(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2012 年 8 月 9 日 (09.08.2012)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2012/103783 A1

(51) 国际专利分类号:
*C07D 493/18* (2006.01) *A61P 35/02* (2006.01)
*A61K 31/357* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2012/070401

(22) 国际申请日: 2012 年 1 月 16 日 (16.01.2012)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201110034201.X 2011 年 1 月 31 日 (31.01.2011) CN

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): **上海交通大学医学院附属瑞金医院 (RUI JIN HOSPITAL AFFILIATED TO SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE)** [CN/CN]; 中国上海市卢湾区瑞金二路 197 号上海血液研究所, Shanghai 200025 (CN)。 **中国科学院上海药物研究所 (SHANGHAI INSTITUTE OF MATERIA MEDICA, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES)** [CN/CN]; 中国上海市浦东新区张江高科技园区祖冲之路 555 号, Shanghai 201203 (CN)。

(72) 发明人; 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): **糜坚青 (MI, Jianqing)** [CN/CN]; 中国上海市卢湾区瑞金二路 197 号上海血液研究所, Shanghai 200025 (CN)。 **李英 (LI, Ying)** [CN/CN]; 中国上海市浦东新区张江高科技园区祖冲之路 555 号, Shanghai 201203 (CN)。 **彭宇 (PENG, Yu)** [CN/CN]; 中国上海市卢湾区瑞金二路 197 号上海血液研究所, Shanghai 200025 (CN)。 **张瑜 (ZHANG, Yu)** [CN/CN]; 中国上海市浦东新区张江高科技园区祖冲之路 555 号, Shanghai 201203 (CN)。 **聂瑞敏 (NIE, Ruimin)** [CN/CN]; 中国上海市瑞金二路 197 号上海血液研究所, Shanghai 200025 (CN)。 **刘静静 (LIU, Jingjing)** [CN/CN]; 中国上海市瑞金二路 197 号上海血液研究所, Shanghai 200025 (CN)。 **王瑾 (Wang, Jin)** [CN/CN]; 中国上海市瑞金二路 197 号上海血液研究所, Shanghai 200025 (CN)。 **王月英 (WANG, Yueying)** [CN/CN]; 中国上海市瑞金二路 197 号上海血液研究所, Shanghai 200025 (CN)。 **蔡循 (CAI, Xun)** [CN/CN]; 中国上海市瑞金二路 197 号上海血液研究所, Shanghai 200025 (CN)。 **李阳 (LI, Yang)** [CN/CN]; 中国上海市瑞金二路 197 号上海血液研究所, Shanghai 200025 (CN)。 **陈赛娟 (CHEN, Saijuan)** [CN/CN]; 中国上海市瑞金二路 197 号上海血液研究所, Shanghai 200025 (CN)。 **王振义 (WANG, Zhenyi)** [CN/CN]; 中国上海市瑞金二路 197 号上海血液研究所, Shanghai 200025 (CN)。

(74) 代理人: **上海德昭知识产权代理有限公司 (HANGHAI DANROSE & RAYMOND INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO. LTD.)**; 中国上海市虹口区大连路 1619 号骏丰国际财富广场 2106-2107 室缪利明, Shanghai 200086 (CN)。

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

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

根据细则 4.17 的声明:
— 发明人资格(细则 4.17(iv))

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

WO 2012/103783 A1

(54) Title: USE OF ARTEMISINE DERIVATIVES AND PHARMACEUTICAL SALTS THEREOF

(54) 发明名称 : 一种青蒿素衍生物及其药用盐的应用

(57) Abstract: Use of artemisine derivatives and pharmaceutical salts thereof is disclosed by the present invention. Arteether dimer amine, the artemisine derivatives and pharmaceutical salts thereof can inhibit the proliferation of leukemic cells, block the cycle of leukemic cells, and induce the apoptosis of leukemic cells. Arteether dimer amine, the artemisine derivatives and pharmaceutical salts thereof in the present invention can be used to manufacture medicaments in treating leukemia, especially in treating acute leukemia, more especially in treating acute myeloid leukemia.

(57) 摘要: 本发明公开了一种青蒿素衍生物及其药用盐的应用。该青蒿素衍生物二蒿乙醚基胺及其药用盐能够抑制白血病细胞的增殖，阻滞白血病细胞周期，诱导白血病细胞凋亡。本发明的青蒿素衍生物二蒿乙醚基胺及其药用盐能用于制备治疗白血病的药物，特别是用于制备治疗急性白血病的药物，更特别是用于制备治疗急性髓细胞性白血病的药物。

# 一种青蒿素衍生物及其药用盐的应用

## 技术领域

本发明属于医学领域，具体地说，涉及一种青蒿素衍生物及其药用盐的应用。

## 背景技术

白血病是血液系统的恶性肿瘤，是一类造血干细胞的恶性克隆性疾病，严重危害人类健康。其中，急性白血病是一类急速发展的疾病，其导致骨髓和血液中未成熟的血细胞大量积累，包括急性非淋巴细胞白血病（ANLL）和急性淋巴细胞性白血病（ALL）。

急性髓细胞性白血病（acute myelocytic leukemia，AML）或急性非淋巴细胞白血病（ANLL）包括所有非淋巴细胞来源的急性白血病。它是多能干细胞或已轻度分化的前体细胞核型发生突变所形成的一类疾病，是造血系统的克隆性恶性疾病。急性髓细胞性白血病的WHO分型标准如下：1、伴有重现性遗传学异常AML，包括（1）AML伴有t（8；21）（q22；q22），（AML1/ETO）。以具有t（8；21）染色体易位，产生AML1-ETO融合基因为特点；（2）AML伴有骨髓异常嗜酸粒细胞，inv（16）（p13；q22）或t（16；16）（p13；q22）；（3）AML伴有t（15；17）（q22：q12），（PML-RARα)及变异型；（4）AML伴有11q23（MLL）异常； 2、伴多系病态造血AML；3、治疗相关AML和MDS；4、不另做分类的AML，其多数亚型的定义与FAB分类中的相应病种几乎相同，诊断标准根据受累的主要细胞系列和成熟程度：（1）AML微分化型，即FAB分类的AML-M0：原始细胞在光镜下类似L2型细胞，核仁明显，胞浆透明，嗜碱性，无嗜天青颗粒及Auer小体。髓过氧化物酶（MPO）及苏丹黑B阳性＜3%。在电镜下，MPO为（+），CD33或CD13等髓系标志可呈（+）。通常淋巴系抗原为（-），但有时CD7+、TdT+；（2）AML无成熟型，即FAB分类的AML-M1：未分化原粒细胞（I型+II型）占骨髓非红系细胞的90%以上，至少3%细胞为过氧化物酶染色（+）；（3）AML有成熟型，即FAB分类的AML-M2：原粒细胞（I型+II型）占骨髓非红系细胞的30%～89%，单核细胞＜20%，其他粒细胞＞10%；（4）急

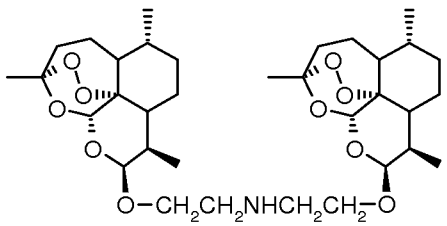
性粒单核细胞白血病，即FAB分类的AML-M4：骨髓中原始细胞占非红系细胞的30%以上，各阶段粒细胞占30%～＜80%，各阶段单核细胞＞20%，CD14阳性；（5）急性单核细胞白血病，即FAB分类的AML-M5：骨髓非红系细胞中原单核、幼单核≥30%，CD14阳性；（6）急性红白血病，即FAB分类的AML-M6：骨髓中幼红细胞≥50%，非红系细胞中原始细胞（I型+II型）≥30%；（7）急性巨核细胞白血病，即FAB分类的AML-M7：骨髓中原始巨核细胞≥30%，CD41、CD61和CD42阳性。

目前治疗白血病标准方法包括常规化疗、骨髓移植和放射治疗。但是，大多数病人的预后依旧很差。治疗后的严重副反应（如感染, 出血，移植后的排斥反应等）或疾病的复发严重地影响了患者的生存率。因此寻找新型的高效的抗肿瘤药物以提高患者的完全缓解率和生存期，显得尤为重要。并且，由于白血病亚型不同，诊断标准也有不同，治疗方案及预后亦不尽相同。因此应根据白血病细胞的形态学、免疫学和细胞遗传学特点进一步作出分型诊断和亚型诊断。

## 发明内容

本发明的目的在于提供一种青蒿素衍生物二蒿乙醚基胺及其药用盐的应用，为白血病患者提供一种新型的治疗药物。

本发明的青蒿素衍生物为二蒿乙醚基胺，具有如下结构：




经发明人广泛而深入的研究，发现水溶性的青蒿素衍生物二蒿乙醚基胺马来酸盐（标记为 SM1044）能够抑制白血病细胞增殖，阻滞细胞周期，诱导细胞凋亡。

因此，发明的青蒿素衍生物二蒿乙醚基胺及其药用盐可用于制备治疗白血病的药物，特别是用于制备治疗急性白血病的药物，更特别是用于制备治疗急性髓细胞性白血病的药物。

根据本发明的优选实施例，所述急性髓细胞性白血病包括伴有重现性遗传学

异常 AML 中的 AML 伴有 t（8；21）（q22；q22），（AML1/ETO）亚型和 AML 伴有 t（15；17）（q22：q12），（PML-RARα)亚型以及不另做分类的 AML 中的 AML-M2 亚型和 AML-M5 亚型。

## 附图说明

图 1 为急性髓细胞性白血病细胞经 SM1044 处理后的生长抑制曲线图，其中，（a）为 Kasumi-1 细胞；（b）为 NB4-R1 细胞；（c）为 HL60 细胞；（d）为 U937 细胞。

图 2 为流式细胞仪检测急性髓细胞性白血病细胞经 SM1044 处理后的凋亡率结果图，其中，（a）为 Kasumi-1 细胞；（b）为 NB4-R1 细胞；（c）为 HL60 细胞；（d）为 U937 细胞。

图 3 为流式细胞仪检测急性髓细胞性白血病细胞经 SM1044 处理后的线粒体跨膜电位结果图，其中，（a）为 Kasumi-1 细胞；（b）为 NB4-R1 细胞；（c）为 HL60 细胞；（d）为 U937 细胞。

图 4 为 western blot 检测急性髓细胞性白血病细胞经 SM1044 处理后的凋亡相关蛋白结果图，其中，（a）为 NB4-R1 细胞；（b）为 HL60 细胞；（c）为 U937 细胞。

图 5A 为 SM1044 诱导 Kasumi-1 细胞融合蛋白 AML1-ETO 降解试验的电泳图；图 5B 为 SM1044 诱导 Kasumi-1 细胞融合蛋白 AML1-ETO 在 mRNA 水平的变化的电泳图。

图 6 为 western blot 检测 HL60 细胞经 SM1044 处理后的 *c-myc*（在 HL60 细胞中高表达的癌基因）表达的蛋白结果图。

图 7 为 SM1044 阻滞急性髓细胞性白血病细胞周期结果图，其中，（a）为 Kasumi-1 细胞；（b）为 HL60 细胞。

图 8 为 SM1044 抑制小鼠的急性髓细胞性白血病细胞移植瘤生长曲线图，其中，（a）为 Kasumi-1 细胞；（b）为 HL60 细胞；（c）为 U937 细胞。

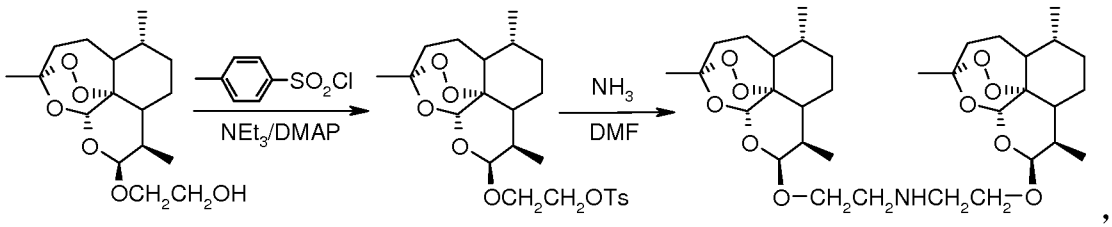
## 具体实施方式

以下结合具体实施例，对本发明做进一步说明。应理解，以下实施例仅用于说明本发明而非用于限制本发明的范围。

以下实施例中使用的细胞株来源于上海血液研究所，包括如下细胞株：Kasumi-1 细胞为 AML 伴有 t（8；21）（q22；q22），（AML1/ETO）亚型细胞株、NB4-R1 细胞为 AML 伴有 t（15；17）（q22：q12），（PML-RARα)亚型维甲酸抗性细胞株、HL60 细胞为 AML-M2 亚型细胞株、U937 细胞为 AML-M5 亚型细胞株。

实施例 1 青蒿素衍生物二蒿乙醚基胺马来酸盐的制备

本实施例从已知化合物羟基蒿乙醚（参考文献：李英 等，药学学报，1981, 16: 429－439）出发，先制成它的对甲苯磺酸酯，然后在溶剂二甲基甲酰胺中与氨水反应即得到二蒿乙醚基胺，反应路线为：



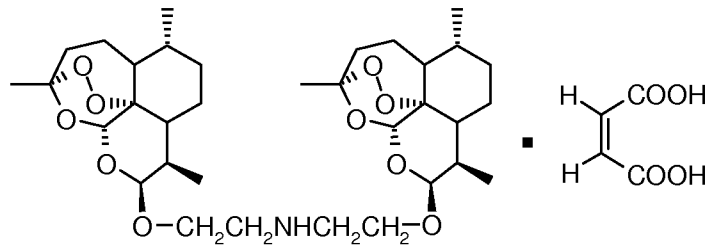

随后将制得的二蒿乙醚基胺再制成马来酸盐。

具体操作如下：

将羟基蒿乙醚的对甲苯磺酸酯（1.54 g）溶于二甲基甲酰胺（10 mL）中，再加氨水（0.5 mL）搅拌加热至 40～50℃，反应 20 h 左右。TLC 检测原料点基本消失后，将反应液倒入冰水，用乙酸乙酯反复提取，合并有机相，再用饱和盐水洗涤，无水硫酸钠干燥。减压蒸去溶剂，残余物通过柱层析（硅胶，洗脱剂为乙酸乙酯/石油醚/三乙胺的混合溶剂，梯度洗脱的浓度为 1/19/1→ 1/10/1，v/v/v）。得到浅黄色油状产物 0.4 g，收率 40%。油状产物用少许乙酸乙酯溶解后，慢慢滴入马来酸/乙酸乙酯溶液至弱酸性，即有固体析出，将此马来酸盐过滤，乙醇/石油醚重结晶，得白色晶体。熔点：140～142℃。$^1$HNMR（游离碱，300 MHz，$CDCl_3$）δ: 5.40 (s, 2H), 4.82 (d, $J$ = 3.3 Hz, 2H), 3.97 (m, 2H), 3.56 (m, 2H), 2.84 (m, 4H), 1.43 (s, 6H), 0.95 (d, $J$ = 6.0 Hz, 6H), 0.90 (d, $J$ = 7.2Hz, 6H)。质谱分析（游离

碱 $C_{34}H_{55}NO_{10}$）： m/z 638 $(M+1)^+$。元素分析（马来酸盐，$C_{38}H_{59}NO_{14}$）：计算值为 C 60.53、H 7.89、N 1.86；实测值为 C 60.72、H 8.00、N 1.73。

以上分析数据确证二蒿乙醚基胺马来酸盐（SM 1044）的结构如下：


O
O
O

实施例 4　SM1044 诱导白血病细胞线粒体跨膜电位丢失试验

将 Kasumi-1、NB4-R1、HL60 和 U937 细胞以 $3\times10^5$～$5\times10^5$ 个/ml 接种于细胞培养皿中。分别设置对照组（0 μM）、不同浓度加药组，培养分别 24 h 和 48 h 后，加入 20 nM $DiOC_6(3)$于 37℃避光孵育 15 min，PBS 洗细胞 2 次，再用 100 μl PBS 重悬细胞，流式细胞仪检测。$DiOC_6(3)$阴性的细胞为线粒体跨膜电位丢失的细胞。结果显示 SM1044 使 Kasumi-1（图 3（a）和表 1）、NB4-R1（图 3（b）和表 2）、HL60（图 3（c）和表 3）和 U937（图 3（d）和表 4）细胞的线粒体跨膜电位丢失，同时电位丢失有时间和浓度的依赖性。细胞凋亡包括内在途经和外在途径，其中线粒体跨膜电位的丢失是细胞凋亡内在途经的重要表现，结果表明 SM1044 可通过内在途径诱导 Kasumi-1、NB4-R1、HL60 和 U937 细胞的凋亡。

表 1、SM1044 诱导 $DiOC_6(3)$阴性的 Kasumi-1 细胞的百分率

| | Con | 0.1μM | 1μM | 5μM |
|---|---|---|---|---|
| 24h | 10.3% | 24.1% | 33.8% | 63.2% |
| 48h | 10.2% | 44.9% | 47.1% | 79.2% |

表 2、SM1044 诱导 DiOC6(3)阴性的 NB4-R1 细胞的百分率

| | Con | 0.1μM | 0.5μM | 1μM |
|---|---|---|---|---|
| 24h | 7.7% | 13.9% | 17.1% | 15.0% |
| 48h | 8.8% | 16.3% | 33.0% | 30.0% |

表 3、SM1044 诱导 $DiOC_6(3)$阴性的 HL60 细胞的百分率

| | Con | 0.5μM | 1μM | 5μM |
|---|---|---|---|---|
| 24h | 10.9% | 23.8% | 25.6% | 48.5% |
| 48h | 18% | 61.7% | 77.1% | 81.1% |

表 4、SM1044 诱导 DiOC6(3)阴性的 U937 细胞的百分率

| | Con | 0.5μM | 1μM | 5μM |
|---|---|---|---|---|
| 24h | 3.1% | 4.3% | 5.2% | 9.4% |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 48h | 2.5% | 5.9% | 5.6% | 16.2% |

实施例 5　SM1044 诱导白血病细胞凋亡相关蛋白形成试验

将 NB4-R1、HL60 和 U937 细胞以 $3\times10^5$～$5\times10^5$ 个/ml 的浓度接种于细胞培养皿中。分别设置对照组（0 μM）、不同浓度加药组，培养 24 h 后抽取细胞总蛋白，通过 western blot 的方法，用抗凋亡相关蛋白（PARP，caspase-3，caspase-8，caspase-9）的抗体检测凋亡相关蛋白量的变化。Caspase 家族在介导细胞凋亡的过程中起着非常重要的作用。而细胞凋亡的途径主要有两条：一条是通过胞外信号激活细胞内的凋亡酶 caspase-8 等；另一条是通过线粒体释放凋亡酶激活因子激活 caspase-9 等。这些活化的 caspase 进而激活凋亡执行蛋白 caspase-3 引起细胞凋亡，其中 PARP 是 caspase-3 的底物。结果显示经 SM1044 处理后，在 NB4-R1（图 4（a））、HL60（图 4（b））和 U937（图 4（c））细胞中，凋亡相关蛋白活化的 caspase-3、caspase-8 和/或 caspase-9 量增加，表明 SM1044 可通过内在和外在两种途径诱导白血病细胞凋亡。

实施例 6　SM1044 诱导 Kasumi-1 细胞融合蛋白 AML1-ETO 降解试验

将 $1\times10^7$ 个 Kasumi-1 细胞悬于 20 ml 培养基中，接种于细胞培养皿中。分别设置对照组（Con）、不同浓度加药组，培养 24 h 后抽提总 mRNA，用 RT-PCR 方法检测融合蛋白在 mRNA 水平的变化，如图 5A 所示，结果表明 SM1044 不影响融合基因 AML1-ETO 的转录。然后将 Kasumi-1 细胞以 $5\times10^5$ 个/ml 的浓度接种于细胞培养皿。分别设置对照组（Con）、不同浓度加药组，培养 24 h 后抽取细胞总蛋白，通过 western blot 的方法，用抗 ETO 的抗体检测融合蛋白 AML1-ETO 的变化，如图 5B 所示，结果表明 SM1044 可降解融合蛋白 AML1-ETO，当 SM1044 浓度为 1 μM 时即可诱导融合蛋白 AML1-ETO 的降解。结果表明 SM1044 不影响融合基因 AML1-ETO 的转录，只诱导融合蛋白的降解。融合蛋白 AML1-ETO 作为 AML-M2b 的特征融合基因，在白血病的发生中起重要作用，可将其作为药物作用的靶点。本研究结果显示，SM1044 能明显引起融合蛋白 AML1-ETO 的降解，说明融合蛋白 AML1-ETO 可作为 SM1044 作用的胞内靶点。

实施例 7　SM1044 抑制 HL60 细胞中癌基因 *c-myc* 表达试验

将 HL60 细胞以 $3\times10^5$ 个/ml 浓度接种于细胞培养皿中。分别设置对照组（0 μM）、不同浓度加药组，培养 24 h 后抽取细胞总蛋白，通过 western blot 的方法，用抗 *c-myc* 的抗体检测癌基因 *c-myc* 的表达变化。HL60 细胞的一个特点是高表达癌基因 *c-myc*，如图 6 所示，当 SM1044 的浓度大于 1 μM 时，能够完全抑制 HL60 细胞中的癌基因 *c-myc* 的表达，表明 SM1044 对癌基因 *c-myc* 的表达具有抑制作用。

实施例 8　SM1044 阻滞白血病细胞周期试验

将 Kasumi-1 和 HL60 细胞以 $5\times10^5$ 个/ml 的浓度接种于细胞培养皿中。分别设置对照组（Con）、不同浓度加药组，培养 24 h（Kasumi-1 细胞）或 12 h（HL60 细胞）后收集细胞，PBS 洗涤 2 次，加入 70%的冷乙醇 4℃固定过夜。用 PBS 洗涤细胞，重悬于含有 l0 mg/ml RNA 酶的 PBS 中，37℃共同孵育 30 min，再加入 50 μg/ml 碘化丙啶（PI）进行细胞 DNA 染色，1 h 内流式细胞仪分析细胞 DNA 含量分布。结果显示，Kasumi-1（图 7（a）和表 5）和 HL60 细胞（图 7（b）和表 6）经 SM1044 处理后被阻滞在 $G_0/G_1$ 期，显示 $G_0/G_1$ 期的细胞增多。表明 SM1044 可以阻滞细胞周期，使细胞停止生长。

表 5、SM1044 对 Kasumi-1 细胞周期的影响

| | Con | 0.1μM | 1μM | 5μM |
|---|---|---|---|---|
| $G_0/G_1$ | 58.33% | 59.62% | 71.75% | 71.07% |
| $G_2/M$ | 8.00% | 6.01% | 6.70% | 6.00% |
| S | 33.67% | 34.37% | 21.75% | 21.92% |

表 6、SM1044 对 HL60 细胞周期的影响

| | Con | 0.1μM | 1μM | 5μM |
|---|---|---|---|---|
| $G_0/G_1$ | 35.91% | 41.60% | 44.12% | 54.48% |
| $G_2/M$ | 8.00% | 3.80% | 8.00% | 8.00% |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| S | 56.09% | 54.61% | 47.88% | 37.52% |

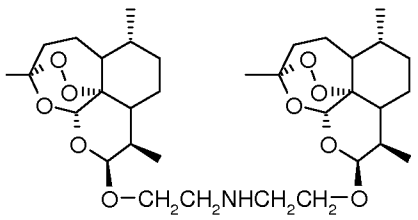
实施例 9　SM1044 抑制小鼠的白血病细胞移植瘤生长试验

建立急性髓细胞性白血病细胞株Kasumi-1、HL60和U937细胞小鼠移植瘤模型，皮下注射$1\times10^7$个白血病细胞，小鼠肿块长到5 mm左右，将小鼠分为2组，分别为对照组（Con）、不同浓度加药组。每天予以腹腔注射，每次注射量为0.125 ml（Kasumi-1和HL60细胞）或0.1 ml（U937细胞），对照组注射等量生理盐水，疗程为18～35天，每日测量小鼠肿块大小。结果显示，在Kasumi-1（图8（a））、HL60（图8（b））和U937（图8（c））细胞小鼠移植瘤模型中，与对照组相比，加药组小鼠肿块明显比对照组的小，说明SM1044能够在小鼠体内抑制肿瘤细胞的增殖。

青蒿素(artemisinin)是从植物黄花蒿中提取出的具有过氧基团的倍半萜内酯，青蒿琥酯(artesunate)、蒿甲醚(artemether)和二氢青蒿素( dihydroartemisinin) 等均为青蒿素的衍生物。目前上述青蒿素类药物已成为在世界范围内治疗疟疾的第一线药物。虽然近 20 年来，国内外学者开展了青蒿素类化合物的抗肿瘤作用的研究，证明青蒿素类化合物体外抗瘤谱广，但是具体在体内实施中往往疗效不佳，而最终没能进一步深入研究。我们试图在原有的基础上研究一种新型的青蒿素衍生物，以期提高抗肿瘤作用的效果。本实验采用新型的水溶性青蒿素衍生物二蒿乙醚基胺马来酸盐，对抑制白血病细胞增殖等试验进行考察，表明 SM1044 能抑制白血病细胞增殖，诱导细胞凋亡，并具有时间和剂量的依赖性。SM1044 能够用于制备治疗白血病的药物，特别是用于治疗急性白血病的药物，更特别是用于制备治疗急性髓细胞性白血病的药物。

应当理解，以上实施例仅用以说明本发明的技术方案，而非对本发明保护范围的限制，尽管参照较佳实施例对本发明作了详细地说明，本领域的普通技术人员应当理解，可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换，如采用二蒿乙醚基胺的其它水溶性盐，也能达到本发明的技术效果。本发明的青蒿素衍生物二蒿乙醚基胺对白血病的诱导凋亡能力较强，可在短时间、小剂量内抑制肿瘤细胞，且毒副作用较小，对白血病的临床治疗有重要意义。

1、一种青蒿素衍生物及其药用盐的应用，其特征在于，用于制备治疗白血病的药物，其中，所述青蒿素衍生物为二蒿乙醚基胺，结构为：



。

2、如权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述白血病为急性白血病。

3、如权利要求 2 所述的应用，其特征在于，所述急性白血病为 AML 型急性髓细胞性白血病。

4、如权利要求 3 所述的应用，其特征在于，所述 AML 型急性髓细胞性白血病包括：伴有重现性遗传学异常 AML 中的 AML 伴有 t（8；21）（q22；q22），（AML1/ETO）亚型和 AML 伴有 t（15；17）（q22：q12），（PML-RARα）亚型以及不另做分类的 AML 中的 AML-M2 亚型和 AML-M5 亚型。

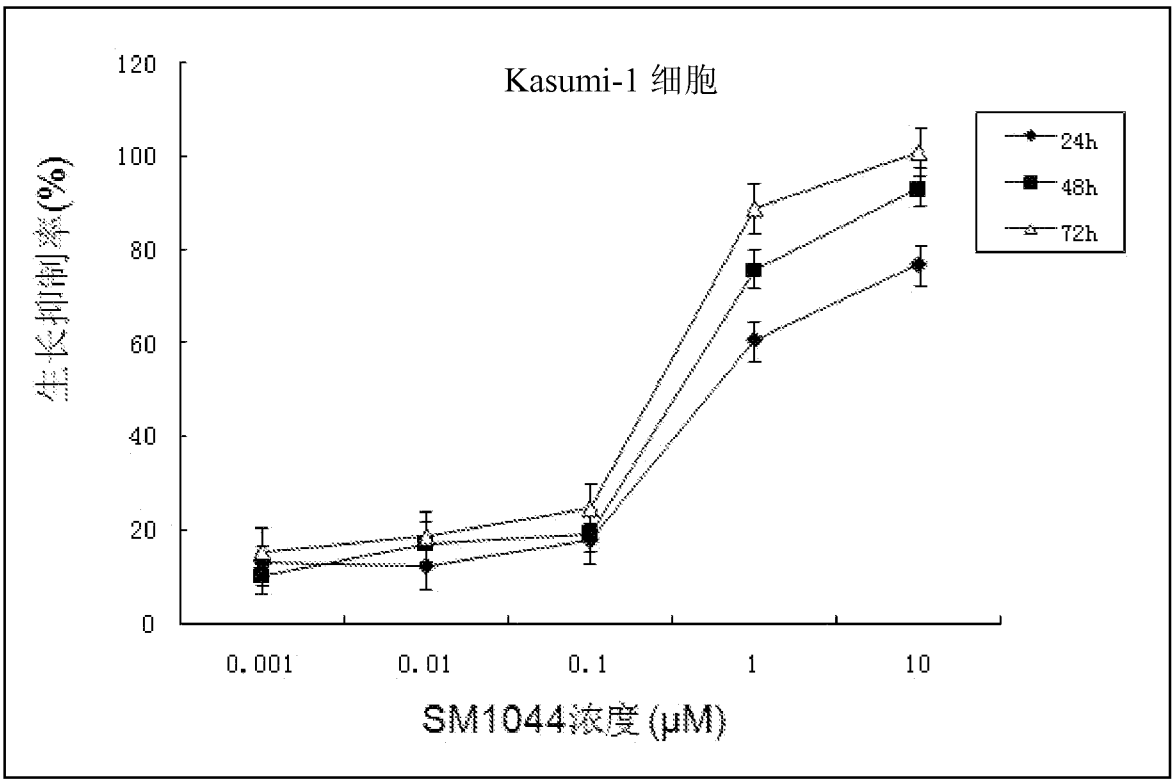

Kasumi-1 细胞
生长抑制率(%)
120
100
80
60
40
20
0
0.001
0.01
0.1
1
10
SM1044浓度(μM)
24h
48h
72h

图 1（a）

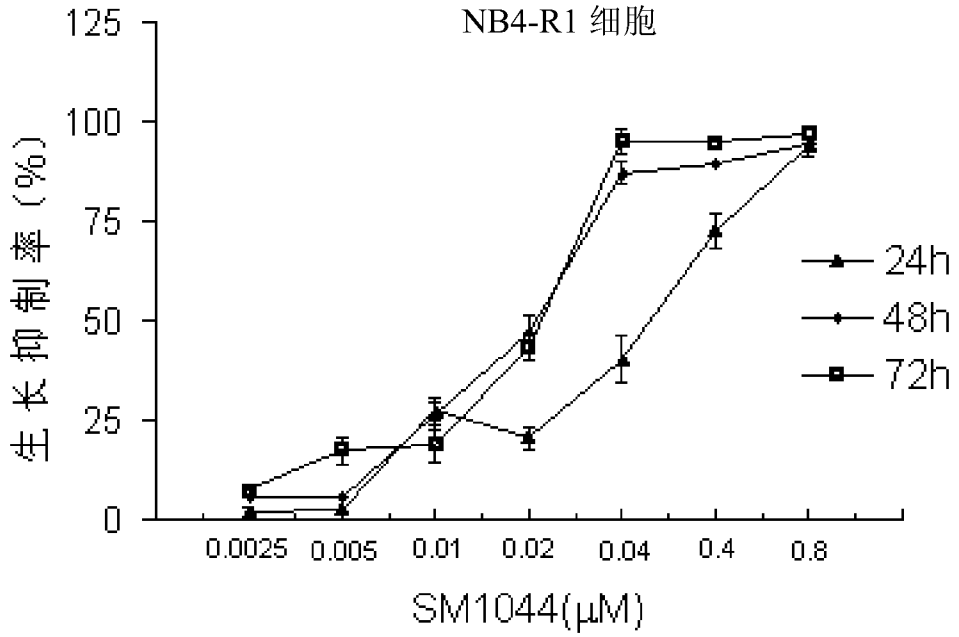

NB4-R1 细胞
生长抑制率（%）
125
100
75
50
25
0
0.0025
0.005
0.01
0.02
0.04
0.4
0.8
SM1044(μM)
24h
48h
72h

图 1（b）

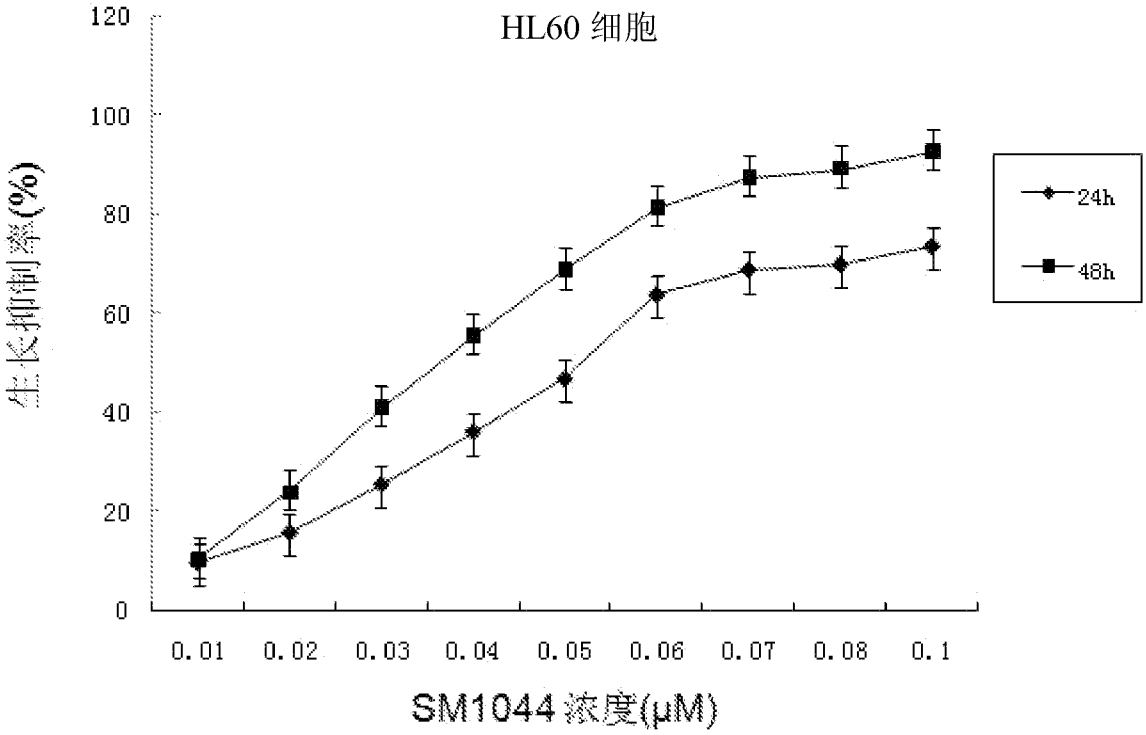

HL60 细胞
生长抑制率(%)
120
100
80
60
40
20
0
0.01
0.02
0.03
0.04
0.05
0.06
0.07
0.08
0.1
SM1044 浓度(μM)
24h
48h

图 1（c）

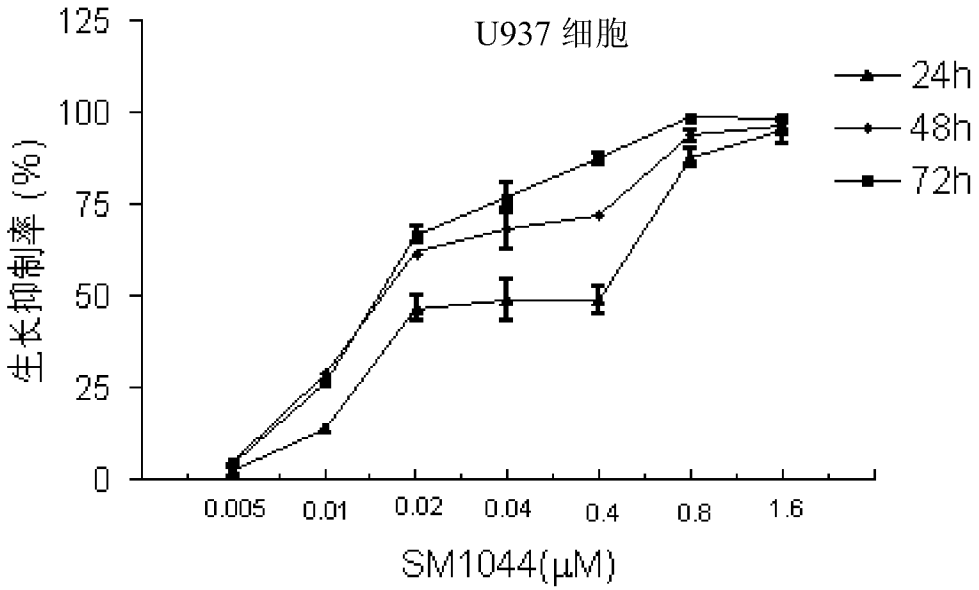

U937 细胞
生长抑制率（%）
125
100
75
50
25
0
0.005
0.01
0.02
0.04
0.4
0.8
1.6
SM1044(μM)
24h
48h
72h

图 1（d）

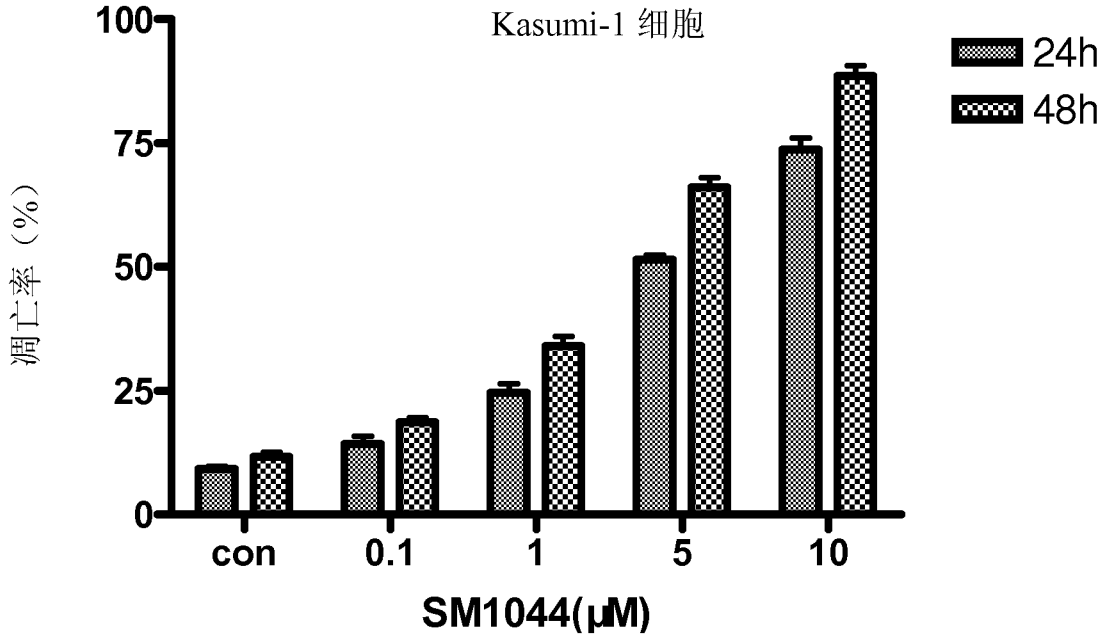

Kasumi-1 细胞
24h
48h
凋亡率（%）
100
75
50
25
0
con
0.1
1
5
10
SM1044(μM)

图 2（a）

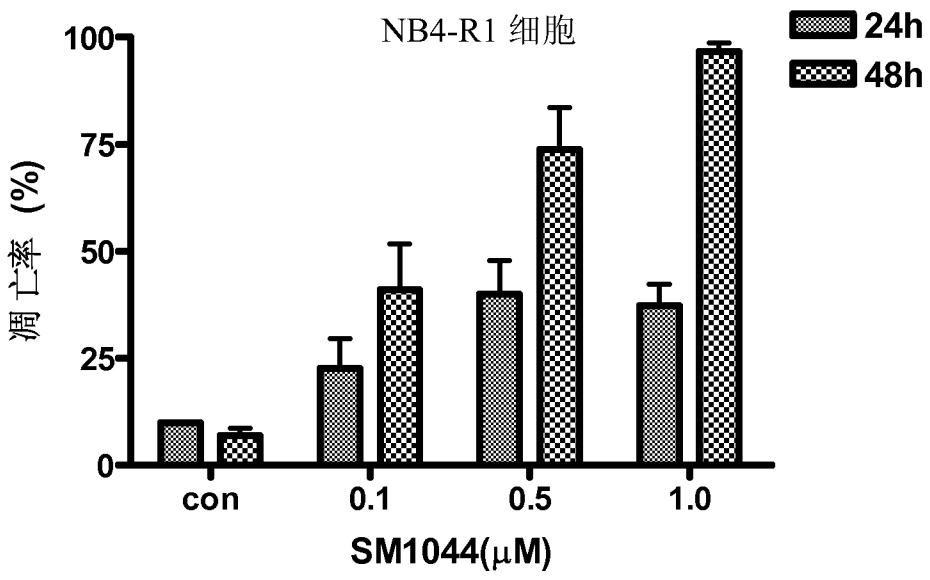

NB4-R1 细胞
24h
48h
凋亡率 (%)
100
75
50
25
0
con
0.1
0.5
1.0
SM1044(μM)

图 2（b）

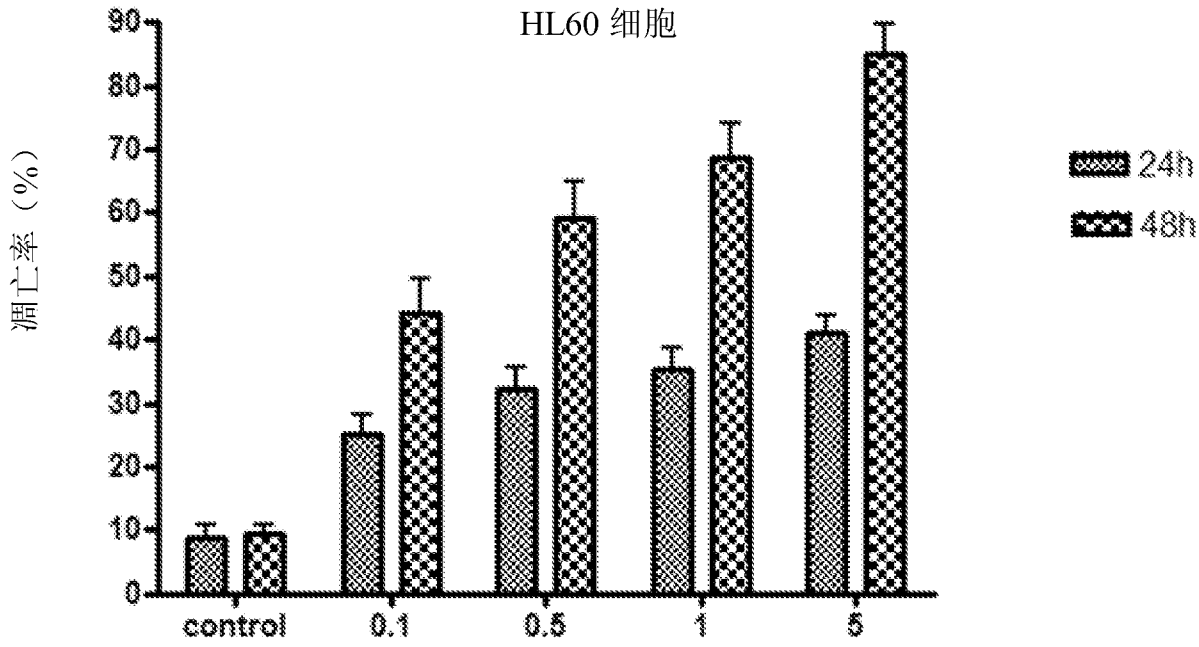

HL60 细胞
凋亡率（%）
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
control
0.1
0.5
1
5
24h
48h
SM1044（μM）

图 2（c）

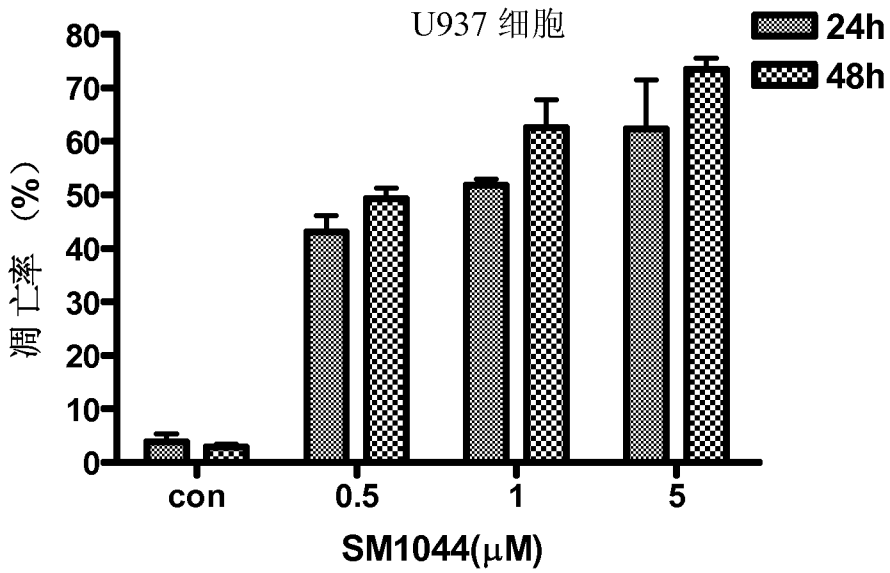

U937 细胞
凋亡率（%）
80
70
60
50
40
30
20
10
0
con
0.5
1
5
SM1044(μM)
24h
48h

图 2（d）

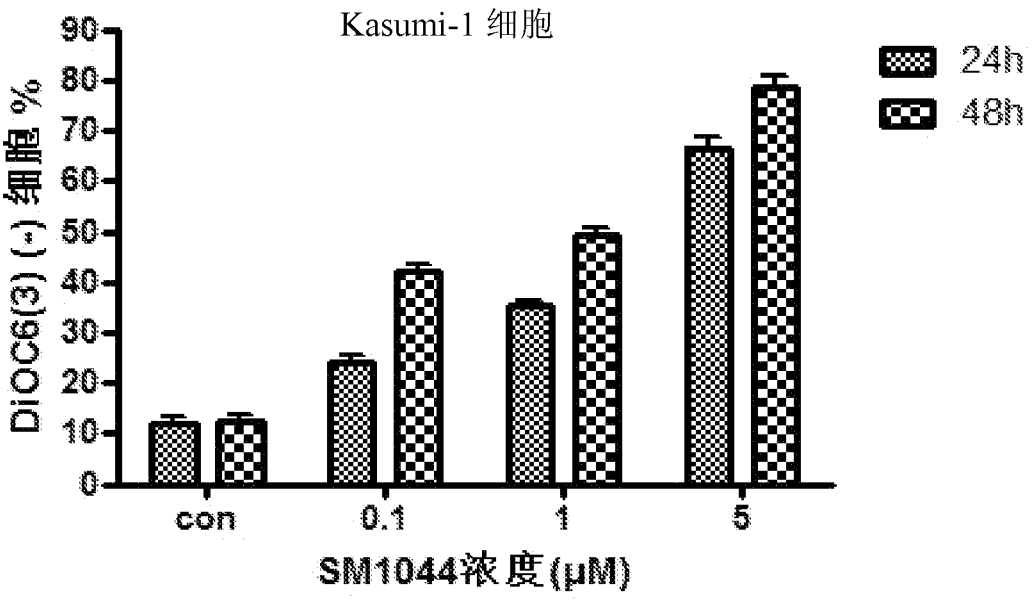

Kasumi-1 细胞
DiOC6(3) (-) 细胞 %
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
con
0.1
1
5
SM1044浓度(μM)
24h
48h

图 3（a）

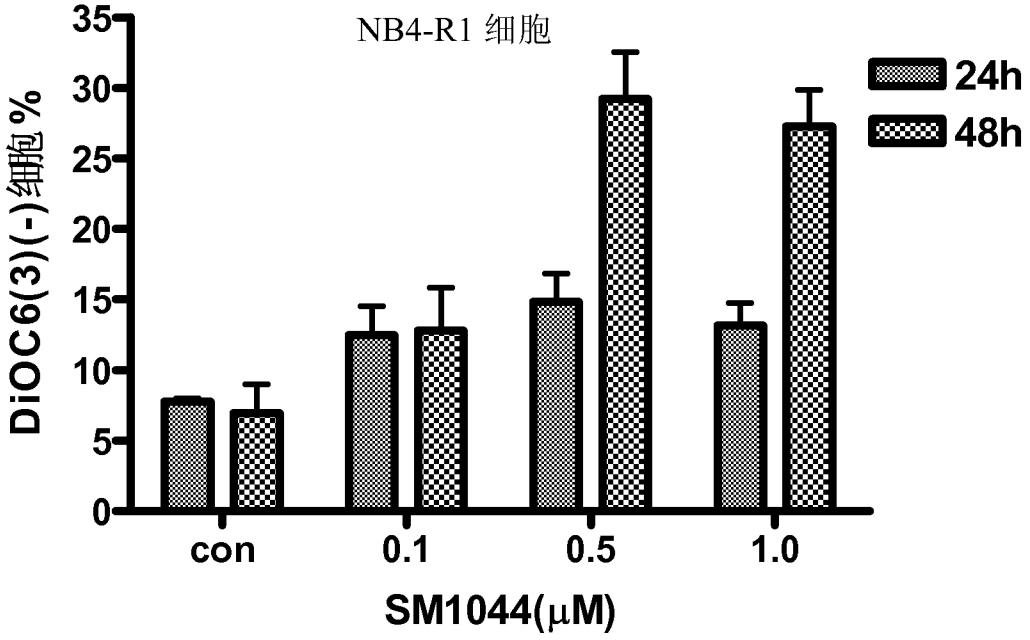

NB4-R1 细胞
DiOC6(3)(-)细胞 %
35
30
25
20
15
10
5
0
con
0.1
0.5
1.0
SM1044(μM)
24h
48h

图 3（b）

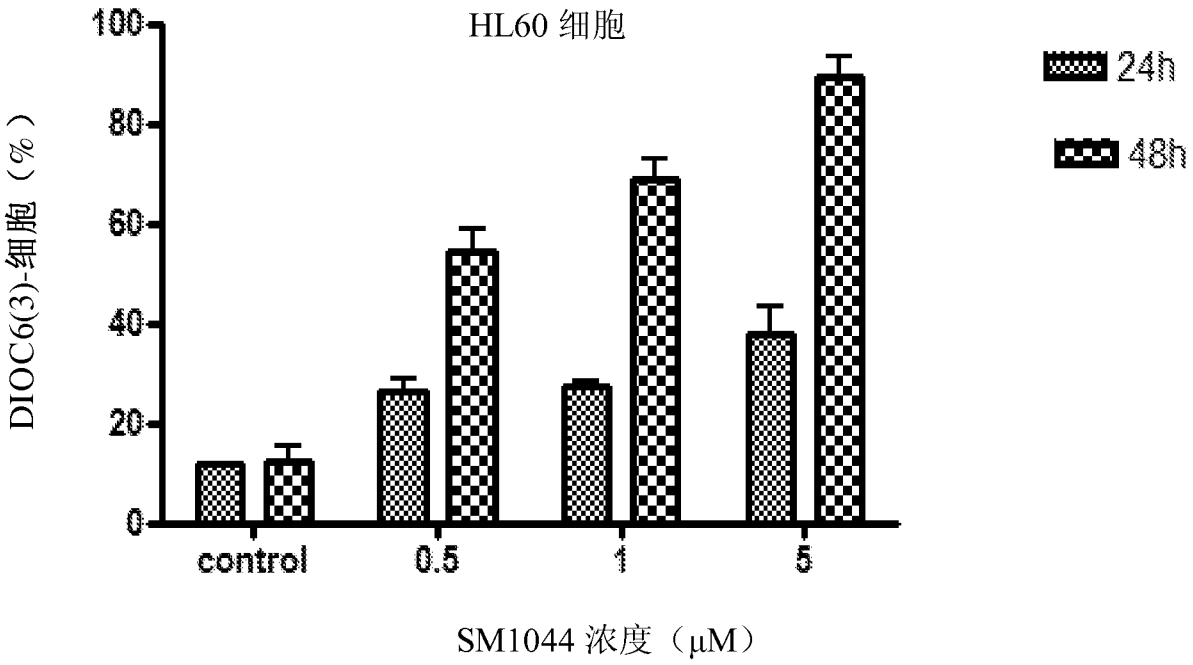

HL60 细胞
DIOC6(3)-细胞（%）
100
80
60
40
20
0
control
0.5
1
5
24h
48h
SM1044 浓度（μM）

图 3（c）

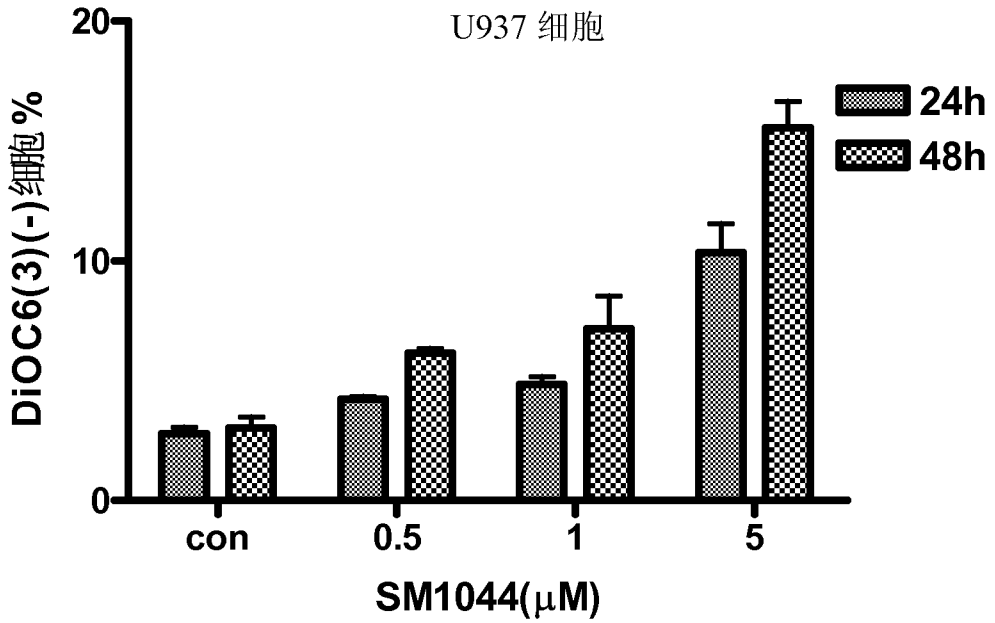

U937 细胞
DiOC6(3)(-)细胞 %
20
10
0
con
0.5
1
5
24h
48h
SM1044(μM)

图 3（d）

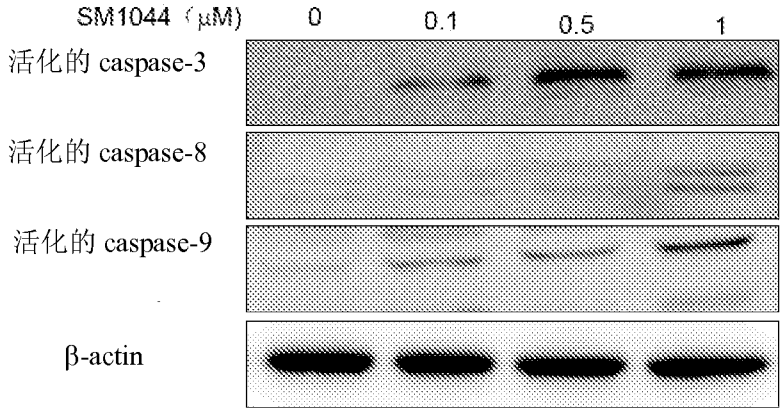

SM1044（μM）
0
0.1
0.5
1
活化的 caspase-3
活化的 caspase-8
活化的 caspase-9
β-actin

图 4（a）

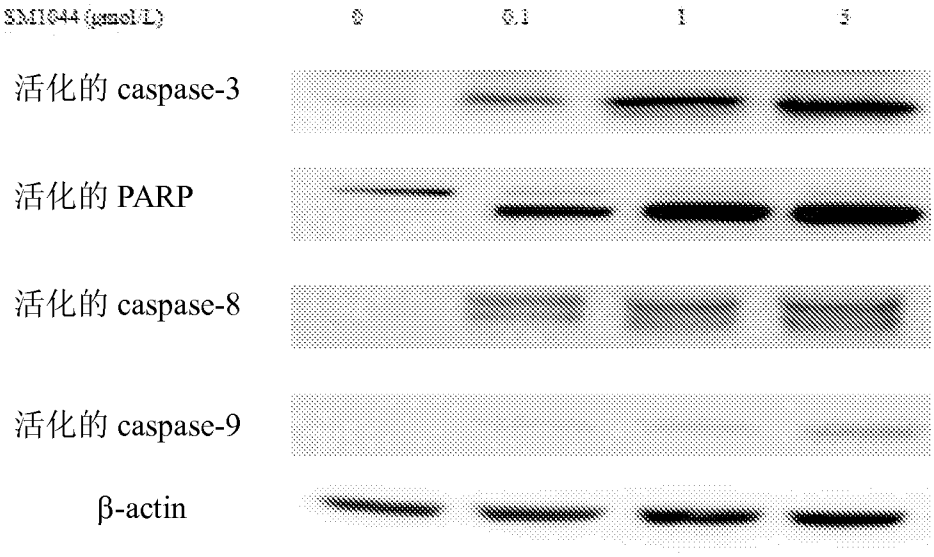

SM1044 (μmol/L)
0
0.1
1
5
活化的 caspase-3
活化的 PARP
活化的 caspase-8
活化的 caspase-9
β-actin

图 4（b）

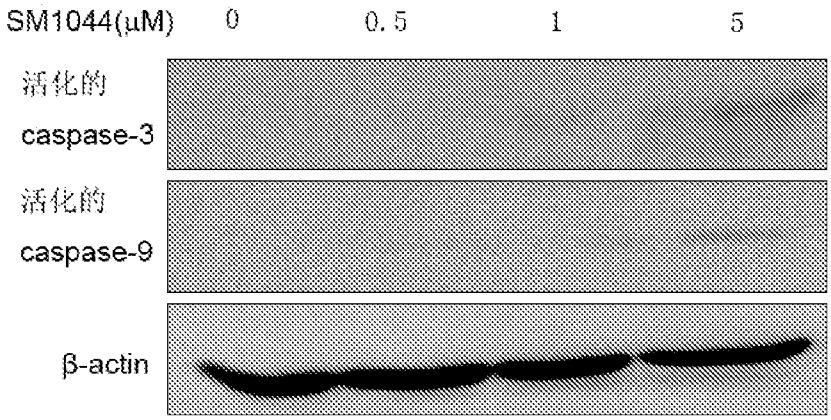

SM1044(μM)
0
0.5
1
5
活化的
caspase-3
活化的
caspase-9
β-actin

图 4（c）

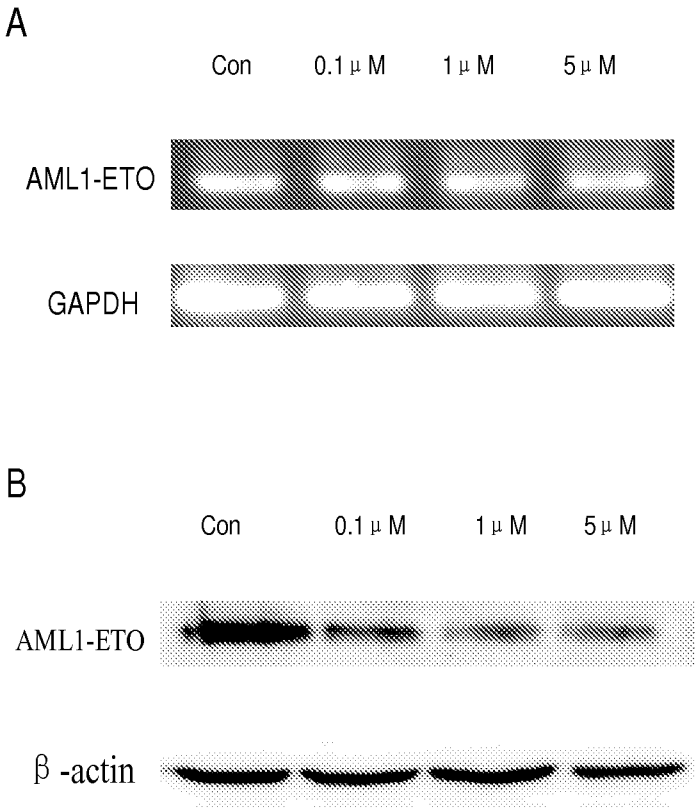

A
Con
0.1μM
1μM
5μM
AML1-ETO
GAPDH
B
Con
0.1μM
1μM
5μM
AML1-ETO
β-actin

图 5

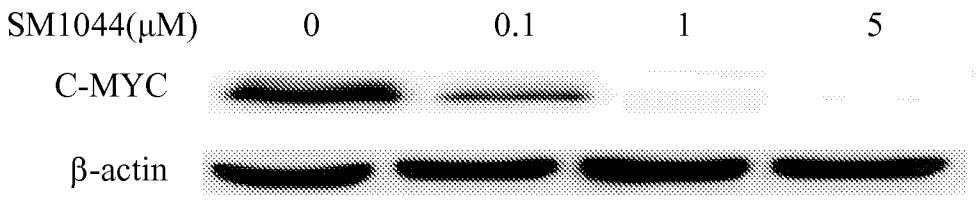
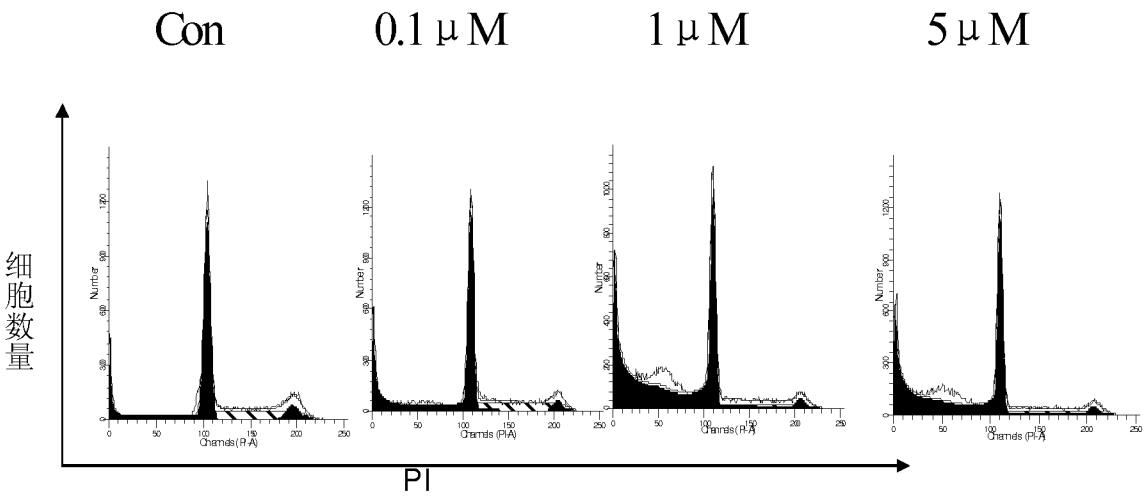
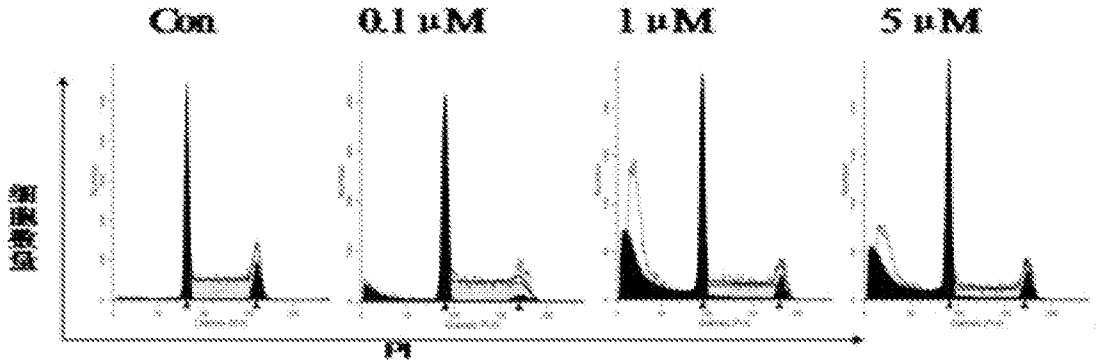

SM1044(μM)
0
0.1
1
5
C-MYC
β-actin

图 6




| Con | 0.1μM | 1μM | 5μM |
|---|---|---|---|
| G0/G1: 58.33% | G0/G1: 59.62% | G0/G1: 71.75% | G0/G1: 71.07% |
| G2: 8.00% | G2: 6.01% | G2: 6.70% | G2: 6.00% |
| S: 33.67% | S: 34.37% | S: 21.75% | S: 21.92% |

图 7（a）




| Con | 0.1 μM | 1 μM | 5 μM |
|---|---|---|---|
| G1: 35.91% | G1: 41.60% | G1: 44.12% | G1: 54.48% |
| G2: 8.00% | G2: 3.80% | G2: 8.00% | G2: 8.00% |
| S: 56.09% | S: 54.61% | S: 47.88% | S: 37.52% |

图 7（b）

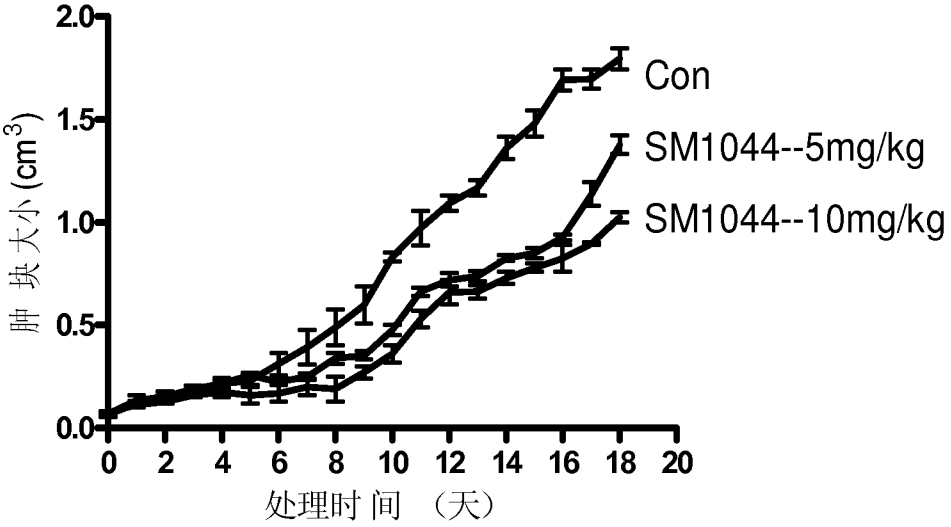

2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
肿 块 大小 (cm3)
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20
处理时 间 （天）
Con
SM1044--5mg/kg
SM1044--10mg/kg

图 8（a）

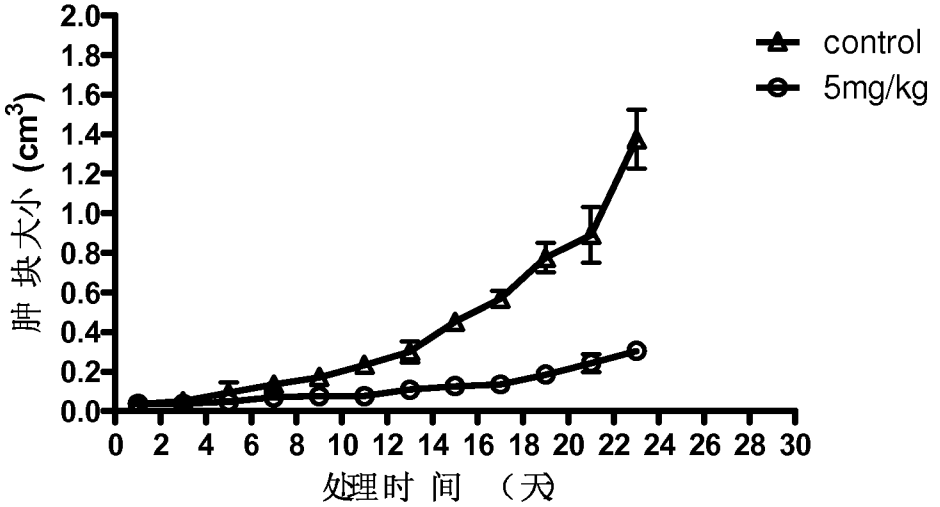

2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
肿 块 大小 (cm3)
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30
处理时 间 （天）
control
5mg/kg

图 8（b）

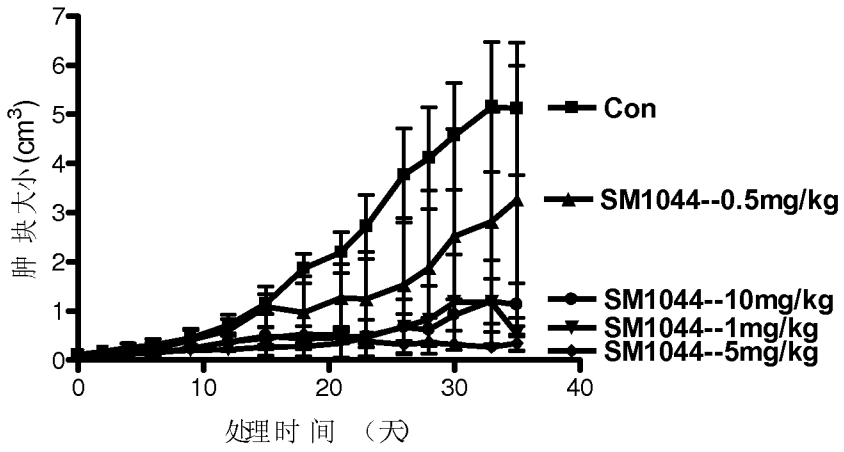

7
6
5
4
3
2
1
0
肿 块 大小 (cm3)
0 10 20 30 40
处理时 间 （天）
Con
SM1044--0.5mg/kg
SM1044--10mg/kg
SM1044--1mg/kg
SM1044--5mg/kg

图 8（c）

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2012/070401

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

See extra sheet

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: A61K, A61P, C07D

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

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

CPRS, CTCMPD, CNKI Full-Text database, Chinese Medicine Abstract, WPI, EPODOC, STN;

Arteannuin, artemisinin dimers, leukemia, cancer, tumor, carcinoma, neoplasm, antineoplastic

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| P, A | CN102153564A (CHINESE ACAD SCI SHANGHAI INST MATERIA et al.) 17 Aug. 2011(17. 08. 2011), see the whole document | 1-4 |
| A | CN101421276A(SANOFI AVENTIS) 29 Apr. 2009(29. 04. 2009), see the whole document | 1-4 |

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"document member of the same patent family

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 05 Apr. 2012 (05. 04. 2012) | 26 Apr. 2012 (26.04.2012) |


Name and mailing address of the ISA
State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No. (86-10) 62019451

Authorized officer
CHEN, Yanyan
Telephone No. (86-10) **62411200**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2012/070401

| Patent Documents referred in the Report | Publication Date | Patent Family | Publication Date |
|---|---|---|---|
| CN102153564A | 17. 08. 2011 | NONE | |
| CN101421276A | 29. 04. 2009 | KR20090009199 A | 22. 01. 2009 |
| | | MX2008012732 A | 31. 10. 2008 |
| | | FR2899586 A1 | 12. 10. 2007 |
| | | US2009082426 A1 | 26. 03. 2009 |
| | | AU2007235813B | 10. 11. 2011 |
| | | WO2007116135 A1 | 18. 10. 2007 |
| | | EP2007769 A1 | 31. 12. 2008 |
| | | TW200815456 A | 01. 04. 2008 |
| | | JP2009533398 A | 17. 09. 2009 |
| | | ZA200808025 A | 30. 12. 2009 |
| | | IN200803685P2 | 20. 02. 2009 |
| | | MX289293 B | 12. 08. 2011 |
| | | NO20084352 A | 16. 10. 2008 |
| | | AU2007235813 A1 | 18. 10. 2007 |
| | | CA2641138 A1 | 18. 10. 2007 |
| | | BR200710152A2 | 02. 08. 2011 |
| | | NZ571342 A | 28. 01. 2011 |
| | | EP2007769B1 | 15. 06. 2011 |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2012/070401

**CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

C07D 493/18(2006.01)i
A61K 31/357(2006.01)i
A61P 35/02(2006.01)i

# 国际检索报告

国际申请号
**PCT/CN2012/070401**

**A. 主题的分类**

参见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

**B. 检索领域**

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: A61K, A61P, C07D

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

CPRS, 中国药物专利数据库(CTCMPD), CNKI, 中国药学文摘库，WPI, EPODOC, STN;

青蒿素二聚体，二蒿乙醚基胺，白血病，癌，肿瘤，Arteannuin, artemisinin dimers, leukemia, cancer, tumor, carcinoma, neoplasm, antineoplastic

**C. 相关文件**

| 类　型* | 引用文件，必要时，指明相关段落 | 相关的权利要求 |
|---|---|---|
| PA | CN102153564A(中国科学院上海药物研究所等) 17. 8 月 2011(17. 08. 2011), 参见全文 | 1-4 |
| A | CN101421276A(赛诺菲-安万特) 29. 4 月 2009(29. 04. 2009), 参见全文 | 1-4 |

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。　　☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

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

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

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

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

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

"&" 同族专利的文件

| 国际检索实际完成的日期 | 国际检索报告邮寄日期 |
|---|---|
| 05. 4 月 2012(05. 04. 2012) | **26.4 月 2012 (26.04.2012)** |
| ISA/CN 的名称和邮寄地址：<br>中华人民共和国国家知识产权局<br>中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088<br>传真号：　(86-10)62019451 | 受权官员<br>陈晏晏<br>电话号码：(86-10) **62411200** |

# 国际检索报告

关于同族专利的信息

国际申请号
**PCT/CN2012/070401**

| 检索报告中引用的专利文件 | 公布日期 | 同族专利 | 公布日期 |
|---|---|---|---|
| CN102153564A | 17. 08. 2011 | 无 | |
| CN101421276A | 29. 04. 2009 | KR20090009199 A | 22. 01. 2009 |
| | | MX2008012732 A | 31. 10. 2008 |
| | | FR2899586 A1 | 12. 10. 2007 |
| | | US2009082426 A1 | 26. 03. 2009 |
| | | AU2007235813B | 10. 11. 2011 |
| | | WO2007116135 A1 | 18. 10. 2007 |
| | | EP2007769 A1 | 31. 12. 2008 |
| | | TW200815456 A | 01. 04. 2008 |
| | | JP2009533398 A | 17. 09. 2009 |
| | | ZA200808025 A | 30. 12. 2009 |
| | | IN200803685P2 | 20. 02. 2009 |
| | | MX289293 B | 12. 08. 2011 |
| | | NO20084352 A | 16. 10. 2008 |
| | | AU2007235813 A1 | 18. 10. 2007 |
| | | CA2641138 A1 | 18. 10. 2007 |
| | | BR200710152A2 | 02. 08. 2011 |
| | | NZ571342 A | 28. 01. 2011 |
| | | EP2007769B1 | 15. 06. 2011 |

主题的分类

C07D 493/18(2006.01)i

A61K 31/357(2006.01)i

A61P 35/02(2006.01)i