



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101243043 B

(45) 授权公告日 2013. 03. 20

(21) 申请号 200680030027. 9

C07D 319/08 (2006. 01)

(22) 申请日 2006. 07. 24

A61K 31/136 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 31/343 (2006. 01)

RM2005A000390 2005. 07. 22 IT

A61K 31/357 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 02. 18

(56) 对比文件

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IE2006/000076 2006. 07. 24

WO 9531194 A1, 1995. 11. 23,

CN 1370159 A, 2002. 09. 18,

WO 2005012280 A1, 2005. 02. 10,

(87) PCT申请的公布数据

W02007/010514 EN 2007. 03. 29

WO 02095393 A2, 2002. 11. 28,

US 3211610 A, 1965. 10. 12,

EP 0102833 A1, 1984. 03. 14,

(73) 专利权人 朱利亚尼国际有限公司

地址 爱尔兰都柏林

徐新敏等. 对氨基水杨酸的新用途. 《新疆医学》. 2002, 第 32 卷 (第 2 期),

(72) 发明人 G·纳卡里 S·巴罗尼

CHTISTEL ROUSSEAU ET AL.. INTESTINAL

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

ANTIINFLAMMATORY EFFECT OF 5-AMINOSLYCYLIC ACID IS DEPENDENT ON PEROXISOME

代理人 袁志明

PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR- γ . 《THE

JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE》. 2005, 第 201 卷 (第 8 期), 1205-1215.

(51) Int. Cl.

C07C 239/16 (2006. 01)

C07C 229/64 (2006. 01)

C07D 307/79 (2006. 01)

审查员 黄明辉

权利要求书 1 页 说明书 20 页 附图 15 页

(54) 发明名称

PPAR 受体和 EGF 受体特异性化合物及其盐以及它们在医药领域中的用途

(57) 摘要

因此本发明特别涉及通式 (I) 的化合物及其在医药领域中的用途, 其中 R_1 和 R_2 (其可以是相同或不同的) 选自 H、 $-C_nH_{2n-1}$ 、具有 1 至 6 个碳原子的直链或支链烷基, 或一起形成具有 5 或 6 个原子的芳香族环或脂肪族环, R_3 选自 $-CO-CH_3$ 、 $-NHOH$ 、 $-OH$ 、 $-OR_6$, 其中 R_6 是具有 1 至 6 个碳原子的直链或支链烷基; R_4 选自 H、具有 1 至 6 个碳原子的直链或支链烷基、苯基、苄基、 $-CF_3$ 或 $-CF_2CF_3$ 、乙烯基或烯丙基; R_5 、 R_7 、 R_8 是氢原子; 或 R_3 和 R_4 、 R_4 和 R_5 、或 R_7 和 R_8 一起形成环, 该环与苯环、具有 5 或 6 个原子的芳香族环或脂肪族环稠合, 所述 5 或 6 个原子含有 1 至 2 个独立地选自 N、O 的杂原子。

表1: 指定化合物的分级剂量
(0.5-10mM) 抑制DLD-1细胞的1%

mM	生长抑制的百分数				
	0.5	1	2.5	5	10
13	21.1	73	92.7	96.3	96.4
14	22.8	36	76.5	90.5	94.1
17	0	0	33.3	89.3	90.7
26	13.6	19	62	86	94.5
28	不可溶的				
31	0	0	0	8.8	31.7
38	6	11.1	51.9	85.9	94.5

1. 化合物,其中该化合物选自:

4-氨基 -N- 羟基 -2- 甲氧基苯甲酰胺,

5-氨基 -N- 羟基 -2- 甲氧基苯甲酰胺,

5-氨基 -2,3- 二氢苯并呋喃 -7- 甲酸,

5-氨基 -2- 乙氧基 -N- 羟基苯甲酰胺,

5-氨基 -2- 异丙氧基苯甲酸,和

5- 二异丙基氨基水杨酸。

2. 权利要求 1 的化合物在制备用于预防或治疗表达 PPAR γ 受体的肿瘤的药品中的用途,所述肿瘤选自食道、胃、胰、结肠、前列腺、乳腺、子宫及子宫附件、肾和肺的肿瘤。

3. 权利要求 1 的化合物在制备用于治疗慢性炎症疾病的药品中的用途,所述慢性炎症疾病选自局限性回肠炎和溃疡性直肠结肠炎。

4. 一种药品组合物,它包含作为活性成分的权利要求 1 的一种或多种化合物以及一种或多种药学上可接受的赋形剂或辅助剂。

PPAR 受体和 EGF 受体特异性化合物及其盐以及 它们在医药领域中的用途

[0001] 发明领域

[0002] 本发明涉及 PPAR 受体和 EGF 受体特异性化合物及其盐以及它们在医药领域中的用途。

[0003] 发明目的

[0004] 本发明的化合物及其盐可以有利地用于预防和治疗表达 PPAR γ 受体（过氧化物酶体增殖物激活受体）及 EGF 受体（表皮生长因子受体）的肿瘤，例如：食道、胃、胰、结肠、前列腺、乳腺、子宫及附件、肾和肺的肿瘤。此外，本发明的化合物及其盐可以用于治疗慢性炎症性疾病，尤其是慢性肠病，如局限性回肠炎（即 Crohn 病）和溃疡性直肠结肠炎。

[0005] 发明背景

[0006] PPAR γ 受体是控制许多基因表达的核受体（大约 50 个转录因子的组），所述基因对于调节脂质代谢、胰岛素的合成和癌发生和炎症的过程是重要的（Bull AW, Arch Pathol Lab Med 2003 ;127 :1121-1123）（Koeffler HP, Clin Cancer Res 2003 ;9 :1-9）（Youssef J 等人, J BiomedBiotech 2004 ;3 :156-166 页）。

[0007] 存在多种天然和合成的激动剂，其结合 PPAR γ 受体并改变其构象，产生激活。The Lancet 2002 ;360 :1410-1418 页中描述了天然和合成的配体。

[0008] 近来的研究已经表明，使用 PPAR γ 受体的配体处理肿瘤细胞引起细胞增殖、细胞分化和凋亡的减少，这提示有可能使用这类化合物作为用于防止癌发生的药物（Osawa E 等人, Gastroenterology 2003 ; 124 :361-367）。

[0009] 其他研究已经表明，PPAR γ 受体的配体（例如，曲格列酮）具有抗炎作用并抑制 IBD 动物模型中的粘膜炎症反应（Tanaka T 等人, Cancer Res 2001 ;61 :2424-2428 页）。

[0010] 此外，最近刚刚公开了证据，5-ASA（5-氨基水杨酸、美沙拉秦）（治疗 IBD 的金标准）的肠抗炎活性依赖于 PPAR γ 受体的结合及随之发生的激活（Rousseaux C 等人, J Exp Med 2005 ;201 :1205-1215 页）。

[0011] 在不同类型的赘生物中非常高程度地表达了活化形式的具有酪氨酸-激酶 EGF 活性的跨膜受体（Mendelsohn J, Endocr Relat Cancer 2001 ;8 :3-9）（Harari PM, Endocr Relat Cancer 2004 ;11 :689-708 页）。

[0012] 受体的过度表达还与癌细胞转移的潜在能力有关。在这一方面，已证明在与胞外基质相互作用的水平上，EGF 促进与病变有关的不同细胞类型的迁移和侵袭（Brunton 等人, Oncogene 1997 ;14 :283-293 页）。

[0013] 在实验动物上和人大进行的大量研究已经确定了 EGF 受体的抑制剂在控制肿瘤的增殖和扩散中的功效（Mendelsohn J, Endocr Relat Cancer 2001 ;8 :3-9 页）（Harari PM, Endocr Relat Cancer 2004 ;11 :689-708 页）。

[0014] 毫无疑问，通过 EGF 受体激活而触发的细胞内信号促进肿瘤细胞的生长和存活，促进病理状况的发展，而且该信号在测定肿瘤细胞扩散和移生远程器官的能力中是必需的（Mendelsohn J, Endocr Relat Cancer 2001 ;8 :3-9）（Kari C 等人, Cancer Res 2003 ;63 :

1-5 页)。

[0015] 根据上述内容并此外考虑到,从生物学的观点看,慢性炎症过程在癌发生中发挥作用,清楚的是对于新化学实体的创新研究存在现实需求,该新的化学实体通过其既对 PPAR γ 受体又对 EGF 受体的互补作用,能够产生化学预防、抗增殖和抗转移类型的抗炎和抗肿瘤作用。

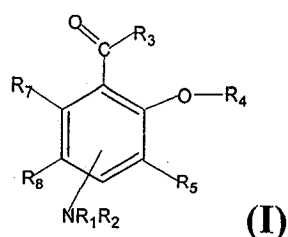
[0016] 发明概述

[0017] 本发明涉及一系列化合物的新的和创造性的医药和治疗用途,在这些化合物的任意一种是未知的情况下,本发明还涉及这些化合物。

[0018] 本发明提供了新的一类化合物,其通过调变特异性受体如 PPAR γ 受体和 EGF 受体而适用于预防和治理癌症和慢性炎症。

[0019] 因此,本发明特别涉及通式 (I) 的化合物

[0020]



[0021] 其中

[0022] R_1 和 R_2 , 可以是相同或不同的, 选自 H 、 $-\text{C}_n\text{H}_{2n-1}$ 、具有 1 至 6 个碳原子的直链或支链烷基, 或者一起形成具有 5 或 6 个原子的芳香族环或脂肪族环;

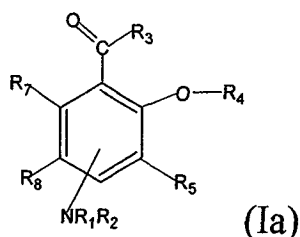
[0023] R_3 选自 $-\text{CO}-\text{CH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OR}_6$, 其中 R_6 是具有 1 至 6 个碳原子的直链或支链烷基;

[0024] R_4 选自 H 、具有 1 至 6 个碳原子的直链或支链烷基、苯基、苄基、 $-\text{CF}_3$ 或 $-\text{CF}_2\text{CF}_3$ 、乙烯基或烯丙基; R_5 、 R_7 、 R_8 是氢原子; 或者

[0025] R_3 和 R_4 、 R_4 和 R_5 , 或 R_7 和 R_8 一起形成环, 该环与苯环、具有 5 或 6 个原子的芳香族环或脂肪族环稠合, 所述 5 或 6 个原子含有 1 至 2 个独立地选自 N 、 O 的杂原子。

[0026] 本发明还涉及通式 (Ia) 的特定亚群化合物

[0027]



[0028] 其中

[0029] R_1 和 R_2 , 可以是相同或不同的, 并选自 H 、 $-\text{CO}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}_n\text{H}_{2n-1}$ 、具有 1 至 6 个碳原子的直链或支链烷基, 或者一起形成具有 5 或 6 个原子的芳香族环或脂肪族环;

[0030] R_3 选自 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OR}_6$, 其中 R_6 是具有 1 至 6 个碳原子的直链或支链烷基;

[0031] R_4 选自 $-\text{H}$ 、具有 1 至 6 个碳原子的直链或支链烷基;

[0032] R_5 、 R_7 、 R_8 是氢原子; 或者

[0033] R_3 和 R_4 、 R_4 和 R_5 、或 R_7 和 R_8 一起形成环,该环与苯环、具有 5 或 6 个原子的芳香族环或脂肪族环稠合,所述 5 或 6 个原子含有 1 至 2 个独立地选自 N、O 的杂原子。

[0034] 上述的具有 1 至 6 个碳原子的式 (I) 或 (IIa) 的直链或支链烷基,可以选自 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}_2\text{H}_5$ 、异丙基、丙基、 $\text{C}_n\text{H}_{2n-1}$ 。

[0035] 本发明还涉及如式 (I) 和 (Ia) 中列举的化合物,除了不允许其中 $R_3 = -\text{COCH}_3$ 以外。存在这样的理论可能性:一些乙酰基衍生物如至少当 $R_3 = -\text{COCH}_3$ 时的那些中的一些可能是无活性的,因为 N-乙酰化作用是芳香族胺类的代谢解毒系统。理论可能性起因于观察到 5-ASA 的无活性代谢产物是 N-乙酰基 5-ASA。

[0036] 在本发明式 (I) 和 (Ia) 二者的一些实施方案中, R_7 和 R_8 可以不形成环。因此, R_3 和 R_4 、或 R_4 和 R_5 可以一起形成环,该环与苯环、具有 5 或 6 个原子的芳香族环或脂肪族环稠合,所述 5 或 6 个原子含有 1 至 2 个独立地选自 N、O 的杂原子。在一些实施方案中,排除化合物 29、36 和 37。在本发明式 (I) 和 (Ia) 二者的一些实施方案中, R_7 和 R_8 可以不形成环,除了当 R_4 是 CH_3 时。在本发明式 (I) 和 (Ia) 二者的一些实施方案中, R_4 选自 H 时, R_7 和 R_8 可以不形成环。在一些实施方案中,本发明涉及由本发明提供的 ketolenes。在一些实施方案中,排除化合物 29。

[0037] 在一些实施方案中,排除一个或多个选自化合物 5、6、7、8、9、12、16、18、19、24、25、27、30 和 41 的化合物。

[0038] 在本发明式 (I) 和 (Ia) 二者的一些实施方案中, R_1 和 R_2 可以不形成环。因此 R_1 和 R_2 可以是相同或不同的,可以选自 $-\text{H}$ 、 $-\text{C}_n\text{H}_{2n-1}$ 、具有 1 至 6 个碳原子的直链或支链烷基。在一些实施方案中,排除化合物 41。

[0039] 在本发明式 (I) 和 (Ia) 二者的一些实施方案中, R_4 可以不是分支的。因此, R_4 可以选自 H、具有 1 至 6 个碳原子的直链烷基; R_5 、 R_7 、 R_8 是氢原子。在这样的实施方案中,排除化合物 30 和 31。在一些实施方案中,当氨基是在苯环的 4' 位上时, R_4 可以不是分支。在这样的实施方案中,排除化合物 30。在一些实施方案中,直链烷基可能仅有 1 个碳原子(即, CH_3)。

[0040] 在本发明式 (I) 和 (Ia) 二者的一些实施方案中, R_1 和 R_2 是 $-\text{H}$ 。在一些实施方案中,排除化合物 6、9、24、27、38 和 41。

[0041] 在本发明式 (I) 和 (Ia) 二者的一些实施方案中, R_2 可以不与 R_1 不同。

[0042] 在本发明式 (I) 和 (Ia) 二者的一些实施方案中,当 R_3 是 $-\text{OH}$ 时, R_4 选自 $-\text{H}$ 、具有 1 至 6 个碳原子的支链烷基,或者 R_3 和 R_4 一起形成环,该环与苯、具有 5 或 6 个原子的芳香族或环稠合,所述 5 或 6 个原子含有 1 至 2 个独立地选自 N、O 的杂原子。在一些实施方案中,支链烷基可以是 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 。在一些实施方案中,支链烷基可以是在 R_8 位的 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 。在一些实施方案中, R_3 和 R_4 形成 5-元脂肪族环并具有一个 O 原子。在一些实施方案(如在这段中描述的实施方案)中,排除化合物 7、8、18、19、42。

[0043] 在本发明式 (I) 和 (Ia) 二者的一些实施方案中,当 R_3 是 $-\text{OH}$ 且 R_4 是 $-\text{H}$ 时,基团 NR_1R_2 不能在 4' 位(而应当在 R_5 或 R_8 上)。在一些实施方案中, R_1 和 R_2 是 $-\text{CH}_3$ 的情况下尤其如此。在一些实施方案中,排除化合物 24。

[0044] 在本发明式 (I) 和 (Ia) 二者的一些实施方案中, R_1 和 R_2 是相同的。在一些实施方案中,排除化合物 9 和 12。

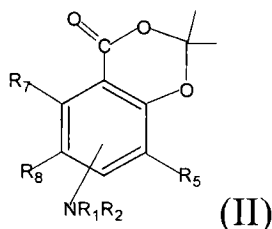
[0045] 在本发明式 (I) 和 (Ia) 二者的一些实施方案中, 当 R_3 是 $-OH$ 且 R_4 是 $-H$ 时, 基团 $-NR_1R_2$ 不能在 R_5 位 (而应当是在 R_8 位)。在一些实施方案中, R_1 和 R_2 是 $-H$ 时可能是这种情况。在一些实施方案中, 排除化合物 6。

[0046] 在本发明式 (I) 和 (Ia) 二者的一些实施方案中, R_3 是 $-NHOH$ 时, R_4 是具有 1 至 6 个碳原子的直链或支链烷基 (或者, 如果式 (I) 苯基、苄基、 $-CF_3$ 或 $-CF_2CF_3$ 、乙烯基或烯丙基), R_3 和 R_4 一起形成环, 该环与苯环、具有 5 或 6 个原子的芳香族环或脂肪族环稠合, 所述 5 或 6 个原子含有 1 至 2 个独立地选自 N、O 的杂原子。在一些实施方案中, 排除化合物 7。

[0047] 在本发明式 (I) 和 (Ia) 二者的一些实施方案中, R_3 是 $-NHOH$, 且 R_4 是具有 2 个碳原子的直链或支链烷基时, 基团 $-NR_1R_2$ 不可以在 $4'$ 位而可以在 R_8 位。在一些实施方案中, 排除化合物 25。

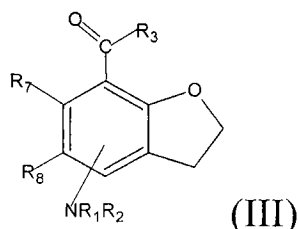
[0048] 在本发明式 (I) 和 (Ia) 二者的一些实施方案中, 当 R_3 是 $-NHOH$ 并且 R_4 是 $-H$ 时, 基团 $-NR_1R_2$ 不可以在 R_8 位, 且必须是在 $4'$ 位。在一些实施方案中, 排除化合物 5。

[0049] 根据一个实施方案, 根据下式 (II), 式 (I) 和 (Ia) 化合物的 R_3 和 R_4 可以形成环
[0050]



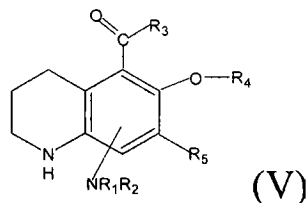
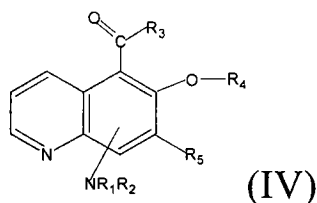
[0051] 其中 R_1 、 R_2 、 R_5 、 R_7 和 R_8 是如上定义的。

[0052] 根据另一个实施方案, 根据下式 (III), 式 (I) 和 (Ia) 化合物的 R_4 和 R_5 可以形成环
[0053]



[0054] 其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_7 和 R_8 是如上定义的。

[0055] 根据进一步的实施方案, 根据下式 (IV) 或 (V), 式 (I) 和 (Ia) 化合物的 R_7 和 R_8 可以形成环
[0056]

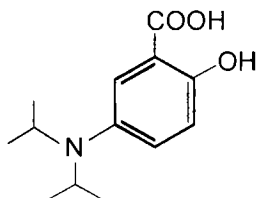


[0057] 其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_5 是如上定义的。

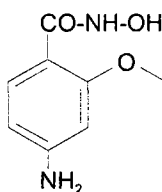
[0058] 特别地, 本发明式 (I) 和 (Ia) 的化合物可以选自:

[0059] 4-氨基-N-羟基-2-甲氧基苯甲酰胺 (化合物 13)

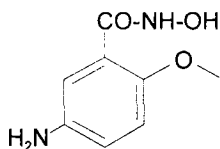
- [0060] 5-氨基 -N- 羟基 -2- 甲氧基苯甲酰胺 (化合物 14)
- [0061] 5-氨基 -2,3- 二氢苯并呋喃 -7- 甲酸 (化合物 17)
- [0062] 5-氨基 -2- 乙氧基 -N- 羟基苯甲酰胺 (化合物 26)
- [0063] 6-氨基 -2,2- 二甲基 -4H- 苯并 [1,3] 二 _ 英 -4- 酮 (化合物 28)
- [0064] 1,2,3,4- 四氢 -6- 羟基喹啉 -5- 甲酸 (化合物 29)
- [0065] 5-氨基 -2- 异丙氧基苯甲酸 (化合物 31)
- [0066] 6- 甲氧基喹啉 -5- 甲酸 (化合物 36)
- [0067] 6- 甲氧基 -1,2,3,4- 四氢喹啉 -5- 甲酸 (化合物 37)
- [0068] 5- 二异丙基氨基水杨酸 (化合物 38)
- [0069] 4- 二异丙基氨基水杨酸 (化合物 42)。
- [0070] 本发明还提供了其中 R_1 和 R_2 选自 -H 和 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 的化合物。 R_1 和 R_2 二者可以是相同的。在一些实施方案中, R_1 和 R_2 可以是 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 。
- [0071] 一个实施例包含以下结构 (化合物 38) :
- [0072]



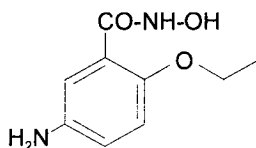
- [0073] 在本发明的其他实施方案中, R_1 和 R_2 均是 -H。
- [0074] 本发明还提供了其中 R_3 选自 -NHOH 和 -OH 的化合物。在一些实施方案中, R_3 可以是 -NHOH。一个实施包括了以下结构 (化合物 13) :
- [0075]



- [0076] 进一步的实施例包含以下结构 (化合物 14) :
- [0077]



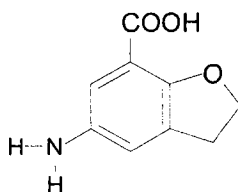
- [0078] 进一步的实施例包含以下结构 (化合物 26) :
- [0079]



- [0080] 在本发明的一些实施方案中, R_3 可以是 -OH。

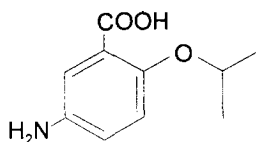
[0081] 适合的实施例包含以下结构（化合物 17）：

[0082]



[0083] 进一步的实施例包含以下结构（化合物 31）：

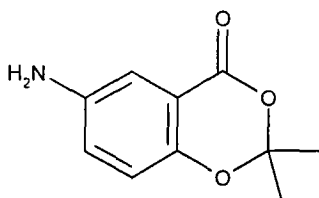
[0084]



[0085] 在本发明的一些实施方案中， R_4 可以是 -H。在本发明一些实施方案中， R_4 可以是 CH_3 。在本发明的一些实施方案中， R_4 可以是 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 。在本发明的一些实施方案中， R_4 可以是 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 。

[0086] 进一步的实施例包含以下结构（化合物 28）：

[0087]



[0088] 在本发明的一些实施方案中， R_3 和 R_4 可以一起形成脂肪族环，该环与苯，5 或 6 个原子的稠合，该 5 或 6 个原子含有一个杂原子 O（氧）。

[0089] 本发明的化合物可以有利地在医药领域中使用。

[0090] 因此，本发明进一步涉及药物组合物，它含有作为活性成分的与一种或多种药学上可接受的赋形剂或辅助剂组合的一种或多种本发明的化合物。

[0091] 此外，本发明涉及本发明的化合物在制备药物产品中的用途，所述药物产品用于预防和治疗表达 PPAR γ 受体和 EGF 受体的肿瘤如食道、胃、胰、结肠、前列腺、乳腺、子宫及附件、肾和肺的肿瘤。

[0092] 而且，本发明涉及本发明的化合物在制备药物产品中的用途，所述药物产品用于治疗慢性炎症疾病如局限性回肠炎和溃疡性结肠炎。本发明还涉及治疗人和 / 或哺乳动物（包括啮齿类、家畜、家养宠物、小鼠、大鼠、仓鼠、兔、狗、猫、猪、羊、牛、马）的方法。

[0093] 特别地，除了上述特定化合物之外，以下化合物可以用于上述应用：

[0094] 5-氨基水杨酰 (salicylo)- 异羟肟酸（化合物 5）

[0095] 3-二甲氨基水杨酸（化合物 6）

[0096] 2-甲氧基-4-氨基苯甲酸（化合物 7）

[0097] 2-甲氧基-5-氨基苯甲酸（化合物 8）

[0098] 5-甲氨基水杨酸（化合物 9）

[0099] 4-甲氨基水杨酸（化合物 12）

[0100] 4-乙酰氨基水杨酸（化合物 16）

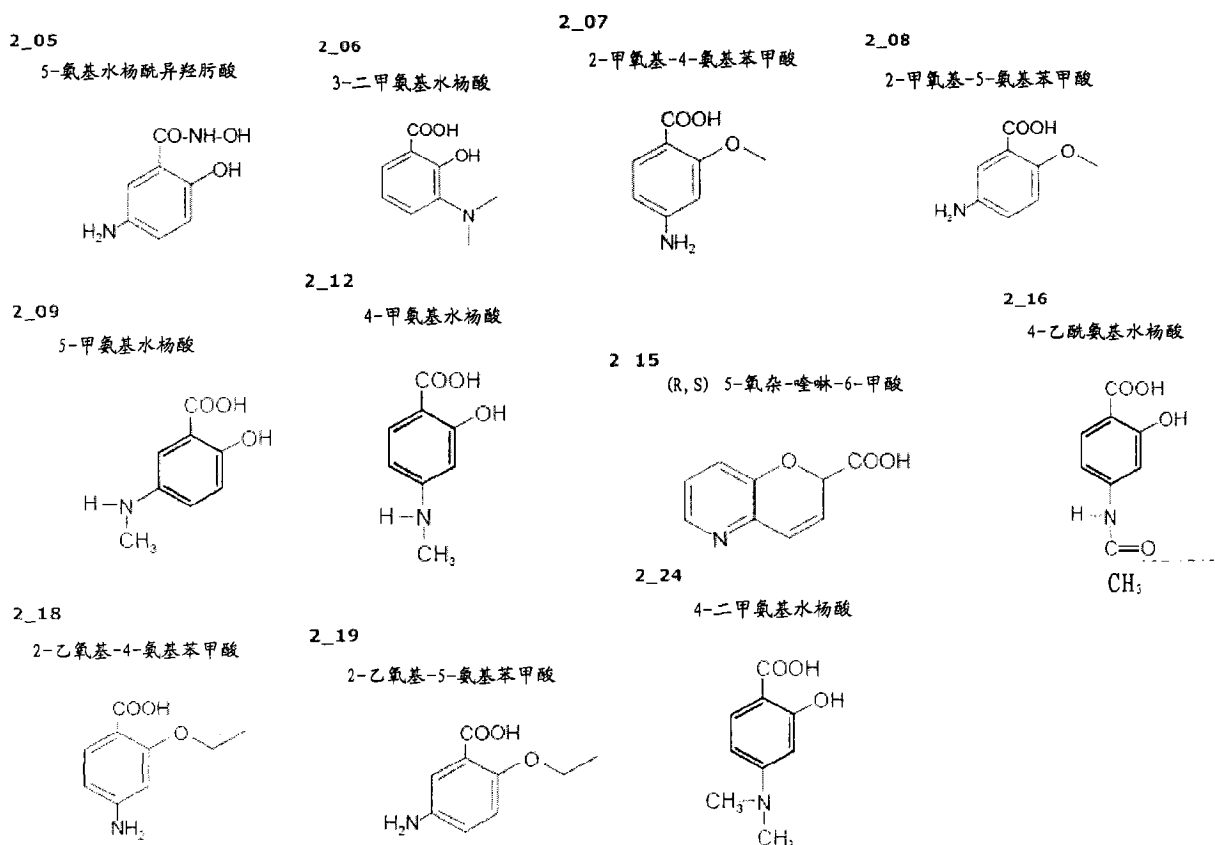
- [0101] 2-乙氧基-4-氨基苯甲酸(化合物 18)
 [0102] 2-乙氧基-5-氨基苯甲酸(化合物 19)
 [0103] 4-二甲氨基水杨酸(化合物 24)
 [0104] 2-乙氧基-4-氨基苯甲酰基异羟肟酸(化合物 25)
 [0105] 6-羟基喹啉-5-甲酸(化合物 27)
 [0106] 2-(2-丙基)氧基-4-氨基苯甲酸(化合物 30)
 [0107] 4-(1-哌嗪基)水杨酸(化合物 41)。

[0108] 本发明的分子产生自分子建模工作,使用美沙拉秦作为基础,评估所有化学上可行的变型,以便在计算机对接实验中取得最好得分(受体的亲和力和激活)。因此,据认为显示了比得上美沙拉秦的功能和/或活性的本发明的化合物是通过相似的生物学途径发挥作用的。据认为本发明分子中固有的与美沙拉秦相似的特征赋予了该分子与 EGF 途径有关的相似活性。

[0109] 本文给出的实验制得了用于预测已经讨论的不同医学领域中化合物的用途的良好模型。所用的模型给出了富有意义的结果,不论作用的机理。

[0110] 除了上述化合物之外,本发明提供了使用以下化合物(化合物号码跟着前缀“2-”):

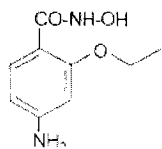
[0111]



[0112]

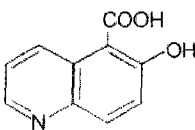
2_25

2-乙氧基-4-氨基苯甲酰基异羟肟酸



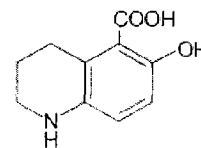
2_27

6-羟基-喹啉-5-甲酸



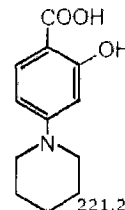
2_29

1, 2, 3, 4-四氢-6-羟基喹啉-5-甲酸



2_41

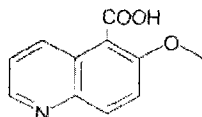
4-(1-哌嗪基)水杨酸



mw 221.25604

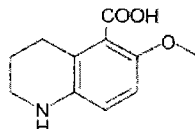
2_36

6-甲氧基喹啉-5-甲酸



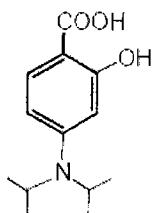
2_37

6-甲氧基-1, 2, 3, 4-四氢喹啉-5-甲酸



2_42

4-二异丙氨基水杨酸



mw 235.28292

[0113] 现在将为了举例说明的目的而描述本发明,但是不限于此,根据其优选的实施方案,特别参考附图中的图。

[0114] 附图和表格简述

[0115] 图 1A 显示了化合物 13、14、17、26、31 和 38 的结构。

[0116] 图 1B 显示了分子 17 和 31 激活 PPAR γ 受体,相对于用 5-ASA 和罗格列酮处理的细胞。用 PPAR γ (2XCYP) 的反应元件转染并用分子 17 和 31 (30mM) 处理的 HT-29STD 细胞显示了诱导了报道基因的约两倍活性其显示 5-ASA 和新化合物 17 和 31 诱导 PPAR γ 激活的能力;结果表达为相对于未处理细胞而言激活(均值 $\pm$ SEM)增加的倍数。也显示了化合物 13、14、26 和 38 的激活。

[0117] 图 2 显示了化合物 17、26 和 31 诱导的上皮细胞表达 PPAR γ 蛋白的增加;PPAR γ 蛋白的表达水平是在未处理的 HT-29 细胞(对照)及用新化合物或用作阳性对照的 5-ASA (30mM) 或罗格列酮 (10^{-5} M) 处理 24 小时之后通过蛋白质印迹进行评估的。计算每种条件的 PPAR γ 的光密度值,其与相同样品中 β -肌动蛋白内部对照的量成比例。

[0118] 图 3 显示化合物 17 和 31 抑制上皮细胞的增殖;与 5-ASA (30mM) 和罗格列酮 (10^{-5} M) 类似,化合物 17 和 31 抑制 HT-29STD 细胞的增殖,相对于仅用培养基培养的细胞(对照),通过用细胞核 Ki-67(浅灰色)染色测试;细胞核使用 Hoechst 33342 溶液染色成蓝色(图中黑灰色);结果表达为在一个实验中计数的细胞的平均数。

[0119] 图 4 显示了化合物 31 诱导上皮细胞的凋亡;与 5-ASA (30mM) 和罗格列酮 (10^{-5} M) 相似,分子 31 诱导 HT-29STD 细胞中的凋亡,其通过 TUNEL 测定法鉴定。3%的自发凋亡是在未处理的 HT-29 细胞中观察到的;结果表达为在一个实验中计数细胞的平均数。

[0120] 图 5 显示了不同化合物与 PPAR γ 结合方式的对接模拟 ; 与根据 PPAR γ 的 X- 射线晶体结构中白色表面代表的配体结合域 (LBD) 中原子类型染色的新化合物 (13 至 38) 的相互作用比较 ; 新分子和 PPAR γ 之间的关键氢结合相互作用的描述。

[0121] 图 5B 显示了美沙拉秦与 PPAR γ 受体结合方式的详细对接模拟方式。

[0122] 图 5C 显示了化合物 17 与 PPAR γ 受体结合方式的更详细对接模拟方式。

[0123] 图 5D 显示了化合物 31 与 PPAR γ 受体结合方式的更详细对接模拟方式。

[0124] 图 6 显示了在转染的 HT-29 细胞中, 化合物 13、14、17、26、28、31 和 38 的 PPAR γ 活性分析。这表明, 新分子增加了报道基因活性, 从而显示了类似或优于 5-ASA 的活性。

[0125] 图 7-8 显示了指定物质对三种不同人结肠癌细胞系 (即, HT29、HT115 和 DLD1) 增殖的作用。细胞用增加浓度的物质 (0.5-10mM) 处理 48 小时, 使用测量 BrdU 结合的比色测定法测定增殖。光密度 (OD) 是在 450nm 处使用 ELISA 读出器测定的。数据表明三个单独实验的均值 $\pm$ SD。

[0126] 图 9 显示了化合物 14 对 DLD-1 细胞增殖的抑制作用的流式细胞计分析。显示了获得相似结果的 3 个代表性实验之一。细胞是用 CFSE 标记的, 在培养 48 小时之后使用流式细胞计计算其增殖百分数。

[0127] 图 10A 显示了化合物 14 在 1.5 ($p < 0.01$) 和 3mM ($p < 0.001$) 的浓度时显著地增强了 DLD1 细胞死亡。让 DLD1 未受刺激 (Unst) 或用化合物 14 处理 48 小时。数据表达了 3 个单独实验的均值 $\pm$ SD, 并显示细胞死亡的百分比, 如通过 AV 和 / 或 PI- 阳性细胞的 FACS 分析评估的。

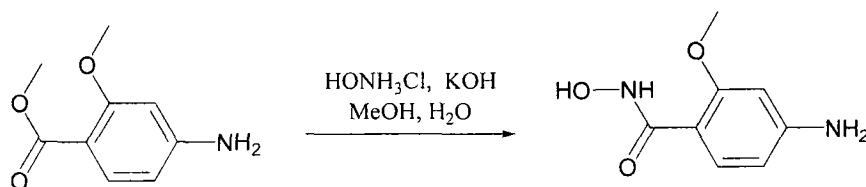
[0128] 图 10B 显示了 Z-VAD (一种泛 - 半胱天冬酶抑制剂) 逆转了化合物 14 对 DLD-1 细胞死亡的作用。结果显示为膜联蛋白 -V-FITC 的双参数直方图, PI 荧光使得能区别存活细胞、具有完整膜的凋亡细胞及经受第二次坏死的细胞。显示了获得相似结果的 3 个代表性的实验之一。

[0129] 表 1. 指定化合物的分级剂量 (0.5-10mM) 的 DLD-1 细胞抑制的百分比。细胞在化合物存在或不存在下培养, 然后在 48 小时培养之后通过比色法 (BrdU) 测定法来测定细胞生长。

[0130] 实施例 1

[0131] 制备 4- 氨基 -N- 羟基 -2- 甲氧基苯甲酰胺 (化合物 13) 的方法

[0132]



[0133] 将 2- 甲氧基 -4- 氨基苯甲酸甲酯 (10g, 55.25mmol) 及盐酸羟胺 (15.36g, 221mmol) 溶解于 MeOH (80ml), 小心加入 KOH (15.4g, 275mmol) 的 MeOH (55ml) 溶液。得到的混合物回流下搅拌 36 小时。真空下除去挥发物。将残留物溶于 1M NaOH (50ml) 并用乙酸乙酯 (EtOAc, 50ml) 洗。缓慢加入浓 HCl 直到固体沉淀 (pH 是 10)。过滤掉固体, 用水洗, 然后用甲基 - 叔丁基醚 (MTBE) 洗, 真空干燥。¹H NMR 显示了固体含有约 1/3 摩尔当量的乙

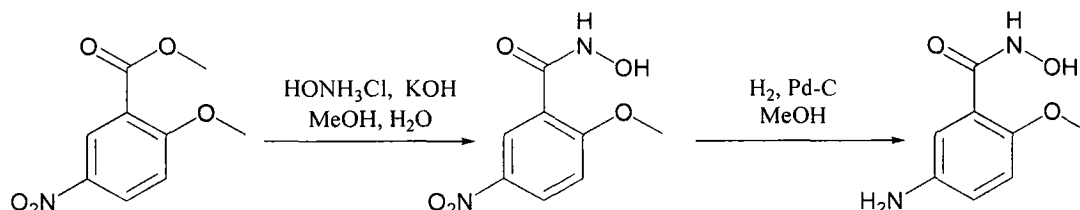
酸乙酯。将固体溶于 1M NaOH(100ml), 真空除去 EtOAc。小心加入浓 HCl 直至固体沉淀 (pH 是 8)。过滤收集固体, 用水洗, 然后用 MTBE 洗, 并真空干燥以得到 4.67g (47%) 的标题化合物, 为暗红色固体。

[0134] ^1H NMR (δ , 250MHz, d_6 -DMSO): 3.75 (s, 3-H, OMe), 5.64 (s, 2-H, NH_2), 6.14 (dd, 1-H, 芳香族的), 6.18 (brs, 1-H, 芳香族的), 7.48 (d, 1-H, 芳香族的), 8.73 (s, 1-H, NH), 10.06 (s, 1-H, OH)。

[0135] 实施例 2

[0136] 制备 5-氨基-N-羟基-2-甲氧基苯甲酰胺 (化合物 14) 的方法

[0137]



[0138] 将 2-甲氧基-5-硝基苯甲酸甲酯 (10g, 47.39mmol) 和盐酸羟胺 (13.17g, 189.56mmol) 溶于 MeOH(100ml), 小心加入 KOH(13.27g, 236.95mmol) 的 MeOH(55ml) 溶液。值得注意的是观察到放热反应; 固体开始溶解, 然后固体从溶液中沉淀出来。酸洗的等分样 TLC(EtOAc 中运行) 显示了起始苯甲酸酯和新产物的痕迹。加入 H_2O (100ml), 过滤收集任何未溶的固体, 用异丙醇 (IPA) 洗, 真空干燥得到 10.23g (> 100%) 的 N-羟基-2-甲氧基-5-硝基苯甲酰胺, 为白色固体。

[0139] ^1H NMR (δ , 250MHz, MeOD): 4.18 (3-H, OMe), 7.43 (d, 1-H, 芳香族的), 8.39 (dd, 1-H, 芳香族的), 8.83 (d, 1-H, 芳香族的)

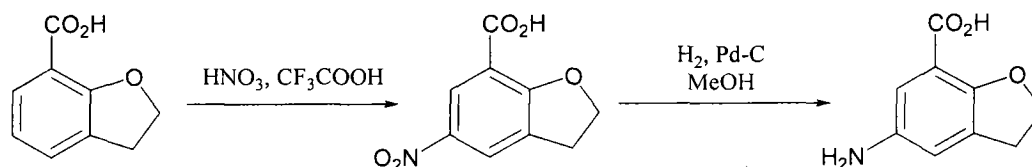
[0140] 将 N-羟基-2-甲氧基-5-硝基苯甲酰胺 (约 47.39mmol) 溶于 IMS(500ml), 并加入 10% 碳载钯 (50% 湿润) (1g)。混合物在 50psi 下氢化 1.5 小时, 然后通过硅藻土过滤, 硅藻土用 2M NaOH(200ml) 洗。真空除去 MeOH, 所得的含水残留物用 MTBE(100ml) 洗。小心加入浓 HCl, 将水相的 pH 降低至 7, 过滤收集得到的沉淀固体, 用水洗, 然后用 MTBE 洗并高真空干燥过夜以得到 5.33g 的标题化合物 (62%), 为浅棕色固体。

[0141] ^1H NMR (δ , 250MHz, d_6 -DMSO): 4.09 (3-H, OMe), 7.02 (1-H, 芳香族的), 7.18 (1-H, 芳香族的), 7.28 (1-H, 芳香族的), 9.36 (1-H, NH), 10.83 (1-H, OH)。

[0142] 实施例 3

[0143] 制备 5-氨基-2,3-二氢苯并 [b] 呋喃-7-甲酸 (化合物 17) 的方法

[0144]



[0145] 把硝酸 (9ml) 加入 2,3-二氢苯并 [b] 呋喃-7-甲酸 (5.1g, 31mmol) 的三氟乙酸 (45ml) 的冷却 (冰浴) 溶液。4 小时之后, 混合物在冰水 (150ml) 中急冷, 过滤混合物得到 5-硝基-2,3-二氢苯并 [b] 呋喃-7-甲酸, 其用水洗, 在下一阶段使用粗制品 (湿的)。

[0146] ^1H NMR (δ , 250MHz, CD_3OD): 3.70 (2H, t, 8.7Hz), 5.21 (2H, t, 8.9Hz), 8.67 (1H, d,

2.7Hz), 8.83(1H, d, 2.4Hz)

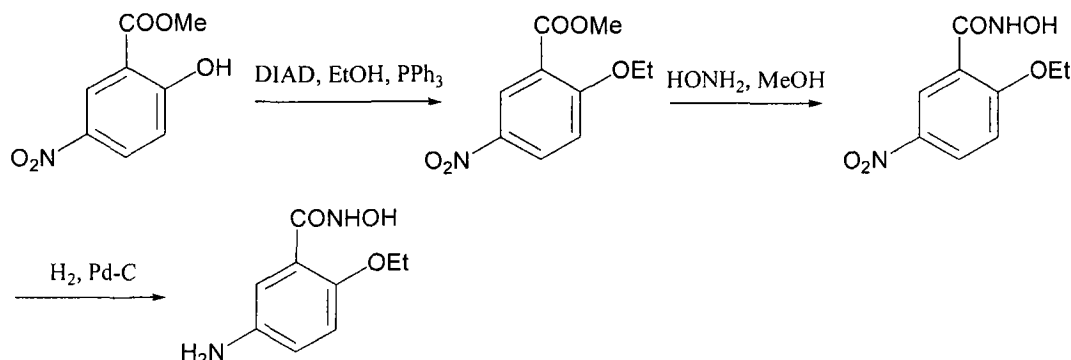
[0147] 将粗制的 5-硝基-2,3-二氢苯并[b]呋喃-7-甲酸溶解于最少量的甲醇(1.3L), 氮气穿过溶液鼓泡 20 分钟。加入含 5% 炭载钯(1.0g) 的水(20ml) 的混合物, 混合物装入 2L 高压釜。2 次连续的排气-氮气吹扫之后, 容器充至 5 巴 H_2 , 搅拌 4 天。混合物用氮气吹扫, 硅藻土过滤, 浓缩得到 5-氨基-2,3-二氢苯并[b]呋喃-7-甲酸(3.5g, 19.5mmol, 2 步 63%)。

[0148] 1H NMR(δ , 250MHz, CD_3OD): 3.46(2H, t, 8.5Hz), 4.85(2H, t, 8.7Hz), 7.19(1H, br s), 7.27(1H, br s)

[0149] 实施例 4

[0150] 制备 5-氨基-2-乙氧基-N-羟基苯甲酰胺(化合物 26) 的方法

[0151]



[0152] 步骤 1

[0153] 将 2-羟基-5-硝基苯甲酸甲酯(11.82g, 60mmol)、三苯基膦(17.29g, 66mmol) 和 $EtOH$ (3.03g, 3.85ml, 66mmol) 溶于 THF (150ml), 用冰冷却。小心加入偶氮二羧酸二异丙基酯(8.31g, 10ml, 66mmol), 反应在室温下搅拌 1 小时。反应在真空下浓缩, 残留物用 $EtOAc$ (50ml) 研磨。由此形成的固体通过过滤收集, 用 $MTBE$ 洗, 真空干燥得到 12.2g 的粗制 2-乙氧基-5-硝基苯甲酸甲酯。真空蒸发滤液, 得到的残留物用 $EtOAc$ (25ml) 研磨。所得固体通过过滤收集, 用 $MTBE$ 洗并真空干燥以得到 6.31g 的第二批的粗制 2-乙氧基-5-硝基苯甲酸甲酯。将合并的 2-乙氧基-5-硝基苯甲酸甲酯的部分溶于热 IPA (50ml) 并冷却至室温。得到的固体通过过滤收集, 用 $MTBE$ 洗并真空干燥以得到纯的 2-乙氧基-5-硝基苯甲酸甲酯(5.49g, 40.5%), 为黄色固体。

[0154] 1H NMR(δ , 250MHz, $DMSO-d_6$): 1.38(3H, t, CH_3CH_2O), 3.85(3H, s, OMe), 4.28(2H, q, CH_3CH_2O), 7.38(1H, d, 芳香族的), 8.40(1H, dd, 芳香族的), 8.48(1H, d, 芳香族的)。

[0155] 步骤 2

[0156] 将 2-乙氧基-5-硝基苯甲酸甲酯(6.099g, 26.99mmol) 和 50% wt/v 的羟胺水溶液(40ml) 溶于 $MeOH$ (100ml) 并在室温下搅拌过夜。过滤收集得到的沉淀的黄色固体, 用 IPA 洗, 真空干燥。滤液真空蒸发, 残留物用 IPA (25ml) 研磨。滤掉未溶的固体, 用最少量的 IPA 洗, 并真空干燥。将两次得到的固体混悬于水(300ml) 中, 小心加入浓盐酸降低 pH 至 2。滤掉固体, 用 $MTBE$ 洗, 并真空干燥以得到 3.9g 的粗制 2-乙氧基-5-硝基-N-羟基苯甲酰胺。将来自以上的 IPA 母液与粗制 2-乙氧基-5-硝基-N-羟基苯甲酰胺合并, 真空蒸发。残留物用 CH_2Cl_2 (25ml) 研磨, 滤掉固体并真空干燥得到 2-乙氧基-5-硝基-N-羟基苯甲酰胺(2.39g, 39%), 为黄色固体。

[0157] ^1H NMR (δ , 250MHz, DMSO-d_6): 1.39 (t, 3-H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 4.28 (q, 2-H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 7.34 (d, 1-H, 芳香族的), 8.38 (dd, 1-H, 芳香族的), 8.48 (d, 1-H, 芳香族的), 9.32 (s, 1-H, NH), 10.79 (s, 1-H, OH)。

[0158] 步骤 3

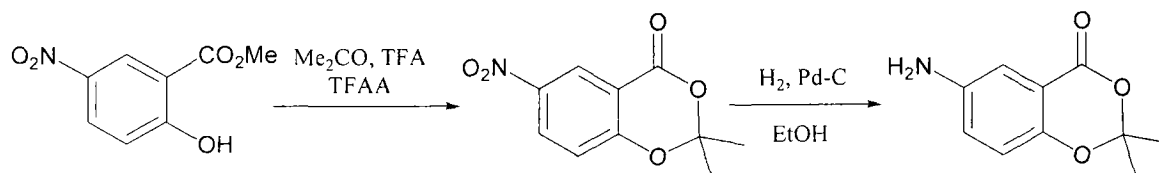
[0159] 将 2-乙氧基-5-硝基-N-羟基苯甲酰胺 (2.39g, 1.06mmol) 混悬于 EtOH (50ml) 中并加入 10% 碳载钯 (湿基) (240mg)。混合物在 50psi 下氢化 1.5 小时。加入 MeOH (50ml), 通过硅藻土过滤混合物。真空下除去挥发物, 将残留物溶于 IPA (50ml)。混合物在 60°C 下加热 0.5 小时, 然后在室温下保持过夜。过滤收集沉淀的固体, 用 MTBE 洗, 真空下干燥得到 1.51g 的 5-氨基-2-乙氧基-N-羟基苯甲酰胺 (73%), 为米色固体。

[0160] ^1H NMR (δ , 250MHz, DMSO-d_6): 1.28 (t, 3-H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 3.97 (q, 2-H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 4.81 (s, 2-H, NH_2), 6.61 (dd, 1-H, 芳香族的), 6.80 (d, 1-H, 芳香族的), 6.87 (d, 1-H, 芳香族的), 9.00 (s, 1-H, NH), 10.35 (s, 1-H, OH)。

[0161] 实施例 5

[0162] 制备 6-氨基-2,2-二甲基-4H-苯并[1,3]二_英-4-酮 (化合物 28) 的方法

[0163]



[0164] 步骤 1

[0165] 将 5-硝基水杨酸 (25g, 136.6mmol) 溶于丙酮 (20ml), 加入三氟乙酸 (150ml) 和三氟乙酸酐 (50ml)。混合物回流下加热。1 小时之后, 加入更多丙酮 (30ml), 反应在回流下加热 48 小时。反应冷却至室温, 真空下除去挥发物。得到的棕色油溶解于 CH_2Cl_2 (400ml) 并用 1 : 1 的 H_2O / 饱和 NaHCO_3 (400ml) 洗。水相用 CH_2Cl_2 (2×200ml) 萃取, 干燥 (MgSO_4) 合并的有机层, 真空下蒸发。固体残留物用戊烷 (150ml) 研磨, 过滤收集, 用戊烷彻底地洗, 并真空干燥以得到 6-硝基-2,2-二甲基-4H-苯并[1,3]二_英-4-酮 (27.84g, 91%), 为暗黄色固体。

[0166] ^1H NMR (δ , 250MHz, CDCl_3): 1.79 (s, 6-H, CH_3), 7.13 (d, 1-H, 芳香族的), 8.43 (dd, 1-H, 芳香族的), 8.87 (d, 1-H, 芳香族的)。

[0167] 步骤 2

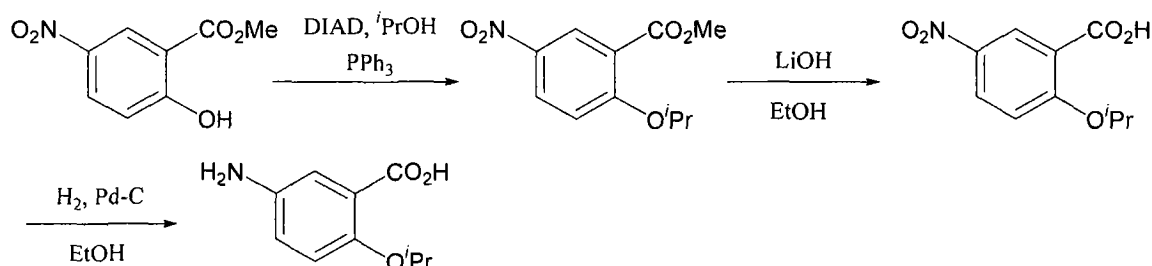
[0168] 将 6-硝基-2,2-二甲基-4H-苯并[1,3]二_英-4-酮 (5g, 22.42mmol) 溶于 EtOH (35ml), 加入 10% 碳载钯 (湿基) (2.37g)。混合物在 50psi 下氢化 1 小时。混合物通过硅藻土过滤, 真空下除去挥发物。加入 IPA (50ml), 混合物在 60°C 下加热 5 分钟, 然后使其冷却至室温。过滤得到的固体, 用 MTBE 洗, 真空下干燥得到 2.93g 的 6-氨基-2,2-二甲基-4H-苯并[1,3]二_英-4-酮 (68%), 为黄色固体。

[0169] ^1H NMR (δ , 250MHz, CDCl_3): 1.71 (s, 6-H, CH_3), 6.80 (d, 1-H, 芳香族的), 6.93 (dd, 1-H, 芳香族的), 7.26 (d, 1-H, 芳香族的)

[0170] 实施例 6

[0171] 制备 5-氨基-2-异丙氧基苯甲酸 (化合物 31) 的方法

[0172]



[0173] 将 2-羟基-5-硝基苯甲酸甲酯 (11.82g, 60mmol)、三苯基膦 (17.29g, 66mmol) 及 *i*PrOH (3.96g, 5ml, 66mmol) 溶于 THF (150ml), 并在冰中冷却。小心加入偶氮二羧酸二异丙基酯 (8.31g, 10ml, 66mmol), 反应在室温下搅拌过夜。真空下除去挥发物, 残留物用 EtOAc (50ml) 处理。过滤除去未溶的固体, 真空下蒸发滤液至干燥。残留物通过柱色谱法纯化得到 2-异丙氧基-5-硝基苯甲酸甲酯 (6.92g, 48.5%), 为黄色油。

[0174] 将 2-异丙氧基-5-硝基苯甲酸甲酯 (6.92g, 28.95mmol) 溶于 THF/H₂O (各自 35ml), 并加入 LiOH (1.39g, 57.9mmol)。混合物在室温下搅拌过夜, 加入浓盐酸降低 pH 至 1, 产物用乙酸乙酯 (50ml) 萃取。干燥 (MgSO₄) 有机层, 蒸发得到 2-异丙氧基-5-硝基苯甲酸 (6.02g, 92.5%), 为黄色固体。

[0175] ¹H NMR (δ, 250MHz, DMSO-d₆): 1.32 (d, 6-H, CH₃), 4.88 (七重峰, 1-H, CH), 7.37 (d, 1-H, 芳香族的), 8.32 (dd, 1-H, 芳香族的), 8.40 (d, 1-H, 芳香族的), 13.13 (s, 1-H, CO₂H)。

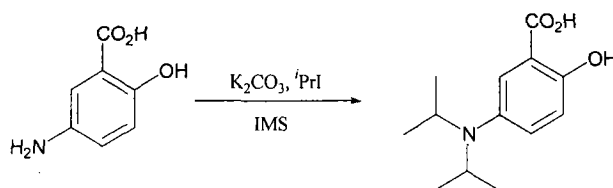
[0176] 将 2-异丙氧基-5-硝基苯甲酸 (6.02g, 26.75mmol) 混悬于 EtOH (100ml) 中, 加入 10% 的碳载钯 (湿基) (600mg)。混合物在 50psi 下氢化 2 小时。混合物通过硅藻土滤过, 真空除去挥发物。残留物用 IPA 研磨, 滤掉得到的固体, 用 MTBE 洗, 真空干燥得到 4.15g 的 5-氨基-2-异丙氧基苯甲酸 (79.5%), 为浅黄色固体。

[0177] ¹H NMR (δ, 250MHz, DMSO-d₆): 1.21 (d, 6-H, CH₃), 4.33 (七重峰, 1-H, CH), 7.68 (dd, 1-H, 芳香族的), 6.84 (d, 1-H, 芳香族的), 6.89 (d, 1H, 芳香族的)

[0178] 实施例 7

[0179] 制备 4-二异丙基氨基水杨酸 (化合物 38) 的方法

[0180]



[0181] 将 5-氨基水杨酸 (3.3g, 21.6mmol)、2-碘丙烷 (9.1g, 53.9mmol) 及碳酸钾 (7.4g, 54mmol) 的混合物在 50°C 在 IMS (300ml) 和水 (100ml) 中搅拌 4 天。停止加热, 混合物浓缩成固体, 其用 100ml CH₂Cl₂ 洗。弃去洗液, 固体在 40°C 在 IMS (200ml) 中加热 30 分钟。加热停止时, 加入硫酸镁, 继续搅拌 25 分钟, 过滤除去无机固体之后, 溶液浓缩, 用二氧化硅色谱法 (洗脱剂: 10-20% 甲醇 / CH₂Cl₂) 纯化。这得到 0.51g 的 4-二异丙基氨基水杨酸。

[0182] ¹H NMR (δ, 250MHz, d6-DMSO): 1.51 (12H, br d, 5.75Hz), 3.9-3.5 (1H, br), 4.41 (2H, br), 7.21 (1H, d, 8.8Hz), 7.70 (1H, dd, 8.8, 2.7Hz), 8.12 (1H, br s)

[0183] 实施例 8

[0184] 研究本发明的新化合物对 PPAR γ 激活 / 表达及细胞增殖和凋亡的调节的作用

[0185] 材料和方法

[0186] 化合物

[0187] 5-ASA 是自 Sigma-Aldrich™(St Quentin Fallavier, 法国) 购得。罗格列酮是在 Spi Bio™(Massy, France) 获得。新分子 13、14、17、26、31、38(图 1A) 是由 Giuliani SpA™(Milano, 意大利) 赠予并由 SAFC Pharma™(Manchester, 英国) 合成。

[0188] 细胞系

[0189] 将结肠癌细胞系 HT-29STD(ATCC HTB-38) 常规地生长在补充了 10% 热 -FCS 和抗生素的 DMEM 中。细胞是单层生长, 在 37°C 的 5% CO₂ 和 95% 相对湿度下培养。

[0190] 用 PPAR γ 瞬时转染并刺激细胞

[0191] 根据生产商的说明书, HT-29STD 细胞使用 Effectene™ 转染试剂 (Qiagen™) 瞬时转染。为了测试 PPAR γ 激活, 我们用含有从细胞色素 p450 4A(2XCYP)(1) 得到的两拷贝 PPRE 的 500ng 最小启动子构建体进行转染。海萤萤光素酶质粒 (0.1 μ g/孔) 也转染, 作为监测转染效率和标准化萤火虫萤光素酶活性的内部对照。使转染的细胞在 37°C 下培养 48 小时。在细胞培养之后, 在 3-6-9-12-15-18-24 小时期间使用浓度 30mM 的化合物 13、14、17、26、31、38 进行刺激, 与用作阳性对照的 PPAR γ 合成的配体 5-ASA 30mM(2) 和罗格列酮 10⁻⁵M(2) 比较。用 NaOH 调节药物溶液的 pH 至 7.4。使用 Passive 溶胞缓冲液 (Promega™, Madison, Wis.) 制得总的细胞提取物。根据生产商的实验设计, 使用 Promega™ 双重萤光素酶测定系统测定 20 μ l 提取物中萤光素酶活性。一式三份在至少三个单独的实验中测定转染。萤光素酶活性表达为在用不同分子处理的细胞中获得的活性除以非刺激的细胞中的萤光素酶活性所得的倍数。

[0192] 通过蛋白印迹分析评价 PPAR γ 和 β -肌动蛋白

[0193] 在提取缓冲液中通过细胞匀浆化得到总的蛋白质, 所述缓冲液是由含 2% Triton™ 的 PBS、100mM 苯基甲基磺酰氟 (PMSF) 及传统的蛋白酶抑制剂鸡尾酒 (2) 组成的。总蛋白质然后通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并电印迹。聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜使用针对 PPAR γ 的兔多克隆一抗 (稀释度 1/500, TEBU, Le Perray en Yveline, 法国) 孵培养过夜。使用稀释 1/10,000 的兔单克隆一抗 (Sigma) 检测 β -肌动蛋白。使用二级过氧化物酶缀合的抗体 (1/1000, Dako™, Trappes, 法国) 和化学发光进行免疫检测, 根据生产商的实验设计 (ECL™, Amersham Pharmacia Biotech™, Orsay, 法国)。得到每种条件下的 PPAR γ 的光密度值, 其与相同样品中内部对照 β -肌动蛋白的量成比例 (2)。

[0194] 使用 Ki-67 免疫染色分析细胞增殖

[0195] 在 24 小时的培养之后, HT-29STD 细胞在 24 小时期间使用 30mM 的新分子 13、14、17、26 和 31 处理。5-ASA(30mM) 和罗格列酮 (10⁻⁵M) 用作阳性对照。分子 38(实施例 7) 不包含在此实验中, 因为其溶解度低。使用 NaOH 调节药物溶液的 pH 至 7.4。细胞固定在 4% PFA 中, 在 4°C 含有 0.1% Triton X-100™ 的 PBS 中渗透化, 然后与山羊正常血清和阻断缓冲液 (含 1% BSA 的 PBS) 培养至抗体的非特异性吸附最小化。

[0196] 细胞增殖是通过细胞核 Ki-67 染色测定的, 使用针对 Ki-67 的小鼠单克隆一抗 (稀释度 1 : 50 过夜; ZYMED™, Clinisciences™, Montrouge, 法国)。使用缀合至吖啶红荧光染料 (稀释度 1 : 100, Molecular Probes™, Invitrogen™, Cergy Pontoise, 法国) 的 Alexa 594 驴抗小鼠 IgG 展现一抗。细胞核使用 Hoechst 33342 溶液 (0.125mg/ml)

(Sigma-Aldrich™) 染色,并在荧光显微镜 (Leica™, Bensheim, 德国) 下显影。阴性对照是由使用非特异性小鼠血清代替特异性抗体染色构成的。在一个实验中,至少 500 个细胞 / 样品的计数是系统盲法 (blindly) 完成的。结果表达为染色细胞数的平均值 $\pm$ SEM。

[0197] 凋亡的检测

[0198] 在 24 小时的培养之后, HT-29STD 细胞在 24 小时期间使用 30mM 的新分子 13、14、17、26 和 31 处理。5-ASA (30mM) 和罗格列酮 (10^{-5} M) 是用作阳性对照。分子 17 和 38 (实施例 3、7) 不包含在此实验之内,由于其差溶解度。使用 NaOH 调节药物溶液的 pH 至 7.4。使用末端转移酶 dUTP 切口末端标记测定盒 (TUNEL 盒, RocheDiagnostics™, Meylan, 法国) 通过酶标记 DNA 链来鉴定经受凋亡的细胞。在一个实验中,至少 500 个细胞 / 样品的计数是系统盲法完成的。

[0199] 结果表达为染色细胞数的平均值 $\pm$ SEM。

[0200] 结果

[0201] 已经观察到,新分子 17 (实施例 3) 和 31 (实施例 6) 诱导 PPAR γ 激活。化合物 26 (实施例 4) 也诱导 PPAR γ , 但是程度较低。PPAR γ 的激活导致级联反应,所述反应导致结合特异性的 DNA 序列元件 (称为过氧化物酶体增殖物反应元件 (PPRE) (7-9))。

[0202] 我们通过使用海鳃萤光素酶 PPRE 质粒瞬时转染上皮细胞,研究了 PPAR γ 转录活性。细胞在 24 小时期间使用不同的分子刺激。转染的 HT-29 细胞中 PPAR γ 活性的分析显示了,新分子 17 (实施例 3) 和 31 (实施例 6) 在 30mM 浓度下增加了报道基因活性 2 倍,由此显示了与 5-ASA 和罗格列酮相似的活性 (图 1B)。分子 13、14 和 38 (实施例 1、2、7) 在 30mM 浓度下对上皮细胞发挥了快速细胞毒性效应,限制了在 6 小时之后研究 PPAR γ 的激活 (图 1B)。

[0203] 新分子 17、26 和 31 诱导 PPAR γ 表达。在 HT-29 细胞系中,在蛋白质水平上,新分子诱导 PPAR γ 表达的能力。在 24 小时期间用分子 17、26 和 31 处理的细胞中观察到由蛋白质印迹量化的平均 2 倍的 PPAR γ 蛋白质水平的诱导 (图 2)。

[0204] 新分子 17 和 31 (实施例 3 和 6) 抑制了上皮细胞增殖。我们在 HT-29STD 细胞系中评估了新分子在细胞增殖调节方面的作用 (图 3)。通过在增殖细胞中表达的细胞核蛋白 Ki-67 染色测定细胞增殖, Ki-67 的存在对于保持细胞增殖是必要的 (10)。比较未处理的细胞, HT-29 细胞与分子 17 和 31 (30mM) 培养 24 小时产生 67-75% 细胞增殖的抑制 (图 3)。没有测试化合物 26 的细胞增殖效应,因为其作为 PPAR- γ 激活剂具有较小作用。

[0205] 用在其最佳浓度下使用的两个阳性对照罗格列酮 (10^{-5} M) 和 5-ASA (30mM), 观察到类似结果。证实分子 13、14 和 26 (实施例 1、2、4) 的潜在抗促细胞分裂效应受其在此浓度下对上皮细胞的快速细胞毒效应限制 (未显示数据)。

[0206] 通过 PPAR γ , 新分子 31 (实施例 6) 诱导上皮细胞凋亡。与罗格列酮和 5-ASA 相似地,分子 31 在 80% 的上皮细胞中显示凋亡,其是通过使用末端转移酶 dUTP 切口末端标记 (TUNEL) 标记 DNA 链断裂鉴定的 (图 4)。与先前的实验类似地,30mM 分子 13、14 和 26 诱导快速细胞毒性效应,阻碍了细胞凋亡分析。

[0207] 实施例 9

[0208] 研究新化合物对于 PPAR γ 激活的影响

[0209] 材料和方法

[0210] 化合物

[0211] 5-ASA 是在 Sigma-Aldrich™ (St Quentin Fallavier, 法国) 购得。新分子 13、14、17、26、28、31、38 (图 1A) 是根据实施例 1-7 所述的合成的。

[0212] 细胞系

[0213] 将结肠癌细胞系 HT-29STD (ATCC HTB-38) 常规生长于补充了 10% 热 -FCS 和抗生素的 DMEM。细胞是单层生长, 在 37°C、5% CO₂ 和 95% 相对湿度下培养。

[0214] 使用 PPAR γ 瞬时转染和刺激细胞

[0215] 根据生产商的说明书, HT-29STD 细胞使用 Effectene™ 转染试剂 (Qiagen™) 瞬时转染。为了测试 PPAR γ 激活, 我们使用含有从细胞色素 p450 4A (2XCYP) 得到的两拷贝 PPRE 的 500ng 最小启动子构建体进行转染 (1)。海鳃萤光素酶质粒 (0.1 μ g/孔) 也转染, 作为监测转染效率和标准化萤火虫萤光素酶活性的内部对照。使转染的细胞在 37°C 下培养 24 小时。在细胞孵育后在 18 小时期间, 使用浓度 1mM 的化合物 13、14、17、26、28、31 和 38 (参见图 6) 进行刺激, 对比用作阳性对照的两个 30mM 的 PPAR γ 合成配体 5-ASA (2)。用 NaOH 调节药物溶液的 pH 至 7.4。使用 Passive 溶胞缓冲液 (Promega™, Madison, Wis.) 制备总的细胞提取物。根据生产商的实验设计, 使用 Promega™ 双重萤光素酶测定系统测定 20 μ l 提取物中萤光素酶活性。一式三份在至少三个单独的实验中测定转染。萤光素酶活性表达为在用不同分子处理的细胞中获得的活性除以非刺激的细胞中萤光素酶活性所得的倍数。

[0216] 结果

[0217] PPAR γ 的激活导致级联反应, 所述反应导致结合特异性的 DNA 序列元件 (称为过氧化物酶体增殖物反应元件 (PPRE) (7-9))。

[0218] 我们通过使用海鳃萤光素酶 PPRE 质粒瞬时转染上皮细胞, 研究了 PPAR γ 转录活性。为了评价新分子是否较 5-ASA 更有效刺激 PPAR γ 激活, 我们在 1mM 浓度下试验了这些分子。将在 1mM 浓度下新分子的作用同用作阳性对照的 30mM 最佳浓度的 5-ASA 比较。细胞在 24 小时期间使用不同的分子刺激。转染 HT-29 细胞中 PPAR γ 活性的分析显示了, 新分子增加了报道基因活性, 由此显示了类似于或优于 5-ASA 的活性 (新分子的浓度是小 30 倍, 参见图 6)。

[0219] 实施例 10

[0220] 研究化合物对于结肠癌细胞生长的效应

[0221] 试验以下物质 13、14、17、26、28、31 和 38 它们调节结肠癌细胞生长的能力。没有使用化合物 28 进行实验, 因为这种物质不溶于培养基。

[0222] 就此目的, 使用三种人结肠癌细胞系 (即, HT-29、HT-115 和 DLD-1)。这些细胞类型是基于环氧合酶 -2 (COX-2) 表达来选择的。实际上, HT-115 细胞表达生物学活性 COX-2, HT-29 细胞表达无功能的 COX-2 同工型, 而 DLD-1 是 COX-2- 缺乏的细胞。

[0223] HT-29 和 DLD-1 细胞分别在 McCoy 和 RPMI1640 培养基中培养, 所述培养基补充了 10% 胎牛血清 (FBS)、1% 青霉素 / 链霉素 (P/S) 及 50 μ g/ml 的庆大霉素。HT-115 是在补充了 15% FBS 和 1% P/S 的 DMEM 培养基中培养。细胞保持在 37°C 的存在 5% CO₂ 的加湿培养箱中。

[0224] 对于细胞生长测定, 单细胞悬浮液以 2×10^3 细胞 / 孔 (HT115 是 4×10^3 细胞 / 孔) 接种在含 0.5% FBS 的培养基的 96- 孔培养皿中, 并使其粘附。然后除去非粘附的细胞, 向

各孔中加入含有 0.5% FBS 的新鲜培养基。在存在或不存在指定物质下培养细胞。各个物质溶解在含 0.5% FBS 的培养基中作为 25mM 储备液,如果需要,用 NaOH 调节各个储备液的 pH 至 7.4。物质是在 0.5–10mM 的最终浓度下使用的。通过使用商业上可购得的细胞增殖试剂盒 (Roche Diagnostics™, Monza, 意大利) 测量掺入 DNA 的 5- 溴 -2' - 脱氧尿苷 (BrdU) 来测定细胞增殖。BrdU 在培养的最后 6 小时期间加入细胞培养物,在 48 小时培养之后使用酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 评估 BrdU- 阳性细胞水平。

[0225] 在 450nm 处使用 ELISA 读数器测定光密度 (OD)。实验是一式三份进行的,结果报告为均值 $\pm$ 标准差 (SD)。

[0226] 为了进一步评估化合物 14 对结肠上皮细胞生长的效应,将血清饥饿的 DLD-1 细胞在 37°C 下在 0.2 μ M 羧基荧光素二乙酸琥珀酰亚胺基酯 (CFSE) (Invitrogen™, Milan 意大利) 中培养 30 分钟,然后彻底地洗,并在加入或未加入化合物下培养。在培养 2 天之后,评估 CFSE 荧光,测定经受分裂的细胞的比例,因此允许计算前体频率和增殖指数。

[0227] 还评估化合物 14 对结肠上皮细胞死亡的效应。为此目的,细胞按照如上指出的培养 2 天,然后使用商业上可得到的试剂盒 (BeckmannCoulter™, Milan, 意大利) 评估膜联蛋白 V (AV) 和 / 或碘化丙锭 (propidium iodide) (PI)- 阳性细胞的百分数。为了评估化合物 14 对结肠上皮细胞死亡的作用是否依赖于半胱天冬酶活性,在加入化合物 14 (1.5mM) 之前,细胞使用 z-VAD-fmk (40 μ M) (一种泛 - 半胱天冬酶抑制剂) 预培养 1 小时。AV 和 PI- 阳性细胞的百分数是在根据如上指出的培养 48 小时之后测定。

[0228] 结果

[0229] 化合物抑制结肠癌细胞生长的能力各不相同。结果是如图 7 和 8 所示。表显示了指定化合物抑制 DLD-1 细胞生长的百分比。物质 13、14、17、26 和 38 显示了显著的抗增殖效应。在这些物质中,化合物 13 和 14 以剂量依赖方式显著地降低了试验的三个细胞系每一个中的细胞生长 (图 7A 和 7B)。当在 10mM 的最终浓度下使用化合物时,观察到超过 90% 的细胞生长抑制作用。仅在 2.5mM 或更高浓度下观察到化合物 17、26 和 38 的抗促细胞分裂效应 (图 8A、8C、7D)。

[0230] 化合物 31 在高剂量 (10mM) 使用时,显著地抑制细胞生长 (图 7C)。

[0231] 全部以上数据表明,物质 13、14 和 38 是结肠癌细胞生长最有效的抑制剂。然而,细胞培养物中产生的沉淀物是在物质 13 和 38 存在下进行的。这接着是大量细胞死亡,这使得难于判断这些化合物的抗增殖效应是由于其抗促细胞分裂作用,还是由于其毒性作用所致。基于这些发现,随后的实验集中于化合物 14 的使用。

[0232] 首先,通过流式细胞仪证实化合物 14 对 DLD-1 细胞生长的抑制作用。为了追踪细胞增殖,细胞用 CFSE 标记。与 BrdU 测定数据一致,化合物 14 抑制 DLD-1 细胞的增殖 (图 9)。重要地,在处理 48 小时之后,增殖细胞的百分数从未处理的培养物中的 $90 \pm 4\%$ 减少到用 0.5、1 和 2.5mM 处理的细胞培养物中的 48 ± 7 、 21 ± 11 和 $11 \pm 6\%$ 。

[0233] 为了检查化合物 14 是否还调节结肠癌细胞的存活,DLD-1 细胞在存在或不存在该化合物下培养 48 小时,然后通过流式细胞计量术评估膜联蛋白 V 和 / 或 PI- 阳性细胞的百分比。如图 10A 所示,化合物 14 在 1.5 或 3mM 的最终浓度使用时,显著地提高了细胞死亡的百分数。为了探究半胱天冬酶是否参与化合物 14- 介导的 DLD-1 细胞死亡,细胞用泛 - 半胱天冬酶抑制剂 Z-VAD 预培养,然后用化合物 14 处理。如图 10B 代表性实验中所示,用 Z-VAD

处理细胞大大地降低了 AV/PI- 阳性细胞的百分比。

[0234] 分级剂量 (0.5-10mM) 的指定化合物抑制 DLD-1 细胞的百分比列在表 1 中。细胞在存在或不存在化合物下进行培养,然后在 48 小时培养之后通过比色 (BrdU) 测定法测定细胞生长。

[0235] 实施例 11

[0236] 建立分子模型

[0237] 分子建模研究是使用在 Silicon Graphics™ 工作站上运行的 SYBYL 软件 6.9.1 版 (Tripos Associates Inc™, St Louis, MO) 完成的。由标准碎片库,建造 5-ASA 的两性离子形式的三维模型,随后使用 Tripos 力场 (3) 优化其几何形状。由于化合物的 pKa 仍然是未知的,使用 SPARC 在线计算器来测定在生理学 pH(7.4) 下存在的种类 (<http://ibmlc2.chem.uga.edu/sparc/index.cfm>)。离子化化合物的三维模型是由标准碎片库建造的,其几何形状随后使用 Tripos 力场 (3) 优化,包括由 Gasteiger 和 Hückel 原子电荷计算的静电项。在 Maximin2 程序中可用的 Powell 的方法用于能量最小化,直至梯度值小于 0.001kcal/mol.。人 PPAR γ 配体-结合域的结构是由其与在 RCSB 蛋白质数据库 (1I7I) (4,5) 可得到的 tesaglitazar (AZ 242) 络合的 X-射线晶体结构获得。使用 GOLD 软件 (6) 完成化合物在受体活性位点中的柔性对接。最稳定的对接模型是根据 GoldScore (6) 和 X-Score 评分函数 (7) 预测的最好得分构象选择的。使用在 Maximin2 程序中可用的 Powell 方法和 Tripos 力场以及 4.0 的介电常数,使络合物能量降低到最小直至梯度值达到 0.01kcal/mol.。使用退火函数定义配体热区域 (10)。

[0238] 对接研究

[0239] 通过与被认为是分子识别及 PPAR γ 激活所需的关键决定子的 His-323、His-449、Tyr-473 和 Ser-289 的氢键合相互作用,所有新分子紧密地适合 PPAR γ -LBD (11-12) (图 5A、5C、5D)。5-ASA 的对接是如图 5B 所示。

[0240] 结论

[0241] 先前已经显示,5-ASA 的抗炎作用是通过结肠中主要由上皮细胞表达的 PPAR γ 介导的 (2)。基于对接分析的首先六个新的优化的 5-ASA 分子的合理发展显示了 2 个分子 31 和 17,在 30mM 的浓度下使用,激活 PPAR γ 并诱导其被肠上皮细胞的表达。这两个新分子还抑制上皮细胞增殖并诱导凋亡,它们是参与结肠癌的发生促进 PPAR γ 激活的两个重要的机制。关于四个其他分子 (13、14、26、38),其大多数在 30mM 的浓度时对上皮细胞具有直接的细胞毒性作用,阻碍分析 PPAR γ 激活及细胞增殖和凋亡的调节和评估。

[0242] 本发明该第一组的实例 (实施例 8) 显示了两个优化分子 31 和 17 刺激 PPAR γ 表达和激活,以及调节上皮细胞增殖和凋亡的能力。化合物 13、14 和 26 在 30mM 时对上皮细胞的细胞毒性作用可能与其结构中存在高度活性的异羟肟酸基团有关,已知所述基团对很多不同酶显示了大的亲和力。

[0243] 本发明第二组的实例 (实施例 9) 表明,在 30 倍小于 5-ASA 的工作浓度的工作浓度下在 24 小时期间,其他试验分子也显示了相似于或优于 5-ASA 的活性。

[0244] 本发明最后组的实例 (实施例 10) 显示了,化合物影响结肠癌细胞系 HT-29、HT-115 和 DLD1 生长的不同程度的抑制,化合物 13、14 和 38 显示了最高的效应。为了阐明细胞死亡的性质,对化合物 14 进行了进一步研究并用流式细胞术证实在随着时间增加浓

度下,抑制 DLD-1 结肠癌细胞的生长。

[0245] 这些分子对于不表达 COX-2 的细胞也是有效的,因此本发明的分子可以用于不表达 COX-2 的细胞,用于治疗肿瘤及本文描述的其他应用的目的。

[0246] 总的结论

[0247] 合成的最高等级的化合物,根据建模研究表明,全部显示了与美沙拉秦相似的活性 / 优于美沙拉秦的活性。

[0248] 参考文献

[0249] 1. Dubuquoy, L., E. A. Jansson, S. Deeb, S. Rakotobe, M. Karoui, J. F. Colombel, J. Auwerx, S. Pettersson, and P. Desreumaux. 2003. Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 124 :1265-1276.

[0250] 2. Rousseaux C, Lefebvre B, Dubuquoy L, Lefebvre P, Romano O, Auwerx J, Metzger D, Wahli W, Desvergne B, Naccari GC, Chavatte P, Farce A, Bulois P, Cortot A, Colombel JF, Desreumaux P. Intestinal anti-inflammatory effect of 5-aminosalicylic acid is dependent on PPAR γ . *J Exp Med* 2005 ;201 :1205-15.

[0251] 3. Clark, M. C. R. D. I. V. O., N. 1989. Validation of the General Purpose Tripos 5.2 Field. *J. Comput Chem.* 10 :982-1012.

[0252] 4. Gampe, R. T., Jr., V. G. Montana, M. H. Lambert, A. B. Miller, R. K. Bledsoe, M. V. Milburn, S. A. Kliewer, T. M. Willson, and H. E. Xu. 2000. Asymmetry in the PPAR γ /RXR α crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors. *Mol Cell* 5 :545-555.

[0253] 5. Jones, G., P. Winett, R. C. Glen, A. R. Leach, and R. Taylor. 1997. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol* 267 :727-748.

[0254] 6. Wang, R., L. Lai, and S. Wang. 2002. Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction. *J Comput Aided Mol Des* 16 :11-26.

[0255] 7. Westin, S., R. Kurokawa, R. T. Nolte, G. B. Wisely, E. M. McNerney, D. W. Rose, M. V. Milburn, M. G. Rosenfeld, and C. K. Glass. 1998. Interactions controlling the assembly of nuclear-receptor heterodimers and co-activators. *Nature* 395 :199-202.

[0256] 8. Mangelsdorf, D. J., C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schutz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon, and et al. 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83 :835-839.

[0257] 9. Misra, P., E. D. Owuor, W. Li, S. Yu, C. Qi, K. Meyer, Y. J. Zhu, M. S. Rao, A. N. Kong, and J. K. Reddy. 2002. Phosphorylation of transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-binding protein (PBP). Stimulation of transcriptional regulation by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 277 :48745-48754. Epub 2002 Sep 4. 48727.

[0258] 10. Gerdes, J. et al. 1986. Growth fractions in breast cancers determined in

situ with monoclonal antibody Ki-67. J ClinPathol 39,977-80.

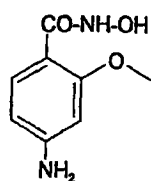
[0259] 11. Nolte, R. T. , G. B. Wisely, S. Westin, J. E. Cobb, M. H. Lambert, R. Kurokawa, M. G. Rosenfeld, T. M. Willson, C. K. Glass, and M. V. Milburn. 1998. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. Nature 395 :137-14

[0260] 12. Xu, H. E. , M. H. Lambert, V. G. Montana, K. D. Plunket, L. B. Moore, J. L. Collins, J. A. Oplinger, S. A. Kliewer, R. T. Gampe, Jr. , D. D. McKee, J. T. Moore, and T. M. Willson. 2001. Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors. Proc Natl Acad Sci USA 98 : 13919-13924. Epub 2001 Nov 13 13916.

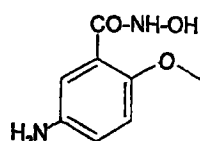
表1: 指定化合物的分级剂量
(0.5-10mM) 抑制DLD-1细胞的1%

mM	生长抑制的百分数				
	0.5	1	2.5	5	10
13	21.1	73	92.7	96.3	96.4
14	22.8	36	76.5	90.5	94.1
17	0	0	33.3	89.3	90.7
26	13.6	19	62	86	94.5
28	不可溶的				
31	0	0	0	8.8	31.7
38	6	11.1	51.9	85.9	94.5

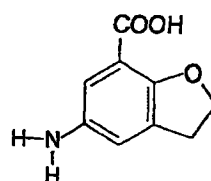
化合物13、14、17、26、31和38的结构



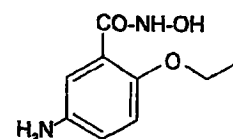
化合物13



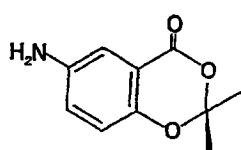
化合物14



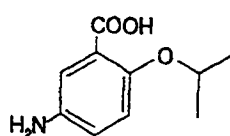
化合物17



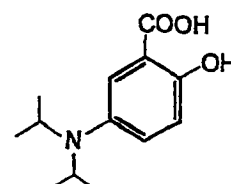
化合物26



化合物28



化合物31



化合物38

图1A

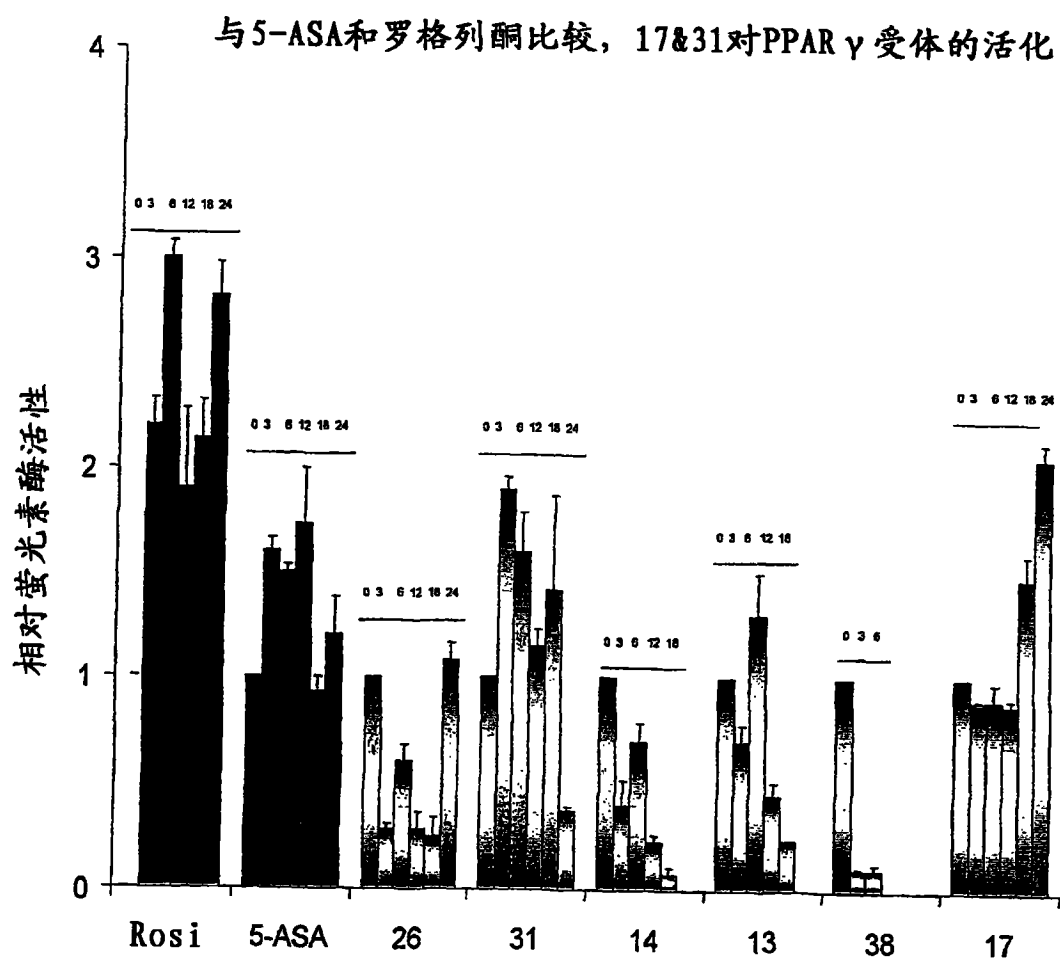


图1B

化合物17, 26和31引起的上皮细胞表达PPAR γ 蛋白增加;
蛋白质印迹分析评价未处理的细胞(对照)和用新化合物、
5-ASA (30mM) 或罗格列酮处理的细胞中的PPAR γ 蛋白质表达;
使用 β -肌动蛋白作为内部对照计算的PPAR γ 光密度值

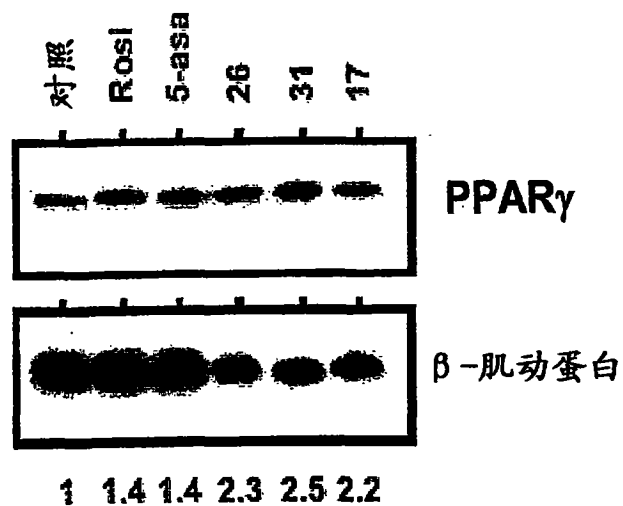


图 2

17和31vs. 5-ASA, 罗格列酮对上皮细胞增殖的抑制的比较

电子显微镜染色细胞放大

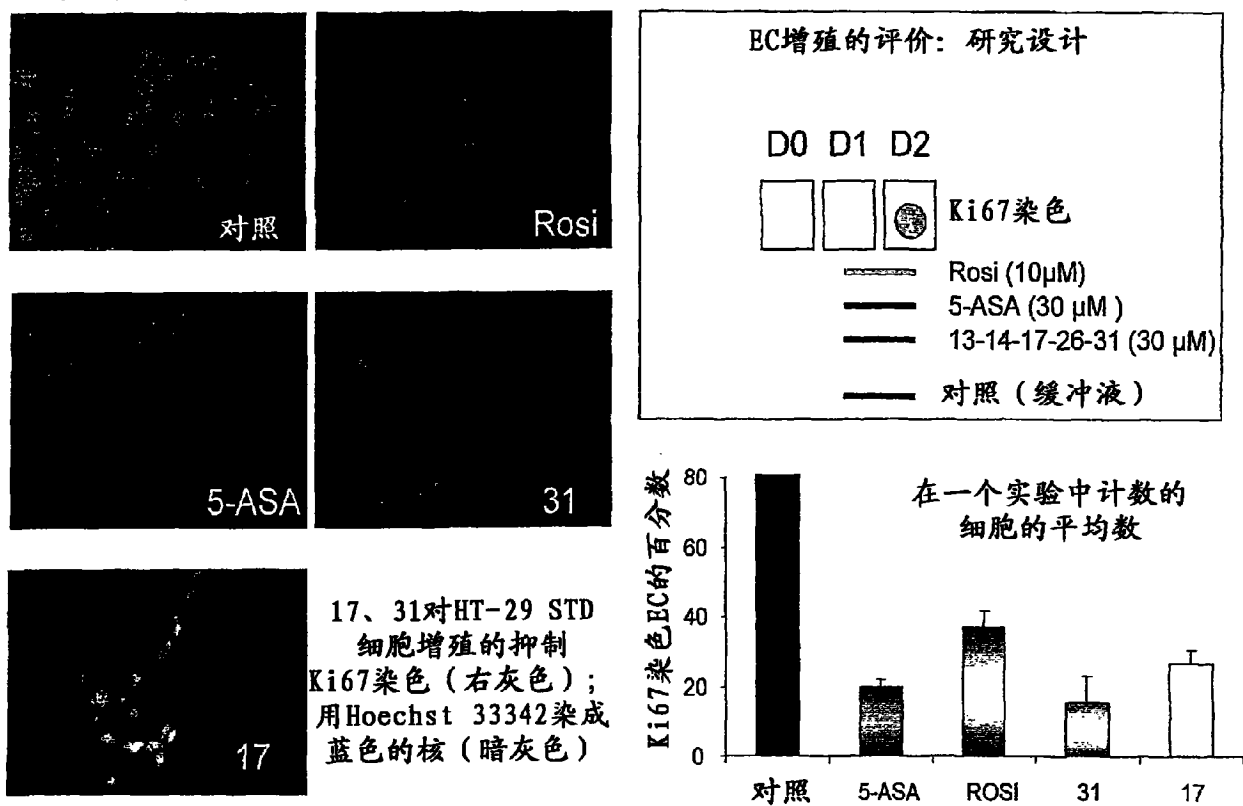


图3

化合物31vs. 5-ASA, 罗格列酮诱导上皮细胞的细胞凋亡

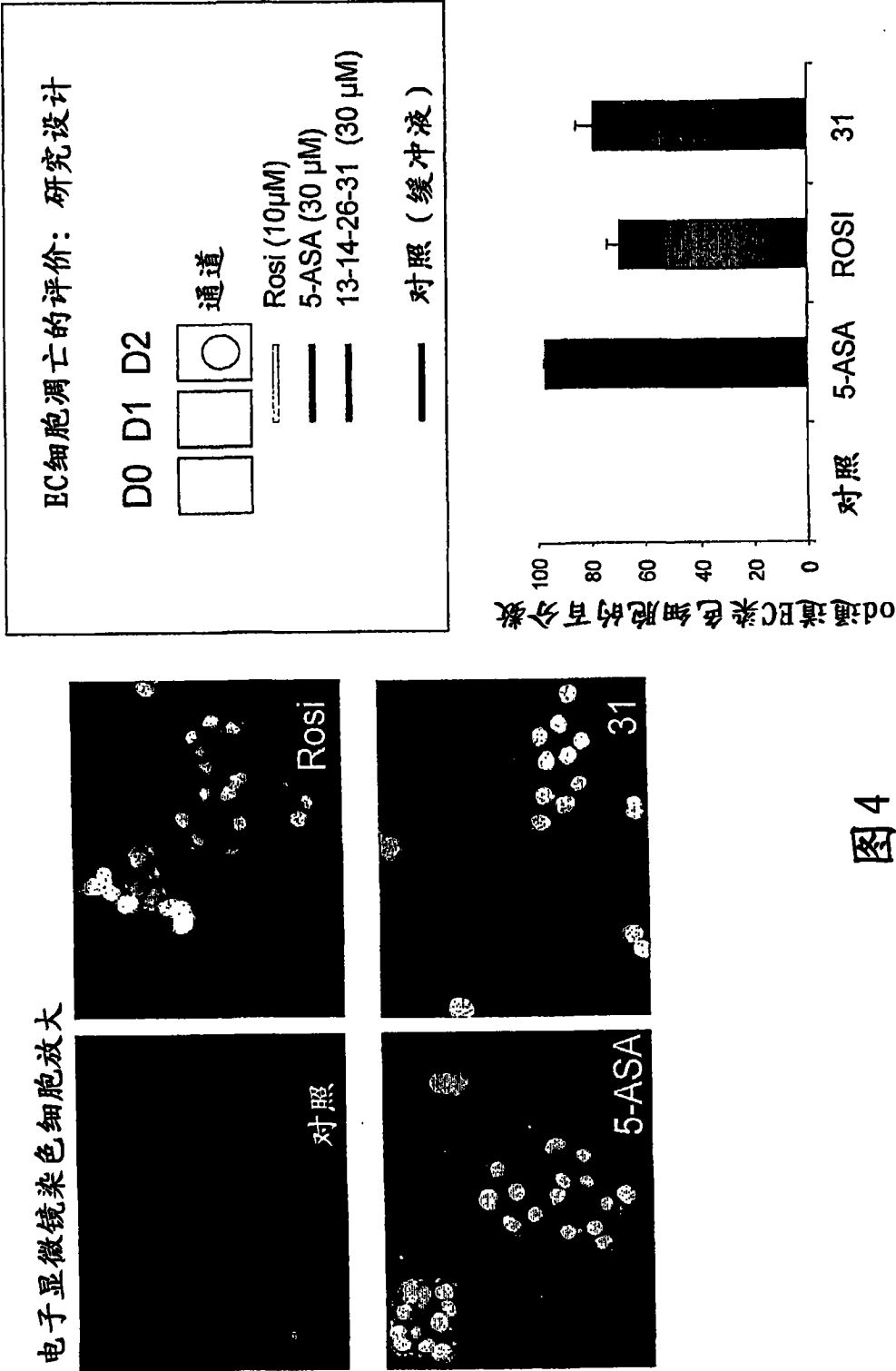


图4

新分子（化合物13, 14, 17, 26, 28, 31, 38）的对接分析
（显示了氢键合相互作用）

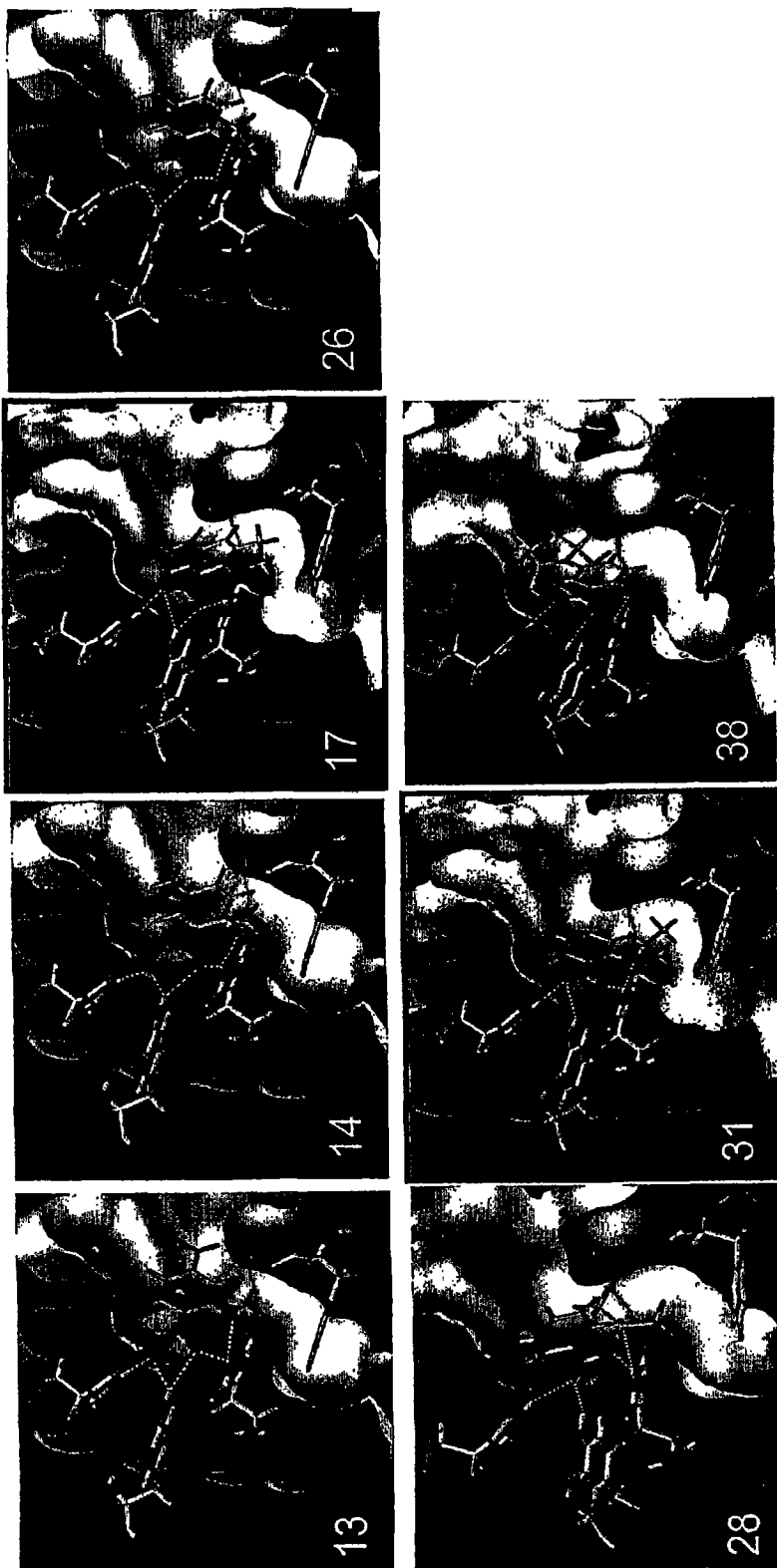


图 5A

5-氨基水杨酸（美沙拉秦）与PPAP γ 受体的对接
(显示了氨基酸残基标记)

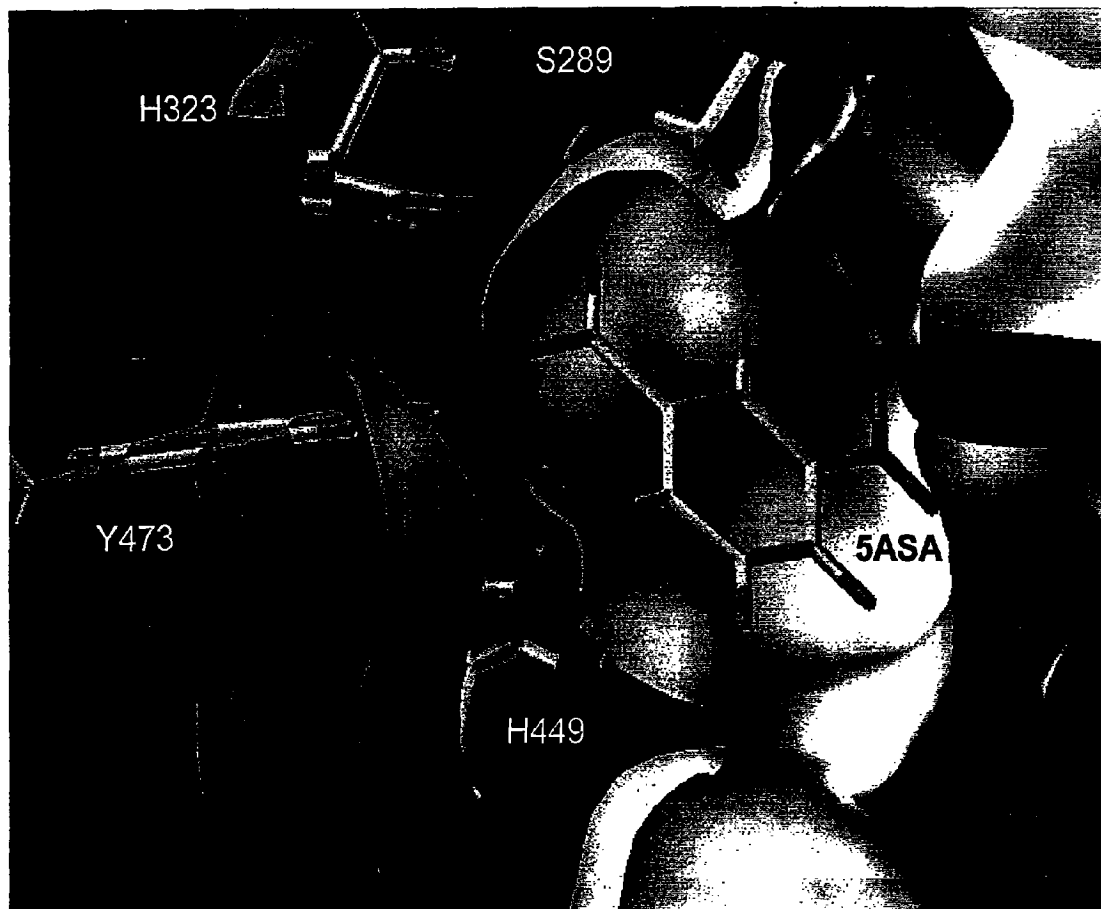


图 5B

化合物17的更详细的受体对接
(显示了氨基酸残基标记和氢键合相互作用)

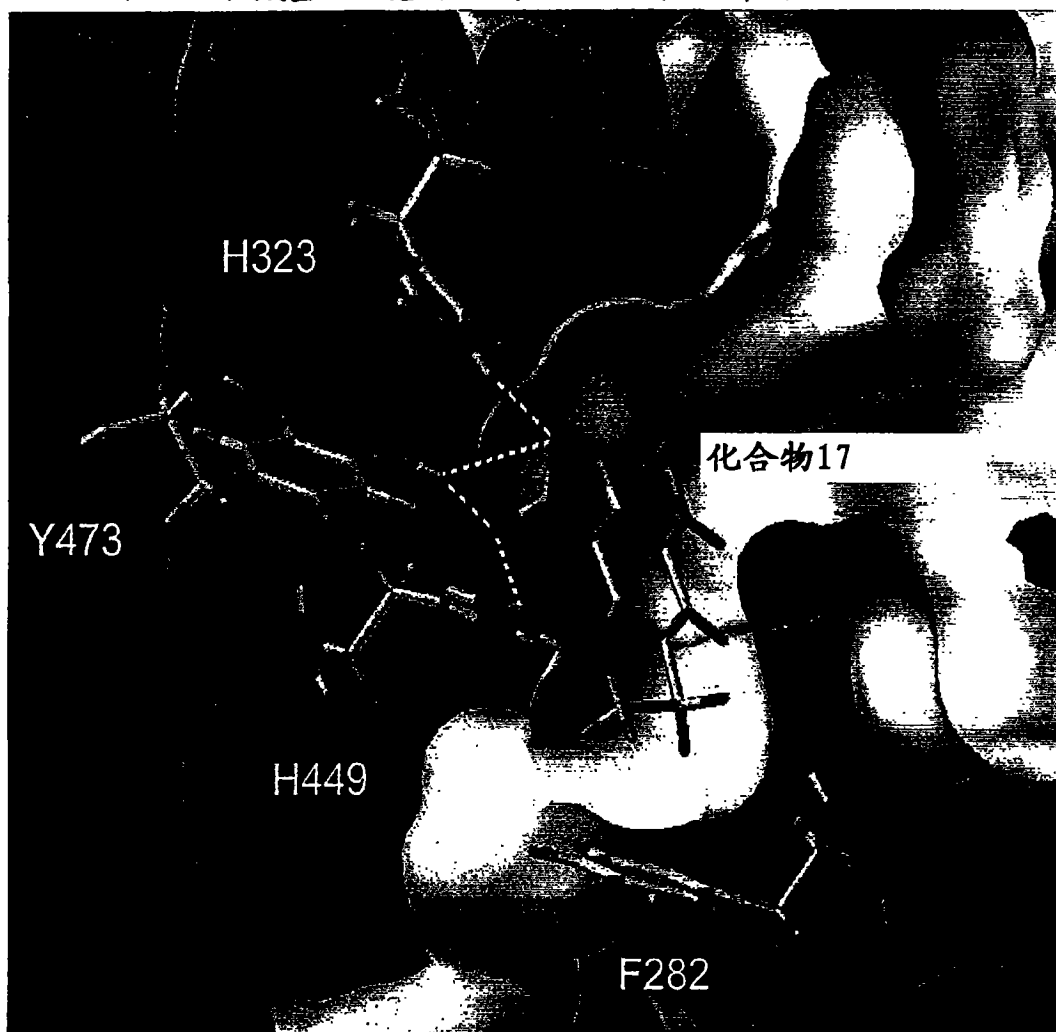


图5C

化合物31的更详细的受体对接
(显示了氨基酸残基标记和氢键合相互作用)

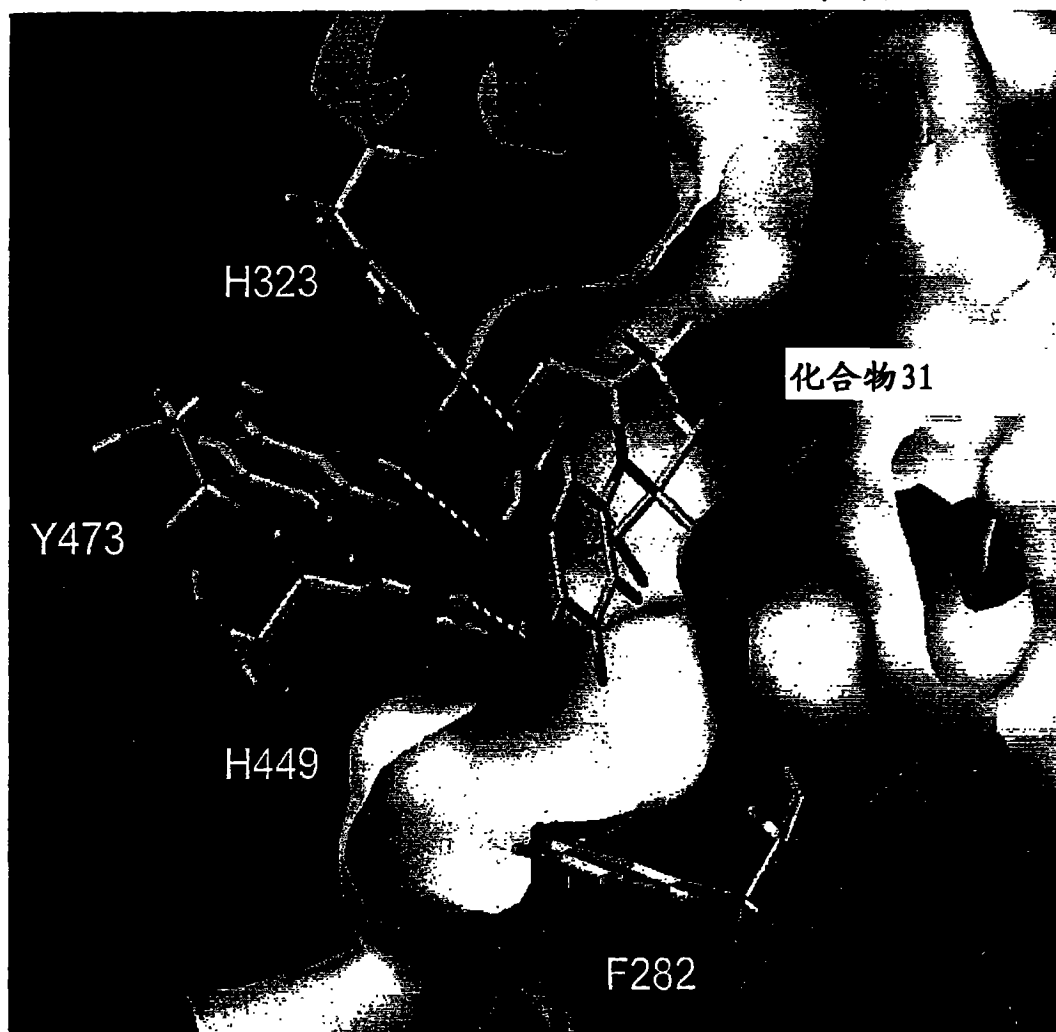


图 5D

与 30 mM 5-ASA相比, 1 mM化合物13, 14, 17, 26, 28, 31和38,
在转染的HT-29细胞中PPAR γ 活性的分析

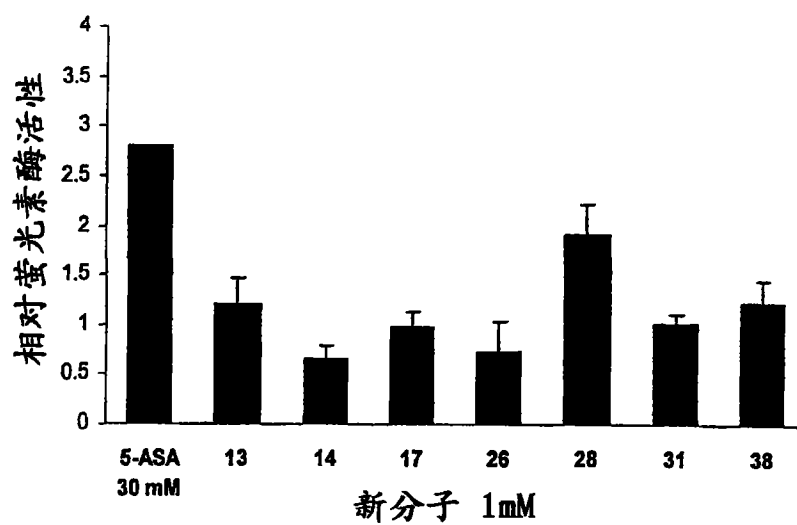


图6

用0.5-10 mM新化合物13, 14, 31和38处理48小时后,
HT29, HT115和DLD1人结肠癌细胞系的增殖

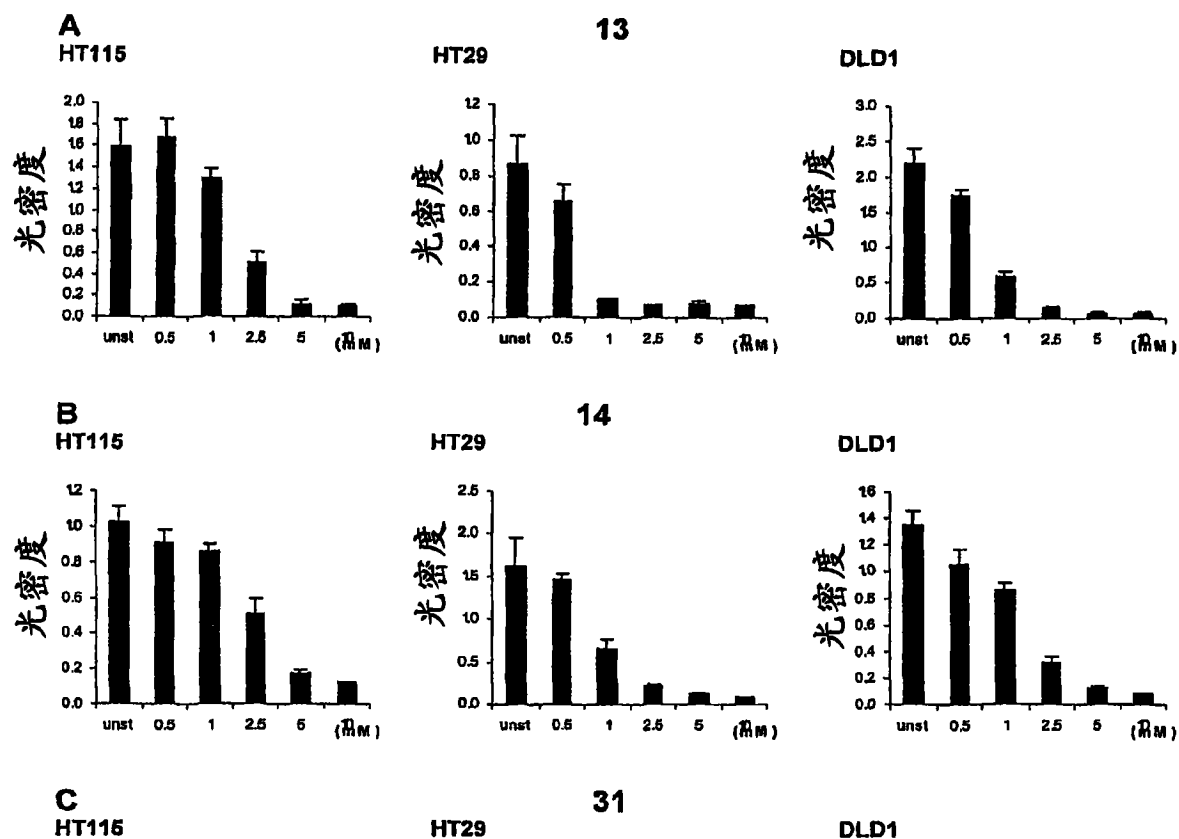


图7

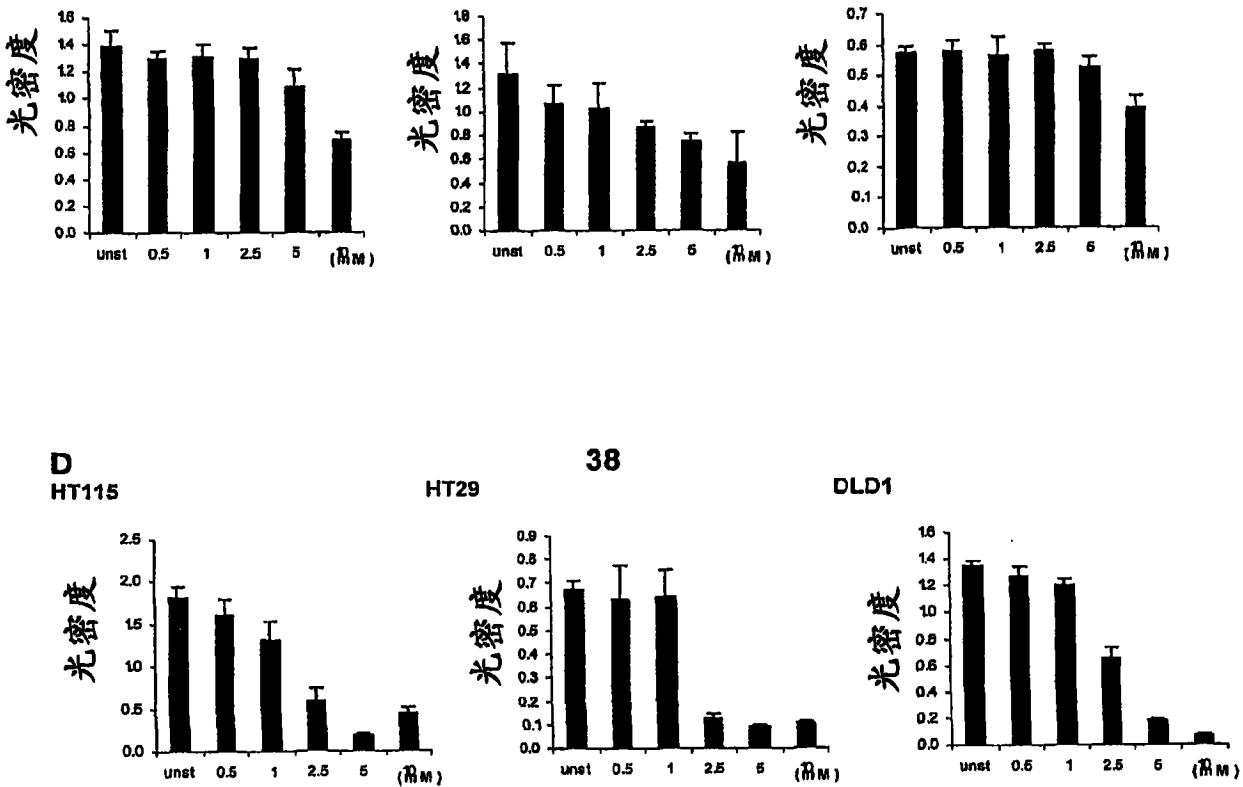


图7 (续)

用0.5-10 mM新化合物17, 28处理48小时后,
HT29, HT115和DLD1人结肠癌细胞系的增殖

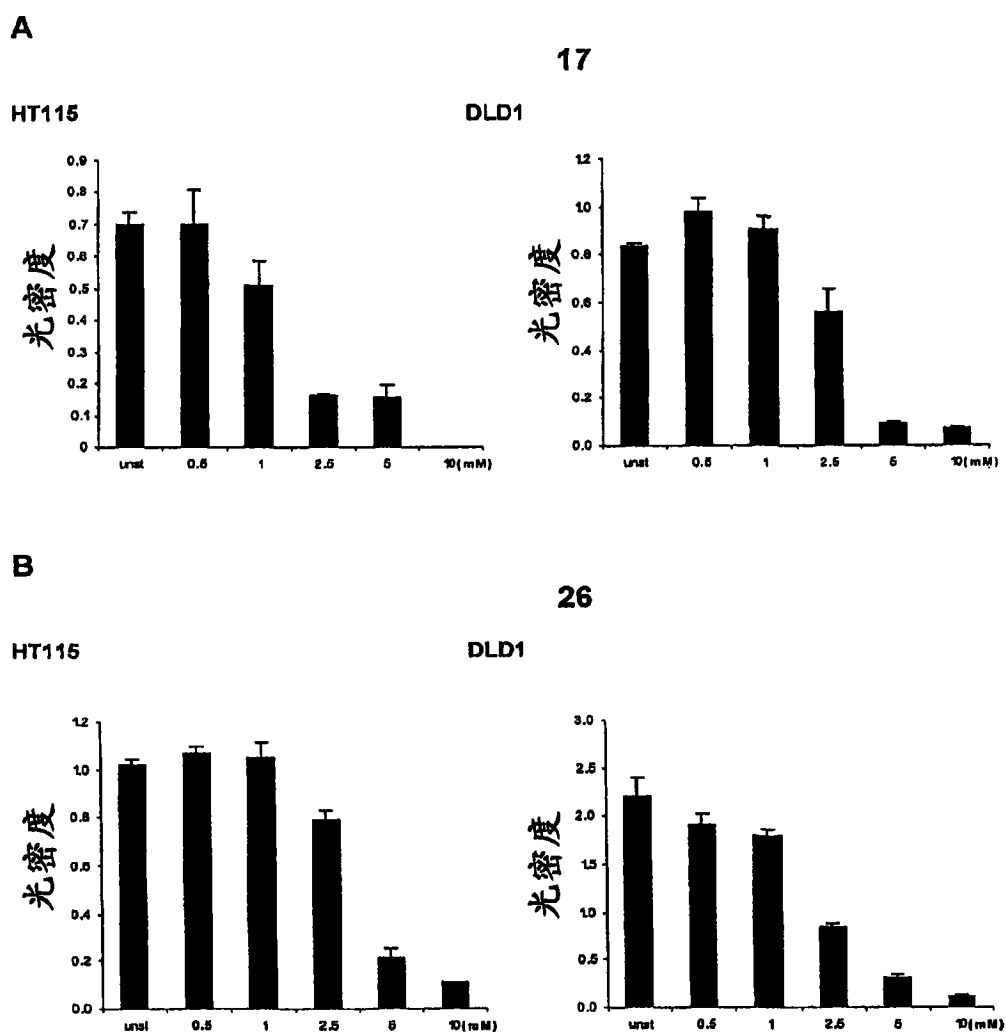


图 8

化合物14对DLD-1细胞增殖的
抑制作用的细胞计量分析

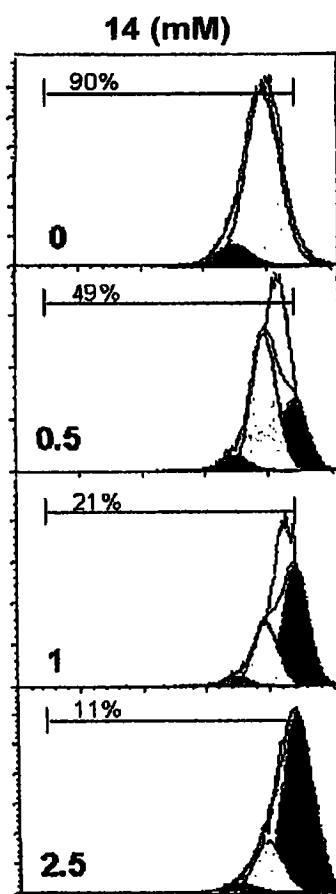


图9

图10A: 在0.75, 1.5和3 mM浓度下, 化合物14增加DLD1细胞死亡

图10B: 化合物14对DLD-1细胞死亡的作用的逆转

