

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03823464.5

[51] Int. Cl.

C07D 403/06 (2006.01)

C07D 405/12 (2006.01)

C07D 401/12 (2006.01)

C07D 409/12 (2006.01)

C07D 403/12 (2006.01)

C07D 487/04 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 9 月 16 日

[11] 授权公告号 CN 100540548C

[51] Int. Cl. (续)

A61K 31/496 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[22] 申请日 2003.8.1 [21] 申请号 03823464.5

[30] 优先权

[32] 2002.8.2 [33] US [31] 60/401,074

[32] 2002.9.16 [33] US [31] 60/411,128

[32] 2003.2.24 [33] US [31] 60/450,063

[86] 国际申请 PCT/US2003/024232 2003.8.1

[87] 国际公布 WO2004/054498 英 2004.7.1

[85] 进入国家阶段日期 2005.3.31

[73] 专利权人 尼瑞斯药品公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 林良雄 珍妮弗·格罗得伯格

迈克尔·帕拉迪诺

[56] 参考文献

JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY. Y. HAYAH ET AL. ; 8402. 8405, Total synthesis of anti. microtubule diketopiperazinederivatives: Phenylahistin and Aurantiamine. . 2000

审查员 胡 振

[74] 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限公司

代理人 王达佐 韩克飞

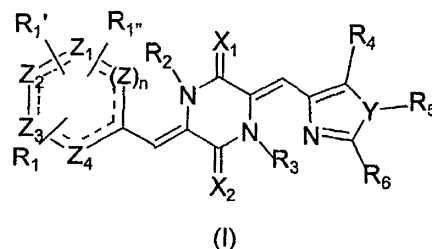
权利要求书 9 页 说明书 120 页 附图 29 页

[54] 发明名称

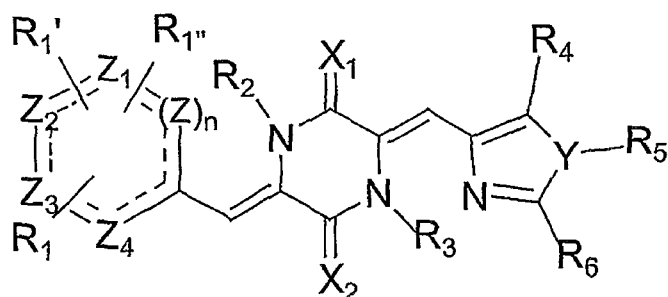
脱氢苯基阿夕斯丁及其类似物以及脱氢苯基阿夕斯丁及其类似物的合成

[57] 摘要

本发明公开了结构式(I)所示的化合物及其制备方法: 其中所述方法包括: 将二酰基哌嗪二酮与第一醛反应制备中间体化合物; 及将该中间体化合物与第二醛反应制备具有所述通式结构的化合物, 其中所述第一醛和第二醛选自噁唑甲醛、咪唑甲醛、苯甲醛、咪唑甲醛衍生物和苯甲醛衍生物, 从而形成上述化合物, 其中 R_1 、 R_1' 、 R_1'' 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 和 R_6 , X_1 和 X_2 , Y、Z、 Z_1 、 Z_2 、 Z_3 和 Z_4 的定义分别与说明书中一致。 本发明还公开了治疗癌症和真菌感染的组合物及方法。



1. 一种合成制备具有式(I)结构的化合物的方法:



其中

R_1 选自氢原子、卤原子和取代的或未取代的饱和的 C_1 - C_{24} 烷基、取代的或未取代的不饱和的 C_2 - C_{24} 烯基、 C_5 - C_{12} 环烷基、 C_5 - C_{12} 环烯基、取代的或未取代的 C_1 - C_6 烷氧基、 C_5 - C_{12} 环烷氧基、氨基、取代的氨基、硝基、取代的硝基、羟基、氰基、 C_1 - C_6 烷硫基以及包括多卤代 C_1 - C_6 烷基在内的卤代 C_1 - C_6 烷基;

R_4 为叔丁基;

R^6 为氢;

R_1' 和 R_1'' 独立地选自氢原子、卤原子和取代的或未取代的饱和 C_1 - C_{24} 烷基、取代的或未取代的不饱和的 C_2 - C_{24} 烯基、 C_5 - C_{12} 环烷基、 C_5 - C_{12} 环烯基、取代的或未取代的 C_1 - C_6 烷氧基、 C_5 - C_{12} 环烷氧基、氨基、取代的氨基、硝基、取代的硝基、羟基、氰基、 C_1 - C_6 烷硫基以及包括多卤代 C_1 - C_6 烷基在内的卤代 C_1 - C_6 烷基;

R_1 、 R_1' 和 R_1'' 或者彼此通过共价键结合形成环或者彼此无共价结合;

R_2 、 R_3 和 R_5 均为氢;

X_1 和 X_2 均为氧;

Y 为氮;

n 为等于 0 或 1 的整数;

非零 n 对应的每一 Z 及 Z_1 、 Z_2 、 Z_3 和 Z_4 分别选自碳原子、硫原子、

氮原子或氧原子；及

虚线表示的键可以是单键或双键；

其中当任何基团被标示为“取代的或未取代的”时，所述基团可任选地被选自下列基团的取代基取代：C₁-C₆烷氧基、C₅-C₁₂环烷基、C₅-C₁₂环烯基、氨基、氰基、卤素、羟基、羰基、硫羰基、C₁-C₆硫代烷氧基、硝基、-SO- C₁-C₆烷基以及-SO₂- C₁-C₆烷基；

所述方法包括：

将二酰基吡嗪二酮与第一醛反应制备中间体化合物；及

将所述中间体化合物与第二醛反应制备所述化合物，其中所述第一醛和第二醛选自噁唑甲醛、咪唑甲醛、苯甲醛、咪唑甲醛衍生物和苯甲醛衍生物，从而形成所述化合物。

2. 如权利要求1所述的方法，其中所述第一醛为咪唑甲醛。

3 如权利要求1所述的方法，其中所述第二醛为苯甲醛。

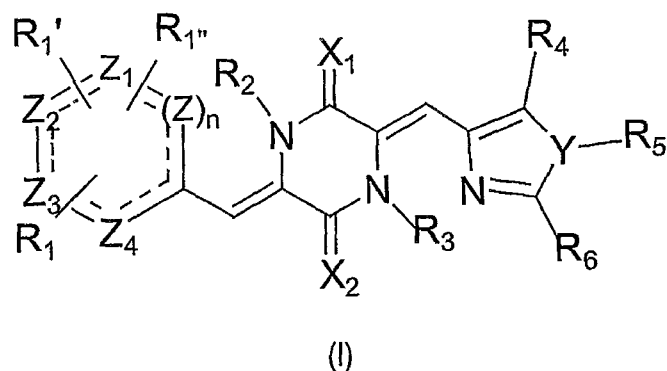
4. 如权利要求1所述的方法，其中所述第一醛为苯甲醛。

5. 如权利要求1所述的方法，其中所述第二醛为咪唑甲醛。

6. 如权利要求1所述的方法，其中 n 等于 1。

7. 如权利要求1所述的方法，其中 n 等于 1 且 Z、Z₁、Z₂、Z₃ 和 Z₄ 均为碳原子。

8. 具有式(I)结构的化合物：



其中

R_1 选自氢原子、卤原子和取代的或未取代的饱和的 C_1 - C_{24} 烷基、取代的或未取代的不饱和的 C_2 - C_{24} 烯基、 C_5 - C_{12} 环烷基、 C_5 - C_{12} 环烯基、取代的或未取代的 C_1 - C_6 烷氧基、 C_5 - C_{12} 环烷氧基、氨基、取代的氨基、硝基、取代的硝基、羧基、氰基、 C_1 - C_6 烷硫基以及包括多卤代 C_1 - C_6 烷基在内的卤代 C_1 - C_6 烷基；

R_4 为叔丁基；

R^6 为氢；

R_1' 和 R_1'' 独立地选自氢原子、卤原子和取代的或未取代的饱和 C_1 - C_{24} 烷基、取代的或未取代的不饱和的 C_2 - C_{24} 烯基、 C_5 - C_{12} 环烷基、 C_5 - C_{12} 环烯基、取代的或未取代的 C_1 - C_6 烷氧基、 C_5 - C_{12} 环烷氧基、氨基、取代的氨基、硝基、取代的硝基、羧基、氰基、 C_1 - C_6 烷硫基以及包括多卤代 C_1 - C_6 烷基在内的卤代 C_1 - C_6 烷基；

R_1 、 R_1' 和 R_1'' 或者彼此通过共价键结合或者彼此无共价结合；

R_2 、 R_3 和 R_5 均为氢；

X_1 和 X_2 均为氧；

Y 为氮；

n 为等于 0 或 1 的整数；

非零 n 对应的每一 Z 及 Z_1 、 Z_2 、 Z_3 和 Z_4 分别选自碳原子、硫原子、氮原子或氧原子；及

虚线表示的键可以是单键或双键；

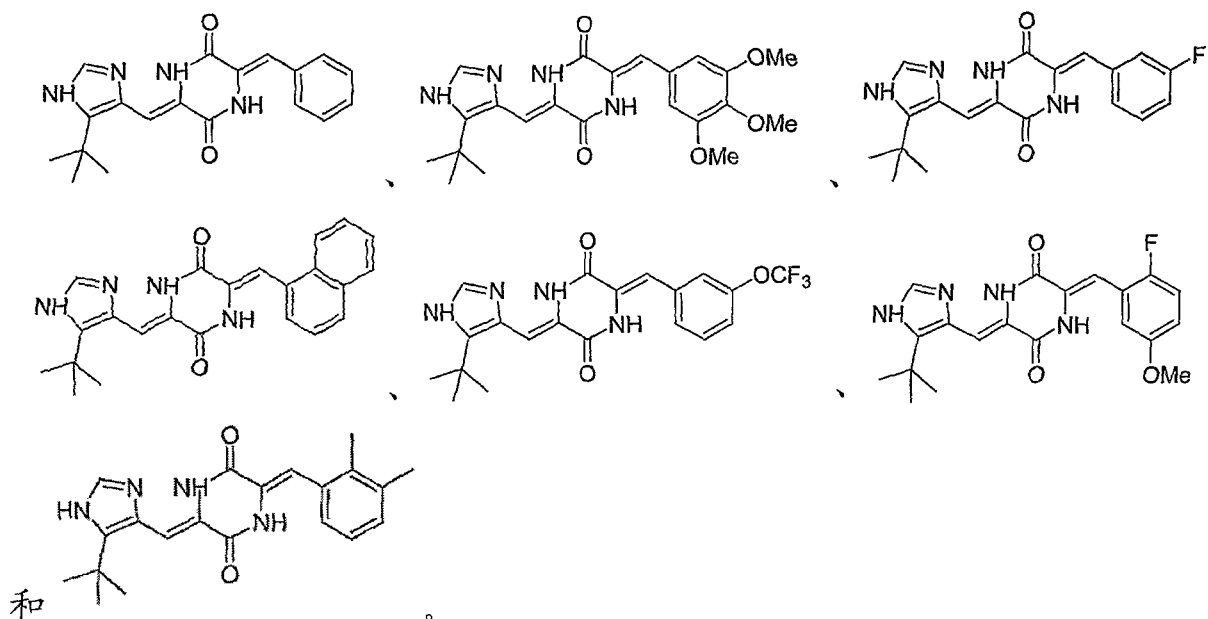
其中当任何基团被标示为“取代的或未取代的”时，所述基团可任

选地被选自下列基团的取代基取代： C_1 - C_6 烷氧基、 C_5 - C_{12} 环烷基、 C_5 - C_{12} 环烯基、氨基、氰基、卤素、羟基、羰基、硫羟基、 C_1 - C_6 硫代烷氧基、硝基、-SO- C_1 - C_6 烷基以及-SO₂- C_1 - C_6 烷基。

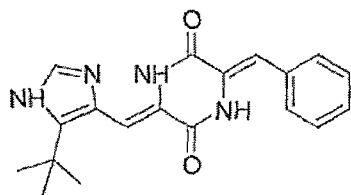
9. 如权利要求 8 所述的化合物，其中 n 等于 1。

10. 如权利要求 8 所述的化合物，其中 n 等于 1 且 Z 、 Z_1 、 Z_2 、 Z_3 和 Z_4 均为碳原子。

11. 如权利要求 8 所述的化合物，其中所述化合物选自：

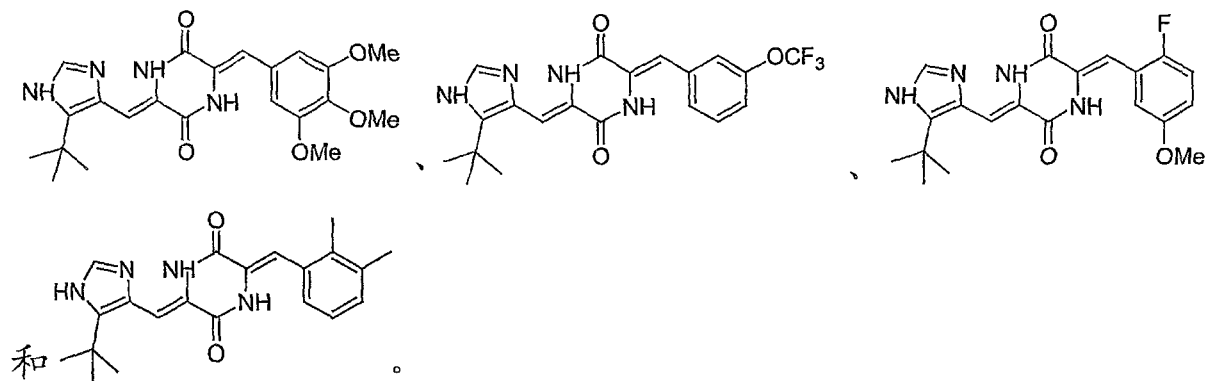


12. 如权利要求 8 所述的化合物，其中所述化合物是：

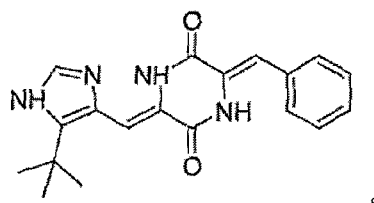


13. 药物组合物，包括权利要求 8 所述的化合物和药物可接受的载体。

14. 如权利要求 13 所述的药物组合物，其中所述化合物选自：



15. 如权利要求 13 所述的药物组合物，其中所述化合物是：

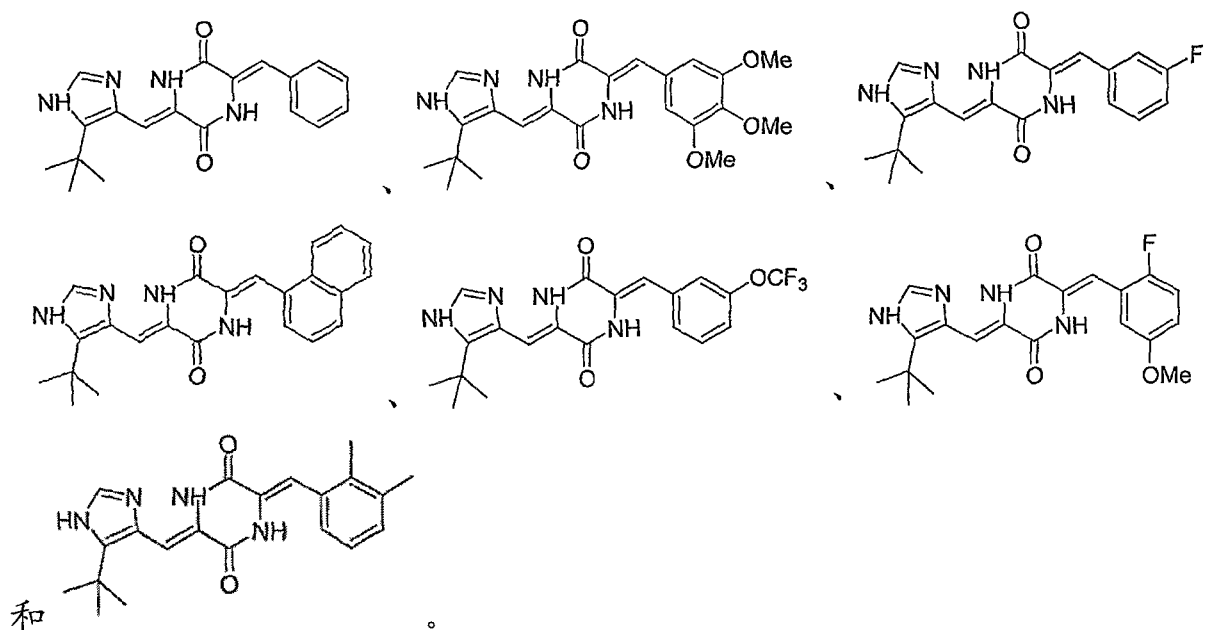


16. 如权利要求 13 所述的药物组合物，其中所述化合物具有细胞毒素活性。

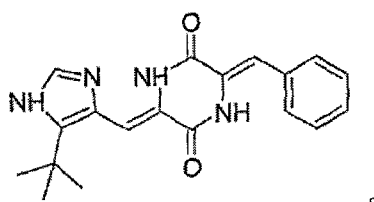
17. 如权利要求 13 所述的药物组合物，其中所述化合物是细胞循环抑制剂。

18. 治疗或预防真菌感染的药物组合物，包括抗真菌有效剂量的权利要求 8 所述的化合物以及药物可接受的载体。

19. 如权利要求 18 所述的药物组合物，其中所述化合物选自：

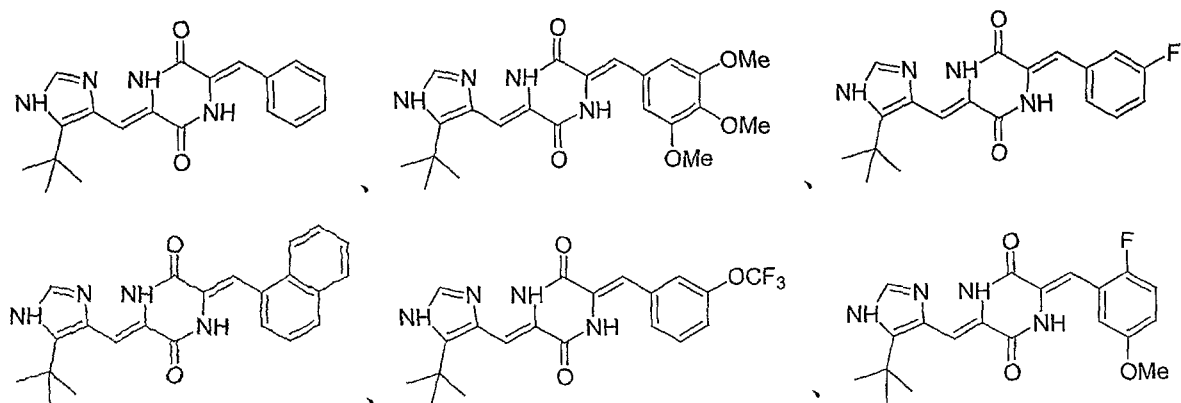


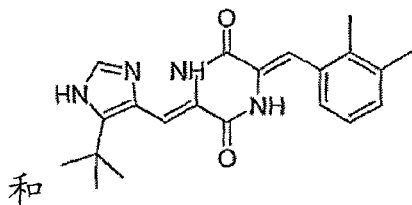
20. 如权利要求 18 所述的药物组合物，其中所述化合物是：



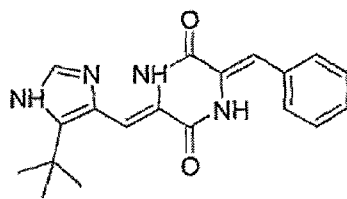
21. 用于治疗或预防肿瘤的药物组合物，包括药物有效剂量的权利要求 8 所述的化合物以及药物可接受的载体。

22. 如权利要求 21 所述的药物组合物，其中所述化合物选自：





23. 如权利要求 21 所述的药物组合物, 其中所述化合物是:



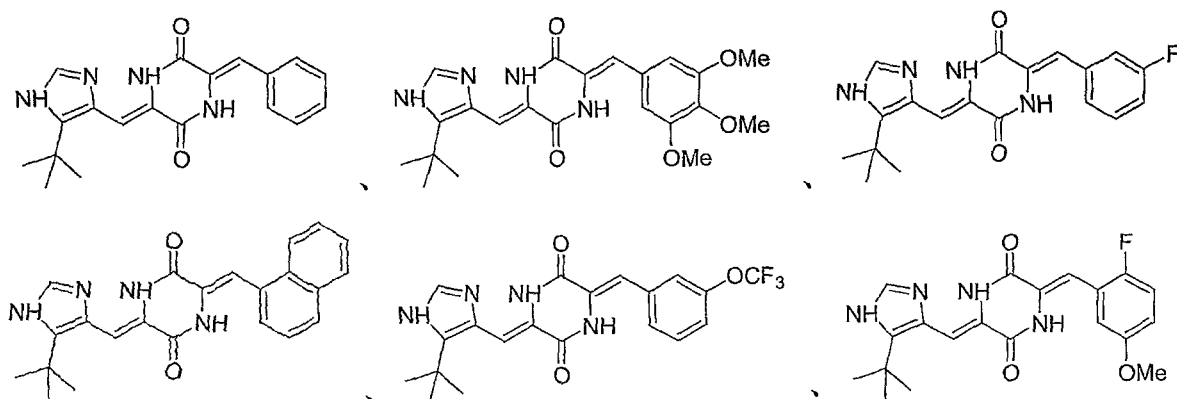
24. 权利要求 13 所述的组合物在制备用于治疗哺乳动物的疾病状态的药物中的用途。

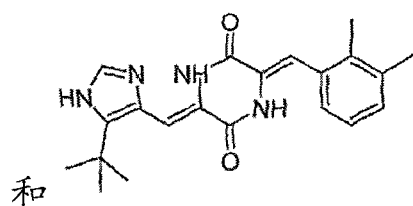
25. 如权利要求 24 所述的用途, 其中所述疾病状态是肿瘤。

26. 如权利要求 24 所述的用途, 其中所述疾病状态是真菌感染。

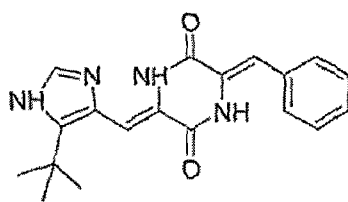
27. 权利要求 8 所述的化合物在制备用于治疗 and/或预防患有至少一种真菌感染的哺乳动物的至少一种真菌感染的药物中的用途。

28. 如权利要求 27 所述的用途, 其中所述化合物选自:



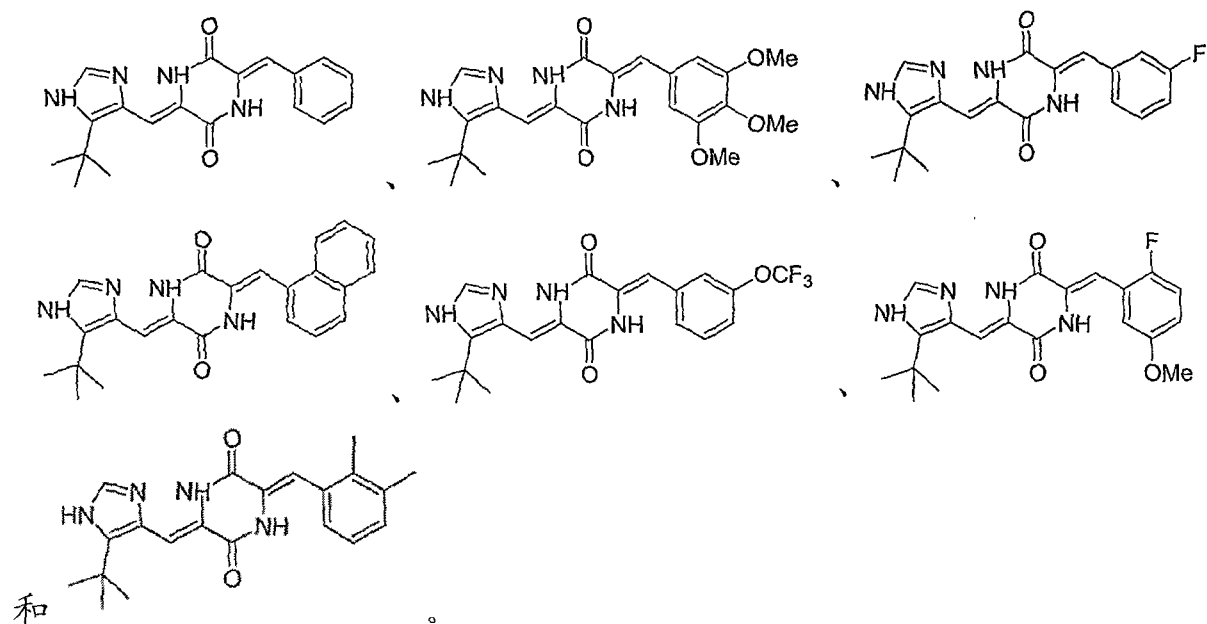


29. 如权利要求 27 所述的用途，其中所述化合物是：

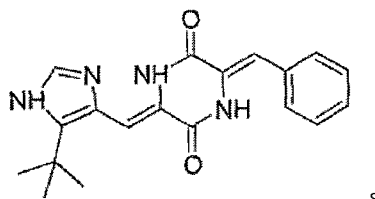


30. 权利要求 8 所述的化合物在制备用于治疗 and/或预防患有癌症的哺乳动物的癌症的药物中的用途。

31. 如权利要求 30 所述的用途，其中所述化合物选自：



32. 如权利要求 30 所述的用途，其中所述化合物是：



脱氢苯基阿夕斯丁及其类似物以及脱氢苯基阿夕斯丁及其类似物的合成

技术背景

技术领域

本发明涉及化学和医药领域的化合物及合成制备方法。更具体地，本发明涉及用于治疗癌症和真菌感染的化合物和制备这类化合物的方法。

相关领域的概述

研究者认为存在单一、通用的控制真核细胞循环过程的调节的细胞机理。参见，例如 Hartwell, L.H.等, Science (1989), 246:629-34。同时，已知当细胞循环的控制机理中出现异常时，就可能产生癌症或免疫紊乱。因此，正如已知的，抗肿瘤试剂和免疫抑制剂可以是调节细胞循环的物质。因此，需要制备真核细胞循环抑制剂(作为抗肿瘤和增强免疫的化合物)的新方法，且这些抑制剂可作为化疗、抗肿瘤试剂用于治疗人类癌症。参见，例如 Roberge, M.等, Cancer Res. (1994), 54,6115-21。

真菌，特别是病原体真菌及相关感染对临床医学的挑战日益增加。现有的抗真菌剂效果有限且有毒性，而对现有药物或开发中的药物具有耐药性的病原体真菌菌株却不断发展和/或被发现。例如，除其它外可在人体中致病的真菌包括：念珠菌属(*Candida* spp.)，包括白色念珠菌(*C. albicans*)、热带念珠菌(*C. tropicalis*)、乳酒念珠菌(*C. kefyr*)、克鲁斯氏念珠菌(*C. krusei*)和光滑念珠菌(*C. glabrata*)；曲霉属(*Aspergillus* spp.)，包括烟曲霉(*A. fumigatus*)和黄曲霉(*A. flavus*)；新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)；芽生菌(*Blastomyces* spp.)，包括皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatitidis*)；卡氏肺囊虫(*Pneumocystis carinii*)；粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*)；蛙生蛙粪霉(*Basidiobolus ranarum*)；耳霉属(*Conidiobolus* spp.)；荚膜组织胞浆菌(*Histoplasma capsulatum*)；根霉菌属(*Rhizopus* spp.)，例如米根霉(*R. oryzae*)和小孢根霉(*R. microsporus*)；小克银汉霉属

(*Cunninghamella* spp.); 根粘菌属(*Rhizomucor* spp.); 巴西芽生菌(*Paracoccidioides brasiliensis*); 波氏足肿菌(*Pseudallescheria boydii*); 西伯氏鼻孢子虫(*Rhinosporidium seeberi*)和申克氏孢子丝菌病(*Sporothrix schenckii*) (Kwon-Chung, K.J. & Bennett, J.E. 1992 *Medical Mycology*, Lea and Febiger, Malvern, PA)。

近来, 据报道 tryprostatin A 和 B (其为由脯氨酸和异戊二烯化(isoprenylated)的色氨酸残基组成的哌嗪二酮)和五种其它的结构相关的哌嗪二酮抑制了有丝分裂期(M phase)中的细胞循环的进行, 参见 Cui, C. 等 1996 *J Antibiotics* 49:527-33; Cui, C.等 1996 *J Antibiotics* 49:534-40, 且这些化合物也影响了微管组装, 参见 Usui, T.等 1998 *Biochem J* 333:543-48; Kondon, M.等 1998 *J Antibiotics* 51:801-04。此外, 已报道有天然和合成化合物可通过与微管蛋白上的秋水仙碱结合位点(CLC-位点)结合抑制有丝分裂, 从而抑制真核细胞循环, 其中所述微管蛋白是一种由两个 50 kDa 亚基(和微管蛋白)组成的大分子并且是微管的主要构成成分。参见, 例如 Iwasaki, S., 1993 *Med Res Rev* 13:183-198; Hamel, E. 1996 *Med Res Rev* 16:207-31; Weisenberg, R.C.等, 1969 *Biochemistry* 7:4466-79。微管被认为参与了多种基本的细胞功能, 例如轴突转运、细胞运动以及细胞形态的确定。因此, 微管功能抑制剂可具有广泛的生物活性, 且可用于医药和农用化学品目的。也有可能, 秋水仙碱(CLC)位点配体可被证明具有作为真核细胞循环抑制剂的价值, 并因此可用作化疗试剂, 其中所述配体如 CLC、五加前胡素(参见 Kupchan, S.M.等, 1973 *J Am Chem Soc* 95:1335-36)、鬼臼毒素(参见 Sackett, D.L., 1993 *Pharmacol Ther* 59:163-228)和 combretastatin(康布瑞塔卡汀)(参见 Pettit, G.R.等 1995 *J Med Chem* 38:166-67)。

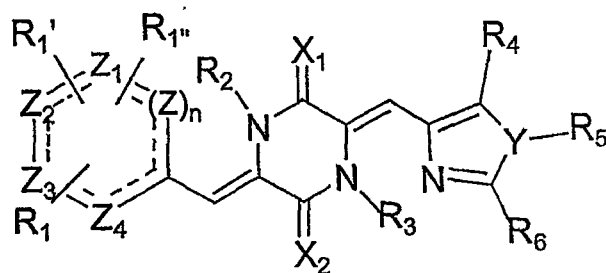
虽然已经从各种真菌中分离出哌嗪二酮型代谢产物作为霉菌毒素(参见 Horak R.M.等, 1981 *JCS Chem Comm* 1265-67; Ali M.等, 1998 *Toxicology Letters* 48:235-41)或作为次级代谢产物(参见 Smedsgaard J.等, 1996 *J Microbiol Meth* 25:5-17), 但对这种哌嗪二酮型代谢产物或其衍生物的具体结构及其抗肿瘤活性特别是体内活性所知甚少。这些化合物不仅已经作为霉菌毒素被分离出来, 并且 Hayashi 等在 *J. Org. Chem.* (2000)

65,第 8402 页上还描述了一种哌嗪二酮型代谢产物—苯基阿夕斯丁(phenylahistin)的化学合成方法。本领域中,通过对母体苯基阿夕斯丁进行酶催化脱氢制备了一种这类哌嗪二酮型代谢产物的衍生物—脱氢苯基阿夕斯丁。随着癌症发生率的上升,迫切需要通过化学方法制备一类基本纯净的、具有动物细胞特异增殖抑制活性和高抗肿瘤活性及选择性的哌嗪二酮型代谢产物衍生物。因此,迫切需要一种有效的、通过合成制备基本纯净的、具有结构和生物学特性的哌嗪二酮型代谢产物衍生物。

同时,国际公开号为 WO/0153290 的 PCT 申请(2001 年 7 月 26 日)描述了一种通过将苯基阿夕斯丁或特定的苯基阿夕斯丁类似物暴露于从白色链霉菌(*Streptomyces albulus*)获得的脱氢酶来制备脱氢苯基阿夕斯丁的非合成方法。

发明内容

本发明公开了一类具有式(I)结构的化合物以及通过合成生产这类化合物的方法:



(I)

所公开的化合物具有式(I)的结构, 其中:

每一 R_1 、 R_4 和 R_6 分别选自氢原子、卤原子和饱和的 C_1 - C_{24} 烷基、不饱和的 C_1 - C_{24} 烯基、环烷基、环烯基、烷氧基、环烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、氨基、取代的氨基、硝基、叠氮基、取代的硝基、苯基及取代的苯基基团、羟基、羧基、 $-COO-R_7$ 、氰基、烷硫基、卤代烷基包括多卤代烷基、卤代羰基以及羰基- $CCO-R_7$, 其中 R_7

选自氢原子、卤原子和饱和 C_1 - C_{24} 烷基、不饱和的 C_1 - C_{24} 烯基、环烷基、环烯基、烷氧基、环烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、氨基、取代的氨基、硝基、叠氮基、取代的硝基、苯基和取代的苯基基团；

R_1' 和 R_1'' 独立地选自氢原子、卤原子和饱和 C_1 - C_{24} 烷基、不饱和的 C_1 - C_{24} 烯基、环烷基、环烯基、烷氧基、环烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、氨基、取代的氨基、硝基、叠氮基、取代的硝基、苯基及取代的苯基基团、羟基、羧基、 $-COO-R_7$ 、氰基、烷硫基、卤代烷基包括多卤代烷基、卤代羰基以及羰基- $CCO-R_7$ ，其中 R_7 选自氢原子、卤原子和饱和 C_1 - C_{24} 烷基、不饱和的 C_1 - C_{24} 烯基、环烷基、环烯基、烷氧基、环烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、氨基、取代的氨基、硝基、叠氮基、取代的硝基、苯基和取代的苯基基团；

每一 R_2 、 R_3 和 R_5 分别选自氢原子、卤原子和饱和的 C_1 - C_{12} 烷基、不饱和的 C_1 - C_{12} 烯基、酰基、环烷基、烷氧基、环烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、氨基、取代的氨基、硝基和取代的硝基基团、磺酰基和取代的磺酰基基团；

X_1 和 X_2 分别选自氧原子、氮原子和硫原子，且均可为未取代的或被如上定义的 R_5 基团所取代；

Y 选自氮原子、被上述 R_5 基团取代的氮原子、氧原子、硫原子、氧化的硫原子、亚甲基基团及取代的亚甲基基团；

n 为等于 0、1 或 2 的整数；

非零 n 对应的每一 Z 和 Z_1 、 Z_2 、 Z_3 和 Z_4 分别独立地选自碳原子、硫原子、氮原子或氧原子；及

虚线表示的键可以是单键或双键；

在特定的化合物中需满足，如果 R_1 、 R_1' 、 R_2 、 R_3 、 R_5 和 R_6 均为氢原子，则 X_1 和 X_2 不能均为氧原子，且 R_4 不能为 3,3-二甲基-1-丁烯或氢原子。

所述方法包括如下步骤：

将二酰基哌嗪二酮与第一醛反应制备中间体化合物；及

将所述中间体化合物与第二醛反应制备具有所述通式结构的一类化

合物，其中：

所述第一醛和第二醛选自噁唑甲醛(oxazolecarboxaldehyde)、咪唑甲醛、苯甲醛、咪唑甲醛衍生物和苯甲醛衍生物，从而形成化合物，其中，所公开的化合物具有式(I)的结构，其中：

每一 R_1 、 R_4 和 R_6 分别选自氢原子、卤原子和饱和的 C_1 - C_{24} 烷基、不饱和的 C_1 - C_{24} 烯基、环烷基、环烯基、烷氧基、环烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、氨基、取代的氨基、硝基、叠氮基、取代的硝基、苯基及取代的苯基基团、羟基、羧基、 $-COO-R_7$ 、氰基、烷硫基、卤代烷基包括多卤代烷基、卤代羰基以及羰基- $CCO-R_7$ ，其中 R_7 选自氢原子、卤原子和饱和 C_1 - C_{24} 烷基、不饱和的 C_1 - C_{24} 烯基、环烷基、环烯基、烷氧基、环烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、氨基、取代的氨基、硝基、叠氮基、取代的硝基、苯基和取代的苯基基团；

R_1' 和 R_1'' 独立地选自氢原子、卤原子和饱和 C_1 - C_{24} 烷基、不饱和的 C_1 - C_{24} 烯基、环烷基、环烯基、烷氧基、环烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、氨基、取代的氨基、硝基、叠氮基、取代的硝基、苯基及取代的苯基基团、羟基、羧基、 $-COO-R_7$ 、氰基、烷硫基、卤代烷基包括多卤代烷基、卤代羰基以及羰基- $CCO-R_7$ ，其中 R_7 选自氢原子、卤原子和饱和 C_1 - C_{24} 烷基、不饱和的 C_1 - C_{24} 烯基、环烷基、环烯基、烷氧基、环烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、氨基、取代的氨基、硝基、叠氮基、取代的硝基、苯基和取代的苯基基团；

每一 R_2 、 R_3 和 R_5 分别选自氢原子、卤原子和饱和的 C_1 - C_{12} 烷基、不饱和的 C_1 - C_{12} 烯基、酰基、环烷基、烷氧基、环烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、氨基、取代的氨基、硝基和取代的硝基基团、磺酰基和取代的磺酰基基团；

X_1 和 X_2 分别选自氧原子、氮原子和硫原子，且均可为未取代的或被如上定义的 R_5 基团所取代；

Y 选自氮原子、被上述 R_5 基团取代的氮原子、氧原子、硫原子、氧化的硫原子、亚甲基基团及取代的亚甲基基团；

n 为等于 0、1 或 2 的整数；

非零 n 对应的每一 Z 和 Z_1 、 Z_2 、 Z_3 和 Z_4 分别选自碳原子、硫原子、氮原子或氧原子；及

虚线表示的键可以是单键或双键。

在本发明化合物和方法的优选实施方案中，所述咪唑甲醛为 5-(1,1-二甲基-2-乙基)咪唑-4-甲醛，且所述苯甲醛包含单独的甲氧基基团。本发明化合物的其它优选实施方案包括具有叔丁基基团、二甲氧基基团、氯基团和甲基噻吩基团的化合物和制备这些化合物的方法，以及表 2、3 和 4 中所示的化合物及制备这些化合物的方法。

本发明还公开了治疗肿瘤组织或预防癌症或病原真菌感染的方法和物质。这些方法和物质特别适用于治疗哺乳动物个体，更特别适用于人类，并且包括将所述个体脱氢苯基阿夕斯丁或其类似物给药。所述方法包括给予个体包括有效抗肿瘤或抗真菌剂量的脱氢阿夕斯丁或其类似物的组合物。

附图的简要说明

本说明书引入并构成其一部分的附图只是为了说明本发明的某些优选实施方案。其与说明书的其它部分共同用来向本领域所属技术人员说明制备本发明某些化合物的优选方式。在所述附图中：

图 1 所示为制备脱氢苯基阿夕斯丁的反应路线图，包括将二酰基哌嗪二酮 1 与咪唑甲醛 2 反应制备中间体化合物 3，再将中间体化合物 3 与苯甲醛 4 反应得到脱氢苯基阿夕斯丁。

图 2 所示为合成脱氢苯基阿夕斯丁粗产物的 HPLC 谱图。

图 3 所示为制备脱氢苯基阿夕斯丁的反应路线图，包括将二酰基哌嗪二酮 1 与苯甲醛 4 反应制备中间体化合物 17，再将中间体化合物 17 与咪唑甲醛 15 反应得到脱氢苯基阿夕斯丁。

图 4 所示为由路线 A 和 B 制备的合成叔丁基-脱氢苯基阿夕斯丁粗产物的 HPLC 谱图。

图 5 显示了对脱氢 PLH 进行修饰使其具有有效细胞毒素活性的两种策略。

图 6 显示了脱氢 PLH 在苯基部分的推定活性构象。

图 7 苯基阿夕斯丁的 Cytochrome P450 代谢。

图 8 所示为叔丁基-脱氢 PLH 的 Z-E 转变。

图 9 显示了酰基-E-叔丁基-脱氢 PLH 的合成和前药的图像。

图 10 显示了 3-Z-亚苄基-6-[5''-(1,1-二甲基烯丙基)-1H-咪唑-4''-Z-基-亚甲基]-哌嗪-2,5-二酮的温度梯度。

图 11 显示了 3-Z-亚苄基-6-[5''-叔丁基-1H-咪唑-4''-Z-基-亚甲基]-哌嗪-2,5-二酮的温度梯度。

图 12 显示了与秋水仙碱和紫杉醇相比, KPU-2、KPU-35 和叔丁基-苯基阿夕斯丁对 FITC-Dextran 的 HuVEC 单层透过性的作用。

图 13 显示了 KPU-2 单独或与 CPT-11 组合时对 HT-29 人体结肠肿瘤异种皮移植(HT-29 Human Colon Tumor Xenograft)模型中估计的肿瘤生长的作用。

图 14 显示了 KPU-2 单独或与 CPT-11 组合时对从 HT-29 人体结肠肿瘤异种皮移植模型中的个体小鼠尸体上切除的肿瘤重量的作用。

图 15 显示了 KPU-2 单独或与 CPT-11 组合时对 HT-29 人体结肠肿瘤异种皮移植模型中估计的肿瘤生长的作用。

图 16 显示了 KPU-2 单独或与 CPT-11 组合时对从 HT-29 人体结肠肿瘤异种皮移植模型中的个体小鼠尸体上切除的肿瘤重量的作用。

图 17 显示了 A. KPU-2、B. KPU-35 和 C. 叔丁基-苯基阿夕斯丁单独或与 CPT-11 组合时对 HT-29 人体结肠肿瘤异种皮移植模型中估计的肿瘤生长的作用。

图 18 显示了 A. KPU-2、B. KPU-35 和 C. 叔丁基-苯基阿夕斯丁单独或与 CPT-11 组合时对从 HT-29 人体结肠肿瘤异种皮移植模型中的个体小鼠尸体上切除的肿瘤重量的作用。

图 19 显示了 KPU-2 单独或与 CPT-11 组合时对 HT-29 人体结肠肿瘤异种皮移植模型中肿瘤增长的作用: 三个研究的比较。

图 20 显示了 KPU-2 单独或与 CPT-11 组合时对从 HT-29 人体结肠肿瘤异种皮移植模型中最终肿瘤重量的作用: 三个研究的比较。

图 21 显示了 KPU-2 单独或与 Taxotere 组合时对 DU-145 人体前列腺肿瘤异种皮移植模型中估计的肿瘤增长的作用。

图 22 显示了 A. KPU-2、B. KPU-35 和 C. 叔丁基-苯基阿夕斯丁单独或与 Taxotere 组合时对估计的肿瘤生长的作用，其中所述估计的肿瘤生长是在 DU-145 人体前列腺肿瘤异种皮移植(DU-145 Human Prostate Tumor Xenograft)模型存活部分进行的观测基础上得到的。

图 23 显示了 KPU-2 单独或与 Taxotere 组合时对 DU-145 人体前列腺肿瘤异种皮移植模型中从尸体上切除的个体肿瘤重量的作用。

图 24 显示了 KPU-35 单独或与 Taxotere 组合时对 DU-145 人体前列腺肿瘤异种皮移植模型中从尸体上切除的个体肿瘤重量的作用。

图 25 显示了 A. KPU-2、B. KPU-35 和 C. 叔丁基-苯基阿夕斯丁单独或与 Taxotere 组合时在 MCF-7 人体乳房肿瘤异种皮移植(MCF-7 Human Breast Tumor Xenograft)模型中的作用。

图 26 显示了 KPU-2 单独或与 Taxotere 组合时对 A549 人体肺肿瘤异种皮移植(A549 Human Lung Tumor Xenograft)模型中估计的肿瘤增长的作用。

图 27 显示了 KPU-2 单独或与 Taxotere 组合时对 A549 人体肺肿瘤异种皮移植模型中从尸体上切除的肿瘤重量的作用。

图 28 显示了 KPU-2 单独或与 Paclitaxel 组合时对移植了 MDA-231 人体乳房肿瘤模型的小鼠乳房颊脂垫中估计的肿瘤重量的作用。

图 29 显示了 A. KPU-2、B. KPU-35 和 C. 叔丁基-苯基阿夕斯丁单独或与 Paclitaxel 组合时在小鼠黑瘤 B16 F10 转移肿瘤模型(Murine Melanoma B16 F10 Metastatic Tumor Model)中的作用。

在某些附图中，所示的化合物是用可替换的名称表示的。这些可替换名称的转换的完整列表如下：

可替换的名称	此处所用的名称
NPI-2350	(-)-苯基阿夕斯丁
NPI-2352	KPU-01
NPI-2353	KPU-03
NPI-2354	KPU-04
NPI-2355	KPU-05

NPI-2356	KPU-06
NPI-2357	KPU-07
NPI-2358	KPU-02
NPI-2359	KPU-08
NPI-2360	KPU-09
NPI-2361	KPU-10
NPI-2362	KPU-11
NPI-2363	KPU-12
NPI-2364	KPU-13
NPI-2365	KPU-14
NPI-2366	KPU-15
NPI-2367	KPU-16
NPI-2368	KPU-17
NPI-2369	KPU-18
NPI-2370	KPU-19
NPI-2371	KPU-21
NPI-2372	KPU-22
NPI-2373	KPU-23
NPI-2374	KPU-24
NPI-2375	KPU-25
NPI-2376	KPU-28
NPI-2377	KPU-26
NPI-2378	KPU-27
NPI-2379	KPU-29
NPI-2380	KPU-20
NPI-2381	KPU-30
NPI-2382	KPU-31
NPI-2383	KPU-32
NPI-2384	KPU-33
NPI-2385	KPU-34

NPI-2386	KPU-35
NPI-2387	KPU-36
NPI-2388	KPU-37
NPI-2389	KPU-38
NPI-2390	KPU-39
NPI-2391	KPU-40
NPI-2392	KPU-41
NPI-2393	KPU-42
NPI-2394	KPU-43
NPI-2395	KPU-44
NPI-2396	KPU-45
NPI-2397	KPU-46
NPI-2398	KPU-47
NPI-2399	KPU-48
NPI-2400	KPU-49
NPI-2401	KPU-50
NPI-2402	KPU-51
NPI-2403	KPU-52
NPI-2404	KPU-53
NPI-2405	KPU-54
NPI-2406	KPU-55
NPI-2407	KPU-56
NPI-2408	KPU-57
NPI-2409	KPU-58
NPI-2410	KPU-59
NPI-2411	KPU-60
NPI-2412	KPU-61
NPI-2413	KPU-62
NPI-2414	KPU-63
NPI-2415	KPU-64

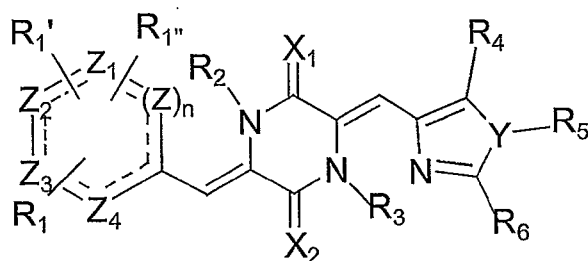
NPI-2416	KPU-65
NPI-2417	KPU-66
NPI-2418	KPU-67
NPI-2419	KPU-68
NPI-2420	KPU-69
NPI-2421	KPU-70
NPI-2422	KPU-71
NPI-2423	KPU-72
NPI-2424	KPU-73
NPI-2425	KPU-74
NPI-2426	KPU-75
NPI-2427	KPU-76
NPI-2428	KPU-77
NPI-2429	KPU-79
NPI-2430	KPU-80
NPI-2431	KPU-81
NPI-2432	KPU-82
NPI-2433	KPU-83
NPI-2434	KPU-84
NPI-2435	KPU-86
NPI-2436	KPU-87
NPI-2437	KPU-88
NPI-2438	KPU-89
NPI-2439	KPU-90
NPI-2440	KPU-91
NPI-2441	KPU-92
NPI-2442	KPU-80
NPI-2455	KPU-94
NPI-2456	KPU-95
NPI-2457	KPU-96

NPI-2458	KPU-97
NPI-2459	KPU-98
NPI-2460	叔丁基苯基阿夕斯丁

优选实施方案的详细说明

本发明提供了通过合成制备包括脱氢苯基阿夕斯丁和脱氢苯基阿夕斯丁衍生物的新型化合物的方法，还提供了以相对高的收率生产药物可接受的细胞循环抑制剂、抗肿瘤试剂和抗真菌试剂的方法，其中所述化合物和/或其衍生物属于这些细胞循环抑制剂、抗肿瘤试剂和抗真菌剂的活性成分。本发明的其它目的包括提供不能通过现有的非合成方法获得的新型化合物。本发明的目的也包括提供治疗癌症特别是人类癌症的方法，该方法包括将抑制肿瘤生长有效剂量的一类新型抗肿瘤化合物中的某些化合物给药的步骤。本发明还提供预防或治疗个体中的病原真菌的方法，包括将有效抗真菌剂量的一类新型抗真菌化合物中的某些化合物对所述个体给药，例如以可产生所需的抗真菌作用的剂量和方式将脱氢苯基阿夕斯丁或其类似物给药。这些目标在本发明公开的所述化合物以及制备和使用这类化合物的方法的优选实施方案中得以实现，而不必在本发明的所有实施方案中都实现。

本发明还公开了化合物和生产这类化合物的方法，其中所述化合物如式(I)所示：



(I)

其中:

每一 R_1 、 R_4 和 R_6 分别选自氢原子、卤原子和饱和的 C_1 - C_{24} 烷基、不饱和的 C_1 - C_{24} 烯基、环烷基、环烯基、烷氧基、环烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、氨基、取代的氨基、硝基、叠氮基、取代的硝基、苯基及取代的苯基基团、羟基、羧基、 $-\text{CO}-\text{O}-R_7$ 、氰基、烷硫基、卤代烷基包括多卤代烷基、卤代羰基以及羧基- $\text{CCO}-R_7$ ，其中 R_7 选自氢原子、卤原子和饱和 C_1 - C_{24} 烷基、不饱和的 C_1 - C_{24} 烯基、环烷基、环烯基、烷氧基、环烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、氨基、取代的氨基、硝基、叠氮基、取代的硝基、苯基和取代的苯基基团；

R_1' 和 R_1'' 独立地选自氢原子、卤原子和饱和 C_1 - C_{24} 烷基、不饱和的 C_1 - C_{24} 烯基、环烷基、环烯基、烷氧基、环烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、氨基、取代的氨基、硝基、叠氮基、取代的硝基、苯基及取代的苯基基团、羟基、羧基、 $-\text{CO}-\text{O}-R_7$ 、氰基、烷硫基、卤代烷基包括多卤代烷基、卤代羰基以及羧基- $\text{CCO}-R_7$ ，其中 R_7 选自氢原子、卤原子和饱和 C_1 - C_{24} 烷基、不饱和的 C_1 - C_{24} 烯基、环烷基、环烯基、烷氧基、环烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、氨基、取代的氨基、硝基、叠氮基、取代的硝基、苯基和取代的苯基基团；

R 、 R_1' 和 R_1'' 或者是共价结合的或者不是共价结合的；

每一 R_2 、 R_3 和 R_5 分别选自氢原子、卤原子和饱和的 C_1 - C_{12} 烷基、不饱和的 C_1 - C_{12} 烯基、酰基、环烷基、烷氧基、环烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、氨基、取代的氨基、硝基和取代的硝基基团、磺酰基和取代的磺酰基基团；

X_1 和 X_2 分别选自氧原子、氮原子和硫原子，且均可为未取代的或被如上定义的 R_5 基团所取代；

Y 选自氮原子、被上述 R_5 基团取代的氮原子、氧原子、硫原子、氧化的硫原子、亚甲基基团及取代的亚甲基基团；

n 为等于 0、1 或 2 的整数；

非零 n 对应的每一 Z 和 Z_1 、 Z_2 、 Z_3 和 Z_4 分别选自碳原子、硫原子、

氮原子或氧原子；及

虚线表示的键可以是单键或双键。

所述方法包括通过如下步骤制备式(I)化合物的方法：

将二酰基哌嗪二酮与第一醛反应制备中间体化合物；和

将所述中间体化合物与第二醛反应制备具有所述通式结构的一类化合物，其中

所述第一醛和第二醛选自噁唑甲醛、咪唑甲醛、苯甲醛、咪唑甲醛衍生物和苯甲醛衍生物，从而形成式(I)的化合物，其中

每一 R_1 、 R_4 和 R_6 分别选自氢原子、卤原子和饱和的 C_1 - C_{24} 烷基、不饱和的 C_1 - C_{24} 烯基、环烷基、环烯基、烷氧基、环烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、氨基、取代的氨基、硝基、叠氨基、取代的硝基、苯基及取代的苯基基团、羟基、羧基、 $-\text{CO}-\text{O}-R_7$ 、氰基、烷硫基、卤代烷基包括多卤代烷基、卤代羰基以及羰基- $\text{CCO}-R_7$ ，其中 R_7 选自氢原子、卤原子和饱和 C_1 - C_{24} 烷基、不饱和的 C_1 - C_{24} 烯基、环烷基、环烯基、烷氧基、环烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、氨基、取代的氨基、硝基、叠氨基、取代的硝基、苯基和取代的苯基基团；

R_1' 和 R_1'' 独立地选自氢原子、卤原子和饱和 C_1 - C_{24} 烷基、不饱和的 C_1 - C_{24} 烯基、环烷基、环烯基、烷氧基、环烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、氨基、取代的氨基、硝基、叠氨基、取代的硝基、苯基及取代的苯基基团、羟基、羧基、 $-\text{CO}-\text{O}-R_7$ 、氰基、烷硫基、卤代烷基包括多卤代烷基、卤代羰基以及羰基- $\text{CCO}-R_7$ ，其中 R_7 选自氢原子、卤原子和饱和 C_1 - C_{24} 烷基、不饱和的 C_1 - C_{24} 烯基、环烷基、环烯基、烷氧基、环烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、氨基、取代的氨基、硝基、叠氨基、取代的硝基、苯基和取代的苯基基团；

每一 R_2 、 R_3 和 R_5 分别选自氢原子、卤原子和饱和的 C_1 - C_{12} 烷基、不饱和的 C_1 - C_{12} 烯基、酰基、环烷基、烷氧基、环烷氧基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、氨基、取代的氨基、硝基和取代的硝基基团、磺酰基和取代的磺酰基基团；

X_1 和 X_2 分别选自氧原子、氮原子和硫原子, 并且

Y 选自氮原子、被上述 R_5 基团取代的氮原子、氧原子、硫原子、氧化的硫原子、亚甲基基团及取代的亚甲基基团;

非零 n 对应的每一 Z 和 Z_1 、 Z_2 、 Z_3 和 Z_4 分别选自碳原子、硫原子、氮原子或氧原子; 及

虚线表示的键可以是单键或双键。

本发明还提供了式(I)化合物的药物可接受的盐和前药酯, 以及通过本发明公开的方法合成这类化合物的方法。

术语“前药酯”, 特别是当指通过本发明方法合成的式(I)化合物的前药酯时, 指所述化合物的化学衍生物, 其可在体内迅速转化(例如在血液或组织内水解)得到所述化合物。术语“前药酯”指本发明公开的化合物的衍生物, 其可通过加入多种可在生理条件下水解的成酯基团中的任意基团形成。前药酯基团的例子包括 pivoyloxymethyl、乙酰基甲基、2-苯并[c]呋喃酮亚基、茛满基和甲氧基甲基以及其它本领域公知的这类基团(包括(5-R-2-氧-1,3-二氧杂环戊烯-4-基)甲基基团)。前药酯基团的其它例子可在例如 T. Higuchi 和 V. Stella 的“Pro-drugs as Novel Delivery Systems”卷 14, A.C.S. Symposium Series, American Chemical Society (1975); 和“Bioreversible Carriers in Drug Design: Theory and Application”, E.B. Roche 编辑, Pergamon Press: New York, 14-21 (1987) (为含有羧基的化合物提供可用作前药的酯的例子)中找到。

本文所用的术语“前药酯”也指所述化合物的化学衍生物, 其可在体内迅速转化(例如在血液中水解)得到所述化合物。术语“前药酯”指本发明公开的化合物的衍生物, 其可通过加入多种可在生理条件下水解的成酯基团中的任意基团形成。前药酯基团的例子包括 pivoyloxymethyl、乙酰氧基甲基、2-苯并[c]呋喃酮亚基、茛满基和甲氧基甲基以及其它本领域公知的这类基团(包括(5-R-2-氧-1,3-二氧杂环戊烯-4-基)甲基基团)。前药酯基团的其它例子可在例如 T. Higuchi 和 V. Stella 的“Pro-drugs as Novel Delivery Systems”卷 14, A.C.S. Symposium Series, American Chemical Society (1975); 和“Bioreversible Carriers in Drug Design: Theory and Application”, E.B. Roche 编辑, Pergamon Press: New York, 14-21 (1987)

(为含有羧基的化合物提供了可用作前药的酯的例子)中找到。

术语“药物可接受的盐”，特别当指通过本发明公开的方法合成的式(I)化合物的药物可接受的盐时，指化合物的任何药物可接受的盐，优选指化合物的酸加合盐。优选的药物可接受的盐的例子是碱金属盐(钠或钾)、碱土金属盐(钙或镁)或者从氨或诸如 C_1 - C_7 烷基胺、环己基胺、三乙醇胺、乙二胺或三(羟甲基)氨基甲烷的药物可接受的有机胺衍生的铵盐。对于用所述方法合成的碱性胺化合物，优选的药物可接受的盐的例子是药物可接受的无机或有机酸的酸加合盐，例如氢卤酸、硫酸、磷酸或脂肪族或芳香族羧酸或磺酸，例如乙酸、琥珀酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、烟酸、甲磺酸、对甲苯磺酸或萘磺酸。

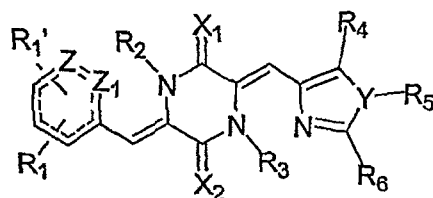
本文所用的术语“药物可接受的盐”也指化合物的任何药物可接受的盐，优选指化合物的酸加合盐。优选的药物可接受的盐的例子是碱金属盐(钠或钾)、碱土金属盐(钙或镁)或者从氨或诸如 C_1 - C_7 烷基胺、环己基胺、三乙醇胺、乙二胺或三-(羟甲基)-氨基甲烷的药物可接受的有机胺衍生的铵盐。对于用所述方法合成的碱性胺化合物，优选的药物可接受的盐的例子是药物可接受的无机酸或有机酸的酸加合盐，例如氢卤酸、硫酸、磷酸、或脂肪族或芳香族的羧酸或磺酸，例如乙酸、琥珀酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、烟酸、甲磺酸、对甲苯磺酸或萘磺酸。

本发明公开的优选药物组合物包括通过本发明方法合成的式(I)化合物的药物可接受的盐和前药酯。因此，如果在药物制剂的生产过程中包括将药物赋形剂和盐形式的所述活性成分充分混合，则优选使用非碱性的即酸性或中性的赋形剂。

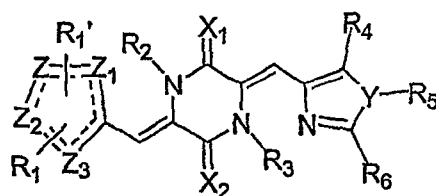
在本发明所述化合物的方法的优选实施方案中，可形成相对刚性的、平面伪三环结构。为了稳定这类相对刚性的、平面伪三环结构， R_3 优选为氢。

在本发明所述化合物的方法的其它优选实施方案中， n 等于 0 或 1，更优选为 1，且每一 Z_2 、 Z_3 和 Z_4 分别选自氧原子、氮原子和碳原子，更优选 Z_2 、 Z_3 和 Z_4 中至少一个为碳原子，最优选 Z_2 、 Z_3 和 Z_4 中至少两个为碳原子。所有的 Z 可同时为碳原子。

本发明所述化合物和方法的其它优选实施方案包括具有以下式(Ia)和(Ib)结构的化合物:



(Ia)



(Ib)

其中各基团定义如本文所述。

本文所用的术语“卤原子”指任一元素周期表第 7 列的放射稳定的原子,即氟、氯、溴或碘,优选氟和氯。

本文所用的术语“烷基”指任意直链或支链、取代或未取代的饱和烃基,优选 C₁-C₆ 的直链、饱和、未取代的烃基,最优选甲基、乙基、异丁基和叔丁基。在所述取代的饱和烃基中,优选 C₁-C₆ 单卤素取代和二卤素取代及全卤素取代的饱和烃基以及氨基取代的烃基,最优选全氟甲基、全氯甲基、全氟叔丁基和全氯叔丁基。术语“取代的”具有其原本的含义,如相关领域中的同时期的各种专利中所述。参见,例如美国专利第 6,583,143、6,509,331; 6,506,787; 6,500,825; 5,922,683; 5,886,210; 5,874,443 和 6,350,759 号。特别地,所述“取代的”的定义与美国专利第 6,583,143 号中所定义的一样宽泛,其中将术语取代的定义为任意至少一个氢原子被取代基所替代的基团,例如烷基、芳基、芳基烷基、杂芳基、杂芳基烷基、杂环基和杂环基烷基。术语“取代的”也和美国专利第 6,509,331 号中所定义的一样宽泛,其中将术语“取代的烷基”定义为指优选含 1-10 个碳原子、具有 1-5 个取代基且优选具有 1-3 个取代基的烷基基团,其中

所述取代基选自烷氧基、取代的烷氧基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、酰基、酰基氨基、酰氧基、氨基、取代的氨基、氨基酰基、氨基酰氧基、氧酰基氨基、氰基、卤素、羟基、羧基、羧基烷基、酮基、硫代酮基、硫醇基、硫代烷氧基、取代的硫代烷氧基、芳基、芳氧基、杂芳基、杂芳基氧基、杂环基、杂环基氧基、羟基氨基、烷氧基氨基、硝基、-SO-烷基、-SO-取代的烷基、-SO-芳基、-SO-杂芳基、-SO₂-烷基、-SO₂-取代的烷基、-SO₂-芳基和-SO₂-杂芳基。其它上述罗列的专利也提供了本领域所属技术人员公知的术语“取代的”的标准定义。术语“环烷基”指任何非芳香族碳氢环、优选所述环由 5-12 个原子构成。术语“酰基”指由含氧酸衍生的烷基或芳基基团，优选乙酰基。

本文所用的术语“烯基”指包括多不饱和烃基在内的任意直链或支链、取代或未取代的不饱和烃基，优选 C1-C6 的直链、单不饱和及双不饱和的、未取代的烃基。最优选单不饱和的、二卤素取代的烃基。在式(I)化合物的 R₁ 和 R₄ 位特别优选为 *z*-异戊二烯部分。术语“环烯基”指任意非芳香族碳氢环，优选所述环由 5-12 个原子构成。

本文所用的术语“芳基”、“取代的芳基”、“杂芳基”和“取代的杂芳基”指芳香族烃环，优选具有 5、6 或 7 个原子，最优选具有 6 个原子构成所述环。“杂芳基”和“取代的杂芳基”指环中具有至少一个杂原子(例如氧、硫或氮原子)和至少一个碳原子的芳香族烃环。

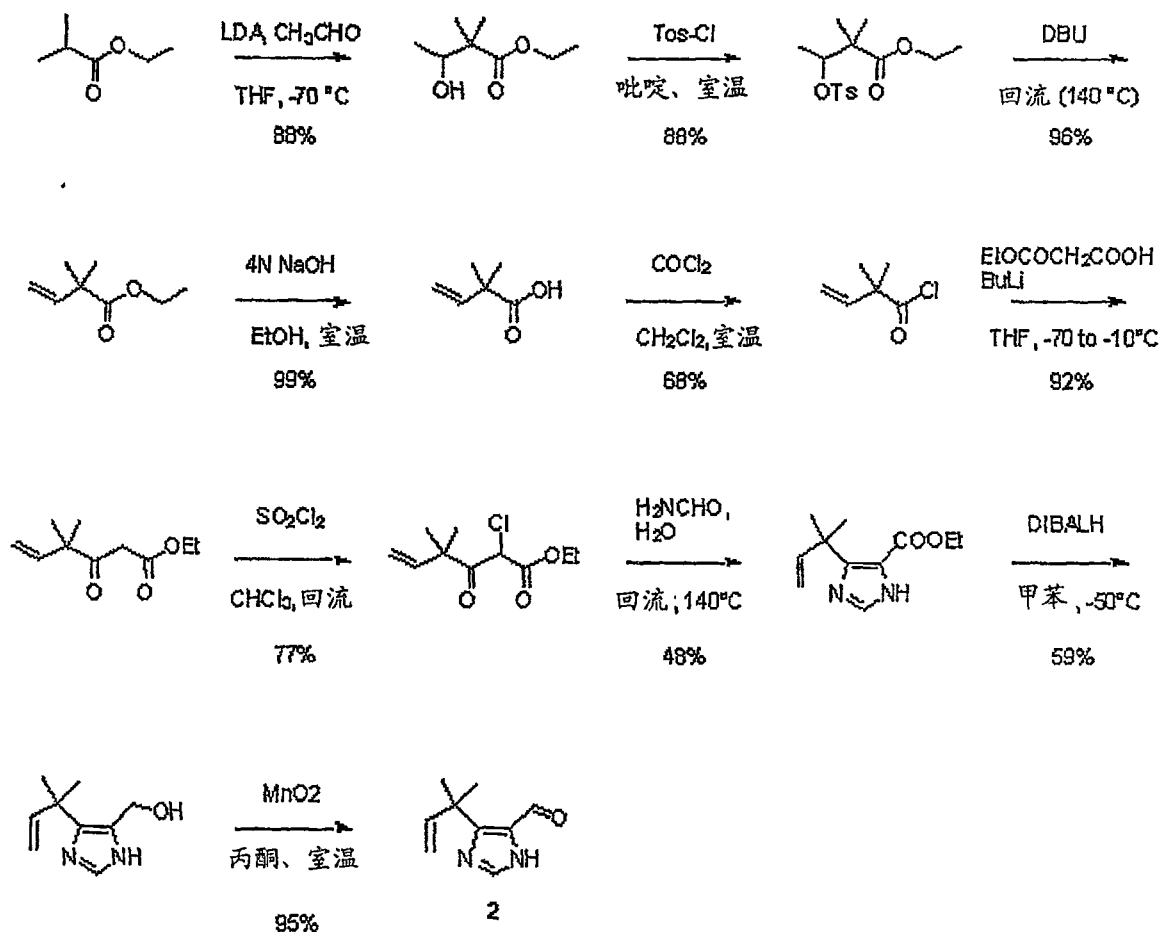
术语“烷氧基”指任意直链或支链、取代或未取代、饱和或不饱和的醚类，优选 C1-C6 直链、饱和、未取代的醚，更优选甲氧基，同样优选二甲基、二乙基、甲基-异丁基及甲基-叔丁基醚。术语“环烷氧基”指任意非芳香烃环，优选由 5-12 个原子构成环。

本文所用的术语“纯化的”、“基本纯化的”或“分离的”指不含其天然状态下通常相关的其它不相似化合物的化合物，因此本发明化合物构成所给样品质量(指重量)的至少 0.5%、1%、5%、10%或 20%，更优选至少 50%或 75%。

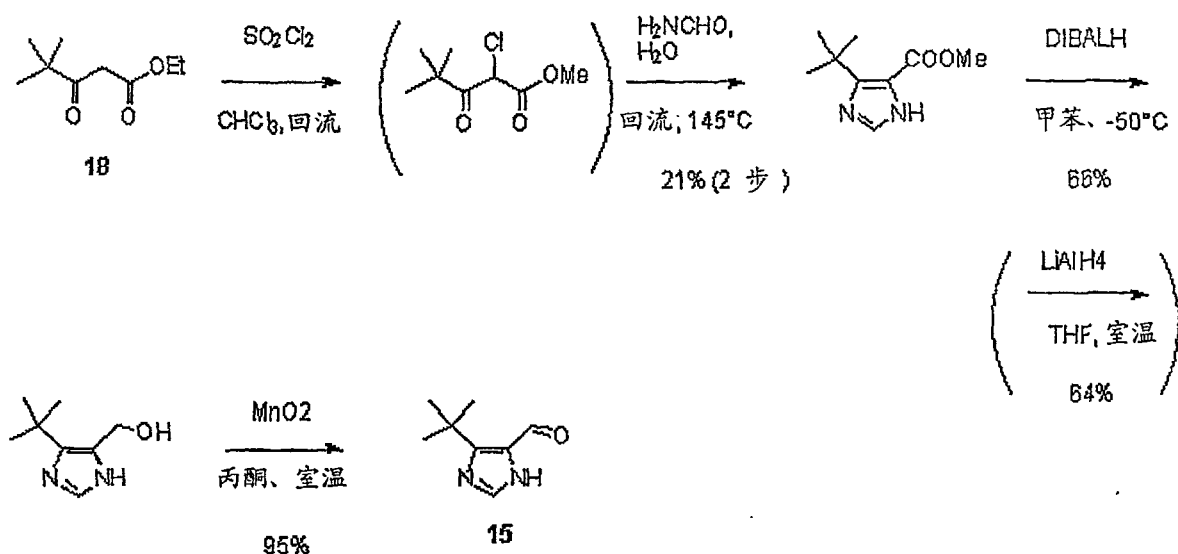
式(I)化合物可由本领域公知并可得的试剂进行化学合成或制备。例如，如 Loughlin 等, 2000 *Bioorg Med Chem Lett* 10:91 或 Brocchini 等在公开号为 WO 95/21832 的国际申请中所述的二酰基哌嗪二酮(二乙酰基哌嗪

二酮)修饰方法。所述二酰基咪唑二酮(二乙酰基咪唑二酮)可通过例如将廉价的 2,5-咪唑二酮(TCI Cat. No. G0100, 25 g)用醋酸钠和酸酐钠(sodium anhydride)二乙酰化来制备。所述具活性的咪唑二酮的二乙酰基结构可被其它酰基基团替代,从而包括诸如 Boc (叔丁氧基羰基)、Z (苯甲酰氧基羰基)的氨基甲酸酯。

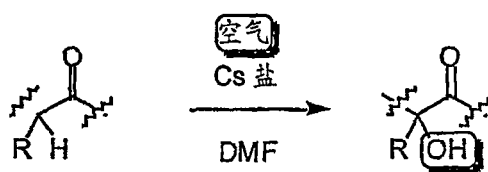
所述咪唑甲醛可根据例如 Hayashi 等, 2000 *J Organic Chem* 65:8402 中所公开的方法(如下)制备:



咪唑甲醛衍生物的另一实例是咪唑-4-甲醛 15 衍生物,其可以例如商业销售的 β -酮酯 18(TCI Cat, No. P1031, 25 mL)为原料按照如下路线制备:



本文公开的合成方法优选在 DMF 中、作为碱的碳酸铯存在下及去氧气氛中进行。例如 Watanabe 等, *18th International Congress of Heterocyclic Chemistry in Yokohama, Japan* (2001 年 7 月 30 日), Abstract, 225 页中所报道的, 惰性气氛可避免用碳酸铯处理过程中可能发生的咪唑二酮环的活性 α -碳原子的氧化(如下)。



铯盐存在下活性羰基化合物的空气氧化

所述合成方法的其它实施方案包括对式(I)所示化合物合成中所使用或涉及的化合物的修饰。这类衍生物可包括对苯环的修饰、引入其它芳香环系、芳香环的位置、咪唑环系的改变和/或进一步对所述咪唑环 5-位的修饰。这类修饰的例子在例如实施例 4 中进行了论述。这类修饰的结果包括苯环和/或所述化合物中氮含量的上升, 其可增强化合物的溶解性。其它修饰可结合已知的微管蛋白抑制剂的衍生物, 从而模拟微管蛋白抑制剂的活性。其它修饰可简化 β -酮酯的合成, 其应用于制备本文公开的

方法中使用的咪唑甲醛。

药物组合物

本发明还将本文公开的化合物(任意地或优选由本文公开的方法制备)应用于药物组合物,该药物组合物包括为储存及后续给药制备的药物可接受的载体,所述药物组合物包括含在药物可接受的载体或稀释剂中的药物有效量的上述产物。用于医疗用途的可接受的载体或稀释剂是药物领域公知的,且在例如 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro edit. 1985)中进行了描述。防腐剂、稳定剂、染料甚至调味剂也可用在所述药物组合物中。例如苯甲酸钠、抗坏血酸和对羟基苯甲酸酯可用作防腐剂。此外,可使用抗氧化剂和悬浮剂。

所述脱氢苯基阿夕斯丁或脱氢苯基阿夕斯丁类似物组合物可制成或以以下形式使用:用于口服给药的片剂、胶囊或酏剂;用于直肠给药的栓剂;用于注射给药的无菌溶液、悬浮液;用于透皮给药的贴片;及皮下沉积物等等。注射剂可制成常规的形式,如液体溶液或悬浮液、适用于在注射或输注(infusion)前溶解或悬浮在液体中的固体形式,或乳剂。适合的赋形剂是例如水、盐水、葡萄糖、甘露糖醇、乳糖、卵磷脂、白蛋白、谷氨酸钠、半胱氨酸盐酸盐、人血清白蛋白等等。此外,如果需要,所述注射用药物组合物可含有微量的无毒辅助物质,如润湿剂、pH缓冲剂等等。如果需要,可使用吸收增强剂(例如脂质体)。

用于非肠道给药的药物制剂包括水溶形式的所述活性化合物的水溶液。此外,所述活性化合物的悬浮液可制备成适当的油性注射悬浮液。适合的亲油溶剂或载体包括诸如芝麻油的脂肪油,或其它诸如大豆油、柚子或杏仁油的有机油,或诸如油酸乙酯或甘油三酯的合成脂肪酸酯,或脂质体。水性注射悬浮液可含有增加所述悬浮液粘度的物质,例如羧甲基纤维素钠,山梨糖醇或葡聚糖。任意地,所述悬浮液也可含有适合的稳定剂或增强所述化合物溶解性的试剂,使得可制备高浓度的溶液。

用于口服的药物制剂可通过将所述活性化合物与固体赋形剂结合、任意地对所得混合物进行研磨、及将所述混合物制成颗粒,加入适合的辅料之后(如果需要),从而得到片剂或糖衣丸的核心。特别适合的赋形剂

是填充剂，例如诸如乳糖、蔗糖、甘露糖醇或山梨糖醇的糖；诸如玉米淀粉、小麦淀粉、稻米淀粉、土豆淀粉、明胶、黄芪胶、甲基纤维素、羟基丙基甲基-纤维素、羧甲基纤维素钠等等的纤维素制剂，和/或聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。如果需要可加入崩解剂，例如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或者藻酸或诸如藻酸钠的藻酸盐。对糖衣丸核心进行适当地包被。为达此目的，可使用浓缩的糖溶液，其可选择性地含有阿拉伯胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、carbopol 凝胶、聚乙二醇和/或二氧化钛、lacquer (紫胶漆)溶液和适合的有机溶剂或混合溶剂。为了鉴别或表示活性化合物剂量的不同组合，可向所述片剂或糖衣丸包衣中加入涂料或颜料。为达此目的，可使用浓缩的糖溶液，其可选择性地含有阿拉伯胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、carbopol 凝胶、聚乙二醇和/或二氧化钛、lacquer 溶液和适合的有机溶剂或混合溶剂。为了鉴别或表示活性化合物剂量的不同组合，可向所述片剂或糖衣丸包衣中加入涂料或颜料。可使用本领域公知的方法来制备这类制剂(参见，例如美国专利第 5,733,888 号(注射用组合物)；5,726,181 号(难溶于水的化合物)；5,707,641 号(有治疗活性的蛋白或肽)；5,667,809 号(亲油性试剂)；5,576,012 号(增溶聚合试剂)；5,707,615 号(抗病毒制剂)；5,683,676 号(微粒药物)；5,654,286 号(局部制剂)；5,688,529 号(口服悬浮剂)；5,445,829 号(缓释制剂)；5,653,987 号(液体制剂)；5,641,515 号(控释制剂)和 5,601,845 号(球形制剂))。

本文还公开了各种制药领域公知的用于包括眼内、鼻内和耳内(intraauricular)输送的药物组合物。药物制剂包括所述活性化合物的水性眼用溶液，其可为水溶性形式(如滴眼液)，或结冷胶(gellan gum)形式(Shedden et al., 2001 *Clin Ther* 23(3):440-50)或水凝胶形式(Mayer et al., 1996 *Ophthalmologica* 210:101-3)；眼用软膏；眼用悬浮剂，例如微粒(悬浮在液体载体介质中的含药物的小聚合颗粒) (Joshi, A., 1994 *J Ocul Pharmacol* 10:29-45)，脂溶性制剂(Alm 等., 1989 *Prog Clin Biol Res* 312:447-58)和微球(Mordenti, 1999 *Toxicol Sci* 52:101-6)；及眼插入剂(ocular insert)。为了稳定和舒适，这类适合的药物制剂通常且优选制成无菌、等张和缓冲的。药物组合物也可包括滴剂和喷雾剂，其通常制备成在许多方面模拟鼻分泌物，从而确保维持正常的睫毛运动。如 Remington's

Pharmaceutical Science (Mack Publishing, 18th Edition)中所述,及本领域所属技术人员公知的,适合的制剂通常且优选为等张、轻微缓冲以维持 pH 5.5-6.5,且通常并优选包括抗菌防腐剂和适当的药物稳定剂。用于耳内输送的药物制剂包括在耳中局部应用的悬浮剂和软膏。用于这类耳用制剂的通用溶剂包括甘油和水。

当用作细胞循环抑制剂,肿瘤生长抑制剂、或真菌生长抑制剂化合物时,所述式(I)化合物可通过口服或非口服途径给药。当口服给药时,可以胶囊、片剂、颗粒剂、喷雾剂、糖浆剂或诸如此类的形式给药。当非口服给药时,可以水性悬浮剂、油性制剂或类似形式给药,或以滴注、栓剂、软膏、软膏等形式给药,当通过注射或输注给药时,可在皮下、腹膜内、静脉内、肌肉内等进行。类似地,可按照本领域所属技术人员认为适当的方式进行局部、直肠或阴道给药,使所述化合物与肿瘤获得最理想的接触,从而抑制该肿瘤的生长。还可以考虑肿瘤切除前或后在肿瘤位置局部给药,例如可控释放的制剂、贮存制剂及输注泵输送。

给药方法

本发明还包括制备和给药所述公开的化合物和药物组合物的方法。除其它外,这类公开的方法包括:(a)通过口服途径给药,包括以胶囊、片剂、颗粒剂、喷雾剂、糖浆剂或诸如此类的形式给药;(b)通过非口服途径给药,包括以水性悬浮剂、油性制剂等等给药,或以滴注、栓剂、软膏、软膏等形式给药;可在皮下、腹膜内、静脉内、肌肉内、真皮内等等进行注射或输注给药;以及按照本领域所属技术人员认为适当的方式进行(c)局部给药,(d)直肠给药或(e)阴道给药,从而使所述化合物与活体组织接触;及(f)通过可控释放制剂、贮存制剂及输注泵输送给药。作为这类给药方式的其它例子及其它公开的给药方式,本文公开了各种给药所述公开的化合物和药物组合物的方法,包括通过眼内、鼻内和耳内途径给药的方式。

所需的所述脱氢苯基阿夕斯丁或脱氢苯基阿夕斯丁类似物组合物的药物有效量的剂量依赖于给药途径、被治疗的动物(包括人)类型和所考虑的具体动物的体质特征。所述剂量可以被调整为能够达到所需效果,但

会依赖于诸如体重、饮食、同时进行的药物治疗的因素及其它医药领域所述技术人员公认的因素。

在实践所述方法的过程中，所述化合物或组合物可单独使用或彼此结合使用，或与其它治疗或诊断试剂结合使用。例如，如本文公开的，当与例如生物制剂和特定的化疗试剂 CPT-11、Taxotene (docataxel) 和 paclitaxel 的其它活性物质(尤其是其它化疗试剂)结合使用时，本文公开的化合物可有效治疗癌症。当与其它活性物质结合使用时，本文公开的化合物也可有效治疗癌症，这些活性物质包括抗血管试剂(anti-vascular agents)、诸如 Erbitux (Imclone/bristol-Myers) 和 Iressa (AstraZeneca) 的抗血管生成试剂、其它 VEGF 抑制剂和生物制剂，更特别地包括至少一种抗-VEGF 抗体，特别是对 VEGF 受体的单克隆抗体，其包括 DC101，一种阻断小鼠 VEGF 受体 2 (flk-1) 的大鼠单克隆抗体。这类组合可应用在体内，通常在哺乳动物体内，优选在人体内，或者可应用在体外。在对其进行体内应用时，所述公开的化合物(单独或与其它化疗试剂或其它生物制剂组合)可使用各种剂量形式、通过多种途径对哺乳动物给药，所述途径包括非肠道、静脉内、通过输注或注射、皮下、肌肉内、结肠、直肠、阴道、鼻或腹膜内。这类方法也可应用于测试体内化学活性。

如对本领域所属技术人员显而易见地，有用的体内给药剂量及具体的给药方式会根据所治疗的哺乳动物种类、体重和年龄，所使用的具体化合物及使用这些化合物的具体目的而变化。本领域所属技术人员根据常规的药理学方法可确定有效剂量水平(即达到所需效果所必需的剂量水平)。通常，产物的人体临床应用从较低的剂量水平开始，随后不断提高剂量水平直到达到所需的效果。可选择地，可通过现有的药理学方法采用可接受的体外研究来建立本方法鉴定的组合物的有用剂量和给药途径。

在非人的动物研究中，潜在产物的应用首先从较高剂量开始，随后减少剂量直到无法实现所需效果或有害副作用消失为止。依赖所需效果和所述治疗表现(indication)，所述剂量可在很宽的范围内变化。通常，所用剂量可在约 10 微克/kg 体重和 100 mg/kg 体重之间，优选在约 100 微克/kg 体重和 10 mg/kg 体重之间。可选择地，本领域所属技术人员应该理

解所用剂量可根据患者的表面积进行计算。口服给药可以每三天一次、每隔一天一次、每天一次、每天两次或每天三次的方式进行。

各医师可根据患者的状况选择确切的配方、给药途径和剂量。参见, 例如 Fingl 等的 *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 1975。需要指出的是, 所述医师应该能根据毒性或器官功能失常状况判断如何及何时停止、中断或调整给药。相反, 当临床反应不足(不包括毒性)时所述医师也应该知道将治疗调至更高水平。在控制所关注的疾病时所采用的给药剂量值须根据待治疗的疾病状态的严重性和给药途径变化。例如可部分通过标准的预后评价方法来评价所述疾病状态的严重性。此外, 所述剂量和大致的剂量频率也可根据个体患者的年龄、体重和反应进行调整。对兽医药物可应用与上述讨论相当的方案。

根据所治疗的具体疾病状态, 这类试剂可针对全身或局部进行制剂或给药。可在 *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)中找到各种组方和给药的技术。适合的给药途径可包括口服、直肠、透皮、阴道、透膜或肠内给药; 非肠道输送, 包括肌肉内、皮下、髓内注射以及鞘内、直接心室内、静脉内、通过输注、腹膜内、鼻内或眼内注射。

对注射或输注, 所述试剂可组方于水溶液中, 例如在诸如 Hank's 溶液、Ringer's 溶液或生理盐水缓冲液的生理相容性缓冲液中。对那些透膜给药, 在所述制剂中使用对待渗透障壁适用的渗透剂。这类渗透剂是本领域公知的。本发明范围还包括使用药物可接受的载体对本文公开的化合物进行组方, 从而将本发明制成适合于全身给药的剂型。选择适当的载体和适合的制备方法, 本文公开的组合物(特别是制成溶液的组合物)可通过非肠道给药, 例如通过静脉内注射或输注。所述化合物可很容易地使用本领域公知的药物可接受的载体制成适合于口服给药的剂型。这类载体使得所述化合物可被制成片剂、丸剂、胶囊、液体、凝胶、糖浆剂、浆液、悬浮液等等, 便于待治疗患者口服。

需要细胞内给药的试剂可采用本领域所属技术人员公知的技术进行给药。例如, 这类试剂可被封装在脂质体中, 然后按上述方法给药。脂质体形成过程中水溶液中的所有分子都被结合于其内部水溶液中。脂质

体内成分均受到保护而不受外部微环境影响,并且因为脂质体与细胞膜融合,因此所述成分被有效地输入细胞质内。此外,由于其疏水性,小分子有机分子可直接进行细胞内给药。

对有效剂量的确定是本领域所属技术人员公知的,尤其根据本文提供的具体公开的指导。除所述活性成分外,这些药物组合物还可含有适合的药物可接受的载体(包括赋形剂和辅料),其可方便地将所述活性化合物制成用于医药用途的制剂。用于口服给药的制剂可为片剂、糖衣丸、胶囊或溶液的形式。所述药物组合物可采用公知的方式进行制备,例如通过常规混合、溶解、成粒、糖衣丸制作、悬浮、乳化、胶囊封装、俘获(entrap)、冻干法。

可使用公知的方法对本文公开的化合物进行药效和毒性评价。例如,可通过测定对细胞系(如哺乳动物的,优选人的细胞系)的体外毒性来建立具体化合物或共享某些化学部分的化合物子集的毒理学。这类研究的结果可用于预测在动物体内(例如哺乳动物或更具体为人体内)的毒性。可选择地,可使用公知的方法确定具体化合物在诸如小鼠、大鼠、兔子或猴子的动物模型中的毒性。可使用多种本领域公认的方法确定具体化合物的药效,这些方法例如体外方法、动物模型或人体临床试验。基本上对每一类疾病状态都有本领域公认的体外方法,所述疾病状态包括可用本文公开的化合物减轻的疾病状态,包括癌症、心血管疾病及各种真菌感染。类似地,可使用可接受的动物模型来确定治疗这类疾病状态的化学物质的药效。在选择确定药效的模型时,本领域所属技术人员可根据本领域规定的指导选择适当的模型、剂量和给药路线及方案。当然,也可利用人体临床试验来确定化合物对人的药效。

当作为抗癌试剂时或肿瘤生长抑制化合物时,本文公开的化合物可通过口服或非口服途径给药。口服给药时,其可以胶囊、片剂、颗粒剂、喷雾剂、糖浆剂或诸如此类的形式给药。非口服给药时,其可以水性悬浮液、油性制剂及其类似形式、或滴注、栓剂、油膏、软膏等等形式给药,当通过注射或输注给药时,可采用皮下、腹膜内、静脉内、肌肉内、透皮等等方式进行。类似地,可以本领域所属技术人员认为适当的方式进行局部、直肠或阴道给药,使所述化合物与肿瘤良好接触,从而抑制

肿瘤生长。也可考虑在肿瘤切除前或后,在肿瘤或其它疾病状态的位置局部给药,或将其作为本领域公认的所述疾病状态的治疗方法的一部分。类似地,也可考虑可控释放剂型、贮存剂型及输注泵输送。

当用作抗癌试剂或抗肿瘤试剂时,可以 0.0007 mg/天到约 7,000 mg/天的所述活性成分剂量对人类患者进行口服或非口服给药,更优选约 0.07 mg/天到约 70 mg/天所述活性成分,优选每天一次,或次优选每天 2 到 10 次。可选择并同样优选地,所述化合物优选通过例如静脉滴注的方式以稳定剂量连续给药。因此,对于体重 70 公斤的患者,所述活性抗肿瘤成分的优选日剂量为约 0.0007 mg/kg/天到约 35 mg/kg/天(包括 1.0 mg/kg/天和 0.5 mg/kg/天),更优选从 0.007 mg/kg/天到约 0.050 mg/kg/天(包括 0.035 mg/kg/天)。然而,本领域所属技术人员可以理解,在某些情况下可能需要给药超过甚至远超上述优选剂量范围的所述抗肿瘤化合物,从而有效地且积极地(aggressively)治疗特定的晚期或致死性肿瘤。

当用作抗真菌剂时,所述对治疗或预防具体真菌病原体有效的脱氢苯基阿夕斯丁或其类似物的优选剂量需部分根据所述真菌的特性和感染的程度,且可由标准的临床技术确定。可选择采用体外或体内分析帮助确定最佳的剂量范围。可从由体外分析或优选由动物模型得到的剂量-反应曲线外推确定有效剂量。确切的剂量水平应该由应用的医师或其它保健人员根据公知的因素确定,这类因素包括给药途径、个体的年龄、体重、性别及全面体质;感染的性质、严重性和临床阶段;使用(或不使用)伴随治疗。

所述脱氢苯基阿夕斯丁或其类似物的有效剂量范围通常在每天约 0.01 mg/kg 到约 50 mg/kg 哺乳动物体重,优选为约 0.1 mg/kg 到约 10 mg/kg,可一次给药或多次给药。通常,所述化合物可以每个患者每天约 1 mg 到约 2000 mg 的剂量对需要这种治疗的患者进行给药。

为了制备包括本文公开的作为抑制肿瘤生长的化合物的制剂,可使用公知的表面活性剂、赋形剂、平滑剂(smoothing agent)、悬浮试剂和药物可接受的成膜物质和包被辅料及其类似物。优选用醇、酯、硫酸化脂肪醇等等作为表面活性剂;蔗糖、葡萄糖、乳糖、淀粉、结晶纤维素、甘露糖醇、轻度无水硅酸盐、铝酸镁、铝酸甲基硅酸镁(Magnesium

methasilicate aluminate)、合成硅酸铝、碳酸钙、酸式碳酸钠、磷酸氢钙、羧甲基纤维素钙等等作为赋形剂；硬脂酸镁、滑石、硬化油等等作为平滑剂；椰子油、橄榄油、芝麻油、花生油、大豆油作为悬浮试剂或润滑剂；邻苯二甲酸醋酸纤维素(碳水化合物(如纤维素和糖)的衍生物)、或醋酸甲酯-异丁烯酸酯共聚物(聚乙烯衍生物)作为悬浮试剂；及诸如邻苯二甲酸酯等等的增塑剂作为悬浮试剂。除前述优选成分外，增甜剂、香料、着色剂、防腐剂等等也可加入所述化合物的给药制剂中，尤其在所述化合物采用口服给药时。

本文公开的药物组合物中还可包含药物可接受的载体。可为贮存及后续给药目的制备这类组合物。用于医疗的可接受的载体或稀释剂是药物领域公知的，且在例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro edit. 1985)中进行了描述。例如，这类组合物可制成或以如下形式使用：用于口服给药的片剂、胶囊或溶液；用于直肠或阴道给药的栓剂；用于注射给药的无菌溶液或悬浮液。注射剂可制成常规的形式，如液体溶液或悬浮液、适用于在注射或输注前溶解或悬浮在液体中的固体形式，或乳剂。适合的赋形剂包括但不限于盐水、葡萄糖、甘露糖醇、乳糖、卵磷脂、白蛋白、谷氨酸钠、半胱氨酸盐酸盐等等。此外，如果需要，所述注射用药物组合物可含有微量的无毒辅助物质，如润湿剂、pH 缓冲剂等等。如果需要，可使用吸收增强剂(例如脂质体)。

所需的所述组合物的药物有效量的剂量依赖于给药途径、被治疗的动物类型和所考虑的具体动物的体质特征。所述剂量可以被调整为达到所需效果，但会依赖于诸如体重、饮食、同时进行的药物治疗的因素及其它医药领域所述技术人员公认的因素。

如上所述的化合物或组合物可单独使用或彼此结合使用，或与其它治疗或诊断试剂结合使用。具体地，所述公开的化合物产物可单独使用或在用于治疗癌症时与其它化疗试剂或生物制剂(包括抗体)结合使用，或在用于治疗真菌感染时与其它抗感染剂结合使用。这些产物或组合物可在体内或体外使用。给药的有用剂量及更有用的方式会根据体重、年龄和所治疗的动物，所使用的具体化合物及使用此组合物或这些组合物的

具体用途而变化。在控制或治疗具体疾病时所采用的剂量值需根据待治疗的疾病状态的严重性和给药途径变化，且根据所述疾病状态及其严重性，所述组合物可针对全身或局部进行制剂或给药。可在 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)中找到各种制剂和给药的技术。

为了对作为细胞循环抑制剂、肿瘤生长抑制或抗真菌化合物的式(I)化合物(优选根据本文公开的方法合成制备)进行制剂，可使用公知的表面活性剂、赋形剂、平滑剂、悬浮试剂和药物可接受的成膜物质和包被辅料及其类似物。优选用醇、酯、硫酸化脂肪醇等等作为表面活性剂；蔗糖、葡萄糖、乳糖、淀粉、结晶纤维素、甘露糖醇、轻度无水硅酸盐、铝酸镁、铝酸甲基硅酸镁、合成硅酸铝、碳酸钙、酸式碳酸钠、磷酸氢钙、羧甲基纤维素钙等等作为赋形剂；硬脂酸镁、滑石、硬化油等等作为平滑剂；椰子油、橄榄油、芝麻油、花生油、大豆油作为悬浮试剂或润滑剂；邻苯二甲酸醋酸纤维素(碳水化合物(如纤维素和糖)的衍生物)、或醋酸甲酯-异丁烯酸酯共聚物(聚乙烯衍生物)作为悬浮试剂；及诸如邻苯二甲酸酯等等的增塑剂作为悬浮试剂。除前述优选成分外，增甜剂、香料、着色剂、防腐剂等等也可加入通过所述方法制备的化合物的给药制剂中，尤其在所述化合物采用口服给药时。

可用所述方法制备的细胞循环抑制剂、抗肿瘤试剂及抗真菌剂可通过口服或非口服形式对人类患者给药，所用剂量为约 0.001 mg/kg/天到约 10,000 mg/kg/天所述活性成分，更优选约 0.1 mg/kg/天到约 100 mg/kg/天所述活性成分，优选以三天一次为一周期、两天一次、每天一次、每天两次，或次优选每天超过 2 到约 10 次。可选择地并同样优选地，由所述方法制备的化合物优选通过例如静脉滴注的方式以稳定剂量连续给药。因此，对于例如体重 70 公斤的患者，所述活性抗肿瘤成分的优选日剂量为约 0.07 mg/天到约 700 g/天，更优选从 7 mg/天到约 7 g/天。然而，本领域所属技术人员可以理解，在某些情况下可能需要给药超过甚至远超上述优选剂量范围的用所述方法制备的所述抗肿瘤化合物，以有效地且积极地治疗特定的晚期或致死性肿瘤。

当使用通过所述方法制备的细胞循环抑制剂作为生化测试试剂时，

通过本发明方法制备的化合物在溶解于有机溶剂或含水有机溶剂时可抑制细胞循环的进行，且可将其直接应用于各种培养的细胞体系。可用的有机溶剂包括，例如甲醇、甲基亚砷等等。所述制剂可为例如粉剂、颗粒剂或其它固体抑制剂，或使用有机溶剂或无水有机溶剂制备的液体抑制剂。尽管通过本发明方法制备的化合物用作细胞循环抑制剂的优选浓度通常在约 1 $\mu\text{g/ml}$ 到约 100 $\mu\text{g/ml}$ 范围，但本领域所属技术人员可以理解，最适当的剂量依赖于使用目的和培养的细胞体系的种类。同时，在某些应用中，本领域所属技术人员可能需要或优选使用超过上述范围的剂量。

从医药角度来看，某些实施方案提供了预防或治疗个体中的真菌感染和/或病原体真菌的方法，包括对所述个体给药包含脱氢苯基阿夕斯丁或其类似物的组合物，例如以可提供所需抗真菌效果的剂量及方式给药所述脱氢苯基阿夕斯丁或其类似物。

其它实施方案包括治疗或预防患者的由诸如上文所罗列的或下文所涉及的病原体真菌引起的感染。

另一实施方案涉及治疗或预防患者的由病原体真菌引起的感染，其中所述病原体真菌可耐一种或多种其它抗真菌剂(特别是不同于脱氢苯基阿夕斯丁或其类似物的试剂)，包括例如两性霉素 B 或其类似物或衍生物(包括 14(s)-羟基两性霉素 B 甲酯、两性霉素 B 与 1-氨基-4-甲基哌嗪的酰胺及其它衍生物)或其它多烯大环内酯抗生素，包括例如制霉菌素(nystatin)、杀念珠菌素、多马徽素和那他霉素；氟胞嘧啶；灰黄霉素(griseofulvin)；棘白菌素(echinocandin)或 aureobasidin，包括天然的或半合成的类似物；二氢苯并[a]四苯醌(dihydrobenzo[a]naphacenequinone)；核苷抗真菌剂，包括多抗霉素(polyoxin)和尼克霉素(nikkomycin)；诸如萘替芬(naftifine)的烯丙胺类和其它角鲨烯环氧酶(epoxidase)抑制剂；以及吡咯、咪唑和三唑，例如克霉唑、咪康唑、酮康唑、益康唑、布康唑(butoconazole)、奥昔康唑(oxiconazole)、特康唑(terconazole)、伊曲康唑(itraconazole)或氟康唑(flucanazole)等等。对其它常规抗真菌剂及正在开发的新试剂参见例如 Turner 和 Rodriguez, 1996 *Current Pharmaceutical Design*, 2:209-224。另一实施方案包括治疗或预防患者的由病原体真菌引

起的感染，其中所述患者对一种或多种其它抗真菌剂过敏，或不耐受、或无反应，或者对所述患者禁用其它抗真菌剂。除其它外，这些其它抗真菌剂还包括上文或本文其它部分公开的抗菌剂。

在前述治疗或预防方法中，以有效抗菌剂量将脱氢苯基阿夕斯丁或其类似物对个体给药。

其它实施方案涉及治疗或预防患者的由病原体真菌引起的感染，其通过将脱氢苯基阿夕斯丁或其类似物给药，同时结合给药一种或多种其它抗真菌剂(包括例如任意前述试剂或试剂类型，如与使用两性霉素 B(优选以类脂或脂质体制剂形式)；例如吡咯或三唑(如氟康唑)；aureobasidin；二氢苯并[a]四苯醌；或棘白菌素的治疗组合)以及不同的脱氢苯基阿夕斯丁或其类似物。

所述脱氢苯基阿夕斯丁或其类似物可在所述其它抗菌剂给药之前、之后或同时给药。在某些实施方案中，所述组合治疗使得一种或全部两种抗菌组分的用量与其单独使用时相比可相对降低。

其它实施方案涉及为治疗或预防由病原体真菌引起的感染而对个体给药脱氢苯基阿夕斯丁或其类似物，其中所述个体是免疫抑制或免疫受损的，例如由以下因素造成的结果：基因缺陷、诸如糖尿病或 HIV 或其它感染的疾病、对癌症或其它疾病的化疗或放射治疗、或者药物诱导的免疫抑制或与组织或器官移植或自身免疫障碍的治疗相关的诱导的免疫抑制。当所述患者正在接受或将接受免疫抑制剂的治疗(例如与组织或器官移植相关)时，可将脱氢苯基阿夕斯丁或其类似物与所述免疫抑制剂共同给药，以治疗或预防病原体真菌感染。

本发明的另一方面涉及治疗或预防 HIV 感染(或怀疑感染)患者的由病原体真菌引起的感染，包括将抗真菌脱氢苯基阿夕斯丁或其类似物给药，同时结合给药一种或多种抗-HIV 治疗剂(包括例如 HIV 蛋白酶抑制剂、反转录酶抑制剂或抗病毒剂)。所述脱氢苯基阿夕斯丁或其类似物可在所述抗-HIV 试剂给药之前、之后或同时给药。

本发明的另一方面涉及治疗或预防患者的由病原体真菌引起的感染，包括将抗真菌脱氢苯基阿夕斯丁或其类似物给药，同时结合给药一种或多种其它抗生素化合物，特别是一种或多种抗菌剂，优选以治疗或

预防细菌感染的有效剂量或方案给药。同样，所述脱氢苯基阿夕斯丁或其类似物可在所述其它试剂给药之前、之后或同时给药。

除其它外，可用本文公开的方法治疗或预防的病原体真菌感染还包括：曲霉病，包括侵入性肺曲霉病；芽生菌病，包括在中枢神经系统中的深度或迅速发展型感染及芽生菌病；念珠菌病，包括泌尿道退行性念珠菌病(如在肾结石、泌尿道梗阻、肾移植或控制不佳的糖尿病患者中)；球孢子菌病，包括对其它化学疗法反应不佳的慢性疾病；隐球菌病；histoplasmosis；毛霉菌病，包括例如颅面毛霉菌病和肺毛霉菌病；巴西芽生菌病；和孢子丝菌病。需要指出的是，将包含抗菌剂量的一种或多种脱氢苯基阿夕斯丁或其类似物的组合物给药特别适用于治疗或预防哺乳动物个体的病原体真菌感染，其中所述真菌耐一种或多种其它抗菌治疗剂或者其中一种或多种抗真菌治疗剂是禁用的(例如上文所述)。

本发明还公开了实践所述公开方法所采用的包含至少一种抗真菌脱氢苯基阿夕斯丁或其类似物的抗真菌药物组合物。这些药物组合物可与适当的包装内插件(除其它外，包括与其抗真菌用途有关的指导和信息)一起进行包装。本发明还公开了含有一种或多种脱氢苯基阿夕斯丁或其类似物以及第二抗真菌剂的药物组合物。

治疗真菌感染的方法

本文公开的某些实施方案涉及治疗或预防病原体真菌感染的方法，所述感染包括，例如曲霉病，包括侵入性肺曲霉病；芽生菌病，包括在中枢神经系统中的深度或迅速发展型感染及芽生菌病；念珠菌病，包括泌尿道退行性念珠菌病(如在肾结石、泌尿道梗阻、肾移植或控制不佳的糖尿病患者中)；球孢子菌病，包括对其它治疗反应不佳的慢性疾病；隐球菌病；histoplasmosis；毛霉菌病，包括例如颅面毛霉菌病和肺毛霉菌病；巴西芽生菌病；和孢子丝菌病。所述方法可包括将至少一种如上所述的抗真菌脱氢苯基阿夕斯丁或其类似物对人类个体给药，从而治疗或预防真菌感染。在某些实施方案中，在将所述脱氢苯基阿夕斯丁或其类似物给药时可结合给药一种或多种非脱氢苯基阿夕斯丁或其类似物的抗真菌试剂，例如两性霉素 B 或诸如前述的咪唑或三唑试剂。

所述病原体真菌感染可以是局部的(例如除其它生物外,由念珠菌属、发癣菌属、小孢子菌属或 *Epidermophyton* (表皮癣菌)种引起的),或粘膜的(例如由白色念珠菌(例如真菌性口炎和阴道念珠菌病)引起的)。所述感染可以是全身性的,例如由白色念珠菌、新型隐球菌、烟曲霉、*Coccidioides*、*Paracoccidioides*、组织胞浆菌属(*Histoplasma*)或芽生菌引起的。所述感染还可包括真菌足分支菌病、着色芽生菌病(chromoblastomycosis)、隐球菌性脑膜炎(cryptococcal meningitis)或藻菌病(phycomycosis)。

另一些实施方案涉及治疗或预防病原体真菌感染的方法,其中所述真菌选自:念珠菌属,包括白色念珠菌、热带念珠菌、乳酒念珠菌、克鲁斯氏念珠菌和光滑念珠菌;曲霉属,包括烟曲霉和黄曲霉;新型隐球菌;芽生菌,包括皮炎芽生菌;卡氏肺囊虫;粗球孢子菌;蛙生蛙粪霉;耳霉属;荚膜组织胞浆菌;根霉属菌,例如米根霉和小孢根霉;小克银汉霉属;根粘菌属;巴西芽生菌;波氏足肿菌;西伯氏鼻孢子虫和申克氏孢子丝菌病。同样,所述方法可包括对有需要的个体给药非免疫抑制的抗真菌脱氢苯基阿芬斯丁或其类似物,从而治疗或预防真菌感染而不会诱导负面的免疫抑制作用。

另一些实施方案涉及治疗或预防耐其它抗真菌治疗剂的病原体真菌感染的方法,所述感染包括耐一种或多种本文其它部分所述的抗真菌剂的病原体真菌感染,这些抗真菌剂例如两性霉素 B、氟胞嘧啶、一种咪唑或三唑(包括,例如氟康唑、酮康唑、伊曲康唑克和其它前述例子)。所述方法可包括将一种或多种抗真菌脱氢苯基阿芬斯丁或其类似物以可治疗或预防个体的耐其它抗真菌治疗剂的真菌感染的剂量和方案对所述患者给药。

另一些实施方案涉及治疗或预防患者的病原体真菌感染的方法,其中所述患者对其它抗真菌治疗剂过敏,或不耐受、或无反应,或者对所述患者禁用其它抗真菌剂,所述其它抗真菌剂包括一种或多种本文其它部分提及的其它抗真菌剂,例如两性霉素 B、氟胞嘧啶、一种咪唑或三唑(包括,例如氟康唑、酮康唑、伊曲康唑克和其它前述例子)。所述方法可包括将一种或多种抗真菌脱氢苯基阿芬斯丁或其类似物以可治疗或预防真菌感染的剂量对这类患者给药。

包装的脱氢苯基阿夕斯丁或其类似物

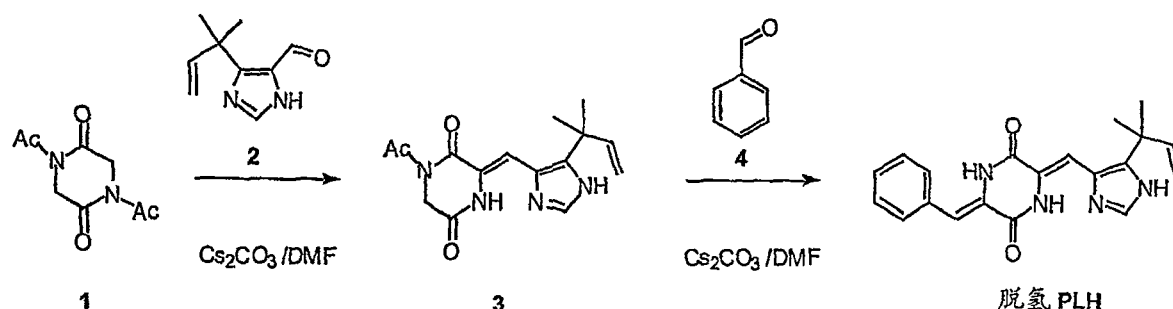
某些实施方案涉及包装的脱氢苯基阿夕斯丁或其类似物，优选包装的非免疫抑制性抗真菌脱氢苯基阿夕斯丁或其类似物，该术语的含义是指包括与说明书一起包装的至少一种上述脱氢苯基阿夕斯丁或其类似物，所述说明书指导将所述脱氢苯基阿夕斯丁或其类似物作为抗真菌剂对人类个体给药而不引起负面免疫抑制效果。在某些实施方案中，所述非免疫抑制性抗真菌脱氢苯基阿夕斯丁或其类似物是上述化合物的一个优选子集的成员。所述脱氢苯基阿夕斯丁或其类似物可单独与说明书一起包装，或可与其它脱氢苯基阿夕斯丁或其类似物、raparnycin 或其它成分或添加剂(例如一种或多种所述药物组合物的成分)一起包装。所述包装可包含一个或多个盛放有一种或多种所述药物组合物成分的容器。任意地在这类容器上标识有管理药物或生物学产品的生产、使用或销售的政府机关规定形式的通知，该通知表明上述机关批准为人类给药目的制造、使用或销售。

以下非限定性的实施方案目的是描述使用某些优选实施方案的优选方法。对所用具体方法及在实践中所得的具体化学组合物的细节进行的改变毫无疑问是本领域所属技术人员显而易见的。

实施例 1

A. 脱氢苯基阿夕斯丁的合成

如图 1 中所示, 根据如下的基本反应路线通过缩聚反应合成脱氢苯基阿夕斯丁:



N,N'-二乙酰基-2,5-吡嗪二酮

将溶于 100 mL 醋酸酐(Ac_2O)的 25.0 g 的 2,5-吡嗪二酮 1[2,5-吡嗪二酮(Aldrich G640-6), 25.0 g, 0.218 mol]与醋酸钠(NaOAc) (17.96 g, 0.218 mol)混合。用双盘冷凝器(double coiled condenser)在氩气环境下将所述混合物在 110°C 加热 8 小时。通过蒸发除去 Ac_2O 后, 将残余物用 AcOEt 溶解, 用 10% 柠檬酸、10% NaHCO_3 和饱和 NaCl 洗涤(各三次), Na_2SO_4 干燥, 并在真空下浓缩。残余物与乙醚一起研磨形成固体。用乙醚-己烷将该固体从 EtOAc 中重结晶出来, 得到 26.4g (61%) 的 $\text{N,N}'$ -二乙酰基-2,5-吡嗪二酮 1。

1-乙酰基-3-[(Z)-1-[5-(1,1-二甲基-2-丙烯基)-1H-4-咪唑基]亚甲基]-2,5-吡嗪二酮 2

向 5-(1,1-二甲基-2-丙烯基)咪唑-4-甲醛(100 mg, 0.609 mmol)的 DMF (2 mL)溶液中加入化合物 1 (241 mg, 1.22 mmol), 在短时间内对所得溶液进行重复排空以除去氧气并充入 Ar , 随后加入 Cs_2CO_3 (198 mg, 0.609 mmol), 并再次重复排空-充气的过程。将所得混合物在室温下搅拌 5 h。通过蒸发除去溶剂后, 将该残余物溶解在 EtOAc 与 10% Na_2CO_3 的混合物中, 所得有机相再次用 10% Na_2CO_3 洗涤并用饱和 NaCl 洗涤三次, 用

Na₂SO₄干燥,并在真空下浓缩。所残留的油状物以 CHCl₃-MeOH (100:0 到 50:1)为洗脱剂用硅胶柱层析纯化,得到 60 mg (33%)淡黄色固体 2。

脱氢苯基阿夕斯丁

向化合物 2 (30 mg, 0.099 mmol)的 DMF (0.8 mL)溶液中加入苯甲醛 (51 mL, 0.496 mol, 5 eq), 在短时间内对所得溶液进行重复排空以除去氧气并充入 Ar, 随后加入 Cs₂CO₃ (53 mg, 0.149 mmol, 1.5 eq), 并再次重复排空-充气的过程。将所得混合物在 80°C 加热 2.5 h (温度必须缓慢提升。迅速升温会导致在亚苄基部位的 E-异构体生成量的增加)。通过蒸发除去溶剂后,将所述残余物溶解在 EtOAc 中,水洗两次并用饱和 NaCl 洗涤三次,用 Na₂SO₄干燥,并在真空下浓缩。在 TLC 上使用 CHCl₃-MeOH (10:1), 在 365 nm UV 下可观察到亮黄绿色发光点。HPLC 分析得知该粗产物的纯度超过 75%。将所得残余物溶解在 90%的 MeOH 水溶液中并加入反相 HPLC 柱(YMC-Pack, ODS-AM, 20 × 250 mm)中,并用从 70%到 74%的线性梯度的 MeOH 水溶液以 12 mL/分钟的流动速率洗脱约 16 分钟,收集所需的部分并通过蒸发浓缩,得到 19.7 mg (60%)的黄色脱氢苯基阿夕斯丁。所合成的粗脱氢苯基阿夕斯丁的 HPLC 谱图如图 2 所示。

在纯化的脱氢苯基阿夕斯丁中(如图 4 所示),主要的峰为所需的脱氢苯基阿夕斯丁的 Z-形式化合物。观察到形成的 E-异构体为次要组分(约 10%),其洗脱成极性比 Z-异构体更大的峰。还观察到另一次要的峰,其代表脱氢苯基阿夕斯丁的二甲基烯丙基部分被还原的 Z-和 E-化合物的还原产物。所述还原化合物的形成是因为所述醛 2 含有还原的杂质,其在使用 DIBAL-H 进行还原的过程中产生且在后续过程中未被分离。

这些次要化合物可通过制备 HPLC 纯化除去,得到在所述亚苄基部位具有 Z-构象的脱氢苯基阿夕斯丁,收率 60% (在两步中的收率为 20%),纯度超过 95%。在该 HPLC 谱图中未观测到在所述哌嗪二酮环的咪唑侧具有 E-构象的化合物,表明图 1 所示的从化合物 1 到 3 的第一反应是 Z-选择性的。

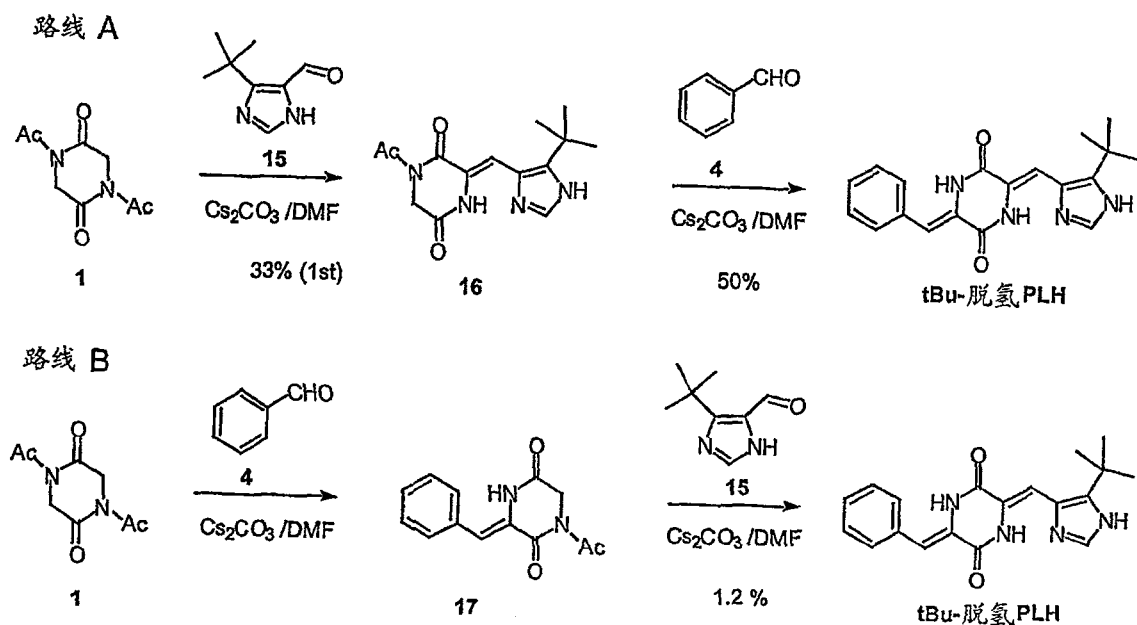
B. 化学性质

上述脱氢苯基阿夕斯丁化合物是淡黄色固体。通过标准 NMR 分析确认了其结构。

实施例 2

叔丁基-脱氢苯基阿夕斯丁衍生物的合成和物理性质

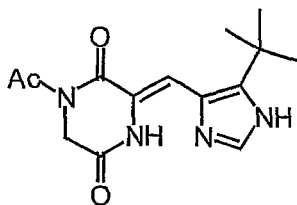
根据如下制备叔丁基-脱氢苯基阿夕斯丁的反应路线合成了脱氢苯基阿夕斯丁的结构衍生物。通过路线 A 的合成(见图 1)在某些方面与实施例 1 中脱氢苯基阿夕斯丁的合成类似。



路线 A:

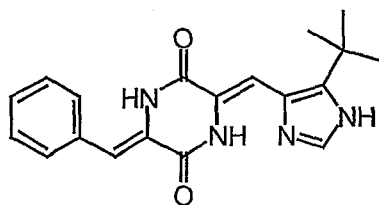
按照实施例 1 中所述方法制备 N,N'-二乙酰基-2,5-哌嗪二酮 1。

1) 1-乙酰基-3-{(Z)-1-[5-叔丁基-1*H*-4-咪唑基]亚甲基}-2,5-哌啶二酮(16)



向 5-叔丁基咪唑-4-甲醛 **15** (3.02 g, 19.8 mmol) 的 DMF (30 mL) 溶液中加入化合物 **1** (5.89 g, 29.72 mmol)，在短时间内对所得溶液进行重复排空以除去氧气并充入 Ar，随后加入 Cs₂CO₃ (9.7 g, 29.72 mmol)，并再次重复排空-充气的过程。将所得混合物在室温下搅拌 5 h。通过蒸发除去溶剂后，将所述残余物溶解在 EtOAc 与 10% NaHCO₃ 的混合物中，所得有机相再次用 10% Na₂CO₃ 洗涤并用饱和 NaCl 洗涤三次，用 Na₂SO₄ 干燥，并在真空下浓缩。所残留的油状物以 CHCl₃-MeOH (100:0 到 50:1) 为洗脱剂用硅胶柱层析纯化，得到 1.90 g (33%) 淡黄色固体 **16**。¹H NMR (270 MHz, CDCl₃), 12.14 (d, br-s, 1H), 9.22 (br-s, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.18 (s, 1H), 4.47 (s, 2H), 2.65 (s, 3H), 1.47 (s, 9H)。

2) 叔丁基-脱氢苯基阿夕斯丁



向 1-乙酰基-3-{(Z)-1-[5-叔丁基-1*H*-4-咪唑基]亚甲基}-2,5-哌啶二酮 (16) (11 mg, 0.038 mmol) 的 DMF (1.0 mL) 溶液中加入苯甲醛 (19 μL, 0.19 mmol, 5 eq)，在短时间内对所得溶液进行重复排空以除去氧气并充入 Ar，随后加入 Cs₂CO₃ (43 mg, 0.132 mmol, 3.5 eq)，并再次重复排空-充气的过

程。将所得混合物在 80°C 加热 2.5 h。通过蒸发除去溶剂后,将所述残余物溶解在 EtOAc 中,水洗两次并用饱和 NaCl 洗涤三次,用 Na₂SO₄ 干燥,并在真空下浓缩。将所得残余物溶解在 90% 的 MeOH 水溶液中并加入反相 HPLC 柱(YMC-Pack, ODS-AM, 20 × 250 mm)中,并用从 70% 到 74% 的线性梯度的 MeOH 水溶液以 12 mL/分钟的流速洗脱约 16 分钟,收集所需的部分并通过蒸发浓缩,得到 6.4 mg (50%) 的黄色叔丁基脱氢苯基阿夕斯丁。¹H NMR (270 MHz, CDCl₃), 12.34 (br-s, 1H), 9.18 (br-s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.31-7.49 (m, 5H), 7.01 (s, 2H), 1.46 (s, 9H)。

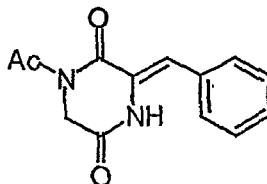
制备叔丁基-脱氢苯基阿夕斯丁的脱氢苯基阿夕斯丁反应与实施例 1 中相同。

回收的叔丁基-脱氢苯基阿夕斯丁的总收率为 16.5%。

路线 B:

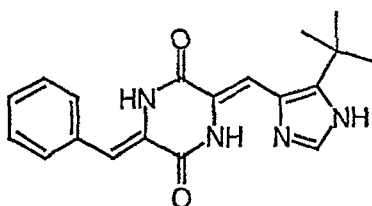
按照实施例 1 中所述方法制备 N,N'-二乙酰基-2,5-哌嗪二酮 1。

1) 1-乙酰基-3-[(Z)-亚苄基-1]-2,5-哌啶二酮(17)



向苯甲醛 4(0.54 g, 5.05 mmol) 的 DMF (5 mL) 溶液中加入化合物 1 (2.0 g, 10.1 mmol), 在短时间内对所得溶液进行重复排空以除去氧气并充入 Ar, 随后加入 Cs₂CO₃ (1.65 g, 5.05 mmol), 并再次重复排空-充气的过程。将所得混合物在室温下搅拌 3.5 h。通过蒸发除去溶剂后,将所述残余物溶解在 EtOAc 与 10% Na₂CO₃ 的混合物中,所得有机相再次用 10% Na₂CO₃ 洗涤并用饱和 NaCl 洗涤三次,用 Na₂SO₄ 干燥,并在真空下浓缩。所得残余物用 MeOH-乙醚重结晶得到 17 的黄白色固体; 产物 1.95 g (79%)。

2) 叔丁基-脱氢苯基阿夕斯丁



向 1-乙酰基-3-[(Z)-亚苄基-1]-2,5-咪啉二酮(17) (48 mg, 0.197 mmol) 的 DMF (1.0 mL) 溶液中加入 5-叔丁基咪唑-4-甲醛 15 (30 mL, 0.197 mmol), 在短时间内对所得溶液进行重复排空以除去氧气并充入 Ar, 随后加入 Cs_2CO_3 (96 mg, 0.296 mmol), 并再次重复排空-充气的过程。将所得混合物在 80°C 加热 14 h。通过蒸发除去溶剂后, 将所述残余物溶解在 EtOAc 中, 水洗两次并用饱和 NaCl 洗涤三次, 用 Na_2SO_4 干燥, 并在真空下浓缩。将所得残余物溶解在 90% 的 MeOH 水溶液中并加入反相 HPLC 柱(YMC-Pack, ODS-AM, 20×250 mm)中, 并用从 70%到 74%的线性梯度的 MeOH 水溶液以 12 mL/分钟的流速洗脱约 16 分钟, 收集所需的部分并通过蒸发浓缩, 得到 0.8 mg (1.2%) 的黄色叔丁基脱氢苯基阿夕斯丁。

回收的叔丁基-脱氢苯基阿夕斯丁的总收率为 0.9%。

通过路线 A 和路线 B 合成的粗叔丁基-脱氢苯基阿夕斯丁的 HPLC 谱图如图 4 所示。

根据路线 A 的方法合成了另两种叔丁基-脱氢苯基阿夕斯丁衍生物。在上述其它叔丁基-脱氢苯基阿夕斯丁衍生物的合成中, 对所述苯甲醛化合物 4 进行了改变。

图 4 显示了实施例 1 合成的脱氢苯基阿夕斯丁(图 2)和上述通过路线 A 制备的代表性的叔丁基-脱氢苯基阿夕斯丁的 HPLC 谱图的相似性(色谱柱: YMC-Pack ODS-AM (20×250 mm); 梯度: 65%-75%的甲醇-水体系洗脱 20 分钟, 随后用 100%的甲醇体系洗脱 10 分钟; 流动速率: 12mL/分钟; O.D. 230 nm)。

所述醛的加入顺序对收率有影响, 从而也是合成的一个方面。作为对照或模型, 合成了脱氢苯基阿夕斯丁的类似物, 其中所述二甲基烯丙基集团转变成在所述咪唑环的 5-位具有类似空间位阻的叔丁基集团。

如上所述使用“路线 A”合成了这种“叔丁基(tBu)-脱氢苯基阿夕斯丁”。特别地, 完全遵循脱氢苯基阿夕斯丁合成的醛加入顺序得到了 16.5%

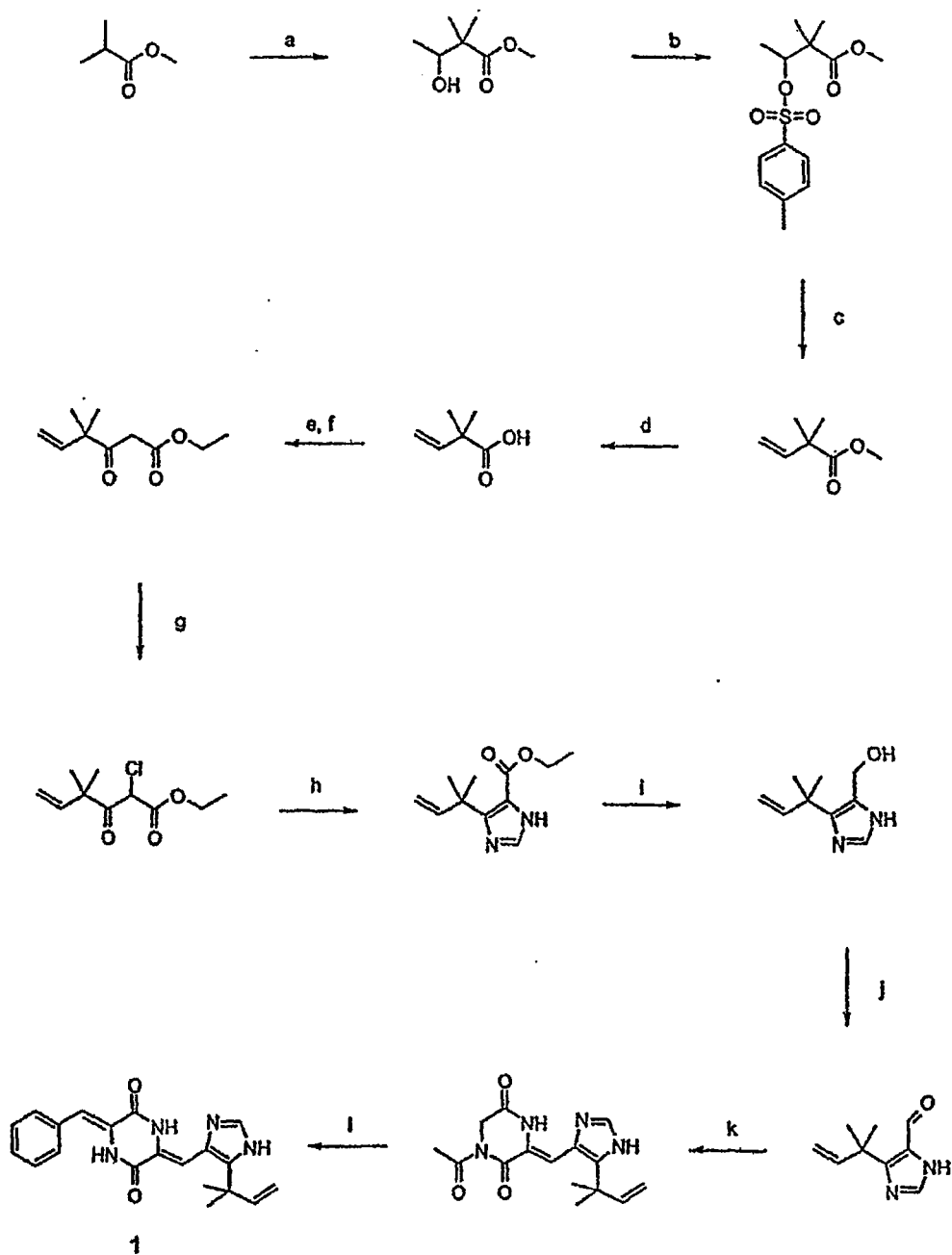
的 tBu-脱氢苯基阿夕斯丁总收率。这一收率与脱氢苯基阿夕斯丁的收率 (20%) 类似。使用“路线 B”，其中所述醛的加入顺序与“路线 A”中合成脱氢苯基阿夕斯丁的顺序相反，只得到总收率 0.9% 的痕量的所需 tBu-脱氢苯基阿夕斯丁，尽管加入第一苯甲醛 4 时得到 76% 收率的中间体化合物 17。这种结果表明可能难以在中间体化合物 17 上引入在咪唑环上相邻的 5-位连有季碳取代基的较大体积的咪唑-4-甲醛 15，说明醛的加入顺序对使用本文公开方法合成高收率的脱氢苯基阿夕斯丁或脱氢苯基阿夕斯丁类似物是一个重要的方面。

如图 4 所示，从对所得最终粗产物的 HPLC 分析中可见，在所述路线 A (左) 的粗样品中观测到高含量的 tBu-脱氢苯基阿夕斯丁和少量的副产物。然而，在通过路线 B (右) 获得的样品中观测到相对少量的所需 tBu-脱氢苯基阿夕斯丁和多种其它副产物。

实施例 3

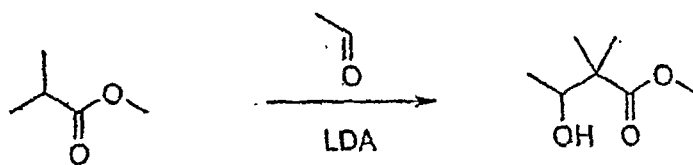
脱氢苯基阿夕斯丁及类似物的其它大规模合成

3-Z-亚苄基-6-[5''-(1,1-二甲基烯丙基)-1H-咪唑-4''-Z-基亚甲基]-哌嗪-2,5-二酮[脱氢苯基阿夕斯丁] (1) 的合成



试剂: a) LDA, CH₃CHO; b) Tos-Cl, 吡啶; c) DBU; d) NaOH; e) C₂Cl₂O₂; f) KOOCCH₂COOEt, BuLi; g) SO₂Cl₂; h) H₂NCHO, H₂O; i) LiAlH₄; j) MnO₂; k) 1,4-二乙酰基-咪唑-2,5-二酮, Cs₂CO₃; l) 苯甲醛, Cs₂CO₃

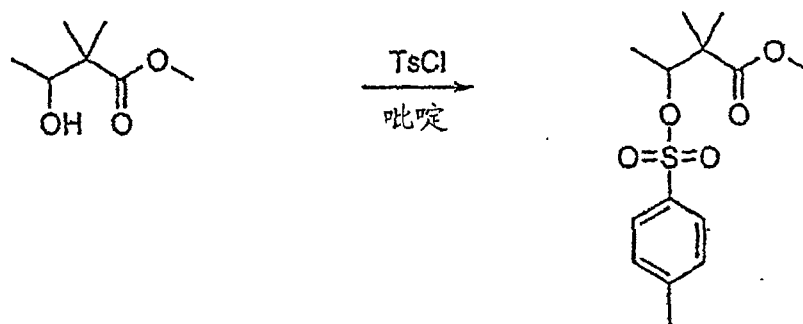
3-羟基-2,2-二甲基-丁酸甲酯



在氩气环境下, 于 -60°C 将 LDA 的己烷/THF/乙苯(2 M, 196 ml, 0.39 mol)溶液加入异丁酸甲酯(45 ml, 0.39 mol)的 THF (270 ml)溶液中, 将所得混合物搅拌 30 分钟。缓慢加入预冷至 -60°C 的乙醛(27 ml, 0.48 mol)的 THF (45 ml)溶液, 使所得溶液继续搅拌 30 分钟。加入饱和氯化铵(50ml)并使所得溶液升温至室温。反应混合物用乙酸乙酯萃取, 萃取物先后用 HCl (2 M)、碳酸氢钠和盐水洗涤。有机层用硫酸镁干燥、过滤、然后蒸发得到澄清的油状物(52.6 g)。在 $76-82^{\circ}/30\text{ mmHg}$ 蒸馏得到纯净的 3-羟基-2,2-二甲基-丁酸甲酯(42.3 g, 74%)。 (Burk et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 117: 4423-4424(1995))。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.15 (d, $J=6.2\text{ Hz}$, 3H); 1.17 (s, 6H); 2.66 (d, $J=6.2\text{ Hz}$, 1H, -OH); 3.71 (s, 3H, -OMe); 3.87 (app 五重峰, $J=6.4\text{ Hz}$, 1H, H3)。

2,2-二甲基-3-(甲苯-4-磺酰氧基)-丁酸甲酯



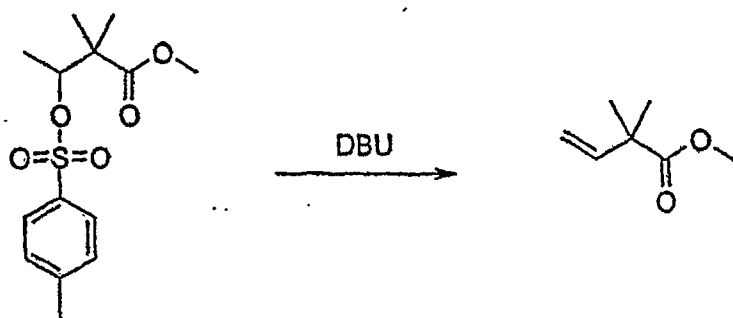
向冷却(0°C)的 3-羟基-2,2-二甲基丁酸甲酯(52.0 g, 0.36 mol)的吡啶 (100 ml)溶液中逐渐加入对甲基苯磺酰氯(69.0 g, 0.36 mol)。使所得混合物升温至室温并搅拌 60 h。在冰中将反应物再次冷却并通过加入 HCl (2 M)

进行酸化。所得溶液用乙酸乙酯萃取，所得萃取物先后用 HCl 和盐水洗涤，干燥、蒸发得到油状物，静置后产生白色沉淀。用最少量的乙酸乙酯将该混合物溶解，随后加入石油醚得到白色沉淀，收集沉淀并用更多石油醚洗涤。滤液进行部分蒸发，再次收集得到的结晶并将其加入第一次收集的结晶中，得到 2,2-二甲基-3-(甲苯-4-磺酰氧基)丁酸甲酯(81.2 g, 76%)。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.12 (s, 3H); 1.13 (s, 3H); 1.24 (d, $J=6.4$ Hz, 3H); 2.45 (s, 3H, -PhMe); 3.58 (s, 3H, -OMe); 4.94 (四重峰, $J=6.4$ Hz, 1H, H3), 7.33 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.78 (d, $J=8.0$ Hz, 2H)。

蒸发剩余的滤液得到额外的粗 2,2-二甲基-3-(甲苯-4-磺酰氧基)丁酸甲酯(19.0 g, 18%)。

2,2-二甲基-3-丁烯酸甲酯



将 2,2-二甲基-3-(甲苯-4-磺酰氧基)丁酸甲酯(18.06 g, 0.06 mol)的 DBU (15 ml)溶液在 140-160°加热 3.5 h。使所得混合物冷却至室温，随后用乙醚稀释。所得混合物先后用 HCl (1 M)、碳酸氢钠和盐水洗涤。将所得醚层干燥并部分蒸发得到浓缩的 2,2-二甲基-3-丁烯酸甲酯溶液(10 g)。(Savu and Katzenellenbogen, *J. Org. Chem.*, 46:239-250 (1981))。因为所得产物(bp 102°)的挥发性，应避免进一步的蒸发。(Tsaconas et al., *Aust. J. Chem.*, 53:435-437 (2000))。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.31 (s, 6H); 3.68 (s, 3H); 5.06 (d, $J=17.1$ Hz, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$); 5.11 (d, $J=10.7$ Hz, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$); 6.03 (dd, $J=17.1$, 10.7 Hz, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$)。

2,2-二甲基-3-丁烯酸



将上述 2,2-二甲基-3-丁烯酸甲酯(10 g)的醚溶液用乙醇稀释(25 ml), 加入氢氧化钠(4 M, 22 ml)并将所得混合物搅拌过夜。将所得溶液部分蒸发除去乙醇, 并将所得混合物加入 HCl (1M, 100 ml)中。所得产物用乙酸乙酯萃取, 将萃取液干燥并蒸发得到 2,2-二甲基-3-丁烯酸(6.01 g, 88%两步)。(Hayashi et al., *J. Org. Chem.*, 65:8402-8405 (2000))。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.33 (s, 6H); 5.11 (d, $J=10.8$ Hz, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$); 5.15 (d, $J=17.2$ Hz, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$); 6.05 (dd, $J=17.2, 10.8$ Hz, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$)。

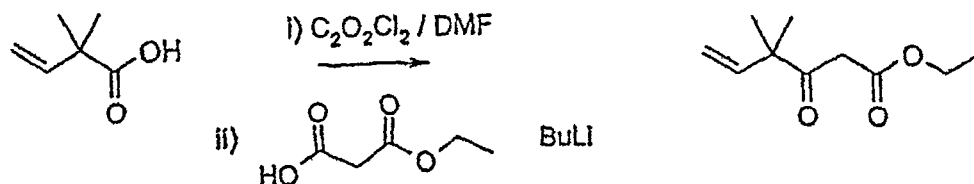
丙二酸单乙酯(Wierenga and Skulnick, "Aliphatic and Aromatic β -keto Esters from Monoethyl Malonate: Ethyl 2-Butyrylacetate," *Organic Syntheses Collective Volume 7*, 213)。



将丙二酸单乙酯的钾盐(25.0 g, 0.15 mol)悬浮在水(15.6 ml)中并在冰浴中冷却。30 分钟内滴加浓盐酸(12.5 ml), 然后将所得混合物继续搅拌 10 分钟。过滤所得沉淀并用乙醚洗涤两次。分离出滤液, 水相用乙醚萃取。将合并的醚溶液干燥(MgSO_4)并蒸发, 得到油状的丙二酸单乙酯(19.2

g, 99%), 使用前将其在真空下干燥过夜(或 50°/1 mm 下 1 h)。

4,4-二甲基-3-氧-5-己烯酸乙酯

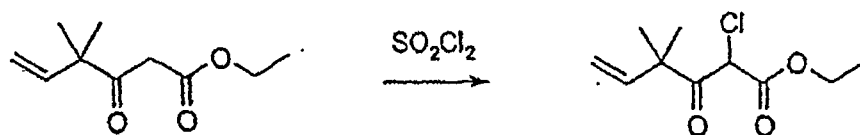


将乙二酰氯(3.83 ml, 43.9 mmol)滴加入冷却(0°C)的 2,2-二甲基-3-丁烯酸(5.0 g, 43.9 mmol)与 DMF(1 滴)的无水二氯甲烷(25 ml)溶液中。将所得混合物在 0°C 搅拌 1 h, 然后在室温下搅拌 16 h。分馏(121°/760 mmHg)得到 2,2-二甲基-3-丁烯酰氯(4.1 g, 71%)。

将丙二酸单乙酯(7.2 g, 0.05 mol)和联吡啶(几毫克)溶解在 THF (90 ml)中, 并在所得体系中充入氮气。将所得溶液冷却至-70°C, 随后加入 BuLi (2.5 M 在己烷中, 37 ml, 0.09 mol)。在加入约 10 ml BuLi 后, 所述溶液变为粉红色, 同时为维持磁力搅拌需再加入 THF (15 ml)。移去冷却浴并加入剩余的 BuLi, 使温度达至-10°, 此时反应溶液变为无色。将混合物再次冷却至-60°C, 并滴加 2,2-二甲基-3-丁烯酰氯(4.1 g, 0.03 mol)的 THF(12ml)溶液。滴加完成后, 使所得混合物升温至 0°并搅拌 3 h, 随后在 0°将其加入 1:1 的乙醚/1M HCl (260 ml)混合物中并继续搅拌 1.5 h。分离有机层, 先后用 HCl (1 M)、碳酸氢钠溶液、盐水洗涤, 然后干燥并蒸发, 得到 4,4-二甲基-3-氧-5-己烯酸乙酯(5.6 g, 98%)。(Hayashi et al., *J. Org. Chem.*, 65:8402-8405 (2000))。用 Kugelrohr 炉蒸馏(160°/1 mmHg)得到纯的材料。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.26 (s, 6H); 1.27 (t, $J=6.9$ Hz, 3H, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 3.51 (s, 2H); 4.18 (q, $J=6.9$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 5.20 (d, $J=17.7$ Hz, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$); 5.21 (d, $J=9.6$ Hz, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$); 5.89 (dd, $J=17.7, 9.6$ Hz, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$)。

2-氯-4,4-二甲基-3-氧-5-己烯酸乙酯



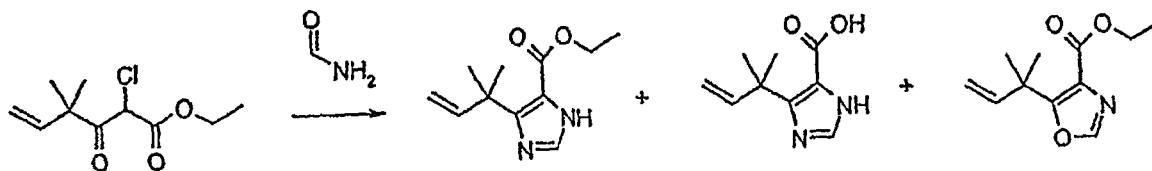
将磺酰氯(0.84 ml, 10.4 mmol)加入冷却(0°)的 4,4-二甲基-3-氧-5-己烯酸乙酯(18.3 g, 9.93 mmol)的氯仿(7 ml)溶液中。使所得混合物升温至室温并搅拌 30 分钟, 随后将其加热回流 2 h。冷却至室温后, 将所得反应混合物用氯仿稀释, 随后依次用碳酸氢钠、水和盐水洗涤。将有机相干燥并蒸发得到褐色油状的 2-氯-4,4-二甲基-3-氧-5-己烯酸乙酯(2.01 g, 93%)。(Hayashi et al., *J. Org. Chem.*, 65:8402-8405 (2000))。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.28 (t, $J=7.0$ Hz, 3H, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 1.33 (s, 3H); 1.34 (s, 3H); 4.24 (q, $J=7.0$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 5.19 (s, 1H); 5.28 (d, $J=16.9$ Hz, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$); 5.29 (d, $J=10.9$ Hz, 1H, $-\text{CH}-\text{CH}_2$); 5.96 (dd, $J=16.9, 10.9$ Hz, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$)。

LC/MS $t_R = 8.45$ (219.3 $[\text{M}(\text{Cl}^{37})+\text{H}]^+$) min。

使用该材料直接进行反应无需进一步纯化。

5-(1,1-二甲基-烯丙基)-3H-咪唑-4-羧酸乙酯



将悬浮在甲酰胺(36.8 ml)中的 2-氯-4,4-二甲基-3-氧-5-己烯酸乙酯(19.4 g, 0.09 mol)和水(1.94 ml, 0.11 mol)的悬浮液轻微摇动, 然后装入 15×18 ml 的小瓶中。将小瓶密封并在 150° 加热 5 h。待冷却至室温后, 将所述各小瓶中的成分混合并用氯仿彻底萃取。将萃取物干燥并蒸发得到浓缩的甲酰胺溶液(14.7 g)。将其加入浸泡于 1% MeOH/1% Et_3N 的氯仿溶

液中的二氧化硅层析柱(7 cm 直径, 11 cm 高)中。用 2 L 这种混合物对所述层析柱进行洗脱, 然后使用 2 L 的 2% MeOH/1% Et₃N 的氯仿溶液洗脱, 在较早洗脱的部分中, 得到怀疑为 5-(1,1-二甲基烯丙基)-咪唑-4-羧酸乙酯(1.23 g, 7%)的化合物。

HPLC (214nm) t_R = 8.68 (50.4%) min。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.40 (t, J =7.2 Hz, 3H, -CH₂CH₃); 1.54 (s, 6H); 4.38 (t, J =7.2 Hz, 2H, -CH₂CH₃); 5.03 (d, J =17.4 Hz, 1H, -CH=CH₂); 5.02 (d, J =10.4 Hz, 1H, -CH=CH₂); 6.26 (dd, J =17.4, 10.4 Hz, 1H, -CH=CH₂); 7.83 (s, 1H)。

LCMS t_R = 8.00 (210.1 [M+H]⁺, 361.1 [2M+H]⁺) min。

从较后的部分中回收得到所需的 5-(1,1-二甲基-烯丙基)-3H-咪唑-4-羧酸乙酯(3.13 g, 17%)。(Hayashi et al., *J. Org. Chem.*, 65:8402-8405 (2000))。

HPLC (214nm) t_R = 5.52 (96.0%) min。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.38 (t, J =7.0 Hz, 3H); 1.57 (s, 6H); 4.35 (q, J =7.0 Hz, 2H); 5.04-5.14 (m, 2H, -CH=CH₂); 6.28 (dd, J =18.0, 10.4 Hz, 1H, -CH=CH₂); 7.52 (s, 1H)。

LC/MS t_R = 5.30 (209.1 [M+H]⁺, 417.2 [2M+H]⁺) min。

也可从所述层析柱中回收更多的 5-(1,1-二甲基-烯丙基)-3H-咪唑-4-羧酸乙酯(3.59 g, 19%), 虽然其纯度较低但仍满足后续反应的需要。

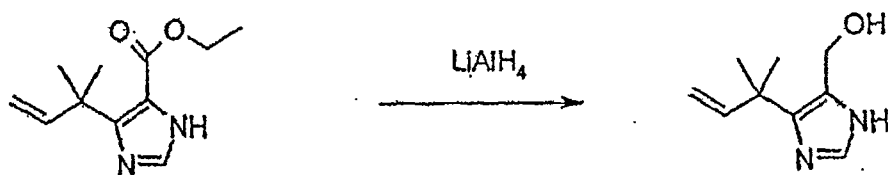
在类似反应(较小规模)中, 通过用溶于氯仿的 5% MeOH/1% Et₃N 对所述层析柱进行进一步洗脱分离得到其它副产物, 怀疑其为 5-(1,1-二甲基-烯丙基)-3H-咪唑-4-羧酸(0.27 g, 9%)。

HPLC (245nm) t_R = 5.14 (68.9%) min。

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.45 (s, 6H); 4.97 (d, J =10.6 Hz, 1H, -CH=CH₂); 5.01 (d, J =17.7 Hz, 1H, -CH=CH₂); 6.28 (dd, J =17.7, 10.6 Hz, 1H, -CH=CH₂); 7.68 (s, 1H)。

LCMS t_R = 4.72 (181.0 [M+H]⁺, 361.1 [2M+H]⁺) min。

[5-(1,1-二甲基-烯丙基)-3H-咪唑-4-基]-甲醇



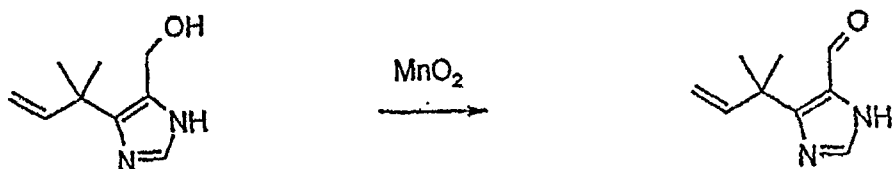
将 5-(1,1-二甲基-烯丙基)-3H-咪唑-4-羧酸乙酯(3.13 g, 15.0 mmol)的 THF (60 ml)溶液滴加入氢化铝锂(95%悬浮, 1.00 g, 25.0 mmol)悬浮在 THF (40 ml)中所得的悬浮液中, 并将所得混合物在室温下搅拌 4 h。加水直至不再产生气体为止, 将反应混合物搅拌 10 分钟, 随后用烧结(sintered)漏斗过滤。沉淀先后用 THF 及甲醇洗涤, 将滤液和洗涤液合并、蒸发、然后冻干, 得到[5-(1,1-二甲基-烯丙基)-3H-咪唑-4-基]甲醇(2.56 g, 102%)。在后续反应前通过与氯仿共沸除去残余的水。(参见, Hayashi 等, *J. Org. Chem.*, 65:8402-8405 (2000))。

HPLC (240nm) t_R = 3.94 (56.8%) min.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.43 (s, 6H); 4.57 (s, 2H); 5.01 (d, J =10.5 Hz, 1H, -CH=CH₂); 5.03 (d, J =17.7 Hz, 1H, -CH=CH₂); 6.10 (dd, J =17.7, 10.5 Hz, 1H, -CH=CH₂); 7.46 (s, 1H)。

LC/MS t_R = 3.77 (167.3 [M+H]⁺) min.

5-(1,1-二甲基-烯丙基)-3H-咪唑-4-甲醛



将二氧化锰(20 g, 0.23 mol)加入[5-(1,1-二甲基烯丙基)-3H-咪唑-4-基]甲醇(2.56 g, 0.02 mol)的丙酮(300 ml)溶液中, 将所得混合物在室温下搅拌 5 h。将反应混合物用滤纸过滤, 残余物用丙酮洗涤。将滤液与洗涤液合

并蒸发，得到 5-(1,1-二甲基烯丙基)-3H-咪唑-4-甲醛(1.82 g, 51%)。

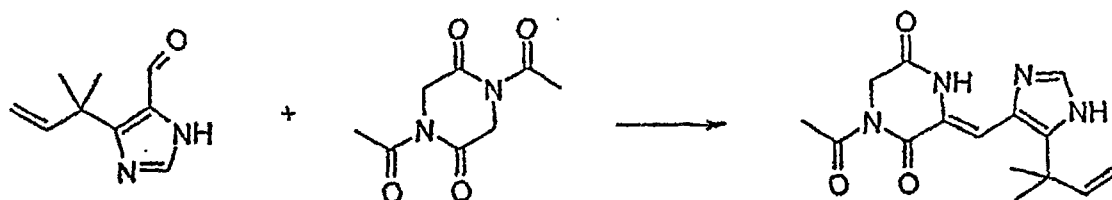
(Hayashi et al., *J. Org. Chem.*, 65:8402-8405 (2000))。

HPLC (240nm) t_R = 4.08 (91.5%) min.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.56 (s, 6H); 5.16 (d, $J=10.6$ Hz, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$); 5.19 (d, $J=17.3$ Hz, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$); 6.22 (dd, $J=17.3, 10.6$ Hz, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$); 7.75 (s, 1H), 10.02 (s, 1H, HCO)。

LC/MS t_R = 3.75 (165.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$) min.

1-乙酰基-3-[5'-(1,1-二甲基烯丙基)-1H-咪唑-4'-Z-基亚甲基]哌嗪-2,5-二酮



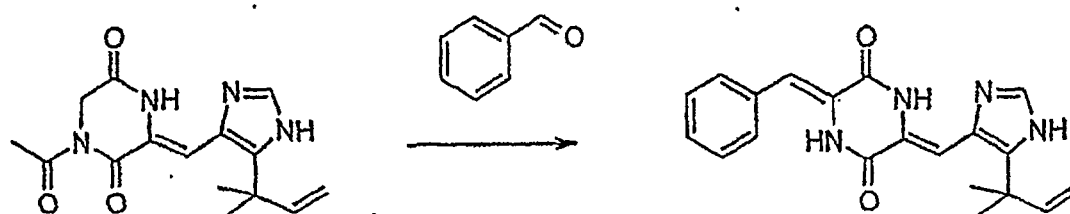
向 5-(1,1-二甲基烯丙基)-3H-咪唑-4-甲醛(1.78 g, 0.01 mol)的 DMF (35 ml)溶液中加入 1,4-二乙酰基哌嗪-2,5-二酮(8.59 g, 0.04 mol)，对所述混合物进行排空，随后充入氩气。将排空-充气过程再重复两次，随后加入碳酸铯(3.53 g, 0.01 mol)。将排空-充气过程再重复三次，随后将反应混合物在 45° 加热 5 h。将反应混合物部分蒸发(在高真空下加热)直到剩余少量体积，将所得溶液滴加入冰水(50 ml)中。收集产生的黄色沉淀，用水洗涤然后冻干，得到 1-乙酰基-3-[5'-(1,1-二甲基烯丙基)-1H-咪唑-4'-Z-基亚甲基]哌嗪-2,5-二酮(1.18 g, 36%)。(Hayashi, Personal Communication (2001))。

HPLC (214nm) t_R = 6.01 (72.6%) min.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.53 (s, 6H); 2.64 (s, 3H); 4.47 (s, 2H); 5.19 (d, $J=17.3$ Hz, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$); 5.23 (d, $J=10.7$ Hz, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$); 6.06 (dd, $J=17.3, 10.7$ Hz, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$); 7.16 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 9.47 (bs, 1H); 12.11 (bs, 1H) [观测到的 ~2% 1,4-二乙酰基哌嗪-2,5-二酮杂质 δ 2.59 (s, 6H); 4.60 (s, 4H)。]

LC/MS $t_R = 6.65$ ($303.3 [M+H]^+$, $605.5 [2M+H]^+$) min. (n.b.使用不同体系)。

3-Z-亚苄基-6-[5''-(1,1-二甲基烯丙基)-1H-咪唑-4''-Z-基亚甲基]哌嗪-2,5-二酮



向 1-乙酰基-3-[5''-(1,1-二甲基烯丙基)-1H-咪唑-4''-基亚甲基]哌嗪-2,5-二酮(2.91 g, 9.62 mmol)的 DMF (70 ml)溶液中加入苯甲醛(4.89 ml, 48.1 mmol), 对所述溶液进行排空, 随后充入氩气。将排空-充气过程再重复两次, 随后加入碳酸铯(4.70 g, 14.4 mmol)。将排空-充气过程再重复三次, 随后将反应混合物在如下的温度梯度下进行加热。

反应共进行 5 小时后, 使反应物冷却至室温, 并将反应混合物加入冰水中(500 ml)。收集产生的沉淀, 用水(300 ml)洗涤然后冻干, 得到黄色固体(2.80 g)。将该材料溶于氯仿(250 ml)中, 用滤纸过滤并蒸发以共沸除去残留的水。将残留的黄色沉淀(2.70 g, HPLC (214 nm) $t_R = 7.26$ (93.6%) min。)部分溶解于氯仿(20 ml), 将所得悬浮液用超声处理 5 分钟, 随后收集所得固体并用空气干燥, 得到 3-Z-亚苄基-6-[5''-(1,1-二甲基烯丙基)-1H-咪唑-4''-Z-基亚甲基]哌嗪-2,5-二酮(1.82 g, 54%) (Hayashi, Personal Communication (2001)), m.p. 239-240° (dec.)。

HPLC (214nm) $t_R = 6.80$ (1.92) min, 7.33 (95.01%)。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.53 (s, 6H); 5.18 (d, $J=17.6$ Hz, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$); 5.21 (d, $J=11.0$ Hz, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$); 6.06 (dd, $J=17.6, 11.0$ Hz, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}_2$); 6.99 (s, 1H, $-\text{C}-\text{C}=\text{CH}$); 7.00 (s, 1H, $-\text{C}-\text{C}=\text{CH}$); 7.30-7.50 (m, $5 \times \text{ArH}$); 7.60 (s, H_2''); 8.07 (bs, NH); 9.31 (bs, NH); 12.30 (bs, NH)。

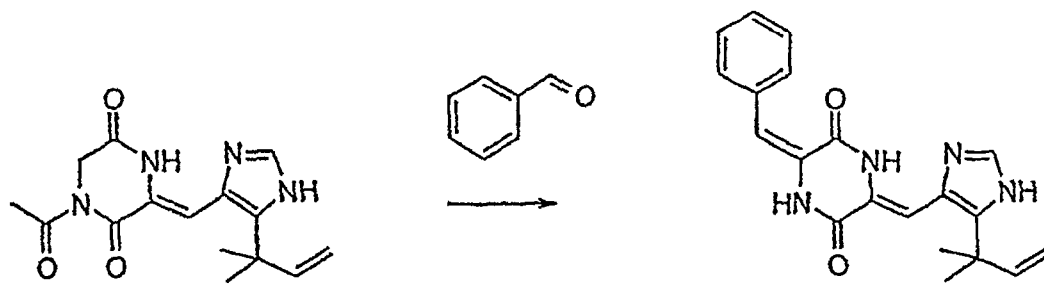
LC/MS $t_R = 6.22$ (349.3 $[M+H]^+$, E 异构体), 6.73 (349.5 $[M+H]^+$, 697.4 $[2M+H]^+$, Z 异构体) min.

ESMS m/z 349.5 $[M+H]^+$, 390.3 $[M+CH_4CN]^+$.

将所得氯仿溶液蒸发得到更多的 3-E-亚苄基-6-[5''-(1,1-二甲基烯丙基)-1H-咪唑-4''-Z-基亚甲基]哌嗪-2,5-二酮(0.76 g, 29%)。

HPLC (214nm) $t_R = 7.29$ (84.5%) min.

3-E-亚苄基-6-[5''-(1,1-二甲基烯丙基)-1H-咪唑-4''-Z-基亚甲基]哌嗪-2,5-二酮



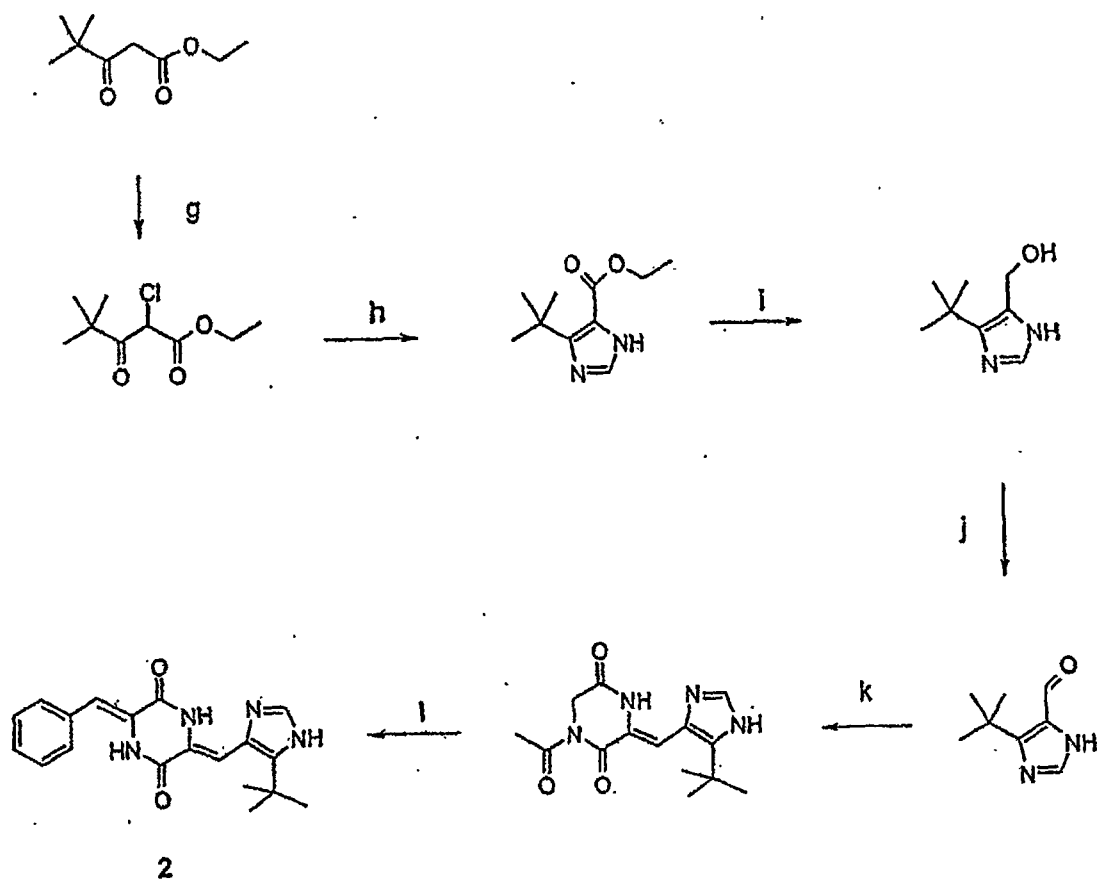
对如上合成的材料的粗样品用制备 HPLC 色谱纯化, 得到几何异构体 3-E-亚苄基-6-[5''-(1,1-二甲基烯丙基)-1H-咪唑-4''-Z-基亚甲基]哌嗪-2,5-二酮(1.7 mg)。

HPLC (214nm) $t_R = 6.75$ (87.79) min.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1.52 (s, 6H); 5.19 (d, $J=20.8$ Hz, 1H, $CH=CH_2$); 5.22 (d, $J=14.0$ Hz, 1H, $CH=CH_2$); 6.05 (dd, $J=18.0, 10.4$ Hz, 1H, $CH=CH_2$); 6.33 (s, 1H, C-C=CH); 6.90-7.65 (m, 7H)。

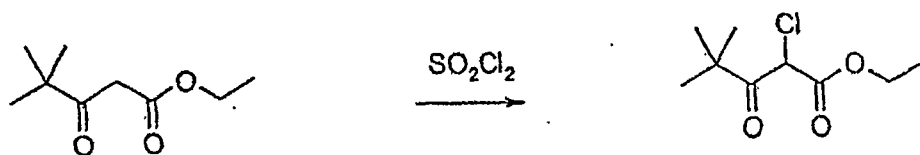
ESMS m/z 349.5 $[M+H]^+$, 390.4 $[M+CH_4CN]^+$.

3-Z-亚苄基-6-(5''-叔丁基-1H-咪唑-4''-Z-基亚甲基)哌嗪-2,5-二酮(2)的合成



试剂: g) SO_2Cl_2 ; h) H_2NCHO , H_2O ; i) LiAlH_4 ; j) MnO_2 ; k) 1,4-二乙酰基哌嗪-2,5-二酮, Cs_2CO_3 ; l) 苯甲醛, Cs_2CO_3

2-氯-4,4-二甲基-3-氧-戊酸乙酯



将磺酰氯(14.0 ml, 0.17 mol)加入冷却(0°)的三甲基乙酰乙酸乙酯(27.17 g, 0.16 mol)的氯仿(100 ml)溶液中。使所得混合物升温至室温并搅

拌 30 分钟, 随后将其在回流温度下加热 2.5 h。冷却至室温后, 将所得反应混合物用氯仿稀释, 随后按顺序用碳酸氢钠、水和盐水洗涤。

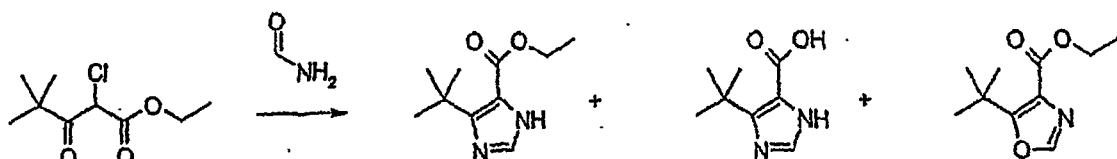
将有机相干燥并蒸发得到澄清油状的 2-氯-4,4-二甲基-3-氧-戊酸乙酯 (33.1 g, 102%)。 (Durant et al., "Aminoalkylimidazoles and Process for their Production." 专利号 GB1341375 (大不列颠, 1973))。

HPLC (214nm) $t_R = 8.80$ (92.9%) min。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.27 (s, 9H); 1.29 (t, $J=7.2$ Hz, 3H); 4.27 (q, $J=7.2$ Hz, 2H); 5.22 (s, 1H)。

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 13.8, 26.3, 45.1, 54.5, 62.9, 165.1, 203.6。

5-叔丁基-3H-咪唑-4-羧酸乙酯



将 2-氯-4,4-二甲基-3-氧戊酸乙酯 (25.0 g, 0.12 mol) 的甲酰胺 (47.5 ml) 溶液和水 (2.5 ml) 摇匀, 然后装入 15×8 ml 的小瓶中。将小瓶全部密封并在 150° 加热 3.5 h。使小瓶冷却至室温, 向其中加入水 (20 ml) 并将所得混合物用氯仿彻底萃取。除去氯仿得到浓缩的甲酰胺溶液 (22.2 g), 将其加入用 1% MeOH/1% Et_3N 的氯仿溶液浸泡的快速二氧化硅层析柱 (6 cm 直径, 12 cm 高) 中。用 2.5 L 这种混合物对所述层析柱进行洗脱, 然后使用 1 L 的 2% MeOH/1% Et_3N 的氯仿溶液洗脱, 在较早洗脱的部分中, 得到怀疑为 5-叔丁基-咪唑-4-羧酸乙酯 (6.3 g, 26%) 的产物。

HPLC (214nm) $t_R = 8.77$ min。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.41 (t, $J=7.2$ Hz, 3H); 1.43 (s, 9H); 4.40 (q, $J=7.2$ Hz, 2H); 7.81 (s, 1H)。

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 14.1, 28.8, 32.5, 61.3, 136.9, 149.9, 156.4, 158.3。

ESMS m/z 198.3 $[M+H]^+$, 239.3 $[M+CH_4CN]^+$.

LC/MS $t_R = 7.97$ (198.1 $[M+H]^+$) min.

从后洗脱的部分中回收得到 5-叔丁基-3H-咪唑-4-羧酸乙酯(6.20 g, 26%)。(Durant et al., "Aminoalkylimidazoles and Process for their Production." 专利号 GB 1341375 (大不列颠, 1973))。

HPLC (214nm) $t_R = 5.41$ (93.7%) min.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1.38 (t, $J=7.0$ Hz, 3H); 1.47 (s, 9H); 4.36 (q, $J=7.2$ Hz, 2H); 7.54 (s, 1H).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 13.7, 28.8, 32.0, 59.8, 124.2, 133.3, 149.2, 162.6.

ESMS m/z 197.3 $[M+H]^+$, 238.3 $[M+CH_4CN]^+$.

用 1L 5% MeOH/1% Et_3N 对所述层析柱进一步洗脱得到怀疑为 5-叔丁基-3H-咪唑-4-羧酸(0.50 g, 2%)的化合物。

HPLC (245nm) $t_R = 4.68$ (83.1%) min.

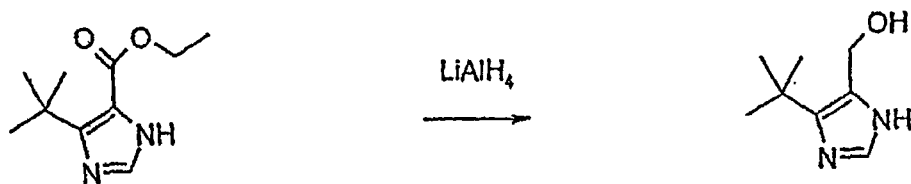
1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 1.36 (s, 9H); 7.69 (s, 1H).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1.37 (s, 9H); 7.74 (s, 1H).

1H NMR (400 MHz, CD_3SO) δ 1.28 (s, 9H); 7.68 (s, 1H).

ESMS m/z 169.2 $[M+H]^+$, 210.4 $[M+CH_4CN]^+$.

(5-叔丁基-3H-咪唑-4-基)-甲醇



将 5-叔丁基-3-咪唑-4-羧酸乙酯(3.30 g, 16.8 mmol)的 THF (60 ml)溶液滴加入氢化铝锂(95%悬浮液, 0.89 g, 22.2 mmol)悬浮在 THF (40 ml)中所得的悬浮液中, 并将所得混合物在室温下搅拌 3 h。加水直至不再产生气体为止, 将反应混合物搅拌 10 分钟, 随后用烧结漏斗过滤。沉淀先后用 THF 及甲醇洗涤, 将滤液和洗涤液合并并蒸发。残余物冻干过夜, 得

到(5-叔丁基-3H-咪唑-4-基)甲醇(2.71 g, 105%)。(Durant et al., "Aminoalkylimidazoles and Process for their Production." 专利号 GB 1341375 (大不列颠, 1973))。

HPLC (240nm) $t_R = 3.70$ (67.4%) min.

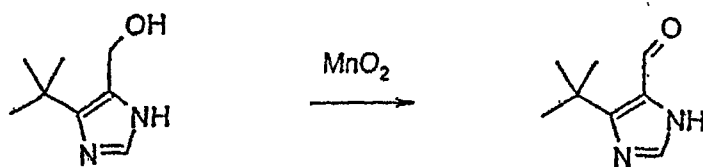
^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 1.36 (s, 9H); 4.62 (s, 2H); 7.43 (s, 1H).

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 31.1, 33.0, 57.9, 131.4, 133.9, 140.8.

LC/MS $t_R = 3.41$ (155.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$) min.

该物质使用前无需进一步纯化。

5-叔丁基-3H-咪唑-4-甲醛



将二氧化锰(30 g, 0.35 mol)加入溶于丙酮(700 ml)的(5-叔丁基-3H-咪唑-4-基)甲醇(4.97 g, 0.03 mol)的多相溶液中, 将所得混合物在室温下搅拌 4 h。将反应混合物用 Celite pad (衬垫)过滤, 并将该 pad 用丙酮洗涤。将滤液与洗涤液合并并蒸发。残余物用乙醚研磨, 得到无色固体的 5-叔丁基-3H-咪唑-4-甲醛(2.50 g, 51%)。(Hayashi, Personal Communication (2000))。

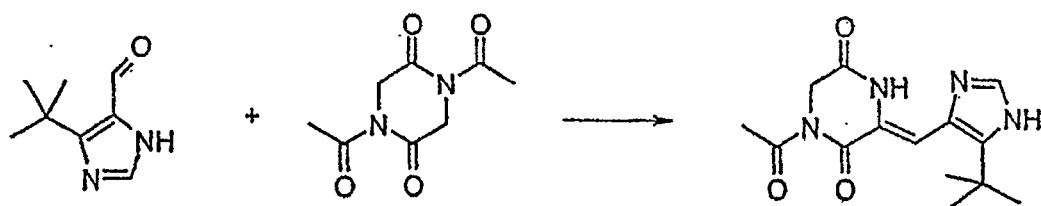
HPLC (240nm) $t_R = 3.71$ (89.3%) min.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.48 (s, 9H); 7.67 (s, 1H); 10.06 (s, 1H).

LC/MS $t_R = 3.38$ (153.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$) min.

对研磨后所得的过滤液进行蒸发, 得到额外的 5-叔丁基-3H-咪唑-4-甲醛(1.88 g, 38%)。

1-乙酰基-3-(5'-叔丁基-1H-咪唑-4'-Z-基亚甲基)哌嗪-2,5-二酮



向 5-叔丁基-3H-咪唑-4-甲醛(2.50 g, 16.4 mmol)的 DMF (50 ml)溶液中加入 1,4-二乙酰基吡嗪-2,5-二酮(6.50 g, 32.8 mmol), 对所述溶液进行排空, 随后充入氩气。将排空-充气过程再重复两次, 随后加入碳酸铯(5.35 g, 16.4 mmol)。将排空-充气过程再重复三次, 随后将所得混合物在室温下搅拌 5 h。将反应混合物部分蒸发(在真空下加热)直到剩余少量体积, 将所得溶液滴加入水(100 ml)中。收集产生的黄色沉淀然后冻干, 得到 1-乙酰基-3-[5'-叔丁基-1H-咪唑-4'-Z-基亚甲基]吡嗪-2,5-二酮(2.24 g, 47%)。(Hayashi, Personal Communication (2000))。

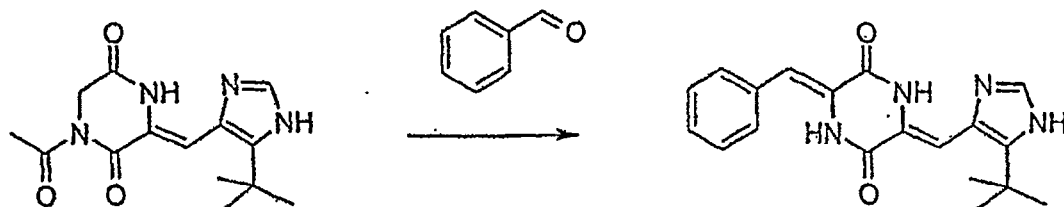
HPLC (214nm) t_R = 5.54 (94.4%) min.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.47 (s, 9H); 2.65 (s, 3H), 4.47 (s, 2H); 7.19 (s, 1H); 7.57 (s, 1H), 9.26 (s, 1H), 12.14 (s, 1H)。

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$) δ 27.3, 30.8, 32.1, 46.5, 110.0, 123.2, 131.4, 133.2, 141.7, 160.7, 162.8, 173.0

LC/MS t_R = 5.16 (291.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 581.6 $[2\text{M}+\text{H}]^+$) min.

3-Z-亚苄基-6-[5''-叔丁基-1H-咪唑-4''-Z-基亚甲基]吡嗪-2,5-二酮



向 1-乙酰基-3-[5'-叔丁基-1H-咪唑-4'-Z-基亚甲基]吡嗪-2,5-二酮(2.43 g, 8.37 mmol)的 DMF (55 ml)溶液中加入苯甲醛(4.26 ml, 41.9 mmol), 对

所述溶液进行排空,随后充入氮气。将排空-充气过程再重复两次,随后加入碳酸铯(4.09 g, 12.6 mmol)。将排空-充气过程再重复三次,随后将反应混合物在如下的温度梯度下进行加热。反应共进行 5 小时后,使反应物冷却至室温,并将反应混合物加入冰水(400 ml)中。收集产生的沉淀,用水洗涤然后冻干,得到黄色固体(2.57 g, HPLC (214 nm) t_R =6.83 (83.1%) min.)。将该物质溶于氯仿(100 ml)中,蒸发以共沸除去残留的水,得到褐色的油状物。将其溶于氯仿(20 ml)并用冰冷却。90 分钟后收集产生的黄色沉淀,空气干燥,得到 3-Z-亚苄基-6-[5''-叔丁基-1H-咪唑-4''-Z-基亚甲基]哌嗪-2,5-二酮(1.59 g, 56%) (Hayashi, Personal Communication (2000))。

HPLC (214nm) t_R = 6.38 (2.1%), 6.80 (95.2) min.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.46 (s, 9H); 7.01 (s, 1H, -C-C=CH); 7.03 (s, 1H, -C-C=CH); 7.30-7.50 (m, 5H, Ar); 7.60 (s, 1H); 8.09 (bs, NH); 9.51 (bs, NH); 12.40 (bs, NH)。

LC/MS t_R = 5.84 (337.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$, E 异构体), 6.25 (337.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 673.4 $[2\text{M}+\text{H}]^+$, Z 异构体) min.

ESMS m/z 337.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 378.1 $[\text{M}+\text{CH}_4\text{CN}]^+$ 。

蒸发所述氯仿溶液得到额外的 3-Z-亚苄基-6-[5''-叔丁基-1H-咪唑-4''-Z-基亚甲基]哌嗪-2,5-二酮(0.82 g, 29%)。HPLC (214 nm) t_R =6.82 (70.6%) min.

一般实验条件

碳酸氢钠指 5% 的溶液。

除非特别声明, 有机溶剂用硫酸钠干燥。

分析条件

NMR 条件

^1H NMR (400 MHz) 分析是在 Varian Inova Unity 400 MHz NMR 设备上进行的。样品用含 0.1% TMS 的氘代氯仿输送(除非特别声明)。化学位移(ppm)以相对 TMS (0.00 ppm) 为基准或对 CD_3OD 输送的样品以 CH_3OH (3.30 ppm) 为基准。耦合(coupling)常数用赫兹(Hz)表示。

分析 HPLC 条件

体系 6 条件:

在 Rainin Microsorb-MV C18 (5 μm , 100 $\text{\AA}$) 50 $\times$ 4.6 mm 柱上进行 RP-HPLC。

缓冲液 A: 0.1%含水 TFA

缓冲液 B: 溶于 90%含水 MeCN 的 0.1% TFA

梯度: 11 分钟内 0-100%缓冲液 B

流动速率: 1.5 mL/分钟

LCMS 条件

在 Perkin-Elmer Sciex API-100 装置上进行 LCMS。

LC 条件:

反相 HPLC 分析

柱: Monitor 5 μm C18 50 $\times$ 4.6 mm

溶剂 A: 0.1% TFA 的水溶液

溶剂 B: 溶于 90%含水 MeCN 的 0.085% TFA

梯度: 11.0 分钟内 0-100%缓冲液 B

流动速率: 1.5 mL/分钟

波长: 214 nm

MS 条件:

离子源: 离子喷射器

检测器: 离子计数器

到质谱的流动速率: 从柱分离(1.5 mL/分钟)后 300 μL /分钟

ESMS 条件

在 Perkin Elmer/Sciex-API III LC/MS/MS 上用电子喷射输入器进行 ESMS。

溶剂: 溶于 60%含水 MeCN 的 0.1% AcOH

流动速率: 25 μL /分钟

离子喷射器: 5000V

孔板(orifice plate): 55V

取数时间(acquisition time): 2.30 分钟

扫描范围: 100-1000 amu/z

扫描步长: 0.2 amu/z

制备 RP-HPLC 纯化条件

采用 Nebula 用 Waters XterraMS 柱(19 × 50mm, 5 μm, C18)在如下条件下进行反相 HPLC 纯化:

溶液 A: 0.1% 含水 TFA

溶液 B: 溶于 90% 含水 MeCN 的 0.1% TFA

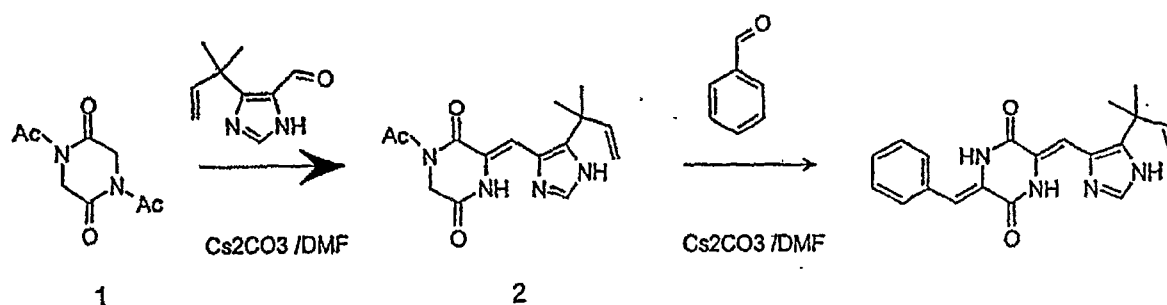
梯度: 4 分钟内 5-95% B

流动速率: 20 mL/分钟

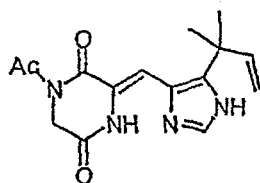
波长: 214 nm

各简写含义如下: br s: 宽的单峰; BuLi: 正丁基锂; d: 双峰; DBU: 1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯; ESMS: 电子喷雾质谱; HCl: 盐酸; HPLC: 高效液相色谱; LCMS: 液相色谱质谱; LD: 二异丙基氨基锂; M^+ : 分子离子; m: 多峰; MeCN: 乙腈; M: 质谱; MW: 分子量; NMR: 核磁共振; q: 四重峰; s: 单峰; : 三峰; t_R : 保留时间; TFA: 三氟乙酸; THF: 四氢呋喃

合成脱氢苯基阿夕斯丁的具体步骤



1-乙酰基-3-{(Z)-1-[5-(1,1-二甲基-2-丙烯基)-1H-4-咪唑基]亚甲基}-2,5-哌嗪二酮(2)



向 5-(1,1-二甲基-2-丙烯基)咪唑-4-甲醛(100 mg, 0.609 mmol)的 DMF (2 mL)溶液中加入化合物 1 (241 mg, 1.22 mmol), 在短时间内对所得溶液进行重复排空以除去氧气并充入 Ar, 随后加入 Cs_2CO_3 (198 mg, 0.609 mmol), 并再次重复排空-充气的过程。优选除去氧气, 因为这样被认为可以减少所述哌嗪二酮环 6 位的 α -碳的氧化。将所得混合物在室温下搅拌 5 h. 通过蒸发除去溶剂后, 将所述残余物溶解在 EtOAc 与 10% Na_2CO_3 的混合物中, 所得有机相再次用 10% Na_2CO_3 洗涤并用饱和 NaCl 洗涤三次, 用 Na_2CO_3 干燥, 并在真空下浓缩。所残留的油状物以 CHCl_3 -MeOH (100:0 到 50:1) 为洗脱剂用二氧化硅柱层析纯化, 得到 60 mg (33%) 淡黄色固体 2。

脱氢苯基阿夕斯丁

向化合物 2 (30 mg, 0.099 mmol) 的 DMF (0.8 mL) 溶液中加入苯甲醛 (51 μL , 0.496 mmol, 5 eq), 在短时间内对所得溶液进行重复排空以除去氧气并充入 Ar, 随后加入 Cs_2CO_3 (53 mg, 0.149 mmol, 1.5 eq), 并再次重复排空-充气的过程。将所得混合物在 80°C 加热 2.5 h (温度必须缓慢提升。迅速升温会导致在亚苄基部位 E-异构体生成量的增加)。通过蒸发除去溶剂后, 将所得残余物溶解在 EtOAc 中, 水洗两次并用饱和 NaCl 洗涤三次, 用 Na_2SO_4 干燥, 并在真空下浓缩。在 TLC 上使用 CHCl_3 -MeOH (10:1), 在 365 nm UV 下可观察到亮黄绿色发光点。HPLC 分析得知该粗产物的纯度超过 75%。将所得残余物溶解在 90% 的 MeOH 水溶液中并加入反相 HPLC 柱(YMC-Pack, ODS-AM, 20 × 250 mm)中, 并用从 70%到 74%的线性梯度的 MeOH 水溶液以 12 mL/分钟的流动速率洗脱约 16 分钟, 收集所需的部分并通过蒸发浓缩, 得到 19.7 mg (60%) (尽管没有对每一步的收率进行优化) 的黄色脱氢苯基阿夕斯丁。

实施例 4

脱氢苯基阿夕斯丁和脱氢苯基阿夕斯丁类似物的生物学特性

A. 生物学评价

在 HT29 人克隆细胞和 PC-3 前列腺癌细胞中对合成的 tBu-脱氢苯基阿夕斯丁和脱氢苯基阿夕斯丁的生物学特性进行评价。

将 HT-29 (ATCC HTB-38)人结肠癌细胞维持在 McCoy's 全培养基(添加了 10% FBS 的含 L-谷酰胺和 25 mM HEPES 的 McCoy's 5A 培养基, 1mM 丙酮酸钠, $1 \times \text{NEAA}$, 2mM L-谷酰胺, 和分别为 100IU/ml 和 100 $\mu\text{g/ml}$ 的 Pen/Strep)中。将 PC-3 (ATCC CRL-1435)人类前列腺癌细胞维持在 F12K 全培养基(添加了 10% FBS 的 F12K 培养基; 2mM 谷酰胺; 1% HEPES; 和分别为 100IU/ml 和 100 $\mu\text{g/ml}$ 的 Pen/Strep)中。将细胞系在 37°C、5% CO_2 、湿度 95% 的恒温箱中培养。

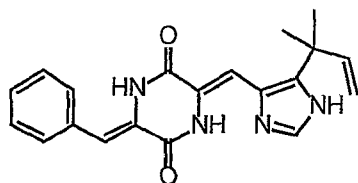
对肿瘤细胞进行毒性分析, 将 HT-29 或 PC-3 细胞以 5,000 细胞/孔(在 90 μl 全培养基中)接种在 Corning 3904 黑壁透明底(black-walled clear-bottom)组织培养板上, 并将该培养板孵育过夜使细胞生长并进入对数生长期。在 100% DMSO 中制备 20 mM 的脱氢苯基阿夕斯丁和 tBu-脱氢苯基阿夕斯丁储备溶液, 并储存在 -20°C。在适当的培养基中制备所述两种化合物的 10X 浓缩的连续稀释液, 达到最终浓度范围为 $20 \times 10^{-5}\text{M}$ 到 $20 \times 10^{-10}\text{M}$ 。将 10 μl 体积的 10X 连续稀释液加入所述测试孔中(共三次), 并将所述培养板放回恒温箱中 48 小时。在所有样品中的最终 DMSO 浓度为 0.25%。

暴露于药物 48 小时后, 在每孔中加入 10 μl 溶于无 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 的 PBS 的 0.2 mg/ml 刃天青(resazurin) (从 Sigma-Aldrich Chemical Co. 获得), 将所述培养板放回恒温箱中 3-4 小时。移除培养板, 并在 Fusion 荧光计(Packard Instruments)中用 530 nm 激发及 590 nm 发射滤光片检测刃天青的荧光。用不含细胞的刃天青染料测定背景, 将其从所有试验孔的数据中扣除。用 Prism 软件(GraphPad Software)分析数据。将上述数据对只用基质处理的细胞(100%细胞生长)的平均值进行归一化, 并用标准的 sigmoidal (S 型) 剂量响应曲线拟合算法确定 EC_{50} 值。

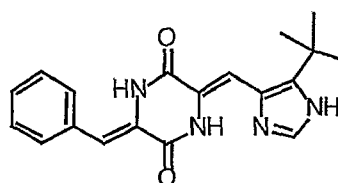
如以下的表 1 所示, 与脱氢苯基阿夕斯丁相比 tBu-脱氢苯基阿夕斯

丁显示出约大 4 倍的细胞毒性活性。

表 1 脱氢苯基阿夕斯丁和衍生物的细胞毒性作用



脱氢苯基阿夕斯丁



tBu-脱氢苯基阿夕斯丁

细胞	EC ₅₀ (nM)	
	ΔPLH	tBu-ΔPLH
HT29	48	13
PC-3	5.4	1.0

B. 脱氢苯基阿夕斯丁衍生物的结构和活性研究

在 P388 的小鼠白血病细胞、HT-29 人克隆细胞和 PC-3 前列腺癌细胞中检验了苯基阿夕斯丁、脱氢苯基阿夕斯丁和各种脱氢苯基阿夕斯丁衍生物的细胞毒性作用。

如上所述，将 HT-29 人结肠癌细胞维持在 McCoy's 全培养基(添加了 10% FBS 的含 L-谷酰胺和 25 mM HEPES 的 McCoy's 5A 培养基, 1mM 丙酮酸钠, 1X NEAA, 2mM L-谷酰胺, 和分别为 100IU/ml 和 100μg/ml 的 Pen/Strep)中。将 PC-3 人类前列腺癌细胞维持在 F12K 全培养基(添加了 10% FBS 的 F12K 培养基; 2mM 谷酰胺; 1% HEPES; 和分别为 100IU/ml 和 100μg/ml 的 Pen/Strep)中。将细胞系在 37°C、5% CO₂、湿度 95% 的恒温箱中培养。

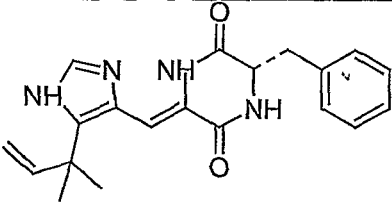
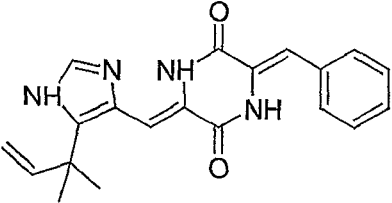
对肿瘤细胞毒性进行分析, 将 HT-29 或 PC-3 细胞以 5,000 细胞/孔(在 90μl 全培养基中)接种在 Corning 3904 黑色壁透明底(black-walled clear-bottom)组织培养板上, 并将该培养板孵育过夜使细胞生长并进入对数生长期。在 100% DMSO 中制备 20 mM 的脱氢苯基阿夕斯丁和 tBu-脱氢苯基阿夕斯丁储备溶液, 并储存在 -20°C。在适当的培养基中制备所述两种化合物的 10X 浓缩的连续稀释液, 达到最终浓度范围为 20×10^{-5} M

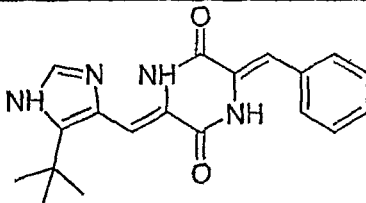
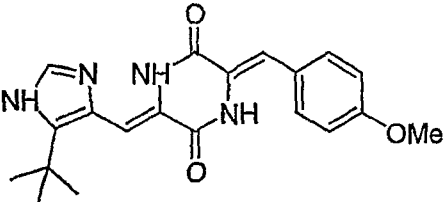
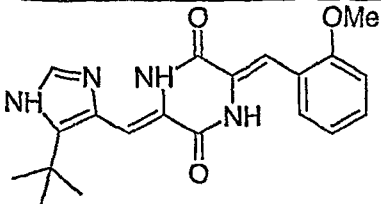
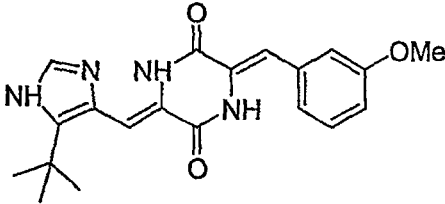
到 20×10^{-10} M。将 $10 \mu\text{l}$ 体积的 10X 连续稀释液加入所述测试孔中(共三次), 并将所述培养板放回恒温箱中 48 小时。在所有样品中的最终 DMSO 浓度为 0.25%。

暴露于药物 48 小时后, 在每孔中加入 $10 \mu\text{l}$ 溶于无 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 的 PBS 的 0.2 mg/ml 刃天青(从 Sigma-Aldrich Chemical Co. 获得), 将所述培养板放回恒温箱中 3-4 小时。移除培养板, 并在 Fusion 荧光计(Packard Instruments)中用 530 nm 激发及 590 nm 发射滤光片检测刃天青的荧光。用不含细胞的刃天青染料测定背景, 将其从所有试验孔的数据中扣除。用 Prism 软件(GraphPad Software)分析数据。将上述数据对只用基质处理的细胞(100%细胞生长)的平均值进行归一化, 并用标准的 sigmoidal 剂量响应曲线拟合算法确定 EC_{50} 值。

下表 2 中总结了苯基阿夕斯丁、脱氢苯基阿夕斯丁和脱氢苯基阿夕斯丁衍生物的 EC_{50} 和 IC_{50} 值。

表 2. 苯基阿夕斯丁或脱氢苯基阿夕斯丁
及脱氢苯基阿夕斯丁衍生物的 SAR 研究

化合物	结构式	EC_{50} (nM)		IC_{50} (nM)
		HT-29	PC-3	P-388
(-)-苯基阿夕斯丁		1600	n.t.	833 ± 153 (n=5)
KPU-1 DPLH		48	4.7	36 ± 12.8 (n=5)

KPU-2 tBu-PLH		13	1	31.8 ± 5.0 (n=5)
KPU-6 tBu-PLH-p-OMe		>2000	n.t.	9333 ± 5457 (n=3)
KPU-8 tBu-PLH-o-OMe		89		315 ± 137 (n=4)
KPU-9 tBu-PLH-m-OMe		31		20.8 ± 68 (n=4)
秋水仙碱	---			208 ± 68 (n=4)

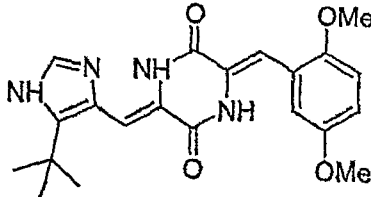
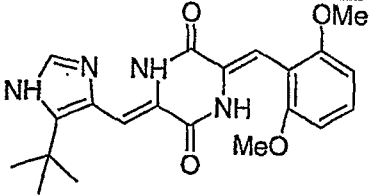
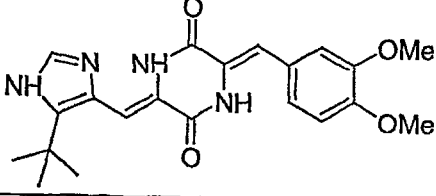
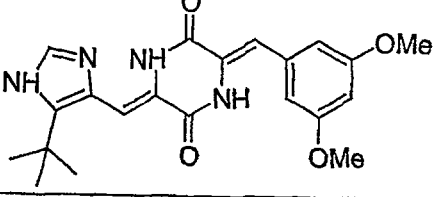
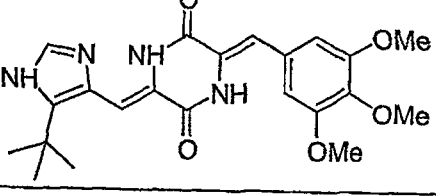
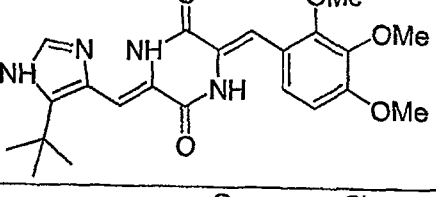
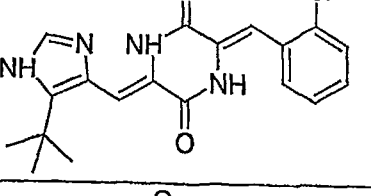
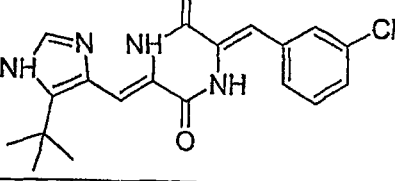
对苯环的修饰对细胞毒性活性有显著的影响。与 tBu-脱氢苯基阿夕斯丁(#6)的活性相比, 间位具有甲氧基基团(KPU-9)的化合物表现出比其它衍生物都高的活性, 其在 P388 细胞中的 IC_{50} 值为 20.8 ± 3.3 nM。所述 KPU-9 衍生物在 HT-29 细胞中也表现出细胞毒性(EC_{50} 31 nM)。脱氢苯基阿夕斯丁、tBu-脱氢苯基阿夕斯丁(KPU-2)和 KPU-9 衍生物都在 P388 细胞中表现出细胞毒性。

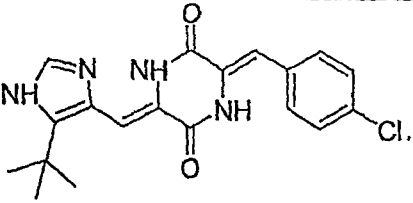
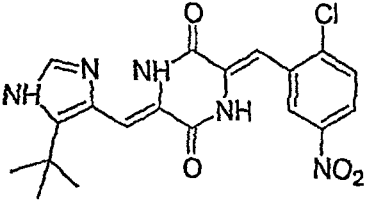
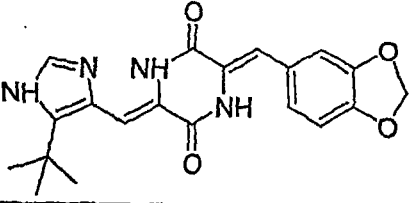
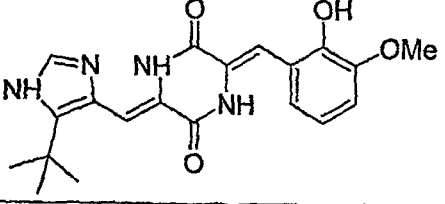
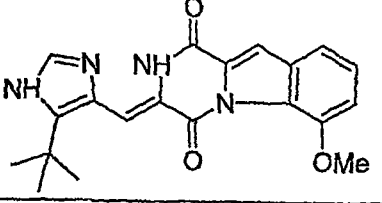
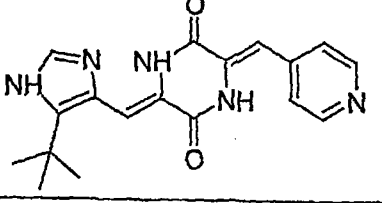
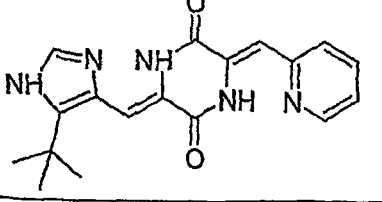
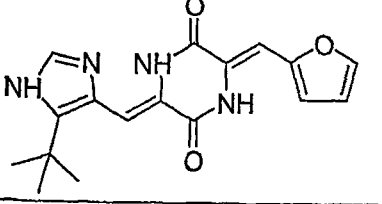
C. 其它脱氢苯基阿夕斯丁衍生物的结构和活性研究

使用上述的方法, 在 HT-29 人克隆细胞和 PC-3 前列腺癌细胞中对苯基阿夕斯丁、脱氢苯基阿夕斯丁和各种其它脱氢苯基阿夕斯丁衍生物的细胞毒性作用进行了检验。

表 3. 苯基阿夕斯丁或脱氢苯基阿夕斯丁及其它脱氢苯基阿夕斯丁衍生物
的 SAR 研究

化合物	结构式	盐形式	M.W.	EC ₅₀ (nM)	
				HT-29	PC-3
(-)-苯基阿夕斯丁		-	350.41	1600	n.t.
KPU-1 PLH		-	348.40	48	4.7
KPU-2 tBu-PLH		-	336.39	13	1
KPU-6 tBu-PLH-p-OMe		-	366.41	>2000	n.t.
KPU-8 tBu-PLH-o-OMe		-	366.41	89	
KPU-9 tBu-PLH-m-OMe		-	366.41	31	
KPU-14 tBu-PLH-2,3-diOMe		TFA	396.44 510.46 (+TFA)	610	96%
KPU-12 tBu-PLH-2,4-diOMe		-	396.44	4980	

化合物	结构式	盐形式	M.W.	EC ₅₀ (nM)	
				HT-29	PC-3
KPU-10 tBu- <i>l</i> PLH-2,5-diOMe		-	396.44	1350	
KPU-15 tBu- <i>l</i> PLH-2,6-diOMe		TFA	396.44 510.46 (+TFA)	4430	96%
KPU-13 tBu- <i>l</i> PLH-3,4-diOMe		-	396.44	2130	
KPU-16 tBu- <i>l</i> PLH-3,5-diOMe		-	396.44	42	82%
KPU-11 tBu- <i>l</i> PLH-3,4,5-triOMe		-	426.47	> 20 μM	
KPU-17 tBu- <i>l</i> PLH-2,3,4-triOMe		TFA	426.47 540.49 (+TFA)	4060	94%
KPU-18 tBu- <i>l</i> PLH-o-Cl		TFA	370.83 484.86 (+TFA)	42	100%
KPU-19 tBu- <i>l</i> PLH-m-Cl		TFA	370.83 484.86 (+TFA)	20	98%

化合物	结构式	盐形式	M.W.	EC ₅₀ (nM)	
				HT-29	PC-3
KPU-20 tBu-PLH-p-Cl		TFA	370.83 484.86 (+TFA)	545	
KPU-21 tBu-PLH-2Cl-5-NO ₂		TFA	415.83 529.85 (+TFA)	51	100%
KPU-22 tBu-PLH-3,4-methylene-dioxy		TFA	380.40 494.42 (+TFA)	82	95%
KPU-23 tBu-PLH-2-OH-3-OMe (o-vanillin)		TFA	382.41 496.44 (+TFA)	5870	86%
KPU-24 tBu-PLH-cyclized-3-MeO		TFA	364.40 487.42 (+TFA)	7040	100%
KPU-25 tBu-PLH-4-pyridyl		TFA	337.38 565.42 (+2TFA)	544	98%
KPU-28 tBu-PLH-2-pyridyl		TFA	337.38 565.42 (+2TFA)	> 20 μM	99%
KPU-26 tBu-PLH-2-furyl		TFA	326.35 440.37 (+TFA)	600	88%

化合物	结构式	盐形式	M.W.	EC ₅₀ (nM)	
				HT-29	PC-3
KPU-27 tBu-PLH-5-Me-2-thienyl		TFA	356.44 470.47 (+TFA)	80	97%
KPU-29 tBu-PLH-3-Me-2-thienyl		TFA	356.44 470.47 (+TFA)	44	81%

实施例 5

其它脱氢苯基阿夕斯丁类似物

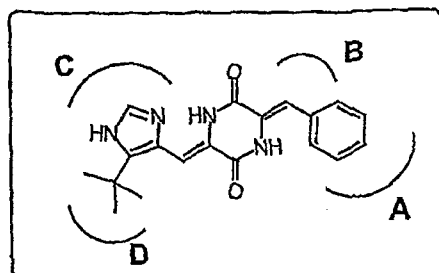
A. 对脱氢苯基阿夕斯丁衍生物合成的改进

单独使用前述技术或结合其它公知的有机合成技术合成其它的脱氢苯基阿夕斯丁衍生物。

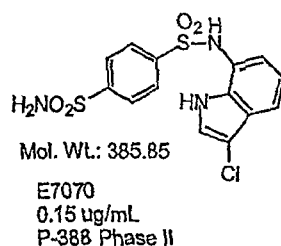
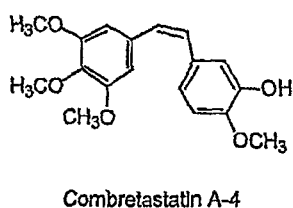
根据待制备的目标衍生物，可改变所述合成方法中采用的二酰基吡嗪二酮和所述第一和第二醛。合成的衍生物为：

- A) 对所述苯环进行修饰和/或引入其它芳香环系，
- B) 改变所述芳香环的位置，
- C) 改变所述咪唑芳香环系，和/或
- D) 对所述咪唑环上的 5 位进行修饰。

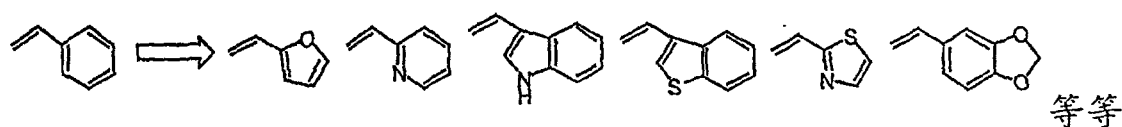
下图显示了在脱氢苯基阿夕斯丁化合物上为制备脱氢苯基阿夕斯丁衍生物而进行修饰的区域。本文公开了修饰的非限定性的例子，且在该公开的基础上本领域所属技术人员可充分理解。



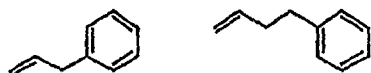
- A 1) 以公知的抗微管蛋白化合物的结构为基础对所述苯环进行修饰
烷基、卤素、烷氧基、乙酰基、磺胺、氨基、羟基、硝基等等。



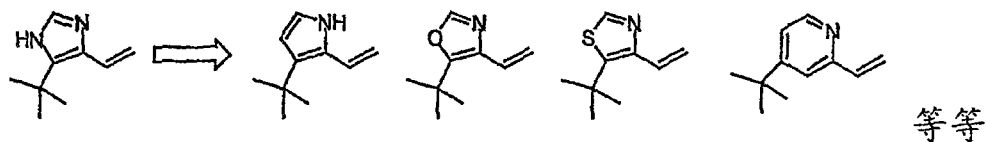
- 2) 引入其它芳香环系



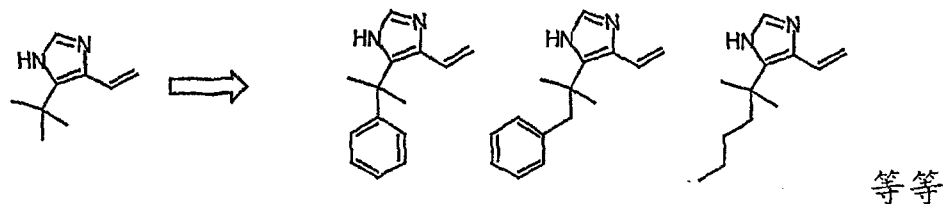
- B 所述芳香环的位置



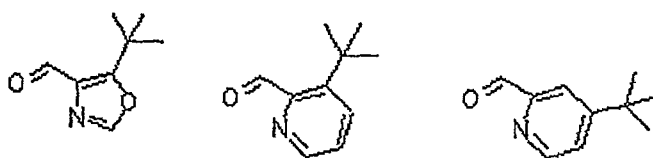
- C 变为其它环系



- D 对所述咪唑环的 5 位进行进一步修饰



对上述的对脱氢苯基阿夕斯丁化合物的修饰进行扩展, 所述化合物的衍生物在其苯环(A)上可包括如下取代基: $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ ($-\text{SO}_2\text{NR}_1\text{R}_2$)、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{CONH}_2$ ($-\text{CONR}_1\text{R}_2$)、 $-\text{COOH}$ 等等。其它环系(C)也可包括下列基团:



B. 合成的脱氢苯基阿夕斯丁衍生物的例子

表 4 中公开了合成的脱氢苯基阿夕斯丁衍生物的其他例子。

表 4. 其它合成的脱氢苯基阿夕斯丁衍生物

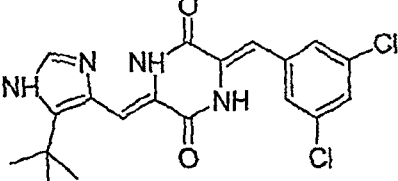
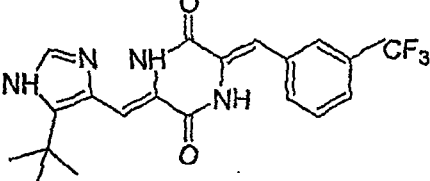
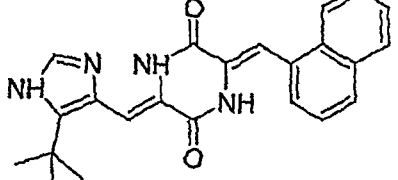
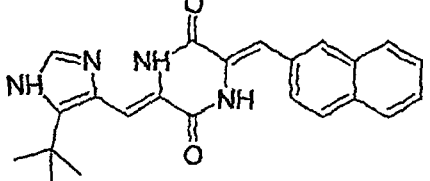
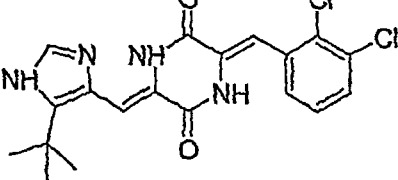
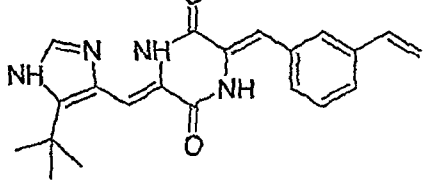
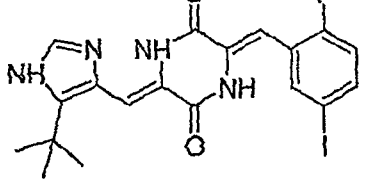
化合物	结构式	盐形式	M.W.
KPU-20 tBu-PLH-p-Cl		TFA	370.83 484.86 (+TFA)
KPU-30 tBu-PLH-2,3-二氧亚甲基		TFA	380.40 494.42 (+TFA)
KPU-31 tBu-PLH-3-吡啶基		2TFA	337.38 565.42 (+2TFA)
KPU-32 tBu-PLH-o-Me		TFA	350.41 464.44 (+TFA)
KPU-33 Tbu-PLH-3-Me-2-吡啶基		2TFA	351.40 579.45 (+2TFA)
KPU-34 tBu-PLH-4-F		TFA	354.38 468.40 (+TFA)
KPU-35 tBu-PLH-m-F		TFA	354.38 468.40 (+TFA)

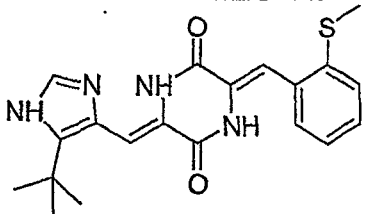
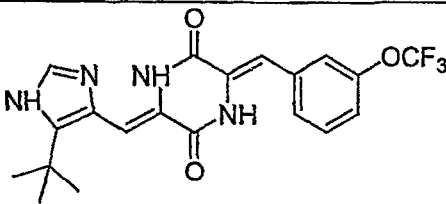
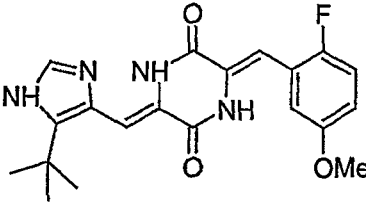
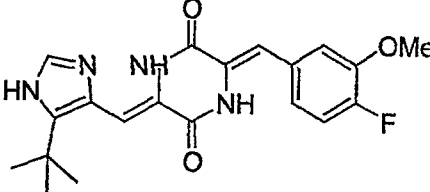
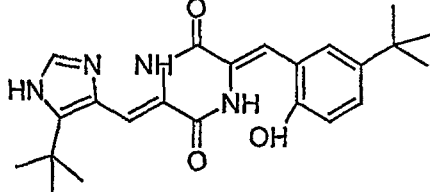
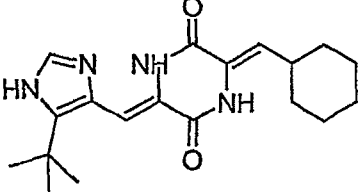
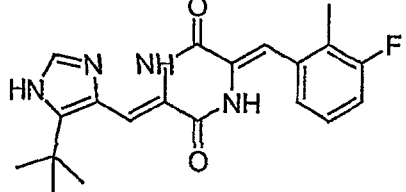
化合物	结构式	盐形式	M.W.
KPU-36 tBu- β PLH-5-Me-4-im		2TFA	356.42 584.47 (+2TFA)
KPU-37 tBu- β PLH-o-F		TFA	354.38 468.40 (+TFA)
KPU-38 tBu- β PLH-m-Me		TFA	350.41 464.44 (+TFA)
KPU-39 tBu- β PLH-p-Me		TFA	350.41 464.44 (+TFA)
KPU-40 tBu- β PLH-p-Br		TFA	415.28 529.31 (+TFA)
KPU-41 tBu- β PLH-m-Br		TFA	415.28 529.31 (+TFA)
KPU-42 tBu- β PLH-3-噻吩基		TFA	342.42 456.44 (+TFA)

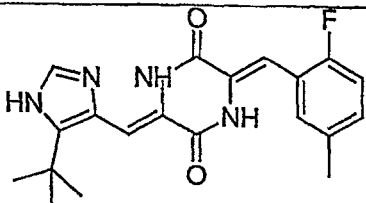
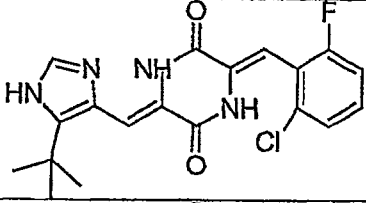
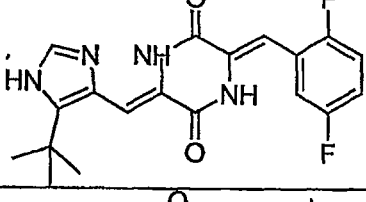
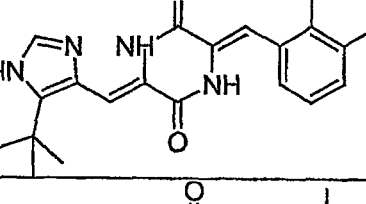
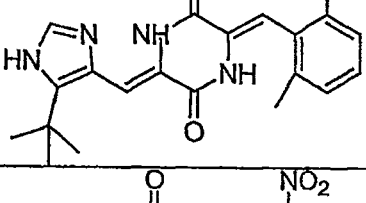
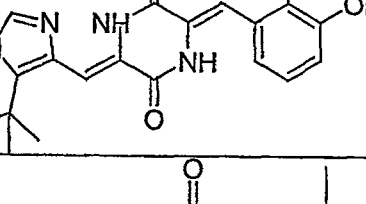
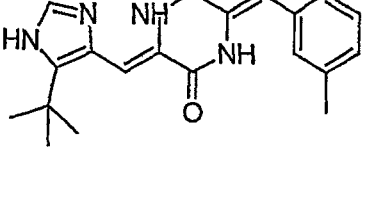
化合物	结构式	盐形式	M.W.
KPU-43 tBu- β PLH-p-CN		TFA	361.40 475.42 (+TFA)
KPU-44 tBu- β PLH-m-EO		TFA	380.44 494.46 (+TFA)
KPU-45 tBu- β PLH-2,4,6-TriOMe		TFA	426.47 540.49 (+TFA)
KPU-46 tBu- β PLH-o-NO ₂		TFA	381.39 495.41 (+TFA)
KPU-47 tBu- β PLH-m-NO ₂		TFA	381.39 495.41 (+TFA)
KPU-48 tBu- β PLH-p-NO ₂		TFA	381.39 495.41 (+TFA)
KPU-49 tBu- β PLH-m-CN		TFA	361.40 475.42 (+TFA)

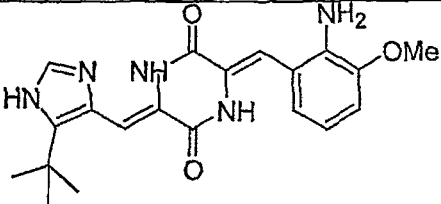
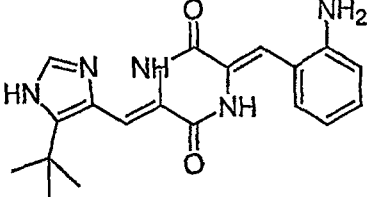
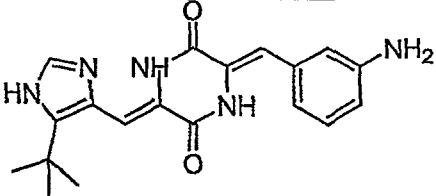
化合物	结构式	盐形式	M.W.
LPU-50 tBu-PLH-o-Br		TFA	415.28 529.31 (+TFA)
KPU-51 tBu-PLH-m-OH		TFA	352.39 466.41 (+TFA)
KPU-52 tBu-PLH-2-NO ₂ -5-Cl		TFA	415.83 529.85 (+TFA)
KPU-53 tBu-PLH-o-OH		TFA	352.39 466.41 (+TFA)
KPU-54 tBu-PLH-2-OH-5-OMe		TFA	382.41 496.44 (+TFA)
KPU-55 tBu-PLH-3-呋喃基		TFA	326.35 440.37 (+TFA)
KPU-56 tBu-PLH-2-OH-5-Br		TFA	431.28 545.31 (+TFA)

化合物	结构式	盐形式	M.W.
KPU-57 TBu-PLH-2-OH-4-OMe		TFA	382.41 496.44 (+TFA)
KPU-58 TBu-PLH-2-OH-4-OMe		TFA	382.41 496.44 (+TFA)
KPU-59 tBu-PLH-2-OH-5-Cl		TFA	386.83 (+TFA) 500.86
KPU-60 TBu-PLH-5-Me-2-呋喃基		TFA	340.38 454.40 (+TFA)
KPU-61 TBu-PLH-5-Cl-2-亚硫酰基		TFA	376.86 490.88 (+TFA)
KPU-62 tBu-PLH-2-亚硫酰基		TFA	342.42 456.44 (+TFA)
KPU-63 TBu-PLH-N-Me-2-吡咯		TFA	339.39 453.42 (+TFA)

化合物	结构式	盐形式	M.W.
KPU-64 tBu-PLH-3,5-diCl		TFA	405.27
KPU-65 tBu-PLH-m-CF ₃		TFA	404.39
KPU-66 tBu-PLH-1-萘		TFA	386.44
KPU-67 tBu-PLH-2-萘		TFA	386.44
KPU-68 tBu-PLH-2,3-diCl		TFA	405.27
KPU-69 tBu-PLH-m-乙烯基		TFA	362.42
KPU-77 tBu-PLH-2-F-5-I		TFA	480.28

化合物	结构式	盐形式	M.W.
KPU-79 TBu-PLH-2-(甲硫基)		TFA	368.45
KPU-80 TBu-PLH-m-OCF ₃		TFA	420.38
KPU-81 TBu-PLH-2-F-5-OMe		TFA	384.38
KPU-82 TBu-PLH-4-F-3-OMe		TFA	384.38
KPU-83 TBu-PLH-2-OH-5-tBu		TFA	408.39
KPU-84 TBu-PLH-环己烷		TFA	341.39
KPU-86 TBu-PLH-2-Me-3-F		TFA	368.39

化合物	结构式	盐形式	M.W.
KPU-87 TBu-PLH-2-F-5-Me		TFA	368.39
KPU-88 TBu-PLH-2-Cl-6-F		TFA	388.83
KPU-89 TBu-PLH-2,5-di-F		TFA	372.38
KPU-90 TBu-PLH-2,3-di-Me		TFA	364.38
KPU-91 TBu-PLH-2,6-di-Me		TFA	364.38
KPU-92 TBu-PLH-2-NO ₂ -3-OMe		TFA	411.39
KPU-93 TBu-PLH-2,5-diMe		TFA	364.38

化合物	结构式	盐形式	M.W.
KPU-94 TBu-PLH-2-NH ₂ -3-OMe		TFA	381.399
KPU-96 TBu-PLH-2-NH ₂		TFA	351.41
KPU-97 TBu-PLH-m-NH ₂		TFA	351.41

C. 脱氢苯基阿夕斯丁衍生物的评价

根据实施例 3 中所述的方法对上述衍生物进行评价。对所述衍生物
的其它评价扩展至评价特定活性，例如测定对细胞增殖的抑制作用、对
特定细胞机理(即微管功能)的作用、对细胞循环进程的作用、评价对癌症
细胞系的体外抗肿瘤活性等等。下面给出了一些评价方法的方案。

1) 脱氢苯基阿夕斯丁及其类似物的细胞增殖抑制作用

在 96-孔微滴定板的每个孔中，加入 100 μ l 在培养基中被制备成 10⁵
细胞/ml 的源自人肺癌的 A-549 细胞，其中所述培养基是通过在 EMEM
培养基(Nissui Seiyaku Co., Ltd.)中加入 10%的胎牛血清得到的，而其中所
述培养基对源自人肺癌的 A-549 细胞具有抗肿瘤作用。将通过上述所列
例子得到的衍生物的甲醇溶液加入最上排的孔中，使用半对数稀释方法
对样品进行稀释并加入，并将所述微滴定板在二氧化碳气体恒温箱中于
37 $^{\circ}$ C 孵育 48 小时。将所得培养物加入多个含 10 μ l MTT 试剂(3-(4,5-二甲
基-2-噻唑)-2,5-联苯基-2H-四溴化物) (1 mg/ml•PBS)中，随后在二氧化碳
气体恒温箱中于 37 $^{\circ}$ C 孵育 6 小时。弃去培养基并将所述细胞中产生的晶
体溶解在 100 μ l/孔的二甲基亚砷中。随后用酶标仪(microplate reader)检测
595 nm 的光吸收。通过比较未处理细胞与用已知浓度样品处理过的细胞

的光吸收,可计算抑制 50%细胞增殖的所述样品的浓度(IC₅₀)。

2) 脱氢苯基阿夕斯丁及其类似物的细胞循环抑制活性

细胞株 A431 源自人肺癌。用含 10%胎牛血清和 1% MEM 非必需氨基酸溶液(SIGMA M2025)的 EMEM 培养基在用 5%二氧化碳气体和水蒸汽饱和的恒温箱中于 37°C 对 A431 细胞进行孵育。将通过上述方法获得的脱氢苯基阿夕斯丁的提纯样品加入处于对数生长期的上述细胞中,并通过流式细胞术和显微镜观测分析细胞循环的进程。

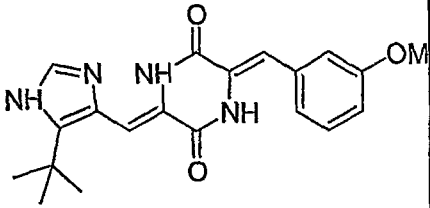
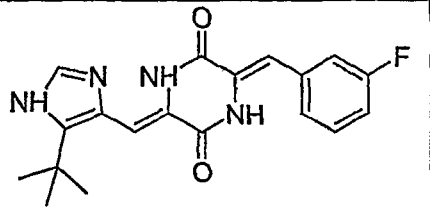
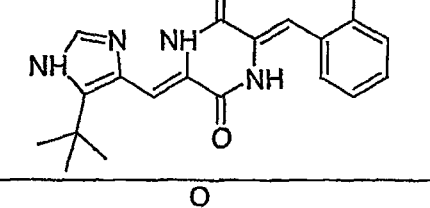
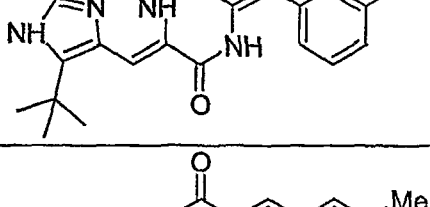
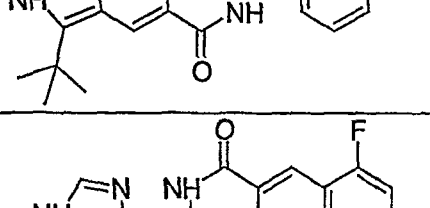
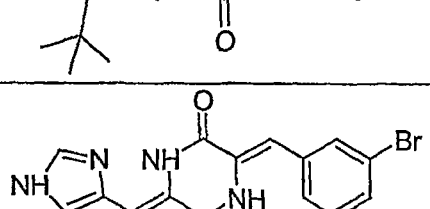
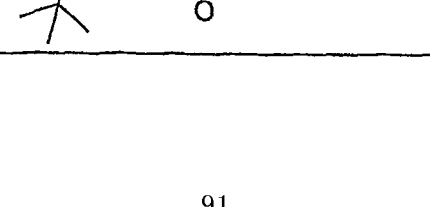
实施例 6

合成的脱氢苯基阿夕斯丁(脱氢 PLH)衍生物的结构-活性关系

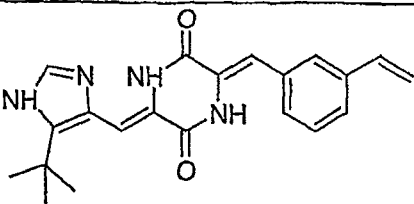
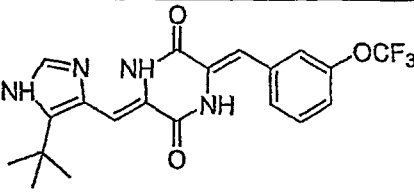
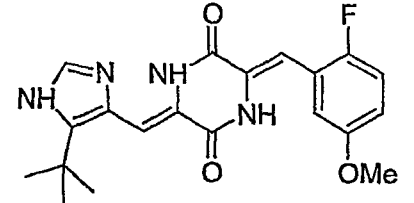
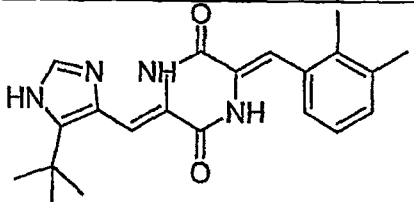
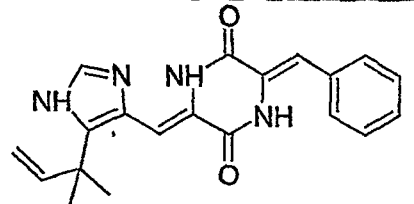
1)衍生物合成中的概述

本文公开的脱氢 PLH 衍生物中许多(但不是全部)在其苯环上具有一、二或三个修饰基团(见以下图 5)。所述衍生物是通过上述方法合成的。如表 5 中所示,某些化合物显示出比脱氢 PLH 和 tBu-脱氢 PLH 更高的细胞毒性活性。活性最高的,EC₅₀ 值为 3 nM 的化合物是 **KPU-90**。上述值分别比脱氢 PLH 和 tBu-脱氢 PLH 的数值高 16 倍和 4 倍。这些衍生物在所述苯环的邻位或间位具有单取代,取代基为卤原子(如氟和氯原子)或甲基、乙烯基或甲氧基基团。在诸如萘、噻吩和呋喃环的杂芳基结构上具有取代基的衍生物也具有有效的活性。**KPU-35、42、69、80 和 81** 也表现出高于 tBu-脱氢 PLH 的活性。

表 5. 合成有效的脱氢 PLH 衍生物

化合物	结构式	EC ₅₀ (nM)
KPU-9		31
KPU-35		10
KPU-18		42
KPU-19		20
KPU-38		45
KPU-37		21
KPU-41		31

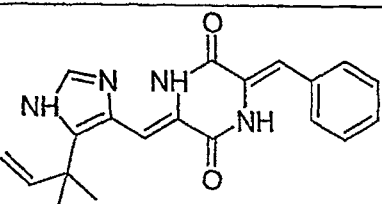
化合物	结构式	EC ₅₀ (nM)
KPU-29		44
KPU-16		42
KPU-32		42
KPU-42		54
KPU-46		44
KPU-44		43
tBu-iPLH (KPU-2)		13

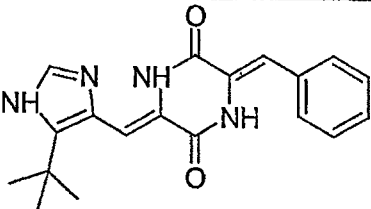
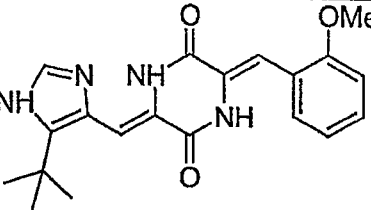
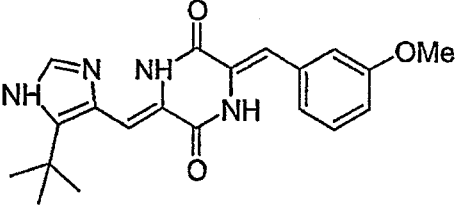
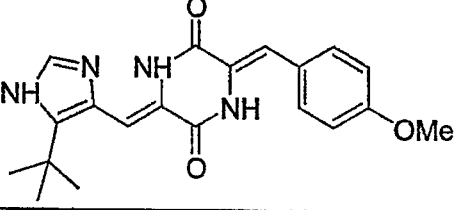
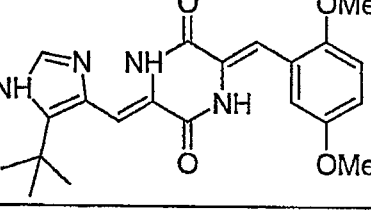
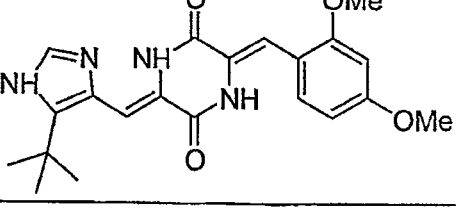
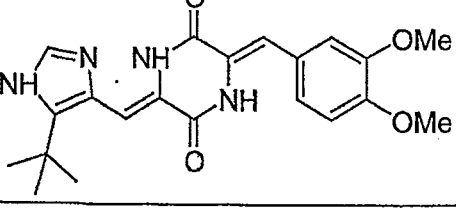
化合物	结构式	EC ₅₀ (nM)
KPU-69		16
KPU-80		13
KPU-81		19
KPU-90		3
脱氢 PLH (KPU-1)		48

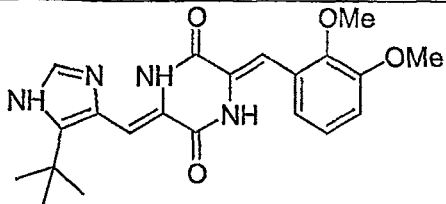
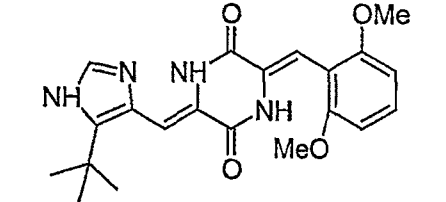
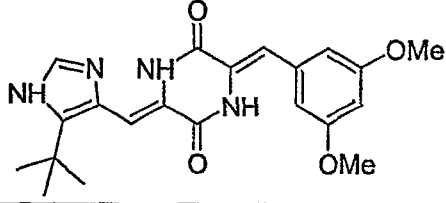
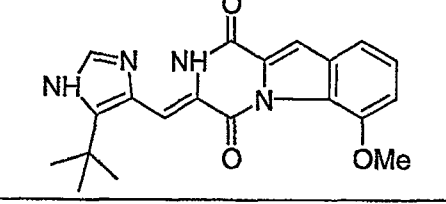
2) 在所述苯环上引入甲氧基基团

秋水仙碱与 PLH 可识别 β -微管蛋白上相同的结合位点。秋水仙碱在其 A 和 B 环上具有 4 个特征甲氧基基团。进行了一系列单甲氧基或多甲氧基的取代，其细胞毒性活性结果如表 6 所示。

表 6. 甲氧基取代对 HT-29 细胞增殖的作用

化合物	结构式	EC ₅₀ (nM)
脱氢 PLH (KPU-1)		48

化合物	结构式	EC50 (nM)
tBu α PLH (KPU-2)		13
KPU-8		89
KPU-9		31
KPU-6		6730
KPU-10		1350
KPU-12		4980
KPU-13		2130

化合物	结构式	EC50 (nM)
KPU-14		610
KPU-15		4430
KPU-16		42
KPU-24		7040

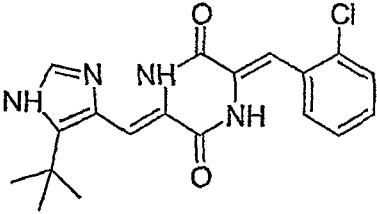
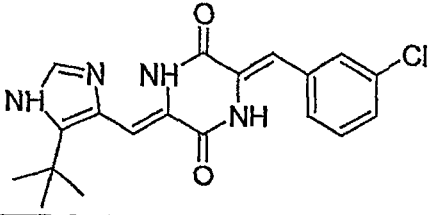
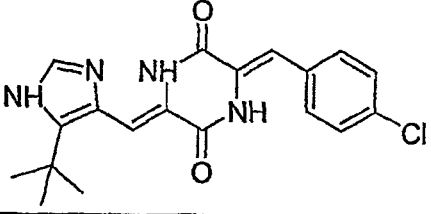
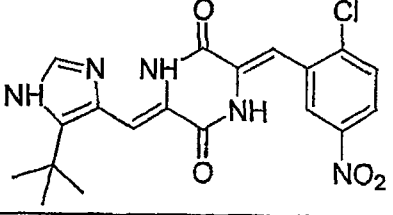
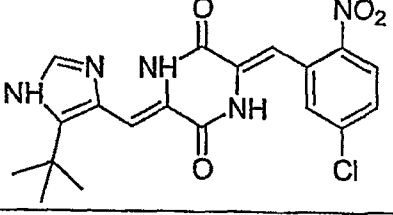
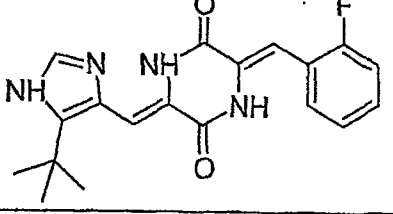
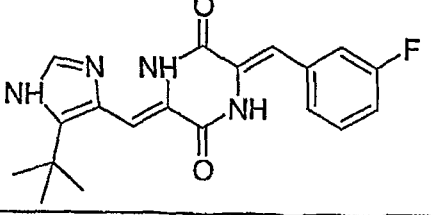
上述结果证明在间位或邻位的取代使对 HT-29 细胞的细胞毒性活性上升。**KPU-9** 和 **16** 显示出高活性。具有三取代的甲氧基衍生物(**KPU-11**、**17** 和 **45**)也显示出活性。**KPU-24** 的结构是通过质谱分析确定的。

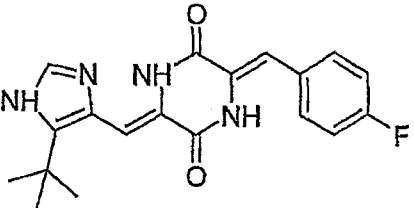
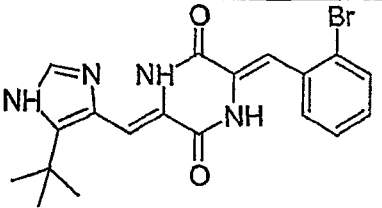
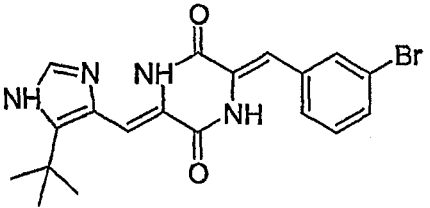
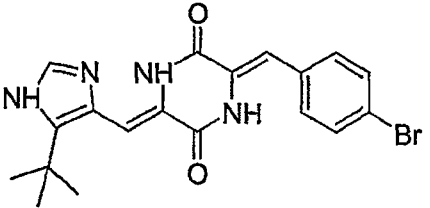
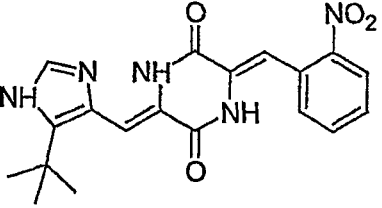
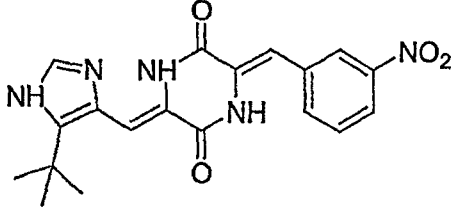
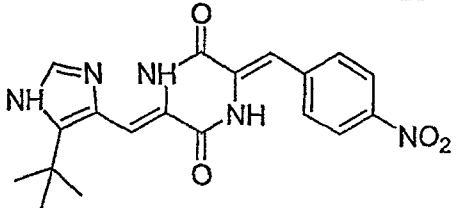
3) 用吸电子基进行修饰

为研究更广泛的所述苯环上的结构-活性关系，引入了一系列不同的官能团，包括吸电子基和给电子基。对 HT-29 细胞的细胞毒性结果分别如表 7 和 8 所示。

在邻位或间位的取代可有效增强活性。这些结果与甲氧基的情况非常一致。

表 7. 吸电子基团对 HT-29 细胞增殖的作用

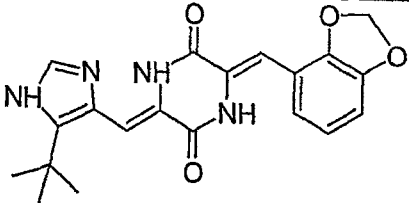
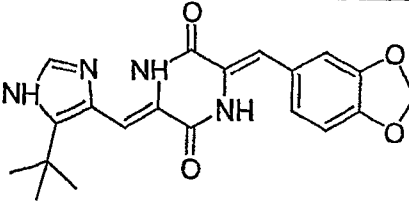
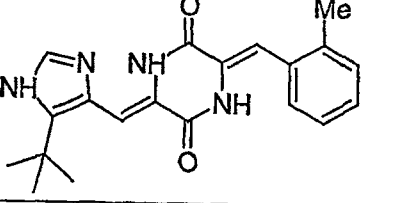
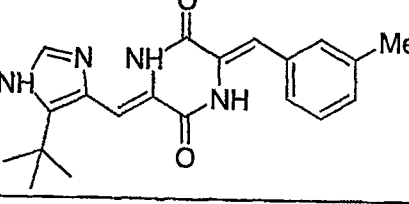
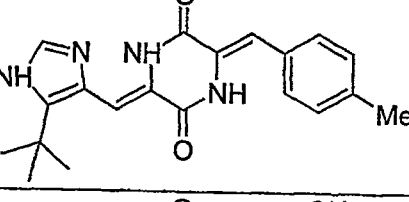
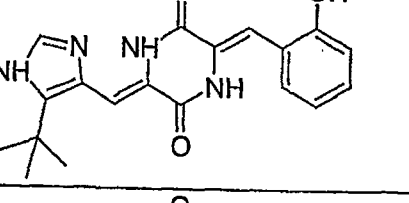
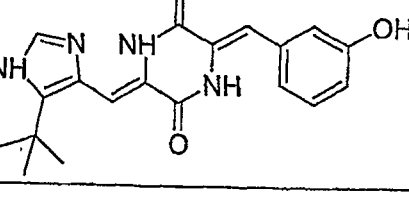
化合物	结构式	EC ₅₀ (nM)
KPU-18		42
KPU-19		20
KPU-20		545
KPU-21		51
KPU-52		110
KPU-37		21
KPU-35		10

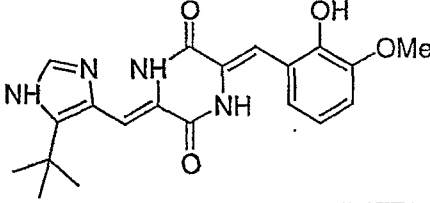
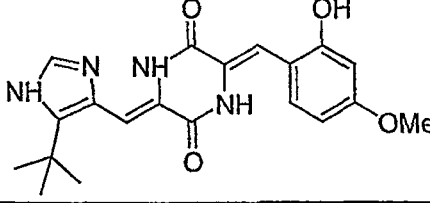
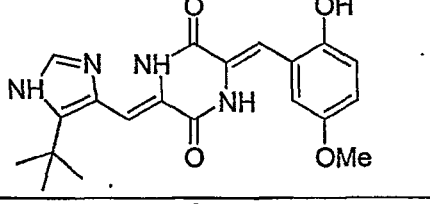
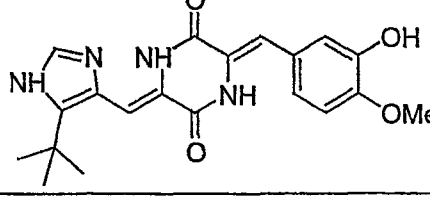
化合物	结构式	EC ₅₀ (nM)
KPU-34		466
KPU-50		38
KPU-41		31
KPU-40		623
KPU-46		44
KPU-47		40
KPU-48		> 20 μ M

化合物	结构式	EC ₅₀ (nM)
KPU-49		28
KPU-43		> 20 μM

表 8. 给电子基团对 HT-29 细胞增殖的作用

化合物	结构式	EC ₅₀ (nM)
KPU-8		89
KPU-9		31
KPU-6		6730
KPU-44		43

化合物	结构式	EC ₅₀ (nM)
KPU-30		477
KPU-22		82
KPU-32		42
KPU-38		45
KPU-39		460
KPU-53		> 20 μM
KPU-51		617

化合物	结构式	EC ₅₀ (nM)
KPU-23		5870
KPU-58		>20 nM
KPU-54		> 20 μM
KPU-57		> 20 μM

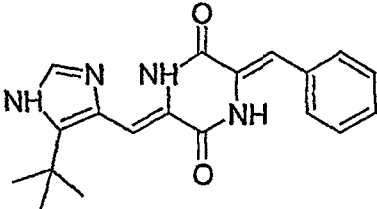
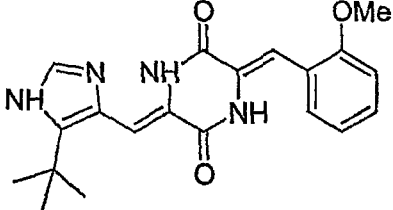
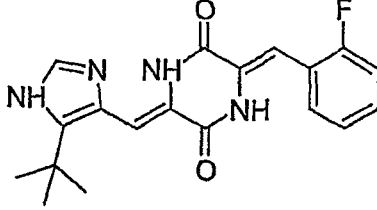
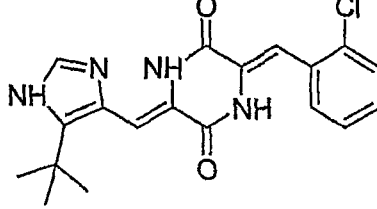
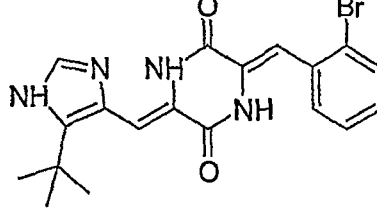
本公开并不被界定或限制于任何具体的科学理论。然而，应当理解本领域所属技术人员可以认同本文呈现出的结论即认为相对较小的官能团(造成的空间位阻较小)可有利于显示更强的活性，而诸如乙氧基(当与甲氧基相比)或 Br 原子(当与 Cl 原子相比)的稍大的基团可造成不利于与例如微管蛋白结合位点反应的空间位阻。此外，因为这些取代基的电子特性并不影响活性，因此认为这些相对较小的基团并不与所述 β -微管蛋白的结合位点直接反应，而是限制了适合于上述结合的脱氢 PLH 的构象。或者，作为另一可能的假设，因为引入亲水性的羟基基团(其可作为氢给体而形成氢键)使活性大幅降低，因此疏水特性在对所述 β -微管蛋白上的邻位或对位的结合位点可能是更重要的因素。

如表 9 所示，可对邻位取代基对细胞毒性活性的作用进行整理，而对间位取代基的情况如表 10 所示。还可对具有有效官能团的化合物(其显示出比 tBu-脱氢 PLH 更高活性)进行进一步修饰。并且因为观测到在可见光照射下的从 Z 到 E 的立体化学转变，因此可降低所述共轭双键的电子密度的取代基可降低由光引起的 Z 到 E 的转变，从而产生物理化学上更

稳定的结构。温度也可影响这种转变。

在所述环的两个部分进行修饰可有利于开发有效且生物学稳定的化合物。所述苯基阿夕斯丁的苯环可被细胞色素 P-450 氧化。因此,可降低所述苯环的电子密度的两重修饰可有效地避免 P-450 的氧化。因此,将所述小吸电子基团(如氟原子)与可增强活性的单元(如-OMe、-Me、-Cl、-F 和 Br)结合起来,可产生更有效且生物学稳定的药物化合物。

表 9. 邻位修饰的概括

化合物	结构式	EC ₅₀ (nM)
KPU-2		48
KPU-8		89
KPU-37		21
KPU-18		42
KPU-50		38

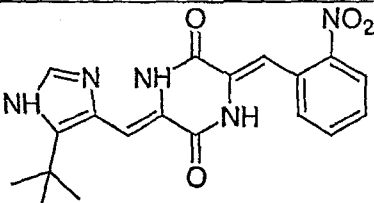
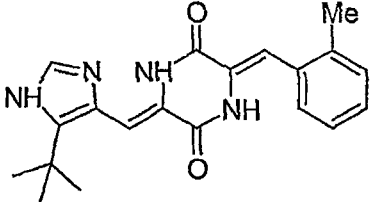
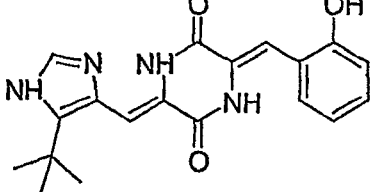
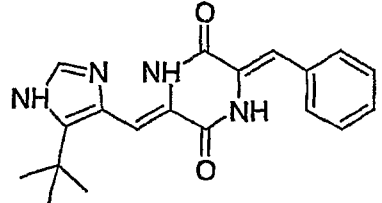
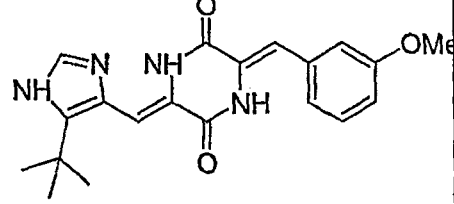
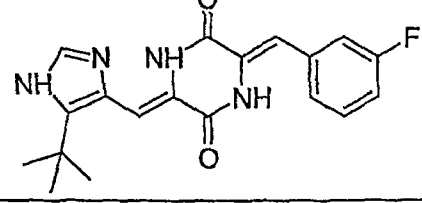
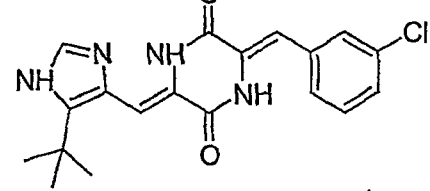
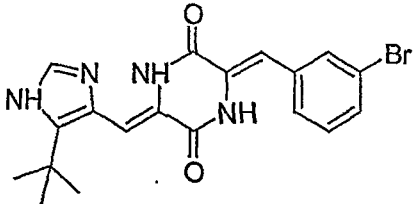
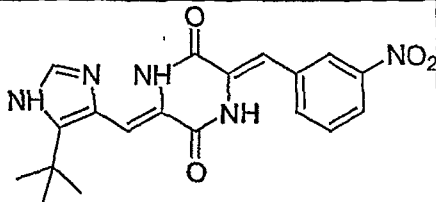
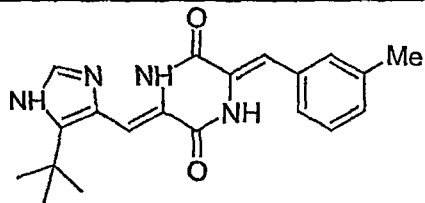
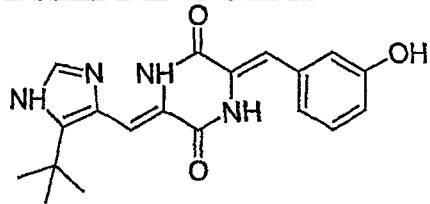
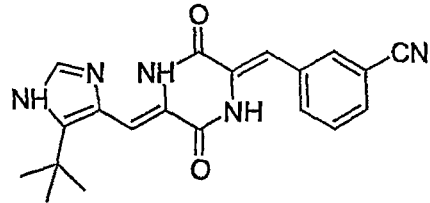
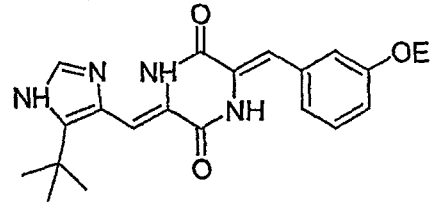
化合物	结构式	EC ₅₀ (nM)
KPU-46		44
KPU-32		42
KPU-53		> 20 μ M

表 10. 间位修饰的概括

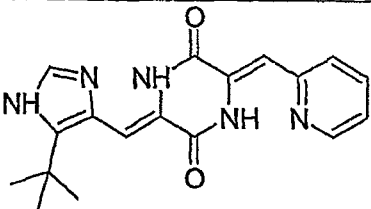
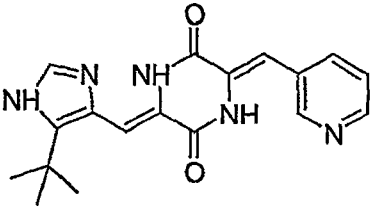
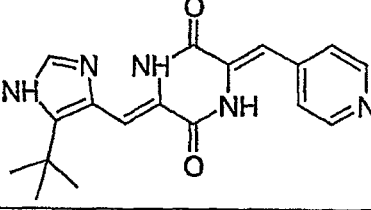
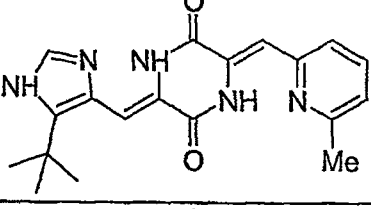
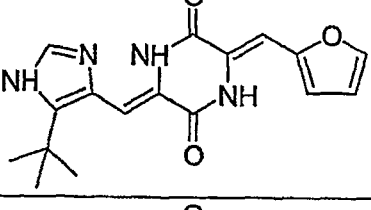
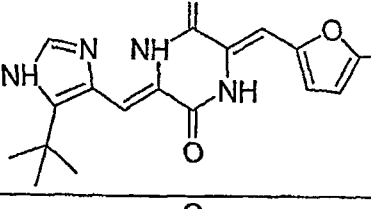
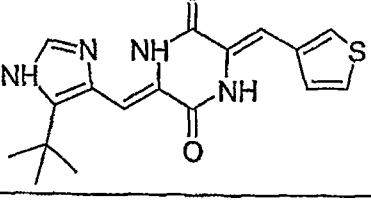
化合物	结构式	EC ₅₀ (nM)
KPU-2		48
KPU-9		31
KPU-35		10
KPU-19		20

化合物	结构式	EC ₅₀ (nM)
KPU-41		31
KPU-47		40
KPU-38		45
KPU-51		617
KPU-49		28
KPU-44		43

4) 用芳基-杂环取代所述苯环

所述苯环也可被杂芳基基团替代。这类替换的细胞毒性活性结果如表 11 所示。因为所述芳环的氮原子可与所述吡嗪二酮环的 NH 基团形成氢键，并限制所述吡啶和吡嗪二酮环间的分子构象为单平面结构，因此脱氢 PLH 的活性构象需要所述吡嗪环的酰胺的氢原子与所述苯环的邻位氢原子之间通过空间排斥形成一定大小的二面角。

表 11. 用杂芳基环进行替换对 HT-29 细胞增殖的作用

化合物	结构式	EC ₅₀ (nM)
KPU-28		>20 nM
KPU-31		96
KPU-25		544
KPU-33		>20 nM
KPU-26		600
KPU-60		71
KPU-42		54

化合物	结构式	EC ₅₀ (nM)
KPU-27		80
KPU-29		44
KPU-61		184
KPU-36		2790
KPU-63		105

用较小的呋喃或噻吩环替代所述苯环(例如 KPU-29 或 42)可表现出活性。在保持较强活性的条件下可将所述苯环转变为其它芳香结构。

5) 苯基阿夕斯丁的代谢

在近期的研究中,用大鼠肝脏微粒体或人肝脏 P450s 对(±)-苯基阿芬斯丁进行处理。在人的情况中,至少检测到七种代谢产物,且其中两种(即 P1 和 P3)是主要的代谢产物,占所述回收代谢产物的超过 60%。

因为在 tBu-脱氢 PLH 中没有外-烯烃结构, 所以当前合成的衍生物没有象 P1 和 P4 的氧化形式。但是, 在肝脏代谢过程中形成诸如 P3 和 P5 的氧化形式。各种可阻止这类代谢的衍生物可有效地避免在所述苯环上

的 P450 氧化。也可对所述咪唑环进行修饰以避免不利的氧化。

6) 脱氢 PLH 的物理化学稳定性

脱氢 PLH 的物理化学稳定性是不利的问题之一。在苯基阿夕斯丁中，因为在所述苄基部分没有其它烯烃结构，因此不存在这类问题。然而，在脱氢 PLH 中，所述亚苄基部分可很容易被活化(可能被可见光活化)，且因为存在双键的较长的共轭，因此经常发生 Z 到 E 的转变。这种转变甚至在正常的室内光线下也会发生。在所述细胞毒性分析中，一些化合物在孵育过程中转变为 E-型，尽管对脱氢 PLH 这种转变可能达到 1:1 比例的平衡。这种转变是可控的。已知在 combretastatin A4(微管蛋白抑制剂的相似类型)中也存在这种 Z 到 E 的转变，且报道了一些改进这种问题的研究。

7) 前药合成

E-型也可用作脱氢 PLH 或一种或多种其类似物(包括本文所述的那些类似物)的前药。尽管抗微管蛋白药物属于分子靶向治疗方法之一，但这些药物的不利特性之一包括其对肿瘤和健康组织的较低的选择性。这导致了不利的副作用。然而，如果所述化合物只选择性地在肿瘤组织中发挥功能，则可降低抗微管药物的不利副作用。由于所述脱氢 PLH (Z-型)可由其 E-异构体通过可见光照射产生，因此可将所述 E-型给药且只对肿瘤位置进行光照射，这样只有肿瘤被光产生的 Z-型所损伤，而降低了对健康组织的负面效果。

通过引入大体积但生物可降解的酰基基团可对所述 E-型进行化学保护，而所述酰基基团可作为前药引入所述哌嗪二酮环上。这类酰基基团可被体内的蛋白酶降解。因此，在给药前保持酰基化的 E-化合物，给药后其变为真正的 E-型，通过局部光照射可将其转变为生物活性的 Z-型。

这类酰基-E-型的 tBu-脱氢 PLH 的合成路线如图 9 所示。

实施例 7

合成的脱氢苯基阿夕斯丁的药物制剂

1) 用于静脉内滴注、注射、输注或类似形式给药的制剂

向含有 5 g 葡萄糖粉末的每一小瓶中无菌加入 10 mg 的用本发明方法合成的化合物并密封。充入氮气、氩或其它惰性气体后，将所述小瓶保存在低温黑暗处。使用前将所述成分用乙醇溶解，并将其加入 100 ml 的 0.85% 生理盐水溶液中。作为抑制确诊患有癌性肿瘤的人体内的肿瘤生长的方法，将所得溶液以约 10 ml/天到约 1000 ml/天进行静脉内给药，其给药方式可为本领域所属技术人员认为适当方式，如滴注或皮下注射或腹膜内注射。

2) 用于口服给药或类似形式的制剂

通过任意常规方法，将由 1 g 用本发明方法合成的化合物、98 g 乳糖和 1 g 羟丙基纤维素充分混合得到的混合物制成颗粒。将所得颗粒充分干燥并过筛，得到适合于包装在瓶中或热封装的颗粒制剂。根据症状，所得颗粒制剂可按人癌性肿瘤治疗领域所属技术人员认为适当的方式以约 100 ml/天到约 1000 ml/天进行口服给药。

3) 用于局部给药的制剂

也可通过对个体皮肤的染病区域直接给药所述化合物来实现局部给药所述个体有效剂量的所述化合物。为此目的，所述化合物以包括药物可接受的局部载体的药物组合物的形式进行给药或应用，例如凝胶、软膏、洗液或乳膏，其中所述局部载体包括但不限于诸如水、甘油、酒精、丙二醇、脂肪醇、甘油三酯、脂肪酸酯或矿物油的载体。其它局部载体包括煤油、棕榈酸异丙基酯、聚乙二醇、乙醇(95%)、聚氧化乙烯单月桂酸酯的水溶液(5%)、或月桂基磺酸钠的水溶液(5%)。如果需要可加入其它材料，例如抗氧化剂、湿润剂、粘度稳定剂和类似的试剂。也可包括诸如 Azone 的经皮渗透增强剂。此外，在某些例子中，所述化合物可布置在位于皮肤上、皮肤内或皮肤下的装置中。这类装置包括可通过被动或主动释放机理向皮肤中释放所述化合物的贴片、植入物和注射物。

实施例 8

KPU-2、KPU-35 和叔丁基苯基阿夕斯丁的体外药理学

用 KPU-2、KPU-35 和叔丁基苯基阿夕斯丁进行的体外效力研究包括：A) 六种肿瘤细胞系的组，B) 在耐多种药物的肿瘤细胞中进行研究，及 C) 研究确定作用的机理。

A) 在六种肿瘤细胞系的组中对 KPU-2、KPU-35 和叔丁基苯基阿夕斯丁的研究

使用如下细胞系(括号中为来源)：HT29 (人克隆肿瘤；ATCC；HTB-38)、PC3 (人前列腺肿瘤；ATCC；CRL-1435)、MDA-MB-231 (人乳房肿瘤；ATCC；HTB-26)、NCI-H292 (人非小细胞肺肿瘤；ATCC；CRL-1848)、OVCAR-3 (人卵巢肿瘤；ATCC；HTB-161)、B16-F10 (小鼠黑瘤；ATCC；CRL-6475) 和 CCD-27sk (正常人成纤维细胞；ATCC；CRL-1475)。将细胞在其各自的培养基质中维持在亚融合(subconfluent)密度。

按照上文实施例 4 中所述进行细胞毒性分析，使用 Resazurin 荧光作为细胞活力的指标。

所述公开的化合物是抗各种不同和明显差别的肿瘤细胞系的有效试剂。特别地，例如 KPU-2 和 KPU-35 在强度(在低纳摩尔范围内有活性)及效力(对最大细胞毒性作用方面效果最强)上对所述 HT-29 肿瘤细胞系都是最有效的；叔丁基苯基阿夕斯丁对所述 PC-3 肿瘤细胞系显示出最大的强度，而对所述 HT-29 细胞系显示出最大的效力；KPU-2 和 KPU-35 强度通常比叔丁基阿夕斯丁高 10-40 倍，而所有三种化合物在所述不同肿瘤细胞系中的效力相当；所述 HT-29、PC-3、MDA-MB-231 和 NCI-H292 肿瘤细胞系对 NPI 化合物的反应类似，而所述 B16-F10 则表现出某种程度的不敏感。叔丁基-苯基阿夕斯丁在正常成纤维细胞和所述肿瘤细胞系之间表现出明显的差别，除对 OVCAR-3 细胞系外，比例范围从 >20 到 >100。

表 12. KPU-2、KPU-35 和叔丁基苯基阿夕斯丁在 Tumor Panel Screen 中的
活性

细胞系	KPU-2			KPU-35			叔丁基苯基阿夕斯丁		
	平均值	SD	n	平均值	SD	n	平均值	SD	n
HT-29 克隆									
IC50 nM	9.8	2.4	4	8.2	2.0	4	420	473	3
%细胞毒性	82.5	5.3	4	81.3	4.0	4	88	0.2	3
PC-3 前列腺									
IC50 nM	13.4	0.7	4	13.2	2.5	4	174	-	2
%细胞毒性	60.3	2.1	4	56.8	1.0	4	59.5	-	2
MDA-MB-231 乳房									
IC50 nM	13.8	1.9	3	9.7	4.2	4	387	-	2
%细胞毒性	56.7	7.2	3	59.3	5.6	4	65.5	-	2
NCI-H292 肺									
IC50 nM	17.5	1.1	4	15.9	1.1	4	384	194	3
%细胞毒性	70.5	2.9	4	68.5	2.9	4	65	5	3
OVCAR-3 卵巢									
IC50 nM	>20,000	-	4	>20,000	-	4	>20,000	-	2
%细胞毒性	45.8	3.0	4	39	2.2	4	37	-	2
B16-F10 黑瘤									
IC50 nM	37.1	26.3	4	32.3	19.9	4	736	650	3
%细胞毒性	71.8	2.5	4	72.0	2.2	4	74	2	3
CCD-27sk 成纤维细胞									
IC50 nM	92	2.9	4	7.4	2.6	4	>20,000	-	2
%细胞毒性	64.3	2.4	4	60.8	1.9	4	45	-	2

B) 耐药性细胞系的研究

在临床肿瘤学中使用化疗试剂的一个主要挑战是肿瘤细胞对所述药物作用发展的耐药性。耐药性的发展有多种机理，其中每一种对化疗药物都有不同的效果。这些机理包括 ATP 依赖的外排泵(efflux pump)的表达上升，所述外排泵例如 *MDR1* 编码的 P-糖蛋白或 *MRP1* 编码的多种药物耐药性相关蛋白 1。药物摄取降低、药物靶标改变、药物诱导的 DNA 损伤的加速修复、凋亡途径的改变及细胞色素 P450 酶的活化作用是癌症细胞对抗癌药物产生耐药性的机理的其它例子。在表现两种不同耐药性机理(P-糖蛋白的过表达和拓扑异构酶 II 活性的改变)的三种不同细胞系中对所选化合物进行研究。

1) 人子宫肉瘤肿瘤细胞系对：MES-SA (紫杉醇敏感)和 MES-SA DX (耐紫杉醇)

这种细胞系表达上调的 *mdr-1* mRNA 和 P-糖蛋白(排出泵机理)。对由 P-糖蛋白上调引起耐药性的化合物，用环孢菌素-A (CsA)预处理可阻断 P-糖蛋白并恢复那些化合物在所述耐药性细胞系中的活性。

如表 13 中所示，KPU-2 和 KPU-35 在所述耐药性细胞系中和所述敏感系中具有相同的强度，而叔丁基苯基阿夕斯丁的强度只是轻微下降。环孢菌素-A (CsA)预处理不能改变所选化合物的强度。与之不同，紫杉醇在所述 MES-SA DX 耐药性细胞系中实际上是无活性的，而该化合物在所述敏感细胞系中是很强效的。CsA 处理恢复了所述 MES-SA DX 细胞系对紫杉醇的敏感性。所述 MES-SA DX 细胞系对依托泊甙(etoposide) (60 倍)、阿霉素(34 倍)和米托蒽醌(mitoxantrone) (20 倍)也显示出降低的敏感性。

这些数据表明，在所述细胞系中 KPU-2、KPU-35 和叔丁基苯基阿夕斯丁的效果不受这种所述紫杉醇相关耐药性机理(p-糖蛋白)的影响，同时表明该模型中紫杉醇对这些所选化合物不存在交叉耐药性。

表 13. KPU-2、KPU-35、叔丁基苯基阿夕斯丁和紫杉醇在 MES-SA 紫杉醇敏感和 MES-SA DX 耐紫杉醇的人子宫肉瘤肿瘤细胞系中的活性

化合物研究	MES-SA 敏感			MES-SA DX 耐药性			
	无 CsA	CsA 预处理		无 CsA		CsA 预处理	
	IC50 nM	IC50 nM	对无 CsA 的比例	IC50 nM	对 MES-SA 的比例	IC50 nM	对无 CsA 的比例
KPU-2							
研究 I	8.5	-	-	10.5	1.2	-	-
研究 II	19.4	27.4	1.4	21.7	1.1	37.8	1.74
KPU-35							
研究 I	6.6	-		5.2	0.8	-	-
研究 III	3.9	20	0.5	2.5	0.6	6.7	2.7
叔丁基苯基 阿夕斯丁	144	-	-	825	5.7	-	-
研究 I	122	162	1.3	694	4.3	622	0.9
研究 III							
紫杉醇							
研究 I	4.4	-	-	>20,000	>455	-	-
研究 II	13.3	7.6	0.6	>>100	>>8	40	<<0.25
研究 III	7.3	2.8	0.4	>24,000	>3000	2.0	<<0.001

2) 人急性前髓细胞白血病细胞系对：HL-60 (米托蒽醌-敏感)和HL-60/MX-2 (耐米托蒽醌)

该细胞系被认为具有非典型的耐药性，具有改变的拓扑异构酶 II 催化活性而无 P-糖蛋白的过表达。

如表 14 所示，这些结果表明所选新化合物的强度在所述敏感和耐药性 HL-60 细胞系中很类似。与之不同，米托蒽醌在耐药性 HL-60/MX-2 细胞系中效力下降了 24 倍。

因此，在该细胞系中 KPU-2、KPU-35 和叔丁基苯基阿夕斯丁对米托蒽醌的耐药性机理不敏感，同时表明在该模型中米托蒽醌对这些所选新化合物没有交叉耐药性。

表 14. KPU-2、KPU-35、叔丁基苯基阿夕斯丁和米托蒽醌在 HL-60 人急性髓细胞白血病肿瘤敏感和耐药性细胞系对中的活性

化合物	HL-60 敏感	HL-60 耐药性	
	IC50 nM	IC50 nM	对敏感型的比例
KPU-2	6.4	8.17	1.28
KPU-35	9.2	7.3	0.79
叔丁基苯基阿夕斯丁	255	175	0.69
米托蒽醌	202	4870	24.1

3) 人乳腺癌细胞系对: MCF-7 (紫杉醇敏感)和 MCF-7/ADR (耐紫杉醇)

该研究将 KPU-2 与紫杉醇进行对比。KPU-2 证明在该细胞系对的敏感和耐药性成员中具有类似的强度。与之不同, 紫杉醇在所述耐药性细胞系中实际上无活性, 而在所述敏感细胞系中具有低纳摩尔强度(表 15)。

这些研究在不同人肿瘤细胞中确认对紫杉醇的耐药性不会转移至 KPU-2。

表 15. KPU-2 和紫杉醇在 MCF-7 人乳腺癌敏感和耐药性细胞系对中的活性

化合物	MCF-7 敏感	MCF-7/ADR 耐药性	
	IC50 nM	IC50 nM	对敏感型的比例
KPU-2	39.6	27.4	0.69
紫杉醇	2.6	>>100	>>38

C) 作用机理的研究

1). 对微管功能的作用

在本研究中使用人脐静脉内皮细胞(来自 Cambrex 的 HuVEC), 通过对 α -微管蛋白进行染色, 对比秋水仙碱和紫杉醇评价了 KPU-2 和叔丁基

苯基阿夕斯丁对微管蛋白的效果。

在所述 HuVEC 细胞中,暴露于 KPU-2、叔丁基苯基阿夕斯丁或秋水仙碱(均为 2 μ M) 30 分钟诱导了与 DMSO 对照中观测结果相对的微管解聚作用(表现为缺乏完整的微管结构)和细胞膜起疱(blebbing) (细胞凋亡的明显标志),而紫杉醇在这些条件下不能诱导微管解聚作用。秋水仙碱是已知的微管解聚试剂而紫杉醇是微管蛋白稳定剂。将 CCD-27sk 细胞暴露于 KPU-2 或秋水仙碱可观察到类似的结果。

2). 诱导细胞凋亡

细胞凋亡及其调节障碍在肿瘤学中起重要作用;在肿瘤细胞中选择性诱导程序化的细胞死亡循环是许多化疗药物开发项目的目标。通过不同方法可证明对细胞凋亡的这种诱导作用,上述方法包括特征性的细胞膜起疱、DNA 断裂、抗凋亡因子 Bcl-2 的过磷酸化、caspase(凋亡蛋白酶)级联反应的活化及多(ADP 核糖)聚合酶(PARP)的降解。

与坏死细胞的死亡明显不同,凋亡细胞死亡的特征信号包括细胞膜起疱、核分解、细胞收缩和凝聚及最终的细胞死亡。KPU-2 在人前列腺肿瘤细胞中诱导与细胞凋亡早期阶段相关的典型形态变化。用 KPU-2 处理 HuVEC 细胞时可以清楚发现类似的现象。

3). DNA 断裂

细胞凋亡的晚期阶段特征是核小体间 DNA 断裂,其导致可被凝胶电泳显现的明显的梯形图案。将这种方法用于研究 Jurkat 细胞(人 T 细胞白血病系)中与 halimide (氯化对十二烷基苄三甲铵)和脱氢苯基阿夕斯丁(KPU-1)相比 KPU-2 对 DNA 梯形化(laddering)的作用。KPU-2 在 1 nM 浓度诱导 DNA 梯形化,而 halimide 和 KPU-1 的强度低得多。

4). Caspase 级联反应的活化

在凋亡过程中,caspase 级联反应中包括 Caspase-3、-8 和-9 在内的多种酶被活化。在 Jurkat 细胞中,在用 KPU-2、KPU-35 和叔丁基苯基阿夕斯丁处理后对 Caspase-3 活性进行了监测。

结果表明, 通过以与 halimide 类似的方式用所有三种化合物进行处理使 caspase-3 以剂量依赖的方式被活化。在所述 Jurkat 细胞系中, 在与表示细胞毒性的 IC50 类似的浓度范围内发生所述 caspase-3 的活化(表 16)。

表 16. KPU-2、KPU-35 和叔丁基苯基阿夕斯丁在 Jurkat 细胞中的细胞毒性

NPI 化合物	细胞毒性	
	强度 IC50 nM	效力 %细胞死亡
KPU-2	11	94
KPU-35	5	93
叔丁基苯基阿夕斯丁	165	93
米托蒽醌	41	99

5). Jurkat 细胞中的多(ADP 核糖)聚合酶(PARP)降解

为了评估这些化合物在 Jurkat 细胞中诱导凋亡的能力, 对多(ADP 核糖)聚合酶(PARP)的降解进行了监测。PARP 是 116 kDa 的核蛋白, 其为 Caspase-3 主要的细胞内靶标之一。PARP 的降解产生稳定的 89 kDa 产物, 而这一过程可很容易地通过 western 印记(blotting)监测。PARP 被 caspase 降解是细胞凋亡的标志之一, 且其本身可作为这一过程的良好标志。将所述细胞暴露于所述化合物 10 小时后, 100 nM 的 KPU-2 可在 Jurkat 细胞中诱导 PARP 的降解。KPU-2 显示出比 halimide 或 KPU-1 更高的活性。

6). 在 HuVEC 细胞中增强的血管渗透性

解聚微管的化合物(例如 combretastatin A-4-磷酸酯, ZD6126)曾显示出可在体内诱导肿瘤内的血管萎缩。在血管萎缩前, 迅速诱导血管细胞的渗透性(最初是对电解质之后迅速发展到大分子)。用 HuVEC 细胞对荧光标记的葡聚糖的渗透性的增强作为对血管萎缩的间接分析。

KPU-2、KPU-35 和叔丁基苯基阿夕斯丁均迅速(1 小时内)诱导明显的

HuVEC 单层渗透性，其程度与秋水仙碱类似。在本分析中微管稳定剂紫杉醇无活性(图 12)。

7). 大范围激酶筛查概况

最初，在一组 60 种不同激酶中以 10 μ M 的浓度对 KPU-2 进行筛查；ATP 的浓度为 10 μ M。在初级筛查中四种激酶被抑制超过 50%，而次级筛查中确定的 IC50 值如表 17 所示。所有的 IC50 值均属于低微摩尔范围，表明对这些激酶的抑制与对肿瘤细胞毒性观察到的低纳摩尔活性无关。

表 17. KPU-2 抗所选激酶的活性

激酶	IC50 (μ M)
CDK1/Cyclin B (人)	10.1
c-RAF (人)	8.9
JNK3 (大鼠)	6.8
Lyn (小鼠)	11.1

实施例 9

体内药理学

在小鼠中，使用 MX-1 (乳房)和 HT-29 (克隆)异种皮移植模型以及 P-388 小鼠白血病肿瘤模型对 KPU-2 进行了初步研究。根据活性，在所述体外肿瘤列表中选取的其它肿瘤模型是 DU-145 (前列腺)、MCF-7 (乳房)和 A549 (肺)细胞系。还包括人胰腺肿瘤(MiaPaCa-2)。将所述新化合物作为单独治疗剂或与临床使用的化疗试剂组合进行研究。通过急性耐受性测试(最大耐受剂量，MTD)确定所选新化合物的剂量，且如果需要可在每一研究中进行调整。所述临床使用的化疗试剂的剂量是在以往研究的基础上选择的。

KPU-2 是在这五个肿瘤模型中研究的第一个化合物。根据该研究的初步结果，将所有三种化合物在 HT-29 人克隆肿瘤、DU-145 人前列腺和 MCF-7 人乳房肿瘤异种皮移植模型中进行了比较。

上述模型均采用皮下异种皮移植的移植技术,且潜在地受到化合物对皮下脉管系统的选择性作用的影响产生放大(或明显)的抗肿瘤活性。为了避免这种可能性,本研究中还采用了两种其它肿瘤模型。其中之一是在静脉内注射 B16-F10 小鼠黑瘤肿瘤细胞后观测肺的转移瘤。另一模型是在小鼠乳房的颊脂垫中移植 MDA-231 人乳房肿瘤细胞。尽管后一模型是异种皮移植模型,所述皮下脉管系统并不起作用。

方法

1). 异种皮移植模型

使用的动物为(例外情况在各研究中声明): 5-6 周龄(~20g, Harlan) 的雌性裸鼠(nu/nu); 除非特别声明,组大小为每组 9~10 只小鼠。

肿瘤移植使用的细胞系为: HT-29 人克隆肿瘤; MCF-7 人乳房肿瘤; A549 人非小细胞肺肿瘤; MiaPaCa-2 人胰腺肿瘤; DU-145 人前列腺肿瘤。

将所选新化合物作为单一治疗剂通过腹膜内途径以各研究给定的剂量进行给药; 对于组合研究,在给药所述化合物前 15~30 分钟注射所选参考化疗试剂。

这些研究中使用的载体为: 12.5% DMSO、5% Cremaphor 和 82.5% 花生油用于所选新化合物; (1:3) 聚山梨醇酯 80 : 13% 乙醇用于 taxotere (泰索帝); (1:1) Cremaphor : 乙醇用于 paclitaxel (紫杉酚); 对 CPT-11 每 mL 溶液含有 20 mg 的盐酸 irinotecan (伊立替康)、45 mg 山梨醇 NF 粉末和 0.9 mg 乳酸,使用 NaOH 或 HCl 将其 pH 值调至 7.4。用生理盐水稀释来得到所述参考化合物的注射浓度。

HT-29 人克隆肿瘤模型

用套针将取自裸鼠宿主皮下生长的肿瘤的 HT-29 肿瘤碎片皮下(s.c.) 移植入动物体中。当肿瘤尺寸达到 5 mm × 5 mm (约 10-17 天)时,将所述动物分入治疗组和对照组。从第一天开始,小鼠一周称重两次,且每周使用测径规(caliper)测量肿瘤尺寸两次。用公式($W^2 \times L$)/2 将所述肿瘤尺寸转化为估计肿瘤的重量 mg。当对照组的估计肿瘤重量平均值达到 1000 mg 时,将小鼠称重、处死并切除肿瘤。将肿瘤称重并计算每组的平均肿

瘤重量，并确定每组的肿瘤生长抑制率(TGI) (100%减去治疗组肿瘤平均重量的变化/对照组肿瘤平均重量的变化 $\times 100$)。

除非对单独的研究有特别声明，在该模型中，将所选新化合物每三天一次进行腹膜内注射 15 天[第 1、4、8、11 和 15 天(q3dx5)]; 在第 1、8 和 15 天(qwx3)将 CPT-11 腹膜内给药。

MF-7 人乳房肿瘤模型

在皮下移植 MCF-7 肿瘤碎片(取自裸鼠宿主的皮下肿瘤)之前 24 小时，对雌性裸鼠(~20g)皮下移植 21 天释放雌激素(0.25 mg)的药丸。然后按照 HT-29 模型中所述进行研究，使用 taxotere 作为标准化疗试剂。

除非对单独的研究有特别声明，在该模型中，将新化合物在第 1-5 天通过腹膜内途径每日注射，包括(qdx5); 在第 1、3 和 5 天(qodx3)将 taxotere 腹膜内给药。

A549 人肺肿瘤模型

用套针将取自裸鼠宿主皮下生长的肿瘤的 A549 肿瘤碎片皮下移植入动物体中。当肿瘤尺寸达到 5 mm $\times$ 5 mm (约 10-17 天)时，将所述动物分入治疗组和对照组。研究的余下部分按照 HT-29 模型中所述进行，用 taxotere 和 CPT-11 作为标准化疗试剂。

除非对单独的研究有特别声明，在该模型中，使用 CPT-11 组合以 q3dx5 剂量方案，或与 taxotere 组合以 qdx5 剂量方案将所述测试化合物通过腹膜内途径给药;通过腹膜内途径以 qwx3 方案给药 CPT-11;以 qodx3 剂量方案将 taxotere 腹膜内给药。

MiaPaCa-2 人胰腺肿瘤模型

用套针将取自裸鼠宿主皮下生长的肿瘤的 MiaPaCa-2 肿瘤碎片皮下移植入动物体中。当肿瘤尺寸达到 5 mm $\times$ 5 mm (约 10-17 天)时，将所述动物分入治疗组和对照组。研究的余下部分按照 HT-29 模型中所述进行，用 gemcitabine (吉西他滨)作为标准化疗试剂。

除非对单独的研究有特别声明，在该模型中，将测试化合物在第 1、

4、7、10 和 15 天(q3dx5)每三天一次通过腹膜内途径给药；在第 1、4、7 和 10 天(q3dx4)将 gemcitabine 通过腹膜内途径给药。

DU-145 人前列腺肿瘤模型

用套针将取自裸鼠宿主皮下生长的肿瘤的 DU-145 肿瘤碎片皮下移植入雄性小鼠中。当肿瘤尺寸达到~5 mm × 5 mm (约在 13-17 天)时，将所述动物分入治疗组和对照组。研究的余下部分按照 HT-29 模型中所述进行，用 taxotere 作为标准化疗试剂。

除非对单独的研究有特别声明，在该模型中，将测试化合物在第 1、3、5、8 和 11 天(q3dx5)通过腹膜内途径给药；在第 1、3 和 5 天(q2dx3)将 taxotere 腹膜内给药。

2). 非皮下移植肿瘤模型

所用动物为：5-6 周龄(~20g, Harlan)的雌性裸鼠(nu/nu) (MDA-231 研究)或 B6D2F1 (B16-F10 研究)小鼠；除非特别声明，组的大小为每组 10 只小鼠。

所用细胞系为：MDA-MB-231 人乳房肿瘤和 B16-F10 小鼠黑瘤细胞。

将 NPI 化合物作为单一治疗剂通过腹膜内途径以各研究给定的剂量进行给药；对于组合研究，在将 NPI 化合物给药前 15~30 分钟注射所选参考化疗试剂。

MDA-231 人乳房肿瘤

在雌性裸鼠的乳房颊脂垫中注射取自体外细胞培植的 2×10^6 MDA-231 细胞。当肿瘤尺寸达到 5 mm × 5 mm (约 14-28 天)时，将所述动物分入治疗组和对照组。研究的余下部分按照 HT-29 模型中所述进行，用 paclitaxel 作为标准化疗试剂。

除非对单独的研究有特别声明，在该模型中，将测试化合物在第 1、4、8、11 和 15 天(q3dx5)通过腹膜内途径给药；在第 1-5 天(qdx5)将 paclitaxel 通过腹膜内途径给药。

B16-F10 转移性小鼠黑瘤模型

在第 0 天小鼠通过 iv 途径接受 B16-F10 细胞(取自 B16-F10 细胞的体外细胞培养)。在第一天将小鼠随机分配到治疗组和对照组中,并开始治疗。从第一天开始,对小鼠每周称重两次。在第 16 天将所有小鼠处死,切除肺、称重并对表面克隆计数。结果表示为治疗组小鼠的平均克隆数/对照组小鼠的平均克隆数(T/C) × 100%。转移生长抑制率(MGI)是从 100% 中扣除上述数值。本研究中使用标准化疗试剂是 Paclitaxel。

除非对单独的研究有特别声明,在该模型中,将所述测试化合物在第 1-5 天(qdx5)通过腹膜内途径给药;在第 1-5 天(qdx5)将 paclitaxel 腹膜内给药。

适当时(n ≥ 3),结果表示为平均值 ± SEM。除非特别声明,使用 ANOVA 和 Neuman-Keuls 后检验(post test)对研究结果(用多组进行的研究)进行统计学分析。基于所述化合物或药物或所述组合可降低肿瘤生长这一假设,还使用了单尾 t 检验(one-tailed t-test)。

结果

在 HT-29 人克隆肿瘤异种皮抑制模型中的研究

1. KPU-2 +/- CPT-11 在 HT-29 人克隆肿瘤异种皮移植模型中的体内评价

该研究在 HT-29 模型中对单独使用 KPU-2 或与相关化疗剂 CPT-11 结合使用时的剂量强度和剂量方案的变化进行了评估。

以每天一次 7.5 mg/kg ip 共五天(qdx5)、一日两次 3.75 mg/kg ip 共五天、每两天一次 7.5 mg/kg ip 共 10 天(qodx5)及每三天一次 7.5 mg/kg ip 共 15 天(q3dx5)的剂量将 KPU-2 给药。将 CPT-11 与 NPI-2358 结合以 7.5 mg/kg ip q3dx5 的剂量给药可产生明显大于任一化合物单独使用时的效果,其在整个研究过程中都始终保持(图 13)。本研究的活体部分得到的这些观测结果被尸检时的组平均最终肿瘤重量所证实,其中只有结合组与对照组相比表现出统计学显著的较低的肿瘤重量。此外,所述结合治疗组与 CPT-11 单独治疗组的平均肿瘤重量差异是统计学显著的(图 14)。当尸检时对个体最终肿瘤重量进行检验后,可清楚看到组合治疗的更大的效果(图 14)。组合治疗的 TGI 为 78%而相对地单独 CPT-11 为 38.9%。结

合治疗组的 TGI 超过了阳性效果的 NCI 标准(58%)。

2. KPU-2 +/-标准化疗剂对五种人肿瘤异种皮移植模型的研究

本研究由五个部分组成，每部分有其各自的方案、时间安排、剂量方案和参考化合物。每一部分均应理解为包含在具体肿瘤模型的描述中。

本研究的 HT-29 部分的目的是研究在 HT-29 人克隆肿瘤异种皮移植模型中使用与上述研究中所用剂量相比稍高剂量的 KPU-2 的效果，其中在 KPU-2 (7.5 mg/kg ip q3dx5)和 CPT-11 (100 mg/kg ip qwx3)之间观察到明显的协同作用。

如图 15 中所示，在该模型中 KPU-2 和 CPT-11 结合在抑制肿瘤生长时有明显的协同作用，此时在所述结合治疗组中在第 29 个治疗日肿瘤生长基本上被完全抑制了。结合治疗具有持续的效力，且该组中估计的肿瘤生长明显低于任一单一治疗组。因此，将 KPU-2 和 CPT-11 给药可抑制肿瘤生长，是有效的抗肿瘤疗法。

尸检时切除的肿瘤的重量测量值(图 16)支持了本研究活体部分的观测结果(估计的肿瘤生长，图 15)。结合组的肿瘤重量明显低于对照组($p<0.01$)，同样也明显低于单独使用 CPT-11 组的肿瘤重量($p<0.05$)。

当考虑到个体最终肿瘤重量时(图 16)，结合组的肿瘤尺寸普遍小于其它治疗组或对照组。结合组的 TGI 为 65.8%，根据 NCI 标准表现为阳性效果，而单独治疗没有达到 TGI >58%的 NCI 标准。

3. 对 HT-29 人克隆肿瘤异种皮移植研究中的 KPU-2、KPU-35 和叔丁基苯基阿夕斯丁的活性的研究

本研究的结果如图 17 和表 18 所示。结合治疗组的所述新化合物与 CPT-11 之间均表现出明显的协同作用。个体肿瘤重量证明了结合治疗的有效性(图 18)。每种情况下，结合组的 TGI 均超过了阳性效果的 NCI 标准，而 CPT-11 单独治疗的 TGI 没有达到这种水平。

表 18. 在 HT-29 人克隆肿瘤模型中进行的研究的总结

研究描述		NPI-化合物		化疗试剂		结合(combination)		评论
编号	终点	代号, mg/kg ip	结果 TGI %	名称, 剂量	结果 TGI%	结果 TGI%	超过 NCI 标准 (TGI≥58%)	
2164	TGI	KPU-2 7.5 qdx5 7.5 q3dx5	无效果 无效果	CPT-11 100 ip qwx3	39*	78 **,#	结合	协同作用
2288	TGI	KPU-2 10→7.5 q3dx5	无效果	CPT-11 100 ip qwx3	36.5*	65.8 **	结合	协同作用 参见文本
2139	TGI	KPU-2 7.5 q3dx5	无效果	CPT-11 100 ip qwx3	32.7	80.7 **,#	结合	协同作用
2139	TGI	KPU-35 10→7.5 q3dx5	无效果	CPT-11 100 ip qwx3	32.7	83.3 **,##	结合	协同作用 1+第 13 天 1+第 27 天
2139	TGI	叔丁基苯基阿 夕斯丁 30 q3dx5	无效果	CPT-11 100 ip qwx3	32.7	77.7 *,#	结合	协同作用

* p<0.05 vs 对照; ** p<0.01 vs 对照; # p<0.05 vs CPT-11 单独; ## p<0.01 vs CPT-11 单独;
+ = 死亡数目

4. KPU-2、KPU-35 和叔丁基苯基阿夕斯丁与 CPT-11 结合在 HT-29 人克隆肿瘤异种皮移植模型中的作用的总结

当与 CPT-11 结合时, KPU-2 把 CPT-11(标准的化疗试剂)的作用增强到远超 $TGI \geq 8\%$ 的阳性效果 NGI 标准的水平。上述三项研究所得的结果在活体观测结果(图 19)和尸检切除的肿瘤的重量(图 20)方面都基本相当。

在 DU-145 人前列腺肿瘤异种皮移植模型中的研究

用此模型完成了两项研究: 第一项研究包括单独使用 KPU-2 以及将其与 taxotere 结合使用; 第二项研究将单独使用 KPU-2、KPU-35 和叔丁基苯基阿夕斯丁与结合使用 taxotere 进行比较。

1. KPU-2 与 Taxotere 结合在 DU-145 人前列腺肿瘤异种皮移植模型中的作用

从本研究活体部分所得的数据(图 21)中可发现, 对 DU-145 人前列腺肿瘤最有效的治疗方法是将 KPU-2 和 taxotere 结合进行治疗。在本研究的开始阶段所述治疗的效果最为显著, 但随着研究的进行不断降低。从治疗的第 20-27 天, 所述结合治疗确实显示出超过 NCI 标准($TGI \geq 8\%$)的明显的 TGI, 而所述结合治疗的估计肿瘤重量也明显低于各单独治疗方法。

2. 单独的 KPU-2、KPU-35 和叔丁基苯基阿夕斯丁或其与 Taxotere 结合在 DU-145 人前列腺异种皮移植模型中的活性

以上述研究中由 KPU-2 与 taxotere 结合而获得的数据为基础, 开展了第二项研究, 该研究比较了单独使用 KPU-2、KPU-35 和叔丁基苯基阿夕斯丁与结合使用 Taxotere 的差异。

本研究活体部分的观测结果表明无论是 KPU-2 还是 KUP-35, 其与 taxotere 结合对肿瘤生长的降低作用都远大于单独使用 taxotere (图 22)。KPU-35 与 taxotere 结合基本上完全阻碍了所述肿瘤的生长。

尸检时切除的肿瘤重量证实了本研究活体阶段的观测结果。将 KPU-2 (图 23)或 KPU-35 (图 24)与 taxotere 结合在阻碍肿瘤生长时都明显比单独

使用 taxotere 有效。在使用 KPU-35 时, 十只小鼠中的三只显示出肿瘤萎缩的迹象。肿瘤生长抑制指标显示 KPU-2 具有显著的肿瘤生长抑制作用(组平均=74.1%), 而 KPU-35 则基本上完全阻碍了肿瘤生长(组平均=92.5%)。单独的 Taxotere 则没有达到 NCI 建立的阳性作用标准(TGA $\geq 8\%$)。

5. 在 MCF-7 人乳房肿瘤异种皮移植模型中的研究

本研究比较了 KPU-2、KPU-35 和叔丁基苯基阿夕斯丁在 MCF-7 人乳房肿瘤异种皮移植模型中的作用。在第 1、2、3、4 和 7 天以给定剂量将所述化合物给药; 在第 1、3 和 7 天将 Taxotere 给药。

在本模型中, 当所选化合物与 taxotere 结合使用时具有起效早的、统计学显著的作用, 明显基本上完全阻碍了所估计的肿瘤生长(图 25)。在上述三种化合物中, KPU-2 显示为最有效, 而叔丁基苯基阿夕斯丁也显示出明显强过 taxotere 的作用。

6. 在 A549 人非小细胞肺肿瘤异种皮移植模型中的研究

本研究活体阶段的观测结果(图 26)表明, 与对照组和任一单一治疗组相比, KPU-2 (7.5 mg/kg ip, qdx5)与 taxotere 的结合使用对肿瘤生长产生了显著的抑制。尸检得到的肿瘤重量证实了上述结果, 其中结合治疗组的平均值明显小于单独使用 taxotere 的组或对照组的平均值(图 27)。所述结合治疗组的肿瘤重量值形成一组低肿瘤重量, 表明所述作用的持续性。

当计算肿瘤生长指标时, 与对照组相比所述结合治疗组具有 74.4%的 TGI, 远超过阳性作用的 NCI 标准(TGI $\geq 8\%$)。单独使用 taxotere 具有 26.1%的 TGI。

7. 在 MDA-231 人乳房肿瘤同位(orthotopic)异种皮移植模型中的研究

该模型包括将人肿瘤组织植入小鼠乳房颊脂垫(天然环境的替代者)中。通过这种方式避免了由对皮下脉管组织的特异作用而产生的阳性作用。本研究将单独使用 KPU-2 (7.5 mg/kg ip, q3dx5)的作用与结合使用 paclitaxel (16 mg/kg ip, qdx5)的作用进行了对比。

本研究进行三周时，在结合治疗组中对肿瘤生长存在显著的抑制(非常明显的作用)。这种作用与单独使用 taxotere 相比明显得多(图 28)。

8. 在小鼠黑瘤 B16 F10 转移性肿瘤模型中的研究

本研究检验了将 B16 F10 黑瘤细胞静脉注射入小鼠 16 天后，单独使用 KPU-2、KPU-35 和叔丁基苯基阿夕斯丁与结合使用 paclitaxel 对肺表面出现的转移瘤数目的作用。该模型不是异种皮移植模型；然而其没有在上述肿瘤块中进行高度血管化。

在该模型中，最有效的治疗方法是单独使用 KPU-2 (图 29)，其平均转移瘤数目约比单独使用 paclitaxel 少 10% (MGI 分别为 41.6%和 35.0%)。尽管本研究本身不能说明结合治疗比单一治疗更有效，其确实表明 KPU-2、KPU-35 和叔丁基苯基阿夕斯丁在高度血管化的肿瘤中最有效。

实施例 10

对抗病原体真菌活性的分析

直接对真菌生物体测量(例如通过 *Diagn Micro and Infect Diseases* 21:129-133 (1995)中所述 NCCLS 肉汤大量稀释(macrodilution)法的微滴定板适应作用)脱氢苯基阿夕斯丁或其类似物相对上述已知抗真菌化合物的抗病原体真菌相对活性，将其用于测定所述脱氢苯基阿夕斯丁或其类似物的 AF/IS 值。也可在真菌感染的全动物模型中测定抗真菌活性。例如，可使用类固醇治疗的肺毛霉菌病小鼠模型(Goldaill, L.Z. & Sugar, A.M. 1994 *J Antimicrob Chemother* 33:369-372)。在这类研究中以说明的方式，在用真菌感染之前、当时或随后开始对大量动物分别给药无脱氢苯基阿夕斯丁或其类似物、各种剂量的脱氢苯基阿夕斯丁或其类似物(和/或结合一种或多种其它抗真菌剂)、或阳性对照(例如两性霉素 B)。可每 24 小时一次，用所选剂量的脱氢苯基阿夕斯丁或其类似物、阳性对照或仅用载体对动物进行治疗。持续治疗预定的天数(如多达 10 天)。治疗阶段后对动物进行一段时间的观测(例如总共 3 周)，每天评估死亡率。模型可采用为模拟怀疑被感染的人类个体而设计的，包含或不包含其它治疗(例如用类固醇治疗)的，全身感染、肺感染、阴道感染和其它感染模型。

为了进一步说明,一种用于测定体内治疗效果(ED_{50} ,例如表示为 mg 脱氢苯基阿夕斯丁或其类似物/kg 个体)的方法是啮齿动物模型系统。例如,用病原体真菌对小鼠进行感染,例如以约 10 倍于 50%致死剂量的病原体(10^6 *C. albicans* 细胞/小鼠)对通过静脉内注射进行感染。真菌感染后立刻将脱氢苯基阿夕斯丁化合物以预定的剂量对小鼠给药。通过 Van der Waerden (*Arch Exp Pathol Pharmacol* 195:389-412, 1940)方法从感染后第 20 天记录的存活率计算所述 ED_{50} 值。通常,未治疗的动物在感染后 7-13 天死亡。

在另一说明性的实施方案中,将在 Sabouraud(萨布罗氏)葡萄糖琼脂(SDA)斜面培养(slant)上于 28°C 生长 48h 的 *C. albicans* Wisconsin (C43) 和 *C. tropicalis* (C112) 悬浮在盐水中,并在分光光度计上将 550 nm 处的透过率调节至 46%。将所述接种物用血细胞计数器进一步调节并用平板计数器确认达到约 1 或 5×10^7 CFU/ml。通过将 1 或 5×10^6 CFU 注射入其尾部血管对 CF-1 小鼠进行感染。感染后 4 h 及其后 3 或 4 天每天一次,将溶于乙醇:水(10:90)的抗真菌剂进行静脉内或皮下给药。每天监测存活量。 ED_{50} 定义为使 50% 小鼠存活的剂量。

实施例 11

评估 Antimicotic(抗霉菌)活性

苯并咪唑和灰黄霉素是可与真菌微管结合的抗微管蛋白试剂。一旦结合,这些化合物阻碍敏感生物体的细胞分裂和细胞内运输,导致细胞死亡。商业上,将苯并咪唑用作兽医药物和作物疾病控制中的杀真菌剂。大量真菌物种,包括灰霉(*Botrytis cinerea*)、白僵菌(*Beauveria bassiana*)、银腐病(*Helminthosporium solani*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和曲霉属都对这些分子敏感。然而,毒性问题和耐药性上升对其应用造成了负面影响。灰黄霉素在临床上用于治疗由毛癣菌属、小孢子菌属和絮状表皮癣菌(*Epidermophyton floccosum*)引起的皮肤、头发和指甲的癣感染。然而其抗真菌范围也局限于这类真菌生物。基因毒性也是一个重要的副作用。而另一可选择的一线治疗(first-line treatment) Terbinafine 则较昂贵。此外,近来在红色毛癣菌(所有皮真菌感染的主要病原体)中观察到

临床抗性。

在白色念珠菌中，当细胞暴露于微管抑制剂 nocodazole 和 chloropropham 时，微管/微丝形成受到影响。这些结果进一步证实可将细胞支架抑制剂作为有效的抗霉菌试剂。因此，评估了几种本文公开的化合物的抗霉菌活性。

特别地，将公开的化合物与商业销售的微管抑制剂以及公认的抗真菌剂放在一起进行评价。本研究中所用的测试化合物和对照为：(-)-苯基阿夕斯丁、KPU-1、KPU-2、KPU-11 和 KPU-17、KPU-35、叔丁基苯基阿夕斯丁、秋水仙碱(针对 3 种念珠菌分离株(isolates)测试的商业销售的微管抑制剂)、苯菌灵(Benomyl) (针对 3 种念珠菌分离株测试的商业销售的微管抑制剂)、灰黄霉素(用于针对 6 种皮真菌分离株测试的商业销售的微管抑制剂和抗生素对照)、两性霉素 B (用于针对 3 种念珠菌分离株测试的抗生素对照)、伊曲康唑(用于针对 2 种 *Aspergillus* 分离株测试的抗生素对照)。

用于测试这些化合物的微生物包括：白色念珠菌、光滑念珠菌、烟曲霉、红色毛癣菌、须毛癣菌(*Trichophyton mentagrophytes*)、絮状表皮癣菌。除光滑念珠菌(一分离株)外，每一物种使用两种分离株进行测试。

根据美国临床实验室标准化委员会(National Committee for Clinical Laboratory Standards)提供的方法(M38-A “Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Conidium-Forming Filamentous Fungi; Approved Standard”)完成了抗真菌敏感性测试。其包括在含谷酰胺且不含碳酸氢盐的 RPMI-1640 中、 $0.4-5 \times 10^4$ 的接种体尺寸及 30 或 35°C 孵育 48 小时的条件下进行测试。最低抑制浓度(MIC)定义为与无药物对照管(tube)相比，可使浑浊度降低 80% 的最低浓度。对所研究的化合物药物浓度为 0.03-16 $\mu\text{g/ml}$ ，对伊曲康唑和灰黄霉素为 0.015-8 $\mu\text{g/ml}$ 。

根据 NCCLS 方案的修改版估计了最低抑制浓度(MIC)，在该浓度时化合物可阻止目标微生物的生长。当可在无药物对照管中测得生长时，间隔第一个 24 小时后测定最小抑制浓度(MIC)。所述 MIC 定义为与生长对照相比显示出浑浊度降低 80% 的最低浓度。通过从所述 MIC 浓度和每一高于所述 MIC 的浓度 plating 0.1 μl 来确定最低致死浓度(MLC)。将第

一个显示出 5 个或更少真菌克隆生长(代表 99.95%的杀灭率)的浓度称为 MLC。当得到 MIC 时, 确定最低杀真菌浓度(MFC)以估计所述化合物的真菌抑制/杀真菌性能。这一过程需要将药物治疗的细胞样本(取自含有等于或高于所述 MIC 的化合物的测试孔)稀释到化合物浓度明显低于所述抑制浓度, 并将它们放置在琼脂板上。如果所述细胞能够继续生长, 则将所述化合物记为真菌抑制, 而如果不存在重新生长, 则记为杀真菌(因为所述化合物已经将微生物杀死了)。

本文公开的化合物显示出对两种毛癣菌属物种有效。红色毛癣菌是人皮真菌感染的主要病原体, 且是开发临床试剂的关键目标微生物。

KPU-2、KPU-11 和 KPU-17、KPU-35 &叔丁基苯基阿夕斯丁在效力上相当, 在某些情况下效力高于灰黄霉素(当前用于治疗皮真菌感染的标准药物试剂)。

当针对红色毛癣菌进行测试时, 化合物(-)-苯基阿夕斯丁和 KPU-1 效力明显低于其它化合物, 而针对敏感的须毛癣菌分离株时效力虽然较弱但更接近了。

在那些例子中, 当可测定 MFC 时, 结果表明这些化合物具有抑制真菌的特性(参见表 19 和 20)。

表 19. 脱氢苯基阿夕斯丁及其类似物的抗真菌活性

化合物	MICs 和 MFCs, µg/ml									
	白色念珠菌 90028		白色念珠菌 10231		平滑念珠菌		烟曲霉 分离株#1		烟曲霉 分离株#2	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
(-)-苯基阿夕斯丁	>70	ND**	>70*	ND	>70	ND	>16	ND	>16	ND
KPU-1	>68*	ND	>68	ND	>68	ND	>16	ND	>16	ND
KPU-2	>32	ND	>32	ND	>32	ND	>16	ND	>16	ND
KPU-11 和 KPU-17	>32	ND	>32	ND	>32	ND	>16	ND	>16	>16
KPU-35	>32	ND	>32	ND	>32	ND	>16	ND	<0.03	0.125
叔丁基苯基阿夕斯丁	>32	ND	>32	ND	>32	ND	>16	ND	<0.03	0.125
两性霉素 B	0.5	0.5	0.5	0.5	1	1	ND	ND	ND	ND
灰黄霉素	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.5	ND
伊曲康唑	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1	ND	ND	ND
秋水仙碱	>128	ND	>128	ND	>128	ND	ND	ND	ND	ND
苯菌灵(benomyl)	64	>512	64	>512	64	>512	ND	ND	ND	ND

表 20. 脱氢苯基阿夕斯丁及其类似物的抗真菌活性

化合物	MICs 和 MFCs, µg/ml											
	红色毛癣菌 分离株#1		红色毛癣菌 分离株#2		须毛癣菌 分离株#1		须毛癣菌 分离株#2		絮状表皮癣菌 分离株#1		絮状表皮癣菌 分离株#2	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
NPI2350	>16	ND	0.16	>16	16	>16	>16	ND	>16	ND	>16	ND
NPI2352	>16	ND	0.25	>16	4	>16	>16	ND	>16	ND	>16	ND
NPI2358	>16	ND	<0.03	0.125	2	>16	>16	ND	>16	ND	>16	ND
NPI2362	0.06	>16	<0.03	<0.03	1	>16	>16	ND	>16	ND	>16	ND
NPI2386	<0.03	0.125	<0.03	0.06	1	>16	>16	ND	>16	ND	>16	ND
NPI2460	<0.03	0.125	<0.03	<0.03	4	>16	>16	ND	>16	ND	>16	ND
两性霉素 B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
灰黄霉素	0.5	ND	<0.015	ND	1	ND	2	ND	2	ND	4	ND
伊曲康唑	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
秋水仙碱	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
苯菌灵	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

提供上述实施例的目的只是为了帮助理解本发明。因此，本领域所属技术人员可以理解本发明公开的方法和化合物包括或可提供其它脱氢苯基阿夕斯丁的衍生物。

本领域所属技术人员应该很容易理解，本发明很适用于获取例如本文所述的目标和优点以及其它固有特性。本文描述的方法和步骤只是代表优选的实施方案，且是示例性的。本领域所属技术人员对其所作的改变和其它应用均包括在本发明的精神中。

对本领域所属技术人员显而易见地，可在不偏离本发明范围和精神的前提下对本文公开的实施例作出各种替换和修改。

如上文指出地，本说明书中提到的所有专利和出版物是为了表明本发明所属技术领域的技术人员的程度。

本文说明性描述的发明可在不具备任何本文未特别公开的要素或限制条件下实现。所用的术语和表达方式均用于说明目的而非限制目的，且没有任何暗示表明，使用这类术语和表达意味着排除其所显示或描述的技术特征或其部分的等同物。公认地，在本发明的范围内可进行各种修改。因此，应该理解虽然本发明是通过优选的实施方案和可选技术特征进行具体公开的，本领域所属技术人员可使用本文公开的概念的修改或变换，而这类修改或变换应理解为属于本发明的范围。本发明的范围仅由所附的权利要求所定义。

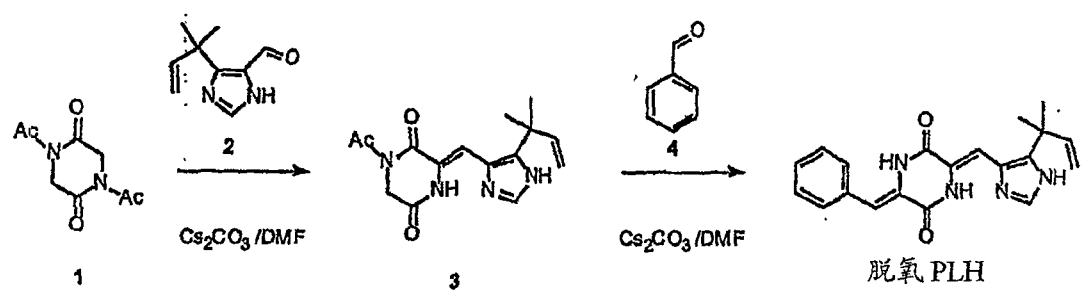


图 1

HPLC 条件:

色谱柱: YMC-Pack ODS-AM
(20×250mm)

梯度: 50 %-100 % MeOH
水溶液, 30 分钟

流速: 12mL/ 分钟

O.D.: 230nm

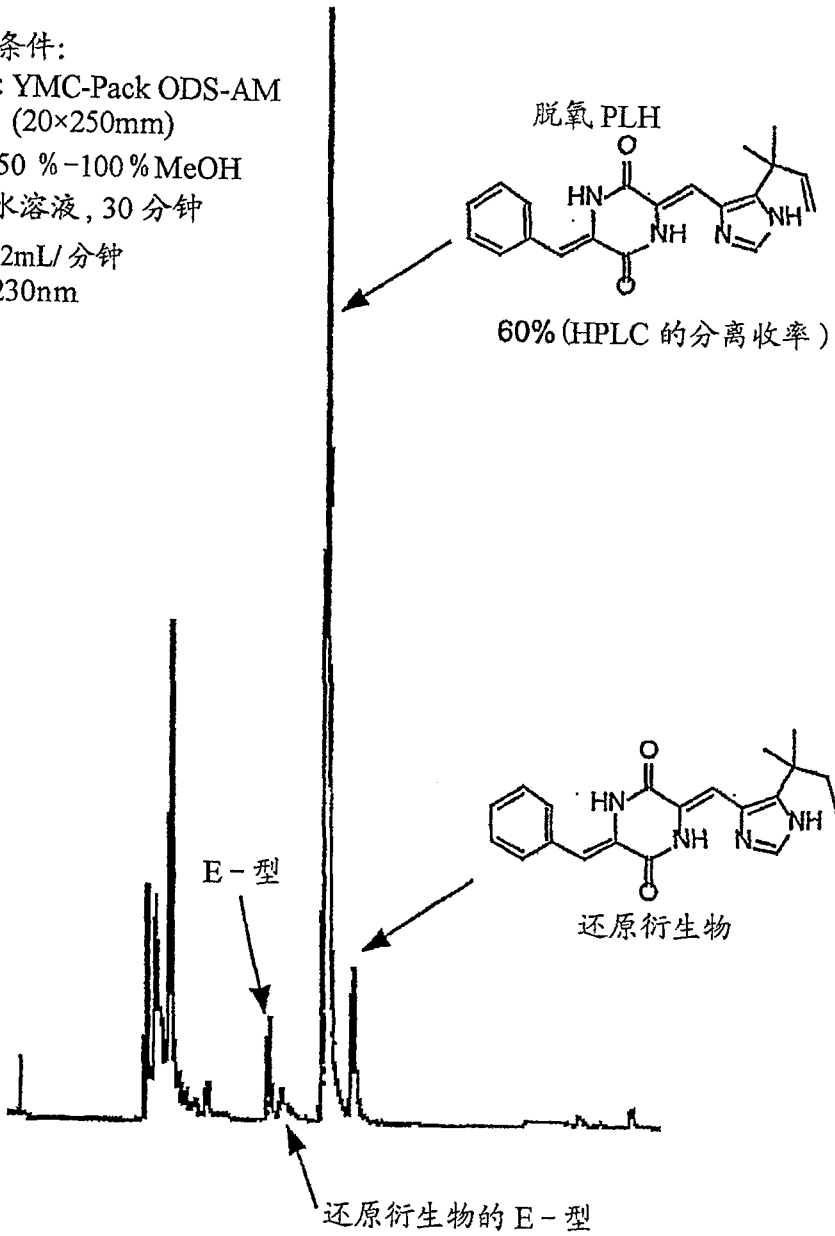


图 2

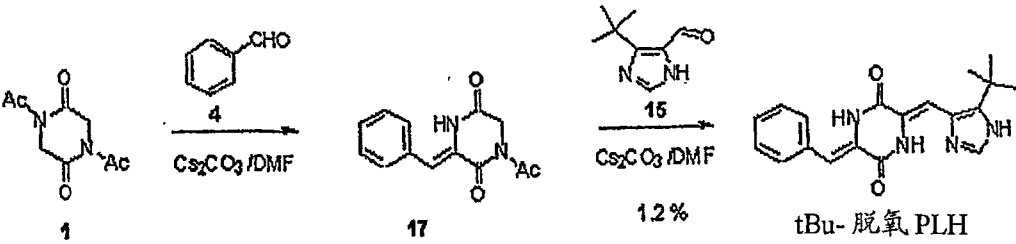
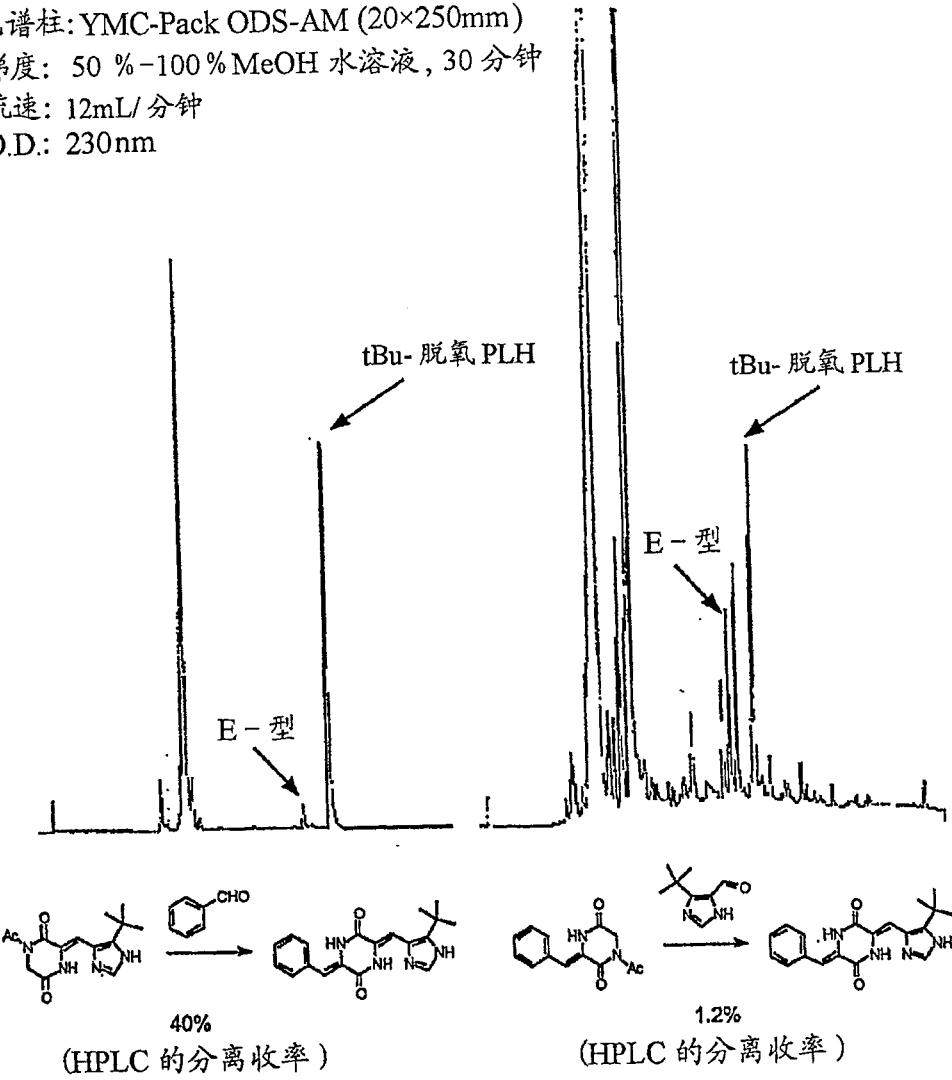


图 3

HPLC 条件:
色谱柱: YMC-Pack ODS-AM (20×250mm)
梯度: 50 %-100 % MeOH 水溶液, 30 分钟
流速: 12mL/ 分钟
O.D.: 230nm



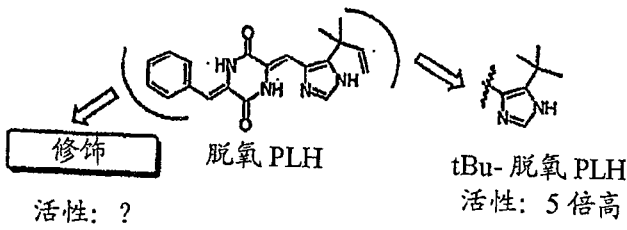


图 5

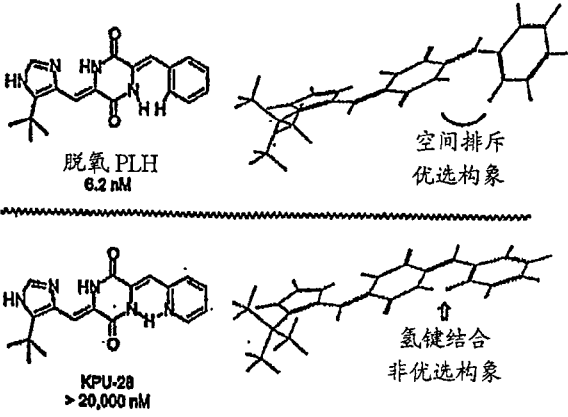


图 6

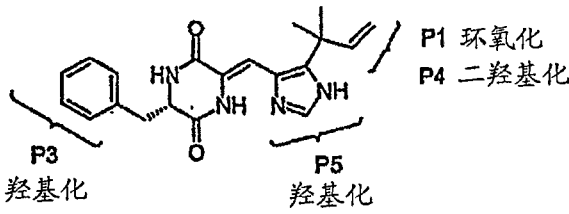


图 7

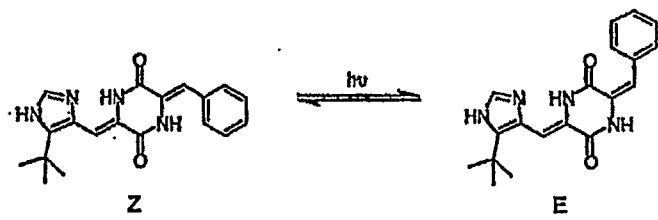


图 8

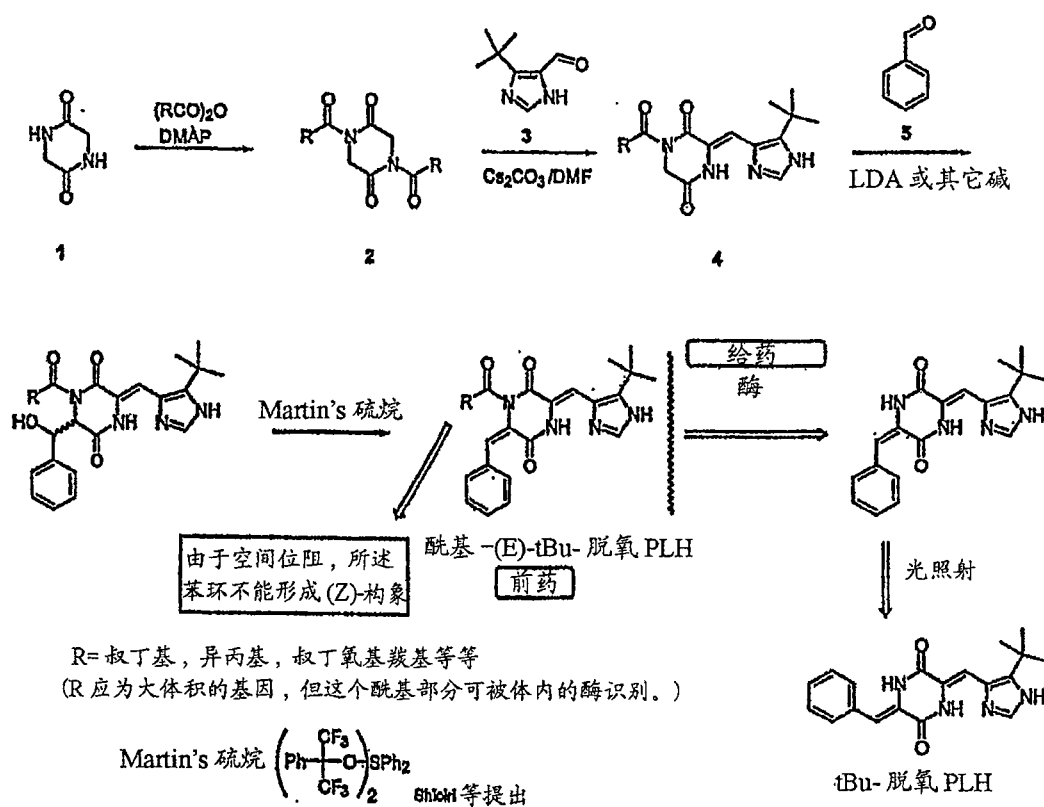


图 9

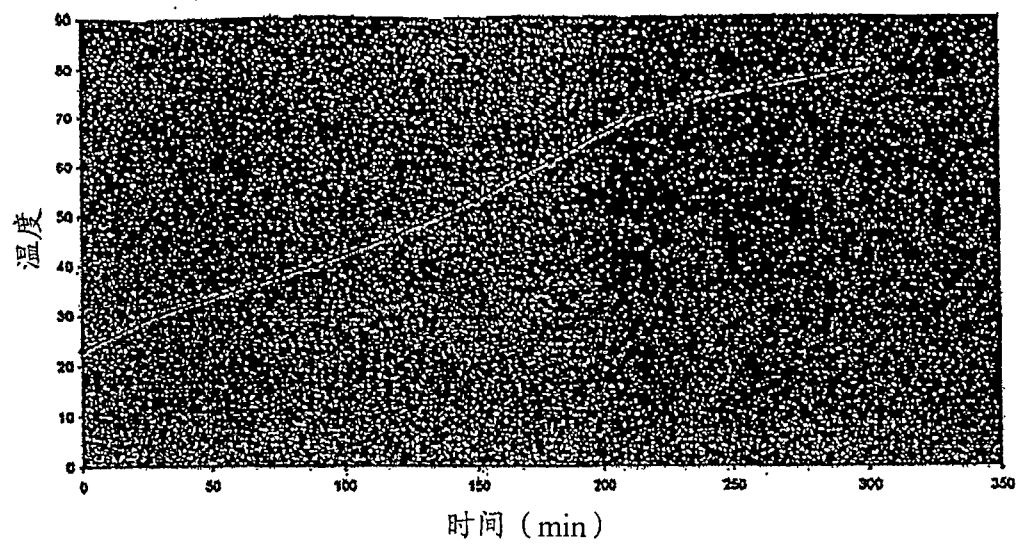


图 10

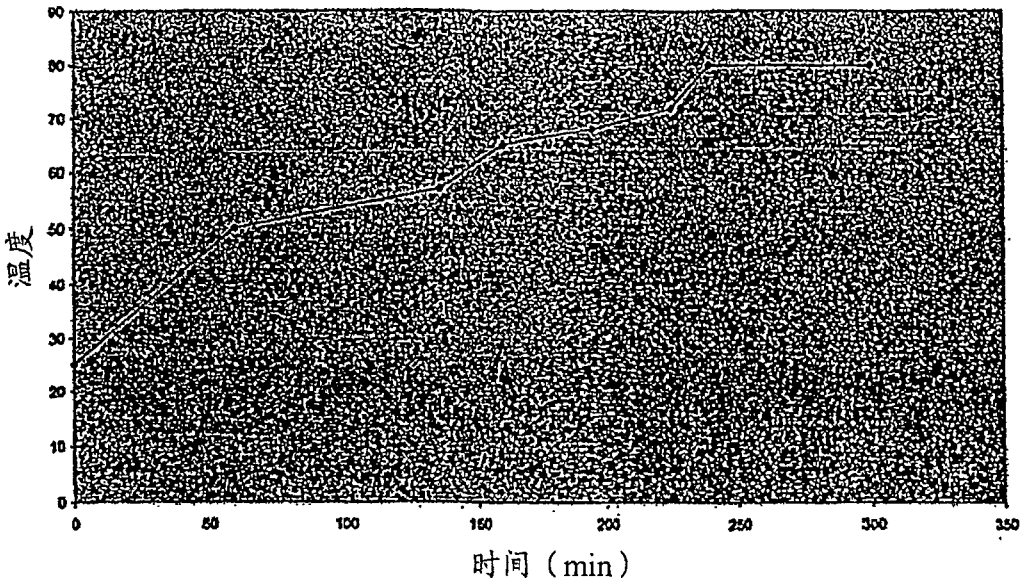


图 11

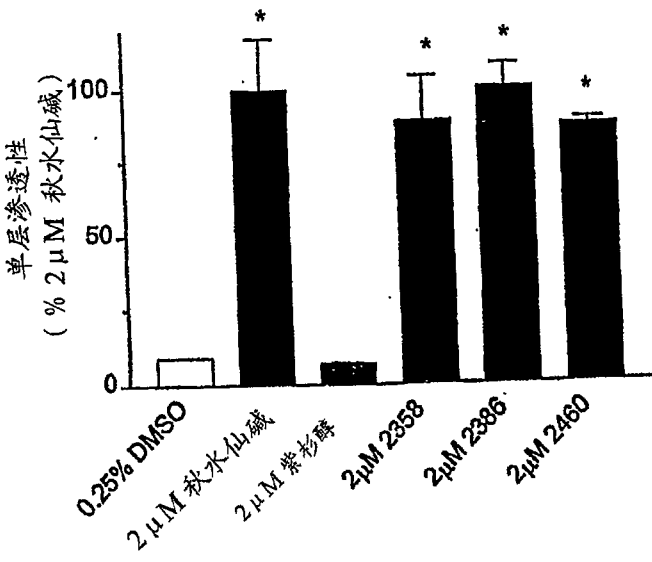


图 12

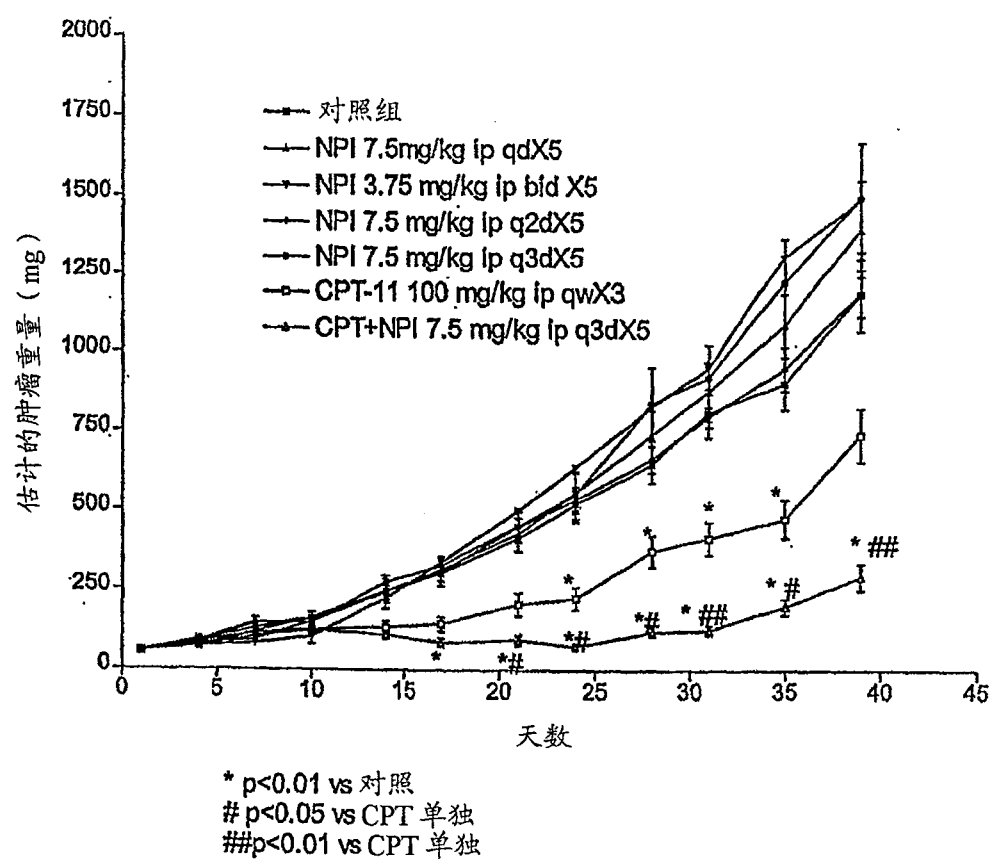


图 13

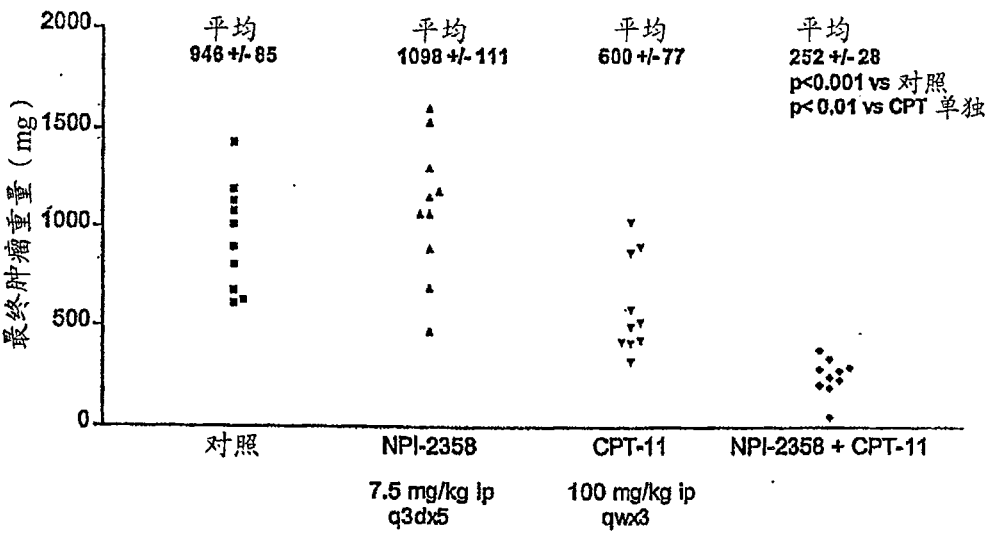


图 14

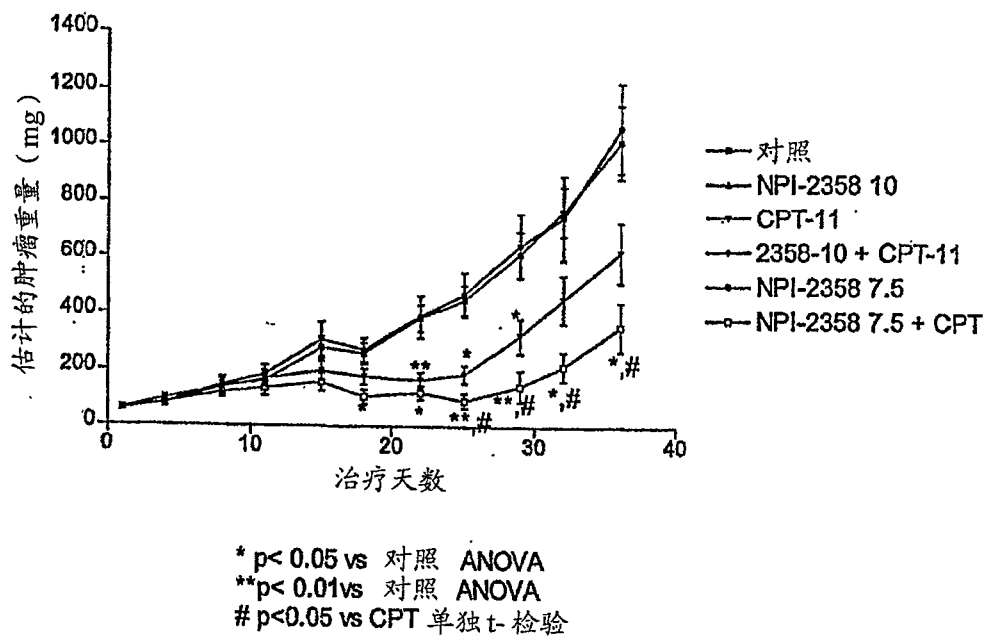


图 15

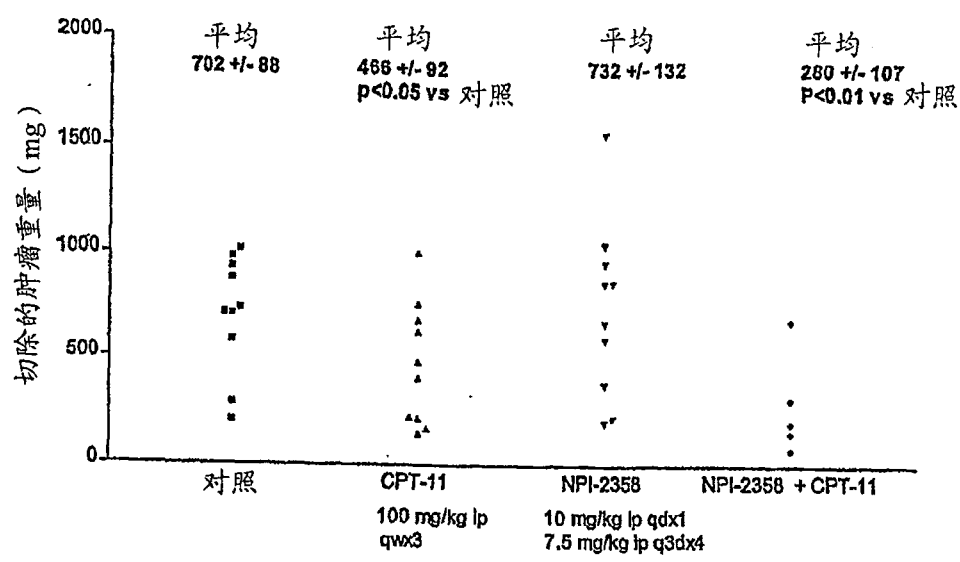


图 16

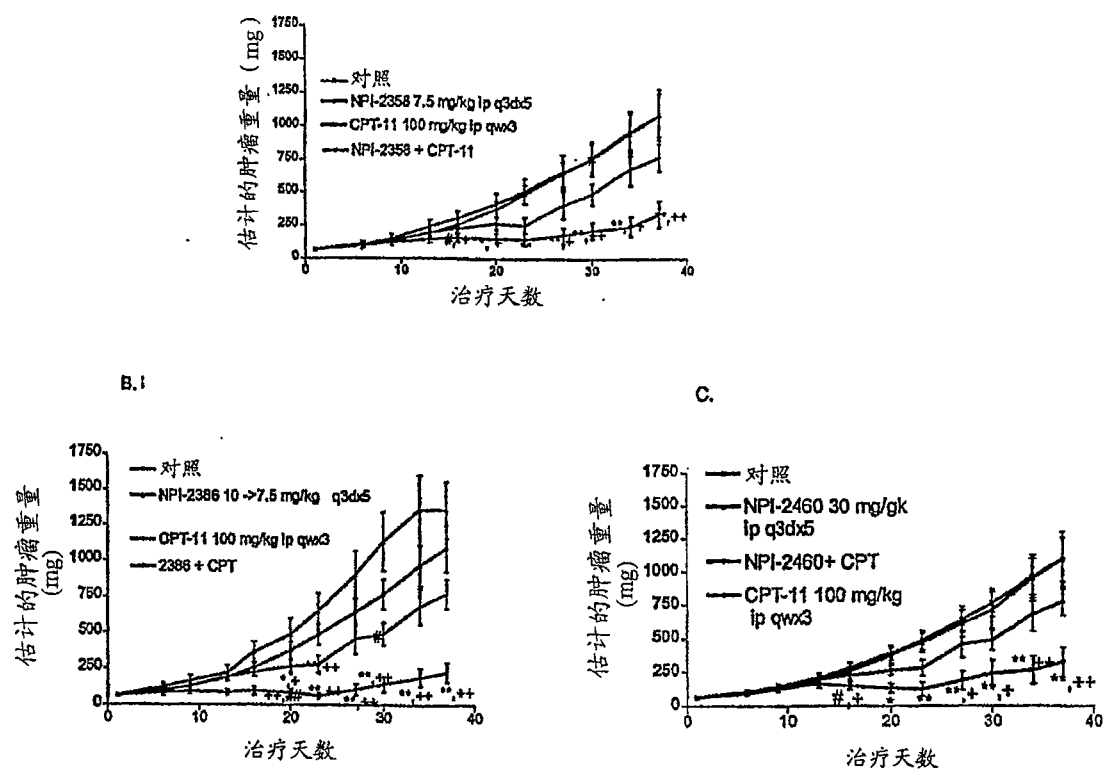


图 17

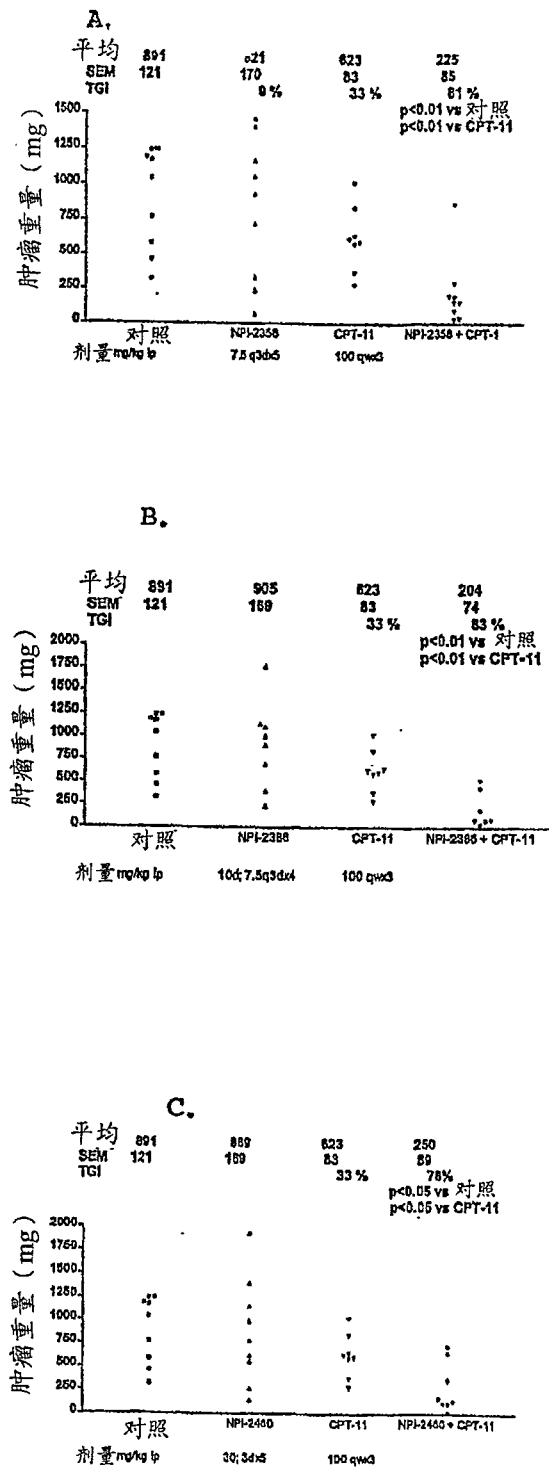


图 18

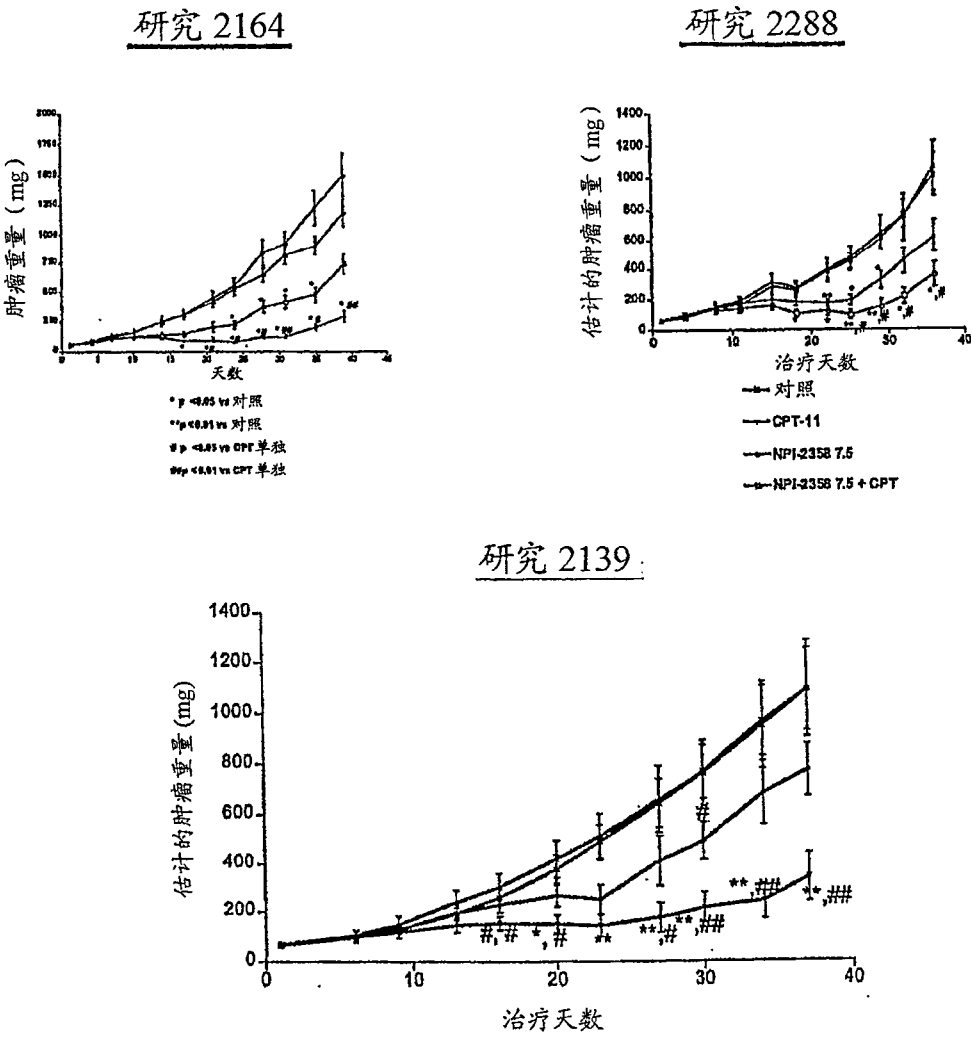


图 19

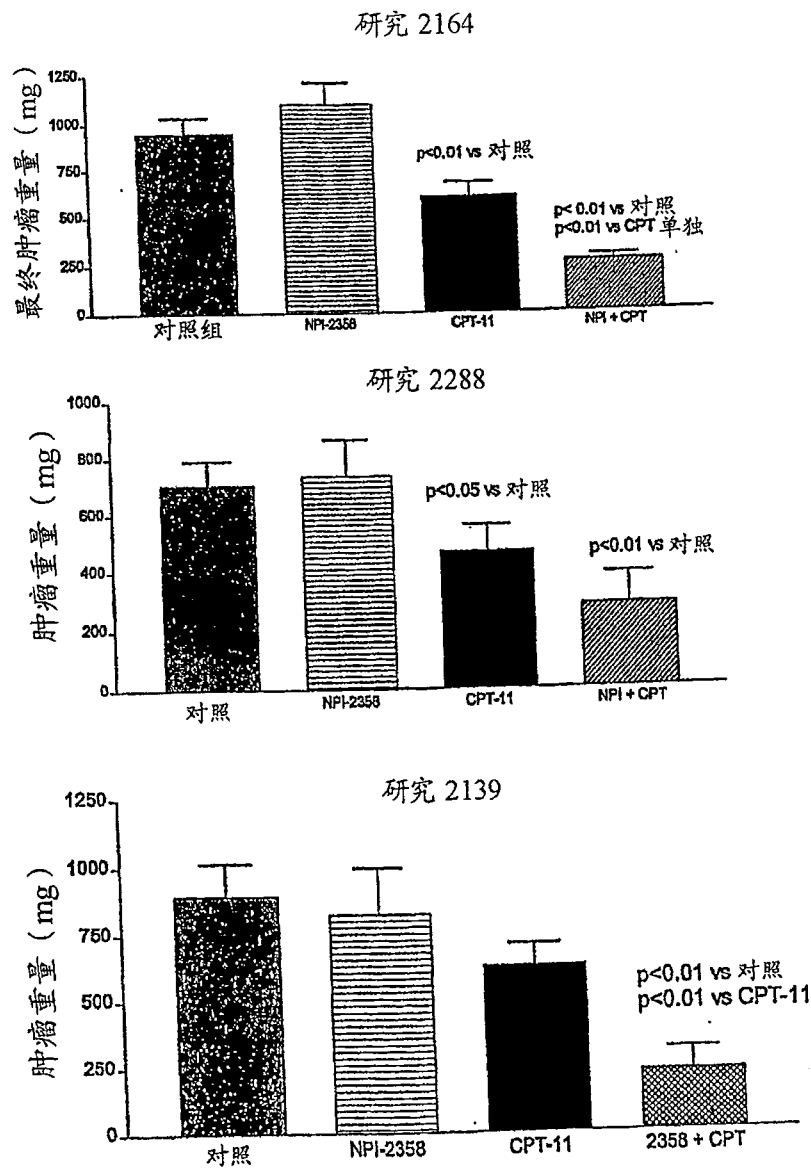


图 20

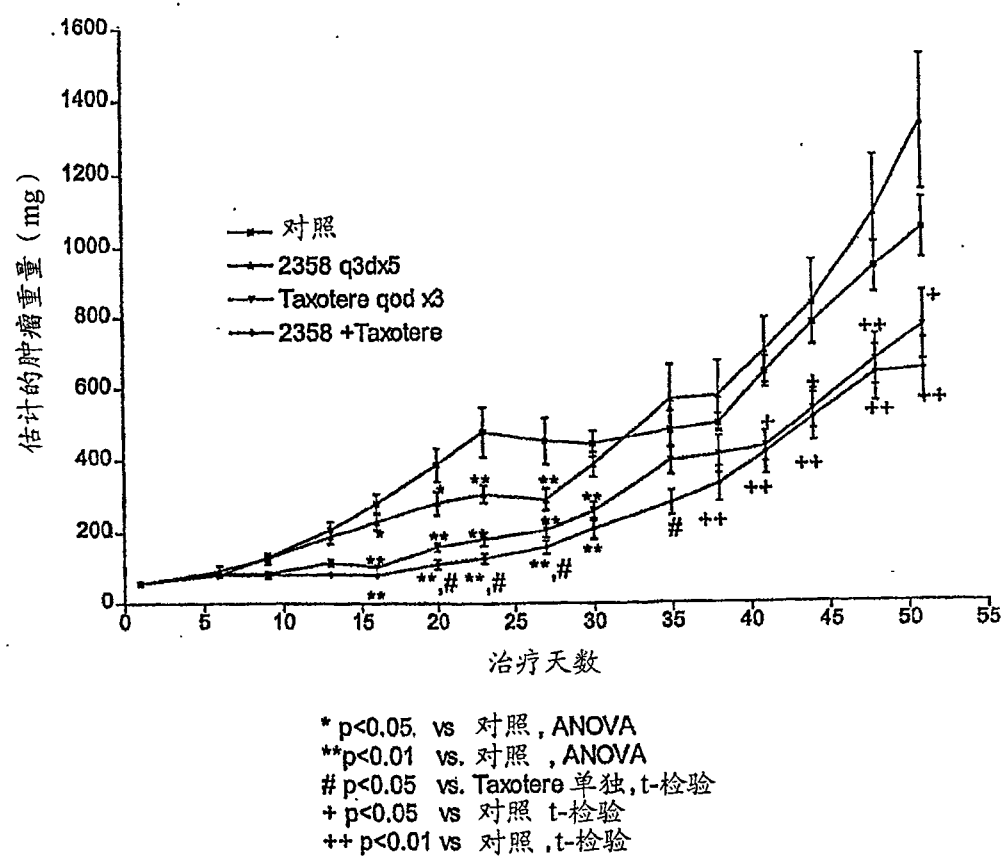


图 21

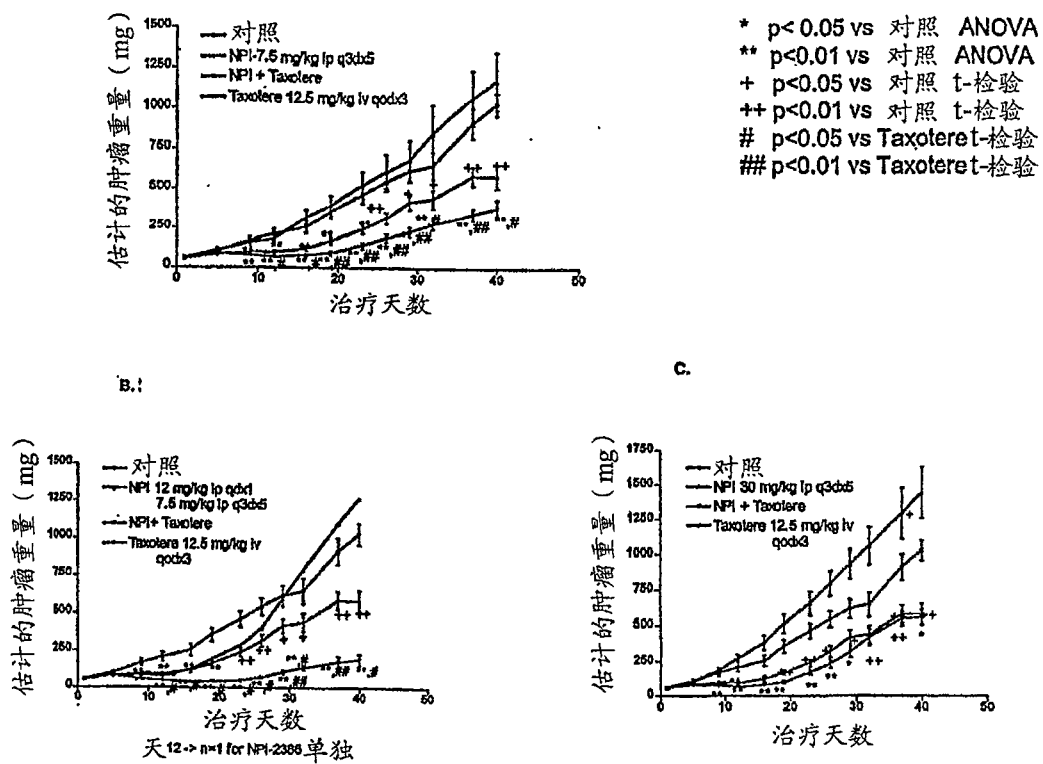


图 22

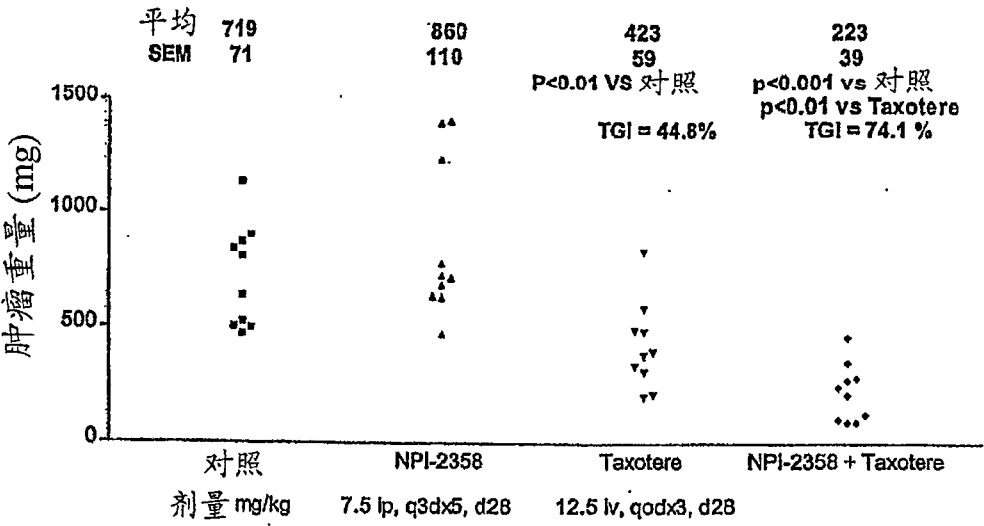


图 23

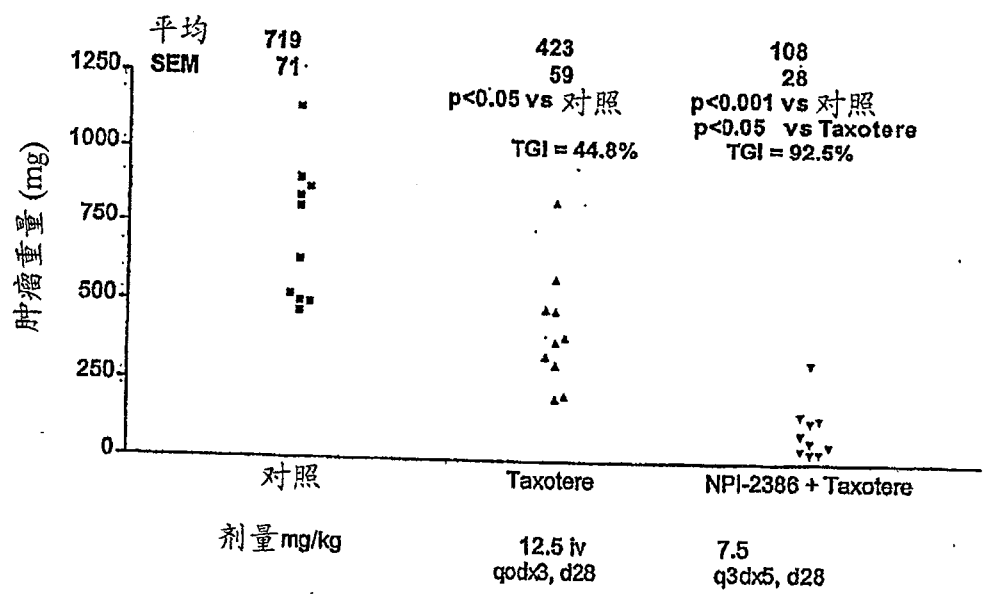


图 24

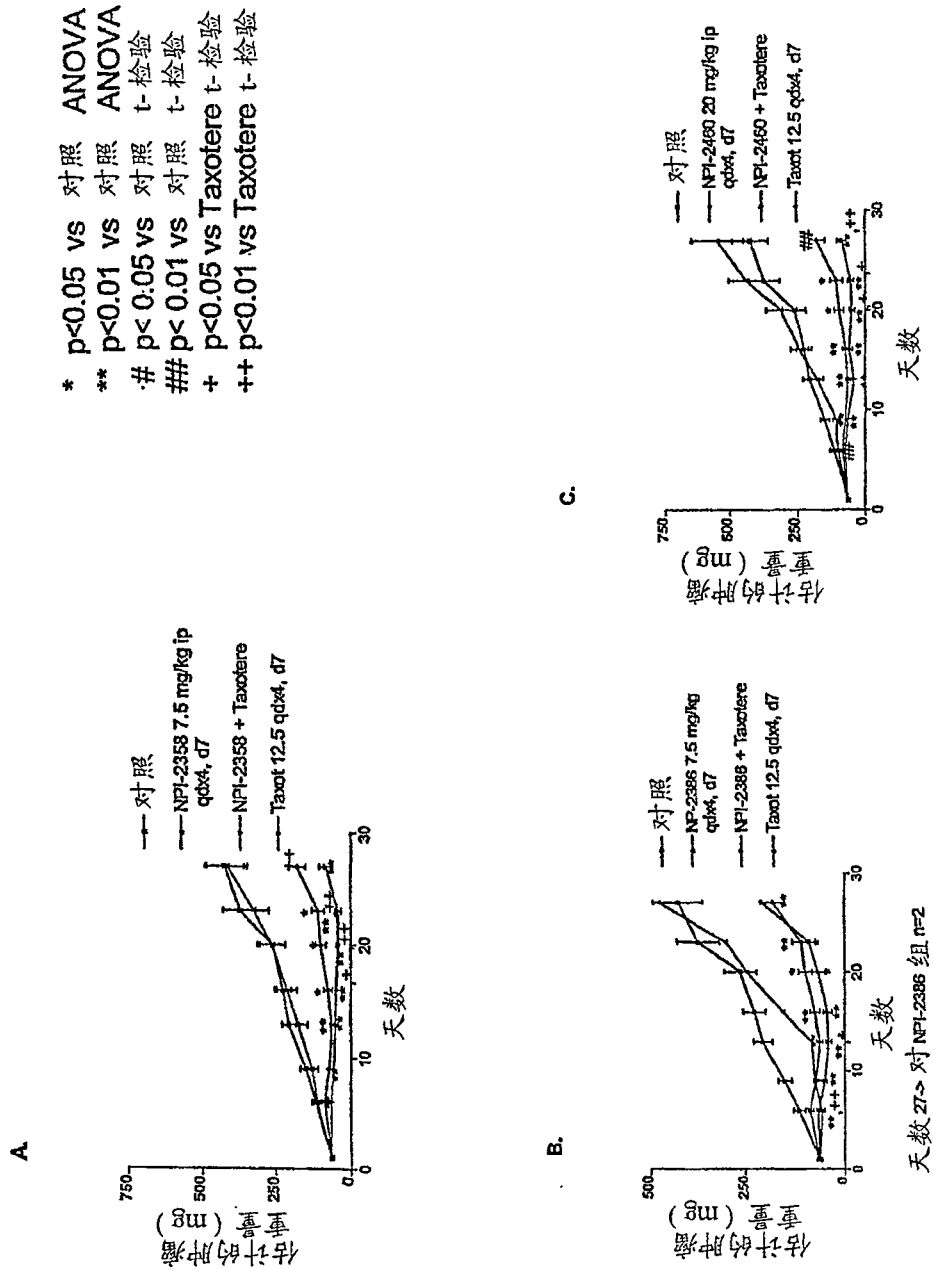


图 25

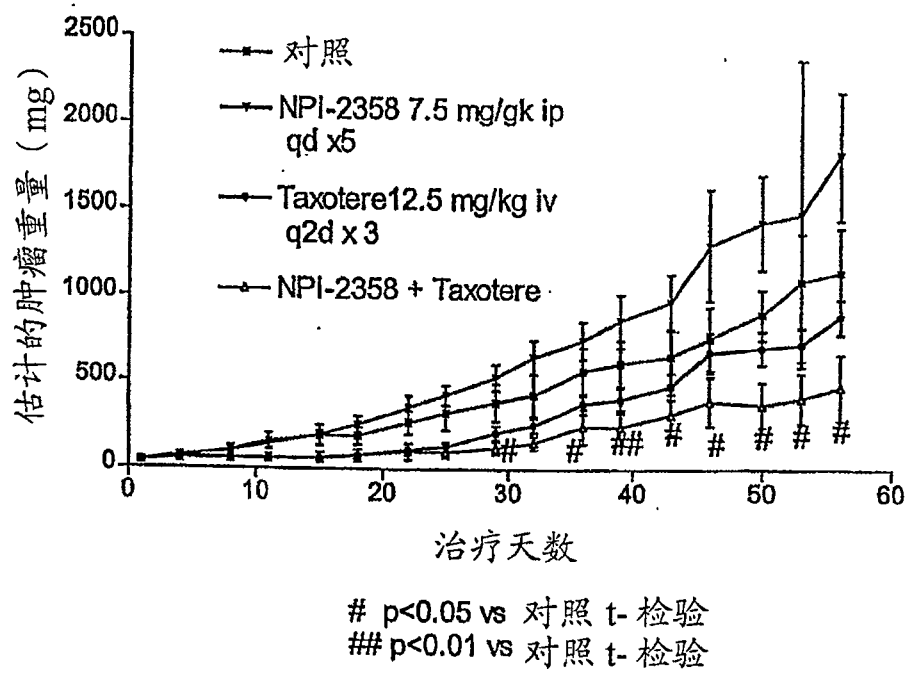


图 26

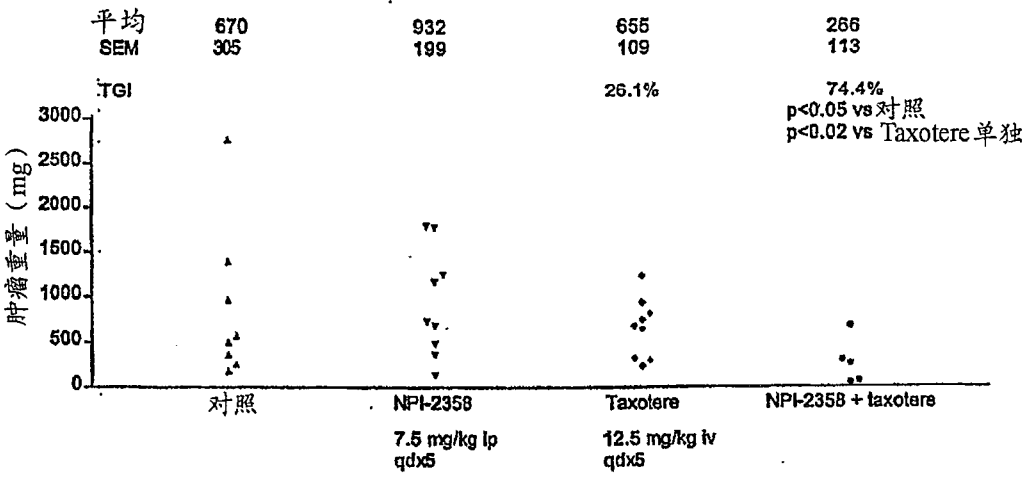


图 27

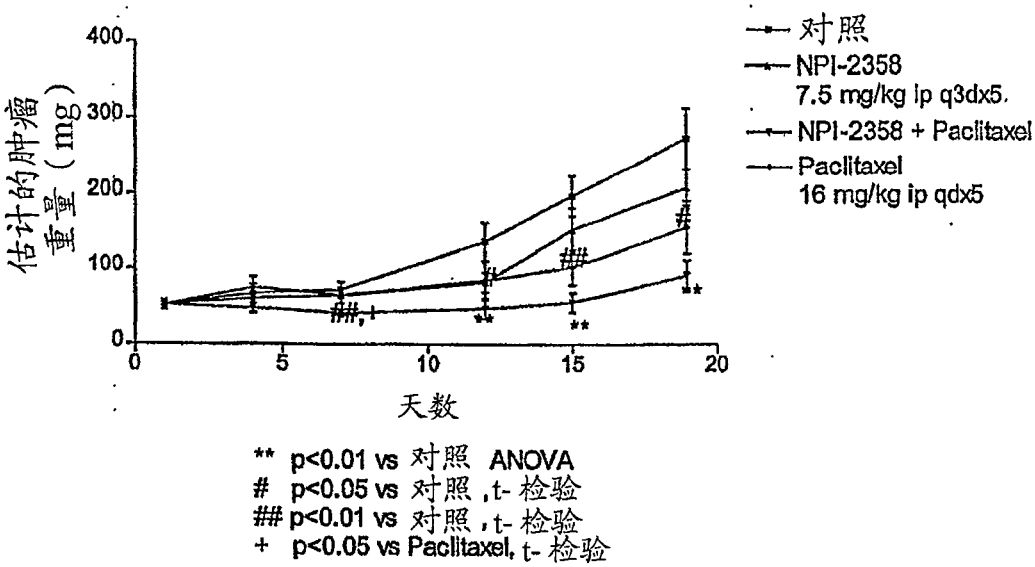


图 28

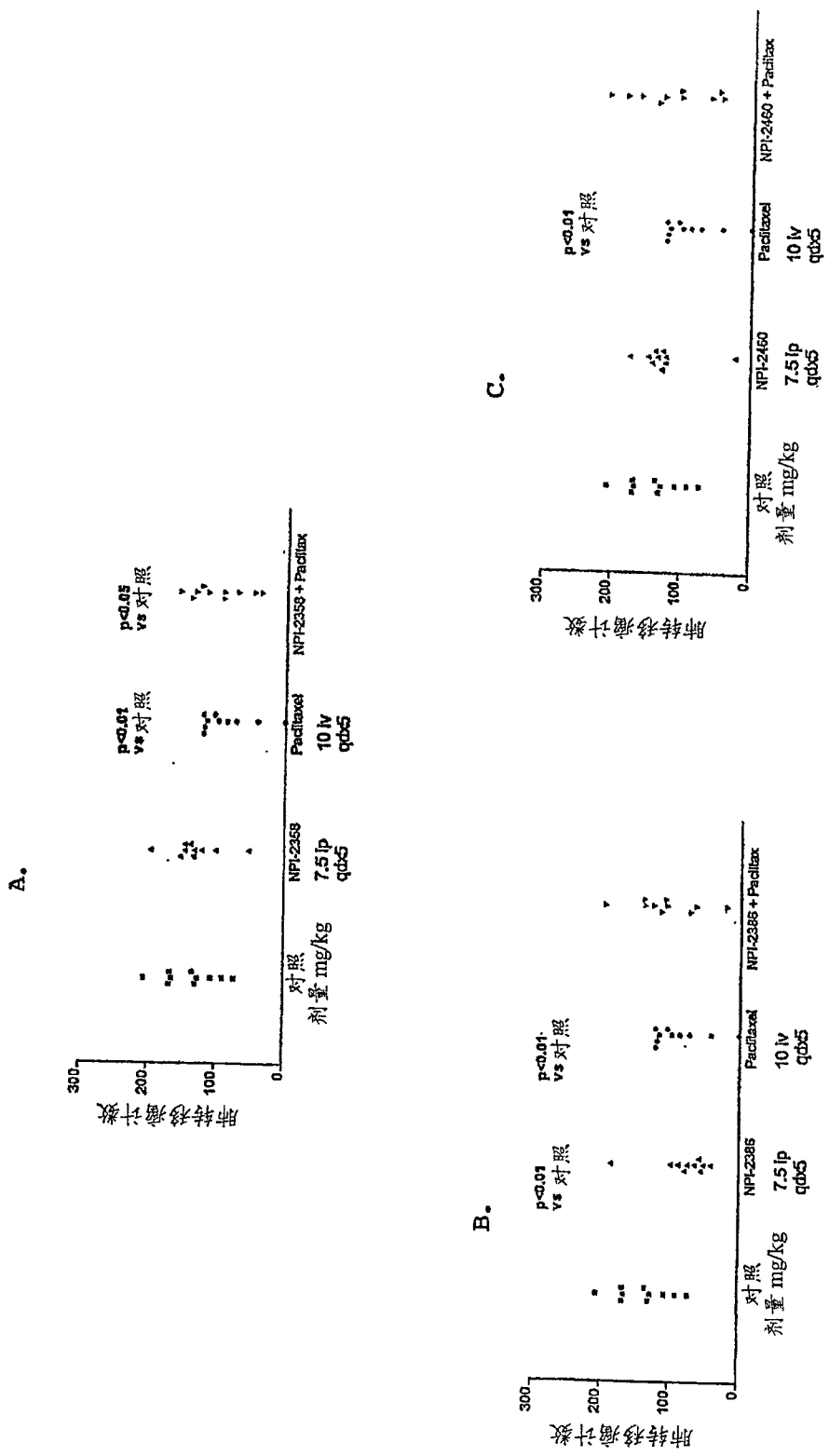


图 29