

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
G01N 33/68



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 97122691.1

[45] 授权公告日 2004 年 1 月 28 日

[11] 授权公告号 CN 1136451C

[22] 申请日 1997. 11. 13 [21] 申请号 97122691. 1

[30] 优先权

[32] 1996. 11. 14 [33] US [31] 030920

[71] 专利权人 道农业科学公司

地址 美国印第安纳

[72] 发明人 D · H · 扬

审查员 王丽华

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

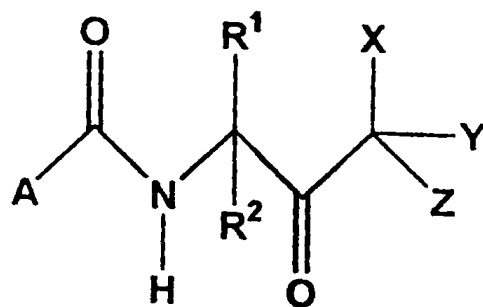
代理人 杜京英

权利要求书 7 页 说明书 31 页 附图 3 页

[54] 发明名称 某些酰胺化合物的应用

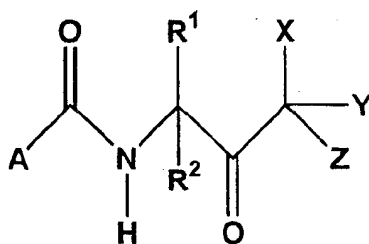
[57] 摘要

本发明涉及用某些酰胺类化合物筛选抗微管蛋白活性、抗性监测和定量测定微管蛋白含量的化合物的方法，所述酰胺在结合试验中可作为探针抑制真核细胞的生长，所说的酰胺是具有下式结构的酰胺或其光学对映体，其中各取代基具有说明书中所述含义。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 某些酰胺化合物作为探针在测定抗微管蛋白活性和抗性检测的应用, 所说的酰胺是具有下式结构的酰胺或其光学对映体:



(I)

其中

A 是 (C₃-C₇) 环烷基、(C₁-C₆) 烷基、卤代 (C₁-C₆) 烷基、(C₂-C₆) 链烯基、卤代 (C₂-C₆) 链烯基、(C₂-C₆) 炔基、卤代 (C₂-C₆) 炔基、苯基、吡啶基、呋喃基、噻吩基、异噻唑基、噻唑基、吡咯基、异噻唑基、噻唑基、吡唑基、咪唑基、嘧啶基、喹啉基、异喹啉基、萘基、吡嗪基、吡嗪基、苯并噻吩基、吲哚基、苯并呋喃基或苄基; 或是各自独立地由选自下述基团的 4 个或少于 4 个取代基取代的苯基、吡啶基、呋喃基、噻吩基、异噻唑基、噻唑基、吡咯基、异噻唑基、噻唑基、吡唑基、咪唑基、嘧啶基、喹啉基、异喹啉基、萘基、吡嗪基、吡嗪基、苯并噻吩基、吲哚基、苯并呋喃基或苄基: 卤素、氰基、(C₁-C₆) 烷基、卤代 (C₁-C₆) 烷基、(C₂-C₆) 链烯基、卤代 (C₂-C₆) 链烯基、(C₂-C₆) 炔基、卤代 (C₂-C₆) 炔基、(C₁-C₆) 烷氧基、卤代 (C₁-C₆) 烷氧基、(C₁-C₆) 烷硫基、卤代 (C₁-C₆) 烷硫基、硝基、-NR⁶R⁷、-CR⁸=NOR⁹、-NHCOOR¹⁰、-CONR¹¹R¹² 和 -COOR¹³; 或者当 A 是不饱和环并被 2 个或多个相邻的取代基取代时, 所说的取代基中的两个取代基可形成含有至多两个选自氧、氮、硫和磷的杂原子的稠合 5、6、7 元环;

R¹ 和 R² 各自独立地是氢原子、(C₁-C₆) 烷基、卤代 (C₁-C₆) 烷基、(C₂-C₆) 链烯基、卤代 (C₂-C₆) 链烯基、(C₂-C₆) 炔基或卤代 (C₂-C₆) 炔基, 条件是 R¹ 和 R² 不能同时为氢;

R⁶ 和 R⁷ 各自独立地是氢原子、(C₁-C₆) 烷基或 (C₁-C₆) 烷基羰基;

R⁸ 是氢原子、(C₁-C₆) 烷基、(C₂-C₆) 链烯基或 (C₂-C₆) 炔基;

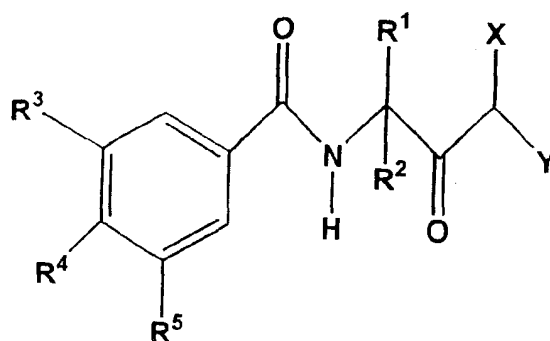
R⁹ 是氢原子、(C₁-C₆) 烷基、(C₂-C₆) 链烯基、(C₂-C₆) 炔基或 (C₁-C₄)

烷基羰基;

R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 和 R^{13} 各自独立地是氢原子、 (C_1-C_6) 烷基、 (C_2-C_6) 链烯基或 (C_2-C_6) 炔基; 和

X、Y 和 Z 各自独立地是氢原子、卤素、氰基、硫氰酸基、异硫氰酸基或 (C_1-C_6) 烷基磺酰氧基, 条件是 X、Y 和 Z 中至少有一个不是氢原子。

2. 权利要求 1 的应用, 使用具有下式结构的酰胺或其光学对映体:



(II)

其中

R^1 和 R^2 各自独立地是氢原子、 (C_1-C_6) 烷基、卤代 (C_1-C_6) 烷基、 (C_2-C_6) 链烯基或 (C_2-C_6) 炔基, 条件是 R^1 和 R^2 不能同时为氢;

R^3 、 R^4 和 R^5 各自独立地是氢原子、卤素、氰基、 (C_1-C_6) 烷基、卤代 (C_1-C_6) 烷基、 (C_2-C_6) 链烯基、 (C_2-C_6) 炔基、 (C_1-C_6) 烷氧基、 (C_1-C_6) 烷硫基、卤代 (C_1-C_6) 烷氧基、硝基、 $-NR^6R^7$ 、 $-CR^8=NOR^9$ 、 $-NHCOOR^{10}$ 、 $-CONR^{11}R^{12}$ 或 $-COOR^{13}$; 或者 R^4 和 R^5 一起形成稠合的 5、6 或 7 元环, 其中最多含有两个选自 O、S、N 和 P 的杂原子;

R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 和 R^{13} 各自独立地是氢原子或 (C_1-C_6) 烷基; 和

X 和 Y 各自独立地是氢原子、卤素、氰基、硫氰酸基、异硫氰酸基或 (C_1-C_6) 烷基磺酰氧基, 条件是 X 和 Y 不能同时为氢原子。

3. 权利要求 2 的应用, 使用具有式 (II) 结构的苯甲酰胺或其光学对映体, 其中:

R^1 是甲基;

R^2 是甲基或乙基;

R^3 和 R^5 各自独立地是氢原子、卤素、甲基、硝基、氰基、 $-NR^6R^7$ 、 $-CR^8=NOR^9$ 或 $-NHCOOR^{10}$ ；条件是 R^3 和 R^5 不能同时为氢原子；

R^4 是氢原子、卤素、 $-NR^6R^7$ 、氰基、 $-CR^8=NOR^9$ 、 $-NHCOOR^{10}$ 、 $-COOR^{13}$ 或 (C_1-C_4) 烷基；

R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 和 R^{13} 各自独立地是氢原子或 (C_1-C_6) 烷基；

X 是氯；和

Y 是氢原子。

4. 权利要求 3 的应用，在用哺乳动物细胞、细胞萃取物或微管蛋白的试验中，使用具有式 (II) 结构的苯甲酰胺或其光学对映体，其中：

R^1 是甲基；

R^2 是乙基；

R^3 是卤素或氰基；

R^4 和 R^5 是氨基或 $-CH=NOCH_3$ ，条件是 R^4 和 R^5 不同；

X 是氯；或

Y 是氢原子。

5. 权利要求 3 的应用，在用真菌细胞、细胞萃取物或其中的真菌属于子囊菌纲、半知菌纲或担子菌纲类真菌的微管蛋白的试验中，使用具有式 (II) 结构的苯甲酰胺或其光学对映体，其中：

R^1 是甲基；

R^2 是甲基或乙基；

R^3 是 $-CH=NOCH_3$ ，卤素或氰基；

R^4 是氢原子、卤素、氨基、氰基或甲基；

R^5 是卤素、甲基、硝基或氰基；

X 是氯；和

Y 是氢原子。

6. 权利要求 3 的应用，在用真菌细胞、细胞萃取物或其中的真菌属于卵菌纲类真菌的微管蛋白的试验中，使用具有式 (II) 结构的苯甲酰胺或

其光学对映体，其中：

R^1 是甲基；

R^2 是乙基；

R^3 和 R^5 各自独立地是氢原子、卤素、甲基、硝基、氰基、 $-NR^6R^7$ 、 $-CR^8=NOR^9$ 或 $-NHCOOR^{10}$ ，条件是 R^3 和 R^5 不能同时为氢原子；

R^4 是氢原子、卤素、 $-NR^6R^7$ 、氰基、 $-CR^8=NOR^9$ 、 $-NHCOOR^{10}$ 、 $-COOR^{13}$ 或 (C_1-C_4) 烷基；

R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 和 R^{13} 各自独立地是氢原子或甲基；

X 是氯；和

Y 是氢原子。

7. 权利要求 3 的应用，在用植物细胞、细胞萃取物或微管蛋白的试验中，使用具有式 (II) 结构的苯甲酰胺或其光学对映体，其中：

R^1 是甲基；

R^2 是甲基或乙基；

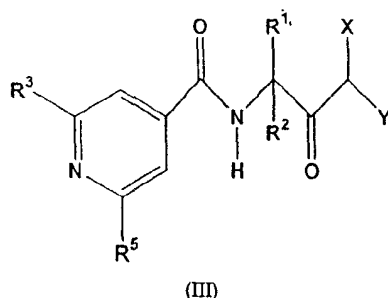
R^3 和 R^5 各自独立地是氢原子、卤素、甲基、硝基或氰基，条件是 R^3 和 R^5 不能同时为氢原子；

R^4 是氢原子；

X 是氯；和

Y 是氢原子。

8. 权利要求 1 的应用，使用具有下式结构的吡啶甲酰胺或其光学对映体：



其中

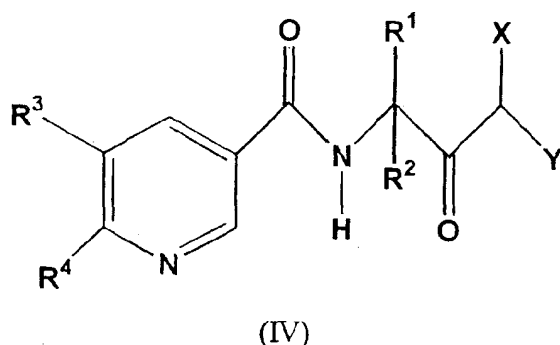
R^1 和 R^2 各自独立地是氢原子、 (C_1-C_6) 烷基、卤代 (C_1-C_6) 烷基、 (C_2-C_6) 链烯基或 (C_2-C_6) 炔基, 条件是 R^1 和 R^2 不能同时为氢;

R^3 和 R^5 各自独立地是氢原子、卤素、氰基、 (C_1-C_6) 烷基、卤代 (C_1-C_6) 烷基、 (C_2-C_6) 链烯基、 (C_2-C_6) 炔基、 (C_1-C_6) 烷氧基、 (C_1-C_6) 烷硫基、卤代 (C_1-C_6) 烷氧基、硝基、羧基、 $-NR^6R^7$ 、 $-CR^8=NOR^9$ 、 $-NHCOOR^{10}$ 、 $-CONR^{11}R^{12}$ 或 $-COOR^{13}$;

R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 和 R^{13} 各自独立地是氢原子或 (C_1-C_6) 烷基; 和

X 和 Y 各自独立地是氢原子、卤素、氰基、硫氰酸基、异硫氰酸基或 (C_1-C_6) 烷基磺酰氧基, 条件是 X 和 Y 不能同时为氢原子。

9. 权利要求 1 的应用, 使用具有下式结构的吡啶甲酰胺或其光学对映体:



其中

R^1 和 R^2 各自独立地是氢原子、 (C_1-C_6) 烷基、卤代 (C_1-C_6) 烷基、 (C_2-C_6) 链烯基或 (C_2-C_6) 炔基, 条件是 R^1 和 R^2 不能同时为氢;

R^3 和 R^4 各自独立地是氢原子、卤素、氰基、 (C_1-C_6) 烷基、卤代 (C_1-C_6) 烷基、 (C_2-C_6) 链烯基、 (C_2-C_6) 炔基、 (C_1-C_6) 烷氧基、 (C_1-C_6) 烷硫基、卤代 (C_1-C_6) 烷氧基、硝基、羧基、 $-NR^6R^7$ 、 $-CR^8=NOR^9$ 、 $-NHCOOR^{10}$ 、 $-CONR^{11}R^{12}$ 或 $-COOR^{13}$; 或者 R^3 和 R^4 一起形成稠合的 5、6 或 7 元环, 其中最多含有两个选自 O、S、N 和 P 的杂原子;

R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 和 R^{13} 各自独立地是氢原子或 (C_1-C_6) 烷基; 和

X 和 Y 各自独立地是氢原子、卤素、氰基、硫氰酸基、异硫氰酸基或

(C₁-C₆) 烷基磺酰氧基, 条件是 X 和 Y 不能同时为氢原子。

10. 权利要求 9 的应用, 使用具有式 (IV) 结构的吡啶甲酰胺或其光学对映体, 其中:

R¹ 是甲基;

R² 是甲基或乙基;

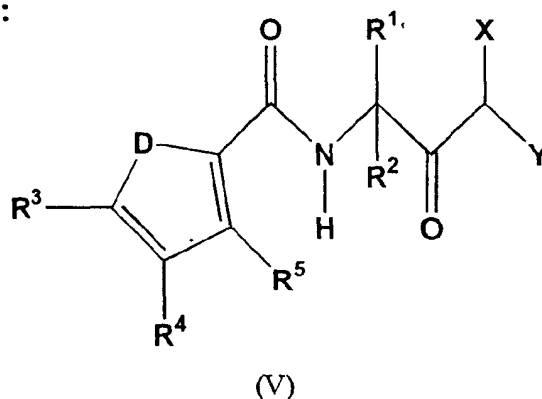
R³ 和 R⁴ 各自独立地是氢原子、卤素、甲基、硝基、氰基、-NR⁶R⁷、-CR⁸=NOR⁹ 或 -NHCOOR¹⁰; 条件是 R³ 和 R⁴ 不能同时为氢原子;

R⁶、R⁷、R⁸、R⁹、R¹⁰ 和 R¹³ 各自独立地是氢原子或 (C₁-C₆) 烷基;

X 是氯; 和

Y 是氢原子。

11. 权利要求 1 的应用, 使用具有下式结构的呋喃甲酰胺、噻吩甲酰胺或它们的光学对映体:



其中

D 是 O 或 S;

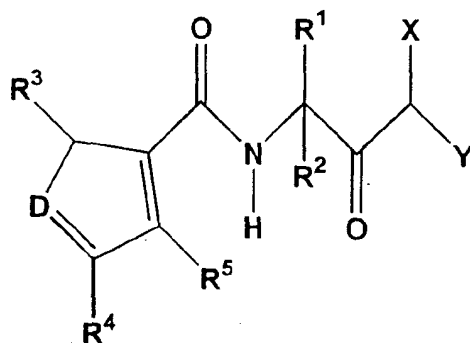
R¹ 和 R² 各自独立地是氢原子、(C₁-C₆) 烷基、卤代 (C₁-C₆) 烷基、(C₂-C₆) 链烯基或 (C₂-C₆) 炔基, 条件是 R¹ 和 R² 不能同时为氢;

R³、R⁴ 和 R⁵ 各自独立地是氢原子、卤素、氰基、(C₁-C₆) 烷基、卤代 (C₁-C₆) 烷基、(C₂-C₆) 链烯基、(C₂-C₆) 炔基、(C₁-C₆) 烷氧基、(C₁-C₆) 烷硫基、卤代 (C₁-C₆) 烷氧基、硝基、羧基、-NR⁶R⁷、-CR⁸=NOR⁹、-NHCOOR¹⁰、-CONR¹¹R¹² 或 -COOR¹³; 或者 R³ 和 R⁴ 一起形成稠合的 5、6 或 7 元环, 其中最多含有两个选自 O、S、N 和 P 的杂原子;

R⁶、R⁷、R⁸、R⁹、R¹⁰、R¹¹、R¹² 和 R¹³ 各自独立地是氢原子或 (C₁-C₆) 烷基; 和

X 和 Y 各自独立地是氢原子、卤素、氰基、硫氰酸基、异硫氰酸基或 (C₁-C₆) 烷基磺酰氧基, 条件是 X 和 Y 不能同时为氢原子。

12. 权利要求 1 的应用, 使用具有下式结构的呋喃甲酰胺、噻吩甲酰胺或它们的光学对映体:



(VI)

其中

D 是 O 或 S;

R¹ 和 R² 各自独立地是氢原子、(C₁-C₆) 烷基、卤代 (C₁-C₆) 烷基、(C₂-C₆) 链烯基或 (C₂-C₆) 炔基, 条件是 R¹ 和 R² 不能同时为氢;

R³、R⁴ 和 R⁵ 各自独立地是氢原子、卤素、氰基、(C₁-C₆) 烷基、卤代 (C₁-C₆) 烷基、(C₂-C₆) 链烯基、(C₂-C₆) 炔基、(C₁-C₆) 烷氧基、(C₁-C₆) 烷硫基、卤代 (C₁-C₆) 烷氧基、硝基、羧基、-NR⁶R⁷、-CR⁸=NOR⁹、-NHCOOR¹⁰、-CONR¹¹R¹² 或 -COOR¹³;

R⁶、R⁷、R⁸、R⁹、R¹⁰、R¹¹、R¹² 和 R¹³ 各自独立地是氢原子或 (C₁-C₆) 烷基; 和

X 和 Y 各自独立地是氢原子、卤素、氰基、硫氰酸基、异硫氰酸基或 (C₁-C₆) 烷基磺酰氧基, 条件是 X 和 Y 不能同时为氢原子。

某些酰胺化合物的应用

本发明涉及某些酰胺化合物的应用，特别是某些酰胺化合物作为探针测定抗微管蛋白活性和抗性检测的应用。

微管是存在于所有真核细胞中的细胞内丝状结构。作为各种细胞器如有丝分裂的纺锤体、中心粒、基粒、纤毛、鞭毛、轴伪足和细胞骨架的组分，在很多细胞功能中涉及微管，这些功能包括有丝分裂期间染色体的移动、细胞游动性、细胞器转运、细胞分裂、细胞板形成、细胞形状的保持和发育植物细胞壁中细胞微原纤维沉积的取向。微管的主要组成是微管蛋白，是由称为 α 和 β 的两种亚单元组成的蛋白质。细胞中的微管蛋白的重要性质是其经过聚合形成微管或在适当条件下降解的能力，此过程在离体的分离微管蛋白中也会出现。

作为有丝分裂的纺锤体的组分，微管在细胞分裂中起着关键的作用，在细胞准确分裂成为两个子核时染色体的分配涉及到细胞器。各种药物和农药通过与微管蛋白或微管的结合阻止细胞分裂。有此作用机制的抗癌药包括生物碱长春新碱和长春花碱，以及紫杉烷基化合物紫杉醇 (paclitaxel) 和多西紫杉醇 (docetaxel) [例如，参见 E. K. Rowinsky 和 R. C. Donehower, *Pharmacology and Therapeutics*, 52, 35-84 (1991)]。其它对哺乳动物细胞具有活性的抗微管蛋白化合物包括苯并咪唑类化合物如诺考达唑 (nocodazole) 和天然产物如秋水仙碱、鬼臼素和 combretastatins。与微管蛋白结合的苯并咪唑类化合物也广泛用于抗蠕虫 [McKELLAR, Q. A. 和 Scott, E. W., *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 13, 223-247 (1990)]。抗微管蛋白的除草剂在 J. R. Corbett, K. Wright 和 A. C. Baillie 的 “*The Biochemical Mode of Action of Pesticides*”, pp202-223 已有描述，这包括二硝基苯胺类，如氟乐灵，N-苯基氨基甲酸酯类如氯苯胺灵、甲基-胺草磷和戊炔草胺。通过与微管蛋白结合而作用的杀真菌剂包括 zarilamide [Young, D. H. 和 Reitz, E. M., *Proceedings of the 10th International Symposium on*

Systemic Fungicides and Antifungal Compounds, Reinhardsbrunn, 由 H. Lyr 和 C. Polter 编辑, 381-385, (1993)], 苯并咪唑类苯菌灵和多菌灵, 和 N-苯基氨基甲酸酯类乙霉威 [Davidse, L. C. 和 Ishi, H., "Modern Selective Fungicides", H. Lyr 编辑, 305-322 (1995)]。

由于微管蛋白成功地作为药物和农药的生化靶, 人们对发现与微管蛋白结合的新化合物有很大的兴趣。通常的方法包括测量在离体试验中试验化合物抑制分离的微管蛋白聚合成微管的能力 [例如, 参见 E. Hamel, Medicinal Research Reviews, 16, 207-231 (1996)]。在第二种试验中, 通过测定试验化合物影响作为探针的第二微管蛋白与结合配体结合的能力, 可以测定结合试验中试验化合物与分离的微管蛋白的相互作用。典型地是, 将该探针进行放射性标记, 以测量结合的探针。试验化合物通过作为探针结合于微管蛋白的蛋白质的相同位点, 可以影响与探针的结合, 因此, 结合的探针量减少。另外, 此结合还会受到“别构”作用的影响, 在此作用中试验化合物和探针结合于不同的位置, 并减少微管蛋白蛋白质的构象变化, 此变化会影响探针的结合位置。此别构作用还可以增加或减少探针的结合。第三种方法包括测定试验化合物对微管蛋白相关的鸟嘌呤核苷三磷酸酶的活性 [Duanmu, C., Shahrik, L. K., Ho, H. H. 和 Hamel, E., Cancer Research, 49, 1344-1348 (1989)]。

目前, 采用上述任何一种方法, 只有用由哺乳动物的脑组织得到的微管蛋白筛选大量化合物才是可行的, 因为由其它来源不可能分离出足够大量的纯微管蛋白。这就限制了这些方法的应用, 因为很多抗微管蛋白化合物对不同来源的微管会显示出显著的特异性。例如, 除草剂安磺灵和甲基胺草灵能抑制植物微管蛋白, 而不是抑制脑微管蛋白的聚合作用, 而秋水仙碱作为抑制剂, 对脑微管蛋白聚合作用比对植物微管蛋白的聚合作用的抑制高 100 倍 [Morejohn, L. C. 和 Fosket, D. E., 'Tubulin from Plant, Fungi, and Protists', "Cell and Molecular Biology of the Cytoskeleton", J. W. Shay 编辑, 257-329 (1986)]。

本发明涉及某些已知能抑制真核细胞的生长的酰胺衍生物的应用, 所说的真核细胞包括真菌和植物细胞 [例如参见 US 3, 661, 991、4, 863, 940 和 5, 254, 584], 该酰胺衍生物在筛选抗微管蛋白活性的化合物的结合试验

中可作为探针。而放射性标记的探针如秋水仙碱[例如参见 M.H. Zweig 和 C.F. Chignell, *Biochemical Pharmacology*, 22, 2141-2150 (1973)] 和长春花碱[例如参见 R.Bai *Journal of Biological Chemistry*, 265, 17141 (1990)]已经广泛用于使用分离微管蛋白的结合试验, 这些化合物以非共价键与微管蛋白结合。与已有的抗微管蛋白化合物相比, 在竞争结合试验中本发明的酰胺化合物的一个优点是特有的以高特异性的方式以共价键结合于微管蛋白, 特别是 β -亚单元的微管蛋白的能力。在结合试验中, 必须要测定和微管蛋白结合的探针的量, 通常要求把结合了微管蛋白的探针与未结合的探针分离。在本发明酰胺的情况下, 由于是以共价键结合, 与微管蛋白结合的探针具有化学稳定性, 从而可采用过滤或离心的方法使之容易地与未结合的探针分离。这使它们不仅可以用于使用分离微管蛋白的试验, 而且可以用于使用全细胞、粗制的细胞萃取物和和部分纯化的微管蛋白制剂的试验, 这就免得要求分离微管蛋白, 以及使微管蛋白的结合试验能用很多不同类型的细胞或细胞萃取物来进行。例如, 在使用植物或真菌或细胞萃取物和酰胺探针的试验中可以检测出结合于植物或真菌微管蛋白的试验化合物, 以提供适当的试验筛选大量的化合物。酰胺探针也可以用于检测哺乳动物细胞中结合于微管蛋白的化合物, 从而提供了研究试验化合物对非脑源哺乳动物微管蛋白的作用的方法。具体地说, 可测定试验化合物对酰胺探针结合的初始速度的影响。与用分离微管蛋白的非细胞试验相比, 全细胞试验的优点是有利于细胞中试验化合物的积累, 和其可能的代谢活化或失活, 这是影响生物活性的重要因素。

本发明的第二方面涉及酰胺探针在评价真核细胞对农药或药物的灵敏度的结合试验中的应用, 所述农药或药物是通过结合于微管蛋白而起作用的。在使用抗微管蛋白的农药或药物期间可能导致细胞的发育, 这说明对抗微管蛋白化合物减少了灵敏度(抗性)。抗性可能是由于微管蛋白的变更, 或可能涉及其它机制, 例如抗微管蛋白化合物的吸收或代谢的变化。由于微管蛋白的变更而引起的对抗微管蛋白化合物的抗性已经出现在真菌病原体 [Davidse, L.C. 和 Ishi, H., “Modern Selective Fungicides”, H. Lyr 编辑, 305-322 (1995)], 藻类 [James, S.W. 等人, *Journal of Cell Science*, 106, 209-218 (1993)] 和蠕虫 [Beech, R.N.

等人, Genetics, 138, 103-110(1994)]。在对酰胺类化合物的结合亲和力上含有变更后的微管蛋白的抗性细胞可能显示出差别, 可使酰胺探针应用于检测这些突变体的结合试验。通过把酰胺探针与接触抗微管蛋白农药或药物之前的细胞或细胞萃取物的结合速率和与未处理的对照细胞或细胞萃取物的结合速率进行比较而完成此试验。

例如, 苯并咪唑和硫菌灵类杀真菌剂如苯菌灵(1-(丁基氨基甲酰基)苯并咪唑-2-基氨基甲酸甲酯)、麦穗宁(2-(2'-呋喃基)苯并咪唑)、噻菌灵(2-(4-噻唑基)苯并咪唑)、多菌灵(苯并咪唑-2-基氨基甲酸甲酯)、甲基-硫菌灵(1, 2-双(3-甲氧羰基-2-硫脲基)苯)和硫菌灵(1, 2-双(3-乙氧羰基-2-硫脲基)苯)在本领域用于抗植物病原体真菌是已知的。但是, 在使用苯并咪唑和硫菌灵类杀真菌剂期间可能会导致能减少这些杀真菌剂灵敏度的真菌菌株生长, 从而在控制特定的真菌疾病时, 使杀真菌剂效果大大降低。典型地, 在作为纯培养物分离时, 这些“抗性的”真菌对苯并咪唑和硫菌灵类的灵敏度比没有接触这些杀真菌剂的地区的真菌小10倍到1000倍以上。而且, 减少了对一种苯并咪唑或硫菌灵类杀真菌剂的灵敏度的真菌常常也会减少对其它苯并咪唑或硫菌灵类杀真菌剂的灵敏度。N-苯基氨基甲酸酯杀真菌剂乙霉威通常被用来控制对苯并咪唑有抗性的真菌, 如灰色葡萄孢(*Botrytis cinerea*)。它的使用产生了对苯并咪唑和乙霉威两种杀真菌剂有抗性真菌菌株。检测真菌菌株对苯并咪唑类、硫菌灵或乙霉威有抗性的真菌菌株的通用方法是费力费时的(labor-intensive and time-consuming)。一些方法中包括了分离纯的试验培养物, 接着用杀真菌剂改良的琼脂板进行菌丝体生长的离体试验, 或者用杀真菌剂处理的叶子进行活体试验。另外, 在杀真菌剂的存在下, 可以进行孢子的玻片发芽试验。对乙霉威和/或苯并咪唑和硫菌灵有抗性的真菌菌株典型地含有变更后的微管蛋白蛋白质[例如参见Koenraad, H., Phytopathology, 82, 1348-1354(1992)以及Yarden, O. 和 Katan, T., Phytopathology, 83, 1478-1483(1993)]。苯并咪唑-抗性、乙霉威-敏感的真菌菌株特别显示出增加本发明的酰胺衍生物灵敏度的作用, 而苯并咪唑-抗性、乙霉威-抗性的真菌菌株特别显示出减少灵敏度的作用。虽然从理论上不希望被结合, 但是, 可以确信酰胺探针可用于

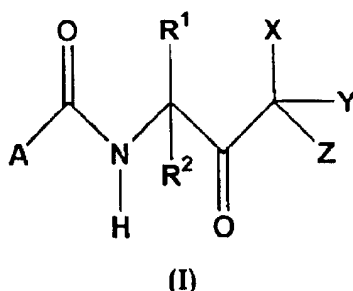
结合试验以便将苯并咪唑-抗性、乙霉威-敏感的真菌菌株,或苯并咪唑-抗性、乙霉威-抗性的真菌菌株与没有抗性的菌株区分开,苯并咪唑-抗性、乙霉威-敏感的真菌菌株在用全细胞或细胞萃取物进行的试验中显示出增加结合酰胺探针的能力,苯并咪唑-抗性、乙霉威-抗性的真菌菌株显示出减少结合酰胺探针的能力。此试验可以减少劳动强度和时间消耗,并且还可以提供关于与微管蛋白变化有关的抗性机制的资料。关于抗性机制的资料可以用来设计抗性控制对策。

本发明的第三方面涉及酰胺探针在结合试验中用于定性和定量测定细胞或细胞萃取物中的微管蛋白。由于微管蛋白成功地作为药物和农药的靶位以及它们重要的细胞功能,因此成为重点研究的课题。在这些研究中常常需要定性和定量测定细胞或细胞萃取物中的微管蛋白。目前,此测定是通过下述方法来完成的:各种免疫试验[D. Thrower 等人, *Methods in Cell Biology*, vol. 37, p129-145 (1993)], 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳[B. M. Spiegelman 等, *Cell*, vol. 12, pp. 587-600 (1977)], 与 DEAE-纤维素的结合[J. C. Bulinski 等, *Analytical Biochemistry*, vol. 104, 432-439 (1980)], 或测定秋水仙碱结合活性[Wilson, L., *Biochemistry*, vol. 9, pp. 4999-5007 (1970)]。酰胺探针提供了另外一种以测量酰胺结合活性为基础的定性和定量测定微管蛋白的方法。使用酰胺探针避免了对抗微管蛋白的抗体的需求,提供了一种比十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳或与 DEAE-纤维素的结合更简单、更快速的方法,并且适合于测量各种细胞,如对秋水仙碱不敏感的事物或真菌细胞之中的微管蛋白水平。

本领域熟练技术人员已知的各种方法都可以用来测定用全细胞、粗制的细胞萃取物、部分纯化的微管蛋白制剂或分离的微管蛋白进行的试验中酰胺探针和微管蛋白的结合。这可能涉及例如放射性标记或荧光的酰胺探针。具体地,该探针是用细胞、细胞萃取物或微管蛋白培养基培育的,在用各种分离技术或这些技术的结合将它们与未结合的探针分离之后,测定结合探针的量。分离技术包括,但不限于离心、色谱、相分离、沉淀结合或未结合探针中的一种,或结合或未结合探针中的一种粘合于固体基质。闪烁接近试验技术(scintillation proximity assay technology) (U. S. 4,568,649) 提供了另外一种测定探针与微管蛋白结合的有效方

法。另一种方法还涉及用质谱技术鉴定结合了酰胺的微管蛋白或结合了酰胺的蛋白质，它们是由化学或酶处理后释放出来的。

本发明提供了用某些抑制真核细胞生长的酰胺进行结合试验的方法，该方法可用于筛选抗微管蛋白活性的化合物、抗性检测和测定在真核细胞、细胞萃取物和微管蛋白制剂中微管蛋白的含量，所说的酰胺是具有以下结构的酰胺或其光学对映体：



其中

A 是 (C₃-C₇) 环烷基、(C₁-C₆) 烷基、卤代 (C₁-C₆) 烷基、(C₂-C₆) 链烯基、卤代 (C₂-C₆) 链烯基、(C₂-C₆) 炔基、卤代 (C₂-C₆) 炔基、苯基、吡啶基、呋喃基、噻吩基、异噁唑基、噁唑基、吡咯基、异噻唑基、噻唑基、吡唑基、咪唑基、嘧啶基、喹啉基、异喹啉基、萘基、哒嗪基、吡嗪基、苯并噻吩基、吲哚基、苯并呋喃基或苄基；或是由各自独立地选自下述基团的 4 个或少于 4 个取代基取代的苯基、吡啶基、呋喃基、噻吩基、异噁唑基、噁唑基、吡咯基、异噻唑基、噻唑基、吡唑基、咪唑基、嘧啶基、喹啉基、异喹啉基、萘基、哒嗪基、吡嗪基、苯并噻吩基、吲哚基、苯并呋喃基或苄基；卤素、氨基、(C₁-C₆) 烷基、卤代 (C₁-C₆) 烷基、(C₂-C₆) 链烯基、卤代 (C₂-C₆) 链烯基、(C₂-C₆) 炔基、卤代 (C₂-C₆) 炔基、(C₁-C₆) 烷氧基、卤代 (C₁-C₆) 烷氧基、(C₁-C₆) 烷硫基、卤代 (C₁-C₆) 烷硫基、硝基、-NR⁶R⁷、-CR⁸=NOR⁹、-NHCOOR¹⁰、-CONR¹¹R¹² 和 -COOR¹³；或者当 A 是不饱和环并被 2 个或多个相邻的取代基取代时，所说的取代基中的两个取代基可形成含有至多两个选自氧、氮、硫和磷的杂原子的稠合 5、6、7 元环；

R¹ 和 R² 各自独立地是氢原子、(C₁-C₆) 烷基、卤代 (C₁-C₆) 烷基、(C₂-C₆) 链烯基、卤代 (C₂-C₆) 链烯基、(C₂-C₆) 炔基或卤代 (C₂-C₆) 炔基，条件是 R¹ 和 R² 不能同时为氢；

R⁶ 和 R⁷ 各自独立地是氢原子、(C₁-C₆) 烷基或 (C₁-C₆) 烷基羰基；

R^8 是氢原子、(C₁-C₆)烷基、(C₂-C₆)链烯基或(C₂-C₆)炔基;

R^9 是氢原子、(C₁-C₆)烷基、(C₂-C₆)链烯基、(C₂-C₆)炔基或(C₁-C₄)烷基羰基;

R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 和 R^{13} 各自独立地是氢原子、(C₁-C₆)烷基、(C₂-C₆)链烯基或(C₂-C₆)炔基;和

X、Y和Z各自独立地是氢原子、卤素、氰基、硫氰酸基、异硫氰酸基或(C₁-C₆)烷基磺酰氧基,条件是X、Y和Z中至少有一个不是氢原子。

这里所说的“卤素”包括氟、溴、氯或碘。

“烷基”包括在每个基团中具有1-6个碳原子的直链或支链的烃基,例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、戊基和己基。

“链烯基”包括在每个基团中至少有一个双键和有2-6个碳原子的直链或支链烃基,例如乙烯基、2-丙烯基、2-丁烯基和2-甲基-2-丙烯基。

“炔基”包括在每个基团中至少有一个三键和有2-6个碳原子的直链或支链烃基,例如乙炔基、2-丙炔基和2-丁炔基。

“烷氧基”包括在每个基团中具有1-6个碳原子的直链或支链的烷氧基,例如甲氧基、丙氧基、正丁氧基和叔丁氧基。

“烷硫基”包括在每个基团中具有1-6个碳原子的直链或支链的烷硫基,例如甲硫基和丙硫基。

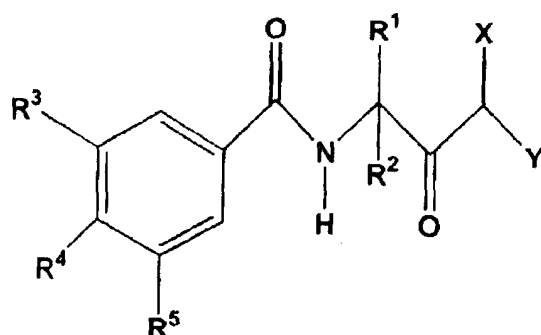
“卤代烷基”、“卤代链烯基”、“卤代炔基”、“卤代烷氧基”和“卤代烷硫基”基团是各自有1-5个卤素取代的“烷基”、“链烯基”、“炔基”、“烷氧基”和“烷硫基”基团。

“环烷基”包括有3-7个碳原子的环状环,例如环丙基、环戊基和环己基。

“烷基羰基”包括每个基团具有1-6个碳原子的直链或支链的烷基,该烷基连接于羰基上,例如甲基羰基和丁基羰基。

“烷基磺酰氧基”包括每个基团具有1-6个碳原子的直链或支链的烷基,该烷基连接于磺酰氧基上,例如甲基磺酰氧基和丙基磺酰氧基。

本发明的优选方法是使用具有下式结构的酰胺或其光学对映体:



(II)

其中

R^1 和 R^2 各自独立地是氢原子、(C₁-C₆)烷基、卤代(C₁-C₆)烷基、(C₂-C₆)链烯基或(C₂-C₆)炔基,条件是 R^1 和 R^2 不能同时为氢;

R^3 、 R^4 和 R^5 各自独立地是氢原子、卤素、氰基、(C₁-C₆)烷基、卤代(C₁-C₆)烷基、(C₂-C₆)链烯基、(C₂-C₆)炔基、(C₁-C₆)烷氧基、(C₁-C₆)烷硫基、卤代(C₁-C₆)烷氧基、硝基、-NR⁶R⁷、-CR⁸=NOR⁹、-NHCOOR¹⁰、-CONR¹¹R¹²或-COOR¹³;或者 R^4 和 R^5 一起形成稠合的5、6或7元环,其中最多含有两个选自O、S、N和P的杂原子;

R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 和 R^{13} 各自独立地是氢原子或(C₁-C₆)烷基;和

X和Y各自独立地是氢原子、卤素、氰基、硫氰酸基、异硫氰酸基或(C₁-C₆)烷基磺酰氧基,条件是X和Y不能同时为氢原子。

本发明更优选的方法是使用具有式(II)结构的苯甲酰胺或其光学对映体,其中:

R^1 是甲基;

R^2 是甲基或乙基;

R^3 和 R^5 各自独立地是氢原子、卤素、甲基、硝基、氰基、-NR⁶R⁷、-CR⁸=NOR⁹或-NHCOOR¹⁰;条件是 R^3 和 R^5 不能同时为氢原子;

R^4 是氢原子、卤素、-NR⁶R⁷、氰基、-CR⁸=NOR⁹、-NHCOOR¹⁰、-COOR¹³或(C₁-C₄)烷基;

R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 和 R^{13} 各自独立地是氢原子或(C₁-C₆)烷基;

X是氯;和

Y是氢原子。

在用哺乳动物细胞、细胞萃取物或微管蛋白的试验中,本发明更优选

的方法是使用具有式 (II) 结构的苯甲酰胺或其光学对映体, 其中:

R^1 是甲基;

R^2 是乙基;

R^3 是卤素或氰基;

R^4 和 R^5 是氨基或 $-\text{CH}=\text{NOCH}_3$, 条件是 R^4 和 R^5 不同;

X 是氯; 或

Y 是氢原子。

在用真菌细胞、细胞萃取物或其中的真菌属于子囊菌纲、半知菌纲或担子菌纲类真菌的微管蛋白的试验中, 本发明更优选的方法是使用具有式 (II) 结构的苯甲酰胺或其光学对映体, 其中:

R^1 是甲基;

R^2 是甲基或乙基;

R^3 是 $-\text{CH}=\text{NOCH}_3$, 卤素或氰基;

R^4 是氢原子、卤素、氨基、氰基或甲基;

R^5 是卤素、甲基、硝基或氰基;

X 是氯; 和

Y 是氢原子。

在用真菌细胞、细胞萃取物或其中的真菌属于卵菌纲类真菌的微管蛋白的试验中, 本发明更优选的方法是使用具有式 (II) 结构的苯甲酰胺或其光学对映体, 其中:

R^1 是甲基;

R^2 是乙基;

R^3 和 R^5 各自独立地是氢原子、卤素、甲基、硝基、氰基、 $-\text{NR}^6\text{R}^7$ 、 $-\text{CR}^8=\text{NOR}^9$ 或 $-\text{NHCOOR}^{10}$, 条件是 R^3 和 R^5 不能同时为氢原子;

R^4 是氢原子、卤素、 $-\text{NR}^6\text{R}^7$ 、氰基、 $-\text{CR}^8=\text{NOR}^9$ 、 $-\text{NHCOOR}^{10}$ 、 $-\text{COOR}^{13}$ 或 (C_1-C_4) 烷基;

R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 和 R^{13} 各自独立地是氢原子或甲基;

X 是氯; 和

Y 是氢原子。

在用植物细胞、细胞萃取物或微管蛋白的试验中, 本发明更优选的方

法是使用具有式 (II) 结构的苯甲酰胺或其光学对映体, 其中:

R^1 是甲基;

R^2 是甲基或乙基;

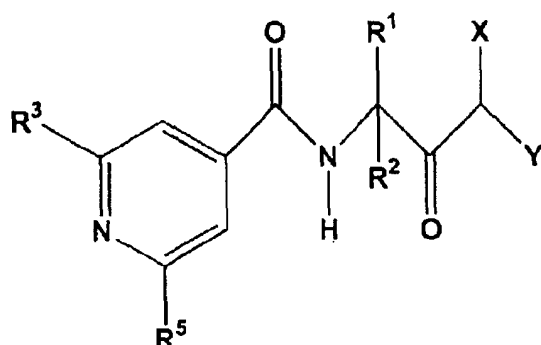
R^3 和 R^5 各自独立地是氢原子、卤素、甲基、硝基或氰基, 条件是 R^3 和 R^5 不能同时为氢原子;

R^4 是氢原子;

X 是氯; 和

Y 是氢原子.

本发明其它更优选的方法是使用具有下式结构的吡啶甲酰胺或其光学对映体:



其中

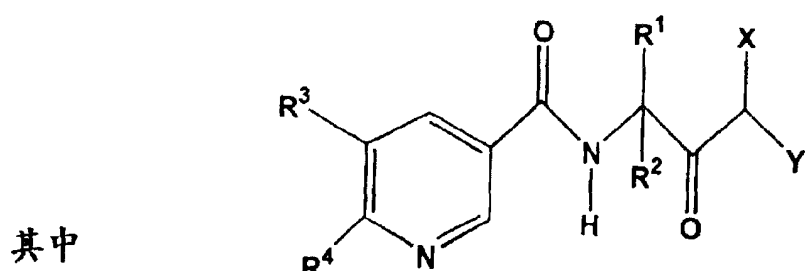
R^1 和 R^2 各自独立地是氢原子、(C₁-C₆)烷基、卤代(C₁-C₆)烷基、(C₂-C₆)链烯基或(C₂-C₆)炔基, 条件是 R^1 和 R^2 不能同时为氢;

R^3 和 R^5 各自独立地是氢原子、卤素、氰基、(C₁-C₆)烷基、卤代(C₁-C₆)烷基、(C₂-C₆)链烯基、(C₂-C₆)炔基、(C₁-C₆)烷氧基、(C₁-C₆)烷硫基、卤代(C₁-C₆)烷氧基、硝基、羧基、-NR⁶R⁷、-CR⁸=NOR⁹、-NHCOOR¹⁰、-CONR¹¹R¹² 或-COOR¹³;

R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 和 R^{13} 各自独立地是氢原子或(C₁-C₆)烷基; 和

X 和 Y 各自独立地是氢原子、卤素、氰基、硫氰酸基、异硫氰酸基或(C₁-C₆)烷基磺酰氧基, 条件是 X 和 Y 不能同时为氢原子.

本发明其它更优选的方法是使用具有下式结构的吡啶甲酰胺或其光学对映体:



R^1 和 R^2 各自独立地是氢原子、(C₁-C₆)烷基、卤代(C₁-C₆)烷基、(C₂-C₆)链烯基或(C₂-C₆)炔基,条件是 R^1 和 R^2 不能同时为氢;

R^3 和 R^4 各自独立地是氢原子、卤素、氰基、(C₁-C₆)烷基、卤代(C₁-C₆)烷基、(C₂-C₆)链烯基、(C₂-C₆)炔基、(C₁-C₆)烷氧基、(C₁-C₆)烷硫基、卤代(C₁-C₆)烷氧基、硝基、羧基、-NR⁶R⁷、-CR⁸=NOR⁹、-NHCOOR¹⁰、-CONR¹¹R¹²或-COOR¹³;或者 R^3 和 R^4 一起形成稠合的5、6或7元环,其中最多含有两个选自O、S、N和P的杂原子;

R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 和 R^{13} 各自独立地是氢原子或(C₁-C₆)烷基;和

X和Y各自独立地是氢原子、卤素、氰基、硫氰酸基、异硫氰酸基或(C₁-C₆)烷基磺酰氧基,条件是X和Y不能同时为氢原子。

本发明另一更优选的方法是使用具有式(IV)结构的吡啶甲酰胺或其光学对映体,其中:

R^1 是甲基;

R^2 是甲基或乙基;

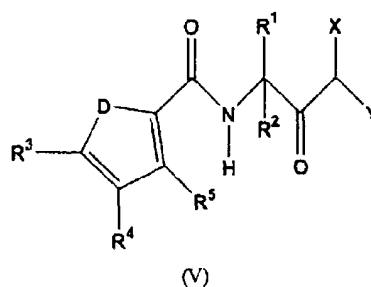
R^3 和 R^4 各自独立地是氢原子、卤素、甲基、硝基、氰基、-NR⁶R⁷、-CR⁸=NOR⁹或-NHCOOR¹⁰;条件是 R^3 和 R^4 不能同时为氢原子;

R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 和 R^{13} 各自独立地是氢原子或(C₁-C₆)烷基;

X是氯;和

Y是氢原子。

本发明还有另一更优选的方法是使用具有下式结构的呋喃甲酰胺、噻吩甲酰胺或它们的光学对映体:



其中

D 是 O 或 S;

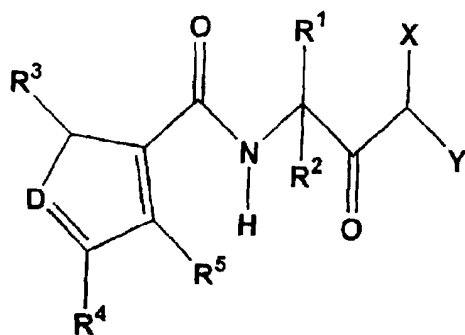
R^1 和 R^2 各自独立地是氢原子、(C₁-C₆) 烷基、卤代 (C₁-C₆) 烷基、(C₂-C₆) 链烯基或 (C₂-C₆) 炔基, 条件是 R^1 和 R^2 不能同时为氢;

R^3 、 R^4 和 R^5 各自独立地是氢原子、卤素、氨基、(C₁-C₆) 烷基、卤代 (C₁-C₆) 烷基、(C₂-C₆) 链烯基、(C₂-C₆) 炔基、(C₁-C₆) 烷氧基、(C₁-C₆) 烷硫基、卤代 (C₁-C₆) 烷氧基、硝基、羧基、 $-NR^6R^7$ 、 $-CR^8=NOR^9$ 、 $-NHCOOR^{10}$ 、 $-CONR^{11}R^{12}$ 或 $-COOR^{13}$; 或者 R^3 和 R^4 一起形成稠合的 5、6 或 7 元环, 其中最多含有两个选自 O、S、N 和 P 的杂原子;

R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 和 R^{13} 各自独立地是氢原子或 (C₁-C₆) 烷基; 和

X 和 Y 各自独立地是氢原子、卤素、氨基、硫氰酸基、异硫氰酸基或 (C₁-C₆) 烷基磺酰氧基, 条件是 X 和 Y 不能同时为氢原子。

本发明还有另一更优选的方法是使用具有下式结构的呋喃甲酰胺、噻吩甲酰胺或它们的光学对映体:



其中

D 是 O 或 S;

(VI)

R^1 和 R^2 各自独立地是氢原子、(C₁-C₆) 烷基、卤代 (C₁-C₆) 烷基、(C₂-C₆) 链烯基或 (C₂-C₆) 炔基, 条件是 R^1 和 R^2 不能同时为氢;

R^3 、 R^4 和 R^5 各自独立地是氢原子、卤素、氨基、(C₁-C₆) 烷基、卤代 (C₁-C₆) 烷基、(C₂-C₆) 链烯基、(C₂-C₆) 炔基、(C₁-C₆) 烷氧基、(C₁-C₆) 烷硫基、卤代 (C₁-C₆) 烷氧基、硝基、羧基、 $-NR^6R^7$ 、 $-CR^8=NOR^9$ 、 $-NHCOOR^{10}$ 、 $-CONR^{11}R^{12}$ 或 $-COOR^{13}$;

R^6 、 R^7 、 R^8 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 和 R^{13} 各自独立地是氢原子或

(C₁-C₆) 烷基; 和

X 和 Y 各自独立地是氢原子、卤素、氰基、硫氰酸基、异硫氰酸基或 (C₁-C₆) 烷基磺酰氧基, 条件是 X 和 Y 不能同时为氢原子。

当 R¹ 和 R² 不同时, 由于存在连接 R¹ 和 R² 的不对称碳原子, 就可能有本发明化合物的光学对映体。在这种情况下, 两种对映体均在本发明的范围之内。已知很多生物活性化合物具有光学对映体, 其中之一与特定蛋白质的结合比另一个更有效。与此类似, 对于本发明方法的化合物而言, 在与微管蛋白的结合中一种对映体可能比另一种对映体更有效。例如, 化合物 1、2 和 3 的“S 对映体”在与微管蛋白结合时比相应的“R 对映体”更为有效。术语“S 对映体”是指连接 R¹ 和 R² 的碳原子上的四个基团如果是按照 Cahn-Ingold-Prelog 体系[Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 5, 385-415 (1966)]的一组序列规则排列时, 则定义该碳原子为 S 构型。术语“R 对映体”是指四个基团形成 R 构型。

已经制得的并且预计可以用于本发明的方法制得的的具体化合物包括, 但不限于表 1-6 所列出的化合物。

在本发明的附图中

图 1 表示: 辣椒疫霉用 ¹⁴C - 标记化合物 3 处理后, 用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳和自动放射线照像分析放射性标记蛋白质;

图 2 表示: 烟草细胞培养悬浮液经 ¹⁴C - 标记处理后, 用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳和自动放射线照像分析放射性标记蛋白质;

图 3 表示: 分离的牛微管蛋白用 ¹⁴C - 标记倾倒物处理后, 用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳和自动放射线照像分析放射标记蛋白质。

表1 式(II)的苯甲酰胺

化合物 nd	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	X	Y
1	CH ₃	C ₂ H ₅	Cl	H	Cl	Cl	H
2	CH ₃	C ₂ H ₅	CH=NOCH ₃	NH ₂	Cl	Cl	H
3	CH ₃	C ₂ H ₅	Cl	CH ₃	Cl	Cl	H
4	CH ₃	C ₂ H ₅	H	NHCOOCH ₃	H	Cl	H
5	CH ₃	C ₂ H ₅	Cl	NH ₂	Cl	Cl	H
6	CH ₃	C ₂ H ₅	CN	H	Cl	Cl	H
7	CH ₃	C ₂ H ₅	CH=NOCH ₃	H	Cl	Cl	H
8	CH ₃	C ₂ H ₅	Br	H	CH ₃	Cl	H
9	CH ₃	C ₂ H ₅	Cl	H	Cl	Br	Br
10	CH ₃	CH ₃	Cl	H	Cl	Br	Cl
11	CH ₃	CH ₃	Cl	H	Cl	Br	Br
12	CH ₃	C ₂ H ₅	Br	NH ₂	Br	Cl	H
13	CH ₃	C ₂ H ₅	CN	H	H	Cl	H
14	CH ₃	C ₂ H ₅	Br	CH ₃	Br	Cl	H
15	CH ₃	C ₂ H ₅	CN	H	CH ₃	Cl	H
16	CH ₃	C ₂ H ₅	CH=NOCH ₃	H	H	Cl	H
17	CH ₃	C ₂ H ₅	Cl	H	Cl	SCN	H
18	CH ₃	CH ₃	Cl	H	Cl	NCS	H
19	CH ₃	CH ₃	Cl	H	Cl	Cl	H
20	CH ₃	CH ₃	Cl	H	Cl	Br	H
21	CH ₃	C ₂ H ₅	Br	CH ₃	Cl	Cl	H
22	CH ₃	C ₂ H ₅	Cl	F	Cl	Cl	H
23	CH ₃	C ₂ H ₅	Cl	Cl	Cl	Cl	H
24	CH ₃	C ₂ H ₅	F	H	F	Cl	H
25	CH ₃	C ₂ H ₅	Cl	H	H	Cl	H
26	CH ₃	C ₂ H ₅	F	F	F	Cl	H
27	CH ₃	isopropyl	Cl	H	Cl	Cl	H
28	CH ₃	C ₂ H ₅	Cl	H	Cl	F	Br
29	CH ₃	CH ₃	Cl	H	Cl	Cl	Cl
30	CH ₃	C ₂ H ₅	NHCOOCH ₃	H	H	Cl	H

表2 式(III)的吡啶甲酰胺

化合物	R ¹	R ²	R ³	R ⁵	X	Y
31	CH ₃	CH ₃	Cl	Cl	Br	Br
32	CH ₃	CH ₃	Cl	Cl	Cl	H

表3 式(IV)的吡啶甲酰胺

化合物	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	X	Y
33	CH ₃	C ₂ H ₅	Br	H	Cl	H
34	CH ₃	C ₂ H ₅	H	Cl	Cl	H

表4 式(V)的噻吩甲酰胺和咪喃甲酰胺

化合物	D	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	X	Y
35	S	CH ₃	CH ₃	Br	Br	H	Cl	H
36	S	CH ₃	C ₂ H ₅	CH ₃	H	H	Cl	H
37	S	CH ₃	CH ₃	H	H	H	Br	Br
38	O	CH ₃	C ₂ H ₅	Br	H	H	Br	Br

表5 式(VI)的噻吩甲酰胺

化合物	D	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	X	Y
39	S	CH ₃	CH ₃	Cl	Cl	H	Cl	H

表6 式(II)的稠合环苯甲酰胺

化合物	R ¹	R ²	R ³	R ⁴ R ⁵ *	X	Y
40	CH ₃	C ₂ H ₅	H	-N=CH-O-	Cl	H
41	CH ₃	C ₂ H ₅	H	-O-CH=N-	Cl	H
42	CH ₃	C ₂ H ₅	H	-N=CH-S-	Cl	H
43	CH ₃	C ₂ H ₅	Cl	-N=CH-O-	Cl	H
44	CH ₃	C ₂ H ₅	Cl	-N=C(CH ₃)-O-	Cl	H

*左端的原子连接于苯甲酸酰胺环的 4-位, 右端原子连接于苯甲酸酰胺环的 5-位。

下面的方法和实施例进一步说明了本发明的应用。

制备表 1-6 所列化合物使用的方法

表 1 中的化合物 1、6、8、9、10、11、13、15、17、18、19、20、22、23、24、25、26、27、28 和 29

表 1 中的化合物 1、6、8、9、10、11、13、15、17、18、19、20、22、23、24、25、26、27、28 和 29 按照 USP 4,822,902, 第 5-8 列, 第 11-17 行所述的合成方法制备。

表 1 中的化合物 7 和 16

表 1 中的化合物 7 和 16 按照 USP 5,254,584, 第 7 和 8 列(化合物 16), 和 10-14 列(化合物 7)所述的合成方法制备。

表 1 中的化合物 3、14 和 21

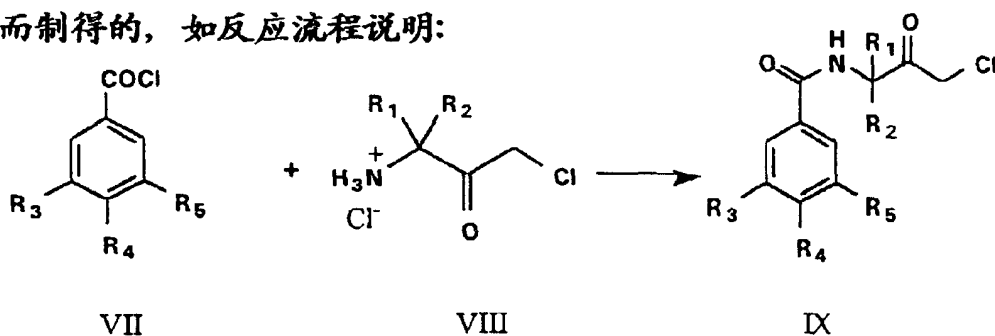
表 1 中的化合物 3、14 和 21 按照 USP 5,304,572, 第 4-8 列所述的合成方法制备。

表 1 中的化合物 5 和 12

表 1 中的化合物 5 和 12 按照 USP 4,863,940, 第 5-7 列所述的常规技术, 由适当的苯甲酸或苯甲酰氯制备。即化合物 5 和 12 分别由 4-氨基-3, 5-二氯苯甲酰氯和 4-氨基-3, 5-二溴苯甲酰氯制备。

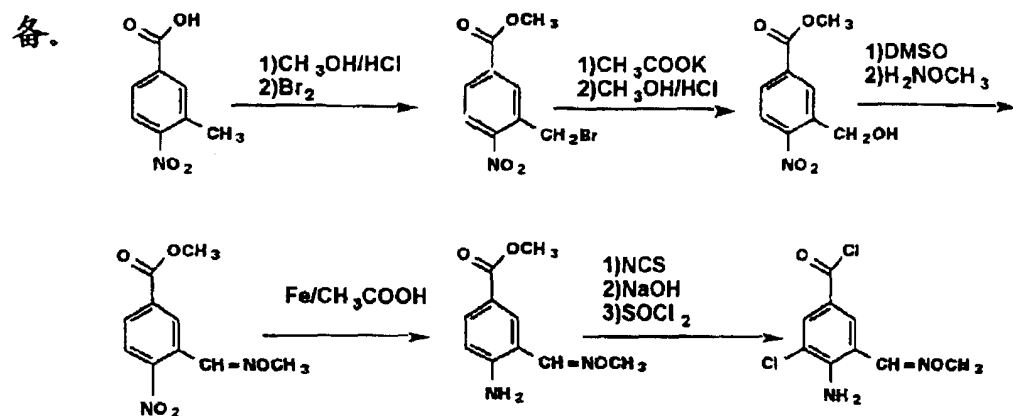
表 1 中的化合物 2

表 1 中的化合物 2 是使 R^3 是 Cl, R^4 是 NH_2 和 R^5 是 $-CH=NOCH_3$ 的式 VII 的苯甲酰氯与 R^1 是甲基和 R^2 是乙基的式 VIII 的 α -氨基- α -氯代酮衍生物反应而制得的, 如反应流程说明:

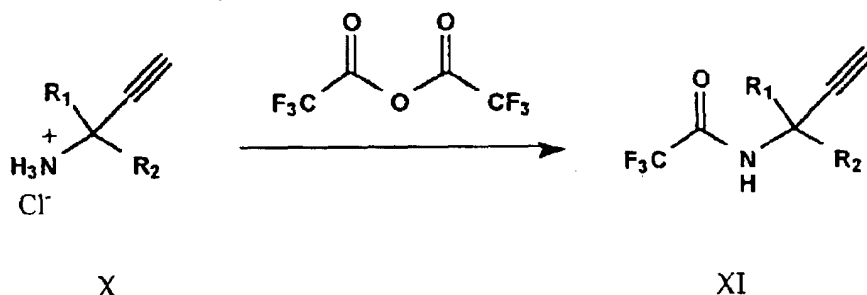


反应流程 A

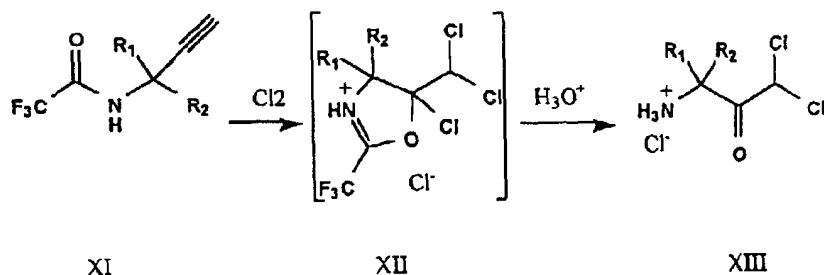
用于制备化合物 2 的原料苯甲酰氯用下面的反应流程 B 所示的方法制备。

反应流程 B

化合物 VIII 用下述方法制备：在溶剂如二氯甲烷、氯仿、乙醚或水中，在有碱如三乙胺、碳酸钠、碳酸氢钠或氢氧化钠存在下，用三氟乙酸酐处理乙炔胺（X），得到乙炔酰胺 XI：



在 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，于溶剂如二氯甲烷或氯仿中，用氯或氯源处理乙炔酰胺 XI，得到中间体噁唑啉（XII）。于 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，以甲醇或四氢呋喃为溶剂，在酸性条件下，用酸，如盐酸或硫酸很容易使噁唑啉 XII 水解，得到 α -氨基- α ， α -二氯代酮（XIII）。



蒸发器上除去溶剂，得到的浅黄色固体用 2 升乙酸乙酯和 1 升水的混合物处理，分离有机相，用水（ $3 \times 400\text{ml}$ ）和盐水（ $1 \times 400\text{ml}$ ）洗涤，无水硫酸镁干燥，用旋转蒸发器除去溶剂。粗制的反应各个外用己烷研磨，过滤，得到 318g 预期的 3-乙酰氧基甲基-4-硝基苯甲酸甲酯，此混合物即可用于下一步骤。

d) 制备 3-羟甲基-4-硝基苯甲酸甲酯

在配备有回流冷凝管、塔顶搅拌器和氮气进气管的 5 升三颈圆底烧瓶中放入 318g 前面得到的 3-乙酰氧基甲基-4-硝基苯甲酸和 3.2 升无水甲醇，在所得到的溶液中鼓泡加入 40g 氯化氢，并把得到的混合物回流 3 小时。反应混合物冷却至室温后用旋转蒸发器除去溶剂，得到 273g 3-羟甲基-4-硝基苯甲酸甲酯，为黄色结晶，含有痕量的甲醇，该固体即可用于下一步骤。

e) 制备 3-甲酰基-4-硝基苯甲酸甲酯

在 5 升三颈圆底烧瓶中把 1.5 升二氯甲烷冷却至 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，缓慢加入草酰氯（164g, 1.29mol），接着再滴加 202g（2.59mol）干燥二甲亚砜的 125ml 二氯甲烷溶液，使温度保持在低于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。加完后于 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 搅拌反应混合物 30 分钟，然后滴加前面制得的，溶于 250ml 二氯甲烷的 273g (1.29mol) 3-羟甲基-4-硝基苯甲酸甲酯，将反应混合物再搅拌 30 分钟。滴加三乙胺（392g, 3.88mol）的 125ml 二氯甲烷溶液，使温度保持在低于 $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。使反应混合物缓慢温热至室温和搅拌过夜。用旋转蒸发器除去溶剂，得到的固体用 2 升乙酸乙酯和 1 升水的混合物处理。分离有机相，通过硅藻土过滤，并顺序用稀盐酸水溶液（ $2 \times 250\text{ml}$ ）、水（ $2 \times 250\text{ml}$ ）、饱和碳酸氢钠水溶液（ $2 \times 250\text{ml}$ ）、水（ $2 \times 200\text{ml}$ ）和盐水（ $1 \times 200\text{ml}$ ）洗涤，用无水硫酸镁干燥，用旋转蒸发器除去溶剂，粗制的反应混合物用己烷研磨，过滤后得到 234.1g 预期的 3-甲酰基-4-硝基苯甲酸甲酯黄色固体，此固体即可用于下一步骤。

f) 制备 3-甲氧基亚氨基甲基-4-硝基苯甲酸甲酯

在充分搅拌的 195g 3-甲酰基-4-硝基苯甲酸甲酯、1 升二氯甲烷和 370ml 水的混合物中依次加入 77.6g 甲氧基胺盐酸盐、76.2g 乙酸钠和 6.8g 四正丁基铵硫酸氢盐，将得到的混合物于室温搅拌过夜，然后用 2 升乙醚

稀释。分离有机相和依次用水 ($1 \times 500\text{ml}$)、2%盐酸水溶液 ($2 \times 500\text{ml}$)、水 ($2 \times 250\text{ml}$) 和盐水 ($1 \times 250\text{ml}$) 洗涤, 用无水硫酸镁干燥, 用旋转蒸发器除去溶剂, 得到 218.6g 预期的 3-甲氧基亚氨基甲基-4-硝基苯甲酸甲酯, 为带红色的油, 使其静置固化, 此固体即可用于下一步骤。

g) 制备 4-氨基-3-甲氧基亚氨基甲基苯甲酸甲酯

在 5 升三颈圆底烧瓶中放入 0.9 升 5%乙酸水溶液和 157g (2.8mol) 铁, 在得到的充分搅拌着的混合物中加入 166.6g (0.7mol) 前面所制得的, 溶于 0.9 升乙酸乙酯的 3-甲氧基亚氨基甲基-4-硝基苯甲酸甲酯, 接着滴加 0.9 升乙酸, 同时保持 35°C 。得到的混合物于 35°C 搅拌 30 分钟并通过硅藻土过滤。把滤液倾入 5 升水中, 分离水相并用乙醚 ($2 \times 500\text{ml}$) 洗涤。合并的有机相依次用水 ($4 \times 500\text{ml}$)、饱和碳酸氢钠水溶液 ($2 \times 500\text{ml}$)、水 ($2 \times 500\text{ml}$) 和盐水 ($1 \times 400\text{ml}$) 洗涤, 有机层用无水硫酸镁干燥, 用旋转蒸发器除去溶剂, 得到 130g 预期的 4-氨基-3-甲氧基亚氨基甲基苯甲酸甲酯。

h) 制备 4-氨基-3-氯-5-甲氧基亚氨基甲基苯甲酸甲酯

在 2 升三颈圆底烧瓶中放入 106g (0.51mol) 前面制备的 4-氨基-3-甲氧基亚氨基甲基苯甲酸甲酯和 500ml 乙腈, 得到的混合物于 70°C 加热并滴加 75.2g (0.56mol) 的 N-氯琥珀酰亚胺, 同时保持温度低于 80°C 。加入完成后, 回流反应混合物 1 小时。将反应混合物冷却至室温, 在旋转蒸发器中除去溶剂。将粗制的产品溶于 5 升乙酸乙酯, 有机溶液用水 ($3 \times 500\text{ml}$) 和盐水洗涤, 无水硫酸镁干燥, 在旋转蒸发器中把反应混合物浓缩成浆液, 用己烷研磨和过滤得到 130g 预期的 4-氨基-3-氯-5-甲氧基亚氨基甲基苯甲酸甲酯, 为黄色固体。用相同用量重复此反应, 得到总量为 210.5g 4-氨基-3-甲氧基亚氨基甲基苯甲酸甲酯, 此化合物即可用于下一步骤。

i) 制备 4-氨基-3-氯-5-甲氧基亚氨基甲基苯甲酸

在 5 升三颈圆底烧瓶中放入 210g (0.86mol) 前面制备的 4-氨基-3-氯-5-甲氧基亚氨基甲基苯甲酸甲酯、1.7 升甲醇和 462g (1.73mol) 15% 氢氧化钠水溶液, 将得到的混合物回流 3 小时, 之后于室温下将反应混合物搅拌过夜。用旋转蒸发器浓缩反应混合物。把粗制的反应混合物溶于 2

升水，得到的水溶液用 500ml 乙酸乙酯洗涤一次，用冰浴冷却，和用浓盐酸酸化至 pH=2。预期的 4-氨基-3-氯-5-甲氧基亚氨基甲基苯甲酸以浅黄色固体的形式沉淀出来，抽滤分离固体。滤饼用乙酸乙酯和己烷的 1:2 混合物洗涤，干燥后得到 185.2g 产品（产率 94%）。

j) 制备 4-氨基-3-氯-5-甲氧基亚氨基甲基苯甲酰氯

在 5 升三颈圆底烧瓶中放入 180g 前面制备的 4-氨基-3-氯-5-甲氧基亚氨基甲基苯甲酸、2 升甲苯、3ml 二甲基甲酰胺和 104g (64ml) 亚硫酸氯。得到的混合物在 70℃ 加热 2 小时，热过滤，用旋转蒸发器除去溶剂得到 178.1g 4-氨基-3-氯-5-甲氧基亚氨基甲基苯甲酰氯。

k) 制备 3-氨基-1-氯-3-甲基-2-戊酮氢氯化物

（化合物 VIII，其中 R¹ 甲基和 R² 是乙基）

(i) 制备 N-[3-(3-甲基-1-戊炔基)三氟乙酰胺]

在配备有机械搅拌、氮气进气管和温度计的 3 升三颈圆底烧瓶中放入 234g (1.75mol) 3-氨基-3-甲基-1-戊炔氢氯化物和 1000ml 二氯甲烷，在得到的充分搅拌的混合物中缓慢滴加 354g (3.51mol) 三乙胺 (TEA)，并保持温度低于 30℃。加完后，搅拌反应混合物 120 分钟，接着滴加溶于 500ml 二氯甲烷的 334.5g (1.59mol) 三氟乙酸酐，加入速度是保持反应温度为 0℃。加完后，反应混合物于室温搅拌过夜并真空浓缩。得到的浆液用乙醚洗涤，乙醚层依次用水、饱和碳酸氢钠水溶液和盐水洗涤，无水硫酸镁干燥，用活性炭处理，通过 Celite™ 过滤。减压除去溶剂，得到的粗制的产品用冷的戊烷处理，过滤和干燥得到 255.5g (83%) 预期的 N-[3-(3-甲基-1-戊炔基)三氟乙酰胺]。

(ii) 制备 5-氯-5-(二氯甲基)-4-乙基-4-甲基-2-三氟甲基噁唑啉氢氯化物

在配备有机械搅拌、温度计和进气管的 5 升四颈圆底烧瓶将 255.5g (1.32mol) N-[3-(3-甲基-1-戊炔基)三氟乙酰胺]溶于 4000ml 二氯甲烷，把得到的混合物冷却至 -30℃，用 2 小时时间鼓泡加入 235g 氯。加入完成后反应混合物于 -30℃ 搅拌 0 分钟并温热至室温。粗制的反应混合物在旋转蒸发器中蒸发得到预期的 5-氯-5-(二氯甲基)-4-乙基-4-甲基-2-三氟甲基噁唑啉氢氯化物，此化合物即可用于下一步骤。

(iii) 制备 3-氨基-1, 1-二氯-3-甲基-2-戊酮氢氯化物

把前一步骤中制得的 5-氯-5-(二氯甲基)-4-乙基-4-甲基-2-三氯甲基噁唑啉氢氯化物溶于 1800ml 甲醇、72ml 水和 190ml 浓盐酸, 温热至 50 °C, 于室温搅拌过夜。把粗制的反应混合物冷却并倾入冰/水/乙醚混合物中, 相分离, 乙醚层用水萃取一次, 留存此乙醚(有机相 I)。合并的含水层用乙醚洗涤一次, 此有机层与有机相 I 合并(有机相 II)。水层用饱和碳酸氢钠水溶液洗涤, 和用乙醚萃取二次。合并的醚层用水和盐水洗涤。用无水硫酸镁干燥, 用活性炭处理和通过 Celite™ 过滤。在得到的无色溶液中用无水氯化氢气体鼓泡, 并使温度保持在低于 20 °C。过滤得到的白色固体并干燥, 得到 124.8g 预期的 3-氨基-1, 1-二氯-3-甲基-2-戊酮氢氯化物, 为白色固体。将乙醚滤液与有机相 II 合并, 浓缩, 把得到的残余物(150g)溶于甲醇/水/浓盐酸的混合物, 在 50 °C 加热过夜按前面描述的方法精制得到另外的 51g 3-氨基-1, 1-二氯-3-甲基-2-戊酮氢氯化物, 所得总量为 175.8g (产率 61%)。

iv) 制备 3-氨基-1-氯-3-甲基-2-戊酮氢氯化物

在 2L Parr™ 瓶中加入 41g 3-氨基-1, 1-二氯-3-甲基-2-戊酮氢氯化物、0.8g 10%钨-碳和 400ml 乙醇, 将得到的混合物在 Parr™ 仪上, 于 50psi 震荡 3 小时。用 Celite™ 过滤粗制的反应混合物, 真空蒸发得到粘稠的油, 将其溶于 300-400ml 乙酸乙酯, 于室温下搅拌数小时。结晶出预期的 3-氨基-1-氯-3-甲基-2-戊酮氢氯化物, 为白色固体。在得到的悬浮液中加入 300ml 己烷, 过滤得到 34g (98%) 3-氨基-1-氯-3-甲基-2-戊酮氢氯化物。

用 41g、41g 和 51g 3-氨基-1, 1-二氯-3-甲基-2-戊酮氢氯化物作原料重复上述反应, 得到总量 132.1g (总产率 90%) 的 3-氨基-1-氯-3-甲基-2-戊酮氢氯化物。

1) 制备 4-氨基-3-氯-甲氧基亚氨基甲基-N-(3-氯-1-乙基-1-甲基-2-氧代丙基) 苯甲酰胺 (化合物 2)

在 5 升四颈圆底烧瓶中加入 93g 3-氨基-1-氯-3-甲基-2-戊酮氢氯化物和 885ml 水, 在得到的溶液中加入 138.6g 碳酸氢钠溶液, 接着加入 500ml 乙酸乙酯。室温下, 有 50 分钟时间在所得到的充分搅拌的混合物中加入

123.5g 4-氨基-3-氯-5-甲氧基亚氨基甲基苯甲酰氯的1000ml 乙酸乙酯溶液。加入完成以后，反应缓和于室温搅拌1小时。分离两相，有机层用水（2×500ml）和盐水（1×500ml）洗涤，用无水硫酸镁干燥和在旋转蒸发器上除去溶剂，得到棕色油状的粗制产物。使此油通过一短的硅胶柱，以二氯甲烷为洗脱溶剂。蒸发溶剂后得到133.3g 预期的4-氨基-3-氯-甲氧基亚氨基甲基-N-（3-氯-1-乙基-1-甲基-2-氧代丙基）苯甲酰胺，为灰白色固体，mp140-141℃。

表1的化合物4和化合物30

化合物30按下述方法制备。

按照上文反应流程A的方法，通过3-硝基苯甲酰氯与VIII反应制备3-硝基-N-（3-氯-1-乙基-1-甲基-2-氧代丙基）苯甲酰胺，然后，以钯为催化剂催化氢化得到3-氨基-N-（3-氯-1-乙基-1-甲基-2-氧代丙基）苯甲酰胺。

在配备有机械搅拌、温度计和加料漏斗的300ml 四颈圆底烧瓶中将3.5g 3-氨基-N-（3-氯-1-乙基-1-甲基-2-氧代丙基）苯甲酰胺悬浮于100ml 二氯甲烷，钯该混合物在冰浴中冷却至0-5℃，然后加入1.8ml 三乙胺，将该混合物搅拌数分钟。缓慢加入氯甲酸甲酯（1.1ml），滴加时保持温度低于5℃，将混合物搅拌20分钟。撤去冰浴，使反应混合物温热至室温。用50ml 水将反应混合物洗涤二次，和用无水硫酸镁干燥。用旋转蒸发器除去溶剂，得到粗制的产物，用硅胶色谱纯化该粗制产品得到230g 化合物30。

化合物4按照和化合物30相同的方法制备，只是使用4-硝基苯甲酰氯为原料。

表2、3、4和5的化合物

表2、3、4和5的化合物按照USP4,863,940所述的合成方法制备。

表6的化合物40、41、42、43和44

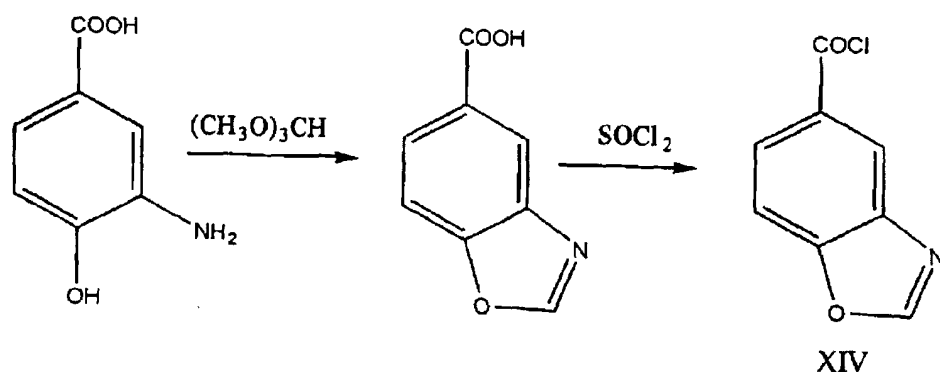
化合物40、41、43和44可按上文反应流程A所述通过其中R⁴和R⁵

一起形成稠合环的相应芳族衍生物(VII)与 3-氨基-1-氯-3-甲基-2-戊酮(化合物VIII, 其中 R^1 是甲基和 R^2 是乙基)反应制备。

要制备化合物42, 首先用亚硫酸氯处理 6-羧基-1, 3-苯并噻唑(购自 Maybrige Chemical Company Ltd.) 得到酰氯。在三乙胺存在下将该酰氯用 3-氨基-1-氯-3-甲基-2-戊酮氢氯化物处理得到化合物42。

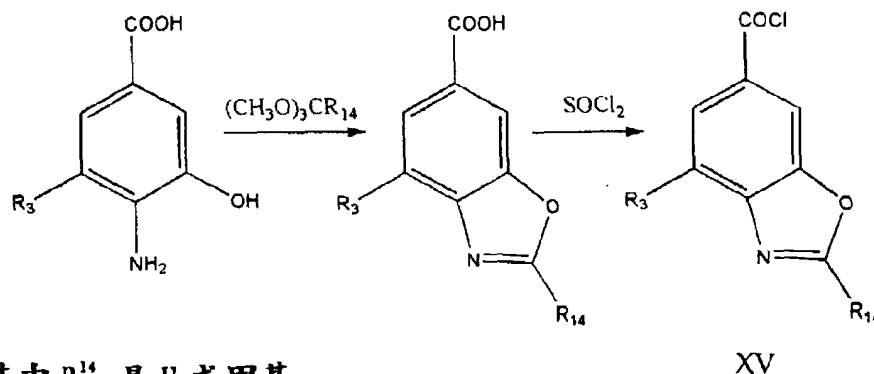
为制备化合物41的芳基部分, 由相应的 2-氨基酚衍生物, 采用本领域已知的方法制备 5-羧基苯并噻唑衍生物 XIV, 该方法如 E.C.Taylor 编辑, The Chemistry of Heterocyclic Compounds, vol. 47, John Wiley & Sons, 1987, "Synthesis of Fused Heterocycles", G.P.Ellis 编辑, p. 50, part I, 和 p. 713-714, part II 中所述。

此方法如下式所述:



然后在三乙胺存在下将XIV用 3-氨基-1-氯-3-甲基-2-戊酮氢氯化物处理得到化合物41。

为了制备化合物40、43和44的芳基部分, 由相应的 2-氨基酚衍生物通过下述方法制备 6-羧基苯并噻唑衍生物(XV):



其中 R^{14} 是H或甲基。

为了制备化合物40, 可以 4-氨基-3-羟基苯甲酸为原料, 用原甲酸三

甲酯处理而制备 6-羧基-1, 3-苯并噁唑。首先将 6-羧基-1, 3-苯并噁唑用亚硫酸氯处理得到酰氯。再在三乙胺存在下将该酰氯用 3-氨基-1-氯-3-甲基-2-戊酮氢氯化物处理, 得到化合物 40。

为了制备化合物 43, 以 4-氨基-5-氯-3-羟基苯甲酸为原料, 用原甲酸三甲酯处理而制备 6-羧基-4-氯-1, 3-苯并噁唑。首先将 6-羧基-4-氯-1, 3-苯并噁唑用亚硫酸氯处理得到酰氯。再在三乙胺存在下将该酰氯用 3-氨基-1-氯-3-甲基-2-戊酮氢氯化物处理, 得到化合物 43。

为了制备化合物 44, 以 4-氨基-5-氯-3-羟基苯甲酸为原料, 用原甲酸三甲酯处理而制备 6-羧基-2-甲基-4-氯-1, 3-苯并噁唑。首先将 6-羧基-2-甲基-4-氯-1, 3-苯并噁唑用亚硫酸氯处理得到酰氯。再在三乙胺存在下将该酰氯用 3-氨基-1-氯-3-甲基-2-戊酮氢氯化物处理, 得到化合物 44。

为了说明本发明的方法给出了下面的实施例。

实施例 1: 此实施例说明化合物 3 用于卵菌纲真菌 (Oomycete fungus) 辣椒疫霉 (*Phytophthora capsici*) 时与 β -微管蛋白共价键结合的能力

P. capsici (ATCC15399) 保持于 V-8 琼脂, pH7.0, 每升中含有 200ml V-8 汁液, 4g 碳酸钙和 20g 琼脂。在含有 20ml Rrwin, D. C. 和 Katznelson, K., 1971, Canada Journal of Microbiology, vol. 7, p. 15-25 (1971) 中所描述的天冬酰胺-蔗糖介质的锥形瓶 (容量 125ml) 中孵化由在 V-8 琼脂上生长的 *P. capsici* 培养物的生长边缘切下来的菌丝体孢塞 (直径 7mm)。在旋转震荡器上以 120rpm 震荡的条件下于 26 °C 孵化 72 小时, 然后加入 50 μ l 0.8mM ¹⁴C-标记的化合物 3。在进一步孵化 1 小时后, 规律收集真菌菌丝体并用 100ml 水洗涤。将菌丝体在液氮中冷冻和研磨成细粉, 在变性条件下 (于 100 °C, 在 62mM 含有 3%十二烷基硫酸钠、5%巯基乙醇、和 10%甘油的 Tris-HCl, pH6.8, 缓冲溶液中加热 5 分钟) 萃取蛋白质, 期望能引起任一非共价键结合的配位体的解离。按照 Laemmli, U. K., Nature (London),, ol. 277, pp. 680-685, 1970 所述的方法, 在双重 7.5%聚丙烯酰胺凝胶上将各等份的萃取蛋白质经过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离蛋白质。在一种凝胶上将蛋白质用 Coomassie 亮兰色 R250 染色。第二凝胶上的蛋白质用电泳法转移至硝基纤维素膜上, 该膜用 EN³HANCE™ 喷雾剂 (Dupont NEN Research

Products) 喷, 使用柯达 X-OMAT AR 胶片, 采用自动放射照相的方法, 曝光 3 周测定放射性标记蛋白质位置。 β -微管蛋白在硝基纤维素上的位置用抗微管蛋白的单克隆抗体按照免疫标记的方法测定。结果用图 1 表示。虚线表示 Coomassie 染色凝胶的密度扫描, 说明了蛋白质的分布, 实线表示自动照相的密度扫描, 以及说明了单个的 ^{14}C -标记键。用免疫标记法测定的 β -微管蛋白的位置用箭头指明, 并和 ^{14}C -标记蛋白质带重合。

实施例 2: 此实施例说明化合物 1 用于烟草细胞的培养悬浮液时与 β -微管蛋白共价键结合的能力

在按照 Naagata, K. 等人, *Molecular and General Genetics*, vol. 184, pp. 161-165 (1981) 制备的生长介质中, 在旋转震荡器上, 200rpm 的条件下于 27 °C 使烟草细胞的培养悬浮液生长。细胞用浓度为 10 μM 的 ^{14}C -标记的化合物 1 处理 1 小时, 然后过滤收集。在液氮中冷冻该细胞并磨成细粉, 之后在实施例 1 描述的双重凝胶上, 用 SDS-PAGE 方法萃取和分离蛋白质。用实施例 1 描述的方法在一种凝胶上将蛋白质染色, 和用自动放射照相和免疫标记的方法分析第二凝胶。结果用图 2 表示。虚线表示 Coomassie 染色凝胶的密度扫描, 说明了蛋白质的分布, 实线表示自动照相的密度扫描, 以及说明了单个的 ^{14}C -标记键。用免疫标记法测定的 β -微管蛋白的位置用箭头指明, 并和 ^{14}C -标记蛋白质带重合。

实施例 3: 此实施例说明化合物 1 与分离的牛微管蛋白的 β -亚单元以共价键结合的能力

用 Vallee, R. B. 在 *Methods in Enzymology*, vol. 134, pp. 89-104 (1986) 中描述的方法从牛脑中分离微管蛋白。在含有 1mM 氯化镁的 1.0M 谷氨酸钠, pH6.6 的溶液中的微管蛋白 (10 μM) 于 37 °C 和 25 μM 的 ^{14}C -标记化合物 1 一起孵化 4 小时。样品转移至冰浴中 3 分钟, 假如 20% 的三氯乙酸使微管蛋白沉淀, 并在冰中继续孵化 20 分钟。在 12000g 离心 5 分钟后用 80% 冰冷的丙酮洗涤微管蛋白小球, 室温下溶解于 62 mM 含有 3% 十二烷基硫酸钠、5% 巯基乙醇、和 10% 甘油的 Tris-HCl, pH6.8, 缓冲溶液。样品于 100 °C 加热 2 分钟, 然后各等份如实施例所述在双重凝胶上, 用 SDS-

PAGE 方法处理。在一种凝胶上将蛋白质染色，以及用自动放射照相和免疫标记的方法分析第二凝胶，免疫标记法用抗 α -和 β -两种微管蛋白的单克隆抗体进行。结果用图 3 表示。用免疫标记法测定的 α -微管蛋白和 β -微管蛋白的位置用箭头指明。虚线表示 Coomassie 染色凝胶的密度扫描，说明了蛋白质的分布，实线表示自动照相的密度扫描，说明了 β -微管蛋白亚单元的主要的标记物。

实施例 4：此实施例说明不同化学类别的各种抗微管蛋白化合物对化合物 1 与烟草细胞的培养悬浮液的微管蛋白结合的影响

将如实施例 2 所述培养的多份（2ml）烟草细胞的培养悬浮液加入容量为 25ml 的玻璃管形瓶，然后在每个管形瓶中加入 5 μ l DMSO（对照）或 5 μ l 溶于 DMSO 的抗微管蛋白化合物。一边震荡一边把这些管形瓶于 27℃ 孵化 2 小时，然后加入 5 μ l 100 μ M 的氘标记化合物 1 的 DMSO 溶液，一边震荡一边把这些管形瓶于 27℃ 孵化 20 分钟，然后通过加入 5 μ l 未标记的 40mM 化合物 1 使放射性配位体的结合停止。一边震荡一边将样品于 27℃ 再孵化 20 分钟，再转移至放置于冰浴中的、容量为 15ml 的聚丙烯离心管中。每个管形瓶用 2ml 冰冷却的生长介质（如实施例 2 所述）洗涤，把洗涤液加入其余样品中。在 4℃，2500rpm 离心 3 分钟后，弃去上清液，把沉淀的细胞再悬浮于 4ml 冰冷却的 10%三氯乙酸。样品在冰浴中放置 1 小时，再次离心，将细胞再悬浮于 4ml 冰冷却的乙醇。将带有洗涤细胞的过滤器转移至闪烁管形瓶中在每个瓶中加入 10ml Hydrofluor™ 闪烁液（National Diagnostics, Manville, 新泽西州），样品在闪烁计数器计数以测定结合的放射活性。不同的抗微管蛋白化合物对放射性配体结合的影响在表 7 中用存在各种抗微管蛋白化合物时结合的放射性配体的量表示，该量表示为是 DMSO 对照组结合放射性配体量的百分数。paclitaxel 和抗微管蛋白的除草剂戊炔草胺和氯苯胺磷减少放射性配体的结合，而抗微管蛋白除草剂氟乐灵增加放射性配体的结合。

表 7：各种抗微管蛋白化合物对氘化的化合物 1 在用烟草细胞培养悬浮液进行的全细胞结合试验中与微管蛋白结合的影响

抗微管蛋白化 合物	浓 度 (μM)	放射性配体的结合 (%对照)
无 (DMSO 对 照)		100.0
paclitaxel	25	50.3
戊炔草胺	100	68.7
氟乐灵	100	129.0
氯苯胺磷	100	29.1

实施例 5: 此实施例说明 paclitaxel 对化合物 1 与辣椒疫霉的微管蛋白结合的影响

用天冬酰胺-蔗糖介质中的 *P. capsici* 的菌丝体震荡培养物液体体制备用于结合试验的真菌物质的均匀悬浮液。天冬酰胺-蔗糖介质 (100ml) 与由 V-8 琼脂上生长的培养物的生长边缘切下来的菌丝体孢塞一起孵化, 在旋转震荡器上于 26℃ 孵化 48 小时, 培养物在搅拌器中均化, 将 30ml 传代培养的均化物加入 100ml 新鲜的介质, 在旋转震荡器上于 26℃ 再孵化 17 小时。由介质中离心回收得到的菌丝体并再悬浮于 1170ml 新鲜的介质。把等份 (2ml) 的此悬浮液加入容量为 25ml 的玻璃管形瓶, 每个管形瓶中加入 5 μl DMSO (对照) 或 5 μl 溶于 DMSO 的 paclitaxel。一边震荡一边把这些管形瓶于 26℃ 孵化 1 小时, 然后加入 5 μl 100 μM 的氘标记化合物 1 的 DMSO 溶液, 一边震荡一边把这些管形瓶于 26℃ 孵化 20 分钟, 然后通过加入 5 μl 未标记的 40mM 化合物 1 使放射性配位体的结合停止。一边震荡一边将样品于 27℃ 再孵化 20 分钟, 再转移至放置于冰浴中的、容量为 15ml 的聚丙烯离心管中。每个管形瓶用 2ml 冰冷却的介质洗涤, 把洗涤液加入其余样品中。在 4℃, 3400rpm 离心 3 分钟后, 弃去上清液, 把沉淀的细胞再悬浮于 4ml 冰冷却的 10% 三氯乙酸。样品在冰浴中放置 1 小时, 再次离心, 将细胞再悬浮于 4ml 冰冷却的乙醇。在冰浴中再孵化 2 小时之后, 用玻璃纤维过滤器过滤收集细胞, 用 10ml 冰冷却的乙醇洗涤二次。将带有洗涤细胞的过滤器转移至闪烁管形瓶中, 加入 10ml Hydrofluor™ 闪烁液, 样品在

闪烁计数器计数以测定结合的放射活性。paclitaxel 对放射性配体结合的影响在表 8 中说明，其影响用存在 paclitaxel 时结合的放射性配体的量表示，该量表示为是 DMSO 对照组结合放射性配体量的百分数。

表 8: paclitaxel 对氟化的化合物 1 在用辣椒疫霉菌丝体进行的全细胞结合试验中与微管蛋白结合的影响

处理	浓度 (μM)	放射性配体的结合 (%对照)
无 (DMSO 对照)		100.0
paclitaxel	0.004	84.5
paclitaxel	0.02	54.6
paclitaxel	0.1	34.6
paclitaxel	0.5	23.6

实施例 6: 此实施例说明 zarilamide 和表 1 所述化合物 7、8、16、19、23 和 27 对化合物 1 与辣椒疫霉的微管蛋白结合的影响

按下述方法制备 *P. capsici* 的游动孢子: 在 9cm 直径和含有 15ml V-8 琼脂的培氏 (Petri) 板上培育辣椒疫霉的菌丝体塞, 在 25℃, 黑暗中培育 4 天, 然后, 放置于连续的荧光下 3 天以诱导孢子形成。为诱导游动孢子的释放, 在每个板上加入 15ml 无菌水。此板在室温孵化 10 分钟, 接着在 4℃ 孵化 20 分钟, 最后, 再回到室温孵化 15 分钟。然后, 从每个板上取出含有游动孢子的液体, 调节其密度为每毫升含有 5×10^5 个游动孢子。按下述方法制备含有萌芽的游动孢子孢囊的试验管: 在 $16 \times 1.25\text{cm}$ 的聚丙烯管中, 于 400 μl 天冬酰胺-蔗糖介质中加入 100 μl 游动孢子悬浮液, 然后将其松松地覆盖并于 26℃ 下, 在 120rpm 的旋转震荡器上孵化 24 小时。

然后在含有萌芽的游动孢子孢囊的试验管中加入 2.5 μl DMSO (对照) 或 2.5 μl 试验化合物的 DMSO 溶液。每种化合物以一系列的浓度进行试验。

试验管于 26 ℃ 震荡孵化 1 小时, 然后加入 2.5 μ l 40 μ M 的氘标记化合物 1 的 DMSO 溶液, 管形瓶于 26 ℃ 震荡孵化 20 分钟, 然后通过加入 1.5ml 冰冷却的 133mM 未标记的化合物 1 使放射性配位体的结合停止, 把管形瓶转移至冰浴中。接着以 3400rpm 的速度离心 3 分钟, 弃去上清液, 把沉淀的细胞再悬浮于 2ml 冰冷却的 10%三氯乙酸。样品在冰浴中放置 1 小时, 再次离心, 将细胞再悬浮于 2ml 冰冷却的乙醇。在冰浴中再孵化 1 小时之后, 在每个管中再加入 4ml 冰冷却的乙醇, 在 Brandell 细胞收集器 (Brandell Biomedical Research and Development Laboratories, Inc., Gaithersburg, 马里兰州) 中用玻璃纤维过滤器过滤收集细胞, 用 4ml 冰冷却的乙醇洗涤二次。将带有洗涤细胞的过滤器转移至闪烁管形瓶中, 加入 0.1ml 水, 接着再加入 1ml Protosol™ (Dupont NEN Research Products)。将此瓶于 60 ℃ 孵化 30 分钟并冷却至室温。向其中加入 10ml Econofluor™ 闪烁液 (Dupont NEN Research Products), 样品在闪烁计数器计数以测定结合的放射活性。每个化合物的 IC₅₀ 值 (定义为与没有试验化合物的对照组相比, 抑制 50%的放射性配体结合所需的浓度) 由剂量-响应曲线确定并列于表 9。

表 9

化合物	IC ₅₀ (μ g/ml)
zarilamide	7.02
7	0.98
8	0.25
16	1.17
19	0.25
23	0.06
27	1.83

实施例 7：此实施例说明化合物 1 作为探针检测抗微管蛋白化合物对分离

的牛微管蛋白的作用方面的应用

在 0.5ml 的聚乙烯管中, 试验混合物是在含有 1mM 氯化镁的 1.0M 谷氨酸钠, pH6.6 的溶液中含有 10 μ M 分离的微管蛋白, 和 2.5 μ l DMSO (对照) 或 2.5 μ l 溶于 DMSO 的试验化合物。混合物于 37 $^{\circ}$ C 孵化 30 分钟, 然后加入 2.5 μ l 640 μ M 的氚标记化合物 1 的 DMSO 溶液。于 37 $^{\circ}$ C 孵化 120 分钟后, 把等份 (80 μ l) 试验混合物用于 2.3cm 直径的 Whatman 3MM 过滤器纸盘, 将其在热气流中干燥 15 分钟, 浸入 3ml 冰冷的 10%三氯乙酸, 并于 4 $^{\circ}$ C 放置过夜。将盘转移至 5%三氯乙酸 30 分钟, 用另外的 5%三氯乙酸洗涤二次, 在 37 $^{\circ}$ C 于乙醇/乙醚 (1: 1, v/v) 中洗涤 30 分钟, 然后在室温下于乙醇/乙醚 (1: 1, v/v) 中洗涤 30 分钟, 最后于室温进行二次连续的洗涤, 每次 15 分钟。将该盘干燥, 并转移至含有 10ml Hydrofluor™ 的管形瓶和在闪烁计数器计数。最后浓度为 100 μ M 的抗微管蛋白化合物对放射性配体结合的影响见表 10, 此影响用有各种抗微管蛋白化合物存在时结合的放射性配体的量表示, 该量表示为是 DMSO 对照组结合放射性配体量的百分数。

表 10

化合物	结合 (%对照)
秋水仙碱	18.7
鬼臼素	21.7
诺考达唑	31.3
长春花碱	90.7

应该理解的是本说明书只是用于说明而不是限制, 并且, 在不脱离由附后的权利要求书所定义的本发明的精神和范围之内可以做各种改进和变化。

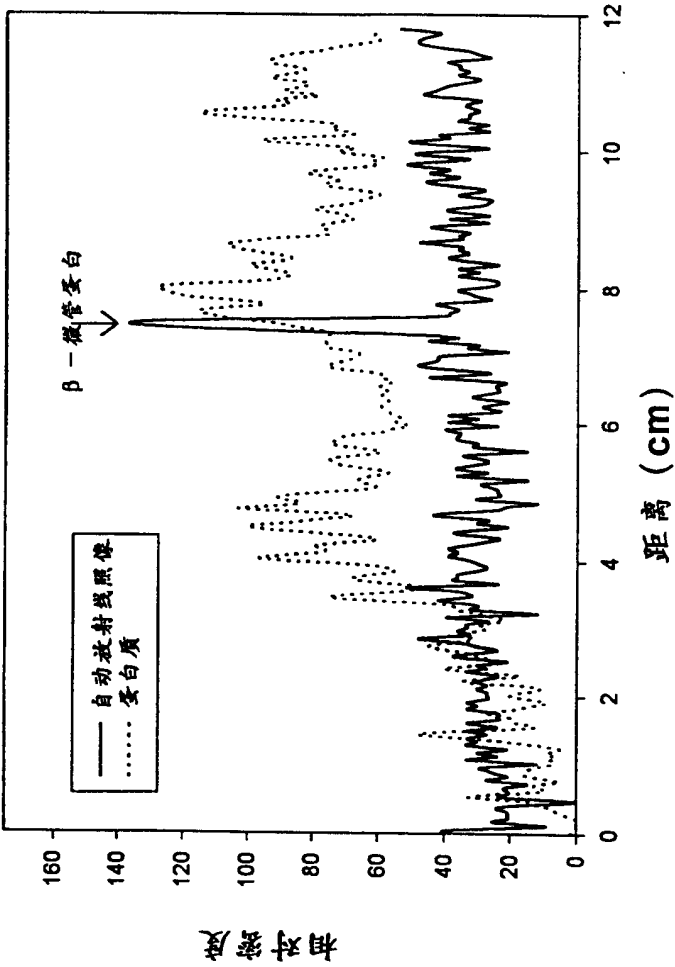


图1.

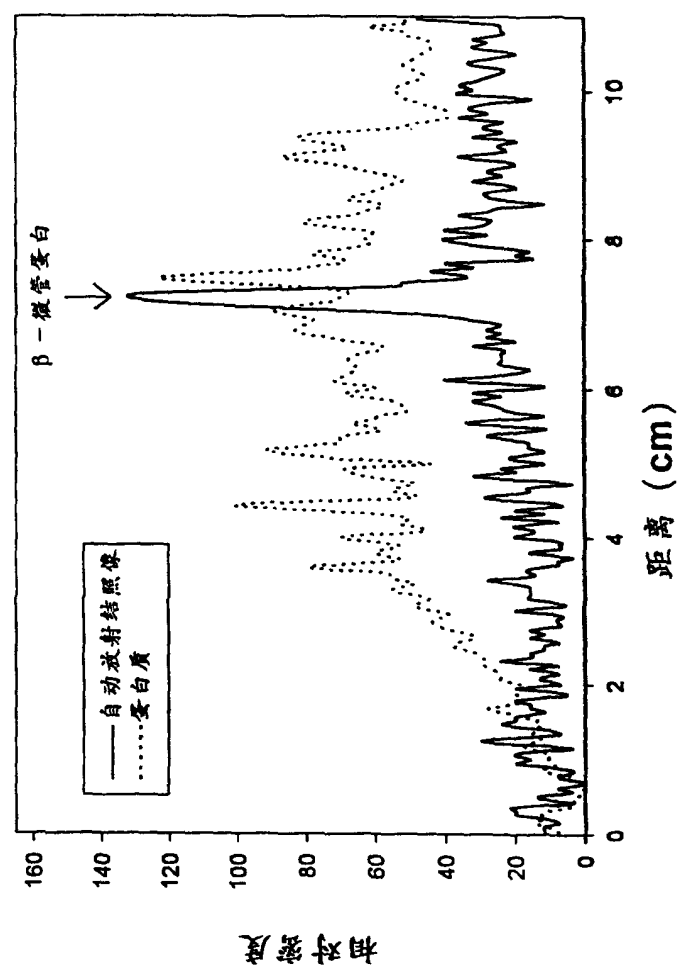


图2.

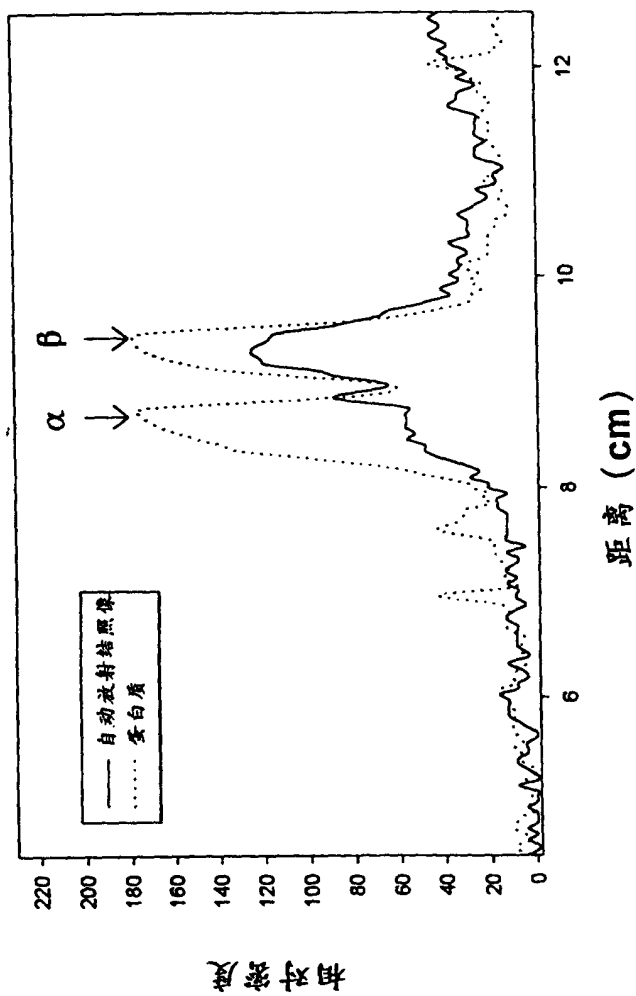


图3.