



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104144919 B

(45)授权公告日 2018.07.03

(21)申请号 201380011625.1

(22)申请日 2013.09.25

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104144919 A

(43)申请公布日 2014.11.12

(66)本国优先权数据

201210363366.6 2012.09.27 CN (续)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.08.29

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2013/084146 2013.09.25

(87)PCT国际申请的公布数据

W02014/048313 ZH 2014.04.03

(73)专利权人 山东营东颖昊生物科技有限公司

地址 264670 山东省烟台市高新区航天路  
101号

(72)发明人 张国营 刘昆 张颖 姚建文

关玉昆 吴彝昊

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 崔锡强

(51)Int.Cl.

C07D 311/74(2006.01) (续)

(56)对比文件

CN 103110621 A, 2013.05.22, 说明书第2-4  
页.

CN 101484430 A, 2009.07.15, 说明书第11-  
12页实施例1.

WO 2009089508 A1, 2009.07.16, 说明书第  
45页实施例12、14.

US 4317774 , 1982.03.02, 说明书第8栏实  
施例8、11-12.

CN 101484430 A, 2009.07.15, 说明书第11-  
12页实施例1.

WO 2009089508 A1, 2009.07.16, 说明书第  
45页实施例12、14.

US 4317774 , 1982.03.02, 说明书第8栏实  
施例8、11-12.

Brett T. Watson et al..Solid Phase  
Synthesis of Substituted Coumarin-3-  
Carboxylic Acids via the Knoevenagel  
Condensation.《Tetrahedron Letters》.1998,  
第39卷(第13期),第6087-6090页.

Brett T. Watson et al..Solid Phase  
Synthesis of Substituted Coumarin-3-  
Carboxylic Acids via the Knoevenagel  
Condensation.《Tetrahedron Letters》.1998,  
第39卷(第13期),第6087-6090页.

吴龙火等.简单香豆素药理作用与构效关系  
研究进展.《医药导报》.2010,第29卷(第4期),第  
498-501页. (续)

审查员 徐建国

权利要求书10页 说明书44页 附图1页

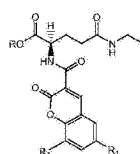
(54)发明名称

茶氨酸衍生物与羧酸香豆素衍生物的缩合  
产物及其中间体、其制备方法和用途

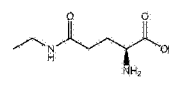
(57)摘要

本发明公开了茶氨酸衍生物与羧酸香豆素  
衍生物的缩合产物式(I)的化合物及其中间体化  
合物式(II)、式(III)的化合物、制备这些化合物  
的方法、包含所述化合物的药物组合物及其在制

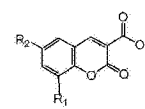
备预防和治疗肿瘤、炎症、心脑血管和免疫缺陷  
疾病的药物中的用途。



(I)



(II)



(III)

[转续页]

[接上页]

(66) 本国优先权数据

201210363367.0 2012.09.27 CN  
201210363369.X 2012.09.27 CN  
201210363378.9 2012.09.27 CN  
201210515826.2 2012.12.06 CN  
201210515827.7 2012.12.06 CN  
201310030234.6 2013.01.28 CN

(51) Int. Cl.

*C07C 229/22*(2006.01)  
*A61K 31/37*(2006.01)  
*A61K 31/223*(2006.01)  
*A61P 35/00*(2006.01)  
*A61P 35/02*(2006.01)  
*A61P 29/00*(2006.01)  
*A61P 9/00*(2006.01)

(56) 对比文件

Mark W. Irvine et al..Coumarin-3-carboxylic acid derivatives as potentiators and inhibitors of recombinant and native N-methyl-D-aspartate receptors.《Neurochemistry International》.2012,第61卷(第4期),第593-600页.

Mark W. Irvine et al..Coumarin-3-carboxylic acid derivatives as potentiators and inhibitors of recombinant and native N-methyl-D-aspartate receptors.《Neurochemistry

International》.2012,第61卷(第4期),第593-600页.

Bhumika Thati et al..In vitro anti-tumour and cyto-selective effects of coumarin-3-carboxylic acid and three of its hydroxylated derivatives, along with their silver-based complexes, using human epithelial carcinoma cell lines.《Cancer Letters》.2006,第248卷(第2期),第321-331页.

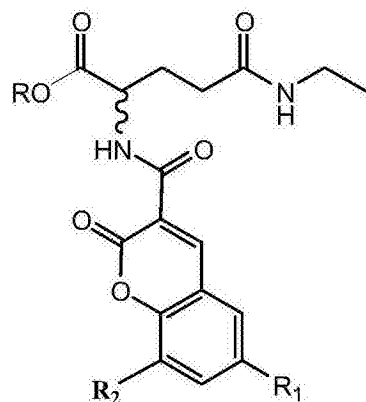
Bhumika Thati et al..In vitro anti-tumour and cyto-selective effects of coumarin-3-carboxylic acid and three of its hydroxylated derivatives, along with their silver-based complexes, using human epithelial carcinoma cell lines.《Cancer Letters》.2006,第248卷(第2期),第321-331页.

郝光等.香豆素类化合物抗肿瘤作用研究进展.《中国中药杂志》.2008,第33卷(第18期),第2016-2019页.

Quan V Vuong et al..L-Theanine: properties, synthesis and isolation from tea.《J Sci Food Agric》.2011,第91卷第1931-1939页.

Daniela Secci et al..Synthesis and selective human monoamine oxidase inhibition of 3-carbonyl, 3-acyl, and 3-carboxyhydrazido coumarin derivatives.《European Journal of Medicinal Chemistry》.2011,第46卷第4846-4852页.

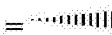
1. 下式 (I) 的化合物:



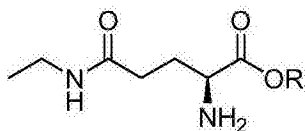
式 (I)

其中,

|      |                                   |                                 |                    |                                                                                                                                                                                  |
|------|-----------------------------------|---------------------------------|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (Ia) | R=CH <sub>3</sub>                 | R <sub>1</sub> =H               | R <sub>2</sub> =H  | <br>=      |
| (Ib) | R=CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =H               | R <sub>2</sub> =H  | <br>=  |
| (Ic) | R=CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =Cl              | R <sub>2</sub> =H  | <br>=  |
| (Id) | R=CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =Br              | R <sub>2</sub> =H  | <br>=  |
| (Ie) | R=CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =F               | R <sub>2</sub> =H  | <br>=  |
| (If) | R=CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =NO <sub>2</sub> | R <sub>2</sub> =H  | <br>=  |
| (Ig) | R=CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =Cl              | R <sub>2</sub> =Cl | <br>=  |
| (Ih) | R=CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =Br              | R <sub>2</sub> =Br |                                                                                             |

|      |                              |                     |                  |                                                                                                                                                                           |
|------|------------------------------|---------------------|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|      |                              |                     |                  | =                                                                                      |
| (II) | $R = \text{CH}_2\text{CH}_3$ | $R_1 = \text{NH}_2$ | $R_2 = \text{H}$ | <br> |

2. 下式 (II) 的化合物:

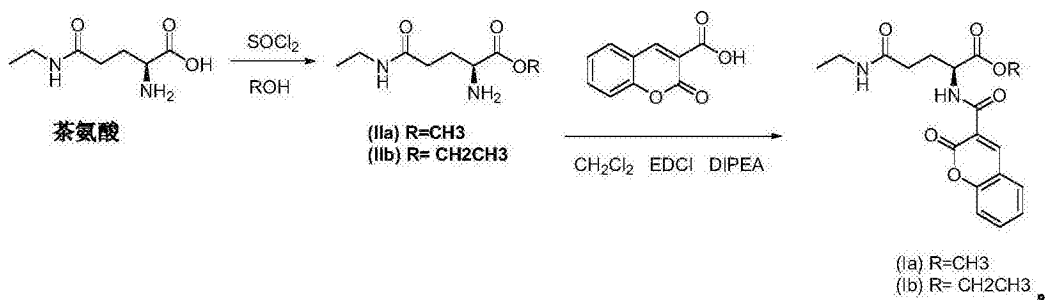


式 (II)

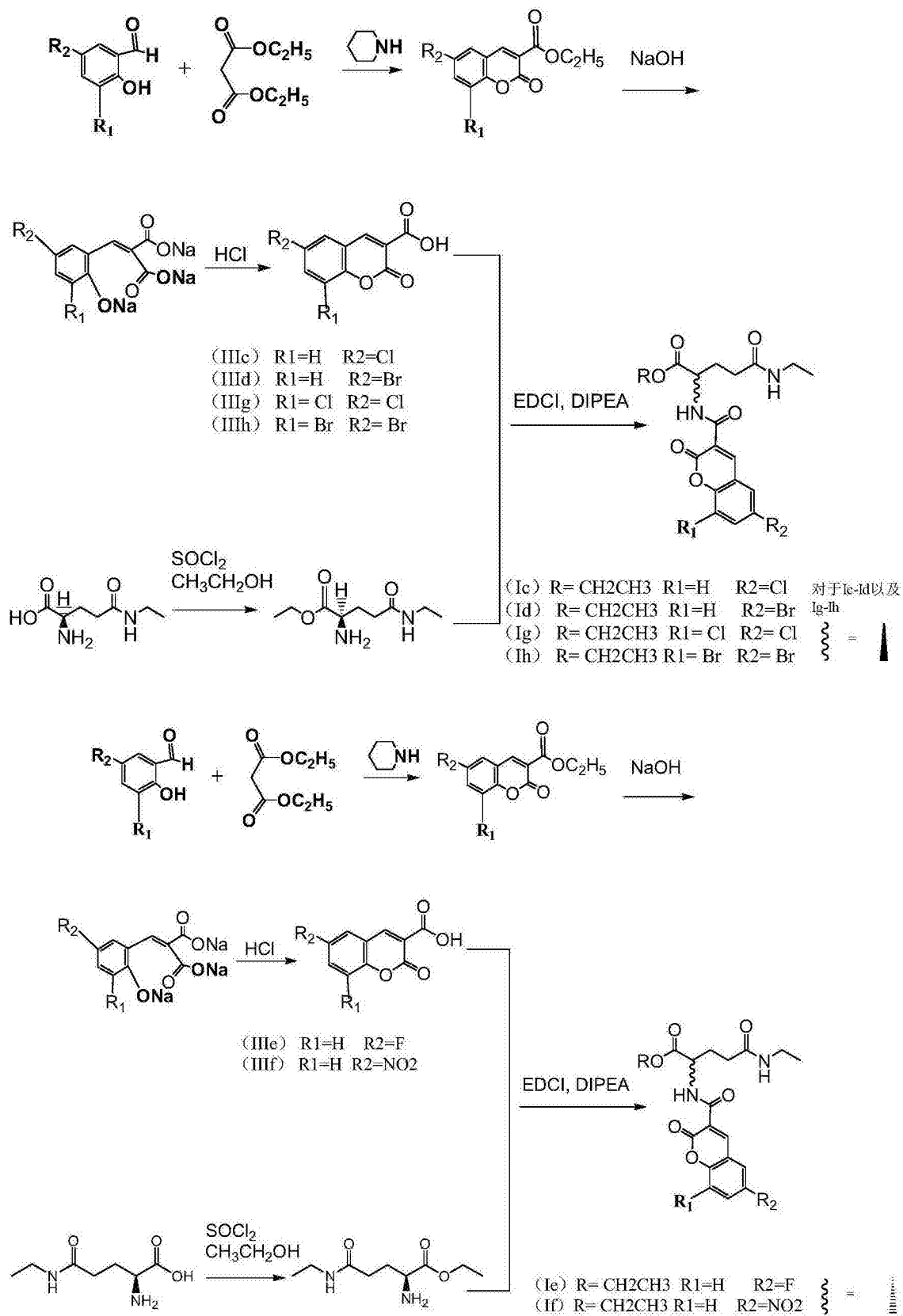
其中,

|       |                              |
|-------|------------------------------|
| (IIb) | $R = \text{CH}_2\text{CH}_3$ |
|-------|------------------------------|

3. 制备化合物 Ia-Ib、化合物 IIb 的方法:



4. 制备化合物 Ic-Ih 的方法:



5. 药物组合物,其包含权利要求1-2任一项中的化合物和任选的药学上接受的赋形剂。

6. 权利要求5所述的药物组合物,所述药物组合物为可吞咽的片剂、胶囊剂、酏剂、悬浮剂、糖浆的形式。

7. 权利要求5所述的药物组合物,所述药物组合物为含片、圆片的形式。

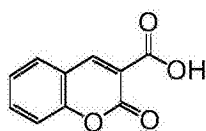
8. 权利要求5所述的药物组合物,所述药物组合物为颊含片剂的形式。

9. 权利要求5所述的药物组合物,所述药物组合物为以下各种药物剂型,所述药物剂型选自脂质体、微球。

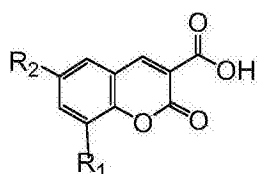
10. 权利要求5所述的药物组合物,所述药物组合物为以下各种药物剂型,所述药物剂型选自乳脂质体和纳米球。

11. 权利要求1-2任一项中的化合物或化合物IIIc、化合物IIId、化合物IIIe、化合物IIIIf、化合物IIIg、化合物IIIh或权利要求5或6或7或8或9或10所述的药物组合物在制备预防和治疗人肺癌、乳腺癌、肝癌、结肠癌、前列腺癌、胃癌、白血病、淋巴瘤、黑色素瘤、宫颈癌、口腔癌、胰腺癌、脑肿瘤、神经瘤的药物中的用途,

以及下式IIIa的化合物或包含式IIIa的化合物和任选的药学上接受的赋形剂的药物组合物在制备预防和治疗人肺癌、乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、胃癌、白血病、淋巴瘤、黑色素瘤、宫颈癌、口腔癌、胰腺癌、脑肿瘤、神经瘤的药物中的用途:



式(IIIa)

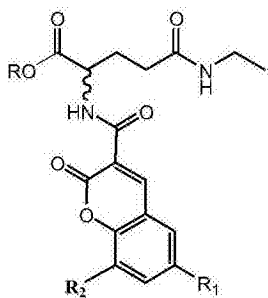


式(III)

其中,

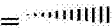
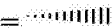
|        |                                 |                    |
|--------|---------------------------------|--------------------|
| (IIIc) | R <sub>1</sub> =Cl              | R <sub>2</sub> =H  |
| (IIId) | R <sub>1</sub> =Br              | R <sub>2</sub> =H  |
| (IIIe) | R <sub>1</sub> =F               | R <sub>2</sub> =H  |
| (IIIf) | R <sub>1</sub> =NO <sub>2</sub> | R <sub>2</sub> =H  |
| (IIIg) | R <sub>1</sub> =Cl              | R <sub>2</sub> =Cl |
| (IIIh) | R <sub>1</sub> =Br              | R <sub>2</sub> =Br |

12. 权利要求1中的化合物Ia、Ib、Ic、Id、Ie、If、Ig、Ih或权利要求5或6或7或8或9或10所述的包含化合物Ia、Ib、Ic、Id、Ie、If、Ig、Ih和任选的药学上接受的赋形剂的药物组合物在制备组蛋白转甲基酶EZH2抑制剂中的用途:

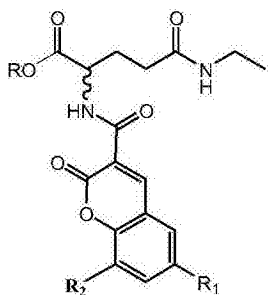


式 (I)

其中,

|      |                |              |            |                                                                                                                                                                                |
|------|----------------|--------------|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (Ia) | $R = CH_3$     | $R_1 = H$    | $R_2 = H$  | <br>     |
| (Ib) | $R = CH_2CH_3$ | $R_1 = H$    | $R_2 = H$  | <br>     |
| (Ic) | $R = CH_2CH_3$ | $R_1 = Cl$   | $R_2 = H$  | <br>   |
| (Id) | $R = CH_2CH_3$ | $R_1 = Br$   | $R_2 = H$  | <br> |
| (Ie) | $R = CH_2CH_3$ | $R_1 = F$    | $R_2 = H$  | <br> |
| (If) | $R = CH_2CH_3$ | $R_1 = NO_2$ | $R_2 = H$  | <br> |
| (Ig) | $R = CH_2CH_3$ | $R_1 = Cl$   | $R_2 = Cl$ | <br> |
| (Ih) | $R = CH_2CH_3$ | $R_1 = Br$   | $R_2 = Br$ | <br> |

13. 权利要求1中的化合物Ia、Ib、Ic、Id、Ie、If、Ig、Ih或权利要求5或6或7或8或9或10所述的包含化合物Ia、Ib、Ic、Id、Ie、If、Ig、Ih和任选的药学上接受的赋形剂的药物组合物在制备组蛋白脱乙酰酶抑制剂中的用途:



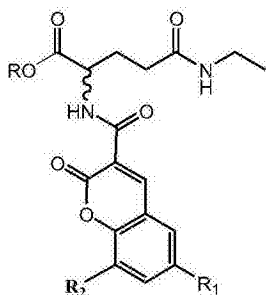
式 (I)

其中,

|      |                                    |                                 |                    |      |
|------|------------------------------------|---------------------------------|--------------------|------|
| (Ia) | R= CH <sub>3</sub>                 | R <sub>1</sub> =H               | R <sub>2</sub> =H  | <br> |
| (Ib) | R= CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =H               | R <sub>2</sub> =H  | <br> |
| (Ic) | R= CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =Cl              | R <sub>2</sub> =H  | <br> |
| (Id) | R= CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =Br              | R <sub>2</sub> =H  | <br> |
| (Ie) | R= CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =F               | R <sub>2</sub> =H  | <br> |
| (If) | R= CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =NO <sub>2</sub> | R <sub>2</sub> =H  | <br> |
| (Ig) | R= CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =Cl              | R <sub>2</sub> =Cl | <br> |
| (Ih) | R= CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =Br              | R <sub>2</sub> =Br | <br> |

14. 权利要求1中的化合物Ia、Ib、Ic、Id、Ie、If、Ig、Ih或权利要求5或6或7或8或9或10所述的包含化合物Ia、Ib、Ic、Id、Ie、If、Ig、Ih和任选的药学上接受的赋形剂的药物组合物在制备促肿瘤、炎症和心脑血管病及免疫缺陷病疾病相关的因子NF-κB抑制剂中的用途:



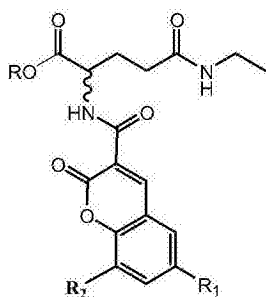


式 (I)

其中,

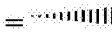
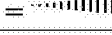
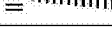
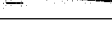
|      |                                    |                                 |                    |      |
|------|------------------------------------|---------------------------------|--------------------|------|
| (Ia) | R= CH <sub>3</sub>                 | R <sub>1</sub> =H               | R <sub>2</sub> =H  | <br> |
| (Ib) | R= CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =H               | R <sub>2</sub> =H  |      |
|      |                                    |                                 |                    |      |
| (Ic) | R= CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =Cl              | R <sub>2</sub> =H  | <br> |
| (Id) | R= CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =Br              | R <sub>2</sub> =H  | <br> |
| (Ie) | R= CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =F               | R <sub>2</sub> =H  | <br> |
| (If) | R= CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =NO <sub>2</sub> | R <sub>2</sub> =H  | <br> |
| (Ig) | R= CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =Cl              | R <sub>2</sub> =Cl | <br> |
| (Ih) | R= CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =Br              | R <sub>2</sub> =Br | <br> |

15. 权利要求1中的化合物Ia、Ib、Ic、Id、Ie、If、Ig、Ih或权利要求5或6或7或8或9或10所述的包含化合物Ia、Ib、Ic、Id、Ie、If、Ig、Ih和任选的药学上接受的赋形剂的药物组合物在制备下调促肿瘤、炎症和心脑血管病及免疫缺陷病疾病相关的因子VEGFR, EGFR, c-Met, K-Ras, H-Ras, Akt, Cyclin D1,  $\beta$ -catenin, ER- $\alpha$ , MMP-9, MMP-2, Dvl-1, Dvl-2, Dvl-3和Bcl-2蛋白水平和上调Bax, p53, p21, E-cadherin, Caspase3及胞浆细胞色素C蛋白水平的药物中的用途:

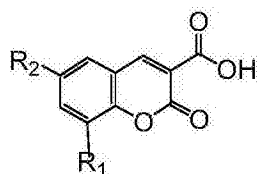


式 (I)

其中,

|      |                                    |                                 |                    |                                                                                                                                                                                |
|------|------------------------------------|---------------------------------|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (Ia) | R= CH <sub>3</sub>                 | R <sub>1</sub> =H               | R <sub>2</sub> =H  | <br>=      |
| (Ib) | R= CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =H               | R <sub>2</sub> =H  | <br>=      |
| (Ic) | R= CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =Cl              | R <sub>2</sub> =H  | <br>=     |
| (Id) | R= CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =Br              | R <sub>2</sub> =H  | <br>=  |
| (Ie) | R= CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =F               | R <sub>2</sub> =H  | <br>=  |
| (If) | R= CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =NO <sub>2</sub> | R <sub>2</sub> =H  | <br>=  |
| (Ig) | R= CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =Cl              | R <sub>2</sub> =Cl | <br>=  |
| (Ih) | R= CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =Br              | R <sub>2</sub> =Br | <br>=  |

16. 权利要求1-2任一项中的化合物或化合物IIIc、化合物IIId、化合物IIIe、化合物IIIIf、化合物IIIg、化合物IIIh或权利要求5或6或7或8或9或10所述的药物组合物与化疗药物联合在制备用于协同放疗、配合放疗、化疗和手术治疗以及热疗、综合治疗肿瘤的药物中的用途,其中所述肿瘤选自人肺癌、乳腺癌、肝癌、结肠癌、前列腺癌、胃癌、白血病、淋巴瘤、黑色素瘤、宫颈癌、口腔癌、胰腺癌、脑肿瘤、神经瘤:



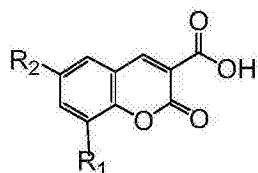
式(III)

其中,

|         |                                 |                    |
|---------|---------------------------------|--------------------|
| (IIIc)  | R <sub>1</sub> =Cl              | R <sub>2</sub> =H  |
| (III d) | R <sub>1</sub> =Br              | R <sub>2</sub> =H  |
| (III e) | R <sub>1</sub> =F               | R <sub>2</sub> =H  |
| (III f) | R <sub>1</sub> =NO <sub>2</sub> | R <sub>2</sub> =H  |
| (III g) | R <sub>1</sub> =Cl              | R <sub>2</sub> =Cl |
| (III h) | R <sub>1</sub> =Br              | R <sub>2</sub> =Br |

17. 根据权利要求14—15中任一项所述的用途,其中所述肿瘤包括人肺癌、乳腺癌、肝癌、结肠癌、前列腺癌、胃癌、白血病、淋巴瘤、黑色素瘤、宫颈癌、口腔癌、胰腺癌、脑肿瘤、神经瘤。

18. 权利要求1—2任一项中的化合物或化合物IIIc、化合物III d、化合物III e、化合物III f、化合物III g、化合物III h或权利要求5或6或7或8或9或10所述的药物组合物在制备对于人肿瘤阻挡防护的产品中的应用,其中所述肿瘤选自人肺癌、乳腺癌、肝癌、结肠癌、前列腺癌、胃癌、白血病、淋巴瘤、黑色素瘤、宫颈癌、口腔癌、胰腺癌、脑肿瘤、神经瘤:



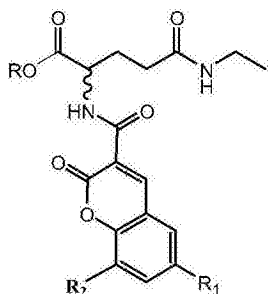
式(III)

其中,

|         |                                 |                    |
|---------|---------------------------------|--------------------|
| (IIIc)  | R <sub>1</sub> =Cl              | R <sub>2</sub> =H  |
| (III d) | R <sub>1</sub> =Br              | R <sub>2</sub> =H  |
| (III e) | R <sub>1</sub> =F               | R <sub>2</sub> =H  |
| (III f) | R <sub>1</sub> =NO <sub>2</sub> | R <sub>2</sub> =H  |
| (III g) | R <sub>1</sub> =Cl              | R <sub>2</sub> =Cl |

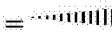
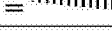
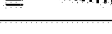
|        |          |          |
|--------|----------|----------|
| (IIIh) | $R_1=Br$ | $R_2=Br$ |
|--------|----------|----------|

19. 权利要求1中的化合物Ia、Ib、Ic、Id、Ie、If、Ig、Ih或权利要求5或6或7或8或9或10所述的包含化合物Ia、Ib、Ic、Id、Ie、If、Ig、Ih和任选的药学上接受的赋形剂的药物组合物在制备对于炎症和心脑血管病及免疫缺陷病疾病阻挡防护和临床诊断荧光标志及日用品荧光标志的产品中的应用:



式 (I)

其中,

|      |              |            |          |                                                                                                                                                                                |
|------|--------------|------------|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (Ia) | $R=CH_3$     | $R_1=H$    | $R_2=H$  | <br>=    |
| (Ib) | $R=CH_2CH_3$ | $R_1=H$    | $R_2=H$  | <br>=  |
| (Ic) | $R=CH_2CH_3$ | $R_1=Cl$   | $R_2=H$  | <br>=  |
| (Id) | $R=CH_2CH_3$ | $R_1=Br$   | $R_2=H$  | <br>=  |
| (Ie) | $R=CH_2CH_3$ | $R_1=F$    | $R_2=H$  | <br>=  |
| (If) | $R=CH_2CH_3$ | $R_1=NO_2$ | $R_2=H$  | <br>=  |
| (Ig) | $R=CH_2CH_3$ | $R_1=Cl$   | $R_2=Cl$ | <br>=  |
| (Ih) | $R=CH_2CH_3$ | $R_1=Br$   | $R_2=Br$ | <br>=  |
|      |              |            |          |                                                                                            |

## 茶氨酸衍生物与羧酸香豆素衍生物的缩合产物及其中间体、 其制备方法和用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医疗技术领域,具体涉及茶氨酸衍生物与羧酸香豆素衍生物的缩合产物式(I)的化合物及其中间体化合物式(II)、式(III)的化合物、制备这些化合物的方法、包含所述化合物的药物组合物及其在制备预防和治疗肿瘤、炎症、心脑血管和免疫缺陷等疾病的药物中的用途。

### 背景技术

[0002] 人肺癌、乳腺癌、结直肠癌、前列腺癌、肝癌、胰腺癌、淋巴瘤和黑色素瘤等恶性肿瘤的非正常生长、侵袭和转移是导致每年数以万计患者死亡的重要原因,其发病也保持一定的水平,已经成为严重危害人类健康的重大疾病。由于临床化疗和放疗的毒副作用,限制了对其有效的防治。茶氨酸(又名谷氨酰乙胺)为茶叶中一种表明其品质优劣的特征性氨基酸,由于是无毒副作用的食品成分,使其成为无限制用量的食品添加剂,得以广泛用于食品工业;研究表明:茶氨酸能够增高抗癌药物在肿瘤中的浓度而协同增效治疗人卵巢癌(Sadzuki et al., Toxicol Lett. 123:159-67, 2001)。我们先前的实验证明茶氨酸有抑制肝癌和肺癌的作用(Liu, et al., Cytotechnology 59:211-217, 2009; Zhang et al. Biosci Biotechnol Biochem. 2002, 66 (4):711-6.)。本发明将茶氨酸通过化学方法形成了一类新的茶氨酸衍生物与羧酸香豆素衍生物的缩合产物及其中间体化合物,其抗肿瘤活性超过抗癌药物和茶氨酸。

[0003] 组蛋白转甲基酶EZH2抑制剂和蛋白脱乙酰酶(HDAC)抑制剂如SAHA(suberoylanilide hydroxamic acid), valproic acid, 和sodium butyrate等已经在美国进行了I期或II期血液和实体肿瘤临床试验,EZH2和HDAC在多种人的癌症包括乳腺癌、肺癌、前列腺癌、白血病、胰腺癌、宫颈癌、肠癌和肝癌等恶性肿瘤中过度表达,美国对其作用抗癌药物靶点进行了大量的研究,这些EZH2抑制剂和HDAC抑制剂被广泛应用于各种肿瘤疾病的治疗中,被认为是应用前景较好的潜在的新型抗癌药物(Yamaguchi et al., Cancer Sci., 10:355-62, 2010; Denis, et al., Clin Exp Metastasis 25:183-189, 2008; Kelly et al., Nat Clin Pract Oncol 2:150-157, 2005; Martinez-Iglesias et al., Clin Transl Oncol. 10:395-8, 2008)。

[0004] 核蛋白因子NF- $\kappa$ B被认为是促进多种肿瘤和炎症及心脑血管、免疫缺陷病等疾病的蛋白因子,正成为防治这类疾病的重要药物靶点(Ishii et al., J Clin Biochem Nutr. 50:91-105, 2012)。

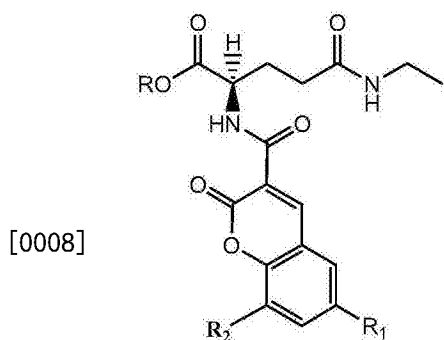
[0005] 高水平的受体VEGFR、EGFR和c-Met、ER- $\alpha$ 非正常高表达的肿瘤信号传导相关的蛋白因子K-Ras, H-Ras, Akt, Cyclin D1, MMP-9, MMP-2, Dvl-1, Dvl-2, Dvl-3,  $\beta$ -catenin和Bcl-2与多种肿瘤发生和恶化发展相关,而上调肿瘤抑制蛋白p53, p21, E-cadherin, Caspase3, Bax和胞浆细胞色素C水平显示了对多种癌细胞生长、侵袭和(或)转移的抑制作用(Cengel, et al., Neoplasia 9:341-8, 2007; Huang et al., Biochem Pharmacol. 77:

794-803, 2009; Prasad et al., Oncology. 73:112-7, 2007), 因此, 这些癌症相关因子成为潜在的防治癌症的重要药物靶点, 能够有效地影响这些蛋白因子表达水平和活性的化合物具有广泛防治癌症的应用前景。

[0006] 本发明提供的茶氨酸衍生物与羧酸香豆素衍生物的缩合产物式 (I) 的化合物及其中间体化合物式 (II)、式 (III) 的化合物具有显著的影响上述一系列蛋白因子的水平和活性, 在制备预防和治疗肿瘤、炎症、心脑血管疾病和免疫缺陷病等疾病抑制剂的应用中有广阔的前景。

## 发明内容

[0007] 本发明的一个目的是提供下式 (I) 的化合物及其中间体化合物式 (II)、式 (III) 的化合物:

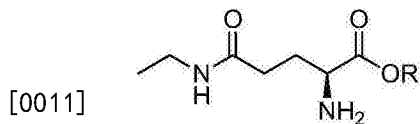


式 (I)

[0009] 其中,

[0010]

|      |                                   |                                 |                    |
|------|-----------------------------------|---------------------------------|--------------------|
| (Ia) | R=CH <sub>3</sub>                 | R <sub>1</sub> =H               | R <sub>2</sub> =H  |
| (Ib) | R=CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =H               | R <sub>2</sub> =H  |
| (Ic) | R=CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =Cl              | R <sub>2</sub> =H  |
| (Id) | R=CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =Br              | R <sub>2</sub> =H  |
| (Ie) | R=CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =F               | R <sub>2</sub> =H  |
| (If) | R=CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =NO <sub>2</sub> | R <sub>2</sub> =H  |
| (Ig) | R=CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =Cl              | R <sub>2</sub> =Cl |
| (Ih) | R=CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =Br              | R <sub>2</sub> =Br |
| (Ii) | R=CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =NH <sub>2</sub> | R <sub>2</sub> =H  |



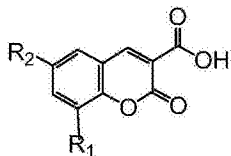
式 (II)

[0012] 其中,

[0013]

|       |                              |
|-------|------------------------------|
| (IIa) | $R = \text{CH}_3$            |
| (IIb) | $R = \text{CH}_2\text{CH}_3$ |

[0014]



式(III)

[0015] 其中,

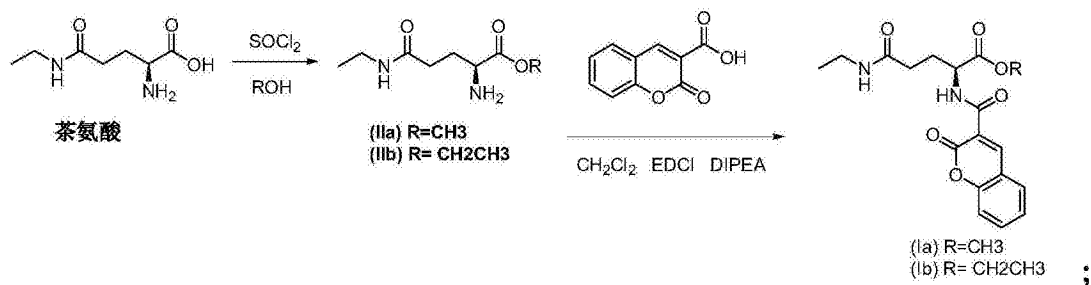
[0016]

|        |                     |                   |
|--------|---------------------|-------------------|
| (IIIc) | $R_1 = \text{Cl}$   | $R_2 = \text{H}$  |
| (IIId) | $R_1 = \text{Br}$   | $R_2 = \text{H}$  |
| (IIIe) | $R_1 = \text{F}$    | $R_2 = \text{H}$  |
| (IIIf) | $R_1 = \text{NO}_2$ | $R_2 = \text{H}$  |
| (IIIg) | $R_1 = \text{Cl}$   | $R_2 = \text{Cl}$ |
| (IIIh) | $R_1 = \text{Br}$   | $R_2 = \text{Br}$ |

[0017] 本发明的另一个目的是提供制备本发明化合物的方法:

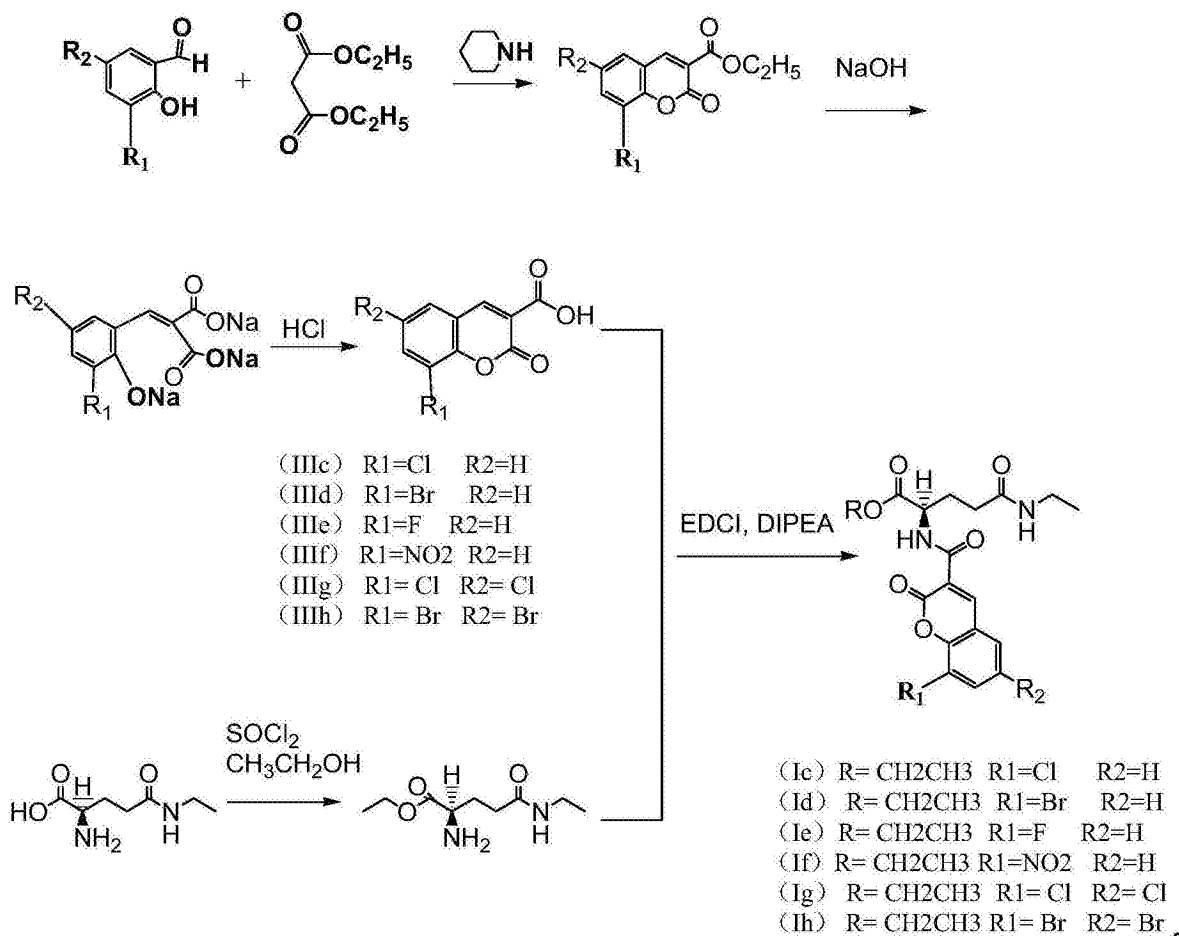
[0018] 1) 制备上述化合物Ia-Ib、IIa-IIb的方法,

[0019]



[0020] 2) 制备上述化合物Ic-Ih、IIIc-IIIh的方法,

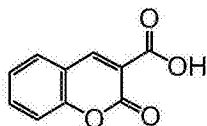
[0021]



[0022] 3) 制备上述化合物Ii的方法:在还原条件下,可以容易地将化合物If还原为化合物Ii。

[0023] 本发明的另一个目的是提供包含本发明化合物的药物组合物,所述药物组合物包括至少一种本发明化合物,和任选的药学上可以接受的赋形剂。

[0024] 本发明的另一个目的是提供本发明化合物或下式IIIa的化合物或包含本发明化合物或式IIIa的化合物的药物组合物在制备药物、特别是预防和治疗人肝癌、乳腺癌、肺癌、结直肠癌、前列腺癌、胰腺癌、淋巴瘤和黑色素瘤等肿瘤的药物中的用途。相应地,本发明提供预防和治疗人肝癌、乳腺癌、肺癌、结直肠癌、前列腺癌、胰腺癌、淋巴瘤和黑色素瘤等肿瘤的方法,包括给予需要治疗的患者治疗有效量的至少一种上述本发明的化合物或式IIIa的化合物或包含本发明化合物或式IIIa的化合物的药物组合物:



[0025]

式(IIIa)

[0026] 本发明还涉及用于预防和治疗人肝癌、乳腺癌、肺癌、结直肠癌、前列腺癌、胰腺癌、淋巴瘤和黑色素瘤等肿瘤的本发明的化合物或式IIIa的化合物或包含本发明化合物或



式IIIa的化合物的药物组合物。

[0027] 本发明的另一个目的是提供本发明化合物或式IIIa的化合物或包含本发明化合物或式IIIa的化合物的药物组合物在制备组蛋白转甲基酶EZH2抑制剂中的用途、在制备组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 抑制剂中的用途、在制备促肿瘤、炎症和心脑血管病及免疫缺陷等疾病相关的因子NF- $\kappa$ B抑制剂中的用途、在制备肿瘤、炎症和心脑血管病及免疫缺陷等疾病相关的因子VEGFR, EGFR, c-Met, ER- $\alpha$ , K-Ras, H-Ras, Akt, Cyclin D1, MMP-9, MMP-2, Dvl-1, Dvl-2, Dvl-3,  $\beta$ -catenin, Bcl-2抑制剂和上调Bax, p53, p21, E-cadherin, Caspase3, 胞浆与线粒体细胞色素C之比激活剂中的用途。相应地, 本发明提供抑制组蛋白转甲基酶EZH2的方法、抑制组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 的方法、抑制促肿瘤、炎症和心脑血管病及免疫缺陷等疾病相关的因子NF- $\kappa$ B的方法、抑制肿瘤、炎症和心脑血管病及免疫缺陷等疾病相关的因子VEGFR, EGFR, c-Met, ER- $\alpha$ , K-Ras, H-Ras, Akt, Cyclin D1, MMP-9, MMP-2, Dvl-1, Dvl-2, Dvl-3,  $\beta$ -catenin, Bcl-2和上调Bax, p53, p21, E-cadherin, Caspase3, 胞浆与线粒体细胞色素C之比激活剂的方法。

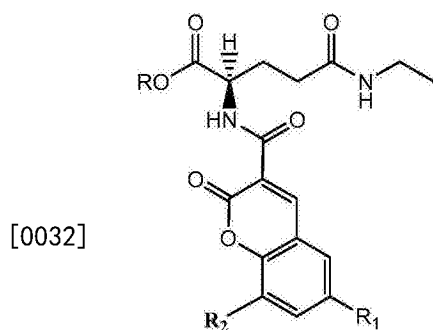
[0028] 本发明还涉及用于抑制组蛋白转甲基酶EZH2剂的方法、抑制组蛋白脱乙酰酶 (HDAC)、抑制促肿瘤、炎症和心脑血管病及免疫缺陷等疾病相关的因子NF- $\kappa$ B、抑制肿瘤、炎症和心脑血管病及免疫缺陷等疾病相关的因子VEGFR, EGFR, c-Met, ER- $\alpha$ , K-Ras, H-Ras, Akt, Cyclin D1, MMP-9, MMP-2, Dvl-1, Dvl-2, Dvl-3,  $\beta$ -catenin, Bcl-2和上调Bax, p53, p21, E-cadherin, Caspase3, 胞浆与线粒体细胞色素C之比激活剂的本发明的化合物。

[0029] 附图简述

[0030] 图1提供了实施例1—7获得的化合物Ia—Ih在动物体内外可以检测的荧光显像。

## 具体实施方式

[0031] 本发明的一个目的是提供下式 (I) 的化合物及其中间体化合物式 (II)、式 (III) 的化合物:



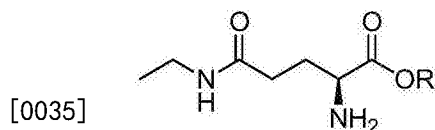
式 (I)

[0033] 其中,

[0034]

|      |                                   |                    |                   |
|------|-----------------------------------|--------------------|-------------------|
| (Ia) | R=CH <sub>3</sub>                 | R <sub>1</sub> =H  | R <sub>2</sub> =H |
| (Ib) | R=CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =H  | R <sub>2</sub> =H |
| (Ic) | R=CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =Cl | R <sub>2</sub> =H |

|      |                                   |                                 |                    |
|------|-----------------------------------|---------------------------------|--------------------|
| (Id) | R=CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =Br              | R <sub>2</sub> =H  |
| (Ie) | R=CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =F               | R <sub>2</sub> =H  |
| (If) | R=CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =NO <sub>2</sub> | R <sub>2</sub> =H  |
| (Ig) | R=CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =Cl              | R <sub>2</sub> =Cl |
| (Ih) | R=CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =Br              | R <sub>2</sub> =Br |
| (Ii) | R=CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | R <sub>1</sub> =NH <sub>2</sub> | R <sub>2</sub> =H  |

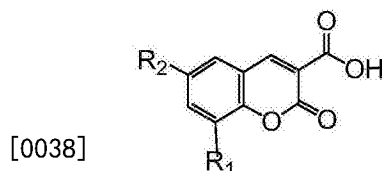


式(II)

[0036] 其中,

[0037]

|       |                                   |
|-------|-----------------------------------|
| (IIa) | R=CH <sub>3</sub>                 |
| (IIb) | R=CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> |



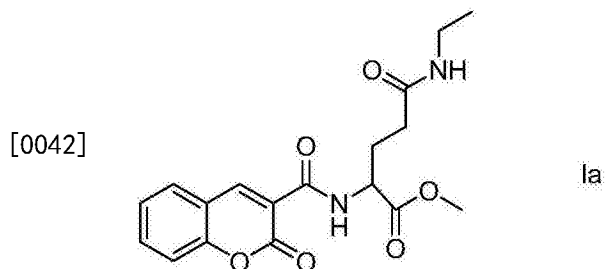
式(III)

[0039] 其中,

[0040]

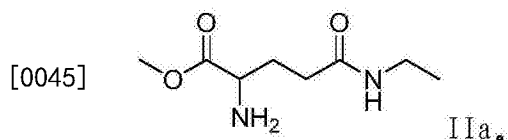
|        |                                 |                    |
|--------|---------------------------------|--------------------|
| (IIIc) | R <sub>1</sub> =Cl              | R <sub>2</sub> =H  |
| (IIId) | R <sub>1</sub> =Br              | R <sub>2</sub> =H  |
| (IIIe) | R <sub>1</sub> =F               | R <sub>2</sub> =H  |
| (IIIf) | R <sub>1</sub> =NO <sub>2</sub> | R <sub>2</sub> =H  |
| (IIIg) | R <sub>1</sub> =Cl              | R <sub>2</sub> =Cl |
| (IIIh) | R <sub>1</sub> =Br              | R <sub>2</sub> =Br |

[0041] 具体地,化合物Ia名称为5-乙氨基-5-氧代-2-(2-氧代-2H-苯并吡喃-3-甲酰胺基)戊酸甲酯,简称茶甲香酸(TMC),具有下式所示的化学结构式:

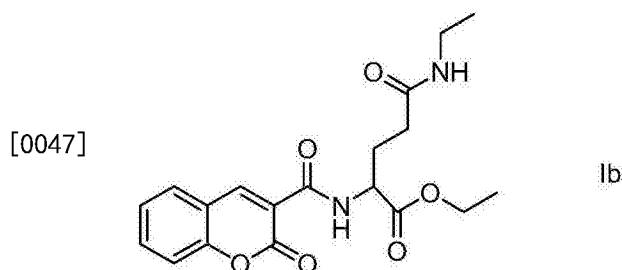


[0043] 其物理性状为白色粉末状固体,熔点在摄氏154°以上分解。

[0044] 中间体茶氨酸甲酯IIa如下面结构式所示;

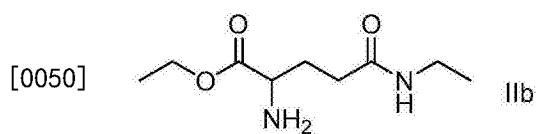


[0046] 化合物Ib名称为5-乙氨基-5-氧代-2-(2-氧代-2H-苯并吡喃-3-甲酰胺基)戊酸乙酯,简称茶乙香酸(TEC),具有下式所示的化学结构式:

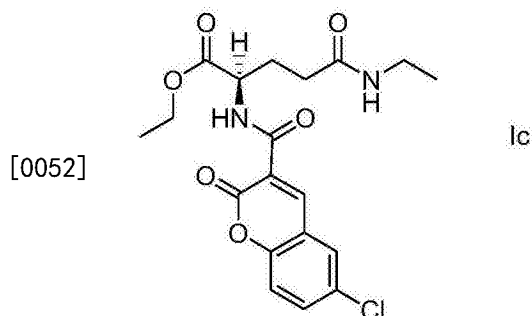


[0048] 其物理性状为白色粉末状固体,熔点在摄氏180°以上分解。

[0049] 中间体茶氨酸乙酯IIb的制备,如下面结构式所示:

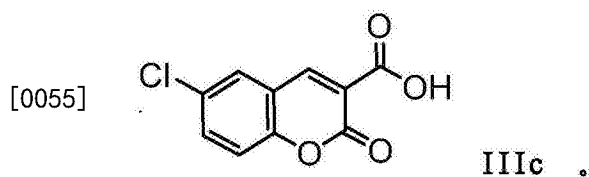


[0051] 化合物Ic名称为(R)-乙酯-2-(6-Cl-2-O-2H-苯并吡喃-3-羧基)-5-(乙氨基)-5-氧代戊酸酯,简称茶氨酸氯香酰胺(TC1C),具有下式所示的化学结构式:

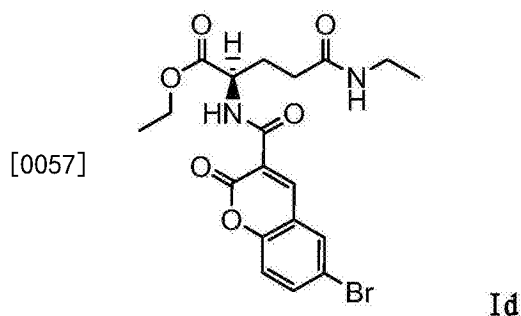


[0053] 该化合物的物理性状为淡黄色粉末状固体,熔点在摄氏242°以上分解。

[0054] 中间体6-氯香豆素-3-羧酸的制备,如下式所示:

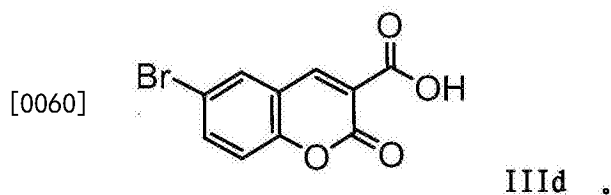


[0056] 化合物Id名称为(R)-乙酯-2-(6-Br-2-O-2H-苯并吡喃-3-羧基)-5-(乙氨基)-5-氧代戊酸酯,简称茶氨酸溴香酰胺(TBrC),具有下式所示的化学结构式:

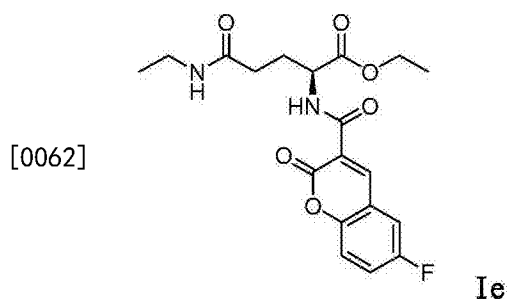


[0058] 该化合物的物理性状为淡黄色粉末状固体,熔点在摄氏211°以上分解。

[0059] 中间体6-溴香豆素-3-羧酸IIIId,如下式所示:

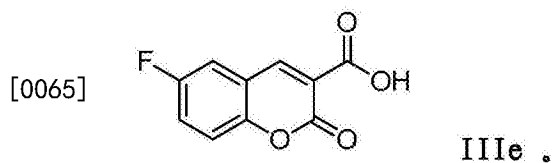


[0061] 化合物Ie名称为(R)-乙酯-2-(6-F-2-O-2H-苯并吡喃-3-羧基)-5-(乙氨基)-5-氧代戊酸酯,简称茶氨酸氟香酰胺(TFC),具有下式所示的化学结构式:

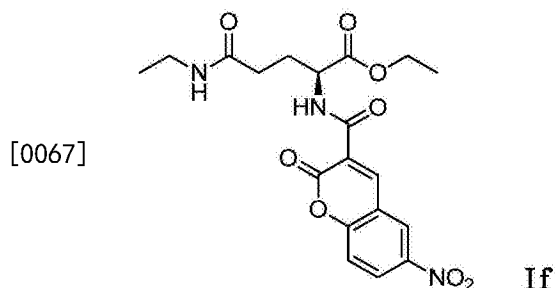


[0063] 该化合物的物理性状为淡黄色粉末状固体,熔点在摄氏65°以上分解。

[0064] 中间体6-氟香豆素-3-羧酸IIIIf的制备,如下式所示:

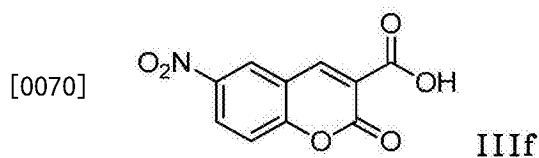


[0066] 化合物If名称为(R)-乙酯-2-(6-NO<sub>2</sub>-2-O-2H-苯并吡喃-3-羧基)-5-(乙氨基)-5-氧代戊酸酯,简称茶氨酸硝香酰胺(TNC),具有下式所示的化学结构式:

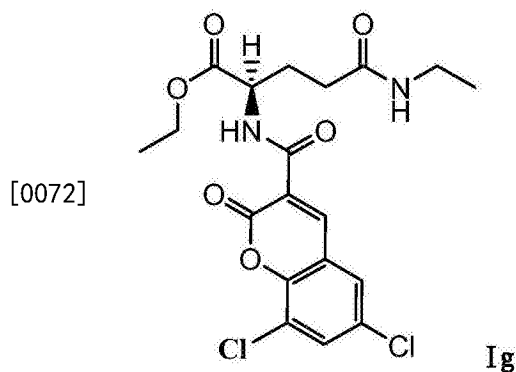


[0068] 该化合物的物理性状为淡黄色粉末状固体,熔点在摄氏300°以上分解。

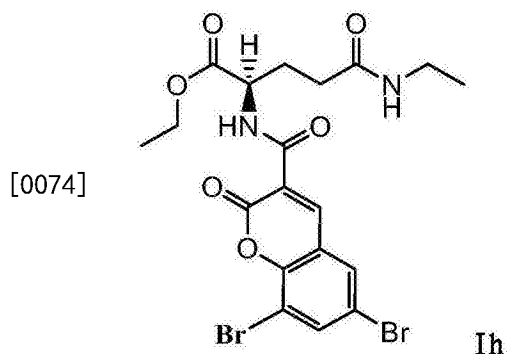
[0069] 中间体6-硝基香豆素-3-羧酸IIIIf的制备,如下式所示:



[0071] 化合物Ig名称为(R)-乙酯-2-(6,8-二氯-2-氧代-2H-苯并吡喃-3-甲酰胺基)-5-(乙氨基)-5-氧代戊酸酯,简称茶双氯香酰胺(DTC1C),具有下式所示的化学结构式:

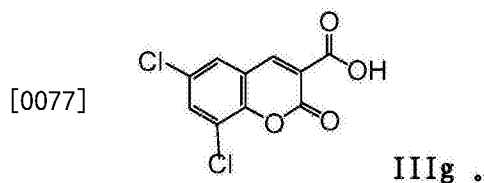


[0073] 化合物Ih名称为(R)-乙酯-2-(6,8-二溴-2-氧代-2H-苯并吡喃-3-甲酰胺基)-5-(乙氨基)-5-氧代戊酸酯,简称茶双溴香酰胺(DTBrC),具有下式所示的化学结构式:

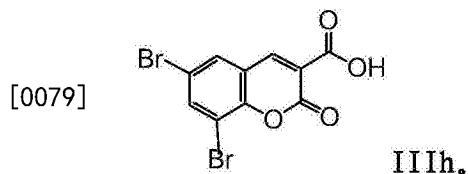


[0075] 上述化合物Ig和Ih的物理性状为均淡黄色粉末状固体,熔点分别在摄氏136°和121°以上分解。

[0076] 中间体6,8-二氯-香豆素-3-羧酸IIIIg如下式所示:

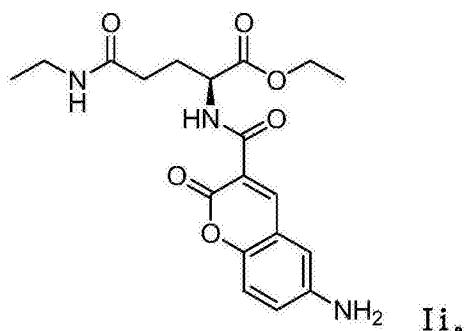


[0078] 中间体6,8-二溴-香豆素-3-羧酸IIIHh如下式所示:



[0080] 化合物Ii名称为(R)-乙酯-2-(6-NH<sub>2</sub>-0-2H-苯并吡喃-3-羧基)-5-(乙氨基)-5-氧代戊酸酯,具有下式所示的化学结构式:

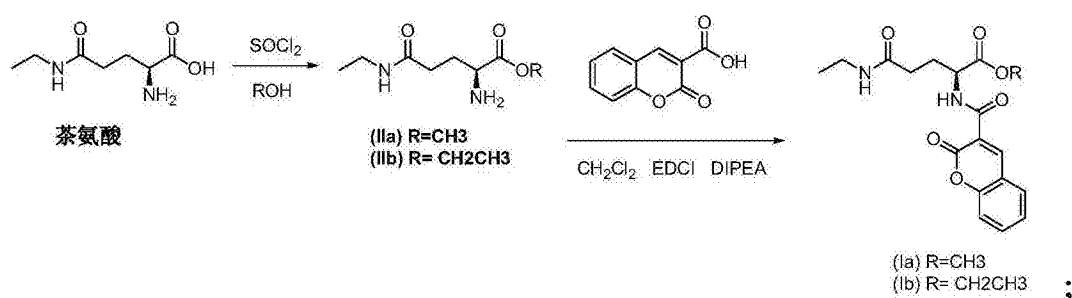
[0081]



[0082] 本发明的另一个目的是提供制备本发明化合物的方法:

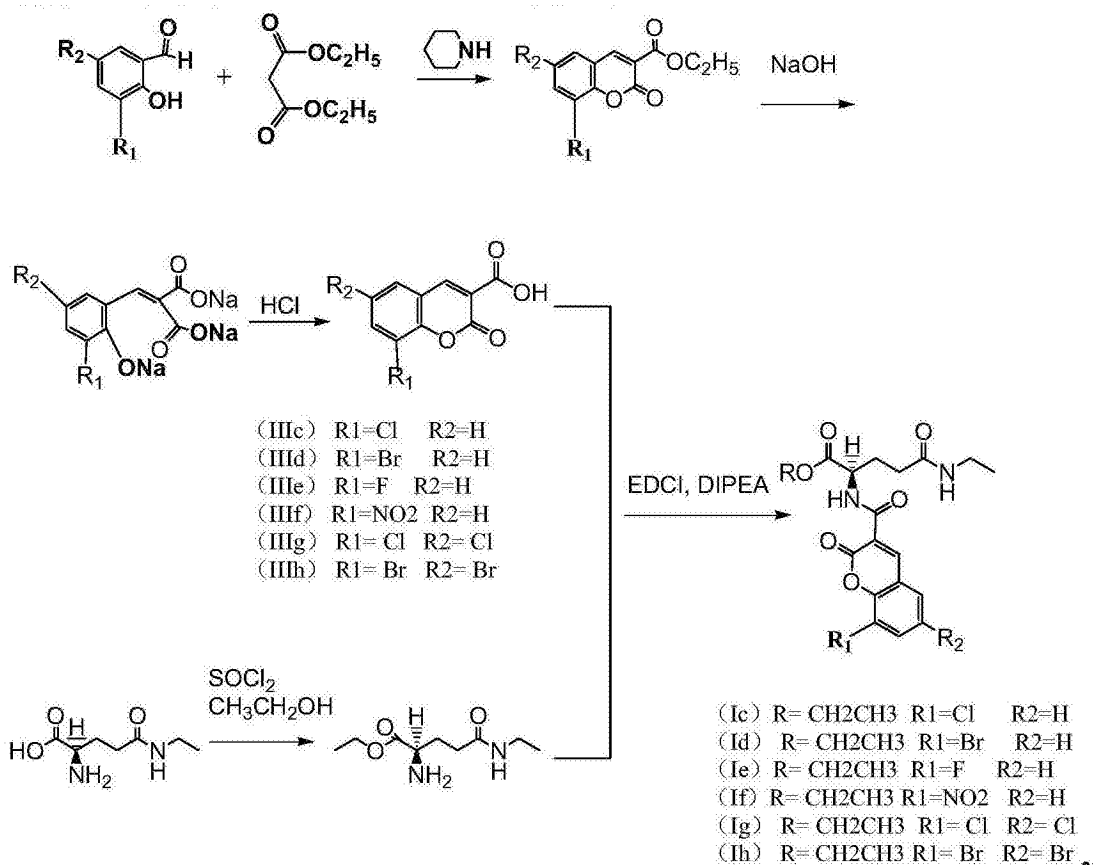
[0083] 1) 制备上述化合物Ia-Ib、IIa-IIb的方法,

[0084]



[0085] 2) 制备上述化合物Ic-Ih、IIIc-IIIh的方法,

[0086]



[0087] 3) 制备上述化合物Ii的方法:在还原条件下,可以容易地将化合物If还原为化合物Ii。

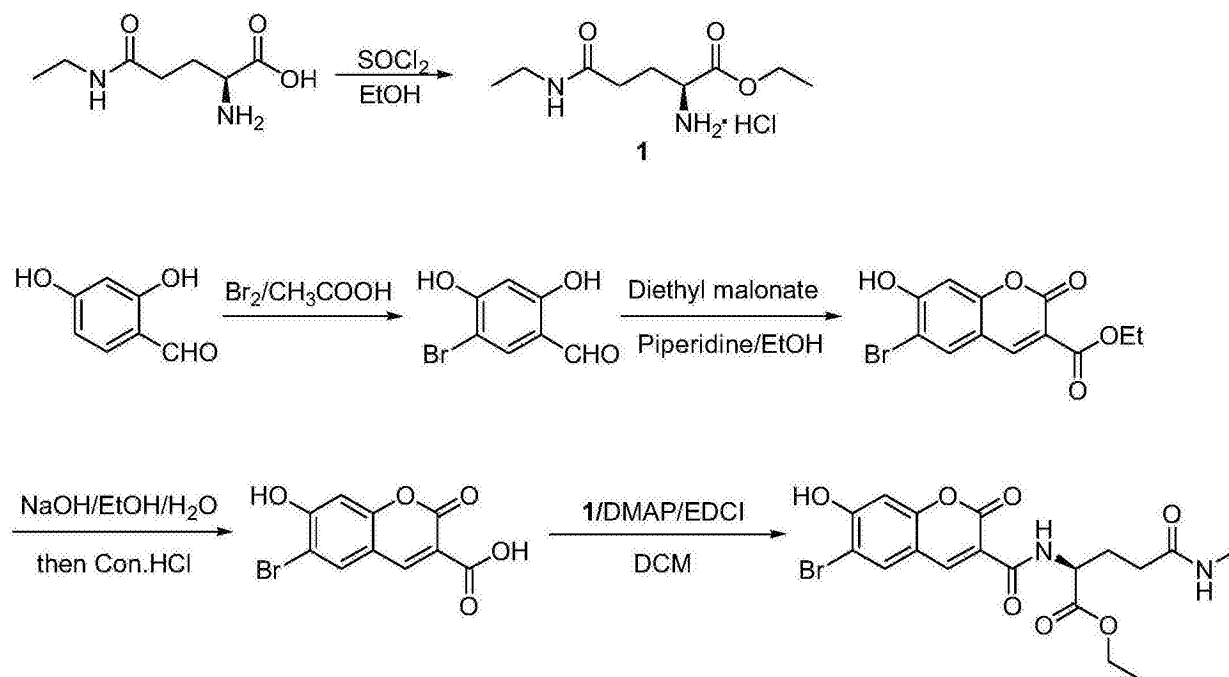
[0088] 本发明还提供了包含上述本发明化合物的药物组合物。本发明提供了这样的药物

组合物,其包含至少一种如上所述的本发明的化合物,和任选的药理学上可以接受的赋形剂。

[0089] 如本文所使用,除非另外说明,术语“前药”是指可以在生物学条件(体外或体内)下水解、氧化或进行其他反应以提供本发明的化合物的衍生物。前药仅在生物学条件下经过该反应成为活性化合物,或者它们在它们不反应的形式中具有活性。通常可以使用公知的方法制备前药,例如1Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery (1995) 172-178, 949-982 (Manfred E. Wolff编,第5版)中描述的那些方法。

[0090] 通过化学修饰成为前药如以下方式:在如下香豆素衍生物的7位羟基或茶氨酸衍生物氨基、烷基、羰基上接单糖如葡萄糖或维生素C、丙二醇等糖、醇类化合物化学修饰成为本发明化合物的前药,这类修饰形成的糖苷键、脂键、酰胺键等在体内可分解为本发明的活性化合物结构发挥生物活性。

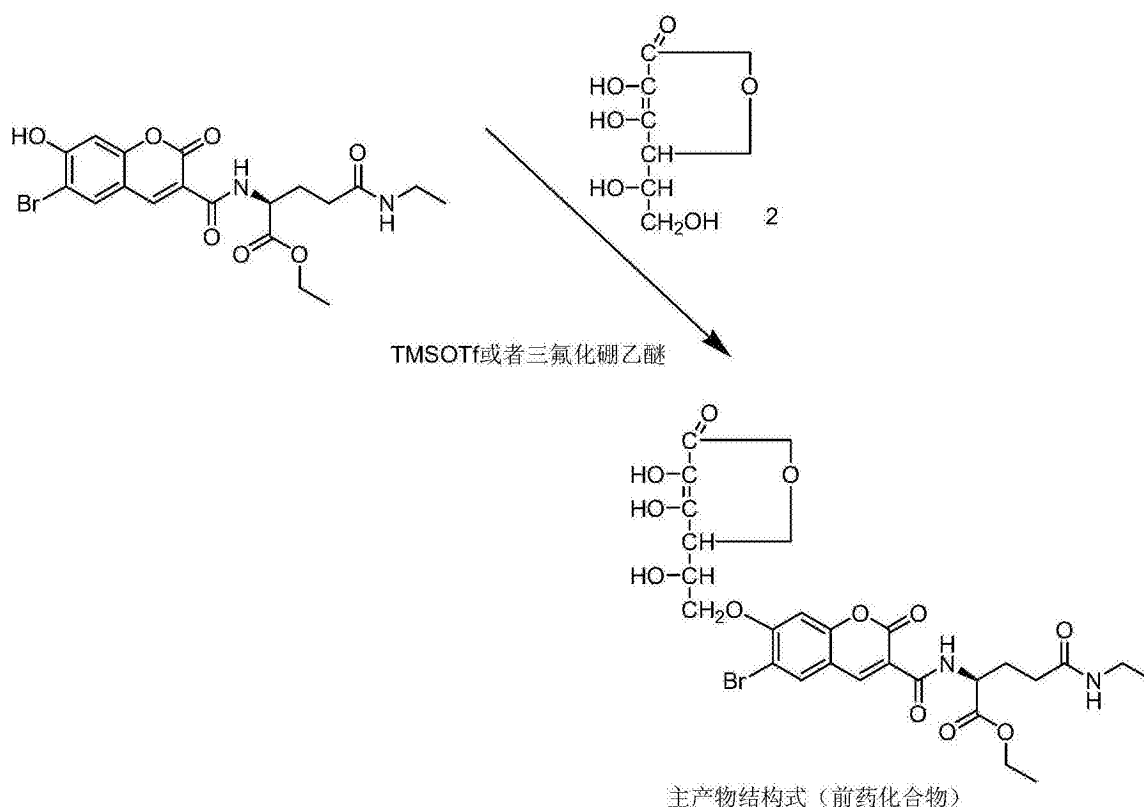
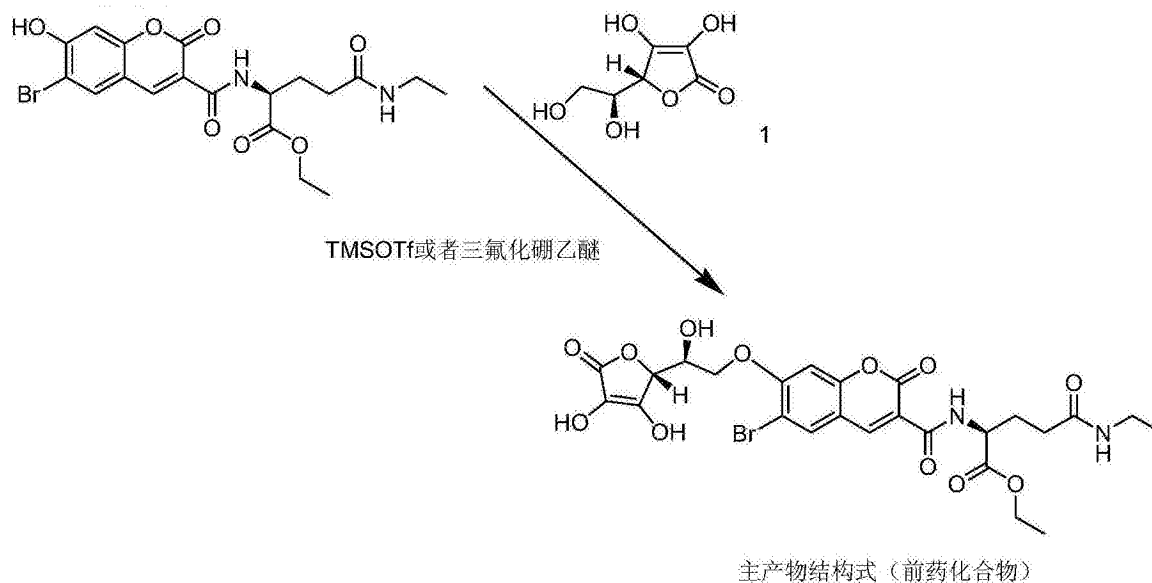
[0091]



[0092] 类似地,可以在本发明的式Ia、Ib、Ic、Id、Ie、If、Ig、Ih和Ii的化合物上引入羟基或类似的基团。

[0093] 进一步地,在上述的7位羟基或其他任何可能引入羟基的位置(例如,5位羟基或茶氨酸直链上可能的位置)上接单糖,比如葡萄糖、维生素C、丙二醇等糖、醇类化合物等任何可能的修饰成分化学修饰成为本发明化合物的前药,这类修饰形成的糖苷键、脂键、酰胺键等在体内可分解为本发明的活性化合物结构或本发明物为主体(或基本)结构发挥生物活性。

[0094]



[0095] 制备各种含有一定量的活性成分的药物组合物的方法是已知的,或根据本发明的公开内容对于本领域技术人员是显而易见的。如REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Martin, E.W., ed., Mack Publishing Company, 19th ed. (1995) 所述, 制备所述药物组合物的方法包括掺入适当的药学赋形剂、载体、稀释剂等。

[0096] 以已知的方法制造本发明的药物制剂, 包括常规的混合、溶解或冻干方法。本发明



的化合物可以制成药物组合物,并向患者以适于选定的施用方式的各种途径施用,例如,口服或肠胃外(通过静脉内、肌内、局部或皮下途径、鼻腔等部位喷雾、药片粘贴等)。

[0097] 因此,本发明的化合物结合药学上可以接受的载体(如惰性稀释剂或可同化的可食用的载体)可以全身施用,例如,口服。它们可以封闭在硬或软壳的明胶胶囊中,可以压为片剂。对于口服治疗施用,活性化合物可以结合一种或多种赋形剂,并以可吞咽的片剂、颊含片剂、含片、胶囊剂、酏剂、悬浮剂、糖浆、圆片等的形式使用。这种组合物和制剂应该包含至少0.1%的活性化合物。这种组合物和制剂的比例当然可以变化,可以占给定的单位剂型重量的大约1%至大约99%。在这种治疗有用的组合物中,活性化合物的量使得能够获得有效剂量水平。

[0098] 片剂、含片、丸剂、胶囊剂等也可以包含:粘合剂,如黄蓍胶、阿拉伯胶、玉米淀粉或明胶;赋形剂,如磷酸氢二钙;崩解剂,如玉米淀粉、马铃薯淀粉、藻酸等;润滑剂,如硬脂酸镁;和甜味剂,如蔗糖、果糖、乳糖或阿司帕坦;或调味剂,如薄荷、冬青油或樱桃香味。当单位剂型是胶囊时,除了上面类型的材料,它还可以包含液体载体,如植物油或聚乙二醇。各种其他材料可以存在,作为包衣,或以其他方式改变固体单位剂型的物理形式。例如,片剂、丸剂或胶囊剂可以用明胶、蜡、虫胶或糖等包衣。糖浆或酏剂可以包含活性化合物,蔗糖或果糖作为甜味剂,对羟苯甲酸甲酯或对羟苯甲酸丙酯作为防腐剂,染料和调味剂(如樱桃香料或桔子香料)。当然,用于制备任何单位剂型的任何材料应该是药学上可以接受的且以应用的量基本上无毒。此外,活性化合物可以掺入缓释制剂和缓释装置中。

[0099] 活性化合物也可以通过输注或注射来静脉内或腹膜内施用。可以制备活性化合物或其盐的水溶液,任选地混和无毒的表面活性剂。也可以制备在甘油、液体聚乙二醇、甘油三乙酸酯及其混合物以及油中的分散剂。在普通的储存和使用条件下,这些制剂包含防腐剂以防止微生物生长。

[0100] 适于注射或输注的药物剂型可以包括包含适于无菌的可注射或可输注的溶液或分散剂的即时制剂的活性成分(任选封装在脂质体中)的无菌水溶液或分散剂或无菌粉末。在所有情况下,最终的剂型在生产和储存条件下必须是无菌的、液体的和稳定的。液体载体可以是溶剂或液体分散介质,包括,例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)、植物油、无毒的甘油酯及其合适的混合物。可以维持合适的流动性,例如,通过脂质体的形成,通过在分散剂的情况下维持所需的粒子大小,或通过表面活性剂的使用。可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂(如对羟苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等)产生预防微生物的作用。在许多情况下,优选包括等渗剂,如糖、缓冲剂或氯化钠。通过使用延缓吸收剂的组合物(例如,单硬脂酸铝和明胶)可以产生可注射的组合物延长吸收。

[0101] 通过将合适的溶剂中的需要量的活性化合物与需要的上面列举的各种其他成分结合,然后进行过滤灭菌,制备无菌可注射溶液。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,这会产生活性成分加上任何另外需要的以前无菌过滤溶液中存在的成分的粉末。

[0102] 有用的固体载体包括粉碎的固体(如滑石、粘土、微晶纤维素、二氧化硅、氧化铝等)。有用的液体载体包括水、乙醇或乙二醇或水-乙醇/乙二醇混合物,本发明的化合物可以任选在无毒的表面活性剂的帮助下以有效含量溶解或分散在其中。可以加入佐剂(如香味)和另外的抗微生物剂来优化对于给定用途的性质。

[0103] 增稠剂(如合成的聚合物、脂肪酸、脂肪酸盐和酯、脂肪醇、改性纤维素或改性无机材料)也可和液体载体用于形成可涂覆的糊剂、凝胶、软膏、肥皂等,直接用于使用者的皮肤上。

[0104] 化合物的治疗需要量,不仅取决于选择的特定的盐,而且取决于施药方式、待治疗的疾病的本质和患者的年龄和状态,最终取决于在场医师或临床医生的决定。

[0105] 上述制剂可以以单位剂型存在,该单位剂型是含有单位剂量的物理分散单元,适于向人体和其它哺乳动物体给药。单位剂型可以是胶囊或片剂,或是很多胶囊或片剂。根据所涉及的具体治疗,活性成分的单位剂量的量可以在大约1到大约2000毫克或更多之间进行变化或调整。

[0106] 此外,还包括各种药物新剂型如乳脂质体、微球和纳米球的应用,如使用微粒分散体系包括聚合物胶束(polymeric micelles)、纳米乳(nanoemulsion)、亚微乳(submicroemulsions)、微囊(microcapsule)、微球(microsphere)、脂质体(liposomes)和类脂囊泡(niosomes)(又称非离子表面活性剂囊泡)等制备的药剂。

[0107] 本发明还提供本发明的化合物或式IIIa的化合物或包含本发明化合物或式IIIa的化合物的组合物在制备药物、特别是预防和治疗人肝癌、乳腺癌、胰腺癌、肺癌、结直肠癌、前列腺癌、淋巴瘤和黑色素瘤等肿瘤的药物中的用途。相应地,本发明提供预防和治疗人肝癌、乳腺癌、胰腺癌、肺癌、结直肠癌、前列腺癌、淋巴瘤和黑色素瘤等肿瘤的方法,包括给予需要治疗的患者治疗有效量的至少一种本发明的化合物或式IIIa的化合物或包含本发明化合物或式IIIa的化合物的组合物。

[0108] 本发明还涉及用于预防和治疗人肝癌、肺癌、乳腺癌、结直肠癌、前列腺癌、胰腺癌、淋巴瘤和黑色素瘤等肿瘤的本发明的化合物或式IIIa的化合物或包含本发明化合物或式IIIa的化合物的组合物。

[0109] 本发明的另一个目的是提供本发明化合物或式IIIa的化合物或包含本发明化合物或式IIIa的化合物的药物组合物在制备组蛋白转甲基酶EZH2抑制剂中的用途、在制备组蛋白脱乙酰酶(HDAC)抑制剂中的用途、在制备促肿瘤、炎症和心脑血管病及免疫缺陷等疾病相关的因子NF- $\kappa$ B抑制剂中的用途、在制备肿瘤、炎症和心脑血管病及免疫缺陷等疾病相关的因子VEGFR,EGFR,c-Met,ER- $\alpha$ ,K-Ras,H-Ras,Akt,Cyclin D1,MMP-9,MMP-2,Dvl-1,Dvl-2,Dvl-3, $\beta$ -catenin,Bcl-2/Bax抑制剂和上调p53,p21,E-cadherin,Caspase3,胞浆与线粒体细胞色素C之比激活剂中的用途。相应地,本发明提供抑制组蛋白转甲基酶EZH2的方法、抑制组蛋白脱乙酰酶(HDAC)的方法、抑制促肿瘤、炎症和心脑血管病及免疫缺陷等疾病相关的因子NF- $\kappa$ B的方法、抑制肿瘤、炎症和心脑血管病及免疫缺陷等疾病相关的因子VEGFR,EGFR,c-Met,ER- $\alpha$ ,K-Ras,H-Ras,Akt,Cyclin D1, $\beta$ -catenin,MMP-9,MMP-2,Dvl-1,Dvl-2,Dvl-3,Bcl-2和上调Bax,p53,p21,E-cadherin,Caspase3,胞浆与线粒体细胞色素C之比激活剂的方法。

[0110] 本发明还涉及用于抑制组蛋白转甲基酶EZH2剂的方法、抑制组蛋白脱乙酰酶(HDAC)、抑制促肿瘤、炎症和心脑血管病及免疫缺陷等疾病相关的因子NF- $\kappa$ B、抑制肿瘤、炎症和心脑血管病及免疫缺陷等疾病相关的因子VEGFR,EGFR,c-Met,ER- $\alpha$ ,K-Ras,H-Ras,Akt,Cyclin D1, $\beta$ -catenin,MMP-9,MMP-2,Dvl-1,Dvl-2,Dvl-3,Bcl-2/Bax和上调p53,p21,E-cadherin,Caspase3,胞浆与线粒体细胞色素C之比激活剂的本发明的化合物。

[0111] 本发明的化合物,可用于协同放疗、化疗、手术和热疗等药物联合治疗肿瘤,在制备用于配合放疗、化疗、手术和热疗等肿瘤药物中的用途。

[0112] 本发明的化合物在能够有效地杀伤肿瘤细胞、能够增强放疗和化疗药物治疗肿瘤的疗效,本化合物抑制肿瘤的药效超过抗癌药物和茶氨酸,而且,毒副作用大大降低,无明显毒副作用。

[0113] 所述肿瘤包括肺癌、乳腺癌、肝癌、直肠癌、结肠癌、前列腺癌、胃癌、食道癌、脑和神经性肿瘤、喉癌、白血病、淋巴瘤、黑色素瘤、子宫癌、视网膜肿瘤、卵巢癌、皮肤癌、支气管癌、细支气管癌、尿道癌、肾癌、口腔癌、阴道癌、胆管癌、胰腺癌、膀胱癌、鼻咽癌以及其它各种肿瘤。

[0114] 本发明提出的化合物能够整合化疗和增效放疗为一体的功效,是具有应用更广泛、疗效更好、毒副作用更小、适应症更广、潜在的应用价值和市场效益更大的新型抗肿瘤药物。

[0115] 本发明所得到的化合物以及其中间体可以通过肌肉、皮下、静脉和腹腔注射或口服,对多种人癌和动物癌细胞和对动物人癌移植瘤的治疗均优于茶氨酸和临床一些抗癌药物如长春新碱、柔红霉素、环磷酰胺和恩度等。

[0116] 本发明所得到的化合物以及其中间体可以通过如下方式发挥其荧光特性的应用功能。关于其荧光特性用途:1、荧光标签作用:用于一切在黑暗中指示和装饰、照明标识、装饰、玩具、道具、日常用品特别荧光标识、节能灯、霓虹灯、黑暗服饰如衣服帽鞋、手套、背包、器具的位置标识和安全状态等。2、用于环境条件变化的指示标识,如:当环境pH值、O<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub>、Na、Ca、NO<sub>3</sub>,氧化还原状态等改变引起荧光颜色发生改变而预测环境变化、食品品质正常与否等指示功能(如:向本化合物荧光探针溶液中加入Ca<sup>2+</sup>时探针在450nm左右的荧光强度急剧增加;当应用香豆素类阴离子荧光探针,这类探针能在水溶液中选择性的识别HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>等)。还可以用于实验研究和应用作为分子探针,如在医疗卫生方面:当用本发明标识细胞或药物或成分,它可显示在细胞或体内的位置、细胞在体内迁移的位置、结合的靶点如蛋白、酶、受体等,从而发挥诊断预测和评估的作用。

[0117] 在下列实施例中,将更加具体地解释本发明。但应理解,下列实施例旨在说明本发明而不对本发明的范围构成任何限制。

[0118] 以下实施例中所用的化学原料均为商购获得或通过本领域熟知的合成方法获得。

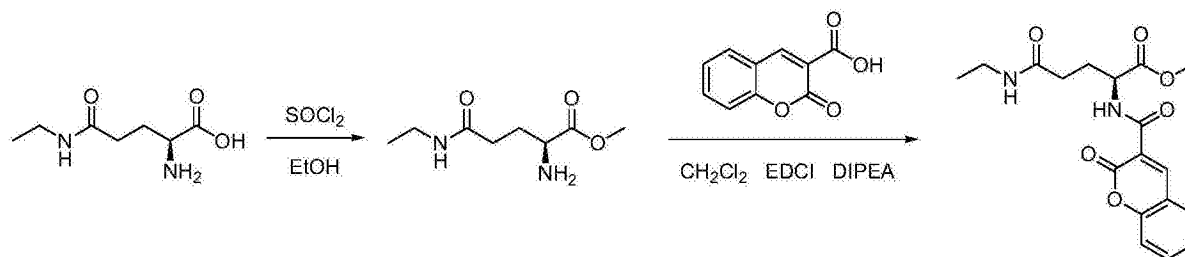
[0119] (本申请书中所有涉及到的温度均为摄氏温度)。

## 实施例

[0120] 实施例1:化合物Ia及其中间体IIa的制备

[0121] 反应总步骤如下:

[0122]



[0123] 步骤1:制备茶氨酸甲酯IIa

[0124] 茶氨酸按照87g/L的比例溶解在甲醇(指每升甲醇溶解87g克茶氨酸),随后向体系缓慢添加二氯亚砷体积比为55ml,混合物在室温条件下搅拌1小时后,将产生的混合物在减压条件下浓缩,获得茶氨酸甲酯IIa。

[0125] 步骤2:制备茶甲香酸Ia

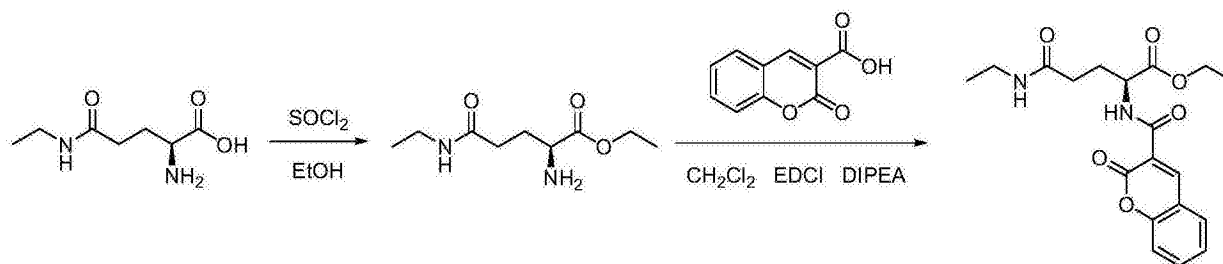
[0126] 20g茶氨酸甲酯溶解于2L无水二氯甲烷,加入27g 3-羧酸香豆素,分别添加0.21LDIPEA(二异丙基乙胺),76g EDCI。混合物在室温条件下搅拌一小时,接着减压浓缩,除去溶剂,通过柱层析进行纯化,收集产物获得茶甲香酸Ia,该产物为淡黄色粉末状固体,熔点摄氏180°以上分解,该化合物分子的结构特征如下:

[0127]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ 1.15 (t, 3H,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 2.10 2.17 (m, 1H), 2.28 2.31 (m, 2H), 2.34 2.41 (m, 1H), 3.27 3.33 (m, 2H), 3.78 (s, 3H), 4.78 4.83 (m, 1H), 6.07 (br s, 1H), 7.38 7.43 (m, 2H), 7.67 7.71 (m, 2H), 8.88 (s, 1H), 9.35 (br d, 1H,  $J=7.6\text{Hz}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ 14.81, 28.72, 32.57, 34.47, 52.29, 52.63, 116.75, 117.93, 118.47, 125.39, 129.89, 134.40, 148.81, 154.57, 161.17, 161.74, 171.22, 171.75; ESI-MS  $m/z$  361 [M+1].

[0128] 实施例2:化合物Ib及其中间体IIb的制备

[0129] 反应总步骤如下:

[0130]



[0131] 步骤1:制备茶氨酸乙酯IIb

[0132] 茶氨酸按照87g/L的比例溶解在乙醇(指每升乙醇溶解87g克茶氨酸),随后向体系缓慢添加二氯亚砷体积比为55ml,混合物在室温条件下搅拌1小时后,将产生的混合物在减压条件下浓缩,获得茶氨酸乙酯IIb。

[0133] 步骤2:制备茶乙香酸Ib

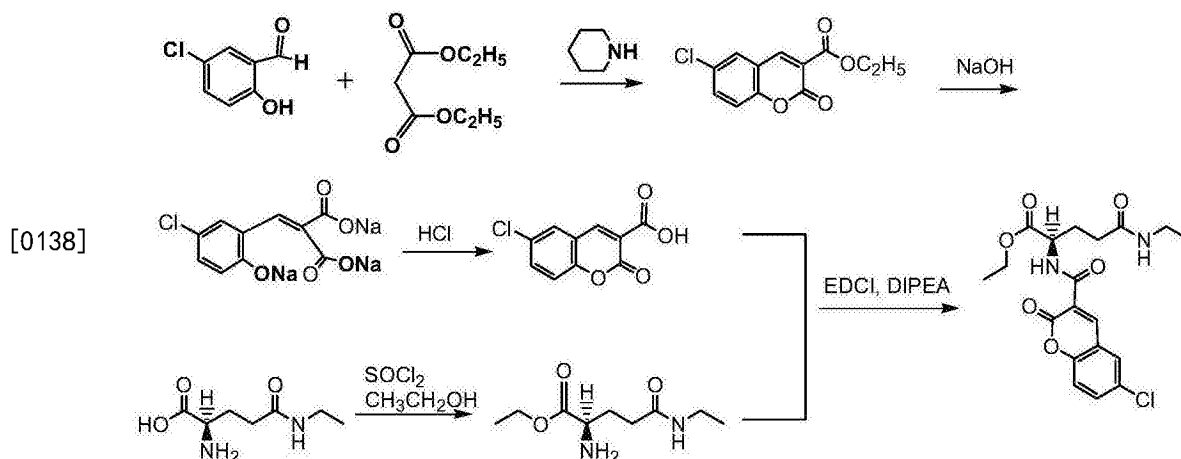
[0134] 20g茶氨酸乙酯溶解于2L无水二氯甲烷,加入27g 3-羧酸香豆素,分别添加0.21LDIPEA(二异丙基乙胺),76g EDCI。混合物在室温条件下搅拌一小时,接着减压浓缩,除去溶剂,通过柱层析进行纯化,收集产物获得茶乙香酸Ib,该产物为淡黄色粉末状固体,

熔点摄氏180°以上分解,该化合物分子的结构特征如下:

[0135]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.11 (t, 3H,  $J=7.2\text{Hz}$ ), 1.28 (t, 3H,  $J=7.1\text{Hz}$ ), 2.17 2.28 (m, 3H), 2.31 2.40 (m, 1H), 3.23 3.28 (m, 2H), 4.10 4.13 (m, 1H), 4.18 4.22 (q, 2H,  $J=7.1\text{Hz}$ ), 5.61 (br s, 1H), 6.90 (dt, 1H,  $J=7.5, 0.8\text{Hz}$ ), 6.97 (d, 1H,  $J=8.2\text{Hz}$ ), 7.28 (dd, 1H,  $J=7.7, 1.6\text{Hz}$ ), 7.34 (dt, 1H,  $J=8.5, 1.6\text{Hz}$ ), 8.39 (s, 1H), 12.96 (br s, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR (125MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  14.2, 14.8, 29, 32, 34, 61, 70, 117, 118.5, 118.9, 131, 132, 160, 167, 170, 171; ESI-MS  $m/z$  375  $[\text{M}+1]$ .

[0136] 实施例3: 化合物Ic及其中间体IIIc的制备

[0137] 反应总步骤如下:



[0139] 具体步骤1: 制备6-氯-香豆素-3-羧酸IIIc

[0140] (1) 依次加入200g 5-氯水杨醛、200mL丙二酸二乙酯、600mL无水乙醇和10mL六氢吡啶(10.3g)及1mL冰醋酸;(2) 在无水条件下,水浴80℃条件下,搅拌回流2h,冷却;(3) 加入约600mL冷水(0℃),待结晶析出后抽滤并用100mL被冰水(0℃)冷却过的50%乙醇洗两次,可得6-氯香豆素-3-缩酸酯;(4) 分别用加入6-氯香豆素-3-羧酸乙酯124g和100g氢氧化钠,然后加入500mL无水乙醇和500mL水,80℃水浴条件下,加热回流约2h;(5) 待反应结束后,立即置于0℃冰浴,加浓盐酸,使体系pH在2-3之间,体系会析出固体,冰浴冷却后过滤,用少量冰水洗涤,干燥后的粗品用水重结晶进行纯化,获得6-氯香豆素-3-羧酸IIIc。

[0141] 步骤2: 制备茶氨酸乙酯IIb

[0142] 茶氨酸按照87g/L的比例溶解在乙醇(指每升乙醇溶解87g克茶氨酸),随后向体系缓慢添加二氯亚砷体积比为55ml,混合物在室温条件下搅拌1小时后,将产生的混合物在减压条件下浓缩,获得茶氨酸乙酯IIb。

[0143] 步骤3: 制备茶氨酸氯香酰胺Ic

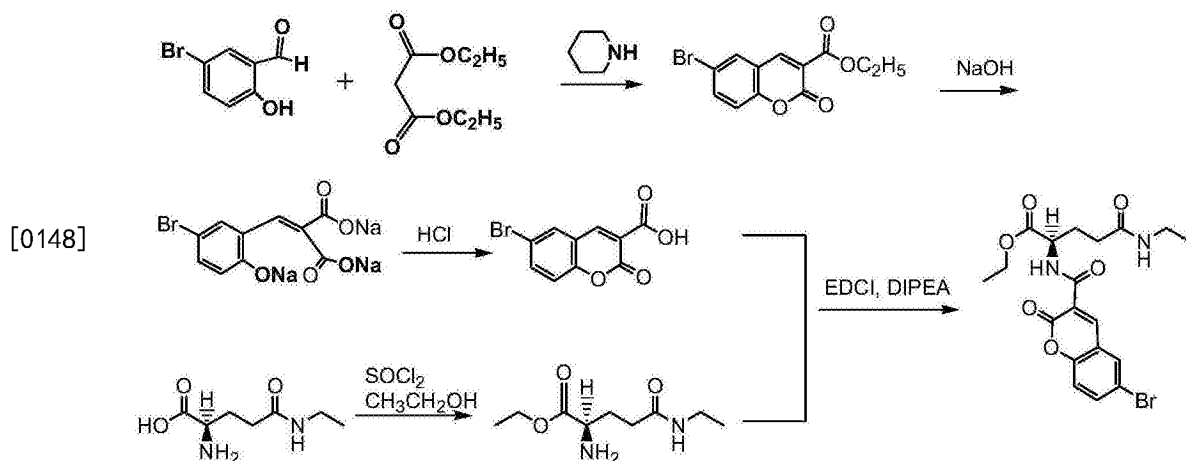
[0144] 20g茶氨酸乙酯溶解于2L无水二氯甲烷,加入27g 6-氯-香豆素-3-羧酸,分别添加0.21L DIPEA(二异丙基乙胺),76g EDCI。混合物在室温条件下搅拌一小时,接着减压浓缩,除去溶剂,通过柱层析进行纯化,收集产物获得茶氨酸氯香酰胺Ic,该产物为淡黄色粉末状固体,熔点摄氏242°以上分解,该化合物分子的结构特征如下:

[0145]  $^1\text{H}$ -NMR (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.12 (t,  $J=7.25\text{Hz}$ , 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.28 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.15-2.40 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 3.26 (m, 2H,  $\text{NH-CH}_2$ ), 4.14 (m, 1H,  $\text{NH-CH}$ ), 4.21 (q,  $J=7.1\text{Hz}$ , 2H,  $\text{O-CH}_2$ ), 5.47 (br, 1H,  $\text{NH}$ ), 6.91 (d,  $J=8.6\text{Hz}$ , 1H, coumarin-8H), 7.25-7.28 (m, 2H,

coumarin-5H,7H), 8.33 (s, coumarin-4H), 12.93 (s, 1H, NH).  $^{13}\text{C-NMR}$   $\delta$ : 14.1 (CH<sub>3</sub>), 14.8 (CH<sub>3</sub>), 29.1 (CH<sub>2</sub>), 32.0 (CH<sub>2</sub>), 34.4 (CH<sub>2</sub>), 61.6 (CH), 70.0 (CH<sub>2</sub>), 118.7 (C), 119.3 (CH), 123.4 (C), 130.9 (CH), 132.7 (CH), 159.6 (C), 166.3 (C), 170.7 (C), 171.2 (C). ESI-MS ( $m/z$ ): 407.1 [M-H]<sup>-</sup>.

[0146] 实施例4: 化合物Id及其中间体IIId的制备

[0147] 反应总步骤如下:



[0149] 具体步骤1: 制备6-溴-香豆素-3-羧酸IIId

[0150] (1) 依次加入200g 5-溴水杨醛、200mL丙二酸二乙酯、600mL无水乙醇和10mL六氢吡啶(10.3g)及1mL冰醋酸;(2) 在无水条件下,水浴80℃条件下,搅拌回流2h,冷却;(3) 加入约600mL冷水(0℃),待结晶析出后抽滤并用100mL被冰水(0℃)冷却过的50%乙醇洗两次,可得6-溴香豆素-3-缩酸酯;(4) 分别用加入6-溴香豆素-3-羧酸乙酯124g和100g氢氧化钠,然后加入500mL无水乙醇和500mL水,80℃水浴条件下,加热回流约2h;(5) 待反应结束后,立即置于0℃冰浴,加浓盐酸,使体系pH在2-3之间,体系会析出固体,冰浴冷却后过滤,用少量冰水洗涤,干燥后的粗品用水重结晶进行纯化,获得6-溴香豆素-3-羧酸IIId。

[0151] 步骤2: 制备茶氨酸乙酯IIb

[0152] 茶氨酸按照87g/L的比例溶解在乙醇(指每升乙醇溶解87g克茶氨酸),随后向体系缓慢添加二氯亚砷体积比为55ml,混合物在室温条件下搅拌1小时后,将产生的混合物在减压条件下浓缩,获得茶氨酸乙酯IIb。

[0153] 步骤3: 制备茶氨酸溴香酰胺Id

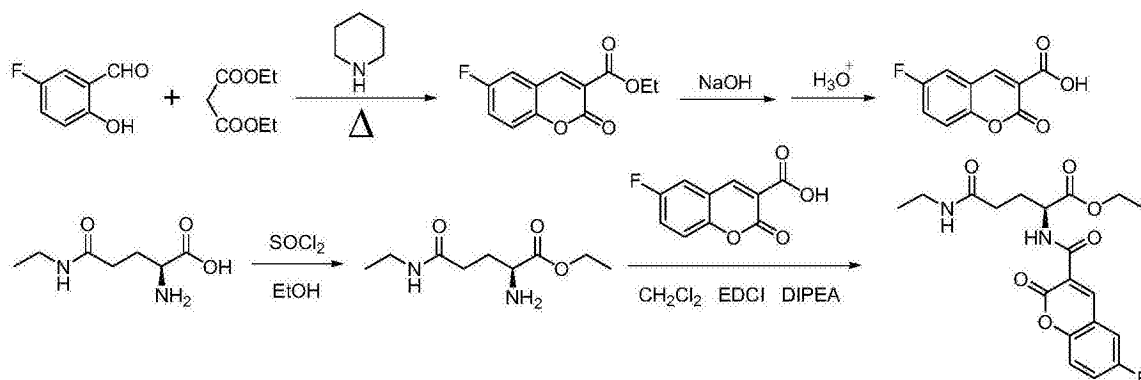
[0154] 20g茶氨酸乙酯溶解于2L无水二氯甲烷,加入27g 6-溴-香豆素-3-羧酸,分别添加0.21L DIPEA(二异丙基乙胺),76g EDCI。混合物在室温条件下搅拌一小时,接着减压浓缩,除去溶剂,通过柱层析进行纯化,收集产物获得茶氨酸溴香酰胺Id,该产物为淡黄色粉末状固体,熔点摄氏211℃以上分解,该化合物分子的结构特征如下:

[0155]  $^1\text{H-NMR}$   $\delta$ : 1.12 (t, J=7.2Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.28 (t, J=7.2Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.17-2.38 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 3.26 (m, 2H, NH-CH<sub>2</sub>), 4.15 (t, J=5.4Hz, 1H, NH-CH), 4.21 (q, J=7.1Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 5.50 (br, 1H, NH), 6.87 (d, J=8.5Hz, 1H, coumarin-8H), 7.39-7.42 (m, 2H, coumarin-5H, 7H), 8.32 (s, coumarin-4H), 12.95 (s, 1H, NH).  $^{13}\text{C-NMR}$   $\delta$ : 14.2 (CH<sub>3</sub>), 14.8 (CH<sub>3</sub>), 29.1 (CH<sub>2</sub>), 32.0 (CH<sub>2</sub>), 34.4 (CH<sub>2</sub>), 61.6 (CH), 70.0 (CH<sub>2</sub>), 110.3 (C), 119.2 (CH), 119.9 (C), 133.9 (CH), 139.7 (CH), 160.1 (C), 166.2 (C), 170.7 (C), 171.2 (C). ESI-MS ( $m/z$ ): 451.0 [M-H]<sup>-</sup>.

[0156] 实施例5:化合物Ie及其中间体IIIe的制备

[0157] 反应总步骤如下:

[0158]



[0159] 具体步骤1:制备6-氟-香豆素-3-羧酸IIIe

[0160] (1) 依次加入200g 5-氟水杨醛、200mL丙二酸二乙酯、600mL无水乙醇和10mL六氢吡啶(10.3g)及1ml冰醋酸;(2) 在无水条件下,水浴80℃条件下,搅拌回流2h,冷却;(3) 加入约600mL冷水(0℃),待结晶析出后抽滤并用100mL被冰水(0℃)冷却过的50%乙醇洗两次,可得6-氟香豆素-3-缩酸酯;(4) 分别用加入6-氟香豆素-3-羧酸乙酯124g和100g氢氧化钠,然后加入500mL无水乙醇和500mL水,80℃水浴条件下,加热回流约2h;(5) 待反应结束后,立即置于0℃冰浴,加浓盐酸,使体系pH在2-3之间,体系会析出固体,冰浴冷却后过滤,用少量冰水洗涤,干燥后的粗品用水重结晶进行纯化,获得6-氟香豆素-3-羧酸IIIe。

[0161] 步骤2:制备茶氨酸乙酯IIb

[0162] 茶氨酸按照87g/L的比例溶解在乙醇(指每升乙醇溶解87g克茶氨酸),随后向体系缓慢添加二氯亚砷体积比为55ml,混合物在室温条件下搅拌1小时后,将产生的混合物在减压条件下浓缩,获得茶氨酸乙酯IIb。

[0163] 步骤3:制备茶氨酸氟香酰胺Ie

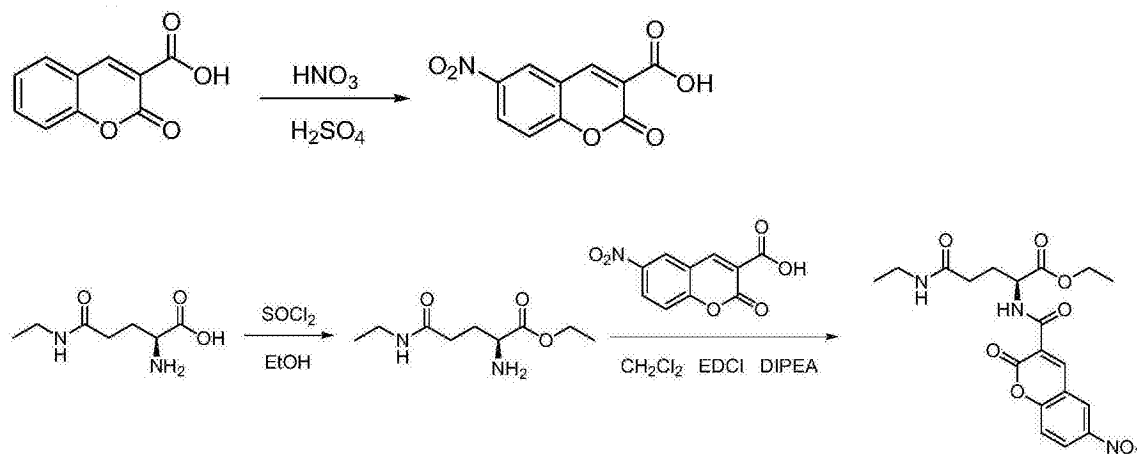
[0164] 20g茶氨酸乙酯溶解于2L无水二氯甲烷,加入27g 6-氟-香豆素-3-羧酸,分别添加0.21L DIPEA(二异丙基乙胺),76g EDCI。混合物在室温条件下搅拌一小时,接着减压浓缩,除去溶剂,通过柱层析进行纯化,收集产物获得茶氨酸氟香酰胺Ie,该产物为淡黄色粉末状固体,熔点摄氏300°以上分解,该化合物分子的结构特征如下:

[0165] m.p.: 109-111℃. <sup>1</sup>H-NMRδ: 1.12 (t, J=7.2Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.28 (t, J=7.2Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.17-2.38 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 3.26 (m, 2H, NH-CH<sub>2</sub>), 4.15 (t, J=5.4Hz, 1H, NH-CH), 4.21 (q, J=7.1Hz, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 5.50 (br, 1H, NH), 6.87 (d, J=8.5Hz, 1H, coumarin-8H), 7.39-7.42 (m, 2H, coumarin-5H, 7H), 8.32 (s, coumarin-4H), 12.95 (s, 1H, NH). <sup>13</sup>C-NMRδ: 14.2 (CH<sub>3</sub>), 14.8 (CH<sub>3</sub>), 29.1 (CH<sub>2</sub>), 32.0 (CH<sub>2</sub>), 34.4 (CH<sub>2</sub>), 61.6 (CH), 70.0 (CH<sub>2</sub>), 110.3 (C), 119.2 (CH), 119.9 (C), 133.9 (CH), 139.7 (CH), 160.1 (C), 166.2 (C), 170.7 (C), 171.2 (C). ESI-MS (m/z): 451.0 [M-H]<sup>-</sup>.

[0166] 实施例6:化合物If及其中间体IIIIf的制备

[0167] 反应总步骤如下:

[0168]



[0169] 具体步骤1:制备6-硝基-香豆素-3-羧酸IIIIf

[0170] 将香豆素-3-酸50g溶于240mL浓硫酸,冷至 $-10^{\circ}\text{C}$ ,加入浓硝酸和浓硫酸的混酸溶液(80mL,浓硝酸和浓硫酸体积比为1:3),在 $0^{\circ}\text{C}$ 下搅拌反应1小时,再升至室温搅拌反应1小时。将反应液倾入5000mL冰水,静置析晶,抽滤,用冰水洗涤,干燥,得6-硝基香豆素-3-羧酸淡黄色无定形固体获得6-硝基香豆素-3-羧酸IIIIf。

[0171] 步骤2:制备茶氨酸乙酯IIb

[0172] 茶氨酸按照87g/L的比例溶解在乙醇(指每升乙醇溶解87g克茶氨酸),随后向体系缓慢添加二氯亚砷体积比为55mL,混合物在室温条件下搅拌1小时后,将产生的混合物在减压条件下浓缩,获得茶氨酸乙酯IIb。

[0173] 步骤3:制备茶氨酸硝香酰胺If

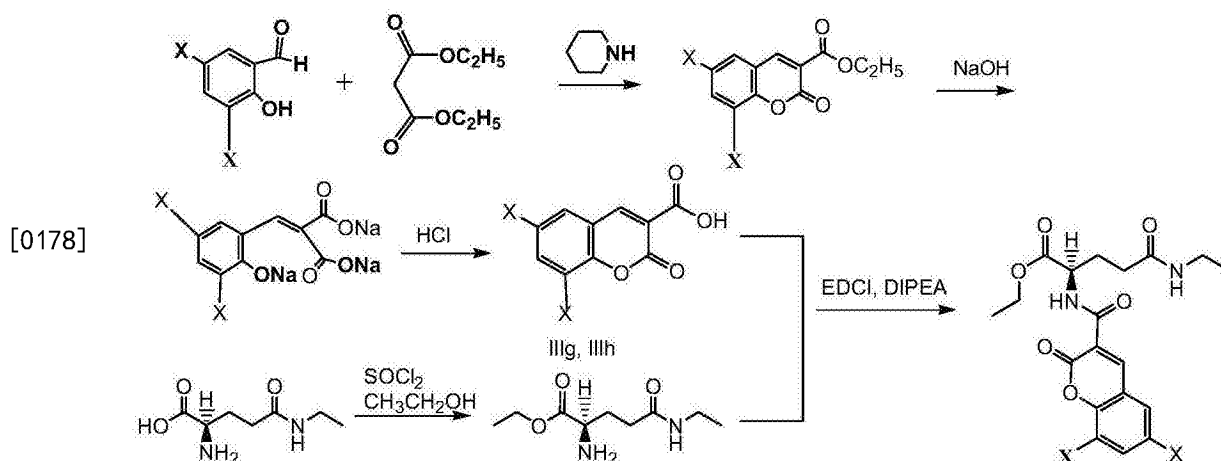
[0174] 20g茶氨酸乙酯溶解于2L无水二氯甲烷,加入27g 6-硝基-香豆素-3-羧酸,分别添加0.21L DIPEA(二异丙基乙胺),76g EDCI。混合物在室温条件下搅拌一小时,接着减压浓缩,除去溶剂,通过柱层析进行纯化,收集产物获得茶氨酸硝香酰胺If,该产物为淡黄色粉末状固体,熔点摄氏 $165^{\circ}$ 以上分解,该化合物分子的结构特征如下:

[0175] m.p.:  $109-111^{\circ}\text{C}$ .  $^1\text{H-NMR}$   $\delta$ : 1.12 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.28 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.17-2.38 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 3.26 (m, 2H,  $\text{NH-CH}_2$ ), 4.15 (t,  $J=5.4\text{Hz}$ , 1H,  $\text{NH-CH}$ ), 4.21 (q,  $J=7.1\text{Hz}$ , 2H,  $\text{O-CH}_2$ ), 5.50 (br, 1H,  $\text{NH}$ ), 6.87 (d,  $J=8.5\text{Hz}$ , 1H, coumarin-8H), 7.39-7.42 (m, 2H, coumarin-5H, 7H), 8.32 (s, coumarin-4H), 12.95 (s, 1H,  $\text{NH}$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$   $\delta$ : 14.2 ( $\text{CH}_3$ ), 14.8 ( $\text{CH}_3$ ), 29.1 ( $\text{CH}_2$ ), 32.0 ( $\text{CH}_2$ ), 34.4 ( $\text{CH}_2$ ), 61.6 ( $\text{CH}$ ), 70.0 ( $\text{CH}_2$ ), 110.3 (C), 119.2 (CH), 119.9 (C), 133.9 (CH), 139.7 (CH), 160.1 (C), 166.2 (C), 170.7 (C), 171.2 (C). ESI-MS ( $m/z$ ): 451.0  $[\text{M-H}]^-$ .

[0176] 实施例7:化合物Ig、Ih及其中间体IIIg、IIIh的制备

[0177] 反应总步骤如下:





[0179]  $X = \text{Cl}$ , IIIg = DC1C, 最终产物为 Ig;  $X = \text{Br}$ , IIIh = DBrC, 最终产物为 Ih。

[0180] 具体步骤1: 制备6,8-二氯-香豆素-3-羧酸IIIg和6,8-二溴-香豆素-3-羧酸IIIh

[0181] (1) 依次加入200g 3,5-二氯水杨醛或3,5-二溴水杨醛、200mL丙二酸二乙酯、600mL无水乙醇和10mL六氢吡啶(10.3g)及1mL冰醋酸;(2) 在无水条件下,水浴80℃条件下,搅拌回流2h,冷却;(3) 加入约600mL冷水(0℃),待结晶析出后抽滤并用100mL被冰水(0℃)冷却过的50%乙醇洗两次,可得6,8-二氯香豆素-3-缩酸酯或6,8-二溴香豆素-3-缩酸酯;(4) 分别用加入6,8-二氯香豆素-3-缩酸酯或6,8-二溴香豆素-3-缩酸酯124g和100g氢氧化钠,然后加入500mL无水乙醇和500mL水,80℃水浴条件下,加热回流约2h;(5) 待反应结束后,立即置于0℃冰浴,加浓盐酸,使体系pH在2-3之间,体系会析出固体,冰浴冷却后过滤,用少量冰水洗涤,干燥后的粗品用水重结晶进行纯化,获得6,8-二氯香豆素-3-羧酸或6,8-二溴香豆素-3-羧酸。

[0182] 步骤2: 制备茶氨酸乙酯IIb

[0183] 茶氨酸按照87g/L的比例溶解在乙醇(指每升乙醇溶解87g克茶氨酸),随后向体系缓慢添加二氯亚砷体积比为55ml,混合物在室温条件下搅拌1小时后,将产生的混合物在减压条件下浓缩,获得的茶氨酸乙酯。

[0184] 步骤3: 制备茶双氯香酰胺Ig和茶双溴香酰胺Ih

[0185] 20g茶氨酸乙酯溶解于2L无水二氯甲烷,加入27g 6,8-二氯-香豆素-3-羧酸或6,8-二溴香豆素-3-羧酸,分别添加0.21L DIPEA(二异丙基乙胺),76g EDCI。混合物在室温条件下搅拌一小时,接着减压浓缩,除去溶剂,通过柱层析进行纯化,收集产物获得茶双氯香酰胺Ig或茶双溴香酰胺Ih,该产物为均淡黄色粉末状固体,熔点摄氏136°和121°以上分解,这两个化合物分子的结构特征分别如下:(I)所示的茶双氯香酰胺(DTC1C):  $^1\text{H-NMR}$   $\delta$ : 1.11 (t,  $J = 7.2\text{Hz}$ , 3H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.28 (t,  $J = 7.1\text{Hz}$ , 3H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 2.19-2.40 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3.20-3.29 (m, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_3$ ), 4.18-4.25 (m, 3H), 6.20 (br s, 1H, NH), 7.19 (d,  $J = 2.4\text{Hz}$ , 1H, coumarin-5H), 7.39 (d,  $J = 2.4\text{Hz}$ , 1H, coumarin-7H), 8.35 (s, coumarin-4H), 14.02 (br s, 1H, NH);  $^{13}\text{C-NMR}$   $\delta$ : 13.92 ( $\text{CH}_3$ ), 14.52 ( $\text{CH}_3$ ), 28.90 ( $\text{CH}_2$ ), 31.45 ( $\text{CH}_2$ ), 34.16 ( $\text{CH}_2$ ), 61.49 (CH), 69.08 ( $\text{CH}_2$ ), 119.15 (C), 122.43 (CH), 122.65 (C), 129.31 (CH), 132.31 (CH), 156.07 (C), 165.68 (C), 170.14 (C), 171.04 (C). ESI-MS ( $m/z$ ): 441.0  $[\text{M-H}]^-$ .

[0186] 茶双溴香酰胺(DTBrC):  $^1\text{H-NMR}$   $\delta$ : 1.12 (t,  $J = 7.3\text{Hz}$ , 3H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_3$ ), 1.28 (t,  $J = 7.2\text{Hz}$ , 3H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 2.17-2.28 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3.22-3.29 (m, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_3$ ), 4.18-4.26 (m,

3H), 5.75 (br s, 1H, NH), 7.38 (d,  $J=2.3$  Hz, 1H, coumarin-5H), 7.71 (d,  $J=2.3$  Hz, 1H, coumarin-7H), 8.32 (s, coumarin-4H), 14.12 (br s, 1H, NH); 12.95 (s, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$ -NMR (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 14.07 ( $\text{CH}_3$ ), 14.71 ( $\text{CH}_3$ ), 28.99 ( $\text{CH}_2$ ), 31.65 ( $\text{CH}_2$ ), 34.34 ( $\text{CH}_2$ ), 61.66 (CH), 69.16 ( $\text{CH}_2$ ), 109.80 (C), 112.09 (CH), 119.82 (C), 133.14 (CH), 137.96 (CH), 157.48 (C), 165.63 (C), 170.20 (C), 171.04 (C). ESI-MS ( $m/z$ ): 528.5  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .

[0187] 实施例8: 实施例1-7获得的化合物及其中间体以及式IIIa的化合物对各种人癌细胞系灭活作用

[0188] 参照文献方法 (Zhang Y, et al., Cytotechnology 2009, 59 (3): 191-200) 测定了上述实施例1-7获得的化合物及其中间体和阳性对照抗癌药物等体外培养对各种人癌细胞灭活作用, 结果见下表-1。

[0189] 1、细胞系和细胞培养: 人肺癌A549和H460, 人乳腺癌MCF-7和MDA-MB-231, 人胃癌BGC-823, 人前列腺癌PC-3, 人慢性白血病K562, 人淋巴瘤细胞U937, 人肝癌SMMC7721和HepG2, 人结肠癌HT29, 人胰腺癌PANC-1和BxPC3和人宫颈癌Hela细胞系、人脑瘤Daoy、人神经瘤D54和耐药性强的人口腔表皮癌细胞KBV200系, 小鼠黑色素瘤B16以及高转移的Lewis肺癌细胞系细胞系购于美国American Type Culture Collection。这些细胞分别用DMEM和RPMI-1640培养液培养;

[0190] 2、仪器设备:

[0191] 二氧化碳培养箱: 3111型, 美国Thermo公司; 倒置荧光显微镜: TE2000-U型, 日本Nikon公司。倒置显微镜: CKX31型, 日本Olympus公司; 台式高速冷冻离心机: 5810R型, 德国Eppendorf公司; 微量加样器: 德国Eppendorf公司; 细胞培养塑料平板 (96孔): BD公司; 酶标仪: SYNERGY HT型多功能酶标仪, 美国BIO-TEK公司; 制冰机: XB 70型, GRANT公司; 美国Carestream Health公司柯达体内X射线和荧光对动物体内活体显像仪Kodak Image Station 2000。

[0192] 实验采用MTT法测试实施例1-7获得的化合物及其中间体以及式IIIa的化合物在体外条件下对癌细胞生长的抑制作用, 苔酚蓝染色法对其验证。步骤如下:

[0193] 1、主要试剂、细胞系和仪器:

[0194] 癌细胞系和仪器如上1和2所述。

[0195] RPMI1640和DMEM培养液: Hyclone公司; 已灭活胎牛血清: Hyclone公司;

[0196] 胰蛋白酶 (trypsin): Amersco公司; 0.4% 台盼蓝: Sigma公司;

[0197] 四甲基偶氮唑盐 (MTT): Sigma公司;

[0198] 2、实验步骤:

[0199] (1) 用0.25%的胰蛋白酶消化对数生长期的癌细胞, 制成单细胞悬液, 调整细胞浓度为 $5 \times 10^4/\text{mL}$ , 以100 $\mu\text{l}$ 每孔接种于96孔培养板;

[0200] (2) 将培养板移入37 $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 饱和湿度培养箱中培养24h; 加入浓度为 (1-1000 $\mu\text{M}$ /L) 的实施例1-7获得Ia-Ih的化合物及其中间体以及式IIIa的化合物或阳性药物对照抗癌药物其终浓度为0.1-1500 $\mu\text{M}$ /L。设对照孔 (只加细胞悬液200 $\mu\text{l}$ ) 和无药物空白对照孔 (含溶媒0.01% DMSO), 每组均设8个复孔, 置37 $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ 饱和湿度培养箱内培养;

[0201] (3) 分别于加药48h、72h后取出96孔板, 小心吸弃原培养基, 每孔加入100 $\mu\text{l}$ 无血清的DMEM培养基及10 $\mu\text{l}$  MTT (5mg/mL) 溶液, 继续培养4h后, 终止培养;

[0202] (4) 小心吸弃孔内上清液,每孔加入150 $\mu$ l DMSO,室温震荡10-15min,使结晶充分溶解。

[0203] (5) 比色:选择570nm波长,在酶标仪上测定各孔吸光值(A值),记录结果;整个均实验重复3次;

[0204] (6) 实验结果按下式计算:相对存活率=(各实验组A值/细胞对照组A值) $\times$ 100%  
中效浓度(IC<sub>50</sub>,即抑制率为50%时的药物浓度,又称半数抑制浓度)的计算:

[0205] 用回归方程求出受检测的成分的IC<sub>50</sub>。

[0206] 3、实验结果(见表1)

[0207] 表1 实施例1-7获得的化合物及其中间体对人癌细胞生长的抑制作用

[0208]

| 药浓度<br>(mM/<br>L)<br>细胞株 | 化合物<br>Ia               | 化合物<br>IIa             | 化合物<br>Ib               | 化合物<br>Ic               | 化合物<br>IIIa  | 化合物<br>IIIc            | 化合物<br>IIb            | 化合物<br>Id               | 化合物<br>IIId*          | 阳性抗<br>癌药物对<br>照                                                  | 溶<br>媒<br>对<br>照 |
|--------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------|------------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------------------------------------------------|------------------|
| A549                     | 0.3<br>±<br>0.06*       | 0.65<br>±<br>0.03<br>* | 0.125<br>±<br>0.05*     | 0.128<br>±<br>0.06*     | >0.7<br>*    | 0.6<br>±<br>0.03<br>*  | 0.5<br>±<br>0.03<br>* | 0.139<br>±<br>0.05*     | 0.6mM/L<br>*<br>±0.03 | 长春新<br>碱<br>0.22 *<br>±0.04                                       | -                |
| H460                     | 0.23*<br>±<br>0.06      | 0.5<br>±<br>0.04       | 0.113<br>±<br>0.04      | 0.106<br>±<br>0.05*     | >0.7<br>70 * | 0.35<br>±<br>0.05<br>* | 0.4<br>±<br>0.01<br>* | 0.101<br>*<br>±<br>0.05 | 0.5 *<br>±0.03        | 柔 红<br>霉素<br>0.063 *<br>±0.04                                     | -                |
| MCF-7                    | 0.22*<br>±<br>0.05      | 0.45<br>±<br>0.06      | 0.103<br>±<br>0.05      | 0.095<br>*<br>±<br>0.04 | >0.7<br>0 *  | 0.3*<br>±<br>0.04      | 0.3 *<br>±<br>0.02    | 0.102<br>*<br>±<br>0.05 | 0.4 *<br>±0.02        | 柔 红<br>霉素<br>0.058 *<br>±0.04                                     | -                |
| MDA-MB<br>-<br>231       | 0.24*<br>±<br>0.06      | 0.48<br>±<br>0.06      | 0.109<br>±<br>0.05      | 0.87 *<br>±<br>0.04     | >0.7<br>*    | 0.5<br>L*<br>±<br>0.06 | 0.4 *<br>±<br>0.06    | 0.091<br>*<br>±<br>0.06 | 0.5 *<br>±0.03        | 长春新<br>碱<br>0.13 *<br>±<br>0.04                                   | -                |
| BGC-82<br>3              | 0.123<br>* ±<br>0.05    | 0.31<br>±<br>0.06      | 0.127<br>±<br>0.05      | 0.066<br>*<br>±<br>0.05 | >0.7<br>0 *  | 0.30<br>*<br>±<br>0.05 | 0.6 *<br>±<br>0.05    | 0.065<br>* ±<br>0.06    | 0.70 *<br>±0.05       | 染料木<br>素<br>0.135*<br>±<br>0.05<br>柔 红<br>霉 素<br>0.068 *<br>±0.03 | -                |
| PC-3                     | 0.146<br>*<br>±<br>0.03 | 0.35<br>*<br>±<br>0.05 | 0.125<br>*<br>±<br>0.04 | 0.105<br>*<br>±<br>0.04 | >0.5<br>0    | 0.5 *<br>±<br>0.05     | 0.4 *<br>±<br>0.05    | 0.11 *<br>±<br>0.04     | 0.5 *<br>±0.05        | 柔 红<br>霉素<br>0.051 *<br>±0.03                                     | -                |
| U937                     | 0.056<br>±<br>0.01 *    | 0.35<br>* ±<br>0.03    | 0.09 *<br>±0.3          | 0.052<br>*<br>±<br>0.03 | >0.7<br>0 *  | 0.5 *<br>±<br>0.1      | 0.4 *<br>±<br>0.1     | 0.124<br>* ±<br>0.3     | 0.5 *<br>±0.05        | 卡铂<br>0.058<br>±<br>0.03*                                         | -                |
| PANC-1                   | 0.067<br>±<br>0.03 *    | 0.28<br>* ±<br>0.04    | 0.065<br>*<br>±<br>0.03 | 0.054<br>*<br>±<br>0.03 | >0.7<br>0 *  | 0.5 *<br>±<br>0.01     | 0.4 *<br>±<br>0.01    | 0.055<br>* ±<br>0.03    | 0.5 *<br>±0.03        | 柔 红<br>霉素<br>0.055 *<br>±0.03                                     | -                |
| HeLa                     | 0.064<br>±<br>0.02 *    | 0.33<br>* ±<br>0.04    | 0.053<br>*<br>±<br>0.02 | 0.35 *<br>±0.1          | >0.7<br>0 *  | 0.6 *<br>±<br>0.01     | 0.5 *<br>±<br>0.01    | 0.075<br>* ±<br>0.01    | 0.6 *<br>±0.03        | 顺铂<br>0.066<br>*<br>±<br>0.006                                    | -                |

[0209]

|        |                         |                        |                         |                         |             |                    |                    |                      |                |                                   |   |
|--------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------|-----------------------------------|---|
| S-7721 | 0.075<br>±<br>0.03 *    | 0.23<br>* ±<br>0.04    | 0.017<br>*<br>± 0.3     | 0.075<br>*<br>±<br>0.03 | >0.5<br>0 * | 0.5 *<br>±<br>0.1  | 0.4 *<br>±<br>0.1  | 0.065<br>* ±<br>0.3  | 0.5 *<br>±0.1  | 长春新<br>碱<br>0.078<br>±<br>0.03*   | - |
| HT29   | 0.062<br>*<br>± 0.2     | 0.25<br>*<br>±<br>0.04 | 0.105<br>*<br>±<br>0.05 | 0.105<br>*<br>±<br>0.05 | >0.7<br>0 * | 0.7 *<br>±<br>0.05 | 0.6 *<br>±<br>0.05 | 0.045<br>* ±<br>0.05 | 0.7 *<br>±0.05 | 柔红<br>霉素<br>0.063 *<br>±<br>0.03* | - |
| B16    | 0.145<br>*<br>±<br>0.05 | 0.45<br>*<br>±<br>0.02 | 0.11 *<br>±<br>0.02     | 0.125<br>*<br>±<br>0.05 | >0.7<br>0 * | 0.6 *<br>±<br>0.02 | 0.5 *<br>±<br>0.02 | 0.12 *<br>±<br>0.02  | 0.6 *<br>±0.02 | 顺铂<br>0.067<br>±<br>0.03*         | - |
| K562   | 0.248<br>*<br>±<br>0.05 | 0.35<br>*<br>±<br>0.02 | 0.15 *<br>±<br>0.02     | 0.105<br>*<br>±<br>0.15 | >0.7<br>0 * | 0.6 *<br>±<br>0.02 | 0.6 *<br>±<br>0.02 | 0.125<br>* ±<br>0.05 | 0.6 *<br>±0.05 | 依托泊<br>苷<br>0.085*<br>± 0.03      | - |
| LLC    | 0.185<br>*<br>±<br>0.04 | 0.1 *<br>±<br>0.03     | 0.115<br>*<br>±<br>0.02 | 0.131<br>*<br>±<br>0.04 | >0.7<br>0 * | 0.4 *<br>±<br>0.03 | 0.3 *<br>±<br>0.02 | 0.116<br>* ±<br>0.04 | 0.4 *<br>±0.03 | 去甲斑<br>蝥素<br>0.015 *<br>± 0.01    | - |
| BxPc3  | 0.35 *<br>±<br>0.01     | 0.6*<br>±<br>0.02      | 0.105<br>*<br>±<br>0.02 | 0.089<br>*<br>±<br>0.03 | >0.7<br>0 * | 0.5 *<br>±<br>0.03 | 0.3 *<br>±<br>0.02 | 0.116<br>* ±<br>0.04 |                | 去甲斑<br>蝥<br>0.06*<br>± 0.03       | - |
| HepG2  | 0.25 *<br>±<br>0.05     | 0.6*<br>±<br>0.02      | 0.225<br>*<br>±<br>0.03 | 0.093<br>*<br>±<br>0.03 | >0.7<br>0 * | 0.3 *<br>±<br>0.03 | 0.3 *<br>±<br>0.02 | 0.125<br>* ±<br>0.04 |                | 长春新<br>碱<br>0.037*<br>± 0.01      | - |
| Caski  | 0.21 *<br>±<br>0.04     | 0.32<br>*<br>±<br>0.03 | 0.116<br>* ±<br>0.05    | 0.086<br>*<br>±<br>0.02 | >0.7<br>0 * | 0.4 *<br>±<br>0.03 | 0.3 *<br>±<br>0.03 | 0.101<br>* ±<br>0.04 |                | 依托泊<br>苷<br>0.089*<br>± 0.03      | - |
| Daoy   | 0.25 *<br>±<br>0.03     | 0.4*<br>±<br>0.02      | 0.135<br>*<br>±<br>0.02 | 0.086<br>*<br>±<br>0.03 | >0.7<br>0 * | 0.4 *<br>±<br>0.03 | 0.4 *<br>±<br>0.02 | 0.128<br>* ±<br>0.03 |                | 顺铂<br>0.0016<br>* ±<br>0.0001     | - |
| D54    | 0.16 *<br>±<br>0.03     | 0.4*<br>±<br>0.03      | 0.165<br>*<br>±<br>0.03 | 0.098<br>*<br>±<br>0.02 | >0.7<br>0 * | 0.3 *<br>±<br>0.03 | 0.3 *<br>±<br>0.02 | 0.092<br>* ±<br>0.04 |                | 顺铂<br>0.021*<br>±<br>0.001        | - |
| KBV200 | 0.24 *<br>±<br>0.02     | 0.38<br>*<br>±<br>0.04 | 0.136<br>* ±<br>0.02    | 0.097<br>*<br>±<br>0.02 | >0.7<br>0 * | 0.4 *<br>±<br>0.03 | 0.3 *<br>±<br>0.03 | 0.112<br>* ±<br>0.02 |                | 柔红<br>霉素<br>0.001*<br>±<br>0.0003 | - |

[0210] 表1—续

[0211]

| 药浓度<br>(mM/L)<br>细胞株 | 化合物<br>Ie *          | 化合物<br>IIIe *       | 化合物<br>If *          | 化合物<br>IIIIf *   | 化合物<br>Ig *           | 化合物<br>Ih *          | 化合物<br>IIIf *    | 化合物<br>IIIf *       | 阳性抗癌药<br>物对照                                           | 溶<br>媒<br>对<br>照 |
|----------------------|----------------------|---------------------|----------------------|------------------|-----------------------|----------------------|------------------|---------------------|--------------------------------------------------------|------------------|
| A549                 | 0.141<br>* ±<br>0.04 | 0.45<br>* ±<br>0.03 | 0.122<br>* ±<br>0.04 | 0.58 *<br>± 0.04 | 0.045*<br>±<br>0.003  | 0.056*<br>±<br>0.004 | 0.33 *<br>± 0.03 | 0.45*<br>±<br>0.02  | 长春新碱<br>0.22 *<br>± 0.04 *                             | —                |
| H460                 | 0.10<br>* ±<br>0.03  | 0.45<br>* ±<br>0.05 | 0.10 *<br>± 0.04     | 0.46 *<br>± 0.04 | 0.093*<br>± 0.06      | 0.109*<br>± 0.05     | 0.4 *<br>± 0.06  | 0.55 *<br>±<br>0.06 | 柔红霉素<br>0.063 *<br>± 0.04                              | —                |
| MCF-7                | 0.115<br>* ±<br>0.03 | 0.39<br>* ±<br>0.02 | 0.112 *<br>± 0.04    | 0.4*<br>± 0.04   | 0.075*<br>± 0.03      | 0.091 *<br>± 0.04    | 0.41*±<br>0.02   | 0.45*<br>±<br>0.02  | 柔红霉素<br>0.058 *<br>± 0.04                              | —                |
| MDA-MB<br>231        | 0.09<br>* ±<br>0.03  | 0.52<br>* ±<br>0.03 | 0.110 *<br>± 0.04    | 0.47 *<br>± 0.04 | 0.092 *<br>± 0.04     | 0.098 *<br>± 0.04    | 0.46 *<br>± 0.03 | 0.42 *<br>±<br>0.03 | 长春新碱<br>0.13 *<br>± 0.04                               | —                |
| BGC-82<br>3          | 0.143<br>* ±<br>0.03 | 0.70<br>* ±<br>0.05 | 0.115 *<br>± 0.06    | 0.65 *<br>± 0.02 | 0.06 *<br>±<br>0.005  | 0.085 *<br>± 0.03    | 0.38 *<br>± 0.03 | 0.48 *<br>±<br>0.04 | 染料木素<br>0.135 *<br>± 0.03<br>柔红霉素<br>0.068 *<br>± 0.05 | —                |
| PC-3                 | 0.127<br>* ±<br>0.06 | 0.52<br>* ±<br>0.05 | 0.171 *<br>± 0.05    | 0.53 *<br>± 0.04 | 0.045 *<br>±<br>0.004 | 0.087 *<br>± 0.03    | 0.31 *<br>± 0.05 | 0.41 *<br>±<br>0.05 | 柔红霉素<br>0.051 *<br>± 0.03                              | —                |
| U937                 | 0.126<br>* ±<br>0.6  | 0.56<br>* ±<br>0.06 | 0.121<br>* ± 0.4     | 0.45 *<br>± 0.06 | 0.038 *<br>± 0.02     | 0.057 *<br>± 0.03    | 0.35 *<br>± 0.03 | 0.39 *<br>±<br>0.04 | 卡铂<br>0.058<br>± 0.03*                                 | —                |
| PANC-1               | 0.072<br>* ±<br>0.01 | 0.48<br>* ±<br>0.03 | 0.077 *<br>± 0.03    | 0.43 *<br>± 0.04 | 0.071 *<br>±<br>0.006 | 0.078 *<br>± 0.03    | 0.43 *<br>± 0.01 | 0.48 *<br>±<br>0.01 | 柔红霉素<br>0.055 *<br>± 0.03                              | —                |
| Hela                 | 0.071<br>* ±<br>0.03 | 0.6 *<br>±<br>0.03  | 0.071 *<br>± 0.03    | 0.58 *<br>± 0.05 | 0.066 *<br>±<br>0.004 | 0.058 *<br>± 0.03    | 0.26 *<br>± 0.01 | 0.29 *<br>±<br>0.02 | 顺铂<br>0.066 * ±<br>0.06                                | —                |
| S-7721               | 0.061<br>* ±<br>0.3  | 0.49<br>* ±<br>0.6  | 0.061 *<br>± 0.3     | 0.46 *<br>± 0.6  | 0.078 *<br>± 0.04     | 0.086 *<br>± 0.04    | 0.49 *<br>± 0.1  | 0.53 *<br>± 0.1     | 长春新碱<br>0.078<br>± 0.03*                               | —                |
| HT29                 | 0.24*<br>±<br>0.05   | 0.57<br>* ±<br>0.05 | 0.153 *<br>± 0.04    | 0.46 *<br>± 0.04 | 0.099 *<br>± 0.05     | 0.108 *<br>± 0.05    | 0.48 *<br>± 0.04 | 0.59 *<br>±<br>0.05 | 柔红霉素<br>0.063 *<br>± 0.03*                             | —                |
| B16                  | 0.23*<br>±<br>0.05   | 0.6<br>* ±<br>0.06  | 0.28 *<br>± 0.06     | 0.67 *<br>± 0.03 | 0.125 *<br>± 0.05     | 0.146 *<br>± 0.05    | 0.5 *<br>± 0.06  | 0.46 *<br>±<br>0.02 | 顺铂<br>0.067<br>± 0.03*                                 | —                |
| K562                 | 0.13*<br>±<br>0.05   | 0.3 *<br>±<br>0.05  | 0.091 *<br>± 0.04    | 0.3 *<br>± 0.04  | 0.057 *<br>± 0.03     | 0.079 *<br>± 0.03    | 0.42 *<br>± 0.06 | 0.48*<br>0.06       | 依托泊苷<br>0.085*<br>± 0.03                               |                  |

[0212]

|        |                     |                     |                  |                     |                  |                  |                 |                      |                           |   |
|--------|---------------------|---------------------|------------------|---------------------|------------------|------------------|-----------------|----------------------|---------------------------|---|
| LLC    | 0.11*<br>±<br>0.03  | 0.38<br>* ±<br>0.03 | 0.10 *<br>±0.04  | 0.37 *<br>±0.06     | 0.036 *<br>±0.02 | 0.053 *<br>±0.04 | 0.25 *<br>±0.05 | 0.35 *<br>0.06       | 去甲斑蝥<br>0.015* ±<br>0.001 | - |
| BxPc3  | 0.26*<br>±<br>0.05  | 0.5<br>*<br>0.06    | 0.18 *<br>±0.03  | 0.114<br>*<br>±0.04 | 0.119 *<br>±0.04 | 0.128 *<br>±0.04 | 0.3 *<br>±0.06  | 0.4 *<br>±<br>0.05   | 去甲斑蝥素<br>0.06* ±<br>0.02  |   |
| HepG2  | 0.23*<br>±<br>0.09  | 0.4 *<br>±<br>0.08  | 0.13 *<br>±0.06  | 0.36 *<br>±0.07     | 0.046 *<br>±0.02 | 0.056*<br>±0.03  | 0.42 *<br>±0.02 | 0.145<br>*<br>0.06   | 长春新碱<br>0.037*<br>±0.02   |   |
| Caski  | 0.23*<br>±<br>0.04  | 0.38<br>* ±<br>0.06 | 0.12 *<br>±0.04  | 0.3 *<br>±0.05      | 0.036 *<br>±0.02 | 0.053 *<br>±0.03 | 0.25 *<br>±0.06 | 0.135<br>* ±<br>0.03 | 依托泊苷<br>0.089*<br>±0.03   |   |
| Daoy   | 0.21<br>* ±<br>0.06 | 0.5*<br>±<br>0.06   | 0.129 *<br>±0.04 | 0.4*<br>±0.06       | 0.11 *<br>±0.04  | 0.121*<br>±0.04  | 0.35*<br>±0.06  | 0.35*<br>±<br>0.03   | 顺铂 0.0016*<br>±0.001      | - |
| D54    | 0.15<br>* ±<br>0.05 | 0.3*<br>±<br>0.03   | 0.105 *<br>±0.03 | 0.3*<br>±0.02       | 0.079 *<br>±0.02 | 0.087*<br>±0.03  | 0.3 *<br>±0.05  | 0.3 *<br>±<br>0.06   | 顺铂 0.021*<br>±0.001       | - |
| KBV200 | 0.21<br>* ±<br>0.04 | 0.3*<br>±<br>0.06   | 0.102*<br>±0.02  | 0.3*<br>±0.06       | 0.084*<br>±0.03  | 0.072*<br>±0.03  | 0.3 *<br>±0.06  | 0.3 *<br>±<br>0.03   | 柔红霉素<br>0.001*<br>±0.0001 | - |

[0213] 注:\* $p < 0.05$ 与溶媒对照相比较;有关MTT测试细胞生长的方法见上述实验方法部分。上述结果使用苔酚蓝染色法对其验证表明药效相同无误。

[0214] §为表中所列化合物分别处理72小时后50%癌细胞成活的药物浓度(IC<sub>50</sub>)。

[0215] A549:人肺癌;NCI-H460:H460人肺癌;MB231:MDA-MB231(雌激素受体阴性高转移的人乳腺癌);MCF-7:雌激素受体阳性的人乳腺癌;S-7721:SMMC7721(人肝癌);PANC-1:人胰腺癌;Hela:人宫颈癌;LLC:Lewis lung cancer(高转移小鼠肺癌);BGC-823:人胃癌;PC-3:人前列腺癌;U937:人组织细胞淋巴瘤细胞;人肝癌;HT29:人结肠癌;B16:黑色素瘤;K562:人白血病;BxPc3:人胰腺癌;HepG2:人肝癌;Caski:人宫颈癌;Daoy:人脑瘤;D54:神经瘤;KBV200:强耐药性人口腔表皮癌细胞。

[0216] 实施例9:实施例1—7获得的化合物及其中间体抑制裸鼠体内多种人癌移植瘤生长和小鼠肺癌转移的实验

[0217] 参照文献方法(George N.Naumov, et al. Combined Vascular Endothelial Growth Factor Receptor and Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Blockade Inhibits Tumor Growth in Xenograft Models of EGFR Inhibitor Resistance Clin Cancer Res 2009, 15:3484-3494;杨镇洲等,)测定了实施例1—7获得的化合物及其中间体对多种人癌动物移植瘤体内生长的抑制作用,结果见下表-2。

[0218] 1、实验动物,细胞系,主要试剂和仪器:

[0219] SPF级BALB/c裸小鼠和C57/BL6J小鼠,4~5周龄,18~22g,雌性,购自北京华阜康实验动物中心,动物许可证号SCXK(京)2009-0004。饲养于SPF级动物实验室;IVC独立送回风笼,苏州苏杭科技器材有限公司;人肺癌A549,雌激素受体阴性的人乳腺癌MDA-MB231,雌激素受体阳性的人乳腺癌MCF-7,人肝癌SMMC7721,人胰腺癌PANC-1,人宫颈癌Hela,高转移的Lewis lung cancer细胞系和其它仪器如上所述。RPMI1640和DMEM培养液:Hyclone公

司;已灭活胎牛血清:Hyclone公司,-20℃保存;胰蛋白酶(trypsin):Amersco公司;0.4%台盼蓝:Sigma公司;

[0220] 2、实验步骤:

[0221] (1) 细胞培养和移植性肿瘤动物模型的建立:人癌细胞株分别培养于含10%胎牛血清的DMEM或RPMI-1640培养液中,在37℃、5%CO<sub>2</sub>的条件下培养,收集对数生长期的细胞并制备成浓度为 $2 \times 10^7$ 个/ml的单细胞悬液,于超净工作台内每只裸小鼠于大腿后部皮下分别接种0.1ml细胞悬液,每天观察各注射点有无红肿破溃。约2-5周后,注射局部出现明显皮丘,所有裸鼠均出现直径约10-15mm的皮下结节,移植瘤模型建立;对于建立小鼠Lewis肺癌转移模型,制备成浓度为 $6 \times 10^6$ 个/ml的单细胞悬液,静脉注射0.1ml细胞悬液进入C57/BL6J小鼠尾静脉后分组第2天开始用药,用药剂量和方式同于裸鼠见如下说明。

[0222] (2) 裸鼠分组和给药:于接种约2-5周后将已建立皮下移植瘤模型的裸小鼠随机分为3组,每组7只;阴性对照组(溶媒DMSO 0.05%,腹腔注射0.2ml/只,每日一次;药物和成分均为腹腔注射(60-90mg/kg):抗癌药物顺铂(1.5mg/kg/day)、环磷酰胺(60mg/kg/2day)和恩度(8mg/kg)阳性对照组,实施例1-7获得的化合物及其中间体的各组,每日一次,用药治疗3-5周;对于检测药物对体内肿瘤EZH2和HDAC酶活性的影响,在用药6小时后分别切除肿瘤,分别提取总蛋白和提取核蛋白用于酶活性检测分析,用阴性对照为DMSO(0.05%)溶媒、阳性对照SAHA(suberoylanilide hydroxamic acid) 25mg/kg鼠)或实施例1-7获得的化合物及其中间体处理小鼠6小时后取瘤,总蛋白和核蛋白提取物由总蛋白裂解液和核蛋白裂解液提取(总蛋白裂解液、核蛋白裂解液以及PMSF购于碧云天生物技术研究),1mg肿瘤组织加入1mL裂解液中加入10μl PMSF,反复吹打混匀,冰上放置15min;将样品转移至1.5mL EP管中,14000r/min,4℃离心10min,将上清蛋白提取物转移到无菌EP管中用于检测酶活性。

[0223] (3) 裸鼠肿瘤瘤体生长的观察:每天观察裸鼠的活动情况(包括进食、大小便性状、精神状态等)、移植瘤的出瘤时间及生长情况,每2-3天测量一次体重、瘤体的大小,用游标卡尺量瘤体的长径a及短径b(mm),计算其体积,体积 $V = \pi/6 \cdot a \cdot b^2$  (mm<sup>3</sup>);

[0224] (4) 动物的处死:治疗实验结束,麻醉小鼠,照相;断颈处死裸鼠,在无菌条件下剥离瘤组织,称取瘤重;检测药物对各器官和组织的病理和毒性影响情况。

[0225] (5) 通过实验组移植瘤的瘤重与空白对照组瘤重(或肺转移瘤)相比较计算抑瘤率,即抑瘤率(%) = (1-实验组平均瘤重/对照平均瘤重) × 100%。

[0226] 3.实验结果(见表2)



[0227]

表2-1 实施例1-7获得的化合物及其中间体对多种人癌细胞移植瘤体内生长和小鼠肺癌转移的抑制作用\*

| 瘤种         | 受试化合物的疗效§ (抑制率%) *  |                    |                    |                    |                    |                    |                     |                     |                     |                     |                                              |                        |        |
|------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------------------------------|------------------------|--------|
|            | 化合<br>物 Ia          | 化合<br>物 Ib         | 化合<br>物 Ic         | 化合<br>物 Id         | 化合<br>物 Ie         | 化合<br>物 If         | 化合<br>物 Ig          | 化合<br>物 Ih          | 化合<br>物 IIf         | 化合<br>物 IJa         | A/顺铂<br>B/ CTX                               | ES                     | Ctrl   |
| A549       | 48.6%<br>*±<br>5.9  | 53.6%<br>*±<br>5.5 | 61.6%<br>*±<br>5.5 | 63.6%<br>*±<br>6.3 | 55.5%<br>*±<br>6.9 | 58.6%<br>*±<br>5.2 | 56.6%<br>*±<br>5.8  | 53.8%<br>*±<br>6.7  | 33.3%<br>*±<br>6.3  | 29.6%<br>*±<br>6.9  | A/46.7%<br>*±<br>6.5%; B/<br>52.4%<br>6.9*   | 38.9<br>%±<br>7.1*     | ±<br>- |
| MB-<br>231 | 50.1%<br>*±<br>8.7  | 59.1%<br>*±<br>7.6 | 54.1%<br>*±<br>7.3 | 53.1%<br>*±<br>7.9 | 50.9%<br>*±<br>7.5 | 52.6%<br>*±<br>7.1 | 59.1%<br>*±<br>7.8  | 55.1%<br>*±<br>8.6  | 44.5%<br>*±<br>5.2  | 31.1%<br>*±<br>5.3  | A/61.3%<br>*±<br>6.7%; B/<br>.43.7%<br>±7.9* | 33.5<br>%±<br>9.8*     | ±<br>- |
| MCF-<br>7  | 50.1%<br>*±<br>6.1  | 52.6%<br>*±<br>7.8 | 58.6%<br>*±<br>8.1 | 56.6%<br>*±<br>7.1 | 66.8%<br>*±<br>9.2 | 68.6%<br>*±<br>8.1 | 65.7%<br>*±<br>7.8  | 58.9%<br>*±<br>7.9  | 43.2%<br>*±<br>7.6  | 39.8%<br>*±<br>7.9  | A. 39.9%<br>*±<br>7.8; B.4<br>5.2%*±<br>8.3  | 36.6<br>%*<br>±<br>9.7 | ±<br>- |
| S-<br>7721 | 52.7%<br>±<br>11.5* | 60.8%<br>*±<br>8.9 | 63.2%<br>*±<br>8.6 | 67.2%<br>*±<br>8.6 | 64.8%<br>*±<br>9.3 | 65.7%<br>*±<br>8.6 | 53.6%<br>*±<br>9.7* | 57.7%<br>*±<br>8.9* | 44.6%<br>±<br>11.3* | 36.6%<br>±<br>11.1* | A. 69.6%<br>*±<br>7.9; B.4<br>7.7%*±<br>8.7  | 28.9<br>%*±<br>10.6    | ±<br>- |

[0228]

|            |                         |                     |                     |                 |                     |                      |                      |                      |                      |                     |                                                |                          |   |
|------------|-------------------------|---------------------|---------------------|-----------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|------------------------------------------------|--------------------------|---|
| PANC<br>-1 | 55.8%<br>*±<br>7.9      | 54.6%<br>*<br>±8.3  | 56.5%<br>*±<br>8.6  | 54.2%*<br>±9.6  | 56.6%*<br>±9.9      | 53.6%*<br>±<br>9.7   | 55.6%*<br>±9.3       | 51.3%*<br>±9.8       | 32.3%*<br>±12.5      | 33.4%<br>±<br>11.3* | A/25.3%<br>*±7.7                               | 16.8<br>%*±<br>12.6      | - |
| HeLa       | 54.7%<br>*<br>±8.8      | 53.9%<br>*<br>±9.1  | 53.7%<br>*<br>±8.6  | 57.9%*<br>±9.5  | 60.7%*<br>±9.9      | 50.9%*<br>±8.5       | 56.7%*<br>±8.9       | 62.9%*<br>±8.5       | 41.7%*<br>±11.5      | 38.7%*<br>±10.5     | A. 36.6%<br>*±7.5                              | 17.2<br>%*±<br>11.8      | - |
| LLC        | 55.4%<br>*<br>±9.8<br># | 58.2%<br>*±<br>9.6# | 74.2%<br>*±<br>9.1# | 69.2%*<br>±7. # | 61.6%*<br>±8.5<br># | 67.5%*<br>± 8.6<br># | 75.5%*<br>±13.6<br># | 77.9%*<br>±13.1<br># | 52.3%*<br>±11.2<br># | 36.8%*<br>±8.9      | A/46.5%<br>*±12.6<br>#; B/<br>37.1%*<br>±9.8 # | 42.7<br>%*±<br>13.8<br># | - |

注：\*  $p < 0.05$ ; 有关测试方法见上述实验方法部分; § 抑制率%是与 DMSO 溶媒对照组相比较、用药组对肿瘤重量的平均抑制率(%) ; # 小鼠 Lewis 肺癌的肿瘤肺转移抑制率%。

A549: 人肺癌; MB231: MDA-MB231 (雌激素受体阴性高转移的人乳腺癌); MCF-7: 雌激素受体阳性的人乳腺癌; S-7721: SMMC7721 (人肝癌); PANC-1: 人胰腺癌; HeLa: 人宫颈癌; LLC: Lewis lung cancer (高转移小鼠肺癌); TMC: 茶甲香酰胺组; TEC: 茶乙香酰胺组; TLC: 茶氯酸氯香酰胺组; TBrC: 茶氯酸溴香酰胺组; TFC: 茶氯酸氟香酰胺组; TNC: 茶氯酸硝香酰胺组; DTCLC: 茶双氯香酰胺组; DTBrC: 茶双溴香酰胺组; TE: 茶氯酸乙酯组; TM: 茶氯酸甲酯组; A: 顺铂组 (Cisplatin); B: 环磷酰胺组 (CTX); ES: 恩度组; Ctrl: 溶媒对照 (DMSO)。

动物病理和毒理学分析结果表明: 在实验期间, 全部合成分使用剂量 60 mg/kg 处理正常的动物和治疗的人癌移植瘤裸鼠, 未见产生毒副作用, 体重未见减少, 心、肝、脾、肾、胃肠道、生殖腺、脑、骨骼肌未见毒性。阳性对照药物顺铂组、环磷酰胺组小鼠有毒性反应, 表现体重下降、厌食、用药 2 周后出现腹部肿胀和行动迟缓等现象。阳性对照组顺铂、环磷酰胺和恩度的小鼠也出现体重下降、

[0229]

厌食和行动迟缓等毒性现象。

急性毒性实验结果：本发明的全部合成成分 2500 mg/kg 口服施用未见小鼠死亡。

表2-2 实施例1-7获得的化合物及其中间体对多种人癌动物移植瘤体内生长和小鼠肺癌转移的抑制作用\*

| 瘤种     | 受试化合物的疗效§（抑制率%）* |               |               |               |               |                |                |                |              |              |                |                |                             | BS           | Ctrl |
|--------|------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|----------------|----------------|--------------|--------------|----------------|----------------|-----------------------------|--------------|------|
|        | 化合物 Ia           | 化合物 Ib        | 化合物 Ic        | 化合物 Id        | 化合物 Ie        | 化合物 If         | 化合物 Ig         | 化合物 Ih         | 化合物 IIa      | 化合物 IIb      | 化合物 IIc        | 化合物 IId        | A/顺铂 B/ CTX                 |              |      |
| A549   | 51.6%<br>±9.9    | 60.6%<br>±9.5 | 67.6%<br>±5.5 | 69.6%<br>±6.3 | 61.5%<br>±8.9 | 64.6%<br>±9.2  | 66.6%<br>±9.9  | 63.8%<br>±8.9  | 31.7%<br>* ± | 38.6%<br>* ± | 63.8%<br>±8.9  | 66.6%<br>±9.9  | A/46.7%<br>B/52.6%<br>±     | 38.9%<br>±   | -    |
| MB-231 | 60.1%<br>±9.5    | 69.1%<br>±9.6 | 65.5%<br>±7.8 | 66.7%<br>±8.9 | 60.9%<br>±9.5 | 62.3%<br>±9.8  | 72.1%<br>±9.8  | 75.1%<br>±9.3  | 36.1%<br>* ± | 47.8%<br>* ± | 75.1%<br>±9.3  | 72.1%<br>±9.8  | A/61.3%<br>B/43.7%<br>±     | 33.5%<br>±   | -    |
| MCF-7  | 61.3%<br>±8.9    | 63.8%<br>±9.6 | 68.8%<br>±9.9 | 66.9%<br>±9.6 | 69.8%<br>±9.8 | 72.6%<br>±8.1  | 76.9%<br>±10.9 | 75.9%<br>±9.9  | 41.3%<br>* ± | 46.8%<br>* ± | 75.9%<br>±9.9  | 76.9%<br>±10.9 | A. 39.9%<br>B. 45.2%<br>* ± | 36.6%<br>* ± | -    |
| S-7721 | 61.9%<br>±       | 66.6%<br>±9.7 | 69.2%<br>±9.6 | 75.7%<br>±9.5 | 69.9%<br>±9.6 | 75.7%<br>±10.8 | 70.6%<br>±10.6 | 78.7%<br>±11.7 | 38.2%<br>±   | 46.8%<br>±   | 78.7%<br>±11.7 | 70.6%<br>±10.6 | A. 69.6%<br>B. 47.7%<br>* ± | 28.9%<br>* ± | -    |
| PANC-1 | 60.5%<br>±9.3    | 65.9%<br>±9.6 | 66.7%<br>±9.3 | 64.8%<br>±9.9 | 64.6%<br>±9.3 | 67.3%<br>±10.5 | 68.9%<br>±11.9 | 67.3%<br>±10.7 | 37.7%<br>±   | 34.8%<br>* ± | 67.3%<br>±10.7 | 68.9%<br>±11.9 | A/25.3%<br>7.7<br>* ±       | 16.8%<br>* ± | -    |

[0230]

|      |                     |                    |                    |                     |                |               |                 |                     |              |              |                                   |              |   |
|------|---------------------|--------------------|--------------------|---------------------|----------------|---------------|-----------------|---------------------|--------------|--------------|-----------------------------------|--------------|---|
| Hela | 62.9%<br>±9.6       | 63.8%<br>±10.5     | 65.8%<br>±9.8      | 71.9%<br>±10.7      | 70.5%<br>±9.3  | 66.8%<br>±9.8 | 70.3%<br>±9.6   | 72.6%<br>±9.7       | 41.7%<br>* ± | 38.7%<br>* ± | A. 36.6% ±<br>7.5                 | 17.2%<br>* ± | - |
| LLC  | 60.9%<br>±10.6<br># | 69.6%<br>±8.9<br># | 79.2%<br>±9.6<br># | 82.5%<br>±10.7<br># | 70.8%<br>±9.3# | 75.8%<br>9.2# | 79.9%<br>±12.3# | 80.7%<br>±12.8<br># | 54.7%<br>* ± | 38.5%<br>* ± | A/46.5% ±<br>12.6#; B/<br>37.1% ± | 42.7%<br>* ± | - |

注：\*  $p < 0.05$ ；有关测试方法见上述实验方法部分；S 抑制率%是与 DMSO 溶媒对照组相比较、用药组对肿瘤重量的平均抑制率（%）；# 小鼠 Lewis 肺癌的肿瘤肺转移抑制率%。

A549：人肺癌；MB231：MDA-MB231（雌激素受体阴性高转移的人乳腺癌）；MCF-7：雌激素受体阳性的人乳腺癌；S-7721：SMMC7721（人肝癌）；PANC-1：人胰腺癌；Hela：人宫颈癌；LLC：Lewis lung cancer（高转移小鼠肺癌）；TMC：茶甲香酰胺组；TEC：茶乙香酰胺组；TCLC：茶双溴香酰胺组；TBrC：茶氨酸溴香酰胺组；TFC：茶氨酸氟香酰胺组；TNC：茶氨酸硝香酰胺组；DTCLC：茶双氯香酰胺组；DTBrC：茶双溴香酰胺组；TB：茶氨酸乙酯组；TM：茶氨酸甲酯组；A：顺铂组（Cisplatin）；B：环磷酰胺组（CTX）；ES：恩度组；Ctrl：溶媒对照（DMSO）。

动物病理和毒理学分析结果表明：在实验期间，全部合成分使用剂量 90 mg/kg 处理正常的动物和治疗的人癌移植瘤裸鼠，未见产生毒副作用，体重未见减少，心、肝、脾、肾、胃肠道、生殖腺、脑、骨髓肌未见毒性。阳性对照药物顺铂组、环磷酰胺组小鼠有毒性反应，表现体重下降、厌食、用药 2 周后出现腹部肿胀和行动迟缓等现象。阳性对照组顺铂、环磷酰胺和恩度的小鼠也出现体重下降、厌食和行动迟缓等毒性现象。

急性毒性实验结果：本发明的全部合成分 2500 mg/kg 口服施用未见小鼠死亡。

[0231] 实施例10:实施例1-7获得的化合物的荧光显像

[0232] 参照文献方法(Chen Y,et al., 2-(3-{1-Carboxy-5-[ (6-[18F]fluoro-

pyridine-3-carbonyl)-amino]-pentyl}-ureido)-pentanedioic acid, [18F]DCFPyL, a PSMA-based PET imaging agent for prostate cancer. Clin Cancer Res, 2011, 17 (24): 7645-53.), 测定了实施例1-7获得的化合物的荧光显像和波长范围, 结果见下表3以及附图1。

[0233] 1、实验动物, 细胞系, 主要试剂和仪器: 详细参考实施例9部分。

[0234] 2、实验步骤: 对于体外荧光显像和检测: 用实施例1-7获得的化合物Ia-Ih在1.5ml塑料离心管中配制为60mg/0.2ml浓度, 分别使用多功能酶标仪和动物体内显像仪在如下激发和发射波长条件检测记录荧光信号和图像, 获得结果如表3和附图1 (小试管照片); 对于动物体内荧光显像的检测: 实验动物禁食16小时 (饮水正常供应) 后, 用实施例1-7获得的化合物Ia-Ih按照60mg/kg体重/0.2ml浓度配制和动物腹腔给药, 使用动物体内显像仪在如下激发和发射波长条件检测记录荧光图像, 获得的结果如附图1 (动物体内显像照片); 实验激发波长范围: 360nm至590nm; 检测波长范围: 410nm至700nm。

[0235] 3. 实验结果 (见表3)

[0236] 表3 实施例1-7获得的化合物Ia-Ih在动物体内外可以检测的荧光显像和波长范围

[0237]

| 化合物与荧光波长 | 化合物 Ia  | 化合物 Ib  | 化合物 Ic  | 化合物 Id  | 化合物 Ie  | 化合物 If  | 化合物 Ig  | 化合物 Ih  |
|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 激发 nm    | 360-610 | 360-610 | 360-610 | 36-610  | 360-610 | 360-610 | 360-610 | 360-610 |
| 发射 nm    | 430-650 | 430-650 | 430-670 | 430-670 | 430-650 | 430-650 | 430-690 | 430-690 |

[0238] 注: 实验检测条件: 实施例1-7获得的化合物Ia-Ih在动物体内外可以检测的荧光显像和波长范围

[0239] (1) 实验给药浓度: 60mg/kg体重/0.2ml; (2) 激发波长范围: 360nm至590nm; 可检测波长范围: 410nm至690nm。

[0240] 实施例11: 实施例1-7获得的化合物Ia-Ih对动物体内EZH2酶活性抑制作用实验;

[0241] 1、实验动物, 细胞系、仪器和主要试剂、:

[0242] 实验动物裸小鼠, 细胞系和仪器详见上述详细参考实施例9动物实验部分。

[0243] EZH2 Assay Kit, 购自BPS Bioscience公司。

[0244] 检测实施例1-7获得的化合物对EZH2酶活性的抑制作用, 实验方法严格按照试剂盒附带的说明书操作, 步骤如下:

[0245] 2、实验步骤:

[0246] (1) 向微孔板中每个反应孔中加入150μl的TBST缓冲液, 室温下孵育15min, 甩去缓冲液;

[0247] (2) 按照说明, 配制S-腺苷甲硫氨酸和EZH2酶工作液, 操作始终在冰浴上进行;

[0248] (3) 按照说明书所注明的比例, 配制空白对照品, 底物对照品, 阳性对照品和抑制剂对照品;

[0249] (4) 将配制好的各对照品和待测试的样品(各组肿瘤蛋白提取物取代EZH2酶)分别加入反应孔中,50 $\mu$ l/孔,室温下反应1h,每个样品均设2个平行孔;各组肿瘤蛋白提取物获得方法详见如上(四)动物实验部分。洗板封闭:每个反应孔加入200 $\mu$ l TBST缓冲液洗板,重复3次;再向每个反应孔加入100 $\mu$ l封闭缓冲液,摇床上摇动封闭10min,弃去液体;

[0250] (5) 将稀释好的一抗工作液加入反应孔中,100 $\mu$ l/孔,摇床上反应1h;

[0251] (6) 洗板封闭,同操作(5);

[0252] (7) 将稀释好的HRP标记的二抗工作液加入反应孔中,100 $\mu$ l/孔,摇床上反应30min;

[0253] (8) 洗板封闭,同操作(5);

[0254] (9) 将HRP化学发光底物A和B在冰浴上等体积混合均匀后,加入反应孔中,100 $\mu$ l/孔;

[0255] (10) 立即在酶标仪上读取荧光数值

[0256] 3、实验结果(见表4)

[0257] 表4 实施例1—7获得的化合物Ia—Ih对体内调节与肿瘤生长、侵袭和转移、心脑血管疾病、免疫缺陷疾病以及炎症等密切相关酶活性的影响

[0258]

| 有效浓度<br>酶活性                      | 实施例1-7获得的化合物 Ia-Ih 对体内生长肿瘤相关重要酶活性调节作用的有效剂量与下调或上调率 (%) |                                             |                                              |                                              |                                                                                          |                                                                                         |                                                                                         |                                                                                         |      |
|----------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|------|
|                                  | 化合物 Ia                                                | 阳性药物对照 (SAHA)                               | 化合物 Ib                                       | 阳性药物对照 (SAHA)                                | 化合物 Ic                                                                                   | 阳性药物对照 (SAHA)                                                                           | 化合物 Id                                                                                  | 阳性药物对照 (SAHA)                                                                           | 溶媒对照 |
| 下调 EZH2 酶活性 / 抑制率 (%)            | 52% (LLC) - 54%* (SMMC-7721)                          | 50%* (LLC-49%* (SMMC-7721);                 | 54%* (A549) - 57%* (SMMC-7721)               | 53%* (A549) - 49%* (SMMC-7721);              | 61%* (A549) - 59%* (SMMC7721); 58%* (MDA-MB231) 56%* (MCF7)                              | 53%* (A549); 49%* (SMMC7721); 55%* (MDA-MB231) 53%* (MCF7)                              | 61%* (A549) - 59%* (SMMC7721); 58%* (MDA-MB231) 56%* (MCF7)                             | 53%* (A549) - 49%* (SMMC7721); 55%* (MDA-MB231) 53%* (MCF7)                             | -    |
| 下调 HDA C3 和 HDA C4 酶活性 / 抑制率 (%) | 55%* 和 52%* (LLC) - 60%* 和 58%* (SMMC7721)            | 51%* 和 49%* (LLC) - 55%* 和 57%* (SMMC-7721) | 65%* 和 62%* (A549) - 63%* 和 61%* (SMMC-7721) | 63%* 和 61%* (A549) - 55%* 和 57%* (SMMC-7721) | 71%* 和 73%* (A549) - 65%* 和 67%* (SMMC-7721); 63%* 和 65%* (MDA-MB231) 60%* 和 63%* (MCF7) | 63%* 和 61%* (A549) - 55%* 和 57%* (SMMC7721); 56%* 和 59%* (MDA-MB231) 53%* 和 56%* (MCF7) | 71%* 和 73%* (A549) - 65%* 和 67%* (SMMC7721); 63%* 和 65%* (MDA-MB231) 60%* 和 63%* (MCF7) | 63%* 和 61%* (A549) - 55%* 和 57%* (SMMC7721); 56%* 和 59%* (MDA-MB231) 53%* 和 56%* (MCF7) | -    |
| 上调 H3 乙酰化水平 (%)                  | 56%* 和 53%* (LLC) - 61%* 和 63%* (SMMC7721)            | 55%* 和 52%* (LLC) - 60%* 和 63%* (SMMC7721); | 66%* 和 67%* (A549) - 63%* 和 65%* (SMMC7721)  | 63%* 和 66%* (A549) - 60%* 和 63%* (SMMC7721); | 75%* 和 79%* (A549) - 73%* 和 77%* (SMMC7721); 70%* 和 72%* (MDA-MB231) 67%* 和 69%* (MCF7)  | 63%* 和 66%* (A549) - 60%* 和 63%* (SMMC7721); 57%* 和 60%* (MDA-MB231) 55%* 和 58%* (MCF7) | 75%* 和 79%* (A549) - 73%* 和 77%* (SMMC7721); 70%* 和 72%* (MDA-MB231) 67%* 和 69%* (MCF7) | 63%* 和 66%* (A549) - 60%* 和 63%* (SMMC7721); 57%* 和 60%* (MDA-MB231) 55%* 和 58%* (MCF7) | -    |
| 上调 H4 乙酰化水平 (%)                  | 60%* 和 63%* (LLC) - 65%* 和 68%* (SMMC7721)            | 55%* 和 56%* (LLC) - 61%* 和 64%* (SMMC7721)  | 68%* 和 69%* (A549) - 65%* 和 68%* (SMMC7721)  | 65%* 和 67%* (A549) - 61%* 和 64%* (SMMC7721)  | 78%* 和 80%* (A549) - 75%* 和 78%* (SMMC7721); 72%* 和 75%*                                 | 65%* 和 67%* (A549) - 61%* 和 64%* (SMMC7721); 57%* 和 62%*                                | 78%* 和 80%* (A549) - 75%* 和 78%* (SMMC7721); 72%* 和 75%*                                | 65%* 和 67%* (A549) - 61%* 和 64%* (SMMC7721); 57%* 和 62%*                                | -    |

[0259]

|   |  |  |  |  |                                              |                                              |                                              |                                              |  |
|---|--|--|--|--|----------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|--|
| ) |  |  |  |  | ( MDA-MB2<br>31)<br>70%* 和<br>73%*<br>(MCF7) | ( MDA-MB2<br>31)<br>58%* 和<br>62%*<br>(MCF7) | ( MDA-MB2<br>31)<br>70%* 和<br>73%*<br>(MCF7) | ( MDA-MB2<br>31)<br>58%* 和<br>62%*<br>(MCF7) |  |
|---|--|--|--|--|----------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|--|

[0260] 表4—续

[0261]

| 有效<br>浓度<br>酶活<br>性                                        | 化合物 Ie                                                                                                            | 阳性药物对<br>照 (SAHA)                                                                                                 | 化合物 If                                                                                                            | 阳性药物对<br>照 (SAHA)                                                                                                 | 化合物 Ig                                                                                                            | 化合物 Ih                                                                                                            | 阳性药物对<br>照 (SAHA)                                                                                                 | 溶<br>媒<br>对<br>照 |
|------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 下调<br>EZH2<br>酶活<br>性 /<br>抑制<br>率<br>(%)                  | 58%* (A549)<br>—<br>56%*<br>(SMMC7721)<br>;<br>59%*<br>(MDA-MB231)<br>;<br>62%* (MCF7)                            | 53%* (A549)<br>—<br>49%*<br>(SMMC7721)<br>;<br>55%*<br>(MDA-MB231)<br>;<br>53%* (MCF7)                            | 65%* (A549)<br>—<br>64%*<br>(SMMC7721)<br>;<br>63%*<br>(MDA-MB231)<br>;<br>66%* (MCF7)                            | 53%* (A549)<br>—<br>49%*<br>(SMMC7721)<br>;<br>55%*<br>(MDA-MB231)<br>;<br>53%* (MCF7)                            | 57%* (A549)<br>—<br>58%*<br>(SMMC7721)<br>;<br>61%*<br>(MDA-MB231)<br>;<br>65%* (MCF7)                            | 55%* (A549)<br>—<br>56%*<br>(SMMC7721)<br>;<br>59%*<br>(MDA-MB231)<br>;<br>61%* (MCF7)                            | 52% (A549);<br>48%*<br>(SMMC7721)<br>;<br>54%*<br>(MDA-MB231)<br>;<br>52%* (MCF7)                                 | —                |
| 下调<br>HDAC<br>3 和<br>HDAC<br>4 酶<br>活性<br>/ 抑<br>制率<br>(%) | 70%*和 72%*<br>(A549) —<br>63%*和 65%*<br>(SMMC7721)<br>;<br>60%*和 62%*<br>(MDA-MB231)<br>;<br>65%*和 67%*<br>(MCF7) | 63%*和 61%*<br>(A549) —<br>55%*和 57%*<br>(SMMC7721)<br>;<br>56%*和 59%*<br>(MDA-MB231)<br>;<br>53%*和 56%*<br>(MCF7) | 73%*和 75%*<br>(A549) —<br>66%*和 68%*<br>(SMMC7721)<br>;<br>65%*和 67%*<br>(MDA-MB231)<br>;<br>67%*和 69%*<br>(MCF7) | 63%*和 61%*<br>(A549) —<br>55%*和 57%*<br>(SMMC7721)<br>;<br>56%*和 59%*<br>(MDA-MB231)<br>;<br>53%*和 56%*<br>(MCF7) | 61%*和 63%*<br>(A549) —<br>62%*和 64%*<br>(SMMC7721)<br>;<br>64%*和 66%*<br>(MDA-MB231)<br>;<br>66%*和 68%*<br>(MCF7) | 57%*和 59%*<br>(A549) —<br>60%*和 62%*<br>(SMMC7721)<br>;<br>62%*和 64%*<br>(MDA-MB231)<br>;<br>64%*和 66%*<br>(MCF7) | 62%*和 60%*<br>(A549) —<br>54%*和 56%*<br>(SMMC7721)<br>;<br>55%*和 58%*<br>(MDA-MB231)<br>;<br>52%*和 55%*<br>(MCF7) | —                |
| 上调<br>H3<br>乙酰<br>化水<br>平<br>(%)                           | 73%*和 76%*<br>(A549) —<br>71%*和 74%*<br>(SMMC7721)<br>;<br>72%*和 75%*<br>(MDA-MB231)<br>;<br>69%*和 71%*<br>(MCF7) | 63%*和 66%*<br>(A549) —<br>60%*和 63%*<br>(SMMC7721)<br>;<br>57%*和 60%*<br>(MDA-MB231)<br>;<br>55%*和 58%*<br>(MCF7) | 76%*和 79%*<br>(A549) —<br>75%*和 78%*<br>(SMMC7721)<br>;<br>73%*和 75%*<br>(MDA-MB231)<br>;<br>71%*和 73%*<br>(MCF7) | 63%*和 66%*<br>(A549) —<br>60%*和 63%*<br>(SMMC7721)<br>;<br>57%*和 60%*<br>(MDA-MB231)<br>;<br>55%*和 58%*<br>(MCF7) | 65%*和 67%*<br>(A549) —<br>66%*和 68%*<br>(SMMC7721)<br>;<br>69%*和 71%*<br>(MDA-MB231)<br>;<br>72%*和 74%*<br>(MCF7) | 64%*和 66%*<br>(A549) —<br>65%*和 67%*<br>(SMMC7721)<br>;<br>67%*和 69%*<br>(MDA-MB231)<br>;<br>68%*和 70%*<br>(MCF7) | 61%*和 63%*<br>(A549) —<br>61%*和 63%*<br>(SMMC7721)<br>;<br>58%*和 60%*<br>(MDA-MB231)<br>;<br>54%*和 56%*<br>(MCF7) | —                |
| 上调<br>H4<br>乙酰<br>化水<br>平<br>(%)                           | 75%*和 77%*<br>(A549) —<br>71%*和 73%*<br>(SMMC7721)<br>;<br>73%*和 76%*<br>(MDA-MB231)<br>;<br>75%*和 77%*<br>(MCF7) | 65%*和 67%*<br>(A549) —<br>61%*和 64%*<br>(SMMC7721)<br>;<br>57%*和 62%*<br>(MDA-MB231)<br>;<br>58%*和 62%*<br>(MCF7) | 77%*和 80%*<br>(A549) —<br>76%*和 78%*<br>(SMMC7721)<br>;<br>73%*和 74%*<br>(MDA-MB231)<br>;<br>74%*和 76%*<br>(MCF7) | 65%*和 67%*<br>(A549) —<br>61%*和 64%*<br>(SMMC7721)<br>;<br>57%*和 62%*<br>(MDA-MB231)<br>;<br>58%*和 62%*<br>(MCF7) | 72%*和 74%*<br>(A549) —<br>73%*和 75%*<br>(SMMC7721)<br>;<br>74%*和 76%*<br>(MDA-MB231)<br>;<br>76%*和 78%*<br>(MCF7) | 70%*和 72%*<br>(A549) —<br>71%*和 73%*<br>(SMMC7721)<br>;<br>72%*和 74%*<br>(MDA-MB231)<br>;<br>73%*和 75%*<br>(MCF7) | 64%*和 66%*<br>(A549) —<br>60%*和 62%*<br>(SMMC7721)<br>;<br>56%*和 60%*<br>(MDA-MB231)<br>;<br>57%*和 59%*<br>(MCF7) | —                |

[0262] 注:\* $p < 0.05$ ;有关测试方法见上述实验方法部分。H3和H4乙酰化水平(%)通过 Western Blotting分LLC:高转移Lewis小鼠肺癌析获得,方法详见如下实施例12-13相关部



分内容。

[0263] 实施例12:实施例1—7获得的化合物Ia-Ih对组蛋白脱乙酰基酶(HDAC)酶活性抑制作用的实验;

[0264] 1、实验动物,细胞系、仪器和主要试剂

[0265] 实验动物裸小鼠,细胞系和仪器详见上述详细参考实施例9动物实验部分。

[0266] EpiQuik HDAC Activity/Inhibition Assay Kit(Colorimetric),Epigentek公司;

[0267] EpiQuik Nuclear Extraction Kit,Epigentek公司;

[0268] 2、实验步骤:

[0269] (1)严格按照EpiQuik Nuclear Extraction Kit说明书的操作要求,制备药物处理的肿瘤核提取物见上述(四)动物实验部分;每个样品均设2个平行孔;

[0270] (2)在每个反应孔中加入样品稀释液50 $\mu$ l,封板膜封板后室温下反应30min;

[0271] (3)小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液150 $\mu$ l,静置30秒后弃去,如此重复2次,拍干;

[0272] (4)将2 $\mu$ l的HDAC酶或肿瘤组织核提取物分别与28 $\mu$ l的样品稀释液混匀,加入孔中,封板膜封板后37℃下反应60min;

[0273] (5)洗板3次,操作同(2);将稀释好的捕捉抗体工作液加入到每个反应孔中,50 $\mu$ l/孔,室温下在摇床上反应60min;

[0274] (6)洗板4次,操作同(2);

[0275] (7)将稀释好的检测抗体工作液加入到每个反应孔中,50 $\mu$ l/孔,室温下反应30min;

[0276] (8)洗板5次,操作同(2);

[0277] 加入显色剂,100 $\mu$ l/孔,室温下避光显色2-10min;

[0278] (9)当标准品孔的颜色变为中等强度的蓝色时,每孔加入50 $\mu$ l的终止液终止反应,此时蓝色立转黄色;

[0279] (10)450nm波长依序测量各孔的吸光度(OD值)。测定应在加终止液后15分钟以内进行;

[0280] (12)酶活性抑制率按照以下公式计算:

[0281] 抑制率% =  $[1 - (\text{OD阳性对照} - \text{OD样品}) / (\text{OD阳性对照} - \text{OD空白对照})] \times 100\%$

[0282] 3、实验结果(见表4)

[0283] 实施例13:实施例1—7获得的化合物Ia-Ih对多种肿瘤生长、侵袭和转移、心脑血管疾病和免疫缺陷疾病以及炎症等等密切相关蛋白因子水平调控作用实验

[0284] 应用Western Blotting法检测实施例1—7获得的化合物Ia-Ih对以下肿瘤相关蛋白因子水平调控作用,步骤如下:

[0285] 1、主要试剂和仪器:

[0286] 抗体:VEGFR,EGFR,c-Met,K-Ras,H-Ras,Akt,NF- $\kappa$ B,Cyclin D1,ER-alpha,Dvl-1,Dvl-2,Dvl-3,MMP-9,MMP2, $\beta$ -catenin,Bcl-2,Bax,p53,p21,E-cadherin,Caspase3蛋白一抗购于美国Cell Signaling Technology公司和Santa Cruz Technology公司;H3乙酰化、H4乙酰化和HDAC(HDAC3和HDAC4等)Antibody Sample Kit抗体购自美国Cell Signaling

Technology公司。

[0287] RPMI-1640, DMEM培养液和已灭活胎牛血清购于Hyclone公司;胰蛋白酶(trypsin)购于Amersco公司;蛋白质分子Marker、0.4%台盼蓝:购于美国Sigma公司;PVDF膜购于Millipore公司;

[0288] 总蛋白裂解液和核蛋白裂解液以及PMSF(苯甲基磺酰氟)溶液购于碧云天生物技术有限公司;二抗:辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔、辣根过氧化物酶标记驴抗山羊、彩色预染蛋白分子量标准、ECL Plus发光试剂盒、定影粉、显影粉购于碧云天生物技术有限公司;医用X射线胶片购于柯达公司。

[0289] 二氧化碳培养箱:3111型,美国Thermo公司;倒置显微镜:CKX31型,日本Olympus公司;台式高速冷冻离心机:5810R型,德国Eppendorf公司;微量加样器:德国Eppendorf公司;细胞培养塑料平板(6孔):Nunc lon公司;小型垂直电泳槽:美国BIO-RAD公司;小型湿式电转移槽:美国BIO-RAD公司;脱色摇床:TS-1型,江苏海门市基林贝尔仪器制造有限公司;制冰机:XB 70型,GRANT公司;OMEGA10凝胶成像分析仪:美国M1TRA LUM公司;封口机:SF-B型,温州市兴业机械有限公司;蛋白分析灯箱:上海荆轲实业有限公司。

[0290] 2、实验步骤:

[0291] (1) 细胞处理:取对数生长期的细胞接种于6孔板中,待细胞密度长至70%~80%左右,分别向细胞中加入受检测实施例1-7获得的化合物Ia-Ih、阳性对照药物环磷酰胺等,使其终浓度分别为1-1500 $\mu$ M/L,另设无药物含溶媒(0.01%DMSO)等体积细胞培养液的对照组,继续培养48h后,收集细胞;

[0292] (2) 细胞蛋白提取:用冷PBS洗2次后,用总蛋白或核蛋白细胞裂解液裂解细胞,1mL裂解液中加入10 $\mu$ L PMSF,反复吹打混匀,冰上放置15min;将样品转移至1.5mL EP管中,14000r/min,4 $^{\circ}$ C离心10min,将上清转移到无菌EP管中,-80 $^{\circ}$ C保存;

[0293] (3) 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE):使用等量的蛋白裂解液样品分离蛋白、转膜、封闭、先后分别使用适当的一抗和二抗处理、洗膜之后、用ECL试剂盒显色,X光片曝光检测印迹蛋白条带;用Gel-Pro Analyzer进行灰度定量分析,对照与药物处理各浓度组分别与各自的内参的光密度值相比,所得的比值分别与对照组相比,半定量蛋白表达水平。

[0294] 3、实验结果(见表5和表6)

[0295] 表5 实施例1-7获得的化合物Ia-Ih抑制肿瘤生长、侵袭和转移、心脑血管疾病免疫缺陷疾病以及炎症等密切相关的蛋白因子

[0296]

| 有效浓度(mM/L)<br>蛋白或酶         | 化合物 Ia   | 化合物 Ib   | 化合物 Ic   | 化合物 Id   | 阳性药物对照 | 空白对照<br>(溶媒) |
|----------------------------|----------|----------|----------|----------|--------|--------------|
| Bcl-2/Bax                  | <0.125*  | <0.12 *  | <0.1 *   | <0.1 *   | >1.0 * | -            |
| Cyclin D1                  | <0.125 * | <0.12 *  | <0.1 *   | <0.1 *   | >1.0 * | -            |
| Akt                        | <0.125 * | <0.12 *  | <0.1 *   | <0.1 *   | >1.0 * | -            |
| K-Ras                      | <0.085 * | <0.075 * | <0.065 * | <0.06 *  | >1.0 * | -            |
| H-Ras                      | <0.085 * | <0.075 * | <0.065 * | <0.06 *  | >1.0 * | -            |
| NF-κB                      | <0.125 * | <0.12 *  | <0.1 *   | <0.08 *  | >1.0 * | -            |
| NF-κB-DNA binding activity | <0.135 * | <0.13 *  | <0.125 * | <0.12 *  | >1.0 * | -            |
| Nuclear β-catenin          | <0.12 *  | <0.12 *  | <0.1 *   | <0.1 *   | >1.0 * | -            |
| Dvl-1                      | <0.135 * | <0.30 *  | <0.25 *  | <0.25 *  | >1.0 * | -            |
| VEGFR1                     | <0.125 * | <0.12 *  | <0.1 *   | <0.1 *   | >1.0 * | -            |
| VEGFR2                     | <0.125 * | <0.12 *  | <0.1 *   | <0.1 *   | >1.0 * | -            |
| EGFR                       | <0.125 * | <0.12 *  | <0.1 *   | <0.1 *   | >1.0 * | -            |
| c-Met                      | <0.16 *  | <0.155 * | <0.5 *   | <0.15 *  | >1.0 * | -            |
| HDAC3                      | <0.075 * | <0.07 *  | <0.065 * | <0.065 * | >0.5 * | -            |
| HDAC4                      | <0.065 * | <0.06 *  | <0.05 *  | <0.05 *  | >0.5 * | -            |

[0297] 表5—续

[0298]

| 有效浓度<br>(mM/L) | 实施例1-7获得的化合物 Ia-Ih 对相关重要信号传导通路受体、调控蛋白和激酶抑制作用的有效浓度 (IC50) |          |                     |              |
|----------------|----------------------------------------------------------|----------|---------------------|--------------|
| 蛋白或酶           | 化合物 Ie                                                   | 化合物 If   | 阳性药物对照<br>(恩度、环磷酰胺) | 空白对照<br>(溶媒) |
| Bcl-2/Bax      | <0.18 *                                                  | <0.09 *  | >0.25 *             | -            |
| Cyclin D1      | <0.16 *                                                  | <0.09 *  | >0.25 *             | -            |
| Akt            | <0.16 *                                                  | <0.09 *  | >0.25 *             | -            |
| K-Ras          | <0.06 *                                                  | <0.055 * | >0.25 *             | -            |
| H-Ras          | <0.06 *                                                  | <0.055 * | >0.25 *             | -            |
| NF-κB          | <0.06 *                                                  | <0.06 *  | >0.25 *             | -            |

[0299]

|                                     |          |          |         |   |
|-------------------------------------|----------|----------|---------|---|
| NF- $\kappa$ B-DNA binding activity | <0.1 *   | <0.10 *  | >0.25 * | - |
| Nuclear $\beta$ -catenin            | <0.065 * | <0.09 *  | >0.25 * | - |
| Dvl-1                               | <0.15 *  | <0.20 *  | >0.25 * | - |
| VEGFR1                              | <0.11 *  | <0.09 *  | >0.25 * | - |
| VEGFR2                              | <0.09 *  | <0.09 *  | >0.25 * | - |
| EGFR                                | <0.11 *  | <0.1 *   | >0.25 * | - |
| c-Met                               | <0.145 * | <0.141 * | >0.25 * | - |
| HDAC3                               | <0.055 * | <0.055 * | >0.25 * | - |
| HDAC4                               | <0.05 *  | <0.045 * | >0.25 * | - |

[0300] 表5—续

[0301]

| 有效浓度<br>(mM/L)                      | 实施例 1-7 获得的化合物及其中间体对相关重要信号传导通路受体、调控蛋白和激酶抑制作用的有效浓度 (IC50) |          |                         |           |
|-------------------------------------|----------------------------------------------------------|----------|-------------------------|-----------|
|                                     | 化合物 Ig                                                   | 化合物 Ih   | 阳性药物对照<br>(恩度 Endostar) | 空白对照 (溶媒) |
| 蛋白或酶                                |                                                          |          |                         |           |
| Bcl-2/Bax                           | <0.07 *                                                  | <0.07 *  | >500mg/L*               | -         |
| Cyclin D1                           | <0.07 *                                                  | <0.07 *  | >500mg/L                | -         |
| Akt                                 | <0.07 *                                                  | <0.07 *  | >500mg/L *              | -         |
| K-Ras                               | <0.065 *                                                 | <0.065 * | >500mg/L *              | -         |
| H-Ras                               | <0.065 *                                                 | <0.065 * | >500mg/L *              | -         |
| NF- $\kappa$ B                      | <0.1 *                                                   | <0.1 *   | >500mg/L *              | -         |
| NF- $\kappa$ B-DNA binding activity | <0.125 *                                                 | <0.125 * | >500mg/L *              | -         |
| Nuclear $\beta$ -catenin            | <0.1 *                                                   | <0.1 *   | >500mg/L *              | -         |
| Dvl-1                               | <0.125 *                                                 | <0.25 *  | >500mg/L *              | -         |
| VEGFR1                              | <0.1 *                                                   | <0.1 *   | >250mg/L *              | -         |
| VEGFR2                              | <0.1 *                                                   | <0.1 *   | >250mg/L *              | -         |
| EGFR                                | <0.1 *                                                   | <0.1 *   | >500mg/L *              | -         |
| c-Met                               | <0.15 *                                                  | <0.5 *   | >500mg/L *              | -         |
| HDAC3                               | <0.065 *                                                 | <0.065 * | >500mg/L *              | -         |
| HDAC4                               | <0.05 *                                                  | <0.05 *  | >500mg/L *              | -         |
| Dvl-2                               | <0.1 *                                                   | <0.1 *   | >250mg/L *              | -         |
| DV1-3                               | <0.1 *                                                   | <0.1 *   | >250mg/L *              | -         |
| ER- $\alpha$                        | <0.1 *                                                   | <0.1 *   | >250mg/L *              | -         |
| MMP9                                | <0.065 *                                                 | <0.065 * | >250mg/L *              | -         |
| MMP2                                | <0.05 *                                                  | <0.05 *  | >250mg/L *              | -         |

[0302] 注:  $p < 0.05$ ; 有关测试方法见上述实验方法部分。

[0303] 表中有关蛋白因子均分别来自于由实施例1—7获得的化合物Ia—Ih或阳性对照抗癌药物或DMSO溶媒处理的人肝癌、Lewis肺癌等癌细胞系和这些肿瘤组织的蛋白裂解液, 用Western blotting检测分析的结果。

[0304] 表6 实施例1—7获得的化合物Ia—Ih对与肿瘤生长、侵袭和转移、心脑血管疾病、免疫缺陷疾病以及炎症等密切相关蛋白因子水平和酶活性的影响

[0305]

| 有效浓度<br><br>蛋白或酶     | 实施例1—7获得的化合物Ia—Ih对相关重要调控蛋白表达水平和酶活性调节作用的有效浓度 (mM/L) |          |           |           |        |           |
|----------------------|----------------------------------------------------|----------|-----------|-----------|--------|-----------|
|                      | 化合物 Ia                                             | 化合物 Ib   | 化合物 Ic    | 化合物 Id    | 阳性药物对照 | 空白对照 (溶媒) |
| 50%上调 p53            | < 0.125 *                                          | < 0.12 * | < 0.1 *   | < 0.1 *   | >1.5 * | —         |
| 50%上调 p21            | < 0.125 *                                          | < 0.12 * | < 0.1 *   | < 0.1 *   | >1.5 * | —         |
| 50%上调 Caspase-3      | < 0.125 *                                          | < 0.12 * | < 0.1 *   | < 0.1 *   | >1.5 * | —         |
| 50%上调胞浆与线粒体细胞色素 C 之比 | < 0.075 *                                          | < 0.07 * | < 0.065 * | < 0.065 * | >1.0 * | —         |
| 50%上调 E-cadherin     | < 0.075 *                                          | < 0.07 * | < 0.065 * | < 0.065 * | >1.0 * | —         |

[0306] 表6—续

[0307]

| 有效浓度<br><br>蛋白或酶      | 实施例1—7获得的化合物Ia—Ih对相关重要调控蛋白表达水平和酶活性调节作用的有效浓度 (mM/L) |           |                  |           |
|-----------------------|----------------------------------------------------|-----------|------------------|-----------|
|                       | 化合物 Ie                                             | 化合物 If    | 阳性药物对照 (恩度、环磷酰胺) | 空白对照 (溶媒) |
| 50%*上调 p53            | < 0.1 *                                            | < 0.065 * | >0.25 *          | —         |
| 50%*上调 p21            | < 0.1 *                                            | < 0.065 * | >0.25 *          | —         |
| 50%*上调 Caspase-3      | < 0.1 *                                            | < 0.08 *  | >0.25 *          | —         |
| 50%*上调胞浆与线粒体细胞色素 C 之比 | < 0.065 *                                          | < 0.065 * | >0.25 *          | —         |
| 50%*上调 E-cadherin     | < 0.065 *                                          | < 0.065 * | >0.25 *          | —         |

[0308] 表6—续

[0309]

| 有效<br>浓度<br>蛋白<br>或酶 | 实施例 1-7 获得的化合物 Ia-Ih 对相关重要调控蛋白表达水平和酶活性调节作用的有效浓度 (IC <sub>50</sub> ) (mM/L) |          |                  |              |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------|----------|------------------|--------------|
|                      | 化合物 Ig                                                                     | 化合物 Ih   | 阳性药物对照<br>(长春新碱) | 空白对照<br>(溶媒) |
| 50%上调<br>p53         | < 0.07 *                                                                   | < 0.07 * | > 0.07 *         | —            |
| 50%上调<br>p21         | < 0.07 *                                                                   | < 0.1 *  | > 0.07           | —            |
| 50%上调                | < 0.07 *                                                                   | < 0.07 * | > 0.07           | —            |

[0310]

|                          |          |          |          |   |
|--------------------------|----------|----------|----------|---|
| Caspase-3                |          |          |          |   |
| 50%上调胞浆与<br>线粒体细胞色素 C 之比 | < 0.07 * | < 0.07 * | > 0.07 * | — |
| 50%上调<br>E-cadherin      | < 0.07 * | < 0.07 * | > 0.07 * | — |

[0311] 注:\*p<0.05;有关测试方法见上述实验方法部分。

[0312] #:有关肿瘤抑制蛋白p53、细胞周期抑制蛋白p21、细胞凋亡水解酶Caspase-3、细胞胞浆与线粒体细胞色素C之比和细胞粘附蛋白E-cadherin均分别来自于由实施例1—7获得的化合物Ia-Ih或阳性对照抗癌药物或DMSO溶媒处理的肝癌Lewis肺癌等癌细胞系和这些肿瘤组织的蛋白裂解液,用Western blotting检测分析的结果。

[0313] 实施例14:实施例1—7获得的化合物Ia-Ih对核蛋白因子NF-κB (p65) -DNA binding活性抑制作用体外实验 (EMSA)

[0314] 1、主要试剂和仪器:

[0315] 化学发光法EMSA试剂盒:美国Pierce Biotechnology公司;

[0316] 生物素标记EMSA探针NF-κB:美国Pierce Biotechnology公司;

[0317] 蛋白质分子Marker和0.4%台盼蓝:美国Sigma公司;PVDF膜:Millipore公司;

[0318] 核蛋白裂解液、PMSF (苯甲基磺酰氟) 溶液:碧云天生物技术研究

[0319] 彩色预染蛋白分子量标准、ECL Plus发光试剂盒、定影粉、显影粉:碧云天生物技术研究。医用X射线胶片:柯达公司。

[0320] 2、实验步骤:

[0321] 分别用1-500μM/L的实施例1—7获得的化合物Ia-Ih、0.1-1000μM/L长春新碱和DMSO (0.01%) 处理癌细胞48小时后获得细胞核蛋白提取物,方法详见实施例6实验部分内容。NF-κB (p65) -DNA binding活性抑制作用体外实验应用美国Pierce Biotechnology公司的化学发光法EMSA试剂盒,实验方法严格按照试剂盒的说明书操作,具体步骤如下:

[0322] (1) EMSA胶的配制

[0323] EMSA胶的配制如下表所示。药物处理的细胞经核蛋白提取液 (碧云天生物技术研究所提供) 提取后的核蛋白提取物10微克/管分别用于如下所示的样品反应和电泳检测分析。

[0324] 表7-1 关于4%\*聚丙烯酰胺凝胶的配制

|        | 各组分名称                         | 上样体积   |
|--------|-------------------------------|--------|
| [0325] | TBE buffer (10X)              | 1.0ml  |
|        | 重蒸水                           | 16.2ml |
|        | 39:1Acrylamide                | 2ml    |
|        | 80% 甘油                        | 625μl  |
| [0326] | 10% 过硫酸铵(ammonium persulfate) | 150μl  |
|        | TEMED                         | 10μl   |

[0327] (2) 预电泳:将胶固定在电泳槽中,加满 $0.5 \times$  TBE电泳缓冲液,按照10V/厘米的电压电泳90分钟。探针结合反应如下:

[0328] 表7-2 阴性对照反应

|        | 各组分名称                     | 体积   |
|--------|---------------------------|------|
| [0329] | Nuclease-Free Water       | 7μl  |
|        | EMSA/Gel-Shift 结合缓冲液 (5X) | 2μl  |
|        | 细胞核蛋白或纯化的转录因子             | 0μl  |
|        | 标记好的探针                    | 1μl  |
|        | 总体积                       | 10μl |

[0330] 表7-3 样品反应

|        | 各组分名称                     | 体积   |
|--------|---------------------------|------|
| [0331] | Nuclease-Free Water       | 0μl  |
|        | EMSA/Gel-Shift 结合缓冲液 (5X) | 2μl  |
|        | 细胞核蛋白或纯化的转录因子             | 7μl  |
|        | 标记好的探针                    | 1μl  |
|        | 总体积                       | 10μl |

[0332] 按照上表依次加在EP管中,混匀室温静置15分钟,消除可能发生的探针和蛋白的非特异性结合。分别加入生物素标记的探针NF-κB 1μl,室温静置20分钟。

[0333] (3) 电泳:换新鲜的 $0.5 \times$  TBE电泳缓冲液,按照10V/厘米的电压电泳1.5小时,确保胶的温度不超过30℃。

[0334] (4) 转膜:EMSA胶上核蛋白因子与结合的探针转到尼龙膜过程是在380mA冰浴中电转40分钟。

[0335] (5) 紫外交联:将尼龙膜放在254nm的紫外灯下照射15分钟。

[0336] (6) 化学发光法检测生物素标记探针:取封闭液封闭交联过的尼龙膜、按试剂盒要求对处理的膜X光片曝光、显影和定影,分析结果。

## [0337] 3、实验结果

[0338] 表8 实施例1—7获得的化合物Ia-Ih对与肿瘤生长、侵袭和转移、心脑血管疾病、免疫缺陷疾病以及炎等密切相关核蛋白因子NF- $\kappa$ B (p65) 与DNA活性的抑制作用(细胞和肿瘤组织核蛋白)

[0339]

| 有效浓度<br>抑制率<br>(%) | 实施例1-7获得的化合物Ia-Ih对核蛋白因子NF- $\kappa$ B (p65) 与DNA结合50%抑制作用的有效浓度(mM/L) |              |               |              |            |             |             |          |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------|--------------|---------------|--------------|------------|-------------|-------------|----------|
|                    | 化合物<br>Ia                                                            | 化合物<br>Ib    | 化合物Ic<br>§    | 化合物<br>Id    | 化合物<br>Ie  | 化合物<br>If   | 阳性药物<br>对照§ | 溶媒<br>对照 |
| 对A549细胞50%抑制       |                                                                      | <<br>0.135 * | <<br>0.125 *  | <<br>0.11 *  | <<br>0.12  | <<br>0.10 * | >1.<br>0 *  | -        |
| 对SMMC7721细胞50%抑制   | <<br>0.125 *                                                         | <<br>0.12 *  | <<br>0.125 *  | <<br>0.08* * | <<br>0.121 | <<br>0.10 * | >1.<br>0 *  | -        |
| MDA-MB231细胞50%抑制   |                                                                      |              | <<br>0.125 *  | <<br>0.1 *   | <<br>0.11  | <<br>0.10 * | >1.<br>0 *  | -        |
| 对MCF7细胞50%抑制       |                                                                      |              | < 0.125*<br>* | < 0.1 *      | < 0.10     | < 0.10<br>* | >1.<br>0 *  | -        |
| 对Lewis肺癌细胞50%抑制    | < 0.135<br>*                                                         |              |               |              |            |             |             |          |

[0340] 表8—续

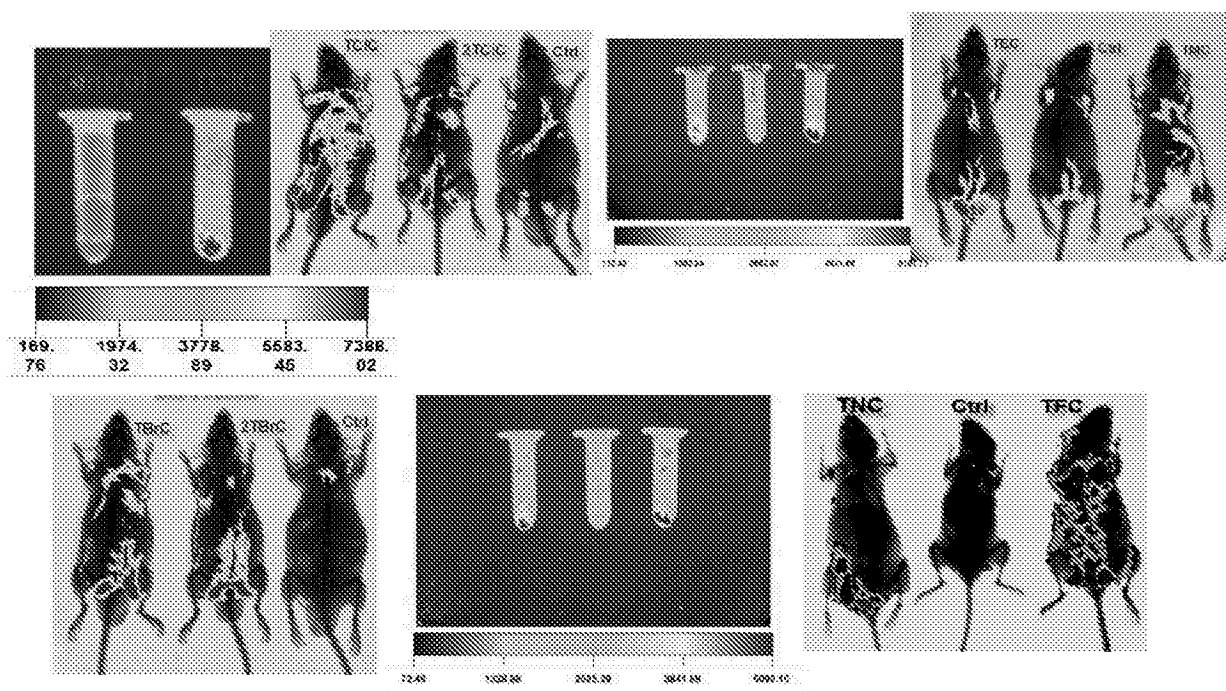
[0341]

| 有效浓度<br>抑制率<br>(%) | 实施例1-7获得的化合物Ia-Ih对核蛋白因子NF- $\kappa$ B (p65) 与DNA结合50%抑制作用的有效浓度(mM/L) |          |                 |           |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------|----------|-----------------|-----------|
|                    | 化合物Ig §                                                              | 化合物Ih §  | 阳性药物对照 § (长春新碱) | 空白对照 (溶媒) |
| 对A549细胞50%抑制       | < 0.07 *                                                             | < 0.07 * | > 0.07 *        | -         |
| 对SMMC7721细胞50%抑制   | < 0.07 *                                                             | < 0.07 * | > 0.07 *        | -         |
| MDA-MB231细胞50%抑制   | < 0.07 *                                                             | < 0.07 * | > 0.07 *        | -         |
| 对MCF7细胞50%抑制       | < 0.07 *                                                             | < 0.07 * | > 0.07 *        | -         |
| PANC-1细胞50%抑制      | < 0.07 *                                                             | < 0.07 * | > 0.07 *        | -         |
| 对HeLa细胞50%抑制       | < 0.07 *                                                             | < 0.07 * | > 0.07 *        | -         |

[0342] §使用体内肿瘤组织核蛋白裂解液检测时实施例1—7获得的化合物和环磷酸胺腹腔注射分别为60mg/kg和25mg/kg用量。

[0343] 补充说明：本专利申请和其中成果相关的研究工作受国家863课题“肿瘤蛋白质分子标志物的研究与开发(2012AA020206)”和山东省科技发展计划项目“酯型儿茶素EGCG等活性成分结构改造优化和抗癌候选新药的研究(2009GG10002087)”以及山东省自然科学基金项目(ZR2012HM016)资助。





TCIC = 化合物 Ic  
 Control 或 Ctrl: 对照  
 TMC = 化合物 Ia  
 TEC = 化合物 Ib  
 TNC = 化合物 If  
 TFC = 化合物 Ie  
 TBrC = 化合物 Id  
 2TCIC = 化合物 Ig  
 2TBrC = 化合物 Ih

图1