



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104159887 A

(43) 申请公布日 2014. 11. 19

(21) 申请号 201280063518. 9

(22) 申请日 2012. 11. 26

(30) 优先权数据

PI1107312-8 2011. 11. 25 BR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 06. 20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/BR2012/000480 2012. 11. 26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/075199 PT 2013. 05. 30

(71) 申请人 圣卡塔琳娜州联邦大学

地址 巴西圣卡塔琳娜州

(72) 发明人 R·J·尼内丝 A·马斯卡雷洛

R·A·尤尼斯 T·R·斯顿夫

P·C·莱亚尔 J·A·尤尼斯

C·佩雷拉·德·索萨·梅洛

R·R·卡内瓦罗洛

L·多梅内吉尼·基亚拉迪亚

A·博尔托利尼·西尔韦拉

A·B·A·拉兰热拉

(74) 专利代理机构 北京邦信阳专利商标代理有限公司 11012

代理人 梁栋 尹吉伟

(51) Int. Cl.

C07C 251/86 (2006. 01)

C07D 271/107 (2006. 01)

C07D 233/54 (2006. 01)

C07D 333/02 (2006. 01)

A61K 31/166 (2006. 01)

A61K 31/4164 (2006. 01)

A61K 31/381 (2006. 01)

A61P 35/02 (2006. 01)

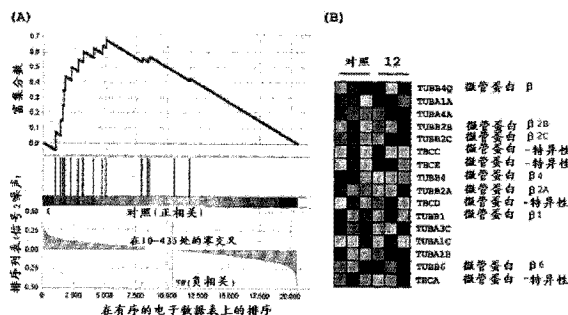
权利要求书2页 说明书28页 附图4页

(54) 发明名称

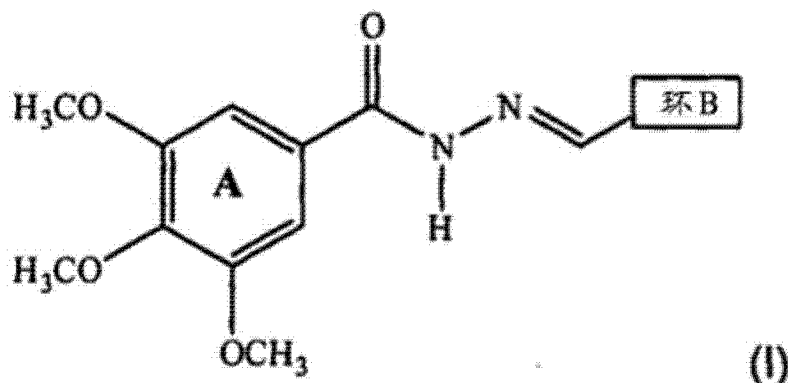
酰基-脲和噁二唑化合物、含有它们的药物组合物及其用途

(57) 摘要

本发明涉及酰基-脲化合物,特别是3,4,5-三甲氧基苯基-酰肼衍生物,及其噁二唑类似物和其它类似化合物,以及涉及它们用于治疗与细胞增殖相关的各种疾病,诸如白血病,包括急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、肿瘤和炎症的药物用途。已经获得与在实验中用作标准的化合物(秋水仙碱)具有相似活性的酰基-脲。根据本发明的化合物的较大选择性是与在当前临床治疗中使用的药物相比具有较小副作用相关的重要特征。合成的酰基-脲,更特别是化合物02和07,显示出重要的抗白血病活性,这表明02和07可作为用于治疗白血病,特别是急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、肿瘤和诸如炎症的其它增殖性疾病的药物原型或药物的候选物。除了健康人淋巴细胞中的选择性研究,最具活性的化合物的作用机制通过使用DNA微阵列和随后通过芯片指示的测试进行测定。

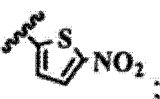


1. 一种化合物,其特征在具有结构式 I



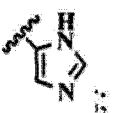
其中环 B 为选自包括苯基、4-Br-苯基、4-NO₂-苯基;3-OCH₃-4-OH-5-Br-苯基;3-OCH₃-4-OH-5-I-苯基;3-OCH₃-4-OH-苯基;1-萘基;2-萘基;4-Cl-苯基;3,4-OCH₂O-苯基;2-Cl-苯基;2,5-二 OCH₃-苯基;3,4,5-三 OCH₃-苯基;2,4,5-三 OCH₃-苯基;

4-O(CH₂)₃CH₃-苯基;4-CH₃-苯基; ; 3-NO₂-苯基;4-N(CH₃)₂-苯基;3-Cl-苯基;

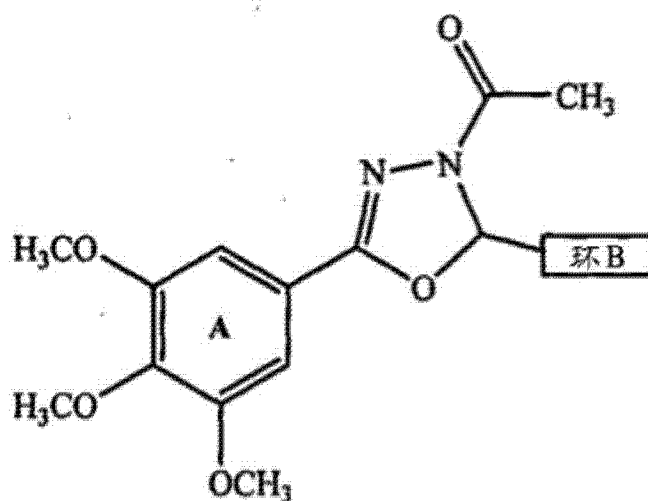
2,6-二 OCH₃-苯基; ; 2-COOH-苯基;3-OCH₂CH₃-4-OH-苯基;3-OCH₃-苯基;

2-OH-4-Br-苯基;(3-OCH₃-4-OCH₂苯基)-苯基;4-CF₃-苯基;和 3-CF₃-4-Cl-苯基的组的取代基。

2. 根据权利要求 1 所述的化合物,其中所述环 B 表示选自包括 3-OCH₃-4-OH-5-I-苯基;

基; ; 2,6-二 OCH₃-苯基;2-OH-4-Br-苯基;和 3-CF₃-4-Cl-苯基的组的取代基。

3. 一种化合物,其特征在于具有结构 II



其中环 B 表示选自包括 3-OCH₃-4-OH-5-Br-苯基、3-OCH₃-4-OH-苯基和 1-萘基的组的取代基。

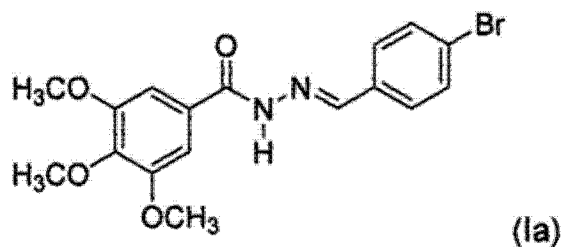
4. 一种药物组合物,其包含一种或多种权利要求 1 至 3 中任一项描述的化合物和药学

上可接受的赋形剂。

5. 根据权利要求 1 中描述的化合物用于制备治疗与细胞增殖相关的疾病的药物的用途。

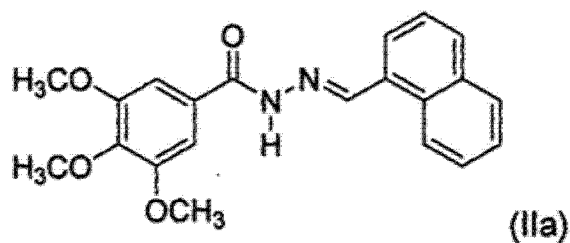
6. 根据权利要求 2 中描述的化合物用于制备治疗与细胞增殖相关的疾病的药物的用途。

7. 式 Ia 的化合物



用于制备治疗与细胞增殖相关的疾病的药物的用途。

8. 式 IIa 的化合物



用于制备治疗与细胞增殖相关的疾病的药物的用途。

9. 根据权利要求 5 至 8 中任一项所述的用途,其中与细胞增殖相关的所述疾病为急性成淋巴细胞性白血病 (ALL)、肿瘤和炎症。

10. 一种治疗与细胞增殖相关的疾病的方法,其包括施用权利要求 1 至 3 中任一项所述的化合物或施用权利要求 4 中所述的组合物。

酰基-腺和噁二唑化合物、含有它们的药物组合物及其用途

发明领域

[0001] 本发明涉及衍生自 3, 4, 5- 三甲氧基苯基酰肼的用于治疗与细胞增殖相关的疾病（诸如白血病、肿瘤、炎症和其它增殖性疾病）的酰基-腺。更具体地讲，本发明涉及对细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶（CDK）和拓扑异构酶 I 具有抑制活性的化合物，所述化合物因此可以用于治疗急性成淋巴细胞性白血病（ALL）。本发明还涉及由 3, 4, 5- 三甲氧基苯基-酰肼获得新颖酰基-腺和噁二唑。

[0002] 发明背景

[0003] 癌症是特征为异常人细胞形式的增殖和不受控制的扩散遍及全身的疾病。肿瘤细胞与正常细胞的不同之处在于它们具有高的侵袭能力、功能的丧失、分化的丧失以及由于它们之间的较低粘附性而具有转移的能力（Rang, H. P. ;Dale, M. M. ;Ritter, J. M ;Moore, P. K. Farmacologia. 第5版. Rio de Janeiro:Elsevier, 2004. 第703页）。在2009年，估计巴西在2009年出现49,000例新病例的乳腺癌、47,000例前列腺癌、27,000例肺癌、25,000例结肠癌和直肠癌、23,000例胃癌和19000例宫颈癌（INCA, Instituto Nacional do Câncer [National Cancer Institute]。可得自：<<http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/index.asp?link=mapa.asp&ID=8>>访问于：2011年2月23日），成为该国第二大主要死亡原因。

[0004] 白血病为若干类型的癌症中的一种，并且通过单个干细胞的突变产生的淋巴或骨髓造血细胞的瘤性增生形成，所述淋巴或骨髓造血细胞的后代形成白血病细胞的克隆。通常发生恶性转化的多基因改变，包括癌基因的不当表达和肿瘤抑制基因的功能的丧失（Bain, B. J. Diagnóstico em leucemias. Rio de Janeiro:Elsevier, 2003, Cap. 1, 01-56），这可能与遗传因素或风险（诸如吸烟、暴露于辐射或化学品诸如苯）相关（INCA, Instituto Nacional do Câncer [National Cancer Institute]-Leucemia - *prevenção, genética, outros fatores de risco* [Leukemia-prevention, genetics, other risk factors] 可得自：<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/leucemia/prevencao_genetica_outros_fatores_de_risco>. 访问于：2011年2月23日；和 IARC (International Agency for Research on Cancer). World Cancer Report 2008. 可得自：<<http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2008/index.php>> 和 <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2008/wcr_2008.pdf>。访问于：2011年2月23日）。基于疾病发展和变得严重的迅速程度将白血病进一步细分，并且可为急性或慢性的。急性白血病的特征为细胞成熟中的缺陷，这导致增殖和成熟之间失衡；由于白血病的细胞克隆持续增殖而不会达到成熟和死亡的阶段，导致白血病克隆和占优势的未成熟细胞的持续扩张（INCA2009b, Bain, B. J. Diagnóstico em leucemias. Rio de Janeiro:Elsevier, 2003, 第1章, 01-56）。

[0005] 急性成淋巴细胞性白血病（ALL）是由于不成熟的淋巴祖细胞在骨髓中不受控制的

增殖,导致赘生性细胞非常迅速的积聚 (Plasschaert, S. ;Van Der Kolk, D. ;De Bont, E. ;Vellenga, E. ;Kamps, W. ;De Vries, E. Breast Cancer Resistance Protein(BCRP) in Acute Leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, 2004, 45, 649-654)。它在儿童急性白血病的病例中占 80 % (Laks, D. ;Longhi, F. , Bernardes, W. M. ;Ramos, G. P. C. J *Pediatr*, 2003, 79, 149-158) 并占有造血系统恶性肿瘤的 50 % (Downing, James R. ;Shannon, Kevin M. *Acute leukemia: A pediatric perspective. Cancer Cell*, 2002, 2, 437-445)。在成人中, ALL 为相对罕见的, 占了造血系统恶性肿瘤的 2-3 % (Downing, James R. ;Shannon, Kevin M. *Acute leukemia: A pediatric perspective. Cancer Cell*, 2002, 2, 437-445) ; 然而, 预后对儿童来说更糟糕, 因为它影响多能干细胞, 产生更具有攻击性的白血病 (Greaves, M. F. *Stem cell origins of leukaemia and curability. British Journal of Cancer*, 1993, 67, 413-423)。

[0006] 有大量的研究是关于天然来源的化合物作为化疗的用途。一个实例为抗肿瘤剂紫杉醇 (Taxol™), 迄今发现的最重要的抗肿瘤天然产物之一, 首次报道于 1971 年 (Wani, M. C. ;Taylor, H. L. ;Wall, M. E. ;Coggon, P. ;McPhail, A. T. *Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from Taxus brevifolia. Journal of the American Chemical Society*, 1971, 93, 2325-2327), 所述抗肿瘤剂紫杉醇在经过长时间之后才被 FDA 批准用于临床应用 (在 1992 年)。另一实例为长春新碱, 在急性白血病和其它类型的肿瘤的治疗中使用的生物碱, 所述长春新碱以与紫杉醇相同的方式通过结合于微管蛋白、干扰微管的形成 (聚合) 或重组 (解聚) 来起作用 (Goodman e Gilman. *As bases farmacológicas da terapêutica*, 第 10^a 版., editora Mc Graw Hill. 2006)。

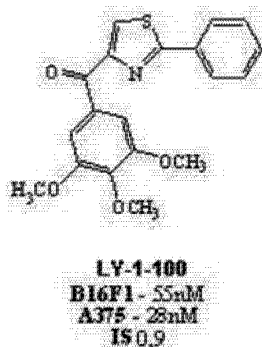
[0007] 在白血病的当前治疗中, 最常用的化学治疗剂包括柔红霉素、多柔比星、地塞米松、长春新碱、甲氨蝶呤和巯嘌呤 (Plasschaert, S. ;Van Der Kolk, D. ;De Bont, E. ;Vellenga, E. ;Kamps, W. ;De Vries, E. Breast Cancer Resistance Protein(BCRP) in Acute Leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, 2004, 45, 649-654)。这些药物由于具有诱导细胞凋亡和抑制细胞增殖的作用而提供治疗益处, 但也对身体和正常细胞具有显著的毒性 (Herr, I. ;Debatin, K. M. *Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. Blood* 2001, 98, 2603-2614 ; 和 Leszczyniecka, M. ;Roberts, T. ;Dent, P. ;Grant, S. ;Fisher, P. B. *Differentiation therapy of human cancer: basic science and clinical applications. Pharmacology & Therapeutics*, 2001, 90, 105-156)。抗肿瘤剂也干扰具有快速分裂细胞的正常组织, 这可产生许多不希望的效应, 诸如降低体内防御细胞的产量、差的伤口愈合、秃发、胃肠上皮损伤、不育和致畸性 (Rang, H. P. ;Dale, M. M. ;Ritter, J. M. ;Moore, P. K. *Farmacologia*. 第 5 版. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 第 703 页)。

[0008] 尽管在癌症研究中取得研究进展, 但是巴西在 2008 年存在 5,686 名来自白血病的死亡登记, 而 2010 年存在估计 9,580 名新的病例 (INCA, Instituto Nacional do Câncer [National Cancer Institute]. 可得自: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/index.asp?link=mapa.asp&ID=8>> 访问于: 2011 年 2 月 23 日), 这不断地激发寻找用于治疗白血病和其它肿瘤的新的药物。

[0009] 在最近的研究中, Wang 和同事 (Wang, Z. ;Lu, Y. ;Seibel, W. ;Miller, D.

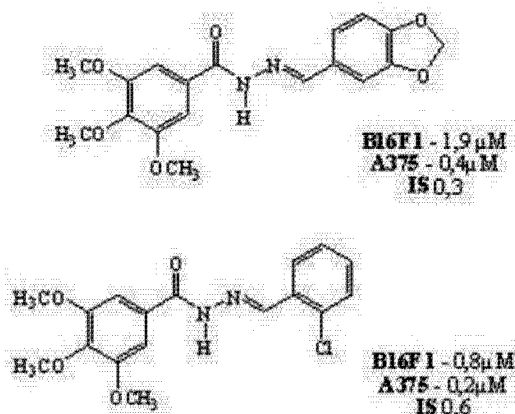
D. ;Li, W. Identifying Novel Molecular Structures for Advanced Melanoma by Ligand-Based Virtual Screening. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2009, 49, 1420-1427) 基于化合物 LY-1-100 的结构评估新的抗肿瘤化合物, 所述化合物 LY-1-100 对微管 (秋水仙碱结合位点) 具有已证实的作用机制和亲和力, 但是具有低的选择性。

[0010]



[0011] 通过配体基虚拟筛选选择结构, 产生 14 个与起始化合物 (LY-1-100) 具有高度结构相似性的新的分子。研究人员获得的理论结果显示必须保持 LY-1-100 化合物的三甲氧基化环以提供抗肿瘤活性, 但是三唑环似乎不重要并且可被 N-亚甲基-胍的结构替换, 这产生酰基-胍结构。尽管这些化合物在鼠 B16F1 和 A375 细胞 (体外) 的结果未对起始化合物示出改善的效力和选择性, 这些结果是非常有前景的并且针对抗黑素瘤活性鉴定了一些主要的结构组分 (Wang, Z. ;Lu, Y. ;Seibel, W. ;Miller, D. D. ;Li, W. Identifying Novel Molecular Structures for Advanced Melanoma by Ligand-Based Virtual Screening. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2009, 49, 1420-1427)。

[0012]



[0013] 就这一点而言, 酰基-胍表现为令人感兴趣的具有抗肿瘤活性的一类化合物。因此, 本发明涉及获得酰基-胍, 特别是衍生自 3, 4, 5-三甲氧基苯基-酰胍的用于治疗与细胞增殖相关的疾病 (诸如白血病、肿瘤、炎症和其它增殖性疾病) 的那些。

[0014] 专利申请 PI 0112674-1 (细胞周期蛋白依赖性激酶的 n-[5-[[[5-烷基-2-噁唑基]甲基]硫代]-2-噁唑基]羧酰胺抑制剂) 描述了作为用于治疗诸如癌症、炎症和关节炎的增殖性疾病的蛋白激酶的抑制剂的化合物和它们的对映结构体、非对映异构体、溶剂化物及其药学上可接受的盐。合成的化合物也可用于治疗阿尔茨海默病、化疗诱发的脱发

和心血管疾病。在申请 PI 0112674-1 中描述的化合物展现出比在本发明中所示结构更复杂的结构。

[0015] 引用的专利申请公布 No. U. S. 20040138272 (1, 4-取代的环己烷衍生物) 的化合物可以通过抑制 Rho 激酶来用于防止恶性疾病中细胞增殖, 可以通过对轴突的生长诱导和使其再生来用于修复中枢和外周神经系统。公布美国 20040138272 的化合物的作用机制不同于针对本发明的结构提出的作用机制。

[0016] 在专利申请 PI 0418095-0 (细胞周期蛋白依赖性激酶的抑制剂、组合物及其相关用途) 中提出可用于调节细胞-周期进展的细胞周期蛋白依赖性激酶 (cdk) 的抑制剂。这些化合物对于治疗与细胞过度增殖相关的病症的患者而言将是有用的。在 PI 0418095-0 中描述的化合物为不同于在本发明中提出的具有更复杂合成方法的那些酰基-腺。

[0017] 在专利申请 PI 0508364-8 中, 描述了 (4-苯并咪唑-2-基-哒嗪-3-酮的衍生物) 化合物及其生理上耐受的盐, 它们作为激酶, 特别是 CDK2 激酶 (细胞周期蛋白依赖性激酶 2) 的抑制剂具有活性。PI 0508364-8 的化合物为不同于在本发明中提出的具有更复杂合成的化合物。

[0018] 美国专利申请 No. U. S. 20070066610 (酰基-腺作为激酶调节剂) 的公布公开了作为酪氨酸激酶的抑制剂的酰基-腺, 包括调节细胞增殖的酪氨酸激酶受体、形态发生和运动性的 c-Met。在美国 20070066610 中描述的酰基-腺为不同于在本发明中提出的具有更复杂合成的那些。此外, 描述的化合物的作用靶标不同于本文所提出的。

[0019] 公布的美国专利申请 20080194562 (Pyrazole Derivatives for The Inhibition of Cdk's And Gsk's (用于抑制 Cdk 和 Gsk 的吡唑衍生物)) 涉及抑制或调节细胞周期蛋白依赖性激酶 (CDK) 和糖原合酶激酶 (GSK) 的活性的吡唑化合物的合成以及它们在治疗或预防激酶介导的疾病或病患中的用途。也描述了含有所述化合物和化学中间体的药物组合物。美国 20080194562 文件的化合物不同于本发明中所提出的化合物。

[0020] 在文献中也对酰基-腺显著的杀虫活性和植物生长刺激活性 (Robinson, B. Fischer indole synthesis. Chem. Rev., 1963, 4, 373-401); 对于肺结核的治疗 (Vigorita, M. G.; Ottana, R.; Zappala, C.; Maccari, R.; Pizzimenti, F. C.; Gabbrielli, G. Halogenated isoniazid derivatives as possible antimycobacterial and anti-HIV agents-III. Farmaco, 1994, 49, 775-781); 以及作为细菌剂和抑菌剂 (Samus, N. M.; Tsapkov, V. I.; Kuracheva, S. A.; Burdenko, T. A. Synthesis and antimicrobial activity of coordination compounds of 3d-elements with some hydrazones derived by using 5-nitro-2-furaldehyde. Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal, 1994, 28, 41-44) 进行了描述。

[0021] 考虑到以上所述, 用酰基-腺和通过闭环的非经典的生物等排性策略获得的它们的噁二唑衍生物进行研究, 目标为开发新的化学治疗剂。所述噁二唑为具有宽范围生物活性 (诸如抗病毒、抗微生物、抗肿瘤、杀真菌和抑制酪氨酸酶和组织蛋白酶 K) 的重要类别的杂环化合物 (Kumar, D.; Sundaree, S.; Johnson, E. O.; Shah, K. An efficient synthesis and biological study of novel indolyl-1,3,4-oxadiazoles as potent anticancer agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2009, 19, 4492-4494)。另外, 它们为酰胺和酯的大的生物等排物, 所述生物等排物可显著地有助于增加药理学活性, 作

为受体参与氢键形成 (Guimaraes, C. R. W. ;Boger, D. L. ;Jorgensen, W. L. Elucidation of Fatty Acid Amide Hydrolase Inhibition by Potent α -Ketoheterocycle Derivatives from Monte Carlo Simulations. Journal of the American Chemical Society, 2005, 127, 17377-17384)。

[0022] 因此,来自以下详细描述的本发明方法的特定的酰基-腺和它们的类似物以及它们在治疗白血病、肿瘤和诸如炎症的其它增殖性疾病中的用途具有重大的经济和社会利益。

[0023] 发明目的

[0024] 本发明的目的是通过简单的合成途径获得衍生自 3, 4, 5-三甲氧基苯基-酰肼(腺和噁二唑)和所有类似物等的合成化合物以及使用这些化合物治疗与细胞增殖相关的疾病(诸如白血病,特别是急性成淋巴细胞性白血病-ALL-肿瘤、炎症和其它增殖性疾病)。本发明还描述了用于测定这些化合物的生物活性的工序。

[0025] 发明概述

[0026] 本发明涉及一类酰基-腺,特别是衍生自 3, 4, 5-三甲氧基苯基-酰肼的那些以及类似化合物噁二唑和其它类似且相关的化合物,和所有这些在治疗与细胞增殖相关的不同疾病诸如白血病(包括急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、肿瘤和炎症)的药物应用。本发明还描述了用于测定所有这些化合物的生物活性的工序。

[0027] 获得与在实验中用作标准的化合物(秋水仙碱)具有类似活性的酰基-腺。本文公开的化合物的较高选择性为与比当前在临床实施中使用的药物具有较少副作用相关的重要特征。合成的酰基-腺,更具体地讲,化合物 02 和 07 示出显著的抗白血病活性,这表明 02 和 07 可作为用于治疗白血病,特别是急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、肿瘤和诸如炎症的其它增殖性疾病的药物原型或药物的候选物。

[0028] 除了在健康人淋巴细胞中的选择性研究,最有活性的化合物的作用机制的确定通过使用 DNA 微阵列和随后通过芯片指示的测试进行。

附图说明

[0029] 图 1 示出 (A) 定义为“后 REACTOME 伴侣蛋白微管蛋白折叠途径”的基因组的富集的概述示出在对照样品 HL-60 对比用化合物 07 处理的样品的富集 ($p = 0.002$, FDR q 值 = 0.168) 和 (B) 作为 (A) 中基因组的一部分的 16 个基因的表达值表示为蓝色方块(低表达)和红色方块(高表达)。

[0030] 图 2 示出化合物 07 诱导细胞周期停滞在 G2/M。将用 125nM 化合物 07 或 DMSO 处理 18h 的 Jurkat 细胞在用碘化丙啶染色之后进行细胞周期分析和流式细胞仪分析。

[0031] 图 3 示出对来自用 125nM 化合物 07 (F8) 或媒介物 (DMSO) 处理的 Jurkat 细胞的各种细胞周期调节蛋白提取物的蛋白质印迹分析的结果。

[0032] 图 4 示出化合物 07 为 Jurkat 细胞中细胞凋亡的强效诱导物。总之,结果表明化合物 07 主要通过 Chk2 和 Rb 促进细胞周期停滞和细胞凋亡。将用 125nM 化合物 07 或 DMSO 处理 18h 的 Jurkat 细胞用膜联蛋白 V/碘化丙啶进行双染色并通过流式细胞仪分析。

[0033] 图 5 示出化合物 07 对人淋巴细胞 (WBC) 和白血病 Jurkat 以及 HEK 细胞在 48h 之后的作用。用植物凝集素刺激正常淋巴细胞的增殖。示出了用化合物 07 处理的细胞存活

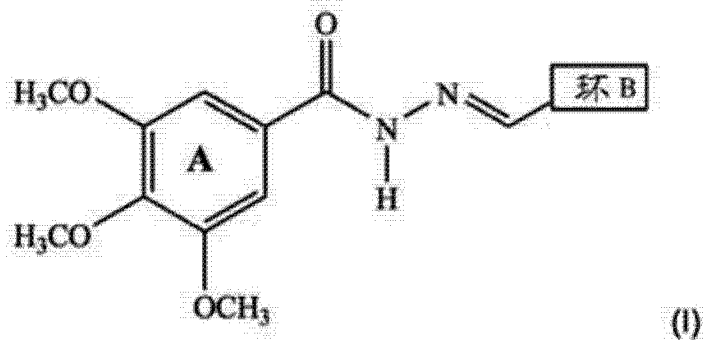
对比用媒介物 (DMSO) 处理的细胞存活的百分比。

[0034] 发明详述

[0035] 本发明包括获得合成酰基-腺以及它们的类似物和相关化合物及其作用机制,所述合成酰基-腺以及它们的类似物和相关化合物可用于治疗白血病,特别是急性成淋巴细胞性白血病 (ALL)、肿瘤和诸如炎症的其它增殖性病症。

[0036] 根据本发明的一个方面,描述具有结构 (I) 的化合物:

[0037]



[0038] 其中环 B 表示:

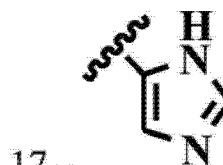
[0039]

01 - 苯基

02-4-Br-苯基

03 - 4-NO₂-苯基

04 - 3-OCH₃-4-OH-5-Br-苯基



18 - 3-NO₂-苯基

[0040]

05 - 3-OCH₃-4-OH-5-I-苯基19 - 4-N(CH₃)₂-苯基06 - 3-OCH₃-4-OH-苯基

20 - 3-Cl-苯基

07-1-萘基

21 - 2,6-二OCH₃-苯基

08 - 2-萘基

09-4-Cl-苯基

10 - 3,4-OCH₂O-苯基

23 - 2-COOH-苯基

11 - 2-Cl-苯基

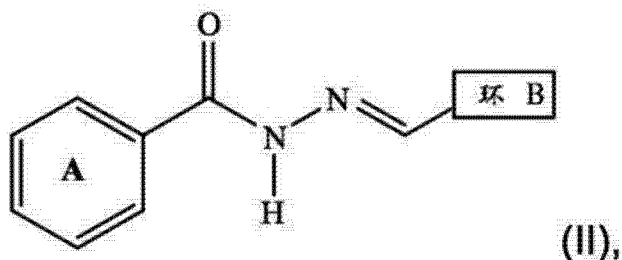
24 - 3-OCH₂CH₃-4-OH-苯基12 - 2,5-二OCH₃-苯基25 - 3-OCH₃-苯基13 - 3,4,5-三OCH₃-苯基

26 - 2-OH-4-Br-苯基

14 - 2,4,5-三OCH₃-苯基27 - (3-OCH₃-4-OCH₂苯基)-苯基15 - 4-O(CH₂)₃CH₃-苯基28 - 4-CF₃-苯基16 - 4-CH₃-苯基29 - 3-CF₃-4-Cl-苯基

[0041] 根据本发明化合物的其它组包含具有结构 II 的化合物：

[0042]



[0043] 其中环 B 表示：

[0044] 30- 苯基

[0045] 31-3, 4-OCH₂O- 苯基

[0046] 32-4-Br- 苯基

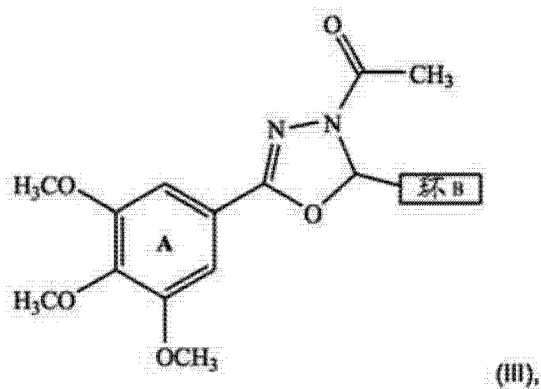
[0047] 33-4-CH₃- 苯基

[0048] 34-1- 萘基

[0049] 35-2- 萘基

[0050] 另外,还描述了根据结构 III 合成类似物噁二唑：

[0051]



[0052] 其中环 B 表示：

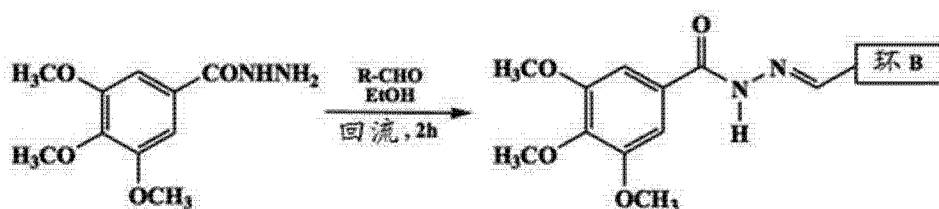
[0053] 36-3-OCH₃-4-OH-5-Br- 苯基

[0054] 37-3-OCH₃-4-OH- 苯基

[0055] 38-1- 萘基

[0056] 根据以下反应，本发明的新颖酰基-胍源自 3, 4, 5-三甲氧基苯基-酰肼与不同的醛之间使用乙醇作为溶剂于回流下进行的缩合反应：

[0057]



[0058] 其中环 B 表示：

[0059]

02 - 4-Br-苯基*

21 - 2,6-二OCH₃-苯基

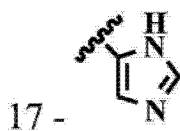
05 - 3-OCH₃-4-OH-5-I-苯基

26 - 2-OH-4-Br-苯基

[0060]

07 - 1-萘基*

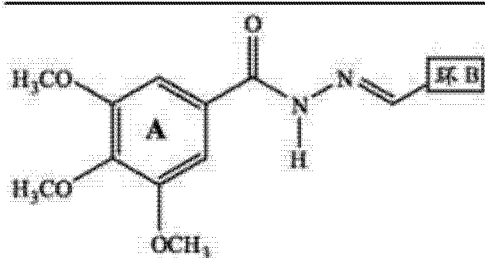
29 - 3-CF₃-4-Cl-苯基



[0061] 表 1 示出在新型 3, 4, 5-三甲氧基苯基-胍的合成中获得的产率和实验熔点。

[0062] 表 1. 新型的合成 3, 4, 5-三甲氧基苯基-胍的产率和熔点。

[0063]



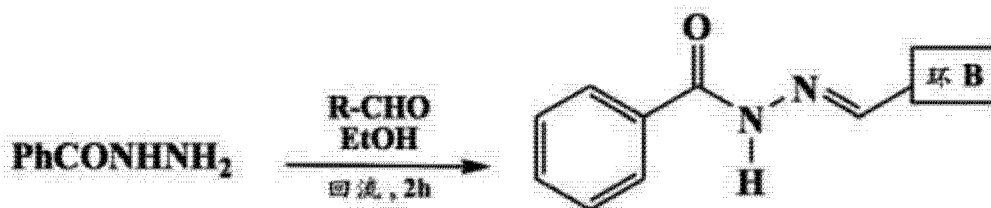
化合物编号.	环B	产率(%)	实验熔点(°C)
02*	4-Br-苯基	82	208-209
05	3-OCH ₃ -4-OH-5-I-苯基	69	247-248
07*	1-萘基	82	229-230
17		75	230-231
21	2,6-二OCH ₃ -苯基	93	245-246
26	2-OH-4-Br-苯基	65	206-208
29	3-CF ₃ -4-Cl-苯基	83	203-204

[0064] 化合物 02 的结构先前被公开为用于获得噁二唑的反应中间体 (Mazzone, G. ; Bonina, F. ; Formica, F. Some aroylhydrazones of halobenzaldehydes and halo-substituted 2,5-diaryl-1,3,4-oxadiazoles. *Farmaco, Edizione Scientifica*, 1978, 33(12), 963-71) 以及化合物 07 先前被评估为 MAO (单胺氧化酶) 抑制剂 (Mazzone, G. ; Arrigo Reina, R. 3,4,5-Trimethoxybenzoyl hydrazides and their anti-MAO [monoamine oxidase] activity. *Bollettino delle Sedute della Accademia Gioenia di Scienze Naturali in Catania*, 1971, 10(8), 689-702)。两种化合物 (02 和 07) 的化学特性此前也由我们研究组在评估这些和其它化合物作为克鲁斯锥虫 (*Trypanosoma cruzi*) 半胱氨酸蛋白酶的抑制剂的活性的研究中公开过, 然而, 化合物 02 和 07 未示出该蛋白的抑制活性 (Borchhardt, Deise M. ; Mascarello, Alessandra ; Chiaradia, Louise Domeneghini ; Nunes, Ricardo J. ; Oliva, Glaucius ; Yunes, Rosendo A. ; Andricopulo, Adriano D. Biochemical evaluation of a series of synthetic chalcone and hydrazide derivatives as novel inhibitors of cruzain from *Trypanosoma cruzi*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2010, 21(1), 142-150)。然而, 使用化合物 02 和 07 治疗白血病在现有技术中未得到描述但在本发明的范围内。

[0065] 根据以下反应, 其它的酰基-脒 (制备以有助于生物测试的讨论) 通过以上描述

的用于制备酰肼的相同工序由苯基酰肼和不同的醛之间的反应合成：

[0066]



[0067] 其中环 B 表示：

[0068] 30- 苯基

[0069] 31-3, 4-OCH₂O- 苯基

[0070] 32-4-Br- 苯基

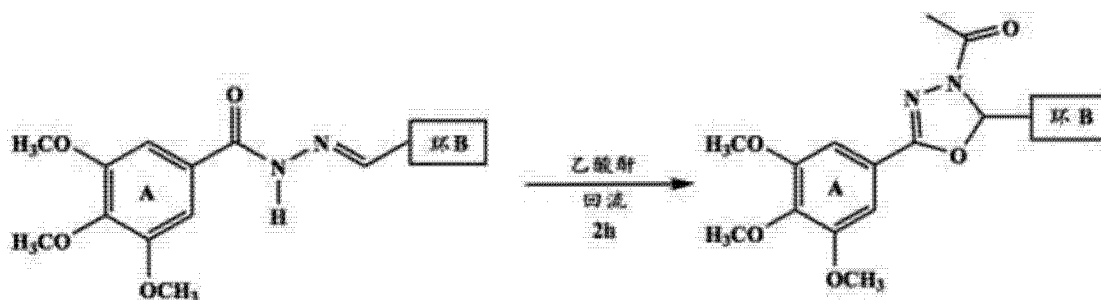
[0071] 33-4-CH₃- 苯基

[0072] 34-1- 萘基

[0073] 35-2- 萘基

[0074] 根据以下反应由这些与乙酸酐的反应也制备了 3, 4, 5- 三甲氧基苯基 - 脲的新颖合成类似物噁二唑：

[0075]



[0076] 其中环 B 表示：

[0077] 36-3-OCH₃-4-OH-5-Br- 苯基

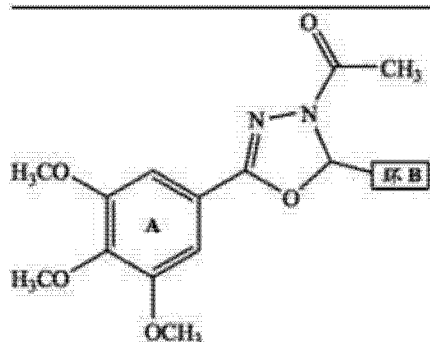
[0078] 37-3-OCH₃-4-OH- 苯基

[0079] 38-1- 萘基

[0080] 表 2 示出在噁二唑的合成中获得的产率和实验熔点。

[0081] 表 2. 新颖的合成噁二唑的产率和熔点。

[0082]



化合物编号.	环B	产率(%)	实验熔点(°C)
36	3-OCH ₃ -4-OH-5-Br-苯基	30	177-179
37	3-OCH ₃ -4-OH-苯基	25	170-172
38	1-苯基	35	189-192

[0083] 本发明还描述了确定合成的酰基-腺和它们的类似物以及包含噁二唑的类似化合物的作用机制。本发明还涉及所有这些化合物作为原型药物或药物在治疗白血病,特别是急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、肿瘤和与细胞增殖相关的其它疾病诸如炎症中的用途。

[0084] 当与其在健康人淋巴细胞中的活性相比时,本文描述的酰基-腺以纳摩尔级活性选择性地作用于白血病细胞,这将在下面以实施例的形式描述。这里示出的为相关的生物学结果,对于测试化合物为新颖的。

[0085] 在另一个实施方案中,本发明提供包含以上描述的化合物以及赋形剂、载体和药学上可接受的佐剂的药物组合物。

[0086] 如本文所用,使用的术语“药学上可接受的”意指无毒的、惰性固体、液体、半固体赋形剂、稀释剂、任何类型的辅助性制剂,或仅为诸如盐水的无菌水介质。可充当药学上可接受的载体的材料的一些实例为糖,诸如乳糖、葡萄糖和蔗糖,淀粉诸如玉米淀粉和马铃薯淀粉,纤维素和它们的衍生物诸如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素、环糊精;油诸如花生油、棉籽油、向日葵油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;二醇,诸如丙二醇,多元醇诸如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;酯诸如月桂酸乙酯和油酸乙酯、琼脂;缓冲剂诸如氢氧化铝和氢氧化镁;海藻酸;无热原水;等渗盐水,林格溶液;乙醇和磷酸盐缓冲溶液,以及药物制剂中使用的其它无毒的可相容物质。

[0087] 特别地,预期可将包含本发明化合物的药物组合物或兽药组合物通过任何类型的施用来给药,特别是肠胃外施用。

[0088] 具体地说,本发明的组合物可以包含在药物的生产中使用的呈任何以上药物形式的任何类型的赋形剂,诸如吸收剂、稀释剂、粘合剂、崩解剂、润滑剂、助流剂、增塑剂、涂层剂、用于控制释放的基质形成剂、溶剂和共溶剂、湿润剂、乳化剂、表面活性剂、增稠剂、张度剂、保湿剂、研磨剂、排气剂、碱化或酸化剂、防腐剂、抗氧化剂、杀菌剂、抑菌剂、螯合剂、着色剂和甜味剂。

[0089] 适合于本发明组合物的吸收剂可以是吸收在提取物中存在的水或用于固定某些挥发性化合物(诸如香精)添加的任何物质。这些赋形剂的非限制性实例为磷酸钙、高岭土、碳酸镁膨润土和滑石。

[0090] 本发明的组合物可以包含添加至配方以允许获得具有适当体积的片剂或填

充胶囊并提供对于生产必需的流动和压缩性能的任何惰性材料作为溶剂,例如,但不限于乳糖、磷酸三钙、淀粉、甘露醇、硫酸钙、微晶纤维素 (Microcel, Avicel)、磷酸二钙 (Encompress, Datab)、氧化镁、碳酸镁、滑石、高岭土、碳酸钙、右旋糖果糖、乳糖、天冬甜素、纤维素、麦芽糖、甘露醇、瓜尔胶、山梨糖醇、淀粉和蔗糖。

[0091] 用于本发明组合物的合适的粘合剂物质可以为在固体药物剂型的制粒和压缩期间用于促进颗粒粘合的试剂并且也可用于本发明的组合物,例如,卡波普、聚维酮、黄原胶、阿拉伯树胶、藻酸、可压缩的糖、CMC-Na、乙基纤维素、明胶、甲基纤维素、聚维酮 (PVP)、淀粉、预胶化淀粉和液体葡萄糖的溶液、分散体或粉末。

[0092] 适合于本发明组合物的分解剂或崩解剂可以为用于加速生物流体中药物形式的崩解和 / 或溶解的任何组分,例如,藻酸、淀粉、藻酸钠、CMC-Na、微晶纤维素、交联羧甲基纤维素钠 (Ac-Di-sol)、淀粉乙醇酸钠 (Explotab) 和交联聚维酮 (Kollidon CL)。

[0093] 适合于本发明组合物的润滑剂可以例如硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸、滑石和氢化植物油 (如 Lubritab)。

[0094] 适合于本发明组合物的助流剂可以例如硅胶 (Aerosil200) 和滑石。

[0095] 适合于本发明组合物的增塑剂可与聚合物一起使用以改变其相变温度并在颗粒、片剂或丸剂上促进形成的膜的凝聚。这些试剂的非限制性实例为甘油、柠檬酸三乙酯、邻苯二甲酸二丁酯、硅酮和 PPG。

[0096] 用于本发明的涂料组合物呈片剂、颗粒、胶囊或丸剂形式的涂层剂可以例如邻苯二甲酸乙酸纤维素、乙基纤维素、结冷胶、麦芽糖糊精、甲基丙烯酸酯、甲基纤维素、微晶纤维素、虫胶、卡拉胶、蜡、虫胶、明胶、纤维素衍生物 (甲基或乙基纤维素、邻苯二甲酸乙酸纤维素、羟丙基甲基纤维素、乙酸纤维素)、丙烯酸和甲基丙烯酸酯的共聚物 (类型为 L100、RS30D、RS PM、S100 等的 Eudragit)、聚乙烯醇 (PVA) 和聚乙酸乙烯酯。

[0097] 为了获得活性成分的延长和 / 或控制释放,在本发明组合物中可能使用的控制释放的基质形成试剂可以为 HPMC、CMC-Na、黄原胶、Carbopol、各种类型的 Eudragit、琼脂-琼脂、聚氧乙烯衍生物 (PEO)、环糊精纳米球和任何性质的纳米颗粒。

[0098] 在本发明组合物中也可使用溶剂和共溶剂诸如乙醇、玉米油、棉籽油、甘油、异丙醇、矿物油、油酸、花生油、纯化水、注射用水等。

[0099] 适合于本发明组合物的湿润剂可以是为了降低液体 / 固体界面处表面张力的目的而添加的任何物质,例如,十二烷基硫酸钠 (SLS)、多库酯钠和聚山梨醇酯 20、60、80 (吐温 20、60、80)。

[0100] 适合于本发明组合物的乳化剂可以例如单硬脂酸甘油酯、鲸蜡醇和明胶以及助剂诸如 CMC-Na、MC、藻酸盐和果胶。

[0101] 表面活性剂诸如,例如,苯扎氯铵、壬苯聚醇 10、辛苯昔醇 9、聚山梨醇酯 80 和十二烷基硫酸钠对于本发明的组合物也为充足的。

[0102] 适合于本发明组合物的增稠剂可以为用于增加软膏稠度的任何物质,例如,鲸蜡醇、白蜡、黄蜡、硬脂醇、石蜡、微晶蜡和鲸蜡基酯蜡。

[0103] 适合于本发明组合物的张度剂可以为用于获得具有与待经眼、鼻、非肠道途径施用的生物流体的渗透特性类似的溶液的任何物质,诸如 NaCl (0.9%)、甘露醇 (5.07%) 和右旋糖 (5.51%)。

[0104] 适合于本发明组合物的保湿剂可为甘油、丙二醇和山梨糖醇。

[0105] 适合于本发明组合物的研磨剂可为乳剂、油基 (oily bases) 等的制备期间在减少药物颗粒的过程中用作促进剂的任何液体,例如,矿物油 (液体凡士林)、甘油、丙二醇、PEG400、棉籽油、蓖麻油和聚山梨醇酯 80 (Tween® 80)。

[0106] 可以使用适合于本发明组合物用于排气的试剂以将空气从气密性密封的封装件或从流体制剂中排出以增加稳定性,例如氮气 (N₂) 和二氧化碳 (CO₂)。

[0107] 碱化或酸化剂诸如柠檬酸、氨、乙酸、碳酸铵、富马酸、二乙醇胺、盐酸 (HCl)、单乙醇胺、酒石酸、氢氧化钾 (KOH)、硼酸、氢氧化钠 (NaOH)、碳酸氢钠、硼酸钠和三乙醇胺也适合于本发明的组合物。

[0108] 可用于本发明组合物中的防腐剂为,例如,抗真菌剂诸如苯甲酸、苯甲酸钠、尼泊金丁酯钠、对羟基苯甲酸甲酯 (Nipagin)、对羟基苯甲酸丙酯 (Nipasol)、对羟基苯甲酸乙酯、丙酸钠和抗菌剂诸如苯扎氯铵、苄索氯铵、苄醇、鲸蜡基吡啶鎓、氯丁醇和氯酚。

[0109] 适合于本发明组合物的抗氧化剂可以选自丁基化羟基苯甲醚 (BHA)、丁基化羟基甲苯 (BHT)、 β -生育酚、抗坏血酸、抗坏血酸棕榈酸酯、焦亚硫酸钠、乙二胺四乙酸 (EDTA)、柠檬酸、半胱氨酸、谷胱甘肽、维生素 C、偏亚硫酸氢钠、半胱氨酸和硫代硫酸钠。

[0110] 本发明的组合物还可以包含柠檬酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液和硼酸盐缓冲液作为缓冲剂。可使用,例如香草、薄荷醇、肉桂油、茴香油和可可作为着色剂、调味剂和香料。甜味剂可以包括,例如,阿司帕坦、右旋糖 (葡萄糖)、甘露醇、山梨糖醇、糖精、环己基氨基磺酸钠、糖、乙酰氨基磺酸钾、甜菊苷和三氯蔗糖。

[0111] 本发明的组合物还可以包含赋形剂诸如杀菌剂、抑菌剂、抗氧化剂、防腐剂、缓冲剂、稳定剂、pH 调节剂、同渗容摩调节剂、消泡剂和表面活性剂以及钝化剂或分级抗原的残余物、通常在药物的生产中使用的生长培养基和溶剂的组分。这些类型的组分的实例可见于 "The Handbook of Pharmaceutical Excipients" (RAYMOND C. Rowe, Publisher The Pharmaceutical Press)。

[0112] 本文描述的组合物的多种施用途径是可用的。选择的特定方式将取决于选择的特定活性成分、治疗功效所需的剂量以及将组合物施用的患者。

[0113] 在另一个实施方案中,本发明描述了本文所述化合物和组合物用于治疗与细胞增殖相关的疾病,诸如急性成淋巴细胞性白血病 (ALL)、肿瘤和炎症的用途。

[0114] 在另一个实施方案中,本发明提供了使用本文描述的用于治疗与细胞增殖相关的疾病诸如急性成淋巴细胞性白血病 (ALL)、肿瘤和炎症的化合物和组合物治疗与细胞增殖相关的疾病诸如急性成淋巴细胞性白血病 (ALL)、肿瘤和炎症的方法。

实施例

[0115] 现将通过示例性实施例对本发明进行。

[0116] 实施例 1:用于制备 3,4,5-三甲氧基苯基-脲 01-29 的一般工序

[0117] 对于合成 3,4,5-三甲氧基苯基-脲 01-29,我们使用 Troeberg 和 col 描述的方法 (Troeberg, L.; Chen, X.; Flaherty, T. M.; Morty, R. E.; Cheng, M.; Hua, H.; Springer, C.; McKerrow, J. H.; Kenyon, G. L.; Lonsdale-Eccles, J. D.; Coetzer, T. H. T.; Cohen, F. E. Chalcone, acyl hydrazide, and related amides kill cultured Trypanosoma brucei

brucei. Molecular Medicine, 2000, 6, 660-669)。在 100mL/1 口反应烧瓶中, 将如实施例 2 描述制备的 3, 4, 5-三甲氧基苯基-酰肼 (2mmol) 放入有机溶剂: 丙酮、乙酸乙酯、乙醚、乙醇、甲醇 (20mL) 和适当的醛 (2mmol) 中。将混合物回流 1 至 10 小时。然后, 将溶液过滤并在有机溶剂中重结晶固体。

[0118] 实施例 2: 对于获得用于得到 3, 4, 5-三甲氧基苯基-腺 01-29 的 3, 4, 5-三甲氧基苯基-酰肼的一般工序

[0119] 对于合成在酰基腺 01-29 的制备中使用的 3, 4, 5-三甲氧基苯基-酰肼, 我们使用已经描述的方法 (Chida, A. S. ; Vani, P. V. S. N. ; Chandrasekharam, M. ; Srinivasan, R. ; Singh, A. K. Synthesis of 2, 3-dimethoxy-5-methyl-1, 4-benzoquinone: a key fragment in coenzyme-Q series. Synthetic communications, 31, 657-660, 2001) 分两步进行:

[0120] 获得酯: 在 1000mL/1 口反应烧瓶中, 将没食子酸 (50g, 0.294mol) 与硫酸二甲酯 (178.1g, 1.413mol)、无水碳酸钾 (175.5g, 1.293mol) 和 TBAI (四丁基碘化铵) (1g) 一起置于可以为乙醇、乙醚、乙酸乙酯、丙酮、石油醚 (375ml) 的有机溶剂中并回流 1 至 12 小时。将获得的固体过滤并用相同的有机溶剂洗涤 (3×50mL)。获得的酯呈奶油色无定形固体形式, 产率为 78%; 熔点: 84°C (文献中熔点: 82-83°C)。NMR¹H(CDCI₃): 1.60 (s, 3H, CH₃), 3.92 (s, 9H, OCH₃), 7.33 (s, 2H, Ar)。

[0121] 获得酰肼: 在 1000mL/1 口反应烧瓶中, 放入在第一步骤中获得的酯 (48g, 0.212mol), 同时放入 99% 肼水合物 (N₂H₄·H₂O) (77.6g, 1.54mol) 溶液以及可以为乙醇、乙酸乙酯、二氯甲烷、丙酮、甲醇的有机溶剂 (200mL)。将混合物回流 1 至 5h 并在仅 0 至 50°C 的温度下磁力搅拌下过夜。将获得的固体过滤并在甲醇中重结晶以获得为白色晶体的 3, 4, 5-三甲氧基苯基-酰肼, 产率为 85%; 熔点: 162-163°C (文献中熔点: 168°C)。NMR¹H(CDCI₃): 3.80 (s, 3H, OCH₃), 3.90 (s, 6H, OCH₃), 7.18 (s, 2H, Ar), 9.55 (NH)。

[0122] 实施例 3: 用于制备苯基-腺 30-35 的一般工序

[0123] 对于合成苯基-腺 30-35, 我们使用与描述用于获得 3, 4, 5-三甲氧基苯基-腺的相同方式由 Troeberg 和 col 描述的方法 (Troeberg, L. ; Chen, X. ; Flaherty, T. M. ; Morty, R. E. ; Cheng, M. ; Hua, H. ; Springer, C. ; McKerrow, J. H. ; Kenyon, G. L. ; Lonsdale-Eccles, J. D. ; Coetzer, T. H. T. ; Cohen, F. E. Chalcone, acyl hydrazide, and related amides kill cultured Trypanosoma brucei brucei. Molecular Medicine, 2000, 6, 660-669)。

[0124] 实施例 4: 用于制备噁二唑 36-38 的一般工序

[0125] 对于合成噁二唑 36-38, 我们使用 Jin 和 col. 描述的方法 (Jin, L. ; Chen, J. ; Song, B. ; Chen, Z. ; Yang, S. ; Li, Q. ; Hu, D. ; Xu, R. Bioorg Med Chem, 2006, 16, 5036-5040)。在 100mL/1 口反应烧瓶中, 将相应的 3, 4, 5-三甲氧基苯基-腺 (1mmol) 和乙酸酐 (10ml) 混合。将混合物回流 1 至 10 小时, 然后加入碎冰冷却并在 0 至 60°C 的温度下放置过夜以沉淀产物。将获得的固体过滤, 用水洗涤并用有机溶剂/水重结晶。

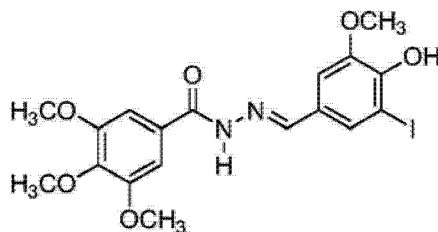
[0126] 新颖化合物的红外 (IR) 光谱数据以及 ¹H 和 ¹³C 的核磁共振 (NMR)

[0127] *ppm 相对于 TMS, 多重性 (J 以 Hz 计)。溶剂 CDCl₃。

[0128] 05 - ¹H NMR(DMSO-d₆) □ 3.73 (s, 3H, p-p-OCH₃), 3.86 (s, 6H, m-OCH₃), 3.89 (s, 3H, m-OCH₃), 7.22 (s, 2H, H₂, H₆), 7.34 (s, 1H, H₆'), 7.60 (s, 1H, H₂'), 8.31 (s, 1H, HC = N), 10

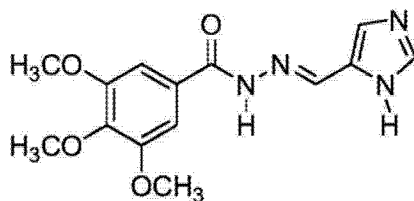
. 08 (1H, OH), 11. 66 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) $\square$ 56. 78 (m- OCH_3), 60. 81 (p- OCH_3), 85. 17 (C3'), 105. 84 (C2, C6), 109. 72 (C6'), 128. 28 (C1), 129. 31 (C1'), 130. 75 (C2'), 141. 03 (C4), 147. 35 (C = N), 147. 97 (C5'), 149. 00 (C4'), 153. 36 (C3, C5), 163. 16 (C = O). IR $\square_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3382 (N-H), 1636, 1228 (C = O), 1565 (C = N), 1290, 1045 (C-O), 2999, 2839, 1585, 1490, 1334, 1137, 997 (Ar) (KBr).

[0129]



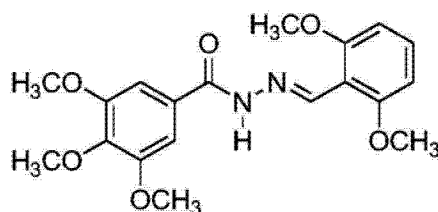
[0130] 17 - ^1H NMR (DMSO- d_6) $\square$ 3. 74 (s, 3H, p- OCH_3), 3. 88 (s, 6H, m- OCH_3), 7. 23 (s, 2H, H2, H6), 7. 53 (s, 1H, H2'), 7. 66 (m, 1H, H4'), 8. 02 (s, 1H, NH5'), 8. 43 (s, 1H, HC = N), 11. 37 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) $\square$ 56. 76 (m- OCH_3), 60. 81 (p- OCH_3), 105. 71 (C2, C6), 129. 51 (C1), 131. 94 (C1'), 132. 16 (C2'), 135. 37 (C4'), 145. 45 (C = N), 153. 35 (C3, C5), 162. 29 (C = O). IR $\square_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3212 (N-H), 1623, 1234 (C = O), 1580 (C = N), 1280, 1054 (C-O), 2994, 2941, 2838, 1503, 1456, 1411, 1344, 1125, 1006, 844 (Ar) (KBr).

[0131]



[0132] 21 - ^1H NMR (DMSO- d_6) $\square$ 3. 71 (s, 3H, p- OCH_3), 3. 79 (s, 6H, o- OCH_3), 3. 85 (s, 6H, m- OCH_3), 6. 72 (d, J = 8. 0Hz, 2H, H3', H5'), 7. 23 (s, 2H, H2, H6), 7. 34 (t, J = 8. 0Hz, 1H, H4'), 8. 60 (s, 1H, HC = N), 11. 52 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) $\square$ 56. 72 (m- OCH_3), 56. 78 (o- OCH_3), 60. 76 (p- OCH_3), 105. 08 (C3', C5'), 105. 76 (C2, C6), 111. 75 (C1'), 129. 37 (C1), 131. 87 (C4'), 140. 88 (C4), 143. 92 (C = N), 153. 31 (C3, C5), 159. 38 (C2', C6'), 162. 81 (C = O). IR $\square_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3186 (N-H), 1644, 1240 (C = O), 1586 (C = N), 1258, 1068 (C-O), 3002, 2928, 2838, 1502, 1473, 1417, 1378, 1342, 1121, 1007, 783 (Ar) (KBr).

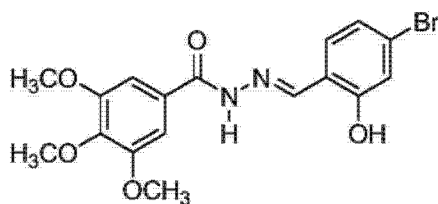
[0133]



[0134] 26 - ^1H NMR (DMSO- d_6) $\square$ 3. 42 (s, 3H, p- OCH_3), 3. 85 (s, 6H, m- OCH_3), 6. 89 (d, J = 8. 6Hz, 1H, H5'), 7. 25 (s, 2H, H2, H6), 7. 42 (d, J = 8. 6Hz, 1H, H6'), 7. 78 (s, 1H, H3'), 8. 61 (s, 1H, HC = N), 11. 26 (s, 1H, NH), 12. 01 (1H, OH). IR $\square_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3220 (N-H), 1653, 1228 (C = O), 1588 (C = N), 1275, 1099 (C-O), 3004, 2941, 2834, 1550, 1503, 1479, 1463, 1416, 1352, 13

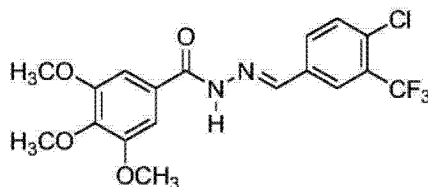
35, 1189, 1011, 992, 951, 839, 760 (Ar) (KBr).

[0135]



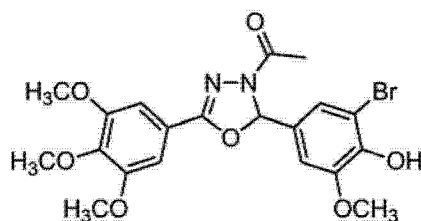
[0136] 29 - ^1H NMR (DMSO- d_6) $\square$ 3.72 (s, 3H, p-OCH₃), 3.85 (s, 6H, m-OCH₃), 7.22 (s, 2H, H 2, H6), 7.82 (d, J = 8.6Hz, 1H, H5'), 8.02 (d, J = 8.6Hz, 1H, H6'), 8.15 (s, 1H, H2'), 8.51 (s, 1H, HC = N), 11.96 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) $\square$ 56.65 (m-OCH₃), 60.73 (p-OCH₃), 105.96 (C2, C6), 126.29 (C2'), 127.98 (C1'), 128.88 (C1), 132.31 (CF₃), 132.91 (C4'), 133.01 (C5'), 134.82 (C6'), 141.27 (C4), 145.61 (C = N), 153.40 (C3, C5), 163.50 (C = O). IR $\square_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3182 (N-H), 1655, 1242 (C = O), 1587 (C = N), 1269, 1039 (C-O), 3008, 2938, 2838, 1506, 1480, 1417, 1336, 1316, 1173, 1121, 1006, 958, 666 (Ar) (KBr).

[0137]



[0138] 36 - ^1H NMR (DMSO- d_6) $\square$ 2.36 (s, 3H, CH₃), 3.85 (s, 3H, p-OCH₃), 3.91 (s, 3H, m-OCH₃), 3.92 (s, 6H, m-OCH₃), 6.00 (s, 1H, OH), 6.99 (s, 1H, H2'), 7.06 (s, 1H, H6'), 7.11 (s, 2H, H2, H6), 7.26 (s, 1H, HC-N). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) $\square$ 21.75 (CH₃), 56.56 (m-OCH₃), 61.25 (p-OCH₃), 91.52 (C-N), 104.44 (C2, C6), 117.93 (C5'), 119.37 (C2'), 122.52 (C6'), 136.02 (C1', C1), 139.24 (C4'), 141.49 (C4), 152.90 (C3'), 153.64 (C3, C5), 155.84 (C = N), 168.32 (C = O). IR $\square_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1766, 1238 (C = O), 1667, 1582 (C = N), 1254, 1047 (C-O), 1177 (C-N), 3445 (OH), 1130, 621 (C-Br), 3004, 2941, 2838, 1466, 1416, 1366, 1306, 1190, 998, 858 (Ar) (KBr).

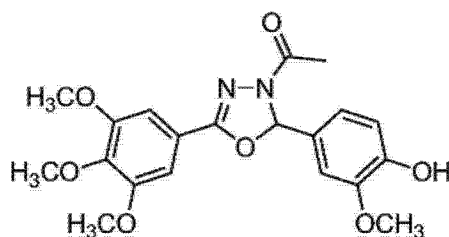
[0139]



[0140] 37 - ^1H NMR (DMSO- d_6) $\square$ 2.35 (s, 3H, CH₃), 3.82 (s, 3H, p-OCH₃), 3.90 (s, 3H, m-OCH₃), 3.92 (s, 6H, m-OCH₃), 6.97 (s, 1H, H2'), 7.06 (m, 1H, H5'), 7.10 (s, 2H, H2, H6), 7.25 (s, 1H, HC-N), 7.44 (m, 1H, H6'); 未观察到对应于OH基团的信号. ^{13}C NMR (DMSO- d_6) $\square$ 21.54 (CH₃), 56.27 (m-OCH₃), 56.33 (m-OCH₃), 61.02 (p-OCH₃), 91.14 (C-N), 104.22 (C2, C6), 109.77 (C2'), 119.16 (C5'), 128.09 (C6'), 136.402 (C1', C1), 141.24 (C4'), 141.96 (C4), 151.78 (C3'), 153.42 (C3, C5), 155.60 (C = N), 168.10 (C = O). IR $\square_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1767, 1243 (C = O), 1665, 1581 (C = N), 1250, 1043 (C-O), 1177 (C-N), 3445 (OH), 1129, 644 (C-Br), 2967, 2945, 2838, 1507, 1466, 14

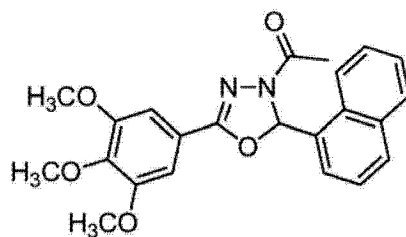
17, 1365, 1036, 1287, 1197, 1083, 997, 958, 861, 699 (Ar) (KBr).

[0141]



[0142] ^{1}H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) $\square$ 2.47 (s, 3H, CH_3), 3.87 (s, 9H, OCH_3), 7.08 (s, 2H, H2, H6), 7.26 (s, 1H, HC-N), 7.26 (m, 1H, H2'), 7.48 (t, $J = 8.0\text{Hz}$, 1H, H3'), 7.55 (t, $J = 8.0\text{Hz}$, 1H, H7', H8'), 7.62 (t, $J = 8.0\text{Hz}$, 1H, H7'), 7.76 (m, 1H, H4'), 7.92 (d, $J = 8.0\text{Hz}$, 1H, H6'), 8.22 (d, $J = 8.0\text{Hz}$, 1H, H9'). ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) $\square$ 21.57 (CH_3), 56.28 (m-OC H_3), 60.98 (p-OC H_3), 91.17 (C-N), 104.27 (C2, C6), 119.61 (C1), 123.04 (C2'), 125.07 (C9'), 125.20 (C3'), 126.05 (C7'), 126.95 (C8'), 128.95 (C4'), 130.51 (C6'), 130.61 (C10'), 130.79 (C5'), 134.04 (C1'), 141.11 (C4), 153.29 (C3, C5), 155.83 (C = N), 168.26 (C = O). IR $\square_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1731, 1243 (C = O), 1669, 1587 (C = N), 1254, 1039 (C-O), 1124 (C-N), 2997, 2941, 2827, 1509, 1465, 1416, 1369, 1332, 1191, 1006, 980, 847, 784, 699 (Ar) (KBr).

[0143]



[0144] 实施例5:化合物对急性成淋巴细胞性白血病 (ALL) 细胞谱系的作用

[0145] a) 化合物的稀释和储存:将所有化合物以 20mM 的储备溶液重悬在 DMSO 中并在 -20°C 下储存。为了进行细胞毒性测试,在排放至细胞之前立即在培养基中 (RPMI-1640+10%胎牛血清、100IU/ml 青霉素和 100pg/mL 链霉素) 由储备溶液制备稀释液。

[0146] b) 通过 MTT 方法进行细胞对化合物的体外敏感性/抗性的测定:将 REH 和 Jurkat 细胞系保持在含有 10% FBS (胎牛血清)、100IU/ml 青霉素、100pg/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养基中并在 37°C 和 5% CO_2 下温育。根据在文献中描述的方法进行细胞毒性测定 (Pieters, R.; 等. In vitro drug sensitivity of cells from children with leukemia using the MTT assay with improved culture conditions. Blood, 1990, 76, 2327-2336; Pieters, R.; 等. Relation of cellular drug resistance to long-term clinical outcome in childhood acute lymphoblastic leukaemia. Lancet, 1991, 338, 399-403e Kaspers, G. J.; 等 In vitro cellular drug resistance and prognosis in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood, 1997, 90, 2723)。将细胞在所描述的培养基中以 3.75×10^5 个细胞/mL 的浓度重悬。将八十微升该悬浮液接种到具有 96 个圆底孔的平板中,所述圆底孔中含有 20 微升不同浓度的化合物或单独媒介物。每种处理以一式三份进行。在 37°C 和 5% CO_2 下温育 48 小时之后,加入 20 μL LMTT 溶液 (5mg/mL 的 1x

PBS),然后在 37℃和 5% CO₂ 下再温育 4 小时 30 分钟。在这 4 小时 30 分钟期间,MTT(浅黄色)被活细胞代谢成甲臞盐(蓝色)。此后,加入 100 μL 十二烷基硫酸钠(SDS)10% +0.1M HCl 以溶解甲臞晶体。在温育过夜后,在 570nm 下读取吸光度。相对于不加入所考虑的化合物的培养基(“阴性对照”)中存活细胞的数目计算处理后存活细胞的百分比。

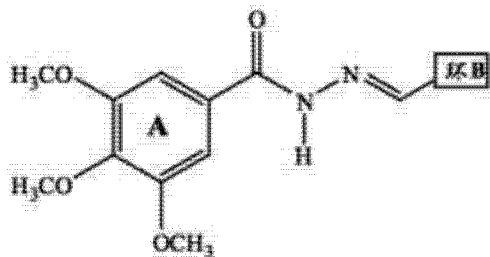
[0147] c) IC 的测定:IC₅₀ 被定义为获得 50%最大抑制的化合物的浓度。在读取吸光度之后,绘制存活曲线并用 GraphPad Prism 软件获得 IC₅₀ 值。

[0148] 结果:酰基脲和噁二唑对 B 和 T 谱系白血病细胞(分别为 HEK 和 JURKAT)的作用

[0149] 合成的化合物对人白血病 Jurkat 和 HEK 细胞的细胞毒性作用根据 Pieters 等描述的方法通过细胞生存力测定(MTT)进行研究(Pieters,R.;等 In vitro drug sensitivity of cells from children with leukemia using the MTT assay with improved culture conditions. Blood, 1990, 76, 2327-2336;和 Pieters,R.;等 Relation of cellular drug resistance to long-term clinical outcome in childhood acute lymphoblastic leukaemia. Lancet, 1991, 338, 399-403) 和 Kaspers 等(Kaspers, G. J.;等 In vitro cellular drug resistance and prognosis in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood, 1997 90, 2723)。结果示于表 3。

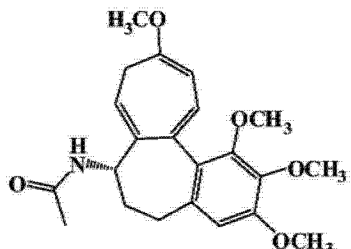
[0150] 表 3. 在人白血病 Jurkat 细胞和 HEK 中筛选 0.1DM 化合物 01-29 以突显最活性的化合物。

[0151]



化合物编号.	环B	白血病细胞的存活百分比(48小时处理)	
		B-衍生的 (REH)	T-衍生的 (Jurkat)
		0,1μM	0,1μM
01	苯基	92%	88%
02	4-Br-苯基	45%	30%
03	4-NO ₂ -苯基	98%	96%
04	3-OCH ₃ -4-OH-5-Br-苯基	99%	102%
05	3-OCH ₃ -4-OH-5-I-苯基	103%	103%
06	3-OCH ₃ -4-OH-苯基	99%	101%
07	1-萘基	39%	30%
08	2-萘基	94%	104%
09	4-Cl-苯基	68%	33%
10	3,4-OCH ₂ O-苯基	43%	30%

[0152]

11	2-Cl-苯基	68%	34%
12	2,5-二OCH ₃ -苯基	106%	122%
13	3,4,5-三OCH ₃ -苯基	101%	121%
14	2,4,5-三OCH ₃ -苯基	94%	83%
15	4-O(CH ₂) ₃ CH ₃ -苯基	88%	100%
16	4-CH ₃ -苯基	37%	17%
17		88%	115%
18	3-NO ₂ -苯基	97%	119%
19	4-N(CH ₃) ₂ -苯基	94%	121%
20	3-Cl-苯基	100%	86%
21	2,6-二OCH ₃ -苯基	102%	90%
22		97%	94%
23	2-COOH-苯基	96%	81%
24	3-OCH ₂ CH ₃ -4-OH-苯基	95%	86%
25	3-OCH ₃ -苯基	89%	78%
26	2-OH-4-Br-苯基	90%	79%
27	(3-OCH ₃ -4-OCH ₂ Bz)-苯基	91%	91%
28	4-CF ₃ -苯基	94%	63%
29	3-CF ₃ -4-Cl-苯基	98%	98%
秋水仙碱		41%	18%

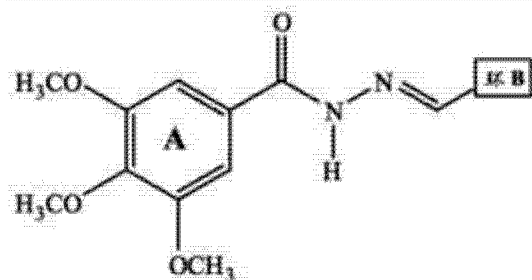
[0153] 为了分析酰基-腺 01-29 的 A 环中甲氧基的影响,我们测试了一系列互补的酰基-腺 (30-35)。在该系列中在进行的筛选中没有化合物对细胞示出活性,因此证明了三甲氧化环对抗白血病活性的必要性。

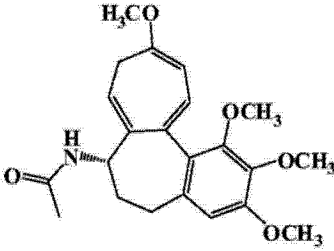
[0154] 在第三种尝试中,检索与所述活性化合物相关的化合物,测试 3,4,5-三甲氧基苯基-腺的环衍生物 1,3,4-噁二唑 (36-38)。与互补的酰基-腺 (30-35) 相类似,没有 1,3,4-噁二唑 (36-38) 示出活性。这些结果的解释可能是由于由环化促进环的刚化,从而防止了分子与靶标的相互作用。

[0155] 因此,选择的化合物 02、07、09、10、11 和 16 具有它们确定的 IC₅₀;数值示于表 4。

[0156] 表 4. 在白血病 Jurkat 细胞和 REH 中活性最高的化合物的 IC₅₀。

[0157]



化合物编号.	环B	<i>IC₅₀ (nM) - 48h 的处理</i>	
		B (REH)	T (Jurkat)
02	4-Br-苯基	33.7	31.4
07	1-萘基	25.4	15.7
09	4-Cl-苯基	328.3	202.9
10	3,4-OCH ₂ O-苯基	206.2	154.5
11	2-Cl-苯基	458.7	189.4
16	4-CH ₃ -苯基	70.6	71.5
秋水仙碱		9.5	7.7

[0158] 酰基-脲 02 和 07 示出优异的结果,其中白血病细胞株 REH 的 IC_{50} 为 33.7nM 和 25.4nM, Jurkat 为 31.4nM 和 15.7nM。

[0159] 实施例 6 :用于测定化合物与 DNA 微阵列的作用机制的实验 :

[0160] 在实验之前,将细胞在新鲜培养基中温育 12 小时。将来自白血病细胞系 HL60 的两百万个细胞以一式三份在补充有 10% 胎牛血清的 DMEM 中用 125nM 剂量的化合物 07 或二甲基亚砜 (DMSO) 媒介物处理 6h。在此阶段的末期,将细胞通过短暂的离心回收并在 RNAspin Mini RNA Isolation 试剂盒 (GE) 的胍溶液中裂解。

[0161] a) RNA 的纯化和生物素化探针的制备:使用 RNAspin Mini RNA Isolation 试剂盒 (GE) 按照制造商的说明从细胞中提取总 RNA。根据制造商的推荐,通过 cDNA 合成,然后使用 GeneChip WT cDNA Synthesis and Amplification 试剂盒 (Affymetrix) 通过体外转录进行扩增,用总共 100ngRNA 制备生物素化的互补 RNA 探针 (Bio-cRNA)。

[0162] b) 寡核苷酸微阵列和杂交阵列:将每个复制品的 cRNA 探针在人基因组 GeneChip Human Gene1.0ST Array (Affymetrix) 的寡核苷酸微阵列中进行杂交。微阵列的杂交和随后的洗涤和显影按照制造商的推荐进行。

[0163] c) 数据分析:微阵列杂交的结果在 Affymetrix Gene Chip Scanner 3000-7G 中读取。数据在 Bioconductor 平台中分析。我们通过 Affymetrix Expression Console 在

基因水平使用 iterPLIER+16 算法来获得基因表达值。响应于化合物 07 差异表达的基因通过使用 LIMMA 包和倍数变化 (FC) 标准 >1.5 且 $p < 0.05$ 的回归分析获得。差异表达的基因的列表使用用于鉴定与已知化合物的作用相关的可能的作用机制的 CMap (<http://www.broad.mit.edu/cmap/>) 进行分析 (Lamb, J., Crawford E. D. The Connectivity Map: Using Gene-Expression Signatures to Connect Small Molecules, Genes and Disease Science 2006, 313, 1929-1935)。

[0164] 为了确定给定的基因组组分 (基因组) 在微阵列实验数据中是否为共调节, 使用 Gene Set Expression Analysis (GSEA; <http://www.broadinstitute.org/gsea/>)。所述 GSEA 算法创建了两个实验组 (用化合物 07 处理和对照) 之间以差异表达排列的示于微阵列上的基因的列表。在这种情况下, 被化合物 07 抑制的基因在列表的顶部, 而被诱导的基因在底部。然后所述算法将在该列表中找到构成某些基因库的基因。如果这些基因在该列表的顶部显著地过度表示, 可以说整个基因被化合物 07 抑制。在相反的情况下, 整个基因被药物处理诱导。由 GSEA 分析的基因组获得自若干公共数据库 (BioCarta, Signaling Pathway Database, Signaling Gateway, Signal Transduction Knowledge Environment, Human Protein Reference Database, GenMAPP, KEGG, Gene Ontology, Sigma-Aldrich Pathways, Gene Arrays BioScience Corp., Human Cancer Genome Anatomy Consortium and NetAffx)。将 1000 个排列作为错误发现率 (FDR) q -值的设定, 考虑了与相同基因有关的探针组的平均表达值。具有小于 5 和大于 500 个组分的基因组不予考虑。

[0165] 结果: 通过用 DNA 微阵列研究提出的作用机制

[0166] 为了确定这些化合物的作用机制, 我们选择化合物 07 通过 DNA 生物芯片分析基因表达。这些试验已经产生随后由 Connectivity Maps (CMap) (www.broadinstitute.org/cmap) 和 GSEA 分析解译的数据集 (算法)。

[0167] 用化合物 07 处理 HL-60 细胞产生 102 个基因的转录抑制和 353 个基因的转录激活 ($FC > 1.5$, $p < 0.05$)。

[0168] 在 CMap 中分析通过用测试化合物 07 处理的细胞的微阵列基因表达的分析获得的结果。在化合物 07 的作用下于细胞中差异表达的基因与响应不同药物的一系列基因列表交联。这些列表为 CMap 数据库的一部分。当将由 ATC 系统分组的药物数据 (Anatomical Therapeutic Chemical; <http://www.whocc.no/atcddd/>) 合在一起时, 化合物 07 的作用与用作驱虫剂的苯并咪唑衍生物 (如阿苯达唑、甲苯咪唑、芬苯达唑、噻苯哒唑) 的 P02CA 组的药物作用最类似。在 CMap 中化合物 07 的分析结果示于下表 5a 中。

[0169] 这些药物的作用机制为通过微管蛋白的抑制并且最近已被描述为用于治疗白血病 (Spagnuolo PA 等, The antihelmintic flubendazole inhibits microtubule function through a mechanism distinct from Vinca alkaloids and displays preclinical activity in leukemia and myeloma. Blood 2010; 115(23):4824-33) 和实体瘤 (Doudican N 等, Mebendazole induces apoptosis via Bcl-2 inactivation in chemoresistant melanoma cells. Mol Cancer Res 2008; 6(8):1308-315; Gupta K 等; antifungal antimitotic compound benomyl inhibits brain microtubule polymerization and dynamics and cancer cell proliferation at mitosis, by binding to a novel site in

tubulin. *Biochemistry* 2004 ;43 (21):6645–6655) 的潜在候选。

[0170] 表 5a: 通过 ATC 代码与化合物 07 正相关的化合物。

[0171]

排序	ATC 代码	平均值	n	富集	p	特异性	非零%
1	P02CA	0.404	16	0.511	0.00018	0.017	68
2	C01AA	0.541	10	0.63	0.00022	0.1852	80
3	N05AC	0.32	24	0.42	0.00026	0.2477	62
4	P01AX	0.415	9	0.638	0.00048	0.0194	77
5	V03AF	-0.532	5	-0.774	0.00106	0.0153	80
6	P02CX	0.585	6	0.724	0.00117	0.0884	83
7	D06BX	-0.386	5	-0.768	0.00124	0	60
8	G04BD	0.354	8	0.597	0.00279	0	62
9	S01GA	0.257	20	0.373	0.0056	0.0148	60
10	G04CB	-0.314	6	-0.642	0.00612	0.1281	50
11	P02CE	0.53	4	0.746	0.0079	0	100
12	S01EX	0.567	3	0.84	0.00803	0	100
13	P02BX	0.513	4	0.733	0.00985	0	0
14	G03CC	0.352	17	0.38	0.01053	0.05	64
15	P03AA	0.47	5	0.666	0.01093	0.1214	80
16	N05CE	-0.294	4	-0.708	0.01486	0.0423	50
17	R01AA	0.248	16	0.376	0.01544	0.016	56
18	R01AB	0.248	16	0.376	0.01544	0.016	56
19	D08AC	-0.455	5	-0.639	0.01568	0.0376	80
20	R02AA	-0.455	5	-0.639	0.01568	0.0376	80

[0172] 与作为 CMap 平台的一部分的其它干扰的数据相比,仅考虑 HL-60 细胞系的数据,化合物 07 的作用与替拉替尼 (tanespimycin) (富集 = 0.699, $p < 0.001$) 的作用最类似,所述替拉替尼为抑制 Hsp90 的药物。Hsp90 为与微管蛋白相互作用且并置排列的陪伴分子 (C Garnier 等, Heat-shock protein90(hsp90) binds in vitro to tubulin dimer and inhibits microtubule formation. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 250 (2):414–9; Redmond T 等; Immunofluorescence colocalization of the90-kDa heat-shock protein and microtubules in interphase and mitotic mammalian cells. *Eur J Cell Biol* 1989 ;50 (1):66–75; Sanchez ER 等; Evidence that the90-kilodalton heat shock protein is associated with tubulin-containing complexes in L cell cytosol and in intact PtK cells. *Mol Endocrinol* 1988 ;2 (8):756–60; Czar MJ 等; Immunofluorescence localization of the90-kDa heat-shock protein to cytoskeleton *Eur J Cell Biol* 1996 ;. 70 (4):322–30), 保护微管蛋白免于变性并使其适合于聚合 (F Weis 等陈述, The90-kDa heat tubulin shock protein Hsp90 protects against thermal denaturation. *J Biol Chem* 2010 ;285 (13):9525–34)。该结果表明,化合物 07 与替拉替尼类似可影响微管蛋白组装的过程或破坏已经形成的微管。

[0173] 表 5b: 对于细胞系,与化合物 07 正相关的化合物。

[0174]

排序	ATC 代码	平均值	n	富集	p	特异性	非零%
1	格尔德霉素-MCF7	0.598	10	0.781	0	0.0168	90
2	替拉替尼-MCF7	0.551	36	0.676	0	0.0263	80
3	曲古抑菌素 A-MCF7	-0.322	92	-0.396	0	0.5347	55
4	曲古抑菌素 A-PC3	-0.275	55	-0.385	0	0.5058	50
5	替拉替尼-HL60	0.571	12	0.699	0.00002	0.0814	75
6	甲氧蝶呤-HL60	-0.835	2	-0.989	0.00026	0	100
7	七里香武甲-PC3	0.8	2	0.987	0.00032	0.0128	100
8	阿螺旋霉素-MCF7	0.624	7	0.703	0.0005	0.0326	85

[0175]

9	0175029-0000 - PC3	0,598	4	0,856	0,00056	0,0573	100
10	PNU-0251126 - PC3	-0,57	4	-0,868	0,0006	0,0067	100
11	嘌呤霉素-MCF7	0.763	2	0.98	0.0007	0.0699	0
12	根赤壳菌素-MCF7	0.414	12	0.534	0.0009	0.0909	58
13	非那雄胺-MCF7	-0.628	3	-0.918	0.00096	0.019	100
14	甲基多巴类-MCF7	-0.726	2	-0.978	0.00107	0.008	100
15	阿苯达唑-MCF7	0.765	2	0.964	0.00225	0	100
16	PHA-00745360 - CF7	-0.374	4	-0.812	0.00229	0.0073	75
17	苄氟噻嗪-MCF7	0.636	3	0.894	0.00234	0	100
18	0198306-0000 - MCF7	-0,688	2	-0,964	0,00288	0	100
19	替拉替尼-PC3	0.41	12	0.496	0.00311	0.2159	66
20	CP-690334-01 - PC3	-0,431	4	-0,799	0,00318	0,0362	75

[0176] 细胞过程的动力学需要持续的细胞骨架重组,因此需要微管蛋白的聚合和解聚。微管蛋白抑制剂可以两种方式起作用:(1)抑制微管蛋白聚合或(2)以抑制解聚的方式稳定微管蛋白。GSEA 分析表明化合物 07 引起微管蛋白和微管蛋白特异性陪伴分子的一组基因的表达明显减少(图 1),所述化合物为抑制微管蛋白聚合的典型的化合物。微管蛋白聚合的抑制导致游离的微管蛋白(非聚合的)在细胞质中积聚。游离的细胞质微管蛋白通过抑制新的微管蛋白 mRNA 的形成和加速现有的 mRNA 的降解而逆向地自动调节微管蛋白 mRNA 的表达(Caron JM, 等;autoregulation of tubulin synthesis in hepatocytes and fibroblasts. Celi J Biol1985;101:1763-72)。相比之下,稳定微管蛋白细丝的化合物导致微管蛋白的表达增加。

[0177] 实施例 7: 化合物 07 对通过细胞周期的细胞的进展、细胞周期的调节剂的激活和细胞凋亡的诱导的作用:

[0178] 在实验之前, 将细胞在新鲜培养基中温育 12 小时。将来自 Jurkat 细胞系的两百万个细胞在补充有 10% 胎牛血清 (FCS) 和 0.2% 青霉素 / 链霉素 (PS) 的化合物 07 或 DMSO (媒介物) 的浓度为 125nM 的 RPMI-640 培养基中温育 12h、18h、24h 和 30h。

[0179] a) 细胞周期的筛选测定: 将用化合物 07 处理的或未用其处理的细胞在 70% 乙醇中固定 2 小时, 在 PBS 中洗涤并在 37℃ 于含 1mL Triton X-1000.1% 0.2mg/mL RNA 酶和 20 μg/mL 碘化丙啶的 PBS 中温育 15min。将 20,000 个事件在具有红色荧光定量的 FACSCalibur 流式细胞仪上进行收集, 通过标准宽度对比红色荧光峰面积排除任何细胞聚集体。使用 ModFit 软件 v2.0 进行数据解卷积以获得在细胞周期的各个阶段的细胞的百分比。

[0180] b) 用膜联蛋白 V/PI 标记的细胞凋亡的定量测定: 将用化合物 07 处理的或未用其处理的细胞在 PBS 中冲洗并用 Annexin V Apoptosis Assay 试剂盒 (Invitrogen) 标记。简而言之, 将细胞重悬于含有钙的适当的缓冲剂中并用膜联蛋白 V-FITC 和碘化丙啶 5 μg/mL 温育 15min。将 10,000 个事件在 FACSCalibur 流式细胞仪上收集, 通过前向和标准侧向散射排除任何碎片, 用绿色和红色荧光定量。

[0181] c) 用于分析细胞周期调节蛋白的表达和磷酸化的蛋白质印迹测试: 将用化合物 07 处理的或未用其处理的细胞在含有 50mM Tris pH7.7、150mM NaCl、5mM EDTA、1% Sigma 磷酸酶抑制剂混合物 I、1% Sigma 磷酸酶抑制剂混合物 II、1% Sigma 蛋白酶抑制剂混合物 II、1% Igepal、0.1% SDS、0.5% 脱氧胆酸钠和 1mM PMSF 的缓冲剂中裂解。在冰上孵育 30min 并进行 3 个循环的冷冻和解冻之后, 将提取物在 4℃ 下于 10,000rpm 离心 20min 以沉淀膜碎片。在上清液中, 我们通过 Bradford 试剂 (Biorad) 进行蛋白定量。将样品在具有先前添加有 β-巯基乙醇中煮沸 5min, 将 100 μg 蛋白进行含有 10% SDS 的丙烯酰胺: 双丙烯酰胺凝胶电泳 (39:1) 并电转移至 0.45 μm 硝酸纤维素膜 (Schleicher & Schuell)。按照制造商的说明书通过将膜与 Cell Cycle/Checkpoint Antibody Sampler 试剂盒 #9917 抗体 (Cell Signaling Technology) 和 Cyclin Dependent Kinase Inhibitor Antibody Sampler 试剂盒 #9867 (Cell Signaling Technology) 一起温育来进行免疫检测。用 Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate 试剂盒 (Pierce) 随后暴露于 X 射线膜进行结果的显影。

[0182] 结果: 化合物 07 诱导细胞周期停滞在 G2 和由细胞凋亡引起的细胞死亡

[0183] 在用化合物 07 处理的 Jurkat 细胞的细胞周期分析中获得与微管蛋白的抑制一致的结果。用化合物 07 处理的 Jurkat 细胞示出细胞周期停滞在 G2/M (图 2)。

[0184] 对调节细胞周期的各种蛋白的表达和磷酸化状态的改变进行了研究。如图 3 所示, 在用化合物 07 处理 12 小时之后, 可在 Thr68 中检测到 Chk2 的磷酸化。Thr68 残基的磷酸化通过运动失调性毛细血管扩张症突变因子 (ATM) 完成并导致 Chk2 的激活和随后多个下游靶标的磷酸化, 包括 cdc25、BRCA1、p53 和 E2F, 所述靶标为细胞周期的重要的控制因子 (检查点)、修复 DNA 损伤和诱导响应于 DNA 损伤的细胞凋亡 (Falck J 等, The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. Nature 2001, 410 (6830): 842-7; Matsuoka S 等; Linkage of ATM to cell

cycle regulation by the Chk2 protein kinase. Science 1998, 282(5395):1893-7; Lee JS 等; hCdsl-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. Nature 2000; 404(6774) 201-4; Hirao A 等, DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. Science 2000, 287(5459):1824-7; C Stevens 等, Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. Nat Cell Biol 2003; 5(5):401-9)。在蛋白质印迹中产生的缺乏可检测的 p53 (图 3) 可通过 Jurkat 细胞中低的 p53 表达来解释 (Vigorito E 等; Contributions of p53 and PMA to gamma-irradiation induced apoptosis in Jurkat cells. Hematol Cell Ther 1999, 41(4):153-61)。

[0185] 用化合物 07 处理导致 CDK4 表达的抑制和较小程度的 CDK6、CDK2 的较小同工型和 CDK9 的较大同工型的表达的抑制 (图 3)。D/CDK4/CDK6 细胞周期蛋白和细胞周期蛋白 E/cdk2 复合体磷酸化并使 Rb 失活以允许细胞周期进展。用化合物 07 处理的细胞中 CDK2、CDK4 和 CDK6 的下降减少 Rb 的失活, 然后 Rb 能够进行抑制细胞周期进展和诱导细胞凋亡的职责。

[0186] 实施例 8: 评估其选择性的化合物 07 对健康人淋巴细胞和集落形成的作用: a) 通过 MTT 方法进行细胞对化合物 07 的敏感性 / 抗性的体外测定: 对于化合物 07 对正常淋巴细胞的测试, 将来自人供体的血液在聚蔗糖梯度中分离并将单核细胞以 200,000 个细胞 / 孔培养在含有 80 微升 RPMI-1640 (含有 10% FBS、100 IU/ml 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素) 和 20 微升植物凝集素溶液 (Cultilab) 的各个孔中用于刺激 T 淋巴细胞。以 300 至 1nm 的连续稀释 (50%) 添加化合物 07。作为对照, 用来自白血病 Jurkat 和 REH 细胞系的细胞与用化合物 07 相同浓度的秋水仙碱的实验进行平行测试。如以上描述, 在 48 小时之后通过 MTT 方法测定细胞毒性。b) 集落形成实验: 用造血细胞的集落形成测定也评估了化合物 07 的细胞毒性。按照制造商的建议使用来自 Miltenyi 的 "HSC-CFU complete with Epo" 试剂盒 (Cat#130-091-280)。将来自健康供体的骨髓细胞培养在补充有胎牛血清、牛血清白蛋白、不同的生长因子 (GM-CSF、G-CSF、SCF、IL-3、IL-6、Epo) 和化合物 07 的半固体甲基纤维素培养基中, 评估所述培养基对血细胞生成的作用。在 37°C 和 5% CO₂ 下培养两周之后, 进行粒细胞 (CFU-G)、巨噬细胞 (CFU-M)、粒细胞 / 巨噬细胞 (CFU-GM)、红细胞 (BFU-E 和 CFU-E) 和混合的 (CFU-GEMM) 集落的评价。

[0187] 结果: 化合物 07 的选择性

[0188] 在用植物凝集素刺激的健康且成熟的 T 淋巴细胞上测试化合物 07 以评价其对正常细胞的作用。将秋水仙碱用作阳性对照。结果示于表 6。

[0189] 表 6. 用不同浓度的化合物 07 处理健康的且植物凝集素刺激的淋巴细胞中的存活百分比。

[0190]

化合物编号.	浓度(nM)							
	300	150	75	37.5	18.75	9.38	4.6	0
07	95%	107%	108%	101%	105%	105%	103%	100%
秋水仙碱	63%	69%	75%	84%	95%	110%	109%	100%

[0191] 浓度为 300nM 的化合物 07 相对于对照具有 5% 的毒性, 而相同浓度的秋水仙碱对淋巴细胞 T 的生存力引起 37% 的抑制。

[0192] 与用植物凝集素刺激正常淋巴细胞相比, 化合物 07 对白血病细胞的剂量-响应分析 (图 5) 示出比针对白血病细胞的细胞毒性剂量高达 10 倍的浓度似乎不影响由植物凝集素诱导的正常淋巴细胞。这表明化合物 07 可在白血病细胞中发挥作用而不影响患者的正常免疫功能。

[0193] 为了确定化合物 07 在血细胞生成中的作用, 相同测定在加有生长因子的半固体甲基纤维素培养基中培养的骨髓细胞的集落形成上测试。如表 7 所示, 浓度非常接近 IC_{50} (20nM) 的化合物 07 在红细胞形成上显示出与 PI3K 抑制剂相当的抑制活性, 所述 PI3K 抑制剂在测定中用作阳性对照。化合物 07 对粒细胞和巨噬细胞也具有抑制活性, 尽管当与 P' I3K 抑制剂相比时强度较低。在 200nM 浓度处, 对于平均 LLA 谱系对应于 10 倍 IC_{50} , 化合物 07 完全抑制血细胞生成。

[0194] 表 7. 使用化合物 07 的骨髓细胞的集落形成 (%)。

[0195]

	BFU-E	CFU-E	CFU-G	CFU-M	CFU-GM	CFU-GEMM
阴性对照	30.7 ± 13.9	27.0 ± 9.5	20.0 ± 4.0	40.7 ± 5.1	46.7 ± 14.6	5.7 ± 7.4
2nM 化合物 7	39	23	11	17	52	1
20nM 化合物 7	26	11	14	25	27	2
200nM 化合物 7	0	0	0	0	0	0
Pi3K 抑制剂	18	12	8	9	20	1

[0196] * 对于对照, 示出 3 次重复的平均值 ± 标准偏差。

[0197] 如上记录, 获得五种新颖 3, 4, 5-三甲氧基苯基-脒和三种新颖 3, 4-噁二唑。在 Jurkat 和 HEK 细胞株的白血病细胞中评估合成的且包括在本发明的范围内的所有酰基-脒和噁二唑, 化合物 02 和 07 示出与标准化合物 (秋水仙碱) 类似的优异的抗白血病活性。使用 DNA 微阵列确定化合物 07 的作用机制, 示出它用 Chk2 和 Rb 活化、细胞周期停滞在 G2/M 和通过细胞凋亡诱导细胞死亡抑制微管蛋白的活性。随后的测试示出当与其在健康人淋巴细胞中的作用相比时, 化合物 07 对白血病细胞具有大约 10 倍的选择性。

[0198] 因此在本发明中存在的 3, 4, 5-三甲氧基苯基-脒和包括噁二唑的相关化合物以

及它们的类似物具有作为用于治疗与细胞增殖相关的不同疾病诸如白血病,包括急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、肿瘤和炎症的药物原型、前药或药物的巨大潜力。

[0199] 为了说明的目的,已经示出本发明的说明书和将来应用的细节用。然而,就本文所述和例示的本发明,本说明书不具有限制性特征。与以上描述相容的变化和修改以及相关领域的技术或知识在本发明的范围内。合理的意图在于,根据报告说明书和权利要求,本发明包括在其范围内的所有修改和变型。

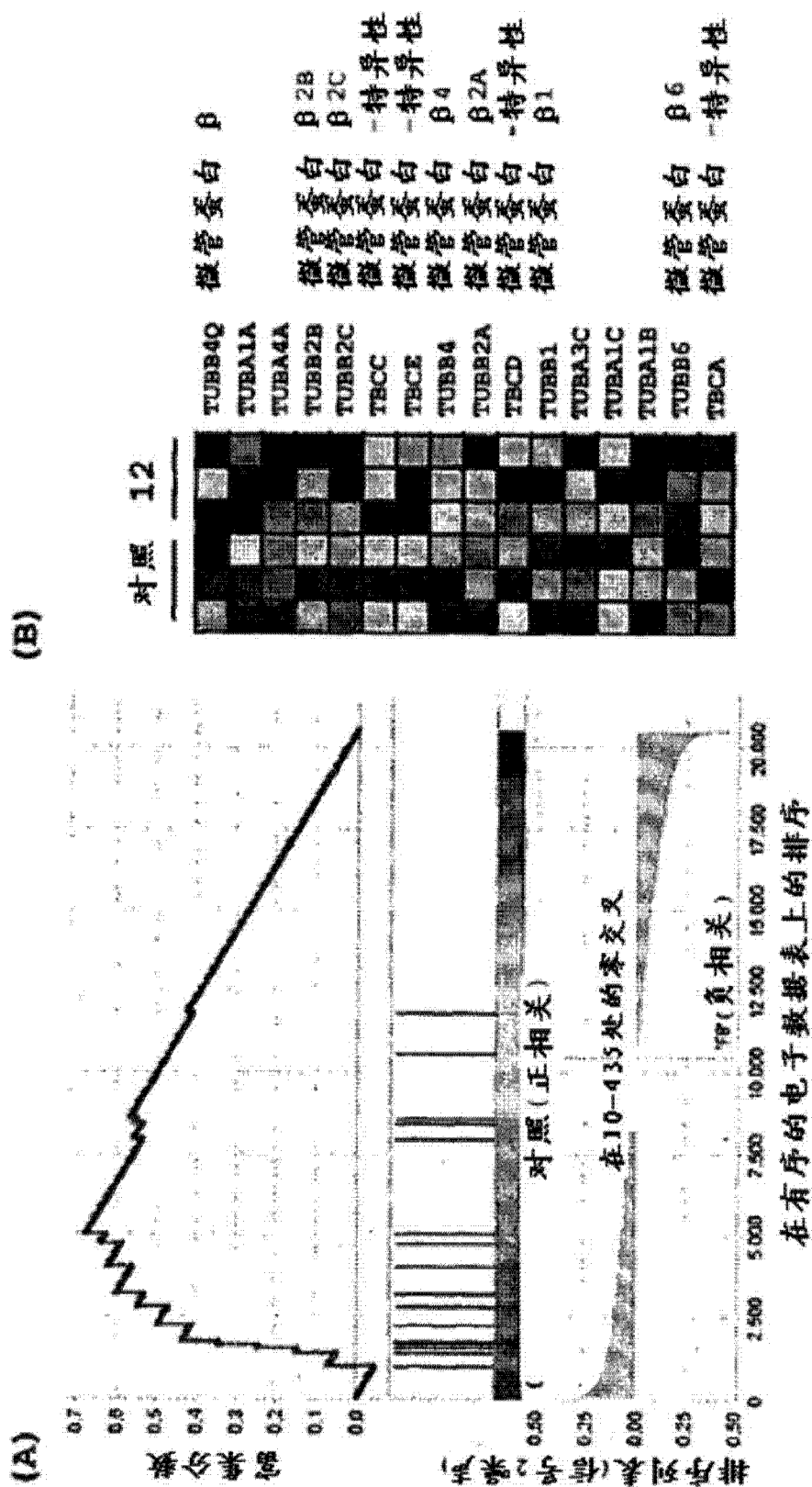


图 1

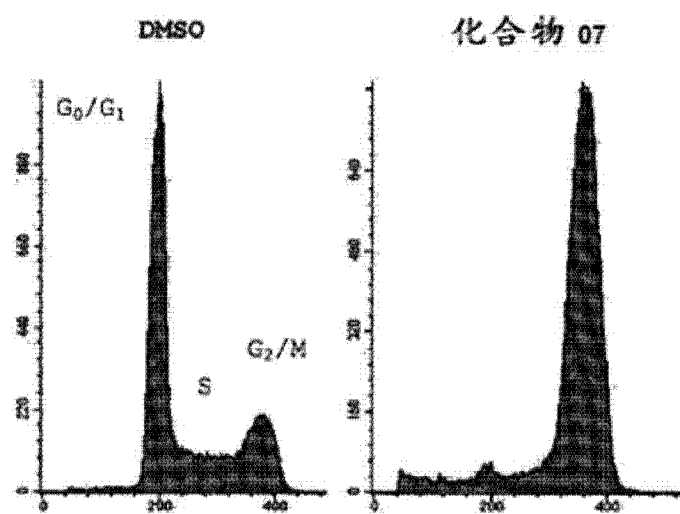


图 2

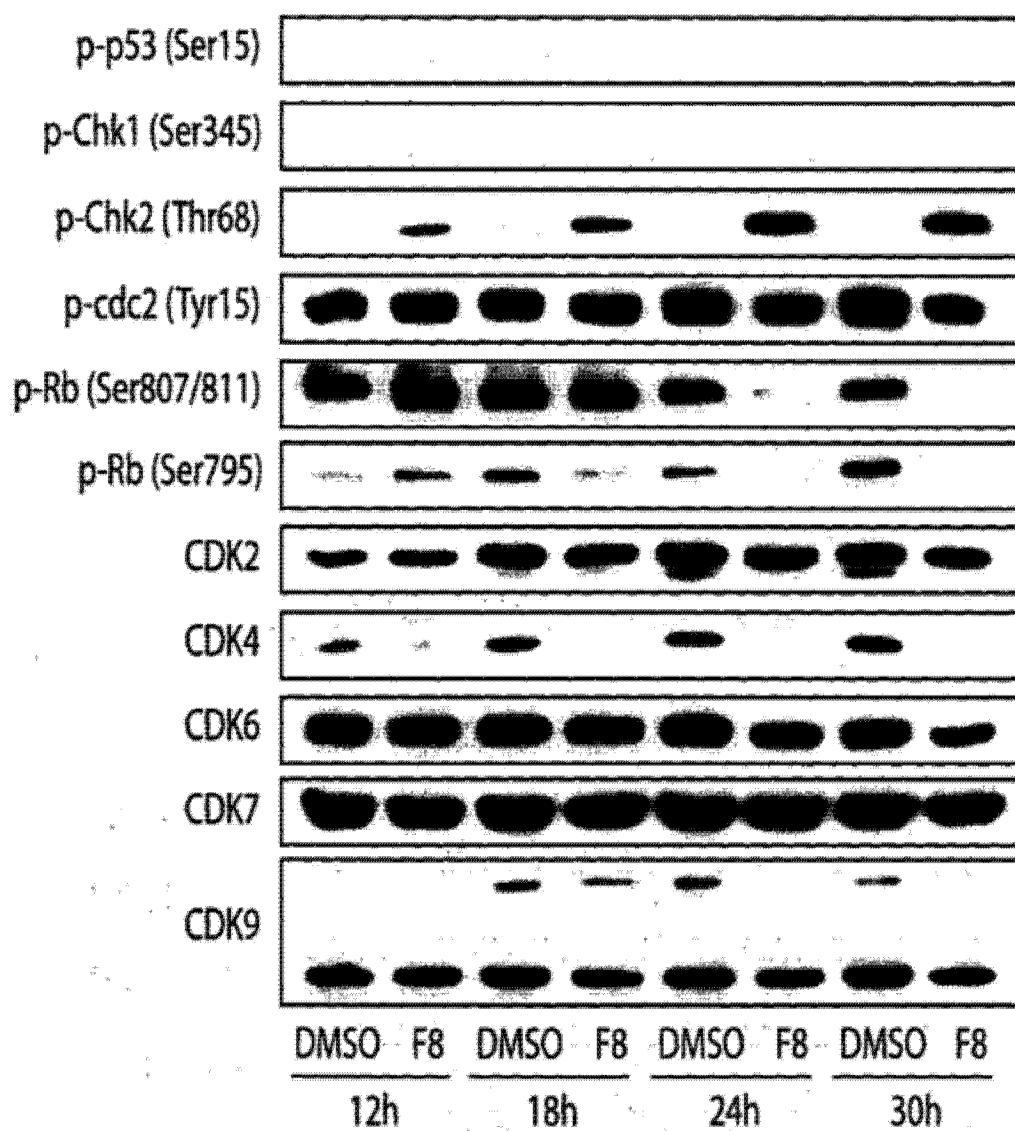


图 3

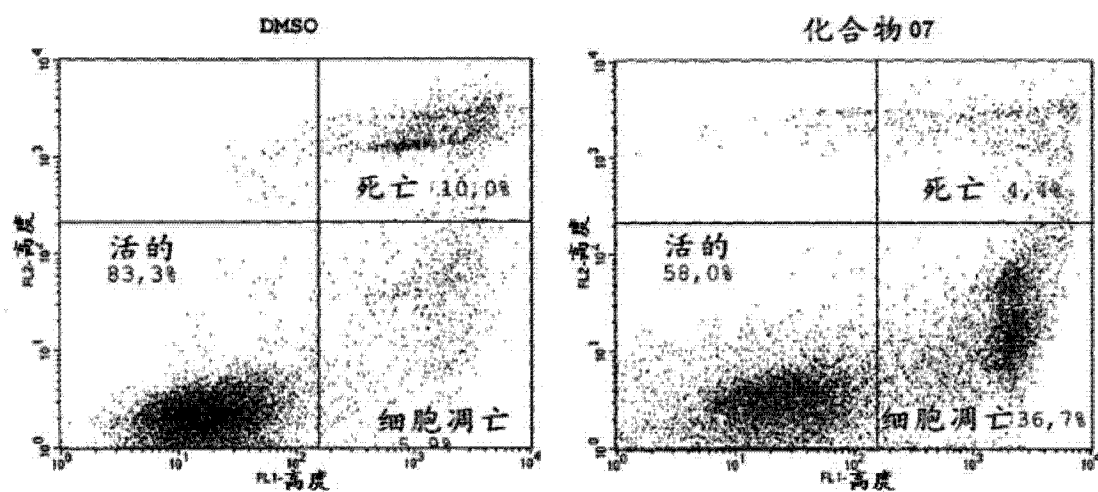


图 4

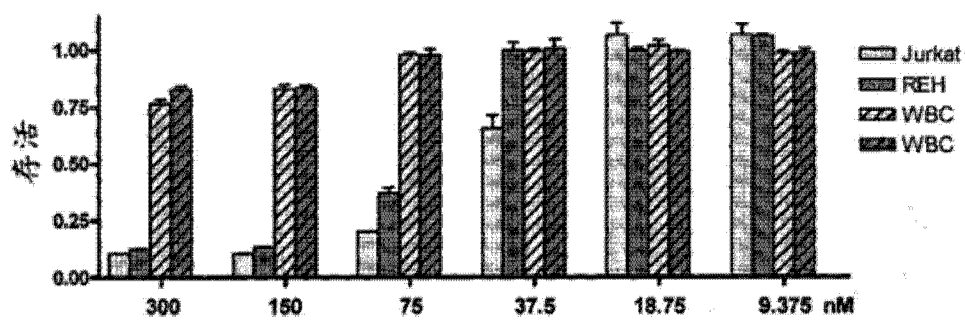


图 5