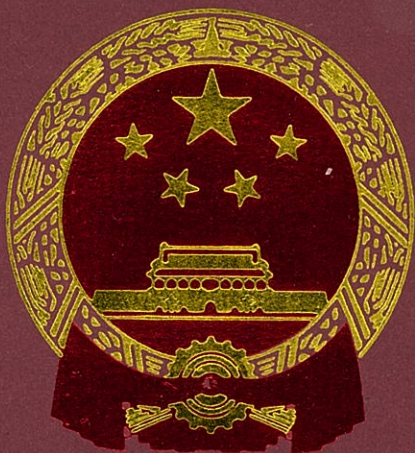




发明专利证书

Certificate of Invention Patent

中华人民共和国国家知识产权局

STATE INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE OF THE PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA

证书号第2052884号



发明专利证书

发明名称：含 SRC 同源区 2 蛋白酪胺酸磷酸酶-1 增效剂及其治疗方法

发明人：萧崇玮;陈昆锋

专利号：ZL 2012 8 0038359.7

专利申请日：2012 年 08 月 03 日

专利权人：萧崇玮;陈昆锋

授权公告日：2016 年 05 月 04 日

本发明经过本局依照中华人民共和国专利法进行审查，决定授予专利权，颁发本证书并在专利登记簿上予以登记。专利权自授权公告之日起生效。

本专利的专利权期限为二十年，自申请日起算。专利权人应当依照专利法及其实施细则规定缴纳年费。本专利的年费应当在每年 08 月 03 日前缴纳。未按照规定缴纳年费的，专利权自应当缴纳年费期满之日起终止。

专利证书记载专利权登记时的法律状况。专利权的转移、质押、无效、终止、恢复和专利权人的姓名或名称、国籍、地址变更等事项记载在专利登记簿上。



局长
申长雨

申长雨





(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104010501 B

(45) 授权公告日 2016. 05. 04

(21) 申请号 201280038359. 7

A61P 35/02(2006. 01)

(22) 申请日 2012. 08. 03

A61P 35/04(2006. 01)

A61P 19/10(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/514, 555 2011. 08. 03 US

审查员 王燕燕

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 01. 29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/049446 2012. 08. 03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/020014 EN 2013. 02. 07

(73) 专利权人 萧崇玮

地址 中国台湾台北市

专利权人 陈昆锋

(72) 发明人 萧崇玮 陈昆锋

(74) 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司

公司 11243

代理人 钟晶 於毓桢

(51) Int. Cl.

A61K 31/075(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

权利要求书1页 说明书42页 附图20页

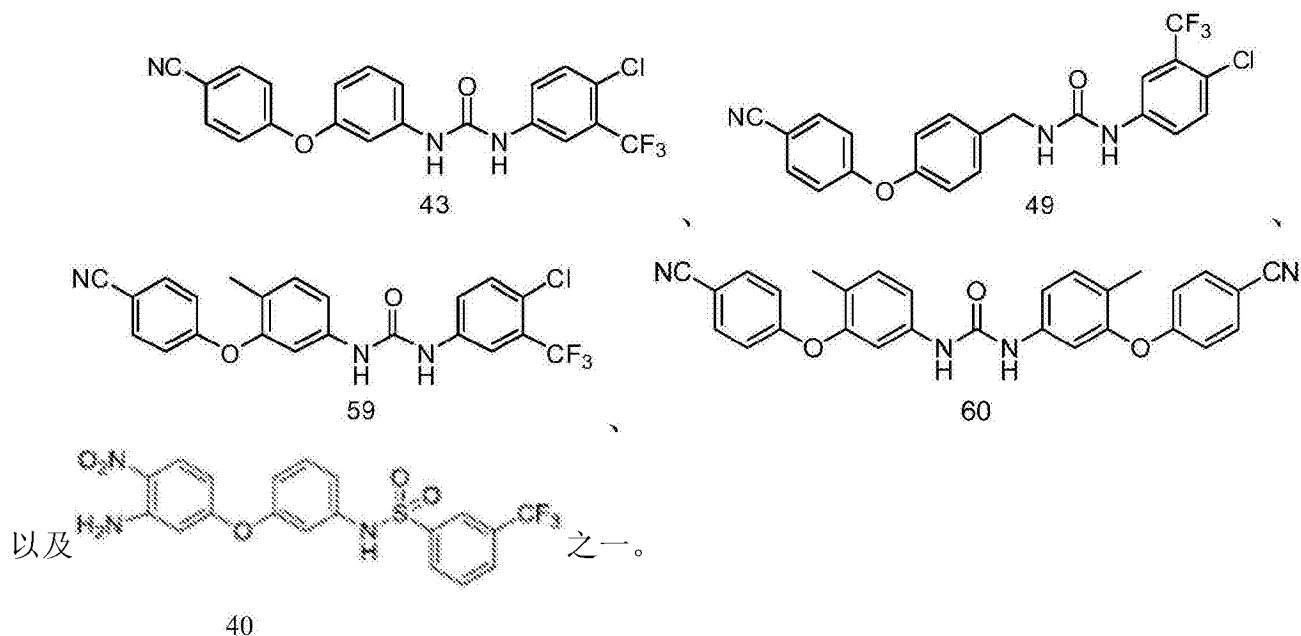
(54) 发明名称

含 SRC 同源区 2 蛋白酪氨酸磷酸酶 -1 增效剂
及其治疗方法

(57) 摘要

本发明提供式 I、II 或 III 的新颖化合物, 该化合物具有含 Src 同源区 -2 的蛋白酪氨酸磷酸酶 -1 (SHP-1) 的促进剂活性。本发明还提供使用该式 I、II 或 III 的化合物的治疗方法。

1. 一种化合物, 为:



2. 一种医药组合物, 包含权利要求1所述的化合物, 以及药理上可接受的载剂。

3. 一种用于增加含Src同源区-2的蛋白酪氨酸磷酸酶-1在细胞内表现的医药组合物, 包含权利要求1所述的化合物, 以及药理上可接受的载剂。

4. 一种用于治疗以含Src同源区-2的蛋白酪氨酸磷酸酶-1减少为特征的疾病或病症的医药组合物, 包含权利要求1所述的化合物, 以及一药理上可接受的载剂。

5. 权利要求1所述的化合物用于制造治疗以蛋白酪氨酸磷酸酶-1表现量减少为特征的疾病或病症的药剂的用途。

6. 根据权利要求5所述的用途, 其中该以蛋白酪氨酸磷酸酶-1表现量减少为特征的疾病或病症为癌症或骨质疏松症。

7. 根据权利要求6所述的用途, 其中该癌症为肝癌、白血病、肺癌、乳癌、肾癌、甲状腺癌、结肠癌和头部及颈部癌症。

含SRC同源区2蛋白酪氨酸磷酸酶-1增效剂及其治疗方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种具有含Src同源区-2的蛋白酪氨酸磷酸酶-1(SHP-1)促进剂活性的新颖化合物,以及使用该化合物的治疗方法。

背景技术

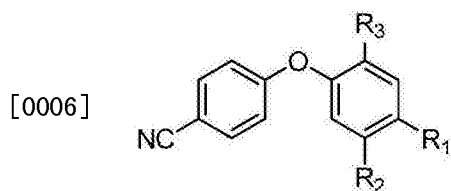
[0002] SHP-1,一种带有二个Src同源区2(SH2)结构区域的蛋白酪氨酸磷酸酶,是一种对不同的细胞内信号分子的调节剂,例如信号转导因子和转录激活因子3(STAT3)、KIT、CD22、CD5、CD72、SHPS-1、TIMP(金属蛋白酶)、CDK2、p27、SRC、ZAP70、介白素10(IL-10)、NF-κB、Lck、3BP2、Lyn,以及细胞周期素D1。

[0003] STAT3是一种由调制目标基因的表现来调节细胞生长和存活的转录因子。它在许多癌症中作为构成型活化的致癌基因,包含肝癌、肺癌、头部及颈部、前列腺癌、乳癌、骨髓癌以及白血病。SHP-1是STAT3活性的一个关键调节因子。从机构的观点来看,SHP-1显现蛋白磷酸酶的活性,进而减少磷酸化-STAT3(P-STAT3)的浓度,并随后阻断P-STAT3的二聚合作用。因此,目标基因的表现,例如由STAT3转录的细胞周期素D1以及生存素,明显地减少。此外,SHP-1蛋白以及SHP-1mRNA的研究显示,在大部份的癌细胞中SHP-1的表现量低;且在癌细胞中SHP-1基因表现的增加导致细胞生长的抑制,这意味着SHP-1基因具有肿瘤抑制因子的作用。从药物发现的观点来看,开发一种可以减少P-STAT3以及增加SHP-1浓度的小分子是一个很有前景的癌症治疗方向。SHP-1并且在骨骼再成型中扮演一个重要的角色,骨骼再成型是一种造骨细胞形成骨骼以及噬骨细胞再吸收骨骼的过程。SHP-1的功能丧失造成噬骨细胞活性的增加且最终导致骨质疏松症。因此,增强SHP-1的活性可能是对骨质疏松症患者的一种治疗方向。此外,SHP-1的增加对于多发性硬化症患者的巨噬细胞而言是有益的。

发明内容

[0004] 本发明是基于意外地发现新设计的化合物可作为SHP-1促进剂以及具有减少P-STAT3的能力,且对于治疗某些疾病,如癌症,是有用的。特定而言,本发明的化合物并不阻断如Raf-1以及VEGFR2等激酶的活性。

[0005] 具体而言,在一方面,本发明提供一种式I的化合物



式 I

[0007] 其中R₁、R₂、以及R₃各自独立,为氢、卤素、羟基、可经取代的烷氧基、可经取代的烷硫基、可经取代的烷基、可经取代的烯基、可经取代的炔基、可经取代的环烷基、可经取代的杂环烷基、可经取代的芳基、可经取代的芳烷基、可经取代的杂芳基、可经取代的杂芳烷基、-(C)_mNHC(X)NH(C)_nR_a-、-(C)_pNHC(X)R_b-、-(C)_qNHS(O)₂R_c-、-(C)_r(X)NHR_d-、或-(C)_sNH(C)

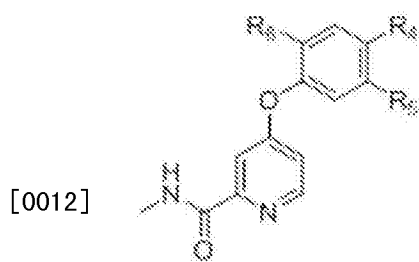
tRe;

[0008] 其中R_a、R_b、R_c、R_d以及R_e各自独立,为氢、卤素、羟基、可经取代的烷氧基、可经取代的烷硫基、可经取代的烷基、可经取代的烯基、可经取代的炔基、可经取代的环烷基、可经取代的杂环烷基、可经取代的芳基、可经取代的芳烷基、可经取代的杂芳基、可经取代的杂芳烷基;

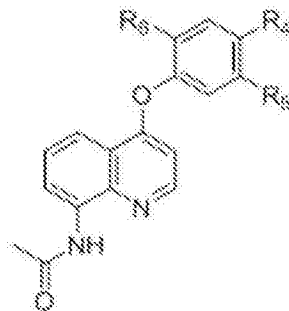
[0009] X为氧(O)或硫(S);以及

[0010] m、n、p、q、r、s、t为0、1或2。

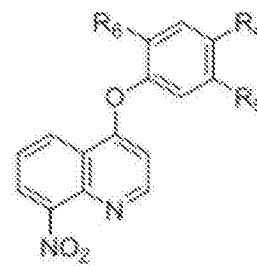
[0011] 在另一方面,本发明提供一种式II的化合物,包括式II(a)的化合物、式II(b)的化合物、或式II(c)的化合物。



式 II(a)



式 II(b)



式 II(c)

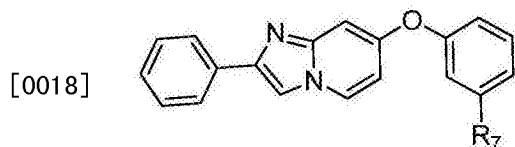
[0013] 其中R₄、R₅以及R₆各自独立,为氢、卤素、羟基、可经取代的烷氧基、可经取代的烷硫基、可经取代的烷基、可经取代的烯基、可经取代的炔基、可经取代的环烷基、可经取代的杂环烷基、可经取代的芳基、可经取代的芳烷基、可经取代的杂芳基、可经取代的杂芳烷基、-(C)_mNHC(X)NH(C)_nR_a、-(C)_pNHC(X)R_b、-(C)_qNHS(O)₂R_c、-(C)_r(X)NHR_d或-(C)_sNH(C)_tR_e;

[0014] 其中R_a、R_b、R_c、R_d以及R_e各自独立,为氢、卤素、羟基、可经取代的烷氧基、可经取代的烷硫基、可经取代的烷基、可经取代的烯基、可经取代的炔基、可经取代的环烷基、可经取代的杂环烷基、可经取代的芳基、可经取代的芳烷基、可经取代的杂芳基、可经取代的杂芳烷基;

[0015] X为氧(O)或硫(S);以及

[0016] m、n、p、q、r、s、t为0、1或2。

[0017] 在又另一方面,本发明提供一种式III的化合物



式 III

[0019] 其中R₇为氢、卤素、羟基、可经取代的烷氧基、可经取代的烷硫基、可经取代的烷基、可经取代的烯基、可经取代的炔基、可经取代的环烷基、可经取代的杂环烷基、可经取代的芳基、可经取代的芳烷基、可经取代的杂芳基、可经取代的杂芳烷基、-(C)_mNHC(X)NH(C)_nR_a、-(C)_pNHC(X)R_b、-(C)_qNHS(O)₂R_c、-(C)_r(X)NHR_d或-(C)_sNH(C)_tR_e;

[0020] 其中R_a、R_b、R_c、R_d以及R_e各自独立,为氢、卤素、羟基、可经取代的烷氧基、可经取代的烷硫基、可经取代的烷基、可经取代的烯基、可经取代的炔基、可经取代的环烷基、可经取代的杂环烷基、可经取代的芳基、可经取代的芳烷基、可经取代的杂芳基、可经取代的杂芳烷基;

烷基;

[0021] X为氧(O)或硫(S);以及

[0022] m、n、p、q、r、s、t为0、1或2。

[0023] 本发明并提供一种包含一或多种上述化合物的医药组合物。本发明的医药组合物可用于增加SHP-1在细胞内的表现量或生物活性,或是用于治疗以含Src同源区-2的蛋白酪氨酸磷酸酶-1(SHP-1)的表现量或生物活性减少为特征的疾病或病症,包括但不限于癌症(如:肝癌、白血病、肺癌、乳癌、肾癌、甲状腺癌、头部及颈部癌症)、硬化及骨质疏松症。而且使用任一上述化合物以增加SHP-1在细胞内的表现量或生物活性,或治疗本文所述的以SHP-1的表现量或生物活性减少为特征的疾病或病症,以及使用任一上述化合物以制造用以治疗该疾病或病症的药物也在本发明的范围之内。

[0024] 本发明并提供一种增加SHP-1在细胞内的表现量或生物活性的方法,包含将该细胞与一有效量的本文所述的化合物或医药组合物接触。

[0025] 本发明并进一步提供一种在需要SHP-1的个体中治疗以SHP-1的表现量或生物活性减少为特征的疾病或病症的方法,包含将本文所述的化合物或医药组合物以有效量投至该个体。

[0026] 本发明的各种具体实施例详述如下。本发明的其他特征将会由以下关于各种具体实施例及申请专利范围的详细描述和图式清楚地呈现。

[0027] 一般认为,本发明所属技术领域中具有通常知识者可以根据此处的描述且无需进一步阐释,而将本发明利用到其最广泛的范围。因此,以下的描述应当被理解为作为示范的目的,而非以任何方式限制本发明的范围。

附图说明

[0028] 为了说明本发明,显示于图式中的为目前较佳的具体实施例。然而,本发明应当被理解为不限于图式中所示的较佳具体实施例。

[0029] 在图式中:

[0030] 图1所示为索拉非尼(sorafenib)及化合物SC-1的化学结构。

[0031] 图2所示为本发明式I、II、及III化合物的一般合成的程序。

[0032] 图3所示为在分别用索拉非尼及化合物1处理的细胞内的Raf-1活性。Huh-7细胞暴露于10 μ M索拉非尼或化合物1的环境下24小时,接着将其细胞裂解物进行raf-1活性分析。柱代表平均值;条带代表标准偏差(n=3);*P<0.05。

[0033] 图4所示为化合物1-25及索拉非尼,每种化合物以10 μ M浓度处理PLC5细胞24小时后,对于在PLC5细胞内经IL-6刺激的P-STAT的抑制效果的ELISA分析结果。柱代表平均值;条带代表标准偏差(N=3)。

[0034] 图5所示为化合物1及12,分别以5 μ M及10 μ M浓度于含FBS培养基内处理PLC5细胞24小时后,对于PLC5细胞内P-STAT3、STAT3、细胞周期素D及生存素的磷酸化的影响的西方墨点分析结果。

[0035] 图6所示为(A)化合物1及12,分别以5 μ M及10 μ M浓度处理PLC5细胞24小时后,诱导细胞死亡的ELISA分析结果;及(B)所示为化合物1及12,分别以5 μ M及10 μ M浓度处理PLC5细胞24小时后,诱导细胞死亡的流式细胞仪分析结果。

[0036] 图7所示为(A)索拉非尼及SC-1对于HUVEC细胞内磷酸化-VEGFR2的影响,其中该细胞是以10 μ M索拉非尼或SC-1处理24小时;(B)索拉非尼及SC-1对Raf-1活性的影响,其中该细胞是以10 μ M索拉非尼或SC-1处理24小时。点代表平均值;条带代表标准偏差(n=6)。

[0037] 图8所示为(A)索拉非尼及SC-1对四种肝癌细胞株的细胞存活率的影响,该影响是随剂量而递增的,其中该细胞是以指示剂量的索拉非尼或SC-1处理72小时,并以MTT分析法分析细胞存活率;以及索拉非尼及SC-1对四种肝癌细胞株的细胞凋亡的影响,该影响是随剂量而递增的,其中该细胞是以指示剂量的索拉非尼或SC-1处理24小时,并将细胞裂解液以流式细胞仪(B),或细胞死亡ELISA(C)分析。点代表平均值;条带代表标准偏差(n=6)。

[0038] 图9所示为(A)索拉非尼或SC-1对STAT3-相关的蛋白质的影响,其中该细胞是以10 μ M索拉非尼或SC-1处理24小时;(B)索拉非尼或SC-1对PLC5细胞内磷酸化-STAT3的影响,该影响是随剂量而递增的,其中该细胞是以指示剂量的药物处理24小时;(C)索拉非尼及SC-1对STAT3活性的影响(左,磷酸化-STAT3ELISA;右,STAT3的荧光酶报导基因分析),其中该细胞是以10 μ M索拉非尼或SC-1处理24小时,并测量磷酸化-STAT3ELISA或荧光酶活性;(D)STAT3对PLC5细胞中由索拉非尼诱导的细胞凋亡的保护效果,其中该细胞(野生型或STAT3的异位表达)是以10 μ M索拉非尼或SC-1处理24小时,并以流式细胞仪分析细胞凋亡的细胞。柱代表平均值;条带代表标准偏差(n=3);*P<0.05。

[0039] 图10所示为索拉非尼及SC-1对磷酸化-STAT3及细胞凋亡的SHP-1逆转效果的抑制。A,左,钒酸钠,一种非专一性的磷酸酶抑制剂。右,SHP-1专一性的抑制剂。柱代表平均值;条带代表标准偏差(n=3);*P<0.05。B,左,siRNA引起的SHP-1基因静默降低了索拉非尼或SC-1对肝癌细胞中磷酸化-STAT3的影响。将对照组siRNA或SHP-1siRNA转染至PLC5细胞内24小时,接着以索拉非尼或SC-1再处理24小时。中间,PLC5细胞中SHP-1的活性。柱代表平均值;条带代表标准偏差(n=3);*P<0.05。右,索拉非尼或SC-1对于SHP-1及STAT3之间的蛋白交互作用的影响。以10 μ M索拉非尼或SC-1处理PLC5细胞24小时。C,SHP-2基因的剔除并不影响索拉非尼或SC-1对p-STAT3及细胞凋亡的效果。D,PTP-1B基因的剔除并不影响索拉非尼对p-STAT3及细胞凋亡的效果。将对照组siRNA或SHP-2siRNA或PTP-1B siRNA转染至PLC5细胞内24小时,接着以10 μ M索拉非尼或SC-1再处理24小时。

[0040] 图11所示为SC-1在HUVEC细胞中向下调节p-STAT3及诱导细胞凋亡。A,索拉非尼或SC-1在HUVEC细胞中对p-STAT3(左)及细胞凋亡(右)的影响。以10 μ M索拉非尼或SC-1处理细胞24小时。以流式细胞仪分析细胞凋亡的细胞(sub-G1)。B,SC-1在肝癌组织中对TRAIL增敏作用的影响。以SC-1(10 μ M)及/或TRAIL(100ng/ml)处理PLC5细胞24小时。C,Raf-1基因静默并不影响药物对p-STAT3的作用。将对照组siRNA或Raf-1siRNA转染至PLC5细胞内24小时,接着以10 μ M索拉非尼或SC-1处理24小时。D,索拉非尼及SC-1对JAK2活性的影响。以10 μ M索拉非尼或SC-1处理PLC5细胞24小时。点代表平均值;条带代表标准偏差(n=6)。E,索拉非尼及SC-1对SOCS-1及SOCS-3的影响。Sk-Hep1细胞先以介白素-6预处理24小时后,接着于介白素-6存在的条件下以指示剂量的索拉非尼或SC-1再处理24小时。F,STAT-C对于在PLC5细胞中由SC-1引起的细胞凋亡的影响。以10 μ M索拉非尼或SC-1处理细胞(野生型或STAT3-C的异位表现)24小时。G,索拉非尼及SC-1对SHP-1的影响。柱代表平均值;条带代表标准偏差(n=3);*P<0.05。

[0041] 图12所示为索拉非尼及SC-1对Huh-7异体移植裸鼠体内的影响。A,索拉非尼对

Huh-7肿瘤具有抗肿瘤效果。左,点代表平均值($n=6$);条带代表标准偏差;*代表 $P<0.05$;**代表 $P<0.01$ 。右上,在Huh-7肿瘤内p-STAT3及STAT3的西方墨点分析。右下,在Huh-7肿瘤内SHP-1的活性。B,SC-1对Huh-7肿瘤具有显著的抗肿瘤效果。左,点代表平均值($n=6$);条带代表标准偏差。右上,在Huh-7肿瘤内p-STAT3及STAT3的西方墨点分析。右下,在Huh-7肿瘤内SHP-1的活性。

[0042] 图13所示为SC-1及SC-43在不同癌症细胞株内具有抗增殖效果,包括乳癌细胞株(A)MDAMB231、(B)MDAMB468及(C)MCF-7,以及白血病癌症细胞株(D)HL-60、(E)KG-1及(F)ML-1。

[0043] 图14所示为索拉非尼衍生物以剂量依赖方式诱导显著的细胞凋亡,其中(A)、(B)、(C)、(D)及(E)是指SC-43分别对PLC5、HepG2、Hep3B、HA59T及SK-Hep1细胞;以及(F)、(G)、(H)、(I)及(J)是指SC-40分别对PLC5、HepG2、Hep3B、HA59T及SK-Hep1细胞。点代表平均值;条带代表标准偏差($n=6$)。

[0044] 图15所示为SC-43在肝癌细胞中向下调节磷酸化-STAT3-相关的信号传导途径,包括PLC5、HepG2、Hep3B、HA59T及SK-Hep1细胞。

[0045] 图16所示为SC-40在肝癌细胞中向下调节磷酸化-STAT3-相关的信号传导途径,包括PLC5、HepG2、Hep3B、HA59T及SK-Hep1细胞。

[0046] 图17所示为SC-43在肝癌细胞中对p-STAT3-相关的信号传导途径的抑制效果优于索拉非尼,(A)PLC5及(B)Hep3B细胞。

[0047] 图18所示为SC-43及SC-40两者皆可引发p-STAT3活性的强烈抑制作用,(A)及(B)为以p-STAT3ELISA分别分析SC-43及SC-40,以及(C)及(D)为以STAT3报导基因分别分析SC-43及SC-40。

[0048] 图19所示为SC衍生物在体外增加SHP-1的磷酸酶活性,(A)SC-43、(B)SC-40、及(C)SC-49。

[0049] 图20所示为SC衍生物在体外增加SHP-1的磷酸酶活性,(A)SC-43及(B)SC-40。

[0050] 图21所示为(A)SC-40对PLC5肿瘤的抗肿瘤效果;(B)PLC5肿瘤内p-STAT3及STAT3的西方墨点分析;(C)受测动物的体重;(D)肿瘤重量以及(E)PLC5肿瘤内SHP-1的活性。点代表平均值($n=6$);条带代表标准偏差。

[0051] 图22所示为SC-43在体外及体内抗肿瘤的效果,(A)SC-43在肝癌细胞内的细胞毒性,(B)SC-43在带有肝癌的小鼠体内的抗肿瘤效果,(C)由SC-43诱导的SHP-1活性,以及(D)在由SC-43处理的肝癌细胞内p-STAT3及STAT3的西方墨点分析(10 μ M及20 μ M)。

[0052] 图23所示为(A)以非侵入性体内成像系统分析处理组小鼠所得的图像,(B)所示为该小鼠的体重,以及(C)显示为对照组小鼠及处理组小鼠之间的存活曲线。

具体实施方式

[0053] 除非另有定义,本文所用的所有技术及科学术语与本发明所属技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本文所提及的所有出版物皆以引用方式并入本文,以揭露及描述与该被引用的出版物有关的方法及/或材料。

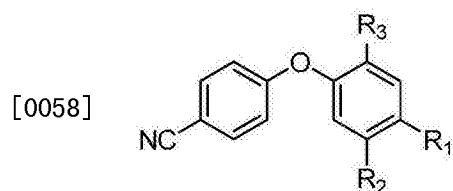
[0054] 如本文所使用,单数形式“一”(a、an)和“该”(the)包括复数对象,除非该内文清楚地另有规定。因此,例如,参照“一样品”包括复数个此类样品以及本领域的技术人员已知的

等同物。

[0055] 索拉非尼(Sorafenib)(拜耳BAY43-9006, 蕾莎瓦膜衣錠)已被使用于肾癌和肝癌(HCC, hepatocellular carcinoma)的临床应用上。该药已知为一多激酶抑制剂, 其抑制Raf-1和其它酪氨酸激酶如VEGFR2、VEGFR3、Flt-3、PDGFR、和FGFR-1的活性。

[0056] 在本发明中, 我们研究了索拉非尼的结构与其生物活性之间的关系, 并修改了索拉非尼的结构。我们据此开发了一些不具有阻断激酶活性能力的索拉非尼衍生物, 并且意外地发现, 至少相较于索拉非尼, 这些化合物在某些疾病中, 如癌症, 具有良好的治疗效果。根据本发明, 本发明新设计的化合物作用为SHP-1促进剂, 且对治疗以SHP-1的表现量或生物活性减少为特征的疾病或病症, 如癌症(例如: 肝癌、白血病、肺癌、乳癌、肾癌、甲状腺癌、头部及颈部癌症)、硬化及骨质疏松症, 是有用的。本发明的化合物亦提供对激酶抑制剂具有抗性的病患一种新的治疗选择。既使在激酶抑制剂存在的情况下, 这些肿瘤在治疗后仍产生激酶突变, 并且以磷酸化活性形式存在。因此, 对化疗具有抗性的病患而言, 肿瘤抑制因子, 特别是SHP-1, 的向上调节以抑制激酶的活性突变形式, 是一种具有前景的治疗方向。换言之, 本发明的化合物透过一种新的标靶机制(非依赖激酶的), 提供替代的治疗选择, 该选择可能在传统医药治疗具有抗性的癌症的治疗上是有帮助的。

[0057] 在一方面, 本发明提供一种式I的化合物



式 I

[0059] 其中R₁、R₂、以及R₃各自独立, 为氢、卤素、羟基、可经取代的烷氧基、可经取代的烷硫基、可经取代的烷基、可经取代的烯基、可经取代的炔基、可经取代的环烷基、可经取代的杂环烷基、可经取代的芳基、可经取代的芳烷基、可经取代的杂芳基、可经取代的杂芳烷基、-(C)_mNHC(X)NH(C)_nR_a、-(C)_pNHC(X)R_b、-(C)_qNHS(O)₂R_c、-(C)_r(X)NHR_d、或-(C)_sNH(C)_tR_e;

[0060] 其中R_a、R_b、R_c、R_d以及R_e各自独立, 为氢、卤素、羟基、可经取代的烷氧基、可经取代的烷硫基、可经取代的烷基、可经取代的烯基、可经取代的炔基、可经取代的环烷基、可经取代的杂环烷基、可经取代的芳基、可经取代的芳烷基、可经取代的杂芳基、可经取代的杂芳烷基;

[0061] X为氧(O)或硫(S); 以及

[0062] m、n、p、q、r、s、t为0、1或2。

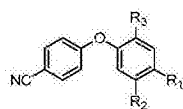
[0063] 在一具体实施例中, 该式I的化合物包括那些其中R₁、R₂、以及R₃各自独立, 为氢、可经取代的低碳烷基、-(C)_mNHC(X)NH(C)_nR_a、-(C)_pNHC(X)R_b、-(C)_qNHS(O)₂R_c、或-(C)_sNH(C)_tR_e。

[0064] 在另一具体实施例中, 该式I的化合物包括那些其中R_a、R_b、R_c、R_d以及R_e各自独立, 为苯基或萘基, 这些基团可经1至3个选自卤素、可经取代的低碳烷基(例如经卤素取代的低碳烷基, 如三氟甲基)、可经取代的烷氧基(例如经卤素取代的低碳烷氧基, 如三氟甲基)以及可经取代的芳氧基(例如经氰基取代的苯氧基)所组成的群组中的基取代。

[0065] 在某些实例中, 该式I的化合物为如表1所列的化合物SC-1、SC-48、SC-49、SC-54、

SC-55、SC-56、SC-58、SC-43、SC-44、SC-45、SC-50、SC-51、SC-52、SC-59、SC-60以及SC-40其中之一。

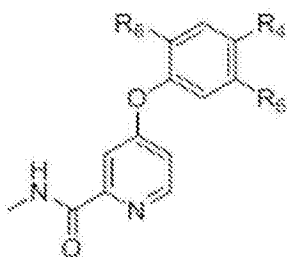
[0066] 表1



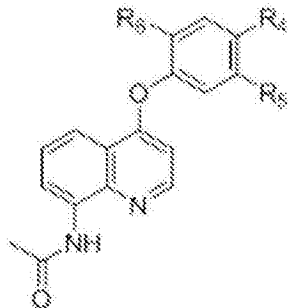
Cpd	R ₁	R ₂	R ₃
SC-1		H	H
SC-48		H	H
SC-49		H	H
SC-54		H	H
SC-55		H	H
SC-56		H	H
[0067] SC-58		H	H
SC-43	H		H
SC-44	H		H
SC-45	H		H
SC-50	H		H
SC-51	H		H
SC-52	H		H
SC-59	H		Me
SC-60	H		Me

[0068] 在另一方面,本发明提供一种式II的化合物,包括式II(a)的化合物、式II(b)的化合物、或式II(c)的化合物。

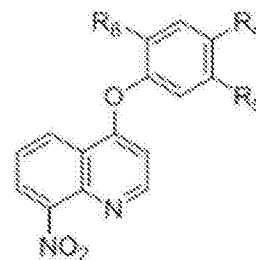
[0069]



式 II(a)



式 II(b)



式 II(c)

[0070] 其中 R_4 、 R_5 以及 R_6 各自独立,为氢、卤素、羟基、可经取代的烷氧基、可经取代的烷硫基、可经取代的烷基、可经取代的烯基、可经取代的炔基、可经取代的环烷基、可经取代的杂环烷基、可经取代的芳基、可经取代的芳烷基、可经取代的杂芳基、可经取代的杂芳烷基、 $-(C)_mNHC(X)NH(C)_nR_a-$ 、 $-(C)_pNHC(X)R_b-$ 、 $-(C)_qNHS(O)_2R_c-$ 、 $-(C)_r(X)NHR_d-$ 或 $-(C)_sNH(C)_tR_e$;

[0071] 其中 R_a 、 R_b 、 R_c 、 R_d 以及 R_e 各自独立,为氢、卤素、羟基、可经取代的烷氧基、可经取代的烷硫基、可经取代的烷基、可经取代的烯基、可经取代的炔基、可经取代的环烷基、可经取代的杂环烷基、可经取代的芳基、可经取代的芳烷基、可经取代的杂芳基、可经取代的杂芳烷基;

[0072] X 为氧(O)或硫(S);以及

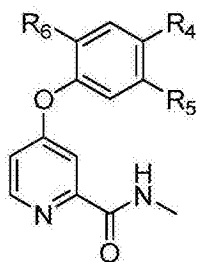
[0073] m 、 n 、 p 、 q 、 r 、 s 、 t 为0、1或2。

[0074] 在一具体实施例中,该式II的化合物包括那些其中 R_4 、 R_5 以及 R_6 各自独立,为氢、可经取代的低碳烷基、 $-(C)_mNHC(X)NH(C)_nR_a-$ 、 $-(C)_pNHC(X)R_b-$ 、 $-(C)_qNHS(O)_2R_c-$ 、或 $-(C)_sNH(C)_tR_e$ 。

[0075] 在另一具体实施例中,该式II的化合物包括那些其中 R_a 、 R_b 、 R_c 、 R_d 以及 R_e 各自独立,为苯基、萘基,这些基团可经1至3个选自卤素、可经取代的低碳烷基(例如经卤素取代的低碳烷基,如三氟甲基)、可经取代的烷氧基(例如经卤素取代的低碳烷氧基,如三氟甲基)以及可经取代的芳氧基(例如经氰基取代的苯氧基)所组成的群组中的基取代。

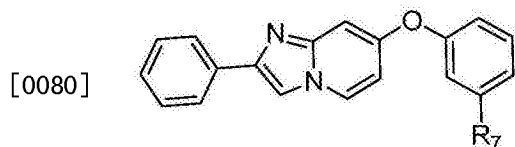
[0076] 在某些实例中,该式II的化合物为如表2所列的化合物SC-31、SC-32、SC-33、SC-34以及SC-35其中之一。

[0077] 表2



Cpd	R ₄	R ₅	R ₆
SC-31	H		H
SC-32	H		H
SC-33	H		H
SC-34	H		H
SC-35	H		H

[0079] 在又另一方面,本发明提供一种式III的化合物



式 III

[0081] 其中R₇为氢、卤素、羟基、可经取代的烷氧基、可经取代的烷硫基、可经取代的烷基、可经取代的烯基、可经取代的炔基、可经取代的环烷基、可经取代的杂环烷基、可经取代的芳基、可经取代的芳烷基、可经取代的杂芳基、可经取代的杂芳烷基、-(C)_mNHC(X)NH(C)_nR_a、-(C)_pNHC(X)R_b、-(C)_qNHS(O)₂R_c、-(C)_r(X)NHR_d或-(C)_sNH(C)_tR_e;

[0082] 其中R_a、R_b、R_c、R_d以及R_e各自独立,为氢、卤素、羟基、可经取代的烷氧基、可经取代的烷硫基、可经取代的烷基、可经取代的烯基、可经取代的炔基、可经取代的环烷基、可经取代的杂环烷基、可经取代的芳基、可经取代的芳烷基、可经取代的杂芳基、可经取代的杂芳烷基;

[0083] X为氧(O)或硫(S);以及

[0084] m、n、p、q、r、s、t为0、1或2。

[0085] 在一具体实施例中,该式III的化合物包括那些其中R₇各自独立,为氢、可经取代

的低碳烷基、 $-(C)_mNHC(X)NH(C)_nR_a-$ 、 $-(C)_pNHC(X)R_b-$ 、 $-(C)_qNHS(O)_2R_c$ 、或 $-(C)_sNH(C)_tR_e$ 。

[0086] 在另一具体实施例中,该式III的化合物包括那些其中 R_a 、 R_b 、 R_c 、 R_d 以及 R_e 各自独立,为苯基、萘基,这些基团可经1至3个选自卤素、可经取代的低碳烷基(例如经卤素取代的低碳烷基,如三氟甲基)、可经取代的烷氧基(例如经卤素取代的低碳烷氧基,如三氟甲基)以及可经取代的芳氧基(例如经氰基取代的苯氧基)所组成的群组中的基取代。

[0087] 在某些实例中,该式III的化合物为如表3所列的化合物SC-36、SC-37以及SC-38其中之一。

[0088] 表3

[0089]	Cpd	R_7
	SC-36	
	SC-37	
	SC-38	

[0090] 术语“卤素的”或“卤素”单独或组合使用是指所有卤素,如氟(F)、氯(Cl)、溴(Br)、碘(I)。

[0091] 术语“羟基”是指基团-OH。

[0092] 术语“巯基”以及“氢巯基”可互换使用且意指基团-SH。

[0093] 术语“烷基”单独或组合使用是指一烷烃衍生的基团,除非另有说明,否则包含1至20个碳原子(C_1 - C_{20}),较佳地为1至15个碳原子(C_1 - C_{15}),更佳地为1至10个碳原子(C_1 - C_{10})。其为一直链烷基、支链烷基或环烷基,较佳地为直链或支链烷基,包含1至15,更佳地为1至8,甚至更佳地为1至6,再更佳地为1至4,以及最佳地为1至2个碳原子,如甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基,叔丁基及其类似物。本文所使用的“低碳烷基”一词是用来描述如上所述的直链烷基。较佳地,环烷基为每环3至8个环成员,更佳地为每环3至6个环成员的单环、双环或三环系统,如环丙基、环戊基、环己基、金刚烷基及其类似物。烷基还包括一直链或支链烷基,该基团含有或被一环烷基的部份中断。该直链或支链烷基被附于任何可用的位置以产生一稳定的化合物。此一实例包括,但不限于,4-(异丙基)-伸环己基或2-甲基-环丙基戊基。烷基可经1至3个选自以下的取代基取代:卤素、羟基、烷氧基、烷硫基、烷基亚磺酰基、烷基磺酰基、酰氧基、芳氧基、杂芳氧基、可经烷基、芳基、杂芳基单-或双取代的胺、脒基、可经烷基、芳基、杂芳基或杂环基取代的脲、可经烷基、芳基或杂芳基进行N-单-或N,N-二-取代的胺基亚磺酰基、烷基磺酰胺基、芳基磺酰胺基、杂芳基磺酰胺基、烷基羰基胺基、芳基羰基

胺基、杂芳基羰基胺基,或类似物。

[0094] “烯基”一词单独或组合使用是指一直链、支链、或环状的碳氢化合物,包含2至20个碳原子,较佳地为2至17个碳原子,更佳地为2至10个碳原子,甚至更佳地为2至8个碳原子,最佳地为2至4个碳原子,以及至少1个,较佳地为1至3个,更佳地为1至2个,最佳地为1个碳-碳双键。在环烯基的情况下,超过1个碳-碳双键的共轭作用并非是将芳香性赋予该环。碳-碳双键可能包含在一环烷基部份之内,除了环丙基以外,或是包含在一直链或支链部份之内。烯基的实例包括乙烯基、丙烯基、异丙烯基、丁烯基、环己烯基、环己烯基烷基及其类似物。一经取代的烯基为先前定义的直链烯基、支链烯基或环烯基,各自独立地经1至3个选自以下的取代基取代:卤素、羟基、芳氧基、烷硫基、烷基亚磺酰基、烷基磺酰基,各自独立地经烷基、芳基或杂芳基取代,脒基、可经烷基、芳基、杂芳基或杂环基取代的脒、可经烷基、芳基或杂芳基进行N-单-或N,N-二-取代的胺基磺酰基、烷基磺酰胺基、烷基羰基胺基、芳基羰基胺基、芳氧基羰基、杂芳氧基羰基,或附加在任何可用的位置上以产生稳定化合物的类似物。

[0095] “炔基”一词单独或组合使用是指一直链、支链、或环状的碳氢化合物,包含2至20个碳原子,较佳地为2至17个碳原子,更佳地为2至10个碳原子,甚至更佳地为2至8个碳原子,最佳地为2至4个碳原子,以及至少1个,较佳地为1至3个,更佳地为1至2个,最佳地为1个碳-碳三键。炔基的实例包括乙炔基、丙炔基、异丙炔基、丁炔基、及其类似物。一经取代的炔基为先前定义的直链炔基、支链炔基,各自独立地经1至3个选自以下的取代基取代:卤素、羟基、芳氧基、烷硫基、烷基亚磺酰基、烷基磺酰基,各自独立地经烷基、芳基或杂芳基取代,脒基、可经烷基、芳基、杂芳基或杂环基取代的脒、可经烷基、芳基或杂芳基进行N-单-或N,N-二-取代的胺基磺酰基、烷基磺酰胺基、烷基羰基胺基、芳基甲基胺基、芳氧基羰基、杂芳氧基羰基,或附加在任何可用的位置上以产生稳定化合物的类似物。

[0096] “烷基烯基”一词是指基团 $-R-CR'=CR''R'''$,其中R为低碳烷基,或经取代的低碳烷基,R'、R''、R'''可各自独立,为氢、卤素、低碳烷基、经取代的低碳烷基、酰基、芳基、经取代的芳基、杂芳基、或经取代的杂芳基,其定义见下文。

[0097] “烷基炔基”一词是指基团 $-R-CCR'$,其中R为低碳烷基,或经取代的低碳烷基,R'为氢、卤素、低碳烷基、经取代的低碳烷基、酰基、芳基、经取代的芳基、杂芳基、或经取代的杂芳基,其定义见下文。

[0098] “烷氧基”一词是指基团 $-OR$,其中R为如定义的低碳烷基、经取代的低碳烷基、酰基、芳基、经取代的芳基、芳烷基、经取代的芳烷基、杂烷基、杂芳基烷基、环烷基、经取代的环烷基、环杂烷基、或经取代的环杂烷基。

[0099] “烷硫基”或“硫代烷氧基”一词是指基团 $-SR$ 、 $S(O)_{n=1-2}-R$,其中R为如本文定义的低碳烷基、经取代的低碳烷基、酰基、芳基、经取代的芳基、芳烷基、或经取代的芳烷基。

[0100] “酰基”一词是指基团 $-C(O)R$,其中R为氢、低碳烷基、经取代的低碳烷基、芳基、经取代的芳基,及其如本文定义的类似物。

[0101] “芳氧基”一词是指基团 $-OAr$,其中Ar为如本文定义的芳基、经取代的芳基、杂芳基、或经取代的杂芳基。

[0102] “酰胺基”一词是指基团 $-C(O)NRR'$,其中R和R'各自独立,为如本文定义的氢、低碳烷基、经取代的低碳烷基、芳基、经取代的芳基,及其类似物。

[0103] “羧基”一词是指基团 $-C(O)OR$,其中R为如本文定义的氢、低碳烷基、经取代的低碳烷基、芳基、经取代的芳基,及其类似物。

[0104] “芳基”一词单独或组合使用是指苯基或萘基,该苯基或萘基可与环烷基碳环融合,该环烷基较佳地为5至7,更佳地为5至6元环及/或可经1至3个选自以下的取代基取代:卤素、羟基、芳氧基、烷硫基、烷基亚磺酰基、烷基磺酰基,各自独立地经烷基、芳基或杂芳基取代,脒基、可经烷基、芳基、杂芳基或杂环基取代的脒、可经烷基、芳基或杂芳基进行N-单-或N,N-二-取代的胺基磺酰基、烷基磺酰胺基、烷基羰基胺基、芳基甲基胺基、芳氧基羰基、杂芳氧基羰基,或其类似物。

[0105] “杂环”一词是指一饱和的、不饱和的、或芳香族的碳环基团,该基团具有一单环(例如,吗啉基、吡啶基或呋喃基)或多个稠环(例如,萘吡啶、喹啉、喹啉基、吲哚基或苯并[b]噻吩基)以及在环内具有至少一个杂原子,如氮、氧或硫,该杂原子可经或非经例如,卤素、低碳烷基、低碳烷氧基、烷硫基、乙炔基、胺基、酰胺基、羧基、羟基、芳基、芳氧基、杂环基、杂芳基、经取代的杂芳基、硝基、氰基、氢硫基、磺胺基及其类似物所取代。

[0106] “杂芳基”一词单独或组合使用是指含有5或6个环原子的单环芳环结构,或含有8至10个原子的双环芳环,包含一或多个,较佳地为1至4,更佳的为1至3,甚至更佳地为1至2个杂原子,该杂原子是各自独立地选自于氧、硫和氮所组成的群组,且可经1至3个选自以下的取代基取代:卤素、羟基、烷氧基、烷硫基、烷基亚磺酰基、烷基磺酰基、酰氧基、芳氧基、杂芳氧基、可经烷基、芳基或杂芳基进行单-或双取代的胺、脒基、可经烷基、芳基、杂芳基或杂环基取代的脒、可经烷基、芳基或杂芳基进行N-单-或N,N-二-取代的胺基亚磺酰基、烷基磺酰胺基、芳基磺酰胺基、杂芳基磺酰胺基、烷基羰基胺基、芳基羰基胺基、杂芳基羰基胺基,或其类似物。杂芳基亦包括氧化的硫或氮,如亚磺酰基、磺酰基和三级环氮的氮-氧化物。碳或氮原子为杂芳基环结构的附着点,以使一稳定的芳环可被维持。杂芳基的实例为吡啶基、哒嗪基、吡嗪基、喹啉基、嘌呤基、茛基、喹啉基、嘧啶基、吡咯基、恶唑基、噻唑基、噻吩基、异恶唑基、氧杂噻二唑基、异噻唑基、四唑基、咪唑基、三嗪基、呋喃基、苯并呋喃基、吲哚基及其类似物。经取代的杂芳基含有一个取代基附加在一可用的碳或氮上以产生一稳定的化合物。

[0107] “杂环基”一词单独或组合使用是指一具有5至10个原子的非芳香族的环烷基,其中在环内的1至3个碳原子由杂原子氧、硫、氮所替换,而且可与苯并融合或与5至6员环的杂芳基融合及/或在环烷基的情况下可经取代。杂环基亦包括氧化的硫或氮,如亚磺酰基、磺酰基和三级环氮的氮-氧化物。碳或氮原子为附着点。杂环基的实例为四氢呋喃基、二氢吡啶基、哌啶基、吡咯啶基、哌嗪基,二氢苯并呋喃基、二氢吲哚基,及其类似物。经取代的杂环基含有一个取代基氮,其附加在一可用的碳或氮上以产生一稳定的化合物。

[0108] “经取代的杂芳基”一词是指一杂环,该杂环可经一或多个官能基,例如卤素、低碳烷基、低碳烷氧基、烷硫基、乙炔基、胺基、酰胺基、羧基、羟基、芳基、芳氧基、杂环基、经取代的杂环基、杂芳基、经取代的杂芳基、硝基、氰基、氢硫基、磺酰胺基及其类似物进行单一或多重取代。

[0109] “芳烷基”一词是指基团 $-R-Ar$,其中Ar为一芳香基,而R为一低碳烷基或经取代的低碳烷基。芳基可经或非经例如卤素、低碳烷基、低碳烷氧基、烷硫基、乙炔基、胺基、酰胺基、羧基、羟基、芳基、芳氧基、杂环基、经取代的杂环基、杂芳基、经取代的杂芳基、硝基、氰

基、氢硫基、磺酰胺基及其类似物取代。

[0110] “杂烷基”一词是指基团-R-Het, 其中Het为一杂环基, 而R为一低碳烷基。杂烷基可经或非经卤素、低碳烷基、低碳烷氧基、烷硫基、乙炔基、胺基、酰胺基、羧基、羟基、芳基、芳氧基、杂环基、经取代的杂环基、杂芳基、经取代的杂芳基、硝基、氰基、氢硫基、磺酰胺基及其类似物取代。

[0111] “杂芳烷基”一词是指基团-R-Het-AR, 其中HetAr为一杂芳基, 而R为一低碳烷基。杂芳烷基可经或非经卤素、低碳烷基、低碳烷氧基、烷硫基、乙炔基、胺基、酰胺基、羧基、羟基、芳基、芳氧基、杂环基、经取代的杂环基、杂芳基、经取代的杂芳基、硝基、氰基、氢硫基、磺酰胺基及其类似物取代。

[0112] “环烷基”一词是指一含有3至15个碳原子的双价环的或多环的烷基。

[0113] “经取代的环烷基”一词是指一含有一或多个取代基的环烷基, 该取代基例如卤素、低碳烷基、低碳烷氧基、烷硫基、乙炔基、胺基、酰胺基、羧基、羟基、芳基、芳氧基、杂环基、经取代的杂环基、杂芳基、经取代的杂芳基、硝基、氰基、氢硫基、磺酰胺基及其类似物。

[0114] “环杂烷基”一词是指一环烷基, 其中一或多个环上的碳原子由一杂原子(例如, 氮、氧、硫或磷)所替代。

[0115] “经取代的环杂烷基”一词是指本文定义的环杂烷基, 该基团含有一或多个取代基, 如卤素、低碳烷基、低碳烷氧基、烷硫基、乙炔基、胺基、酰胺基、羧基、羟基、芳基、芳氧基、杂环基、经取代的杂环基、杂芳基、经取代的杂芳基、硝基、氰基、氢硫基、磺酰胺基及其类似物。

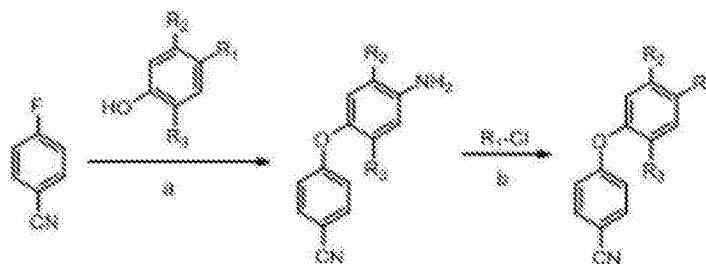
[0116] “烷基环烷基”一词是指基团-R'-环烷基, 其中环烷基为一环烷基基团, 而R为一低碳烷基或经取代的低碳烷基。环烷基可经或非经例如卤素、低碳烷基、低碳烷氧基、烷硫基、乙炔基、胺基、酰胺基、羧基、羟基、芳基、芳氧基、杂环基、经取代的杂环基、杂芳基、经取代的杂芳基、硝基、氰基、氢硫基、磺酰胺基及其类似物取代。

[0117] “烷基环杂烷基”一词是指基团-R'-环杂烷基, 其中R为一低碳烷基或经取代的低碳烷基。环杂烷基可经或非经例如卤素、低碳烷基、低碳烷氧基、烷硫基、乙炔基、胺基、酰胺基、羧基、羟基、芳基、芳氧基、杂环基、经取代的杂环基、杂芳基、经取代的杂芳基、硝基、氰基、氢硫基、磺酰胺基及其类似物取代。

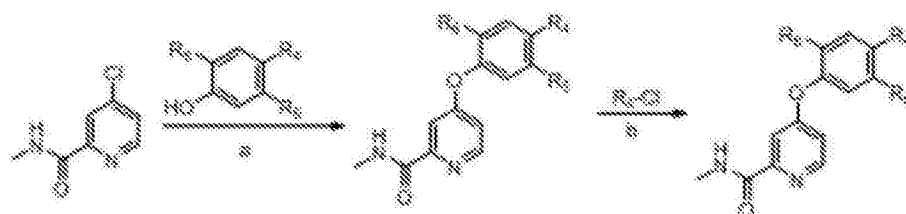
[0118] 本发明的化合物可由一般的化学程序所制备, 如弗朗西斯凯利(Francis Carey)与理查德桑德博格(Richard Sundberg)所著的进阶有机化学或评论期刊“Account of Chemical research”内所述的程序。

[0119] 具体而言, 在以下总体图解内所示的程序提供了本发明某些化合物的合成实例。

式 I.

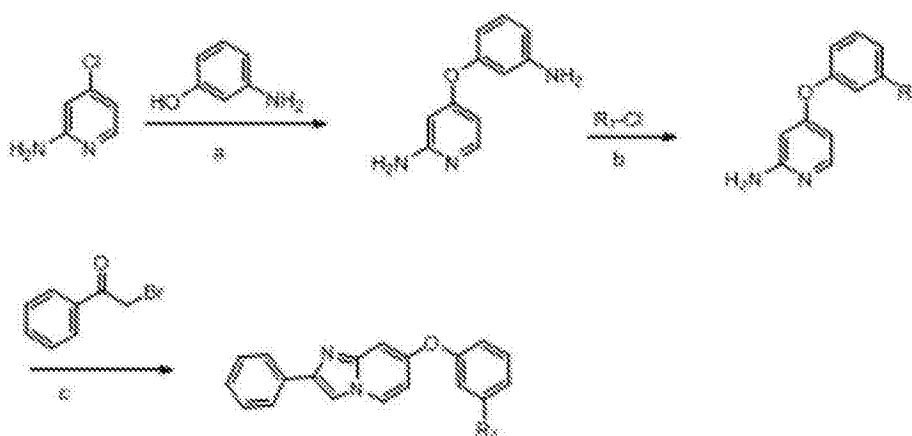


式 II.



[0120]

式 III.



式 I、II、III 的一般合成程序：a 为碳酸钾 (K_2CO_3)、二甲基甲酰胺 (DMF)；
b 为吡啶、四氢呋喃 (THF)；c 为三乙胺 (Et_3N)、二氧化二仲乙基。

[0121] 本发明的化合物经合成后可以色层分析法或结晶法或本领域中已知的任何其他适当的方法进一步纯化。

[0122] 本发明并且提供一种医药组合物，包含一或多个上述的化合物以及一医药上可接受的载剂。本发明的医药组合物可用于增加 SHP-1 在细胞内的表现量或生物活性，或用于治疗以 SHP-1 的表现量或生物活性减少为特征的疾病或病症。此外，将任何上述的化合物用于增加 SHP-1 在细胞内的表现量或生物活性，或用于治疗如本文所述的以 SHP-1 的表现量或生物活性减少为特征的疾病或病症的用途，以及用于治疗该等疾病的药剂的制造也包含在本发明的范围之内。

[0123] 本发明并且提供一种增加 SHP-1 在细胞内的表现量或生物活性的方法，包含将该细胞与一有效量的本文所述的化合物或医药组合物接触。本发明并进一步提供一种在需要

SHP-1的个体中治疗以SHP-1的表现量或生物活性减少为特征的疾病或病症的方法,包含将本文所述的化合物或医药组合物以有效量投至该个体。

[0124] “治疗”(动词)或“治疗”(名词)一词包括该特定失调或病症的预防,或与一特定失调或病症有关的症状的减轻及/或该症状的预防或消除。

[0125] 本发明的化合物可以被用于治疗以SHP-1的表现量或生物活性减少为特征的疾病或病症。本发明的化合物可以单独或以医药组合物的形式投与人类病患一剂量,该医药组合物与适当的载剂或赋形剂混合,以治疗或改善各种以SHP-1的表现量或生物活性减少为特征的病症。一因子(例如SHP-1)的表现量或生物活性的增加或减少可以由该因子的基因产物如蛋白质或RNA而容易地检测到,在来自于一个体的检体(例如自血液或活体组织而来)中使用本领域已知的检测方法如酵素结合免疫吸附分析法(ELISA)、西方墨点分析法以及北方墨点分析法进行体外分析其RNA含量、表现蛋白及其类似物的结构及/或活性。根据本发明,以SHP-1的表现量或生物活性减少为特征的疾病或病症的具体实例包括,但不限于,癌症(例如肝癌、白血病、肺癌、乳癌、肾癌)及骨质疏松症。

[0126] 具体而言,一“个体”为一动物,如人类,但也可以是一宠物(例如,狗、猫及其类似物)、经济动物(例如,牛、羊、猪、马及其类似物)或实验用动物(例如,大鼠、小鼠、天竺鼠及其类似物),该动物需要如本文所述的治疗。

[0127] 本文所述的“有效量”是指在一个体上达到治疗效果所需要的活性剂的量,不论是单独或与一种或多种其他活性剂组合使用。根据给药途径、赋形剂的使用,以及与其他活性剂共同使用等不同情况,在由本领域技术人员确认下,有效量各不相同。

[0128] 适合的给药途径可能包括如口服、直肠给药、黏膜给药、或肠道给药;非经口传输,包括肌内、皮下、髓内注射,以及鞘内、直接心室内、静脉、腹膜、鼻内或眼内注射,并可为补充或缓释剂型。

[0129] 本发明的医药组合物可以本领域已知的方式制造,例如,透过习用的混合、溶解、乳化、包埋、包封、或冻干过程制造。因此,根据本发明所提供使用的医药组合物可以常规的方式配制,使用一个或多个生理上可接受的载剂,包含赋形剂及/或助剂,以助于活性化合物的加工而形成医药上可使用的制剂。如本文所用,“可接受”是指该载剂必须与该组合物的活性成分兼容(且较佳地,能够稳定该活性成分),且不会对受治疗的个体有害。适当的剂型取决于所选择的给药途径。

[0130] 具体而言,针对注射给药,本发明的化合物可以被配制于例如生理上兼容的缓冲液内,如汉克缓冲液、林格氏缓冲液或生理食盐缓冲液。针对口服给药,本发明的化合物的配制可经由将该活性化合物与本领域已知的医药上可接受的载剂结合,如乳糖、蔗糖、甘露糖醇、山梨糖醇、玉米淀粉、小麦淀粉、米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄蓍胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠,及/或聚乙烯吡咯烷酮(PVP, polyvinylpyrrolidone),以使本发明的化合物可以配制为片剂、丸剂、糖衣丸、胶囊、液体、凝胶、糖浆、浆液、悬浮液及其类似物。针对吸入法给药,本发明的化合物可被配制为自加压容器或喷雾器喷出的气雾喷雾,并搭配使用适当的推进剂,例如,二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它合适的气体。

[0131] 不需进一步的阐述,一般认为,上面的描述已充分地使本发明能被据以实施。因此,以下特定的实施例是被解释为仅作为说明之用,而非以任何方式限制本发明所揭露的

其余部分。所有本文中所引用的出版物,包括专利,是透过引用方式将其全部内容并入本文。

[0132] 实施例1:化学合成

[0133] 1.1材料

[0134] 质子核磁共振(^1H -NMR)光谱记录于核磁共振光谱仪(Bruker DPX300(400MHz))。化学位移是被报告为 δ 值(ppm)低磁场,该低磁场来自指示用有机溶液内部的氘代氯仿。峰的多重性表示如下:s,单峰;d,双峰;t,三重峰;q,四重峰;dd,双重双峰;ddd,双重峰组成的双重双峰;dt,双重三重峰;brs,宽单峰;m,多重峰。偶合常数(J值)是以赫兹(Hz,hertz)表示。反应进程是以在硅胶60F254板(Merck)上进行薄层色层分析法(TLC,thin layer chromatography)分析而确定。色层分析的纯化是于硅胶管柱60(0.063-0.200mm或0.040-0.063mm,Merck),碱性硅胶中进行。使用市售的试剂和溶剂而无需再纯化。化学式缩写如下所示: CDCl_3 ,氘代氯仿;DMSO- d_6 ,二甲亚砜- d_6 ;EtOAc,乙酸乙酯;DMF,N,N-二甲基甲酰胺;MeOH,甲醇;THF,四氢呋喃;EtOH,乙醇;DMSO,二甲亚砜;NMP,N-甲基吡咯烷酮。高解析质谱是纪录于FINNIGAN MAT95S质谱仪上。

[0135] 1.2方法

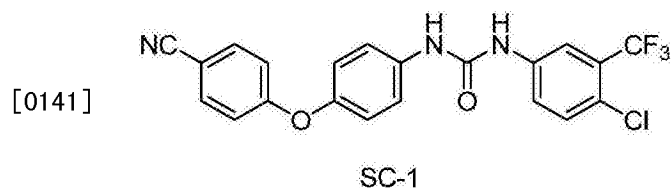
[0136] 本发明的化合物的结构设计描述如下。首先,为了解经由索拉非尼对Raf激酶抑制与P-STAT3的向下调节之间的关系,我们以化学方法来减少索拉非尼的酰胺基与Raf之间的氢键相互作用,是透过以苯基氰基替换酰胺基来进行(化合物1,图1)。基于含有不同尺寸的官能基、氢供体、氢受体、疏水性和亲水性的能力,我们也修改了SC-1以产生一系列的化合物SC-48、SC-49、SC-54、SC-55、SC-56、SC-58、SC-43、SC-44、SC-45、SC-50、SC-51、SC-52、SC-59、SC-60以及SC-40。此外,我们以不同的酰胺及磺胺替换索拉非尼骨干上的尿素官能基以得到化合物2-11。进一步地,我们以喹啉替换吡啶环,并以其作为平台以进行结构修饰,产生一系列化合物12-19和20-25。这些SC-1衍生物是根据图2式II中所描述的一般程序进行合成。此外,我们由增加一苯环来延伸化合物的长度,以探索带有不同官能基36-38的结构活性关系。

[0137] 1.2.1化合物1(式I)的合成程序

[0138] 将4-氯-3-(三氟甲基)苯胺(0.21g,1.1mmol)和2当量的三乙胺加入50mL含有三光气(0.30g,1.0mmol)的THF溶液中。将混合物加热至50℃后加热30分钟。待温度降至室温后,将溶于10mL THF溶液的4-(4-氨基苯氧基)苄腈加入该混合物中,并再次加热至50℃后加热30分钟。将该混合物蒸发,用水稀释,并用乙酸乙酯(EtOAc)萃取。以食盐水洗涤萃取液,以无水硫酸镁干燥,并进行减压浓缩,得到化合物1(0.34g,80%)。

[0139] 1.2.1.1.

[0140] 1-(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)-3-(4-(4-氰基苯氧基)苯基)脲(1)

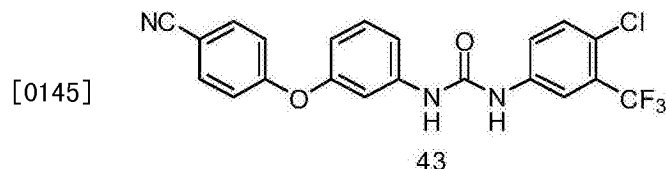


[0142] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ 9.17(s,1H),8.94(s,1H),8.10(s,1H),7.81(d,2H,J=6.8),7.63-7.59(m,2H),7.54(d,2H,J=7.2Hz),7.10(d,2H,J=6.8Hz),7.05(d,2H,J=

7.2Hz); ^{13}C NMR(100MHz, 甲醇- d_4): δ 163.7, 163.6, 154.8, 151.4, 151.2, 140.1, 137.7, 137.4, 135.3, 132.9, 129.7, 129.4, 129.1, 128.8, 128.3, 125.6, 125.5, 125.4, 124.2, 122.9, 122.4, 122.3, 122.1, 120.2, 119.7, 118.8, 118.7, 118.6, 118.6, 106.5, 106.4; $\text{C}_{21}\text{H}_{13}\text{ClF}_3\text{N}_3\text{O}_2(\text{M}+\text{H})$ 的HRMS计算值: 431.0648; 实测值: 431.0656。

[0143] 1.2.1.2.

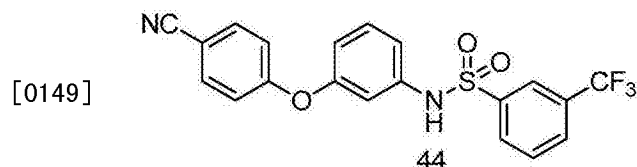
[0144] 1-(3-(4-氰基苯氧基)苯基)-3-(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)脲(43)



[0146] ^1H NMR(400MHz, DMSO): δ 9.17(s, 1H), 9.03(s, 1H), 8.04(d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 7.83(d, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 7.64-7.55(m, 2H), 7.41-7.32(m, 2H), 7.23(d, $J=7.2\text{Hz}$, 1H), 7.11(d, $J=8.0\text{Hz}$, 2H), 6.75(dd, $J=8.0\text{Hz}$, 2.4Hz, 1H); $\text{C}_{21}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_2\text{F}_3\text{Cl}[\text{M}-\text{H}]^-$ 的HRMS计算值: 430.0570; 实测值: 430.0576。

[0147] 1.2.1.3.

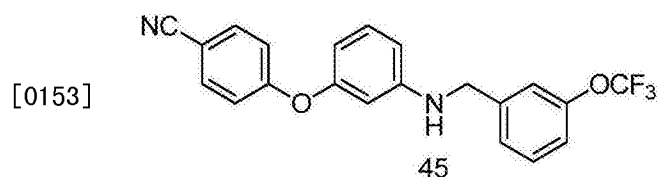
[0148] 4-(3-(3-(三氟甲基)苯-磺酰基胺基)苯氧基)苄腈(44)



[0150] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ 8.00(s, 1H), 7.96(d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 7.81(d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 7.65-7.54(m, 3H), 7.26(t, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 7.08(s, 1H), 7.05-6.97(m, 1H), 6.94-6.86(m, 3H), 6.84(t, $J=2.0\text{Hz}$, 1H), 6.81(dd, $J=8.4\text{Hz}$, 2.0Hz, 1H); $\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3\text{F}_3\text{S}[\text{M}-\text{H}]^-$ 的HRMS计算值: 417.0521; 实测值: 417.0518。

[0151] 1.2.1.4.

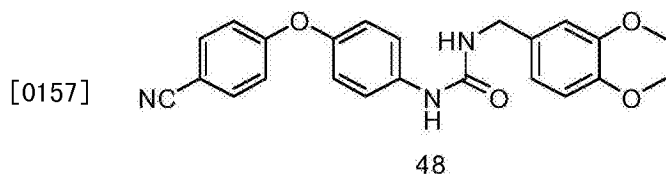
[0152] 4-(3-(3-(三氟甲氧基)苄基胺基)苯氧基)苄腈(45)



[0154] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ 7.61(d, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 7.43(t, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 7.33(d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 7.29-7.16(m, 3H), 7.04(d, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 6.55(dd, $J=8.0\text{Hz}$, 2.4Hz, 1H), 6.46(dd, $J=8.0\text{Hz}$, 2.0Hz, 1H), 6.34(t, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 4.41(s, 2H); $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{F}_3[\text{M}+\text{H}]^+$ 的HRMS计算值: 385.1164; 实测值: 385.1157。

[0155] 1.2.1.5.

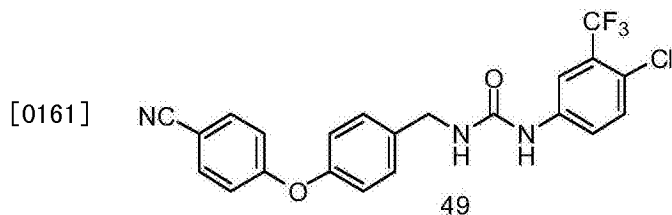
[0156] 1-(4-(4-氰基苯氧基)苯基)-3-(3,4-二甲氧基苄基)脲(48)



[0158] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ 7.56(d, $J=6.8\text{Hz}$, 2H), 7.34(d, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 6.98–6.94(m, 4H), 6.88–6.75(m, 4H), 6.56(brs, 1H), 4.36(s, 2H), 3.84(s, 6H); $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_4$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 的HRMS计算值:402.1454;实测值:402.1462。

[0159] 1.2.1.6.

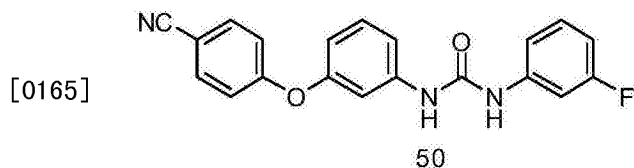
[0160] 1-(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)-3-(4-(4-氰基苯氧基)苄基)脲(49)



[0162] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ 7.76Hz(s, 1H), 7.51–7.39(m, 3H), 7.29(dd, $J=8.8\text{Hz}$, 2.4Hz, 1H), 7.13(d, $J=8.4\text{Hz}$, 3H), 6.83(dd, $J=8.8\text{Hz}$, 4.8Hz, 4H), 5.93(t, $J=6.0\text{Hz}$, 1H), 4.24(d, $J=6.0\text{Hz}$, 2H); $\text{C}_{22}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_2\text{F}_3\text{Cl}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 的HRMS计算值:444.0727;实测值:444.0732。

[0163] 1.2.1.7.

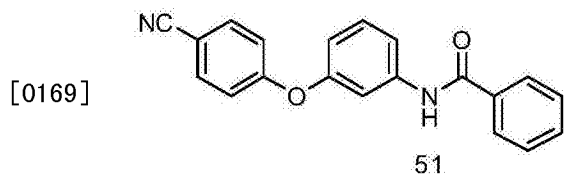
[0164] 1-(3-(4-氰基苯氧基)苯基)-3-(3-氟苯基)脲(50)



[0166] ^1H NMR(400MHz, MeOD): δ 7.66(d, $J=9.2\text{Hz}$, 2H), 7.60(s, 1H), 7.41–7.34(m, 2H), 7.22(q, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 7.18(dd, $J=8.0\text{Hz}$, 2.0Hz, 1H), 7.10–7.02(m, 3H), 6.71(dd, $J=8.8\text{Hz}$, 2.4Hz, 2H); $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 的HRMS计算值:346.0992;实测值:346.0999。

[0167] 1.2.1.8.

[0168] N-(3-(4-氰基苯氧基)苯基)苯甲酰胺(51)

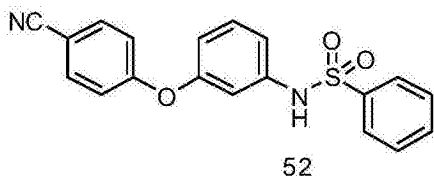


[0170] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ 8.82(s, 1H), 7.75(d, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 7.53(s, 1H), 7.46–7.35(m, 4H), 7.28(t, $J=8.0\text{Hz}$, 2H), 7.22(t, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 6.90(d, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 6.72(dd, $J=8.0\text{Hz}$, 2.0Hz, 1H); $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ 的HRMS计算值:313.0977;实测值:313.0971。

[0171] 1.2.1.9.

[0172] N-(3-(4-氰基苯氧基)苯基)苯磺酰胺(52)

[0173]

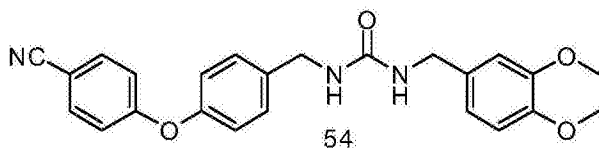


[0174] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ 7.79(d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 7.53(t, $J=4.4\text{Hz}$, 3H), 7.42(t, $J=8.0\text{Hz}$, 2H), 7.20(t, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 6.93(dd, $J=8.0\text{Hz}$, 2.0Hz, 1H), 6.86-6.83(m, 3H), 6.73(dd, $J=8.0\text{Hz}$, 2.0Hz, 1H); $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}[\text{M}-\text{H}]^-$ 的 HRMS 计算值: 349.0647; 实测值: 2349.0643。

[0175] 1.2.1.10.

[0176] 1-(4-(4-氰基苯氧基)苄基)-3-(3,4-二甲氧基苄基)脲(54)

[0177]

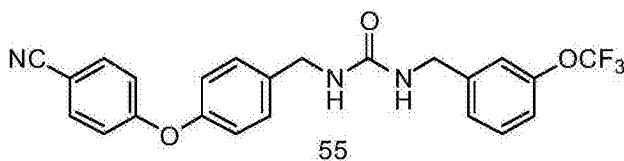


[0178] ^1H NMR(400MHz, DMSO): δ 7.81(d, $J=9.2\text{Hz}$, 2H), 7.33(d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 7.06(dd, $J=15.6\text{Hz}$, 9.2Hz, 4H), 6.86(d, $J=9.2\text{Hz}$, 2H), 6.76(dd, $J=8.0\text{Hz}$, 2.0Hz, 1H), 6.45(t, $J=6.0\text{Hz}$, 1H), 6.38(t, $J=6.0\text{Hz}$, 1H), 4.23(d, $J=5.2\text{Hz}$, 2H), 4.14(d, $J=5.2\text{Hz}$, 2H), 3.69(s, 6H); $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_4[\text{M}+\text{H}]^+$ 的 HRMS 计算值: 418.1767; 实测值: 418.1773。

[0179] 1.2.1.11.

[0180] 1-(4-(4-氰基苯氧基)苄基)-3-(3-(三氟甲氧基)苄基)脲(55)

[0181]

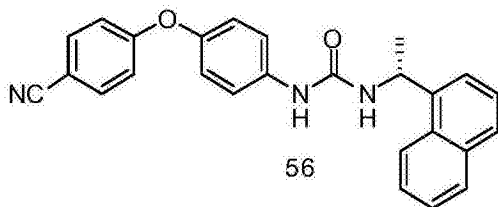


[0182] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ 7.49(d, $J=9.2\text{Hz}$, 2H), 7.17(t, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 7.10(d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 7.00-6.92(m, 3H), 6.88(d, $J=9.2\text{Hz}$, 2H), 6.84(d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 6.17-6.05(m, 2H), 4.10(m, 4H); $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3\text{F}_3[\text{M}+\text{H}]^+$ 的 HRMS 计算值: 442.1379; 实测值: 442.1381。

[0183] 1.2.1.12.

[0184] (R)-1-(4-(4-氰基苯氧基)苄基)-3-(1-(萘-1-基)乙基)脲(56)

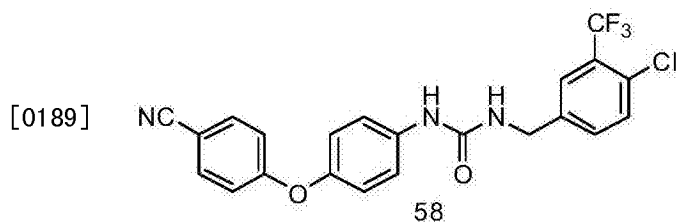
[0185]



[0186] ^1H NMR(400MHz, MeOD): δ 8.17(d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 7.87(d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 7.78(d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 7.65(d, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 7.58(d, $J=7.2\text{Hz}$, 1H), 7.53(d, $J=7.2\text{Hz}$, 1H), 7.50-7.45(m, 2H), 7.41(d, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 6.99(t, $J=9.2\text{Hz}$, 4H), 5.74(d, $J=6.8\text{Hz}$, 1H), 1.63(d, $J=6.8\text{Hz}$, 3H); $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2[\text{M}-\text{H}]^-$ 的 HRMS 计算值: 406.1556; 实测值: 406.1563。

[0187] 1.2.1.13.

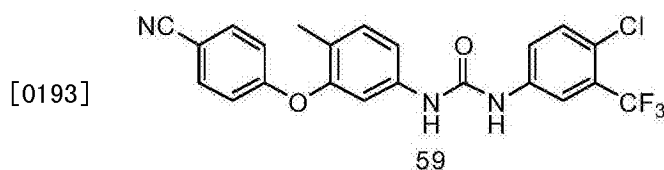
[0188] 1-(4-氯-3-(三氟甲基)苄基)-3-(4-(4-氰基苯氧基)苄基)脲(58)



[0190] ^1H NMR(400MHz, MeOD): δ 7.74(brs, 1H), 7.66(d, $J=9.2\text{Hz}$, 2H), 7.56(d, $J=2.0\text{Hz}$, 2H), 7.44(d, $J=9.2\text{Hz}$, 2H), 7.05–6.98(m, 4H), 4.43(s, 2H); $\text{C}_{22}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_2\text{F}_3\text{Cl}$ [M-H] $^-$ 的HRMS计算值:444.0727;实测值:444.0736。

[0191] 1.2.1.14.

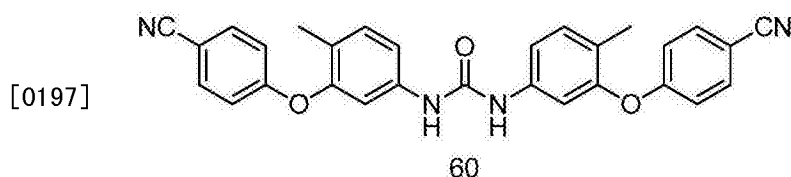
[0192] 1-(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)-3-(3-(4-氰基苯氧基)-4-甲基苯基)脲(59)



[0194] ^1H NMR(400MHz, MeOD): δ 7.87(d, $J=2.8\text{Hz}$, 1H), 7.60(d, $J=9.2\text{Hz}$, 2H), 7.54(dd, $J=8.4\text{Hz}$, 2.4Hz, 1H), 7.39(d, $J=8.8\text{Hz}$, 1H), 7.25(d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 7.18(d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 7.12(dd, $J=8.0\text{Hz}$, 2.4Hz, 1H), 6.93(d, $J=9.6\text{Hz}$, 2H), 2.02(s, 3H); $\text{C}_{22}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_2\text{F}_3\text{Cl}$ [M-H] $^-$ 的HRMS计算值:444.0727;实测值:444.0725。

[0195] 1.2.1.15.

[0196] 1,3-双(3-(4-氰基苯氧基)-4-甲基苯基)脲(60)



[0198] ^1H NMR(400MHz, DMSO): δ 8.77(s, 2H), 7.80(d, $J=8.0\text{Hz}$, 4H), 7.29(s, 2H), 7.24(d, $J=8.0\text{Hz}$, 2H), 7.13(d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 6.98(d, $J=8.4\text{Hz}$, 4H), 2.02(s, 6H); $\text{C}_{29}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_3$ [M-H] $^-$ 的HRMS计算值:473.1614;实测值:473.1619。

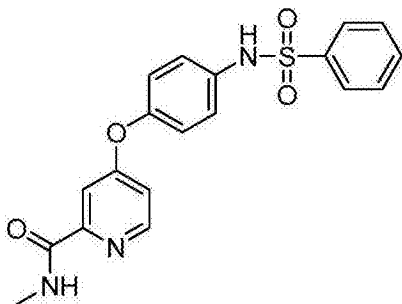
[0199] 1.2.2化合物2-25的一般程序

[0200] 在25mL的双颈圆底烧瓶中,于室温下将苯胺衍生物(1mmol)和催化量的吡啶加入无水THF(10mL)。将酰基氯或磺酰基氯化物加入该混合物中,并在室温下搅拌2小时。在真空下除去溶剂,并在硅胶管柱中以层析法纯化粗残余物,以乙酸乙酯(EtOAc)/己烷(1/10至1/2)作为洗提液。此一程序得到白色固体的预期的耦合产物,其产率为70%至95%。

[0201] 1.2.2.1.

[0202] N-甲基-4-(4-(苯磺酰胺基)苯氧基)吡啶酰胺(2)

[0203]

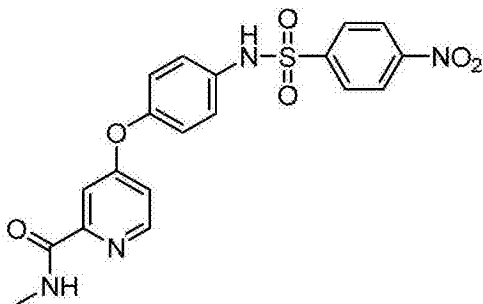


[0204] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 8.36(d, 1H, $J=5.6\text{Hz}$), 8.01(brs, 1H), 7.76(d, 2H, $J=7.6\text{Hz}$), 7.59(s, 1H), 7.54(t, 1H, $J=8.0\text{Hz}$), 7.46(t, 2H, $J=8.0\text{Hz}$), 7.12(d, 2H, $J=8.8\text{Hz}$), 6.94(d, 2H, $J=8.8\text{Hz}$), 6.92-6.90(m, 1H), 3.00(d, 3H, $J=5.2\text{Hz}$); $^{13}\text{C NMR}$ (100MHz, CDCl_3): δ 166.0, 164.6, 152.1, 151.0, 149.7, 138.9, 134.2, 133.0, 129.0, 127.1, 123.9, 121.6, 114.3, 109.9, 26.1; $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}(\text{M}+\text{H})$ 的 HRMS 计算值: 383.0940; 实测值: 383.0941。

[0205] 1.2.2.2.

[0206] N-甲基-4-(4-(4-硝基苯磺酰胺基)苯氧基)吡啶酰胺(3)

[0207]

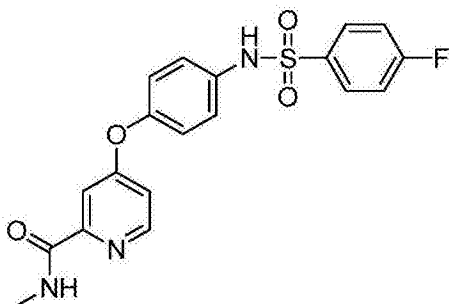


[0208] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 8.39(d, 1H, $J=5.6\text{Hz}$), 8.30(d, 2H, $J=8.8\text{Hz}$), 8.07(brs, 1H), 7.93(d, 2H, $J=8.8\text{Hz}$), 7.49(s, 1H), 7.17(d, 2H, $J=8.8\text{Hz}$), 7.01-6.98(m, 3H), 3.00(d, 3H, $J=5.2\text{Hz}$); $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}(\text{M}+\text{H})$ 的 HRMS 计算值: 428.0791; 实测值: 428.0798。

[0209] 1.2.2.3.

[0210] 4-(4-(4-氟苯磺酰胺基)苯氧基)-N-甲基吡啶酰胺(4)

[0211]

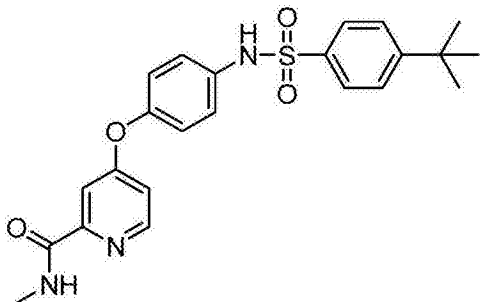


[0212] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 8.37(d, 1H, $J=5.6\text{Hz}$), 8.00(brs, 1H), 7.77-7.43(m, 2H), 7.57(s, 1H), 7.17-7.09(m, 4H), 6.99-6.93(m, 4H), 3.00(d, 3H, $J=4.8\text{Hz}$); NMR (100MHz, CDCl_3): δ 166.5, 165.9, 164.6, 163.9, 152.1, 151.2, 149.7, 135.0, 134.0, 130.0, 129.9, 124.1, 121.7, 116.4, 116.2, 114.5, 109.8, 26.19; $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{FN}_3\text{O}_4\text{S}(\text{M}+\text{H})$ 的 HRMS 计算值: 401.0846; 实测值: 401.0849。

[0213] 1.2.2.4.

[0214] 4-(4-(4-叔丁基苯磺酰胺基)苯氧基)-N-甲基吡啶酰胺(5)

[0215]

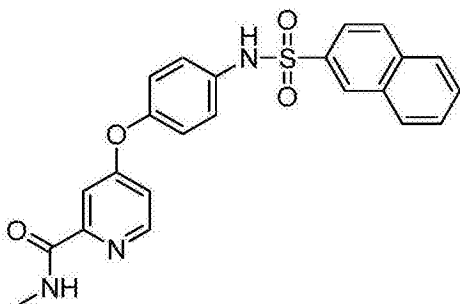


[0216] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 8.33(d, 1H, $J=6.0\text{Hz}$), 8.21(brs, 1H), 7.79(brs, 1H), 7.69(d, 2H, $J=6.8\text{Hz}$), 7.62(s, 1H), 7.44(d, 2H, $J=6.8\text{Hz}$), 7.15(d, 2H, $J=6.8\text{Hz}$), 6.91(s, 2H, $J=6.8\text{Hz}$), 6.88-6.86(m, 1H), 2.98(d, 3H, $J=5.2\text{Hz}$); $^{13}\text{C NMR}$ (100MHz, CDCl_3): δ 166.0, 164.6, 156.8, 152.2, 150.8, 149.7, 136.1, 134.4, 127.0, 126.1, 123.6, 121.6, 114.1, 110.1, 35.1, 30.1, 26.1; $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ (M+H) 的 HRMS 计算值: 439.1566; 实测值: 439.1564.

[0217] 1.2.2.5.

[0218] N-甲基-4-(4-(萘-2-磺酰胺基)苯氧基)吡啶酰胺(6)

[0219]

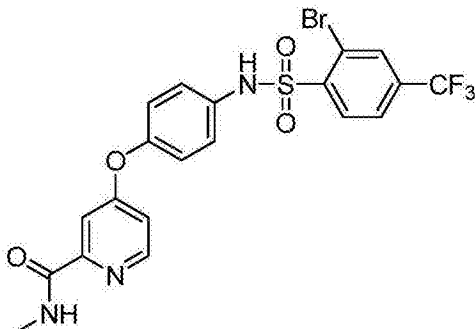


[0220] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 8.34(s, 1H), 8.30(d, 1H, $J=5.2\text{Hz}$), 8.05-8.02(m, 1H), 7.89-7.83(m, 4H), 7.74(dd, 1H, $J=8.4, 1.6\text{Hz}$), 7.60-7.52(m, 3H), 7.16(d, 2H, $J=8.8\text{Hz}$), 6.88(d, 2H, $J=8.8\text{Hz}$), 6.84-6.82(m, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (100MHz, CDCl_3): 165.9, 164.6, 152.1, 151.0, 149.7, 135.9, 134.9, 134.2, 132.0, 129.4, 129.3, 128.9, 128.7, 127.9, 127.5, 123.9, 122.2, 121.6, 114.2, 110.1, 26.2; $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ (M+H) 的 HRMS 计算值: 433.1096; 实测值: 433.1079.

[0221] 1.2.2.6.

[0222] 4-(4-(2-溴-4-(三氟甲基)苯磺酰胺基)苯氧基)-N-甲基吡啶酰胺(7)

[0223]

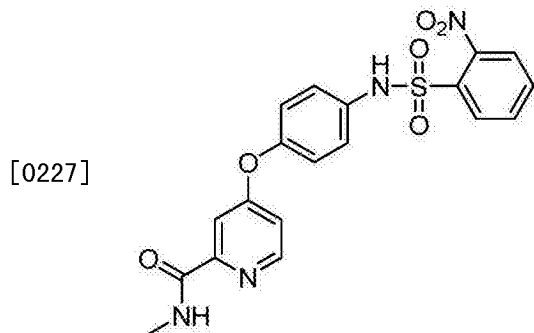


[0224] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 8.35(d, 1H, $J=5.6\text{Hz}$), 8.15(d, 1H, $J=8.0\text{Hz}$), 7.79

(brs, 1H), 7.96(s, 1H), 7.67(d, 2H, J=8.0Hz), 7.57(s, 1H), 7.18(d, 2H, J=9.2Hz), 6.95(d, 2H, J=9.2Hz), 6.90-6.88(m, 1H), 2.98(d, 3H, J=5.2Hz); ^{13}C NMR(100MHz, CDCl_3): δ 165.7, 164.5, 152.2, 151.6, 149.8, 141.5, 136.1, 135.8, 135.5, 135.2, 132.7, 132.2(m), 124.9(m), 124.1, 123.5, 121.7, 120.8, 120.4, 114.5, 110.0, 26.1; $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{BrF}_3\text{N}_3\text{O}_4\text{S}(\text{M}+\text{H})$ 的HRMS计算值: 528.9919; 实测值: 528.9917。

[0225] 1.2.2.7.

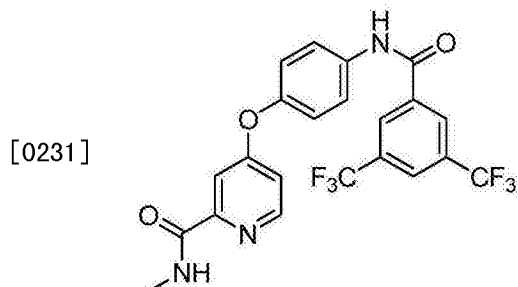
[0226] N-甲基-4-(4-(2-硝基苯磺酰胺基)苯氧基)吡啶酰胺(8)



[0228] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ 8.37(d, 1H, J=6.0Hz), 7.98(brs, 1H), 7.86-7.83(m, 2H), 7.72-7.68(m, 2H), 7.55(s, 1H), 7.24(d, 2H, J=8.8Hz), 6.98(d, 2H, J=8.8Hz), 6.94-6.92(m, 1H), 2.98(d, 3H, J=4.8Hz); $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}(\text{M}+\text{H})$ 的HRMS计算值: 428.0791; 实测值: 428.0796。

[0229] 1.2.7.8

[0230] 4-(4-(3,5-双(三氟甲基)苯甲酰胺基)苯氧基)-N-甲基吡啶酰胺(9)

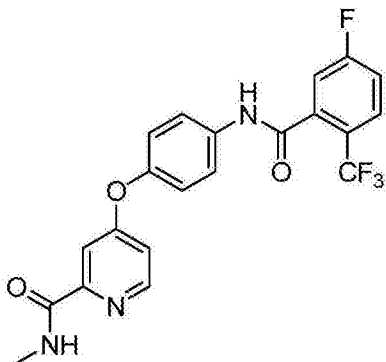


[0232] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ 9.92(s, 1H), 8.40(s, 1H), 8.33(d, 1H, J=5.6Hz), 8.10(q, 1H, J=5.2Hz), 7.90(s, 1H), 7.71(d, 2H, J=8.8Hz), 7.40(d, 1H, J=2.8Hz), 6.99-6.97(m, 1H), 6.93(d, 2H, J=8.8Hz), 2.91(d, 3H, J=4.8Hz); ^{13}C NMR(100MHz, 甲醇- d_4): δ 167.8, 166.8, 165.1, 153.4, 151.8, 151.6, 138.6, 137.6, 133.6, 133.3, 133.0, 132.6, 129.4(d), 126.2(m), 126.0, 124.2, 123.2, 122.4, 115.2, 110.7, 26.4; $\text{C}_{22}\text{H}_{15}\text{F}_6\text{N}_3\text{O}_3(\text{M}+\text{H})$ 的HRMS计算值: 483.1018; 实测值: 483.1017。

[0233] 1.2.2.9

[0234] 4-(4-(5-氟-2-(三氟甲基)苯甲酰胺基)苯氧基)-N-甲基吡啶酰胺(10)

[0235]

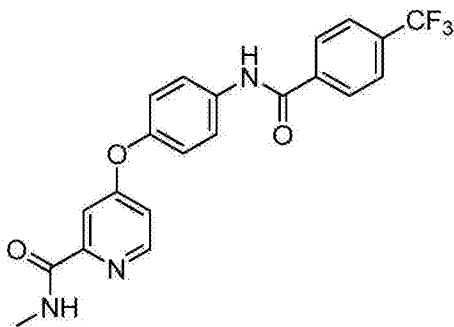


[0236] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ 8.66(d, 1H, $J=12.4\text{Hz}$), 8.31–8.26(m, 2H), 7.93(s, 1H), 7.70–7.65(m, 3H), 7.56(t, 1H, $J=2.4\text{Hz}$), 7.24–7.19(m, 1H), 7.02(d, 2H, $J=6.4\text{Hz}$), 6.89–6.87(m, 1H), 2.90(d, 3H, $J=3.2\text{Hz}$); ^{13}C NMR(100MHz, 甲醇- d_4): δ 166.2, 164.5, 162.9, 160.4, 160.0, 159.9, 152.2, 150.4, 149.7, 135.0, 130.6(m), 129.8(m), 128.3, 128.1, 127.7, 127.4, 124.5, 122.5, 122.4, 122.3, 121.8, 121.5, 117.2, 117.0, 114.1, 110.1, 26.1; $\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{F}_4\text{N}_3\text{O}_3(\text{M}+\text{H})$ 的HRMS计算值: 433.1050; 实测值: 433.0152。

[0237] 1.2.2.10.

[0238] N-甲基-4-(4-(4-(三氟甲基)苯甲酰胺基)苯氧基)吡啶酰胺(11)

[0239]

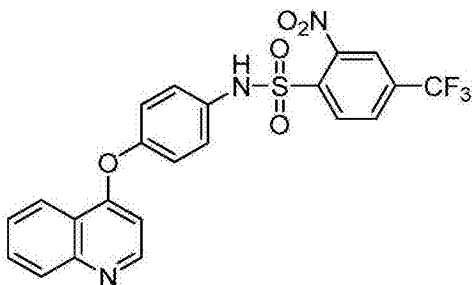


[0240] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ 9.45(s, 1H), 8.31(d, 1H, $J=5.6\text{Hz}$), 8.15(s, 1H), 8.08(d, 2H, $J=8.0\text{Hz}$), 7.71–7.65(m, 3H), 7.50(d, 1H, $J=2.4\text{Hz}$), 7.47(t, 1H, $J=8.0\text{Hz}$), 6.96–6.91(m, 3H), 2.92(d, 3H, $J=5.2\text{Hz}$); ^{13}C NMR(100MHz, CDCl_3): δ 166.4, 164.8, 164.7, 151.8, 149.9, 149.8, 138.8, 135.5, 131.4, 131.1, 130.8, 130.7, 130.5, 129.1, 128.1, 125.0, 124.3(m), 122.6, 122.3, 121.2, 114.4, 109.5, 26.1; $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3(\text{M}+\text{H})$ 的HRMS计算值: 415.1144; 实测值: 415.1146。

[0241] 1.2.2.11.

[0242] 2-硝基-N-(4-(喹啉-4-基氧基)苯基)-4-(三氟甲基)苯磺酰胺(12)

[0243]

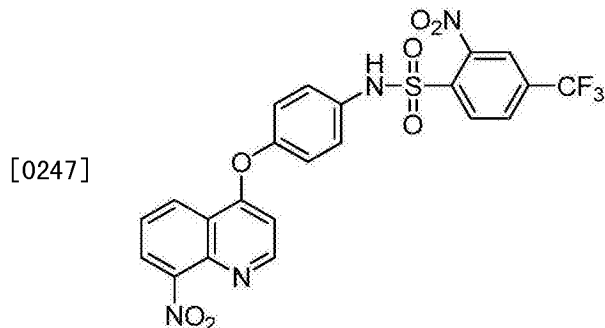


[0244] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ 8.71(d, 1H, $J=5.2\text{Hz}$), 8.28(d, 1H, $J=8.4\text{Hz}$), 8.12(d,

1H, J=8.4Hz), 8.10(s, 1H), 8.05(d, 1H, J=8.4Hz), 7.89(d, 1H, J=8.4Hz), 7.80-7.76(m, 1H), 7.61-7.57(m, 1H), 7.31(d, 2H, J=8.8Hz), 7.13(d, 1H, J=8.8Hz), 6.53(d, 1H, J=5.2Hz); C₂₂H₁₄F₃N₃O₅S(M+H)的HRMS计算值: 489.0606; 实测值: 489.0610。

[0245] 1.2.2.12.

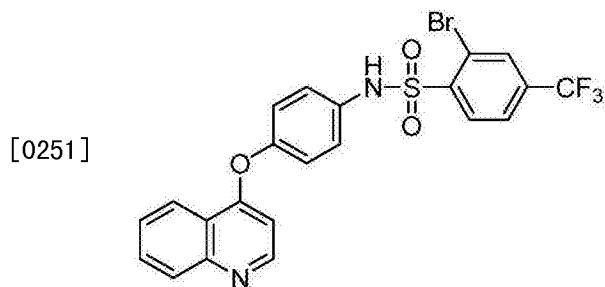
[0246] 2-硝基-N-(4-(8-硝基喹啉-4-基氧基)苯基)-4-(三氟甲基)苯磺酰胺(13)



[0248] ¹H NMR(400MHz, CDCl₃): δ8.78(d, 1H, J=5.2Hz), 8.51(d, 1H, J=8.8Hz), 8.19(s, 1H), 8.12-8.02(m, 3H), 7.89(t, 1H, J=9.6Hz), 7.62(t, 1H, J=8.4Hz), 7.34(d, 2H, J=9.6Hz), 7.15(d, 2H, J=9.6Hz), 6.91(d, 1H, J=6.8Hz), 6.59(d, 1H, J=5.2Hz), 6.55(d, 1H, J=6.8Hz); C₂₂H₁₃F₃N₄O₇S(M+H)的HRMS计算值: 534.0457; 实测值: 534.0423。

[0249] 1.2.2.13

[0250] 2-溴-N-(4-(4-喹啉-4-基氧基)苯基)-4-(三氟甲基)苯磺酰胺(14)

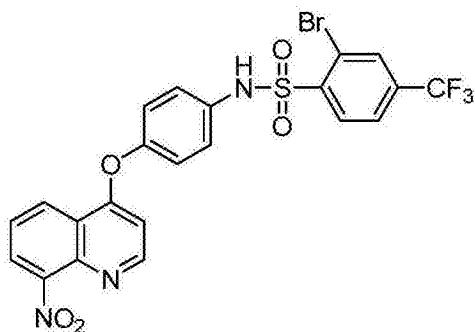


[0252] ¹H NMR(400MHz, CDCl₃): δ8.65(d, 1H, J=5.2Hz), 8.25(d, 1H, J=8.4Hz), 8.18(d, 1H, J=8.4Hz), 8.07(d, 1H, J=8.4Hz), 7.98(s, 1H), 7.73(t, 1H, J=7.6Hz), 7.67(d, 1H, J=8.4Hz), 7.54(t, 1H, J=7.6Hz), 7.24(d, 2H, J=8.8Hz), 7.05(d, 2H, J=8.8Hz), 6.43(d, 1H, J=5.2Hz); ¹³C NMR(100MHz, CDCl₃): δ161.3, 152.6, 150.9, 149.7, 141.4, 135.9, 135.6, 135.3, 132.7, 132.4, 132.2(m), 130.3, 129.1, 126.3, 124.9(m), 124.4, 123.5, 122.1, 122.0, 121.9, 121.6, 121.3, 120.8, 120.4, 116.3, 104.4; C₂₂H₁₄BrF₃N₂O₃S(M+H)的HRMS计算值: 521.9861; 实测值: 521.9858。

[0253] 1.2.2.14.

[0254] 2-溴-N-(4-(8-硝基喹啉-4-基氧基)苯基)-4-(三氟甲基)苯磺酰胺(15)

[0255]

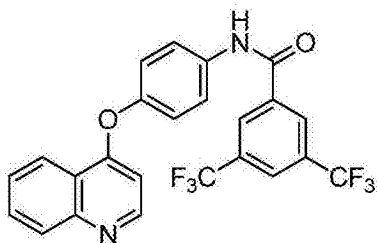


[0256] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ 8.76(d, 1H, $J=5.2\text{Hz}$), 8.49(d, 1H, $J=8.4\text{Hz}$), 8.18(d, 1H, $J=8.4\text{Hz}$), 8.04(d, 1H, $J=7.6\text{Hz}$), 7.99(s, 1H), 7.68(d, 1H, $J=8.4\text{Hz}$), 7.60(t, 1H, $J=8.4\text{Hz}$), 7.25(d, 2H, $J=8.4\text{Hz}$), 7.07(d, 2H, $J=8.4\text{Hz}$), 6.53(d, 1H, $J=5.2\text{Hz}$); $\text{C}_{22}\text{H}_{13}\text{BrF}_3\text{N}_3\text{O}_5\text{S}(\text{M}+\text{H})$ 的HRMS计算值:566.9711;实测值:566.9706。

[0257] 1.2.2.15.

[0258] N-(4-(喹啉-4-基氧基)苯基)-3,5-双(三氟甲基)苯甲酰胺(16)

[0259]

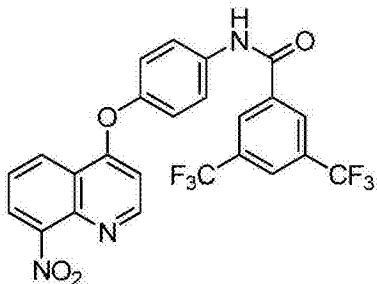


[0260] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ 10.02(s, 1H), 8.59(d, 1H, $J=5.6\text{Hz}$), 8.37(s, 2H), 8.34(d, 1H, $J=8.4\text{Hz}$), 7.99(d, 1H, $J=8.4\text{Hz}$), 7.92(s, 1H), 7.80(d, 2H, $J=9.2\text{Hz}$), 7.70(t, 1H, $J=7.6\text{Hz}$), 6.56(t, 1H, $J=7.6\text{Hz}$), 7.14(d, 2H, $J=9.2\text{Hz}$), 6.52(d, 1H, $J=5.2\text{Hz}$); ^{13}C NMR(100MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 162.6, 161.0, 151.5, 150.0, 149.2, 137.0, 136.1, 131.0, 130.7, 130.4, 130.3, 130.0, 128.8, 128.5(m), 126.4, 125.2(m), 124.5, 122.5, 121.7, 121.5, 121.3, 120.6, 104.3; $\text{C}_{24}\text{H}_{14}\text{F}_6\text{N}_2\text{O}_2(\text{M}+\text{H})$ 的HRMS计算值:476.0959;实测值:476.0958。

[0261] 1.2.2.16

[0262] N-(4-(8-硝基喹啉-4-基氧基)苯基)-3,5-双(三氟甲基)苯甲酰胺(17)

[0263]

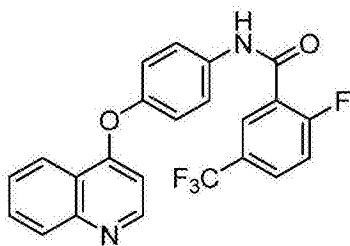


[0264] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ 9.05(s, 1H), 8.69(d, 1H, $J=5.0\text{Hz}$), 8.59(d, 1H, $J=5.0\text{Hz}$), 8.35(s, 2H), 8.06(d, 1H, $J=7.8\text{Hz}$), 7.97(s, 1H), 7.80(d, 2H, $J=9.0\text{Hz}$), 7.63(t, 1H, $J=8.6\text{Hz}$), 7.16(d, 2H, $J=9.0\text{Hz}$), 6.62(d, 1H, $J=5.0\text{Hz}$); $\text{C}_{24}\text{H}_{13}\text{F}_6\text{N}_3\text{O}_4(\text{M}+\text{H})$ 的HRMS计算值:521.0810;实测值:521.0814。

[0265] 1.2.2.17

[0266] 2-氟-N-(4-(喹啉-4-基氧基)苯基)-5-(三氟甲基)苯甲酰胺(18)

[0267]

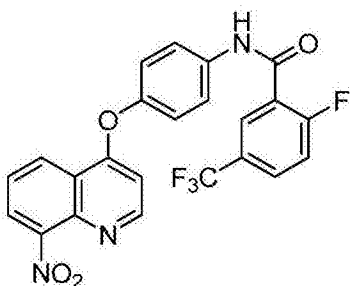


[0268] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ 8.83(d, 1H, $J=12.8\text{Hz}$), 8.68(d, 1H, $J=5.2\text{Hz}$), 8.39–8.30(m, 2H), 8.11(d, 1H, $J=8.4\text{Hz}$), 7.79–7.67(m, 4H), 7.58(t, 1H, $J=8.0\text{Hz}$), 7.27–7.22(m, 1H), 7.18(d, 2H, $J=9.2\text{Hz}$), 6.56(d, 1H, $J=5.2\text{Hz}$); ^{13}C NMR(100MHz, 甲醇- d_4): δ 164.4, 164.2, 163.8, 161.7, 151.9, 151.8, 149.7, 137.5, 132.1(m), 131.2(m), 128.9(m), 128.3, 128.1, 127.9, 126.5, 126.3, 123.7, 123.6, 123.0, 122.7, 122.6, 119.1, 119.8, 118.7, 118.5, 105.2; $\text{C}_{23}\text{H}_{14}\text{F}_4\text{N}_2\text{O}_2$ (M+H)的HRMS计算值:426.0991;实测值:426.0991。

[0269] 1.2.2.18.

[0270] 2-氟-N-(4-(8-硝基喹啉-4-基氧基)苯基)-5-(三氟甲基)苯甲酰胺(19)

[0271]

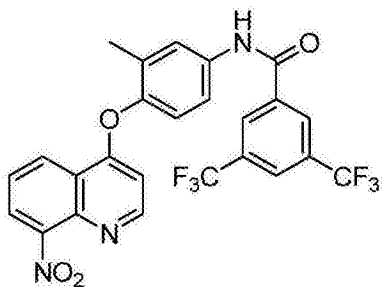


[0272] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ 8.81(d, 1H, $J=5.2\text{Hz}$), 8.59(d, 1H, $J=8.8\text{Hz}$), 8.53–8.47(m, 2H), 8.06(d, 1H, $J=7.6\text{Hz}$), 7.83–7.77(m, 3H), 7.64(t, 1H, $J=7.6\text{Hz}$), 7.37–7.32(m, 1H), 7.23–7.20(m, 2H), 6.68(d, 1H, $J=5.2\text{Hz}$); $\text{C}_{23}\text{H}_{13}\text{F}_4\text{N}_3\text{O}_4$ (M+H)的HRMS计算值:471.0842;实测值:471.0850。

[0273] 1.2.2.19

[0274] N-(3-甲基-4-(8-硝基喹啉-4-基氧基)苯基)-3,5-双(三氟甲基)苯甲酰胺(20)

[0275]

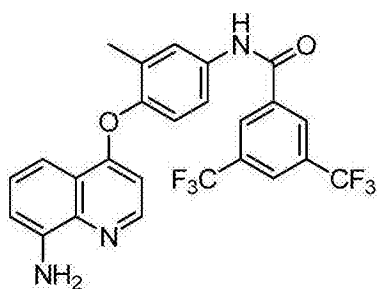


[0276] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ 9.86(s, 1H), 8.45(d, 1H, $J=5.2\text{Hz}$), 8.38(s, 2H), 8.31(d, 1H, $J=8.4\text{Hz}$), 7.92(s, 1H), 7.89(d, 1H, $J=8.4\text{Hz}$), 7.69–7.63(m, 2H), 7.53(t, 1H, $J=7.6\text{Hz}$), 7.33(s, 1H), 7.28(d, 1H, $J=8.4\text{Hz}$), 6.33(d, 1H, $J=5.2\text{Hz}$); $\text{C}_{25}\text{H}_{15}\text{F}_6\text{N}_3\text{O}_4$ (M+H)的HRMS计算值:535.0967;实测值:535.0956。

[0277] 1.2.2.20.

[0278] N-(4-(8-氨基喹啉-4-基氧基)-3-甲基苯基)-3,5-双(三氟甲基)苯甲酰胺(21)

[0279]

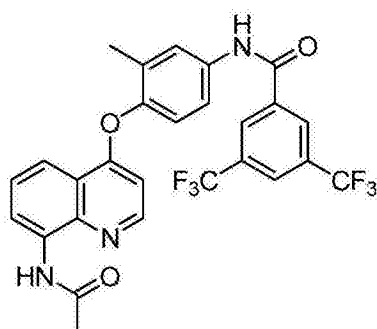


[0280] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ 8.49(d, 1H, $J=2.0\text{Hz}$), 8.27(s, 1H), 8.02(s, 1H), 7.94(s, 1H), 7.65(d, 1H, $J=8.0\text{Hz}$), 7.48-7.45(m, 2H), 7.37-7.32(m, 2H), 6.96(d, 1H, $J=7.6\text{Hz}$), 4.95(s, 2H), 2.16(s, 3H); $\text{C}_{25}\text{H}_{17}\text{F}_6\text{N}_3\text{O}_2(\text{M}+\text{H})$ 的HRMS计算值: 505.1225; 实测值: 505.1216。

[0281] 1.2.2.21.

[0282] N-(4-(8-乙酰胺基喹啉-4-基氧基)-3-甲基苯基)-3,5-双(三氟甲基)苯甲酰胺(22)

[0283]

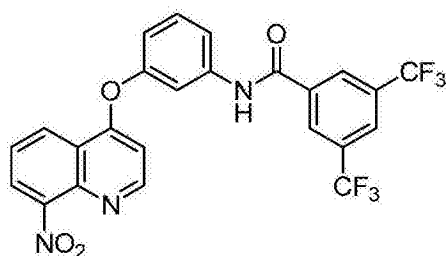


[0284] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ 9.77(s, 1H), 9.36(s, 1H), 8.65(d, 1H, $J=7.2\text{Hz}$), 8.46(s, 2H), 8.44(d, 1H, $J=5.2\text{Hz}$), 7.97(s, 1H), 7.87(d, 1H, $J=8.4\text{Hz}$), 7.72(d, 1H, $J=8.4\text{Hz}$), 7.50(d, 1H, $J=2.0\text{Hz}$), 7.37(t, 1H, $J=8.0\text{Hz}$), 7.28(d, 1H, $J=8.4\text{Hz}$), 6.41(d, 1H, $J=5.2\text{Hz}$), 2.26(s, 3H), 2.10(s, 3H); ^{13}C NMR(100MHz, CDCl_3): δ 169.2, 163.0, 161.2, 152.0, 148.8, 139.5, 137.2, 136.7, 133.8, 132.6, 132.3, 132.2, 132.0, 131.6, 127.8, 127.1, 126.3, 125.2(m), 124.2, 121.5, 120.4, 118.8, 118.3, 116.7, 115.7, 113.8, 25.0, 15.4; $\text{C}_{27}\text{H}_{19}\text{F}_6\text{N}_3\text{O}_3(\text{M}+\text{H})$ 的HRMS计算值: 547.1331; 实测值: 547.1325。

[0285] 1.2.2.22.

[0286] N-(3-(8-硝基喹啉-4-基氧基)苯基)-3,5-双(三氟甲基)苯甲酰胺(23)

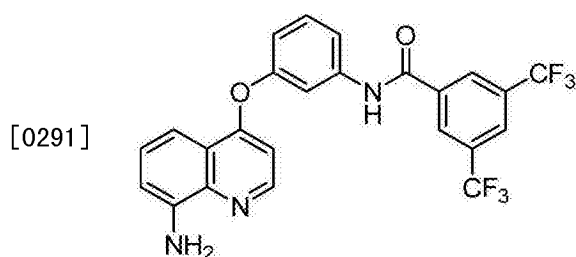
[0287]



[0288] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3): δ 8.78(d, 1H, $J=5.6\text{Hz}$), 8.58(d, 1H, $J=8.4\text{Hz}$), 8.52(s, 1H), 8.31(s, 2H), 8.22(s, 1H), 8.08-8.04(m, 2H), 7.71(s, 1H), 7.64(t, 1H, $J=8.0\text{Hz}$), 7.53-7.49(m, 2H), 7.03(d, 1H, $J=7.2\text{Hz}$), 6.71(d, 1H, $J=4.8\text{Hz}$); $\text{C}_{24}\text{H}_{13}\text{F}_6\text{N}_3\text{O}_4(\text{M}+\text{H})$ 的HRMS计算值: 521.0810; 实测值: 521.0821。

[0289] 1.2.2.23.

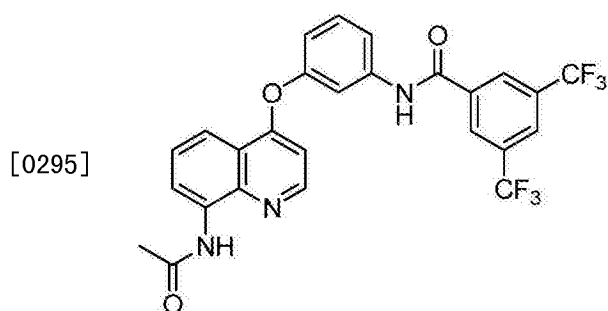
[0290] N-(3-(8-氨基喹啉-4-基氧基)苯基)-3,5-双(三氟甲基)苯甲酰胺(24)



[0292] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 8.55(d, 1H, $J=4.8\text{Hz}$), 8.29(s, 2H), 8.05(s, 1H), 7.90(s, 1H), 7.60(d, 1H, $J=8.4\text{Hz}$), 7.55(s, 1H), 7.70-7.43(m, 2H), 7.34(t, 1H, $J=8.0\text{Hz}$), 7.01(d, 1H, $J=8.0\text{Hz}$), 6.96(d, 1H, $J=7.9\text{Hz}$), 6.63(d, 1H, $J=4.8\text{Hz}$); $^{13}\text{C NMR}$ (100MHz, CDCl_3): δ 163.1, 161.3, 155.3, 147.9, 143.6, 139.9, 138.8, 136.5, 132.7, 132.4, 132.1, 131.7, 130.6, 127.5(d), 127.0, 126.8, 125.3(m), 124.1, 122.0, 118.7, 117.4, 117.2, 113.1, 111.1, 110.0, 105.4; $\text{C}_{24}\text{H}_{15}\text{F}_6\text{N}_3\text{O}_2(\text{M}+\text{H})$ 的 HRMS 计算值: 491.1068; 实测值: 491.1068。

[0293] 1.2.2.24.

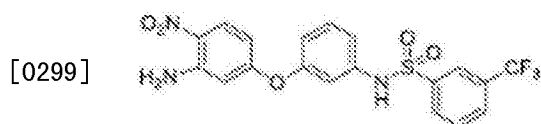
[0294] N-(3-(8-乙酰胺基喹啉-4-基氧基)苯基)-3,5-双(三氟甲基)苯甲酰胺(25)



[0296] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 9.77(s, 1H), 8.74(d, 1H, $J=7.6\text{Hz}$), 8.54(d, 1H, $J=5.2\text{Hz}$), 8.48(s, 1H), 8.39(s, 2H), 8.04(s, 1H), 7.87(d, 1H, $J=8.4\text{Hz}$), 7.67-7.60(m, 2H), 7.50-7.43(m, 2H), 7.37(t, 1H, $J=8.0\text{Hz}$), 7.00(d, 1H, $J=8.4\text{Hz}$), 6.65(d, 1H, $J=5.2\text{Hz}$), 2.30(s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (100MHz, CDCl_3): δ 169.3, 163.1, 161.7, 154.6, 148.7, 139.6, 136.6, 133.8, 132.7, 132.4, 132.1, 131.7, 130.8, 127.8(d), 126.9, 126.5, 125.3(m), 124.2, 121.5, 120.8, 117.7, 117.3, 116.8, 115.7, 113.2, 104.9, 25.0; $\text{C}_{26}\text{H}_{17}\text{F}_6\text{N}_3\text{O}_3(\text{M}+\text{H})$ 的 HRMS 计算值: 533.1174; 实测值: 533.1167。

[0297] 1.2.2.25

[0298] N-(3-(三氟甲基)苯磺酰基)-3-(3-氨基-4-硝基苯氧基)苯胺(SC-40)



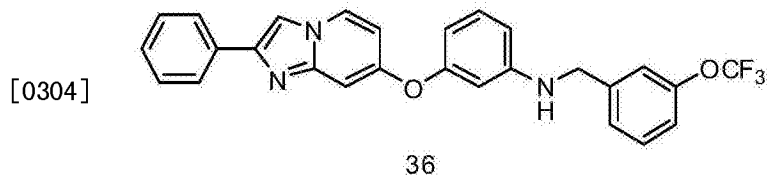
[0300] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 8.06(d, $J=9.6\text{Hz}$, 1H), 8.00(s, 1H), 7.96(d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 7.81(d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 7.61(t, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 7.27(t, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 6.91-6.80(m, 3H), 6.19(dd, $J=9.6\text{Hz}$, 2.4Hz, 1H), 6.14(d, $J=2.4\text{Hz}$, 1H), 6.10(brs, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (100MHz, CDCl_3): δ 163.1, 155.5, 146.7, 140.0, 137.6, 132.0, 131.6, 130.9, 130.3, 130.0,

129.9(m), 128.8, 128.0, 124.4, 124.3, 124.2, 124.2, 124.0, 121.6, 117.8, 117.6, 113.6, 107.6, 104.3; LC-MS(ESI): M/Z 452[M-H]⁻; C₁₉H₁₃N₃O₅F₃S[M-H]⁻的HRMS计算值: 452.0528; 实测值: 452.0529。

[0301] 1.2.3化合物36-38

[0302] 1.2.3.1

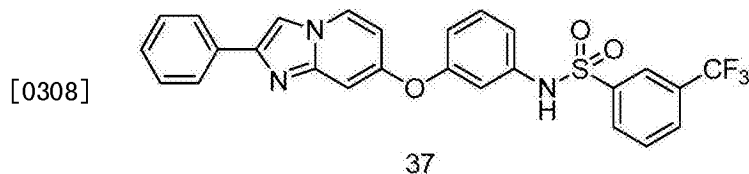
[0303] 3-(2-苯基H-咪唑并[1,2-a]吡啶-7-基氧基)-N-(3-(三氟甲氧基)苄基)苯胺(36)



[0305] ¹H NMR(400MHz, CDCl₃): δ 7.96(d, J=8.0Hz, 1H), 7.89(d, J=8.0Hz, 2H), 7.71(s, 1H), 7.40(t, J=7.2Hz, 2H), 7.35-7.24(m, 3H), 7.18(s, 1H), 7.14(t, J=8.0Hz, 1H), 7.09(d, J=7.6Hz, 1H), 6.98(d, J=2.4Hz, 1H), 6.60(dd, J=7.2Hz, 2.4Hz, 1H), 6.46-6.40(m, 2H), 6.32(t, J=2.4Hz, 1H), 4.31(s, 1H), 4.20(s, 1H); C₂₇H₂₁N₃O₂F₃[M+H]⁺的HRMS计算值: 476.1586; 实测值: 476.1592。

[0306] 1.2.3.2

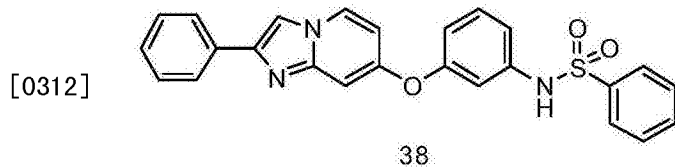
[0307] N-(3-(2-苯基咪唑并[1,2-a]吡啶-7-基氧基)苯基)-3-(三氟甲基)苯磺酰胺(37)



[0309] ¹H NMR(400MHz, CDCl₃): δ 8.03(d, J=6.8Hz, 2H), 7.92(d, J=8.0Hz, 1H), 7.87(d, J=6.8Hz, 2H), 7.76(d, J=6.0Hz, 2H), 7.60(t, J=7.6Hz, 1H), 7.39(t, J=8.0Hz, 2H), 7.30(t, J=6.4Hz, 1H), 7.21(d, J=8.8Hz, 1H), 6.96-6.90(m, 2H), 6.83(dd, J=13.6Hz, 2.4Hz, 1H), 6.82(t, J=2.0Hz, 2H), 6.60(dd, J=7.2Hz, 2.4Hz, 1H); C₂₆H₁₉N₃O₃F₃S[M+H]⁺的HRMS计算值: 510.1099; 实测值: 510.1100。

[0310] 1.2.3.3

[0311] N-(3-(2-苯基咪唑并[1,2-a]吡啶-7-基氧基)苯基)苯磺酰胺(38)



[0313] ¹H NMR(400MHz, DMSO): δ 8.52(d, J=7.2Hz, 1H), 8.33(s, 1H), 7.93(d, J=7.2Hz, 2H), 7.76-7.70(m, 2H), 7.66-7.54(m, 3H), 7.43(t, J=7.6Hz, 2H), 7.33-7.26(m, 2H), 6.92(d, J=7.6Hz, 1H), 6.84-6.76(m, 3H), 6.64(dd, J=7.6Hz, 2.4Hz, 1H); C₂₅H₂₀N₃O₃S[M+H]⁺的HRMS计算值: 442.1225; 实测值: 442.1216。

[0314] 实施例2: 生物活性检测

[0315] 2.1材料与方法

[0316] 2.1.1试剂与抗体

[0317] 索拉非尼(蕾莎瓦膜衣錠®)是由拜耳制药公司(Bayer Pharmaceuticals)(西哈芬,康乃迪克州)提供。钒酸钠及SHP-1抑制剂皆购自开曼化学公司(Cayman Chemical)(安娜堡,密执安州)。免疫墨点分析所用的抗体,如Raf-1、细胞周期素D1、以及PARP抗体均购自圣克鲁斯生物技术公司(Santa Cruz Biotechnology)(圣地亚哥,加州)。其他抗体,如抗pVEGFR2(Y1175)、VEGFR2、存活素、磷酸化STAT3(Tyr705),以及STAT3抗体均来自细胞信号转导公司(Cell Signaling)(丹弗斯,麻州)。

[0318] 2.1.2细胞培养

[0319] Huh-7肝癌细胞株是获自健康科学研究资源库(Health Science Research Resources Bank)(大阪,日本;JCRB0403)。PLC/PRF/5(PLC5)、Sk-Hep-1、以及Hep3B细胞株则获自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)(马那萨斯,维吉尼亚州)。上述细胞维持在含有10%胎牛血清、100units/mL青霉素G、100μg/mL链霉素硫酸盐以及25μg/mL两性霉素B的DMEM培养液中,置于37℃含有5%二氧化碳氛围的加湿培养箱中。其它细胞株,包括乳腺癌细胞,例如MDAMB231、MDAMB468、MCF-7,以及白血病细胞,例如HL-60、KG-1、以及ML-1也提供给如下所述的检测使用。

[0320] 2.1.3.以酵素结合免疫吸附分析法(ELISA)侦测细胞死亡

[0321] 本发明的化合物对细胞存活率的效果是以细胞死亡ELISA检测(罗氏应用科学公司(Roche Applied Science),曼海姆,德国)进行评估。将细胞以待测化合物处理,例如待测化合物浓度为5和10μM、处理24小时。接着收集细胞,并以厂商提供的标准操作程序进行分析。

[0322] 2.1.4.细胞凋亡分析

[0323] 以流式细胞仪(sub-G1)对凋亡的细胞进行计量。在以各种化合物处理后,细胞以胰蛋白酶消化、通过离心收集并再悬浮于PBS中。离心后,将细胞以PBS冲洗并再悬浮于碘化钾(PI,potassium iodide)染色溶液。于黑暗中、37℃下将样本培养30分钟,然后以EPICS Profile II流式细胞仪(库尔特公司(Coulter Corp.),海厄利亚,佛罗里达州)分析。所有实验皆进行三重复。

[0324] 2.1.5.磷酸化-STAT3-程度

[0325] 使用PathScan磷酸化Stat3(Tyr705)三明治酵素结合免疫吸附法套组侦测磷酸化STAT3(细胞信号转导公司(Cell Signaling),丹弗斯,麻州)。细胞以1ng/ml介白素-6预处理,然后与浓度10μM的各种化合物处理24小时。在与细胞裂解物一起培养后,非磷酸化以及磷酸化Stat3蛋白均被涂覆的抗体捕捉。以在波长450nm处的吸亮度测定磷酸化-STAT3蛋白的表现量。

[0326] 2.1.6.西方墨点分析法

[0327] 细胞与浓度5及10μM的各种化合物处理24小时。细胞裂解物以西方墨点分析法分析。

[0328] 2.1.7.使用siRNA进行基因剔除

[0329] Smart-pool siRNA,包括对照组(D-001810-10)、RAF-1、SHP-1、SHP-2、以及PTP-1B,均购自Dharmacon公司(芝加哥,伊利诺伊州)。实验操作程序已于先前文献中描述(Chen KF et al.J Biol Chem2009;284:11121-11133)。

[0330] 2.1.8.PLC5与STAT3的异位表达

[0331] STAT3 cDNA(KIAA1524)及STAT3-C皆购自Addgene质体库(<http://www.addgene.org/>)。简言之,经转染作用后,细胞在G418(0.78mg/mL)的存在下培养。经8周的筛选后,存活的细胞集落,意即从稳定转染的细胞所产生的细胞,分别经选择并各自增殖。

[0332] 2.1.9.磷酸酶及激酶活性

[0333] 使用RediPlate96 EnzChek®酪胺酸磷酸酶检测套组(R-22067)进行SHP-1活性测定(分子探针公司(Molecular Probes),卡尔斯巴德,加州)。Raf-1激酶讯息放大效应检测套组(上州-密里博公司(Upstate-Millipore),比尔里卡,麻州)则被用来检验Raf-1激酶的活性。JAK2激酶活性套组是购自反应生物股份有限公司(Reaction Biology Corp.)(马尔文,宾州)。

[0334] 2.1.10. STAT3报导基因分析

[0335] 将细胞接种于96孔盘中,并以剂量为10ng/ μ l的介白素-6预处理30分钟。STAT3报导基因套组购自SABiosciences(弗雷德里克,马里兰州)。

[0336] 2.1.11 异体移植肿瘤的生长

[0337] 雄性NCr无胸腺裸鼠(5-7周龄)是自实验动物中心(National Laboratory Animal Center)(台北,台湾)而来。所有使用这些小鼠进行的实验程序,皆按照台湾大学批准的实验操作程序。当Huh-7肿瘤达到100至200mm³,对小鼠进行口服投药,每天一次,投予甲苯磺酸索拉非尼(sorafenib tosylate)(10mg/kg),或SC-1(10mg/kg)。对照组则投与基剂(Chen KF et al. Cancer Res. 2008;68:6698-6707)。

[0338] 2.1.12 统计分析

[0339] 平均值的比较是采用在支持Windows11.5的SPSS软件(SPSS公司,芝加哥,伊利诺伊州)中的独立样本t检验来进行(Chen KF et al. Cancer Res 2008;68:6698-6707)。

[0340] 2.2 结果

[0341] 2.2.1 化合物1不影响Raf激酶的活性

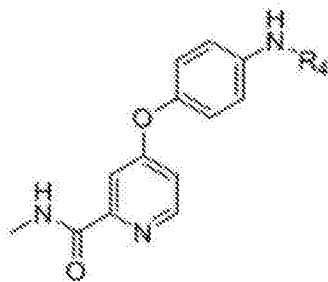
[0342] 如上所述,我们由以氰苯替换吡啶环和酰胺官能基的方式,在不提供氢供体的能力的情况下合成了索拉非尼的衍生物。接着,我们测试了化合物1在PLC5细胞中抑制Raf激酶活性的能力,并与索拉非尼的该能力相比。如图3所示,在PLC5细胞中5 μ M的浓度下,索拉非尼可以抑制未处理细胞50%的Raf-1激酶活性;然而以化合物1处理的细胞则显示具有与处理基剂的对照组相同的Raf-1活性。抑制Raf-1能力的损失可以推测是因为氢键结能力的损失,而氢键结能力的损失则是由于以氰苯替换吡啶环和酰胺官能基所造成的结果。

[0343] 2.2.2 在细胞死亡中,脲基与吡啶环的替换的结构活性关系

[0344] 如上所述,我们以各种酰胺及磺酰胺替换索拉非尼的脲官能基键结,以生成化合物2-11。以MTT法分析这些化合物在PLC5细胞中对细胞生长的抑制作用。其结果如表4所示。

[0345] 表4

[0346]

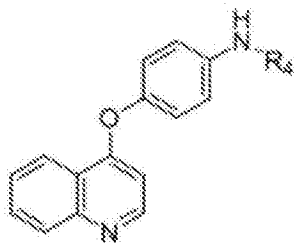


Cpd	R ₄	在 PLC5 细胞的 IC ₅₀ (μM)	Cpd	R ₄	在 PLC5 细胞的 IC ₅₀ (μM)
索拉非尼		8.3			
1		7.5	7		>40
2		>40	8		>40
3		>40	9		>40
4		>40	10		>40
5		>40	11		>40
6		>40			

[0347] 结果显示,这些衍生物不论是具有推电子或拉电子基,其细胞毒性皆未比绍拉非尼及化合物1的毒性高。

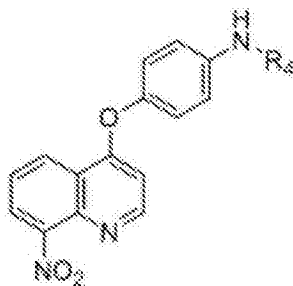
[0348] 接下来,我们将吡啶改为喹啉环及酰胺交联剂以生成化合物12-25。亦使用MTT法分析这些化合物在PLC5细胞中对细胞生长的抑制作用。其结果如表5所示。

[0349] 表5



Cpd	R ₄	在 PLC5 细胞的 IC ₅₀ (μM)
12		>40
14		>40
16		16.0
18		21.1

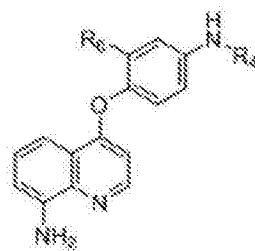
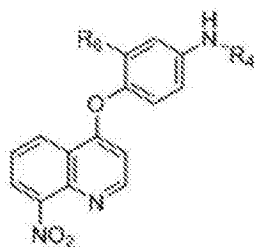
[0351] 表6



Cpd	R ₄	在 PLC5 细胞的 IC ₅₀ (μM)
13		>40
15		>40
17		>40
19		>40

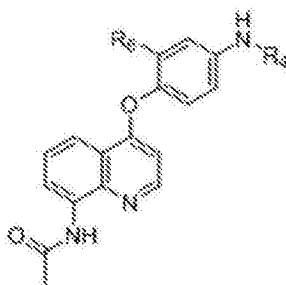
[0353] 表7

[0354]



Cpd	R ₄	R ₆	在 PLC5 细胞的 IC ₅₀ (μM)
20		Me	>40
23		H	>40

Cpd	R ₄	R ₆	在 PLC5 细胞的 IC ₅₀ (μM)
21		Me	25.4
24		H	19.0



Cpd	R ₄	R ₆	在 PLC5 细胞的 IC ₅₀ (μM)
22		Me	>40
25		H	10.8

[0355] 酰胺链接剂显现出不同于磺酰基链接剂的构形,其展现出比磺酰基链接剂化合物具有更佳活性。例如,化合物16显现出比化合物12更好的细胞毒性。化合物25则显现出与索拉非尼及化合物1相当的细胞毒性。我们得到的结论是脲和酰胺链接剂在PLC5细胞中展现出的最高的细胞毒性。

[0356] 2.2.3. 索拉非尼衍生物的作用模式的机制验证

[0357] 为确认索拉非尼衍生物对STAT3的去磷酸化作用,先将PLC5细胞以10 μ M各种化合物处理24小时,并以ELISA分析这些PLC5细胞内P-STAT3的状态。结果如图4所示,磺酰基链接剂化合物对P-STAT3没有明显的变化;然而,化合物1与一些酰胺链接剂化合物则具有高度的STAT3去磷酸化作用。由这些衍生物引起的P-STAT3量的下降与细胞毒性有关。换言之,这些衍生物是部分透过抑制STAT3而诱导细胞死亡。

[0358] 此外,我们测试了在抑制P-STAT3后的下游讯号传导途径。以化合物1及12分析细胞周期素D1及生存素的表现量,细胞周期素D1及生存素为STAT3的下游目标基因。如图5所示,化合物1具有抑制STAT3的活性,可以降低细胞周期素D1及生存素的表现量,但化合物12则对上述两种蛋白质均无影响。此外,将以化合物1处理的PLC5细胞进行DNA片段化分析与流式细胞仪分析,结果显示细胞死亡是由于STAT3的抑制作用且进一步诱导了细胞凋亡的信号所造成(图6)。

[0359] 我们的前提是,索拉非尼对Raf及STAT3的抑制作用可以经由结构离解,该前提被化合物1所证实,化合物1缺乏Raf活性,但其对P-STAT3向下调节的程度却与索拉非尼相同。我们认为,化合物1的氰基降低了其与Raf的交互作用。透过将链接剂及吡啶环改变为酰胺及喹啉以对索拉非尼进行后续的修饰(分别产生化合物1、16及25)结果导致对STAT3抑制能力的降低。

[0360] 2.2.4. SC-1,一种索拉非尼的衍生物,缺乏Raf-1的抑制功能,在肝癌细胞株内出现类似索拉非尼对细胞死亡的影响

[0361] 在此实验中,我们再次检验索拉非尼和SC-1对Raf-1活性的影响。将自PLC5或Hep3B细胞萃取物而来的Raf-1免疫沉淀物与MEK重组蛋白共同培养,并于索拉非尼或经SC-1处理的细胞内分析磷酸化-MEK的状态。在索拉非尼的存在下我们观察到Raf-1激酶活性减少了20-40%;然而,SC-1并不抑制Raf-1的活性,这表示SC-1不是Raf-1的抑制剂(图7A)。此外,我们亦检测VEGFR2的磷酸化,VEGFR2为索拉非尼在癌症治疗上的一个关键目标。在以索拉非尼处理的PLC5细胞中,p-VEGFR2(Tyr1175)的表现减少,而处理SC-1则没有显著的影响(图7B)。这些数据表示,衍生自索拉非尼的SC-1不影响激酶的抑制作用。

[0362] 接着,我们检验了索拉非尼及SC-1的抗增殖效果。SC-1以及索拉非尼两者皆依照剂量依赖的方式降低各种肝癌细胞的存活率,包括PLC5、SK-Hep1、Huh7、及Hep3B细胞(图8A)。此外,以SC-1或索拉非尼处理24小时的肝癌细胞的sub-G1期细胞数量显著增加(图8B)。如同在以SC-1或索拉非尼处理的肝癌细胞中侦测到DNA片段化的诱发,这两种药物皆会诱导显著的细胞凋亡而造成的细胞死亡(图8C)。这些数据表示,即使SC-1不具有阻碍激酶活性的能力,SC-1对细胞凋亡仍具有显著的效果,如同索拉非尼在抑制肝癌细胞生长一样有效,这表示,索拉非尼诱导肝癌细胞凋亡的机制可能与其激酶抑制活性无关。

[0363] 2.2.5. STAT3对索拉非尼及SC-1在肝癌细胞株中的增敏效果极为重要

[0364] 为了验证p-STAT3的向下调节是否依赖索拉非尼的激酶抑制作用,我们进一步检测在以SC-1处理的肝癌细胞内与STAT3相关的信号传导途径。有鉴于索拉非尼会对STAT3向下调节并导致细胞死亡的诱发,因此检测包括诱发骨髓白血病细胞分化蛋白-1(Mcl-1, Induced myeloid leukemia cell differentiation protein)、细胞周期素D1、和生存素的与细胞凋亡相关的调控因子的表现。我们发现,p-STAT3的抑制在调节SC-1-诱导或索拉非尼诱导的细胞死亡中具有作用。SC-1降低了STAT3相关蛋白在肝癌细胞中的表现。STAT3

蛋白的第705个氨基酸为酪氨酸(Y705),该酪氨酸的磷酸化对STAT3的转录活化极为重要。SC-1以及索拉非尼皆会在Y705残基上对p-STAT3向下调节,并且在所有测试的肝癌细胞株中抑制Mc1-1及细胞周期素D1,肝癌细胞株包括PLC5、Huh7、及Sk-Hep1细胞株(图9A)。值得注意的是,STAT3总蛋白并未受到索拉非尼及SC-1的影响(图9A)。此外,SC-1及索拉非尼是以剂量及时间依赖的方式对p-STAT3进行向下调节(图9B)。这些数据进一步表示,索拉非尼是由一种非依赖激酶的机制来抑制STAT3。

[0365] 我们还以STAT3ELISA测定p-STAT3的活性状态。在处理索拉非尼或SC-1之前24小时,Sk-Hep1细胞先以重组介白素-6预处理,以模仿STAT3的高表现量,接着在介白素-6存在的情况下,以SC-1或索拉非尼处理细胞24小时。SC-1或索拉非尼处理过的细胞萃取物与抗在Y705上磷酸化的STAT3的抗体共同培养。ELISA结果显示,索拉非尼以及SC-1皆显著地降低了p-STAT3的活性(图9C,左)。为了评估转录活性,将STAT3结合区选殖到Luc报导基因之前。我们发现,当索拉非尼或SC-1存在的情况下,STAT3的转录活性显著地降低(图9C,右)。以水母冷光酶对萤火虫荧光酶的活性进行评估及正常化。这些结果显示,索拉非尼及SC-1两者皆透过抑制转录作用而有效地降低STAT3磷酸化的程度。我们接着建立了过度表现STAT3的肝癌细胞稳定植株,以验证索拉非尼在肝癌内的影响。如图9D所示,以sub-G1分析证实,在过度表现STAT3的肝癌细胞中,索拉非尼诱导的细胞凋亡以及SC-1诱导的细胞凋亡皆被废止,这表示STAT3是索拉非尼及SC-1诱导的细胞凋亡的一个主要调节因子。

[0366] 2.2.6.SHP-1磷酸酶在索拉非尼及SC-1对磷酸化-STAT3及细胞凋亡的效果上发挥了作用

[0367] 为了进一步研究索拉非尼如何在肝癌组织中抑制STAT3,我们检验了数种可能参与调节p-STAT3的蛋白磷酸酶。我们的研究结果显示,钒酸钠,一种常见的磷酸酶抑制剂,可降低细胞凋亡以及增加p-STAT3(图10A,左)。这些数据表示,由将STAT3相关的蛋白磷酸酶作为目标,索拉非尼及SC-1可能影响p-STAT3。此外,我们发现,SHP-1磷酸酶专一的抑制剂会逆转由索拉非尼诱导的细胞死亡及p-STAT3的抑制(图10A,右)。为了进一步确认SHP-1在由SC-1及索拉非尼诱导的p-STAT3的抑制中的作用,我们采用了SHP-1的特异性siRNA以检验索拉非尼及SC-1的影响。我们发现,SHP-1基因的静默逆转了索拉非尼或SC-1诱导的细胞凋亡及p-STAT3的抑制(图10B,左)。此外,相较于对照组细胞,索拉非尼及SC-1两者皆可使SHP-1的活性增加3倍($P < 0.05$)(图10B,中间)。将索拉非尼或SC-1处理的PLC5细胞以SHP-1特异性抗体进行免疫沉淀,然后将含有SHP-1的复合物以荧光为基础的磷酸基进行测定。值得注意的是,经由SHP-1免疫沉淀证实,无论是索拉非尼或SC-1皆不会影响STAT3和SHP-1的交互作用(图10B,右)。这些数据表示,索拉非尼是透过SHP-1依赖的STAT3去活化作用来诱导细胞死亡。

[0368] 除了SHP-1之外,其他的磷酸酶如SHP-2及PTP-1B,已被报导可以调节p-STAT3。如图10C所示,索拉非尼对细胞凋亡和p-STAT3的影响并没有因为SHP-2或PTP-1B的静默而逆转,这表示,无论是SHP-2或PTP-1B皆对于调节索拉非尼或SC-1对p-STAT3的影响上没有作用。

[0369] 2.2.7.SC-1向下调节p-STAT3且在HUVEC细胞内诱发细胞凋亡

[0370] p-VEGFR2为索拉非尼在癌症治疗上的一个关键目标,为了厘清索拉非尼对p-VEGFR2的影响,我们检验了索拉非尼及SC-1在人类脐静脉内皮细胞(HUVEC, Human

umbilical vein endothelial cells)内的影响。如图11A左半部所示,索拉非尼及SC-1两者在HUVEC细胞内皆对p-STAT3向下调节,且在肝癌组织中明显地诱导细胞凋亡($P<0.05$)。值得注意的是,在HUVEC细胞内,索拉非尼,而非SC-1,对VEGFR的磷酸化向下调节(图7A,中间)。这些结果显示,Raf-1及VEGFR皆未调节索拉非尼对细胞凋亡及p-STAT3的影响。

[0371] 先前的研究也发现Mc1-1在调解索拉非尼对TRAIL增敏化的效果上是极为重要。有趣的是,我们的数据显示,由p-STAT3的向下调节,在肝癌组织中,SC-1也显示出类似的由TRAIL诱导的细胞凋亡的增强(图11B)。为了进一步探讨索拉非尼对p-STAT3的抑制作用是否与Raf-1有关,我们以小片段干扰RNA来剔除Raf-1基因。Raf-1的静默并未影响索拉非尼或SC-1对p-STAT3的效果(图11C),表示Raf-1并不调节索拉非尼对p-STAT3的效果。值得注意的是,无论是索拉非尼或是SC-1,两者皆不改变JAK2的激酶活性(图11D),这表示JAK2并不调节这两种化合物对p-STAT3的影响。此外,我们的数据显示,索拉非尼及SC-1并不会影响细胞激素信息抑制剂-1(SOCS-1, Suppressor of cytokine signaling-1)及细胞激素信息抑制剂-3(SOCS-3)的蛋白量(图11E)。有趣的是,具有组成性活化的STAT-3(STAT3-C)的肝癌细胞并无法完全抵抗SC-1(图11F)。如同SC-1增强了SHP-1的活性(图11B,中间),我们的数据表示,除了STAT-3之外,其他SHP-1相关的分子可能也在调节SC-1的效果上发挥作用。为了检验索拉非尼或SC-1是否直接以SHP-1为目标,PLC5细胞与SHP-1抗体进行免疫沉淀,然后与索拉非尼或SC-1共同培养6小时。如图11G所示,在这些裂解物中,索拉非尼和SC-1增加了SHP-1的活性,显示索拉非尼及SC-1是直接以SHP-1为目标的。

[0372] 2.2.8. SC-1及索拉非尼对Huh7-带瘤小鼠的治疗效果的评估

[0373] 为了验证SC-1的治疗效果,我们进一步将SC-1应用于肝癌异体移植,以评估其在体内的重要性。首先,Huh7带瘤小鼠每日以口服接受基剂或10mg/kg/day剂量的索拉非尼的治疗。索拉非尼处理组显著地抑制了Huh7异体移植肿瘤的生长,且索拉非尼处理的动物的肿瘤尺寸比对照组小鼠的肿瘤小一半(图12A,左)。任何小鼠的体重或毒性皆无明显的差异(未显示数据)。此外,自以基剂处理的小鼠及索拉非尼处理的小鼠上取得的肿瘤以p-STAT3进行免疫墨点分析。在以索拉非尼处理的肿瘤内p-STAT3是向下调节的(图12A,右)。在三颗具有代表性的Huh7肿瘤的均质液中观察到p-STAT3/STAT3。此外,我们检验了在以索拉非尼处理的Huh7异体移植中SHP-1的活性。以索拉非尼处理的肿瘤在体内显示出显著诱导SHP-1的活性(图12A,右)。将这些结果合并,证实在涉及肝癌异体移植模型中的肿瘤抑制,索拉非尼能增加SHP-1的活性以抑制p-STAT3。

[0374] 此外,SC-1处理组具有强烈的抑制效果($P<0.05$),且在处理结束时,此组的肿瘤尺寸只有基剂处理组小鼠肿瘤的25%(图12B,左)。p-STAT3的免疫墨点分析和SHP-1的活性分析也在从SC-1处理的动物的肿瘤样品上进行。有趣的是,SC-1诱导了SHP-1活性显著地上升,且向下调节p-STAT3(图12B,右)。这些数据显示,SC-1,一种SHP-1的促进剂与STAT3的抑制剂,表现出在抑制肿瘤生长的治疗效果。

[0375] 2.2.9. 癌细胞生长的抑制作用

[0376] 我们还检验了在其它癌症细胞株中SC-1及SC-43的影响,包括乳癌细胞株,例如MDAMB231、MDAMB468、MCF-7,以及白血病的癌症细胞株,例如HL-60、KG-1和ML-1。图13显示这些检验结果。这些数据显示,本发明的化合物在抑制癌细胞的生长上是有效的。

[0377] 2.2.10. 在肝癌细胞内的抗癌效果

[0378] 以指示剂量的索拉非尼衍生物(SC-43或SC-40)处理肝癌细胞24小时。收集的细胞以75%乙醇固定,并以20 μ g/ml碘化丙啶(PI, Propidium Iodide)染色。以流式细胞仪进行sub-G1分析。图14显示,索拉非尼衍生物SC-43及SC-40在肝癌细胞中显示出显著的抗癌效果,(A)、(B)、(C)、(D)和(E)是分别指以SC-43处理PLC5、HepG2、Hep3B、HA59T和SK-Hep1细胞;而(F)、(G)、(H)、(I)和(J)则分别指以SC-40处理PLC5、HepG2、Hep3B、HA59T和SK-Hep1细胞。点代表平均;条带代表标准偏差(n=6)。

[0379] 2.2.11. 索拉非尼或SC-43对STAT3相关蛋白质的影响

[0380] 以RIPA裂解缓冲液收集以SC-43(10 μ M、24小时)处理的肝癌细胞。用来进行免疫墨点分析的抗体如细胞周期素D1是购自Santa Cruz生技公司。其他抗体,如生存素、磷酸化STAT3(Tyr705)、STAT3、Mc1-1、SOCS1、和SOCS3则来自细胞信号传导公司。图15显示在肝癌组织中,SC-43向下调节与磷酸化STAT3相关的信号传导途径。

[0381] 2.2.12. 索拉非尼或SC-40对STAT3相关蛋白质的影响

[0382] 以RIPA裂解缓冲液收集以SC-40(10 μ M、24小时)处理的肝癌细胞。用来进行免疫墨点分析的抗体如细胞周期素D1是购自Santa Cruz生技公司。其他抗体,如生存素、磷酸化STAT3(Tyr705)、STAT3、Mc1-1、SOCS1、和SOCS3则来自细胞信号传导公司。图16显示在肝癌组织中,SC-40向下调节与磷酸化STAT3相关的信号传导途径。

[0383] 2.2.13. 索拉非尼或SC-43对STAT3相关蛋白质的影响

[0384] 以RIPA裂解缓冲液收集以SC-43(10 μ M、24小时)处理的肝癌细胞。用来进行免疫墨点分析的抗体如细胞周期素D1是购自Santa Cruz生技公司。其他抗体,如生存素、磷酸化STAT3(Tyr705)、STAT3、以及Mc1-1则来自细胞信号传导公司。图17显示在肝癌组织中,SC-43对p-STAT3相关的信号传导途径的抑制效果优于索拉非尼,(A)PLC5及(B)Hep3B。在比绍拉非尼处理剂量低的情况下,SC-43对p-STAT3相关的蛋白具有显著的抑制效果。

[0385] 2.2.14. SC-43及SC-40对STAT3活性的影响

[0386] p-STAT3活性:以RIPA缓冲液收集以SC衍生物处理的PLC5细胞,并以p-STAT3ELISA套组进行分析。分析实验操作流程是依照制造商所提供。

[0387] STAT3报导基因分析:将PLC5细胞接种在96孔盘中。细胞以STAT3报导基因构筑物预转染24小时,接着以衍生物再处理24小时。STAT3报导基因套组是购自SABiosciences公司。

[0388] 以10 μ M SC-43或SC-40处理细胞24小时后,进行磷酸化-STAT3ELISA分析或荧光酶活性测定。图18显示SC-43及SC-40两者皆可诱导对p-STAT3活性的强烈抑制作用,(A)和(B)分别为处理SC-43和SC-40的细胞的p-STAT3ELISA分析结果,以及(C)和(D)分别为处理SC-43和SC-40的细胞的STAT3报导基因的分析结果。

[0389] 2.2.15. SC-43/40对磷酸酶活性的影响

[0390] PLC5细胞的蛋白质萃取物与抗-SHP-1抗体在免疫沉淀缓冲液中共同培养整夜。将蛋白G琼脂糖凝胶4快速流动(Protein G Sepharose4Fast flow)(GE Healthcare Bio-Science公司)加到各样品中,接着在4 $^{\circ}$ C下旋转培养3小时。该含有SHP-1的蛋白质萃取物进一步与SC化合物(10或100nmol/L)在4 $^{\circ}$ C下培养30分钟。以RediPlate96EnzChek酪胺酸磷酸酶测定套组(R-22067)进行SHP-1活性的测定(Molecular Probes公司)。图19显示SC衍生物在体外增加了SHP-1的磷酸酶活性,(A)SC-43,(B)SC-40,以及(C)SC-49。

[0391] 2.2.16.SC衍生物在重组SHP-1内对磷酸酶活性的影响

[0392] 以RediPlate96EnzChek酪胺酸磷酸酶测定套组(R-22067)进行SHP-1活性的测定(Molecular Probes公司)。重组SHP-1蛋白(25ng)与指示剂量的SC-43或SC-40共同培养30分钟,然后进行SHP-1磷酸酶活性分析。图20显示SC衍生物在体外增加了SHP-1的磷酸酶活性,(A)SC-43以及(B)SC-40。

[0393] 2.2.17.SC-40对带有PLC5的异体移植的体内作用

[0394] 雄性NCr无胸腺裸鼠(5-7周龄)是自实验动物中心(台北,台湾)而来。所有使用这些小鼠进行的实验程序,皆按照台湾大学实验动物管理及使用委员会批准的实验操作程序进行。在每只小鼠的背侧面以皮下注射方式,接种 1×10^6 个PLC5细胞,该细胞是悬浮于0.1mL含有50%基质胶(BD Biosciences公司)的无血清培养基内。当肿瘤达到100至200mm³时,对小鼠投与SC-40甲苯磺酸(10或20mg/kg),每日口服一次。每周使用光标卡尺测量肿瘤,并使用下列标准公式计算其体积:宽 $\times$ 长 $\times$ 高 $\times 0.52$ 。

[0395] 图21显示(A)SC-40在PLC5肿瘤上的抗肿瘤效果;点代表平均($n=6$);条带代表标准偏差;(B)p-STAT3和STAT3在PLC5肿瘤内的西方墨点分析;(C)受测动物的体重;以及(D)肿瘤重量和(E)SHP-1在PLC5肿瘤内的活性。这些结果显示,SC-40对PLC5肿瘤具有显著的抗肿瘤效果,但不影响动物的体重。对照组小鼠的体重与经SC-40处理过的小鼠的体重没有显著差异。

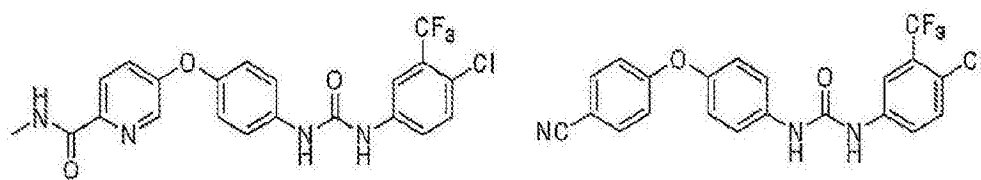
[0396] 2.2.18SC-43的抗肿瘤效果

[0397] 在本实施例中,我们证明SC-43在体外和体内皆具有抗肿瘤的效果。SC-43在肝癌细胞中显示出显著的细胞毒性(IC₅₀约为0.5 μ M)。此外,SC-43显著地造成在带有肝癌的小鼠体内肿瘤生长的抑制。SHP-1/STAT3-相关的信息传导途径是SC-43的抗肿瘤效果的一个重要的目标。请参照图22(A)SC-43在肝癌细胞内的细胞毒性;(B)SC-43在带有肝癌的小鼠体内的抗肿瘤作用;(C)由SC-43引起的SHP-1活性;以及(D)在以SC-43(10 μ M和20 μ M)处理的肝癌细胞中p-STAT3和STAT3的西方墨点分析。

[0398] 2.2.19SC-43对PLC5/luc原位模型的体内作用

[0399] 雄性NCr无胸腺裸鼠(5-7周龄)是自实验动物中心(台北,台湾)而来。所有使用这些小鼠进行的实验程序,皆按照台湾大学实验动物管理及使用委员会批准的实验操作程序进行。在每只小鼠的背侧面肝脏范围内,接种 1×10^4 个PLC5/luc细胞,该细胞是悬浮于0.1mL含有50%基质胶(BD Biosciences公司)的无血清培养基内。当肿瘤形成时,对小鼠投与索拉非尼或SC-43甲苯磺酸(10mg/kg),每日口服一次。每周两次以非侵入性体内成像系统(IVIS,in vivo imaging system)的图像系统监测肿瘤生长。

[0400] SC-40对带有PLC5肿瘤的原位小鼠显现出显著的抗肿瘤效果。肿瘤的生长是于指定时间以IVIS图像系统监测。小鼠是以基剂、索拉非尼(10mg/kg)或SC-43(10mg/kg)处理。图23显示(A)处理过的小鼠的图像;(B)显示小鼠的体重;以及(C)显示对照组及处理组小鼠之间的生存曲线。结果显示,SC-40对带有PLC5肿瘤的原位小鼠显现出显著的抗肿瘤效果。对照组小鼠的体重与经SC-43处理过的小鼠的体重没有显著差异。

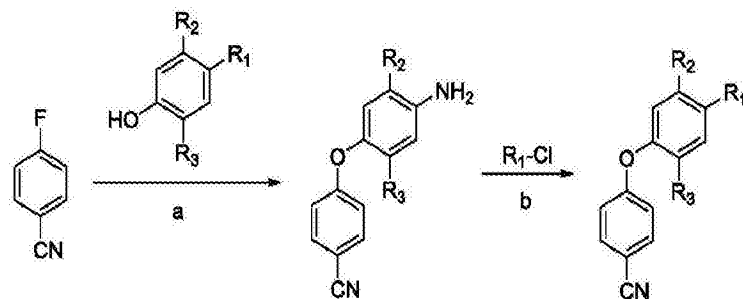


索拉非尼

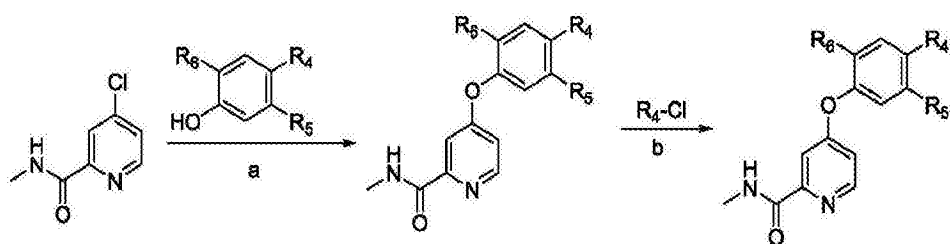
1

图1

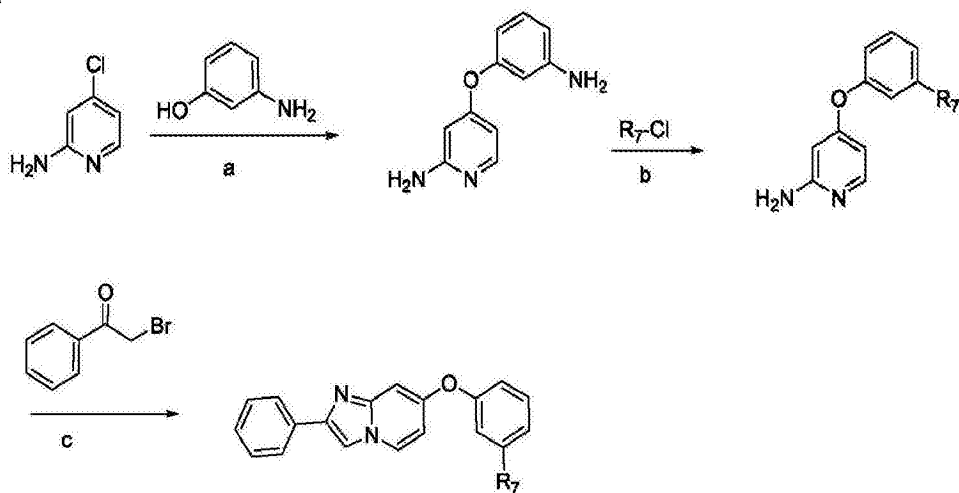
式 I



式 II



式 III



式 I、II、III 的一般合成程序：a 为碳酸钾 (K_2CO_3)、二甲基甲酰胺 (DMF)；b 为吡啶、四氢呋喃 (THF)；c 为三乙胺 (Et_3N)、二氧化二仲乙基。

图2

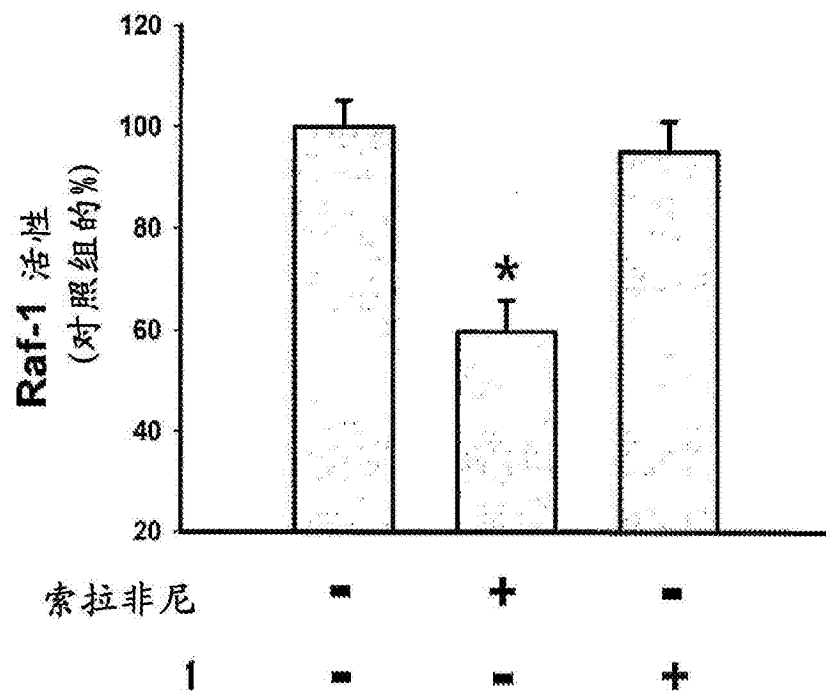


图3

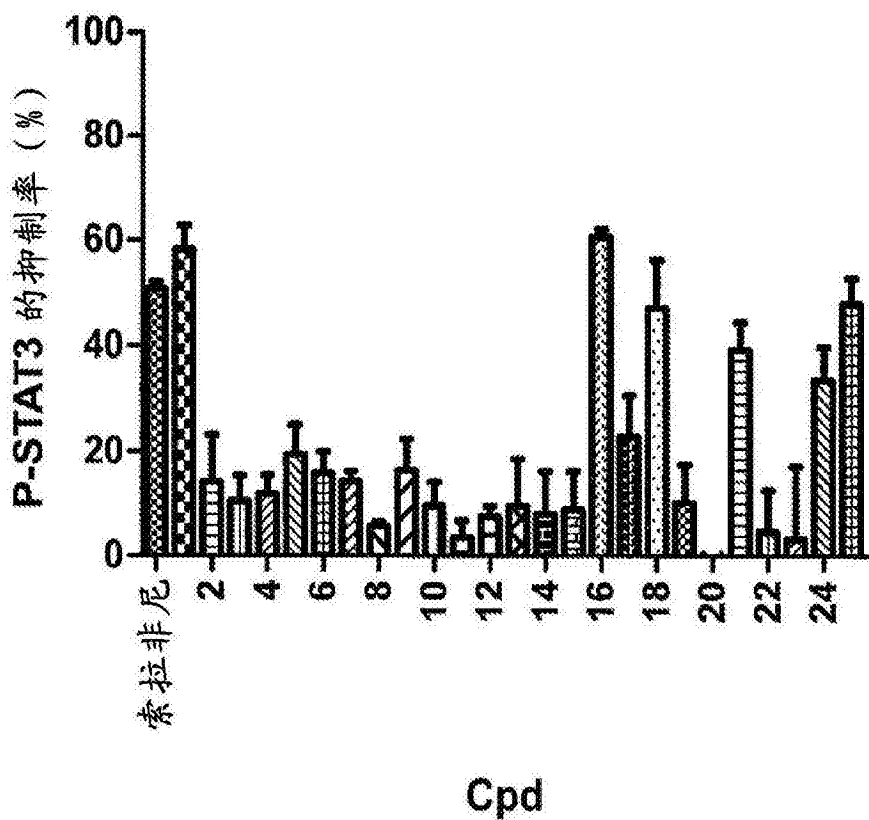


图4

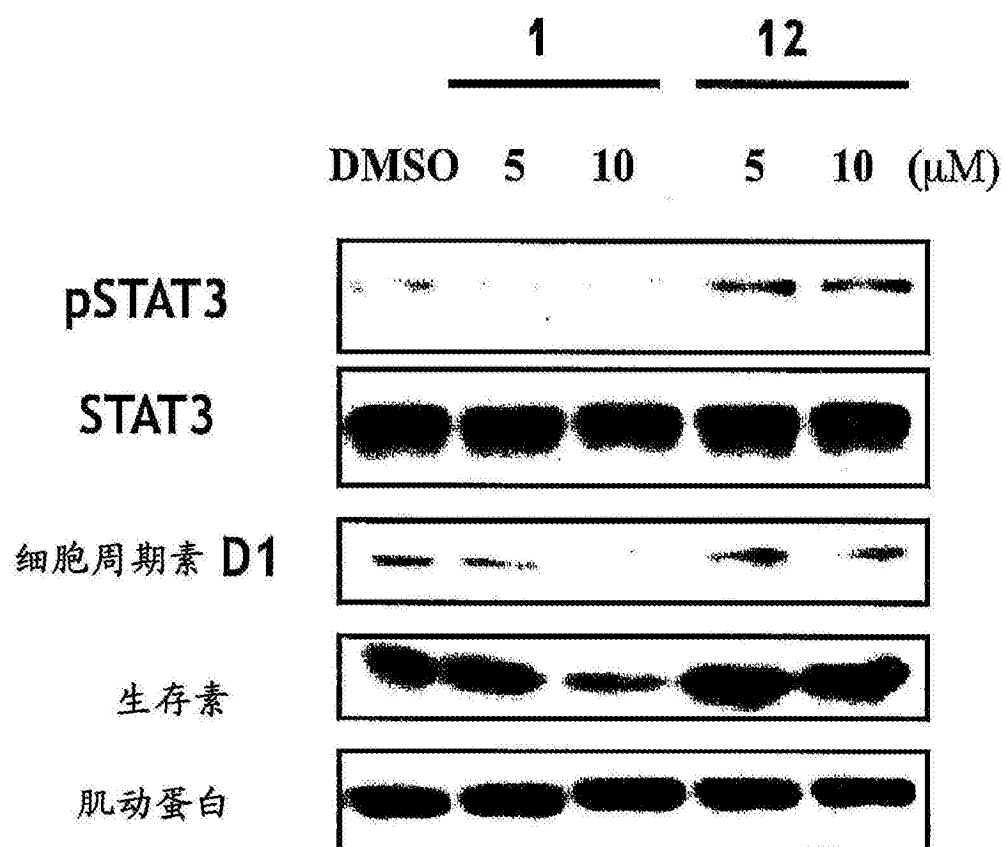


图5

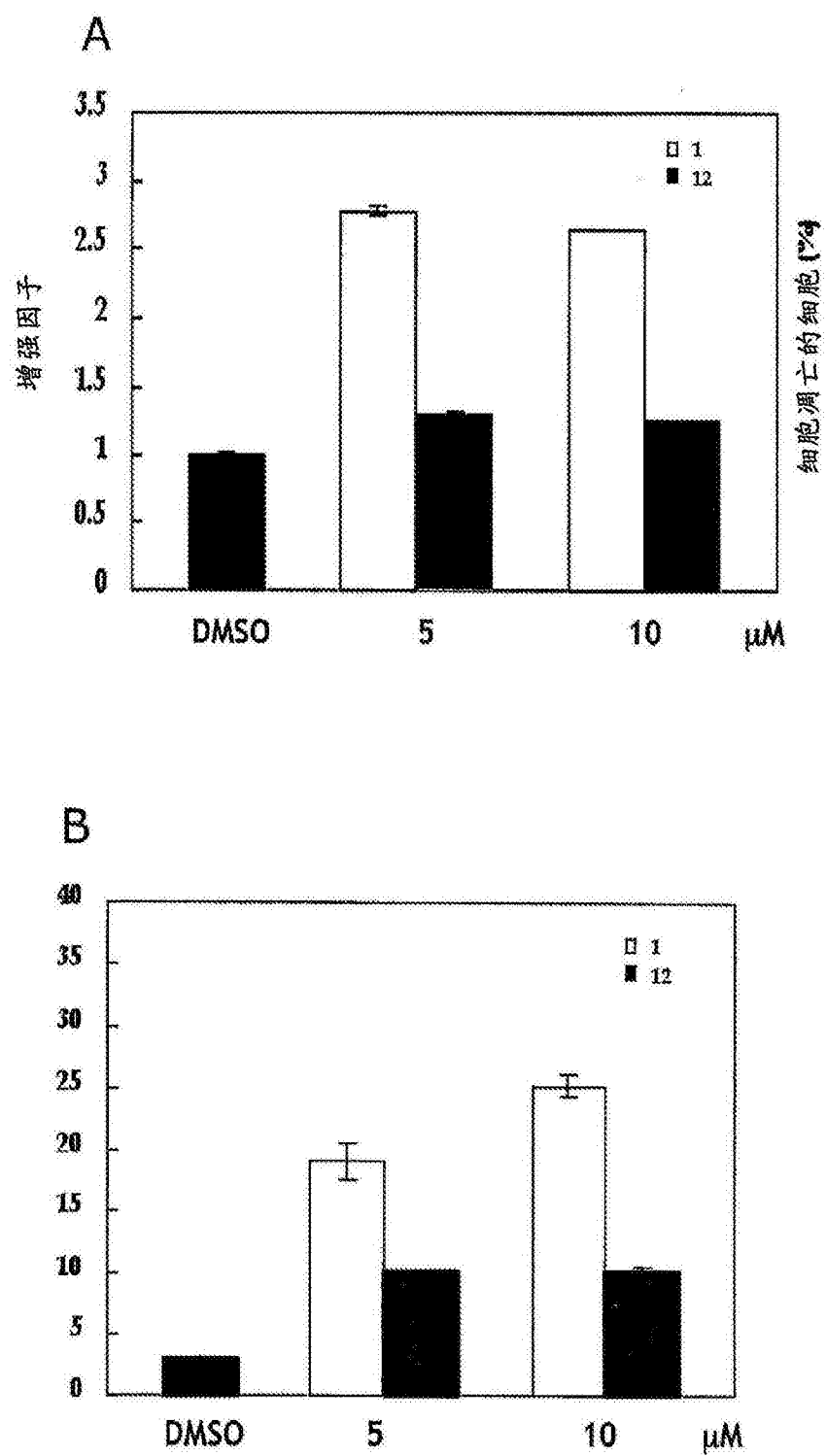
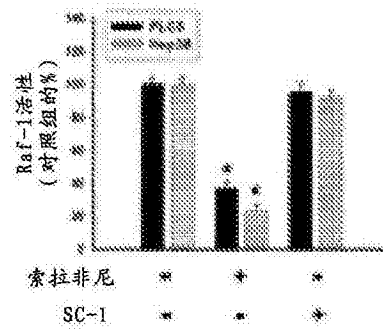


图6

A



B

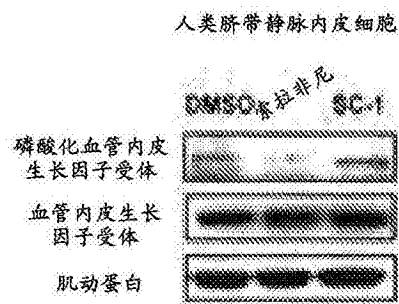
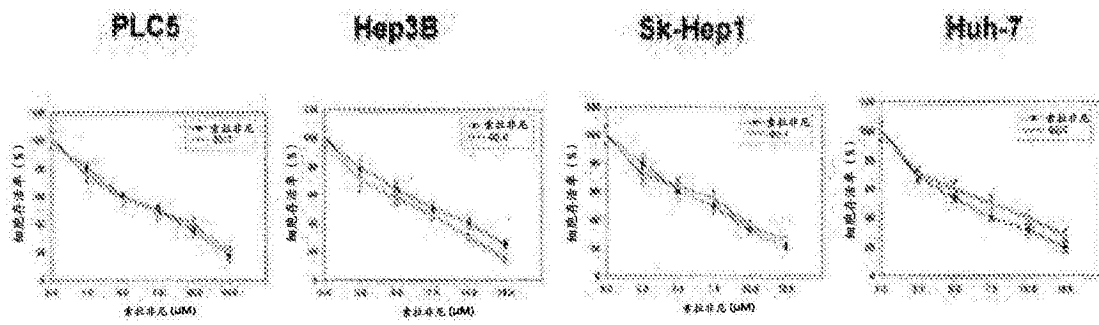
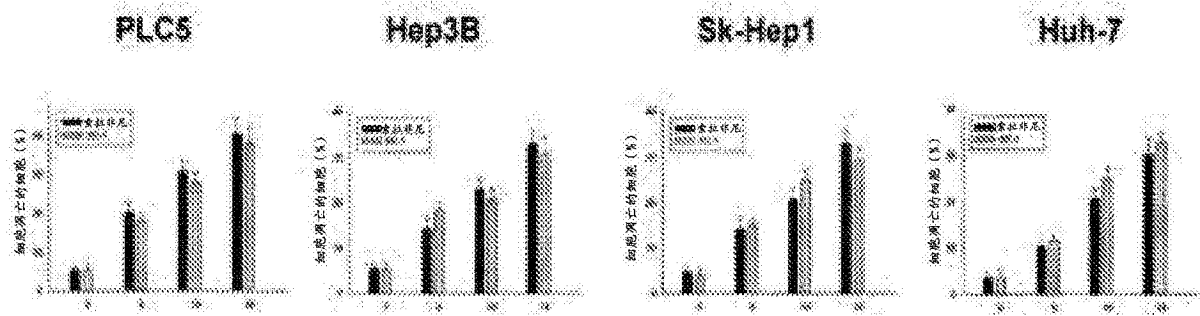


图7

A



B



C

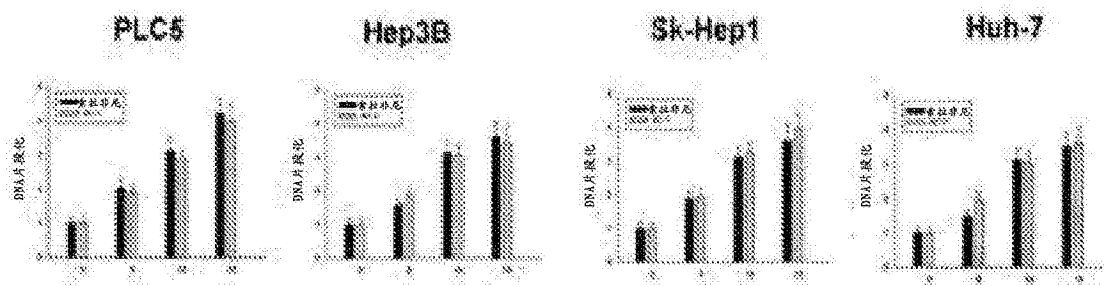


图8

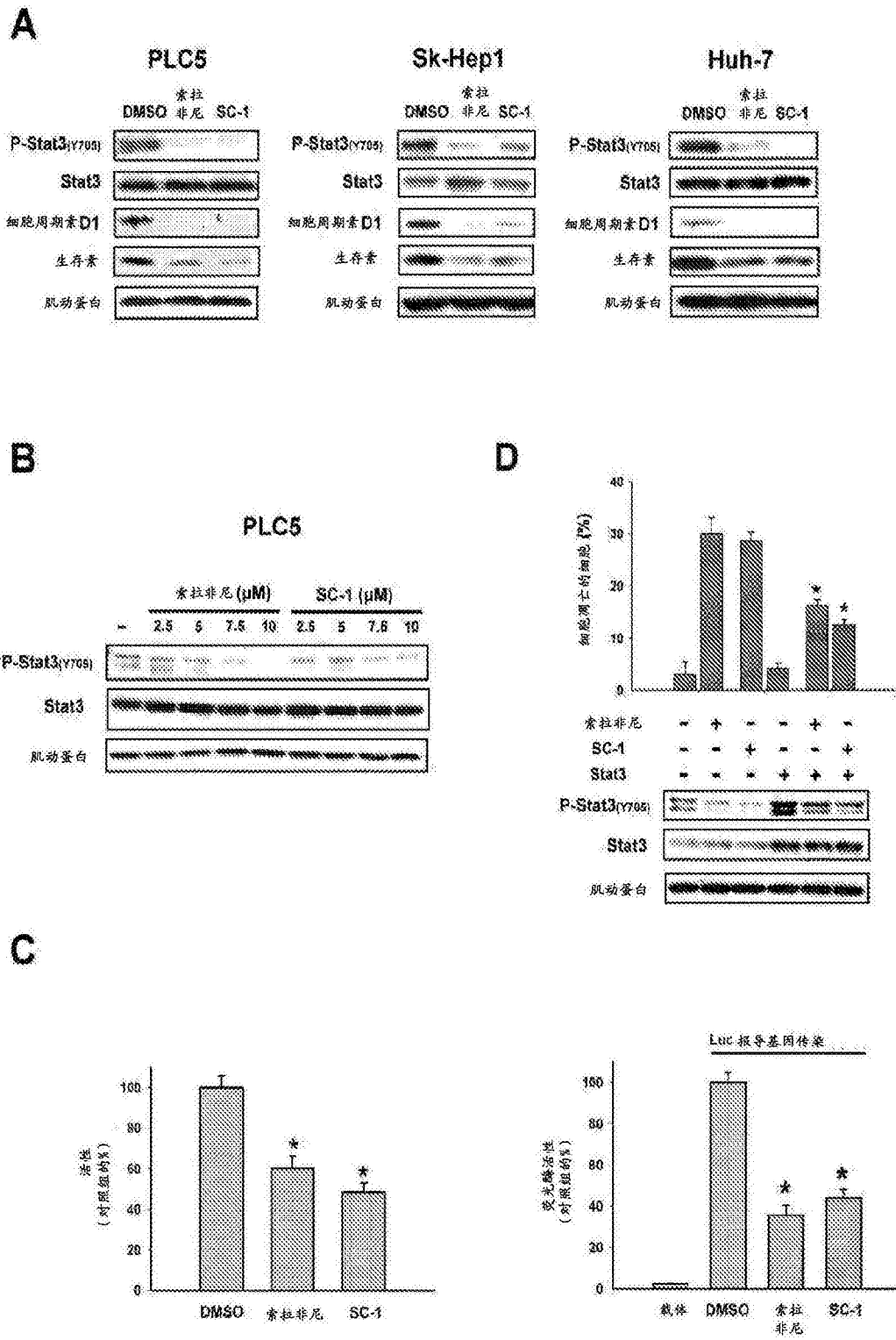


图9

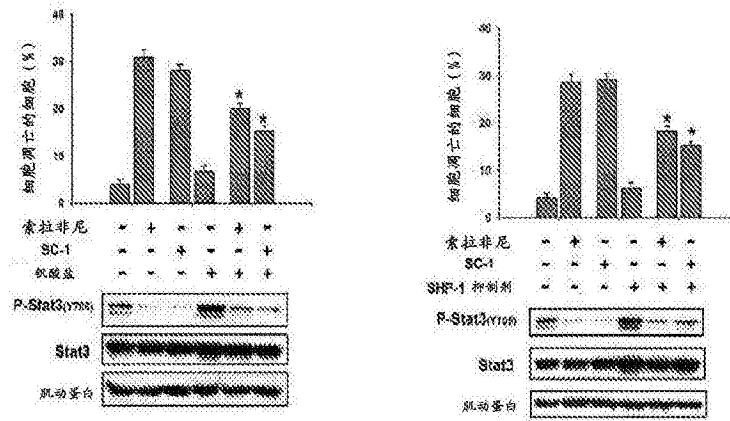
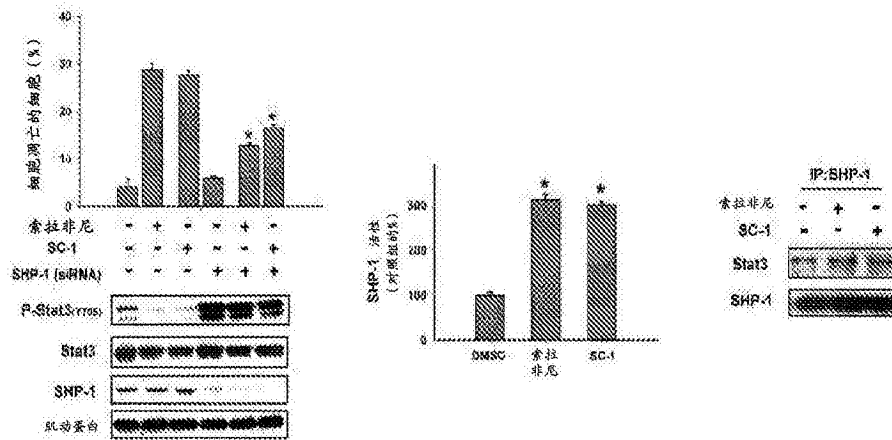
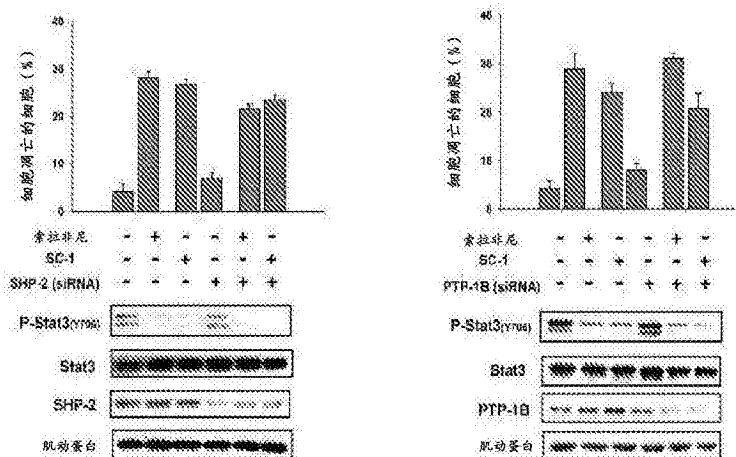
A**B****C**

图10

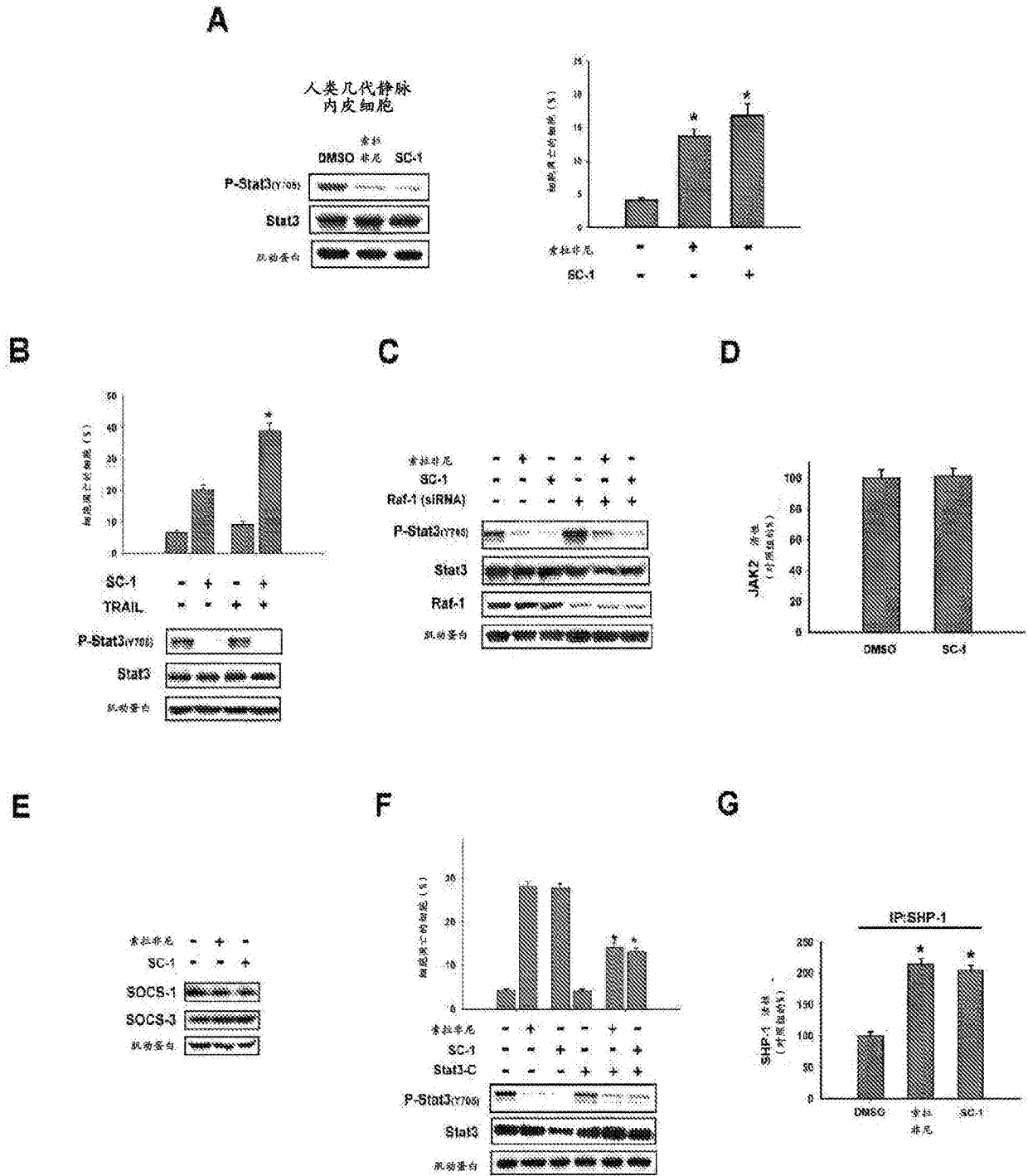


图11

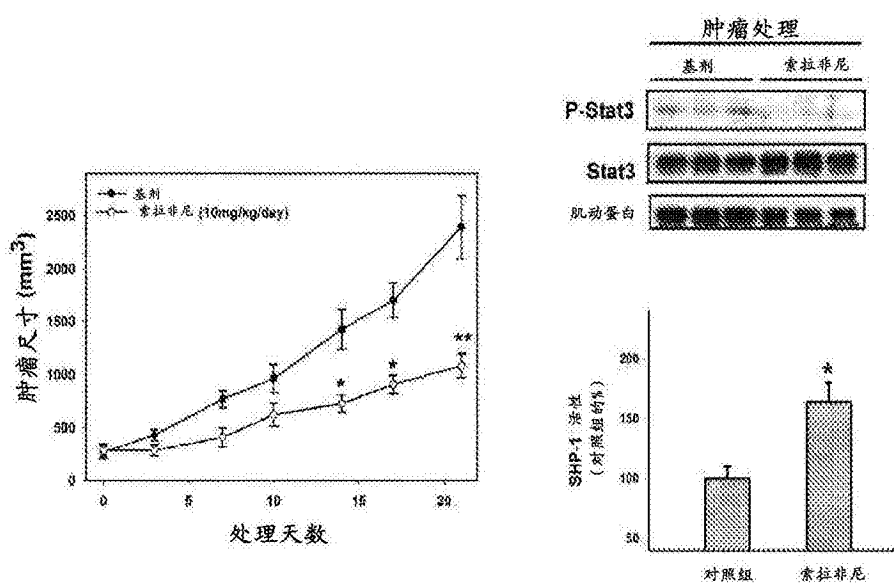
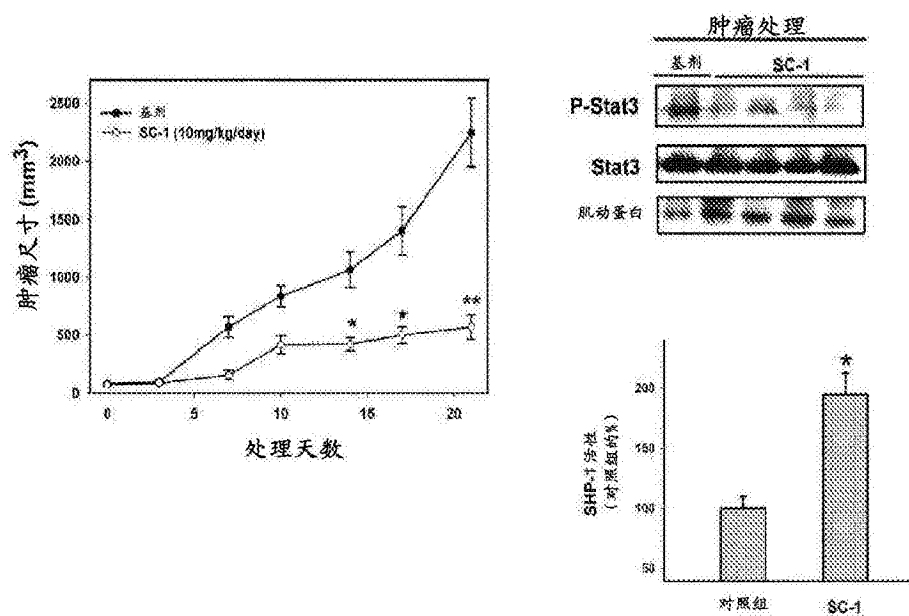
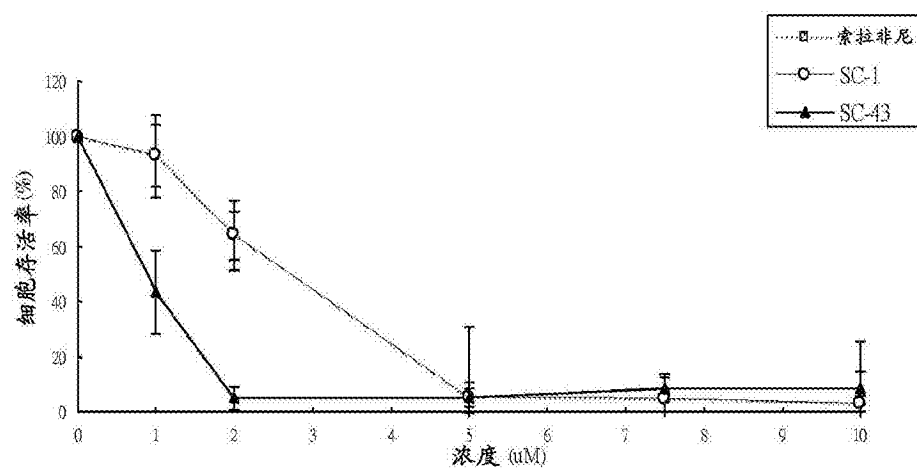
A**B**

图12

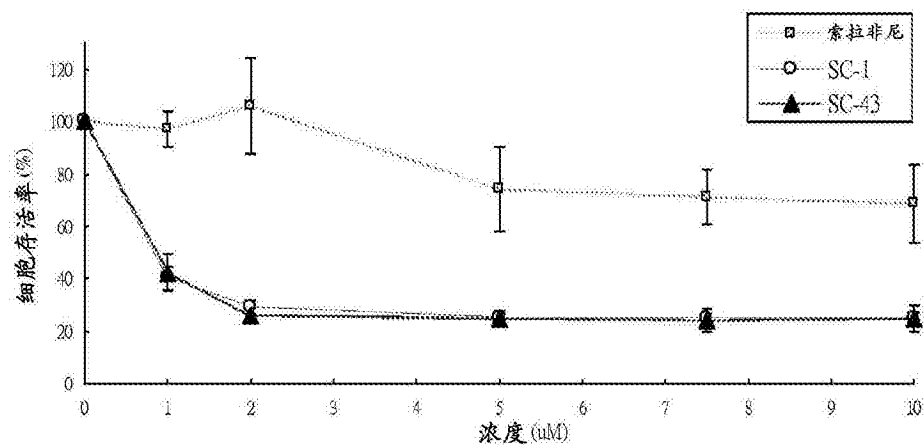
(A)

MDAMB231



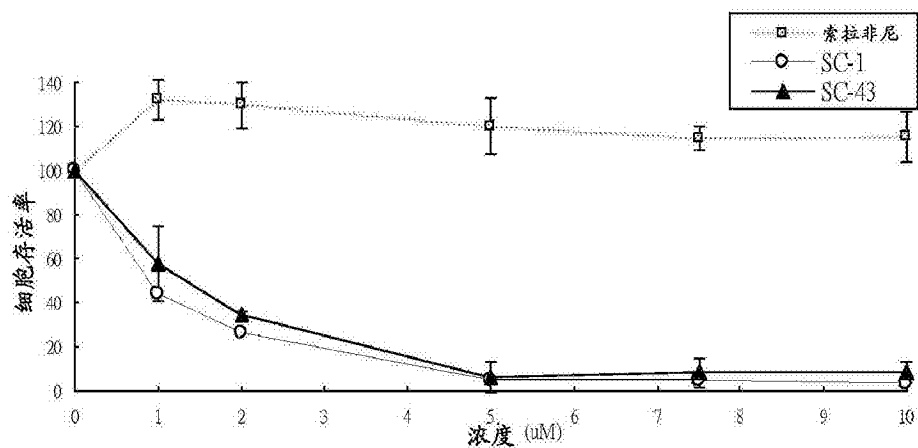
(B)

MDAMB468

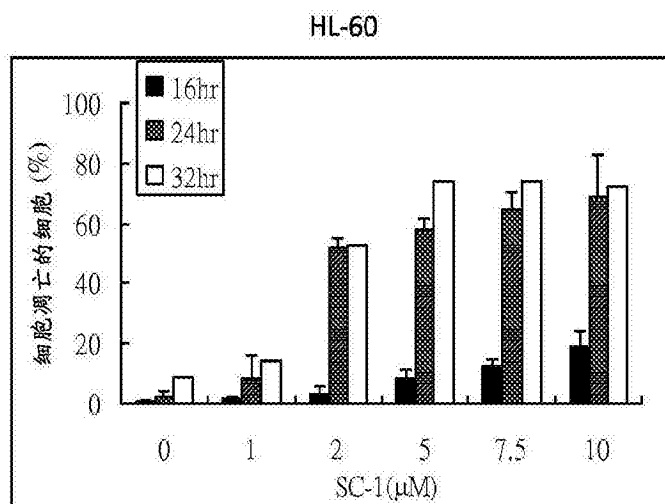


(C)

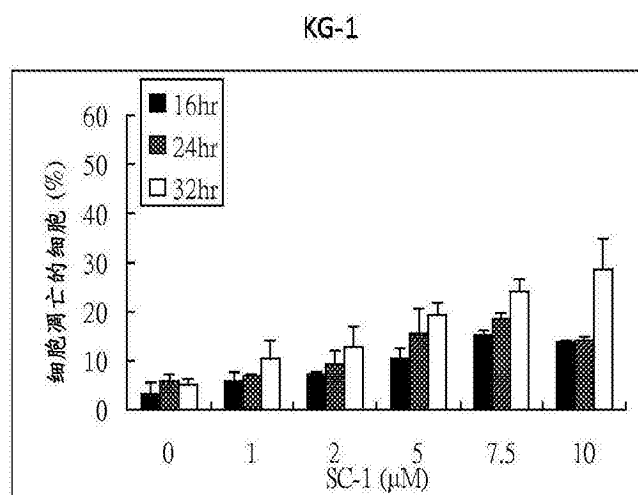
MCF-7



(D)



(E)



(F)

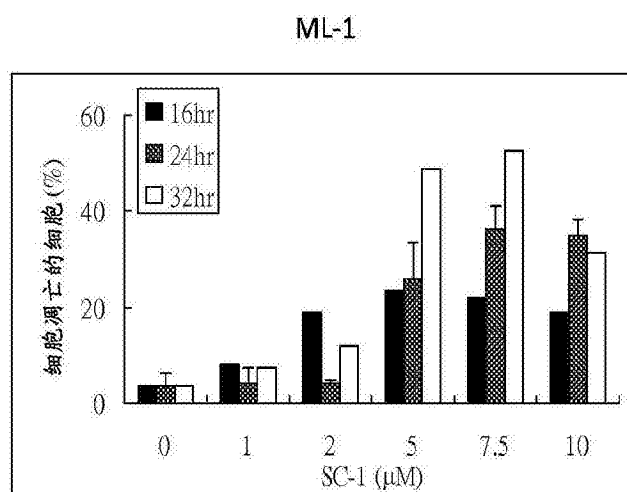


图13

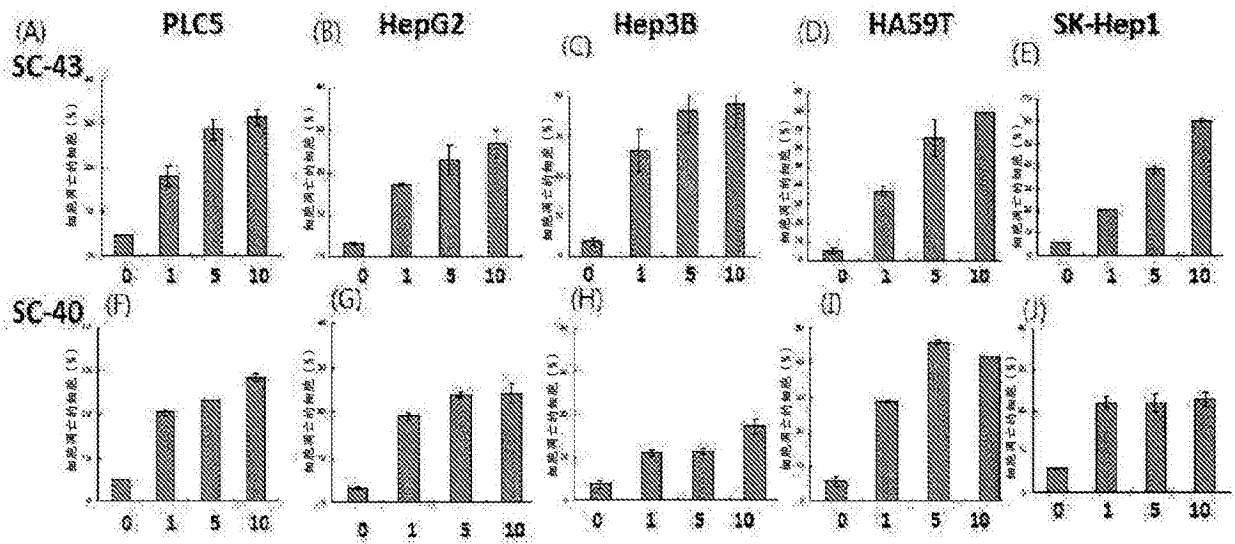


图14

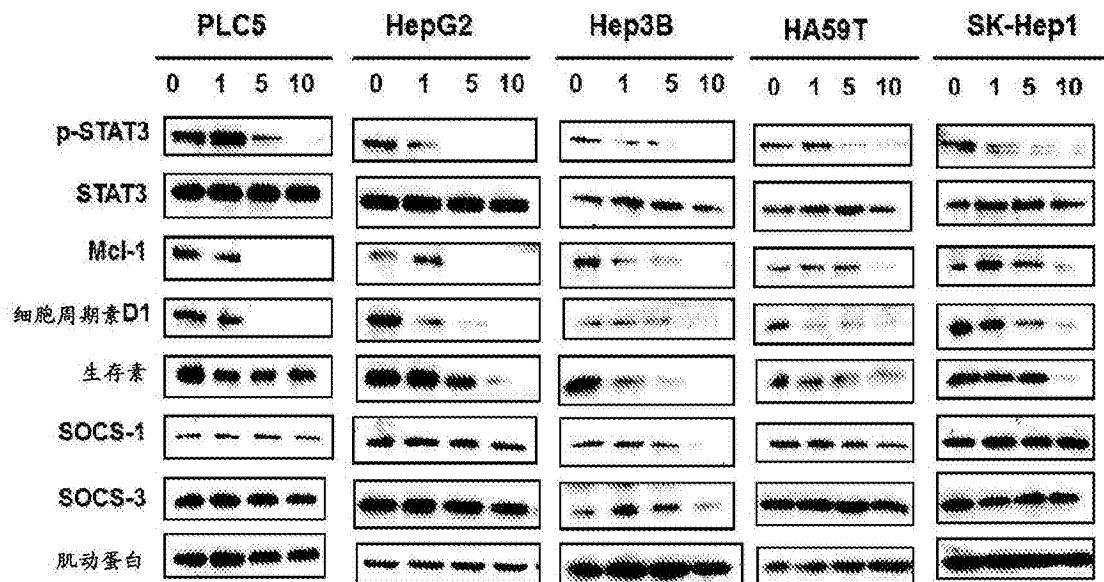


图15

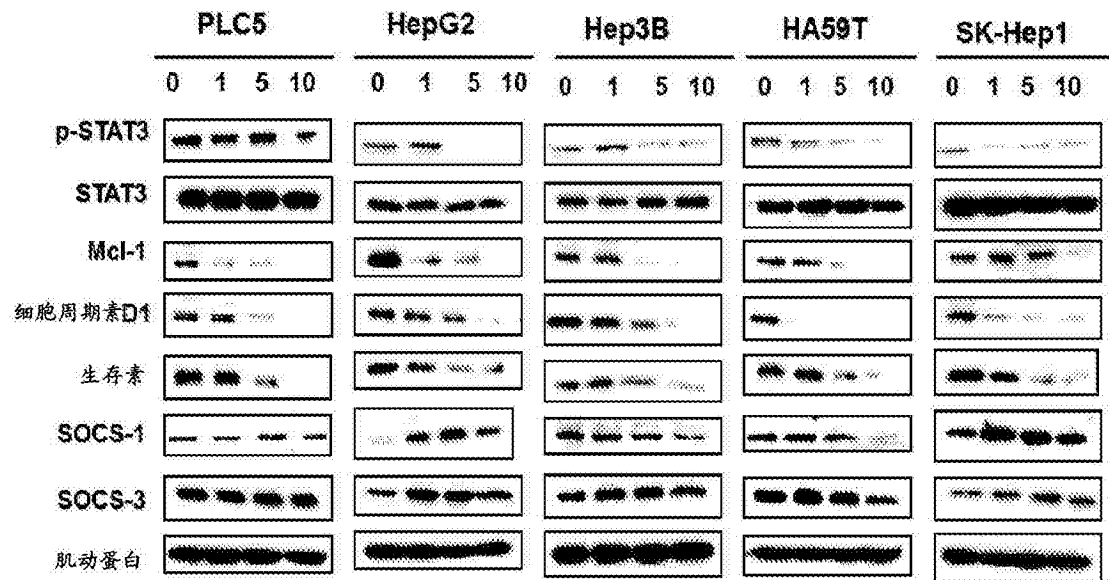
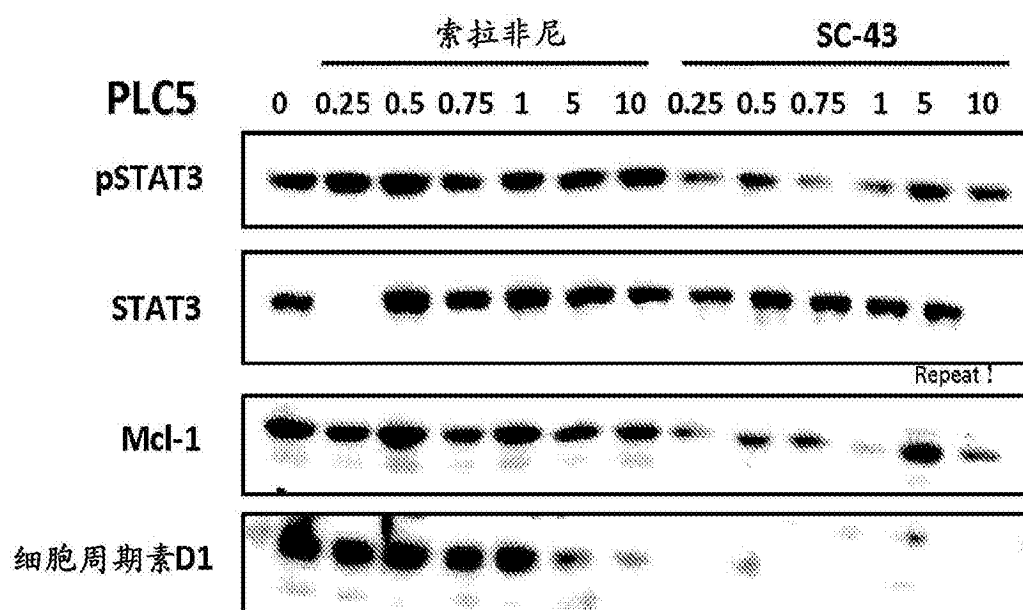


图16

(A)



(B)

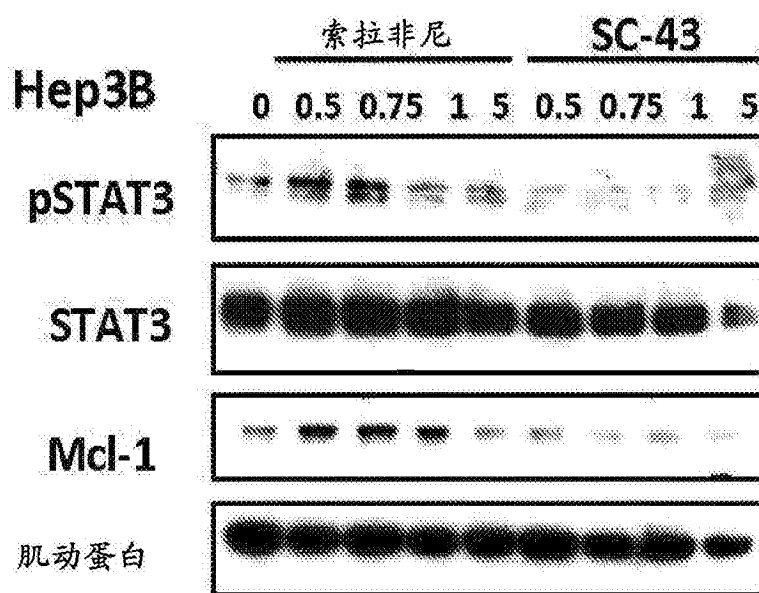


图17

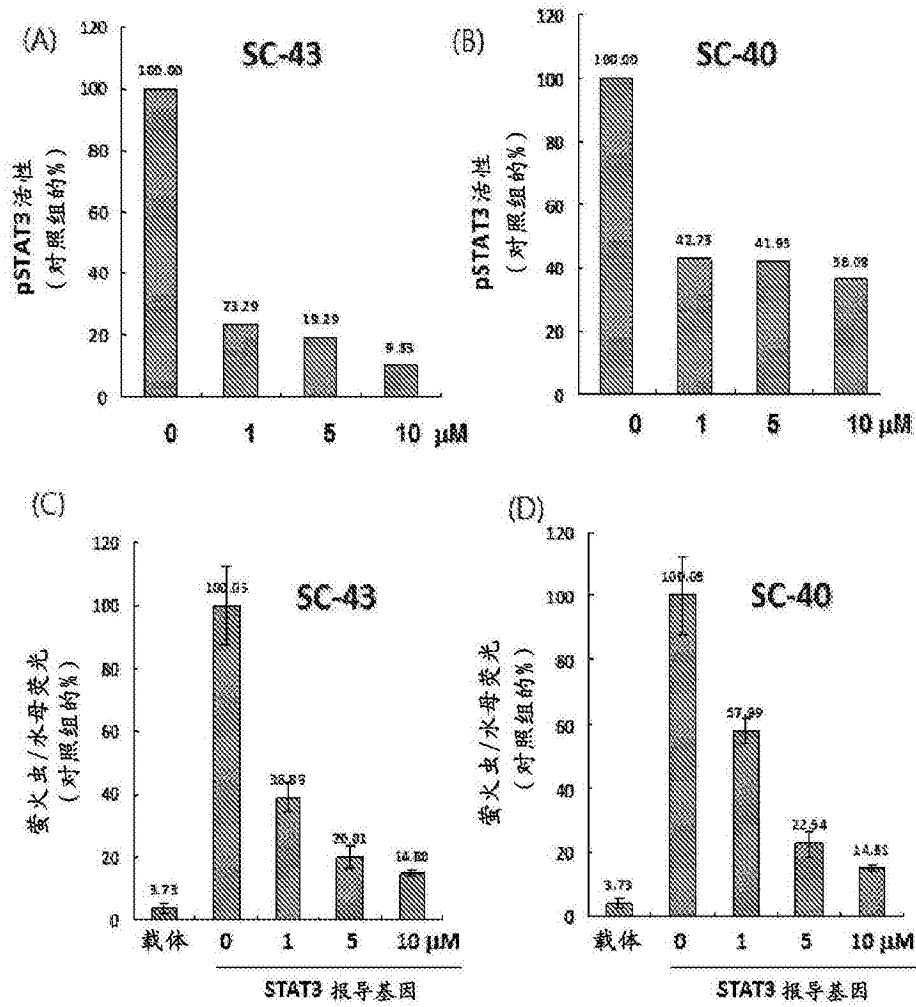


图18

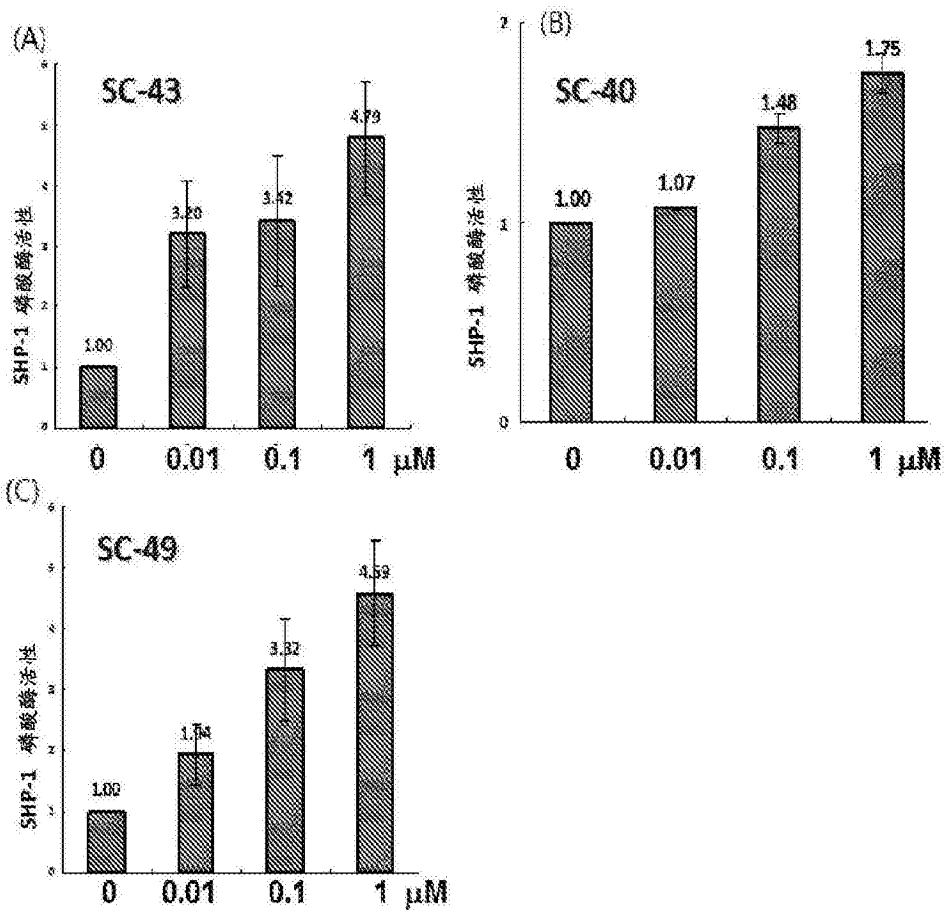


图19

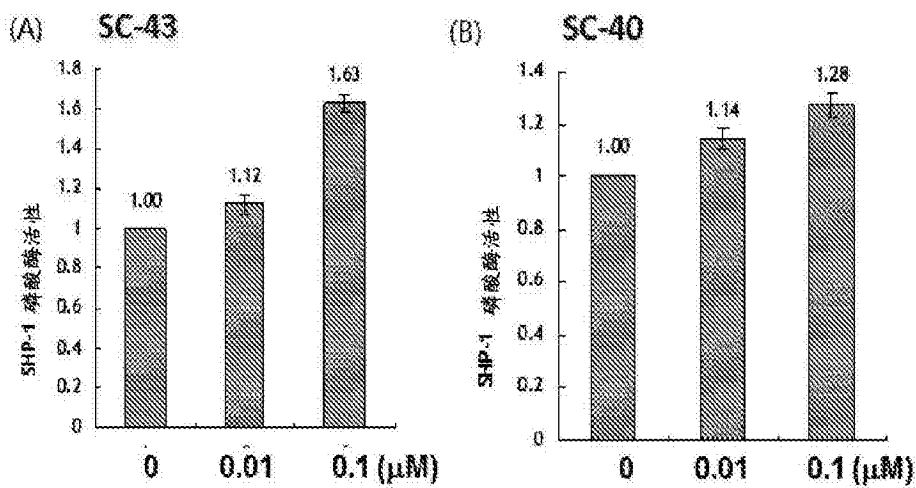


图20

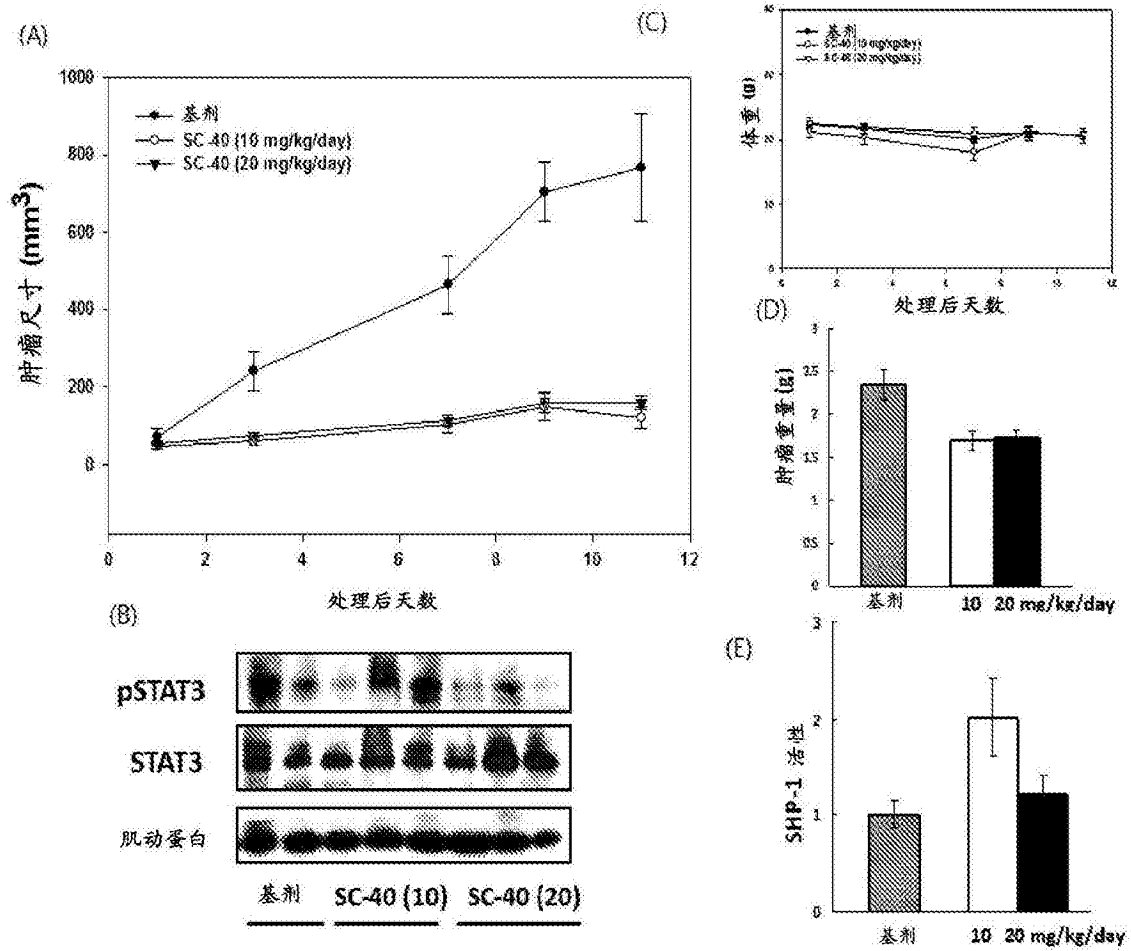


图21

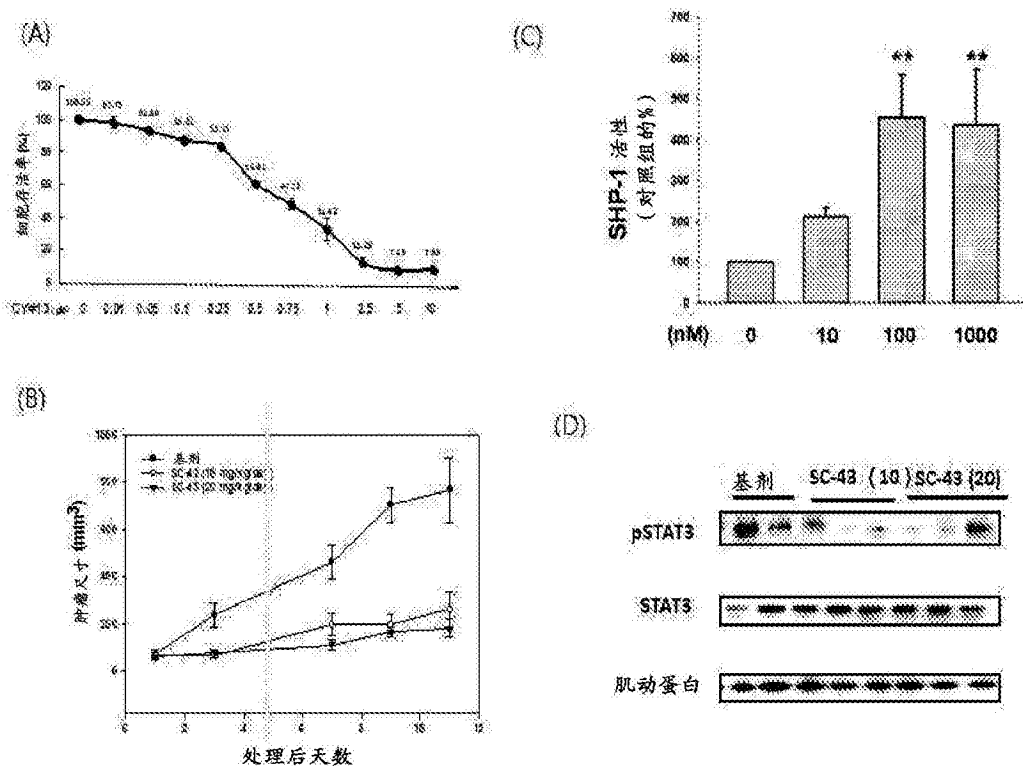


图22

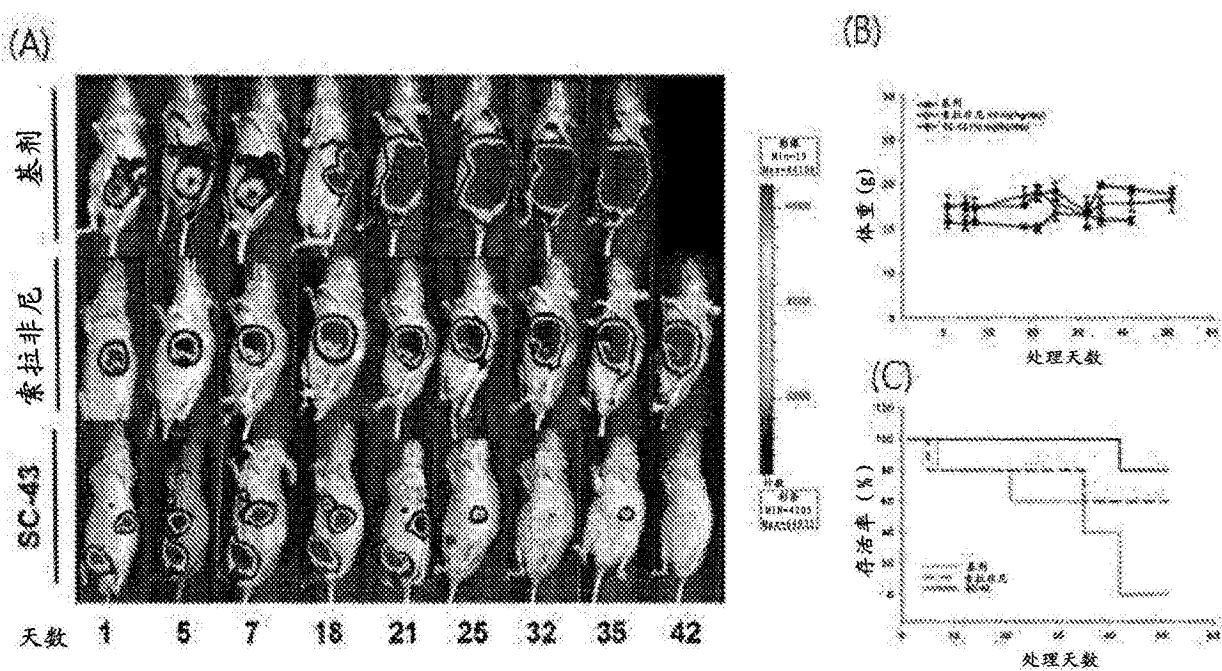


图23