

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日
2011年12月1日 (01.12.2011)

PCT

(10) 国际公布号
WO 2011/147254 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07C 229/42 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07C 227/18 (2006.01) A61P 35/02 (2006.01)
A61K 31/216 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2011/073844
- (22) 国际申请日: 2011年5月9日 (09.05.2011)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201010183509.6 2010年5月26日 (26.05.2010) CN
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 福建医科大学 (FUJIAN MEDICAL UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国福建省福州市台江区交通路88号, Fujian 350002 (CN)。
- (72) 发明人; 及
- (75) 发明人/申请人 (仅对美国): 许建华 (XU, Jianhua) [CN/CN]; 中国福建省福州市台江区交通路88号, Fujian 350002 (CN)。 刘洋 (LIU, Yang) [CN/CN]; 中国福建省福州市台江区交通路88号, Fujian 350002 (CN)。 吴丽贤 (WU, Lixian) [CN/CN]; 中国福建省福州市台江区交通路88号, Fujian 350002 (CN)。

(CN)。 林燕芳 (LIN, Yanfang) [CN/CN]; 中国福建省福州市台江区交通路88号, Fujian 350002 (CN)。
吴枝娟 (WU, Zhijuan) [CN/CN]; 中国福建省福州市台江区交通路88号, Fujian 350002 (CN)。
郭晓丹 (GUO, Xiaodan) [CN/CN]; 中国福建省福州市台江区交通路88号, Fujian 350002 (CN)。
吴敏 (WU, Min) [CN/CN]; 中国福建省福州市台江区交通路88号, Fujian 350002 (CN)。

(74) 代理人: 上海旭诚知识产权代理有限公司 (SUN-
RAY INTELLECTUAL PROPERTY ATTORNEYS);
中国上海市浦东新区东方路710号汤臣金融大厦
1212室郑立, Shanghai 200122 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP,
KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL,
PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV,
SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, ZA, ZM, ZW。

[见续页]

(54) Title: PHENYLBUTYRYL CURCUMIN DERIVATIVES AND USES FOR PREPARING ANTI-TUMOR DRUGS THEREOF

(54) 发明名称: 苯丁酰基姜黄素衍生物及其在制备抗肿瘤药物中的应用



图4 / Fig. 4

1 COMPOUND

(57) Abstract: Provided are phenylbutyryl curcumin derivatives, their preparation methods, pharmaceutical compositions containing said derivatives and uses thereof for preparing anti-tumor drugs. Said curcumin derivatives are specifically 4-[bis(2-chloroethyl)amino]phenylbutyryl curcumin and 4,4'-bis[bis(2-chloroethyl)amino]phenylbutyryl curcumin, and their pharmaceutically acceptable salts. The curcumin derivatives are effective on inhibiting various animal tumor cell transplantation models in vivo, and do not have serious toxicity in mouse.

(57) 摘要:

提供了苯丁酰基姜黄素衍生物、它们的制备方法、含有所述衍生物的药物组合物及其在制备抗肿瘤药物中的应用。所述姜黄素衍生物具体为 4-[双(2-氯乙基)氨基]苯丁酰基姜黄素和 4,4'-二[双(2-氯乙基)氨基]苯丁酰基姜黄素及其药学上可接受的盐。所述姜黄素衍生物在体内对多种动物肿瘤细胞移植模型都有显著抑制作用, 并且对小鼠未发现严重毒性。

WO 2011/147254 A1



(84) **指定国** (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF,

CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

说明书

苯丁酰基姜黄素衍生物及其在制备抗肿瘤药物中的应用

技术领域

本发明属制药领域，尤其涉及苯丁酰基姜黄素衍生物及其制备方法，以及其在制备抗肿瘤药物中的应用。

背景技术

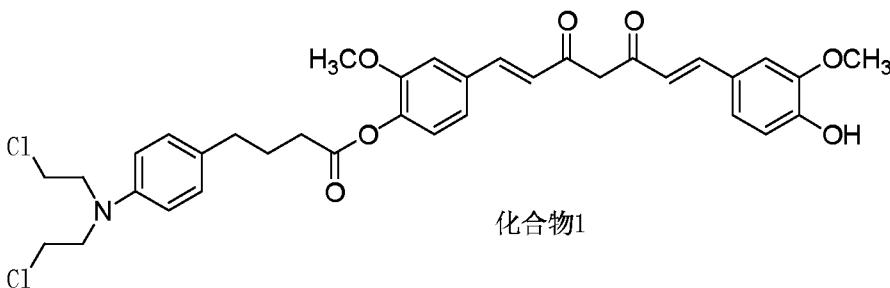
姜黄素 (Curcumin, 简称 Cur) 是从姜科姜黄属植物姜黄、莪术、郁金等的根茎中提取的有效成分，具有抗肿瘤、抗炎、抗人类免疫缺陷病毒、抗胆固醇、抗氧化等多种药理作用，具有良好的临床应用潜力。但 Cur 不稳定，在体内代谢迅速，生物利用度低，体内难以达到有效浓度，严重制约了姜黄素开发成有效的抗癌药。通过结构改造合成姜黄素衍生物，提高生物利用度、延长生物消除半衰期 $t_{1/2}$ 有重要意义。

发明内容

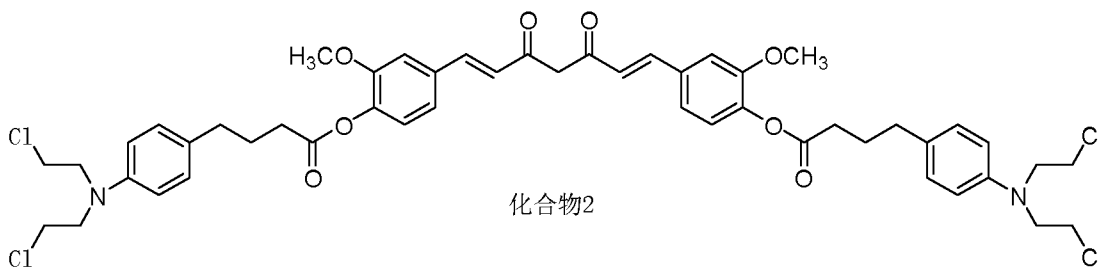
本发明的目的之一在于提供 4-[双(2-氯乙基)氨基]苯丁酰基姜黄素和 4,4'-[双(2-氯乙基)氨基]双苯丁酰基姜黄素及其药学上可接受的盐。

本发明的目的之二在于提供 4-[双(2-氯乙基)氨基]苯丁酰基姜黄素和 4,4'-[双(2-氯乙基)氨基]双苯丁酰基姜黄素及其药学上可接受的盐的制备方法。

为实现本发明的目的采用的技术方案如下：本发明所述的 4-[双(2-氯乙基)氨基]苯丁酰基姜黄素其结构式如下列化合物 1 所示；4,4'-[双(2-氯乙基)氨基]双苯丁酰基姜黄素其结构式如下列化合物 2 所示，以及本发明所述的姜黄素衍生物的盐类是下式结构的化合物 1 和化合物 2 在药学上可接受的盐类：



说明书



在药学上可接受盐包括碱金属盐、碱土金属盐、含有机碱的盐、含有机碱的盐。该可接受盐包括钙盐、镁盐、铵盐、三乙基胺盐、乙醇胺盐。

本发明所述的姜黄素衍生物和盐类的制备方法，具体步骤如下：将姜黄素溶于干燥过的二氯甲烷，加入催化量 DMAP (N,N-4-二甲基氨基吡啶)，而后加入已溶解于二氯甲烷的 4-[双(2-氯乙基)氨基]苯丁酸进行酯化反应，而后将产物经过柱层析分离纯化。在上述本发明的方法中可以先加脱水剂 DCC (二环己基碳二亚胺) 或 EDCI (1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐)，再加化学领域的通用催化量的 DMAP。

本发明所合成的化合物 1 和化合物 2 结构的姜黄素衍生物，均获得核磁共振光谱 (NMR)、红外线光谱 (IR)、紫外线光谱 (UV)、液相色谱-质谱法 (HPLC-Mass) 鉴定，在鉴定后的化合物 1 和化合物 2，依据需要而制成合适的药物学上的剂型。

本发明是保护化合物 1 或化合物 2 的药物或其药学上可接受的盐，或含有化合物 1 或化合物 2 的药物或其药学上可接受的盐组成的药物组合物或制剂。

在制备药物学上的剂型中，其载体为药学领域常规的药物载体，例如稀释剂、赋形剂、填充剂、粘合剂、崩解剂、表面活性剂、润滑剂等；其可以制成口服和其他给药方式的各种剂型，如口服液、混悬液、胶囊、片剂、丸剂、颗粒剂、及粉针注射液等；按药学领域的常规生产方法制备，其选用含有重量百分比为 0.1%—99.5% 活性成分的化合物 1 或化合物 2。也可含有 0.1%—99.5% 的化合物 1 或化合物 2 的药物组合物；为同领域一般技术人员能实现的技术。

本发明的使用量可根据用药途径，患者的年龄、体重、所治疗的疾病的类型和严重程度等变化，其服用量可以是 0.001—10g / kg 体重，可以一次或多次给药。

本发明目的之三在于 4-[双(2-氯乙基)氨基]苯丁酰基姜黄素和 4,4'-[双(2-氯乙基)氨基]双苯丁酰基姜黄素，用于制备抗肿瘤药物的应用。

姜黄素衍生物，可用于但不限于制备治疗白血病、皮肤癌、胃癌、结肠癌、肝癌、乳腺癌或前列腺癌药物。白血病优选人慢性粒细胞白血病。

说明书

本发明的有益效果：本发明所述的化合物 1 姜黄素 4-[双(2-氯乙基)氨基]苯丁酸酯在体内对多种动物肿瘤细胞移植模型均有明显抑制，尤其是对人慢性粒细胞白血病 K562 细胞裸鼠移植瘤的抑制作用可高达 60%，而且给药组裸鼠体重无明显下降，无动物发生死亡。化合物 1 对人慢性粒细胞白血病 K562 细胞株接种 NOD-SCID 小鼠构建人慢性粒细胞白血病模型，生命延长率也提高了，且未见有对小鼠的严重毒性。对小鼠肝癌 H22 在体抑瘤率为 40—75%，同样化合物 2 由于结构相似，实验证明也有同样的效果。因此，该类化合物具有比姜黄素更强的抑瘤作用。

附图说明

图 1 是化合物 1 静脉给药对小鼠肝癌 H22 移植瘤的抑制作用图

图 2 是化合物 1 口服给药对小鼠肝癌 H22 移植瘤的抑制作用图

图 3 是化合物 1 对人慢性粒细胞白血病 K562 细胞裸鼠移植瘤生长曲线图

图 4 是化合物 1 对人慢性粒细胞白血病 K562 细胞裸鼠移植瘤的作用图

图 5 和图 6 是化合物 1 对人慢性粒细胞白血病小鼠模型的小鼠大体解剖和小鼠骨髓 bcr-abl 基因表达图

图 7 和图 8 是 NS 组和化合物 1 给药对人慢性粒细胞白血病模型小鼠外周血象图

图 9 是化合物 2 对小鼠肝癌 H22 移植瘤的抑制作用图；

如图 1 所示，建立 H22 小鼠移植瘤，分别静脉给予小鼠生理盐（对照组），化合物 1：50、70mg/kg（给药组）。抑瘤率高达 60%。

如图 2 所示，建立 H22 小鼠移植瘤，分别口服给予小鼠生理盐（对照组），化合物 1：50、75、100mg/kg（给药组），姜黄素 50 mg/kg（姜黄素对照组）。给药组抑瘤率分别为 41.21%、52.93%、75.06%。姜黄素对照组（与化合物 100mg/kg 等摩尔）抑瘤率仅为 16.58%，可见化合物抑瘤作用明显比姜黄素要强。

如图 3 所示，建立人慢性粒细胞白血病 K562 细胞裸鼠移植瘤模型，分别口服给予裸鼠生理盐（对照组），化合物 1：40、60mg/kg（给药组）。于第 0、4、8、11 天用游标卡尺测小鼠瘤的长、宽、高，计算瘤体积=长×宽×高×1/2，增长百分率（%）=（实验组平均瘤体积-对照组平均瘤体积）/ 对照组平均瘤体积×100%。从图 3 可见，给药组肿瘤的生长受到明显抑制。

如图 4 所示，建立 K562 细胞裸鼠移植瘤模型，分别口服给予裸鼠生理盐（对照组），化合物 1：40、60mg/kg（给药组）。抑瘤率分别为 66.6%、56.7%。

如图 5、图 6 所示，用 NOD-SCID 小鼠构建人慢性粒细胞白血病模型，对照组小鼠大体解剖，腹腔内见大量血性腹水，并出现实体瘤。小鼠骨髓细胞

说明书

RT-PCR 均检测到人人慢性粒细胞白血病的特征基因 *bcr-abl*，说明人慢性粒细胞白血病细胞 K562 归巢至 NOD-SCID 小鼠骨髓。

如图 7、图 8 所示，NOD-SCID 小鼠人慢性粒细胞白血病模型，分别口服给予小鼠生理盐水（对照组），化合物 1：60mg/kg（给药组），给药组外周血象幼稚细胞亦明显少于对照组。

如图 9 所示，分别口服给予小鼠生理盐（对照组），化合物 2：35、50、75、115mg/kg（给药组），姜黄素 50 mg/kg（姜黄素对照组）。给药组抑瘤率分别为 27.43%、32.25%、62.60%、58.39%。姜黄素对照组（与化合物 100mg/kg 等摩尔）抑瘤率仅为 13.42%，可见化合物 2 的抑瘤作用明显比姜黄素要强。

具体实施方式

下列结合附图和实例对本发明进行详细说明

实施例 1 4-[双(2-氯乙基)氨基]苯丁酰基姜黄素（化合物 1）的合成

EDCI 1.92g (10mmol) 溶于无水二氯甲烷 200ml 中，在冰浴下搅拌并加入姜黄素 7.36g (20mmol)，DMAP 0.244g (2mmol)，再缓慢滴加溶有 4-[双(2-氯乙基)氨基]苯丁酸 3.04g (10mmol) 的二氯甲烷 200ml，室温下继续搅拌反应 6 小时。用蒸馏水洗涤，有机相用无水硫酸镁干燥后，过滤浓缩得粗品，粗品用中压制备色谱分离，反向 C18 柱，流动相甲醇：水 50%→100%（体积百分比）梯度洗脱，得到 4-[双(2-氯乙基)氨基]苯丁酰基姜黄素纯品 1.30g，产率 20%，化学结构式如下：



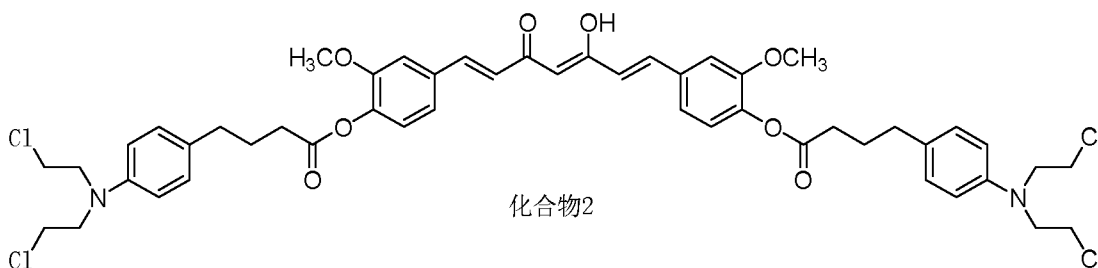
分子式 $C_{35}H_{37}Cl_2NO_7$, mp 100-102 °C

1H NMR (D6-DMSO): δ 1.88(t, 2H, -COCH₂CH₂CH₂Ph), 2.51(t, 2H, -COCH₂CH₂CH₂Ph), 2.58(m, 2H, -COCH₂CH₂CH₂Ph), 3.62(t, 4H, -NCH₂CH₂Cl), 3.71(t, 4H, -NCH₂CH₂Cl), 3.85 (s, 6H, 2Ar-OCH₃), 6.14 (s, 1H, -COCH=C(OH)-), 6.70 (d, 2H, 2-CH=CH-Ar), 6.78-6.99(m, 2H), 7.13-7.19(m, 2H), 7.33(m, 2H), 7.51 (d, 2H), 7.58 (d, 2H), 7.62 (d, 2H, 2Ar-CH=), 9.72 (s, 1H, Ar-OH); HPLC-MS m/z: 654.2(M+1)

说明书

实施例 2 4,4'-[双(2-氯乙基)氨基]双苯丁酰基姜黄素(化合物 2)的合成

EDCI 1.92g(10mmol)溶于无水二氯甲烷 100ml 中,在冰浴下搅拌并加入姜黄素 1.84g(5mmol), DMAP 0.122g(1mmol),再缓慢滴加溶有 4-[双(2-氯乙基)氨基]苯丁酸 3.04g(10mmol)的二氯甲烷 200ml,室温下继续搅拌反应 6 小时。用蒸馏水洗涤,有机相用无水硫酸镁干燥后,过滤浓缩得粗品,粗品用中压制备色谱分离,反向 C18 柱,流动相甲醇:水 50%→100%(体积百分比)梯度洗脱,得到 4,4'-[双(2-氯乙基)氨基]双苯丁酰基姜黄素纯品(化合物 2)1.88g,产率 40%,化学结构式如下:



$C_{49}H_{54}N_2O_8$, mp 58-60°C, 1H NMR ($CDCl_3$): δ 2.04(m,4H, $-COCH_2CH_2CH_2Ph$), 2.29(t,4H, $-COCH_2CH_2CH_2Ph$), 2.60(m,4H, $-COCH_2CH_2CH_2Ph$), 3.63(t,4H, $-NCH_2CH_2Cl$), 3.70(t,4H, $-NCH_2CH_2Cl$), 3.87(s,6H, 2Ar-OCH₃), 6.58(d,2H, J=16Hz, 2-CH=CH-Ar), 6.63(d,4H, J=8Hz), 6.66(s, 1H, $-COCH=C(OH)-$), 7.03(s,2H), 7.05(m,2H), 7.08(m,2H), 7.12(d,4H, J=8Hz), 7.17(m,2H), 7.51(d,2H), 7.53(d,2H), 7.62(d,2H, J=16Hz, 2Ar-CH=); HPLC-MS m/z: 941.3(M+1)

实施例 3 化合物 1 对小鼠肝癌 H22 移植瘤模型的作用

3.1 材料

8~12 周龄昆明种健康小鼠,雌性,体重为(20±2)g;小鼠由福建医科大学实验动物中心提供(合格证号 SCXK(闽)200420002)。小鼠肝癌细胞株 H22。化合物 1 使用前用配成所需浓度。

3.2 方法

3.2.1 荷瘤小鼠模型的建立

H22 肿瘤细胞传两代以上,调整细胞数至 $10^7/ml$, 0.2mL/只接种于小鼠右前肢皮下,接种 2 只,待约两周,剥瘤,匀浆,再接种 80 只。

说明书

3.2.2 分组

A: 共分为3组: 接种瘤株 24 h 后的小鼠随机分成3组: I组为生理盐水对照组, 化合物 1 采用上述实施例方法制得的, 以下同, II组为化合物 1 低剂量组 (化合物 1 50mg/kg), III组为化合物 1 高剂量组 (70mg/kg), 给药方法为尾静脉注射, 0.1ml/10g。

B: 共分为5组: 接种瘤株 24 h 后的小鼠随机分成5组: I组为生理盐水组 (即肿瘤对照组), II组为化合物 1 低剂量组 (剂量为 50mg/kg), III组为化合物 1 中剂量组 (剂量为 75mg/kg), IV组为化合物 1 高剂量组 (剂量为 100mg/kg), V组为 Cur 组 (剂量为 50mg/kg, 与高剂量IV组等摩尔), 给药方法为灌胃, 0.1ml/10g。

3.2.3 抑瘤率

处死小鼠后剥瘤称瘤质量, 计算抑瘤率. 肿瘤抑制率 (%) = 对照组平均瘤质量 - 实验组平均瘤质量 / 对照组平均瘤质量 × 100%。

3.3 结果

3.3.1 化合物1静脉给药的抑瘤作用

观察不同给药剂量的抑瘤作用, 可见化合物1对小鼠肝癌H22移植瘤率具有明显的抑制作用 (见表1, 说明书附图的图1)。

表 1 化合物 1 静脉给药对小鼠肝癌 H22 移植瘤抑制作用

组 别	剂 量 mg/kg × day	鼠 数 前/后	瘤 重(g) ($\bar{x} \pm s$)	抑 瘤 率 (%)
NS	0×10	10/10	1.01±0.47	0
低剂量组	50×7	10/9	0.40±0.15	60.84**
高剂量组	70×5	10/6	0.335±0.16	66.83**

注: NS (生理盐水对照组), 与 NS 组相比, * P<0.05; ** P<0.01.

3.3.2 化合物1口服给药的抑瘤作用

观察口服给药6天的抑瘤作用。可见随剂量的增加抑瘤率逐渐提高, 呈现良好的量效关系。给药组 (100mg/kg) 比等摩尔的对照药姜黄素 (50 mg/kg) 抑瘤率有显著提高, 而且大剂量未见有小鼠死亡, 可见化合物1较安全。(见表2及说明书附图的图2)

说明书

表 2 口服给药对小鼠肝癌 H22 移植瘤的抑制作用

组 别	鼠 数 前/后	体 重($\bar{x} \pm s$)		瘤 重 (g) ($\bar{x} \pm s$)	抑 瘤 率 (%)
		前	后		
NS	10/10	20.26±1.68	26.43±4.00	1.60±0.24	0
化合物 1 (50mg/kg)	10/10	20.79±1.63	22.12±2.48	0.94±0.33	41.21**
化合物 1 (75mg/kg)	10/10	21.02±1.54	22.00±3.98	0.76±0.26	52.93**
化合物 1 (100mg/kg)	10/10	21.10±1.57	18.64±1.91	0.40±0.15	75.06**
姜黄素 50mg/kg	10/10	21.17±1.62	26.61±3.67	1.34±0.25	16.58

注：与 NS 组相比，* P<0.05; ** P<0.01. Cur 为姜黄素

实施例 4 化合物 1 对人慢性粒细胞白血病 K562 细胞裸鼠移植瘤模型的作用

4.1 材料

4-6周龄SPF级裸鼠,雄性,购自由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供(许可证号: SCXX(沪)2007-0005),在SPF实验室饲养。人类慢性粒细胞白血病K562细胞购自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库。化合物1使用前配成所需浓度。

4.2 方法

4.2.1 荷瘤小鼠模型的建立

K562 细胞传两代以上,调整细胞数至 5×10^7 /ml, 0.2mL/只接种于裸鼠右前肢皮下, 接种 30 只。

4.2.2 分组

共分为 3 组: 接种瘤株 6 天后, 根据小鼠肿瘤大小, 将小鼠分层随机随机分成 3 组: I 组为生理盐水对照组, II 组为化合物 1 低剂量组 (40mg/kg), III 组为化合物 1 高剂量组 (60mg/kg), 给药方法为灌胃给药, 0.1ml/10g。

4.2.3 瘤增长百分率

分别于第 0、4、8、11 天用游标卡尺测小鼠瘤的长、宽、高, 计算瘤体积=长×宽×高×1/2, 增长百分率 (%) = (实验组平均瘤体积 - 对照组平均瘤体积) / 对照组平均瘤体积×100%。

说明书

4.2.4 抑瘤率

处死小鼠后剥瘤称瘤质量，计算抑瘤率。肿瘤抑制率(%) = (对照组平均瘤质量 - 实验组平均瘤质量) / 对照组平均瘤质量 × 100%。

4.3 结果

4.3.1 瘤增长百分率

各组荷瘤小鼠肿瘤生长的动态变化见说明书附图的图3，可见给药组的肿瘤增长速率明显比NS对照组要低。

4.3.2 口服给药的抑瘤作用

观察口服给药11天的抑瘤作用。结果显示化合物1能明显抑制K562细胞裸鼠移植瘤的生长,其抑瘤率分别为66.6%、56.7%，经统计学处理(t检验)具有显著性差异，具有一定的量效关系(见表3，说明书附图的图4)。与生理盐水组比较,给药组裸鼠体重无明显下降，无动物发生死亡，提示化合物在提高药物抗癌作用的同时并没有增加药物的毒性。试验表明化合物1对人慢性粒细胞白血病K562细胞裸鼠移植瘤模型具有显著的抑瘤作用。

表3 口服给药对人慢性粒细胞白血病K562细胞裸鼠移植瘤的抑制作用

组别	鼠数 前/后	体重($\bar{x} \pm s$)		瘤重(g) ($\bar{x} \pm s$)	抑瘤率 (%)
		前	后		
NS	6/6	19.9±1.8	21.1±1.0	1.36±1.19	0
化合物1(40mg/kg)	6/6	19.6±1.9	20.6±1.6	0.46±0.17	65.90**
化合物1(60mg/kg)	6/6	20.7±1.6	21.5±1.2	0.50±0.40	57.70**

注：与NS组相比，* P<0.05;** P<0.01.

实施例5 化合物1对人慢性粒细胞白血病小鼠模型的作用

5.1 材料

5.1.1 NOD-SCID小鼠

雌性和雄性兼用，4~6周龄，体重18~22g，中国医学科学院实验动物研究所提供，许可证编号：SCXK(京)2005-0013。NOD-SCID小鼠在SPF实验室层流架内带盖鼠盒中饲养(符合SPF标准)。标准颗粒饲料,饮水,垫料及一切与鼠接触物品均经灭菌处理。

5.1.2 人白血病细胞株(K562)

说明书

购自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库，本室常规传代培养，采用对数生长期的细胞做动物体内移植。

5.1.3 化合物1使用前配成所需浓度。

5.2 方法

5.2.1 小鼠慢性粒细胞白血病模型的建立

NOD-SCID 小鼠接受 2.0 Gy X 射线全身照射，次日取对数生长期 K562 细胞用于移植，尾静脉一次性注射 1×10^7 cell/ 鼠。

5.2.2 化合物 1 对 NOD-SCID 小鼠慢性粒细胞白血病模型作用

NOD-SCID 小鼠移植 K562 细胞后，随机分组，分设生理盐水对照组及给药治疗组，每组四只。空白对照组给予生理盐水 0.2ml/只灌胃，给药治疗组给予化合物 1 60mg/kg 灌胃，于移植后两周开始给药，连续给药 5 天，给药治疗组停药 5 天后再连续用药 8 天。给药期间密切观察小鼠一般情况、体重及食量，评估药物毒性及动物对药物的耐受程度以调整给药方案。记录各实验组小鼠生存时间，观察时间为三个月，K562 细胞移植后存活两个月以上者为长期生存。

5.2.3 外周血涂片及白细胞计数

各实验组小鼠分别于接种前和接种后 1 周、2 周、3 周、4 周、5 周，取尾静脉血计数白细胞总数，并制备血涂片，经瑞氏-吉姆萨染色，油镜下分类、计数。

5.3 结果

5.3.1 NOD-SCID 小鼠人慢性粒细胞白血病模型构建

生理盐水对照组小鼠移植人慢性粒细胞白血病细胞 K562 后，自然存活时间为 32.5 ± 9.0 天。动物皮毛起皱、萎靡少动、步态不稳，体重逐渐减轻。移植后三周外周血白细胞明显升高，可达移植前 2-10 倍，外周血涂片见大量幼稚细胞。死亡小鼠大体解剖，腹腔内见大量血性腹水，并出现实体瘤，脾大不明显（见说明书附图 5）。生理盐水对照组 NOD-SCID 小鼠骨髓细胞 RT-PCR 均检到人 bcr-abl 基因（见说明书附图 6），说明人慢性粒细胞白血病细胞 K562 归巢至 NOD-SCID 小鼠骨髓。证明人慢性粒细胞白血模型构建成功。

5.3.2 口服给药对小鼠慢性粒细胞白血病作用

给药治疗组截至结束为止 4 只小鼠中有 2 只尚存活，生存时间已达 85 天，实现长期生存，其余小鼠生存时间较生理盐水对照组明显延长，外周血白细胞数明显低于生理盐水对照组，外周血象幼稚细胞亦明显少于对照组。（见表 4、5，及说明书附图 7、8），试验表明实施例 1 所合成的化合物 1 对小鼠慢性粒细胞白血

说明书

病有作用。

表 4 口服给药对慢性粒细胞白血病小鼠生存时间影响

组别	剂量 (mg/kg)	给药前后体重 前 / 后 ($\bar{x} \pm s$)	长期生存	生存时间 (d) ($\bar{x} \pm s$)	生存时间 延长率 (%)
NS	0	26.3±2.5/ 28	0/4	32.5±9.0	0
化合物 1	60	25.5±2.1/ 23.3±0.6	2/4	68.5±24.4	110.77*

*: $P < 0.05$, VS NS 组。

表 5 各实验组小鼠外周血白细胞数 ($\times 10^9/L$)

组别	K562 细胞接种后时间 (周)					
	0	1	2	3	4	5
NS	4.02±1.02	3.31±1.34	4.68±1.52	14.03±5.52	8.91±2.66	死亡
化合物 1	3.92±0.34	2.53±0.70	2.52±1.27	7.86±2.52	7.35±3.11	6.47±3.86

实施例 6 化合物 2 对小鼠肝癌 H22 移植肿瘤的抑制作用

化合物 2 为上述实施例方法制得的，本实例的测试方法同化合物 1。将化合物 2 使用前配成所需浓度。取肿瘤生长良好的种鼠脱颈处死，无菌条件下剥取瘤块，取生长状态良好的肿瘤组织，匀浆过滤制成单细胞悬液，调整细胞数为 $1.0 \times 10^7/ml$ ，每只接种 0.2ml 于小鼠右腋下，建立 H22 小鼠移植瘤模型。接种次日，将小鼠按体重随机分组，每组 9 只小鼠，并且记录给药前体重。按 0.2ml/10g 体重给药，每天一次，共 8 次口服给药。于末次给药后 24h 脱颈处死，剥瘤拍照并称重（见表 6 和说明书附图 9），计算肿瘤平均重量及肿瘤抑制率。肿瘤抑制率(%)=[对照组平均瘤质量-实验组平均瘤质量] / 对照组平均瘤质量 $\times 100\%$ 。

说明书

表 6 化合物 2 口服给对小鼠肝癌 H22 移植瘤的抑制作用

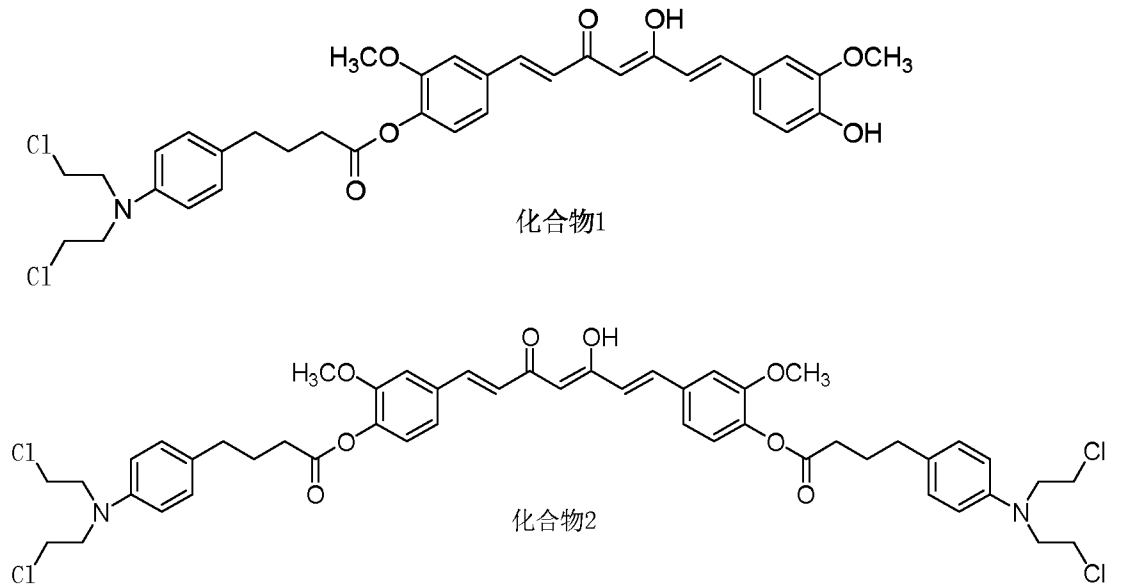
组别	鼠数 前/后	体重 ($\bar{x}\pm s$) 前/后	瘤重 (g) ($\bar{x}\pm s$)	抑瘤率 (%)
NS	9/9	20.08 \pm 1.03/28.9 \pm 3.15	1.24 \pm 0.64	
姜黄素 50mg/kg \times 8	9/9	19.83 \pm 0.96/30.08 \pm 3.77	1.08 \pm 0.33	13.42
阳性对照 20mg/kg \times 8	9/9	19.96 \pm 1.19/21.56 \pm 3.28	0.90 \pm 0.20	27.25
化合物 2 35mg/kg \times 8	9/9	20.52 \pm 1.23/26.23 \pm 3.41	0.90 \pm 0.36	27.43
化合物 2 50mg/kg \times 8	9/8	20.38 \pm 1.24/23.74 \pm 1.85	0.84 \pm 0.42	32.25
化合物 2 75mg/kg \times 8	9/9	20.56 \pm 1.82/21.08 \pm 1.01	0.46 \pm 0.26	62.60**
化合物 2 115mg/kg \times 8	9/9	20.14 \pm 1.52/18.69 \pm 2.55	0.52 \pm 0.16	58.39**

注：与 NS 组相比，*P < 0.05；**P < 0.01。

本发明以上述实施例同样的方式也可验证包括化合物 1 或化合物 2 或其药学上可接受盐以及含有化合物 1 或化合物 2 或其药学上可接受盐形式的药物组合物具有类似的特性；药学上可接受盐的例子包括碱金属盐如钠盐或钾盐，碱土金属盐如钙盐或镁盐，含有机碱的盐如铵盐，或含有机碱的盐如三乙胺盐或乙醇胺盐。

权利要求书

- 1、 结构式为下述化合物 1 的 4-[双(2-氯乙基)氨基]苯丁酰基姜黄素和结构式为下述化合物 2 的 4,4'-[双(2-氯乙基)氨基]双苯丁酰基姜黄素及其药学上可接受的盐:



- 2、 权利要求 1 所述的化合物 1 或化合物 2 的制备方法, 其特征在于: 将姜黄素溶于干燥过的二氯甲烷, 加入催化量 DMAP, 而后加入已溶解于二氯甲烷的 4-[双(2-氯乙基)氨基]苯丁酸进行酯化反应获得化合物 1 或化合物 2 产物, 而后将化合物 1 或化合物 2 产物经过柱层析分离纯化得到纯化的化合物 1 或化合物 2 产物。
- 3、 根据权利要求 2 的化合物 1 或化合物 2 的制备方法, 其特征在于所述的二氯甲烷溶解脱水剂 DCC 或 EDCI 后再溶解姜黄素, 而后加入催化量的 DMAP。
- 4、 权利要求 1 所述的化合物 1 或化合物 2 的姜黄素衍生物及其药学上可接受的盐在制备抗肿瘤药物中的应用。
- 5、 含有权利要求 1 所述的化合物 1 或化合物 2 姜黄素衍生物或其药学上可接受的盐组合成的药学上可接受的药物组合物或制剂在制备抗肿瘤药物的应用。
- 6、 根据权利要求 4 或 5 所述的应用, 其特征在于: 所述的抗肿瘤药物用于制备治疗白血病、淋巴瘤、皮肤癌、胃癌、结肠癌、肝癌、乳腺癌、前列腺癌或其

权 利 要 求 书

他恶性肿瘤的药物。

7、一种含有权利要求 1 所述的药物或其药学上可接受的盐，或含有权利要求 1 所述的药物或其药学上可接受的盐组成的药物组合物或制剂。

8、权利要求 1 所述的 4-[双(2-氯乙基)氨基]苯丁酰基姜黄素的单酯或双酯或其药学上可接受的盐或含有 4-[双(2-氯乙基)氨基]苯丁酰基姜黄素的单酯或双酯及其药学上可接受的盐组合成的药物组合物或制剂在制备抗肿瘤药物中的应用。

9、根据权利要求 4 或 5 或 8 所述的应用，其特征在于：所述的肿瘤为白血病、皮肤癌、胃癌、结肠癌、肝癌、乳腺癌或前列腺癌药物。

10、根据权利要求 9 所述的的应用，其特征在于：白血病为人慢性粒细胞白血病。

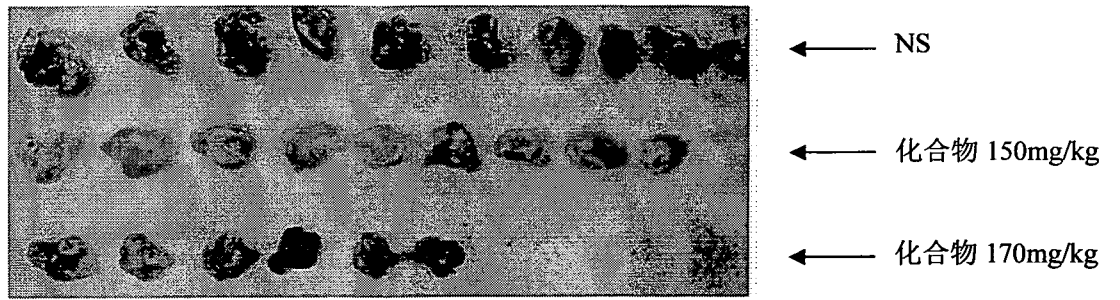


图 1

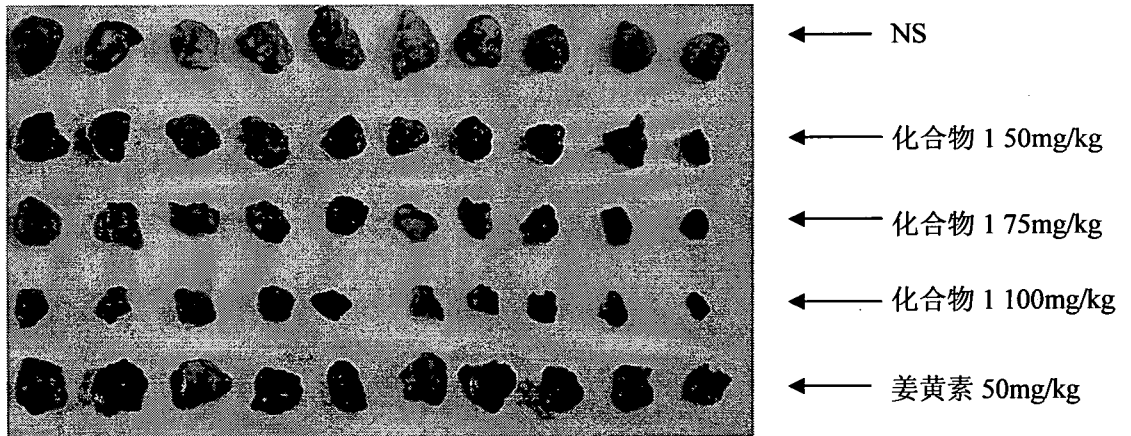


图 2

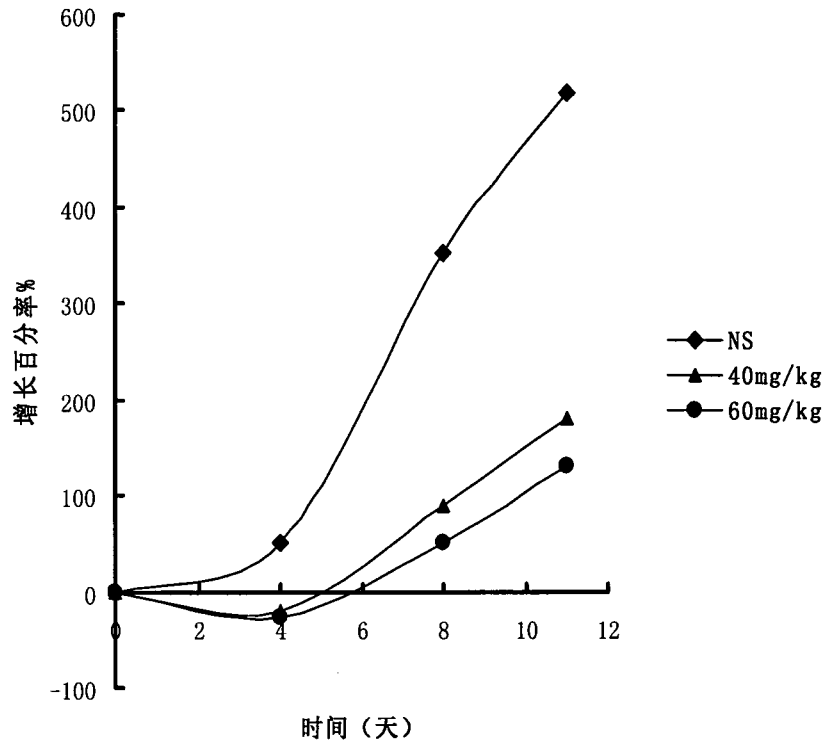


图3

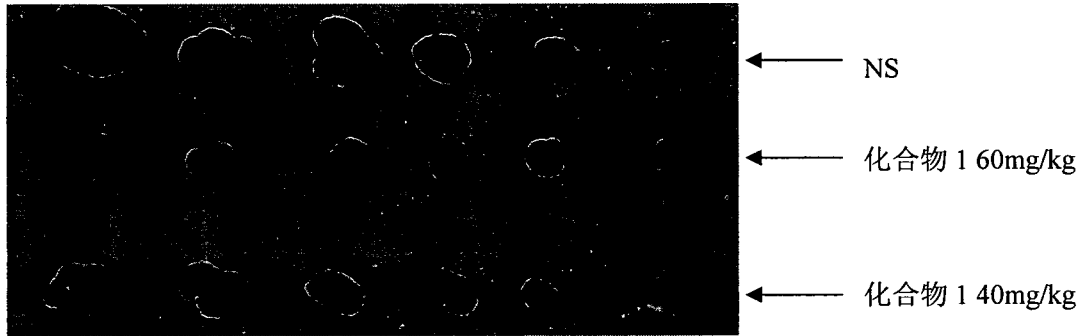


图 4



图 5

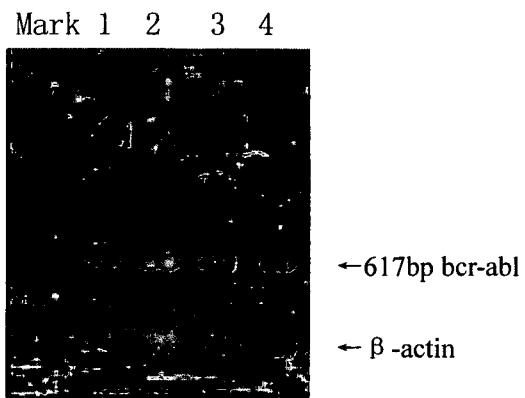


图 6

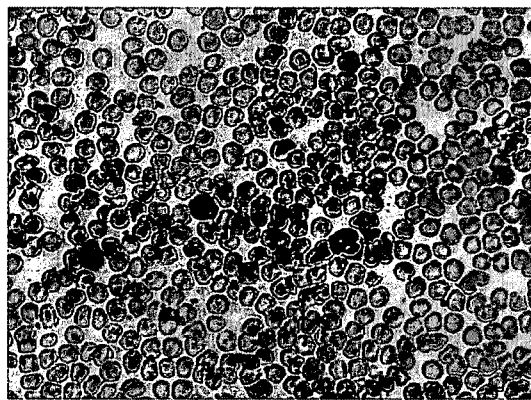


图 7

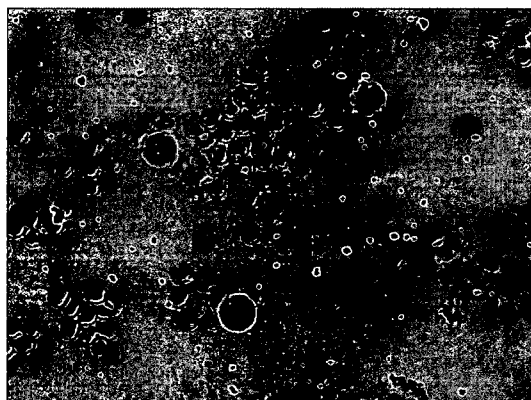


图 8

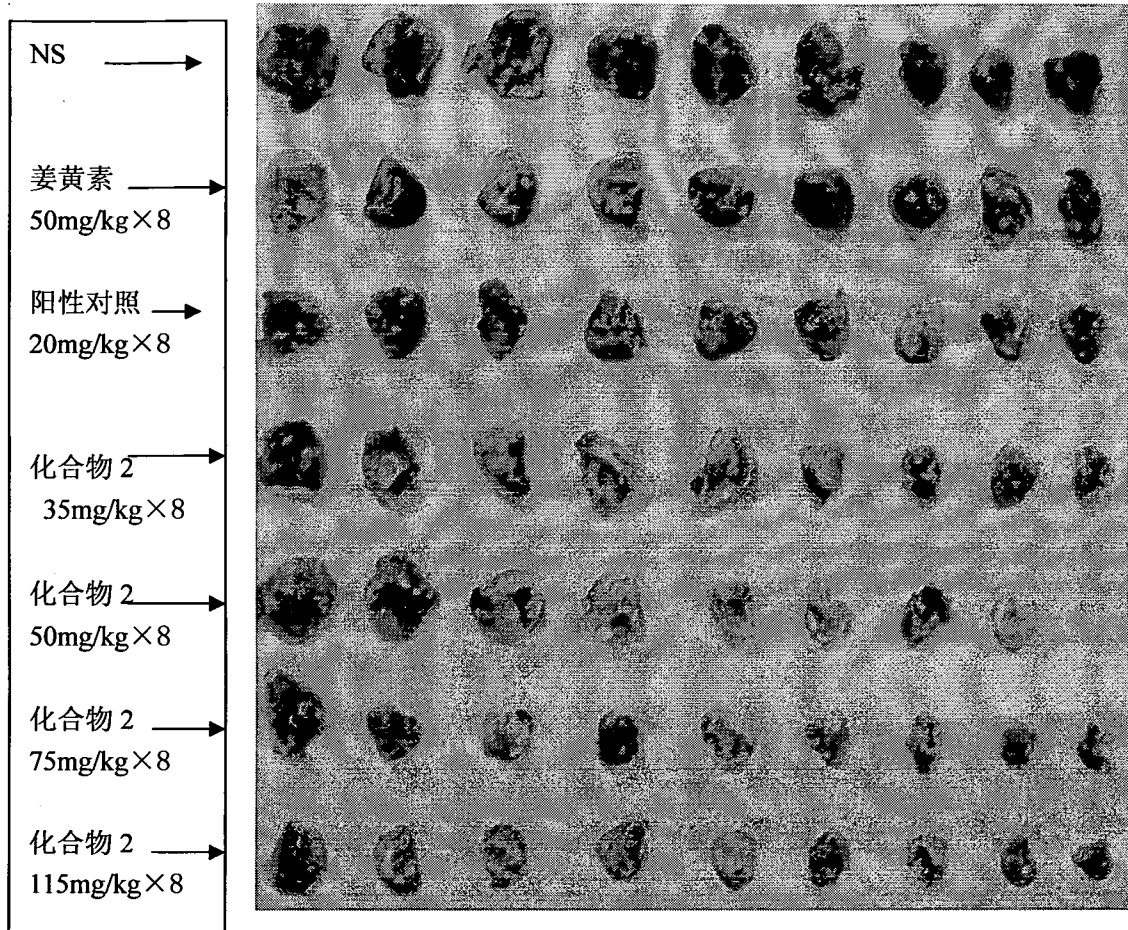


图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2011/073844

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
See extra sheet				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)				
IPC: C07C, A61K, A61P				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)				
See extra sheet				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
PX	CN101830819A(UNIV FUJIAN MEDICAL) 15 September 2010(15.09.2010) See claims 1-10.	1-10		
A	WO2004031122A1(RIEKS LABOR ENZYMT TECHNOLOGIE GMBH ANDRE) 15 April 2004(15.04.2004) See the whole document, especially examples 1, 3, 5, 11 and 12, claims 1-42.	1-10		
A	CN101669931A(BEIJING DINGGUO CHANGSHENG BIOTECH CO LTD) 17 March 2010(17.03.2010) See the whole document.	1-10		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.				
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;"> * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%; border: none;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 20 June 2011(20.06.2011)	Date of mailing of the international search report 11 Aug. 2011 (11.08.2011)			
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer DAI, Qingwei Telephone No. (86-10)62084480			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/073844

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO2008045534A2(RESEARCH FOUNDATION OF THE CITY UNIVERSITY OF NEW YORK) 17 April 2008(17.04.2008)</p> <p>See the whole document</p>	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2011/073844

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN101830819A	15.09.2010	None	
WO2004031122A1	15.04.2004	DE10245988 A	15.04.2004
		AU2003270283 A	23.04.2004
		DE10342925 A	21.04.2005
CN101669931A	17.03.2010	WO2010025589 A	11.03.2010
WO2008045534A2	17.04.2008	CA2665916 A	17.04.2008
		EP2076129 A	08.07.2009
		JP2010506836 T	04.03.2010
		US2010240905 A	23.09.2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/073844

Continue of:

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07C229/42(2006.01)i

C07C227/18(2006.01)i

A61K31/216(2006.01)i

A61P35/00(2006.01)i

A61P35/02(2006.01)i

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Electronic data base: WPI, EPODOC, CNPAT, CNKI, STN

search terms : curcumin, tumor, tumour, cancer, neoplasm, CAS RNs: 458-37-7, 1247899-92-8, 1247899-88-2

<p>A. 主题的分类</p> <p style="text-align: center;">参见附加页</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类</p>																	
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p style="text-align: center;">IPC: C07C, A61K, A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词 (如使用))</p> <p style="text-align: center;">参见附加页</p>																	
<p>C. 相关文件</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">类 型*</th> <th style="width: 60%;">引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th style="width: 30%;">相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN101830819A(福建医科大学) 15.9 月 2010(15.09.2010) 参见权利要求 1-10</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO2004031122A1(RIEKS LABOR ENZYMT TECHNOLOGIE GMBH ANDRE) 15.4 月 2004(15.04.2004) 参见全文, 尤其是实施例 1、3、5、11 和 12, 权利要求 1-42</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN101669931A(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司) 17.3 月 2010(17.03.2010) 参见全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO2008045534A2(RESEARCH FOUNDATION OF THE CITY UNIVERSITY OF NEW YORK) 17.4 月 2008(17.04.2008) 参见全文</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN101830819A(福建医科大学) 15.9 月 2010(15.09.2010) 参见权利要求 1-10	1-10	A	WO2004031122A1(RIEKS LABOR ENZYMT TECHNOLOGIE GMBH ANDRE) 15.4 月 2004(15.04.2004) 参见全文, 尤其是实施例 1、3、5、11 和 12, 权利要求 1-42	1-10	A	CN101669931A(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司) 17.3 月 2010(17.03.2010) 参见全文	1-10	A	WO2008045534A2(RESEARCH FOUNDATION OF THE CITY UNIVERSITY OF NEW YORK) 17.4 月 2008(17.04.2008) 参见全文	1-10
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
PX	CN101830819A(福建医科大学) 15.9 月 2010(15.09.2010) 参见权利要求 1-10	1-10															
A	WO2004031122A1(RIEKS LABOR ENZYMT TECHNOLOGIE GMBH ANDRE) 15.4 月 2004(15.04.2004) 参见全文, 尤其是实施例 1、3、5、11 和 12, 权利要求 1-42	1-10															
A	CN101669931A(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司) 17.3 月 2010(17.03.2010) 参见全文	1-10															
A	WO2008045534A2(RESEARCH FOUNDATION OF THE CITY UNIVERSITY OF NEW YORK) 17.4 月 2008(17.04.2008) 参见全文	1-10															
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																	
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>																	
<p>国际检索实际完成的日期 20.6 月 2011(20.06.2011)</p>		<p>国际检索报告邮寄日期 11.8 月 2011 (11.08.2011)</p>															
<p>ISA/CN 的名称和邮寄地址: 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451</p>		<p>授权官员 代庆伟 电话号码: (86-10) 62084480</p>															

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2011/073844

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN101830819A	15.09.2010	无	
WO2004031122A1	15.04.2004	DE10245988 A AU2003270283 A DE10342925 A	15.04.2004 23.04.2004 21.04.2005
CN101669931A	17.03.2010	WO2010025589 A	11.03.2010
WO2008045534A2	17.04.2008	CA2665916 A EP2076129 A JP2010506836 T US2010240905 A	17.04.2008 08.07.2009 04.03.2010 23.09.2010

续:

A. 主题的分类

C07C229/42(2006.01)i

C07C227/18(2006.01)i

A61K31/216(2006.01)i

A61P35/00(2006.01)i

A61P35/02(2006.01)i

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

数据库: WPI, EPODOC, CNPAT, CNKI, STN

检索词: 姜黄素, 酰基, 肿瘤, 癌, curcumin, tumor, tumour, cancer, neoplasm, CAS RNs: 458-37-7, 1247899-92-8, 1247899-88-2