



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102149703 B

(45) 授权公告日 2014. 09. 10

(21) 申请号 200980135652. 3

(22) 申请日 2009. 09. 14

(30) 优先权数据

2230/CHE/08 2008. 09. 15 IN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 03. 12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IN2009/000504 2009. 09. 14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/029577 EN 2010. 03. 18

(73) 专利权人 卡斯娜莱拉伊诺制药私人有限公司

地址 印度安德拉邦维杰亚瓦达莱比帕特部  
瑞德瓦殖民地 40-15-14

(72) 发明人 G·R·古卡拉吉 S·卡斯娜

R·R·古卡拉吉 T·吉拉考提

V·索门帕利 S·柯瑞莎鲁

K·布湖帕瑟拉吉

(74) 专利代理机构 广州弘邦专利商标事务所有  
限公司 44236

代理人 张钺斌

(51) Int. Cl.

C07D 333/38 (2006. 01)

C07D 333/40 (2006. 01)

C07D 495/04 (2006. 01)

A61K 31/381 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

L. Henriksen, et al..The Chemistry of 1,1-Dithiolates. 《ACTA CHEMICA SCANDINAVICA》. 1972, 第 26 卷 (第 8 期), 3342-3346.

E. Wagner, et al..Synthesis and Cytostatic Activity of 4-Substituted Derivatives of Isoxazolyltriazenes. 《Polish J. Chem. 》. 2003, 第 77 卷 (第 8 期), 1001-1006.

审查员 杨杰

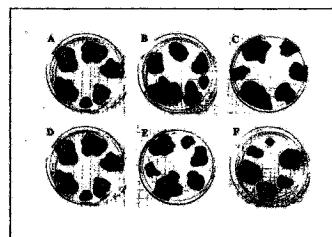
权利要求书3页 说明书37页 附图10页

(54) 发明名称

抗癌药物及其用于治疗转移性恶性黑色素瘤及其他癌症

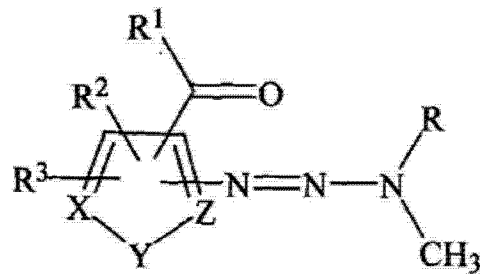
(57) 摘要

本发明公开了用于治疗转移性恶性黑色素瘤和非限制性地包括淋巴瘤,肉瘤,癌,神经胶质瘤等其它癌症且通式(I)和通式(II)所示的三氮烯类似物及其异构体,立体异构体,多晶体,水合物,溶剂化物和药物可接受形式盐。本发明还公开了一种制备上述通式(I)和通式(II)所示的三氮烯类似物及其药物可接受形式混合物的方法。



处理的组	平均重量 (gm)	肿瘤 SD	与对照相比的减少
对照	2.858	0.865	
DTIC 50 mg/kg	2.046	0.232	28.411
DTIC 100 mg/kg	1.957	0.641	31.332
化合物6 (50 mg/kg)	1.858	0.881	34.989
化合物6 (100 mg/kg)	1.168	0.735	59.118

1. 通式 (I) 所示的一种化合物：



基本通式 I

其中，

R 是选自 CH<sub>3</sub> 的单基团，

R<sup>1</sup> 是选自 OH、NH<sub>2</sub> 单基团，

R<sup>2</sup> 和 R<sup>3</sup> 选自 H、Cl、Br、F、I、NO<sub>2</sub>、OCH<sub>3</sub>、CONH<sub>2</sub>，X、Z 是选自 C 的单基团，和 Y 是选自 S 的单基团，由此产生的杂环芳香基中的五元环系统是噻吩；或是它们的一种药物可接受形式盐。

2. 如权利要求 1 所述的化合物，其特征在于其特定地包括：

3-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-2-甲酰胺

3-[(二甲氨基)二氮烯基]-4-溴噻吩-2-甲酰胺

3-[(二甲氨基)二氮烯基]-5-硝基噻吩-2-甲酰胺

4-[(二甲氨基)二氮烯基]-3-甲氧基噻吩-2,5-二甲酰胺

3-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-2-羧酸

3-[(二甲氨基)二氮烯基]-5-硝基噻吩-2-羧酸

{3-[(二甲氨基)二氮烯基](2-噻吩基)}-N-(2-羟乙基)-甲酰胺

{3-[(二甲氨基)二氮烯基](2-噻吩基)}-N-甲酰胺

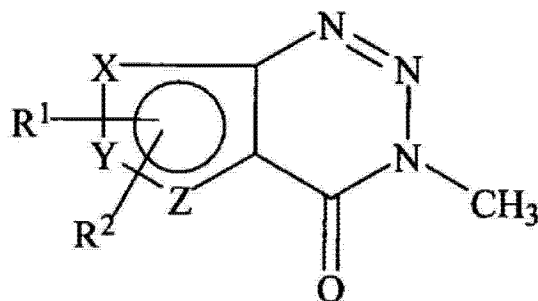
N-(2-氨基乙基){3-[(二甲氨基)二氮烯基](2-噻吩基)}-甲酰胺

4-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-2-甲酰胺

4-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-3-甲酰胺

3-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-2-羧酸的钾盐。

3. 通式 (II) 所示的一种化合物：



基本通式 II

其中

R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 选自 H、NH<sub>2</sub>、Cl、Br、F、I 和 NO<sub>2</sub>，

X、Y 是选自 C 的单基团, 和 Z 是选自 S 的单基团, 由此产生的杂环芳香基中的五元环系统是噻吩; 或是它们的一种药物可接受形式盐。

4. 如权利要求 3 所述的化合物, 其特征在于其包括:

3- 甲基噻吩 [2, 3-d]1, 2, 3- 三嗪 -4- 酮

3- 甲基 -6- 硝基噻吩 [2, 3-d]1, 2, 3- 三嗪 -4- 酮

6- 氨基 -3- 甲基噻吩 [2, 3-d]1, 2, 3- 三嗪 -4- 酮。

5. 一种药物混合物, 其特征在于其含有权利要求 1 所述的通式 (I) 所示化合物或权利要求 3 所述的通式所示化合物或这两者药物可接受形式盐中的至少一种, 还含有一种药物可接受形式稀释剂或载体。

6. 一种药物混合物, 其特征在于其含有权利要求 1 所述的通式 (I) 所示化合物或权利要求 3 所述的通式所示化合物或这两者药物可接受形式盐中的至少一种, 还含有至少一种化疗剂和任意一种药物可接受形式稀释剂或载体。

7. 如权利要求 6 所述的混合物, 其特征在于所述的化疗剂是达卡巴嗪, 替莫唑胺, 甲氨蝶呤, 阿霉素, 环磷酰胺, 5- 氟尿嘧啶, 顺铂, 卡铂, 奥沙利铂, 长春新碱, 长春碱, 依托泊苷, 伊立替康, 托泊替康, 紫杉醇, 多西他奇, 泰索帝, 红杉醇, 他莫西芬, 吉非替尼, 亚德里亚霉素, 吉西他滨, 马法兰, 链脲菌素, 氟尿苷, 6- 巯基嘌呤, 博莱霉素, 道诺霉素, 丝裂霉素 -C, 安吡啶, 丙卡巴肼, 卡培他滨, 阿瓦斯丁, 赫赛汀, 百克沙, 万珂, 泽娃灵, 希罗达, 爱必妥 (西妥昔单抗), 利妥昔单抗, 坎帕斯。

8. 一种药物混合物, 其特征在于其含有权利要求 1 所述的通式 (I) 所示化合物或权利要求 3 所述的通式所示化合物或这两者药物可接受形式盐中的至少一种, 还含有至少一种化疗剂, 至少一种生物响应改性剂和任意一种药物可接受形式稀释剂或载体。

9. 如权利要求 8 所述的混合物, 其特征在于所述的生物响应改性剂是单克隆抗体, 干扰素, 白细胞介素, 各种类型的集落刺激因子或 TNF- $\alpha$  受体阻滞剂类药物。

10. 一种抑制癌症细胞生长或杀死癌症细胞的药物混合物, 其特征在于所述的药物混合物包括权利要求 1-4 中任一个所述化合物的一个有效治疗量。

11. 如权利要求 10 所述的一种抑制癌症细胞生长或杀死癌症细胞的药物混合物, 其特征在于所述的癌症是任意类型的, 非限制性地选自转移性恶性黑色素瘤, 淋巴瘤, 肉瘤, 脑瘤, 中枢神经系统转移, 脑胶质瘤。

12. 如权利要求 11 所述的一种抑制癌症细胞生长或杀死癌症细胞的药物混合物, 其特征在于所述的癌包括乳腺癌, 前列腺癌, 肺癌, 结肠癌, 胰腺癌, 头颈部癌或口咽部鳞状细胞癌。

13. 如权利要求 10 所述的一种抑制癌症细胞生长或杀死癌症细胞的药物混合物, 其特征在于一种癌症细胞是从身体任意部分起源的, 不限于人体的任何组织, 选自脑, 肺, 肾上腺, 脑垂体, 乳房, 前列腺, 胰腺, 卵巢, 胃肠道, 肾脏, 肝脏, 脾脏, 睾丸, 子宫颈, 上、下或中间食道处起源的任意初级或次级肿瘤。

14. 如权利要求 10 所述的一种药物混合物, 其特征在于, 所述药物混合物以任意形式给药, 所述的形式特定地选自腹腔内 (IP), 静脉注射 (IV), 口服 (PO), 肌肉注射 (IM), 皮内 (IC), 皮层内 (ID), 宫内或直肠内。

15. 如权利要求 10 所述的一种药物混合物, 其特征在于所述药物混合物使用了含有不

同大小纳米颗粒的乳胶。

## 抗癌药物及其用于治疗转移性恶性黑色素瘤及其他癌症

### 技术领域

[0001] 本发明公开了用于治疗转移性恶性黑色素瘤和非限制性地包括淋巴瘤,肉瘤,癌,神经胶质瘤等其它癌症且通式 (I) 和通式 (II) 所示的三氮烯类似物及其异构体,立体异构体,多晶体,水合物,溶剂化物和药物可接受形式盐。

[0002] 本发明还公开了一种制备上述通式 (I) 和通式 (II) 所示的三氮烯类似物及其药物可接受形式混合物的方法。

[0003] 发明背景

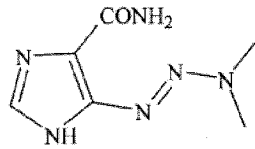
[0004] 黑色素瘤,一种恶性瘤,来自细胞并可形成黑色素,最常出现在身体任何部分的皮肤上和眼睛里,或者少数出现在生殖器,肛门,口腔,或其他位置上。大多发生在成年人中并可能是开始于或来自于色素痣或恶性雀斑。在早期阶段,皮肤具有在可很快侵入邻近组织的真表皮交汇处的细胞增殖的特征。细胞呈现不同的数量和在细胞质中沉积色素;细胞核相对变大及其形状频繁怪异,并且细胞核明显呈嗜酸性;有丝分裂的数量往往很多。黑色素瘤广泛频繁的转移;区域淋巴结,皮肤,肝脏,肺和大脑都有可能被感染。

[0005] 1985年1月,环境保护署(EPA)预测,地球臭氧层即来自太空防紫外线(UV)辐射警卫的枯竭,将在全球范围内导致皮肤癌病例数量的增加,包括黑色素瘤。环保署估计,到2050年,由于人类活动——主要是长寿命的氯氟烃排放在大气层中(现在大多数发达国家禁用)使臭氧层预计将减少10%,到时每年将增加两百万病例。公共卫生工作的重点是鼓励人们使用防晒霜,在曝晒高峰的时间内避免户外活动,进行频繁的自我皮肤检查,并当出现不正常现象时去看皮肤科医师。暴露在更高水平的紫外线辐射下还可以促进白内障和免疫系统功能障碍。

[0006] 紫外线辐射对皮肤癌是一个明确的危险因素,尤其暴露可以使某些隐性遗传特性的密码子发生,如红头发,皮肤白皙(1)。皮肤色素沉积是色素生成细胞即黑色素细胞合成黑色素,黑色粒料通过分配和转移到相邻的角化细胞中的结果。人们普遍认为,黑色素在用来吸收因紫外线在细胞质中生成的自由基和作为直接屏蔽紫外线和可见光辐射具有至关重要的作用(2,3)。

[0007] 紫外线引起的色素沉积(太阳晒黑)需要角化细胞分泌 $\alpha$ -黑素刺激激素( $\alpha$ -MSH)来诱导。 $\alpha$ -MSH和其它生物活性肽是阿黑皮素原(POMC)的裂解产物(4)。p53肿瘤抑制基因是在癌症遗传改变中最常见的目标之一。p53是一个POMC基因的转录调控因子,其翻译的蛋白质导致黑色素细胞产生黑色素,可防止因紫外线辐射的皮肤癌。观察到有接近一半的人类肿瘤直接是p53的突变失活(5)。恶性黑色素瘤是一种皮肤癌,尤其是到今天为止,它是最难治疗的癌症之一。达卡巴嗪(DTIC)是唯一用于治疗转移性恶性黑色素瘤的单剂。然而,达卡巴嗪在临床上的完全响应(CR)率低于10%,因此它不能满足医疗需求从而需要一个更好的药剂。此外,与其他淋巴瘤的有效药物联合使用时,达卡巴嗪也可作为辅助剂用于霍奇金淋巴瘤的治疗。化学药品DTIC是5-(3,3-二甲基-1-三氮)-咪唑-4-羧酰胺,其结构式如下:

[0008]



### DTIC

[0009] (达卡巴嗪)

[0010] 然而,达卡巴嗪需要在体内由肝脏来生物激活作用。甲基中的二甲基三氮基团是通过肝微粒体酶并且尤其是通过细胞色素 P450 来激活,通过氧化生产羟甲基的结果。因此,氧化二甲基三氮基团的单脱甲基的结果是单甲基三氮烯。该单甲基三氮烯的代谢物,3-甲基-(三氮烯-1-基)咪唑-4-甲酰胺(MTIC)进一步水解得到5-氨基咪唑-4-甲酰胺(AIC),其公认为是嘌呤和核酸生物合成被认为是活化烷基类的甲基胍的一个中间产物。细胞色素 P450 酶在 MTIC 的新陈代谢中只起作较小的作用。

[0011] 替莫唑胺也是一种类似的在亲核位置 DNA 甲基化的咪唑四嗪烷化物。替莫唑胺是口服生物制剂,亲脂性,能自发地转化为 MTIC,并似乎会产生较少的恶心(6)。O<sup>6</sup>-甲基鸟嘌呤加合物可导致 DNA 复制时错配和增加胸苷而不是胞嘧啶来形成新的 DNA 链(7)。由于优越的体内分布的中枢神经系统(CNS),替莫唑胺在初期脑肿瘤和 CNS 转移中可作为放射致敏剂来用(8-11)。替莫唑胺的药代动力学已经在儿童中并许可用于相关的身体表面进行了研究(12)。替莫唑胺在脑转移患者的放射治疗中可改善生活质量。不像达卡巴嗪,替莫唑胺对肉瘤也具有活性(13-15)。因此,它可与用于转移治疗一样,用在肉瘤的放射治疗中来起主要控制。替莫唑胺是一种耐受性好,具有温和的副作用放射增敏剂。替莫唑胺和依立替康的组合对于一些癌症更加有效(16)。在文献中作者报告说他们的经验证实了在尤文氏肉瘤和 DSRCT 的病情复发中具有高的响应率甚至高于那些报告(17-19)。替莫唑胺加依立替康的组合比标准环磷酰胺控制方案具有更少的免疫抑制(20)。这可能在尤文肉瘤中特别重要,因为这些作者和其他人已表明,淋巴细胞恢复(即在化疗的第一个周期后的第15天,淋巴细胞的绝对数 > 500)明显高于相关尤文氏肉瘤中的生存(21,22)。替莫唑胺或达卡巴嗪也与其他药物包括吉西他滨和阿霉素脂质体等药物组合(23,24)。DTIC 从血液中消失具有第一个半衰期为 19 分钟和末端半衰期为 5 小时的两个阶段。在肾和肝功能障碍的患者,半衰期分别延长至 55 分钟和 7.2 小时。在 6 小时内尿液中平均累积排泄未变化的 DTIC 是注射剂量的 40%。DTIC 是受肾小管分泌,而不是肾小球过滤。在治疗浓度方面,DTIC 对人类血浆蛋白没有明显的限制。

[0012] 在人体中,DTIC 被广泛地分解。除不变的 DTIC 外,AIC 是一个 DTIC 主要代谢产物并在尿中排出。虽然对 DTIC 确切作用机理尚不清楚,现已提出三个假设:

[0013] 1. 作为模拟嘌呤来抑制 DNA 合成作用

[0014] 2. 作为一种烷化剂

[0015] 3. 与 SH 基相互作用

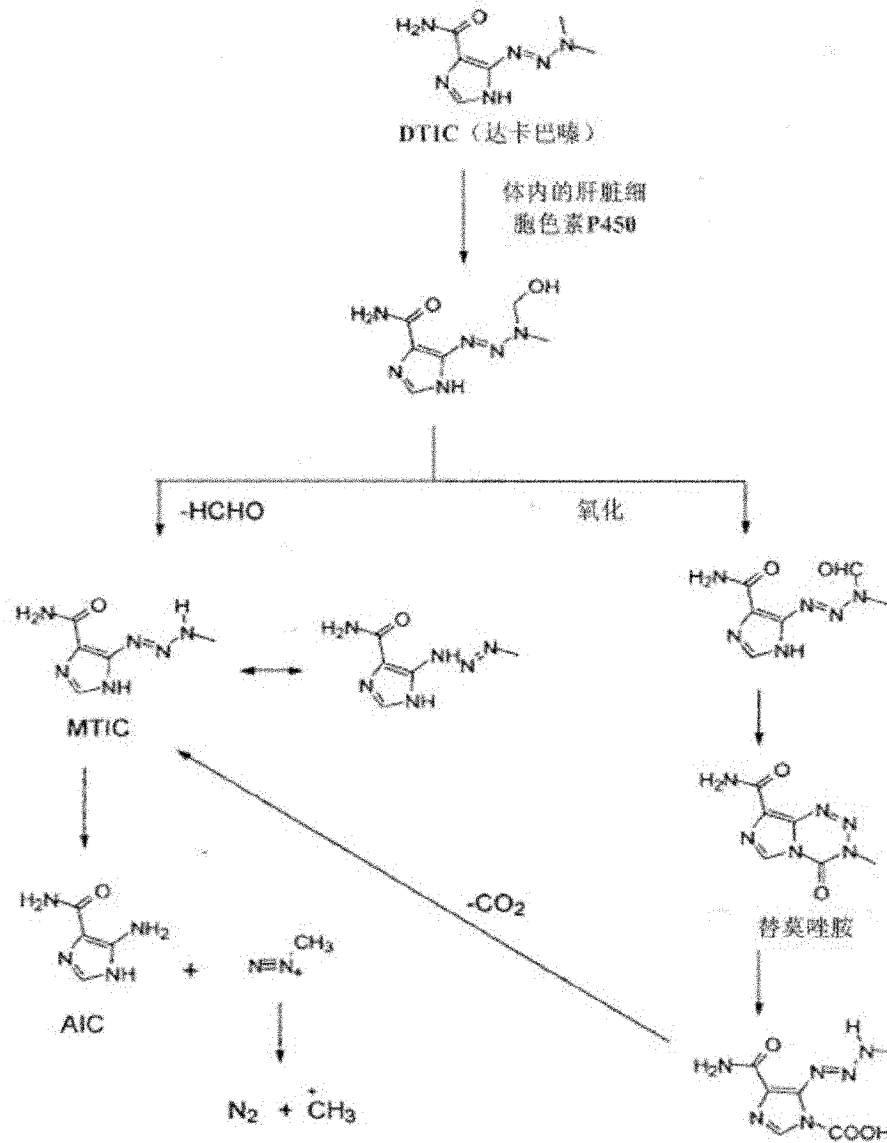
[0016] 因此,在体内 MTIC 反应生成物的细胞毒性参与生产正离子甲基的作用机理认为主要是由于 DNA 烷基化。烷基化(甲基化)主要发生在鸟嘌呤的 O<sup>6</sup> 和 N<sup>7</sup> 的位置上。

[0017] 另外,DTIC 在其新陈代谢到单甲基三氮烯类似物之前,最初被氧化成单羟甲基类似物并最终成为一种醛。单甲基三氮烯类似物在其醛形式被氧化成单脱甲基类似物之前,

是环形的环状化合物（如式 1 所示），它干扰双螺旋 DNA 结构和癌细胞复制块。最后，次级代谢产物 AIC 是无活性的。

[0018] 式 1. 达卡巴嗪作用的生理理

[0019]



[0020] 达卡巴嗪的咪唑环系统在本质上是亲水性。因此，在文献中有能有效结合黑色素的需要以致于该分子的细胞毒素功能是百分之百有效的。因此，本发明的目的是提供增加亲脂性的新化合物从而提供更多的特异性目标。因此，噻吩，它有一个五元杂环体系，在本质上是有效的亲脂性，并可通过增加亲和力来有效的结合黑色素，因此，将得到在明显低剂量时获得同样的治疗效果，从而最大限度地减少毒性。相应的可提供高特异性的治疗指数 (TI) 的更大机会。在一般情况下，为癌症患者治疗，首选治疗指数更大的。这是因为，一开始想的治疗方案具有非常高的最大耐受量 (MTD)，使得癌细胞在第一次化疗时被彻底打击。否则，幸存的癌细胞将修复损伤的 DNA，随后转移到其他器官。此外，第一次治疗幸存下来的肿瘤细胞会在如果需要的第二个化疗时产生耐药性。而且，由于第一次化疗后免疫系统虚弱，在第二次治疗中给予最理想的剂量将产生副作用。如式 1 所示，不同于 DTIC，噻吩环系统与肿瘤抗原表面上的 -SH 更好的相互作用其结果是提高疗效结果。这是因为硫 (S) 是大

原子,因此五杂环噻吩环系统在立体上类似于一个苯环,将有助于它的借出电子与肿瘤上的巯基的环结构更好的作用。此外,由于它的电子结构,噻吩杂环芳香环系统可能通过作为模拟嘌呤与作为烷化剂一样来抑制DNA合成的方法来较好的结束DTIC。同样,不同于DTIC,氨基咪唑甲酰胺(AIC)是无活性的,相应的氨基噻吩甲酰胺(ATC)可在体内通过来自硫环的电子定位来增强活性从而具有很好的活性。因此,新的三氮烯噻吩衍生物在达卡巴嗪上在内部固有的结构上具有多个额外优势来增加活性。

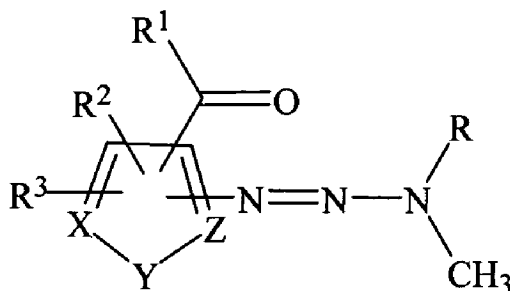
[0021] 除了其作用机理,最近在文献中有一些关于达卡巴嗪通过与其他化疗药物组合使用来明显提高其治疗效果的报道(25,26)。同样的,在临床前,达卡巴嗪纳米乳制剂在小鼠黑色素移植瘤模型中具有明显的增强效果(27)。同样的,追求一些创新的治疗方案以提高其结果,包括免疫治疗,酪氨酸激酶抑制剂和血管生成抑制剂(28)。文献中报道使用达卡巴嗪与干扰素组合来治疗转移性黑色素瘤的效果很差(29)。

[0022] 如上所述,目前,达卡巴嗪和替膜唑胺已广泛用作化疗药物用于治疗转移性恶性黑色素瘤。然而,成功率很低,并且副作用很大。因此,开发一种用于治疗转移性恶性黑色素瘤的满足医疗需求的有效药物和方法仍然是一项巨大的挑战。

[0023] 发明概述

[0024] 本发明提供了通式(I)所示的化合物,本文中称之外三氮烯类似物。

[0025]



[0026] 通式(I)

[0027] 其中,

[0028] R是选自H、CH<sub>3</sub>、CH<sub>2</sub>OH的单基团,

[0029] R<sup>1</sup>是选自OH、NHR<sup>4</sup>、NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>、SH的单基团,

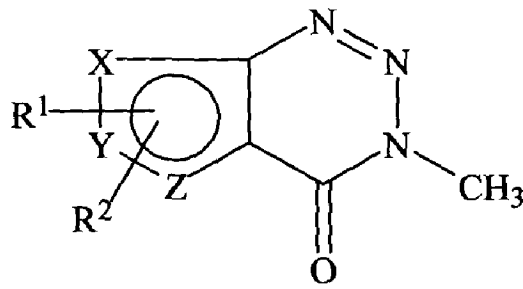
[0030] R<sup>2</sup>和R<sup>3</sup>中至少有一个选自H、N=N-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、N=N-NHCH<sub>3</sub>、N=N-N(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>OH、CONHR<sup>4</sup>、CONR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>、CONHNH<sub>2</sub>、CONHNHR<sup>4</sup>、CONHNR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>、COOCH<sub>3</sub>、COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、COOH、COSH、CN、C≡CH、SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、SO<sub>2</sub>NHR<sup>4</sup>、SO<sub>2</sub>NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>、SO<sub>3</sub>H、SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、SO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、NHCH<sub>2</sub>COOH、NHCH(CH<sub>3</sub>)COOH、NO<sub>2</sub>、CF<sub>3</sub>、Cl、Br、F、I、CCl<sub>3</sub>、Ph(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)、CH<sub>3</sub>、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>、n-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>、iso-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>、n-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>、iso-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>、tert-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>、OH、OCH<sub>3</sub>、NH<sub>2</sub>、NHCH<sub>3</sub>等吸电基团和供电基团。

[0031] R<sup>4</sup>和R<sup>5</sup>是选自H、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烷基,烯基,醇胺,烷基胺等的单基团。X、Y和Z是选自C、N、O和S的单基团,由此产生的杂环芳香基中的五元环系统是未取代和噻吩,咪唑,噻唑,异噻唑和解草胺取代的。

[0032] 本发明另一个方面还提供了通式(II)所示的化合物。

[0033]





[0034] 通式 (II)

[0035]  $R^1$  和  $R^2$  中至少有一个选自 H、 $N=N(CH_3)_2$ 、 $N=N-NHCH_3$ 、 $N=N-N(CH_3)CH_2OH$ 、 $CONH_2$ 、 $CONHR^4$ 、 $CONR^4R^5$ 、 $CONHNH_2$ 、 $CONHNHR^4$ 、 $CONHNHR^4R^5$ 、 $COOCH_3$ 、 $COOCH_2CH_3$ 、 $COOH$ 、 $COSH$ 、 $CN$ 、 $C \equiv CH$ 、 $SO_2NH_2$ 、 $SO_2NHR^4$ 、 $SO_2NR^4R^5$ 、 $SO_3H$ 、 $SO_2CH_3$ 、 $SO_2CH_2CH_2NH_2$ 、 $NHCH_2COOH$ 、 $NHCH(CH_3)COOH$ 、 $NO_2$ 、 $CF_3$ 、 $Cl$ 、 $Br$ 、 $F$ 、 $I$ 、 $CCl_3$ 、 $Ph(C_6H_5)$ 、 $CH_3$ 、 $C_2H_5$ 、 $n-C_3H_7$ 、 $iso-C_3H_7$ 、 $n-C_4H_9$ 、 $iso-C_4H_9$ 、 $tert-C_4H_9$ 、 $OH$ 、 $OCH_3$ 、 $NH_2$ 、 $NHCH_3$  等吸电基团和供电基团。

[0036]  $R^4$  和  $R^5$  是选自 H、 $C_1-C_{10}$  烷基，烯基，醇胺，烷基胺等的单基团，

[0037] X、Y 和 Z 是选自 C、N、O 和 S 的单基团，由此产生的杂环芳香基中的五元环系统是未取代和噻吩，呋喃，噻唑，异噻唑和解草胺取代的。通式 (II) 所示的化合物不是 3- 甲基苯酚 [3,2-d]1,2,3 三嗪 -4- 酮 ( $X=Y=C$ ； $Z=S$ ； $R^1=R^2=H$ )。

[0038] 本发明的另一个方面是公开了通式 (I) 和 (II) 所示化合物的药物可接受形式盐，例如有机或无机酸加成盐。

[0039] 本发明的另一个方面公开了混合物，其含有至少一种通式 (I) 和 / 或 (II) 所示三氮烯类似物或其药物可接受形式盐。

[0040] 本发明的另一个方面公开了混合物，其含有至少一种通式 (I) 和 / 或 (II) 所示三氮烯类似物或其药物可接受形式盐，并含有任意药物可接受形式载体或稀释剂。

[0041] 本发明的另一个方面公开了混合物，其含有通式 (I) 和 / 或 (II) 所示三氮烯类似物或其药物可接受形式盐，并含有至少一种生物反应改性剂和任意药物可接受形式载体或稀释剂。

[0042] 本发明的另一个方面公开了一种向一个所需的患者给药，来抑制患者体内癌症细胞生长或杀死患者体内一种癌症细胞的方法，其中使用了有效量能杀死一种癌症细胞的通式 (I) 和 / 或 (II) 所示三氮烯类似物或含有它们或还含有其它化疗剂的混合物。

## 附图说明

[0043] 图 1 所示的是 A2058 人体黑色素瘤细胞经各种浓度的化合物 1、化合物 6、化合物 13 和 DTIC 处理后所分泌的乳酸脱氢酶 (LDH) 的增长百分率线性图。每个点所表示的是相对于空白对照培养所分泌 LDH 的四倍孔的平均值计算得到的增长百分率。

[0044] 图 2 所示的是 HS. 531. sk 人体皮肤上皮细胞经不同浓度的 DTIC 及相关的测试化合物处理后细胞活性柱状图 (上图)。下面的图是经各种  $120 \mu g/ml$  的测试化合物处理的 HS. 531. sk 细胞的失活 (百分率) 柱状图。

[0045] 图 3 所示的免疫印迹图显示了在分别经过  $100 \mu g/ml$  的 DTIC，测试物化合物 1，化合物 6 和化合物 13 处理后的 A2058 细胞的 PARP 裂解。对照培养只含有 0.5% 的 DMSO 作为空白。肌动蛋白的表达作为内参照如图所示。裂解后的 PARP 蛋白在 89kDa 时的表达使用

肌动蛋白的表达作为标准（任意单位），结果如下面的柱状图所示。

[0046] 图 4 所示的是体外存在的 DTIC 和化合物 6 对 B16F0 菌落形成的抑制作用。用 0.1% 的 DMSO (A) 或 100  $\mu$ g/ml 的 DTIC (B) 或 50  $\mu$ g/ml (C) 或 100  $\mu$ g/ml (D) 的化合物 6 处理 B16F0 细胞。用 0.1% 的 DMSO (a)，或 100  $\mu$ g/ml 的 DTIC (b) 或 50  $\mu$ g/ml of 化合物 6 (c) 或 100  $\mu$ g/ml 的化合物 6 (d) 处理后的培养菌群平均数量和菌落平均面积分别如柱状图 E 和 F 所示。

[0047] 图 5 所示的是使用化合物 6 对 G2/M 期的细胞周期阻滞产生的诱导。B16F0 细胞经过图中所示的不同浓度的空白 (0.1% DMSO) 或 DTIC 或化合物 6 处理 24 小时。使用流式细胞仪来分析所述的碘化丙啶染色细胞在细胞周期中的分布，并使用 ModFIT 软件来确定其在不同期的细胞周期中的分布率。所示的数据是至少三个以上单独实验获得的一个代表值。

[0048] 图 6 所示的显微照片显示了分别经对照 (A)，100  $\mu$ g/ml 的 DTIC (B) 和化合物 6 (C) 处理培养基后的扩散 B16F0 细胞。柱状图 (D) 表示用 20 倍目镜观察 20 个独立区域所获得的扩散细胞的平均数量。

[0049] 图 7 所示的免疫印迹图显示了 VEGF 蛋白在化合物 6 处理后的 B16F0 细胞中的表达下调。柱状图表示 VEGF 蛋白在任意单位下的规范表达。其中每条柱表示通过至少三个实验获得的平均表达。

[0050] 图 8 所示的是化合物 6 在人体内皮细胞迁移中的抑制效果。显微照片显示了在 DTIC (图中 B 和 C 分别是 25 和 50  $\mu$ g/ml) 或化合物 6 (图中 E 和 F 分别是 25 和 50  $\mu$ g/ml) 中 HUVEC 的迁移。图中 A 和 D 表示在经 0.1% DMSO 处理的空白对照中的细胞迁移。柱状图所示的是不同培养条件下迁移细胞的数量，图中显示了每条柱的培养条件。每条柱所示的迁移细胞是用 20 倍目镜至少观察 20 个区域所获得的。

[0051] 图 9 所示的化合物 6 形成的类毛细血管抑制情况。将人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 涂布于含有 DTIC (图中 B 和 C 分别是 25 和 50  $\mu$ g/ml) 或化合物 6 (图中 E 和 F 分别是 25 和 50  $\mu$ g/ml) 的 Cultrex 涂板上，在 37°C 下放置 16 小时，用于形成内皮毛细血管。图中 A 和 D 表示在经 0.1% DMSO 处理的空白对照中形成内皮毛细血管。

[0052] 图 10 显示了在 C57B6J 小鼠体内，化合物 6 和 DTIC 抑制 B16F0 肿瘤生长的效果。上面的图显示的显微照片表示从动物尸体上切割肿瘤的大小，分别包括空白对照组 (A 和 D)，用 50 和 100mg/kg 的 DTIC (B 和 C) 处理组和用 50 和 100 的 mg/kg 化合物 6 (E 和 F) 处理组。下面的图表显示每组 (n = 6) 中肿瘤的平均重量。每组达到的肿瘤生长抑制百分率均是参照空白对照组计算获得的。

[0053] 下面将通过具体实施例方式，并结合对应的附图来详细说明本发明的这些以及其它实施例。

[0054] 具体实施例方式

[0055] 黑色素瘤迄今被认为是抗化疗且非常难治疗的。目前，达卡巴嗪和替莫唑胺已广泛用于治疗转移性恶性黑色素瘤的化疗药物。但是其成功率很低，且副作用很大。

[0056] 转移性恶性黑色素瘤是一种持续的不治之症，其平均生存期约 8 个月，诊断后 5 年存活率低于 5%。联合方案的响应率可重复地高于标准的达卡巴嗪。但是，为了明确地获得一个不同的对转移性恶性黑色素瘤的控制，必需证实所述的药物能单独地率先实现更高的

完全缓解 (CR) 率的显著疗效。只有这样,涉及化疗药品,白细胞介素,干扰素等生物反应调节剂的任何其他组合剂量方案将使恶性黑色素瘤的治疗更便于管理和控制。因此,为了使剂量方案有效,亲脂噻吩系统等可能的强黑色素结合基可以提供一种治疗,其具有所有优于 DTIC(达卡巴嗪)作用的三种生化机理,其积极成果可以显著增加所获得的完全响应。

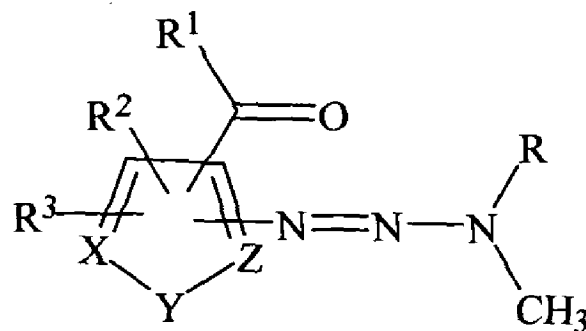
[0057] 因此,我们首选的分子结构涉及一种五元杂环噻吩环系统,它与苯环的形状和大小类似,且是亲脂性的。此外,噻吩环结构内部具有额外的优点,即有助于自身增加分子级效果。

[0058] 因此,本发明的目的是实现还未满足医疗需求的可选择性地与目标黑色素瘤细胞结合并保护正常细胞,从而增加靶细胞与非靶细胞的比例,还提供了如本文所述的其它优点。因此,为了提高黑色素的结合,首选的几种化合物涉及将杂环噻吩环系统作为一个骨架。由于含有大分子量的硫原子,因此五元噻吩环系统与一个亲脂性六元苯基环系统的空间大小和形状相似。因此被取代的噻吩环系统除了它的芳香性之外,其环中还有电子共振失实,这就能增加效果。因此还将提供在环这可能有助于提高疗效的共振电子失实。于是一些三氮烯类似物的噻吩的一个测试模式可以用 DTIC 来合成并评估其体外疗效。由于体内效果比首选的化合物 DTIC 更好,所以可以进一步评估涉及体内效果和作用模式的特性。下面将说明本发明所述的三氮烯类似物,含有其混合物及该类似物和混合物在医疗上的使用。

[0059] 根据本发明的目的,所述的词/词组“噻吩三氮烯类似物”,“黑色素结合类似物”,“新型类似物”在下文中可以用通式 I 和通式 II 所示的化合物来替换。本发明所述的通式 I 和通式 II 所示的化合物,噻吩三氮烯类似物对黑色素具有高亲和力,因此能显著地提高效率。此外在一个优选的实施例中,本发明所述的新型类似物可以特别地设计为与黑色素更有效地结合,提高靶细胞与非靶细胞的比例,从而降低毒性。

[0060] 在一个实施例中,所述的黑色素结合类似物可以是如下所示的:

[0061]



[0062] 通式 (I)

[0063] 其中,

[0064] R 是选自 H、CH<sub>3</sub>、CH<sub>2</sub>OH 的单基团,

[0065] R<sup>1</sup> 是选自 OH、NHR<sup>4</sup>、NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>、SH 的单基团,

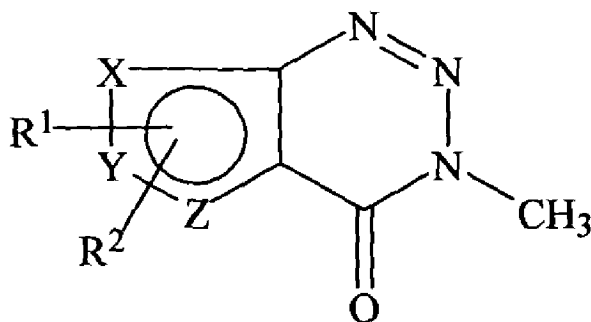
[0066] R<sup>2</sup> 和 R<sup>3</sup> 中至少有一个选自 H、N = N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、N = N-NHCH<sub>3</sub>、N = N-(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>OH、CONHR<sup>4</sup>、CONR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>、CONHNH<sub>2</sub>、CONHNHR<sup>4</sup>、CONHNHR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>、COOCH<sub>3</sub>、COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、COOH、COSH、CN、C ≡ CH、SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、SO<sub>2</sub>NHR<sup>4</sup>、SO<sub>2</sub>NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>、SO<sub>3</sub>H、SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、SO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、NHCH<sub>2</sub>COOH、NHCH(CH<sub>3</sub>)COOH、NO<sub>2</sub>、CF<sub>3</sub>、Cl、Br、F、I、CCl<sub>3</sub>、Ph(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)、CH<sub>3</sub>、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>、n-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>、iso-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>、n-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>、iso-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>、tert-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>、OH、OCH<sub>3</sub>、

NH<sub>2</sub>、NHCH<sub>3</sub> 等吸电基团和供电基团。

[0067] R<sup>4</sup> 和 R<sup>5</sup> 是选自 H、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基, 烯基, 醇胺, 烷基胺等的单基团。X、Y 和 Z 是选自 C、N、O 和 S 的单基团, 由此产生的杂环芳香基中的五元环系统是未取代和噻吩, 呋喃, 噻唑, 异噻唑和解草胺取代的。

[0068] 在另一个实施例中, 本发明还提供了通式 (II) 所示的化合物:

[0069]



[0070] 通式 (II)

[0071] 其中

[0072] R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 中至少有一个选自 H、N = N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、N = N-NHCH<sub>3</sub>、N = N-N(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>OH、CONH<sub>2</sub>、CONHR<sup>4</sup>、CONR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>、CONHNH<sub>2</sub>、CONHNHR<sup>4</sup>、CONHR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>、COOCH<sub>3</sub>、COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、COOH、COSH、CN、C ≡ CH、SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、SO<sub>2</sub>NHR<sup>4</sup>、SO<sub>2</sub>NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>、SO<sub>3</sub>H、SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、SO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>、NHCH<sub>2</sub>COOH、NHCH(CH<sub>3</sub>)COOH、NO<sub>2</sub>、CF<sub>3</sub>、Cl、Br、F、I、CCl<sub>3</sub>、Ph (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)、CH<sub>3</sub>、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>、n-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>、iso-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>、n-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>、iso-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>、tert-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>、OH、OCH<sub>3</sub>、NH<sub>2</sub>、NHCH<sub>3</sub> 等吸电基团和供电基团。

[0073] R<sup>4</sup> 和 R<sup>5</sup> 是选自 H、CH<sub>3</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 烷基, 烯基, 醇胺, 烷基胺等的单基团,

[0074] X、Y 和 Z 是选自 C、N、O 和 S 的单基团, 由此产生的杂环芳香基中的五元环系统是未取代和噻吩, 呋喃, 噻唑, 异噻唑和解草胺取代的。通式 (II) 所示的化合物不是 3-甲硫基苯酚 [3,2-d]1,2,3 三嗪-4-酮 (X = Y = C; Z = S; R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = H)。

[0075] 应理解为本发明的保护范围包括所有本文所述的本发明的所有特定实施例的组合, 它们与通式 I 和通式 II 所示的化合物的定义是一致的。

[0076] 本发明所述的通式 I 和通式 II 所示的一些优选的噻吩三氮烯类似物非限制性的为:

[0077] 3-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-2-甲酰胺 (化合物编号:1)

[0078] 3-[(二甲氨基)二氮烯基]-4-溴噻吩-2-甲酰胺 (化合物编号:2)

[0079] 3-[(二甲氨基)二氮烯基]-5-硝基噻吩-2-甲酰胺 (化合物编号:3)

[0080] 4-[(二甲氨基)二氮烯基]-3-甲氧基噻吩-2,5-二甲酰胺 (化合物编号:4)

[0081] 3-[(二甲氨基)二氮烯基]-5-苯基噻吩-2-甲酰胺 (化合物编号:5)

[0082] 3-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-2-羧酸 (化合物编号:6)

[0083] 3-[(二甲氨基)二氮烯基]-5-硝基噻吩-2-羧酸 (化合物编号:7)

[0084] 3-[(二甲氨基)二氮烯基]-5-苯基噻吩-2-羧酸 (化合物编号:8)

[0085] {3-[(二甲氨基)二氮烯基](2-噻吩基)}-N-(2-羟乙基)-甲酰胺 (化合物编号:9)

[0086] {3-[(二甲氨基)二氮烯基](2-噻吩基)}-N-甲酰胺 (化合物编号:10)

[0087] N-(2-氨基) 3-[(二甲氨基)二氮烯基](2-噻吩基)-甲酰胺(化合物编号: 11)

[0088] 4-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-2-甲酰胺(化合物编号: 12)

[0089] 4-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-3-甲酰胺(化合物编号: 13)

[0090] 3-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-2-羧酸酯的钾盐(化合物编号: 14)

[0091] 3-甲基噻吩[2,3-d]1,2,3-三嗪-4-酮(化合物编号: 15)

[0092] 3-甲基-6-硝基噻吩[2,3-d]1,2,3-三嗪-4-酮(化合物编号: 16)

[0093] 6-氨基-3-甲基噻吩[2,3-d]1,2,3-三嗪-4-酮(化合物编号: 17)

[0094] 3-甲基-6-苯基噻吩[3,2-d]1,2,3-三嗪-4-酮(化合物编号: 18)

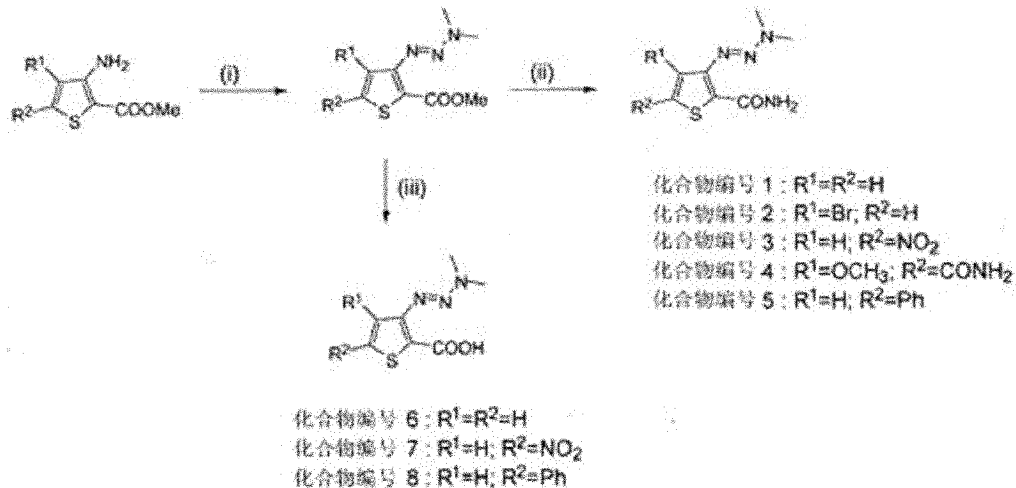
[0095] 本发明同时说明通式 I 和通式 II 所示的化合物是因为它们结构相似。例如将通式 I 所示的钝性化合物氧化去甲基,再用肝微粒激活酶(细胞色素 P450)进行体内活化,激活单甲基三氮烯类似物。同样地,通式 II 所示的化合物在体内水解后,产生通式 I 衍生的具有酶活的单甲基三氮烯类似物。因此由于它们在体内的代谢产物相似,所以在另一个实施例中公开了通式 II 所示的化合物。于是能方便地说明通式 I 和通式 II 所示的化合物,并且由于生物方面的原因可以认为它们的结构相似。

[0096] 三氮烯类似物的合成

[0097] 如本发明的另一个特征所述,本发明还提供了如图所示的一种方法来制备通式 I 和通式 II 所示的三氮烯类似物,其中所有的基团如上文所述。使用如图 A 所示的方法可以制备通式 I 所示的化合物(1-8)。

[0098] 图 A

[0099]



[0100] 试剂 & 条件: (i) HCl, NaNO<sub>2</sub>, 二甲基氨, 0°C; (ii) NH<sub>3</sub>, 室温; (iii) 水合 NaOH, 甲醇, 室温。

[0101] 将甲基 3-氨基噻吩-2-羧酸酯或其前体用亚硝酸钠进行重氮化作用,然后用二甲胺处理,产生高产率的甲基 3-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-2-甲酰胺或其衍生物。将上述酯用氨水处理,获得通式 I 所示的三氮烯类似物(3-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-2-甲酰胺(化合物编号: 1), 化合物编号: 2, 化合物编号: 3, 化合物编号: 4, 化合物编号: 5)

[0102] 在甲醇中,用氢氧化钠水溶液水解甲基 3-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-2-甲酰胺或其衍生物,获得通式 I 所示的三氮烯酸类似物(化合物编号: 6, 化合物编号: 7 和化合

物编号:8)。图A中使用的前体化合物是用下述方法制备而成的:将甲基 3-氨基噻吩-2-羧酸酯(Aldrich)溴化获得甲基 3-氨基-4-溴噻吩-2-甲酰胺。

[0103] 将甲基 4-羟基-5-(甲氧羰基)噻吩-2-羧酸酯(30)硝基化获得甲基 4-羟基-5-(甲氧羰基)-3-硝基噻吩-2-羧酸酯,然后使用硫酸二甲酯将甲基化获得 4-甲氧基-5-(甲氧羰基)-3-硝基噻吩-2-羧酸酯。用铁和 HCl 除去硝基基团获得甲基 3-氨基-4-甲氧基-5-(甲氧羰基)噻吩-2-羧酸酯。用公知的方法制备甲基 3-氨基-5-苯基噻吩-2-羧酸酯(31,32)。

[0104] 使用如图 B 所示的方法可以制备通式 I 所示的化合物(9-11)。

[0105] 图 B

[0106]



化合物编号 9: R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=H; R<sup>3</sup>=CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH

化合物编号 10: R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=H; R<sup>3</sup>=CH<sub>3</sub>

化合物编号 11: R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=H; R<sup>3</sup>=CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>

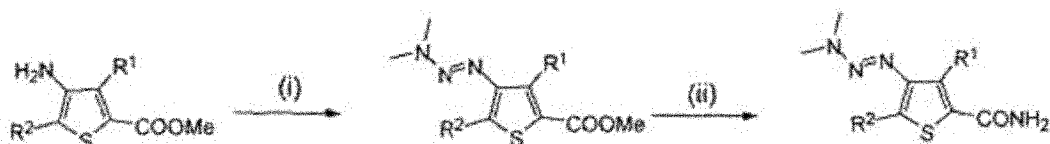
[0107] 试剂 & 条件:(i)NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH 或 NH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> 或 NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, 室温。

[0108] 用各种胺,如甲基胺,乙醇胺和乙二胺处理甲基 3-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-2-羧酸酯,获得相应的通式 I 所示的三氮烯氨基类似物(化合物编号:9,化合物编号:10 和化合物编号:11)。

[0109] 使用如图 C 所示的方法可以制备通式 I 所示的化合物(12)。

[0110] 图 C

[0111]



化合物编号 12: R<sup>1</sup>=R<sup>2</sup>=H

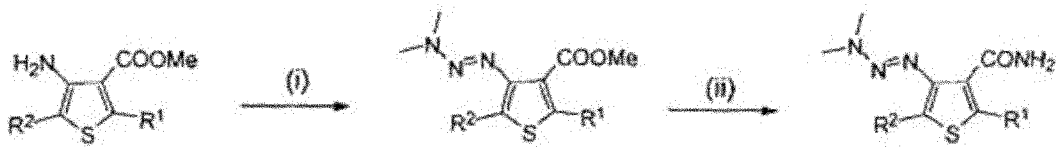
[0112] 试剂 & 条件:(i)HCl, NaNO<sub>2</sub>, 二甲胺, 0℃;(ii)NH<sub>3</sub>, 室温。

[0113] 将甲基 4-氨基噻吩-2-羧酸酯用亚硝酸钠进行重氮化作用,然后用二甲胺处理,产生甲基 4-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-2-羧酸酯。将上述酯用氨水处理,获得所需的 4-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-2-甲酰胺(化合物编号:12)。前体化合物,甲基 4-氨基噻吩-2-羧酸酯从市售的噻吩-2-羧酸制得。硝化噻吩-2-羧酸得到不可分开的 4-硝基噻吩-2-羧酸和 5-硝基噻吩-2-羧酸混合物,其酯化得到相应的酯类。然后,硝基的功能可减少使用铁粉的胺并用硅胶柱层析分离混合物得到甲基 4-氨基噻吩-2-羧酸酯。

[0114] 使用如图 D 所示的方法可以制备通式 I 所示的化合物(13)。

[0115] 图 D

[0116]

化合物编号 13:  $R^1=R^2=H$ 

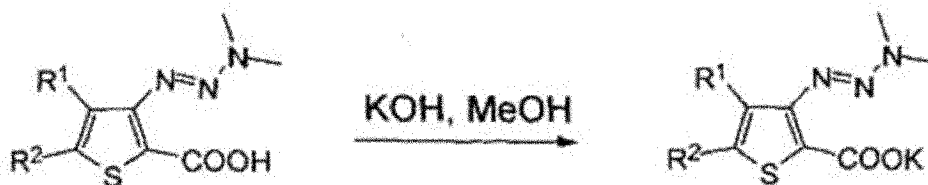
[0117] 试剂 & 条件: (i) HCl,  $\text{NaNO}_2$ , 二甲胺,  $0^\circ\text{C}$ ; (ii)  $\text{NH}_3$ , 室温。

[0118] 将甲基 4-氨基噻吩-3-羧酸酯用亚硝酸钠进行重氮化作用, 然后用二甲胺处理, 产生甲基 4-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-3-羧酸酯。将上述酯用氨水处理, 获得所需的 4-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-3-甲酰胺 (化合物编号: 13)。所述的甲基 4-氨基噻吩-3-羧酸酯是使用现有技术中公知的方法制备而成的 (33, 34, 35)。因此丙烯酸甲酯额外地转化为巯基乙酸甲酯能获得定量产量的甲基 3-[(甲氧羰基)甲硫基]丙酸酯, 它在甲醇钠中能环化产生甲基 4-氧-2,3,5-三氢噻吩-3-羧酸酯。用羟胺处理甲基 4-氧-2,3,5-三氢噻吩-3-羧酸酯, 然后用氨碱化, 获得甲基 4-氨基噻吩-3-羧酸酯。

[0119] 使用如图 E 所示的方法可以制备通式 I 所示的化合物 (14)。

[0120] 图 E

[0121]

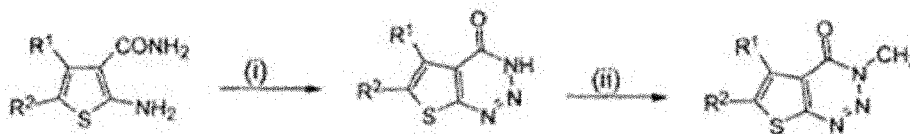
化合物编号 14:  $R^1=R^2=H$ 

[0122] 用氢氧化钾在甲醇中处理 3-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-2-羧酸, 获得对应的通式 I 所示的三氮烯类似物的钾盐, 如化合物编号: 14。

[0123] 使用如图 F 所示的方法可以制备通式 I 所示的化合物 (15-17)。

[0124] 图 F

[0125]

化合物编号 15:  $R^1=R^2=H$ 化合物编号 16:  $R^1=H$ ;  $R^2=\text{NO}_2$ 化合物编号 17:  $R^1=H$ ;  $R^2=\text{NH}_2$ 

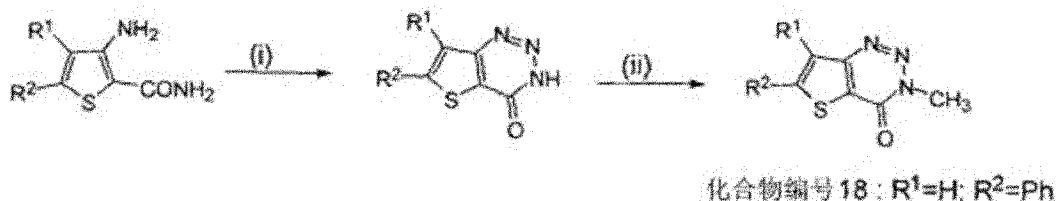
[0126] 试剂 & 条件: (i)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaNO}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$ ; (ii)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{I}$ , 丙酮, 室温。用亚硝酸钠在浓硫酸中对 2-氨基噻吩-3-甲酰胺或其衍生物进行重氮化, 获得 3H-苯硫酚 [2,3-d]1,2,3-三嗪-4-酮或其衍生物。用碘代甲烷在碳酸钾中对 3H-苯硫酚 [2,3-d]1,2,3-三嗪-4-酮或其衍生物进行甲基化, 获得对应的通式 (II) 所示的三氮烯类似物 (化合物编号: 15 或化合物编号: 16 或化合物编号: 17)。2-氨基噻吩-3-甲酰胺是使用现有技术中公知的方法制备

而成的 (36, 37), 而硝基衍生物是处理硝化混合物制备而成的。

[0127] 使用如图 G 所示的方法可以制备通式 I 所示的化合物 (18)。

[0128] 图 G

[0129]



[0130] 试剂 & 条件 : (i) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaNO<sub>2</sub>, 0°C ; (ii) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>I, 丙酮, 室温。

[0131] 用亚硝酸钠在浓硫酸中对 3-氨基-5-苯基噻吩-2-甲酰胺进行重氮化作用, 获得 6-苯基-3H-苯硫酚 [3, 2-d]1, 2, 3-三嗪-4-酮。用碘代甲烷在碳酸钾中对 3H-苯硫酚 [2, 3-d]1, 2, 3-三嗪-4-酮进行甲基化, 获得对应的通式 (II) 所示的三氮烯类似物, 如化合物编号 : 18。

[0132] 在另一个实施例中, 合成通式 I 所示的三氮烯类似物的方法包括使用金属硝酸盐和一种酸对相应的胺化合物进行重氮化作用 ; 所获得的重氮产生可以在一种碱中与胺进行发生反应 ; 最后所述的三氮烯酯会转化为一种羧酸或一种羧基酰胺。

[0133] 合成通式 I 所示的三氮烯类似物的方法中重氮化步骤所使用的金属硝酸盐选自亚硝酸钠或亚硝酸钾, 酸选自无机酸或有机酸。所述的无机酸可以是盐酸, 硫酸等, 有机酸可以是苯甲酸, 甲基苯磺酸等。

[0134] 合成通式 I 所示的三氮烯类似物的方法中重氮化产物是与胺发生反应, 所述的胺选自如甲基胺, 乙基胺等伯胺或者如二甲基胺, 二乙胺等仲胺。

[0135] 合成通式 I 所示的三氮烯类似物的方法中, 所述的羧酸类似物是使用金属氢氧化物在一种溶剂中水解相应的酯获得的。所述的金属氢氧化物选自氢氧化钠或氢氧化钾, 所述的溶剂选自水, 甲醇, 乙醇或它们的混合物。

[0136] 合成通式 I 所示的三氮烯类似物的方法中, 所述的羧酸类似物是室温下使用胺在一种碱溶剂中处理相应的酯获得的。所述的胺选自氨, 甲基胺, 乙醇胺, 乙二胺等, 所述的碱选自碳酸钾, 碳酸钠, 氢氧化钠, 氢氧化钾, 吡啶, 三乙基胺等, 所述的溶剂选自四氢呋喃, 甲醇, 乙醇, 丙酮, 水或它们的混合物。在另一个实施例中, 本发明涉及通式 (I) 和通式 (II) 所示化合物的药物可接受形式盐, 例如有机或无机酸盐。上述通式 (I) 和通式 (II) 所示化合物及其衍生物可以是一种溶剂形式或一种药物可接受形式盐, 如一种酸盐或一种碱盐。这些盐包括盐酸盐, 硫酸盐, 磷酸盐, 柠檬酸盐, 富马酸盐, 磺酸盐, 醋酸盐, 酒石酸盐, 马来酸盐, 乳酸盐, 扁桃酸盐, 琥珀酸盐, 草酸盐, 氨基酸盐及现有技术中其它合适的盐。

[0137] 在另一个实施例中, 本发明涉及通式 (I) 和通式 (II) 所示的光学活性化合物的对映体或非对映体。

[0138] 含有三氮烯类似物的混合物

[0139] 本发明提供了一种药物或兽药混合物 (下文将简称为一种药物混合物), 它可以含有上文所述的一种针对黑色素的类似物, 该类似物与一种药物可接受形式载体或稀释剂混合物。本发明提供了一种药物混合物, 它可以含有上文所述的一种针对黑色素的类似物,



该类似物与一种药物可接受形式载体或稀释剂混合物。

[0140] 本发明所述的药物混合物可以是任何使该混合物能向一个对象给药的形式。例如,该混合物可以是一种固体,液体或气体(喷雾剂)。典型的给药方式非限制性地包括口服,外用,注射,舌下和直肠的给药。本文中使用的术语注射包括皮下注射,静脉注射,肌肉注射,胸骨内注射或灌注技术。本发明所述的药物混合物可以形成为在将其向一个对象给药时,其中的活性成分能发挥生物药效应。

[0141] 在制备所述的药物混合物中使用的原料应是药物级纯的,并且其使用量是无毒的。本领域的普通技术人员可知在药物混合物中活性成分的优选剂量是根据各种因素决定的。有关的因素非限制性地包括对象的类型(如人体),活性成分的特定形式,给药方式和所使用的混合物。

[0142] 通常药物混合物可以包括本文所述的一种黑色素靶向类似物或其衍生物,它与一种或多种载体混合。所述的载体可以是微粒,于是所述混合物如是药片或粉末状。所述的载体可以是液体,此时所述混合物如是口服糖浆或注射液。此外所述的载体可以是气体,于是产生一种喷雾剂混合物来用于如吸入式给药。如果需要口服给药,那么所述的混合物优选是固体或液体状,其中半固体,半液体,悬浮液和凝胶状在本文中作为固体或液体。

[0143] 由于一种固体混合物是口服给药的,因此混合物可以是粉末,颗粒,压缩片剂,丸剂,胶囊剂,口香糖,水等。这样一种固体混合物通常含有一种或多种惰性稀释剂或食用载体。此外可以含有一种或多种下述佐剂:如羧甲基纤维素、乙基纤维素、微晶纤维素或明胶等粘合剂;如淀粉、乳糖或糊精、环糊精等赋形剂,如海藻酸,海藻酸钠,羧甲基淀粉钠,玉米淀粉等裂解剂;如硬脂酸镁或氯化植物油等润滑剂;如二氧化硅胶体等助流剂;如蔗糖或糖精等甜味剂,如薄荷,水杨酸甲酯或橙香味等一种调味剂和一种着色剂。

[0144] 若混合物是一种胶囊,如一种凝胶胶囊,它可以含有上述类型的其它原料,一种液体载体如聚乙二醇或一种脂肪油。

[0145] 所述的混合物可以是一种液体,如一种酞剂,糖浆,溶液,乳液或悬浮液。所述的液体可以是口服给药或注射给药两种实施方式。如果是口服给药,那么优选的混合物除所述的混合物之外还含有一种或多种甜味剂,防腐剂,染料/着色剂和增味剂。如果是注射给药,则含有一种或多种表面活性剂,防腐剂,润湿剂,分散剂,悬浮剂,缓冲剂,稳定剂和等渗剂。本发明所述的液体药物混合物,无论它们是溶液,悬浮液等形式都含有一种或多种下述佐剂:如水等用于注射的无菌稀释液,盐溶液,优选的生理盐水,林格氏液,等渗氯化钠,如合成式单或二甘油酯等能作为溶剂或悬浮媒介使用的挥发性油,乙二醇,甘油,丙二醇或其他溶剂;如苯甲醇或甲基苯甲酸酯等抗菌剂;如抗坏血酸或硫酸氢钠等抗氧化剂;如乙二胺四乙酸等螯合剂;如醋酸,柠檬酸或磷酸盐和氯化钠,葡萄糖等能用于调节弹性的试剂的缓冲剂。所述的注射液制剂可以封装在安瓿,一次性注射器或多次使用的玻璃或塑料小瓶中。生理盐水是一种优选的佐剂。一种可注射的药物混合物优选为无菌的。

[0146] 可以注射或口服给药的一种液体混合物需要含有一定量通式(I)和/或通式(II)所示的三氮烯类似物,从而可以获得一种适宜的剂量。这个量通常至少是混合物中含有1%的本发明的一种化合物。如果是口服给药,这个量可以是混合物重量的0.1-80%。优选的口服混合物含有4%-50%的活性三氮烯化合物。本发明优选的混合物和制剂制备为使一种注射剂量单位至少含有通式(I)和/或通式(II)所示的三氮烯类似物重量的0.01%-1%。

[0147] 所述的药物混合物可以是局部给药,此时合适的载体包括一种溶液,乳剂,软膏或凝胶底物。所述的底物,例如可以包括下述中的一种或多种:凡士林,羊毛脂,聚乙二醇,蜂蜡,矿物油,如水和酒精等稀释剂,乳化剂和稳定剂。增稠剂可以存在于一种药物混合物中用于典型的给药。如果是经皮给药,那么所述的混合物可以含有一种贴剂或离子电泳作用设备。典型的组成可以至少含有通式(I)和/或通式(II)所示的三氮烯类似物的0.1-10% w/v(每单位体积的重量)浓度。

[0148] 用于直肠给药的混合物形为,例如一种悬浮液,它在直肠中融解并释放药物。所述的直肠给药的混合物可以含有一种油性底物作为一种合适的无刺激性赋形剂。这些底物非限制性地包括羊毛脂,可可脂和聚乙二醇。

[0149] 所述的混合物可以含有各种能改变一种固体或液体剂量单位物质形态的原料。例如,所述的混合物可以含有能在通式(I)和/或通式(II)所示的三氮烯类似物周围形成一个涂料外壳的原料。所述的能形成涂料外壳的原料通常是惰性的,可以选自例如糖,虫胶和其它肠溶包衣剂。或者所述的通式(I)和/或通式(II)所示的三氮烯类似物可以装在一个凝胶胶囊中。

[0150] 本发明所述的药物混合物可以由气态剂量单位组成,如它可以是一种喷雾剂型。术语喷雾剂可以用于指从那些胶状性到增压包装组成的系统的各种系统。可以用能将通式(I)和/或通式(II)所示的三氮烯类似物分发的一种液体或增压气体或一种合适的泵系统来实现释放。本发明所述的化合物的喷雾剂可以在单相,双相,三相系统分发,使通式(I)和/或通式(II)所示的三氮烯类似物释放。分发喷雾剂包括必需的容器,活化剂,阀,子容器,间隔等,它们一起形成一个试剂盒。优选的喷雾剂可以由本领域的普通技术人员决定,而不需要过量的实验。在另一个实施例中,本发明的一种药物混合物含有通式(I)和/或通式(II)所示的化合物或其药物可接受形式盐,和至少一种化疗剂和任意一种药物可接受形式稀释剂或载体。

[0151] 上述混合物中所含的化疗剂选自达卡巴嗪,替莫唑胺,甲氨蝶呤,阿霉素,环磷酰胺,5-氟尿嘧啶,顺铂,卡铂,奥沙利铂,长春新碱,长春碱,依托泊苷,伊立替康,托泊替康,紫杉醇,多西他奇,泰索帝,红杉醇,他莫西芬,吉非替尼,亚德里亚霉素,吉西他滨,马法兰,链脲菌素,氟尿苷,6-巯基嘌呤,博来霉素,道诺霉素,丝裂霉素-C,安吡啶,丙卡巴肼,卡培他滨,阿瓦斯丁,赫赛汀,百克沙,万珂,泽娃灵,希罗达,爱必妥(西妥昔单抗),利妥昔单抗,坎帕斯等。

[0152] 用于注射给药的一种混合物可以通过将通式(I)和/或通式(II)所示的三氮烯类似物与水混合形成一种溶液制备而成。可以加入一种表面活性剂来加速均匀溶液或悬浮液的形成。表面活性剂是那些与三氮烯类似物或衍生物非共价结合的化合物,因此它们能促进通式(I)和/或通式(II)所示的三氮烯类似物悬浮液的溶解或均匀化。

[0153] 本发明所述的一种化合物或混合物的有效量可以用于治疗具有黑素瘤的细胞疾病或其它癌症。这些细胞通常是哺乳动物细胞。可以使用公知的方法将通式(I)和/或通式(II)所示的三氮烯类似物的有效量进行给药,这些方法包括吸入式,口服或注射式给药。这些剂型非限制性地包括注射液,片剂,胶囊,缓释植入物和经皮给药系统;或是使用干燥粉末吸入器或增压式多剂吸入装置的吸入式剂型系统。所述的剂量和重复率可以选择为形成所述试剂的一个有效水平,同时没有副作用。通常的有效剂量约为0.01-100mg/kg/

天,口服或静脉注射给药的通常约为 2-10mg/kg/天,滴入或吸入给药的通常约为 0.1-4mg/kg/天。

[0154] 一种药物混合物含有至少一种通式 (I) 和 / 或通式 (II) 所示的化合物或其药物可接受形式盐,并至少一种化疗剂和至少一种生物响应改性剂以及任意一种药物可接受的稀释剂或载体。

[0155] 如上所述,所述的混合物至少含有一种生物响应改性剂,其中所述的生物响应改性剂选自单克隆抗体,干扰素(干扰素- $\gamma$ ),白细胞介素(IL-1、IL-2、IL-9、IL-11、IL-12),各种类型的菌落刺激因子(CSF, GM-CSF, G-CSF), TNF- $\alpha$  受体阻滞剂类药物(TNF- $\alpha$ )等。

[0156] 含有三氮烯类似物的试剂盒及其制备和使用方法

[0157] 本发明的另一个实施例中,一个试剂盒中可以含有上述一种三氮烯类似物来制备本发明的一种药用三氮烯类似物(黑色素靶向类似物)。这些试剂盒通常在医院,临床或其它医疗上使用,以便于根据每天的入院病人做准备。一种抑制患者体内癌症细胞生长或杀死患者体内癌症细胞的方法是使用一个治疗有效量的通式 (I) 和 / 或通式 (II) 所示的化合物向所述的患者给药。

[0158] 一种治疗癌症患者的方法,其中所述的癌症是任意类型的(固体,液体和淋巴起源),它们非限制性地包括转移性恶性黑色素瘤,淋巴瘤(霍奇金,非霍奇金),肉瘤(尤因氏肉瘤),癌,脑瘤,中枢神经系统(CNS)转移,脑胶质瘤,乳腺癌,前列腺癌,肺癌(小细胞和非小细胞),结肠癌,胰腺癌,头颈部癌,口咽部鳞状细胞癌,该方法包括使用一个有效量的通式 (I) 和 / 或通式 (II) 所示的化合物向所述的患者给药

[0159] 如上所述的一种抑制患者体内癌症细胞生长或杀死患者体内癌症细胞的方法,其中一种癌症细胞是从身体任意部分起源的,不限于人体的任何组织,如脑,肺,肾上腺,脑垂体,乳房,前列腺,胰腺,卵巢,胃肠道,肾脏,肝脏,脾脏,睾丸,子宫颈,上、下或中间食道处起源的任意初级或次级肿瘤。

[0160] 一种使用一个有效量的通式 (I) 和 / 或通式 (II) 所示的化合物以任意方式向所述的患者给药的方法,所述的给药方式非限制地包括腹腔内(IP),静脉注射(IV),口服(PO),肌肉注射(IM),皮内(IC),皮层内(ID),宫内,直肠内等。

[0161] 一种使用通式 (I) 和 / 或通式 (II) 所示的化合物向所需的患者给药的方法,其使用了含有不同大小纳米颗粒的乳胶向所需的患者给药。

[0162] 抗肿瘤活性

[0163] 我们评估了通式 (I) 和 / 或通式 (II) 所示的三氮烯类似物的抗肿瘤潜力。所述的细胞增殖分析是在 A2058 细胞中基于 MTT 法,结果显示,与 DTIC 相比,通式 (I) 和 / 或通式 (II) 所示的三氮烯类似物具有更高效的抑制肿瘤细胞增殖能力(表 1)。一些通式 (I) 和 / 或通式 (II) 所示的三氮烯类似物在 50%抑制浓度(IC<sub>50</sub>)下能具有比标准药物(DTIC)更高效的活性。

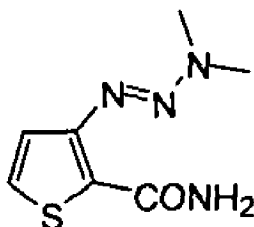
[0164] 类似地,通式 (I) 所述的混合物 6 在 C57B6J 小鼠的 B16F0 色素瘤移植瘤模型中显示了比 DTIC 更高效的抗肿瘤活性。此外混合物 6 还在所测试的两个剂量水平下显示了剂量响应抑制。但是 DTIC 没有在所测试的两个剂量水平下显示显著的剂量响应(图 10)。DTIC 没有剂量响应是与文献报道是一致的,说明 DTIC 是一种血管再生启动剂,但是我们的发现证实混合物 6 是一种血管再生抑制剂(图 7,9)。

[0165] 下面将用实施例来说明本发明,但是这仅用于说明本发明,而不能认为是限制本发明的保护范围。本领域的普通技术人员可以在不偏离本发明权利要求确定的保护范围和特征的情况下对本发明进行各种改变和变化。

### 实施例

[0166] 实施例 1 :3-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-2-甲酰胺(化合物 1)的合成

[0167]



[0168] 步骤 a :

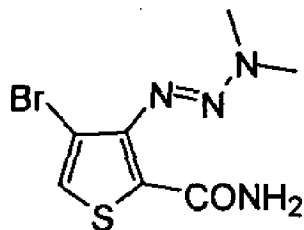
[0169] 甲基 3-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-2-羧酸酯:向一种甲基 3-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-2-羧酸酯(0.5g, 3.18mmol)和浓 HCl(1.3mL, 12.73mmol)的水溶液(7.5mL)中加入 NaNO<sub>2</sub>(0.24g, 3.50mmol), 0°C下静置 5min。然后在 0-5°C下持续搅拌 0.5h。在 0°C下向反应后的混合物中加入 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(1.66g, 12.09mmol)和二甲胺(1.3mL, 40%, 11.46mmol)的水溶液(9mL)。所得的混合物在 0-5°C下持续搅拌 1h, 并加入冰冷水。所获得的溶液用氯仿萃取(3×30mL)。用水, 盐水洗去结合的 CHCl<sub>3</sub>层, 并用硫酸钠干燥。将所得的溶液过滤, 蒸发掉溶剂。残留物通过硅胶柱层析, 柱层析中使用乙烷-乙酸乙酯(80:20)作为洗提液, 最后获得一种淡橙色固体(600mg, 88%), 其熔点为 74-76°C。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.33(1H, d, J = 5.6Hz), 7.24(1H, d, J = 5.6Hz), 3.87(3H, s), 3.52(3H, s), 3.29(3H, s); LC-MS(正离子模式): m/z 214(M+H)<sup>+</sup>。

[0170] 步骤 b :

[0171] 3-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-2-甲酰胺:向冰冷(0-5°C)的氢氧化铵溶液(20mL)中加入一种甲基 3-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-2-羧酸酯(600mg)的 THF 溶液(5mL), 加入时间共计 5 分钟, 然后在室温下持续搅拌 20h。向所得的溶液中加入冰冷水, 将析出的固体过滤并干燥获得粗产物, 然后经过硅胶柱层析, 柱层析中使用氯仿-甲醇(98:2)作为洗提液, 最后获得一种白色固体产物(400mg, 72%), 其熔点为 168-170°C。IR(neat) ν<sub>max</sub> 3337, 3172, 2923, 1636, 1599, 1348, 1219, 1117, 884, 771cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.28(2H, br s), 7.35(1H, d, J = 5.6Hz), 7.31(1H, d, J = 5.6Hz), 3.58(3H, br s), 3.20(3H, br s); LC-MS(正离子模式): m/z 221(M+Na)<sup>+</sup>。

[0172] 实施例 2 :3-[(二甲氨基)二氮烯基]-4-溴噻吩-2-甲酰胺(化合物 2)的合成

[0173]



[0174] 步骤 a :

[0175] 甲基 3-氨基-4-溴噻吩-2-羧酸酯:在室温下,向一种甲基 3-氨基-4-溴噻吩-2-羧酸酯 (1g, 6.36mmol) 的乙酸溶液 (10mL) 中缓慢加入一种溴 (0.32mL, 6.36mmol) 的乙酸溶液 (1mL), 加入时间共计 5 分钟, 然后在室温下持续搅拌 16h。所得的反应混合物中加入冰冷水, 并用氯仿 (3×100mL) 萃取。所结合的有机层用水, 盐水洗去, 并用硫酸钠干燥。过滤所得的溶液并蒸发掉溶剂。残留物进行柱层析, 柱层析中的洗提液为乙烷-乙酸乙酯 (95 : 5), 最后获得一种淡黄色固体 (0.5g, 33%), 其熔点为 58-60°C。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 7.29 (1H, s), 5.63 (2H, br s), 3.85 (3H, s)。

[0176] 步骤 b :

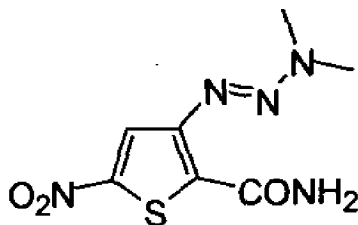
[0177] 甲基 3-[(二甲氨基)二氮烯基]-4-溴噻吩-2-羧酸酯:向一种甲基 3-氨基-4-溴噻吩-2-羧酸酯 (0.5g, 2.11mmol) 和浓 HCl (0.85mL, 8.47mmol) 的水溶液 (5mL) 中加入 NaNO<sub>2</sub> (160mg, 2.33mmol), 在 0°C 下静置 5min。然后在 0-5°C 下持续搅拌 0.5h, 在 0°C 下向反应后的混合物中加入 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.1g, 8.04mmol) 和二甲胺 (0.85mL, 40%, 7.6mmol) 的水溶液 (6mL)。所得的混合物在 0-10°C 下持续搅拌 1h, 并加入冰冷水。所获得的溶液用氯仿萃取 (3×30mL)。用水, 盐水洗去结合的 CHCl<sub>3</sub> 层, 并用硫酸钠干燥。将所得的溶液过滤, 蒸发掉溶剂。残留物通过硅胶柱层析, 柱层析中使用乙烷-乙酸乙酯 (90 : 10) 作为洗提液, 最后获得一种淡橙色固体 (0.5g, 81%)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 7.38 (1H, s), 3.80 (3H, s), 3.53 (3H, br s), 3.28 (3H, br s)。

[0178] 步骤 c :

[0179] 3-[(二甲氨基)二氮烯基]-4-溴噻吩-2-甲酰胺:向冰冷 (0-5°C) 的氢氧化铵溶液 (10mL) 中加入一种甲基 3-[(二甲氨基)二氮烯基]-4-溴噻吩-2-羧酸酯 (500mg) 的 THF 溶液 (5mL), 加入时间共计 5 分钟, 然后在室温下持续搅拌 20h。向所得的溶液中加入冰冷水, 然后用乙酸乙酯 (3x 50mL) 萃取。用水, 盐水洗去结合的乙酸乙酯层, 用硫酸钠干燥。过滤所得的溶液并蒸发掉溶剂。残留物经过硅胶柱层析, 柱层析中使用氯仿-甲醇 (98 : 2) 作为洗提液, 最后获得一种白色固体产物 (250mg, 53%), 其熔点为 194-196°C。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) : δ 7.85 (1H, s), 7.75 (1H, br s), 7.56 (1H, br s), 3.56 (3H, br s), 3.21 (3H, br s); LC-MS (正离子模式) : m/z 277, 279 (M+H)<sup>+</sup>。

[0180] 实施例 3 : 3-[(二甲氨基)二氮烯基]-5-硝基噻吩-2-甲酰胺 (化合物 3) 的合成

[0181]



[0182] 步骤 a :

[0183] 甲基 3-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-2-羧酸酯:向一种甲基 3-氨基噻吩-2-羧酸酯 (2.0g, 12.7mmol) 和浓 HCl (5mL, 50.8mmol) 的水溶液 (30mL) 中加入 NaNO<sub>2</sub> (0.96g, 14.08mmol), 在 0°C 下静置 5min。然后在 0-5°C 下持续搅拌 0.5h, 0°C 下向反应后的混合物中

加入  $K_2CO_3$  (6.65g, 48.26mmol) 和二甲胺 (5.14mL, 40%, 45.7mmol) 的水溶液 (36mL)。所得的混合物在 0-10°C 下持续搅拌 1h, 并加入冰冷水。所获得的溶液用氯仿萃取 (3×100mL)。用水, 盐水洗去结合层, 并用硫酸钠干燥。将所得的溶液过滤, 蒸发掉溶剂。残留物通过硅胶柱层析, 柱层析中使用乙烷-乙酸乙酯 (80 : 20) 作为洗提液, 最后获得一种淡橙色固体 (2.5mg, 91%), 其熔点为 74-76°C。

[0184] 步骤 b :

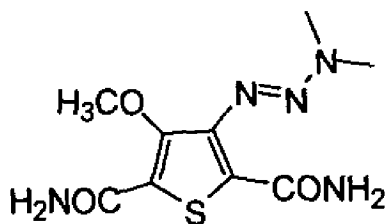
[0185] 甲基 3-[(二甲氨基)二氮烯基]-5-硝基噻吩-2-羧酸酯 : 0-5°C 下将浓硫酸 (20mL) 缓慢地加入到甲基 3-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-2-羧酸酯 (2g, 9.38mmol), 加入时间共计 15min。然后向上述反应后的混合物中加入浓硝酸 (0.54mL, 70%, 10.7mmol), 加入时间共计 10min, 接着在同样的温度下持续搅拌 1h, 并在室温下持续搅拌 16h。向所得的混合物中加入冰冷水, 并用氢氧化铵碱化。所获得的溶液用氯仿萃取 (3×100mL), 用水, 盐水洗去结合的有机层, 并用硫酸钠干燥。将所得的溶液过滤, 蒸发掉溶剂。残留物通过硅胶柱层析, 柱层析中使用乙烷-乙酸乙酯 (80 : 20) 作为洗提液, 最后获得一种淡黄色固体 (450mg, 26%), 其熔点为 128-130°C。

[0186] 步骤 c :

[0187] 3-[(二甲氨基)二氮烯基]-5-硝基噻吩-2-甲酰胺 : 向冰冷 (0-5°C) 的氢氧化铵溶液 (35mL) 中加入一种甲基 3-[(二甲氨基)二氮烯基]-5-硝基噻吩-2-羧酸酯 (400mg) 的 THF 溶液 (10mL), 加入时间共计 5 分钟, 然后在室温下持续搅拌 20h。向所得的溶液中加入冰冷水, 然后用乙酸乙酯 (3×100mL) 萃取。用水, 盐水洗去结合的有机层, 用硫酸钠干燥。过滤所得的溶液并蒸发掉溶剂。残留物经过硅胶柱层析, 柱层析中使用乙烷-乙酸乙酯 (50 : 50) 作为洗提液, 最后获得一种黄色固体产物 (90mg, 26%), 其熔点为 240-246°C。  
 $^1H$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ ) :  $\delta$  8.22 (1H, s), 8.05 (1H, s), 7.91 (1H, s), 3.63 (3H, s), 3.26 (3H, s); LC-MS (正离子模式) : m/z 266 (M+Na) $^+$ 。

[0188] 实施例 4 : 4-[(二甲氨基)二氮烯基]-3-甲氧基噻吩-2,5-二甲酰胺 (化合物 4) 的合成

[0189]



[0190] 步骤 a :

[0191] 甲基 4-羟基-5-(甲氧羰基)-3-硝基噻吩-2-羧酸酯 : 在 0-5°C 下将浓硫酸 (25mL) 缓慢地加入到甲基 4-羟基-5-(甲氧羰基)噻吩-2-羧酸酯 (5g, 23.14mmol), 加入时间共计 15min。然后向上述反应后的混合物中加入浓硝酸 (3.2mL, 70%, 34.7mmol), 加入时间共计 10min, 接着在同样的温度下持续搅拌 1h。向所得的混合物中加入冰冷水, 并用乙酸乙酯 (3×100mL) 萃取。用水, 盐水洗去结合的有机层, 并用硫酸钠干燥。将所得的溶液过滤, 蒸发掉溶剂。残留物通过硅胶柱层析, 柱层析中使用氯仿-甲醇 (95 : 5) 作为洗提液, 最后获得一种黄色半固体产物 (1.2g, 20%)。

[0192] 步骤 b :

[0193] 甲基 4- 甲氧基 -5-( 甲氧羰基 )-3- 硝基噻吩 -2- 羧酸酯 :在室温下向一种甲基 4- 羟基 -5-( 甲氧羰基 )-3- 硝基噻吩 -2- 羧酸酯 (650mg, 2.5mmol) 的丙酮溶液 (20mL) 中加入碳酸钾 (0.68g, 5mmol)。向上述反应后的混合物中缓慢地加入硫酸二甲酯 (0.36mL, 3.73mmol), 在加入的同时持续搅拌, 并加入一个催化量的 KI。所得的混合物回流 4h, 冷却后过滤反应混合物, 所得的残留物通过硅胶柱层析, 柱层析中使用乙烷 - 乙酸乙酯 (90 : 10) 作为洗提液, 最后获得一种淡黄色固体产物 (0.3g, 45%), 其熔点为 80-82°C。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 4.08(3H, s), 3.94(3H, s), 3.92(3H, s)。

[0194] 步骤 c :

[0195] 甲基 3- 氨基 -4- 甲氧基 -5-( 甲氧羰基 ) 噻吩 -2- 羧酸酯 :向一种甲基 4- 甲氧基 -5-( 甲氧羰基 )-3- 硝基噻吩 -2- 羧酸酯 (0.9g, 3.27mmol) 的甲醇溶液 (20mL) 中加入浓盐酸 (0.3mL)。在室温下依次向上述溶液中加入铁粉 (0.91g, 16.36mmol) 和一种氯化铵水溶液 (0.87g, 16.3mmol, 水 :5mL)。持续搅拌所得的反应混合物, 并将其加热至 70°C 保温 1h, 接着冷却至室温。过滤所得的溶液, 用饱和的碳酸氢钠溶液钠碱化。所得的溶液用乙酸乙酯 (4×100mL) 萃取。用水, 盐水洗去结合的有机层, 并用硫酸钠干燥。将所得的溶液过滤, 蒸发掉溶剂, 获得一种淡黄色半固体产物 (0.65g, 81%), 其熔点为 120-124°C。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 5.39(2H, br s), 4.01(3H, s), 3.87(3H, s), 3.85(3H, s); LC-MS( 正离子模式 ) :m/z 246(M+H)<sup>+</sup>。

[0196] 步骤 d :

[0197] 甲基 3-[( 二甲氨基 ) 二氮烯基 ]-4- 甲氧基 -5-( 甲氧羰基 ) 噻吩 -2- 羧酸酯 :向一种甲基 3- 氨基 -4- 甲氧基 -5-( 甲氧羰基 ) 噻吩 -2- 羧酸酯 (0.6g, 2.44mmol) 和浓 HCl (1mL, 9.8mmol) 的水 (10mL) 和丙酮 (10mL) 混合溶液中加入 NaNO<sub>2</sub> (0.19g, 2.7mmol), 在 0°C 下静置 5min。然后在 0-5°C 下持续搅拌 0.5h。在 0°C 下向反应后的混合物中加入 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.28g, 9.3mmol) 和二甲胺 (1mL, 40%, 8.78mmol) 的水溶液 (8mL)。所得的混合物在 0-10°C 下持续搅拌 1h, 并加入冰冷水。所获得的溶液用氯仿萃取 (3×100mL)。用水, 盐水洗去结合的 CHCl<sub>3</sub> 层, 并用硫酸钠干燥。将所得的溶液过滤, 蒸发掉溶剂。残留物通过硅胶柱层析, 柱层析中使用乙烷 - 乙酸乙酯 (80 : 20) 作为洗提液, 最后获得一种淡橙色固体 (0.45g, 62%)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 3.93(3H, s), 3.88(3H, s), 3.82(3H, s), 3.53(3H, br s), 3.26(3H, br s); LC-MS( 正离子模式 ) :m/z 324(M+Na)<sup>+</sup>。

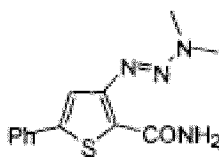
[0198] 步骤 e :

[0199] 4-[( 二甲氨基 ) 二氮烯基 ]-3- 甲氧基噻吩 -2,5- 二甲酰胺 :向冰冷 (0-5°C) 的氢氧化铵溶液 (20mL) 中加入一种甲基 3-[( 二甲氨基 ) 二氮烯基 ]-4- 甲氧基 -5-( 甲氧羰基 ) 噻吩 -2- 羧酸酯 (400mg) 的 THF 溶液 (5mL), 加入时间共计 5 分钟, 然后在室温下持续搅拌 20h。向所得的溶液中加入冰冷水, 然后用乙酸乙酯 (10×50mL) 萃取。用水, 盐水洗去结合的有机层, 用硫酸钠干燥。过滤所得的溶液并蒸发掉溶剂。残留物经过氯仿 - 甲醇柱层析, 最后获得一种白色固体产物 (80mg, 22%), 其熔点为 226-228°C。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) : δ 7.86(1H, s), 7.81(1H, s), 7.73(1H, s), 7.35(1H, s), 3.72(3H, s), 3.59(3H, br s), 3.21(3H, br s); LC-MS( 正离子模式 ) :m/z 294(M+Na)<sup>+</sup>。

[0200] 实施例 5 :3-[( 二甲氨基 ) 二氮烯基 ]-5- 苯基噻吩 -2- 甲酰胺 ( 化合物 5) 的合

成

[0201]



[0202] 步骤 a :

[0203] 3-氯-3-苯丙基-2-烯腈:向冰冷(0-5℃)的二甲基甲酰胺(25.6mL,333.2mmol)溶液中滴加三氯氧磷(15.6mL,166.6mmol),并搅拌15分钟。向这种冷的混合物中滴加苯乙酮(10g,83mmol),同时使反应混合物的温度保持在45-55℃,维持10min。将所得的反应混合物缓慢冷却至室温,并维持30min。向所得的反应混合物中加入7mL的盐酸羟胺(23.1g,333.2mmol)的干DMF溶液(33mL),在70-80℃下持续搅拌混合物5分钟。然后将反应混合物的温度升高约145-155℃,并以前面的速度向混合物中加入剩余的盐酸羟胺DMF溶液。加完后将反应混合物置于室温中30min,并用冷水(0.5L)稀释。所得的溶液用氯仿萃取,所得的氯仿层用水,盐水洗去,再用硫酸钠干燥。过滤所得的溶液并蒸发掉溶剂。残留物经过硅胶柱层析,柱层析的洗提液为己烷-乙烷(98:2),最后获得一种油状产物(7g,52%)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,CDCl<sub>3</sub>):δ 7.64-7.67(2H,m),7.43-7.53(3H,m),6.02(1H,s)。

[0204] 步骤 b :

[0205] 甲基3-氨基-5-苯噻吩-2-羧酸酯:向一种甲基巯基乙酸(1g,9.43mmol)的甲醇溶液(5mL)中加入一种甲醇钠(0.5g,9.43mmol)的甲醇溶液(5mL),并持续搅拌0.5h。在室温下向上述混合物中滴加一种3-氯-3-苯丙基-2-烯腈(1.22g,7.5mmol)的DMF溶液(3.5mL),滴加时间总计10min,然后在60℃下持续搅拌混合物2h。在室温下滴加一种甲醇钠(1g,18.6mmol)的甲醇溶液(10mL),60℃下持续搅拌2h。所得的混合物降到室温,并加入冷水,搅拌15min。所得的溶液用氯仿(3×100mL)萃取,所得的结合氯仿层用水,盐水洗去,再用硫酸钠干燥。过滤所得的溶液并蒸发掉溶剂。残留物经过硅胶柱层析,柱层析的洗提液为己烷-乙烷(92:8),最后获得一种淡黄色固体产物(1.1g,50%),其熔点为130-132℃。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>):δ 7.62-7.65(2H,m),7.38-7.48(3H,m),7.00(1H,s),4.29(2H,br s),3.74(3H,s);LC-MS(正离子模式):m/z 234(M+H)<sup>+</sup>。

[0206] 步骤 c :

[0207] 甲基3-[(二甲氨基)二氮烯基]-5-苯基噻吩-2-羧酸酯:向一种甲基3-氨基-5-苯噻吩-2-羧酸酯(5g,21.4mmol)和浓盐酸(9mL,85.8mmol)的水溶液(51mL)中加入丙酮(30mL)来溶解该产物。接着加入NaNO<sub>2</sub>(1.7g,23.6mmol),在0℃下静置5min。然后在0-5℃下持续搅拌1h,在0℃下向反应后的混合物中加入K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(11.2g,81.5mmol)和二胺(8.5mL,40%,77.2mmol)的水溶液(60mL)。所得的混合物在0-5℃下持续搅拌1h,并加入冰冷水。所获得的溶液用氯仿(3×30mL)萃取。用水,盐水洗去结合的CHCl<sub>3</sub>层,并用硫酸钠干燥。将所得的溶液过滤,蒸发掉溶剂。残留物通过硅胶柱层析,柱层析中使用乙烷-乙酸乙酯(90:10)作为洗提液,最后获得一种淡褐色固体(3.8g,76%),其熔点为92-94℃。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>):δ 7.78-7.80(2H,m),7.64(1H,s),7.46-7.52(3H,m),3.84(3H,s),3.60(3H,s),3.28(3H,s);LC-MS(正离子模式):m/z 290(M+H)<sup>+</sup>。

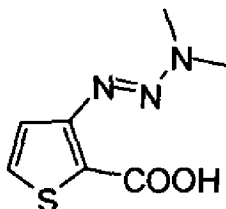
[0208] 步骤 d :



[0209] 3-[(二甲氨基)二氮烯基]-5-苯基噻吩-2-甲酰胺:向冰冷(0-5℃)的氢氧化胺(80mL)溶液中依次加入一种甲基3-[(二甲氨基)二氮烯基]-5-苯基噻吩-2-羧酸酯(2.2g)的THF溶液(15mL)和催化量的PEG-400,加入时间总计5min,所得的混合物在室温下持续搅拌36h。所得的溶液中加入冰冷水,并用氯仿萃取。所得的结合有机层用水,盐水洗去,再用硫酸钠干燥。过滤所得的溶液并蒸发掉溶剂。残留物经过硅胶柱层析,柱层析的洗提液为氯仿-甲醇(94:6),最后获得所述的产物。该粗产物用氯仿-己烷再结晶获得一种黄色固体产物(170mg,8%),其熔点为220-222℃。IR(neat) $\nu_{\max}$  3343, 2922, 2855, 1642, 1595, 1221, 1023, 880, 841 $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$ (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.30(1H, br s), 7.64-7.66(2H, m), 7.53(1H, s), 7.30-7.41(3H, m), 6.34(1H, br s), 3.59(3H, s), 3.20(3H, s);  $^{13}\text{C NMR}$ (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  164.7, 151.1, 146.7, 133.9, 128.9, 128.5, 125.8, 125.4, 114.7, 43.6, 36.5; LC-MS(正离子模式):  $m/z$  297(M+Na) $^+$ 。

[0210] 实施例6:3-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-2-羧酸(化合物6)的合成

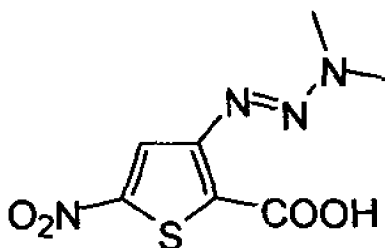
[0211]



[0212] 向一种甲基3-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-2-羧酸酯(200mg, 0.93mmol)的甲醇溶液(10mL)中加入一种氢氧化钠(93mg, 2.3mmol)的水溶液(2mL),在室温下持续搅拌2h。所得的混合物用冰冷水稀释,并用稀释剂HCl酸化,再用氯仿萃取。用水,盐水洗去结合的 $\text{CHCl}_3$ 层,并用硫酸钠干燥。将所得的溶液过滤,蒸发掉溶剂。残留物通过硅胶柱层析,柱层析中使用己烷-乙酸乙酯(80:20)作为洗提液,最后获得一种白色固体(70mg, 38%),其熔点为108-110℃。IR(neat) $\nu_{\max}$  3402, 3082, 2923, 1708, 1218, 1116, 1066, 1016, 880, 773 $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$ (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  12.21(1H, s), 7.47(1H, d,  $J = 5.2\text{Hz}$ ), 7.30(1H, d,  $J = 5.2\text{Hz}$ ), 3.65(3H, s), 3.28(3H, s); LC-MS(正离子模式):  $m/z$  200(M+H) $^+$ 。

[0213] 实施例7:3-[(二甲氨基)二氮烯基]-5-硝基噻吩-2-羧酸(化合物7)的合成

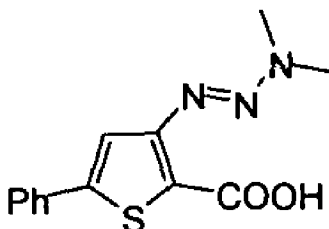
[0214]



[0215] 在室温下向一种甲基3-[(二甲氨基)二氮烯基]-5-硝基噻吩-2-羧酸酯(550mg)的甲醇溶液(10mL)中加入一种氢氧化钠(5mL水中含有0.25g)溶液,持续搅拌该混合物14h。减压蒸发掉过量的甲醇,所得的残留物用冰冷水稀释。所得的溶液用稀HCl酸化,滤去析出的固体,用水洗涤后干燥,获得一种黄色固体产物(450mg, 86%)。所得的粗产物用氯仿-甲醇(290mg)重结晶,获得的产物熔点为184-186℃。 $^1\text{H NMR}$ (400MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  13.26(1H, br s), 8.00(1H, s), 3.59(3H, s), 3.25(3H, s); LC-MS(正离子模式):  $m/z$

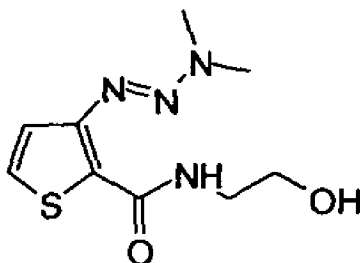
245 (M+H)<sup>+</sup>。

[0216] 实施例 8 :3-[(二甲氨基)二氮烯基]-5-苯基噻吩-2-羧酸 (化合物 8) 的合成  
[0217]



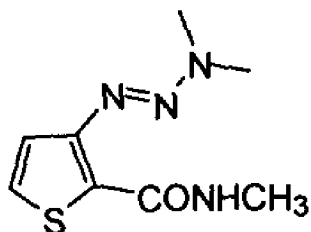
[0218] 向一种甲基 3-[(二甲氨基)二氮烯基]-5-苯基噻吩-2-羧酸酯 (1.8g, 6.22mmol) 的甲醇溶液 (50mL) 中加入一种氢氧化钠 (1.24g, 31.1mmol) 的水溶液 (15mL), 在室温下持续搅拌 16h。所得的混合物用冰冷水稀释, 并用稀 HCl 酸化。所得的混合物持续搅拌 30min, 过滤掉析出的固体, 用水洗涤并干燥。所得的固体通过硅胶柱层析, 柱层析中使用己烷-乙酸乙酯 (70 : 30) 作为洗提液, 获得产物。该粗固体产物用己烷-氯仿重结晶, 获得一种淡粉色固体 (1.1g, 61%), 其熔点为 162-166°C。IR(neat)  $\nu_{\max}$  2923, 2853, 1708, 1260, 1220, 1173, 1042, 1020, 879, 836  $\text{cm}^{-1}$ ; <sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  12.15(1H, br s), 7.58-7.60(2H, m), 7.44(1H, s), 7.32-7.40(3H, m), 3.65(3H, s), 3.25(3H, s); <sup>13</sup>C NMR(100MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  162.8, 153.3, 149.7, 133.3, 129.1, 129.0, 125.9, 120.1, 113.4, 44.3, 37.0; LC-MS(正离子模式): m/z 298 (M+Na)<sup>+</sup>。

[0219] 实施例 9 :{3-[(二甲氨基)二氮烯基](2-噻吩基)}-N-(2-羟乙基)-甲酰胺 (化合物 9) 的合成  
[0220]



[0221] 向一种乙醇胺 (5mL) 的 THF (5mL) 冰冷 (0-5°C) 溶液中加入一种甲基 3-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-2-羧酸酯 (500mg) 的 THF 溶液 (5mL), 加入时间总计 5min, 然后在室温下持续搅拌 20h。所得的溶液中加入冰冷水, 然后用乙酸乙酯 (3×50mL) 萃取。用水, 盐水洗去结合的乙酸乙酯层, 再用硫酸钠干燥。所得的溶液过滤后蒸发掉溶剂。所得的残留物经过硅胶柱层析, 柱层析中使用氯仿-甲醇 (95 : 5) 作为洗提液, 获得的产物用氯仿-己烷重结晶得到一种淡橙色固体产物 (430mg, 77%), 其熔点为 118-122°C。IR(neat)  $\nu_{\max}$  3397, 3278, 2926, 1621, 1353, 1298, 1220, 1083, 1007, 882, 775  $\text{cm}^{-1}$ ; <sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8.86(1H, br s), 7.31(1H, d, J = 5.6Hz), 7.28(1H, d, J = 5.2Hz), 3.78-3.82(2H, m), 3.60-3.64(2H, m), 3.57(3H, br s), 3.23(3H, br s), 2.76(1H, t, J = 5.0Hz); LC-MS(正离子模式): m/z 243 (M+H)<sup>+</sup>。

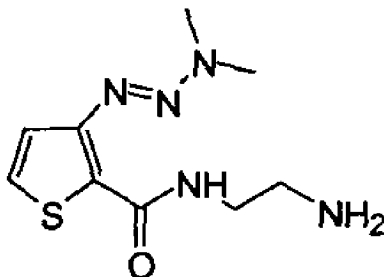
[0222] 实施例 10 :{3-[(二甲氨基)二氮烯基](2-噻吩基)}-N-甲酰胺 (化合物 10) 的合成  
[0223]



[0224] 向一种甲基胺 (3mL) 的 THF 冰冷 (0-5°C) 溶液 (5mL) 中加入一种甲基 3-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-2-羧酸酯 (500mg) 的 THF 溶液 (5mL), 加入时间总计 5min, 然后在室温下持续搅拌 36h。所得的溶液中加入冰冷水, 然后用氯仿 (3×100mL) 萃取。用水, 盐水洗去结合的氯仿层, 再用硫酸钠干燥。所得的溶液过滤后蒸发掉溶剂。所得的残留物经过硅胶柱层析, 柱层析中使用氯仿-甲醇 (98 : 2) 作为洗提液, 获得的产物用氯仿-己烷重结晶得到一种淡橙色固体产物 (380mg, 76%), 其熔点为 98-102°C。IR (neat)  $\nu_{\max}$  3297, 3082, 2929, 1637, 1380, 1348, 1299, 1221, 1109, 1016, 882, 776 $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.35 (1H, br s), 7.29 (1H, d,  $J = 5.2\text{Hz}$ ), 7.27 (1H, d,  $J = 5.2\text{Hz}$ ), 3.57 (3H, br s), 3.21 (3H, br s), 3.00 (3H, d,  $J = 4.8\text{Hz}$ ); LC-MS (正离子模式):  $m/z$  213 (M+H) $^+$ 。

[0225] 实施例 11 : N-(2-氨基乙基) 3-[(二甲氨基)二氮烯基] (2-噻吩基) -甲酰胺 (化合物 11) 的合成

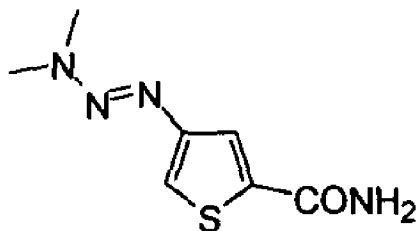
[0226]



[0227] 向一种乙二胺 (5mL) 的乙醇冰冷 (0-5°C) 溶液 (5mL) 中加入一种甲基 3-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-2-羧酸酯 (250mg) 的乙醇溶液 (5mL), 加入时间总计 5min, 然后在室温下持续搅拌 24h。所得的溶液中加入冰冷水, 然后加入氯化钠使之成为氯化钠饱和溶液。所得的溶液用 THF (3×100mL) 萃取。用水, 盐水洗去结合的 THF 层, 再用硫酸钠干燥。所得的溶液过滤后蒸发掉溶剂。所得的残留物经过硅胶柱层析, 柱层析中使用氯仿-甲醇 (90 : 10) 作为洗提液, 获得一种白色固体产物 (60mg, 22%), 其熔点为 98-100°C。 $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.65 (1H, br s), 7.30 (1H, d,  $J = 5.2\text{Hz}$ ), 7.28 (1H, d,  $J = 5.2\text{Hz}$ ), 3.50-3.57 (5H, m), 3.24 (3H, br s), 2.91 (2H, t,  $J = 6.0\text{Hz}$ )。

[0228] 实施例 12 : 4-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-2-甲酰胺 (化合物 12) 的合成

[0229]



[0230] 步骤 a :

[0231] 4-硝基噻吩-2-羧酸:在0-10℃下向硝酸(2.0mL, 2.98g, 49.6mmol)中缓慢地加入硫酸(3.0mL, 5.505g, 56.17mmol)。加完后在相同温度下向上述硝酸混合物中缓慢地加入噻吩-2-羧酸(2.8g, 21.87mmol),加入时间总计15min,然后持续地搅拌该混合物1h。所得的反应混合物中加入冰冷水,搅拌30min。滤去析出的固体,用冷水,盐水洗涤并用硫酸钠干燥。所得的溶液过滤后蒸发掉溶剂。加入己烷(2×50mL)并搅拌,滤去析出的固体并干燥,得到一种白色固体产物(2.8g, 75%),其熔点为110-118℃。HPLC和<sup>1</sup>H NMR显示所得的产物是一种含有两种化合物的混合物,其将在下面的步骤中接着处理。

[0232] 步骤b:

[0233] 甲基4-硝基噻吩-2-羧酸酯:在室温下向一种硝基噻吩-2-羧酸(6.8g, 39.3mmol)的甲醇溶液(50mL)中滴加亚硫酸二氯(6mL, 78.6mmol),滴加的同时持续地搅拌。所得的反应混合物回流2h后冷却至室温。所得的混合物中加入冰冷水并搅拌15min。滤去析出的固体,用冷水洗涤并干燥,获得一种白色固体产物(6.2g, 85%)。<sup>1</sup>H NMR显示该产物是一种含有两种化合物的混合物,该粗产物将在下面的步骤中接着处理。

[0234] 步骤c:

[0235] 甲基4-氨基噻吩-2-羧酸酯:向一种甲基硝基噻吩-2-羧酸酯(7g, 37.43mmol)的水(150mL)和甲醇(50mL)混合溶液中加入浓盐酸(4.5mL)。在室温下向上述溶液中依次加入铁粉(10.5g, 188mmol)和氯化铵(10g, 187mmol)。搅拌所得的反应混合物并加热到70℃保持1h,然后冷却至室温。过滤所得的溶液并用饱和的重碳酸钠溶液碱化。所得的溶液用氯仿(4×100mL)萃取。用硫酸钠干燥所得的结合有机层并过滤。蒸发掉溶剂所得的残留物经过硅胶柱层析,柱层析中使用己烷-乙酸乙酯(90:10,并含有少量的三乙基胺)作为洗提液,获得甲基4-氨基噻吩-2-羧酸酯(1.8g, 31%),其熔点为76-78℃。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.31(1H, d, J = 1.6Hz), 6.40(1H, d, J = 1.6Hz), 3.85(3H, s), 3.63(2H, br s)。再用具有相同溶剂系统的柱来洗提所获得的甲基5-氨基噻吩-2-羧酸酯(0.5g, 8.5%),其熔点为70-72℃。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.45(1H, d, J = 4.0Hz), 6.09(1H, d, J = 4.0Hz), 4.29(2H, br s), 3.81(3H, s)。

[0236] 步骤d:

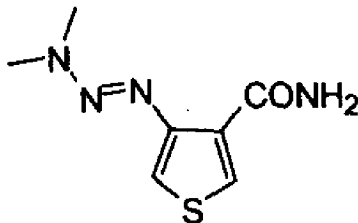
[0237] 甲基4-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-2-羧酸酯:向一种甲基4-氨基噻吩-2-羧酸酯(1.7g, 10.82mmol)和浓盐酸(4.6mL, 43.5mmol)的水溶液(20mL)中加入NaNO<sub>2</sub>(0.84g, 12.17mmol),在0℃下静置5min。然后在0-5℃下持续搅拌1h并加入冰冷水。所获得的溶液用氯仿萃取(3×100mL)。用水,盐水洗去结合的CHCl<sub>3</sub>层,并用硫酸钠干燥。将所得的溶液过滤,蒸发掉溶剂。残留物通过硅胶柱层析,柱层析中使用乙烷-乙酸乙酯(80:20)作为洗提液,将获得的产物用氯仿-己烷(110mg)重结晶,最后获得一种淡红色固体产物(250mg),其熔点为90-92℃。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.93(1H, d, J = 1.6Hz), 7.31(1H, d, J = 1.6Hz), 3.88(3H, s), 3.31(6H, br s)。

[0238] 步骤e:

[0239] 4-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-2-羧酸酯:向一种氢氧化铵的冰冷(0-5℃)溶液(5mL)中加入一种甲基4-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-2-羧酸酯(110mg)的THF溶液(2mL),加入时间总计5min,在室温下持续搅拌20h。所得的溶液中加入冰冷水,然后用氯仿萃取。用水,盐水洗去结合的有机层,并用硫酸钠干燥。将所得的溶液过滤,蒸发掉溶剂。

残留物通过硅胶柱层析,柱层析中使用氯仿-甲醇(99:1)作为洗提液,获得一种淡红色固体产物(60mg,60%),其熔点为128-130℃。IR(neat) $\nu_{\max}$  3372,3189,1648,1609,1219,1120,1088,865,772 $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$ (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.68(1H, d,  $J = 1.2\text{Hz}$ ), 7.28(1H, d,  $J = 1.2\text{Hz}$ ), 6.18(2H, br s), 3.29(6H, br s); LC-MS(正离子模式):  $m/z$  199(M+H) $^+$ 。

[0240] 实施例 13:4-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-3-甲酰胺(化合物 13)的合成  
[0241]



[0242] 步骤 a:

[0243] 甲基 3[(甲氧羰基)甲硫基]丙酸酯:在室温下,将丙烯酸甲酯(4.25g,49.5mmol)滴加到一种持续搅拌的巯基乙酸甲酯(5g,47.16mmol)和哌啶(0.10mL)溶液中,滴加时间超过20min。大约有一半的丙烯酸酯转化后,再加入哌啶(0.10mL)。加完丙烯酸酯之后,所得的反应混合物在室温下持续搅拌1h。所得的混合物用100mL氯仿稀释。用水,盐水洗去氯仿层,并用硫酸钠干燥。过滤所得的溶液并蒸发掉溶剂,获得一种油状产物(9g,100%)。

[0244] 步骤 b:

[0245] 甲基 4-氧-2,3,5-三羟基噻吩-3-羧酸酯:在室温下,向一种持续搅拌的甲醇钠(1.68g,31.25mmol)的干THF(15mL)浆液中加入一种去甲基-3-硫己烷标准品(5g,26.03mmol)的THF(10mL)溶液,加入时间总计5min。所得的反应混合物加热回流2h后冷却至室温,再加入冰冷水,用稀HCl酸化。所得的溶液用氯仿萃取,然后用水,盐水洗去结合的氯仿层,并且硫酸钠干燥。过滤所得的溶液并蒸发掉溶剂。所得的残留物经过硅胶柱层析,柱层析中使用己烷-乙酸乙酯(95:5)作为洗提液,获得一种淡黄色油状产物(1.6g,39%)。

[0246] 步骤 c:

[0247] 氯化甲基 4-氨基噻吩-3-羧酸酯:搅拌混合 4-氧-3-甲氧基羰基四水噻吩(6.5g,40.62mmol),盐酸羟胺(2.84g,40.62mmol)和乙腈(30mL),然后回流1h。冷却所得的混合物,过滤分离出固体,用干乙醚洗涤后,获得题述的化合物(4.9g,62%),其熔点为192-196℃。

[0248] 步骤 d:

[0249] 甲基 4-氨基噻吩-3-羧酸酯:氯化甲基 4-氨基噻吩-3-羧酸酯(290mg)溶解于水(20mL)中,用氨水溶液碱化。所得的溶液用氯仿萃取,用水,盐水洗去结合的氯仿层,再用硫酸钠干燥。过滤所得的溶液并蒸发掉溶剂,获得粉黄色油状产物(150mg,65%)。 $^1\text{H NMR}$ (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.92(1H, d,  $J = 3.6\text{Hz}$ ), 6.08(1H, d,  $J = 3.6\text{Hz}$ ), 4.79(2H, br s), 3.85(3H, s)。

[0250] 步骤 e:

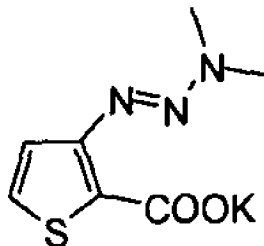
[0251] 甲基 4-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-3-羧酸酯:向一种甲基 4-氨基噻吩-3-羧酸酯(200mg,1.27mmol)和浓盐酸(0.5mL,5.09mmol)的水溶液(5mL)中加入  $\text{NaNO}_2$ (96mg,

1.39mmol), 在 0°C 下静置 5min。然后在 0-5°C 下持续搅拌 0.5h, 在 0°C 下向反应后的混合物中加入  $K_2CO_3$  (665mg, 4.8mmol) 和二甲胺 (0.5mL, 40%, 4.57mmol) 的水溶液 (5mL)。所得的混合物在 0-5°C 下持续搅拌 1h, 并加入冰冷水。所获得的溶液用氯仿萃取 (3×30mL)。用水, 盐水洗去结合的  $CHCl_3$  层, 并用硫酸钠干燥。将所得的溶液过滤, 蒸发掉溶剂。残留物通过硅胶柱层析, 柱层析中使用乙烷-乙酸乙酯 (90 : 10) 作为洗提液, 最后获得一种淡红色固体 (20mg, 8%)。 $^1H$  NMR (400MHz,  $CDCl_3$ ) :  $\delta$  8.00 (1H, d,  $J = 2.8$ Hz), 6.97 (1H, d,  $J = 3.6$ Hz), 3.85 (3H, s), 3.34 (6H, br s)。

[0252] 步骤 f :

[0253] 4-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-3-甲酰胺 : 向一种氢氧化铵的冰冷 (0-5°C) 溶液 (5mL) 中加入一种甲基 4-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-3-羧酸酯 (110mg) 的 THF 溶液 (2mL), 加入时间总计 5min, 在室温下持续搅拌 36h。所得的溶液中加入冰冷水, 然后用氯仿萃取。用水, 盐水洗去结合的有机层, 并用硫酸钠干燥。将所得的溶液过滤, 蒸发掉溶剂。残留物通过硅胶柱层析, 柱层析中使用氯仿-甲醇 (98 : 2) 作为洗提液, 获得一种淡红色固体产物 (25mg, 25%), 其熔点为 168-172°C。IR (neat)  $\nu_{max}$  3324, 3125, 2917, 2851, 1655, 1600, 1367, 1336, 1090  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  NMR (400MHz,  $CDCl_3$ ) :  $\delta$  8.55 (1H, br s), 8.19 (1H, d,  $J = 3.6$ Hz), 7.15 (1H, d,  $J = 3.6$ Hz), 5.84 (1H, br s), 3.56 (3H, br s), 3.19 (3H, br s); LC-MS (正离子模式) :  $m/z$  199 (M+H)<sup>+</sup>。

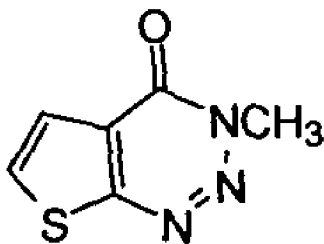
[0254] 实施例 14 : 3-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-2-羧酸的钾盐 (化合物 14) 的合成  
[0255]



[0256] 在室温下, 向一种 3-[(二甲氨基)二氮烯基]噻吩-2-羧酸 (实施例 4 : 300mg, 1.50mmol) 的甲醇溶液 (15mL) 中加入一种氢氧化钠 (84mg, 1.50mmol) 的甲醇溶液 (5mL), 所得的混合物在同样的温度下持续搅拌 1h。过滤所得的溶液以去除所有杂质, 然后减压蒸发, 获得一种棕色的固体化合物 (290mg, 81%), 其熔点为 274-280°C。 $^1H$  NMR (400MHz,  $D_2O$ ) :  $\delta$  7.36 (1H, d,  $J = 5.6$ Hz), 7.10 (1H, d,  $J = 5.6$ Hz); LC-MS (正离子模式) :  $m/z$  238 (M+H)<sup>+</sup>。

[0257] 实施例 15 : 3-甲基噻吩 [2,3-d]1,2,3-三嗪-4-酮 (化合物 15) 的合成

[0258]



[0259] 步骤 a :

[0260] 2-氨基噻吩-3-甲酰胺 : 在室温下, 向一种 2,5-二羟基-1,4-二噻烷 (10g, 65.78mmol) 的乙醇 (200mL) 和三乙胺 (2mL) 混合溶液中加入氰基乙酰胺 (5.52g,

65.78mmol), 加入时间总计 15min。所得的溶液用乙酸乙酯 (3×100mL) 萃取, 用水, 盐水洗去结合的乙酸乙酯层, 并用硫酸钠干燥。将所得的溶液过滤, 蒸发掉溶剂。残留物通过硅胶柱层析, 柱层析中使用氯仿-甲醇 (95 : 5) 作为洗提液, 获得一种淡黄色固体产物 (4.9g, 53%), 其熔点为 150-152°C。

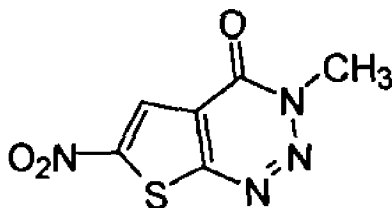
[0261] 步骤 b :

[0262] 3H- 硫代苯基 [2,3-d]1,2,3- 三嗪-4- 酮 : 向 2- 氨基噻吩-3- 甲酰胺 (5g, 35.21mmol) 的冰冷 (0°C) 浓硫酸溶液 (40mL) 中加入一种硝酸钠 (2.5g, 35.21mmol) 的冷 (0°C) 浓硫酸溶液 (30mL) 中, 加入时间总计 30min (加入时温度需保持在 -5-0°C)。加入后在同样的温度下 (0°C) 搅拌混合物 3h。并在 15min 内边搅拌边向所得的混合物中缓慢加入碎冰, 并在同样的温度下再搅拌 15min。所得的溶液用乙酸乙酯 (4×200mL) 萃取, 用水, 盐水洗去结合的乙酸乙酯层, 并用硫酸钠干燥。将所得的溶液过滤, 蒸发掉溶剂。残留物通过硅胶柱层析, 柱层析中使用氯仿-甲醇 (95 : 5) 作为洗提液, 获得一种淡红色固体产物 (1.0g, 18%), 其熔点为 175-176°C。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) : δ 15.18 (1H, s), 8.16 (1H, d, J = 5.6Hz), 7.64 (1H, d, J = 5.6Hz); <sup>13</sup>C NMR (100MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) : δ 159.1, 153.8, 132.0, 126.1, 121.2; LC-MS (负离子模式) : m/z 152 (M-H)<sup>-</sup>。

[0263] 步骤 c :

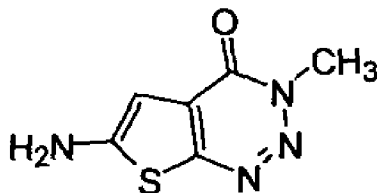
[0264] 3- 甲基噻吩 [2,3-d]1,2,3- 三嗪-4- 酮 : 在室温下向一种 3H- 噻吩 [2,3-d]1,2,3- 三嗪-4- 酮 (80mg, 0.522mmol) 的丙酮溶液 (50mL) 依次加入碳酸钾 (144mg, 1.04mmol), 碘代甲烷 (0.04mL, 0.627mmol) 和碘化钾 (催化剂), 所得的混合物在室温下搅拌 3h。过滤溶液后得到的固体用丙酮洗涤。然后减压蒸发丙酮, 用冰冷水稀释, 搅拌 10min。所得的溶液用氯仿 (4×75mL) 萃取, 并用水, 盐水洗去结合的 CHCl<sub>3</sub> 层, 并用硫酸钠干燥。将所得的溶液过滤, 蒸发掉溶剂。残留物通过硅胶柱层析, 柱层析中使用己烷-乙烷乙酯 (90 : 10) 作为洗提液, 获得一种白色固体产物 (50mg, 57%), 其熔点为 104-108°C。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) : δ 8.17 (1H, d, J = 5.6Hz), 7.64 (1H, d, J = 5.6Hz), 3.95 (3H, s); <sup>13</sup>C NMR (100MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 159.4, 153.9, 130.7, 125.6, 121.7, 37.3。

[0265] 实施例 16 : 3- 甲基-6- 硝基噻吩 [2,3-d]1,2,3- 三嗪-4- 酮 (化合物 16) 的合成  
[0266]



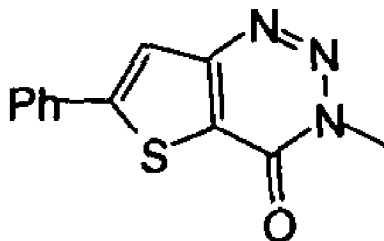
[0267] 向一种浓硫酸的冰冷 (-10°C) 溶液 (5mL) 中加入 3- 甲基噻吩 [2,3-d]1,2,3- 三嗪-4- 酮 (0.6g, 3.6mmol), 加入时间总计 10min, 然后向上述反应混合物中加入硝酸 (0.4mL, 9mmol), 加入时间总计 5min, 所得的混合物升到室温并搅拌 1h。所得的混合物中加入冰水并搅拌 15min。过滤析出的固体, 通过硅胶柱层析, 柱层析中使用己烷-氯仿 (1 : 1) 作为洗提液, 获得一种淡黄色固体产物 (390mg, 51%), 其熔点为 164-168°C。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) : δ 8.60 (1H, s), 3.99 (3H, s)。

[0268] 实施例 17 : 6- 氨基-3- 甲基噻吩 [2,3-d]1,2,3- 三嗪-4- 酮 (化合物 17) 的合成  
[0269]



[0270] 向一种 3-甲基-6-硝基噻吩 [2,3-d]1,2,3-三嗪-4-酮 (1.25g, 5.9mmol) 的甲醇溶液 (50mL) 中加入浓盐酸 (0.6mL)。然后在室温下向上述溶液中依次加入铁粉 (1.67g, 29.5mmol) 和一种氯化铵 (1.57g, 29.5mmol) 的水溶液 (10mL)。搅拌所得的反应混合物并加热到 70℃ 保持 1h, 然后冷却至室温。过滤所得的溶液并用饱和的重碳酸钠溶液碱化。所得的溶液用乙酸乙酯 (4×100mL) 萃取。用硫酸钠干燥所得的结合有机层并过滤。蒸发掉溶剂所得的残留物经过硅胶柱层析, 柱层析中使用己烷-乙酸乙酯 (60 : 40) 作为洗提液, 获得一种淡黄色固体产物 (80mg, 7.5%), 其熔点为 190-194℃。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) : δ 7.40 (2H, s), 6.11 (1H, s), 3.82 (3H, s); LC-MS (负离子模式) : m/z 181 (M-H)<sup>-</sup>。

[0271] 实施例 18 : 3-甲基-6-苯基噻吩 [3,2-d]1,2,3-三嗪-4-酮 (化合物 18) 的合成  
[0272]



[0273] 步骤 a :

[0274] 3-氨基-5-苯基噻吩-2-腈 : 在室温下向一种硫酸钠 (0.95g, 12.23mmol) 的 DMF 溶液 (12.5mL) 中加入一种 3-氯-3-苯丙基-2-烯腈 (2g, 12.23mmol) 的 DMF 溶液 (5mL), 加入时间总计 5min, 并在 60-70℃ 下搅拌所得的混合物 2h。接着向反应混合物中滴加氯乙腈 (0.77mL, 12.23mmol), 并再次在 60-70℃ 下搅拌所得的混合物 2h。然后再滴加一种甲醇钠 (0.66g, 12.23mmol) 的甲醇溶液 (5mL), 同样温度下持续搅拌 1h。所得的混合物降到室温, 并加入冷水, 搅拌 15min。过滤析出的固体, 水洗并干燥。所得的固体用己烷-氯仿重结晶获得一种淡棕色固体产物 (150mg, 8%), 其熔点为 158-160℃。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 7.52-7.54 (2H, m), 7.37-7.41 (3H, m), 6.75 (1H, s), 4.48 (2H, s); LC-MS (负离子模式) : m/z 199 (M-H)<sup>-</sup>。

[0275] 步骤 b :

[0276] 3-氨基-5-苯基噻吩-2-甲酰胺 : 向一种 3-氨基-5-苯基噻吩-2-腈 (150mg) 的水合氢氧化钠 (20mL, 10%) 悬浮液中加入乙醇 (10mL), 所得的混合物回流 1h。所得的反应混合物降到室温, 过滤析出的结晶, 冷水洗并干燥, 获得一种金黄色固体产物 (70mg, 45%), 其熔点为 180-182℃。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ 7.56-7.58 (2H, m), 7.33-7.41 (3H, m), 6.79 (1H, s), 5.68 (1H, s), 5.21 (1H, s); LC-MS (正离子模式) : m/z 241 (M+Na)<sup>+</sup>。

[0277] 步骤 c :

[0278] 6-苯基-3H-噻吩 [3,2-d]1,2,3-三嗪-4-酮 : 向 3-氨基-5-苯基噻吩-2-甲酰胺 (0.37g, 1.7mmol) 的冰冷 (0℃) 浓硫酸 (20mL) 溶液中加入一种硝酸钠 (120mg, 1.86mmol) 的冰冷 (0℃) 浓硫酸 (8mL) 溶液, 加入时间总计 10min (加入时温度保持在 -5-0℃)。加入



后所得的混合物在 0℃ 下搅拌 1h, 室温下搅拌 1h。冷却所得的反应混合物, 并在 15min 内边搅拌边缓慢加入碎冰, 然后在同样温度下再搅拌 15min。所得的溶液用乙酸乙酯 (3×50mL) 萃取, 用水, 盐水洗去结合的乙酸乙酯层, 并用硫酸钠干燥。将所得的溶液过滤, 蒸发掉溶剂, 获得一种白色固体产物 (200mg, 39%), 其熔点为 178–180℃。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 12.30 (1H, br s), 7.86 (1H, s), 7.73–7.75 (2H, m), 7.49–7.54 (3H, m); LC-MS (负离子模式): m/z 228 (M-H)<sup>-</sup>。

[0279] 步骤 d:

[0280] 3-甲基-6-苯基噻吩 [3,2-d]1,2,3-三嗪-4-酮: 在室温下向一种 6-苯基-3H-噻吩 [3,2-d]1,2,3-三嗪-4-酮 (250mg, 1.1mmol) 的丙酮溶液 (25mL) 中依次加入碳酸钾 (300mg, 2.18mmol), 碘代甲烷 (0.08mL, 1.31mmol) 和碘化钾 (催化剂), 所得的混合物在室温下搅拌 16h。过滤溶液后得到的固体用丙酮洗涤。然后减压蒸发丙酮, 用冰冷水稀释, 搅拌 10min。所得的溶液用氯仿 (4×75mL) 萃取, 用水, 盐水洗去结合的 CHCl<sub>3</sub> 层, 并用硫酸钠干燥。将所得的溶液过滤, 蒸发掉溶剂。残留物通过硅胶柱层析, 柱层析中使用氯仿-甲醇 (95:05) 作为洗提液, 获得一种黄色固体产物 (110mg, 42%), 其熔点为 220–222℃。IR (KBr) ν<sub>max</sub> 3095, 2924, 1680, 1298, 1248, 1102, 977, 829cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.78 (1H, s), 7.70–7.73 (2H, m), 7.45–7.51 (3H, m), 4.09 (3H, s); <sup>13</sup>C NMR (100MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 155.1, 153.8, 153.3, 132.2, 130.2, 129.4, 126.7, 125.4, 119.5, 37.4; LC-MS (正离子模式): m/z 244 (M+H)<sup>+</sup>。

[0281] 在体外和体内对抗黑色素瘤生长潜力的评估

[0282] 实施例 19: 基于 MTT 分析法的细胞增殖分析

[0283] 基于 MTT [3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四氮唑溴盐] 的细胞增殖分析法是采用具有有一些修改的标准方法 (38) 来进行。测试化合物的细胞毒性效果是通过 MTT 细胞增殖分析试剂盒 (Roche Applied Sciences 公司, 德国) 对人类恶性黑色素瘤 A2058 细胞进行评估。分析过程按照厂家指供的说明书来操作。简单的说, 相同数量的细胞接种在具有 100 μL 培养基的 96 孔平底板并暴露在不同浓度并升至 150 μg/mL 的 DTIC 或其衍生化合物中三天。空白对照培养孔只加入最大量的 0.5% DMSO。之后, 0.5mg/ml 的 MTT 试剂加入到每个孔中并将微板在 5% CO<sub>2</sub> 下 37℃ 作用 4 小时。最后, 通过加入促溶溶液并在 37℃ 下作用一整夜使细胞溶解。随后用微板读数仪 (BioRad 公司, 美国) 在 540nm 处读取完全溶解甲贇晶体的吸光度。其结果 (即 OD ± SD) 是通过用四倍孔数来计算并确定测试化合物对细胞增殖的抑制作用 (50% 抑制作用的浓度, IC<sub>50</sub>)。

[0284] 表 1. DTIC 及其衍生化合物对人类恶性黑色素瘤 A2058 细胞的抗肿瘤潜力。

[0285]

测试化合物	在 A2058 细胞中的 IC <sub>50</sub> (μg/ml)
化合物 1	78.701
化合物 2	113.3

	化合物 6	53.6
	化合物 9	214.2
	化合物 10	178.7
	化合物 11	164.3
[0286]	化合物 12	165.01
	化合物 13	48.8
	化合物 17	146.7
	DTIC	68.08

[0287] 实施例 20 :使用 LDH 分泌分析的细胞毒性试验

[0288] 从 MTT 分析法获得的数据 (表 1) 可知,化合物 1,化合物 6 和化合物 13 具有选择性并通过分析 LDH 的分泌来进一步证实它们的细胞毒性潜力。图 1 所示的是在不同浓度下的 DTIC 和其他指明的测试化合物对细胞活性损失的 LDH 分泌增长百分率。

[0289] DTIC 和其衍生物化合物的细胞毒性潜力通过测量分泌到培养基表面的乳酸脱氢酶 (LDH) (LDH 细胞毒性检测试剂盒<sup>plus</sup>, Roche Applied Sciences 公司, 德国) 来评估。LDH 的分泌量与细胞毒性化合物对细胞的损害成正比。简言之,用不同浓度的测试化合物处理细胞并作用 48 小时。空白对照培养孔只加入最大量的 0.5% DMSO。用催化剂和染色剂将自由生长在表面的细胞混合并在室温下作用 15 分钟。最后,停止反应并用微板读数仪 (BioRad 公司, 美国) 在 492nm 测量光学浓度。其结果 (即 OD $\pm$ SD) 是通过用四倍孔数来计算并确定测试化合物的细胞毒性潜力 (50%抑制作用的浓度, IC<sub>50</sub>)。药物浓度与相对的通过 LDH 分泌量来指示细胞能力损失的图表如图 1 所示。

[0290] 实施例 21 :肿瘤的选择性

[0291] 接下来,为了检查 DTIC 衍生化合物是否可选择性的杀死黑色素瘤细胞而没有或极少影响正常的细胞,我们评估了测试化合物对正常人类皮肤上皮 HS. 531. sk 细胞的效果。LDH 分泌分析表明 DTIC 的剂量升到 100  $\mu$ g/mL 时其衍生化合物不对正常细胞皮肤细胞的生长产生影响。然而,120  $\mu$ g/mL 的 DTIC,化合物 1,化合物 3 和化合物 4 可分别对正常细胞的活性造成 5.8%, 4.2%, 2.4%, 和 2.4% 的降低。因此,从这些数据表明,化合物 3 和化合物 4 比 DTIC 在杀死黑色素瘤细胞而不或极少影响正常细胞方面具有更多的选择性 (图 2)。

[0292] 实施例 22 :三氮烯化合物对人类黑色素瘤 A20S8 细胞的凋亡性细胞死亡潜力的效果

[0293] PARP 的半胱氨酸蛋白酶裂解蛋白被认为是细胞凋亡的标志。半胱氨酸蛋白酶 -3 切割 113-kDa PARP 产生 89- 和 24-kDa 多肽 (39)。接下来,在 A2058 细胞上进行 PARP 裂解分析,来有目的的评估比较 DTIC 和测试物化合物 1,化合物 6 和化合物 13 的细胞凋亡潜力。通过先前所述的 (40) 免疫印迹分析法来评估 PARP 的裂解。图 3 所示的是的测试化合物在 100  $\mu$ g/ml 的固定剂量下 PARP 裂解效果比较。免疫印迹图像显示在同样的浓度下,PARP 在 89kDa 的切割亚分子表达中化合物 3 处理 A2058 细胞比 DTIC 处理细胞超过 56.6%。这一

数据表明,化合物 3 呈现出对人类黑色素瘤 A2058 细胞的凋亡性细胞死亡的潜力更好。实施例 23 :DTIC 和化合物 6 对小鼠黑色素瘤 B16F0 细胞和人类黑色素瘤 A375 细胞抑制细胞增殖的效果比较

[0294] DTIC 和化合物 6 对小鼠黑色素瘤 B16F0 细胞和人类黑色素瘤 A375 细胞的抗肿瘤生长潜力比较通过使用先前所述(例 19)的基于增殖分析的 MTT 法来测试。简而言之,相同数量的 B16F0 或 A375 细胞接种于 100  $\mu$  L 培养基的 96 孔平板上并用 DTIC 或化合物 6 的不同浓度处理 3 天。空白对照培养孔只加入最大量的 0.5% DMSO。之后加入 MTT 反应剂,细胞被溶解并用微板读数仪(BioRad 公司,美国)在 540nm 下测量细胞内中形成的甲臞浓度。其结果(即 OD $\pm$ SD)是通过用四倍孔数来计算并确定测试化合物对细胞增殖的抑制作用(50%抑制作用的浓度, IC50)。

[0295] 表 2. DTIC 和化合物 6 对小鼠黑色素瘤 B16F0 细胞和人类黑色素瘤 A375 细胞抗肿瘤生长潜力比较

[0296]	测试化合物	50%抑制作用的浓度, IC50 ( $\mu$ g/ml)	
		B16F0 细胞	A375 细胞
	DTIC	360.4	70.1
[0297]	化合物 6	57.6	46.5

[0298] 实施例 24 :DTIC 和化合物 6 在小鼠黑色素瘤 B16F0 细胞和人类黑色素瘤 A375 细胞上的细胞毒性潜力比较

[0299] DTIC 和化合物 6 在小鼠黑色素瘤 B16F0 细胞和人类黑色素瘤 A375 细胞上的细胞毒性潜力比较通过先前描述的方法(20)测量分泌到培养基表面的乳酸脱氢酶(LDH)(LDH 细胞毒性检测试剂盒<sup>plus</sup>, Roche Applied Sciences 公司,德国)来评估。其结果(即 OD $\pm$ SD)是通过用四倍孔数来计算并确定测试化合物的细胞毒性潜力(50%抑制作用的浓度, IC50)(表 3)。

[0300] 表 3. DTIC 和化合物 6 在小鼠黑色素瘤 B16F0 细胞和人类黑色素瘤 A375 细胞上的细胞毒性潜力比较。

[0301]

测试化合物	处理浓度 ( $\mu$ g/ml)	与方法处理对照相比 LDH 分泌量增加的%	
		B16F0 细胞	A375 细胞
DTIC	100	5.7	246
化合物 6	100	61.5	331

[0302] 实施例 25 :化合物 1 和化合物 6 对人类乳腺癌肿瘤 MCF-1 细胞,人类胰腺肿瘤 MIA-PaCa2 细胞和人类前列腺肿瘤 DU145 细胞的抗肿瘤效果。

[0303] 化合物 1 和化合物 6 对人类乳腺癌肿瘤 MCF-1 细胞,人类胰腺肿瘤 MIA-PaCa2 细胞和人类前列腺肿瘤 DU145 细胞的抗肿瘤生长潜力通过先前所述的(例 19)基于分裂增殖研究的 MTT 法来评估。其结果(即 OD $\pm$ SD)通过是用四倍孔数来计算并确定测试化合物对细胞分裂增殖抑制作用(50%抑制作用的浓度, IC50)(表 4)。

[0304] 表 4. DTIC, 化合物 1 和化合物 6 对人类乳腺癌肿瘤 MCF-1 细胞,人类胰腺肿瘤

MIA-PaCa2 细胞和人类前列腺肿瘤 DU145 细胞抗肿瘤生长潜力的比较。

		50%抑制作用的浓度, IC50 (μg/ml)		
	测试化合物	MCF-1	MIA-PaCa2	DU145
[0305]	DTIC	135.1	202.9	87.2
	化合物 1	130.3	168.5	153.2
[0306]	化合物 2	91.7	81.9	62.6

[0307] 实施例 26 :小鼠黑色素瘤 B16F0 细胞菌落形成试验

[0308] 化合物 6 和 DTIC 的菌落形成效果根据先前一些修改 (41) 所述的步骤来试验。简单地说,收集 B16F0 细胞并接种到 6-孔平板上 (100 细胞 /mL)。细胞生长 2 天后,细胞用含有 0.1% DMSO 或 100 μg/ml DTIC 或 50 μg/ml 和 100 μg/ml 化合物 6 的 DMEM 培养基培养超过 8 天。含有测试剂的新鲜培养基每隔 24 小时更换一次。最后,用 PBS 冲洗细胞三次并用甲醇固化 15 分钟。这些细胞用吉姆萨染色法染色并在显微镜下观察。染色孔的图像用数字拍摄 (柯达影像站 4000MM, Carestream Health 公司, 纽黑文市, 康涅狄格州) 并用 NIH 图像 J 软件进行菌落计数与分析。图 4 所示的是 DTIC 和化合物 6 处理的孔中 B16 菌落生长的抑制情况。与 DTIC 相比,化合物 6 呈现出明显的对 B16 肿瘤细胞菌落生长的抑制作用。100 μg/ml 的 DTIC, 50 μg/ml 和 100 μg/ml 的化合物 6 最好的生长抑制作用分别是 37.6%, 55.2% 和 68.7%。

[0309] 实施例 27 :化合物 6 处理小鼠黑色素瘤 B16F0 细胞的细胞周期分析

[0310] 化合物 6 和 DTIC 对 B16F0 细胞的细胞周期分析是通过如先前一些修改中 (42) 所述的流式细胞术来分析。简单地说, B16F0 细胞培养在含有 10% 胎牛血清 (FBS) 和 4.5g/L D-葡萄糖的 DMEM 培养基上。次融合细胞用 DTIC 或化合物 6 处理并作用 24 小时。收集细胞并用缓冲液 (PBS+2% FBS) 来制备单细胞悬浮液。用冷的 PBS 冲洗两次细胞然后用冷乙醇固化 30 分钟。通过离心去除乙醇并得到细胞悬浮液,然后将细胞数量调整为每 mL $10^6$  细胞。用 PBS 冲洗细胞两次然后在 37°C 存在有核糖核酸酶下用碘化丙啶染色细胞 30 分钟。最后,用 FACS Calibur 流式细胞仪 (BD Biosciences 公司, 美国) 来进行细胞分析。图 5 所示的是 DTIC 和化合物 6 处理过的不同细胞周期阶段的细胞分布。

[0311] 实施例 28 :小鼠黑色素瘤 B16F0 细胞的扩散实验

[0312] DTIC 和化合物 6 对 B16F0 在体外扩散能力的抑制效果测试的细胞扩散实验,采用具有 8 μm 微孔膜的细胞培养添加物 (Becton Dickinson 公司, 美国) 涂在基质胶 (BME-Cultrex®, R&D Systems 公司, 美国) 上来进行。相同数量 (5 万) 的 B16F0 细胞应用到每个添加物中并在 37°C 下附着在一起 2 小时并通入 5% CO<sub>2</sub>。此后,细胞进行扩散通过存在或不存在测试化合物的基质胶层。100 μg/ml 的 DTIC 或化合物 6 应用到组合添加物的较低孔隙中。0.1% 的 DMSO 应用到空白对照培养孔隙中。处理 24 小时后,基质胶层含有的细胞用棉塞消除并用甲醇固化处理 5 分钟扩散到膜另一边的细胞,然后吉姆萨染色。然后将染色膜放置在载玻片上并用光学显微镜 (尼康 Eclipse TS 100) (20X 物镜) 随机计算 20 个区域中扩散细胞的数量。与对照或 DTIC 组比较时,化合物 6 在体外对黑色素瘤 B16 细胞培养实验中可明显降低恶性肿瘤细胞扩散 (图 6)。

[0313] 实施例 29 :化合物 6 抑制血管内皮生长因子 (VEGF) 产生的 B16F0 细胞

[0314] B16F0 细胞培养在含有 10% 的胎牛血清 (FBS) 和 4.5g/L D-葡萄糖的杜尔贝科改良的伊格尔氏的红色培养基 (DMEM 培养基) 上 (Sigma Life Science 公司, 美国)。相同数量的细胞 ( $5 \times 10^4$ ) 分别接种在培养皿 (35x10mm, 11.7cm<sup>2</sup>) 里。细胞用 50  $\mu$ g/ml 的 DTIC 或化合物 6 处理 24 小时。空白对照组的细胞只在 0.1% 的 DMSO 中作用。24 小时后, 用于血管内皮生长因子 (VEGF) 表达的细胞裂解液的制备和分析采用如先前适当修改中 (43) 所述的免疫印迹分析法。对于免疫印迹分析, 相等数量的 B16F0 细胞裂解液蛋白在 12.5% 的 SDS-PAGE 中的还原条件下进行分离, 并转移到硝酸纤维素膜上 (Bio-Rad 公司, 美国)。该膜用超级滑块 (Thermo scientific 公司, 美国) 堵塞并随后用 VEGF 抗体 (Abeam 公司, 英国) 在 40°C 下反应一夜。用山葵过氧化酶共轭次生抗体和用增强化学发光 (Thermo scientific 公司, 美国) 发展的特异免疫反应来研究结合抗体。再次用抗肌动蛋白抗体发展的裂解物膜作为内部对照。免疫反应带的图像用柯达影像机 4000MM (Carestream Health 公司, 纽黑文市, 康涅狄格州) 来拍摄并通过柯达分子成像分析软件, 版本 4.5 来网格浓度分析。图 7 显示了一个在化合物 6 处理 B16F0 细胞的 VEGF 蛋白控制下的典型免疫印迹图。

#### [0315] 实施例 30 : 内皮细胞迁移实验

[0316] 内皮细胞迁移实验的方法基本上与先前一些修改中 (43) 所描述的一样。具有 8  $\mu$ m 微孔 PET 膜的 FALCON™ 细胞培养添加物 (Becton Dickinson 公司, 美国) 覆盖在 0.1mg/ml 的胶原蛋白上。人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 以  $5 \times 10^4$  细胞 / 添加物的浓度加入到细胞培养添加物 (Becton Dickinson 公司) 中。在不同的 DTIC 或化合物 6 的浓度下细胞迁移通过添加物需要 18 小时。迁移组合对照培养只含 0.1% DMSO。没有迁移的这些细胞被棉塞刮掉并且对迁移的细胞用甲醇固化 5 分钟, 然后吉姆萨染色。然后添加物膜放置在载玻片上。迁移通过膜孔的细胞在尼康 Eclipse TS 100 显微镜的 20 倍物镜下随机计算 20 个区域。图 8 所示化合物 6 处理对内皮细胞的迁移具有明显的抑制作用。

#### [0317] 实施例 31 : 体外毛细血管形成实验

[0318] 体外毛细血管形成实验的进行是用人脐静脉内皮细胞 (HUVEC), 培养在 10mg/ml 基底膜提取物 (BME-Cultrex®, R&D Systems 公司, 美国) 培养基上。体外毛细血管形成实验的报告与具有若干修改的先前 (44) 描述一样。简单地说, 四百微升的 Cultrex 试剂在 4°C 时涂在 24 孔培养板的每孔中并在 37°C 凝胶 1 小时。HUVEC 接种密度为  $7.5 \times 10^4$  细胞每孔, 每孔具有 400  $\mu$ L 含 10% 胎牛血清和 4.5g/L D-葡萄糖的 DMEM。然后这些细胞用预期浓度的 DTIC 或化合物 6 来处理如 16 小时。空白对照培养只加入 0.1% DMSO。照片拍摄使用尼康的 Eclipse TS 100 显微镜配备尼康的 Coolpix 相机。化合物 6 呈现出对毛细血管形成抑制作用呈剂量依赖性, 相反, DTIC 在体外培养条件下能促进人内皮细胞的毛细血管形成 (图 9)。

[0319] 实施例 32 : 在 C57B6J 小鼠的 B16F0 黑色素瘤移植模型中化合物 6 抗肿瘤生长的潜力。

[0320] 化合物 6 在体内抗黑色素瘤生长是在 C57B6J 小鼠的 B16F0 黑色素瘤移植模型中进行评估的 (45)。6 周龄 (体重 18-22 克) 的 C57B6J 小鼠购自国家营养研究所 (NIN), 海得拉巴 (印度)。动物研究报告经临床伦理委员会 (IAEC) 检验认可。所有的研究是依照管理和监督动物实验委员会 (CPCSEA) 的指导方针和经合组织试验准则委员会 (OECD) 的指导方针进行的。动物允许自由进入, 并随意提供标准的饲料和经木炭过滤和紫外线消毒

的水。动物维持在受控制温度 (24-26℃), 湿度 (45-70%), 和光 / 暗周期 12h/12h。为了诱导黑色素瘤的形成, 通过简短的胰蛋白酶消化收获次融汇状态的 B16F0 细胞并皮下注射 0.2mL 磷酸盐缓冲液的 IxI06 细胞。在明显肿瘤发生后 (植入细胞的 3-5 天后) 开始药物治疗。药物制备在磷酸盐缓冲液 (10% 二甲基亚砜, V/V) 中并每日通过腹膜内途径给予不同剂量的 DTIC 或化合物 6。治疗空白对照动物只加入 10% 的 DMSO。经过 14 天的治疗, 动物通过吸入 CO<sub>2</sub> 处死然后将肿瘤切除并称重。图 10 所示的是在 C57B6J 小鼠的 B16F0 黑色素瘤移植模型中各种 DTIC 和化合物 6 浓度对肿瘤生长抑制的相对效果。

[0321] 参考文献:

[0322] 1. Fitzpatrick, T. B., Sober, A. J. Sunlight and skin cancer. *N. Engl. J. Med.*, 1985, 313, 818-820.

[0323] 2. Pathak, M. A., Fanselow, D. L. Photobiology of melanin pigmentation :dose/response of skin to sunlight and its contents. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 1983, 9, 724-733.

[0324] 3. Riley, P. A. Melanin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 1997, 29, 1235-1239.

[0325] 4. Rutao, C, Hans R., Widlund, E. F., Jennifer, Y. L., Dara, L. W., Viven, E. I., John, D. O., Claire, Y. F., Carl, F. S., Scott, R. G., David, E. F., *Cell*, 2007, 128, 853-864.

[0326] 5. Moshe, O., Jiri, B. *Cell*, 2007, 128, 826-828.

[0327] 6. Danson, S. J., Middleton, M. R. Temozolomide :a novel oral alkylating agent. *Expert Rev. Anticancer Ther.*, 2001, 1, 13-19.

[0328] 7. Nagasubramanian, R., DoIa, M. E. Tomozolamide :Realizing the promise and potential. *Curr. Opin. Oncol.*, 2003, 15, 412-418.

[0329] 8. Lanzetta, G., Campanella, C, Razzi, A., et al. Temozolomide in radio-chemotherapy combined treatment for newly-diagnosed glioblastoma multi-forme :Phase-II clinical trial. *Anticancer Res.*, 2003, 23, 5159-5164.

[0330] 9. Stripp, R., Mason, W. P., Van den Bent, M.J., et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.*, 2005, 352, 987-996.

[0331] 10. Gilbert, M. R. Advances in the treatment of brain tumors :dawn of a new era ? *Curr. Oncol. Rep.*, 2006, 8, 45-49.

[0332] 11. Atallah, E., Flaherty, L. Treatment of metastatic malignant melanoma. *Curr. Treat. Options Oncol.*, 2005, 6, 185-193.

[0333] 12. Panetta, J. C., Kirstein, M. N., Gajjar, A., et al. Population of temezolomide and metabolites in infants and children with primary central nervous system tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2003, 52, 435-441.

[0334] 13. Houghton, P. J., Stewart, C. F., Cheshire, P.J., et al. Anti-tumor activity of tomazolomide combined with irinotecan is partly independent of 06-methylguanine-DNA methyltransferase and mismatch repair phenotypes in xenograft models. *Clin. Cancer Res.*, 2000, 6, 4110-4118.

[0335] 14. Middlemas, D. S., Stuart, C. F., Kirstein, M. N., et al. Biochemical correlates of temozolomide sensitivity in pediatric solid tumor xenograft models.

Clin. Cancer Res. , 2000, 6, 998-1007.

[0336] 15. Aksoy, S. , Abali, H. , Kilickap, S. , et al. Successful treatment of a chemoresistant tumor with temozolomide in an adult patient :report of a recurrent intracranial mesenchymal chondrosarcoma. J. Neurooncol, 2005, 71, 333-334.

[0337] 16. Patel, V. J. , Elion, G. B. , Houghton, P. J. , et al. Schedule-dependent activity of temozolomide plus CPT-11 against a human central nervous system tumor-derived xenograft. Clin. Cancer Res. , 2000, 6, 4154-4157.

[0338] 17. Anderson, P. M. , Pearson, M. Novel therapeutic approaches in pediatric and young adult sarcoma. Curr. Oncol. Rep. , 2006, 8, 310-315.

[0339] 18. Wagner, L. M. , McAllister, N. , Goldsby, R. E. , et al. Temozolomide and intravenous irinotecan for treatment of advanced Ewing' s sarcoma. Pediatr. Blood Cancer, 2007, 48, 132-139.

[0340] 19. Wagner, L. M. , Crews, K. R. , Iacono, L. C. , et al. Phase I trial of temozolomide and protracted irinotecan in pediatric patients with refractory solid tumors. Clin. Cancer Res. , 2004, 10, 840-848.

[0341] 20. Kushner, B. H. , Kramer, K. , Modak, S. , et al. Irinotecan plus temozolomide for relapsed or refractory neuroblastoma. J. Clin. Oncol. , 2006, 24, 5271-5276.

[0342] 21. De Angulo, G. , Hernandez, M. , Morales-Arias, J. , et al. Early lymphocyte recovery as a prognostic indicator for High-risk Ewing' s sarcoma. J. Pediatr. Hematol. Oncol. , 2007, 29, 48-52.

[0343] 22. DuBois, S. G. , Elterman, K. , Grier, H. E. Early lymphocyte recovery in Ewing sarcoma. J. Pediatr. Hematol. Oncol, 2007, 29, 351-352.

[0344] 23. Losa, R. , Fra, J. , Lopez-Pousa, A. , et al. Phase II study with the combination of gemcitabine and DTIC in patients with advanced soft tissue sarcoma. Cancer Chemother. Pharmacol, 2007, 59, 251-259.

[0345] 24. Awada, A. , Gil, T. , Sales, F. , et al. Prolonged schedule of temozolomide (Temodal) plus liposomal doxorubicin (Caelyx) in advanced solid cancers. Anticancer Drugs, 2004, 15, 499-502.

[0346] 25. Cruz-Munoz, W. , Man, S. , Kerbel, R. S. Effective treatment of Advanced human melanoma metastases in **immunodeficient** mice using combination metronomic chemotherapy regimens. Clin. Cancer Res. , 2009, 15, 4867-74.

[0347] 26. Ott, P. A. , Chang, J. L. , Oratz, R. , Jones, A. , Farrell, K. , Muggia, F. , Pavlick, A. C. Phase II trial of dacarbazine and thalidomide for the treatment of malignant melanoma. Chemotherapy, 2009, 55, 221-7.

[0348] 27. Tagne, J. B. , Kakumanu, S. , Nicolosi, R. J. Nanoemulsion preparations of the anticancer drug dacarbazine significantly increase its efficacy in a xenograft mouse melanoma model. Mol. Pharm. , 2008, 5, 1055-63.

[0349] 28. Mansfield, A. S. , Markovic, S. N. Novel therapeutics for the treatment of metastatic melanoma. Future Oncol. , 2009, 5, 543-57.

- [0350] 29. Lui, P. , Cashin, R. , Machado, M. , Hemels, M. , Corey-Lisle, P. K. , Einarson, T. R. Treatments for metastatic melanoma :synthesis of evidence from randomized trials. *Cancer Treat. Rev.* , 2007, 33, 665-80.
- [0351] 30. Fiesselmann, H. Method for the preparation of 3-Oxythiophen-2-carboxylic acids derivatives. DE 1020641(1957).
- [0352] 31. Hartmann, H. , Liebscher, J. A simple method for the synthesis of 5-aryl-3-aminoalkoxycarbonylthiophenes. *Synthesis*, 1984, 275-276.
- [0353] 32. Shishoo, C. J. , Pathak, U. S. , Jain, K. S. , Devani, I. T. , Chhabria, M. T. Synthesis of some 2-substituted-6-phenyl-and 7-phenyl-thieno[3,2-d]pyrimidin-4(3H)-ones. *Indian J. Chem.* , 1994, 33B, 436-440.
- [0354] 33. Barker, J. M. , Huddleston, P. R. , Wood, M. L. A rapid conversion of 3-oxothiolanes into 3-aminothiolanes. *Synth. Commun.* , 2002, 32, 2565-2568.
- [0355] 34. Dowd, P. , Choi, S. -C. Free radical ring-expansion leading to novel six-and seven membered heterocycles. *Tetrahedron*, 1991, 47, 4847-4860.
- [0356] 35. Woodward, R. B. , Eastman, R. H. Tetrahydrothiophene derivatives. *J. Am. Chem. Soc.*, 1946, 68, 2229-2235.
- [0357] 36. Hesse, S. , Perspicace, E. , Kirsch, G. Microwave-assisted synthesis of 2-aminothiophene-3-carboxylic acid derivatives, 3H-thieno[2,3-d]pyrimidin-4-one and 4-chlorothieno[2,3-d]pyrimidine. *Tetrahedron Letts.* , 2007, 48, 5261-5264.
- [0358] 37. Dumaitre, B. , Dodic, N. Synthesis and cyclic GMP phosphodiesterase inhibitory activity of a series of 6-phenylpyrazolo[3,4-d]pyrimidones. *J. Med. Chem.* , 1996, 39, 1635-1644.
- [0359] 38. Banerjee, S. , Mehta, S. , Haque, I. , Sengupta, K. , Dhar, K. , Kambhampati, S. , Van Veldhuizen, P. J. , Banerjee, S. K. VEGF-A 165 induces human aortic smooth muscle cell migration by activating neuropilin-1-VEGFR1-PI3K axis. *Biochemistry*, 2008, 47, 3345-51.
- [0360] 39. Tewari, M. , L. T. Quan. , O' Rourke, K. , Desnoyers, S. , Zeng, Z. , Beidler, D. R. , Poirier, G. G. , Salvesen, G. S. , Dixit, V. M. Yama/CPP32B, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose)polymerase. *Cell*, 1995, 81, 801-809.
- [0361] 40. Sengupta, K. , Banerjee, S. , Dhar, K. , Saxena, N. K. , Mehta, S. , Campbell, D. R. , Banerjee, S. K. WISP-2/CCN5 is involved as a novel signaling intermediate in Phorbol ester protein kinase Calpha-mediated breast tumor cell proliferation. *Biochemistry*, 2006, 45, 10698-709.
- [0362] 41. Wu, K. , Yuan, L. H. , Xia, W. Inhibitory effects of apigenin on the growth of gastric carcinoma SGC-7901 cells. *World. J. Gastroenterol*, 2005, 11, 4461-4464.
- [0363] 42. Ray, G. , Dhar, G. , Van Veldhuizen, P. J. , Banerjee, S. , Saxena, N. K. , Sengupta, K. , Banerjee, S. K. Modulation of cell-cycle regulatory signaling network by 2-Methoxyestradiol in prostate cancer cells is mediated through multiple signal



transduction pathways. *Biochemistry*, 2006, 45, 3703-3713.

[0364] 43. Sengupta, K. , Banerjee, S. , Saxena, N. K. , Banerjee, S. K. Thombospondin-1 Disrupts Estrogen-Induced Endothelial Cell Proliferation and Migration and its Expression Suppressed by Estradiol. *Mol. Cancer Res.* , 2004, 2, 150-158.

[0365] 44. Diana, G. , Chalupowicz, Z. , Chowdhury, A. , Tami, L. B. , Carl, B. , Jose, M. Fibrin II Induces Endothelial Cell Capillary Tube Formation. *J. Cell Biol.* , 1995, 130, 207-215.

[0366] 45. Michelle, L. R. , Johnathan, M. , Hartwig, B. , Ronald, G. T. Dietary glycine inhibits the growth of B16 melanoma tumors in mice. *Carcinogenesis*, 1999, 20, 793-798.

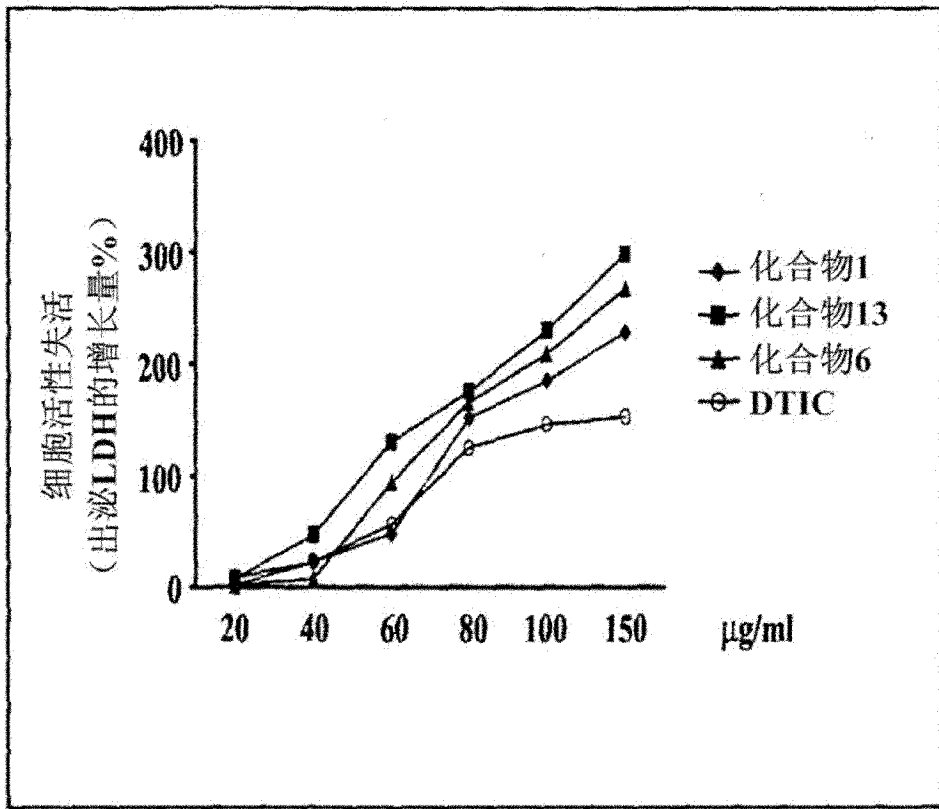


图 1

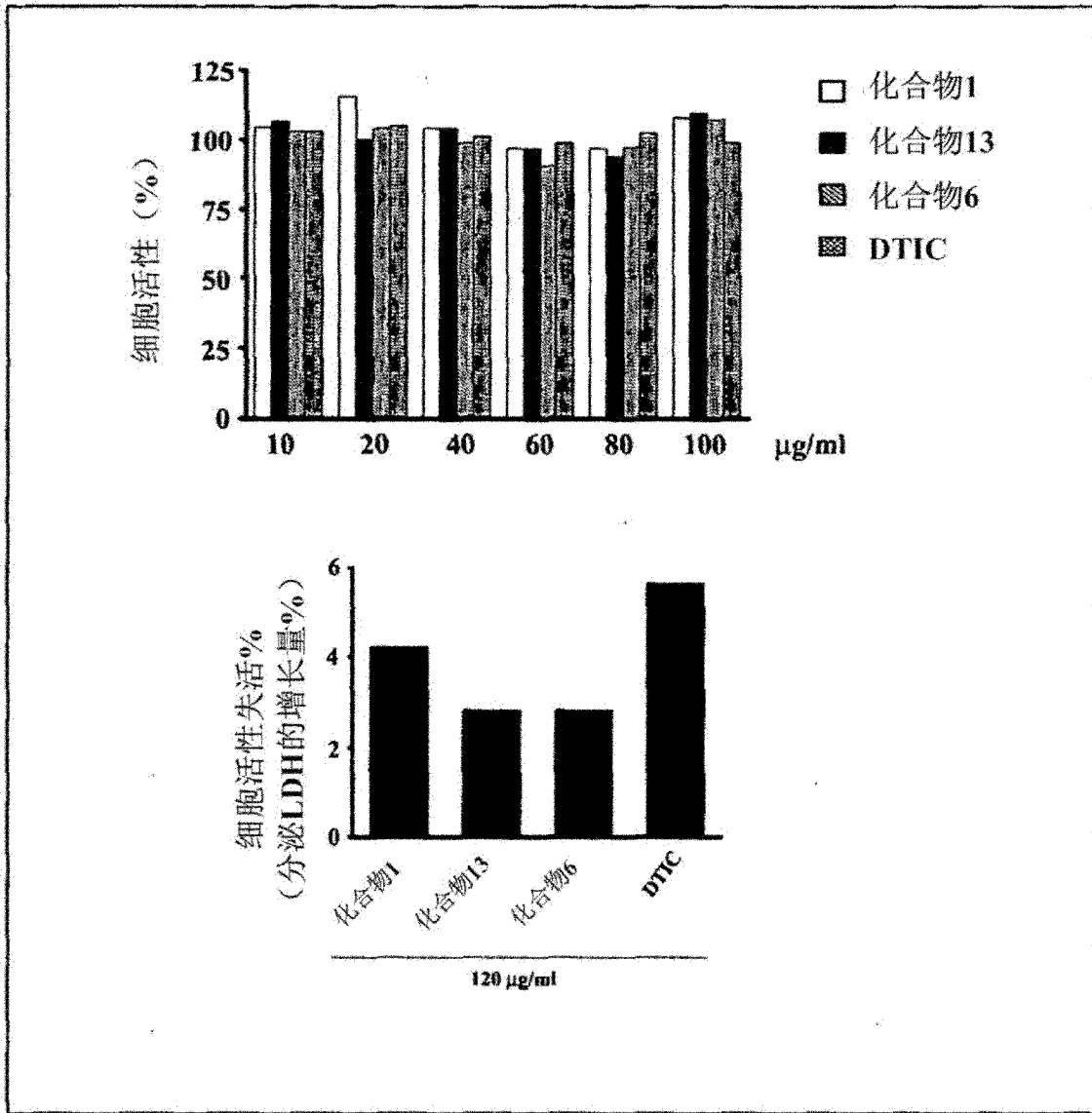


图 2

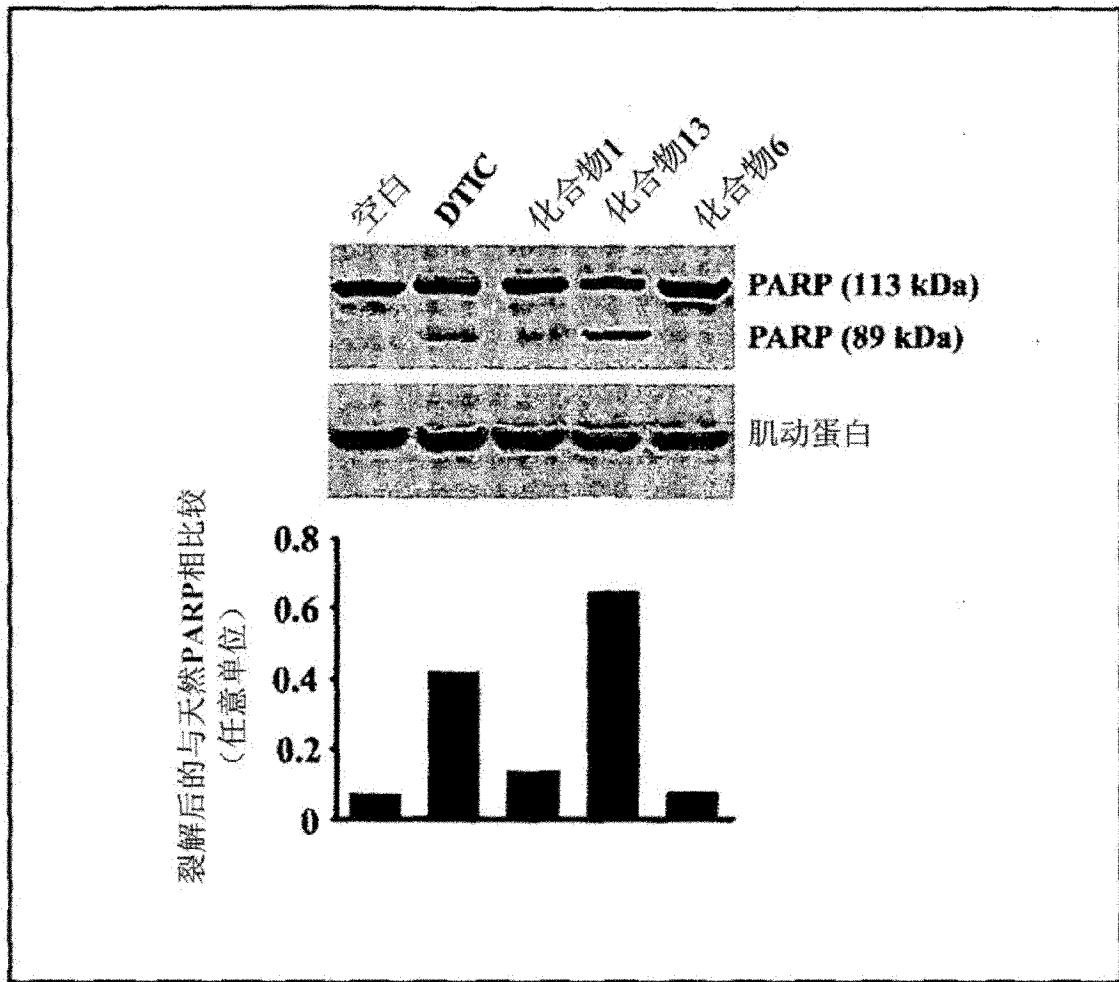


图 3

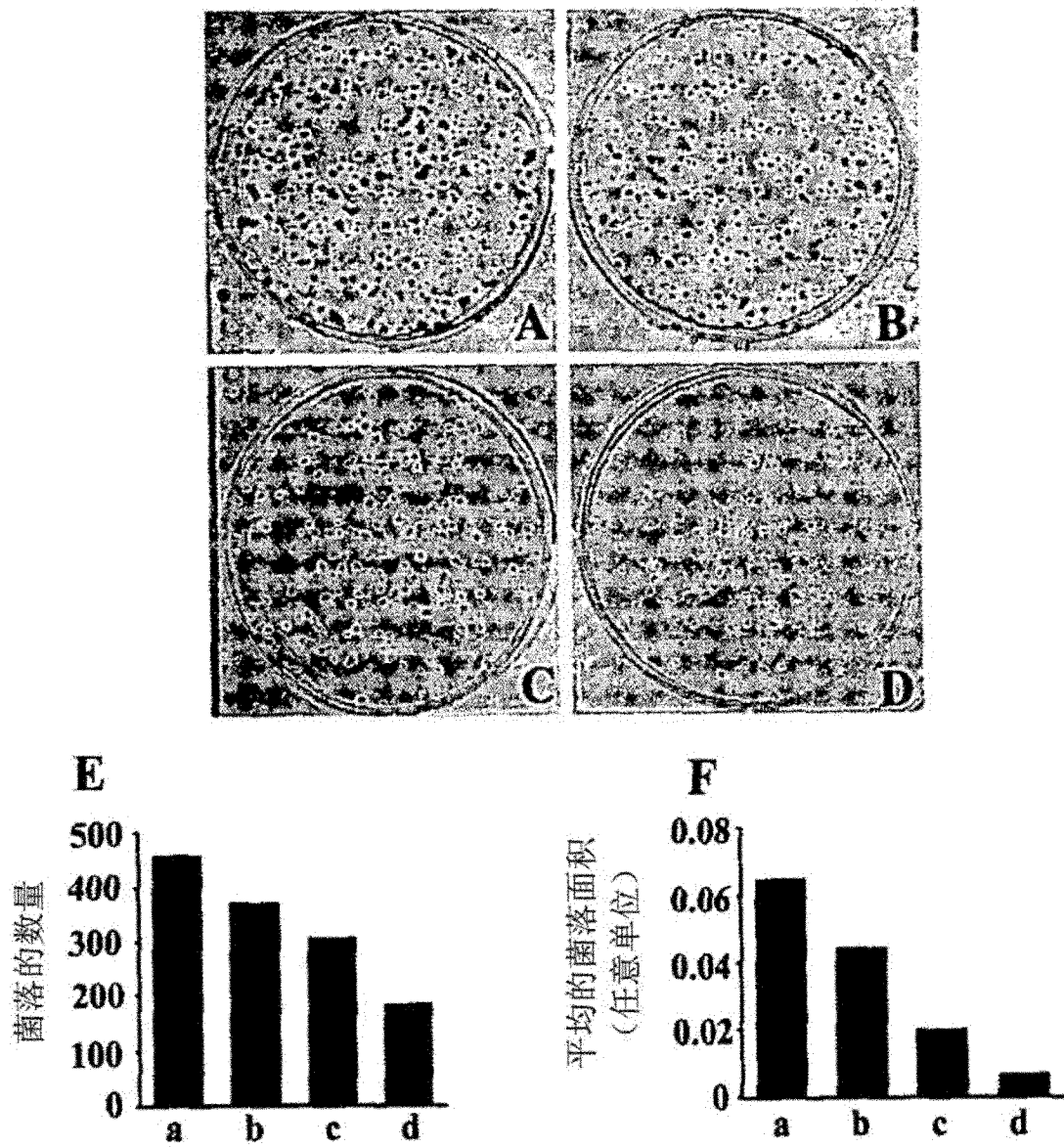
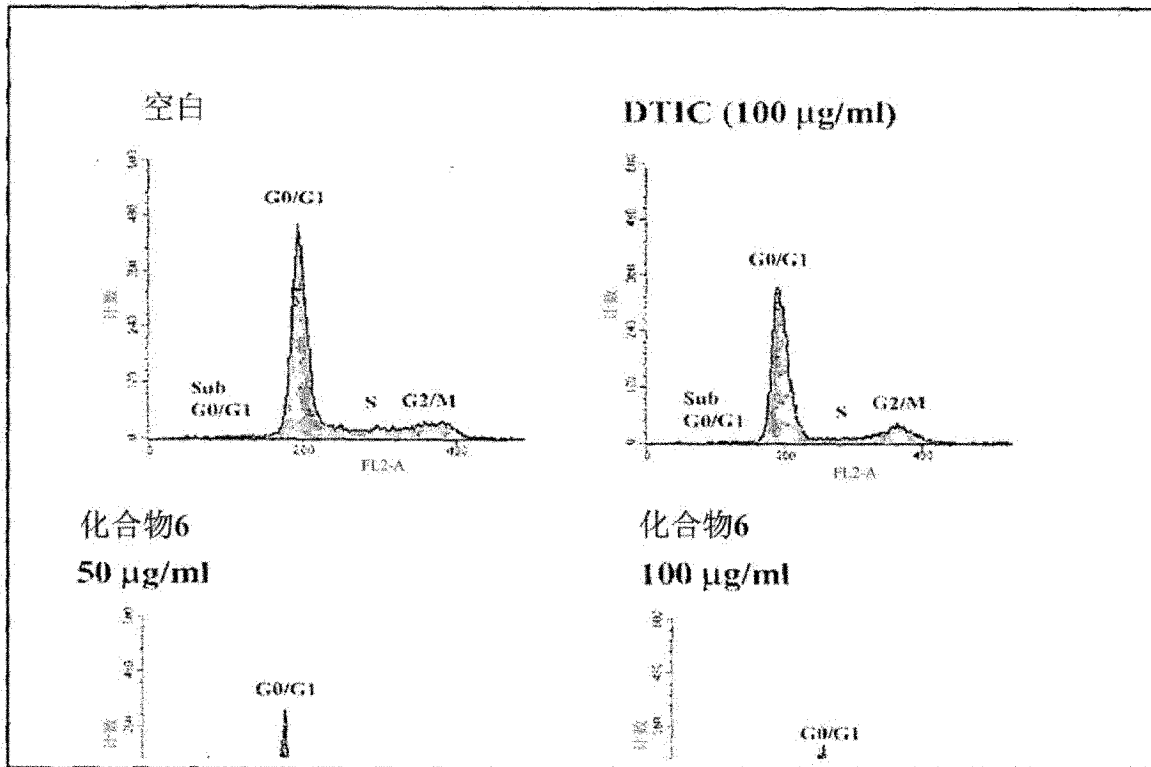


图 4



	Sub G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
空白对照 (0.1% DMSO)	1.19	74.02	12.12	12.65
化合物6 (50 µg/ml)	1.17	56.01	15.76	26.71
化合物6 (100 µg/ml)	3.89	49.82	22.02	20.74
DTIC (100 µg/ml)	1.07	77.54	7.19	13.92

图 5

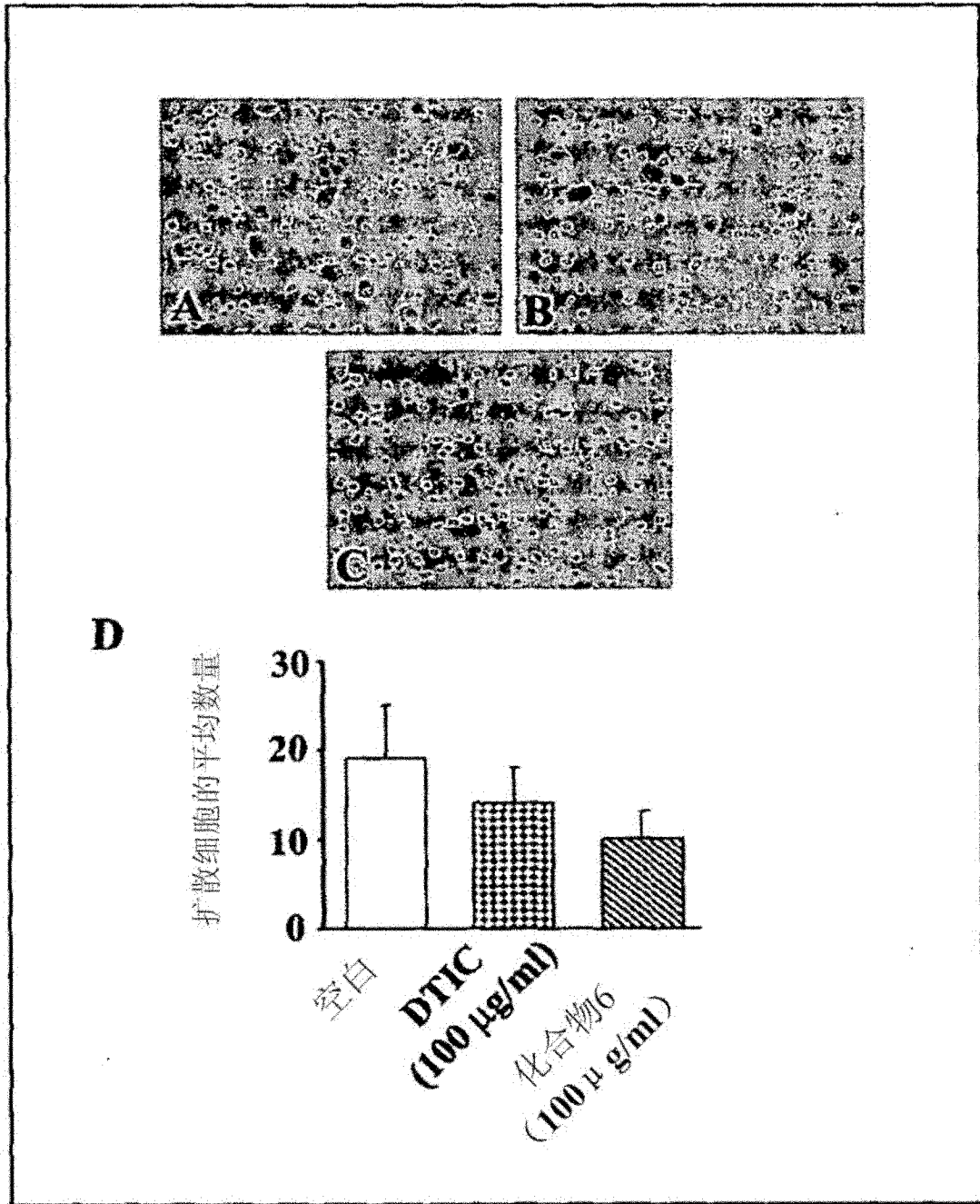


图 6

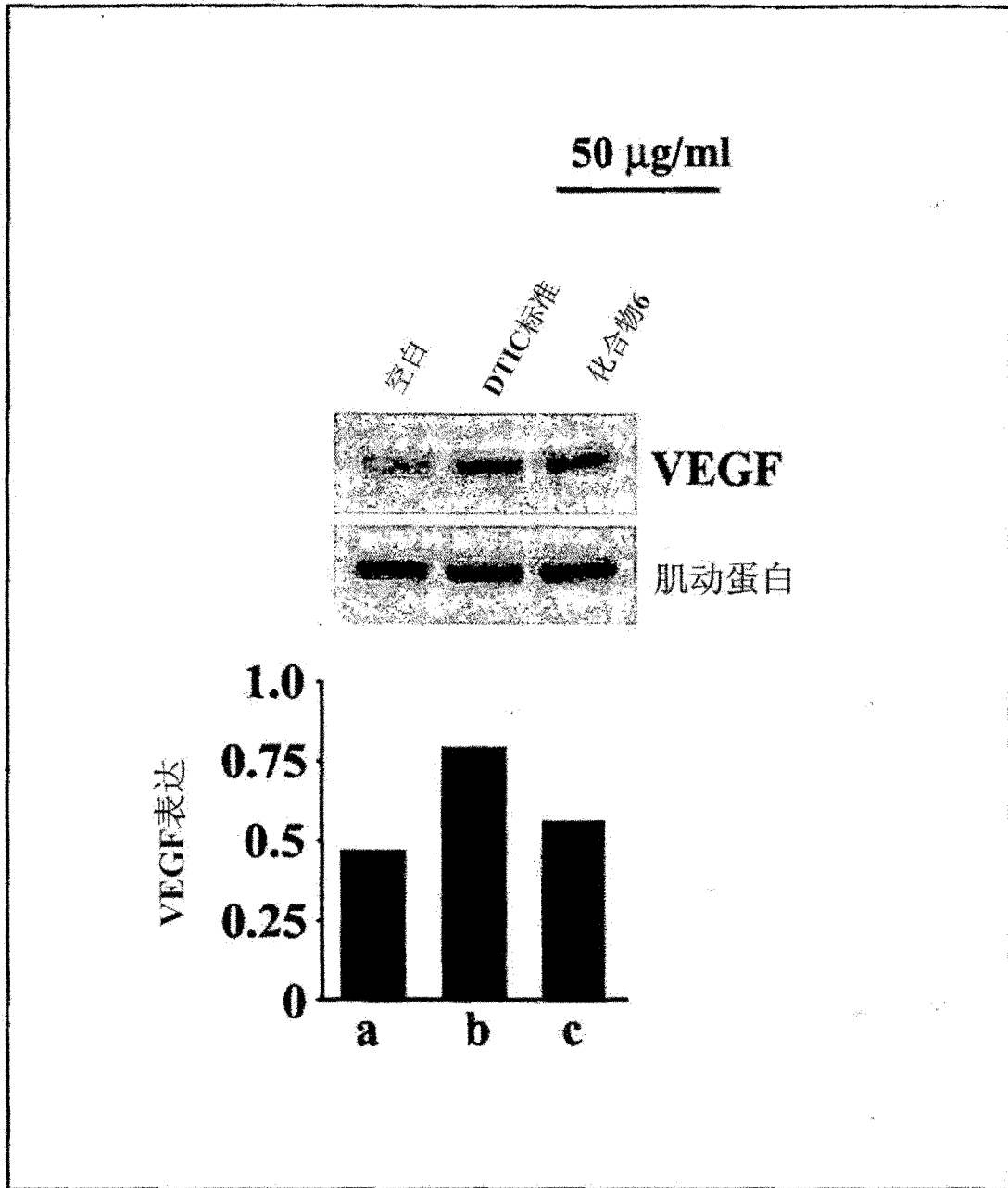


图 7



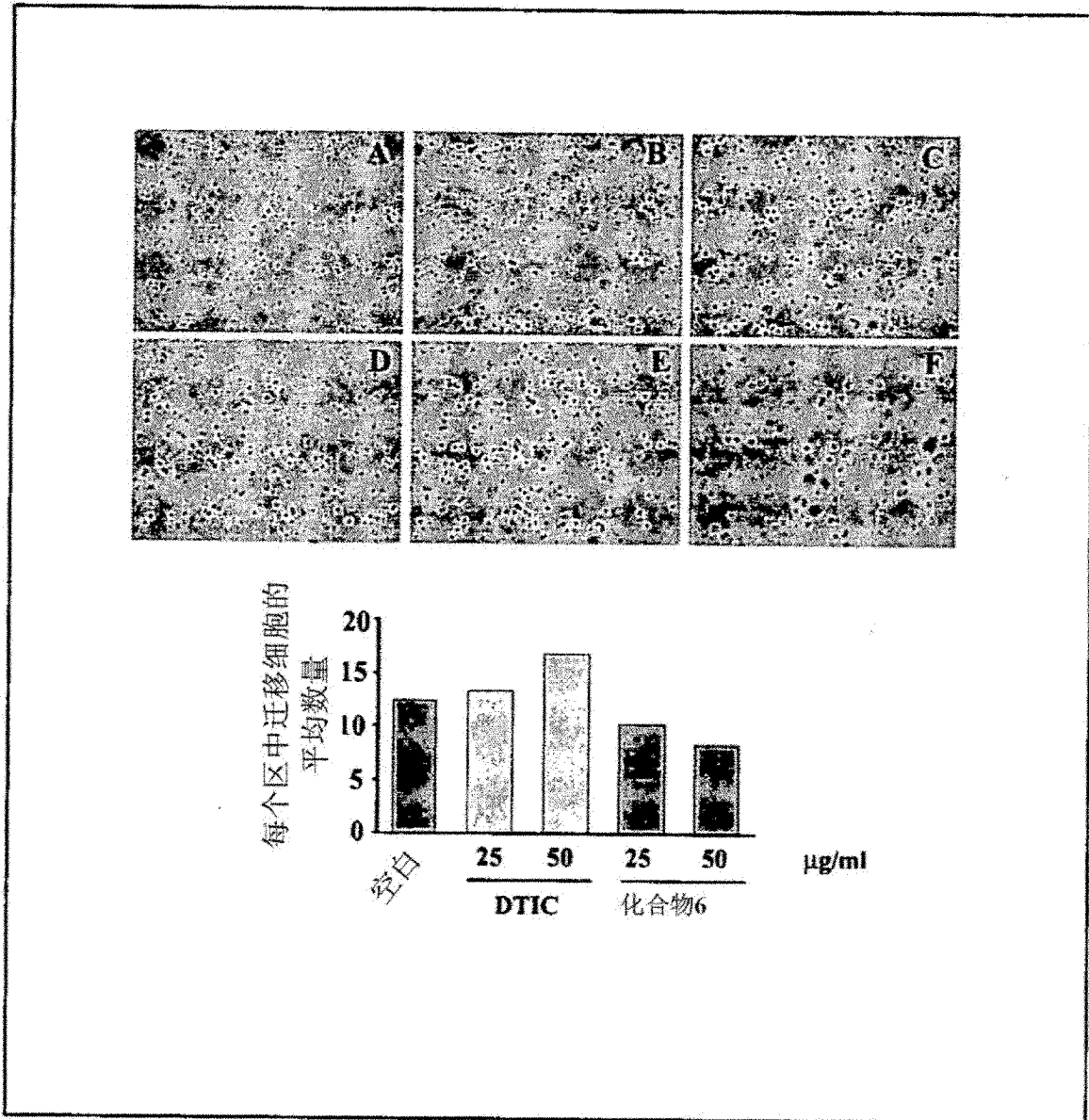


图 8

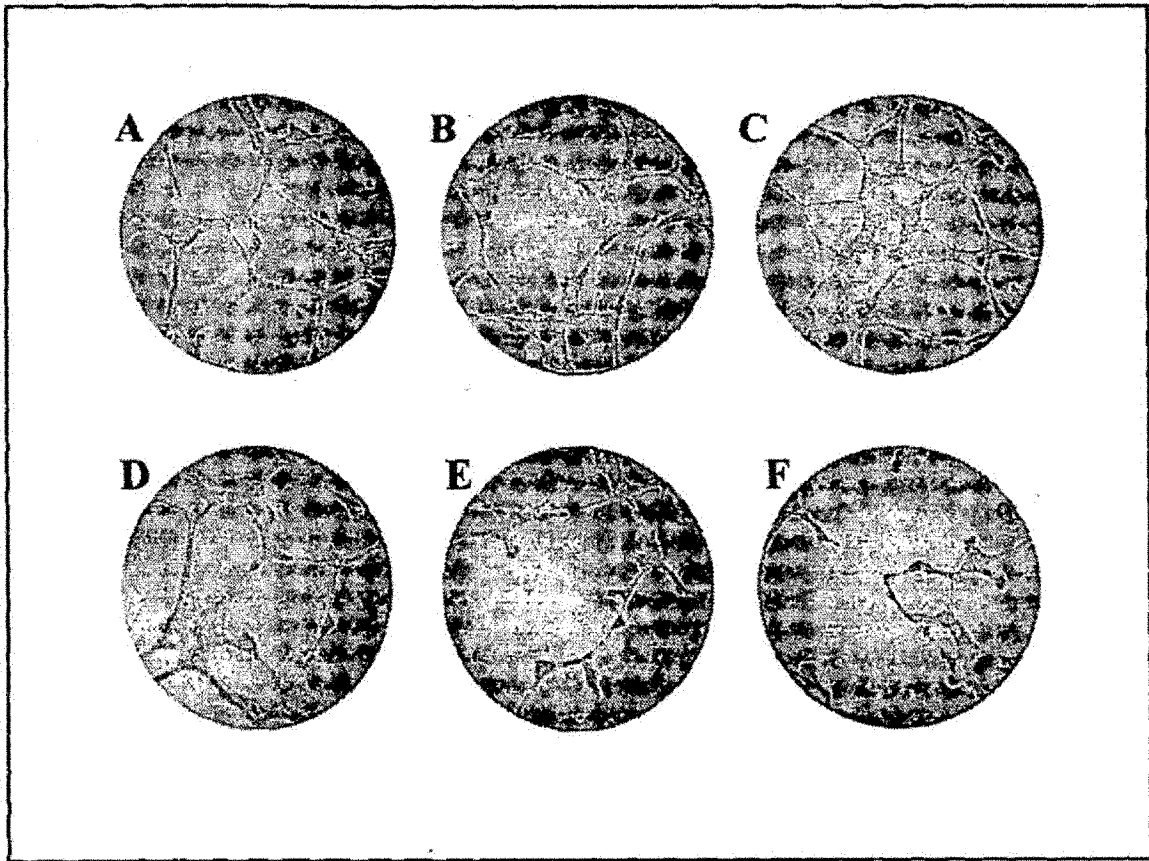
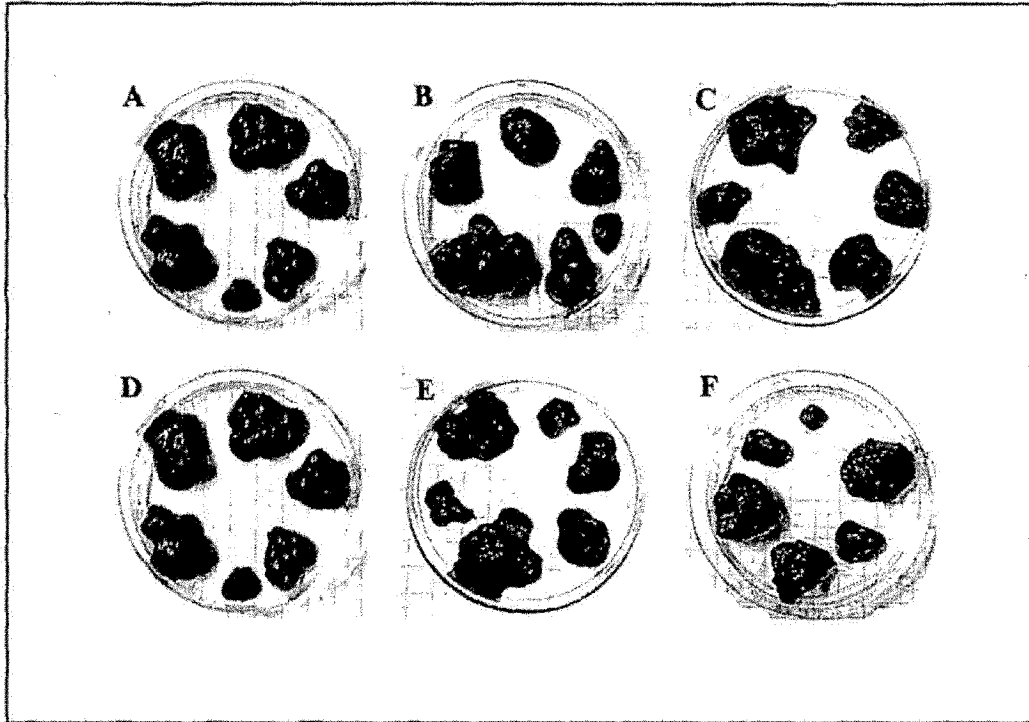


图 9



处理的组	平均重量 (gm)	肿瘤 SD	与对照相 比的减少
对照	2.858	0.865	
DTIC 50 mg/kg	2.046	0.232	28.411
DTIC 100 mg/kg	1.957	0.641	31.532
化合物6 (50 mg/kg)	1.858	0.881	34.989
化合物6 (100 mg/kg)	1.168	0.735	59.118

图 10