



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1980674 B

(45) 授权公告日 2011.05.25

(21) 申请号 200580022258.0

C07D 401/04 (2006.01)

(22) 申请日 2005.06.28

C07D 403/12 (2006.01)

(30) 优先权数据

C07D 403/14 (2006.01)

04076886.3 2004.06.30 EP

A61P 31/00 (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2006.12.30

US 5231184 A, 1993.07.27, 全文.

(86) PCT申请的申请数据

DE 1006423 B, 1957.04.18, 全文.

PCT/EP2005/053030 2005.06.28

WO 03015785 A1, 2003.02.27, 全文.

(87) PCT申请的公布数据

GB 732581 A, 1955.06.29, 全文.

W02006/003147 EN 2006.01.12

US 3753988 A, 1973.08.21, 全文.

(73) 专利权人 詹森药业有限公司

审查员 钟彦

地址 比利时比尔斯

(72) 发明人 L·A·默维勒克 L·E·J·肯尼斯

J·C·默坦斯 J·A·J·范杜恩

M·V·F·索默斯 W·B·L·沃特斯

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

72001

代理人 王颖煜 黄可峻

(51) Int. Cl.

A61K 31/502 (2006.01)

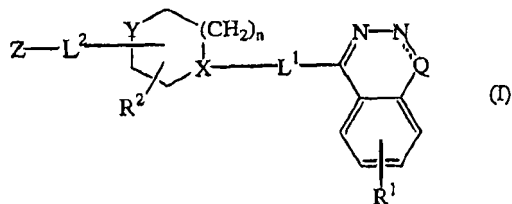
权利要求书 4 页 说明书 36 页

(54) 发明名称

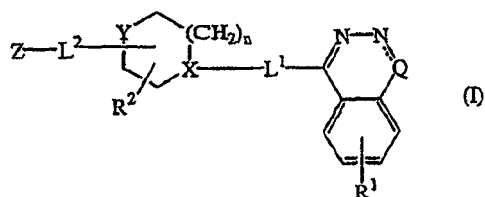
作为 PARP 抑制剂的 2,3-二氮杂萘衍生物

(57) 摘要

本发明体提供了式 (I) 的化合物、它们作为 PARP 抑制剂的应用、以及包含所述的式 (I) 化合物的药物组合物, 其中 R¹、R²、L¹、L²、X、Y、Q 和 Z 具有所述定义。



1. 式 (I) 的化合物：



其可药用加成盐和立体化学异构体形式，其中：

虚线表示任选键；

n 是 0、1、2 或 3 并且当 n 是 0 时则意味着是直接键；

Q 是 $-C(=O)-$ 或 $-CR^3-$ ，其中 R^3 是卤素或 C_{1-6} 烷基，和当 Q 是 $-CR^3-$ 时则虚线表示键；

X 是 $-CH<$ ，Y 是 $-N<$ 或 $-NH-$ ；

L^1 是直接键或选自以下的二价基： $-C_{1-6}$ 烷二基 $-NH-$ 、 $-NH-$ 或 $-NH-C_{1-6}$ 烷二基 $-NH-$ ；

L^2 是直接键或选自以下的二价基： $-C_{1-6}$ 烷二基 $-$ 、 $-C_{2-6}$ 烯二基 $-$ 、羰基或被选自羟基或芳基的一个取代基取代的 $-C_{1-6}$ 烷二基 $-$ ；

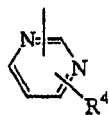
R^1 是氢、硝基、卤素或氨基；

R^2 是氢、 C_{1-6} 烷基或芳基 C_{1-6} 烷基；

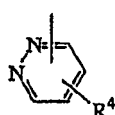
中心  部分还可与亚乙基桥桥接形成双环部分；

Z 是氢、羟基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷基氧基、芳基氧基、氨基、氰基、芳基 C_{1-6} 烷基氨基或苯并噻唑基 (C_{1-6} 烷基) 氨基或

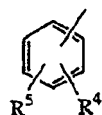
选自以下的环体系：



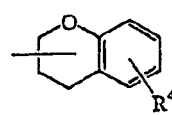
(a-1)



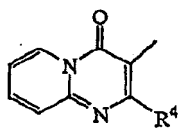
(a-2)



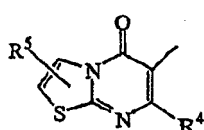
(a-3)



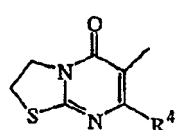
(a-4)



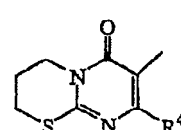
(a-5)



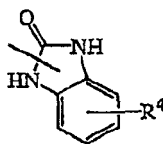
(a-6)



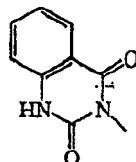
(a-7)



(a-8)



(a-9)



(a-10)

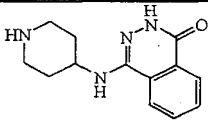
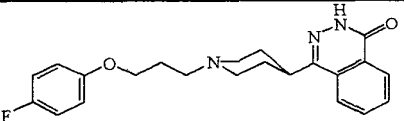
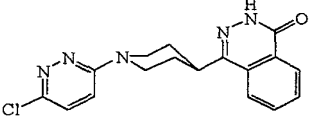
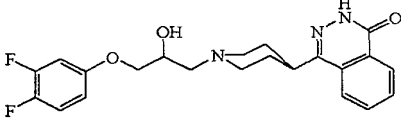
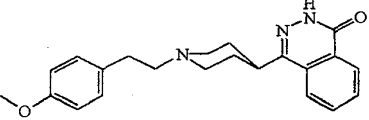
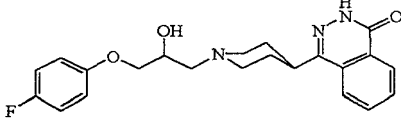
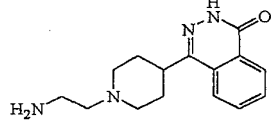
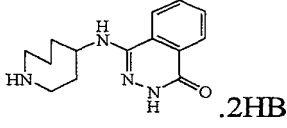
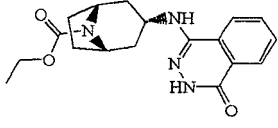
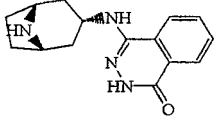
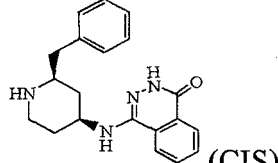
其中 R^4 和 R^5 各自独立地选自氢、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷基氧基或三卤代甲基；

芳基是苯基、或被一个或两个各自独立地选自卤素、 C_{1-6} 烷基或 C_{1-6} 烷基氧基的取代基取代的苯基。

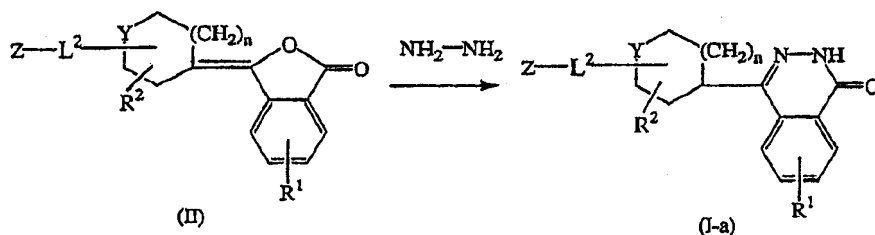
2. 权利要求 1 的化合物, 其中:

n 是 1 或 2; Q 是 $-C(=O)-$; L^1 是直接键或二价基 $-NH-$; L^2 是直接键或选自以下的二价基: 羰基、 $-C_{1-6}$ 烷二基-或被羟基取代的 $-C_{1-6}$ 烷二基-; R^1 是氢; R^2 是氢、芳基 C_{1-6} 烷基; Z 是氢、 C_{1-6} 烷基氧基、芳基氧基、氨基、或选自 (a-2) 或 (a-3) 的环体系; 并且 R^4 和 R^5 各自独立地选自氢或卤素。

3. 权利要求 1 和 2 的化合物, 其中所述化合物为化合物 41、13、62、26、64、2、8、34、11、15 和 10:

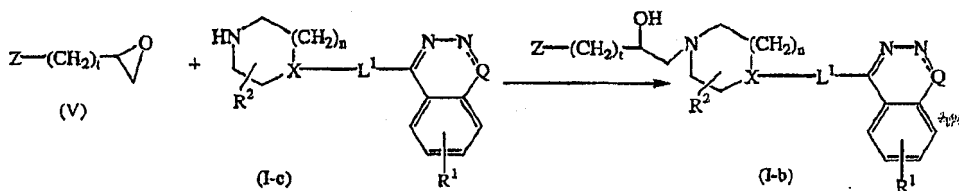
 <p>.2HBr Co. No. 41</p>	 <p>.HCl Co. No. 13</p>
 <p>.HCl.1/2 H2O.1/2 C3H8O Co. No. 62</p>	 <p>Co. No. 26</p>
 <p>.HCl Co. No. 64</p>	 <p>Co. No. 2</p>
 <p>Co. No. 8</p>	
 <p>.2HBr Co. No. 34</p>	 <p>(ENDO) Co. No. 11</p>
 <p>.HBr (ENDO) Co. No. 15</p>	 <p>(CIS) Co. No. 10</p>

4. 用作药物的权利要求 1-3 中任一项定义的化合物。
5. 药物组合物,其包括可药用载体和作为活性成分的治疗有效量的权利要求 1-3 中任一项定义的化合物。
6. 制备权利要求 5 的药物组合物的方法,其中将可药用载体和权利要求 1-3 中任一项定义的化合物密切混合。
7. 权利要求 1 中定义的式 (I) 化合物在制备用于化学敏化或辐射敏化的药物中的应用。
8. 权利要求 7 的应用,其中所述药物用于化学敏化。
9. 权利要求 7 的应用,其中所述药物用于辐射敏化。
10. 制备权利要求 1 中定义的化合物的方法,其特征在于:
 - a) 使式 (II) 的中间体与肼反应,形成式 (I-a) 的化合物:



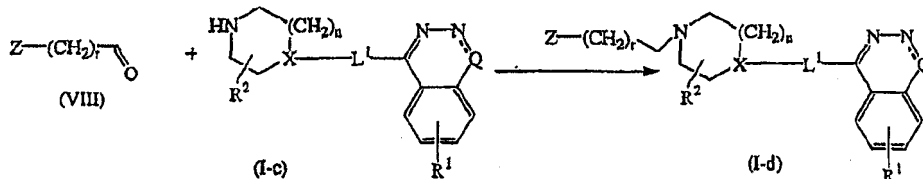
式中各基团具有如权利要求 1 中的定义;

- b) 使其中 t 是 0、1、2、3 或 4 的整数的式 (V) 的中间体与式 (I-c) 的化合物反应:



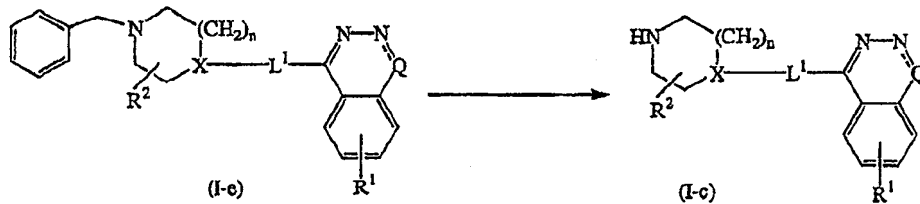
式中各基团具有如权利要求 1 中的定义;

- c) 使用适当的式 (VIII) 的羰基中间体对其中 r 是 0、1、2、3、4 或 5 的式 (I-c) 的化合物进行还原 N-烷基化:



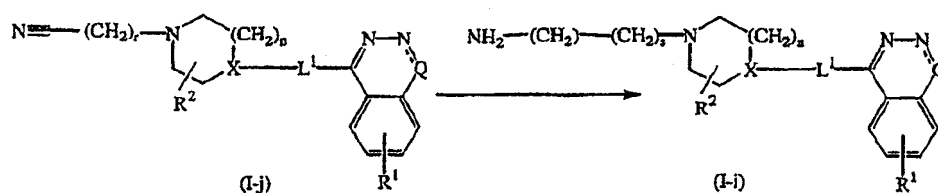
式中各基团具有如权利要求 1 中的定义;

- d) 从式 (I-e) 的化合物开始制备式 (I-c) 的化合物:



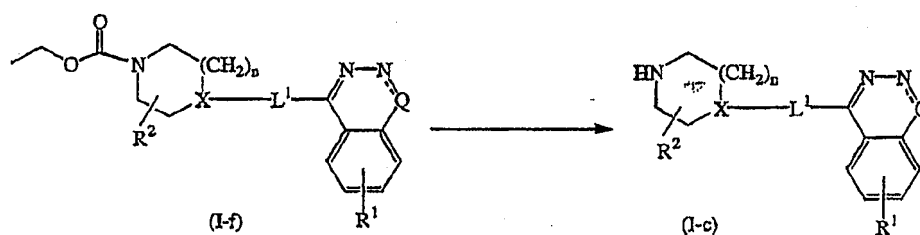
式中各基团具有如权利要求 1 中的定义;

e) 将式 (I-j) 的化合物转化为式 (I-i) 的化合物：



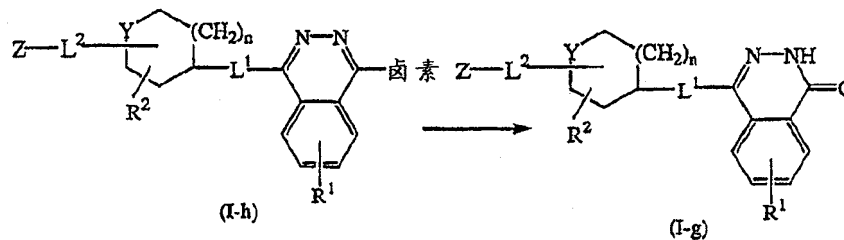
式中各基团具有如权利要求 1 中的定义；

f) 将式 (I-f) 的化合物脱酰基化制备式 (I-c) 的化合物：



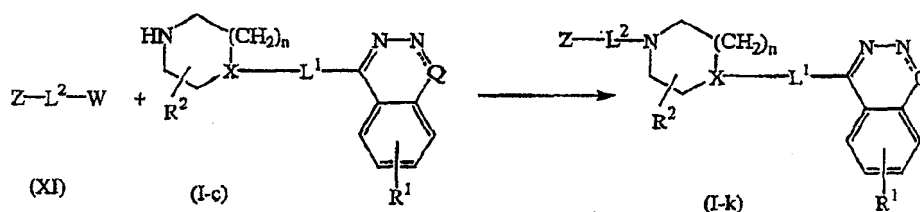
式中各基团具有如权利要求 1 中的定义；

g) 将式 (I-h) 的化合物转化为式 (I-g) 的化合物：



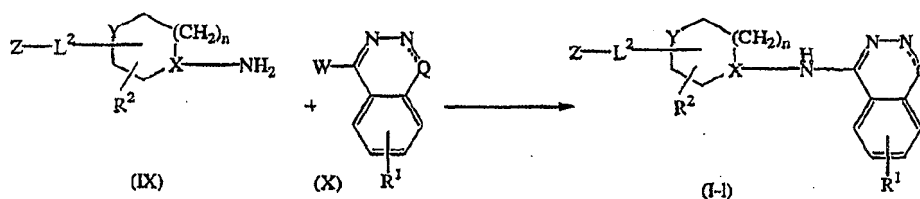
式中各基团具有如权利要求 1 中的定义；

h) 使 (I-c) 的化合物与其中 W 是适当的离去基团的式 (XI) 的中间体反应制备式 (I-k) 的化合物：



式中各基团具有如权利要求 1 中的定义；

i) 使式 (IX) 的中间体与式 (X) 的中间体反应形成式 (I-l) 的化合物：



式中各基团具有如权利要求 1 中的定义。

作为 PARP 抑制剂的 2,3- 二氮杂萘衍生物

技术领域

[0001] 本发明涉及 PARP 抑制剂,并提供了化合物和含有所述化合物的组合物。另外,本发明提供了使用所公开的 PARP 抑制剂作为例如药物的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 核酶聚 (ADP-核糖) 聚合酶 -1 (PARP-1) 是 PARP 酶家族的成员。这个不断发展的酶家族包括 PARPs 和端锚聚合酶 (Tankyrase, TANKs), 所述 PARP 例如 PARP-1、PARP-2、PARP-3 和 Vault-PARP; 所述端锚聚合酶例如 TANK-1、TANK-2 和 TANK-3。PARP 还被称作聚 (腺苷 5' - 二磷酸核糖) 聚合酶或 PARS (聚 (ADP-核糖) 合成酶)。

[0004] PARP-1 是 116kDa 的主要的核蛋白,由三个结构域组成:含有两个锌指状结构的 N-末端 DNA 结合结构域、自修饰结构域和 C-末端催化结构域。其几乎全部存在于真核细胞中。该酶合成聚 (ADP-核糖),一种可以由 200 个以上 ADP-核糖单元组成的分支的聚合物。聚 (ADP-核糖) 的蛋白质接受体直接或间接涉及到保持 DNA 完整性。它们包括组蛋白、拓扑异构酶、DNA 和 RNA 聚合酶、DNA 连接酶和 Ca^{2+} - 和 Mg^{2+} - 依赖的核酸内切酶。PARP 蛋白在许多组织高水平表达,最显著地在免疫系统、心脏、大脑和微生物系细胞中。在正常的生理条件下,存在最小的 PARP 活性。但是, DNA 损伤导致 PARP 立即活化高达 500 倍。

[0005] 端锚聚合酶 (TANKs) 被确定为人端粒复合物的成分。它们也曾被认为在小泡运输中有作用,还可能作为涉及各种其它细胞过程的蛋白的支架。端粒对于染色体的保持和稳定性是必不可少的,其被端粒酶 (专一性的逆转录酶) 所保持。TANKs 是 (ADP-核糖) 转移酶,具有信号和细胞骨架蛋白的一些特征。它们含有 PARP 结构域 (催化底物蛋白的聚 -ADP-核糖基化作用)、不育 α 基序 (为与某些信号分子共有) 和 ANK 结构域 (含有 24 个与细胞骨架蛋白锚蛋白同源的锚蛋白重复序列)。ANK 结构域与端粒蛋白,端粒重复结合因子 -1 (TRF-1) 相互作用。这些蛋白因此被称作 TRF1- 相互作用、锚蛋白 - 相关的 ADP-核糖聚合酶 (TANKs)。

[0006] TANK 的更特异的功能之一是 TRF-1 的 ADP-核糖基化作用。人端粒功能要求两个端粒特异性 DNA 结合蛋白 TRF-1 和 TRF-2。TRF-2 保护染色体末端, TRF-1 调节端粒长度。ADP-核糖基化作用抑制 TRF-1 与端粒 DNA 结合的能力。TRF-1 这种聚 -ADP-核糖基化作用从端粒释放 TRF-1, 打开端粒复合物, 并允许接近端粒酶。因此, TANK 用作端粒长度的正性调节剂功能, 通过端粒酶允许端粒伸长。

[0007] 在归结于 PARP 尤其是 PARP-1 的许多功能中, 通过 ADP-核糖基化作用促进 DNA 修复是它的主要作用, 因此调节许多 DNA 修复蛋白。作为 PARP 活化的结果, NAD^+ 水平显著降低。广泛的 PARP 活化导致在遭受大量 DNA 损伤的细胞中 NAD^+ 的严重损耗。聚 (ADP-核糖) 短的半衰期导致快速的周转速率。一旦形成聚 (ADP-核糖), 其就被组成性活化的聚 (ADP-核糖) 活性糖水解酶 (PARG), 以及磷酸二酯酶和 (ADP-核糖) 蛋白裂解酶快速降解。PARP 和 PARG 形成循环, 转化大量 NAD^+ 至 ADP-核糖。在小于 1 小时内, PARP 的过量刺激可以导致 NAD^+ 和 ATP 下降到小于正常水平的 20%。这样的情况在局部缺血期间尤其有害, 此时氧的缺乏已经显著威胁到细胞能量输出。随后在再灌注期间自由基的产生被认为是组织

损伤的主要原因。部分 ATP 的下降,其典型地存在于在局部缺血和再灌注期间的许多器官中,与由于聚 (ADP-核糖) 周转造成的 NAD^+ 损耗相联系。因此,抑制 PARP 或 PARG 预期可以保存细胞能量水平,由此加强在损伤后局部缺血组织的存活。

[0008] 聚 (ADP-核糖) 合成还包括对炎症响应必不可少的许多基因的诱导表达。PARP 抑制剂抑制在巨噬细胞中诱导型一氧化氮合成酶 (iNOS) 的产生,以及抑制在内皮细胞中 P-型选择蛋白和细胞内粘连分子-1 (ICAM-1) 的产生。这样的活性是 PARP 抑制剂表现出强抗炎作用的原因。通过阻止嗜中性粒细胞向损伤组织的移动和浸润,PARP 抑制能减少坏死。

[0009] PARP 被损伤的 DNA 碎片活化,并且一旦活化,催化高达 100 个 ADP-核糖单元向多种核蛋白包括组蛋白和 PARP 本身的附着。在主要的细胞应激反应期间,通过损耗能量储存,PARP 广泛的活化可以快速导致细胞损伤或死亡。由于每再生成一个 NAD^+ 分子消耗四个 ATP 分子, NAD^+ 被大量 PARP 活化耗尽,在努力再合成 NAD^+ 的过程中,ATP 也可变得被耗尽。

[0010] 据报道 PARP 活化在 NMDA-和 NO-两者诱导的神经毒性中发挥重要作用。这已经在皮层培养物和海马切片中得到证明,其中毒性预防与 PARP 抑制效能直接相关。PARP 抑制剂在治疗神经退行性疾病和头部创伤中的潜在作用因此被认识到,然而该作用的确切机理还没有被阐明。

[0011] 类似地,已经证明单次注射 PARP 抑制剂减小了兔子的由心脏或骨骼肌局部缺血和再灌注导致的梗塞面积。在这些研究中,在闭合前一分钟或再灌注前一分钟单次注射 3-氨基-苯甲酰胺 (10mg/kg),在心脏中导致类似的梗塞面积减小 (32-42%),1,5-二羟基异喹啉 (1mg/kg),为另一个 PARP 抑制剂,以可比的程度减小梗塞面积 (38-48%)。从这些结果使得可以合理地推测 PARP 抑制剂能够预先挽救心脏局部缺血或肌肉组织再灌注损伤。

[0012] PARP 活化还可以被用于测定神经毒伤害后的损伤,所述神经毒伤害是由暴露于下列任何诱导剂引起的,例如谷氨酸盐 (通过 NMDA 受体刺激)、活性氧中间体、淀粉样 β -蛋白、N-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 (MPTP) 或其活性代谢物 N-甲基-4-苯基吡啶 (MPP^+),其参与病理状态例如中风、阿尔茨海默病和帕金森病。其它研究已经连续探究了在体外小脑颗粒细胞中和在 MPTP 神经毒性中 PARP 活化的作用。过量神经暴露于谷氨酸盐,最经常是中风或其它神经退行性过程的结果,谷氨酸盐作为主导的中枢神经系统神经递质,在 N-甲基-D-天门冬氨酸盐 (NMDA) 受体和其它亚型受体有作用。在局部缺血大脑伤害期间例如中风或心脏病发作期间,氧缺乏的神经元大量释放谷氨酸盐。这种过量释放的谷氨酸盐反过来导致 N-甲基-D-天门冬氨酸盐 (NMDA)、AMPA、红藻氨酸盐和 MGR 受体的过度刺激 (兴奋毒性),打开离子通道并允许不受控制的离子流动 (例如 Ca^{2+} 和 Na^+ 流进细胞和 K^+ 流出细胞),导致神经元的过度刺激。过度刺激的神经元分泌更多的谷氨酸盐,产生反馈循环或多米诺骨牌效应,通过蛋白酶、脂肪酶和游离基的产生最终导致细胞损伤或死亡。谷氨酸盐受体的过分活化与各种的神经疾病和病症有牵连,包括癫痫、中风、阿尔茨海默病、帕金森病、肌肉萎缩侧索硬化症 (ALS)、亨廷顿舞蹈症、精神分裂症、慢性疼痛、局部缺血和组织缺氧、低血糖症、局部缺血、创伤和神经伤害后的神经元损失。谷氨酸盐暴露和刺激还牵涉到作为强迫症特别是药物依赖的基础。证据包括在许多动物种属中的发现,以及用谷氨酸盐或 NMDA 处理的大脑皮层培养基中发现,谷氨酸盐受体拮抗剂 (即阻断谷氨酸盐与

受体结合或活化受体的化合物) 阻断血管中风后的神经系统的损伤。尝试通过阻断 NMDA、AMPA、红藻氨酸盐和 MGR 受体预防兴奋性毒性, 被证明是困难的, 因为每个受体都具有谷氨酸盐可以结合的多个位点, 因此发现有效的混合拮抗剂或通用拮抗剂以阻止谷氨酸盐与所有受体的结合, 并实验这种理论是困难的。而且, 许多有效阻断受体的组合物对动物还是有毒的。所以, 目前对谷氨酸盐异常还没有已知有效的治疗。

[0013] 通过谷氨酸盐刺激 NMDA 受体, 例如活化酶神经元一氧化氮合成酶 (nNOS), 导致一氧化氮 (NO) 的形成, 其也调节神经毒性。通过用一氧化氮合成酶 (NOS) 抑制剂或通过体外靶向 nNOS 基因的破坏可以预防 NMDA 神经毒性。

[0014] PARP 抑制剂的另一个用途是治疗外周神经损伤以及其导致的被称作神经疼的病理疼痛综合征, 例如由普通坐骨神经的慢性收缩损伤 (CCI) 诱导的疼痛, 其中脊髓背角跨突触改变的特征在于发生细胞质和核质 (所谓的“黑色神经元”) 的色素过多。

[0015] 证据还存在于 PARP 抑制剂用于治疗炎症性肠病, 例如结肠炎。具体地, 结肠炎是在大鼠中通过管腔内施用半抗原在 50% 乙醇中的三硝基苯磺酸诱导的。被治疗的大鼠接受 3-氨基苯甲酰胺, 一种专一性的 PARP 活性抑制剂。PARP 活性的抑制减少炎症响应, 恢复形态和末端结肠能量状态。

[0016] 进一步证据显示 PARP 抑制剂用于治疗关节炎。进一步地 PARP 抑制剂似乎可用于治疗糖尿病。PARP 抑制剂已经显示可用于治疗内毒性休克或脓毒性休克。

[0017] PARP 抑制剂还被用于延长寿命和延长细胞增生能力, 包括治疗疾病例如皮肤衰老、阿尔茨海默病、动脉粥样硬化、骨关节炎、骨质疏松症、肌营养不良、骨骼肌退行性疾病包括重复性衰老、年龄相关的肌肉退化、免疫老化、AIDS 和其它免疫老化疾病; 和改变老化细胞的基因表达。

[0018] 还已知 PARP 抑制剂例如 3-氨基苯甲酰胺, 影响总的 DNA 修复, 例如对过氧化氢或离子化辐射的响应。

[0019] PARP 在 DNA 链断裂修复中的关键作用被很好地确立, 尤其是当断裂通过离子化辐射直接引起时, 或间接地在甲基化试剂、拓扑异构酶 I 抑制剂和其它化疗剂如顺铂和博莱霉素诱导 DNA 损伤酶修复后引起。使用“敲除”小鼠、反式为主的抑制模型 (过量表达 DNA- 结合结构域)、反义和小分子量抑制剂的多种的研究已经表明 PARP 在 DNA 损伤诱导后修复和细胞生存中的作用。PARP 酶活性的抑制可以导致肿瘤细胞对 DNA 损伤治疗增强的敏感性。

[0020] PARP 抑制剂曾被报导在放射敏感的 (缺氧的) 肿瘤细胞中是有效的, 以及在放疗后 DNA 潜在致死和亚致死量损伤中阻止肿瘤细胞的恢复, 推测这是由于它们可阻止 DNA 链破裂再结合的能力, 以及由于影响几种 DNA 损伤信号通路。

[0021] PARP 抑制剂曾被用于治疗癌症。此外, 美国专利 5,177,075 讨论了几种异喹啉用于增强离子化辐射或化疗剂对肿瘤细胞的致死作用。Weltin 等在“聚 (ADP-核糖) 聚合酶抑制剂 6-(5-菲啶酮) 在培养基的肿瘤细胞上的作用” (“Effect of 6(5-Phenanthridinone), an Inhibitor of Poly (ADP-ribose) Polymerase, on Cultured Tumor Cells”)、*Oncol. Res.*, 6 :9, 399-403 (1994) 中讨论了 PARP 活性的抑制, 降低肿瘤细胞增生, 以及当肿瘤细胞用烷基化药物共同处理时的显著协同作用。

[0022] 本领域技术状况的综述由 Li 和 Zhang 在 *IDrugs* 2001, 4(7) :804-812, Ame 等在

Bioassays 2004,26 :882-883 和 Nguewa 等在 Biophysic & Molecular Biology 2005,88 : 143-172 发表。

[0023] 这些继续成为对有效和强效的 PARP 抑制剂的需求,更特别是 PARP-1 抑制剂,其产生的副作用最小。本发明提供抑制 PARP 活性的化合物、组合物和方法,用于治疗癌症和 / 或预防细胞、组织和 / 或器官损伤,这些是由于例如坏死或凋亡造成的细胞损伤或死亡引起的。本发明的化合物和组合物尤其用于增强化疗和放疗效果,其中治疗的主要影响是导致靶标细胞 DNA 损伤。

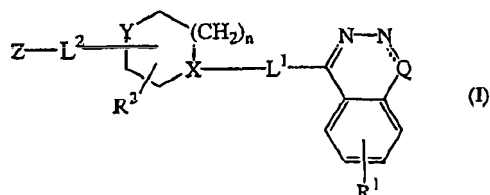
现有技术

[0024] 氨基 -2,3- 二氮杂萘酮衍生物的合成由 komendy 等人在 ActaChimica Academiae Scientiarum Hungaricae 1981,106(2) :155-66 和在 Acta Chimica Hungarica 1983, 112(1) :65-82 中描述。1985 年 10 月 2 日公开的 EP 156433 公开了哒嗪胺。所述化合物具有抗病毒性质。更特别地,公开了本发明的化合物 77、78、79、80、81、82、83 和 84。

发明内容

[0025] 本发明涉及式 (I) 的化合物 :

[0026]



[0027] 其 N- 氧化物形式、可药用加成盐和立体化学异构体形式,其中 :

[0028] 虚线表示任选键 ;

[0029] n 是 0、1、2 或 3 并且当 n 是 0 时则意味着直接键 ;

[0030] Q 是 $-C(=O)-$ 或 $-CR^3-$, 其中 R^3 是卤素或 C_{1-6} 烷基,和

[0031] 当 Q 是 $-CR^3-$ 时则虚线表示键 ;

[0032] 每个 X 独立地为 $-N <$ 或 $-CH <$; 并且当 X 是 $-CH <$ 时则 Y 是 $-N <$ 或 $-NH-$;

[0033] 每个 Y 独立地为 $-N <$ 、 $-NH-$ 、 $-CH <$ 或 $-CH_2-$;

[0034] 除了当 X 是 $CH <$ 时则 Y 是 $N <$ 或 $-NH-$;

[0035] L_1 是直接键或选自以下的二价基 : $-C_{1-6}$ 烷二基 $-NH-$ 、 $-NH-$ 或 $-NH-C_{1-6}$ 烷二基 $-NH-$;

[0036] L^2 是直接键或选自以下的二价基 : $-C_{1-6}$ 烷二基 $-$ 、 $-C_{2-6}$ 烯二基 $-$ 、羰基或被选自羟基或芳基的一个取代基取代的 $-C_{1-6}$ 烷二基 $-$;

[0037] R^1 是氢、硝基、卤素或氨基 ;

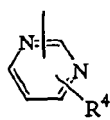
[0038] R^2 是氢、 C_{1-6} 烷基或芳基 C_{1-6} 烷基 ;

[0039] 中心 $\begin{array}{c} Y \\ | \\ \text{---} \\ | \\ X \end{array}$ $(CH_2)_n$ 部分还可与乙烯桥桥接 (即形成双环部分) ;

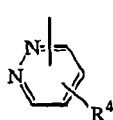
[0040] Z 是氢、羟基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷基氧基、芳基氧基、氨基、氰基、芳基 C_{1-6} 烷基氨基或苯并噻唑基 (C_{1-6} 烷基) 氨基或

[0041] 选自以下的环体系：

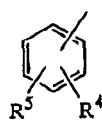
[0042]



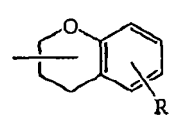
(a-1)



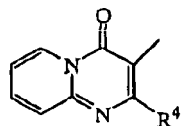
(a-2)



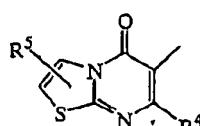
(a-3)



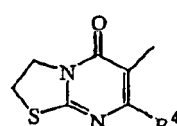
(a-4)



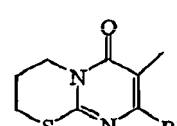
(a-5)



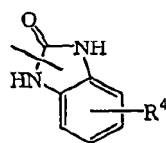
(a-6)



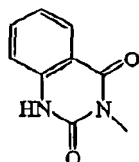
(a-7)



(a-8)



(a-9)



(a-10)

[0043] 其中 R^4 和 R^5 各自独立地选自氢、卤代、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷基氧基或三卤代甲基；

[0044] 芳基是苯基、或被一个或两个各自独立地选自卤代、 C_{1-6} 烷基或 C_{1-6} 烷基氧基的取代基取代的苯基；

[0045] 条件是当 Q 是 $-C(=O)-$ 且 X 是 $-N<$ 且 Y 是 $-CH<$ 或 $-CH_2-$ 且 L^1 是直接键且 L^2 是直接键、或二价基 $-C_{1-6}$ 烷二基 - 或被羟基取代的 $-C_{1-6}$ 烷二基 - 且 R^1 是氢且 R^2 是氢或 C_{1-6} 烷基时，则 Z 不是氢、羟基或 C_{1-6} 烷基；且

[0046] 当 n 是 1 且 X 是 $-N<$ 且 Y 是 $-N<$ 且 L^1 和 L^2 是直接键且 R^1 和 R^2 是氢且 Q 是 $-CR^3-$ ，其中 R^3 是氯时，则 Z 不是环体系 (a-3)。

[0047] 式 (I) 的化合物还可以其互变异构形式存在。尽管上式中未明确指明这种形式，但是这种形式也包括在本发明的范围内。

[0048] 上面定义和下文中使用的许多术语在后面说明。这些术语有时原样使用或用在组合术语中。

[0049] 如上述定义和下文中使用的，卤素一般是指氟、氯、溴和碘；三卤代甲基是指含有三个相同或不同取代基的甲基如三氟甲基； C_{1-6} 烷基是指含 1-6 个碳原子的直链和支链饱和和烃基，诸如例如甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、1-甲基乙基、2-甲基丙基、2-甲基-丁基、2-甲基戊基等； $-C_{1-6}$ 烷二基 - 是指含 1-6 个碳原子的二价直链和支链饱和和烃基，诸如例如亚甲基、1,2-乙二基、1,3-丙二基、1,4-丁二基、1,5-戊二基、1,6-己二基及其支链异构体如 2-甲基戊二基、3-甲基戊二基、2,2-二甲基丁二基、2,3-二甲基丁二基等； $-C_{2-6}$ 烯二基 - 是指含 2-6 个碳原子并具有一个双键的二价直链和支链烃基，诸如例如乙烯二基、2-丙烯二基、3-丁烯二基、2-戊烯二基、3-戊烯二基、3-甲基-2-丁烯二基等。

[0050] 术语“可药用盐”意指可药用酸或碱加成盐。上文提及的可药用酸或碱加成盐意指式 (I) 化合物能够形成的包含治疗活性的无毒酸和无毒碱加成盐形式。通过用适当的

酸处理,具有碱性性质的式(I)化合物可以转化为它们的可药用酸加成盐。适当的酸包括例如无机酸,例如氢卤酸例如盐酸或氢溴酸;硫酸;硝酸;磷酸等酸;或有机酸例如乙酸、丙酸、羟基乙酸、乳酸、丙酮酸、草酸、丙二酸、丁二酸(即丁烷二酸)、马来酸、富马酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、甲烷磺酸、乙烷磺酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、环己烷基氨基磺酸、水杨酸、对氨基水杨酸、双羟萘酸等酸。

[0051] 具有酸性性质的式(I)化合物可以转化为它们的可药用碱加成盐,通过用合适的有机或无机碱处理所述的酸形式得到。适当的碱盐形式包括例如铵盐、碱和碱土金属盐例如锂盐、钠盐、钾盐、镁盐、钙盐等,与有机碱的盐例如苄星、N-甲基-D-葡糖胺盐、哈胺盐,和与氨基酸的盐例如例如精氨酸、赖氨酸的盐等。

[0052] 术语酸或碱加成盐还包含式(I)化合物能够形成的水合物和溶剂加成形式。这样形式的实例例如水合物、醇合物等。上文中所用的术语式(I)化合物的立体化学异构体形式,定义了所有可能的由相同原子通过相同顺序键合但是具有不同的三维结构且不可互换的化合物,其是式(I)化合物可能拥有的。除非另有提及或指明,化合物的化学名称包括所述化合物可能拥有的所有可能的立体化学异构体形式的混合物。所述的混合物可以含有所述化合物基本结构的所有非对映异构体和/或对映异构体。式(I)化合物的所有立体化学的异构体形式包括以纯的形式和以彼此混合物形式的均包含在本发明范围之内。

[0053] 式(I)化合物的N-氧化物形式意指包含那些式(I)化合物,其中一个或几个氮原子被氧化为所谓的N-氧化物,特别是那些其中一个或多个吡啶-或吡嗪的氮为N-氧化的N-氧化物。

[0054] 无论何时下文中使用的术语“式(I)化合物”意指还包括N-氧化物形式、可药用酸或碱加成盐和所有的立体异构体形式。

[0055] 在Komendy等人中,仅描述了氨基-2,3-二氮杂萘酮衍生物的合成。在EP 156433中公开的化合物具有抗病毒性质。更特别地,已经公开了本申请中的化合物77、78、79、80、81、82、83和84。意想不到的,已经发现本发明的化合物具有PARP抑制活性。

[0056] 第一组感兴趣的化合物由具有以下一个或多个限制的式(I)化合物组成:

[0057] a)n是0、1或2;

[0058] b) R^2 是氢或芳基 C_{1-6} 烷基;

[0059] c)Z是氢、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷基氧基、芳基氧基、氨基、氰基、芳基 C_{1-6} 烷基氨基或苯并噻唑基(C_{1-6} 烷基)氨基或选自(a-1)、(a-2)、(a-3)、(a-4)、(a-5)、(a-6)、(a-7)、(a-8)、(a-9)、(a-10)的环体系。

[0060] 第二组感兴趣的化合物由具有以下一个或多个限制的式(I)化合物组成:

[0061] a)Q是 $-CR^3-$ 其中 R^3 是卤素或 C_{1-6} 烷基;

[0062] b)每个X是 $-CH<$;

[0063] c)每个Y独立地为 $-N<$ 或 $-NH-$;

[0064] d) L^1 是选自以下的二价基: $-C_{1-6}$ 烷二基 $-NH-$ 、 $-NH-$ 或 $-NH-C_{1-6}$ 烷二基 $-NH-$;

[0065] e) L^2 是选自以下的二价基: $-C_{2-6}$ 烯二基-、羰基或被芳基取代的 $-C_{1-6}$ 烷二基-;

[0066] f) R^1 是硝基、卤素或氨基;

[0067] g) R^2 是芳基 C_{1-6} 烷基;

[0068] h)Z是 C_{1-6} 烷基氧基、芳基氧基、氨基、氰基、芳基 C_{1-6} 烷基氨基或苯并噻唑基(C_{1-6}

烷基)氨基或选自(a-1)、(a-2)、(a-3)、(a-4)、(a-5)、(a-6)、(a-7)、(a-8)、(a-9)、(a-10)的环体系。

[0069] 第三组感兴趣的化合物由具有以下一个或多个限制的式(I)化合物组成:

[0070] a)n 是 0、2 或 3;

[0071] b)Q 是 $-C(=O)-$ 或 $-CR^3-$, 其中 R^3 是 C_{1-6} 烷基;

[0072] c) 每个 X 是 $-CH<$;

[0073] d) 每个 Y 独立地为 $-CH<$ 或 $-CH_2-$;

[0074] e) L^1 是选自以下的二价基: $-C_{1-6}$ 烷二基 $-NH-$ 、 $-NH-$ 或 $-NH-C_{1-6}$ 烷二基 $-NH-$;

[0075] f) L^2 是选自以下的二价基: $-C_{1-6}$ 烷二基 $-$ 、 $-C_{2-6}$ 烯二基 $-$ 、羰基或被选自羟基或芳基的一个取代基取代的 $-C_{1-6}$ 烷二基 $-$;

[0076] g) R^1 是硝基、卤代或氨基;

[0077] h) R^2 是 C_{1-6} 烷基或芳基 C_{1-6} 烷基;

[0078] i)Z 是氢、羟基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷基氧基、芳基氧基、氨基、氰基、芳基 C_{1-6} 烷基氨基或苯并噻唑基 (C_{1-6} 烷基) 氨基或选自(a-1)、(a-2)、(a-4)、(a-5)、(a-6)、(a-7)、(a-8)、(a-9)、(a-10)的环体系。

[0079] 一组优选的化合物由具有以下一个或多个限制的式(I)化合物组成:

[0080] a)n 是 1 或 2;

[0081] b)Q 是 $-C(=O)-$;

[0082] c)Y 是 $-N<$ 、 $-NH-$ 或 $-CH<$;

[0083] c) L^1 是直接键或二价基 $-NH-$;

[0084] d) L^2 是直接键或选自以下的二价基: 羰基、 $-C_{1-6}$ 烷二基 $-$ 或被羟基取代的 $-C_{1-6}$ 烷二基 $-$;

[0085] e) R^1 是氢;

[0086] f) R^2 是氢、芳基 C_{1-6} 烷基;

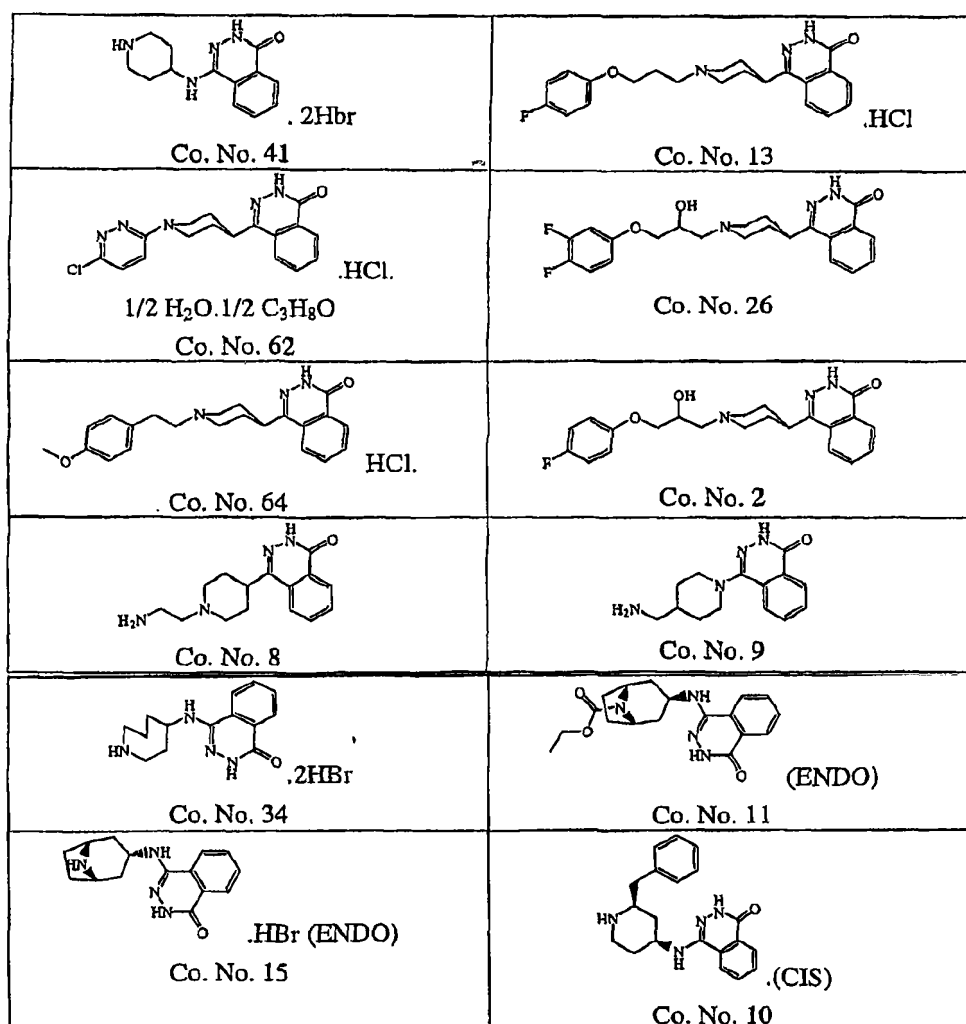
[0087] g)Z 是氢、 C_{1-6} 烷基氧基、芳基氧基、氨基,或选自(a-2)或(a-3)的环体系;

[0088] h) R^4 和 R^5 各自独立地选自氢或卤素。

[0089] 一组最优选的化合物由以下的式(I)化合物组成:其中 n 是 1 或 2;Q 是 $-C(=O)-$;Y 是 $-N<$ 、 $-NH-$ 或 $-CH<$; L^1 是直接键或二价基 $-NH-$; L^2 是直接键或选自以下的二价基: 羰基、 $-C_{1-6}$ 烷二基 $-$ 或被羟基取代的 $-C_{1-6}$ 烷二基 $-$; R^1 是氢; R^2 是氢、芳基 C_{1-6} 烷基; Z 是氢、 C_{1-6} 烷基氧基、芳基氧基、氨基、或选自(a-2)或(a-3)的环体系;并且 R^4 和 R^5 各自独立地选自氢或卤代。

[0090] 最优选的化合物是化合物 41、13、62、26、64、2、8、9、34、11、15 和 10。

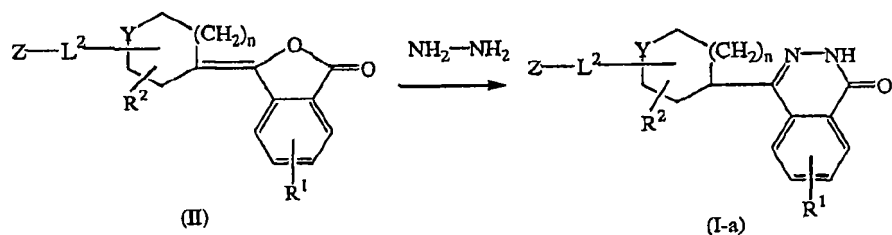
[0091]



[0092] 式 (I) 的化合物可以根据 EP156433 中所述方法制备。起始原料和一些中间体是已知的化合物并且是市售的、或者可根据本领域通常已知的常规反应过程制备。一些制备方法将在下文更详细地描述。其它用于获得最终的式 (I) 化合物的方法在实施例中描述。

[0093] 其中 L¹ 是键、X 是 -CH- 且 Q 是 -C(=O)- 的式 (I) 的化合物 (本文称作式 (I-a) 的化合物), 可通过式 (II) 中间体与肼反应制备。反应可在适当的溶剂诸如例如醇例如甲醇、乙醇、丙醇等中进行。

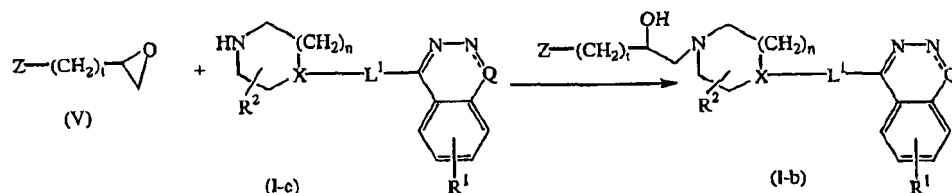
[0094]



[0095] 其中 Y 是 -N < 且 L² 是被羟基取代的二价基 -C₁₋₆ 烷二基 - 的式 (I) 的化合物 (本文称作式 (I-b) 的化合物), 可通过其中 t 是 0、1、2、3 或 4 的整数的式 (V) 的中间体与其中 L² 是直接键且 Z 是氢的式 (I) 的化合物 (本文称作式 (I-c) 的化合物) 反应制备。反应可

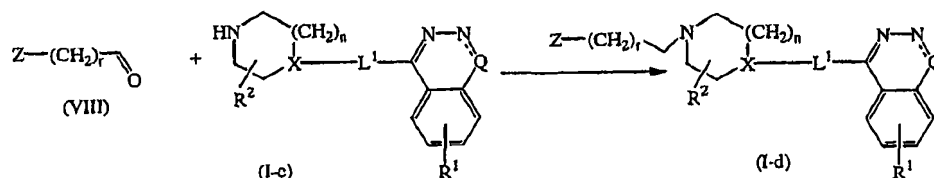
以在反应惰性溶剂诸如例如 N, N- 二甲基甲酰胺等中或醇例如丙醇等中进行。可以添加适当的碱, 诸如例如碱金属或碱土金属的碳酸盐或碳酸氢盐, 如三乙胺或碳酸钠。

[0096]



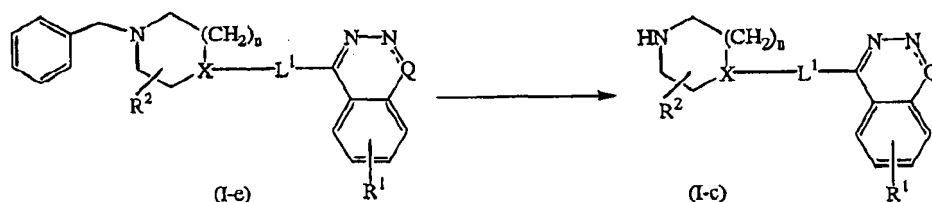
[0097] 其中 Y 是 $-N <$ 且 L^2 任选取代的二价基 $-C_{1-6}$ 烷二基 $-$ 的式 (I) 的化合物 (本文称作式化合物 (I-d)), 可通过其中 r 是整数 0、1、2、3、4 或 5 的式 (I-c) 的化合物与适当的式 (VIII) 的羰基中间体的还原 N- 烷基化制备。所述的还原 N- 烷基化反应可根据本领域已知的催化氢化过程通过对反应物在适当的反应惰性有机溶剂中的经搅拌和加热的混合物进行催化氢化而方便地进行。适当的溶剂例如是醇例如甲醇、乙醇、2- 丙醇等; 环醚, 如 1, 4- 二氧杂环己烷等; 卤代烃, 如三氯甲烷等; N, N- 二甲基甲酰胺; 二甲基亚砜等; 或两种或多种上述溶剂的混合物。术语“本领域已知的催化氢化过程”是指反应在氢气氛下在适当的催化剂诸如例如炭载钨、炭载铂等存在的条件下进行。为了避免反应物和反应产物中某些官能团发生进一步的不需要的氢化, 向反应混合物中添加适当的催化剂中毒剂如噻吩等是有利的。

[0098]



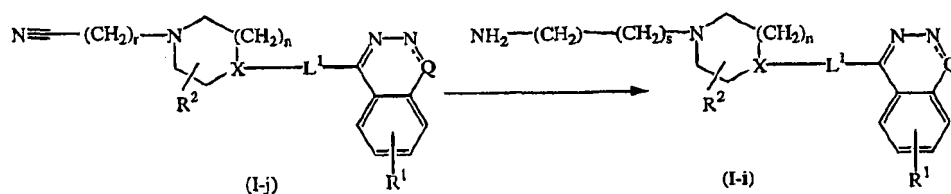
[0099] 也可使用上述的本领域已知的催化氢化过程从其中 $Z-L^2-$ 是芳基 C_{1-6} 烷基 (例如) 或芳基 C_{1-6} 烷基氨基的式 (I) 的化合物 (本文称作式化合物 (I-e)) 的起始化合物制备式 (I-c) 的化合物 (例如)、或其中 L^2 是直接键或二价基 $-C_{1-6}$ 烷二基 $-$ 且 Z 是氨基的式 I 的化合物。

[0100]



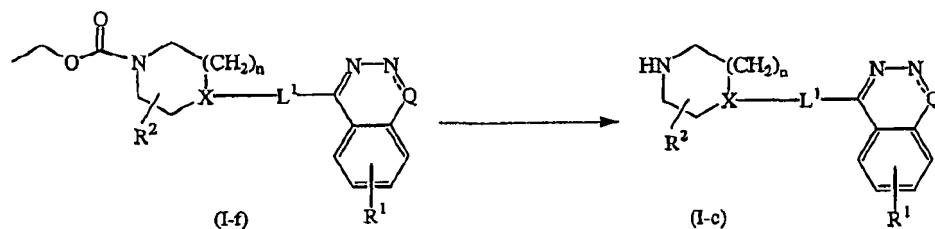
[0101] 也可使用催化氢化过程通过转化其中 $Z-L^2-$ 是氰基 $-(CH_2)_r-$ (其中 s 是 0、1、2、3、4 或 5 的整数) 的式 (I) 的化合物 (本文称作式 (I-j) 的化合物) 制备其中 $Z-L^2-$ 是氨基 C_{1-6} 烷基的式 (I) 的化合物 (本文称作式化合物 (I-i))。反应在氢气氛下和在甲醇和氨的混合物中的拉内镍存在的条件下进行。

[0102]



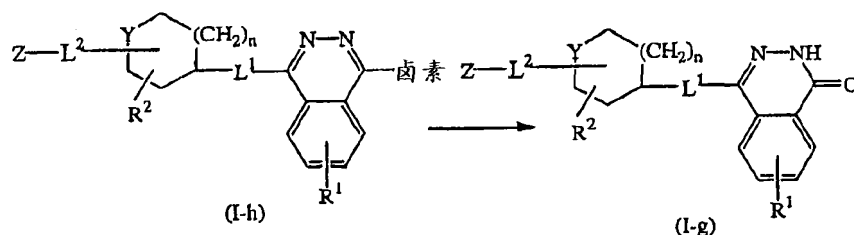
[0103] 也可通过其中 $Z-L^2$ 是 $-C_{1-6}$ 烷基氧基羰基的式 (I) 的化合物 (本文称作式 (I-f) 的化合物) 与适当的酸性或碱性溶剂如盐酸或氢溴酸在适当的溶剂如醇例如丙醇中反应将式 (I-f) 的化合物脱酰基化而制备式 (I-c) 的化合物。

[0104]



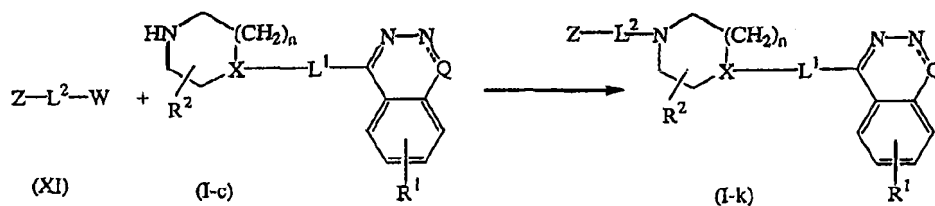
[0105] 可通过处理其中 Q 是 $-CR^3$ 、 R^3 是卤素并且虚线表示键的式 (I) 的化合物 (本文称作式 (I-h) 的化合物)、乙酸钠和乙酸以及适当的酸性溶液如盐酸的混合物处理式 (I-h) 的化合物而制备其中 Q 是 $-C(=O)-$ 的式 (I) 的化合物 (本文称作式 (I-g) 的化合物)。

[0106]



[0107] 可通过式 (I-c) 的化合物与其中 W 是适当的离去基团诸如例如卤素如氟、氯、溴或碘或磺酰基氧基如甲基磺酰基氧基、4-甲基苯基磺酰基氧基等的式 (XI) 的中间体反应制备其中 Y 是 $-N<$ 的式 (I) 的化合物 (本文称作式 (I-k) 的化合物)。反应可以在反应惰性溶剂诸如例如醇例如甲醇、乙醇、2-甲氧基乙醇、丙醇、丁醇等;醚例如 4,4-二氧杂环己烷、1,1'-氧基二丙烷等;酮例如 4-甲基-2-戊酮;N,N-二甲基甲酰胺;或硝基苯等中进行。可以添加适当的碱诸如例如碱金属或碱土金属的碳酸盐或碳酸氢盐如三乙胺或碳酸钠吸收反应过程中放出的酸。可添加少量的适当的金属碘化物例如碘化钠或碘化钾以促进反应。搅拌可提高反应速率。反应可在室温和反应混合物的回流温度之间的温度范围内方便地进行,并且如果需要反应可在加压下进行。

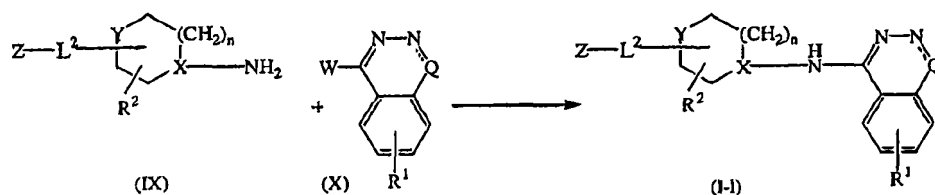
[0108]



[0109] 以类似的方法,可通过式 (IX) 的中间体与其中 W 如上述定义的式 (X) 的中间体反应制备其中 X 是 $>N-$ 或 L^1 是 $-C_{1-6}$ 烷二基 $-NH-$ 、 $-NH-$ (例如) 或 $-NH-C_{1-6}$ 烷二基 $-NH-$ 的式

(I) 的化合物 (本文称作式 (I-1) 的化合物) 。

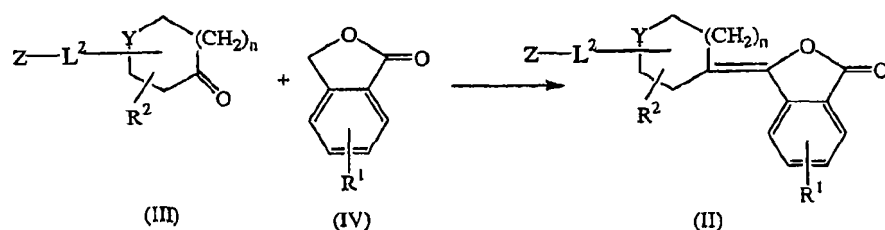
[0110]



[0111] 式 (I) 的化合物还可通过本领域已知的反应或官能团转化进行彼此转化。一些上述转化已经在上文描述。其它例子是羧酸酯水解得到相应的羧酸或醇 ; 酰胺水解得到相应的羧酸或胺 ; 腈水解得到相应的酰胺 ; 咪唑或苯基上的氨基可通过本领域已知的重氮化反应和随后的用氢替换重氮基而被氢替换 ; 醇可转化为酯和醚 ; 伯胺可转化为仲胺或叔胺 ; 双键可进行氢化得到相应的单键 ; 苯基上的碘代基团可通过在适当的钯催化剂的存在下插入一氧化碳而转化为酯基。

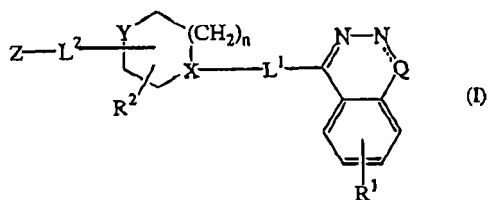
[0112] 可通过式 (III) 的中间体与适当的式 (IV) 的 1(3H)-异苯并咪唑酮在钠和适当的溶剂诸如例如醇如乙醇等的混合物中反应制备式 (II) 的中间体。

[0113]



[0114] 本发明还涉及用作药物的化合物, 其中所述化合物是式 (I) 的化合物 :

[0115]



[0116] 其 N-氧化物形式、可药用加成盐和立体化学异构体形式, 其中 :

[0117] 虚线表示任选键 ;

[0118] n 是 0、1、2 或 3 并且当 n 是 0 时则意味着直接键 ;

[0119] Q 是 $-C(=O)-$ 或 $-CR^3-$, 其中 R^3 是卤素或 C_{1-6} 烷基, 和

[0120] 当 Q 是 $-CR^3-$ 时则虚线表示键 ;

[0121] 每个 X 独立地为 $-N<$ 或 $-CH<$; 并且当 X 是 $-CH<$ 时则 Y 是 $-N<$ 或 $-NH-$;

[0122] 每个 Y 独立地为 $-N<$ 、 $-NH-$ 、 $-CH<$ 或 $-CH_2-$;

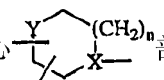
[0123] 除了当 X 是 $CH<$ 时则 Y 是 $N<$ 或 $-NH-$;

[0124] L^1 是直接键或选自以下的二价基 : $-C_{1-6}$ 烷二基 $-NH-$ 、 $-NH-$ 或 $-NH-C_{1-6}$ 烷二基 $-NH-$;

[0125] L^2 是直接键或选自以下的二价基 : $-C_{1-6}$ 烷二基 $-$ 、 $-C_{2-6}$ 烯二基 $-$ 、羰基或被选自羟基或芳基的一个取代基取代的 $-C_{1-6}$ 烷二基 $-$;

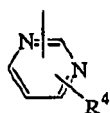
[0126] R^1 是氢、硝基、卤代或氨基；

[0127] R^2 是氢、 C_{1-6} 烷基或芳基 C_{1-6} 烷基；

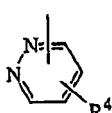
[0128] 中心  部分还可与乙烯桥桥接（即形成双环部分）；

[0129] Z 是氢、羟基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷基氧基、芳基氧基、氨基、氰基、芳基 C_{1-6} 烷基氨基或苯并噻唑基（ C_{1-6} 烷基）氨基或选自以下的环体系：

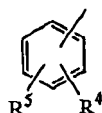
[0130]



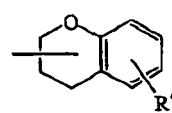
(a-1)



(a-2)

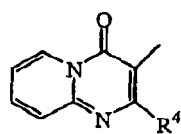


(a-3)

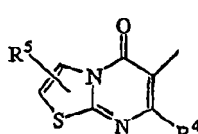


(a-4)

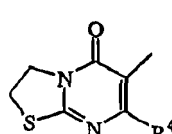
[0131]



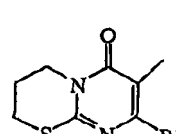
(a-5)



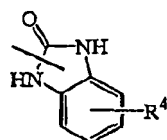
(a-6)



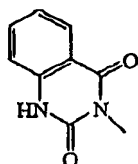
(a-7)



(a-8)



(a-9)



(a-10)

[0132] 其中 R^4 和 R^5 各自独立地选自氢、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷基氧基或三卤代甲基；

[0133] 芳基是苯基、或被一个或两个各自独立地选自卤素、 C_{1-6} 烷基或 C_{1-6} 烷基氧基的取代基取代的苯基；

[0134] 条件是当 n 是 1 且 X 是 -N< 且 Y 是 -N< 且 L^1 和 L^2 是直接键且 R^1 和 R^2 是氢且 Q 是 $-CR^3-$ ，其中 R^3 是氯时，则 Z 不是环体系 (a-3)。

[0135] 本发明的化合物具有 PARP 抑制性，这可从下文的实验部分看出。

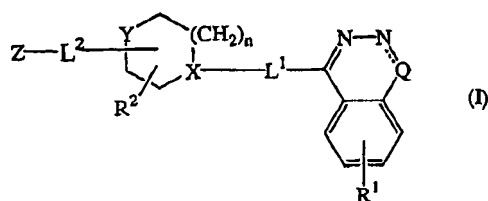
[0136] 本文使用的术语“PARP”是指具有聚 ADP-核糖基化活性的蛋白质。在该术语的意义内，PARP 包括所有的由 parp 基因、其突变株及其选择性的部分 (slice) 蛋白编码的蛋白质。另外，本文使用的术语“PARP”包括 PARP 类似物、同系物和其它动物的类似物。

[0137] 术语“PARP”包括但不限于 PARP-1。在该术语的意义内的还可包括 PARP-2、PARP-3、Vault-PARP (PARP-4)、PARP-7 (TiPARP)、PARP-8、PARP-9 (Ba1)、PARP-10、PARP-11、PARP-12、PARP-13、PARP-14、PARP-15、PARP-16、TANK-1、TANK-2 和 TANK-3。

[0138] 抑制 PARP-1 和端锚蛋白酶 2 的化合物具有的有利性质在于它们具有增强的癌细胞生长抑制活性。

[0139] 本发明还涉及化合物在制备用于治疗本文所述的动物的任何疾病和病症的药物中的应用，其中所述化合物是式 (I) 的化合物：

[0140]



[0141] 其 N-氧化物形式、可药用加成盐和立体化学异构体形式,其中:

[0142] 虚线表示任选键;

[0143] n 是 0、1、2 或 3 并且当 n 是 0 时则意味着直接键;

[0144] Q 是 $-C(=O)-$ 或 $-CR^3-$, 其中 R^3 是卤素或 C_{1-6} 烷基, 和

[0145] 当 Q 是 $-CR^3-$ 时则虚线表示键;

[0146] 每个 X 独立地为 $-N<$ 或 $-CH<$; 并且当 X 是 $-CH<$ 时则 Y 是 $-N<$ 或 $-NH-$;

[0147] 每个 Y 独立地为 $-N<$ 、 $-NH-$ 、 $-CH<$ 或 $-CH_2-$;

[0148] 除了当 X 是 $CH<$ 时则 Y 是 $N<$ 或 $-NH-$;

[0149] L^1 是直接键或选自以下的二价基: $-C_{1-6}$ 烷二基 $-NH-$ 、 $-NH-$ 或 $-NH-C_{1-6}$ 烷二基 $-NH-$;

[0150] L^2 是直接键或选自以下的二价基: $-C_{1-6}$ 烷二基 $-$ 、 $-C_{2-6}$ 烯二基 $-$ 、羰基或被选自羟基或芳基的一个取代基取代的 $-C_{1-6}$ 烷二基 $-$;

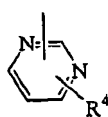
[0151] R^1 是氢、硝基、卤素或氨基;

[0152] R^2 是氢、 C_{1-6} 烷基或芳基 C_{1-6} 烷基;

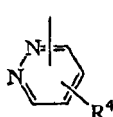
[0153] 中心 $\begin{matrix} Y \\ \diagup \quad \diagdown \\ (CH_2)_n \\ \diagdown \quad \diagup \\ X \end{matrix}$ 部分还可与乙烯桥桥接 (即形成双环部分);

[0154] Z 是氢、羟基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷基氧基、芳基氧基、氨基、氰基、芳基 C_{1-6} 烷基氨基或苯并噻唑基 (C_{1-6} 烷基) 氨基或选自以下的环体系:

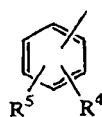
[0155]



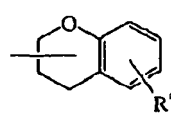
(a-1)



(a-2)

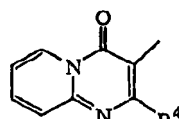


(a-3)

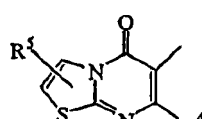


(a-4)

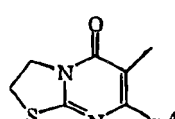
[0156]



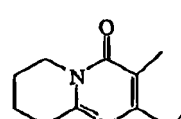
(a-5)



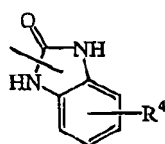
(a-6)



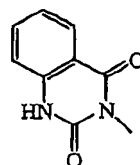
(a-7)



(a-8)



(a-9)



(a-10)

[0157] 其中 R^4 和 R^5 各自独立地选自氢、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷基氧基或三卤代甲基; 和

[0158] 芳基是苯基、或被一个或两个各自独立地选自卤素、C₁₋₆ 烷基或 C₁₋₆ 烷基氧基的取代基取代的苯基。

[0159] 鉴于本发明化合物的 PARP 结合性质，它们在分子的原子之一可被例如放射性同位素替换的情况下可用作参考化合物或示踪化合物。

[0160] 为制备本发明的药物组合物，以有效量的碱或酸加成盐形式的特定化合物作为活性成分，与可药用载体形成紧密的混合物，根据给药所需的制剂形式，载体可以采用各种各样的形式。这些药物组合物理想地以单位剂型形式，优选适合于口服、直肠、透皮或通过胃肠外注射施用。例如在制备口服剂型组合物时在口服液体剂型例如混悬剂、糖浆、酏剂和溶液的情况下，可以采用任何常用药物介质例如水、二醇类、油、醇等；或在粉末、丸剂、胶囊和片剂的情况下，采用固体载体例如淀粉、糖、高岭土、润滑剂、粘合剂、崩解剂等。因为它们给药方便，片剂和胶囊代表了最有利的口服剂量单位形式，其明显采用固体药用载体。对于肠胃外组合物，载体通常包含至少大部分的灭菌水，尽管也包括其它成分，例如帮助溶解的成分。注射液，例如可以被制备为其中载体包含盐水溶液、葡萄糖溶液或盐水和葡萄糖溶液混合物。还可以制备可注射的混悬剂，其中可以采用适当的液体载体、悬浮剂等。在适合透皮施用的组合物中，载体任选包含渗透增强剂和 / 或合适的增湿剂，任选与任何性质的占小比例的合适的添加剂混合，其中添加剂不导致显著的皮肤有害作用。所述的添加剂可以促进对皮肤的施用，和 / 或可以帮助制备所需的组合物。这些组合物可以以各种的方式被施用，例如作为经皮贴剂、作为 spot-on、作为软膏剂。为了容易施用和剂量均匀度，配制成前述剂量单位形式的药物组合物尤其有利。用于本发明说明书和权利要求中的剂量单位形式是指适合作为单位剂量的物理上离散单位，每个单位含有计算产生所需治疗作用的预定数量活性成分与必须的药用载体混合。这样剂量单位形式的实例为片剂（包括刻痕的或包衣的片剂）、胶囊、丸剂、粉末包、圆片、可注射溶液或混悬剂、一茶匙的量、一汤匙的量等和分离的多份形式。

[0161] 本发明化合物能够治疗或预防由坏死或凋亡引起的细胞损伤或死亡所致组织损伤；能改善神经系统或心血管组织损伤，包括下列病灶局部缺血、心肌梗塞和再灌注损伤；能治疗通过 PARP 活性导致或加重的各种的疾病和病症；能延长或增加寿命或细胞增生能力；能改变衰老细胞的基因表达；能使细胞放射性敏化和 / 或化学敏化。一般说来，PARP 活性抑制阻碍细胞能量损失，在神经系统细胞中阻止神经元的不可逆去极化，因此提供神经保护作用。

[0162] 由于前述理由，本发明进一步涉及以足以抑制 PARP 活性的量施用治疗有效量的上述定义的化合物的方法，以治疗或预防由坏死或凋亡引起的细胞损伤或死亡所致组织损伤，以产生不通过 NMDA 毒性介导的神经元活性，以产生通过 NMDA 毒性介导的神经元活性，以治疗由局部缺血和再灌注损伤导致的神经系统的组织损伤、神经病症和神经退行性疾病；以预防或治疗中风；以治疗或预防心血管病症；以治疗其它病症和 / 或疾病例如年龄相关的肌肉退化、AIDS 和其它免疫衰老疾病、炎症、痛风、关节炎、动脉粥样硬化、恶病质、癌症、包含复制性衰老的骨骼肌退行性疾病、糖尿病、头部创伤、炎症性肠病（例如结肠炎和局限性肠炎）、肌营养不良、骨关节炎、骨质疏松症、慢性和 / 或急性疼痛（例如神经疼）、肾衰竭、视网膜局部缺血、脓毒性休克（例如内毒性休克）、和皮肤衰老，延长寿命和细胞增生能力；改变衰老细胞的基因表达；化学敏化和 / 或放射性敏化（缺氧的）肿瘤细胞。本发明

还涉及治疗动物的疾病和病症,包含给所述的动物施用治疗有效量的上述鉴定的化合物。

[0163] 特别地,本发明涉及治疗、预防或抑制动物神经病症的方法,包含给所述的动物施用治疗有效量的上述鉴定的化合物。神经病症选自物理损伤或疾病状态导致的外周神经疾病、创伤性大脑损伤、脊髓的物理损伤、与脑损伤相关的中风、病灶局部缺血、整体局部缺血、再灌注损伤、脱髓鞘疾病和与神经退化相关的神经病症。

[0164] 本发明还预期式(I)化合物抑制 PARP 活性的用途,用于治疗、预防或抑制由坏死或凋亡引起的细胞损伤或死亡所致组织损伤,用于治疗、预防或抑制动物神经病症。

[0165] 术语“预防神经退化”包括能够阻止新近诊断患有神经退行性疾病或具有发展新近退行性疾病危险的患者的神经退化的能力,以及预防已经遭受或具有神经退行性疾病症状的患者进一步神经退化。

[0166] 本文中所述的术语“治疗”包括对动物特别是人疾病和 / 或病症的任何治疗,包括:(i) 对有患上所述疾病和 / 或病症倾向但是还没有被诊断为患有该疾病的对象预防疾病和 / 或病症的发生;(ii) 抑制疾病和 / 或病症,即阻止其发展;(iii) 减轻疾病和 / 或病症,即导致疾病和 / 或病症的消退。

[0167] 本文中所述的术语“放射性敏化剂”定义为分子,优选低分子量分子,以治疗有效量施用给动物以增加细胞对离子化辐射的敏感性和 / 或促进对离子化辐射可治疗疾病的治疗。可用离子化辐射治疗的疾病包括肿瘤疾病、良性和恶性肿瘤以及癌症细胞。没有列在本文中的其它疾病的离子化辐射治疗也是本发明预期的。

[0168] 本文中所述的术语“化学敏化剂”定义为分子,优选低分子量分子,以治疗有效量施用给动物以增加细胞对化疗的敏感性和 / 或促进可用化疗治疗的疾病的治疗。可用化疗治疗的疾病包括肿瘤疾病、良性和恶性的肿瘤和癌症细胞。其它在本文中没有列出的化疗治疗疾病是本发明预期的。

[0169] 本发明的化合物、组合和方法特别用于治疗或预防由坏死或凋亡引起的细胞损伤或死亡所致组织损伤。

[0170] 本发明化合物可以为“抗癌剂”,该术语还包括“抗肿瘤细胞生长剂”和“抗肿瘤剂”。例如本发明的方法用于治疗癌症,且化学敏化和 / 或放射性敏化癌症的肿瘤细胞,例如 ACTH- 产生肿瘤、急性淋巴性白血病、急性非淋巴性白血病、肾皮层癌、膀胱癌、大脑癌、乳腺癌、子宫颈癌、慢性淋巴性白血病、慢性髓细胞白血病、结直肠癌、皮肤 T- 细胞淋巴瘤、子宫内膜癌、食道癌、Ewing' s 肉瘤、胆囊癌、毛细胞白血病、头颈癌、霍奇金 (Hodgkin' s) 淋巴瘤、Kaposi' s 肉瘤、肾癌、肝癌、肺癌 (小和 / 或非小细胞)、恶性的腹膜渗出、恶性胸膜渗出、黑色素瘤、间皮瘤、多发性骨髓瘤、神经胚细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、骨肉瘤、卵巢癌、卵巢 (胚芽细胞) 癌症、前列腺癌、胰腺癌、阴茎癌、成视网膜细胞瘤、皮肤癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、胚胎滋养层肿瘤、子宫癌、阴道癌、外阴癌和 Wilm' s 肿瘤。

[0171] 因此,本发明化合物可以被用作“放射性敏化剂”和 / 或“化学敏化剂”。

[0172] 放射性敏化剂已知是增加癌细胞对离子辐射毒性作用的敏感性。放射性敏化剂作用方式的几种机制曾在文献中提出,包括:缺氧细胞放射性敏化剂 (例如 2- 硝基咪唑化合物和苯并三嗪二氧化物化合物) 模拟氧,或者在组织缺氧下以生物还原剂起作用;非缺氧细胞放射性敏化剂 (例如卤代嘧啶) 可以为 DNA 碱基的类似物,且优选与癌细胞的 DNA 结合,因此促进辐射诱导的 DNA 分子的断裂,和 / 或阻止正常的 DNA 修复机制;已经提出在疾

病治疗中放射性敏化剂的各种其它可能作用机制。

[0173] 当前许多癌症治疗方案采用放射性敏化剂与 x- 射线辐射联合。x- 射线活化放射性敏化剂的实例包括但不限于下列的：甲硝唑、米索硝唑、去甲米索硝唑 (demethylmisonidazole)、哌莫硝唑、依他硝唑、尼莫唑、丝裂霉素 C、RSU 1069、SR 4233、EO9、RB 6145、烟酰胺、5- 溴脱氧尿苷 (BUdR)、5- 碘脱氧尿苷 (IUdR)、溴脱氧胞苷、氟脱氧尿苷 (FudR)、羟基脲、顺铂和所述药物的治疗有效的类似物和衍生物。

[0174] 癌症的光动力学治疗 (PDT) 采用可见光作为敏化剂的辐射活化剂。光动力学放射性敏化剂的实例包括但不限于下列的：血卟啉衍生物、光敏素、苯并卟啉衍生物、锡初卟啉、Pheorbide-a、细菌叶绿素 -a、萘酞菁、酞花青、酞花青锌和所述药物的治疗有效的类似物和衍生物。

[0175] 放射性敏化剂可以与一个或多个治疗有效量的其它化合物联合施用，所述其它化合物包括但不限于：促进放射性敏化剂与靶标细胞结合的化合物；控制治疗剂、营养素和 / 或氧向靶标细胞流动的化合物；在给予或不给予另外的辐射时作用于肿瘤的化疗剂；或其它治疗癌症或其它疾病的治疗有效的化合物。可以与放射性敏化剂联合使用的另外治疗剂的实例包括但不限于：5- 氟尿嘧啶、亚叶酸、5' - 氨基 -5' 脱氧胸腺嘧啶脱氧核苷、氧、卡波金、红细胞输注、全氟代碳 (例如 Fluoso110DA)、2,3-DPG、BW12C、钙通道阻滞剂、pentoxifylline、抗血管生成化合物、胍苯哒嗪和 LBSO。可以与放射性敏化剂联合使用的化疗剂实例包括但不限于：阿霉素、喜树碱、卡波铂、顺铂、道诺霉素、多希他赛、多柔比星、干扰素 (α 、 β 、 γ)、白介素 2、伊立替康、紫杉醇、拓扑替康和所述药物治疗有效的类似物和衍生物。

[0176] 化学敏化剂可以与一个或多个治疗有效量的其它化合物联合施用，包括但不限于：促进靶标细胞与化学敏化剂结合的化合物；控制治疗剂、营养素和 / 或氧向靶标细胞流动的化合物；作用于肿瘤的化疗剂或其它治疗癌症或其它疾病的治疗有效的化合物。可以与化学敏化剂联合的另外治疗剂的实例包括但不限于：甲基化剂、拓扑异构酶 I 抑制剂和其它化疗剂例如顺铂和博来霉素。

[0177] 式 (I) 化合物还可以用于检测或鉴定 PARP，更特别地检测或鉴定 PARP-1 受体。为此目的，式 (I) 化合物可以被标记。所述的标记可以选自放射性同位素、旋转标记、抗原标记、酶标记荧光基团或化学发光基团。

[0178] 从下文提出的实验结果中，那些本领域技术人员容易确定有效量。通常预期的有效量为 0.001mg/kg 至 100mg/kg 体重，特别地为 0.005mg/kg 至 10mg/kg 体重。在一整天中在适当的时间间隔以二、三、四或更多亚剂量施用所需的剂量是适当的。所述的亚剂量可以配制为单位剂型，例如每个单位剂型中含有 0.05 至 500mg，特别地 0.1mg 至 200mg 活性成分。

[0179] 以下实施例说明本发明。

[0180] 实验部分

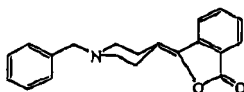
[0181] 在下文中，“DCM”是指二氯甲烷，“DIPE”是指二异丙基醚，“DMF”是指 N,N-二甲基甲酰胺，“EtOH”是指乙醇，“EtOAc”是指乙酸乙酯，“MeOH”是指甲醇和“TEA”是指三乙胺，“THF”是指四氢呋喃。

[0182] A. 中间体化合物的制备

[0183] 实施例 A1

[0184] 中间体 1 的制备

[0185]

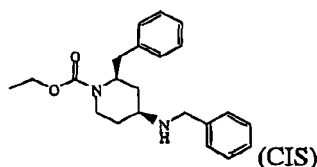


[0186] 将 1-(苯基甲基)-4-哌啶酮 (0.2mol) 和 1-(3H)-异苯并呋喃酮 (0.2mol) 添加到钠 (0.2mol) 溶解在绝对 EtOH(400ml) 中的混合物中。混合物回温直到回流、并回流过夜, 蒸发混合物, 添加水并用甲苯提取, 水层用乙酸中和并用 DCM 提取。有机层经过干燥、过滤和蒸发, 得到 30.3g (51.7%) 的中间体 1。

[0187] 实施例 A2

[0188] a) 中间体 2 的制备

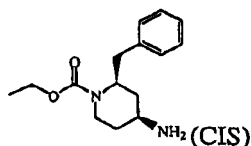
[0189]



[0190] 在室温下添加四(异丙醇基)钛 (50ml) 到 4-氧代-2-(苯基甲基)-1-哌啶羧酸乙酯 (0.14mol) 和 苄胺 (0.14mol) 的 EtOH(300ml) 混合物中, 混合物在室温搅拌 6 小时, 添加硼酸氢钠 (5.3g) 的 EtOH(150ml) 溶液, 混合物在室温搅拌 18 小时, 混合物用水进行水解, 通过硅藻土过滤并蒸发, 将残余物吸收在 DCM 中, 并用水洗涤, 分离出有机层, 干燥 (MgSO₄)、过滤并蒸发溶剂, 残余物 (38.5g) 通过硅胶 (20-45 μm) 柱色谱法纯化 (洗脱剂: 环己烷 / EtOAc 60/40)。收集纯级分并蒸发溶剂, 得到 10g (27%) 的中间体 2。

[0191] b)- 中间体 3 的制备

[0192]



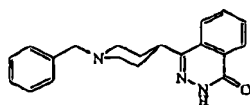
[0193] 中间体 2 (0.0571mol) 在 EtOH(300ml) 中在 50°C 用 Pd/C(10g) 作为催化剂在 Parr 装置中在 3 巴压力下氢化一晚。在吸取 H₂(1eq) 后, 通过硅藻土过滤催化剂, 用 EtOH 洗涤, 蒸发滤液, 得到 13.4g (93%) 的中间体 3。

[0194] B. 最终化合物的制备

[0195] 实施例 B1

[0196] 化合物 1 的制备

[0197]



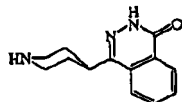
[0198] 将中间体 1 (0.098mol) 和胍一水合物 (0.22mol) 在 EtOH(350ml) 中的混合物搅拌并回流过夜, 蒸发混合物, 添加水并用 DCM 提取, 有机层经过干燥、过滤和蒸发, 残余物通过

硅胶柱色谱法纯化（洗脱剂：CHCl₃/MeOH 98.5/1.5）。收集纯级分并蒸发，将一部分（2.5g）残余物（10.5g, 33.5%）从 2-丙醇结晶，得到 1.5g（20.1%）的化合物 1，熔点 222℃。

[0199] 实施例 B2

[0200] a) 化合物 23 的制备

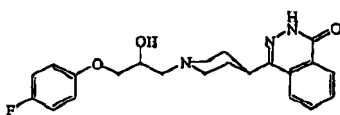
[0201]



[0202] 化合物 1 (0.028mol) 在 MeOH (150ml) 中的混合物使用 Pd/C 10% (2g) 作为催化剂在 50℃ 氢化。在吸收 H₂ (1eq) 后，催化剂通过 hyflo 过滤，蒸发滤液，得到 6.8g (100%) 的化合物 23。

[0203] b) 化合物 2 的制备

[0204]

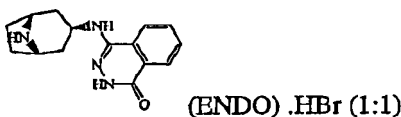


[0205] [(4-氟苯氧基)甲基]-环氧乙烷 (0.011mol) 和化合物 23 (0.01mol) 在 2-丙醇 (150ml) 中的混合物搅拌并回流过夜，将混合物搅拌冷却并结晶。滤出沉淀物并干燥，得到 2.4g (60.3%) 的化合物 2，熔点 226.9℃。

[0206] 实施例 B3

[0207] a) 化合物 15 的制备

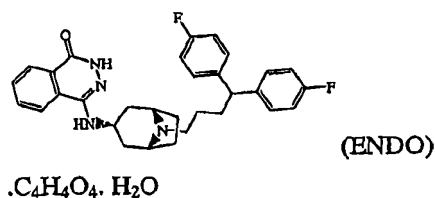
[0208]



[0209] 化合物 11 (0.08mol) 在 48% 的氢溴酸水溶液 (400ml) 中的混合物搅拌并回流 30 分钟，蒸发溶剂，残余物在 2-丙醇 (300ml) 中搅拌、过滤并干燥。一部分 (2g) 残余物 (28g) 从 MeOH 重结晶，滤出沉淀物并干燥，得到 0.8g (40%) 的化合物 15，以氢溴酸盐分离，熔点 > 299℃。

[0210] b) 化合物 3 的制备

[0211]



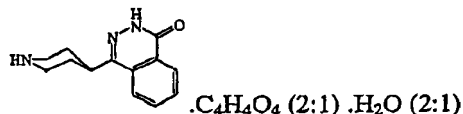
[0212] 4-氟-γ-(4-氟苯基)-苯丁醛 (0.045mol)、化合物 15 (0.045mol) 和乙酸钾 (6g) 在 MeOH (250ml) 中的混合物在 50℃ 使用 Pd/C 10% (3g) 作为催化剂在 4% 的噻吩溶液 (1ml) 的存在下氢化过夜。在吸收 H₂ (1equiv) 后，滤出催化剂，蒸发滤液，将残余物溶在 DCM 中，有机溶液用氨水洗涤，干燥 (MgSO₄)，过滤并蒸发溶剂，残余物通过硅胶柱色谱法纯化（洗脱剂：DCM/MeOH 96/4）。收集所需级分并蒸发溶剂，一部分 (3g) 残余物 (18g, 78%)

溶在 2-丙醇中并转化为 (E)-2-丁烯二酸盐 (1 : 1)。滤出沉淀物并干燥, 得到 2.9g (60%) 的化合物 3, 熔点 164.4°C。

[0213] 实施例 B4

[0214] 化合物 4 的制备

[0215]

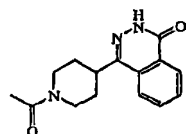


[0216] 化合物 1 (0.028mol) 在 MeOH (150ml) 中的混合物用 Pd/C 10% (2g) 作为催化剂在 50°C 氢化, 在吸收 H_2 (1eq) 后, 滤出催化剂, 蒸发滤液。一部分 (1.5g) 残余物 (6.8g, 100%) 溶在 2-丙醇中并在 2-丙醇中转化为 (E)-2-丁烯二酸盐 (2 : 1), 得到 0.7g (37.2%) 的化合物 4, 熔点 264.9°C。

[0217] 实施例 B5

[0218] 化合物 5 的制备

[0219]

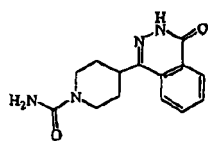


[0220] 在室温将乙酸酐 (0.00523mol) 滴加到化合物 4 (0.00436mol) 和 TEA (0.00872mol) 在 DCM (10ml) 中的混合物中。混合物在室温搅拌 2 小时并倾入到冰水中, 添加 DCM, 混合物用 1N HCl 酸化, 并用 DCM 提取, 分离出有机层, 用 10% 的碳酸钾碱化, 干燥 (MgSO_4)、过滤并蒸发溶剂。残余物 (1g, 85%) 从乙腈重结晶。滤出沉淀物并真空干燥, 得到 0.88g (75%) 的化合物 5, 熔点 222°C。

[0221] 实施例 B6

[0222] 化合物 6 的制备

[0223]

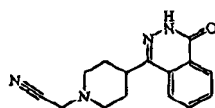


[0224] 在室温将异氰酸根合三甲基-硅烷 (0.00523mol) 滴加到化合物 4 (0.00436mol) 在 DCM (20ml) 中的混合物中, 混合物在室温搅拌 2 小时, 蒸发溶剂直至干燥, 将残余物溶于温 MeOH 中, 滤出沉淀物并真空干燥, 将残余物 (0.8g, 67%) 溶于 MeOH 和 DCM 中, 搅拌混合物, 滤出沉淀物并真空干燥, 得到 0.55g (46%) 的化合物 6, 熔点 > 300°C。

[0225] 实施例 B7

[0226] 化合物 7 的制备

[0227]

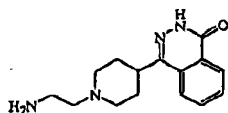


[0228] 化合物 4(0.013mol)、氯-乙腈(0.014mol)和碳酸钠(0.065mol)在 DMF(150ml)中的混合物在 70℃ 搅拌 3 小时,冷却,倾入到冰水中,并用 EtOAc 提取,分离出有机层,干燥(MgSO₄)、过滤并蒸发溶剂直至干燥,将残余物(6.1g)通过硅胶(15-40 μm)柱色谱法纯化(洗脱剂:DCM/MeOH/NH₄OH 98/2/0.1),收集纯级分并蒸发溶剂,将残余物吸收在 MeOH 中,滤出沉淀物并干燥,得到 0.33g(10%)的化合物 7,熔点 259℃。

[0229] 实施例 B8

[0230] 化合物 8 的制备

[0231]

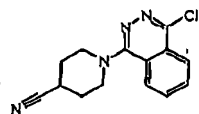


[0232] 化合物 7(0.0027mol)在 MeOH/NH₃7N(30ml)中的混合物在 3 巴压力下使用阮内镍(0.73g)作为催化剂氢化 24 小时,在吸收 H₂(2equiv)后,通过硅藻土过滤催化剂,蒸发滤液,将残余物(0.48g)通过硅胶(15-40 μm)柱色谱法纯化(洗脱剂:DCM/MeOH/NH₄OH 85/14/1 到 83/15/2)。收集纯级分并蒸发溶剂,残余物从乙醚重结晶,滤出沉淀物并干燥,得到 0.3g(40.5%)的化合物 8,熔点 202℃。

[0233] 实施例 B9

[0234] a) 化合物 17 的制备

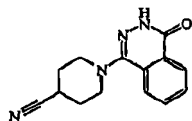
[0235]



[0236] 1,4-二氯-2,3-二氮杂萘(0.05mol)、4-哌啶甲腈一盐酸盐(0.045mol)和碳酸钠(0.301mol)在 DMF(100ml)中的混合物在 130℃ 搅拌 5 小时,倾入到冰水中并用 EtOAc 提取,分离出有机层,用水洗涤,干燥(MgSO₄)、过滤并蒸发溶剂直至干燥。残余物(16g)通过硅胶(20-45 μm)柱色谱法纯化(洗脱剂:DCM/MeOH 98/2)。收集纯级分并蒸发溶剂,得到 7.5g(61.1%)的化合物 17。

[0237] b) 化合物 18 的制备

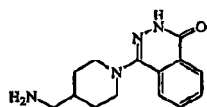
[0238]



[0239] 化合物 17(0.024mol)和乙酸钠(0.036mol)在乙酸(77ml)中的混合物搅拌并回流 2 小时,蒸发溶剂直至干燥,残余物吸收于水中,混合物用碳酸钾固体碱化,添加 DCM。滤出固体并干燥,得到 4.67g(76%)的化合物 18,熔点 253℃。

[0240] 化合物 9 的制备

[0241]



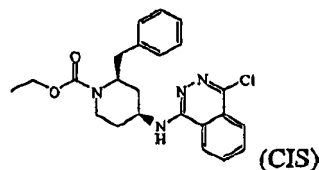
[0242] 化合物 18(0.016mol)在 MeOH/NH₃7N(150ml)中的混合物在室温在 3 巴压力下使用

阮内镍 (4.2g) 作为催化剂氢化 18 小时, 在吸收 H_2 (2equiv) 后, 通过硅藻土过滤催化剂, 蒸发滤液直至干燥, 残余物 (5.3g) 通过硅胶 (15-40 μm) 柱色谱法纯化 (洗脱剂: DCM/MeOH/ NH_4OH 88/12/1)。收集纯级分并蒸发溶剂, 残余物从 DIPE 重结晶, 滤出沉淀物并干燥, 得到: 2.8g (67.7%) 的化合物 9, 熔点 $182^\circ C$ 。

[0243] 实施例 B10

[0244] a) 化合物 19 的制备

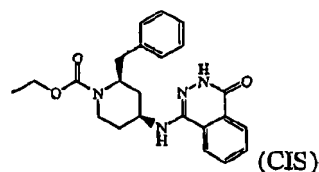
[0245]



[0246] 1,4-二氯-2,3-二氮杂萘 (0.00502mol)、中间体 3 (0.00452mol) 和碳酸钠 (0.01004mol) 在 DMF (15ml) 中的混合物在 $130^\circ C$ 搅拌 5 小时, 回温到室温, 倾入到冰水中并用 DCM 提取, 分离出有机层, 用水洗涤, 干燥 ($MgSO_4$)、过滤并蒸发溶剂。残余物 (1.2g) 通过硅胶 (15-40 μm) 柱色谱法纯化 (洗脱剂: DCM/MeOH/ NH_4OH 99/1/0.1 到 85/15/0.1)。收集纯级分并蒸发溶剂。残余物 (0.7g, 33%) 从乙腈和乙醚重结晶。滤出沉淀物并真空干燥, 得到 0.32g (15%) 的化合物 19, 熔点 $161^\circ C$ 。

[0247] b) 化合物 16 的制备

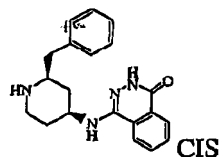
[0248]



[0249] 化合物 19 (0.0087mol) 和乙酸钠 (0.01306mol) 在乙酸 (40ml) 中的混合物搅拌并回流 4 小时, 蒸发溶剂直至干燥, 添加 10% 的盐酸 (40ml), 混合物搅拌并回流 1 小时, 然后回温到室温, 添加 DCM, 混合物用稀 NH_4OH 溶液碱化并用 DCM 提取, 分离出有机层, 用水洗涤, 干燥 ($MgSO_4$)、过滤并蒸发溶剂。残余物通过硅胶 (15-40 μm) 柱色谱法纯化 (洗脱剂: DCM/MeOH 97.5/2.5)。收集所需级分并蒸发溶剂。残余物 (1.4g, 40%) 从乙醚重结晶, 滤出沉淀物并真空干燥, 得到 0.95g (27%) 的化合物 16, 熔点 $140^\circ C$ 。

[0250] c) 化合物 10 的制备

[0251]

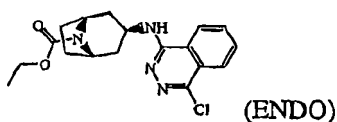


[0252] 化合物 16 (0.00492mol) 在 12N HCl (50ml) 中的混合物搅拌并回流过夜, 然后回温到室温, 蒸发溶剂直至干燥, 将残余物吸收在 EtOAc 中, 混合物用 10% 的碳酸钾碱化并用 EtOAc 和少量 EtOH 提取, 分离出有机层, 干燥 ($MgSO_4$)、过滤并蒸发溶剂。将残余物吸收在乙腈中, 滤出沉淀物并真空干燥, 得到 1.29g (79%) 的化合物 10, 熔点 $238^\circ C$ 。

[0253] 实施例 B11

[0254] a) 化合物 24 的制备

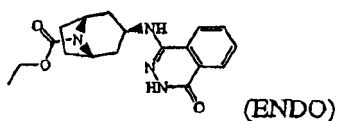
[0255]



[0256] 3-氨基-8-氮杂双环[3.2.1]辛烷-8-羧酸乙酯(0.25mol)、1,4-二氯-2,3-二氮杂萘(0.25mol)和碳酸钠(0.25mol)在DMF(600ml)中的混合物在130℃搅拌4小时,将反应混合物冷却并倾入到水中,滤出沉淀物,用水洗涤,然后溶在DCM中,有机溶液经过干燥(MgSO₄)、过滤并蒸发溶剂。残余物从2-丙醇/DIPE重结晶,滤出沉淀物并干燥,得到65g(72%)的化合物24。

[0257] b) 化合物 11 的制备

[0258]

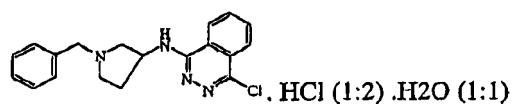


[0259] 化合物 24(0.16mol)和乙酸钠(0.16mol)在乙酸(800ml)中的混合物搅拌并回流5小时,蒸发溶剂,添加10%的盐酸(800ml)到残余物中,反应混合物搅拌并回流1小时,然后冷却到室温,滤出得到的沉淀物,用水洗涤,然后干燥。一部分(4g)残余物(30g)从2-丙醇重结晶,滤出沉淀物并干燥,得到2.5g(34%)的化合物11,熔点218.6℃。

[0260] 实施例 B12

[0261] 化合物 12 的制备

[0262]

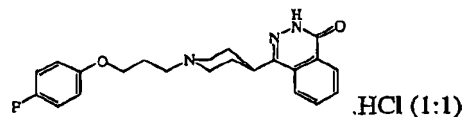


[0263] 1,4-二氯-2,3-二氮杂萘(0.13mol)、1-(苯基甲基)-3-吡咯烷胺(0.12mol)和碳酸钠(0.26mol)在DMF(150ml)中的混合物在130℃下在N₂下搅拌4小时,将混合物冷却,倾入到冰中并用DCM提取,有机层用饱和NaCl溶液洗涤,干燥(MgSO₄)、过滤并蒸发。残余物通过硅胶柱色谱法纯化(洗脱液:DCM/MeOH 100/0到97/3)。收集纯级分并蒸发。一部分残余物(38g,93.5%)溶在2-丙醇中并在2-丙醇中转化为盐酸盐(1:2),得到2.43g的化合物12,熔点171.8℃。

[0264] 实施例 B13

[0265] 化合物 13 的制备

[0266]



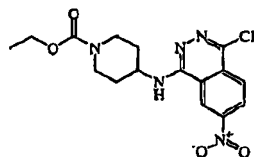
[0267] 1-(3-氯丙氧基)-4-氟-苯(0.025mol)、化合物 23(0.02mol)和碳酸钠(0.06mol)在DMF(150ml)中的混合物在60℃搅拌12小时,将混合物冷却,倾入到冰水中,用HCl酸化并用NH₃中和,滤出沉淀物并从MeOH结晶。滤出沉淀物并在60℃干燥,在2-丙醇中将残余物(2.1g)转化为盐酸盐(1:1)。滤出沉淀物并用2-丙醇和DIPE洗涤。残余物在室温干

燥,得到 1.2g(14.4%) 的化合物 13,熔点 227.6°C。

[0268] 实施例 B14

[0269] a) 化合物 20 的制备

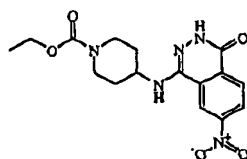
[0270]



[0271] 1,4-二氯-6-硝基-2,3-二氮杂萘(0.0557mol)、4-氨基-1-哌啶羧酸乙酯(0.0501mol)和碳酸钠(0.0836mol)在DMF(150ml)中的混合物在130°C搅拌过夜,然后回温到室温,蒸发溶剂直至干燥,将残余物吸收在DCM中,将混合物倾入到冰水并用DCM提取,分离出有机层,用水洗涤,干燥(MgSO₄)、过滤并蒸发溶剂。残余物通过硅胶(20-45 μm)柱色谱法纯化(洗脱剂:DCM/MeOH/NH₄OH 98/2/0.4)。收集纯级分并蒸发溶剂。残余物(6.5g)从乙醚重结晶,滤出沉淀物并真空干燥,得到6.2g(29%)的化合物20,熔点199°C。

[0272] b) 化合物 21 的制备

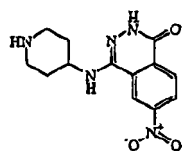
[0273]



[0274] 化合物 20(0.0155mol)和乙酸钠(0.0233mol)在乙酸(50ml)中的混合物搅拌并回流3小时,蒸发溶剂直至干燥,添加10%的盐酸(50ml),混合物搅拌并回流1小时,回温到室温,倾入到冰水,用浓NH₄OH溶液碱化,滤出沉淀物,用水洗涤,用2-丙酮和乙醚洗涤并真空干燥,得到5.3g(95%)的化合物21,熔点286°C。

[0275] c) 化合物 22 的制备

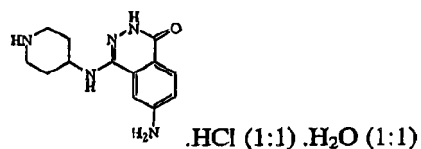
[0276]



[0277] 化合物 21(0.11mol)在10N盐酸(100ml)中的混合物搅拌并回流过夜,回温到室温,蒸发溶剂直至干燥,将残余物吸收在MeOH和EtOH中,搅拌混合物,滤出沉淀物并真空干燥,得到3.5g(98%)的化合物22,熔点300°C。

[0278] d) 化合物 14 的制备

[0279]



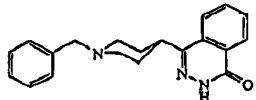
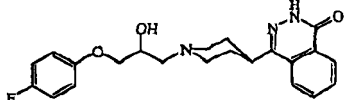
[0280] 将N₂鼓泡通入化合物22(0.00614mol)在MeOH(30ml)和THF(30ml)中的混合物中,分批加入阮内镍(2g),将N₂鼓泡通过该混合物,混合物在室温在3巴压力下氢化2小时,

在吸收 H_2 (3equiv) 后,通过硅藻土过滤催化剂,用 DCM 和 MeOH 洗涤,蒸发滤液直至干燥,将残余物溶于 MeOH 和 EtOH,滤出沉淀物并真空干燥,将残余物吸收在温 MeOH 中,滤出沉淀物并真空干燥,得到 0.47g (24%) 的化合物 14,熔点 $> 300^\circ C$ 。

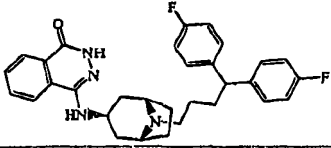
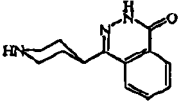
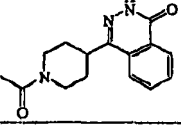
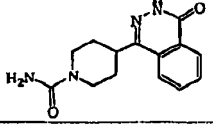
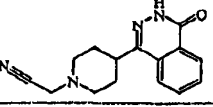
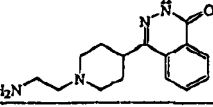
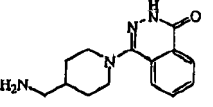
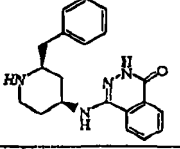
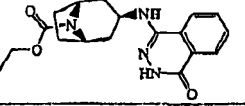
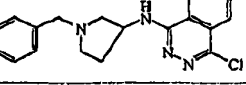
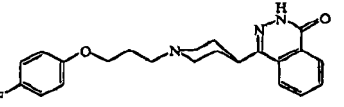
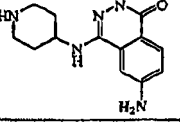
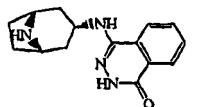
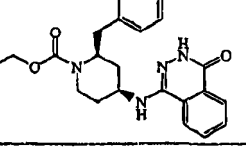
[0281] 表 F-I 列出了根据上述实施例之一制备的化合物。

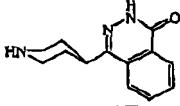
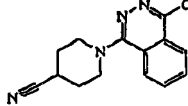
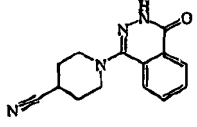
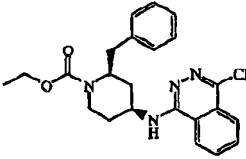
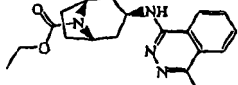
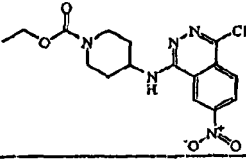
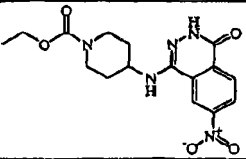
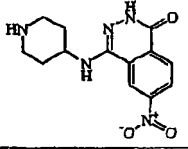
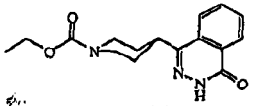
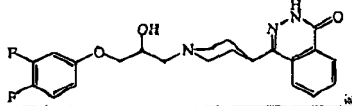
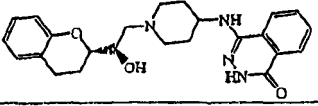
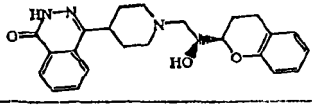
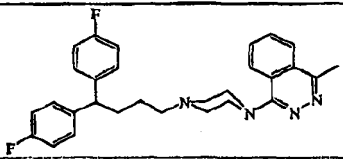
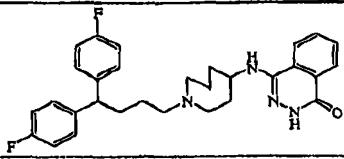
[0282] 表 F-1

[0283]

	
Co. No. 1; Ex. [B1]; mp. $222^\circ C$	Co. No.2; Ex. [B2]; mp. $226.9^\circ C$

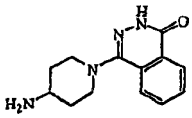
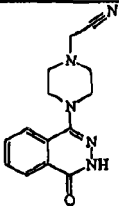
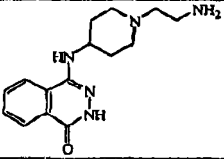
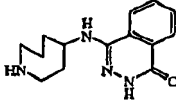
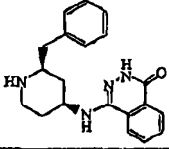
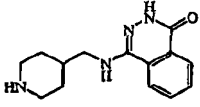
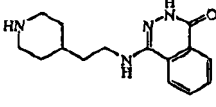
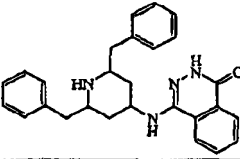
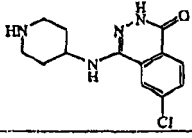
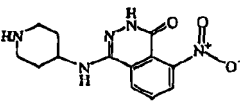
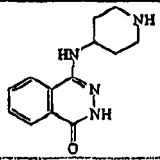
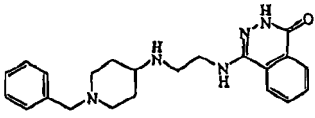
[0284]

	
.C ₄ H ₄ O ₄ .H ₂ O; (ENDO); Co. No.3; Ex. [B3]; mp. 164.4°C	.1/2 C ₄ H ₄ O ₄ .1/2 H ₂ O; Co. No. 4; Ex. [B4]; mp. 264.9°C
	
Co. No. 5; Ex. [B5]; mp. 222°C	Co. No. 6; Ex. [B6]; mp. >300°C
	
Co. No. 7; Ex. [B7]; mp. 259°C	Co. No. 8; Ex. [B8]; mp. 202°C
	
Co. No. 9; Ex. [B9]; mp. 182°C	(CIS); Co. No. 10; Ex. [B10]; mp. 238°C
	
(ENDO); Co. No. 11; Ex. [B11]; mp. 218.6°C	.2 HCl .H ₂ O; Co. No. 12; Ex. [B12]; mp. 171.8°C
	
.HCl; Co. No. 13; Ex. [B13]; mp. 227.6°C	.HCl .H ₂ O; Co. No. 14; Ex. [B14]; mp. >300°C
	
.HBr; (ENDO); Co. No. 15; Ex. [B3]; mp. >299°C	(CIS); Co. No. 16; Ex. [B10]; mp. 140°C

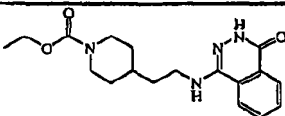
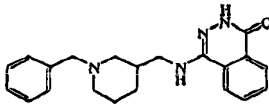
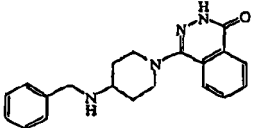
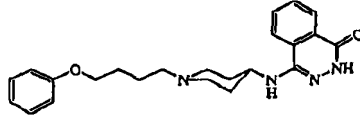
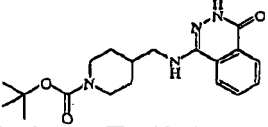
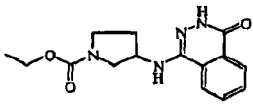
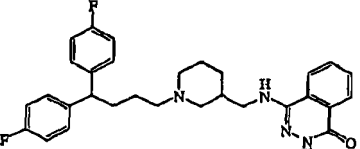
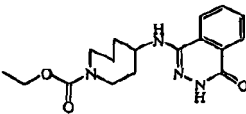
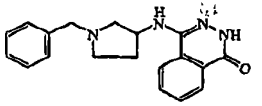
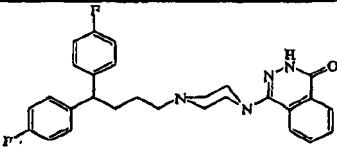
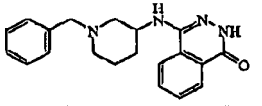
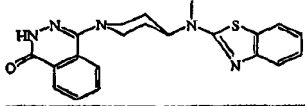
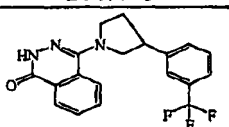
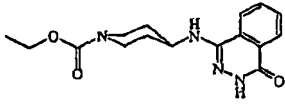
	
Co. No. 23; Ex. [B2]	Co. No. 17; Ex. [B9]
	
Co. No. 18; Ex. [B9]; mp. 253°C	CIS; Co. No. 19; Ex. [B10]; mp. 161°C
	
Co. No. 24; Ex. [B11]	Co. No. 20; Ex. [B14]; mp. 199°C
	
Co. No. 21; Ex. [B14]; mp. 286°C	Co. No. 22; Ex. [B14]; mp. 300°C
	
Co. No. 25; Ex. [B1]; mp. 228.4°C	Co. No. 26; Ex. [B2]; mp. 214.6°C
	
[S-(R*,S*)]; Co. No. 27; Ex. [B2]; mp. 232.7°C	.HCl; [S-(R*,S*)]; Co. No. 28; Ex. [B2]
	
.2 HCl; Co. No. 29; Ex. [B3]	Co. No. 30; Ex. [B3]; mp. 163.7°C

[0285]

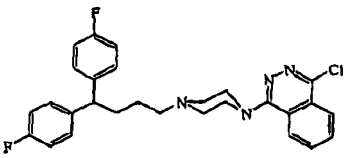
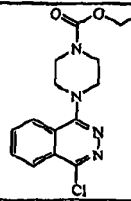
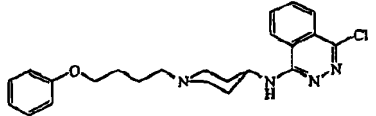
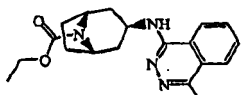
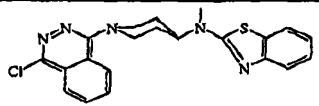
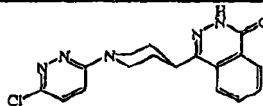
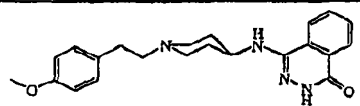
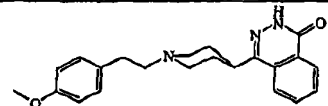
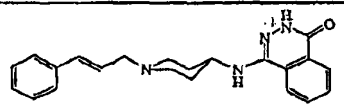
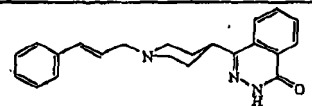
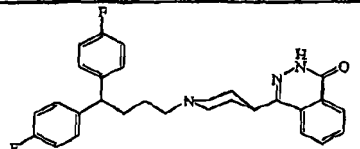
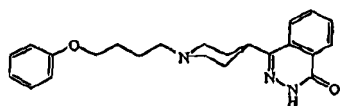
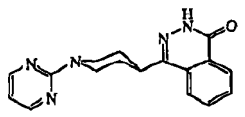
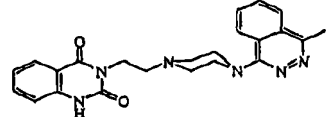
[0286]

	
Co. No. 31; Ex. [B4]; mp. 177°C	Co. No. 32; Ex. [B7]; mp. 230°C
	
Co. No. 33; Ex. [B8]; mp. 250°C	.2 HBr; Co. No. 34; Ex. [B10]
	
(TRANS); Co. No. 35; Ex. [B10]; mp. 110°C	.2 HCl; Co. No. 36; Ex. [B10]; mp. 248°C
	
.2HCl .H2O; Co. No. 37; Ex. [B10]; mp. 240°C	Co. No. 38; Ex. [B10]; mp. 218°C
	
.2 HCl .H2O; Co. No. 39; Ex. [B10]; mp. >260°C	.2 HCl; Co. No. 40; Ex. [B10]; mp. 260°C
	
.2 HBr; Co. No. 41; Ex. [B10]	Co. No. 42; Ex. [B11]; mp. 194°C

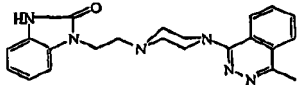
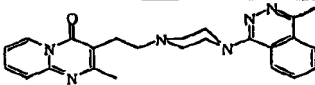
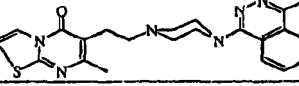
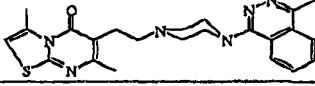
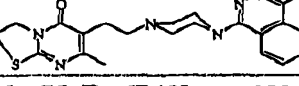
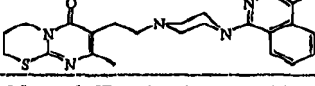
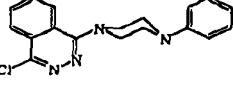
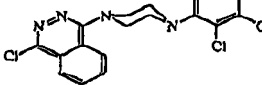
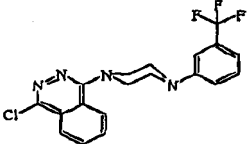
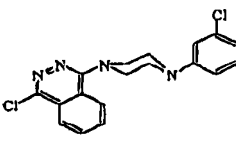
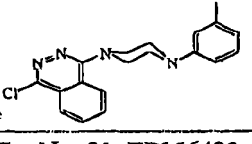
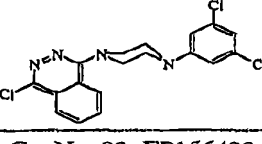
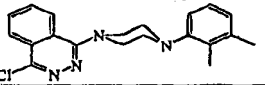
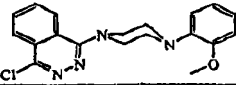
[0287]

	
Co. No. 43; Ex. [B11]; mp. 227°C	.C ₄ H ₄ O ₄ ; Co. No. 44; Ex. [B11]; mp. 207.8°C
	
Co. No. 45; Ex. [B11]; mp. 205°C	.HCl .H ₂ O; Co. No. 46; Ex. [B11]; mp. 253.1°C
	
Co. No. 47; Ex. [B11]; mp. 182°C	Co. No. 48; Ex. [B11]
	
.2 C ₂ H ₂ O ₄ ; Co. No. 49; Ex. [B11]; mp. 131.5°C	Co. No. 50; Ex. [B11]; mp. 177.9°C
	
Co. No. 51; Ex. [B11]; mp. 221.1°C	.HCl; Co. No. 52; Ex. [B11]; mp. 150.6°C
	
.HCl. H ₂ O; Co. No. 53; Ex. [B11]; mp. 208.4°C	Co. No. 54; Ex. [B11]; mp. 270.8°C
	
Co. No. 55; Ex. [B11]; mp. 170.9°C	Co. No. 56; Ex. [B11]; mp. 224.5°C

[0288]

	
.C ₄ H ₄ O ₄ ; Co. No. 57; Ex. [B12]; mp. 190.2°C	Co. No. 58; Ex. [B12]; mp. 168°C
	
.2 HCl.2 H ₂ O; Co. No. 59; Ex. [B12]; mp. 234.4°C	.C ₂ H ₂ O ₄ ; (ENDO); Co. No. 60; Ex. [B12]; mp. 178.5°C
	
Co. No. 61; Ex. [B12]; mp. 183.5°C	.HCl .1/2 H ₂ O .1/2 C ₃ H ₈ O; Co. No. 62; Ex. [B13]; mp. 277.7°C
	
.2 HCl .H ₂ O; Co. No. 63; Ex. [B13]; mp. 289.2°C	.HCl; Co. No. 64; Ex. [B13]; mp. 288.5°C
	
2 HCl.1/2 H ₂ O; (E); Co. No. 65; Ex. [B13]; mp. 225.7°C	(E); Co. No. 66; Ex. [B13]; mp. 203.1°C
	
.HCl .1/2 H ₂ O; Co. No. 67; Ex. [B13]; mp. 218.3°C	Co. No. 68; Ex. [B13]; mp. 161.9°C
	
Co. No. 69; Ex. [B13]; mp. 251.8°C	Co. No. 70; Ex. [B13]; mp. >300°C

[0289]

	
Co. No. 71; Ex. [B13]; mp. 274.1°C	Co. No. 72; Ex. [B13]; mp. 186.5°C
	
Co. No. 73; Ex. [B13]; mp. 203°C	Co. No. 74; Ex. [B13]; mp. 184.6°C
	
Co. No. 75; Ex. [B13]; mp. 202.6°C	Co. No. 76; Ex. [B13]; mp. 198.8°C
	
Co. No. 77; EP156433	Co. No. 78; EP156433
	
Co. No. 79; EP156433	Co. No. 80; EP156433
	
Co. No. 81; EP156433	Co. No. 82; EP156433
	
Co. No. 83; EP156433	Co. No. 84; EP156433

[0290] 药理学的实施例

[0291] PARP-1 抑制活性的体外邻近闪烁分析 (SPA)

[0292] 基于 SPA 技术 (授权给 Amersham Pharmacia Biotech) 对本发明化合物进行了体外分析。

[0293] 通常,该分析依靠对于检测生物素化的靶标蛋白例如组蛋白的聚 (ADP-核糖基化) 而很好确立的 SPA 技术。这种核糖基化作用是使用带缺口的 DNA 活化的 PARP-1 酶诱导的,并且以 [³H]-烟酰胺腺嘌呤二核苷 (³H)-NAD⁺) 作为 ADP-核糖基给体。[0294] 作为 PARP-1 酶活性的诱导剂,制备带缺口的 DNA。为此,将 25mg DNA (供应商: Sigma) 溶解在 25ml DNA 酶缓冲液 (10mM Tris-HCl, PH 7.4 ;0.5mg/ml 牛血清白蛋白 (BSA) 中 ;5mMMgCl₂·6H₂O 和 1mM KCl) 中,加入 50 μl DNA 酶溶液 (1mg/ml 在 0.15M NaCl 中)。在 37°C 培养 90min 后,通过加入 1.45g NaCl 终止反应,随后在 58°C 进一步培养 15min。将反应混合物在冰上冷却,在 4°C 对 1.510.2M KCl 分别渗析 1.5 和 2 小时,对 1.510.01M KCl 分别渗析 1.5 和 2 小时。将混合物分成等份,在 -20°C 储存。使用 Amersham 的生物素化试剂盒将组蛋白 (1mg/ml, type II-A, 供应商: Sigma) 生物素化,以等份储存在 -20°C。在 PBS 中制备 100mg/ml SPA 聚 (乙烯基甲苯) (PVT) 小珠 (供应商: Amersham) 的备用溶液。通过向 6ml 培

养缓冲液 (50mM Tris/HCl, PH 8 ;0.2mM DTT ;4mM MgCl₂) 中加入 120 μ l [³H]-NAD⁺ (0.1mCi/ml, 供应商 :NEN) 制备 [³H]-NAD⁺ 的备用溶液。在培养缓冲液 (来自在 -20°C 在水中储存的 100mM 备用溶液) 中制备 4mM NAD⁺ (供应商 :Roche) 溶液。使用本领域已知的技术, 即由人肝 cDNA 开始克隆和表达蛋白生产 PARP-1 酶。包括在参考文献中的关于使用的 PARP-1 酶蛋白序列的信息可以在 Swiss-Prot 数据库中发现, 原始获取号为 P09874。将生物素化的组蛋白和 PVT-SPA 小珠混合, 在室温下预先培养 30min。将 PARP-1 酶 (浓度依赖于批次) 与带缺口的 DNA 混合, 在 4°C 预先培养混合物 30min。将等份的这种组蛋白 /PVT-SPA 小珠溶液和 PARP-1 酶 /DNA 溶液混合, 取 75 μ l 这种混合物与 1 μ l 在 DMSO 中的化合物和 25 μ l [³H]-NAD⁺ 加入 96-孔微滴定板的每孔中。在培养混合物中的最终浓度为 2 μ g/ml 生物素化的组蛋白, 2mg/ml PVT-SPA 小珠, 2 μ g/ml 带缺口的 DNA 和 5-10 μ g/ml 的 PARP-1 酶。在室温下在混合物培养 15min 后, 通过加入在培养缓冲液 (最终浓度 2mM) 中的 100 μ l 4mM NAD⁺ 终止反应, 将板子混合。

[0295] 使小珠沉淀至少 15min, 将板子转移到 TopCountNXT™ (Packard) 进行闪烁计数, 数值表示为每分钟计数 (cpm)。对于每个试验, 将对照 (含有 PARP-1 酶和 DMSO, 没有化合物)、空白培养液 (含有 DMSO, 但是没有 PARP-1 酶或化合物) 和样品 (含有 PARP-1 酶和溶解在 DMSO 中的化合物) 平行运行。将所有受试的化合物溶解, 并进一步在 DMSO 中稀释。在第一种情况下, 将化合物在 10⁻⁵M 浓度下试验。当化合物在 10⁻⁵M 显示出活性时, 制备剂量-响应曲线, 其中化合物浓度在 10⁻⁵ 和 10⁻⁸M 之间。在每个试验中, 从对照和样品值中减去空白值。对照样品代表最大的 PARP-1 酶活性。对于每个样品, cpm 量表达为占对照平均 cpm 值的百分率。当适当时, 使用在 50% 水平相邻的上和下试验点之间的线性插补计算药物的 IC₅₀- 值 (降低 PARP-1 酶活性至对照的 50% 的药物浓度)。本文中试验化合物的作用表达为 pIC₅₀ (IC₅₀- 值的负 log 值)。作为参考化合物, 包括 4-氨基-1,8-萘二甲酰亚胺以验证 SPA 分析。试验化合物在最初试验浓度 10⁻⁵M 显示出抑制活性 (参见表-2)。

[0296] PARP-1 抑制活性的体外过滤分析

[0297] 对本发明化合物在体外过滤分析中进行试验评价 PARP-1 活性 (在带缺口的 DNA 存在下触发), 通过其组蛋白聚 (ADP-核糖基) 化活性的方法使用 [³²P]-NAD 作为 ADP-核糖基给体。通过三氯乙酸 (TCA) 在 96-孔过滤板中将放射活性的核糖基化作用组蛋白沉淀, 使用闪烁计数器测定结合的 [³²P]。

[0298] 制备组蛋白 (备用溶液 :5mg/ml 在 H₂O 中)、NAD⁺ (备用溶液 :100mM 在 H₂O 中) 和 [³²P]-NAD⁺ 在培养缓冲液 (50mM Tris/HCl, PH8 ;0.2mM DTT ;4mM MgCl₂) 中的混合物。还制备 PARP-1 酶 (5-10 μ g/ml) 和带缺口的 DNA。按照在 PARP-1 抑制活性体外 SPA 中描述的方法制备带缺口的 DNA。将 75 μ l PARP-1 酶 /DNA 混合物与 1 μ l 在 DMSO 中的化合物和 25 μ l 组蛋白 -NAD⁺ / [³²P]-NAD⁺ 混合物加入 96-孔过滤板 (0.45 μ m, 供应商 Millipore) 的每孔中。在培养混合物中最终浓度为 2 μ g/ml 组蛋白、0.1mM NAD⁺、200 μ M (0.5 μ C) [³²P]-NAD⁺ 和 2 μ g/ml 带缺口的 DNA。在室温下培养板 15min, 通过加入 10 μ l 冰冷却的 100% TCA, 随后加入 10 μ l 冰冷却的 BSA 溶液 (1% 在 H₂O 中) 终止反应。使蛋白部分在 4°C 沉淀 10min, 将板真空过滤。随后在室温下对板子的每个孔用 1ml 10% 冰冷却的 TCA、1ml 5% 冰冷却的 TCA 和 1ml 5% TCA 洗涤。向每个孔中加入最终为 100 μ l 的闪烁溶液 (Microscint 40, Packard), 将板子转移到 TopCountNXT™ (supplier :Packard) 进行闪烁计数, 数值表达为每

分钟计数 (cpm)。对于每个试验,将对照 (含有 PARP-1 酶和 DMSO,没有化合物)、空白培养液 (含有 DMSO 但是没有 PARP-1 酶或化合物) 和样品 (含有 PARP-1 酶和溶解在 DMSO 中的化合物) 平行运行。将所有的试验化合物溶解并最终在 DMSO 中进一步稀释。在第一种情况下,将化合物在 10^{-5} M 浓度试验。当化合物在 10^{-5} M 显示出活性时,制备剂量 - 响应曲线,其中化合物浓度在 10^{-5} 和 10^{-8} M 之间。在每个试验中,从对照和样品值中减去空白值。对照样品代表最大的 PARP-1 酶活性。对于每个样品, cpm 量表达为占对照平均 cpm 值的百分率。当适当时,使用在 50% 水平相邻的上和下试验点之间的线性插补计算药物的 IC_{50} - 值 (降低 PARP-1 酶活性至对照的 50% 的药物浓度)。本文中试验化合物的作用表达为 pIC_{50} (IC_{50} - 值的负 \log 值)。作为参考化合物,包括 4- 氨基 -1,8- 萘二甲酰亚胺以验证过滤分析。试验化合物在最初试验浓度 10^{-5} M 显示出抑制活性 (参见表 -2)。

[0299] 对 TANK-2 抑制活性的体外邻近闪烁分析 (SPA)

[0300] 使用 Ni 闪板 (96 或 384 孔),基于 SPA 技术,将本发明化合物进行体外分析试验。

[0301] 通常,该分析使用 [3 H]-烟酰胺腺嘌呤二核苷 ([3 H]-NAD⁺) 作为 ADP-核糖基给体,依靠 SPA 技术检测 TANK-2 蛋白的自动聚 (ADP-核糖基) 化作用。

[0302] 通过向 1888.7 μ l 分析缓冲液 (60mM Tris/HCl, PH 7.4 ;0.9mM DTT ;6mM MgCl₂) 中加入 64.6 μ l [3 H]-NAD⁺ (0.1mCi/ml, 供应商 :Perkin Elmer) 和 46.7 μ l NAD- 备用液 (10.7mM, 储存在 -20°C, 供应商 Roche) 制备 [3 H]-NAD⁺/NAD 备用溶液。按照在 EP123806 中的描述生产 TANK-2 酶。将 60 μ l 分析缓冲液与 1 μ l 在 DMSO 中的化合物、20 μ l [3 H]-NAD⁺/NAD 和 20 μ l TANK-2 酶 (最终浓度 6 μ g/ml) 加入 96- 孔 Ni- 包衣闪板 (Perkin Elmer) 的每孔中。在室温下培养混合物 120min 后,通过加入 60 μ l 停止溶液 (42.6mg NAD 在 6ml H₂O 中) 终止反应。将板子用板密封器覆盖,放在 TopCountNXT™ (supplier :Packard) 中进行闪烁计数,数值表达为每分钟计数 (cpm)。对于每个试验,将对照 (含有 TANK-2 酶和 DMSO,没有化合物)、空白培养液 (含有 DMSO 但是没有 TANK-2 酶或化合物) 和样品 (含有 TANK-2 酶和溶解在 DMSO 中的化合物) 平行运行。将所有的试验化合物溶解并最终在 DMSO 中进一步稀释。在第一种情况下,将化合物在 10^{-5} M 浓度试验。当化合物在 10^{-5} M 显示出活性时,制备剂量 - 响应曲线,其中化合物浓度在 10^{-5} 和 10^{-8} M 之间。在每个试验中,从对照和样品值中减去空白值。对照样品代表最大的 TANK-2 酶活性。对于每个样品, cpm 量表达为占对照平均 cpm 值的百分率。当适当时,使用在 50% 水平相邻的上和下试验点之间的线性插补计算药物的 IC_{50} - 值 (降低 TANK-2 酶活性至对照的 50% 的药物浓度)。本文中试验化合物的作用表达为 pIC_{50} (IC_{50} - 值的负 \log 值)。作为参考化合物,包括 3- 氨基苯甲酰胺和 4- 氨基 -1,8- 萘二甲酰亚胺以验证 SPA 分析。本文中使用 96- 孔板描述分析。在本分析中使用 384- 孔板相同的最终浓度,并且体积是合适的。如果 96- 孔板的结果是可以得到的,则这些结果被结合在表 -2 中,否则显示 384- 孔板分析的结果。

[0303] 表 1-2

[0304]

化合物编号	体外过滤 分析 PARP-1 pIC50	体外 SPA 分析 PARP-1 pIC50	体外 SPA 分析 TANK-2 pIC50
1	7.26	6.547	5.074
2	7.764		
3	6.69	6.367	5.297
4	7.15	6.601	< 5
5	6.569		< 5
6	6.71		< 5
7	7.051		5.017
8	7.537		< 5
9	7.809		< 5
10	7.615		< 5
11	7.523	7.062	5.671
12	6.726	5.942	5.033
13	7.719	7.122	< 5
14	6.116		< 5
15	7.45	6.858	< 5
16	6.423		< 5
19			< 5
20			< 5
24	6.411	6.012	5.36

25	6.62	5.525	< 5
26	7.761		< 5
27	6.668	6.067	< 5
28	7.343		
29	6.52	5.749	< 5
30	6.638	6.355	5.398
31	6.926		< 5
32	6.963		5.034
33	6.813		< 5
34	7.306	6.922	< 5
35	6.751		< 5
36	7.077		5.504
37	7.209		< 5
38	6.83		< 5
39	6.672		< 5
40	6.664		< 5
41	7.424		< 5
42	6.748		< 5
43	7.246		< 5
44	6.656	5.949	< 5
45	6.961		5.265
46	6.874	6.074	< 5
47	6.741		5.196

48	6.789	5.513	< 5
49	6.287	5.418	5.806
50	6.192	5.601	< 5
51	6.523	6.365	< 5
52	6.448	6.362	5.184
53	6.664	5.972	< 5
54	7.037		
55	6.677	5.782	5.825
56	6.111	5.249	< 5
57	6.326	5.705	5.294
58	6.501	5	5.045
59	6.09	5.482	< 5
61	6.528	5.888	< 5
62	7.413		
63	6.837	6.165	< 5
64	7.535		
65	7.04	6.07	< 5
66	7.016	6.115	5.364
67	6.633	8.519	< 5
68	7.301	6.563	< 5
69	6.902	5.667	5.258
70	6.572	5.464	5.428
71	6.273	5.13	< 5

72	5.979	5.047	< 5
73	6.288	5.721	< 5
74	6.215	5.493	5.329
75	6.443	5.373	< 5
76	6.384	5.44	< 5
77	6.774	5.88	5.054
79			< 5
80			< 5
81			5.555
84			< 5

[0305] 所述化合物可以进一步在细胞化学和 / 或辐射敏化试验中进行评价,所述试验测量癌细胞系中内源性 PARP-1 活性的抑制并最终在体内辐射敏化试验中的内源性 PARP-1 活性的抑制。