



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I660949 B

(45)公告日：中華民國 108 (2019) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：104122033

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 07 月 07 日

(51)Int. Cl. : C07D241/44 (2006.01)

C07D403/12 (2006.01)

A61K31/498 (2006.01)

A61K31/44 (2006.01)

A61K31/337 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2014/07/07 美國

62/021,214

(71)申請人：國立台灣大學(中華民國) NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY (TW)

臺北市大安區羅斯福路 4 段 1 號國立臺灣大學

國立陽明大學(中華民國) NATIONAL YANG-MING UNIVERSITY (TW)

臺北市北投區立農二街 155 號

財團法人工業技術研究院(中華民國) INDUSTRIAL TECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE. (TW)

新竹縣竹東鎮中興路 4 段 195 號

(72)發明人：陳昆鋒 CHEN, KUEN FENG (TW)；蕭崇瑋 SHIAU, CHUNG WAI (TW)；陳志宏 CHEN, CHIH HUNG (TW)

(74)代理人：洪堯順；侯德銘

(56)參考文獻：

US 2002/0120137A1

WO 2012/045196A1

Beckert, R. et al., Pharmazie, 1997, 52(8): 638-639

Babu, P. V. et al., Org. Biomol. Chem., 2013, 11: 6680-6685

Schramm, F. et al., Z. Naturforsch., 2005, 60(b): 843-852

Hampel, O. et al., Z. Naturforsch., 2002, 57(b): 946-956

審查人員：魏鳳鳳

申請專利範圍項數：項 圖式數： 共頁

(54)名稱

作為抗癌藥物之芳基胺取代的喹喔啉

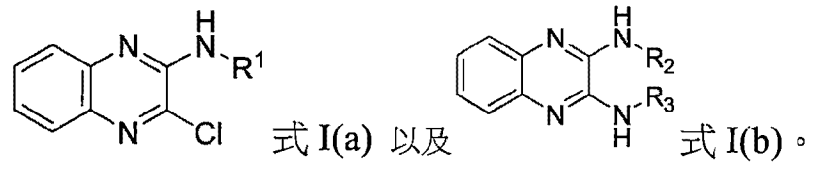
ARYLAMINE SUBSTITUTED QUINOXALINE AND THEIR USE AS ANTICANCER DRUGS

(57)摘要

本發明提供式 I 及 II 的新穎化合物，該化合物具有蛋白質磷酸酶 2A(PP2A)的促進劑、癌蛋白 CIP2A 抑制劑及癌蛋白 SET 拮抗劑之功效。本發明並提供使用該式 I 及 II 之化合物的治療方法。

The present invention provides new compounds of formula I and II, which have potential of protein phosphatase 2A (PP2A) agonist, CIP2A inhibitor and SET antagonist. Also provided are treatment methods using the compounds of formula I and II.

特徵化學式：



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

作為抗癌藥物之芳基胺取代的喹喔啉/

Arylamine Substituted Quinoxaline and Their Use as Anticancer Drugs

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種經芳基胺取代的喹喔啉(quinoxaline)的新穎化合物，以及該化合物的用途。

【先前技術】

【0002】 在大部分的人類癌細胞中可發現抑制蛋白質磷酸酶 2A 癌性抑制因子(cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A, CIP2A)過度表現，包含白血病、前列腺癌、非小細胞肺癌、胃癌、頭頸部癌、結腸癌及乳癌，因此 CIP2A 已發現於臨床上侵略性腫瘤及促進癌細胞生長有密切的關聯性。CIP2A 直接與轉錄因子 c-Myc 相互作用並抑制 c-Myc 的蛋白質磷酸酶 2A (PP2A)去磷酸化，因而使致癌的 c-Myc 更穩定免於降解。

【0003】 蛋白質磷酸酶 2A(PP2A)係藉由在絲氨酸或蘇胺酸殘基蛋白質激酶的去磷酸化為細胞增殖的關鍵調節劑，PP2A 係由三個調節受體專一性的次單元所組成；例如，PP2A 使 p-Akt 在絲氨酸 473 去磷酸化並減少細胞生長。因此，CIP2A-PP2A-Akt 信號級聯放大(signaling cascade)被認為是癌症種藥的生存調節劑；此外，SET 另一個被發現的 PP2A 的抑制劑，已發現 SET 在許多不同腫瘤組織均有過度表現，且 SET 的表現量與癌細胞的生長速率呈正相關。

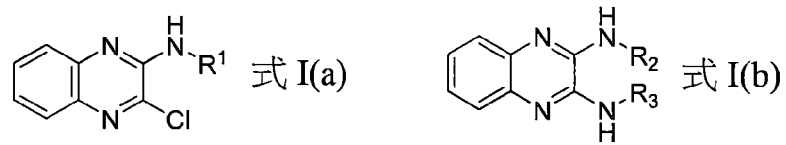
【0004】 因此，若開發以拮抗 SET 或是 CIP2A 對於 PP2A 的抑制，來在癌細胞中重新活化 PP2A，繼而抑制 p-Akt 等促癌訊息的傳遞，進而誘發癌細胞凋亡的化合物可成為抗癌的新的治療策略。

【發明內容】

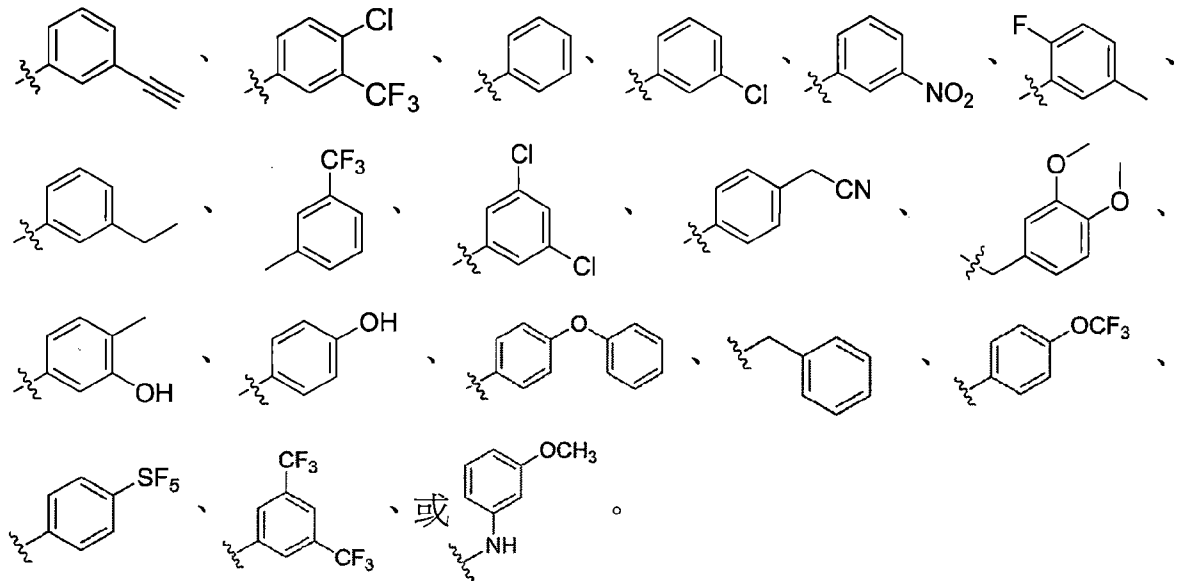
【0005】 本發明提供新設計的化合物具有阻礙 PP2A 與 SET 結合的能力，同時能有效抑制具有抑制蛋白質磷酸酶 2A 癌性抑制因子(CIP2A)及 p-Akt 表現，其可作為具有蛋白質磷酸酶 2A(PP2A)的促進劑及癌蛋白 SET

拮抗劑，且能有效治療癌症。

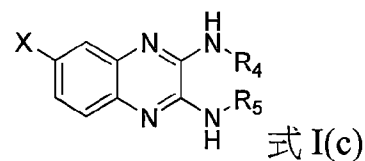
【0006】 本發明之一目的在提供一種可經芳基胺取代的喹喔啉，係具有如式 I(a)或式 I(b)之結構：



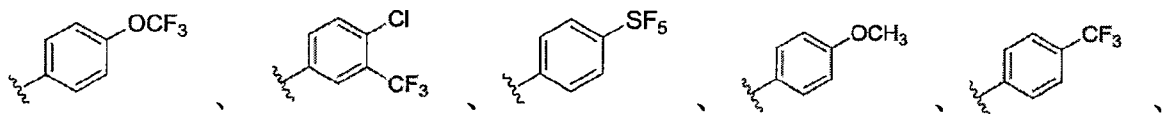
其中 R^1 、 R^2 及 R^3 係為相同或不同各自獨立為可經取代的苯基和苯上有其他官能基之原子或基團、雜環芳香基，且該可經取代的苯基包含

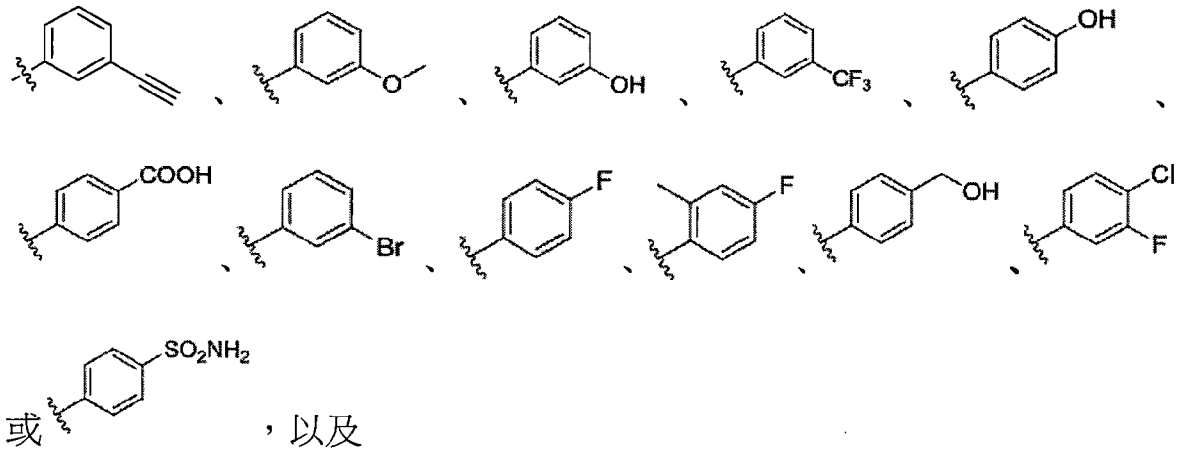


【0007】 本發明另提供一種可經芳基胺取代的喹喔啉，係具有如式 I(c)化學結構之：



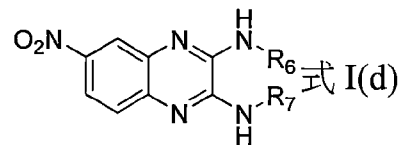
其中 R^4 及 R^5 係為相同或不同各自獨立為可經取代的苯基和苯上有其他官能基之原子或基團、雜環芳香基，且該可經取代的苯基包含



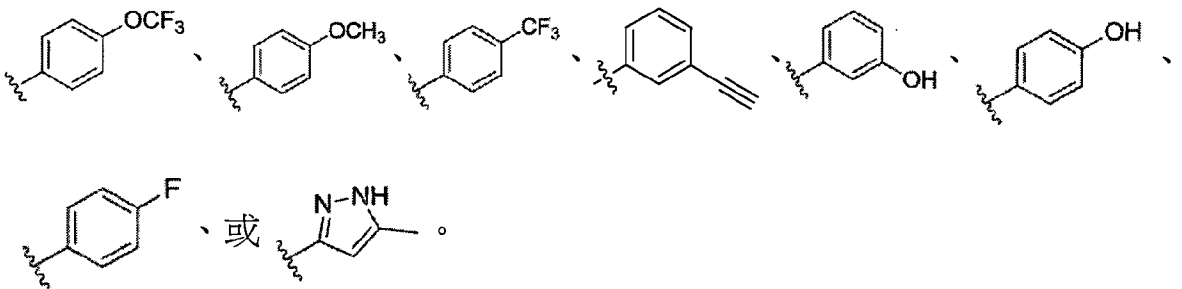


其中 X 係為鹵素、鹵代烷基、甲氧基、硝基、胺基、羧基、酸基、苯酮基或甲氧羰基。

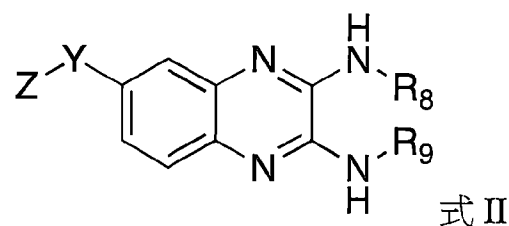
【0008】 本發明另提供一種可經芳基胺取代的喹喔啉，係具有式 I(d) 化學結構之：



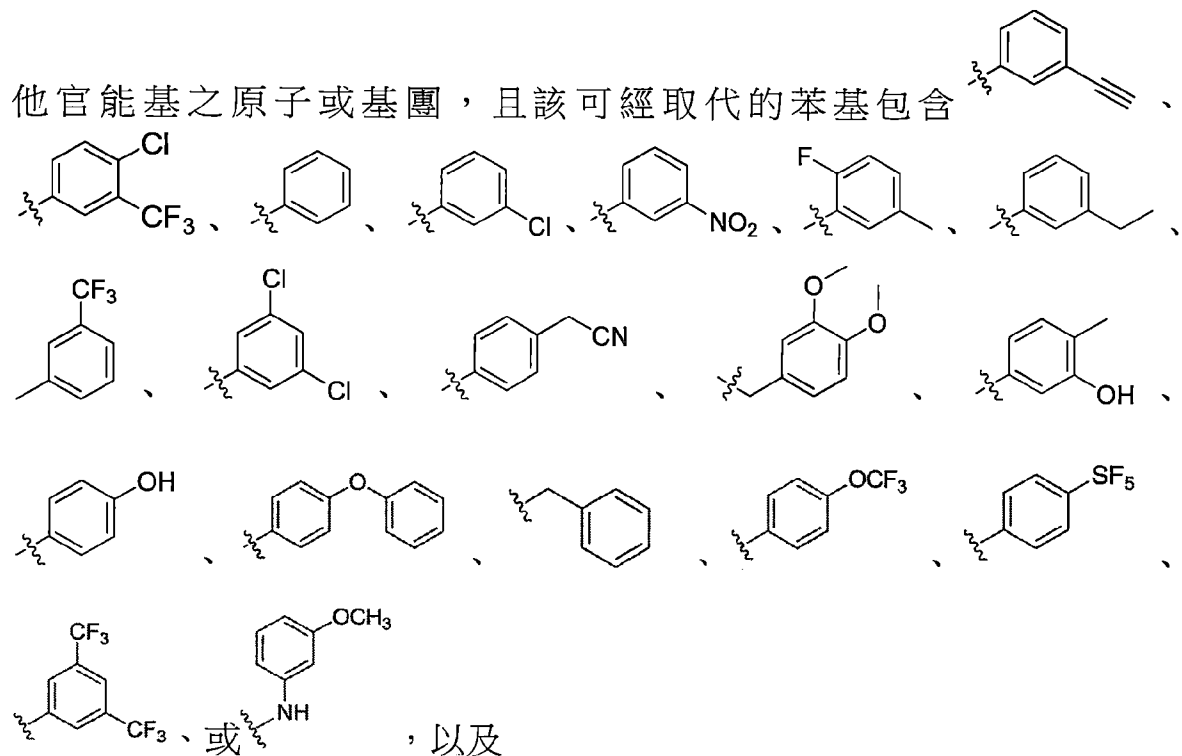
其中 R^6 及 R^7 係為相同或不同各自獨立為可經取代的苯基和苯上有其他官能基之原子或基團、雜環芳香基，且該可經取代的苯基包含



【0009】 本發明另提供一種化合物，係具有如下式 II 之結構：



其中 R^8 及 R^9 係為相同或不同各自獨立為可經取代的苯基和苯上有其



其中 Y 為 CO 或 $(CH_2)_n$, $n=1-3$; Z = COOR¹⁰, 或具有取代官能基之苯環, R¹⁰ 為芳香基或烷基取代基。

【0010】 本發明之另一目的係提供一種醫藥組合物，包含上述所定義之化合物，以及一藥理上可接受的載體。

【0011】 本發明之又一目的係提供一種用於活化蛋白質磷酸酶 2A (PP2A) 在細胞內表現、作為癌蛋白 SET 拮抗劑、蛋白質磷酸酶 2A 癌性抑制因子(CIP2A)拮抗劑或干擾癌蛋白(SET)與蛋白質磷酸酶 2A(PP2A)結合的醫藥組合物，包含上述所定義的化合物，以及一藥理上可接受的載體。

【0012】 本發明之再一目的係提供一種用於治療以蛋白質磷酸酶 2A(PP2A) 不活化以、癌蛋白 SET 表現量增加或蛋白質磷酸酶 2A 癌性抑制因子(CIP2A)表現量增加為特徵之疾病或病症的醫藥組合物，包含在上述所定義的化合物，以及一藥理上可接受的載體。

【0013】 在本發明之一實施例中，其中該醫藥組合物進一步包含一抗癌藥物，且該抗癌藥物係為索拉非尼(Sorafenib)或紫杉醇(Paclitaxel)。

【0014】 本發明之另一目的係提供一種上述所定義之化合物用於製

造以治療蛋白質磷酸酶 2A (PP2A) 不活化、癌蛋白 SET 表現量增加、蛋白質磷酸酶 2A 癌性抑制因子(CIP2A)表現量增加為特徵之疾病或病症之醫藥組合物的用途。

【0015】 在本發明之一實施例中，其中該以蛋白質磷酸酶 2A (PP2A) 不活化、癌蛋白 SET 表現量增加或蛋白質磷酸酶 2A 癌性抑制因子(CIP2A)表現量增加為特徵之疾病或病症為肝癌、肺癌、白血病、乳癌、腎癌、甲狀腺癌、結腸癌、頭部或頸部癌症。

【0016】 以下將配合圖式進一步說明本發明的實施方式，下述所列舉的實施例係用以闡明本發明，並非用以限定本發明之範圍，任何熟習此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可做些許更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

【圖式簡單說明】

【0017】 第一圖 A 至 G 係表示本發明之埃羅替尼(Erlotinib)衍生物 TD-52 對比埃羅替尼對 HCC 細胞有較佳的細胞凋亡效果。第一圖 A 係為以 MTT 分析在 HCC 細胞中，TD-52 及埃羅替尼的細胞凋亡效果，顯示在不同細胞株中 TD-52 的 IC₅₀，點代表平均值；條帶代表標準差(n=3)；第一圖 B 係為以流式細胞儀檢測在劑量依賴下 TD-52 及埃羅替尼的 HCC 細胞凋亡效果，點代表平均值；條帶代表標準差(n=3)；第一圖 C 係以膜聯蛋白-V/PI 雙重染色法分析細胞凋亡及細胞壞死的比例；第一圖 D 係以西方墨點分析法分析胱氨酸蛋白酶-9、半胱氨酸蛋白酶-3 及過氧化物酶體增殖物啟動受體(PAPP)的表現；第一圖 E 係為以 TD-52 處理後 DNA 片段化檢測(n=6)；第一圖 F 係表示經由 TD-52 與 z-VAD-fmk 共處理處理會減少誘發細胞凋亡，上圖為以西方墨點分析法分析，下圖係為以流式細胞儀分析；第一圖 G 係經由西方墨點分析法確認 TD-52 對比埃羅替尼不具有抑制的上皮細胞成長因子接受體(EGFR)磷酸化活性。

【0018】 第二圖 A 至 H 係顯示 HCC 細胞經由抑制蛋白質磷酸酶 2A 癌性抑制因子(CIP2A)使 p-Akt 向下調節以確認本發明之埃羅替尼衍生物 TD-52 的抗癌效果。第二圖 A 係為 HCC 細胞中以不同 TD-52 濃度處理 24 小時會向下調節 CIP2A 蛋白質表現，收集細胞裂解物以西方墨點分析法分

析 CIP2A、p-Akt、Akt 蛋白質表現量；第二圖 B 係為 HCC 細胞中在不同時間下 1 μ M TD-52 處理會向下調節 CIP2A 蛋白質表現，收集細胞裂解物以西方墨點分析法分析 CIP2A、p-Akt、Akt 蛋白質表現量；第二圖 C 係表示 HCC 細胞以 TD-52 處理後 PP2A 活性提升，經由細胞裂解物量測 PP2A 磷酸酶活性，柱代表平均值，誤差線代表標準差(n=3)；第二圖 D 係 TD-52 對 PP2A 各次單位蛋白質表現量的影響，以西方墨點分析法確認 PP2A 次單元的表現量；第二圖 E 係為 myc-標記 CIP2A 異位過量表現的 PLC5 細胞影響 TD-52 在 PLC5 細胞凋亡的效果，分別以流式細胞儀(右圖)及西方墨點分析法分析(左圖)，柱代表平均值，誤差線代表標準差(n=3)；第二圖 F 以 PP2A 抑制劑、黑海棉酸(OA)共處理會影響 TD-52 細胞凋亡的效果，分別以流式細胞儀(右圖)及西方墨點分析法分析(左圖)，柱代表平均值，誤差線代表標準差(n=3)；第二圖 G 係經由 siRNA 剔除 PP2A 催化區(PP2Ac)表現影響 TD-52 在 PLC5 細胞凋亡之效果，分別以流式細胞儀(右圖)分析細胞凋亡及西方墨點分析法分析 p-Akt、PP2Ac 及 PARP 的表現量(左圖)，柱代表平均值；誤差線代表標準差(n=3)；第二圖 H 係為 myc-標記 Akt1 異位過量表現減少 TD-52 在 PLC5 細胞凋亡的效果，分別以流式細胞儀(右圖)及西方墨點分析法分析(左圖)，柱代表平均值，誤差線代表標準差(n=3)。

【0019】 第三圖 A 至 D 係表示 TD-52 經由干擾 Elk-1 功能向下調節 CIP2A 的轉錄作用。第三圖 A 係為在劑量依賴方式及時間依賴方式以 TD-52 處理 PLC5 細胞會影響 CIP2A 的轉錄，不同的 TD-52 劑量處理(左上圖)及 TD-52 處理時間不同(左下圖)，利用 RT-PCR 定量 CIP2A mRNA，柱代表平均值，誤差線代表標準差(n=3)，右圖係為西方墨點分析法檢測以蛋白質合成抑制劑放線菌酮(cycloheximide)及有(右下圖)或無(右上圖)TD-52 處理的 CIP2A 蛋白質表現量；第三圖 B 係表示 TD-52 會影響 CIP2A 近端啟動子區域(n=3, * P <0.05, 柱代表平均值，誤差線代表標準差，NS 代表非顯著性)；第三圖 C 表示在 PLC5 細胞中 TD-52 會經由抑制 Elk-1 轉錄因子在細胞核的表現量，進而抑制 CIP2A 蛋白在細胞質隻表現量，核質分離後之細胞裂解物，以西方墨點分析法分析 Elk-1 及 CIP2A 蛋白質表現量，核層蛋白 B(lamin B)及微管蛋白(tubulin)為對照組；第三圖 D 表示在 PLC5 細胞中 TD-52 會抑

制 Elk-1 結合至 CIP2A 的啟動子，利用染色質免疫沈澱技術(ChIP)確認在 CIP2A 啟動子結合位置 Elk-1 的結合能力，以電泳圖分析 PCR 產物(左圖)，在 PLC5 細胞中異位過量表現 Elk-1 會減少 TD-52 誘導癌細胞凋亡的效果(右上及右下)，柱代表平均值，誤差線代表標準差(n=3)。

【0020】 第四圖 A 至 D 係以活體內 PLC5 小鼠模型及臨床上肝癌樣本證實 CIP2A-PP2A-p-Akt 信號路徑。第四圖 A 係為 PLC5 的異體移植小鼠模型分別給予索拉非尼、TD-52 或二甲基亞(DMSO)(作為控制組)後的腫瘤生長曲線，* $P < 0.05$ ，點代表平均值，條帶代表標準差(n=6)；第四圖 B 係以西方墨點分析法分析在 PLC5 異體移植腫瘤中 CIP2A、p-Akt 及 Akt1 的表現量；第四圖 C 係為分別以 TD-52 或 DMSO(作為控制組)處理的 PLC5 異體移植腫瘤中 PP2A 活性分析，* $P < 0.05$ ，柱代表平均值，誤差線代表標準差(n=3)；第四圖 D 係表示在 PLC5 細胞中以劑量依賴方式索拉非尼及 TD-52 對細胞活性的影響，柱代表平均值，誤差線代表標準差(n=3)；第四圖 E 係為信號路徑的示意圖說明在 HCC 細胞中 TD-52 對促進細胞凋亡的影響。第四圖 F 係為臨床肝癌腫瘤樣本 p-Akt 細胞核表現及 CIP2A 細胞質表現的免疫組織化學染色法影像圖。

【0021】 第五圖 A 至 F 表示在肝癌患者腫瘤組織中 SET 過度表現。第五圖 A 係表示在成對的肝癌腫瘤組織及鄰近的正常組織中 SET 的免疫組織化學染色法影像圖；第五圖 B 在臨床上樣本中腫瘤組織及非腫瘤組織的平均 SET 表現量，柱代表平均值，誤差線代表標準差(n=294)；第五圖 C 表示相對於成對腫瘤組織對比非腫瘤組織表現量的比值，點代表每個患者的表現量的比質(n=147)，橫線代表所有病人平均比率；第五圖 D 上圖表示不同患者的 SET 及 p-Akt 的免疫組織化學染色法影像圖，下圖表示肝癌患者手術後經由 SET 及 p-Akt 共表現確認無復發存活率(recurrence-free survival)；第五圖 E 表示有及無剔除 SET 的 PLC5 細胞的細胞群形成影像及數目分析(n=6)，右下方以西方墨點分析法確認基因剔除的效果；第五圖 F 表示有及無剔除 SET 的 Hep3B 細胞的肝癌細胞微球(hepatosphere)形成影像及數目分析(n=6)。

【0022】 第六圖 A 至 F 係以本發明之埃羅替尼衍生物(EMQA)作為

SET 拮抗劑誘發肝癌細胞凋亡。第六圖 A 係為經由 MTT 分析 EMQA 抑制肝癌細胞的存活率，點代表平均值，條帶代表標準差(n=3)；第六圖 B 係以流式細胞儀分析經由 EMQA 劑量依賴處理的肝癌細胞凋亡，柱代表平均值，條帶代表標準差(n=3)；第六圖 C 係以 DNA 片段化分析經由 EMQA 劑量依賴處理的肝癌細胞凋亡，柱代表平均值，條帶代表標準差(n=3)；第六圖 D 以流式細胞儀(上圖)及西方墨點分析法(下圖)分析在時間依賴方式 EMQA 誘發 p-Akt 致癌蛋白表現量減少與肝癌細胞凋亡，柱代表平均值，條帶代表標準差(n=3)，CF 係代表切割型式；第六圖 E 係表示在 EMQA 及控制組治療的 PLC5 異體移植腫瘤小鼠的腫瘤生長曲線，點代表平均值，條帶代表標準差(n=10)；第六圖 F 係以西方墨點分析法分析 PLC5 異體移植腫瘤小鼠的腫瘤裂解物的 p-Akt 及 Akt1(左圖)及 PP2A 活性(右圖)的表現量，柱代表平均值，條帶代表標準差(n=10)。

【0023】 第七圖 A 至 E 係說明 EMQA 以 SET 為標的強化 PP2A-調節 p-Akt 向下調節的功能之抗癌幾轉。第七圖 A 以流式細胞儀及西方墨點分析法分析 EMQA 對具有 myc-標記 Akt 異位表現的 PLC5 細胞的細胞凋亡效果，柱代表平均值，條帶代表標準差(n=3)；第七圖 B 以流式細胞儀及西方墨點分析法分析 EMQA 對 PP2A 抑制劑、黑海棉酸(OA)共處理的 PLC5 細胞凋亡的效果減少，柱代表平均值，條帶代表標準差(n=3)；第七圖 C 以流式細胞儀及西方墨點分析法分析 EMQA 對經由 siRNA 剔除 PP2Ac 的 PLC5 細胞的細胞凋亡效果減少，柱代表平均值，條帶代表標準差(n=3)；第七圖 D 以西方墨點分析法分析 EMQA 向下調節 p-Akt 表現而不影響 PI3K、PTEN 及 PDK1 的表現；第七圖 E 以流式細胞儀及西方墨點分析法分析 EMQA 對 myc-標記 SET 異位表現的 Hep3B 細胞凋亡效果減少，柱代表平均值，條帶代表標準差(n=3)；第七圖 F 係以表面等離子共振 (SPR 左圖) 與共免疫沉澱法(co-IP 右圖)分析具有全長 SET、N-末端片段(SET_{NTF}, a.a. 1-227)及 C-末端片段(SET_{CTF}, a.a.76-277)之重組蛋白與基因載體轉殖的 Sk-Hep1 細胞以確定 EMQA 作為 SET 拮抗劑的影響(左圖)，柱代表平均值，條帶代表標準差(n=3)；以西方墨點分析法顯示 EMQA 顯著減少全長 SET 及 SET_{CTF} 對 PP2Ac 的結合，不會影響 SET_{NTF} 的結合(右圖)。

【0024】 第八圖 A 至 E 係顯示在活體外(*in vitro*)及活體內(*in vivo*)EMQA 與索拉非尼的組合對抗作用具有協同效果(*synergism*)。第八圖 A 係 CalcuSyn 分析軟體 (Biosoft, 劍橋, 英國)分析 EMQA 與索拉非尼的組合在不同肝癌細胞以 MTT 測試細胞凋亡實驗結果, 確認 EMQA 與索拉非尼的協同效果; 第八圖 B 係以流式細胞儀及西方墨點分析法分析在肝癌細胞中 EMQA 顯著改善索拉非尼促進細胞凋亡的效果; 第八圖 C 係為 EMQA 與索拉非尼的組合顯著抑制肝癌腫瘤生長的腫瘤生長曲線圖, 點代表平均值($n=10$), $*P<0.05$; 第八圖 D 係為以 EMQA 與索拉非尼的組合顯著抑制肝癌腫瘤生長的腫瘤重量數據圖, 柱代表平均值, 條帶代表標準差, $*P<0.05$; 第八圖 E 係為分別分析以控制組及 EMQA 與索拉非尼的組合治療 PLC5 異體移植腫瘤小鼠的腫瘤的 PP2A 活性, 柱代表平均值, 條帶代表標準差($n=10$)(上圖); 以西方墨點分析法分析 PLC5 異體移植腫瘤小鼠的腫瘤的 p-Akt、Akt1 及 SET 的表現(下圖)。

【0025】 第九圖 A 至 D 係為 EMQA 及紫杉醇(*paclitaxel*)結合可向下調節 p-Akt。第九圖 A 係利用西方墨點分析法分析三種不同非小細胞肺癌(NSCLC)細胞株以 EMQA 及/或紫杉醇向下調節 p-Akt; 第九圖 B 係在以時間依賴的方式 EMQA 及紫杉醇結合處理 A549 細胞株的 p-Akt 及聚(ADP-核糖)聚合酶(*poly (ADP-ribose) polymerase, PARP*)的表現量; 第九圖 C 係在以劑量依賴的方式下 EMQA 及紫杉醇結合處理 A549 細胞株的 p-Akt 及 PARP 的表現量; 第九圖 D 以流式細胞儀及西方墨點分析法分析 EMQA 對具有 myc-標記 Akt 過量異位表現的 A549 細胞的細胞凋亡效果, 柱代表平均值, 條帶代表標準差($n=3$)。

【0026】 第十圖 A 至 E 顯示在活體內(*in vivo*)EMQA 與紫杉醇的組合對抗作用的效果。第十圖 A 係為利用控制組、紫杉醇及/或 EMQA 治療 A549 異體移植腫瘤小鼠的腫瘤生長曲線, 點代表平均值, $*P<0.05$ (每組治療 $n=10$); 第十圖 B 係為利用控制組、紫杉醇及/或 EMQA 治療 A549 異體移植腫瘤小鼠的平均腫瘤重量, 柱代表平均值, 條帶代表標準差($n=10$); 第十圖 C 係為 PP2A 活性分析圖, 柱代表平均值, 條帶代表標準差($n=3$); 第十圖 D 係以西方墨點分析法分析 A549 異體移植腫瘤小鼠的腫瘤裂解物的

p-Akt 及 Akt 表現量；第十圖 E 表示受治療的小鼠的體重改變，點代表平均值。

【實施方式】

【0027】 除非另有定義，本文所用之所有技術及科學術語與本發明所屬技術領域之技術人員通常理解的含義相同。本文所提及之所有出版物皆以引用方式併入本文，以揭露及描述與該被引用之出版物有關的方法及/或材料。

【0028】 如本文所使用，單數形式「一」(a、an)和「該」(the)包括複數對象，除非該內文清楚地另有規定。因此，例如，參照「一樣品」包括複數個此類樣品以及本領域之技術人員已知的等同物。

【0029】 本文所使用的「EMQA」代表本發明所述之埃羅替尼(Erlotinib)衍生物，其包含 TD-52 至 TD-95、ITRI TD-627、ITRI TD-602 至 ITRI TD-605、ITRI TD-607、ITRI TD-608、ITRI TD-612 至 ITRI TD-626、ITRI TD-628 至 ITRI TD-631 以及 TD-632 化合物。

【0030】 「羧基」一詞係指基團-C(O)OR，其中 R 係為如本文定義之氫、低碳烷基、經取代的低碳烷基、芳基、經取代的芳基，及其類似物。

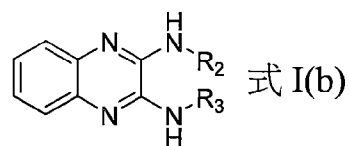
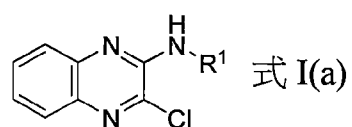
【0031】 「鹵代烷基」一詞係指烷基基團被一個或多個鹵素原子所取代，這樣的實例包含，但並不限於，三氟甲基。

【0032】 「鹵素」一詞係指氟、氯、溴、碘及鉍。

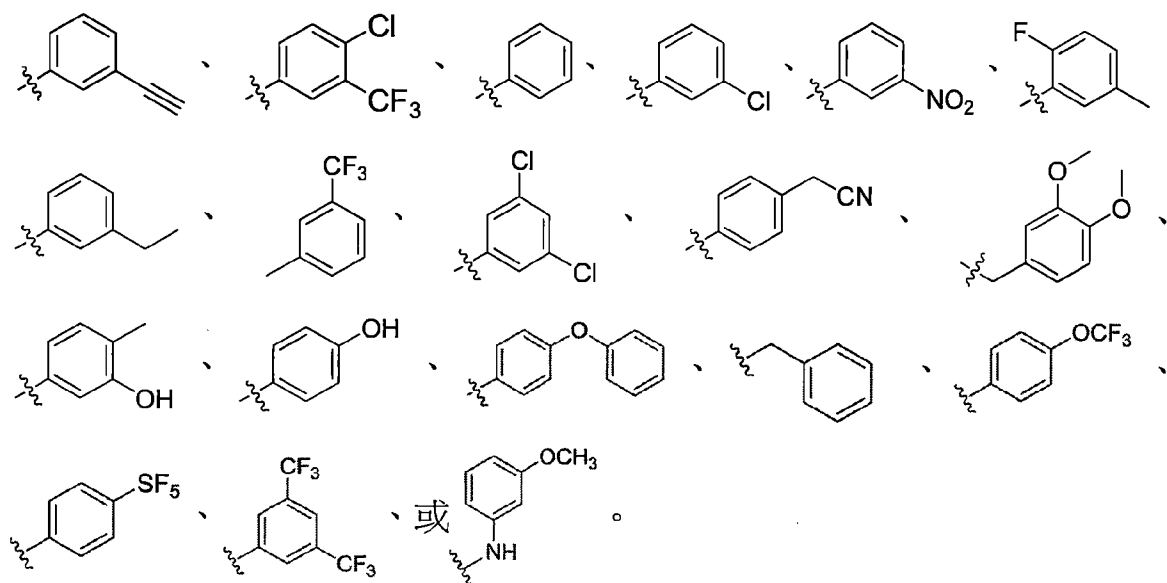
【0033】 在本發明中研究埃羅替尼的結構與其生物活性之間的關係，並修改了埃羅替尼的結構。本發明據此開發了一些具有 SET 拮抗劑功能的埃羅替尼衍生物，並且意外地發現，相較於癌症常用藥物埃羅替尼(Erlotinib)、索拉非尼(Sorafenib)及紫杉醇(Paclitaxel)，這些化合物在某些疾病中，如癌症，具有良好的治療效果。根據本發明，本發明新設計之化合物作用為 SET 拮抗劑，且能有效治療以抑制 SET 的表現量為特徵之疾病或病症，如肝癌、白血病、肺癌、乳癌、腎癌、甲狀腺癌、頭部及頸部癌症。本發明之化合物以干擾 SET-PP2A 結合為目標進而活化 PP2A 達到使癌細胞凋亡的效果，因此，本發明之化合物透過一種新的標靶機制，提供替代的治療選擇，該選擇可能在對傳統醫藥治療具有抗性之癌症的治療上是極有

幫助的。

【0034】 在本發明之一目的，提供一種可經芳基胺取代的喹啉，係具有如式 I(a)或式 I(b)之結構：

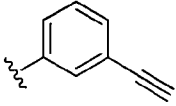
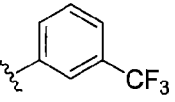
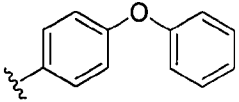
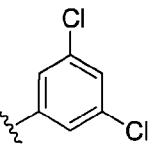
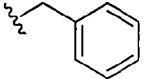
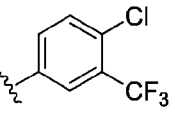
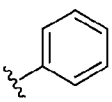
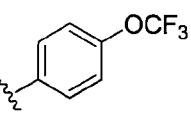
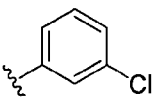
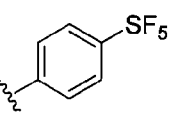
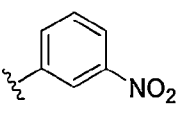
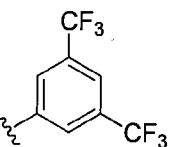
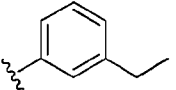


其中 R^1 、 R^2 及 R^3 係為相同或不同各自獨立為可經取代的苯基和苯上有其他官能基之原子或基團、雜環芳香基，且該可經取代的苯基包含



【0035】 在本發明之一實施例中，該式 I(a)化合物如表一所列之化合物 TD-70 至 TD-82，但不限於此。

表一、式 I(a) 化合物

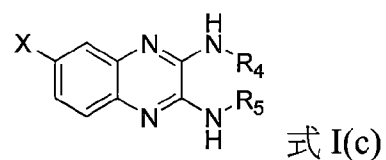
No.	R ¹	No.	R ¹
TD-70		TD-77	
TD-71		TD-78	
TD-72		TD-79	
TD-73		TD-80	
TD-74		TD-81	
TD-75		TD-82	
TD-76			

【0036】 在本發明之一實施例中，該式 I(b) 化合物如表二所列之化合物 TD-52 至 TD-69 以及 ITRI TD-627，但不限於此。

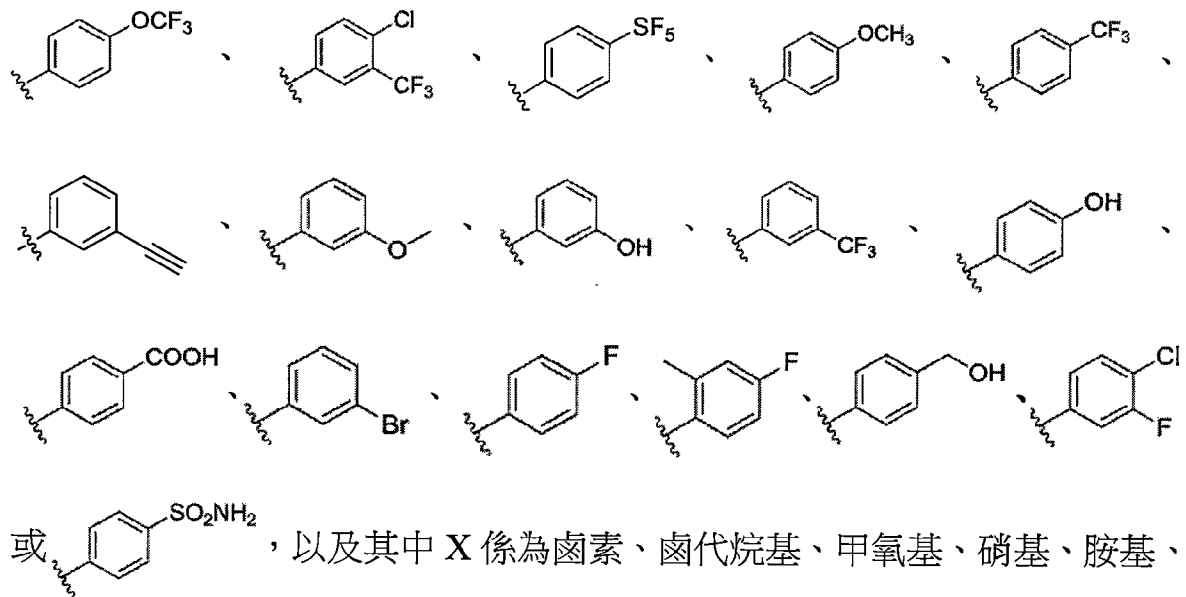
表二、式 I(b)化合物

No.	R ² /R ³	No.	R ² /R ³	No.	R ² /R ³
TD-52		TD-59		TD-66	
TD-53		TD-60		TD-67	
TD-54		TD-61		TD-68	
TD-55		TD-62		TD-69	
TD-56		TD-63		ITRI TD-627	
TD-57		TD-64			
TD-58		TD-65			

【0037】 在本發明之另一目的，提供可經芳基胺取代的喹喔啉，係具有式 I(c)化學結構：



其中 R⁴ 及 R⁵ 係為相同或不同各自獨立為可經取代的苯基和苯上有其他官能基之原子或基團、雜環芳香基，且該可經取代的苯基包含



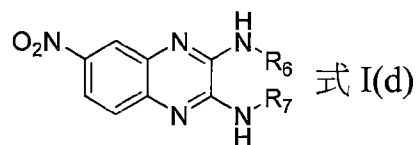
羧基、酸基、苯酮基或甲氧羰基。

【0038】 在本發明之一實施例中，該式 I(c) 化合物如表三所列之化合物 TD-83 至 TD-95、ITRI TD-602 至 ITRI TD-604、ITRI TD-607、ITRI TD-608、ITRI TD-613 至 ITRI TD-618、ITRI TD-620 至 ITRI TD-624 及 ITRI TD-629，但不限於此。

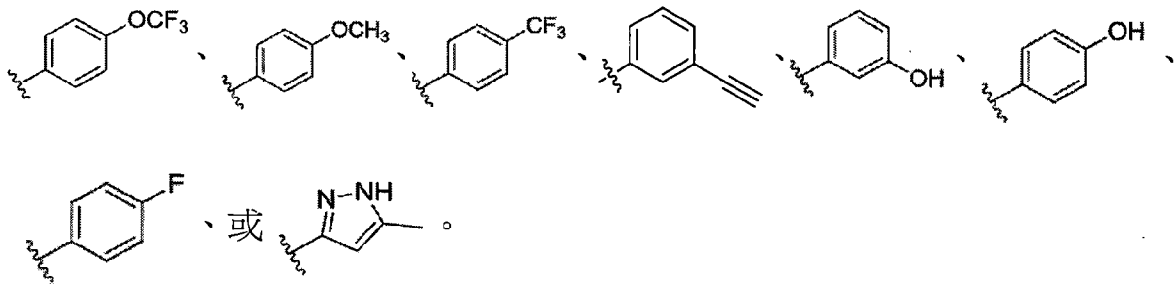
表三、式 I(c) 化合物

No.	X	R ⁴ /R ⁵	No.	X	R ⁴ /R ⁵	No.	X	R ⁴ /R ⁵
TD-83	F		TD-93	NO ₂		ITRI TD-620	NO ₂	
TD-84	F		ITRI TD-602	NO ₂		ITRI TD-621	NO ₂	
TD-85	Cl		ITRI TD-603	NO ₂		ITRI TD-623	NO ₂	
TD-86	Cl		ITRI TD-604	NO ₂		ITRI TD-624	NO ₂	
TD-87	CF ₃		ITRI TD-608	NO ₂		ITRI TD-629	NO ₂	
TD-88	CF ₃		ITRI TD-613	NO ₂		ITRI TD-607	NH ₂	
TD-89	OCH ₃		ITRI TD-615	NO ₂		ITRI TD-614	NH ₂	
TD-90	OCH ₃		ITRI TD-616	NO ₂		ITRI TD-622	NH ₂	
TD-91	NO ₂		ITRI TD-617	NO ₂		TD-94	COOCH ₃	
TD-92	NO ₂		ITRI TD-618	NO ₂		TD-95	COOCH ₃	

【0039】 在本發明之另一目的，提供一種可經芳基胺取代的喹啉，係具有如式 I(d) 之結構：



其中 R⁶ 及 R⁷ 係為相同或不同各自獨立為可經取代的苯基和苯上有其他官能基之原子或基團、雜環芳香基，且該可經取代的苯基包含



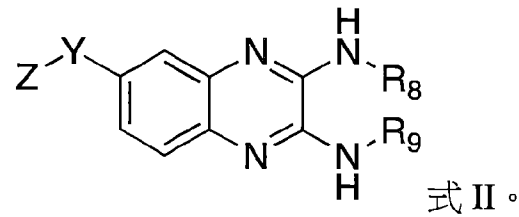
【0040】 在本發明之一實施例中，該式 I(d) 化合物如表四所列之化合物 ITRI TD-605、ITRI TD-612、ITRI TD-619、ITRI TD-625、ITRI TD-626、ITRI TD-628、ITRI TD-630、ITRI TD-631，但不限於此。

表四、式 I(d) 化合物

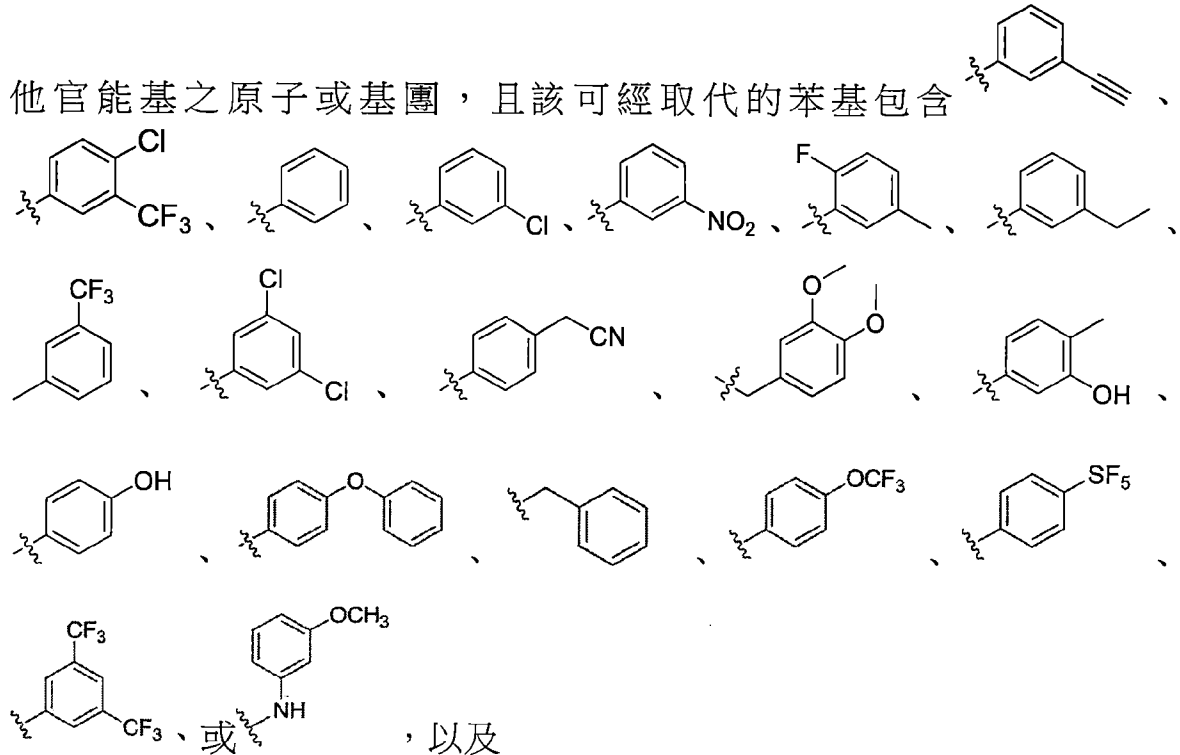
No.	R ⁶	R ⁷
ITRI TD-605		
ITRI TD-612		
ITRI TD-619		
ITRI TD-625		
ITRI TD-626		
ITRI TD-628		
ITRI TD-630		
ITRI TD-631		

【0041】 在本發明之另一目的，提供一種化合物，係具有如下式 II

之結構：

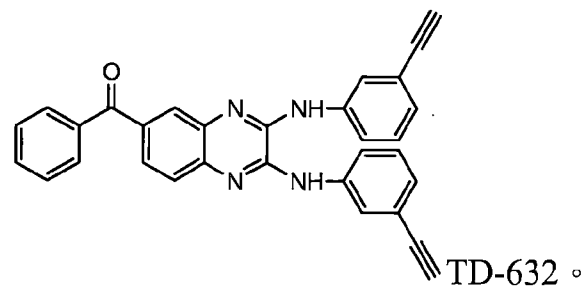


其中 R^8 及 R^9 係為相同或不同各自獨立為可經取代的苯基和苯上有其



其中 Y 為 CO 或 $(CH_2)_n$ ， $n=1-3$ ；Z= $COOR^{10}$ ，或具有取代官能基之苯環， R^{10} 為芳香基或烷基取代基。

【0042】 在本發明之一實施例中，該式 II 化合物如



【0043】 本發明之化合物經合成後可以色層分析法或結晶法或本領域中已知的任何其他適當的方法進一步純化。

【0044】 本發明提供一種醫藥組合物，包含一或多個上述之化合物以及一醫藥上可接受的載劑。本發明之醫藥組合物可用於阻礙蛋白質磷酸酶 2A(PP2A)與癌蛋白 SET 的結合，以增加 PP2A 在細胞內的生物活性，或用於治療以 PP2A 的不活化或癌蛋白 CIP2A 與 SET 過度表現為特徵之疾病或病症。此外，將任何上述之化合物用於增加 PP2A 在細胞內的表現量或癌蛋白 SET 拮抗劑，或用於治療如本文所述之以 PP2A 的表現量減少或 SET 過度表現為特徵之疾病或病症的用途，以及用於治療該等疾病的藥劑的製造也包含在本發明的範圍之內。

【0045】 本發明並提供一種增加 PP2A 或減少癌蛋白 SET 在細胞內的表現量或生物活性的方法，包含將該細胞與一有效量的本文所述之化合物或醫藥組合物接觸。本發明並進一步提供一種在需要 PP2A 的個體中治療以 PP2A 的不活化或 SET 過度表現為特徵之疾病或病症的方法，包含將本文所述之化合物或醫藥組合物以有效量投予至該個體。

【0046】 本發明之化合物可以被用於治療以 PP2A 的不活化或癌蛋白 SET 過度表現為特徵之疾病或病症。本發明之化合物可以單獨或以醫藥組合物的形式投予人類病患一劑量，該醫藥組合物係與適當的載劑或賦形劑混合，以治療或改善各種以 PP2A 的表現量減少或癌蛋白 SET 過度表現為特徵之病症。一因子(例如 PP2A)的表現量或生物活性的增加或減少可以藉由該因子的基因產物如蛋白質或 RNA 而容易地偵測到，在來自於一個體的檢體(例如自血液或活體組織而來)中使用本領域已知的檢測方法如酵素結合免疫吸附分析法(ELISA)、西方墨點分析法以及北方墨點分析法進行體外分析其 RNA 含量、表現蛋白及其類似物的結構及/或活性。根據本發明，以 PP2A 的不活化或癌蛋白 SET 及 CIP2A 過度表現為特徵之疾病或病症的具體實例包括，但不限於，癌症(例如肝癌、白血病、肺癌、乳癌、腎癌)及骨質疏鬆症。

【0047】 「治療」一詞包括該特定失調或病症的預防，或與一特定失調或病症有關的症狀的減輕及/或該症狀的預防或消除。

【0048】 具體而言，一「個體」係為一動物，如人類，但也可以是一寵物(例如，狗、貓及其類似物)、經濟動物(例如，牛、羊、豬、馬及其類

似物)或實驗用動物(例如，大鼠、小鼠、天竺鼠及其類似物)，該動物係需要如本文所述之治療。

【0049】 本文所述之「有效量」係指在一個體上達到治療效果所需要的活性劑的量，不論是單獨或與一種或多種其他活性劑組合使用。根據給藥途徑、賦形劑的使用，以及與其他活性劑共同使用等不同情況，在由本領域技術人員確認下，有效量各不相同。

【0050】 適合的給藥途徑可能包括如口服、直腸給藥、黏膜給藥、或腸道給藥；非經口傳輸，包括肌內、皮下、髓內注射，以及鞘內、直接心室內、靜脈、腹膜、鼻內或眼內注射，並可為補充或緩釋劑型。

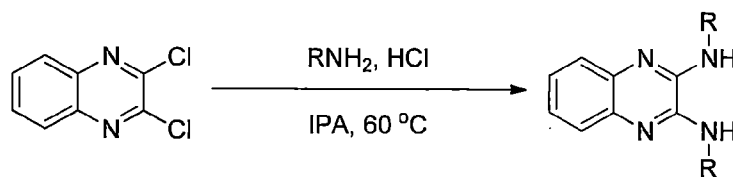
【0051】 本發明之醫藥組合物可以本領域已知之方式製造，例如，透過習用的混合、溶解、乳化、包埋、包封、或凍乾過程製造。因此，根據本發明所提供使用之醫藥組合物係可以常規的方式配製，使用一個或多個生理上可接受的載劑，包含賦形劑及/或助劑，以助於活性化合物的加工而形成醫藥上可使用的製劑。如本文所用，「可接受」係指該載劑必須與該組合物的活性成分相容(且較佳地，能夠穩定該活性成分)，且不會對受治療的個體有害。適當的劑型係取決於所選擇的給藥途徑。

【0052】 具體而言，針對注射給藥，本發明之化合物可以被配製於例如生理上相容的緩衝液內，如漢克緩衝液、林格氏緩衝液或生理食鹽緩衝液。針對口服給藥，本發明之化合物的配製可經由將該活性化合物與本領域已知的醫藥上可接受之載劑結合，如乳糖、蔗糖、甘露糖醇、山梨糖醇、玉米澱粉、小麥澱粉、米澱粉、馬鈴薯澱粉、明膠、黃耆膠、甲基纖維素、羥丙基甲基纖維素、羧甲基纖維素鈉，及/或聚乙烯吡咯烷酮(PVP，polyvinylpyrrolidone)，以使本發明之化合物可以配製為片劑、丸劑、糖衣丸、膠囊、液體、凝膠、糖漿、漿液、懸浮液及其類似物。針對吸入法給藥，本發明之化合物可被配製為自加壓容器或噴霧器噴出之氣霧噴霧，並搭配使用適當的推進劑，例如，二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它合適的氣體。

實施例 1 化學合成

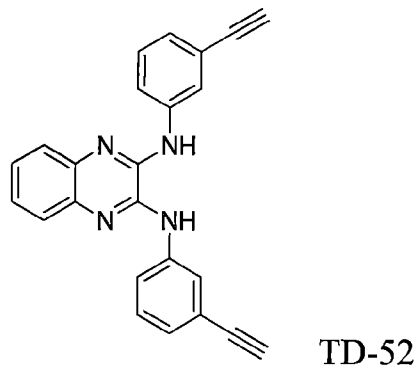
【0053】 具體而言，在以下所示的反應式提供了本發明某些化合物的合成方案 I 至 V。

1.1 合成方案 I



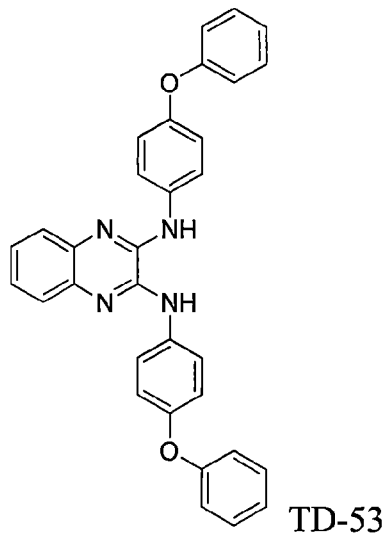
【0054】 本發明的化合物可以通過上述合成方案 I 製備得到，具體合成方案見實施例描述。在合成方案 1 中，先將 1 當量的 2,3-二氯喹喔啉 (2,3-dichloroquinoxaline) 及 2.3 當量的苯胺類似物加入至 3 至 5 mL 的異丙醇 (isopropyl alcohol) 中，隨後加入 2 滴濃 HCl。然後將混合物加熱至 60 °C 隔夜且產生白色或黃色固體。反應完成後，該反應的混合物以異丙醇沖洗，得到二個取代基的喹喔啉衍生物，該產物進一步使用乙酸乙酯/己烷經由正相色譜法進行純化，以得到 TD-52 至 TD-69 及 ITRI TD-627 等化合物。

1.1.1 N^2, N^3 - 雙 (3- 乙炔基 苯基) 喹 喔 啉 -2,3- 二 胺 (N^2, N^3 -bis(3-ethynylphenyl)quinoxaline-2,3-diamine) (TD-52)



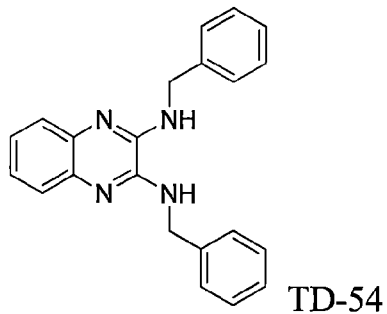
【0055】 ^1H NMR (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) δ 3.47 (s, 1H) 7.16 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.29-7.33 (m, 2H), 7.56 (dd, $J = 3.4, 6.4$ Hz, 1H), 7.84 (dd, $J = 8.0, 1.2$ Hz, 1H), 7.96 (s, 1H)。

1.1.2 N^2, N^3 - 雙 (4- 苯 氧 基 苯 基) 喹 喔 啉 -2,3- 二 胺 (N^2, N^3 -bis(4-phenoxyphenyl)quinoxaline-2,3-diamine) (TD-53)



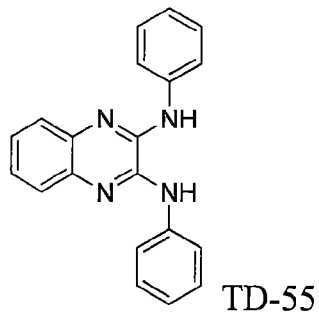
【0056】 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.02 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.08-7.13 (m, 3H), 7.32 (s, 1H), 7.38 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.53 (s, 1H), 7.92 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H)。

1.1.3 N^2, N^3 - 二苄基喹喔啉-2,3-二胺 (TD-54)
(N^2, N^3 -dibenzylquinoxaline-2,3-diamine) (TD-54)



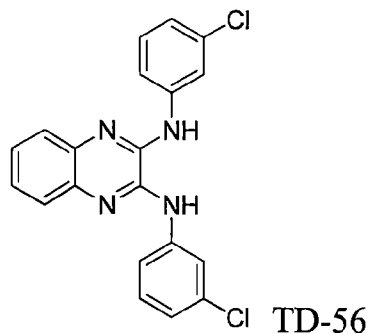
【0057】 ^1H NMR (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) δ 4.72 (s, 2H), 7.18-7.24 (m, 2H), 7.29 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.38 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.52 (dd, $J = 3.4, 6.4$ Hz, 1H)。

1.1.4 N^2, N^3 - 聯苯喹喔啉-2,3-二胺
(N^2, N^3 -diphenylquinoxaline-2,3-diamine) (TD-55)



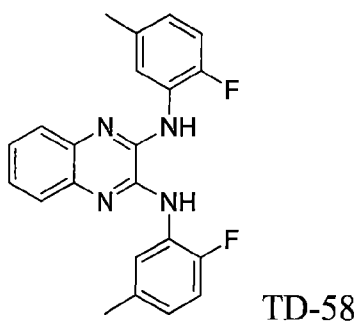
【0058】 ^1H NMR (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) δ 7.10 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.34 (dd, $J = 3.4, 6.4$ Hz, 1H), 7.39 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.58 (dd, $J = 3.4, 6.4$ Hz, 1H), 7.83 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H)。

1.1.5 N^2, N^3 - 雙 (3- 氯 苯 基) 喹 喔 啉 -2,3- 二 胺
(N^2, N^3 -bis(3-chlorophenyl)quinoxaline-2,3-diamine) (TD-56)



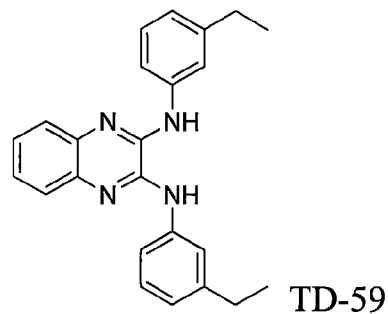
【0059】 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.14 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.38-7.43 (m, 2H), 7.60 (dd, $J = 3.2, 6.0$ Hz, 1H), 8.02 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.24 (s, 1H)。

1.1.6 N^2, N^3 - 雙 (2- 氟 -5- 甲 基 苯 基) 喹 喔 啉 -2,3- 二 胺
(N^2, N^3 -bis(2-fluoro-5-methylphenyl)quinoxaline-2,3-diamine)
(TD-58)



【0060】 ^1H NMR (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) δ 2.42 (s, 3H), 7.23 (s, 1H), 7.25 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.43 (dd, $J = 3.4, 6.4$ Hz, 1H), 7.51 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.61 (dd, $J = 3.4, 6.4$ Hz, 1H)。

1.1.7 N^2, N^3 - 雙 (3- 苯 乙 醚) 喹 喔 啉 -2,3- 二 胺
(N^2, N^3 -bis(3-ethylphenyl)quinoxaline-2,3-diamine) (TD-59)

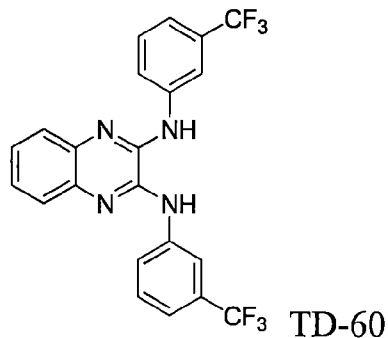


【0061】 ^1H NMR (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) δ 1.23 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H), 2.61 (q, $J = 7.6$ Hz, 2H), 6.86 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.21 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.54-7.56 (m, 2H), 7.62 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H)。

1.1.8 N^2, N^3 -雙(3-(三氟甲基)苯基) 喹喔啉-2,3 二胺

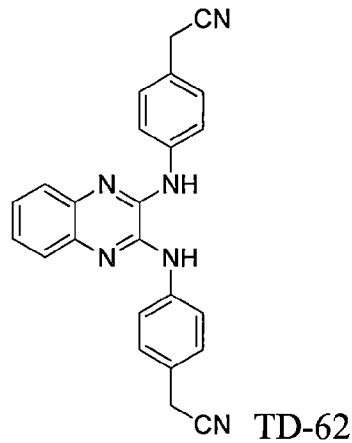
(N^2, N^3 -bis(3-(trifluoromethyl)phenyl)quinoxaline-2,3-diamine)

(TD-60)



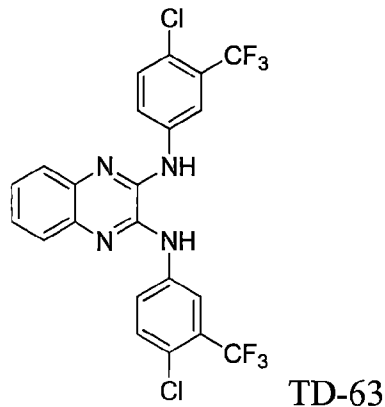
【0062】 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.40 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.58 (dd, $J = 3.6, 5.6$ Hz, 1H), 7.62 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.19 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.34 (s, 1H), 9.33 (s, 1H)。

**1.1.9 2,2'-((喹喔啉-2,3-亞基雙(脲二基))雙(4,1-苯二胺))乙腈
(2,2'-((quinoxaline-2,3-diylbis(azanediyl))bis(4,1-phenylene))diacetonitrile) (TD-62)**



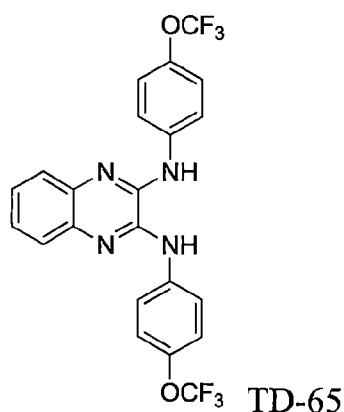
【0063】 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 4.03 (s, 2H), 7.35-7.39 (m, 3H), 7.58 (dd, $J = 3.4, 6.4$ Hz, 1H), 7.99 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H)。

1.1.10 N^2, N^3 - 雙 (4- 氯 -3-(三 氟 甲 基) 苯 基) 喹 喔 啉 -2,3- 二 胺
(N^2, N^3 -bis(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)quinoxaline-2,3-diamin
e) (TD-63)



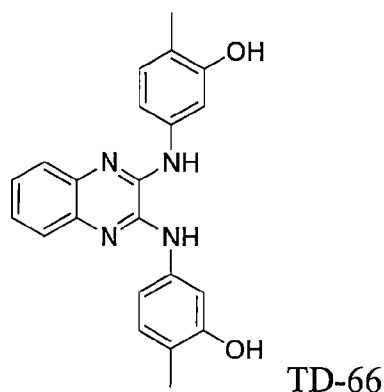
【0064】 ^1H NMR (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) δ 7.28 (dd, $J = 3.6, 6.0$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.48 (dd, $J = 3.4, 6.4$ Hz, 1H), 8.03 (dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz, 1H), 8.34 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H)。

1.1.11 N^2, N^3 - 雙 (4-(三 氟 甲 氧 基) 苯 基) 喹 喔 啉 -2,3- 二 胺
(N^2, N^3 -bis(4-(trifluoromethoxy)phenyl)quinoxaline-2,3-diamine)
(TD-65)



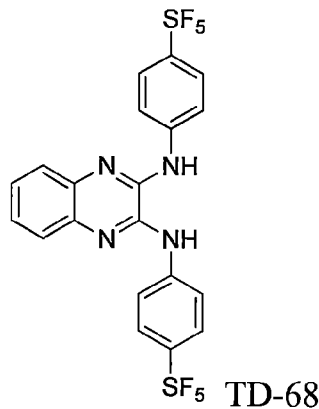
【0065】 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) δ 7.26 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.32 (dd, $J = 3.2, 6.0$ Hz, 1H), 7.57 (dd, $J = 3.2, 6.0$ Hz, 1H), 7.90 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H)。

1.1.12 5,5'-(喹啶啉-2,3-亞基雙(脲二基)雙(2-甲基苯酚))(5,5'-(quinoxaline-2,3-diylbis(azanediyl))bis(2-methylphenol))(TD-66)



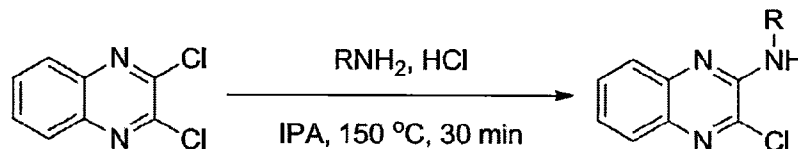
【0066】 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) δ 2.24 (s, 3H), 7.03 (dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, 1H), 7.21 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.44 (dd, $J = 3.4, 6.0$ Hz, 1H), 7.67 (dd, $J = 3.4, 6.0$ Hz, 1H)。

1.1.13 N^2, N^3 -雙(4-(五氟硫基)苯基)喹啶啉-2,3-二胺(N^2, N^3 -bis(4-(Pentafluorothio)phenyl)quinoxaline-2,3-diamine)(TD-68)



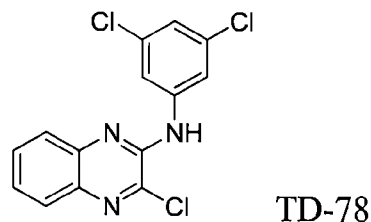
【0067】 ^1H NMR (400 MHz, MeOH- d_4) δ 7.41 (dd, $J = 3.6, 6.0$ Hz, 1H), 7.67 (dd, $J = 3.4, 6.4$ Hz, 1H), 7.79 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 8.03 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H)。

1.2 合成方案 II



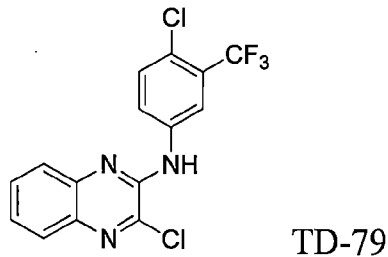
【0068】 本發明的化合物可以通過上述合成方案 II 製備得到，具體合成方案見實施例描述。在合成方案 II 中，先將 1 當量的 2,3-二氯喹喔啉 (2,3-dichloroquinoxaline) 及 1 當量的苯胺類似物加入至 3 至 5 mL 的異丙醇中，隨後加入 1 滴濃 HCl。然後將混合物經由微波爐加熱至 150 °C 30 分鐘。反應完成後，將該反應混合物以異丙醇(IPA)過濾以產生白色固體，該反應的混合物以異丙醇沖洗，該產物使用醚或乙酸乙酯沖洗以得單一取代的喹喔啉衍生物，其係為 TD-70 至 TD-82 等化合物。

1.2.1 3-氯-N-(3,5-二氯苯基)喹喔啉-2-胺 (3-chloro-N-(3,5-dichlorophenyl)quinoxalin-2-amine) (TD-78)



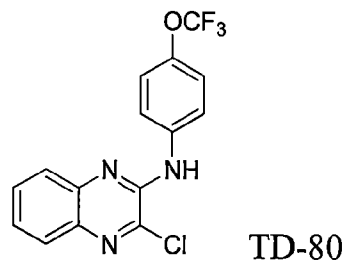
【0069】 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.20-7.28 (m, 4H), 7.52 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.35 (s, 2H), 9.82 (s, 1H)。

1.2.2 3-氯-N-(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)喹啉-2-胺
(3-chloro-N-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)quinoxalin-2-amine)
(TD-79)



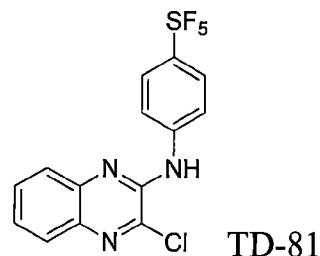
【0070】 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.21-7.26 (m, 3H), 7.47 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 8.47 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 8.89 (s, 1H), 9.97 (s, 1H)。

1.2.3 3-氯-N-(4-(三氟甲氧基)苯基)喹啉-2-胺
(3-chloro-N-(4-(trifluoromethoxy)phenyl)quinoxalin-2-amine)
(TD-80)



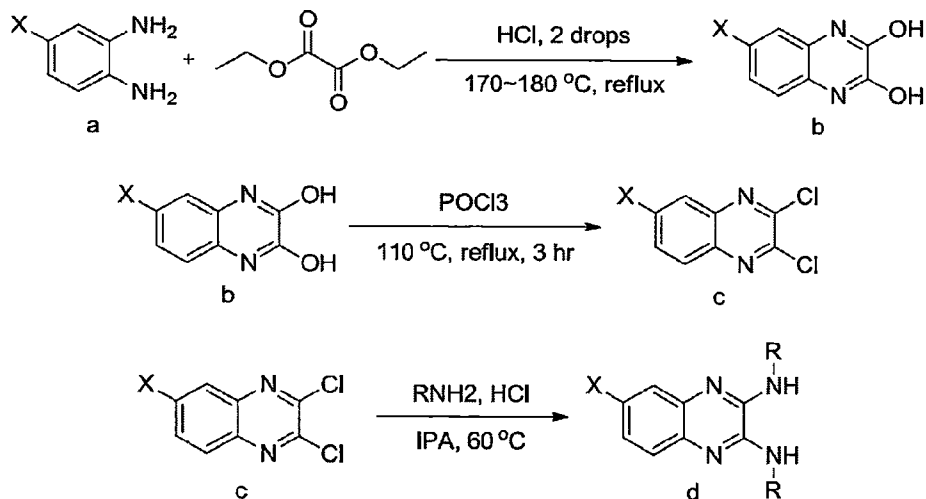
【0071】 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.19-7.20 (m, 3H), 7.34 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.50 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.28 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 9.65 (s, 1H)。

1.2.4 3-氯-N-(4-(五氟硫基)苯基)喹啉-2-胺
(3-chloro-N-(4-(Pentafluorothio)phenyl)quinoxalin-2-amine)
(TD-81)



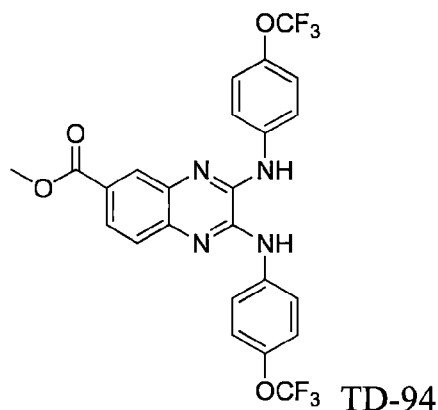
【0072】 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.22-7.27 (m, 3H), 7.54 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.84 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 8.38 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 9.90 (s, 1H)。

1.3 合成方案 III



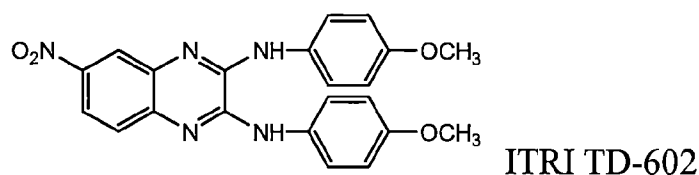
【0073】本發明的化合物可以通過上述合成方案 III 製備得到，具體合成方案見實施例描述。在合成方案 III 中，先將 4 個位置有修飾的苯二胺 a 溶解在 2 mL 的濃 HCl 並加熱至 180 °C 隔夜，該混合物以水過濾並乾燥後獲得沉澱的中間產物 b。然後將該中間產物 b 溶解至 POCl₃ 並加熱至 110 °C 3 小時。反應混合物降溫至室溫之後，將其倒入冰水中產生沉澱物，將該沉澱物以烤箱烘乾以獲得中間產物 c。將苯胺及中間產物 c 溶解在 IPA 中，隨後加入 2 滴濃 HCl，然後將混合物加熱至 60 °C 隔夜。將該混合物以 IPA 過濾以產生沉澱物，將該沉澱物進一步使用色譜法進行純化，以得到 TD-83 至 TD-95、ITRI TD-602 至 ITRI TD-604、ITRI TD-607、ITRI TD-608、ITRI TD-613 至 ITRI TD-618、ITRI TD-620 至 ITRI TD-624、ITRI TD-629 等化合物。

1.3.1 甲基 2,3-雙((4-(三氟甲氧基)苯基)胺基)喹啶啉-6-羧酸(methyl 2,3-bis((4-(trifluoromethoxy)phenyl)amino)quinoxaline-6-carboxylate) (TD-94)



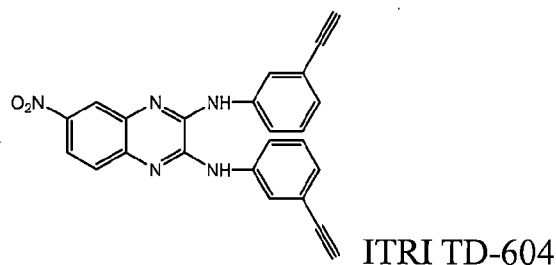
【0074】 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 3.84 (s, 3H), 7.38 (dd, $J = 4.4, 8.0$ Hz, 4H), 7.56 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.83 (dd, $J = 8.6, 1.6$ Hz, 1H), 8.10 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 8.18 (t, $J = 8.8$ Hz, 4H)。

1.3.2 N^2, N^3 - 雙 (4- 甲 氧 苯 基)-6- 硝 基 喹 喔 啉 -2,3- 二 胺
(N^2, N^3 -bis(4-methoxyphenyl)-6-nitroquinoxaline-2,3-diamine)(ITRI
TD-602)



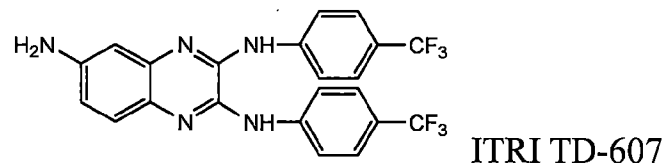
【0075】 ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 3.79 (s, 6H), 7.00 (dd, 4H), 7.56 (d, 1H), 7.89 (dd, 4H), 8.03 (d, 1H), 8.23 (s, 1H), 10.0 (b, 2H)。

1.3.3 N^2, N^3 -bis(3- 乙 炔 基 苯 基)-6- 硝 基 喹 喔 啉 -2,3- 二 胺
(N^2, N^3 -bis(3-ethynylphenyl)-6-nitroquinoxaline-2,3-diamine) (ITRI
TD-604)

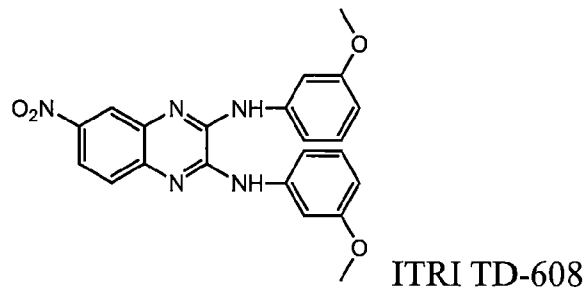


【0076】 ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 4.19 (s, 1H), 4.20 (s, 1H), 7.23 (dd, 2H), 7.42 (m, 3H), 7.64 (d, 1H), 8.11 (b, 4H), 8.23 (s, 1H), 10.1 (b, 2H)。

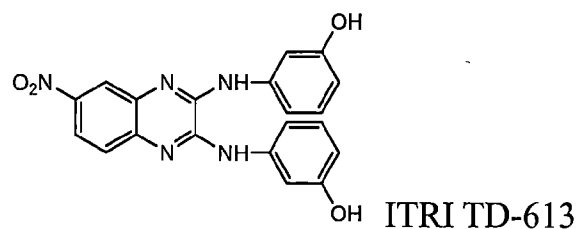
1.3.4 N^2, N^3 - 雙 (4- 三 氟 甲 基) 苯 基) 喹 喔 啉 -2,3,6- 三 胺

(N²,N³-bis(4-(trifluoromethyl)phenyl)quinoxaline-2,3,6-triamine)**(ITRI TD-607)**

【0077】 ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 7.71 (d, 1H), 7.77 (m, H), 8.1(m, 5H), 9.66 (s, 1H), 9.80 (s,1H)。

1.3.5 N²,N³- 雙 (3- 甲 氧 苯 基)-6- 硝 基 喹 喔 啉 -2,3- 二 胺**(N²,N³-bis(3-methoxyphenyl)-6-nitroquinoxaline-2,3-diamine)(ITRI TD-608)**

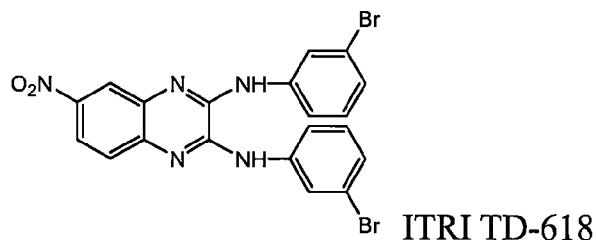
【0078】 ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 3.98 (s,3H), 3.97(s, 3H), 6.68 (dd, 2H), 7.27 (t, 2H), 7.43 (d, 1H), 7.44 (d, 1H), 7.61 (s,1H), 7.62(m, 2H), 8.05(d, 1H), 8.25(s, 1H), 9.28(s, 1 H), 9.35,(s, 1H)。

1.3.6 3-(2-(3- 氫 氧 苯 胺)-6- 硝 基 喹 喔 啉 -3- 基 胺 基) 苯 酚**(3-(2-(3-hydroxyphenylamino)-6-nitroquinoxalin-3-ylamino)phenol)****(ITRI TD-613)**

【0079】 ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 6.68 (dd, 2H), 7.09 (m, 2H), 7.18 (m, 2H), 7.58 (d, 1H), 7.61 (d,1H), 7.70(d, 1H), 8.10(d, 1H), 8.31(s, 1 H), 9.60-10.1,(b, 4H)。

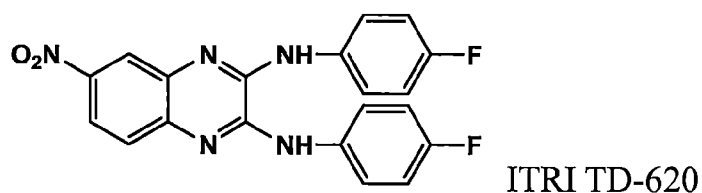
1.3.7 N²,N³- 雙 (3- 溴 苯)-6- 硝 基 喹 喔 啉 -2,3- 二 胺

(N²,N³-bis(3-bromophenyl)-6-nitroquinoxaline-2,3-diamine) (ITRI TD-618)



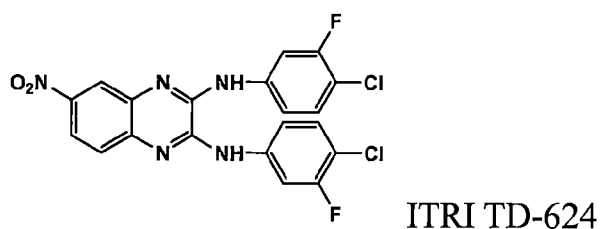
【0080】 ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 7.00 (dd, 1H), 7.19 (m, 2H), 7.30 (m, 1H), 7.58 (d, 1H), 7.39 (dd, 2H), 7.62(d, 1H), 8.05(m, 3H), 8.38(s, 1 H), 10.2-10.6,(b, 2H)。

1.3.8 N²,N³- 雙 (4- 氟 苯 基)-6- 硝 基 喹 喔 啉 -2,3- 二 胺 (N²,N³-bis(4-fluorophenyl)-6-nitroquinoxaline-2,3-diamine) (ITRI TD-620)



【0081】 ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 7.25 (m, 4H), 7.59 (d, 1H), 7.88 (m, 4H), 8.06 (d, 1H), 8.26 (s, 1H), 9.34(s, 1H), 9.51(s, 1H)。

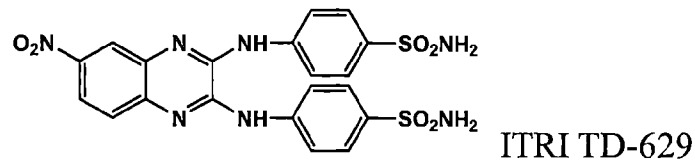
1.3.9 N²,N³- 雙 (4- 氯 -3- 氟 苯 基)-6- 硝 基 喹 喔 啉 -2,3- 二 胺 (N²,N³-bis(4-chloro-3-fluorophenyl)-6-nitroquinoxaline-2,3-diamine) (ITRI TD-624)



【0082】 ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 7.41 (dd, 2H), 7.68 (m, 3H), 7.95 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 8.10 (d, 1H), 8.30(s, 1H), 10.0(b, 2H)。

1.3.10 N²,N³- 雙 (4- 苯 磺 醯 胺)-6- 硝 基 喹 喔 啉 -2,3- 二 胺 (N²,N³-bis(4-phenylsulfonamide)-6-nitroquinoxaline-2,3-diamine)(IT

RI TD-629)

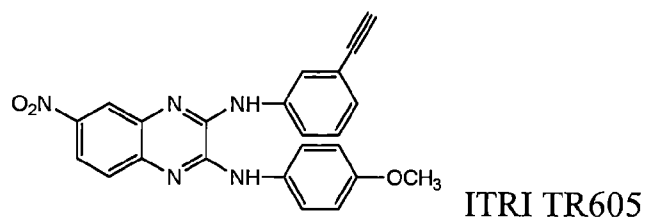


【0083】 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7.29 (b, 4H), 7.74 (d, 1H), 7.88 (d, 4H), 8.20 (m, 5H), 8.42 (s, 1H), 10.14(s, 1H), 10.30(b, 1H)。

1.4 合成方案 IV

【0084】 本發明的化合物可以通過上述合成方案 IV 製備得到，具體合成方案見實施例描述。在合成方案 IV 先分別將 1 當量的 4-(2-氯-7-硝基喹啶啉-3-基胺基)苯酚(4-(2-chloro-7-nitroquinoxalin-3-ylamino)phenol)、3-氯-N-(4-甲氧基)-6-硝基喹啶啉-2-胺 (3-chloro-N-(4-methoxyphenyl)-6-nitroquinoxalin-2-amine)、4-(2-氯-7-硝基喹啶啉-3-基胺基)-3-甲基苯酚(4-(2-chloro-7-nitroquinoxalin-3-ylamino)-3-methylphenol)或 3-氯-N-(5-甲基-1H-吡唑-3-基)-6-硝基喹啶啉-2-胺 (3-chloro-N-(5-methyl-1H-pyrazol-3-yl)-6-nitroquinoxalin-2-amine)與 1.2 當量的苯胺化合物加入 3 至 5 mL 的 DMF，隨後加熱至 110 °C 3 小時。反應完成後，將該反應混合物加水並以乙酸乙酯萃取，將乙酸乙酯經水洗、乾燥後減壓抽乾，得到粗產物。將粗產物進一步使用乙酸乙酯/己烷經由正相色譜法進行純化可分別得到 ITRI TD-605、ITRI TD-612、ITRI TD-619、ITRI TD-625、ITRI TD-626、ITRI TD-628、ITRI TD-630、ITRI TD-631 等化合物。

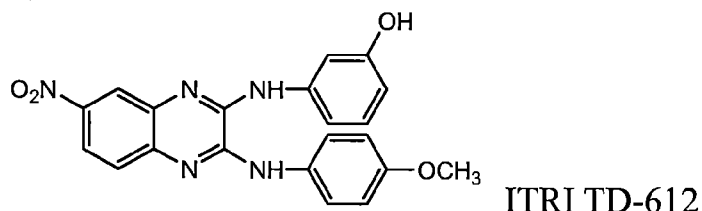
1.4.1 N^3 -(3-乙炔基苯基)- N^2 -(4-甲氧基苯基)-6-硝基喹啶啉-2,3-二胺 (N^3 -(3-ethynylphenyl)- N^2 -(4-methoxyphenyl)-6-nitroquinoxaline-2,3-diamine) (ITRI TR-605)



【0085】 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 3.78(s, 3H), 4.21(s, 1H),

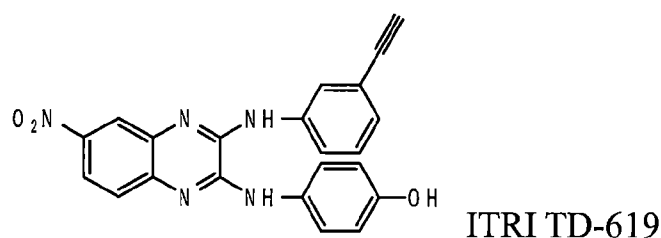
7.00 (d, 2H), 7.21 (d, 1H), 7.42 (t, 1H), 7.59(d, 1H), 8.01 (dd, 2H), 8.02(d, 2H), 8.07(d, 1H), 8.26(s, 1H), 9.34(s, 1H), 9.41(s, 1H)。

**1.4.2 3-(2-(4-甲氧基苯基胺)-6-硝基喹啶啉-3-基胺基)苯酚
(3-(2-(4-methoxyphenylamino)-6-nitroquinoxalin-3-ylamino)phenol)
(ITRI TD-612)**



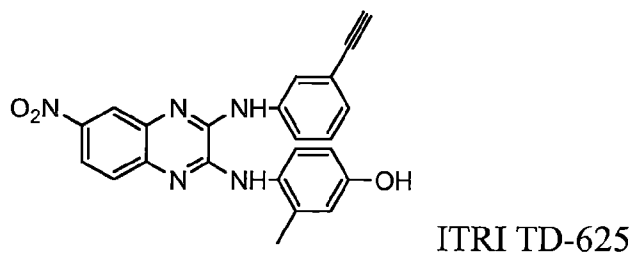
【0086】 ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 3.78(s, 3H), 6.51(d, 1H), 7.02 (dd, 2H), 7.17 (t, 1H), 7.24 (d, 1H), 7.56(d, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.77(dd, 2H), 8.06(d, 1H), 8.30(s, 1H), 9.16(s, 1H), 9.45(s, 1H), 9.47(s, 1H)。

**1.4.3 4-(2-(3-乙炔基苯基胺)-7-硝基喹啶啉-3-基胺基)苯酚
(4-(2-(3-ethynylphenylamino)-7-nitroquinoxalin-3-ylamino)phenol)
(ITRI TD-619)**



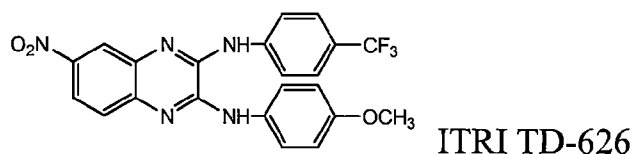
【0087】 ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 4.19(s, 1H), 6.81(dd, 2H), 7.20 (d, 1H), 7.22 (t, 1H), 7.54 (d, 1H), 7.60(dd, 2H), 8.00 (d, 2H), 8.05(d, 1H), 8.23(s, 1H), 9.31(b, 2H), 9.39(b, 1H)。

**1.4.4 4-(2-(3-乙炔基苯基胺)-7-硝基喹啶啉-3-基胺基)-3-甲基苯酚
(4-(2-(3-ethynylphenylamino)-7-nitroquinoxalin-3-ylamino)-3-methyl
phenol) (ITRI TD-625)**



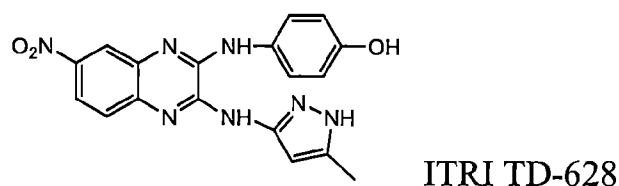
【0088】 ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 2.05(s, 3H), 4.21(s, 1H), 6.65(d, 1H), 6.67 (s, 1H), 7.13 (d, 1H), 7.21(d, 1H), 7.42 (m, 2H), 8.05(d, 1H), 8.05(m, 2H), 8.26(s, 1H), 9.10(s, 1H), 9.25(s, 1H), 9.39(s, 1H)。

1.4.5 N^3 -(4-(三氟甲基)苯基)- N^2 -(4-甲氧基苯基)-6-硝基喹啶啉-2,3-二胺 (N^3 -(4-(trifluoromethyl)phenyl)- N^2 -(4-methoxyphenyl)-6-nitroquinoxaline-2,3-diamine) (ITRI TD-626)



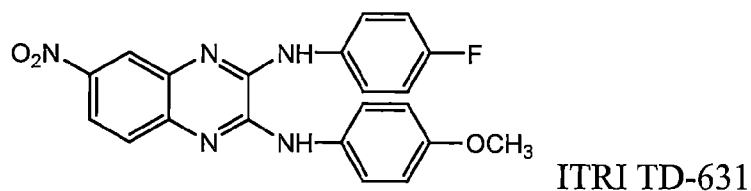
【0089】 ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 3.89(s, 3H), 7.00(d, 2H), 7.59 (d, 1H), 7.77 (m, 4H), 8.11(d, 1H), 8.17 (d, 2H), 8.36(s, 1H), 9.47(s, 1H), 9.56(s, 1H)。

1.4.6 4-(2-(5-甲基-1H-吡唑-3-基胺基)-6-硝基喹啶啉-3-基胺基)苯酚 (4-(2-(5-methyl-1H-pyrazol-3-ylamino)-6-nitroquinoxalin-3-ylamino)phenol) (ITRI TD-628)



【0090】 ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 2.28(s, 3H), 6.80(d, 2H), 6.88 (s, 1H), 7.64 (d, 1H), 7.65(d, 2H), 8.03 (d, 1H), 8.21(s, 1H), 9.28(s, 1H), 9.30(s, 1H), 10.2(s, 1H)。

1.4.7 N^3 -(4-氟苯基)- N^2 -(4-甲氧基苯基)-6-硝基喹啶啉-2,3-二胺 (N^3 -(4-fluorophenyl)- N^2 -(4-methoxyphenyl)-6-nitroquinoxaline-2,3-diamine) (ITRI TD-631)



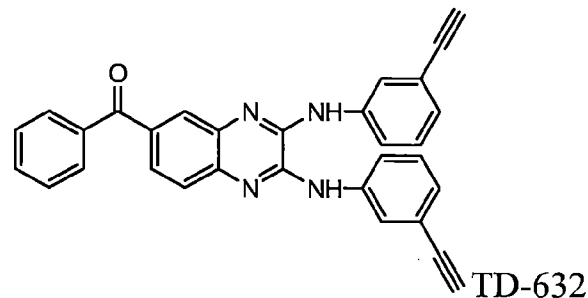
【0091】 ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 3.78(s, 3H), 7.00(d, 2H),

7.26 (t, 2H), 7.57 (d, 1H), 7.93(d, 2H), 7.92 (dd, 2H), 8.07(d, 1H), 8.25(s, 1H), 9.31(s, 1H), 9.40(s, 1H)。

1.5 合成方案 V

【0092】 本發明的化合物可以通過上述合成方案 V 製備得到，在合成方案 V 中；先將 1 當量的 (2,3- 二氯喹啶啉-6-基)(苯基)甲酮 ((2,3-dichloroquinoxalin-6-yl)(phenyl)methanone)與 1.2 當量的 3-乙炔基苯胺 (3-ethynylbenzenamine)於 IPA 中加熱迴流 5 小時後冷卻，將析出的固體再以 IPA 洗滌，所得固體經烘乾可得到產物 TD-632 (式 II)。

1.5.1 2,3- 雙 (3- 乙炔 苯 基 胺) 喹 啶 啉 -6- 基)(苯 基) 甲 酮 (2,3-bis(3-ethynylphenylamino)quinoxalin-6-yl)(phenyl)methanone (TD-632)



【0093】 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) 4.2 (s,1H), 4.1(s,1H).7.24 (d, 1H), 7.25 (d, 1H),7.56 (d, 2H), 7.40 (m ,2H), 7.6 (m, 3H), 7.64 (m 3H) ,7.79 (m 2H) 7.82 (s 1H),8.15(b,2H) ,9.25(b,2H)。

實施例 2 生物活性檢測

2.1 材料與方法

2.1.1 試劑與抗體

【0094】 索拉非尼 (Sorafenib)(蕾 莎 瓦 膜 衣 錠)、 埃 羅 替 尼 (Erlotinib)(得舒緩膜衣錠)紫杉醇(Paclitaxel)係分別由由拜耳製藥公司(Bayer Pharmaceuticals)(西哈芬，康乃迪克州)及羅氏大藥廠 (Roche Pharmaceuticals)(巴賽爾，瑞士)提供。黑海棉酸(okadaic acid, OA)購自開曼化學公司(Cayman Chemical)(安娜堡，密西根州)以及 z-VAD-fmk 購自西格瑪(Sigma)(聖路易、蜜蘇里州)。關於活體外(*in vitro*)實驗，各種藥物皆溶解

於二甲基亞砷(DMSO)中，並細胞培養在含有 5%胎牛血清(FBS)的 DMEM 杜氏改良 Eagle 培養基(dulbecco's modified eagle's medium)或 RPMI(Roswell Park Memorial Institute) 培養基中。

【0095】 關於活體內(*in vitro*)實驗，加入至培養基後最後 DMSO 的濃度係為 0.1 %。免疫墨點分析所用的抗體，如抗-CIP2A、抗-Akt1、抗-PAPP、anti-PP2A-C、抗-PP2A-A、抗-PP2A-B55 及抗-Elk-1 均購自聖克魯斯生物技術公司(Santa Cruz Biotechnology)(聖地牙哥，加州)。其他抗體，如抗-半胱氨酸蛋白酶-3(anti-caspase-3)及抗-P-Akt(Ser473)均來自細胞信號轉導公司(Cell Signaling)(丹弗斯，麻州)。

2.1.2 細胞培養

【0096】 Sk-Hep1、PLC/PRF/5(PLC)及 Hep3B 細胞株則獲自美國典型培養物保藏中心(American Type Culture Collection)(馬那薩斯，維吉尼亞州)。Huh-7 肝癌細胞株係獲自健康科學研究資源庫(Health Science Research Resources Bank)(大阪，日本；JCRB0403)。上述細胞維持在含有 10%胎牛血清的 DMEM 培養液中，置於 37 °C 含有 5%二氧化碳的加濕培養箱中。其他的細胞株，包括非小細胞肺癌細胞株 H358、H460 及 A549 以及人類鱗癌細胞 NCI-1703、H2170、H520、SW900 及 NCI-H226 均獲自美國典型培養物保藏中心(American Type Culture Collection)(馬那薩斯，維吉尼亞州)等亦提供給如下所述細胞檢測使用。

2.1.3 細胞凋亡分析

【0097】 在以 DMSO、索拉非尼、本發明之埃羅替尼衍生物處理後，使用流式細胞儀(sub-G1)對凋亡的細胞進行計量。使用膜聯蛋白-V/碘化丙啶(propidium iodide, PI)雙重染色法檢測細胞凋亡及壞死的數量。上述兩種分析方式，本發明之埃羅替尼衍生物處理後將 HCC 細胞收成，在與 PI 單獨培養以作為 sub-G1 分析使用，以及與膜聯蛋白-V-FITC 組合培養。以流式細胞儀進行細胞組合物的分析；經由半胱氨酸蛋白酶以及剪切的 PAPP 以西方墨點分析評估本發明之埃羅替尼衍生物誘導細胞死亡效果；以細胞質組蛋白相關的 DNA 片段化的酵素結合免疫吸附分析法(ELISA)檢測細胞死亡(羅氏，印第安納波利斯，印第安納州)。經由西方墨點分析及流式細胞

儀評估以本發明之埃羅替尼衍生物及 z-VAD-fmk、半胱氨酸蛋白酶共處理的效果。

2.1.4 西方墨點分析法

【0098】 細胞與半胱氨酸蛋白酶-3、PAPP、P-Akt、Akt、CIP2A 等處理一段時間後細胞裂解物以西方墨點分析法分析。

2.1.5 使用 siRNA 進行基因剔除

【0099】 Smart-pool siRNA，包括對照組(D-001810-10)以及 PP2A-C(L-001810-10)，均購自 Dharmacon 公司(芝加哥，伊利諾州)。11121-11133)。依據製造商的操作手冊，在六孔盤內使用 Dharma-FECT4 轉染液(Dharmacon 公司)以 siRNA(最後濃度 100 nM)進行細胞第一次轉染 48 小時，之後替換為培養液，再將細胞以本發明之埃羅替尼衍生物(2 μ M，48 小時)，然後收成細胞以進行西方墨點分析法及流式細胞儀的細胞凋亡分析。

2.1.6 過渡性轉染(Transient transfection)

【0100】 CIP2A cDNA(KIAA1524)及 Elk-1 cDNA 購自 Origene 公司(RC219918 及 RG208921；羅克維爾，馬利蘭州)。進行轉染 48 小時之後，細胞以本發明之埃羅替尼衍生物處理一段時間後接者收成以進一步分析。

2.1.7 PP2A 磷酸酶活性

【0101】 使用孔雀石綠磷酸鹽複合物分析 (malachite green-phosphate complex assay)(upstate 生物科技公司，普萊西德湖，紐約州)量測從蘇胺酸磷酸肽產生游離的磷酸鹽以確定在每一個細胞裂解物的蛋白磷酸酶活性。先在低洗滌劑裂解緩衝液(low-detergent lysis buffer)中製備 HCC 細胞裂解液，在含有 750 μ M 磷酸肽受質的 PP2A-特定反應緩衝液(密理博公司，比爾里卡，麻州)中進行磷酸酶分析。在 30 °C 培養 10 分鐘後，加入孔雀石染劑且在 650 nm 下經由光密度量測游離的磷酸鹽。為避免樣本之間免疫沉澱蛋白質數量的差異而導致差異，磷酸酶活性以每個處理群組皆經過免疫印跡檢測及定量的 PP2A 免疫沉澱數量標準化。

2.1.8 建構螢光酶報導子分析 CIP2A 啟動子及 5'端檢測

【0102】 依據上述研究的 PLC5 細胞的基因組 DNA 含有外顯子 1(-2000 bp 至-1 bp)的 CIP2A 啟動子上游區域以 PCR 進行擴增，以及選殖至

報導子載體，Frie-fly 載體(pGL4.17)經由 *KpnI* 及 *Bg/II* 限制酶切割，PCR 擴增的引子區域-1000/-1、-400/-1、-300/-1、-150/-1、-110/-1 選殖至 pGL4 載體 *KpnI* 及 *Bg/II* 限制酶切割位置，經由定序確認選殖的核苷酸序列。

2.1.9 染色質免疫沈澱技術 (chromatin immunoprecipitation assay, ChIP) 分析

【0103】 Chip 試劑組購買自 Novus 生物公司(NBP1-71709，利特爾頓，科羅拉多州)。以 1×10^7 個 PLC5 細胞數進行 ChIP，該細胞以本發明之埃羅替尼衍生物處理 16 小時，以 37% 甲醛 v/v(Sigma 公司，F1635)在 1% 最終濃度達到 1%，在室溫下 DNA 結合蛋白與 DNA 交聯 10 分鐘。交聯後，該細胞以含有蛋白酶抑制劑混合物(Cocktail)的 1 倍冰 PBS 清洗兩次，收集細胞以 $800 \times g$ 離心 5 分鐘，以 400 μ l 含有蛋白酶抑制劑混合物(Cocktail)的裂解緩衝液再懸浮。然後該細胞以六次脈衝超聲波處理，每個脈衝 50% 輸出 15 秒，每個脈衝之間休息 60 秒。在 4 °C 下將細胞裂解物以 $12500 \times g$ 離心 5 分鐘，加入 Elk1 或兔子 IgG 抗體最為陰性對照組進行免疫沉澱，在 4 °C 下該免疫複合物以 25 μ l 蛋白質 A/G 磁珠處理進行沉澱反應 1 小時。使用 400 μ l 洗脫緩衝液將蛋白質-DNA 複合物從磁珠沖洗出來，在 95 °C 下蛋白質-DNA 的交聯經由 8 μ l 5M 的 NaCl 去交聯 15 分鐘。利用自旋管柱(spin column)純化 DNA，取 2 μ l DNA 進行半定量 PCR 反應擴增 CIP2A 啟動子區域(-139/-16 bp)。

2.1.10 異體移植(xenograft)腫瘤的生長

【0104】 雄性 NCr 無胸腺裸鼠(5-7 週齡)係自國家實驗動物中心(National Laboratory Animal Center)(台北，台灣)而來。所有使用這些小鼠進行的實驗程序，皆按照國立臺灣大學批准的實驗操作程序。當 1×10^6 個 PLC5 或 A549 細胞數懸浮在含有 Matrigel(基底膜基質，BD 生物科技，貝德福爾，馬薩諸塞州)不含血清的培養基中。當小鼠腫瘤達到 100-150 mm^3 ，對小鼠進行口服灌胃給予實驗預定之治療，如每天每公斤 10 mg 索拉非尼、本發明之埃羅替尼衍生物或控制組 4 周。

2.1.11 免疫組織化學染色法

【0105】 石蠟包埋的 HCC 組織切片(4 mm)在聚-L-賴氨酸包被玻

片(poly-1-lysine-coated slides)上去包埋，以 10 mM Tris-HCl (pH7.4)及 150 mM 氯化鈉沖洗，過氧化氫酶以甲醇及 3%過氧化氫抑制(quenched)，然後在 100 °C 下加壓加熱室內將玻片放置於 10 mM 檸檬酸鹽緩衝液(pH 6.0)20 分鐘。以 1:200 稀釋的 p-Akt1/2/3(Thr 308)-抗體(ab8805, abcam 公司, 劍橋)以及以 1:100 稀釋的 CIP2A 抗體(ab84547, abcam 公司, 劍橋)在室溫下處理 1 小時，玻片以 PBD 完全地清洗三次。使用 EnVision 過氧化氫酶檢測系統/DAB 兔子/小鼠試劑組(Dako 公司, 格洛斯楚普)檢測已結合的抗體，然後該玻片以蘇木精(hematoxylin)反染色。小鼠石蠟包埋切片腎組織和人類結腸癌分別作為 p-Akt1/2/3 及 CIP-2A 的陽性對照組。陰性對照組以 PBS 取代初級抗體。經由認證的病理學家基於半定量的染色強度評估 p-Akt1/2/3 及 CIP-2A 的表現，染色強度的評分為負、弱、中等及強。

2.2.12 表面等離子共振(Surface plasmon resonance)

【0106】 本發明分析全長 SET 及截斷 SET 結合至 PP2Ac(PP2A 的催化區)的結合親和力以及本發明之埃羅替尼衍生物干擾 SET 及 PP2Ac 的效果。PP2Ac-GST 重組蛋白結合至具有 GST 捕捉抗體的 CM5 晶片，經由注射不同濃度本發明之埃羅替尼衍生物與固定濃度的 SET 組合蛋白質，或在固定劑量本發明之埃羅替尼衍生物不同濃度的截斷 SET 蛋白質所產生的傳感圖(sensogram)。PP2Ac-GST 重組蛋白購自亞諾法生技公司(H00005515, Abnova 公司, 台灣)以及 SET-His 重組蛋白購自 Genway 公司(GWB-ATG319)。

2.2.13 統計分析

【0107】 腫瘤生長數據為平均腫瘤體積±S.E.並與獨立樣本 *t*-檢驗進行比較，臨床樣本以 X^2 -檢驗進行比較。在雙尾檢驗 *P* 值 < 0.05 視為顯著意義。所有統計分析採用在支援 Windows 軟體的 SPSS 軟體計算(第 17.0 版, SPSS 公司, 芝加哥, 伊利諾州)。

2.1 結果

2.2.1 本發明之埃羅替尼(erlotinib)衍生物增加 HCC 細胞凋亡

【0108】 本發明以埃羅替尼衍生物 TD-52 及埃羅替尼進行在 HCC 細胞中抗癌活性之比較。本發明使用 MTT 分析以證實 HCC 細胞暴露

於 TD-52 及埃羅替尼 48 小時之後的細胞活性，並以 DMSO 處理做為對照組，其結果如第一圖 A 所示，在 HCC 細胞株(包含 HA22T、Hep3B、PLC5 及 Hep3B)測試中 TD-52 對癌細胞活性的減少優於埃羅替尼，其中包含 HA22T($IC_{50}=0.9 \mu\text{mol/l}$)、Hep3B($IC_{50}=0.9 \mu\text{mol/l}$)、PLC5($IC_{50}=0.8 \mu\text{mol/l}$)及 Sk-Hep1($IC_{50}=1.2 \mu\text{mol/l}$)。為進一步確認細胞凋亡的程度，將四個細胞株分別以 TD-52 及埃羅替尼處理 24 小時後，以流式細胞儀確認 sub-G1 細胞的比例，如第一圖 B 所示，在劑量依賴下 sub-G1 分析反映出與 MTT 分析中一樣的結果，也就是 TD-52 比埃羅替尼更具有抗癌的效果。

【0109】 為更確認 TD-52 抗癌的特性，本發明進行膜聯蛋白-V/PI 雙重染色法、西方墨點分析、細胞週期分析及 DNA 片段化分析(第一圖 C 至第一圖 E)。在劑量逐漸增加下，以膜聯蛋白-V/PI 雙重染色法分析細胞凋亡及細胞壞死的比例，其結果發現以 $2 \mu\text{M}$ TD-52 及更高劑量處理四個細胞株中 48 小時之後，癌細胞死亡的程度(包含細胞凋亡及壞死)為 50%或更高(第一圖 C)，且 Hep3B 細胞對於 TD-52 誘導壞死細胞死亡較為敏感，而相同劑量下在 HA22T、PLC5 及 Sk-Hep1 細胞中大部分為誘導細胞凋亡死亡。而西方墨點分析結果中，以 TD-52 處理的細胞會誘發半胱氨酸蛋白酶-9、半胱氨酸蛋白酶-3 的活性及聚(ADP-核糖)聚合酶(poly (ADP-ribose) polymerase, PARP)產生裂解物(第一圖 D)。再者，TD-52($2 \mu\text{M}$)與 z-VAD-fmk、pan-半胱氨酸蛋白酶抑制劑共處理 48 小時後，會減少 TD-52 誘發細胞凋亡的結果(第一圖 F)。同時，在較低濃度 TD-52 處理($1 \mu\text{mol/l}$ ，24 小時)會誘發癌細胞 DNA 片段化(第一圖 E)。但 TD-52 並不具有與埃羅替尼相同抑制上皮細胞成長因子接受體(EGFR)激酶抑制劑的效果(第一圖 G)。因此，本發明之埃羅替尼衍生物的抗癌活性之效果優於埃羅替尼，且該活性係經由異於上皮細胞成長因子接受體(EGFR)激酶抑制的機轉。

【0110】 此外，本發明之各個埃羅替尼衍生物亦分別以 $1 \mu\text{M}$ 及 $10 \mu\text{M}$ 處理人類鱗癌細胞 NCI-1703、H2170、H520、SW900 及 NCI-H226、非小細胞肺癌 A549、H358 細胞株進行細胞活性及 IC_{50} 檢測，其結果陳列於表五，證實本發明之埃羅替尼衍生物能有效促進癌細胞死亡。

2.2.2 本發明之埃羅替尼衍生物可經由抑制 CIP2A 強化 PP2A 活性

【0111】 本發明進一步探討本發明之埃羅替尼衍生物 TD-52 的作用機制，特別注重於蛋白質磷酸酶 2A 癌性抑制因子(CIP2A)-蛋白質磷酸酶 2A(PP2A) -p-Akt 信號路徑。如第二圖 A 及 B 所示，在劑量及時間依賴的方式下 TD-52 向下調節 CIP2A 及 p-Akt 的表現。再者，HCC 細胞經由 1 μ M TD-52 的處理 24 小時後可提升 PP2A 的活性(第二圖 C)，而與 PP2A 相關的次單元(subunit)、PP2A-A、PP2A-B5 及 PP2A-C 次單元的表現量不受影響。依據上述結果，TD-52 處理係經由抑制 CIP2A 表現而提升 PP2A 活性，進而向下調節 p-Akt 及導致 HCC 細胞凋亡(第二圖 D)。

【0112】 為確認經由 TD-52 誘發細胞凋亡 CIP2A-PP2A-p-Akt 信號路徑扮演的角色，本發明以過渡型轉染(Transient transfection)具有 myc-標記 CIP2A 異位表現的 PLC5 細胞 48 小時(第二圖 E)，再以 2 μ M TD-52 處理 24 小時後，相較於野生型細胞在 CIP2A-過度表現細胞中 p-Akt 的表現量被向上調節。甚至，本發明利用 sub-G1 分析發現 TD-52 的凋亡影響係顯著在該些 CIP2A-過度表現細胞中減少。接者，本發明利用兩個方法確認 PP2A 在 TD-52 處理的 HCC 細胞中扮演的角色，經由沉默 RNA(siRNA)剔除 PP2A 基因，並與 PP2A 抑制劑、黑海棉酸(OA)共處理(第二圖 F 及 G)。當 PLC5 細胞以 100 nM OA 處理時，p-Akt 的表現量會提升，並減少 TD-52-誘發 HCC 腫瘤細胞凋亡(第二圖 F)。同樣的，當 PP2A 被經由 siRNA 剔除時，p-Akt 的表現量會增加且 TD-52 的抗癌效果減少。本發明經由過渡型轉染產生 Akt-過度表現 PLC5 細胞，並發現 HCC 細胞 TD-52 誘發細胞凋亡顯著減少(第二圖 H)，該些結果證實 CIP2A-PP2A-p-Akt 信號路徑在調節 HCC 細胞 TD-52 抗癌效果中扮演關鍵性的角色。

2.2.3 本發明之埃羅替尼衍生物誘發細胞凋亡在 CIP2A-PP2A-p-Akt 信號路徑的分子機制

【0113】 為進一步確認 TD-52 如何影響 CIP2A-PP2A-p-Akt 信號路徑，本發明確認當蛋白質合成抑制劑放線菌酮(cycloheximide)阻礙轉譯作用時，TD-52 是否會影響 CIP2A 蛋白質的降解(degradation)，並以 DMSO 處理做為對照組，其結果如第三圖 A 所示，CIP2A 蛋白質的降解所需的時間不會因有或沒有 TD-52 而受影響，但經由 RT-PCR 的檢測結果發現其

mRNA 表現是因 TD-52 處理而被抑制。該結果顯示 TD-52 可抑制 CIP2A 的轉錄作用。本發明進一步確認 CIP2A 啟動子的作用機制，當 CIP2A 基因啟動子與螢光素酶(luciferase)報導子連接時，發現在劑量依賴的方式下 TD-52 會抑制螢光素酶的活性(第三圖 B 上圖)。本發明建構一系列 pGL4 螢光素載體缺失選植株以確認 CIP2A 基因啟動子區域中的序列對 TD-52 的影響是關鍵性的，如第三圖 B 所示，再具有-110/-1 載體的細胞中 TD-52 處理不會影響螢光素酶活性，此結果說明再 PLC5 細胞中-110 及-150 之間還有 CIP2A 表現的結合位置。在先前文獻中提及 Elk-1 會結合至該位置上，在子宮頸癌及子宮內膜癌中 Elk-1 會與另一個轉錄因子 Ets-1 一起調節 CIP2A 的表現。因此，本發明經由西方墨點分析法確認經 TD-52 處理的 PLC5 細胞檢測 Elk-1 及 CIP2A 的表現，已確認 Elk-1 在調節 CIP2A-PP2A-p-Akt 信號路徑扮演的角色，其結果發現在肝癌細胞中 Elk-1 轉錄因子會透過在細胞核中表現進而調控 CIP2A 基因的轉錄，但在經 TD-52 處理後的 PLC5 細胞，CIP2A 及 Elk-1 表現是顯著被抑制的(第三圖 C)。本發明以染色質免疫沈澱技術(ChIP)及定量 PCR 確認 Elk-1 與 CIP2A 啟動子基因之間的關係(第三圖 D)，在未處理的細胞中，以交聯蛋白質-DNA 複合物檢測 Elk-1 表現可證實 Elk-1 結合至 CIP2A 基因的啟動子區域，再者，當細胞暴露於 TD-52 時，在劑量依賴方式下 Elk-1 的表現是減少的。因此，此結果表示 TD-52 經由干擾 Elk-1 與 CIP2A 啟動子之間的結合進而導致 CIP2A 轉錄減少向下調節 CIP2A。當 CIP2A 受抑制時，PP2A 活化導致 Akt 去磷酸化使癌細胞凋亡。再者，Elk-1 過度表現會減少 TD-52 誘導 CIP2A 向下調節作用及癌細胞凋亡(第三圖 D，右欄)。

2.2.4 本發明之埃羅替尼衍生物對帶有 PLC5 的異體移植的體內作用

【0114】 本發明裡用 PLC5 的異體移植小鼠模型評估 TD-52 在活體內(*in vivo*)的影響。本發明使用目前臨床上的抗癌藥物索拉非尼(10/mg/kg)、TD-52(10/mg/kg)或 DMSO(作為控制組)，給予四周後，接受索拉非尼及 TD-52 的小鼠的腫瘤尺寸小於控制組。再者，相較於索拉非尼，TD-52 顯示對活體外腫瘤生長及活體內的細胞活性更有抑制能力($P < 0.05$ ；

第四圖 A 及 D)。本發明進一步檢測給予 TD-52 及控制組小鼠的異體移植腫瘤組織的蛋白質表現，如第四圖 B 及 C 所示，在活體腫瘤樣本中 TD-52 提升 PP2A 活性且向下調節 CIP2A 及 p-Akt 的表現量。因此，TD-52 顯示出經由干擾 Elk-1 與 CIP2A 啟動子之間的結合進而導致 CIP2A 轉錄減少向下調節 CIP2A 的轉錄及增加 PP2A 的活性。當 TD-52 增加 PP2A 活性時，Akt 會去磷酸化促進 HCC 細胞凋亡。

2.2.5 肝癌患者腫瘤組織的檢測

【0115】 為確認 p-Akt 及 CIP2A 的臨床意義，更進一步分析 147 個肝癌患者的腫瘤樣本及臨床特性，在第四圖 F 中，55.5%的腫瘤樣本 CIP2A 高度表現，再者，p-Akt 免疫組織化學染色法顯示細胞核 p-Akt 表現強度與細胞核質 CIP2A 有顯著相關。

2.2.6 癌蛋白 SET 在腫瘤組織中過度表現

【0116】 本發明進一步驗證在肝癌腫瘤組織中 SET 過度表現及 SET 及 p-Akt 共表現可預測手術後肝腫瘤患者再復發的風險。本發明收集 147 肝癌患者腫瘤組織及其鄰近正常組織檢測 SET 癌症蛋白質的異常表現(第五圖 A 至 C)，在腫瘤組織中 SET 的表達顯著高於其他正常組織，在 294 樣本中(每個患者有一對樣本)SET 表現在腫瘤組織的平均 H 分數是 170.8，在非腫瘤組織的分數是 86.7(p=86.8)(第五圖 B)，當腫瘤中的 SET 的表現量相較於成對的正常組織時顯示出腫瘤組織 SET 專一性的表現。如第五圖 C 所示，幾乎每個患者皆具有明顯更高 SET 表現，腫瘤對非腫瘤 SET 表現的平均比例為 2.2。甚至，SET 的高表現量與較差的臨床特性可顯著關聯性。因 SET 係為一癌症抑制劑磷酸酶 PP2A 的抑制劑，本發明進行檢測腫瘤細胞中 SET 的異常表現與 PP2A 功能障礙有關，發現 SET 的高表現量與 Akt 信號的活性有顯著關聯性，經由 PP2A 調節重要的腫瘤信號路徑(第五圖 D)，且肝癌患者手術後 SET 與 p-Akt 共表現量高可預測再復發的高風險(第五圖 D，下圖)。進一步確認在肝腫瘤細胞中 SET 致癌的特性，以特定的 shRNS 在細胞生長中使 SET 沉默的效果，如第五圖 E 所示，以抗 SET 的 shRNA 轉殖至 PLC5 細胞相較於以 shRNA 轉殖的陰性對照組的生長率，其結果與先前一致，SET 沉默會導致 Hep3B 細胞自我分化成為肝癌細胞微球

(hepatosphere)的能力減少(第五圖 F)。因此，該發現顯示 SET 的異常表現會促進肝腫瘤的發生。同時，本發明亦經由非小細胞肺癌(NSCLC)A549 細胞株及非小細胞肺癌患者組織證實 SET 在肺癌細胞中扮演關鍵性致癌的角色，以及肝癌細胞中 SET 與 PP2Ac(PP2A 催化區域(catalytic domain))結合會導致 PP2A 的活性增加(結果未顯示)。

2.2.7 PP2A 會促進 Akt 向下調節及肝癌細胞凋亡

【0117】 本發明進一步證實 SET-PP2A 是否可為抗癌策略的新目標。首先本發明將肝癌細胞暴露於相同劑量的本發明之埃羅替尼衍生物(EMQA)48 小時以 MTT 分析檢測以確定細胞活性，如第六圖 A 所示，EMQA 會造成肝癌細胞活性顯著的減少，包含四種肝癌細胞 PLC5、HuH7、Hep3B 及 Sk-Hep1 細胞株。檢測以 EMQA 處理後促進細胞凋亡的效果，四種肝癌細胞暴露於相同濃度的 EMQA 下 24 小時，再以流式細胞儀、酵素結合免疫吸附分析法(ELISA)及西方墨點分析法分析細胞死亡，並以 DMSO 最為對照組。經由流式細胞儀檢測相對於 EMQA 高劑量或長時間處理的 sub-G1 細胞的比例(第六圖 B 及 D，上圖)，經由 ELISA 分析顯示 DNA 片段化程度隨者 EMQA 處理的劑量增加而增加(第六圖 C)。在劑量依賴及時間依賴的方式下 EMQA-誘發-肝細胞凋亡會向下調節 p-Akt 信號(第六圖 D)。再者，本發明以 PLC5 異體移植腫瘤小鼠模型以評估活體內 EMQA 對抗肝癌的影響，相較於接受控制組的小鼠，以 EMQA 治療(10 mg/kg/day)的帶腫瘤小鼠顯著減少腫瘤生長(第六圖 E)。為確認腫瘤組織發生的分子機制，以西方墨點分析法分析及 PP2A 活性分析檢測接受 EMQA 及控制組的異體移植腫瘤小鼠的腫瘤組織，其與在活體外檢測的結果一致，接受 EMQA 治療的異體移植腫瘤小鼠的腫瘤組織比控制組 p-Akt 表現更低且 PP2A 的活性更高(第六圖 F)。

2.2.8 以 SET/PP2A/p-Akt 信號的抑制確認本發明之埃羅替尼衍生物的促細胞凋亡的效果

【0118】 本發明確認 Akt 是否為調節 EMQA 對抗 HCC 效果的關鍵。經由過渡性轉染(Transient transfection)產生具有 myc-標記 Akt 異位表現的 PLC5 細胞並以 5 μ M EMQA 處理 24 小時後，如第七圖 A 所示，相較於

野生型,以 EMQA 處理後 sub-G1 細胞及 PARP 切割形式的比例在過度表現 Akt 的 PLC5 細胞中顯著地減少,其表示 Akt 決定 EMQA 促進細胞凋亡的效果。接者,本發明以三個不同的策略證實 EMQA-調節 Akt 向下調節 PP2A 的角色,首先,使用 PP2A 抑制劑、黑海棉酸(OA)以抑制 PP2A 的活性,如第七圖 B 所示,經由 EMQA 處理誘發後向下調節 p-Akt 的表現及促進細胞凋亡的效果會再經由 5 μ M EMQA 及 100 nM OA 共處理後得到相反的結果;接者,本發明以 siRNA 專一性的剔除 PP2Ac,相較於野生型的 PLC5 細胞,當以 siRNA 剔除 PP2Ac 時 p-Akt 的表現增強(如第七圖 C);再者,MQA-誘發細胞凋亡的比例在 PP2Ac-剔除-PLC5 細胞中明顯減少,除了 PP2A 外,其他蛋白質激酶,包含 PI3K、PTEM 及 PDK1 已知與調節 Akt 信號活性有關,本發明在 EMQA-處理肝癌細胞裂解物中確認該些蛋白質的表現,如第七圖 D 所示,以 EMQA 能顯著抑制 p-Akt 的表現,但不會影響 PI3K、PTEM 及 PDK1 的表現,該些結果證實 PP2A 在 PP2A 在調節 EMQA-誘發 Akt 向下調節過程中扮演重要的角色。

【0119】 因 EMQA 經由打斷 SET-PP2Ac 結合再活化 PP2A,本發明為證實 SET 的角色,經由過渡性轉染產生具有 myc-標記 SET 異位表現的 Hep3B 細胞,並在 SET 過度表現的細胞中,經由 EMQA 處理誘發後向下調節 p-Akt 的表現及細胞凋亡的效果皆減少(第七圖 E)。本發明以兩種截斷的 SET 蛋白質確認 EMQA 的目標位置,其分別為 N-末端片段(SET_{NTF}, a.a. 1-227)及 C-末段片段(SET_{CTF}, a.a.76-277),並以活體外 SPR 系統檢測(第七圖 F,左圖)以及細胞系統(cell-based system,第七圖 F,右圖)。隨者 PP2Ac 塗覆固定於 CM 晶片的量,本發明測試在 SPR 系統中固定劑量的 EMQA 會干擾不同比例全長及截斷型式的 SET 蛋白質,如第七圖 F 所示,EMQA 的干擾效果不因 SET_{NTF} 的比例增加而受到影響,相反地,含有 SET_{NTF} 及全長的 SET 蛋白質複合體對 PP2Ac 的結合親和力隨 SET_{NTF} 比例增加而增加。本發明亦經由過渡性轉染產生具有兩個截斷型式的 Flag-標記 SET 蛋白質的異位表現的細胞,與 SPR 的結果一致,EMQA 會減少全長 SET 及 SET_{CTF} 對 PP2Ac 的結合,不會影響 SET_{NTF} 的結合(第七圖 F,右圖),同時本發明亦在肺癌細胞 A549 中得到相同的結果(結果未示),此結果證實 EMQA 專一

性目標 SET 蛋白的 C-末端。

2.2.9 本發明之埃羅替尼衍生物在活體外及活體內改善索拉非尼對 HCC 細胞的敏感性強化 PP2A 的功能

【0120】 目前，索拉非尼為治療肝癌患者合格的標靶藥物，其具有有限的無惡化存活(progression-free survival)及較高的治療相關毒性程度，因此有必要改善索拉非尼對肝癌患者的藥物敏感性，本發明測試再活化 PP2A 是否能改善索拉非尼的效果，本發明先以 MTT 測試 EMQA 組合索拉非尼的效果，在四個不同的肝癌細胞株中，當 EMQA 組合索拉非尼的比值為 1:5 時可顯著改善抗癌效果，經由 MTT 的結果確認所有的肝癌細胞株的組合比值，其表示有協同效果(synergism)(第八圖 A)。進一步以 sub-G1 分析及西方墨點分析法確認該組合處理的促進細胞凋亡的結果，相較於單獨以索拉非尼處理，當在 Hep3B 及 PLC5 細胞中 EMQA 加入至索拉非尼時，經由流式細胞儀檢測 sub-G1 的比例以及 PARP 的切割型式皆顯著的增加(第八圖 B)。目前索拉非尼僅適合用於晚期的肝癌治療，其腫瘤通常是巨大的且無法以其他的方式處理，為模擬次這種臨床症狀，本發明以具有 PLC5 異體移植腫瘤的小鼠測試索拉非尼及 EMQA 結合的治療效果，如第八圖 C，相較於單獨接受 EMQA 或索拉非尼的小鼠，索拉非尼及 EMQA 結合能顯著抑制腫瘤生長的速率，且在接受治療的末期腫瘤的平均重量明顯較低(第八圖 D)，甚至，在腫瘤中該組合治療亦可強化 PP2A 的活性(第八圖 E，上圖)及抑制 p-Akt 表現。

2.2.10 本發明之埃羅替尼衍生物與紫杉醇(paclitaxel)會向下調節 p-Akt 並促進非小細胞肺癌細胞凋亡

【0121】 本發明利用西方墨點分析法以紫杉醇及/或 EMQA 處理的細胞裂解物，如第九圖 A 所示，在以紫杉醇及 EMQA 處理的肺癌細胞 p-Akt 表現量顯著減少。再者，在劑量依賴及時間依賴的方式下共處理會誘發 p-Akt 向下調節(第九圖 B 及 C)，更重要的是，PARP 信號的活性與 p-Akt 向下調節的結果一致。本發明經由過渡性轉染產生具有 myc-標記 Akt 異位表現的 A549 細胞並以 5 μ M EMQA 及 10 nM 紫杉醇處理 24 小時後，如第

九圖 D 所示，共處理可顯著減少 Akt 過度表現細胞，因此經由抑制 Akt 信號可確認在非小細胞肺癌細胞中 EMQA 及紫杉醇的協同效果。

2.2.11 在活體內(in vivo)本發明之埃羅替尼衍生物與紫杉醇對抗癌的協同效果

【0122】 本發明在活體內測試 EMQA 與紫杉醇結合的抗癌效果，本發明產生 A549 異體移植腫瘤的小鼠並以控制組、紫杉醇及/或 EMQA 治療小鼠，相較於單獨接受 EMQA 或紫杉醇的小鼠，接受 EMQA 與紫杉醇結合治療的小鼠的腫瘤生長速率明顯減少(第十圖 A)，且平均腫瘤種量亦顯著較低(第十圖 B)，值得注意的是，給予不同治療的小鼠的體重沒有明顯差異(第十圖 E)。本發明經由西方墨點分析法及 PP2A 活性分析腫瘤裂解物，其結果與先前相同，接受 EMQA 與紫杉醇結合治療的小鼠腫瘤的 PP2A 活性明顯高於接受控制治療(第十圖 C)，且 p-Akt 的表現亦向下調節；本發明亦以西方墨點分析法分析 A549 異體移植腫瘤小鼠的腫瘤裂解物 p-Akt 及 Akt 表現量有減少的趨勢(第十圖 D)。

【0123】 因此，本發明之埃羅替尼衍生物在腫瘤細胞表現新的治療機制，經由抑制 CIP2A 進而提升 PP2A 表現且向下調節 p-Akt，顯示出本發明之埃羅替尼衍生物可作為用以增強 PP2A 活性的癌症治療方法。同時，本發明亦證實 SET 的高度表現與患者腫瘤較嚴重及預後較差有關，因此，本發明以干擾 SET-PP2A 的結合作為治療癌症的新策略，並以本發明之埃羅替尼衍生物與索拉非尼或紫杉醇結合以強化索拉非尼的治療效果，可有效抑制腫瘤的生長。本發明提供一種癌症治療的替代選擇，該選擇可能在對傳統醫藥治療具有抗性之癌症的治療上是極有幫助的。

【符號說明】

【0124】 無。

108 年 03 月 18 日修正替換頁

表五、本發明之埃羅替尼衍生物能有效促進癌細胞死亡

compound	NCI-1703 細胞活性(%)			NCI-H226 細胞活性(%)			A549 細胞活性(%)			H358 細胞活性(%)			H2170 細胞活性 (%)		
	1 (uM)	10 (uM)	IC50	1 (uM)	10 (uM)		1 (uM)	10 (uM)		1 (uM)	10 (uM)		1 (uM)	10 (uM)	
TD52	84.7±2.5	10.1±0.1	3.8	79.5±6.9	5.3±0.1		71.5±6.0	9.7±0.9		99.8±3.8	11.2±0.7		100.46±3.21	7.84±9.49	
TD53	68.4±1.4	46.7±0.2	7.4	86.2±5.7	56.8±2.7		99.4±6.9	82.7±99.9		119.5±9.2	41.9±3.9		99.71±6.00	59.19±1.25	
TD54	127.2±2.0	96.7±4.2		120.0±4.9	110.9±0.8								100.24±4.93	79.08±7.69	
TD55	64.2±5.3	49.9±4.8	8.3	106.5±17.3	96.4±7.4		100.1±7.2	36.5±5.9	109.5 ±14.2	42.1±0.6			102.73±0.73	94.80±6.05	
TD56	49.9±4.7	28.8±2.3		115.4±0.8	19.0±2.0								95.00±0.91	32.46±14.08	
TD57	48.1±4.5	31.4±2.6		90.0±1.5	33.6±1.7								93.86±1.12	67.41±3.86	
TD58	126.7±2.9	98.9±1.1		123.2±3.6	74.9±1.5								92.85±2.03	83.02±3.41	
TD59	113.6±7.4	26.4±0.7		121.7±2.6	32.5±2.5		164.6±0.1	24.1±3.9	117.3±12.1	19.0±1.5			88.41±2.01	8.96±1.43	
TD60	51.9±2.9	26.1±0.8		92.5±1.7	15.9±1.0		91.3±4.0	21.8±1.4	55.3±1.9	18.1±1.3			72.32±0.89	0.41±0.65	
TD61	31.1±1.6	8.5±0.3	0.3	52.5±3.4	20.9±2.8		39.1±5.8	18.6±1.2	39.9±1.2	20.6±1.5			96.17±2.24	32.37±13.01	
TD62	111.6±3.6	65.2±0.6		86.0±2.0	90.1±8.2		165.6±23.1	120.1±29	121.3±2.2	97.4±8.1			92.55±1.41	85.34±4.56	
TD63	54.5±5.5	28.8±7.9		99.9±4.3	19.6±0.4		79.2±7.8	21.9±2.2	66.8±8.5	16.2±1.3			78.45±1.28	9.13±0.63	
TD64	85.2±1.3	81.5±10.4		95.6±4.9	89.3±3.6		107.3±10.8	92.3±8.1	69.1±9.0	57.0±11.9			109.11±1.85	99.92±3.86	
TD65	53.2±2.3	26.3±1.0		46.2±2.5	14.1±1.3		66.4±6.9	27.7±2.0	27.1±1.2	18.3±3.0			77.88±3.48	0.26±0.10	
TD66	84.5±2.3	10.1±0.2		71.2±1.2	4.7±0.1		55.5±5.1	11.1±0.6	96.6±0.9	14.9±3.0			101.50±0.48	3.70±1.37	
TD67	22.3±4.2	11.2±0.0		88.3±2.4	7.3±0.7		94.7±5.9	20.9±2.3	115.9 ±23.4	26.4±2.5			113.64±2.52	33.63±0.16	
TD68	48.6±2.0	33.3±7.1		40.2±0.3	14.8±0.3		57.3±19.1	32.9±4.0	22.4±1.8	16.7±0.8			69.39±0.67	0.17±0.16	
TD69	52.2±4.5	15.5±0.4	1	69.0±1.0	28.0±1.5		71.4±6.3	9.9±0.7	102.9±5.2	12.7±0.4			116.44±6.86	89.28±2.49	
TD70	73.2±5.1	59.7±7.4	>10	106.1±5.7	123.4±13.1		103.3±22.8	91.9±21.8	131.7±4.3	116.6±6.4			92.42±3.67	86.44±5.11	
TD71	85.1±5.6	47.0±8.6	8.6	118.3±14.6	112.5±8.5		97.6±8.2	96.9±9.3	123.3±6.1	114.0±1.1			110.87±9.77	104.21±3.99	

I660949

發明摘要

※ 申請案號：104122033

※ 申請日：

※IPC 分類：

【發明名稱】(中文/英文)

作為抗癌藥物之芳基胺取代的喹喔啉/

Arylamine Substituted Quinoxaline and Their Use as Anticancer Drugs

【中文】

本發明提供式 I 及 II 的新穎化合物，該化合物具有蛋白質磷酸酶 2A(PP2A)的促進劑、癌蛋白 CIP2A 抑制劑及癌蛋白 SET 拮抗劑之功效。本發明並提供使用該式 I 及 II 之化合物的治療方法。

【英文】

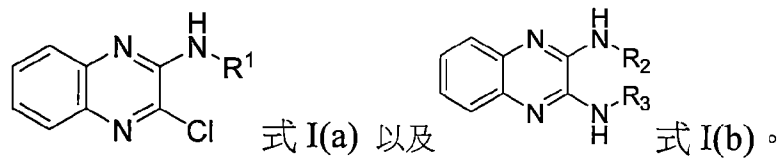
The present invention provides new compounds of formula I and II, which have potential of protein phosphatase 2A (PP2A) agonist, CIP2A inhibitor and SET antagonist. Also provided are treatment methods using the compounds of formula I and II.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 無 ）圖。

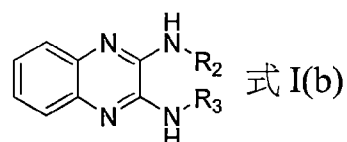
【本代表圖之符號簡單說明】：無。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

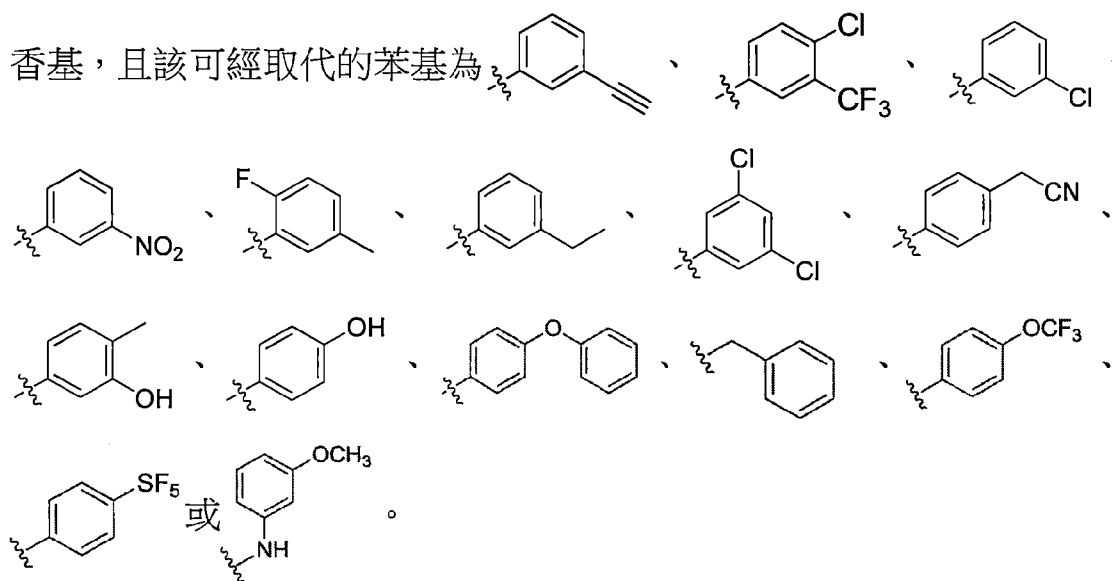


申請專利範圍

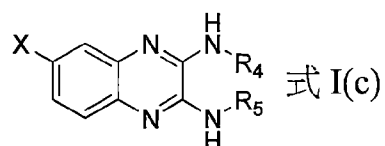
1. 一種可經芳基胺取代的喹喔啉，係具有如式 I(b) 之結構：



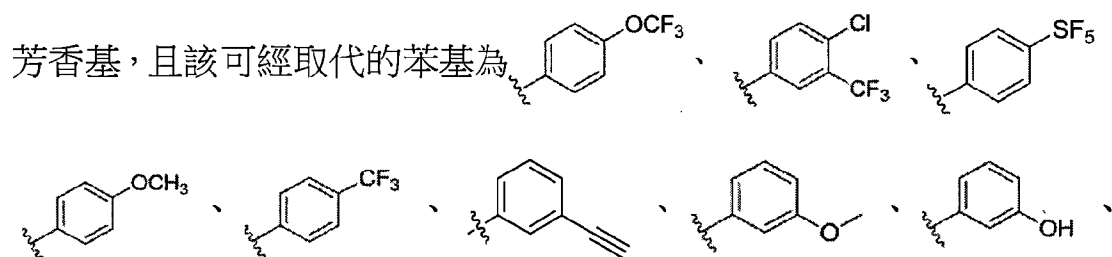
其中 R^2 及 R^3 係為相同或不同各自獨立為可經取代的苯基、雜環芳

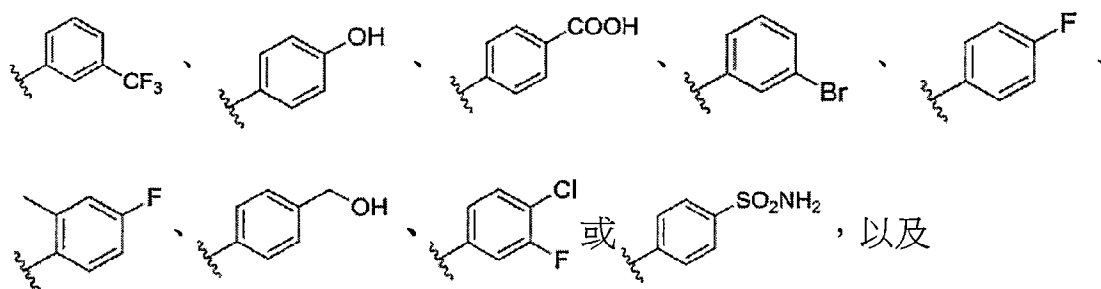


2. 一種可經芳基胺取代的喹喔啉，係具有如式 I(c) 化學結構之：



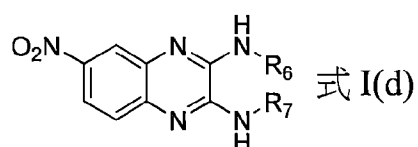
其中 R^4 及 R^5 係為相同或不同各自獨立為可經取代的苯基、雜環



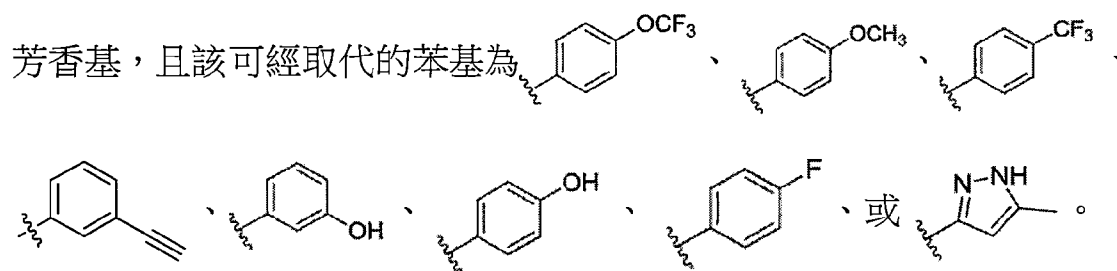


其中 X 係為鹵素、鹵代烷基、甲氧基、硝基、胺基、羧基、苯酮基或甲氧羰基。

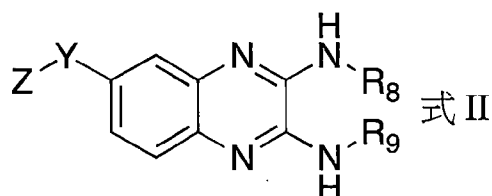
3. 一種可經芳基胺取代的喹啉，係具有式 I(d) 化學結構之：



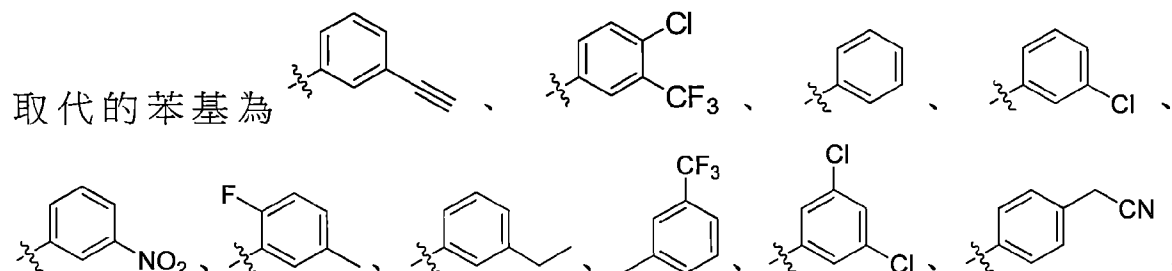
其中 R⁶ 及 R⁷ 係為相同或不同各自獨立為可經取代的苯基、雜環

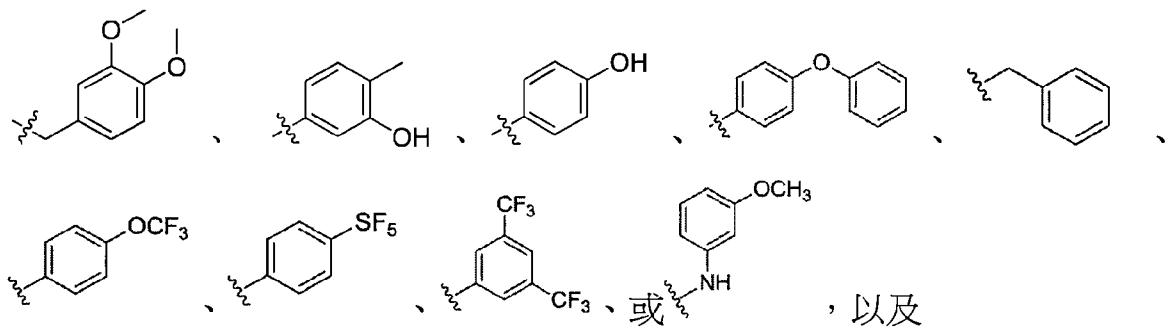


4. 一種化合物，係具有如下式 II 之結構：



其中 R⁸ 及 R⁹ 係為相同或不同各自獨立為可經取代的苯基，且該可經





其中 Y 為 CO 或 $(\text{CH}_2)_n$, $n=1-3$; Z= COOR¹⁰, 或具有取代官能基之苯環, R¹⁰ 為芳香基或烷基取代基。

5. 一種醫藥組合物, 包含如申請專利範圍第 1 項至第 4 項之任一項中所定義之化合物, 以及一藥理上可接受的載體。
6. 如申請專利範圍第 5 項所述之醫藥組合物, 進一步包含一抗癌藥物。
7. 如申請專利範圍第 6 項所述之醫藥組合物, 其中該抗癌藥物係為索拉非尼(Sorafenib)或紫杉醇(Paclitaxel)。
8. 一種用於活化蛋白質磷酸酶 2A (PP2A)在細胞內表現的醫藥組合物, 包含如申請專利範圍第 1 項至第 4 項之任一項中所定義的化合物, 以及一藥理上可接受的載體。
9. 一種用於治療以蛋白質磷酸酶 2A(PP2A)不活化為特徵之疾病或病症的醫藥組合物, 包含如申請專利範圍第 1 項至第 4 項之任一項中所定義的化合物, 以及一藥理上可接受的載體。
10. 一種用於作為癌蛋白 SET 拮抗劑的醫藥組合物, 包含如申請專利範圍第 1 項至第 4 項之任一項中所定義的化合物, 以及一藥理上可接受的載體。
11. 一種用於治療以癌蛋白 SET 表現量增加為特徵之疾病或病症的醫藥組合物, 包含如申請專利範圍第 1 項至第 4 項之任一項中所定義的化合

- 物，以及一藥理上可接受的載體。
12. 一種用於作為蛋白質磷酸酶 2A 癌性抑制因子(CIP2A)拮抗劑的醫藥組合物，包含如申請專利範圍第 1 項至第 4 項之任一項中所定義的化合物，以及一藥理上可接受的載體。
 13. 一種用於治療以蛋白質磷酸酶 2A 癌性抑制因子(CIP2A)表現量增加為特徵之疾病或病症的醫藥組合物，包含如申請專利範圍第 1 項至第 4 項之任一項中所定義的化合物，以及一藥理上可接受的載體。
 14. 一種用於干擾癌蛋白 SET 與蛋白質磷酸酶 2A(PP2A)結合的醫藥組合物，包含如申請專利範圍第 1 項至第 4 項之任一項中所定義的化合物，以及一藥理上可接受的載體。
 15. 如申請專利範圍第 8 項至第 14 項任一項所述之醫藥組合物，進一步包含一抗癌藥物。
 16. 如申請專利範圍第 15 項至所述之醫藥組合物，其中該抗癌藥物係為索拉非尼(Sorafenib)或紫杉醇(Paclitaxel)。
 17. 一種如申請專利範圍第 1 項至第 4 項之任一項中所定義之化合物用於製造以治療蛋白質磷酸酶 2A (PP2A)不活化為特徵之疾病或病症之醫藥組合物的用途。
 18. 如申請專利範圍第 17 項所述之用途，其中該以蛋白質磷酸酶 2A (PP2A)不活化為特徵之疾病或病症為肝癌、肺癌、白血病、乳癌、腎癌、甲狀腺癌、結腸癌、頭部或頸部癌症。
 19. 一種如申請專利範圍第 1 項至第 4 項之任一項中所定義之化合物用於製造以治療癌蛋白 SET 表現量增加為特徵之疾病或病症之醫藥組合物的

用途。

20. 如申請專利範圍第 19 項所述之用途，其中該以癌蛋白 SET 表現量增加為特徵之疾病或病症為肝癌、肺癌、白血病、乳癌、腎癌、甲狀腺癌、結腸癌、頭部或頸部癌症。
21. 一種如申請專利範圍第 1 項至第 4 項之任一項中所定義之化合物用於製造以治療蛋白質磷酸酶 2A 癌性抑制因子(CIP2A)表現量增加為特徵之疾病或病症之醫藥組合物的用途。
22. 如申請專利範圍第 21 項所述之用途，其中該以蛋白質磷酸酶 2A 癌性抑制因子(CIP2A)表現量增加為特徵之疾病或病症為肝癌、肺癌、白血病、乳癌、腎癌、甲狀腺癌、結腸癌、頭部或頸部癌症。