



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102151261 A

(43) 申请公布日 2011. 08. 17

(21) 申请号 201010253451. 8

A61P 35/00(2006. 01)

(22) 申请日 2004. 06. 18

A61P 35/02(2006. 01)

(30) 优先权数据

60/480, 270 2003. 06. 20 US

60/566, 952 2004. 04. 30 US

(62) 分案原申请数据

200480023710. 0 2004. 06. 18

(71) 申请人 尼瑞斯药品公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 迈克尔·帕拉迪诺

萨斯基亚·狄奥多拉·科尔内利

亚·内特博姆

文卡塔·拉米·雷迪·马舍拉

芭芭拉·克里斯蒂娜·波茨

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 阴亮

(51) Int. Cl.

A61K 31/407(2006. 01)

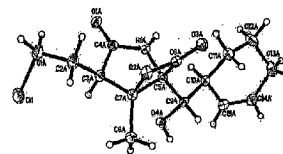
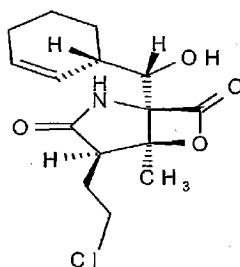
权利要求书 3 页 说明书 88 页 附图 23 页

(54) 发明名称

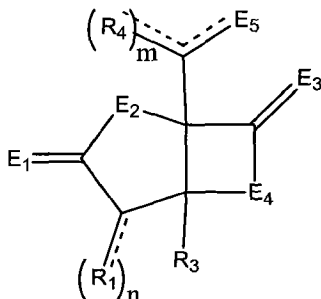
[3. 2. 0] 杂环化合物及其类似物在癌症、炎症和感染性疾病治疗中的应用

(57) 摘要

本发明公开了治疗动物体内癌症、炎症性疾病状态和 / 或者感染性疾病的方法, 包括以下内容: 给予所述动物治疗上有效量的 [3. 2. 0] 杂环化合物, 优选为 6- 氧杂 -2- 氮杂二环 [3. 2. 0] 庚烷 -3, 7- 二酮, 例如 Salinosporamide A。所述动物为哺乳动物, 优选为人或啮齿类动物。



1. 通式 II 化合物及其药物可接受的盐在制备治疗癌症的药物中的用途,



通式 II

其中虚线表示单键或双键,

其中  $R_1$  独立地选自氢, 卤素, 下列基团的单取代、多取代或者未取代的变体: 饱和的  $C_1-C_{24}$  烷基, 不饱和的  $C_2-C_{24}$  烯基, 不饱和的  $C_2-C_{24}$  炔基, 酰基, 酰氧基, 烷氧羰基氧基, 芳氧羰基氧基, 环烷基, 环烯基, 烷氧基, 环烷氧基, 芳基, 杂芳基, 芳烷氧基羰基, 烷氧羰基酰基, 氨基, 氨基羰基, 氨基羰基氧基, 硝基, 叠氮基, 苯基, 环烷基酰基, 羟基, 烷硫基, 芳硫基, 羟基磺酰基, 羧基, 氰基, 和包括多卤代烷基的卤代烷基,

其中  $n$  等于 1 或 2, 且当  $n$  等于 2 时,  $R_1$  能够相同或不同;

其中  $R_3$  选自卤素, 下列基团的单取代、多取代或者未取代的变体: 饱和的  $C_1-C_{24}$  烷基, 不饱和的  $C_2-C_{24}$  烯基, 不饱和的  $C_2-C_{24}$  炔基, 酰基, 酰氧基, 烷氧羰基氧基, 芳氧羰基氧基, 环烷基, 环烯基, 烷氧基, 环烷氧基, 芳基, 杂芳基, 芳烷氧基羰基, 烷氧羰基酰基, 氨基, 氨基羰基, 氨基羰基氧基, 硝基, 叠氮基, 苯基, 环烷基酰基, 羟基, 烷硫基, 芳硫基, 羟基磺酰基, 羧基, 氰基, 和包括多卤代烷基的卤代烷基;

其中  $R_4$  独立地选自氢, 卤素, 下列基团的单取代、多取代或者未取代的变体: 饱和的  $C_1-C_{24}$  烷基, 不饱和的  $C_2-C_{24}$  烯基, 不饱和的  $C_2-C_{24}$  炔基, 酰基, 酰氧基, 烷氧羰基氧基, 芳氧羰基氧基, 环烷基, 环烯基, 烷氧基, 环烷氧基, 芳基, 杂芳基, 芳烷氧基羰基, 烷氧羰基酰基, 氨基, 氨基羰基, 氨基羰基氧基, 硝基, 叠氮基, 苯基, 环烷基酰基, 羟基, 烷硫基, 芳硫基, 羟基磺酰基, 羧基, 氰基, 和包括多卤代烷基的卤代烷基;

其中  $m$  等于 1 或 2, 并且当  $m$  等于 2 时,  $R_4$  能够是相同的或不同的;

其中  $E_1$ 、 $E_3$  和  $E_4$  是 O,  $E_2$  是 NH, 并且  $E_5$  是 OH、O、 $OR_{10}$ 、S、 $SR_{11}$ 、 $SO_2R_{11}$ 、NH、 $NH_2$ 、NOH、 $NHOH$ 、 $NR_{12}$  或者  $NHOR_{13}$ , 其中  $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 、 $R_{12}$  和  $R_{13}$  选自氢, 取代或未取代的烷基, 取代或未取代的芳基以及取代或未取代杂芳基; 并且

其中所述癌症选自肝癌、血管瘤、血管肉瘤、食道癌、输尿管癌和窦癌。

2. 如权利要求 1 所述的用途, 其中所述癌症为耐药的癌症。

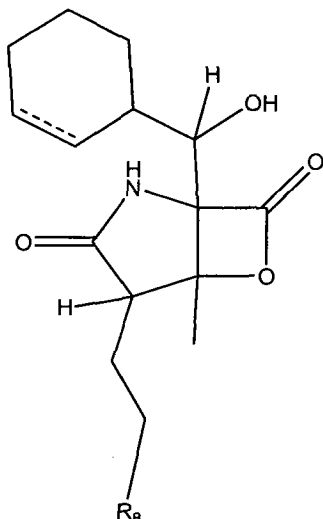
3. 如权利要求 2 所述的用途, 其中所述耐药的癌症表现为至少下列中的一种: P-糖蛋白流出泵的水平提高, 通过 MRP1 编码的多药耐药性相关蛋白 1 的表达增加, 药物的吸收减少, 药物的靶标改变或药物诱导的 DNA 损害修复增加, 细胞凋亡途径改变或细胞色素 P450 酶活化。

4. 如权利要求 1 所述的用途, 其中所述动物为哺乳动物。

5. 如权利要求 1 所述的用途, 其中所述动物为人。

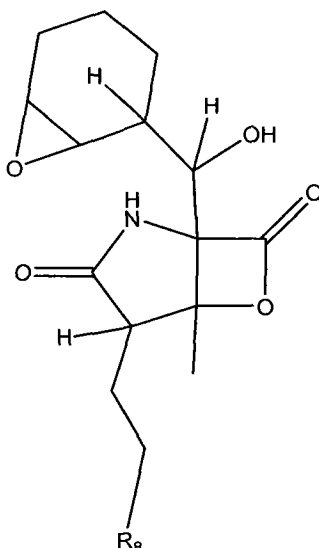
6. 如权利要求 1 所述的用途, 其中所述动物为啮齿类动物。

7. 如权利要求 1 所述的用途,其中所述化合物为:



其中  $R_8$  选自 H、F、Cl、Br 和 I。

8. 如权利要求 1 所述的用途,其中所述化合物为:



其中  $R_8$  选自 H、F、Cl、Br 和 I。

9. 如权利要求 1 所述的用途,其中  $R_1$  独立地选自氢, 卤素, 下列基团的单取代、多取代或者未取代的变体: 饱和的  $C_1-C_{24}$  烷烃, 不饱和的  $C_2-C_{24}$  烯烃, 不饱和的  $C_2-C_{24}$  炔烃, 酰基, 酰氧基, 烷氧羰基氧基, 芳氧羰基氧基, 环烷基, 环烯基, 烷氧基, 环烷氧基, 芳基, 杂芳基, 芳烷氧基羰基, 烷氧羰基酰基, 氨基, 氨基羰基, 氨基羰基氧基, 硝基, 叠氮基, 苯基, 羟基, 烷硫基, 芳硫基, 羟基磺酰基, 羧基, 氰基, 和包括多卤代烷基的卤代烷基,

其中  $n$  等于 1 或 2, 且当  $n$  等于 2 时,  $R_1$  能够相同或不同;

其中  $R_3$  为甲基, 并且

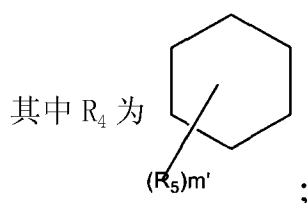
其中  $R_4$  独立地选自氢, 卤素, 下列基团的单取代、多取代或者未取代的变体: 饱和的  $C_1-C_{24}$  烷烃, 不饱和的  $C_2-C_{24}$  烯烃, 不饱和的  $C_2-C_{24}$  炔烃, 酰基, 酰氧基, 烷氧羰基氧基, 芳氧羰基氧基, 环烷基, 环烯基, 烷氧基, 环烷氧基, 芳基, 杂芳基, 芳烷氧基羰基, 烷氧羰基酰基, 氨基, 氨基羰基, 氨基羰基氧基, 硝基, 叠氮基, 苯基, 羟基, 烷硫基, 芳硫基, 羟基磺酰基, 羧基, 氰基, 和包括多卤代烷基的卤代烷基。

10. 如权利要求 1 所述的用途,其中  $R_1$  独立地选自氢,卤素,下列基团的单取代、多取代或者未取代的变体:饱和的  $C_1-C_{24}$  烷烃,不饱和的  $C_2-C_{24}$  烯烃,不饱和的  $C_2-C_{24}$  炔烃,酰基,酰氧基,烷氧羰基氧基,芳氧羰基氧基,环烷基,环烯基,烷氧基,环烷氧基,芳基,杂芳基,芳烷氧基羰基,烷氧羰基酰基,氨基,氨基羰基,氨基羰基氧基,硝基,叠氮基,苯基,羟基,烷硫基,芳硫基,羟基磺酰基,羧基,氰基,和包括多卤代烷基的卤代烷基,

其中  $n$  等于 1 或 2,且当  $n$  等于 2 时,  $R_1$  可以相同或不同;

其中  $R_3$  选自卤素,下列基团的单取代、多取代或者未取代的变体:饱和的  $C_1-C_{24}$  烷烃,不饱和的  $C_2-C_{24}$  烯烃,不饱和的  $C_2-C_{24}$  炔烃,酰基,酰氧基,烷氧羰基氧基,芳氧羰基氧基,环烷基,环烯基,烷氧基,环烷氧基,芳基,杂芳基,芳烷氧基羰基,烷氧羰基酰基,氨基,氨基羰基,氨基羰基氧基,硝基,叠氮基,苯基,羟基,烷硫基,芳硫基,羟基磺酰基,羧基,氰基,和包括多卤代烷基的卤代烷基,

其中  $m$  等于 1;

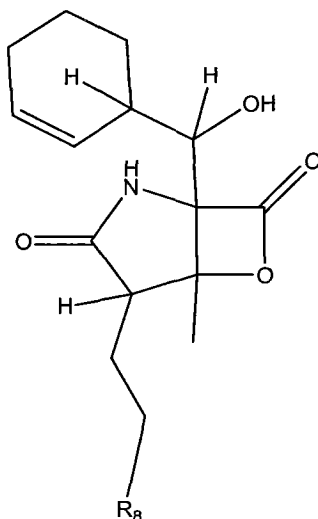


其中  $R_5$  独立地选自氢,卤素,下列基团的单取代、多取代或者未取代的变体:饱和的  $C_1-C_{24}$  烷烃,不饱和的  $C_2-C_{24}$  烯烃,不饱和的  $C_2-C_{24}$  炔烃,酰基,酰氧基,烷氧羰基氧基,芳氧羰基氧基,环烷基,环烯基,烷氧基,环烷氧基,芳基,杂芳基,芳烷氧基羰基,烷氧羰基酰基,氨基,氨基羰基,氨基羰基氧基,硝基,叠氮基,苯基,羟基,烷硫基,芳硫基,羟基磺酰基,羧基,氰基,和包括多卤代烷基的卤代烷基,并且

$m'$  为 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或 11,并且当  $m'$  大于 1 时,  $R_5$  能够相同或不同。

11. 如权利要求 10 所述的用途,其中  $R_3$  为甲基。

12. 如权利要求 1 所述的用途,其中所述化合物为:



其中  $R_8$  选自 H、F、Cl、Br 和 I。

13. 如权利要求 1 所述的用途,其中至少一个  $R_1$  为  $CH_2CH_2X$ ,其中 X 选自 H、F、Cl、Br 和 I,并且  $R_3$  为甲基。

### [3. 2. 0] 杂环化合物及其类似物在癌症、炎症和感染性疾病治疗中的应用

#### [0001] 发明背景

#### 发明领域

[0002] 本发明涉及了某些化合物及其制备方法以及在化学和医药领域内该类化合物的应用。本发明所公开的实施方案涉及应用杂环化合物的方法。在一些实施方案中,所述的化合物作为蛋白酶体 (proteasome) 抑制剂使用。在其它实施方案中,所述的化合物用于治疗炎症、癌症和感染性疾病。

#### [0003] 相关技术说明

[0004] 在美国,癌症是引起死亡的主要原因。尽管在发现治疗癌症的新方法方面已有了显著成就,但是主要的治疗选择仍然是外科手术、化学疗法和放射疗法,这三种治疗方法可单独使用或者联合应用。但是,外科手术和放射疗法通常对癌症类型清楚确定的患者有用,在治疗癌症已扩散的患者方面它们具有局限性。化学疗法普遍用于治疗转移癌或者诸如白血病的弥散性癌症的患者。尽管化学疗法有治疗价值,但是由于患者的癌细胞对化学治疗药物有耐药性,因此它经常不能治愈疾病。一部分原因可能是癌细胞对化学治疗药物有耐药性,这类治疗剂通常联合应用治疗患者

[0005] 类似地,例如由细菌、真菌和原生动物引起的感染性疾病也日益变得难于治疗和治愈。比如越来越多的细菌、真菌和原生动物对当前的抗生素和化学治疗药物逐步产生耐药性。这类微生物包括杆菌、利什曼原虫、疟原虫和锥虫。

[0006] 此外,越来越多的疾病和医学现象属于炎症性疾病。这类疾病包括哮喘到心血管疾病疾病状态。尽管有新的疗法和医学技术进步的出现,但是这类疾病仍然在世界范围内影响着越来越多的人。

[0007] 因此,存在对于新的化学疗法、抗菌剂以及抗炎药剂的需求,以治疗癌症、炎症性疾病以及感染性疾病。为此,不同的研究者、学院和公司在进行着持续不断的努力,以试图发现新的、潜在有效的化疗和抗菌药剂。

[0008] 海洋天然产物是新的潜在抗癌药剂和抗菌药剂的丰富来源。海洋是一个巨大复合体系,多种多样的微生物生活于其中,这些微生物在极端不同的压力、盐分以及温度的海洋环境中生存。海洋微生物因此进化发展出了新陈代谢上的以及生理学上的特性,这些特性不仅使它们能在极端且多变的环境中生存,而且能够使它们产生出特别的代谢产物,这些代谢产物是从陆生微生物的代谢产物中观察不到的 (Okami, Y. 1993 JMar Biotechnol 1 :59)。这类代谢产物的代表性结构类型包括萜、肽,多聚乙酰和混合生物合成来源的化合物。许多这些分子都显示出抗肿瘤、抗细菌、抗真菌、抗炎或者免疫抑制的活性 (Bull, A. T. et al. 2000 Microbiol Mol Biol Rev 64 :573 ;Cragg, G. M. & D. J. Newman 2002 Trends Pharmacol Sci 23 :404 ;Kerr, R. G. & S. S. Kerr 1999 Exp Opin Ther Patents 9 :1207 ;Moore, B. S 1999 Nat Prod Rep 16 :653 ;Faulkner, D. J. 2001 NatProd Rep 18 :1 ;Mayer, A. M. & V. K. Lehmann 2001 Anticancer Res 21 :2489),这证明了利用这种资源 (海

洋天然产物资源)的实用性;可以从中分离出价值无法衡量的疾病治疗药物。此外,与目前市场上销售的药物的作用机理不同的新的抗癌以及抗菌药剂的分离有助于解决耐药性的问题,其中包括对那些基于药物作用机理的耐药性,此类耐药性已经被工程化为用于生物恐怖用途的病原体。

#### [0009] 发明概述

[0010] 总体上,本发明公开的实施方案涉及一些化学化合物,包括杂环化合物及其类似物。一些实施方案涉及作为蛋白酶体抑制剂的化合物应用。

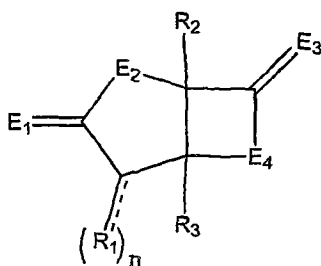
[0011] 在其它实施方案中,所述的化合物用于治疗与肿瘤相关的疾病,例如,抑制肿瘤、癌和其它肿瘤性组织的生长。本发明公开的治疗方法可用于治疗被怀疑有肿瘤生长、癌或者良性或恶性的肿瘤性生长物的任何患者(本发明所使用的“肿瘤”或“多种肿瘤”包括肿瘤,癌,扩散的肿瘤性细胞和局限的肿瘤性生长)。这类生长物的例子包括但并不局限于乳腺癌;骨肉瘤,血管肉瘤,纤维肉瘤和其它的肉瘤;白血病;静脉窦瘤;卵巢癌,输尿管癌,膀胱癌,前列腺癌和其它生殖泌尿系统的癌症;结肠癌,食道癌和胃癌以及其它胃肠道癌症;肺癌;淋巴瘤;骨髓瘤;胰腺癌;肝癌;肾癌;内分泌腺癌;皮肤癌;黑素瘤;血管瘤;以及脑或中枢神经系统(CNS)的癌症。一般而言,欲治疗的所述肿瘤或生长物可以是任何肿瘤或者癌症,原发的或者继发的。某些实施方案涉及了治疗动物体内肿瘤性疾病的方法。这些方法可包括,例如,给予患者所需要的有效量的化合物。其它实施方案涉及了所述化合物在治疗肿瘤性疾病的药物或药剂的制造中应用。所述的化合物可以与化学治疗剂联合给药。

[0012] 在其它实施方案中,所述的化合物用于治疗炎症性疾病状态。某些实施方案涉及治疗动物体内炎症性疾病状态的方法,这些方法包括,例如,给予患者所需要的有效量的化合物。其它实施方案涉及了化合物在治疗炎症的药物或药剂的制造中的应用。

[0013] 在某些实施方案中,所述的化合物可用于治疗感染性疾病。感染性病原体可以是微生物,例如、细菌、真菌、原生动、及显微镜下可见的藻类或病毒。而且,所述的感染性病原体也可以是 *B. anthracis* (炭疽)。在一些实施方案中,所述的感染性病原体是寄生虫。例如,所述的感染性病原体可以是疟原虫、利什曼原虫和锥虫。某些实施方案涉及了治疗动物体内感染性病原体的方法。这些方法包括,例如,给予患者所需要的有效量的化合物。其它实施方案涉及了化合物在治疗感染性病原体的药物或药剂的制造中的应用。

[0014] 一些实施方案涉及了具有通式 I 的结构化合物、其药物可接受的盐类及其酯类前药在癌症、炎症和感染性疾病治疗中的应用:

[0015]



[0016] 通式 I

[0017] 其中虚线表示单键或双键,其中  $R_1$  可独立地选自氢、卤素以及下列残基的单取代、

多取代或未取代的变体：饱和的  $C_1-C_{24}$  的烷基，不饱和的  $C_2-C_{24}$  的烯基或者  $C_2-C_{24}$  的炔基，酰基，酰氧基，烷氧羰基氧基，芳氧羰基氧基，环烷基，环烯基，烷氧基，环烷氧基，芳香基，杂芳香基，芳烷氧基羰基，烷氧羰基酰基，氨基，氨基羰基，氨基羰氧基，硝基，叠氮基，苯基，环烷酰基，羟基，烷硫基，芳硫基，含氧磺酰基，羧基，氰基，和包括多卤代烷基的卤代烷基。其中  $n$  等于 1 或 2，且当  $n$  等于 2 时， $R_1$  可以相同或不同；

[0018] 其中  $R_2$  可选自氢、卤素以及下列残基的单取代、多取代或未取代的变体：饱和的  $C_1-C_{24}$  的烷基，不饱和的  $C_2-C_{24}$  的烯基或  $C_2-C_{24}$  的炔基，酰基，酰氧基，烷氧羰基氧基，芳氧羰基氧基，环烷基，环烯基（包括，例如环己基甲醇），烷氧基，环烷氧基，芳香基，杂芳香基，芳烷氧基羰基，烷氧羰基酰基，氨基，氨基羰基，氨基羰氧基，硝基，叠氮基，苯基，环烷酰基，羟基，烷硫基，芳硫基，含氧磺酰基，羧基，氰基，以及包括多卤代烷基的卤代烷基；

[0019] 其中  $R_3$  可选自氢、卤素和下列残基的单取代、多取代或未取代的变体：饱和的  $C_1-C_{24}$  的烷基，不饱和的  $C_2-C_{24}$  的烯基或  $C_2-C_{24}$  的炔基，酰基，酰氧基，烷氧羰基氧基，芳氧羰基氧基，环烷基，环烯基，烷氧基，环烷氧基，芳香基，杂芳香基，芳烷氧基羰基，烷氧羰基酰基，氨基，氨基羰基，氨基羰氧基，硝基，叠氮基，苯基，环烷酰基，羟基，烷硫基，芳硫基，含氧磺酰基，羧基，氰基，以及包括多卤代烷基的卤代烷基；且其中每一  $E_1$ ， $E_2$ ， $E_3$  和  $E_4$  为取代或未取代的杂原子。

[0020] 其它实施方案涉及治疗动物体内肿瘤性疾病的方法，这些方法可包括，例如，给予所述动物在治疗上有效量的化合物，该化合物选自通式 I-V、其药物可接受的盐及其酯类前药。

[0021] 另外的实施方案涉及药物组合物，该组合物包括选自通式 I-V 的化合物。所述药物组合物还可包括抗微生物剂。

[0022] 实施方案还涉及抑制肿瘤细胞生长的方法，该方法可包括，例如，用通式化合物与肿瘤细胞接触，该通式化合物选自通式 I-V、其药物可接受的盐及其酯类前药。

[0023] 其它实施方案涉及抑制蛋白酶体活性的方法，该方法包括用通式化合物与细胞接触的步骤，该通式化合物选自通式 I-V、其药物可接受的盐及其酯类前药。

[0024] 其它实施方案涉及抑制 NF- $\kappa$ B 活化的方法，该方法包括用通式化合物与细胞接触的步骤，该通式化合物选自通式 I-V、其药理学上可接受的盐类及其酯类前药。

[0025] 一些实施方案涉及炎症性疾病状态的治疗方法，包括给予患者所需要的有效量的选自通式 I-V 的通式化合物。

[0026] 其它的实施方案涉及治疗由微生物引起的疾病的方法，包括给予患者所需要的有效量的选自通式 I-V 的通式化合物。

[0027] 附图简要说明

[0028] 在此引入并作为说明书一部分的所述的附图仅仅说明本发明的某些优选的实施方案。与说明书的其它部分一起，它们都用于向本领域技术人员解释本发明中制备某些化合物的优选方式。在附图中：

[0029] 图 1. 显示 Salinosporamide A 的化学结构

[0030] 图 2. 显示 Salinospora 的泛热带分布。“X”表示 Salinospora 的采集位置。

[0031] 图 3. 显示 Salinospora 菌落的实例。

[0032] 图 4. 显示 Salinospora 的典型的 16S rDNA 序列。条状表示 Salinospora 的特征

标记核苷酸,这种特征标记核苷酸将 *Salinospora* 与其最近的相关物种中分离出。

[0033] 图 5. 显示 Omuralide, 一种微生物的代谢产物 - 乳胞素的降解产物。图 5 也显示用式 II-16 表示的化合物,也称为 Salinosporamide A。式 II-16 化合物与 Omuralide 结构上相似。

[0034] 图 6. 显示致命性的毒素介导的巨噬细胞的细胞毒性。NPI-0052B 表示式 II-16 的化合物。

[0035] 图 7. 描述了具有结构式 II-20 的化合物的  $^1\text{H}$  NMR 图谱。

[0036] 图 8. 描述了具有结构式 II-24C 的化合物的  $^1\text{H}$  NMR 图谱。

[0037] 图 9. 描述了具有结构式 II-19 的化合物的  $^1\text{H}$  NMR 图谱。

[0038] 图 10. 描述了具有结构式 II-2 的化合物的  $^1\text{H}$  NMR 图谱。

[0039] 图 11. 描述了具有结构式 II-2 的化合物的质谱。

[0040] 图 12. 描述了具有结构式 II-3 的化合物的  $^1\text{H}$  NMR 图谱。

[0041] 图 13. 描述了具有结构式 II-3 的化合物的质谱。

[0042] 图 14. 描述了具有结构式 II-4 的化合物的  $^1\text{H}$  NMR 图谱。

[0043] 图 15. 描述了具有结构式 II-4 的化合物的质谱。

[0044] 图 16. 描述了具有结构式 II-5A 的化合物的  $^1\text{H}$  NMR 图谱。

[0045] 图 17. 描述了具有结构式 II-5A 的化合物的质谱。

[0046] 图 18. 描述了具有结构式 II-5B 的化合物的  $^1\text{H}$  NMR 图谱。

[0047] 图 19. 描述了具有结构式 II-5B 的化合物的质谱。

[0048] 图 20. 描述了具有结构式 IV-3C 的化合物在氘代二甲基亚砜中的  $^1\text{H}$ NMR 图谱 (式 IV-3C 化合物在 DMSO- $d_6$  的  $^1\text{H}$  NMR 图谱)。

[0049] 图 21. 描述了具有结构式 IV-3C 的化合物在  $\text{C}_6\text{D}_6$  和氘代二甲基亚砜中的  $^1\text{H}$  NMR 图谱 (式 IV-3C 化合物在  $\text{C}_6\text{D}_6$ /DMSO- $d_6$  的  $^1\text{H}$  NMR 图谱)。

[0050] 图 22. 描述了具有结构式 II-13 的化合物的  $^1\text{H}$  NMR 图谱。

[0051] 图 23. 描述了具有结构式 II-8C 的化合物的  $^1\text{H}$  NMR 图谱。

[0052] 图 24. 描述了具有结构式 II-25 的化合物的  $^1\text{H}$  NMR 图谱。

[0053] 图 25. 描述了具有结构式 II-21 的化合物的  $^1\text{H}$  NMR 图谱。

[0054] 图 26. 描述了具有结构式 II-22 的化合物的  $^1\text{H}$  NMR 图谱。

[0055] 图 27. 显示 II-16 抑制家兔肌蛋白酶体的胰凝乳蛋白酶样活性。

[0056] 图 28. 显示 II-16 抑制家兔肌蛋白酶体的 PGPH 活性。

[0057] 图 29. 显示 II-16 抑制人红细胞蛋白酶体的胰凝乳蛋白酶样活性。

[0058] 图 30. 显示 II-16 处理胰凝乳蛋白酶介导的 LLVY-AMC 底物裂解的作用。

[0059] 图 31. 显示 II-16 的 NF- $\kappa$ B/ 萤虫素酶的活性和 II-16 的细胞毒性特征谱。

[0060] 图 32. 显示在 HEK293 细胞 (A) 以及 HEK293NF- $\kappa$ B/ 荧光素酶报告基因克隆 (B) 中 II-16 引起的 I $\kappa$ B $\alpha$  降解的减少和磷酸化的 I $\kappa$ B $\alpha$  的滞留。

[0061] 图 33. 显示 II-16 对 HEK293 细胞 (A) 以及 HEK293NF- $\kappa$ B/ 荧光素酶报告基因克隆 (B) 处理后,细胞周期调节蛋白, p21 和 p27 的累积。

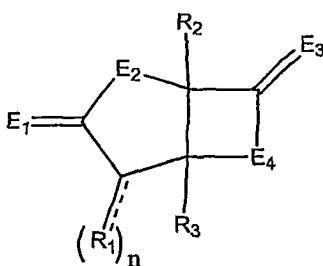
[0062] 图 34. 显示在 Jurkat 细胞中, Caspase-3 (半胱天冬酶 -3) 被 II-16 活化。

[0063] 图 35. 显示在 Jurkat 细胞中, PARP 被 II-16 裂解。

- [0064] 图 36. 显示在 RAW264.7 细胞中, II-16 抑制 LeTx 诱导的细胞毒性。
- [0065] 图 37. 显示 II-16 处理对 RPMI 8226 和 PC-3 细胞中 PARP 和前 Caspase-3 裂解的作用。
- [0066] 图 38. 显示 RPMI 8226 的 II-16 处理导致 PARP 和前 Caspase-3 的剂量依赖性的裂解。
- [0067] 图 39. 显示 II-16 (实心圆,  $IC_{50}$  3nM), II-17 (空心圆,  $IC_{50}$  11nM), II-18 (空心方块,  $IC_{50}$  13nM) 在体外对蛋白酶体的抑制作用。
- [0068] 图 40. 显示从 II-16 治疗的小鼠中制备的 PWBL 中的蛋白酶体的活性。
- [0069] 图 41. 显示在所述 PWBL 分析中, epoxomicin 的治疗效果。
- [0070] 图 42. 显示内部分析的比较。
- [0071] 图 43. 显示在经 LPS 处理的小鼠中, 血浆 TNF 水平的下降。
- [0072] 图 44. 描述用于说明在 HEK293 NF- $\kappa$ B/Luc 细胞中, 式 II-2, II-3 和 II-4 对 NF- $\kappa$ B 介导的荧光素酶活性作用的分析结果。
- [0073] 图 45. 描述用于说明在 HEK293 NF- $\kappa$ B/Luc 细胞中, 式 II-5A 和 II-5B 对 NF- $\kappa$ B 介导的荧光素酶活性作用的分析结果。
- [0074] 图 46. 描述了用于说明式 II-2, II-3 和 II-4 对家兔 20S 蛋白酶体的胰凝乳蛋白酶样活性的作用的分析结果。
- [0075] 图 47. 描述了式 II-5A 和 II-5B 对家兔 20S 蛋白酶体的胰凝乳蛋白酶样的活性的作用。
- [0076] 图 48. 描述了式 II-2, II-3 和 II-4 抗 LeTx 介导的细胞毒性的作用。
- [0077] 图 49. 描述了具有结构式 II-17 的化合物的  $^1H$  NMR 图谱。
- [0078] 图 50. 描述了具有结构式 II-18 的化合物的  $^1H$  NMR 图谱。
- [0079]
- [0080] 优选实施方案的详细说明
- [0081] 本发明的实施方案包括但并不局限于: 提供化合物的制备方法, 包括化合物, 例如, 本发明描述的化合物及其类似物, 以及提供用于制备例如药物可接受的抗菌, 抗癌和抗炎的组合物的方法。所述的方法包括以相对高收率生产所述的组合物, 其中所述的化合物和 / 或它们的衍生物是这些组合物中的有效活性成分。其它的实施方案涉及了提供一类无法通过现有方法获得的新的化合物。此外, 实施方案涉及了癌症, 炎症和感染性疾病, 特别是感染人的疾病的治疗方法。
- [0082] 所述的方法可以包括, 例如, 有效量的一类新化合物中成员的给药步骤。优选的实施方案涉及了本发明所述的化合物, 以及这些化合物的制备方法和使用方法, 但是所述的化合物和方法不必包括在本发明的全部实施方案中, 这些发明目的仍被满足。
- [0083] 对于本发明描述的化合物, 每一个立体的碳原子可以是 R 或 S 构型。虽然在本申请中举例说明的特定的化合物以具体的构型所描述, 但是也可以想到下列化合物: 在任何给定的手性中心处有相反的立体化学或者其混合物。当本发明中的衍生物中有手性中心时, 应理解, 所述的化合物包含全部的可能的立体异构体。
- [0084] 通式 I 化合物
- [0085] 一些实施方案提供了多种化合物和制备这些化合物、其药物可接受的盐类及其酯

类前药的方法,其中所述的化合物用通式 I 表示:

[0086]



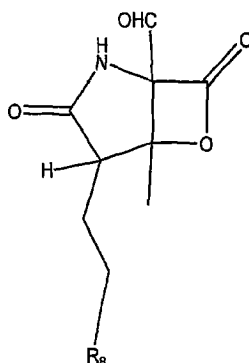
[0087] 通式 I

[0088] 在某些实施方案中,取代基  $R_1$ ,  $R_2$  和  $R_3$  分别可以包括氢、卤素和下列残基的单取代、多取代或者未取代的变体:饱和的  $C_1$ - $C_{24}$  的烷基,不饱和的  $C_2$ - $C_{24}$  的烯基或者  $C_2$ - $C_{24}$  的炔基,酰基,酰氧基,烷氧基羰氧基,芳氧基羰氧基,环烷基(包括,例如环己基甲醇),环烯基烷氧基,环烷氧基,芳基,杂芳基,芳烷氧羰基,烷氧羰酰基,氨基,氨基羰基,氨基羰氧基,硝基,叠氮基,苯基,环烷酰基,羟基,烷硫基,芳硫基,含氧磺酰基,羧基,氰基,和包括多卤代烷基的卤代烷基。此外,在某些实施方案中,每一  $E_1$ ,  $E_2$ ,  $E_3$ , 和  $E_4$  为取代或未取代的杂原子,例如,分别选自氮,硫和氧的杂原子。

[0089] 在一些实施方案中,  $n$  可以等于 1 或等于 2,当  $n$  等于 2 时,取代基可以相同或不同。此外,在一些实施方案中,  $R_3$  不为氢。

[0090]  $R_2$  优选为甲酰基。也就是,所述的化合物可含有以下结构 I-1:

[0091]

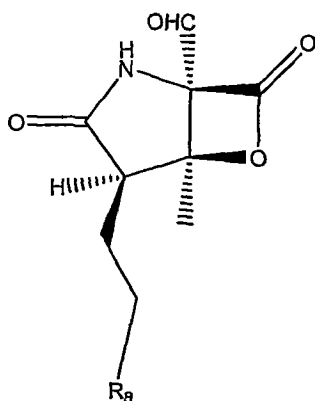


[0092] 通式 I-1

[0093]  $R_8$  可以包括,例如,氢,氟,氯,溴和碘。

[0094] 通式 I-1 的结构可优选具有以下立体化学结构:

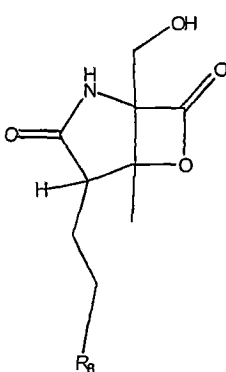
[0095]



[0096]  $R_8$  可以包括, 例如, 氢, 氟, 氯, 溴和碘。

[0097] 优选地,  $R_2$  可为甲醇。例如, 所述的化合物可具有以下结构 I-2 :

[0098]

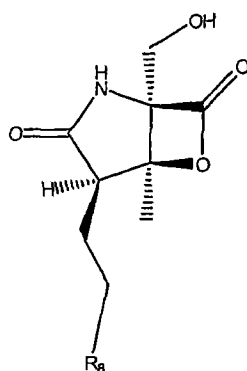


[0099] 通式 I-2

[0100]  $R_8$  可以包括, 例如, 氢, 氟, 氯, 溴和碘。

[0101] 作为例子, 通式 I-2 的结构可具有以下立体化学结构 :

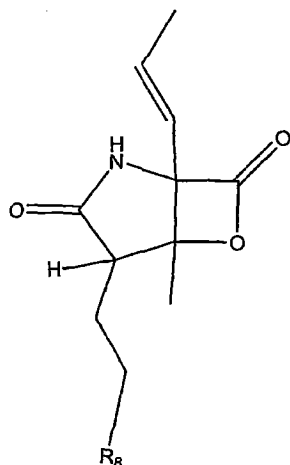
[0102]



[0103]  $R_8$  可以包括, 例如, 氢, 氟, 氯, 溴和碘。

[0104] 作为通式 I 的示例性化合物可以是具有以下结构 I-3 的化合物 :

[0105]

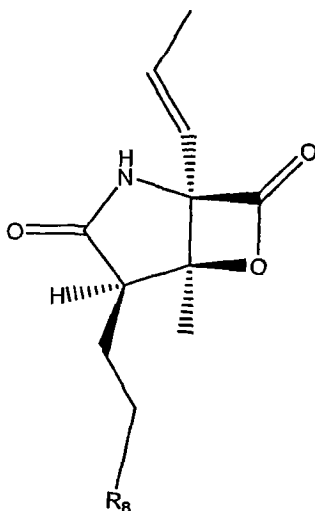


[0106] 通式 I-3

[0107]  $R_8$  可以包括,例如,氢,氟,氯,溴和碘。

[0108] 通式 I-3 的化合物可具有以下立体化学结构:

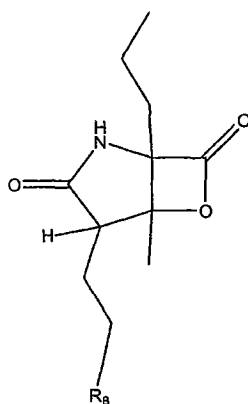
[0109]



[0110]  $R_8$  可以包括,例如,氢,氟,氯,溴和碘。

[0111] 通式 I 的另一个示例性化合物可是具有以下结构 I-4 的化合物:

[0112]

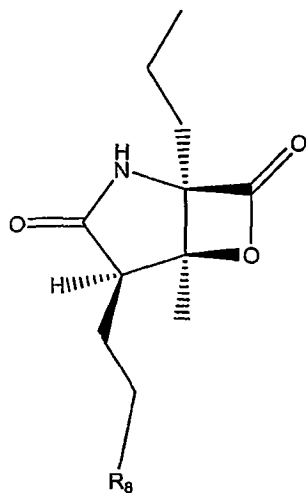


[0113] 通式 I-4

[0114]  $R_8$  可以包括,例如,氢,氟,氯,溴和碘。

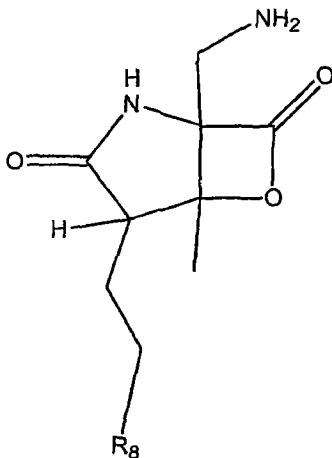
[0115] 优选地,通式 I-4 的化合物可具有以下立体化学结构:

[0116]

[0117] R<sub>8</sub> 可以包括,例如,氢,氟,氯,溴和碘。

[0118] 通式 I 的示例化合物还可以是具有以下结构 I-5 的化合物:

[0119]

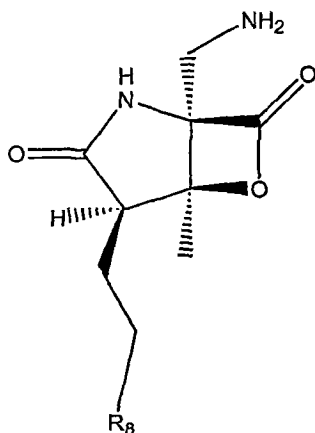


[0120] 通式 I-5

[0121] R<sub>8</sub> 可以包括,例如,氢,氟,氯,溴和碘。

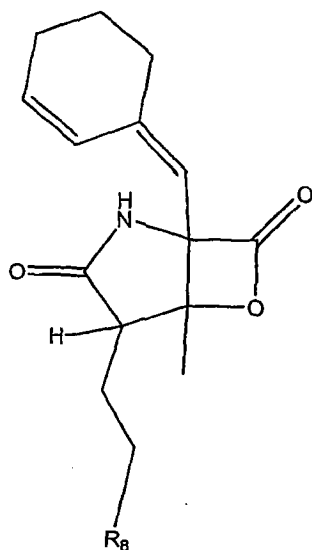
[0122] 例如,通式 I-5 的化合物可含有下列立体化学结构:

[0123]

[0124] R<sub>8</sub> 可以包括,例如,氢,氟,氯,溴和碘。[0125] 在一些实施方案中,通式 I 的 R<sub>2</sub> 可以是,例如,3-亚甲基环己烯。例如,所述的化

合物可具有下列通式 I-6 的结构：

[0126]

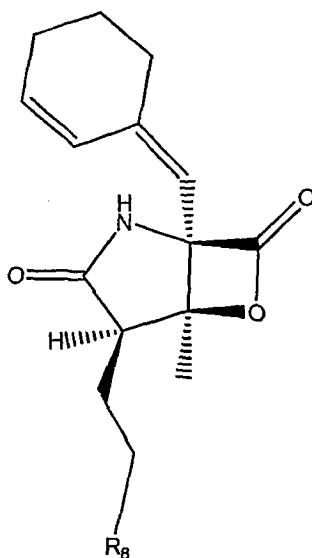


[0127] 通式 I-6

[0128]  $R_8$  可以包括, 例如, 氢, 氟, 氯, 溴和碘。

[0129] 优选地, 通式 I-6 的化合物可具有下列立体化学结构：

[0130]



[0131]  $R_8$  可以包括, 例如, 氢, 氟, 氯, 溴和碘。

[0132] 在其它实施方案中,  $R_2$  可以是环己基烷基胺。

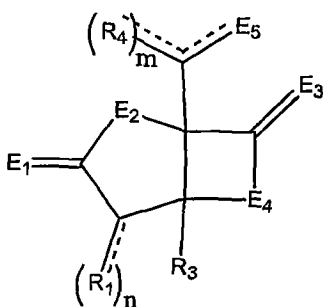
[0133] 在其它实施方案中,  $R_2$  也可以是 C-环己基烷基胺-亚甲基胺。在另一些实施方案中,  $R_2$  可以是环己烷醛-O-脞。

[0134] 此外, 在一些实施方案中,  $R_2$  可以是环烷酰基。

[0135] 通式 II 化合物

[0136] 其它实施方案提供了一些化合物和产生这类化合物、其药物可接受的盐类及其酯类前药的方法, 其中所述的化合物用通式 II 表示：

[0137]



[0138] 通式 II

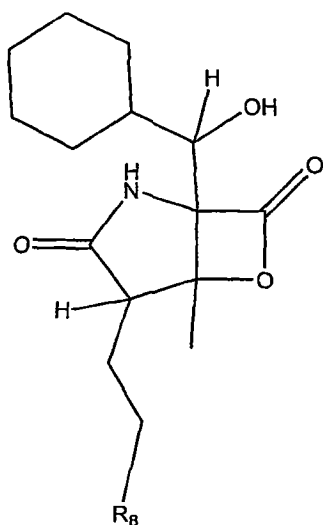
[0139] 在某些实施方案中,取代基  $R_1$ ,  $R_3$  和  $R_4$  分别可以包括氢,卤素和下列残基的单取代,多取代或者未取代的变体:饱和的  $C_1-C_{24}$  的烷基,不饱和的  $C_2-C_{24}$  的烯基或者  $C_2-C_{24}$  的炔基,酰基,酰氧基,烷氧基羰氧基,芳氧基羰氧基,环烷基,环烯基,烷氧基,环烷氧基,芳香基,杂芳基,芳烷氧羰基,烷氧羰酰基,氨基,氨基羰基,氨基羰氧基,硝基,叠氮基,苯基,环烷酰基,羟基,烷硫基,芳硫基,含氧磺酰基,羧基,氰基,和包括多卤代烷基的卤代烷基。此外,在某些实施方案中,每一个  $E_1, E_2, E_3$ , 和  $E_4$  为取代或未取代的杂原子,例如,选自氮,硫和氧的杂原子或者取代的杂原子。

[0140] 在一些实施方案中, $n$  可以等于 1,当在其它实施方案中它可以等于 2。当  $n$  等于 2 时,取代基可以相同或不同。此外,在一些实施方案中, $R_3$  不为氢。 $m$  可以等于 1 或 2。当  $m$  等于 2 时, $R_4$  可以相同或不同。

[0141]  $E_5$  可以是,例如,OH, O,  $OR_{10}$ , S,  $SR_{11}$ ,  $SO_2R_{11}$ , NH,  $NH_2$ , NOH, NHOH,  $NR_{12}$ , 和  $NHOR_{13}$ , 其中  $R_{10-13}$  可以分别包括,例如,氢、下列任何基团的取代或未取代形式:烷基,芳香基,杂芳香基等。 $R_1$  也可以是  $CH_2CH_2X$ , 其中  $X$  可以是,例如, H, F, Cl, Br, 和 I。 $R_3$  可以是甲基。此外, $R_4$  可包括环己基。此外,每一  $E_1, E_3$  和  $E_4$  可以是 O,  $E_2$  可以是 NH。 $R_1$  可优选为  $CH_2CH_2X$ , 其中  $X$  选自 H, F, Cl, Br, 和 I; 其中  $R_4$  可包括环己基; 其中  $R_3$  可以是甲基; 且其中每一个  $E_1, E_3$  和  $E_4$  可分别是 O,  $E_2$  可以是 NH。

[0142] 例如,通式 II 的示例性化合物具有下列结构 II-1:

[0143]

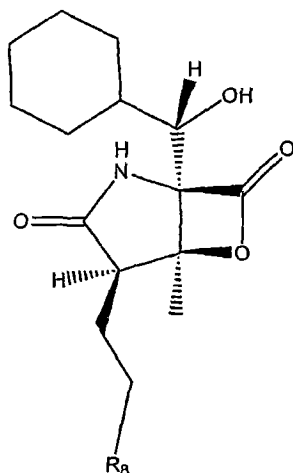


[0144] 通式 II-1

[0145]  $R_8$  可以包括,例如,氢、氟、氯、溴和碘。

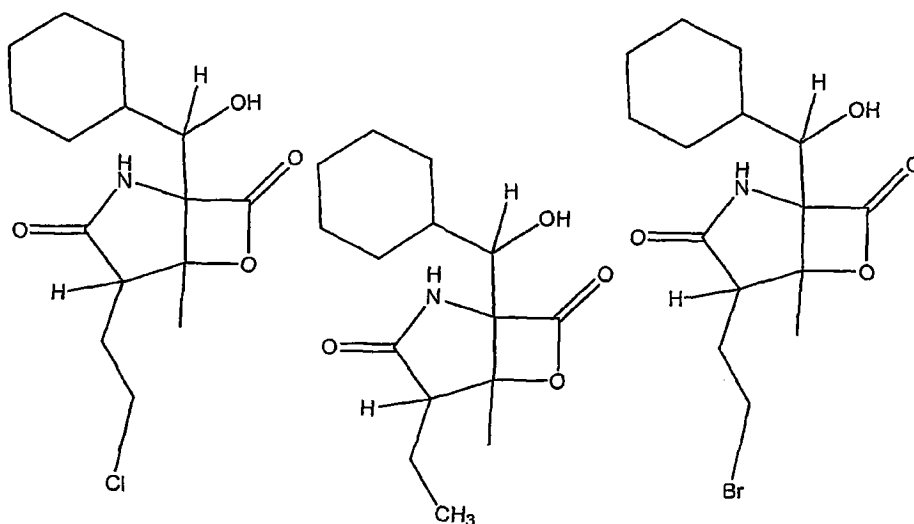
[0146] 示例性立体化学结构可以如下:

[0147]



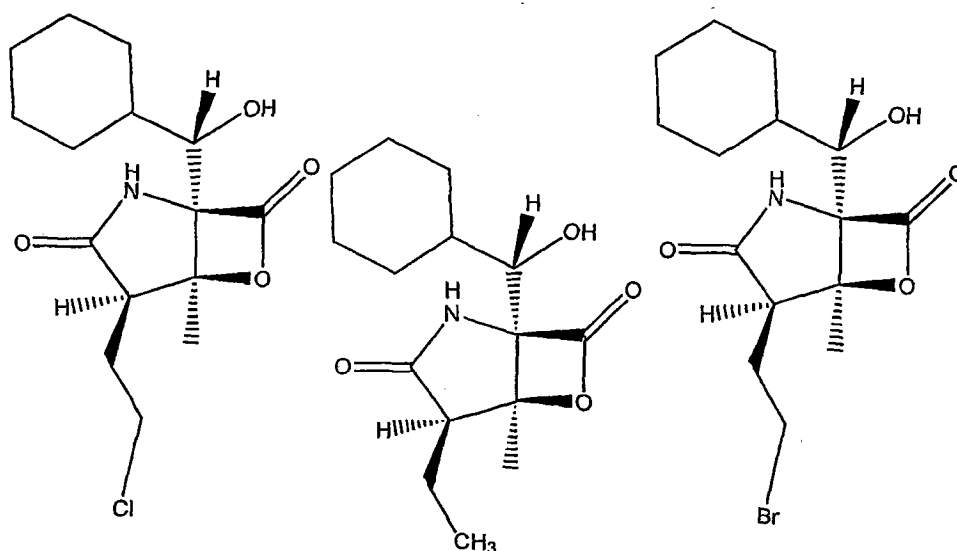
[0148] 在优选的实施方案中,通式 II 的化合物具有下列结构中的任何一种:

[0149]



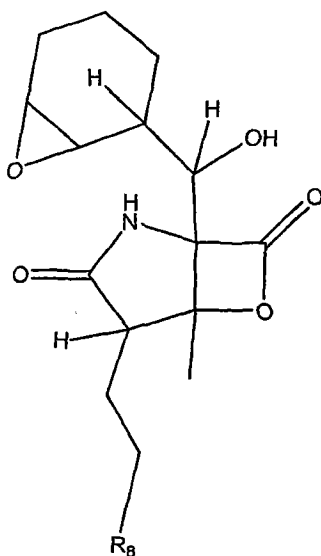
[0150] 下列是具有结构 II-2、II-3 和 II-4 的化合物的分别的示例性立体化学结构:

[0151]

[0152] 在其它实施方案中,其中 R<sub>4</sub> 可以包括 7-氧杂-二环[4.1.0]庚-2-基。通式 II

的示例性化合物为下列结构 II-5：

[0153]

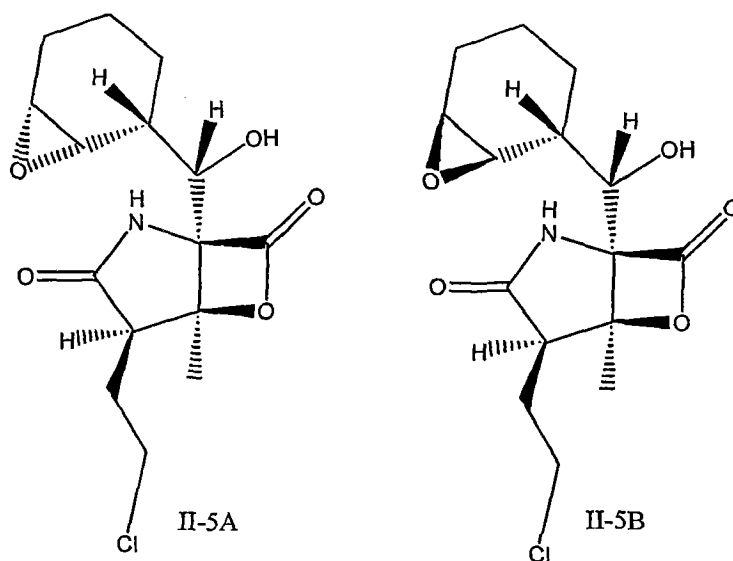


[0154] 通式 II-5

[0155]  $R_8$  可以包括, 例如, 氢、氟、氯、溴和碘。

[0156] 下列是具有通式 II-5 的结构化合物的示例：

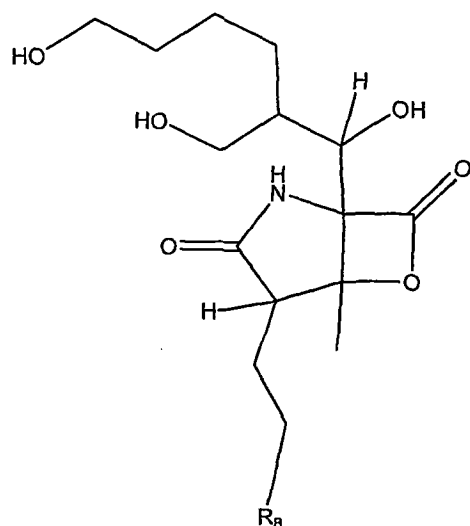
[0157]



[0158] 式 II-5A 和式 II-5B

[0159] 在另外的实施方案中, 至少有一个  $R_4$  可包括取代或未取代的支链烷基。例如, 通式 II 的化合物可以是下列结构 II-6：

[0160]

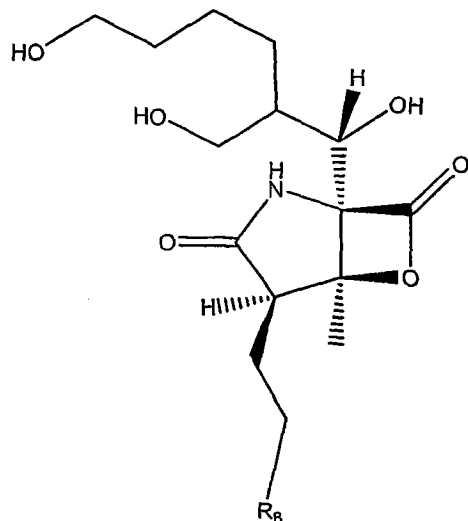


[0161] 通式 II-6

[0162]  $R_8$  可以包括,例如,氢、氟、氯、溴和碘。

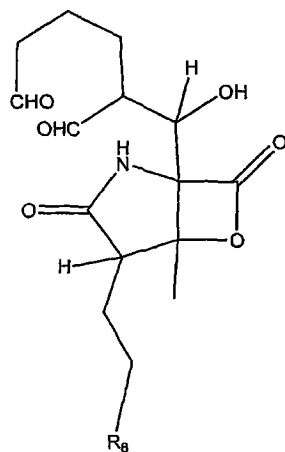
[0163] 下列是具有通式 II-6 的结构的化合物的示例性立体化学结构:

[0164]



[0165] 作为其它例子,通式 II 的化合物可以是下列结构 II-7:

[0166]

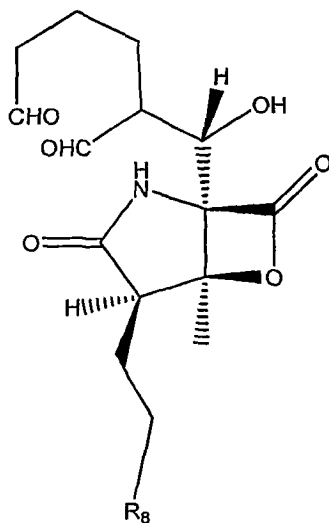


[0167] 通式 II-7

[0168]  $R_8$  可以包括,例如,氢、氟、氯、溴和碘。

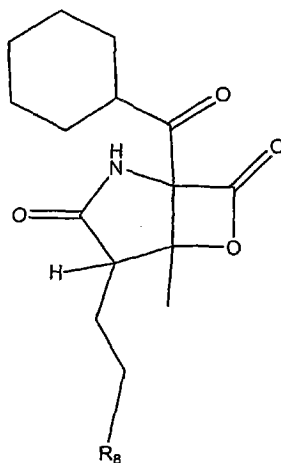
[0169] 下列是具有通式 II-7 的结构的化合物的示例性立体化学结构:

[0170]



[0171] 在其它实施方案中,至少有一个  $R_4$  是环烷基,  $E_5$  可以是氧。通式 II 的示例性化合物可以是下列结构 II-8:

[0172]

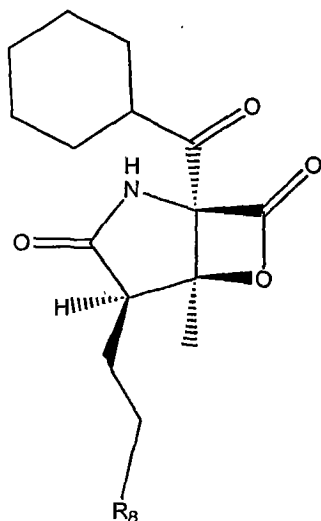


[0173] 通式 II-8

[0174]  $R_8$  可以包括,例如,氢 (II-8A)、氟 (II-8B)、氯 (II-8C)、溴 (II-8D) 和碘 (II-8E)。

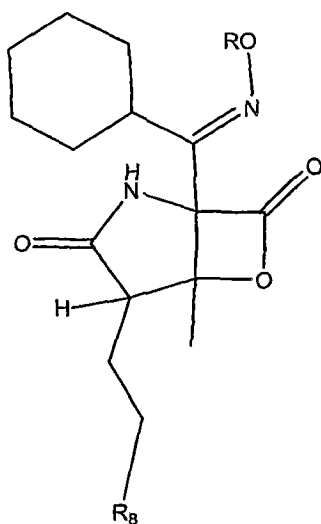
[0175] 下列是具有通式 II-8 结构的化合物的示例性立体化学结构:

[0176]



[0177] 在一些实施方案中,  $E_5$  可以为生成脒的氧化脒。通式 II 的示例性化合物具有下列结构 II-9:

[0178]

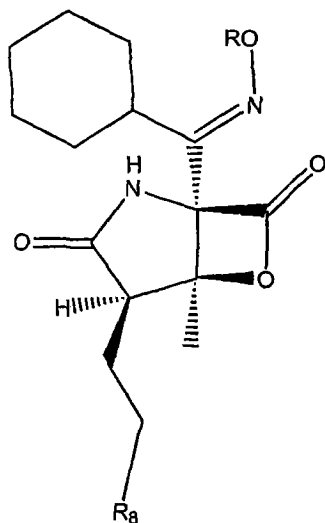


[0179] 通式 II-9

[0180]  $R_8$  可以包括, 例如, 氢、氟、氯、溴和碘; R 可以是氢、取代或未取代的烷基、芳香基或杂芳香基等。

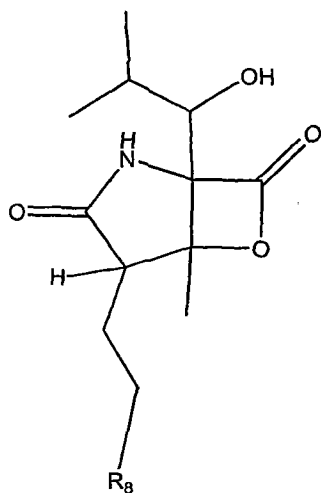
[0181] 下列是具有通式 II-9 结构的化合物的示例性立体化学结构:

[0182]



[0183] 通式 II 的另外的示例性化合物具有下列结构 II-10：

[0184]

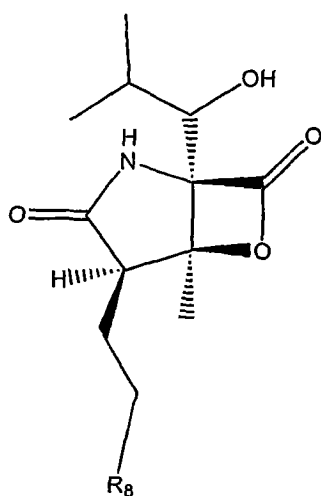


[0185] 通式 II-10

[0186]  $R_8$  可以包括, 例如、氢、氟、氯、溴和碘。

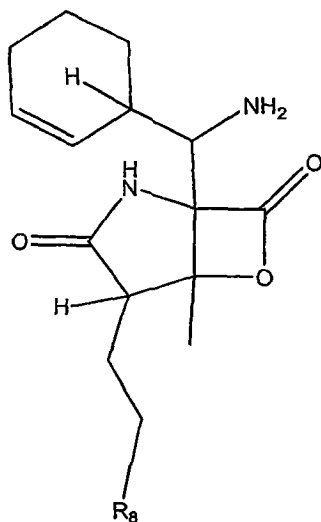
[0187] 下列是具有式 II-10 结构的化合物的示例性立体化学结构：

[0188]



[0189] 在一些实施方案中,  $E_5$  可以是  $NH_2$ 。通式 II 的示例性化合物具有下列结构 II-11：

[0190]

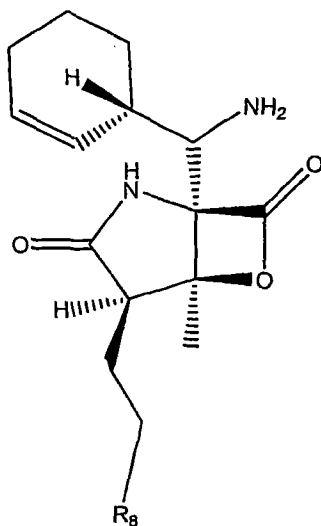


[0191] 通式 II-11

[0192] R<sub>8</sub> 可以包括, 例如、氢、氟、氯、溴和碘。

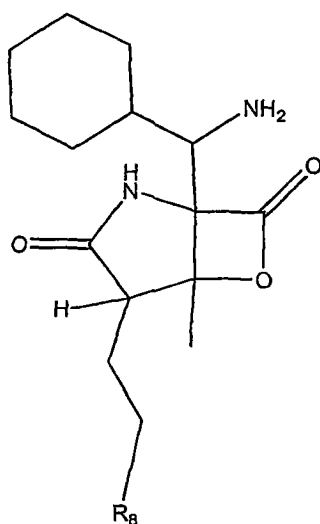
[0193] 下列是具有通式 II-11 结构的化合物的示例性立体化学结构:

[0194]

[0195] 在其它实施方案中, 至少有一个 R<sub>4</sub> 可包括环烷基, E<sub>5</sub> 可以是 NH<sub>2</sub>。

[0196] 通式 II 的示例性化合物具有下列结构 II-12:

[0197]

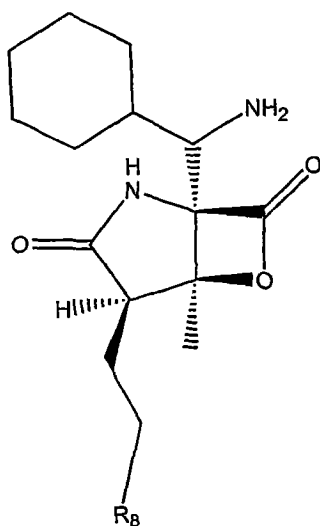


[0198] 通式 II-12

[0199]  $R_8$  可以包括, 例如、氢、氟、氯、溴和碘。

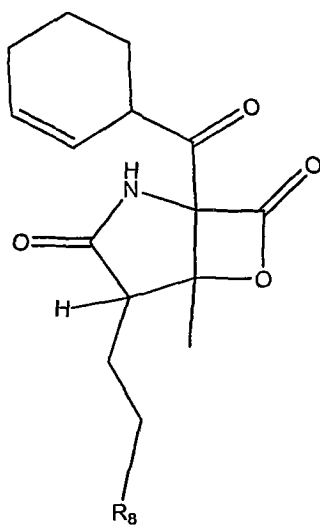
[0200] 下列是具有通式 II-12 结构的化合物的示例性立体化学结构:

[0201]



[0202] 通式 II 的另外的示例性化合物具有下列结构 II-13:

[0203]

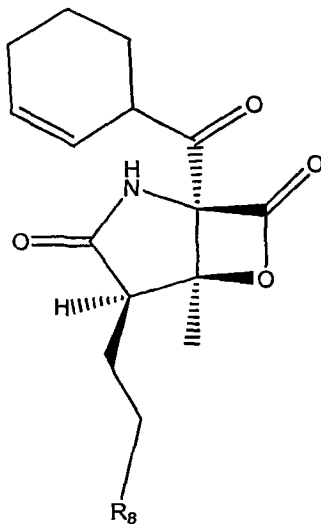


[0204] 通式 II-13

[0205]  $R_8$  可以包括, 例如、氢 (II-13A)、氟 (II-13B)、氯 (II-13C)、溴 (II-13D) 和碘 (II-13E)。

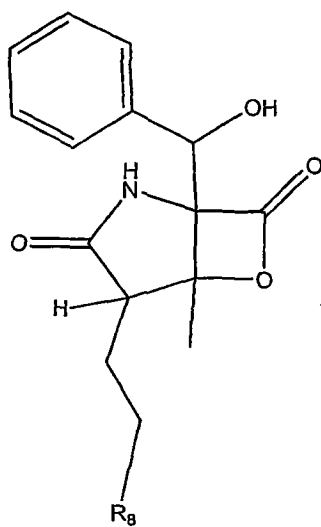
[0206] 下列是具有通式 II-13 结构的化合物的示例性立体化学结构:

[0207]



[0208] 通式 II 的另外的示例性化合物具有下列结构 II-14:

[0209]

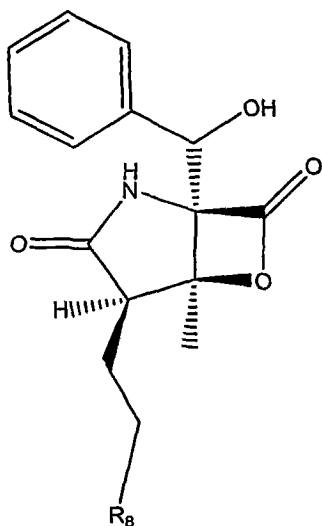


[0210] 通式 II-14

[0211]  $R_8$  可以包括, 例如、氢、氟、氯、溴和碘。

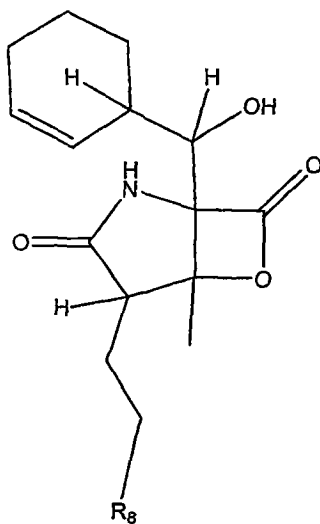
[0212] 下列是具有通式 II-14 结构的化合物的示例性立体化学结构:

[0213]



[0214] 在一些实施方案中,通式 II 的化合物可包括例如 R<sub>4</sub> 至少一个为环烷基。此外,在一些实施方案中,所述的化合物可包括例如 E<sub>5</sub> 位为羟基。通式 II 的另外的示例性化合物具有下列结构 II-15:

[0215]

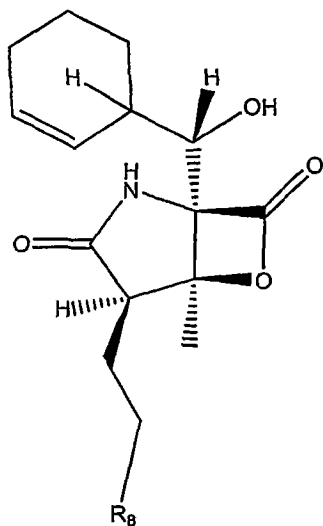


[0216] 通式 II-15

[0217] R<sub>8</sub> 可以包括、例如、氢、氟、氯、溴和碘。

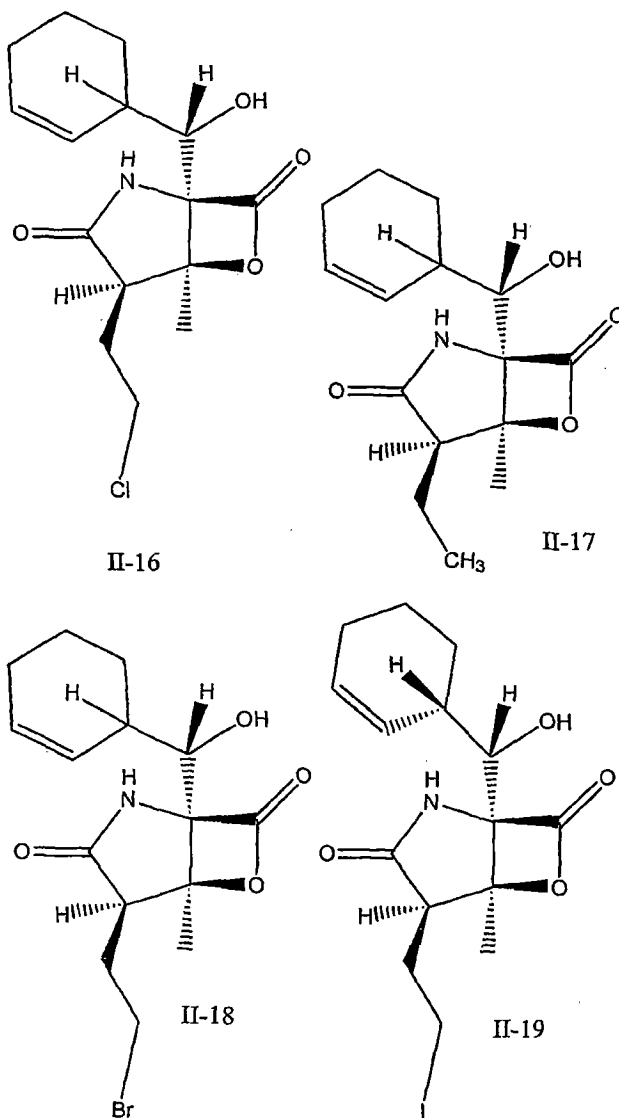
[0218] 示例性立体化学结构可如下:

[0219]



[0220] 以下分别是具有结构 II-16、II-17、II-18 和 II-19 的化合物的示例性立体化学结构：

[0221]

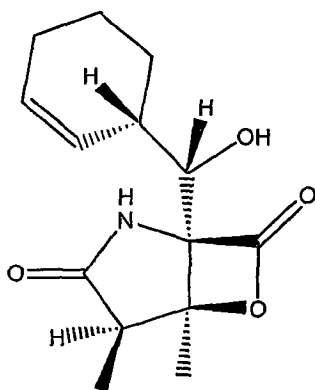


[0222] 式 II-16、II-17、II-18 和 II-19 的化合物可通过下面阐明的发酵、合成、或半合成和分离 / 纯化方法获得。此外,使用称为“起始物”的式 II-16、II-17、II-18 和 II-19 的化

合物来制备本发明所述的其它化合物。

[0223] 在一些实施方案中,通式 II 的化合物,可包括例如当  $R_1$  为甲基的例子。另外的的示例性化合物,式 II-20,具有下列结构和立体化学结构:

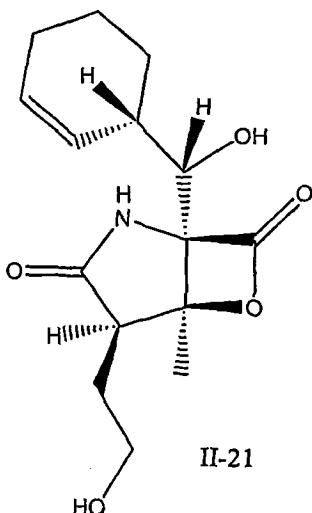
[0224]



II-20

[0225] 在一些实施方案中,通式 II 的化合物,可包括例如当  $R_1$  为羟乙基的例子。另外的的示例性化合物,式 II-21,具有下列结构和立体化学结构:

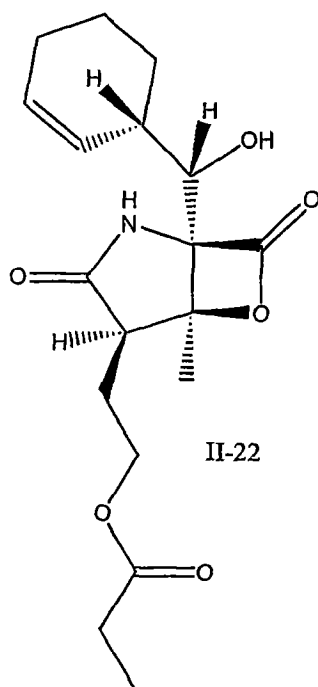
[0226]



II-21

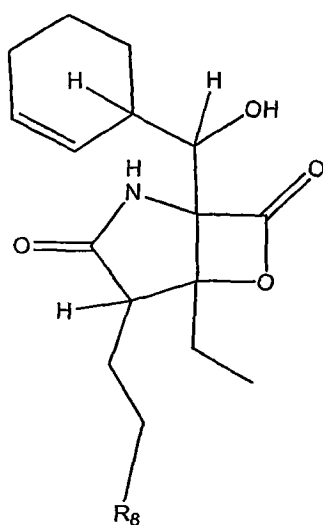
[0227] 在一些实施方案中,式 II-21 的羟基可以被酯化,由此  $R_1$  可包括例如丙酸乙酯。示例性化合物,式 II-22,具有下列结构和立体化学结构:

[0228]



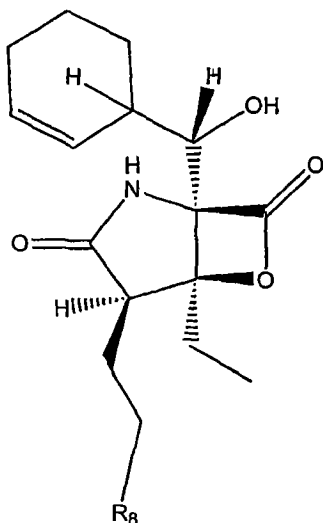
[0229] 在一些实施方案中,通式 II 的化合物可包括例如当  $R_3$  为乙基的例子,通式 II 的另外的示例性化合物具有下列结构 II-23 :

[0230]



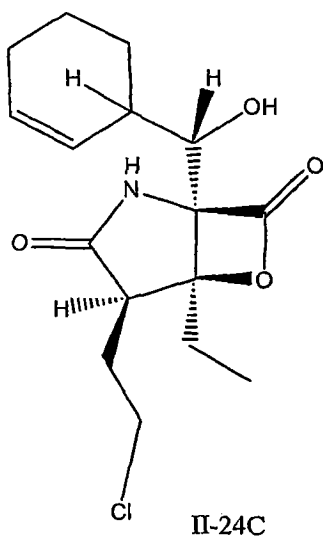
[0231]  $R_8$  可以包括,例如,氢、氟、氯、溴和碘。示例性立体化学结构可如下 :

[0232]



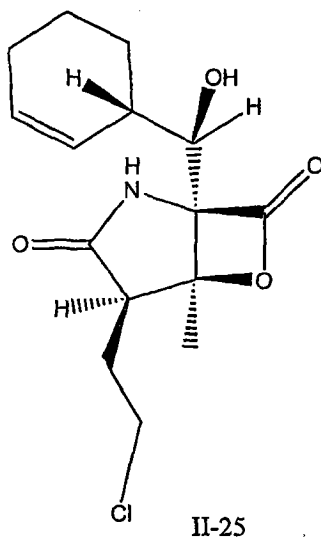
[0233] 在一些实施方案中,通式 II-23 的化合物可具有下列结构和立体化学结构,通过式 II-24C 举例说明,其中 R<sub>8</sub> 为氯:

[0234]



[0235] 在一些实施方案中,通式 II-15 的化合物可具有下列立体化学结构,通过式 II-25 举例说明,其中 R<sub>8</sub> 为氯:

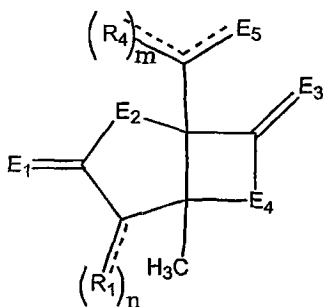
[0236]



[0237] 通式 III 的化合物：

[0238] 其它实施方案提供了化合物和产生该化合物，其药物可接受的盐及其酯类前药的方法，其中所述的化合物用通式 III 表示：

[0239]



[0240] 通式 III

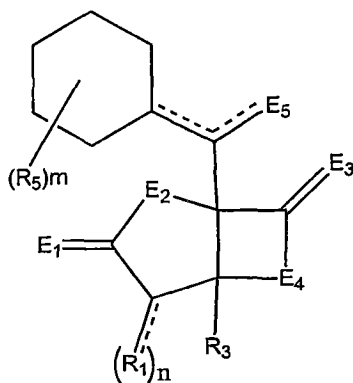
[0241] 在某些实施方案中，取代基  $R_1$  可独立地包括，例如，氢，卤素，下列残基的单取代、多取代或未取代的变体：饱和的  $C_1-C_{24}$  的烷基、不饱和的  $C_2-C_{24}$  的烯基或者  $C_2-C_{24}$  的炔基、酰基、酰氧基、烷氧基羰基、芳氧基羰基、环烷基、环烯基、烷氧基、环烷氧基、芳香基、杂芳基、芳烷氧基羰基、烷氧羰基酰基、氨基、氨基羰基、氨基羰基氧基、硝基、叠氮基、苯基、环烷基酰基、羟基、烷硫基、芳硫基、含氧磺酰基、羧基、氰基、和包括多卤代烷基的卤代烷基。例如， $n$  可以等于 1 或 2。

[0242] 在某些实施方案中， $R_4$  可以是，例如，氢，卤素，下列残基的单取代，多取代或者未取代的变体：饱和的  $C_1-C_{24}$  的烷基，不饱和的  $C_2-C_{24}$  的烯基或者  $C_2-C_{24}$  的炔基，酰基，酰氧基，烷氧羰基氧基，芳氧羰基氧基，环烷基，环烯基，烷氧基，环烷氧基，芳香基，杂芳基，芳烷氧基羰基，烷氧羰基酰基，氨基，氨基羰基，氨基羰基氧基，硝基，叠氮基，苯基，羟基，烷硫基，芳硫基，含氧磺酰基，羧基，氰基，和包括多卤代烷基的卤代烷基。在一些实施方案中， $m$  可以等于 1 或 2，以及当  $m$  等于 2 时，所述的取代基可以相同或不同。而且，每一个  $E_1$ ， $E_2$ ， $E_3$ ， $E_4$  和  $E_5$  为取代或未取代的杂原子，例如，杂原子可以是氮，硫和氧。

[0243] 通式 IV 的化合物：

[0244] 其它实施方案提供了化合物和产生该化合物，其药物可接受的盐及其酯类前药的方法，其中所述的化合物用通式 IV 表示：

[0245]



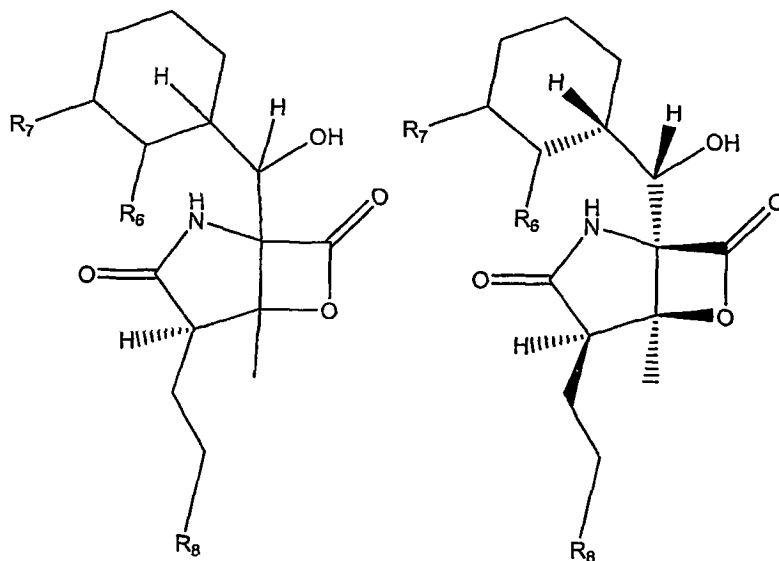
[0246] 通式 IV

[0247] 在某些实施方案中，取代基  $R_1$ ， $R_3$ ，和  $R_5$  可独立地包括氢，卤素，下列残基的单取代，多取代或未取代的变体：饱和的  $C_1-C_{24}$  的烷基，不饱和的  $C_2-C_{24}$  的烯基或者  $C_2-C_{24}$  的炔

基, 酰基, 酰氧基, 烷氧羰基氧基, 芳氧羰基氧基, 环烷基, 环烯基, 烷氧基, 环烷氧基, 芳香基, 杂芳基, 芳烷氧基羰基, 烷氧羰基酰基, 氨基, 氨基羰基, 氨基羰基氧基, 硝基, 叠氮基, 苯基, 羟基, 烷硫基, 芳硫基, 含氧磺酰基, 羧基, 氰基, 以及包括多卤代烷基的卤代烷基。而且, 每一个  $E_1$ ,  $E_2$ ,  $E_3$ ,  $E_4$  和  $E_5$  可以为杂原子或取代的杂原子, 例如, 氮, 硫和氧。在一些实施方案中,  $R_3$  不为氢。n 等于 1 或 2。当 n 等于 2 时, 所述的取代基可以相同或不同。m 也可以是 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 或 11。当 m 大于 1 时, 所述的取代基可以相同或不同。

[0248] 在一些实施方案中,  $R_5$  可以为双-取代的环己基。通式 IV 的示例性化合物为下列结构 IV-1, 具有和不具有下列示例性立体化学结构:

[0249]

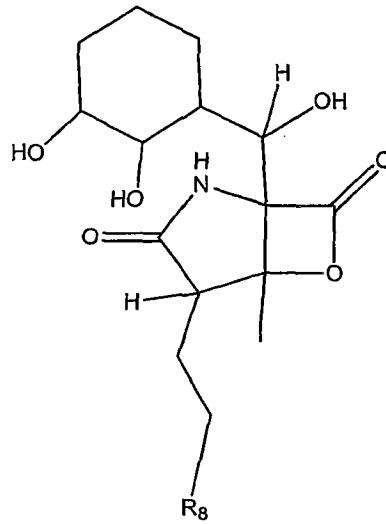


[0250] 通式 IV-1

[0251]  $R_8$  可以包括, 例如, 氢, 氟, 氯, 溴和碘。取代基  $R_6$  和  $R_7$  可独立地包括氢, 卤素, 下列残基的单取代, 多取代或未取代的变体: 饱和的  $C_1-C_{24}$  的烷基, 不饱和的  $C_2-C_{24}$  的烯基或者  $C_2-C_{24}$  的炔基, 酰基, 酰氧基, 烷氧羰基氧基, 芳氧羰基氧基, 环烷基, 环烯基, 烷氧基, 环烷氧基, 芳香基, 杂芳基, 芳烷氧基羰基, 烷氧羰基酰基, 氨基, 氨基羰基, 氨基羰基氧基, 硝基, 叠氮基, 苯基, 羟基, 烷硫基, 芳硫基, 含氧磺酰基, 羧基, 氰基, 以及包括多卤代烷基的卤代烷基。此外,  $R_6$  和  $R_7$  可以都相同或不同。

[0252] 例如, 通式 IV 的示例性化合物具有下列结构 IV-2:

[0253]

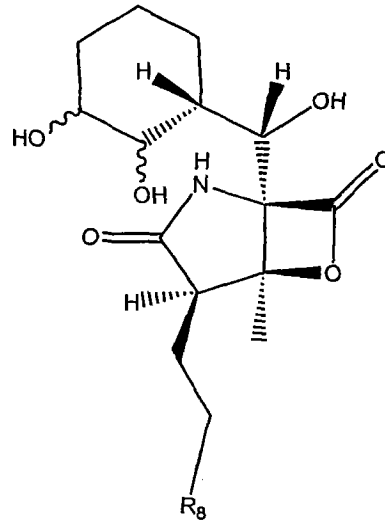


[0254] 通式 IV-2

[0255]  $R_8$  可以包括, 例如, 氢, 氟, 氯, 溴和碘。

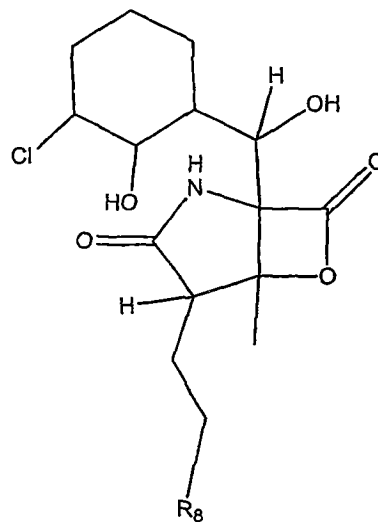
[0256] 示例性立体化学结构可以如下:

[0257]



[0258] 例如, 通式 IV 的示例性化合物具有下列结构 IV-3:

[0259]

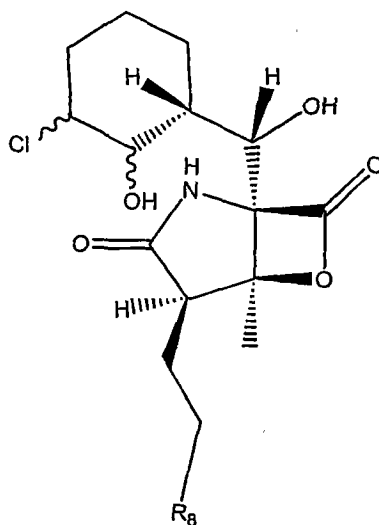


[0260] 通式 IV-3

[0261]  $R_8$  可以包括, 例如, 氢 (IV-3A), 氟 (IV-3B), 氯 (IV-3C), 溴 (IV-3D) 和碘 (IV-3E)。

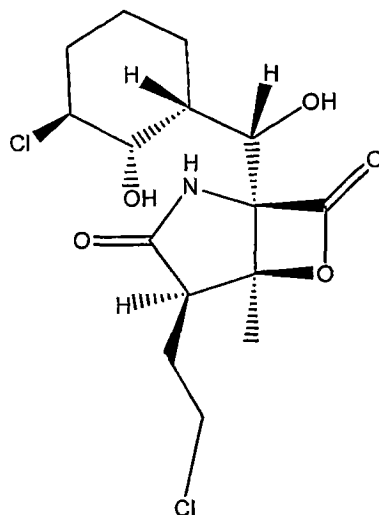
[0262] 示例性结构和立体化学结构可以如下:

[0263]



[0264] 另外的示例性结构和立体化学结构可以如下:

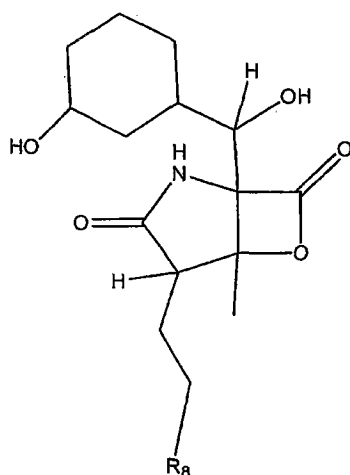
[0265]



[0266] 式 IV-3C

[0267] 例如, 通式 IV 的示例性化合物具有下列结构 IV-4:

[0268]

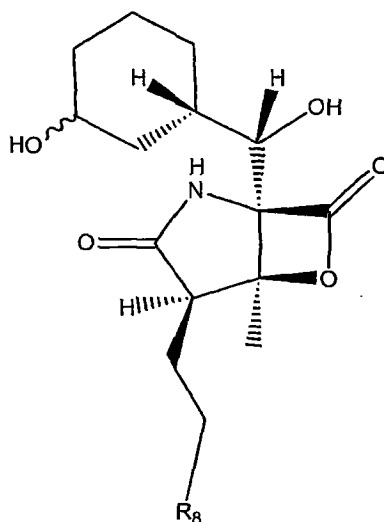


[0269] 通式 IV-4

[0270]  $R_8$  可以包括, 例如, 氢, 氟, 氯, 溴和碘。

[0271] 示例性立体化学结构可以如下:

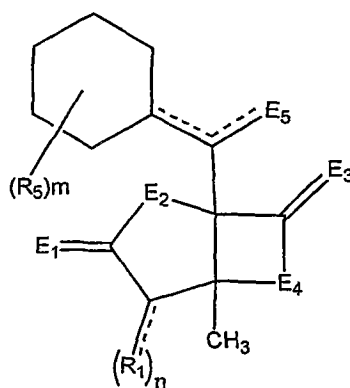
[0272]



[0273] 通式 V 的化合物:

[0274] 一些实施方案提供了化合物和产生该化合物, 其药物可接受的盐及其酯类前药的方法, 其中所述的化合物用通式 V 表示:

[0275]



[0276] 通式 V

[0277] 在某些实施方案中, 取代基  $R_1$  和  $R_5$  可独立地包括氢, 卤素, 下列残基的单取代、

多取代或未取代的变体：饱和的  $C_1-C_{24}$  的烷基，不饱和的  $C_2-C_{24}$  的烯基或者  $C_2-C_{24}$  的炔基，酰基，酰氧基，烷氧羰基氧基，芳氧羰基氧基，环烷基，环烯基，烷氧基，环烷氧基，芳香基，杂芳基，芳烷氧基羰基，烷氧羰基酰基，氨基，氨基羰基，氨基羰基氧基，硝基，叠氮基，苯基，羟基，烷硫基，芳硫基，含氧磺酰基，羧基，氰基，以及包括多卤代烷基的卤代烷基。在某些实施方案中，每一个  $E_1, E_2, E_3, E_4$  和  $E_5$  可以为杂原子或取代的杂原子，例如，氮，硫和氧。n 等于 1 或 2，且当 n 等于 2 时，取代基可以相同或不同。

[0278] 优选地，m 可以为，例如，0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 或 11。当 m 大于 1 时， $R_5$  可以相同或不同。

[0279] 某些实施方案也提供了通式 I-V 的化合物的药物可接受的盐和酯类前药，且提供了通过本发明公开的方法获得和纯化所述化合物的方法。

[0280] 术语“酯类前药”，尤其当指的是通过本发明公开的方法合成通式 I 的化合物的酯类前药时，该术语指的是所述化合物的化学衍生物，该衍生物在体内快速转化，例如在血液或组织内被水解，生成所述化合物。该术语“酯类前药”指的是本发明公开的所述化合物的衍生物，该衍生物是通过形成酯的若干个基团的任何一个的加成而形成的，该形成酯的基团在生理条件下被水解。酯类前药基团的例子包括 pivoyloxymethyl, 乙酸基甲基, 2- 苯并 [c] 咪喃酮亚基, 2, 3- 二氢化茛基和甲氧基甲基，以及其它本领域已知的这类基团，包括 (5-R-2- 氧 -1, 3- 二氧杂环戊烯 -4- 基) 甲基基团。酯类前药基团的其它例子可在下列文献中找到：例如，T. Higuchi 和 V. Stella, 在“作为新颖的递药系统的前药”，第 14 卷，A. C. S. 学术讨论会丛刊，美国化学会 (1975)；(T. Higuchi and V. Stella, in " Pro-drugs as Novel Delivery Systems " , Vol. 14, A. C. S. Symposium Series, American Chemical Society (1975)) 和“药物设计中生物可逆性载体：原理和应用”，E. B. 罗氏编辑，Pergamon 印刷：纽约，14-21 (1987) ( " Bioreversible Carriers in Drug Design: Theory and Application " , edited by E. B. Roche, Pergamon Press : New York, 14-21 (1987)) ( 提供了用作包含羧基的化合物前药的酯类的例子 )。

[0281] 本发明使用的术语“酯类前药”也指的是在体内快速转化，例如，在血液中被水解，生成所述化合物的该化合物的化学衍生物。

[0282] 本发明使用的术语“药物可接受的盐”，且当特别指的是包括通式 I-V 化合物以及通过本发明公开的方法制造和合成通式 I-V 的化合物的药物可接受的盐，该术语指的是该化合物的任何药物可接受的盐，且优选指的是该化合物的酸加成盐。药物可接受的盐的优选例子是碱金属盐（钠或钾），碱土金属盐（钙或镁），或从氨中或从药物可接受的有机胺中衍生的铵盐，例如  $C_1-C_7$  烷基胺，环己胺，三乙醇胺，乙二胺或三（羟甲基）氨基甲烷。就通过此实施方案的方法合成的且为碱性胺的化合物而言，药物可接受的盐的优选例子为药物可接受的无机酸或有机酸的酸加成盐，例如，氢卤酸，硫酸，磷酸或脂肪族的或芳香族的羧酸或磺酸，例如乙酸，琥珀酸，乳酸，苹果酸，酒石酸，柠檬酸，抗坏血酸，烟酸，甲磺酸，对甲苯磺酸或萘磺酸。

[0283] 本发明公开的优选药物组合物包括通过本发明公开的方法获得和纯化的通式 I-V 化合物的药物可接受的盐及其酯类前药。因此，如果药物制剂的制造涉及药物赋形剂与其盐形式存在的活性成分的直接混合，那么优选使用的药物赋形剂为非碱性，也就是酸性赋形剂或中性赋形剂。

[0284] 也可以理解为：短语“化合物和包含该化合物的组合物”或任何相似短语具有包含与药物递送相配的任何适合形式存在的化合物的含意，本发明另外详细讨论该化合物。例如，在某些实施方案中，所述的化合物或包含该化合物的组合物可包括该化合物的药物可接受的盐。

[0285] 在一实施方案中，所述的化合物可用于治疗微生物疾病、癌症和炎症。疾病广泛地解释为涵盖了感染性疾病，和自身免疫性疾病，非感染性疾病和慢性疾病状态。在优选的实施方案中，疾病是由微生物引起的，例如，细菌、真菌和原生动物。使用方法也可包括向有感染性疾病或癌症的个体给药化合物或包含该化合物的组合物的步骤。所述的化合物或组合物按照治疗具体的感染性疾病，癌症或炎症性疾病状态的有效量给药。

[0286] 感染性疾病可以是，例如，由诸如 *B. anthracis* 和 *B. cereus* 的杆菌引起的疾病。感染性疾病可以由原生动物引起的疾病，例如，利什曼原虫，疟原虫或锥虫。所述的化合物或组合物可以与药物可接受的载体，稀释剂，赋形剂等等一同给药。

[0287] 癌症可以是，例如，多发性骨髓瘤，结肠直肠癌，前列腺癌，乳腺癌，非小细胞肺癌，卵巢癌，黑素瘤等等。

[0288] 炎症性疾病状态可以是，例如，类风湿性关节炎，哮喘，多发性硬化症，银屑病，中风，心肌梗塞等等。

[0289] 本发明所使用的术语“卤素原子”是指元素周期表的第 7 栏的非放射性原子，即氟、氯、溴或碘，溴和氯是优选的。

[0290] 本发明所使用的术语“烷基”是指任何直链的或支链的、取代的或未取代的饱和烃，优选含 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 的直链、饱和、未取代的烃，最优选甲基、乙基、异丁基和叔-丁基丙基和戊基。在所述取代的饱和烃中，优选 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 的一卤代、二卤代和全卤代的饱和烃和氨基取代的烃，最优选全氟甲基、全氯甲基、全氟-叔丁基和全氯-叔丁基。

[0291] 术语“取代的”为其普通的含意，如同相关领域内的众多同时期专利中所述的含意。例如，见美国专利第 6,509,331 ;6,506,787 ;6,500,825 ;5,922,683 ;5,886,210 ;5,874,443 和 6,350,759 号。特别的是，取代的定义同美国专利第 6,509,331 号中提供的定义一样宽泛，美国专利第 6,509,331 号定义的术语“取代的烷基”，使其指的是烷基，该烷基优选具有 1 到 10 个碳原子，含有 1 到 5 个的取代基，优选 1 到 3 个的取代基，选自烷氧基，取代的烷氧基，环烷基，取代的环烷基，环烯基，取代的环烯基，酰基，酰氨基，酰氧基，氨基，取代的氨基，氨酰基，氨酰基氧基，氧酰氨基，氰基，卤素，羟基，羧基，羧基烷基，酮基，硫酮基，巯基，硫代烷氧基，取代的硫代烷氧基，芳香基，芳基氧基，杂芳基，杂芳香基氧基，杂环基，杂环基氧基，羟氨基，烷氧基氨基，硝基，--SO- 烷基，--SO- 取代的烷基，--SO- 芳香基，--SO- 杂芳香基，--SO<sub>2</sub>- 烷基，--SO<sub>2</sub>- 取代的烷基，--SO<sub>2</sub>- 芳香基和 --SO<sub>2</sub>- 杂芳香基。其它上述所列的专利也提供了术语“取代的”的标准的定义，该定义被本领域中的技术人员充分理解。

[0292] 术语“环烷基”指的是任何非芳香烃环，优选含有五到十二个原子构成的环。术语“酰基”指的是从酮酸中衍生出的烷基或芳香基，优选乙酰基。

[0293] 本发明使用的术语“烯基”是指任何直链的或支链的、取代的或未取代的、不饱和烃，包括多不饱和烃，优选含 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 无支链的、单不饱和的和双不饱和的、未取代的烃，且最优选单不饱和的、二卤代的烃。术语“环烯基”指的是任何非芳香烃环，优选含有五到十二

个原子构成的环。

[0294] 本发明使用的术语“芳香基,”“取代的芳香基,”“杂芳基”和“取代的杂芳基”指的是芳烃环,优选含有五个、六个或七个原子,最优选六个原子构成的环。“杂芳香基”和“取代的杂芳香基”指的是其中含有至少一个杂原子的芳香烃环,例如,氧,硫或氮原子,该杂原子在环中连同至少一个碳原子。术语“杂环”或“杂环的”指的是含有一个或多个杂原子的任何环状化合物。所述的取代的芳香基,杂环和杂芳香基可以被任何取代基取代,该取代基包括如上所述的取代基和本领域中所知的取代基。

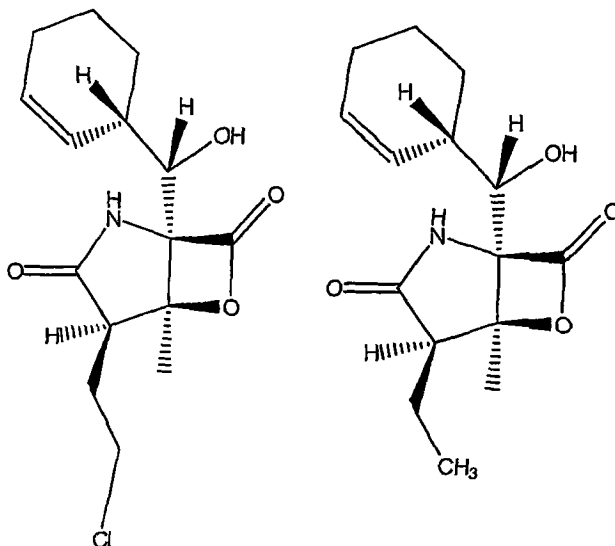
[0295] 术语“烷氧基”指的是任何无支链的或支链的、取代的或未取代的、饱和的或不饱和的醚类,含  $C_1-C_6$  无支链的、饱和的、未取代的醚类是优选的,甲氧基是优选的,且二甲基、二乙基、甲基-异丁基和甲基-叔丁基醚类也是优选的。术语“环烷氧基”指的是任何非芳香烃环,优选含有五到十二个原子构成的环。术语“烷氧基羰基”指的是与羰基相连的任何直链的、支链的、环状的、饱和的、不饱和的、脂肪族的或芳香族的烷氧基。例子包括甲氧基羰基,乙氧基羰基,丙基氧基羰基,异丙基氧基羰基,丁氧基羰基,仲-丁氧基羰基,叔-丁氧基羰基,环戊基氧基羰基,环己基氧基羰基,苄氧基羰基,烯丙基氧基羰基,苯基氧基羰基,吡啶基氧基羰基等等。

[0296] 本发明使用的术语“纯的,”“纯化的,”“基本上纯化的”和“分离的”指的是实施方案中所述的化合物独立于其它的与之不同的化合物,如果该化合物以其自然状态存在,则该化合物以其自然状态与其它与之不同的化合物相关联。在本发明的某些实施方案中所述的化合物被描述为“纯的,”“纯化的,”“基本上纯化的”和“分离的”,则该化合物可构成给定样品的至少 0.5%、1%、5%、10% 或 20% 的重量份,且最优选地包含至少 50% 或 75% 的重量份。

[0297] 术语“衍生物,”“变体”或其它的相似术语指的是为其它化合物类似物的化合物。

[0298] 某些通式 I-V 的所述化合物可获得并纯化,或者从本发明所提及的纯化的化合物中通过半合成获得。一般而言,没有对此限定的话,通式 II-15 的化合物,优选地,式 II-16, II-17, II-18 和 II-19 可合成获得或通过发酵获得。在下文提供示例性发酵操作。此外,通式 II-15 的化合物,优选地,式 II-16, II-17, II-18 和 II-19 可作为为了获得 \ 合成本发明描述的各种其它化合物的起始化合物使用。本发明提供了示例性非限制的合成。

[0299]

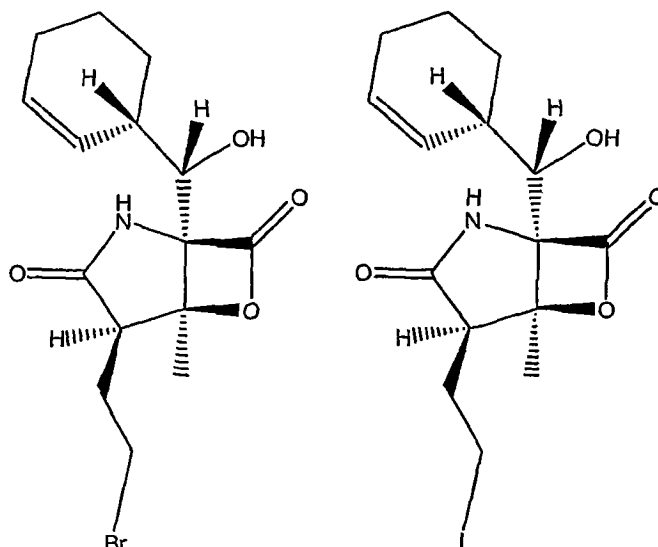


[0300]

式 II-16

式 II-17

[0301]



[0302]

式 II-18

式 II-19

[0303] 当前通过高收率的盐醇（约 200mg/L）产生式 II-16 化合物，且发酵条件的改变产生发酵提取物中的新类似物。图 1 显示 II-16 的化学结构。可通过定向生物合成产生其它的类似物。定向生物合成指的是通过向产微生物的发酵物中添加生物合成的前体类似物得到天然产物的修饰。（Lam, et al., *J Antibiot (Tokyo)* 44 :934 (1991), Lam, et al., *J Antibiot (Tokyo)* 54 :1 (2001)）。

[0304] 将产生培养物暴露在乙酸、苯丙氨酸、缬氨酸、丁酸、莽草酸和卤素的类似物中，优选不包括氯，可导致新类似物的形成。产生的新类似物可通过 HPLC 和 LC-MS 在粗提取物中轻易地被检测到。例如，在处理含有不同浓度的溴化钠 - 溴的类似物的培养基后，在摇瓶培养物中可顺利地产生 14mg/L 的滴定度的式 II-18。

[0305] 产生新类似物的第二个途径是通过生物转化。生物转化反应是由酶或含有这些酶的完整细胞催化的化学反应。参见 Zaks, A., *Curr Opin Chem Biol* 5 :130 (2001)。因为它们是通过在微生物细胞内的一系列的酶促反应被合成的，所以微生物的天然产物是生物转化反应的理想的底物。参见 Riva, S., *Curr Opin Chem Biol* 5 :106 (2001)。

[0306] 所述化合物的给定的结构，包括通式 II-15 的化合物，例如，可能的生物合成的起源是乙酰辅酶 A、乙基丙二酰辅酶 A (ethylmalonyl-CoA)、苯丙氨酸和氯。乙基丙二酰辅酶 A 衍生自丁酰辅酶 A，丁酰 - 辅酶 A 衍生自缬氨酸或者丁烯酰辅酶 A。参见 Liu, et al., *Metab Eng* 3 :40 (2001)。苯丙氨酸衍生自莽草酸。

[0307] 式 II-16, II-17 和 II-18 的化合物的产生

[0308] 式 II-16, II-17 和 II-18 的化合物的产生可通过下述方法实现：在本发明叙述的条件下，优选为在液体有氧条件下，在适宜的营养培养基中培养菌株 CNB476，直到在发酵物中检测到基本量的化合物，然后通过用合适的溶剂从发酵液中提取有效成分来收获化合物，再浓缩含有合适组分的溶剂，然后所述浓缩后的材料经色谱分离从也存在于培养基中的其它代谢产物中分离出所述的化合物。

[0309] 图 2 显示培养物 (CNB476) 的世界范围内的一些采集位置，该培养物也指的是 *Salinospora*。图 3 显示 *Salinospora* 的菌落。图 4 显示 *Salinospora* 的典型的 16S rDNA

序列。条状表示 *Salinospora* 的特征标记核苷酸,这种特征标记核苷酸将 *Salinospora* 与其最近的相关物种中分离出。

[0310] 培养物 (CNB476) 于 2003 年 6 月 20 号被存放于在 Rockville, MD 的美国标准菌库 (American Type Culture Collection) (ATCC) 并指定为 ATCC 专利存放号 PTA-5275。ATCC 的存放条件满足布达佩斯条约的所有要求。所述的培养物也能从在 10480 Wateridge Circle, San Diego, CA 92121 的 Nereus 药用菌库 (Pharmaceutical Culture Collection) 维护和获得。除了本发明描述的特定微生物外,本发明可以理解为:突变体,例如通过化学的或包括 X-射线等物理的诱变剂的使用产生的突变体,和生物体-其基因结构通过分子生物学技术被改变也可以被培养产生式 II-16, II-17 和 II-18 的起始化合物。

#### [0311] 菌株 CNB476 的发酵

[0312] 在适合所述的产生生物体生长的温度下可完成化合物的产生,例如从 16°C 到 40°C,但是优选的有助于发酵的温度是 22°C 到 32°C。孵育水性培养基一段时间,该时间对完成经高压液相色谱 (HPLC) 监测的化合物的产生是必要的,例如,优选的时间段为大约 2 到 10 天,在旋转振荡器上以大约 50rpm 到 400rpm 运转,优选为 150rpm 到 400rpm。

[0313] 本领域的普通技术人员可通过使用合适的培养基完成所述的微生物的生长。广泛地说,碳的来源包括葡萄糖、果糖、甘露糖、麦芽糖、半乳糖、甘露醇和甘油、其它的糖和糖醇、淀粉和其它碳水化合物、或者诸如葡聚糖、结晶葡萄糖的碳水化合物的衍生物、以及复杂的营养素例如燕麦粉,玉米面粉,谷子,玉米等。应用于所述培养基中的碳来源的确切量部分依赖于培养基中的其它成分,但是例如,可满意地使用 0.5% 到 25% 培养基的重量比的碳水化合物量。例如,可单独使用这些碳源或在同一培养基中可联合使用几个这样的碳源。优选使用下文给出的某些碳源。

[0314] 氮的来源包括氨基酸,例如甘氨酸、精氨酸、苏氨酸、蛋氨酸等等,铵盐以及复杂来源,例如酵母提取液、玉米浸液、可溶的蒸馏液、大豆粉、棉花种子粉、鱼粉、蛋白胨等等。例如,可单独使用氮的各种来源或者联合使用 0.5% 到 25% 培养基的重量比量的氮源。

[0315] 在营养的无机盐中,该无机盐可加入到培养基中,常用的无机盐能产生钠、钾、镁、钙、磷、硫、氯、碳酸盐和相似离子,也包括微量金属例如钴、锰、铁、钼、锌、镉等等。

#### [0316] 化合物的生物活性和应用

[0317] 一些实施方案涉及癌症、炎症和感染性疾病,特别是影响人的疾病的治疗方法。所述的方法可包括,例如,有效量的一类新化合物中成员的给药步骤。因此,本发明公开的所述化合物可用于治疗癌症、炎症和感染性疾病。

[0318] 所述的化合物具有多种生物活性。例如,该化合物具有化学致敏活性、抗微生物、抗炎症和抗癌活性。

[0319] 所述的化合物具有蛋白酶体抑制活性。蛋白酶体抑制活性可全部或部分地产生该化合物作为抗癌剂、抗炎剂和抗微生物剂的能力。

[0320] 所述的蛋白酶体是多亚基蛋白酶,它通过它的胰凝乳蛋白酶样、胰蛋白酶样和肽基谷氨酰基肽水解 (PGPH; 也称为 Caspase 样活性) 活性降解细胞内的蛋白质。所述的 26S 蛋白酶体包含称为所述的 20S 蛋白酶体的蛋白水解核心和两个 19S 调节亚基。该 20S 蛋白酶体负责针对许多底物的蛋白水解活性,这些底物包括被损坏的蛋白质、转录因子 NF- $\kappa$ B 及其抑制剂 I $\kappa$ B、信号分子、肿瘤抑制因子和细胞周期调节因子。在所述的蛋白酶体内

有三种不同的蛋白酶活性:1) 胰凝乳蛋白酶样;2) 胰蛋白酶样和3) 肽基谷氨酰基肽水解(PGPH) 活性。

[0321] 作为例子,式 II-16 的化合物 ( $EC_{50}$  2nM) 在抑制所述的家兔肌蛋白酶体的胰凝乳蛋白酶样活性方面比 Omuralide ( $EC_{50}$  52nM) 更有效且也可抑制人红血球衍生的蛋白酶体的胰凝乳蛋白酶样活性 ( $EC_{50}$  约 250pM)。图 5 显示乳胞素的降解产物 Omuralide 和式 II-16 的化合物。式 II-16 的化合物针对抑制胰凝乳蛋白酶的催化活性,显示了抑制所述的蛋白酶体的胰凝乳蛋白酶样活性显著特性。式 II-16 的化合物也显示了低 nM 的胰蛋白酶样抑制活性 (约 10nM),但是在抑制所述蛋白酶体的 PGPH 活性方面有较差的效果 ( $EC_{50}$  约 350pM)。

[0322] 另外的研究已显示了本发明描述的化合物的效果特征,包括式 II-16 在 NF- $\kappa$  B/I $\kappa$  B 信号途径方面的研究。用瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 对 HEK293 细胞 (人胚肾) 的处理诱发 I $\kappa$  B $\alpha$  的磷酸化和蛋白酶体介导的降解,随后 NF- $\kappa$  B 活化。为了确定蛋白酶体抑制作用,HEK293 细胞用式 II-16 化合物预处理 1 个小时接着用 TNF- $\alpha$  刺激。用式 II-16 化合物的处理促进磷酸化的 I $\kappa$  B $\alpha$  的蓄积,这表明蛋白酶体介导的 I $\kappa$  B $\alpha$  降解被抑制。

[0323] 此外,产生了稳定的 HEK293 克隆 (NF- $\kappa$  B/Luc 293),它在 5x NF- $\kappa$  B 结合位点的调节下游携带荧光素酶报告基因。用 TNF- $\alpha$  处理的 NF- $\kappa$  B/Luc293 的刺激作用增加了荧光素酶活性,这是 NF- $\kappa$  B 活化的结果,而经式 II-16 化合物预处理则降低了活性。蛋白质印迹法 (Western blot) 分析显示式 II-16 化合物促进 NF- $\kappa$  B/Luc 293 细胞中的磷酸化的 I $\kappa$  B $\alpha$  的蓄积并减少的总 I $\kappa$  B $\alpha$  的降解。式 II-16 化合物也显示出增加细胞周期调节蛋白, p21 和 p27 的水平。

[0324] 肿瘤细胞对蛋白酶抑制剂比正常细胞更敏感。而且,蛋白酶抑制作用增加了癌细胞对抗癌剂的敏感性。通过针对各种癌细胞系的细胞毒性作用来检测本发明描述的包括式 II-16 的化合物的细胞毒性作用。例如,对国立癌症研究所 60 个人肿瘤细胞系进行筛查检测式 II-16 化合物。式 II-16 化合物显示了选择性的细胞毒性作用,其平均  $GI_{50}$  值 (获得 50% 生长抑制的浓度) 小于 10nM。在抗 SK-MEL-28 黑素瘤和 MDA-MB-235 乳腺癌细胞方面观察到了最大潜能 [两者的  $LC_{50}$  (50% 细胞致死性浓度) < 10nM]。

[0325] 用 Salinosporamide A 处理包括人结肠直肠 (HT-29 和 LoVo)、前列腺 (PC3)、乳腺 (MDA-MB-235)、肺 (NCI-H292)、卵巢 (OVCAR3)、急性 T- 细胞白血病 (Jurkat)、鼠的黑素瘤 (B16-F10) 和正常人成纤维细胞 (CCD-27sk) 的一组细胞系 48h 后评价细胞毒性作用。HT-29, LoVo, PC3, MDA-MB-231, NCI-H292, OVCAR3, Jurkat, 和 B16-F10 细胞是敏感的,它们的  $EC_{50}$  值分别为 47、69、78、67、97、69、10 和 33nM。相反,对 CCD-27sk 细胞的  $EC_{50}$  值是 196nM。用 Salinosporamide A 在大约  $EC_{50}$  浓度对 Jurkat 细胞的处理导致 Caspase-3 活化和 PARP 的裂解,证实凋亡作用的诱导。

[0326] 用体外 LeTx 诱导的细胞毒性分析来评价所述化合物的抗炭疽活性。作为一个例子,该结果表明式 II-16 化合物是鼠巨噬细胞样 RAW264.7 细胞的 LeTx 诱导的细胞毒性的强力抑制剂。用式 II-16 化合物对 RAW264.7 细胞的处理与 LeTx 单独对该细胞的处理相比较在 LeTx 处理的细胞的成活力方面导致了 10 倍的增长 (平均  $EC_{50}$  < 4nM)。

[0327] 式 II-16 化合物的潜在的化学致敏作用

[0328] 另外的研究已显示了本发明描述的化合物对 NF- $\kappa$  B/I $\kappa$  B 信号途径方面的作用特征 (见实施例)。在未刺激的细胞中,所述的转录蛋白核因子 -kappa B (NF- $\kappa$  B) 与抑

制蛋白 I $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B 的抑制剂) 以非活化复合物形式位于细胞浆中。各种刺激经由 I $\kappa$ B 激酶能引起 I $\kappa$ B 磷酸化,接着是蛋白酶体的泛素化 (ubiquitination) 和降解作用。随着 I $\kappa$ B 的降解, NF- $\kappa$ B 转移至核内并调节基因表达,来影响包括细胞凋亡抑制的许多细胞过程。诸如 CPT-11 (依立替康 Irinotecan) 的化学治疗剂能活化包括 LoVo 细胞的人结肠癌细胞系中 NF- $\kappa$ B, 导致这些细胞发生细胞凋亡的能力降低。参见 Painter, R. B. *Cancer Res* 38:4445(1978). Velcade™ 是二肽基硼酸, 它抑制所述蛋白酶体的胰凝乳蛋白酶样活性 (Lightcap, et al., *Clin Chem* 46:673(2000), Adams, et al., *Cancer Res* 59:2615(1999), Adams, *Curr Opin Oncol* 14:628(2002)), 但增加胰蛋白酶和 PGPH 活性。最近 Velcade™ (PS-341; Millennium Pharmaceuticals, Inc.) 作为蛋白酶抑制剂被许可, 它已显示出对癌细胞的直接毒性且也提高体外的 LoVo 细胞中以及经由蛋白酶抑制 I $\kappa$ B 降解的 LoVo 异种移植模型中的 CPT-11 的细胞毒性作用。参见 Blum, et al., *Ann Intern Med* 80:249(1974)。此外, 发现 Velcade™ 能够抑制扁平细胞癌中促血管生成 (proangiogenic) 趋化因子 / 细胞因子生长相关原癌基因 - $\alpha$  (Growth Related Oncogene- $\alpha$ , GRO- $\alpha$ ) 以及血管内皮生长因子的表达, 可能是通过所述 NF- $\kappa$ B 途径的抑制实现的。参见 Dick, et al., *J Biol Chem* 271:7273(1996)。这些数据表明蛋白酶抑制不仅可以减少肿瘤细胞的存活和生长, 也可以减少血管生成。

#### [0329] 抗炭疽活性

[0330] 蛋白酶抑制剂的另外的潜在应用来自于关于生物防御类别 A 物质 (biodefense Category A agent) B. anthracis (炭疽) 的最近的研究。炭疽芽孢被吸入且寄宿于肺中, 在肺中它们被巨噬细胞所摄入。在巨噬细胞内, 芽孢开始发育, 该有机体复制, 最终导致了所述细胞的杀死。但是在杀死该细胞前, 感染的巨噬细胞迁移到淋巴结中, 死亡时, 释放出它们的内含物并允许所述的有机体进入血流中, 进一步复制和分泌致死毒素。参见 Hanna, et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10198(1993)。炭疽毒素引起炭疽相关症状。在炭疽的发病机理中起关键作用的两个蛋白质是保护性抗原 (PA, 83kDa) 和致死因子 (LF, 90kDa), 它们共同地称为致死毒素。LF 具有酶功能, 但是需要 PA 来完成它的生物效应。PA 和 LF 两者之一都不能单独引起死亡, 但是, 当两者联合使用静脉注射到动物体内, 它们引起死亡。参见 Kalns, et al., *Biochem Biophys Res Commun* 297:506(2002), Kalns, et al., *Biochem Biophys Res Commun* 292:41(2002)。

[0331] 保护性抗原, 炭疽毒素的受体结合组分, 负责将致死因子转运入宿主细胞中。PA 寡聚体化成环形的七聚体 (见图 6)。在细胞表面与它的受体相结合的每一个七聚体, 具有结合三个 LF 分子的能力。在 PA 七聚体和 LF 之间形成的复合物经受体介导的细胞内吞作用被摄入所述细胞中。随着细胞内吞作用后, LF 被释放入所述的胞浆中, 在那里它进攻各种的细胞靶标。参见 Mogridge, et al., *Biochemistry* 41:1079(2002), Lacy, et al., *J Biol Chem* 277:3006(2002), Bradley, et al., *Nature* 414:225(2001)。

[0332] 致死因子是锌依赖的金属蛋白酶, 在胞浆中它可分裂和失活丝裂原活化的蛋白激酶激酶家族 (MAPKK) 的信号蛋白。参见 Duesbery, et al., *Science* 280:734(1998), Bodart, et al., *Cell Cycle* 1:10(2002), Vitale, et al., *J Appl Microbiol* 87:288(1999), Vitale, et al., *Biochem J* 352 Pt 3:739(2000)。在所述的七个不同的所知的 MAPK 激酶中, 六个已显示出被 LF 裂解。在所述的细胞内, MAPK 激酶途径转导参与使这

些蛋白成为非常显著靶标的细胞死亡、增殖和分化的相关的各种信号。但是,某些阻止LeTx诱导的细胞死亡的抑制剂不能阻止MAPKK被LF裂解,这表明该抑制剂的活性对细胞死亡的诱导作用是不充分的。参见Kim, et al., J BiolChem 278 :7413(2003), Lin, et al., Curr Microbiol 33 :224(1996)。

[0333] 研究表明所述蛋白酶体的抑制作用能阻止LeTx诱导的细胞死亡。参见Tang, et al., Infect Immun 67 :3055(1999)。数据显示蛋白酶活性对LeTx介导的RAW264.7巨噬细胞样细胞的杀死是必需的,且蛋白酶体抑制剂保护RAW264.7免于LeTx。蛋白酶体抑制作用不阻断MEK1裂解,这表明在这些研究中所描述的LeTx途径不是在MEK1裂解上游被阻断。另外,用LeTx处理的细胞中在蛋白酶活性方面没有增加。这些数据表明同本发明描述的化合物一样,一个新颖的、有效的蛋白酶抑制剂也可以阻止LeTx诱导的细胞死亡,如图6所示。

[0334] 已鉴别了PA的受体且在许多细胞类型中表达。参见Escuyer, et al.: , Iyafect Inaraun 59 :3381(1991)。致死毒素在巨噬细胞的一些细胞培养株中有活性,在几个小时内引起细胞死亡。参见Hanna, et al., Proc Natl AcadSci U S A 90 :10198(1993), Kim, et al., J Biol Chem 278 :7413(2003), Lin, et al., Curr Microbiol 33 :224(1996)。LeTx能诱导在小鼠巨噬细胞样RAW264.7中以及在经体外处理的J774A.1细胞中的坏死和细胞凋亡。

[0335] 所述结果表明本发明描述的化合物是鼠巨噬细胞样RAW264.7细胞的LeTx诱导的细胞毒性的有效抑制剂。例如,用式II-16化合物对RAW264.7细胞的处理与LeTx对该细胞的单独处理相比较在LeTx处理的细胞的成活力方面导致了10倍的增长(平均 $EC_{50} < 4nM$ ),且因此对炭疽感染提供有价值的疗法。例如,式II-16,在LeTx存在下促进RAW264.7巨噬细胞样细胞的存活率,这表明这个化合物及其衍生物对炭疽感染提供有价值的临床治疗。

#### [0336] 药物组合物

[0337] 在一个实施方案中,本发明公开的所述化合物用于药物组合物中。该化合物优选地可通过本发明公开的方法制造。该化合物可用于,例如,药物的组合物,该组合物包含制备成贮藏和后来给药的药物可接受的载体。实施方案也涉及在药物可接受的载体或稀释剂中含有药物有效量的上述公开的所述产物和化合物。用于治疗用途的可接受的载体或稀释剂在制药领域中是公知的,且例如如《雷明顿制药学》(Remington's Pharmaceutical Sciences), Mack 出版公司(A. R. Gennaro 编辑, 1985)所述。防腐剂、稳定剂、染料和甚至调味剂可用在所述的药物组合物中。例如,苯甲酸钠、抗坏血酸和对羟基苯甲酸酯可作为防腐剂被添加。另外,也可使用抗氧化剂和悬浮剂。

[0338] 所述的组合物,具体而言是通式I-V的组合物,可按配方制造且作为以下剂型使用:供口服给药的片剂、胶囊或酏剂;供直肠给药的栓剂;供注射给药的无菌溶液,悬浮液;供经皮肤给药的贴片以及皮下沉积物等等。注射剂可以下列常规形式制备:溶液或悬浮液、在注射前适合制成溶液或悬浮液的固体剂型、或乳剂。适合的赋形剂是,例如,水、盐水、葡萄糖、甘露醇、乳糖、卵磷脂、白蛋白、谷氨酸钠、半胱氨酸盐酸盐等等。另外,如果需要,所述的注射用药药物组合物可包含较少量的无毒性辅助物,例如湿润剂、pH缓冲剂等等。如果需要,也可使用吸收增强剂(例如,脂质体)。

[0339] 用于非经肠给药的制剂包括以水溶性形式存在的所述活性化合物的水溶液。另外,所述活性化合物的悬浮液可制备成合适的油状注射悬液。适合的亲脂性溶剂或载体包

括诸如芝麻油的脂肪油,或其它诸如大豆油、柚油或杏仁油的有机油,或诸如油酸乙酯或甘油三酯的合成的脂肪酸酯,或脂质体。水性注射悬液可包含增加所述悬液粘度的物质,例如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或葡聚糖。任选地,所述的混悬液可包含适合的稳定剂或提高所述化合物的溶解性的试剂,使得可制备高浓度的溶液。

[0340] 用于口服的药物制剂可通过下述方法获得:将所述的活性化合物与固体赋形剂结合,任选地碾磨所得的混合物,以及将该混合物加工成颗粒,如果需要,在加入适合的辅助剂后得到了片剂或糖衣剂核。适合的赋形剂是,具体而言,诸如糖的填充剂,包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨糖醇;纤维素制剂例如玉米淀粉、小麦淀粉、米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄芪胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、和\或者聚乙烯吡咯酮(PVP)。如果需要,可加入崩解剂,例如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或藻酸或诸如藻酸钠的藻酸盐。对糖衣剂核进行适合的包被。为了这个目的,可被使用浓缩的糖溶液,该溶液可任选地包含阿拉伯胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、聚羧乙烯凝胶、聚乙二醇和\或二氧化钛、紫胶漆溶液和适合的有机溶剂或溶剂混合物。为了识别或表示活性化合物剂量的不同组合的特征,可向片剂或糖衣剂包衣中加入染料或色素。使用本领域中公知的方法可制造这些制剂(见例如,美国专利号 5,733,888(注射用组合物);5,726,181(难溶于水的化合物);5,707,641(治疗有效的蛋白质或肽);5,667,809(亲脂性试剂);5,576,012(增溶的聚合试剂);5,707,615(抗病毒制剂);5,683,676(微粒药剂);5,654,286(局部制剂);5,688,529(口服悬浮剂);5,445,829(缓释制剂);5,653,987(液体制剂);5,641,515(控释制剂)和 5,601,845(球形制剂))。

[0341] 本发明还公开了在制药领域中公知的用于包括眼内的、鼻内的和耳内的输送的各种药物组合物。制剂配方包括所述活性化合物的水性眼用溶液,其可以诸如滴眼剂的水溶性形式存在,或以结冷胶(gellan gum)(Shedden et al., Clin. Ter., 23(3):440-50(2001))或水凝胶(Mayer et al., Ophthalmologica, 210(2):101-3(1996));眼用软膏;眼用混悬液,例如微粒,悬浮在液体载体介质中的包含药物的小聚合粒子(Joshi, A. 1994 J Ocul Pharmacol 10:29-45),脂溶性制剂(Alm et al., Prog Clin. Biol. Res., 312:447-58(1989)),和微球(Mordenti, Toxicol. Sci., 52(1):101-6(1999));以及眼用嵌入剂。为了稳定性和舒适性,这些合适的药物制剂最经常和优选地制造成无菌的、等渗的和缓冲的制剂。药物组合物也包括滴剂和喷雾剂,其常在许多方面模拟鼻分泌物来确保正常纤毛作用的维持。正如在《雷明顿制药学》(Mack 出版,第十八版)公开的和本领域的技术人员公知的那样,合适的制剂最常和优选地是等渗的,保持 pH 值 5.5 到 6.5 的轻度缓冲的,且最经常和优选地包括抗菌性防腐剂和适当的药物稳定剂。用于耳内转运的药物制剂包括悬浮液和在耳内局部应用的软膏。

[0342] 用于这些耳用制剂的普通溶剂包括甘油和水。

[0343] 当作为抗癌、抗炎或抗微生物的化合物使用时,例如,通式 I-V 的所述化合物或包括通式 I-V 的组合物可通过口服或非口服途径给药。当口服给药时,它可以胶囊、片剂、颗粒剂、喷雾剂、糖浆剂或其它这些剂型给药。当非口服给药时,它可以以水性悬浮液、油性制剂等等或以滴剂、栓剂、油膏剂、软膏剂等等给药,通过皮下、腹膜内、静脉内、肌内等等方式注射给药。

[0344] 在一实施方案中,所述的抗癌剂、抗炎剂或抗微生物剂可与加强它们效果的附加

的物质混合。在一实施方案中,所述的抗微生物剂与其它的抗微生物剂组合。在另外的实施方案中,所述的抗微生物剂与对正服用抗微生物剂的患者有益的药物或药剂联合。

#### [0345] 给药方法

[0346] 在可选的实施方案中,所公开的化合物和所公开的药物组合物作为抗微生物剂通过特殊的方法给药。在其它方法中,这些方法包括 (a) 通过口服途径给药,该给药方式包括以胶囊、片剂、颗粒剂、喷雾剂、糖浆剂或其它这样的剂型给药;(b) 通过非口服途径给药,该给药方式包括作为水性悬浮液、油性制剂等等或作为滴剂、栓剂、油膏剂、软膏剂等等给药;通过皮下、腹膜内、静脉内、肌内、皮内等等方式注射给药;以及 (c) 局部给药, (d) 经直肠给药,或 (e) 阴道内给药,本领域中的技术人员认为适当的使本实施方案的所述化合物与活组织接触的形式;以及 (f) 通过缓释制剂、长效 (depot) 制剂、和输注泵运送给药。作为所述给药模式的另外例子和作为另外公开的给药方式,本发明公开了关于所述的公开化合物和药物组合物的给药的各种方法,包括通过眼内的、鼻内的和耳内途径的给药方式。

[0347] 作为剂量要求的包括所描述的化合物、包括通式 I-V 的化合物的所述组合物的药物有效量,依赖于给药途径、包括人的处理的动物的类型,以及特定动物的物理特征都是要考虑的。可调整所述的剂量来完成预期效果,但是将依赖例如体重、饮食、同时进行的药物药物治疗的因素以及在医药领域的技术人员公认的其它因素。

[0348] 在实施所述方法的实施方案中,所述的产物或组合物可单独使用或互相联合使用,或与其它的治疗试剂或诊断试剂联合使用。这些产物可在体内,通常在哺乳动物体内,优选在人体内,或在体外应用。在体内应用它们时,所述产物或组合物以各种方式对所述哺乳动物给药,包括非肠道、静脉内、皮下、肌内、结肠、直肠、阴道、鼻或腹膜内应用各种剂型进行给药。这些方法也可以在体内应用测试化学活性。

[0349] 正如本领域的技术人员所显而易见的,所述的用于体内给药剂量和所述具体给药方式将依赖下列因素而变化:年龄、体重和处理的哺乳动物种类,应用的具体化合物和这些被应用化合物的特殊用途。有效剂量水平即完成所述预期结果所必需的剂量水平的确定可通过本领域的技术人员使用常规药理学方法实现。通常,以较低剂量水平开始进行对人的产物的临床应用,随着剂量水平的增加直到实现所述的预期效应。可选择地,利用可接受的体外研究,通过利用已建立的药理学方法的目前的方法,可确定所述组合物的有用剂量和给药途径。

[0350] 在非人类的动物研究中,潜在产物的应用以高剂量水平开始,随着减少剂量直到所述的预期效应不再完成或不良副作用消失。所述的剂量范围可较宽泛,依赖于所述的预期效应和所述的治疗学指征。通常,剂量可以为约 10 微克 / 公斤体重至 100 毫克 / 公斤体重,优选为约 100 微克 / 公斤体重至 10 毫克 / 公斤体重。可选择地,正如本领域的技术人员理解的,剂量可基于和按照所述患者的表面积计算。优选地以每天一次或每天两次口服给药。

[0351] 所述的确切的制剂、给药方式和剂量可由各个医师根据所述患者的情况来选择。参见例如,Finigl 等,治疗学的药理学基础,1975。要注意的是,因为毒性或器官功能紊乱,主治医师将知道如何且何时终止、中断或调整给药。相反,如果所述的临床反应不充分(排除毒性),该主治医师也知道调整治疗到更高的水平。在控制目标病症的给药剂量的量值将随欲治疗的所述疾病状态的严重性和给药途径而变化。该疾病状态的严重性可以,例如,部

分通过标准预测评价法评价。此外,所述剂量和可能的剂量频率也依照年龄、体重和所述各个患者的反应而变化。与上述讨论方案相当的方案可用于兽医学中。

[0352] 依赖于治疗的特殊疾病状态,这些试剂可配制以及全身地或局部地给药。用于制剂和给药的各种技术可在《雷明顿制药学》,第十八版,Mack 出版公司,Easton,PA(1990)中找到。适合的给药途径也包括口服、直肠、经皮肤、阴道、透膜或肠内给药;非肠道输送,包括肌肉、皮下、髓内注射,鞘内、直接心室内、静脉内、腹膜内、鼻内或眼球内注射。

[0353] 对于注射,所述实施方案的试剂可以组方在水性溶液中,优选在诸如 Hanks' 溶液, Ringer' s 溶液,或生理盐水的生理学相容的缓冲液中。对于所述的透膜给药,在所述制剂中使用通透屏障的恰当的渗透剂。所述的渗透剂在本领域中广泛公知。在所述实施方案的范围内可使用药物可接受的载体将用于实施所述实施方案的本发明公开的所述化合物组方成适合全身用药的剂型。由于选择适合的载体和适合的制造方法,本发明公开的所述组合物,具体而言,作为溶液按组方制造的组合物可经非肠道给药,例如通过静脉注射。利用本领域公知的药物可接受的载体按配方将所述化合物制造成适合口服给药的剂型。所述载体使实施方案中的所述化合物按配方制造成片剂、丸剂、胶囊、液体、凝胶剂、糖浆剂、膏剂、混悬液等,用于待治疗患者的口服摄取。

[0354] 意欲细胞内给药的试剂可利用本领域所属技术人员公知的技术给药。例如,所述试剂可包裹成脂质体,然后按上述方法给药。在脂质体形成的时候存在于水制溶液中的所有分子结合在所述的水性内部中。所述脂质体的内含物不仅被保护不受外部微小环境的影响,而且因为脂质体与细胞膜融合,该内含物有效地转输入所述细胞质中。另外,由于它们的疏水性,小的有机分子可直接进行细胞内给药。

[0355] 对有效量的确定是本领域所属技术人员公知的,尤其是根据本发明提供的详细公开的内容来确定。除所述的活性成分外,这些药物组合物可包含包括赋形剂和辅助剂的适当的药物可接受的载体,其促进所述的活性化合物加工成可药用的制剂。可组方称为口服给药的制剂,其可以是片剂、糖衣片、胶囊或溶液的剂型。所述药物组合物可以以其自身公知的方式加工,例如,通过常规混合、溶解、粒化、制成糖衣剂、悬浮、乳化、装入胶囊、捕收(entrap)或冻干法。

[0356] 应用公知的方法可对本发明公开的化合物药效和毒性进行评价。例如,可以通过测定对诸如哺乳动物的且优选人的细胞系的细胞系的体外毒性来建立具体的化合物的毒理学,或共享某些化学部分的该化合物的子集的毒理学。所述研究的结果可预测动物体内,例如哺乳动物或更明确地是人体内的毒性。可选择地,利用公知的方法测定具体化合物在动物模型体内,例如小鼠、家兔、狗或猴子体内的毒性。可利用多种本领域公认的方法来确定具体的化合物的有效性,例如体外方法、动物模型或人的临床试验。几乎存在每一类疾病状态的本领域公认的体外模型,包括通过本发明公开的所述化合物减轻的所述疾病状态,包括癌症、心血管疾病和各种免疫功能紊乱和传染性疾病。相似地,可接受的动物模型可用于建立治疗所述疾病状态的化学药物的有效性。当选择模型来确定有效性时,本领域所属技术人员可在本领域的知识指导下选择合适的模型、剂量、和给药途径及方案。当然,人的临床试验也可以用于测定化合物在人体内的有效性。

[0357] 当作为抗微生物剂、抗癌剂或抗炎剂使用时,本发明公开的所述化合物可通过口服或非口服途径给药。当口服给药时,它可以以胶囊、片剂、颗粒剂、喷雾剂、糖浆剂或其它

所述剂型给药。当非口服给药时,它可以作为水性悬浮液、油性制剂等等或作为滴剂、栓剂、油膏剂、软膏剂等等给药,当注射给药时,可通过皮下、腹膜内、静脉内、肌内、皮内等等给药。同样考虑控释制剂、长效(储存)制剂和输注泵传输。

[0358] 药物组合物中的本发明公开的所述组合物也可包括药物可接受的载体。所述组合物可制备用于贮存和后续给药。用于治疗用途的可接受的载体或稀释剂在药物领域是公知的,且例如,在《雷明顿制药学》,Mack 出版公司(A. R. Gennaro 编辑 1985)一书中描述。例如,所述组合物可按配方制造且作为下列剂型使用:供口服给药的片剂、胶囊或溶液;供直肠或阴道给药的栓剂;供注射给药的灭菌溶液或悬浮液。注射剂可制备成常规形式,如溶液或悬浮液、在注射前适合制成溶液或悬浮液的固体剂型,或乳剂。适合的赋形剂包括但不限于盐水、葡萄糖、甘露醇、乳糖、卵磷脂、白蛋白、谷氨酸钠、半胱氨酸盐酸盐等。另外,如果要求,所述的可注射的药物组合物可包含较少量的无毒性辅助物,例如湿润剂、pH 缓冲剂等等。如果要求,也可利用吸收增强剂(例如,脂质体)。

[0359] 作为剂量所要求的所述组合物的药物有效量将依赖于所述给药途径、处理的动物模型且也考虑具体动物的物理特征。调整所述剂量来实现预期效应,但是将依赖于下列因素:例如体重、饮食、同时的药物治疗和医药领域的技术人员公认的其他因素。

[0360] 上述的所述实施方案的产物或组合物可单独使用或互相联合使用,或与其它的治疗试剂或诊断试剂联合使用。这些产物可在体内或体外利用。所述的有用剂量和大多数有用的给药模式将依赖于年龄、体重和处理的动物、使用的具体的化合物和使用的这些组合物或多种组合物的具体用途而变化。在具体病症的处理或治疗中的剂量的量值将随要治疗的疾病状态的严重性和给药途径而变化,且依赖于所述疾病状态和它们的严重性,所述组合物可组方成全身或局部给药形式。关于制剂和给药的各种技术可在《雷明顿制药学》,Mack 出版公司,Easton, PA(1990)一书中找到。

[0361] 为了组方制备作为抗微生物、抗癌剂或抗炎剂的通式 I-V 的所述化合物,可使用公知的表面活性剂、赋形剂、光滑剂、混悬剂和药物可接受的成膜的物质和包衣辅助剂等。醇类、酯类、硫酸化的脂肪醇类等等可优选地作为表面活性剂使用;蔗糖、葡萄糖、乳糖、淀粉、结晶的纤维素、甘露醇、轻的无水硅酸盐、铝酸镁、铝酸甲基硅酸镁、合成的硅酸铝、碳酸钙、酸式碳酸钠、磷酸氢钙、羧甲基纤维素钙等等可作为赋形剂使用;硬脂酸镁、滑石、硬化油等等可作为光滑剂使用;椰子油、橄榄油、芝麻油、花生油、大豆油可作为混悬剂或润滑剂使用;作为纤维素或糖等等碳水化合物的衍生物的醋酸邻苯二甲酸纤维素,或作为聚乙烯的衍生物的乙酸甲酯-异丁烯酸共聚物可作为混悬剂使用;且诸如邻苯二甲酸酯等等的增塑剂可作为混悬剂使用。除了前述的优选的配料外,增甜剂、芳香剂、着色剂、防腐剂等等也可添加到通过所述实施方案的方法产生的所述化合物的给药制剂配方中,特别是所述化合物是口服给药。

[0362] 所述化合物和组合物可按下列剂量对人类患者进行口服或非口服给药:约 0.001mg/kg/天到约 10,000mg/kg/天的所述活性成分,且更优选为约 0.1mg/kg/天到约 100mg/kg/天的活性成分,优选为以每天一次给药,较其次优选为以超过每天两次到约十次给药。可选择地且也优选地,通过所述实施方案制造的所述化合物可优选地通过例如静脉滴注按照所述量连续给药。因此,对于体重 70 公斤的患者,所述活性的或抗感染的成分的优选每天剂量为约 0.07mg/day 到约 700g/天,且更优选为 7mg/天到大约 7g/天。但

是,本领域所属技术人员可理解,在某些情形中,进行其剂量超过或甚至远远超过上述剂量的所述实施方案的所述的抗癌、抗炎或抗感染的化合物的给药可以是必需的,优选的剂量范围有效地且强势地治疗特殊的晚期癌症或传染病。

[0363] 关于所述实施方案的方法产生的抗微生物剂作为生化实验反应物使用时,通过所述实施方案的方法产生的所述化合物溶于有机溶剂或含水的有机溶剂中时且当它直接应用到任何不同的培养细胞体系中时,它抑制所述疾病的进展。可用的有机溶剂包括,例如,甲醇、二甲基亚砷等。所述制剂可以是,例如,粉剂、颗粒剂或其它固体抑制剂,或应用有机溶剂或含水的有机溶剂制备的液体抑制剂。通过所述实施方案的方法产生的所述化合物作为抗微生物、抗癌或抗肿瘤的化合物使用时的优选浓度通常在大约 1 到大约 100  $\mu\text{g/ml}$  范围内,最适当的使用量依赖于培养细胞体系的类型和使用目的而变化,而且是本领域所属普通技术人员能够理解的。在某些应用中,也可必需的或优选的是本领域所属普通技术人员可使用前述范围外的剂量。

[0364] 在一实施方案中,作为抗微生物剂、抗癌剂或抗炎剂的化合物的使用方法包括给予有效量的任何通式 I-V 的所述化合物或这些化合物的组合物。在优选的实施方案中,所述方法包括向需要抗微生物剂的患者给予通式 II 代表的化合物,直到该需要被有效地减少或更优选地消除。

[0365] 本领域所属技术人员应理解,“需要”不是绝对的术语且只含有所述患者可从使用中的所述抗微生物剂、抗癌剂或抗炎剂的治疗中受益的意思。“患者”的含意是通过所述抗微生物剂、抗癌剂或抗炎剂的使用受益的生物体。例如,B. anthracis、疟原虫、利什曼原虫、锥虫等等微生物的任何生物体可从所述抗微生物剂的应用中受益,该微生物剂从而减少存在于所述患者体内的所述微生物的数量。作为另外的例子包括,癌症的任何生物体,例如,结肠直肠癌、前列腺癌、乳腺癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、多发性骨髓瘤、黑素瘤等等,可从所述抗癌剂的应用中受益,该抗癌剂从而减少存在于所述患者体内的所述癌的数量。此外,炎症性疾病状态的任何生物体,例如,类风湿性关节炎、哮喘、多发性硬化症、银屑病、中风、心肌梗塞等等,可从所述抗炎剂的使用中受益,该抗炎剂从而减少存在于所述患者体内与所述炎症应答相关联的细胞的数量。在一实施方案中,所述患者的健康状态可以不需要抗微生物剂、抗癌剂或抗炎剂的给药,但是,该患者可依然从存在于患者体内的微生物、癌细胞或炎症细胞的水平的减少获得一些益处,因而需要。在一实施方案中,所述的抗微生物剂或抗癌剂在抗一种类型的微生物或癌方面是有效的,但是抗其它类型的微生物或癌是无效的;因此允许在所述患者的治疗中的高度选择性。在其它实施方案中,所述抗炎剂在抗炎症性疾病状态方面是有效的,该炎症性疾病状态以与所述炎症相关的不同细胞为特征。在所述的抗微生物剂、抗癌剂或抗炎剂的选择中,可使用所述实施例中公开的方法和结果。在可选择的实施方案中,所述的抗微生物剂对宿主生物体中的广谱微生物是有效的,优选为广谱的外来细菌,且更优选为有害细菌。在实施方案中,所述的抗癌剂和\或抗炎剂在抗广谱的癌症和炎症性疾病状态\细胞\物质方面是有效的。在另外的实施方案中,所述的抗微生物在抗所有的微生物,甚至是所述宿主天生的微生物方面是有效的。可以是抗微生物剂目标的微生物的例子包括但不局限于B. anthracis、疟原虫、利什曼原虫、锥虫等。在另外的实施方案中,所述的抗癌剂在抗广谱的癌症或所有癌症方面是有效的。在抗该癌症方面所述化合物是有效的癌症例子包括结肠直肠癌、前列腺癌、乳腺癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、多

发性骨髓瘤、黑素瘤等等。所述试剂在抗该炎症性疾病状态方面是有效的炎症性疾病状态的例子包括类风湿性关节炎、哮喘、多发性硬化症、银屑病、中风、心肌梗塞等等。

[0366] “治疗有效量,” “药物有效量”或相似的术语指所述药物或药用试剂的量,将导致细胞的、组织的、全身的、动物的或人的正寻求的生物或医学反应。在优选的实施方案中,所述的医学反应是被研究人员、兽医、医学博士或其它临床医师寻求的反应。

[0367] “抗微生物剂”指的是减少微生物的存活可能性或阻断或减轻微生物的有害作用的化合物。在一实施方案中,所述的存活可能性因个体微生物的功能而决定;因此,所述抗微生物剂将增加个体微生物死亡的可能性。在一实施方案中,所述的存活可能性因微生物群体的功能而决定,因此所述抗微生物剂将增加所述微生物群体减少的可能性。在一实施方案中,抗微生物剂意思是抗生素或其它相似术语。所述抗微生物剂具有下列能力:阻断所述的有害作用,破坏或抑制诸如细菌的所述微生物的生长或复制。例如,所述的抗菌药物或其它抗微生物剂在《用于疾病控制的抗菌素,化学疗法和抗菌剂》(M. Grayson, 编辑, 1982), 和 E. Gale 等,《抗菌素作用的分子基础》,第二版(1981)书中被叙述。在另外的实施方案中,抗微生物剂将不改变所述的存活可能性,但是改变所述微生物以某一方式对所述宿主有害的可能性。例如,如果所述微生物分泌对所述宿主有害的物质,所述抗微生物剂可作用于该微生物使其停止分泌或中和或阻断该有害作用。在一实施方案中,虽然抗微生物剂增加了所述微生物死亡的可能性,但其对周围、非微生物、细胞是最低限度地有害的。在可选择的实施方案中,所述抗微生物剂对周围、非微生物、细胞是如何地有害是不重要的,只要它减少所述微生物的存活的可能性。

[0368] “抗癌剂”指的是减少癌细胞存活可能性的化合物或包含该化合物的组合物。在一实施方案中,所述的存活的可能性因个体癌细胞的功能而决定;因此,所述抗癌剂将增加该个体癌细胞死亡的可能性。在一实施方案中,所述的存活可能性因癌细胞群体的功能而决定,因此所述抗癌剂将增加该癌细胞群体减少的可能性。在一实施方案中,抗癌剂意思是化学治疗剂(化疗剂)和其它相似术语。

[0369] “化学治疗剂”是在诸如癌症的肿瘤性疾病的治疗中有用的化合物。化学治疗剂的例子包括烷化剂,例如氮芥、乙烯亚胺和甲基蜜胺,烷基磺酸酯、亚硝基脲和三氮烯,叶酸拮抗物、核苷酸代谢的抗代谢物、抗生素、嘧啶类似物、5-氟尿嘧啶、顺铂、嘌呤核苷、胺、氨基酸、三唑核苷、皮质激素,天然产物,例如长春花生物碱、鬼臼乙叉甙、抗生素、酶、紫杉烷和生物反应调节剂;混杂的试剂,例如铂配位络合物、蒽醌、蒽环类抗生素、取代的尿素、甲基胍衍生物、或肾上腺皮质的抑制剂;或者激素或拮抗剂,例如肾上腺皮质类固醇、黄体酮、雌激素、抗雌激素剂、雄激素、抗雄激素物质、或 gonadotropin- 释放激素类似物。具体的例子包括阿霉素、14-羟柔红霉素、5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷(“Ara-C”),环磷酰胺、三胺硫磷、白消安、细胞毒、紫杉酚、欧洲杉醇(Toxotere)、甲氨喋呤、顺铂、苯丙氨酸氮芥、长春碱、博来霉素、鬼臼乙叉甙、异磷酰胺、丝裂霉素 C、盐酸米托蒽醌、长春新碱、长春瑞滨、卡铂、鬼臼噻吩甙、柔红霉素、10-去甲基柔红霉素、氨喋呤、更生霉素、丝裂霉素、Esperamicin、美法兰和其它相关的氮芥。在这个定义中也包括激素试剂,该试剂调节或抑制肿瘤上的激素作用,例如它莫西芬和奥那司酮。

[0370] 所述抗癌剂可直接作用于癌细胞,杀死该细胞,诱发该细胞死亡、阻止该细胞分裂等等。可选择地,所述的抗癌剂可间接地作用于所述癌细胞,例如通过限制供给该细胞的营

养或血液。这种抗癌剂具有破坏或禁止所述癌细胞的生长或复制的能力,该癌细胞例如为结肠直肠癌、前列腺癌、乳腺癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、多发性骨髓瘤、黑素瘤等等。

[0371] “肿瘤性疾病”或“肿瘤”指的是细胞或细胞的群体,包括肿瘤或组织(包括诸如骨髓细胞的悬液和诸如血或血清的流体),该细胞或细胞的群体通过比正常组织更多的细胞增生显示出异常的生长。肿瘤可以是良性的或恶性的。

[0372] “炎症性疾病状态”包括,例如,缺血、败血症性休克、自身免疫性疾病、类风湿性关节炎、肠炎、系统性红斑狼疮、多发性硬化症、哮喘、骨关节炎、骨质疏松症、纤维化疾病、皮肤病、包括银屑病、异位性皮炎和紫外线照射(UV)诱发的皮肤损害、银屑病、关节炎,alkylosing 脊椎炎、组织和器官排异反应、阿耳茨海默(氏)病、中风、动脉粥样硬化、再狭窄、糖尿病、肾小球肾炎、癌、霍奇金病、恶病质、与感染和某些病毒感染相关的炎症、包括获得性免疫缺陷综合征(AIDS)、成人呼吸窘迫综合征和共济失调。

[0373] 在一实施方案中,所述的化合物,优选为含有通式 I-V 的化合物,包括本发明描述的化合物,如果该化合物可影响 10% 的所述微生物、癌细胞或炎症细胞,就认为是有效的抗微生物剂、抗癌剂或抗炎剂。在更优选的实施方案中,如果所述化合物可影响 50% 的所述微生物、癌细胞或炎症细胞,则该化合物是有效的。在甚至更优选的实施方案中,如果所述化合物可影响 50% -80% 的所述微生物、癌细胞或炎症细胞,则该化合物是有效的。在甚至更优选的实施方案中,如果所述化合物可影响 80% -95% 的所述微生物、癌细胞或炎症细胞,则该化合物是有效的。在甚至更优选的实施方案中,如果所述化合物可影响 95% -99% 的所述微生物、癌细胞或炎症细胞,则该化合物是有效的。通过每个化合物的作用机理定义“影响”。因此,例如,如果化合物阻止所述微生物的复制,则影响是测定阻止复制。同样地,如果化合物破坏微生物,则影响是测定微生物死亡。也例如,如果化合物阻止癌细胞的分裂,则影响是测定阻止癌细胞分裂。另外地,例如,如果化合物阻止炎症细胞的增殖,则影响是测定阻止炎症细胞增殖。并非所有的作用机理需要相同作用的百分比。在可选择的实施方案中,如果该作用的较低百分比被其它因素弥补,例如该化合物的特异性,则低的作用百分比可以是合适的。因此,例如,化合物只有 10% 的效果,但是对宿主无任何有害副作用、或是无害微生物或细胞,仍可以考虑该化合物的效果。

[0374] 在一实施方案中,本发明描述的化合物直接给药消除微生物、癌细胞或炎症细胞,且无需向患者给药。例如,在微生物出现问题的某些情形中,例如在食品中,本发明描述的化合物可直接应用于该食品减少微生物在该食品中的危险。可选择地,所述化合物可用于减少存在于周围环境中的所述微生物水平,例如操作表面。作为另外的例子,所述化合物可离体作用(ex vivo)地对细胞样品给药,例如骨髓或干细胞移植,以确保只有非癌性细胞被引入受者。在所述化合物给药后,它们可任选地被移除。这在某些情况中是特别适合的,该情况是操作表面或食品可能与有被所述化合物破坏风险的其它表面或有机体接触时。在可选择的实施方案中,考虑到更多的保护,所述化合物可遗留在所述食品中或操作表面上。否是进行这种选择,则依赖于情况的相对需要以及与所述化合物相关的风险,这在下面叙述的实施例部分中确定。

[0375] 下列非限制性实施例是对所述方法优选实施方案的描述。本领域所属技术人员应确信无疑,存在有具体实施方法的细节以及所获得的精确化学组合物的变体。

## 实施例

### [0376] 实施例 1

#### [0377] 式 II-16, II-20 和 II-24C 的化合物的发酵

[0378] 将菌株 CNB476 生长在含有 100ml 营养培养基的 500ml 烧瓶中, 该培养基由每升去离子水中的下列成分组成: 葡萄糖, 4g; Bacto 胰蛋白胨, 3g; Bacto 酪朊, 5g; 和合成的食盐 (Instant Ocean, Aquarium Systems), 30g。一级种子培养在 28°C、以 250rpm 工作的旋转振荡器中孵育 3 天。将每 4 毫升的第一种子培养物接种在含有 100ml 所述营养培养基的三个 500ml 烧瓶中。将第二种子培养物在 28°C、以 250rpm 工作的旋转振荡器中孵育 2 天。将每 4 毫升的第二种子培养物接种在含有 100ml 该营养培养基的 35 个 500ml 烧瓶中。将第三种子培养物在 28°C、以 250rpm 工作的旋转振荡器中孵育 2 天。将每 4 毫升的第三种子培养物接种在含有 100ml 生产培养基的 400 个 500ml 烧瓶中, 该生产培养基由每升去离子水中的下列组成: 淀粉, 10g; 酵母提取物, 4g; Hy-Soy, 4g; 硫酸铁, 40mg; 溴化钾, 100mg; 碳酸钙, 1g; 和合成的食盐 (Instant Ocean, Aquarium Systems), 30g。将该生产培养物在 28°C、以 250rpm 工作的旋转振荡器中孵育 1 天。将约 2-3g 的无菌 Amberlite XAD-7 树脂加入该生产培养中。该生产培养再进一步在 28°C、以 250rpm 工作的旋转振荡器中孵育 5 天。用乳酪布过滤该培养发酵液来回收所述 Amberlite XAD-7 树脂。用 6 升的乙酸乙酯提取该树脂 2 次, 接着用 1.5 升的乙酸乙酯提取 1 次。真空干燥混合后的该提取物。干燥后的该提取物含有 3.8g 的式 II-16 的化合物和少量量的 II-20 和 II-24C 的化合物, 然后对其加工处理回收式 II-16, II-20 和 II-24C 的化合物。

### [0379] 实施例 2

#### [0380] 式 II-16, II-20 和 II-24C 的化合物的纯化

[0381] 通过快速色谱接着通过高效液相色谱 (HPLC) 获得式 II-16, II-20 和 II-24C 的纯化合物。通过快速色谱处理含有 3.8 克式 II-16 化合物和少量量的 II-20 和 II-24C 化合物的 8 克粗提取物, 该快速色谱使用 Biotage Flash40i 体系和 Flash 40M 柱 (KP-Sil 硅, 32-63  $\mu$ m, 90g)。该快速色谱通过下列不连续梯度洗脱:

- [0382] 1. 己烷 (1L)
- [0383] 2. 含有 10% 乙酸乙酯的己烷 (1L)
- [0384] 3. 含有 20% 乙酸乙酯的己烷, 第一洗脱 (1L)
- [0385] 4. 含有 20% 乙酸乙酯的己烷, 第二洗脱 (1L)
- [0386] 5. 含有 20% 乙酸乙酯的己烷, 第三洗脱 (1L)
- [0387] 6. 含有 25% 乙酸乙酯的己烷 (1L)
- [0388] 7. 含有 50% 乙酸乙酯的己烷 (1L)
- [0389] 8. 乙酸乙酯 (1L)

[0390] 含有式 II-16 化合物的部分通过 HPLC 以较大的或等于 70% UV 的纯度混合并经过 HPLC 纯化, 正如下面叙述的, 获得 II-16, 随同 II-20 和 II-24C 一起, 每一个以纯化合物。

[0391]

色谱柱	Phenomenex Luna 10 $\mu$ 硅
尺寸	25 cm $\times$ 21.2 mm ID
流速	25 ml/min
检测器	ELSD
溶剂	24%乙酸乙酯/己烷, 19min, 24%乙酸乙酯/己烷到 100%乙酸乙酯, 1min, 然后 100% 乙酸乙酯, 4 min 的梯度

[0392] 将富集 II-16 化合物的部分 (如上述; 约 70% 纯的 II-16 化合物) 溶于丙酮中 (60mg/ml)。该溶液的一部分 (950  $\mu$  l) 注入正相的应用上述条件的 HPLC 柱中。式 II-16 化合物在约 14 分钟时洗脱, 且微量的式 II-24C 和 II-20 化合物分别在大约 11 和 23 分钟洗脱。含有 II-16、II-24C 和 II-20 的部分基于目前化合物的组合物被混合。减压浓缩含有有所预期化合物的部分生成式 II-16 的纯化合物, 以及分离含有 II-24C 和 II-20 的部分, 含有 II-24C 和 II-20 的部分在下述中进一步纯化。

[0393] 含有 II-24C (70mg) 的样品以 10mg/ml 的浓度溶于乙腈中, 然后将 500  $\mu$  l 溶液装在尺寸 21mm i. d., 15cm 长, 含有 Eclipse XDB-C18 支持物的 HPLC 色谱柱上, 所述溶剂梯度从 15% 乙腈 / 85% 水到 100% 乙腈经过 23 分钟以 14.5ml/min 的流速线性地增加。该溶剂组合物在返回到所述的起始溶剂混合物之前以 100% 乙腈维持 3 分钟。在这些条件下式 II-24C 化合物在 19 分钟时以纯化合物洗脱。

[0394] 为了获得纯化合物 II-20, 用乙酸乙酯研磨从上述的准备的 HPLC 方法中产生的富集样品, 去除微量的亲脂的杂质。所得的样品含有大于 95% 纯度的化合物 II-20。

[0395] 式 II-16 化合物: UV (乙腈 / 水)  $\lambda_{\max}$  225 (sh) nm。低分辨率质谱: m/z 314 (M+H), 336 (M+Na)。

[0396] 式 II-20 化合物: UV (乙腈 / 水)  $\lambda_{\max}$  225 (sh) nm。低分辨率质谱: m/z 226 (M+H)。图. 7 描述了具有式 II-20 结构的化合物的  $^1\text{H}$  NMR 图谱。

[0397] 式 II-24C 化合物: UV (乙腈 / 水)  $\lambda_{\max}$  225 (sh) nm。低分辨率质谱: m/z 328 (M+H), 350 (M+Na) (M+H)。图. 8 描述了具有式 II-24C 结构的化合物的  $^1\text{H}$  NMR 图谱。

### [0398] 实施例 3

#### [0399] 式 II-17 和 II-18 的化合物的发酵

[0400] 将菌株 CNB476 生长在含有 100ml 第一营养培养基的 500ml 烧瓶中, 该培养基由每升去离子水中的下列成分组成: 葡萄糖, 4g; Bacto 胰蛋白胨, 3g; Bacto 酪蛋白, 5g; 和合成的食盐 (Instant Ocean, Aquarium Systems), 30g。将第一种子培养物在 28 $^{\circ}$ C、以 250rpm 工作的旋转振荡器中孵育 3 天。将 5 毫升的第一种子培养物接种在含有 100ml 第二营养培养基的 500ml 烧瓶中, 该培养基由每升去离子水中的下列组成: 淀粉, 10g; 酵母提取物, 4g; 蛋白胨, 2g; 硫酸铁, 40mg; 溴化钾, 100mg; 碳酸钙, 1g; 和溴化钠, 30g。将第二种子培养物在 28 $^{\circ}$ C、以 250rpm 工作的旋转振荡器中孵育 7 天。将约 2-3g 的无菌 Amberlite XAD-7 树脂加入第二种子培养物中。将第二种子培养物在 28 $^{\circ}$ C、以 250rpm 工作的旋转振荡器中进一

步孵育 2 天。将 5 毫升的第二种子培养物接种在含有 100ml 第二营养培养基的 500ml 烧瓶中。将第三种子培养物在 28°C、以 250rpm 工作的旋转振荡器中孵育 1 天。将约 2-3g 的无菌 Amberlite XAD-7 树脂加入第三种子培养物中。将第三种子培养物在 28°C、以 250rpm 工作的旋转振荡器中进一步孵育 2 天。将 5 毫升的第三种子培养接种在含有 100ml 第二营养培养基的 500ml 烧瓶中。将第四种子培养物在 28°C、以 250rpm 工作的旋转振荡器中孵育 1 天。将约 2-3g 的无菌 Amberlite XAD-7 树脂加入第四种子培养物中。将第四种子培养物在 28°C、以 250rpm 工作的旋转振荡器中进一步孵育 1 天。将每 5 毫升的第四种子培养物接种在含有 100ml 第二营养培养基的 10 个 500ml 烧瓶中。将第五种子培养物在 28°C、以 250rpm 工作的旋转振荡器中孵育 1 天。将约 2-3g 的无菌 Amberlite XAD-7 树脂加入第五种子培养物中。将第五种子培养物在 28°C、以 250rpm 工作的旋转振荡器中进一步孵育 3 天。每 4 毫升的第五种子培养接种在含有 100ml 的同第二营养培养基相同组成的生产培养基的 150 个 500ml 烧瓶中。将约 2-3g 的无菌 Amberlite XAD-7 树脂也加入该生产培养物中。将该生产培养物在 28°C、以 250rpm 工作的旋转振荡器中孵育 6 天。用乳酪布过滤该培养发酵液来回收该 Amberlite XAD-7 树脂。用 3 升的乙酸乙酯提取所述树脂 2 次,接着用 1 升的乙酸乙酯提取 1 次。真空干燥混合后的该提取物。干燥后的该提取物含有 0.42g 的式 II-17 化合物和 0.16g 的 II-18 化合物,然后加工处理来回收所述化合物。

[0401] 实施例 4

[0402] 式 II-17 和 II-18 的化合物的纯化

[0403] 通过下述的反相高效液相色谱法 (HPLC) 获得式 II-17 和 II-18 的纯化合物:

[0404]

色谱柱	ACE 5 C18-HL
尺寸	15 cm × 21 mm ID
流速	14.5 ml/min
检测器	214nm
溶剂	35% 乙腈 / 65% 水到 90% 乙腈 / 10% 水经过 15 min 的梯度

[0405] 将粗提取物 (100mg) 溶于 15ml 的乙腈中。将该溶液的部分 (900  $\mu$ l) 注入应用上述条件的反相 HPLC 色谱柱中。式 II-17 和 II-18 化合物分别在 7.5 分钟和 9 分钟时洗脱。先应用氮气浓缩含有所述纯化合物的部分来去除有机溶剂。然后冷冻和低压冻干干燥该剩余溶液。

[0406] 式 II-17 化合物:UV(乙腈/水)  $\lambda_{\max}$  225(sh)nm。高分辨率质谱 (APCI) :m/z 280.156 (M+H),  $\Delta_{\text{calc}} = 2.2\text{ppm}$ ,  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{NO}_4$ 。图 49 描述了具有式 II-17 结构的化合物的  $^1\text{H}$  NMR 图谱。

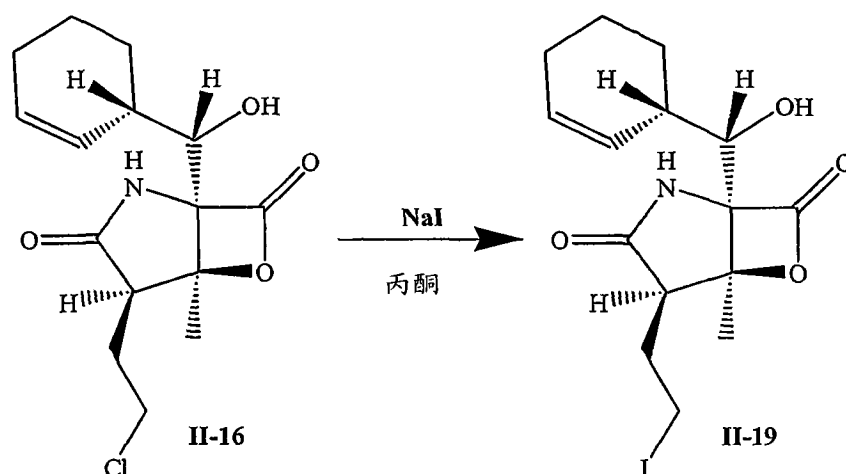
[0407] 式 II-18 化合物:UV(乙腈/水)  $\lambda_{\max}$  225(sh)nm。高分辨率质谱 (APCI) :m/z 358.065 (M+H),  $\Delta_{\text{calc}} = -1.9\text{ppm}$ ,  $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}_4\text{Br}$ 。图 50 描述了具有式 II-18 结构的化合物的  $^1\text{H}$  NMR 图谱。

[0408] 实施例 5

[0409] 从 II-16 化合物中制备 II-19 化合物

[0410] 将式 II-16 的化合物样品 (250mg) 中加入碘化钠的丙酮溶液 (10ml 含 1.5g) 且将所得的混合物搅拌 6 天。所述溶液用 0.45  $\mu$  的注射器式滤器过滤并且将 0.95ml 份的溶液直接注射到正相硅胶 HPLC 色谱柱上 (PhenomenexLuna 10u Silica, 25cm x 21.2mm)。从未反应的 II-16 化合物中分离式 II-19 化合物的 HPLC 条件采用由 24% 乙酸乙酯和 76% 己烷组成的等强度洗脱 HPLC 方法, 在该方法中, 主要的化合物 II-19 在化合物 II-16 之前 2.5 分钟洗脱。将 10 次注射的每一次注射中相等的部分混合生成 35mg 化合物 II-19。化合物 II-19 :UV (乙腈 / 水) 225 (sh), 255 (sh) nm ;ESMS, m/z 406.0 (M+H)<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR 在氘代二甲基亚砜中 (见图 9)。

[0411]



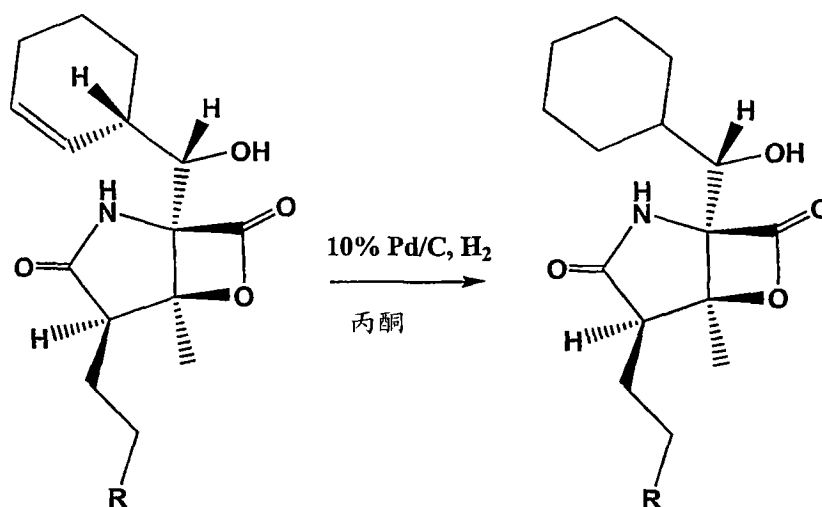
[0412] 实施例 6

[0413] 式 II-2, II-3, 和 II-4 化合物的合成

[0414] 分别从式 II-16, II-17 和 II-18 化合物中通过催化氢化合成式 II-2, II-3 和 II-4 化合物。

[0415] 合成的示例性说明

[0416]



[0417] II-16 :R = Cl

[0418] II-17 :R = H

[0419] II-18 :R = Br

II-2 :R = Cl

II-3 :R = H

II-4 :R = Br

[0420] 实施例 6A :式 II-16 化合物的催化氢化

[0421] 在闪烁管 (20mL) 中将式 II-16 化合物 (10mg) 溶于丙酮 (5mL) 中, 向管中加入 10% (w/w)Pd/C(1-2mg) 和磁力搅拌子。在氢气气氛中室温下搅拌该反应混合物约 15 小时。用 3cc 硅胶柱过滤并用丙酮洗涤该反应混合物。再用 0.2  $\mu$ m Gelman Acrodisc 过滤该滤液去除任何痕量的催化剂。减压蒸除所得滤液中的溶剂, 生成纯的白色粉末状的式 II-2 化合物: UV(乙腈/水):  $\lambda_{\max}$  225(sh)nm。图 10 描述了式 II-2 化合物在氘代二甲基亚砜中的 NMR 图谱。图 11. 描述了式 II-2 化合物的低分辨率质谱: m/z 316 (M+H), 338 (M+Na)。

[0422] 实施例 6B :式 II-17 化合物的催化氢化

[0423] 在闪烁管 (20mL) 中将式 II-17 化合物 (5mg) 溶于丙酮 (3ml) 中, 向管中加入 10% (w/w)Pd/C(约 1mg) 和磁力搅拌子。在氢气气氛中室温下搅拌该反应混合物约 15 小时。用 0.2  $\mu$ m Gelman Acrodisc 过滤该反应混合物去除催化剂。蒸除该滤液中的溶剂, 生成式 II-3 化合物, 该化合物通过正相 HPLC 应用下列条件纯化得到白色粉末:

[0424] 色谱柱 Phenomenex Luna 10  $\mu$  硅

[0425] 尺寸 25cm $\times$ 21.2mm ID

[0426] 流速 14.5ml/min

[0427] 检测器 ELSD

[0428] 溶剂 5% 到 60% 乙酸乙酯 / 己烷, 19 分钟; 60 到 100% 乙酸乙酯, 1 分钟; 然后 100% 乙酸乙酯, 4 分钟

[0429] 式 II-3 化合物在 22.5 分钟作为纯化合物洗脱: UV(乙腈/水):  $\lambda_{\max}$  225(sh)nm。图 12 描述了式 II-3 化合物在氘代二甲基亚砜中的 NMR 图谱。图 13 描述了式 II-3 化合物的低分辨率质谱: m/z 282 (M+H), 304 (M+Na)。

[0430] 实施例 6C :式 II-18 化合物的催化氢化

[0431] 在闪烁管 (20mL) 中将 3.2mg 式 II-18 化合物溶于丙酮 (3ml) 中, 向管中加入 10% (w/w)Pd/C(约 1mg) 和磁力搅拌子。在氢气中室温下搅拌该反应混合物约 15 小时。用 0.2  $\mu$ m Gelman Acrodisc 过滤该反应混合物去除催化剂。蒸除该滤液中的溶剂, 生成式 II-3 化合物, 该化合物通过正相 HPLC 应用下列条件纯化得到白色粉末:

[0432] 色谱柱 Phenomenex Luna 10  $\mu$  硅

[0433] 尺寸 25cm $\times$ 21.2mm ID

[0434] 流速 14.5ml/min

[0435] 检测器 ELSD

[0436] 溶剂 5% 到 80% 乙酸乙酯 / 己烷, 19 分钟; 80 到 100% 乙酸乙酯, 1 分钟; 然后 100% 乙酸乙酯, 4 分钟

[0437] 式 II-4 化合物在 16.5 分钟作为纯化合物洗脱: UV(乙腈/水):  $\lambda_{\max}$  225(sh)nm。图 14 描述了式 II-4 化合物在氘代二甲基亚砜中的 NMR 图谱。图 13 描述了式 II-4 化合物的低分辨率质谱: m/z 360 (M+H), 382 (M+Na)。

[0438] 实施例 7

[0439] 式 II-5A 和 II-5B 化合物的合成

[0440] 可从式 II-16 化合物中通过与 mCPBA 的环氧化作用合成式 II-5A 和式 II-5B 化合物。

[0441] 在 100ml 圆底烧瓶中将式 II-16 化合物 (101mg, 0.32mmole) 溶于二氯甲烷中 (30mL), 向烧瓶中加入 79mg (0.46mmole) 的间氯过苯甲酸 (mCPBA) 和磁力搅拌子。在室温下搅拌该反应混合物大约 18 小时。所述反应混合物倾倒在 20cc 硅胶闪柱中并用 120ml 的二氯甲烷, 75ml 的 1 : 1 乙酸乙酯 / 己烷最后用 40ml 的 100% 的乙酸乙酯洗脱。该 1 : 1 乙酸乙酯 / 己烷部分生成环氧衍生物, 式 II-5A 和式 II-5B 的非对映体的混合物, II-5A 和式 II-5B 通过正相 HPLC 应用下列条件分离:

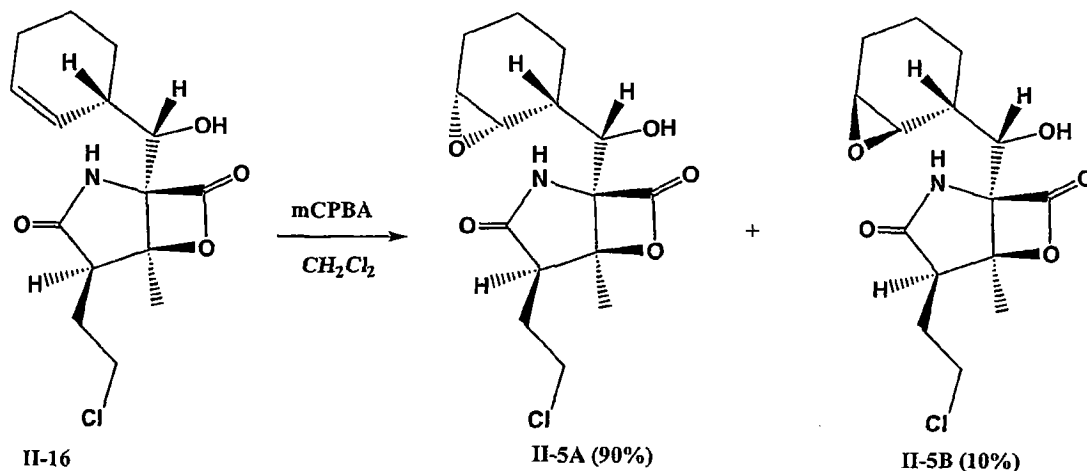
[0442]

色谱柱	Phenomenex Luna 10 $\mu$ 硅
尺寸	25 cm x 21.2 mm ID
流速	25 ml/min
检测器	ELSD
溶剂	25%到 80%乙酸乙酯/己烷, 19min; 80%到 100%乙酸乙酯 1min; 然后 100%乙酸乙酯, 5 min

[0443] 化合物式 II-5A (主产物) 和 II-5B (次产物) 作为纯化合物, 分别在 21.5 和 19 分钟时洗脱。在 3cc 硅胶闪柱上进一步色谱分离化合物 II-5B 去除痕量的氯苯甲酸试剂。

[0444] 化学结构:

[0445]



[0446] 结构鉴定:

[0447] 式 II-5A :UV (乙腈 / 水)  $\lambda_{\text{max}}$  225 (sh) nm。低分辨率质谱: m/z 330 (M+H), 352 (M+Na)。图 16-17 分别描述了具有式 II-5A 的  $^1\text{H}$  NMR 图谱和式 II-5A 的质谱。

[0448] 式 II-5B :UV (乙腈 / 水)  $\lambda_{\text{max}}$  225 (sh) nm。低分辨率质谱: m/z 330 (M+H), 352 (M+Na)。图 18-19 分别描述了具有式 II-5B 的  $^1\text{H}$  NMR 图谱和式 II-5B 的质谱。

[0449] 实施例 8

[0450] 式 IV-1, IV-2, IV-3 和 IV-4 化合物的合成

[0451] 二元醇衍生物的合成 (式 IV-2)

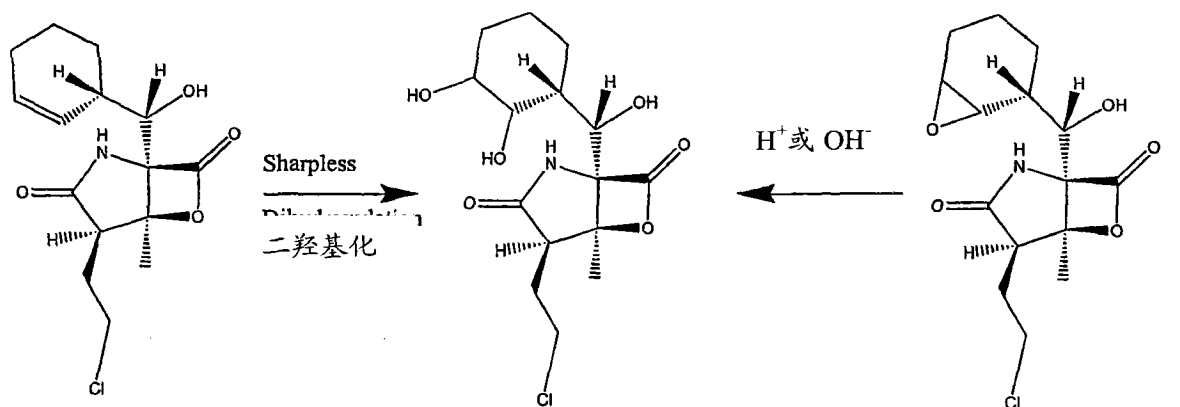
[0452] 可通过使用 AD mix- $\alpha$  和 AD mix- $\beta$  的 Sharpless 二羟基化合成二元醇:

AD mix- $\alpha$  是四个试剂的预混合物： $K_2OsO_2(OH)_4$ 、 $K_2CO_3$ 、 $K_3Fe(CN)_6$ 、 $(DHQ)_2$ -PHAL[1,4-二(9-O-氢化奎宁)2,3-二氮杂萘]；AD mix- $\beta$  是  $K_2OsO_2(OH)_4$ 、 $K_2CO_3$ 、 $K_3Fe(CN)_6$ 、 $(DHQD)_2$ -PHAL[1,4-二(9-O-双氢奎尼丁)2,3-二氮杂萘]的预混合物，所述试剂从 Aldrich 商业获得。二元醇也可通过环氧化物（式 II-5A 和 II-5B）的酸性或碱性水解作用合成，该方法获得的产物与在 Sharpless 二羟基化中获得的产物相比它们的立体化学在有羟基的碳原子处是不同的。

[0453] 化合物 II-16, II-17 和 II-18 的 Sharpless 二羟基化

[0454] 式 II-16, II-17 和 II-18 的化合物的任何一个都可以作为所述的起始化合物使用。在下面的实例中，使用的是式 II-16 化合物。在圆底烧瓶中将该起始化合物溶于叔丁醇/水中，向瓶中加入 AD mix- $\alpha$  或  $\beta$  和磁力搅拌子。通过硅胶薄层层析和质谱仪监测该反应。通过常规后处理获得并且通过快速色谱法或 HPLC 纯化所述的纯二元醇。通过核磁共振分光术和质谱分析法确定该结构。在该方法中两个羟基是在相同的一面。

[0455]



[0456] 起始物

式 IV-2

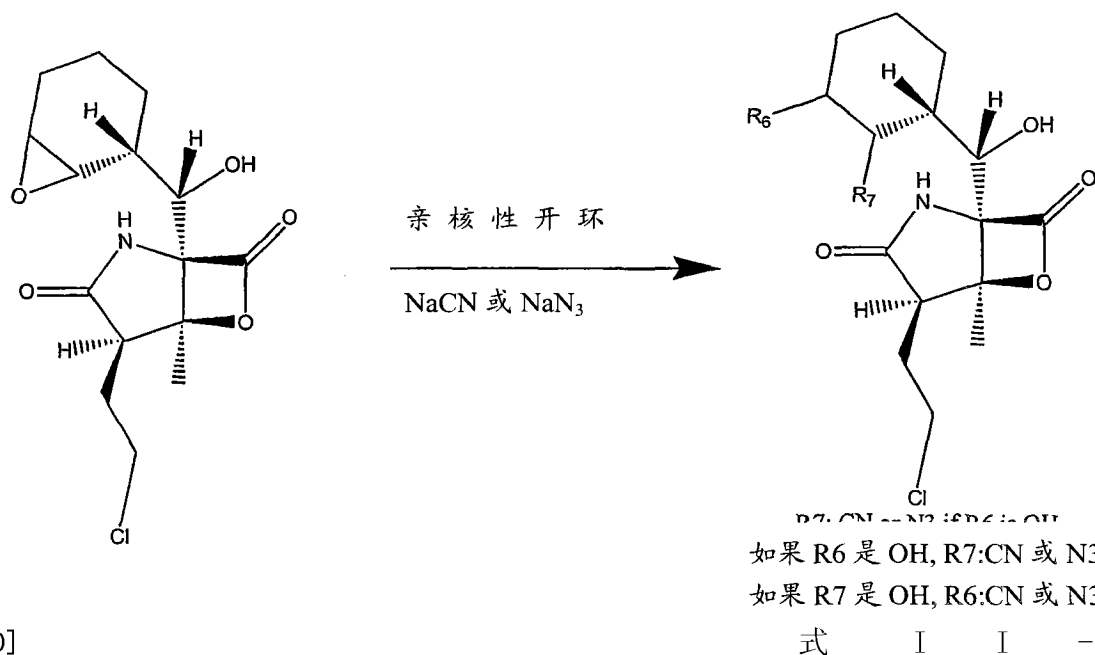
式

II-5

[0457] 环氧化物 (II-5) 的亲核性开环：

[0458] 所述环氧环与诸如 NaCN、 $NaN_3$ 、NaOAc、HBr、HCl 等等的各种亲核试剂反应开环产生在该环己烷环上的各种取代基，包括羟基取代基。例如：

[0459]

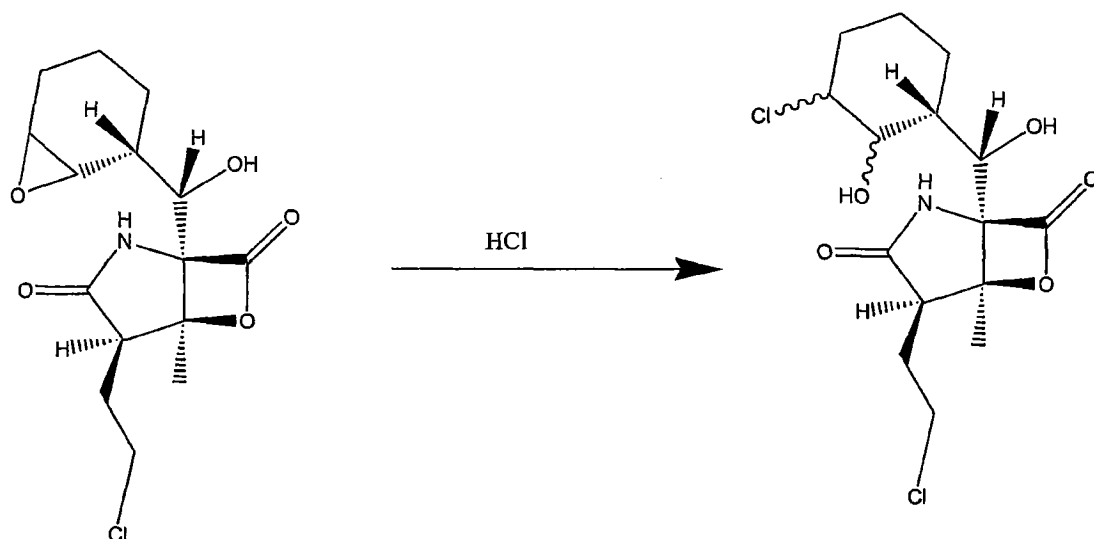


[0460]

式 IV-1

[0461] 所述的环氧与 HCl 反应开环产生式 IV-3:

[0462]

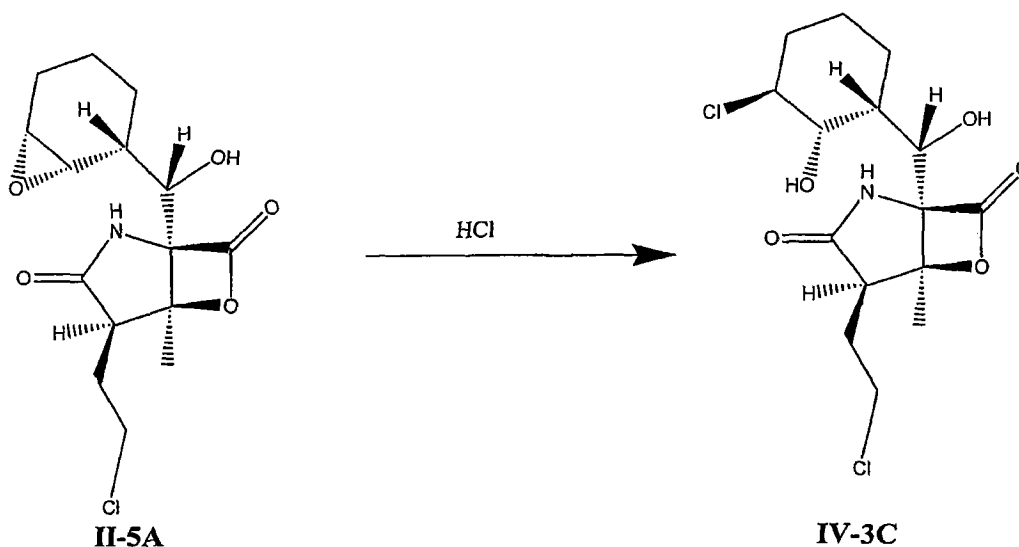


[0463] 式 II-5

式 IV-3

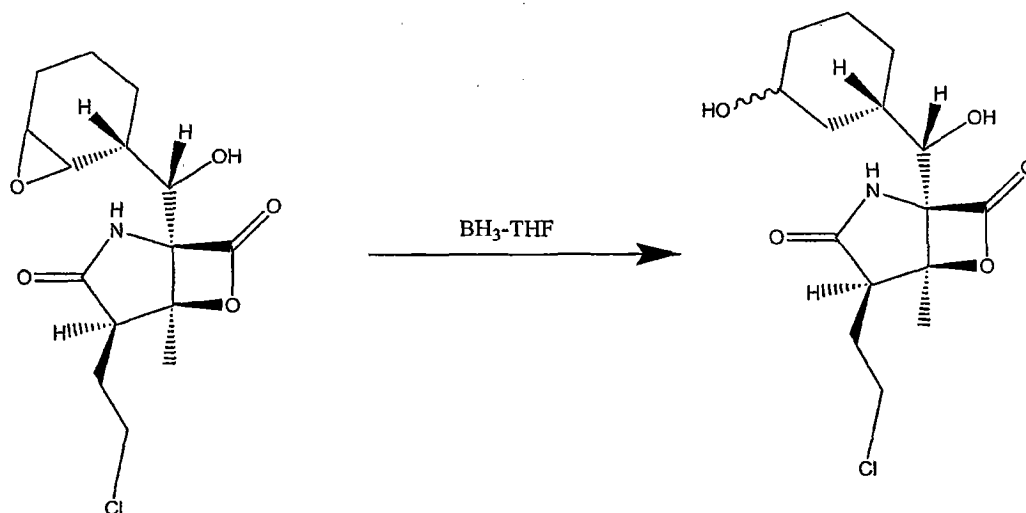
[0464] 在 1 英钱 (dram) 的管形瓶中将式 II-5A 化合物 (3.3mg) 溶于乙腈 (0.5ml) 中, 向瓶中加入 5% HCl (500  $\mu$  l) 和磁力搅拌子。在室温下搅拌该反应混合物约 1 小时。通过质谱分析法监测该反应。不经任何后处理将所述反应混合物直接注入正相 HPLC 中获得式 IV-3C 的纯化合物。用于所述纯化的 HPLC 条件如下: Phenomenex Luna 10  $\mu$  硅柱 (25cm  $\times$  21.2mm ID), 25% 到 80% 乙酸乙酯 / 己烷, 19min; 80 到 100% 乙酸乙酯, 1min; 然后 100% 乙酸乙酯, 5min 的溶剂梯度, 14.5ml/min 的流速。用 ELSD 监测该纯化过程。式 IV-3C 化合物在约 18 分钟时洗脱 (2.2mg)。式 IV-3C 化合物: UV (乙腈 / 水)  $\lambda_{\max}$  225 (sh) nm; ESMS, m/z 366 (M+H), 388 (M+Na), 在氘代二甲基亚砷中的 <sup>1</sup>H NMR 图谱 (图 20)。根据 1 : 1 C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>/DMSO-d<sub>6</sub> 中的环己烷环中观察到的耦合常数确定式 IV-3C 化合物的立体化学 (图 21)。

[0465]



[0466] 环氧化物 (II-5) 的还原性开环: 该式化合物被金属氢化物例如  $\text{BH}_3\text{-THF}$  络合物处理产生式 IV-4 的化合物。

[0467]



[0468] 式 II-5

式 IV-4

[0469] 实施例 9

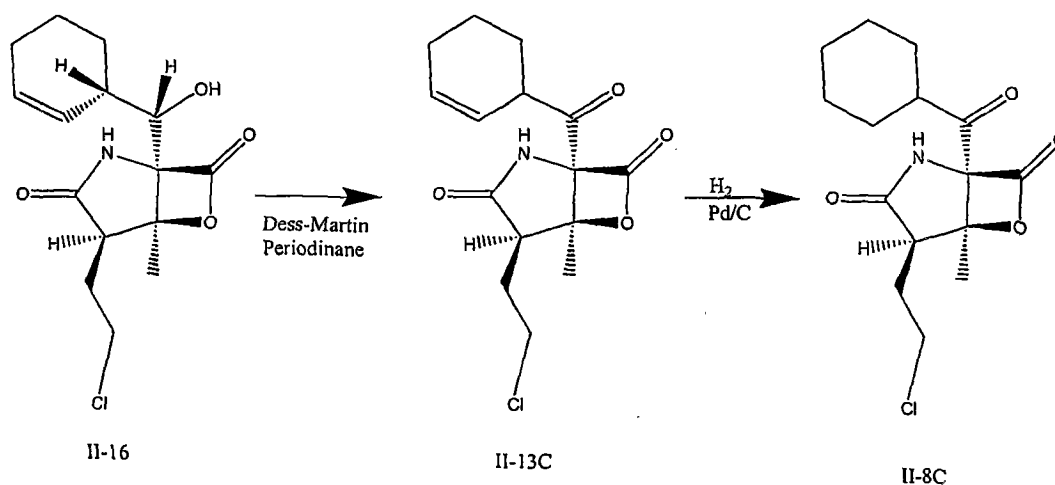
[0470] 式 II-13C 和 II-8C 的化合物的合成

[0471] 在闪烁瓶 (20ml) 中将式 II-16 化合物 (30mg) 溶于  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (6ml) 中, 向瓶中加入 Dess-Martin Periodinane (122mg) 和磁力搅拌子。在室温下搅拌该反应混合物约 2 小时。用 TLC (己烷: 乙酸乙酯, 6 : 4) 和分析的 HPLC 监测该反应的进程。在该反应混合物中, 溶剂体积减少到三分之一, 吸附在 硅胶上, 倾倒在 20cc 硅胶闪柱上并用从 10 到 100% 的己烷 / 乙酸乙酯的梯度洗脱在 20ml 部分中。用含 30% 乙酸乙酯的己烷洗脱剂洗脱的部分含有比例为 1.5 : 8.5 的式 II-13C 的旋转异构体的混合物。通过正相 HPLC 用下列条件进一步纯化该混合物: Phenomenex Luna  $10\mu$  硅柱 (25cm $\times$ 21.2mm ID), 25% 到 80% 乙酸乙酯 / 己烷, 19min; 80% 到 100% 乙酸乙酯, 1min; 100% 乙酸乙酯维持 5min 的溶剂梯度, 14.5ml/min 的流速。用 ELSD 监测该纯化过程。式 II-13C 化合物作为比例为 1.5 : 8.5 的旋转异构体的混合物在 13.0 和 13.2 分钟时洗脱 (7mg)。式 II-13C: UV (乙腈 / 水)  $\lambda_{\text{max}}$  226 (sh) &

330 (sh) nm ;ESMS,  $m/z$  312 (M+H)<sup>+</sup>, 334 (M+Na)<sup>+</sup> ;在氘代二甲基亚砜中的 <sup>1</sup>H NMR 图谱 (见图 22)。

[0472] 在闪烁瓶 (20ml) 中将式 II-13C 的旋转异构体混合物 (4mg) 溶于丙酮 (1ml) 中, 向瓶中加入催化量 (0.5mg) 的 10% (w/w) Pd/C 和磁力搅拌子。在氢气中室温下搅拌该反应混合物约 15 小时。用 0.2 μm Gelman Acrodisc 过滤该反应混合物去除所述催化剂。所述溶剂从该滤液中蒸除生成无色胶状的式 II-8C 化合物, 通过正相 HPLC 应用下列条件进一步纯化该化合物: Phenomenex Luna 10 μ 硅柱 (25cm×21.2mm ID), 25% 到 80% 乙酸乙酯/己烷, 19min; 80% 到 100% 乙酸乙酯, 1min, 100% 乙酸乙酯维持 5min 的溶剂梯度, 14.5ml/min 的流速。用 ELSD 监测该纯化过程。式 II-8C 化合物 (1mg) 在 13.5 分钟时作为纯化合物洗脱。式 II-8C: UV (乙腈/水) λ<sub>max</sub> 225 (sh) nm ;ESMS,  $m/z$  314 (M+H)<sup>+</sup>, 336 (M+Na)<sup>+</sup> ;在氘代二甲基亚砜中的 <sup>1</sup>H NMR 图谱 (见图 23)。

[0473]

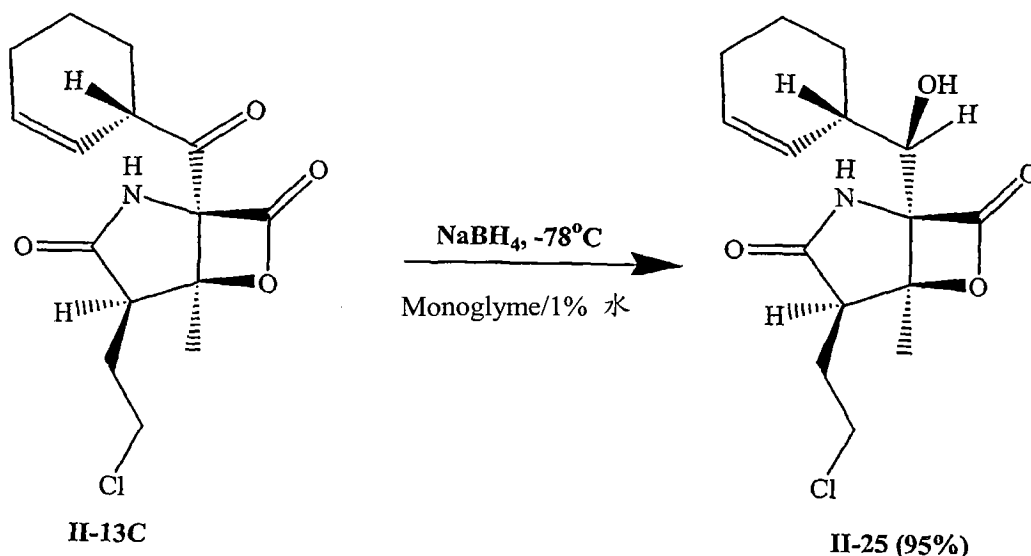


[0474] 实施例 10

[0475] 从式 II-13C 中合成式 II-25 化合物

[0476] 在闪烁瓶 (20ml) 中将式 II-13C 的旋转异构体混合物 (5mg) 溶于二甲氧基乙烷 (monoglyme; 1.5ml) 中, 向瓶中加入水 (15 μl (该溶液终浓度为 1%)) 和磁力搅拌子。上述溶液在干冰-丙酮浴中冷却到 -78°C, 并且滴加硼氢化钠 (含 3.7mg NaBH<sub>4</sub> 的 0.5ml monoglyme (考虑到缓慢加入所制备))。在 -78°C 下搅拌该反应混合物约 14 分钟。用 2ml 的 4% HCl 水溶液酸化该反应混合物并用 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 提取。蒸除该有机层生成比例为 9.5 : 0.5 的白色固体状的式 II-25 和 II-16 的化合物的混合物, 通过用 Phenomenex Luna 10 μ 硅柱 (25cm×21.2mm ID) 的正相 HPLC 进一步纯化该混合物。流动相是 24% 乙酸乙酯/76% 己烷, 该洗脱剂维持等强度洗脱 19 分钟, 接着 24% 到 100% 的乙酸乙酯的线性梯度洗脱 1min, 100% 乙酸乙酯维持 3min; 流速是 25ml/min。用 ELSD 监测该纯化过程。式 II-25 化合物 (1.5mg) 在 11.64 分钟时作为纯化合物洗脱。式 II-25 化合物: UV (乙腈/水) λ<sub>max</sub> 225 (sh) nm ;ESMS,  $m/z$  314 (M+H)<sup>+</sup>, 336 (M+Na)<sup>+</sup> ;在氘代二甲基亚砜中的 <sup>1</sup>H NMR 图谱 (见图 24)。

[0477]

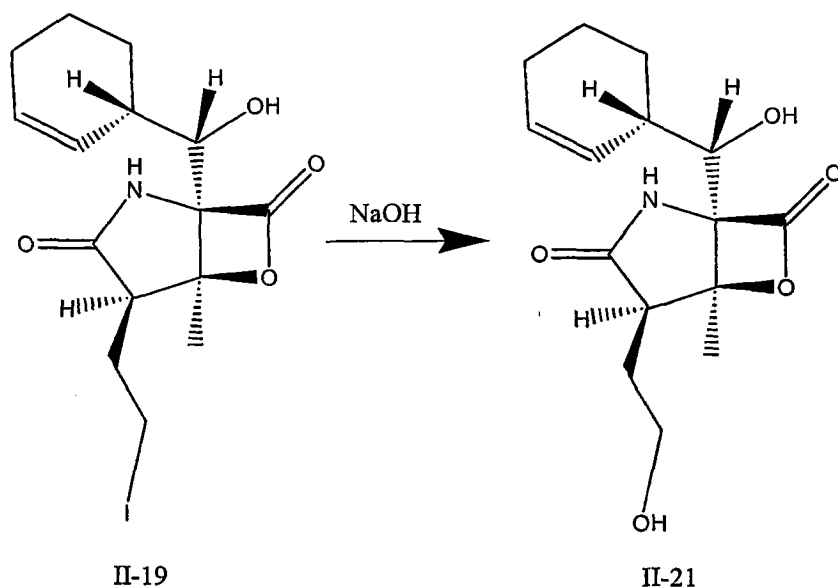


[0478] 实施例 11

[0479] 从式 II-19 中合成式 II-21 化合物

[0480] 丙酮 (7.5ml) 与 5N NaOH(3ml) 剧烈混合并且所得混合物在真空蒸发成最小容量。该溶液的 100  $\mu$  l 样品与在丙酮 (1ml) 中的式 II-19 化合物 (6.2mg) 混合并且将所得的双相混合物漩涡搅拌 2 分钟。该反应溶液立刻经过预备的 C18 HPLC。用于该纯化的条件包括从 10% 乙腈 /90% 水到 90% 乙腈 /10% 水经过 17 分钟的线性梯度和使用尺寸 22mm id 150mm 长的 Ace 5  $\mu$  C18 HPLC 柱。在这些条件下式 II-21 化合物在 9.1 分钟时洗脱产生 0.55mg 化合物。式 II-21 化合物 :UV (乙腈 / 水) 225 (sh) nm ;ESMS, m/z 296.1 (M+H) ;在氘代二甲基亚砷中的  $^1\text{H}$  NMR 图谱 (见图 25)。

[0481]



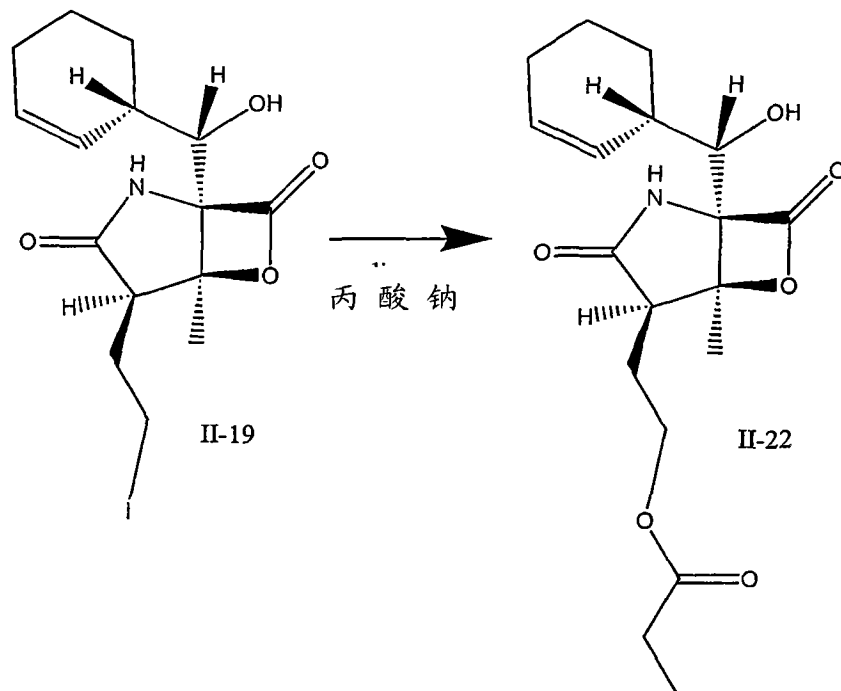
[0482] 实施例 12

[0483] 从式 II-19 中合成式 II-22 化合物

[0484] 将 60mg 丙酸钠的样品加入含式 II-19 化合物 (5.3mg) 的 DMSO (1ml) 溶液中并且超声振荡该混合物 5 分钟, 虽然该丙酸钠不能完全溶解。在 45 分钟后, 用 0.45  $\mu$  的注射器式过滤器过滤并用 HPLC 直接纯化该溶液。用于该纯化的条件包括从 10% 乙腈 /90% 水到 90%

乙腈/10%水经过 17 分钟的线性梯度和使用尺寸 22mm id 150mm 长的 Ace 5 $\mu$  C18 HPLC 柱。在这些条件下式 II-22 化合物在 12.3 分钟时洗脱生成 0.7mg 化合物 (15% 的分离率)。UV (乙腈/水) 225(sh)nm ;ESMS, m/z 352.2 (M+H)<sup>+</sup>; 在氘代二甲基亚砜中的 <sup>1</sup>H NMR 图谱 (见图 26)。

[0485]



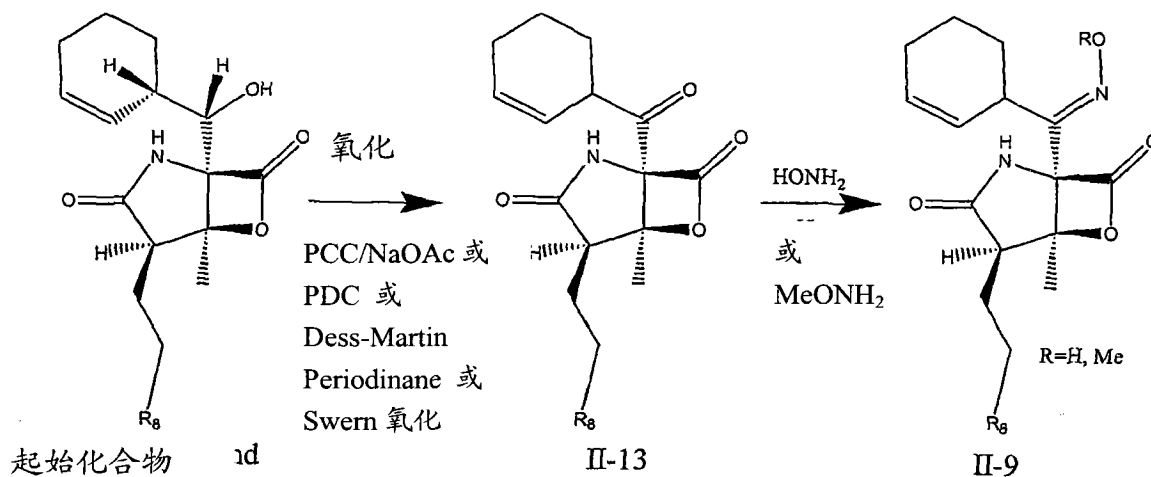
[0486] 实施例 13

[0487] 式 II-16, II-17 和 II-18 化合物的仲羟基的氧化及与羟基或甲氧基胺的反应

[0488] 式 II-16, II-17 和 II-18 化合物的任何一个化合物都可以作为所述起始化合物使用。用下列试剂的任何一种试剂氧化该起始化合物中的仲羟基: 吡啶重铬酸盐 (PDC), 氯铬酸吡啶 (PCC), Dess-Martin periodinane 或草酰氯 (Swern 氧化) (参考文献: 有机合成, 集合卷 I-VIII)。优选地, Dess-Martin periodinane 作为试剂在这个反应中使用 (参考文献: Fenteany G. et al. Science, 1995, 268, 726-73)。用羟胺或甲氧基胺处理所得的酮类化合物生成肟。

[0489] 例子:

[0490]



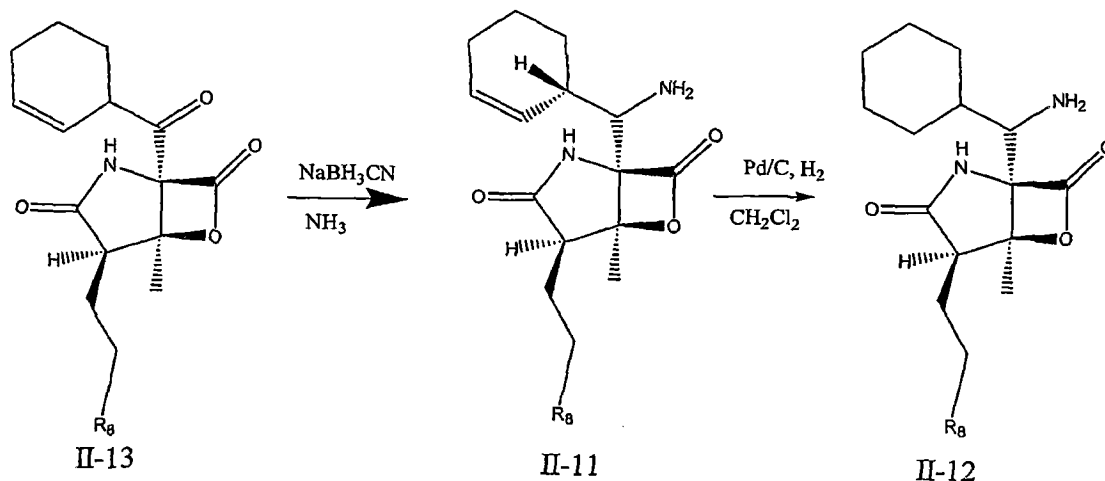
## [0491] 实施例 14

## [0492] 酮类衍生物的还原胺化

[0493] 所述的酮类衍生物,例如,通式 II-8 和 II-13 在各种碱存在下被氰基硼氢化钠 ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ) 处理生成该起始化合物的胺衍生物,该衍生物接着被 10% Pd/C,  $\text{H}_2$  氢化来还原环己烯环中的双键。

[0494] 例子:

[0495]

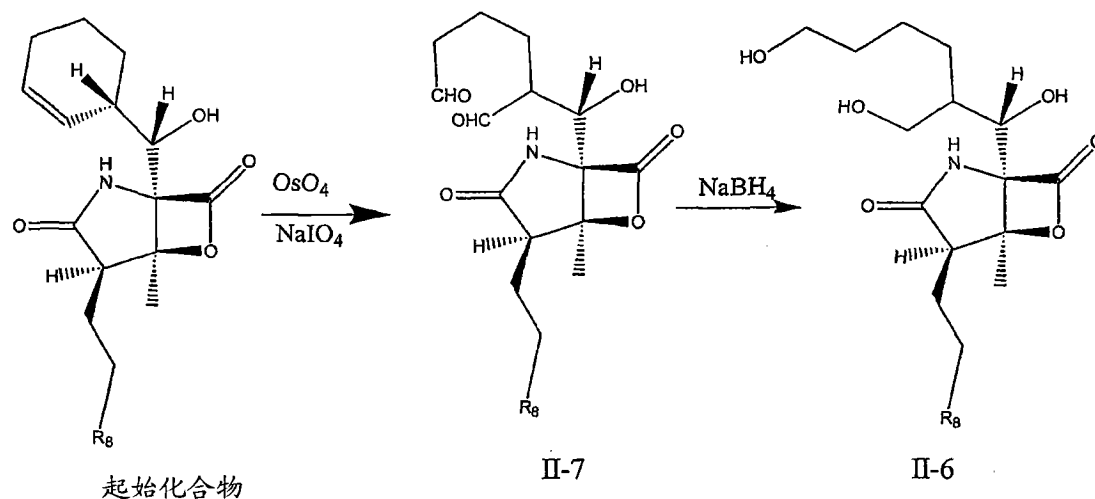


## [0496] 实施例 15

## [0497] 环己烯开环

[0498] 通式 II-16、II-17 或 II-18 化合物的任何一个化合物都可作为起始化合物使用。该起始化合物在 THF- $\text{H}_2\text{O}$  溶液中被  $\text{OsO}_4$  和  $\text{NaIO}_4$  处理生成二元醛衍生物,该衍生物在相同的反应罐中被  $\text{NaBH}_4$  还原成醇。

[0499]

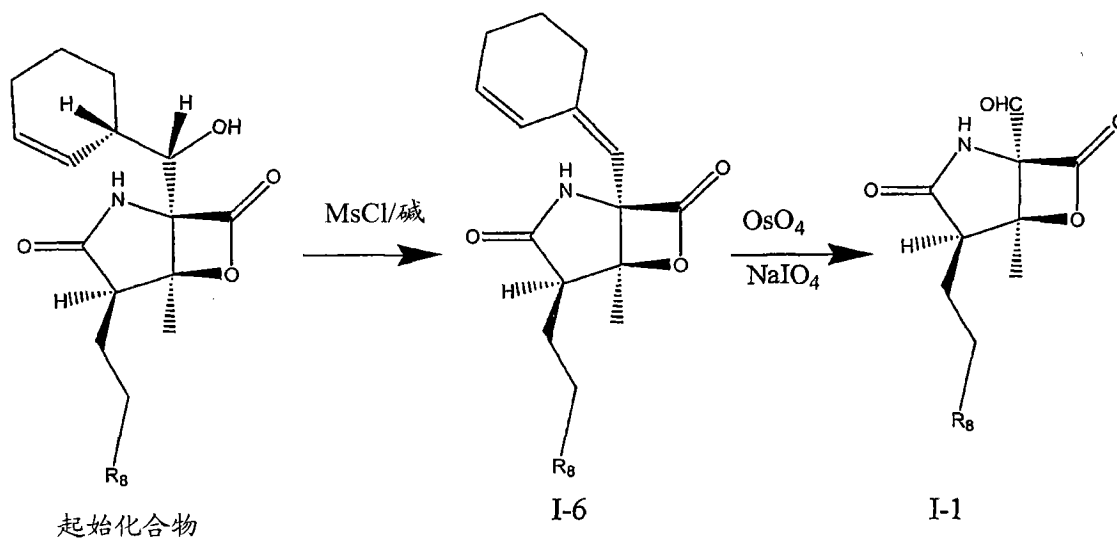


## [0500] 实施例 16

## [0501] 在内酯-内酰胺的环接合处的醇脱水接着形成醛

[0502] 任何一个通式 II-16, II-17 或 II-18 化合物的起始化合物在碱的存在下被甲磺酰氯处理生成脱水的衍生物。所得的脱水化合物在 THF- $\text{H}_2\text{O}$  中被  $\text{OsO}_4$  和  $\text{NaIO}_4$  处理生成在内酯-内酰胺的环接合处的醛基。

[0503]



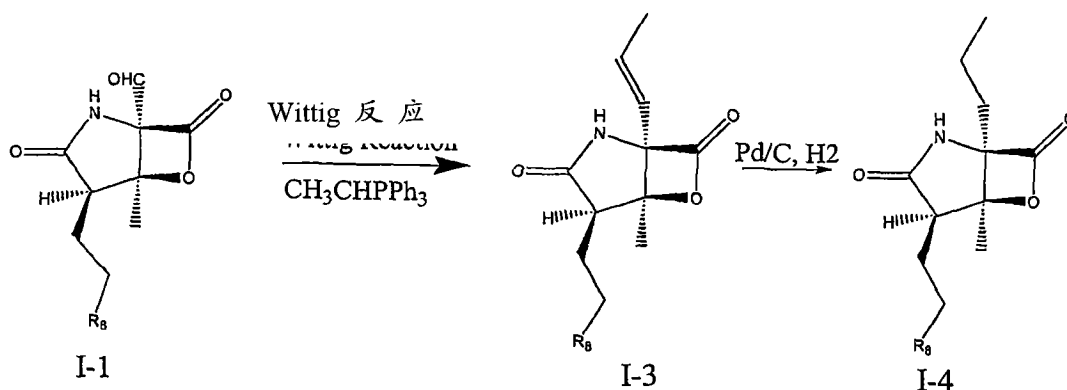
[0504] 实施例 17

[0505] 在醛衍生物 I-1 上的各种反应

[0506] 应用各种磷叶立德 [例如 (triphenylphosphoranylidene) 乙烷] 完成在所述醛基上的 Wittig 反应生成烯烃。在该侧链的所述双键被催化氢化还原。

[0507] 例子：

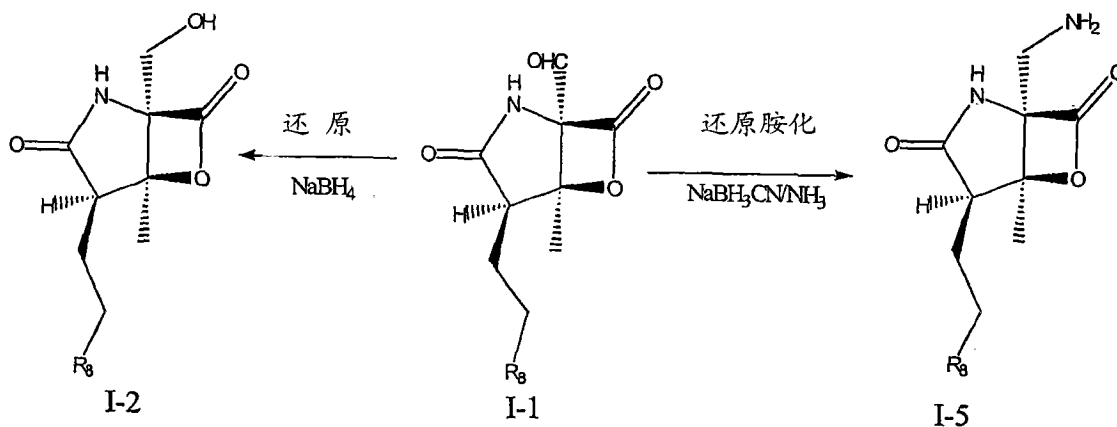
[0508]



[0509] 应用各种碱 (例如  $\text{NH}_3$ ) 和氰基硼氢化钠完成在所述醛基上的还原胺化生成胺衍生物。可选择地, 该醛被  $\text{NaBH}_4$  还原生成在该侧链的醇。

[0510] 例子：

[0511]

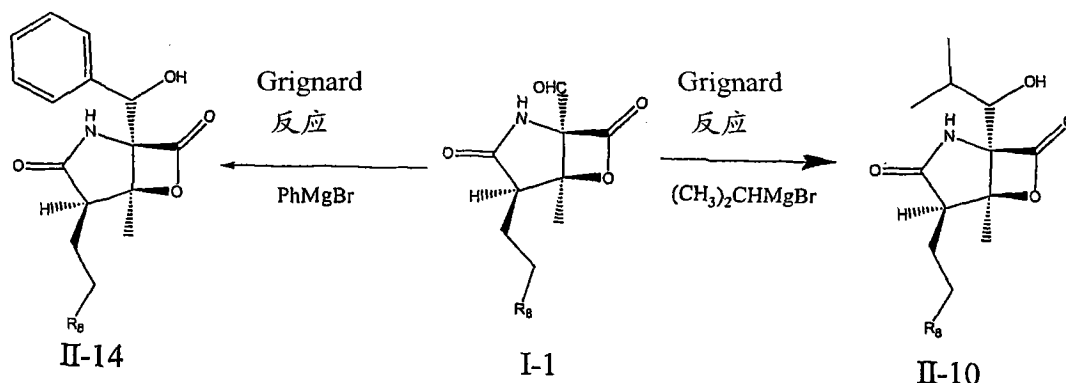


[0512] 可用各种烷基溴化镁试剂或烷基氯化镁试剂 (例如异丙基溴化镁, 苯基溴化镁)

完成对所述醛羰基的有机金属加成反应,例如 Grignard 反应,生成各种取代的仲醇。

[0513] 例子:

[0514]



[0515] 实施例 18

[0516] 体外生物学

[0517] 涉及到 Salinosporamide A 的式 II-16 化合物的初期研究使用国立癌症研究所 (NCI) 的由 60 株人肿瘤细胞系组成的筛查组,该肿瘤细胞系代表白血病、黑素瘤以及肺癌、结肠癌、脑癌、卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌和肾癌。该筛查操作的详细说明可在超文本传送方案中找到 ([http://](http://dtp.nci.nih.gov/branches/btb/ivclsp.html)) “dtp.nci.nih.gov/branches/btb/ivclsp.html.”

[0518] 简而言之,将每一个所述 60 株的人肿瘤细胞系生长在添加 5% 胎牛血清和 2mM L- 谷氨酰胺的 RPMI 1640 培养液中。细胞在 96- 孔的微滴定板中以它们适当的密度接种并在 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 空气和 100% 相对湿度中孵育。在 24 小时后,将 Salinosporamide A 的各种 10 倍系列稀释的 100 μL 液加入到含有 100 μL 细胞的恰当的孔中,产生从 10nM 到 100 μM 的范围内最终 Salinosporamide A 浓度。细胞又另外孵育 48 小时并用 sulforhodamine B 蛋白分析评价细胞的成活力或生长。

[0519] 三种剂量反应参数计算如下:

[0520] GI<sub>50</sub> 表示抑制 50% 生长的浓度

[0521] TGI 表示抑制全部生长的浓度

[0522] LC<sub>50</sub> 表示 50% 细胞致死的浓度

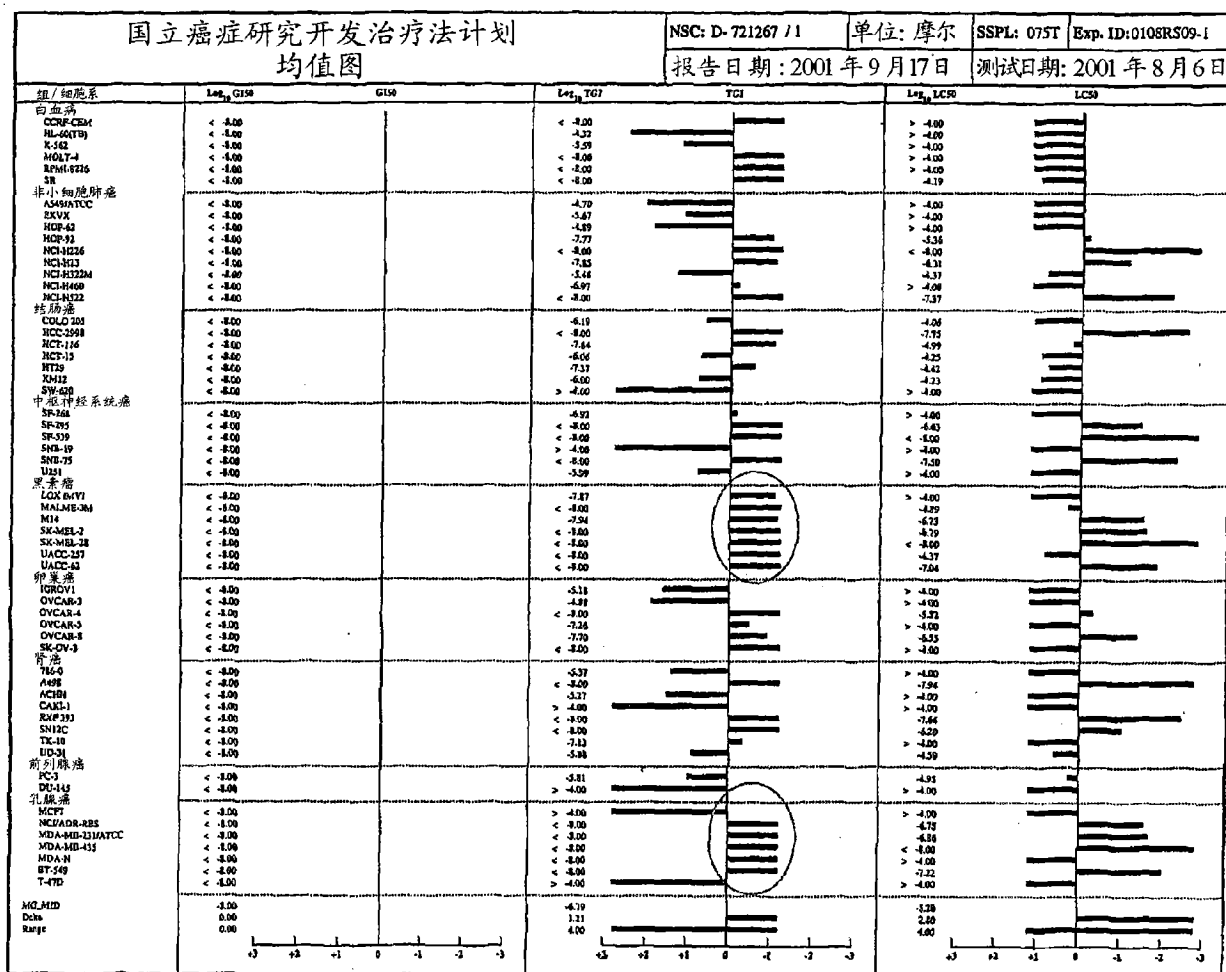
[0523] 在所述 NCI 的筛查中评价 Salinosporamide A 的研究的实例在下面的表 1 中显示。

[0524] 数据表明 Salinosporamide A 的平均 GI<sub>50</sub> 值小于 10nM。在对于最敏感和最耐受的肿瘤细胞系观察到的平均 TGI 值和平均 LC<sub>50</sub> 值的范围较宽 (> 1000 倍的差异),表明 Salinosporamide A 显示良好的选择性并且不显示一般毒性。此外,平均 TGI 数据表明 Salinosporamide A 对黑素瘤和乳腺癌细胞系显示优先的特异性。重复该分析并显示相似的结果。

[0525] NCI 肿瘤筛查的结果显示 Salinosporamide A : (1) 它是有效的化合物,其平均 GI<sub>50</sub> 值小于 10nM, 且 (2) 显示大于 1000 倍差异的良好的肿瘤选择性,该差异是最敏感和最耐受的肿瘤细胞系之间的平均 TGI 值差异和平均 LC<sub>50</sub> 值中的差异。

[0526] 表 1: NCI 60 株人肿瘤细胞系对 Salinosporamide A 的相对敏感性

[0527]



[0528] 实施例 19

[0529] 肿瘤细胞系的生长抑制

[0530] 将 B16-F10 (ATCC ;CRL-6475), DU 145 (ATCC ;HTB-81), HEK293 (ATCC ; CRL-1573), HT-29 (ATCC ;HTB-38), LoVo (ATCC ;CCL-229), MDA-MB-231 (ATCC ;HTB-26), MIA PaCa-2 (ATCC ;CRL-1420), NCI-H292 (ATCC ;CRL-1848), OVCAR-3 (ATCC, HTB-161), PANC-1 (ATCC ;CRL-1469), PC-3 (ATCC ;CRL-1435), RPMI 8226 (ATCC ;CCL-155) 以及 U266 (ATCC ;TIB-196) 维持在适当的培养基中。所述细胞在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 和 95% 潮湿空气的培养箱中培养。

[0531] 对于细胞生长抑制分析,将 90 μl 完全培养液中分别为 1.25×10<sup>3</sup>, 5×10<sup>3</sup>, 1.5×10<sup>4</sup>, 5×10<sup>3</sup>, 5×10<sup>3</sup>, 1×10<sup>4</sup>, 2×10<sup>3</sup>, 4×10<sup>3</sup>, 1×10<sup>4</sup>, 7.5×10<sup>3</sup>, 5×10<sup>3</sup>, 2×10<sup>4</sup>, 2.5×10<sup>4</sup> 细胞 / 孔的 B16-F10, DU 145, HEK293, HT-29, LoVo, MDA-MB-231, MIA PaCa-2, NCI-H292, OVCAR-3, PANC-1, PC-3, RPMI8226 和 U266 接种 Corning 3904 黑壁, 澄清的底的组织培养板中。在 100% 的 DMSO 中配制 20mM 的式 II-16 化合物的储存液, 并分成份且贮存在 -80°C 中。连续稀释式 II-16 化合物重复三次加入到所述的测试孔中, 产生从 20 μM 到 0.2pM 的终浓度。将该培养板放回到所述培养箱中培养 48 小时。在全部样品中的 DMSO 终浓度是 0.25%。

[0532] 药物暴露 48 小时后, 在每个孔中加入 10 μl 含 0.2mg/ml 刃天青 (从 Sigma-Aldrich 化学公司获得) 的无 Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup> 的磷酸盐缓冲液, 并将该培养板放回到所述

培养箱中培养 3-6 个小时。因为活细胞代谢刃天青 (resazurin), 应用 Fusion 微孔培养板荧光计 (Packard Bioscience) 通过  $\lambda_{ex} = 535\text{nm}$  和  $\lambda_{em} = 590\text{nm}$  的过滤器测定刃天青的还原产物的荧光。不含细胞的刃天青染料培养液用于确定背景, 其用于从所有实验孔的数据中扣除。该数据标准化成用培养基 +0.25% DMSO 处理的细胞 (100% 细胞生长) 的平均荧光度, 并且用标准的 S 形剂量反应曲线拟合法则 (该法则通过 Xlfit 3.0, ID Business Solutions Ltd 或 Prism 3.0, GraphPad Software Inc 产生) 确定  $EC_{50}$  值 (药物浓度, 在该浓度下观察到 50% 的最大生长抑制)。

[0533] 表 2 中的数据概述式 II-16 抗 13 种不同的人和小鼠的肿瘤细胞系的生长抑制效果

[0534] 表 2

[0535] 式 II-16 抗各种肿瘤细胞系的平均  $EC_{50}$  值

[0536]

细胞系	来源	$EC_{50}$ (nM), 平均值 $\pm$ SD*	n
B16-F10	小鼠, 黑素瘤	47 $\pm$ 20	12
DU145	人, 前列腺癌	37 $\pm$ 10	3
HEK293	人, 胚肾	47	2
HT-29	人, 结肠直肠癌	40 $\pm$ 26	5
LoVo	人, 结肠直肠癌	70 $\pm$ 8	3
MDA-MB-231	人, 乳腺癌	87 $\pm$ 40	12
MIA PaCa-2	人, 胰腺癌	46	2
NCI-H292	人, 非小细胞肺癌	66 $\pm$ 29	12
OVCAR-3	人, 卵巢癌	49 $\pm$ 31	6
PANC-1	人, 胰腺癌	60	2
PC-3	人, 前列腺癌	64 $\pm$ 26	19
RPMI 8226	人, 多发性骨髓瘤	8.6 $\pm$ 1.9	26
U266	人, 多发性骨髓瘤	4.7 $\pm$ 0.7	6

[0537] \*n (独立实验次数) = 2 时, 显示的是平均值

[0538] 所述  $EC_{50}$  值表明式 II-16 对 B16-F10, DU 145, HEK293, HT-29, LoVo, MDA-MB-231, MIA PaCa-2, NCI-H292, OVCAR-3, PANC-1, PC-3, RPMI8226 和 U266 细胞有细胞毒性。

[0539] 实施例 20

[0540] 式 II-2, II-3, II-4, II-5A, II-5B, II-8C, II-13C, II-16, II-17, II-18, II-19, II-20, II-21, II-22, II-24C, II-25 和 IV-3C 化合物对蛋白酶体活性的体外抑制

[0541] 在 DMSO 中将所有所述化合物制备为 20mM 的储存液, 且以小份贮存在  $-80^{\circ}\text{C}$  中。从 CalBiochem 中获得纯化的家兔肌 20S 蛋白酶体。为了增强该蛋白酶的胰凝乳蛋白酶样活性, 在分析缓冲液 (20mM HEPES (羟乙基哌嗪乙磺酸), pH7.3, 0.5 mM EDTA (乙二胺四乙酸) 和 0.05% Triton X100) 中补充 SDS, 使 SDS 最终浓度为 0.035%。使用的底物是 suc-LLVY-AMC, 一种被所述蛋白酶的胰凝乳蛋白酶样活性特异裂解的荧光肽底物。分析是在 96 孔 Costar 微滴定板中、含  $1\mu\text{g/ml}$  蛋白酶体浓度的  $200\mu\text{l}$  最终容积中完成的。式 II-2, 式 II-4, 式 II-16, 式 II-17, 式 II-18, 式 II-19, 式 II-21 和式 II-22 化合物以从 500nM 到 158pM 的终浓度范围的 8 点剂量反应曲线测试。II-5A, 式 II-5B 和式 II-20 化合物以从  $1\mu\text{M}$  到 0.32nM 的终浓度范围测试, 而式 II-8C, 式 II-13C, II-24C, 式 II-25 和式 IV-3C 以从  $20\mu\text{M}$  到 6.3nM 的终浓度范围测试。所述样品在  $37^{\circ}\text{C}$  的温度控制培养板读数器中孵

育 5 分钟。在所述的预孵育步骤中,所述底物在含有 SDS 的分析缓冲液中稀释 25 倍。在所述的预孵育步骤后,通过加入  $10\ \mu\text{M}$  的该稀释的底物引发所述反应,并将所述培养板放回该温度控制培养板读数器中。在该反应中的底物的终浓度为  $20\ \mu\text{M}$ 。所有的数据每 5 分钟收集一次,持续超过 1.5 小时并且按照三次数据点的平均值绘图。通过 Prism(GraphPad 软件)应用 S 形的剂量反应,可变的斜面模型计算  $\text{EC}_{50}$  值(即,50%的最大相对荧光单位被抑制的药物浓度)。为了评价所述化合物对抗所述 20S 蛋白酶体的 Caspase(半胱天冬酶)样活性方面的活性,除了 Z-LLE-AMC 作为肽底物被使用外,反应按上述内容完成。式 II-3, II-4, II-5A, II-5B, II-8C, II-13C, II-17, II-18, II-20, II-21, II-22, II-24C, II-25 和式 IV-3C 化合物以从  $20\ \mu\text{M}$  到  $6.3\text{nM}$  的浓度范围测试。式 II-2 以从  $10\ \mu\text{M}$  到  $3.2\text{nM}$  的浓度范围测试,而式 II-16 和式 II-19 以从  $5\ \mu\text{M}$  到  $1.58\text{nM}$  的浓度范围测试。对于所述化合物对抗所述蛋白酶的胰蛋白酶样活性方面的评价,从该分析缓冲液中省略所述 SDS,并且 Boc-LRR-AMC 作为肽底物应用。式 II-20 以从  $5\ \mu\text{M}$  到  $1.6\text{nM}$  的浓度范围测试。式 II-3, II-8C, II-13C, II-17, II-21, II-22, II-24C, II-25 和 IV-3C 以从  $20\ \mu\text{M}$  到  $6.3\text{nM}$  的浓度范围测试。对于式 II-2 和 II-5B,它们测试的浓度范围从  $10\ \mu\text{M}$  到  $3.2\text{nM}$ ,而式 II-4, II-5A, II-16, II-18 和 II-19 以从  $1\ \mu\text{M}$  到  $0.32\text{nM}$  的浓度范围测试。

[0542] 结果(平均  $\text{EC}_{50}$  值)显示在表 3 中并表明在所测试的化合物中,式 II-5A、II-16、II-18、II-19、II-20、II-21 和 II-22 是所述的 20S 蛋白酶体的胰凝乳蛋白酶样活性的最有效的抑制剂,其  $\text{EC}_{50}$  值范围从  $2.2\text{nM}$  到  $7\text{nM}$ 。式 II-2、II-4、II-5B 和 II-17 抑制该蛋白酶的胰凝乳蛋白酶样活性的  $\text{EC}_{50}$  值范围从  $14.2\text{nM}$  到  $87\text{nM}$ ,而式 II-3 的  $\text{EC}_{50}$  值是  $927\text{nM}$ 。式 II-24C, II-13C 和 IV-3C 抑制该胰凝乳蛋白酶样活性的  $\text{EC}_{50}$  值分别是  $2.2\ \mu\text{M}$ ,  $8.2\ \mu\text{M}$  和  $7.8\ \mu\text{M}$ 。式 II-8C 和 II-25 的  $\text{EC}_{50}$  值大于  $20\ \mu\text{M}$ 。在所述的测试条件下,式 II-2, II-3, II-4, II-5A, II-5B, II-13C, II-16, II-17, II-18, II-19, II-20, II-21, II-22 和 II-24C 能抑制所述 20S 蛋白酶体的胰蛋白酶样活性。式 II-4, II-5A, II-16, II-18 和 II-19 抑制所述 caspase 酶样活性的  $\text{EC}_{50}$  值范围从  $250\text{nM}$  到  $744\text{nM}$ ,而式 II-2, II-5B, II-17, II-20, II-21, 和 II-22 具有从  $1.2\ \mu\text{M}$  到  $3.3\ \mu\text{M}$  的  $\text{EC}_{50}$  值范围。

[0543] 表 3

[0544] 式 II-2, II-3, II-4, II-5A, II-5B, II-8C, II-13C, II-16, II-17, II-18, II-19, II-20, II-21, II-22, II-24C, II-25 和 IV-3C 对纯化的家兔 20S 蛋白酶体的各种酶活性的作用

[0545]

类似物	EC <sub>50</sub> 值		
	胰凝乳蛋白酶样	胰蛋白酶样	Caspase 样
式 II-2	18nM	230nM	1.5μM
式 II-3	927nM	6.6μM	>20μM
式 II-4	14.2nM	109nM	744nM
式 II-5A	6.5nM	89nM	487nM
式 II-5B	87nM	739nM	3.3μM
式 II-8C*	>20μM	>20μM	>20μM
式 II-13C	8.2μM	10.7μM	>20μM
式 II-16	2.5nM	21nM	401nM
式 II-17	29.5nM	588nM	1.2μM
式 II-18	2.2nM	14nM	250nM
式 II-19*	3nM	13nM	573nM
式 II-20*	5nM	318nM	1.4μM
式 II-21*	7nM	720nM	2.6μM
式 II-22*	5nM	308nM	1.3μM
式 II-24C*	2.2μM	3.2μM	>20μM
式 II-25*	>20μM	>20μM	>20μM
式 IV-3C	7.8μM	>20μM	>20μM

[0546] \*n = 1

[0547] 实施例 21

[0548] Salinosporamide A (II-16) 抑制家兔肌 20S 蛋白酶体的胰凝乳蛋白酶样活性

[0549] 利用从 Calbiochem(目录号 539158) 商业获得的试剂盒检测 Salinosporamide A (II-16) 对蛋白酶体的作用, 该试剂盒用荧光的肽底物测定家兔肌 20S 蛋白酶体的活性 (Calbiochem 20S Proteasome Kit)。该肽底物对所述蛋白酶体的胰凝乳蛋白酶样活性是特异的。

[0550] 在 DMSO 中制备 10mM 的 Omuralide 储存液, 并且以 5 μl 的整份贮存在 -80℃ 中。在 DMSO 中制备 25.5mM 的 Salinosporamide A 溶液并整份地贮存在 -80℃ 中。该分析测定 Suc-LLVY-AMC 水解成 Suc-LLVY 和 AMC。通过用  $\lambda_{ex} = 390\text{nm}$  和  $\lambda_{em} = 460\text{nm}$  荧光测定所释放的香豆素 (AMC)。该分析是在微滴定板 (Corning 3904) 中完成的, 并接着每五分钟动态地测定一次。使用的仪器是 Thermo Lab Systems Fluoroskan, 并将孵育室设定在 37℃。该分析依照该制造商的方案完成, 并有如下改变。所述蛋白酶体如描述地被 SDS 活化, 并在进行该分析之前保持在冰中。在分析缓冲液中连续地稀释 Salinosporamide A 和 Omuralide, 制备成 8 个剂量点的剂量反应曲线。在所述分析板中重复三次加入 10 μl 每一剂量, 并且加入 190 μl 的所述活化的蛋白酶体并混合。将所述样品在所述的 Fluoroskan 中在 37℃ 下预孵育 5 分钟。加入底物, 随后检测 AMC 的动力学 1 小时。所有的数据被采集并以三次数

据点的平均值绘图。该数据标准化成在没有 Salinosporamide A 情况下完成的反应数据,并以 S 形的剂量反应,可变的斜面模建在 Prism 中。

[0551] 与体外的细胞毒性中获得结果相似(表 2),参见 Feling, et al., SngewChem I71t Ed Engl 42 :355(2003),在所述的 20S 蛋白酶体分析中的 EC<sub>50</sub> 值显示 Salinosporamide A 比 Omuralide 更有效,其作用大约是 40 倍,平均 EC<sub>50</sub> 值分别是 1.3nM 对 49nM(图 27)。重复该实验并且在两次的分析中平均 EC<sub>50</sub> 确定为 Salinosporamide A 是 2nM 和 Omuralide 是 52nM。

[0552] Salinosporamide A 是所述蛋白酶体的胰凝乳蛋白酶样活性的有效抑制剂。细胞毒性的 EC<sub>50</sub> 值在 10-200nM 范围内,表明 Salinosporamide A 在诱发细胞死亡方面的能力至少大部分归因于对蛋白酶的抑制。该数据表明 Salinosporamide A 是所述蛋白酶体的有效的小分子抑制剂。

#### [0553] 实施例 22

##### [0554] Salinosporamide A(II-16) 对家兔肌 20S 蛋白酶体的 PGPH 活性的抑制

[0555] Omuralide 可抑制所述蛋白酶体的 PGPH(也称为 Caspase 样)活性;因此评价了 Salinosporamide A 在抑制纯化的家兔肌 20S 蛋白酶体的 PGPH 活性方面的能力。使用对该 PGPH 活性特异的商业可得的荧光底物来代替上述的蛋白酶分析试剂盒中胰凝乳蛋白酶底物。

[0556] 在 DMSO 中制备 20mM 的 Salinosporamide A(II-16) 溶液并且以小的整份贮存在 -80°C 中。在 DMSO 中制备 20mM 底物 Z-LLE-AMC 的储存液并贮存在 -20°C 中。所述蛋白酶体的来源是 Calbiochem(Cat. # 539158) 商业可得的试剂盒。用所述的胰凝乳蛋白酶底物,该蛋白酶可将 Z-LLE-AMC 裂解成 Z-LLE 和游离的 AMC。然后通过测定所释放的 AMC 的荧光确定该活性( $\lambda_{ex} = 390nm$  和  $\lambda_{em} = 460nm$ )。用 SDS 活化该蛋白酶,并且按照制造商的建议保持在冰中。在 DMSO 中 Salinosporamide A 被稀释产生 400 倍浓缩的 8 剂量点的稀释系列。用分析缓冲液稀释 20 倍该系列并且为了检测胰凝乳蛋白酶样活性用所描述的蛋白酶体预孵育。在加入底物后,所述样品在 37°C 孵育,并且在荧光计中监测该荧光 AMC 的释放。收集所有数据并且按照三次点的平均值绘图。在这些实验中,按照标准化的活性将该 EC<sub>50</sub> 模建在 Prism 中,其中,在没有 Salinosporamide A 的情况下释放的 AMC 的量表示 100% 的活性。如以前一样,选择的该模型是 S 形的剂量反应,具有可变的斜面。

[0557] 数据显示 Salinosporamide A 抑制家兔肌 20S 蛋白酶体中的 PGPH 活性,其 EC<sub>50</sub> 是 350nM(图. 28)。进行重复性实验,该实验产生 610nM 的预测 EC<sub>50</sub>。这些结果显示 Salinosporamide A 确实体外阻断纯化的家兔肌 20S 蛋白酶的 PGPH 活性,虽然比观察到的对所述胰凝乳蛋白酶样活性的抑制具有较差的抑制。

#### [0558] 实施例 23

##### [0559] 人红细胞 20S 蛋白酶体的胰凝乳蛋白酶样活性的抑制

[0560] Salinosporamide A(II-16) 在抑制人红细胞 20S 蛋白酶的胰凝乳蛋白酶样活性方面的能力是在体外评价的。计算的 EC<sub>50</sub> 值范围从 45 到 247pM 并且似乎依赖于测试的蛋白酶体(BIOMOL, Cat#SE-221) 类型。这些数据显示 Salinosporamide A 的抑制效果不局限于家兔骨骼肌蛋白酶体。

[0561] 在 DMSO 中制备 20mM 的 Salinosporamide A 溶液并以小份在 -80°C 中贮存。所述底

物,在DMSO中制备20mM的suc-LLVY-AMC溶液并在-20℃中贮存。从BIOMOL(Cat. #SE-221)获得人红细胞20S蛋白酶。该蛋白酶可裂解suc-LLVY-AMC成suc-LLVY和游离的AMC并且通过测定所释放的AMC的荧光确定该活性( $\lambda_{ex} = 390\text{nm}$ 和 $\lambda_{em} = 460\text{nm}$ )。如同家兔肌蛋白酶体的实验一样,用SDS活化该蛋白酶并且保持在冰中。在DMSO中稀释Salinosporamide A产生400倍浓缩的8个点的稀释系列。该系列用分析缓冲液稀释20倍并用蛋白酶在37℃中预孵育。底物引发该反应并且随后在Fluoroskan微培养板荧光计中测定AMC的释放。收集数据并且按照三点的平均值绘图。动态地收集数据3小时,并且表明这些反应在该时间段内显示线性的动力学。这些数据被标准化成没有Salinosporamide A情况下完成的反应,并且Prism中以S形的剂量效应、可变的斜面做模型。

[0562] 利用不同类型的人红细胞蛋白酶进行重复实验,产生 $EC_{50}$ 值的范围在45和250pM之间(图29显示代表性实验)。据报道,从人红细胞中纯化的20S蛋白酶在亚单位组成中具有较高的异源性。参见Claverol, et al., Mol Cell Proteomics 1:567(2002)。因此所述人红细胞蛋白酶制品的组成与活性的差异导致了这些实验中的可变性。无论如何,这些结果表明体外的人红细胞20S蛋白酶体的胰凝乳蛋白酶样活性对Salinosporamide A是敏感的。

#### [0563] 实施例 24

#### [0564] Salinosporamide A(II-16) 的特异性

[0565] Salinosporamide A抑制所述蛋白酶体的可能的机理是通过Salinosporamide A的 $\beta$ -内酯官能团与该蛋白酶的活性位点苏氨酸反应。该蛋白酶体的共价键改性将阻断该活性位点,因为该残基对该蛋白酶体的催化活性是必需的。参见Fenteany, et al., J Biol Chem 273:8545(1998)。结构上相关的化合物乳胞素,也显示出抑制组织蛋白酶A(Ostrowska, et al., Int J Biochem Cell Biol 32:747(2000), Kozlowski, et al., Tumour Biol 22:211(2001), Ostrowska, et al., Biochem Biophys Res Commun 234:729(1997))和TPPII(Geier, et al., Science 283:978(1999))但是不抑制胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、番木瓜蛋白酶、钙蛋白酶,(Fenteany, et al., Science 268:726(1995)),凝血酶和纤溶酶原活化因子(Omura, et al., J Antibiot(Tokyo)44:113(1991))的活性。类似的研究通过评价Salinosporamide A对抑制原型(prototypical)丝氨酸蛋白酶,胰凝乳蛋白酶的催化活性的能力,开始探索它对所述蛋白酶的特异性。

[0566] 在DMSO中制备20mM的Salinosporamide A溶液并以小份在-80℃中贮存。在DMSO中制备20mM的所述底物,suc-LLVY-AMC溶液并在-20℃中贮存。通过蛋白酶或胰凝乳蛋白酶对该底物的蛋白水解释放所述的荧光产物AMC,在荧光计中监测该AMC( $\lambda_{ex} = 390\text{nm}$ 和 $\lambda_{em} = 460\text{nm}$ )。从Sigma(Cat. #C-4129)中获得牛胰脏的胰凝乳蛋白酶,并且每天在分析缓冲液(10mM HEPES,0.5mM EDTA,0.05% Triton X-100, pH 7.5)中制备5mg/ml溶液。在分析前即刻,用缓冲分析液将胰凝乳蛋白酶稀释到 $1\mu\text{g/ml}$ ( $0.2\mu\text{g/孔}$ )并在冰中保持。在DMSO中稀释Salinosporamide A并产生8个点的剂量效应曲线。获得胰凝乳蛋白酶的完全抑制所需的Salinosporamide A的高终浓度要求所述的稀释的酶直接加入该化合物的稀释系列中。在该反应物中的1% DMSO(在所述测试孔中的溶剂的终浓度)的内含物在胰凝乳蛋白酶对该底物的活性方面没有显著的影响。在37℃下预孵育该反应物5分钟并且通过加入底物引发该反应。在37℃下在Fluoroskan中动态地收集数据1小时并且按照三

次数据点的平均值绘图。所述数据被标准化成在没有 Salinosporamide A 的情况下完成的反应,并且在 Prism 中以 S 形的剂量效应,可变的斜面做模型。在同一张图中,包含来自 Salinosporamide A 对家兔 20S 蛋白酶体的胰凝乳蛋白酶样活性抑制的标准化数据。

[0567] 在使用 Salinosporamide A 对胰凝乳蛋白酶做预处理的两次实验中观察到的平均抑制为  $17.5 \mu\text{M}$  (图 30 显示代表性实验)。该数据表明 Salinosporamide A 介导的蛋白酶体的胰凝乳蛋白酶样体外活性的抑制优先于胰凝乳蛋白酶的催化活性的抑制。

[0568] 因此, Salinosporamide A 抑制所述蛋白酶体的胰凝乳蛋白酶样和 PGPH 活性。初步的研究表明 Salinosporamide A 也抑制蛋白酶体的胰蛋白酶样活性,其  $\text{EC}_{50}$  值为约  $10\text{nM}$  (不显示数据)。

[0569] 实施例 25

[0570] 式 II-2, II-3, II-4, II-5A, II-5B, II-8C, II-13C, II-16, II-17, II-18, II-19, II-20, II-21, II-22, II-24C, II-25 和 IV-3C 化合物对 NF- $\kappa$ B 介导的荧光素酶活性的抑制;

[0571] HEK293NF- $\kappa$ B/ 荧光素酶报告细胞系

[0572] 所述的 HEK293NF- $\kappa$ B/ 荧光素酶报告细胞系衍生自人的胚肾细胞系 (ATCC ; CRL-1573) 并且在 5X NF- $\kappa$ B 结合位点的调节下携带荧光素酶报告基因。该报告细胞系常规地维持在用  $250 \mu\text{g/ml}$  G418 补充的完全 DMEM 培养液中 (加 10% (v/v) 胎牛血清,  $2\text{mM}$  L- 谷氨酰胺,  $10\text{mM}$  HEPES 和分别为  $100\text{IU/ml}$  和  $100 \mu\text{g/ml}$  青霉素 / 链霉素的 DMEM)。当进行该荧光素酶分析时,用无酚红的 DMEM 基础培养基替代 DMEM 基础培养基,并省略 G418。该细胞在  $37^\circ\text{C}$ , 5% 二氧化碳和 95% 潮湿空气的培养箱中培养。

[0573] 对 NF- $\kappa$ B 介导的荧光素酶分析时,以  $1.5 \times 10^4$  细胞 / 孔的数量将  $90 \mu\text{l}$  无酚红 DMEM 完全培养基中 HEK293 NF- $\kappa$ B/ 荧光素酶报告细胞接种入 Corning 3917 白色不透明底的组织培养板中。对于式 II-2, 式 II-4, 式 II-5A, 式 II-16 和式 II-18 化合物,在 100% DMSO 中制备  $400 \mu\text{M}$  的起始稀释液并且该稀释液用于产生 8 点半对数稀释系列。该稀释系列在适当的培养液中进一步地稀释 40 倍并且  $10 \mu\text{l}$  的整份重复三次加到该测试孔中产生  $1 \mu\text{M}$  到  $320\text{pM}$  的终测试浓度范围。对于式 II-3, 式 II-5B, 式 II-8C, 式 II-13C, 式 II-17, 式 II-20, 式 II-21, 式 II-22, 式 II-24C, 式 II-25 和式 IV-3C, 在 100% DMSO 中制备  $8\text{mM}$  的起始稀释液并且按照上述的方法接着进行相同的操作过程产生从  $20 \mu\text{M}$  到  $6.3\text{nM}$  终测试浓度范围。对于式 II-19, 在 100% DMSO 中制备  $127 \mu\text{M}$  的起始稀释液并且终测试浓度范围从  $317\text{nM}$  到  $0.1\text{nM}$ 。该培养皿放回到所述培养箱中 1 小时。在 1 小时的预处理后,加入在无酚红的 DMEM 培养基中制备的  $10 \mu\text{l}$  的  $50\text{ng/ml}$  的 TNF- $\alpha$  溶液,并将该培养板另外孵育 6 小时。在全部的样品中 DMSO 的终浓度为 0.25%。

[0574] 在 TNF- $\alpha$  刺激结束后,将  $100 \mu\text{l}$  的 Steady Lite HTS 荧光素酶试剂 (Packard Bioscience) 加入到每一个孔中并且在测试该荧光素酶活性将前所述培养板在室温下不受干扰地放置 10 分钟。通过使用 Fusion 微量培养板荧光计 (Packard Bioscience) 测量所述的相对荧光素酶单位 (RLU)。该  $\text{EC}_{50}$  值 (50% 的最大相对荧光素酶单位抑制的药物浓度) 在使用 S 型剂量效应,可变的斜面的 Prism (GraphPad 软件) 中模型计算。

[0575] 式 II-2, II-3, II-4, II-5A, II-5B, II-8C, II-13C, II-16, II-17, II-18, II-19, II-20, II-21, II-22, II-24C, II-25 和 IV-3C 化合物对 NF- $\kappa$ B 活化作用的抑制

[0576] NF- $\kappa$ B 调节在炎症、细胞凋亡、肿瘤发生和自身免疫性疾病中发挥重要作用的大

量基因的表达。在它的非活化形式中, NF- $\kappa$  B 与在胞质中的 I $\kappa$  B 络合, 并且在刺激时, I $\kappa$  B 被所述蛋白酶磷酸化, 泛素化并随后降解。I $\kappa$  B 的降解导致 NF- $\kappa$  B 的活化作用和它移位到细胞核。式 II-2, 式 II-3, 式 II-4, 式 II-5A, 式 II-5B, 式 II-8C, 式 II-13C, 式 II-16, 式 II-17, 式 II-18, 式 II-19, 式 II-20, 式 II-21, 式 II-22, 式 II-24C, 式 II-25 和式 IV-3C 对 NF- $\kappa$  B 的活化作用的效果通过评估 TNF- $\alpha$  刺激的 HEK293 NF- $\kappa$  B/Luc 细胞中 NF- $\kappa$  B 介导的荧光素酶活性来评价。

[0577] 用式 II-2, 式 II-4, 式 II-5A, 式 II-5B, 式 II-16, 式 II-17, 式 II-18, 式 II-19, 式 II-20, 式 II-21, 式 II-22 和式 II-24C 化合物对 NF- $\kappa$  B/Luc 293 细胞的预处理导致 TNF- $\alpha$  刺激的荧光素酶活性的剂量依赖性降低。抑制 NF- $\kappa$  B 介导的荧光素酶活性的平均 EC<sub>50</sub> 值显示在表 4 中, 并且表明式 II-2, 式 II-4, 式 II-5A, 式 II-5B, 式 II-16, 式 II-17, 式 II-18, 式 II-19, 式 II-20, 式 II-21, 式 II-22 和式 II-24C 的化合物在此基于细胞的分析中抑制 NF- $\kappa$  B 活性。

[0578] 表 4

[0579] 从 NF- $\kappa$  B 介导的荧光素酶报告基因分析中式 II-2, II-3, II-4, II-5A, II-5B, II-8C, II-13C, II-16, II-17, II-18, II-19, II-20, II-21, II-22, II-24C, II-25 和 IV-3C 的平均 EC<sub>50</sub> 值

[0580]

化合物	EC <sub>50</sub> (nM)
式 II-2	82
式 II-3	> 20000
式 II-4	77.7
式 II-5A	31.5
式 II-5B	270
式 II-8C*	> 20000
式 II-13C	> 20000
式 II-16	11.8
式 II-17	876
式 II-18	9.5
式 II-19	8.5
式 II-20*	154
式 II-21*	3172
式 II-22*	1046
式 II-24C*	5298
式 II-25*	> 20000
式 IV-3C	> 20000

[0581] \*n = 1

[0582] 实施例 26

[0583] Salinosporamide A 对 NF- $\kappa$  B 信号传导途径的作用

[0584] 进行了研究 Salinosporamide A 对 NF- $\kappa$  B 信号传导途径的作用的实验。产生稳定的携带 5X NF- $\kappa$  B 结合位点调节下的荧光素酶报告基因的 HEK293 克隆 (NF- $\kappa$  B/Luc 293)。用 TNF- $\alpha$  刺激的该细胞系, 由于 NF- $\kappa$  B 的活化作用导致荧光素酶活性的增强。

[0585] 用 Salinosporamide A 的 8 点半对数系列稀释液 (范围从 1  $\mu$ M 到 317pM) 预处理 NF- $\kappa$  B/Luc 293 细胞 1 小时, 随后用 TNF- $\alpha$  (10ng/mL) 刺激 6 小时。在 6 小时测试 NF- $\kappa$  B 诱导的荧光素酶活性。用 Salinosporamide A 处理 24 小时后, NF- $\kappa$  B/Luc 293 细

胞的成活力如前所述的,通过加入刃天青染料被评价。

[0586] 用 Salinosporamide A 预处理的 NF- $\kappa$ B/Luc 293 细胞导致随后的 TNF- $\alpha$  刺激的荧光素酶活性的剂量依赖性降低(图 31,右侧 y 轴)。对于 NF- $\kappa$ B/ 荧光素酶活性的抑制作用,计算的 EC<sub>50</sub> 为约 7nM。细胞毒性分析同时完成并且显示该浓度的 Salinosporamide A 不影响细胞成活力(图 31,左侧 y 轴)。这些代表性数据表明通过 Salinosporamide A 处理观察到的荧光素酶活性的降低主要归因于 NF- $\kappa$ B 介导的信号传导事件而不是细胞的死亡。

#### [0587] 实施例 27

[0588] 除 NF- $\kappa$ B 荧光素酶报告基因分析之外,通过蛋白质印迹(Western blot)法评价 Salinosporamide A 对磷酸化 I $\kappa$ B $\alpha$  和总 I $\kappa$ B $\alpha$  水平的作用。在 HEK293 细胞和所述的 NF- $\kappa$ B/Luc 293 报告克隆中评价内源性蛋白质水平。

[0589] 用指示浓度的 Salinosporamide A 预处理细胞 1 小时,接着用 10ng/mL 的 TNF- $\alpha$  刺激 30 分钟。用抗 I $\kappa$ B $\alpha$  的完全形式和磷酸化形式的抗体测定每一个蛋白质的内源性水平,并且用抗微管蛋白抗体来确定等量的蛋白质上样。

[0590] 如图 32 所示,用 50nM 和 500nM 的 Salinosporamide A 处理的两种细胞系,当用 TNF- $\alpha$  刺激时不仅减少总 I $\kappa$ B $\alpha$  的降解,而且保持磷酸-I $\kappa$ B $\alpha$  的水平。这些结果坚定地支持 Salinosporamide A 作为蛋白酶抑制剂的作用机理,它防止随后的 TNF- $\alpha$  刺激的磷酸化的 I $\kappa$ B $\alpha$  的降解。

#### [0591] 实施例 28

##### [0592] Salinosporamide A 对细胞周期调节蛋白的作用

[0593] 泛素-蛋白酶体途径通过调节细胞周期蛋白的降解和细胞周期蛋白依赖性激酶(Cdk)抑制剂例如 p21 和 p27,是参与细胞周期控制的必要的蛋白水解体系。参见 Pagano, et al., Science 269:682(1995), Kisselev, et al., Chem Biol 8:739(2001), King, et al., Science 274:1652(1996)。此外,p21 和 p27 蛋白水平在蛋白酶抑制剂的存在下增加。参见 Fukuchi, et al., Biochim Biophys Acta 1451:206(1999), Takeuchi, et al., Jpn J Cancer Res 93:774(2002)。因此,通过蛋白质印迹分析采用所述的 HEK293 细胞和所述 HEK293NF- $\kappa$ B/ 荧光素酶报告克隆来评价 Salinosporamide A 处理对 p21 和 p27 的内源性水平的作用。

[0594] 图 33 所示的蛋白质印迹是利用抗 p21 和 p27 的抗体探测来确定每一个蛋白的内源性水平,并且用抗微管蛋白抗体来确定等量的蛋白上样。

[0595] 如图 33A 和 33B 所示,初步的结果表明当用各种浓度的 Salinosporamide A 处理两种细胞系时,p21 和 p27 的蛋白水平提高。数据显示 Salinosporamide A 通过抑制蛋白酶体活性起作用从而阻止 TNF- $\alpha$  诱导的 NF- $\kappa$ B 的活化。另外,该蛋白酶体的抑制导致所述 Cdk 抑制剂,p21 和 p27 的蓄积,这已在致敏细胞的细胞凋亡中报道。参见 Pagano, et al., supra(1995), King, et al., supra(1996)。

#### [0596] 实施例 29

##### [0597] Salinosporamide A(II-16) 引起的 Caspase-3 的活化

[0598] 为了验证 Salinosporamide A 是否诱发细胞凋亡,用 Jurkat 细胞(美国模式培养物保藏所(ATCC)TIB-152,人急性 T 细胞白血病)评价它对 Caspase-3 活性诱导的作用。

[0599] 以  $2 \times 10^6$  细胞/3mL/孔将 Jurkat 细胞接种在 6 孔培养板中并且在  $37^\circ\text{C}$ , 5% (v/v)  $\text{CO}_2$  和 95% (v/v) 湿度中孵育。分别以 20mM 和 40mM 的浓度在 DMSO 中制备 Salinosporamide A 和盐酸米托蒽醌 (Sigma, St. Louis, MO. Cat#M6545) 储存液。盐酸米托蒽醌是化疗药物, 它通过对 DNA 合成和修复的抑制在分裂和不分裂的细胞中诱发细胞凋亡, 并且作为阳性对照被包括。参见 Bhalla, et al., Blood 82 :3133(1993)。用  $\text{EC}_{50}$  浓度处理 (表 5) 细胞并且在 Caspase-3 活性的评定前孵育 19 小时。用 0.25% DMSO 处理的细胞作阴性对照用。所述细胞通过离心分离法收集并且去除培养基。按照在制造商描述的方案加工处理细胞沉淀物用于 Caspase-3 活性分析 (来自 Molecular Probes 的 EnzChek Caspase-3 分析试剂盒 (E-13183; 见附件 G, 它是该申请书的一部分并可从在世界网络“probes.com/media/pis/mp13183.pdf”上的超文本传送方案中获得)。简而言之, 在冰中溶解细胞沉积物, 在 96 孔平板中与 EnzChek Caspase-3 组分混合, 然后在黑暗中孵育 30 分钟, 最后用有  $\lambda_{\text{ex}} = 485\text{nm}$  和  $\lambda_{\text{em}} = 530\text{nm}$  过滤器的 Packard Fusion 读出裂解的苜氧羰基-DEVD-AMC 的荧光。溶胞产物的蛋白浓度用 BCA 蛋白分析试剂盒 (Pierce) 测定, 并且用这些数值来进行标准化。

[0600] 代表性实验中的数据表明 Salinosporamide A 对 Jurkat 细胞的处理导致细胞毒性和 Caspase-3 的活化 (表 5, 图 34)

[0601] 表 5: Salinosporamide A 和盐酸米托蒽醌对 Jurkat 细胞的细胞毒性和  $\text{EC}_{50}$  值  
[0602]

化合物	Jurkat 细胞	
	$\text{EC}_{50}$ (nM)	% 最大杀灭细胞
Salinosporamide A	10	97
盐酸米托蒽醌	50	99

[0603] 实施例 30

[0604] 在 Jurkat 细胞中 Salinosporamide A 引起 PARP 裂解

[0605] 为了评价 Salinosporamide A 在 Jurkat 细胞中诱发细胞凋亡的能力, 监测了聚 (ADP-核糖) 多聚酶 (PARP) 的裂解。PARP 是 116kDa 的核蛋白, 它是 Caspase-3 主要的细胞内靶之一。参见 Decker, et al., J Biol Chem 275 :9043(2000), Nicholson, D. W, Nat Biotechnol 14 :297(1996)。PARP 的裂解产生稳定的 89kDa 的产物, 并且该过程可通过蛋白印迹法监测。经 Caspase 作用产生的 PARP 的裂解是细胞凋亡的标志, 并且可作为该过程的良好标记使用。

[0606] 在该实验之前以低密度 (每毫升  $2 \times 10^5$  细胞) 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 维持 Jurkat 细胞。细胞通过离心分离法采集并在培养液中以每 3 毫升  $1 \times 10^5$  细胞的密度再混悬。用 100nM 的 Salinosporamide A (20mM 在  $-80^\circ\text{C}$  贮存的 DMSO 储存液) 处理 20 毫升的该细胞混悬液, 并且取出 3 毫升份放置在冰上为  $T_0$  样品。将加 Salinosporamide A 的 3 毫升该细胞混悬液的整份加入 6 孔板中并放回所述培养箱中。作为 PARP 裂解的阳性对照, 用 350nM 的十字孢碱 (Staurosporine), 一种已知的细胞凋亡引发剂 (Sigma S5921,  $700 \mu\text{M}$  在  $-20^\circ\text{C}$  贮存的 DMSO 储存液) 处理完全相同的细胞混悬液。在 Salinosporamide A 处理细胞的情况下, 在 2, 4, 6, 8 和 24hrs 时取出样品, 并且在 4hrs 时为十字孢碱对照。对于每一

个时间点,该细胞用简单的离心分离法收集,用 400  $\mu$  L 的 PBS 洗涤该细胞,并再次沉淀该细胞。移除 PBS 后,在 SDS PAGE 之前,将该沉淀物贮存在  $-20^{\circ}\text{C}$  中。在 100  $\mu$  l 的 NuPAGE 样品缓冲液 (Invitrogen 46-5030) 中再混悬每一个细胞沉淀物,并且在 10% NuPAGE BIS-Tris 凝胶 (Invitrogen NB302) 中分离 10  $\mu$  l 的每一个样品。在硝化纤维素的电转移后,用抗 PARP 的家兔多克隆抗体 (Cell Signaling 9542) 探测所述的薄膜,随后加入山羊抗家兔的碱性磷酸酶耦联的第二抗体 (Jackson 11-055-045)。用 BCIP/NBT (Roche1681451) 比色分析法检测结合的抗体。

[0607] 图 35 中显现的蛋白质印迹表明,在所述 Jurkat 细胞内 PARP 以时间依赖性形式裂解。Salinosporamide A 暴露后 2 和 4 小时之间在处理的细胞中出现该裂解的形式(通过星号 \* 表示),而剩余的大多数 PARP 在 24 小时之前裂解。所述十字孢碱处理的细胞 (St) 显示 PARP 的快速裂解,大多数蛋白在 4 小时内降解。这些数据强烈地表明 Salinosporamide A 可诱导 Jurkat 细胞中的细胞凋亡。

#### [0608] 实施例 31

#### [0609] 抗炭疽活性

[0610] 为了分析 Salinosporamide A 或其它化合物在阻止因 LeTx 暴露引起的细胞死亡方面的能力,如以下所述,RAW264.7 巨噬细胞样细胞和重组 LF 和 PA 致死毒素组分作为分析细胞毒性的体外模型系统被使用。

[0611] 在含 5% 的胎牛血清 (ADMEM, Mediatech, Herndon, VA) 的高级 Dulbecco's 改进的 Eagle 培养液中,在  $37^{\circ}\text{C}$  潮湿的 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中适应并维持 RAW264.7 细胞 (ATCC#TIB-71)。以 50000 细胞/孔的浓度将细胞接种在 96 孔培养板的含 5% FBS 的 ADMEM 中,在  $37^{\circ}\text{C}$  潮湿的 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱过夜。可选择地,也可使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养的细胞并发现适用于该分析。在第二天早晨移除培养液并用无血清的 ADMEM 的替换,该 ADMEM 有或没有剂量范围从 1  $\mu$  M 到 0.5nM 的 8 点剂量效应的 Salinosporamide A 或 Omuralide。从 1mg/mL DMSO 储备 溶液中制备所述化合物并在 ADMEM 中稀释到终浓度。在 15 分钟预孵育后,将 200ng/mL LF 或 400ng/mL PA 单一地或联合地 (LeTx) 加入细胞中。重组体 LF 和 PA 从所列的生物学实验室中获得并按照制造商描述的以 1mg/mL 储备溶液在含有 1mg/ml BSA 的无菌水中在  $-80^{\circ}\text{C}$  贮存。细胞在  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 6 小时,接着按照先前描述的加入刃天青。在测量荧光评价细胞成活力之前再另外孵育培养板 6 小时。所述数据是三次实验,每次实验重复 3 到 6 次的总结并且用 DMSO (阴性的) 和 LeTx (阳性的) 作对照以百分比成活力表达并用下列公式标准化数据:成活力% =  $100 \times (\text{观察到的 OD} - \text{阳性对照}) / (\text{阴性对照} - \text{阳性对照})$ 。

[0612] 图 36 中所示数据表明用 Salinosporamide A 处理可阻止 LeTx 诱导的体外的巨噬细胞样 RAW264.7 细胞的细胞死亡。单独用 LF 或 PA 处理的或单独用 Salinosporamide A 处理的 RAW 细胞几乎不降低细胞成活力,然而用 LeTx 的处理与对照相比较导致大约 0.27% 细胞成活力。Salinosporamide A 通过抑制特异蛋白的降解和减少细胞因子的合成可增强巨噬细胞的存活率,它最终导致体内的炭疽毒素的致死作用的抑制。

[0613] 虽然 Salinosporamide A 在大于并等于 100nM 浓度时单独处理产生非常适度的细胞毒性,但是用较低的,相对无毒性水平处理时,显示在 LeTx 处理的细胞中,RAW 264.7 细胞成活力有显著的增加(图 36)。例如,当用 12nM Salinosporamide A 预处理时,

Salinosporamide A+LeTx 处理组显示 82% 的细胞成活力,用该浓度的 Salinosporamide A 单独处理时显示 96% 成活力。在这些研究中 Salinosporamide A 的平均  $EC_{50}$  值为 3.6nM。相反, Omuralide 在细胞成活力方面显示相对没有的作用直到其达到 1  $\mu$ M 的浓度。即使 Omuralide 在高浓度的情况下,观察到只有 37% 的成活力,这表明 Salinosporamide A 是更有效的抑制 LeTx 诱导的 RAW264.7 细胞死亡的抑制剂。与这些数据一致, Tang et. al., Infect Immun 67 :3055 (1999), 发现在所述 LeTx 的分析中, MG132 和乳胞素 (Omuralide 的前体) 的  $EC_{50}$  浓度为 3  $\mu$ M。综上所述, 这些数据进一步表明 Salinosporamide A 与目前描述的任何其它化合物相比, 是更有效的抑制 LeTx 诱导的细胞毒性的抑制剂。

[0614] 在 LeTx 的存在下, Salinosporamide A 促进 RAW264.7 细胞的成活率, 这表明该化合物或它的衍生物是对炭疽的有价值的临床治疗剂。另外, 值得注意的是 Salinosporamide A 对 RAW 264.7 细胞比对许多肿瘤细胞更具有较低的细胞毒性。

[0615] 实施例 32

[0616] Salinosporamide A 抗多发性骨髓瘤和前列腺癌细胞系的活性

[0617] NF- $\kappa$ B 对多发性骨髓瘤中肿瘤生长及抗细胞凋亡方面是至关重要的并且它也在各种前列腺癌细胞系方面已报导有组成型活性 (Hideshima Tet al.2002, Shimada K et al. 2002 and Palayoor ST et al. 1999)。NF- $\kappa$ B 的活性通过它的抑制剂 I $\kappa$ B $\alpha$  的蛋白酶体的降解作用调节。因为 Salinosporamide A 体外显示抑制蛋白酶体并且干扰 NF- $\kappa$ B 的信号传导途径, 因此 Salinosporamide A 抗多发性骨髓瘤细胞系 RPMI 8226 和前列腺癌细胞系 PC-3 和 DU 145 的活性被评价。

[0618] 在标准的生长物抑制分析中利用刃天青染料和 48 小时的药物暴露测定  $EC_{50}$  值。2-5 次独立实验的结果 (表 6) 显示 Salinosporamide A 抗 RPMI8226 和所述前列腺癌细胞系的  $EC_{50}$  值范围为 10-37nM。

[0619] 表 6: Salinosporamide IA (II-16) 抗多发性骨髓瘤和前列腺肿瘤细胞系的  $EC_{50}$  值  
[0620]

化合物	RPMI8226(n = 5)		DU145(n = 3)		PC-3(n = 2)	
	$EC_{50}$ (nM), 平均值 $\pm$ SD	%细胞毒 性, 平均 值 $\pm$ SD	$EC_{50}$ (nM), 平均值 $\pm$ SD	%细胞毒 性, 平均 值 $\pm$ SD	$EC_{50}$ (nM)	%细胞 毒性
Salinosporamide A	10 $\pm$ 3	94 $\pm$ 1	37 $\pm$ 10	75 $\pm$ 4	31, 25	88, 89

[0621] 应用蛋白印迹分析法通过监测 PARP 和前 Caspase 3 (Pro-Caspase 3) 的裂解评价 Salinosporamide A 在 RPMI 8226 和 PC-3 细胞中诱发细胞凋亡的能力。简单说, 用 100nM Salinosporamide A (2345R01) 处理 PC-3 和 RPMI 8226 细胞 0, 8 或 24 小时。制备全部的蛋白溶胞产物并且在还原 / 变性条件下溶解 20  $\mu$ g 的溶胞产物, 然后转印在硝基纤维素膜上。用抗 PARP 或 Caspase 3 的抗体探测该印迹, 接着用抗肌动蛋白的抗体解吸和再探测。

[0622] 这些实验的结果表明 Salinosporamide A 对 RPMI 8226 细胞的处理导致以时间依赖性方式的 PARP 和前 Caspase 3 的裂解 (图 37)。RPMI 8226 细胞与 PC-3 细胞相比对 Salinosporamide A 似乎更敏感, 因为在 8 小时时可观察到 PARP 裂解的诱导作用并在 24 小

时前完成。相反,在 PC-3 细胞中在 24 小时观察到 PARP 的裂解,然而前细胞凋亡蛋白酶 (Pro-Caspase 3) 的裂解在该实验中未检测出 (图 37)。

[0623] RPMI 8226 细胞用于评价用各种浓度的 Salinosporamide A 处理该细胞 8 小时的作用。简单说,用各种浓度的 Salinosporamide A (2345R01) 处理 RPMI 8226 细胞 8 小时并制成蛋白溶胞产物。在还原 / 变性条件下溶解 25  $\mu$ g 的该溶胞产物然后转印在硝基纤维素膜上。该印迹用抗 PARP 或抗 Caspase 3 的抗体探测,接着用抗肌动蛋白的抗体解吸和再探测。图 38 证明 Salinosporamide A 诱发 PARP 和前 -Caspase 3 的剂量依赖性裂解。

[0624] 实施例 33

[0625] 式 II-2, II-3, II-4, II-5A, II-5B, II-8C, II-13C, II-16, II-17, II-18, II-19, II-20, 和 IV-3C 化合物对人多发性骨髓瘤生长的抑制; RPMI 8226 和 U266 细胞

[0626] 人的多发性骨髓瘤细胞系, RPMI 8226 (ATCC ; CCL-155) 和 U266 (ATCC ; TIB-196) 在适当的培养基中维持。该细胞在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 和 95% 潮湿空气的培养箱中培养。

[0627] 在细胞生长抑制分析中, RPMI 8226 细胞和 U266 分别以  $2 \times 10^4$  和  $2.5 \times 10^4$  细胞 / 孔的浓度接种在 Corning 3904 黑色壁、透明底的组织培养板内的完全培养基中。在 100% DMSO 中制备所述化合物的 20mM 储备溶液, 分成整份并在 -80 $^{\circ}$ C 中贮存。连续稀释所述化合物并重复三次加入到该测试孔中。式 II-3, II-8C, II-5B, II-13C, II-17, IV-3C 和 II-20 化合物的终浓度范围从 20  $\mu$ M 到 6.32nM。式 II-16, II-18 和 II-19 化合物的终浓度范围从 632nM 到 200pM。式 II-2, II-4 和 II-5A 化合物的终浓度范围从 2  $\mu$ M 到 632pM。在所有的样品中 DMSO 的终浓度为 0.25%。

[0628] 在药物暴露 48 小时后, 将 10  $\mu$ l 的含 0.2mg/ml 刃天青 (从 Sigma-Aldrich 化学公司获得) 的无 Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> 的磷酸盐缓冲液加入到每一个孔中并且将该培养板有放回所述的培养箱中 3-6 小时。因为活细胞代谢刃天青, 刃天青的还原产物的荧光用有  $\lambda_{ex} = 535\text{nm}$  和  $\lambda_{em} = 590\text{nm}$  过滤器的 Fusion 微培养板荧光计 (Packard Biosciences) 测定。没有细胞的培养液中的刃天青用于确定背景, 从用于全部实验孔的数据中减去这部分。所述的数据标准化成用培养液 +0.25% DMSO (100% 细胞生长) 处理的所述细胞的平均荧光值并且 EC<sub>50</sub> 值 (50% 的最大实测的生长抑制的药物浓度) 用标准的 S 形剂量效应曲线拟和法则 (产生于 Xlfit 3.0, ID Business Solutions Ltd) 确定。该数据在表 13 和 15 中概述。

[0629] 实施例 34

[0630] Salinosporamide A (II-16) 对多重耐药细胞系 MES-SA/Dx5 和 HL-60/MX2 的保留活性。

[0631] Salinosporamide A 对人子宫肉瘤 MES-SA 细胞系和它的多重耐药性衍生物 MES-SA/Dx5 的 EC<sub>50</sub> 值用下述内容确定: 评价 Salinosporamide A 对过分表达 P-糖蛋白流出泵的细胞系是否保留活性。包括 Paclitaxel, 已知的 P-糖蛋白泵的底物作为对照。

[0632] 表 7: Salinosporamide A 对 MES-SA 和耐药性衍生物 MES-SA/Dx5 的 EC<sub>50</sub> 值

[0633]

	MES-SA		MES-SA/Dx5		变化倍数
	EC <sub>50</sub> (nM), 平均值	%细胞毒性, 平均值 ± SD	EC <sub>50</sub> (nM), 平均值 ± SD	%细胞毒性, 平均值 ± SD	
Salinosporamide A	20 ± 5	94 ± 1	23 ± 1	92 ± 2	1.2
Paclitaxel	5 ± 2	63 ± 7	2040 ± 150	78 ± 1	408

[0634] 这些生长抑制分析中的结果(表7)显示,正如期望的,Paclitaxel对MES-SA/Dx5细胞不保留其活性,这也通过在EC<sub>50</sub>值中480倍的增长反映出。Salinosporamide A抗MES-SA和抗MES-SA/Dx5的EC<sub>50</sub>值相似。这表明Salinosporamide A能抑制多重耐药性细胞系MES-SA/Dx5的生长,这表示Salinosporamide A似乎不是P-糖蛋白流出泵的底物。

[0635] 另外,还评价Salinosporamide A对HL-60/MX2,人白血病细胞系HL-60的耐药衍生物的能力,其中HL-60/MX2具有减少的拓扑异构酶II活性的特征并认为具有非典型的多重耐药性。测定Salinosporamide A对该HL-60和HL-60/MX2的生长抑制的EC<sub>50</sub>值。包括作为对照的DNA的结合剂盐酸米托蒽醌(Mitoxantrone),因为据报导HL-60/MX2细胞对该化疗剂有耐药性(Harker W. G. et al. 1989)。

[0636] 表8:Salinosporamide A对HL-60和耐药衍生物HL-60/MX2的EC<sub>50</sub>值

[0637]

	HL-60		HL-60/MX2		变化倍数
	EC <sub>50</sub> (nM)	%细胞毒性	EC <sub>50</sub> (nM)	%细胞毒性	
Salinosporamide A	27, 30	88, 91	28, 25	84, 89	1.0, 0.8
盐酸米托蒽醌	59, 25	98, 100	1410, 827	98, 99	24, 33

[0638] 在表8中的数据显示Salinosporamide A相对于HL-60细胞,对HL-60/MX2细胞能保留其活性,这表明Salinosporamide A在表达减少的拓扑异构酶II活性的细胞中是有效的。相反,盐酸米托蒽醌对HL-60/MX2细胞有较差的活性,约减少29倍。

[0639] 实施例35

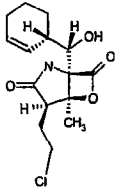
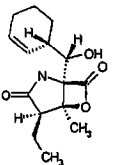
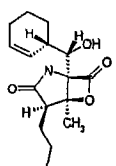
[0640] Salinosporamide A及其几个类似物:构效关系

[0641] 为了确定Salinosporamide A的初期的构效关系(SAR),评价了Salinosporamide A的一系列类似物抗多发性骨髓瘤细胞系RPMI8226的能力。在标准化的生长抑制分析中用刃天青染料和48小时的药物暴露测定EC<sub>50</sub>值。

[0642] SAR的初期系列的结果(表9)显示卤素基团添加到乙基中似乎增加了细胞毒性。

[0643] 表9:Salinosporamide A的初期SAR系列

[0644]

化合物编号	分子结构	EC <sub>50</sub> , $\mu\text{M}$ (平均值 $\pm$ SD)	%细胞毒性 (平均值 $\pm$ SD)
II-16		0.007 $\pm$ 0.0001	94 $\pm$ 0
II-17		2.6, 2.3	94, 95
II-18		0.017, 0.022	94, 94

[0645] 当  $n > 2$ , 确定平均值  $\pm$  标准偏差

[0646] 实施例 36

[0647] 在体内的生物学

[0648] 最大耐受剂量 (MTD) 的测定

[0649] 体内的研究设计为当向雌性 BALB/c 系小鼠静脉内给药 Salinosporamide A 时确定 Salinosporamide A 的 MTD。

[0650] 称重 BALB/c 系小鼠并且各种浓度的 Salinosporamide A (范围从 0.01mg/kg 到 0.5mg/kg) 以单次剂量给药 (qdx1) 或每天给药连续 5 天 (qdx5) 静脉内给药。每天观察动物的临床迹象并且每只小鼠每周称重两次直到实验结束 (在给药的最后一天后最多 14 天)。在表 11 中显示的结果表明 Salinosporamide A 的单一静脉给药的剂量一直到 0.25mg/kg 是耐受的。当每天给药连续 5 天时, Salinosporamide A 的浓度一直到 0.1mg/kg 是良好耐受的。在实验过程中习性变化没有注意到。

[0651] 表 11 Salinosporamide A 在雌性 BALB/c 系小鼠中的 MTD 的测定

[0652]

组	剂量(mg/kg)	途径/时间表	死亡数/总数	死亡日期
1	0.5	i.v.; qdx1	3/3	3, 3, 4
2	0.25	i.v.; qdx1	0/3	
3	0.1	i.v.; qdx1	0/3	
4	0.05	i.v.; qdx1	0/3	
5	0.01	i.v.; qdx1	0/3	
6	0	i.v.; qdx1	0/3	
7	0.5	i.v.; qdx5	3/3	4, 6, 7
8	0.25	i.v.; qdx5	3/3	4, 5, 5
9	0.1	i.v.; qdx5	0/3	
10	0.05	i.v.; qdx5	0/3	
11	0.01	i.v.; qdx5	0/3	
12	0	i.v.; qdx5	0/3	

[0653] 实施例 37

[0654] Salinosporamide A 的吸收、分布、代谢和消除 (ADME) 特征的初步评价

[0655] 对 Salinosporamide A 的 ADME 特征的初步评价的研究已完成。这些研究由溶解度评价、LogD<sup>7.4</sup> 确定和检测细胞色素 P450 酶抑制作用的初步筛查组成。这些研究的结果显示 Salinosporamide A 在磷酸盐缓冲液 (pH7.4) 中估计的溶解度为 9.6 μM (3g/ml), LogD<sup>7.4</sup> 值为 2.4。该 LogD<sup>7.4</sup> 值是在与药物开发相一致的可接受的限度内 (LogD<sup>7.4</sup> < 5.0) 并且表明有口服有效性。初步的 P450 抑制筛查的结果显示 Salinosporamide A, 当以 10 μM 试验时, 对所有的 P450 异构体显示没有或低的抑制: CYP1A2, CYP2C9 和 CYP3A4 分别为 3%, 6% 和 6% 的抑制, 而 CYP2D6 和 CYP2C19 分别为 19% 和 22% 的抑制。

[0656] 实施例 38

[0657] Salinosporamide A 及其在体内对全血蛋白酶体活性的作用

[0658] Salinosporamide A 先前已表明是在体外的有效的和特异的蛋白酶体抑制剂, 对纯化的 20S 蛋白酶的胰凝乳蛋白酶样活性的 IC<sub>50</sub> 值为 2nM。为了监测 Salinosporamide A 在体内的活性, 已开发快速并可重复的分析 (改编自 Lightcap et al. 2000) 并评价在全血中的所述蛋白酶体的活性。

[0659] 简而言之, 为了通过低渗休克溶解所述细胞, 将冷冻的全血样品在冰中解冻 1 小时并在 700 μl 的冰冷的 5mM EDTA, pH 8.0 中再混悬。这表示聚集的全血细胞的容积增加约为 2-3 倍。使溶解过程进行 1 小时, 并且该细胞碎片经过 14,000X g 的离心分离 10 分钟去除。该上清液 (聚集的全血胞溶物, Packed Whole Blood Lysate, PWBL) 转移到干净的试管中, 并且清除沉淀物。该 PWBL 的蛋白浓度通过 BCA 分析 (Pierce) 用 BSA 为标准确定。大约 80% 的样品具有 800 到 1200 μg/mL 的总蛋白浓度。

[0660] 通过测量对蛋白酶体的胰凝乳蛋白酶样活性特异的荧光物质 (suc-LLVY-AMC,

Bachem Cat. 1-1395) 的水解测定蛋白酶体的活性。对照实验表明在这些提取物中 > 98% 的该蛋白的水解是通过所述蛋白酶体介导的。分析是通过将来自动物体的 5  $\mu$  l 的 PWBL 与 185  $\mu$  l 的分析缓冲液 (20mMHEPES, 0.5mM EDTA, 0.05% Triton X-100, 0.05% SDS, pH 7.3) 在 Costar3904 板中混合建立。滴定法实验显示如果在该分析中蛋白浓度在 200 到 1000  $\mu$  g 之间, 在蛋白浓度和水解速率之间有线性关系。所述反应通过加入 10  $\mu$  l 的 0.4mM suc-LLVY-AMC (通过在比例为 1 : 25 的 DMSO : 分析缓冲液中稀释 10mM 的蛋白溶液制备) 引发, 并且在 37 $^{\circ}$ C 的荧光计 (Labsystems Fluoroskan) 中孵育。底物的水解导致游离的 AMC 的释放, AMC 通过用  $\lambda_{ex} = 390\text{nm}$  和  $\lambda_{em} = 460\text{nm}$  的荧光分析测定。在该体系中在至少 1 小时内水解速率是线性的。然后每一个样品的水解速率标准化成每毫克蛋白的相对荧光单位 (RFU/mg)。

[0661] 为了探索 Salinosporamide A 的体内活性, 用各种浓度的 Salinosporamide A 处理雄性 Swiss-Webster 小鼠 (每组 5 只, 体重为 20-25g)。静脉给药 Salinosporamide A 并且给出 2.4 的  $\text{LogD}^{7.4}$  值, 提示口服可利用性。也口服给药 Salinosporamide A。在给药之前即刻, 通过用 10% solutol 稀释 Salinosporamide A 储备溶液 (100% DMSO) 制备 Salinosporamide A 的剂量溶液, 产生 2% DMSO 的终浓度。所述的载体对照由在 10% solutol 中的 2% DMSO 组成。为了确定蛋白酶体活性的基线, 对一组动物不给药载体和 Salinosporamide A。Salinosporamide A 或者载体以 10mL/kg 的浓度给药并且在给药 90 分钟后麻醉该动物并通过心脏穿刺提取血液。通过离心分离法收集聚集的全血细胞, 用 PBS 洗涤并再离心分离。所有的样品在蛋白酶活性评价前贮存在 -80 $^{\circ}$ C 中。

[0662] 为了确定在这些实验中观察到的底物的水解只归因于所述蛋白酶的活性, 用高特异性的蛋白酶抑制剂 Epoxomicin 进行所述提取物中的剂量效应实验。以 1 : 40 的比例用分析缓冲液稀释 PWBL 溶胞产物, 并且将 180  $\mu$  l 加入到 Costar 3904 板中。在 DMSO 中连续地稀释 Epoxomicin (Calbochem Cat. 324800) 产生 8 个点的剂量效应曲线, 在分析缓冲液中以 1 : 50 的比例稀释, 并且将 10  $\mu$  l 重复三次加入到所稀释的 PWBL 中。所述样品在 37 $^{\circ}$ C 中预培养 5 分钟, 并且用上述的底物引发该反应。在 Prism 中, 用 S 形的剂量效应并以可变的斜面为模型分析该剂量效应曲线。

[0663] 图 40 为散点图, 这显示在 PWBL 中的标准化的蛋白酶体活性来源于个别的小鼠 (每组 5 只小鼠)。在每一组中, 水平线表示平均的标准化的活性。这些数据显示 Salinosporamide A 引起在 PWBL 中蛋白酶活性的显著降低, 并且该抑制作用是剂量依赖性的。另外, 这些数据显示 Salinosporamide A 在口服给药时是有效的。

[0664] 通过检测已知的蛋白酶抑制剂, Epoxomicin 对所述蛋白底物的水解的作用显示该分析的特异性。Epoxomicin 是肽环氧化物, 对所述蛋白酶体已显示出较高的特异性, 对其它已知的蛋白酶没有抑制活性 (Menget al., 1999)。载体对照中的溶胞产物和用 0.1mg/kg Salinosporamide A 静脉注射 (i. v.) 处理的动物中的溶胞产物与各种浓度的 Epoxomicin 的孵育, 并且确定  $\text{IC}_{50}$  值。参见 Palayoor et al., Oncogene 18 : 7389-94 (1999)。如图 41 所示, Epoxomicin 在所述蛋白酶底物的水解中引起剂量依赖性抑制作用。在这些实验中获得的  $\text{IC}_{50}$  值与体外利用纯化的 20S 蛋白酶体所观察到的 10nM 值 (没有显示) 是良好相配的。这些数据也表明对经 0.1mg/kg Salinosporamide A 处理的动物中制备的这些溶胞产物中的所述底物保留活性, 归因于该蛋白酶体, 而不是一些其他蛋白酶。用高剂量的 Epoxomicin

处理的提取物中看到的剩余活性小于 2% 的全部信号, 这表明用 suc-LLVY-AMC 作为底物所观察到的超过 98% 的活性只归因于存在于 PWBL 中的所述蛋白酶的活性。

[0665] 也评价了基线活性中的内在变化与 Salinosporamide A 抑制蛋白酶活性的能力之间的比较。在图 42 中, 显示分开进行几周的单独实验的结果。参见 Qureshi, et al., J. Immunol. 171(3):1515-25 (2003)。为了清楚, 只显示所述的载体对照和匹配的剂量结果。当在 PWBL 中的所述蛋白酶体活性方面的一些变异来源于对照组中的个别动物差异时, 在两组之间的全部平均值时非常相似的。用 Salinosporamide A (0.1mg/kg i.v.) 处理的动物也显示非常相似的剩余活性和平均抑制作用。这表明在分析之间的结果可以与置信度相比较。

#### [0666] 实施例 39

#### [0667] Salinosporamide A 在体内对 LPS 诱导的 TNF 的抑制作用

[0668] 研究表明所述蛋白酶在许多信号分子的活化中发挥作用, 包括经由 NF- $\kappa$ B 的抑制剂 (I $\kappa$ B $\alpha$ ) 的蛋白性降解的转录因子 NF- $\kappa$ B。通过所述的 TLR4 受体的 LPS 信号激活 NF- $\kappa$ B 和其它转录调节因子, 导致大量的促炎症反应基因例如 TNF, IL-6, 和 IL-1 $\beta$  的表达。已经鉴定促炎细胞因子的连续表达是许多疾病中的主要因子。TNF 和 IL-1 $\beta$  的抑制剂在许多炎症模型中显示有效性, 该模型包括所述的 LPS 鼠模型, 和类风湿性关节炎及肠炎的动物模型。最近的研究表明所述蛋白酶体的抑制作用可阻止 LPS- 诱导的 TNF 分泌 (Qureshi et al., 2003)。这些数据显示 Salinosporamide A, 新的有效的蛋白酶抑制剂, 可阻止体内的高剂量 LPS 鼠模型中的 TNF 的分泌。

[0669] 为了评价 Salinosporamide A 抑制小鼠体内的 LPS 诱导的血浆 TNF 水平的能力, 在 BolderBioPATH, Inc. in Boulder, CO. 开始进行体内实验。下列方法概括了为这些研究的实验设计。

[0670] 雄性的 Swiss Webster 小鼠 (12 只为一组, 体重为 20-25g) 通过腹腔内途径注射 LPS (2mg/kg)。三十分钟后, 在热灯下小鼠静脉注射 (尾部静脉) 2.5mg/kg 剂量的 Salinosporamide A 大约 5 分钟。在 LPS 注射后 90 分钟, 该小鼠用异氟烷麻醉, 并通过心脏穿刺取血获取血浆。剩余的血液的沉淀物然后在 500  $\mu$ l 的 PBS 中再混悬洗去残留的血清蛋白并再次离心。移除上清液并且为了在聚集的全血溶胞产物中分析蛋白酶的抑制作用冷冻血的沉淀物。

#### [0671] 表 12

#### [0672] 时间

#### [0673]

组名	组号	n =	0 分钟	+30 分钟
未注射 / 基线	1	5		
盐水 +solutol 载体	2	5	盐水	
盐水 +solutol 载体	3	5	盐水	Solutol/DMSO
LPS i. p. / 载体 (-30min)	4	12	LPS	
LPS i. p. / 载体 (+30m)	5	12	LPS	Solutol/DMSO
盐水 /Salinosporamide A(-30min)0.25mg/kg	6	12	盐水	
盐水 /Salinosporamide A(+30m)0.25mg/kg	7	12	盐水	0.25mg/kg
LPS/Salinosporamide A(-30min)0.25mg/kg	8	12	LPS	
LPS/Salinosporamide A(+30m)0.25mg/kg	9	12	LPS	0.25mg/kg

[0674] 用在 100% DMSO 中的 10mg/mL Salinosporamide A 贮存液制备给药溶液。通过用无内毒素的水以 w/w 稀释制备 10% solutol 溶液并且用 10mg/ml 的 Salinosporamide A 贮存液制成 1 : 160 的稀释液。动物以 4ml/kg 的剂量静脉注射给药。也通过将 100% DMSO 加入 10% 贮存液产生 9.375% 的 solutol 的水溶液和 0.625% DMSO 的终浓度, 用其进行相同的 1 : 160 稀释来制备载体对照溶液。用 Biosource mTNF Cytoset 试剂盒 (Biosource Intl., Camarillo, CA ; 目录号 #CMC3014) 依照制造商的技术说明书完成血浆 TNF 水平的测量。样品以 1 : 60 的比例稀释并用于该分析。

[0675] 从两次每组至少有 10 只重复动物的独立的实验中获得的数据表明用 0.125 或 0.25mg/kg 的 Salinosporamide A 的处理降低体内的 LPS 诱导的 TNF 的分泌。代表性实验显示在图 43 中。这些数据显示注射 2mg/kg LPS 三十分钟后再用 0.25mg/kg Salinosporamide A 处理的动物导致血浆中 TNF 水平的显著降低。聚集的全血样品也用于分析在体外处理的蛋白酶体抑制作用, 显示用 0.125mg/kg Salinosporamide A 处理的动物体内有  $70 \pm 3\%$  的抑制作用和用 0.25mg/kg Salinosporamide A 处理的动物体内有  $94 \pm 3\%$  的抑制作用。在用或没有用 LPS 处理的动物体内之间在蛋白酶抑制作用方面没有看到显著的差异。当在 LPS 处理三十分钟后, 以 0.125 或 0.25mg/kg 的剂量向小鼠静脉注射给药时, Salinosporamide A 降低约降低 65% 的 LPS 诱导的血浆中 TNF 水平。

#### [0676] 实施例 40

#### [0677] Salinosporamide A 在体外的潜在的化学敏感效应

[0678] 诸如 CPT-11 (依立替康) 的化学治疗剂可活化包括 LoVo 细胞的人结肠癌细胞系中的转录因子核因子  $\kappa$  B (NF- $\kappa$  B), 导致这些细胞发生细胞凋亡的能力的降低。参见 Cusack, et al., Cancer Res 61 :3535 (2001)。在未刺激的细胞中, NF- $\kappa$  B 与所述的抑制性蛋白 I $\kappa$  B (NF- $\kappa$  B 的抑制剂) 位于细胞质中的失活复合物上。各种刺激可通过 I $\kappa$  B 激酶引起 I $\kappa$  B 磷酸化, 随后通过蛋白酶体引起 I $\kappa$  B 的泛素化和降解。随着 I $\kappa$  B 的降解, NF- $\kappa$  B 转移至细胞核并且调节基因表达, 影响许多细胞过程, 包括存活基因的上调从而抑制细胞凋亡。

[0679] 最近许可的蛋白酶抑制剂, Velcade™ (PS-341 ; Millennium 制药公司) 对癌细胞有直接毒性并且也可以通过抑制蛋白酶体诱导的 I $\kappa$  B 的降解加强 CPT-11 抗体外 LoVo 和 LoVo 异种移植物模型中的细胞毒性作用。参见 Adams, J., Eur J Haematol 70 :265 (2003)。此外, 发现 Velcade™ 能抑制在扁平细胞癌中的促血管再生趋化因子 / 细胞因子 GRO- $\alpha$  和 VEGF 的表达, 大概是通过所述的 NF- $\kappa$  B 途径的抑制实现的。参见 Sunwoo, et al., ClinCancer Res 7 :1419 (2001)。该数据表明蛋白酶体的抑制作用不仅减少肿瘤细胞的存活率和生长, 而且减少血管发生。

#### [0680] 实施例 41

#### [0681] 结肠癌、前列腺癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、多发性骨髓瘤和黑素瘤的生长抑制

[0682] 人结肠腺癌 (HT-29 ; HTB-38), 前列腺癌 (PC-3 ; CRL-1435), 乳腺癌 (MDA-MB-231 ; HTB-26), 非小细胞肺癌 (NCI-H292 ; CRL-1848), 卵巢癌 (OVCAR-3 ; HTB-161), 多发性骨髓瘤 (RPMI 8226 ; CCL-155), 多发性骨髓瘤 (U266 ; TIB-196) 和小鼠黑素瘤 (B16-F10 ; CRL-6475) 细胞全部从 ATCC 中购买并在适当的培养基中维持。所述细胞在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 和 95% 的潮湿空气的培养箱中培养。

[0683] 对于细胞生长抑制分析, HT-29, PC-3, MDA-MB-231, NCI-H292, OVCAR-3 和 B16-F10 细胞分别以  $90 \mu\text{l}$  完全培养基中的  $5 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  和  $1.25 \times 10^3$  细胞 / 孔接种在 96 孔 (Corning ;3904) 黑壁, 透明底的组织培养板中的并且将该培养板孵育过夜使细胞建立并进入对数生长期。RPMI 8226 和 U266 在分析当天分别以  $90 \mu\text{l}$  完全培养基中的  $2 \times 10^4$  和  $2.5 \times 10^4$  细胞 / 孔接种在 96 孔培养板中。在 100% DMSO 中制备 20mM 的所述化合物的储存液并在  $-80^\circ\text{C}$  中贮存。连续地稀释所述化合物并重复三次加入到该测试孔中。II-2 和 II-4 化合物的测试浓度范围为从  $6.32 \mu\text{M}$  到 632pM 的浓度。II-3 和 II-17 以范围从  $20 \mu\text{M}$  到 6.32nM 的浓度测试。式 II-18 和 II-19 化合物以范围从  $2 \mu\text{M}$  到 200pM 的浓度测试。式 II-5A 和式 II-5B 化合物分别以范围从  $2 \mu\text{M}$  到 632pM 和从  $20 \mu\text{M}$  到 6.32nM 的终浓度测试。将所述培养板再放回到该培养箱中培养 48 小时。在全部的样品中 DMSO 的终浓度为 0.25%。

[0684] 在 48 小时的药物暴露后, 将  $10 \mu\text{l}$  的含 0.2mg/ml 的刃天青 (从 Sigma-Aldrich Chemical Co. 获得) 的无  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  的磷酸盐缓液加入到每一个孔中, 并且将该培养板又放回到该培养箱中培养 3-6 小时。因为活细胞代谢刃天青, 用具有  $\lambda_{\text{ex}} = 535\text{nm}$  和  $\lambda_{\text{em}} = 590\text{nm}$  的过滤器的 Fusion 微量培养板荧光计 (Packard Bioscience) 测量刃天青的还原产物的荧光。用没有细胞的培养液中的刃天青染料确定背景, 并从所有的实验孔中获得的数据中扣除。该数据标准化成用培养基 +0.25% DMSO (100% 细胞生长) 处理的所述细胞的平均荧光并且  $\text{EC}_{50}$  值 (50% 的最大的实测的生长抑制的药物浓度) 用标准的 S 型剂量效应曲线拟和运算法则 (Xlfit 3.0, IDBusiness Solutions Ltd) 确定。如果细胞生长的最大抑制小于 50%,  $\text{EC}_{50}$  值则无法确定。

[0685] 在表 13 中的所述数据概述式 II-2, II-3, II-4, II-5A, II-5B, II-17, II-18 和 II-19 化合物对下列肿瘤细胞系的生长抑制作用: 人结肠直肠癌, HT-29; 人前列腺癌, PC-3; 人乳腺癌, MDA-MB-231; 人非小细胞肺癌, NCI-H292; 人卵巢癌, OVCAR-3; 人多发性骨髓瘤, RPMI 8226 和 U266 以及鼠黑素瘤 B16-F10 细胞系。

[0686] 表 13

[0687] 式 II-2, II-3, II-4, II-5A, II-5B, II-17, II-18 和 II-19 化合物对各种肿瘤细胞系的  $\text{EC}_{50}$  值

[0688]

细胞系	EC <sub>50</sub> (nM)*							
	II-2	II-3	II-4	II-5A	II-5B	II-17	II-18	II-19
HT-29	129 ± 21	>20000	132 ± 36	85	1070	>20000	18 ± 7.8	13
PC-3	284 ± 110	>20000	204 ± 49	97	1330	>20000	35 ± 5.6	27
MDA-MA-231	121 ± 23	>20000	114 ± 4	66	1040	5900 ± 601	16 ± 2.8	17
NCI-H292	322 395	>20000 >20000	192 213	90	>20000	>20000 >20000	29 41	31
OVCAR-3	188 251	>20000	>6320 >6320	NT	NT	>20000 >20000	>2000 >2000	NT
RPMI 8226	49 45	>20000 >20000	57 51	36 29	326 328	6200 3500	6.3 6.3	5.9 7.1
U266	39 32	>20000 >20000	39 34	10 9	118 111	1620 1710	4.2 4.2	3.2 3.4
B16-F10	194 180	>20000 >20000	163 175	NT	NT	10500 10300	19 36	NT

[0689] \*当 n = 3, 给出平均值 ± 标准差 ; NT = 未测试

[0690] 所述的 EC<sub>50</sub> 值表明式 II-2, II-4 和 II-18 化合物对所述的 HT-29, PC-3, MDA-MB-231, NCI-H292, RPMI 8226, U266 和 B16-F10 肿瘤细胞系有细胞毒性。式 II-2 对所述的 OVCAR-3 肿瘤细胞有细胞毒性。式 II-17 对 MDA-MB-231, RPMI 8226, U26 和 B16-F10 肿瘤细胞系有细胞毒性。式 II-5A, II-5B 和 II-19 化合物对 HT-29, PC-3, MDA-MB-231, RPMI 8226 和 U266 肿瘤细胞有细胞毒性。式 II-5A 和 II-19 对 NCI-H292 肿瘤细胞有细胞毒性。

[0691] 在表 15 中的数据概述式 II-2, II-3, II-4, II-5A, II-5B, II-8C, II-13C, II-16, II-17, II-18, II-19, IV-3C 和式 II-20 化合物对人多发性骨髓瘤细胞系, RPMI 8226 和 U266 的生长抑制效应。

[0692] 表 15

[0693] 式 II-2, II-3, II-4, II-5A, II-5B, II-8C, II-13C, II-16, II-17, II-18, II-19, IV-3C 和式 II-20 化合物对 RPMI 8226 和 U266 细胞的平均 EC<sub>50</sub> 值

[0694]

化合物	RPMI8226	U266
	EC <sub>50</sub> (nM)	EC <sub>50</sub> (nM)
式 II-17	4800	1670
式 II-16	7.0	4.1
式 II-18	6.3	4.2
式 II-2	47	36
式 II-3	>20000	>20000
式 II-4	54	36
式 II-5A	33	10
式 II-5B	327	115
式 II-8C	>20000	>20000
式 II-13C	>20000	>20000
式 II-19	6.5	3.3
式 IV-3C	>20000	8020
式 II-20*	10500	3810

[0695] \*n = 1

[0696] 所述的 EC<sub>50</sub> 值表明式 II-2, II-4, II-5A, II-5B, II-16, II-17, II-18, II-19 和 II-20 化合物对 RPMI 8226 和 U266 细胞有细胞毒性。式 IV-3C 对 U266 细胞有细胞毒性。

[0697] 实施例 42

[0698] MES-SA、MES-SA/Dx5、HL-60 和 HL-60/MX2 肿瘤细胞系的生长抑制

[0699] 人子宫肉瘤 (MES-SA ;CRL-1976), 它的多重耐药性衍生物 (MES-SA/Dx5 ; CRL-1977), 人急性前髓细胞性白血病细胞 (HL-60 ;CCL-240) 和它的多重耐药性衍生物 (HL-60/MX2 ;CRL-2257) 从 ATCC 中购买并在适当的培养基中维持。所述细胞在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 和 95% 潮湿空气的培养箱中培养。

[0700] 为了进行细胞生长抑制分析, MES-SA 和 MES-SA/Dx5 细胞都以 90 μl 完全培养基中的 3×10<sup>3</sup> 细胞 / 孔接种在 96 孔 (Corning ;3904) 黑色壁, 透明底的组织培养板中, 并且将该培养板孵育过夜使细胞建立并进入对数生长期。HL-60 和 HL-60/MX2 细胞在化合物添加当天都以 90 μl 完全培养基中的 5×10<sup>4</sup> 细胞 / 孔接种在 96 孔培养板中。在 100% DMSO 中制备 20mM 的所述化合物的储存液并在 -80℃ 中贮存。连续地稀释所述化合物并重复三次加入到该测试孔中。II-2 和 II-4 化合物的测试浓度范围为 6.32 μM 到 2nM 的浓度。II-3 和 II-17 以范围从 20 μM 到 6.32nM 的浓度测试。化合物 II-18 以范围从 2 μM 到 632pM 的浓度测试。所述培养板又放回到该培养箱中培养 48 小时。在全部的样品中 DMSO 的终浓度为 0.25%。

[0701] 在 48 小时的药物接触后,  $10\ \mu\text{l}$  的含  $0.2\text{mg/ml}$  刃天青 (从 Sigma-Aldrich Chemical Co. 获得) 的无  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  的磷酸盐缓冲液加入到每一个孔中并且将该培养皿又放回到该培养箱中培养 3-6 小时。因为活细胞代谢刃天青, 用具有  $\lambda_{\text{ex}} = 535\text{nm}$  和  $\lambda_{\text{em}} = 590\text{nm}$  的过滤器的 Fusion 微量培养板的荧光计 (Packard Bioscience) 测量刃天青的还原产物的荧光。在没有细胞的培养液中的刃天青染料用于确定背景, 这将从所有的实验孔中获得的数据中扣除。该数据标准化成用培养基 +0.25% DMSO (100% 细胞生长) 处理的所述细胞的平均荧光, 并且  $\text{EC}_{50}$  值 (50% 的最大实测的生长抑制的药物浓度) 用标准的 S 型剂量效应曲线拟和运算法则 (Xlfit 3.0, ID Business Solutions Ltd) 确定。如果细胞生长的最大抑制小于 50%,  $\text{EC}_{50}$  值则无法确定。

[0702] 该多重耐药的 MES-SA/Dx5 肿瘤细胞系衍生于人子宫肉瘤 MES-SA 肿瘤细胞系并表达升高的 P-糖蛋白 (P-gp), 一种 ATP 依赖的流出泵。在表 16 中的数据概述式 II-2, II-3, II-4, II-17 和 II-18 对 MES-SA 和它的多重耐药衍生物 MES-SA/Dx5 的生长抑制作用。包括作为对照的紫杉醇 (Paclitaxel), 所述 P-gp 泵的已知的底物。

[0703] 表 16

[0704] 式 II-2, II-3, II-4, II-17 和 II-18 化合物对 MES-SA 和 MES-SA/Dx5 肿瘤细胞系的  $\text{EC}_{50}$  值

[0705]

化合物	$\text{EC}_{50}$ (nM)		变化倍数*
	MES-SA	MES-SA/Dx5	
II-2	193	220	1.0
	155	138	
II-3	>20000	>20000	NA
	>20000	>20000	
II-4	163	178	0.9
	140	93	
II-17	9230	9450	0.8
	12900	7530	
II-18	22	32	1.2
	17	14	
紫杉醇	5.6	2930	798
	4.6	5210	

[0706] \* 变化倍数 =  $\text{EC}_{50}$  值的比 (MES-SA/Dx5 : MES-SA)

[0707] 所述的  $\text{EC}_{50}$  值表明 II-2, II-4, II-17 和 II-18 对 MES-SA 和 MES-SA/Dx5 肿瘤细胞系有细胞毒性作用。通过观察紫杉醇对耐药的 MES-SA/Dx5 细胞降低 800 倍的活性来确

定所述的多重耐药的表型。

[0708] HL-60/MX2 是多重耐药肿瘤细胞系, 衍生自人前髓细胞性白血病细胞系 HL-60 并且表达为减少的拓扑异构酶 II 活性。显示在表 17 中的数据概述式 II-2, II-3, II-4, II-17 和 II-18 化合物抗 HL-60 和它的多重耐药衍生物 HL-60/MX2 的生长抑制作用。包括作为对照的盐酸米托蒽醌, 所述的拓扑异构酶 II 的靶向试剂。

[0709] 表 17

[0710] 式 II-2 II-3 II-4, II-17 和 II-18 对 HL-60 和 HL-60/MX2 肿瘤细胞系的  $EC_{50}$  值

[0711]

化合物	$EC_{50}$ (nM)		变化倍数*
	HL-60	HL-60/MX2	
<u>II-2</u>	237	142	0.7
	176	133	
<u>II-3</u>	>20000	>20000	NA
	>20000	>20000	
<u>II-4</u>	143	103	0.8
	111	97	
<u>II-17</u>	>20000	>20000	NA
<u>II-18</u>	27	19	0.7
	23	18	
盐酸米托蒽醌	42	1340	30.6
	40	1170	

[0712] \* 变化倍数 =  $EC_{50}$  值的比 (HL-60/MX2 : HL-60)

[0713] 所述的 =  $EC_{50}$  值表明 II-2, II-4 和 II-18 对 HL-60 和 HL-60/MX2 肿瘤细胞系保留细胞毒性作用。通过观察盐酸米托蒽醌对耐药的 HL-60/MX2 细胞具有 30 倍降低的活性来确定多重耐药的显型。

[0714] 实施例 43

[0715] NF- $\kappa$ B 介导的萤光素酶活性的抑制 ; HEK293NF- $\kappa$ B/ 萤光素酶报告细胞系

[0716] 所述的 HEK293 NF- $\kappa$ B/ 萤光素酶报告细胞系衍生自人胚肾细胞系 (ATCC ; CRL-1573) 并且携带 5X NF- $\kappa$ B 结合位点调节下的萤光素酶报告基因。所述报告细胞系常规地用含有 250  $\mu$ g/ml G418 的完全 DMEM 培养液中 (DMEM+10% (v/v) 胎牛血清, 2Mm L-谷氨酰胺, 10Mm HEPES 和分别为 100IU/ml 和 100  $\mu$ g/ml 的青霉素 / 链霉素) 维持。当进行该萤光素酶分析时, 用无酚红的 DMEM 基础培养液取代该 DMEM 基础培养液并省略该 G418。所述细胞在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 和 95% 潮湿空气的培养箱中培养。

[0717] 为了NF- $\kappa$ B介导的荧光素酶分析,将90  $\mu$ l无酚红的DMEM完全培养基中 $1.5 \times 10^4$ 细胞/孔的HEK293 NF- $\kappa$ B/萤光素酶细胞接种在Corning3917白色不透光底的组织培养板中。对于式II-2,式II-4和式II-5A,在100% DMSO中制备400  $\mu$ M起始稀释物并且将该稀释物用于产生8个点的半对数稀释系列。进一步在适当的培养基中稀释该稀释系列40倍并且将10  $\mu$ l的整份重复三次加入到该测试孔中,产生1  $\mu$ M到320pM的最终测试浓度范围。对于式II-3和式II-5B,在100% DMSO中制备8mM起始稀释物并且随后按照上述的相同过程操作产生从20  $\mu$ M到6.3nM的最终测试浓度范围。将该培养板又放回到该培养箱中1小时。在1小时的预处理后,将在无酚红的DMEM培养基中制备的10  $\mu$ l的50ng/ml TNF- $\alpha$ 溶液加入,并且将该培养皿又另外孵育6小时。在所有的样品中DMSO的终浓度为0.25%。

[0718] 在结束TNF- $\alpha$ 刺激后,将100  $\mu$ l的Steady Lite HTS荧光素酶试剂(Packard Bioscience)加入到每一个孔中并且在测量该荧光素酶活性前将该培养板在室温下未干扰的放置10分钟。通过使用Fusion微量培养板的荧光计(Packard Bioscience)测量所述的相对荧光素酶单位(RLU)。该EC<sub>50</sub>值(50%的最大相对荧光素酶单位抑制的药物浓度)在Prism(GraphPad软件)中用S型剂量效应,可变的斜面模型计算。

[0719] NF- $\kappa$ B调节炎症、细胞凋亡、肿瘤发生和自身免疫性疾病中发挥重要作用的大量的基因表达。因此,例如,能调节或影响NF- $\kappa$ B活性的化合物在治疗与炎症、癌症和自身免疫性疾病相关的疾病中是有用的。在它的失活形式中,在胞浆中NF- $\kappa$ B与I $\kappa$ B络合,并且刺激后,所述蛋白酶磷酸化、泛素化和降解I $\kappa$ B。I $\kappa$ B的降解导致NF- $\kappa$ B的活化和它移位到细胞核中。通过评估在HEK293NF- $\kappa$ B/Luc细胞中TNF- $\alpha$ 刺激后的NF- $\kappa$ B介导的荧光素酶活性来评价式II-2,式II-3,式II-4,式II-5A和式II-5B对NF- $\kappa$ B活化的作用。

[0720] 从评价式II-2,式II-3和式II-4的代表性实验中的结果(图44)显示式II-2和式II-4化合物的预处理导致TNF- $\alpha$ 刺激的NF- $\kappa$ B/Luc293细胞中荧光素酶活性的剂量依赖性降低。在该实验中式II-2的抑制NF- $\kappa$ B可诱导的荧光素酶活性的计算的EC<sub>50</sub>为73nM,而对于式II-4EC<sub>50</sub>值为67nM。在重复实验中观察到类似的数据。

[0721] 评价式II-5A和式II-5B化合物的代表性实验中的数据入图45所示,并且表明式II-5A和式II-5B抑制NF- $\kappa$ B可诱导的荧光素酶活性,其EC<sub>50</sub>值分别为30nM和261nM。在重复实验中观察到类似的数据。

#### [0722] 实施例 44

[0723] 式II-2,式II-3,式II-4,式II-5A和式II-5B对蛋白酶活性的体外抑制作用

[0724] 式II-2,式II-3,式II-4,式II-5A和式II-5B化合物作为20mM储备溶液在DMSO中制备并且以小份在-80°C中贮存。从CalBiochem中获得纯化的家兔肌20S蛋白酶体。为了增强该蛋白酶体的胰凝乳蛋白酶样活性,将SDS加入到所述的分析缓冲液(20mM HEPES, pH7.3, 0.5mM EDTA,和0.05% Triton X100)中使SDS的终浓度为0.035%。所用的底物为sucLLVY-AMC,一种荧光的肽底物,该底物特异被所述蛋白酶体的胰凝乳蛋白酶样活性裂解。分析是在96孔Costar微量滴定板中、200  $\mu$ l最终容积的1  $\mu$ g/ml蛋白酶浓度完成的。式II-2和式II-4作为8个点剂量效应曲线测试,其终浓度范围从500nM到0.16nM,而式II-3以范围从10  $\mu$ M到3.2nM的终浓度测试。式II-5A和式II-5B以范围从1  $\mu$ M到0.32nM的终浓度测试。将样品在温度控制培养板读数器中37°C孵育5分钟。在预孵育步骤中,所

述底物用含 0.035% SDS 的分析缓冲液中稀释 25 倍。在预孵育阶段后,通过加入 10  $\mu$ l 的所述稀释底物引发所述反应,并将该培养板又放回到该培养板读数器中。在该反应中底物的终浓度为 20  $\mu$ M。所有的数据每五分钟采集一次,持续 1.5 小时并且按照三次数据点的平均值绘图。 $EC_{50}$  值(抑制 50%的最大相对荧光单位的药物浓度)通过 Prism(GraphPad 软件)用 S 型剂量效应、可变的斜面模型计算。

[0725] 评价式 II-2,式 II-3 和式 II-4 化合物的代表性实验的结果入图 46 所示,并表明式 II-2 和式 II-4 抑制所述蛋白酶体的胰凝乳蛋白酶样活性,其  $EC_{50}$  值分别为 18.5nM 和 15nM。式 II-3 在该分析中是有活性的,其  $EC_{50}$  值为 890nM。从独立的实验中观察到相似的结果。

[0726] 评价式 II-5A 和式 II-5B 化合物的代表性实验的结果如图 47 所示,并表明式 II-5A 和式 II-5B 抑制所述蛋白酶体的胰凝乳蛋白酶样活性,其  $EC_{50}$  值分别为 6nM 和 88nM。从独立的实验中观察到相似的结果。

[0727] 实施例 45

[0728] 炭疽致死毒素的抑制

[0729] 炭疽毒素是形成炭疽相关症状的原因。在该疾病中,B. anthracis 芽孢吸入并寄宿在肺中,在那里它们被巨噬细胞摄入。在巨噬细胞内,芽孢发芽、复制、导致该细胞被杀死。但是在杀死该细胞前,感染的巨噬细胞迁移到淋巴结中,随着死亡,它们释放它们的内含物,使该有机体进入血液系统中,进一步复制并分泌致死毒素。

[0730] 被称为保护性抗原(PA 83kDa)和致死性因子(LF,90kDa)的两种蛋白在炭疽的发病机理中起重要作用。这些蛋白一起地被认为是致死毒素(LeTx)。当它们组合在一起,静脉注射进动物体内时,PA 和 LF 引起死亡。致死毒素在巨噬细胞的一些细胞培养系中也有活性,在几个小时内引起细胞死亡。体外处理后 LeTx 在小巨噬细胞样鼠 RAW264.7 cells 中诱发坏死和细胞凋亡。

[0731] 致死毒素介导的细胞毒性的抑制剂的体外基于细胞的分析

[0732] RAW264.7 细胞(从美国典型培养物保藏中心获得)在 37 $^{\circ}$ C、潮湿的 5%  $CO_2$  的培养箱中,在含 10%胎牛血清、2mM L-谷氨酰胺和 1%青霉素/链霉素(完全培养基)的 RPMI-1640 培养基中适应并维持。为了进行该分析,细胞在完全培养基中以 50,000 细胞/孔的浓度在 96 孔的培养皿中放置过夜。在第二天移除培养基并用无血清的完全培养基取代,该完全培养基有或没有以 330nM 为起始浓度并为 8 个点剂量效应以 1/2 对数间隔稀释的不同浓度的式 II-2, II-3, II-4, II-5A, II-5B, II-13C, II-17, II-18 和 IV-3C 化合物。45 分钟预孵育后,将 1  $\mu$ g/ml LF 和 1  $\mu$ g/ml PA 单独或联合地(LF:PA,也称为致死毒素(LeTx))加入细胞中。重组 LF 和 PA 从 ListBiological Laboratories 获得。包括作为对照的没有加入 LeTx 的另外的培养板。然后孵育细胞 6 小时,接着加入无  $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$  的 PBS(Mediatech, Herndon, VA)中制备的 0.02mg/ml 刃天青染料(Molecular Probes, Eugene, OR)。在评估细胞成活力之前,将培养板又另外孵育 1.5 小时。通过用 530 激发和 590 发射的过滤器测量荧光评价细胞毒性或细胞成活力。数据按照百分比的成活力表达,该百分比成活力为应用下列公式在 DMSO 单独对照(高)与该 LeTx 单独对照(低)之间作比较:百分比成活力 = 100\*(测量的 OD-低对照)/(高对照-低对照)。

[0733] 在 RAW 264.7 细胞中炭疽致死毒素介导的细胞毒性的抑制作用

[0734] 图 48 中的数据概述式 II-2, 式 II-3 和式 II-4 化合物对 LeTx 介导的所述的 RAW 264.7 鼠巨噬细胞样细胞系的细胞毒性的作用。用式 II-2 和式 II-4 对 RAW 264.7 细胞处理产生 LeTx 处理细胞的成活力的增长, 其  $EC_{50}$  值为 14nM (图 48)。式 II-3 对 LeTx 防护的  $EC_{50}$  值在测试的浓度中无法确定 ( $EC_{50} > 330nM$ , 评价的最大浓度)。在表 18 中的数据显式 II-5A, II-5B, II-13C, II-17, II-18 和 IV-3C 对 LeTx 介导的 RAW 264.7 鼠巨噬细胞样细胞系的细胞毒性的作用。用式 II-5A 和 II-18 处理的 RAW 264.7 细胞显示在 LeTx 处理 RAW 264.7 细胞的成活力方面的增长, 其  $EC_{50}$  值分别为 3nM 和 4nM。式 II-17 和式 II-5B 的处理作用导致在 LeTx 处理细胞的成活力方面的增长, 其  $EC_{50}$  值分别为 42nM 和 45nM。式 II-13C 和 IV-3C 对 LeTx 防护的  $EC_{50}$  值在测试的浓度中无法确定 ( $EC_{50} > 330nM$ , 评价的最大浓度)。

[0735] 表 18 : 炭疽致死毒素介导的 RAW 264.7 细胞的细胞毒性的抑制的  $EC_{50}$  值

[0736]

化合物	$EC_{50}$ (nM)
式 II-17	42
式 II-18	4
式 II-5A	3
式 II-5B	45
式 II-13C	> 330nM
式 IV-3C	> 330nM

[0737] 实施例 46

[0738] 用于口服给药或其类似形式的制剂

[0739] 将通过所述实施方案的方法获得并纯化的 1g 化合物、98g 乳糖和 1g 羟丙基纤维素充分混合成混合物, 通过常规方法将混合物制成颗粒。彻底干燥并该颗粒筛成适合装瓶或热封的颗粒制剂。依赖于所述症状, 所得的颗粒制剂以约 100ml/ 天到约 1000ml/ 天的剂量口服给药, 如同治疗人体中癌性肿瘤的本领域中普通技术人员所恰当地认为的那样。

[0740] 上述给出的实施例仅为了帮助所述实施方案的理解。因此, 本领域所属技术人员应理解, 所述方法可提供化合物的衍生物。

[0741] 本领域所属的技术人员容易理解, 本发明很好地适合实现所述目的并且获得所述目标和优势, 以及其它内在固有特性。本发明描述的方法和操作仅是代表优选实施方案, 并且是示例性的不能理解为对本发明范围的限制。本领域所属技术人员能够对本发明的作出改变和其它应用, 这均包含在本发明的精神中。

[0742] 本领域所属技术人员显而易见, 在不偏离本发明的范围和精神下, 可对本发明公开的所述实施方案作出不同的替换和修改。

[0743] 本说明书中提到的所有专利和出版物预示着本发明所属技术领域的技术人员的水平。

[0744] 本文适当的示例性描述的本发明可以不在本发明没有特别公开的任何要素或各种要素、任何限制或各种限制的条件下实践。所用术语和表达方式均用于说明目的而非限制目的, 并且没有意向表明使用该术语和表达方式意味着排除所显示的或所描述的特征或其部分的等价物。公认的是在本发明的范围内可进行各种修改。因此, 应理解虽然本发明通过优选的实施方案和任选的特征进行特定地公开, 但是本领域的技术人员可采用本发明公开的概念的修饰和变换, 并且修饰和变换应认为是属于本发明的范围内, 并由所附的权

利要求限制。

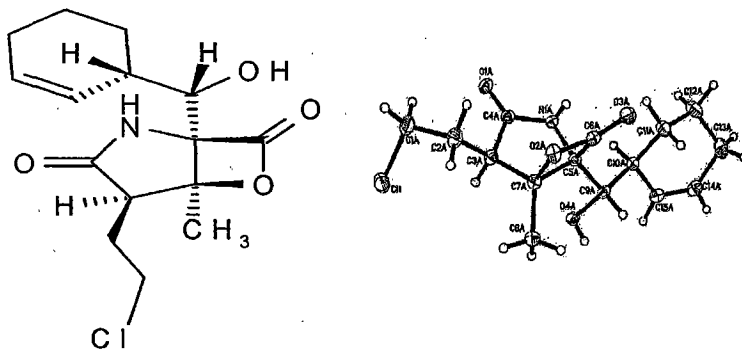


图 1



图 2

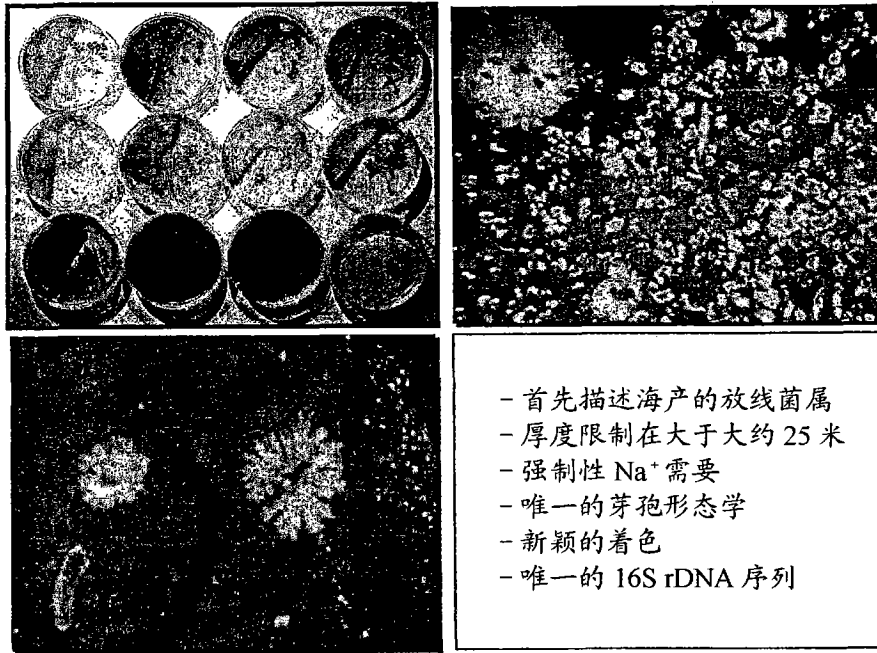


图 3

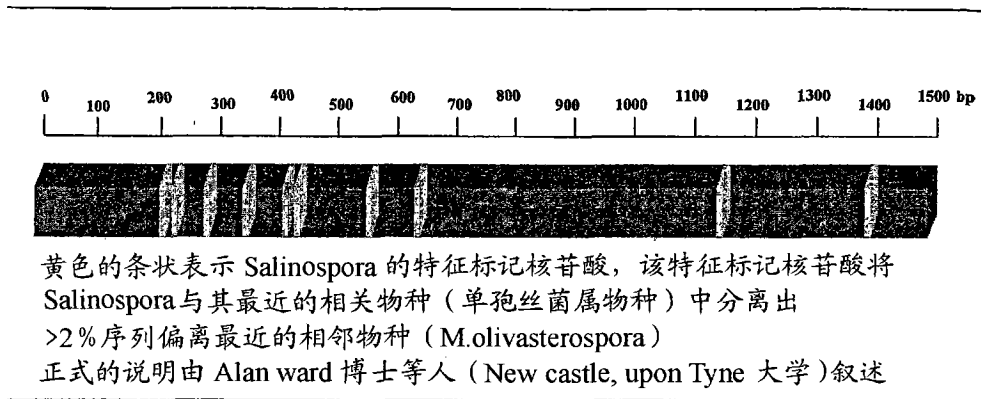


图 4

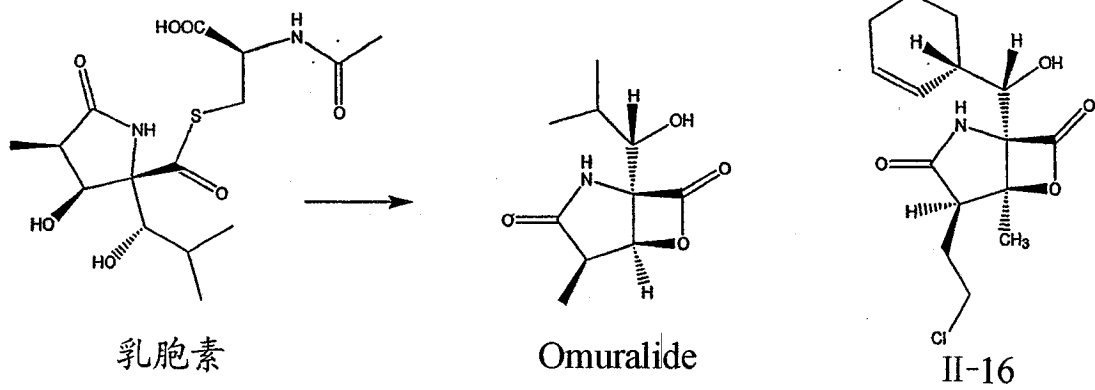


图 5

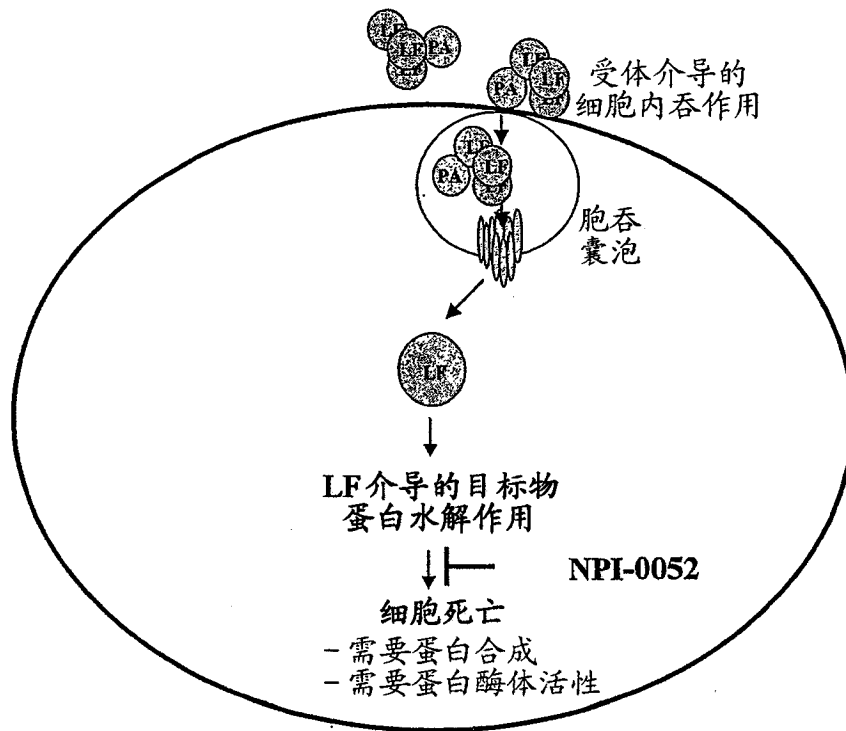
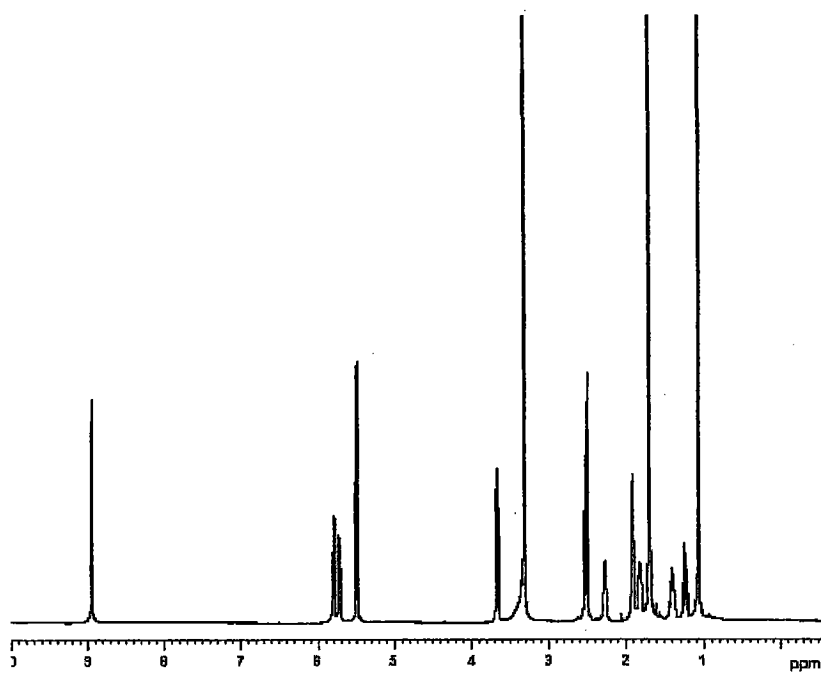
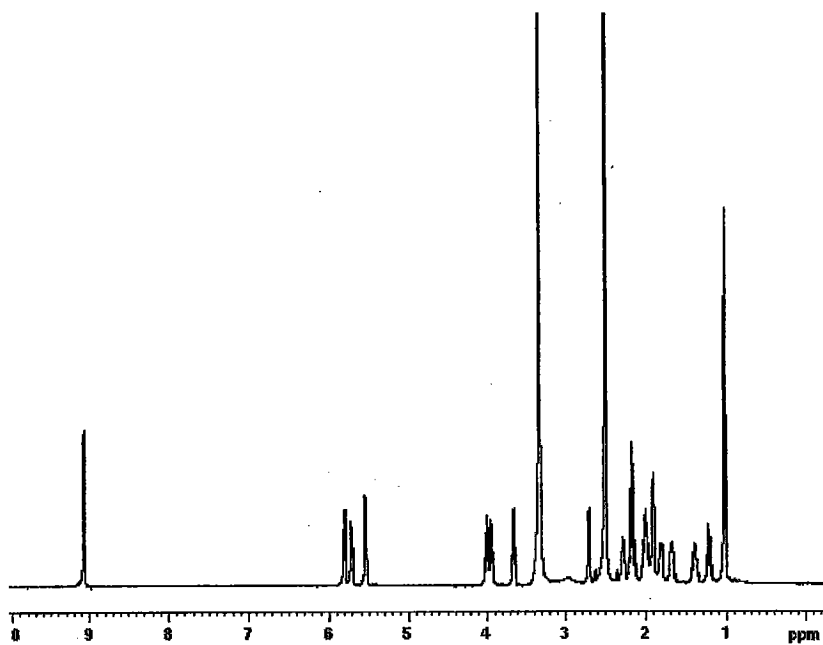


图 6



II-20

图 7



II-24C

图 8

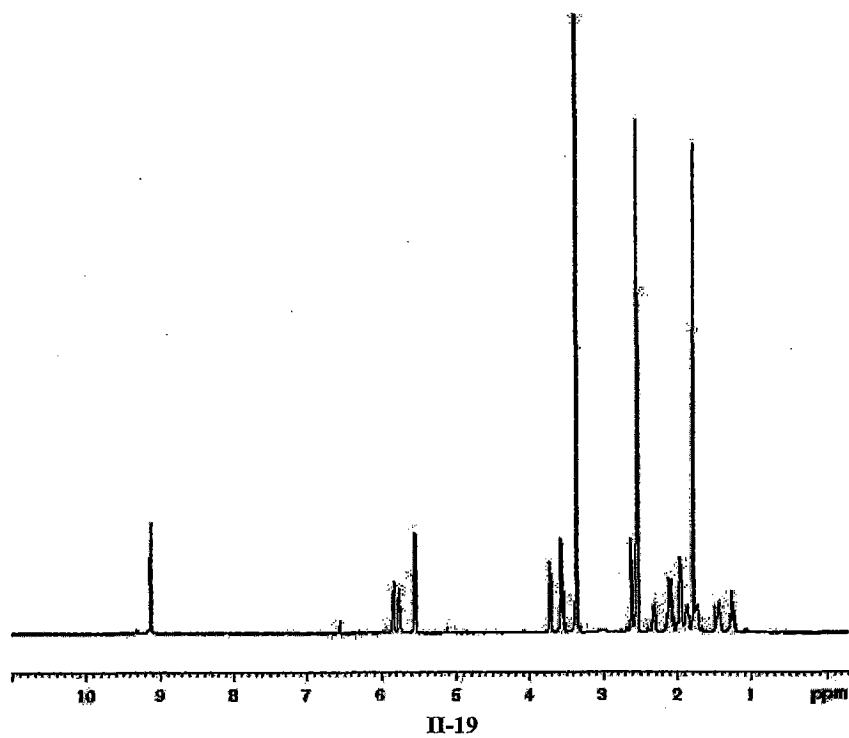


图 9

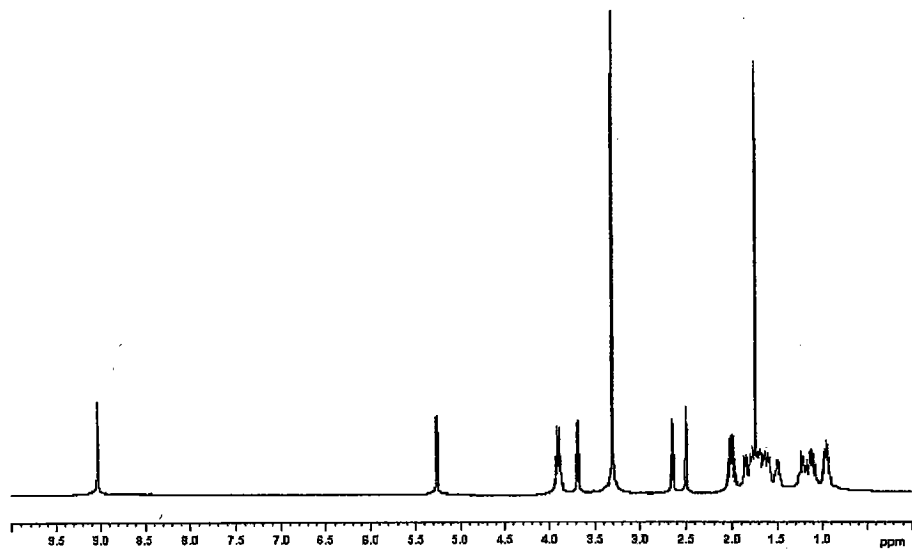


图 10

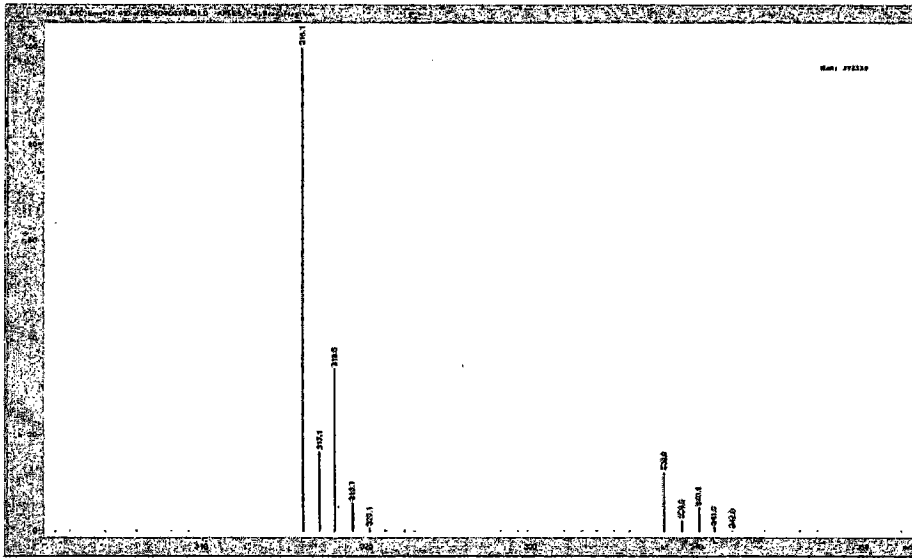


图 11

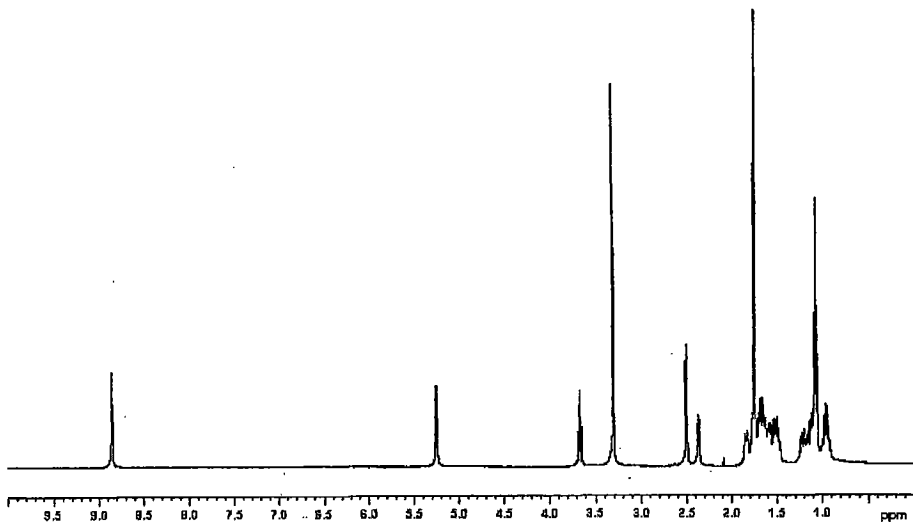


图 12

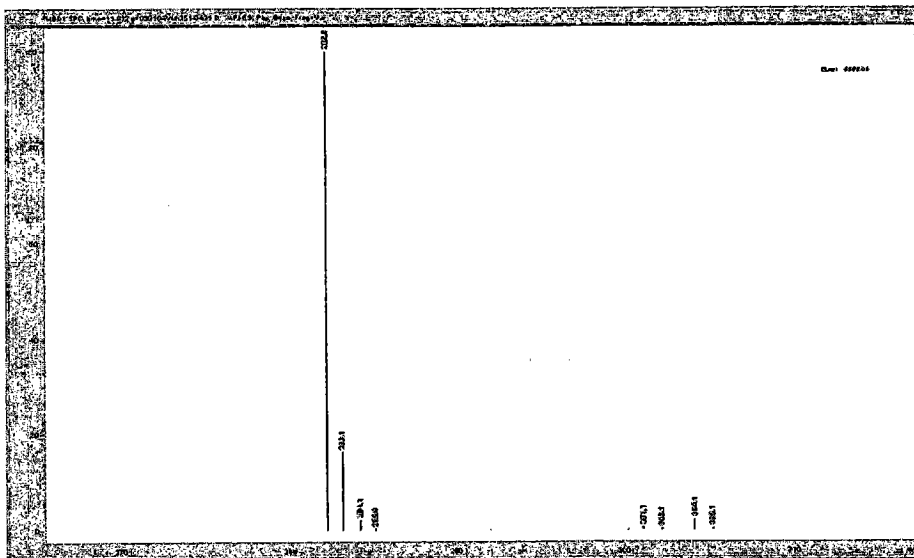


图 13

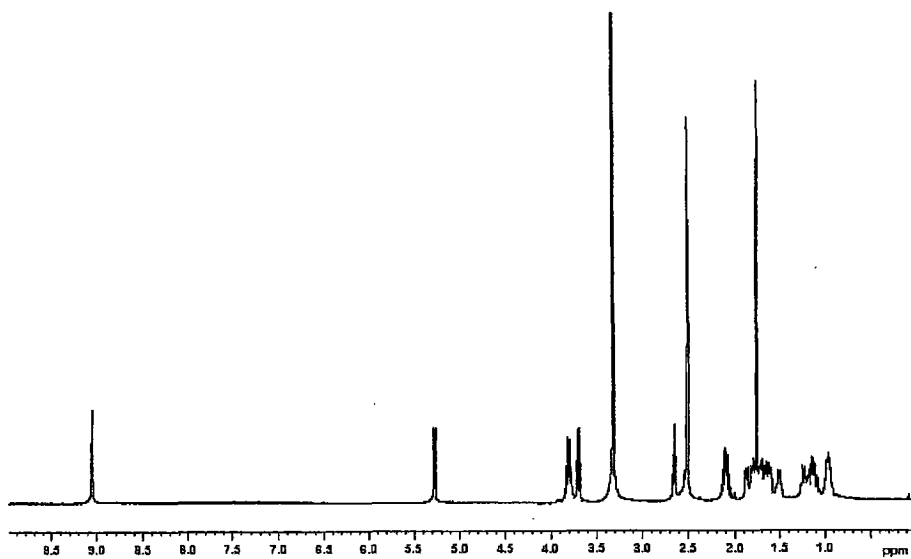


图 14

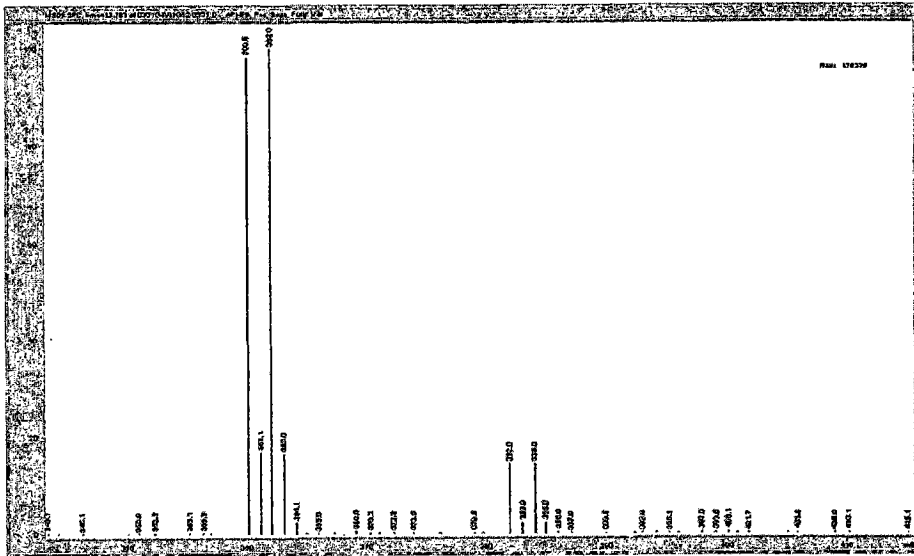


图 15

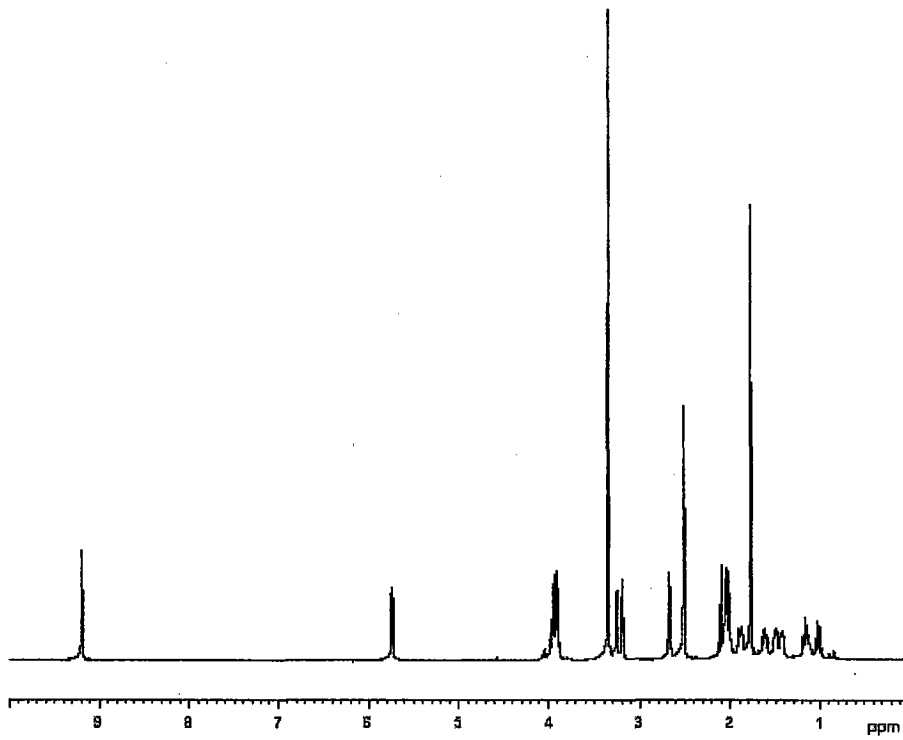


图 16

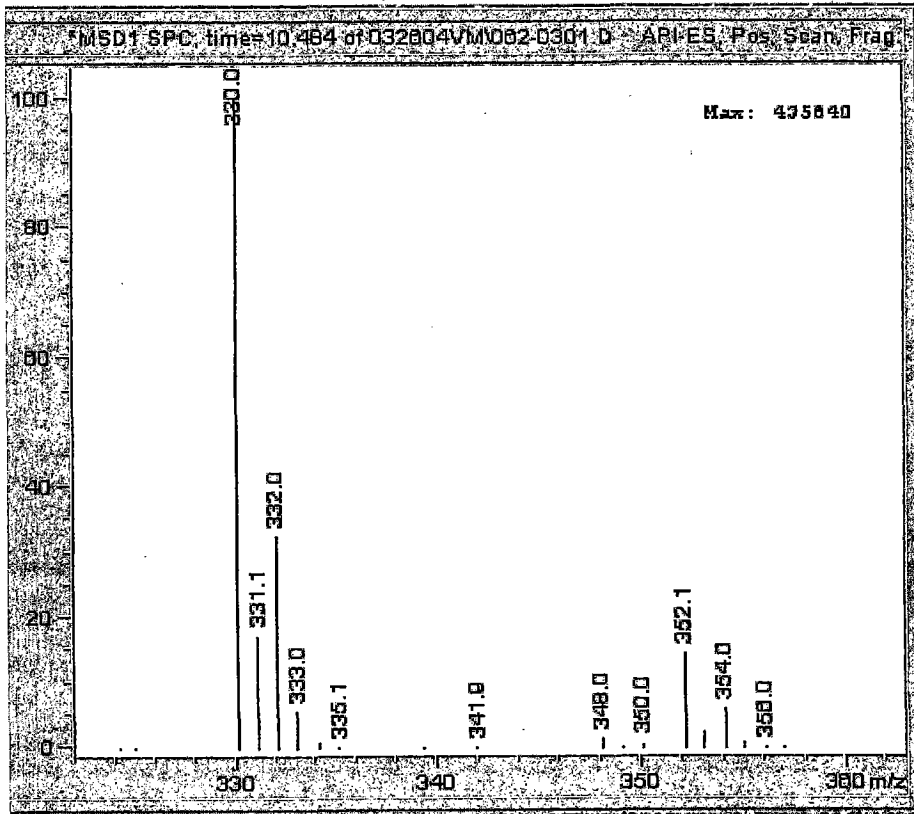


图 17

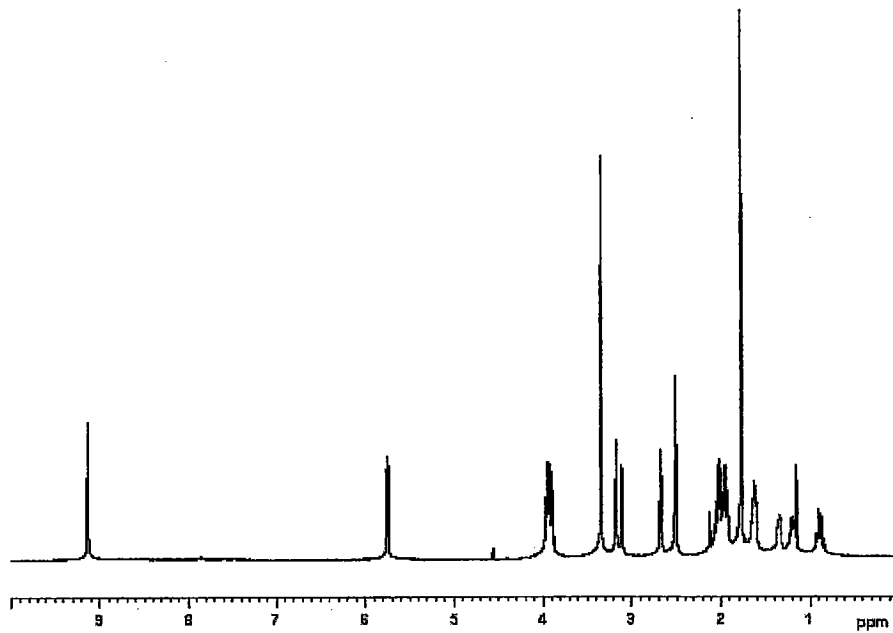


图 18

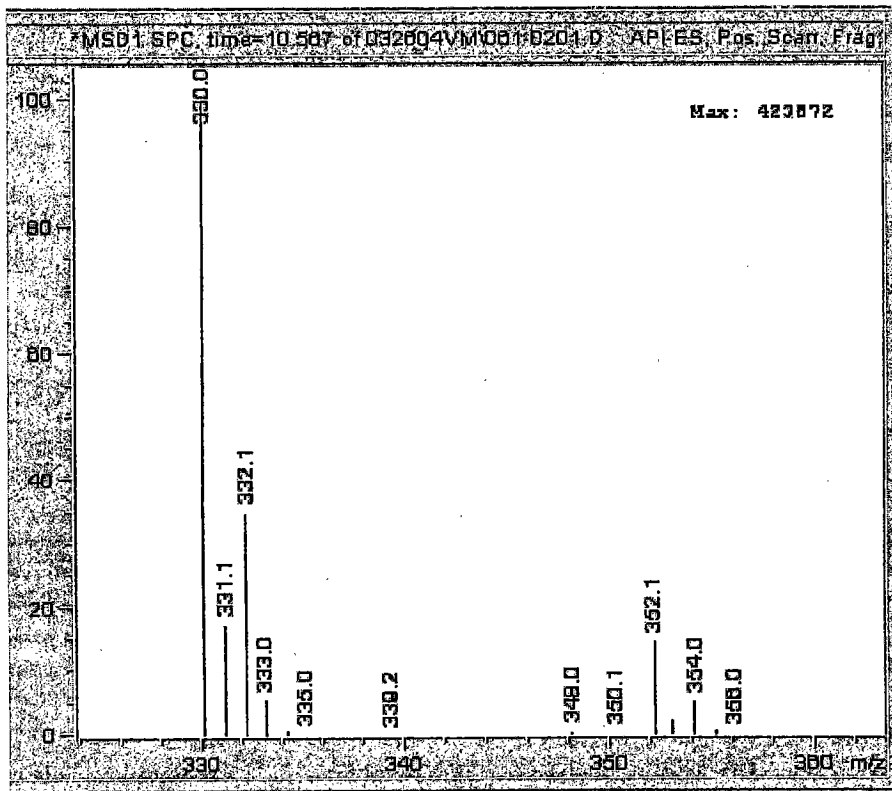


图 19

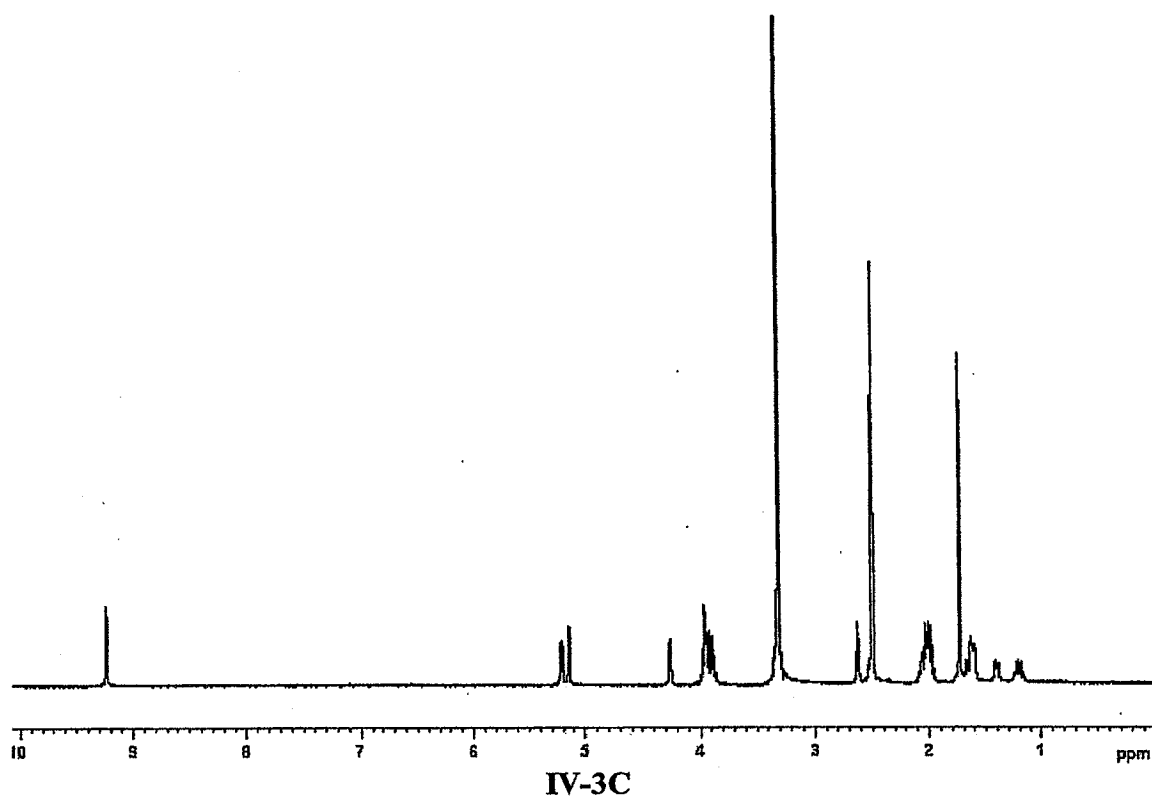
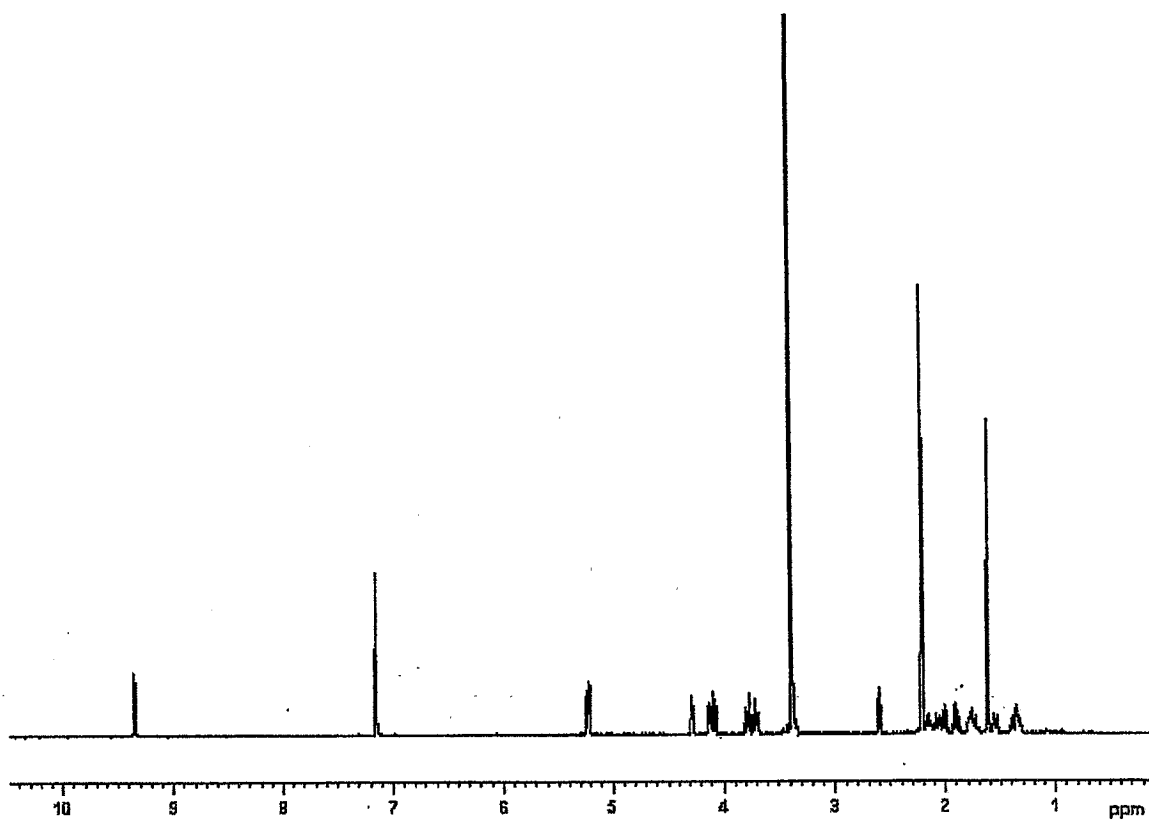
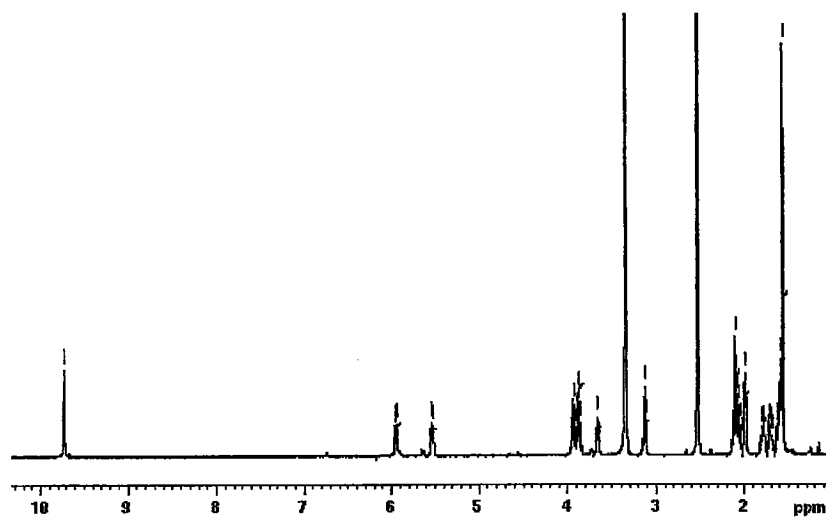


图 20



IV-3C

图 21



II-13C

图 22

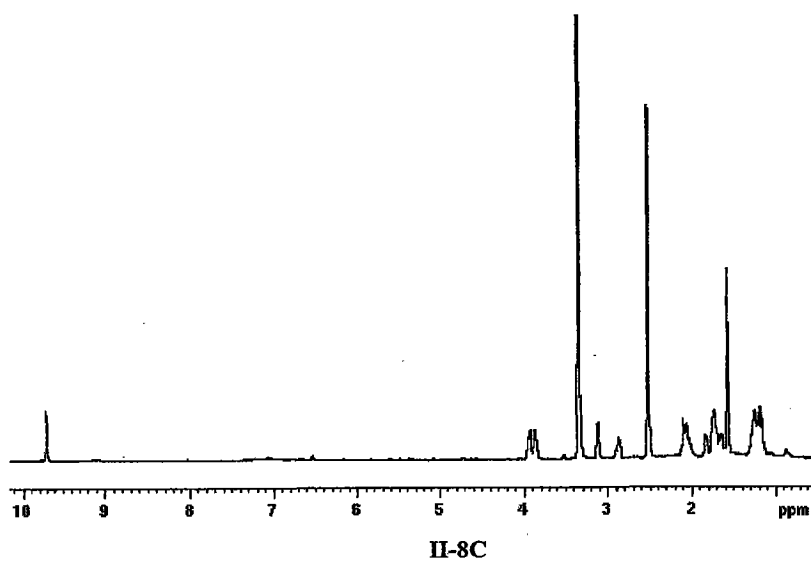


图 23

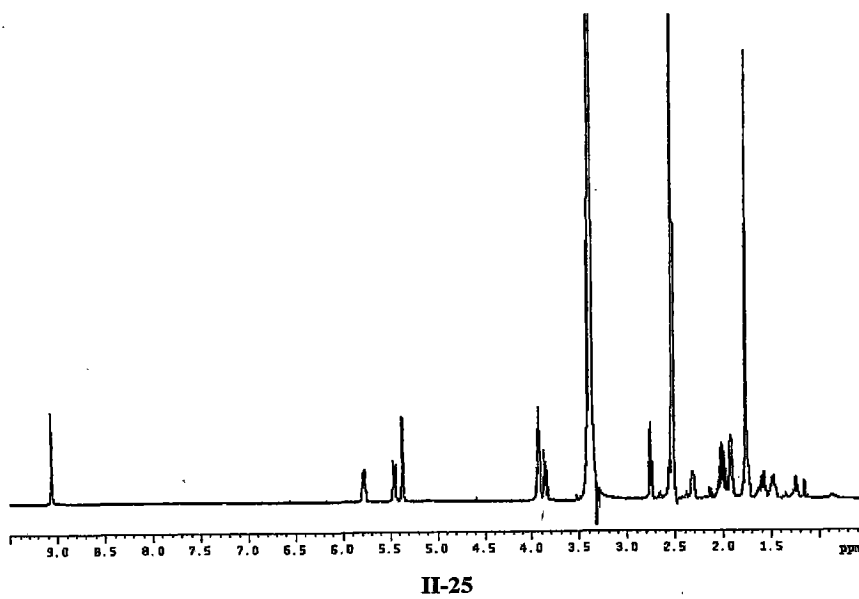
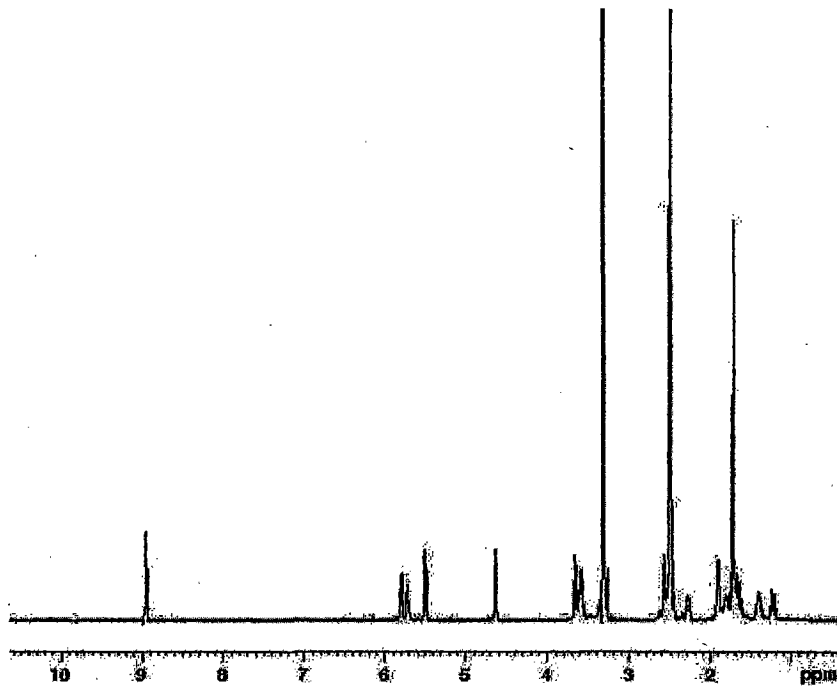
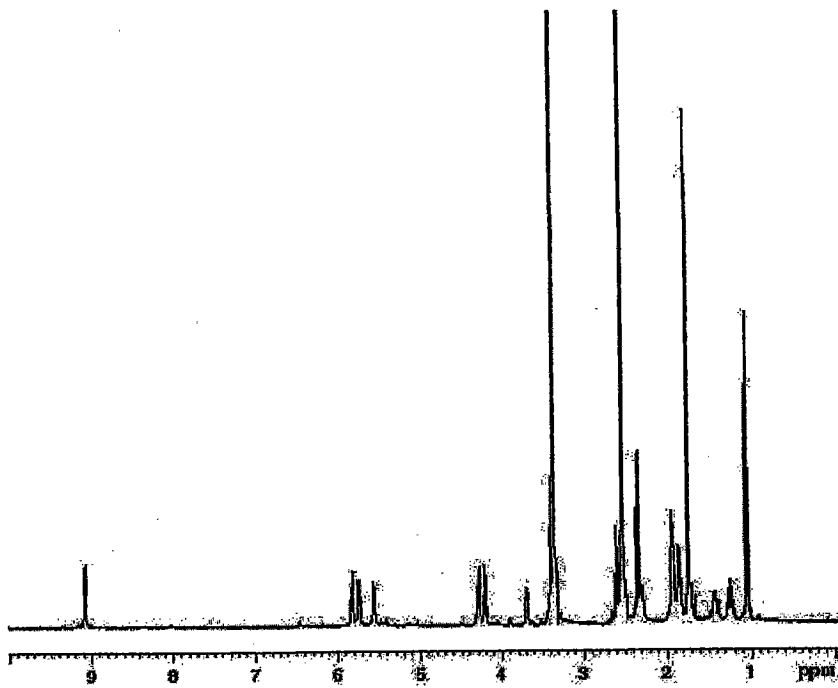


图 24



II-21

图 25



II-22

图 26

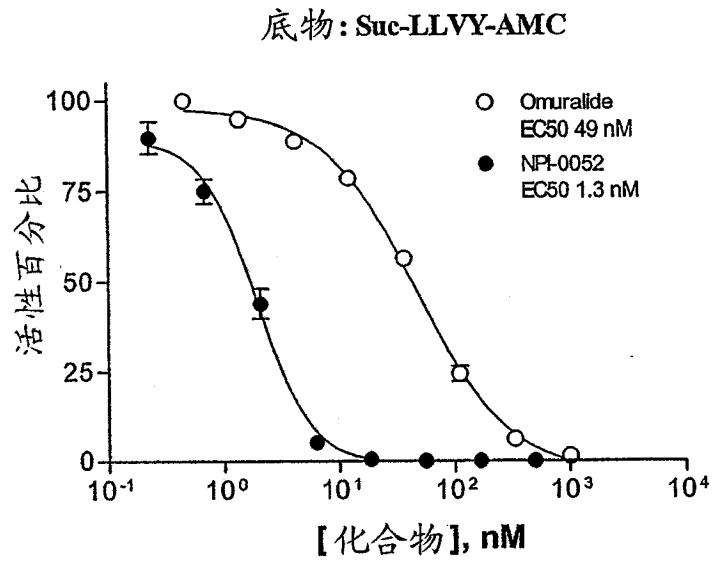


图 27

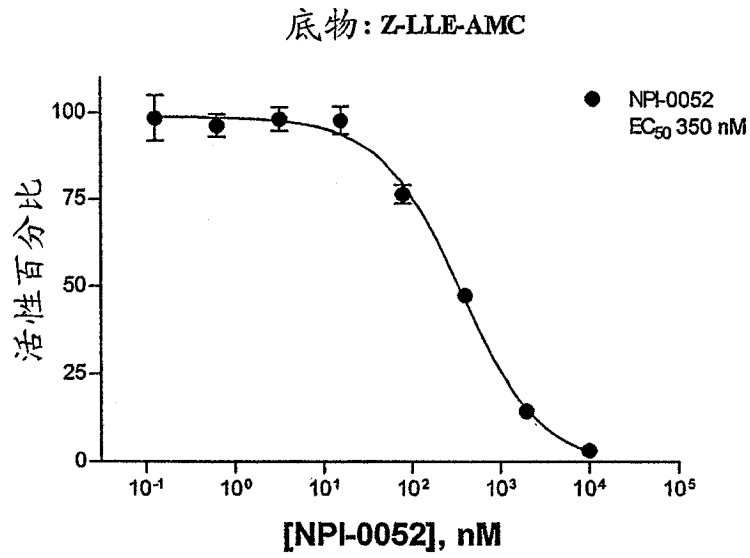


图 28

底物: Suc-LLVY-AMC

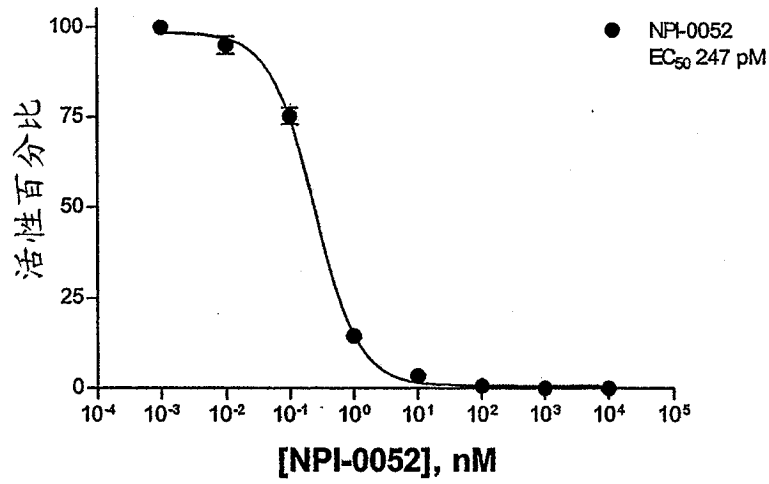


图 29

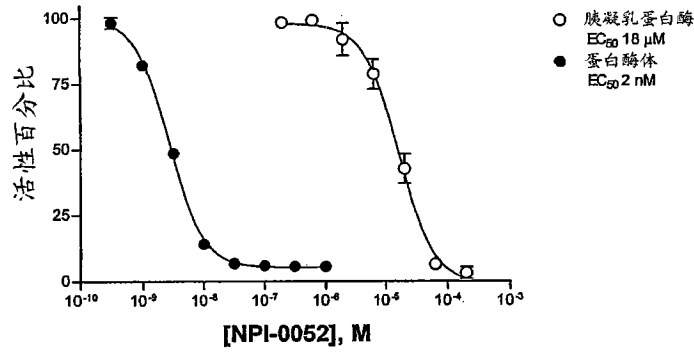


图 30

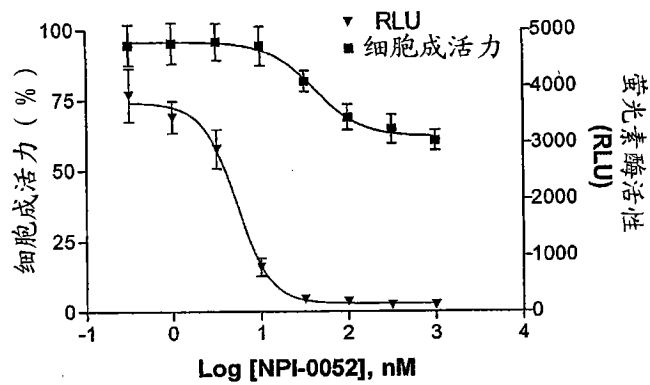


图 31

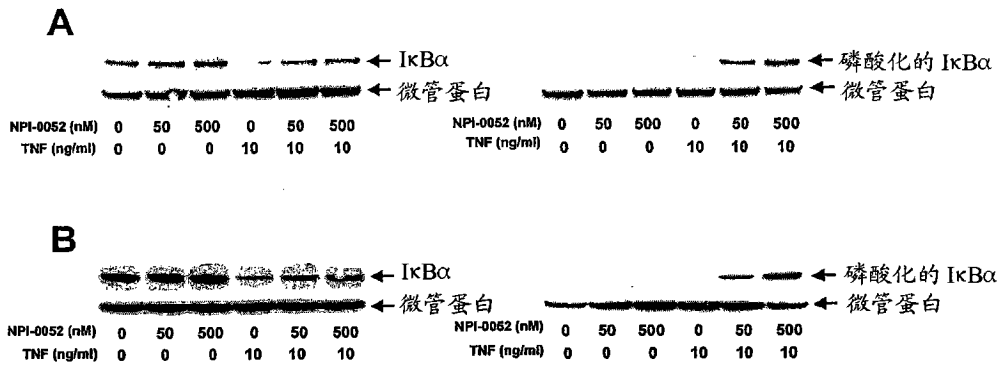


图 32

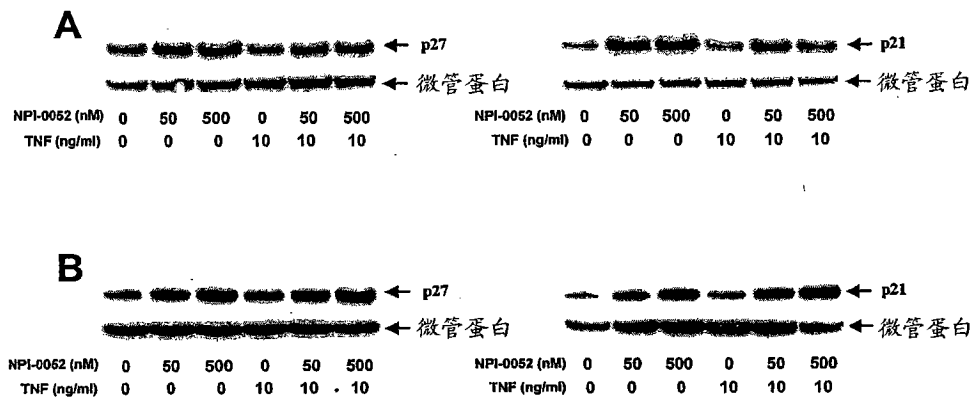


图 33

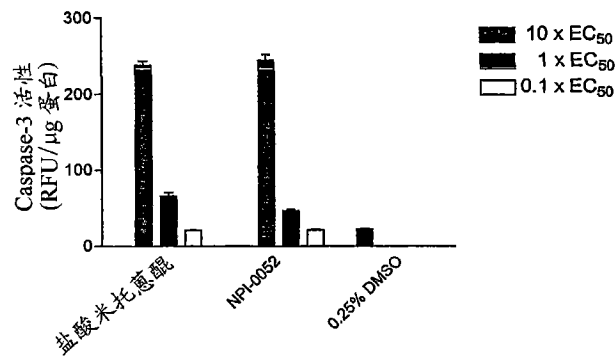


图 34

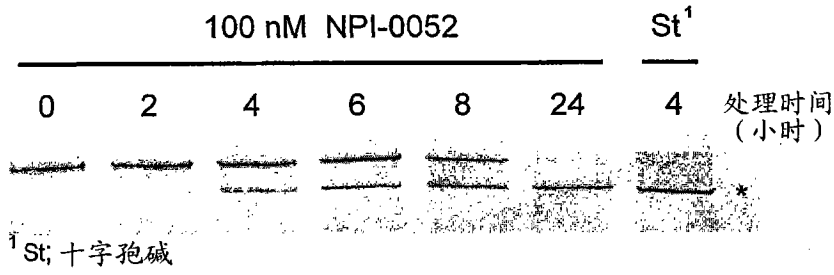


图 35

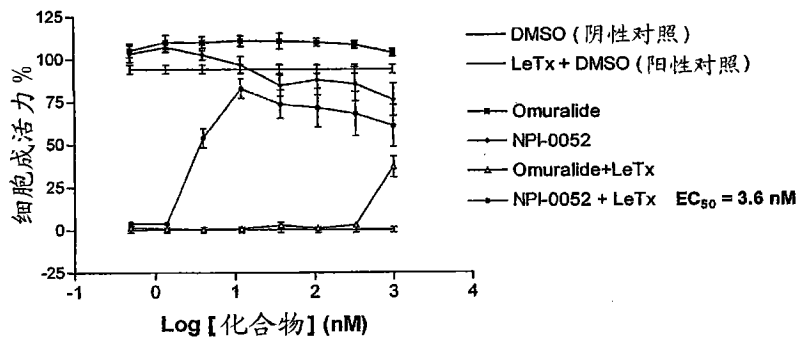


图 36

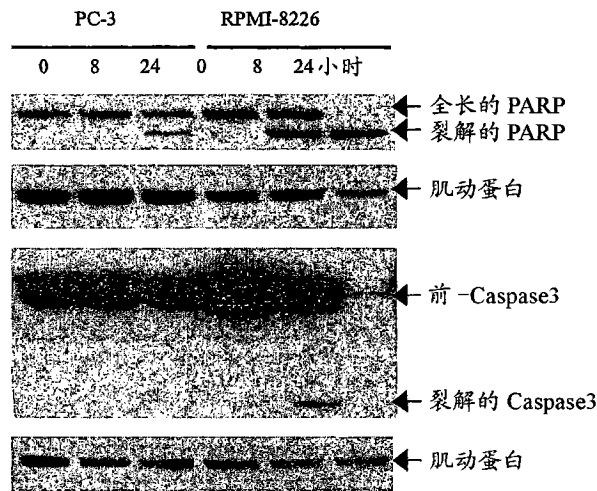


图 37

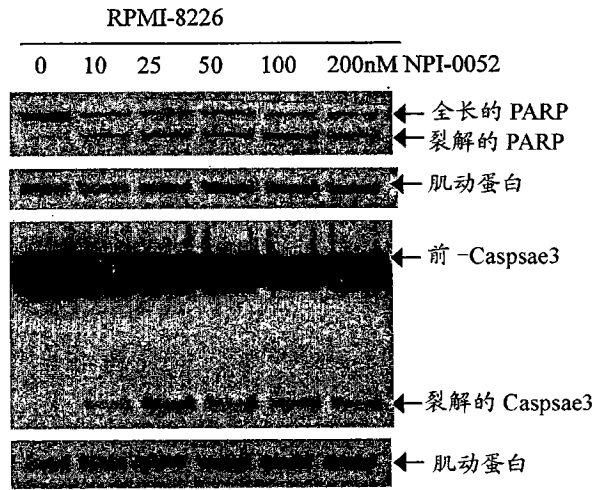


图 38

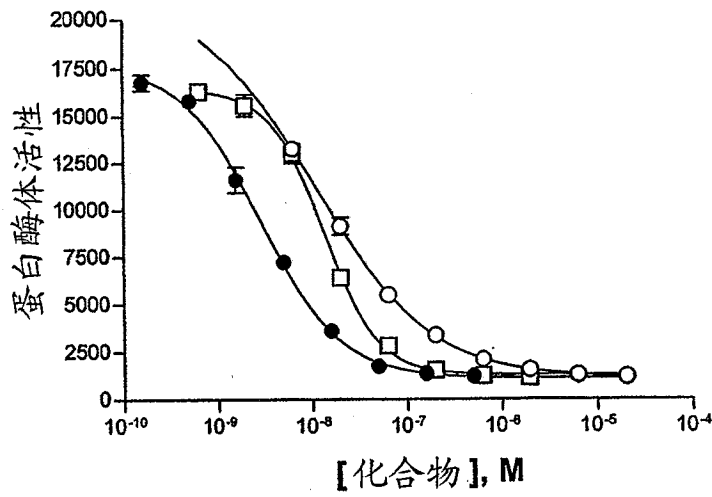


图 39

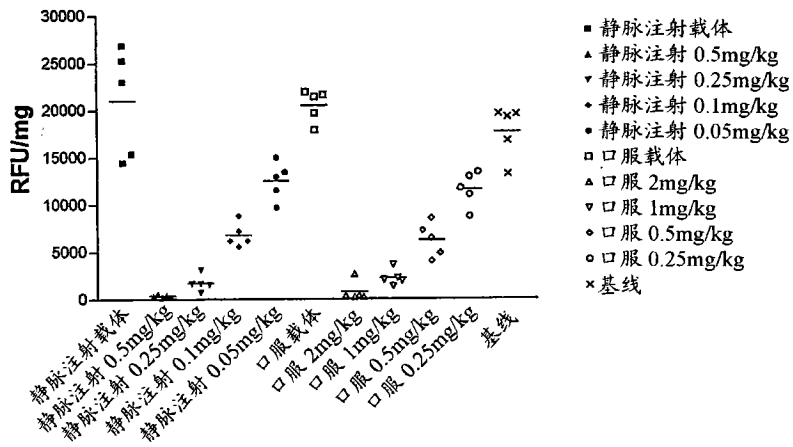


图 40

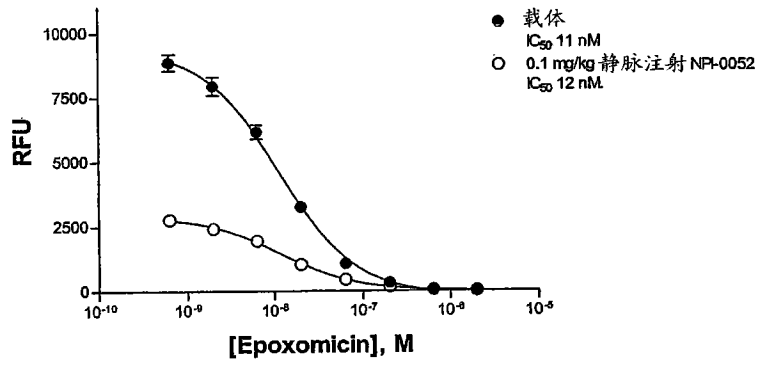


图 41

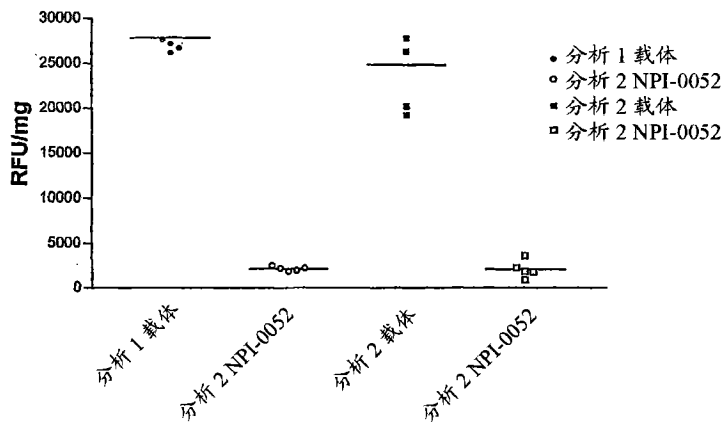


图 42

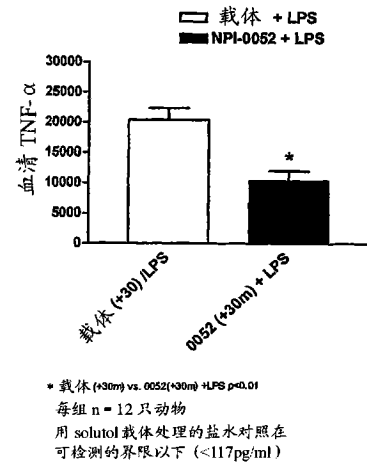


图 43

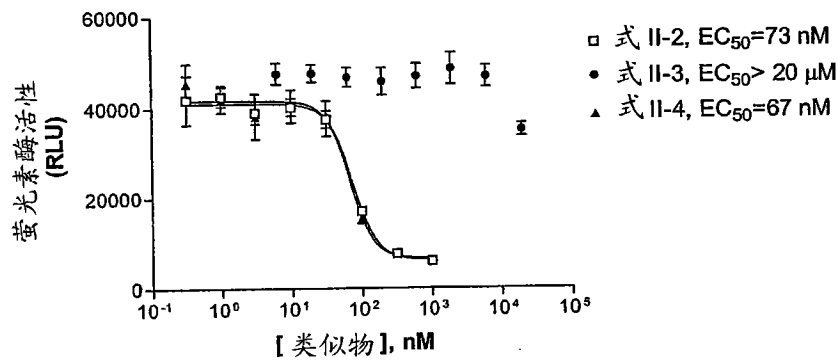


图 44

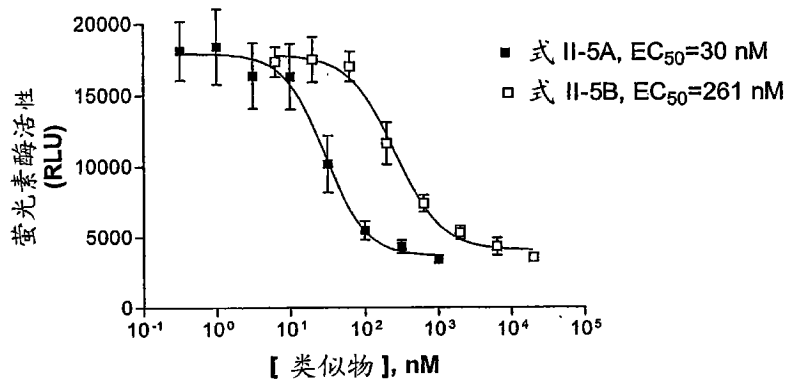


图 45

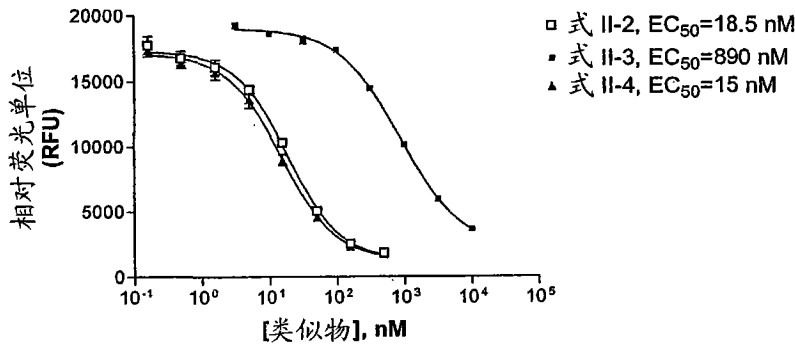


图 46

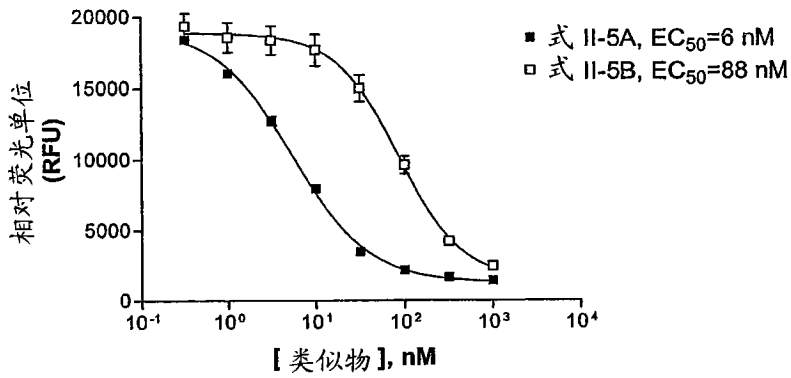


图 47

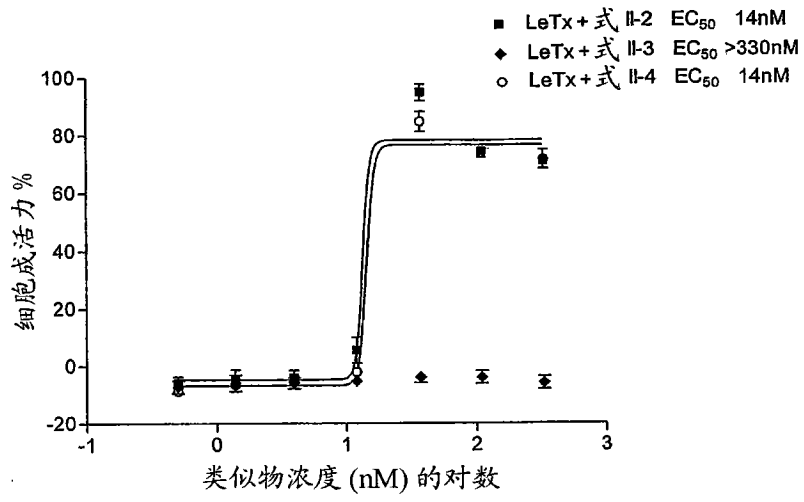


图 48

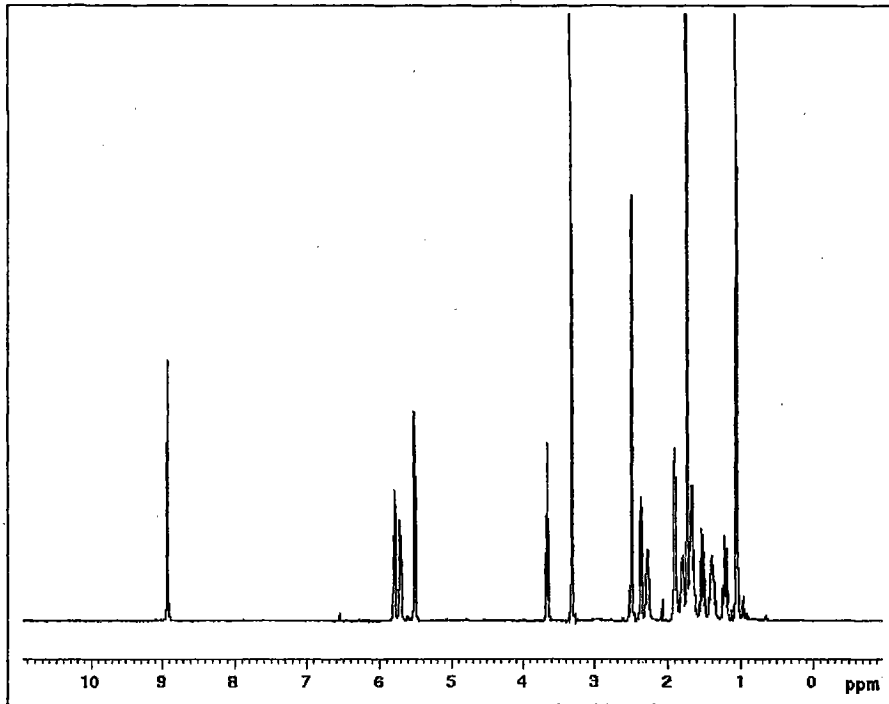


图 49

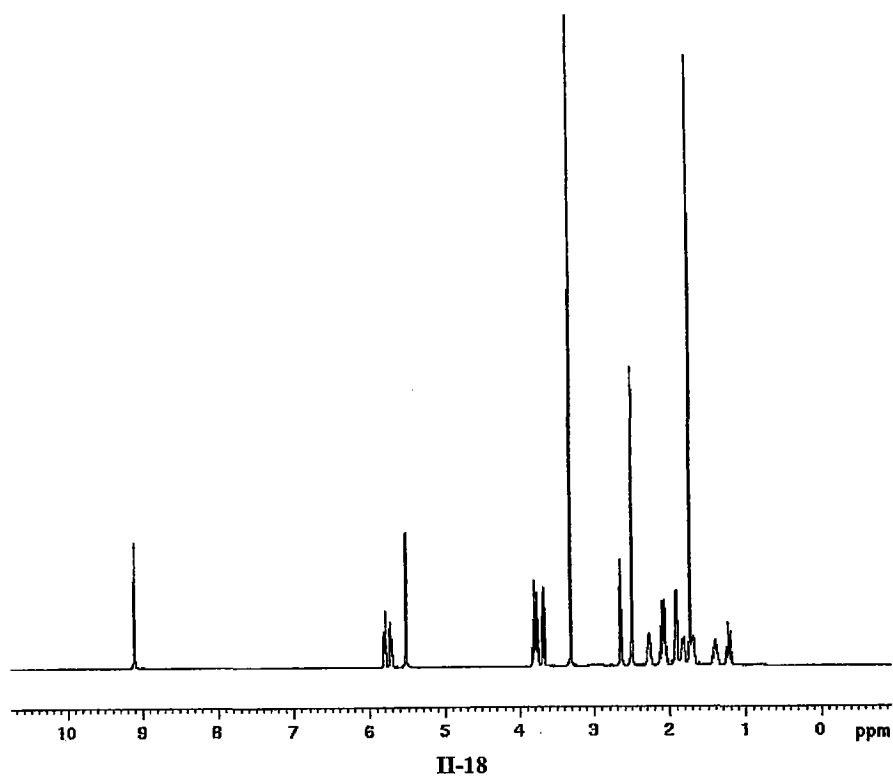


图 50