

申請日期	88. 1. 22
案 號	88-0000
類 別	A61K47/48

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書		
一、發明 名稱	中 文	酵素催化之治療劑
	英 文	"ENZYME CATALYZED THERAPEUTIC AGENTS"
二、發明 人	姓 名	1. H. 麥可 雪帕德 2. 麥可 P. 葛洛茲克
	國 籍	均美國
三、申請人	住、居所	1. 美國加州瑞可聖塔菲市聖塔菲路16825號 2. 美國加州保羅亞特市普里洛斯路153號
	姓 名 (名稱)	美商新生物公司
三、申請人	國 籍	美國
	住、居所 (事務所)	美國加州聖地牙哥市索雷特山谷路第R棟11760號
三、申請人	代 表 人 姓 名	H. 麥可 雪帕德

裝

訂

線

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C 分類：

A6

B6

本案已向：

國 (地區)	申請專利，申請日期：	案號：	， ☐ 有 ☐ 無主張優先權
美國	1998 年 01 月 23 日	60/072,264	☒ 有 ☐ 無主張優先權
美國	1998 年 03 月 05 日	60/076,950	☒ 有 ☐ 無主張優先權
美國	1998 年 11 月 16 日	60/108,634	☒ 有 ☐ 無主張優先權

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

有關微生物已寄存於：

，寄存日期：

，寄存號碼：

裝

訂

線

五、發明說明⁽¹⁾

相關申請案交叉參考之文獻

本申請案依據美國法典 35 U.S.C. § 119(e) 主張美國臨時申請號 60/072,264 ; 60/076,950 ; 及 60/108,634 之優先權，其分別於 1998 年 1 月 23 日、1998 年 3 月 5 日及 1998 年 11 月 16 日申請。該等申請案內容均併於本文供參考。

技術領域

本發明係有關發現醫藥之領域，且詳言之，係設計一種前藥，其為病理細胞中抗治療劑為重要之細胞內酵素之基質且藉細胞內酵素轉化成細胞毒素。

發明背景

全文揭示中，以第一位作者及日期、專利號數或申請號數表示各種公告文獻。各參考文獻之完全書誌引證見於本發明說明書中或說明書末，隨後立即接續申請專利範圍。該等公告揭示併於本文供參考以更完全描述本發明技術狀態。

癌細胞之特徵為無法控制生長、去分化及基因上不安定。不安定性本身表現為異常染色體數、染色體刪除、重排、喪失或複製超出正常二倍體數。Wilson J.D. 等人(1991)。此基因學不安定性可肇因於數種因素。最具特徵之一為喪失腫瘤抑制基因功能時發生之增強基因可塑性(如 Almasan, A. 等人(1995))。基因可塑性本身賦與腫瘤細胞對其改變環境之適應性，使其更經常突變、基因增殖及形成外染色體元素(Smith, K.A. 等人(1995)及 Wilson J.D. 等人(1991))。該等特徵由於可使腫瘤快速發展出對天然宿主

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (2)

抗衡機制、生物治療 (Wilson, J.D. 等人 (1991) 及 Shepard, H.M. 等人 (1988)) 及對化學療法 (Almasan, A. 等人 (1995) 及 Wilson, J.D. 等人 (1991)) 具抗性，而提供導致更聚集惡性之機制。

癌症為全世界最普遍致命之人類疾病之一。以抗腫瘤藥治療為穩定增加重要性之選擇，尤其對全身性惡質病或對通過手術治療率之轉移癌症而言。不幸地，現今修正成治療性治療之次組人類癌種類仍相當少 (Haskell, C.M. 編輯 (1995), 32 頁)。發展可治癒人類癌之藥物進展相當緩慢。惡性腫瘤相對於其基因、生物學及生物化學以及對治療之主要或治療誘發抗性而言之異質性減緩了治療性治療。再者，許多抗腫瘤藥僅呈現低程度之選擇性，經常引致嚴重或甚至危及生命之毒性副作用，因此避免施用足以殺死所有癌細胞之高劑量。因此研究對治療抗性病理之惡性細胞具改良選擇性之抗腫瘤劑之研究仍為藥物發展之中心課題。此外，對抗生素之普及抗性變為重要之全世界健康爭論點 (Segovia, M. (1994) 及 Snyderman, D.R. 等人 (1996))。

化學治療劑種類

試劑主要種類包含烷化劑、抗腫瘤抗生素、植物生物鹼、抗代謝物、激素激動劑及拮抗劑及各種 miscellaneous 劑。參見 Haskell, C.M. 編輯 (1995) 及 Dorr, R.T. 及 Von Hoff, D.D. 編輯 (1994)。

典型烷化劑為具有以烷基取代某種有機化合物氫原子之能力之高反應性化合物。核苷酸 (主要為 DNA) 之烷化反應

五、發明說明 (3)

對大部份該等化合物為重要之細胞毒素作用。引起之損害將干擾 DNA 複製及 RNA 轉錄。典型烷化劑包含氮芥 (mechlorethamine)、苯丁酸氮芥 (chlorambucil)、苯丙氨酸氮芥 (melphalan)、環磷醯胺 (cyclophosphamide)、依氟沙胺 (ifosfamide)、噻替哌 (thiotepa) 及馬利蘭 (busulfan)。數種非典型烷化劑亦損及 DNA 及蛋白質，但係經由多種且複雜機制如甲基化或氯乙基化反應，其不同於典型之烷化劑。非典型烷化劑包含氮烯咪胺 (dacarbazine)、卡氮芥 (carmustine)、環己亞硝脲 (lomustine)、順氯氮鉑 (cisplatin)、卡氮氮鉑 (carboplatin)、甲基苄胍 (procarbazine) 及阿卓胺 (altretamine)。

許多臨床可用之抗腫瘤藥為土壤真菌鏈霉菌 (Streptomyces) 各種菌株之天然產物。其藉一或多種機制產生其殺腫瘤效果。所有抗生素均可結合 DNA，一般係藉插入作用，隨後解開該螺旋。此扭曲損及 DNA 合成或 RNA 合成或兩者之模板之能力。該等藥物亦可因為形成游離基及螯合重要之金屬離子而損害 DNA。其亦可作為模拓異構酶 II (對細胞門為重要之酵素) 之抑制劑。此類藥物包含多魯比辛 (doxorubicin) (阿霉素 (Adriamycin))、紅比霉素 (daunorubicin)、依多霉素 (idarubicin)、米多山酮 (mitoxantrone)、博來霉素 (bleomycin)、達汀諾霉素 (dactinomycin)、絲裂霉素 C (mitomycin C)、摺皺霉素 (plicamycin) 及鏈脲菌素 (streptozocin)。

植物已提供有些最有用之抗腫瘤藥。此類中三群藥劑為

五、發明說明 (4)

長春花(Vinca)生物鹼(長春新鹼及長春鹼)，表鬼白脂素(依托普塞(etoposide)及泰尼普塞(teniposide))及帕利塔西(paclitaxel)(Taxol)。長春花生物鹼結合至見於分裂細胞及神經系統中之微管蛋白質。此結合改變了微管蛋白加成之動力並在有絲分裂紡錘體端處喪失，最終導致遏止有絲分裂。表鬼白脂素抑制樸拓異構酶 II 因此對細胞功能具相當影響。帕利西塔對微管具有複合效果。

抗代謝物為細胞功能及複製所需之正常代謝物之結構類似物。其一般藉與細胞酵素相互作用而作用。已發展且經臨床測試之許多抗代謝物為氮甲蝶呤(methotrexate)、5-氟脲嘧啶(5-FU)、5-氟去氧尿苷(FUDR)、阿糖胞苷(cytarabine)、6-巰基嘌呤(6-MP)、6-硫代鳥嘌呤、去氧冠法霉素(deoxycofomycin)、氟達明(fludarabine)、2-氟去氧腺苷及羥基脲。

內分泌控制為數種贅生疾病之有效療法。已發展廣泛種類之激素及激素拮抗劑供有效用於腫瘤學。可提供之激素劑實例為二乙基己烯雌酚(diethylstilbestrol)、塔莫西芬(tamoxifen)、甲地氫朵酮乙酸酯、地塞米松(dexamethasone)、潑尼松(prednisone)、胺基苯乙哌啶酮(aminoglutethimide)、白脯來(leuprolide)、谷色啉(goserelin)、氟它醯胺(flutamide)及歐托泰德乙酸鹽(octreotide acetate)。

現行化學治療劑之缺點

使用化學治療劑治療癌症之現行問題為需要高劑量；對

五、發明說明(5)

正常細胞具毒性，亦即缺乏選擇性；免疫抑制；二次惡化；及藥物抗性。

現今用於癌症治療之藥劑主要係藉抗增殖之機制而作用。由於許多正常細胞種類(如結腸表皮、造血細胞)具高增殖速率而產生毒性。由於宿主毒性，須在比殺死所有存活腫瘤細胞所需劑量更低之劑量斷續治療。

現今療法引起之另一副作用為化學治療對最快速分裂之正常宿主組織如骨髓、腸黏膜及淋巴系統細胞具毒性作用。此藥劑亦有各種其他不利作用，包含神經毒性；對性慾及性腺功能之負面影響；及心臟、肺、胰及肝毒性；血管及過度敏感反應性及皮膚學反應。

表 1

正常及腫瘤乳房表皮細胞對多魯比辛化療法具相等敏感性

細胞或組織	樣品數	平均 IC ₅₀
正常乳房細胞	13	14.8±8.7 ng/ml
原發性癌(UT)	19	11.4±6.8 ng/ml
轉移性癌(UT)	4	36±26.3 ng/ml
轉移性癌(Rx)	10	19.8±12.7 ng/ml

得自 Smith 等人之 JNC1 74:341-347 (1985)。

血液毒性為許多臨床實務中所用抗腫瘤藥最危險形態之毒性。其最普遍形態為嗜中性白血球減少症，而伴隨高感染危險性，但亦可發生血小板減少症及出血且將危及生命。化學療法在多形核白血球及血小板兩者功能中亦可誘

五、發明說明(6)

發性質缺陷。造血素生長因子已發展成解決該等重要副作用。Wilson, J.D. 等人(1991)及 Dorr, R.T. 及 Von Hoff, D.D. 編輯(1994)。

大部份普遍使用之抗腫瘤劑為可同時抑制細胞及體液免疫性。感染普遍引起病患因癌增進而死亡且受損之免疫性為此種死亡之原因。慢性顯現之免疫抑制作用亦源自癌化學療法。

主要形態之神經毒性為蜘蛛膜炎；脊髓病或腦脊髓病；慢性腦病及嗜眠徵候群；急性腦病；末梢神經病；及急性腦徵候群或運功失調。

許多普遍使用之抗腫瘤劑為突變及畸形。有些(包含普卡巴吡(procarbazine)及烷化劑)為致癌性。此致癌潛能主要見於以多官能性烷化劑及樸拓異構酶 II 如依托普塞及蒽環素抗生素治療之病患中有延遲之急性白血病。化學療法亦伴隨有延遲之非霍奇金氏淋巴瘤及實心腫瘤。本發明由於前藥僅在腫瘤細胞內被活化因此可減少該等作用。

化學治療劑之臨床利用性嚴重地受限於抗該等藥之惡性細胞發生。數種細胞機制可能涉及藥物抗性，亦即藥物代謝改變、細胞對活性化合物之不滲透性或加速藥物自細胞消除、受抑制酵素之改變特異性、增加標的分子產生、增加細胞毒素損害之修復、或受抑制之反應藉另一種生化途徑而旁通。有些例中，對一種藥物之抗性可賦與對其他生化學上不同之藥物之抗性。對癌症抗性之另一種機制，化學療法經由腫瘤抑制基因尤其是 p53、RB 及 p16 之功能

五、發明說明 (7)

喪失而作用。該等基因產物功能喪失引致慣由抗腫瘤藥 (如 5FU/胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶及氮甲蝶呤/二氫葉酸酯還原酶) 所到達之酵素之反抑制表現 (Lee, V. 等人 (1997), Exp. Cell Res. 234:270-6; Lenz, H.J. 等人 (1998), Clinical Cancer Res. 4:1227-34 (1998), Fan, J. 及 Bertino, J. (1987), Oncogene 14:1191-200)。某種基因之擴增涉及對生物及化學療法之抗性。編碼二氫葉酸酯還原酶之擴增與對氮甲蝶呤之抗性有關, 而編碼胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶之基因之過度表現/擴增與對 5-氟嘧啶治療之抗性有關。Smith (1995)。表 2 概述對生物及化學療法具抗性之有些顯著酵素。

表 2

對腫瘤化學療法抗性中過度抑制之酵素

酵素	生物或化學療法	參考(實例)
胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶	以尿嘧啶為主	Lonn, U. et al. Cancer 77:107, 1996
	以葉酸酯為主	Kobayashi, H. et al. Jpn. J. Cancer Res. 86:1014, 1995
	以喹唑啉為主	Jackman, AL et al. Anticancer Drug Des. 10:573, 1995
二氫葉酸酯還原酶	以葉酸酯為主	Banerjee, D. et al. Acta Biochem Pol. 42:457, 1995
		Bertino, J.R. et al. Stem Cells 14:5,

五、發明說明 (8)

		1996
酪氨酸激酶	TNF- α	Hudziak, R.M. et al. PNAS 85:5102,
	多藥物抗性	1988
		Stuhlinger, M. et al. J. Steroid
		Biochem 49:39, 1994
MDR-引起之蛋白質 (ABC P-gp 蛋白質)	多藥物抗性	Simon, S.M. and Schindler, M. PNAS
		91:3497, 1994
		Gottesman, M.M. et al. Annu. Rev.
		Genet. 29:607, 1995
CAD*	PALLA**	Smith, K.A. et. al. Philos. Trans. R.
		Soc. Lon. B. Biol. Sci. 347:49, 1995
		Dorr, R.T. and Von Hoff, D.D., eds.
		"Cancer Chemotherapy Handbook"
		2nd ed. (Appleton and Lange 1994),
		pp. 768-773
樸拓異構酶 I (結腸及前列腺癌)	喜樹鹼	Husain et al. Cancer Res. 54:539, 1994
核糖核苷酸還原酶	羥脲	Wettergren, Y. et al. Mol. Genet.
		20:267-85, 1994
		Yen, Y. et al. Cancer Res. 54:3686-91,
		1994

* CAD = 胺甲鹽基-P 合成酶，天冬氨酸轉胺甲酸酶，二氫
乳清酸酶

** PALA = N-(磷鹽乙鹽基)-L-天冬氨酸酯

五、發明說明（ 9 ）

使用前藥增強化學治療劑選擇性

長久以來已知悉抗腫瘤劑具不良選擇性並嘗試改良選擇性並且大多數為投與更大劑量。已發展出前藥之解決方式。前藥為具溫和毒性但於體內可轉化或治療活性產物之化合物。有些例中，係藉由非內源性酵素輸送至抗體標的之細胞之作用產生活化作用("ADEPT"或抗體依存性酵素前藥治療法(U.S.P 4,975,278))或藉基因標的作用而產生活化作用("GDEPT"或基因依存性酵素前藥治療法(Melton, R.G. 及 Sherwood, R.F. (1996))。該等技術因其出血及滲透腫瘤之能力而有嚴格限制。Connors, T.A. 及 Knox, R.J. (1995)。

據此，需要可滲透腫瘤並抑制可發展成對治療抗性之癌細胞增殖及/或殺死該細胞之更具選擇性之藥劑。本發明滿足此需求亦提供相關優點。

發明概述

本發明提供一種鑑定潛在治療劑之方法，係使標的或測試細胞與在細胞中為標的酵素之選擇性基質之候選治療劑或前藥接觸。此新穎方法稱為"ECTA"，為酵素催化之治療劑(Enzyme Catalyzed Therapeutic Agents)。一具體例中，標的酵素為過度表現且賦與生物及化學治療劑抗性之內源性細胞內酵素。於另一具體例中，因腫瘤抑制劑功能喪失結果，(Smith, K.A. 等人(1995)及 Li. W. 等人(1995))及/或因事前曝露至化療法中之選擇作用(Melton, R.G. 及 Sherwood, R.F. (1996)及 Lonn, U. 等人(1996))使酵素活性於腫瘤細胞中大為增加另一具體例中，標的酵素為細胞中感染劑之表現產

五、發明說明(10)

物。

細胞於活體外及/或活體內與候選前藥接觸後，注意藥劑是否引起細胞增殖減少或藥劑是否殺死細胞而分析藥劑對細胞之效力。本發明另一目的中，前藥係藉標的酵素自前藥釋出毒性副產物而殺死細胞或抑制細胞增殖。本發明又一目的中，可使用一或多種"標的酵素"活化前藥使其釋出毒性副產物。

本發明另一目的包含用以分析具有本文所述對標的酵素具有之特徵之新穎前藥之套組。此套組包括該試劑及完成分析及分析該結果之指示。

本發明亦提供選擇性殺死致病細胞之方法及分子實例，係使該細胞與為標的酵素(如前述定義之內源細胞內酵素)之選擇性基質之前藥接觸。基質藉細胞內標的酵素而特異地轉化成細胞毒素。本發明另一目的中，最初反應之產物隨後藉一般細胞酵素如醃酶、磷酸酶或其他"持家(housekeeping)"酵素(Voet 等人(1995))或一般細胞構成物(如水)完全活化，以自前藥釋出毒性副產物。

本發明又提供一種對受療者治療具有病理過度增殖性細胞之病理特徵之方法，係對受療者投與為標的酵素之選擇性基質之前藥，並於過度增殖之細胞中藉酵素選擇性轉化成細胞毒素。本發明前藥可單獨使用或與其他化學治療劑或與他種抗腫瘤療法如輻射組合使用。

本發明又一目的為製造用於治療具病理過度增殖細胞病徵之受療者病理之醫藥之方法，係對受療者投與標的酵素

五、發明說明 (11)

之選擇性基質之前藥，並於過度增殖細胞中藉酵素選擇性轉化成細胞毒素。

本發明再一目的為鑑定對受療者最適療法之方法，係單離過度表現內源細胞內酵素之細胞並使細胞與至少一種本發明前藥，接著鑑定何者前藥可抑制細胞增殖或殺死細胞，因而鑑定對受療者最佳之療法。

圖式簡單說明

圖 1 顯示細胞中對抗癌形式之抗性發展及結果。

圖 2 圖示本發明前案之活化途徑。

圖 3 圖示顯示由藥物抗性中具重要性之細胞內酵素所活化之前藥之高產量篩選。

圖 4 圖示顯示使用 TS-陰性大腸菌作為細胞標的如何發現引導人類胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶(TS)前藥。

圖 5 顯示如何使用此篩選同時使前藥對兩種標的酵素反應性最適化之實例。

圖 6 顯示供產生胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶(TS)-可活化前藥之多分配基質之一具體例。

方塊 1 代表隱蔽或不存在之磷酸酯基 R^7 。若隱蔽時，為可加速細胞進入並可以細胞內加工成可結合至 TS 之單磷酸酯之磷醯胺酯或類似衍生物。參見 Fries, K. M. 等人 (1995)。若不存在時， R^7 為氫原子且前藥為細胞胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯(TK)之基質，其於體內產生必要之單磷酸酯。

方塊 2 為 2'-脫氧核糖呋喃糖基或其他類似糖、硫糖、

五、發明說明 (12)

碳環或非環狀基，其以支撐前藥官能基結合至 TS 且當 R^7 為氫原子時則結合至 TK 之方式使單磷酸酯連接至嘧啶環。此基不須要利用到附接至方塊 1 之 R^7 基之氧原子，因此，糖磷酸酯之磷酸酯類似物為可接受者。

方塊 3 代表鏈基，基中 n 為 0 至 10 之整數，亦即作用以使電子自嘧啶環脫離且當前藥藉 TS 作用時可朝向離去基 R^4 之單-或多不飽和電子導管。此鏈基由 0 至 10 個不飽和部份所構成，如丙烯酸乙酸基、乙炔基、亞胺或偶氮單元或環狀不飽和、芳族或雜芳族基，其可混合及密接，只要其連接性可提供必要之導電子導管即可。

方塊 4 代表間隔單元 X，其中 m 為 0 至 1 之整數，其可使鏈基連接至離去基 R^4 。若方塊 3 之 n 等於 0，則方塊 4 中 m 等於 1。較佳形態中，X 為伸甲基(CH_2)單元，可具有或不具取代基。此外，X 可為氧、硫、氮或其他可形成至少兩個共價鍵之原子。當 X 不存在(方塊 4 中 m 等於 0)時，前藥藉 TS 加工期間離去基 R^4 脫離，留下嘧啶後方之核苷為主之烷化實體，參見 Barr 等人(1983)。當 X 存在(方塊 4 中 m 等於 1)時，在前藥藉 TS 加工期間早期發生離去基 R^4 脫離。

方塊 5 表示因 TS 作用在前藥後所釋出之離去基 R^4 。其本身為毒性抗代謝物或烷化劑或為在活體內易產生毒性抗代謝物或烷化劑之實體。例如，當抗癌劑三乙烯磷醯胺(Tepa)或硫代三乙烯磷醯胺、磷醯胺芥菜、N-乙醯基神經鞘氨醇(C_2 神經醯胺，腫瘤抑制劑脂質或羥基脲(核糖苷還

五、發明說明 (13)

原酶之抑制劑)因 TS 釋出活性代謝物時，離去基 R^4 脫離。離去基 R_1 亦可為 α, α -二鹵化醚，此例中，當 α, α -二鹵化醇因 TS 經歷水解而釋出時，其可提供羧酸基。因此，離去基 R^4 可作為氟乙酸酯、氟檸檬酸酯、丙二酸、甲基丙二酸或 3-硝基丙酸(均為氧化性磷醯化作用之強力抑制劑)之前驅物而脫離。

圖 7 顯示含或不含 HER-2 原癌基因之編碼新黴素抗性之質體所轉染之細胞系之 TS 西方墨點。線(1) MCF7/HER2 ; (2) MCF/7/neo ; (3) MDA-MB-435/HER2 ; (4) MDA-NM-435/neo ; (5) BT-20/HER2 ; (6) BT-20/neo 。

圖 8 顯示前藥化合物與酵素胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶之反應產物。

發明之詳細說明

本發明係藉由利用與對癌細胞之生物及化學療法具抗性有密切關連之有些主要基因組及表現型改變而達成。本發明提供一種供活體內選擇性抑制因曝露至癌治療(包含生物治療如腫瘤壞死因子(TNF)或化學治療)(參考表 2)而經歷選擇作用之細胞之生長及/或殺死該細胞之方法。結果，可藉突變或基因擴增而活化之某種酵素對該藥劑最初或進一步治療具抗性。不似先前技藝之有關產生內源性細胞內酵素之更強效抑制劑之治療法，本發明利用治療抗性之疾病細胞及組織對正常細胞及組織產生之較高酵素活性且未必為抑制該酵素。另一方面，本發明前藥所成功治療之腫瘤細胞之特徵為增強之標的酵素活性且因此具有比不

五、發明說明 (14)

過度表現標的酵素之正常細胞更大潛能使前藥轉化成其毒性態。"標的酵素"一詞用以定義為具有一或多種上述特徵之酵素。

除非另有說明，否則本發明之操作利用本技藝悉知之分子生物、微生物、細胞生物及重組 DNA 之習知技術，參見例如 Sambrook, Fritsch 及 Maniatis，分子選殖：實驗室手冊，第 2 版(1989)；分子生物現行議題(F.M. Ausubel 等人編輯(1987))；酵素學方法(研究院出版工業)；PCR2：實務方法(M.J. MacPherson, B.D. Names 及 G.R. Taylor 編輯(1995))及動物細胞培養(R.I. Freshney 編輯(1987))。

本說明書及申請專利範圍中所用之單數態"-"及"該"包含複數個參考，除非有明確說明。例如"一細胞"包含複數個細胞，包含其混合物。

"有效量"為足以進行有益或所需結果之量。有效量可以一或多次投藥、施用或劑量投與。

本文中，"宿主細胞"、"標的細胞"及"過度增殖細胞"包含藉基因突變或細胞內酵素內源性過度表現而活化之特徵之細胞。有些具體例中，酵素過度表現與腫瘤抑制劑基因產物功能藥物抗性喪失或以病理表現型有關之基因不穩定性有關。數種細胞機制與藥物抗性有關，如藥物改變代謝機制、細胞對活性化合物之不滲透性或加速藥物自細胞消失、受抑制之酵素特異性改變、增加標的分子產量、增加細胞毒性損傷之修復或藉另一種生化路徑旁通抑制反應。活化或過度表現且與藥物抗性相關之酵素包含(但不

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (15)

限於)胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶(TS)(Lönn, U. 等人(1996); Kobayashi, H. 等人(1995); Jackman, A.L. 等人(1995)), 二氫葉酸酯還原酶(Banerjee, D. 等人(1995)及 Bertino, J.R. 等人(1996)), 酪氨酸激酶(TNF- α , Hudziak, R.M. 等人(1998))及多藥物抗性(Stühlinger, M. 等(1994)); Akdas, A. 等人(1996); 及 Tannock, I.F. (1996)); 及 ATP-依存性多藥抗性相關蛋白質(Simon, S.M. 及 Schindler, M. (1994))及於某些疾病包含結腸及前列腺癌中之樸拓異構酶 I(Husain 等人(1994))。或者, 對一種藥物之抗性可對其他生化不同類藥物之抗性。雖然本發明特定指出癌症, 但類似方法可應用於由人類及動物致病原編碼且其中因發展出抗性而使抑制劑無效之酵素。

某種基因之擴增涉及對化學療法之抗性。二氫葉酸酯還原酶(DHFR)之擴增與對氨甲蝶呤之抗性有關, 而編碼胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶之基因擴增與對以 5-氟嘧啶治療三腫瘤抗性有關。與藥物抗性引起之基因擴增可藉述於 Kashini-Sabet 等人(1988), USP 5,085,983 之修正聚合酶鏈反應(PCR)或以本文所述方法偵測並追蹤。所得藥物抗性可藉偵測細胞遺傳異常而追蹤, 如均勻染色體染色區及微小染色體, 兩者均與基因擴增有關。另一種分析包含直接或間接酵素活性分析且兩者均與基因擴增(如 Carreras 及 Santi (1995)); 其他方法(如聚合酶鏈反應, Houze, T.A. 等人(1997)或免疫組織化學(Johnson, P.G. 等人(1997))相關。

或者, 標的細胞之特徵為具有去活化之腫瘤抑制劑功

五、發明說明(16)

能，如視網膜細胞瘤(RB)或 p53 之喪失或去活化，已知可增強 TS (Li, W. 等人(1995))或 DHFR (Bertino, 等人(1996)及 Li, W. 等人(1995))之表現。

本發明之前藥可用以治療或舒緩任何疾病，該疾病中疾病相關酵素與藥物對化學療法之抗性有關，無論是否由於化學療法或組合之活體內選擇作用之腫瘤抑制劑功能喪失。此包含酵素於病理細胞中比正常細胞更過度表現、過度累積或活化，例如 TS 酵素。尤其排除在有些人類腫瘤中顯現偶然升高之酵素谷胱甘肽-S-轉移酶。Morgan, A.S. 等人(1998)。本發明此前藥區別基準為本發明標的酵素於病理細胞中比正常細胞普遍過度表現、過度累積或活化。區別本發明與其他方法最重要之理論為：

(1)本發明描述合成酵素如胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶之基質。過度表現之酵素將產生毒素，尤其在生病細胞中。先前方法依賴抑制劑。抑制劑引致酵素擴大表現且因此對治療產生抗性(參見例如 Lonn, U. 等人(1996))。

(2)本方法亦可與其他"基質-前藥"方法如谷胱甘肽-S-轉移酶酵素有所區別(參見例如 Morgan, A.S. 等人(1998))。GST 族群之酵素以增加量表現，反應於對細胞之毒性傷害。酵素之 GST 族群與基質特性重疊，而使其難以設計出僅與癌細胞中升高表現之單物種酵素具反應性之基質(Morgan, A.S. 等人(1998))。由於本發明各酵素(如胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶、二氫葉酸還原酶及胸腺嘧啶脫氧核苷激酶)之結構及基質特異性為獨特，其易設計獨特基

五、發明說明 (17)

質。胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶之基質數種實例見於本發明說明書中。

(3) 有些例中，編碼標的酵素(如胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶)之基因可經歷突變而對抑制劑產生抗性(Barbour, K.W. 等人(1992)及 Dicken, A.P. 等人(1993))但仍可與非抑制劑基質前藥進行反應。

(4) 本方法進一步優點為腫瘤抑制劑功能喪失對惡性瘤發展具重要性。腫瘤細胞主要喪失 p53、RB 或 p16 之一種腫瘤抑制劑功能。此種喪失導致抗性酵素(如胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶)之表現增加，與先前曝露至化學療法無關。本文所述前藥可用以治療早期惡性瘤及先前以化學療法治療之疾病。酵素如 GST 之基質須要使腫瘤曝露至化學療法中，以充分達到過度表現以賦與最適治療指數之可能性。

藥物分析

本發明提供一種鑑定具有治療過度增殖性或贅生障礙如癌之潛力之治療前之方法。此方法亦可鑑定可抑制細胞生長或過度增殖細胞如癌細胞之細胞胞轉之藥劑。包含之其他細胞為細菌、酵母及引致病患中不適當增殖結果之疾病之寄生細胞。若相對於對照組樣品中之細胞，細胞之增殖、複製或細胞胞轉降低，則藥劑視為潛在之治療劑。最好，細胞被藥劑殺死。細胞可為原核生物(細菌如大腸菌)或真核生物。細胞可為哺乳類或非哺乳類細胞如可引致疾病之老鼠細胞、大鼠細胞、人類細胞、真菌(如酵母)或寄

五、發明說明 (18)

生物(如肺囊蟲(Pneumocystis)或萊什曼原蟲(Leishmania))。

本文中"過度增殖細胞"意欲包含去分化、永存、贅生、惡性、遷移或轉形之細胞。此種細胞實例包含(但不限於)肉瘤細胞、白血病細胞、癌細胞或腺瘤細胞。詳言之,該細胞可為乳癌細胞、肝癌細胞、可偵測之癌細胞、胰癌細胞、食道癌細胞、膀胱癌細胞、卵巢癌細胞、皮膚癌細胞、肝癌細胞或胃癌細胞。另一具體例中,標的細胞可對用以預防或殺死受對習知抗生素具抗性之感染劑感染之細胞之藥物或化合物具抗性。感染劑包含細胞、酵素及寄生物如錐蟲。

本發明目的物之標的酵素特定實例列於下表 2 或 3。該等酵素涉及對化學療法之抗性、為在具有對癌療法具抗性且伴隨有病理或疾病之特徵細胞中內源性活性、過度表現或過度累積者,但不限於如酪氨酸激酶超族或 ATP-依存性 MDR-有關蛋白質、CAD、胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶、二氫葉酸酯還原酶及核糖核苷還原酶之組群之酵素。表 3 列示可於感染疾病中以本方法標的之酵素。

表 3

於感染疾病中過度表現且對藥物具抗性之酵素

酵素	對下列具增加抗性：
β -內醯胺酶	青黴素及其他含 β -內醯胺之抗生素
胺基糖苷酶或胺基糖苷改質酵素	胺基糖苷抗生素(如鏈黴素、慶大黴素)
氯黴素轉乙醯酶	氯黴素
二氫葉酸酯還原酶	甲氧苄氨嘧啶

五、發明說明 (19)

參考：微生物疾病機制，第 2 版，M. Schaechter, G. Medloff, B.I. Eisenstein, 編輯者 TS Satterfield, Publ. Williams 及 wilkins 第 973 頁(1993)。

以本發明方法鑑定之潛在治療劑為酵素基質且在細胞內轉化成細胞內毒素之前藥。本文中"前藥"為比藥物代謝物對標的或過度增殖細胞具較低細胞毒性且可酵素活化或轉化成更活性態之醫藥活性劑或物質之前驅物或衍生物態(參見 Connors, T.A. (1986)及 Connors, T.A. (1996))。藥劑毒性係針對細胞在有病細胞中產生有效生產治療濃度細胞毒素之轉化酵素。

本發明亦提供一種快速且簡單之篩選分析法，其可初鑑定具至少有些所需特徵之化合物。就本發明目的而言，一具體例之一般反應式示於圖 3。此圖式描述如何排列分析及此目的必要之材料。如圖 3 所示，分析需要兩種細胞，第一種為標的酵素未表現或以低量表現之對照組細胞。第二種細胞為測試細胞，其中標的酵素以可偵測量表現，如大量表現。例如非內源性表現標的酵素 TS 之原核生物大腸菌為適宜之宿主細胞或標的細胞。此細胞可具有對照之抗衡部份(缺乏標的酵素)，或於另一具體例中，抗衡部份通常改質至差別性表現標的酵素或諸酵素(含標的酵素之適宜物種)。可使用一種以上之酵素以分別轉導個別宿主細胞，因此可同時比較候選藥物對標的酵素之效果可與其他酵素或得自另一物種之對應酵素之效果。

另一具體例中，使用第三種標的細胞作為對照組，因其

五、發明說明 (20)

接受有效量之化合物例如顯現為強力前藥之下示化合物。此具體例尤其可用以篩選被胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶活化之新穎藥劑。

另一具體例中，轉形細胞系如 ras-轉形之 NIH 3T3 細胞 (ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, U.S.A.) 以工程表現可變及增加量之得自對該酵素編碼之選殖 cDNA 之有用標的酵素。使用本技藝悉知且述於 Chen, L. 等人 ((1996), Hudziak, R.M. 等人 (1998) 或 Carter, P. 等人 (1992) 之程序並述於下列實驗段落中之程序予以瞬間或暫時轉染。插入該 cDNA 之適宜載體可購自 Stratagene, La Jolla, CA 及其他賣方。各轉染細胞系中酵素表現量可藉免疫污點及於細胞溶胞產物中酵素分析而追蹤，可使用先前提出之對免疫偵測之酵素具抗性之單株或多株抗體。例如參見 Chen, L. 等人 (1996) 所述者。表現量可藉導入細胞之數份表現盒或藉改變啟動子用法而調節。偵測表現酵素量之酵素分析亦可如 Carreras, C.W. 及 Santi, D.V. (1995) 所述般或以下列實驗段落所述方法進行。可選擇腫瘤細胞系以表現增進量之胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶 (如 Copur 等人 (1995) 所述之結腸腫瘤細胞)。

如上所述，含所需基因缺陷之細胞可得自冷泉港農業研究服務菌種收集中心或美國菌種收集中心。適宜菌株亦可使用 Miller (1992), Sambrook 等人 (1989) 及 Spector 等人 (1997) 所述標準技術，藉由對細胞插入可編碼標的酵素之基因而製備。生長分析可藉 Miller (1992), Sugarman 等人 (1985) 及

五、發明說明 (21)

Spector 等人(1997)所述標準方法進行。

熟悉本技藝者將了解圖 3 所示之篩選可廣泛用於發現抗生素。例如得自酵母之胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶可替代圖 4 中之大腸菌。此可發現可標的酵母相關致病原之特定抗真菌抗生素。此外，其他酵素可進行此處理。例如，可選用可特異標的感染劑(如卡林肺囊蟲)之二氫酸酯還原酶活性之前藥。該等藥劑將選擇對標的酵素具特異性且可顯示利用圖 3 所示篩選分析而不活化天然宿主之酵素。對照之細胞構成物含有對應之正常人類酵素，以在僅存在正常人類酵素時可顯現毒性缺乏。

例如且如圖 4 所示，外來基因如編碼 TS 之人類基因可插入宿主細胞中，而表現人類 TS。此基因工程後之細胞在圖 3 中稍為"測試細胞"。"對照細胞"不表現該標的酵素。有些具體例中，須要以標的酵素之蛋白質產物補充培養基。

另一具體例中，野生型宿主細胞不足或無法表現一種以上之有用酵素。如圖 4 所示，宿主細胞無法內源性產生胸腺嘧啶脫氧核苷酸激酶(TK)或胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶(TS)。對該等細胞之人類抗衡部份編碼之基因導入該宿主細胞中，得到所需之表現量。各轉染細胞系中酵素表現量可藉本文所述方法追蹤，如藉細胞溶胞產物中之免疫污點及酵素分析，使用前述對免疫偵測之酵素具抗性之單株或多株抗體。例如參見 Chen, L. 等人(1996)所述者。酵素分析亦可如 Carreras, C.W. 及 Santi, D.N. (1995)所述使用可偵測之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (22)

標記取代基如氘標記之取代基進行。"兩種酵素"系統之可能優點為藉主要在腫瘤細胞中過度表現之兩種酵素活化之需求可對正常細胞提供增進之安全性。

測試細胞於小的多洞盤中生長並用以偵測測試前藥之生物活性。本發明目的而言，成功之候選藥物將阻斷測試細胞生長或殺死該細胞，但留下未受損之對照細胞。

候選前藥可直接加至細胞培養基中或預先共軛至對細胞表面受體具特異性之配位體上，再添加至培養基中。供細胞特異輸送之共軛方法為本技藝悉知者，例如參見 SUP 5,459,127 ; 5,264,618 ; 及公告之專利說明書 WO 91/17424 (1991 年 11 月 14 日公告)。候選前藥之離去基可以例如氘偵測地標記。接著分析標的細胞或培養基自候選前藥中釋出之釋記量。或者，可使用 Lasic, D.D. (1996) 所述方法或與 Lewis, J.G. 等人(1996)所述之 cytofectins 組合，將前藥填入脂質體中而增強細胞吸收。

另一具體例中，過度表現有用(如標的)酵素之培養人類腫瘤細胞如上述般鑑定。細胞在有利於將藥劑併入細胞之細胞內分室之條件下與潛在治療劑接觸。接著分析細胞抑制細胞增殖或殺死細胞之作用。

須了解，雖然未明白陳述，但各具體例可藉提供另一種標的細胞而如接受有效量化合物(如下列所示為強力前藥之化合物)之對照組般作用加以進一步改質。

鑑定生物活性化合物之高篩選生產量概略於圖 3、4 及 5。測試基準為易使大腸菌及類似之單細胞有機體(如酵

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明（23）

母)基因擴增及生長，參見 Miller (1992) 及 Spector 等人 (1997)。主要步驟為移除對應於供前藥設計之酵素標的之內源性酵素活性。此可藉 Miller (1992)、Sambrook 等人 (1989) 或 Spector 等人 (1997) 所述任何方法進行。該等方法包含化學及生物(如病毒或 transposon 插入體)突變作用，接著進行適宜之選擇程序。接著 TS 陰性(TS⁻)細胞變成對前藥鑑定為負對照組，當藉胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶作用時，會變成細胞毒素。對其他種細胞如其他細菌、酵母或其他可選擇之單細胞有機體可進行類似方法。此分析中，可比較對照組及重組有機體兩者對測試化合物之敏感性。如熟悉本技藝者所了解，區別酵素物種之前藥亦可得自此程序。例如，表現人類及酵母酵素之相同細胞可用以偵測僅對表現酵母酵素之細胞具主要毒性之抗生素前藥。此方式中，可發現新穎且特異之抗生素。

舉例之細胞系為 ras-轉形之 HIH 3T3 細胞(得自 ATCC)及以工程方式表現選殖之 cDNA 之增加量之人類胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶(Hu TS)。轉染係作成暫時性或永久性基準(參見 Chen, L. 等人(1996)，Hudziak, R.M. 等人(1988)及 Carter, P. 等人(1992))。NIH-000 (ras-轉形之母細胞系)；NIH-001 (HuTS 之高表現物)；NIH-002 (HuTS 之中間表現物)；NIH-003 (HuTS 之高表現物)。TS 於各細胞系中之表現量係藉細胞溶胞產物中免疫污點及酵素分析，使用所指抗體相對免疫偵測用之 HuTS 蛋白質而追蹤(如 Chen, L. 等人(1996))所述。酵素分析如 Carreras 及 Santi (1995)所述

五、發明說明 (24)

般進行。

人類結腸直腸及乳房腫瘤細胞系篩選對 HuTS 酵素之表現。發現低度中度及高度量 HuTS 之細胞系將曝露至前述供 NIH 3T3 細胞系用之候選藥物中。如上述般追蹤生長抑制劑作用及細胞毒性。對表 1 所列各酵素進行類似測試。

取腫瘤細胞中 TS 過度表現之優點之前藥另一具體例為脫氧尿苷磷醯胺酯或與治療性放射核苷共軛之其他改質作用(本文所列)。治療性放射核苷實例為銻 188。同位素可如 Callahan 等人(1989)所述般合成。或者,可購自例如荷蘭之 Mallicrodt 醫藥 BV。治療性放射核苷可以標準方法(例如 Lin, W-Y 等人(1997)所述)與脫核尿苷、或脫氧尿苷 5'-磷醯胺酯或其他衍生物共軛。含放射核苷之脫氧尿苷磷醯胺酯將可優勢地吸入過度表現胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶之腫瘤細胞 DNA 中,並經由集中放出 β 及 γ 輻射令其死亡。另一種放射核苷包含銻-186等(Troutner, D.A. (1987))。

活體內投藥

於帶有人類腫瘤或受抗生素抗性微生物感染之動物模型確認活體外分析以決定活體內效率。

本發明另一目的為治療於受療者中具有過度增殖細胞特徵之病理之方法,包括對受療者投與治療量之前藥,該前藥可於過度增殖細胞中藉本文定義之內源性細胞內酵素轉化成毒素。於較佳具體例中,化合物係選自"前藥"段落中定義之化合物。

當前藥投與受療者如小鼠、老鼠或人類病患時,藥劑可

五、發明說明 (25)

添加至醫藥可接受性載體中並全身性或局部對受療者投藥。

爲了決定可有利治療之病患，自病患切除腫瘤樣品並分析細胞對有用酵素表現之量。若表現高於正常細胞所表現者因此前藥毒性量可引致投藥但無不利副作用時，則腫瘤或細胞可決定爲有利治療，且因此病患適用於本發明療法。例如若標的酵素比正常細胞表現至少高約 2 倍且較好高約 3 倍，則病患爲適於本發明治療方法之受療者。治療量可以實驗決定，且將隨欲治療之病理、欲治療之受療者及轉化之前藥或細胞毒素之毒性而異。

當輸送至動物時，此方法可用以進一步確認前藥之效力。動物模型實例，裸毛小鼠群 (Balb/c NCR nu/nu 雌性，Simonsen, Gilroy, CA) 各以皮下接種約 10^5 至約 10^9 過度增殖之癌或本文定義之標的細胞。當建立腫瘤時，藉例如皮下注射腫瘤周圍而投與前藥。每週 2 次以 venier 測徑器以二維方式測量腫瘤以測定腫瘤減小。若適宜亦可使用其他動物模型。Lovejoy 等人 (1997) 及 Clarke, R. (1996)。

活體內投藥可以一劑量在治療過程連續或間歇性進行。決定最有效投藥方式及劑量之方法爲本技藝者悉知者且隨用以治療之組合物、治療目的、欲治療之標的細胞及欲治療之受療者而異。以劑量程度可以單次或多次投藥且由治療醫師加以選擇。適宜劑量配方及投藥方法說明如下。

本發明藥劑及組合物可用於醫藥製造並藉習知程序如活性成分於醫藥組合物中投藥供治療人類及其他動物。

五、發明說明 (26)

醫藥組合物可口服、經皮、非經腸道或吸入治療而投藥且可製成錠劑、錠片、顆粒、膠囊、丸粒、安瓿、栓劑或氣溶膠態。其亦可製成活性成分於水性或非水性稀釋劑中之懸浮液、溶液及乳液，糖漿、顆粒或粉末。除了本發明化合物以外，醫藥組合物亦可含有其他醫藥活性化合物或複數種本發明化合物。

詳言之，本發明化合物在本文中亦可表示為活性成分，可以任何適宜路徑包含口服、直腸、鼻、局部（包含經皮、氣溶膠、頰內及舌下）、陰道、非經腸道（包含皮下、股肉內、靜脈內及皮內）及肺部治療法投藥。亦知較好之路徑將隨受療者病況及年齡及欲治療疾病而異。

通常，上述各化合物之適宜劑量為每天每公斤病患體重約 1 至約 100 毫克，較好每天每公斤病患體重約 1 至 50 毫克且最好每天每公斤病患體重約 1 至約 25 毫克。除非另有說明，活性成分所有重要均以本發明母化合物計算其鹽或酯，重量可按比例增加。所需劑量較好在全天中以適當間隔分 2、3、4、5、6 或更多次副劑量投藥。該等副劑量可以單位劑型投藥，例如每單位劑量型含約 1 至約 100 毫克、較好約 1 至高於約 25 毫克且最好約 5 至約高於 25 毫克活性成分。將了解適宜劑量之本發明化合物及組合物可視疾病種類及嚴重性及階段而定且各病患可不同。決定最適劑量通常包含使治療效益與本發明治療之任何危險性或不利副作用間達平衡。

理想上，前藥須投藥至在疾病部位上達最高濃度之活性

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

五、發明說明 (27)

化合物。此可藉例如靜脈內注射前藥(視情況含於食鹽水中)或口服投藥(例如含活性成分之錠劑、膠囊或糖漿)而達成。前藥所需之血中量可藉連續灌注予以維持以在疾病組織內提供治療量之活性成分。企圖使用操作性組合以提供比各個別治療化合物或藥物單獨使用時所須之劑量更低之各成分抗毒劑之總劑量治療組合，因而降低不利效果。

雖然可能單獨投與前藥成分，但較好如上述般呈含有至少一種活性成分及一或多種醫藥可接受性載體及視情況之其他治療劑之醫藥配方形式存在。各載體須為"可接受性"，意指可與配方其他成分相容且不損及病患者。

配方包含適於口服、直腸、鼻內、局部(包含經皮、頰內及舌下)、陰道、非經腸道(包含皮下、肌肉內、靜脈內及皮內)及肺部投藥者。配方可使利地呈單位劑型且可以醫藥領域悉知之任何方式製備。此種方法包含使活性成分與構成一或多種輔助成分之載體混合。通常，配方係使活性成分均勻且緊密與液體載體或細粒固體載體或兩者混合且接著若需要予以成型而製得。

適用於口服之本發明配方可呈不連續單位，如膠囊、扁囊劑或錠劑，各含預定量之活性成分；粉末或顆粒；於水性或非水性液體中之溶液或懸浮液；或水包油液體乳液或油包水液體乳液。活性成分亦可製成丸粒、糖果劑或糊膏。

錠劑可藉視情況含一或多種輔助成分而壓縮或模製製得。壓縮錠劑亦可於適宜機器中壓縮呈自由流動態如粉末

五、發明說明 (28)

或顆粒之活性成分，視情況與黏合劑(如聚吡咯烷酮、明膠、羥丙基甲基纖維素)、潤滑劑、惰性稀釋劑、保存劑、崩解劑(澱粉乙醇酸鈉、交聯聚乙烯吡咯烷酮、交聯羧甲基纖維素鈉)、表面活性劑或分散劑混合而製備。模製錠劑可於適宜機器中模製以惰性液體稀釋劑溼潤之粉化合物混合物而製得。錠劑可視情況包衣或作記號且可調配成使用例如各種比例之羥丙基甲基纖維素製成緩釋或控制釋出活性成分之配方以提供所需之釋出輪廓。錠劑可視情況提供有腸包衣以提供在胃以外之消化道內釋出。

適於口中局部投藥之配方包含含有活性成分之矯味基劑(通常為蔗糖及阿拉伯膠或西黃蓍膠)之舌錠；含活性成分之惰性基劑(如明膠及甘油酯，或蔗糖與阿拉伯膠)之含藥錠；及含活性成分之適宜惰性液體之漱口液。

本發明用以局部投藥之醫藥組合物可調配成軟膏、乳霜、懸浮液、乳液、粉末、溶液、糊膏、凝膠、噴霧劑、氣溶膠或油。或者，配方可包括貼片或繃帶，如溼潤有活性成分及視情況一或多種賦形劑或稀釋劑之繃帶或黏著貼膏劑。

對眼睛或其他外部組織如口腔及皮膚之疾病而言，配方較好以含例如約 0.075 至約 20% w/w，較好約 0.2 至約 25% w/w 且最好約 0.5 至約 10% w/w 量之活性成分之局部軟膏或乳霜。當調配成軟膏時，前藥可與石蠟或水可溶混軟膏基劑一起使用。或者前藥成分可以水包油乳霜基劑調配成乳霜。

五、發明說明 (29)

若需要，乳霜基劑之水相可包含例如至少約 30% w/w 多元醇，亦即含 2 或多個羥基之酸，如丙二醇、丁-1,3-二醇、甘露糖醇、山梨糖醇、甘油及聚乙二醇及其混合物。局部配方較好包含可增進前藥成分吸收或滲透皮膚或其他受影響區之化合物。此種皮膚滲透增進劑實例包含二甲基亞砷及相關類似物。

本發明乳液之油相可依已知方式自己知成分構成。雖然此糊膏可僅包含括乳化劑，但較好包括至少一種乳化劑與脂或油或與脂及油兩者之混合物。較好親水性乳化劑與親脂性乳化劑一起作為安定劑。亦較好包含油及脂兩者。含或不含安定劑之乳化劑一起構成所謂之乳化蠟，且該蠟與油及/或脂一起構形成乳霜配方油性分散相之所謂乳化軟膏基劑。

適用於本發明配方之乳化劑及乳液安定劑包含 Tween 60, Span 80，鯨蠟硬脂醇、肉豆蔻醇、單硬脂酸甘油酯及月桂基硫酸鈉。

選擇配方之適宜油或脂係基於達成所需化粧品性質，因活性成分在一般用以醫藥乳液配方之大部份油中溶解度非常低之故。因此乳霜較好須非油脂、非污著且具適宜黏度之可洗除產品以避免自管體或其他容器中滲漏。可使用直鏈或分支鏈單-或二-鹼式烷酯如二-異己二酸酯、硬脂酸異鯨蠟酯、椰子脂肪酸之丙二醇酯、肉豆蔻酸異丙酯、油酸癸酯、棕櫚酸異丙酯、硬脂酸丁酯、棕櫚酸 2-乙基己酯或已知為 Crodamol CAP 之分支鏈酯摻合物，以後三種為較佳

五、發明說明 (30)

酯。其可視所需性質而單獨或組合使用。或者，可使用高熔點脂質如白色軟石蠟及/或液體石蠟或其他礦油。

適用於對眼睛局部投藥之配方亦包含其中活性成分溶於或懸浮於適宜載體(尤其是前藥成分之水性溶性)之眼滴劑。前藥成分於此配方中存在濃度較好約 0.5 至約 20%，宜約 0.5 至約 10%，尤其約 1.5% w/w。

直腸投藥之配方可呈含適宜基劑(包括例如椰子脂或水楊酸酯)之栓劑。

適於陰道投藥之配方可呈除了含前藥成分以外尚含本技藝悉知適宜載體之栓劑、棉球、乳霜、凝膠、糊膏、泡沫或噴霧配方。

適於鼻內投藥之配方，其中載體為固體者，包含粒徑約例如 20 至約 500 微米而以經由鼻道自裝載粉末之容器緊閉鼻口快速吸入之方式投藥之粗粉末。其中載體為液體且以例如鼻噴霧、鼻滴劑或以霧化器經氣溶膠投藥之適宜配方包含前藥成分之水性或油性溶液。

適於非經腸道投藥之配方包含可含有抗氧化劑、緩衝劑、制菌劑及賦與配方具血中等張性之溶質之水性及非水性等張殺菌注射溶液；及可包含懸浮劑及增稠劑之水性及非水性殺菌懸浮液；及設計成使化合物標的至血液成分或一或多種器官上之脂質體或其他微粒系統。配方亦可呈單位劑量或多劑量密封容器，如安瓿及小瓶，且可以冷凍乾燥(凍乾)條件下貯存，僅須在使用前添加殺菌液體載體如注射用水即可。速成注射溶液及懸浮液可由前述種類之殺

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

表

訂

五、發明說明 (31)

菌粉末、顆粒及錠劑製得。

較佳單位劑量配方為含日劑量或單位、日副劑量(如本文所述)、或其適宜比例之前藥成分者。

須了解除了前述特定成分以外，本發明配方可包含與配方形式有關之領域常用之其他藥劑，例如適於口服投藥者可包含進一步藥劑如甜味劑、增稠劑及矯味劑。

本發明前藥及組合物亦可以獸醫配方使用，其可藉該領域悉知之方式製備。

下列概略提供可用以活化本發明前藥之細胞及標的酵素。

酪氨酸激酶

酪氨酸激酶超群包括 EGF 受體(EGFR)、巨噬菌群刺激因子(CSF-1)受體(v-fms)及胰島素受體，其與 ros 致癌基因產物有 30 至 40% 相似性。詳言之，此超群組分包含 v-src、c-src、EGFR、HER2、CSF-1 受體、c-fms、v-vos、胰島素受體及 c-mos。參見 Burck, K.B. 等人編輯(1988)之圖 8.5。1 型酪氨酸激酶超群組分之過度表現已於許多種癌中考證(Eccles, S.A. 等人(1994-95))。酪氨酸激酶之過度表現與曝露至 α -癌生物劑 TNF- α (Hudziak, R.M. 等人(1988)及 Hudziak, R.M. 等人(1990))及曝露至化學療法(Stuhlinger 等人(1994))有關連。

勞斯(Rous)肉瘤病毒之轉形基因 v-src 可對使蛋白質上酪氨酸殘基磷酸化之酵素編碼。c-src 原致癌基因見於染色體 20 上。衍生自具有中性表現型之神經外胚層來源之腫

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (32)

瘤之組織及細胞系伴隨著高特異性激酶活性而表現大量之 c-src 。

數組研究者已報導 c-erbB-2/neu ("HER2") 致癌基因於癌細胞中過度表現。 Brison (1993) 注意到 erbB 原致癌基於人類腫瘤中於大部份例中因所產物之過度表現而擴增。 c-erbB-2/neu 致癌基因之擴增已報導見於人類乳房腫瘤 (Slamon 等人 (1987), van de Vijver 等人 (1987), Pupa 等人 (1993) 及 Andersen 等人 (1995)) 及膀胱腫瘤 (Sauter 等人 (1993)) 中, 且於每一例中, 過度表現伴隨有擴增作用。 c-erbB-2/neu 過度表現亦報導見於卵巢癌組織樣品 (Slamon 等人 (1989), Meden 等人 (1994) 及 Felip 等人 (1995)) 及衍生自末梢神經系統之腫瘤中。 Sukumar 及 Barbacid, (1990)。

爲了進行藥物篩選分析, 腫瘤細胞系將分析其致癌基因之表現或將加工表現可變量之酪氨酸激酶。培育經選擇之細胞系並添加變化濃度之候選藥物。如 Hudziak, R.M. 等人 (1988) 及 Hudziak, R.M. 等人 (1990) 所述般分析細胞殺死細胞或抑制細胞增殖作用。

二氫葉酸酯還原酶

氮甲蝶呤爲二氫葉酸酯還原酶之強力抑制劑, 爲細胞內葉酸酯代謝機制必須之酵素。二氫葉酸酯還原酶功能爲自二氫葉酸酯再產生四氫葉酸酯, 爲胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶反應之產物 (Voet 等人編輯 (1995), 第 813 頁)。細胞對氮甲蝶呤抗性之重要機制爲由於 DHFR 基因擴增作用而增加 DHFR 活性, 該機制已完全建立。 Banerjee, D. 等人

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (33)

(1995), Schimke, R.T. 等人 (1988), Lönn, U. 等人 (1996) 報導 DHFR 基因擴增作用見於手術後先前已接受輔助性化學療法(環磷醯胺、氮甲蝶呤、5-氟尿嘧啶[CMF])之乳癌病患中。缺乏視網膜胚細胞瘤(Rb)在無基因擴增下增加 DHFR mRNA 表現活性結果,亦可引致增強之 MTX 抗性。Li, W.W. 等人(1995)。具突變 p53 之細胞系顯示經歷基因擴增且抗性細胞係藉化學療法選擇。Banerjee, D. 等人(1995), Yin, Y. 等人(1992)及 Livingston, L.R. 等人(1992)。就進行本發明分析目的而言, Schimke, R.T. 等人(1988)描述數種小鼠、大頰鼠及人類細胞系。或者, Lönn U. 等人(1996)之 PCR 方法用以分析 DHFR 基因擴增作用並鑑定可用於本文鑑定治療劑之方法中之細胞。對人類二氫葉酸酯還原酶編碼之 cDNA 核苷序列提供於 Masters, J.N. 及 Attardi, G. (1983) 中且細胞可加工表現改變量之本文所述酵素。Dicken, A.P. 等人(1993)描述藉化學療法選擇之突變 DHFR 基因。與酵素功能有關之 DHFR 純化及分析描述於 Nakano, T. 等人(1994)中。或者,編碼 DHFR 之 cDNA 轉染成 NIH 3T3 細胞。以變化濃度添加候選藥物並分析殺死細胞及抑制增殖之作用。

與二氫葉酸酯還原酶活性有關之抗代謝物可藉例如烷化基附接至二氫葉酸酯之 N5 或 C6 位置任一者而合成。藉 DHFR 還原 N5-C6 鍵將導致烷化劑釋出。除了烷化基以外,可藉 DHFR 釋出之任何部份導致毒素產生或抗代謝物將可用以操作本發明。該等化合物可藉添加磷酸酶或磷醯

五、發明說明 (34)

胺酯部份而進一步改質。

多藥物抗性腫瘤

多藥物抗性(MDR)為用以避開抗癌藥物細胞毒性效果之多樣策略腫瘤細胞之概稱。MDR特徵為腫瘤細胞不僅對化學療法所用藥物具降低敏感性亦對不具顯見結構相似性或普遍標的之廣群譜藥物具降低敏感性。此基因多效性抗性為成功治癌腫瘤之主要干擾之一。MDR可源自原生質膜或在細胞質、細胞分室或細胞核中之結構或功能改變。MDR之分子機制以於解毒作用及DNA修復途徑、細胞位置中藥物隔離改變、藥物標的親和性降低、特定藥物抑制劑於細胞內之合成、蛋白質改變或不當標的及加速移除或分泌藥物之改質作用加以討論。

與MDR有關之機制之一源自己知為在藥物選擇之細胞系中伴隨ATP相關性多藥物抗性之蛋白質(MRP)之基因擴增及過度表現。回顧MDR機制，可參見Gottesman, M.M.等人(1995)及Noder等人(1996)。

為了建立MDR細胞系，以Gottesman, M.M.等人(1995)及Simon, S.M.及Schindler, M. (1994)及其內所列參考文獻所述之單步驟或多步驟進行藥物選擇。對來自各種哺乳類物種之MDR編碼之DNA序列之單離述於Gros, P.等人(1986), Gudkov, A.V.等人(1987)及Roninson, I.B.等人(1984)並回顧於Gottesman, M.M.等人(1995)中，且細胞可加工以表現變化量之上述此酵素。標的MDR之前藥將基於此轉運子(transporter)之ATP酶活性。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (35)

核糖核苷還原酶

酵素核糖核苷還原酶使核糖核苷二磷酸酯還原成對應之脫氧核糖核苷二磷酸酯。此酵素為由兩個 α -次單元及兩個 β -次單元所構成之四聚物。羥基脲藉與 β_2 -基質複合物之酪氨酸游離基(Tyr-122)相互作用而特異地阻斷此反應。Voet 等人(1995)。標的此反應之目標為累積高度細胞毒性之游離基產物 O_2^- 。

對其他疾病之技術應用

雖然本發明主要焦點在於癌症，但須了解此技術可廣泛用於其他疾病，尤其是抗生素抗性之細菌傳染。 β -內酰胺酶過度表現結果使 β -內酰胺抗生素於細菌中遭遇抗性。Hamilton-Miller, J.M.T. 及 Smith, J.T. 編輯(1979)，第 443 頁。其他酵素如胺基糖苷磷轉移酶 III 型經誘發並選擇供以胺基糖苷抗生素如卡納黴素之隨後治療。Mckay, G.A. 等人(1994)。就本應用目的而言，衍生自己知基質之前藥基質將可製備而不阻斷酵素活性，但仍取對感染劑產生細胞內毒素之高酵素活性之優點。

胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶

胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶之過度表現伴隨有結腸癌、乳癌、胃癌、頭及頸癌、肝癌及胰癌。該等疾病目前以抗代謝藥物(尿嘧啶為主、葉酸酯為主、或喹唑啉為主(參見表 1))治療。各該等例中，同樣地，腫瘤抑制劑喪失及/或 5-氟尿嘧啶治療可引致 TS 擴增活性或選擇藥物抗性態之酵素，且因此引起疾病復發之藥物抗性。Lönn, U.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (36)

等人(1996)報導 TS 基因擴增作用發生於手術後先前接受輔助性化學療法(環磷醯胺、氮甲蝶呤、5-氟尿嘧啶[CMF])之乳癌病患中。此增強之 TS 表現除了基礎以外，又增強 TS，其源自腫瘤抑制劑功能喪失。一般由 TS 進行之理論反應為由脫氧尿苷單磷酸酯(dUMP)及 N(5),N(10)-伸甲基四氫葉酸酯(THF)合成脫氧胸腺嘧啶核苷單磷酸酯(dTMP)及二氫葉酸酯(DHF)。一具體例中，對表現 TS 之細胞提供尿嘧啶或 THF 衍生物。對本發明目的而言，"尿嘧啶"(僅為鹼)及"尿苷"(鹼及糖)係互相變化且為同義字地使用。表 4 概述受升高之 TS 表現衝擊之許多型癌。

表 4

胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶過度表現衝擊殘存癌症病患

中位殘存時間(月數)

癌	TS (低)	TS (高)	參考文獻
乳癌	84	54	Pestalozzi 等人，1997
NSCLC	46	10	Volm 及 Mattern, 1992
結腸癌	13.6	8.2	Leichman 等人，1997
直腸癌	>60	24	Johnston 等人，1994
頭及頸癌	>72	24	Johnston 等人，1997
胃癌	43	6	Lenz 等人，1995
	平均>53.1	平均 21	

倍數差>2.5

五、發明說明 (37)

衍生物或"前藥"藉酵素轉化成高度細胞毒性之代謝物。於正常細胞中表現低量之 TS 不會產生毒性量之轉化毒素。於生病組織中表現高量之 TS 產生更多毒素且因此抑制細胞增殖及/或細胞死亡。例如現行療法利用 5- 氟脫氧尿嘧啶核苷酸酯抑制 TS 活性。與基質反應期間，氟原子不可逆地變成附接至 TS 酵素並抑制該酵素。一具體例中，提議之新療法使 TS 完成反應但當併入 DNA 時產生改質產物，引致毒性作用。此酵素產物亦可阻斷其他重要之細胞功能(如蛋白質合成或能量代謝機制)。前藥之轉化亦可釋出代謝物如對細胞具毒性之 CN^- 。尿嘧啶/dUMP 及 N(5)(10)-THF 之衍生物可經合成，其在以 TS 代謝轉形後均具有產生毒性產物之潛能。

主要序列顯示 TS 為最高度轉化酵素之一。Perry, K. 等人(1990)。由數種原核生物物種乾酪乳桿菌(*Lactobacillus casei*)(Hardy, L.W. 等人(1987)；Finer-Moore, J. 等人(1993))及大腸菌(*Escherichia coli*)(Perry, K. 等人(1990))；真核生物萊什曼原蟲(*Leishmania major*)(Knighton, E.R. 等人(1994))及 T4 噬菌(Finer-Moore, J.S. 等人(1994))所得之 TS 結晶結構業經測定且顯示三級結構亦非常良好受保存。TS 物種序列排列之三維結構業經測定且示於 Schiffer, C.A. 等人(1995)中。由該等胺基酸序列，可使用本技藝悉知之方法推論或單離 DNA 序列。Sambrook 等人(1989)。或者，得自不同有機體之有些 29 TS 序列經選殖並寄存至 Carreras, C.W. 及 Santi, D.V. (1995)所述之 DNA 資料庫中。人類胸腺嘧啶脫

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (38)

氧核苷酸酯合成酶基因之序列、其選殖、表現及純化提供於 Takeishi, K. 等人 (1985), Davisson, V.J. 等人 (1989) 及 Davisson, V.J. 等人 (1994) 中。編碼 TS 蛋白質且含必要調節序列之基因使用本技藝悉知方法架構。編碼 TS 之基因藉電穿透、轉形或轉染程序導入標的細胞中。Sambrook 等人 (1989)。或者，此基因藉本技藝悉知方法如 Carreras, C.W. 及 Santi, D.V. (1995), Miller (1992) 及 Spector 等人 (1997) 所述方法插入適宜表現載體中。此表現載體將 TS 基因插入細胞中。接著此細胞在有利於 TS 蛋白質表現及生產之條件下生長。

人類胃癌細胞 MKN-74、MKN-45、MKN-28 及 KATO-III 可用於上述分析中以鑑定 TS 選擇性基質之潛在治療劑。MKN-74 及 MKN-45 分別由良好及不良分化之腺瘤所建立。該等細胞系及培養條件見於 Osaki, M. 等人 (1997) 及其中之參考文獻。或者，可使用已藉 5-FU 選擇以過度表現胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶之腫瘤細胞系，如 Copur, S. 等人 (1995) 所述者。

TS 定量可使用本技藝悉知之酵素生化分析法進行。爲了定量由人類腫瘤組織樣品表現之 TS 蛋白質及 TS 基因，由 Johnston, P.G. 等人 (1991) 及 Horikoshi, T. 等人 (1992) 所報導之方法提供敏感性分析。或者，使用 Lönn, U. 等人 (1996) 之 PCR 方法分析 TS 基因擴增作用並鑑定可用於本文所述鑑定治療劑方法中之細胞。

如熟悉本技藝者所了解，亦分析不含藥物及分別含參考

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

表

訂

五、發明說明 (39)

藥物如下列例舉化合物之對照細胞培養系統。引導化合物為比正常細胞高約 2 倍且較好約 3 倍或更大活性殺死標的細胞之化合物。本發明亦提供由本文所述方法鑑定之藥劑。

另一方面，本發明提供一種抑制過度增殖細胞增殖之方法，係先進行上述分析。以此分析所鑑定之前藥與細胞接觸並在細胞中以前述內源性細胞內酵素轉化成毒性代謝物。細菌、酵母及其他細胞種類之生長或細胞毒性可以 Miller 等人 (1992)，Sugarman 等人 (1985) 及 Spector 等人 (1997) 所述般追蹤。

TS 前藥

較佳具體例中，本發明包含兩類由 TS 活化之化合物，各為 5-取代之脫氧尿苷單磷酸酯之衍生物或經保護之 5-取代尿嘧啶或脫氧尿苷單磷酸酯。經保護之 5-取代脫氧尿苷單磷酸酯衍生物為其中磷酸酯部份經由附接適宜化學保護基而阻斷者。5-取代脫氧尿苷單磷酸酯衍生物之保護作用可改良溶解度、加速細胞滲透、加速通過血液-腦障壁及避免細胞或細胞外磷酸酯之作用，其可導致磷酸酯基喪失。另一具體例中，5-取代尿嘧啶或尿苷衍生物對含核苷激酶活性之細胞投藥，其中 5-取代尿嘧啶/尿苷衍生物轉化成 5-取代尿苷單磷酸酯衍生物。尿苷衍生物亦可經改質以增加其溶解度、細胞滲透作用及/或通過血液-腦障壁。

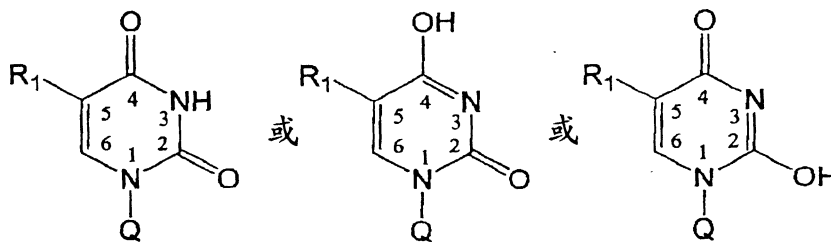
胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶對 5-取代尿苷單磷酸酯衍生物作用可釋出附接至嘧啶環 5-位置之取代基("離去基")

五、發明說明 (40)

。此釋出之取代基可固性地或接著與其他細胞成分反應而作為細胞增殖之毒或抑制劑作用。

I 類化合物之一般合成

I 類化合物之 L 及 D 異構物具下列結構：



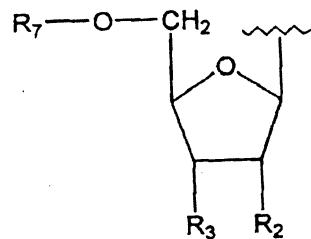
上式中， R_1 (5-位置) 為或含有離去基，其化學整體性具有可與藉胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶自嘧啶環抽取作用可相容之分子尺寸及親電子性且藉胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶而自嘧啶環釋出，其具有抑制細胞增殖或殺死細胞之能力。

上式中， Q 為含有選自糖基、硫糖基、碳環基及其衍生物之組群之化學本質之磷酸酯或磷醯胺衍生物。糖基實例包含(但不限於)單糖環狀糖基如衍生自氧雜環丁烷(4-員環糖)、呋喃糖(5-員環糖)及吡喃糖(6-員環糖)者。呋喃糖實例包含蘇-呋喃糖基(得自蘇糖，4-碳糖)；赤-呋喃糖基(得自赤糖，4-碳糖)；核-呋喃糖基(得自核糖，5-碳糖)；阿-呋喃糖基(亦經常稱為阿糖呋喃糖基；得自阿拉伯糖，5-碳糖)；木質-呋喃糖基(得自木質糖，5-碳糖)；及來蘇-呋喃糖基(得自來蘇糖，5-碳糖)。糖基衍生物實例包含"脫氧"、"酮基"及"脫氫"衍生物以及經取代衍生

五、發明說明(41)

物。硫糖基實例包含上述糖基之硫類似物，其中環氧經硫原子替代。碳環基實例包含 C₄ 碳環基、C₅ 碳環基及 C₆ 碳環基，其可再具有一或多個取代基如 -OH 基。

一具體例中，Q 為下式之 β-D-核呋喃糖基：



其中 R₇ 係選自磷鹽基、磷鹽胺酯及其衍生物，且其中 R₂ 及 R₃ 為相同或不同且獨立為 -H 或 -OH。

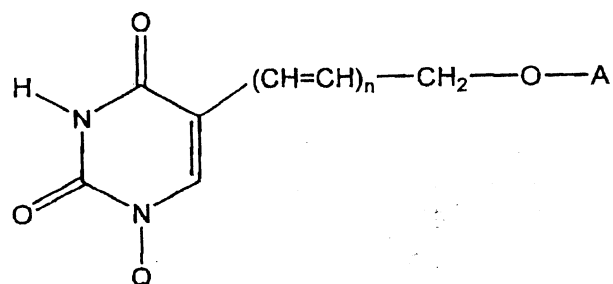
有些具體例中，R₁ 為烯基，亦即 $(-\text{CH}=\text{CH})_n-\text{R}_4$ ，其中 n 為 0 至 10 之整數及 R₄ 為鹵素如 I⁻ 或 Br⁻，CN⁻ 或汞；其中 R₂ 為 H 及 R₃ 為 -OH；其中 R₂ 為 OH 及 R₃ 為 H；其中 R₂ 及 R₃ 為 H；或其中 R₂ 及 R₃ 為 OH。

另一方面，R₁ 為烯基，亦即 $(-\text{CH}=\text{CH})_n-\text{R}_4$ ，其中 n 為 0 至 10 之整數，及 R₄ 為或含選自 H、鹵素、烷基、烯、炔、羥基、-O-烷基、-O-芳基、O-雜芳基、-S-烷基、-S-芳基、氰基、氰酸根及硫代氰酸根鹵乙烯基、鹵汞基、-S-雜芳基 -NH₂、-NH-烷基、-N(烷基)₂、-NHCHO、-NHOH、-NHO-烷基、-NH₂CONHO- 及 NHNH₂ 之組群之基。該等具體例中，進一步目的包含：其中 R₂ 及 R₃ 為 H；其中 R₂ 為 OH 及 R₃ 為 H；其中 R₂ 為 H 及 R₃ 為 OH；或其中 R₂ 及 R₃ 為 OH。

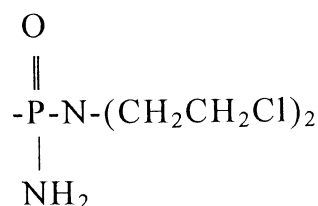
五、發明說明 (42)

R₁ 位置取代基之較佳具體例為如圖 8 所示可經歷烯丙基系交換者。

又進一步目的中，候選治療劑為下式化合物：

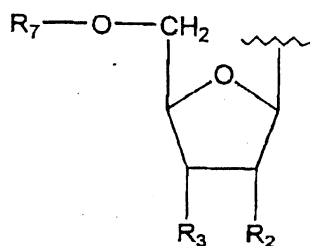


其中 n 為 0 至 10 之整數；其中 A 為磷醯胺衍生物，或下式化合物：



及其中 Q 係選自 H、上述定義之未取代或經取代糖及上述定義之經取代或未取代碳環。

進一步具體例中，上述化合物係藉下列結構之 Q 改質：

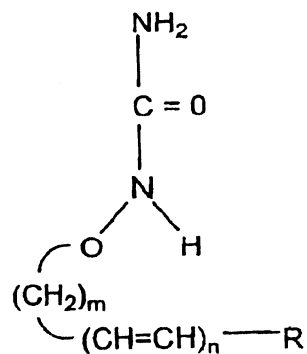


其中 R₇ 係選自 H、磷醯基、磷醯胺酯及其衍生物及其

五、發明說明 (43)

中 R_2 及 R_3 為相同或不同且獨立為 $-H$ 或 $-OH$ 。一具體例中， R_7 不為 H 。對該等具體例而言， R_1 亦可具 $-(CH=CH)_n-R_4$ 結構，其中 n 為 0 至 10 之整數，及 R_4 係選自 H 、鹵素、烷基、烯、炔、羥基、 $-O$ -烷基、 $-O$ -芳基、 O -雜芳基、 $-S$ -烷基、 $-S$ -芳基、 $-S$ -雜芳基、 $-NH_2$ 、 $-NH$ -烷基、 $-N$ (烷基) $_2$ 、 $-NHCHO$ 、氰基、氰酸根及硫代氰酸根鹵乙烯基化合物、鹵汞化合物、 $-NHOH$ 、 $-NHO$ -烷基、 $NHNH_2$ 、及 NH_2CONHO -之組群。

此外，進一步目的中，候選治療劑為下式化合物：



其中 $R=2'$ -脫氧-5-尿苷基， m 為 0 或 1 及 n 為 0 至 10 之整數。

若適宜，此化合物可呈任何其對映異構物、非對映異構或立體異構物態，包含例如 D -或 L -態，且可呈任何立體化學組態，包含例如 α -或 β -異構態。

上述 5-取代嘧啶核苷及 5-嘧啶核苷單磷酸酯之合成可藉本技藝悉知方法完成。例如在 Li_2PdCl_4 存在下以鹵烷基化合物、鹵乙酸酯或鹵烯處理 5-氯汞-2'-脫氧尿苷，可經由有機鈰中間物分別形成 5-烷基、5-乙醯基或 5-烯衍生

五、發明說明 (44)

物。 Wataya, 等人(1979)及 Bergstrom, 等人(1981)。嘧啶核苷及核苷之 C5-改質作用另一實例為以乙酸汞處理未保護之核苷，接著在 Li_2PdCl_4 存在下添加苯乙烯或環-取代苯乙烯，形成 C5-反式-苯乙烯基衍生物。 Bigge, 等人(1980)。在乙酸鹽緩衝液中在 50°C 以乙酸汞處理嘧啶環 5 位置 3 小時，使汞衍生成嘧啶脫氧核糖核苷三磷酸酯。 Dale 等人(1973)。此種處理預期對單磷酸酯之改質亦有效；或者，改質之三磷酸酯可例如以鹼磷酸酶控制地處理再進行單磷酸酯純化，可酵素轉化成改質之單磷酸酯。分子性質類似於汞但具較佳醫藥性質之有機或非有機其他部份可經取代。合成經取代嘧啶之一般方法例如 USP 4,247,544；4,267,171；及 4,948,882；及 Bergstrom 等人(1981)。上述方法亦可應用於合成 5-取代嘧啶核苷及含核糖或 2'-脫氧核糖以外之糖例如 2',3'-二脫氧核糖、阿拉伯糖、呋喃糖、木質糖、戊糖、己糖、庚糖及吡喃糖之核苷。5-位置取代基實例為鹵乙烯基，如 E-5-(2-溴乙烯基)-2'-脫氧尿苷酯。 Barr, P.J. 等人(1983)。此化合物依實驗段落所述般合成。

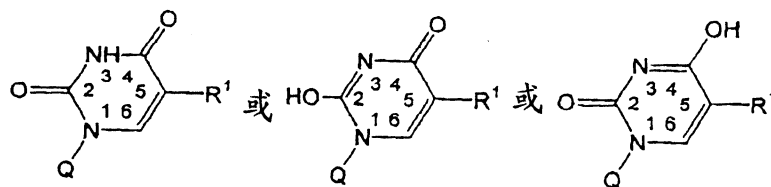
或者，5-溴脫氧尿苷、5-碘脫氧尿苷及其單磷酸酯衍生物可購自 Glen 研究公司，Sterling, VA (USA)，Sigma-Aldrich 公司，聖路易士，MO (USA)，Moravek 生化工業，Brea, CA (USA)，ICN, Costa Mesa, CA (USA) 及新英格蘭核子公司，波士頓，MA (USA)。市售之 5-溴脫氧尿苷及 5-碘脫氧尿苷可使用購自 Glen 研究公司，Sterling, VA (USA) 及

五、發明說明 (45)

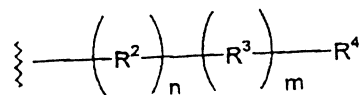
ICN, Costa Mesa, CA (USA) 之試藥，經由激酶酵素之作用，化學性或酵素性轉化成其單磷酸酯。該等鹵衍生物可與其他取代基組合產生新穎且更強力之抗代謝物。

II 類化合物之一般合成

進一步目的中，與細胞過度轉化之胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶接觸之前藥為 L 或 D 態之下式化合物：

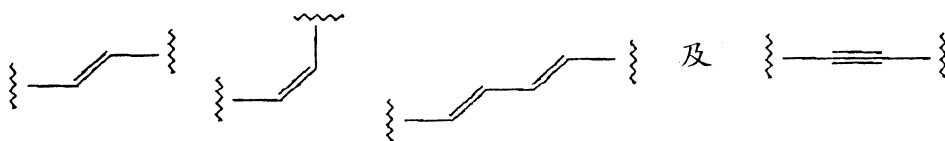


上式中， R^1 為下式基：



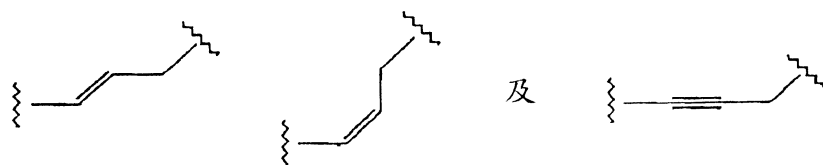
上式中， R^2 為或含二價導電子基。一具體例中， R^2 為或含作用以引導電子自嘧啶環脫離並朝離去基 R^1 之單-或多不飽和導電子基。一具體例中， R^2 係選自：不飽和烴基；含一或多個不飽和烴之芳族烴基；及含一或多個不飽和烴基之雜芳基。

一具體例中， R^2 為具選自下列結構之不飽和烴基：

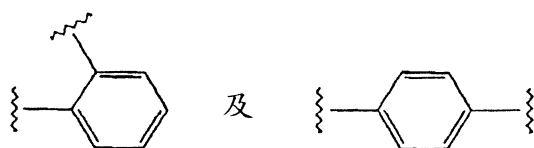


一具體例中， R^2 及 R^3 合而形成選自下列之結構：

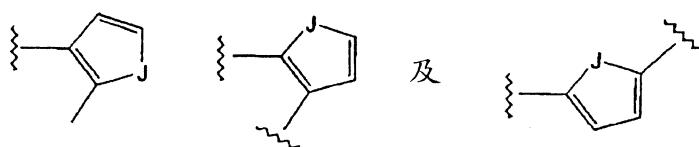
五、發明說明 (46)



一具體例中， R^2 為具選自下列結構之芳族烴基：

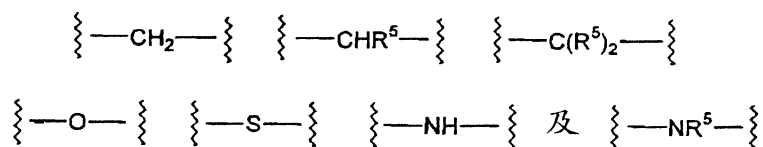


一具體例中， R^2 為具選自下列結構之雜芳基：



其中 J 為雜原子如 -O-、-S- 或 -Se-，或雜原子基如 -NH- 或 -NR^{ALK}-，其中 R^{ALK} 含 1 至 10 個碳原子之直鏈或分支烷基或含 3 至 10 個碳原子之環烷基。

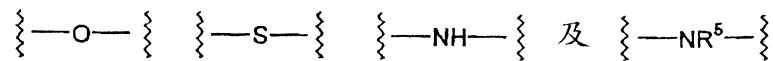
上式中， R^3 為二價間隔基，亦稱為間隔基單元。一具體例中， R^3 為具有選自下列結構之二價間隔基部份：



其中 R^5 為相同或不同且獨立為含 1 至 10 個碳原子之直鏈或分支烷基或含 3 至 10 個碳原子之環烷基。

一具體例中， R^3 為具有選自下列組群之二價間隔基部份：

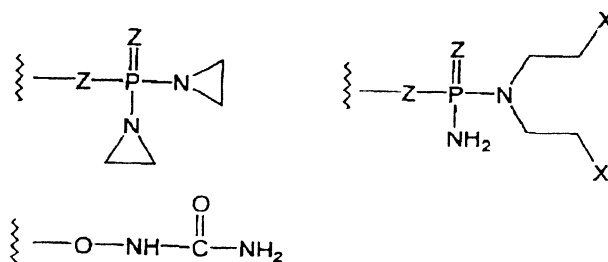
五、發明說明 (47)



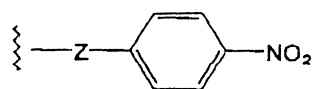
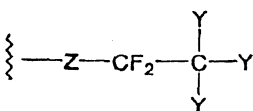
上式中， n 為 0 至 10 之整數及 m 為 0 或 1。一具體例中， n 為 0 至 10 之整數及 m 為 1。一具體例中， n 為 0 且 m 為 0。一具體例中，當 R^7 為 -H，則 n 不為 0。一具體例中，當 R^7 為 -H，則 m 不為 0。一具體例中，當 R^7 為 -H，則 n 不為 0 且 m 不為 0。一具體例中，當 R^7 為 -H，則 R^4 不為鹵素（亦即 -F、-Cl、-Br、-I）。一具體例中，當 R^7 為 -H 且 m 為 0，則 R^4 不為鹵素（亦即 -F、-Cl、-Br、-I）。一具體例中，當 R^7 為 -H 且 m 為 0 且 n 為 0，則 R^4 不為鹵素（亦即 -F、-Cl、-Br、-I）。

上式中， R^4 為毒素載體部份。本文中"毒物載體"意指為或含有離去基之部份，該離去基為與可藉胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶自嘧啶環抽取作用具可相容分子尺寸及親電子性且藉胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶作用自嘧啶環釋出具有抑制細胞增殖或殺死細胞之能力之化學本質。

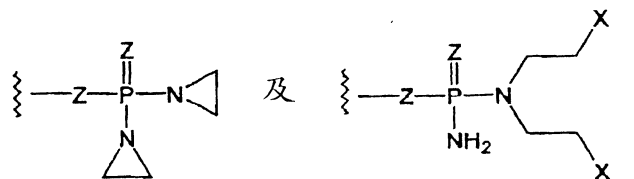
一具體例中，毒物載體為或含有藉細胞中過度表現之細胞內酵素而活化或釋出之離去基。一具體例中， R^4 為或含具選自下列結構之基：



(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)



一具體例中 R^4 爲或含具選自下列結構之基：



一具體例中， R^4 爲或含具選自下列結構之基：

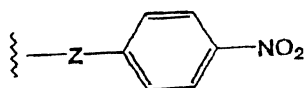
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)



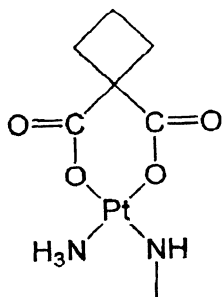
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)



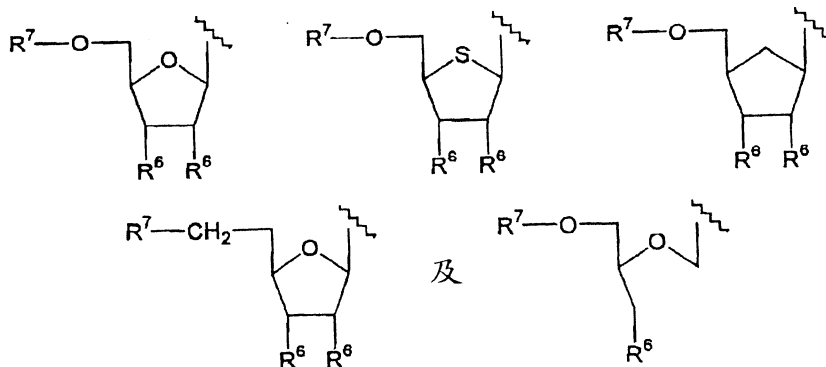
訂



一具體例中， R^4 為或含有選自下列之化學整體性：
-Br、-I、-O-烷基、-O-芳基、O-雜芳基、-S-烷基、-S-芳基、-S-雜芳基、-CN、-OCN、-SCN、-NH₂-、-NH-烷基、-N(烷基)₂、-NHCHO、-NHOH、-NHO-烷基、NH₂CONHO-、NHNH₂、-N₃及順氯鉑銨之衍生物，如：



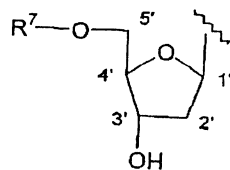
上式中，Q 為或含糖部份或可支持前藥官能基鍵結至酵素如 TS 或 TK 之類似部份。一具體例中，Q 係選自下列：



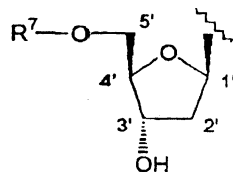
五、發明說明 (51)

其中 R^6 為相同或不同且獨立為 $-H$ 、 $-OH$ 、 $-OC(=O)CH_3$ 或其他經保護羥基(包含, 但不限於, 苯甲醯基 $-COC_6H_5$ 及 甲苯醯基 $-COC_6H_4CH_3$) ; 及 R^7 為氫、磷酸酯基、磷醯胺酯基或其他含磷之基。

一具體例中, Q 為 :

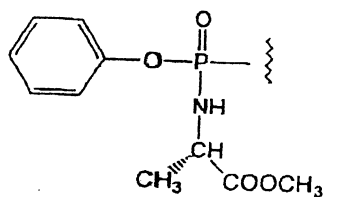


一具體例中, Q 為 :



一具體例中, R^7 為氫。一具體例中, R^7 不為氫。一具體例中, R^7 為磷酸酯基或磷醯胺酯基。一具體例中, R^7 為磷醯胺酯基。

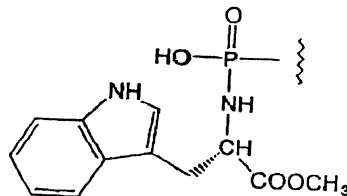
一具體例中, R^7 為衍生自胺基酸之磷醯胺酯基, 包含例如 20 個天然胺基酸。一具體例中, R^7 為衍生自丙氨酸之磷醯胺酯基。一具體例中, R^7 為或含下列結構之基 :



上述基及其製法述於 McGuigan 等人(1993)及 McGuigan 等人(1996)中。

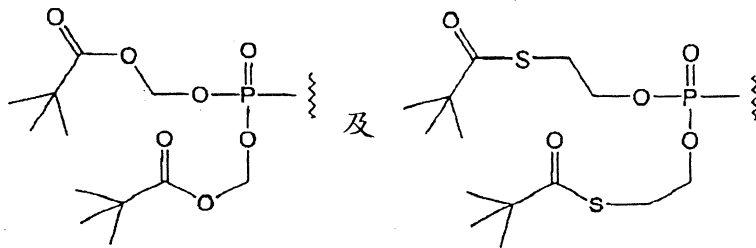
五、發明說明 (52)

一具體例中， R^7 為衍生自色氨酸之磷醯胺酯基。一具體例中， R^7 為或含具下列結構之基：



上述基及其製法述於 Abraham 等人(1996)中。

一具體例中， R^7 為磷酸酯基。一具體例中， R^7 為或含具有選自下列結構之基：



上述兩基中第一個基及其製法述於 Freed 等人(1989)；Sastry 等人(1992)；Farquhar 等人(1994)及 Farquhar 等人(1995)中。上述兩基第二個基及其製法述於 Valette 等人(1996)；及 Benzaria 等人(1996)中。

一具體例中， R^7 為或含具有選自下列結構之基(其中 R 為芳族取代基)：

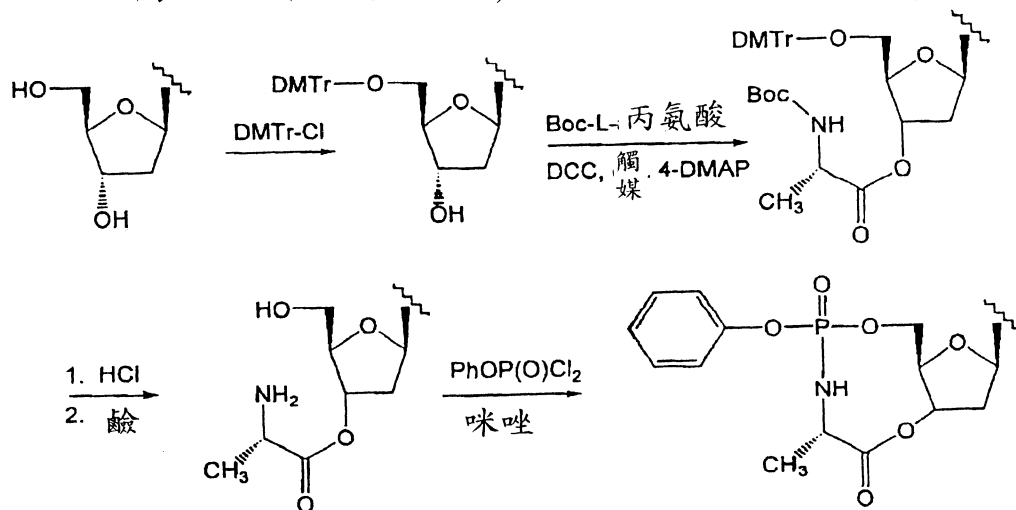


上述兩基第一個基及其製法述於 Meier 等人(1997)；Meier 等人(1997)；及 Meier 等人(1997)中。上述兩基第二

五、發明說明 (53)

個基及其製法述於 Hostetler 等人(1997)；及 Hostetler 等人，公告之國際專利申請案 WO 96/40088 (1996)。

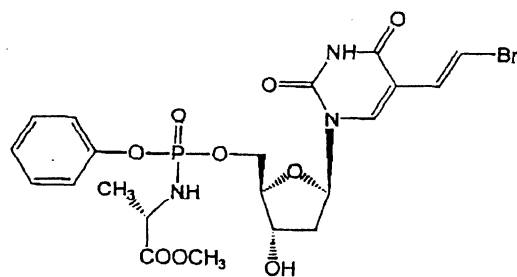
一具體例中， R^7 形成 Q 中之環狀基。一此具體例及其製法述於下列(其中 DMTr 為 4,4'-二甲氧基三甲苯基，Boc 為第三丁氧羰基，DCC 為 1,3-二環己基碳二醯亞胺，及 4-DMAP 為 4-二甲胺基吡啶)：



一具體例中，此化合物可呈任何對映異構態、非對映異構態、立體異構態、包含 D-態、L-態、 α -立體異構態及 β -立體異構態。

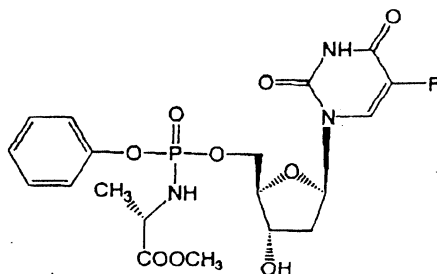
一具體例中，此化合物可呈鹽態、或呈經保護或前藥態，或其組合，例如鹽、醚或酯。

一具體例中，前藥為下式化合物：

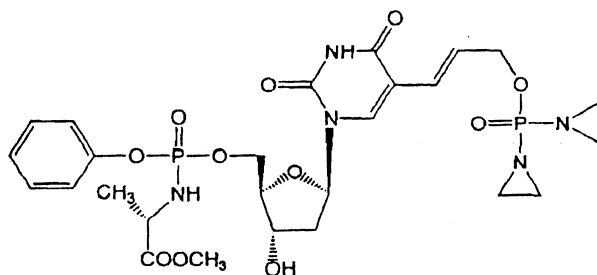


五、發明說明 (54)

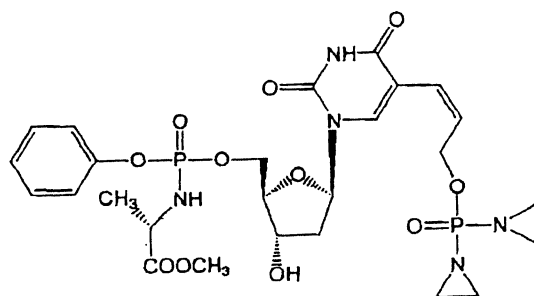
一具體例中，前藥為下式化合物：



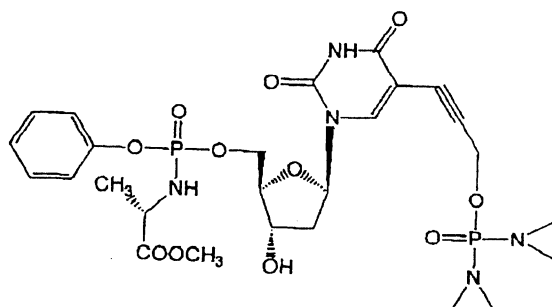
一具體例中，前藥為下式化合物：



一具體例中，前藥為下式化合物：



一具體例中，前藥為下式化合物：



五、發明說明 (55)

另一具體例中，上述結構使用下述方法進一步修飾或帶有硫代磷鹽二吡啶丁啶替代磷二吡啶丁啶基。

II 類化合物之一般合成策略

尿啶 5-位置之結構稱為鏈，因其使提議之離去基(毒性載體)連接至雜環。藉與 Cys-195 於人類 TS 中反應使雜環活化後，負電荷自尿啶 6-位置移至該鏈。此機制由 Barr 等人(1983)描述為(E)-5-(溴乙烯基)-2'-脫氧尿苷(BVDU)及由 Wataya 等人(1979), Santi (1980)及 Bergstrom 等人(1984)描述為(E)-5-(3,3,3-三氟-1-丙烯基)-2'-脫氧尿苷(TFPe-dUrd)之 5'-單磷鹽化受體。

毒素與 dNMP 間之鏈"間隔基"須不飽和因此可引導由 TS-Cys-巰基攻擊所提供之易毒素化之負電荷。就此目的所提供之許多不飽和有機官能基中，乙烯基、烯丙基及炔丙基單元為簡單、小且易合成者。乙烯基及烯丙基單元之優點為其可製成兩種非內部可轉化之幾何異構態。因此其可作為由 TS 活化位置調節之前藥"探針"。另一方面，炔丙基之優點為具圓筒對稱性，因此由此類鏈釋出之 TS 催化毒素不依賴其相對於 dUMP's 尿啶環之定向，如乙烯基及烯丙基分子之例。

已有兩種不同方式設計本發明之核苷為主之前藥。一種係基於 BVDU 單磷酸酯之結構且特徵為離去基/毒素直接附接至 dUMP 之 C5 上(聚)乙烯基取代基之端部。該等化合物一部份定義為"I 類"化合物。另一種基於 TFPe-dUMP 結構且類似於第一種，但具有伸甲基分隔離去基/毒素及不飽和單元，且因此含有烯丙基或炔丙基單元，於下文稱

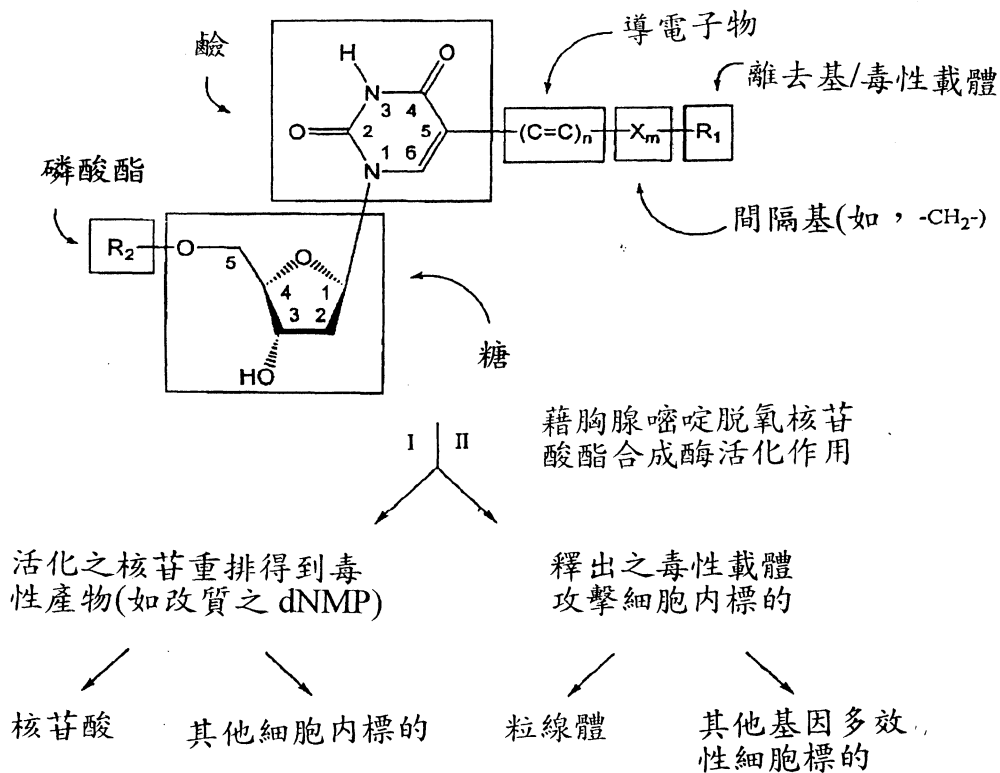
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (56)

為 "II 類"。此為烯丙基鏈方法。

各型之 5'-磷醯胺酯變體結構如下：



烯丙基鏈方式之炔丙基變體活化機製慣例為 5-乙炔基-2'-脫氧尿苷 5'-單磷酸酯 (EdUMP) 及 5-(3-羥基-1-丙炔基)-2'-脫氧尿苷 5'-單磷酸酯 (HOPdUMP) 兩者與 TS 之相互反應 (Barr 等人, 1981, Barr 及 Robins 1983)。EdUMP 為 TS 之強力抑制劑 ($K_i=0.1 \mu\text{M}$) 且同樣地在活化位置形成丙二烯為主之物種。HOPdUMP ($K_i=3.0 \mu\text{M}$) 顯示非尋常之抑制作用動力學, 其可能由於在活化位置形成累積烯烴為主之物種。

近來已合成結構類似於乙烯基及烯丙基鏈方式機制兩者慣有之中間物之 5-亞烷基化 5,6-二氫尿啶 (Anglada 等人, (1996))。其顯示高度親電子性。其與乙醇反應產生 5-(乙氧甲基)尿啶之反應為圖 8 所示機制中再產生催化性成分

五、發明說明 (57)

TS 之水加成反應。甚至更最近，由捕捉研究證實存在有由 TS 產生之非長鏈 C5 伸甲基甲間物 (Barrett 等人 (1998))。

具有 C5 炔丙基及烯丙基醇之 2'-脫氧尿苷係直接合成。該等及其相近衍生物許多已於文獻中報導，且有些已被研究與 TS 關連性。例如。5-炔基-dUMPs 包含 5-(3-甲氧基-1-丙炔基)及 5-(3-羥基-1-丙炔基)者已檢視為 TS 抑制劑 (Barr 等人 (1981)) 且其有些顯示變成併入 TS-缺乏之癌細胞 DNA 中 (Balzarini 等人 (1985))。

5-汞-(Ruth 等人 (1978)) 及 5-碘尿苷 (Robins 等人 (1981)) 易在鈀觸媒存在下與烯類及炔類縮合，得含鏈之尿苷。更常使用後者途徑 (Robins 等人 (1982)，Asakura 及 Robins (1988) 及 (1990))。已達成 5-碘-2'-脫氧尿苷與第三丁基二甲基矽烷基炔丙基醚 (Graham 等人 (1998) De Clorcq 等人 (1983))，甲基炔丙基醚 (Tolstikov 等人 (1997)) 及甚至炔丙基醇本身 (Chaudhuri 等人 (1995), Goodwin 等人 (1993)) 之高產率縮合。後者反應所導入之 3-羥基-1-丙炔基取代基亦可藉 DIBAL-H 使甲基丙烯酸酯基還原而完成 (Cho 等人 (1994))，本身係由用以合成 BVDU 之相同 Heck 反應所得。該等鈀催化之反應為多變因此可用以縮合非常長且精巧官能化之炔丙基為主之鏈成 5-碘-2'-脫氧尿苷 (Livak 等人 (1992), Hobbs (1989))。藉使炔丙基類前驅物在 Unidar 觸媒上部份氫化產生 (Z)-烯丙基為主之鏈 (Robins 及 Barr (1983)) 而最好藉 (E)-三丁基錫化乙烯之 Heck 偶合反應製備

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

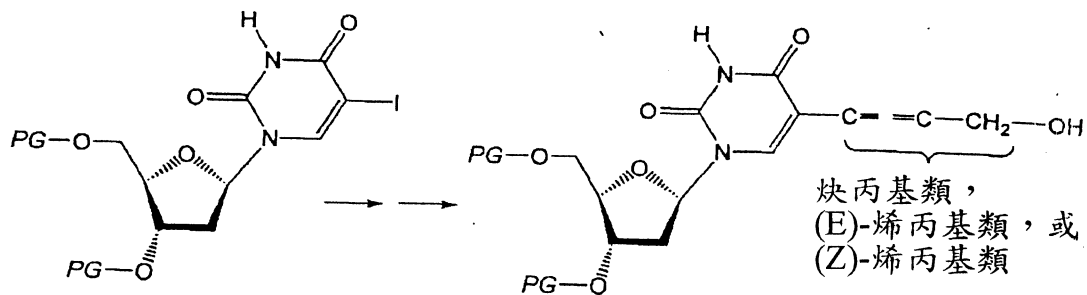
表

訂

五、發明說明 (58)

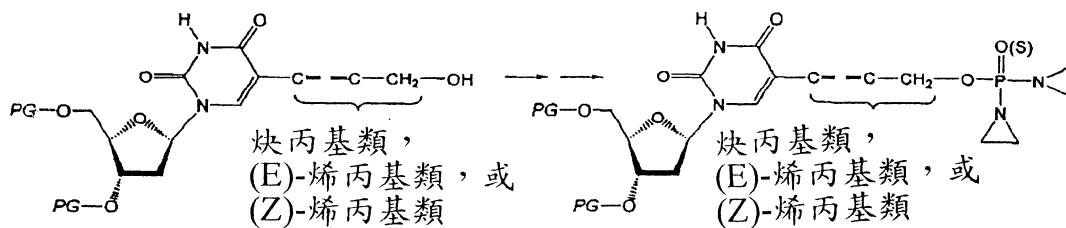
(E)-烯丙基為主者。

緊接著參考文獻程序，製備含第三丁基二甲基矽烷基炔丙基醚之 3',5'-二-O-保護之 2'-脫氧尿苷 (Graham 等人(1998), De Clercq 等人(1983)) 並部份還原轉化成對應之 (Z)-烯丙基醚 (Robins 及 Barr (1983))。由於 TBAF-調節地移除 TBDMS 基產生可就地官能化之氧陰離子，該等 TBDMS-保護之炔丙基-及 (Z)-烯丙基鏈核苷將作為有些含毒性載體標的之有利前驅物。對含 (E)-烯丙基醇之核苷而言，藉文獻之 Heck 偶合 (E)-三丁基錫化乙烯 (Crisp (1989)) 製備已知之 O-四氫吡喃基醚衍生物。

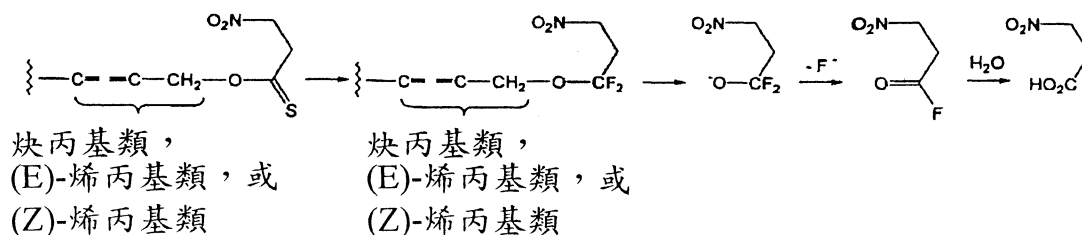


使用兩步驟之文獻方法 (Phelps 等人(1980), Hsiao 及 Bardos (1981))，炔丙基類及 (E) 及 (Z) 烯丙基類醇轉化成其對應之雙-吡啶啉基磷醯胺酯或硫代磷醯胺酯，因而 5'-單核苷變體之 TS 加工將分別釋出制細胞藥物 TEPA 或硫代 TEPA 之活性代謝物 (Dirven 等人(1995))。

五、發明說明 (59)



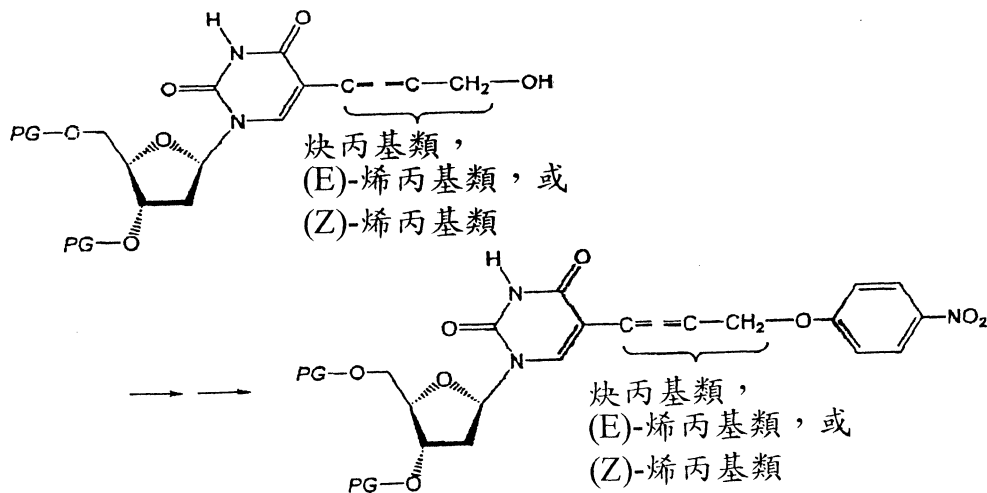
爲了避免衍生自炔丙基類或烯丙基類醇之酯之潛在水解力，毒性載體如 3-硝基丙酸之羧酸部份藉使其連接至醇成 α, α -二氟醚類而"隱蔽"。就此，先以勞森氏(Lawesson's)試劑處理正酯(Cava 及 Levinson (1985))再於已建立方式中以二氫三氟化四丁銨使硫酯轉化成 α, α -二氟醚(Kuroboshi 及 Hiyama (1991) 及 (1994))而製備炔丙基或烯丙基硫酯鏈。接著 α, α -二氟醚爲主之鏈如尋常般與經保護之 5-碘-2'-脫氧尿苷。至於 α, α -二氟醚，經隱蔽之毒性載體係安定至因潛在反應性鹼基氟化物而使 TS 將其釋出。確實之快速水解將就地產生羧酸爲主之毒性載體。



含 CS 炔丙基類及 (E) 及 (Z)-烯丙基類醇之 2'-脫氧尿苷由於釋出之對-硝基酚之分光光譜性動力學測定與以可使離去基自鏈端催化性釋出之方式結合至 TS 之該等鏈化之 dUMP 平台相同。因此可提供活體外 TS 酵素分析之良好試劑。所需之對-硝基苯基醚將藉由與 4-氟硝基苯鹼催化縮

五、發明說明 (60)

合或由 Heck 偶合適當之對-硝基苯基炔丙基或烯丙基醚而直接由醇獲得。TS 分析必需之 5'-單磷酸酯係依據已建立之立體選擇性 5'-單磷酸化方式 (Imai 等人 (1969)) 自核苷以酵素或化學方式產生。



許多 5-取代 2'-脫氧尿苷並非人類 TK 之基質，但有趣地，發現 5-(4-羥基-1-丁炔基)-2'-脫氧尿苷例外 (Barr 等人 (1981))。因此，預期有些含毒性載體之核苷亦具有適宜之 TK 基質活性，因此檢視其對腫瘤細胞生長之活性。又，依據此新發展之立體選擇性程序製備 5'-磷酸酯為簡單方法，且因此製備並測試該等前藥原變體。

組合合成

達成引導化合物之快速方式為使用組合化學方法。由於胸腺嘧啶脫氧核苷酸酶酵素之作用機制很多為已知 (Schiffer 等人 (1995))，可考慮下列論點：藉前藥進入細胞，藉胸腺嘧啶脫氧核苷激酶之前藥磷酸化作用及藉胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶使前藥(尿苷衍生物)轉化成活性

五、發明說明 (61)

藥物。關於進入細胞，可利用磷醯化核苷之改質作用(參見例如 USP 5,233,031 及 5,627,165)。此外，前藥於腫瘤細胞中之較佳磷醯化反應因腫瘤抑制基因喪失結果於大部份腫瘤細胞中之胸腺嘧啶脫氧核苷激酶過度表現而加速(Hengstschlager 等人(1996))。同樣地，由於隨腫瘤抑制劑喪失(Li, W. 等人(1995))及化學療法(Peters, G.J. 等人(1995))使胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶過度表現，因此於腫瘤細胞中發生磷醯化前藥或磷醯胺酯衍生物之更加活化。以組合化學法標的尿苷環之 5'-位置(由其可產生細胞毒素)或戊糖之 5'-位置(以加速結合至胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶)，藉使尿苷環之離去基結構(細胞毒素)最適化以及加速戊糖 5'-位置之磷醯化作用或分基最適化，將大為加速發現引導化合物。就圖 3、4 及 5 所示篩選目的而言，欲測試之化學本質將藉指向單一位置化學(圖 4)或同時指向分子上兩個位置(圖 5)而產生。與圖 3 所示之篩選一起，已發展出發現標的胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶之前藥之有效力系統。所用之組合化學方式將類似於 Lam, K.S. (1997)所述者。一具體例中，提供毒性離去基之前藥示於圖 6。圖 6 中所示尿苷基質取磷醯胺酶(存在於所有細胞)及於腫瘤細胞中升高之胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶(TS)之優點。如熟悉本技藝者將了解，此合理化之藥物設計可應用於本文定義之其他前藥合成。

熟悉本技藝者須了解圖 3 所示之篩選可廣泛用於發現抗生素。例如，得自酵母之胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶可

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (62)

替代圖 4 中之大腸菌。此可發現標的與致病原相關之酵母之特定抗真菌抗生素。此外，其他酵素可進行此處理。例如，可選擇特異性標的感染劑如卡林肺囊蟲之二氫葉酸酯還原酶活性之前藥。該等藥劑係選擇其對標的酵素之特異性且顯示利用圖 3 所述之篩選分析不會活化天然宿主之酵素。對照之細胞構成成分可含對應之正常人類酵素，以顯示當僅存在有正常人類酵素時將缺乏毒性。

本發明或本文所述之藥物或藥劑藉各種化學改質作用可製成更可滲透過例如細胞膜及血液-腦障壁。其包含將可改良膜滲透性之各種官能基附接至其磷酸酯部份。此等官能基包含，但不限於，述於 USP 5,233,031 及 5,627,165；Fries, K.M. 等人(1995)及 McGuigan, C. 等人(1984)者。二脫氧尿苷(ddU)之某些磷醯胺酯衍生物為對 HIV 活化且成功地旁通胸腺嘧啶脫氧核苷激酶。McGuigan, C. 等人(1984)。此種化學改質作用亦可用以保護經取代嘧啶單磷酸酯衍生物免受細胞及細胞外磷酸酶之作用。雖然汞或鹵素衍生物可能有效，但預期釋出烷化或抗代謝化合物之改質作用較佳。較佳具體例示於圖 6。

I 及 II 類化合物之衍生物

本文揭示之上述化合物之鹽類、酯類及醚類亦在本發明範圍內。本發明前藥之鹽類可衍生自無機或有機酸及鹼。酸實例包含鹽酸、氫溴酸、硫酸、硝酸、過氯酸、富馬酸、馬來酸、磷酸、乙醇酸、乳酸、水楊酸、琥珀酸、對-甲苯磺酸、酒石酸、乙酸、檸檬酸、甲烷磺酸、乙烷磺

五、發明說明 (63)

酸、甲酸、苯甲酸、丙二酸、苯-2-磺酸及苯磺酸。其他酸如草酸本身雖非醫藥可接受性，但可用於製備用作為獲得本發明化合物及其醫藥可接受性酸加成鹽之中間物之鹽類。鹼實例包含鹼金屬(如鈉)氫氧化物、鹼土金屬(如鎂)氫氧化物、鹼及式 NW_4^+ 化合物，其中 W 為 C_{1-4} 烷基。

鹽實例包含：乙酸鹽、己二酸鹽、藻朊酸鹽、天冬氨酸鹽、苯甲酸鹽、苯磺酸鹽、硫酸氫鹽、丁酸鹽、檸檬酸鹽、樟腦酸鹽、樟腦磺酸鹽、環戊烷丙酸鹽、二葡萄糖酸鹽、十二烷基硫酸鹽、乙烷磺酸鹽、富馬酸鹽、氟庚酸鹽、甘油磷酸鹽、半硫酸鹽、庚酸鹽、己酸鹽、鹽酸鹽、氫溴酸鹽、氫碘酸鹽、2-羥基乙烷磺酸鹽、乳酸鹽、馬來酸鹽、甲烷磺酸鹽、2-苯磺酸鹽、菸鹼酸鹽、草酸鹽、棕櫚酸鹽、果膠酸鹽、過硫酸鹽、苯基丙酸鹽、苦味酸鹽、三甲基乙酸鹽、丙酸鹽、琥珀酸鹽、酒石酸鹽、硫代氰酸鹽、甲苯磺酸鹽及十一烷酸鹽。鹽其他實例包含與適宜陽離子如 Na^+ 、 NH_4^+ 及 NW_4^+ (其中 W 為 C_{1-4} 烷基) 化合之本發明化合物陰離子。

就治療用途而言，本發明化合物之鹽為醫藥可接受性，但非醫藥可接受性之酸及鹼之鹽發現亦可用於例如製備或純化醫藥可接受性化合物。

以本發明方法鑑定之前藥或化合物之酯類包含由 2'-,3'-及/或 5'-羥基酯化所得之羧酸酯(亦即 $-O-C(=O)R$)，其中 R 係選自(1)直鏈或分支烷基(例如正丙基、正丁基或正丁基)、烷氧烷基(例如甲氧甲基)、芳烷基(例如苄基)、芳

五、發明說明 (64)

氧烷基(例如苯氧甲基)、芳基(例如視情況經例如鹵素、 C_{1-4} 烷基或 C_{1-4} 烷氧基或胺基取代之苯基)；(2)磺酸酯如烷磺醯基(例如甲烷磺醯基)或芳烷磺醯基；(3)胺基酸酯(例如 L-纈氨酸或 L-異白氨酸)；(4)磷酸酯及(5)單-、二-或三-磷酸酯。該磷酸酯可進一步經例如 C_{1-20} 醇或其反應性衍生物或經 2,3-二-(C_{6-24}) 醯基甘油酯化。此種酯中，除非另有說明，否則任何存在之烷基部份較好含 1 至 18 個碳原子，尤其自 1 至 6 個碳原子，更尤其為 1 至 4 個碳原子。此種酯中存在之任何環烷基部份較好含 3 至 6 個碳原子。此種酯中存在之任何芳基部份較好包括苯基。本發明木質呋喃糖基前藥衍生物實例含例如含有化學保護羥基(如含 O-乙醯基)如 2'-O-乙醯基-木質呋喃糖基；3'-O-乙醯基-木質呋喃糖基；5'-O-乙醯基-木質呋喃糖基；2',3'-二-O-乙醯基-木質呋喃糖基及 2',3',5'-三-O-乙醯基-木質呋喃糖基之化合物。

本發明化合物之醚類包含甲醚、乙醚、丙醚、丁醚、異丁醚及第二丁醚。

進一步具體例中，基質可與嘧啶或葉酸酯化學性不相關，但較好依據已知之合理藥物設計參數合成，參見 Dunn, W.J. 等人(1996)。

例如其中反應產物為 dUMP 之溴乙烯基衍生物抗代謝物之產物之化學分析述於下列所提供之實例或 Barr, P.J. 等人(1983)中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

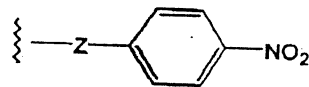
訂

五、發明說明 (65)

診斷應用

本發明另一目的有關一種篩選治療劑之方法，包括使標的細胞與本發明前藥化合物接觸。

一具體例中，前藥為下列所示之式中 R^4 為下式之 II 類化合物：



該標的細胞有利於化合物併入標的細胞中，供偵測胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶細胞內之量診斷目的。

實例

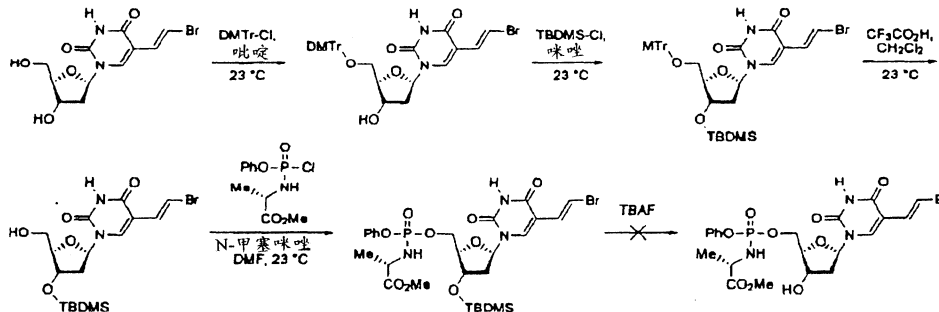
下列實例特別有關標的酵素 TS。對熟悉本技藝者將了解下列方法可予以修飾以發現對本文定義之標的酵素之前藥，或使用作為發現 TS 及其他細胞內酵素之其他前藥之對照劑。

前藥之合成

合成 5-氟-2'-脫氧尿苷(5-FUdR)之磷醯胺酯衍生物及(E)-5-(2-溴乙烯基)-2'-脫氧尿苷(BVDU)及 BVDU 之磷醯胺酯衍生物。

依據文獻之程序(Dyer 等人(1991))自 2'-脫氧尿苷製備 BVDU。依據標準方法，先以二甲氧基三甲苯基(DMTr)保護 O5'位置再以第三丁基二甲基矽烷基(TBDMS)保護 O3'位置，然後以酸處理移除 5'-O-DMTr 基(參見下文)。

五、發明說明 (66)



所得之 3'-O-TBDMS-保護之核昔與苯基 L-甲氧基丙氨酯基氯磷酸酯 (PMPC) 反應 (McGuigan 等人 (1992))，得 3'-O-TBDMS-保護之 BVOU-PA。但意外地以 ^1H 核磁共振 (NMR) 光譜計發現磷醯胺酯官能度對矽膠上氟化四丁銨 (TBAF) 之非常溫和脫矽烷基反應條件易反應。此對溫和鹼性條件敏感性之觀察提供除了阿拉伯糖昔 (McGuigan 等人 (1998)) 以外為何目前所報導之所有核昔 5'-磷醯胺酯衍生物均缺乏 3'-羥基官能度 (參見例如 McGuigan 等人 (1996)；McGuigan 等人 (1993)；McGuigan 等人 (1994)，Balzarini 等人 (1997)，Balzarini 等人 (1996)) 之可能解釋。發展新穎之合成方法以解決此問題。

爲了合成苯基 L-丙氨酯基磷醯胺 (E)-5-(溴乙烯基)-2'-脫氧-5'-尿昔酯，在氬氣中以咪唑 (103 毫克，1.51 毫莫耳) 處理含 BVDU (420 毫克，1.26 毫莫耳) 之 2 毫升無水 DMF 溶液，再滴加苯基 L-甲氧基丙氨酯基氯磷酸酯 (350 毫克，1.26 毫莫耳) (McGuigan 等人 (1992))。反應混合物在氬氣中於 23 °C 攪拌 24 小時。以矽膠上之 TLC 使用含 10% 甲醇之二氯甲烷作為溶離液，自 BVDU (R_f 0.53) 產生

五、發明說明 (67)

BVDU-PA (R_f 0.70)，但僅部份量(約 15%)且因此再添加咪唑(52 毫克，0.75 毫莫耳)及 PMPC 試劑(175 毫克，0.63 毫莫耳)且混合物在氬氣中於 23 °C 再攪拌 12 小時。藉 TLC 發現反應進展有些許增加(約完成 30%)。藉旋轉蒸發器使溶液體積減少至 0.75 毫升，再以等體積之二氯甲烷稀釋並直接施加至乾燥之 4 毫米矽膠色譜板上。使用 250 毫升二氯甲烷之放射狀層析法以溶離殘留之 DMF，再以含 10% 甲醇之二氯甲烷以溶離產物及起始物，得 144 毫克(20%) BVDU-PA 及 294 毫克未反應 BVDU，依據未反應起始物為基準，BVDU-PA 產率為 67%，若產物之 ^1H NMR 光譜顯示存在有咪唑(δ 7.65 及 7.01)或 DMF (δ 7.95，2.89 及 2.73)，則再進放射狀層析法純化。此方式中，得到油狀或發泡粉末之 TLC 及 ^1H NMR 純度至少 98% 之 BVDU-PA。
 ^1H NMR ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 11.4 (bs, 與 D_2O 交換，1, 3'OH), 8.28 (t, 1, H6), 7.35 (m, 2, Ph), 7.31 (d, 1, 乙烯基 1H), 7.20 (m, 3, Ph), 6.89 (d, 1, 乙烯基 2H), 6.19 (假-t, 1, H1'), 6.08 (t, 與 D_2O 交換，1, 丙氧基 NH), 5.45 (bs, 與 D_2O 交換，1, 3'OH), 4.32 (m, 1, H4'), 4.22 (m, 2.5'CH₂), 3.97 (m, 1, H3'), 3.86 (t, 1 丙氧基 CH), 3.58 (s, 3, CO₂Me), 2.15 (m, 2, 2'CH₂), 1.23 (t, 3, 丙氧基 CH₃).
 $J_{\text{乙烯基 CH}-\text{乙烯基 CH}}=1.35$, $J_{\text{H1}'-\text{H2}'}\sim 6.8$, $J_{\text{H2}'-\text{H3}'}\sim 5$, $J_{\text{H3}'-\text{H4}'}\sim 0$, $\text{alaCH-Ala-NH}_3\text{NH}\sim 6\text{ Hz}$. $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY 2D NMR 分光儀確認光譜研究。

依類以方法，得到 TLC 及 ^1H NMR 純度至少 98% 之苯基 L-丙氧基磷醯胺 5-氟-2'-脫氧-5'-尿苷酯(5FUdR-PA)。

^1H NMR ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 11.9 (bs, 與 D_2O 交換，1, N3H), 7.88 (t, 1,

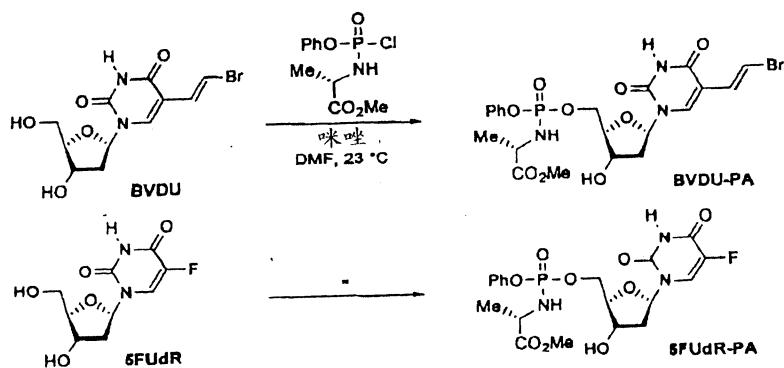
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (68)

H6), 7.36 (m, 2, Ph), 7.19 (m, 3, Ph), 6.15 (假-t, 1, H1'), 6.07 (t, 與 D₂O 交換, 1, 丙氨酸基 NH), 5.42 (bs, 與 D₂O 交換, 1, 3'OH), 4.21 (m, 3, H4'及 5'CH₂), 3.98 (m, 1, H3'), 3.84 (t, 1, 丙氨酸基 CH), 3.58 (s, 3, CO₂Me), 2.08 (m, 2, 2'CH₂), 1.22 (t, 3, 丙氨酸基 CH₃). $J_{H6-5F}=7.1$, $J_{H1'-H2'}\sim 5.2$, $J_{H2'-H3'}\sim 2$, $J_{H3'-H4'}\sim 0$, $J_{\text{丙氨酸基 CH-丙氨酸基 NH}}\sim 6$ Hz. ¹H/¹H COSY 2D NMR 分光儀確認光譜研究。低解析度質譜 (DCI-NH₃), m/z 505 (MNH₄⁺), 488 (MH⁺)。

推論為若在無鹼但在所產生之 HCl 之清除劑存在下, 未保護之 2'-脫氧核糖核苷與 PMPC 之直接縮合反應進展非常良好, 得所需之磷醯胺酯且以 5'-O-幾何選擇性方式進行。BVDU 及 5FUdR 兩者在咪唑存在下於無水 DMF 溶液中與 McGuigan 試劑縮合, 分別可得所需之 BVDU-PA 及 5FUdR-PA (見下文)。反應條件並未最適化, 且雖然反應未進行完全, 但在兩例中易分離之產物混合物以薄層層析法 (TLC) 檢測, 僅由所需產物及起始物所構成。合成圖概述如下:



苯基 L-丙氨酸基磷醯胺(E)-5-(溴乙烯基)-2'-脫氧-5'-尿

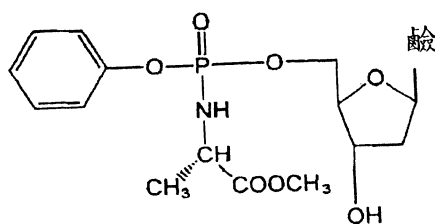
五、發明說明 (69)

苷酯 (BVDU-PA)

TLC 追蹤(以含 10% 甲醇之二氯甲烷作為溶離液)顯示由 BVDU (R_f 0.53) 製得 BVDU-PA (R_f 0.70)。此方法中，獲得 TLC 及 ^1H NMR 純度至少 98% 之 BVDU-PA。 ^1H NMR ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$)。A $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY 2D NMR 光譜確認光譜研究。使用 NH_3 以直接化學離子化法(DCI)之低解析質譜 m/z 593/591 ($\text{M}\cdot\text{NH}_4^+$), 576/574 ($\text{M}\cdot\text{H}^+$)。

苯基 L-丙氨酸鹽基磷醯胺 5-氟-2'-脫氧-5'-尿苷酯 (5FUdR-PA)。依類似方法，獲得 TLC 及 ^1H NMR 純度至少 98% 之 5FUdR-PA。 ^1H NMR ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$)。A $^1\text{H}/^1\text{H}$ COSY 2D NMR 光譜確認光譜研究。低解析質譜(DCI- NH_3), m/z 505 ($\text{M}\cdot\text{NH}_4^+$), 488 ($\text{M}\cdot\text{H}^+$)。

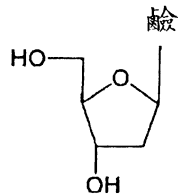
因此，本發明一目的係有關一種製備呋喃糖基核苷之 2'-脫氧、3'-羥基、5'-磷醯胺酯之方法，該方法包含使 2'-脫氧、3'-羥基及 5'-羥基之未保護呋喃糖基核苷在 HCl 清除劑存在下與磷氯酸鹽反應。一具體例中，氯磷酸鹽包括衍生自胺基酸如丙氨酸之磷取代基。一具體例中，磷氯酸鹽為苯基 L-甲氧基丙氨酸磷氯酸鹽。因此，於進一步具體例中，本發明係有關一種形成下式化合物之方法：



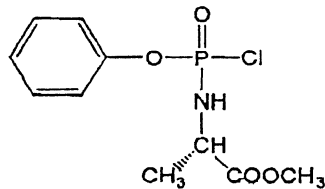
其中"鹼"表示核苷酸鹼(如尿嘧啶、胸腺嘧啶、胞嘧啶、腺

五、發明說明 (70)

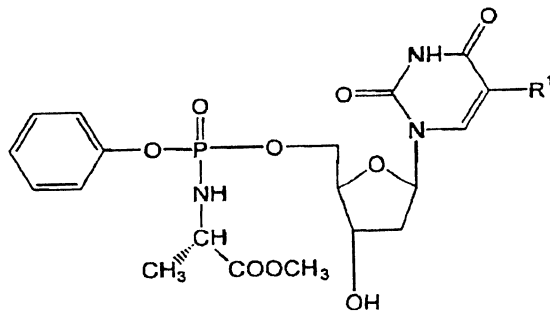
嘌呤或鳥嘌呤，但較好為尿嘧啶，或其衍生物)；該方法包括之步驟為使下式化合物：



在 HCl 清除劑存在下與下式化合物反應：

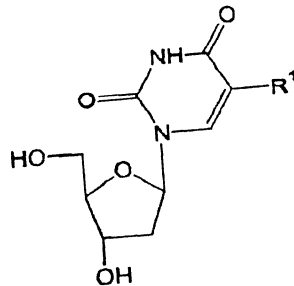


一具體例中，呋喃基核苷為尿苷核苷。另一具體例中，呋喃糖基核苷為尿苷核糖呋喃糖基核苷。另一具體例中，呋喃糖基核苷為尿苷β-D-核糖呋喃糖基核苷。因此於一具體例中，本發明係有關一種形成下式化合物之方法：

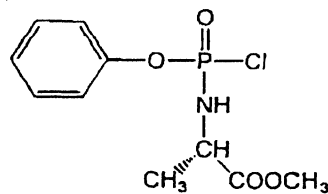


其中 R¹ 為取代基(包含例如上述 R¹ 所述者)；該方法包括之步驟為使下式化合物：

五、發明說明 (71)



在 HCl 清除劑存在下，與下式化合物反應：



一具體例中，反應係在無鹼但在 HCl 清除劑如咪唑存在下進行。另一具體例中，反應係在非水性介質中進行。另一具體例中，反應係在包括無水二甲基甲醯胺(DMF)之非水性介質中進行。

化學及細胞為主之分析

該等分析中使用兩種細胞系，H630R10 (Copur 等人 (1995)) 及正常結腸表皮細胞 CCD18co (ATCC)。H630P (Copur 等人 (1995)) 細胞系經選擇為對 10 μ M 5-FU 之抗性，而提高至 H630R10。該等細胞系之特徵為表現升高量之 TS 酵素。正常結腸表皮細胞型 CDD18co (得自 ATCC) 用以與 H630R10 比較其對測試化合物之敏感性。如 Pegram 等人 (1997) 所述般製備表現 p185-HER2 之細胞系或僅新徽素標記物，以西方墨點分析測定顯示 H630R 及 H630R10 表現胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶酵素比 CCD18co 增加 10

五、發明說明 (72)

倍。

藉結晶紫程序 (Sugarman 等人 (1985) 及 Antelman 等人 (1995)) 測定測試化合物阻斷細胞增殖之能力。

化合物溶於二甲基亞砜中成 1 M 濃度。其若需要則進一步稀釋至 DMEM 細胞培養基中且隨後加入 96 洞微滴定盤之第一個洞中。在標的細胞系上各濃度測試三次。化合物測試濃度自 1 μ M 至 3000 μ M。細胞以化合物培育 72 小時，洗滌滴定盤，且細胞以甲醇固定並以 Sugarman 等人 (1995) 及 Antelman 等人 (1995) 所述般以結晶紫著色。

細胞系中 TS 量之西方墨點分析

以人類正常結腸表皮細胞型 CCD18co (得自 ATCC，馬納薩斯，VA)、結腸腺瘤細胞系 H630R10 (得自 S. Copur 博士，Yale 大學) 及 HER2 轉染之乳癌細胞系 (Pegram 等人 (1997)) 進行西方墨點實驗。細胞溶解於 RIPA 緩衝液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 0.1% SDS 及 0.5% 脫氧膽酸，鈉鹽及蛋白酶抑制劑)。使用 BCA-200 蛋白質分析套組 (得自 Pierce, Rockford, IL) 測定蛋白質濃度。以 12% SDS-PAGE 自各細胞系溶解 10 微克蛋白質。分離之蛋白質轉移至 PVDF 膜 (得自 Amersham，英國) 上，再以人類胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶單株主要抗體及抗微管蛋白單株抗體 (由 NeoMarkers, Fremont CA 製造) 免疫墨點。使用辣根過氧化酶連接之羊抗小鼠 Ig 作為二級抗體 (Amersham)。使用 ECL+ 套組 (Amersham) 偵測免疫活性。定量對應於胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶之區帶並藉成像分

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (73)

析(分子動力學優動)常態化至微管蛋白者。

細胞系中 TS mRNA 之 RT-PCR 分析

使用 RT-PCR 定量不同細胞系中人類胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶轉錄之表現量。人類胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶及 β -肌纖蛋白之寡核苷引子設計如下：胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶有義引子 5'-GGGCAGATCCAACACATCC-3' (相當於胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶 cDNA 序列之鹽基 208-226，基因銀行登記號 X02308)，反義引子 5'-GGTCAACTCCCTGTCCTGAA-3' (相當於鹽基 564-583)， β -肌纖蛋白有義引子 5'-GCCAACACAGTGCTGTCTG-3' (相當於 β -肌纖蛋白基因序列之鹽基 2643-2661，基因銀行登記號 M10277) 及反義引子 5'-CTCCTGCTTGCTGATCCAC-3' (相當於鹽基 2937-2955)。

使用 Rneasy 迷你套組 (得自 Qiagen, Valencia, CA) 自 CCD18co 及 H630R10 細胞單離所有 RNAs。爲了追蹤可能之 DNA 污染， β -肌纖蛋白擴增用之引子設計成跨越 exon4/intron5/exon5 接合點。基因組 DNA 模板引致 313 bp β -肌纖蛋白片段，及 cDNA 模板產生 210 bp 產物。

使用超錄 (SuperScript) 預擴增系統 (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD) 進行逆轉錄反應。依循製造商指示於 20 微升體積緩衝液中施加合計 3 微克 RNA 以進行逆轉錄反應。於 48 微升體積之含 3 微升得自逆轉錄反應之 cDNA 混合物、3 mM $MgCl_2$ 、50 mM KCl、20 mM Tris-Cl、pH 8.4，0.2 mM 各 dNTP，0.4 μ M 胸腺嘧啶脫氧核苷酸酶有義及反義引子及

五、發明說明 (74)

3 單位 Tag DNA 聚合酶(得自 Promega, Madison, WI) 中進行 PCR 反應。反應混合物在 94 °C 培育 3 分鐘, 接著進行 94 °C 培育 1 分鐘、58 °C 培育 1 分鐘及 72 °C 培育 1 分鐘之 10 次循環。10 次循環後, 添加 2 微升之人類 β -肌纖蛋白引子達 0.2 μ M 終濃度, 使最終反應體積成為 50 微升。PCR 反應持續進行 28 次循環, 接著在 72 °C 培育 7 分鐘。

於 2% 瓊脂糖膠中電泳解析 5 微升 PCR 產物, 再以 SYBR 金核苷酸凝膠著色劑(得自 Eugene, OR 之分子探針公司)著色。定量相當於胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶之 DNA 區帶並藉分子動力學擾動常態化至 β -肌纖蛋白者。

北方墨點分析

自 Invitrogen (Carlsbad, CA) 獲得北方墨點並雜化至選殖之 TS cDNA 探針。雜化訊號對核糖體蛋白 S9 常態化作為持家轉錄。若與正常組織對照組比較, 常態化訊號增強至少 2 倍, 則腫瘤視為可過度表現 TS mRNA。

人類胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶之選殖、表現及純化

使用修飾之人類 TS cDNA 於 pGCHTS 中架構用於人類胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶(TS)之大腸菌質體表現載體。得自 Dan Santi 博士之此單株含有用於人類 TS 之完全打開之讀碼。

對大腸菌中表現而言, 完全之人類 TS ORF 次選殖入 T7 啟動子表現載體 pET28a (Novagen 工業)。所得質體載體編碼人類 TS 之合成作為含 6 個組氨酸之重組融合蛋白質, 接著編碼凝血酶斷裂位置。此融合蛋白質於人類 TS 胺基

五、發明說明 (75)

端共加入 20 個額外胺基酸。爲了產生重組蛋白質，在控制 lac 操縱子之條件下，將人類 TS 表現載體導入大腸菌菌株 BL21(DE3)(具有插入染色體中之 T7 RNA 聚合酶基因之菌株)。

人類 TS-聚-His 融合蛋白質使用金屬螯合親和性樹脂 (Novagen 工業) 純化。蛋白質純化後在 10% SDS 聚丙烯醯胺凝膠上電泳。使用 Pierce BCA 蛋白質分析測定蛋白質濃度。自 500 毫升大腸菌培養基中回收約 10 毫克人類 TS 融合蛋白質。當見到銀染色時，僅明顯有對應於人類 TS 之區帶。以抗-TS 單株抗體 TS106 (NeoMarkers) 進行西方墨點分析確認人類 TS 區帶之鑑定。

胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶酵素活性分析

使用 Wahba 及 Friedkin (1961) 之分光計分析測量 TS 活性。此分析中，在 dUTP 轉化成 dTTP 時，共因子 5,10-伸甲基四氫葉酸酯氧化成二氫葉酸酯後，測量 340 nm 增加之吸收度而追蹤 TS 活性。依此方法製備之酵素之特異活性爲 0.5 至 0.65 單位/毫克蛋白質。一單位係定義爲每分鐘產生一微莫耳 dTNP。此值類似於 Pedersen-Lane 等人 (1997) 所報導者。

實驗結果

該等結果建立利用胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶作爲腫瘤細胞中細胞毒素產生劑之可行性。此分析中，利用 CCD18co 細胞 (正常結腸表皮) 及 H630R10 (比胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶表現大數倍之 H630P 之衍生物) (Copur

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (76)

等人(1995))。進行各型細胞中 TS 蛋白質量之西方墨點分析並比較所用抗體對人類微管蛋白而在樣品間常態化(表 5)。得到 H630R10 (13x) 及 CCD18co (1x) 之順序等級。

亦比較藉 RT-PCR 測定時細胞系間之 mRNA 量。參見表 5。類似於西方墨點分析，當對 β -肌纖蛋白 RT-PCR 標準常態化時，順序等級為 H630R10 (24x) 及 CCD18co (1x)。

表 5

於 CCD18co 及 H630R10 細胞中 TS 蛋白質及 mRNA 表現之分析

細胞系	TS 表現	
	相對 mRNA 量	相對蛋白質量
CCD18co	1	1
H630R10	24	13

於腫瘤細胞中 HER2 原癌基因表現增加 TS 量

使用免疫墨點技術評估新黴素及 HER2/neu- 轉染之人類乳房肉瘤細胞中 TS 表現量。結果(參見圖 7)證明人類 HER2/neu cDNA 轉染及過度表現後 TS 表現增加。以 HER2/neu- 轉染之人類卵巢肉瘤細胞得到類似結果。MCF7/HER2 及 MCF7/neo 細胞系為本發明分析之標的細胞，係由於 TS 在該等細胞型中誘發最顯著之故。

氟嘧啶 5-FUdR 經由類似於 5-FU 之機制抑制細胞生長。此包含由併入核苷酸及抑制 TS 酵素活性產生之細胞毒性

五、發明說明 (77)

影響(Goodman 及 Gilman (1996))。因此預期表現更大量 TS 之細胞經常比表現較低量酵素之細胞更具抗性(見較高 IC_{50})。表 6(第 1 行)證明此為所得結果。再者，如早期研究所預期，BVDU 在此分析中具較低活性(表 6；第 2 行)。此假設因 BVDU 無法藉人類胸腺嘧啶脫氧核苷激酶單磷酸化之結果，其為結合至胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶之必要條件(Balzarini 等人(1987), Balzarini 等人(1993), Carreeras 及 Santi (1995))。該兩種細胞系對 BVDU 之敏感度並無明顯差異。以核糖部份之 5'-羥基之磷酸胺化發生 BVDU 活化。BVDU-PA (表 6，第 3 行)對較高表現 H630R10 細胞系比對 CCD18co 細胞之活性高 10 倍以上。

表 6

較大量 TS 表現預測對 BVDU-PA 具較高敏感度

化合物	$IC_{50}(\mu M)^1$	
	CCD18co	H630R10
1. 5-FUdR	9.5M±0.42	169.8±2.4
2. BVDU	2540±58.2	2876.2±54.5
3. BVDU-PA	2810.2±75.1	216.7±15.7

1 - 低於 20% 之標準誤差

接著比較該兩種細胞系對 5FUdR 及 BVDU 磷酸胺酯衍生物(BVDU-PA)之敏感度。由於 5FUdR 經由 5FU 之相同機制抑制細胞生長，因此預期 CCD18co 將比 H630R10 更敏感

五、發明說明 (78)

(具較低 IC_{50})，因後者細胞系具較高細胞內胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶量之故。表 7 所列數據證明此為使用前述結晶紫分析所得之結果。此結果亦說明以目前癌症化學療法之主要問題之一，亦即其對正常細胞之毒性經常大於對癌細胞之毒性。表 7 數據顯示正常結腸表皮細胞 (CCD18co ; $IC_{50}=9.5 \mu M$) 對 5FUdR 之敏感度比 H630-R10 結腸腫瘤細胞 ($IC_{50}=169.8$) 大約 18 倍。但前藥基質 BV DU-PA 逆轉此關係。由 TS 轉化成細胞毒性部份之 BV DU-PA 比高 TS 表現 H630R10 細胞 ($IC_{50}=216.7$) 之效力比對正常結腸細胞型 ($IC_{50}=2810.2$) 約大 13 倍。

表 7

TS 前藥 BV DU-PA 比對胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶過度表現腫瘤細胞系比對正常細胞(1, 2)更具活性

化合物	IC_{50}	
	CCD18co	H630R10
	(正常結腸表皮)	(結腸癌細胞系)
5-FUdR(氟尿嘧啶)	9.5 μM	169.8 μM
BV DU-PA	2810.2 μM	216.7 μM

1. 由數次分析所得之代表性數據。
2. 在各濃度以三次洞中進行分析，標準誤差小於 20%。

此結果使用 Alamar 藍分析(購自 ACCUMED 國際公司，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

五、發明說明 (79)

西湖，OH) 確認。下列表 8 之數據顯示甚至 5-FU 具有非選擇性性質，使其對正常及腫瘤細胞均具毒性。

表 8

正常細胞至少如腫瘤細胞對 5- 氟尿嘧啶般之敏感度

正常細胞	IC ₅₀	腫瘤細胞	IC ₅₀
結腸表皮 (CCD18co)	0.2	乳房(MCF7)	0.61
皮膚纖維母細胞 (DET551)	1.1	乳房(MDA 468)	0.40
肺表皮 (W138)	0.4	肉瘤(Saos 2)	11.30

X=0.57 μM

X=4.10 μM

本發明之額外分析需要在含及不含 N5N10- 伸甲基四氫葉酸酯及含候選前藥之人類胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶之反應混合物中篩選候選藥物。候選前藥之離去基(如在嘧啶 5 位置)以例如使用本技藝悉知之方法以氘標記。對照基質同樣地在相同反應條件下標記(如 5-³H) dUMP。類似於 Carreras, C.W. 及 Santi, D.V. (1995) 及其中之參考文獻中之描述進行分析。人類胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶可自含有經表現之人類胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶之大腸菌中純化。參見 Davisson, V.J. 等人 (1989) 及 Davisson, V.J. 等人

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

訂

五、發明說明 (80)

(1994)。此方法提供可篩選大量候選化合物之可量產之分析。

TS 前藥代謝之細胞內前藥之測定

重要地是測定 TS 前藥代謝之細胞內前藥以證明活化作用及作用之提議機制並用以定義為候選治療劑之藥劑。芳基磷酸二酯鹽胺酯之細胞內代謝之可接受觀點包含酵素轉化成羧酸、磷酸單酯鹽胺酯之分子內重排成 5'-單磷酸鹽基核苷 (Valette 等人(1996))。但此機制不像描述所有磷酸鹽胺酯為主之原核苷之細胞內加工。例如，對芳基磷酸單酯鹽胺酯加工提出不同機制，一種包含藉磷酸鹽胺酯水解物使磷酸鹽胺酯簡單地直接轉化成單磷酸酯物種 (McIntee 等人(1997) 及 Fries 等人(1995))。無關於未遮蔽核苷單磷酸酯之機制，此分析將在細胞內偵測細胞內單磷酸酯 TS 轉化成細胞毒性化合物之產物。

前藥化合物與 TS 之反應所提產物示於圖 8。為了完成此任務，細胞以可誘發高 TS 表現細胞系之 50% 生長抑制作用之量之前藥化合物培育(於同上之 72H 分析中)。使用低及高 TS 表現子細胞(如 CCD18co 對 H630R10)。進行時間歷程研究，其中依據 McIntee 等人(1997)所述方法加工該經處理細胞。細胞在 -20 °C 下於含 60% 甲醇之水中溶解並離心移除顆粒狀殘留物。上澄液經乾燥並在 -20 °C 貯存。先以 RP-HPLC 評估該份數再以 LC-MS 評估以證明磷酸鹽胺酯轉化成單磷酸酯亦確使單磷酸酯藉胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶之轉形作用。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (81)

利用純化之胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶證明基質活性

此分析證明未來 TS 酵素製劑之特異活性，以確信此製劑之經時活性，並決定篩選適宜活性之化合物在活體外反應條件下是否可使 TS 酵素去活化。

爲了測定前藥化合物與純化之重組體 TS 酵素一起培育時產生何種反應產物，使用類似於 TS 活性分析所用之反應條件以於活體外產生反應產物。該等反應產物接著以 GC-質譜儀分析以鑑定所形成之確實分子。

活體內效力研究

1. 細胞系及細胞培養

自 Dennis Slamon 博士 (UCLA) 獲取 MCF7/NEO 及 MCF7/HER-2-轉染之乳房細胞系。MCF7/HER-2-轉染之人類乳房肉瘤細胞及其他 HER-2/neu-轉染之細胞系證明 TS 表現增加 (Pegram 等人 (1997))。因此，除了 CCD18co 及 H630R10 以外，該等細胞系適於測試對前藥之不同反應。首先使用上述活體外實驗方法之相同方法證實活體外 MCF7/NEO 及 MCF7/NER-2 細胞對 5-FUdR 及 BVDU-PA 之差異反應。得自 Bertino 博士 (Banerjee 等人 (1998)) 之 HT1080 腫瘤細胞系亦同樣地特徵化。

2. 測試前藥化合物之異種移植模型

MCF7/HER-2 乳房細胞於無胸腺老鼠中以高效率形成具體移植且其生長性質經充分特徵化 (Pegram 等人 (1997))。此異種移植模型之生長性質均一，使得可預測以不同藥物組合處理之該等腫瘤生長軌跡之電腦模型得以由 Angela

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (82)

Lopez 博士及 Elliot Landau 博士於 UCLA 醫藥學校之生物測定學系發展完成 (Lopez 等人, 未審定之副任務)。由於此模型之均一性及再現性, 使其變得非常可用於測試新穎之實驗治療劑。例如, 此模型形成藥物 Herceptin® 之預備活體內分析之基礎, 該藥物近來已由美國食品藥物管理局認可可用以治療轉移性乳癌 (Pegram 等人 (1998))。此結腸腫瘤細胞系 (HT1080/NEO 及 HT1080/E2F1.1) 已證明其腫瘤發生性 (Banerjee 等人 (1998))。

Ras-轉形之 NIH 3T3 細胞系皮下移植入免疫缺乏之老鼠中。先直接進行腫瘤內注射治療。預期結果為人類 TS 表現增量或標的酵素藉候選藥物引致增強之抗腫瘤活性。以表現增量之人類 TS 之人類腫瘤或標的酵素進行類似研究並證明對藥物之反應效力與人類 TS 表現量或標的酵素有關。視情況, 如上述般進行實驗但藥物以靜脈內對動物投藥以解決與候選藥物之效力、毒性及藥理學有關之議題。進一步具體例中, 對照藥物將接受有效量之前述"前藥"段落中鑑定之化合物。

詳言之, 可使用兩種不同異種移植模型進行活體內研究。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (83)

表 9

用於活體內效力測試之腫瘤發生細胞系

異種移植	相對 TS 表現	細胞源	來源
MCF7/NEO	低(1X)	人類乳房肉瘤	Slamon 博士
MCF7/HER2	高(20X)		
H630R10	高(13X)	人類結腸肉瘤	Copur 等人(1995)
HT1080/NEO	低(1X)	人類結腸肉瘤	Bertino 博士
HT1080/E2F1.1	高(14X)		Banerjee 等人(1998)

具 TS 定義表現之測試細胞(示於表 8)如所述(Pegram 等人(1997))般以 5×10^6 / 部位靜脈內注射入 4-6 週齡(20 至 25 克)CD-1 (nu/nu)無胸腺老鼠(Charles River 實驗室, 威明頓, MA)之側腹區。各處理組(載體對照組溶液或前藥化合物)使用 8 隻老鼠(每籠 4 隻)。每隻老鼠建立兩個異種移植, 同時減少各實驗所需之動物數並改良統計率以在各組間偵測反應差異性。藉於耳朵上貼標籤以辨別各老鼠, 使得除了分析各組平均以外尚可計算個別老鼠之異種移植軌跡。MCF-7 乳房異種移植模型中使用之所有老鼠為雌性且在細胞注射前以皮下施用於生物可降解黏合劑中之 17B-雌二醇(美國 Innovative 研究, Toledo, OH)(1.7 毫克雌二醇/粒片)引發。以單一盲眼觀察藉連續微米測量每週二次追蹤以(寬度² × 長度)/2 計算之預料腫瘤體積。對各處理組分配動物使得各組中平均開始腫瘤體積相同。進行統計學測試(單因素 ANOVA)以確使處理組間起始腫瘤體積均

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (84)

一。於第一組實驗中藉單次 I.P. 注射投與前藥或等體積載體對照溶液。初次實驗中若效力相同，將以總前藥劑量等於單次 I.P. 劑量研究中界定之 IC_{10} 之皮下日劑量療程進行額外研究 5 天。

對該等效力實驗而言，當各組中平均異種移植體積達 50 MM^3 時開始量前藥劑量。使用圖形分析之描述性統計學對前藥處理之平均腫瘤體積與對照組處理者動物之腫瘤體積作圖。應用統計學測試(單因素 ANOVA)以比較處理組間之異種移植體積差異。對 ANOVA 電腦化施用 Log-轉形作用，當顯示時，使異種移植體積數據組變異穩定。視異種移植體積數據分佈而定，若需要可施用非參數之統計學測試。使用所述(Pegram 等人(1997))之統計學利用前藥處理/對照組處理之腫瘤體積比(T/C 比例)比較高 TS 表現之異種移植間之效力與低 TS 表現者之差異。此方法可調節高 TS 表現異種移植與低 TS 表現異種移植間固有生長率之差異。

亦可如 Harris, MP 等人(1996)及 Antelman, D. 等人(1995)所述般進行活體內研究。

3. 未帶有腫瘤之無胸腺老鼠中劑量發現研究以界定最大忍耐劑量(MTD)

經由腹膜內(I.P.)路徑以單一劑量前藥注射每組 6 隻之 CD-1 nu/nu 無胸腺老鼠(Charles River 實驗室)(3 隻雄性，3 隻雌性)。劑量實驗性地自達到血清濃度等於活體外 IC_{50} 之前藥量所界定之初劑量開始，假設前藥分佈之體積限制

五、發明說明 (85)

至老鼠之總體內水(total body water, TBW)(0.6X 克數體重之 TBW_{老鼠})。若在此量未觀察到毒性，則在一半之 log 間隔時於 6 隻老鼠組中進行劑量階梯式擴大。若在實驗劑量時即具毒性，則同樣地進行重複劑量階梯式擴大實驗，自毒性劑量之 10% 開始進行。每天觀察老鼠致死率、訓練行為及取食物及水之能力。每週評估老鼠體積。MTD 定義為在觀察期間導致體重減低 10% 或以下之劑量，或劑量 = LD₁₀ 之 90%。若在特定劑量產生致死性則重複實驗(假設在此劑量無毒性)。觀察期約 60 天。若在特定劑量不具毒性則在 3 週間隔於預測個體區中進行劑量放大。

雖然本發明已參考特定具體例詳細說明，但熟悉本技藝者將了解在不違離本發明精神及範圍內可作各種變化及修正。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (86)

參考資料

文獻

- Abraham et al., *J. Med. Chem.*, Vol. 39, pp. 4569-4575 (1996).
- Agarwala, S.S. et al. (1988) *J.M. Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 12(4):823-833
- Akdas, A. et al. (1996) *Eur. Urol.* 29(4):483-486
- Almasan, A. et al. (1995) *Cancer Metastases Rev.* 14:59-73
- Andersen, et al. (1995) *Acta Oncol.* 34(4):499-504
- Anglada, J.M. (1996) *J. Heterocycl. Chem.* 33:1259-1270
- Antelman, D. et al. (1995) *Oncogene* 10:697
- Asakura, J. et al. (1988) *Tetrahedron Lett.* 29:2855-2858
- Asakura, J. et al. (1990) *J. Org. Chem.* 55:4928-4933
- Balzarini, J. et al. (1987) *Molecular Pharm.* 32:410-16
- Balzarini, J. et al. (1985) *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 7:19-28
- Balzarini, J. et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:6332-6337
- Balzarini, J. et al. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225:363-369
- Balzarini, J. et al. (1997) *FEBS Lett.* 410:324-328
- Banerjee, D. et al. (1998) *Cancer Res.* 58:4292-4296
- Banerjee, D. et al. (1995) *Acta Biochem. Pol.* 42(4):457-464
- Barbour, K.W. et al. (1992) *Mol. Pharmacol.* 42:242-8
- Barr, P.J. et al. (1983) *J. Biol. Chem.* 258(22):13627-13631
- Barr, P.J. et al. (1983) *Biochemistry* 22:1696-1703
- Barr, P.J. (1981) *J. Med. Chem.* 24:1385-1388
- Barr, P.J. (1983) *J. Biol. Chem.* 258:3627-3631
- Barrett, J.E. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* 120:449-450
- Bergstrom, D.E. et al. (1984) *J. Med. Chem.* 27:279-284
- Benzaria et al., *J. Med. Chem.*, Vol. 39, p. 4958 (1996)
- Bergstrom, et al. (1981) *J. Org. Chem.* 46:1432-1441
- Bertino, J.R. et al. (1996) *Stem Cells* 14:5-9

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (87)

- Bigge, et al (1980) *J. Amer. Chem. Soc.* 102:2033-2038
- Bohman, C. et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:8036-8043
- Brisson (1993) *Biochem. Biophys. Acta* 1155(1):25-41
- Budavari, eds., *Merck Index* (12th Ed., 1996)
- Burck, K.B. et al. eds. "Oncogenes: An Introduction to the Concept of Cancer Genes"
(Springer-Verlag, New York 1988)
- Callahan, A.P., et al. (1989) *Commun Nucl Med* 20: 3-6
- Canute, G.W. et al. (1996) *Neurosurgery* 39:976-983
- Carreras, C.W. et al. (1995) *Annu. Rev. Biochem* 64:721-762
- Carter, P. et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285-4289
- Cava, M.P. et al. (1985) *Tetrahedron* 41:5061-5087
- Chadhuri, N.C. et al. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* 117:10434-10442
- Chakravarty P.K. et al. (1983) *J. Med. Chem.* 16(5):638-644
- Chen, C.H. et al. (1998) *J. Biomed. Sci.* 5(4):231-252
- Chen, L. et al. (1996) *Cancer Research* 56:1331-1340
- Cho, Y.M. et al. (1994) *Tetrahedron Lett.* 25:1149-1152
- Christopherson, K.S. et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 89:6314-6318
- Chu, E. et al. (1996a) *Cancer Treat. Res.* 87:175-195
- Chu, E. et al. (1996b) *Adv. Enzyme Regul.* 36:143-163
- Clarke, R. (1996) *Brest Cancer Res. Treat.* 39:1-6
- Clark, J.W. (1997) *Semin. Oncol.* 24 (Suppl.):518-519
- Connors, T.A. (1986) *Xenobiotica* 16(10/11):975-988
- Connors, T.A. (1996) *Ann. Oncol.* 7:445
- Connors, T.A. and Knox, R.J. (1995) *Stem Cells* 13:501-511
- Copur, S. et al. (1995) *Biochem. Pharm.* 49(10):1419-26
- Crisp, G.T. (1989) *Synth. Commun.* 19:2117-2123
- Dale, et al. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:2238-2242
- Davisson, V.J. et al. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:9145-48
- Davisson, V.J. et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:30740
- DeClercq, E. et al. (1983) *J. Med. Chem.* 26:661-666

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (88)

- Dicken, A.P. et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11797-801
- Dirven, H.A. et al. (1995) *Cancer Res.* 55:1701-1706
- Dorr, R.T. and Von Hoff, D.D., eds. "Cancer Chemotherapy Handbook" 2nd ed. (Appleton and Lange 1994), pp. 768-773, 1020
- Dunn, W.J. et al. (1996) *J. Med. Chem.* 39:4825
- Dyer, R.L. et al. (1991) "Nucleic Acids Chemistry: Improved and New Synthetic Procedures, Methods, and Techniques." Townsend, L.B. & Tipson, R.S., eds. (Wiley-Interscience, New York, NY) Vol. 4:79-83
- Eccles, S.A. et al. (1994-95) *Invasion Metast.* 14(1-6):337-348
- El-Deiry, W.S. (1997) *Current Opinion in Oncology* 9:79-87
- Fan and Bertino, J.R. (1997) *Oncogene* 14(10):1191-1200
- Farquhar et al. (1994) *J. Med. Chem.*, Vol. 37, pp. 3902-3909
- Farquhar et al. (1994) *J. Med. Chem.*, Vol. 38, pp. 488-495
- Felip, et al. (1995) *Cancer* 75(8):2147-2152
- Findlay, M.P. et al. (1997) *Br. J. Cancer* 75:903-909
- Finer-Moore, J. S. et al. (1994) *Biochemistry* 33:15459-15468
- Finer-Moore, J. et al. (1993) *J. Mol. Bio.* 232:1101-1116
- Freed et al. (1989) *Biochem. Pharmacol.*, Vol. 38, pp. 3193-3198
- Fries, K.M., et al. (1995) *J. Med Chem* 38:2672-80
- Garrett, C. et al. (1979) *Biochem* 18:2798-2804
- Goodwin, J.T. et al. (1993) *Tetrahedron Lett.* 34:5549-5552
- Gottesmanm, M.M. et al. (1995) *Annu. Rev. Genet.* 29:607-649
- Graham, D. et al. (1998) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1:1131-1138
- Gros, P. et al. (1986a) *Cell* 47:371-80
- Gros, P. et al. (1986b) *Nature* 323:728-731
- Gros, P. et al. (1986c) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:337-41
- Gudkov, A.V. et al. (1987) *Somat. Cell Mol. Genet.* 13:609-19
- Hamilton-Miller, J.M.T. and Smith, J.T., eds. *B-Lactamases* (Academic Press, 1979)
- Hardy, L.W. et al. (1987) *Science* 235:448-455
- Harris, M.P. et al. (1996) *Cancer Gene Therapy* 3:121

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (89)

- Hashimoto, Y. et al. (1987) *Anal. Biochem.* 167:340-346
- Hashimoto, Y. et al. (1988) *Cancer Biochem. Biophys.* 10:1-10
- Haskell, C.M. ed. *Cancer Treatment* 4th Ed., J. Dyson, Ed., (Philadelphia: W.B. Saunders Co. 1995)
- Hengstschlager, M. et al. (1996) *Oncogene* 12:1635-43
- Hermann, J.G. (1995) *Cancer Res.* 55(20):4525-4530
- Hobbs, F.W. Jr. (1989) *J. Org. Chem.* 54:3420-3422
- Horikoshi, T. et al. (1992) *Cancer Res.* 52:108-116
- Hostetler et al. (1997) *Biochem. Pharmacol.*, Vol. 53, p. 1815
- Houze, T.A. (1997) *Tumour Biol.* 18:53-68
- Hsiao, L.Y. et al. (1981) *J. Med. Chem.* 24:887-889
- Hudziak, R.M. et al. (1988) *PNAS USA* 85:5102-5106
- Hudziak, R.M. et al. (1990) *Cell Growth & Differentiation* 1:129-134
- Husain, I. et al. (1994) *Cancer Res.* 54:539-546
- Hussain, S. P. et al. (1998) *Cancer Res.* 58(18):4023-4027
- Imai, K. et al. (1969) *J. Org. Chem.* 24:1547-1550
- Jackman, A.L. (1995) *Anti-Cancer Drug Design* 10:573-589
- Jackman, A.L. et al. (1995) *Ann. Oncol.* 6(9):871-881
- Johnson, P.G. et al. (1997) *J. Clin. Oncol.* 15:1923-1931
- Johnston, P.G. (1991) *Cancer Res.* 51:6668-6676
- Johnston, P.G. (1994) *J. Clin. Oncol.* 12:2640-2647
- Johnston, P.G. (1995) *Cancer Res.* 55:1407-1412
- Kamb, A. (1998) *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 227:139-148
- Kashani-Sabet, et al. (1988) *Cancer Res* 48:5775-5778
- Knighton, E.R. et al. (1994) *Nature Struct. Biol.* 1:186-194
- Kobayashi, H. et al. (1995) *Japanese J. Cancer Res.* 86:1014-1018
- Komaki, K. (1995) *Breast Cancer Res. and Treat.* 35:157-162
- Kornmann, M. (1997) *Cancer Letters* 118:29-35
- Kuroboshi, M. et al. (1991) *SYNLETT.* 909-910
- Kuroboshi, M. et al. (1994) *SYNLETT.* 251-252

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (90)

- Lasic, D.D. (1996) *Nature* 380:561-2
- Lam, K.S. (1997) *Anticancer Drug Research* 12:145-67
- Lasic, D.D. (1996) *Nature* 380:561-562
- Lee, Y. (1997) *Exp. Cell Res.* 234:270-276
- Leichman, C.G. (1997) *J. Clin. Oncol.* 15:3223-3229
- Lenz, H.J. (1995) *PCR Methods Appl.* 4:305-308
- Lewis, J.G. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:3176-3181
- Li, W.W. et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:10436-10440
- Lin W-Y., et al. (1997) *Eur J. Nucl. Med* 24: 590-595
- Livak, K. J. et al. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:4831-4837
- Livingstone, L.R. et al. (1992) *Cell* 70:923-936
- Lönn, U. et al. (1996) *Cancer* 77(1):107-112
- Lovejoy, et al. (1997) *J. Pathol.* 181:130-5
- Maeldandsmo, G. M. (1996) *Br. J. Cancer* 73:909-916
- Masters, J.N. and Attardi, G. (1983) *Gene* 21:59-63
- McGuigan, C. (1992) *Antiviral Res.* 17:311-321
- McGuigan, C. (1998) *Antiviral Chem. Chemother.* 9:187-197
- McGuigan, C. (1993) *J. Med. Chem.*, 36:1048-1052
- McGuigan, C. (1996) *J. Med. Chem.* 39:1748-1753
- McGuigan, C. et al. (1994) *FEBS Let* 351:11-14
- McIntee, E.J. (1997) *J. Med Chem.* 40:3323-3331
- McKay, G.A. et al. (1994) *Biochem* 33:6936-6944
- Meden, et al. (1994) *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 120(6):378-81
- Meier et al. (1997) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 7:1577
- Meier et al. (1997) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 7:99
- Meier et al., (1997) *International Antiviral News.* 5:183
- Melton, R.G. and Sherwood, R.E. (1996) *J. Natl. Cancer Inst.* 88:153-65
- Miller, J.H. "A short course in bacterial genetics: A laboratory manual and handbook for *E. coli* and related bacteria" (Cold Spring Harbor Press 1992)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (91)

- Mitchell, M.S. (1996) *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 1(2):215-218
- Montfort, W.R. et al. (1997) *Pharmacol. Ther.* 76(1-3):29-43
- Morgan, A.S. et al. (1998) *Cancer Res.* 58:2568-2575
- Murakami et al. (1998) *Mutat. Res.* 400(1-2):421-437
- Nakano, T. et al. (1994) *Biochemistry* 33:9945-52
- Noder, et al. (1996) *Pathol. Res. Pract.* 192:768-80
- Osaki, M. et al. (1997) *Apoptosis* 2:221-226
- Parr, A. (1998) *Biochem. Pharmacol.* 56:231-235
- Pederson-Lane, J. (1997) *Protein Expression and Purification* 10:256-262
- Pegram, M.D. (1998) *J. Clin. Oncol.* 16(8):2659-2671
- Pegram, M.D. et al. (1997) *Oncogene* 15:537-547
- Perry, K. et al. (1990) *Proteins* 8:315-333
- Pestalozzi, B.C. (1997) *J. Clin. Oncol.* 15:1923-1931
- Peters, G.J. et al. (1995) *Eur. J. Cancer* 31A:1299-1305
- Phelps, M.E. et al. (1980) *J. Med. Chem.* 23:1229-1232
- Pupa, et al. (1993) *Oncogene* 8(11):2917-23
- Rigg, A. et al. (1997) *Mol. Med. Today* 3:359-366
- Roberts, D. (1966) *Biochem.* 5:3546-3548
- Robins, M.J. et al. (1983) *J. Org. Chem.* 48:1854-1862
- Robins, M.J. et al. (1981) *Tetrahedron Lett.* 22:421-424
- Robins, M.J. et al. (1982) *Can. J. Chem.* 60:554-557
- Roninson, I.B. et al. (1984) *Nature* 309:626-28
- Rustum, Y.M. (1997) *J. Clin. Oncol.* 15(1):389-400
- Ruth, J.L. et al. (1978) *J. Org. Chem.* 43:2870-2876
- Sambrook, et al., eds. "Molecular Biology: A Laboratory Manual" (2nd ed.) (Cold Spring Harbor Press 1989)
- Santi, D.V. (1980) *J. Med. Chem.* 23:103-111
- Sastry et al., (1992) *Mol. Pharmacol.* 41:441-445
- Sauter, et al. (1993) *Cancer Res.* 53(10 Suppl.):2199-203

五、發明說明 (92)

Schaechter, M. et al., eds. "Mechanisms of Microbial Disease" (2nd ed.) (Williams and Wilkins 1993)

Schiffer, C.A. et al. (1995) *Biochemistry* 34:16279-16287

Schimke, R.T. et al. (1988) *J. Biol. Chem.* 263:5989-5992

Segovia, M. (1994) *Ann. Tropical Med. Paras.* 88(2):123-130

Shepard, H.M. et al. (1988) *J. Clin. Immunol.* 8:353-395

Simon, S.M. and Schindler, M. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91(9):3497-3504

Slamon, D.J. et al. (1987) *Science* 235:177-182

Slamon, D.J. et al. (1989) *Science* 244:707-712

Smith, K.A. et al. (1995) *Philos Tran Royal Soc* 347:49-56

Snydman, D.R. et al. (1996) *Clinical Infectious Diseases* 23(Suppl. 1):554-65

Spector, D.L. et al. (1997) "Cells, A laboratory manual"

Spector, D.L. (1998) "Cells, a laboratory manual: culture and biochemical analysis of cells"

Vol. 1 to Vol. 3

Stühlinger, M. et al. (1994) *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 49(1):39-42

Sugarman, B.J. et al. (1985) *Science* 230:943-945

Sukumar and Barbacid (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(2):718-722

Takeishi, K. et al. (1985) *Nucl. Acid Res.* 13:2035-2043

Takemura, Y. et al. (1997) *Anticancer Drugs* 8(1):3-16

Tannock, I.F. (1996) *J. Clin. Oncol.* 14(12):3156-3174

Tolstikov, V.V. et al. (1997) *Nucleosides Nucleotides* 16:215-225

Troutner, D.A. (1987) *Nucl. Med. Biol.* 14: 171-176

Valette et al. (1996) *J. Med. Chem.*, Vol. 39, p. 1981

Van Den Berg, C.L. (1994) *Anti-Cancer Drugs* 5:573-578

van de Vijver, et al. (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7(5):2019-23

Vlaykova, T. (1997) *Oncology* 54:146-152

Voet, et al. eds. *Biochemistry* 2nd Ed. (John Wiley & Sons, Inc. 1995)

Volm, M. et al. (1996) *Critical Rev. in Oncogenesis* 7:227-244

Volm, M and Mattern, J. (1992) *Anticancer Res.* 12(6B):2293-6

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (93)

- Wahba, A.J. et al. (1961) *J. Biol. Chem.* 236(3):C11
- Wall, M.E. (1998) *Med. Res. Rev.* 18:229-314
- Wataya, Y. (1979) *J. Med. Chem.* 22:339-340
- Wettergren, Y. et al. (1994) *Mol. Genet.* 20:267-85
- Wilson, J.D., et al. (eds.) "Harrison's Principles of Internal Medicine" (12th ed) (McGraw-Hill, Inc. 1991) 2208, esp. 21-76
- Yamachika, T. (1998) *Cancer* 82:70-77
- Yeh, K.H. et al. (1998) *Chemotherapy Cancer* 82(9):1626-1631
- Yin, Y et al. (1992) *Cell* 70:937-948
- Yin, Y. et al. (1994) *Cancer Res.* 54:3686-91
- 專利文件
- U.S. Patent No. 4,247,544, Bergstrom, D.E. et al. "C-5 Substituted Uracil Nucleosides", issued January 27, 1981
- U.S. Patent No. 4,267,171, Bergstrom, D.E. et al. "C-5 Substituted Cytosine Nucleosides" issued May 12, 1981
- U.S. Patent No. 4,948,882, Ruth, J.L. "Single-Stranded Labelled Oligonucleotides, Reactive Monomers and Methods of Synthesis" issued August 14, 1990
- U.S. Patent No. 4,975,278, Senter, P.D. et al. "Anti-body-Enzyme Conjugates in Combination with Prodrugs for the Delivery of Cytotoxic Agents to Tumor Cells" issued December 4, 1990
- U.S. Patent No. 5,085,983, Scanlon, K.J. "Detection of human tumor progression and drug resistance" issued February 4, 1992
- U.S. Patent No. 5,233,031, Borch, R.F. et al. "Phosphoramidate Analogs of 2'-Deoxyuridine" issued August 3, 1993
- U.S. Patent No. 5,264,618, Felgner, P.L. et al. "Cationic Lipids for Intracellular Delivery of Biologically Active Molecules" issued November 23, 1993
- U.S. Patent No. 5,459,127, Felgner, P.L. et al. "Cationic Lipids for Intracellular Delivery of Biologically Active Molecules" issued October 17, 1995
- U.S. Patent No. 5,627,165, Glazier, A. "Phosphorous Prodrugs and Therapeutic Delivery Systems Using Same" issued May 6, 1997
- PCT Application WO 91/17474, published November 4, 1991
- Hostetler et al., Patent Application No. WO 96/40088 (1996)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

四、中文發明摘要(發明之名稱： 酵素催化之治療劑)

本發明提供一種鑑定潛在治療劑之方法，係使標的細胞與因生物或化學療法選擇結果增強其表現之細胞中內源細胞內酵素之選擇性基質之候選治療劑接觸。本發明亦提供一種藉使細胞與內源細胞內酵素之選擇性基質之前藥接觸而選擇性殺死致病細胞之方法及分子。此前藥隨後轉化成細胞毒素。本發明又提供一種治療受療者中具病理過度增殖細胞特徵之病理之方法，係對受療者投與前藥，該前藥為內源過度表現之細胞內酵素之選擇性基質，且在過度增殖細胞中藉酵素轉化成細胞毒素。

英文發明摘要(發明之名稱："ENZYME CATALYZED THERAPEUTIC AGENTS")

This invention provides a method for identifying potential therapeutic agents by contacting a target cell with a candidate therapeutic agent which is a selective substrate for an endogenous, intracellular enzyme in the cell which is enhanced in its expression as a result of selection by biologic or chemotherapy. This invention also provides methods and examples of molecules for selectively killing a pathological cell by contacting the cell with a prodrug that is a selective substrate for an endogenous, intracellular enzyme. The prodrug is subsequently converted to a cellular toxin. Further provided by this invention is a method for treating a pathology characterized by pathological, hyperproliferative cells in a subject by administering to the subject a prodrug that is a selective substrate for an endogenous, overexpressed, intracellular enzyme, and converted by the enzyme to a cellular toxin in the hyperproliferative cell.

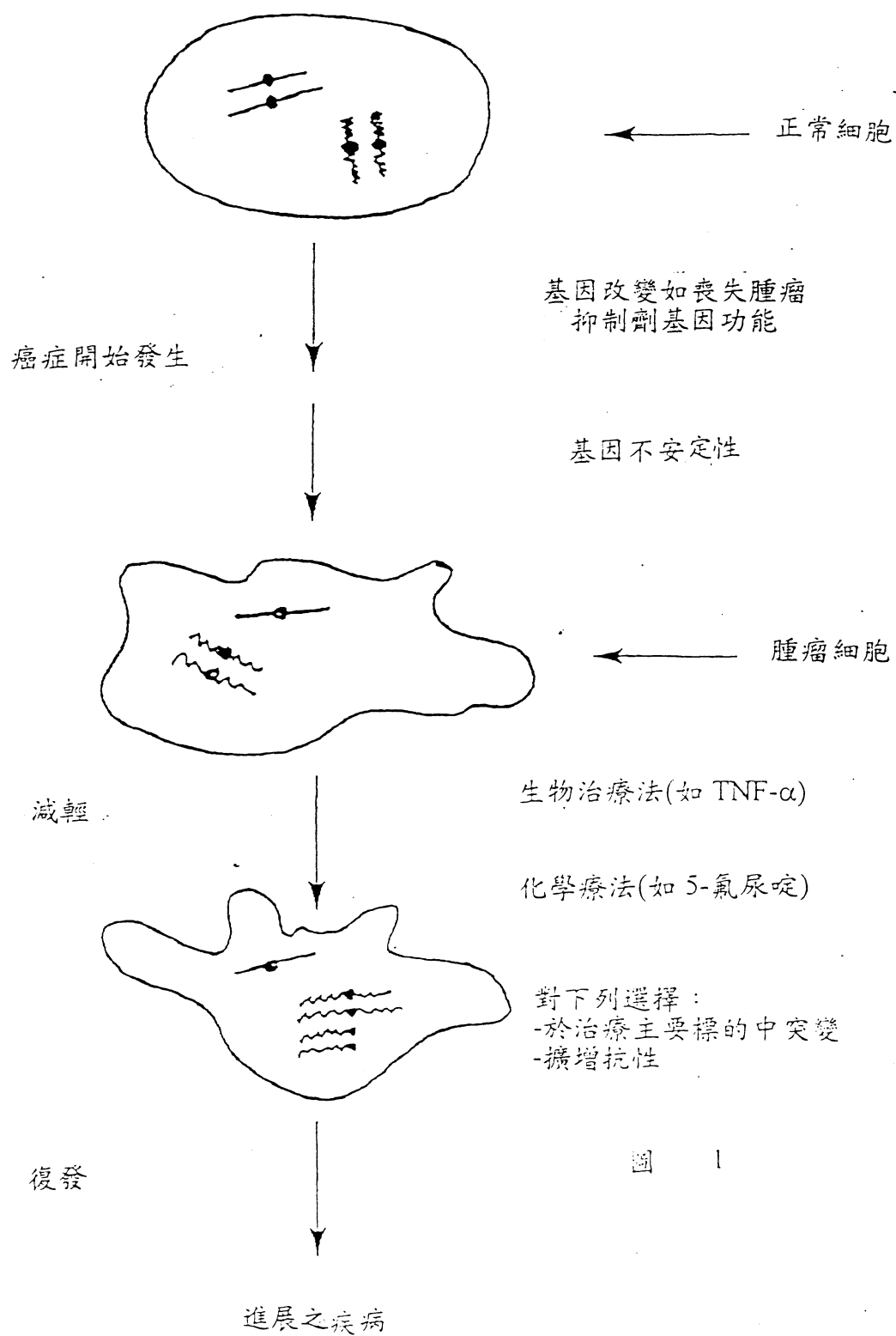


圖 1

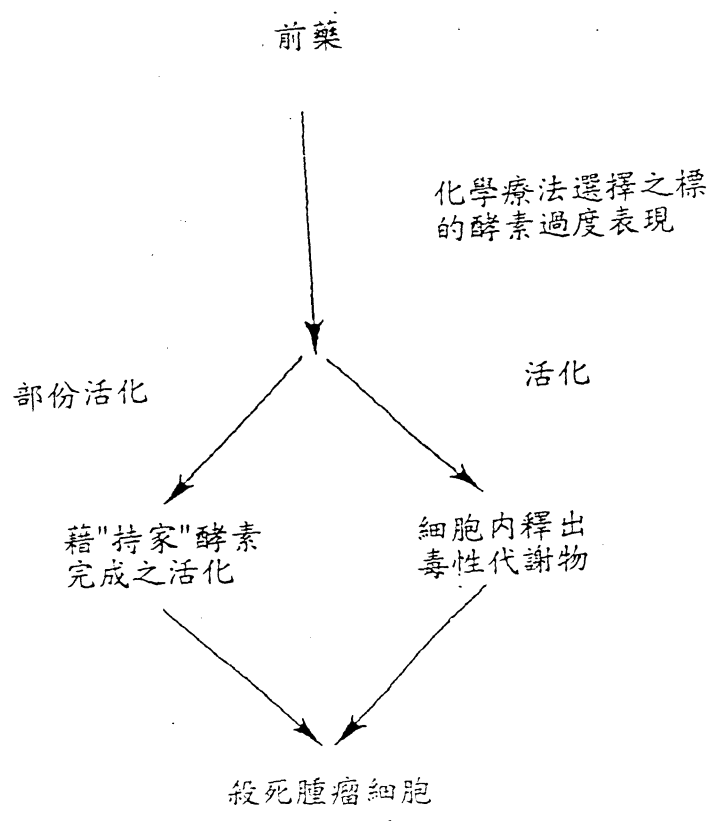


圖 2

新穎前藥包含抗癌前藥
之高產量篩選一般反應圖

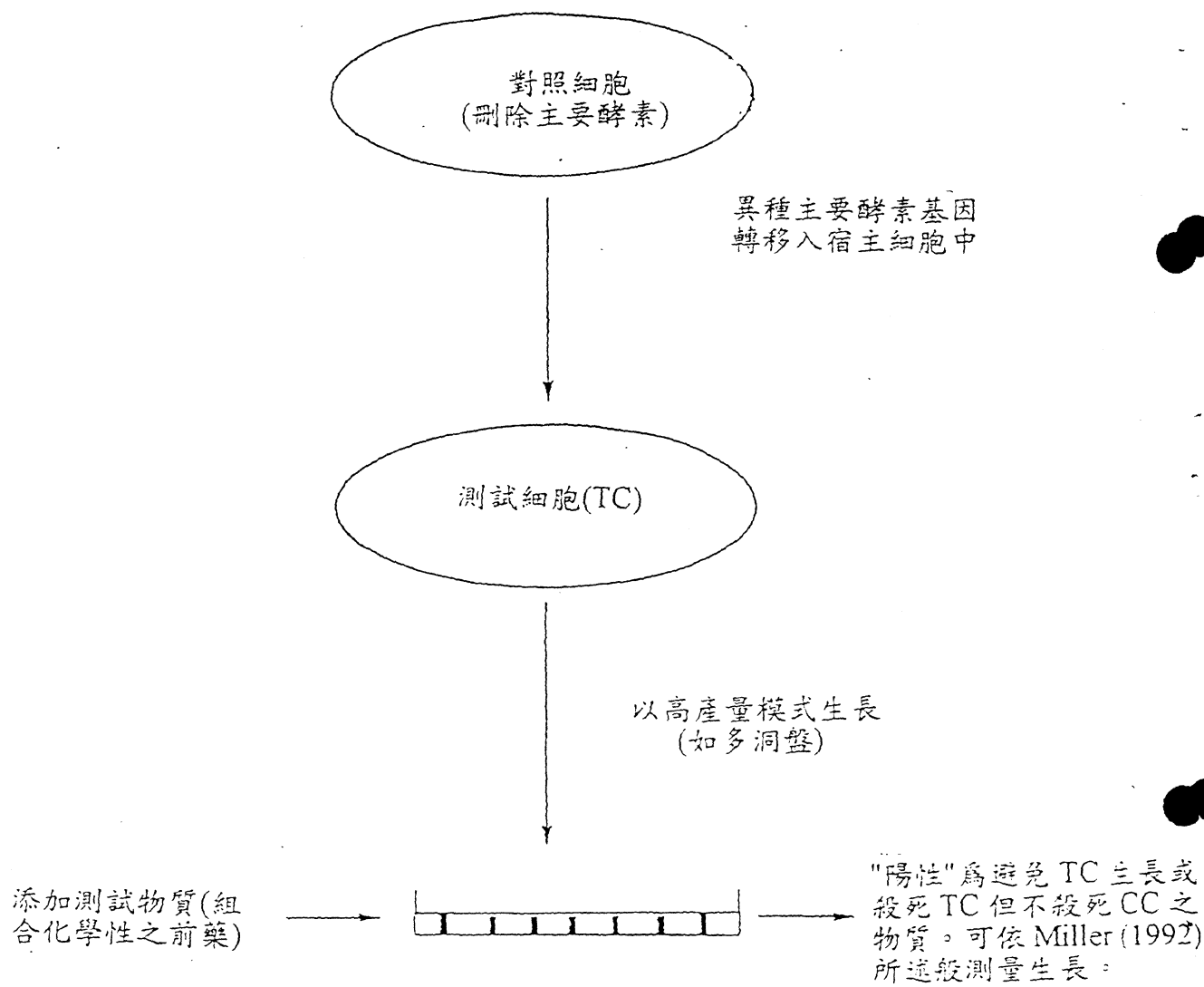
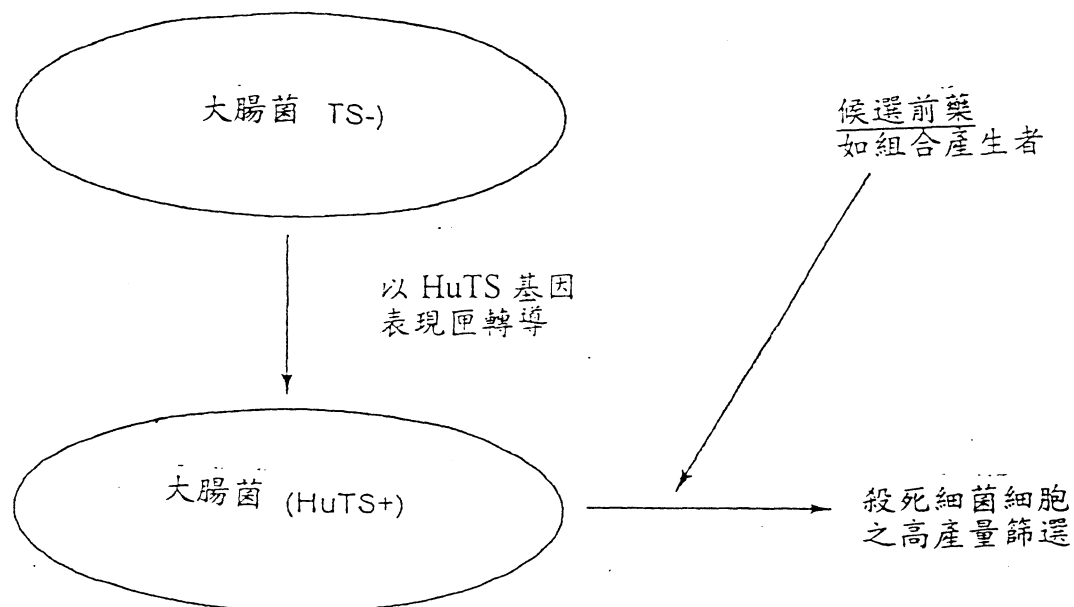


圖 3

如何發現 TS 引導分子：設計高產量篩選方法如
使用胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶作為標的酵素



如何發現 TS 引導分子：置換兩種酵素如胸腺嘧啶脫氧核苷酸合成酶(TS)及胸腺嘧啶脫氧核苷激酶(TK)

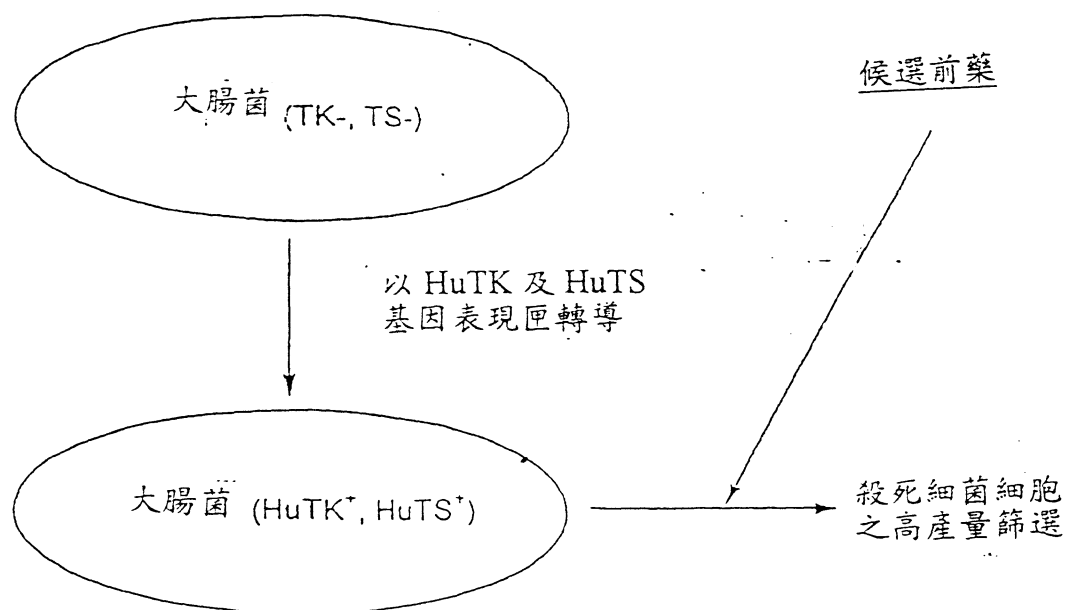
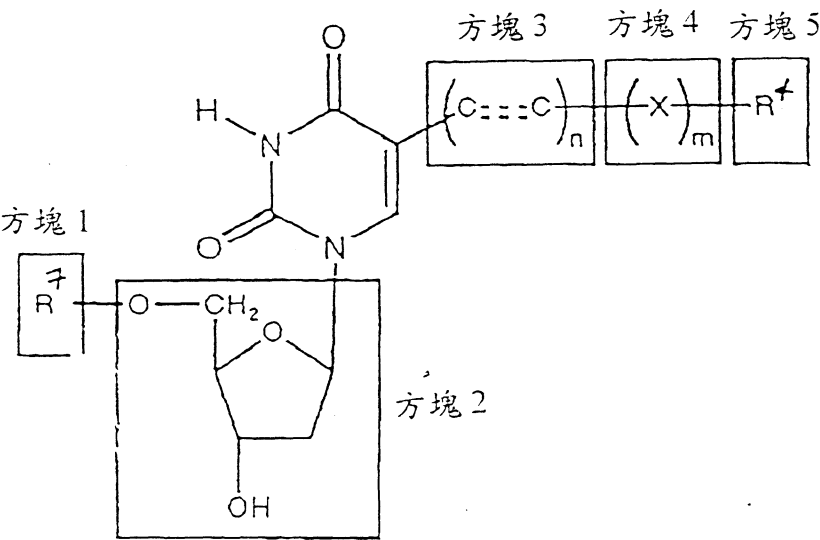
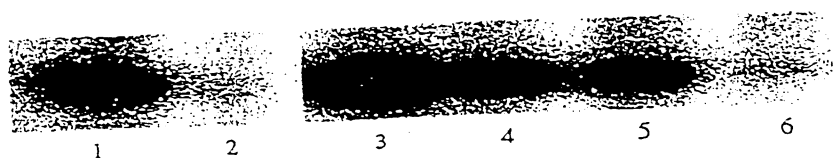


圖 5



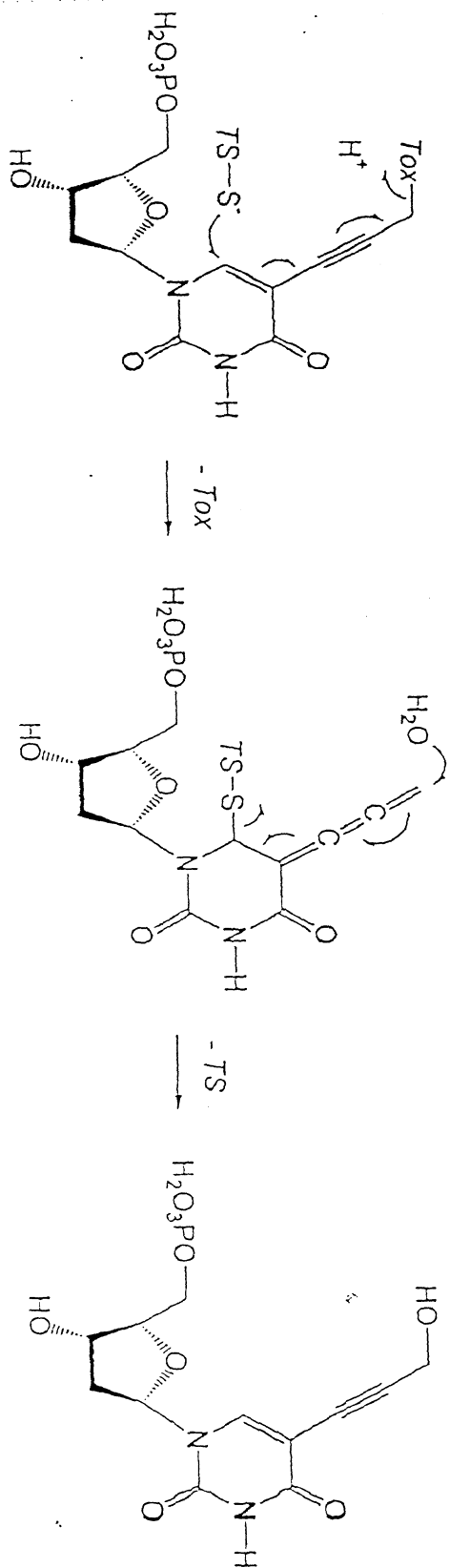
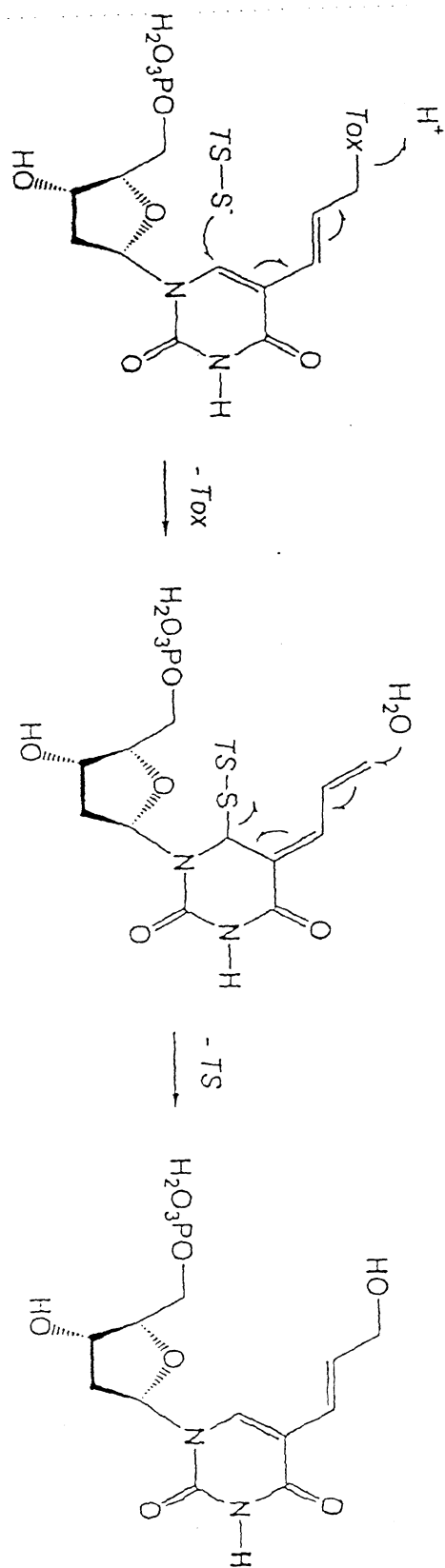
I244924

p36 T.S →



25

7



六、申請專利範圍

1. 一種鑑定前藥之方法，包括：

(a)使標的細胞在有利於前藥併入標的細胞內之條件下，與候選之治療前藥接觸，該前藥係為尿苷之 5' 磷醯基或 5'-磷醯胺酯衍生物或類似物且為內源性細胞內胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶之選擇性基質；及

(b)分析標的細胞抑制細胞增殖或細胞死亡之作用。

2. 一種鑑定潛在前藥之方法，包括：

(a)使標的細胞在有利於前藥併入細胞內間隔標的細胞之條件下，與候選之治療前藥接觸，其中該前藥係為尿苷之 5' 磷醯基或 5'-磷醯胺酯衍生物或類似物且為內源性細胞內胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶之選擇性基質，其中該前藥具有可偵測標記毒性離去基；及

(b)分析培養基釋出之標記量。

3. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中標的細胞之特徵為對化學治療劑具抗性。

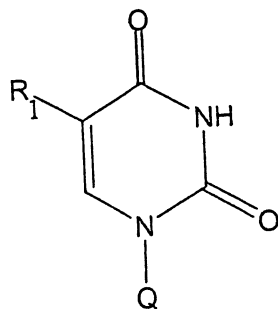
4. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中標的酵素係因活體內化學療法選擇結果而擴增者。

5. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中內源性細胞內酵素在標的細胞中過度表現。

6. 根據申請專利範圍第 5 項之方法，其中該內源性過度表現胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶係編碼胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶之基因的擴增結果。

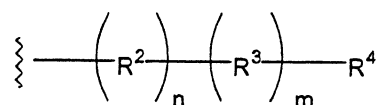
六、申請專利範圍

7. 根據申請專利範圍第 1 或 2 項之方法，其中該細胞係乳癌細胞、腺瘤細胞、肝癌細胞、直結腸癌細胞、胰致癌細胞、食道致癌細胞、膀胱癌細胞、卵巢癌細胞、皮膚癌細胞、肝致癌細胞、或胃癌細胞。
8. 根據申請專利範圍第 1 或 2 項之方法，其中候選前藥劑係共軛至對細胞表面上細胞表面受體具特異性之配位基上。
9. 一種下式之化合物：



其中：

R^1 為氫或下式：



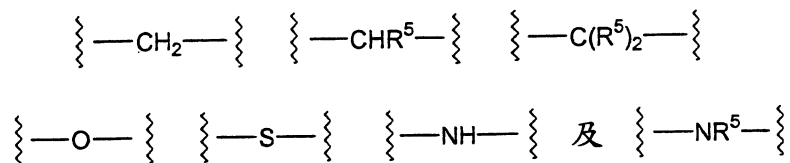
其中 R^2 為下列之一：

不飽和 C_2 至 C_4 烴基；

芳族 C_4 -X 羥基，其中 X 為雜原子；

其中 R^3 係選自下列所組成之群：

六、申請專利範圍

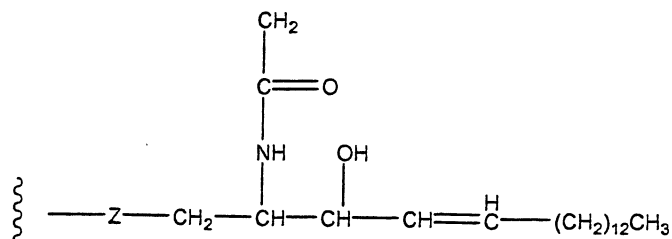
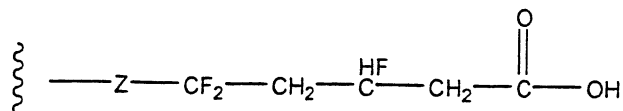
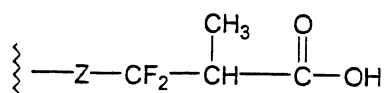
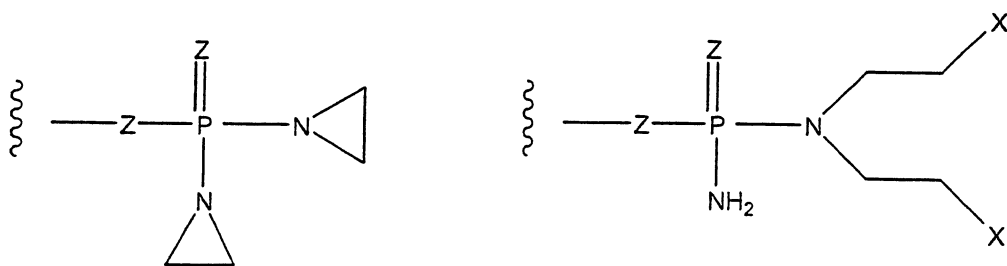


其中 R^5 可相同或不同且獨立為含 1 至 10 個碳原子之直鏈或分支烷基或含 3 至 10 個碳原子之環烷基；

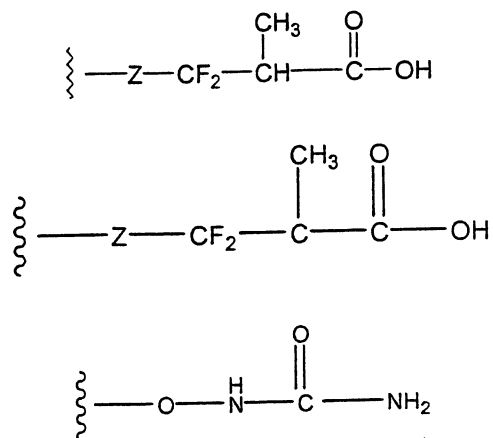
其中 n 為 1 至 10 之整數；

其中 m 為 0 或 1；

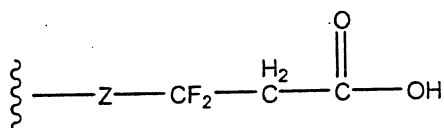
R^4 為選自下列所組成之群之毒性載體部份：



六、申請專利範圍



及

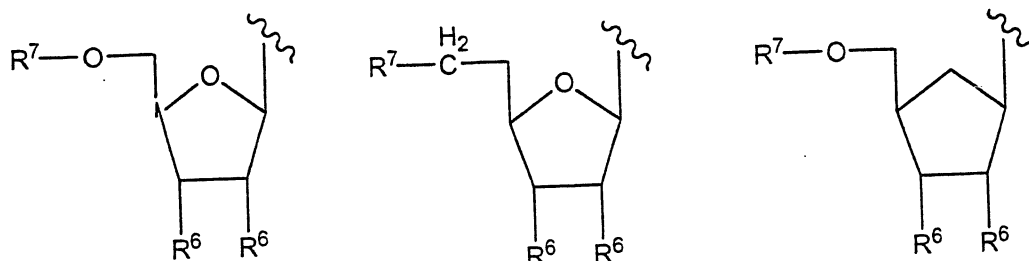


X 為 -Cl、-Br、-I 或其他強力離去基，但當 R^7 為 -H 且 M 為 0 時，則 R^4 不為鹵素，或當 m 為 0 且 n 為 0，則 R^4 不為鹵素；

Y 獨立為 -H 或 -F；

Z 獨立為 -O- 或 -S-；

Q 為選自下列所組成之群：



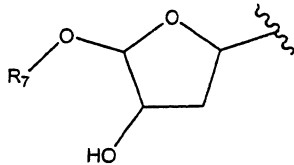
其中 R^6 獨立為 -H 或 -OH；及

六、申請專利範圍

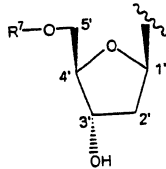
R^7 為天然發生胺基酸之磷酸酯基或磷醯胺酯基衍生物；

且其中該化合物可為對映異構物、非對映異構物或立體異構物態，包含 D-態、L-態、 α -異構態及 β -異構態。

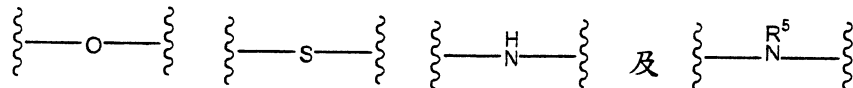
10. 根據申請專利範圍第 9 項之化合物，其中 Q 為：



11. 根據申請專利範圍第 9 項之化合物，其中 Q 為：



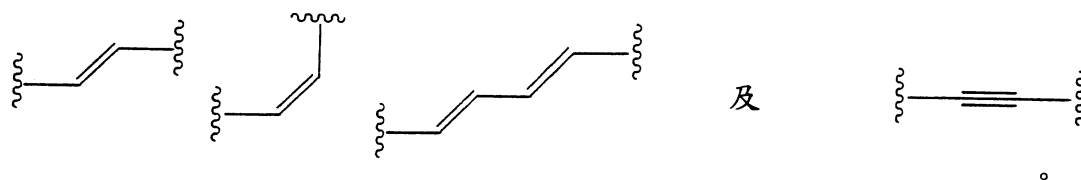
12. 根據申請專利範圍第 9 至 11 項任一項之化合物，其中 R^3 為選自下列組群之二價間隔基：



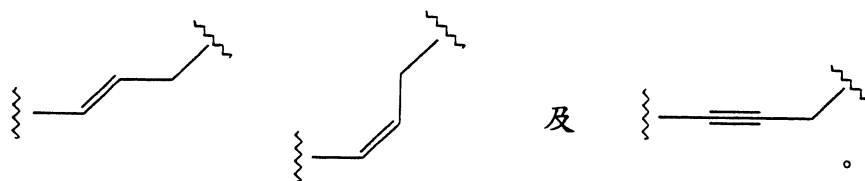
13. 根據申請專利範圍第 12 項之化合物，其中 R^2 為選自下

六、申請專利範圍

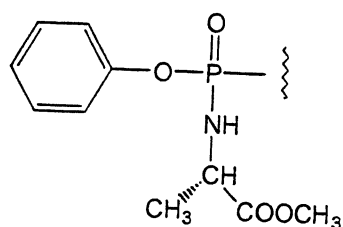
列組群之不飽和烴基：



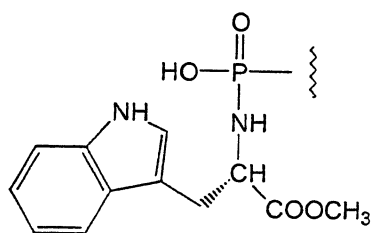
14. 根據申請專利範圍第 12 項之化合物，其中 R^2 及 R^3 合而形成選自下列組群之結構：



15. 根據申請專利範圍第 12 項之化合物，其中 R^7 係選自下列基：

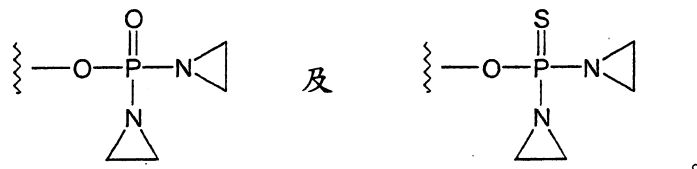


16. 根據申請專利範圍第 12 項之化合物，其中 R^7 係選自下列基：

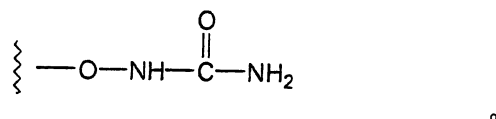


六、申請專利範圍

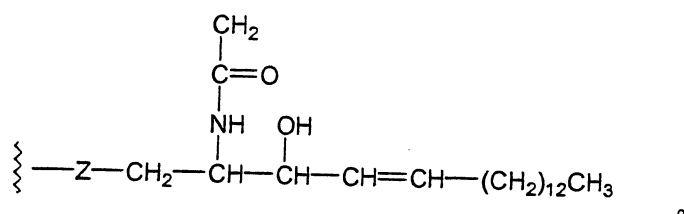
17. 根據申請專利範圍第 12 項之化合物，其中 R^4 係選自下列基：



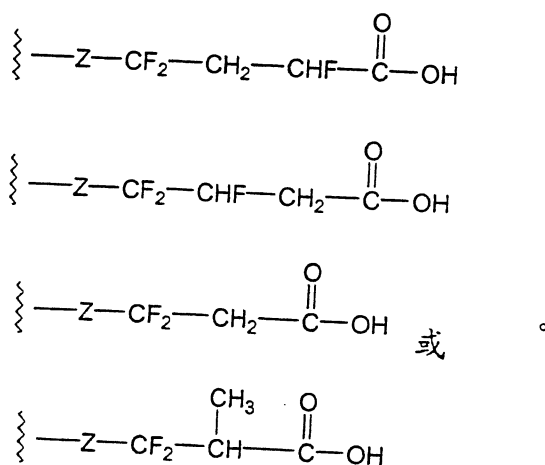
18. 根據申請專利範圍第 12 項之化合物，其中 R^4 為：



19. 根據申請專利範圍第 12 項之化合物，其中 R^4 為：

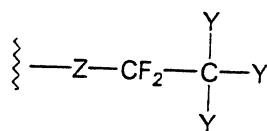


20. 根據申請專利範圍第 12 項之化合物，其中 R^4 為：

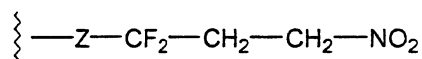


六、申請專利範圍

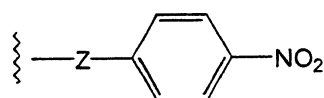
21. 根據申請專利範圍第 12 項之化合物，其中 R^4 為：



22. 根據申請專利範圍第 12 項之化合物，其中 R^4 為：



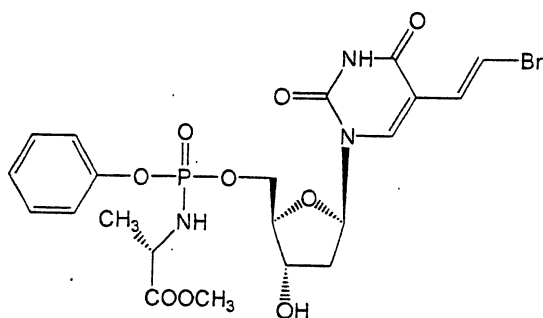
23. 根據申請專利範圍第 12 項之化合物，其中 R^4 為：



24. 一種用於抑制過度增殖細胞增殖之醫藥組合物，其包括有效量之根據申請專利範圍第 9 項之化合物及藥理上可接受之載劑。

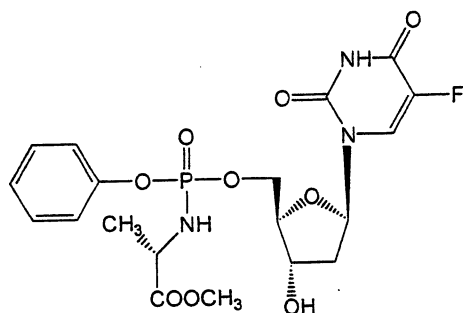
25. 一種用於受療者內治療具有過度增殖細胞特徵之病理之醫藥組合物，其包括有效量之根據申請專利範圍第 9 項之化合物及藥理上可接受之載劑。

26. 一種下式 L-或 D-化合物：

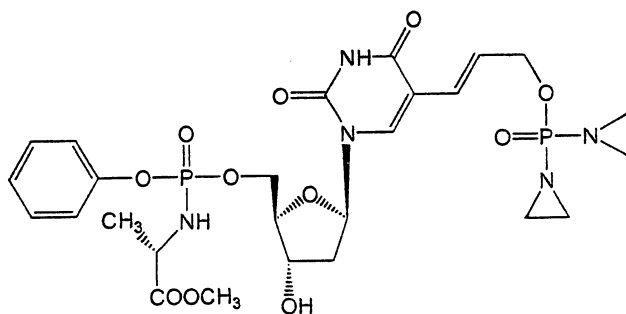


六、申請專利範圍

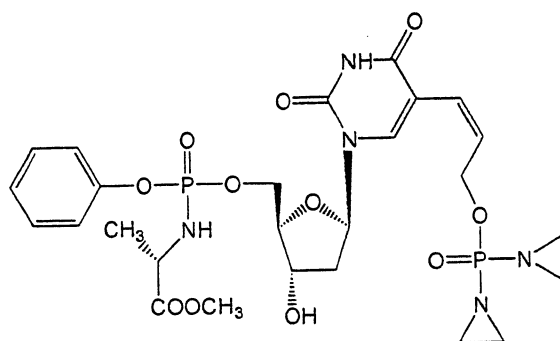
27. 一種下式 L - 或 D - 化合物：



28. 一種下式 L - 或 D - 化合物：

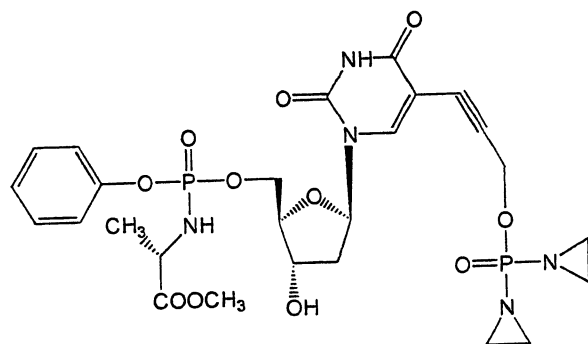


29. 一種下式 L - 或 D - 化合物：

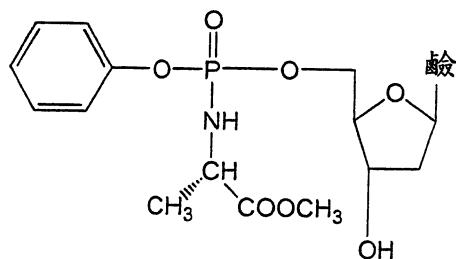


六、申請專利範圍

30. 一種下式 L-或 D-化合物：

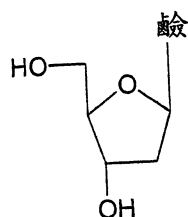


31. 一種製備下式 L-或 D-化合物之方法：

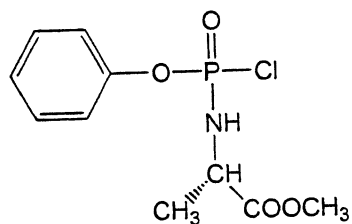


其中"鹼"代表核苷酸鹼；

該方法包括之步驟為使下式化合物：

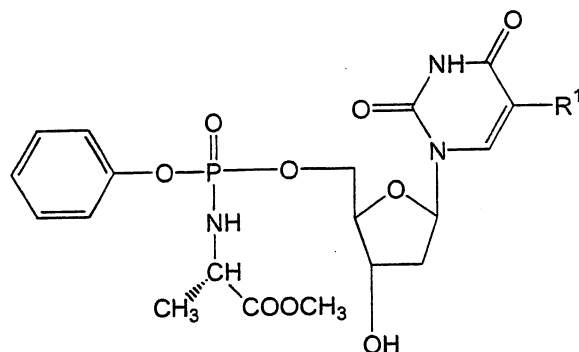


在 HCl 清除劑存在下與下式化合物反應：



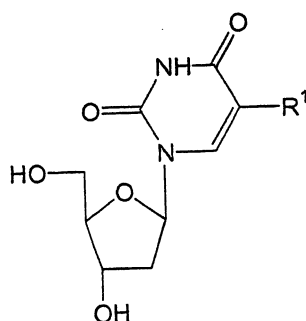
六、申請專利範圍

32. 一種製備下式 L-或 D-化合物之方法：

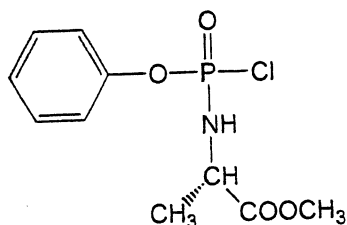


其中 R¹ 為取代基；

該方法包括之步驟為使下式化合物：



在 HCl 清除劑存在下與下式化合物反應：



六、申請專利範圍

33. 根據申請專利範圍第 31 或 32 項之方法，其中 HCl 清除劑為咪唑。
34. 根據申請專利範圍第 31 或 32 項之方法，其中該反應係在含二甲基甲醯胺之非水性溶劑中進行。
35. 一種用於抑制過度增殖細胞增殖之醫藥組合物，其包括有效量之根據申請專利範圍第 9 至 23 及 26 至 30 項中任一項之化合物，及藥理上可接受之載劑。
36. 根據申請專利範圍第 9 至 11 及 26 至 30 項中任一項之化合物，其係用於製備治療或抑制細胞增殖之藥物。
37. 一種用於抑制過度增殖細胞增殖之醫藥組合物，其包括有效量之根據申請專利範圍第 12 項之化合物，及藥理上可接受之載劑。
38. 根據申請專利範圍第 37 項之醫藥組合物，其中過度增殖細胞之特徵為細胞內酵素之內源性過度表現。
39. 根據申請專利範圍第 37 項之醫藥組合物，其中過度增殖細胞之特徵為對化學治療藥具抗性。
40. 根據申請專利範圍第 38 項之醫藥組合物，其中細胞內酵素之內源性過度表現為編碼酵素之基因擴增之結果。
41. 根據申請專利範圍第 37 項之醫藥組合物，其中酵素係因化學療法於活體內選擇作用之結果而擴增。
42. 根據申請專利範圍第 40 項之醫藥組合物，其中酵素為

六、申請專利範圍

胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶。

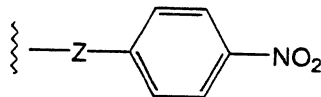
43. 一種用於治療受療者中具過度增殖細胞之特徵之病理之醫藥組合物，其包括有效量之根據申請專利範圍第 9 至 23 及 26 至 30 項任一項之化合物，及藥理上可接受之載劑。
44. 根據申請專利範圍第 43 項之醫藥組合物，其中標的細胞之特徵為與對化療法抗性有關之細胞內酵素之內源性過度表現。
45. 根據申請專利範圍第 43 項之醫藥組合物，其中標的細胞之特徵為對化學治療劑具抗性。
46. 根據申請專利範圍第 43 項之醫藥組合物，其中標的細胞之特徵為具有去活化之腫瘤抑制劑功能。
47. 根據申請專利範圍第 44 項之醫藥組合物，其中細胞內酵素之內源性過度表現為編碼酵素之基因擴增之結果。
48. 根據申請專利範圍第 44 項之醫藥組合物，其中酵素係因化學療法於活體內之選擇作用結果而擴增。
49. 根據申請專利範圍第 44 項之醫藥組合物，其中酵素為胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶。
50. 根據申請專利範圍第 24 項之醫藥組合物，其中標的細胞可表現對標的酵素編碼之外來基因。
51. 根據申請專利範圍第 24 項之醫藥組合物，其進一步包

六、申請專利範圍

括使對照細胞在有利於藥劑併入細胞之細胞內之條件下與候選治療劑接觸。

52. 根據申請專利範圍第 24 項之醫藥組合物，其中標的細胞可表現兩種或多種外來基因，各外來基因可編碼標的酵素。

53. 一種篩選治療劑之方法，其包括使標的細胞與根據申請專利範圍第 9 項之化合物接觸，其中 R^4 為：



該標的細胞有利於化合物併入標的細胞中，供偵測細胞內胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶量之診斷目的。

54. 一種根據申請專利範圍第 9 至 23 及 26 至 30 項中任一項之化合物之醫藥上可接受之鹽。

55. 一種用於抑制過度增殖細胞增殖之醫藥組合物，其包括有效量之根據申請專利範圍第 9 至 23 及 26 至 30 項中任一項之化合物，或其醫藥上可接受之鹽，及醫藥上可接受之載劑。

56. 根據申請專利範圍第 55 項之醫藥組合物，其進一步包括抗癌藥物。

57. 根據申請專利範圍第 55 項之醫藥組合物，其中該過度增殖細胞之特徵為對化學治療劑具抗性。

六、申請專利範圍

58. 根據申請專利範圍第 57 項之醫藥組合物，其該化學治療劑為 5-FU。
59. 根據申請專利範圍第 55 項之醫藥組合物，其該細胞之內源性細胞內酵素過度表現。
60. 根據申請專利範圍第 59 項之醫藥組合物，其中該內源性細胞內酵素為胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶。
61. 根據申請專利範圍第 55 項之醫藥組合物，其中該過度增殖細胞為癌細胞。
62. 根據申請專利範圍第 61 項之醫藥組合物，其中該癌細胞為結腸癌細胞或乳癌細胞。
63. 根據申請專利範圍第 54 項之化合物，其係用於製備抑制過度增殖細胞增殖之藥物。
64. 根據申請專利範圍第 63 項之化合物，其中該過度增殖細胞之特徵為對化學治療劑具抗性。
65. 根據申請專利範圍第 64 項之化合物，其該化學治療劑為 5-FU。
66. 根據申請專利範圍第 63 項之化合物，其該過度增殖細胞之內源性細胞內酵素過度表現。
67. 根據申請專利範圍第 66 項之化合物，其中該內源性細胞內酵素為胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶。
68. 根據申請專利範圍第 63 項之化合物，其中該過度增殖細胞為癌細胞。

六、申請專利範圍

69. 根據申請專利範圍第 68 項之化合物，其中該癌細胞為結腸癌細胞或乳癌細胞。
70. 一種用於治療有過度增殖細胞特徵之病理患者之醫藥組合物，其包括有效量之根據申請專利範圍第 54 項之化合物，及醫藥上可接受之載劑。
71. 根據申請專利範圍第 70 項之醫藥組合物，其中該過度增殖細胞之特徵為對化學治療劑具抗性。
72. 根據申請專利範圍第 71 項之醫藥組合物，其該化學治療劑為 5-FU。
73. 根據申請專利範圍第 70 項之醫藥組合物，其該過度增殖細胞之內源性細胞內酵素過度表現。
74. 根據申請專利範圍第 73 項之醫藥組合物，其中該內源性細胞內酵素為胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶。
75. 根據申請專利範圍第 70 項之醫藥組合物，其中該過度增殖細胞為癌細胞。
76. 根據申請專利範圍第 75 項之醫藥組合物，其中該癌細胞為結腸癌細胞或乳癌細胞。
77. 根據申請專利範圍第 54 項之化合物，其係用於製備治療有過度增殖細胞特徵之病理患者之藥物。
78. 根據申請專利範圍第 77 項之化合物，其中該過度增殖細胞之特徵為對化學治療劑具抗性。
79. 根據申請專利範圍第 78 項之化合物，其該化學治療劑

六、申請專利範圍

為 5-FU。

80. 根據申請專利範圍第 77 項之化合物，其該過度增殖細胞之內源性細胞內酵素過度表現。
81. 根據申請專利範圍第 80 項之化合物，其中該內源性細胞內酵素為胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶。
82. 根據申請專利範圍第 77 項之化合物，其中該過度增殖細胞為癌細胞。
83. 根據申請專利範圍第 82 項之化合物，其中該癌細胞為結腸癌細胞或乳癌細胞。
84. 一種篩選治療劑之方法，其包括將含有過度增殖細胞之第一樣本與有效量之根據申請專利範圍第 54 項之化合物接觸，及將含有該過度增殖細胞之第二樣本與潛在治療劑接觸，並比較於第一樣本中第一過度增殖細胞與第二樣本中第二過度增殖細胞之生長。
85. 根據申請專利範圍第 84 項之方法，其中該過度增殖細胞之特徵為對化學治療劑具抗性。
86. 根據申請專利範圍第 85 項之方法，其該化學治療劑為 5-FU。
87. 根據申請專利範圍第 84 項之方法，其該過度增殖細胞之內源性細胞內酵素過度表現。
88. 根據申請專利範圍第 87 項之方法，其中該內源性細胞內酵素為胸腺嘧啶脫氧核苷酸酯合成酶。

六、申請專利範圍

89. 根據申請專利範圍第 84 項之方法，其中該過度增殖細胞為癌細胞。
90. 根據申請專利範圍第 89 項之方法，其中該癌細胞為結腸癌細胞或乳癌細胞。