(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105228618 A
(43)申请公布日 2016.01.06

(21)申请号 201480028681.0
(22)申请日 2014.03.19
(30)优先权数据
61/803,177 2013.03.19 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.11.17
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/031235 2014.03.19
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2014/153415 EN 2014.09.25
(71)申请人 斯克里普斯研究所
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 弗拉迪米尔·克拉夫琴科
理查德·J·乌莱维特
基姆·D·扬达
(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
代理人 吴胜周
(51)Int.Cl.
A61K 31/402(2006.01)

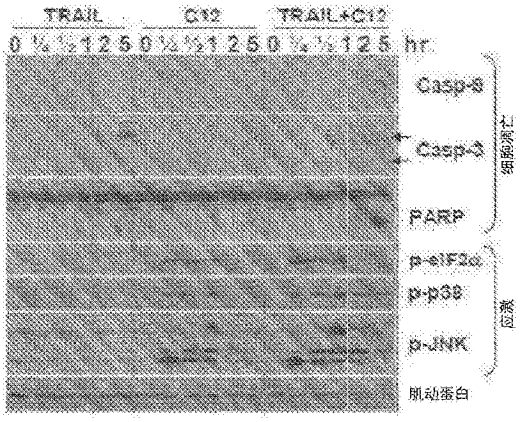
权利要求书5页 说明书43页 附图17页

(54)发明名称

用于选择性杀死癌细胞的TRAIL增强剂

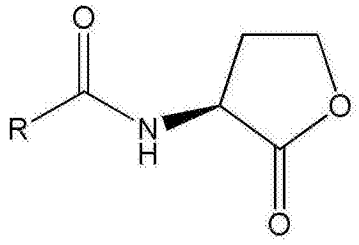
(57)摘要

本发明涉及在肿瘤细胞中诱导细胞凋亡、捕获细胞周期或抑制细胞增殖或它们的任意组合的方法，所述方法通过向患者施用有效量的N-酰基高丝氨酸内酯类似物(AHL)，任选地联合肿瘤调制剂如肿瘤坏死因子(TNF)相关的细胞凋亡诱导配体(TRATL)进行。还提供N-酰基高丝氨酸内酯的新型生物活性类似物。



CN 105228618 A

1.一种药物组合物，所述药物组合物包含有效量的式（I）的N-酰基高丝氨酸内酯（AHL）类似物化合物：

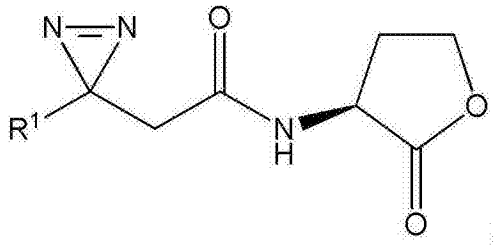


(I)

其中R是约9至约15个碳原子的直链烷基、烯基或炔基，所述烷基、烯基或炔基具有一个或多个二氮杂环丙烯基，任选地在所述烷基、烯基或炔基上的4以上的位置处具有一个或多个羰基，并且还任选地被叠氮基、羟基或卤素取代；或其药用盐；和，任选地，

药用赋形剂。

2.权利要求1所述的药物组合物，其中所述化合物具有式（II）：



(II)

其中R^1是约7至13个碳原子的直链烷基、烯基或炔基，所述烷基、烯基或炔基任选地具有以下各项中的一个或多个：

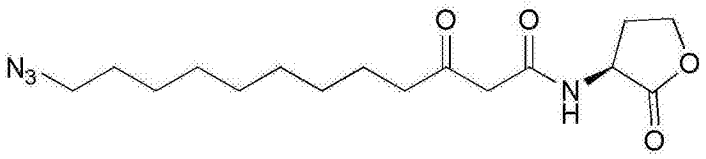
(j) 二氮杂环丙烯基；

(k) 一个或多个羰基；或

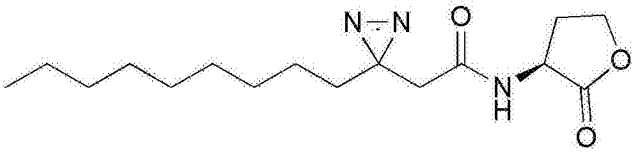
(l) 一个或多个独立地选择的叠氮基、羟基或卤素基团。

3.权利要求1所述的药物组合物，所述药物组合物还包含肿瘤调制剂，所述肿瘤调制剂是TRAIL多肽。

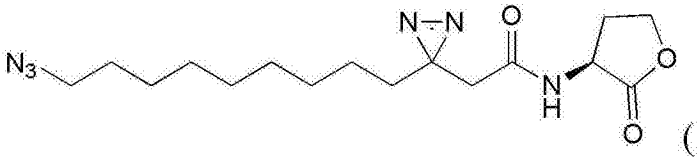
4.权利要求1所述的药物组合物，其中所述N-酰基高丝氨酸内酯（AHL）类似物选自由以下各项组成的组：



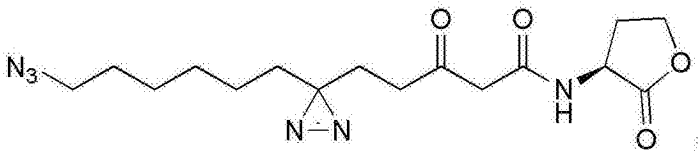
(12-N_3-12)



(3-N_2)

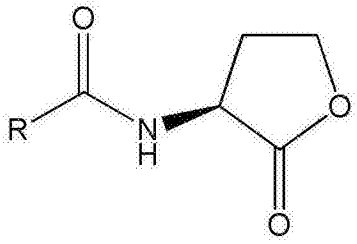


(12-N_3-3N_2) 和



(12-N_3-6-N_2-12)。

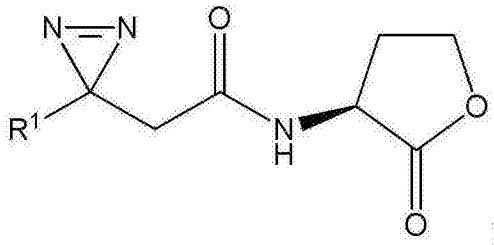
5. 一种治疗患者的肿瘤的方法，所述方法包括向所述患者施用有效量的式 (I) 的 N- 酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 类似物化合物，



(I)

其中 R 是约 9 至约 15 个碳原子的直链烷基、烯基或炔基，所述烷基、烯基或炔基具有一个或多个二氮杂环丙烯基，任选地具有一个或多个羰基，并且还任选地被叠氮基、羟基或卤素取代；或药用盐；和任选地，药用赋形剂。

6. 权利要求 5 所述的治疗患者的肿瘤的方法，其中所述化合物是式 (II) 的化合物，



(II)

其中 R^1 是约 7 至 13 个碳原子的直链烷基、烯基或炔基，所述烷基、烯基或炔基任选地具有以下各项中的一个或多个：

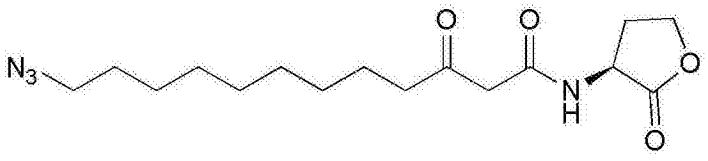
(g) 二氮杂环丙烯基；

(h) 一个或多个羰基；或

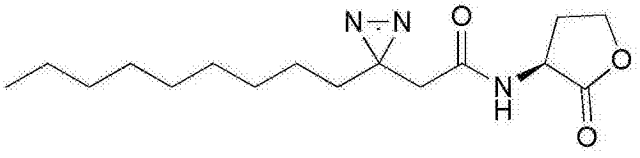
(i) 一个或多个独立地选择的叠氮基、羟基或卤素基团。

7. 权利要求 5 所述的治疗患者的肿瘤的方法，所述方法还包括施用有效量的肿瘤调制剂，所述肿瘤调制剂是 TRAIL 多肽。

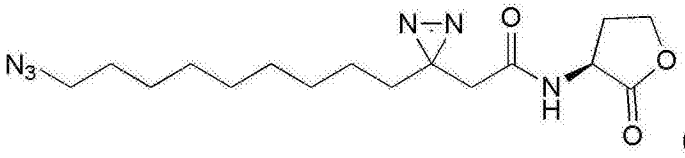
8. 权利要求 5 所述的治疗患者的肿瘤的方法，其中所述 N- 酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 类似物选自由以下各项组成的组 ：



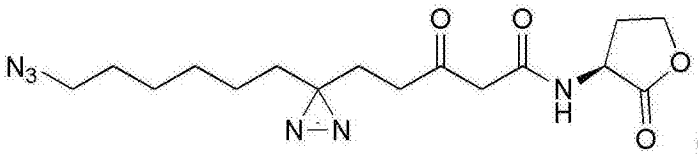
(12-N_3-12)



(3-N_2)



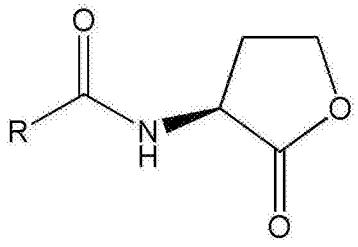
(12-N_3-3N_2) 和



(12-N_3-6-N_2-12)。

9. 权利要求 5 所述的治疗患者的肿瘤的方法，其中所述肿瘤选自由以下各项组成的组 ：肺肿瘤、子宫颈肿瘤、乳腺肿瘤和脑肿瘤。

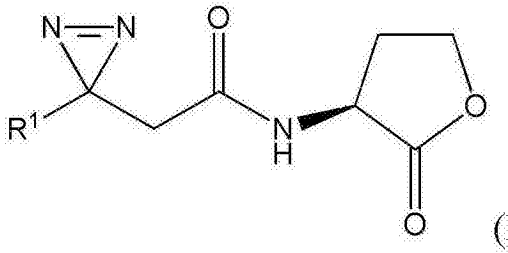
10. 一种式 (I) 的化合物 ：



(I)

其中 R 是约 9 至约 15 个碳原子的直链烷基、烯基或炔基，所述烷基、烯基或炔基具有一个或多个二氮杂环丙烯基，任选地在所述烷基、烯基或炔基上的 4 以上的位置处具有一个或多个羰基，并且还任选地被叠氮基、羟基或卤素取代 ；或其药用盐。

11. 权利要求 10 所述的化合物，其中所述化合物是式 (II) 的化合物，



(II)

其中 R^1 是约 7 至 13 个碳原子的直链烷基、烯基或炔基，所述烷基、烯基或炔基任选地

具有以下各项中的一个或多个：

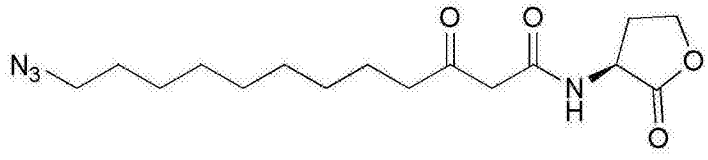
(g) 二氮杂环丙烯基；

(h) 一个或多个羰基；或

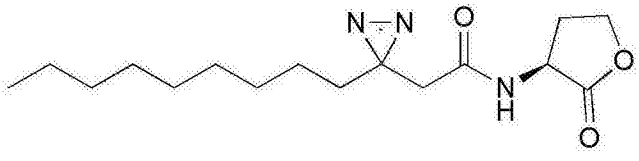
(i) 一个或多个独立地选择的叠氮基、羟基或卤素基团。

12. 权利要求 10 所述的化合物，所述化合物为与肿瘤调制剂的药物组合，所述肿瘤调制剂是 TRAIL 多肽。

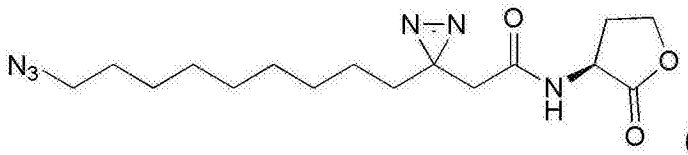
13. 权利要求 10 所述的化合物，其中所述 N- 酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 类似物选自由以下各项组成的组：



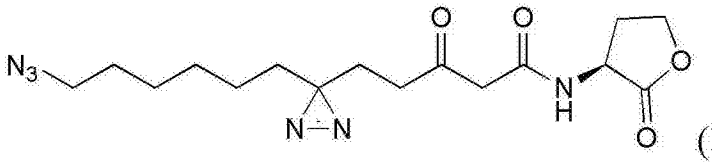
(12-N_3-12)



(3-N_2)

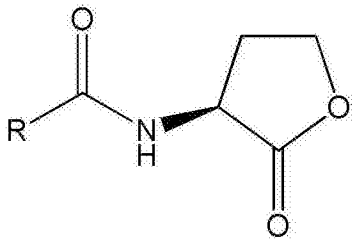


(12-N_3-3N_2) 和



(12-N_3-6-N_2-12)。

14. 一种用于在肿瘤细胞中诱导细胞凋亡、捕获细胞分裂或抑制细胞增殖的方法，所述方法包括将所述细胞与有效量的 N- 酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 化合物以及有效量的 TRAIL 接触，其中所述 AHL 化合物具有式 (I)：

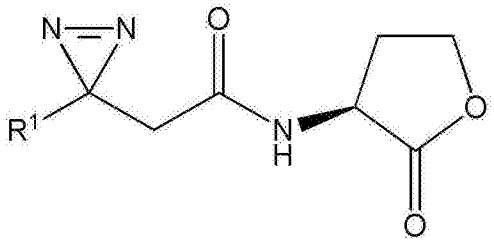


(I)

其中 R 是约 9 至约 15 个碳原子的直链烷基、烯基或炔基，所述烷基、烯基或炔基具有一个或多个二氮杂环丙烯基，任选地具有一个或多个羰基，并且还任选地被叠氮基、羟基或卤素取代。

15. 权利要求 14 所述的用于在肿瘤细胞中诱导细胞凋亡、捕获细胞分裂或抑制细胞增殖的方法，其中处于所述有效量的所述 AHL 类似物是所述肿瘤细胞中的未折叠蛋白反应 (UPR)、内质网膨胀 (ERS) 或两者的激活剂。

16. 权利要求 14 所述的用于在肿瘤细胞中诱导细胞凋亡、捕获细胞分裂或抑制细胞增殖的方法，其中所述化合物是式 (II) 的化合物，



(II)

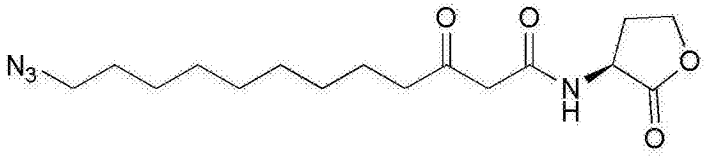
其中 R^1 是约 7 至 13 个碳原子的直链烷基、烯基或炔基，所述烷基、烯基或炔基任选地具有以下各项中的一个或多个：

(f) 二氮杂环丙烯基；

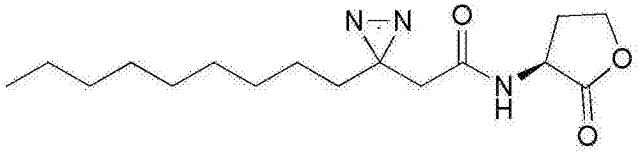
(g) 一个或多个羰基；和

(h) 一个或多个独立地选择的叠氮基、羟基或卤素基团。

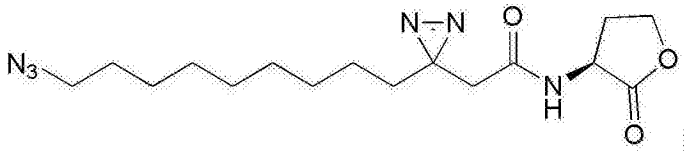
17. 权利要求 14 所述的用于在肿瘤细胞中诱导细胞凋亡、捕获细胞分裂或抑制细胞增殖的方法，其中所述 N- 酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 类似物选自由以下各项组成的组：



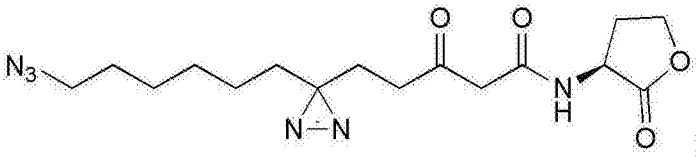
(12-N_3-12)



(3-N_2)



(12-N_3-3N_2) 和



(12-N_3-6-N_2-12)。

用于选择性杀死癌细胞的 TRAIL 增强剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2013 年 3 月 19 日提交的美国临时申请序列号 61/803,177 的优先权的利益，将该申请以其整体通过引用结合于此。

[0003] 政府资助声明

[0004] 本发明在以由国立卫生研究所授予的 HHSN27200700038C、AI077644、AI079436 和 AI094348 的政府资助下完成。美国政府具有本发明中的某些权利。

[0005] 背景

[0006] 细胞凋亡是细胞死亡的遗传学编程的且在生理学上重要的形式。其是保守的细胞适应性机制，其通过维持健康成体组织中的细胞周转而在正常发育中具有重要作用。异常细胞凋亡活性与自体免疫的发病和传染性疾病（包括持久的炎性疾病）相关 (Gyrd-Hansen 等，Nat Rev Cancer 10(8)561-74)。逃避细胞凋亡已被鉴定为癌症的标志 (Hanahan D. 等，Cell 2000,100(1),57-70)。因此，触发细胞凋亡过程对于杀死癌细胞并且使它们对不同的治疗方案敏感可能是重要的 (Ashkenazi,A.,Nat Rev Drug Discov 2008,7(12),1001-12；Ashkenazi,A 等，J Clin Invest 1999,104(2),155-62)。

[0007] 有前景的用于癌症疗法的候选之中，肿瘤坏死因子 (TNF) 相关的细胞凋亡诱导配体 (TRAIL) 通过受体介导的机制启动细胞凋亡，也被称为外部细胞凋亡通路。与天然存在的促细胞凋亡配体如 TNF 和 Fax 配体 (FasL) 相反，TRAIL 注入小鼠中对组织和器官不引起致死反应或可检测的毒性 (Ashkenazi, A., Nat Rev Drug Discov 2008,7(12),1001-12；Ashkenazi,A 等，J Clin Invest 1999,104(2),155-62；Walczak,H. 等，Nat Med 1999,5(2),157-63)。此外，TRAIL 对于杀死癌细胞的潜在重要性已经得到动物模型中的研究的支持，证明该细胞因子具有对人肿瘤异种移植物的选择性毒性，但是对正常组织则没有。然而，对 TRAIL 诱导的细胞凋亡的敏感性是限制 TRAIL 治疗的效力的关键因素，因为在不同的恶性细胞中观察到敏感性谱 (Lippa,M.S. 等，Apoptosis 2007,12(8),1465)。此外，与正常细胞类似，一些癌细胞也对 TRAIL 诱导的细胞凋亡具有抗性。

[0008] 对细胞凋亡的分子细节增加的理解表明，肿瘤细胞能够通过干扰外部或内部细胞凋亡信号传导通路来获得对细胞凋亡的抗性。然而，如果通过能够克服抗细胞凋亡影响的机制被触发，则大部分癌细胞保持承受细胞凋亡的能力。例如，抑制 NF-κB 活性显著增加由细胞凋亡刺激物诱导的细胞凋亡 (Beg.A.A. 等，Science 1996,274(5288),782-4；Wang,C.Y. 等，Science 1996,274(5288),784-7；Van Antwerp,D.J. 等，Science 1996,274(5288),787-9；Liu,Z.G. 等，Cell 1996,87(3),565-76)。此外，在激活若干细胞内的非细胞凋亡信号传导过程，包括 JNK 通路或内质网 (ER) 应激（其在真核细胞中被称为未折叠蛋白反应 (UPR)）后，也发生细胞凋亡增强 (Ron,D. 等，Nat Rev Mol Cell Biol 2007,8(7),519-29)。已经观察到，UPR 激活剂如衣霉素 (tunicamycin)、毒胡萝卜内酯 (thapsigargin) 和 RRR-α-生育酚醚连乙酸类似物（α-TEA），使癌细胞对 TRAIL 诱导的细胞凋亡敏感 (Jiang,C.C. 等，Cancer Res 2007,67(12),5880；Chen,L.H. 等，Carcinogenesis 2007,28(11),2328-36；Tiwary,R. 等，PLoS One 5(7),e11865)。然而，这些试剂诱导 UPR 的组成

性和持续的激活。

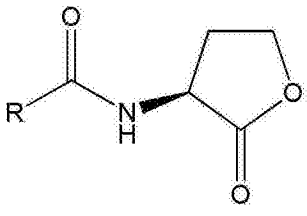
[0009] 细菌代谢物在对于对于正常发育和包括癌症在内的多种慢性疾病的发病机制是必需的炎症介导的过程中起重要作用。炎症典型地作为通过依赖于受体的机制的对特定细菌产物的先天免疫反应引发，其中转录因子 NF-κB 的诱导对于活化的细胞中的免疫系统的激活和细胞凋亡的控制是所需的。例如，在存在革兰氏阴性菌的情况下，NF-κB 激活初始地响应于细菌脂多糖 (LPS)（其是 Toll 样受体 4(TLR4) 的激动剂）被诱导，这导致编码促炎性细胞因子如肿瘤坏死因子 -α (TNF) 和白细胞介素 -1(IL-1) 的 NF-κB 调节的基因的表达。在接合 TNF 或 IL-1 受体后，另外轮次的 NF-κB 激活放大该 LPS 诱导的炎性反应。依赖于 NF-κB 的过程，与其他信号传导通路呼应地，上调促细胞凋亡癌症免疫监视效应物的表达，该效应物包括 TNF 相关的细胞凋亡诱导配体 (TRAIL)，其是一种细胞凋亡性细胞死亡所必需的介体（尤其是在癌细胞中）。虽然 LPS 诱导的炎性反应导致促细胞凋亡的细胞因子如 TNF 和 TRAIL 的释放，但是接收这些死亡信号的癌细胞仍然可以由于 NF-κB 信号传导对细胞凋亡的抑制作用而存活。

[0010] 概述

[0011] 本发明在多个实施方案中涉及在肿瘤细胞中诱导细胞凋亡、捕获 (arrest) 细胞分裂或抑制细胞增殖或它们的任意组合的方法。相对于正常细胞，肿瘤坏死因子相关的细胞凋亡诱导配体 (TRAIL) 优先诱导癌细胞中的细胞凋亡；然而，肿瘤细胞可以形成 TRAIL 抗性。这里我们证实：在存在细菌性酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 类似物或产生 AHL 的细菌的情况下，通过 TRAIL 诱导的细胞凋亡和 AHL 介导的由 NF-κB 信号传导调节的炎症的抑制的组合作用，该抗性可以被克服。此发现揭示了之前未被认识的细菌和宿主免疫监视之间的共生联系。

[0012] 在多个实施方案中，本发明提供一种药物组合物，所述药物组合物包含有效量的式 (I) 的 N- 酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 类似物化合物：

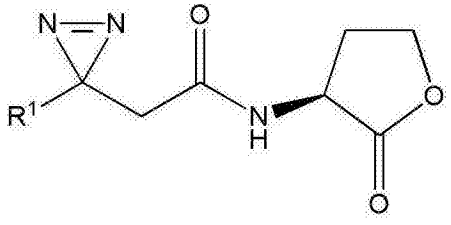
[0013]



(I)

[0014] 其中 R 是约 9 至约 15 个碳原子的直链烷基、烯基或炔基，所述烷基、烯基或炔基具有一个或多个二氮杂环丙烯基 (diazirenyl group)，任选地在所述烷基、烯基或炔基上的 4 以上的位置处具有一个或多个羰基，并且还任选地被叠氮基、羟基或卤素（卤代基，halo）取代；或其药用盐；和，任选地，药用赋形剂。例如，该 AHL 化合物可以是式 (II) 的化合物，

[0015]



(II)

[0016] 其中 R^1 是约 7 至 13 个碳原子的直链烷基、烯基或炔基，所述烷基、烯基或炔基任

选地具有以下各项中的一个或多个：

[0017] (a) 二氮杂环丙烯基；

[0018] (b) 一个或多个羰基；

[0019] (c) 或，一个或多个独立地选择的叠氮基、羟基或卤素基团。

[0020] 例如，式 (I) 的化合物可以是所述化合物关于在氮原子与内酯环的结合位置处的手性中心的 (S)- 对映异构体。

[0021] 在多个实施方案中，本发明提供一种治疗患者的肿瘤的方法，所述方法包括向所述患者施用有效量的如上所述的式 (I) 的 N- 酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 类似物化合物。任选地，还可以施用有效量的肿瘤调制剂如 TRAIL 多肽。

[0022] 在多个实施方案中，本发明提供一种用于在肿瘤细胞中诱导细胞凋亡、捕获细胞分裂或抑制细胞增殖的方法，所述方法包括将细胞与有效量的 N- 酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 化合物以及任选地有效量的肿瘤调制剂如 TRAIL 多肽接触，其中所述 AHL 化合物具有如上所述的式 (I)。

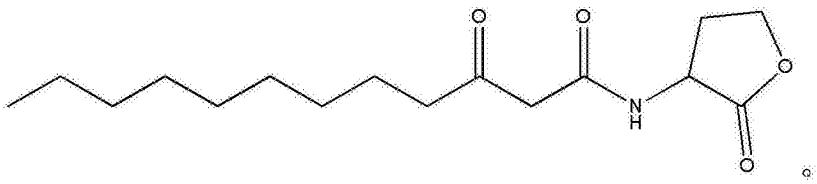
[0023] 在多个实施方案中，本发明提供合成可用于实施本发明的方法的本发明的 AHL 类似物的方法。

[0024] 在多个实施方案中，本发明提供一种试剂盒，所述试剂盒包括在容器中的本发明的化合物，如化合物 (S)-(3-N_2)，其任选地被溶解在药用液体介质中；所述试剂盒任选地还包括在第二容器中的肿瘤调制剂，如 TRAIL，其任选地被溶解在药用液体介质中；所述试剂盒还任选地包括用药或存储信息或两者。

[0025] 附图简述

[0026] 图 1：C12 在哺乳动物细胞中诱导 UPR。(A 和 B). 对铜绿假单胞菌 (P. aeruginosa) (P. a.)、鼠伤寒沙门氏菌 (S. typhimurium) (S. t.) 和金黄色葡萄球菌 (S. aureus) (S. a.) 的巨噬细胞应答性的比较。显示了在用细菌处理后在细胞提取物中的 XBP1 的 RT-PCR 测定 (A) 与 p38、其磷酸化形式 (p-p38) 以及磷酸化形式的 PERK (p-PERK) 和 eIF2α (p-eIF2α) 的蛋白质印迹分析 (B)。(C) 将巨噬细胞用铜绿假单胞菌野生型 (wt) 或 lasI 突变体 (ΔlasI) 进行刺激，并且制备细胞提取物 (总 RNA 或总蛋白质) 并且如在 (A 和 B) 中那样进行分析。(D 和 E) 显示了自用化合物 (C12)，即 (S)- 对映异构体，或用 (R)- 对映异构体 (C12R)，或水解产物 (C12h) 处理后的巨噬细胞制备的总 RNA 中的 XBP1 或肌动蛋白的 RT-PCR 测定。(F) 总 RNA 自接种媒介物 (vehicle)(-) 或 (C12) 后的小鼠的肺制备并且如在 (D) 中那样进行分析。(G) 化合物 (C12)、(C12R) 和 (C12h) 的化学结构。化合物 (C12) 是下式的化合物的 (S)- 对映异构体：

[0027]



[0028] 图 2：C12 通过调节鞘酯代谢 (medabolism) 诱导 UPR。(A 和 B) 如所示的在存在或不存在 CHX(A) 或 D-MAPP(B) 的情况下自用 C12、Tm 或 Tg 处理的巨噬细胞制备的总 RNA 中的 XBP1 的 RT-PCR 测定。(C) 蛋白质印迹分析显示 D-MAPP 对 (C12) 诱导的 eIF2α 的磷

酸化 (p-eIF2α) 和 p38 的磷酸化 (p-p38) 的作用 ;用于肌动蛋白的蛋白印迹是加载对照。(D) 在存在或不存在 D-MAPP 的情况下用 LPS 刺激巨噬细胞,并且制备总蛋白质提取物并且通过蛋白质印迹分析 p-p38 以及 IκBα 的表达。(E)RT-PCR 测定 (上图) 或蛋白质印迹 (下图) 监测自在用 (C12)、鞘氨醇 (Sph) 或二甲基鞘氨醇 (DMS) 处理后的巨噬细胞制备的样品中的 XBP1 或 eIF2α 或 p-p38 的水平。(F) 如所示的,TLC 测定监测用 DMSO(对映异构体) 或 C12 处理后的巨噬细胞中的 ^{3}H-Sph 代谢。在左边指示标准鞘脂的位置。Cer,神经酰胺 ;Sph,鞘氨醇 ;S1P,1- 磷酸鞘氨醇 ;SM,鞘磷脂。

[0029] 图 3 :癌性和非癌性细胞对由 TNF、C12 或 C12 和 TNF 的组合诱导的细胞凋亡的敏感性。如所示的,将细胞与 TNF、(C12) 或 TNF 和 (C12) 的组合孵育,并且通过蛋白质印迹确定 PARP(一种细胞凋亡标志) 的裂解。(A 和 B) 用对照载体 (载体 (Vector)) 和表达 Bcl-2 或 CLARP 的载体转染的乳腺癌 MCF-7 细胞。(C)HeLa 细胞系。(D) 正常人支气管上皮细胞 (NHBE)。

[0030] 图 4 :C12 使肺癌细胞系 A549 对 TRAIL 敏感。(A) 在含有 TRAIL(50ng/ml)、化合物 (C12)(1μM)、化合物 (C12R)(25μM) 或 TRAIL(T) 与 (C12) 或 (C12R) 的指定组合的培养基中温育 24 小时后,考察细胞的生存力。在右侧显示 (C12) 及其立体异构体 (C12R) 的化学结构。(B) 在含有 TRAIL(50ng/ml) 和指定剂量的 C12 的培养基中温育 24 小时后,考察细胞的生存力。根据基于 XTT 的毒理学测定试剂盒 (Sigma),作为存活细胞的线粒体活性的函数,确定在所述处理后剩余的存活细胞,并且将其显示为存活的未处理细胞的百分比。

[0031] 图 5 :C12 使肺癌细胞系 A549 对 TRAIL 诱导的细胞凋亡敏感。将细胞用 TRAIL、(C12) 或 TRAIL 和 (C12) 的组合处理指定的时间,并且通过蛋白质印迹分析考察细胞提取物的细胞凋亡标志 (裂解形式的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 -9、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 -3 或 PARP)、应激反应 (磷酸化形式的 eIF2α、p38 或 JNK) 和肌动蛋白 (加载对照)。

[0032] 图 6 :在存在 C12 的情况下原代人 B 细胞对 TRAIL 有抗性。(A) 将细胞用 TRAIL(T)、(C12)、毒胡萝卜内酯 (thapsigargin)(Tg) 或如所示的组合处理。根据基于 XTT 的毒理学测定试剂盒 (Sigma),作为存活细胞的线粒体活性的函数确定在 24- 小时处理后剩余的存活细胞,并且将其显示为存活的未处理细胞的百分比。(B) 将细胞用 TRAIL、(C12)、毒胡萝卜内酯 (Tg) 或如指定的组合处理 6 小时。通过蛋白质印迹考察细胞提取物的作为细胞凋亡标志的 PARP 的裂解或作为加载对照的肌动蛋白。

[0033] 图 7 :癌性和非癌性细胞对 TRAIL 和 (C12) 的组合的敏感性。将正常人支气管上皮 (NHBE) 和癌性人 HeLa 细胞用 TRAIL 和指定剂量的 (C12) 温育,并且通过 XTT 测定确定相对于未处理对照的细胞生存力。

[0034] 图 8 :(C12) 的安全性和促细胞凋亡活性。将细胞用 TRAIL、(C12)、bormetazomid(Bor) 或如所示的 TRAIL 和 (C12) 或 Bor 的组合温育,并且确定细胞生存力 (上图) 或 PARP 的裂解 (下图)。(A) 肺癌细胞系 A549。(B) 来自正常供体的原代人肝细胞。

[0035] 图 9 :对癌性细胞对于 TRAIL 的敏感性的 (C12) 介导和化合物 #15 介导的作用的比较。(A) 在含有 TRAIL(25ng/ml) 和指定剂量的 (C12) 或其类似物 (#15)(见表 1) 的培养基中温育 24 小时后,考察 A549 细胞的生存力。(B) 将 A549 细胞用 TRAIL、衣霉素 (tunicamycin)(Tu)、毒胡萝卜内酯 (Tg)、化合物 #15、(C12) 或如所示的组合处理。通过蛋白质印迹考察

细胞提取物的作为细胞凋亡标志的 PARP 的裂解或作为加载对照的肌动蛋白。

[0036] 图 10 :类似物的生物学活性。(A) 将肺癌 A549 细胞用 (C12) 或如所示的其类似物 (化合物 13,16 和 17,见表 1) 处理,并且通过蛋白质印迹考察细胞提取物的磷酸化形式的 eIF2α 或 p38 和作为加载对照的肌动蛋白。(B) 将 A549 细胞用 TRAIL、化合物、(C12) 或如所示的组合处理,并且也如在 (A) 中所示的那样制备细胞提取物 (6 小时处理) 并通过蛋白质印迹考察作为细胞凋亡标志的 PARP 的裂解。

[0037] 图 11. 产生 (C12) 的细菌或 (C12) 在癌细胞中促进细胞因子介导的细胞凋亡。a) 该研究中考察的 AHL 的化学结构。b) 如所示的,在有或没有铜绿假单胞菌 (Bac) 野生型 (wt) 或 lasI 突变体菌株 (ΔlasI) 的情况下,在存在或不存在 TNF 或 TRAIL 的情况下温育肺癌细胞。2h 后,制备细胞溶解产物并且通过免疫印迹法利用对 PARP 或作为加载对照的肌动蛋白特异性的抗体进行分析。c) 将肺细胞不处理 (空白 (Mock)) 或在存在指定剂量的 (C12) 的情况下用 TNF 或 TRAIL 处理 6h ;如在 b) 中那样分析细胞样品。d) 对于 TRAIL、(C12) 或它们的组合的肺细胞应答性的比较。在用如所示的刺激物处理后制备的细胞提取物中的 PARP、IκBα、磷酸化形式的 p38(p-p38) 和肌动蛋白的蛋白质印迹分析。

[0038] 图 12. (C12) 促进 TRAIL 介导的癌细胞杀伤。a)、c) 用 TRAIL、(C12) 或如所示的两者的组合处理 3 小时的癌细胞或正常细胞中的 PARP 裂解的蛋白质印迹分析。b)、d) 监测在含有 TRAIL 和指定剂量的 (C12) 的培养基中培养 18 小时的癌细胞和正常细胞的生存力的基于 XTT 的测定。在对照样品 (未处理的细胞) 中以及在用单独的 TRAIL 或在没有 TRAIL 的情况下相同剂量的 (C12) 温育的样品中,细胞存活率为～ 100％。

[0039] 图 13. 炎症诱导的 NF-κB 信号传导的 AHL 介导的抑制足以使得肿瘤易感于 TRAIL 诱导的细胞凋亡。a) 用 TRAIL 或如所示的其与不同 AHL 的组合刺激 3 小时的癌细胞中的 PARP 裂解的蛋白质印迹分析。b) 来自用如所示的 (C12) 或 (3-N_2),即 (S)-(3-N_2) 刺激的骨髓来源巨噬细胞 (BMDM) 的提取物中的 PARP 裂解以及磷酸化形式的 eIF2α 和 p38 的蛋白质印迹分析。c) 在用 LPS 或其与 (C12) 或 (3-N_2) 的组合处理后制备的 BMDM 提取物中的 PARP 裂解和 IκBα 表达的时序分布的蛋白质印迹分析。d) (C12) 及其衍生物对 BMDM 中的 LPS 诱导的 TNF 产生的抑制作用。e) 将肺癌细胞暴露于 (3-N_2) (10μM)、TRAIL(0.5ng/ml)、TNF(20ng/ml) 或如所示的它们的组合。2h 后,制备细胞溶解产物并且通过蛋白质印迹分析 PARP 裂解、IκBα 和肌动蛋白。

[0040] 详述

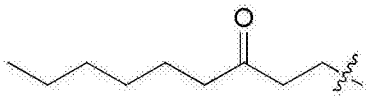
[0041] 烷基包括具有 1 至约 20 个碳原子,并且典型地具有 1 至 12 个碳或,在某些实施方案中,具有 1 至 8 个碳原子的直链和支链烷基和环烷基。直链烷基的实例包括具有 1 至 8 个碳原子的那些如甲基,乙基,正丙基,正丁基,正戊基,正己基,正庚基和正辛基。支链烷基的实例包括但不限于,异丙基,异丁基,仲丁基,叔丁基,新戊基,异戊基和 2,2- 二甲基丙基。如本文使用的,术语“烷基”涵盖正烷基,异烷基和反异烷基 (anteisoalkyl) 以及烷基的其他支链形式。

[0042] 烯基包括如上所定义的直链和支链和环状烷基,不同之处在于至少一个双键存在于两个碳原子之间。因此,烯基具有 2 至约 20 个碳原子,并且典型地具有 2 至 12 个碳或,在某些实施方案中,具有 2 至 8 个碳原子。实例尤其包括但不限于乙烯基,-CH＝CH(CH_3),-CH＝C(CH_3)$_2$,-C(CH_3)＝CH_2,-C(CH_3)＝CH(CH_3),-C(CH_2CH_3)＝CH_2,环己烯基,环戊烯基,环己

二烯基，丁二烯基，戊二烯基和己二烯基。

[0043] 炔基包括直链和支链烷基，不同之处在于至少一个三键存在于两个碳原子之间。因此，炔基具有 2 至约 20 个碳原子，并且典型地具有 2 至 12 个碳或，在某些实施方案中，具有 2 至 8 个碳原子。实例尤其包括但不限于 -C≡CH，-C≡C-CH_3)，-C≡C-CH_2CH_3)，-CH_2C≡CH，-CH_2C≡C-CH_3) 和 -CH_2C≡C-CH_2CH_3)。

[0044] 当取代基超过一价如二价的 O 时，其可以通过超过一个键与其所取代的原子键合，即，二价取代基通过双键键合；例如，被 O 取代的 C 形成羰基 C＝O，其也可以被书写为″ CO″、″ C(O)″或″ C(＝O)″，其中 C 和 O 成双键。当碳原子被成双键的氧（＝O) 基团取代时，氧取代基被称为″氧代″基团。当本文中陈述烷基、烯基或炔基包含羰基时，所指的分别是其中链的碳原子与氧原子成双键结合的烷基、烯基或炔基链，例如，式

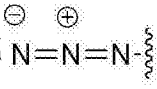


中，其中波形线指示连接点。羰基也可以键接所述烷基、烯基或炔基的任何其他碳原子。

[0045] 除非另有说明，术语“卤代”或“卤素”或″卤化物″自身或作为另一取代基的一部分，表示氟、氯、溴或碘原子，优选表示氟、氯或溴。

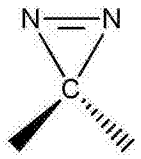
[0046] “卤代烷基”包括一卤代烷基、多卤代烷基（其中所有卤素原子可以是相同的或不同的）和全卤代烷基（其中所有氢原子被卤素原子如氟取代）。卤代烷基的实例包括三氟甲基，1,1- 二氯乙基，1,2- 二氯乙基，1,3- 二溴 -3,3- 二氟丙基，全氟丁基等。

[0047] “羟基”是与碳键合的 OH 基团。

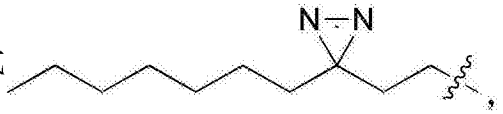
[0048] 术语″叠氮基″是指式  的 N_3基团，其中波形线指示连接点。

[0049] “二氮杂环丙烯基 (diazireny1)”作为本文中使用的术语是指包括一个碳原子和两个氮原子的三元环，其中两个氮原子彼此成双键并且每个氮原子与所述碳原子成单键，例如，为以下结构：

[0050]



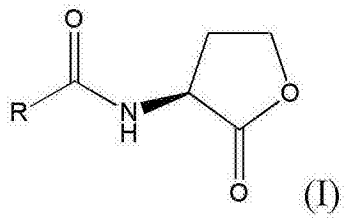
[0051] 其中四面体碳原子可以与两个另外的取代基键接。当本文中陈述烷基、烯基或炔基包含二氮杂环丙烯基时，所指的分别是这样的烷基、烯基或炔基链，其中所述链的饱和碳原子是与两个氮原子中的每个键合的碳原子。例如，包含二氮杂环丙烯基的 C10 烷基可以具有式



其中波形线指示连接点。二氮杂环丙烯基也可以键接所述烷基、烯基或炔基的任何其他碳原子。

[0052] “N- 酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 类似物”作为本文中使用的术语可以指具有如在 Cahn-Ingold-Prelog 体系下指定的 (S) 绝对构型的式 (I) 的化合物

[0053]

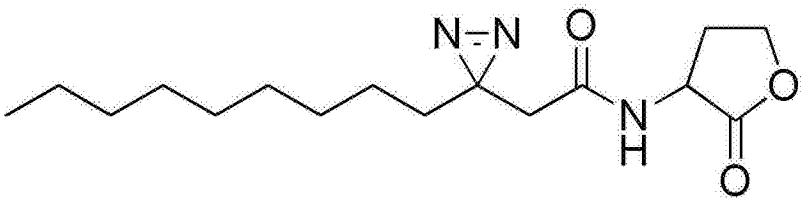


(I)

[0054] 其中基团 R 是约 9 至约 15 个碳原子的直链烷基、烯基或炔基链，其可以结合二氮杂环丙烯基、羰基或两者，并且可以进一步被如上所定义的基团取代。

[0055] 式 (I) 的化合物的一个实例是化合物 (3-N_2)

[0056]

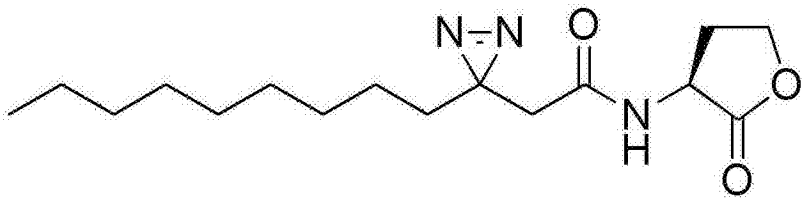


(3-N_2)。

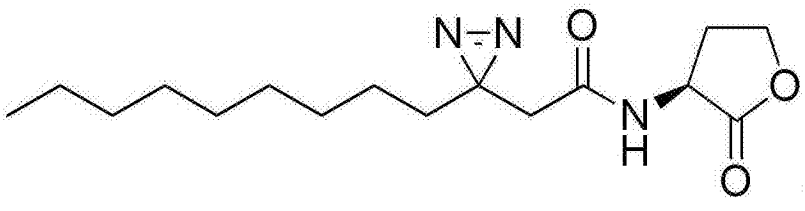
[0057] 二氮杂环丙烯与酰基链的 3- 碳键接，并且通篇都使用该命名法。

[0058] 如明显的，手性中心存在于丁内酯环取代的位置处。因此，所述化合物可以为任一构型，但是 (S)-(3-N_2) 化合物是优选的，其可以在结构意义上没有任何改变的情况下被不同地显示为

[0059]



(S)-(3-N_2)，或

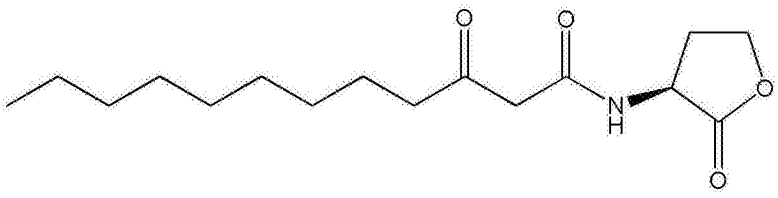


(S)-(3-N_2)；

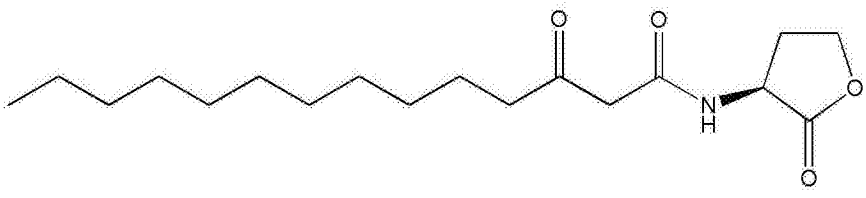
[0060] 两者都表示 (S)- 对映异构体。

[0061] 存在天然存在的 AHL 化合物

[0062]



化合物(C12)，或



，化合物(C14)，

[0063] 其可以在本发明方法的多个实施方案中使用，用于诱导肿瘤细胞中的细胞凋亡，或用于治疗患有癌症的患者。

[0064] 如本领域中已知的，″盐″包括与抗衡离子结合的离子形式的有机化合物如羧酸、磺酸或胺。例如，处于其阴离子形式的酸可以与阳离子如金属阳离子例如钠、钾等形成盐；与铵盐如 NH_4^+ 或各种胺的阳离子，包括四烷基铵盐如四甲基铵，或其他阳离子如三甲基锍等形成盐。″药用（药学上可接受的）″或″药理学可接受的″盐是由已被批准用于人使用的并且通常是无毒性的离子形成的盐，如氯化物盐或钠盐。″两性离子″是内盐如可以在具有至少两个可离子化基团（一个形成阴离子而另一个形成阳离子，其用于彼此平衡）的分子中形成。例如，氨基酸如甘氨酸可以以两性离子形式存在。″两性离子″是本文意义范围内的盐。本发明的化合物可以采取盐的形式。术语“盐”包括作为本发明的化合物的游离酸或游离碱的加成盐。盐可以是″药用盐″。术语“药用盐”是指这样的盐，其具有在药物应用中提供实用性的范围内的毒性分布。但是，药学上不可接受（不可药用）的盐可以具有性质如高结晶度，其在本发明的实施中具有用处，如例如可用于本发明化合物的合成、纯化或配制过程中。

[0065] 合适的药用酸加成盐可以制备自无机酸或有机酸。无机酸的实例包括盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硝酸、碳酸、硫酸和磷酸。合适的有机酸可以选自脂肪族、脂环族、芳族、芳脂族、杂环、羧酸和磺酸类的有机酸，其实例包括甲酸、乙酸、丙酸、琥珀酸、乙醇酸、葡糖酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、葡糖醛酸、马来酸、富马酸、丙酮酸、天冬氨酸、谷氨酸、苯甲酸、邻氨基苯甲酸、4-羟基苯甲酸、苯乙酸、扁桃酸、双羟萘酸（扑酸）、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、泛酸、三氟甲磺酸、2-羟基乙磺酸、对甲苯磺酸、磺胺酸、环己基氨基磺酸、硬脂酸、藻酸、β-羟基丁酸、水杨酸、半乳糖二酸和半乳糖醛酸。药学上不可接受的酸加成盐的实例包括，例如，高氯酸盐和四氟硼酸盐。

[0066] 典型的组合物包含本发明的化合物和药用赋形剂(excipient)，所述药用赋形剂可以是载体(carrier)或稀释剂(diluent)。例如，活性化合物通常将与载体混合或由载体稀释，或被封装在载体内，其可以是安瓿、胶囊、小袋、纸或其他容器的形式。当将活性化合物与载体混合时，或当载体充当稀释剂时，它可以是充当用于活性化合物的载体、赋形剂或介质的固体、半固体或液体材料。活性化合物可以被吸附在例如容纳在小袋中的粒状固体载体上。合适载体的一些实例是水、盐溶液、醇、聚乙二醇、多羟基乙氧基化的蓖麻油、花生油、橄榄油、明胶、乳糖、白土(terra alba)、蔗糖、糊精、碳酸镁、糖、环糊精、支链淀粉、硬脂酸镁、滑石、明胶、琼脂、果胶、阿拉伯树胶、硬脂酸或纤维素的低级烷基醚、硅酸、脂肪酸、脂

肪酸胺、脂肪酸甘油一酯和甘油二酯、季戊四醇脂肪酸酯、聚氧乙烯、羟甲基纤维素和聚乙烯吡咯烷酮。类似地，载体或稀释剂可以包括本领域中已知的任何持续释放材料，如甘油一硬脂酸酯或甘油二硬脂酸酯，单独地或与蜡混合。

[0067] 所述制剂可以与不会与活性化合物发生有害反应的助剂混合。这样的添加剂可以包括湿润剂、乳化剂和悬浮剂、用于影响渗透压的盐、缓冲剂和 / 或着色物质防腐剂、增甜剂或调味剂。如果需要，所述组合物也可以被灭菌。

[0068] 给药途径可以是将本发明的活性化合物有效地运送至合适或所需的作用位点的任何途径，如经口，经鼻，经肺，含服，皮下，皮内，透皮或肠胃外，例如，直肠，储库 (depot)，皮下，静脉内，尿道内，肌肉内，鼻内，眼科溶液或软膏，经口途径是优选的。

[0069] 如果将固体载体用于口服给药，则可以将制剂制成片剂，以粉末或小丸形式置于硬明胶胶囊中，或其可以是药片或锭剂的形式。如果使用液体载体，则制剂可以是糖浆、乳液、软明胶胶囊或无菌注射液如水性或非水性液体混悬剂或溶液的形式。

[0070] 注射剂型通常包括水混悬剂或油混悬剂，其可以使用合适的分散剂或湿润剂和悬浮剂制备。注射形式可以为溶液相或是以混悬剂的形式，其用溶剂或稀释剂制备。可接受的溶剂或载体包括无菌水、Ringer 溶液或等渗盐水溶液。备选地，无菌油可以用作溶剂或悬浮剂。优选地，油或脂肪酸是非挥发性的，包括天然或合成油、脂肪酸、甘油一酯、甘油二酯或甘油三酯。

[0071] 对于注射，制剂也可以是适用于如上所述的用适当的溶液重构的粉末。这些的实例包括但不限于，冷冻干燥、旋转干燥或喷雾干燥的粉末、非晶态粉末、细粒 (granule)、沉淀物或颗粒 (particulate)。对于注射，制剂可以任选地含有稳定剂、pH 调节剂、表面活性剂、生物利用度改良剂及这些的组合。所述化合物可以被配制用于通过注射如通过推注或连续注入的肠胃外给药。用于注射的单位剂型可以在安瓿中或在多剂量容器中。

[0072] 本发明的制剂可被设计成在通过采用本领域中已知的方法施用于患者后提供活性成分的快速、持续或延迟的释放。因此，所述制剂也可以被配制成用于受控释放或用于缓慢释放。

[0073] 本发明考虑的组合物可以包括，例如，胶束或脂质体，或一些其他包封形式，或可以以延长的释放形式施用以提供延长的存储和 / 或递送效果。因此，所述制剂可以被压缩成小丸或圆柱体并且被肌肉内或皮下植入以作为储库注射 (depot injection)。这样的植入物可以采用已知的惰性材料如硅酮和可生物降解的聚合物，例如，聚交酯 - 聚乙醇酸交酯。其他可生物降解的聚合物的实例包括聚 (原酸酯) 和聚 (酸酐)。

[0074] 对于经鼻给药，制剂可以含有本发明的化合物，其溶解或悬浮在液体载体、优选含水载体中，用于气溶胶应用。所述载体可以含有添加剂如增溶剂，例如，丙二醇，表面活性剂，吸收促进剂如卵磷脂 (磷脂酰胆碱) 或环糊精，或防腐剂如对羟苯甲酸酯。

[0075] 对于肠胃外应用，尤其适合的是注射溶液或混悬剂，优选水溶液，其中活性化合物溶解在多羟基化的蓖麻油中。

[0076] 具有滑石和 / 或碳水化合物载体或粘合剂等的片剂、糖锭剂或胶囊尤其适用于经口应用。片剂、糖锭剂或胶囊的优选载体包括乳糖、玉米淀粉和 / 或马铃薯淀粉。在其中可以采用增甜媒介物的情况下，可以使用糖浆或酏剂。

[0077] 可以通过常规压片技术制备的典型片剂可以含有 ：

[0078] 核心：

[0079]

活性化合物(作为游离化合物或其盐)	250 mg
胶体二氧化硅(Aerosil)®	1.5 mg
微晶纤维素(Avicel)®	70 mg
改性纤维素胶(Ac-Di-Sol)®	7.5 mg
硬脂酸镁	Ad.

[0080] 包衣：

[0081] HPMC 约 9mg

[0082] *Mywacett 9-40T 约 0.9mg

[0083] * 用作用于薄膜包衣的增塑剂的酰基化的甘油一酯。

[0084] 典型的用于经口施用的胶囊含有本发明的化合物 (250mg)、乳糖 (75mg) 和硬脂酸镁 (15mg)。使该混合物通过 60 目筛并且将其装入 1 号明胶胶囊中。典型的可注射制剂通过将 250mg 本发明的化合物无菌地放入到小瓶中，无菌地冻干并且密封制备。对于使用，将小瓶的内容物与 2mL 无菌生理盐水混合，以制备可注射制剂。

[0085] 本发明的化合物可以被施用至需要对不良状况进行这样的治疗、预防、消除、减轻或改善的哺乳动物，尤其是人。这样的哺乳动物还包括动物，家养动物例如家庭宠物、农场动物以及非家养动物如野生动物。

[0086] 本发明的化合物在宽的剂量范围内是有效的。例如，在成人的治疗中，可以使用约 0.05 至约 5000mg，优选约 1 至约 2000mg，并且更优选约 2 至约 2000mg/ 天的剂量。典型的剂量是约 10mg 至约 1000mg/ 天。在选择用于患者的治疗方案中，可能常常需要以较高的剂量开始并且当症状得到控制时减小剂量。准确的剂量将取决于化合物的活性、给药形式、所需的疗法、施用的形式、待治疗的受试者以及要治疗的受试者的体重，以及负责的医生或兽医的偏好和经验。

[0087] 通常，本发明的化合物被分配在单位剂型中，其包含每单位剂量约 0.05mg 至约 1000mg 活性成分以及药用载体。

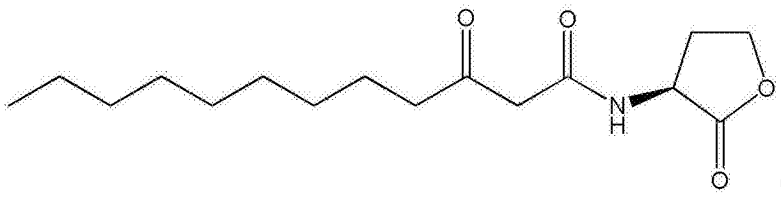
[0088] 通常，适用于经口施用、经鼻施用、肺施用或透皮施用的剂型包含约 125μg 至约 1250mg，优选约 250μg 至约 500mg，并且更优选约 2.5mg 至约 250mg 的所述化合物，该化合物与药用载体或稀释剂混合。

[0089] 剂型可以每日施用，或每天超过一次，如每日两次或三次。备选地，如果开处方的医生认为是可取的，则剂型可以以低于每天的频率施用，如每隔一天一次，或每周一次。

[0090] 详述

[0091] 我们考察了革兰氏阴性细菌铜绿假单胞菌 (Pseudomonas aeruginosa)，其是一种仅能够促进具有缺陷的免疫系统功能的宿主中的感染的机会性致病菌 (Smith, R.S. 和 Iglewski, B.H. (2003)Pseudomonas aeruginosa quorum sensing as a potential antimicrobial target(铜绿假单胞菌定额感测作为潜在的抗微生物靶标).J Clin Invest 112,1460-5)。因为化合物 (C12)

[0092]



(C12)

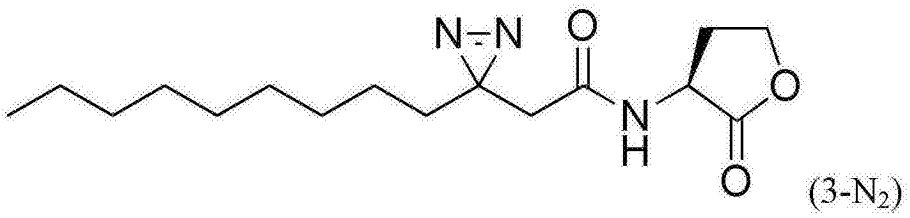
[0093] 是由该细菌大量产生的信号传导分子，我们考察了野生型铜绿假单胞菌或缺少lasI（负责合成化合物(C12)的基因）的突变体菌株是否能够使肺癌细胞易感于TNF-或TRAIL诱导的聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)的裂解（其是细胞凋亡的指示特征）。令人激动地，仅在细胞接受TRAIL和野生型细菌的组合时才检测到PARP裂解（图11b），这表明化合物(C12)是癌细胞中的TRAIL诱导的细胞凋亡所需要的。值得注意的是，在将其他AHL生产细菌添加至细胞因子刺激的细胞时观察到类似的结果，而不具有AHL合酶的细菌没有效果。此外，滴定实验证实，直接添加C12或若干天然存在的AHL类似物导致对TNF或TRAIL的强烈促细胞凋亡反应，并且与我们的细菌实验一致，细胞对TRAIL更敏感（图11c）。

[0094] 因为NF-κB信号传导的激活抑制细胞凋亡，所以观察到的TNF和TRAIL的促细胞凋亡作用方面的差异可能与这些细胞因子调节NF-κB活性的不同能力相关。与这种解释相一致，对IκBα(NF-κB信号传导的一种指示性生化标志）的降解和再合成的蛋白质印迹分析揭示响应于TNF而不响应于TRAIL的强烈NF-κB信号传导的激活。虽然响应于TRAIL或化合物(C12)没有诱发NF-κB或细胞凋亡信号传导的调节，但是IκBα水平的显著变化与用化合物(C12)和TRAIL的组合刺激的肺癌细胞中的PARP裂解相匹配（图11d）。令人感兴趣的是，我们还观察到TRAIL和化合物(C12)的组合作用导致丝裂原活化的蛋白激酶(MAPK)p38的延长激活，如通过对磷酸化形式的p38进行的蛋白质印迹分析所确定的（图11d;p-p38）。这些发现表明化合物(C12)通过调节NF-κB、p38或两者的信号传导过程增强TRAIL在癌细胞中执行细胞凋亡的能力。

[0095] 尽管表达TRAIL受体，但正常细胞对TRAIL诱导的细胞凋亡有抗性。类似于非转化的细胞，许多恶性细胞对TRAIL的促细胞凋亡作用不敏感或仅部分敏感。因此，为了评估化合物(C12)作为依赖于TRAIL的肿瘤免疫监视的调质的选择性，我们比较了若干种癌细胞系和正常细胞对TRAIL和化合物(C12)的敏感性。与我们之前的观察结果相一致，在用化合物(C12)和TRAIL的组合刺激的肺、结肠和乳腺癌细胞中观察到PARP裂解的大量诱导。相反，来自正常供体的人肝细胞以及其他来自正常组织的原代细胞对相同的处理有抗性（图12a和12c）。重要地，癌细胞用TRAIL加上化合物(C12)的更长时间处理显著降低其生存力，尽管没有注意到对正常细胞的存活性的作用（图12b和12d）。

[0096] 虽然这些数据证明了化合物(C12)作为依赖于TRAIL的抗癌活性的增强剂的治疗潜力，但是仍然需要解决关于(C12)介导的对免疫细胞（如原代巨噬细胞）的促细胞凋亡作用的问题。考虑到与C12相关的可能的固有药代动力学不利条件，针对来源于骨髓的巨噬细胞和TRAIL处理的肺癌细胞测试了较小的一系列化合物(C12)类似物。从这些研究中，发现缺少3-氧代部分的AHL在两种测定中都完全无活性；然而，发现被称为化合物($3\text{-}N_2$)的化合物(C12)的含3-二氮杂环丙烯(diazirine)的衍生物，

[0097]



(3-N_2)

[0098] 所提及的是其 (S)- 对映异构体，其中二氮杂环丙烯环（即，含有在两个氮原子之间的双键）代替了化合物 (C12) 的羰基；(结构、合成和表征数据参见以下实施例)，对巨噬细胞无毒性，但是以与母体分子类似的方式显示对 TRAIL 处理的癌细胞的毒性。此外，我们还观察到化合物 (C12) 和化合物 (3-N_2) 对 TRAIL 抗性癌细胞中的 TRAIL 诱导的 PARP 裂解的相当的作用（图 13a)。

[0099] 为了更好地定义 AHL 介导的对 TRAIL 的促细胞凋亡作用的效果和 (C12) 或化合物 (3-N_2) 的激动潜力之间的结构 - 活性关系，通过对 PARP 裂解、p38 的激活以及真核翻译起始因子 2α (eIF2α) 的磷酸化（响应于 C12 及其 3- 氧代 - 类似物的哺乳动物细胞活化的区别特征）的蛋白质印迹分析考察了巨噬细胞对这些化合物的反应。对化合物 (C12) 和化合物 (3-N_2) 的激动活性的比较揭示两种化合物以类似的方式诱导 eIF2α 磷酸化；然而，化合物 (3-N_2) 不诱导 p38 磷酸化和 PARP 裂解（图 13b)，这表明除了如之前公开的刺激噬菌活性以外，p38 通路的激活还促进 AHL 诱导的细胞凋亡。

[0100] 除了其激动活性以外，化合物 (C12) 还在多种细胞类型中抑制对 TNF、LPS 和其他 TLR 配体的炎性反应。在巨噬细胞中，C12 的抗炎活性干扰 NF-κB 靶基因如 IκBα 和 TNF 的可诱导的表达。我们的结果还表明 IκBα 依赖性 NF-κB 信号传导的 AHL 介导的破坏使得癌细胞易感于 TNF 和 TRAIL 诱导的细胞凋亡（见图 11d)。因此，为了考察化合物 (3-N_2) 是否影响刺激物诱导的 NF-κB 信号传导，我们比较了用 LPS 或其与化合物 (C12) 或化合物 (3-N_2) 的组合活化的巨噬细胞中 IκBα 表达的动力学。令人奇怪的是，虽然在化合物 (C12) 的存在下（在化合物 (3-N_2) 存在下则没有）观察到预期的 PARP 的促细胞凋亡裂解，但是两种化合物都可以同样有效地阻断 IκBα 的 LPS 诱导的再合成（图 13c)。此外，从对化合物 (C12) 和化合物 (3-N_2) 对 TNF 的 LPS 诱导的产生的抑制作用的比较，同样明显的是其抗炎活性间的相似性（图 13d)。这些实验表明化合物 (3-N_2) 对休眠的或炎症激活的巨噬细胞是无毒性的；然而，它保持了 C12 调节 LPS 诱导的 NF-κB 信号传导的能力。

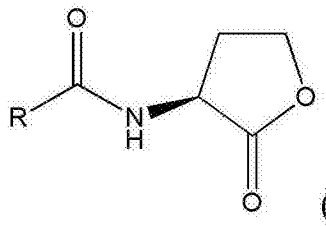
[0101] TNF 是负责 LPS 诱导的肿瘤生长的关键炎性介体，并且 TNF 的促生长活性依赖于 NF-κB 活化。最重要地，使用 LPS 诱导的肿瘤生长的小鼠模型的实验表明，癌细胞中 TNF 介导的 NF-κB 信号传导的抑制将炎症诱导的肿瘤生长转变为由内源性 TRAIL 介导的炎症诱导的肿瘤退化。为了确定 AHL 是否能够增强 TRAIL 在炎症激活的癌细胞中的抗癌活性，我们考察了非最优浓度的 TRAIL 对在用 TNF 和化合物 (3-N_2) 的组合处理的癌细胞中的 PARP 裂解的作用。蛋白质印迹分析揭示，在化合物 (3-N_2) 存在下用 TNF 刺激的癌细胞中出现依赖于 TRAIL 的 PARP 裂解，并且显著地，TRAIL 介导的细胞凋亡反应与 TNF 诱导的 NF-κB 信号传导的破坏一致（图 13e).

[0102] 总之，对作为“TRAIL 增强剂”的化合物 (C12) 及其类似物如化合物 (3-N_2) 以及这些化合物通过调节 NF-κB 信号传导而抑制促炎症反应的能力的鉴定，为选择性杀死癌细胞提供了原理论证的应用。值得注意地，化合物 (3-N_2) 对癌细胞中的 TRAIL 诱导的细胞凋

亡的协同作用与抗癌剂硼替佐米 (bortezomib) 的作用相当；然而，与硼替佐米不同，化合物 (3-N_2) (单独的或与 TRAIL 组合) 对来源于正常供体的组织的人肝细胞是没有毒性的。癌症和炎症的联系表明在癌症治疗和预防中使用抗炎剂如 NF-κB 的抑制剂可以获得很大的好处。

[0103] 因此，在多个实施方案中，本发明提供一种药物组合物，所述药物组合物包含有效量的式 (I) 的 N- 酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 类似物化合物 ：

[0104]



(I)

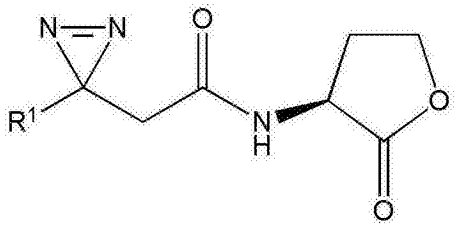
[0105] 其中 R 是约 9 至约 15 个碳原子的直链烷基、烯基或炔基，所述烷基、烯基或炔基具有与其键接的一个或多个二氮杂环丙烯基，任选地在所述烷基、烯基或炔基上的 4 以上的位置处具有一个或多个羰基，并且还任选地被叠氮基、羟基或卤素取代 ；或其药用盐 ；和，任选地，

[0106] 药用赋形剂。

[0107] 对于关于对任选地在所述烷基、烯基或炔基上的 4 以上的位置处具有一个或多个羰基的陈述，位置编号 (例如，4) 是指与氧原子键接的酰基链的碳编号 (例如，在酰基链的位置 4 处)。酰基链与高丝氨酸内酯氨基形成酰胺键从而提供 AHL 化合物。

[0108] 例如，AHL 化合物可以具有式 (II)

[0109]



(II)

[0110] 其中 R^1 是约 7 至 13 个碳原子的直链烷基、烯基或炔基，所述烷基、烯基或炔基任选地具有以下各项中的一个或多个 ：

[0111] (d) 二氮杂环丙烯基 ；

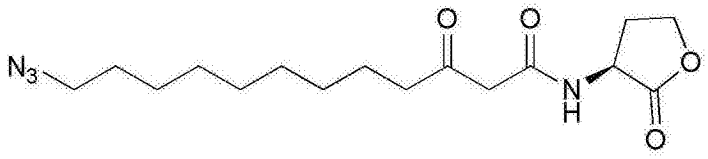
[0112] (e) 一个或多个羰基 ；或

[0113] (f) 一个或多个独立选择的叠氮基、羟基或卤素基团。

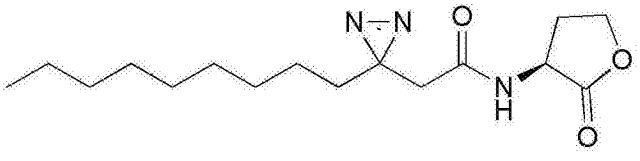
[0114] 在多个实施方案中，本发明的药物组合物还可以包含肿瘤调制剂，所述肿瘤调制剂是 TRAIL 多肽。

[0115] 更具体地，N- 酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 类似物选自由以下各项组成的组 ：

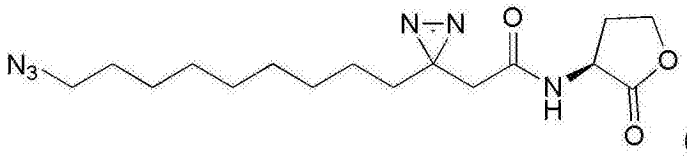
[0116]



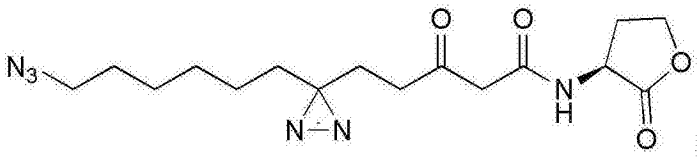
(12-N_3-12)



(3-N_2)



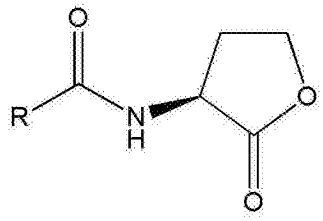
(12-N_3-3N_2) 和



(12-N_3-6-N_2-12)。

[0117] 在多个实施方案中，本发明提供一种治疗患者的肿瘤的方法，所述方法包括向所述患者施用有效量的式（I）的N-酰基高丝氨酸内酯（AHL）类似物化合物，

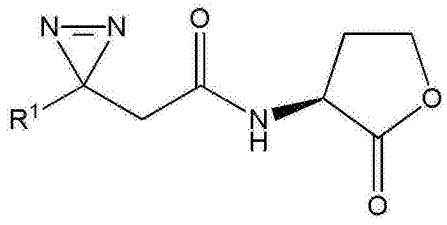
[0118]



(I)

[0119] 其中R是约9至约15个碳原子的直链烷基、烯基或炔基，所述烷基、烯基或炔基具有一个或多个二氮杂环丙烯基，任选地具有一个或多个羰基，并且还任选地被叠氮基、羟基或卤素取代；或药用盐；和任选地，药用赋形剂。例如，所述化合物可以是式（II）的化合物，

[0120]



(II)

[0121] 其中R^1是约7至13个碳原子的直链烷基、烯基或炔基，所述烷基、烯基或炔基任选地具有以下各项中的一个或多个：

[0122] (a)二氮杂环丙烯基；

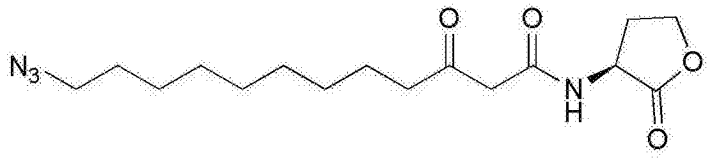
[0123] (b)一个或多个羰基；或

[0124] (c)一个或多个独立选择的叠氮基、羟基或卤素基团。

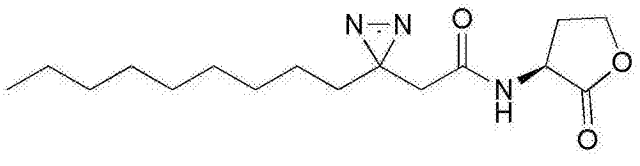
[0125] 本发明的方法还可以包括施用有效量的肿瘤调制剂，所述肿瘤调制剂是TRAIL多

肽。更具体地，N-酰基高丝氨酸内酯（AHL）类似物可以选自由以下各项组成的组：

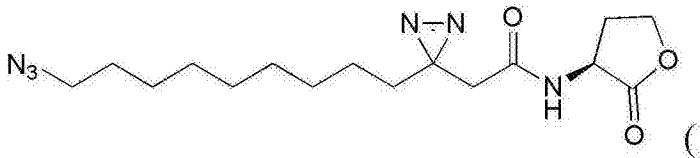
[0126]



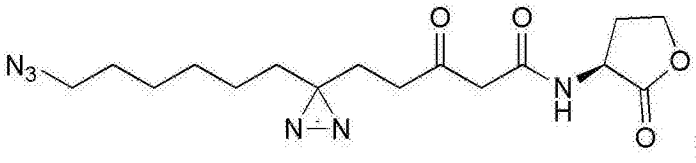
(12-N_3-12)



(3-N_2)



(12-N_3-3N_2) 和

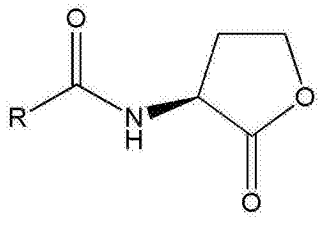


(12-N_3-6-N_2-12)。

[0127] 例如，可以根据本发明的方法治疗的肿瘤可以选自由以下各项组成的组：肺肿瘤（lung tumor）、子宫颈肿瘤（cervical tumor）、乳腺肿瘤（breast tumor）和脑肿瘤（brain tumor）。

[0128] 在多个实施方案中，本发明提供一种用于在肿瘤细胞中诱导细胞凋亡、捕获细胞分裂或抑制细胞增殖的方法，所述方法包括将细胞与有效量的N-酰基高丝氨酸内酯（AHL）化合物和有效量的TRAIL接触，其中所述AHL化合物具有式（I）：

[0129]

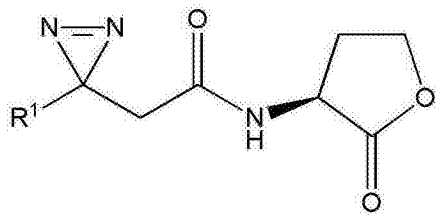


(I)

[0130] 其中R是约9至约15个碳原子的直链烷基、烯基或炔基，所述烷基、烯基或炔基具有一个或多个二氮杂环丙烯基，任选地具有一个或多个羰基，并且还任选地被叠氮基、羟基或卤素取代。例如，在多个实施方案中，有效量的AHL类似物是肿瘤细胞中未折叠蛋白反应（UPR）、内质网膨胀（ERS）或两者的激活剂。

[0131] 更具体地，对于实施本发明的方法，AHL化合物是式（II）的化合物，

[0132]



(II)

[0133] 其中 R^1 是约 7 至 13 个碳原子的直链烷基、烯基或炔基，所述烷基、烯基或炔基任选地具有以下各项中的一个或多个：

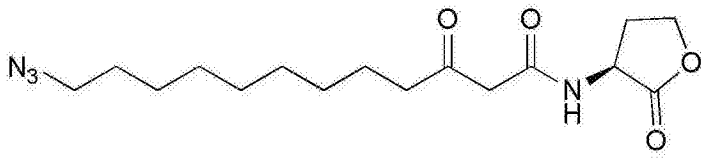
[0134] (a) 二氮杂环丙烯基；

[0135] (b) 一个或多个羰基；和

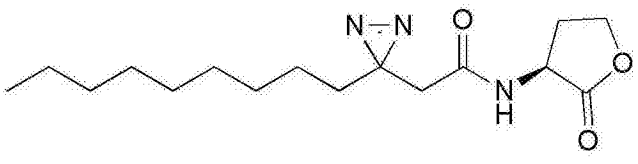
[0136] (c) 一个或多个独立选择的叠氮基、羟基或卤素基团。

[0137] 更具体地，N- 酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 类似物可以选自由以下各项组成的组：

[0138]

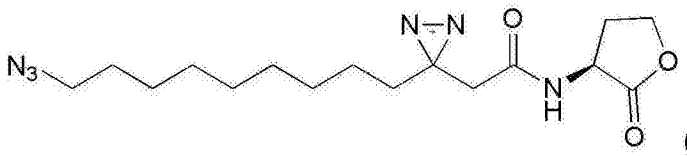


(12-N_3-12)

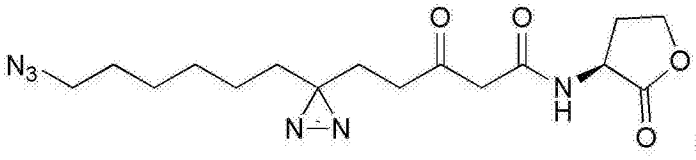


(3-N_2)

[0139]



(12-N_3-3N_2) 和

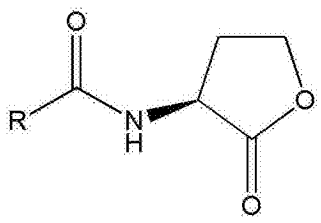


(12-N_3-6-N_2-12)。

[0140] 肿瘤细胞可以来自选自由以下各项组成的组的肿瘤：肺肿瘤、子宫颈肿瘤、乳腺肿瘤和脑肿瘤。

[0141] 在多个实施方案中，本发明还提供式 (I) 的化合物：

[0142]

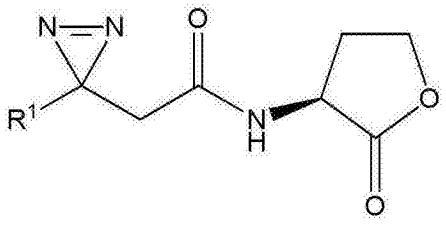


(I)

[0143] 其中 R 是约 9 至约 15 个碳原子的直链烷基、烯基或炔基，所述烷基、烯基或炔基具

有一个或多个二氮杂环丙烯基，任选地在所述烷基、烯基或炔基上的 4 以上的位置处具有一个或多个羰基，并且还任选地被叠氮基、羟基或卤素取代；或其药用盐。例如，所述化合物可以是式 (II) 的化合物，

[0144]



(II)

[0145] 其中 R^1 是约 7 至 13 个碳原子的直链烷基、烯基或炔基，所述烷基、烯基或炔基任选地具有以下各项中的一个或多个：

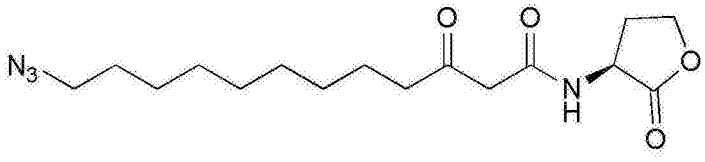
[0146] (a) 二氮杂环丙烯基；

[0147] (b) 一个或多个羰基；或

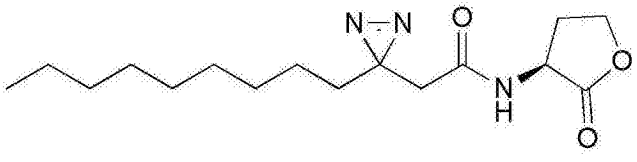
[0148] (c) 一个或多个独立选择的叠氮基、羟基或卤素基团。

[0149] 如上所述的式 (I) 的化合物可以以与肿瘤调制剂的药物组合提供，所述肿瘤调制剂是 TRAIL 多肽。例如，本发明的 N- 酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 类似物可以选自由以下各项组成的组：

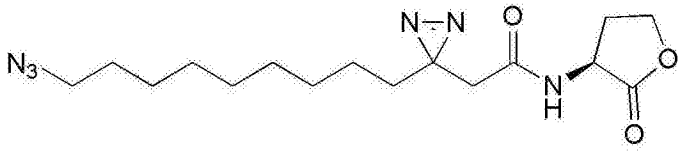
[0150]



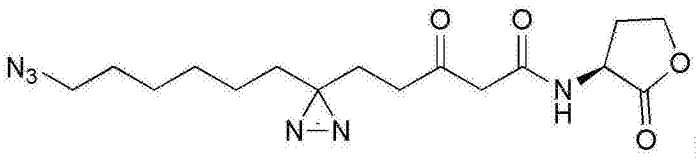
(12-N_3-12)



(3-N_2)



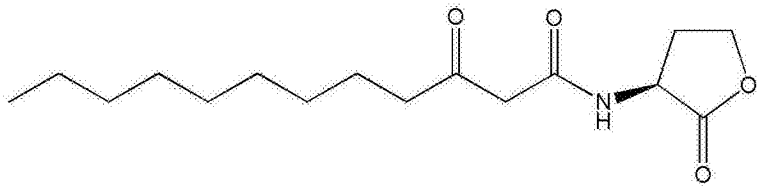
(12-N_3-3N_2) 和



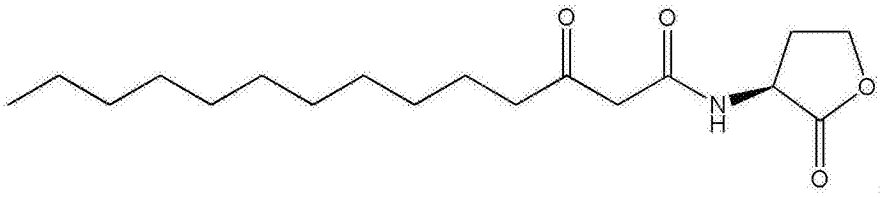
(12-N_3-6-N_2-12)。

[0151] 在多个实施方案中，本发明提供一种在细胞中诱导细胞凋亡的方法，所述方法包括将细胞与有效量的如上所述的 N- 酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 类似物接触，条件是所述 AHL 类似物不具有下式：

[0152]



或

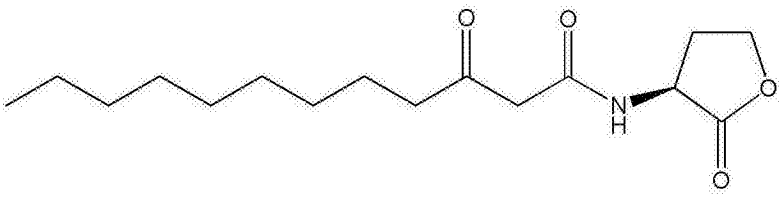


。

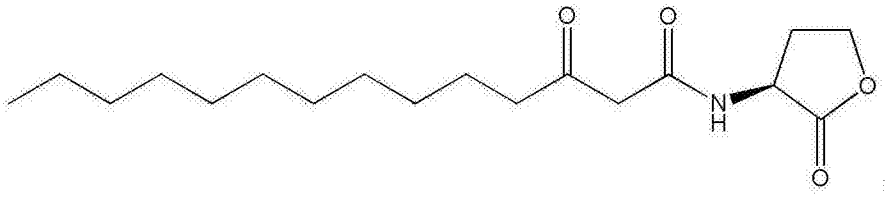
[0153] 任选地，所述诱导细胞凋亡的方法还包括施用有效量的肿瘤调制剂，如 TRAIL。所述诱导细胞凋亡的方法可以相对于正常细胞对癌细胞是选择性的。

[0154] 在多个实施方案中，本发明提供一种治疗患者的肿瘤的方法，所述方法包括向所述患者施用有效量的 N- 酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 类似物，加上有效量的肿瘤调制剂，如 TRAIL。在多个实施方案中，AHL 类似物不具有下式：

[0155]



或

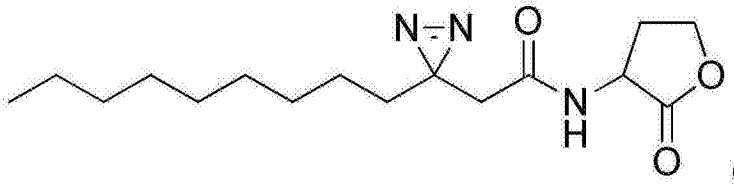


。

[0156] 在多个实施方案中，所述治疗肿瘤的方法可以在患者身体的正常细胞存在下提供对肿瘤细胞的选择性杀伤。

[0157] 式 (I) 的化合物可以是式 (3-N_2) 的化合物：

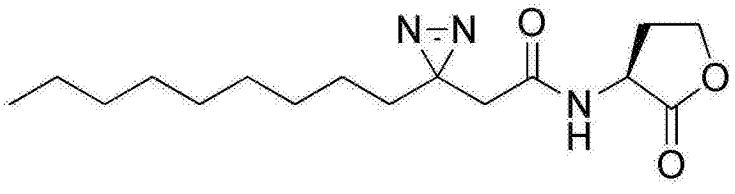
[0158]



(3-N_2)。

[0159] 例如，式 (I) 的化合物可以是式 (3-N_2) 的化合物的 (S)- 对映异构体：

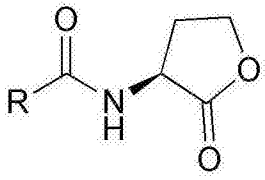
[0160]



。

[0161] 在多个实施方案中，本发明提供一种式（I）的化合物：

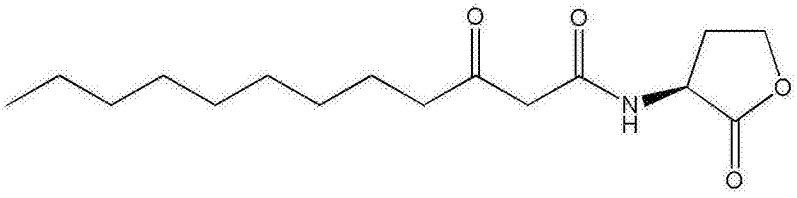
[0162]



(I)

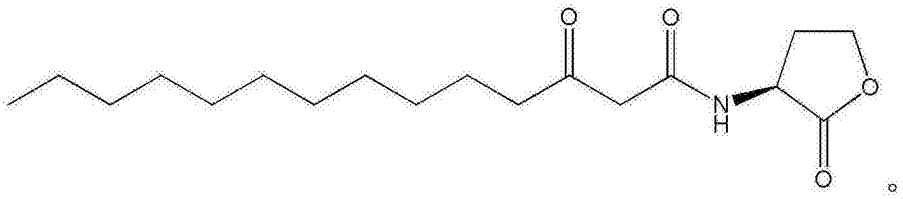
[0163] 其中 R 是约 9 至约 15 个碳原子的直链烷基、烯基或炔基，其包含一个或多个二氮杂环丙烯基，任选地还包含一个或多个羰基，并且还任选地被叠氮基、羟基或卤素取代，或其药用盐，前提是所述化合物不是

[0164]



或

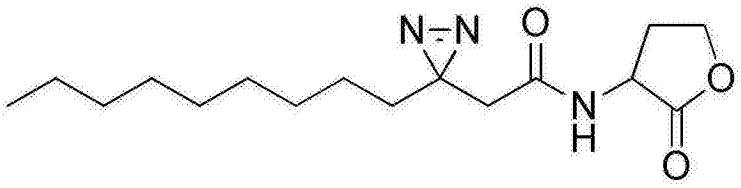
[0165]



。

[0166] 在多个实施方案中，本发明提供一种式（3-N_2）的化合物：

[0167]



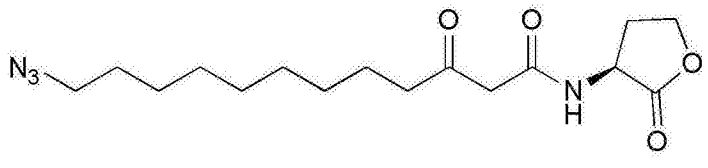
[0168] 其中含有在两个氮原子之间的双键的二氮杂环丙烯环替代化合物 C12 的羰基从而提供化合物（3-N_2）。

[0169] 在多个实施方案中，本发明提供一种药物组合物，所述药物组合物包含本发明的化合物和药用赋形剂。

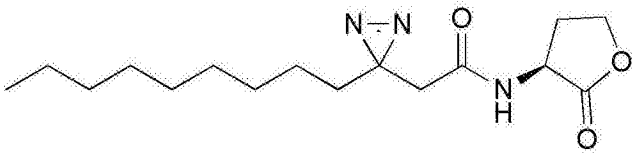
[0170] 在多个实施方案中，本发明提供一种试剂盒，所述试剂盒包括在容器中的本发明的化合物，其任选地溶解在药用液体介质中；所述试剂盒任选地还包括在第二个容器中的肿瘤调制剂，如 TRAIL，其任选地溶解在药用液体介质中；还任选地包括用药或存储信息或两者。

[0171] 更具体地，如本文公开并要求保护的式（I）的 N- 酰基高丝氨酸内酯（AHL）类似物可以是以下中任一个：

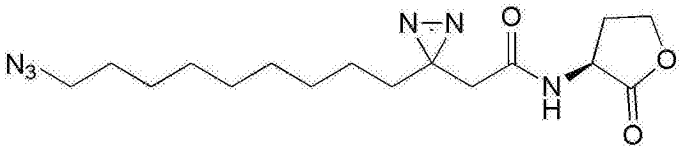
[0172]



(12-N_3-12)

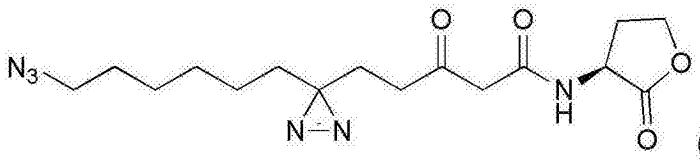


(3-N_2)



(12-N_3-3N_2)

[0173]



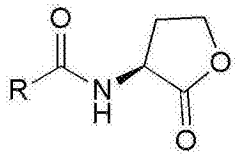
(12-N_3-6-N_2-12)

[0174] 或其任何药用盐。

[0175] 肿瘤可以是肺肿瘤、子宫颈肿瘤、乳腺癌、脑癌等。在多个实施方案中，有效量的式(II)的AHL类似物可以是肿瘤细胞中的未折叠蛋白反应(UPR)、内质网膨胀(ERS)或两者的激活剂。

[0176] 在多个实施方案中，本发明提供一种在哺乳动物细胞中诱导未折叠蛋白反应(UPR)的方法，所述方法包括将所述细胞与有效量的式(I)的AHL或其类似物或其药用盐接触

[0177]

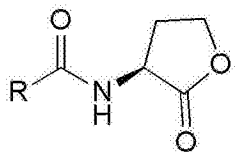


(I)

[0178] 其中R是约9至约15个碳原子的直链烷基、烯基或炔基，其包含一个或多个二氮杂环丙烯基，任选地还包含一个或多个羰基，并且还任选地被叠氮基、羟基或卤素取代。

[0179] 在多个实施方案中，由此诱导的UPR可以产生细胞周期捕获和/或可以抑制细胞分裂或增殖。细胞周期捕获和/或细胞分裂或增殖的抑制可以是在赘生物(如肿瘤)治疗中的有效疗法。因此，在多个实施方案中，本发明提供一种治疗其中UPR的诱导、细胞分裂的捕获和/或细胞增殖的抑制在医学上被指出的患者的不良状况的方法，所述方法包括向所述患者施用有效量的式(I)的AHL或其类似物，或其药用盐，

[0180]



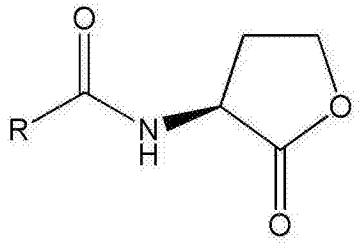
(I)

[0181] 其中 R 是约 9 至约 15 个碳原子的直链烷基、烯基或炔基，其包含一个或多个二氮杂环丙烯基，任选地还包含一个或多个羰基，并且还任选地被叠氮基、羟基或卤素取代。

[0182] 包括诱导 UPR 的治疗方法还可以包括共同施用有效量或浓度的 TRAIL。所述不良状况可以例如包括癌症或癌前病症或组织增生。

[0183] 在多个实施方案中，本发明还提供一种药物组合物，所述药物组合物包含有效量的来自式 (I) 的化合物的 N- 酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 类似物 ：

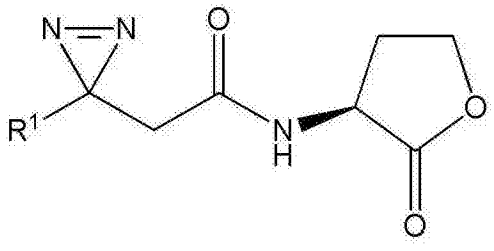
[0184]



(I)

[0185] 其中 R 是约 9 至约 15 个碳原子的直链烷基、烯基或炔基，所述烷基、烯基或炔基具有一个或多个二氮杂环丙烯基，任选地在所述烷基、烯基或炔基上的 4 以上的位置处具有一个或多个羰基，并且还任选地被叠氮基、羟基或卤素取代 ；和药用盐。例如，所述化合物可以是式 (II) 的化合物，

[0186]



(II)

[0187] 其中 R^1 是约 7 至 13 个碳原子的直链烷基、烯基或炔基，其任选地具有 ：

[0188] (g) 二氮杂环丙烯基 ；

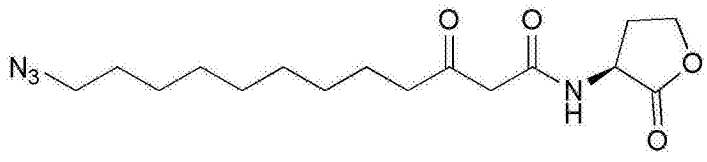
[0189] (h) 一个或多个羰基 ；和

[0190] (i) 任选地被叠氮基、羟基或卤素取代。

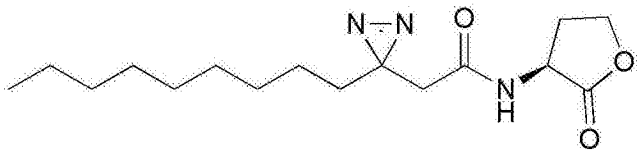
[0191] 在多个实施方案中，本发明还可以提供如上所述的药物组合物，所述药物组合物还包含肿瘤调制剂，所述肿瘤调制剂是 TRAIL 多肽。

[0192] 更具体地，本发明提供如上所述的药物组合物，其中所述 N- 酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 类似物选自由以下各项组成的组 ：

[0193]

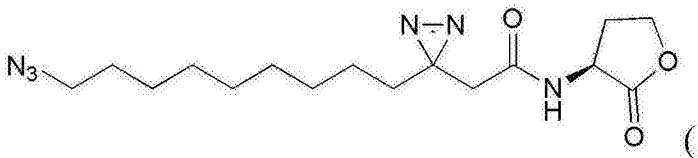


(12-N_3-12)

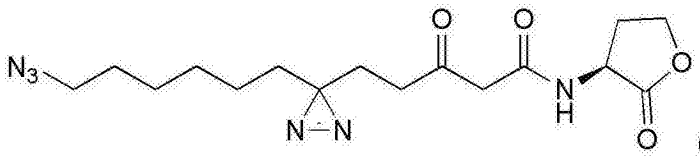


(3-N_2)

[0194]



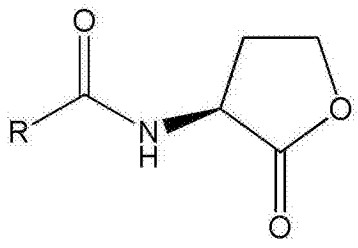
(12-N_3-3N_2) 和



(12-N_3-6-N_2-12)。

[0195] 在多个实施方案中，本发明提供一种治疗患者的肿瘤的方法，所述方法包括向所述患者施用有效量的 N- 酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 类似物，其包括式 (I) 的化合物 ：

[0196]

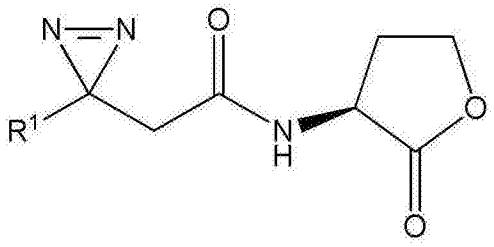


(I)

[0197] 其中 R 是约 9 至约 15 个碳原子的直链烷基、烯基或炔基，所述烷基、烯基或炔基具有一个或多个二氮杂环丙烯基，任选地具有一个或多个羰基，并且还任选地被叠氮基、羟基或卤素取代 ；和

[0198] 药用盐。例如，为了实施本发明的方法，所述化合物可以是式 (II) 的化合物 ：

[0199]



(II)

[0200] 其中 R^1 是约 7 至 13 个碳原子的直链烷基、烯基或炔基，其任选地具有 ：

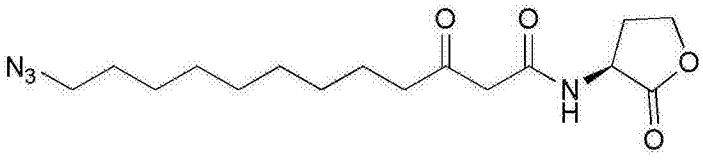
[0201] (d) 二氮杂环丙烯基 ；

[0202] (e) 一个或多个羰基 ；和

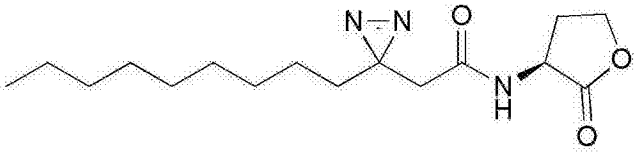
[0203] (f) 任选地被叠氮基、羟基或卤素取代。

[0204] 例如，如上所述的治疗患者的肿瘤的方法还可以包括施用肿瘤调制剂，所述肿瘤调制剂是 TRAIL 多肽。例如，为了实施如上所述的治疗患者中肿瘤的方法，N- 酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 类似物可以选自由以下各项组成的组 ：

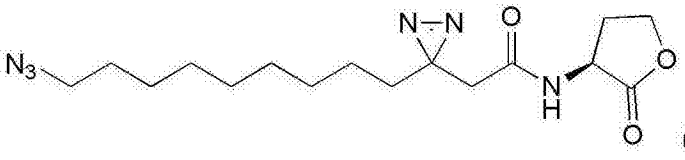
[0205]



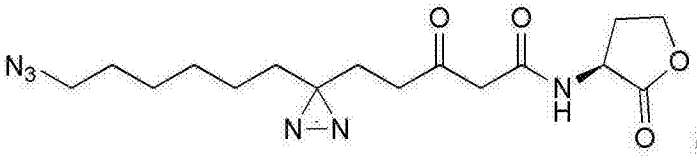
(12-N_3-12)



(3-N_2)



(12-N_3-3N_2) 和

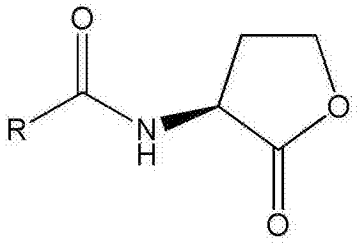


(12-N_3-6-N_2-12)。

[0206] 例如，肿瘤可以选自由以下各项组成的组 ：肺肿瘤、子宫颈肿瘤、乳腺肿瘤和脑肿瘤。

[0207] 在多个实施方案中，本发明还提供一种式 (I) 的化合物 ：

[0208]

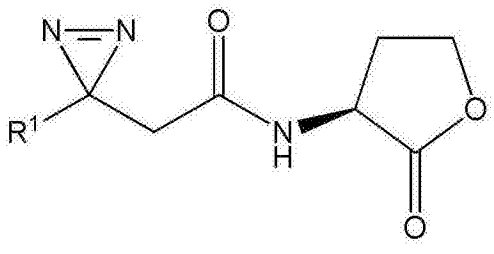


(I)

[0209] 其中 R 是约 9 至约 15 个碳原子的直链烷基、烯基或炔基，所述烷基、烯基或炔基具有一个或多个二氮杂环丙烯基，任选地在所述烷基、烯基或炔基上的 4 以上的位置处具有一个或多个羰基，并且还任选地被叠氮基、羟基或卤素取代 ；和

[0210] 药用盐。例如，所述化合物可以是式 (II) 的化合物，

[0211]



(II)

[0212] 其中 R^1 是约 7 至 13 个碳原子的直链烷基、烯基或炔基，其任选地具有：

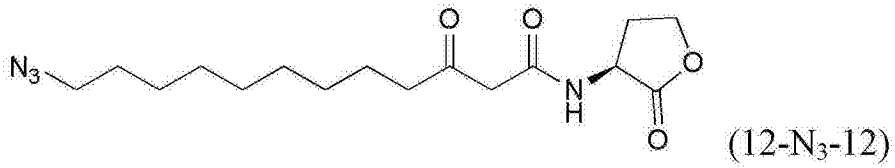
[0213] (d) 二氮杂环丙烯基；

[0214] (e) 一个或多个羰基；和

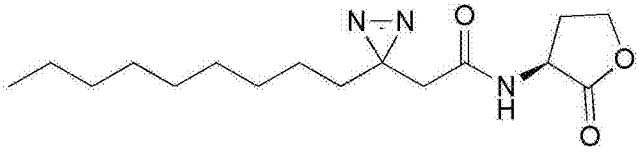
[0215] (f) 任选地被叠氮基、羟基或卤素取代。

[0216] 所述化合物可以与肿瘤调制剂组合，所述肿瘤调制剂是 TRAIL 多肽。本发明的化合物可以选自由以下各项组成的组：

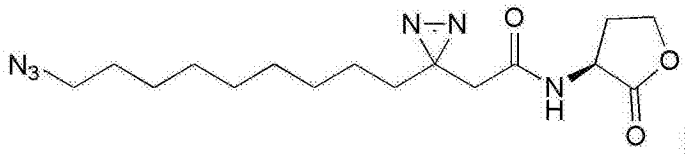
[0217]



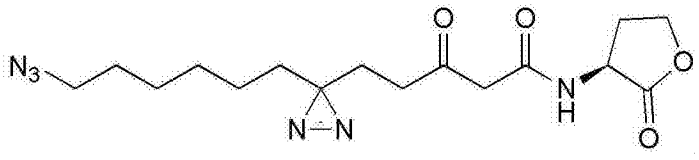
(12-N_3-12)



(3-N_2)



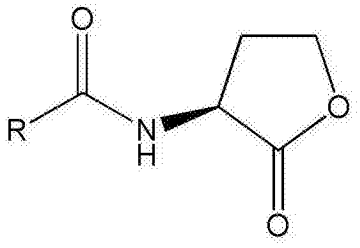
(12-N_3-3N_2) 和



(12-N_3-6-N_2-12)。

[0218] 在多个实施方案中，本发明还提供一种用于在肿瘤细胞中诱导细胞凋亡、捕获细胞分裂或抑制细胞增殖的方法，所述方法包括将细胞与有效量的 N- 酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 化合物和有效量的 TRAIL 接触，其中所述化合物来自式 (I)：

[0219]



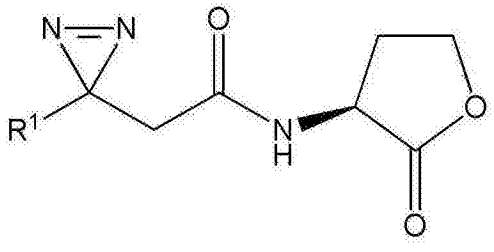
(I)

[0220] 其中 R 是约 9 至约 15 个碳原子的直链烷基、烯基或炔基，所述烷基、烯基或炔基具

有一个或多个二氮杂环丙烯基，任选地具有一个或多个羰基，并且还任选地被叠氮基、羟基或卤素取代。更具体地，为了实施用于在肿瘤细胞中诱导细胞凋亡、捕获细胞分裂或抑制细胞增殖的方法，处于有效量的 AHL 类似物可以是肿瘤细胞中的未折叠蛋白反应 (UPR)、内质网膨胀 (ERS) 或两者的激活剂。

[0221] 例如，为了实施如上所述的本发明的方法，所述化合物可以是式 (II) 的化合物，

[0222]



(II)

[0223] 其中 R^1 是约 7 至 13 个碳原子的直链烷基、烯基或炔基，其任选地具有：

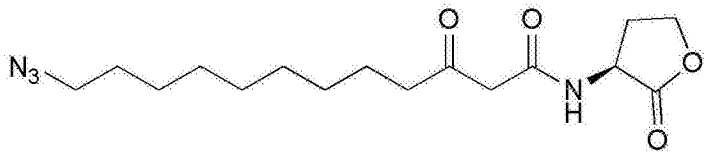
[0224] (d) 二氮杂环丙烯基；

[0225] (e) 一个或多个羰基；并且

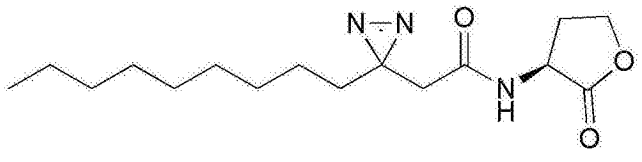
[0226] 任选地被叠氮基、羟基或卤素取代。

[0227] 更具体地，为了实施用于在肿瘤细胞中诱导细胞凋亡、捕获细胞分裂或抑制细胞增殖的方法，N- 酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 类似物可以选自由以下各项组成的组：

[0228]

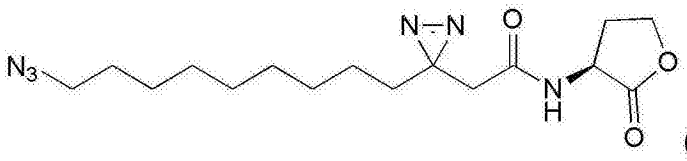


(12-N_3-12)

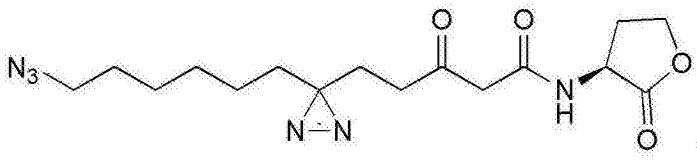


(3-N_2)

[0229]



(12-N_3-3N_2) 和



(12-N_3-6-N_2-12)。

[0230] 在多个实施方案中，本发明提供一种试剂盒，所述试剂盒包括在容器中的 AHL 类似物或本发明的化合物，其任选地溶解在药用液体介质中；所述试剂盒任选地还包括在第二容器中的肿瘤调制剂，其任选地溶解在药用液体介质中；还任选地包括用药或存储信息或两者。

[0231] 生物学研究

[0232] 此处，发明人之前的工作已经显示，细菌性 N-(3- 氧代 - 酰基）高丝氨酸内酯 (AHL) 瞬时地诱导 ER 膨胀和出现 UPR 的生化标志，如真核翻译起始因子 2α (eIF2α) 的磷酸化，表明了 AHL 在 UPR 中的作用 (V.Kravchenko 等，J Biol Chem 2006,281(39), 28822-30)。因为编码转录因子 XBP1(X-box 结合蛋白）的 mRNA 的需要肌醇的蛋白 1(IRE1) 介导的剪接是 UPR 的进化保守的特征 (Schroder，M.，et al，Ann Rev Biochem 2005,74, 739-89)，我们通过研究 XBP1 mRNA 的剪接形式 (sXBP1) 是否响应于 N-(3- 氧代 - 酰基 - 十二烷酰基）高丝氨酸内酯（“C12”）的存在产生而确定了 AHL 在 UPR 激活中的作用。RT-PCR 测定揭示，化合物 C12 以及其他 AHL 在小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 中诱导 sXBP1 的产生并且对 C12 的反应与衣霉素 (Tg) 和毒胡萝卜内酯 (Tg) 的作用是相当的。此种对 C12 的反应不限于 MEF，而是在包括人转化的细胞在内的多种细胞类型中也观察到。

[0233] 细菌超群落（也被称为微生物群）与多细胞器官共存并且是在多种应激感应生理过程（尤其是参与宿主细胞代谢和免疫反应的那些）中具有重要作用的古老的环境因子。例如，肠微生物群有利地有助于代谢系统（通过促进饮食营养物的收获）[1,2] 和免疫系统（通过保持正常的低级水平的炎症）[2 4] 两者。常规地，炎性过程是组织修复所需的并且包括整合许多复杂的信号传导机制，包括调节 Toll 样受体 (TLR) 通路以响应于细菌产物如脂多糖 (LPS) 和肽聚糖 [4,5]。另一方面，微生物群介导的炎症也与代谢病如肥胖和癌症发展相关 [2, 6 8]。虽然这些病症内在的分子机制不可避免地与内质网 (ER) 应激通路的激活相关联 [5,9,10]，但是还未鉴定触发 ER 应激的细菌组分。

[0234] 被称为未折叠蛋白反应 (UPR) 的多组分 ER 应激通路的关键性生化特征中，有真核翻译起始因子 -2 的 α - 亚基 (eIF2α) 的磷酸化和转录因子 XBP1/Hac1（多细胞动物中的 X-box 结合蛋白 -1 并且分别与酵母中的 ATF/CREB 同源）的激活 [11]。某些来源于革兰氏阴性菌的分子，如 N-(3- 氧代 - 酰基）高丝氨酸内酯 (3- 氧代 -AHL) 诱导 eIF2α 磷酸化的能力 [12] 以及 3- 氧代 -AHL 在微生物群样品中的存在 [13 15] 促使我们去研究其在 UPR 激活中的作用。选择革兰氏阴性铜绿假单胞菌和革兰氏阳性金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus) 细菌作为两种在进化上疏远的微生物，其可以形成人微生物群的部分，并且主要分别通过 TLR4 和 TLR2 激活哺乳动物细胞 [4,16]；与金黄色葡萄球菌不同，铜绿假单胞菌还代表了一类合成 3- 氧代 -AHL 家族的原型成员 N-(3- 氧代 - 十二烷酰基）高丝氨酸内酯化合物 (C12) 的细菌。此外，使用革兰氏阴性菌鼠伤寒沙门氏菌作为对照微生物，其含有与铜绿假单胞菌中的那些类似的 TLR4 配体，但是不合成化合物 (C12)[17]。为了开始我们的研究，我们将来源于骨髓的巨噬细胞 (BMDM) 暴露于这些细菌，并且针对 UPR 的生化标志和作为 TLR 通路的共同标志的丝裂原活化蛋白激酶 p38 的磷酸化分析巨噬细胞应答性。观察到响应于铜绿假单胞菌的快速且强烈的产生 XBP1 mRNA 的剪接形式 (sXBP1)，而两种其他细菌诱导非常微弱的（如果有的话）水平的 sXBP1（图 1A)。此外，虽然三种细菌都诱导类似水平的 p38 磷酸化 (p-p38)，但是仅在响应于铜绿假单胞菌的情况下观察到另外的 UPR 迹象，如磷酸化形式的 eIF2α 和 PERK[双链 RNA 依赖性蛋白激酶 (PRK) 样 ER 激酶]（图 1B)。值得注意地，我们发现缺少 lasI（负责化合物 (C12) 合成的基因）的铜绿假单胞菌丧失激活 sXBP1 和 eIF2α 磷酸化的能力（图 1C)，这提供了以下证据，即观察到的 UPR 标志的诱导与野生型铜绿假单胞菌中存在 C12 有关。实际上，直接添加 C12 导致 sXBP1 的依赖于时间和剂量的

诱导（图 1D 和 1E）。这样的 UPR 激活对化合物 (C12) 的天然 (S) 形式具有选择性，而化合物 (C12) 的非天然 (R)- 立体异构体 (C12R) 或水解形式 (C12h) 是无效的（图 1D 和 1G）。

[0235] 重要地，对内酯环基序的结构完整性的类似要求在对 AHL 家族的其他天然立体异构体的响应中也是明显的（表 1）。AHL 对 UPR 激活的这些作用不限于巨噬细胞，而在包括小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF)、正常人支气管上皮细胞和人 TPH1 细胞系在内的其他细胞类型中也观察到（表 2）。更重要地，将 C12 施用到小鼠肺中导致产生 sXBP1（图 1F），这与我们在培养的细胞中的实验一致。因此，AHL 代表了具有在多种哺乳动物细胞中诱导 UPR 的能力的分泌的细菌分子的第一个实例。

[0236] 通过 C12 调节鞘酯代谢导致 UPR 的激活 .

[0237] 未折叠蛋白反应依赖于 ER 的蛋白质和脂质组分两者 [11]。为了阐明 C12 是否靶向 ER 的蛋白质组分，我们考察了通用蛋白合成抑制剂 CHX 对响应于 C12、衣霉素 (Tm，一种影响新合成蛋白质的折叠的蛋白糖基化抑制剂）或毒胡萝卜内酯 (Tg，一种自 ER 库存被动释放钙的诱导物，导致独立于从头蛋白合成的 UPR 激活）的 sXBP1 诱导的作用。与 Tg 相比并且尤其是与 Tm 相比，C12 诱导的 sXBP1 的产生对 CHX 具有完全的抗性（图 2A），表明 ER 应激的蛋白组分对于 C12 诱导的 UPR 激活不是必要的。

[0238] 已经提出，脂质的生物合成和 UPR 的调节是相关联的，尽管还未确定参与 UPR 调节的具体的脂质组分 [10,11,18]。因为在 ER 中发生核心鞘酯 N- 酰基 - 鞘氨醇或神经酰胺 (Cer) 的从头合成 [10]，所以我们尝试测试鞘酯代谢的药理学抑制剂是否改变通过 C12 的 UPR 激活。这些实验的结果确定 D-MAPP（一种 Cer 裂解抑制剂）作为显著破坏 C12 诱导的 eIF2α 的磷酸化的试剂（图 2B）。该抑制作用对 C12 介导的 UPR 激活具有特异性，因为 Tm 介导的和 Tg 介导的 sXBP1 的诱导在存在 D-MAPP 的情况下都没有改变（图 2C）；此外，LPS 诱导的 p38 磷酸化的激活和 IκBα 表达的特征也未被 D-MAPP 改变（图 2D）。因此，这些发现表明 UPR 的 IRE1 和 PERK 臂 (arm) 两者感应并响应于由 C12 诱导的鞘酯代谢的改变。

[0239] 所有鞘酯的骨架组分鞘氨醇 (Sph) 是 Cer 裂解的产物。利用脂肪酸将 Sph 氨基酰基化回收 Cer，而 Sph 的磷酸化导致产生 1- 磷酸鞘氨醇 (S1P)，其水解代表了代谢通路的最后步骤 [10,19]。Sph 还可以被 N- 甲基化成 N,N- 二甲基鞘氨醇 (DMS)，其充当鞘氨醇激酶活性的天然存在的抑制剂；并且将其添加至细胞导致 S1P 的减少并伴有 Sph 水平的小量增加 [20,21]。对此，我们的数据显示 Sph 代谢的调节与 UPR 激活有关，因为预期的由 DMS 处理所致的细胞内 Sph 水平的提高导致 sXBP1 和 eIF2α 磷酸化的诱导，而胞外添加 Sph 对这些 UPR 的生化标志没有作用（图 2E）。因此，为了确定 C12 是否调节细胞内 Sph 的代谢转化，在不存在或存在 C12 的情况下用 ^{3}H-Sph 对 BMDM 进行放射性标记，并且通过薄层色谱法 (TLC) 评估鞘脂级分内放射性的分布。我们发现大量的 ^{3}H- 放射性快速地 (5min 内）结合到 Cer 级分中，并且两小时后，其分布在神经酰胺和鞘磷脂 (SM) 级分之间。添加 C12 显著改变鞘酯代谢的早期以及晚期步骤；2h 后，没有观察到预期的到鞘磷脂中的结合，而是放射性保持在鞘氨醇级分中（图 2F）。此外，用 C12 处理 5 分钟也导致 ^{3}H- 放射性结合到另一个级分（可能是 S1P），其随时间减少。虽然需要进一步详细地研究参与这些过程的机制，但是这些发现提供了第一件证据，即 C12 具有调节鞘酯代谢的能力，可能是通过 Sph 周转和产生中涉及的步骤，并且 C12 的这种作用与 UPR 激活有关。因此，我们假设 C12 通过调节鞘脂的代谢来诱导细胞激活。

[0240] C12 具有充当癌症终止剂和癌症预防剂的能力 .

[0241] 神经酰胺 (Cer)、鞘氨醇 (Sph) 和 Sph-1- 磷酸 (S1P) 代表了在调节受损细胞的细胞凋亡性去除以防止自体免疫和癌症发展的防御机制中具有重要作用的常见信号传导脂质[9,10,19,22]。

[0242] 在真核生物中，鞘酯在内质网 (ER) 中经由生物合成通路从头合成，其中 N- 酰基 - 鞘氨醇或 Cer 是核心代谢物，其可以被进一步修饰以产生鞘磷脂或更复杂的鞘糖酯。与 Cer 不同，D- 赤鲜 - 鞘氨醇 (Sph) 仅在 Cer 裂解的结果中形成，而用脂肪酸将 Sph 胺基酰基化回收 Cer。此外，虽然 Cer 和 Sph 各自的磷酸化产物 C1P 和 S1P 可以通过脱磷酸作用被回收，但是 S1P 可能被不可逆地裂解。在产生后，这些分子变成“具有生物活性的”脂质，其以与线性信号传导通路的典型范例不同的方式调节多种细胞功能[10]。鞘酯信号传导的独特复杂性不仅在于其代谢互变，而且还是个体生物活性脂质对特定通路的相反效果。例如，Sph 充当细胞生长的负向调节剂并且促进刺激物诱导的细胞凋亡通路[21 24]，而其磷酸化的对应物 S1P 诱导细胞增殖并且保护以免于细胞凋亡[22,24,25]。实际上，多种环境和内源性因子 / 状况改变鞘酯代谢[10]。因为这些状况中的若干也与代谢疾病和癌症的发展和进展相关，合乎逻辑地认为如果给定的试剂维持健康细胞完整同时诱导癌细胞自毁，则鞘脂介导的细胞凋亡信号传导的增强可以阻止疾病自任何阶段进展。

[0243] 在这点上，C12 影响 Sph 代谢的能力 (见以上图 2) 表明，C12 通过选择性激活转化的细胞或炎症破坏的细胞，如产生肿瘤坏死因子 (TNF)(一种炎性细胞因子) 的巨噬细胞中的细胞凋亡而充当潜在的癌症终止剂和癌症预防剂。与该假设一致，我们之前发表的数据揭示了 C12 处理骨髓细胞导致细胞凋亡的快速诱导，而非骨髓细胞显示明显延迟的动力学和细胞凋亡标志表达的减少 (见 Kravchenko 等，2006 ；参考文献 #12 中的图 3)。

[0244] 为了进一步验证该假设，我们比较了乳腺癌细胞系 MCF7 对由 TNF、C12 或它们的组合诱导的细胞凋亡的敏感性。在这些实验中，我们使用 MCF7 的对照变体 (载体) 以及稳定表达细胞凋亡的负向调节物如 Bcl-2 和 CLARP 的 MCF7 细胞 ；Bcl-2 是一种内部细胞凋亡通路的抑制剂，而 CLARP 抑制依赖于受体的细胞凋亡信号传导，也被称为外部细胞凋亡通路。将细胞与 TNF、C12 或它们的组合温育，并且通过蛋白质印迹分析蛋白提取物的 PARP 裂解 (一种指示细胞凋亡的生化标志)[26]。如预期的，对照和 MCF7/Bcl-2 细胞与 TNF 的延长的温育诱导 PARP 裂解，而 MCF7/CLARP 细胞对 TNF 介导的细胞凋亡具有抗性 (图 3A)。相反，三种细胞系都显示对 C12 的敏感性 ；并且，C12 和 TNF 之间的协同作用在用两种刺激物的组合处理的三种细胞系中都是明显的 (图 3B)。

[0245] 通过使用正常人支气管上皮细胞和作为转化的细胞的实例的 HeLa 细胞系进行类似的实验。我们观察到 HeLa 和正常细胞对 TNF 的促细胞凋亡作用都具有抗性 (图 3C 和 3D)。正常细胞还显示对 C12 及其与 TNF 的组合的抗性 (图 3D)，虽然单独的 C12 在 HeLa 细胞中诱导 PARP 裂解。值得注意地，在 HeLa 细胞中在 TNF 和 C12 之间观察到强的协同作用 (见图 3C)。因此，这些数据进一步支持我们的假设，即 C12 诱导癌细胞的细胞凋亡，而正常细胞相对地对 C12 或其与 TNF 的组合具有抗性。此外，两种刺激物 -C12 和 TNF- 协同作用于癌性细胞，而正常细胞保持完整。

[0246] TRAIL 和 C12 或类似物的组合协同地杀死癌性细胞 .

[0247] 在有前景的癌症疗法的候选中的是肿瘤坏死因子 (TNF) 相关的细胞凋亡诱导配

体 (TRAIL)。类似于 TNF 家族的其他成员，TRAIL 通过受体介导的机制（也被称为外部细胞凋亡通路）启动细胞凋亡。对比于其他天然存在的促细胞凋亡配体如 TNF 和 Fas 配体 (FasL)，将 TRAIL 注入小鼠中不会引起致死反应或对组织和器官的可检测的毒性[27 29]。此外，TRAIL 用于杀死癌细胞的潜在的有效性已经得到动物模型中的研究的支持，所述研究证明该细胞因子对人肿瘤异种移植物具有选择性毒性，但是对正常组织却没有[28,29]。然而，对 TRAIL 诱导的细胞凋亡的敏感性是限制 TRAIL 治疗的效力的关键因素，因为敏感性谱在不同的恶性细胞中变化[27,28,30]。此外，类似于正常细胞，一些癌细胞也对 TRAIL 诱导的细胞凋亡具有抗性，尽管细胞对 TRAIL 介导的作用的敏感性和抗性的基础未被全面了解。

[0248] 增加的对细胞凋亡的分子细节的了解表明肿瘤细胞可以通过干扰外部或内部细胞凋亡信号传导通路来获得对细胞凋亡的抗性，这通常伴有细胞生长控制的缺陷或 / 和存活通路如 NF-κB 和 Akt 信号传导级联的抗细胞凋亡活性的增加。实际上，如果通过能够克服这样的抗细胞凋亡活性的机制被触发，则大部分癌细胞保持进行细胞凋亡的能力。例如，抑制 NF-κB 活性显著增加由细胞凋亡刺激物诱导的细胞凋亡[31 34]。此外，在激活若干细胞内非细胞凋亡信号传导过程后也发生细胞凋亡增强，所述过程包括 JNK 通路或内质网 (ER) 应激，其在真核细胞中被称为未折叠蛋白反应 (UPR)[11]。引人注目地，近来的观察结果揭示 UPR 激活剂如衣霉素 (Tm)、毒胡萝卜内酯 (Tg) 和 RRR-α-生育酚醚连乙酸类似物（α-TEA）使癌细胞对 TRAIL 诱导的细胞凋亡敏感[35 37]。然而，这些试剂诱导组成性的和持续的 UPR 激活，这通常导致依赖于线粒体的内部细胞凋亡通路的诱导[38 40]，甚至是在不存在促细胞凋亡刺激物如 TRAIL 的情况下[37,40]。

[0249] 现代对宿主和微生物群之间的亲密联合的理解[41]，表明微生物已经进化出巧妙的和选择性的策略以与宿主生物学协调[1,42]。正常地很多细菌产物诱导炎性过程，其是通常与癌症和自体免疫病的发展相关的风险因素[17,43]。然而，对于其他细菌分子则不是这样。例如，我们近来的发现揭示 C12 具有强的抗炎活性[17]。此外，对 C12 还诱导 UPR 的认识促使我们去探索其作为抗癌疗法的补充的潜力。

[0250] 为了验证该假设，我们在体外考察了 C12 对 TRAIL 针对来源于人肺癌样品的 A549 细胞系的活性的作用。与报道的关于 A549 细胞的观察一致[28](Ashkenazi A 等，1999)，体外添加 TRAIL(50ng/ml) 到培养的 A549 细胞中并不明显影响其生存力和生长。然而，当将 TRAIL(50ng/ml) 和 C12(1μM) 的组合添加至培养基时，A549 细胞的生存力显著下降（图 4)，尽管在存在 C12(1μM 或 25μM)，其非天然的立体异构体 C12R(25μM) 或 TRAIL(50ng/ml) 和 C12R(25μM) 的组合的情况下，细胞生长和生存力实际上不改变（图 4A)。滴定实验揭示在含有 100nM C12 和 50ng/ml TRAIL 的培养基中温育 24 小时后，超过 50％的细胞丧失其生存力（图 4B)。这些数据支持我们的假设，即对 TRAIL 介导的细胞凋亡的抗性可以在 C12 的存在下被克服。

[0251] 为了确定 C12 是否增加 TRAIL 针对癌性细胞的促细胞凋亡作用，我们通过针对与细胞凋亡和细胞生长的调节以及细胞应激应答相关的若干生化参数的蛋白质印迹分析比较了 A549 细胞对 TRAIL、C12 或 TRAIL+C12 的反应。即，聚 (ADP- 核糖）聚合酶 (PARP) 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 -3 的裂解被用作指示由外部和内部细胞凋亡通路两者诱导的过程的两种共同的标志[26,44]；我们还考察了作为指示内部细胞凋亡通路的标志的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 -9 的裂解[45]；通过分析 JNK 的磷酸化来测试蛋白激酶 JNK 通路的激活（一种

与细胞生长控制相关的哺乳动物应激反应的标志[46 48])。为了监测 C12 的活性，我们分析了 eIF2α 的磷酸化 (ER 应激的独特特征[11,49]) 和蛋白激酶 p38 的磷酸化（一种哺乳动物应激反应的另外标志[50])。这些实验的结果揭示利用 C12 的刺激导致快速且强烈的应激反应的激活，其中全部三种标志的动力学都类似，尽管在测试的任何时间点都没有诱导细胞凋亡信号传导（图 5)。相反，对于 eIF2α 磷酸化的激活和应激反应的其他标志，TRAIL 处理当然是平静的，而我们在 6 小时时间点几乎没有观察到可检测的 p38 和 JNK 磷酸化；并且，我们观察到预期的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 -3 的激活，其导致随后的 PARP 裂解（见图 5)。值得注意地，在后面的时间点，细胞凋亡和应激反应标志的显著变化在用 TRAIL 和 C12 的组合处理的细胞中是明显的（图 5；比较 2 小时和 6 小时时间点）。

[0252] 对一组其他癌性细胞和正常细胞进行的类似研究证实了这些观察结果并且显示 C12 显著地使不同的癌细胞对 TRAIL 介导的细胞凋亡敏感，而正常细胞是完全具有抗性的（图6、图 7 和表 2)，这与我们之前在使用 TNF 而不是 TRAIL 的情况下的观察结果相一致（见以上图 3)。因此，C12- 和 TRAIL- 或 TNF 介导的信号传导之间的相互协同作用导致针对癌细胞的显著促细胞凋亡作用，这表明应用 C12 可能揭开新的抗癌治疗策略。

[0253] 硼替佐米 (bortezomid)（也被称为万珂 (velcade)) 是一种抗癌药物，其强效地使癌细胞对 TRAIL 诱导的细胞凋亡敏感[51 53]。因此，为了评估 C12 用于抗癌治疗的潜在效用，我们比较了这两种化合物 -(C12) 和硼替佐米 (bartezomid)(Bor)- 对癌症 A549 细胞和原代人肝细胞中 TRAIL 介导的细胞凋亡的作用。在存在 Bor 或 (C12) 的情况下观察到 A549 细胞对 TRAIL 的敏感性的类似增加（图 8A，上图）；并且，响应于 TRAIL 与 Bor 或 (C12) 的组合，类似水平的 PARP 裂解（一种细胞凋亡标志）被诱导（图 7，下图)。在 TRAIL 存在下正常人肝细胞的生存力未改变（图 8B，上图）；并且，TRAIL 处理的肝细胞没有显示细胞凋亡的迹象（图 8B，下图)。对 Bor 处理的样品的类似考察揭示虽然单独的该药物显示较低水平的对肝细胞的毒性，但是在 TRAIL 存在下 Bor 介导的毒性以及 Bor 诱导的细胞凋亡显著增强（见图 8B)。相反，在 (C12) 或其与 TRAIL 的组合存在下，肝细胞实际上是健康且完整的（见图 8B)。因此，(C12) 具有有效的抗癌活性同时对非癌性细胞不具有明显的毒性。

[0254] 因为 (C12) 是 3- 氧代 -AHL 家族的原型成员，所以有理由进行结构 - 活性 - 关系 (SAR) 研究以确定癌症终止和癌症预防活性以及 UPR 激活所需的 AHL 的一般结构特征。为了解决该问题，合成了一组 AHL 及其类似物（见 AHL 和类似物的列表），并且考察所有化合物对一组癌性细胞和正常细胞的生物活性。所选类似物的生化数据的原型实例显示在图 9 和图 10 中，而表 2 概述了对所有化合物的 SAR 研究。这些全面的 SAR 研究鉴定了 (C12) 的数种类似物 (13、15 和 16，见下表 1)，其具有与 (C12) 类似的对哺乳动物细胞的作用。此外，类似于 (C12)，全部三种类似物都强效地使多种癌细胞对 TRAIL 介导的细胞凋亡敏感，这表明其应用可以产生新抗癌治疗策略。

[0255] 引用的文献：

[0256] 1.Backhed, F. ;Ley, R.E. ;Sonnenburg, J.L. ;Peterson, D.A. ;Gordon, J.I., Host-bacterial mutualism in the human intestine(人肠中的宿主 - 细菌互利共生).Science2005,307(5717),1915-20.

[0257] 2.Cani, P.D. ;Delzenne, N.M., Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis(肠微生物群作为能量和代谢稳态的靶标).Curr Opin Clin Nutr

Metab Care2007,10(6),729-34.

[0258] 3.Cebra,J.J.,Influences of microbiota on intestinal immune system development(微生物群对肠免疫系统发育的影响).Am J Clin Nutr 1999,69(5),1046S-1051S.

[0259] 4.Janeway,C.A.,Jr.;Medzhitov,R.,Innate immune recognition(先天免疫识别).Annu Rev Immunol 2002,20,197-216.

[0260] 5.Hotamisligil,G.S.,Inflammation and metabolic disorders(炎症和代谢病).Nature2006,444(7121),860-7.

[0261] 6.Maslowski,K.M.;Mackay,C.R.,Diet,gut microbiota and immune responses(饮食,肠微生物群和免疫应答).Nat Immunol 12(1),5-9.

[0262] 7.Wolowczuk,I.;Verwaerde,C.;Viltart,O.;Delanoye,A.;Delacre,M.;Pot,B.;Grangette,C.,Feeding our immune system:impact on metabolism(饲喂我们的免疫系统:对代谢的影响).Clin Dev Immunol 2008,2008,639803.

[0263] 8.Ley,R.E.;Turnbaugh,P.J.;Klein,S.;Gordon,J.I.,Microbial eeology:human gut microbes associated with obesity(微生物生态学:与肥胖相关的人肠微生物).Nature 2006,444(7122),1022-3.

[0264] 9.Hotamisligil,G.S.;Erbay,E.,Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases(营养物感测和代谢病中的炎症).Nat Rev Immunol 2008,8(12),923-34.

[0265] 10.Hannun,Y.A.;Obeid,L.M.,Principles of bioactive lipid signalling:lessons from sphingolipids(生物活性脂质信号传导的原理:来自鞘脂的课程).Nat Rev Mol Cell Biol2008,9(2),139-50.

[0266] 11.Ron,D.;Walter,P.,Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response(内质网未折叠蛋白反应中的信号集成).Nat Rev Mol Cell Biol 2007,8(7),519-29.

[0267] 12.Kravchenko,V.V.;Kaufmann,G.F.;Mathison,J.C.;Scott,D.A.;Katz,A.Z.;Wood,M.R.;Brogan,A.P.;Lehmann,M.;Mee,J.M.;Iwata,K.;Pan,Q.;Fearns,C.;Knaus,U.G.;Meijler,M.M.;Janda,K.D.;Ulevitch,R.J.,N-(3-oxo-acyl)homoserine lactones signal cell activation through a mechanism distinct from the canonical pathogen-associated molecular pattern recognition receptor pathways(N-(3-氧代-酰基)高丝氨酸内酯通过与典范病原体相关的分子模式识别受体通路不同的机制对细胞活化进行信号传导).J Biol Chem 2006,281(39),28822-30.

[0268] 13.Edrington,T.S.;Farrow,R.L.;Sperandio,V.;Hughes,D.T.;Lawrence,T.E.;Callaway,T.R.;Anderson,R.C.;Nisbet,D.J.,Acyl-homoserine-lactone autoinducer in the gastrointestinal[corrected]tract of feedlot cattle and correlation to season,E.coli O157:H7prevalence,and diet(饲育场牛的胃肠[修正的]道中的酰基-高丝氨酸-内酯自诱导物以及与季节,大肠杆菌O157:H7优势和饮食的关系).Curr Microbiol 2009,58(3),227-32.

[0269] 14.Kumari,A.;Pasini,P.;Daunert,S.,Detection of bacterial quorum

sensing N-acyl homoserine lactones in clinical samples(细菌定额检测感测临床样品中的N-酰基高丝氨酸内酯).Anal Bioanal Chem 2008,391(5),1619-27.

[0270] 15.Hughes,D.T. ;Terekhova,D.A. ;Liou,L. ;Hovde,C.J. ;Sahl,J.W. ;Patankar,A.V. ;Gonzalez, J.E. ;Edrington, T.S. ;Rasko, D.A. ;Sperandio, V., Chemical sensing in mammalian host-bacterial commensal associations(哺乳动物宿主-细菌共生联合中的化学品感测).Proc Natl Acad Sci U S A 107(21),9831-6.

[0271] 16.Irazoqui, J.E. ;Troemel, E.R. ;Feinbaum, R.L. ;Luhachack, L.G. ;Cezairliyan,B.O. ;Ausubel,F.M.,Distinct pathogenesis and host responses during infection of C.elegans by P.aeruginosa and S.aureus(铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌感染线虫期间不同的发病和宿主反应).PLoS Pathog 6,e1000982.

[0272] 17.Kravchenko,V.V. ;Kaufmann,G.F. ;Mathison,J.C. ;Scott,D.A. ;Katz,A.Z. ;Grauer,D.C. ;Lehmann,M. ;Meijler,M.M. ;Janda,K.D. ;Ulevitch,R.J., Modulation of gene expression via disruption of NF-kappaB signaling by a bacterial small molecule(经由通过细菌小分子破坏NF-κB信号传导来调节基因表达).Science 2008,321(5886),259-63.

[0273] 18.Cox, J.S. ;Chapman, R.E. ;Walter, P., The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane(未折叠蛋白反应调节内质网蛋白和内质网膜的生产).Mol Biol Cell 1997,8(9),1805-14.

[0274] 19.Merrill, A.H., Jr., De novo sphingolipid biosynthesis:a necessary, but dangerous,pathway(从头鞘脂生物合成:必要但不危险的通路).J Biol Chem 2002,277(29),25843-6.

[0275] 20.Yatomi, Y. ;Ruan, F. ;Megidish, T. ;Toyokuni, T. ;Hakomori, S. ;Igarashi, Y., N, N-dimethylsphingosine inhibition of sphingosine kinase and sphingosine 1-phosphate activity in human platelets(人血小板中的鞘氨醇激酶和鞘氨醇1-磷酸活性的N,N-二甲基鞘氨醇抑制).Biochemistry 1996,35(2),626-33.

[0276] 21.Suzuki,E. ;Handa,K. ;Toledo,M.S. ;Hakomori,S., Sphingosine-dependent apoptosis:a unified concept based on multiple mechanisms operating in concert(依赖于鞘氨醇的细胞凋亡:基于协同作用的多种机制的统一构思).Proc Natl Acad Sci U S A 2004,101(41),14788-93.

[0277] 22.Cuvillier,O.,Sphingosine in apoptosis signaling(细胞凋亡信号传导中的鞘氨醇).Biochim Biophys Acta 2002,1585(2-3),153-62.

[0278] 23.Ohta,H. ;Yatomi,Y. ;Sweeney,E.A. ;Hakomori,S. ;Igarashi,Y.,A possible role of sphingosine in induction of apoptosis by tumor necrosis factor-alpha in human neutrophils(鞘氨醇在人嗜中性粒细胞中通过肿瘤坏死因子α的诱导细胞凋亡中的可能作用).FEBS Lett 1994,355(3),267-70.

[0279] 24.Spiegel, S. ;Milstien, S., Sphingosine-1-phosphate:signaling inside and out(鞘氨醇-1-磷酸:内部和外部信号传导).FEBS Lett 2000,476(1-2),55-7.

[0280] 25.Spiegel,S.,Sphingosine 1-phosphate:a ligand for the EDG-1 family of

G-protein-coupled receptors(1-磷酸鞘氨醇:EDG-1家族的G蛋白偶联受体的配体).Ann NYA cad Sci 2000,905,54-60.

[0281] 26.Nicholson,D.W.;Ali,A.;Thornberry,N.A.;Vaillancourt,J.P.;Ding,C.K.;Gallant,M.;Gareau,Y.;Griffin,P.R.;Labelle,M.;Lazebnik,Y.A. 等,Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis(哺乳动物细胞凋亡所需的ICE/CED-3蛋白酶的鉴定和抑制).Nature 1995,376(6535),37-43.

[0282] 27.Ashkenazi,A.,Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists(利用促细胞凋亡受体激动剂将癌细胞引向自我毁灭).Nat Rev Drug Discov2008,7(12),1001-12.

[0283] 28.Ashkenazi,A.;Pai,R.C.;Fong,S.;Leung,S.;Lawrence,D.A.;Marsters,S.A.;Blackie,C.;Chang,L.;McMurtrey,A.E.;Hebert,A.;DeForge,L.;Koumenis,I.L.;Lewis,D.;Harris,L.;Bussiere,J.;Koeppen,H.;Shahrokh,Z.;Schwall,R.H.,Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand(重组的可溶性Apo2配体的安全性和抗肿瘤活性).J Clin Invest 1999,104(2),155-62.

[0284] 29.Walczak,H.;Miller,R.E.;Ariail,K.;Gliniak,B.;Griffith,T.S.;Kubin,M.;Chin,W.;Jones,J.;Woodward,A.;Le,T.;Smith,C.;Smolak,P.;Goodwin,R.G.;Rauch,C.T.;Schuh,J.C.;Lynch,D.H.,Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo(肿瘤坏死因子相关的细胞凋亡诱导配体在体内的杀肿瘤活性).Nat Med 1999,5(2),157-63.

[0285] 30.Lippa,M.S.;Strockbine,L.D.;Le,T.T.;Branstetter,D.G.;Strathdee,C.A.;Holland,P.M.,Expression of anti-apoptotic factors modulates Apo2L/TRAIL resistance in colon carcinoma cells(抗细胞凋亡因子的表达调节结肠癌细胞中的Apo2L/TRAIL抗性).Apoptosis 2007,12(8),1465-78.

[0286] 31.Beg,A.A.;Baltimore,D.,An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death(NE-kappaB在防止TNF-α诱导的细胞死亡中的基本作用).Science 1996,274(5288),782-4.

[0287] 32.Wang,C.Y.;Mayo,M.W.;Baldwin,A.S.,Jr.,TNF-and cancer therapy-induced apoptosis:potentiation by inhibition of NF-kappaB(TNF-和癌症治疗诱导的细胞凋亡:通过抑制NF-κB的强化).Science 1996,274(5288),784-7.

[0288] 33.Van Antwerp,D.J.;Martin,S.J.;Kafri,T.;Green,D.R.;Verma,I.M.,Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB(通过NF-κB抑制TNF-α诱导的细胞凋亡).Science 1996,274(5288),787-9.

[0289] 34.Liu,Z.G.;Hsu,H.;Goeddel,D.V.;Karin,M.,Dissection of TNF receptor 1effector functions:JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death(TNF受体1效应子功能解析:JNK激活与细胞凋亡无关而NF-κB激活阻止细胞死亡).Cell 1996,87(3),565-76.

[0290] 35.Jiang,C.C.;Chen,L.H.;Gillespie,S.;Kiejda,K.A.;Mhaidat,N.;Wang,Y.F.;Thorne,R.;Zhang,X.D.;Hersey,P.,Tunicamycin sensitizes human melanoma

cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by up-regulation of TRAIL-R2 via the unfolded protein response(衣霉素通过经由未折叠蛋白反应上调 TRAIL-R2 使人黑素瘤细胞对肿瘤坏死因子相关的细胞凋亡诱导的配体诱导的细胞凋亡敏感).Cancer Res 2007,67(12),5880-8.

[0291] 36.Chen,L.H. ;Jiang,C.C. ;Kiejda,K.A. ;Wang,Y.F. ;Thorne,R.F. ;Zhang,X.D. ;Hersey,P.,Thapsigargin sensitizes human melanoma cells to TRAIL-induced apoptosis by up-regulation of TRAIL-R2 through the unfolded protein response(毒胡萝卜内酯通过经由未折叠蛋白反应上调 TRAIL-R2 使人黑素瘤细胞对 TRAIL 诱导的细胞凋亡敏感).Carcinogenesis 2007,28(11),2328-36.

[0292] 37.Tiwary,R. ;Yu,W. ;Li,J. ;Park,S.K. ;Sanders,B.G. ;Kline,K.,Role of endoplasmic reticulum stress in alpha-TEA mediated TRAIL/DR5 death receptor dependent apoptosis(内质网应激在 α-TEA 介导的 TRAIL/DR5 死亡受体依赖性细胞凋亡中的作用).PLoS One 5(7),e11865.

[0293] 38.Szegezdi,E. ;Logue,S.E. ;Gorman,A.M. ;Samali,A.,Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis(内质网应激诱导的细胞凋亡中的介体).EMBO Rep2006,7(9),880-5.

[0294] 39.Gupta,S. ;Cuffe,L. ;Szegezdi,E. ;Logue,S.E. ;Neary,C. ;Healy,S. ;Samali,A.,Mechanisms of ER Stress-Mediated Mitochondrial Membrane Permeabilization(ER 应激介导的线粒体膜透性化的机制).Int J Cell Biol 2010,170215.

[0295] 40.Szegezdi,E. ;Cahill,S. ;Meyer, M. ;O ′ Dwyer,M. ;Samali,A.,TRAIL sensitisation by arsenic trioxide is caspase-8 dependent and involves modulation of death receptor components and Akt(通过三氧化砷的 TRAIL 敏化是依赖于半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-8 的并且涉及死亡受体组分和 Akt 的调节).Br J Cancer 2006,94(3),398-406.

[0296] 41.Savage,D.C.,Microbial ecology of the gastrointestinal tract(胃肠道的微生物生态学).Annu Rev Microbiol 1977,31,107-33.

[0297] 42.Hsiao,W.W. ;Metz,C. ;Singh,D.P. ;Roth,J.,The microbes of the intestine:an introduction to their metabolic and signaling capabilities(肠微生物:其代谢和信号传导能力的导言).Endocrinol Metab Clin North Am 2008,37(4),857-71.

[0298] 43.Telford,G. ;Wheeler,D. ;Williams,P. ;Tomkins,P.T. ;Appleby,P. ;Sewell,H. ;Stewart,G.S. ;Bycroft,B.W. ;Pritchard,D.I.,The Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity(铜绿假单胞菌菌群感测信号分子 N-(3-氧代十二烷酰基)-L-高丝氨酸内酯具有免疫调节活性).Infect Immun 1998,66(1),36-42.

[0299] 44.Gyrd-Hansen,M. ;Meier,P.,IAPs:from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB,inflammation and cancer(IAP:从半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶抑制剂到 NF-κB 的调质,炎症和癌症).Nat Rev Cancer 10(8),561-74.

[0300] 45.Green, D.R. ;Reed, J.C., Mitochondria and apoptosis(线粒体和细胞凋亡).Science 1998,281(5381),1309-12.

[0301] 46.Brenner, D.A. ;O′ Hara, M. ;Angel, P. ;Chojkier, M. ;Karin, M., Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor-alpha(通过肿瘤坏死因子 α 的 jun 和胶原酶基因的延长激活).Nature 1989,337(6208),661-3.

[0302] 47.Schreiber, M. ;Kolbus, A. ;Piu, F. ;Szabowski, A. ;Mohle-Steinlein, U. ;Tian, J. ;Karin, M. ;Angel, P. ;Wagner, E.F., Control of cell cycle progression by c-Jun is p53dependent(通过 c-Jun 控制细胞周期进展依赖于 p53).Genes Dev 1999,13(5),607-19.

[0303] 48.Shaulian, E. ;Schreiber, M. ;Piu, F. ;Beeche, M. ;Wagner, E.F. ;Karin, M., The mammalian UV response:c-Jun induction is required for exit from p53-imposed growth arrest(哺乳动物UV反应:逃离p53所致的生长捕获需要c-Jun诱导).Cell 2000,103(6),897-907.

[0304] 49.Schroder, M. ;Kaufman, R.J., The mammalian unfolded protein response(哺乳动物未折叠蛋白反应).Annu Rev Biochem 2005,74,739-89.

[0305] 50.Ono, K. ;Han, J., The p38 signal transduction pathway:activation and function(p38 信号转导通路:激活和功能).Cell Signal 2000,12(1),1-13.

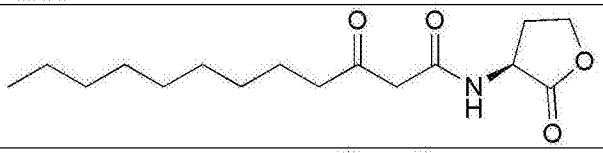
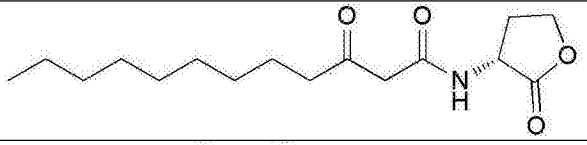
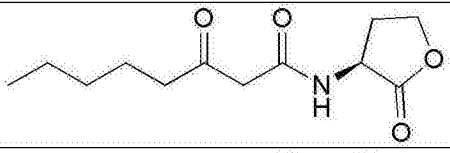
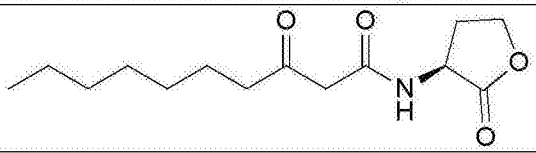
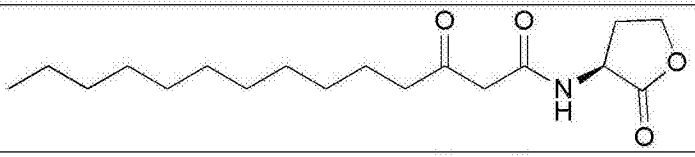
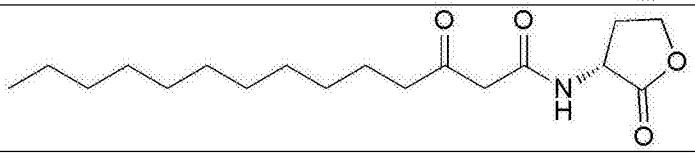
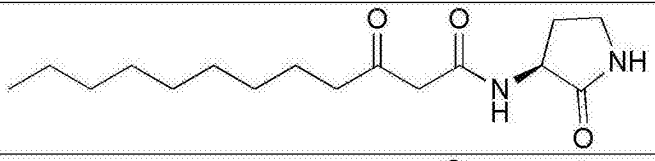
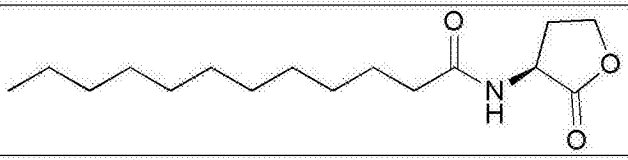
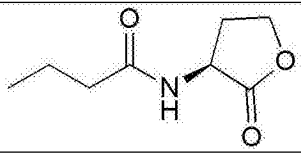
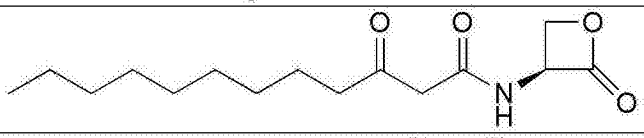
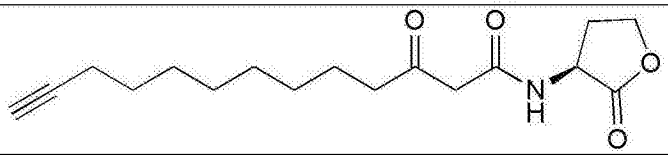
[0306] 51.Christian, P.A. ;Thorpe, J.A. ;Schwarze, S.R., Velcade sensitizes prostate cancer cells to TRAIL induced apoptosis and suppresses tumor growth in vivo(万珂使前列腺癌细胞对 TRAIL 诱导的细胞凋亡敏感并且在体内抑制肿瘤生长).Cancer Biol Ther 2009,8(1),73-80.

[0307] 52.Arpinati, M. ;Chirumbolo, G. ;Nicolini, B. ;Agostinelli, C. ;Rondelli, D., Selective apoptosis of monocytes and monocyte-derived DCs induced by bortezomib(Velcade)(通过硼替佐米(万珂)诱导的单核细胞和来源于单核细胞的 DC 的选择性细胞凋亡).Bone Marrow Transplant 2009,43(3),253-9.

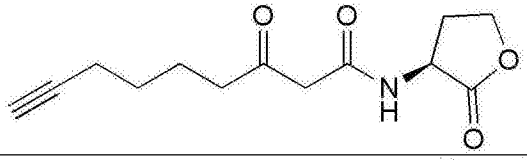
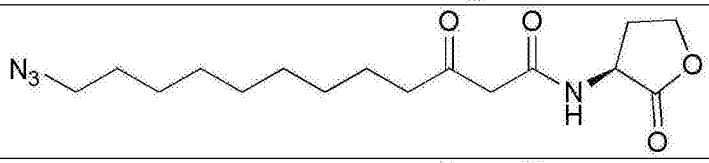
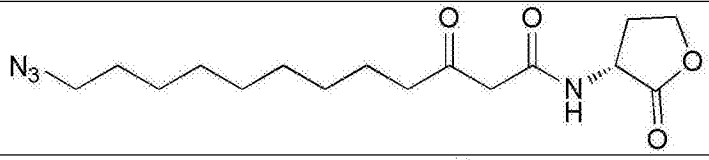
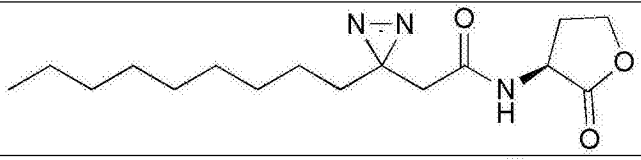
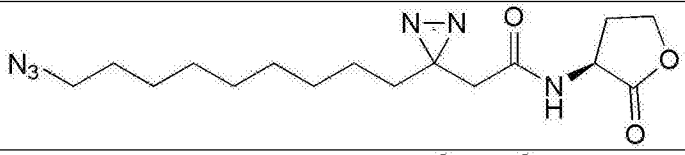
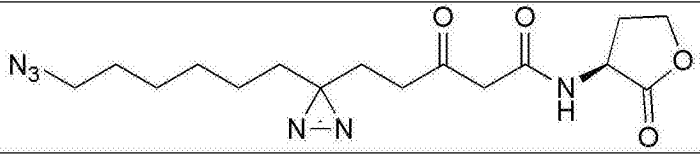
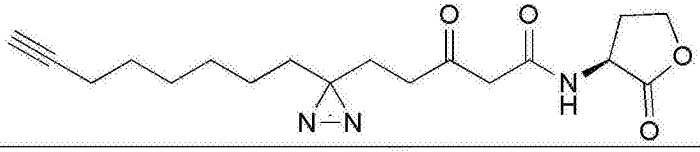
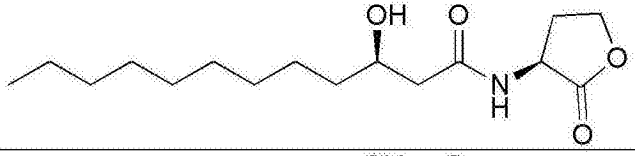
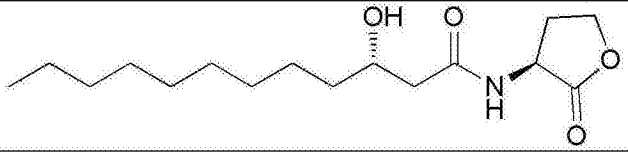
[0308] 53.Pandit,B. ;Gartel,A.L.,Proteasome inhibitors induce p53-independent apoptosis in human cancer cells(蛋白酶体抑制剂在人癌细胞中诱导不依赖于p53的细胞凋亡).Am dPathol 178(1),355-60.

[0309] 表 1:评价的化合物

[0310]

化合物#	结构	LogP(估算值)
1 **C12**		**2.685**
2 **C12R**		**2.685**
3		**0.569**
4		**1.627**
5		**3.743**
6		**3.743**
7		**2.569**
8		**3.718**
9		**-0.514**
10		**3.299**
11		**1.856**

[0311]

12		**-0.26**
13 **(12-N_3-12)**		**2.958**
14		**2.958**
15 **3-N_2**		**3.202**
16 **12-N_3-3-N_2**		**3.475**
17 **12-N_3-6-N_2-12**		**1.71**
18		**0.079**
19		**2.64**
20		**2.64**

[0312] 表 2 :合成用于哺乳动物细胞中的结构 - 活性关系研究的化合物 (N- 酰基高丝氨酸内酯的天然存在的或合成的衍生物) 的生物学活性。

[0313]

化合物	天然的(n)或合成的(s)	PARP裂解的效率(%)*	p38激活的效率(%)*	UPR激活的效率(%)*	对癌细胞的作用：与TRAIL或TNF的协同作用
1	**n**	**100**	**100**	**100**	++++
2	s	**<0.1**	**<0.1**	**<0.1**	-
3	**n**	**<0.1**	**<0.1**	**<0.1**	**n.d.**
4	**n**	**~0.5**	**~2.0**	**~5.0**	+
5	**n**	**>100**	**>100**	**>100**	++++
6	s	**<0.1**	**<0.1**	**<0.1**	-
7	s	**<0.1**	**<0.1**	**<0.1**	-
8	**n**	**<0.1**	**<0.1**	**<0.1**	-
9	**n**	**<0.1**	**<0.1**	**<0.1**	-
10	s	**~10.0**	**~2.0**	**~1.0**	**n.d.**
11	s	**~1.0**	**~2.0**	**~2.0**	**n.d.**
12	s	**<0.1**	**<0.1**	**<0.1**	-
13	s	**~100**	**~100**	**~100**	++++
14	s	**<0.1**	**<0.1**	**<0.1**	-
15	s	**~30.0**	**~40.0**	**~40.0**	+++
16	s	**~60.0**	**~50.0**	**~70.0**	++++
17	s	**~10.0**	**~5.0**	**~10.0**	+
18	s	**~5.0**	**~2.0**	**~2.0**	**n.d.**
19	s	**<0.1**	**<0.1**	**<0.1**	-
20	n	**~1.0**	**~2.0**	**~2.0**	+

[0314] *相对于N-(3-氧代-十二烷酰基)高丝氨酸内酯(化合物#1,在文中也被简写为(C12))的活性,将化合物的活性标准化。

[0315] 材料和方法

[0316] A.通用方法

[0317] 癌症和正常细胞培养。肺癌细胞系A549和结肠癌细胞系HT29购自ATCC。乳腺癌细胞系MDA-MB-468接收自J.C.Reed(The Burnham Institute,La Jolla,California)。细胞系被保持在培养基(GM):补充有10%FBS(HyClone,Logan,UT),L-谷氨酰胺,青霉素/链霉素和非必需氨基酸的DMEM培养基(4.5g/l葡萄糖)(Invitrogen,Carlsbad,CA)。正常人支气管上皮(NHBE)细胞和正常人乳腺上皮(NHME)细胞获自Cambrex(East Rutherford,NJ)并且按照生产者的建议培养。正常人结肠平滑肌细胞获得自ScienCell Research Lab(San Diego,CA)并按照生产者的建议培养。人肝细胞的原代培养物(新鲜涂板;未冷冻保存)和培养基获得自Celsis In Vitro Technologies(Baltimore,MD)。在收到细胞后,轻柔地自各孔中吸出培养基并且再用补充有Torpedo Antibiotic Mix的InVitroGRO HI培养基(Celsis)装满,并将平板保持在5% CO_2,在37℃,在饱和湿度的培养箱中。2-4h后,如正文和图例所述地刺激细胞。

[0318] 小鼠、来源于骨髓的巨噬细胞和其他细胞培养物。C57BL/6小鼠购买自Jackson Laboratory(Bar Harbor,ME)。来源于骨髓的巨噬细胞(BMDM)和鼠胚胎成纤维细胞(MEF)通过使用由TSRI Animal Care and Use Committee批准的标准程序制备。L929/NCTC克隆929(结缔组织,小鼠)细胞系购买自ATCC(Manassas,VA)。MEF和L929细胞系被保持在GM中(见以上)。BMDM在70%GM和30%L929条件培养基中培养。通常,在刺激前将细胞

（～ 60-70％汇合率）在新鲜培养基中温育 12-14h。

[0319] 细菌培养物。我们的研究中使用的铜绿假单胞菌细菌菌株由 Dr. Scott A. Beatson, University of Queensland, Brisbane, Australia 友好地提供并且包括野生型铜绿假单胞菌 PAO1（最初来源于 ATCC）和 PAO1 ΔlasI。用于对照研究的细菌菌株包括鲍氏不动杆菌 (Acinetobacter baumannii)、大肠杆菌 (Escherichia coli)、金黄色葡萄球菌和鼠伤寒沙门氏菌，其都来自 ATCC。

[0320] 试剂和标准测定。重组人 TRAIL 购买自 R&D System, Inc (Minneapolis, MN)，并且以 20ng/ml 的浓度或如图例中所示的浓度用于所有实验中的细胞刺激。将表达重组蛋白 mTRAIL 的变体 118-291 的大肠杆菌的细菌培养物用于制备重组鼠 TRAIL，其通过在 DE52 和羟基磷灰石上的标准离子交换色谱法分离。如之前所述那样制备 S. minnesota Re595 LPS[E1]。所有酰基高丝氨酸内酯，包括 N-(3-氧代十二烷酰基)-S-和-R-高丝氨酸内酯（分别为 C12 和 C12R），如之前所述的那样合成和纯化[E2]。纯度大于 99％并且通过 HPLC/质谱法分析确认。将所有合成的分子以所需浓度的 200x 溶解在 DMSO 中并将等分试样存储在 -20℃。此外，定量 QCL-1,000 发色法变形细胞溶解产物测定 (BioWhittaker, Walkersville, MD) 显示 C12 的制剂没有内毒素。样品中 TNF 的上清水平通过 ELISA (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) 测量。总 RNA 通过使用 TRizol 试剂 (Invitrogen) 分离。

[0321] 抗体和蛋白质印迹分析。抗 -eIF2α、磷酸 -eIF2α (p-eIF2α)、p38、p-p38 (Thr180/Tyr132)、p-RelA (Ser536)、p-IκBSer32/36)、PARP 抗体购买自 Cell Signaling；抗 -RelA、IκBα、IκBβ 来自 Santa Cruz Biotechnology。制备细胞提取物并且通过如之前所述的蛋白质印迹测定进行分析[E3]。

[0322] 数据呈现。图 11-13 中所示数据三个以上实验中的一个，其中每张图反映多个研究的典型发现。

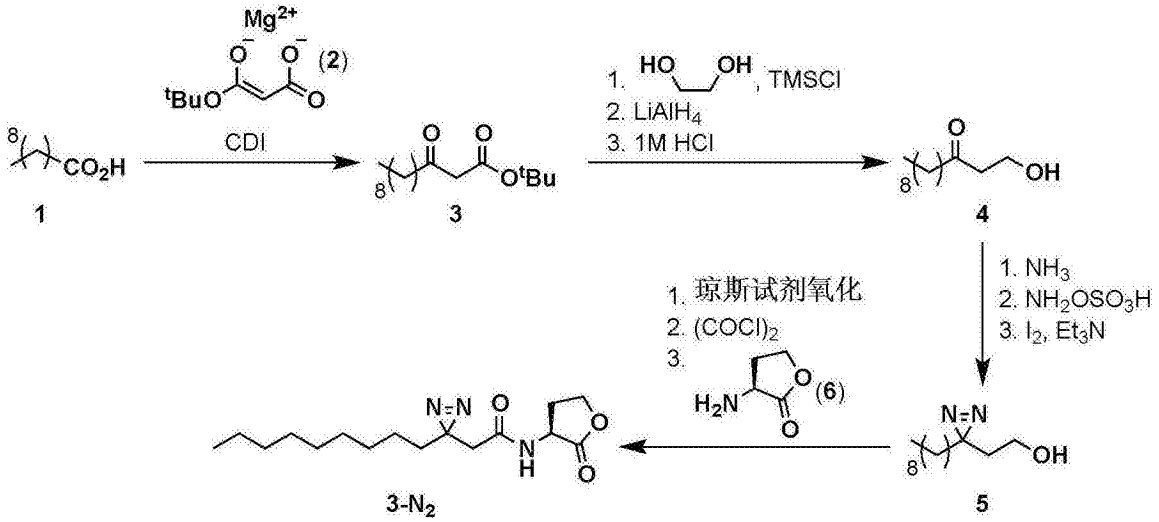
[0323] 通用化学方法：除非另外说明，在氮气氛下利用无水的新鲜蒸馏的溶剂在无水条件下进行反应。二氯甲烷 (CH_2Cl_2) 从氢化钙蒸馏。四氢呋喃 (THF) 从二苯甲酮钠蒸馏。除非另外说明，产率提及色谱和光谱上的均一物质。通过使用茴香醛、$KNnO_4$ 或 PMA 染色在 0.25-mm EMD 硅胶板 (60F-254) 上进行的薄层色谱法 (TLC) 监测反应。在 Silicycle 硅胶 (40-63 目）上进行急骤色谱法分离。在 Bruker 400MHz 分光计上记录 NMR 谱并且使用溶剂峰作为内标进行校准。使用以下缩写来指示多重性：s，单峰；d，双峰；t，三重峰；q，四重峰；m，多重峰；br，宽峰。

[0324] 化学材料：(S)-α-氨基-γ-丁内酯购买自 Aldrich 并且原样使用。

[0325] B. 合成过程和表征数据

[0326] 合成 C12 的 3-二氮杂环丙烯衍生物 (3-N_2).

[0327]



[0328] 3 的制备。在氮气氛下在 25℃将癸酸 1(700mg,4.06mmol) 加入至圆底烧瓶并溶解在 THF(5.0mL) 中。然后加入 CDI(725mg,4.47mmol) 并将所得的混合物在 25℃搅拌 4h。在氮气氛下在 25℃,在第二个圆底烧瓶中,将丙二酸叔丁酯 (716mg,4.47mmol) 溶解在 THF(4.0mL) 中。将烧瓶冷却至 0℃,然后逐滴加入异丙基氯化镁 (4.5mL,2.0M,在 THF 中,8.93mmol)。将所得的混合物在 0℃搅拌 30min,然后温热至 50℃达 30min。冷却至 0℃后,经由插管加入癸酸溶液并且在 0℃ -25℃搅拌过夜。然后将反应用 1M HCl(10mL) 猝灭并用 EtOAc(2×20mL) 萃取。将合并的有机相用盐水洗涤,用 Na_2SO_4 干燥并且在真空中浓缩。将所得的剩余物通过急骤柱色谱法 (98 ∶ 2 己烷,在 EtOAc 中) 纯化,从而获得 3(950mg,86% 产率)。3 的表征数据与之前报道的匹配 [E4]。^1H NMR(400MHz, $CDCl_3$,25℃) :δ = 3.31(s, 2H),2.48(t,2H, J = 7.2Hz),1.56-1.53(m,2H),1.44(s,9H),1.21-1.18(m,12H),0.85(t, 3H, J = 6.8Hz)。

[0329] 4 的制备。在 25℃将化合物 3(1.34g,5.0mmol) 加入至圆底烧瓶并溶解在乙二醇 (910mg,14.75mmol) 和二氯甲烷 (30mL) 中。然后在 25℃向搅拌溶液中逐滴加入 TMSCl(3.2g,3.7mL,29.5mmol)。将所得的混合物在 25℃搅拌 4 天,然后用水 (15mL) 猝灭并用二氯甲烷 (2×20mL) 萃取。将合并的有机相用 Na_2SO_4 干燥并在真空中浓缩。将该经保护的材料用作后续反应的原料。在氮气氛下在 0℃将粗的乙二醇保护的 3 加入至圆底烧瓶并溶解在 THF(40mL) 中。逐滴加入氢化铝锂 (1.0M,在己烷中,1.5 当量),并使反应混合物温热至 25℃。搅拌 4h 后,将反应用水猝灭并过滤。将滤液浓缩至～ 20mL,加入 1M HCl(20mL) 并将混合物在 25℃搅拌过夜。然后将反应混合物用 EtOAc(2×30mL) 萃取,并将合并的有机相用 Na_2SO_4 干燥并在真空中浓缩。将所得的剩余物通过急骤柱色谱法 (3 ∶ 1 己烷,在 EtOAc 中) 纯化,从而获得 4(1.0g,3 个步骤的产率为 80%)。4 的表征数据与之前报道的匹配 [E5]。^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$,25℃) :δ = 3.82(t,2H,J = 5.4Hz),2.64(t,2H,J = 5.2Hz), 2.39(t,2H, J = 5.2Hz),1.56-1.54(m,2H),1.26-1.23(m,12H),0.86(t,3H, J = 6.8Hz)。

[0330] 5 的制备。用于二氮杂环丙烯装联的方案遵循之前的报道 [3]。将化合物 4(489mg, 2.44mmol) 加入至配有冷凝器的圆底烧瓶并溶解在甲醇 (8mL) 中。加入液态氨 (30mL),并将搅拌的溶液加热至回流达 7h。将所得的混合物在干冰 - 丙酮浴中冷却,并在 5 分钟内加入 NH_2OSO_3H(332mg,2.93mmol) 在甲醇 (10mL) 中的溶液。除去冷却浴,并将混合物加热至回流达 1 小时。在过夜蒸发液态氨后,将反应混合物过滤,并将滤饼用甲醇洗涤。将滤液和洗

液在真空中浓缩，并将粗二氮杂环丙烯（diazirine）用作随后的氧化反应的原料。粗二氮杂环丙烷到二氮杂环丙烯5的氧化使用之前所述的碘-Et_3N法进行[E6]，在急骤柱色谱法后获得所述化合物（120mg，23％产率）。^1H NMR(400MHz，$CDCl_3$，25℃）：δ ＝3.44(t，2H，J＝6.4Hz)，1.64(t，2H，J＝6.4Hz)，1.37(t，2H，J＝6.4Hz)，1.26-1.17(m，14H)，0.87(t，3H，J＝6.8Hz)；^{13}C NMR(100MHz，$CDCl_3$，25℃）：δ ＝170.1，52.6，49.8，46.9，31.9，29.6，29.6，29.6，29.3，22.7，19.4，14.1；对于$C_{12}H_{24}N_2O[M+H]^+$计算的HRMS(ESI-TOF)m/z 212.1889，实际值212.1318。

[0331] 3-N_2的制备。使用标准琼斯试剂（Jones）氧化条件将二氮杂环丙烯5的伯醇氧化为相应的酸。^1H NMR(400MHz，$CDCl_3$，25℃）：δ ＝2.28(d，2H，J＝4.4Hz)，1.53-1.51(m，2H)，1.26-1.17(m，14H)，0.84(t，3H，J＝6.8Hz)；^{13}C NMR(100MHz，DMSO，25℃）：δ ＝177.3，168.9，52.4，46.3，31.9，29.6，29.6，29.6，29.3，22.7，19.1，14.1；对于$C_{12}H_{22}N_2O_2[M+H]^+$计算的HRMS(ESI-TOF)m/z 226.1681，实际值226.1653。使用草酰氯将所述酸转化为相应的酰基氯并偶联至(S)-α-氨基-γ-丁内酯，如之前所述[E7，E8]。^1H NMR(400MHz，$CDCl_3$，25 ℃）：δ ＝6.24(app s，1H)，4.57-4.47(m，2H)，4.32-4.29(m，1H)，2.88-2.85(m，1H)，2.27-2.2(m，3H)，1.53(t，2H，J＝6.8Hz)，1.26-1.15(m，14H)，0.87(t，3H，J＝6.8Hz)；^{13}C NMR(100MHz，DMSO，25 ℃）：δ ＝190.0，175.4，168.9，66.3，49.6，41.4，32.7，29.6，29.5，29.4，29.2，24.0，14.3，14.2(14实际值）；对于$C_{16}H_{27}N_3O_3[M+H]^+$计算的HRMS(ESI-TOF)m/z 309.2052，实际值309.2039。

[0332] C. 细菌实验

[0333] 将癌细胞暴露于细菌培养物.

[0334] 我们使用了这样的实验体系，其中由细菌释放的产物可以与真核靶标相互作用同时避免细菌与组织培养物中的细胞的直接接触。将包含细菌培养物的插入物紧邻未用TRAIL处理的或用TRAIL处理的（同时将TRAIL直接加入到GM培养基中）培养的肺癌细胞放置。我们使用定制的插入物，所述插入物制备自切割的具有溶剂焊接的聚偏二氟乙烯膜基底（PVDF Durapore亲水性0.1μm膜，Millipore VVLP09050）的聚苯乙烯管（14mm直径x25mm高）。为了制备这些插入物，将切割的聚苯乙烯管的一端浸入二氯甲烷中达5秒，并将软化的塑料压在PVDF膜的切割部分的表面上达0.5min。使软化的聚苯乙烯充分地流入PVDF中从而形成不透水的粘合而不破坏膜孔结构。在使溶剂完全蒸发数小时后，将插入物浸入1％次氯酸盐中达30分钟，之后用无菌盐水清洗6次（在层流净化罩中进行）。14mm直径插入物最适合24孔板，插入物的内部区域覆盖孔表面的～70％。

[0335] 我们使用原型0.1μm PVDF膜插入物用于研究，其中将组织培养物细胞暴露于来源于铜绿假单胞菌PAO1（野生型）、PAO1ΔlasI、金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌、鲍氏不动杆菌和大肠杆菌的可溶性产物。将细菌培养在BHI琼脂平板上，转移至接种培养物过夜，之后1/100稀释到在125ml三角摇杯（baffled shake flask）中的20ml BHI肉汤中以用于在37℃、250rpm温育4-6小时。将等量的后对数期培养物或对照BHI肉汤转移至PVDF插入物，所述PVDF插入物被放置在含有在0.5ml DMEM培养基中培养的目标细胞的24孔板中。

[0336] 确定细菌培养物中的C12浓度。将2-ml培养物用50μl HCl酸化并加入10ml乙酸乙酯，并将内含物剧烈混合。使各层分离，并取出5ml的乙酸乙酯层，用$MgSO_4$干燥，并在

真空中浓缩。将剩余物重悬在冷的甲醇中并浓缩以除去沉淀。通过 LC-MS(液相色谱-质谱)分析所得的甲醇溶液的 C12 含量。进行反相 LC-MS 分析 (Agilent Zorbax 柱,5μm,300SB-C8,4.6×50mm),利用 MeCN-H2O-0.1% 甲酸的梯度 (0 至 1min :5% MeCN,1min 至 9min :5% MeCN 至 98% MeCN 的梯度,并且 9 至 11min :98% MeCN),从而允许通过测量以下离子来量化 C12 :298($M+H^+$)、316($M+H_2O+H^+$)、320($M+Na^+$) 和 338($M+H_2O+Na^+$)。C12 在铜绿假单胞菌 PAO1(野生型)的样品中的浓度为约 4.3μM($P < 0.001$,$n = 5$ 次独立实验)。

[0337] D. 哺乳动物细胞激活

[0338] 细胞刺激。在所有实验中,如图例所示的,用 LPS(100ng/ml)、AHL(10-25μM ;通常 BMDM 和原代巨噬细胞用 25μM C12 刺激)或它们的组合来刺激 BMDM。如果没有指示,则用 40ng/ml TNFα、20ng/ml TRAIL 和 10μM(在癌细胞的情况下)或 25μM(在正常细胞的情况下)AHL 来刺激癌细胞和正常细胞。

[0339] E. 细胞生存力和细胞凋亡评估.

[0340] 通过使用基于 XTT 的毒理学测定试剂盒 (Sigma,St.Louis,MS) 根据生产者的说明来确定细胞毒性。对于一些实验,为了确认毒性的细胞凋亡性质,使用 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (Biovision, Mountain View, California) 的方案和说明来分析细胞。此外,通过比色测定 (R&D System) 来确定半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3、8 和 9 活性,并且将数据表示为与未处理或对照处理的细胞的值相比的倍数增加 ($n = 5$)。

[0341] E 引用的实验文献

[0342] (E1)Mathison, J.C. ;Virca, G.D. ;Wolfson, E. ;Tobias, P.S. ;Glaser, K. ; Ulevitch, R.J.J.Clin.Invest.1990,85,1108.

[0343] (E2)Kaufmann, G.F. ;Sartorio, R. ;Lee, S.H. ;Rogers, C.J. ;Meijler, M.M. ; Moss, J.A. ;Clapham, B. ;Brogan, A.P. ;Dickerson, T.J. ;Janda, K.D.Proc.Natl.Acad. Sci., U.S.A.2005,102,309.

[0344] (E3)Kravchenko, V.V. ;Ulevitch, R.J. ;Kaufmann, G.F. Methods Mol. Biol.2010,692,133.

[0345] (E4)Langer, P. ;Bellur, E.J.Org.Chem.2003,68,9742.

[0346] (E5)Kirihara, M. ;Kakuda, H. ;Ichinose, M. ;Ochiai, Y. ;Takizawa, S. ;Mokuya, A. ;Okubo, K. ;Hatano, A. ;Shiro, M.Tetrahedron 2005,61,4831.

[0347] (E6)Church, R.F.R. ;Weiss, M.J.J.Org.Chem.1970,35,2465.

[0348] (E7)Kaufmann, G.F. ;Sartorio, R. ;Lee, S.H. ;Mee, J.M. ;Altobell, L.J., 3rd ;Kujawa, D.P. ;Jeffries, E. ;Clapham, B. ;Meijler, M.M. ;Janda, K.D.J.Am.Chem. Soc.2006,128,2802.

[0349] (E8)Garner, A.L. ;Yu, J. ;Struss, A.K. ;Lowery, C.A. ;Zhu, J. ;Kim, S.K. ;Park, J. ;Mayorov, A.V. ;Kaufmann, G.F. ;Kravchenko, V.V. ;Janda, K.D.Bioorg.Med.Chem. Lett.2011,21,2702.

[0350] 本文中提及的所有专利和出版物(专利和非专利)通过引用结合于此,其程度与将各个单独的出版物具体且个别地指定为通过引用完整地结合一样。

[0351] 已经使用的术语和表达用作说明而非限制的术语,并且在这样术语和表达的使用中无意排除显示和描述的特征的任何等效物或其部分,而要认识到,多种改进在要求保护

的本发明的范围内是可能的。因此，应当理解，虽然已经通过优选的实施方案和任选特征具体公开了本发明，本文中公开的构思的更改和变化可以诉诸于本领域技术人员，并且这样的更改和变化被认为是在如所附权利要求所限定的本发明的范围内。

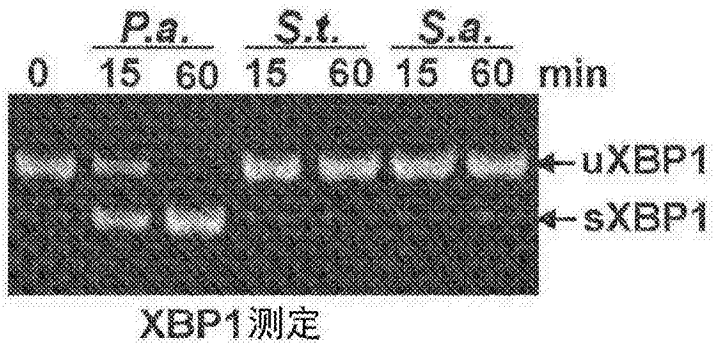

P.a.
S.t.
S.a.
0 15 60 15 60 15 60 min
uXBP1
sXBP1
XBP1测定

图 1A

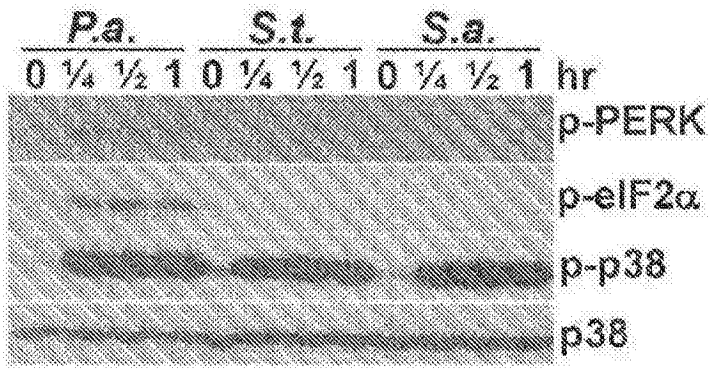

P.a.
S.t.
S.a.
0 ¼ ½ 1 0 ¼ ½ 1 0 ¼ ½ 1 hr
p-PERK
p-eIF2α
p-p38
p38

图 1B

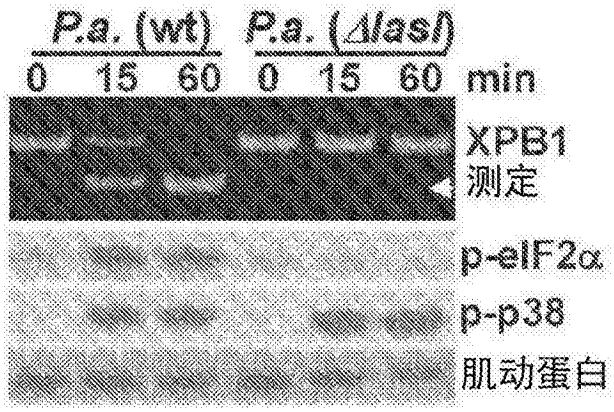

P.a. (wt)
P.a. (⊿lasI)
0 15 60 0 15 60 min
XPB1
测定
p-eIF2α
p-p38
肌动蛋白

图 1C

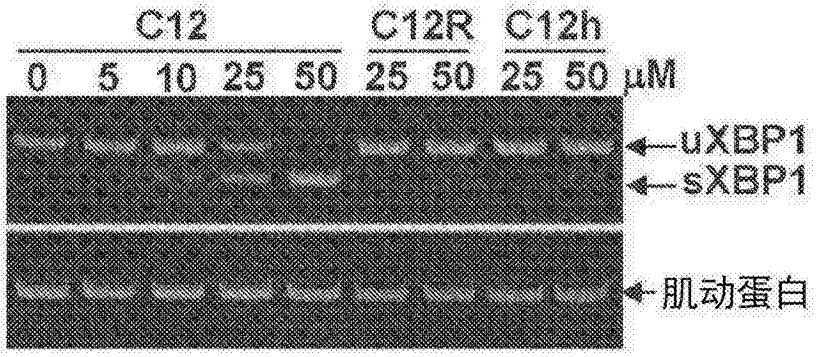

C12
C12R
C12h
0 5 10 25 50 25 50 25 50 μM
uXBP1
sXBP1
肌动蛋白

图 1D

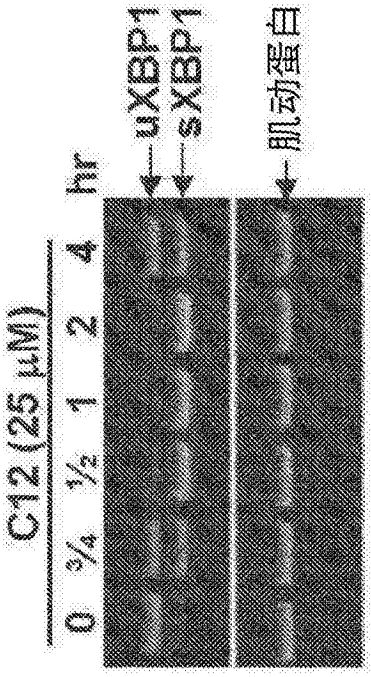

uXBP1
sXBP1
肌动蛋白
C12 (25 μM)
0 ¼ ½ 1 2 4 hr

图 1E

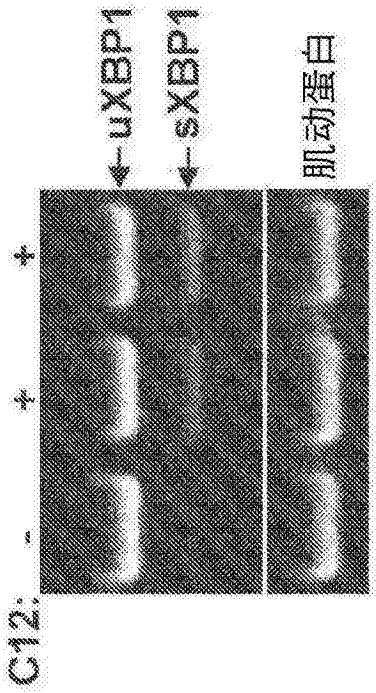

uXBP1
sXBP1
肌动蛋白
C12:
-
+
+

图 1F

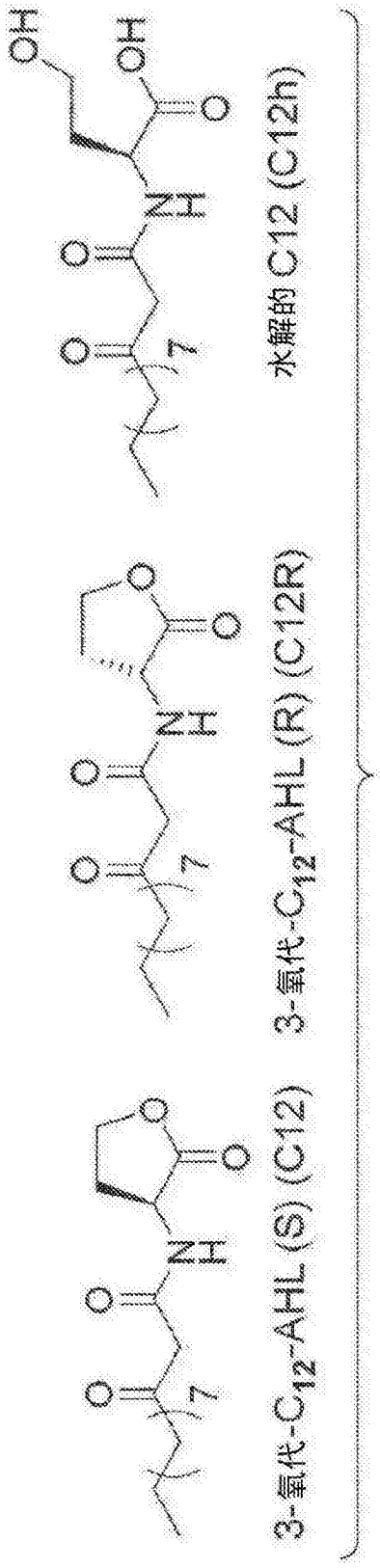

水解的 C12 (C12h)
3-氧代-C_{12}-AHL (R) (C12R)
3-氧代-C_{12}-AHL (S) (C12)

图 1G

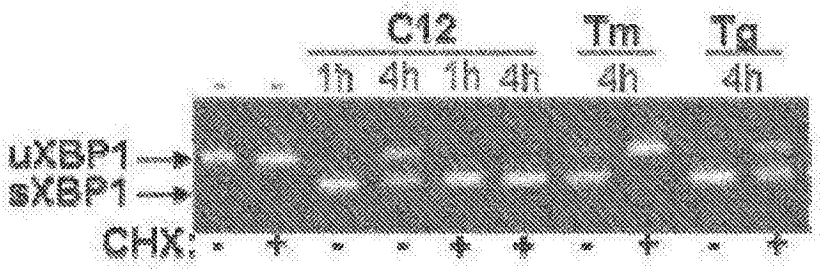

C12
Tm
Tg
1h 4h 1h 4h
4h
4h
uXBP1
sXBP1
CHX:

图 2A

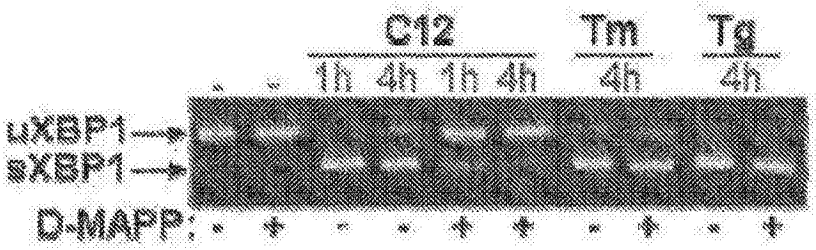

C12
Tm
Tg
1h 4h 1h 4h
4h
4h
uXBP1
sXBP1
D-MAPP:

图 2B

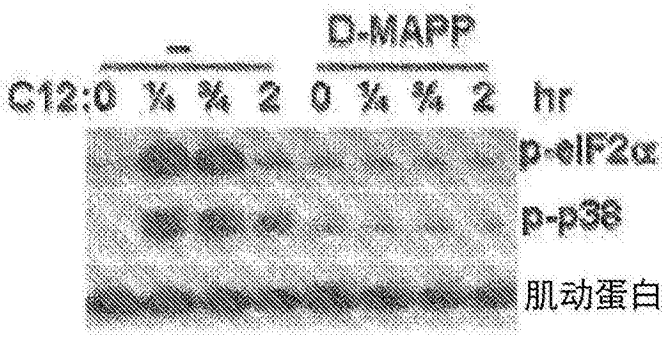

-
D-MAPP
C12:0 ¼ ½ 2 0 ¼ ½ 2 hr
p-eIF2α
p-p38
肌动蛋白

图 2C

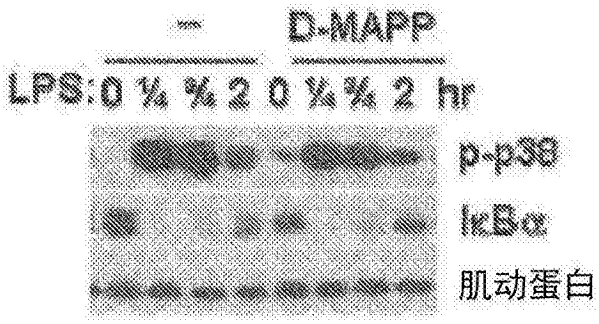

-
D-MAPP
LPS:0 ¼ ½ 2 0 ¼ ½ 2 hr
p-p38
IκBα
肌动蛋白

图 2D

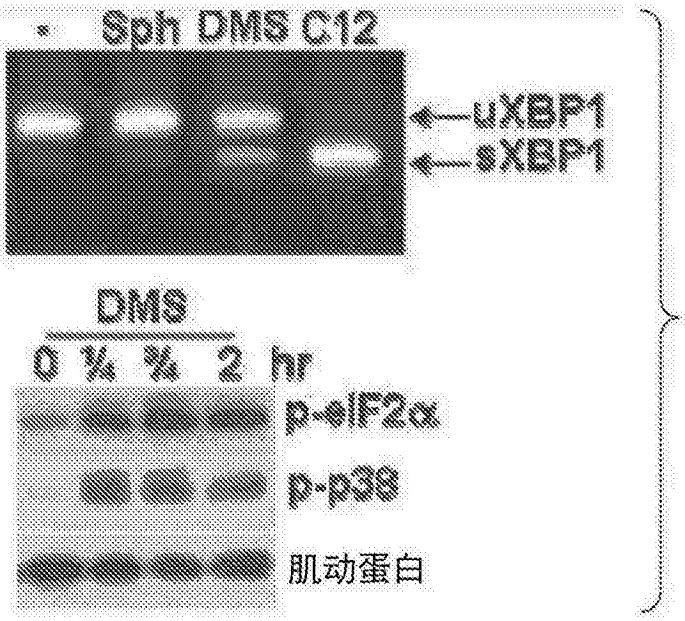

Sph DMS C12
uXBP1
sXBP1
DMS
0 ¼ ½ 2 hr
p-eIF2α
p-p38
肌动蛋白

图 2E

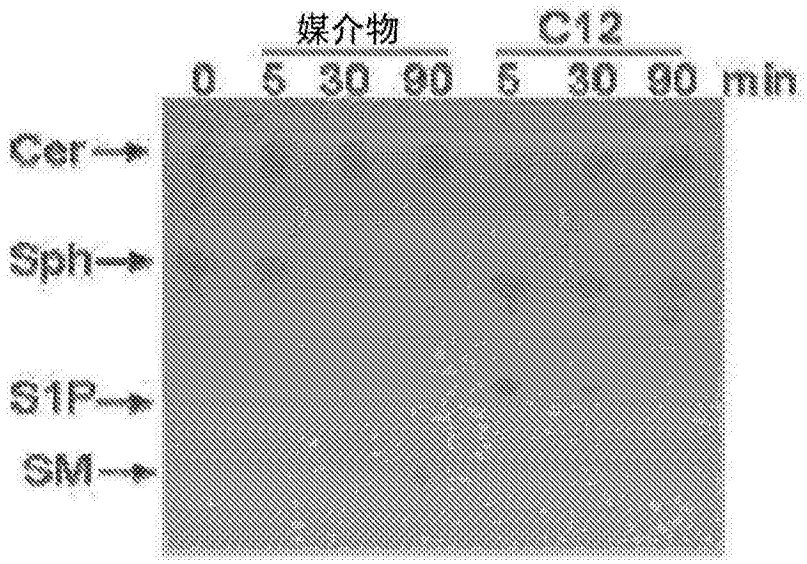

媒介物
C12
0 5 30 90 5 30 90 min
Cer
Sph
S1P
SM

图 2F

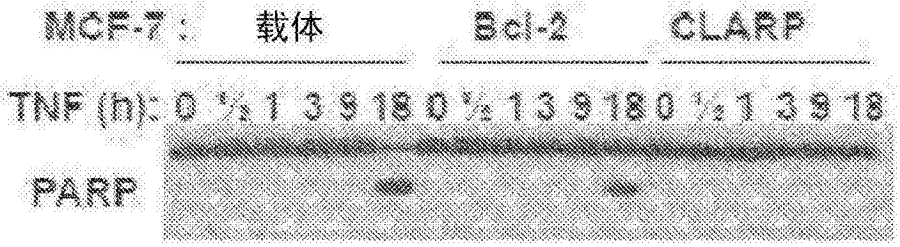

MCF-7 :
载体
Bcl-2
CLARP
TNF (h):
0 ½ 1 3 9 18 0 ½ 1 3 9 18 0 ½ 1 3 9 18
PARP

图 3A

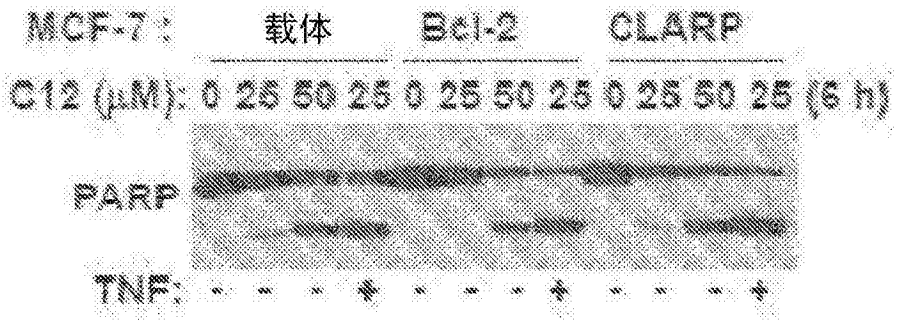

MCF-7 :
载体
Bcl-2
CLARP
C12 (μM): 0 25 50 25 0 25 50 25 0 25 50 25 (6 h)
PARP
TNF: - - - + - - - + - - - +

图 3B


TNF: - + - - - + + +
C12 (μM): 0 0 10 25 50 5 10 25
PARP
癌性的 (HeLa)

图 3C


TNF: - + - - - + +
C12 (μM): 0 0 10 30 60 10 30
PARP
正常的 (NHBE)

图 3D

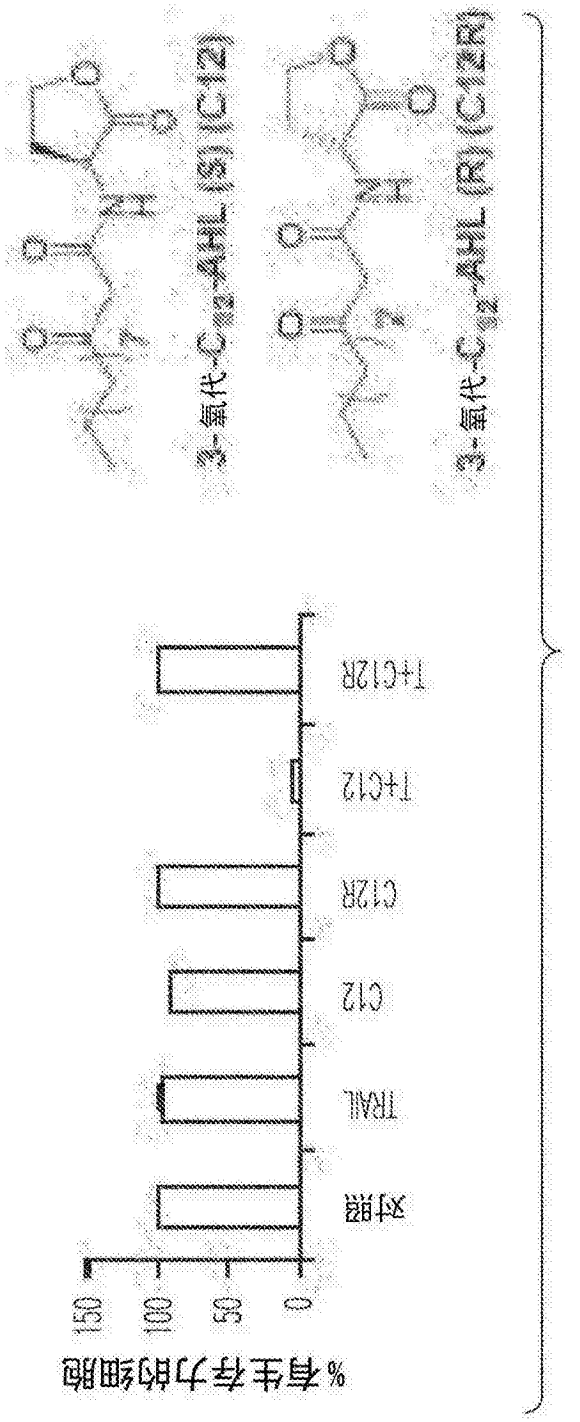

3-氧代-C12-AHL (S) (C12)
3-氧代-C12-AHL (R) (C12R)
% 有生存力的细胞
150
100
50
0
对照
TRAIL
C12
C12R
T+C12
T+C12R

图 4A

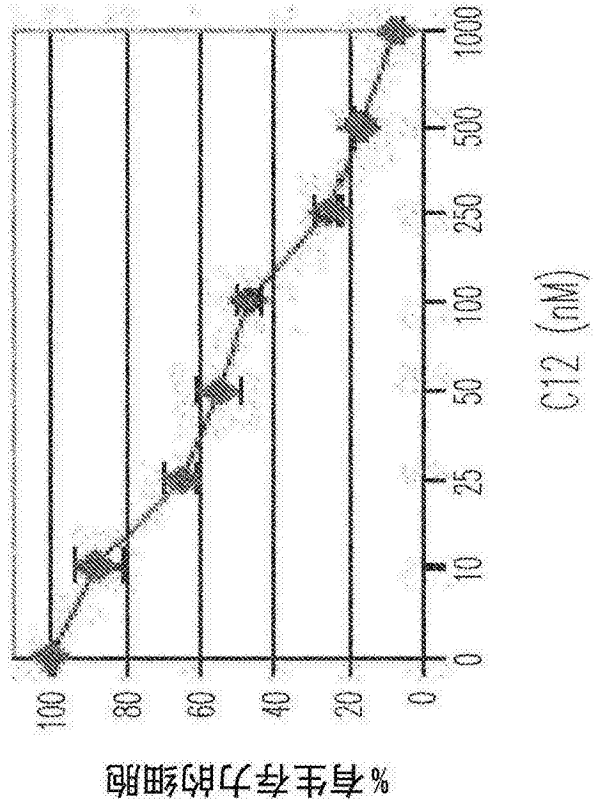

% 有生存力的细胞
100
80
60
40
20
0
0
10
25
50
100
250
500
1000
C12 (nM)

图 4B

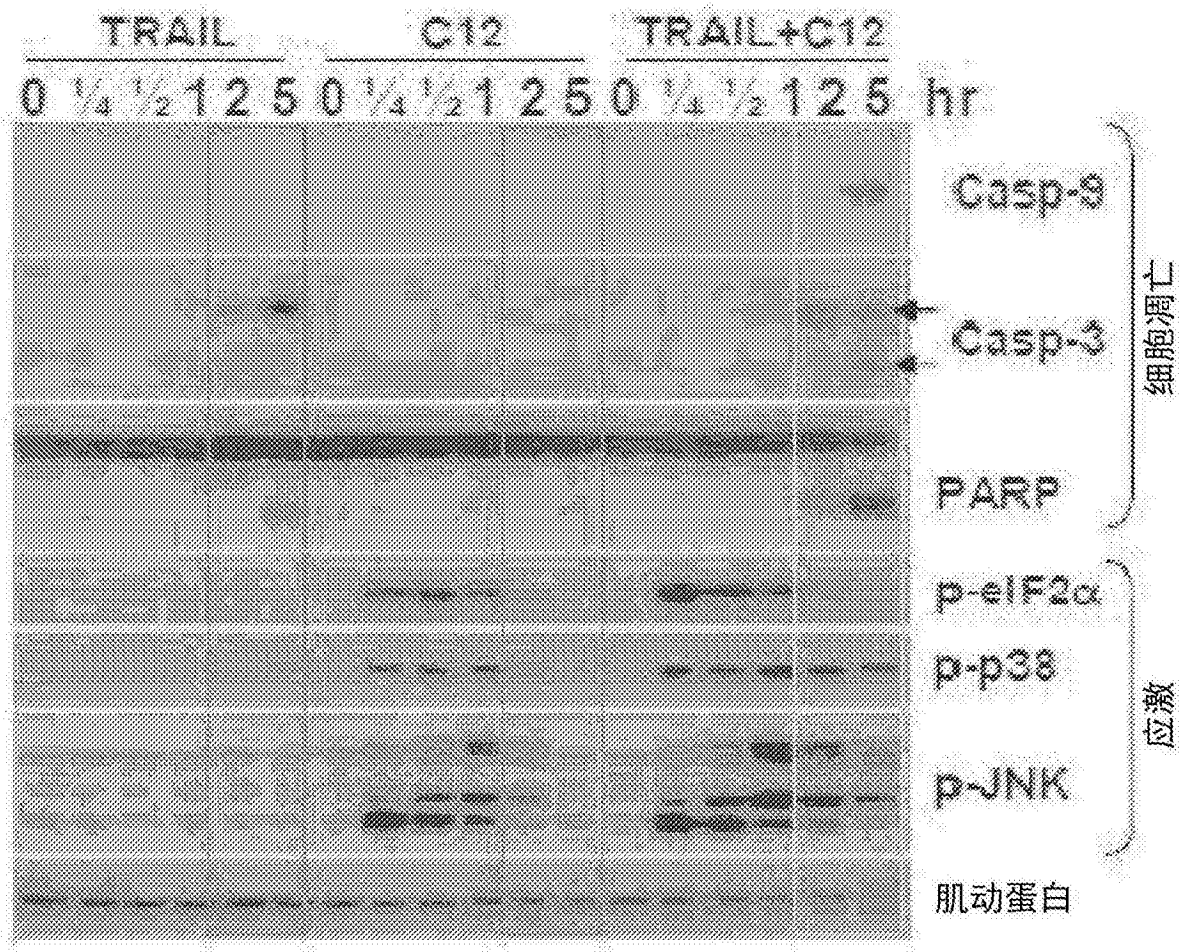

TRAIL
C12
TRAIL+C12
0 ¼ ½ 1 2 5 0 ¼ ½ 1 2 5 0 ¼ ½ 1 2 5 hr
Casp-9
Casp-3
PARP
细胞凋亡
p-eIF2α
p-p38
p-JNK
应激
肌动蛋白

图 5

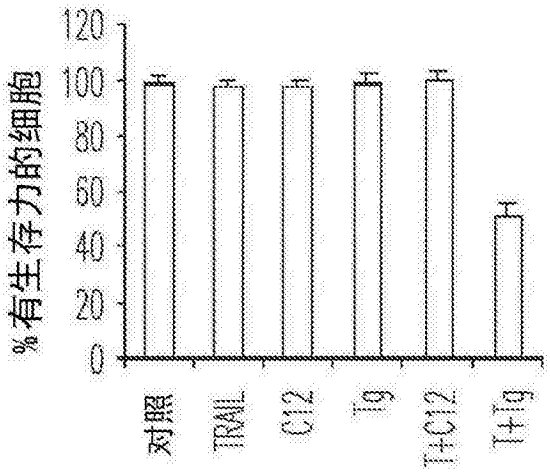

% 有生存力的细胞
120
100
80
60
40
20
0
对照
TRAIL
C12
Tg
T+C12
T+Tg

图 6A

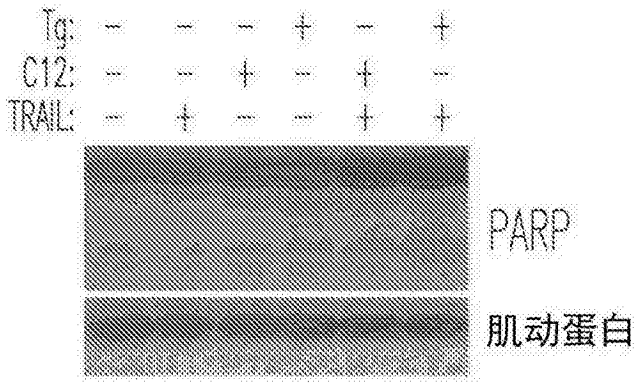

Tg: – – – + – +
C12: – – + – + –
TRAIL: – + – – + +
PARP
肌动蛋白

图 6B

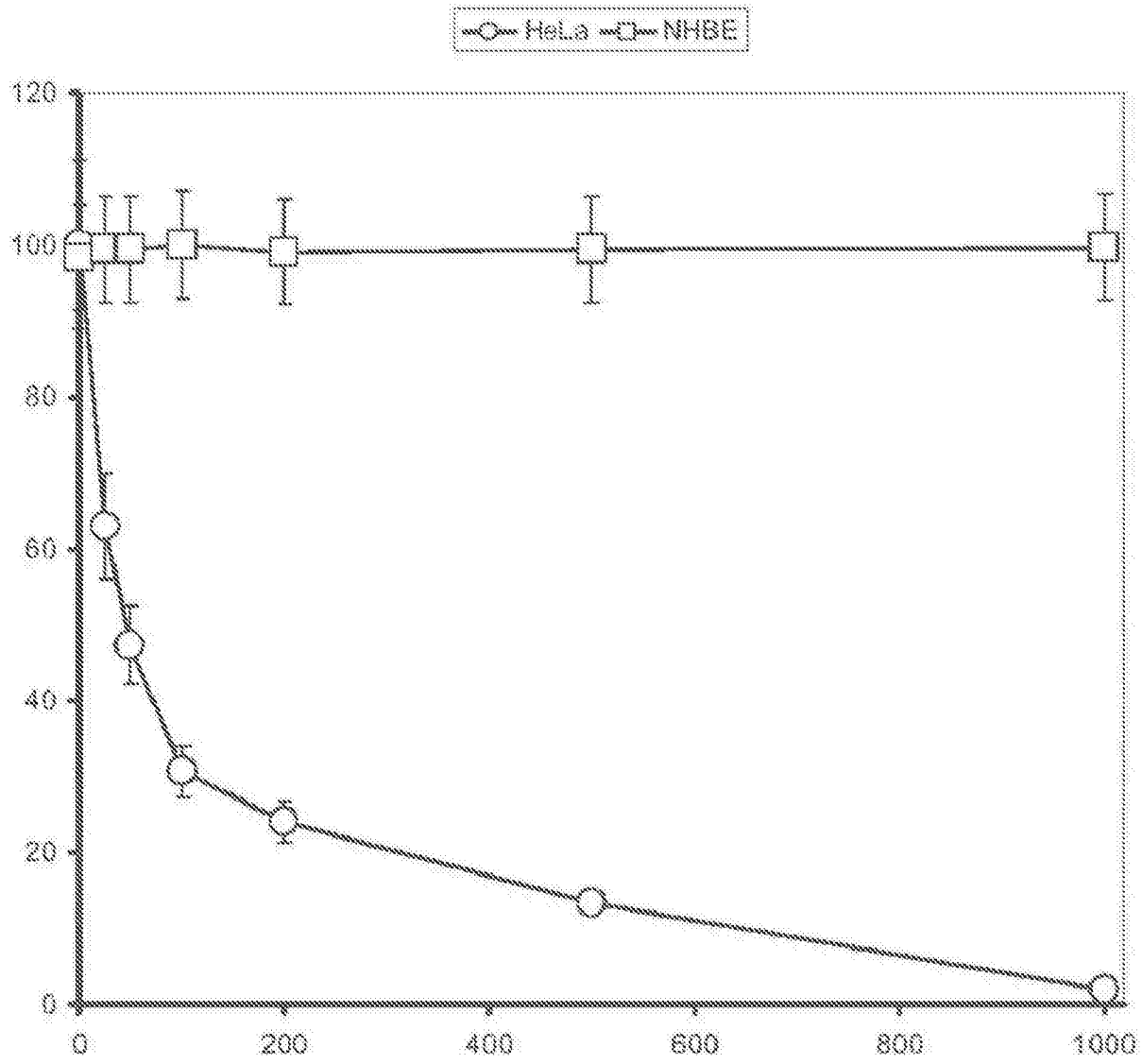


图 7

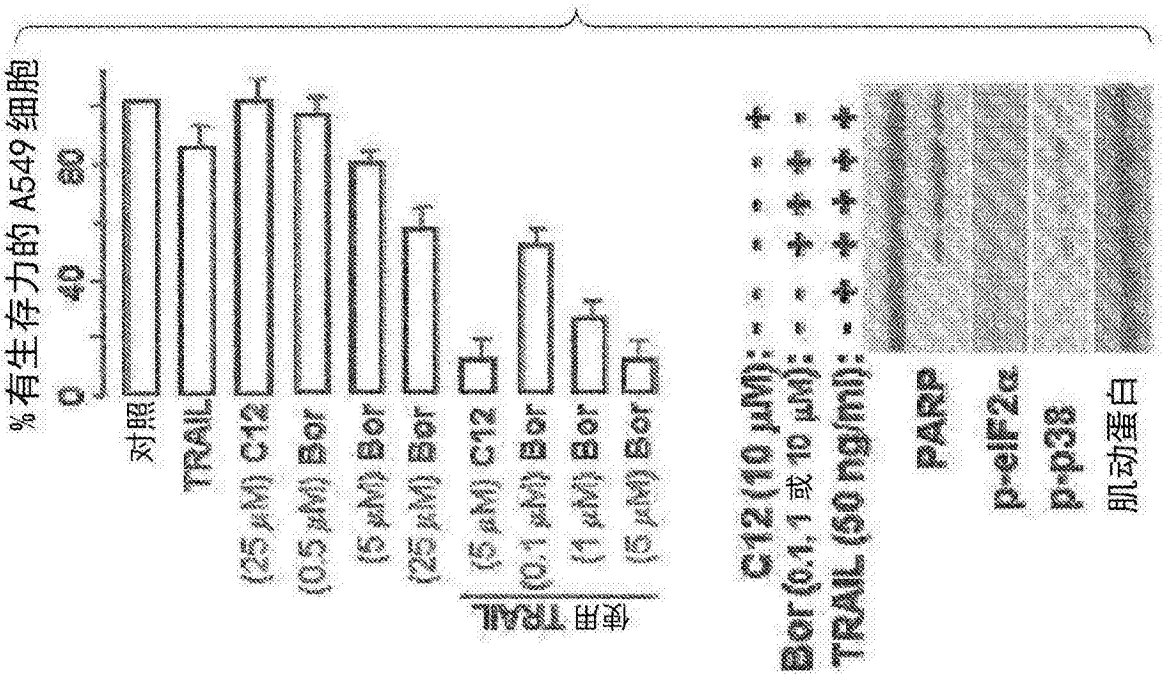

% 有生存力的 A549 细胞
0
40
80
对照
TRAIL
(25 μM) C12
(0.5 μM) Bor
(5 μM) Bor
(25 μM) Bor
使用 TRAIL
(5 μM) C12
(0.1 μM) Bor
(1 μM) Bor
(5 μM) Bor
C12 (10 μM):
Bor (0.1 或 10 μM):
TRAIL (50 ng/ml):
PARP
p-eIF2α
p-p38
肌动蛋白

图 8A

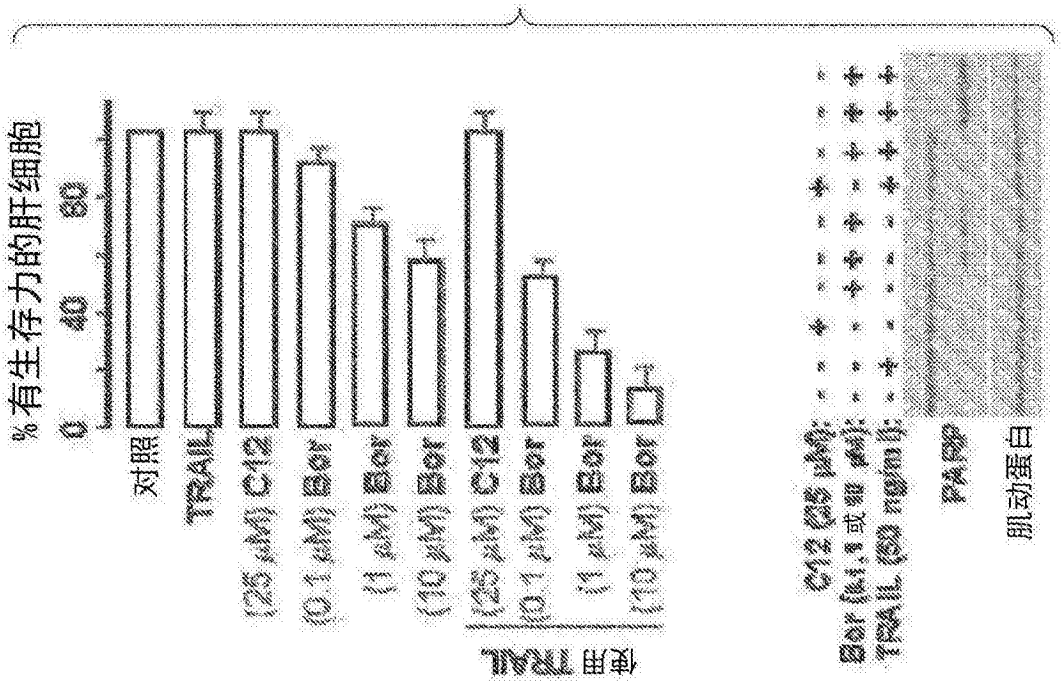

% 有生存力的肝细胞
0
40
80
对照
TRAIL
(25 μM) C12
(0.1 μM) Bor
(1 μM) Bor
(10 μM) Bor
(25 μM) C12
(0.1 μM) Bor
(1 μM) Bor
(10 μM) Bor
使用 TRAIL
C12 (25 μM):
Bor (0.1 或 1 μM):
TRAIL (50 ng/ml):
PARP
肌动蛋白

图 8B

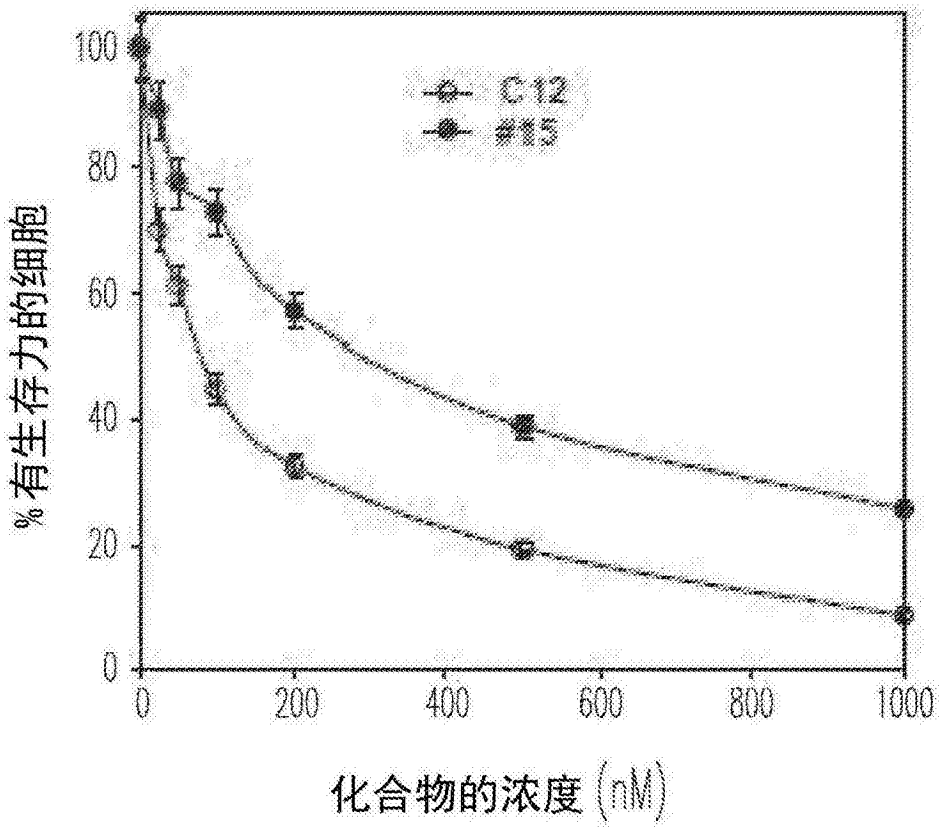

C12
#15
% 有生存力的细胞
100
80
60
40
20
0
0
200
400
600
800
1000
化合物的浓度 (nM)

图 9A

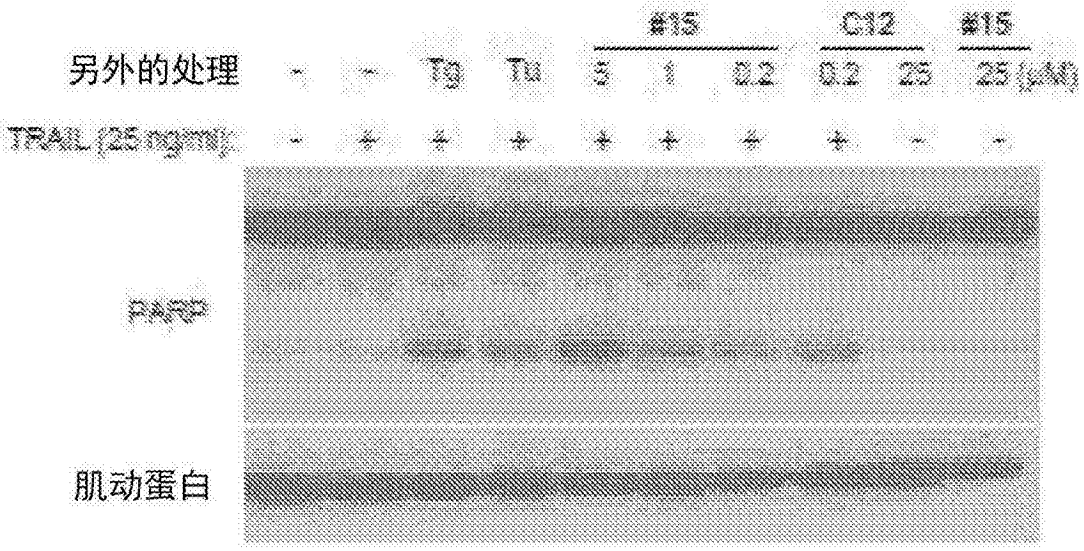

另外的处理
-
-
Tg
Tu
#15
5
1
0.2
C12
0.2
25
#15
25 (μM)
TRAIL (25 ng/ml)
-
+
+
+
+
+
+
+
-
-
PARP
肌动蛋白

图 9B

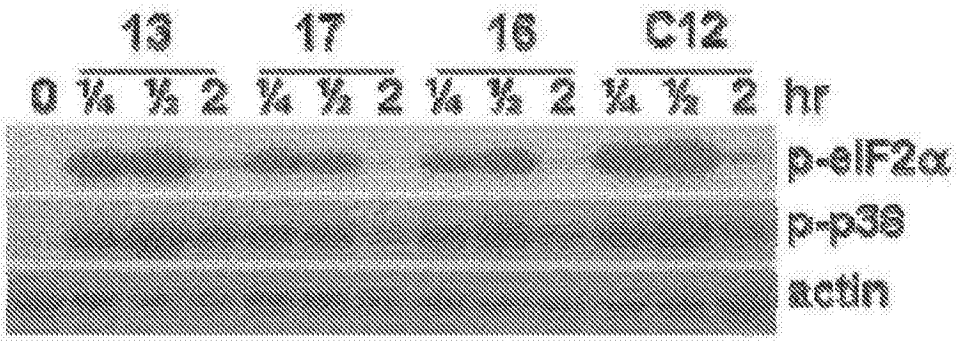


图 10A

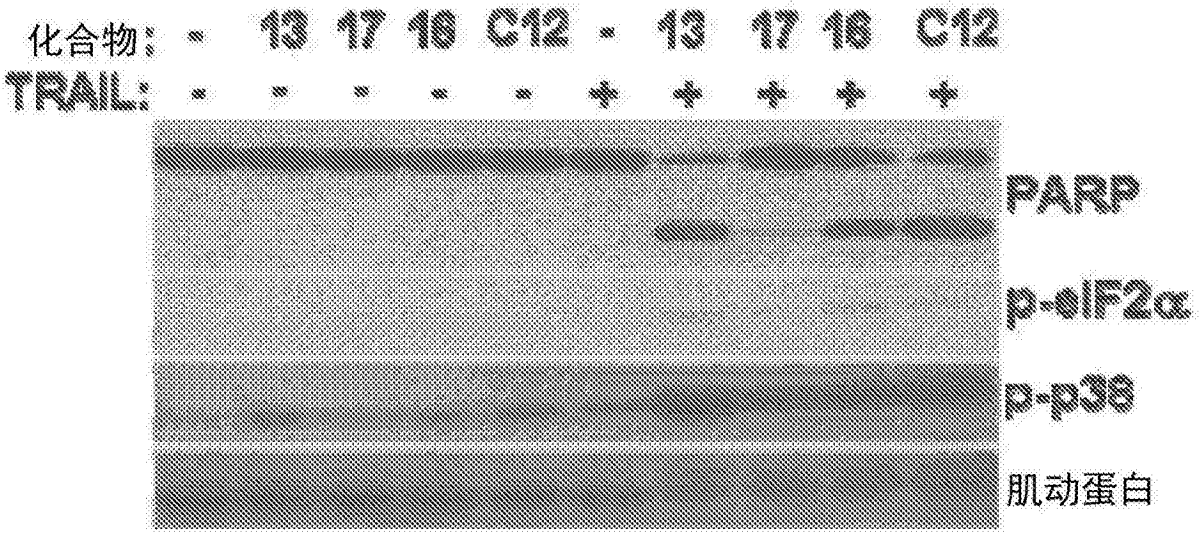


图 10B

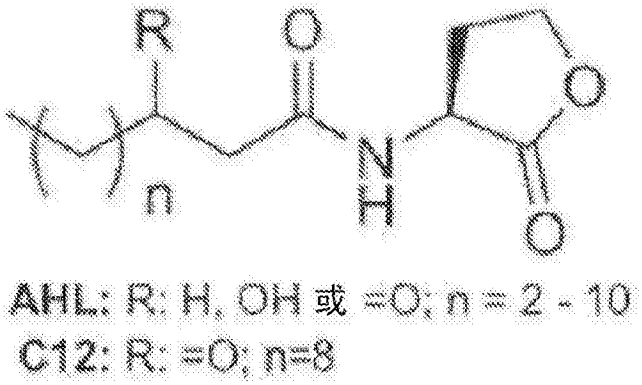


图 11A

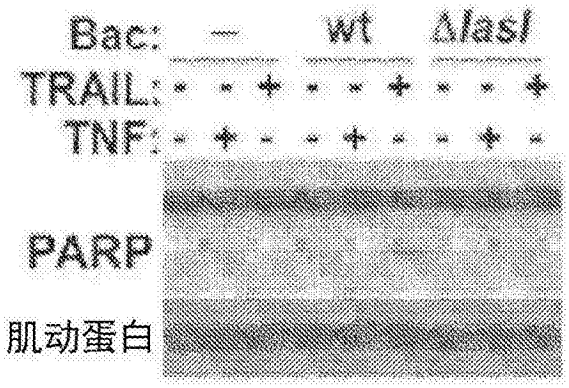


图 11B

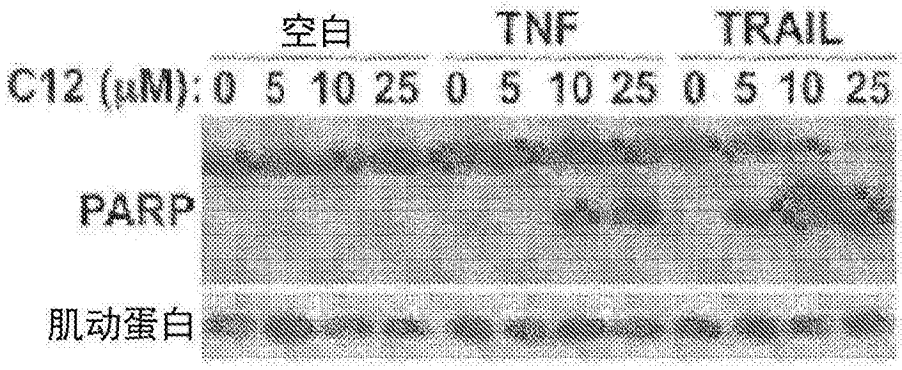

空白
TNF
TRAIL
C12 (μM): 0 5 10 25 0 5 10 25 0 5 10 25
PARP
肌动蛋白

图 11C

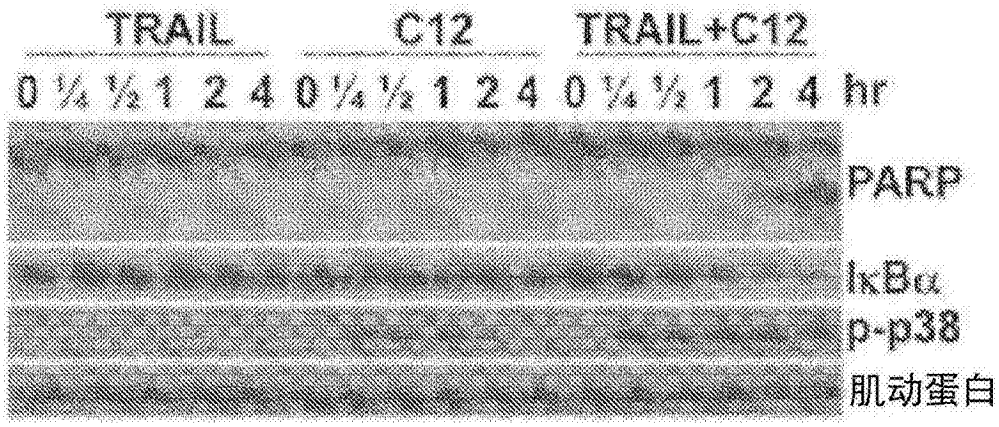

TRAIL
C12
TRAIL+C12
0 ¼ ½ 1 2 4 0 ¼ ½ 1 2 4 0 ¼ ½ 1 2 4 hr
PARP
IκBα
p-p38
肌动蛋白

图 11D

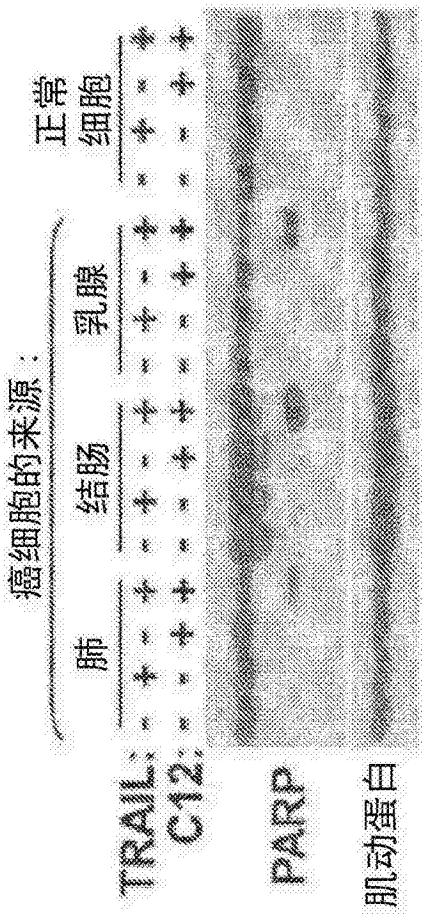

癌细胞的来源：
肺
结肠
乳腺
正常细胞
TRAIL:
C12:
PARP
肌动蛋白

图 12A

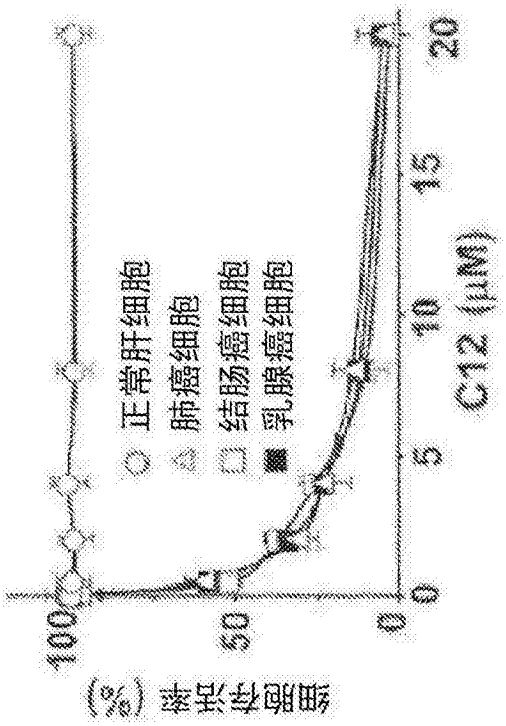

正常肝细胞
肺癌细胞
结肠癌细胞
乳腺癌细胞
细胞存活率（%）
C12 (μM)
100
50
0
0
5
10
15
20

图 12B

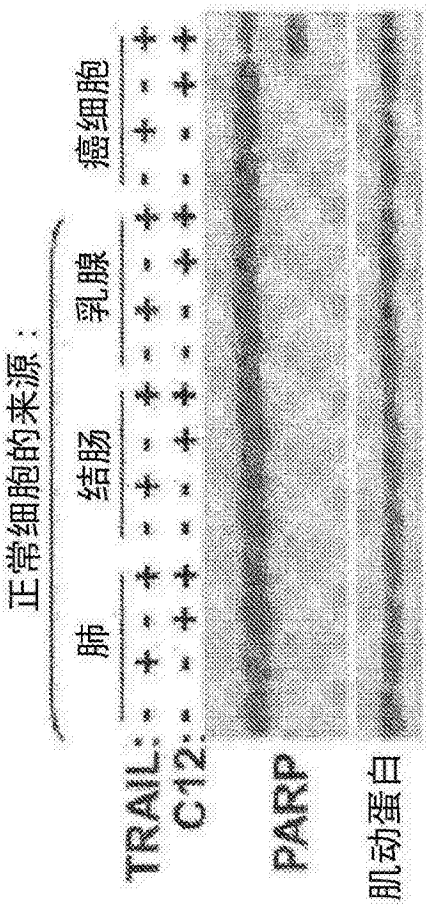


图 12C

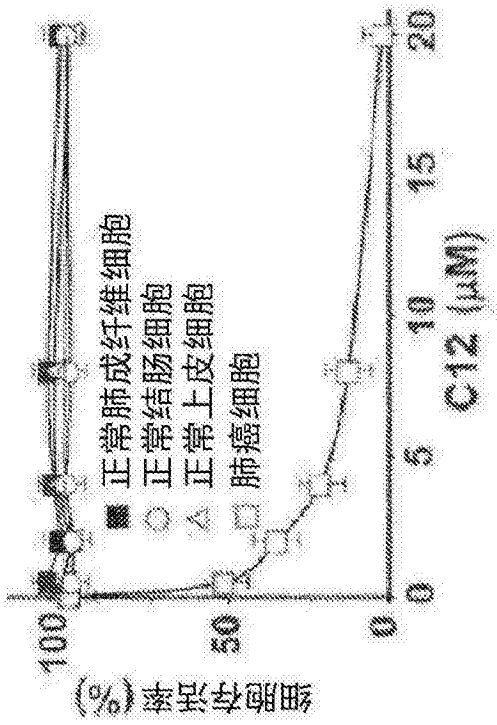


图 12D

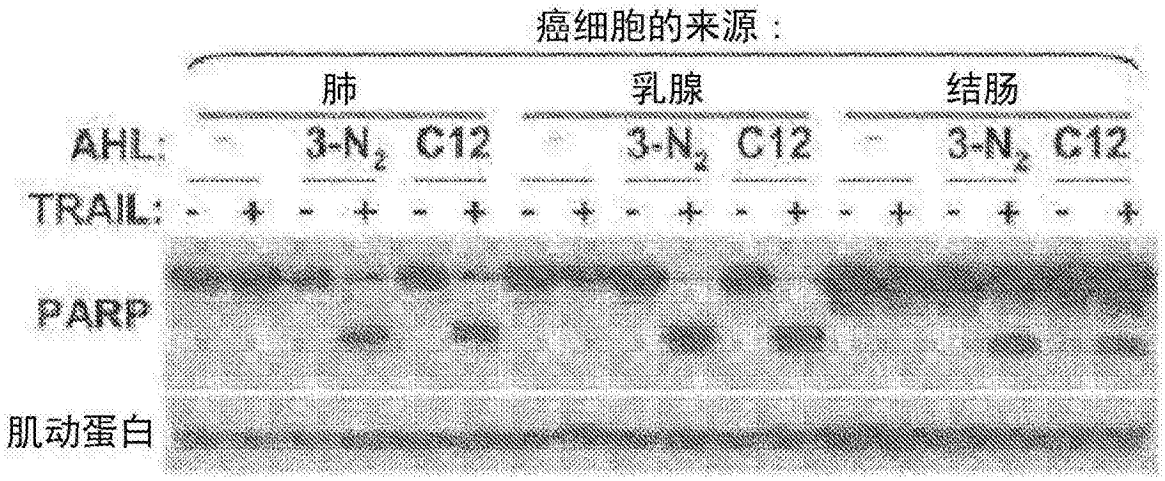


图 13A

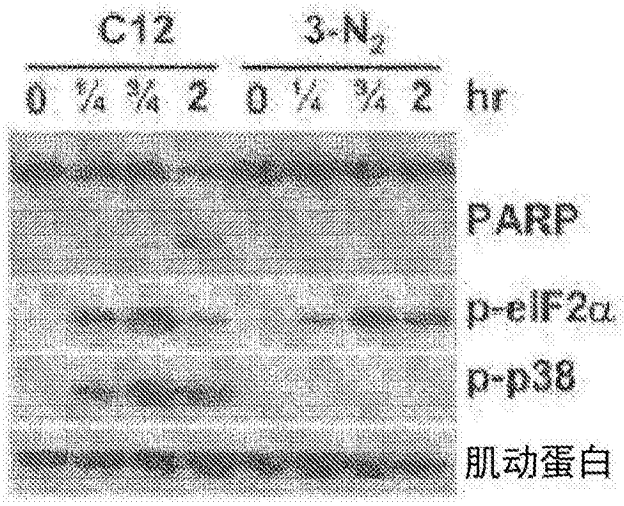

C12
3-N2
0 ¼ ¾ 2 0 ¼ ¾ 2 hr
PARP
p-eIF2α
p-p38
肌动蛋白

图 13B

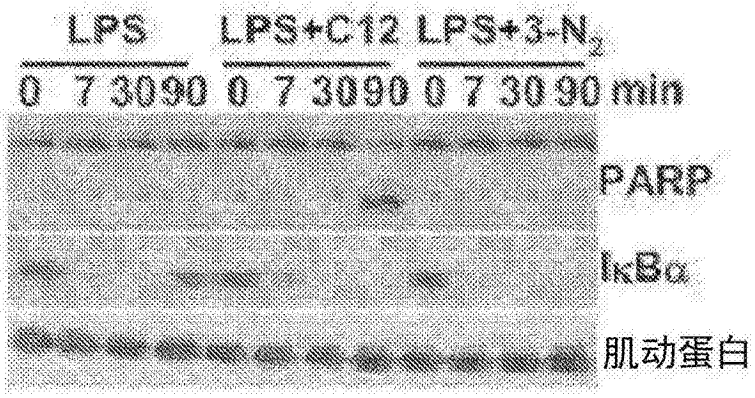

LPS
LPS+C12
LPS+3-N2
0 7 30 90 0 7 30 90 0 7 30 90 min
PARP
IκBα
肌动蛋白

图 13C

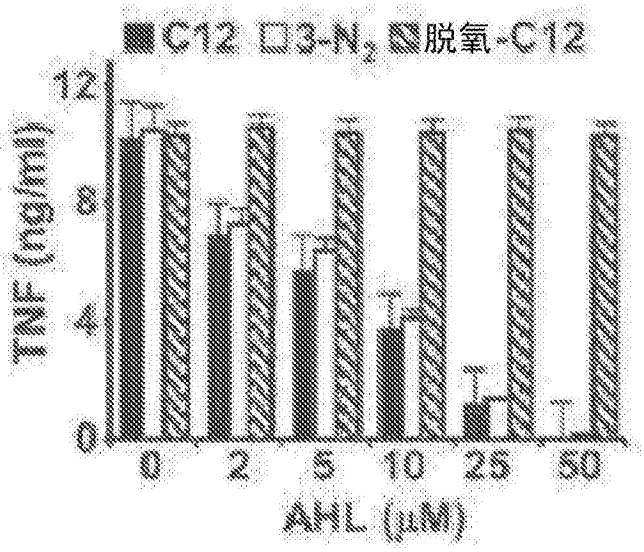

C12
3-N2
脱氧-C12
TNF (ng/ml)
12
8
4
0
0
2
5
10
25
50
AHL (μM)

图 13D

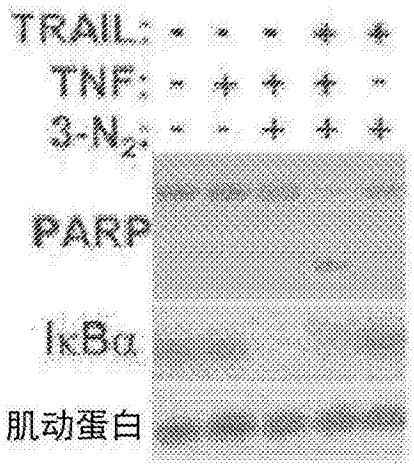

TRAIL:
TNF:
3-N2:
PARP
IκBα
肌动蛋白

图 13E