

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 95190013.7

A61K 31/42

A61K 31/275

A61K 31/4152 A61K 31/404

A61K 31/535 A61K 31/505

A61K 31/47 A61K 31/495

A61K 31/44 A61K 31/165

A61K 33/24 A61K 31/70

[45]授权公告日 2001 年 5 月 16 日

[11]授权公告号 CN 1065744C

[22]申请日 1995.1.6 [24]颁证日 2001.2.3

[21]申请号 95190013.7

[30]优先权

[32]1994.1.7 [33]US [31]08/179,570

[86]国际申请 PCT/US95/00363 1995.1.6

[87]国际公布 WO95/19169 英 1995.7.20

[85]进入国家阶段日期 1995.9.7

[73]专利权人 休正公司

地址 美国加利福尼亚州

共同专利权人 生物信号有限公司

耶路撒冷希伯来大学伊休研究发展公
司

[72]发明人 克劳斯·彼得·赫斯

唐娜·普鲁艾斯·舒沃茨

伊雷那·曼 劳瑞·凯·肖沃

盖奥基·克瑞 伊斯特温·斯热凯利

塔马斯·巴乔 简尼斯·海米歇尔

拉兹洛·奥飞 亚历克斯·列维茨凯

艾卫伍·格伊特

艾克塞尔·尤尔瑞茨

瑞内尔·兰莫斯

费尔鲁茨 F·卡宾纳维尔

[56]参考文献

CN1056684 1991.12.4 C07C255229

WO9220642 1992.11.26 C07C43/21

WO9220642 1992.11.26 C07C43/21

[74]专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 程 伟

审查员 安佩东

权利要求书 1 页 说明书 148 页 附图页数 40 页

[54]发明名称 对与血小板源生长因子有关的疾病如癌症的治疗

[57]摘要

本发明有关可抑制血小板衍生的生长因子受体(PDGF-R)活性的化合物,优选地这类化合物也抑制PDGF-R 超级家族的其它成员的活性,并对PDGF-R 超级家族的成员有选择性。PDGF-R 超级家族包括PDGF-R 和PDGF-R 相关的激酶F1t,和KDR。特征化合物对降低PDGF-R 活性的细胞培养是活性的,并优选一种或多种PDGF-R 相关的激酶。特征化合物的一个例子,A10(见图1a),和其体内抑制肿瘤细胞生长的能力在下面描述。用本申请作指南可以得到其它能抑制PDGF-R 并优选F1t 和/或KDR 的化合物。这类化合物被优选用于治疗患有以不良的PDGF-R 活性为特征的细胞增生疾病的患者。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

知识产权出版社出版

权 利 要 求 书

1. 5-甲基异恶唑-4-羧酸-(4-三氟甲基)-酰基苯胺或其药用可接受的盐在制备非肠道给药的治疗以不正常的 PDGF-R 活性为特征的固态肿瘤的药剂中的应用。
2. 如权利要求的 1 应用是用于内轴脑癌的治疗。
3. 如权利要求的 1 应用是用于卵巢癌的治疗。
4. 如权利要求的 1 应用是用于结肠癌的治疗。
5. 如权利要求的 1 应用是用于前列腺癌的治疗。
6. 如权利要求的 1 应用是用于肺癌的治疗。
7. 如权利要求的 1 应用是用于神经胶质瘤的治疗。
8. 一种用于非肠道给药的药剂组合物, 其包括: 5-甲基异恶唑-4-羧酸-(4-三氟甲基)-酰基苯胺或其药用可接受的盐, 以及生理上可接受的载体, 该载体包括: 3%w/v 苺醇, 8%w/v 聚山梨醇酯 80, 以及 65%w/v 聚乙二醇 (MW=300 道尔顿) 的绝对乙醇溶液, 以 1:1 的 5%右旋糖水溶液稀释。

说明书

对与血小板源生长因子有关的疾病 如癌症的治疗

本发明涉及治疗细胞增生疾病的方法和组合物,该疾病是以血小板源生长因子受体(platelet derived growth factor receptor)(PDGF-R)的不良活性为特征的。

本申请是 Hirth 等人,名称为“TREATMENT OF PLATELET DERIVED GROWTH FACTOR RELATED DISORDER SUCH AS CANCERS”,U.S. 申请号 08/179,590 的继申请,它于 1994 年 1 月 7 日申请,其内容包括附图在此结合参考。

血小板源生长因子受体(PDGF-R)是一种经膜受体酪氨酸激酶。配体与受体的结合导致的二受体的二聚作用常常引起各受体的分子内磷酸化,通常称之为自体磷酸化作用或磷酸根转移作用,以及引起受体复合物的活化。PDGF 是 PDGF-R 的配体,是具有通过二硫键连接的两条多肽链的二聚蛋白质。每条多肽成为 A 链多肽,或为 B 链多肽。因此,PDGF 或有两条 A 链,两条 B 链,或一条 A 链和一条 B 链。

PDGF-R 由两种异构体 α 和 β 组成。含 α 和 β 的受体均与有丝分裂原活性有关,而只有含 β 的受体与趋化性和肌动蛋白改组有关(Heldin, C-H, EMBO Journal 11: 4251

—4259, 1992)。

根据 Plate 等, Laboratory Investigation 4: 529—534, 1992:

对于间质细胞和神经外胚层细胞而言, PDGF 是潜在的生长因子。内皮细胞被认为对 PDGF 是非应答的, 但最近的研究表明 PDGF 可能在胎盘生长过程中对血管生长起作用。此外, 已证实 PDGFR- β 在发炎组织内皮细胞和神经胶质瘤中表达。这表明, PDGF 在病理情况下对血管的功能起作用。[引用部分略]

Heldin, *supra*, 描述了 PDGF 及其受体的关系, 并讨论了 PDGF 在癌症中的作用, 强调某些癌症不产生 PDGF 而有中枢的坏死。Heldin 指出:

如上所述, PDGF 在某些疾病中的副作用使得 PDGF 拮抗剂的需求大大增加。最近, 我们和别人采取了几种方法以发展这样的拮抗剂。PDGF 抗体在抑制 SSV—转移细胞中的自分泌刺激和小鼠颈动脉去内皮作用后出现的动脉粥样硬化过程方面是有用的。而且, 已证实 PDGF 受体的可溶形式可连接和灭活 PDGF, 因此可能用于抑制体内 PDGF 作用。

另一方法是设计或找到一种按拮抗方式是与 PDGF 竞争结合受体的制剂。为了确定干扰 PDGF 结合的肽, 我们系统观察了由 B—链序列派生的肽, 发现了一种可抑制 PDGF 结合和 α —及 β —受体的自动磷酸化作用的肽。然而, 这种肽也显示了细胞毒性, 而在肽拮抗剂可用于体内研究之前还需

进一步的发展。已发现了可干扰受体结合的低分子量化合物,例如苏拉明(suramin)。但是,苏拉明在临床用作PDGF拮抗剂时并不是有足够特异性。最近,我们发现了另一低分子量化合物新霉素,在高浓度时它可抑制PDGF-BB与 α -受体的结合,但并不抑制与 β -受体的结合。因此,这种化合物代表了可区分两种受体类型的拮抗剂;然而,这种化合物的低效力使其不适合用于体内。令人乐观的是,对于苏拉明和新霉素的经验可帮助我们在未来设计出更有效更特异的PDGF受体拮抗剂。对PDGF-受体复合物三维结构的说明有助于这类拮抗剂的设计。

PDGF拮抗活性也可通过对PDGF诱导受体二聚作用的抑制来体现。我们假定单体的PDGF不能引起受体的二聚反应并因此是有拮抗活性。由于PDGF的还原可引起受体结合能力损失,我们试图找到链内二硫键以转化这些残基,并因此阻止配体的二聚作用。由于PDGF中半胱氨酸残基的高密度使得这一过程十分困难。最终成功的方法包括对PDGF分子的部分还原,采用的是仅只还原链间二硫键,而不影响链内键的一定浓度的二硫苏糖醇。通过这一方法,在PDGF内N-末端的第二和第四半胱氨酸残基形成了二个链内键。对于这两个半胱氨酸的残基已转化为丝氨酸残基的PDGF B-链变异体的分析表明在其中隐含着受体结合活性。它是受体拮抗剂吗?答案是否定的,事实上,单体PDGF可引起受体二聚作用,以及自体磷酸化作用。这个结果表明PDGF诱导的受体二聚作用不仅是在二受体分子间形成桥

的问题:二聚作用也包含了增强了受体-受体间作用的,受体细胞外区域由配体诱导那里的构象变化。正如我们目前探讨的,实现拮抗作用的一可能的方式是使一条野生型(wild-type)PDGF 链与一条不与 PDGF 受体结合但可有效防止受体二聚作用的变异链结合。[引用略]

在 Spada A. P. 等,名称为“Bis Mono—and Bicyclic Aryl and Heteroaryl Compounds which Inhibit EGF and/or PDGF Receptor Tyrosine Kinase,” PCT/US92/03736 中,提及某些双单和二环芳基化合物的应用。根据 Spada:

根据本发明,它提供了对患有这种异常增生疾病病人的异常细胞增生的抑制方法,包括给病人施用具有蛋白质酪氨酸激酶抑制活性的抑制有效量的二单一和/或二环芳基和/或杂环化合物 EGF 和/或 PDGF 受体,其中的各芳基和/或杂芳基是含有 0—4 个杂原子的环系统,所述化合物可被任意取代或多取代。

本发明涉及可抑制血小板源生长因子受体(PDGF-R)活性的化合物,优选地,这些化合物也可抑制 PDGF-R 超级家族成员的活性,并且对于 PDGF-R 超级家族成员是有选择性。PDGF-R 超级家族包括 PDGF-R 和 PDGF-R 相关的激酶 Flt 和 KDR。特征化合物对于细胞培养物中降低 PDGF-R 活性和优选的降低一或多种 PDGF-R 相关激酶活性是有效的。特征化合物的一个实例,A10 (见图 1a),及其体内抑制肿瘤细胞生长的能力如下所述。根据本发明的指示,其它可抑制 PDGF-R 的化合物,优选是 Flt

和/或 KDR。这些化合物优选地用来治疗以不良 PDGF-R 活性为特征的细胞增生疾病患者。

不良的细胞增生是在不同类型细胞包括癌细胞、癌细胞周围细胞(基质细胞)、内皮和平滑肌细胞中,由 PDGF-R 的不良活性引起的。例如,癌细胞周围内皮细胞 PDGF-R 活性的增加可增进肿瘤血管化,并因此有利于癌细胞的生长。所以,PDGF-R 的不良活性以不同的方式与细胞增生疾病有关,例如通过增加生长因子的生成,通过造成细胞的异常生长,以及在固体肿瘤中增加了血管的形成和分布并因此帮助了肿瘤的生长。

PDGF-R 超级家族加了的其它成员也有助于肿瘤细胞的生长。PDGF 超级家族的成员具有与 α -或 β -PDGF-R 激酶区域至少 45% 序列相似性的激酶区域。血管内皮生长因子(VEGF)至少可激活酪氨酸激酶受体;Flk-1 或其人体中相应物 KDR。这些受体都在内皮细胞出现并且在血管生成中是重要的。Plate et al., Nature 359:848, 1992; Shweiki, et al. Nature 359:843—845, 1992; Millauer et al., cell 72:835—846, 1993; Plate et al., Cancer Res., 53:5822—5827, 1993; Waltenberger et al., Journal of Biological Chemistry 43:26988—26995, 1994。血管化对于固体肿瘤的生长是必须的,并且是被具有内皮细胞性和/或促有丝分裂作用的肿瘤细胞因子调节的。PDGF-R、KDR 和 Flt 均与营养固体肿瘤的血管形成和分布有关。通过抑制 PDGF-R 以及一种或多种有关的酪氨酸激酶活性,可抑制

细胞的异常生长和对于这种生长的营养。

给出了属于特征组(见图 2 a-j)的多个化合物实例(见图 1 a-k)。本领域熟练技术人员可以本申请公开的内容为指导,得到抑制 PDGF-R 优选 Flt 和/或 KDR 的其它化合物,它们对于受体酪氨酸激酶具有同样的或更好的活性。例如,这里所述的评估可很容易地检测属于特征组(见图 2a-j)的化合物的同等活性。通过标准试验,可以测定下述任一化合物的作用位点,并可测定在同一位点显示活性的其它化合物。

通过改变 PDGF-R 活性,并且优选的也通过改变 Flt 和/或 KDR 活性,设计了抑制不良细胞增生的方法和组合物。不局限于任何理论,对不良细胞增生的抑制是通过改变 PDGF-R 活性进行的(例如通过抑制 PDGF-R 的酪氨酸磷酸化作用,通过抑制底物或应接蛋白质与受体的结合,或通过抑制其它下游区信号行为),从而抑制 PDGF-R 的活性。但是,除非另有说明,所要求的方法和组合物的应用并不局限于这一特定的理论。

因此,本发明第一方面涉及对以下不良 PDGF-R 活性为特征的细胞增生疾病患者的治疗方法。这个方法包括给病人施用治疗有效量的含说明如图 2 a-j 所述化合物的组合物、或任意上述化合物生理条件下形成的活性产物(即上述前药的活性结构整体),施用一特定的化合物就是给病人提供这一特定化合物或给病人提供在其体内可生成这一化合物的化合物前药。

“细胞增生疾病”就是在多细胞有机体中一个或多个细胞亚组的不良的细胞增生,结果对多细胞有机体产生伤害(例如不适或减少寿命)。细胞增生疾病可在不同类型动物和在人中出现。细胞增生疾病包括癌、血管增生疾病和纤维变性疾病。

“不良 PDGF-R 活性”就是 1)通常不表达 PDGF-R 的细胞内 PDGF-R 的表达;2)通过通常不表达 PDGF 的细胞的 PDGF 表达;3)增加 PDGF-R 表达引起不良细胞增生;4)增加 PDGF-R 表达引起不良细胞增生;或 5)变异引起 PDGF-R 持续活化。可根据本领域熟知的方法测知不良或异常 PDGF 和 PDGF-R 水平的存在。

所述组合物可用于治疗细胞增生疾病,这是通过对病人(即患有细胞增生疾病的人或动物)用治疗有效量的组合物进行给药。组合物也可用于研究体内 PDGF-R 或 PDGF 本身作用的机理。

“治疗有效量”在治疗癌症时是指足以产生下述一种或多种结果的用量:缩小肿瘤尺寸,抑制肿瘤代谢,抑制肿瘤生长,阻止肿瘤生长,减轻肿瘤引起不适,或延长癌症患者的生命。

“治疗有效量”在治疗细胞增生疾病而非癌症时,是指足以产生下述一种或多种结果的用量:抑制引起疾病的细胞的生长,减轻疾病症状,或延长这种疾病患者的生命。

受体酪氨酸激酶活性的“明显”抑制是指采用下述实例所述的一种或多种试验得到的 IC_{50} 小于或等于 $75\mu m$ 。优选

的, IC_{50} 少于或等于 $50\mu m$ 的化合物可抑制 PDGF-R 活性, 更优选的是 IC_{50} 少于或等于 $10\mu m$ 的化合物, 还要优选的是 IC_{50} 少于或等于 $1\mu m$ 的化合物。较低的 IC_{50} 是优选的, 因为 IC_{50} 体现了体内化合物的有效性。本领域已知的其它因素, 如化合物的半衰期、生物分布及毒性, 在化合物用于治疗时也应考虑在内。这些因素使得具有较低 IC_{50} 的化合物比具有较高 IC_{50} 的化合物具备更大体内作用。

对 PDGF-R 超级家族的选择抑制是通过对 PDGF-R 活性的明显的抑制而同时具有不明显的作用而体现的(即在 EGR-R 上酪氨酸磷酸化作用的 IC_{50} 大于 $100\mu m$)。优选的, 至少一个 PDGF-R 超级家族的其它成员被明显抑制。

优选的化合物为 A10, A11, A12, A13, B10, B11, B12, B13, B14, B15, B16, B17, B18, B19, C10, C11, C13, D11, D12, D13, D14, D15, D16, D17, D18, D20, E10, E11, E12, E13, E14, E15, E16, F10, F11, F12, G10, G11, G12, G13, G14, G15, G16, G17, G18, G19, G20, G21, G22, G23, G24, G25, G27, G28, G29, G30, H12, I10, J11, P10, P12, P13, P14, P15, P16, P17, P18, P19, P20, P21, P22, P23, P24, P25。或这些化合物的活性药, 或其药物上可接受的盐。化合物优选采用药物组合物的形式, 通过使一种上述化合物与生理上可接受的载体混合而制备。

生理上可接受的载体是可使加入的化合物溶解或者有助于化合物给药的一种制剂。生理上可接受的载体的实例包括水、盐水、生理缓冲盐水、环糊精和 PBTE; D5W。憎水化

合物如 A10 的施用优选采用载体如 PBTE:D5W。选择生理上可接受的载体的重要因素是选择化合物在其中能保持活性的载体,或者载体和化合物的结合能够产生活性化合物的载体。化合物也可以连续形式采用缓释制剂或泵给药以保持患者体内恒定或变化的药物水平。

本发明另一方面涉及采用 A10, A12 或 B11, 对以不良 PDGF-R 活性为特征的细胞增生疾病患者的治疗方法。该方法包括向患者给药治疗有效量的 A10, A12 或 B11。

本发明另一方面叙述了采用结合治疗法, 对以不良 PDGF-R 活性为特征的癌症患者的治疗方法。结合治疗是采用一种或多种所述制剂以及标准抗癌剂进行的。该方法包括对癌症患者给药治疗有效量的含有可明显抑制 PDGF-R 活性的制剂和细胞毒性剂的组合物。优选的细胞毒性剂为 VP-16 或顺氯氨铂。更优选的, 细胞毒性剂为顺氯氨铂, 而癌症为肺癌。

本发明的另一方面涉及采用变异的 PDGF-R 或核酸编码的变异的 PDGF-R, 对以不良 PDGF-R 活性为特征的细胞增生患者的治疗方法。“变异的”PDGF-R 是指其中一个或多个氨基酸丢失或改变的 PDGF-R。如下所述, 无激酶区域的核酸编码的变异的(即截断的)PDGF-R 可抑制体内肿瘤的生长。变异的 PDGF-R 可以蛋白质、或以给蛋白质编码和在细胞内表达蛋白质的重组核酸的形式给药。

另一方面, 本发明涉及新的含有一种所述特征化合物和 PBTE:D5W 载体的组合物, 这里, 特征化合物可溶解于

PBTE:D5W 中;而且新化合物为 B10、B12、C10、C11、E10、E11、E12、E13、E14、E15、E16、F10、F11、F12、G21、G22、H11、H12、H13 和 H14。

从下面对本发明优选实施方案的描述及权利要求中,可以看到本发明的其余特征和优点。

图 1. a—k 表示优选化合物的化学结构。

图 2. a—j 分别表示 1—10 组的一般化学结构。

图 3. 按所述方法用 A10 处理过表达了人体 PDGF—b (A)或人体 EGF(B)的 NIH3T3 细胞。细胞周期中 S 期细胞所占百分数由血细胞计数流测定。

图 4. 在两个独立试验中,将 C6 细胞(1×10^5 细胞/ $4 \mu\text{l}$)植入 BALB/C, nu/nu 小鼠的大脑中。A10 是在移植后某天,每天以给定的剂量、溶于 $100 \mu\text{l}$ PBTE:D5W 中腹膜内给药。V=赋形剂对照。n=每组 8 至 12(Expt #1),或 5(Expt #2)只动物每组。 $*P < 0.00001$; $**P < 0.002$; $***P < 0.02$,这是相对于赋形剂对照组而言的。

图 5. 在两个独立的试验中,将 C6 细胞(5×10^4 细胞/ $20 \mu\text{L}$ (Expt #1)或 $5 \mu\text{l}$ (Expt #2))移植入癌鼠大鼠大脑中。A10 是在移植后某天开始,每天以给定的剂量,溶于 $500 \mu\text{l}$ PBTE 中腹膜内给药。V=赋形剂对照,n=7 至 8 只动物/组。 $*P = 0.00002$; $**P = 0.0003$,这是相对于赋形剂对照组而言的。

本发明涉及治疗以不良 PDGF—R 活性为特征的细胞增生疾病的方法和组合物。本申请证实了所述化合物明显抑

制 Flt-1 和/或 PDGF-R 活性的能力,并提供了这些化合物用于治疗细胞增生疾病如癌症的实例。所述化合物能用于治疗与 PDGF-R 不良表达有关的其它的增生疾病,如以不良的 PDGF-R 活性为特征的增生和纤维变性疾病。以本申请公开的内容为指导,本领域技术人员能够很容易确定哪种化合物可用于治疗特定的增生疾病。

本申请叙述了单独的、不良 PDGF-R 活性的存在的靶位点,它涉及现有技术中与许多固定靶有关的大量疾病,用所述化合物可抑制 PDGF-R 活性优选抑制 Flt 和/或 KDR 活性。优选地,PDGF-R 活性和 KDR 和/或 Flt 活性可被一单独化合物如 A10 抑制。化合物或治疗类型的结合也可作用于与酪氨酸激酶有关的不同 PDGF-R。上述结合的实例包括:采用 PDGF-R 活性抑制化合物和 KDR 抑制化合物,以及采用抑制 PDGF-R 生成的 PDGF-R 核酸和 KDR 抑制化合物。

本发明所采用的化合物(这里也称之为“药物”)属于至少 8 个不同的组。通常能够显著抑制 PDGF 受体活性的、上述组以及还未定义的其它组中优选的化合物如图 1 a-k 所示。因为给出了通式,本领域技术人员应认识到采用所述的筛选方法和现有技术中已知的方法可以确定本发明可用的化合物。

动物体内 A10,PDGF-R 的截断型(truncated version)和其它化合物抑制肿瘤生长的能力说明了这些化合物的有效性和功效。这样的动物研究通过证实化合物对动物有

效支持了化合物有效性,尽管这其中存在着内在的与采用化合物给动物治疗特定疾病有关的多种问题。这种内在的问题异种细胞数、各种药理情况如化合物的生物利用度、化合物半衰期、和化合物的消除率。这些内在问题常常会阻止化合物发挥生理作用。

下述实例说明了各种化合物抑制 PDGF-R 磷酸化的能力。也提供了实例说明定义为 A10(见图 1a)的化合物体内抑制癌的能力。而且,以本申请公开的内容为指导,本领域熟练技术人员可采用所述的方法和组合物得到其它的抑制化合物,并使其作用于以不良 PDGF-R 活性为特征的其它细胞增生疾病。

I. PDGF-R 超级家族

A. PDGF-R 活性

配体与 PDGF-R 的结合导致了可激活细胞内激酶区域的受体二聚体的形成和构象变化,并引起酪氨酸残基上的受体的磷酸根转移作用和/或自体磷酸化。受体的磷酸化刺激了被激受体与靶分子的物理联系。一些靶分子顺序磷酸化,这就给细胞质传递了信息。其它靶分子未被磷酸化,但作为对二级信号换能蛋白质的截短或应接分子而对信号传递起帮助作用。由激活受体产生的二级信号换能分子产生了可调节细胞功能如细胞分裂的信号串连(见 Fry M. J. 等, *Protein Science* 2;1785-1797,1993)。

因此,PDGF-R 活性增加的特征在于是对于 PDGF-R 配体结合而言一种或多种活性的增加:(1)PDGF-R 的

磷酸化或自体磷酸化,(2)PDGF-R 底物的磷酸化(例如 PL-3 激酶,RasGAP,PLCY、见 Fry *supra*),(3)应接分子的活化,以及(4)增加了细胞分裂。可采用下述的和本领域已知的技术测量上述活性。例如,如下述实施例所述,采用抗-磷酸酪氨酸抗体测定 PDGF-R 的自体磷酸化,并通过测量³H-胸苷向 DNA 的并入实现如下所述的细胞分裂增加。优选的,PDGF-R 活性的增加是与磷酸化 PDGF-R 和 DNA 合成的增加量有关的。

B. PDGF-R 相关激酶

. PDGF-R 相关激酶 Flt-1 和 KDR 可被 VEGF 激活。VEGF 是一种单二聚的糖蛋白,与 PDGF 结构相应。已分离出四种不同的 VEGF 拼接变体。Rosenthal 等,Growth Factors, 4:53-59,1990;Conn 等,Proc. Natl. Acad. Sci. (USA),87:1323-1327,1990;Houck 等,Mol. endocrinol, 5:1806-1814,1991;其中二种是分泌型,二种保持与细胞有关。已证实 VEGF 不被缺氧调节并且特别作用于内皮细胞。Plate 等,Nature 359:845-848,1992;Shweike 等,Nature 359:843-845,1992。

KDR 活性的特征是指对于 VEGF 配体结合而言一种或多种活性的增加:(1)KDR 的磷酸化或自体磷酸化;(2)KDR 底物的磷酸化,(3)应接分子活化,和(4)细胞分裂增加。

Flt-1 活性的特征是指对于 VEGF 配体结合而言一种或多种活性的增加:(1)Flt-1 的磷酸化或自体磷酸化,(2)

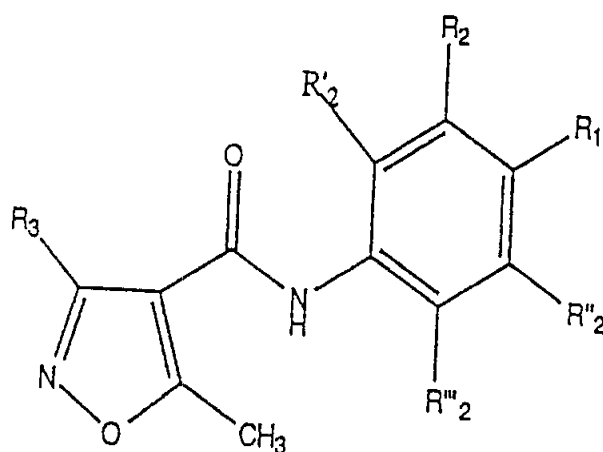
Flt-1 底物磷酸化, (3) 应接分子的活化, 和 (4) 细胞分裂增加。

II. 特征化合物

1-11 组化合物如图 2 a-k 所示。

A. 第 1 组化合物

第 1 组化合物的基本结构如下



其中 R_1 、 R_2 、 $R'2$ 、 $R''2$ 和 $R'''2$ 独立地选自由氢、卤素、三卤甲基和硝基组成的基团, 优选的 R_1 和 R_2 独立地为 CF_3 、 NO_2 或氢, 及 $R'2$ 、 $R''2$ 和 $R'''2$ 为氢; 及

R_3 选自由羧基、烷氧基或烷酯基组成的基团。优选选自氢、羧基或甲基。

第 1 组化合物的实例列于表 I 中, 并如图 1a 所示。

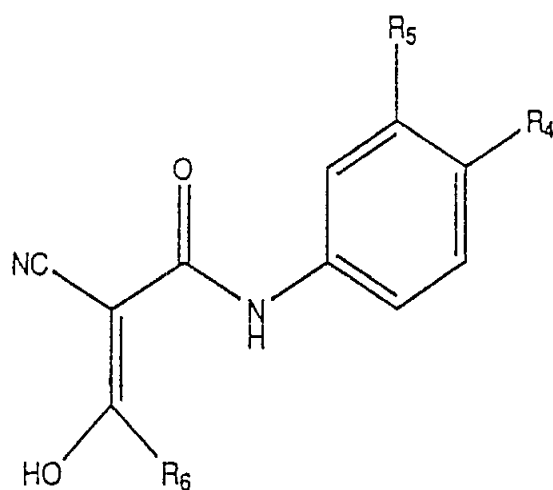
表 I

化合物	R ₁	R ₂	R ₃
A10	CF ₃	H	H
A11	H	CF ₃	H
A12	CF ₃	H	羧基
A13	CF ₃	H	CH ₃

这些化合物被认为是前药,并在体内开环产生活性代谢物。

B. 第 2 组化合物

第 2 组化合物的基本结构如下:



其中 R₄ 和 R₅ 独立地表示卤素、氢、三卤甲基或硝基;优选的 R₄ 表示 CF₃ 和 R₅ 表示 H; R₆ 为芳基、烷基、烯基或为炔基;

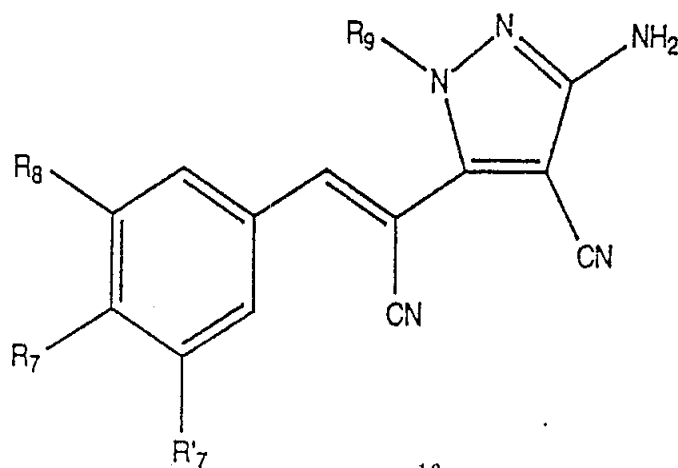
R_6 表示烷基或表 II 中所列化合物的取代基之一。第 2 组化合物的实例列于表 II 中并如图 1b 所示。

表 II

化合物	R_4	R_5	R_6
B10	NO_2	H	CH_3
B11	CF_3	H	CH_3
B12	CF_3	H	4-氟苯基
B13	CF_3	H	环己基
B14	CF_3	H	2,2,3,3-四甲基环丙基
B15	CF_3	H	五氟苯基
B16	CF_3	H	3-苯氧基-苯基
B17	CF_3	H	苄基
B18	CF_3	H	2-甲基丙基
B19	CF_3	H	二苯基甲基

C. 第 3 组化合物

第 3 组化合物的结构如下：



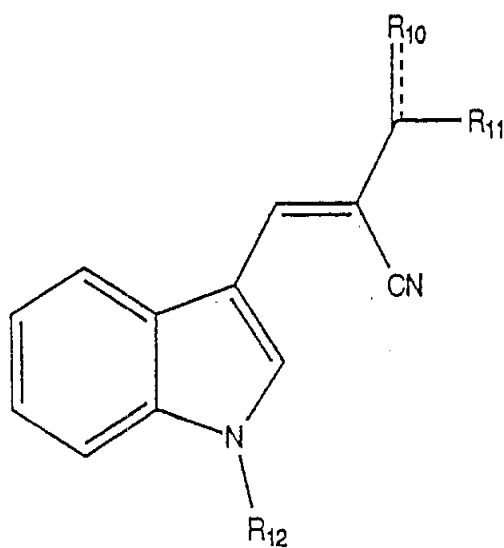
其中 R_7 、 R'_7 和 R_8 独立地表示卤素、OH、氢、烷氧基、SH、 NH_2 或 $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ，优选的 R'_7 、 R_7 和 R_8 独立地选自 H、OH 和 $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ；更优选的， R_7 和 R_8 表示 OH； R_9 表示芳基或氢原子，优选的表示氢原子或苯基。第 3 组化合物的实例列于表 III 中并如图 1c 所示。

表 III

化合物	R'_7	R_7	R_8	R_9
C10	H	OH	OH	苯基
C11	H	OH	OH	H
C13	$\text{C}(\text{CH}_3)_3$	OH	$\text{C}(\text{CH}_3)_3$	H

D. 第 4 组化合物

第 4 组化合物的化学结构如下：



其中 R_{10} 表示 $=S$ 、 $=O$ 、 SH 、 OH 或 NH_2 ; 及

R_{11} 表示 SH 、 OH 、 NH_2 、 $=C(CN)_2$ 或芳基, 优选表示 NH_2 、 $=C(CN)_2$ 或二羧基苯基; 或 R_{10} 和 R_{11} 一起表示芳基, 优选 3-氨基-4-氟基-5-吡唑或 1-苯基-3-氨基-4-氟基-5-吡唑; 以及 R_{12} 表示氢、芳基、烷基、烯基或炔基, 优选表示氢- $(CH_2)_2CN$ 或 $-(CH_2)_2N(CH_3)_2$ 。

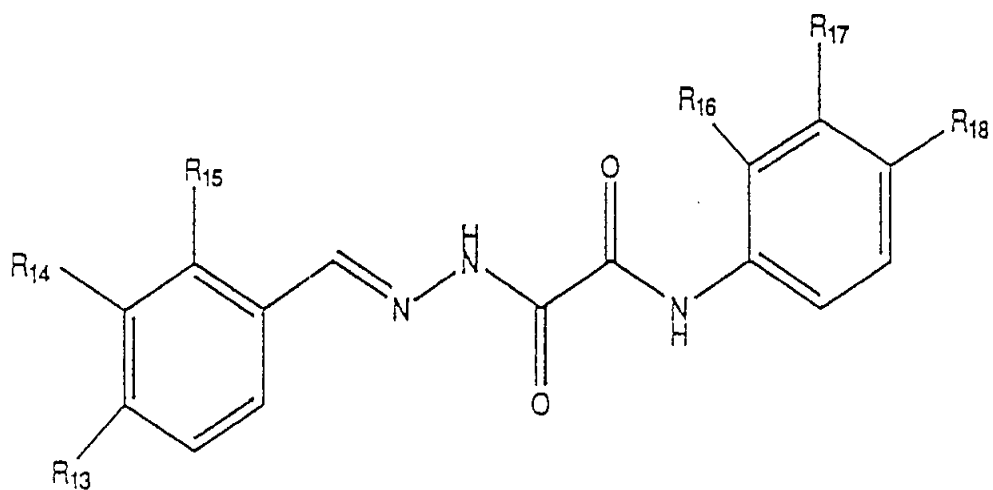
第 4 组化合物的实例列于表 IV 中并如图 1d 所示。

表 IV

化合物	R_{10}	R_{11}	R_{12}
D11	$=S$	NH_2	H
D12	NH_2	$=C(CN)_2$	H
D13	$=O$	NH_2	H
D14	3-氨基-4-氟基-5-吡唑基		H
D15	3-氨基-4-氟基-5-吡唑基		$-(CH_2)_2N(CH_3)_2$
D16	$=O$	3,4-二羟基苯基	$-(CH_2)_2N(CH_3)_2$
D17	$=O$	3,4-二羟基苯基	$-(CH_2)_2CN$
D18	3-氨基-4-氟基-5-吡唑基		$-(CH_2)_2N(CH_3)_2$
D20	1-苯基-3-氨基-4-氟基-5-吡唑基		H

E. 第 5 组化合物

第 5 组化合物的化学结构如下:



其中 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 、 R_{16} 、 R_{17} 和 R_{18} 独立地表示氢、卤素、烷基、氧基、OH、氨基、烷基氨基或 SH；优选的表示氢原子或 OH。

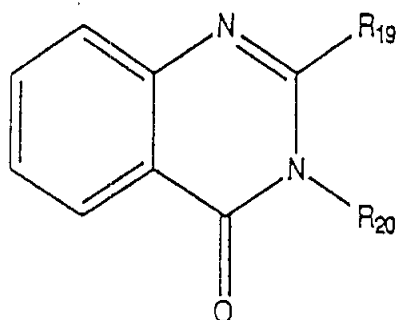
第 5 组化合物的实例列于表 1 中并如图 1e 所示。

表 V

化合物	R_{13}	R_{14}	R_{15}	R_{16}	R_{17}	R_{18}
E10	OH	OH	H	H	H	$N(CH_3)_2$
E11	OH	OH	H	H	OH	H
E12	H	H	OH	H	OH	H
E13	OH	OH	H	OCH_3	H	H
E14	OH	OH	H	OC_2H_5	H	H
E15	OH	OH	H	H	NO_2	H
E16	OH	H	H	H	ON_2	H

F. 第 6 组化合物

第 6 组化合物的化学结构如下：



其中 R_{19} 表示芳基、烷基、链烯基或炔基, 优选表示 2-(3,4-二羧基苯基) 乙烯基; R_{20} 表示烷基, 优选表示羟乙基 (ethylenhydroxy); 或 R_{19} 和 R_{20} 一起表示芳基, 优选表示具有 $=CH-$ (单或双羧基-苯基) 取代基的咪啉环。

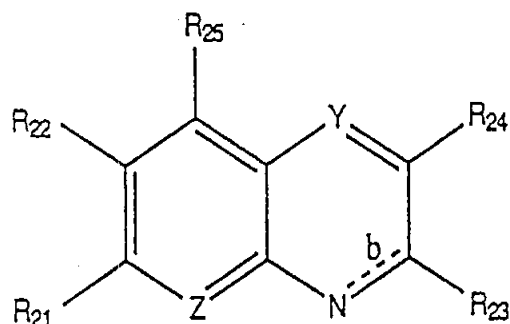
第 6 组化合物的实例列于表 VI 中并如图 1f 所示。

表 VI

化合物	R_{19}	R_{20}
F10	$(CH_2)_2OH$	$CH=CH-3,3-$ 二羟基苯基
F11	2-C=CH-(3,4-二羟基苯基)咪啉代	
F12	2-C=CH-(3-羟基苯基)咪啉代	

G. 第 7 组化合物

第 7 组化合物的化学结构如下：



其中 b 表示任意的 pi 键,

Y 和 Z 独立地表示碳或氮;

R_{21} 和 R_{22} 独立地表示氢、卤素、OH、SH、 NH_2 、 NO_2 、烷基、烯基、炔基、烷氧基、苯甲酰基、COOH、戊烷酯基, 优选表示 OH、 NO_2 、 CH_3 、甲氧基、苯甲酰基或 COOH; 或 R_{21} 和 R_{22} 一起形成芳环表示芳基, 优选表示苯基;

R_{23} 表示氢、卤素、=O、OH、SH、 NH_2 、烷氧基、COOH、芳基, 优选表示取代或未取代的苯胺基、取代或未取代的苯基、氢、COOH、=O、烷氧基或甲氧基, 条件是如果 R_{23} 表示 =O, b 表示一键。

R_{24} 表示 H 或芳基, 优选表示取代或未取代的苯胺基、苯基或 2-噻吩基; 以及

R_{25} 表示氢原子、卤素、=S 或 =O, 这里若 R_{25} 表示 =O 或 =S, 那么 b 为一键; 条件是如果 b 不为一键, 在相邻氮原子上可任意地带有选自氢、烷基、亚烷基氨基、亚烷基氨基烷

基和亚烷基氨基的取代基。

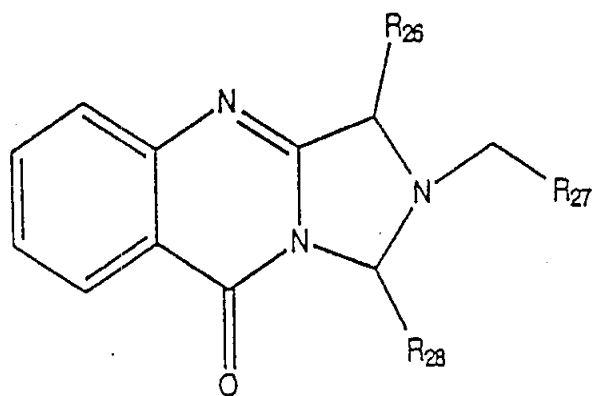
第 7 组化合物的实例列于表 V II 中并如图 1g 所示。

表 VII

化合物	b	Y	Z	R ₂₁	R ₂₂	R ₂₃	R ₂₄	R ₂₅
G10	键	N	C	H	H	H	苯基	H
G11	键	C	C	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	苯基	Cl
G12	键	C	C	OCH ₃	OCH ₃	H	苯基	Cl
G13	键	N	C	CH ₃	CH ₃	H	苯基	H
G14	键	N	C	OCH ₃	OCH ₃	H	苯基	H
G15	键	N	C	H	H	H	2- 噻吩基	H
G16	键	N	N	H	H	H	苯基	H
G17	键	N	C	OH	OCH ₃	H	苯基	H
G18	无价键	N	C	CH ₃	CH ₃	=O	苯基	H
G19	键	N	C	H	CH ₃	H	苯基	H
G20	键	N	C	OH	OH	H	苯基	H
G21	键	N	C	H	苯甲酰基	H	苯基	H
G22	键	N	C	苯基		H	苯基	H
G23	键	N	C	H	NO ₂	H	苯基	H
G24	键	N	C	CH ₃	CH ₃	3,4-二 羟基苯基	苯基	H
G25	键	N	C	CH ₃	CH ₃	COOH	苯基	H
G27	键	N	C	CH ₃	CH ₃	H	NO ₂	H
G28	键	N	C	CH ₃	CH ₃	H	3-溴 苯基氨基	H
G29	键	N	C	CH ₃	CH ₃	3-碘 苯基氨基	H	N
G30	键	N	C	CH ₃	CH ₃	4-碘代 苯基氨基	H	H

H. 第 8 组化合物

第 8 组化合物的化学结构如下：



其中 R_{26} 和 R_{28} 独立地表示烷基、芳基、烯基或炔基；及 R_{27} 表示芳基。

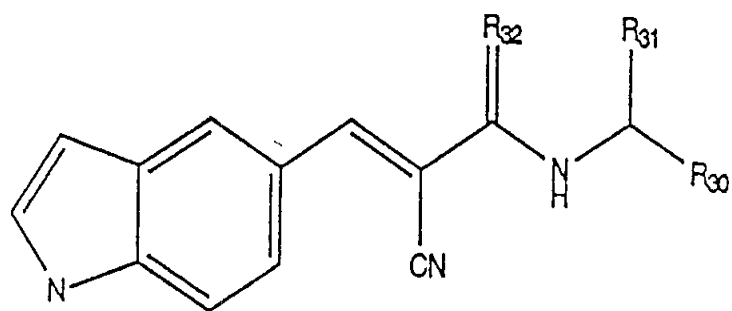
第 8 组化合物实例列于表 VIII 中并如图 1h 所示。

表 VIII

化合物	R_{26}	R_{27}	R_{28}
H10	CH_3	苄基	3,4—二羟基苯基
H11	CH_3	苄基	2—羟基苯基
H12	CH_3	苄基	3—羟基苯基
H13	CH_3	苄基	4—羟基苯基
H14	CH_3	苄基	3,4,5—三羟基苯基

I. 第 9 组化合物

第 9 组化合物的化学结构如下：



其中 R_{30} 表示烷基、烯基或炔基, 优选表示 CH_3 ;

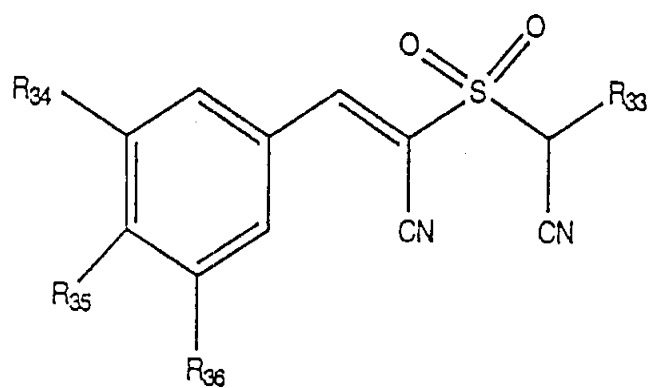
R_{31} 表示芳基, 优选苯基; 及

R_{32} 表示 O 或 S。

第 8 组化合物的一个实例即 I10, 如图 1i 所示。

J. 第 10 组化合物

第 10 组化合物的化学结构如下:



其中 R_{33} 表示烷基或芳基;

R_{34} 、 R_{35} 和 R_{36} 独立地表示卤素、OH、氢、烷氧基、SH、 NH_2 或 $C(CH_3)_3$, 优选的 R_{34} 、 R_{35} 和 R_{36} 独立地选自 H、OH 和 $C(CH_3)_3$ 。

第 10 组化合物的实例为 J10 和 J11, 如图 1j 所示。

K. 第 11 组化合物。

第 11 组化合物的实例如图 1k 所示。第 10 组化合物通过“P.”识别。

L. 化学命名原则

本申请提及的一些化学基团的定义如下所述。

“烷基”是指饱和的脂族烃, 包括直链、支链和环烷基。优选的烷基含 1—12 个碳原子, 更优选的含 3—9 个碳原子。烷基可被取代或不被取代。当被取代时, 取代基优选的为羧基、氰基、烷氧基、 $=O$ 、 $=S$ 、 NO_2 或 $N(CH_3)_2$ 、氨基、SH 或芳基。

“烯基”是指含至少一个碳—碳双键的不饱和烃基, 包括直链、支链或环状基团。优选的烯基含 1—12 个碳原子, 更优选的含 3—9 个碳原子。烯基可被取代或不被取代。当被取代时, 取代基优选的为羧基、氰基、烷氧基、 $=O$ 、 $=S$ 、 NO_2 或 $N(CH_3)_2$ 、氨基、SH 或芳基。

“炔基”是指含至少一个碳—碳三键的不饱和烃基, 包括直链、支链或环状炔基。优选的炔基含 1—12 个碳原子, 更优选的含 3—9 个碳原子。炔基可被取代或不被取代。当被取代时, 取代基优选的为羧基、氰基、烷氧基、 $=O$ 、 $=S$ 、 NO_2 或 $N(CH_3)_2$ 、氨基、SH 或芳基。

“烷氧基”是指“—O—烷基”基团,其中“烷基”的定义如前所述。

“芳基”是指具有至少一个共轭 π 电子体系环的芳基,包括碳芳基、杂环芳基和双环基团,所有基团都可被任意取代。芳基的优选取代基为羧基、氰基、烷氧基、烷基、烯基、炔基、氨基和芳基。

碳环芳基是指芳环的环原子是碳原子的基团,碳原子可被任意取代。碳环芳基包括单环碳环芳基以及被任意取代的萘基。

杂环芳基是指在芳环中有 1—3 个杂原子作为环原子而其它环原子是碳原子的基团。合适的杂原子包括氧、硫和氮,并且包括呋喃基、噻吩基、吡啶基、吡咯基、N—低级烷基吡咯基、嘧啶基、吡嗪基、咪唑基等,均可被任意地取代。

“烷酯基”是指 COOX 基团,其中 X 表示低级烷基。

术语“低级”在这里分别与有机基团或化合物相关的是指至多 7 个且包括 7 个碳原子,优选是指至多 4 个且包括 4 个碳原子,更优选的是指一或二个碳原子。这样的基团可为直链或支链的。

II 细胞增生疾病

我们设计了上述组合物和方法通过抑制 PDGF—R 活性抑制细胞增生疾病。如上所述,细胞增生疾病在多细胞有机体中引起一或多个细胞亚组的不良细胞增生,并对有机体产生伤害。不良 PDGF 活性可刺激细胞增生疾病。不良的 PDGF 或 PDGF—R 活性可以两种方式刺激特定类型细胞

的不良细胞增生,即通过直接刺激特定区域的血管化,这样的细胞包括例如肿瘤组织,并因此有利于组织的生长。

应用本发明最好首先鉴别细胞增生疾病是否是由 PDGF-R 引起的。一旦发现这种疾病,利用医生们熟知的手段通过对症状的分析可以确定这种疾病的患者。这样的患者可采用上述的方法治疗。

要确定细胞增生疾病是否由 PDGF-R 引起首先要确定细胞内或身体特定部分的 PDGF-R 活性水平。例如,在有癌细胞情况下,使一或多种 PDGF-R 活性的水平与非 PDGF-R 引起癌症的情况(例如下述 A431 细胞)和 PDGF-R 引起癌症的情况(例如下述的恶性胶质瘤细胞)相比较。如果相对于非 PDGF-R 引起癌症的情况而言,癌细胞具有较高 PDGF-R 活性水平,优选是等于或高于 PDGF-R 引起癌症的情况,那么对它们可采用所述 PDGF-R 抑制剂治疗。

在非癌细胞的不良增生引起的细胞增生疾病的情况下,使其 PDGF-R 活性水平与普通人群的活性水平相比较(例如除去患细胞增生疾病的人或动物的普通人或动物的平均水平)。如果不良细胞增生疾病的特征在于比普通人群具有更高的 PDGF-R 水平,那么该疾病可采用所述 PDGF-R 抑制剂治疗。

细胞增生疾病包括癌症、血管增生疾病和纤维变性疾病。这些疾病并不一定是独立的。例如,纤维变性疾病可能与血管疾病有关,甚至与血管疾病叠加。例如动脉粥样硬化

(这里是以血管疾病为特征的)可引起纤维组织的异常生长。

癌细胞指各种恶性肿瘤,其中绝大多数侵犯周围组织,并向不同部位转移,这正如 Stedman's Medical Dictionary 25th edition(Hensyl ed. 1990)所述。可采用本发明治疗的癌症的实例包括轴内脑瘤、卵巢癌、结肠癌、前列腺癌、肺癌、卡波济氏肉瘤和皮肤癌,它们都具有不良 PDGF-R 活性。癌症的类型可被进一步特征化。例如轴内脑瘤包括多形性恶性胶质瘤、退行发育的星形细胞瘤、星形细胞瘤、室管膜瘤、间胶质瘤、成神经管细胞瘤、脑脊膜瘤、成血管细胞瘤和松果体薄壁组织。

血管的形成和分布、或血管产生和血管生成分别在各种生理过程如胚胎发育中起重要的作用,并可治愈器官退化。这也在肿瘤的生长过程中起作用。血管增生疾病是指常常可引起血管异常增生的血管产生和血管发生疾病。这样的疾病的实例包括再狭窄、视网膜病和动脉粥样硬化。

进一步的动脉粥样硬化损伤是由于对血管壁内皮细胞和平滑肌细胞损伤过分的发炎—增生反应引起的。(Ross R., Nature 362:801—809(1993))。看起来,部分反应是由 PDGF-BB 分泌和内皮细胞和平滑肌细胞中的 PDGF-R 的活化调节的。细胞转移和细胞增生二者都在动脉粥样硬化损伤的形成中起作用。

纤维变性疾病是指细胞外基质的异常生成。纤维变性疾病的实例包括肝硬变和肾小球膜的细胞增生。

肝细胞是以细胞外基质组分的增加为特征的并引起肝

伤疤的生成。肝硬变可引起疾病如肝硬化。可产生肝伤疤的细胞外基质的增加也可由于病毒感染产生如肝炎。脂细胞似乎在肝硬变中起了主要的作用。不良的PDGF-R活性可刺激脂细胞增生。

肾小球膜细胞增生疾病是指由肾小球膜细胞的异常增生引起的疾病。肾小球膜增生疾病包括各种人体肾病,如肾小球性肾炎、糖尿病肾病、恶性肾硬化、血栓形成的微血管病综合症、移植排斥和肾小球病。PDGF与肾小球膜细胞增生的维持有关。(Floege, J. et al., *Kidney International* 43S:47-54(1993).)。

如上所述,其它这样的增生疾病可通过标准技术和通过确定所述化合物作用的效率而确认。

A. 卵巢癌

本发明的一个方面涉及卵巢癌的治疗。内皮卵巢癌大约占有卵巢癌的90%并继续发展成极致命的恶性肿瘤。在美国每年大约新诊断出19,000例卵巢癌,其中12,000名妇女死于癌症(Bodriguez et al., in Devita, Hellman, Roseu-berg (eds) *Biologic Therapy of Cancer*, JB Lippincott, 1991)。

对进一步恶化的卵巢癌的治疗通常包括细胞还原术,随后化疗和烷基化剂结合使用。烷基化剂例如顺氯氨铂和环磷酰胺。然而,恶化的卵巢癌患者的长期存活率是极低的,在10%-20%范围内,这主要是由于在整个腹腔内,以及某些

情况下,在淋巴结内的肿瘤转移的高发生率。而且,采用化疗和顺氯氨铂可带来潜在的肾脏毒性和进行性神经病。

本发明揭示了 PDGF 受体表达和内皮卵巢癌之间的病理关系,并且提供了抑制内皮卵巢癌细胞的不良 PDGF—R 活性以抑制增生疾病的组合物和方法。治疗卵巢癌的方法,包括向卵巢癌细胞、支持基质细胞(即肿瘤或转移的损伤生长的骨架),和/或有关的血管内皮细胞中给药可抑制不良 PDGF—R 活性的组合物。

对采用所述化合物的治疗敏感的卵巢癌包括内皮卵巢癌、卵巢肿瘤转移以及其它表达 PDGF 受体的卵巢细胞。如下所述,可抑制 PDGF—R 活性的组合物也可抑制体内卵巢癌细胞的增生和抑制体内卵巢肿瘤的生长。更具体地说,采用本发明的一个组合物 A10 几乎可以完全抑制用人体卵巢癌细胞异移植的小鼠肿瘤的生长,而没有明显的细胞毒性和死亡率,从而具有优异的治疗效果。

因此,作为本发明方法的一个实例,A10 是通过任何常规的给药途径和采用任何可使 A10 与 PDGF 受体—阳性(receptor—positive)卵巢癌细胞和/或周围基质细胞接触的合适的药物载体,向被确诊为卵巢癌的患者给药的。在卵巢癌在腹腔内定点扩散的情况下,特别是恶化的情形下,优选的给药方式就是通过静脉或腹腔内注射 A10 的无毒药物制剂。

对于治疗卵巢癌治疗有效的组合物的制备和应用详述如下并通过实施例说明。除了在此特别公开的组合物之外,

本发明还提供了对其它组合物的识别,这些组合物由于具有对 PDGF-R 活性的抑制作用而可被用于抑制卵巢新生物的增生。采用任何适当的试验,如体外自动磷酸化抑制 ELISA 和酪氨酸激酶抑制试验,通过它们抑制 PDGF 受体自体磷酸化的能力选择组合物。选定的组合物通过测试其抑制卵巢癌细胞生长的能力,以及理想情况下,通过测试其对体内异种移植肿瘤的抑制,评估治疗效率。下面实例中所述的方法或类似的方法可在这样的试验中采用。

B. 神经胶质瘤

本发明另一方面涉及神经胶质瘤家族中原发轴内脑瘤的治疗,包括但不局限于星形细胞瘤和恶性胶质瘤。在成人中,多形性恶性胶质瘤是源于星形细胞瘤的最常见和最恶性的肿瘤,并在所有原发性脑瘤中占了大半(参见,例如 Cecil Textbook of Medicine, Wyngaarden, Smith, Bennett (eds) WB Saunders, 1993, p. 2220)。

神经胶质瘤具有直接进攻进入脑组织的一般性质,它基本上是恶性的并总是致命的。即使逐步采用手术、化疗和放疗结合治疗,恶性胶质瘤患者也只具有少于 1 年的中等存活期。不幸的是,鉴于确定神经胶质瘤在正常脑组织中微观界限的困难和不可能性,成功的手术切除是极罕见的。类似的,用烷基化剂化疗也很少成功,少于 10% 神经胶质瘤患者有明显反应。放疗在控制神经胶质瘤生长方面有一定作用,但常常引起很大的神经损伤。用干扰素- β 与放疗和化疗结合

使用有一些成功(Devita, Hellman, Rosenberg (eds) *Biologic Therapy of Cancer*, JB Lippincott, 1991)。

本发明揭示了 PDGF 受体表达和神经胶质瘤之间的病理关系,并且提供了抑制神经胶质瘤细胞内 PDGF 活性以抑制增生疾病的组合物和方法。治疗神经胶质瘤的方法包括给药在神经胶质瘤细胞和/或近血管内皮细胞中表达的抑制 PDGF-R 活性的组合物。特别的,这里特别公开的绝大多数组合物在体外抑制人体神经胶质瘤方面具有很高的活性。一些这样的组合物可抑制培养的神经胶质瘤移出培养物的生长。而且,A10 强烈抑制向小鼠中异移植的神经胶质瘤的生长。在一些动物中,相对于未接受治疗的对照组而言对肿瘤生长抑制超过 95%。

因此,作为本申请方法的一个实例,可通过任何给药途径和采用任何合适的可使 A10 与 PDGF 受体-阳性神经胶质瘤细胞和近血管内皮细胞(它常常使神经胶质瘤大规模增生)接触的药物载体,向神经胶质瘤患者给药 A10。静脉和动脉注射是优选的给药途径。而且,最近发展起来的微导管技术对于将本发明组合物直接运送到神经胶质瘤所在位置是特别有效的,因此可以实现与癌和近内皮细胞的立即的定点的接触,从而有可能减低与更远程脉内运送有关的潜在的毒性。

对于治疗神经胶质瘤治疗有效的组合物的制备和应用详述如下并通过实施例说明。除了在此特别公开的组合物外,本发明还提供了对其它组合物的识别,这些组合物由于

具有对 PDGF 受体活性的抑制作用而可被用于抑制各种轴内肿瘤的增生。采用任何适当的试验,如体外自体磷酸化抑制 ELISA 和酪氨酸激酶抑制试验。通过其抑制 PDGF 受体活性的能力选择组合物。通过测试其对神经胶质瘤的抑制,以及理想情况下,通过测试其对体内异种移植肿瘤的抑制,来评估选定组合物的治疗效率。

III. A10

本发明描述几种可用于抑制 PDGF-R 活性因而抑制细胞增生疾病的组合物。尽管几种药理考虑被预料会妨碍组合物发挥其效力,用 A10 在动物中抑制肿瘤生长证明这些组合物在体内发挥了功能。这类体内抑制在后面所述的实施例中举例说明。

A10 也已知为 leflunomide, HWA486, 和 5-甲基异恶唑-4-羧酸-(4-三氟甲基)苯胺化物。几种公开物曾讨论过 A10 不同的可能用途。根据 Kommerer F-J 等人 US-4284786 (1981) 和 Kommerer F-J 等人 US-4351841 (1982) 的摘要, A10 “具有抗风湿, 消炎, 退热和止痛作用, 并可用于治疗多发性硬化。” 根据 Talmadge J. E., 和 Twar-dzik D. R. Agent and Actions 35S: 135-141 (1991)。“leflunomide 活性的机理可能是抑制细胞活素特别是磷酸根转移酶的假设被提出。” 与 5-甲基异恶唑-4-羧酸有关的 Robertson S. M. 和 Lang L. S., EP-0413329A2 (1991 公开) 围绕 leflunomide 宣称:

本发明指通过用 5-甲基异恶唑-4-羧酸苯胺化物和羧基亚烷基氰基乙酸苯胺衍生物治疗与免疫病原学有关的眼病的方法。另外,化合物可用于治疗与免疫病原学有关的全身病相关联的视觉现象。化合物显示免疫抑制,抗炎,和中等抗过敏活性,并可用于治疗眼病如眼色素层炎(包括类风湿性小结)、视网膜炎,过敏(春季角膜结膜炎和过敏性或巨型乳头结膜炎)和干眼(Sjogren 综合症)。另外,化合物对角膜或其它眼组织的移植存活有用,并可作为异位或免疫减少患者的外科附属物。

Barlett R. R 等人,标题为“异恶唑-4-甲酰胺和羧基亚烷基-氰基乙酰胺,含有这些化合物的药物的用途”的 PCT/EP90/01800 的摘要宣称:

异恶唑-4-甲酰胺衍生物和羧基亚烷基氰基乙酰胺衍生物适宜于治疗癌症。这些化合物可通过现有技术方法制备。另外,它们中有些是新的并适于治疗风湿病。

Barlett R. R. 等人,Agents and Actions 32:10-21 (1991),宣称:leflunomide 已显示对预防和治愈几种自身免疫动物疾病特别有效。Barlett 也宣称:可以显示 RR-SRC 肽底物的酪氨酸化和表皮生长因子(EGF)受体的自身磷酸化,依赖于剂量,被 leflunomide 抑制。

Matter 等人,FEBS 334:161-164(1993 年 11 月)(不认为是现有技术)描述了使用 leflunomide 的活性代谢物来抑制 EGF-依赖的细胞生长,包括 A431 细胞。Matter 也宣称:

血小板一衍生的生长因子一依赖的酪氨酸磷酸化也在未受损细胞中以类似于附图 3(数据未示出)所述的 EGF—依赖的磷酸化浓度被 A771726 抑制。

研究本发明的一种组合物, A10, 通过后面实施例更充分地描述, 确定了其抗以不良的 PDGF—R 活性而不是 EGF 活性为特征的脑、肺、前列腺, 卵巢, 皮肤, 和结肠癌细胞的效力。如后面所述实施例说明的, A10 抑制 PDGF—R 活性, 但对 EGF—受体或 HER2 磷酸化几乎没有作用。此外, 当 A10 抑制 PDGF—R 活性为特征的肿瘤生长时, A10 并不明显地抑制表达 EGF 受体的异物移植细胞的生长(A431 表皮样细胞)。这一数据以由 Bartlett 等人, 前述 Agents and Actions 所述结果的观点是令人惊奇的, 文献中 leflunomide 被显示抑制 EGF 诱导的 EGF 受体自身磷酸化和细胞增生, 和前面 Matter 等人的结果, 其中 leflunomide 的活性代谢物抑制 A431 细胞的生长。

本申请证实了 A10 抑制不适宜的 PDGF—R 活性和不良的体内细胞增生能力, 如发生在以不良的 PDGF—R 活性为特征的癌中的。如后面所述实施例举例说明的, A10 可用于选择性地抑制不良的 PDGF—R 活性。

如果其抑制受体磷酸化的能力(例如如后所述的 IC_{50}) 低于其细胞毒性作用(例如, 如后所述的 LD_{50}), 则化合物被判定为有磷酸化效果。不同受体如 PDGF—R, EGF—R 或 HER—2 受体的磷酸化的抑制依赖于诸如药物浓度的条件。“选择性抑制”意指化合物可在特定的浓度用于抑制 PDGF

-R 的磷酸化,且在同样浓度如果对 EGF-R 和/或 HER-2 受体的磷酸化有任何作用,也是很小的。

优选的,象 A10 这样的化合物可抑制 PDGF-R,同时,如果对 EGF-R 和/或 HER-2 磷酸有任何作用也很小。对 EGF-R,或 HER-2 活性“如果有任何作用也很小”意指受体活性对一特定受体效果不大于 35%,更优选地不大于 20%,最优选地不大于 10%。

酪氨酸激酶对许多生物过程包括细胞生长,变异,聚集,趋化性,细胞活素释放,和肌肉收缩等很重要。很多这类事件是通过不同的酪氨酸激酶受体介导的。另外,不同的酪氨酸激酶受体对不同细胞类型的特定生物功能是重要的。通过发展 PDGF-R 的选择性抑制剂,化合物可能的毒性作用被降低。

这里所描述的化合物在它们选择性地抑制 PDGF-R 方面是变化的。例如,D14,G12,G13 和 G14 抑制 PDGF-R 磷酸化但对 EGF 或 Her-2 磷酸化没有效果,而 C10 对 EGFR,PDGF-R,和 Her-2 磷酸化起作用。

IV. 变异的 PDGF-R

以不良的 PDGF-R 活性为特征的细胞增生疾病也可用变异的 PDGF-R 抑制。Ueno H., 等人,Science 252:844-252(1991),描述了核酸编码截短的 PDGF-R 体内抑制 PDGF-R 磷酸化。根据 Ueno:

当截短的受体与野生型受体相比过表达时,被 PDGF

受体自身磷酸化刺激,将磷脂酰肌醇-3 激酶与受体关联,钙流动被阻断。

Ueno 没有由变异的蛋白质可抑制不良的细胞增生证明 PDGF-R 活性的抑制。

这类体内的不良的细胞增生抑制在后面所述的实施例中说明,用核酸编码 PDGF-R,刚好在第一个酪氨酸激酶区域结构有一个终止密码子。核酸被用于将截短的蛋白质引入细胞。例如,编码一个截短的 PDGF-R 的核酸被用标准重组 DNA 技术放入逆病毒载体中。该载体然后侵染一个细胞,在其中其核酸最终转译入蛋白质产生一个截短的 PDGF-R。其它将变异的蛋白质引入细胞的手段包括在体外制备变异的蛋白质并用载体如脂质体将蛋白质引入细胞内。

突变体 PDGF-R 将被建造以干扰发生在二聚的受体间的分子间磷酸化。这一点可通过各种手段实现,例如 1) PDGF-R 的截短,优选地消除一个酪氨酸激酶区域结构,最优选地消除所有两个酪氨酸激酶区域结构;2)抑制 PDGF-R 催化区域催化能力的变异作用,如赖氨酸 602 变异为精氨酸防止 ATP 的联接。这些方法中,酪氨酸残基的变异是优选的,而受体的截短是最优选的。

用核酸编码截短的 PDGF-R 以抑制动物的肿瘤生长证明了这类截短的受体在体内发挥功能的能力,尽管各种药理考虑被预料会妨碍组合物发挥其功效。这样,本申请证明用核酸编码截短的 PDGF 受体并不限于在细胞培养中抑制 PDGF-R。更确切地,核酸编码 PDGF-R 可被用于在动物

细胞中抑制不良的 PDGF-R 活性、因而抑制动物细胞的肿瘤生长,并可应用于其它 PDGF-R 相关的疾病。

V. 特征化合物的给药

本发明化合物可以对病人单独给药,或以含有活性化合物的一种载体或赋形剂的药物组合物形式给药。化合物可被制成药学上可接受的盐(即,不妨碍化合物发挥作用的无毒盐)。

药学上可接受的盐可以是酸加成盐,如盐酸盐,硫酸盐,磷酸盐,氨基磺酸盐,乙酸盐,柠檬酸盐,乳酸盐,酒石酸盐,丙二酸盐,甲基磺酸盐,乙基磺酸盐,苯磺酸盐,对-甲苯磺酸盐,环己基氨基磺酸盐和奎尼酸盐。(参见,在前申请 PCT/US92/03736)。这些盐可以通过使用盐酸,硫酸,磷酸,氨基磺酸,乙酸,柠檬酸,乳酸,酒石酸,丙二酸,甲基磺酸,乙基磺酸,苯磺酸,对-甲苯磺酸,环己基氨基磺酸和奎尼酸衍生获得。

药学上可接受的盐可通过标准技术制备。例如先将游离碱形式的化合物溶于含有合适酸的水或水-醇溶液,然后蒸发溶液分离出盐。再例如,在有机溶剂中使游离碱和酸反应制备盐。

载体或赋形剂可以促进化合物的吸收,例如增加化合物的溶解性。载体和赋形剂的例子包括碳酸钙,磷酸钙,不同的糖或不同类型的淀粉,纤维素衍生物,明胶,植物油,聚乙二醇和生理上相容的溶剂。组合物或药物组合物可通过不同途径给药,包括,静脉内的,腹膜内的,皮下的,肌内的,口服,体

表给药或转化粘液质式给药。

许多特征化合物,如 A10 和 B11,是疏水性的,因此在水中不易溶。有效量的 A10 可通过使 A10 与 PBTE:D5W 结合获得。PBTE 由 3%W/V 苄醇,8%W/V 多乙氧基醚和含 65%W/V 聚乙二醇(MW=300 道尔顿)的绝对乙醇溶液组成。PBTE:D5W 由 PBTE 以 1:1 的 5%右旋糖水溶液稀释组成。A10 在 PBTE:D5W 中的溶解性为 5mg/ml。这里所描述的其它化合物的溶解性可通过标准技术获得。另外,活性药物本身(如 B11)可通过口服制剂给药。

其它的克服疏水性问题的方法包括以每天少量多次给药代替大量少次给药。例如,组合物以较短的时间间隔给药。最好使用一个泵控制间隔时间给药或连续给药。合适的泵商业可获得、(比如,AL2a 公司卖的 ALZET 泵,如 Bard MedSystems 卖的 BARD 非卧床 PCA 泵)

可选择的、也可使用前药增加溶解性。前药在生理条件下可降解成活性药物。例如,Patterson 等人,J. Med. Chem. 35:507—510(1992)描述 A12(3-羧酸-5-甲基-N-[4(三氟甲基)苯基]-4-异恶唑甲酰氨)与 A10 相似;可作为 B11 的前药。

合适的剂量取决于不同的因素,如所治疗疾病的类型,所用的特定的组合物,病人的大小和病人的生理条件。治疗癌症所期望的 A10 的每天的剂量为 1 到 2000mg/天,优选 1 到 250mg/天,特别优选 10 到 150mg/天。只要药物活性部分的血浆水平能达到足以维持治疗有效,给药不需太频繁。

影响药物用量的一个因素是体重。给药量范围应在 0.02~25mg/kg/天, 优选 0.02~15mg/kg/天, 特别优选 0.2~15mg/kg/天。另外, 给药量可按 0.5~1200mg/m²/天, 优选 0.5~150mg/m²/天。平均血浆水平应为 50~500mg/ml, 优选 50~100mg/ml, 特别优选 100 到 500mg/ml。如果在所关注的位点上达到了药物药理学上的有效浓度, 则血浆水平可能降低。

VI. 变异 PDGF-R 的给药

PDGF-R 突变体可使用如下所述的标准技术以核酸表达蛋白质的形式给药。传递赋形剂包括脂质体和其它药物组合物。核酸编码变异的 PDGF-R 同样可应用标准技术如逆转录和离子成对分子引入到细胞中。同样地此技术可应用于体外活细胞而应用于病人。使用如上所述的载体或赋形剂可促进蛋白质的给药。

所选药物的特定释放途径依赖于所使用的药剂(特征化化合物的给药也要考虑此点)。一般的, 药剂的特定释放方案主要考虑药剂摄取时细胞内的定位, 并接着进行药效证明。另外, 可继续进行动物实验, 将药物释放到动物的器官或组织的同样细胞内。摄取研究包括测定到评估, 例如, 不考虑传递赋形剂或方案, 细胞核酸或蛋白质的摄取。这种测定同时确定了药剂摄取后细胞定位, 最终确定了维持含有靶序列的细胞室内的稳态浓度所需的必要条件。(细胞核和/或细胞质)。然后测定效果和细胞毒性。毒性不仅包括细胞活性还包括细胞功能。一般地, 突变蛋白和核酸的用量如前述特征

化合物用量。

药物传递赋形剂对系统和局部给药同样有效。他们可被设计为缓慢释放的药物贮库,或将其内含物直接释放到靶细胞。使用直接释药赋形剂的优点在于每次摄取可释放许多分子。这种赋形剂能延长药物循环的半衰期,不使用赋形剂时它们将被血液很快清除。此范围内的特定释药赋形剂的一些实例有脂质体,水凝胶,环糊精,生物可降解的微囊,生物粘附微球。泵也可用于此目的。

此范围内的释放系统,优选脂质体,脂质体能增加分子内稳定性,增加有效摄取和生物活性。脂质体是空球形泡囊,它同脂类组成,这些脂类的排列与组成细胞膜的脂类排列相似。它们含有中间水空间可以容纳水溶性化合物。其大小范围在直径 0.05 到几微米。抗体可连接在脂质体上以定位于特定细胞。

PDGF-R 突变体和特征化合物的局部给药较为有利,因为它将浓度集中于具有最小系统吸收的给药点。这样简化了药剂在病变点的释放方法,也减小了毒理特征范围。而且,这种给药途径所用的药物剂量的其它给药途径所需的量小得多。有效的释放需要核酸进入细胞膜或细胞质,以不良的 PDGF-R 活性和表达蛋白质为特征。

药物还可系统给药。内吸吸收是指药物先累积在血流中然后再分布于全身。导致全身吸收的给药途径包括:静脉内的,皮下的,腹膜内的,鼻内的,鞘内的和眼的。每个给药途径都是将药暴露于易达到的病变组织。皮下给药药物经淋巴网

进入循环,集中于淋巴结。进入循环的比例显示为细胞重量或大小的函数。

VII. 实施例

下述实施例举例说明了本发明的不同方面,并更具体体现了本发明。这些例子不以任何方式限制所公开的发明。而且,所用论述方法是那些已公开了分子式的药物能通过常规方法很容易的证明他们具有所期望的活性。这样,能在本发明要求保护的化合物形式中筛选以决定那些具有最适合活性的化合物优先的用于动物或人。采用本发明的方法也可以对其它化合物进行筛选以决定他们的适用性。

用在下列实施例中的某些过程的描述在下列附录中被描述。在不同的过程中提及使用 A10,但是,非 A10 的化合物可通过代替 A10 作为试验化合物通过这些过程被测试。

附录 1

1. 细胞系

细胞系以 ATCC 购买除非另外指定。U1240 和 U1242 细胞从 Dr. Joseph Schlessinger (New York University) 获得, SF763 和 SF767 细胞从 Dr. Michael Berens (Barrow Neurological Institute) 获得。

SF767T, SF763T, U118T, 和 SKOV37 分别是 SF767, SF763, U118 和 SKOV3 细胞的亚型(sublines), 它们通过将亲代细胞 SC 植入 BALB/c, nu/nu 小鼠而衍生获得。显示相当的生长特征的肿瘤可在无菌平皿中被切除或很好地控制(minced)。向血浆中加入 2 到 5ml 适当的培养基, 肿瘤部

分被进一步机械挑开。所得悬浮液放入组织培养瓶,用附加有 100 单位/ml 青霉素 G 钠和 100 μ g/ml 链霉素硫酸盐 (Gibco, Grand Island, NY) 的适当培养基喂养。培养基每两到三天换一次,三到五代后,撤除附加的抗生素,将细胞保存在无抗生素的介质中。

使用逆转录病毒的载体设计 NIH3T3 小鼠成纤维细胞过度表达 (overexpressing) EGF 受体, FLK-1, IGF-1 受体或 PDGF-b 受体。在 MCF7 环境中,使用逆转录病毒构件体过度表达 HER2 基因得到 MCF7/HER2 细胞。

2. 细胞培养

所有细胞培养基,谷氨酰胺和胎牛血清除非另外指定均从 Gibco Life Technologies (Grand Island, NY) 购买。所有细胞都在 90~95% 空气和 5-10% CO₂ 的湿润气体环境和 37°C 条件下生长。所有细胞系按常规方法每周传代两次,并用 Mycotect 方法鉴定为支原体阴性。

C6 细胞保存在附加了 5% 胎牛血清 (FBS) 和 2mM 谷氨酰胺 (GLN) 的 Ham's F10。T98G 细胞在含有 10% FBS, 2mM GLN, 1mM 丙酮酸钠 (NaPyr) 和非-必需氨基酸 (NEAA) 的 MEM 中培养。SKOV3T 细胞在 DMEM, 10% FBS 和 2mM GLN 中培养。

NIH3T3 小鼠成纤维细胞被设定过度表达 FLK-EGF 受体并保存在含有 10% 小牛血清 (CS) 和 2mM GLN 的 DMEM 中。NIH3T3 被设定过度表达 IGF-1 或胰岛素受体并保存在含有 10% FBS 和 2mM GLN 的 DMEM 中。

HL60 细胞保存在含有 10%FBS 和 2mMGLN 的 RPMI1640 中。T47D 和 BT474 细胞保存在含有 10%FBS, GMS-G 和 2mMGLN 的 RPMI1640 中。

DU145 细胞在含有 10%FBS 和 2mMGLN 的 DMEMF12 中生长。A172, A431, U118MG 和 RAG 细胞在含有 10%FBS 和 2mMGLN 的 DMEM 中生长。L1210 细胞在含有 10%马血清和 2mMGLN 的 PMEM 中生长。C1300 细胞在含有 10%加热灭活的 FBS, 2mMGLN 和 50mM β -巯基乙醇的 DMEM 中生长。T98G, U138MG, U87MG, U373MG, U1240, U1242, Calu-3, Calu-6, SF767, SF767T, SF763, SF763T, SK-N-MC 和 SK-U-SH 细胞在含有 10%FBS, NEAA, 1mMNaPyr 和 2mMGLN 的 MEM 中生长。MDA MB 361 和 MDA MB 468 细胞在含有 10%FBS 和 2mMGLN 的 HAM's F12 中生长。ZAR75-30 细胞在含有 10%FBS, 2mMGLN 和 1mMNaPyr 的 RPMI1640 中生长。MCF7, MCF7/HER2, A375, BT549, 9L, C81-61, ZR75-1 和 K562 细胞在含有 10%FBS 和 2mMGLN 的 RPMI1640 中生长。Ovcar3 细胞在含有 20%FBS 和 2mMGLN 和 10mg/mL 胰岛素的 RPMI1640 中生长。D1B 和 T27A 细胞在含 10%加热灭活的 FBS, 2mMGLN 和 50mM β -巯基乙醇的 RPMI1640 中生长; 7TD1 细胞在附加 50 单位/ml 鼠 IL-6 重组体的同样培养基中生长。Colo 320DM, WEHI-164.13, 和 HBL100 细胞在含 10%加热灭活的 FBS 和 2mMGLN 的 RPMI1640 中生长。

SKBR3 细胞在含有 15%FBS 和 2mMGLN 的 McCoy's 5A 中生长。PA-1 细胞在含有 10%加热灭活的 FBS, 2mMGLN 和 NEAA 的 MEM 中生长。Neuro 2A 细胞在含有加热灭活的 FBS, 2mMGLN, NEAA, NaPyr 和 50mM β -巯基乙醇的 MEM 中生长。

附录 2

1. 受体磷酸化

通过使用 western 印迹和 ELISA 方法进行使用 A10 抑制受体酪氨酸激酶活性的研究。在 western 印迹实验中, 将细胞悬浮于 2mL 培养基中并涂布在 6-孔盘上。(每孔含细胞 500,000 个), 贴附过夜。用附加 1%FBS 的 2mLMCDB105(UCSF Cell Culture Facility)替换培养基。将板在 CO₂ 环境下, 37℃培养过夜。测试化合物对配体媒介的受体自动磷酸化的作用, 在配体刺激受体酪氨酸激酶活性之前将细胞在 A10 或 DMSO 中, 37℃条件下暴露 1 小时。与配体在室温保温 7 分钟后, 将板放在冰上, 用 1ml 冰冷却的 PBS 加上 1mM 原钒酸盐洗涤 3 次。将细胞用移液管移至含有 50mM (Tris) 缓血酸胺, PH7.4, 10%甘油, 1%NP-40, 2mMEDTA, 1mM 钒酸钠, 10mM 焦磷酸盐, 1mMPMSF, 10mg/ml 抑肽酶, 10mg/ml 亮肽素的 0.5ml 缓冲液中, 使细胞溶解。将每份 300 μ l 的细胞溶解物立即加入到 100 μ L 4 $\times$ LaemmLi 标准缓冲液(0.2mM 缓血酸胺, PH6.9, 20%甘油, 7%SDS, 5mMEDTA, 5% β -巯基乙醇)含有磷酸酶抑制剂, 2mMNa₃VO₄ 和 10mM 焦磷酸。样品沸

腾5分钟,在干燥冰—乙醇中冰冻,在 -80°C 保存。将蛋白质溶于 SDS—PAGE (Bio—Rad Miniprotean II),在含有 25mM Tris, PH8.3, 20% 甲醇, 0.2M 甘氨酸, 0.1% SDS 的缓冲液中, 120 伏特, 室温条件下, 用 1 小时将蛋白转移到硝化纤维素膜上。蛋白质到膜的转移是否完全用 1% 丽春红 (ponceau) S 在 5% 乙醇中染色 5 分钟测定。用几次蒸馏的水冲洗脱色后, 将膜在含有 5% 牛奶 Tris—缓冲盐水, 0.05% Tween20 的抑制缓冲液中浸泡过液。磷酸酪氨酸通过将膜和抗—磷酸酪氨酸抗血清保温(室温 1 小时)检测, 所用的抗血清在抑制缓冲液中以 1:3000 稀释。对于 C6 细胞, 细胞溶解物中所含有 PDGF—b 受体是通过应用 western 印迹试验使用 PDGF—b 受体的特异性抗体在双位置样品泳道中被证实。抗体通过使用 Amersham 的 ECL 试剂在 Fuji RX 底片上曝光显象。

对 ELISA 测定来说, 细胞在培养基中长到 80—90% 汇合后接种于含有 0.5% 血清的 96—孔组织培养板上, 每孔含细胞 25,000 到 30,000。在 0.5% 含血清培养基中保温过夜, 将细胞培养基换为无血清培养基, 并用试验化合物在 5% CO_2 , 37°C 保温条件下处理 2 小时。细胞用配体刺激 5—10 分钟, 接着用 HNTG (20mM Hepes, 15mM NaCl, 10% 甘油, 5mM EDTA, 5mM Na_3VO_4 , 0.2% Triton X—100, 2mM NaPyr) 溶解。细胞溶解物 (0.5mg/孔, 在 PBS 中) 转移到预先用受体特异性抗体包被的并用含 5% 牛奶的 TBST (50mM Tris—HCl, pH7.2, 150mM NaCl 和 0.1% Triton X

-100)在室温封闭30分钟的ELISA板上。细胞溶解物在室温保温1小时并振荡。板用TBST洗涤4次,与多克隆抗磷酸酪氨酸抗体在室温保温30分钟。用TBST漂洗4次除去过量的抗磷酸酪氨酸抗体。向ELISA板中加入山羊抗兔IgG抗体并在室温保存30分钟,用TBST漂洗四次以上。ABTS(100mμ 柠檬酸,250mMNa₂HPO₄和0.5mg/mL2,2'-偶氮-双(3-乙基苯噻唑啉-6-磺酸)加上H₂O₂(1.2mL30%H₂O₂加到10ml ABTs)加到ELISA板上使颜色改变。加入ABTS15到30分钟后以630nm为参照波长,测定410nm的吸光度。在ELISA测定中使用的细胞系有U1242(PDGF-b受体),HL-60细胞(GMCSF受体/JAK-2),或过度表达EGF受体,Flk-1,IGF-1受体或胰岛素受体的NIH3T3细胞。IC₅₀值通过比较药物在有无适合配体存在时对酪氨酸磷酸化的阻碍作用测定的。

2. DNA 合成

A10对PDGF-依赖的DNA合成的作用是通过将³H-胸腺嘧啶脱氧核苷插入细胞DNA测定的。测定物条件基本上在Pollack,等人,J. Neurosurg.,73:106-112,1990中描述,但有些改变。将对数生长期的T98G细胞移至96-孔盘中。每200μL含血清培养基中含20,000个细胞。经过过夜贴附期,用200μLMCDB105培养基洗涤单层细胞两次,将细胞在200μL无血清MCDB105培养基中培养24小时。孔中培养基只用新鲜培养基代替(MCDB105加5μg/ml胰岛素),培养基只含PDGF-BB,或培养基含有PDGF-BB

与不同浓度的 A10 的结合物。将板在 37℃, CO₂ 环境中保温约 18 小时, 向每孔中加入 ³H-胸腺嘧啶脱氧核苷(Amersham, 5Ci/mmol)使最终浓度达到 5μCi/mL, 将板放回到 37℃ 孵箱中, 4 小时后移去培养基, 将板放在冰上, 用冰一冷却的 PBs 将每孔洗涤两次。使用 100μL 冰冷却的 TCA 在冰上沉淀 10 分钟, 可将插入放射性的 DNA 从未插入 ³H-胸腺嘧啶脱氧核苷的 DNA 分离出来。用冰冷却的 TCA 洗涤两次, 将沉淀物溶解(含 1%SDS 的 100mL 10mM Tris 碱), 并转移到液体闪烁计数小瓶中。加入 6ml 合剂(Ready Safe, Beckman)在 Beckman LS6000SC 型液体闪烁计数器中定量测量放射性。

3. 细胞周期分析

将过度表达人 PDGF- β 受体的 NIH3T3 小鼠成纤维细胞接种于附加了 10%CS 和 2mMGLN 的 PMEN 上。细胞长到约 80%汇合后用无血清培养基(DMEM, 2mMGLN, 2mMNEAA, 2mMNaPyc 和 2mMHEPEs)处理过夜。将细胞与 100ng/mL PDGF-BB 和不同浓度的 A10(0.1, 1, 10, 25 或 100mM)一起保温 20 小时。收集细胞, 染色, 用流式细胞光度术分析 DNA 含量。

4. 生长测定

Skehan 等人在 J. Natl. Cancer Inst. 82:1107-1112, 1990 中描述了应用比色鉴定法测试 A10 对于不依赖锚基肿瘤细胞生长的抑制作用。使用平衡离子结合的硫氰酸胺 B (SRB, Sigma)染料测量酸固定(acid-fixed)细胞中蛋白质

含量。将 A10 溶解于 DMSO (Sigma, 细胞培养级), 并用适当的培养基稀释, 使浓度为最后所需最终试验浓度的两倍。在测定中使用 C₆ 细胞, 向含有粘接着单层细胞的 96 孔板中加入 A10 (100 μ L) (2000 细胞/孔在 100 μ L 中)。对于其它细胞系, 在药液调制好后立即将细胞 (2000 细胞/孔在 100 μ L 中) 引入到孔中。4 天后 (37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂), 单层细胞用 PBS 洗涤 3 次, 用 200 μ L 冰冷却的 10%TCA (Fisher Scientific) 固定, 在 4 $^{\circ}$ C 保存 60 分钟。移去 TCA, 固定的单层细胞用自来水洗涤 5 次, 在室温用吸水纸干燥, 用溶于 1%乙酸的 100 μ L 0.4% SRB 对细胞蛋白染色 10 分钟。用自来水洗涤 5 次, 将染料溶解于 10mM Tris 碱 (100 μ L 每孔), 应用 MR5000 型 Dynatech 板读数器在 570nm 读取吸光度。生长抑制数据是以只用 0.4%DMSO 处理的孔所测得的吸光度百分比表示的。PMSO 控制与细胞在正常培养基中生长没有区别, IC₅₀ 的值由对应函数的 4 参数曲线测定。

在不依赖于锚基肿瘤细胞生长鉴定中, 细胞 (3000 到 5000 每盘) 悬浮于 0.4%琼脂糖在鉴定培养基 (DMEM 含 10%FCS) 中有或无 A10 情况下放入 35mm 盘, 此盘用固化琼脂碱层包被过 (0.8%琼脂糖), 在 37 $^{\circ}$ C 保温 2—3 周, 用 Ommicon3800 肿瘤菌落叶计数器定量得到菌落大于 50 μ m。

附录 3

1. 肿瘤细胞系生长鉴定

对于大多数肿瘤细胞系, 如附录 2 中描述的使用 SRS 评定 A10 对细胞生长的抑制作用。对于 K562, D1B, L1210,

7TD1, T27A, 和 Colo320DM 细胞, 使用 MTT 测定法评估细胞生长。(Hansen 等人, J. Immunol. Methods, 119:203—210, 1989) 简单地说, 向 96 孔板的每孔加入 50 μ L 含有不同浓度 A10 的培养基和 50 μ L 细胞悬浮液(2,000 细胞)。将细胞在的 7%CO₂ 环境下, 37℃温育 4 天, 最后, 向每孔加入 15 μ L MTT (5mg/mL 在 PBS 中 Sigma) 将板在 37℃温育 4 小时, 再向每孔加入溶解性溶液(含 20%W/V 的 SDS 的 50% N,N-二甲基甲酰胺, PH4.7)。在一封闭容器内湿润环境下将板温育过夜。使用 ELISA 板读数器以 630nm 为参照波长, 测定波长为 570nm 的吸光度。

2. 原发性肿瘤生长测定

Oncotech, Inc. (Irvine, CA) 已经测定了 A10 对原发性肿瘤生长的作用。在相关机构做完外科手术立即由病理学家将活肿瘤装入培养基, 连夜运送到 Oncotech。一收到肿瘤立即将一部分在福尔马林中固定以便切片, 剩余部分切除坏死的, 结缔组织和脂肪组织。对肿瘤的所有处理均在无菌条件下操作。将剩余肿瘤放入含有 5mL 培养基(RPMI1640 附加了 10%FBS, 100Iu/mL 青霉素, 100mg/mL 链霉素和 L-谷氨酰胺)的 Petri 盘中, 使用剪刀机械解聚成 2mm 或更小的块。所得浆状物与含有 0.003%DNA 酶(DNase) (2650Kunitz units/mL) 和 0.14% I 型胶原酶(酶来自 Sigma Chemical co., st. Louis Mo) 的培养基混合, 放入 50mL 烧瓶中搅拌, 并在的 5%CO₂ 环境中 37℃温育 90 分钟。一部分细胞悬浮液用于 cytopsin 玻片的制备, 并经医学病理学

家使用苏木精和曙红染色后检测以确诊,并测定肿瘤细胞数和活性。

经过酶促分散至几乎单细胞悬浮液后,肿瘤细胞用尼龙筛过滤,在培养基中洗涤,悬浮于软琼脂糖并以大约 20,000 细胞每孔的比例加入到含有琼脂糖底层的 24 孔板中,细胞在存在或不存在 A10 的情况下在标准培养条件下保温 5 天,在细胞培养期最后 48 小时加入³H-胸苷,(Amersham, 5mci 每孔)。经过合适的标注期,组织培养板在 60℃加热使琼脂糖熔化,细胞用微量采集器采集到玻璃纤维过滤器上,并测定放射性。抑制百分比(PCI)应用公式: $PCT = 1 - (CPM_{处理组} / CPM_{对照组})$ 测定。对照组的增殖按回倍进行,而处理组的增殖按三倍量测定。

附录 4

1. 动物

雌性无胸腺小鼠(BALB/c, nu/nu), BALB/c 小鼠, Wistar 大鼠和 Fisher 344 大鼠从 Simonsen 试验室(Gilroy, CA)获得。雌性 A/J 小鼠从 Jackson 试验室(Bar Harbor, ME)获得。DA 大鼠从 B & K Universal, Inc. (Fremont, CA)获得。无胸腺的 R/Nu 大鼠, DBA/2N 小鼠和 BALB/c 鼠从 Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, IN)获得。雌性 C57BL/6 小鼠从 Taconic(Germantown, NY)获得。所有动物在有 α-dri 床的分隔开的细小干净环境的小笼中,动物

用无菌的磨碎食物和任意水喂养。

2. 皮下异种移植模型

细胞系在适当的培养基中生长(参见附录 1)使用 0.05%胰蛋白—EDTA 收集长满或近乎长满的细胞,并在 $450\times g$ 离心 10 分钟,将沉淀重新悬浮于无菌 PBS 或培养基(无 FBS)中并达到特定浓度,将细胞植入小鼠的背侧(hind-flank)。经过 3—6 周用 Venier 测径器测量肿瘤生长。肿瘤的体积除非另外指定使用长 $\times$ 宽 $\times$ 高的积计算。P 值使用 Students't—试验计算。将 A10 溶于 50—100 μ l 赋形剂(DMSO, PBTE, PBTE6C:D5W, 或 PBTE:D5W)以不同浓度腹膜注射给药。

3. 大脑内异种移植模型

对于小鼠 IC 模型,采集大鼠 C6 神经胶质瘤细胞并悬浮于无菌 PBS 中,浓度为 2.5×10^7 细胞/ml,将其放在冰上。按下述方法将细胞植入 BALB/c,nn/nu 小鼠:用动物剪毛器将小鼠额顶的头皮刮净,如果必要先用 70%乙醇擦拭。将动物用异氟烷麻醉并将针通过头颅骨插入到大脑左半球。使用 30gauge 1/2 英寸针配有只允许 3mm 穿透量(penetration)套筒的 Hamilton 气密注射器将细胞注入(disposed)。重复分配细胞使用精确的 4 μ l 细胞悬浮液给药。每天监测动物看它们是健康还是牺牲了。牺牲指它们失去约 40%体重和/或显示出精神病症状。

对于大鼠 IC 模型,将大鼠(Wistar, Sprague Dawley, Fisher 344, 或无胸腺 R/Nu; 约 200g)用腹腔注射 100mg/kg Ketaset(酮胺(ketamine)盐酸化物; Aveco, Fort Dodge, Iowa)和 5mg/kg Rompun(xylazine, 2%溶液; Bayer, Germany)麻醉。在开始麻醉后,将头皮刮光,并将动物定位于定向性仪器上(Stoelting, Wood Dale, IL)。在头皮切口位置交替使用 70%乙醇和 10%聚乙烯吡咯烷酮—碘棉球擦拭。使用手术用无菌刀片在头皮上切—1.0~1.5cm 中等长度的切口。将表皮轻轻分开并拨离到旁边使颅骨表面骨缝暴露。使用牙钻(Stoelting, Wood Dale, IL)在头颅骨约在前囟前叶 1mm 旁边 2mm 处钻一洞(直径 1—2mm)。将细胞悬浮液插吸到配有 23 或 25ga 标准斜面针头的 50 μ L Hamilton 注射器中,将注射器蛛网膜水平定位在洞中,降低到针尖深入脑结构 3mm 为止,将细胞悬浮液缓缓注入。细胞注射完毕,将针头留在钻洞中 1—2 分钟,使细胞注入完全。然后清洁颅骨 2—3 针将表皮缝合。观察从手术和麻醉状态恢复的动物。在整个实验过程中,每天至少观察两次与大脑内的肿瘤进展相关的症状的变化。动物显示晚期症状(倾斜,失去平衡,脱水,丧失食欲,丧失协调力,停止整理毛发,和/或明显的体重减轻)被人道地处死并切除所关注的组织和器官。

4. 腹膜内的模型

如附录 1 描述,细胞系在适当的培养基中生长。采集细胞并在无菌 PBS 或无 FBS 培养基中洗涤,重新悬浮至适当

浓度,注射入适当种的小鼠的腹膜腔中。优先植入 7TD1 细胞,C57BL/6 小鼠通过腹腔注射 0.5mL 姥蛟烷接触抗原。将 SKOV3T 细胞植入无胸腺的且无姥蛟烷作为引发抗原的小鼠中。每天观察小鼠形成腹水的情况。当显示出重量达到 40%或随腹腔肿瘤开始引起过度的压力和疼痛时,个别动物会死亡。

5. 免疫组织化学

通过免疫组织化学方法使用高效特异的受体抗体,对丙酮—固定的,5 μ m 冰冻组织切片,衍生于人,大鼠或鼠的肿瘤细胞的未处理的异种移植肿瘤,进行分析。简单地说,在使用初始抗体之前,先用 10%一般山羊血清封闭非特异性结合位置。应用合适的抗体浓度以达到理想的灵敏度和特异性(兔抗人 PDGF—b 受体,1:400 和兔抗鼠 Flk—1,5.5 μ g/ml)。将已知含有所研究蛋白质的组织切片作为阳性对照。合适的阴性对照是使用相同蛋白浓度和异型正常兔 IgG 和小鼠抗鸡 IgG 作为初始抗体使用。检测方法使用三步间接方法包括将初始抗体与生物素—标记的二级抗体(山羊抗兔 IgG 1:500)结合接着使用配合有辣根过氧化物酶的链霉素和霉。

Chromagen/底物使用 0.05%二氨基联苯胺/0.03% H₂O₂。组织切片用苏木精对染,使用升级乙醇脱水,用二甲苯代替品清洗,使用 Permount 进行盖片以便使用显微镜观察测定。所有结果的强度用十到十十十系统表示。十=低,十

+=中等,++++=高强度。特异染色反应可在(T)肿瘤细胞或(V)血管内皮细胞,或者两种细胞上观察到。

附录 5

1. 体外免疫测定

在指定的时间,将动物处死,在无菌条件下取出脾脏并放入无菌培养基中,使用研磨方法在无菌冷冻的玻璃显微镜载玻片上将脾脏处理成为单细胞悬浮液。用一次洗涤除去组织碎片后,将脾细胞重新悬浮于低渗的氯化铵缓冲液中,以便使红细胞溶解。将淋巴细胞洗涤并重新悬浮于合适浓度的完全培养基中,培养基含有加了 10%热灭活的 FBS 的 RPMI, 2mM 谷氨酰胺, 50 μ m P—巯基乙醇,和青霉素—链霉素。按照下述可使用的方法进行鉴定淋巴细胞的反应。(Current Protocols in Immunology. Cline, J. E, Kruisbeek, A. M., Margulies, D. H., Shevach, E. M., Strober, W. (eds.) John Wiley and Sons, Inc., 1992)。

1. a. 促丝裂素应答

将 T—细胞促丝裂素, ConA, 和与 T—细胞独立的 B—细胞促丝裂素按指定浓度加入到 96—孔圆底孔中。向孔中加入从正常动物, 给赋形剂动物, 给药动物得来的淋巴细胞达到终浓度为 2.5×10^5 /孔。培养通常按三倍量或四倍量进行。将板在 37℃, 湿润的含 5%CO₂ 环境下, 按指定时间培养。从孔中小心移出上清液(约 100 μ L)并在 -80℃ 保存用于淋巴因子和免疫球蛋白的分析。为了测量淋巴细胞增生情

况,向每孔中加入 $1\mu\text{Ci}^3\text{H}$ —胸苷,将板保温 6 小时。将培养物采集到玻璃纤维滤器上,使用液体闪烁计数器(Betaplate,Wallac)定量测量插入的(incorporated)放射性。

1. b. 混合淋巴细胞应答

将从正常动物,给赋形剂动物,给药动物得来的淋巴细胞以 2.5×10^5 /孔的浓度涂布于圆底 96—孔板中。加入相同浓度的刺激细胞,刺激细胞由测定前经 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 自力霉素 C 处理 30 分钟的同系或同种淋巴细胞组成。将板培养 3 到 4 天,在此期间收集上清液并向其中加入用于促丝裂素测定的培养物。

1. c. 淋巴因子测定

测定从促丝裂素和 MLR 培养物得来的上清液,使它们与含有 IL—2 和 2L—6 的物质反应,测定它们支持因子依赖的细胞系生长的能力。将 HT—2 细胞(10^4 /孔,IL—2—依赖的)和 7TD1 细胞(2×10^3 /孔,IL—6—依赖的)涂布于 96—孔平底板, $50\mu\text{L}$ /孔。加入上清液, $50\mu\text{L}$ /孔,然后培养过夜(HT—2)或 4 天(7TD1)。细胞的增生使用在 MTT 中比色测定。(附录 3.1)。

1. d. 免疫球蛋白 ELISA

平底 96—孔 EIA 板用山羊抗鼠 Ig 抗体(Southern Biotechonlogy)在 4°C 包被过夜。加入 PBS+1% BSA 将板封闭。用 PBS 洗涤后,加入从鼠促丝裂素和 MLR 培养物得来的上清液,室温培养 1 小时。将板用 PBS 洗涤,然后加入 HRP—标记的山羊抗小鼠 Ig 抗体,在室温培养 1 小时。将板

洗涤并加入底物(ABTS)进行试验。

附录 6

1. HPLC 测定

在用 A10 处理小鼠或大鼠一定时间后,用末端强心穿刺的方法将血收集到肝素化的试管中。制备血浆并在液氮中冷冻。切除组织和器官并立即用液氮冷冻。加入内标物后,将血浆样品用 HCl 酸化并用乙腈提取,乙腈层在真空离心机中加热蒸发至干,然后重新溶于甲醇。组织和器官样品按重量比 1 : 5(W : V)在 50mM Tris-HCl, pH7.4, 使用组织匀浆器(Brinkmann Polytron Model PT3000)以 20,000 转/分进行匀化。加入内标后,匀浆用 HCl 酸化并用乙腈提取。乙腈层再用等量乙醚萃取。将乙醚层在真空离心机中加热蒸发至干,然后重新溶于甲醇。

将用于 HPLC 分析的样品注入 Hewlett Packard Hypersil 5 μ m C18 筒形柱(100 $\times$ 4.6mm)。以含有 4mM 三乙胺的甲醇 : 35mM KH₂PO₄(pH4.5)55 : 45 作为流动相。流速为 1.2ml/min. 化合物使用 Hewlett-Packard diode-array 检测器(HP Model 1090)在 254nm 监测吸收值。血浆和组织浓度由使用峰面积定量的标准曲线决定。血浆和组织匀浆来自无药大鼠,和加了已知量的 A10 和 B11 的大鼠,分别作它们的标准曲线。结果以内标的回收率校正。内标物使用 5-甲基-吡唑-4-羧酸-(4-三氟甲基)-酰苯胺。

附录 7

1. A10 对于体重的影响

无胸腺小鼠(BALB/c, nu/nu, 雌性, 4—5 周大小)每天用 A10 腹腔给药。A10(20mg/kg/天)溶于 100 μ L PBTE : D5W(1 : 1 V : V), 共给药 101 天。赋形剂对照组动物每天腹腔给药 100 μ L PBTE : D5W(1 : 1 V : V), 共给药 101 天, 未处理对照组不接受任何处理, 每组有 8 只动物。体重从第 0 天开始测量, (给药的前一天)并且两次/周直到实验结束。体重变化百分比按每次测量的平均重量与第 0 天的平均重量比值计算。

2. LD₅₀的测定

一组含有 5—10 只无胸腺小鼠(BHLB/c, nu/nu, 雌性)或 BALB/c(雄性或雌性)小鼠, 用 A10 的 50 μ L PBTE, 100 μ L PBTE, 或 50 μ L DMSO 腹腔给药。在一次试验中, 在单独使用 A10 腹腔给药前, 先对一组 5 只 BALB/c 雌性小鼠每天使用 Decadron^R(注射用地塞米松磷酸钠, 1.5mg/kg)腹腔给药, 共 7 天。在另一附加实验中, 在单独使用 A10 给药前, 先对一组 5 只 BALB/c 雌性小鼠每天腹腔注射 Dilantin^R(注射用苯妥英钠, 20mg/kg), 共 7 天。所有动物在最后给药后观察 7—14 天。LD₅₀从死亡百分率对相应剂量(logM)的曲线中计算出。

实施例 1: 使用 A10 抑制 PDGF—R 自体磷酸化

此实施例举例说明了 A10 在大鼠 C6 神经胶质瘤细胞中对 PDGF—R 的抑制能力。将大鼠 C6 神经胶质瘤细胞(5×10^5)悬浮于含 5%FCS 的 MCDB105 培养基中,并涂布于 6—孔板,在 37℃培养 24 小时。然后将细胞放入含 1%FCS 的培养基中再培养 24 小时。用 50, 100, 或 200mM 的 A10 在 37℃处理细胞 1 小时。细胞再用 20mg/ml PDGF—BB 在 37℃处理 10 分钟。将细胞溶解于 50mM Tris—HCl(pH7.4)含有 2mM EDTA, 10%甘油, 1% NP—40, 1mM 原钒酸盐钠, 10mM 焦磷酸 1mM PMSF, 10mg/mL 抑肽酶和 10mg/ml 亮肽素。

使用 SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分离蛋白质。通过 Western 印迹试验使用抗磷酸酪氨酸抗体证明蛋白中含有磷酸化了的酪氨酸。酪氨酸磷酸化的水平通过是量结合抗—磷酸酪氨酸的量来测定。使用分子动态计算光密度计(300S 型)和 Image Quant V3.0 软件(分子动态学的)得出峰面积积分计算定量。数据以相对峰强度表示。(磷酸化受体除以磷酸化了的酪氨酸总量)。

PDGF—BB 刺激 PDGF—R 的自体磷酸化,而 A10 抑制这种刺激。增加 A10 的浓度能导致 PDGF 刺激的受体磷酸化的减小。当 A10 的浓度达到 200mM 时,PDGF—R 磷酸化的程度可减少到低于无 PDGF—BB 刺激的水平。

实施例 2:使用 A10 对 PDGF—R 自体磷酸化的选择性抑制
A10 抑制人体 T98G 成胶质细胞瘤细胞中 PDGF—R

培养自体磷酸化,而对 EGF 受体的自体磷酸化几乎无影响,将 T98G 细胞植入含有 2%FBS 的 MCDB105 培养基中 37℃24 小时,将培养基吸出用 MCDB105 代替,细胞用 200, 500 或 100mM A10 处理 1 小时。细胞在有无配体存在下以不同浓度 A10 处理。(0,200,500 和 1000mM)。细胞再用配体处理 10 分钟(20ng/ml, PDGF—BB 或 50ng/ml EGF)。将细胞溶解,受体磷酸化水平按实施例 1 描述的定量测定。A10 能抑制通过 PDGF 的 PDGF—R 自体磷酸化,但对于 EGF 刺激的 EGF—R 自体磷酸化能力几乎没有任何影响。

实施例 3:使用不同化合物对 PDGF—R 的抑制作用

这个实施例举例说明了不同化合物抑制 PDGF—刺激的受体磷酸化的能力。将 U1242MG 细胞接种到 96—孔板中,浓度为 5×10^6 细胞/孔,所用培养基为含 0.5%FBS 培养基。将细胞培养 24 小时。细胞用特定化合物处理 2 小时,接着加入 100ng/ml PDGF—BB 并培养 10 分钟。

在 0.2M Hepes, 0.15M NaCl, 10%V/V 甘油,0.04% Triton X—100,5mM EDTA, 5mM 钒酸钠,和 2mM 焦磷酸钠中将细胞裂解。将细胞裂解物加入到被抗—PDGF 受体抗体(Genzyme)包被的 ELISA 板中。在加入细胞裂解物之前先将 ELISA 板使 0.5mg 抗体/孔在 150ml PBS 中,4℃包被 18 小时。

细胞裂解物在包被的板中培养 1 小时,然后在 TBST (35mM Tris—HCl pH7.0, 0.15M NaCl,0.1% Triton X—

100)中洗涤4次。加入抗—磷酸酪氨酸抗体(100ml在PBS中),将混合物在室温培养30分钟。将孔在TBST中洗涤4次,向每孔中加入接合到POD(TAGO)的次级抗体,将孔在室温培养30分钟,将孔再在TBST中洗涤4次,向每孔加入ABTS/H₂O₂溶液并将其培养2分钟。在410nm测定吸光度。

每种药的毒性也被测定。将细胞装板如上所述,接着与药物一起培养,使用如Mossman J. Immunol. Methods 65: 55—63(1983)中描述的MTT测定法测定细胞存活数;或者测定LDH的释放量。(Korzeniewski and Callewaert, J. Immunol. Methods 64: 313(1983); Decker and Lohmann—Matthes, J. Immunol. Methods 115: 61(1988))。

结果如表IX所示。IC₅₀值,(即,达到50%抑制时所需的浓度)应用ELISA筛选测定法来测定。LD₅₀值(即,导致50%中毒的剂量)应用MTT或LDH评估测定。

在U1242细胞中,抑制PDGF—刺激的受体磷酸化IC₅₀值范围为0.4~>500mM。如表IX中所列大多数化合物测试了抑制PDGF—刺激的受体磷酸化作用。如较高的ID₅₀所示,抑制受体磷酸化不是因为对细胞活性的非特异性作用造成的,因此,这些药是很好的候选药,因为化合物能通过抑制PDGF—受体的活性来治疗细胞增生性疾病。G13和G14的IC₅₀值最低,但他们的LD₅₀小于A10。一般的,优选的化合物是那些具有较高治疗指数(LD₅₀/IC₅₀),的化合物,治疗指数用于表示安全系数。

表 IX

化合物	ELISA	细胞毒性	
	P-TYR U1242 IC50(mM)	LDH U1242 LD50 (mM)	MTT U1242 LD50 (mM)
A10	65	>500	700
B10	180		
B12	100	>500	>1351
B13	180		
B14	180		
B15	120		200
B16	35		50
B17	125	>1000	>500
B18	160		
B19	100		
C10	25		>500
C11	70	>500	>500
D11	8	>441	90
D12	60	>386	>390
D13	30	>500	>500
D14	20	>100	>500
D15	20	400	80
D16	50	>168	>167
D17	>100		
E10	45		
E11	90		
E12	180		

化合物	ELISA	细胞毒性	
	P-TYR U1242 IC50(mM)	LDH U1242 LD50 (mM)	MTT U1242 LD50 (mM)
E13	>100		
E14	100		
E15	5		>100
E16	125		
F10	45		
F11	100		
F12	70		
G10	10	>485	>490
G11	15	90	145
G12	10	>333	>333
G13	0.4	>100	100
G14	0.8	>100	>500
G15	100		
G16	35		>100
G17	100		
G18	10	>100	
G19	90		
G20	>100		
G21	6	>100	
G22	1	>100	
H12	30		
I10	90	>317	>320

实施例 4: A10 抑制 PDGF—刺激的 DNA 合成和细胞周期过程

这个实施例举例说明了 A10 抑制 PDGF—BB 刺激的 DNA 合成和细胞周期过程。A10 在 T98G 细胞中对 DNA 合成的影响在有无 PDGF—BB 存在时通过测量插入 DNA 的³H—胸苷来测定。在细胞周期中中期细胞的百分数通过下述细胞计量术测定。

细胞如上述附录中描述的培养。测定条件基本上描述于 Pollack 等人, J. Neurosurg. 73:106—112(1990), 并有些改进。细胞(大鼠 C6 或人 T89G)在对数生长期移入 96—孔板, 浓度为 2×10^4 在含有 2% FBS 的 200ml MCDB105 培养基中。经过过夜贴附期后, 将培养基换为无血浆测定培养基(MCDB105 和 5mg/ml 胰岛素)并将细胞培养 18—24 小时。

DNA 合成的研究从只加入 50ng/ml 的 PDGF—BB 或与不同浓度 A10 培养开始。基础³H—胸苷插入的影响在无 PDGF 时测定。将板在 37℃ 培养约 18 小时。将³H—胸苷 (Amersham, 5ci/mmol) 加入到每孔以达到最后浓度为 5mci/ml, 将板重新放回 37℃ 培育箱, 4 小时后除去培养基, 并将板放在冰上。每孔用冰冷却的 PBS 洗涤两次。用 100ml 冰冷却的 TCA 沉淀 10 分钟, 将插入放射性物质的 DNA 与未插入³H—胸苷的 DNA 分开。用冰冷却的 TCA 洗涤两次,

将沉淀溶解(1%SDS 的 100ml 20mM Tris—base)并移入液体闪光计数器。加入 6ml 合剂(Ready safe, Beckman)并在 LS6000 SC 型 Beckman 液体闪光计数器进行放射性定量。

在两种细胞中 A10 都能减少 PDGF—刺激的 DNA 合成,但在人 T89G 成胶质细胞瘤细胞中比大鼠 C6 神经胶质瘤细胞中影响大。为了证实结果,检测 A10 对 PDGF—刺激的进入细胞周期 S 期的影响,NIH3T3 细胞设定过度表达人 PDGF—b 受体被抑制生长(血浆—饥饿),接着在有或无 A10 存在下用 PDGF 配体处理。用下述细胞计量法分析细胞 DNA 含量。分析结果总结于图 3 中。PDGF 处理导致细胞在 S 期的停留显著增加(62%)相对于未用 PDGF 处理的细胞(11%)。但是,用 A10 处理的细胞显示出剂量—依赖的由 PDGF 引起的进入细胞周期 S 期的细胞数的减少。显示出 A10 能阻碍 PDGF—刺激的有丝分裂。

在相似的实验中,在过表达人 EGF 受体的 NIH3T3 细胞中,A10 的浓度为 100mM 时不能抑制 EGF—刺激的有丝分裂。与前述实验结果相比,这个结果证明 A10 对 PDGF—传递的信号有选择性。

实施例 5:抑制不同受体激酶的活性

对不同化合物对抑制不同受体酪氨酸激酶的能力进行

了试验。试验结果列在表 X 中。

表 X

化合物	PDGFR IC50(μ M)	EGFR IC50(μ M)	HER2 IC50(μ M)	FLK-1 IC50(μ M)
G14	0.8(W)	NT	NT	>30 (W)
G25	0.9	>50	>50	>50
J10	1 (W)	>100	>100	NT
P13	1.1	>50	>50	>50
G13	1.5	NT	>50	>10 (W)
P10	3 (W)	31	>100	NT
J11	3	>100	>50	>25
F10	5 (W)	NT	NT	>50
G24	5	>100	>50	9.3
D11	8 (W)	NT	NT	>50
G10	10 (W)	NT	NT	>50
G12	10 (W)	NT	NT	>50
G18	10 (W)	550 (W)	NT	NT
E14	10 (W)	NT	NT	>50
G22	14	>100	>50	4.4
D20	14	>50	>50	>50
C13	16	16	29	3.3
D15	19 (W)	NT	NT	>50
G11	20 (W)	NT	NT	NT
G29	23	<0.8	34	10
C10	25 (W)	NT	NT	NT
G23	25 (W)	>100	>100	325.2
H10	25 (W)	NT	NT	>50
H12	25 (W)	NT	NT	NT
P12	25 (W)	NT	<50	>50
P14	26	>50	10	>200
D13	30 (W)	NT	NT	>50
P25	30 (W)	>100	>100	>500
G30	32	>100	34	10
D18	34	>50	>50	>50
P15	46	>100	>50	>50
D14	47	>100	>50	>50
G27	48	>100	>50	>50

实施例 6: 体外效果

A10 作为直接生长抑制剂对于肿瘤细胞系, 和病人身上分离出的原发性肿瘤的效果被测定。经过附录 3 中描述的过程 4 天后, 定量细胞密度并将细胞暴露于一定范围的药物浓中测定 A10 对于肿瘤细胞系的作用。表 XI 提供了对不同细胞系的测试结果。

表 XI A10 对不同肿瘤类型的生长的效应

肿瘤类型	细胞系	IC ₅₀ (μ M)
神经胶质瘤	SF763T	0.8
	SF767T	3
	U1242	19
	A172	32
	T98G	62
	U87MG	78
	SF767	87
	SF763	110
	U373MG	115
	U118MG	150
	U1240	250
	U138MG	>400
卵巢瘤	SKOV3T	40
	PA-1	40
	SKOV3	>100
	Ovar3	>100
乳腺	BT474	>100
	MCF7/HER2	116
	MDA MB 468	150
	T47D	195
	MDA MB 361	200
	MCF7	288
	ZR75-30	300
	ZR 75-1	355
	HBL100	>400
	BT549	>400
	SKBR3	>400
肺	Calu-6	70
	A549	118
	Calu-3	>400
尿道旁腺	PC3	46
	DU145	>100
黑素瘤	A375	25
	C81-61	40
结肠	Colo 320 DM	34
表皮样瘤	A431	34
白血病	K562	26

A10 的 IC_{50} 值范围从 $0.8\mu M$ 到 $>400\mu M$ 。

A10 在体外对于原发性肿瘤的作用通过从六个病人身上得到的多形性恶性胶质瘤(GBM)和六个卵巢癌病人进行测试。样本从新诊断的事先未经治疗的病人身上得到,如实施例 13 附录 3 描述的进行评估。

在两种类型的细胞中都进行了用 A10 抑制肿瘤生长和 PDGF—R 表达的正向关系的测定。增加 A10 的浓度(从 0 到 $40mM$),两种类型的肿瘤生长都下降。在两种类型的和不同的肿瘤细胞中,生长抑制都是剂量—依赖性的。对 GBM 肿瘤 IC_{50} 值范围为 $35\mu M \sim 198\mu M$,而对卵巢肿瘤的 IC_{50} 值范围为 $20mM \sim 140mM$ 。

实施例 7 A10 与 B11 的体内药效研究

本实施例概括了几个说明 A10 在体内对不同肿瘤生长的抑制力的实验。第一系列实验的目的是观察不同制剂和给药方式的结果。第二系列实验的目的是观察 A10 对不同肿瘤的各种不同效果。

不同制剂和给药方式

如前“细胞生长”所述,C6 细胞和 SKOV—3(T)细胞在培养基中生长,并在实验的当天,将 $100ml$ PBS 中含的 3×10^6 个细胞(用于 C6 实验)或 1×10^7 个细胞(用于 SKOV—3

实验)植入雌性 Balb/c nu/nu 小鼠的后肋中。将 U87MG、U118MG、U373MG 人恶性胶质瘤细胞(从 ATCC 获得)也植入无胸腺小鼠中。若无其它说明,植入了肿瘤的小鼠与未移植的小鼠在开始的第一天通过腹腔注射入剂量为用 50ml 的 DMSO,100mlPBTE:D5W 或 100mlPBTE 配制的 A10 或 B11 液。肿瘤用 Venier 测径器测量,肿瘤的体积通过其长、宽、高的积来计算。

在一组实验中,小鼠被植入 A431。大鼠 C6 神经胶质瘤细胞,SKOV-3(T)卵巢癌细胞,并以每天每公斤体重 15 毫克(15mg/kg/day)A10(DMSO)处理。在未给药及 DMSO 对照组中,肿瘤是按对数规律生长的。相反,在 A10 给药组,移植了大鼠 C6 神经胶质瘤细胞或 SKOV-3(T)卵巢癌细胞的小鼠体内的肿瘤生长则极微弱(即在给药 20 天后,相对于对照组、肿瘤生长抑制率 $>90\%$)。但 A10 对 A431 肿瘤的生长几乎无影响(即 $<25\%$)。用 15mg/kg/日的 B11(DMSO)和 15mg/kg/日的 A10(DMSO)给药,两者对移植了大鼠 C6 神经胶质瘤细胞的小鼠肿瘤生长的抑制程度是相同的。

在另一组实验中,用 A10 对移植 C6 神经胶质瘤细胞的小鼠给药,表 X II 概括了在不同给药方式下 A10 对无胸腺小鼠中大鼠 C6 神经胶质瘤细胞的抑制能力。抑制百分率指

的是用 A10 给药动物的肿瘤体积除以赋形剂对照组动物的肿瘤体积。不同给药方式所得的抑制率从 51% 到大于 95%。

表 X II

A10 给药方式研究		
剂量	方式	%抑制数
20mg/kg (PBTE:D5W)	每日	>95%
20mg/kg (PBTE:D5W)	每 2 日	77%
20mg/kg (DMSO)	每 4 日	60%
30mg/kg (DMSO)	每 2 日	91%
30mg/kg (DMSO)	每 3 日	87%
40mg/kg (PBTE)	每 2 日	>95%
60mg/kg (PBTE)	每周	51%
100mg/kg (PBTE)	每周	63%

在另一组实验中,在 C6 神经胶质瘤细胞上测定 A10 的不同给药方式的影响。从移植后的第一天开始,A10 是用不同剂量不同给药方式通过腹腔注射给药的。A10 对动物的总给药量用于抑制百分率的比较。这些研究表明:在总剂量相等的情况下,高剂量低频率的给药方式与低剂量每日给药所产生的抗肿瘤药效相等。例如,将 A10 用 20mg/kg 每日,40mg/kg 每二日或 80mg/kg 每四日的方式给药,均可获得

95%的肿瘤生长抑制率,实验用鼠是在后肋被皮下(SC)植入 C6 细胞(3×10^6 个细胞)的 BALB/c,nu/nu 鼠。

另一组实验测定了不同剂量的 A10 对恶性胶质瘤的作用。表 X III 的数据说明 A10 在体内对恶性胶质瘤细胞的抑制能力。生长抑制率是指给药动物的肿瘤体积与未给药动物的肿瘤体积之比。

表 X III

细胞系	剂量 (mg/kg)	%抑制率
U 87	5	52
	10	58
	15	66
	20	92
U 118	15	57
U 373	15	54
SF763T	20	89
SF767T	20	70

表 X IV 比较了不同 A10 制剂的体内(植入 C6 细胞的小鼠)药效。PBTE、PBTE:D5W 和 DMSO 制剂具有相等的体内肿瘤生长抑制率。

表 X IV

对制剂的效力		
剂量	制剂	抑制率%
15mg/kg/日	DMSO	90%
20mg/kg/日	DMSO	95%
15mg/kg/日	PBTE	92%
20mg/kg/日	PBTE	>95%
40mg/kg/2 日	PBTE	>95%
20mg/kg/日	PBTE:D5W	>95%

表 X V (实验用小鼠植入了 C6 细胞) 是 A10 用 DMSO PBTE 或 PBTE:D5W 制剂对动物死亡率的影响, 可以看出 PBTE:D5W 制剂与 DMSO 和 PBTE 制剂相比, 具有非常显著的低死亡率。

表 X V

A10 对死亡率的影响			
剂量	给药	死亡率	n
20mg/kg/日 (DMSO)	21	54%	
20mg/kg/日 (PBTE:D5M)	27—100	80%	
25mg/kg/日 (PBTE:D5M)	67	0%	8
20mg/kg/日 (PBTE:D5M)	20—48	8%	12
30mg/kg/日 (PBTE)	48	50%	4
40mg/kg/日 (PBTE)	48	75%	4

A10 对不同类型肿瘤的抑制

该组实验比较了 A10 对不同类型肿瘤的生长抑制力。在其中的一组实验中,用附录中所述的方法测定了 A10 对用 SC 异种移植建立的卵巢癌、黑素瘤、前列腺癌、肺癌、和乳腺癌细胞系的抑制能力。第二组实验也用前面附录中描述的方法测定了 A10 对人工模型(synthetic model)中鼠白血病细胞系生长的影响。

表 X VI 概括了用 SC 异种移植的研究结果。在 12 到 20mg/kg/天的剂量范围内,A10 能有效地抑制神经胶质瘤、SKOV3T (人卵巢)、PA-1(人卵巢)、A375(人黑素瘤)、PC-3(人前列腺)、Calu-6(人肺)、和 D1B 及 L1210(鼠白血病)细胞的生长。然而,A10 却不能有效地抑制异种移植的 A549(人肺)、MCF7(人乳腺)和 A431(人表皮)异种移植细胞的生长。

表 X VI

A10 对肿瘤生长的影响

肿瘤类型	细胞系	种	剂量 mg/kg/日	抑制率% (天)**	P < ***
神经胶质瘤	C6*	nu/nu	20	>95(21)	0.00001
	C6*	nu/nu†	20	84(18)	0.00001
	9L*	nu/nu	20	83(20)	0.00001
	U87MG	nu/nu	15	75(28)	0.0092
	U118T	nu/nu	15	57(47)	0.0027
	U373Mg	nu/nu	15	54(37)	0.0477
	SF763T	nu/nu	20	85(22)	0.00001
	SF767T	nu/nu	20	70(22)	0.00001
卵巢癌	SKOV3T	nu/nu	15	94(21)	0.0014
	PA-1	nu/nu	20	53(36)	0.04
黑素瘤	A375	nu/nu	20	53(31)	0.03
	A375	SCID [¥]	15	35(31)	0.002
前列腺癌	PC-3	nu/nu	20	71(45)	0.01
	PC-3	SCID [£]	12	47(36)	0.001
肺癌	Calu-6	nu/nu	20	64(28)	0.0001
	A549	SCID [°]	15	19(48)	NS
白血病	DLB*	DBA/2	20	95(22)	0.00001
	L1210*	DBA/2	20	75(18)	0.04
表皮样瘤	A431	nu/nu	15	40(15)	NS
乳腺癌	MCF7	SCID	15	8(27)	NS

表 X VI. 肿瘤细胞是 SC 移植入指定种的小鼠体内。从移植后的第一天开始每日给赋形剂或 A10, 但有以下例外: $\dagger$ = 第 4 天, $\mathbb{Y}$ = 第 9 天, $\mathfrak{L}$ = 第 15 天, π = 第 29 天, $\mathfrak{J}$ = 第 8 天。* D1B 和 L1210 是鼠肿瘤细胞系, C6 和 9L 是大鼠 (rat) 肿瘤细胞系; 其它的均是人肿瘤细胞系。* * 肿瘤生长抑制率数据是在指定的那一天与赋形剂对照组比较而得的; 除 D1B 和 L1210 每组小鼠的数量为 4 ($n=4$) 外, 其余 $n=8$ 到 10 小鼠/组。* * * P 值是用 T 实验计算的。NS = 不显著。

在第二组实验中发现, A10 可以显著地提高腹腔注射异种移植了 SKOV3T 的动物及同系植了 7DT1 的小鼠的存活率。在一个实验中, 将 SKOV37 细胞 (2×10^6 个细胞) 通过腹腔注射移入 BALB/c, nu/nu 小鼠体内。从移植后第一天开始将 A10 溶于 50 μ L DMSO 以 15mg/kg/日的剂量给药 21 天并监测小鼠的存活率 (每给药组与对照组的动物数均为 8)。所有对照组动物均在 27 天后死亡, 而给 A10 组的动物则在 28 天后仅一只死亡且 32 天后的有 40% 的给药组动物存活。

在另一实验中, 以 15mg/kg/日的 A10 对腹腔注射移入 37TD1 (B-细胞杂交) 细胞的同源免疫活性 C57BL/6 小鼠给药 30 天 (每给药组与对照组动物数均为 8), 在移植后的

第一天,将 15mg/kg/日的 A10 制成的 50 μ lDMSO 溶液给药 30 天。第 30 天停药,存活的小鼠再观察 50 天。对照组的所有动物在第 9 天便全部死亡,而给药组中 8 个动物中有 3 只活过了 80 天。

实施例 8:具有不良血小板源生长因子受体活性特征的靶向癌

本实施例说明 A10 对具有不良血小板源生长因子受体活性特征的靶向癌的抑制能力。而 A10 对无血小板源生长因子受体活性特征的癌有微弱作用或无作用。PDGF(血小板源生长因子)受体的表达用 Westen 印迹法定性地测定。用 SRB 测定法评定细胞的生长,即用硫氰酸胺-B(sulforhodamine-B)测定总细胞蛋白质(Skehan, T et al., J. Natl. Cancer Inst. 82:1107-1112(1990))。软琼脂测定法(SAA)是通过在琼脂碱基层上的半固体琼脂培养基上的菌落群上接种细胞,2 到 3 周后,用自动 Omincon 3800TM肿瘤菌落计数器定量地测定菌落的大小和数量。SRB 和 SAA 值用 IC₅₀值表示,单位为 mM。测定异种移植的无胸腺小鼠的体内抑制率,结果见表 X VII。

表 X VII

受体表达与生长抑制的关系				
细胞系	PDGF-受体 表达	SRB	SAA	体内
C6	++	0.3	0.4	95%
SF767	—	100	ND	18%
SF767T	++	3	0.5—2	70%
SF763	—	>100	ND	35%
SF763T	++	ND	ND	89%
SKOV-3	—	>100	6.3	ND
SKOV-3T	++	50	0.3	95%

从表 X VII 可看出,在 PDGF-R 高水平表达时,对细胞的生长抑制率最高,说明该受体活性与肿瘤细胞的增生有明显的关系。

实施例 9: A10 对移植后的体内抑制

本实施例描述了 A10 对小鼠移植肿瘤细胞多天以后再给药时的作用。在一个实验中,SCID 鼠在移植入 PC-3 前列腺细胞系 15 天后再用 A10 给药。每周的给药方式为:5 天以 12mg/kg/日用 A10(PBTE;D5W)给药,2 天不给药。对小鼠给药 3 周。在另一实验中,移植了 375 黑素瘤细胞的实验鼠除在移植后第 9 天开始以 15mg/kg/日的用 A10 给药

外,还用同样方法移植了 PC-3。

上述两种肿瘤的生长均受到了 A10 的抑制。PC-3 肿瘤的生长在 3 周后有 50% 被抑制, A375 在 3 周后则有 40% 被抑制。因此,该实施例通过 A10 对治疗前生长在宿主体内的肿瘤的抑制能力进一步说明 A10 对肿瘤生长抑制的有效性(参见实施例 7,在移植后的第一天开始给药)

实施例 10: A10 对大脑中肿瘤生长的作用

通过一系列的实验测定了 A10 对脑肿瘤模型中肿瘤的生长作用。

在两个分别实验中将经 A10 给药后的无胸腺小鼠再 IC (intracerebral) 移植 C6 细胞,用 A10 给药的动物的平均存活时间显著地高于对照组。实验结果见图 4。

在另一实施中,无胸腺小鼠在经 A10 给药后,接着脑内移植(IC)U87MG 细胞,给药组动物的平均存活时间为 65 天,而对照组为 60 天,增长并不显著($P=0.15$)

A10 的药效也用无胸腺鼠的 IC 模型进行测定,如图 5 所示,A10 对 IC 脑移植 C6 癌细胞的无胸腺小鼠的存活有很弱而非显著的正影响。

实施例 11: 免疫学研究

测定了 A10 对几个正常免疫功能参数的影响,这些参数包括淋巴细胞的增生、细胞毒效应器细胞的增生、淋巴因

子产物、免疫球蛋白的分泌。这些研究包括大鼠和小鼠的 A10 体内给药,接着进行体外免疫功能分析。免疫学研究所用的方法在附录 5 中有详细的描述。

A10 对正常小鼠免疫功能的体内作用

对首次用来作试验的 BALB/c 鼠以 15mg/kg/日的剂量用 A10 或赋形剂(PBTE:D5W)给药 7 天和 21 天。如附录 5 描述的那样,将动物处死并将其脾细胞离体测其对 ConA (一种 T 细胞有丝分裂原),LPS(一种非依赖 B 细胞的 T 细胞有丝分裂原),LPS(一种非依赖 B 细胞的 T 细胞有丝分裂原)和同源抗原(C3H/HeJ 脾细胞)的反应。48 小时(有丝分裂原)或 72 小时(同种抗原)后测定 IL-2,IL-6,Ig 的含量和细胞的增生。实验结果概括在表 X VIII 中。

表 X VIII

A10 对初次作试验小鼠正常免疫功能的影响

刺激物	IL-2 产物		IL-6 产物		Ig 产物		H- 胸苷的摄入	
	d7	d21	d7	d21	d7	d21	d7	d21
ConA	0	0	++	0	0	0	0	0
LPS	0	0	0	0	+	+/-	0	0
Allo	0	0	0	0	0	0	0	0

表 XVIII。雌性 BALB/c 小鼠用 A10 给药 7 或 21 天。将脾细胞离体并用丝分裂原及同种抗原进行刺激。测定细胞的增生、细胞因子产物、Ig 产物,该方法已在附录 5 中描述。上述结果是将药处理动物与赋形剂(PBTE:D5W)处理动物比较而得的。0=无变化;+/-=在某些动物中有微弱增加;+=在所有动物中有中等强度的增加;++=在所有动物中有明显增加。

由 A10 影响产生的两个参数:ConA 诱导的 IL-6 产物在第 7 天,用 A10 给药组高于对照组,而在第 21 天,这种差别并不明显。LPS 诱导的 Ig 产物在第 7 天,用 A10 给药组略高于对照组,而在第 21 天,这种差异在 4 分之 3 的给药组动物中并不明显。这些数据表明:A10 对脾细胞 IL-6 产物和 Ig 产物的影响甚至在用 A10 连续给药时也只是短时的。

A10 在体内对小鼠初次免疫接种期免疫功能的影响

测定 A10 对动物对活初次免疫接种的反应的影响。BALB/c 小鼠 SC 免疫接种 50 μ g 完全悬浮于弗氏佐剂中的(CFA)钥孔 戚血兰素(KLH);对照组小鼠模型免疫接种(mock-immunized)PBS 缓冲液与 CFA 制成的乳剂。在开始的第二天,将小鼠分成三组:未给药、仅给赋形剂(PBTE:D5W)及 20mg/kg/日的 A10。第 14 天将所有小鼠处死,测

定其脾细胞。此外,还要用附录5所述的方法测定其对KLH和破伤风类素的免疫反应。

正如表XIX概括的那样,脾细胞激活因子产物(IL-2和IL-6)受单独的赋形剂或药物的影响并不显著。而且,A10对体外再次用免疫抗原(KLM)刺激的脾细胞的增生的抑制也是极微弱的(表XIX)。A10对用LPS或同种(异体)细胞刺激的脾细胞的作用也与上述作用相似(表XIX)。

表 X IX

A10对小鼠正常免疫功能对初级免疫的反应的影响

刺激物	IL-2 产物	IL-6 产物	Ig 产物	H- 胸苷的摄入
KLH	0	0	0	—
ConA	0	0	0	0
LPS	0	0	0	—
Allo	0	0	0	—

表XIX。BALB/c小鼠免疫接种KLH,然后分成三个处理组;接种后的第1天开始给药,一直到免疫后第14天。空白组、赋形剂对照组或A10给药组与无免疫对照(正常)鼠的脾细胞均用指定的细胞有丝分裂剂或同种抗原培养。用附

录5描述的方法测定细胞的增生、细胞因子产物和免疫球蛋白产物。所示结果为给药组动物与赋形剂对照组(PBTE:D_{5W})反应的比较。0=无变化;—=在所有动物中有微弱下降。

A10 在给药体内对带肿瘤鼠免疫功能的影响

BALB/c 小鼠在第0天SC接种同源 WEHI—164.13 纤维肉瘤细胞。在第1天,将鼠分成3个处理组:未给药组,每日仅给赋形剂(PBTE:D_{5W}),或每日给 20mg/kg/日的 A10。第17天,将动物处死并分离出脾细胞。体外测定脾细胞对同种抗原和细胞有丝分裂剂的反应。A10 并不影响用同种抗原和细胞有丝分裂剂刺激的脾细胞的增生、细胞因子的分泌或 Ig 的分泌,结果概括于表 X X。

还测定脾细胞中在混合淋巴癌细胞培养(MCTC)中的 WEHI—164.13 特异细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)的生成。未给药的带肿瘤动物的脾细胞具有强烈的 CTL 应答(44%特异分解为 E:T=50:1),这种应答在仅给赋形剂处理的动物中几乎完全受到抑制(13%特异分解)。赋形剂中含~15%的乙醇。而乙醇是公知的能对 CTL 的增生和活性产生影响的。(Walia, et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 192:177—200, 1989)

相对于赋形剂处理组而言, A10 处理增强了 CTL 应答

(78%特异分解);A10 给药鼠的脾细胞 CTL 应答同样高于空白对照组。因此,很明显在免疫活性鼠模型上,A10 克服了赋形剂在 CTL 产生中的抑制作用。

表 X X

A10 对具原发肿瘤小鼠的正常免疫功能的影响

刺激物	IL-2 产物	IL-6 产物	Ig 产物	CTL 活性
Tumor	0	0	0	++
ConA	0	0	0	NT
LPS	0	0	0	NT
Allo	0	0	0	NT

表 X X。 带肿瘤鼠在移植后分别以赋形剂、A10 给药或不给药 17 天。处死鼠并用指定的细胞有丝分裂剂、同种抗原培养或用丝裂霉素 C 处理 WEHI-164.13 肿瘤细胞。用附录 5 所述方法测定细胞的增生、细胞激活因子产物、免疫球蛋白产物和 CTL 活性。所示结果是给药组动物与赋形剂对照组(PBTE:D5W)反应的比较。0=无变化;++=在所有动物中有显著增长;NT=未测定。

A10 给药在体内对大鼠免疫功能的作用

Wistar 大鼠在第 0 天 SC 接种 C6 细胞。在开始的第 1

天并以后每日,经 IP 以 8.4mg/kg/日的赋形剂(PBTE: D5W)或 A10(相当于给小鼠 20mg/kg/日的 A10)给药。对照组在肿瘤移植后不给药。第 21 天处死动物并分离出脾细胞做体外分析。与鼠(murine)的研究一样,脾细胞用 ConA、LPS、及同种抗原(DA 大鼠脾细胞)刺激。

在所测定的参数中,A10 处理似乎仅影响同源混合淋巴细胞应答(MLC)的细胞增生,结果概括于表 X XI 中。未给药组、赋形剂处理组或带肿瘤动物的同源 MLR 远高于无肿瘤动物。这种增生应答在 4 个经 A10 处理的带肿瘤动物之一中减少到与无肿瘤对照组相似。同种抗原应答并不减弱。

同时也测定 Wistar 大鼠脾细胞中 MLTC 的特异性 C6CTC 的产生,结果概括在表 X XI 中。带肿瘤、未处理的动物的脾细胞产生一个强烈的 CTL 应答(35%特异分解,E : 7=100 : 1),而无肿瘤对照大鼠的脾细胞则产生微弱的反应(13%特异分解 E : T=100 : 1)。与 BALB/c 小鼠的研究相似,在 7 天的培养中,赋形剂抑制 CTL 的产生。而与鼠(murine)研究相反,A10 并不克服赋形剂对免疫活性大鼠的抑制作用。

表 X XI

A10 对具原发肿瘤的大鼠正常免疫功能的影响

刺激物	IL-2 产物	IL-6 产物	3H 胸苷摄入	CTL 活性
Tumor	0	0	0	0
ConA	0	0	0	NT
LPS	0	0	0	NT
Syn	0	0	+/-	NT
Allo	0	0	0	NT

表 X XI。Wistar 大鼠 SC 接种 C6 细胞,然后每日以赋形剂或 A10 给药;研究包括带肿瘤未给药动物和正常无肿瘤动物。在第 21 天,处死动物并用指定的细胞有丝分裂剂(ConA, LPS),同源(Syn)或同种抗原(Allo)刺激脾细胞;或用丝裂霉素 C 处理治疗 C6 肿瘤细胞。用附录 5 的方法测定细胞的增生、细胞因子产物和 CTC 活性。所示结果是给药组动物与赋形剂(PBTE;D5W)对照组动物的比较。0=无变化;+/-=给药组动物与正常(无肿瘤、未给药)动物的检测水平相比有所降低;NT=未检测。

这些免疫学研究结果表明:A10 在体内或体外对免疫活性或免疫缺损的啮齿动物的正常免疫应答并不产生相反的作用。而且,A10 在抗同源免疫活性宿主中鼠肿瘤细胞系

的试验中的药效表明 A10 并不削弱抗肿瘤免疫力。

实施例 12: A10 的药理学研究

研究了 A10 在小鼠和大鼠中的几个药理学特性, 包括在血浆和脑组织中的代谢和半衰期。A10 药理学研究中所用方法的详细描述见附录 6。此外, 还用大鼠和猴子研究了与正常细胞毒研究相关的 A10 的药物动力学参数。

A10 的代谢

A10 异恶唑环经一个分子内重排形成 2-氟基-3-羟基-N-[4-(三氟甲基)苯基]-2-丁烯酰胺(B11)。在人或大鼠离体鲜肝素化血浆中观察 A10 到 B11 的代谢。A10 到 B11 的转化用附录 6 中描述的反相 HPLC 监测。25℃(室温)时, A10 在人血浆中经 21 小时完全转化成 B11。在 37℃培养, 用鼠血浆做类似的试验, 经 2 小时培养, A10 就全部转化成 B11。在人或大鼠热无活性血浆(60℃, 15min)中, A10 并不转为 B11。此外, 用鲜人血浆同时培养 B11 与 A10, 并监测其浓度。21 小时后测试, 仅有 B11 而无 A10。

代谢产物 B11 在体外生长测定与对 PDGF-刺激的 DNA 合成与 PDGF 刺激的细胞周期进程的抑制均等效于 A10。B11 在体内对 C6 肿瘤细胞生长的抑制力也等于 A10。这些数据提示 B11 是 A10 的活性代谢产物。使用 A10 治疗

细胞增生失调优于 B11, 因其更适宜制成静脉注射用溶液。

A10 与 B11 的体内药动学

在给大、小鼠腹腔注射 A10 后观察 A10 与其代谢产物 (B11) 的体内药动学。无胸腺鼠 (BALB/c, nu/nu, 雌性) 以 A10 ($120\text{mg}/\text{m}^2$, $40\text{mg}/\text{kg}$) 给药, 3 小时后转化为 B11, 此时, 全身内吸循环母体化合物的浓度低于检测极限。48 小时后在血浆中检测 B11, 且 $t_{1/2}$ 为 16 小时 $T_{\max}$ 为 3 小时。B11 的浓度时间曲线 (AUC) 下的面积计算值为 $2773\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ 。清除率 (CL) 为 $0.29\text{mL}/\text{hr}$, 假设生物利用度为 100%, 平均给药时间为 0。计算的分布容积 (VD) 为 6.7mL 。在鼠脑中, B11 的 $t_{1/2}$ 为 14hr, $T_{\max}$ 为 3hr。

表 X X II

A10 与 B11 在小鼠和大鼠腹腔注射给药后的药物动力学

		无胸腺小鼠			小鼠	大鼠
		40mg/kg	75mg/kg	75mg/kg	40mg/kg	80mg/kg
		120mg/m ²	225mg/m ²	225mg/m ²	120mg/m ²	560mg/m ²
		单剂	单剂	1/周×4	单剂	单剂
血浆						
t _{1/2} (hr)	B11	16	15.5	16.9	14.9	6
	A10	<1.5	<1	<1	ND	<2
T _{max} (hr)	B11	3	3	3	3	6
	A10	<0.5	ND	ND	ND	<2
C _{max}	B11	111±14	249±26	190±12	208±34	260
	A10	ND	ND	ND	ND	5.0
AUC (μg·hr/mL)		2773	5660	5012	4444	6417
CL(mL/hr)		0.29	0.27	0.30	0.18	0.26
VD(mL)		6.7	6.4	8.2	3.1	5.3
Brain						
t _{1/2} (hr)	B11	14	NT	NT	2	6
	A10	<1.5	NT	NT	<1	20
T _{max} (hr)	B11	3	NT	NT	1	6
	A10	1.0	NT	NT	1.0	7

表 X X II。如所述,给雌性无胸腺小鼠(BALB/c,nu/nu,每

组 4 个)腹腔注射 A10。BALB/c 鼠雌性,每组 4 个)腹腔注射 $120\text{mg}/\text{m}^2$ ($40\text{mg}/\text{kg}$) 的 A10。Wistar 大鼠(雌性,每取样点 1 个)腹腔注射 $560\text{mg}/\text{m}^2$ ($80\text{mg}/\text{kg}$) A10。制备好血浆与脑样并用附录 6 描述的 HPLC 法分析。所有结果用内标法计算。NT=未试验。ND=未检测。

测定给予 A10 制剂的无胸腺鼠的药动参数,计算值为 LD_{10} 。腹腔注射 $225\text{mg}/\text{m}^2$ ($75\text{mg}/\text{kg}$) 的 A10 并在 48 小时最后取样时间后检测 B11, $t_{1/2}$ 为 15.5 小时。 $T_{\max}$ 为 3 小时(表 X X II)。AUC 计算值为 $5660\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$ 。CL 计算值为 $0.27\text{mL}/\text{hr}$,假设生物利用度为 100%,平均给药时间为 0。VD 的计算值为 6.4mL。

对 4 个每日 1 次 IP 给药 7 天后的鼠中的 A10 药动参数 LD_{10} ($75\text{mg}/\text{kg}$) 也进行了研究。在最后一次给药 48 小时后检测血浆中的 B11 其 $t_{1/2}$ 为 16.9 hr, $T_{\max}$ 为 3 hrs (表 X X II)。B11 的 AUC 计算为 $5012\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$ 。CL 计算为 $0.3\text{mL}/\text{hr}$,假设生物利用度为 100%,平均给药时间为 0。VD 计算值为 8.2mL。

检测 A10 在 BALB/c 小鼠中的药动参数。给 BALB/c 鼠 IP 一个剂量的 A10 ($120\text{mg}/\text{m}^2$, $40\text{mg}/\text{kg}$)。给药 1 小时后, A10 因全部转化为 B11 而不再能检测到。48 小时(最后分析时间)后检测血浆中的 B11, 且 $t_{1/2}$ 为 14.9 hr, $T_{\max}$ 为 3

hr,如表 X X II 所示。AUC 的计算值为 $4444\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$ 。CL 计算值为 $0.18\text{mL}/\text{hr}$ 。假设生物利用度为 100%,平均给药时间为 0。VD 计算值为 3.1mL 。在鼠脑中,B11 的 $t_{1/2}$ 为 2 hr, $T_{\max}$ 为 1 hr(表 X X II)。

当给大鼠(Wistar,雌性)经 IP 一个剂量的 A10 ($560\text{mg}/\text{m}^2,80\text{mg}/\text{kg}$),2 小时后转化成 B11,此时为第 1 分析时间点。且 A10 在给药 8 小时后仍可检测到。如表 X X II 所示,A10 的 $t_{1/2}$ 小于 2 hr, $T_{\max}$ 小于 2 hr。服药 24 小时后检测 B11。其 $t_{1/2}$ 为 6 hr。 $T_{\max}$ 为 6hr。AUC 计算值 $6417\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$ 。CL 计算值为 $0.26\text{mL}/\text{hr}$ 。假设生物利用度为 100%,平均给药时间为 0。VD 计算值为 5.3mL 。在鼠脑中,B11 的 $t_{1/2}$ 为 6 hr, $T_{\max}$ 为 6 hr 而 A10 的 $t_{1/2}$ 为 20 hr, $T_{\max}$ 为 7 hr(见表 X X II)

体内血浆水平

检测 B11 在单剂量或多次每日给 A10 无胸腺鼠中体内血浆水平,结果概括于表 X X III 中。单剂量给 A10($20\text{mg}/\text{kg}$)后 3 小时,检测到的 B11 浓度为 $51.2\pm 7.3\mu\text{g}/\text{mL}$ (范围 $38.8\sim 55.2\mu\text{g}/\text{mL}$),而 A10 未检测到。在多次给 A10 ($20\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$)的无胸腺鼠中检测 B11 的血浆稳态水平,测量间隔为 24 小时(给药 8 次)。B11 的最大血浆稳态水平为 $79.7\pm 11.2\mu\text{g}/\text{mL}$ (范围 $65.2-94.6\mu\text{g}/\text{mL}$),稳定状态最

小值或谷水平值为 $33.6 \pm 7.3 \mu\text{g/mL}$ (范围 $23.4 \sim 45.8 \mu\text{g/mL}$)。B11 在达稳态(最大稳态水平)后的血浆水平值为 64%, 大于单剂量给药(表 X X III)。

表 X X III
B11 的血浆浓度

A10 剂量	B11 浓度($\mu\text{g/mL}$)		
	单次	多次给药	%增长率
20mg/kg	51.2 ± 7.3	79.7 ± 11.2	64
40mg/kg	110.9 ± 15.3	161.1 ± 27.8	69

表 X X III。测定 B11 在单剂量或多次每日给 A1020 到 40mg/kg/日的无胸腺鼠中的血浆水平。所有数据均为 4 个动物的平均值。

同样测定 B11 在单剂量 40mg/kg 的 A10 给药后, $T_{\max}$ 时的血浆浓度。B11 的浓度为 $110.9 \pm 15.3 \mu\text{g/mL}$ (范围 $93.5 \sim 131.3 \mu\text{g/mL}$), 而未检测到 A10。还测定 B11 在多次给 A10(40mg/ μg) 无胸腺鼠中的血浆稳态水平, 检测间隔为 24 小时。B11 的最大血浆稳态水平为 $161.1 \pm 27.8 \mu\text{g/mL}$ (范围 $119.9 \sim 204.1 \mu\text{g/mL}$), 稳态最小值或谷水平值为 $38.2 \pm 21.7 \mu\text{g/mL}$ (范围 $13.5 \sim 66.9 \mu\text{g/mL}$)。在达稳态后的

B11 血浆水平为 69%，大于单剂量给药(表 X X Ⅲ)。这些数据说明 B11 在每日多次给 A10 时有积累作用。

除血浆水平外，还测定 A10 与 B11 在给 A10 后的大、小鼠脑组织中的浓度。结果见表 XXIV。两种和两族动物的 B11 和 A10 脑水平存在差异。无胸腺鼠中，B11 在脑中含量最高、其次为 BALB/c 鼠、最低为 Wistar 大鼠。在 B11 给药后 2 hr 和 4 hr，B11 在无胸腺鼠脑中的含量比在 Wistar 大鼠脑中分别高 11 和 6.5 倍。在给药后 2 小时，无胸腺鼠脑中的 A10 比在 Wistar 大鼠多 2 倍。在给药 4 小时后，在无胸腺鼠脑中检测到的 A10 与在 Wistar 鼠中检测到的大致相等。

表 X X IV

脑组织中 B11 和 A10 浓度的比较

时间	B11 和 A10 在脑组织中的浓度(ng/mg)					
	无胸腺小鼠		BALB/c 小鼠		Wistar 大鼠	
	B11	A10	B11	A10	B11	A10
2hr	21.9±12.7	19.9±13.5	3.5±2.8*	9.1±13.5*	1.9±1.5	8.9±4.8
4hr	21.3±19.3	1.8±1.6	10.7±3.7	3.8±2.9	3.3±1.5	2.1±3.2

表 X X IV。 用附录 6 所述的方法检测到的脑组织中的 B11 和 A10 含量。* 给药后 2.5 小时检测。 n=4(动物)。

上述药理学研究说明:A10 在大和小鼠中均代谢成 B11。此外,A10 与 B11 在两种鼠的血浆和脑组织中均可检测。然而,两种实验动物的血浆和脑组织中的 A10 和 B11 的药动和分布是明显不同的。

实施例 13:A10 的初级毒理学研究

A10 的初级毒理学研究包括 A10 对血细胞、体重、LD₅₀ 的影响的测定试验。为测定潜在的辅料对 A10 的 LD₅₀ 的影响,还做了其它相关的实验。该方法的详细描述见附录 7。药理学和毒理学研究表明:如果有任何相对的影响存在,尤其是用 PBTE:D5W 制剂,则 A10 的给药几乎是无条件的。在本申请的指导下,本领域普通技术人员可以制得适宜的 A10 的制剂。

A10 对血细胞的影响

实际上很多癌症治疗方法具有细胞毒性且对血细胞产生较深的影响而导致血细胞减少症。实验测定 A10 对红细胞和白细胞数量的影响以及淋巴细胞与多形核白细胞的百分比的影响。

在用 A10 在 DMSO、PBTE 或 PBTE:D5W(1:1)中以 15mg/kg/日的剂量给药,在 21 天中,血细胞没有明显变化。用 PBTE:D5W 以 20 或 25mg/kg/日给药时,不影响 RBCs 和 WBCs 数及淋巴细胞与中性粒细胞的百分比。然而,仅用

PBTE 制剂以 30mg/kg/日 给药时,在给药 2—3 周后, WBCs 有少量降低。仅用 PBTE 的 A10 以 40mg/kg/日 给药几周后可见有贫血和白细胞减少症。用 A10 的 PBTE:D5W 制剂给药 100 天后,未见对血细胞影响。

A10 对体重的影响

每天以 A10(20mg/kg/日)给药 100 天,检测体重的影响。与对照组相比,A10 在开始使体重有所增加。然而,几周后,用药组动物的体重增加速度与未给药组或赋形剂对照组相似。在给药期间,无动物死亡。此外,A10 对血细胞变化及对主要病理组织,包括心脏、肝脏、肺、肾、脾、长骨胃、肠系粘膜淋巴结、大、小肠及胰腺均无影响。

LD₅₀ 的检测

用不同剂量方式测定了 A10 在无胸腺小鼠(BALB/c, nu/nu,雌性)和 BALB/c 小鼠(雄性和雌性)中的半数致死量(LD₅₀)。见表 X X V, A10 的 LD₅₀ 范围从 83—145mg/kg。

还测定了抗惊厥药 Dilantin(苯妥英钠注射液)和抗炎药 Decadron(地塞米松钠磷酸盐注射液)对 A10 的 LD₅₀ 的影响(表 XIV)。动物在用 Decadron 或 Dilantin 给药之后的 A10 的 LD₅₀ 分别为 94 和 144mg/kg。

表 X X V

A10 在小鼠中 LD₅₀(半数致死量)的测定

剂量/方式	种,性别	LD ₅₀ (mg/kg)
单剂	无胸腺,f	145
每4天×4	无胸腺,f	75
每7天×4	无胸腺,f	100
单剂	BALB/c,f	83
单剂	BALB/c,m	107
用 Decadron [○] 后,单剂	BALB/c,f	94
用 Decadron [○] 后,单剂	BALB/c,f	144

表 X X V。 Decadron 在单剂量给 A10 之前以 1.5mg/kg/日给药 7 天。Dilantin 同法以 20mg/kg/日给药 7 天。LD₅₀是通过用四参数计算方程得到的死亡率与剂量之比计算的。f=雌性,m=雄性,n=每组 5 个动物。

实施例 14:在体内通过变异 PDGF-R 受体对肿瘤的抑制

该实施例说明核酸编码的 PDGF-b 受体片断在体内对肿瘤生长的抑制。用携带人 PDGF-b 受体突变基因的逆转录病毒感染 C6 大鼠神经胶质瘤细胞。七种选择性 G418 克隆通过用能够识别人受体细胞外功能区而又不与野生大鼠受体起交叉反应的抗体的 Western 印迹来筛选受体片断

的表达。两种克隆 HiMut. 1 和 HiMut. 2 表达受体缺乏大多数细胞内功能区而具有预期分子量的蛋白质的高水平。几种克隆表达受体片断的低水平;选择 LoMut. 1 做进一步实验。HiMut. 1 表达的 PDGF-R 比 LoMut-1 高 8.3 倍。HiMut. 2 比 LoMut. 1 高 9.4 倍。含变异受体的菌落的分离和特征如下面所述。

细胞培养。 所有培养基、牛胎儿血清(FBS)和化学药品均购自 Gibco BRL。C6 大鼠神经胶质瘤细胞在 Ham's/F-10 培养基中培养,培养基还加入 5%牛胎儿血清和 2mm 的谷氨酰胺。COS 细胞在含 10%牛胎儿血清和 2mM 谷氨酰胺的 Dulbecco's Modified Eagle's 培养基(DMEM)中培养。

变异 PDGF- β 受体的表达。通过直接定位诱变将一个密码子引入从第一酪氨酰激酶功能区直接逆流而得的人 PDGF- β 受体基因。将变异基因克隆入一个鼠肉瘤病毒长末端重复控制的介质中。(Muller, A. J., et al., Mol. Cell. Biol. 11:1785-1792, 1991)。每个介质 4mg 并将一个含需逆转录病毒包附的基因(Muller, supra)的介质用磷酸钙沉淀法转染入 COS 细胞(2×10^5 个/60mm 盘)(Chen, C. A. and H. Okayama, BioTech. 6:632-638, 1988)。细胞用 PBS 洗涤,然后使其生长一天并集中在转染后的 4-6 天调节培养

基。C6 细胞(10^5 个细胞/60mm 盘)用调节好的含 6mg/ml 聚凝胺(Sigma)的培养基稀释剂感染。两天后,用 800mg/ml 的 G418(Gibco)来选择细胞选出可识别的菌落。介质对照细胞同法制得但使用 LTR 下缺乏基因的介质。

野生型(动物)和受体片断的协同免疫沉淀反应。介质对照细胞和变异 PDGF-b 受体高水平表达的细胞(HiMut. 1),在 6 孔盘上分别接种 3×10^5 个细胞/孔。接下来的一天,用 0.5ml 3% 的含 100mCi/ml 的 ^{35}S 标记的(ICN) —cys, —met DMEM (ICN) 调节培养基。细胞在 37°C 培养 16hrs。用组合缓冲液(0.1% BSA, 10mg/ml $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10mg/ml $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10mg/ml 抑肽酶和 0.2mM PMSF 的 PSB)洗涤两次,然后在每个孔中加入 0.5ml 混合缓冲液或 0.5ml 20ng/ml PDGF-BB (Collaborative Research Inc.) 的混合缓冲液。细胞在 4°C 恒温 4hrs,用 PBS 洗涤两次并用 0.5ml 1% Triton-100 的 HNTG (20mM HEPES, (PH 7.5), 150mM NaCl, Triton X-100, 100% 甘油、各 10mg/ml 的抑制酶、亮肽素和抑胃酶素及 0.2mM PMSF) 溶液溶解。PDGF-BB 在有 PDGF 的细胞的溶解缓冲液中。溶解产物在 4°C , $100000 \times g$ 离心 30 分钟。将上清液转入干净试管中并用蛋白 A-琼脂糖(vector Laboratories)进行前期清除。向 2 个 PDGF 处理的样品中加入 SDS 使每一个细胞系

的最后浓度为 0.1%。重复样品用能识别野生大鼠受体(VBI 抗 PDGF-b 受体)C-端的抗体或能识别人变异受体(Genzyme 抗-PDGF-b 受体)的抗体进行免疫沉淀。用于 Genzyme 抗-受体培养的样品的第二种抗体是兔抗-鼠 IgG。复合体用蛋白 A-琼脂糖沉淀并用 0.1% Triton X-100 的 HNTG 液洗涤 5 次。蛋白质用 7.5% 还原的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离。凝胶用 Amplify(Amersham)处理并曝露于 X-射线胶片下 3 天而凝固。

Western 印迹法。每个细胞系被置于 5×10^5 细胞/孔的六孔盘的多孔中。接着供给 1% FBS 的 MCDB105(UCSF 细胞培养设备)并于无 CO₂ 的环境中培养 24hrs。在每一克隆的一个孔中加入 PDGF-AA 或 BB(collaborative Reserch Inc.)达到所需的最终浓度。室温下培养 7 分钟后,细胞用 PBS 洗涤并分解在 50mM Tris-HCl(PH 7.4), 1% nonidet

P-40, 10% 甘油, 2mMEDTA, 10mM 焦磷酸钠, 各 10mg/ml 的抑肽酶和亮肽素, 1mMPMSF 和 1mM 原钒酸钠中。每一等体积的分解产物继续用大量 7.5% SDS 聚丙烯酰胺凝胶处理, 然后转移到硝纤维素上(Schleicher & schuell)。用含 5% 配好的脱脂牛奶的 Tris-缓冲盐/0.05% Tween-20(TBST-T)阻断细胞膜。二重膜在含多克隆含抗磷酸酪氨酸 1:3000 或者抗 PDGF-b 受体(UBI)1:

1000 的阻断缓冲液中培养。二级抗体(secondary antibody)是辣根螯合过氧化酶山羊抗兔 IgG(Sigma)1:1000。用抗 1:500 稀释的抗人 PDGF-b 受体细胞外功能区的单克隆抗体测定受体片断(Genzyme)。所用二级抗体(Secondary antibody)是螯合过氧化酶兔抗鼠 IgG(ICN)1:1000。所用印迹法均为 ECL(Amersham)检测。相关区面积用 Molecular Devices Computing Densitometer 测定。每一点均减去基础磷酸化水平。

细胞系的依附生长。为了测定生长密度,每一个细胞系均以 10^4 细胞/孔接种在 5 个 24-孔盘上,该盘在 1%或 5%的 FBS Ham's/F-10 培养基上有三倍量的样品。培养基每 3 天一换。每 2 天,一个盘上的细胞用胰蛋白酶作用并用 Coulter 计数器计数。为了检测克隆的效果,将每个细胞系中的 100 个细胞置于 3 个 10cm 在 1%或 5%FBS 的 Ham's/F-10 培养基中的托盘上。培养基每 3 天一换大约 12 天。克隆被固定,用美兰染色并计数。

不依赖于锚基的细胞系生长(软琼脂测定)。在 35mm 托盘中用 0.8% Seaplaque 琼脂糖(FMC Bioproducts),1% FBS 2m/M 谷氨酰胺、1mM 丙酮酸钠、10mMHFPES 和非必需氨基酸制成一个碱基层。细胞悬浮在 0.4%含其它上列成分的琼脂糖及所需浓度的 PDGF-BB(Collaborative Re-

search Labs)的溶液中。将悬浮液置于 3000 细胞/盘的碱基层中。然后在含 5%CO₂ 的加湿器中培养 2 周。用目视法或自动 Ominon3800TM 肿瘤克隆计数器对克隆计数。

裸鼠中细胞系的生长。细胞在滚动瓶中膨胀,受胰蛋白酶作用并悬浮 PBS 中。计数并将其量调节为 3×10^7 细胞/ml。对于每一细胞系,对 4 至 8 个无胸腺小鼠(Simonsen Lab)皮下注射 100ml(3×10^6 个细胞)。肿瘤量用测径器测量。每周测 2 次到 18 至 21 天。

肿瘤切片的免疫组织化学染色。将肿瘤从小鼠中切除并冻在 OCT(Miles Lab)中。切成 5mm 厚的切片固定于丙酮中。切片用先保存于 20mg/ml 生物素标记抗人 PDGF-b 受体中的 10%正常山羊血清阻断(Genzyme 抗体,用分子探针生物表标记),用螯合过氧化酶抗生蛋白链菌素(caltag)1:100 和二胺基联苯胺(Sigma)的双氧水液检测。做为阴性对照,用一个生物素标记的单克隆抗体与同样蛋白质浓度的不相关蛋白做为抗-PDGF-b 受体。用 Harris 苏木素(Anatech)染色计菌株数。

用前面描述的逆转录病的表达系统,将 PDGF-b 受体片断引入大鼠 C6 神经胶质瘤细胞中。在抗 G418 克隆表达变异受体时,野生动物的 PDGF-BB 诱导的酪氨酸的磷酸化明显降低。而且,与母 C6 细胞相比,这些细胞生长的密度

低并生成较小的菌落。

细胞表达的受体片断在裸鼠中的生长能力明显减弱。21天后,HiMut. 1 和 HiMut. 2 中的肿瘤量仅是母细胞肿瘤量的 12—16%。C6 母细胞和介质对照细胞衍生的肿瘤基本上相同,这说明介质对照细胞的 G418 选择并不影响其在裸鼠体内的生长能力。从 HiMut. 1 衍生的肿瘤至少有 10% 的细胞有非常暗的免疫染色。HiMut. 2 衍生的肿瘤有 45—85% 的细胞着色。

用溶解肿瘤切片的 Western 印迹法确定了 PDGF—b 受体片断的存在。这样,PDGF—b 受体在体内表达 21 天后至少有 10% 的细胞受到抑制。这些研究说明 PDGF—R 的明显性负变异株抑制体内具异常 PDGF—R 活性的肿瘤的生长效用。

实施例 15: 其它化合物的细胞培养及体外作用

本实施例说明除 A10 与 B11 之外的特征化合物对细胞培养的或体内肿瘤生长的影响。PDGF—R 活性、C6 SRB 及体内效力用前面附录所述方法测定。结果见表 XXVI 和 XXVII。这些结果为原始数据。本领域普通技术人员可用本领域的已知方法如不同给药方式改进不同化合物的效能。

表 X X VI

化合物	U1242 激酶 IC ₅₀ (μM)	C6 SRB IC ₅₀ (μM)	LD ₁₀ (mg/kg)	C6 体内药效 IC ₅₀ (μM)	P 值	注释
P10	3.0 (W)	12				
J10	1 (W) >50	12	171	73%在 40		在 第 18 天 100%死亡
G13	1.5	>50	未试验	12%在 15		死亡率 0%
G14	0.8 (W)	>50	未试验	36%在 15	0.285	在 第 14 天死亡 率 0%
G21	6.0 (W) >50	>12 >12	> 200 无 死亡	无效应在 40		死亡率 0%
G22	0.9 (W) 14	>6 >6	25	在 20 无效应		死亡率 0%由于 溶解问题仅做 一次 MTO 剂量 试验
P16	0.8 >50	17	> 400 无 试验	在 60 无效应		死亡率 0%
F10	45 (W)	>12.5				
G24	0.6 5	1 2.2	> 200 无 死亡	在 20 无效应		死亡率 0%第 15 天 死亡率 12.5%第 10 天 死亡率 100%
G25	1.0	50				
P13	1.2	>100				
P17	0.8/3.0 >50	12	> 100 无 死亡			由于溶解性问 题 仅 做 一 次 MTD 剂量试验
H10	25 (W) >50	13	75	52%在 30	0.006	第 17 天, 14.3%死亡率

化合物	U1242 激酶 IC ₅₀ (μM)	C6 SRB IC ₅₀ (μM)	LD ₁₀ (mg/kg)	C6 体内药效 IC ₅₀ (μM)	P 值	注释
H12	>250 (W) 25 (W)	19				
H13	>50 >50	20 10.5	>400 无死亡	0%在 40 41%在 100	0.12	死亡率 0% 死亡率 0%
E15	5.0 (W) 10 (W) >50	4.4	>400 无死亡	66%在 15 58%在 50 0%在 100	0.019 0.1	死亡率 0% 第 15 天死亡率 12.5%第 8 天 死亡率 100%
P19		>50				
P21		>25				
F11	3.1	14				
P21	93	>25				

W=在 Western 试验中所作

表 XXVII

化合物	U1242 激酶 IC ₅₀ (μM)	C6 SRB IC ₅₀ (μM)	LD ₁₀ (mg/kg)	注释
A13		>>25	>200 无死亡	25μM 时的~30%抑制率
P22		>>25		25μM 时的~10%抑制率
P23		18		
P24		14		
G28	16.4 (scndry)	4.5		
G29	23.2	>13 在 12.5μM 时 杀死所有细胞		
G30	32.5	2		

W=在 Western 试验中所作

实施例 16: 联合治疗

该研究的目的在于观察 PDGF-R 抑制剂与已知的通常用于肿瘤治疗的细胞毒药物联合用药时对肿瘤生长的影响。给裸鼠皮下移植 CALU-6 细胞和 MCF-7/Her2 细胞分别实验。在其一的实验中,小鼠单独用 A10 给药、仅用顺氯氨铂给药或同时用顺氯氨铂和 A10 给药。A10 以 5mg/kg 每周两次腹腔给药。顺氯氨铂在第 2 天以 5mg/kg 腹腔给药一剂。

在移植 MCF-7/Her2 细胞的小鼠中,A10 与顺氯氨铂联合给药对肿瘤生长的抑制比单独用顺氯氨铂或未给药好,但并不强于单独用 A10 给药。然而,在移植 CALU-6 细胞的小鼠中,A10 与顺氯氨铂联合给药对肿瘤生长的抑制明显强于 A10 单独给药、顺氯氨铂单独给药和未给药组。

在第 2 个用 CALU-6 细胞的实验中,小鼠分别用 A10、顺氯氨铂或 UP-6(10mg/kg 在第 4、7、10 天)单独给药或顺氯氨铂和 VP-16;A10、顺氯氨铂和 VP-16 联合给药。A10、顺氯氨铂和 VP-16 联合给药对肿瘤生长的抑制作用明强于单独给药或顺氯氨铂与 VP-16 联合给药。

实施例 17: 化学合成

本发明的一些化合物可以通过从已知化合物或已制得的中间体开始,以文献中已知的过程制备。喹喔啉化合物可通过或者 1)1,2 芳香二胺与 α -酮醛或 α -二酮反应,或者 2)在酸催化剂存在下 α -双硫化半卡巴脎和 1,2-二胺的交

换反应而制备。在下面的制备中,芳香二胺可以从市面买到或如实施例所述制备。在实施例中反应溶剂不是指定的,反应在乙醇—乙酸中进行。根据元素分析,一些用此溶剂合成的喹喔啉被分离为与一分子乙酸的酸加成复合物。在单独的乙醇中反应,接着溶剂蒸发并重结晶,得到更为洁净的产物和较高产率。

第 1 组化合物

A10

A10 可如 EP—0013376A2 中制备。另外 A10 可如下制备:

步骤 1: 乙酰乙酸—(4—三氟甲基)苯胺的制备

将 4—三氟甲基苯胺(16.1g, 0.1mol), 2,2,6—三甲基—4H—1,3—二氧杂环己烯—4—酮(纯度 95%; 14.97g, 0.1mol), 和二甲苯(20ml)的混合物在预热至 150℃ 的热浴中加热回流 30 分钟。产生的深色溶液冷却至室温使产物结晶。将晶体过滤收集。从母液(初始结晶和过滤之后保留的溶液)得到更多物质。粗苯胺化物的产量为 17.75g (72%), 苯胺化物的熔点为 153—154℃。

步骤 2: 2—乙氧基亚甲基乙酰乙酰基—(4—三氟甲基)苯胺

乙酰乙酰基—(4—三氟甲基)苯胺(14.11g, 57.6mmol), 三乙氧基甲烷(9.43g, 63.4mmol), 和乙酐

(16.30ml, 173mmol)混合在一起并加热回流 90 分钟。将产生的深色溶液蒸发至干。将残渣再悬浮于苯/异辛烷中,产物结晶。从母液得到更多物质。纯产物的产量为 11.93g (72%), mp. 120—122°C。

步骤 3: A10 的制备

将乙醇(6ml)中的 2—乙氧基亚甲基乙酰乙酰基—(4—三氟甲基)苯胺(3.01g, 10.4mmol)慢慢加入冰冷的盐酸羟胺(0.77g, 11.0mmol)于 2M NaOH(5.5ml)的溶液中。将混合物加热至回流 1 小时,冷至室温并蒸发至干。将残余物再悬浮并分配在乙酸乙酯和水中。分出有机层,用水提取,硫酸钠干燥并蒸发溶剂。残余物再悬浮于甲苯中并结晶产生熔点为 166—167°C 的 A10 固体残渣(2.4g, 87%)。

A11

5—甲基—异恶唑—4—羧酸—(3—三氟甲基)苯胺化物的制备以三步进行:

a) 乙酰乙酸—(3—三氟甲基)—苯胺化物的制备

在 25ml 装有 Claisen 蒸馏头和磁力搅拌器的圆底烧瓶中,将 4g (18.6mm) α, α, α —三氟—对甲苯胺, 3.71g (24.8mm, 1 当量) 95% 2,2,6—三甲基—4H—1,3—二氧杂环己烯—4—酮, 112ml 二乙醇胺和 12.4ml 二甲苯混合。混合物的温度升至 110°C, 混合物在此温度搅拌 6 小时,同时从体系中蒸出丙酮。反应进程用 TLC(板: Merck Kieselgel 60

F₂₅₄,洗脱剂:石油醚(90—110℃馏分):丙酮2:1),用乙醇中5%PMA显色)监测。

6 小时后,在20Hg mm 蒸去二甲苯,残余物用中压(2atm)液相色谱纯化,用硅胶60 作固定相,石油醚(90—110℃馏分):丙酮2:1 作淋洗剂。

收集在Rf=0.3 部分的产物—用于反应监测的TLC 系统—去掉溶剂后,3.82g 乙酰乙酸—(3—三氟甲基)苯胺化物被分离出来。熔点:91—92℃。

H—NMR (ppm,丙酮—d₆)

ArH	7.36—7.87	4H	(m)
NH	9.41	1H	(s)
CH ₂	3.62	2H	(s)
CH ₃	2.64	3H	(s)

b)2—丙烯酰胺,2—乙酰基—3—乙氧基—N—[(三氟甲基)苯基]的制备

在干燥过的(120℃,30 分钟)50ml 装有磁力搅拌器,温度计,橡胶隔膜和T 型活塞上的氮气球圆底烧瓶中,将1.0g (4.1mm)乙酰乙酸—(3—三氟甲基)苯胺化物,0.85g (5.7mM)原甲酸三乙酯,1.37g 乙醇和450mg 干燥氯化锌混合。混合物在氮气氛中于60℃搅拌30 分钟。反应进程用TLC (板:Merck Kieselgel 60 F₂₅₄,洗脱剂:石油醚(90—110℃馏分):丙酮5:1)监测。如果30 分钟后反应没有完成,再加入0.85g (5.7mm)原甲酸三乙酯。

反应混合物逐渐变成棕色。反应完成后,将反应混合物

真空汽提,残余物溶于乙酸乙酯中,水洗,有机相用硫酸镁干燥,然后过滤,真空蒸去乙酸乙酯。1.16g 粗产物用中压(2atm)液相色谱纯化,用硅胶 60 作固定相,石油醚(90—110℃馏分):丙酮 5:1 作淋洗剂。

在 $R_f=0.231$ 的产物部分被收集—用用于反应监测的 TLC 体系—去掉溶剂后,分离出 2—丙烯酰胺,2—乙酰基—3—乙氧基—N—[(三氟甲基)苯基]。熔点: 100.5℃。 ^1HMR (ppm,丙酮—d6)

ARH	7.29—8.00	4H	(m)
NH	11.25	1H	(s)
CH=	8.46	1H	(s)
EtCH ₂	4.37	2H	(s)
EtCH ₃	1.45	3H	(s)
AcMe	2.48	3H	(s)

c) 5—甲基—异恶唑—4—羧酸—(3—三氟甲基)苯胺化物

在装有磁力搅拌器和温度计的 25ml 圆底烧瓶中, 0.11g (1.5g mM) 盐酸羟胺被溶于 0.5ml 水中,并往此溶液中加入 64mg (1.6mM) 氢氧化钠(加到 0.5ml 水中)。往此溶液中加入 2.2ml 甲醇,在室温下加入 0.44g (1.6mM) 2—丙烯酰胺,2—乙酰基—3—乙氧基—N—[(三氟甲基)苯基]。反应进程用 TLC(板: Merck Kieselgel 60 F₂₅₄,洗脱剂:石油醚(90—110℃馏分):丙酮 4:1,用乙醇中 5%PMA 显色)监测。反应完成后,将反应混合物真空浓缩,残余物溶于乙酸乙酯中。有机相用水洗,硫酸镁干燥。过滤并浓缩。得到的

0.51 g 粗产物用中压(2 atm)液相色谱纯化,用硅胶 60 作固定相,石油醚(90—110℃):丙酮 4:1 作淋洗剂。

在 $R_f=0.162$ 的产物部分被收集—用用于反应监测的体系—去掉溶剂后,分离出 0.22g 5—甲基—异恶唑—4—羧酸—(3—三氟甲基)苯胺。熔点:115—120℃。

^1HMR (ppm,丙酮— d_6)

ArH+NH	7.42—7.88	4H	(m)
CH=	8.50	1H	(s)
CH	8.50	1H	(s)

A12

A12 可如 Patterson 等人, *J. Med. Chem.* 35:507—510 (1992)所述制备。

A13: N—三氟甲基苯基 3,5—二甲基异恶唑—4—甲酰胺

320mg 3,5—二甲基异恶唑—4—羧基氯化物和 2ml 二氯甲烷中的 1ml 4—三氟甲基苯胺混合物在室温搅拌过夜。混合物然后用乙酸乙酯和水处理。粗产物用乙醇和水结晶得到 330mg N—三氟甲基苯基 3,5—二甲基异恶唑—4—甲酰胺。

第 2 组化合物

B10

B10 以两步合成

a) 氟基乙酰基—(4—硝基)苯胺化物的合成

将 1.38g (10mmol) 4—硝基苯胺溶于 30ml 绝对吡啶中, 然后冷却至 -30°C , 在连续搅拌下滴加 0.43ml (5mmol) 三氯化磷, 避免温度超过 -20°C 。0.5 小时后, 加入 0.85g 氰基乙酸, 将溶液在 -20°C 搅拌 0.5 小时, 再于室温搅拌 12 小时。

真空蒸发溶剂。残余物用 1N HCl 覆盖并用乙酸乙酯提取。乙酸乙酯溶液用 Na_2SO_4 干燥, 过滤并蒸发。残渣用乙醚研制, 过滤并真空干燥。产率为 1.70g (83%)。产物具有如下特征:

熔点: $81-83^{\circ}\text{C}$

Rf: 0.95 (己烷—EtOAc; 1 : 1)

b) 氰基乙酰基—(4—硝基)苯胺化物的乙酰化

将 0.82g (4mmol) 氰基乙酰基 4—硝基苯胺化物溶于 2ml 绝对吡啶中, 接着加入 20mg 4—氨基吡啶催化剂和 0.50ml 四甲基胍。搅拌反应混合物, 硝基苯胺化物溶解。然后在 0°C 滴入 5ml 乙酐。

2 天后蒸发吡啶, 加入乙酸乙酯, 有机层用 5% NaHCO_3 溶液提取, 在 1N HCl, 和水中。有机层用 Na_2SO_4 干燥并蒸发。残余物从乙醚中结晶, 得到 210mg (21% 产率) 产物。产物具有下列特征:

Rf = 0.35 (EtOAc)

熔点: 260°C

B11 用两种不同方法合成:方法 A 和方法 B。

方法 A

27g A10 于 150ml 乙醇中的混合物与 16.2g 1,8—二氮杂双环[5.4.0]十一碳—7—烯混合。反应混合物然后在室温搅拌 30 分钟,并将乙醇蒸发掉。产生的固体悬浮于 500ml 乙醚中并与 200ml 0.6N 盐酸溶液混合。所有固体空吸过滤。用 200ml 乙醇洗涤并空吸干燥得到 25g 产物。

方法 B

2—丁烯酰胺,2—氟基—3—羟基—N—[(4—三氟甲基)苯基]($C_{12}H_{19}F_3NO_3$)以如下两步制备:

a) 氟基乙酰基—(4—三氟甲基)苯胺化物的制备

3g (18.6mM) α, α, α —三氟—p—甲苯胺和 3.37g (29.8mM, 1.6 当量)氟基乙酸乙酯的混合物在 50ml 配有磁力搅拌器,温度计和氮气进口的烧瓶中,于 180°C 油浴上搅拌 5 小时。反应进程用 TLC(板:Merck Kieselgel 60 F₂₅₄, 洗脱剂:石油醚(90—110°C 馏分):丙酮 1:1)监测。反应混合物用中压(2 atm)液相色谱纯化,用硅胶 60 作固定相,石油醚(90—110°C 馏分):丙酮 1:1 作淋洗剂。

收集产物部分—用用于反应监测的 TLC 系统—去掉溶剂后,分离出 2.11g 氟基乙酰基—(4—三氟甲基)苯胺化物。熔点:192—194。

¹H—NMR (ppm, 丙酮—d₆)

ArH 7.68—7.85 4H (dd)

NH 9.84 1H (s)

CH₂ 3.90 2H (s)

b) 2—丁烯酰胺, 2—氟基—3—羟基—N—[(4—三氟甲基)苯基]的制备

在装有磁力搅拌器, 温度计, 橡胶隔膜和 T 型活塞(带有真空和氩气层气球接头)的圆底烧瓶中, 将 1.78g (0.89g, 37.1mM) 50%NaH 油分散体悬浮于 4ml 干燥(用 P₂O₅)乙腈中。悬浮液冷却至 10℃, 在此温度搅拌下, 加入 2.72g (11.9mM) 氟基乙酰基—(4—三氟甲基)苯胺, 10 分钟内溶于 25ml 干燥(用 LiAlH₄)四氢呋喃中。反应混合物变黄, 加完后冷却至 -10℃, 然后在 20 分钟内加入 1.05g (13.11mM, 1.1 当量) 乙酰氟。在加入的过程中, 反应混合物的温度不能高于 -5℃。反应进程用 TLC(板: Merck Kieselgel 60 F254, 洗脱剂: 石油醚(90—110℃馏分): 丙酮 1:1) 监测。

当反应完成时, 反应混合物在 0℃搅拌 30 分钟, 35℃搅拌 30 分钟和 65℃再搅 30 分钟, 然后将反应混合物真空汽提。残余物溶于 30ml 蒸馏水中, 在 80℃活性炭处理并过滤。产生的残黄色滤液用 10% 盐酸溶液酸化, 滤出沉淀的晶体, 水洗并干燥。粗晶体(2.51g)用中压(2 atm)液相色谱纯化, 用硅胶 60 作固定相, 石油醚(90—110℃馏分): 丙酮 1:1 作淋洗剂。

收集 R_f=0.138 的产物部分—用用于反应监测的 TLC 系统—去掉溶剂后, 分离出 1.99g 2—丁烯酰胺, 2—氟基—

3—羟基—N—[(4—三氟甲基)苯基]。

TLC 石油醚(90—110℃)/丙酮 1/1=0.138。

H—NMR	(ppm, DMSO—d)		
ArH	7.65—7.78	4H	(dd)
NH	10.85	1H	(s)
CH ₃	2.26	3H	(s)
OH	6.39	1H	(s)

B12

2—丙烯酰胺, 2—氟基—3—羟基—3—(4—氟代苯基)—
N—[(4—三氟甲基)苯基]

(C₁₇H₁₀F₄N₂O₂ MW: 350.3)的制备如下进行:

a) 氟基乙酰基—(4—三氟甲基)苯胺化物的制备:

3g (18.6mM) α, α, α —三氟—p—甲苯胺和 3.37g (29.8mM, 1.6 当量) 氟基乙酸乙酯的混合物在配有磁力搅拌器, 温度计和氮气口的 50ml 烧瓶中, 于 180℃ 油浴上搅拌 5 小时。反应进程用 TLC(板: Merck Kieselgel 60 F254, 洗脱剂: 石油醚(90—110℃馏分): 丙酮 1:1 作洗脱剂。

收集产物部分, 去掉溶剂后, 分离出 2.11g 氟基乙酰基—(4—三氟甲基)苯胺化物。产物具有下列特征:

熔点: 192—194℃。

¹HMR(ppm, 丙酮—d₆)

ArH	7.68—7.85	4H	(dd)
-----	-----------	----	------

NH 9.84 1H (s)

CH₂ 3.90 2H (s)

b) 2—丙烯酰胺, 2—氟基—3—羟基—3—(4—氟苯基)—N—[(4—三氟甲基)苯基]的制备:

在 50ml 配有磁力搅拌器, 温度计, 橡胶隔膜和 T 型活塞(带真空和氩气层气球接头)的圆底烧瓶中, 将 0.55g (0.275g, 11.4mM) 50%NaH 油分散液悬浮于 1ml 干燥(用 P₂O₅)乙腈中。将悬浮液冷却至 10℃, 在此温度搅拌下, 10 分钟内加入溶于 10ml 干燥(用 LiAlH₄)四氢呋喃中的 1g (4.4mM) 氟基乙酰基—(4—三氟甲基)苯胺化物。将反应混合物冷却至 -10℃, 在此温度下 20 分钟内加入 0.77g (4.8mM, 1.1 当量) 4—氟苄基氟。在加入期间, 反应混合物的温度不允许高于 -5℃。反应进程用 TLC (板: Merck Kieselgel 60 F₂₅₄, 洗脱剂: 石油醚(90—110℃馏分): 丙酮 1 : 1) 监测。

反应混合物再于 0℃搅拌 30 分钟, 然后将反应混合物真空汽提。残余物溶于 30ml 蒸馏水中, 80℃活性碳处理并过滤。产生的浅黄色滤液用 10% 盐酸溶液酸化, 沉淀的晶体被过滤, 水洗并干燥。粗晶体(2.47g)用中压(2 atm)液相色谱纯化, 用硅胶 60 作固定相, 石油醚(90—110 馏分): 丙酮 1 : 1 作淋洗剂。

收集 R_f=0.216 的产物部分, 去掉溶剂之后, 分离出 1.05g 2—丙烯酰胺, 2—氟基—3—羟基—3—(4—氟苯基)—N—[(4—三氟甲基)苯基]。产物具有如下特征:

熔点:195°C(分解)。

HMR(ppm,丙酮—d₆)

ArH	7.36—8.13	8H	(m)
NH	9.5	1H	(s)
OH	16.5	1H	(s)

B13

2—丙烯酰胺,2—氟基—3—羟基—3—环己基—N—[(4—三氟甲基)苯基](C₁₇H₁₇F₃N₂O₂ MW:338.3)的制备如对 B12 所述的进行,用 0.71g(4.8mM,1.1 当量)环己基乙酰基氯代替 4—氟苯甲酰氯。所得产物具有下列特征:

TLC:Rf=0.265(石油醚(90—110°C):丙酮,1:1)

熔点:212°C(分解)

B14

2—氟基—3—羟基—3—(2,2,3,3—四甲基环丙基)丙醇—4—(三氟甲基)苯胺化物的制备如上面对 B12 所述的进行,用 2,2,3,3—四甲基环丙基羰基氯代替 4—氟苯甲酰氯。

B15

2—丙烯酰胺,2—氟基—3—羟基—3—(五氟苯基)—N—[(4—三氟甲基)苯基]的制备如对 B12 所述的进行,用 1.5g(6.51mM,1.1 当量)五氟苯甲酰氯代替 4—氟苯甲酰

氯。所得产物具有下列特征:

TLC:Rf=0.360(石油醚(90—110℃):丙酮,1:1)

熔点:157—158℃。

B16

2—丙烯酰胺,2—氟基—3—羟基—3—((3—苯氧基)苯基)—N—[(4—三氟甲基)苯基](C₂₃H₁₅F₃N₂O₃ MW:424.4)的制备如对 B12 所述的进行,用 1.65g(4.8mM,1.1 当量)3—苯氧基苯甲酰氯代替 4—氟苯甲酰氯。所得产物具有下列特征:

TLC:Rf=0.300(石油醚(90—110℃):丙酮,1:1)

熔点:197—198℃。

B17

2—丁烯酰胺,2—氟基—3—羟基—4—苯基—N—[(4—三氟甲基)苯基]的制备如对 B12 所述的进行,用 0.68g(4.8mM,1.1 当量)苯基乙酰氯代替 4—氟苯甲酰氯。所得产物具有下列特征:

TLC:Rf=0.165(石油醚(90—110℃):丙酮,1:1)

熔点:165—158℃。

B18

2—己烯酰胺,2—氟基—3—羟基—5—甲基—N—[(4—三氟甲基)苯基](C₁₅H₁₅D₃N₂O₂ MW:312.3)的制备如对 B12

所述的进行,用 0.58g (4.8mM, 1.1 当量) 异戊酰氯代替 4—氟苯甲酰氯。所得产物具有下列特征:

TLC: $R_f=0.323$ (石油醚(90—110℃): 丙酮, 1:1)

熔点: 161—163℃。

B19

2—丁烯酰胺, 2—氟基—3—羟基—4, 4—二苯基—N—[(4—三氟甲基)苯基] ($C_{24}H_{17}F_3N_2O_2$ MW: 422.4) 的制备如对 B12 所述的进行, 用 1.12g (4.8mM, 1.1 当量) 二苯基乙酰氯代替 4—氟苯甲酰氯。所得产物具有下列特征:

TLC: $R_f=0.354$ (石油醚(90—110℃): 丙酮, 1:1)

熔点: 195—202℃。

第 3 组化合物

C10

将 340mg (1.5mM) 1—苯基—3—氨基—4—氟基—5—氟甲基—2—吡唑, 210mg (1.5mM) 3, 4—二羟基苯甲醛和 4 滴溶于 30ml 乙醇中的哌啶回流 6 小时。冷却并过滤得到 145mg 黄色固体。蒸发溶剂并用 CH_2Cl_2 —丙酮研制得到另外 145mg 黄色固体 (56% 产率)。产物具有 147℃ 的熔点。

NMR 丙酮 d_6 δ —7.87 (1H, s, 乙烯基), 7.68 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H_2) 7.66—7.45 (5H, m, Ph), 7.28 (1H, dd, $J=8.3, 2.2$ Hz, H_6), 6.92 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H_5)。

C11

C11 用两步方法合成。

a. 合成 3—氨基—4—氰基—5—氰甲基—2—吡唑：

将 2.2g 丙二腈二聚物和于 20ml 水中的 0.9ml N_2H_4 在 100°C 加热 15 分钟。冷却并过滤得到 1.5g (61% 产率) 熔点为 187°C 的白色固体。(NMR 丙酮— d_6 δ 3.88(s).)(参见 Carboni 等人, J. Am. Chem. Soc. 80:2838(1958), 报道 m. p. 197°C)。

b. 与二羟基苯甲醛缩合：

往 0.28g (2 mM) 3,4—二羟基苯甲醛和 1.33g (2.2mM) 于 20ml 乙醇中的 3—氨基—4—氰基—5—氰甲基—2—吡唑中加入三滴吡啶, 反应混合物回流 3 小时。冷却, 过滤并用乙醇洗涤得到 1.3g (56% 产率), 熔点为 300°C 的黄色固体。

C13

将 0.7g, 3mM, 3,5—二叔丁基—4—羟基醛, 0.46g, 3.1mM, 3—氨基—4—氰基—5—氰甲基吡唑(根据 Carboni 等人, J. Chem. Soc., 80:2838, 1958 制备)和 40mg β —苯胺回流 15 小时。冷却并过滤得到 0.5g, 46% 产率, 黄色固体, mp. 255°C 。NMR CDCl_3 δ 7.92(1H, s, 乙烯基), 7.80(2H, s), 5.76(1H, s, OH), 3.75(2H br, s, NH_2), 1.48(18H, s). MS—364(M^+1 , 28), 363(M^+ , 100%), 348(MCH_3 , 58), 292($\text{M}-56-\text{CH}_3$, 31), 147(41), m/e。

第4组化合物

D11

将 435mg (3mM) 3—甲酰基吲哚, 300mg (4.5mM) 2—硫代氨基甲酰乙腈和 20mg β —苯胺(于 30ml 乙醇中)回流六小时。冷却并过滤得到 0.47g (81%产率) 具有 238°C 熔点的黄色固体)。

D12

如 D11 的合成, 所不同的是用 1,1,4—三氟基—2—氨基—1—丙烯代替乙腈衍生物。最终产物熔点 293°C。

D13

如 D11 的合成, 只是用 2—氨基甲酰基乙腈代替乙腈衍生物。最终产物熔点 242°C。

D14

将 0.29g (2mM) 3—甲酰基吲哚, 0.29g (2mM), 3—氨基—4—氟基—5—氟甲基—2—吡啶和 20 mg β —苯胺(于 30ml 乙醇中)回流 4 小时。冷却并过滤得到 0.34g (62%产率) 熔点为 281°C 的黄色固体。

NMR 丙酮 d_6 8.52 (1H, S, 乙烯基 1), 8.42 (1H, S, H_2), 7.79 (1H, m), 7.57 (1H, m), 7.27 (2H, m), 6.17 (1H, br, S, NH)。

MS-274 ($M+$, 100%), 219(14), 91(35), m/e .

D15

0.3 g (1.3mM) 3-氨基-4-氰基-5-氰甲基-2-吡唑, 0.2g (1.36mM) 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-甲酰基吡啶和 20mg β -苯胺在 20ml 乙醇中回流 4 小时。蒸发, 用苯研制并过滤, 得到 0.4g 黄色固体(94%产率), 含 10% 3-氨基-4-氰基-5-氰甲基-2-吡唑。0.4g 用硅胶 (70-220 目) 层析, 用 85:15 二氯甲烷: 甲醇洗脱得到 0.12g 熔点为 250°C 的亮黄色固体。

NMR 丙酮 d_6 8.45 (1H, S₁, 乙烯基), 8.37 (1H, S₁, H₂), 7.78 (1H₁, m), 7.60 (1H₁, m), 7.28 (2H₁, m), 4.47 (2H₁, t, J = 6.8 Hz), 2.29 (2H₁, t, J = 6.8 Hz), 2.24 (6H, S, N-(CH₃)₂). MS-360 ($M+1$, 8%), 359 ($M+$, 31), 289 (100), 261(15), 144(6), m/e .

D16

将 0.4g (1.7mM) 3-氨基-4-氰基-5-氰甲基-2-吡唑, 0.3g (1.73mM) 1-氧代-1-(3,4-二羟基苯基)-2-氰基乙烷和 20mg β -苯胺在 20ml 乙醇中回流 5 小时。冷却并过滤得到 0.1g 褐色固体。制备性色谱得到 20mg (3% 产率) 熔点为 115°C 的橙色固体。

NMR 丙酮 d_6 8.72 (1H, S, 乙烯基), 8.52 (1H₁, S₁, H₂), 7.90 (1H₁, m), 7.73 (1H, m), 7.40 (4H, m), 7.0

(1H, d, $J=8.2$ Hz, H_5), 4.57 (2H, t, $J=7.2$ Hz), 2.46 (2H, t, $J=7.2$ Hz), 2.34 (6H, s, $N(CH_3)_2$), 2.17 (2H, 五重峰, $J=7.2$ Hz)。

D17

0.4g (2mM) 3—甲酰基吲哚, 0.36g 1—氧代—1—(3, 4—二羟基苯基)—2—氰基乙烷和 3 滴哌啶, 在 25ml 乙醇中, 回流 6 小时。用苯处理和研制得到 0.36g 熔点为 225°C 的黄色固体。

NMR 丙酮 d_6 δ 8.77 (1H, s), 7.90 (1H, m), 7.70 (1H, m), 7.40 (4H, m), 7.0 (2H, t, $J=6.7$ Hz), 4.92 (2H, t, $J=6.8$ Hz), 3.26 (2H, t, $J=6.8$ Hz)。

D18

0.29g, 2mM, 3—甲酰基吲哚, 0.29g, 2mM, 3—氨基—4—氰基—5—氰甲基—2—吡唑, 和 20mg β —苯胺在 30mg 乙醇中回流 4 小时。冷却和过滤得到 0.34g, 62% 产率, 黄色固体, mp. 281°C 。

NMR 丙酮 d_6 δ 8.52 (1H, s, 乙烯基), 8.42 (1H, s, H_2), 7.79 (1H, m), 7.75 (1H, m), 7.27 (2H, m), 6.17 (1H, Br, s, NH), MS—274 (M^+ , 100%), 219 (14), 91 (35), m/e.

D20

80mg, 0.55mM, 3—甲酰基吲哚, 130mg, 0.6mM, 3—

氨基—4—氟基—5—氟甲基—1—苯基吡唑和 2 滴吡啶于 10ml 乙醇中回流 8 小时。冷却并过滤得到 120mg, 62% 产率, 黄绿色固体, m. p. 258°C。

NMR 丙酮 d_6 δ 8.56 (1H, S), 8.52 (1H, S), 7.84 (1H, m), 7.60—7.25 (8H, m).

第 5 组

第 5 组化合物以三步制备。

a) N—芳基—草氨酸酯(=乙基—草酰基苯胺化物)的制备:

0.025mol (3.4ml) 草酸二乙酯和 0.1mol 适当的苯胺混在一起并在 190°C 回流 15 分钟。产生的溶液冷却并放置过夜使产物结晶。滤出晶体, 用乙醇洗涤并用热乙醇萃取。滤除不溶物, 溶液放入冰箱内。产生的晶体过滤并干燥。

表 XXVIII

No.	取代基	MP °C	分子式	MW	产率[%]
1a	4-N(CH ₃) ₂	116—118	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₃	236.27	75
1b	3-OH	184—185	C ₁₀ H ₁₁ NO ₄	209.20	86
1c	2-OCH ₃	81—82	C ₁₁ H ₁₃ NO ₄	223.23	60
1d	2-OC ₂ H ₅	74—76	C ₁₂ H ₁₅ NO ₄	237.26	64
1e	3-NO ₂	93—96	C ₁₀ H ₁₀ N ₂ O ₅	238.20	53

b) N—芳基—草氨酸酰肼(N—芳基—草氨酸酰肼)的制备

将 0.05mol 适当的 N—芳基—草氨酸酯(1a…1e)溶于 200ml 乙醇中并慢慢加到充分搅拌的 7.5ml(~0.15mol)水合肼于 50ml 乙醇中的溶液中。混合物在室温放置 48 小时。产生的非均相溶液回流 15 分钟并过滤热溶液。冷至室温后, 过滤沉淀物, 用乙醇洗涤并干燥。

表 XXIX

No.	取代基	MP °C	分子式	MW	产率[%]
2a	4-N(CH ₃) ₂	228—232	C ₁₀ H ₁₄ N ₄ O ₂	222.25	83
2b	3-OH	200—202	C ₈ H ₉ N ₃ O ₃	195.18	72
2c	2-OCH ₃	165—167	C ₉ H ₁₁ N ₃ O ₃	209.21	67
2d	2-OC ₂ H ₅	152—154	C ₁₀ H ₁₃ N ₃ O ₃	223.23	58
2e	3-NO ₂	231—234	C ₈ H ₈ N ₄ O ₅	224.18	49

c)N—芳基—草氨酰基脒的制备:

E10

0.001mol(0.222g)N—(4—二甲氨基)苯基草氨酰基脒肼(2a)溶于 5ml 乙酸中,并于 100°C,在催化量乙酸钠存在下与 0.001mol(0.138g)3,4—二羟基苯甲醛加热 20—25 分钟。反应混合物然后冷却并放置过夜。滤出分离的晶体并用乙酸和水洗涤。

纯产品的产率为 0.23g(68%),m.p. 253°C。

(C₁₇H₁₈N₄O₄, MW:342.36)

元素分析[%]:实测 C,59.51;H,5.28,N,16.25

计算 C,59.64;H,5.30,N,16.37。

E11

0.001mol(0.195g)N—3—羟基苯基草氨酰基酰肼(2b)溶于 5ml 乙酸中,并于 100℃在催化量的乙酸钠存在下与 0.001mol(0.138g)3,4—二羟基苯甲醛加热 20—25 分钟。混合物然后冷却并在室温过夜。滤出析出的晶体并用乙酸和水洗涤。

纯产品的产率为 0.142g (45%) m. p. >260℃。

(C₁₅H₁₃N₃O₅, MW:315.29)

元素分析[%]:实测 C,57.06;H,4.10;N,13.20

计算 C,57.14;H,4.16,N,13.33。

E12

0.001mol(0.195g)N—3—羟基苯基草氨酰基酰肼(2b)溶于 5ml 乙酸中,并于 100℃在催化量的乙酸钠存在下与 0.001mol(0.122g)2—二羟基苯甲醛加热 20—25 分钟。将混合物冷却并在室温过夜。滤出析出的晶体并用乙酸和水洗涤。

纯产品的产率为 0.224g (75%) m. p. 264—266℃。

(C₁₅H₁₃N₃O₄, MW:299.29)

元素分析[%]:实测 C,60.11;H,4.40;N,13.76

计算 C,60.20;H,4.38;N,14.04。

E13

0.001mol(0.21g)N—2—甲氧苯基草氨酰基酰肼(2c)溶于5ml乙酸中,并于100℃在催化量的乙酸钠存在下与0.001mol(0.138g)3,4—二羟基苯甲醛加热20—25分钟。混合物然后冷却并室温过夜。滤出析出的晶体并用乙酸和水洗涤。

纯产品的产率为0.21g(64%) m.p. 232—238℃。

($C_{16}H_{15}N_3O_5$, MW:329.31)

元素分析[%]:实测 C,60.01;H,4.51;N,12.59

计算 C,58.36;H,4.59;N,12.72。

E14

0.001mol(0.22g)N—2—乙氧苯基—草氨酰基酰肼(2d)溶于5ml乙酸中,并于100℃在催化量的乙酸钠存在下与0.001mol(0.138g)3,4—二羟基苯甲醛加热20—25分钟。混合物然后冷却并室温过夜。滤出析出的晶体并用乙酸和水洗涤。

纯产品的产率为0.15g(44%) m.p. 208—214℃。

($C_{17}H_{17}N_3O_3$, MW:343.34)

元素分析[%]:实测 C,59.78;H,4.81;N,12.10

计算 C,59.47;H,4.99;N,12.24。

E15

0.001mol(0.22g)N—3—硝基苯基—草氨酰基酰肼(2e)溶于5ml乙酸中,并于100℃在催化量的乙酸钠存在下

与 0.001mol (0.138g) 3,4—二羟基苯甲醛加热 20—25 分钟。混合物然后冷却并室温过夜。滤出析出的晶体并用乙酸和水洗涤。

纯产品的产率为 0.19g (56%) m. p. $>260^{\circ}\text{C}$ 。

($\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_6$, MW: 344.286)

元素分析[%]: 实测 C, 52.08; H, 3.47; N, 16.10

计算 C, 52.32; H, 3.51; N, 16.27。

E16

0.001mol (0.22g) N—3—硝基苯基草氨酰基酰肼(2e) 溶于 5ml 乙酸中, 并于 100°C 在催化量的乙酸钠存在下与 0.001mol (0.122g) 4—羟基苯甲醛加热 20—25 分钟。混合物然后冷却并室温过夜。滤出析出的晶体并用乙酸和水洗涤。

纯产品的产率为 0.19g (61%) m. p. $>260^{\circ}\text{C}$ 。

($\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_5$, MW: 328.29)

元素分析[%]: 实测 C, 54.80; H, 3.59; N, 16.86

计算 C, 54.88; H, 3.68; N, 17.07。

第 6 组化合物

F10

F10 可用两步路线制备

a) 2—甲基—3—羟乙基喹唑啉—4—酮的制备:

1. 37g (0.01mol) 邻氨基苯甲酸与 8ml 乙酐回流 3 小时。形成的乙酸在大气压下连续蒸出。乙酸形成结束后, 混合物真空蒸发至干。产生的油状物与 2ml 乙醇胺混合并在 160℃ 加热 3 小时, 反应完成后, 将物质冷却, 与醇混合物并室温过夜。过滤收集沉淀的晶体。

m. p. 159—60℃; 1.40g (65%)。

步骤 b

1.08g (0.005mol) 2—甲基—3—羟乙基喹唑啉—4—酮和 0.69g 3,4—二羟基苯甲醛在 160℃ 稠合并再加热 30 分钟。产生的物质溶于异丙醇, 活性碳脱色并室温过夜。沉淀的晶体过滤并干燥。纯产品的产量为 0.79g (49%) m. p. 221—223℃。($C_{18}H_{16}N_2O_4$, MW: 324.34), 元素分析[%]: 实测 C, 66.48; H, 4.86; N, 8.62。计算 C, 66.66; H, 4.97; N, 8.64。

F11 和 F12

1.01g (5mmol) 3,4—二氢—1,4—恶嗪并[3,4—b]喹唑啉—6—酮与 6mmol 相应的苯甲醛衍生物在油浴上于 100—200℃ 稠合。除去反应的水之后, 所得混合物溶于乙醇并用活性碳净化。蒸发溶剂, 产品重结晶。

对于 F11 的制备, 用 3,4—二羟基苯甲醛得到熔点为 290—292℃ 的产物 (85% 产率)。

对于 F12 的制备, 用 3—羟基苯甲醛得到熔点为 208—214℃ 的产品 (63% 产率)。

第7组化合物

苯甲酰基羟亚氨基乙基乙酸酯

在冰冷却下,往10g于20ml乙酸中的苯甲酰基乙基乙酸酯中加入3.7g NaNO_2 。10分钟后加入5ml水。3小时后加入100ml水,滤出固体7.7g,84%产率,mp. 110°C 。

NMR CDCl_3 δ 7.90(2H,m), 7.6—7.5(3H,m), 4.30(2H,q, $J=7.4$ Hz), 1.24(3H,t, $J=7.4$ Hz)。

2—乙氧羰基—6,7—二甲基—3—苯基喹啉

将5g, 22.6mM 苯甲酰基羟亚氨基乙基乙酸酯和3.1g, 22.8mM, 4,5—二甲基—1,2—苯二胺在20ml乙醇和5ml HCl 中回流6小时。用 H_2O , NaHCO_3 , CH_2Cl_2 处理,层析并用己烷研制,得到2g, 29%产率,白色固体,mp. 100°C 。

NMR CDCl_3 δ 7.96(1H,S), 7.93(1H,S), 7.7(2H,m), 7.5(3H,m) 4.30(2H,q, $J=7.0$ Hz), 2.53(6H,S), 1.17(3H,t, $J=7.0$ Hz)。

6,7—二甲基喹啉—2—酮

将2g, 15mM, 4,5—二甲基—1,2—二氨基苯和1.5g, 16mM, 水合乙醛酸在30ml乙醇中回流2小时。冷却并过滤得到1.2g, 46%产率,白色固体 mp. 263°C , S1 溶于丙酮。

NMR DMSO d_6 δ 60 : 40 混合物

主要的— 8.07 (1H,S), 7.55(1H,S), 7.06(1H,S), 2.30(6H,S)。

次要的— 8.02 (1H,S), 7.42(1H,S), 7.28(1H,S), 2.28 (6H,S)。

备注—4.1g 反应得到 3g, 57%。

2—氯—6,7—二甲基喹啉

将 1.1g, 6.2mM, 6,7—二甲基喹啉—2—酮, 1ml POCl_3 和 1ml 二甲基苯胺在 20ml 甲苯中回流 2 小时。处理 ($\text{NH}_3, \text{CH}_2\text{Cl}_2$) 并层析得到 0.4g, 33% 产率, 白色固体, mp. 86°C 。

NMR CDCl_3 δ 8.68(1H,S, H_2), 7.85(1H,S), 7.76(2H,S), 2.50(6H,S)。

G10

将 0.4g (4mM) 苯二胺和 0.6g (4mM) 苯基乙二醛—水合物于 20ml 乙醇, 和 10ml 乙酸中回流 3 小时。用 50ml H_2O 和 80ml CH_2Cl_2 处理, 接着用己烷研制得到 0.38g (46% 产率) 熔点为 65°C 的白色固体。

NMR (CDCl_3 δ 9.44(1H,S), 8.1(4H,m), 7.8(2H,m), 7.6(3H,m)。

MS—206(M+, 100%), 179(M—HCN, 25), 152(37), 103 (M—Ph—CN, 42), m/e。

G12

往 3ml MDF 和 16ml POCl_3 中加入 2.7g (10mM) N—

(3,4—二甲氧基苯基)苯乙酰胺。反应在 90℃ 加热 4 小时, 倾在冰上, 过滤并用水洗得到 2.9g (96% 产率) 熔点为 234℃ 的白色固体。

NMR CDCl_3 : δ 8.26(1H, s, H_4), 8.0(1H, s, H_8), 7.15 (5H, s Ph), 7.15(1H, s, H_5), 4.13, 4.05(6H, 2s OCH_3).

MS: 301, 299 (M^+ , 33%, 100%), 286, 284 ($\text{M}-\text{CH}_3$, 2%, 6%), 258, 256, (6%, 18%), 220(9%), 215, 213 (4%, 13%), m/e .

G11

此化合物通过用于 G12 的方法合成, 只是反应物 N—(3,4,5—三甲氧基苯基)苯乙酰胺被取代。最终产物熔点为 103℃。

G13

将 2.3g (16mM) 水合苯基乙醛酸和 2.2g (16mM) 3,4—二甲基—1,2—苯二胺在 20ml 乙醇中回流 1.5 小时。冷却并过滤得到 3.25g (88% 产率) 熔点为 124℃ 的白色固体。

NMR CDCl_3 δ 9.23(1H, s, H_2), 8.19(1H, d, $J=1.6\text{H}_2$), 8.15(1H, d, $J=1.7\text{H}_2$), 7.90(2H, d, $J=9.0\text{H}_2$), 7.57(3H, m) 2.52(6H, s, CH_3).

MS — 234 (M^+ , 100%), 219 ($\text{M}-\text{CH}_3$, 11), 207 ($\text{M}-\text{HCH}$, 12), 165 ($\text{M}-2\text{HCN}-\text{CH}_3$, 2), 131 ($\text{M}-\text{ph}-\text{CN}$, 3), m/e .

G14

7g 藜芦醚(51mM)被加到 19ml 冰冷的 70% HNO_3 中。冷却 0.5 小时后,0.5 小时内慢慢加入 10ml H_2SO_4 。所得深色悬浮液在室温搅拌 3 小时,将冰和水加到悬浮液中沉淀产物。过滤,水洗并干燥得到 10.2g(96%产率)黄色固体,熔点 120°C (NMR CDCl_3 δ 7.35(2H,S),4.06(6H, OCH_3))。(参见:J. Org, Chem. 12:522(1947),报导的 mp. 130°C ,而 J. Med,Chem. 36:331(1993)报导的 mp. 122°C 。此化合物由 Lancaster Co. 出售,(报导的 mp 101°C)。

2g 1,2—二硝基—4,5—二甲氧基苯用 0.3g PtO_2 氢化 1 小时,然后过滤并蒸发得到 1.5g 黑色固体(参见 J. Med. Chem. 36:331(93),报道为红褐色固体,mp. 151°C)。黑色固体与 1.3g 苯基乙二醛,15ml 绝对乙醇和 15ml 浓 HCl 混合并回流 5 小时。如 G10 处理,得到深色固体,将其用乙醇重结晶得到 0.72g(31%产率)白色固体,熔点 134°C 。

NMR CDCl_3 δ 9.13(1H,S, H_2), 8.16(1H,d, $J=1d$. 6 H_2), 7.60—7.40(5H,m), 4.09(6H,S, OCH_3)。

MS—266(M^+ ,100%), 251 ($\text{M}-\text{CH}_3$,12), 223($\text{M}-\text{CH}_3-\text{CO}$, 13), 196($\text{M}-\text{CH}_3-\text{CO}-\text{HCN}$,5),m/e。

G15

噻吩—2—乙二醛—双—硫代半卡巴脲(3.4mM)和 0.6g(4mM)邻苯二胺在 15ml 乙酸中回流 6 小时。真空蒸去

溶剂,残余物溶于 CH_2Cl_2 并用 H_2O 洗。有机层真空蒸发,残渣用苯—己烷研制得到白色固体(23%产率)mp. 104°C 。

NMR (CDCl_3): δ 9.25(1H, d, H_2), 8.07, 7.72(4H, m, H_{5-8}), 7.85, 7.56, 7.21(3H, m. 噻吩)。

MS: 212(M^+ , 100%), 185($\text{M}-\text{HCN}$, 25%), 141(6%), 106(8%), m/e。

G16

2,3—二氨基吡啶和苯基乙二醛如对 G13 的反应,得到白色固体(77%产率),熔点 135°C 。

NMR CDCl_3 δ 9.25(1H, s. H_2), 9.21, 8.50, 7.71 (8 线 ABC m, $\text{H}_7, \text{H}_5, \text{H}_6$), 8.35(2H, m, Ph), 7.60(3H, m)。

MS—207(M^+ , 100), 180($\text{H}-\text{HCN}$, 8), 179(11), 104(23), 77(14), m/e。

CDCl_3 δ 7.67(1H, dd), 6.89(dd), 6.62(dd), 4.25, 3.30 (br. S.)。

G17

G17 以如下两步合成:

a. 2—甲氧基—4,5—二硝基苯酚的合成

3.3g 1,2—二甲氧基—4,5—二硝基苯在 20ml 48% HBr 中回流 16 小时。加入水,反应用 CH_2Cl_2 提取得到 1.1g 橙色固体。硅胶层析,用含 2% CH_3OH 的 CH_2Cl_2 洗脱得到 0.42g (13%产率)黄色固体,与 KOH 一起变红。

NMR (CDCl_3): δ 7.44(1H, s), 7.42(1H, s), 6.30(1H, s), 4.07(3H, s).

用乙酸乙酯提取水相得到 2g 红色油状物。硅胶层析, 用含 5% CH_3OH 的 CH_2Cl_2 的洗脱得到 0.1g (3.5% 产率) 黄色固体, 熔点 160°C , 与 KOH 呈紫色, 对应于 1,2—二羟基—4,5—二硝基苯。NMR (丙酮— d_6) δ 7.51(2H, s)。

b. 还原并与苯基乙二醛缩合

0.2g 2—甲氧基—4,5—二硝基苯酚用 Pd/C 在 20ml 乙醇中氢化 1 小时。滤掉 Pd , 加入 0.3g 苯基乙二醛, 将反应回流 3 小时。蒸发并用硅胶层析, 用含 1% CH_3OH CH_2Cl_2 的洗脱得到 0.1g 橙色油。

NMR (CDCl_3): δ 8.10, 7.6(7H, m), 3.54(3H, s)。

G18

将 0.56g (4mM), 4,5—二甲基—1,2—二氨基苯和 0.6g (4mM) 苯甲酰基甲酸在 15ml 乙醇中回流 5 小时。冷却并过滤得到 0.8g (80% 产率) 黄色固体, 熔点 275°C 。

NMR (CDCl_3): δ 8.38(2H, m), 7.51(3H, m), 7.70(1H, s), 7.06(1H, s), 2.40(3H, s), 2.37(3H, s). 在 8.38ppm 处照射, 于 7.51ppm 处得到单峰。

G19

3,4—二氨基甲苯和苯基乙二醛如 G13 反应得到浅褐色固体 (31% 产率), 熔点 114°C 。

NMR CDCl_3 δ 9.29, 9.26(2s, 2 : 1, H_2), 8.2, 8.17(2br. s), 8.07—7.90(3H, m), 7.60(3H, m), 2.62(3H, s).

G20

0.15g G14 在 5ml 48% HBr 中回流 23 小时。冷却并过滤得到 95mg (53% 产率) 黄绿色固体, 对应于喹唑啉衍生物的 HBr 盐, mp 280°C 。HBr 用元素分析确定。

NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ 9.25(1H, s, H_2), 8.24(1H, d, $J=1.9$ Hz), 8.20(1H, d, $J=1.9$ Hz), 7.50(3H, m), 7.35(2H, m).

母液用 NaHCO_3 中和。用 EtOAc 提取得到 20mg (15% 产率) 橙色固体, mp 305°C , 相当于游离碱。

NMR (丙酮 d_6): δ 9.19(1H, s, H_2), 8.29(1H, d, $J=1.5$ Hz), 8.25(1H, d, $J=1.5$ Hz), 7.60(3H, m), 7.40(2H, m).

MS: 238(M^+ , 54%), 211($\text{M}-\text{HCN}$, 10%), 154(7%), 108(1,2-苯醌, 100%), m/e.

G21

4-苯甲酰基-1,2-苯二胺和苯基乙二醛如 G13 反应得到白色固体(69% 产率), 熔点 133°C 。

NMR: CDCl_3 δ 9.40(1H, s, H_2), 8.49(1H, s, H_5), 8.27(4H, br, s, $\text{H}_{7,8}\text{H}_2$, '6'), 7.90(2H, d, $J=7.6$ Hz), 7.60(6H, m).

G22

将 0.47g (3mM) 2,3—二氨基苯和 0.47g 水合苯基乙二醛在 20ml 乙醇中回流 1.5 小时。冷却并过滤得到 0.5g (65% 产率) 浅褐色固体, 熔点 163℃。

NMR: CDCl_3 δ 9.38 (1H, s, H_2), 8.71, 8.67 (2H, 2d, $\text{H}_{5,10}$), 8.25, 8.10 (4H, AA' BB' m., $\text{H}_{6,9}$), 7.58 (5H, m, Ph),

MS— 256 (H^+ , 100%), 229 ($\text{H}-\text{CN}$, 12%), 126 (71), m/e.

G23

将 0.6g, 4mM, 苯基乙二醛和 0.6g, 4mM, 4—硝基苯二胺在 15ml 乙醇中回流 1.5 小时。冷却并过滤得到 0.9g, 90% 产率, 白色固体, mp 203℃。

NMR: CDCl_3 δ 9.49 (1H, s, H_2),

9.02 (2H, d, $J=2.5$ Hz, H_5),

8.54 (1H, dd, $J=9.2, 2.5$ Hz, H_7),

8.27 (3H, m, Ph + H_7), 7.60 (3H, m, Ph)。

G24

将 1.4g, 10.3mM, 4,5—二甲基—1,2—苯二胺和 1.9g, 10.2mM, α —氯—3,4—二羟基—苯乙酮在 25ml 乙醇中回流 2 小时。冷却并过滤得到 0.76g, 18% 产率, 深黄色固

体, mp 278°C, 为 HCl 盐。

G25

2. 4g 2—乙氧羰基—6,7—二甲基—3—苯基喹喔啉和 5g KOH 于 20ml 乙醇和 20ml H₂O 中, 在室温搅拌 20 小时。用 HCl 酸化, 过滤并用水洗涤得到 2.1g, 96% 产率, 浅黄色固体, mp 153°C。

NMR 丙酮 d₆ δ 7.92(1H, S), 7.90(1H, S), 7.85(2H, m), 7.50(3H, m), 2.56(6H, S)。

G27: 2—(4—硝基苯基)—6,7—二甲基喹喔啉

1. 4—硝基苯基乙二醛

6.60g (40mmol) 4—硝基苯乙酮溶于 30ml 二恶烷, 5g (45mmol) 二氧化硒溶于 2.2ml 水, 两者混合。混合物在连续搅拌下回流 16 小时。反应混合物通过氧化铝柱以除去硒。真空蒸发溶剂。粗产物不经进一步纯化用于下步。

R_f 0.80(EtOAc)

Y: 7.00 (85%)

IR (cm⁻¹): 1730 (CO), 1520, 1330 (NO₂)

2. 2—(4—硝基苯基)—6,7—二甲基喹喔啉

0.50g (3mmol) 4—硝基苯基乙二醛溶于 20ml 乙醇中, 0.34g (2.5mmol) 1,2—二甲基—4,5—二氨基苯溶于乙醇中。反应混合物搅拌回流 1 小时。冷却后产品结晶, 过滤, 用乙醇, 然后乙醚洗涤。

G28

G28 可用下面对 G29 所述的方案生产,只是用了 3—溴苯胺代替间碘苯胺。

G29

150mg, 0.8mM, 2—氯—6,7—二甲基喹喔啉和 0.8g, 3.6mM, 间碘苯胺在 100℃加热 3.5 小时。层析得到 100mg, 35%产率, 黄色固体, mp 185℃.

NMR CDCl_3 δ 8.33(1H, S), 8.22(1H, m), 7.7(2H, m), 7.40(1H, m). 7.10(2H, m), 2.45(3H, S), 2.43(3H, S).

G30

210mg, 1.1mM, 2—氯—6,7—二甲基—喹喔啉和 0.8g, 3.6mM, 对碘苯胺在 100℃加热 4 小时。层析得到 245mg, 60%产率, 浅绿色固体, mp 228℃.

NMR, CDCl_3 δ 8.32(1H, S), 7.67(1H, S), 7.64(H, S), 7.68, 7.56(4H, ABq, $J_{ab}=9.0$ Hz).

第 8 组

H10

0.01mol(1.07g) 苄胺和 0.01mol(1.38g) 3,4—二羟基苯甲醛混合于 15ml 乙醇中并在水浴上回流 15 分钟, 然后加入 0.01mol(3.44g) 2—(1'—对甲苯磺酰氧乙基)喹唑啉—

4—酮和 1 滴吡啶,混合物回流 6 小时。将所得溶液蒸发并用 5%碳酸氢钠水溶液提取。滤出保留的晶体,水洗并用异丙醇重结晶。

产量:3.07g(77%) mp:209—211℃,

分子式: $C_{24}H_{21}N_3O_3$

元素分析[%]

计算:C:72.17 H:5.30 N:10.52

实测:C:72.12 H:5.26 N:10.46

H11

0.01mol(1.07g)苄胺和 0.01mol(1.22g)水杨醛混合在 15ml 乙醇中,并在水浴上回流 15 分钟,然后加入 0.01mol(3.44g)1—(1'—对甲苯磺酰氧基乙基)喹唑啉—4—酮和 1 滴吡啶并将混合物回流 6 小时。将所得溶液蒸发并用 5%碳酸氢钠水溶液提取。滤出保留的晶体,水洗并用异丙醇重结晶。

产量:2.99g(78%) mp:189—192℃ 分子式: $C_{24}H_{21}N_3O_2$

元素分析[%]

计算:C:75.18 H:5.52 N:10.96

实测:C:75.09 H:5.49 N:10.90

H12

0.01mol(1.07g)苄胺和 0.01mol(1.22g)3—羟基苯甲醛混合在 15ml 乙醇中,并在水浴上回流 15 分钟,然后加入

0.01mol(3.44g)2—(1'—对甲苯磺酰氧基乙基)喹唑啉—4—酮和1滴吡啶并将混合物回流6小时。将所得溶液蒸发并用5%碳酸氢钠水溶液提取。滤出保留的晶体,水洗并用异丙醇重结晶。

产量:2.72g(71%) M. p.:184—185℃ 分子式: $C_{24}H_{21}N_3O_2$

元素分析[%]

计算:C:75.18 H:5.52 N:10.96

实测:C:75.02 H:5.45 N:11.08

H13

0.01mol(1.07g)苄胺和0.01mol(1.22g)3—羟基苯甲醛混合在15ml乙醇中,并在水浴上回流15分钟,然后加入0.01mol(3.44g)2—(1'—对甲苯磺酰氧基乙基)喹唑啉—4—酮和1滴吡啶并将混合物回流6小时。将所得溶液蒸发并用5%碳酸氢钠水溶液提取。滤出保留的晶体,水洗并用异丙醇重结晶。以下重复H₁₂相应段落,只是将其中的“3—”改为“4—”

产量:3.40g(89%) mp:217—219℃ 分子式: $C_{24}H_{21}N_3O_2$

元素分析[%]

计算:C:75.18 H:5.52 N:10.96

实测:C:75.26 H:5.47 N:10.88

H14

0.01mol(1.07g)苄胺和0.01mol(1.54g)3,4,5—三羟

基苯甲醛混合在 15ml 乙醇中,并在水浴上回流 15 分钟,然后加入 0.01mol(3.44g)2—(1'—对甲苯磺酰氧基乙基)喹唑啉—4—酮和 1 滴吡啶并将混合物回流 6 小时。将所得溶液蒸发并用 5%碳酸氢钠水溶液提取。滤出保留的晶体,水洗并用异丙醇重结晶。

产量: 3.36g(81%) mp: 223—225°C 分子式: $C_{24}H_{21}N_3O_4$

元素分析[%]

计算: C: 69.39 H: 5.10 N: 10.11

实测: C: 69.51 H: 5.07 N: 10.08

第 9 组

I10

将 5ml 乙醇中的 0.3g(2mM)5—甲酰基吲哚和 0.4g(2mM),2—氟基—H—(1—(+)—苯乙基)乙酰胺和 2 滴吡啶回流 3 小时。加入水和 HCl,用乙酸乙酯提取反应得到粘性油。硅胶层析得到 0.42g(66%产率)米黄色固体,熔点 76°C。

MS—315 (M^+ , 24%), 196 ($M - NCH(CH_3)C_6H_5$, 22), 195 (25), 188 (21), 173 (24), 168 (13), 149 (57), 145 (100), 134 (92), 116 (53), m/e。

第 10 组

H10

将 230mg, 1.06mM, 5—溴—3,4—二羟基苯甲醛,

76mg, 0.53mM, 二乙腈砒和 10mg β -苯胺于 10ml 乙醇中回流 5 小时。冷却并过滤得到 220mg, 76% 产率, 橙色固体, mp > 300°C。

NMR 丙酮 d_6 δ 8.18(2H, S, 乙烯基), 7.90(2H, d, J=1.6 Hz), 7.78(2H, d, J=1.6 Hz)。

J11: 2-(3-溴-4,5-二羟基苯基)-1-氰基-1-氰甲基磺酰基乙烯

500mg 5-溴-3,4-二羟基苯甲醛和 700mg 二乙腈基砒在 6ml 乙醇中与几滴吡啶回流 4 小时。乙醇在旋转蒸发器中除去, 混合物用乙酸乙酯、稀酸和盐水处理。粗产物的一部分然后用 HPLC 在 C-18 柱上纯化产生约 50mg 2-(3-溴-4,5-二羟基苯基)-1-氰基-1-氰甲基磺酰基乙烯。

第 11 组

6,7-二甲氧基喹唑啉-4-酮

7g 4,5-二甲氧基-2-氨基苯甲酸和 8ml 甲酰胺在 170°C 加热。加入冷水并滤出固体得到 0.9g, 12% 产率, 浅褐色固体, mp. 308°C。

NMR — DMSO d_6 δ 8.0(1H, S) 7.43(1H, S), 7.12(1H, S) 3.89(3H, S), 3.85(3H, S)。

4-氯-6,7-二甲氧基喹唑啉

0.8g, 6,7-二甲氧基喹唑啉-4-酮, 1ml POCl₃ 和 1ml 二甲基苯胺在 20ml 甲苯中回流 3.5 小时。用己烷处理

并研制得到浅灰色固体, 0.5g, 57%产率, mp. 188°C。

NMR CDCl_3 δ 8.88 (1H, S), 7.41 (1H, S), 7.36 (1H, S), 4.09 (3H, S), 4.08 (3H, S)。

P10

0.3g, 1.4mM, 3,4—二羟基—5—溴苯甲醛, 0.15g, 0.7mM, N—3—氟甲基羰基氨基—N—丙基氟基乙酰胺, 和 25mg β —苯胺于 20ml 乙醇中回流 3 小时。冷却并过滤得到 0.24g, 57%产率, 黄色固体, mp 282°C。

P12: 噻吩—2—羧酸 (3,5—二—(三氟甲基)苯胺化物

0.45ml (2.9mmol) 3,5—二—(三氟甲基)苯胺溶于 5ml 绝对吡啶中, 然后冷却至 10°C。连续搅拌下滴加 0.12ml (1.5mmol) 三氯化磷。0.5 小时后加入 0.51g (4mmol) 噻吩—2—羧酸, 并在室温下搅拌 12 小时。真空蒸发溶剂, 经残余物中加入 1N HCl 并用乙酸乙酯提取。乙酸乙酯溶液用碳酸氢钠溶液提取, 硫酸钠干燥, 过滤并蒸发。产物用乙醚研制, 过滤并真空干燥。

m. p. : 145—147°C

Rf: 0.80 (己烷—EtOAc=1:1)

y: 0.62g (80%)

IR (cm^{-1}): 3280 (N—H); 1640 (CONH); 1560 (Car); 1130 (C—F)

P13

3g, 20.1 mM, 3—甲基异喹啉在 20ml 乙酸中和 5ml 30% H_2O_2 在 70℃ 加热 14 小时。将水加入冷却过的溶液, 碳酸氢盐中和。用 CH_2Cl_2 提取并用己烷研制得到 1.9g, 57% 产率, 白色固体, mp 128℃。 (J. O. C., 21:1337(1956), mp 138℃)。NMR CDCl_3 δ 8.86(1H, S), 7.70—7.50(5H, m), 2.64(3H, S)。

P14

a. 0.04g, 1.8mM, 4—氯—6,7—二甲氧基喹唑啉和 0.19g, 2mM, 苯胺在 15ml 乙醇中回流 1 小时。冷却并过滤得到 0.445g, 78% 产率, 浅黄色固体, mp 268℃, 为 HCl 盐 P14a。

b. 游离碱—0.35g P14a 用 H_2O — Na_2CO_3 处理并用 CH_2Cl_2 提取得到 0.13g, 42% 产率, 白色固体, mp 241℃。NMR CDCl_3 δ 8.66 (1H, S, H_2), 7.67(1H, S), 7.63(1H, S), 7.4—7.14(5H, m), 3.96(3H, S), 3.93(3H, S)。

P15: 1—(2—氯苯基亚甲基)—3—(3—甲氧基正丙基)—2,4—噻唑烷二酮

400mg 3—(3—甲氧基正丙基)—2,4—噻唑烷二酮和 260mg 2—氯苯甲醛于 4ml 乙醇的溶液与 1 滴吡啶回流 4 小时。然后将混合物用乙酸乙酯和水处理。粗产物用硅胶柱 (5% 甲醇于二氯甲烷中) 纯化得到 200mg 1—(2—氯苯基亚

甲基)—3—(3—甲氧基正丙基)—2,4—噻唑烷二酮。(P15 也可从 Aldrich Chemical 得到)。

P16

0.69g, 2.5mM, 5—碘香草醛, N—3—苯基—N—丙基 氰基乙酰胺(如 Gazit 等人, J. Med. Chem 34:1896, 1991 所述制备)和 50mg β —苯胺在 30ml 乙醇中回流 5 小时。蒸发得到油状物, 将其用苯—己烷研制得到亮黄色固体, 0.82g, 71% 产率。

mp. 83°C

NMR CDCl_3 δ 8.12(1H, s), 7.75(1H, d, $J=2.0$ Hz), 7.68(1H, d, $J=2.0$ Hz), 7.30—7.10(5H, m), 3.96(3H, s, O, CH_3), 3.45(2H, q, $J=6.0$ Hz), 2.70(2H, t, $J=6.0$ Hz), 1.95(2H, quin, $J=6.0$ Hz).

MS — 462(M^+ , 53), 357($\text{M}-\text{CH}_2$)₃Ph, 18), 335($\text{M}-\text{I}$, 100), 327($\text{M}-\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{ph}$, 31), m/e.

P17

a. 0.4g, 1.8mM, 4—氯—6,7—二甲氧基噻唑啉和 0.24g, 2mM, 二氢吲哚在 10ml 乙醇中回流 2 小时, 冷却并过滤得到 0.46g, 74% 产率, 黄色固体(P17a), mp. 238°C.

b. 游离碱—0.3g AG P17a 用 $\text{H}_2\text{O}-\text{Na}_2\text{CO}_3$ 处理并用 CH_2Cl_2 提取得到 0.13g, 48% 产率, 白色固体, mp. 158°C.

NMR CDCl_3 δ 8.79(1H, s, H_2), 7.30(1H, s), 7.28

(1H,S), 7.14—6.80(4H,m), 4.36(2H,t,J=7.6 Hz), 4.06(3H,S,OCH₃), 3.85(3H,S,OCH₃), 3.22(2H,t,J=7.6 Hz).

P18: 1—氟基—2—(3—乙氧基—4—羟基苯基)—1—甲氧羰基乙烯

20g 3—乙氧基—4—羟基苯甲醛和 13g 氟基乙酸甲酯的混合物在 100ml 乙醇中与 1ml 吡啶回流 4 小时。使粗混合物冷至室温,并在搅拌下加水直至固体开始形成。然后将此混合物冷冻 4 小时并抽滤固体,用冷的乙醇和水的混合物(1:2)洗涤,抽干得到 25g 1—氟基—2—(3—乙氧基—4—羟基苯基)—1—甲氧羰基乙烯。

P19: N—2—氟苯基—(2—氟基—2—N—吗啉基羰基)硫代乙酰胺

在 0℃ 将 680mg 乙醇钠加到 1.5g N—吗啉基氟基乙酰胺于 20ml 四氢呋喃的溶液中。此混合物在 0℃ 搅拌 1 小时,并滴加 5ml 四氢呋喃中的 1.7g 2—氟苯基异硫氰酸酯。加完后,混合物温热至室温并在 50℃ 加热 6 小时。冷却,除去所有乙醇,所得固体悬浮于 10ml 水中。然后加入 3ml 1N 氢氧化钠溶液,剧烈摇动并用 50ml 乙醚洗涤。水层然后用 1N 盐酸酸化直至 pH 1。然后抽滤收集固体。产生 750mg N—2—氟苯基—(2—氟基—2—N—吗啉基羰基)硫代乙酰胺。(P19 也可从 Ryan Scientific 得到)。

P20: N—2—氯苄基—(2—氟基—2—N—3—三氟苄基氨基羰基)硫代乙酰胺

P20 用与 P19 所述相似的条件合成,但开始用 N—3—三氟甲基苄基氟基乙酰胺。(P20 也可从 Ryan Scientific 得到)

P21: N—3—甲氧基苄基—(2—氟基—2—N—吡咯烷基羰基)硫代乙酰胺

P21 用与 P19 所述相似的条件合成,但开始用 N—吡咯烷基氟基乙酰胺和 3—甲氧基苄基异硫氰酸酯作试剂。(P21 也可从 Ryan Scientific 得到)。

P22: N—4—三氟甲基苄基—3,5—二甲基异恶唑—4—甲酰胺

P22 用与 N—三氟甲基苄基—3,5—二甲基异恶唑—4—甲酰胺(A.13)所述相同的条件制造,但开始用 4—三氟甲基苄胺。

P23: N—三氟甲基苄基—3—甲基异恶唑—4—甲酰胺

3g 3—甲基异恶唑—4—羧酸和 4.8g 1,3—二环己基碳二亚胺于 30ml 二氯甲烷的溶液在室温搅拌 30 分钟。然后滴加 8ml 4—三氟甲基苄胺,混合物在室温搅拌过夜。再将混

合物用乙酸乙酯(100ml)稀释并用稀盐酸溶液,饱和碳酸氢钠和氯化钠溶液处理。硫酸钠干燥,过滤并浓缩。粗产物用乙醇和水结晶得到 1.5g N—三氟甲基苄基—3—甲基异恶唑—4—甲酰胺。

P24: 1—三氟甲基苄氨基羰基—1—氟基—2—羟基丙烯

将 500mg N—三氟甲基苄基—3—甲基异恶唑—4—甲酰胺于 5ml 乙醇的溶液加到 300mg 1,8—二氮杂双环[5.4.0]十一碳—7—烯中。混合物然后在室温搅拌 1 小时并用 2ml 2N 盐酸溶液酸化。过滤收集固体得到 350mg 1—三氟甲基苄基氨基羰基—1—氟基—2—羟基丙烯。

P25

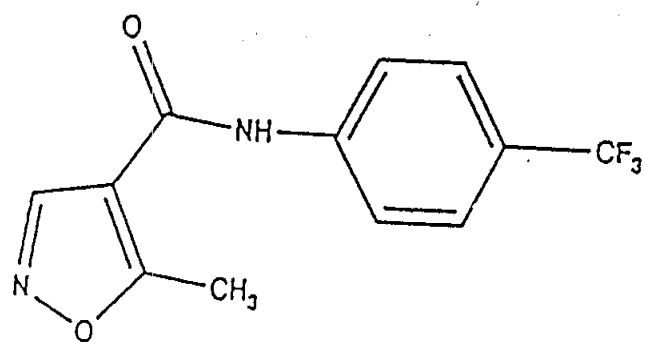
将 0.42g, 3mM, 3,4—二羟基苯甲醛, 0.6g, 3.1mM, N—4—氟苄基氟基乙酰胺和 2.0mg β —苯胺回流 5 小时。浓缩并过滤得到 0.89g, 95% 产率, 黄色固体, mp 212°C。

NMR 丙酮 d_6 δ 8.10(1H, s, 乙烯基), 7.68(1H, d, $J=2.3$ Hz, H_2), 7.40(3H, m, H_6, H_2, H_6), 7.09(2H, t, $J=8.8$ Hz, $H_3, 5'$), 6.98(1H, d, $J=8.3$ Hz, H_5), 4.56(2H, br, s).

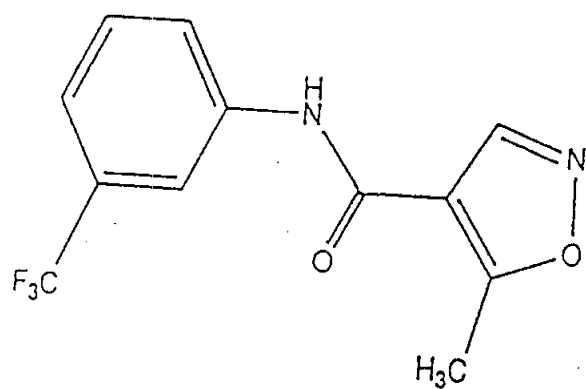
MS—312(M^+ , 46%), 311(30), 295($H-OH$, 35), 161(17), 124($NHCH_4C_6H_4F$, 100%), 109($CH_2C_6H_4F$, 73)— m/e .

其它实施方案在下述的权利要求书中。

说明书附图



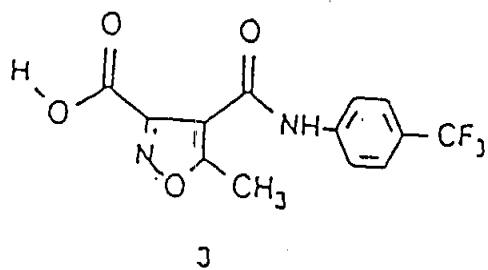
A10



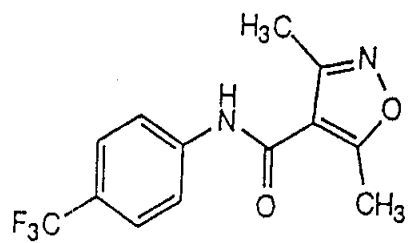
A11

第1组

图 1a



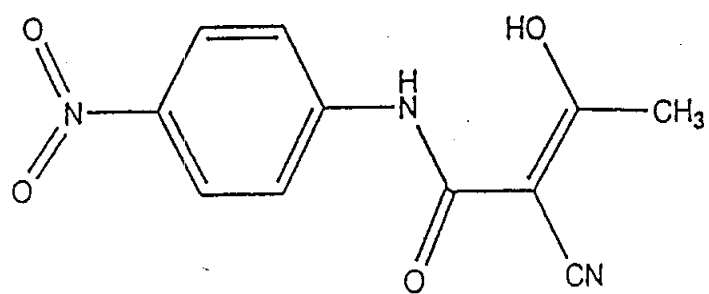
A12



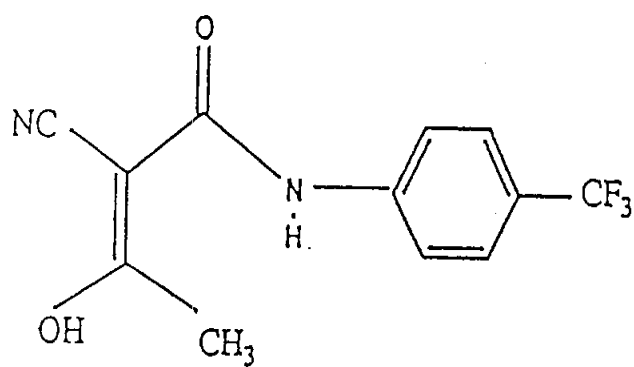
A13

第 1 组续

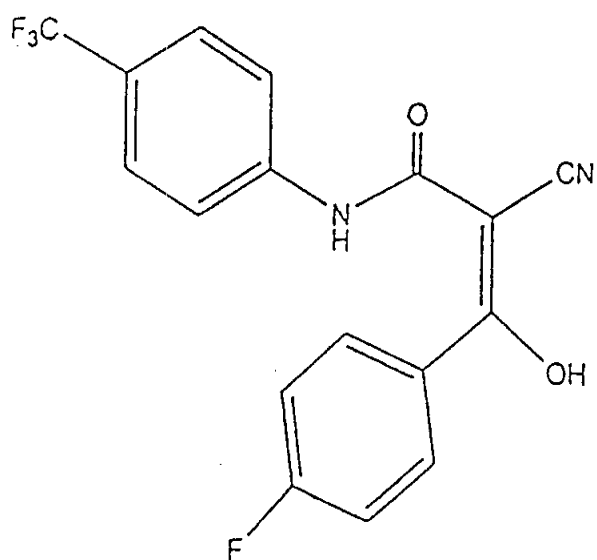
图 1a



B10



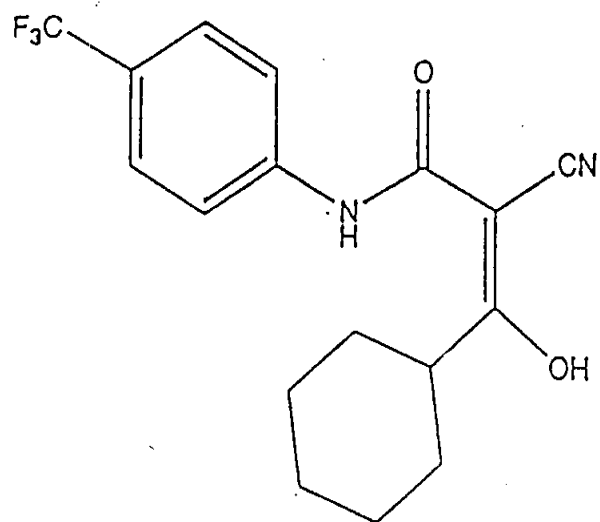
B11



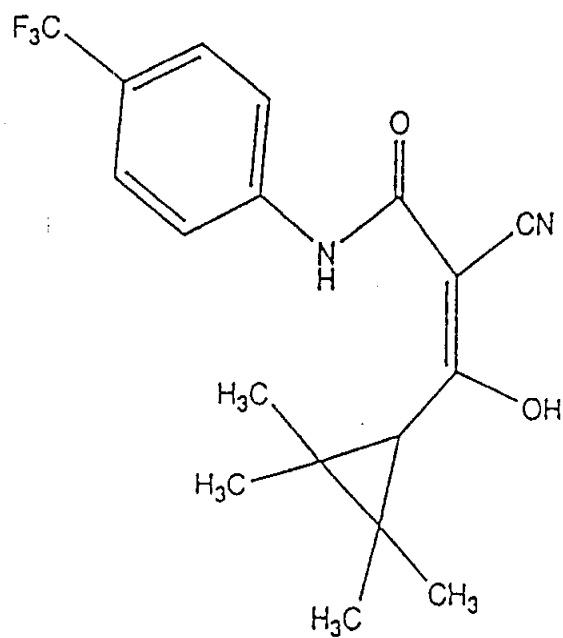
B12

第 2 组

图 1b



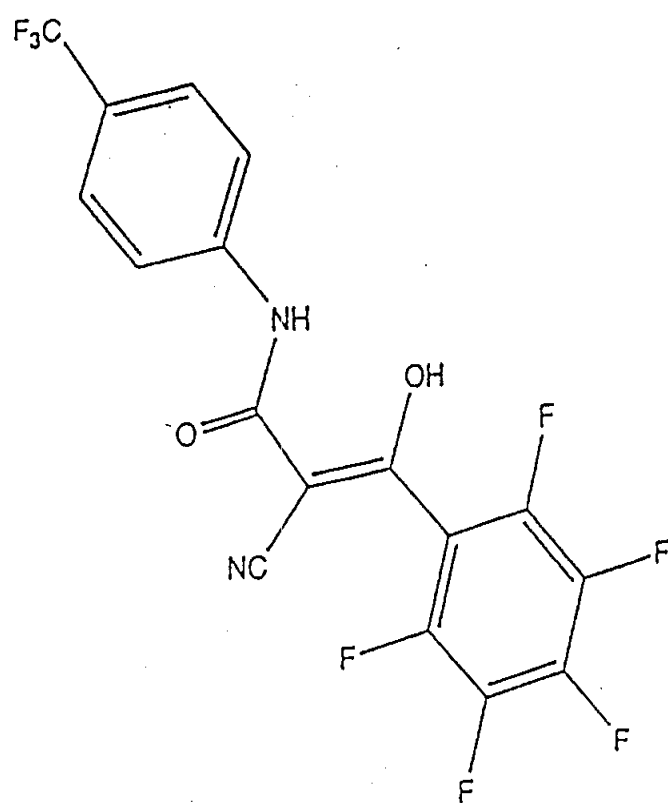
B13



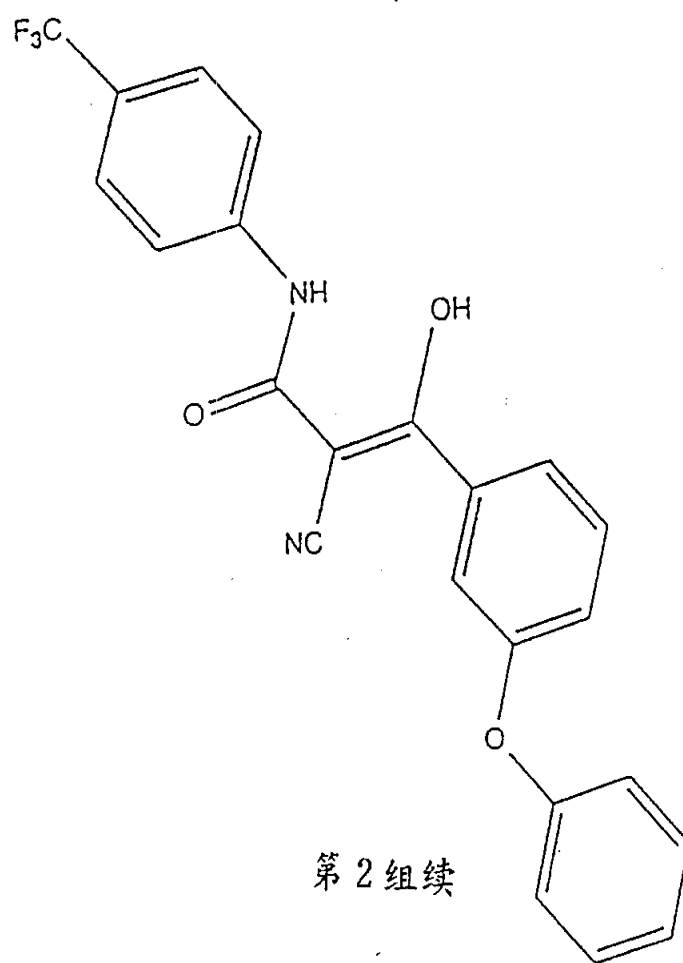
B14

第 2 组续

图 1b



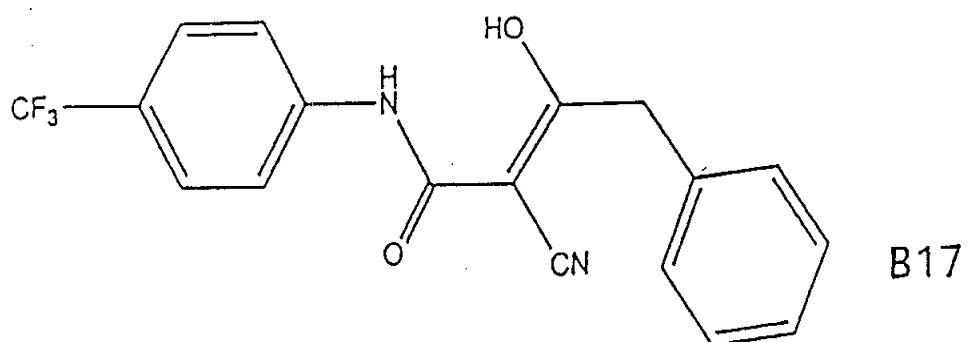
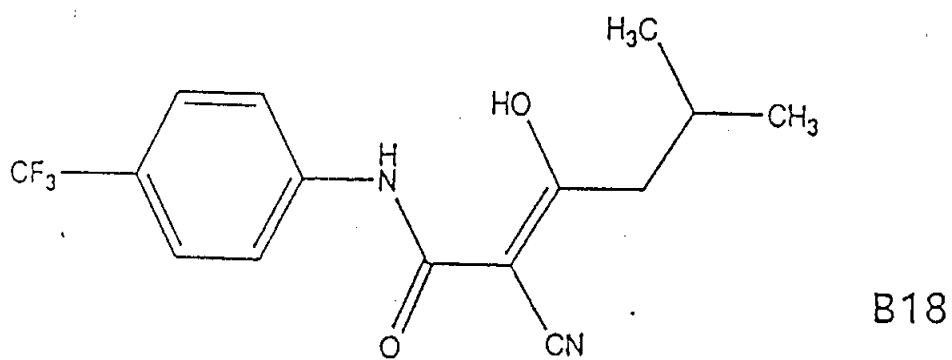
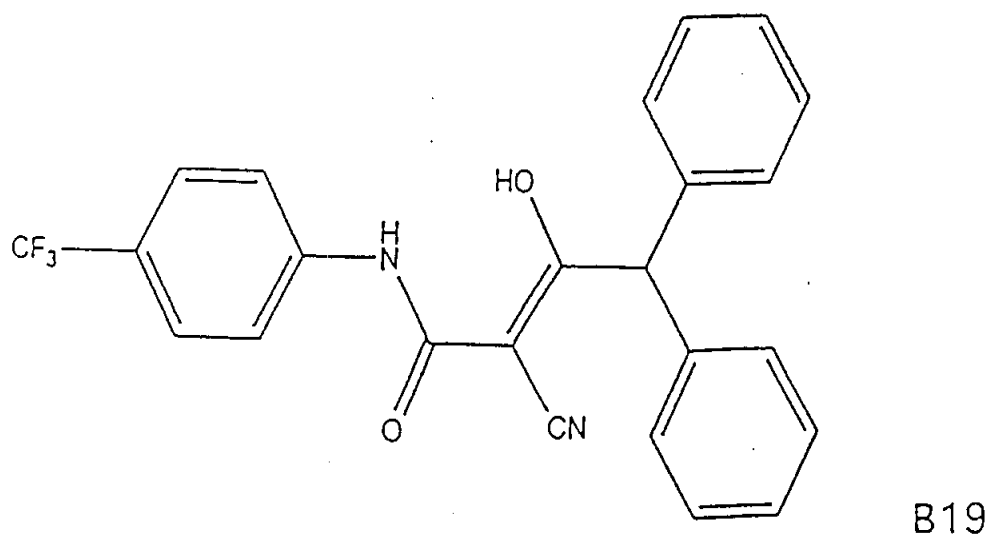
B15



B16

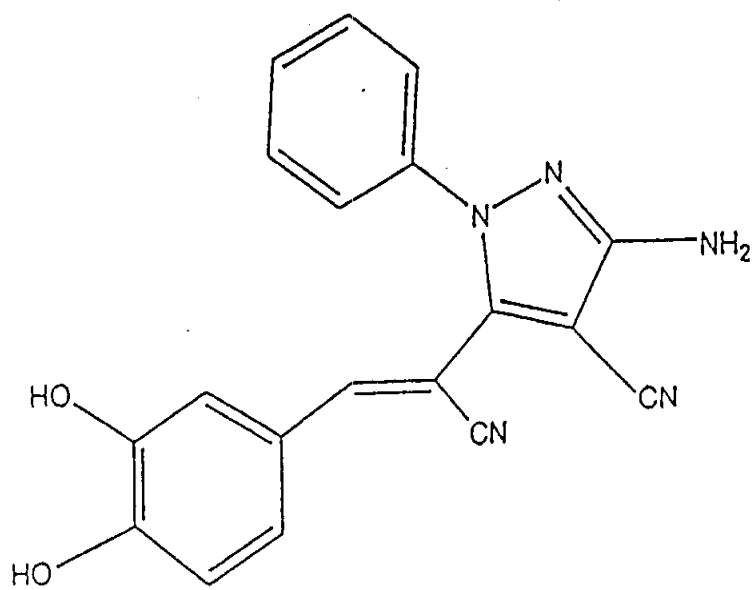
第 2 组续

图 1b

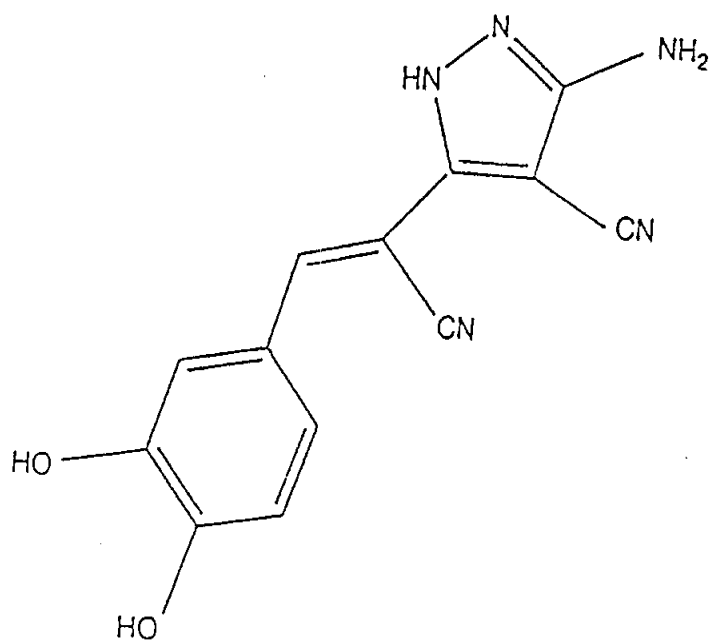


第 2 组续

图 1b



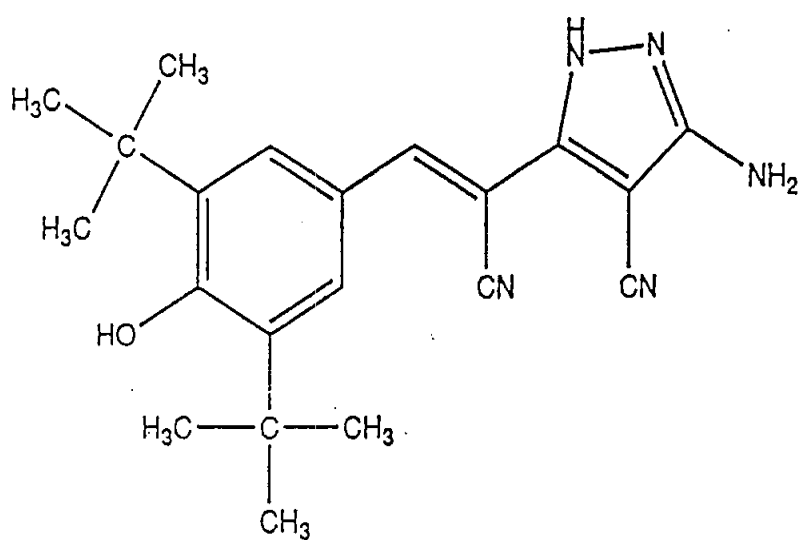
C10



C11

第3组

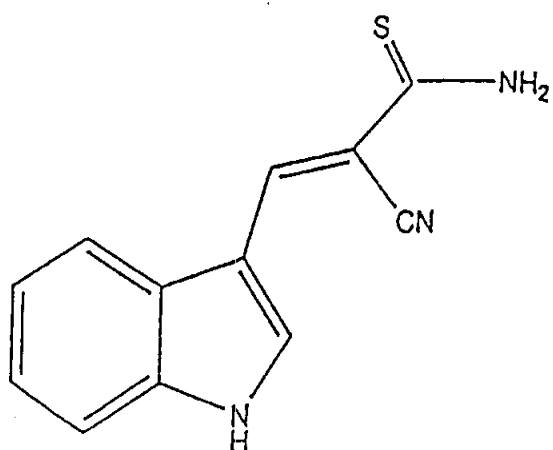
图 1c



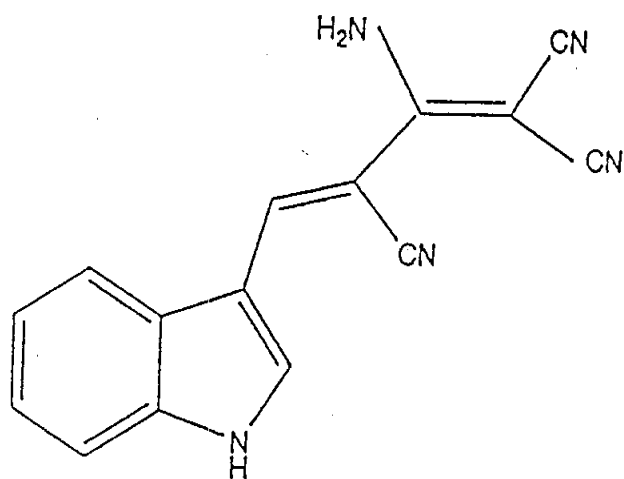
C13

第 3 组续

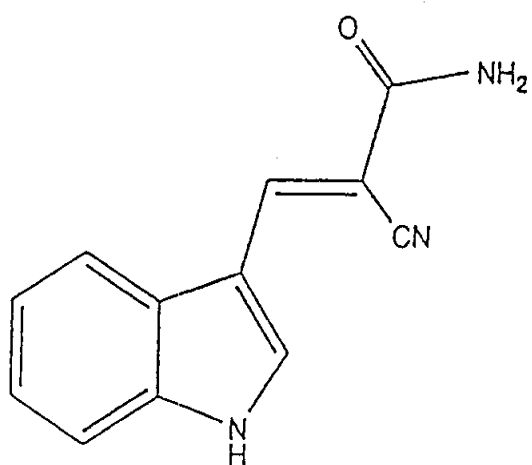
图 1c



D11



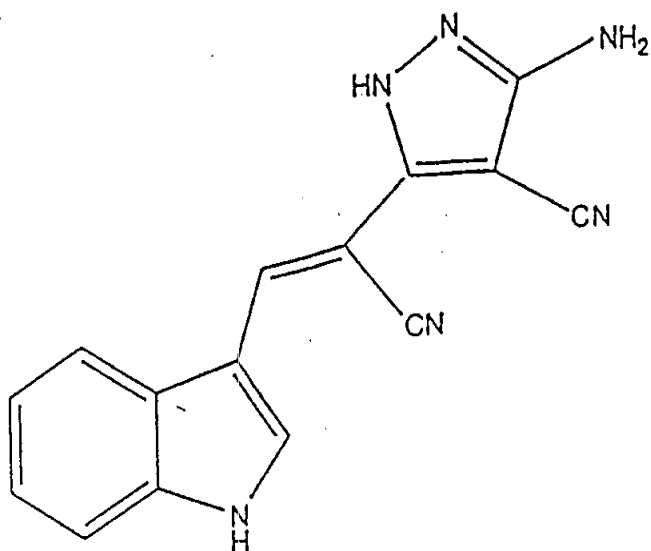
D12



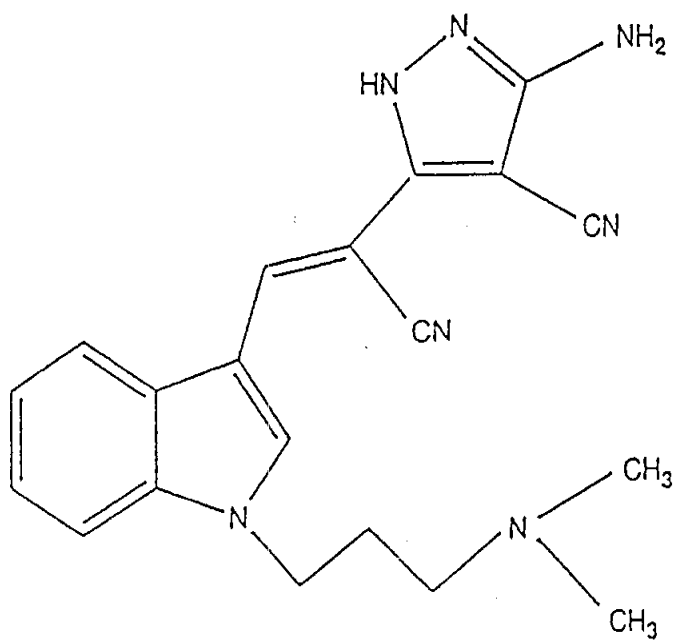
D13

第 4 组

图 1d



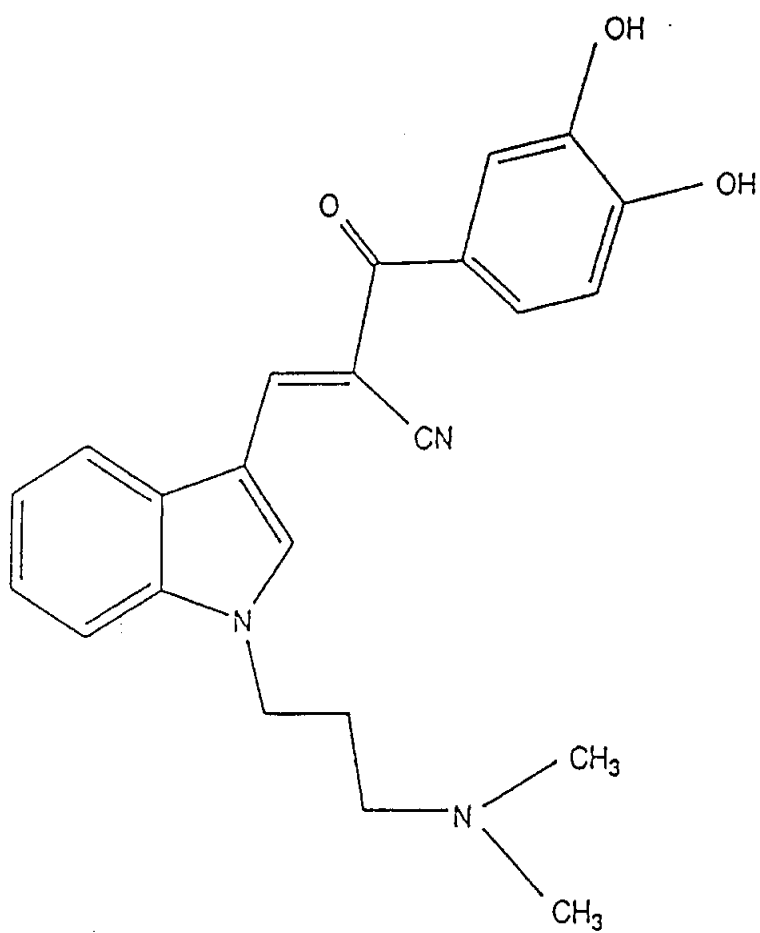
D14



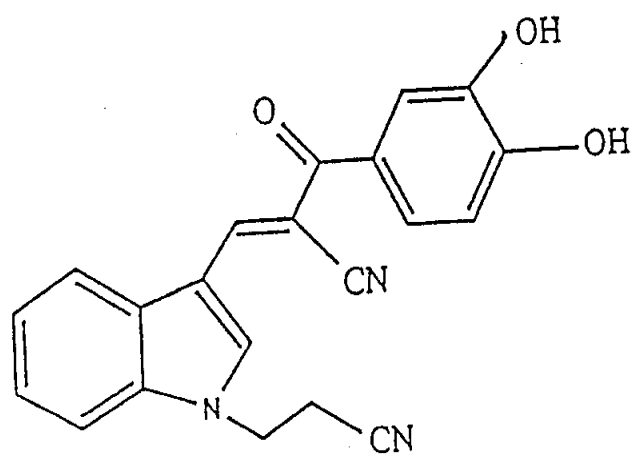
D15

第 4 组续

图 1d



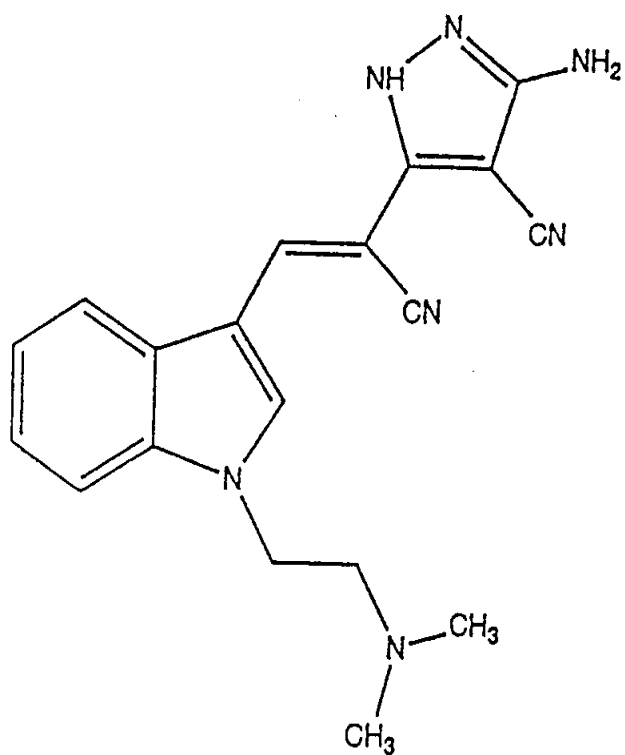
D16



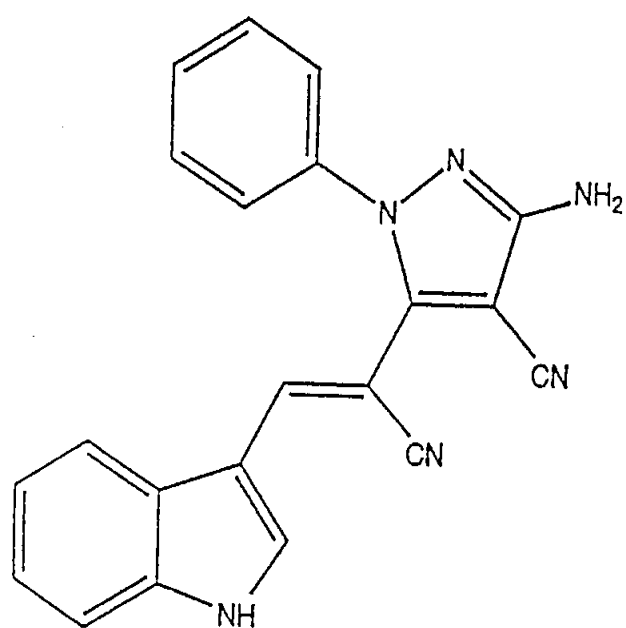
D17

第 4 组续

图 1d



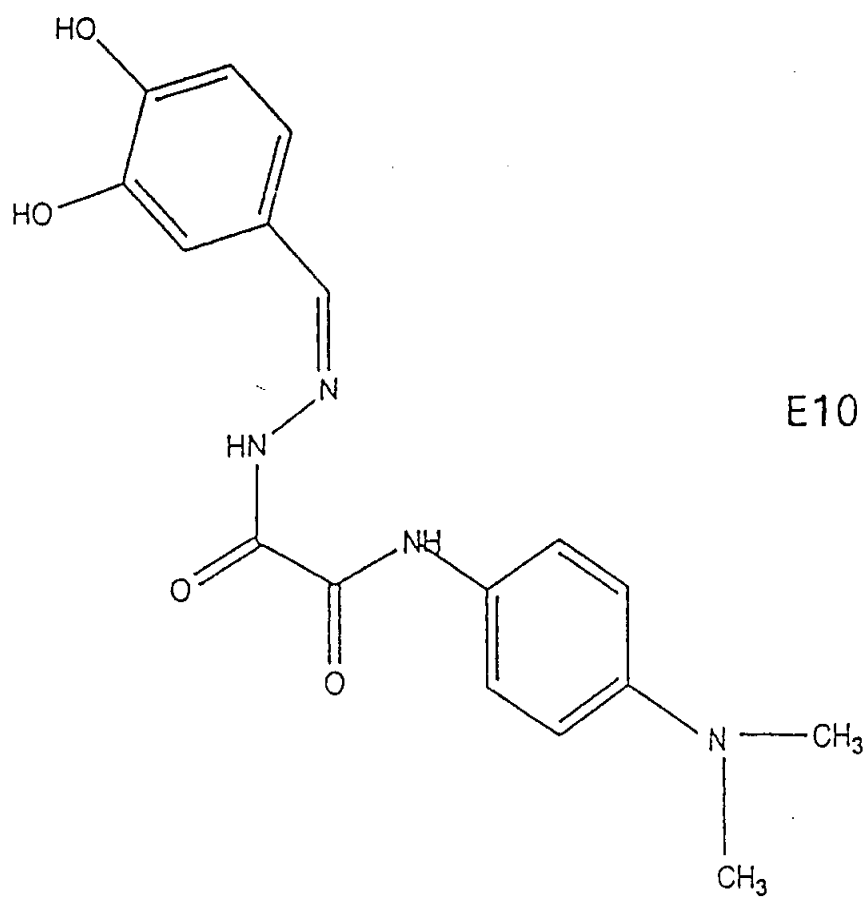
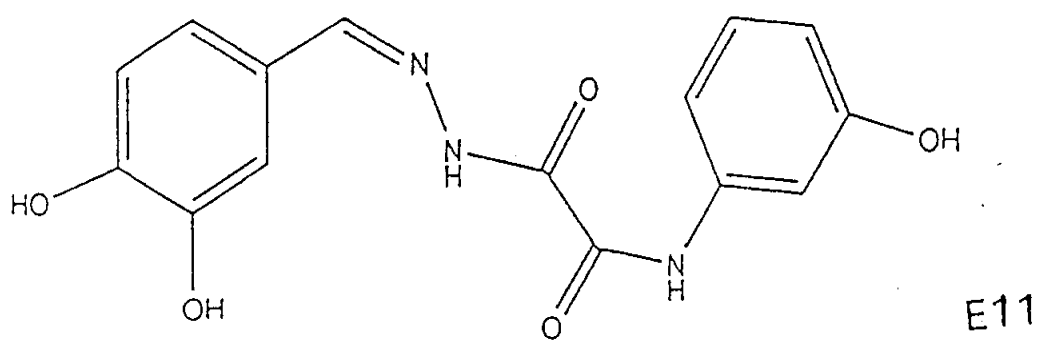
D18



D20

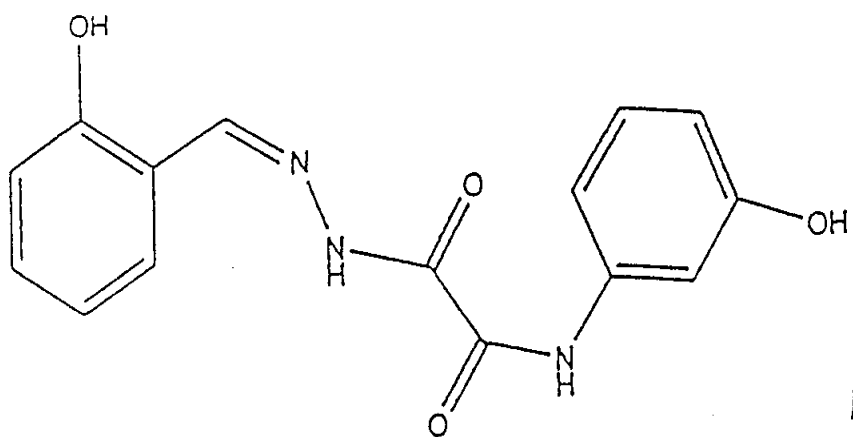
第 4 组续

图 1d

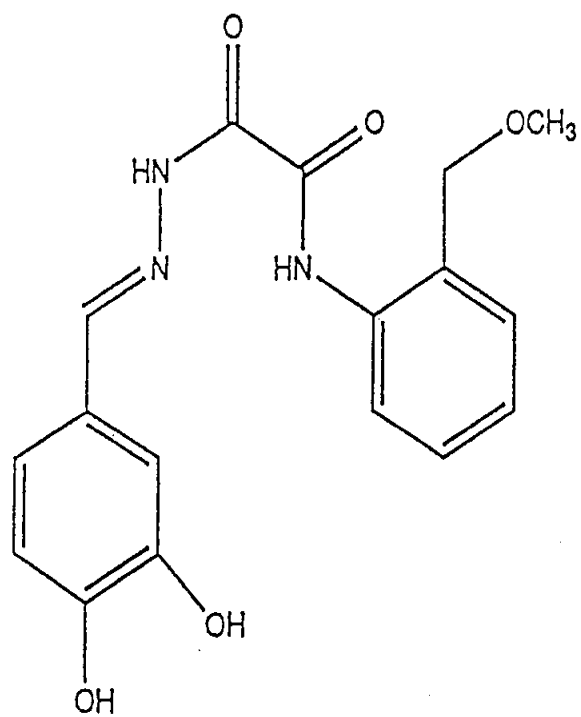


第 5 组

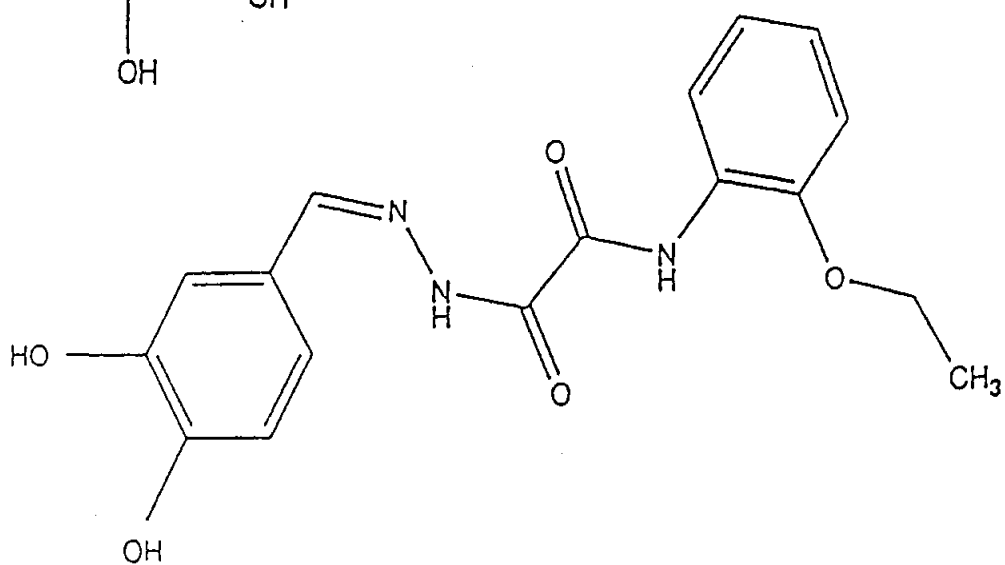
图 1e



E12



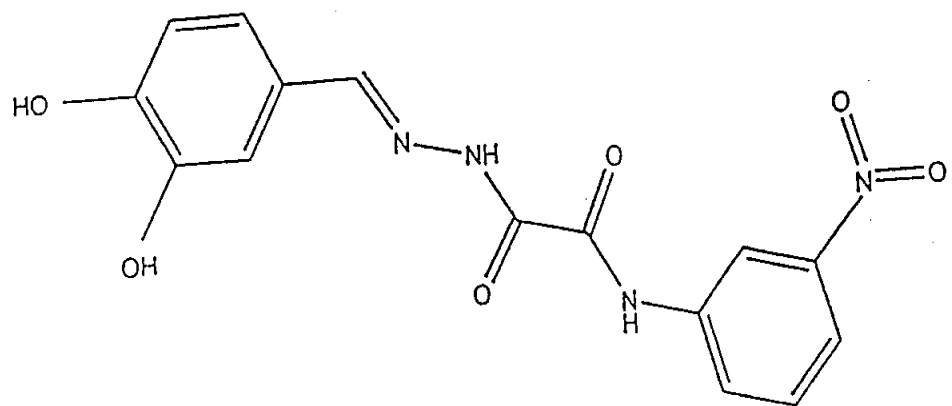
E13



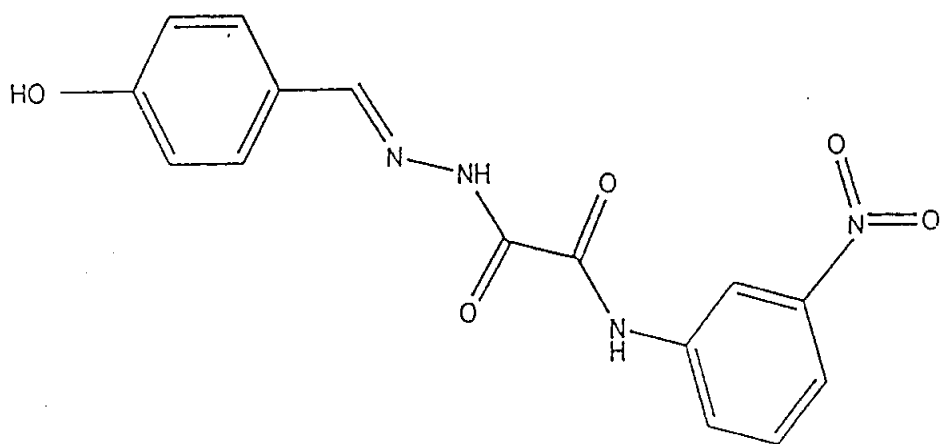
E14

第 5 组续

图 1e



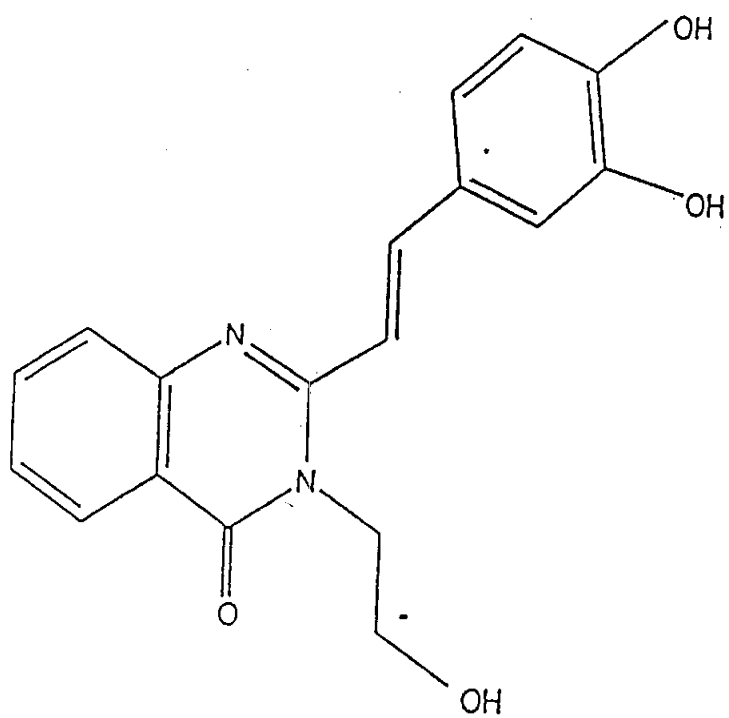
E15



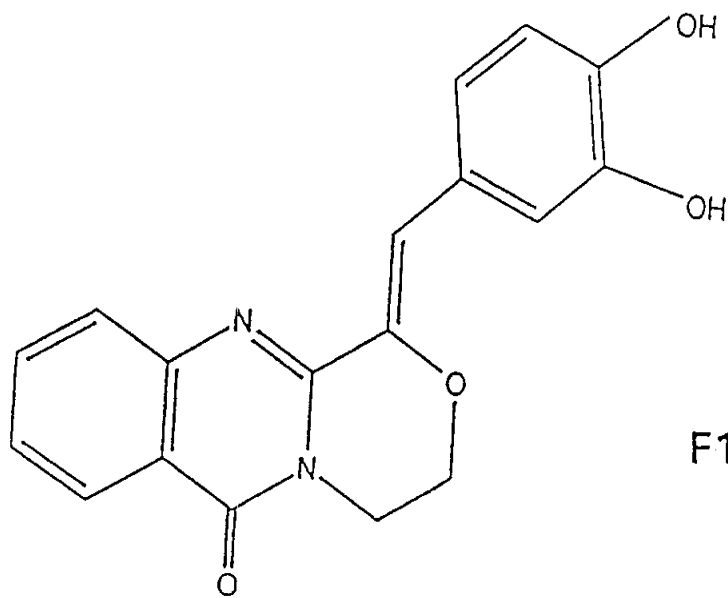
E16

第 5 组续

图 1e



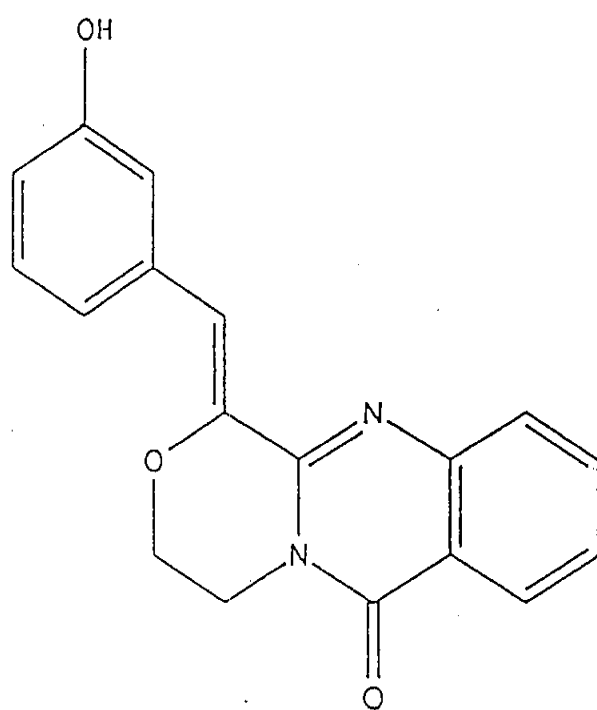
F10



F11

第 6 组

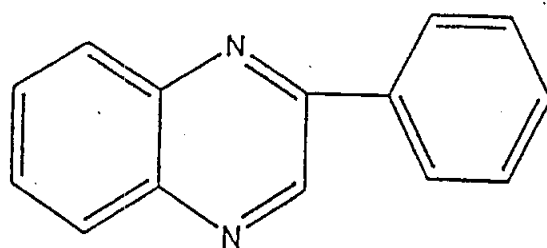
图 1f



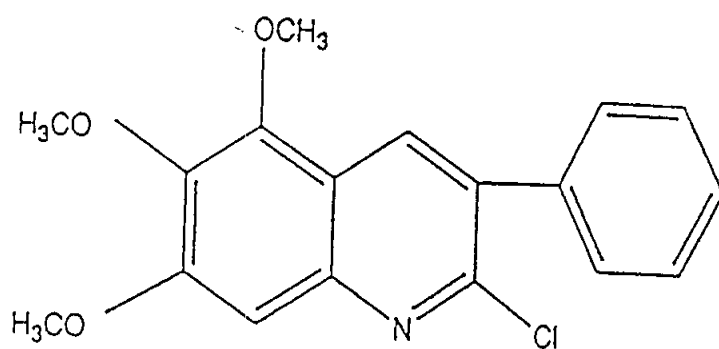
F12

第 6 组续

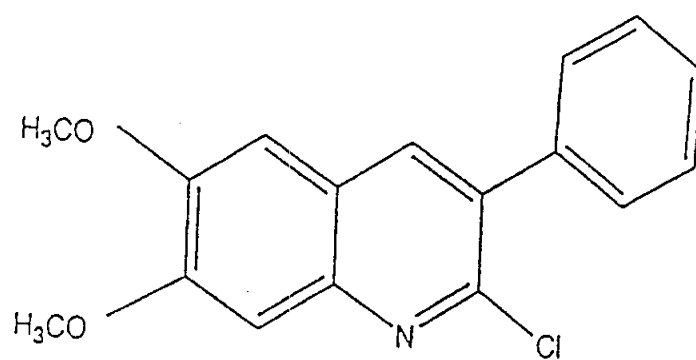
图 1f



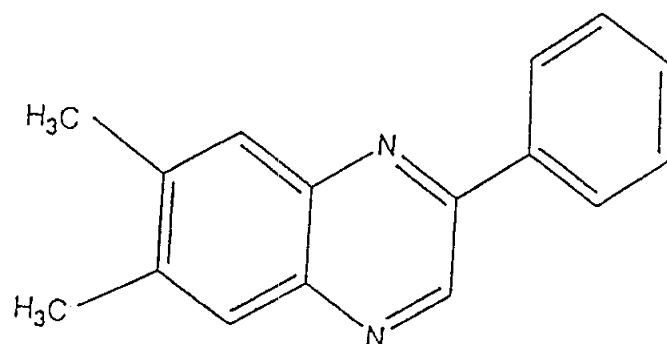
G10



G11



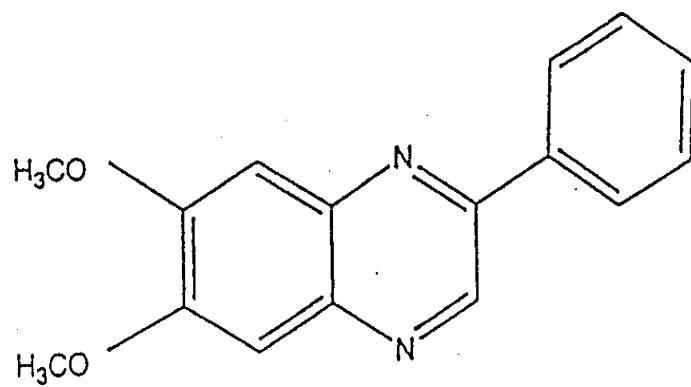
G12



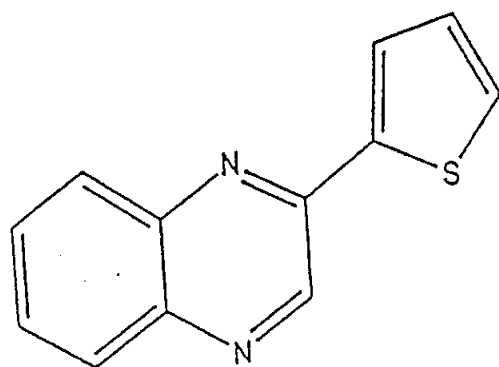
G13

第7组

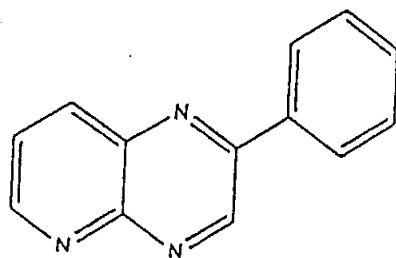
图 1g



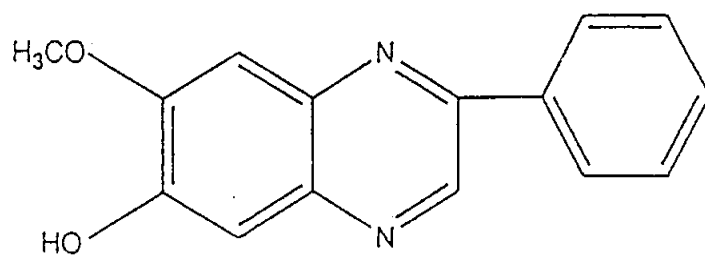
G14



G15



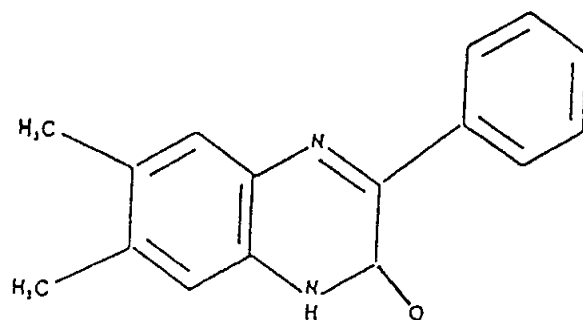
G16



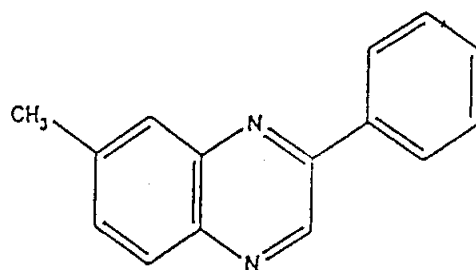
G17

第 7 组续

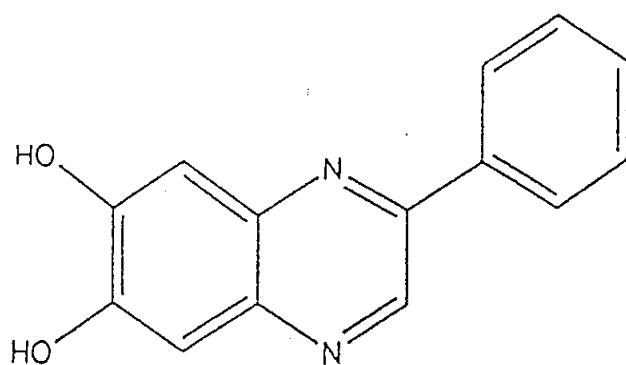
图 1g



G18



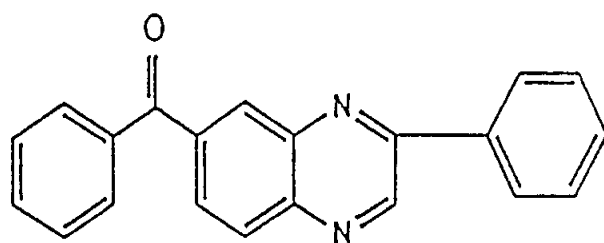
G19



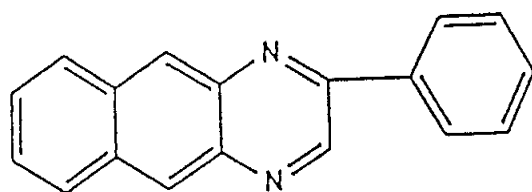
G20 (HBr 盐)

第 7 组续

图 1g



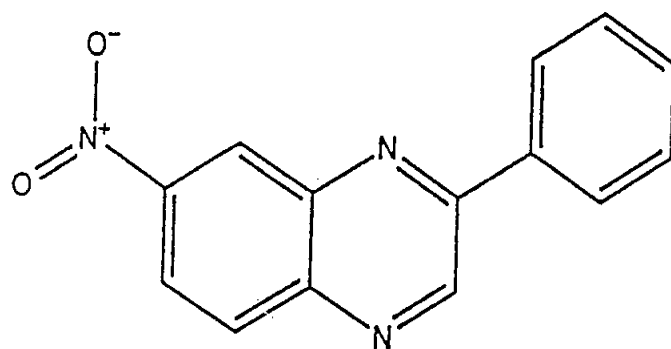
G21



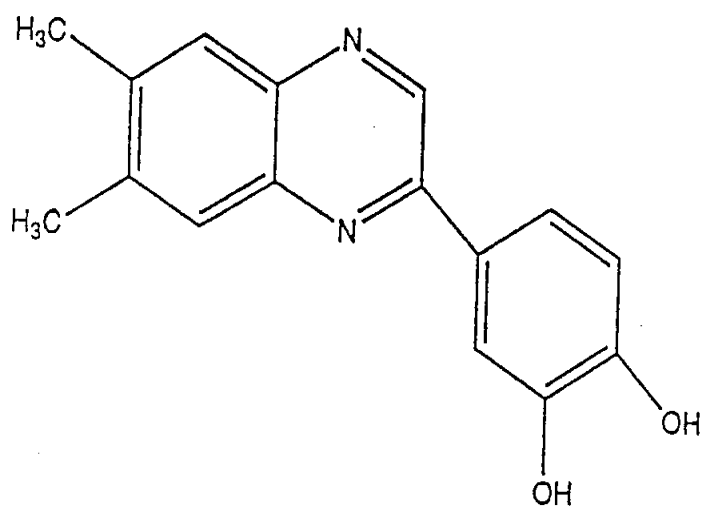
G22

第 7 组续

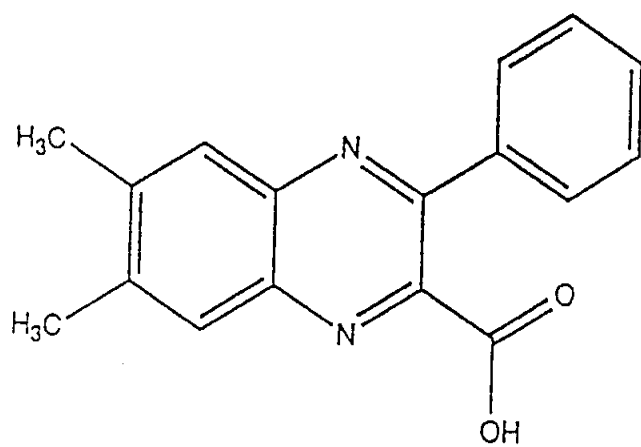
图 1g



G23



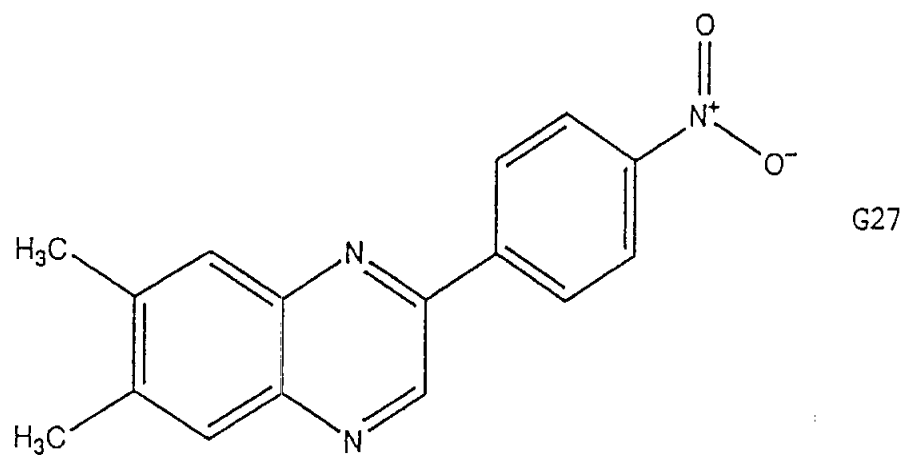
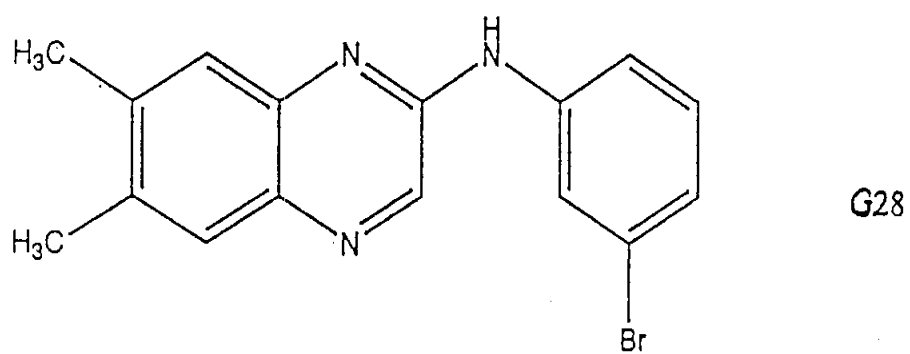
G24



G25

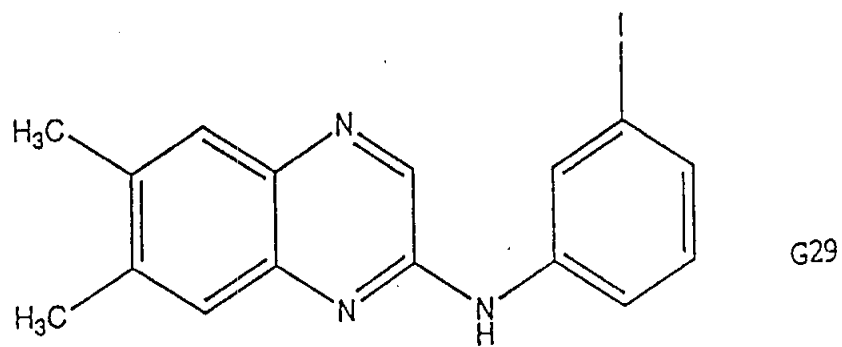
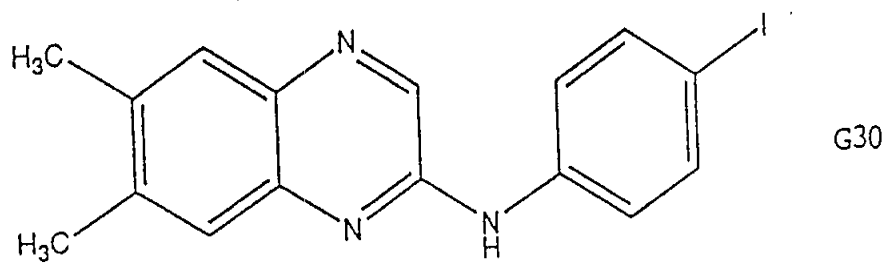
第7组续

图 1g



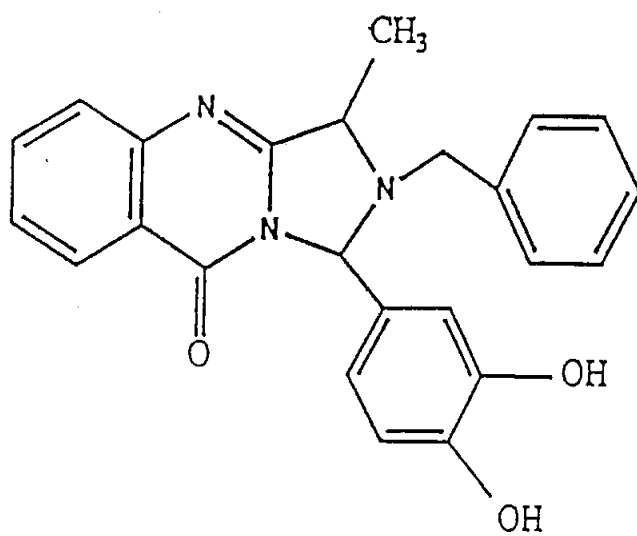
第 7 组续

图 1g

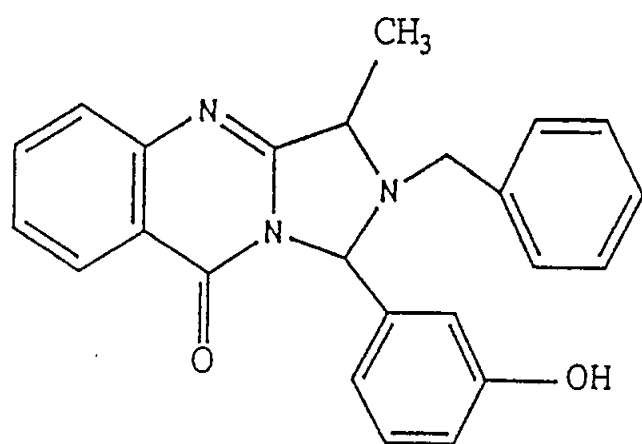


第 7 组续

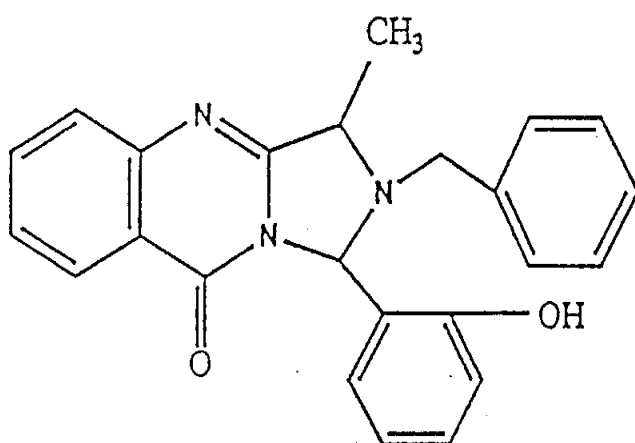
图 1g



H10



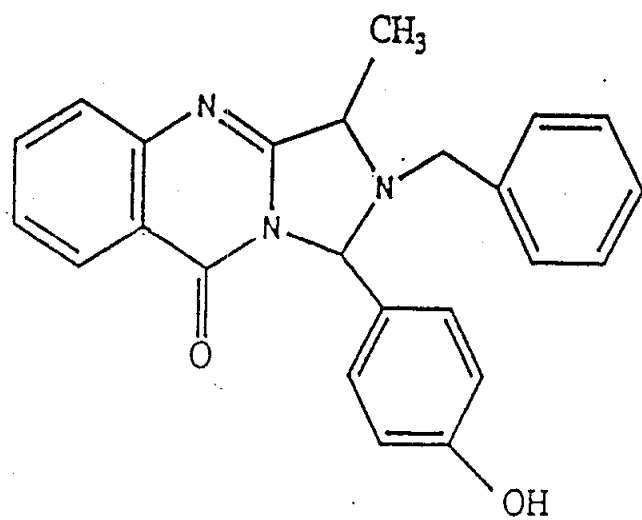
H12



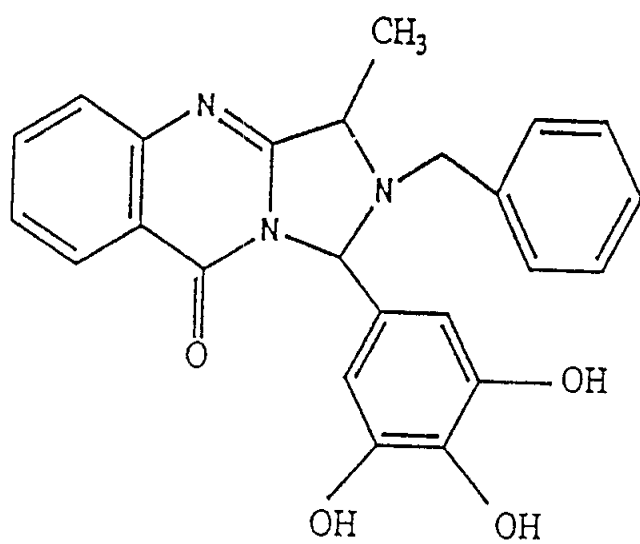
H11

第 8 组

图 1h



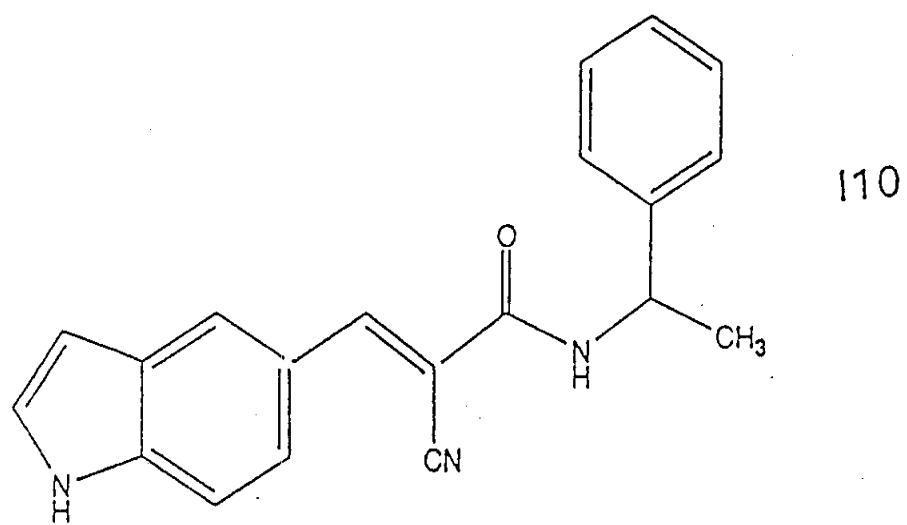
H13



H14

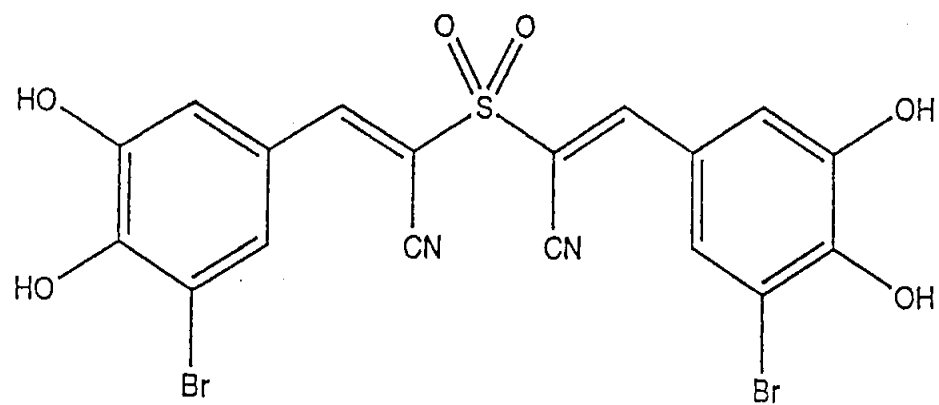
第 8 组续

图 1h

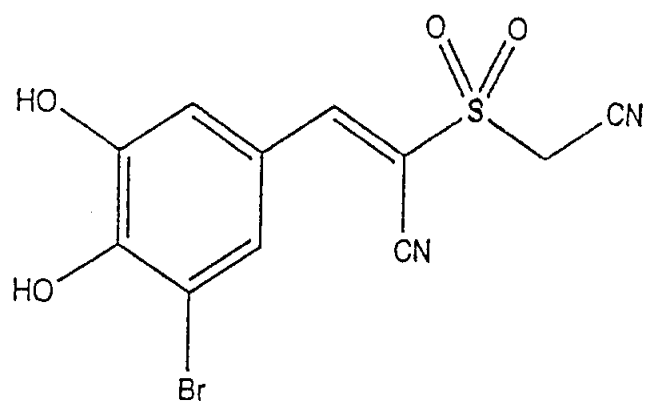


第 9 组

图 11



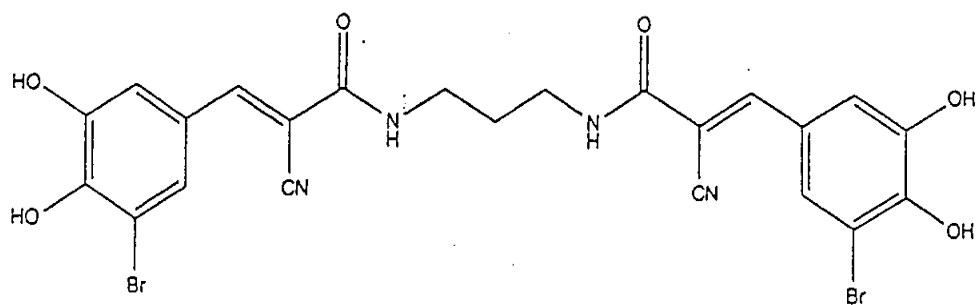
J10



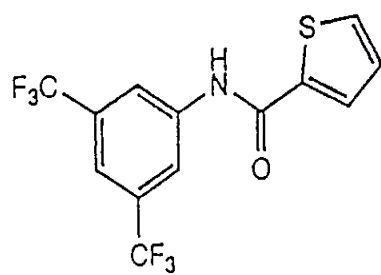
J11

第 10 组

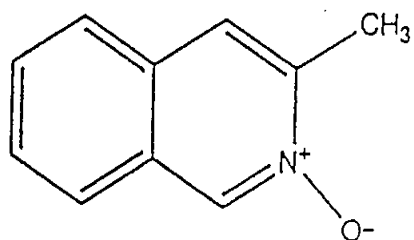
图 1j



P10



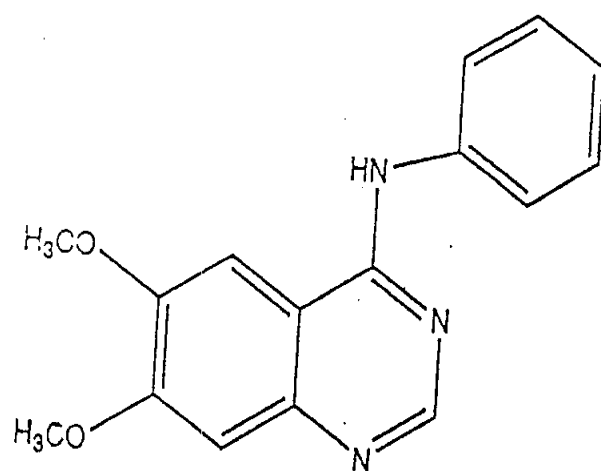
P12



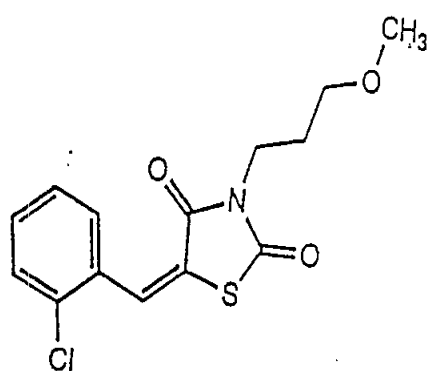
P13

第 11 组

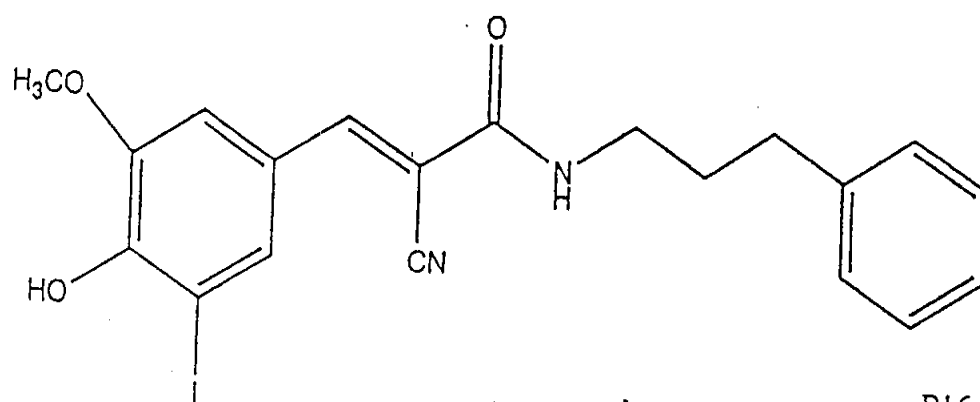
图 1k



P14



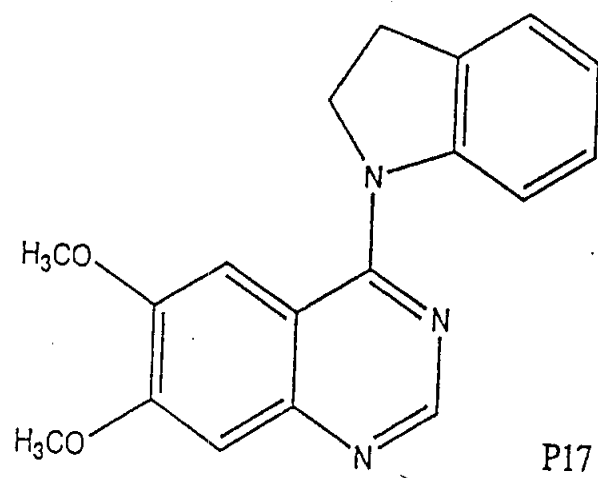
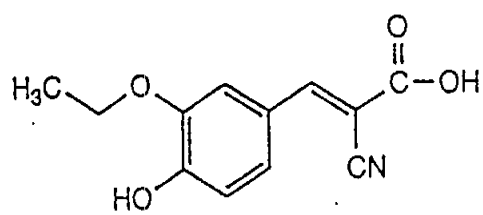
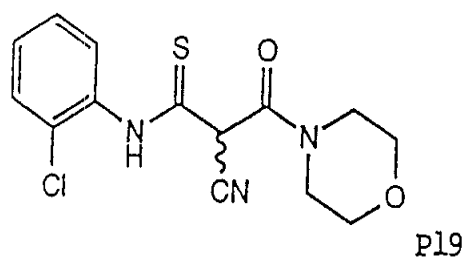
P15



P16

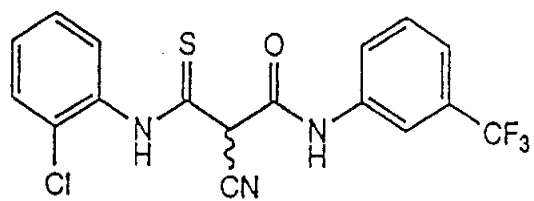
第 11 组续

图 1k

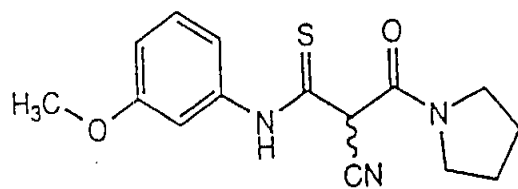


第 11 组续

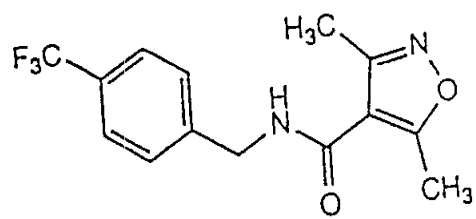
图 1k



P20



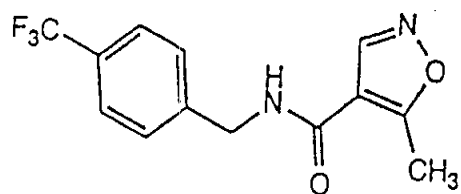
P21



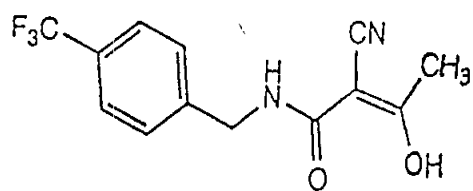
P22

第 11 组续

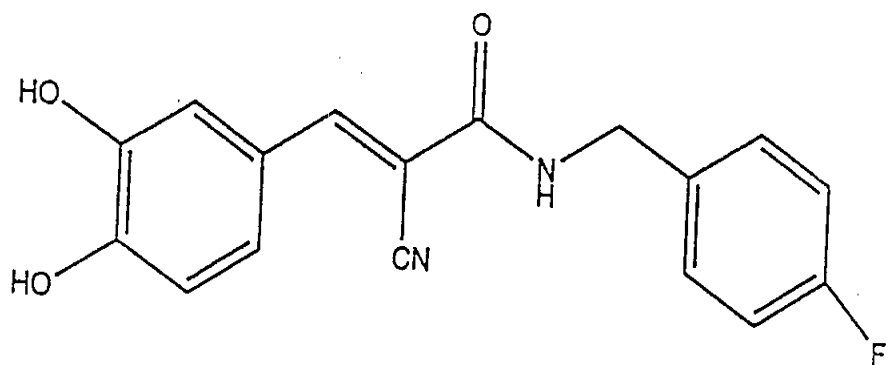
图 1k



P23



P24



P25

第 11 组续

图 1k

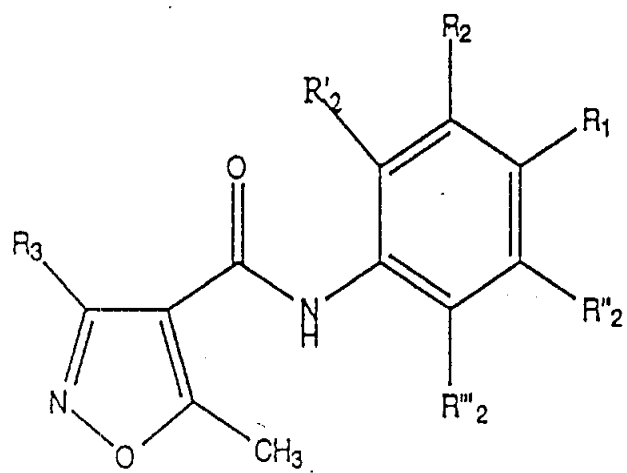


图 2a

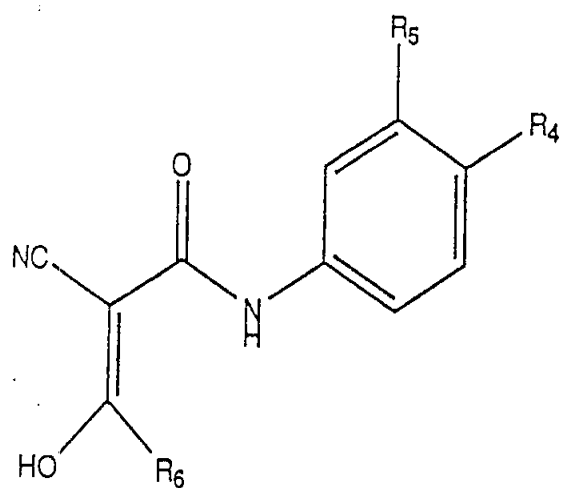


图 2b

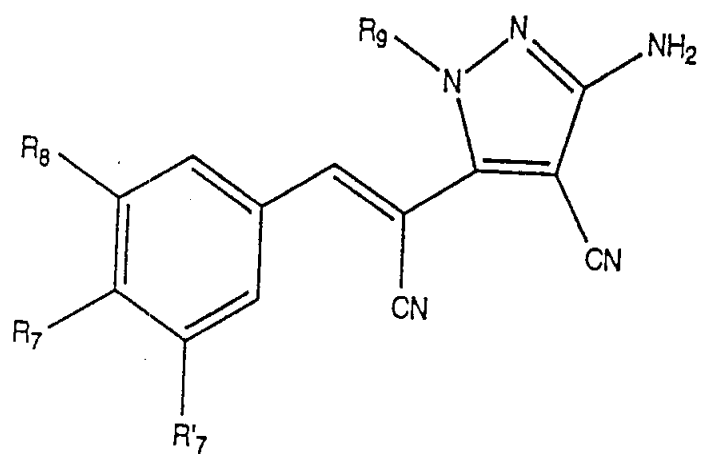


图 2c

图 2

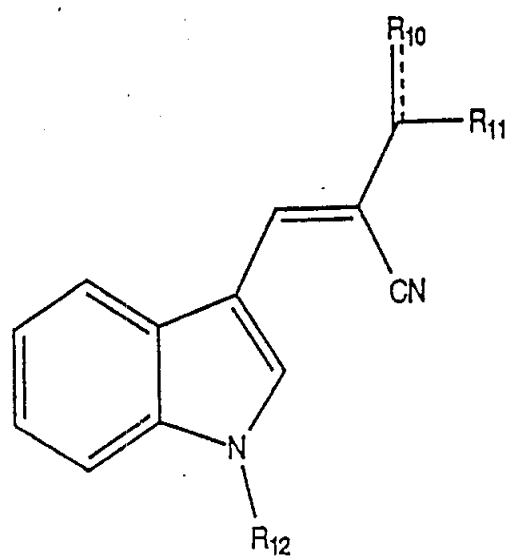


图 2d

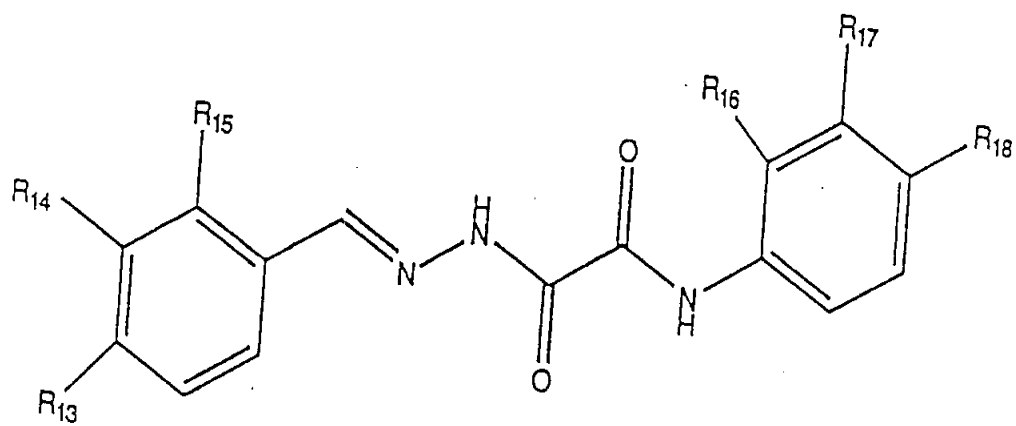


图 2e

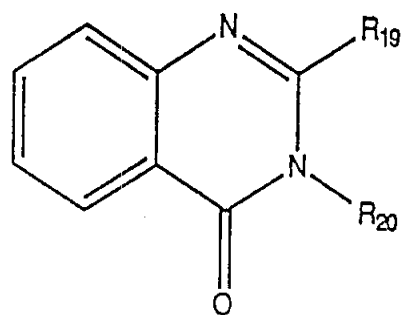


图 2f

图 2 续

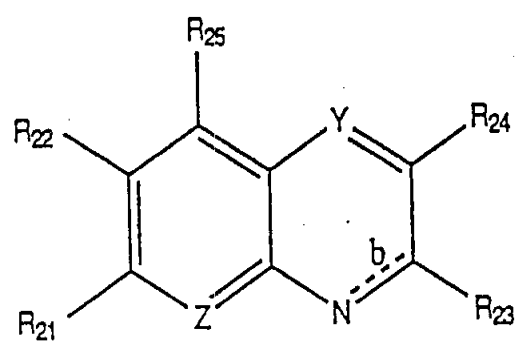


图 2g

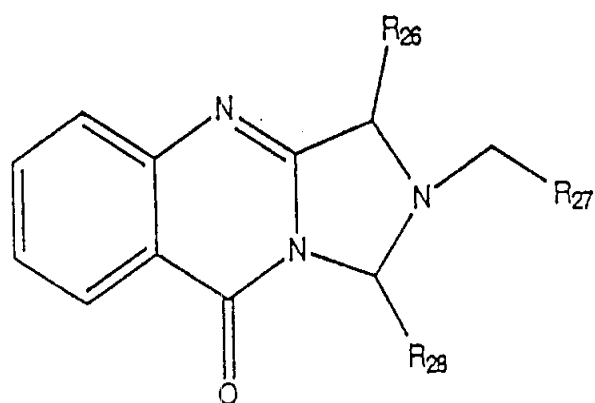


图 2h

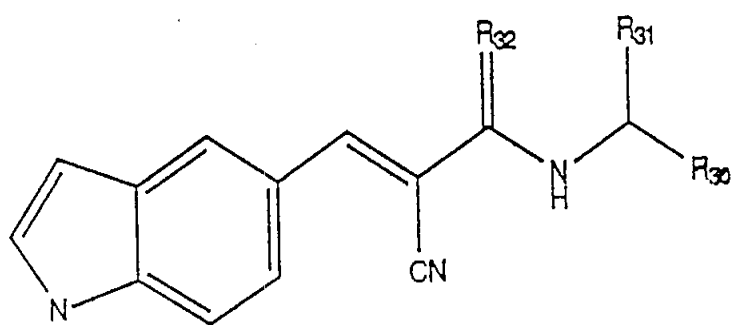


图 2i

图 2 续

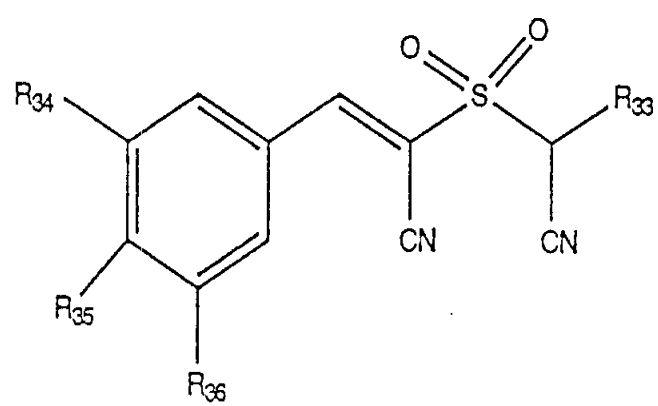
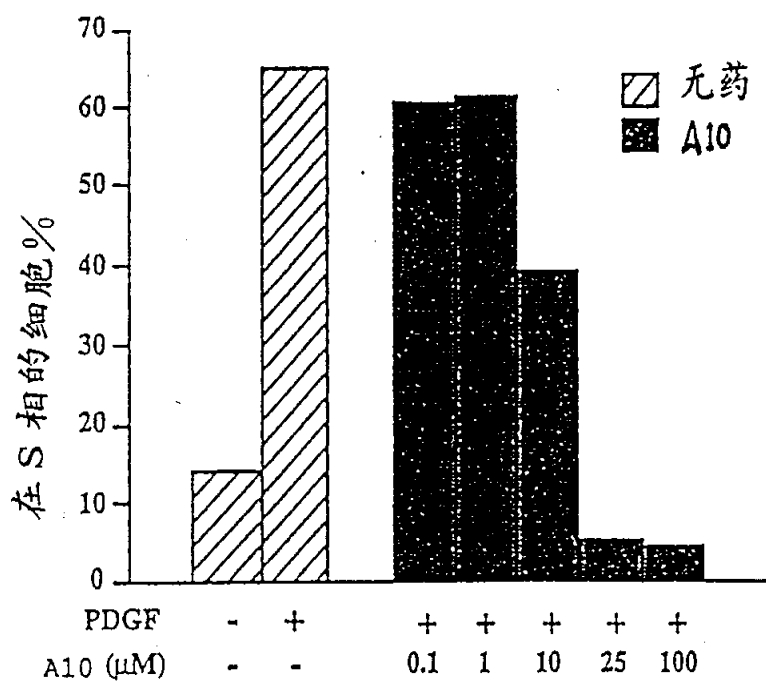


图 2j

图 2 续

A A10 在细胞周期上的效果



B

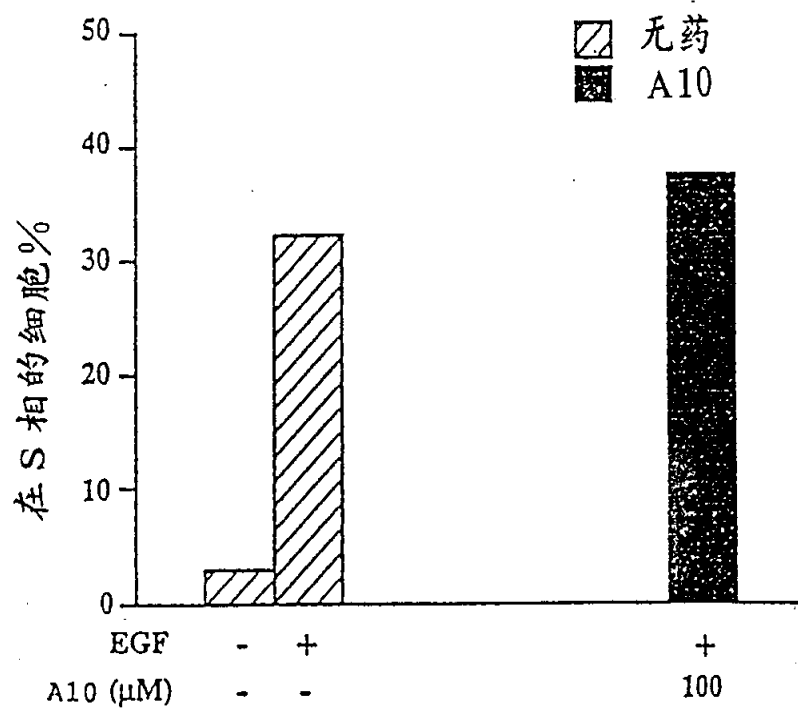


图 3

在鼠 IC 模型中 C6 神经胶质肿瘤生长的抑制

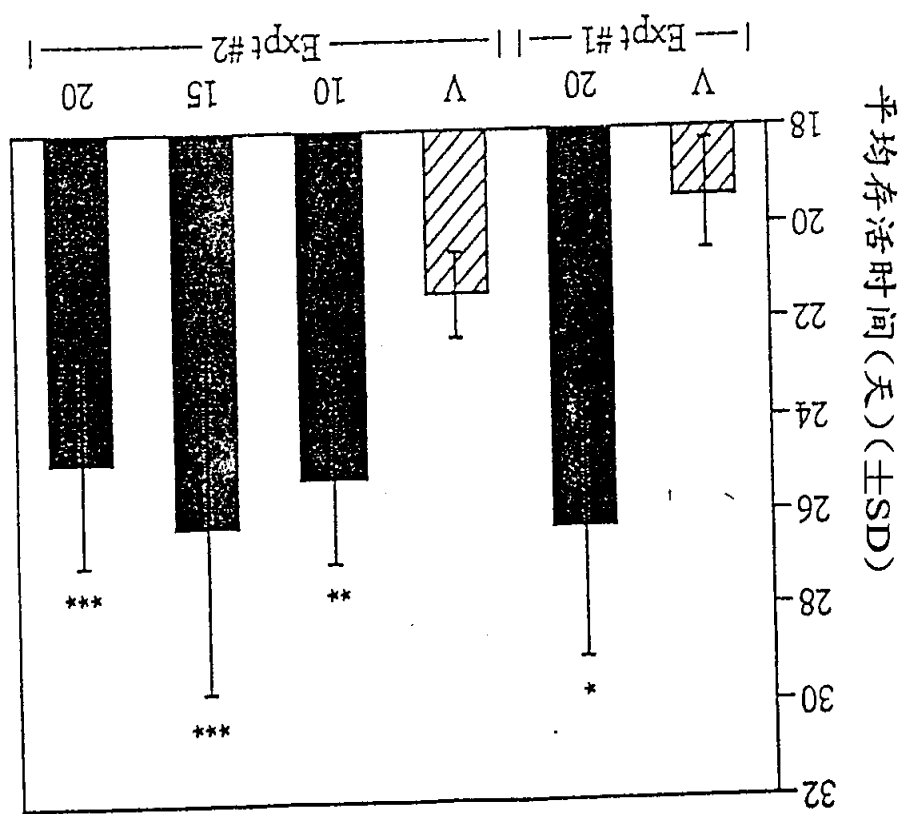


图 4

在大鼠 IC 模型中 C6 神经胶质肿瘤生长的抑制

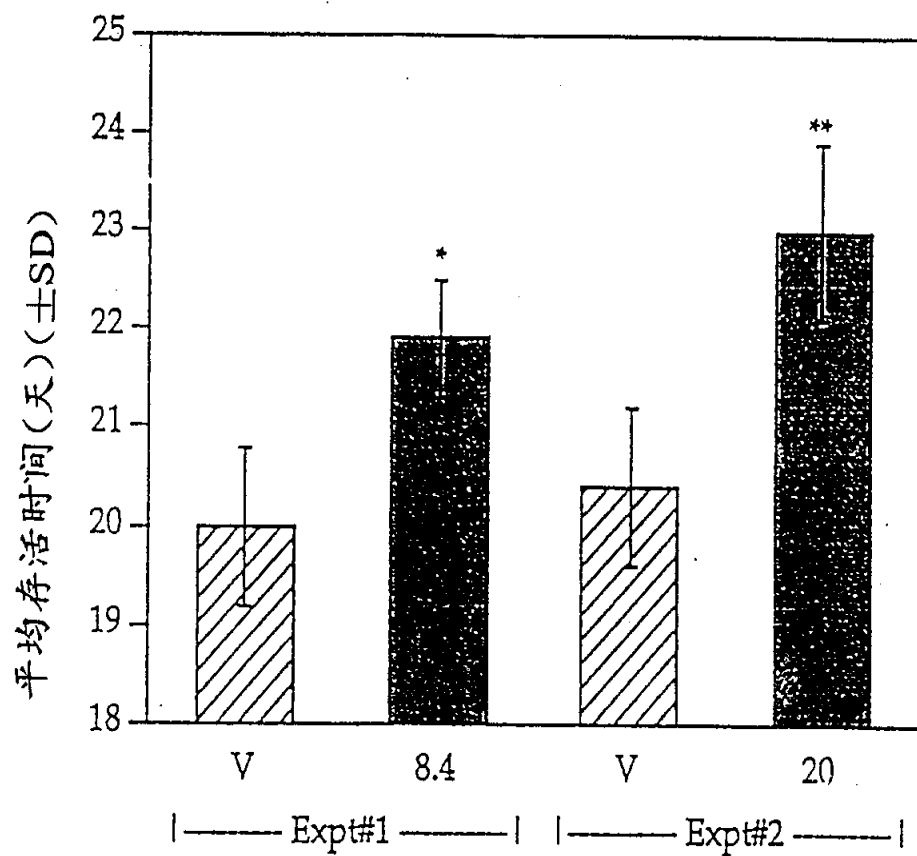


图 5