



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101360422 B

(45) 授权公告日 2013. 10. 23

(21) 申请号 200680051618. 4

审查员 赵保忠

(22) 申请日 2006. 11. 22

(30) 优先权数据

60/739, 865 2005. 11. 23 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 07. 23

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2006/061219 2006. 11. 22

(87) PCT申请的公布数据

W02007/062399 EN 2007. 05. 31

(73) 专利权人 得克萨斯大学体系董事会

地址 美国得克萨斯

(72) 发明人 方炳良 刘劲松 郭薇 吴书泓

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 袁志明

(51) Int. Cl.

A61K 31/405 (2006. 01)

A01N 43/38 (2006. 01)

权利要求书4页 说明书56页 附图20页

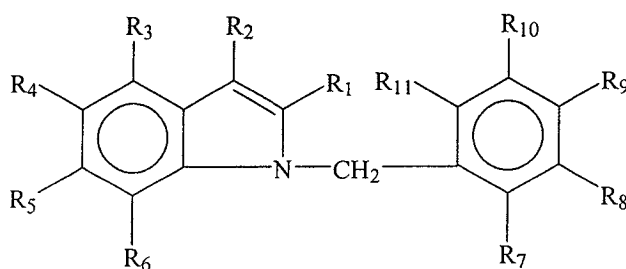
(54) 发明名称

致癌 Ras 特异性细胞毒化合物及其使用方法

(57) 摘要

本发明的实施方案提供了包含昂克立新, 如 1-[(4- 氯苯基) 甲基]-1H- 吡啶-3- 甲醛 (昂克立新-1), 和 / 或它的类似物或衍生物的方法和组合物。

1. 结构式如下的化合物或其盐在制备药物中的用途,其中所述药物用于抑制细胞中 Ras 蛋白的活性,所述细胞表达高活性 Ras 蛋白或表达突变 Ras 蛋白:



其中 R_1 是卤素, 氢, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 叔丁基, 戊基, 己基或异戊基;

其中 R_2 是甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 叔丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 甲醇, 乙醇, 丙醇, 丁醇, 醛或酯;

其中 R_3 是卤素, 氢, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 叔丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 醛, 酯或酮基;

其中 R_4 是卤素, 氢, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 叔丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 醛, 酯, 酮, 呋喃基, 吡啶基, 噻吩基, 噻唑基, 咪唑基, 异噻唑基, 噻唑基, 吡唑基, 吡咯基, 吡嗪基, 嘧啶基, 嘧啶碱基, 嘌呤基, 噌啉基, 苯并呋喃基, 苯并噻吩基, 苯并三唑基, 苯并噻唑基, 喹啉, 异噻唑基, 异喹啉环烷基, 链烯基, 环烯基, 苯基或吡啶基;

其中 R_5 是卤素, 氢, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 叔丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 酰胺, 胺类, 醛, 酯或酮基;

其中 R_6 是卤素, 氢, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 叔丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 醛, 酯或酮基;

其中 R_7 是卤素, 氢, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 叔丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 醛, 酯或酮基;

其中 R_8 是卤素, 氢, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 叔丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 醛, 酯或酮基;

其中 R_9 是卤素, 氢, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 叔丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 醛, 酯或酮基;

其中 R_{10} 是卤素, 氢, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 叔丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 醛, 酯或酮基;

其中 R_{11} 是卤素, 氢, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 叔丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 醛, 酯或酮基。

2. 权利要求 1 的用途, 其中 R_1 是卤素基团。

3. 权利要求 2 的用途, 其中 R_1 是氯或溴基团。

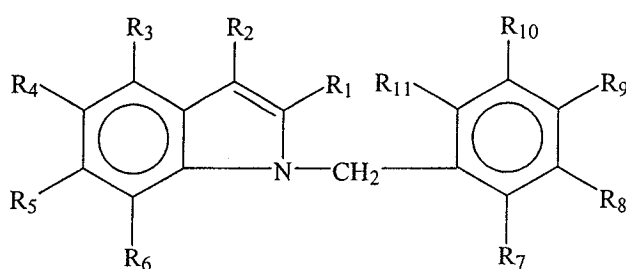
4. 权利要求 1 的用途, 其中 R_2 是甲基、正丙基、异丙基、甲醇、乙醇、丙醇、醛或酯。

5. 权利要求 1 的用途, 其中 R_9 是氯基团。

6. 权利要求 4 的用途, 其中 R_9 是溴基团。

7. 权利要求 1 的用途, 其中 R_3 是卤素基团。

8. 权利要求 1 的用途, 其中 R_4 是卤素, 甲基酯或甲基喹啉酯基团。
9. 权利要求 1 的用途, 其中 R_5 是甲基或酰胺基。
10. 权利要求 1 的用途, 其中 R_7 是氯或溴基团。
11. 权利要求 1 的用途, 其中 R_8 是氯或溴基团。
12. 权利要求 1 的用途, 其中 R_9 是氯。
13. 权利要求 1 的用途, 其中 R_{10} 是氯或溴基团。
14. 权利要求 1 的用途, 其中 R_{11} 是氯基团。
15. 权利要求 1 的用途, 其中所述化合物是 1-[(4-氯苯基)甲基]-1H-吡啶-3-甲醛, 1-(3-氯苯基)-1H-吡啶-3-甲醛, 1-(4-溴苯基)-1H-吡啶-3-甲醛, N4-[(1-苄基吡啶)-3-基]亚甲基-N1-2-噻唑磺胺, [1-(3,4-二氯苄基)-1H-吡啶]-3-基]甲醇, [1-(2-氟苯基)-1H-吡啶-3-基]甲醇, 1-(4-氯苯基)甲基-1H-吡啶-3-基]甲醇, 1-[3-(三氟甲基)苄基]-1H-吡啶-3-基]甲醇, 1-(3-硝基苄基)-1H-吡啶-3-基]甲醇, 1-(3-硝基苯基)甲基-1H-吡啶-3-基]甲醇, 1-(4-硝基苄基)甲基-1H-吡啶-3-基]甲醇, 1-(3-氯苄基)甲基-1H-吡啶-3-基]甲醇, 或 1-(4-溴苄基)甲基-1H-吡啶-3-基]甲醇。
16. 权利要求 1 的用途, 其中所述突变 Ras 蛋白是突变 K-Ras 蛋白。
17. 权利要求 16 的用途, 其中 K-Ras 在氨基酸甘氨酸 12, 甘氨酸 13, 谷氨酰胺 61 或它们的组合处突变。
18. 权利要求 1 的用途, 其中所述细胞是癌细胞。
19. 权利要求 18 的用途, 其中所述癌细胞是膀胱、血液、骨、骨髓、脑、乳腺、结直肠、食道、胃肠道、肾、肝、肺、鼻咽、颈、卵巢、胰腺、前列腺、皮肤、睾丸、舌或子宫细胞。
20. 权利要求 18 的用途, 其中所述癌细胞是头细胞。
21. 权利要求 18 的用途, 其中所述药物与第二种抗癌疗法联用。
22. 权利要求 21 的用途, 其中所述第二种抗癌疗法是外科手术、化学疗法、放射疗法或免疫疗法。
23. 结构式如下的化合物或其盐在制备药物中的用途, 其中所述药物用于治疗癌症:



其中 R_1 是卤素, 氢, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 叔丁基, 戊基, 己基或异戊基;

其中 R_2 是甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 叔丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 甲醇, 乙醇, 丙醇, 丁醇, 醛或酯;

其中 R_3 是卤素, 氢, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 叔丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 醛, 酯或酮基;

其中 R_4 是卤素, 氢, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 叔丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 醛, 酯, 酮, 呋喃基, 吡啶基, 噻吩基, 噻唑基,

咪唑基, 异噁唑基, 噁唑基, 吡唑基, 吡咯基, 吡嗪基, 嘧啶基, 嘧啶碱基, 嘌呤基, 噌啉基, 苯并呋喃基, 苯并噻吩基, 苯并三唑基, 苯并噁唑基, 喹啉, 异噁唑基, 异喹啉环烷基, 链烯基, 环烯基, 苯基或吡啶基;

其中 R_5 是卤素, 氢, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 叔丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 酰胺, 胺, 醛, 酯或酮基;

其中 R_6 是卤素, 氢, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 叔丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 醛, 酯或酮基;

其中 R_7 是卤素, 氢, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 叔丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 醛, 酯或酮基;

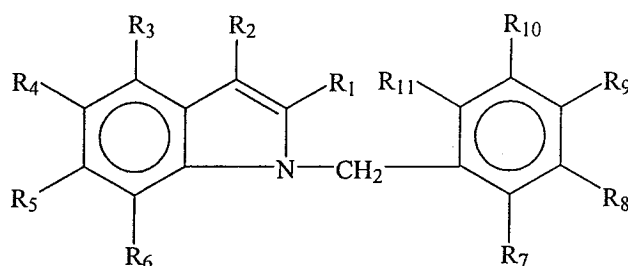
其中 R_8 是卤素, 氢, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 叔丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 醛, 酯或酮基;

其中 R_9 是卤素, 氢, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 叔丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 醛, 酯或酮基;

其中 R_{10} 是卤素, 氢, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 叔丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 醛, 酯或酮基;

其中 R_{11} 是卤素, 氢, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 叔丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 醛, 酯或酮基。

24. 昂克立新化合物在制备药物中的用途, 其中所述药物用于调节细胞内细胞通路, 所述昂克立新化合物为结构式如下的化合物或其盐:



其中 R_1 是卤素, 氢, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 叔丁基, 戊基, 己基或异戊基;

其中 R_2 是甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 叔丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 甲醇, 乙醇, 丙醇, 丁醇, 醛或酯;

其中 R_3 是卤素, 氢, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 叔丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 醛, 酯或酮基;

其中 R_4 是卤素, 氢, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 叔丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 醛, 酯, 酮, 呋喃基, 吡啶基, 噻吩基, 噻唑基, 咪唑基, 异噁唑基, 噁唑基, 吡唑基, 吡咯基, 吡嗪基, 嘧啶基, 嘧啶碱基, 嘌呤基, 噌啉基, 苯并呋喃基, 苯并噻吩基, 苯并三唑基, 苯并噁唑基, 喹啉, 异噁唑基, 异喹啉环烷基, 链烯基, 环烯基, 苯基或吡啶基;

其中 R_5 是卤素, 氢, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 叔丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 酰胺, 胺类, 醛, 酯或酮基;

其中 R_6 是卤素, 氢, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 叔丁基, 戊基,

己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 醛, 酯或酮基;

其中 R_7 是卤素, 氢, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 叔丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 醛, 酯或酮基;

其中 R_8 是卤素, 氢, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 叔丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 醛, 酯或酮基;

其中 R_9 是卤素, 氢, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 叔丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 醛, 酯或酮基;

其中 R_{10} 是卤素, 氢, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 叔丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 醛, 酯或酮基;

其中 R_{11} 是卤素, 氢, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 叔丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 醛, 酯或酮基。

25. 权利要求 24 的用途, 其中所述通路是细胞内 PKC 活性。

26. 权利要求 25 的用途, 其中所述 PKC 活性是 PKC ι 活性。

27. 权利要求 24 的用途, 其中所述通路是细胞内 NF κ B 活化。

28. 权利要求 24 的用途, 其中所述通路是细胞内调节 RNA 转录。

29. 权利要求 24 的用途, 其中所述通路是细胞内调节 RNA 剪接。

30. 权利要求 24 的用途, 其中所述通路是细胞内 Raf-1 活性。

致癌 Ras 特异性细胞毒化合物及其使用方法

技术领域

[0001] 一般地说,本发明涉及癌症的治疗,更具体地说,涉及小分子,该小分子诱导细胞死亡和/或抑制癌细胞,特别是 Ras- 突变体和致肿瘤的癌细胞的细胞生长。

背景技术

[0002] 导致三种 Ras 致癌基因,即 H-ras、K-ras 和 N-ras 活化的突变常常可以在各种肿瘤类型中找到,包括 90% 胰腺肿瘤,50% 结肠直肠肿瘤,50% 肺癌,50% 甲状腺肿瘤,和 30% 白血病,但是这些突变不出现在正常的细胞中。在三种 ras 基因中,K-ras 突变在肿瘤中最常见,包括胰腺癌 (70-90%),结肠腺癌 (50%) 和肺腺癌 (50%)。携带有能够被自发重组激活的 K-ras 等位基因的小鼠株常常会患多种肿瘤类型,尤其是早发性肺癌。添加 HRAS (V12) 或者 KRAS (V12) 突变基因可足以使得用人端粒酶逆转录酶 (HTERT) 的催化亚基和 SV40 早期基因组区永生化的人类卵巢表面上皮细胞在裸鼠内形成肿瘤。而且,除去多西环素可诱导的 H-ras 或 K-ras 致癌基因的表达就能够导致肿瘤细胞中的细胞凋亡和转基因小鼠肿瘤的消退。因此,ras 基因的突变在肿瘤发生和恶性表型的维持中起着重要的作用,并且这些 ras 基因的突变充当抗癌治疗的重要靶点。此外,因为活跃的 ras 功能是一些病毒复制所必需的,如呼吸道肠道病毒,乙肝病毒,疱疹病毒,柯萨奇病毒和一些腺病毒,所以抑制 ras 功能的物质也可以用作抗病毒的治疗。

[0003] 因为为了使 Ras 蛋白与多种多样的膜受体相互作用并且调节多种多样的控制细胞生长,增殖,分化和死亡的信号途径,它们必须易位于质膜的内小叶,所以对于干扰 Ras 蛋白运输至质膜所必需的转录后修饰的物质抑制 ras 功能进行了深入研究。例如,在临床前和临床癌症疗法中深入研究了法尼基转移酶抑制剂 (FTI)。然而,这个方法可能在防止 H-ras 运输到质膜中是有效,但不适用于 K-ras 和 N-ras,因为在 FTI 存在时,N-ras 和 K-ras 蛋白质被 geranylgeranylated,并转移到质膜。几个 II 期和 III 期临床试验研究也表明,FTI 单独用药对肺癌,胰腺癌,结肠直肠癌,膀胱癌和前列腺癌没有显示出显著的活性。因此,特异地诱导细胞死亡或抑制 ras 突变细胞的细胞增殖的新化合物是合乎抗癌疗法需要的。

[0004] 在癌症治疗中的一个主要挑战就是如何鉴别对恶性细胞或恶性组织具有高度特异性的治疗剂。因为恶性细胞和正常细胞有相同的新陈代谢途径,并且因为尽管它们含有许多突变,它们还是被认为“自身”细胞,所以今天所用的所有抗癌药物都影响同时存在于正常细胞和癌细胞中的细胞靶。结果是,传统的化学疗法和放射疗法的应用常常被低治疗指数所限制。事实上,大部分今天所用的抗癌药物的发现是由于他们能够在体外杀死迅速分裂的癌细胞,因而也对迅速分裂的正常细胞有毒,如骨髓造血前体细胞和胃肠粘膜上皮细胞 (Kaelin, 2005)。然而,由于在癌细胞中的遗传和表观遗传的改变,所以通过对杀灭癌细胞但不杀灭正常细胞的化合物进行合成致死性筛选来鉴别肿瘤选择性细胞毒药剂是可能的。

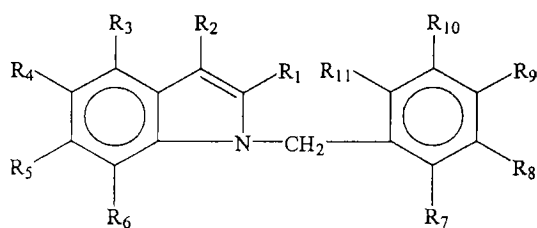
发明内容

[0005] 本发明的实施方案涉及一组化合物（昂克立新（Oncrasin），致癌 Ras 抑制性化合物），它们对癌细胞，特别是含致癌 K-ras 基因和 / 或非典型蛋白激酶 C 的癌细胞有合成致死效应。昂克立新化合物能够在低微摩尔浓度和纳摩尔浓度有效地杀死多种带有 K-Ras 突变的肺癌细胞，肠癌细胞，和胰腺癌细胞，但是不杀灭含正常水平的野生型 K-ras 的正常细胞。细胞毒活性与诱导凋亡相关。昂克立新化合物的治疗导致非典型蛋白激酶 C iota (PKC ι 或 PKC iota) 的异常细胞内分布，RNA 剪接体的异常聚集，或 RNA 加工异常。用 siRNA 抑制 K-ras 或 PKC iota 的活性减少了昂克立新诱发的癌细胞的细胞凋亡，表明昂克立新诱发的细胞凋亡需要 K-Ras 和 / 或 PKC iota 的活性。昂克立新化合物也能抑制 Raf-1 的表达和 TNF α 诱导的 NF κ B 的激活。体内实给予昂克立新化合物能抑制人类异种移植的肿瘤在裸鼠中的生长，并延长带有肿瘤的动物的存活，而不引起可检测的毒性。在所检测的超过 100 种类似物中，大约 30 种昂克立新化合物有效诱导多种癌细胞系中的细胞毒性。这种细胞毒性被认为是合成致死性或 Ras 蛋白或 Ras 相关途径的诱导。合成致死性不需要依赖于突变 Ras 蛋白的存在，并且可能在含野生型或变异型 Ras 蛋白（即无病理后果而不被认为是“突变体”的 Ras 蛋白）的细胞中有效。因此，昂克立新化合物可能是有希望用于治疗癌症、炎症性疾病和感染性病的潜在药物。

[0006] 鉴于上述内容，为了寻找能够特异性杀灭 ras 突变癌细胞，本发明的方法实施方案可以使用固定的人类卵巢表面上皮细胞（命名为 T29）及其用突变 H-Ras (T29H) 或突变 K-Ras (T29K) 转化的致肿瘤的衍生物，筛选化合物库（例如，ChemBridge Corporation 库），筛选能够选择性杀灭肿瘤细胞的化合物。可以鉴别多种化合物，它们能够选择性地杀灭 T29K、T29H 或这二者，但不杀死亲代 T29 细胞。一种对 T29K 具有高度特性性的化合物（1-[(4-氯苯基)甲基]-1H-吡啶-3-甲醛）或 CPMIC，即致癌 RAS 抑制性化合物 1，昂克立新-1 对含有 K-ras 突变的多种肺癌细胞系也非常有效。这种化合物在 33 μ M（测试的最高浓度）时对 T29、T29H 和 H322 (ras 野生型的肺癌细胞) 没有毒性，但它可以分别在 10 μ M 和 1 μ M 浓度下有效地杀死 K-ras 突变 T29K 或 H460（肺癌细胞）。昂克立新-1 还能在 ras 突变的细胞中诱发细胞凋亡，凋亡现象由碘化丙啶 (PI) 或膜联蛋白染色细胞、胱天蛋白酶-3 的裂解和胱天蛋白酶-8 的裂解的显著增加得以证明。昂克立新-1 显著减少 raf-1（一种在 ras 介导的肿瘤细胞的增殖和存活中起关键作用的丝氨酸 / 苏氨酸激酶）在 Ras 信号通道介导的细胞增殖和肿瘤细胞存活中起关键作用。此外，通过对昂克立新-1 的同类化合物及衍生物分析，我们获得一些比昂克立新-1 更有效的 Kras 选择性的细胞毒化合物。这些结果证明了昂克立新-1 和它的同类物能够选择性杀伤含致癌 RAS 基因突变或 Ras 信号通道高活性的癌细胞，而对 Ras 正常功能的细胞的毒性很小。

[0007] 本发明具体内涵包括了能用于治疗及减少对正常细胞毒性的化合物和方法。式 I 为这些化合物的结构。

[0008]



[0009] 式 I

[0010] 在某些化合物中,基团 R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, 和 / 或 R11 各自为氢,羟基,氨基,氰基,含卤素的基团,溴,氯,硝基,巯基,或者是取代或未取代的基团,如 C1-C15 的烷基, C2-C15 烯基, C2-C15 炔基, C6-C15 芳基, C7-C15 芳烷基, C1-C15 杂环芳基, C2-C15 烷杂环芳基, C1-C15 酰基, C1-C15- 烷氧基, C2-C15 烯氧基, C2-C15 炔氧基, C6-C15 芳氧基, C7-C15 芳烷氧基, C1-C15 杂环芳氧基, C2-C1 杂环芳烷基, C1-C15 酰氧基, C1-C15- 烷基, C2-C15 烯基, C2-C15 炔基, C6-C15 芳基, C7-C15 芳烷基, C1-C15 杂环芳基, C2-C15 杂环芳烷基, C2-C15 胺基, C1-C15 硫代烷基, C6-C15 硫代芳基, C7-C15 硫代芳烷基, C1-C15 硫代杂环芳基, C2-C15- 硫代杂环芳烷基, C1-C15 硫代酰基或 C0-C1 硅烷基。

[0011] 某些具体例子里, R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, , 和 / 或 R11 是以取代或未取代基团的形式: 烷基, 烯基, 炔基, 芳基, 芳烷基, 杂环芳基, 杂环芳烷基, 酰基, 烷氧基, 烯氧基, 炔氧基, 芳氧基, 芳烷氧基, 杂环芳氧基, 杂环芳烷基, 酰氧基, 烷基, 烯基, 炔基, 芳基, 芳烷基, 杂环芳基, 杂环芳烷基或胺基。

[0012] 在某些化合物中, R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, , 和 / 或 R11 各自是 -H, -CH3, -CH2CH3, -CH2CH2CH3, -CH(CH3)2, -CH(CH2)2, -CH2CH2CH2CH3, -CH(CH3)CH2CH3, -CH2CH(CH3)2, -C(CH3)3, -CH2C(CH3)3, -C6H5, -C6H4CH3, -C6H4CH2CH3, -C6H4CH2CH2CH3, -C6H4CH(CH3)2, -C6H4CH(CH2)2, -C6H3(CH3)2, -C6H3(CH3)CH2CH3, F, Cl, Br, I, -OH, -OCH3, -OCH2CH3, -OCH2CH2CH3, -OCH(CH3)2, -OCH(CH2)2, -OCH2CF3, -OCOCH3, -OC6H5, -NH2, -NHCH3, -NHCH2CH3, -NHCH2CH2CH3, -NHCH(CH3)2, -NHCH(CH2)2, -N(CH3)2, -N(CH3)CH2CH3, -N(CH2CH3)2, -NHCOC(=O)CH3, -NHCOC(=O)C(CH3)3, -CH2F, -CH2Cl, -CH2Br, -CH2OH, -CH2OCH3, -CH2OCH2CH3, -CH2OCH2CH2CH3, -CH2OCH(CH3)2, -CH2OCH(CH2)2, -CH2OCH2CF3, -CH2OC(=O)CH3, -CH2NH2, -CH2NHCH3, -CH2N(CH3)2, -CH2NHCH2CH3, -CH2N(CH3)CH2CH3, -CH2NHCH2CH2CH3, -CH2NHCH(CH3)2, -CH2NFI CH(CH2)2, -CH2N(CH2CH3)2, -CH = NH, -CH = NCH3, -CH = NCH2CH3, -CH = NCH2CH2CH2CH3, -CH = NCH2CH2CH3, -CH = NCH(CH3)2, -CH = NFICH(CH2)2, -CH = N(benzy1), -CH2CH2F, -CH2CH2Cl, -CH2CH2Br, -CH2CH2I, -CH2CH2OH, -CH2CH2OC(=O)CH3, -CH2CH2NH2, -CH2CH2N(CH3)2, -CH2CH2NHCH2CH3, -CH2CH2N(CH3)CH2CH3, -CH2CH2NHCH2CH2CH3, -CH2CH2NHCH(CH3)2, -CH2CH2NHCH(CH2)2, -CH2CH2N(CH2CH3)2, -CH2CH2NHCOC(=O)C(CH3)3, -CH2CH = CH2, -CH2CH = CHCH3, -CH2CH = CHCH2CH3, -CH2CH = CHCH2CH2CH3,

[0013] -CH2CH = CHCH(CH3)2, -CH2CH = CHCH(CH2)2, -CF3, -CN, -CH = CH2, -CH = CHC(=O)H, -COH, -COCH3, -COCH2CH3, -COCH2CH2CH3, -COCH(CH3)2, -COCH(CH2)2, -COCH2CF3, -COC6H5, -COC6H4CH3, -COC6H4CH2CH3, -COC6H4CH2CH2CH3, -COC6H4CH(CH3)2, -COC6H4CH(CH2)2, -COC6H3(CH3)2, -CO2H, -CO2CH3, -CO2CH2CH3, -CO2CH2CH2CH3, -CO2CH(CH3)2, -CO2CH(CH2)2, -CONH2, -CONHCH3,

[0014] $-\text{CONHCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CONHCH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CONHCH}(\text{CH}_2)_2$, $-\text{CON}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}_3$, $-\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, $-\text{CONHCH}_2\text{CF}_3$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}=\text{CHCH}_3$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{F}$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{Br}$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{I}$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{OCOCCH}_3$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{OC}_6\text{H}_5$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}_2$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{NHCH}_3$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{NHCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{Cl}$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{Br}$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{OCOCCH}_3$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCOCCH}_3$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CF}_3$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CN}$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{C}\equiv\text{CH}$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{C}\equiv\text{CCH}_3$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{C}\equiv\text{CSi}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{COH}$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{COCH}_3$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{COCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{COCH}_2\text{CF}_3$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{COC}_6\text{H}_5$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{CH}_3$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CONH}_2$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CONHCH}_3$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CON}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{SH}$, $-\text{SCH}_3$, $-\text{SC}_6\text{H}_5$, $-\text{SCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$, 或者 $-\text{SCOCH}_3$.

[0015] 在某些化合物中, R_1 是卤素, 氯, 溴, 氢, 烷基, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 特丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 羰基, 醛基, 酯或酮基; R_2 是烷基, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 特丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 醇基, 甲醇, 乙醇, 丙醇, 丁醇, 羰基, 醛, 酯, 酮, 苯甲基或芳基; R_3 是卤素, 氯, 溴, 氢, 烷基, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 特丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 羰基, 醛, 酯, 或酮; R_4 是卤素, 氯, 溴, 氢, 烷基, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 特丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 羰基, 醛, 酯, 酮, 芳基, 杂环芳基, 呋喃基, 吡啶基, 苯基硫代, 噻唑基, 咪唑基, 异噻唑基, 噻唑基, 吡唑基, 吡咯基, 吡嗪基, 吡啶基, 嘧啶基, 嘌呤基, 噌啉基, 苯并呋喃基, 苯并噻吩基, 苯并三唑基, 苯并噻唑基, 喹啉, 异噻唑基, 异喹啉, 环烷基, 烯基, 环烯基, 苯基或吡啶基; R_5 是卤素, 氯代, 溴代, 氢, 烷基, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 特丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 酰胺, 胺, 羰基, 醛, 酯或酮; R_6 是卤素, 氯, 溴, 氢, 烷基, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 特丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 羰基, 乙醛, 酯, 或者酮; R_7 是卤素, 氯代, 溴, 氢, 烷基, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 特丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 羰基, 醛, 酯或酮; R_8 是卤素, 氯代, 溴, 氢, 烷基, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 特丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 羰基, 醛, 酯或酮; R_9 是卤素, 氯代, 溴, 氢, 烷基, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 特丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 羰基, 醛, 酯或酮; R_{10} 是卤素, 氯, 溴, 氢, 烷基, 甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 特丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 羰基, 醛, 酯或酮; 以及 / 或者 R_{11} 是卤素, 氯代, 溴, 氢, 烷基, 甲基, 羧, 正丙基, 异丙基, 正丁基, 异丁基, 仲丁基, 特丁基, 戊基, 己基, 异戊基, 羧甲基, 羧乙基, 羧丙基, 羧丁基, 羰基, 醛, 酯或酮.

[0016] 特别指出的是, 在一些化合物中, R_1 是卤代基团, 尤其是指氯, 溴代基团, R_2 是指羟基, 烷氧基, 醛基, 羧基或羰基, 尤其指醛基, 或醇类. R_9 是氯代基团, 溴代基团等. 另有 R_3 为卤代基团. 在某些情况下, R_4 是卤代、甲酯、甲氧基或者甲基喹啉酯基团. R_5 是甲基, 甲氧基或酰胺基. R_6 是烷基. R_7 是卤素, 氯, 溴代基团. R_8 是氯, 溴代基团. R_9 是氯代基; R_{10} 是卤氯或溴代基团. R_{11} 是氯代基团.

[0017] 字母“n”在分子式或结构中能够是 0, 1, 2, 3, 4, 5, 或 6.

[0018] 在一些情况下,上述化合物可以是药物学上可接受的盐或前体药物的形式用于治疗疾病。本发明同时也提供了由分子式或结构定义的化合物的光学异构体。在某些情况下,由分子式和结构定义的化合物的光学异构体实际上不同于其他的光学异构体。在另外的情况下,两个或更多的光学异构体存在于同一个组分中。在某些情况下,本发明亦备有光学异构化化合物的外消旋混合物。

[0019] 具体地说,这些化合物包括 1-[(4-氯代苯基)甲基]-1H-吡啶-3-甲醛(昂克立新 1),1-(3-氯代苯基)-1H-吡啶-3-甲醛(昂克立新 27),1-(4-溴代苯基)-1H-吡啶-3-甲醛(昂克立新 29),N4-[(1-苯基)吡啶-3-亚甲基]-N1-2-噻唑磺胺(昂克立新 42),[1-(3,4-二氯代苯基)-1H-吡啶]-3-甲醇(昂克立新 49),[1-(2-氟苯基)-1H-吡啶-3-甲醛(昂克立新 51),1-[(4-氯代苯基)甲基]-1H-吡啶-3-甲醇(昂克立新 60),1-[3-(三氟甲基)苯基]-1H-吡啶)-3-甲醇(昂克立新 63),1-(3-硝基苯基)-1H-吡啶-3-甲醛(昂克立新 68),1-[(3-硝基苯基)甲基]-1H-吡啶-3-甲醇(昂克立新 69),1-[(4-硝基苯基)甲基]-1H-吡啶-3-甲醇(昂克立新 71),1-[(3-氯代苯基)甲基]-1H-吡啶-3-甲醇(昂克立新 72);和/或 1-[(4-溴代苯基)甲基]-1H-吡啶-3-甲醇(昂克立新 73)。

[0020] 在这个发明的一些方法里,癌细胞就是肿瘤细胞。而且,本发明的化合物可施用于体外培养的细胞,有机体内的细胞,或者体外培养后再输回到有机体内的细胞。因此,癌细胞可能在一个病人中。病人可能有一个实体肿瘤或血液肿瘤。在一些具体的病例,本发明的化合物(药物)可与外科手术或放射治疗联合应用。如切除所有或部分的肿瘤之前或之后用药。本发明的成分的施用可能在病人手术前,手术后或在手术的同时实行。在另外的具体体现中,病人也有可能直接用药,用内窥镜给药,经气管内给药,肿瘤内给药,静脉内给药,病灶内给药,肌肉内给药,腹腔内给药,局部给药,经皮肤给药,皮下给药,动脉内给药,膀胱内给药,肛肠内给药,阴道或宫颈内给药,皮肤表面或者皮下给药。本发明的成分可能被施用 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20 或更多次,还有它们可能每隔 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24 小时或 1,2,3,4,5,6,7 天,或者 1,2,3,4,5 个星期,或者 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12 个月重复施用。

[0021] 治疗癌症的方法可能进一步的包括给病人施用化学疗法或放射疗法,这种治疗可能要施用不止一次。化学疗法包括 cisplatin(CDDP),carboplatin,甲基苄肼,二氯甲基二乙胺,环磷酰胺,喜树碱,美法仑,苯丁酸氮芥,双硫胺,硝化甘油尿素,更生霉素,柔毛霉素,阿霉素,博来霉素,plicomycin,丝裂霉素,etoposide(VP 16),三苯氧胺,taxotere,taxol,transplatinum,5-氟尿嘧啶,vincristin,vinblastin,氨甲叶酸,gemcitabine,oxaliplatin,irinotecan,topotecan,或者它们的任何类似物或衍生物。放射疗法包括但是不限于 X-射线放射,紫外线放射,伽玛放射,电子束放射,或者微波。还有一个细胞或者一个病人可能加用一种微管稳定剂治疗,包括 taxane。这些联合治疗都作为本发明方法的一部分。所以,可以明确预期,任何用于癌症治疗的手段与方法,化合物和/或它的类似物和衍生物都可与本发明的成分进行联合治疗。

[0022] 在一些具体体现中,本发明成分所针对的癌细胞可来自膀胱,血,骨,骨髓,脑,胸部,结肠直肠,食道,胃肠,头脑,肾,肝,肺,鼻咽,颈,卵巢,胰腺,前列腺,皮肤,胃,睾丸,舌

头或者子宫细胞。

[0023] 在某些方面,Ras 蛋白质是一种突变的 Ras 蛋白质,特别是一种突变的 K-Ras 蛋白质。在 K-Ras 蛋白质中的任何一个氨基酸都可能发生突变,特别是 Ras 蛋白的 12 号甘氨酸,13 号甘氨酸,61 号谷氨酸的突变,或者是它们的混合体。

[0024] 本发明预期的其他方法包括:治疗癌症的方法,这些方法包含将一种细胞毒化合物按照足够的数量诱发细胞凋亡或抑制癌细胞生长来施用于癌细胞;包括细胞毒化合物本身,它们的盐,代谢物或相关的前体药物。治疗病毒性传染病的方法,包含将本发明的成分用于治疗病毒性疾病。应用本发明的成分,用于已发病的患者,或有传染病接触史,有被病毒感染的危险的人群,减少或者抑制病毒复制,从而达到治疗目的。

[0025] 在本说明书中,术语"IC₅₀"是指获得最大反应的 50%所需的剂量。

[0026] 发明的具体体现也包括调整各种细胞信号或代谢途径的方法,如细胞里的蛋白激酶 C(PKC) 的活性,举例来说,PKC zeta 和 / 或 PKC iota 活性;细胞内的 NFκB 活性;细胞内 RNA(核糖核酸)的合成,剪切和加工;细胞内的蛋白质合成;细胞内的蛋白质降解;细胞内的蛋白磷酸化与去磷酸化;细胞内 Raf-1 活性改变等。

[0027] 发明的具体体现也包括应用本专利所述化合物,以及它在药学上可接受的盐或相关酯,一种或几种,作为有效药物成份进行疾病治疗,如抑制癌细胞生长或抑制病毒复制;或调接细胞内信号传导或代谢。药物的制剂也包括配方上可接受的载体。

[0028] 发明的其他具体体现贯穿这个说明书的每一部份。任何关于本发明的一个方面的具体阐述也将适用于本发明的其他方面,反之亦然。在实施例中的具体体现应该被理解为可应用于本发明的所有方面的具体体现。

[0029] 术语"抑制","减少"或者"预防",或者这些术语的任何变更,当用于权利要求和 / 或专利说明时,包含任何可测量的降低或完全的抑制,从而达到预期的结果或疗效。

[0030] 在用于权利要求和 / 或专利说明时,和术语"组成,包含"一起用的"a"或"an"的用法可理解为"一个",也可理解为"一个或多个","至少一个"和"一个或多个"的意思。

[0031] 任何在此讨论的关于任何一种方法或者发明的成分的具体体现,能在不同场合得到应用,反之亦然。可以预期,任何讨论中关于一种特定的癌症,病毒性传染病或其它疾病,都可延伸到其它癌症,病毒性传染病或其它相关疾病。此外,本发明的组成成分和试剂就能用来完成本发明所述的方法。

[0032] 贯穿这个申请书,当术语"about 大约"描述一种数值时,它包含该数值及用来确定该数值的标准差或标准误,它们也与使用的设备或方法相关。术语"or 或者"在权利要求书和说明书里的用法意味着"and/or 和 / 或"。除非另有明确地指明提到只有两者选一或者选择性是互斥的,否则就应视为和 / 或"and/or"。

[0033] 在权利要求和说明书中用到的,"comprising 组成"(还有 comprising 的任何形式,如"comprise"和"comprises"),"having 有"(还有 having 的任何形式,如"have"和"has"),"including 包括"(还有 including 的任何形式,如"includes"和"include")或者"containing 包含"(还有 containing 的任何形式,如"contains"和"contain"),这些词的用意是包含性的以及开放性的。它们并不排除那些没有叙述到的其它要素或者方法步骤。

[0034] 本发明的其他实体,特征和优势会在以下的详细的描述中进行阐述。然而,必需指明,有关本发明的具体事例的阐明,虽然仅通过实施例描述具体的事例,但完全可通过各种变化,组合和修改,在本发明的精神和范围内创造出新的或类似的事例,产品和方法。这些所谓的创造对那些熟练的技术人员在明了本专利的综旨之后是显而易见。因此,这一些都应包含在本专利的范筹之内。

[0035] 图片描述

[0036] 下面展示的图片是本说明书的一部分。这些图片将进一步展示本发明的各个方面。参考这些图片中的一张或多张图片相,或它们的组合,以及在此特殊的具体体现的详细描述,可以更好地理解本发明。

[0037] 图. 1A-1C(图. 1A) 用于剂量效应测试的 6 种化合物的化学结构。(图. 1B) 这些化合物对 T29, T29Ht1 和 T29Kt1 细胞的剂量效应。这些细胞分别被列 A 中所列化合物以不同的浓度(范围为 $0.1 \mu\text{M} \sim 33 \mu\text{M}$) 治疗。细胞的存活能力由 SRB 蛋白染色法测定。对照细胞由溶剂 DMSO 治疗。他们的值设置为 1。(图. 1C) T29, T29Kt1 和 T29Ht1 细胞在接受浓度为 33 微摩尔的化合物治疗后,生存的时间记录/曲线。细胞的存活能力就由 SRB 染色法测定。这些显示的值是所做的 2 个化验的平均值 $\pm$ SD. 每个化验一式四份。

[0038] 图. 2A 和 2B 昂克立新-1 对肺癌细胞的疗效。(图. 2A) 含各种状态的致癌 RAS 基因(突变型或野生型)的肺癌细胞经受各种浓度的昂克立新-1 治疗。显示的值是所做 2 个化验的平均值 $\pm$ SD. 每个化验一式四份。(图. 2B) Ras 基因的变异情况。

[0039] 图. 3A and 3B(FIG. 3A) 由昂克立新-1 引起的细胞凋亡。T29, T29Kt1 和 H460 细胞用昂克立新-1 在浓度为 $30 \mu\text{M}$ (对 T29 或 T29Kt1) 或 $3 \mu\text{M}$ 的(对 H460) 进行治疗,然后 12 或 24 小时后收获。由 PI 和膜联蛋白检测细胞死亡。H460 和 T29Kt1 细胞的 70% 到 90% 用膜联蛋白或 PI 或两者兼有着色。(图. 3B) 蛋白西方印迹分析。H460 细胞由 $1 \mu\text{M}$ 昂克立新-1 在各种时间段按所指示的治疗。治疗后被激活的胱天蛋白酶-3 和胱天蛋白酶-8 被蛋白印迹分析检测到。

[0040] 图. 4A and 4B K-Ras 敲低抑制了昂克立新诱导的细胞凋亡。(图. 4A) 人类肺癌细胞 H460 经被对照 siRNA 或 K-Ras siRNA 处理,然后接受 12 小时的 DMSO 或昂克立新-1 的治疗。昂克立新诱发的细胞凋亡由 FACS 分析测定,并以被 DMSO 治疗后的细胞微标准进行分析。具体的值分别反映了两个试验的每一个。(图. 4B)。以 siRNA 为媒介敲低 K-Ras 的蛋白质免疫印迹分析。

[0041] 图. 5 耐药和易感细胞内的分子变化。T29, T29Kt1 和 H469 接受 10 微摩尔(对 T29 和 T29Kt1) 或 1 微摩尔(对 H460) 浓度的昂克立新-1 治疗。12 小时后,收获细胞,并用蛋白质印迹免疫分析。所分析的蛋白标明在印迹图的。接受 DMSO 治疗的细胞被用作对照(C)。

[0042] FIGs. 6A-6C 由昂克立新-1 引发的 PKC ι (PKC ι) 聚集。接受 DMSO 或昂克立新-1 处理 12 小时的细胞,经免疫组织化学染色。图片显示 H460(图. 6A) 和 T29Kt1(图. 6B) 细胞里测试 PKC ζ 和 PKC ι 。(图. 6C) 比较 T29Kt1, T29 和 PKC ι 敲低的 T29Kt1 细胞的反应。

[0043] 图. 7 接受不同的抗癌药物治疗后的 T29Kt1 细胞中的 PKC ι 亚细胞定位。

[0044] 图. 8A-8D 昂克立新-1 诱导 RNA 剪接体的聚集。(图 8A) T29Kt1 细胞接受昂克立新-1 或者放射治疗, SC35 和 Rad51 的亚细胞定位然后由抗体染色决定。PKC ι 和 SC35

在一般的荧光显微镜 (图. 8B) 和共焦显微镜下 (图. 8C) 的同定位决定. (图. 8D) T29Kt1 和 T29 细胞接受 DMSO 或昂克立新-1 的治疗, 然后以 ASF/SF2 抗体染色.

[0045] 图. 9A 和 9B PKC ι 在由昂克立新引起的细胞毒中的作用. (图. 9A) 在 H460 细胞中 PKC ι 的短暂敲低. (图. 9B) 在 T29Kt1 细胞中 PKC ι 的稳定敲低. PKC ζ siRNA 用作对照. 本图比较在对照组合敲低组对昂克立新-1 诱导的细胞凋亡和细胞生存能力改变的反应.

[0046] 图. 10A-10D 昂克立新-1 对 Raf-1 表达的作用. (图. 10A) H460 细胞接受昂克立新-1 的各种浓度的治疗, 24 小时后收获, 进行蛋白质免疫印迹分析. (图. 10B) 逆转录酶/多聚合酶连锁反应 (RT-PCR) 检测 mRNA 水平. H460 细胞用 1 微摩尔昂克立新-1 处理不同时间, 或用不同浓度的昂克立新-1 处理 24, 如图指示的 (+, -, 为正负对照). (图. 10C) 蛋白质免疫印迹分析显示了在经 DMSO 或昂克立新-1 (10 微摩尔) 处理 24 小时后的细胞内 Raf-1 表达的变化. (图. 10D) 在稳定转染 Raf-1 质粒的细胞对昂克立新-1 的剂量反应. 原始的 H460 细胞和转染野生型 Raf-1 (Raf-1), 持续激活的 Raf-1 (Raf-1C) 或负显性 Raf-1 (Raf-1/DN) 的 H460 细胞接受昂克立新-1 各种浓度的处理, 细胞的生存能力用 SRB 染色法测定.

[0047] 图. 11A-11C 抑制 TNF α 诱发的 NF κ B 活化. NF κ B 报告质粒试验. T29K 细胞经转染 pNF κ B-Luc 和 pCMV-lacZ. 12 小时后, 细胞分别用或不用 TNF α 处理, 再加昂克立新-1 (10 微摩尔) (图. 11A) 或舒林酸 (图. 11B) (10 微摩尔) 处理. 荧光素酶活性在处理 8 小时后测定, 并由半乳糖苷酶 (beta-gal) 的活性进行校正. (图. 11C) H460 和 T29K 细胞经 DMSO 或如所图指示的昂克立新-1 的不同浓度处理 12 小时, 另加或不加 TNF α (1ng/ml). NF κ B 活化由 EMSA 法分析.

[0048] 图. 12 昂克立新类似物或衍生物的合成途径. 以 NaH 为催化剂, 合成原材料 A (吡啶类) 和 B (苄基卤) 进行反应.

[0049] 图. 13A 和 13B (图. 13A) 合成后提纯的昂克立新-27 的高压液相与质谱分析 (HPLC-MS). (图. 13B) 昂克立新-27 的核磁共振谱.

[0050] 图. 14A 和 14B 在活的有机体内的抗癌活性. (图. 14A) 抑制 H460 肿瘤在裸鼠体内生长. 将 H460 细胞接种到裸鼠皮下, 形成肿瘤后, 裸鼠接受如所指示的昂克立新-1 或昂克立新-27 的治疗. 治疗后, 测量肿瘤的生长. 具体的值代表每组 5 只小鼠的平均数 $\pm$ SD. 单独接受昂克立新-1 或昂克立新-27 治疗的小鼠中的肿瘤平均大小和接受溶剂治疗的小鼠 ($p < .05$) 中的肿瘤平均大小有明显的差异. (图. 14B) (FIG. 14B) 平均存活期. 接受溶剂, 昂克立新-1 和昂克立新-27 治疗的小鼠的平均存活期分别是 24 天, 32 天和 34 天.

[0051] 图. 15A 和 15B 在有机体内的毒性试验. 在图 14 中描述的动物, 治疗后的最后两天取血液样品, 分析血清肝肾功能. (图. 15B) 血清 ALT, AST 和 (图. 15A) 肌氨酸酐的活性或浓度. 数值表示三只动物的平均数.

[0052] 图. 16A 和 16B 对核糖核酸加装制的影响. (图. 16A) T29, T29Kt1, 和 H460 细胞接受 10 微摩尔昂克立新-1 (T29 和 T29Kt1) 或 1 微摩尔昂克立新-1 (H460) 的治疗. 12 小时后, 收获细胞并用蛋白质免疫印迹分析测定核糖核酸聚合酶 II 磷酸化和 SR 蛋白质的磷酸化. 接受 DMSO 治疗的细胞被用来作为对照组 (C), 接受昂克立新-1 处理的细胞为治疗组 (T). 箭头表示减少的聚合酶 II (pPolIII) 和 SR 蛋白质 (pSR) 的磷酸化. (图. 16B) 在生物体外, 用 HeLa 细胞核浸液的核糖核酸形成化验 (Promoega). 根据厂商的说明运行化验. 所

用的浓度在嵌板的上面有所指示。DRB 作为对核糖核酸形成抑制的阳性对照。

[0053] 本发明的详细描述

[0054] 本发明将会在下面的具体实施及附图中更全面的描述。然而,这个发明可以在很多方面以不同的形式体现,因此不能将本发明局限于在此提出的具体实施例。提供这些具体实施例是为了使本专利的阐述更具体,更完整。这将本专利的发明范畴完全提供给有关专业人士,包括涉及贯穿的原理和数据。

[0055] I. RAS 相关的条件和信号途径

[0056] A. 癌症

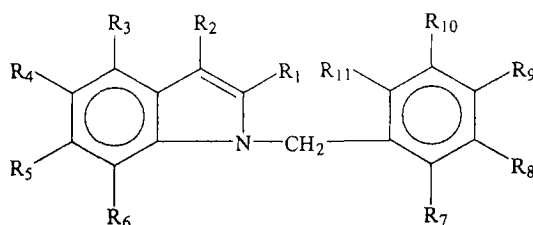
[0057] 致癌 RAS 基因,包括 H-ras, K-ras, 和 N-ras,经常能在多种肿瘤类型中发生突变。其中 K-ras 基因有 2 个剪接体,一个是主要的 K-Ras4B 和一个次要的 K-Ras4A。K-Ras4B, H-Ras, 和 N-ras 在各种组织中都有表达,然而, K-Ras4A 主要在肾,肝,和胃肠组织中表达 (Pells 等人,1997 ;Fiorucci 和 Hall,1988)。作为一个小的鸟嘌呤核苷结合蛋白质的亚科,Ras 蛋白质循环于有活性的三磷酸鸟苷 (GTP) 结合体状态和无活性性的二磷酸鸟苷 (GDP) 结合体状态之间 (Bar-Sagi 和 Hall,2000 ;Colicelli,2004)。催化 GDP 的释放的鸟嘌呤核苷交换因子可促进 Ras 和三磷酸鸟苷的结合,该结合状态对于 Ras 和它的下游(底物)蛋白质的相互作用是必需的 (Rossman 等人,2005)。而三磷酸鸟苷酶活化蛋白 (Bernards 和 Settleman,2004) 则增强 Ras 内在的三磷酸鸟苷酶活性,将三磷酸鸟苷转变为 GDP,导致一个 GDP 结合的,无活性的 Ras。减少三磷酸鸟苷酶活性或减少 GDP 结合能力的 Ras 突变使得 Ras 处于持续激活状态,即与三磷酸鸟苷结合态。Ras 蛋白质也能被其他机制激活,如基因扩增, (Galinana 等人,1995 ;Hoa 等人,2002 ;Filmus and Buick,1985),基因过度表达 (Algarra 等人,1998 ;Coleman,1994),和来自生长素受体的酪氨酸激酶的上游信号,如 Her2 (Ehrhardt 等人 2004 ;Rowley 和 Van Ness,2002) 的增加。因此,有时尽管无 Ras 基因突变,Ras 信号通道的活性增强也经常在人类癌细胞中见到。

[0058] 在细胞浆里合成的 Ras 蛋白质,被转移到细胞质膜的内叶,那里他们和多种膜受体结合,并执行在多种信号途径中信号转换。这些信号途径管理着细胞生长,增殖,分化和死亡。转译后修饰的几个步骤对 Ras 运输到质膜是非常重要的,包括在羧基末端 CAAX 序列的半胱氨酸残基的法尼基化, AAX 氨基酸残基的切除,和在 C- 终端法尼基半胱氨酸的甲基化 (Hancock,2003)。对于 H-Ras 和 N-Ras,在接近 C- 终端的半胱氨酸残余上的棕榈酰化对 Ras 再定位到膜上也是必需的。对于 K-Ras,定位在 C- 终端的一个多碱区域作为膜定位的第二信号 (Cadeallader 等人,1994 ;Hancock 等人.,1990)。因为 Ras 的法尼基化对它的生物功能是必需,所以法尼基转移酶抑制剂 (FTIs) 广泛用于临床前和临床癌症治疗研究中 (Sebti and Adjei,2004 ;Zhu 等人,2003 ;Baum 和 Kirschmeier,2003)。然而,这个方法可能在阻止 H-Ras 运输到质膜是有效,但是对 K-Ras 和 N-Ras 无效。因为在法尼基转移酶抑制剂 (FTIs) 存在的情况下,N- 和 K-Ras 蛋白质被牛龙牛儿酯化,再转移到细胞膜 (James, 等人,1995 ;Whyte 等人,1997 ;James 等人,1996)。一些 II 期和 III 期临床试验也显示法尼基转移酶抑制剂 (FTIs) 在肺,胰腺,结肠直肠,膀胱和前列腺癌治疗中,单独应用时并无疗效 (Sebti and Adjei,2004 ;Zhu 等人,2003 ;Baum 和 Kirschmeier,2003)。因此,尽管针对致癌 Ras 的抗癌治疗是一个理想的靶向治疗,至今未能找到能在临床上应用的,针对致癌 Ras 靶点的有效药物。

[0059] 为了寻找能特异地杀死含 Ras 突变或 Ras 信号通道增强地癌细胞,本专利发明者用经人类端粒酶逆转录酶的催化亚基和 SV40 病毒早期大 T 基因永生化的人类卵巢表面上皮细胞(命名为 T29),以及 T29 经 H-ras 突变基因转染后的细胞(T29Ht1),和经 K-ras 突变基因转染的细胞(T29Kt1),进行化合物文库的筛选。这些细胞系由在 M. D. Anderson 癌症中心的刘劲松(Jinsong Liu)博士的实验室建立(Liu 等,2004)。而化合物文库购自 ChemBridge 公司(San Diego, CA)。应用细胞水平的合成致死方法进行筛查。在 10000 个化合物中,发明者确定一种化合物(1-[(4-氯苯基)甲基]-1H-吡啶-3-甲醛),指定昂克立新-1(昂克立新-1,致瘤 Ras 抑制化合物 1),能在较宽范围的剂量内选择性地杀死 T29Kt1 细胞。这种化合物在任何测试剂量中对 T29 或 T29Ht1 没有毒性。还有昂克立新-1 对一些含有 K-ras 突变的人类肺,结肠,和胰腺癌细胞也有效。发明者也测试了化学结构和昂克立新-1 相似的 100 多种类似物(衍生物),这些衍生物或在发明者实验室合成,或通过市场购买。发明者发现其中 30 多种衍生化合物对含有 K-ras 突变的癌细胞是有效的。其中 20 种的衍生化合物对发致瘤 Ras- 突变地细胞的杀伤作用与昂克立新-1 相比,更有效或一样有效。分子研究揭示了昂克立新化合物诱发细胞凋亡,核糖核酸剪接体的不正常聚合,不正常的 PKC ι 亚细胞分布,还有哺乳动物的核糖核酸聚合酶 II 的最大亚单位的脱磷酸作用。将 K-Ras 或 PKC ι 的敲低,能减少昂克立新-1 在癌细胞中引起的细胞凋亡,表明昂克立新引起的细胞凋亡需要活跃的 K-ras 和 / 或 PKC ι 。另外昂克立新化合物能够抑制 Raf 蛋白质表达和抑制 TNF α 诱发的 NF κ B 活化。因此,昂克立新化合物可能是一种低毒性的,致瘤 Ras- 选择性的新类抗癌化合物。

[0060] 为测试选择性地杀死 T29K 或 T29H 细胞的化合物的效果,发明者从 ChemBridge 公司得到若干化合物,以确定细胞对这些化合物剂量的反应。在试验过的 6 种化合物中,化合物(1-[(4-氯苯基)甲基]-1H-吡啶-3-甲醛)(昂克立新 1)在较宽的剂量范围内对 T29Kt1 细胞具有高度选择性,而其他的化合物要么有有限的选择性,要么有窄的剂量选择窗口(图 1)。因而发明者的焦点就放在 K-ras 特殊化合物的抗癌作用上。在时间效应试研中也显示昂克立新-1 对 T29K 细胞的杀伤作用由时间的增加而加强。但是时间的增加并不增强昂克立新-1 对其他相关细胞的作用。就化学结构来讲,这种化合物和吡啶-3-甲醇(13C)有相似的核心结构。吡啶-3-甲醇是一种存在于自然界的用来做癌症预防和治疗试验的化合物。在许多植物食品中可找道吡啶-3-甲醇。然而,用同样的剂量范围测试吡啶-3-甲醇时发现,该化合物对所测试的 3 个细胞系都无细胞毒作用(数据未显示)。

[0061]



[0062] 式 I

[0063] 为进一步评价昂克立新-1 的抗癌活性(式 I 中, R₂ 是 CH=O; R₉ 是 Cl; R₁, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₁₀ 和 R₁₁ 是氢),发明者在不同 ras 状况的 6 个人类肺癌细胞系中试验昂克立新-1 的疗效。结果显示昂克立新-1 在肺癌细胞系 H460, H2122 和 A549 非常有

效。这三个细胞排分别包含在 K-ras 中的 Q61H, G12C, 和 G12S 突变。昂克立新 -1 在 H226b 也有效果, 该细胞系的 ras 基因状况仍不清楚。在 H322, H1299 (N-ras 突变) 和 H522 细胞系上它没有效果。这个结果表明昂克立新 -1 不仅对有 Kras 突变的卵巢癌细胞有效, 而且对有 Kras 突变的一些肺细胞上也有效。

[0064] 为研究昂克立新 -1 的抗癌活性是否与细胞增殖抑制或杀死细胞导致的, 发明者用 30 μ M (对 T29 或 T29K) 或 3 μ M (对 H460) 处理 T29, T29K 和 H460 细胞系后, 再用膜联蛋白 /Propidium 碘化物染色。在治疗后的 12 至 24 小时之间, H460 和 T29K 细胞的 70% 到 90% 对膜联蛋白, PI 或者两者作了阳性染色, 表明它们的大多数细胞都被昂克立新 -1 治疗杀死了。相反, H460 和 T29K 细胞的对照组样品, 以及 T29 细胞的对照和治疗组样品, 其有膜联蛋白和 / 或 PI 阳性细胞的不到 10%。这个结果表明昂克立新 -1 够有效地杀死 T29K 和 H460 细胞。

[0065] 对 H460 细胞的凋亡诱导也进行了分析。H460 细胞接受 1 μ M 的昂克立新 -1 的治疗 6 到 24 小时。对对照组细胞用 DMSO 治疗。然后对细胞溶解体进行蛋白印记免疫分, 来检查胱天蛋白酶 -3 (半胱天冬酶 -3) 和胱天蛋白酶 -8 (半胱天冬酶 -8) 的分裂。结果显示昂克立新 -1 能够有效地诱导半胱天冬酶 -3 和半胱天冬酶 -8 的活化, 表明昂克立新 -1 能在这些细胞中诱发凋亡。通昂克立新 -1 治疗后, 涉及 Ras 信号途径的一些分子的表达也进行了评估。蛋白印记免疫分析显示 H460 细胞经昂克立新 -1 治疗, 可导致 Raf-1 的大量减少。Raf-1 是一种丝氨酸 / 苏氨酸激酶。它在 Ras 信号通道介导的细胞增殖和肿瘤细胞存活中起着关键的作用。同时也是抗癌治疗的重要靶点。活性 Raf-1 能够转移到线粒体的位置, 在线粒体中它通过和 Bad 蛋白或者其他蛋白质基相互作用来执行抗细胞凋亡的信号。Raf-1 在血管生成期间也是一个很重要的内皮细胞存活调整器。即使再细胞外信号调节的激酶在正常状态, 去除 Raf-1 使细胞对细胞凋亡非常敏感。因此可以通过抑制 raf-1 来达到抗癌目的。

[0066] 为研究昂克立新 -1 的衍生物也具有相似的抗癌活性, 发明者从 ChemBridge 公司获得四个衍生物, 并对它们在 H460, T29 和 T29K 细胞中的细胞毒效果进行评估。其中三个在 H460 上的非常有效果。其中两个在 T29K 细胞上非常有效。另外, 和 T29 细胞相比, 两个衍生物对于 T29K 和 T29H 细胞有一定选择性, 但是效力比较少。这个结果表明昂克立新 -1 的一些衍生物也具有抗癌功能。

[0067] 最为一种小鸟嘌呤核苷结合蛋白质的一个亚科, Ras 循环于有活性的 GTP 结合态和无活性的 GDP 结合态。鸟嘌呤核苷交换因子通过催化 GDP 的释放来促进 Ras 和 GTP 的结合。这种结合态也是 Ras 和其目标 (底物) 蛋白质相互作用所必需的。另一方面, GTP 酶激活蛋白质 (GAPs) 能激活 Ras 内在的 GTP 酶活动性, 使 GTP 转化成 GDP, 导致一个与 GDP 结合的, 无活性的 Ras。减少 GTP 酶活性或减少 GDP 结合能力的 Ras 突变使 Ras 处于持续活跃的, GTP 结合态位。有趣的是, 昂克立新 -1 有一个类似于鸟嘌呤的差不多的中心结构。现在还不清楚昂克立新 -1 是否能和 GTP 竞争, 并与突变的 ras 蛋白质或其他 ras 家族成员的结合。

[0068] 因为 Ras 在胰腺癌和结肠直肠癌中经常有突变, 这些化合物和它们的衍生物可能对这些癌症的治疗会有用。昂克立新 -1 和它的衍生物在这些癌症的抗癌活性也将在培养的癌细胞中被评定。这些化合物在体内的抗癌活性也会在带有人类癌细胞异种植的小

鼠中,或在因为 Ras 基因突变而自发肿瘤的转基因小鼠中进行研究。

[0069] 致癌 Ras 基因突变存在于 30% 的人类癌症中,包括 90% 的胰腺癌及 50% 的肺癌和结肠癌。其中 K-Ras 突变在人类癌症中是最常见的。能够抑制 Ras 功能的法尼基转移酶抑制剂 (FTIs) 经常在癌症治疗的临床试验中被测试。FTIs 对 H-Ras 突变是有效的,但是对 K-ras 突变则无效。大部分用 FTIs (当单独用时) 的临床试验都失败了,可能是因为在人类癌症中 K-ras 比较普遍,而 H-ras 却不是。这里描述的化合物能有效地杀死 K-ras 突变的癌细胞,因此,也可以期待其对癌症治疗比 FTIs 更有效。据报道,有些病毒在 Ras 活跃的细胞里能更有效的复制。因此, Ras 特异的细胞毒化合物也可用来抗病毒治疗。

[0070] A. Ras 信号途径和昂克立新诱发细胞凋亡的分子机制

[0071] 已知的诱发细胞凋亡的分子机制表明,不少信号途径和蛋白质都可引起细胞死亡。与细胞凋亡和 / 或 Ras 信号途径有关的蛋白质包括 Bax, Bik, Bcl2, Bcl-XL, Raf-1, B-Raf, Akt, Mst1 和非典型蛋白激酶 (aPKC) zeta 和 PKC iota,当然也不限于这些。Bax 和 Bik 是致细胞凋亡蛋白质,而 Bcl2 和 BclXL 是抗细胞凋亡蛋白质。据报道,那些致和抗细胞凋亡蛋白质的比例对细胞凋亡诱发或细胞凋亡抑制起决定性的作用 (Oltvai 等人,1993; Zhang 等人,2000)。Raf 蛋白质是一类在以 Ras 信号通道中起着关键作用的丝氨酸 / 苏氨酸激酶。(Jun 等人,1999; Wellbrock 等人,2004)。在人类和其他脊椎动物中,有三种异构体,分别由编码 A-Raf, B-Raf 和 C-Raf (Raf-1) 的三个 RAF 基因编码 (Wellbrock 等人., 2004; Garnett 和 marais, 2004)。Raf 被 Ras 激活,反过来激活分裂素激活的蛋白质激酶 (MEK) 和细胞外信号控制激酶 (ERK) 这一信号链 (Wellbrock 等人,2004),导致抗细胞凋亡活性增强。除了 MEK/ERK 途径的激活,有活性的 Raf-1 能够转移到线粒体的位置,在线粒体中它通过和 Bad 或者其他蛋白质互作用来执行发抗细胞凋亡信号。(von Gisse 等人,2001; Wang 等人,1996)。Raf-1 也能通过抑制哺乳动物脂 20 激酶 (MST2) (O' Neill 等人,2004) 而起到阻碍细胞凋亡。最近,各种 B-RAF 基因的活性增强的突变也在各种人类癌症中检测到,包括恶性黑瘤素 (60-70%), 甲状腺癌 (36-50%), 结肠直肠癌 (5-22%), 浆细胞卵巢癌 (30%)。在其他人类癌症中 B-Raf 的突变也被发现,但频率较低 (Davies 等人., 2002; von Gise 等人,2001)。这些事实说明了 Raf 在抗癌治疗中的重要性。

[0072] AKT 和非典型 PKCs, PKC zeta 和 PKC iota 是由 Ras 通过 PI3K/PDK1 途径激活。与其他蛋白质激酶 C 成分不同, PKCzeta 和 PKC iota 不受由甘油二酯 (DAG), 钙离子, 或佛波醇酯的调节影响,但是由磷酸肌醇-3- 激酶 (PI3K) 和它的脂质产品磷脂酰肌醇-3, 4, 5- 三磷酸盐 (PIP3) (Nakanishi 等人., 1993) 激活。3- 磷酸肌醇- 依赖的蛋白质激酶-1 (PDK1) 催化的非典型 PKCs 中的 Thr410 (Thr 403) 的磷酸化是需要 PI3K 参与的,并对 aPKCs 起着直接的开关作用 (Le Good, 1998)。PDK1 是一个持续活性激酶,然而,它和底物的结合是由磷酸肌醇调节 (Pullen 等人, 1998; Stephens 等人, 1998)。GTP 结合态的 Ras 直接和磷脂酰肌糖-3-OH 激酶 (PI3Ks) 的催化亚基结合,并激活 PI3Ks (Rodriguez-Viciano 等人, 1994; Pacold 等人, 2000),从而导致短暂的第二信使产品如磷脂酰肌糖 3, 4, 5- 磷酸盐 (PIP3) 的产生 (Vivanco and 20 Sawyers, 2002) 和许多由 PI3K/PDK1 决定的激酶的活化,包括 aPKC (Le Good 等人, 1998) 和 Akt (Alessi 等人, 1997)。此外, Ras 蛋白质在生物体外或有机体内能够直接和 aPKCs 相结合,调节 PKC 的活性 (Diaz-Meco 等人, 1994; Fedorov 等人., 2002)。有证据也显示 aPKCs 是 Ras 下游的效应分子之一,它们调停 RAS 发信号途径的信号

转换 (Fedorov 等人, 2002 ;Berra 等人, 1993), 同时也是 RAS 诱发肿瘤形成所必需 (Murray 等人, 2004)。

[0073] II. 昂克立新 (昂克立新) 化合物

[0074] 昂克立新 (昂克立新) 和昂克立新的类似物。在化学结构上, 昂克立新-1 有与 1- 吡啶-3- 甲醇同样的核心结构, 1- 吡啶-3- 甲醇是一种用来癌症预防和治疗的试验化合物, 天然存在于许多植物食品中。(Brignall, 2001 ;Kelloff 等人, 1996 ;Chinni 等人, 2001)。昂克立新-1 和舒林酸 (Taylor 等人, 2000 ;Sun 等人, 2002) 及氯尼达明 (Ravagnan 等人, 1999 ;Papaldo 等人, 2003) 在结构上也有相似性, 它们两个已用于临床前和临床癌症治疗研究。但是, 1- 吡啶-3- 甲醇, 舒林酸和氯尼达明在任何测试浓度 (最高为 100 微摩尔 ;数据没有显示) 对 T29, T29Kt1, T29Ht1 和 H460 细胞都无细胞杀伤效果。这表明了昂克立新合 1- 吡啶-3- 甲醇, 舒林酸及氯尼达明有不同的抗癌谱或分子靶点。与异戊烯半胱氨酸羧基转甲基酶 (Icmt) 的小分子抑制剂, 2-[5-(3- 甲基)-1- 辛基-1H- 吡啶-3- 基] 乙酰胺 (cysmethynil) 一样, 昂克立新化合物也有一个吡啶的核心结构。Cysmethynil 也具有抗 Ras 基因突变的癌细胞的活动 (Winter-Vann 等人, 2005)。据报道, Cysmethynil 在野生型小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 中诱发 Icmt 依赖性生长抑制, 而不抑制 Icmt 敲除的 MEF 细胞生长。而且能阻止人类结肠癌细胞的非停泊依赖性生长 (Winter-Vann 等人, 2005)。因为 cysmethynil 在市场上买不到, 发明者测试了昂克立新化合物能否在鼠胚 MEF 细胞中诱发 Icmt 依赖性生长抑制。结果显示昂克立新-1 不能在鼠胚 MEF 细胞中诱发 Icmt 依赖性生长抑制。野生型 MEF 和 Icmt-/- (敲除) 的鼠胚 MEF (Bergo 等人, 2004) (由旧金山加利福尼亚大学的 SG Young 博士提供) 都对昂克立新-1 有抵抗性。在测试的最高浓度下 (100 微摩尔), 昂克立新-1 在两种细胞中只诱发相似和轻度的生长抑制, 这表明了昂克立新和 cysmethynil 有不一样的作用机制。

[0075] 根据美国化学文摘数据库检索, 发明者得到了 100 多种昂克立新-1 的类似物。这些化合物多数由发明者合成, 部分购自 ChemBridge 公司和美国国立卫生院癌症研究所 [NCI] 药物化学合成研究室, 或其它在美国, 俄国和乌克兰的公司。有 30 多种化合物在 T29Kt1 和 H460 细胞中能诱发细胞毒作用, 而对 T29 细胞无作用。有 20 多种化合物在 T29Kt1 和 H460 细胞中的细胞杀死活性和昂克立新-1 相似或比它好。基于这些细胞中 IC₅₀ 数值, 发明者作了一个简单结构 / 活动关系 (SAR) 分析, 结果显示, 与昂克立新-1 中的吡啶环相联结的环状结构对于这些化合物的抗癌活性较为重要, 尽管这个环可以是一个取代或不取代的苯环或一个取代或不取代的 5 元环。在环中的各种代替基团可影响在 T29Kt1 和 H460 细胞中的 IC₅₀ 数值 ;然而, 这些变化是量变而不是质变。当苯环或 5 元环被直链脂肪或分支脂肪链取代时, 对 H460 细胞的抗癌作用影响不大, 但对 T29Kt1 细胞的抗癌作用明显降低。将吡啶环 3- 醛改为羧基或酮基, 则抗癌活性明显降低, 但改为羟基或盐, 则它们的抗癌作用与昂克立新-1 号一样或更好。同样, 在 R₃ 上经酯键, 醚键或 C = N 键等连结其它基团, 则它们的抗癌作用与昂克立新-1 号一样或更好。部份被测试的类似物和他们对于 T29, T29Kt1 和 H460 细胞的 IC₅₀ 在表 1 中列出。表 2 显示了在各种其他癌细胞的一些活性 (昂克立新化合物的 IC₅₀ 数值)。

[0076] A. 化合物的合成、纯化和质量检测

[0077] 正如上文提到, 部分化合物是购自 ChemBridge 公司或美国国家癌症研究所药物

合成和化学研究室. 发明者在他们的实验室里也合成了很多种类类似物, 如 1-[1-(2-氯苯甲基)-1H-吡啶]-3-乙酮, 1-(3-氯苯甲基)-1H-吡啶]-3-乙酮, 1-[1-(4-氯苯甲基)-1H-吡啶]-3-乙酮, {1-[4-(三氟甲基)苯甲基]-1H-吡啶}-3-甲醇, {1-[3,5-二(三氟甲基)苯甲基]-1H-吡啶}-3-甲醇, {1-[3,5-二(三氟甲基)苯甲基]-1H-吡啶}-3-甲醇, 1-(4-特丁基苯甲基)-1H-吡啶-3-羧酸, (1-(4-特丁基苯甲基)-1H-吡啶)-3-甲醇, 1H-吡啶-3-甲醇, 1-[(3-甲氧基-4-氯苯基)甲基]-1H-吡啶-3-甲醇, 1-[(3-氯代-4-氟苯基)甲基]-甲醇, 1-[1-(β-D-吡喃葡萄糖苷)-1H-吡啶]-3-甲醇, 1-(β-D-呋喃核糖苷)-1H-吡啶-3-甲醇和 1-[(4-氯苯基)甲基]-1H-吡啶-3-胍生物胞素,. 有两种典型的方法用来合成新的或市场上得不到的类似物. 一种方法是经 LiAlH_4 或 NaBH_4 还原或由 KMnO_4 氧化由市场上购到的吡啶-3-甲醇类似物, 得到吡啶-3-甲醇或吡啶-3-羧酸类似物. 第二种方法是通过各种化合物的起始物 (如图 12 所示) 来合成新的化合物. 简要地讲, 1.0 摩尔的起始物 A (含有吡啶) 在无水的 DMSO 中溶解并与 1.1 摩尔的 NaH 混合. 在室温下搅拌一个多小时后, 加入 1.2 摩尔的起始物 B (苄基卤化物), 混合物在室温下再搅拌 2-4 小时. 然后, 加蒸馏水 (3 倍于 DMSO 体积) 并混匀, 用氯仿或二氯甲烷萃取. 该有机相用水和 10% 的 NaCl 洗涤. 由无水 Na_2SO_4 除去有机相中残存的水. 通过滤纸过滤去除无水 Na_2SO_4 . 所得溶液在旋转真空蒸发器中蒸发浓缩. 根据化合物的极性, 所得产物通过硅胶柱层析分离和纯化. 洗脱液为 CH_2Cl_2 : 正己烷 (1 : 1) 或 CHCl_3 : 甲醇 (20 : 1). 然后真空蒸发器中除去有机洗脱剂, 得到终产物. 或者基于化合物在各种溶液中的溶解性, 所得产物也可结晶纯化. 终产物的纯度和分子量由高压液体色谱-质谱 (HPLC-MS) 分析鉴定. 化合物的结构由核磁共振 (NMR) 分析鉴定. 图 13 为合成和纯化后的昂克立新-27 经 HPLC-MS 和 NMR 鉴定分析的图谱的实例. 大部分化合物的纯度为 95% -99%, 它们的分子量经 MS 分析, 符合预先计算的分子量. 只有通过 HPLC-MS 分析显示的纯度为 95% 或更高的化合物才用于细胞培养试验.

[0078] 表 1 昂克立新类似物和 T29, T29K 和 H460 细胞的 IC_{50} (logM)

[0079]

化合物		化学名称与结构	不同细胞的 IC ₅₀ (logM)		
编号	CAS 注册号码		T29	T29k	H460
K001	75629-57-1	1-[(4-氯代苯基)甲基]-1H-吡啶-3-甲醛	>4.5	-5.6	-6.6
K002	302828-82-6	N-1-[(2, 4-二氯苯基)甲基]-3-甲基-1H-吡啶-4H-1, 2, 4-三唑-4-胺	>4.5	>4.5	-4.8
K003	302829-20-5	2-[(2-氯苯基)甲基]-3-亚甲基-1H-吡啶-N-乙基胍硫代酰胺	>4.5	>4.5	-4.75
K004	337506-29-3	N-[2-(2-甲基-1-苯基)-3-乙基-1H-吡啶]乙酰胺	>4.5	>4.5	>4.5
K005	525-02-0	(5-甲氧基-2-甲基-1-苯基)-1H-吡啶-3-乙胺盐酸盐	-4.8	-4.8	-5.2
K006	92407-89-1	1-(2-氯代苯基)-1H-吡啶-3-甲醇	>4.5	-5.6	-7
K007	677015-20-2	4-[(3-苯甲酰-1-亚甲基-1H-吡啶)]氧苯	>4.5	>4.5	>4.5
K008	3377-71-7	1-苯基-1H-吡啶	>4.5	>4.5	>4.5
K009	5102-18-1	1-苯基-2-甲基-5-羟基-1H-吡啶-3-乙酰	>4.5	>4.5	>4.5
K010	676537-97-6	环丙基[3-(1-苯基-1H-吡啶)]甲酮	>4.5	>4.5	>4.5
K011	609823-07-6	5-羟基-2-甲基-1-(1-苯基)-1H-吡啶-3-乙酸甲酯	-5.5	-5.5	-5.8
K012	29957-93-5	1-(苯基)-1H-吡啶-3-丙醇	>4.5	>4.5	>4.5
K013	2731-06-8	2-甲基-1H-吡啶-3-乙胺	>4.5	>4.5	>4.5
K014	10511-51-0	1-苯基-1H-吡啶-3-甲醛	>4.5	-5.3	-7.6
K015	487-89-8	1H-吡啶-3-甲醛	>4.5	>4.5	>4.5
K016	56344-53-7	5, 6-二甲基-7-苯基-7H-吡咯[2, 3-d]嘧啶-4-胺,	>4.5	>4.5	>4.5
K017	842975-80-8	N-[3-(1H-咪唑)丙烷基]-5, 6-二苯基-7-苯基-7H-吡咯[2, 3-d]嘧啶-4-胺	-4.8	-5	>4.5
K018	4584-39-8	1-[(4-氯苯基)甲基]-5-甲氧基-2-甲基-1H-吡啶-3-乙酸	>4.5	>4.5	>4.5
K019	173458-80-5	4-氯代-5, 6-二甲基-7-苯基-7H-吡咯[2, 3-d]嘧啶	>4.5	>4.5	>4.5
K020	833441-48-8	1-[(3-氯代苯)甲基]-1H-吡啶-3-腈	>4.5	>4.5	>4.5
K021	385382-15-0	1-[1-[2-(4-氯代苯)乙基]-5-羟基-2-甲基-1H-吡啶-3-乙酮	>4.5	>4.5	>4.5

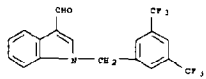
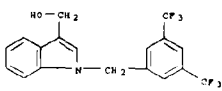
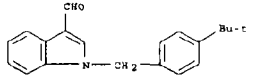
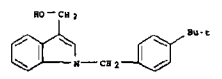
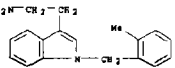
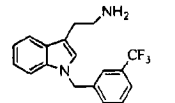
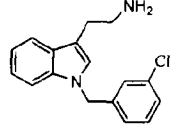
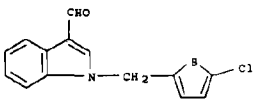
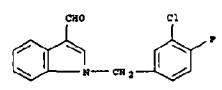
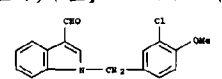
[0080]

K022	342398-67-8	3-乙酰基-1-[2-(3,4-二甲氧基苯)乙基]-2-甲基-1H-吡啶-5-(2-糠酸酯)	>4.5	>4.5	>4.5
K023	432008-82-7	1-[2-(4-甲氧基)乙酰基]-1H-吡啶-3-羧酸甲酯	>4.5	>4.5	>4.5
K024	583818-66-0	5-[[1-(3,4-二氯代苯)甲基]-1H-吡啶-3-亚甲基]-2,4-咪唑二酮	>4.5	>4.5	>4.5
K025	151409-77-7	1-(1-萘基)-1H-吡啶-3-甲醛	>4.5	>4.5	>4.5
K026	331869-66-0	5-羧基-1-[2-羧基-2-(4-硝基苯)乙基]-2-甲基-1H-苯基[g]吡啶-3-羧酸乙酯	>4.5	>4.5	>4.5
K027	90815-01-3	1-[(3-氯代苯)甲基]-1H-吡啶-3-甲醛	>4.5	-6.43	-8.43
K028	90815-00-2	1-[(2-氯代苯)甲基]-1H-吡啶-3-甲醛	>4.5	>4.5	>4.5
K029	174367-70-5	1-[(4-溴代苯)甲基]-1H-吡啶-3-甲醛	>4.5	-5	>4.5
K030	27018-76-4	1-苯基-1H-吡啶-3-羧酸	>4.5	>4.5	>4.5
K031	155883-86-6	2-(1-苯基-1H-吡啶-3-亚甲基)肼硫代酰胺-	>4.5	-5	>4.5
K032	146-82-7	1-[(4-氯代苯基)甲基]-5-甲基-2-苯基-1H-吡啶-3-乙酸	>4.5	>4.5	>4.5
K033	500726-45-4	5,6-二氯-1H-1,2,3-三唑[4,5-b]并吡嗪	>4.5	>4.5	>4.5
K034	93548-92-6	2-氯代-1-[(2,4-二氯代苯)甲基]-1H-吡啶-3-羧酸	>4.5	>4.5	>4.5
K035	907172-02-5	(6-溴-3-甲基-2,3-二氢吡啶)-1-苯基-甲酮	>4.5	>4.5	>4.5
K036	94005-21-7	1-苯基-5-甲氧基-1H-吡啶-3-乙酸	>4.5	>4.5	>4.5
K037	147-19-3 (NSC 66574)	1-[(4-氯代苯)甲基]-2-乙基-5-甲基-1H-吡啶-3-乙酸	>4.5	>4.5	>4.5
K038	147-19-3 (NSC 74617)	1-[(4-氯代苯)甲基]-2-乙基-5-甲基-1H-吡啶-3-乙酸	>4.5	>4.5	>4.5
K039	500542-35-8	1-[(4-氯代苯)甲基]-5-甲氧基-2-(4-甲氧基苯)-1H-吡啶-3-乙酸	>4.5	>4.5	>4.5
K040	53-86-1	1-(4-氯代苯甲酰)-5-甲氧基-2-甲基-1H-吡啶-3-乙酸	>4.5	>4.5	>4.5
K041	142311-28-2	2-氨基-5,7-二氢-1-7a-甲基-5-氧代-1-苯基-1H-吡啶-3-特丁基酯	-5.3	-5.3	>4.5
K042	28558-66-9	N4-[(1-苄基吡啶)-3-亚甲基]-N1-2-噻唑-磺胺	>4.5	-6	-8
K043	97077-43-5	5-甲氧基-2-甲基-1-苯基-1H-吡啶-3-乙酰胺	>4.5	>4.5	>4.5
K044	906517-47-3	2-[(2-氯代苯甲酰)氨基]-N-[(4-氯-2-甲基苯)-4,5-二氢-4-氧代]-5-乙酰胺噻唑	>4.5	>4.5	>4.5
K045	500282-33-7	1-[(2-氯代苯基)甲基]-2-甲基-5-甲基硫-1H-吡啶-3-乙胺	>4.5	>4.5	>4.5

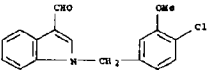
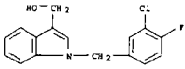
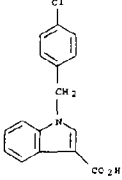
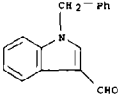
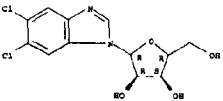
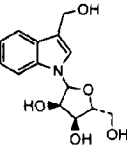
[0081]

K046	25791-28-0	1-苯甲基-3-(2-吡啶亚甲基)-2-咪唑酮	-5.3	-5.3	>4.5
K047	109448-43-3	1-苯甲基-咪唑-3-酚乙酸酯	>4.5	-4.5	-5
K048	159884-36-3	2, 3-二氢-3-羟基-2-氧代-1-苯甲基-1H-咪唑-3-乙酸乙酯	>4.5	>4.5	>4.5
K049	92407-93-7	1-[(3, 4-二氯代苯)甲基]-1H-咪唑-3-甲醇	>4.5	-6.5	-7.5
K050	90815-03-5	1-[(2, 4-二氯代苯)甲基]-1H-咪唑-3-甲醛	>4.5	-5.8	-7
K051	192997-17-4	1-[(2-氯代苯)甲基]-1H-咪唑-3-甲醛	>4.5	-6.5	-7
K052	420814-87-5	1-[(2-氯代-6-氯代苯)甲基]-1H-咪唑-3-甲醛	>4.5	>4.5	>4.5
K053	93548-80-2	1-[(2, 6-二氯代苯)甲基]-1H-咪唑-3-甲醛	>4.5	>4.5	>4.5
K054	50264-69-2	1-[(2, 4-二氯代苯基)甲基]-1H-咪唑-3-羧酸	>4.5	>4.5	>4.5
K055	38194-50-2	5-氟-2-甲基-1-[[4-(甲基亚磺酰基)苯基]亚甲基]-1H-茚-3-乙酸	>4.5	>4.5	>4.5
K056	63804-15-9	5-氟-2-甲基-1-[[4-(甲基亚磺酰基)苯基]亚甲基]-1H-茚-3-乙酸	>4.5	>4.5	>4.5
K057	937792-72-8	1-[(2-氯代苯基)甲基]-1H-咪唑-3-乙酮	>4.5	>4.5	>4.5
K058	937792-73-9	1-[(3-氯代苯基)甲基]-1H-咪唑-3-乙酮	>4.5	-4.5	>4.5
K059	558469-85-5	1-[(4-氯代苯基)甲基]-1H-咪唑-3-乙酮	>4.5	>4.5	>4.5
K060	92407-91-5	1-[(4-氯代苯基)甲基]-1H-咪唑-3-甲醇	>4.5	-7.1	-7.8
K061	93548-89-1	1-[(4-氯代苯基)甲基]-1H-咪唑-3-羧酸	>4.5	>4.5	>4.5
K062	192997-22-1	1-[(3-三氟甲基苯)甲基]-1H-咪唑-3-甲醛	>4.5	-5.25	-7.86
K063	937792-74-0	1-[(3-三氟甲基苯)甲基]-1H-咪唑-3-甲醇	>4.5	-6.25	-7.4
K064	501660-56-6	1-[(4-三氟甲基苯)甲基]-1H-咪唑-3-甲醛	>4.5	>4.5	-5.8
K065	937792-75-1	1-[(4-三氟甲基苯)甲基]-1H-咪唑-3-甲醇	>4.5	-5.9	-5.9
K066	151409-79-9	1-[(4-甲基苯)甲基]-1H-咪唑-3-甲醛	-4.5	-5.4	-7.2
K067	664317-83-3	1-[(4-甲基苯)甲基]-1H-咪唑-3-甲醇	-4.8	-6.1	-7
K068	591210-47-8	1-[(3-硝基苯)甲基]-1H-咪唑-3-甲醛	-4.5	-6.3	-7.4
K069	678182-31-5	1-[(3-硝基苯)甲基]-1H-咪唑-3-甲醇	>4.5	-6.4	-7.4
K070	192997-25-4	1-(4-硝基苯)甲基]-1H-咪唑-3-甲醛	>4.5	-5	-6.3
K071	678551-69-4	1-[(4-硝基苯)甲基]-1H-咪唑-3-甲醇	>4.5	-6.8	-7.1
K072	92407-90-4	1-[(3-氯代苯基)甲基]-1H-咪唑-3-甲醇	>4.5	-5.75	-5.9

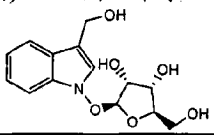
[0082]

K073	210426-43-0	1-[(4-溴代苯)甲基]-1H-吡啶-3-甲醇	>4.5	-6.4	-9.5
K074	92407-92-6	1-[(2, 4-二氯代苯)甲基]-1H-吡啶-3-甲醇	>4.5	-5.8	-7.1
K075	93548-82-4	1-[(3, 5-二氯代苯)甲基]-1H-吡啶-3-甲醇	>4.5	>4.5	>4.5
K076	937792-77-3	1-[[3, 5-二(三氟甲基)苯]甲基]-1H-吡啶-3-甲醇 	-5.2	-5.4	-5.9
K077	937792-79-5	1-[[3, 5-二(三氟甲基)苯]甲基]-1H-吡啶-3-甲醇 	-5.2	-5.1	-5.1
K078	405274-91-1	1-[(4-特基苯)甲基]-1H-吡啶-3-甲醇 			
K079	959988-46-6	1-[(4-特基苯)甲基]-1H-吡啶-3-甲醇 			
K080	781589-99-9	1-[(2-甲基苯)甲基]-1H-吡啶-3-乙胺 			
K081	SW28	1-[[3-(三氟甲基)苯基]甲基]-1H-吡啶-3-乙胺 			
K082	SW29	1-[(3-氯代苯基)甲基]-1H-吡啶-3-乙胺 			
K083	959988-41-1	1-[(5-氯代-2-噻吩基)甲基]-1H-吡啶-3-甲醇 			
K084	959988-42-2	1-[(3-氯代-4-氟苯基)甲基]-1H-吡啶-3-甲醇 			
K085		1-[(3-氯代-4-甲氧基苯基)甲基]-1H-吡啶-3-甲醇 			
K086		1-[(3-甲氧基-4-氯代苯基)甲基]-1H-吡啶-3-甲醇			

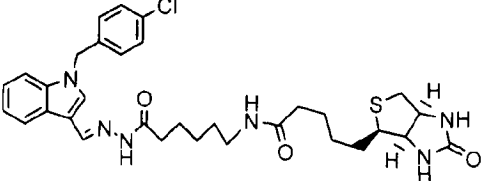
[0083]

					
K087		1-[(3-氯-4-氟苯基)甲基]-1H-吲哚-3-甲醇 			
K088	93548-89-1	1-[(4-氯代苯)甲基]-1H-吲哚-3-羧酸 			
K089	10511-51-0	1-苯甲基-1H-吲哚-3-甲醛 			
K090	53-85-0	5, 6-二氯代-1- (1- -D-呋喃核糖) -1H-苯并咪唑 	>4.5	>4.5	>4.5
K091	化合物 14	1- (1- -D-呋喃核糖) -1H-吲哚-3-甲醇 			
K092	121103-34-2	5-溴-1-苯甲基-1H-吲哚-3-甲醛			
K093	593235-84-8	5-溴-1-[(3-氯代苯基)甲基]-1H-吲哚-3-甲醛			
K094	713085-30-4	1-[1-(4-氯代苯基)甲基]-1H-吲哚-3-丙酮			
K095	92407-86-8	1-[(4-氯代苯基)甲基]-2-甲基-1H-吲哚-3-甲醛			
K096	593236-94-3	1-[(3-氯代苯基)甲基]-7-乙基-1H-吲哚-3-甲醛			
K097	664317-83-3	1-[(4-甲基苯)甲基]-1H-吲哚-3-甲醇			
K098	420811-32-1	1-(4-氯代苯甲酰)-1H-吲哚-3-羧酸甲酯			
K099	592546-71-9	1-[(4-羧甲基苯)甲基]-1H-吲哚-3-甲醛			
K100	340318-80-1	1-[2-(2-氯代苯氧基)乙基]-1H-吲哚-3-甲醛			
K101	885526-36-3	5-甲氧基-1-(苯甲基)-1H-吲哚-3-甲醇			
K102	677345-08-3	环丙烷基[1-[(3, 4-二氯代苯)甲基]-1H-吲哚]-3-甲酮			
K103	676247-82-8	1-(1-萘甲基)-1H-吲哚-3-甲醇			
K104	591210-47-8	1-[(3-硝基苯)甲基]-1H-吲哚-3-甲醛			

[0084]

K105	401580-42-5	1-(4-氯代苯甲酰)-1H-吡啶-3-羧酸甲酯			
K106	487-60-5	3- -D-吡喃葡萄糖基 -1H-吡啶			
K107	化合物 15	1-[1-(-D-吡喃葡萄糖基)]-1H-吡啶-3-甲醇			
K108	34365-14-5	1-[1-(-D-吡喃葡萄糖基)]-1H-吡啶-3-乙酮			
K109	754199-86-5	1-(2, 4-二氯代苯基)甲基-1H-吡啶-3-羧酸甲酯			
K110	412284-65-2	5-氯-1-甲基-1H-吡啶-3-甲醛			
K111	329061-82-7	1-[2-(4-氯代苯氧基)乙基]-1H-吡啶-3-甲醛			
K112	833441-48-8	1-(3-氯代苯基)甲基-1H-吡啶-3-腈			
K113	155134-26-2	1-(苯甲基)-1H-吡啶-3-羧酸甲酯			
K114	29957-93-5	1-苯甲基-1H-吡啶-3-丙醇			
K115	299936-51-9	1-(2-苯氧基乙基)-1H-吡啶-3-甲醛			
K116	22948-94-3	1-乙酰基-1H-吡啶-3-甲醛,			
K117	773101-94-3	1-苯甲基-1H-吡啶-3-[2-(1, 3-二氧戊环)]			
K118	5414-45-9	1-[(4-氯代苯基)甲基]-1, 2, 3, 4-四氢-喹啉			
K119	107456-42-8	1-[(4-氯代苯基)甲基]-苯并咪唑			
K120	862652-44-6	1-[2-(1-苯氧基)乙基]-1H-吡啶-3-甲醛			
K121	89542-38-1	3-[(4-氯代苯基)甲基]-苯并噻唑溴盐			
K122	906345-77-5	1-葡萄糖醛酸-1H-吡啶-3-羧酸			
K123	4958-11-6	1-吡喃葡萄糖基-二氢吡啶			
K124	400782-50-5	1-(-D-吡喃葡萄糖基)-5-硝基-1H-吡啶			
K125	444794-70-1	1-(2-脱氧- -D-赤型-呋喃戊糖基)-4-甲基-1H-吡啶			
K126	化合物 16	1-(-D-呋喃核糖基)-1H-吡啶-3-甲醇 			
K127	400782-53-8	5-硝基-1-(-D-呋喃核糖基)-1H-吡啶			
K128	78434-21-6	1-(-D-吡喃葡萄糖基)-1H-苯并咪唑-2-腈			
K129	207598-26-3	甲基-1H-吡啶-3-(-D-吡喃乳糖基)			

[0085]

K130	SW37-胍生物胞素	1-[(4-氯代苯基)甲基]-1H-吡咯-3-胍生物胞素		>4.5	-5.6	-6.4
------	------------	------------------------------	--	------	------	------

[0086] 表格 2. 不同细胞系里的活动 (IC₅₀ (-LogM))

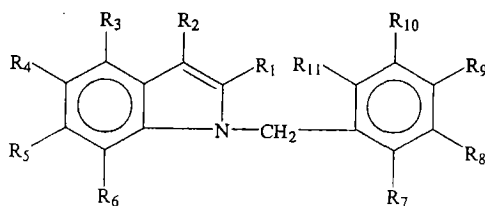
[0087]

细胞系	癌症	OnK-	OnK6	Onk6	Onk6	OnK6	Onk6	OnK7	Onk2	OnK7	Onk4	OnK	OnK4	OnK2	Onk5	Onk27	Onk14
		1	0	2	3	8	9	1	9	3	2	6	9	9	1		
H46@	肺	6.6	7.8	7.8	7.4	7.4	7.4	7.1	8.5	8.5	8	7	7.5	8.5	7	8.4	7.6
H226B	肺	7	8.6	5.5	6.5	8.6	7.5	6.5	7.1	7	5.5	8.6	8.6	6.9	6.1	6.5	5.7
H226B	肺	5.6	8.5	5	5.8	7.2	7	5.8	5.5	5.8	5.3	7.4	8.5	5.3	5	5.4	4.5
PS49	肺	>4.5	5.7	5	>4.5	5.3	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	5	4.9	5	5	4.9	5	4.5
AS49CK	肺	5.8	6	5.1	5	5.5	5.9	5.1	5.5	5.5	5.3	5.4	5.2	5.5	5	4.8	5.2
8																	
HctMB	结肠	5.5	7	4.9	5.1	6.8	6.5	5.5	5.6	5.5	5	6.3	8	5.5	5	5.4	5.1
CTH16P5	结肠	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5
3																	
HKE3	结肠	6.4	7.6	5.5	6	7	7.1	6.4	7	6.5	6	6.9	8.6	6.6		6	6
HKE3	结肠	6	>8.5	5.3	5.8	6.4	6	6.7	6.3	6.1	5	6.6	8.5	5.8	5	5.9	5.3
H322	肺	4.5	4.5	5	4.5	4.5	>4.5	>4.5	4.5	>4.5	>4.5	4.5	5	4.5	>4.5	>4.5	>4.5
h1299	肺	>4.5	5.5	5	>4.5	5	>4.5	5	4.9	>4.5	>4.5	5	5	5.1	5.7	4.8	>4.5
ASPC1	pancreasE	5.5	5.7	4.8	5	5.7	5.1	5	5.4	5.5	5	5.4	5	5.3	5.1	4.8	5.1
ULDI	结肠	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5
Heb46	肾	6.1	6.7	5	5	6.7	6.5	5.4	6.6	6.1	5.4	5.7	7.5	5.6	5	5.7	5.5
Heb44	肾	8	8	7	6.6	8	7.1	6.8	8.1	7.4	6.7	8	8	7.2	6.5	7.2	6.3
capand	DancreasE	5		4.5	4.5	4.5	4.5	6.9	6	5.5	5.5	4.9	4.9	5	4.5	4.5	4.5
Siv62@	结肠	5.4	5.3	>4.5	>4.5	>4.5	4.5	4.5	4.5	>4.5	>4.5	5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5
miapac	pancreas	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5
H2122	肺	6.1	6		6	5.7	5.5	5.7	5.6			5.4	6.5				6.2
H2@9	肺	>4.5	4.8		>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5	>4.5		4.5	5				>4.5
H23	肺	>4.5	4.8		4.5	>4.5	4.5	4.5	4.5	4.5		4.6	4.8				>4.5
H1933	肺	>4.5	5		4.6	>4.5	4.5	4.5	4.5	4.5		4.8	4				>4.5
H1395	肺	>4.5	4.7		>4.5	>4.5	>4.5	4.5	>4.5			4.5	4.8				>4.5
H287	肺	>4.5	4.6		4.5	4.5	>4.5	4.5	4.5			4.6	5.1				>4.5
Ovar3	卵巢	5.6	7		6.8	6.6	5.6	5.3	5.9			6.2	8				5.5
Ovar44	卵巢	4.5	5.6		5	>4.5		5	4.8			5.1	5				
3																	
Key	卵巢	4.6	5		>4.5	>4.5	4.5	4.5	4.5			4.5					
Ova429	卵巢	4.5	4.5		4.5	4.5	5.5	5.5	5			5.1					
SKOV3	卵巢	5.8	6.2		6	5.5		5.5	5.5			5.4	5.5				

[0088] B. Onrasin 化合物的化学结构式

[0089] Onrasin 化合物的化学结构式通常由下列式 I 表示

[0090]



[0091] 式 I

[0092] 在某些化合物中, 基团 R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, 和 / 或 R11 各自为氢,

羟基,氨基,氰基,含卤素的基团,溴,氯,硝基,巯基,或者是取代或未取代的基团,如 C1-C15 的烷烃基, C2-C15 烯基, C2-C15 炔烃基, C6-C15 芳烃基, C7-C15 芳烷基, C1-C15 杂环芳烃基, C2-C15 杂环芳烷基, C1-C15 酯酰基, C1-C15- 烷氧基, C2-C15 烯氧基, C2-C15 炔氧基, C6-C15 芳氧基, C7-C15 芳烷基氧基, C1-C15 杂环芳氧基, C2-C1 杂环芳烷基, C1-C15 酸基, C1-C15- 烷氨基, C2-C15 烯氨基, C2-C15 炔氨基, C6-C15 芳氨基, C7-C15 芳烷基氨基, C1-C15 杂环芳氨基, C2-C15 杂环芳烷基氨基, C2-C15 酰氨基, C1-C15 烷基硫代, C6-C15 芳基硫代, C7-C15 芳烷基硫代, C1-C15 杂环芳基硫代, C2-C15- 杂环芳烷基硫代, C1-C15 酰基硫代或 C0-C1 硅烷基。

[0093] 某些具体例子里, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, , 和 / 或 R₁₁ 是以取代或未取代基团的形式: 烷基, 烯基, 炔基, 芳基, 芳烷基, 杂环芳基, 杂环芳烷基, 酯酰基, 烷氧基, 烯氧基, 炔氧基, 芳氧基, 芳烷基氧基, 杂环芳氧基, 杂环芳烷基氧基, 酸基, 烷氨基, 烯氨基, 炔氨基, 芳氨基, 芳烷基氨基, 杂环芳氨基, 杂环芳烷基氨基或酰氨基。

[0094] 某些具体例子里, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, 和 / 或 R₁₁ 各自为 -H, -CH₃, -CH₂CH₃, -CH₂CH₂CH₃, -CH(CH₃)₂, -CH(CH₂)₂, -CH₂CH₂CH₂CH₃, -CH(CH₃)CH₂CH₃, -CH₂CH(CH₃)₂, -C(CH₃)₃, -CH₂C(CH₃)₃, -C₆H₅, -C₆H₄CH₃, -C₆H₄CH₂CH₃, -C₆H₄CH₂CH₂CH₃, -C₆H₄CH(CH₃)₂, -C₆H₄CH(CH₂)₂, -C₆H₃(CH₃)₂, -C₆H₃(CH₃)CH₂CH₃, F, Cl, Br, I, -OH, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -OCH₂CH₂CH₃, -OCH(CH₃)₂, -OCH(CH₂)₂, -OCH₂CF₃, -OCOCH₃, -OC₆H₅, -NH₂, -NTICH₃, -NIICH₂CH₃, -NHCH₂CH₂CH₃, -NHCH(CH₃)₂, -NHCH(CH₂)₂, -N(CH₃)₂, -N(CH₃)CH₂CH₃, -N(CH₂CH₃)₂, -NHCOC₃, -NHCO₂C(CH₃)₃, -CH₂F, -CH₂Cl, -CH₂Br, -CH₂OH, -CH₂OCH₃, -CH₂OCH₂CH₃, -CH₂OCH₂CH₂CH₃, -CH₂OCH(CH₃)₂, -CH₂OCH(CH₂)₂, -CH₂OCH₂CF₃, -CH₂OCOC₃, -CH₂MMH₂, -CH₂NHCH₃, -CH₂N(CH₃)₂, -CH₂NHCH₂CH₃, -CH₂N(CH₃)CH₂CH₃, -CH₂NHCH₂CH₂CH₃, -CH₂NHCH(CH₃)₂, -CH₂NHCH(CH₂)₂, -CH₂N(CH₂CH₃)₂, -CH₂CH₂F, -CH₂CH₂Cl, -CH₂CH₂Br, -CH₂CH₂I, -CH₂CH₂OH,

[0095] CH₂CH₂OOCOC₃, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂N(CH₃)₂, -CH₂CH₂NHCH₂CH₃, -CH₂CH₂N(CH₃)CH₂CH₃, -CH₂CH₂N]ICH₂CH₂CH₃, -CH₂CH₂NHCH(CH₃)₂, -CH₂CH₂NHCH(CH₂)₂, -CH₂CH₂N(CH₂C₃)₂, -CH₂CH₂NHCOC₂C(CH₃)₃, -CH₂CH=CH₂, -CH₂CHCHCH₃, -CH₂CH=CHCH₂CH₃, -CH₂CH=CHCH₂CH₂CH₃, CH₂CHCHCH(CH₃)₂, -CH₂CH=CHCH(CH₂)₂, -CF₃, -CN, -CH=CH₂, -CH=CHC₃, -COH, -COCH₃, -COCH₂CH₃, -COCH₂CH₂CH₃, -COCH(CH₃)₂, -COCH(CH₂)₂, -COCH₂CF₃, -COC₆H₅, -COC₆H₄CH₃, -COC₆H₄CH₂CH₃, -COC₆H₄CH₂CH₂CH₃, -COC₆H₄CH(CH₃)₂,

[0096] -COC₆H₄CH(CH₂)₂, -COC₆H₃(CH₃)₂, -CO₂H, -CO₂CH₃, -CO₂CH₂CH₃, -CO₂CH₂CH₂CH₃, -CO₂CH(CH₃)₂, -CO₂CH(CH₂)₂, -CONH₂, -CONFI CH₃, -CONHCH₂CH₃, -CONHCH₂CH₂CH₃, -CONHCH(CH₃)₂, -CONIICH(CH₂)₂, -CON(CH₃)₂, -CON(CH₂CH₃)CH₃, -CON(CH₂CH₃)₂, -CONHCH₂CF₃, -C₆H₄CH=CH₂, -C₆H₄CH=CHCH₃, -C₆H₄F, -C₆H₄Cl, -C₆H₄Br, -C₆H₄I, -C₆H₄OH, -C₆H₄OCH₃, -C₆H₄OCH₂CH₃, -C₆H₄OCH₂CH₂CH₃, -C₆H₄OCOC₃, -C₆H₄OC₆H₅, -C₆H₄NFI₂, -C₆H₄NHCH₃, -C₆H₄NHCH₂CH₃, -C₆H₄CH₂Cl, -C₆H₄CH₂Br, -C₆H₄CH₂OH, -C₆H₄CH₂OOCOC₃, -C₆H₄CH₂N₁₋₁₂, -C₆H₄N(CH₃)₂, -C₆H₄CH₂CH₂Cl, -C₆H₄CH₂CH₂OH, -C₆H₄CH₂CH₂OOCOC₃, -C₆H₄CH₂CH₂NH₂,

[0097] -C₆H₄CH₂CH=CH₂, -C₆H₄CF₃, -C₆H₄CN, -C₆H₄CH₃, -C₆H₄CH₃ Si(CH₃)₃, -C₆H₄COH, -C₆H₄COCH₃, -C₆H₄COCH₂CH₃, -C₆H₄COCH₂CF₃, -C₆H₄CO₂C₆H₅, -C₆H₄CO₂H, -C₆H₄CO₂CH₃, -C₆H₄CONH₂, -C₆H₄CONFI CH₃, -C₆H₄CON(CH₃)₂, -SH, -SCH₃, -SC₆H₅, -SCH₂C₆H₅, 或者 -SCOCH₃。

[0098] 在这些结构式中的“n”可以是 0, 1, 2, 3, 4, 5, 或 6.

[0099] 在这里使用的术语“氨基”指的是 $-\text{NH}_2$; “硝基”指的是 $-\text{NO}_2$; “卤素”指的是 $-\text{F}$, $-\text{Cl}$, $-\text{Br}$ 或者 $-\text{I}$; “巯基”指的是 $-\text{SH}$; “腈”指的是 $-\text{CN}$; “硅烷基”指的是 $-\text{SiH}_3$; “羟基”指的是 $-\text{OH}$.

[0100] 术语“取代基团”:意指在修饰一类有机基团(例如,烷基,芳基,酰基等等)时,其中一个或者多个氢原子被杂原子或者含有杂原子的基团所取代。在下文中对一些特别的取代有机基团有更全面的定义。

[0101] 术语“未取代基团”:意指在修饰一类有机基团(例如,烷基,芳基,酯酰基等等)时,其中没有任何氢原子被杂原子或者含有杂原子的基团所取代。由碳原子或者只含有碳、氢原子的基团取代氢原子即不足以定义为“取代基团”。如基团 $-\text{C}_6\text{H}_4\text{C}\equiv\text{CH}$ 就是一个未取代芳基的例子,而 $-\text{C}_6\text{H}_4\text{F}$ 就是一个取代芳基的例子。下文将对一些特别的未取代有机基团进行更详细的定义。

[0102] 术语“未取代 C_n -烷基”指其有机基团具有线型或支链、环状或非环状结构,没有碳-碳双键或三键,它们总共有 n 个碳原子,所有的都是非芳香型的、有 3 个或更多个氢原子,并无杂原子。例如,一个未取代的 C_1 - C_{10} 烷基有 1 到 10 个碳原子。术语“烷基”包括直链烷基、支链烷基、环状(非环状)烷基,烷基取代的环状烷基,以及环状烷基取代的烷基。未取代烷基的实例有: $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}(\text{CH}_2)_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 和 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 。

[0103] 术语“取代 C_n -烷基”指其有机基团具有一个饱和的碳原子作为连接点,没有碳-碳双键或者三键,有线型或者是支链的、环状的或非环状的结构,共含有 n 个碳原子,它们都是非芳香性的,具有 0, 1 或者多于 1 的氢原子,至少一个杂原子,每一个杂原子从杂原子系列 N、O、F、Cl、Br、I、Si、P 和 S 中任意选择。例如,一个 C_1 - C_{10} 的烷基有 1 到 10 个碳原子。下列基团是所有取代烷基的例子:三氟甲基, $-\text{CH}_2\text{F}$, $-\text{CH}_2\text{Cl}$, $-\text{CH}_2\text{Br}$, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$,

[0104] $-\text{CH}_2\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{OCH}(\text{CH}_2)_2$, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $\text{CH}_2\text{NHCH}(\text{SH}_3)_2$, $\text{CH}_2\text{NHCH}(\text{CH}_2)_2$, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{F}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{I}$,

[0105] $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCOCCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_3$,

[0106] $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}(\text{CH}_2)_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOC}(\text{CH}_3)_3$, 和 $-\text{CH}_2\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ 。

[0107] 术语“未取代 C_n -烯基”指其有机基团拥有线型或支链、环状或非环状结构,还至少有一个碳-碳双键,共有 n 个碳原子,它们都是非芳香性的、3 个或者多个氢原子、并且无杂原子。例如:一个未取代 C_2 - C_{10} 的烯基有 2 到 10 个碳原子。未取代烯基包括: $-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{CH}=\text{CHCH}_3$, $-\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}=\text{CHCH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}=\text{CHCH}(\text{CH}_2)_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_3$, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}(\text{CH}_3)_2$ 和 $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}(\text{CH}_2)_2$ 。

[0108] 术语“取代 C_n -烯基”指其有机基团具有一个非芳香性的碳原子作为连接点,并且至少有一个非芳香性的碳-碳双键,无碳-碳三键,还有线型或支链、环状或非环状结构,共有 n 碳原子,0, 1, 或者多于 1 个氢原子,至少含有一个杂原子。这里每个杂原子各自从 N, O,

F, Cl, Br, I, Si, P 和 S 中选取。例如, 一个取代的 C_2-C_{10} 烯基有 2 到 10 个碳原子。 $-CH=CHF$, $-CH=CHCl$ 和 $-CH=CHBr$ 族就是取代烯基的例子。

[0109] 术语“未取代 C_n -炔烃基”指其有机基团拥有线型或支链、环状或非环状结构, 还至少有一个碳-碳三键, 共有 n 个碳原子。它们是非芳香性的, 至少有一个氢原子, 并无杂原子。例如, 一个未取代的 C_2-C_{10} 炔烃基有 2 到 10 个碳原子。 $-C\equiv CH$ 和 $-C\equiv CCH_3$ 基团是未取代炔烃基的例子。

[0110] 术语“取代 C_n -炔烃基”指其有机基团具有一个非芳香性的碳原子作为连接点, 至少有一个非芳香性的碳-碳三键, 还有线型或支链、环状或非环状结构, 共有 n 个碳原子, 0, 1, 或多于 1 个氢原子, 至少一个杂原子。这里每个杂原子各自从 N, O, F, Cl, Br, I, Si, P 和 S 中选取。例如, 一个取代的 C_2-C_{10} 炔烃基有 2 到 10 个碳原子。 $-C\equiv CSi(CH_3)_3$ 基是一个取代炔烃基的例子。

[0111] 术语“未取代 C_n -芳基”指其有机基团具有一个单个碳原子作为连接点。在这里该碳原子是只含碳原子芳香环结构的一部分。总共有 n 个碳原子, 5 个或者更多的氢原子, 并无杂原子。例如, 一个未取代 C_6-C_{10} 芳基有 6 到 10 个碳原子。未取代芳基族的例子有苯基, 甲苯基, 二甲苯基, $-C_6H_4CH_2CH_3$, $-C_6H_4CH_2CH_2CH_3$, $-C_6H_4CH(CH_3)_2$, $-C_6H_4CH(CH_2)_2$,

[0112] $-C_6H_3(CH_3)CH_2CH_3$, $-C_6H_4CH=CH_2$, $-C_6H_4CH=CHCH_3$, $-C_6H_4C\equiv CH$ 和 $-C_6H_4C\equiv CCH_3$ 。芳基也包括稠环芳基, 如萘基, 喹啉基, 吲哚等类似基团。

[0113] 术语“取代 C_n -芳基”指其有机基团具有一个单个碳原子作为连接点。在这里该碳原子是只含碳原子芳香环结构的一部分。还有总数为 n 的芳香性或非芳香性碳原子, 0, 1, 或者多于 1 个的氢原子, 至少有一个非芳香性的杂原子, 这里每个杂原子各自从 N, O, F, Cl, Br, I, Si, P 和 S 中选取。例如, 一个取代的 C_6-C_{10} -芳基有 6 到 10 个碳原子。 $-C_6H_4F$, $-C_6H_4Cl$, $-C_6H_4Br$, $-C_6H_4I$, $-C_6H_4OH$, $-C_6H_4OCH_3$, $-C_6H_4OCH_2CH_3$, $-C_6H_4OC(=O)CH_3$, $-C_6H_4OC(=O)C_6H_5$, $-C_6H_4NH_2$, $-C_6H_4NHCH_3$, $-C_6H_4NHCH_2CH_3$, $-C_6H_4CH_2Cl$, $-C_6H_4CH_2Br$, $-C_6H_4CH_2OH$, $-C_6H_4CH_2OC(=O)CH_3$, $-C_6H_4CH_2NH_2$, $-C_6H_4N(CH_3)_2$, $-C_6H_4CH_2CH_2Cl$, $-C_6H_4CH_2CH_2OH$, $-C_6H_4CH_2CH_2OC(=O)CH_3$, $-C_6H_4CH_2CH_2NH_2$, $-C_6H_4CH_2CH=CH_2$, $-C_6H_4CF_3$, $-C_6H_4CN$, $-C_6H_4=CSi(CH_3)_3$, $-C_6H_4C(=O)H$, $-C_6H_4C(=O)CH_3$, $-C_6H_4C(=O)CH_2CH_3$, $-C_6H_4C(=O)CH_2CF_3$, $-C_6H_4C(=O)C_6H_5$, $-C_6H_4C(=O)H$, $-C_6H_4C(=O)CH_3$, $-C_6H_4CONH_2$, $-C_6H_4CONHCH_3$ 和 $-C_6H_4CON(CH_3)_2$ 是取代芳基的例子。

[0114] 术语“未取代 C_n -芳烷基”指其有机基团具有一个饱和的碳原子作为连接点, 总共有 n 个碳原子, 在这里至少 6 个碳原子组成了只含有碳原子的芳香环状结构, 7 个或更多个氢原子, 并无杂原子。例如, 一个未取代 C_7-C_{10} 芳烷基有 7 到 10 个碳原子。芳烷基”包括被芳基取代的烷基。取代芳烷基的例子有苯甲基(苄基)和苯乙基。

[0115] 术语“取代 C_n -芳烷基”指其有机基团具有一个饱和的碳原子作为连接点, 总共有 n 个碳原子, 在这里至少 6 个碳原子组成了只含有碳原子的芳香环状结构, 0, 1, 或更多于 1 个氢原子和至少一个杂原子。每个杂原子各自从 N, O, F, Cl, Br, I, Si, P 和 S 中选取。例如, 一个取代 C_7-C_{10} 芳烷基有 7 到 10 个碳原子。

[0116] 术语“未取代 C_n -杂环芳基”指其有机基团具有或是一个芳香性碳原子, 或是一个芳香性杂原子作为连接点, 共有 n 个碳原子, 至少一个氢原子和一个杂原子, 这里至少有一个碳原子和所有的杂原子在结合成的一个或多个芳香环结构中, 每个杂原子各自从 N, O, F, Cl, Br, I, Si, P 和 S 中选取。例如, 一个未取代 C_1-C_{10} 杂环芳基有 1 到 10 个碳原子。例如,

术语“杂环芳基”包括了从下列化合物衍生的基团：吡咯，呋喃，噻吩，咪唑，噁唑，异噁唑，噻唑，异噻唑，三唑，吡唑，吡啶，吡嗪，哒嗪，嘧啶以及相似基团。

[0117] 术语“取代 C_n -杂环芳基”指其有机基团具有或是一个芳香性碳原子，或是一个芳香性杂原子作为连接点，共有 n 个碳原子，至少一个氢原子和至少两个杂原子，这里至少一个碳原子和至少一个杂原子在结合成的一个或多个芳香环结构中，至少还有一个杂原子不在它们的环形结构中，这里每个杂原子各自从 N, O, F, Cl, Br, I, Si, P 和 S 中选取。例如一个取代 C_1 - C_{10} 杂环芳基有 1 个到 10 个碳原子。

[0118] 术语“未取代 C_n -杂环芳烷基”指其有机基团具有一个饱和的碳原子作为连接点，总共有 n 个碳原子，至少三个氢原子和至少一个杂原子，这里至少有一个碳原子和所有的杂原子构成一个芳香环结构，每个杂原子都是从杂原子系列 N, O, F, Cl, Br, I, Si, P 和 S 中任意选取的。例如，一个未取代 C_2 - C_{10} -杂环芳烷基有 2 个到 10 个碳原子。

[0119] 术语“取代 C_n -杂环芳烷基”指其一种有机基团，它有一个饱和的碳原子作为连接点，共含有 n 个碳原子，0、1 或者多于 1 个氢原子和至少 2 个杂原子，这里至少一个碳原子和至少一个杂原子在构成的一个或者多个芳香环结构中，并且，至少有一个杂原子不在它们的芳香环结构中。在这里每个杂原子都是从杂原子系列 N, O, F, Cl, Br, I, Si, P 和 S 中任意选取的。例如一个取代 C_2 - C_{10} 杂环芳烷基有 2 个到 10 个碳原子。

[0120] 术语“未取代 C_n -酯酰基”指其一种有机基团，它有一个羰基上的碳原子作为连接点，还有线型或支链、环状或非环状的结构，共含有 n 个碳原子，1 个或多个氢原子，有一个氧原子，而无其它杂原子。例如，一个未取代 C_1 - C_{10} 酯酰基有一到十个碳原子。 $-COH$ ， $-COCH_3$ ， $-COCH_2CH_3$ ， $-COCH_2CH_2CH_3$ ， $-COCH(CH_3)_2$ ， $-COCH(CH_2)_2$ ， $-COC_6H_5$ ， $-COC_6H_4CH_3$ ， $-COC_6H_4CH_2CH_3$ ， $-COC_6H_4CH_2CH_2CH_3$ ， $-COC_6H_4CH(CH_3)_2$ ， $-COC_6H_4CH(CH_2)_2$ 和 $COC_6H_3(CH_3)_2$ 都是未取代酯酰基团的例子。

[0121] 术语“取代 C_n -酯酰基”指其一种有机基团，它有一个羰基上的碳原子作为连接点，含有线型或支链、环状或非环状的结构，共有 n 个碳原子，0、1，或者多于一个的氢原子，除了羰基的氧以外，至少还有一个其他杂原子，在这里每个其他的杂原子都是从杂原子系列 N, O, F, Cl, Br, I, Si, P 和 S 中任意选取的。例如，一个取代 C_1 - C_{10} 酰基有 1 到 10 个碳原子。术语取代 C_n -酯酰基包括氨基甲酰基，硫代羧酸酯基和硫代羧酸基。

[0122] $-COCH_2CF_3$ ， $-CO_2H$ ， $-CO_2CH_3$ ， $-CO_2CH_2CH_3$ ， $-CO_2CH_2CH_2CH_3$ ， $-CO_2CH(CH_3)_2$ ， $-CO_2CH(CH_2)_2$ ， $CONH_2$ ，

[0123] $CONHCH_3$ ， $-CONHCH_2CH_3$ ， $-CONHCH_2CH_2CH_3$ ， $-CONHCH(CH_3)_2$ ， $-CONHCH(CH_2)_2$ ， $-CON(CH_3)_2$ ，

[0124] $-CON(CH_2CH_3)CH_3$ ， $-CON(CH_2CH_3)_2$ 和 $CONHCH_2CF_3$ 都是取代酰基团的例子。

[0125] 术语“未取代 C_n -烷氧基”指含有 $-OR$ 结构的有机基团，其中 R 是一个如以上所定义的未取代烷基。未取代烷氧基包括： $-OCH_3$ ， $-OCH_2CH_3$ ， $-OCH_2CH_2CH_3$ ， $-OCH(CH_3)_2$ 和 $-OCH(CH_2)_2$ 。

[0126] 术语“取代 C_n -烷氧基”指含有 $-OR$ 结构的有机基团，其中 R 是一个取代 C_n -烷基，其定义如以上所述。例如， $-OCH_2CF_3$ 就是一个取代烷氧基。

[0127] 术语“未取代 C_n -烯氧基”指含有 $-OR$ 结构的有机基团，其中 R 是一个未取代 C_n -烯基，其定义如以上所述。

[0128] 术语“取代 C_n-烯氧基”指含有 -OR 结构的有机基团,其中 R 是一个取代 C_n-烯基,其定义如以上所述。

[0129] 术语“未取代 C_n-炔氧基”指含有 -OR 结构的有机基团,其中 R 是一个未取代 C_n-炔基,其定义如以上所述。

[0130] 术语“取代 C_n-炔氧基”指含有 -OR 结构的有机基团,其中 R 是一个取代 C_n-炔基,其定义如以上所述。

[0131] 术语“未取代 C_n-芳氧基”指含有 -OAr 结构的有机基团,其中 Ar 是一个未取代 C_n-芳基,其定义如以上所述。-OC₆H₅ 就是未取代芳氧基的例子。

[0132] 术语“取代 C_n-芳氧基”指含有 -OAr 结构的有机基团,其中 Ar 是一个取代 C_n-芳基,其定义如以上所述。

[0133] 术语“未取代 C_n-芳烃烷氧基”指含有 -OAr 结构的有机基团,其中 Ar 是一个未取代 C_n-芳烷基,其定义如以上所述。

[0134] 术语“取代 C_n-芳烃烷氧基”指含有 -OAr 结构的有机基团,其中 Ar 是一个取代 C_n-芳烷基,其定义如以上所述。

[0135] 术语“未取代 C_n-杂环芳氧基”指含有 -OAr 结构的有机基团,其中 Ar 是一个未取代 C_n-杂环芳基,其定义如以上所述。

[0136] 术语“取代 C_n-杂环芳氧基”指含有 -OAr 结构的有机基团,其中 Ar 是一个取代 C_n-杂环芳基,其定义如以上所述。

[0137] 术语“未取代 C_n-杂环芳烃烷氧基”指含有 -OAr 结构的有机基团,其中 Ar 是一个未取代 C_n-异芳烷基,其定义如以上所述。

[0138] 术语“取代 C_n-杂环芳烃烷氧基”指含有 -OAr 结构的有机基团,其中 Ar 是一个取代 C_n-杂环芳烃烷基,其定义如以上所述。

[0139] 术语“未取代 C_n-酸基”指含有 -OAc 结构的有机基团,其中 Ac 是一个未取代 C_n-酯酰基,其定义如以上所述。一个未取代酸基包括烷烃酸基和芳烃酸基。例如,-OCOCH₃ 就是未取代酸基基团的例子。

[0140] 术语“取代 C_n-酸基”指含有 -OAc 结构的有机基团,其中 Ac 是一个取代 C_n-酯酰基,其定义如以上所述。取代酸基包括烷氧酸基,芳氧酸基,羧酸酯基,烷烃羰基,烷氧羰基,氨羰基和烷烃硫代碳基。

[0141] 术语“未取代 C_n-烷氨基”指其一种有机基团,它有一个氮原子作为连接点,还有一个或两个饱和碳原子连接到氮原子上,有线状或支链状、环状或者非环状结构,共含有 n 个碳原子,且都是非芳香性的,4 个或更多的氢原子,总共 1 个氮原子,无另外的杂原子。例如,未取代 C₁-C₁₀ 烷烃氨基有 1 到 10 个碳原子。烷烃氨基包括二烷烃氨基。未取代烷烃氨基包括 -NHCH₃, -NHCH₂CH₃, -NHCH₂CH₂CH₃, -NHCH(CH₃)₂, -NHCH(CH₂)₂, -NHCH₂CH₂CH₂CH₃, -NHCH(CH₃)CH₂CH₃, -NHCH(CH₃)CH₂CH₃, -NHCH₂CH(CH₃)₂, -NHC(CH₃)₃, -N(CH₃)₂, -N(CH₃)CH₂CH₃, -N(CH₂CH₃)₂, N-吡咯烷基和 N-哌啶烷基。

[0142] 术语“取代 C_n-烷烃氨基”指其一种有机基团,它有一个氮原子作为连接点,还有一个或两个饱和碳原子连接到氮原子上,无碳-碳双键或三键,还有线状或支链状、环状或者非环状结构,共含有 n 个碳原子,且都是非芳香性的,0,1 个或者多于一个氢原子,至少有一个其他的杂原子,也就是说除了一个连接点上的氮原子外,另有杂原子。在这里每个其

他的杂原子都是从杂原子系列 N, O, F, Cl, Br, I, Si, P 和 S 中任意选取的。例如, 一个取代 C1-C10- 烷烃氨基有 1 个到 10 个碳原子。

[0143] 术语“未取代 Cn- 烯烃氨基”指其一种有机基团, 它有一个氮原子作为连接点, 还有线状或支链状、环状或者非环状结构, 至少含有一个碳-碳双键, 总共有 n 个碳原子, 它们都是非芳香性的, 4 个或者更多氢原子, 1 个氮原子, 无其他杂原子。例如, 一个未取代 C2-C10 烯烃氨基有 2 到 10 个碳原子。一个烯烃氨基包括了二烯烃氨基和烷基烯烃氨基。

[0144] 术语“取代 Cn- 烯烃氨基”指其一种有机基团, 它有一个氮原子作为连接点, 至少有一个非芳香性碳-碳双键, 但是没有碳-碳三键, 还有一个线状或支链状、环状或者非环状结构, 总共有 n 个碳原子, 0, 1 个或者多于一个氢原子, 至少有一个其他的杂原子, 也就是说除了连接点的氮原子之外, 还有至少有一个其他的杂原子, 在这里每个其他的杂原子都是从杂原子系列 N, O, F, Cl, Br, I, Si, P 和 S 中任意选取的。例如, 一个未取代 C2-C10- 烯烃氨基有 2 个到 10 个碳原子。

[0145] 术语“未取代 Cn- 炔烃氨基”指其一种有机基团, 它有一个氮原子作为连接点, 还有线状或支链状、环状或者非环状结构, 至少有一个碳-碳三键, 总共 n 个碳原子, 它们都是非芳香性的, 至少有一个氢原子, 仅有 1 个氮原子, 无其他的杂原子。例如, 一个未取代 C2-C10- 炔基氨基有 2 到 10 个碳原子。炔烃氨基族包括二炔烃氨基和烷基炔烃氨基。

[0146] 术语“取代 Cn- 炔烃氨基”指其一种有机基团, 它有一个氮原子作为连接点, 至少有一个非芳香性碳-碳三键, 还有线状或支状、环状或者非环状结构, 总共 n 个碳原子, 0, 1, 或者多于一个的氢原子, 和至少一个其他的杂原子, 也就是说除了连接点的氮原子之外, 至少一个其他的杂原子。在这里每个其他的杂原子都是从杂原子系列 N, O, F, Cl, Br, I, Si, P 和 S 中任意选取的。例如, 一个未取代 C2-C10- 炔烃氨基有 2 个到 10 个碳原子。

[0147] 术语“未取代 Cn- 芳烃氨基”指其一种有机基团, 它有一个氮原子作为连接点, 至少有一个芳香环状结构连接到这个氮原子上。并且该芳香环结构只含有碳原子, 总共有 n 个碳原子、6 个或者多于 6 个氢原子, 仅有 1 个氮原子, 但是没有其他的杂原子。例如, 一个未取代 C6-C10 芳氨基有 6 到 10 个碳原子。一个芳基氨基包括了二芳基氨基和烷芳基氨基。

[0148] 术语“取代 Cn- 芳烃氨基”指其一种有机基团, 它有一个氮原子作为连接点, 至少有一个芳香环状结构连接到这个氮原子上。并且该芳香环结构只含有碳原子, 它总共有 n 个碳原子、0, 1 个或者多于 1 个氢原子, 还有至少一个其他的杂原子。也就是说除了连接点的氮原子之外, 至少有一个其他的杂原子。在这里每个其他的杂原子都是从杂原子系列 N, O, F, Cl, Br, I, Si, P 和 S 中任意选取的。例如, 取代 C6-C10 芳氨基有 6 到 10 个碳原子。

[0149] 术语“未取代 Cn- 芳烷烃氨基”指其一种有机基团, 它有一个氮原子作为连接点, 还有一个或两个饱和碳原子连接在该氮原子上, 总共有 n 个碳原子, 在这里至少 6 个碳原子形成仅含有碳原子的芳香环状结构, 8 个或多于 8 个的氢原子, 仅一个氮原子, 而无其他的原子。例如, 取代 C7-C10 芳烷烃氨基有 7 到 10 个碳原子。芳烷烃氨基包括了二芳烷烃氨基, 烷基芳烷烃氨基和芳基芳烷烃氨基。

[0150] 术语“取代 Cn- 芳烷烃氨基”指其一种有机基团, 它有一个氮原子作为连接点, 还有一个或两个饱和碳原子连接到该氮原子上, 共有 n 个碳原子, 在这里至少 6 个碳原子形成仅含有碳原子的芳香环结构, 有 0, 1 个或多于 1 个的氢原子, 另有至少一个其他的杂原子。也就是说除了连接点的氮原子之外, 至少有一个其他的杂原子。在这里每个其他的杂原子都

是从杂原子系列 N, O, F, Cl, Br, I, Si, P 和 S 中任意选取的。例如, 一个取代 C7-C10 芳烷烃氨基有 7 到 10 个碳原子。

[0151] 术语“未取代 C_n-杂环芳氨基”指其一种有机基团, 它有一个氮原子作为连接点, 共有 n 个碳原子, 至少一个氢原子, 除了连接点的氮原子外, 至少有一个其他的杂原子, 在这里至少有一个碳原子与所有其他的杂原子共同形成一个或者多个芳香环结构, 每个其他的杂原子都是从杂原子系列 N, O, F, Cl, Br, I, Si, P 和 S 中任意选取的。例如, 一个未取代 C1-C10 杂环芳氨基有 1 到 10 个碳原子。一个杂环芳氨基包括了烷基杂环芳氨基和芳基杂环芳氨基。

[0152] 术语“取代 C_n-杂环芳氨基”指其一种有机基团, 它有一个氮原子作为连接点, 共有 n 个碳原子, 至少一个氢原子, 除了连接点的氮原子外, 至少有两个其他的杂原子, 在这里至少有一个碳原子与至少一个其他的杂原子共同形成一个或者多个芳香环结构, 而至少有一个其他的杂原子不在一个或多个芳香环结构中, 另外, 每个其他的杂原子都是从杂原子系列 N, O, F, Cl, Br, I, Si, P 和 S 中任意选取的。例如, 一个取代 C1-C10 杂环芳氨基有 1 到 10 个碳原子。

[0153] 术语“未取代 C_n-杂环芳烷烃氨基”指其一种有机基团, 它有一个氮原子作为连接点, 还有一个或两个饱和碳原子连接到该氮原子上, 共有 n 个碳原子、至少三个氢原子和至少一个其他的杂原子。在这里至少一个碳原子和所有其他的杂原子共同形成一个或者多个芳香环结构, 每个其他的杂原子都是从杂原子系列 N, O, F, Cl, Br, I, Si, P 和 S 中任意选取的。例如, 一个未取代 C2-C10 杂环芳氨基有 2 到 10 个碳原子。一个杂环芳氨基包括了烷基杂环芳氨基和芳基杂环芳氨基。

[0154] 术语“取代 C_n-杂环芳烷烃氨基”指其一种有机基团, 它有一个氮原子作为连接点, 还有一个或两个饱和碳原子连接到该氮原子上, 共有 n 个碳原子、0, 1, 或者多于一个氢原子, 除了连接点的氮原子外, 还有至少两个其他的杂原子。在这里有一个碳原子与至少一个其他的杂原子共同形成一个或者多个芳香环结构, 而这里至少有一个其他的杂原子不在一个或多个芳香环结构中。每个其他的杂原子都是从杂原子系列 N, O, F, Cl, Br, I, Si, P 和 S 中任意选取的。例如, 取代 C2-C10 杂环芳烷烃氨基团有 2 到 10 个碳原子。

[0155] 术语“未取代 C_n-酰胺基”指其一种有机基团, 它有一个氮原子作为连接点, 还有一个羰基通过它的羰基碳原子连接到该氮原子上, 并有线状或支链状、环状或非环状结构, 共有 n 个碳原子, 一个或者更多个氢原子, 仅有一个氧原子和一个氮原子, 无其他的杂原子。例如, 未取代 C1-C10 酰胺基有 1 到 10 个碳原子。酰胺基包括了 N-烷基-酰胺基, N-芳基-酰胺基, N-芳烷基-酰胺基, 酰胺氨基, 烷烃羰基氨基, 芳烃羰基氨基和酰脲基。-NHC(=O)CH₃ 是未取代酰胺基团的一个例子。

[0156] 术语“取代 C_n-酰胺基”指其一种有机基团, 它有一个氮原子作为连接点, 还有一个羰基通过它的羰基碳原子连接到该氮原子上, 并有线状或支链状、环状或非环状结构, 另外还有 n 个芳香性或非芳香性碳原子, 0, 1 个或者多于一个氢原子, 除了酰胺基的氧原子外还有至少一个其他的杂原子。在这里, 每个其他的杂原子都是从杂原子系列 N, O, F, Cl, Br, I, Si, P 和 S 中任意选取的。例如, 取代 C1-C10 酰胺基有 1 到 10 个碳原子。-NHC(=O)C(CH₃)₃ 就是一个取代酰胺基团的例子。

[0157] 术语“未取代 C_n-烷烃硫代”指其具有 -SR 结构的有机基团。在这里 R 是未取代

Cn-烷基,其定义如上所述。-SCH₃ 是未取烷烃硫代的一个例子。

[0158] 术语“取代 Cn-烷基基硫代”指其具有 -SR 结构的有机基团, R 是取代 Cn-烷基,其定义如上所述。

[0159] 术语“未取代 Cn-烯基基硫代”指其具有 -SR 结构的有机基团, R 是未取代 Cn-烯基,其定义如上所述。

[0160] 术语“取代 Cn-烯基基硫代”指其具有 -SR 结构的有机基团, R 是取代 Cn-烯基,其定义如上所述。

[0161] 术语“未取代 Cn-炔基基硫代”指其具有 -SR 结构的有机基团, R 是未取代 Cn-炔基,其定义如上所述。

[0162] 术语“取代 Cn-炔基基硫代”指其具有 -SR 结构的有机基团, R 是取代 Cn-炔基,其定义如上所述。

[0163] 术语“未取代 Cn-芳基基硫代”指其具有 -SAr 结构的有机基团, Ar 是未取代 Cn-芳基,其定义如上所述。-SC₆H₅ 就是一个未取代芳基基硫代的例子。

[0164] 术语“取代 Cn-芳基基硫代”指其具有 -SAr 结构的有机基团, Ar 是取代 Cn-芳基,其定义如上所述。

[0165] 术语“未取代 Cn-芳烷基基硫代”指其具有 -SAr 结构的有机基团, Ar 是未取代 Cn-芳烷基,其定义如上所述。-SCH₂C₆H₅ 就是一个未取代芳烷基基硫代的例子。

[0166] 术语“取代 Cn-芳烷基基硫代”指其具有 -SAr 结构的有机基团, Ar 是取代 Cn-芳烷基,其定义如上所述。

[0167] 术语“未取代 Cn-杂环芳基基硫代”指其具有 -SAr 结构的有机基团, Ar 是未取代 Cn-杂环芳基,其定义如上所述。

[0168] 术语“取代 Cn-杂环芳基基硫代”指其具有 -SAr 结构的有机基团, Ar 是取代 Cn-杂环芳基,其定义如上所述。

[0169] 术语“未取代 Cn-杂环芳烷基基硫代”指其具有 -SAr 结构的有机基团, Ar 是未取代 Cn-杂环芳烷基,其定义如上所述。

[0170] 术语“取代 Cn-杂环芳烷基基硫代”指其具有 -SAr 结构的有机基团, Ar 是取代 Cn-杂环芳烷基,其定义如上所述。

[0171] 术语“未取代 Cn-酯基基硫代”指其具有 -SAc 结构的有机基团, Ac 是未取代 Cn-酯基,其定义如上所述。-SCOCH₃ 族是未取代酯基基硫代的例子。

[0172] 术语“取代 Cn-酯基基硫代”指其具有 -SAc 结构的有机基团, 在这里 Ac 是取代 Cn-酯基,其定义如上所述。

[0173] 术语“未取代 Cn-硅烷基”指其一种有机基团, 它有一个硅原子作为连接点, 有一个、两个或者三个饱和碳原子连接到硅原子上, 还有线状或支链状、环状或非环状结构, 共有 n 个碳原子, 他们都是非芳香性的, 5 个或者更多氢原子, 仅有一个硅原子, 并且无其他的杂原子。例如, 一个未取代 C₁-C₁₀ 硅烷基有 1 到 10 个碳原子。硅烷基包括二烷基硅烷基。-Si(CH₃)₃ 和 -Si(CH₃)₂C(CH₃)₃ 是未取代硅烷基的例子。

[0174] 术语“取代 Cn-硅烷基”指其一种有机基团, 它有一个硅原子作为连接点, 有一个、两个或者三个饱和碳原子连接到硅原子上, 无碳-碳双键或三键, 含线状或支链状、环状或非环状结构, 共有 n 个碳原子, 他们都是非芳香性的, 还有 0、1 或者多于一个的氢原子。并

且,除了在连接点的硅原子外,还有至少一个其他的杂原子. 每个其他的杂原子都由杂原子系列 N, O, F, Cl, Br, I, Si, P 和 S 的元素中任意选取. 例如,取代 C1-C10 硅烷基有 1 到 10 个碳原子.

[0175] 术语“药用盐”,是指本发明化合物的盐,它们对活的生物有机体基本无毒. 典型的药用盐是根据本发明化合物的取代基,用无机酸或有机酸,或有机碱与本发明的化合物反应而制成.

[0176] 可用于药用盐制备的无机酸有:盐酸,磷酸,硫酸,溴酸,碘酸,亚磷酸等无机酸. 其有机酸的例子有:脂肪族的一元羧酸和二元羧酸,例如草酸,碳酸,柠檬酸,琥珀酸,苯基取代链烷酸,脂肪族和芳香族硫酸等类似的有机酸. 因此,由无机酸或有机酸所制备的药用盐包括:盐酸盐,溴酸盐,硝酸盐,硫酸盐,焦硫酸盐,硫酸氢盐,亚硫酸盐,酸性亚硫酸盐,磷酸盐,磷酸氢盐,磷酸二氢盐,偏磷酸盐,焦磷酸盐,碘酸盐,氟酸盐,醋酸盐,丙酸盐,甲酸盐,草酸盐,柠檬酸盐,乳酸盐,对-甲苯磺酸盐,甲基磺酸盐,马来酸盐等类似盐类. 其他各种适合的盐也是该专业领域通常所知的.

[0177] 合适的药用盐也可以由本发明的化合物和有机碱反应而形成,例如,甲胺,乙胺,乙醇胺,赖氨酸,鸟氨酸和类似的有机碱. 其他合适的盐类是该专业领域通常所知的

[0178] 药用盐也包括那些由本发明化合物中的羧基或磺酸基与无机阳离子或有机阳离子之间形成的盐,比如无机阳离子有:钠、钾、铵、钙. 有机阳离子如:异丙铵、三甲基铵、四甲基铵和咪唑翁盐等形成的盐类.

[0179] 应该说明的是,总体上,只要盐在制药上是可以接受的,以及阴离子或阳离子不会产生不希望的质量或者效果,所列举的形成本发明中任何盐的阴离子或者阳离子并不是重要. 另外,其他在专业领域中众所周知的制药用盐,也包括在本发明的范围之内. 其他的制药用盐例子,制备方法及应用在由 C. G. Wermuth 和 P. H. Stahl 所著的《制药用盐:特性,选择和应用-手册》(Verlag Helvetica Chimica Acta, 2002) 一书中有交详细叙述,在此可作为参考.

[0180] III. 治疗用化合物的配方和施用

[0181] 本发明的具体形式之一,是在制药上可接受的昂克立新化合物成分的药剂配方,它们可施用于细胞,组织,动物或者病人. 它们可单独使用,业可和一个或两个其它治疗药剂或者治疗方案合并使用.

[0182] 本发明中的水溶性药剂成分组成将会对所需调节的蛋白质或者相关生物功能或活性的目标蛋白质成分起作用的有效剂量. 这些成分组成通常会溶解或者分散于一个制药可接受的溶剂或者载体或者水性媒介中. 用于治疗目的“有效剂量”,被定义为在具体条件中产生一个临床可测变化的剂量. 这个剂量会取决于具体条件,物质,病人的状况,治疗方法等等.

[0183] 术语“制药上的”和“制药上可接受的”指的是当施用于动物或者人的时候不会产生显著的不良反应,过敏反应,或者其他不利反应的分子实体和成分. 这里所用的“制药上可接受的载体”包括了所有溶剂,分散媒质,涂层,抗菌和抗真菌药剂,等渗的 (isotonic), 延迟吸收的媒质和类似物. 在药剂学及制药工艺上使用这些媒质和溶剂对药学有效成分进行配方是在该领域众所周知的. 应当考虑任何传统媒质或溶剂和药学有效成份是否存在不兼容性. 若存在不兼容性,则应避免使用. 辅助性的有效组分,像其他的治疗制剂或成

份,都能够合并成为配方成分。

[0184] 主要活性化合物除可配成注射用制剂(像静脉注射或肌肉注射用药)外,也可配制成其他制药上可接受的形式包括,例如口服用的片剂或者其他固体药剂;延时胶囊;其他现在临床使用的任何剂形,包括乳剂,洗剂,吸入药剂和类似药剂。

[0185] 本发明的活性化合物可以配制成为注射用制剂,例如配成静脉注射剂,肌肉注射剂或者皮下甚至腹腔内注射用药。根据本专利说明,制备包含 Oncrasion 化合物作为主要活性成分的药物制剂,或者 Oncrasion 化合物和第二种作为有效活性成分的联合治疗制剂,对于专业领域熟练的技术人员来说并不是件难事。一般说来,这些成分可以配成注射剂,如液体溶剂或者悬浮液;或以固体的形式制备,而在用前加一液体将其转变成可注射溶液或者悬浮液;并且配制物也可以被乳化。

[0186] 主要有效成分的化合物可以游离硷或者制药上可接受的盐的形式,与混合了适当的表面活性剂的水一起制成溶液。比如羟基丙基纤维素就是这样一类药用表面活性剂。散剂药方也可以在甘油,液体聚乙烯乙二醇和它们的混合物以及油类中配制。在常规储存和使用的条件下,配方里常含有一防腐剂以防止微生物的生长。

[0187] 用注射的药物制剂形式包括无菌水溶液或者乳液;配方成分包括脂质,芝麻油,花生油,或者液体丙二醇;和无菌粉剂,它们在用前可临时配制成无菌注射剂溶剂或者悬浮液剂。在很多情况下,注射制药形式必须是无菌的而且必须是方便注射用的流体。在生产,仓储的时候必须是稳定的,必须保护好以防止像细菌和真菌类的微生物的污染。

[0188] 用效活性化合物也可以配制成为中性或者盐性的制剂形式。制药上可接受盐包括加酸后形成的盐,由像盐酸或磷酸这样的无机酸形成的盐,或者像乙酸,草酸,酒石酸,扁桃酸等有机酸形成的盐。盐也可以从一些无机硷而形成得到,比如钠,钾,铵,钙或者氢氧化铁,也可加一些有机硷而得到,比如异丙胺,三甲胺,组氨酸,普鲁卡因和类似物。

[0189] 载体也可以是一个溶剂或者悬浮液中介质,它包括水,乙醇(酒精),DMSO,多羟基化合物(例如:甘油,丙烯甘油,液态聚乙烯乙二醇和类似物),它们的合适的混合物和植物油等。适当的流动性可以通过加一些辅加剂而保持,例如,通过使用涂层,如蛋黄素,对悬浮液则通过保持要求大小的微粒尺和通过使用表面活性剂。可以通过多种抗细菌制剂和抗真菌制剂,像 parabens,氯丁醇,石碳酸,山梨酸,消毒液原料(thimerosal)和类似物,来阻止微生物污染和生长。在很多情况下,最好加入等渗媒质,如糖或者氯化钠。通过使用延迟吸收媒质的成分,像铝化单硬脂酸盐(aluminium monostearate)和凝胶,从而延长使可注射成分的吸收时间。

[0190] 配制成无菌可注射溶剂需要适当数量的有效活性化合物,和适当数量的上面列举的不同附加溶液成分或乳化成分,混匀后再进行过滤除菌。通常情况下,将各种无菌的有效活性成分加于含有悬浮媒质和其它上面列举的附加成分的无菌容器中而制备成悬浮制剂。对于无菌注射剂的配方中的无菌粉剂,合适的配置方法是真空干燥和冷冻干燥技术,这样生产出一个活性组分和经无菌过滤的溶剂中得到得附加剂组分得混合粉剂。

[0191] 配成的药剂,按制剂剂量形式和治疗学上是有效剂量进行给药。药剂配方应很容易地以各种剂量形式给药。像上述的注射用溶剂,甚至包括药物释放胶囊的使用等在内的类似用药。

[0192] 对于肠胃外给药的液体或者液态制剂类,溶剂在必要的条件下应经过适当的缓

冲,液态稀释剂应先经盐或葡萄糖等成分调制成为等渗。这些特别适合于静脉,肌肉,皮下和腹膜内注射的液态溶剂。可以应用无菌液体媒质而配制上述制剂,这对专业领域的相关技术人员来说,是个普通的常识。通过这个,例如,一个剂量可以溶解到 1mL 的等渗 NaCl 溶剂中,或者加到 1000mL 的皮下输液中或者注射到建议的输液处(如见,Remington 的制药科学 1035-1038 和 1570-1580)。根据治疗需要的客体的状况,所给剂量可以适当调整或多样化。在任何情况下,由负责治疗的医务人员针对不同的个体决定适当的剂量。

[0193] 在本发明的某些方面,治疗成分的给药途径可能是通过肠胃外给药。肠胃外给药可以是静脉注射,皮下注射,肌肉注射或者是肿瘤内部注射(intratatumoral injection),摄食或者以上方式相结合。在一些方面,由昂克立新组成的成分的使用量为每一剂量 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 到 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 或者 100 纳克或微克/公斤体重/人/次,包括这之间的整数和距离微分。在某些方面,一个含有昂克立新化合物的组分的使用量是从 1 到大约 5 纳克或微克/公斤体重/人/次。在另些方面,一个含有昂克立新化合物的组分的使用量是从约 1.2 到大约 2.4 毫微克/公斤体重/人/剂量。在某些方面,昂克立新化合物的一剂使用量可能是约 0.1, 约 0.2, 约 0.3, 约 0.4, 约 0.5, 约 0.6, 约 0.7, 约 0.8, 约 0.9, 约 1.0, 约 1.1, 约 1.2, 约 1.3, 约 1.4, 约 1.5, 约 1.6, 约 1.7, 约 1.8, 约 1.9, 约 2.0, 约 2.1, 约 2.2, 约 2.3, 约 2.4, 约 2.5, 约 2.6, 约 2.7, 约 2.8, 约 2.9, 约 3.0, 约 3.1, 约 3.2, 约 3.3, 约 3.4, 约 3.5, 约 3.6, 约 3.7, 约 3.8, 约 3.9, 约 4.0, 约 4.1, 约 4.2, 约 4.3, 约 4.4, 约 4.5, 约 4.6, 约 4.7, 约 4.8, 约 4.9, 约 5.0, 约 5.1, 约 5.2, 约 5.3, 约 5.4, 约 5.5, 约 5.6, 约 5.7, 约 5.8, 约 5.9, 约 6.0, 约 6.1, 约 6.2, 约 6.3, 约 6.4, 约 6.5, 约 6.6, 约 6.7, 约 6.8, 约 6.9, 约 7.0, 约 7.1, 约 7.2, 约 7.3, 约 7.4, 约 7.5, 约 7.6, 约 7.7, 约 7.8, 约 7.9, 约 8.0, 约 8.1, 约 8.2, 约 8.3, 约 8.4, 约 8.5, 约 8.6, 约 8.7, 约 8.8, 约 8.9, 约 9.0, 约 9.1, 约 9.2, 约 9.3, 约 9.4, 约 9.5, 约 9.6, 约 9.7, 约 9.8, 约 9.9 到约 10.0 或者更多的纳克/公斤体重/人,微克/公斤体重/人或者毫克/公斤体重/人。

[0194] 制药上可接受的附加剂和载体溶剂的配方设计在专业领域中是广为人知,同样地,将在这里描述的特殊成分研发成合适的剂量,剂型 and 治疗方法,用于各种治疗方法,包括口服,肠胃外投药,静脉,鼻内和肌肉等,也都为专业领域中的技术人员所熟悉。

[0195] A. 消化道给药

[0196] 术语“消化道给药”指的是直接或者别的方式经客体或病人的消化道的一部分给药。术语“消化道”指的是对食物起消化和吸收作用和对食物残渣进行清除的管式通道,它从口开始结束于肛门,也包括它们之间的任何和所有的部分或者节段,例如,口腔,食道,胃,大小肠和结肠,还有这些复合部分,比如胃肠道。因此,术语“消化道给药”包括了几个给药途径包括(但是不局限于)口服,直肠给药,内窥镜给药和舌下或者口腔给药。对这些给药模式的一个常规要求就是经消化道的一些部分吸收或者所有消化道的吸收,需要对使用的有消成分有一个有效的黏膜渗透。

[0197] 1, 口腔给药

[0198] 在一些具体应用中,这里描述的药用成分可能通过口服的方式给药于动物或者人。这些药用成分可能与一种惰性稀释剂或者可吸收食用载体组成药剂配,或者包在软壳或硬壳的明胶胶囊里,或者可以压缩成药片,或者可以直接和食用的食物合并起来。

[0199] 药用有消活性成分甚至可以和附加剂合并,在这下述制剂形式中使用,如可吸收药片,口腔含片,锭剂,胶囊,悬浮液,含药糖浆,糯米纸和类似物 (Mathiowits et al.1997; Hwang et al.,1998;美国专利 5,641,515;5,580,579 和 5,792,451,在此作为参考)。药片,锭剂,药丸,胶囊等类似制剂可能也含有下述成分:粘合剂,黄蓍胶,阿拉伯树胶,玉米淀粉,或者白明胶;附加剂,像磷酸二钙;分散媒质,像玉米淀粉,马铃薯淀粉,褐藻酸和类似物;润滑剂,像硬脂酸镁;和甜味剂,像蔗糖,乳糖,糖精;或者一种调味剂,像胡椒薄荷,冬青油,或者樱桃调味剂。当药物剂型是胶囊时,除了以上所描述的材料外,它或许还含有一种液体载体。可能有各种其他材料用在药物制剂中,如在涂层里,或者其他的材料中以改变药物剂型的物理形式。比如,药片,药丸,或者胶囊的涂层中都可能含有虫漆,糖或者两者兼有。糖浆或者清药酒可能含有活性成分蔗糖作为甜味剂,甲基,和 propylparabens 作为防腐剂,像樱桃或者橘子味道的颜色剂和调味剂。当然,在配药中使用的任何材料都应该是制药上纯净的和使用量上基本无毒的。另外,活性成分也可制成持续缓释制剂和配方。

[0200] 典型地,这些配方可能包含至少约 0.1%或者更多的药学有效活性成分,尽管药学有效活性组分的百分比当然也可能会变化,可能在总配方的总重量或者总体积的约 1-2%和约 60%-70%或者更多时更方便。自然的,每个治疗学上有用的组分中,有效活性化合物的含量配置可能会根据使用要求而有各种剂量形式,这使我们从任何给定的化合物单位剂量都可以得到一个合适的使用剂量单位。有些因素,像溶解性,生物利用度,生物半衰期,给药途径,产品保存限期,和其他药理学上需要考虑的各种因素,在制药配方设计时由专业领域的专家来加于考虑。药物剂量和治疗方案的多样化也值得注意。

[0201] 2. 内窥镜给药

[0202] 内窥镜可将药物制剂直接传输到消化道的内部部分。例如:Endoscopic retrograde cystopancreatography (ERCP) 利用了延长了的胃窥镜,能够有选择的进入胆道和胰管 (Hirahata et al.,1992)。但是,这个操作对病人来说不太舒服,而且需要一个高级技术人员操作。

[0203] 3. 直肠给药

[0204] 口腔途径的治疗给药经常可以换成下端的肠内给药,比如通过肛门口到直肠或者较下游的小肠。我们可以使用直肠栓剂,灌肠剂或者直肠导管来完成这个目的,当病人依从配合有困难的时候,更合适用这个方法(比如在儿科和老人科或者是病人正在呕吐或者无意识)。直肠给药比口腔给药可能会造成更快更高的血液水平,但是反过来的可能也是成立的 (Remington 的制药科学,711,1990)。因为大约 50%从直肠吸收的治疗药将经过肝脏,通过这个途径给药明显的减少了第一次新陈代谢的潜力 (Benet et al.,1996)。

[0205] B. 注射给药

[0206] 在一定情况下,把本专利所述的治疗成分通过肠胃外给药,静脉给药,肌肉给药或者甚至腹膜内给药更有效,如美国专利 5,543,158;5,641,515 和 5,399,363 所述(具体收编在这里作为整体参考)。有效活性化合物可作为游离硷或者制药学可以接受的盐和表面活性剂一起可配制成水溶剂。可用于此目的的表面活性剂如 hydroxypropylcellulose。悬浮液也能够能够在甘油,液体聚乙二醇,和它们的混合物和油里进行配置。在常规仓储和使用的条件下,这些配方里有一个防腐剂来阻止微生物的生长。

[0207] 适合注射用的制药形式包括无菌水性溶剂或者悬浮液和用来临时配置无菌可注

射溶剂或者悬浮液的无菌粉剂（美国专利 5, 466, 468, 具体收编在这里作为整体参考）。在任何情况下, 这个形式必须是无菌的, 必须是可以流动的, 流动性保持可以简单放入注射管里。

[0208] 用来肠胃外给药的水性溶剂, 必要时须经缓冲, 液体稀释液也应先用盐和葡萄糖调节其渗透压至等渗。这些对于用于静脉, 肌肉, 皮下, 腹膜内给药的水性溶剂特别重要（参看例子, Remington 的制药科学, 1035-1038 和 1570-1580 页）。根据治疗客体的条件, 可以对剂量进行必要的调整。在任何情况下, 负责给药的医务人员应决定给受治疗个体适当的剂量。另外, 对人进行给药, 配方应该满足无菌, 无热原性和国家规定的标准里对常规安全性能和纯度规定的标准。

[0209] 术语“肠胃外给药”指的是不通过消化道使用本发明中的一个治疗制剂对一个动物进行给药, 肠胃外治疗成分的配置和给药的方式在专业行业中已广为人知（见, Remington 的制药科学, 1545-1569 页, 1990）。

[0210] C. 管腔内部给药

[0211] 管腔内部给药, 把一个治疗剂直接传送到一个管状器官或者组织（例如一个动脉, 静脉, 尿管或尿道）的某一孤立部分, 可能对于有涉及这些器官或者组织的管腔壁的疾病来说是个理想的给药方法。采用这种给药模式, 需用适当的外科方式, 用导管或者插管插进给药的管腔内。可将需要治疗的管状器官或者组织部位与别的部位分开, 然后将包含了本发明的治疗剂的一个成分由导管或者插管注射到需治疗的部位。药物在管腔内滞留 1 到 120 分钟, 在这段时间内治疗药物被器官内壁的细胞吸收或与之相接触。之后, 拿掉注射导管或插管, 去掉用来分离该部位的绷带, 使管状器官或组织的内部循环重新流通 (Morishita et al., 1993)。本发明的治疗剂成分也可以和一种不会引起排斥的生物兼容物质（如水凝胶物质）合并使用, 直接作用到管腔组织上。

[0212] D. 鼻腔给药

[0213] 在某些具体实施中, 可能通过鼻腔喷射, 吸入, 和或者其他气雾剂运载工具传输治疗剂成分。通过鼻腔气雾剂喷射把基因, 核酸, 和蛋白多肽成分直接传输到肺部的方法在美国专利 5, 756, 353 和 5, 804, 212 中已进行了阐述（具体收编在这里作为整体参考）。同样的, 使用鼻腔内微粒状树脂 (Takenaga et al., 1998) 和溶血磷脂酰甘油成分（美国专利, 5, 725, 871, 具体收编在这里作为整体参考）进行药物输给的方法在制药领域已广为人知。同样的, 在美国专利 5, 780, 045（具体收编在这里作为整体参考）里也对以聚四氟乙烯为支承介质的形式进行跨粘膜药物传输的方式进行了阐述。

[0214] E. 外皮和跨皮肤给药

[0215] 外皮和通过跨皮肤给药, 这种方法将药物制剂用于皮外浅表部位, 或局部应用, 也可使用这种方法让药物经真皮吸收, 或者进一步渗透到皮下组织而吸收。制备皮肤浅表给药的剂型和给药的方法在本行业内广为普及（见, 如 Remington 的制药科学, 1596-1609, 1990）。

[0216] F. 脂质体, 纳米胶囊和微粒介导的给药方法

[0217] 在某些具体实施中, 发明者打算使用脂质体, 纳米胶囊, 微粒, 微球体, 脂质物, 泡囊和类似物把本发明的成分引入到适当的细胞或者需要治疗的对象中。特别的是, 本发明的成分可以配制成脂质物, 脂质体, 泡囊, 纳米球体或者纳米粒或类似物装入胶囊中进行给

药。

[0218] 在某些具体实施中,可优先考虑用上述剂型配制本发明所讲述的昂克立新成分。在本行业内脂质体的制备和使用是广为人知的(见下文,见例子, Couvreur et al.,1977; Couvreur,1988;Lasic,1998;在里面讲述了应用脂质体和纳米胶囊配制抗菌素来治疗胞内细菌感染和疾病的方法)。近来,通过改良以增加脂质体的血清稳定性和循环时间获得了进展(Gabizon 和 Papahadjopoulos,1988;Allen 和 Chonn,1987;美国专利 5,741,516 具体收编在这里作为整体参考)。另外,有关脂质体和脂质体类似物作为一种潜在的药物载体的配制及其多种制备方法已经在不少综述文献中讨论(Takakura,1998;Chandran et al.,1997;Margalit,1995;美国专利 5,567,434;5,552,157;5,565,213;5,738,868 和 5,795,587,具体收编在这里作为整体参考)。

[0219] 脂质体是由磷脂形成的。将磷脂在水性媒质中散开后可自发地形成多层薄片状同心的双层囊状结构(multilamellar concentric bilayervesicles),也叫作多层薄片状囊体(multilamellar vesicles,MLVs)。MLVs 的直径通常是从 25 纳米到 4 微米。MLVs 经超声波粉碎,可形成小的单层薄片状囊体(SUVs),它们的直径范围为:200-500A,在它的核心有一个水性溶剂相。

[0220] 静脉注射的脂质体的命运和特性取决于他们的物理特征,比如大小尺寸,流动性和表面电荷。他们可能在组织里呆上几个小时或者几天,这取决于他们的组成成分。它们在血液里的半衰期可能为几分钟或者几个小时。较大的脂质体,像 MLVs 和 LUVs,迅速地被网状内皮组织系统的噬菌细胞吞噬,但是循环系统的生理机能将决定这些大的脂质体的命运。它们只能够从存在于毛血管内皮的较大的缺口或孔处离开,就像肝或脾的窦状隙。因此,这些器官就成了吸收脂质体的主要场所。另一方面,较小的 SUVs 有更宽的组织分布,但是它们在肝脏和脾脏中的分布还是最高的。总体来说,脂质体在有机体内的分布,还局限于那些按大小尺寸脂质体可以容易进入的器官和组织。它们包括血液,肝脏,脾脏,骨髓和淋巴器官。

[0221] 本发明的化合物成分也可以制备成纳米胶囊的形式进行给药。纳米胶囊通常能够将有效成分包裹在里面,方法稳定,重复性好(Henry-Michelland et al.,1987;Quintanar-Guerrero et el.,1998)。能被生物分解的聚烷基-氰基丙烯酸盐粘合剂的纳米微粒满足这些要求,可以考虑在本发明中使用。这些微粒可以容易地生产出来(Couvreur et al.,1980;Zur Muhlen et al.,1998;Zambaux et al.,1998;Pinto-Alphandary et al.,1995 和美国专利 5,145,684,具体收编在这里作为整体参考)。

[0222] G. 脂质配方剂型

[0223] 本发明包括包含一个昂克立新化合物以及昂克立新的优化体药物的脂质体药物配方。它包括本领域已知的所有类型的脂质成分或脂质体,也包括了下面的这些例子。这里使用的,一个脂质体是指一个由脂质组成的膜性结构,其内部含有水性成分。脂质体可能有一个或者多个脂质膜。本发明包括了单层脂质体,我们称之为单层薄片(unilamellar),和多层脂质体,我们称之为多层薄片。更广意地说,只要能达到昂克立新化合物的给药目的,脂质成分及其结构式样就不是主要的。

[0224] 1. 脂质体 / 脂质成分

[0225] 本发明的药物配方的脂质成分可以包括任何更多类型的不同脂质,包括了如两

性分子的,中性的,阳离子的和阴离子的脂质.这些脂质可以单独使用或者合并使用,也可以包括附加成分,比如胆固醇,双分子层稳定成分,例如聚酰胺低聚物(Polyamide oligomers)(见,美国专利 6,320,017),多肽链,蛋白质,清洁剂和脂质衍生物,例如 PEG 结合到磷脂酰乙醇胺和 PEG 结合到神经酰胺(见,美国专利 5,885,613).

[0226] 在无数的具体实施中,两性脂质也包括在本发明的脂质体内.”两性脂质”指的是任何合当的物质,其疏水部分定向到疏水界层,亲水部分定向到水性界层.这些组分包括,但是不局限于,磷脂,氨脂质和鞘脂类.代表性的磷脂包括鞘磷脂,卵磷脂,磷脂酰乙醇胺,磷脂酰丝氨酸,磷脂酰纤维醇,磷酸,棕榈油酰磷酸胆碱(phosphatidylcholine),溶血磷脂酰胆碱,溶血磷脂乙醇胺,二棕榈磷酸胆碱,二油酰磷酸胆碱,二硬脂酰磷酸胆碱,或者二亚麻油酰卵磷脂(dilinoleoylphosphatidylcholine).其他缺磷的化合物,比如鞘脂类,鞘糖脂族,甘油二酯和 t3 酰氧酸脂等也可以被使用.另外,这些两性脂质很容易与他脂质混合使用,例如甘油三酸酯和固醇.

[0227] 中性脂质成分包括任何在生理条件的 pH 下不带电荷,或呈中性离子状态的分子,如二酰基卵磷脂,二酰基磷脂酰乙醇胺,神经酰胺,鞘磷脂,脑磷脂,胆固醇,脑苷脂类,甘油二酯,甾醇类.

[0228] 阳离子脂质在生理学的 PH 上携带一个净阳电荷,可以组合于脂质体中,并用于本发明的药剂配方.这些脂质包括但是不局限于下列化合物,N,N- 一油烯基 -N,N- 二甲铵氯化物(“DODAC”);N-(2,3- 二含氧油酰)丙基 -N,N,N- 三乙铵氯化物(“DOTMA”);N,N- 二硬脂 -N,N- 二甲基铵溴化物(“DDAB”);N-(2,3- 二含氧油酰)丙烷基 -N,N,N- 三甲基铵氯化物(“DOTAP”);3 β -[N-(N,N- 二甲氨基乙烷)氨基甲酰]胆固醇(“DC-Chol”),N-(1-(二含氧油酰)丙基)-N-2-(精胺酰胺)乙烷基)-N,N- 二甲基胺三氟醋酸酯(“DOSPA”),双十八烷氨基甘氨酸乙酰精胺(“DOGS”),1,2- 二油酰 -sn-3- 磷乙醇胺(“DOPE”),1,2- 二油酰 -3- 二甲基铵丙烷(“DOPAP”),和 N-(1,2- 二含氧十四烷丙基)-3-N,N 二甲基 -N- 羟乙基铵溴化物(“DMRIE”).另外,一系列的商业制备供应的阳离子脂质体可以被使用,例如 LIPOFECTIN(包括 DOTMA 和 DOPE,从 GIBCO/BRL 获得的),和 LIPOFECTAMINE(由 DOSPA 和 DOPE 组成,从 GIBCO/BRL 中获得).

[0229] 适合本发明使用的阴离子脂质包括,但不局限于磷脂酰甘油,双磷脂酰甘油,磷二酰脂酰丝氨酸,二酰基磷酸,N- 十二磷脂酰乙醇胺,N- 琥珀酰磷脂酰乙醇胺,N- 戊二酰磷脂酰乙醇胺,赖氨酰磷脂酰甘油和其他参加到中性脂质的阴离子族.

[0230] 在具体实施中,可以把涂层物质,例如聚酰胺-齐聚物偶联体,和 PEG- 脂质偶联体,加到酯质体的配方中,以降低宿主免疫系统对脂质体的清除.(见,美国专利 5,820,873,5,534,49 和 5,885,613).

[0231] 另外适合归纳到本发明的脂质还有可程序化的溶化脂质配方.这些配方几乎不会和细胞膜融合,直到发生指定信号事件,才将他们运载的药物释放.这样,脂质体在注射到一个生物体内或者疾病部位之后,与细胞融合之前可更均匀地分布.信号事件可以是,例如,pH 值的变化,温度的变化,离子环境的变化或者时间的变化.在后者里,一个推迟融合或”隐蔽”的脂质体的组份,例如一个 PEG- 脂质偶联物,可以随时间改变而简单地从脂质体膜中交换出去.等到脂质体配方合适地分布在有机体内后,”隐蔽”组份已基本上从脂质体中丢失,此时脂质体就能和细胞膜融合.在别的信号事件,最好选择一个和疾病部位或

者靶细胞相关联的一个信号,例如,炎症部位的温度升高等,来控制脂质体与细胞的融合或释放药物。

[0232] 在一些具体的实施中,本发明的所用脂质体也包括神经鞘磷脂(SM)。在此所使用的神经鞘磷脂包括了拥有长链硷基或者含脂肪酸性链的鞘磷脂。自然界存在的SM有磷酸胆碱作位头部,连接到在长链基部的碳原子一上的羟基族,和连接到在长链碱基碳原子二的氨基化合物族的一个长链饱和酰基(参见Barenholz 1984)。在培养的细胞中,约90%到95%的SM包含了神经鞘氨醇(1,3-二羟基-2-氨基-4-十八碳烯),它包含了一个在C4和C5之间的反式双键,就像长链碱基,其它大部分的剩余结构都有神经鞘氨醇(1,3-二羟基-2-氨基-4-十八烯)作为硷基,而缺少长链硷基的在碳4和碳5之间的反式双键。后者SMs叫做二氢神经鞘磷脂(DHSM)。DHSM在所含的脂肪酸链中可能含有一个或者多个顺式双键连接。在一个具体实施中,DHSM包含了一个完全饱和的脂肪酸链和一个饱和长链硷基。包含有SM或者尤其是DHSM的脂质体在美国临时专利申请No. 60/571,712中有详细的描述。

[0233] 在一些具体实施中,最好采用对一个细胞种类或者器官能够定位的脂质来配制发明的化合物的药物剂型。多种靶向分子可用于脂质体的靶向定位,这在以前已经描述过(见,美国专利4,957,773和4,603,044),这些靶向分子有:配体,细胞表面受体,糖蛋白类,维生素(如:核黄素)和单克隆抗体。这些靶向分子可以是整个蛋白质或它们的一段碎片。在本领域内多种不同的靶向分子煤质和制备方法也已有描述,例如:Sapra and Allen(2003);和Abra et al. (2002)。

[0234] 采用带有亲水聚合物作为表面涂层的脂质体,例如聚乙二醇(PEG),来作定向给药的方法已经有人提出(Allen, et al., 1995; Blume, et al., 1993; Klibanov, et al., 1992; Woodle, 1991; Zalipsky, 1993; Zalipsky, 1994; Zalipsky, 1995)。有一种途径,一个配体,例如抗体,与脂质头部的极性基团连接,形成靶向脂质体。另一种途径,将靶向配合连接在远端形成亲水聚合物涂层的分上,如PEG链(Klibanov et al., 1992)。

[0235] 可以使用常规的偶连方法来连接靶向分子。例如。磷脂酰乙醇胺可以经激活而与靶向分子偶连,或者与派生的亲油化合物,比如脂质派生的博来霉素偶连。抗体介导的靶向脂质体可用其它脂质来构建,例如,用含蛋白质A的脂质体来构建(见, Renneisen, et al., Bio. Chem., 265:16337-16342(1990)和 Leonetti, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 87:2448-2451(1990)。在美国专利6,027,726中对抗体偶连的脂质体的其他例子也有描述。靶向分子的实例也包括其他蛋白质,特别是细胞组分,包括和肿瘤有关的抗原。作为靶向分子的蛋白质可以通过共价键连接在脂质体上(见, Heath, 蛋白质到脂质的共价依附,在酶学里 111-119 的 149Methods(学术出版社, Inc. 1987))。其他靶向介导方法包括生物素-抗生物素蛋白系统。

[0236] 2. 配制方法

[0237] 在专业行业内,已知多种脂质体制备方法,包括 Szoka, et al., (1980) 里描述的方法;美国专利4,186,183,4,217,344,4,235,871,4,261,975,4,485,054,4,501,728,4,837,028,4,946,787;PCT出版物第W0 91/17424号;Deamer and Bangham(1976);Fraleigh, et al., (1979);Hope, et al. (1985);Mayer et al. (1986);Williams et al. (1988);Ostro(1983);Hope, et al. (1986);和 Torchilin et al. (2003),和其他在这里陈述的参

考书。合适的方法包括,但不局限于,超声粉碎法,挤压,高压/均浆化,微流态化,去污剂透析,小脂质体囊的钙诱融合和乙醚输注法,上述方法在专业行业都是已知。

[0238] 还有其它一些脂质体的制备用方法。例如,在美国专利 5,976,567 里已经披露了基于去污剂透析法的脂质微粒的自我装配。采用连续流动水合作用等其他制备方法也在研究中,也可以提供高效率的大规模生产过程。

[0239] 单层薄片囊可以通过超声波粉碎解法和挤压法进行制备。超声波粉碎法通常是在一个冰溶液里用一个尖端超声波粉碎器来操作,例如 Branson 尖端超声波粉碎器。典型地,悬浮液受几个回合的激烈的超声波粉碎。

[0240] 挤压是通过生物膜挤压仪来操作的,像 Lipex 生物膜挤压机。在挤压机过滤器里过滤膜片的孔径大小决定所制备的单层薄片脂质囊的尺寸大小。也可以通过一个不对称陶制过滤器,像 Ceraflow 微过滤器(可以从 NWorcester MA 的 Norton 公司买到),进行挤压生成脂质体,

[0241] 也可以通过将磷脂溶于乙醇中,然后把脂质注射到一个缓冲液,使脂质本能地形成单层薄片囊。磷脂也可以溶解在去污剂中,例如胆酸, Triton X 或者 n-烷基葡萄糖。随着在溶解的脂质去污剂胶束中加入药物,洗涤剂可被包括透析,凝胶过滤,亲和层析法,离心过滤和超滤的任何一个可能的方法去除。

[0242] 在脂质体配置之后,在成型过程中没有定大小尺寸的脂质体将根据需要的尺寸范围制定其大小,而使脂质体大小分配相对较窄。约 0.2-0.4 微米的尺寸范围的脂质体悬浮液可以通过一个传统过滤器进行过滤来消毒。

[0243] 如果脂质体的尺寸可以降低到约 0.2-0.4 微米,在批量生成的基础上可以施行过滤器消毒的方法。

[0244] 现在已经有几种技术把脂质体的尺寸做成需要的大小。通常定制脂质体尺寸的方法有,如,通过溶液或者探针装置的超声波粉碎法,或者均质化,包括美国专利 4,737,323 所描述的方法。通过溶液或探针装置进行的脂质体悬浮液的超声波粉碎,可以把尺寸进行进一步的降低,直到小单层薄片囊的尺寸小于 0.05 微米。均质化是另外一种方法,通过剪切能量把大的脂质体剪成碎片从而变成小的脂质体。在典型的均质化过程中,多层薄片囊通过一个常规的乳液均化器进行循环,直到它到需要的脂质体尺寸为止,据观察,典型的尺寸为 0.1 和 0.5 微米。脂质体囊的尺寸可以通过半电子光散热(QELS)来测定,见 Bloomfield 里的描述,在此作为参考。根据本发明可以使用任何尺寸的脂质体。在一些具体的实施中本发明的脂质体的尺寸(直径)范围为约 0.05 微米到约 0.45 微米,约 0.05 微米到约 0.2 微米,或者约 0.08 微米到 0.12 微米。在其他的具体实施中,本发明的脂质体的尺寸在约 0.45 微米到约 3.0 微米,约 1.0 微米到约 2.5 微米,约 1.5 微米到约 2.5 微米和约 2.0 微米。

[0245] IV. 联合治疗

[0246] 在本发明的内含中,为了更有效的治疗癌症或者病毒感染,有考虑到把昂克立新治疗和其它治疗方法,制剂联合起来使用。能和昂克立新治疗联合使用的治疗方法和制剂包括传统的抗癌治疗法。这些抗癌治疗法包括(但不局限于)放射治疗,化学疗法,基因疗法,激素疗法或免疫疗法,这些疗法针对癌症/肿瘤,在下文中会进行更为详细的讨论。

[0247] 为了杀死细胞,包括细胞周期抑制,抑制移动,抑制转移,抑制生存,抑制扩散,或

者甚至逆转或者降低癌症细胞的恶性表型,采用本发明的方法和成分,可以将昂克立新疗法和其它疗法结合起来使用. 这个制剂成分 / 疗法将会提供一个联合的量,使癌症或病毒感染得到抑制. 这个程序可能包括通过同时使用一个昂克立新疗法和一个其它的治疗药物或方法,来攻击癌细胞. 也可以通过一个单一的成分或疗法来攻击癌细胞或肿瘤,也可以通过同时采用两种不同的成分或疗法来攻击癌细胞,在这里包括了昂克立新疗法和其他的治疗方法.

[0248] 还有其它的方法,在数分钟到数星期的时间间隔中,先使用昂克立新疗法再使用附加治疗,或者先相反. 在具体实施中,把附加疗法直接作用于癌细胞,我们通常需要确保两种疗法之间有足够充裕的时间以确保联合治疗的优点得到充分体现. 在这种情况下,应考虑用两种药物或治疗方法在约 12-24 小时内分别攻击癌细胞或肿瘤,有时需要在约 6-12 小时内各自攻击. 间隔时间约为 12 个小时可能更理想. 因此,可维持住了药物的治疗水准. 在一些情况下,可以把治疗的时间明显延长,例如为了降低毒性. 因此与下一疗程的时间间隔可以为几天 (2,3,4,5,6 或 7) 到几个星期 (1,2,3,4,5,6,7 或 8).

[0249] 可以想到在昂克立新疗法和其它抗癌症疗法的联合应用时,给药次数可能是一次以上 (即多次给药). 我们可以用多样的联合方式,例如,在这里昂克立新疗法为 "A",另一治疗方法为 "B",可有如下多种组合:

[0250] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B B/A/A A/B/B B/B/B/AB/B/A/B

[0251] A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/BB/B/B/A

[0252] A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A A/B/B/B B/A/B/BB/B/A/B

[0253] 其他的联合方式也应考虑. 为了获得一个治疗效果,两种药物 / 治疗方法以联合治疗的剂量传送到癌细胞,以得到预期效果.

[0254] V. 治疗目标 (对象)

[0255] A. 癌症

[0256] 本发明的具体实施可以用来治疗多种多样的疾病或病理条件,例如癌症或病毒感染. 可以通过本发明的方法和成分来对癌症进行治疗,包括来自于膀胱,血液,骨,骨髓,大脑,乳房,结肠,食道,肠胃,牙龈,头,肾,肝,肺,鼻咽,颈,卵巢,胰腺,前列腺,皮肤,胃,睾丸,舌或者子宫的细胞和癌细胞. 另外,癌症还可以是下列组织学类型,尽管不仅局限与此:肿瘤,恶性的;癌;未分化的癌症;巨细胞和梭形细胞癌症;小细胞癌症;乳突状癌症;鳞状细胞癌症;淋巴上皮癌症;基底细胞癌症;pilomatrix 癌症;移行性细胞癌症;乳突移行性细胞癌症;腺癌;促胃液素瘤,恶性的;胆管癌症;肝细胞癌症;肝细胞和胆管癌症;横纹腺癌;腺样胆囊癌症;腺瘤息肉样腺癌;腺癌,家族性息肉病;实体癌症 (solid carcinoma);类癌瘤,恶性;支气管肺泡腺癌;乳突腺癌;难染细胞癌症;嗜酸细胞癌症;嗜酸腺癌;嗜碱细胞癌症;透明细胞腺癌;颗粒细胞癌症;小囊腺癌;乳突和小囊腺癌;非侵袭性硬化性癌症;肾上腺皮质癌症;子宫内膜癌症;皮肤附器癌症;顶浆分泌腺癌;脂肪腺癌;肝腺癌;粘液样表皮状癌;膀胱癌症;乳突膀胱癌症;乳突浆液膀胱癌症;粘液膀胱癌症;粘液腺癌;图章戒指细胞癌症;渗透性导管癌症;髓鞘癌症;小叶癌症;炎症癌症;佩吉特氏疾病,乳腺的;腺细胞癌症;腺性鳞状癌症;腺癌鳞状组织变形;胸腺瘤,恶性;卵巢间质肿瘤,恶性;泡膜细胞瘤,恶性;粒层细胞肿瘤,恶性;男性胚细胞瘤,恶性;塞尔托利细胞癌症;Leydig 细胞肿瘤,恶性;脂质细胞肿瘤,恶性;副神经节瘤,恶性;乳房外副神经节

瘤,恶性;嗜铬细胞瘤;网状血管肉瘤;恶性黑素瘤;非黑变病黑素瘤;表面扩散性黑素瘤;在有颜色的大痣中的恶性黑素瘤;类上皮细胞黑色素瘤;蓝痣,恶性;肉瘤;纤维肉瘤;纤维组织细胞瘤,恶性;粘液肉瘤;脂肪肉瘤;平滑肌肉瘤;横纹肌肉瘤;胚芽的横纹肌肉瘤;齿槽横纹肌肉瘤;间质细胞肉瘤;混合肿瘤,恶性;繆勒式混合肿瘤;肾母细胞瘤;肝母细胞瘤;癌肉瘤;间质瘤,恶性;勃伦纳肿瘤,恶性;叶状柄肿瘤,恶性;滑液肉瘤;间皮瘤,恶性;dysgerminoma;胚胎癌症;畸胎瘤,恶性;卵巢瘤,恶性;绒(毛)膜癌;中肾瘤,恶性;血管肉瘤;血管内皮瘤,恶性;Kaposi 瘤;血管外皮细胞瘤,恶性;淋巴管肉瘤;骨肉瘤;阳端基环皮质骨肉瘤;软骨肉瘤;成软骨细胞瘤,恶性;间质细胞的软骨肉瘤;骨巨细胞肿瘤;尤因氏肉瘤;牙基因肿瘤,恶性;成釉细胞牙基因肿瘤;成釉细胞肿瘤,恶性;成釉细胞纤维肉瘤;松果体瘤,恶性;脊索瘤;神经胶质瘤,恶性;室鼓膜瘤;星细胞瘤;原形质的星细胞瘤;纤维状的星细胞瘤;星状母细胞瘤;神经胶母细胞瘤;少突神经胶质瘤;原生神经外胚;小脑肉瘤;神经节细胞瘤;成神经细胞瘤;视网膜母细胞瘤,眼癌;嗅神经肿瘤;脑(脊)膜瘤,恶性;神经纤维瘤;神经膜瘤,恶性;颗粒细胞肿瘤,恶性;恶性淋巴瘤;霍奇金氏疾病;霍奇金氏淋巴瘤;副肉芽肿;恶性淋巴瘤,小淋巴细胞瘤;恶性淋巴瘤,大细胞,迷散;恶性淋巴瘤,小囊的,蕈样真菌病;其他非霍奇金氏淋巴瘤;恶性组细胞增多病;多发性骨髓瘤;主细胞肉瘤;免疫增生性小肠疾病;白血病;类淋巴白血病;浆细胞白血病;红白血病;淋巴瘤肉瘤细胞白血病;骨髓白血病;嗜碱白细胞血病;嗜曙红细胞的白血病;单核细胞白血病;主细胞白血病;嗜碱性细胞白血病;成巨核细胞白血病;骨髓肉瘤;毛细胞白血病. 另外,其他一些癌前病变,例如:组织异生,发育障碍和增生过盛.

[0257] B. 病菌感染

[0258] 病毒感染是导致影响大面积人群的传染性疾病的一个主要原因. 这里面,流行性感冒病毒,括类型 A 和类型 B,是导致呼吸道症状和全身不适一个重要因素;其他呼吸道病毒包括副流感病毒 1,2,3 和 4,呼吸道合胞体病毒和腺病毒. 流感病毒经历快速突变,产生不同程度的致病性和病症的病原体.

[0259] 本发明的组分和相关方法可以用来治疗病毒感染. 含有昂克立新的药剂配方可以用于病人,以抑制病毒复制. 病毒感染可以是一个 RNA 病毒或者 DNA 病毒. 可以通过昂克立新治疗的具体病毒性疾病包括(但是不局限于)甲型肝炎,乙型肝炎,丙型肝炎,非甲,非乙,非丙肝炎,爱泼斯坦巴乐(EB)病毒感染,HIV 感染,疱疹病毒(EB,CML,单纯疱疹),乳头状瘤病毒,痘病毒,轮状病毒,细小的核糖核酸病毒,腺样病毒,犀牛病毒,HTLVI,HTLVII,和人类轮状病毒. 病人可以使用第二种抗病毒药物进行联合治疗.

[0260] VI. Ras 靶向化合物的筛选

[0261] 用已知遗传差异的正常及肿瘤细胞,例如 T29, T29Kt1, 和 T29Ht1 细胞,可筛选能有针对性的杀死肿瘤细胞而不是他们相对应的正常细胞的化合物. 各细胞组用含不同结构的化合物文库并平行处理(同时,同条件处理). 例如, T29 细胞是人类正常的卵巢表皮细胞,并经用人类端粒逆转录酶的催化亚单位与 SV40 病毒早其基因区处理后永生化(Liu et al., 2004). T29Ht1 和 T29Kt1 细胞是从 T29 细胞中衍生出来的,并经 H-Ras 和 K-Ras 分别稳定传染的肿瘤细胞(Liu et al., 2004),具有高度致肿瘤特性. 各组细分别接种到筛选板中培养,然后对各组细胞加入化学文库的各个化合物进行治疗. 通过对检测细胞周期状况,细胞死亡或者细胞生成抑制的化验分析而确定杀伤效果. 对靶细胞(如 T29Ht1 和 / 或

T29Kt1) 杀伤率大于 50%，而对非靶细胞的作用较弱的化合物将进入下一轮分析，以确定所发现的结果。当结果得到验证后，对这些化合物分的进一步分析包括对这些细胞的剂量效应分析和抗肿瘤效果分析。

[0262] VII. 实施例

[0263] 给出以下实施例的目的是为了示例说明本发明的多种具体实施方式，而不是以任何形式来限制本发明。本领域技术人员将会明白本发明完全适合于上面所述目标，并取得所提到的成果和优点，而这些目标，结果和优点都包含在本发明的范畴之内。本发明的实施例，以及本文描述的方法代表了优选的实施方式，是示例性的，但不是用于限制本发明的范围。包含于通过权利要求限定的本发明的精神之内的各种改变和其它应用，对于本领域技术人员来说应该是很清楚的。

[0264] 实施例 1

[0265] 昂克立新家族的化合物的鉴定和表征

[0266] 致癌 Ras- 靶向化合物的文库筛选为了筛选能够特异性杀死肿瘤细胞而不是他们相应的正常细胞的化合物，发明者用购自 Chembridge 公司的综合化学文库对 T29、T29Kt1 和 T29Ht1 细胞进行平行处理。T29 细胞是人类正常的卵巢表皮细胞，其经人类端粒逆转录酶的催化亚单位与 SV40 早基因组区转染而永生化 (Liu 等, 2004)。T29Ht1 和 T29Kt1 细胞是从肿瘤衍生而来的，并分别用致癌的 H-Ras 和 K-Ras 基因稳定转染 T29 细胞而建立 (Liu 等, 2004)，具有高度的致癌性。将各组细胞接种在 96- 孔培养板里，再用化学文库中的每个化合物处理这些细胞，所用化合物的最终浓度为约 5/mL (约 20-30 μ M)。用溶剂 (二甲亚砜, DMSO) 处理的细胞被用作对照。在处理 4 天后，用 sulforhodamine B (SRB) 染色分析，测定杀伤效果 (Rubinstein 等, 1990)。将能够杀死大于 50% 的 T29Kt1 或者 T29Ht1 细胞而不伤及 T29 的化合物进行第二次试验，以验证 SRB 试验分析的结果。通过对 10,000 个化合物的筛选，发明者鉴定了 6 个化合物对 T29Kt1 或 T29Ht1 具有细胞毒作用，而对亲本细胞 T29 产生的细胞毒作用很小。

[0267] 为了进一步研究这些选择性杀死 T29Kt1 或 T29Ht1 细胞的化合物的作用，发明者测定了这 6 个化合物在上述些细胞中的剂量效应 (FIG. 1A)。发明者先前曾报导过化合物 4 对肿瘤细胞有选择性细胞毒作用 (Wu 等, 2003; Zhu 等, 2004)。然而，剂量效应分析结果显示只有昂克立新 -1 对 T29Kt1 细胞在一个大剂量范围内是具有高度选择性的；其它五个化合物只有有限的选择性或较小的选择性剂量窗口 (FIG. 1B)。发明者于是集中分析了昂克立新 -1 的抗肿瘤作用。昂克立新 -1 对 T29Kt1 细胞的细胞毒作用是剂量依赖性的，其 50% 的有效剂量 (IC₅₀) 约为 2.5 μ M。相反的是，直到 100 μ M (试验中的最高浓度)，昂克立新 -1 对 T29 和 T29Ht1 细胞都无可检测的细胞毒作用。时间效应试验显示昂克立新 -1 对 T29Kt1 细胞的毒性也是时间依赖性的，而对 T29 或 T29Ht1 细胞没有时间依赖性 (FIG. 1C)。

[0268] 昂克立新在人类癌细胞中的抗肿瘤活性为了研究昂克立新 -1 对人类自发癌症细胞的作用，发明者用不同剂量的昂克立新 -1 对 8 种人肺癌细胞株进行处理，并测定处理后的细胞存活率。结果表明昂克立新 -1 可以有效杀死有 K-Ras 突变基因的 H460 细胞 (IC₅₀ = 0.25 μ M)、H2122 细胞 (IC₅₀ = 0.79) 和 A549 细胞 (IC₅₀ = 1.58 μ M) (FIG. 2)。这三个细胞株分别含有 K-Ras 基因的 Q61H、G12C 和 G12S 突变。昂克立新 -1 也能有效地杀死 H226B 细胞 (IC₅₀ = 1.2 μ M)，但该细胞株的 Ras 基因中状态不明。但是，昂克立新 -1 对拥

有野生型 Ras 基因的 H322 和 H1395 细胞只有很小的作用,对含有 N-Ras 基因突变的 H1299 和 H2087 的作用也很小。这个结果说明:昂克立新-1 不仅对带有 K-Ras 突变基因的卵巢癌细胞起作用,而且对带有 K-Ras 突变基因的肺癌细胞也起作用。同时,发明者也发现一些带有 K-Ras 突变基因的胰腺癌细胞系和结肠癌细胞系也对昂克立新-1 的治疗敏感。例如,在胰腺癌细胞 AsPC-1 (K-RasG12D 突变) 和 Capanc-1 (K-RasG12V 突变) 中,昂克立新-1 的 IC50 分别为 0.04 和 0.42 μ M。结肠癌细胞系 HCT116 (含 K-Ras 基因的一个 G13D 突变) 的 IC50 是 3.1 μ M。这些结果说明昂克立新对带有 K-Ras 突变的多种肺癌细胞、结肠癌细胞和胰腺癌细胞株是有效的。

[0269] 昂克立新诱导细胞凋亡作用 很多抗肿瘤疗法通过在肿瘤细胞内诱导细胞凋亡而起作用 (Fisher, 1994; Thompson, 1995)。为了确定昂克立新-1 抗肿瘤活性是不是由于抑制细胞增殖或者杀死细胞,发明者用昂克立新-1 在 30 μ M (对于 T29 或 T29Kt1 细胞) 或 3 μ M (对于 H460 细胞) 处理细胞后,再用 Annexin V/propidium iodide (PI) 对 T29、T29Kt1 和 H460 细胞染色。结果发现,经过 12-24 小时处理后,70% -90% 的 H460 和 T29Kt1 细胞显示 Annexin V、PI 或者两者的阳性染色 (图. 3A),标志着大多数细胞被昂克立新-1 杀死。相反, < 10% 的用 DMSO 处理过的对照 H460 和 T29Kt1 细胞和用昂克立新-1 处理过的 T29 细胞被 annexin V 或者 PI 染色。这个结果表明昂克立新-1 可以在 T29Kt1 和 H460 细胞内有效诱导细胞杀死作用。Western 印迹分析进一步显示用 1 μ M 昂克立新-1 处理的 H460 细胞,能有效地激活胱天蛋白酶-3 和胱天蛋白酶-8 (图. 3B),显示它在癌细胞中的细胞毒作用是由于它诱导细胞凋亡。

[0270] K-Ras 敲减抑制了昂克立新诱导的细胞凋亡。为了进一步研究 K-Ras 基因在昂克立新诱导的细胞死亡中的作用,用 200pM 的 K-Ras 特异 siRNA 或者对照 siRNA 对 H460 细胞进行 24 小时处理。然后用 DMSO 或者 1 μ M 的昂克立新-1 对细胞进行处理。再过 12 小时后,用荧光激活血细胞计数分析法对收获的细胞进行细胞凋亡检测。细胞溶解产物也被用来检测 K-Ras 的基因表达。结果表明用 K-Ras 特异 siRNA 而不是对照 siRNA 的处理,能抑制 K-Ras 在 H460 细胞里的表达。与 DMSO 处理的细胞相比,经对照 SiRNA 处理过的细胞再用昂克立新-1 处理能明显地产生凋亡细胞的显著增加。相反,当细胞经 K-Ras siRNA 处理后再经昂克立新-1 的处理,则其细胞凋亡水平和与 DMSO 处理组相似 (图. 4)。这个结果说明 K-Ras 活性在昂克立新-1 诱导的 H460 细胞凋亡过程中是个必要的因素。

[0271] Ras 信号途径和昂克立新诱导细胞凋亡的分子机理。为了研究由昂克立新化合物诱导的细胞凋亡的分子机理,发明者分析了参与细胞凋亡和或者参与 Ras 信号途径的几个蛋白质,包括 Bax、Bik、Bcl2、Bcl-XL、Raf-1、B-Raf、Akt、Mst1 和非典型性蛋白质激酶 C (aPKC) ζ 和 PKC ι 。为了研究哪些分子因昂克立新处理而改变,T29、T29Kt1 和 H460 经最佳浓度的昂克立新-1 处理,该浓度大约在 T29Kt1 和 H460 细胞的 IC60 到 IC80 之间。处理 12 小时后,收集细胞,对其溶解产物进行 Western 印迹分析。结果显示昂克立新-1 处理并没有对 Bax、Bik、Bcl-2、Bcl-XL、Mst1、B-Raf、PKC ζ 和 PKC 的水平产生显而易见的变化。昂克立新-1 的处理导致 H460 细胞而不是 T29 和 T29K 细胞里的 Raf-1 和 Akt 表达水平的降低。但是的处理导致敏感的 H460 细胞和 T29K 细胞里磷酸化的 PKC ι 增加,而这一现象并未在昂克立新-1 抗性的 T29 细胞中见到 (图 5)。

[0272] 对 PKC ι 亚细胞定位的影响 Western 印迹分析没有提供有关昂克立新诱导细胞

凋亡机制的确定性资料。为了进一步研究昂克立新作用的分子机制,由于 Ras 和其他蛋白质的功能与他们的亚细胞定位有直接的关联,发明人研究了 Ras 信号转导通路中一些分子的亚细胞定位。出于这个目的,将 T29Kt1 或 H460 细胞接种在玻璃盖玻片上,并加入 DMSO 或昂克立新-1,处理 12 小时。用多聚甲醛固定细胞,用 Triton X-100 增加细胞膜的渗透性,再用多种抗体进行染色用于免疫组织化学检查。昂克立新治疗并没有引起 Raf-1、Akt、Pkc ζ 和 p53 的亚细胞定位的明显变化。但是,昂克立新-1 治疗后,发现 PKC ι 亚细胞定位有实质性的变化(见图 6)。在 H460 和 T29Kt1 细胞中,PKC ι 和 PKC ζ 散布在细胞中,但在细胞核中细胞膜的浓度较高,这与之前的报告是一致的,即:aPKC 包含核定位信号(NLS)和核输出信号(NES),并且穿梭于细胞质和细胞核之间,这种穿梭由分子内构象变化、磷酸化反应或生长因素处理等所调节(Perander 等,2001;White 等,2002;Neri 等,1999)。PBS 或 DMSO 治疗没有使 aPKC 亚细胞分布产生明显的变化。昂克立新-1 治疗也没有使 PKC ζ 亚细胞定位产生明显变化。有趣的是,昂克立新-1 治疗使 T29Kt1 细胞和 H460 中的 PKC ι 在细胞核中聚集成大斑点。在昂克立新抗性 T29 和 H1299 细胞中没有发现这样的 PKC ι 聚集。随即,发明人测试其他化疗制剂,如 5-FU、紫杉醇等是否会导致 PKC ι 在细胞核中的聚集。结果显示,T29Kt1 细胞经化疗制剂 5-FU、紫杉醇,或者放疗处理,尽管它们的用量达到和昂克立新类似程度的细胞杀伤,但它们都没有导致 PKC ι 在细胞核中聚集。PI3K 抑制剂 LY29400364 也没有诱导 PKC ι 聚集。这表明 PKC ι 聚集于细胞核中并不是临死细胞中常见的现象。

[0273] 对 RNA 剪接体的影响 为研究 PKC ι 聚集于细胞核中的性质,发明者研究了昂克立新-1 对 SC35 以及对 Rad51 的影响,SC35 是一个 RNA 剪接和剪接体组装必需的蛋白质(Fu 等,1992;Vellard 等,1992),而 Rad51 是一个 DNA 修复中涉及到的一个同源重组酶(Benson 等,1996)。RNA 加工和 DNA 修复是在细胞核中进行的两个重要功能。在未治疗或用 DMSO 治疗的细胞中,SC35 以小斑点的形式散布或集中成簇存在于细胞核中(Mistele 等,1997),Rad51 则更均匀地分布于细胞核中。T29Kt1 细胞经昂克立新-1 治疗使 SC35 聚集成一些大的斑点,这个现象类似于 PKC ι (见图 8)。对昂克立新抗性的 T29 细胞经昂克立新-1 治疗后并没有发现 SC35 的聚集。另一方面,放射疗法(10 戈瑞)导致细胞核中 Rad51 形成小的斑点,而对 SC35 没有明显影响。但是,昂克立新-1 疗法对 Rad51 没有明显影响。PKC ι 和 SC35 的免疫化学共同染色表明,经昂克立新-1 治疗,PKC ι 和 SC35 共同定位于巨大剪接体。这个结论通过共焦显微镜检测得到证实(图 8B)。发明者研究了昂克立新对另一种剪接体蛋白质——可变剪接因子/剪接因子 2(ASF/SF2)的影响(Krainer 等,1991)。和 SC35 相似,经昂克立新-1 治疗可引起敏感 T29Kt1 细胞在核内 ASF/SF2 的聚集,这在敏感 T29Kt1 细胞中也与 PKC ι 重叠了。在抗性 T29 细胞中没有发现这样的聚集(见图 8C)。

[0274] 剪接因子,如 SC35,ASF/SF2,以高浓度存在于哺乳动物的细胞核中,它们集中成一小块,称作斑点。在电子显微镜下,斑点由两个形态不同的部分组成:(1) 大一些,更集中的区域,叫做染色质间颗粒簇(IGC),它们是转录惰性,并作为剪接因子的存储区。(2) 更分散分布于 IGC 周围区域的剪接因子,与包含初期转录和活性剪接体的染色质周边纤维一致(Spector 等,1993;Fakan 等,1978)。剪接体斑点的形态在 IGC 和染色质周边纤维之间动态地变化,这个过程受 RNA 聚合酶 II 介导转录的影响(Misteli 等,1997)。基于 RNA 聚合酶 II 转录(Camo-Fonseca 等,1992;Zeng 等,1997)的抑制或剪接因子的基因反义寡核苷酸或

抗体处理 (O' Keefe 等, 1994), 剪接因子重新分布并更趋向于定位于变得更大形式上更统一的或者变成巨大剪接体斑点的染色质间颗粒簇。经昂克立新介导的 SC35 和 ASF/SF2 聚集成巨大斑点的现象说明昂克立新化合物可能会抑制 RNA 转录或剪接体。总结起来, 以上结果表明昂克立新化合物可能不是 DNA 损坏因子, 而是干扰 RNA 加工的因子, 或者是转录, 或者是剪接, 或者是两者都干扰。

[0275] PKC ι 敲减抑制昂克立新介导的细胞凋亡和细胞毒性 为研究在昂克立新 -1 介导细胞毒性中 PKC ι 可能的作用, 发明人用低聚核苷酸敲减 H460 细胞中的 PKC ι 。H460 细胞经 200pM 的 PKC ι siRNA 处理 24 小时, 然后再与 DMSO 或 1 μ M 昂克立新反应 12 个小时。在这之后, 收集细胞, 并通过荧光激活细胞分拣法 (FACS) 分析细胞凋亡以及通过 Western 印迹分析 PKC ι 表达。结果显示, 通过 siRNA 敲减 PKC ι 也显著上抑制了昂克立新诱导的 H460 细胞凋亡 (见图 9A)。为进一步研究昂克立新诱导细胞毒性中非典型 PKC 产生的影响, 发明人从 Origene 公司取得编码有 PKC ι 和 PKC ζ siRNA 的质体, 并建立了稳定的 PKC ι 和 PKC ζ 敲减 T29Kt1 细胞。如图 6C 所示, 当 T29Kt1 细胞中 PKC ι 的稳定敲减后, 昂克立新没有使 PKC ι 在细胞核中聚集成巨大斑点。细胞活性分析表明, 经 siRNA 构建体将 PKC ι 稳定敲减的 T29Kt1 细胞对昂克立新 -1 几乎完全抗性。PKC ι 敲减的 T29Kt1 细胞的 IC50 比 T29Kt1 母细胞高 100 余倍。这个值可以与昂克立新抗性的 T29 细胞相当。相反, 经同样载体体系将 PKC ζ 敲减并没有改变 T29Kt1 对昂克立新的易感性。这些结果表明昂克立新介导的细胞毒性也和 PKC ι 活动有关。有报道指出 PKC ι 是 Ras 诱导瘤形成所需要的 (Murray 等, 2004)。最近发现, 大约 44% 卵巢瘤中 PKC ι 基因有扩增 (Zhang 等, 2006), PKC ι 的过量表达预示着肺癌和卵巢癌患者存活率很低 (Regala 等, 2005; eder 等, 2005)。对 PKC ι 有复合杀伤力的化合物可能有利于这些癌症的治疗。

[0276] 昂克立新对 Raf-1 表达的抑制图 5 中 Western 印迹分析表明在昂克立新 -1 治疗后的 H460 中 Raf-1 表达下调了。为了阐明 Raf-1 在昂克立新诱导细胞凋亡中的作用, 发明人在用不同浓度昂克立新 -1 治疗后, 评估了 H460 细胞中 Raf-1 的表达。Western 印迹分析显示, H460 细胞在昂克立新 -1 治疗下显著地降低了 Raf-1 的产生 (图 10A)。逆转录耦联的聚合酶链式反应 (RT-PCR) 分析进一步显示出在昂克立新 -1 治疗下, Raf-1 mRNA 水平以剂量和时间依赖形式下降 (图 10B), 表明在 RNA 水平有 Raf-1 下调。H460 细胞中 Raf-1 下调是否与 RNA 加工干扰或巨大斑点的形成有关就不清楚了。但是, Raf-1 下调没有导致 ERK 抑制, 因为在同样的标本中 ERK 磷酸化增加了。因为 Raf-1 通过多种通路执行抗细胞凋亡功能, 通过将野生型 Raf-1, 持续活性型 Raf-1 和显性阴性 Raf-1 与 H460 细胞稳定转染, 发明人研究了 Raf-1 下调是否有利于昂克立新 -1 诱导细胞凋亡, 所述凋亡通过用野生型 Raf-1、组成性活性 Raf-1 和显性阴性 Raf-1 的通道转染 H460 细胞, 并且测试这三种 Raf-1 在昂克立新 -1 上反应的效应。由于所用的质粒构建体不包含内含子, 那些重组表达可能不受 RNA 剪接的影响。有关那些稳定转染细胞的研究表明, 和 H460 母细胞比起来, 经野生型或组成性活性 Raf-1 转染的 H460 细胞对昂克立新 -1 相对低的易感性。而且, 组成性活性型 Raf-1 转染细胞对昂克立新 -1 的耐药比野生型转染细胞更显著 (见图 10C, 10D)。相反, 显性阴性 Raf-1 的转染致使 H460 细胞对昂克立新 -1 更敏感。这个结果显示出 Raf-1 细胞状态会显著影响对昂克立新化合物的反应。

[0277] 对 NF κ B 抑制发明人在一项独立的研究中评估了昂克立新化合物对 NF- κ B 活性

的效应。核因子- κ B (NF- κ B)/Rel 代表一组结构上相关联、进化上保守的转录因子,这些转录因子在慢性和急性炎症性疾病、自身免疫疾病和多种癌症中扮演重要角色 (Karin and Neriah, 2000 ;Karin and Karin, 2006 ;Barnes 等, 1997)。在未刺激细胞里,大多数 NF- κ B/Rel 二聚体与 I κ Bs 结合并保留在细胞质中。在多种刺激下, I κ Bs 磷酸化并迅速降解,释放 NF- κ B, NF κ B 然后进入细胞核,发挥转录功能。由于它在炎症性疾病和癌症发展中的重要作用, NF κ B 通路是这些疾病治疗中的重要目标 (Karin 等, 2004)。多个非甾族抗炎药物,如 枢力达、阿司匹林,可以抑制 NF κ B 活化 (Yamamoto 等, 1999 ;Yin 等, 1998)。由于昂克立新化合物与 枢力达有一些结构上的相似,发明人分析了昂克立新 -1 以及 枢力达对 T29Kt1 细胞中肿瘤坏死因子 α (TNF α) 介导 NF κ B 活化的影响。T29Kt1 细胞经质粒 pNF κ B-Luc (引自 Clontech 公司, 圣地亚哥, 加拿大) 转染,该质粒从包含 4 个 NF κ B 共有序列和 TATA 样序列的合成启动子表达荧光素酶。表达 CMV-lacZ 基因的质粒用作转染的对照。转染 24 小时后,用 TNF α (1ng/ml) 与 10 μ M 昂克立新 -1 或 10 μ M 枢力达联合或分别处理细胞。8 小时后收集细胞,测定荧光素酶活性,并用与 β -半乳糖苷酶活性的转染进行校正。结果表明在抑制 TNF α 诱导 NF κ B 活化方面,昂克立新 -1 比 枢力达更活性更强 (见图 11A)。为进一步测试昂克立新 -1 对 NF κ B 活化的作用,用不同浓度 DMSO 或昂克立新 -1 治疗 H460 和 T29Kt1 细胞,同时加入 1ng/ml TNF α ,而有些组则不加。12 小时后,收集细胞裂解液,并按以前报导的方法 (Zhu 等, 2005),进行细胞核提取和电泳迁移率 (EMSA) 检测。结果显示,当浓度是 1 μ M 或以上时,昂克立新 -1 可以有效的抑制 H460 和 T29Kt1 细胞中 TNF α 介导的 NF κ B 活化 (见图 11B)。由于 NF κ B 不仅在癌症发展和恶化中扮演重要角色,也是抵抗其他抗癌制剂诱导的细胞凋亡的重要成分 (Karin and Karin, 2006),对 NF κ B 活化的抑制作用表明昂克立新 -1 可用于与其他抗癌制剂的联合治疗,也可能有利于缓解疼痛或癌症的恶病质。

[0278] 实施例 2

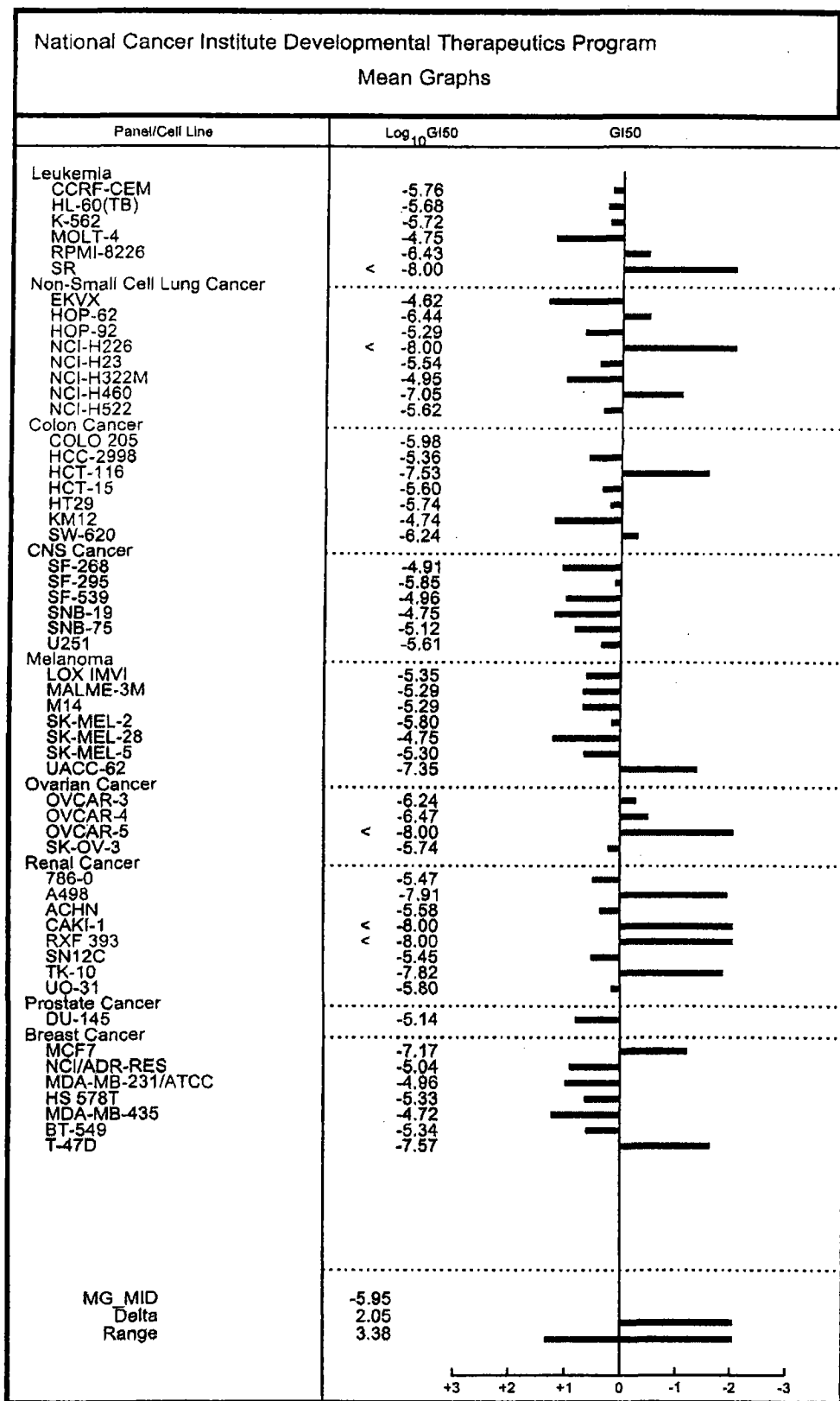
[0279] 昂克立新和昂克立新类似物

[0280] 发明人将昂克立新 -27 和昂克立新 -60 这两个化合物提交到美国国家癌症中心 (NCI),用于对一组取自于多种组织和器官的 60 个癌细胞系进行测试。在国家癌症中心进行的测试显示昂克立新 -27 和昂克立新 -60 有相似的抗癌谱,并在取自于白血病、非小细胞肺癌、直肠癌、黑素瘤、卵巢癌、肾癌、乳腺癌的癌细胞系中具有活性 (见表 3A、3B)。例如,在 54 个测试的癌细胞系中,昂克立新 -60 的平均半数生长抑制浓度 (GI_{50}) 是 1.12 μ M。17 个细胞系 (31%) 的 GI_{50} < 1 μ M;12 个细胞系 (22%) 的 GI_{50} 低于 0.1 μ M;5 个细胞系 (9.3%) 的 GI_{50} < 10nM。这些结果表明昂克立新化合物对众多癌症很有效。根据 NCI60 癌细胞系的基因突变数据,发明人对比了敏感细胞系和耐药细胞系基因突变。结果表明 35% 敏感细胞系中含有 K-Ras 突变,14% 抗性细胞系含有 K-Ras 基因突变。24% 敏感细胞系中磷脂酰肌醇激酶催化亚基 (PIK3CA) 中含有突变,而仅 8% 抗性细胞中有这一基因的突变。敏感细胞和抗性细胞中, p53、p16、PTEN 基因突变的细胞系百分比差不多 (见表 4A、4B)。因此,这些数据也表明昂克立新化合物可能有利于治疗含有 K-Ras 或 PI3K 基因突变的癌症。有趣的是,65% 敏感细胞含有野生型 K-Ras 基因。还不清楚那些细胞有没有 Ras 活性增加或 PKC α 活性增加。但是,结果表明即使没有 K-Ras 基因突变的癌症,昂克立新化合物对它们也有治疗效果。

[0282]

[0283] 表 3B 昂克立新 60

[0284]



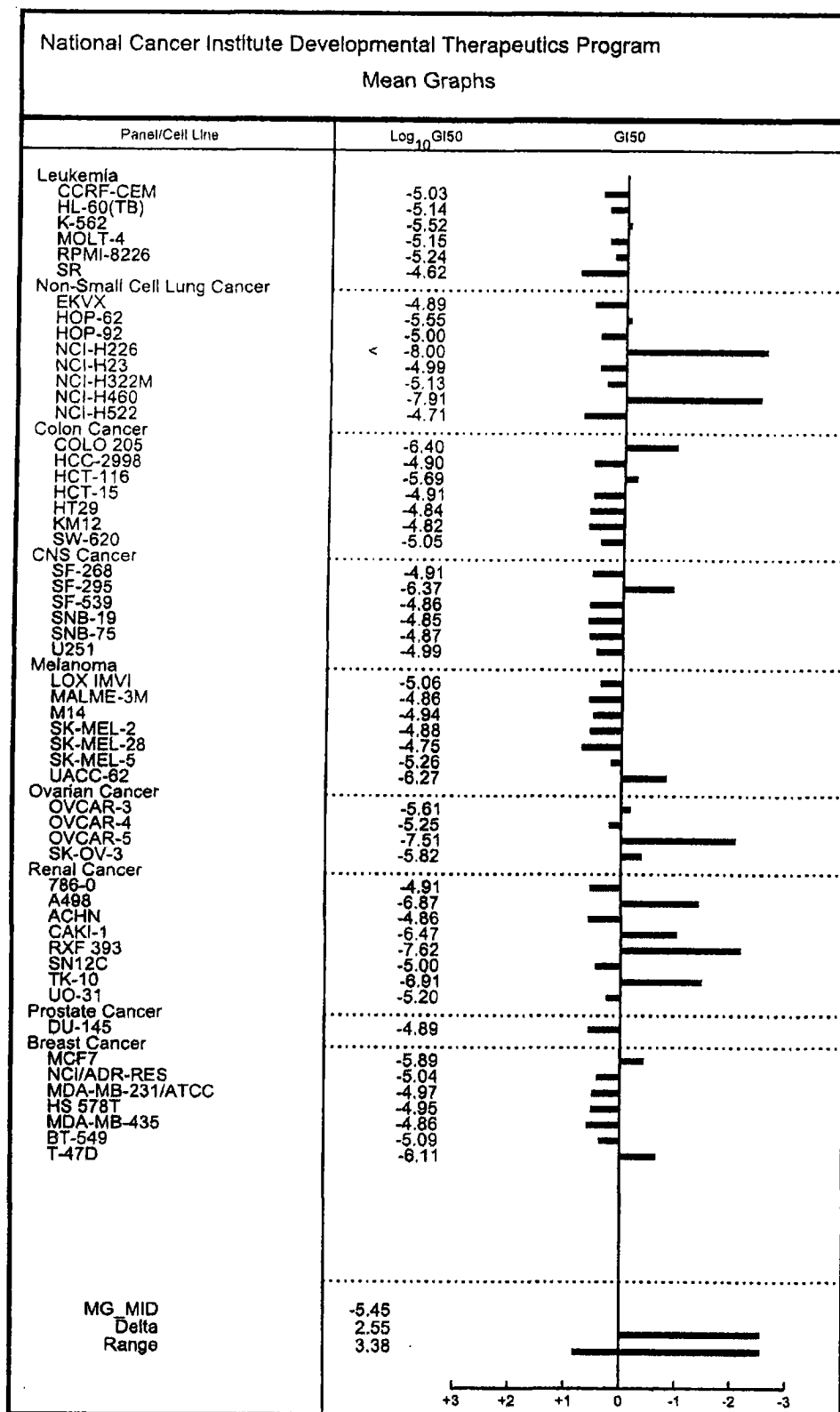
[0285] 表 4A 昂克立新 27

[0286]

National Cancer Institute Developmental Therapeutics Program In-Vitro Testing Results														
NSC : D741909 / 1				Experiment ID : 0606RS75				Test Type : 08				Units : Molar		
Report Date : October 03, 2006				Test Date : June 26, 2006				QNS :				MC :		
COMI : FL-K60 (48727)				Stain Reagent : SRB Dual-Pass Related				SSPL : 0PNH						
Log10 Concentration														
Panel/Cell Line	Time	Zero	Ctrl	-8.0	-7.0	-6.0	-5.0	-4.0	-3.0	-2.0	-1.0	G50	GI50	LC50
Leukemia														
CCRF-CEM	0.349	1.948	1.946	1.900	1.641	0.187	0.116	100	97	81	-47	-87	1.74E-6	4.31E-6
HL 60(1B)	0.321	1.182	1.135	1.057	0.916	0.402	0.072	95	85	69	9	-78	2.10E-6	1.28E-5
K-562	0.092	0.841	0.717	0.640	0.458	0.135	0.027	114	100	67	8	-71	1.92E-6	1.26E-5
MOLT-4	0.471	1.801	1.982	1.827	1.021	1.630	0.177	114	102	109	87	-82	1.77E-5	3.82E-5
RPMI-8225	0.379	1.513	1.713	1.341	0.649	0.290	0.208	119	85	24	-23	-35	3.72E-7	3.19E-6
SR	0.576	1.138	0.818	0.429	0.166	0.474	0.187	43	-26	-71	-18	-71	< 1.00E-6	4.26E-6
Non-Small Cell Lung Cancer														
ECVX	0.609	1.582	1.611	1.628	1.652	1.628	0.476	103	105	107	84	-22	2.40E-5	6.47E-5
HOP-62	0.474	1.250	1.162	0.985	0.756	0.509	0.290	91	87	36	15	-37	3.00E-7	1.83E-5
HOP-92	0.441	0.820	0.816	0.783	0.785	0.573	0.175	97	81	89	34	-60	5.17E-6	7.79E-5
NCI-H226	0.478	0.936	0.864	0.376	0.182	0.151	0.168	40	-22	-62	-69	-65	< 1.00E-6	4.46E-6
NCI-H23	0.390	1.101	1.058	0.978	0.888	0.607	0.141	94	82	87	31	-64	2.80E-6	2.10E-5
NCI-H322M	0.641	1.147	1.258	1.262	1.200	0.870	0.418	118	117	109	54	-23	1.13E-5	5.05E-5
NCI-H460	0.221	2.282	1.847	1.219	0.638	0.483	0.201	79	48	20	13	-9	8.89E-6	3.79E-5
NCI-H527	0.711	1.541	1.465	1.392	1.344	0.773	0.187	91	82	76	7	-74	2.41E-6	1.24E-5
Colon Cancer														
COLO 205	0.186	0.881	0.873	0.839	0.533	0.296	0.047	86	93	61	18	-72	1.09E-6	1.68E-6
HCC-T988	0.398	1.199	1.162	1.088	0.887	0.740	0.012	86	86	82	43	-97	4.39E-6	2.04E-6
HCT-116	0.265	2.128	1.626	0.826	0.448	0.298	0.085	88	30	10	2	-64	2.94E-6	1.06E-5
HCT-15	0.308	1.854	1.835	1.514	1.238	0.597	0.214	89	90	89	21	-31	2.82E-6	2.68E-5
HT29	0.286	1.860	1.910	1.633	1.183	0.726	0.080	103	79	58	29	-68	1.89E-6	6.78E-6
KM12	0.400	1.366	1.441	1.485	1.387	1.238	0.186	108	113	102	87	-54	1.83E-6	4.15E-6
SW-620	0.216	1.524	1.444	1.298	0.732	0.423	0.116	84	83	39	18	-46	6.71E-7	1.80E-6
CNS Cancer														
SF-268	0.330	1.237	1.264	1.216	1.179	0.869	0.238	106	88	84	58	-30	1.24E-6	4.58E-5
SF-295	0.711	2.308	2.364	1.894	1.603	0.881	0.608	104	80	80	18	-15	1.43E-6	3.32E-5
SF-538	0.420	1.492	1.534	1.395	1.480	0.987	0.119	108	116	104	58	-73	1.09E-6	2.70E-5
SNB-19	0.626	1.553	1.682	1.518	1.493	1.287	0.400	103	87	81	74	-24	1.78E-5	5.68E-5
SNB-75	0.540	1.132	1.223	1.227	1.193	0.846	0.171	118	118	112	42	-73	7.64E-6	2.31E-5
U87	0.364	1.768	1.673	1.650	1.289	0.737	0.258	93	84	86	28	-38	2.45E-6	2.63E-5
Melanoma														
LOX IMVI	0.386	2.087	2.124	2.007	2.024	0.814	0.053	102	95	86	25	-88	4.48E-6	1.88E-6
MALME-3M	0.517	0.791	0.742	0.700	0.704	0.592	0.217	105	114	88	36	-58	5.17E-6	2.37E-6
M14	0.424	1.382	1.333	1.327	1.289	0.790	0.090	95	84	87	36	-79	5.18E-6	5.59E-6
SK-MEL-2	0.797	1.353	1.341	1.265	1.172	0.840	0.287	86	84	87	-20	-94	1.08E-6	4.82E-5
SK-MEL-28	0.204	0.794	0.784	0.780	0.782	0.680	0.113	83	99	93	82	-46	1.80E-6	4.44E-5
SK-MEL-5	0.295	1.709	1.833	1.602	1.390	0.658	0.010	85	82	74	40	-97	4.97E-6	1.05E-5
UACC-62	0.727	2.107	1.865	1.238	0.718	0.383	0.041	79	35	-2	-47	-94	4.51E-6	8.97E-7
Ovarian Cancer														
OVCA9-3	0.381	1.398	1.349	1.184	0.807	0.399	0.158	85	77	41	1	-60	5.88E-7	1.03E-5
OVCA9-4	0.411	1.160	1.133	0.888	0.653	0.487	0.284	94	71	31	-10	-29	3.40E-7	1.80E-5
OVCA9-5	0.367	0.975	0.678	0.420	0.340	0.283	0.185	43	10	-7	-23	-50	< 1.00E-6	3.72E-7
SK-OV-3	0.595	1.118	1.094	1.035	0.904	0.645	0.456	86	88	82	18	-18	1.82E-6	2.96E-5
Renal Cancer														
786-O	0.491	1.940	1.023	1.768	1.590	0.870	0.232	89	88	76	27	-52	3.40E-6	2.19E-5
A498	0.896	1.692	1.394	0.408	0.120	0.048	0.050	61	-66	-87	-86	-94	1.24E-6	8.47E-6
ACHN	0.486	1.601	1.589	1.515	1.323	0.608	0.345	89	82	76	10	-30	2.00E-6	2.25E-5
CAKI-1	0.428	0.901	0.431	0.418	0.337	0.226	0.433	1	-3	-21	-47	1	< 1.00E-6	< 1.00E-6
RXFP-383	0.268	0.630	0.380	0.295	0.297	0.188	0.041	31	7	-12	-30	-86	< 1.00E-6	2.44E-7
SN12C	0.906	2.138	2.103	2.047	1.874	1.234	0.308	97	83	78	27	-66	3.58E-6	1.94E-5
TK-10	0.827	1.348	1.074	0.607	0.565	0.574	0.514	82	-3	-10	-8	-16	1.53E-6	8.94E-6
UO-31	0.807	1.373	1.290	1.200	1.028	0.594	0.282	80	80	60	10	-47	1.58E-6	1.55E-5
Prostate Cancer														
DU-145	0.211	0.836	0.885	0.888	0.821	0.475	0.100	106	108	98	42	-83	7.25E-6	2.78E-5
Breast Cancer														
MCF7	0.377	2.090	1.653	1.146	0.551	0.509	0.340	75	46	10	8	-10	8.73E-6	2.78E-5
NCI-MADR-RES	0.347	1.182	1.161	1.117	1.045	0.744	0.182	103	84	86	48	-45	9.22E-6	3.32E-5
MDA-MB-231(AT)CC	0.558	1.205	1.237	1.332	1.265	0.904	0.380	105	120	108	53	-32	1.10E-6	4.23E-5
HS 578T	0.426	0.896	1.023	0.984	0.946	0.595	0.283	105	98	81	30	-36	4.88E-6	2.75E-5
MDA-MB-435	0.418	1.789	1.811	1.793	1.738	1.535	0.287	102	100	98	81	-29	1.93E-6	5.47E-5
BT-549	0.426	0.794	0.637	0.656	0.762	0.524	0.066	110	118	97	28	-65	4.82E-6	1.73E-5
T-47D	0.537	1.284	1.079	0.584	0.474	0.453	0.465	73	20	-12	-18	-14	2.87E-6	4.23E-7

[0287] 表 4B 昂克立新 27

[0288]



[0289] 实施例 3

[0290] 昂克立新化合物的体内活性

[0291] 发明人研究了昂克立新化合物的体内抗癌活性,如昂克立新-1、昂克立新-27,这两者相对来说可得到较多的量,用来作体内分析。通过接种 1.5×10^6 H460 细胞于每个小鼠的脊部两侧,将皮下肿瘤细胞种植入 4-6 星期大的雌裸鼠中。肿瘤长到直径为 3mm 大时,

以每天 100mg/kg/ 注射的剂量（溶剂为含有 10% DMSO、10% 聚氧乙烯黄麻油、10% 乙醇的溶剂），给小鼠腹膜内注射昂克立新-1（10 天）或昂克立新（3 天，由于化合物获取的量有限），或者仅腹膜注射溶剂。用公式 $axb^2 \times 0.5$ 计算肿瘤体积，a 和 b 分别代表较大和较小的直径（Gu 等，2000；Terashi 等，2005）。当肿瘤长到直径为 1.5cm 时小鼠将被处死。为评估该治疗方法的毒性，在治疗前和最后一次治疗后 2 天，从尾静脉中抽取血样，如同其他描述（Gu 等，2000；Terashi 等，2005），测量血清丙氨酸转氨酶，天冬氨酸转氨酶，肌酸酐水平。通过计算红细胞、白细胞和血小板来监测对造血系统的毒性（Gu 等，2000；Terashi 等，2005）。在小鼠被处死后，取肺、心脏、肝脏、肠、脾和肾来检测这两个化合物对这些器官的毒性。在 M. D. Anderson 癌症中心动物医药与外科部门的组织学实验室里进行了组织病理学分析。结果显示昂克立新-1 和昂克立新-27 明显抑制了肿瘤的生长。和溶剂治疗组相比，昂克立新-1 和昂克立新-27 分别抑制了肿瘤生长的 75.4% 和 76.3%（见图 14A）。这两者也延长了存活期（见图 14B）。用溶剂、昂克立新-1 和昂克立新-27 治疗的小鼠的平均存活期分别为 24 天、32 天和 34 天。用溶剂、昂克立新-1 或昂克立新-27 治疗，未发现小鼠的体重有何变化。此外，血细胞的数量都相同，都在正常范围内。尽管接受的治疗不同，所有小鼠的丙氨酸转氨酶（ALT）、天门冬氨酸转氨酶（AST）和肌酸酐水平都在正常范围内（见图 15）。组织病理学检查进一步显示，任何接受检测的小鼠或器官都没有明显的损伤（即肺、心脏、胃、小肠、肝、脾、胰腺和肾），这表明可在没有能观察到的毒性情况下实现体内抗肿瘤活性。以上数据表明昂克立新化合物可用于癌症治疗。

[0292] 实施例 4

[0293] 对 RNA 加工的调节

[0294] 关于 SC35 和 ASF/SF2 细胞内分布的研究表明昂克立新化合物可以诱导剪接因子的聚集，这表明昂克立新可能会影响 RNA 加工，可以是转录，可以是剪接，也可以两者。为进一步测试 RNA 转录和剪接在昂克立新介导抗肿瘤活性中的作用，发明人分析了 RNA 集合酶 II 最大的亚基和剪接因子的磷酸化。以最佳浓度的昂克立新-1 治疗 T29、T29Kt1 和 H460 细胞，这些浓度大约在 T29Kt1 和 H460 细胞的 IC_{60} 至 IC_{80} 之间。12 小时后收集细胞裂解产物，用对于磷酸化的 RNA 集合酶 II（H5，Covance 研究产品公司，Berkeley，CA）和 SR 蛋白质（1H4，Zymed，取自于 Invitrogen，Carlsbad，CA）特异的抗体，进行 Western 印迹分析。结果显示用昂克立新-1 治疗明显地抑制了磷酸化的 RNA 集合酶 II 和一定的 SR 蛋白质（见图 16A），这表明昂克立新治疗的确干扰了 RNA 加工。有趣的是，用 HeLa 核提取物（Promega，Madison，Wisconsin）的体内转录测定表明，不和 RNA 集合酶 II 抑制剂 5,6-二氯-1- β -D-呋喃核糖苷苯并咪唑（DRB）一样（Chodosh 等，1989；Zandomeni 等，1984），昂克立新-1 没有直接抑制体外 RNA 转录（见图 16B），表明对 RNA 集合酶 II 磷酸化的影响可以是间接的。

[0295] 丝氨酸精氨酸富集蛋白（SR）构成一个大约有 12 个多肽的家族，包括 SC35 和 ASF/SF2，这些多肽对剪接的运行和调控很关键。SR 蛋白的特异磷酸化是调控剪接的一个重要决定因素。已经鉴定并表征了 SR 蛋白磷酸化中涉及到的一些激酶，其中包括 SR 蛋白激酶 SRPK-1 和 SRPK-2（Wang 等，1998）、CLK/STY（Colwill 等，1996）和 DNA 拓扑异构酶 I（Rossi 等，1996）。已有报导指出高度磷酸化和低磷酸化抑制了 SR 蛋白剪接活性（Prasad 等，1999）。最近，也有报导称 SRPK 抑制剂可以有效的抑制 HIV 病毒度的复制和繁殖（Fukuhara

等,2006)。

[0296] 真核 RNA 聚合酶 II 最大亚基的 C 端域 (CTD) 含 YSPTSPS 七肽序列的多次重复,在 CTD 酵母中有 26 次重复,在哺乳动物 CTD 中有 52 次 (Oelgeschlager and Oelgeschlager, 2002)。CTD 中的丝氨酸和苏氨酸有不同程度的磷酸化,这导致了体内 RNA 聚合酶 II 两种形态的产生:一种低磷酸化形态,称为 IIa,另一种为高度磷酸化形态,称为 IIo。三种主要的细胞周期蛋白依赖蛋白激酶:CDK7/ 细胞周期蛋白 H(TF II H) (Iarochelle 等,2001; Shiekhattar 等,1995)、CDK8/ 细胞周期蛋白 C(Akoulitchchev 等,2000; Leclerc 等,2000) 和 CDK9/cyclin T(P-TEFb) 磷酸化 CTD(Kim 等,1995)。除了这些 CDK 外,还有其他蛋白激酶也有有效的磷酸化 CTD,如 DNA 依赖蛋白激酶 (DNA-PK) (Peterson 等,1995),细胞外调解激酶 (ERK) (Bonnet 等,1995), c-abl 酪氨酸激酶 (Baskaran 等,1996; Baskaran 等,1993)。CTD 的磷酸化是有效的转录延伸, mRNA 加工因子募集所需要的,包括有效 RNA 加工转录所需的加帽酶和剪接因子 (McCracken 等,1997; Misteli 等,1999; Mortillaro 等,1996)。PolIII 以它未磷酸化的 CTD(IIa 形态),进入集合转录复合物。此后,由 CDK7 和 CDK9 磷酸化 CTD,将 PolIII 转化成 IIo 形态,使有效的 RNA 延伸和加工成为可能 (McCracken 等,1997; Misteli 等,1999)。在转录周期的最后,磷酸酶 FCP1 (Kamenski 等,2004; Achambault 等,1997) 将集合酶 II 去磷酸化。FCP1 是起始活性 RNA 集合酶 II 再生所需要的,并且可能也会对抗 CDK8 的活性,CDK8 通过在前起始复合体募集之前磷酸化集合酶 II 来抑制转录 (Hengartner 等, 1998)。

[0297] 证据也指出转化细胞要求 RNA 聚合酶 II 持续活性,来抵抗致癌基因诱导细胞凋亡 (Koumenis 等,1997)。抑制未转化细胞的 RNA 聚合酶可致细胞周期停止,但不导致细胞凋亡。相反,用 c-Myc 转化细胞显著地增加了对 5,6- 二氯 -1- β -D- 呋喃核糖苷苯并咪唑 (DRB) 的敏感,这表明致癌基因的表达极大的增强了 RNA 集合酶 II 功能抑制后的细胞凋亡。CTD 磷酸化也参与 HIV(Wei 等,1998) 和丁型肝炎病毒 (Yamaguchi 等,2001) 的再生。近期的研究指出,在 Tat(一种人类免疫缺陷综合征病毒 1 的反式激活蛋白) 转录初期,人类 CDK7 和 CDK9 通过一个叫做反式激活反应因子 (TAR) 的顺式作用元件被募集到 HIV-1 启动子,并且高度磷酸化 CTD。Tat 与病毒长末端重复 (LTR) 的 TAR RNA 茎-环结合,并且用 RNA 聚合酶 II(PolIII) 增加转录延伸的频率 (Kim 等,2002; Zandomeni 等,1984)。RNA 聚合酶 II 抑制剂,如 (DRB) (Chodosh 等,1989; Zandomeni 等,1984) 抑制 HIV LTR 体内和体外 (Critchfield 等,1997; Marciniak 等,1991) 的转录活性,尽管 HIV LTR 中基础转录和短转录的产生与 CTD 无关。

[0298] 总结起来,昂克立新化合物对 RNA 集合酶 II 的磷酸化的抑制和对 SR 蛋白磷酸化的抑制表明他们有利于癌症治疗和 / 或某些病毒性疾病,如 AIDS、丁型肝炎的治疗。

[0299] 参考文献

[0300] 以下参考文献以对本文所提到的内容提供示例性程序和其他补充性的细节的程度通过引用特别并入本文。

[0301] U. S. Patent 4, 837, 028

[0302] U. S. Patent 4, 186, 183

[0303] U. S. Patent 4, 217, 344

[0304] U. S. Patent 4, 235, 871

- [0305] U. S. Patent 4, 261, 975
- [0306] U. S. Patent 4, 485, 054
- [0307] U. S. Patent 4, 501, 728
- [0308] U. S. Patent 4, 603, 044
- [0309] U. S. Patent 4, 737, 323
- [0310] U. S. Patent 4, 946, 787
- [0311] U. S. Patent 4, 957, 773
- [0312] U. S. Patent 5, 795, 587
- [0313] U. S. Patent 5, 145, 684
- [0314] U. S. Patent 5, 399, 363
- [0315] U. S. Patent 5, 466, 468
- [0316] U. S. Patent 5, 534, 499
- [0317] U. S. Patent 5, 543, 158
- [0318] U. S. Patent 5, 552, 157
- [0319] U. S. Patent 5, 565, 213
- [0320] U. S. Patent 5, 567, 434
- [0321] U. S. Patent 5, 580, 579
- [0322] U. S. Patent 5, 641, 515
- [0323] U. S. Patent 5, 641, 515
- [0324] U. S. Patent 5, 725, 871
- [0325] U. S. Patent 5, 738, 868
- [0326] U. S. Patent 5, 741, 516
- [0327] U. S. Patent 5, 756, 353
- [0328] U. S. Patent 5, 780, 045
- [0329] U. S. Patent 5, 792, 451
- [0330] U. S. Patent 5, 804, 212
- [0331] U. S. Patent 5, 820, 873
- [0332] U. S. Patent 5, 885, 613
- [0333] U. S. Patent 5, 976, 567
- [0334] U. S. Patent 6, 027, 726
- [0335] U. S. Patent 6, 320, 017
- [0336] U. S. Prov. Appln. 60/571, 712
- [0337] Abra et al, J. Liposome Res. ,12 :1-3, 2002.
- [0338] Akoulitchiev et al. , Nature, 407 :102-106, 2000.
- [0339] Alessi et al. , Current Biology, 7 :776-789, 1997.
- [0340] Algarra et al. , Invasion and Metastasis, 18 :261-270, 1998.
- [0341] Allen and Chonn, FEBS Lett. , 223(1) :42-46, 1987.
- [0342] Allen et al. , Biochim Biophys Acta, 1237(2) :99-108, 1995.
- [0343] Archambault et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94 :14300-14305, 1997.

- [0344] Barenholz, In: Physiology of Membrane Fluidity, Shinitzky (Ed.), CRC Press, FL. (1) :131-174, 1984.
- [0345] Barnes et al., NE J. Medicine, 336 :1066-1071, 1997.
- [0346] Bar-Sagi and Hall, STKE, RE13, 2004.
- [0347] Baskaran et al., Molec. Cell. Biol., 16 :3361-3369, 1996.
- [0348] Baskaran et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 :11167-11171, 1993.
- [0349] Baum and Kirschmeier, Current Oncology Reports, 5 :99-107, 2003.
- [0350] Baumann et al., Cell, 87 :757-766, 1996.
- [0351] Benson et al., EMBO J., 13 :5764-5771, 1994.
- [0352] Bergo et al., J. Clinical Investigation, 113 :539-550, 2004.
- [0353] Bernards and Settleman, Trends in Cell Biology, 14 :377-385, 2004.
- [0354] Bernhard et al., Cancer Res., 60 :6597-6600, 2000.
- [0355] Berra et al., Cell, 74 :555-563, 1993.
- [0356] Bloomfield, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 10 :421-450, 1981.
- [0357] Blume et al., Biochim Biophys Acta, 1146 (2) :157-168, 1993.
- [0358] Bonnet et al., Nucleic Acids Research, 27 :4399-4404, 1999.
- [0359] Bos et al., Nature, 327 :293-297, 1987.
- [0360] Bos, Cancer Res., 49 :4682-4689, 1989.
- [0361] Brignall, Alternative Medicine Review, 6 :580-589, 2001.
- [0362] Cadwallader et al., Molecular and Cellular Biology, 14 :4722-4730, 1994.
- [0363] Carmo-Fonseca et al., J. Cell Biology, 117 :1-14, 1992.
- [0364] Chandran et al., Indian J. Exp. Biol., 35 (8) :801-809, 1997.
- [0365] Chinni et al., Oncogene, 20 :2927-2936, 2001.
- [0366] Chodosh et al., J. Biological Chemistry, 264 :2250-2257, 1989.
- [0367] Coleman et al., Carcinogenesis, 15 :1005-1012, 1994.
- [0368] Colwill et al., EMBO J., 15 :265-275, 1996.
- [0369] Couvreur et al., FEBS Lett., 84 (2) :323-326, 1977.
- [0370] Couvreur, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., 5 (1) :1-20, 1988.
- [0371] Critchfield et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94 :6110-6115, 1997.
- [0372] Cujec et al., Genes and Development, 11 :2645-2657, 1997.
- [0373] Davies et al., Nature, 417 :949-954, 2002.
- [0374] Deamer and Bangham, Biochim. Biophys. Acta, 443 :629-634, 1976.
- [0375] Diaz-Meco et al., J. Biological Chemistry, 269 :31706-31710, 1994.
- [0376] Eder et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102 :12519-12524, 2005.
- [0377] Ehrhardt et al., Molecular & Cellular Biology, 24 :6311-6323, 2004.
- [0378] Fakan et al., Experimental Cell Research, 113 :327-337, 1978.
- [0379] Fedorov et al., Molecular and Cellular Biology, 22 :1140-1149, 2002.
- [0380] Filmus et al., Cancer Res., 45 :4468-4472, 1985.
- [0381] Fiorucci and Hall, Biochimica et Biophysica Acta, 950 :81-83, 1988.

- [0382] Fisher, Cell, 78 :539-42, 1994.
- [0383] Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76 :3348-3352, 1979.
- [0384] Fu et al., Science, 256 :535-538, 1992.
- [0385] Fukuhara et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103 :11329-11333, 2006.
- [0386] Gabizon and Papahadjopoulos, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85 (18) :6949-6953, 1988.
- [0387] Galiana et al., Molecular Carcinogenesis, 14 :286-293, 1995.
- [0388] Garnett and Marais, Cancer Cell, 6 :313-319, 2004.
- [0389] Gu et al., Cancer Res., 60 :5359-5364, 2000.
- [0390] Gu et al., Gene Ther., 9 :30-37, 2002.
- [0391] Guerrero et al., Cancer Res., 60 :6750-6756, 2000.
- [0392] Hancock et al., Cell, 63 :133-139, 1990.
- [0393] Hancock, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 4 :373-384, 2003.
- [0394] Heath, In :Methods in Enzymology, (149) :111-119, Academic Press, Inc. 1987.
- [0395] Hengartner et al., Molecular Cell, 2 :43-53, 1998.
- [0396] Hirahata et al, Gan To Kagaku Ryoho., 19(10Suppl) :1591-1594, 1992.
- [0397] Hoa et al., Cancer Res., 62 :7154-7156, 2002.
- [0398] Hope et al, Biochim. Biophys. Acta, 812 :55-65, 1985.
- [0399] Hope et al., Chem. Phys. Lip., 40 :89, 1986.
- [0400] Hwang et al, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., 15(3) :243-284, 1998.
- [0401] James et al., J. Biological Chemistry, 270 :6221-6226, 1995.
- [0402] James et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93 :4454-4458, 1996.
- [0403] Jun et al., Science ' sSTKE[Electronic Resource] :Signal Transduction Knowledge Environment, 1999 :E1, 1999.
- [0404] Kaelin, NatureReviewsCancer, 5 :689-698, 2005.
- [0405] Kamenski et al., Molecular Cell, 15 :399-407, 2004.
- [0406] Karin and Ben Neriah, Annual Review of Immunology, 18 :621-663, 2000.
- [0407] Karin and Karin, Nature, 441 :431-436, 2006.
- [0408] Karin et al., Nature Reviews, Drug Discovery. 3 :17-26, 2004.
- [0409] Kelloff et al., Journal of Cellular Biochemistry-Supplement, 26 :1-28, 1996.
- [0410] Kim et al., Molecular and Cellular Biology, 22 :4622-4637, 2002.
- [0411] Klibanov et al., Ann. NY Acad. Sci., 672, 1992.
- [0412] Koumenis et al., Molecular and Cellular Biology, 17 :7306-7316, 1997.
- [0413] Krainer et al., Cell, 66 :383-394, 1991.
- [0414] Larochelle et al., EMBO Journal, 20 :3749-3759, 2001.
- [0415] Lasic, Trends Biotechnol., 16(7) :307-321, 1998.
- [0416] Le Good et al., Science, 281 :2042-2045, 1998.
- [0417] Leclerc et al., Molecular Biology of the Cell, 7 :505-513, 1996.

- [0418] Leonetti et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 :2448-2451, 1990.
- [0419] Liu et al., Cancer Res. ,64 :1655-1663, 2004.
- [0420] Marciniak et al., EMBO Journal, 10 :4189-4196, 1991.
- [0421] Mathiowitz et al., Nature, 386 (6623) :410-414, 1997.
- [0422] Mayer et al., Biochim. Biophys. Acta, 858 :161-168, 1986.
- [0423] McCracken et al., Nature, 385 :357-361, 1997.
- [0424] Mills et al., Cancer Res. ,55 :1444-1447, 1995.
- [0425] Misteli et al., Molecular Cell, 3 :697-705, 1999.
- [0426] Misteli et al., Nature, 387 :523-527, 1997.
- [0427] Morishita et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 :8474, 1993
- [0428] Mortillaro et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. , 93 :8253-8257, 1996.
- [0429] Murray et al., Journal of Cell Biology, 164 :797-802, 2004.
- [0430] Nakanishi et al., Journal of Biological Chemistry, 268 :13-16, 1993.
- [0431] Nemunaitis et al., American Journal of Clinical Oncology, 20 :527-529, 1997.
- [0432] Neri et al., FASEB Journal, 13 :2299-2310, 1999.
- [0433] Oelgeschlager and Oelgeschlager, Journal of Cellular Physiology, 190 : 160-169, 2002.
- [0434] O' Keefe et al., Journal of Cell Biology, 124 :249-260, 1994.
- [0435] Oltvai et al., Cell, 74 :609-19, 1993.
- [0436] O' Neill et al., Science, 306 :2267-2270, 2004.
- [0437] Ostro, In :Liposomes, Marcel Dekker, Inc. , Chap. 1, NY, 1983.
- [0438] Pacold et al., Cell, 103 :931-943, 2000.
- [0439] Papaldo et al., Journal of Clinical Oncology, 21 :3462-3468, 2003.
- [0440] PCT Appln. WO 91/17424
- [0441] Pellegata et al., Cancer Res. ,54 :1556-1560, 1994.
- [0442] Pells et al., Oncogene, 15 :1781-1786, 1997.
- [0443] Perander et al., Journal of Biological Chemistry, 276 :13015-13024, 2001.
- [0444] Peterson et al., Journal of Biological Chemistry, 270 :1449-1454, 1995.
- [0445] Pinto-alphandary et al., J. Drug Target, 3(2) :167-169, 1995.
- [0446] Prasad et al., Molecukr and Cellular Biology, 19 :6991-7000, 1999.
- [0447] Pullen et al., Science, 279 :707-710, 1998.
- [0448] Quintanar-Guerrero et al., Pharm. Res. , 15(7) :1056-1062, 1998.
- [0449] Ravagnan et al., Oncogene, 18 :2537-2546, 1999.
- [0450] Regala et al., Cancer Res. ,65 :8905-8911, 2005.
- [0451] Remington' s Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580, 1990.
- [0452] Remington' s Pharmaceutical Sciences, 1035-1038 and 1570-1580
- [0453] Remington' s Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company,

pp. 1289-1329, 199

- [0454] Renneisen et al., J. Bio. Chem., 265 :16337-16342, 1990.
- [0455] Rodriguez-Viciana et al., Nature, 370 :527-532, 1994.
- [0456] Rossi et al., Nature, 381 :80-82, 1996.
- [0457] Rossman et al., Nature Reviews MolecularCell Biology, 6 :167-180, 2005.
- [0458] Rowley and Van Ness, Oncogene, 21 :8769-8775, 2002.
- [0459] Rubinstein et al., Journal of the National Cancer Institute, 82 : 1113-1118, 1990.
- [0460] Sapra and Allen, Prog. Lipid Res, 42(5) :439-462, 2003.
- [0461] Sebti and Adjei, Seinarns in Oncology, 31 :28-39, 2004.
- [0462] Shiekhattar et al., Nature, 374 :283-287, 1995.
- [0463] Spector and Spector, Annual Review of Cell Biology, 9 :265-315, 1993.
- [0464] Stephens et al., Science, 279 :710-714, 1998.
- [0465] Sun et al., Clinical CancerResearch, 8 :3100-3104, 2002.
- [0466] Szoka et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9 :467, 1980.
- [0467] Takakura, Nippon Rinsho., 56(3) :691-695, 1998.
- [0468] Takenaga et al., J. ControlRelease, 52(1-2) :81-87, 1998.
- [0469] Taylor et al., CancerRes., 60 :6607-6610, 2000.
- [0470] Teraishi et al., Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 314 :355-362, 2005.
- [0471] Thompson, Science, 267 :1456-62, 1995.
- [0472] Torchilin et al., In:Liposomes :APractical Approach, Oxford University Press, 2003.
- [0473] Vellard et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 89 :2511-2515, 1992.
- [0474] Vivanco and Sawyers, Nature Reviews, Cancer. 2 :489-501, 2002.
- [0475] Vlahos et al., Journal of Biological Chemistry, 269 :5241-5248, 1994.
- [0476] Vogelstein et al., New England Journal of Medicine, 319 :525-532, 1988.
- [0477] von Gise et al., Molecular and Cellular Biology, 21 :2324-2336, 2001.
- [0478] Wang et al., Cell, 87 :629-638, 1996.
- [0479] Wang et al., Journal of Cell Biology, 140 :737-750, 1998.

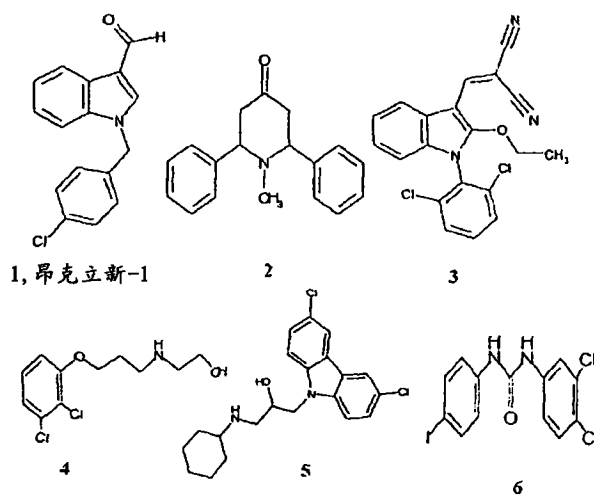


图 1A

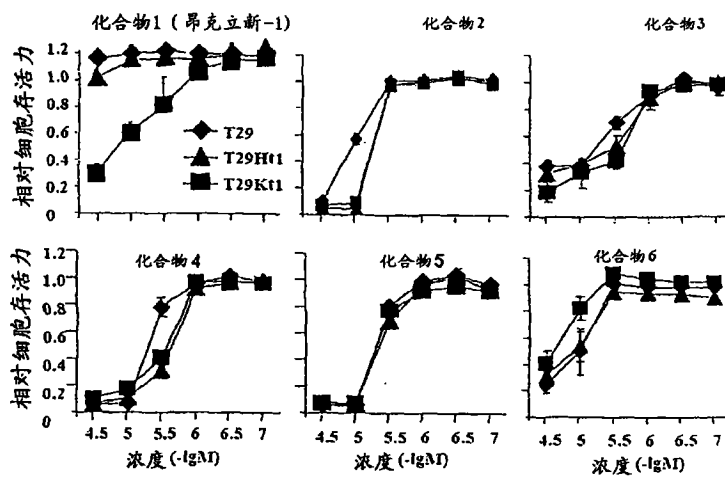


图 1B

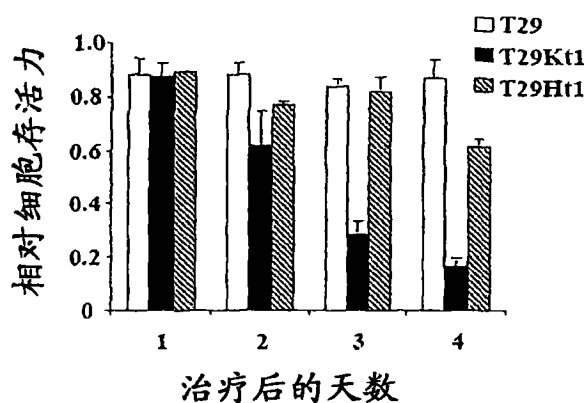
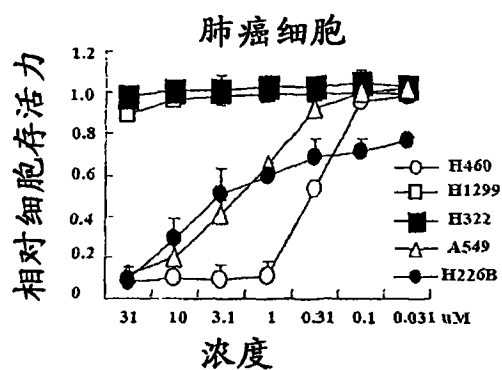


图 1C



细胞系	Ras 基因 *	IC50
H460	K-Ras 61H	0.25
H2122	K-Ras 12C	0.79
A549	K-Ras 12S	1.58
H226B	未知	1.31
H2087	N-Ras 61K	>31
H1299	N-Ras	>31
H322	wt	>31
H1395	wt	>31

*基于公开的数据和癌症基因组计划数据库 (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/>)

图 2A

图 2B

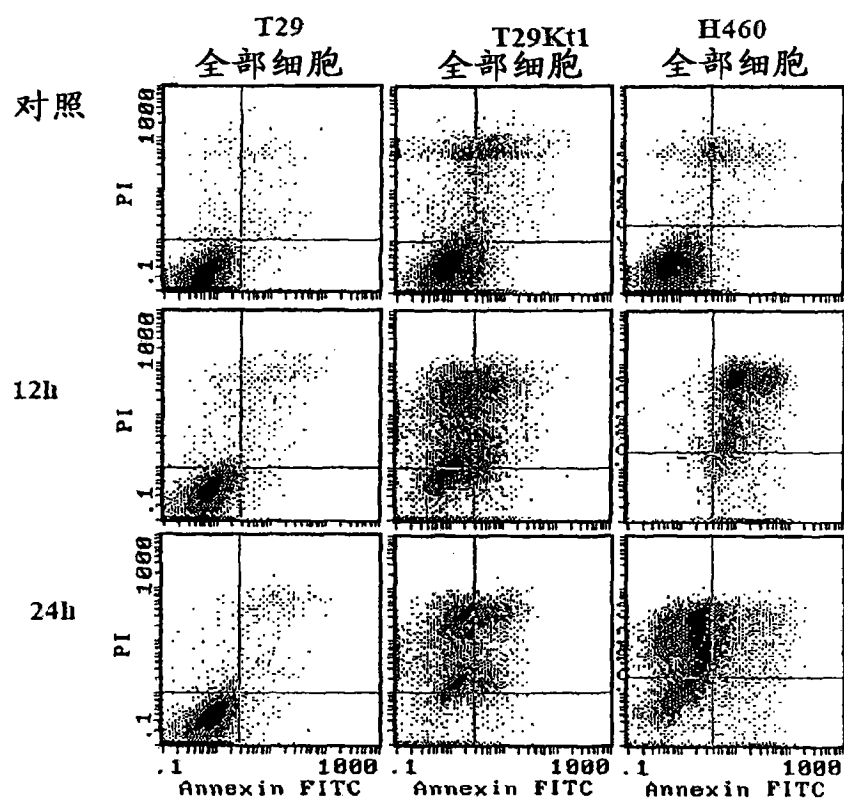


图 3A

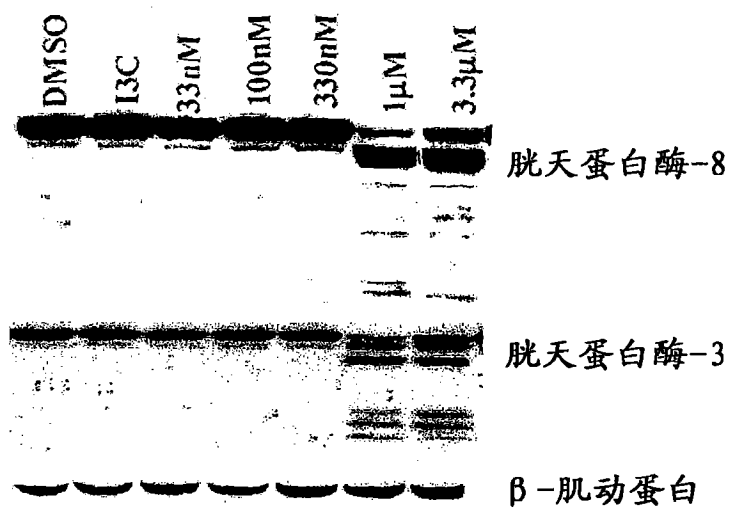


图 3B

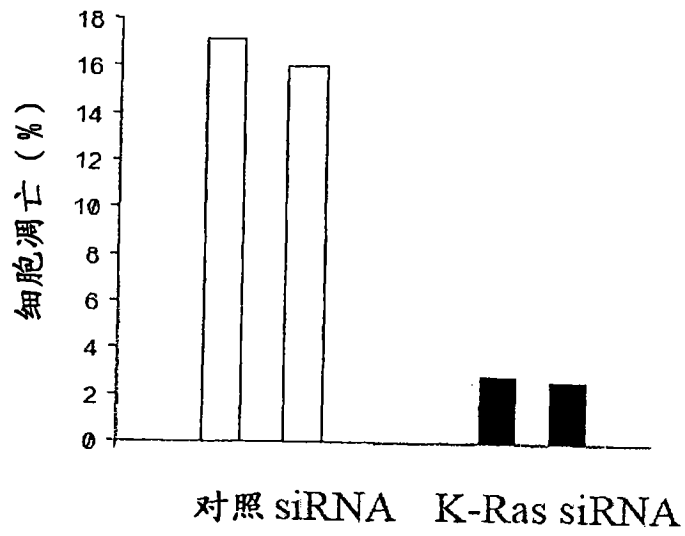


图 4A

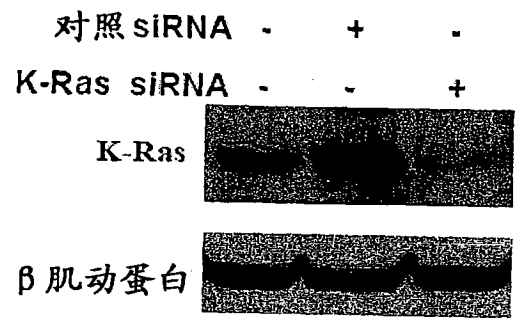


图 4B

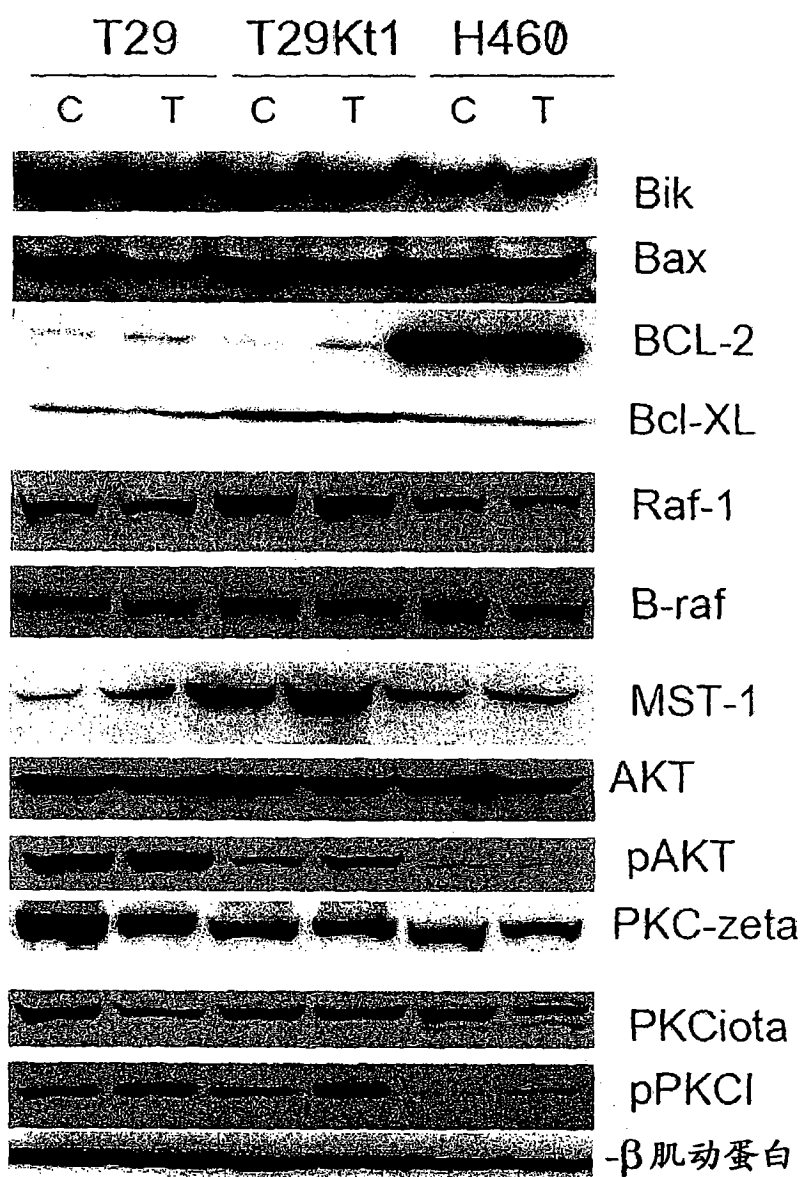


图 5

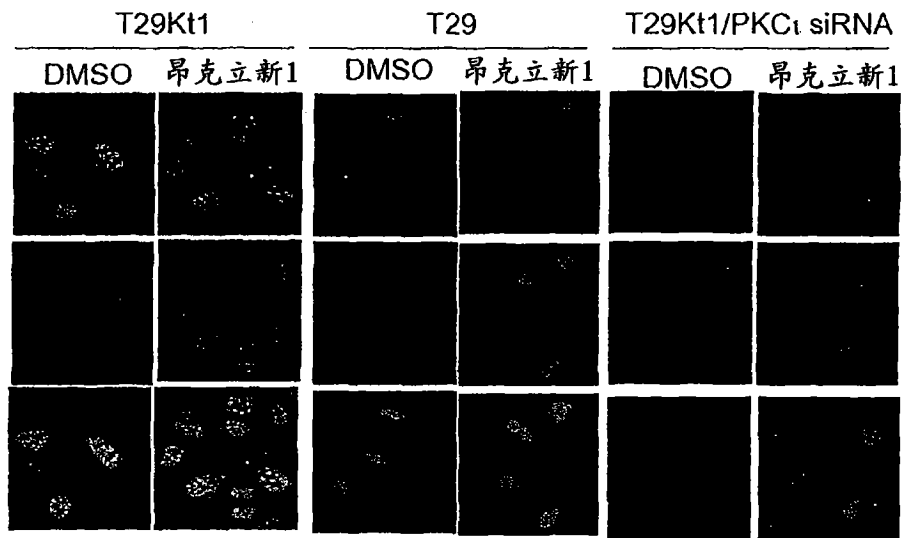


图 6C

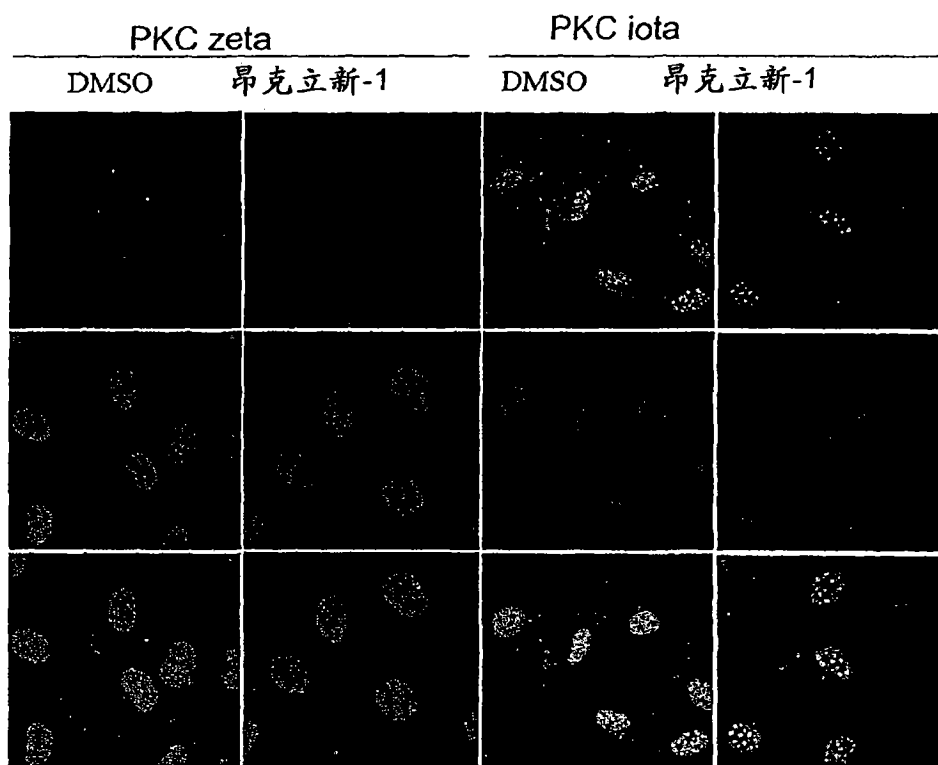
T29Kt1细胞中的 α PKC

图 6B

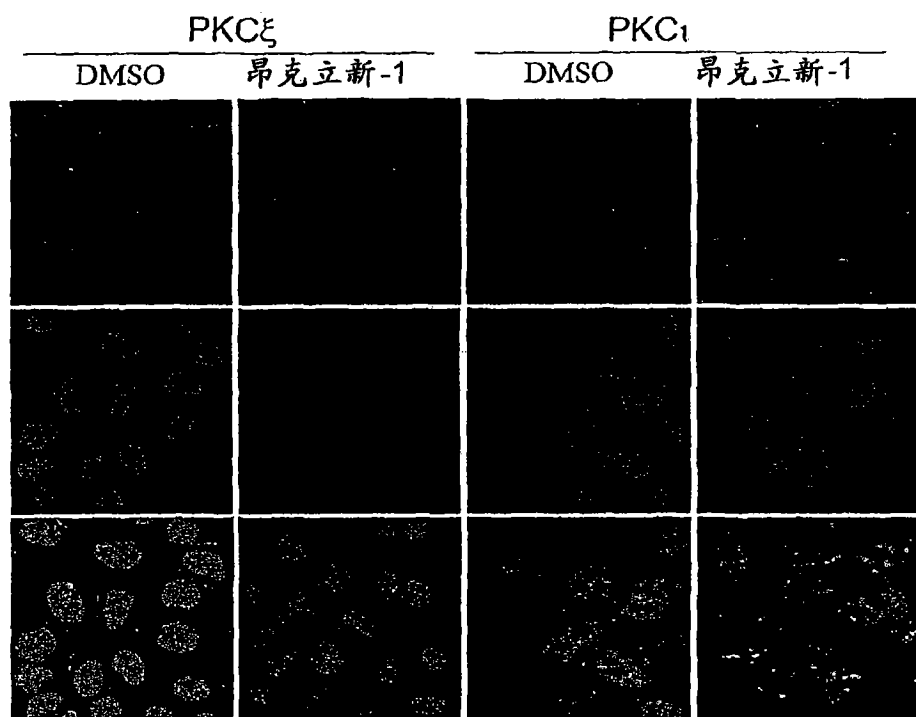
H460细胞中的 α PKC

图 6A

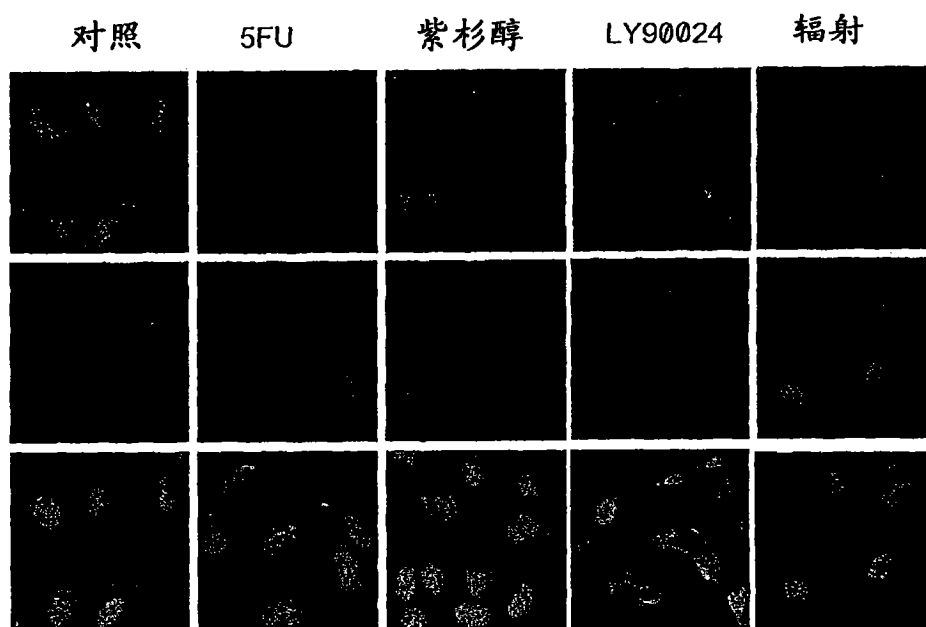


图 7

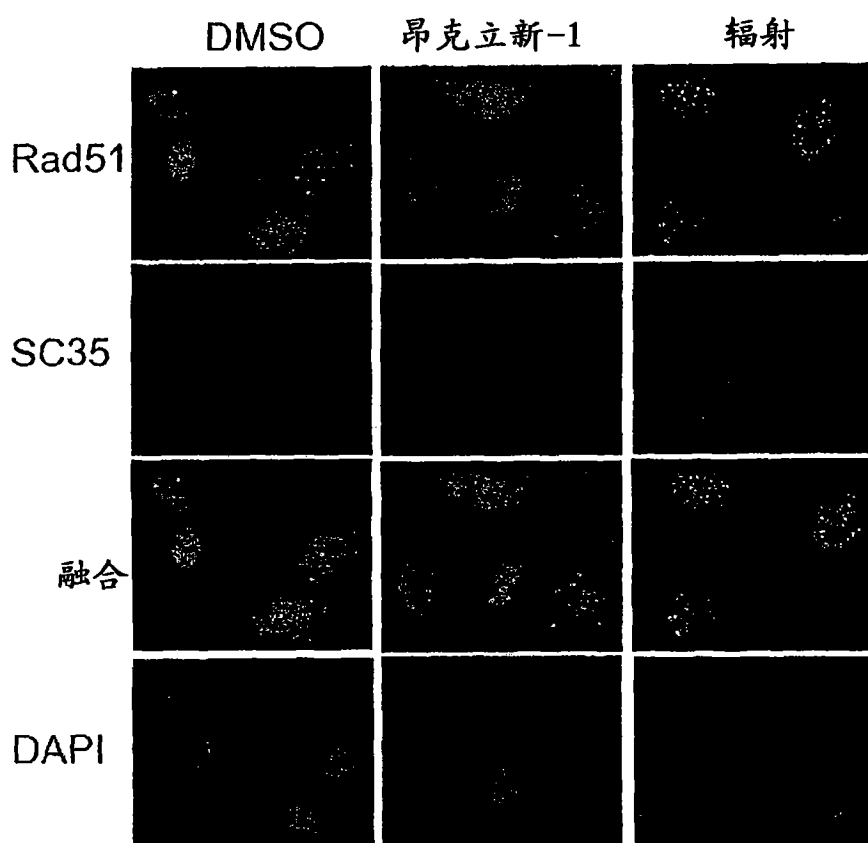


图 8A

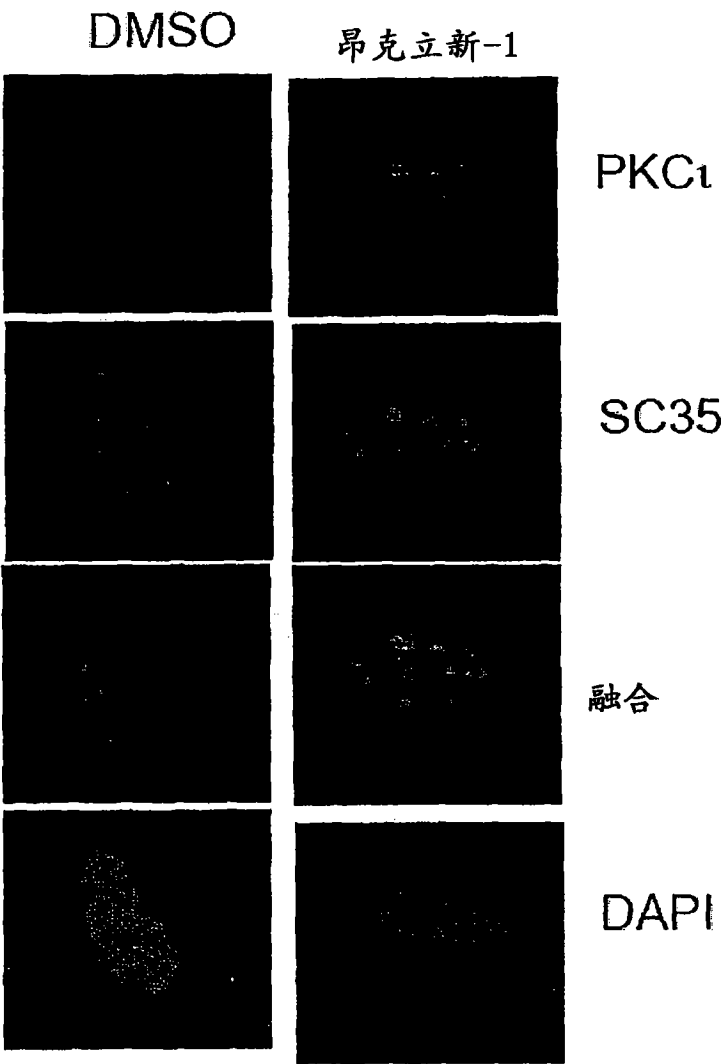


图 8B

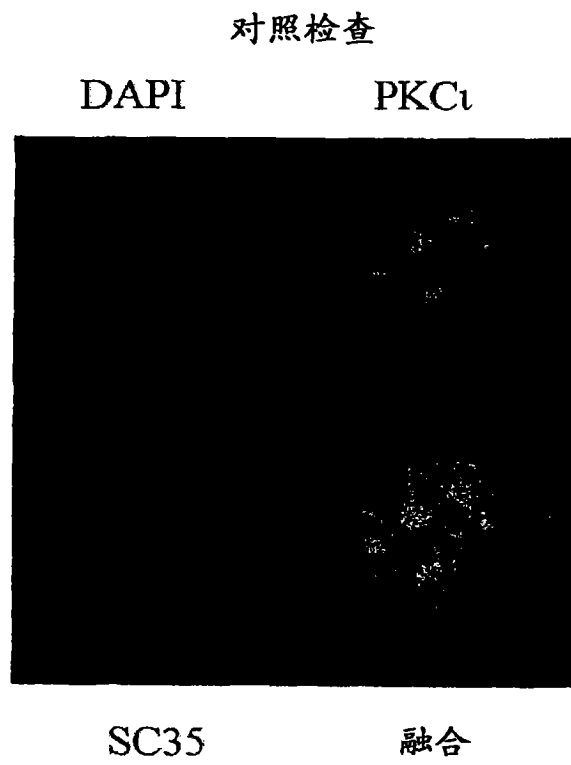


图 8C

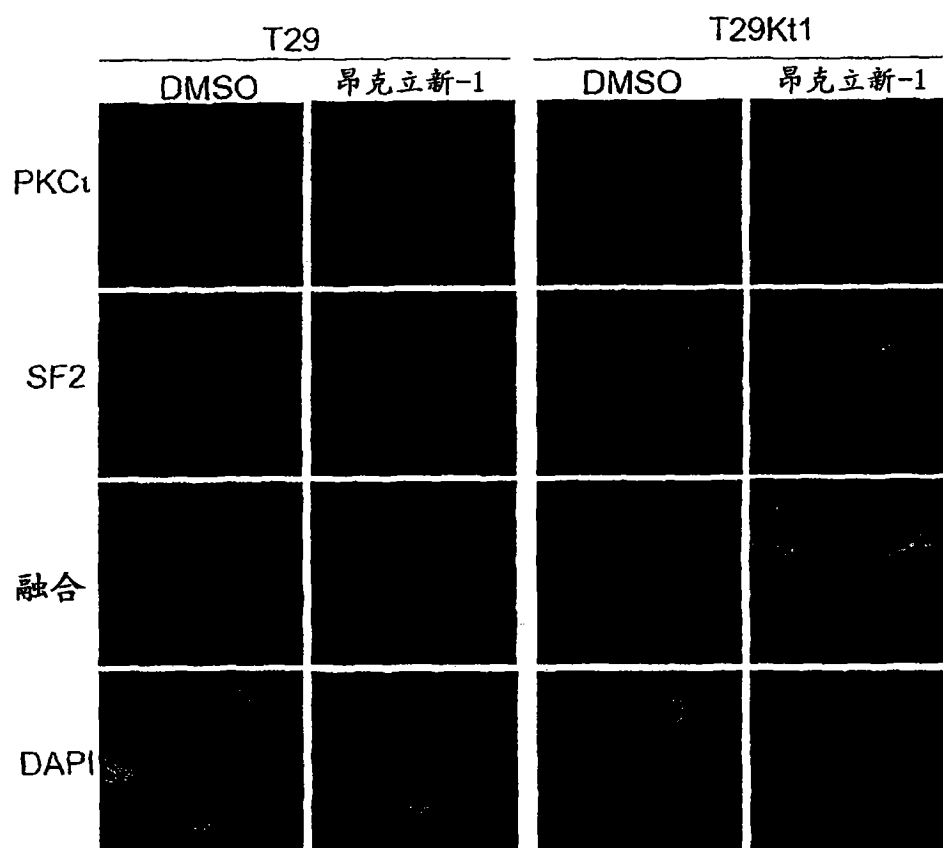


图 8D

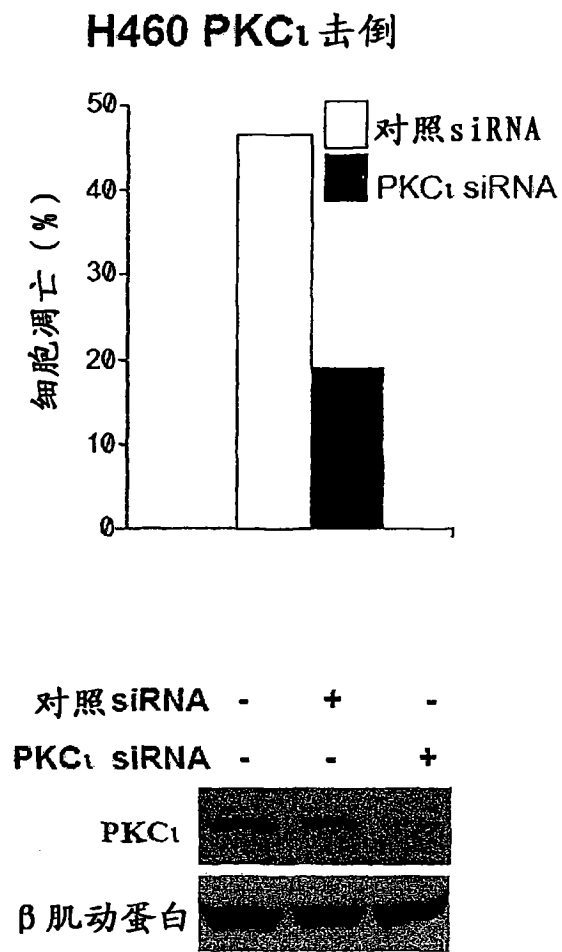
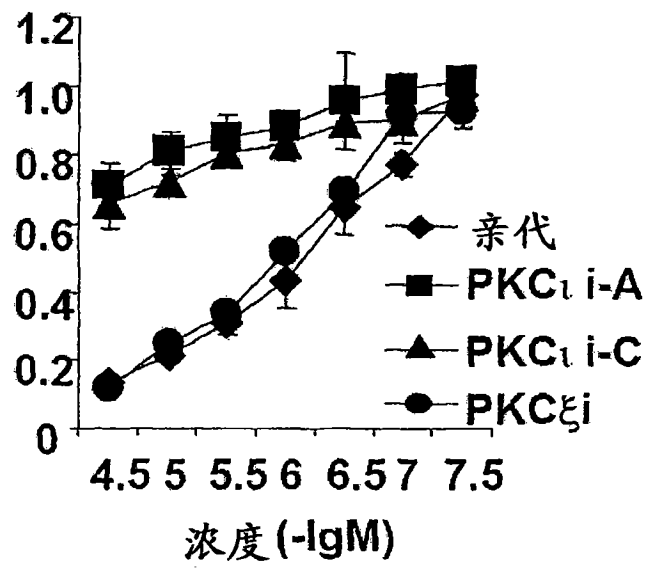


图 9A

T29K PKC ϵ 击倒

PKC ξ siRNA - + - -

PKC ϵ siRNA - - + +

PKC ϵ

β 肌动蛋白

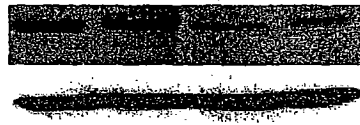


图 9B

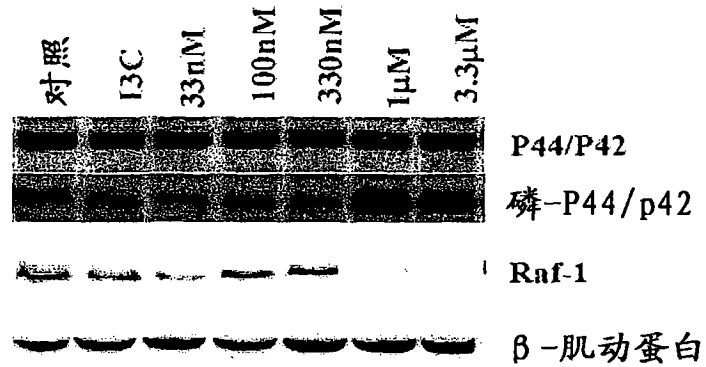


图 10A

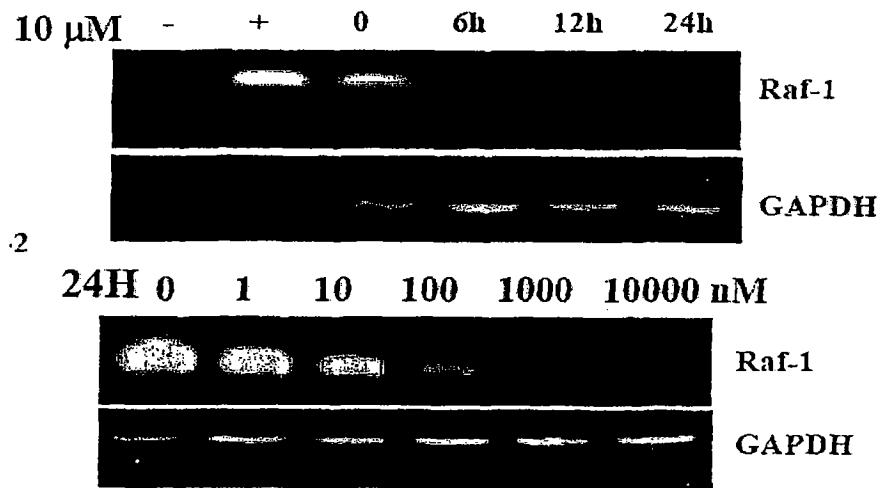


图 10B

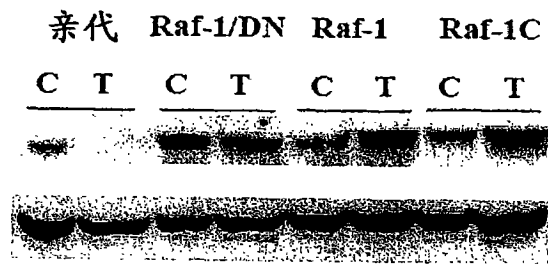


图 10C

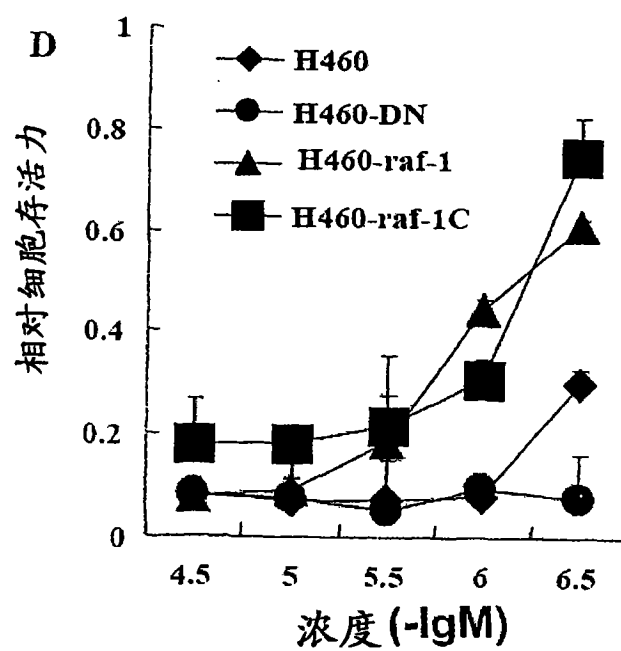


图 10D

昂克立新-1

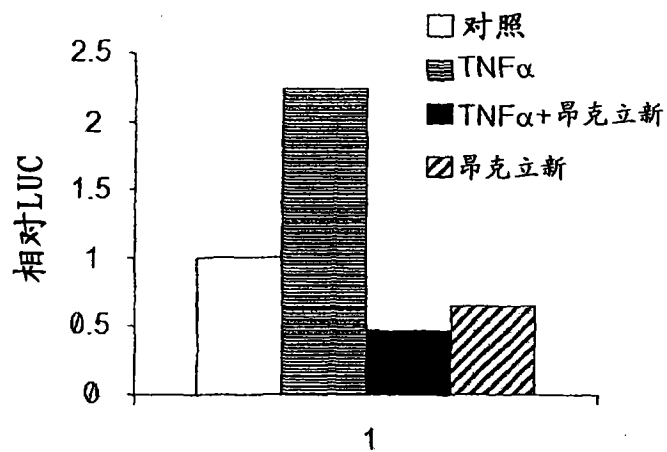


图 11A

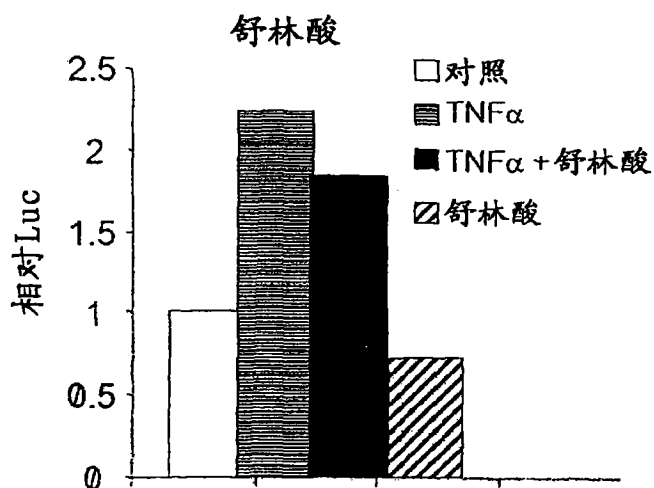


图 11B

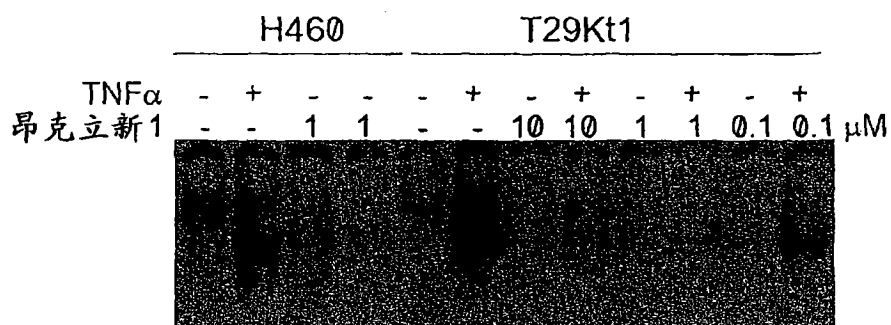


图 11C

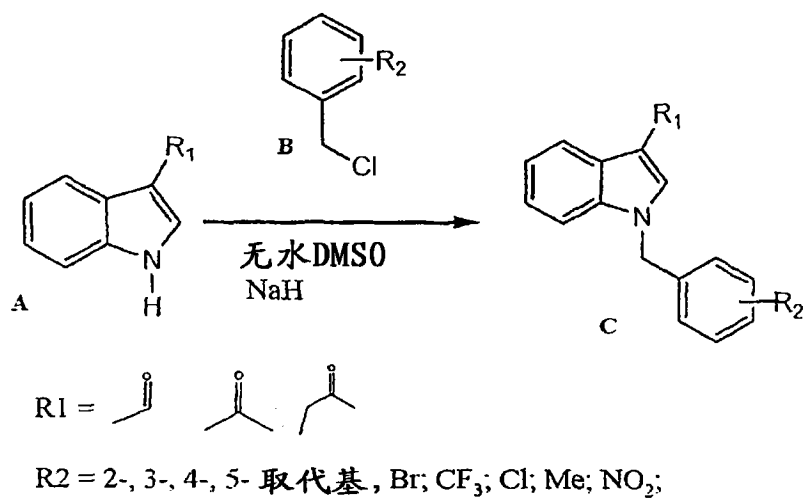


图 12

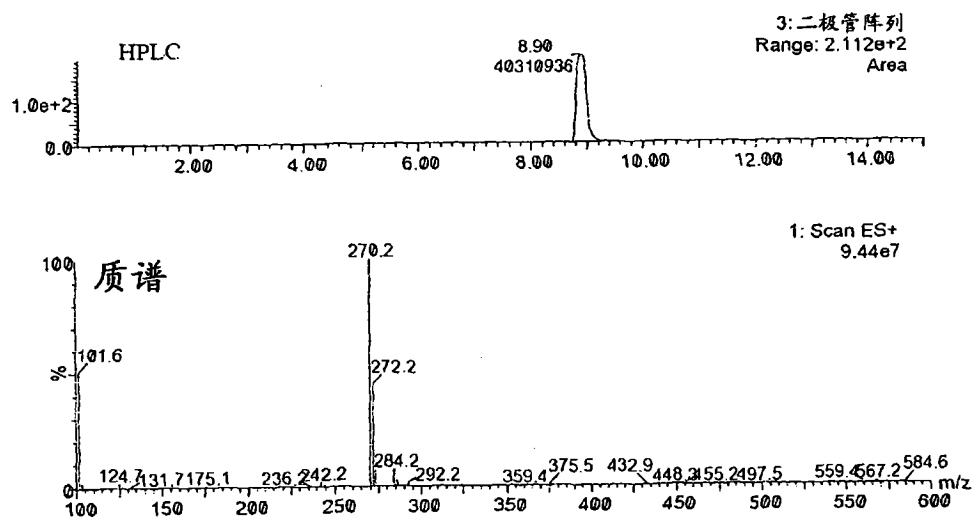


图 13A

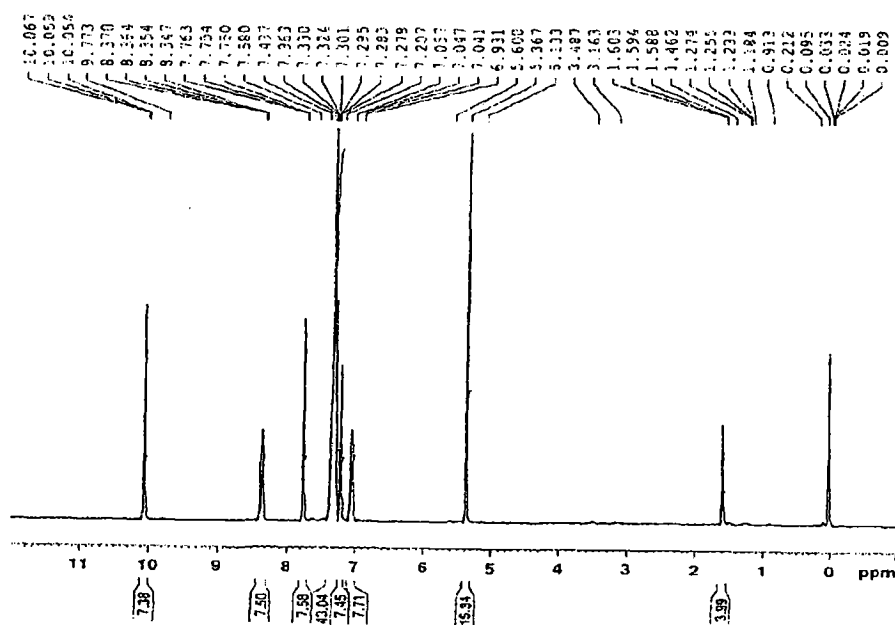


图 13B

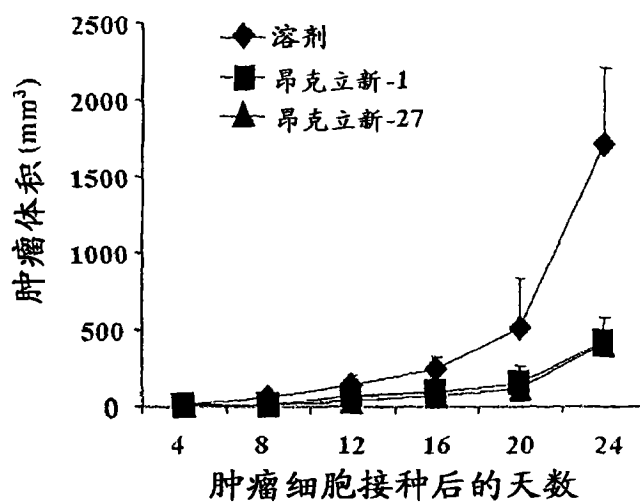


图 14A

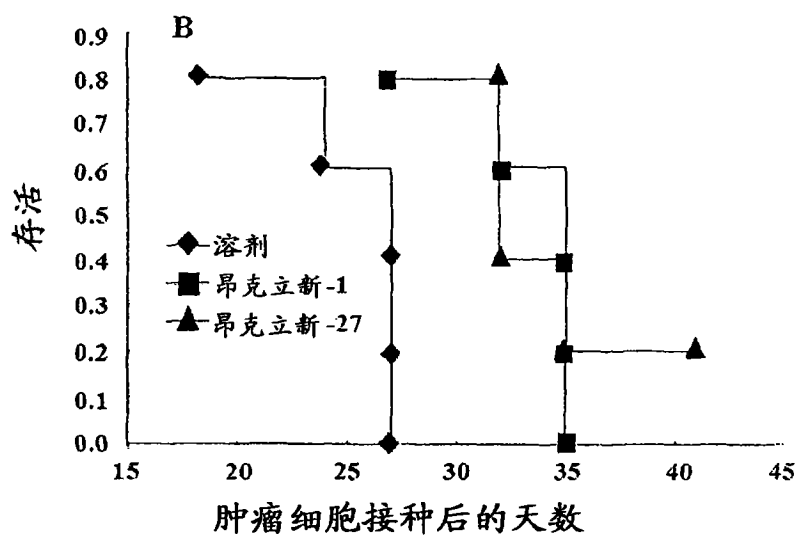


图 14B

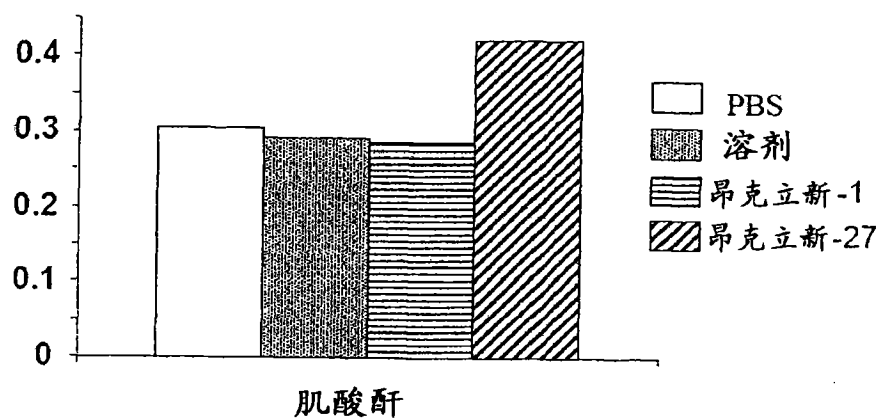


图 15A

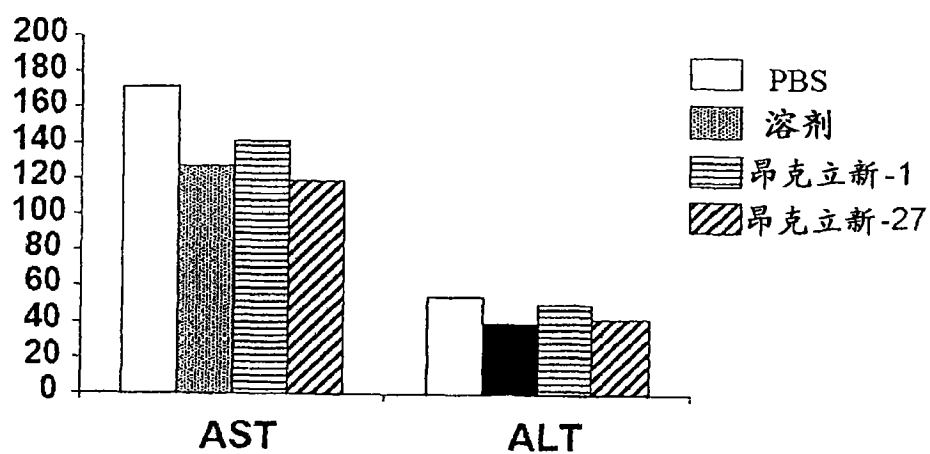


图 15B

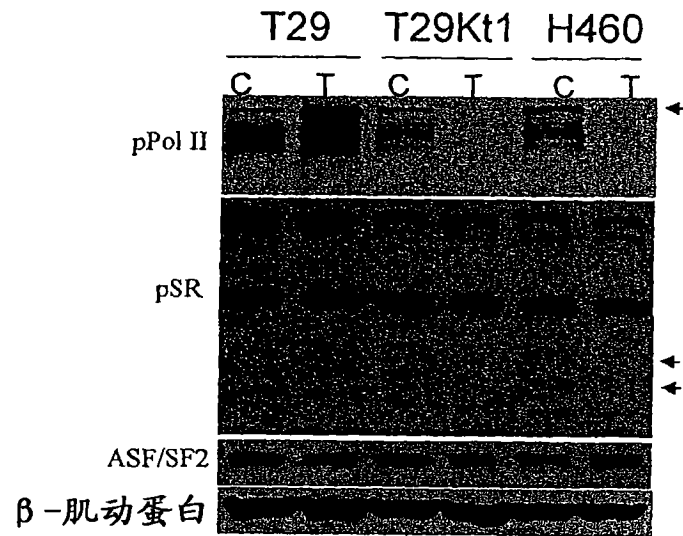


图 16A

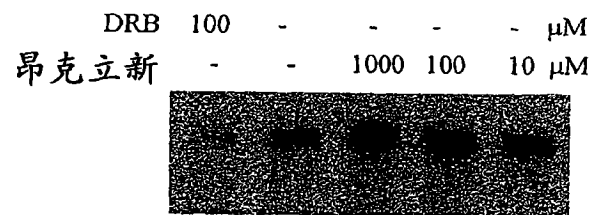


图 16B