

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580012495.9

[51] Int. Cl.

C07H 15/24 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

A61K 31/704 (2006.01)

C07D 315/00 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 5 月 2 日

[11] 公开号 CN 1956992A

[22] 申请日 2005.4.22

[21] 申请号 200580012495.9

[30] 优先权

[32] 2004.4.22 [33] SE [31] 0401066-6

[86] 国际申请 PCT/SE2005/000596 2005.4.22

[87] 国际公布 WO2005/103065 英 2005.11.3

[85] 进入国家阶段日期 2006.10.20

[71] 申请人 卡塔琳娜·爱德华兹

地址 瑞典乌普萨拉

共同申请人 斯特凡·舍贝里 约根·卡尔松

拉尔斯·耶达

[72] 发明人 卡塔琳娜·爱德华兹

斯特凡·舍贝里 约根·卡尔松

拉尔斯·耶达

[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

代理人 顾颂邈

权利要求书 5 页 说明书 23 页 附图 3 页

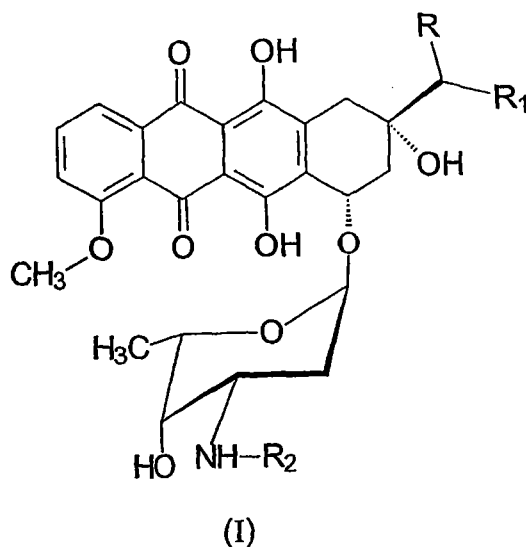
[54] 发明名称

蒽环类抗生素衍生物

[57] 摘要

本发明涉及新的蒽环类抗生素衍生物及其在癌症治疗和诊断中的应用。这些蒽环类抗生素衍生物可以是放射标记的，并用作癌症诊断中的显像剂。放射标记的蒽环类抗生素衍生物还可以和药物递送系统、特别是包括两步靶向策略的药物递送系统一起使用，用于治疗实体瘤和播散性瘤。这些药物递送系统可以有利地用于治疗 and 诊断乳腺癌。

1、蒽环类抗生素衍生物(药物前体)及其盐, 其具有通式 I,



其中:

R 是双键结合的氧原子, 两种立体异构形式的羟基, 或

R₁ 是 CH₃, CH₂OH,

R₂ 是 Y-Ar-Z 基团, 其中:

Y 是间隔分子如-(CH₂)_n-, 或是具有式-(CH₂CH₂O)_n-的聚乙二醇链, 其中 n 是 1-8;

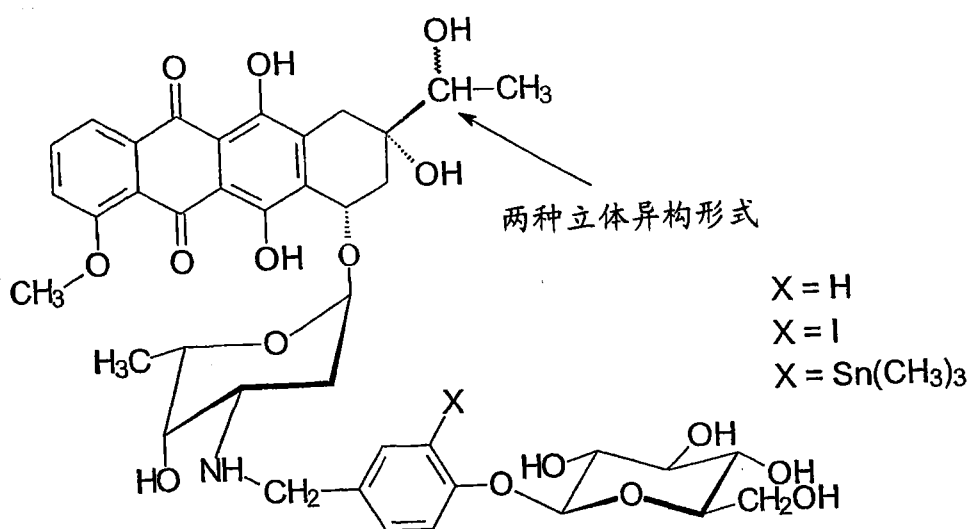
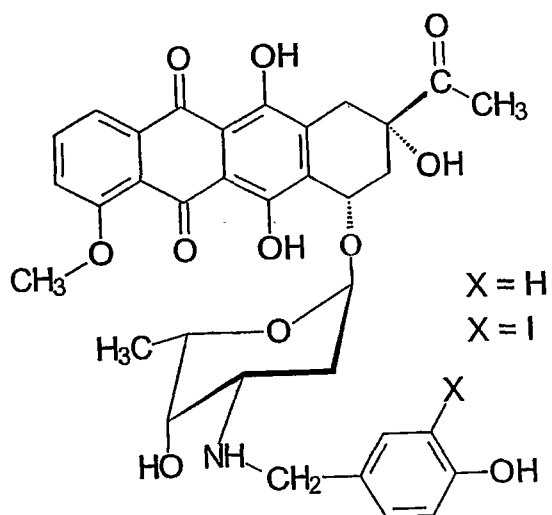
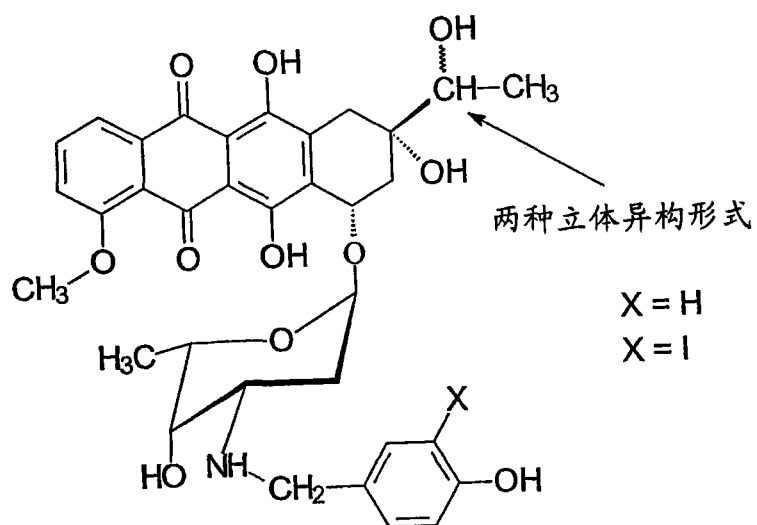
Ar 是常规的单环芳香基团或稳定的芳香硼笼型化合物, 其中常规的芳香残基含有能够使用亲电芳香取代或激活基团(例如三烷基甲锡烷基如三甲基甲锡烷基或三丁基甲锡烷基)被直接放射标记的取代基(如氢原子), 其可以与放射性核素交换或其含有卤素(例如, Br 或 I), 以使芳香残基能够经历卤素-卤素交换反应; 和

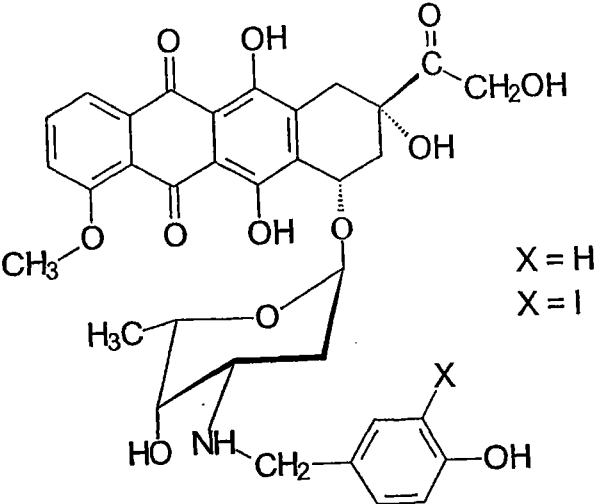
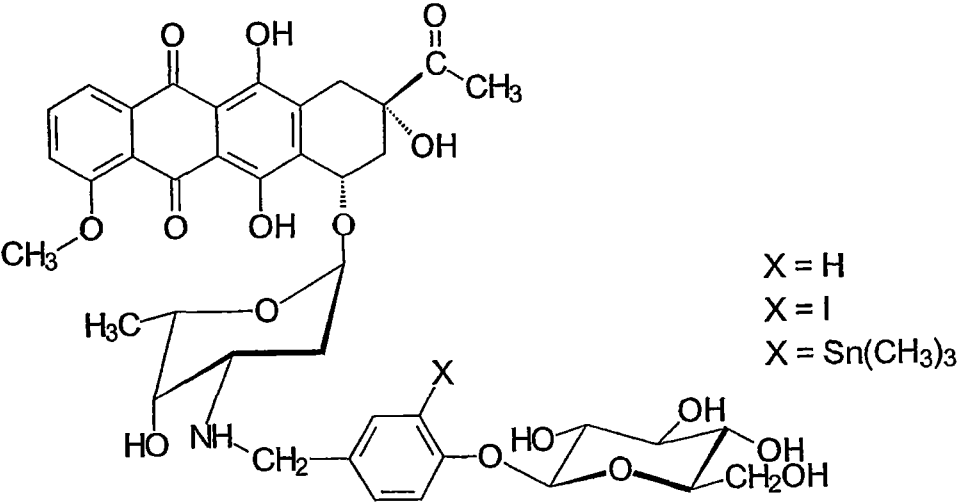
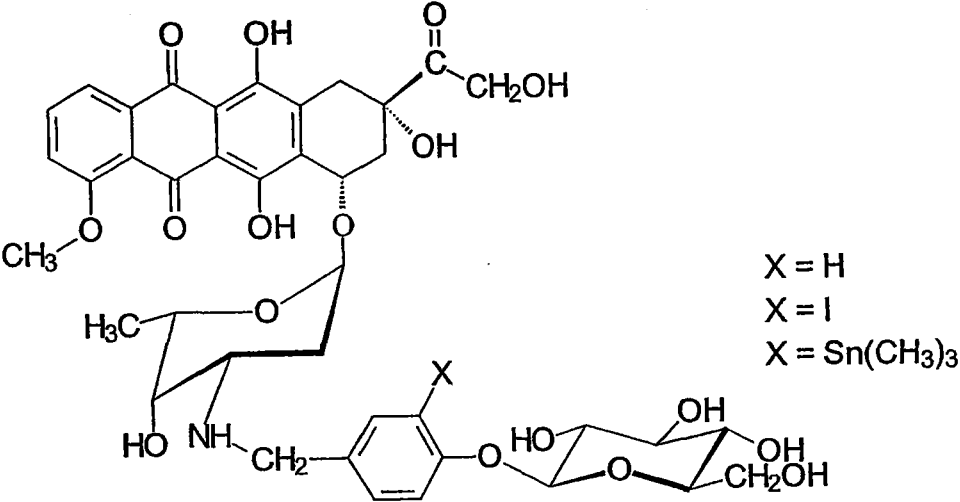
Z 任选是增加亲水性的化学基团, 如糖基。

2、权利要求 1 的蒽环类抗生素衍生物, 其中常规的单环芳香基团是苯基或吡啶基, 并且稳定的芳香硼笼型化合物是稳定的闭合-碳硼如 C₂H₁₂B₁₀。

3、权利要求 1-2 任一项所述的蒽环类抗生素衍生物, 其中衍生物

是:





4、含有权利要求 1-3 任一项定义的蒽环类抗生素衍生生物的放疗药物，其中所述蒽环类抗生素衍生物含有放射性核素，或可以被中子或光子外部辐射活化的稳定的核素。

5、权利要求 4 的放疗药物，其中放射性核素选自 $^{123-125}\text{I}$ 、 ^{131}I 、 ^{18}F 、 $^{76-77}\text{Br}$ 、 ^{211}At 、 ^{90}Y 、 ^{32}P 、 ^{67}Cu 和 ^{189}Re ，并且稳定的核素选自 ^{10}B 和 ^{157}Gd 。

6、权利要求 4-5 任一项的放疗药物作为用于癌症诊断的显像剂的用途。

7、权利要求 1-3 任一项的蒽环类抗生素衍生物或权利要求 4-5 任一项的放疗药物作为 DNA 靶向剂、即 DNA-相互作用剂的用途。

8、含有 DNA-相互作用剂的药物递送系统，所述 DNA-相互作用剂是权利要求 1-3 任一项所述的蒽环类抗生素衍生物或权利要求 4-5 任一项所述的放疗药物。

9、权利要求 8 的药物递送系统，其中该药物递送系统含有能够包裹或结合药用活性剂包括所述 DNA-相互作用剂的载体。

10、权利要求 9 的药物递送系统，其中所述载体是类脂载体如脂质体、聚合的载体如微凝胶，或类脂/聚合物的复合粒子。

11、权利要求 10 的药物递送系统，其中药物递送系统包括两步靶向，包括

(a) 于载体上提供的一种细胞-靶向试剂以靶向特异性细胞或组织；和

(b) 载体内部提供或与载体结合的 DNA-靶向剂 (DNA-相互作用剂) 以使放射性核素靶向细胞核。

12、权利要求 11 的药物递送系统，其中细胞靶向试剂选自配体、抗体和抗体片段。

13、权利要求 12 的药物递送系统，其中细胞靶向试剂包含表皮生长因子 (EGF) 或结合至肿瘤特异性突变 EGF 受体的分子。

14、用于癌症治疗和/或诊断的方法，包括给予有此需要的患者治疗有效量的权利要求 8-13 任一项所述的药物递送系统，随后当肿瘤已经被定位时，任选照射肿瘤区域的步骤。

15、用于治疗乳腺癌的方法，包括给予有此需要的患者治疗有效量的权利要求 8-13 任一项所述的药物递送系统，随后当肿瘤已经被定位时，任选地照射肿瘤区域的步骤。

16、用于播散性癌的癌症治疗方法，包括给予有此需要的患者治疗有效量的权利要求 8-13 任一项所述的药物递送系统，随后当肿瘤已经被定位时，任选地照射肿瘤区域的步骤。

17、用于过度表达 P-糖蛋白 (PGP) 的多药物耐药 (MDR) 肿瘤的癌症治疗方法，包括给予有此需要的患者治疗有效量的权利要求 8-13 任一项所述的药物递送系统，随后当肿瘤已经被定位时，任选地照射肿瘤区域的步骤。

蒽环类抗生素衍生物

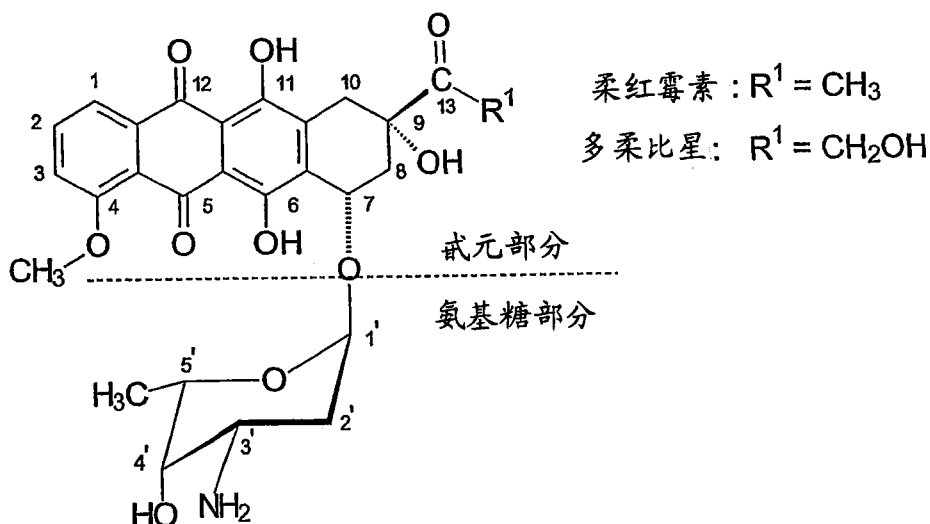
发明领域

本发明涉及新的蒽环类抗生素衍生物及其在癌症治疗和诊断中的应用。

发明背景

多柔比星 ($C_{27}H_{29}NO_{11}$; MW: 543.53), 缩写为 DOX, 还已知其它的名称如: 阿霉素或 adriablastine, 是蒽环类抗生素家族 (参见以下结构) 的一种抗生素和抗肿瘤药。DOX 最初从水生细菌波赛链霉菌 coesius 变种 (*Streptomyces peucetius* var. *coesius*) 中分离, 自 19 世纪 70 年代早期以来, 在当今临床上蒽环类抗生素尤其是多柔比星和柔红霉素, 以及烷化剂 (环磷酰胺、美法仑等) 是最通用和最频繁使用的化疗药 [1]。蒽环类抗生素是两亲分子, 由含一个醌-氢醌官能团的疏水甙元杂环和亲水的氨基糖部分 [2, 3] 组成。

柔红霉素和多柔比星的化学结构



多柔比星广泛地用于治疗骨和软组织肉瘤以及肺、乳房、甲状腺、膀胱、卵巢、睾丸、头和颈部的癌症[1, 4]。多柔比星还用于对抗白血病和淋巴瘤，但柔红霉素是对抗急性白血病的主要疗法。多柔比星的总的应答率，对于甲状腺癌是45%、对于淋巴瘤是41%，对于膀胱癌是33%，对于肉瘤是26%，对于卵巢癌是25%，对于白血病是24% [5]。

多柔比星具有复杂的作用机理，但是多柔比星和其它蒽环类抗生素的主要抗肿瘤活性源自它们嵌入DNA并阻断DNA-、RNA-和蛋白质-合成的能力。蒽环类抗生素还抑制拓扑异构酶II和削弱DNA修复[1, 5]。由于它们的醌-氢醌官能团，蒽环类抗生素还被认为与导致DNA损伤的自由基的生成有关[2]。蒽环类抗生素特异性地结合心磷脂，发现其是在心脏的线粒体和恶性细胞的膜上以高浓度存在的磷脂，这可以说明多柔比星的心脏毒副作用[1]。蒽环类抗生素具有窄的治疗指数，即给药剂量不得不在狭窄的限度之内，因为如果剂量太小药物不起作用，而剂量太大可能产生严重的副作用。多柔比星的急性剂量限制毒性是骨髓抑制、白细胞减少和口炎，它们存在于80%的接受治疗患者中。其它副作用包括脱发(100%)、恶心和呕吐(20-55%)、1-10%的患者有心脏毒性，即室上心律失常、心传导阻滞、室性心动过速，甚至充血性心力衰竭。

以前，蒽环类抗生素衍生物已经由例如 Pribe (2003) *Chemico-Biological Interactions* 145: 第349-358页、US-4 948 880、US-6 673 907 和 W000/56267 公开。这些衍生物在癌症治疗中具有细胞毒效应。

放射性核素治疗在癌症治疗中具有相对小但重要的作用，目前得到的关注日益增加。放射性核素治疗实施核辐射来消灭恶性细胞。辐射可以由中子激活之后的稳定的核素例如 ^{10}B 和 ^{157}Gd 产生或由放射性核素产生。最常使用的治疗用放射性核素、特别是对抗甲状腺癌是中间范围(800 μm) β -发射源(emitter) ^{131}I ，但是给予 ^{131}I 引起健康组织相当大的辐射损伤[6]。然而，由于这些副作用，短程

(short-range)、低能量 Auger 电子发射源如 ^{125}I 的治疗潜力得到日益增加的广泛认识。为了使 ^{125}I 在抗癌治疗中有效，不得不将其直接和选择性地传送到肿瘤细胞核，因为，除非 ^{125}I 在距 DNA 的几纳米范围内，否则 ^{125}I 是无毒的 [7]。因此 ^{125}I 疗法需要特殊的核递送方法，所述方法先前已采用 ^{125}I -标记的核苷、寡核苷酸、甾体激素类和生长因子达到目的，但是已经认识到需要改进 [7]。

Murali D. 和 DeJesus.O, Bioorganic & Medicinal Chemistry letters 8 (1998) 第 3419-3422 页描述了与多柔比星相比具有改善的细胞毒性的放射标记的柔红霉素衍生物。在文章中没有提出结果，这项研究的续篇还没有公开。

通过把细胞毒素剂包囊进结合小囊泡(脂质体)的膜并使肿瘤特异性抗体连接脂质体膜(靶向脂质体)，经脂质体的靶向药物递送使常规的癌症化疗的副作用如骨髓抑制、粘膜炎，心脏毒性、神经毒性和肾毒性的剂量限制副作用最小化 [1]。在血液中靶向脂质体是主动地和选择性地被过度表达靶向表面标记的肿瘤细胞吸收。然而，尽管有一些进展，这种对策迄今为止在化疗中没有产生显著的改进 [8]。

因此，强烈需要更有效的治疗药和治疗的对策。

发明概述

本发明涉及具有 DNA 嵌入特性的诊断和治疗药，而且涉及可以连结(coupled)核素的诊断和治疗药。本发明进一步涉及用于这些诊断或治疗药的药物递送系统以及使用该药物或药物递送系统的治疗和诊断方法。本发明期望用于癌症诊断和治疗。本发明的目标是特异性地递送核素进入肿瘤细胞核，从而以单一的两步靶向方法来联合放射性核素治疗、化疗和靶向脂质体药物递送的益处，使健康组织中的细胞毒副作用最小化。因此，本发明提供了一种采用新药物的新治疗策略，其比以前已知的化疗药物可能更有效。

蒽环类抗生素自身是有效的抗癌药。在本申请中，发明人已经合成柔红霉素(药物母体)的氨基-苄基衍生物，其具有与商业上成功的蒽

环类抗生素多柔比星和柔红霉素相似的细胞毒性特征。当本发明人用¹²⁵I 碘化药物前体时,他们得到了更有效地对抗培养的肿瘤细胞的放疗药。为了保护健康组织并选择性地递送放射性核素进入恶性癌细胞,¹²⁵I-偶联的柔红霉素衍生物可被包囊进入靶向脂质体,其用作肿瘤细胞的特异性药物递送载体。

在此描述的实验结果证实,本发明的治疗药可以成功地包囊进入靶向脂质体,并且该药物在实验性制备和测定条件下可以很好地保留。与肿瘤细胞温育后,上述药物以与多柔比星相似的亲和性到达并结合细胞核。当结合 DNA 时,放疗药引起 DNA 断裂,导致肿瘤细胞生长抑制比多柔比星和柔红霉素引起的肿瘤细胞生长抑制高几个数量级,而多柔比星和柔红霉素是当今临床上两种最成功的放疗药。

现有技术中没有记载本发明的药物前体或放疗药。

根据本发明的一个方面,提供了蒽环类抗生素衍生物,其用作放疗药的前体分子,下文中的将被称为药物前体。所述药物前体嵌入 DNA 并具有细胞毒性。因此,药物前体自身可以用于细胞或组织靶向的癌症治疗。蒽环类抗生素衍生物(药物前体)如在权利要求 1-3 所定义。

根据本发明进一步的方面,提供了放疗药,其可以用于细胞或组织靶向放疗。通过使药物前体连接核素或含核素的化学基团从所述前体产生放疗药。这样的核素可以是放射性核素、稳定的核素或核素,其可以通过暴露于中子或光子被激活,例如 ¹⁰B(作为富含硼的笼型化合物衍生物如闭合-碳硼邻-、间-或对-C₂H₁₂B₁₀的部分),下文中的将称为核素。放疗药如权利要求 4-5 所定义。

根据本发明的更进一步的方面,放疗药还可以用作癌症诊断的成像工具。作为成像工具的应用在权利要求 6 中定义。

根据本发明的更进一步的方法,药物前体或放疗药还可以用作 DNA 靶向剂,即作为如权利要求 7 中定义的 DNA-相互作用剂。

根据本发明的更进一步方面,这里还提供了药物递送系统。该系统优选包括能够包囊药物前体或放疗药(具有 DNA-相互作用性质)并指引药物特异性或优先地至靶向细胞群的载体。因此,细胞-和组织-

损害效应将优先地作用靶向细胞或组织。这样的药物递送系统可以包括单个-或多重-步骤的靶向策略。药物前体的 DNA-相互作用性质是 DNA-靶向步骤的基础，其引导它们的细胞毒效应至细胞核，或当核素偶联药物前体时，使由核素发射的放射性集中于细胞核中。因此这样的靶向步骤，下文中将称为 DNA-靶向步骤，显著地增加放疗药的治疗效果并减少对健康细胞和组织的损伤。

对于恶性组织和健康组织之间的差别，放疗药使用在其表面显示肿瘤细胞特异性靶向剂的药物递送系统定向于癌细胞或组织作为两步靶向策略中的细胞靶向步骤，下文中将其称为细胞靶向步骤。药物载体能够包裹或结合放疗药，并在全身给药后指引其转运至靶向细胞膜并优选跨过靶向细胞的膜。放疗药的细胞毒效应和/或放射性毒效应将因此局限于靶向细胞群。药物递送系统和权利要求 8-13 中所定义。

根据本发明的更进一步方面，还提供了一种诊断或治疗癌症的方法，包括给予有此需要的患者包含前体药物或放疗药的所述药物递送系统。除了用作对实体瘤的治疗之外，本发明还预想在摘除原发肿瘤后的系统循环中作为对抗转移性肿瘤细胞的治疗。所述治疗除了对播散性乳腺癌特别地有益外，还可对抗播散性卵巢癌、前列腺癌和结肠直肠癌。

当肿瘤的定位是已知的，该治疗方法还可以与随后的肿瘤辐射组合使用。使用稳定的核素和用中子或光子的外部辐照的激活完成局部的放疗。

本发明还可以有效治疗过度表达 P-糖蛋白 (PGP) 的多药物耐药 (MDR) 肿瘤，所述 P-糖蛋白是用于外来物的膜结合流出泵。在这种情况下，放疗药将靶向和放射损伤已知结合蒽环类抗生素的 P-糖蛋白。治疗方法在权利要求 14-17 中定义。

附图简述

图 1: 在 37°C 下，多柔比星在缓冲液或培养基中的保留，以及化合物 1 在缓冲液中的保留。

图 2: 装载化合物 1 的脂质体的冻结-递送显微成像。球状物表示脂质体并且脂质体内部的斑点表示结晶性化合物 1。

图 3: 在 37℃ 下与肿瘤细胞温育 1 小时后的 ^{125}I -化合物 1 的放射自显影。

图 4: 在冰上温育 2.5 小时后, ^{125}I -化合物 1 与游离 DNA 的结合。

图 5: 在装填含 U-343MGaC12:6 胶质瘤细胞 DNA 填料的琼脂糖凝胶中, ^{125}I -化合物 1-结合后的 DNA 断裂。在图中, a) 表示分子量标记 (*Scizosaccharomyces pombe*, Megabase DNA standard), b) 与 ^{125}I -化合物 1 温育的 DNA, c) 与 ^{125}I -化合物 1 和过量的多柔比星温育的 DNA, 和 d) 含有没有与 ^{125}I -化合物 1 温育的 DNA 的对照。

图 6: 用 0.5 ng/ml 的多柔比星、柔红霉素、化合物 1 或 ^{125}I -化合物 1 处理的肿瘤细胞的生长曲线。

发明详述

在此描述的药物衍生物预期以药物前体或偶联核素的形式作为有效的放射治疗的抗癌药和诊断成像工具用作癌症治疗。

然而它们的有用性可能受它们对于健康组织不加选择的细胞毒性危害。通过包囊药物进入脂质体或选择药物载体, 并通过将肿瘤特异性靶向试剂附加在脂质体或选择的药物载体表面来选择性靶向肿瘤细胞, 将使这个问题最小化。因此, 药物前体或放疗药预期与如美国专利号 6 562 316 中公开的两步靶向药物递送系统联合使用。这样的药物递送系统包含偶联细胞-靶向剂的载体, 从而在特异性地针对靶向细胞群或组织的细胞靶向步骤中指引药物递送系统。在 DNA-靶向步骤中, 通过它们与具有的 DNA-嵌入性质的分子的连接, 包囊的核素将定向于细胞核。在此描述的药物前体或放疗药将用作这种具有 DNA-嵌入性质的 DNA-靶向剂。

描述的两步靶向系统将使核素、药物前体或放疗药在健康组织中的细胞毒性最小化。两步靶向系统的进一步的优点是具有治疗转移性和/或多药物耐药肿瘤细胞的潜力。

药物载体可以是能够结合或包囊(enclose)药物活性剂即药物前体或放疗药的分子、聚集体或粒子。脂质体是目前优选的药物载体,而聚合的药物载体如微凝胶或类脂/聚合物复合粒子可以同样地或更好地适于某些应用。

用于两步靶向策略的细胞靶向步骤的靶向试剂选择性并高亲和力地结合肿瘤细胞。理想地,肿瘤特异性靶点是唯一地存在于肿瘤细胞表面的分子。然而,尚待发现存在于所有癌细胞但不存在于正常细胞的一般的肿瘤特异性标记,并且肿瘤细胞和正常细胞之间的相似性远远超过它们的差异。然而,在某些肿瘤细胞中存在特异性地过度表达的细胞表面标记。例如,与正常细胞相比,EGF(表皮生长因子)受体是在脑、膀胱、乳房和肺的肿瘤细胞中过度表达。因此,肿瘤中EGF的受体可以被靶向获得EGF-共轭的放射性核素或稳定的核素的高选择性。对抗靶肿瘤细胞的单克隆抗体也已被证明对肿瘤靶向是有效的。

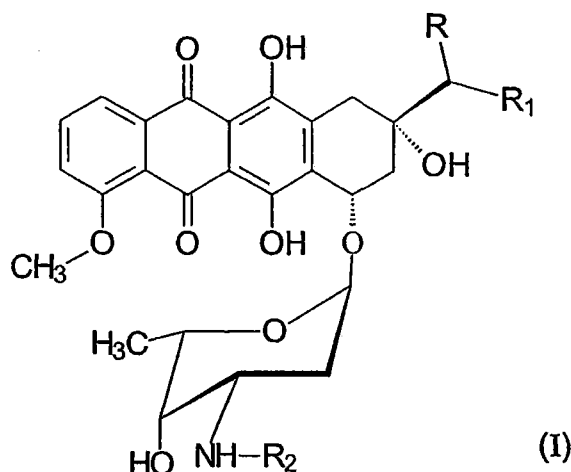
因此,用于细胞-靶向步骤的试剂优先选自含配体、抗体或抗体碎片的组,还可以包含表皮生长因子(EGF)或结合肿瘤特异性突变的EGF受体的分子。

上述的美国专利6 562 316中描述了第一步靶向试剂脂质体药物递送系统及其各自的制备。聚合的载体或类脂/聚合物载体的制备没有在本发明中公开,但是本领域技术人员从文献中将很容易获得相关的制备方案。

药物前体(DNA-靶向试剂)

用作DNA-靶向试剂的蒽环类抗生素衍生物(药物前体)应该具有DNA-相互作用性质或静电结合性质。DNA-嵌入剂特别适于作为DNA-靶向试剂,因为带有DNA分子的嵌入本身就产生治疗活性。

本发明的通式(I)的蒽环类抗生素衍生物如下所示:



其中

R 是双键结合的氧原子，两种立体异构形式的羟基，或

R₁ 是 CH₃，CH₂OH，

R₂ 是 Y-Ar-Z 基团，其中：

Y 是间隔分子如-(CH₂)_n-，或是具有式-(CH₂CH₂O)_n-的聚乙二醇链，其中 n 是 1-8；

Ar 是常规的单环芳香基团或稳定的芳香硼笼型化合物，其中常规的芳香残基含有能够使用亲电芳香取代或激活基团（例如三烷基甲锡烷基如三甲基甲锡烷基或三丁基甲锡烷基）被直接放射标记的取代基（如氢原子），其可以与放射性核素交换或其含有卤素（例如，Br 或 I），以使芳香族残基能够经历卤素-卤素交换反应；并且

Z 任选是增加亲水性的化学基团，如糖基，及其盐。

盐的实例如盐酸化物、氢溴化物、甲酸盐以及其它羧酸盐的盐。

常规的单环芳香基团优选苯基或吡啶基，稳定的芳香硼笼型化合物优选稳定的闭合-碳硼如 C₂H₁₂B₁₀。

本发明涉及所述药物前体（放疗药以其为基础）的立体异构的混合物，以及分离的立体异构体。

用于 DNA-靶向步骤的试剂必须：

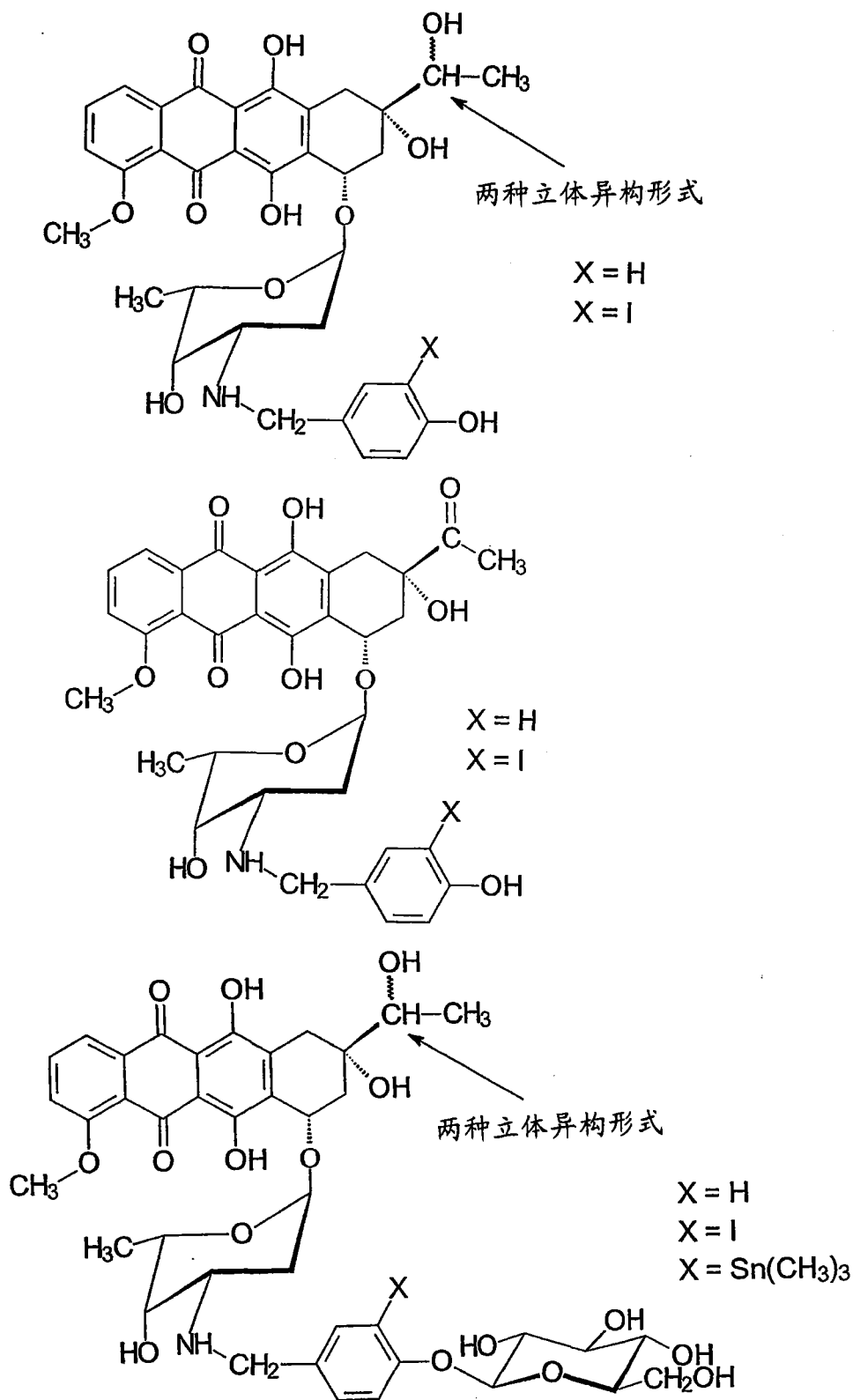
- 具有对核 DNA 的高亲和力，
- 具有许可有效地装载入载体的性质，
- 当包囊于（或结合至）载体时，生理学 pH 和离子强度显示最低限

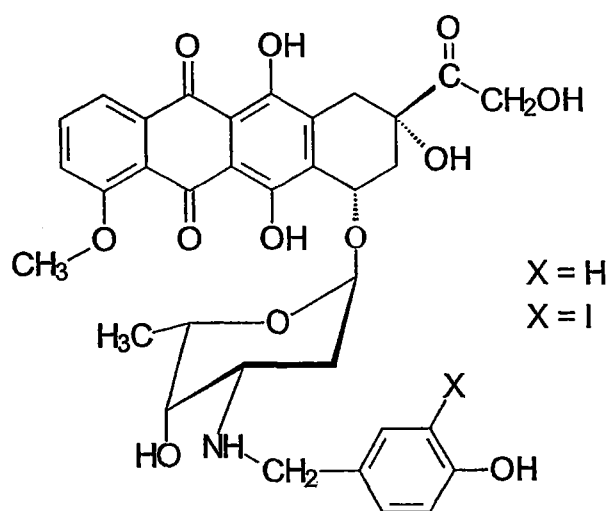
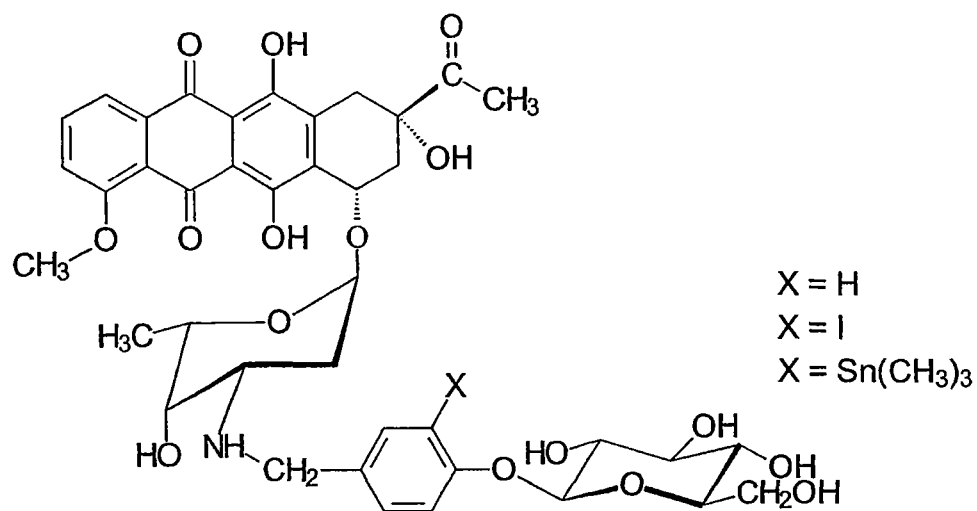
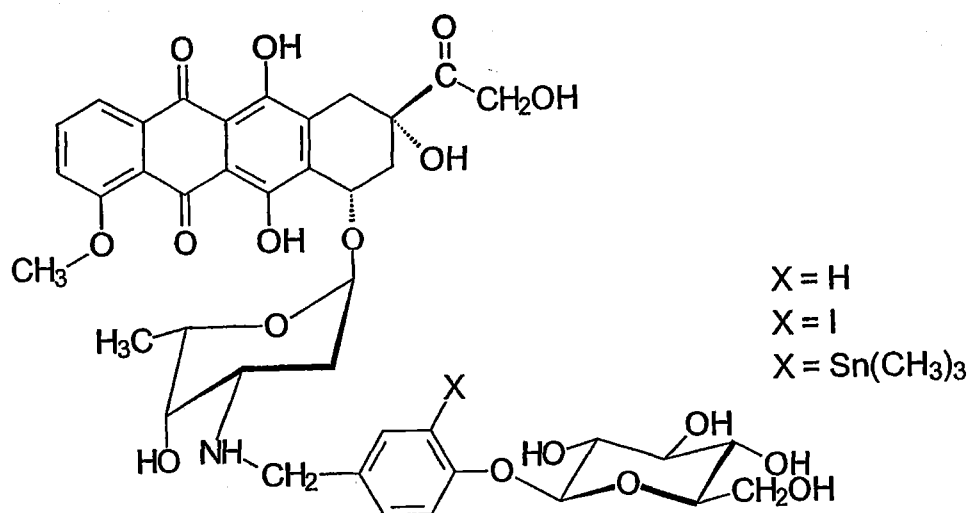
度的泄漏(或释放);

-具有从载体释放后能使试剂到达并结合核 DNA 的性质。

本发明的药物前体和放疗药物表现出这些特征。

药物前体的具体实例如下所示:





药物前体的合成

药物前体的合成遵循标准操作，并可以由本领域普通技术人员完成。药物前体的合成不是预期的保护范围的部分。

放疗药物

当使用本发明的放疗药物即偶联核素的药物前体时，大量的核素将递送至肿瘤细胞，并且这些核素将到达并与核 DNA 结合。每一种放射性衰变将导致核 DNA 损伤。因此，放疗药物在相同的浓度时将比它们的药物前体更有效。与放射性核素在细胞核外时的情形相比，当放射性核素集中于细胞核内时，DNA 损伤的量将至少高 10 倍。因此，大量的放射性核素递送至肿瘤细胞可以扩展从缓解到治愈的治疗范围。如果使用常规的细胞一步(没有 DNA-嵌入)靶向策略，似乎仅可能实现缓解治疗。

每种放射性核素具有不同的性质如半衰期和发射辐射的类型。本发明允许选择性地选择合适的核素用于特定类型的癌症或特定的临床问题。所选的放射性核素的物理半衰期必须与药物前体的生物半衰期相匹配。因此，放射性核素的发射特征匹配特定肿瘤的大小和定位是重要的。高能 β 发射源如 ^{90}Y 适于大肿瘤的治疗。其它核素、如 ^{131}I 发射低能量的 β 粒子并因此具有更短的放射范围，其使它们更适于较小的肿瘤甚至单一的肿瘤细胞。Auger 电子发射源如 ^{125}I 和 ^{123}I 发射行程仅约 1-2 μm 的粒子，因此必须位于癌细胞内部引起 DNA 损伤。 α 粒子发射源的范围通常在 50 和 70 μm 之间，并引起大量能量的局部沉积。

放射性卤素具有宽范围的物理半衰期和发射辐射的类型，其扩大了它们的应用范围。 β 发射源 ^{131}I 是在核素治疗中最常使用的放射性核素之一。正电子发射放射性卤素如 ^{18}F 、 ^{76}Br 和 ^{124}I 可以正电子发射体层摄影(PET)方式用于诊断目的。通过 PET 扫描，其允许组织的放射剂量测定和监测肿瘤体积的变化。

放射性卤素 ^{211}At 具有相对短的半衰期(7.2 小时)，并通过 α -粒子发射衰变。它是极其细胞毒性的，因此如果特异地递送至靶向细胞群，

可以是有效的治疗药物。

当掺入细胞核，Auger 电子发射源有效地杀死细胞。 ^{125}I (半衰期 60 天)、 ^{123}I (半衰期 13.2 小时) 和 ^{77}Br (半衰期 56 小时) 通过电子俘获接着发射 Auger 电子衰变。本专利申请中讨论的放疗药物尤其很好地适于偶联 ^{125}I 。 ^{125}I 是相对廉价、商业上广泛可得的，而且其相对长的半衰期适于在体外应用。 ^{123}I 也可以是用用于治疗应用的具有吸引力的候选者，因为其短的物理半衰期以及尤其因为除 Auger 电子之外其还发射 γ -辐射而允许成像。

具有短的辐射范围的放射性核素，例如 ^{125}I (Auger 辐射) 和 ^{211}At (α 粒子) 产生高的局部电离密度，并且现在看来最适于靶向单个细胞且对周围的健康细胞或组织造成的损伤最小。

放疗药物可以包括稳定的核素，其可以被中子或光子激活。稳定的核素 ^{10}B 没有细胞毒性。然而，如果富含 ^{10}B 的化合物选择性地定位于肿瘤细胞，然后用无毒的低能量的中子外部辐射细胞。这些中子是被产生激发态的 ^{11}B 原子的 ^{10}B 原子俘获，其瞬间衰变 (disintegrate) 成两个高细胞毒性粒子， α -粒子和 $^7\text{Li}^{3+}$ 离子。这些离子在组织中的范围大约分别是 $9\text{ }\mu\text{m}$ 和 $5\text{ }\mu\text{m}$ ，其接近一个细胞的直径。 ^{157}Gd 还可以接受中子激活。其它供选方案是稳定的碘或溴同位素，它们可以被光子激活。此外，这些同位素可以结合远程的 β -发射放射性核素，即 ^{131}I 、 ^{32}P 、 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 或 ^{189}Re ，产生适于较大肿瘤细胞聚集体的信道间的干扰辐射 (cross-fire radiation)。这些中子-或光子-激活的核素可以例如是采用闭合碳硼稳定的，即富含硼的笼型化合物如闭合碳硼邻-、间-或对- $\text{C}_2\text{H}_{12}\text{B}_{10}$ 。

本专利申请描述的放疗药物中的放射性核素优选 $^{123-125}\text{I}$ 、 ^{131}I 、 ^{18}F 、 $^{76-77}\text{Br}$ 、 ^{211}At 、 ^{90}Y 、 ^{32}P 、 ^{67}Cu 或 ^{189}Re ，且 ^{125}I 是特别优选的，稳定的核素优选 ^{10}B 和 ^{157}Gd 。

药物前体的放射性标记

用于放射性碘标记的所有药物前体含有芳香残基，并采用常规方

法如氯胺-T 方法用 ^{125}I 标记。通过芳香环的直接亲电取代或芳香环中的激活基团如三烷基甲锡烷基例如三甲基甲锡烷基或三丁基甲锡烷基的置换实施放射性标记。这些方法遵循标准操作，并可由本领域的普通技术人员实施。

实施例

为了试验本发明的药物前体或放疗药物是否可以用于药物递送系统，进行了以下实验。

实施例 1. 脂质体中的药物保留

脂质体的制备

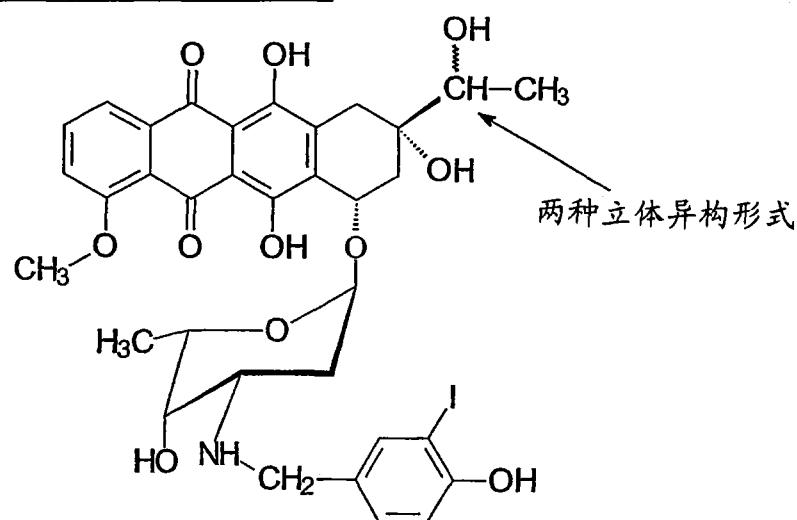
脂质体是由 1, 2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷脂酰基-胆碱 (DSPC)、胆固醇、1, 2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷脂酰基-乙醇胺-N-[甲氧基(聚-乙二醇)-2000 (DSPE-PEG₂₀₀₀)] 以 57: 40: 3 的摩尔比组成。脂质体通过类脂膜水合方法制得[9]。简要地，将胆固醇和类脂溶解在氯仿中。溶剂在温和的氮气流下蒸发，类脂膜在真空下干燥过夜。类脂膜用 300 mM 柠檬酸盐缓冲液 (pH 4) 水合 1 小时，在 60°C 20 mM 的类脂浓度下中等程度搅拌混合。脂质体在液氮中反复冷冻，挤出前在 60°C 下解冻 5 次。使用 Avanti 微挤出机 (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL)，通过两个层叠的聚碳酸酯膜滤器 (Whatman Inc. Nucleopore, Newton, MA) 10 次挤出脂质体，所述的聚碳酸酯膜滤器在室温下具有 100 nm 的孔径。

药物包囊

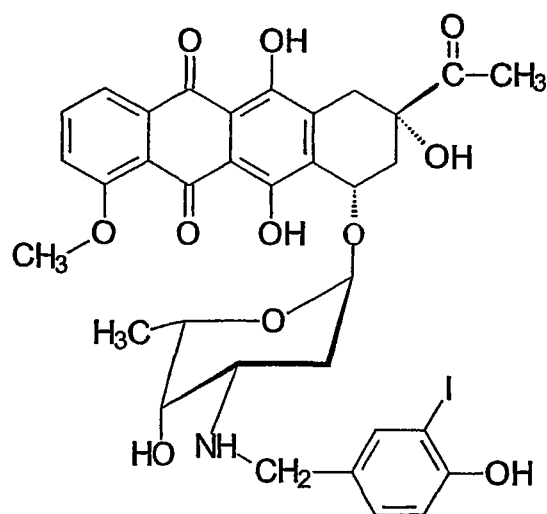
采用 Mayer 等人的 pH-梯度驱动装载方案，将结构如下所示的化合物 1 (3'-N-(4-羟基-3-碘代苄基)-13-(R/S)-二氢柔红霉素、立体异构的混合物) 和化合物 2 (3'-N-(4-羟基-3-碘代苄基)柔红霉素)，或多柔比星 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 包囊进入脂质体。跨过脂质体膜的 pH 梯度是由外囊泡 (extravesicular) 300 mM 柠檬酸

盐缓冲液 (pH 4) 和 20 mM 的 N-[2-羟基乙基]哌嗪-N'-[2-乙磺酸] (HEPES) 缓冲的 150 mM 盐水 (HBS) (pH 7.5) 在 Sephadex G-50 柱上交换产生。将多柔比星以 1 mM 的浓度溶解在 HBS 中。化合物 1 以 0.5 mM 的浓度溶解在 10% (wt/vol) 的蔗糖溶液中。化合物 2 不能以 0.5 mM 的浓度完全溶解在 10% (wt/vol) 的蔗糖溶液中, 而当加入脂质体且药物包囊进入脂质体时, 其可以溶解。将预热的药物溶液以 0.2 的药物-对-脂质的摩尔比加入脂质体中。混合物在 60℃ 下温育 15 分钟, 期间使用涡旋装置间歇混合, 使 100% 的药物包囊。

化合物 1 和 2 的化学结构



化合物 1



化合物 2

靶向配体曲妥单抗与装载药物的脂质体连接

a) ^{125}I -曲妥单抗与 DSPE-PEG₃₄₀₀ 的缀合

1, 2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷脂酰基-乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-3400 (NHS-DSPE-PEG₃₄₀₀) 的 N-羟基琥珀酰亚胺基酯用 ^{125}I -曲妥单抗溶液以 0.1:6 的摩尔比在 60℃ 下水合 5 分钟。放射标记的曲妥单抗用于示踪脂质体。NHS-DSPE-PEG₃₄₀₀ 的浓度大约是 0.2 mM。所述混合物在室温搅拌下温育 1 小时。通过在带有 HBS (pH 7.4) 的 Sephacryl S-300 柱上的凝胶过滤从 ^{125}I -曲妥单抗-DSPE-PEG₃₄₀₀ 中除去未结合的曲妥单抗。

b) ^{125}I -曲妥单抗-DSPE-PEG₃₄₀₀ 向脂质体的转移

在 60℃ 下, 将 ^{125}I -曲妥单抗-DSPE-PEG₃₄₀₀ 与装载药物的脂质体以 1:33 的摩尔比混合 1 小时。通过在带有 HBS (pH 7.4) 的 Sepharose CL-4B 柱上的凝胶过滤从脂质体中除去未掺入的 ^{125}I -曲妥单抗-DSPE-PEG₃₄₀₀。

药物保留的测定

在 37℃ 或 60℃ 下温育脂质体。在选择的时间间隔内, 取出三份等分试样, 通过在带有 HBS (pH 7.5) 的 Sephadex G-50 微-柱上在 680g 的离心力场持续 2 分钟除去未包裹的药物。洗脱液的体积用 HBS 调节至 1 ml, 并加入 1 ml 的 1% 的 Triton X-100 溶液。样品加热到 90℃ 并冷却至室温。在 468 nm 的激发波长和 589 nm 的发射波长下测定样品的荧光强度。与温育前包裹药物的量相比, 测定温育后包裹药物的百分比。

负载脂质体的低温传送电子显微术 (Cryo-TEM)

简而言之, 在受控的温度(25℃)和湿度条件下, 将脂质体样品转移至定制构建的环境室中用穿孔的聚合物薄膜涂覆的铜网栅上, 以使水蒸发最小化。通过在滤纸上抽吸除去过量的样品。薄(10-500 nm)的样品薄膜浸入-165℃的液体乙烷中成玻璃状, 并在氮气和-165℃下转移进 Zeiss EM 920A 传送电子显微镜(Carl Zeiss Inc., Oberkochen, Germany)。将样品暴露于 $5-15\text{e}^-/\text{\AA}^2$ 的电子密度下, 并在零损耗的明亮场模式(zero-loss bright field mode)下使用 80 kV 的加速电压得到成像。

结果和讨论

当在 37℃ 下介质中温育 24 小时后, 大约 80% 的多柔比星和多于 90% 的化合物 1 保持包囊在脂质体中(图 1)。这些结果表明, 在所述的脂质体制备和细胞培养条件下, 多柔比星和化合物 1 将不从脂质体中显著地释放。

含 ^{125}I -曲妥单抗-DSPE-PEG₃₄₀₀ 并装载化合物 1 的脂质体的 Cryo-TEM 成像(图 2)证实, 化合物 1 在脂质体内部为结晶状态。

实施例 2. DNA 结合

实施例 2a

细胞培养

在 37℃ 并加湿的 5% 的 CO₂ 温育箱中, 采用含有 10% 的胎牛血清、谷氨酰胺(2 mM)、链霉素(100 μg/ml)和青霉素(100 IU/ml)的 Ham's F-10 培养基(Biochrom AG, Berlin, Germany), 将人的培养的肿瘤细胞过度表达生长为单层培养物。

DNA-结合

培养的人肿瘤 A431 细胞(鳞癌)在载玻片上生长, 冷却至 4℃, 用磷酸盐缓冲液洗涤。细胞在-20℃下的甲醇中灭活 15 分钟, 然后在 4℃ 下快速地用磷酸盐缓冲液洗涤。此后, 细胞在 4℃ 下通过丙酮透化

(permeablise) 处理 10 秒。干燥后, 细胞与 ^{125}I -化合物 1 在室温下温育 1 小时, 洗涤, 并采用伽马计数器 (1480 Wallac Wizard, Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA) 进行放射性分析。此外, 通过荧光显微镜检查细胞。

结果和讨论

当培养的透化的人肿瘤 A431 细胞 (鳞癌) 与 ^{125}I -化合物 1 在室温下温育 1 小时后, 扣除本底后, 在 $21.2 \pm 3.7 \times 10^3$ cpm/ 10^5 细胞中测定结合细胞的化合物 1 的特异性放射性。可以使用过量的多柔比星阻断结合。

荧光显微术显示, 化合物 1 结合细胞核, 且未处于细胞质内部。使用人膀胱癌 T24 细胞和人胶质瘤 U343 细胞重复荧光显微实验, 得到相似的结果。

实施例 2b

琼脂糖填料

将 InCert 琼脂糖 (BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME) 溶解于不含血清的培养基中, 至最终浓度为 1%。将 1 ml 的琼脂糖溶液与 1.5×10^6 U-343 的细胞混合, 并使 20 μl 的填料在塑料模具中铸塑, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下冷却 30 分钟。将填料浸没在 50 $^{\circ}\text{C}$ 的溶胞缓冲液 (1 mg/ml 的蛋白水解酶 K、10 ml 0.5 M 的 $\text{Na}_3\text{-EDTA}$ 中的 2% 的十二烷基肌氨酸钠、pH 8.0) 中过夜获得纯 DNA。溶胞后, 填料用 0.5 M 的 $\text{Na}_3\text{-EDTA}$ 洗涤 2 次, 除去细胞碎片。将填料保存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 的 0.5 M 的 $\text{Na}_3\text{-EDTA}$ 中。不含 DNA 的填料作为对照。琼脂糖填料与 600 μl 的含 ^{125}I -化合物 1 的溶液温育 3 小时, 一式两份。对照填料含有浓度为 3×10^{-5} M 的过量多柔比星。 ^{125}I -化合物 1 的最终浓度是 4×10^{-7} M (在 dH_2O 中)。温育并在冰上彻底淋洗后, 使用伽马计数器测定填料中剩余的放射性。

放射自显影术

在 37℃ 下的浓度为 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 的培养基 (0.3 kBq/ng) 中, 将 SKBR-3 培养的乳腺癌细胞用 ^{125}I -化合物 1 温育 1 小时。温育后, 细胞用不含血清的培养基洗涤 6 次, 并用 1 ml 的胰蛋白酶/EDTA (PBS 中 0.25 % / 0.02 %, Biochrome, Berlin, Germany) 分离 (detach) 10 分钟。细胞用 14 ml 的培养基再悬浮, 并转移至离心管中。以 1200 rpm 离心细胞 5 分钟得细胞小球。该细胞小球用甲醛缓冲液 (0.01 M 的磷酸盐缓冲的甲醛 (4 %), Histolab Products AB, Göteborg, Sweden) 在 4℃ 下固定 1 周。此后, 通过以下步骤使细胞小球脱水: 2 x 15 分钟的 70 % EtOH, 30 分钟的 90 % EtOH、2 x 15 分钟的 95 % EtOH, 2 x 15 分钟 99 % EtOH 和 3 x 20 分钟 Historesin 浸润液 (Leica Instruments GmbH, Heidelberg, Germany)。包埋入含激活剂的 Historesin 的过夜后, 从小球切下 4 μm 的切片并转移到载玻片。将载玻片在黑暗中浸在 Kodak NTB 照相乳液 (Eastman Kodak Company, Rochester, N. Y., USA) 里, 贮存前在 4℃ 下干燥 3 天。载玻片用 Kodak D19 溶液显影 3 分钟, 其后转移至 0.1 % 的乙酸中 10 秒, 并用 Kodak 定影剂固定 5 分钟, 所有的操作都在黑暗中进行。用水放大冲洗后, 细胞核用 Mayer 苏木精 (Histolab Products AB, Göteborg, Sweden) 染色 3 分钟。在用 Pertex (Histolab Products AB, Göteborg, Sweden) 装片前, 载玻片用水洗涤 5 分钟并使其在空气中干燥。在显微镜中检查细胞, 俘获代表性的细胞影像。

结果和讨论

化合物 1 和细胞核的结合可以通过 ^{125}I -化合物 1 的放射自显影 (图 3) 来证实, 因为 ^{125}I 的染色式样是用苏木精-染色的细胞核的共局限化 (co-localized)。

当含有 U-343 细胞 DNA 的琼脂糖填料用 ^{125}I -化合物 1 溶液温育 3 小时后, ^{125}I -化合物 1 在琼脂糖填料中蓄积。因此, 蓄积以及 ^{125}I -化合物 1 与 DNA 的结合可以被过量的多柔比星阻断。结果证实了化合物

1 对 DNA 的亲合力。¹²⁵I-化合物 1 与 DNA 结合可以被多柔比星代替的事实(图 4)提示, 化合物 1 和多柔比星占据相同的 DNA 结合位点。

实施例 2c

脉冲场凝胶电泳(PFGE)

为了研究 ¹²⁵I-化合物 1 诱导 DNA 损伤的效率, 通过脉冲场凝胶电泳(PFGE, Phannacia Biotech, Uppsala, Sweden)分析双链断裂(dsb)的诱导(induction)。按照上述方法将琼脂糖-填料与 ¹²⁵I-化合物 1 进行温育。洗涤后, 填料在 4℃下保持 8 天。然后, 将填料装入 0.8% (w/v) 的琼脂糖凝胶(Seakem Gold agarose powder, Cambrex Bio Science Rockland Inc., Rockland, ME, USA)中。根据以下的实验方案, 在 2 V/cm 下通过脉冲场凝胶电泳分析 DNA-断裂 45 小时: 10 分钟脉冲(即, 每 10 分钟给予场以脉冲)3 小时, 20 分钟脉冲 5 小时 20 分钟, 30 分钟脉冲 8 小时, 40 分钟脉冲 9 小时 20 分钟和 1 小时脉冲 20 小时。通过凝胶后, 其用菲啶溴红(0.5 μg/ml)染色 8 小时, 再于 dH₂O 中脱色过夜。作为分子量标记, 使用 *Scizosaccharomyces pombe*、Megabase DNA 标准品(Cambrex Bio Science Rockland Inc., Rockland, ME, USA)。每条泳道切成 2 段, 相当于分别具有大小等于或小于 5.7 Mbp 和等于或大于 5.7 Mbp 的 DNA 碎片。将每段放入小瓶中, 并用先前提到的自动伽马计数器测定放射性。测定小于 5.7 Mbp 的 DNA 的碎片(fraction), 然后采用 Blöcher 公式计算:

$$F_{<k}=1-e^{-rk/n}(1+rk/n(1-k/n)) \quad (\text{Int J Rad Biol 57, 7-12, 1990})$$

$F_{<k}$ 是小于 K 碱基对的 DNA 碎片, r 是 dsb/染色体的平均数, n 是一个平均大小的染色体中碱基对的总数, k =在此项测定中使用 5.7 Mbp; 对于平均人染色体, $n=130$ Mbp。

为了获得双链断裂(r)的数目, 所述公式不得不从数字上来解决。

结果和讨论

在大约 0.4 dsb/衰变下, 测定 ¹²⁵I-化合物 1 与胶质瘤细胞 DNA 温

育后的双链断裂(dsb)的数目(图5)。因此,当偶联化合物1时, ^{125}I 的定位足够接近DNA以引起DNA断裂,因为 ^{125}I 不结合DNA将不能导致DNA断裂。作为比较,使用 ^{125}I -标记的DNA-前体分子,其导致核素直接掺入DNA链,得到约1 dsb/衰变的dsb值。dsb值上的差异相对小,其表明核素必须在距离DNA非常短的距离内(为了使辐射有所述作用)并且已发生DNA-嵌入。

实施例 2d

类型1小牛胸腺DNA钠盐(Sigma-Aldrich Co., St Louis, M. O., USA)在BPES缓冲液(6 mM Na_2HPO_4 , 2 mM NaH_2PO_4 , 1 mM EDTA, 185 mM NaCl, pH 7)中、在浓度为约2 mg/ml下水合,在置于冰上的水浴中的MSE Soniprep 150 超声粉碎机(Integrated Services TCP Inc., Palisades Park, N. J., USA)中,在约8 μA 下声处理30分钟。然后样品使用 Slide-A-Lyzer[®] 透析盒(10,000 MWC0) (Pierce, Rockford, I. L., USA)透析48小时除去BPES。在260nm的波长下,使用12,824 M (bp)⁻¹ cm⁻¹的消光系数,通过HP8453分光光度计(Hewlett-Packard Company Houston TX., USA)分光光度测定最终的DNA浓度。

在室温下,通过SPEX 1680 Fluorolog 荧光分光光度计(SPEX Industries Inc., Edison, N. J., USA)进行荧光滴定实验, $\lambda_{\text{ex}}=480\text{nm}$ (载玻片厚度2.5 mm)且 $\lambda_{\text{ex}}=592\text{ nm}$ (载玻片厚度2.5 mm)。最初的游离药物浓度是1 μM 。在不存在(I_0)和存在DNA(I)的情况下,通过测定研究的化合物的荧光强度比,根据下式计算游离药物的浓度(C_f (M)):

$$C_f = C_T (I/I_0 - P) / (1 - P) \quad (\text{Biopolymers } 6, 1225-1235, 1968)$$

其中, C_T (M)是最初的药物浓度, P 是完全结合的药物(I_{min})和游离药物($P=I_{\text{min}}/I_0$)的观察到的荧光强度的量子产率(quantum yield)之比。通过 C_T 和 C_f 之间的差异计算结合药物的浓度。通过绘制 r/C_f 对 r (Scatchard曲线),计算结合常数(K_1)和排斥参数(n),其中 r 是每摩尔DNA碱基对的结合药物的摩尔数。使用下列算法计算邻近排斥模型

的理论曲线:

$$r/C_f = K_i (1-nr) [(1-nr) / [1-(n-1)r]]^{n-1} \quad (\text{J. Mol. Biol. 86, 469-489, 1974})$$

其中 K_i (M^{-1}) 是固有结合常数, n (碱基对) 是排斥参数。参数 K_i 和 n 是变化的, 以产生最接近拟合的 (fitted) 实验数据的理论曲线。

表 1 (下文) 显示了柔红霉素、多柔比星、化合物 1 和化合物 2 与小牛胸腺 DNA (CT DNA) 的结合常数 (K_i) 和排斥参数 (n)。括号中的值表明平均值的标准差 (SEM) ($n=3$)。^a= $p<0.05$ 对柔红霉素。^b= $p<0.05$ 对化合物 2。平均值之间的差异通过方差的单向分析接着通过 Student Newman-Keuls 检验进行检验。

文献值

柔红霉素 K_i : $0.7 \times 10^6 M^{-1} \pm 0.07$, n : 3.5 碱基对 ± 0.35 (Chaires, 等人. (1982) Biochemistry 21, 3933-3940)。多柔比星 K_i : $3.3 \times 10^6 M^{-1}$, n : 3.8 碱基对 (Messori 等人. (2001) Bioorg. Med. Chem. 9, 1815-1825)。

表 1: : 多柔比星、柔红霉素、化合物 1 和化合物 2 的结合常数和排斥参数。

药物	K_i ($K_i \times 10^6 M^{-1}$)	n (碱基对)
柔红霉素	0.7 (0.05)	3.6 (0.17)
多柔比星	3.2 ^a (0.64)	3.9 (0.23)
化合物 1	3.3 ^a (0.11)	3.4 (0.21)
化合物 2	3.0 ^a (0.65)	3.7 (0.31)

结果和讨论

化合物 1 和化合物 2 的 CT DNA 结合常数和排斥参数与多柔比星的 CT DNA 结合常数和排斥参数的相似性证实了柔红霉素的衍生化没有引

起 DNA-结合性质的损失(表 1)。相反,化合物 1 和化合物 2 的结合常数高于母体化合物柔红霉素的结合常数。

实施例 3. 毒性

生长曲线

将 ^{125}I -化合物 1、化合物 1、多柔比星或柔红霉素溶于培养基至浓度为 0.5 ng/ml。 ^{125}I -化合物 1 的特异活性是 100 kBq/ng。将 SKBR-3 细胞与药物在 60mm 塑料 Petri 培养皿中温育 2.5 小时,一式三份。用常规培养基温育对照细胞。温育后,从所有培养皿中除去培养基,并且细胞用不含血清的培养基洗涤 6 次。在 37℃ 下通过加入 0.5ml 的胰蛋白酶/EDTA 10 分钟使细胞从培养皿中分离。在再悬浮于 1 ml 培养基后,用库尔特粒度仪(Z2 库尔特粒度仪, Beckman Coulter)计数细胞,传代培养至 10^5 细胞以得到生长曲线。每次传代培养后因细胞的损失校正生长曲线。

结果和讨论

培养的 SKBR-3 细胞单层的生长曲线揭示,与用化合物 1、多柔比星或柔红霉素温育之后的细胞毒效应相比,浓度低至 0.5 ng/ml 的 ^{125}I -化合物 1 的细胞毒效应高几个数量级(图 6)。后者化合物中没有任何显著的细胞毒效应。因此, ^{125}I -化合物 1 所显示的细胞毒效应是由附着化合物 1 的核素 ^{125}I 独自引起的。

参考

[1] B. A. Chabner, C. E. Meyers (1982) in Cancer: Principles and practice of oncology (DeVita Jr. V. T., S. Hellman and S. A. Rosenberg, eds.), 第 156-197 页, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, Toronto.

[2] H.G. Keizer, H. M. Pinedo, G.J. Schuurhuis, H. Joenje, Doxorubicin (adriamycin) : A critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity, *Pharmaceutics and Therapeutics* 47 (1990) 219-231.

[3] J. Bouma, J. H. Beijnen, A. Bult, W.J.M. Underberg, Anthracycline antitumour agents, *Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition* 8 (1986) 109-133.

[4] C. P. Association, Compendium of pharmaceuticals and specialities, Vol. 13, CK Productions, Toronto, 1995.

[5] R. H. Blum, S. K. Carter, Adriamycin. A new anticancer drug with significant clinical activity, *Ann Intern Med* 80 (1974) 249-59.

[6] M. N. Gaze, The current status of targeted radiotherapy in clinical practice, *Phys Med Biol* 41 (1996) 1895-903.

[7] J.A. O'Donoghue, T. E. Wheldon, Targeted radiotherapy using auger electron emitters, *Phys Med Biol* 41 (1996) 1973-92.

[8] S. Kim, Liposomes as carriers of cancer chemotherapy. Current status and future prospects, *Drugs* 46 (1993) 618-38.

[9] (M. J. Hope, M. B. Bally, G. Webb, and P. R. Cullis (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 812: 55-65).

图1

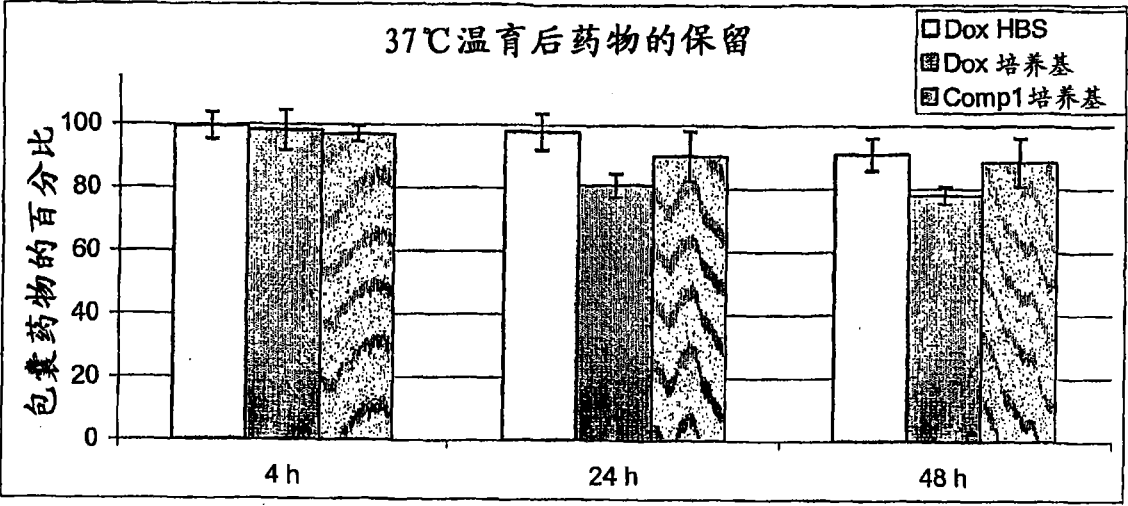


图2

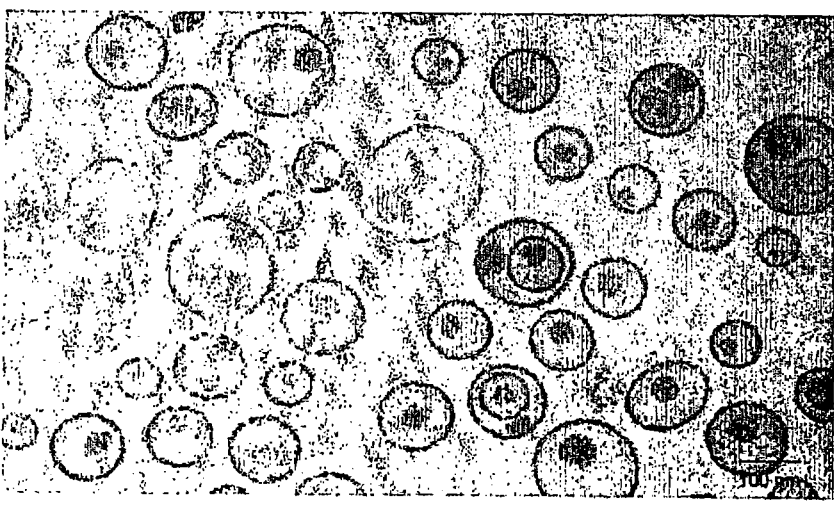


图 3

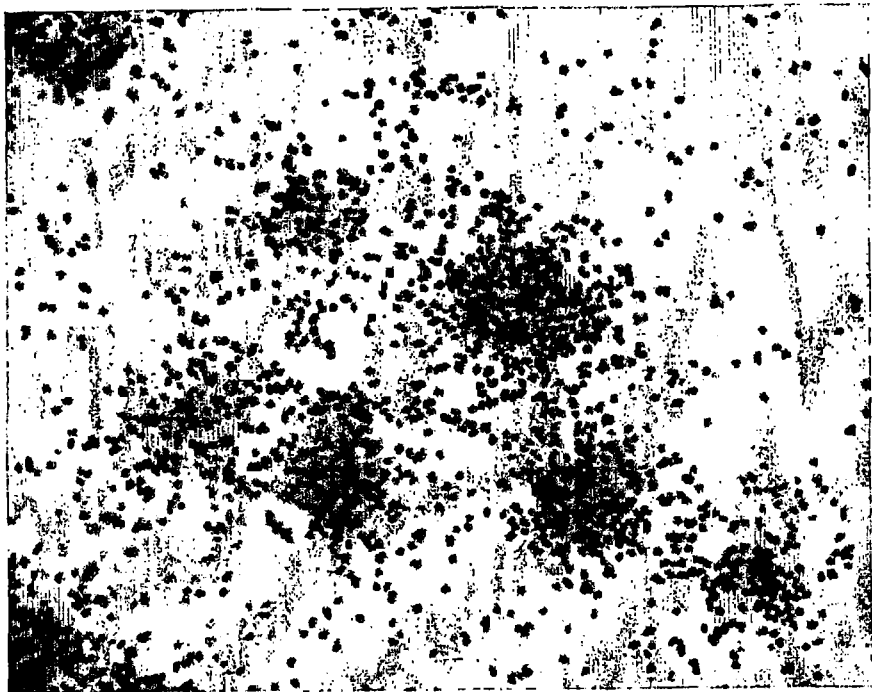


图 4 ¹²⁵I-化合物1的DNA结合

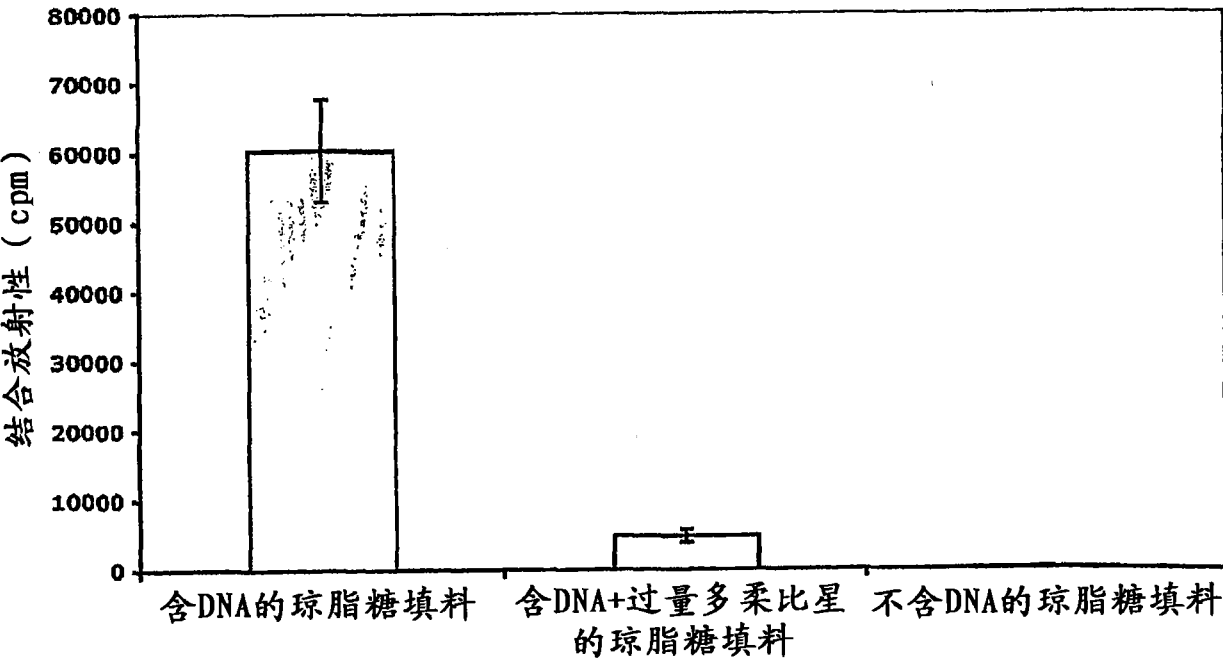


图 5

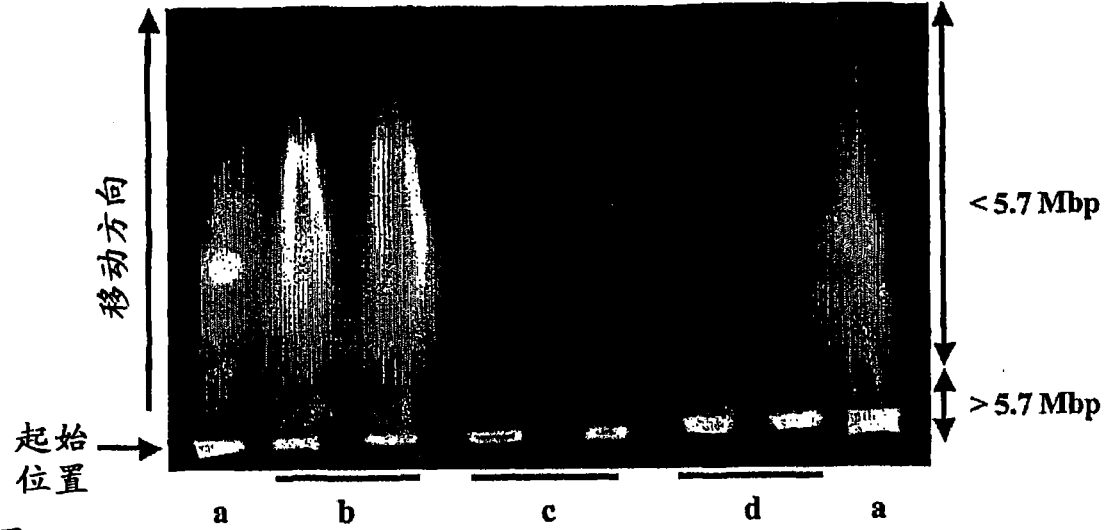


图 6

