

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶

C07J 63/00

A61K 31/56



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 89107605.0

[45]授权公告日 1998 年 12 月 16 日

[11] 授权公告号 CN 1041204C

[22]申请日 89.8.24 [24]颁证日 98.10.24

[21]申请号 89107605.0

[30]优先权

[32]88.8.24 [33]US[31]07/235,903

[73]专利权人 研究三角协会

地址 美国北卡罗利纳州

[72]发明人 李珏伟 方齐成 王震国 李得华

C·E·库克

[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 辛敏忠

审查员 47 10

权利要求书 4 页 说明书 26 页 附图页数 6 页

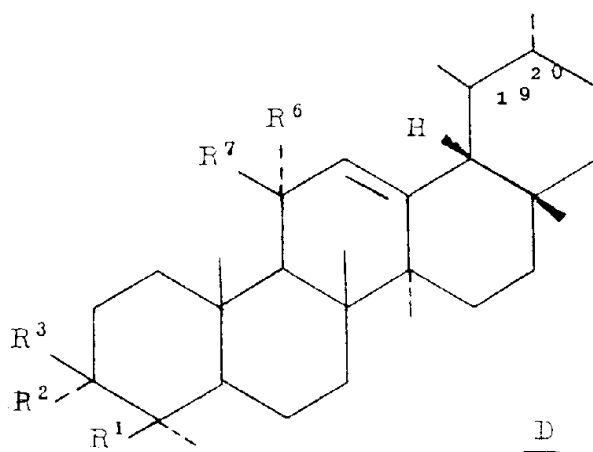
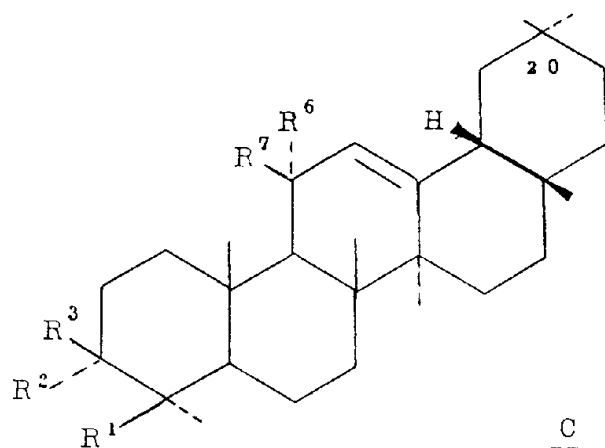
[54]发明名称 用作拓扑酶抑制剂或细胞分化诱导物的
五环三萜系化合物

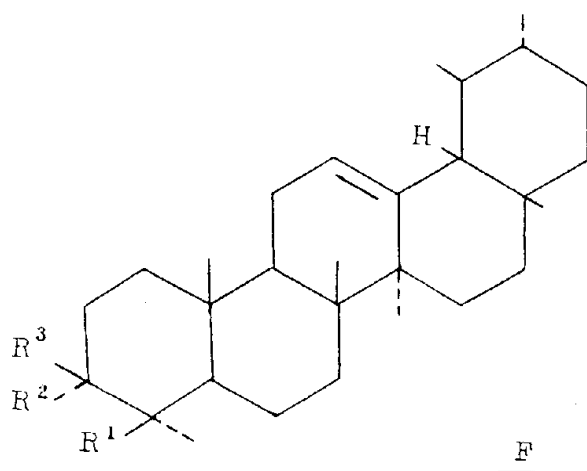
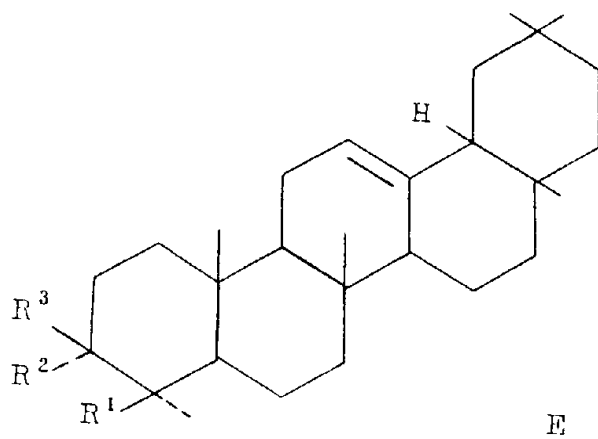
[57]摘要

本发明公开了对拓扑酶 I 和拓扑酶 II 有抑制作用
的五环三萜系化合物,如 α 乳香酸及其酯、 β 乳香
酸及其酯。还公开了以可用于治疗哺乳动物中各种
癌的以五环三萜系化合物为基础的组合物。

权 利 要 求 书

1.一种抑制拓扑酶 I 的方法，它包括将拓扑酶 I 在体外与有效抑制量的一种化合物接触，该化合物从具有下述化学式的化合物组成的组中选出：





其中： R^1 是 $-\text{COOR}^4$ ，式中 R^4 是 $-\text{H}$ 、 C_1-4 烷基或 NH_2 ；
 R^2 、 R^3 、 R^6 和 R^7 为 H 、 OH 、 OAc 、 OCOC_2H_5 或
 NHAc ，或 R^2 和 R^3 共同为 $=\text{O}$ 、 $=\text{NOH}$ 或 $=\text{NOCH}_3$ ，以及它
 们的可作药用的盐。

2.根据权利要求1的方法，其中 R^3 是 $-\text{H}$ ，而 R^2 是 $-\text{H}$ ，
 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OAc}$ 、 $-\text{OCOC}_2\text{H}_5$ 或 $-\text{NHAc}$ 。

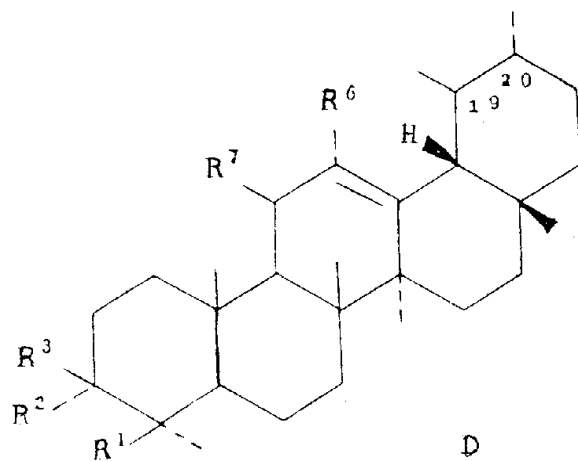
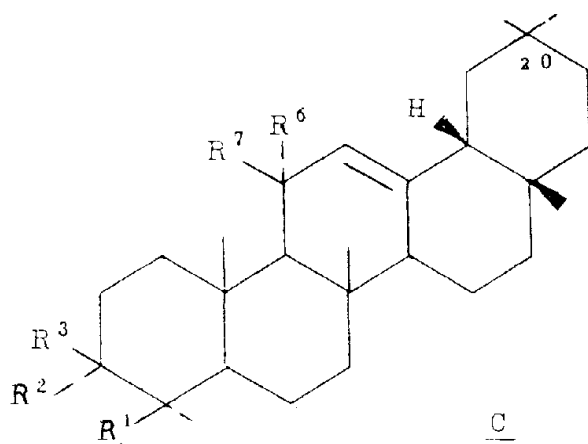
3.根据权利要求1的方法，其中 $R^6 = R^7 = R^3 = \text{H}$ ， $R^2 =$
 OH ，以及 $R^1 = \text{COOH}$ 。

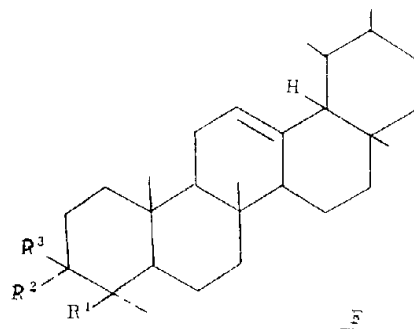
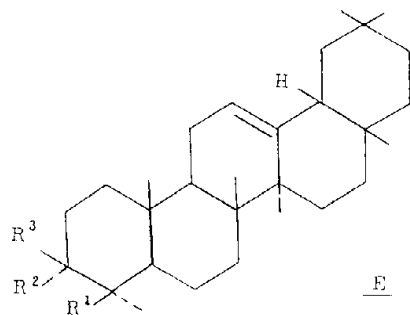
4.根据权利要求1的方法，其中 $R^6 = R^7 = R^3 = \text{H}$ ， $R^2 =$

OCOCH₃ 以及 R¹ = COOH.

5. 权利要求 1 的方法, 其中 R⁶ = R⁷ = R³ = H, R² = OH, 以及 R¹ = COOH.

6. 一种抑制拓扑酶 II 的方法, 它包括将拓扑酶 II 在体外与有效抑制量的一种化合物接触, 该化合物从具有下述化学式的化合物组成的组中选出:





其中: R^1 是 $-\text{COOR}^4$, 式中 R^4 是 $-\text{H}$ 、 C_1-4 烷基或 NH_2 ;
 R^2 、 R^3 、 R^6 和 R^7 为 H 、 OH 、 OAc 、 OCOC_2H_5 或
 NHAc , 或 R^2 和 R^3 共同为 $=\text{O}$ 、 $=\text{NOH}$ 或 $=\text{NOCH}_3$, 以及它
 们的可作药用的盐。

7. 根据权利要求 6 的方法, 其中 R^1 是 $-\text{COOR}^4$, 而 R^4 是 $-\text{H}$,
 C_1-4 烷基, 或 NH_2 。

8. 根据权利要求 6 的方法, 其中 R^3 是 $-\text{H}$, 而 R^2 是 $-\text{H}$,
 $-\text{OH}$, $-\text{OAc}$, $-\text{OCOC}_2\text{H}_5$ 或 $-\text{NHAc}$ 。

9. 根据权利要求 6 的方法, 其中 $R^6 = R^7 = R^3 = \text{H}$, $R^2 =$
 OH , 以及 $R^1 = \text{COOH}$ 。

10. 根据权利要求 6 的方法, 其中 $R^6 = R^7 = R^3 = \text{H}$, $R^2 =$
 OCOCH_3 , 以及 $R^1 = \text{COOH}$ 。

用作拓扑酶抑制剂或细胞分化诱导物
的五环三萜系化合物

本发明总的是涉及具有拓扑酶 (topoisomerase) 抑制活性、细胞分化诱导活性和/或抗癌活性的五环三萜系化合物, 如 α -乳香酸乙酸酯、 β -乳香酸乙酸酯和它们的类似物。

DNA 拓扑酶 I 和 II 是核酶, 因它们能使 DNA 的单链或双链断裂或重新联接而可以分别作为 DNA 和染色质的结构变换的媒介。这些酶可以催化 DNA 拓扑异构体间的多种类型互变。实例是连环体和去连环体以及纠结的和未纠结的。已发现拓扑酶影响许多极其重要的生物功能, 包括复制、转录、重组和修复 (Gellert, M., Ann. Rev. Biochem., 50, 879—910 (1981); Wang, J. C., Ann. Rev. Biochem., 54, 665—695 (1985); Cozzarelli, N. R., Cell, 22, 327—328 (1980); 和 Liu, L. F., Crit. Rev. Biochem., 15, 1—24 (1983))。

已由各种各样生物源分离出拓扑酶, 这些生物源如细菌: 大肠杆菌和 *M. luteus*; 噬菌体: T₄; 酵母: *Saccharomyces*; 昆虫: *Drosophila*; 两栖动物: *Xenopus*; 以及哺乳动物, 海拉细胞, 小牛胸腺, 老鼠白血病细胞和人体白血病细胞 (Miller, K. G., 等人, J. Biol. Chem. 256, 9334 (1987); Pommier, Y., 等人, Biochem. 24, 6410 (1985))。

在细菌 *E. coli* 中已发现一种新的 I 型拓扑酶, DNA 拓扑

酶Ⅲ。与其他Ⅰ型酶类似，这种酶使负性超卷曲DNA松弛(Wang 1985)。

拓扑酶机制的一个重要特点是它们在反应中能生成一种共价的蛋白质—DNA配合物。在拓扑酶Ⅰ的情况下，这涉及到该酶与其断裂部位的3'端之间的磷酸酐酰胺键，而在拓扑酶Ⅱ的情况下，则与其5'端生成磷酸酐酰胺键。很清楚，由于对DNA拓扑和DNA链的断裂和重新联结的这些作用，有许多极重要的细胞过程都涉及拓扑酶(Vosberg, H. P., Current Topics in Microbiology and Immunology, P. 19, Springer-Verlag: Berlin (1985); Wang, J. C., Ann. Rev. Biochem, 54, 665—695 (1985))。

因此，研制能调节拓扑酶活性的化学剂对控制基因表达和癌的化学治疗干涉都将有很大的价值。

癌化学疗法中的DNA拓扑酶

自从1980年以来，已显露出DNA拓扑酶在癌的化学治疗中作为靶酶大有希望。以前，诸如阿霉素、柔红霉素、胺苯吡啶(m-AMSA)和mitoxantrone这样的抗肿瘤药物都被认为是因嵌入DNA而阻断DNA与RNA聚合酶的有规则的发展而发生作用。然而，这种见解不能完全说明各种嵌入剂之间效力不同的原因，也不能说明当细胞接触到这些药剂时产生DNA断裂的原因。另外，诸如表鬼臼毒素(EPD)，鬼臼乙叉甙和鬼臼噻吩甙等抗癌药物并不嵌入DNA。现在认为这些药物实际上是通过它们与核酶DNA拓扑酶的相互作用杀死细胞(Tewey, K. M., 等人, J. of Biol. Chem., 259, 9182 (1984a); Tewey, K. M.

等人, *Science*, 226, 466 (1984b); Rowe, T. C., 等人, *Cancer Res.*, 46, 2021 (1986))。

迅速增加的证据清楚地表明, 拓扑酶I和II通过生成“可酶切的配合物”在DNA复制和遗传过程中每种都具有重要的作用。因此, 拓扑酶的抑制或拓扑酶—DNA“可切配合物”的稳定可解释为细胞中DNA损伤的形态。因此, 这种损伤导致细胞努力处理或修复该可酶切的配合物, 并因此激活了蛋白酶, 该酶的表达是致死的, 并最终导致细胞死亡(Liu, L., *National Cancer Institute Monographs* (1987))。

拓扑酶I抑制剂

拓扑酶I在近来药物研制中已成为有很大意义的靶酶。例如, 喜树碱(CMT)已显示出在各种动物和人的体外肿瘤细胞系中抑制RNA和DNA的合成(Bosman, H. B., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 41, 1412 (1970); Horwitz, M. S. 和 Horwitz, S. B., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 45, 723 (1971); Kessel, D., 等人, *Biochim. Biophys. Acta.*, 269, 210 (1972); Li, L. H 等人, *Cancer Res.*, 32, 2643 (1972); Bhuyan, B. K., 等人, *Cancer Res.*, 33, 888 (1973); Drewinko, B., 等人; *Cancer Res.*; 34, 747 (1974)和体内肿瘤细胞系中抑制RNA和DNA的合成(Gallo, R. C., 等人, *J. National Cancer Institute*, 46, 789 (1971); Neil. G. J. 等人, *Cancer Res.*, 33,

895 (1973))。核酸合成的抑制作用, DNA链断裂和体内抗肿瘤活性之间良好相关关系的观测结果导致如下结论:对DNA的影响是细胞毒性的一个主要决定因素。

最近对具有改善治疗比例的CMT衍生物可能应用的关注导致了更加广泛研究它们的细胞毒性的方式。Hsiang等人(J. Biol. Chem., 260, 14873 (1985))已报导过,CMT阻断拓扑酶I与DNA的断裂—再接合反应中的重新连结的步骤。CMT不使纯的DNA断裂(Horwitz, M. S. 和Horwitz, S. B., Biochem. Biophys. Res. Commun., 45, 723 (1971)); Hsiang, Y. H. 等人, J. Biol. Chem. 260, 14873 (1985)),在纯化的哺乳动物拓扑酶I存在下,CMT诱发DNA的部位特异断裂(Castora, F. J. 和Kelley, W. G., Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 1680 (1986)),拓扑酶I接到已断裂DNA链的3'端(Hsiang, Y. H. 等人, J. Biol. Chem., 260, 14873 (1985))。诱发链断裂是即时的。在除去药物或用0.5M盐培养时是可逆的。CMT并不嵌入单链或双链的DNA。它既不通过纯化的哺乳动物拓扑酶II诱发DNA的断裂,也不抑制酶的催化活性(Hsiang, Y. H. 等人, J. Biol. Chem., 260, 14873 (1985))。这些数据清楚地表明,CMT特异地抑制哺乳动物拓扑酶I,它的细胞毒性作用可用酶与DNA间的可酶切配合物的稳定作用、造成抑制核酸合成和诱发DNA链断裂来解释。

拓扑酶II的抑制剂

最近, 许多临床上的活性抗肿瘤药物显示出提高了由纯化真核生物DNA拓扑酶II引起的DNA的酶切(Nelson, E. M. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 1361 (1984) Tewey, K. M 等人, J. of Biol. Chem., 259, 9182 (1984a); Tewey, K. M. 等人, Science, 226, 466 (1984b); Ross, W 等人, Cancer Res., 44, 5857 (1984); Minocha, A 等人, Biochem. Biophys. Res. Commun., 122, 165 (1984))。例如, 嵌入的氨基吡啶衍生物4'-(9-吡啶基-氨基)甲烷砒-m-茴香酰胺(m-AMSA)通过20 μ g/ml浓度的哺乳动物DNA拓扑酶II明显地促进DNA的断裂。(Nelson, E. M. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 1361 (1984); Rowe, T. C. 等人, Cancer Res., 46, 2021 (1986))。其他嵌入和不嵌入的抗肿瘤药物, 包括阿霉素, 5-亚氨基柔红霉素, 椭圆玫瑰树碱、2-甲基-9-羟基椭圆玫瑰树碱和表鬼臼毒素、VP-16和VM-25, 离体在试管内部起着类似作用(Ross, W. 等人, Cancer Res., 44, 5857 (1984); Minocha, A. 等人, Biochem. Biophys. Res. Commun., 122, 165 (1984); Tewey, K. M. 等人, J. of Biol. Chem., 259, 9182 (1984a); Tewey, K. M. 等人, Science, 226, 466 (1984b); Chen, G. L. 等人, J. Biol. Chem., 259, 13560 (1984))。Liu 小组直连证明这种由拓扑酶引起的DNA断裂, 他们发现这类

药物导致变性时该酶与其断裂部位的 5' 端共价连接。

对密切相关的同种类药物的结构—活性关系的研究提供了强有力的支持, 即嵌入剂和 E P P 两者都直接与该酶作用, 并加强该可酶切配合物的生成能力 (Silber, R., 等人, Natl. Cancer Institute Monographs 4, 111 (1987))。此外, 还观察到细胞毒性与体内和体外的可酶切配合物生成能力之间的极好相关性 (Rowe, T. C. 等人, Cancer Res., 46, 2021 (1986); Long, B. H. 等人, Biochemistry, 23, 1183 (1984); Levin, M. 等人, Cancer Res., 41, 1006 (1981); Zwellling, L. A 等人, Biochemistry, 20, 6553 (1981); Nelson, E. M. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 1361 (1984))。

这些拓扑酶引起的 DNA 断裂被认为与药物的细胞毒性有关。

癌化学治疗时的细胞分化

癌可以看作是细胞分化失调 (Pierce G. 等人 Cancer, A Problem of Developmental Biology, Englewood Cliffs, Prentice Hall, 1978; Greaves, M. F., J. Cell Physiol., 1, 113—125 (1982)), 这很容易由血液瘤进行说明。致癌转化, 定义为阻止分化而不损失增殖能力, 可在任何一个中间成熟阶段出现。因此, 阻止成熟的细胞继续增殖, 未成熟“癌”细胞群体的出现, 就产生了不利的临床症状 (Bloch, A., Cancer Treatment Reports, 68, 199 (1984))。

在正常的条件下,增殖与成熟分别由生长因子(GF)和分化因子(DF)调节,肿瘤细胞可由改变细胞对这些因子的灵敏度而产生。这些变化可能带来对GF灵敏度的增大,对DF响应的降低降低了宿主对DF的加工以及降低了由肿瘤细胞本身内生的GF(Todaro, G. I. Fed. Proc., 41, 2987 (1982))。

几乎所有临床上有效的抗癌剂都是DNA合成或转录的抑制剂(Bloch, A., Purine and Pyrimidine Analogs in Cancer Chemotherapy in New Leads in Cancer Therapeutics (E. Mihich, ed), Boston, G. K. Hall and Co., 1981, PP 65—72)。抗肿瘤活性来源于DNA—靶剂诱导灵敏的癌细胞越过致癌分化阻止阶段成熟的能力,因而去除了它们无限增殖能力,这种见解在近来的研究中被暗示(Takeda, K, 等人, Cancer Res., 42, 5152—5158 (1982))。这些研究清楚地证明,只有诸如柔红霉素或阿糖胞苷之类的DNA—特异抑制剂才能有效地诱发各种骨髓白血病细胞系的分化。

乳香酸

乳香,一种由橄榄科属植物生产的昂贵树脂,曾广泛地应用于香料,用于宗教目的和作为民间传统医学治疗几种疾病,包括炎症和关节炎(Chinese Herbal Dictionary, 1, 1379—1381 (1977), Yadav, D. S. 等人,在“药物化学”科学会议上发表的论文摘要, Indian Pharmaceutical Congress, Bangalore, February 1985)。化学分析结果表明它含有许多化合物,包括 α 乳香酸、 β 乳香酸、乙酰基 α

乳香酸，其他三萜系羧酸以及大环双萜系化合物，如香醚 (incensole)、氧化香醚和氧化异香醚 (Winterstein, A. 等人, *Physiol Chem.*, 208, 9 (1932); *Chem. Abstr.*, 26, 4321 (1932); Simpson, J. C. E. 等人, *J. Chem. Soc.*, 686 (1938); Beton, J. L. 等人, *J. Chem Soc.*, 2904 (1956); Corsano, S. 等人 *Tetrahedron*, 23, 1977 (1967); Nicoletti, R. 和 Forcellese, M. L., *Tetrahedron* 24, 6519 (1968); Nicoletti, R., Forcellese, M. L. 和 Petresi, V., *Tetrahedron*, 28, 325 (1972); Nicoletti, R., Santarelli, C. 和 Forcellese, M. L., *Tetrahedron Lett.*, 3783 (1973)。现已报导，它的抗炎和抗关节炎的活性是由于有 β —乳香酸和其他相关的三萜系羧酸的存在 (Yadav, D. S. 等人, 在“药物化学”科学会议上发表的论文摘要, *Indian Pharmaceutical Congress, Bangalore, February, 1985*)。直到现在，尽管有这些活性，但没有一个人认识到三萜系化合物可以抑制任何一种拓扑酶或产生细胞分化。

因此，本发明的一个目的是提供能抑制体内外拓扑酶 I 的组合物。

本发明的另一个目的是提供能抑制体内外拓扑酶 II 的组合物。

本发明还有一个目的是提供能诱发细胞分化，尤其是通过致癌分化阶段的细胞分化的组合物。

本发明另一个目的是提供抑制体内外拓扑酶 I 的方法。

本发明的另一个目的是提供抑制体内外拓扑酶 II 的方法。

本发明还有另一个目的是提供诱发通过致癌分化阶段的细胞分化的方法。

本发明另外目的是提供治疗各种癌症的组合物。

本发明另外的目的是提供治疗各种癌症的方法。

正如以后将会很明显地看到的一样，本发明的这些目的和其他目的因下述发现而已达到：某些五环三萜系化合物，包括 α 乳香酸、 β 乳香酸、乙酰基 α 乳香酸以及这些化合物的其他衍生物，都具有抑制拓扑酶I和拓扑酶II以及诱发体外（并预期体内）细胞分化的能力，重要的是，已证实以这些分子为基础的组合物对有肿瘤的老鼠有很强的抗癌活性。因此，对于其他动物，包括人都预期有抗癌活性。

结合附图参看下面详细的描述将能更好地理解本发明及其许多附带的优点。

图1是 α 乳香酸醋酸酯（A—1）、 α 乳香酸（A—2）、 β 乳香酸醋酸酯（B—1）和 β 乳香酸（B—2）的结构。

图2是用X射线结晶图展示的晶态 β 乳香酸醋酸酯的结构。

图3显示了本发明三萜系化合物的一般结构。其中 $R^1 - R^7$ 被标明。

图4表示由Boswellia Carterii Birdw. 分离得到油胶树脂渗出物的示意图。

图5表示DNA拓扑酶I松弛的凝胶电泳分析结果。

图6表示DNA拓扑酶II不纠结的凝胶电泳分析结果。

中国的临床研究报告过中草药Tian-Shian-Wan具有抗肿瘤活性。但既没有关于这种复杂的天然物质混合物中存在的各单个化合物的资料，也没有关于其中哪一些部分对所报导的抗肿瘤活性起作用。

为了试图证实这种活性并提供所报导临床观察结果的生物和生物化学基础，提取了该药试样（由天然原料的混合物制备）并分离成几种组份。

用这些组份对慢性病人白血病细胞纯化的拓扑酶 I 的试验表明，只有一种组份存在很强的抑制活性。这种组份进一步纯化得到一种结晶物质，由 HPLC 分析表明，它由两种不同的化合物组成。质谱分析表明这两种化合物是同分异构体，并给出分子式是 $C_{32}H_{50}O_4$ 。根据该结果和中草药文献的知识，可以假定这两种化合物分别是 α 和 β 乳香酸的醋酸酯（图 1 中的 A—1 和 B—1）。

以后获得 Boswellia Cavteri Birdw 的渗出树脂，它含有这两种化合物，它们按图 4 所示的流程被分离，并被表明与由 Tian-Shian-Wan 得到的物质是相同的。这些化合物的结构已由质谱确定，得出分子式，并且除了其它特征峰外，还显示一个高度特征的逆狄尔斯—阿德尔片段。NMR 谱包括测定二维碳—氢相关谱和碳— ^{13}C NMR 谱，也都与所示的结构一致。X 射线晶体图的研究也已证实 β 乳香酸醋酸酯的结构，而且， α 乳香酸醋酸酯的 2D—NMR 是与结构 A—1 一致的。

按照 Hsiang 等人（1985）的方法，试验了 α 和 β 乳香酸醋酸酯两者抑制拓扑酶 I 和拓扑酶 II 的能力。按照它们的非芳香结构来看非常令人惊奇，这两种乳香酸醋酸酯的异构体对拓扑酶 I 和 II 都是高度活性的（见图 5 和 6）。在拓扑酶 I 抑制试验中， α 异构体 A—1 是两种形态中更强的一种，并在对拓扑酶 I 的抑制分析中比标准化合物喜树碱更强。异构体 A—1 和 B—1 对拓扑酶 II 的抑制作用是等同的，并且比标准化合物 VP—16—213（鬼臼乙叉甙）更强，

它对小细胞肺癌、睾丸癌、淋巴瘤和白血病显示出很强的临床活性 (O'Dwyer, P. 等人, 鬼臼乙叉甙 (VP-16-213) 一种活性抗癌药的现状, New Engl. J. Med. 312, 692-700 (1985))。

中华人民共和国北京药物研究所对该化合物的研究也已表明, 以 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度, 它们能诱发 HL-60 细胞分化 (见例 4)。

更有意义的是, 这些体外活性与该药物所的动物研究结果一致, 在该研究中十只有肿瘤的小鼠中有四只存活, 两对照组中所有的小鼠都死亡 (见例 5)。

如上所述, 乳香酸化合物具有三种至今未报导过的性质, 这些性质应该有很大的医疗优点。这就是它们抑制拓扑酶 I、抑制拓扑酶 II、以及诱发细胞分化的能力, 所有这三种性质在抗癌药物中都是重要的。

细胞中存在拓扑酶和它们的性质是较近的发现, 从细胞生长、复制和功能中 DNA 的转录、重组和修复的极端重要性来看, 似乎可能随着对这些酶更多的了解, 还会出现拓扑酶抑制剂其它可能的应用。

本发明化合物与已知酶抑制剂的明显不同在于其本质上是非芳香的。另外, 如前说明的那样, 它们比喜树碱和 VP 16 更有效力。因此它们代表了一种新的结构类型, 它可能不会呈现出这些现有化合物的某些毒性付作用。从科学和实际两方面来看, 这是值得注意的和预料不到的结果。

因此, 按照本发明预料不到地发现了 α 乳香酸醋酸酯、 β 乳香酸醋酸酯及其类似物都是很强的拓扑酶 I 和 II 抑制剂, 并都能在低浓度下诱发细胞分化。本发明首次公开了五环三萜系化合物可具有很强的拓扑酶 I 和 II 抑制活性以及细胞分化诱发性质。

本发明的三萜系化合物包括具有图3中结构C和D的化合物。

其中 R^1 是 $-COOR^4$ ，式中 R^4 是单、双或三糖； $-H$ ； C_{1-4} 烷基； C_{2-4} 烯烃基； C_{3-4} 炔烃基、未取代的或由卤素、甲氧基、乙氧基、亚磺酰氨基、氨基、单或双- C_{1-4} -烷基氨基、单或双-乙酰基氨基、 C_{1-4} 烷基、 C_{2-4} 烯烃基取代的 C_{6-8} 芳基。

R^1 是 $-CONH_2$ ； $-CONHR^5$ ；或 $-CONR_2^5$ ；其中 R^5 是单、双或三糖； $-CH_3$ ； $-CH_2COOH$ ； $-CH_2CH_2COOH$ ； C_{2-8} 烷基； C_{2-8} 烯烃基； C_{2-8} 炔烃基；未取代的或由卤素、甲氧基、乙氧基、亚磺酰氨基、氨基、单或双- C_{1-4} -烷基-氨基、单或双-乙酰基氨基、 C_{1-4} 烷基或 C_{2-4} 烯烃基取代的 C_{6-8} 芳基，以及

R^2 和 R^3 可以是氢或 R^5 与 $-H$ 、 $-OR^4$ 、 $-NH_2$ 、

$-NHR^5$ 、 $-NHR_2^5$ 、 $-O\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}R^5$ 或 $-NH\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}R^5$ 的组合、其中 R^4 和 R^5 如前面所定义，

或

R^2 和 R^3 一起可以是 $=O$ 或 $=N-OR^4$ ，其中 R^4 如前所定义，以及

R^6 和 R^7 可以是氢或 R^5 与 $-H$ 、 $-OR^4$ 、 $-NH_2$ 、

$-NHR^5$ 、 $-NHR_2^5$ 、 $-O\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}R^5$ 或 $-NH\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}R^5$ 的组合，其中 R^4 和 R^5 如前定义，

或

R^6 和 R^7 一起可以是 $=O$ 或 $=N-OR^4$ ，其中 R^4 如前定义。

作为 $C_1 - 4$ 烷基基团的例子，可以是甲基、乙基、丙基、丁基、仲丁基和特丁基。作为 $C_2 - 8$ 烷基，还可以是戊基、己基、庚基和辛基。对于 $C_2 - 4$ 烯烃基，可以是乙烯基、1-丙烯基、2-丙烯基。作为 $C_2 - 8$ 烯烃基还可以是1-戊烯基。也想象得出相类似的炔烃基。

对于芳基，可以是苯基或由卤素、 $O - C_1 - 4$ 烷基、亚磺酰氨基、氨基、 $C_1 - 4$ 烷基氨基或乙酰基氨基取代的苯基基团。

对于单、双或三糖，可以是葡萄糖基、半乳糖基、果糖基及类似物。

优选的 R^1 基团是 $-COOH$ 、 $-COOCH_3$ 、 $-COOC_2H_5$ 和 $-CONH_2$ 。

当 R^3 是 $-H$ 时优选的 R^2 基团是 $-H$ 、 $-OH$ 、 $-OAc$ 、 $-OCOC_2H_5$ 和 $-NHAc$ 。

当 R^2 是 $-H$ 时， R^3 最好是 $-H$ 、 $-OH$ 、 $-OAc$ 、 $-OCOC_2H_5$ 或 $-NHAc$ ；或 R^2 R^3 是 $=O$ 、 $=NOH$ 或 $=NOCH_3$ 。

优选的 R^6 和 R^7 基团与 R^2 和 R^3 的相同。

R^1 是 $-COOH$ 或 $-COOCH_3$ ，不论 R^2 或 R^3 中一个是 $-H$ ，另一个则是 $-OH$ 、 $-OAc$ 、 $-OCOC_2H_5$ 或 $-NHAc$ 而 $R^6 = R^7 = -H$ 的组合是优选的。

R^1 是 $-COOH$ 或 $-COOCH_3$ ， R^2 或 R^3 中一个是 $-H$ ，而另一个是 $-OH$ 、 $-OAc$ 、 $-OCOC_2H_5$ 或 $-NHAc$ ， R^6 或 R^7 中一个是 H ，另一个是 $-OH$ 、 $-OAc$ 或 $-OCOC_2H_5$ 的组合也是优选的。

R^1 是 $-COOH$ 或 $-COOCH_3$ ， R^2 或 R^3 中一个是 $-H$ ，另一个是 $-OH$ 、 $-OAc$ 或 $-OCOC_2H_5$ ，而 R^6 、 R^7 是 $=O$ 、

$=\text{NOH}$ 或 $=\text{NOCH}_3$ 的组合也是优选的。

R^1 是 $-\text{COOH}$ 或 $-\text{COOCH}_3$, R^3 是 $-\text{H}$, R^2 是 $-\text{OH}$, $-\text{OAc}$ 或 $-\text{OCOC}_2\text{H}_5$, R^6 和 R^7 是 $-\text{H}$ 的组合是特别优选的。

R^1 是 $-\text{COOH}$, R^2 是 $-\text{OH}$, $-\text{OAc}$ 或 $-\text{OCOC}_2\text{H}_5$ 而 R^3 , R^6 和 R^7 是 H 的组合是最为优选的。

如这里所使用的, 卤素最好是 Cl 、 Br 、 I 或 F 。

在上述范围内的各种成盐化合物的药用盐也都包括在本发明的范围之内。尤其是当分子中存在阴离子基团时, 任何已知的药用阳离子可与之结合。因此, 例如, 钠、钾、钙和季铵盐, 包括铵都可使用。最好使用钠盐和钾盐。而且, 当分子中存在能生成阳离子的基团时, 一个药用阴离子可与之结合。这样一些阴离子的实例有醋酸盐、天门冬氨酸盐、苯甲酸盐、延胡索酸盐、乙烷磺酸盐、盐酸盐、乳酸盐、草酸盐、甲苯磺酸盐等。在这些盐中, 最好是如卤化氢盐这样的简单无机盐。

本发明还涉及与这里公开的活性化合物相类似的药物前体化合物。这种化合物一般来说本身不是活性的或活性很低的, 但在体内被转化成活性化合物, 例如像这样的药物前体: 如任何一个本身无活性或活性很低的酸功能的甲基酯, 它可以不用催化条件下水解或用诸如酯酶之类的酶催化水解成为诸如乳香酸这样的活性化合物。这种药物前体化合物极可能是本化合物的最佳治疗形式。这些类似的药物前体化合物可以根据本技术领域普通技术人员所熟知的方法和因素由这些活性化合物制得。因此, 申请中所用的“药物前体类似物”意指这样一种化合物: 相对来说它是无毒的, 在药物学上是惰性的, 但它可以在体内转化成有药物学活性的药物 (Connors, T. A.,

Xenobiotica, 16: 975 (1986))。更确切地说, 它是指本发明三萜系化合物的一种衍生物或类似物, 它们不具有或具有比较低的抑制拓扑酶 I 或 II, 或者引起细胞分化, 或杀死癌细胞的能力, 直到在体内转换成具有这种能力的衍生物或类似物。这种药物前体化合物应该具有有利的性质, 这些性质如增强的吸收性质、水溶解度、较低的毒性或较好地瞄准肿瘤细胞 (如由于对肿瘤细胞较大的亲和力, 或与正常细胞相反在肿瘤细胞中较大量的活化酶, 因此在肿瘤细胞中产生更大浓度的活化化合物)。这类化合物实例有酯, 如甲基、乙基、苯基、N, N-二甲基氨基乙基、酰基衍生物如苯甲酰基、对-N, N-二甲基氨基苯甲酰基、N, N-二甲基氨基甘氨酸基、肽衍生物如 γ -谷氨酸基、甘氨酸基、D-Val-Leu-Lys (参看 Chakravarty, P. K. 等人, J. Med. Chem, 26: 663 (1983)), 或糖苷衍生物, 如葡萄糖苷酸 (参看 Connors, T. A. 和 Whisson. M., Nature 210: 866 (1966))。

标准方法如酯化、水解、羧酸或酯的酰胺化、或氧化作用, 还原作用, 有机金属 (如格利雅) 反应都会导致取代基 R^1 、 R^2 和 R^3 。烯丙基氧化或溴化得到的化合物中, $R^6 R^7 = H, OH; H, Br$, 或 $=O$, 这些化合物接着按标准的氧化、还原、酯化或亲核取代方法, 得到取代基 R^6 和 R^7 。 $R^2 R^3$ 或 $R^6 R^7$ 是 $=O$ 的化合物可以用标准方法转化成肟或烷基肟 (alkoxime)。

用 Hsiang (1985) 法测定出本发明活性 (即非药物前体) 化合物与拓扑酶 I 和 II 具有 K_i , 并如下述实例举例, 其 K_i 为 50 微摩尔或少于 50 微摩尔。最好, K_i 应是 1 毫微摩尔到 20 微摩尔。因此, 此处所用的本发明的一种化合物的“抑制有效量”是指该组合

物的量足以造成50—100%的酶抑制作用，最好70—100%的抑制作用，由使用具有所要求 K_i 值的化合物体试验测定。

用Lu和Han (1986)方法测定，在每毫升100 μ g或更低的浓度下本发明的活性化合物（即非药物前体）在HL60细胞中具有细胞分化诱导的能力。并在下述的实例作例证，最好的有效浓度是每毫升1 μ g到100 μ g，更好的是由每毫升0.1至50 μ g。此处所用的本发明一种化合物的“有效分化量”是指该组合物的量足以造成25—100%的细胞分化，最好50—100%细胞分化，用具有所要求的有效细胞分化浓度的化合物进行体外试验来测定。

本发明还包括对拓扑酶I和拓扑酶II之任何一种或两种具有抑制活性的化合物。还应理解为，这类化合物可能不仅抑制本技术领域技术人员现在已经知道的拓扑酶I和II，而且还可能用于抑制其他已知的或尚待发现的这种类型的异构酶和具有有关活性的其他拓扑酶酶类（DNA促旋酶）这对本技术领域的技术人员将是显而易见的。

同样，本发明的化合物可用于诱发除本实例细胞外的其他细胞的细胞分化，这对本技术领域的技术人员将是显而易见的。

具有本申请中描述的结构式的化合物可能只具有这里所叙述的一种活性。这样的化合物仍然是本发明的组成部分。因此，例如一个给定化合物可能只具有对拓扑酶I的抑制能力，而不具有对拓扑酶II的抑制能力。类似地，本发明的一个化合物可以诱发细胞分化而不抑制两种拓扑酶中的任何一种。这样一些化合物是本发明的组成部分，因为它们是具有这里描述的活性的任何一种组合的化合物。

DNA拓扑酶I是最初从*Escherichia Coli* 中鉴定出的

单独一种能使超螺旋的DNA松弛的酶活性 (Wang 1971)。其后, 已由许多真核细胞分离出拓扑酶I的活性 (Champoux 和 Dulbecco, 1972; Dynan 等人, 1981; Liu 和 Miller, 1981, Castora 1986)。这种酶不要求一个高能辅因子如ATP或NAD。它因生成共价的酶DNA中间体起作用。这种短暂DNA断裂使得DNA两链之间的连接数改变。拓扑酶I酶是一种分子量约100KDa的单聚蛋白质, 并使负或正超螺旋DNA松弛。已可靠地确定, 不同于与5'端结合的原核生物细胞酶, 真核细胞拓扑酶I与断裂的DNA3'端通过酪氨酸残基形成一个共价的中间体 (Gellert, 1981; Liu, 1983; Wang, 1985)。

拓扑酶II已从E. Coli 和真核细胞有机体 (Baldi, 1980; Hsieh, 1980)、如小牛胸腺和人体海拉细胞 (Liu, 1981; Glisson, 1984) 分离出。真核细胞拓扑酶II是分子量为300KDa的同种二聚物 (Liu 等人, 1980)。

真核细胞II型拓扑酶在5'端产生相同的酶切部位 (Sander, 1983)。

已报导过一些抗癌药物通过纯化的真核细胞DNA拓扑酶II提高DNA酶切的直接证据 (Nelson, 1984; Tewey, 1984; Ross, 1984; 和Minocha, 1984)。

可以提到的、对服用本发明化合物治疗敏感的具体癌包括小细胞肺癌, 睾丸癌, 淋巴瘤和白血病 (基于与VP-16相似的活性); 食道癌、和胃癌; 结肠癌 (基于与喜树碱相似的活性); 乳腺癌; 中枢神经系统的癌 (基于该化合物通过脑血屏障的可能性); 肝癌; 以

及前列腺癌。其它癌也可能对这些化合物的治疗敏感，并且这种活性可以用标准试验的方法很容易测量，试验方法包括对裸体肿瘤植入物的活性，无胸腺小鼠模型，这是本领域的专业人员都知道的。与这些癌相关联的细胞包括可用本发明化合物或组合物诱发分化的那些细胞实例。

具有拓扑酶 I 或拓扑酶 II 抑制活性的其它化合物应用于治疗人体和非人哺乳动物中的癌 (Rose K. M., FASEB J. 2, 2474—2478, 1978)，能调节拓扑酶活性的化合物对基因控制中重组 DNA 也有很大的价值。

非人哺乳动物是指例如狗、猫、猴、牛、马等。尽管这些哺乳动物中含有的酶与人体来源分离出来的拓扑酶 I 或拓扑酶 II 可能不严格相同，但是，如果它们的功能在这些非人哺乳动物中与在人体中的总的来说是相同的，并且抑制作用可用标准试验方法测定（如这里所指明的方法），那么这种抑制作用也是在本发明组合物和方法之内的。

某些临床上有效的抗癌剂，如柔红霉素或阿糖胞苷，都能有效地诱发各种骨髓白血病细胞的分化，因此，具有细胞分化诱发性质的化合物可以应用于抗癌目的。

本发明化合物可采用口服、非肠胃道方式或静脉方式施用，或用施药技术领域专业人员都知道的方法通过皮肤或粘膜表面吸收给药。

对于治疗给药，该活性成分可以加入到一种溶液或悬浮液中。

溶液和悬浮液还可以包括下列成分：灭菌稀释剂如注射用水，盐溶液、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶液、蛋白质如血清蛋白以提高溶解度；抗菌剂如苯甲醇或羟苯甲酸甲酯；抗氧化剂如抗坏血酸或亚硫酸氢钠；螯合剂如乙二胺四乙酸；缓冲剂如醋酸盐、柠檬

酸盐或磷酸盐以及滋补调节剂如氯化钠或葡萄糖。制剂可封装在安瓿瓶中、一次性注射器中或由玻璃或塑料制造的多种剂量的小瓶中。

含有本发明活性化合物的组合物可以配制成专门针对肿瘤。例如，本发明各种化合物中的任何一种可以共价连接到一个单克隆抗体上，该抗体针对与肿瘤相关的抗原。这种连接能够通过抗体的氨基基团生成肽键而建立。比较好是这种连接应当有一个二硫化物部分或如 Vitetta 等人所描述 (E. S. Vitetta, R. Jerrold Fulton, Richard D. May, Mark Till, Jonathan W. Uhr, Science, 238: 1098 (1987)) 的其它容易酶切的部分，设计使得通过对二硫化物键的酶切而释放的化合物很快转变成活性的拓扑酶抑制剂或细胞分化诱发剂。作为另外一种方法，本发明的化合物可以连接到或结合到脂质体中，大家知道，脂质体对靶抗癌药物是有用的 (G. Gregoriadis, J. Senior 和 A. Trouet, Editors, Targeting of Drugs, NATO Advanced Study Institute Series, Vol. 47, Plenum Press, New York, 1982)。肺癌对脂质体靶是特别敏感的。制备和使用这种脂质体的方法已在 Gregoriadis 等人的书中讨论过。

因此，这里所述的将本发明化合物瞄准癌部位的试剂包括对癌部位特异的单克隆抗体，优先吸附到癌部位的脂质体，以及本技术领域人员都知道的适于连接到或吸收到癌部位的其它试剂。这类试剂已描述过，如 Ghose, T. 等人, Antibody-Linked Cytotoxic Agents in the Treatment of Cancer: Current Status and Future

Prospects, J. Natl. Cancer Inst. 61 (1978)。

靶剂的量可由本技术领域专业人员不用过多实验就能确定。一般来说，当靶剂是能与发明化合物共价连接的单克隆抗体或其它细胞毒性剂时，应当用接近等摩尔量或更低一些的靶剂量。然而，使用不同摩尔比的本发明化合物和共价连接的试剂也是可能的。

根据本发明可以使用的单克隆抗体以及可由本发明化合物瞄准的相关癌的具体实例如下：

单 克 隆 抗 体			
产 品	公 司	指 征	状 态
Panorex	Centocor	结肠直肠癌,	
M A b	(Malvern, Pa)	胰腺癌	第Ⅱ期
Ovarian RT	Centocor	卵巢癌	第Ⅰ期
M A b	(Malvern, Pa)		
M A b	Cetus	乳腺癌	第Ⅰ期
	(Emeryville, Ca)		
M A b	Damon(Needham	肺癌	第Ⅰ期
	Heights, Mass.)		
KS 1 / 4 —	Eli Lilly	癌	处于临
DAVLB MAb	(Indianapolis,		床试验
	Ind.)		
MAb — L 6	Bristol-Myers /	肺癌	第Ⅰ期
	Oncogen		
	(New York, N. Y.)		
M A b	Immunomedics	结肠直肠癌	第Ⅰ期
	(Newark, N. J.)		
	Johnson & Johnson		
	(Now Brunswick,		
	N. J.)		

其它的单克隆抗体也可使用，只要它们瞄准特定的癌部位，如肺癌。

本发明的化合物还可以结合其它治疗方法给药，如结合辐射治疗，或者结合其它抗癌药、如细胞毒性药物或其它拓扑酶抑制剂或细胞分化诱发剂给药。

虽然剂量值要随待缓解病症的严重程度而改变，但是，只要以有效的口服、非肠胃的或静脉注射的剂量对需要这种治疗的对象给药，就能达到好的效果。合适的剂量可由该化合物的有效量、所叙述的体外试验以及由该给药途径下所述化合物的生物利用率来估算，以便在该对象体内的靶部位达到该化合物有效的浓度。

然而，应当理解，对任何特定的对象，特定的剂量情况应按给药或监测施用上述化合物的人的专业判断调整到该个体的需要量。还应理解，所提出的剂量并不限制本发明的范围或实施。这些剂量可以一次施用，也可以按不同的时间间隔分成一些较小的剂量施用。

下面叙述的实例仅对本发明作示例说明；而不是用于限制本发明，通过对这些实施例的描述，本发明的其它特征将成为显而易见。

实例 1 分离和纯化 α 和 β 乳香酸醋酸酯

如图 4 所示，在渗析器中用 70% 含水丙酮对树脂 (290 克) 进行完全提取，得到粗提取物 (248.8 克 85.7%)。用二氯甲烷处理粗提取物，并将二氯甲烷溶解部分浓缩 (194.8 克 65.1%)。用二氯甲烷中逐渐增加的丙酮作淋洗剂在二氧化硅凝胶上色谱分离该粗提取物。

由二氯甲烷淋出液得到 α 和 β 乳香酸醋酸酯粗混合物 (16 克)。在重复色谱分离和在甲醇中重结晶后，得到细粒无色针状晶体

4.54克)。HPLC分析表明,该结晶物仍是混合物,由比例大约1:1的 α 和 β 乳香酸醋酸酯组成。

用92%含水甲醇作流动相,在一个C-18反相柱(25mm $\times$ 30cm)上色谱分离0.25克的这种异构体混合物。将含有纯 α 和纯 β 乳香酸醋酸酯的组分(用HPLC分析测定)分别合并并浓缩。从甲醇中进一步重结晶得到5mg α 乳香酸醋酸酯(A-1)和11mg β 乳香酸醋酸酯(B-1)。

α 乳香酸醋酸酯和 β 乳香酸醋酸酯的鉴别

基于下述的物理和光谱分析来证实 α 和 β 乳香酸醋酸酯的结构。

α 乳香酸醋酸酯

无色的针状体, $[\alpha]_D^{22} + 66.2^\circ$, HRMS 498.3769, $C_{32}H_{50}O_4$, 计算值为498.3709。它的红外光谱表明:在 1734 cm^{-1} 处的羧基带归于醋酸基, 1692 cm^{-1} 归于羧基。EI质谱显示出在 m/z 280、218处的峰,它代表 Δ^{12} -夹竹桃烯/乌斯烯衍生物的环-C的特征逆狄尔斯-阿德尔劈裂峰。它的 ^1H NMR谱表明有8个甲基信号(参见表1)。它的 ^{13}C NMR谱揭示了32个碳信号。

β 乳香酸醋酸酯

无色的针状体, $[\alpha]_D^{22} + 60.0^\circ$, HRMS 498.3701, $C_{32}H_{50}O_4$, 计算值498.3709。它的红外谱表明,在 1733 cm^{-1} 的羧基带归于醋酸基, 1693 cm^{-1} 归于羧基。EI质谱表明如 α 乳香酸醋酸酯一样的特征峰。它的 ^1H NMR谱也显示8个甲基信号(表1)。它的 ^{13}C NMR谱显示32个碳信号。

X射线衍射分析(见图2)证实了 β 乳香酸醋酸酯的这种结构。

表 I

α 和 β 乳香酸醋酸酯的

M Θ 基团的化学位移(由TMS得到, PPM)

	23M Θ	25M Θ	26M Θ	27M Θ	28M Θ	29M Θ	30M Θ	-CO-CH ₃
α 乳香酸 醋酸酯	0.90	1.01	1.19	1.24	0.84	0.87	0.87	2.09
β 乳香酸 醋酸酯	0.91	1.05	1.12	1.25	0.81	0.81	0.91	2.10

实例2 拓扑酶I抑制活性

根据一个已发表的方法(Lin等人, Proc. Natl. Acad. Sci, U. S. A., 76, 3487(1987)), 用超螺旋 pBR322 DNA的松弛试验监测拓扑酶I的抑制活性。

由人的慢性白血病细胞纯化成均一的DNA拓扑酶I。通过澄清的溶胞产物的苯酚脱蛋白作用,接着用CsCl/乙腈等密度离心和凝胶过滤来纯化质粒 pBR322 DNA。化合物A—1和B—1的拓扑酶I抑制活性被总结于图5中。该 α 异构体A—1显示出比标准喜树碱更高的效力(约3倍)。 β 异构体B—1显示出与标准喜树碱相当的效力。

实例3 拓扑酶II抑制活性

用P4非纠结试验(Liu等人, Nucleic Acid Res., 9, 3979(1981))监测拓扑酶II的活性。由噬菌体无尾衣壳分离出的自然纠结的DNA作为基质。由人体白血病细胞纯化得到拓

扑酶Ⅱ。异构体 A—1 和 B—1 两者都显示出比标准 VP—16 更高的效力。其结果总结于图 6 上。

实例 4 细胞分化诱发活性

用约 1 : 1 的化合物 A—1 和 B—1 的混合物诱发培养的人的前骨髓白血病细胞系, HL—60, 以分化成成熟的细胞。用 Lu 和 Han 的方法分析细胞的分化 (Lu, Y 和 Han, R., Differentiation of Human Promyelocytic Cells (HL—60) Induced by Aclacinomycin B, Acta Academia Medica Sinica, 8 (37), 211—214 (1986))。在不同浓度的试验混合药物存在下, 对 5 个培养日中的每个培养日都要进行一式两份培养液的分析 (见表 II)。

表 II

对 HL—60 细胞的影响

浓 度	N B T
($\mu\text{g}/\text{ml}$)*	降低% **
1	2.5
8	27.0
10	51.0

* A—1 和 B—1 混合物比例为约 1 : 1

**在降低 N B T 能力方面增加超过对照细胞

实例 5 体内抗肿瘤活性

将 α 乳香酸醋酸酯和 β 乳香酸醋酸酯的 1 : 1 混合物对 C D F—

1 小鼠施用来测定该化合物对 L—1 2 1 0 白血病的影晌。在第 0 天将 L—1 2 1 0 细胞 (1×10^6 细胞/小鼠) 通过腹内植入 C D F—1 小鼠 (10 只小鼠/组), 从第 1 天开始用这种化合物进行腹内治疗达 12 天。其结果总结于表 III。

表 III

BC—4 * 对患 L—1 2 1 0 小鼠的作用 (体内)

组	动物数		体 重		平均存活时间 (天)
	起始	终止	起始	终止	
对照	16	0	17.0	19.7	15.7 ± 1.9
50 mg/Kg	10	1	16.9	17.8	16.9 ± 6.1
100 mg/Kg	10	4	16.7	17.4	22.9 ± 8.5

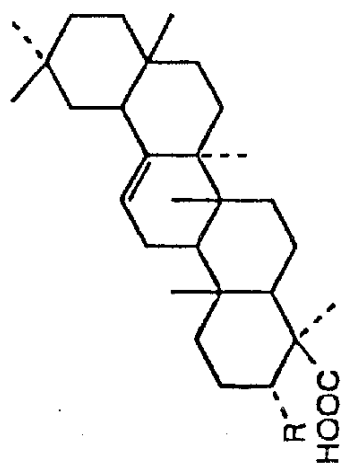
* BC—4 由 α 乳香酸醋酸酯和 β 乳香酸醋酸酯按约 1 : 1 组成。

** 试验终止时存活的动物 (第 30 天)

很显然, 根据上述教导, 可能对本发明作出许多修改和变更。因此, 应当理解, 在所附权利要求的范围之内, 本发明可以用不同于这里具体描述的方式来实施。

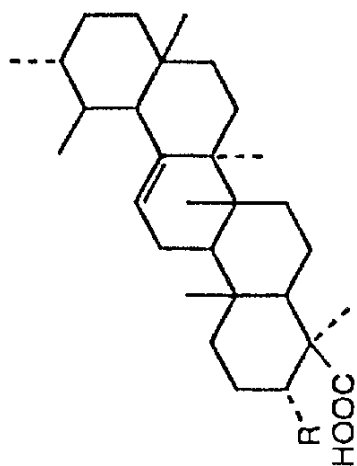
说明书附图

图 1



A

A-1. $R = CH_3COO$
A-2. $R = OH$



B

B-1. $R = CH_3COO$
B-2. $R = OH$

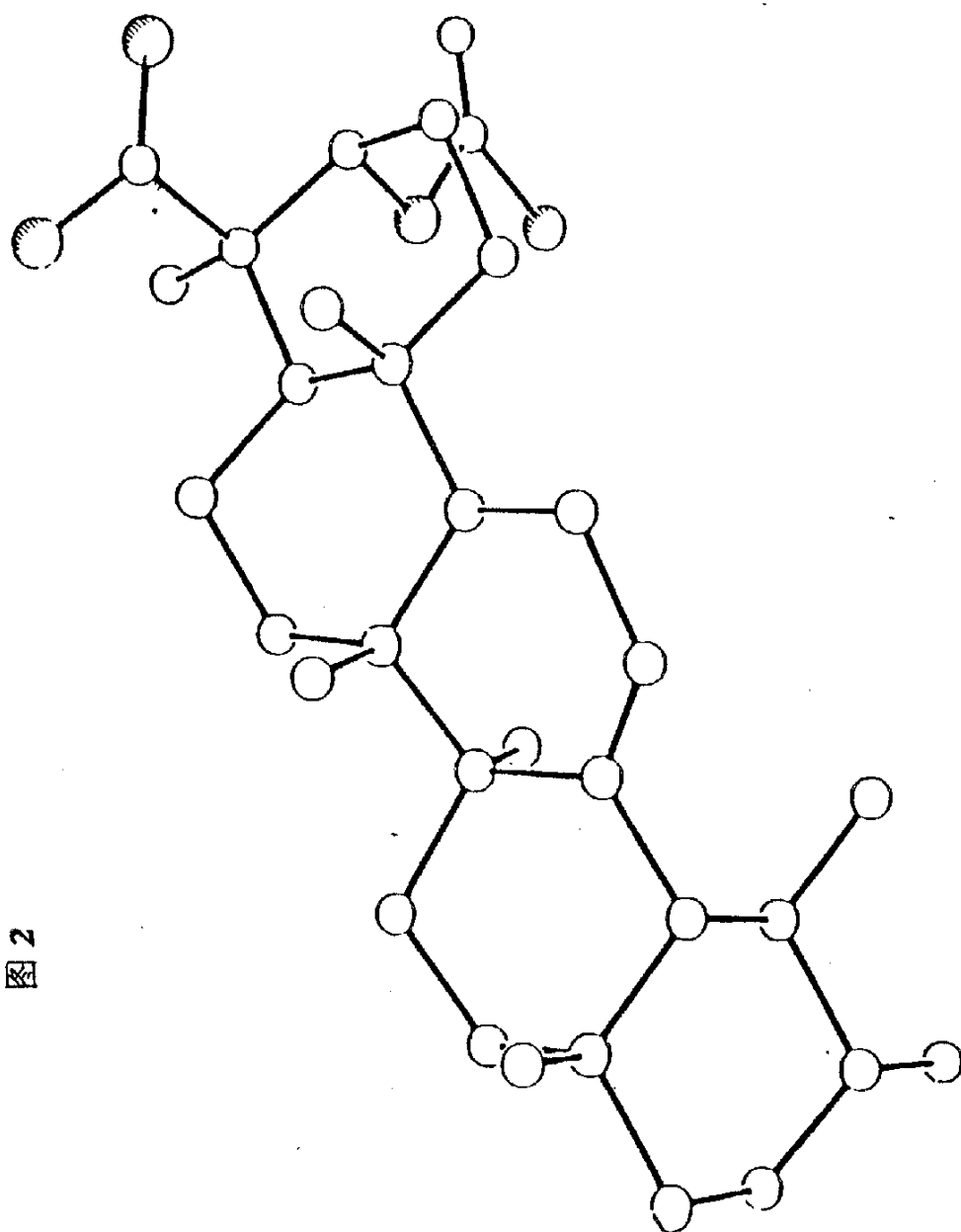
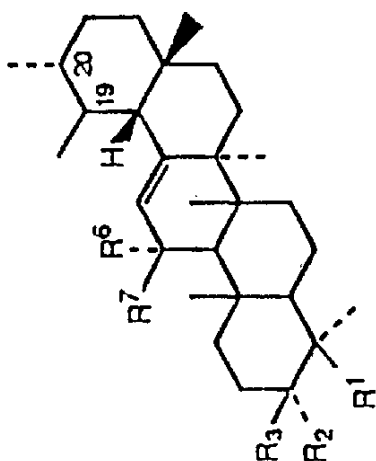
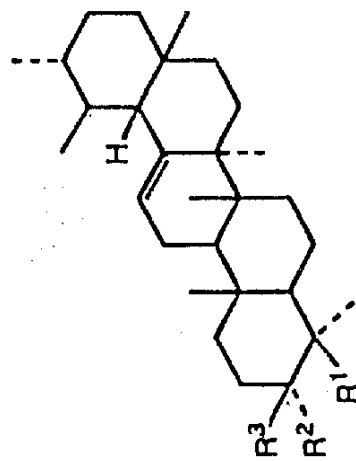


图 2

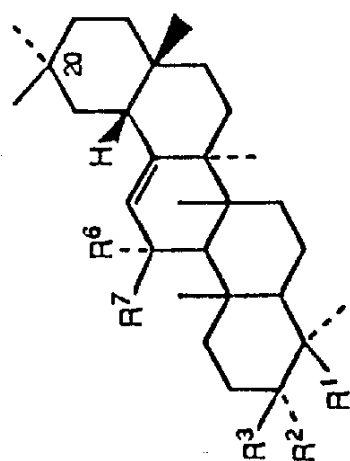
图 3



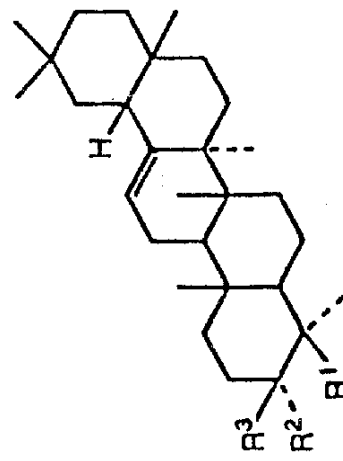
D



E



C



F

图 4 分离由 *Boswellia Carterii* Birdw 得到的油胶树脂渗出物的示意图

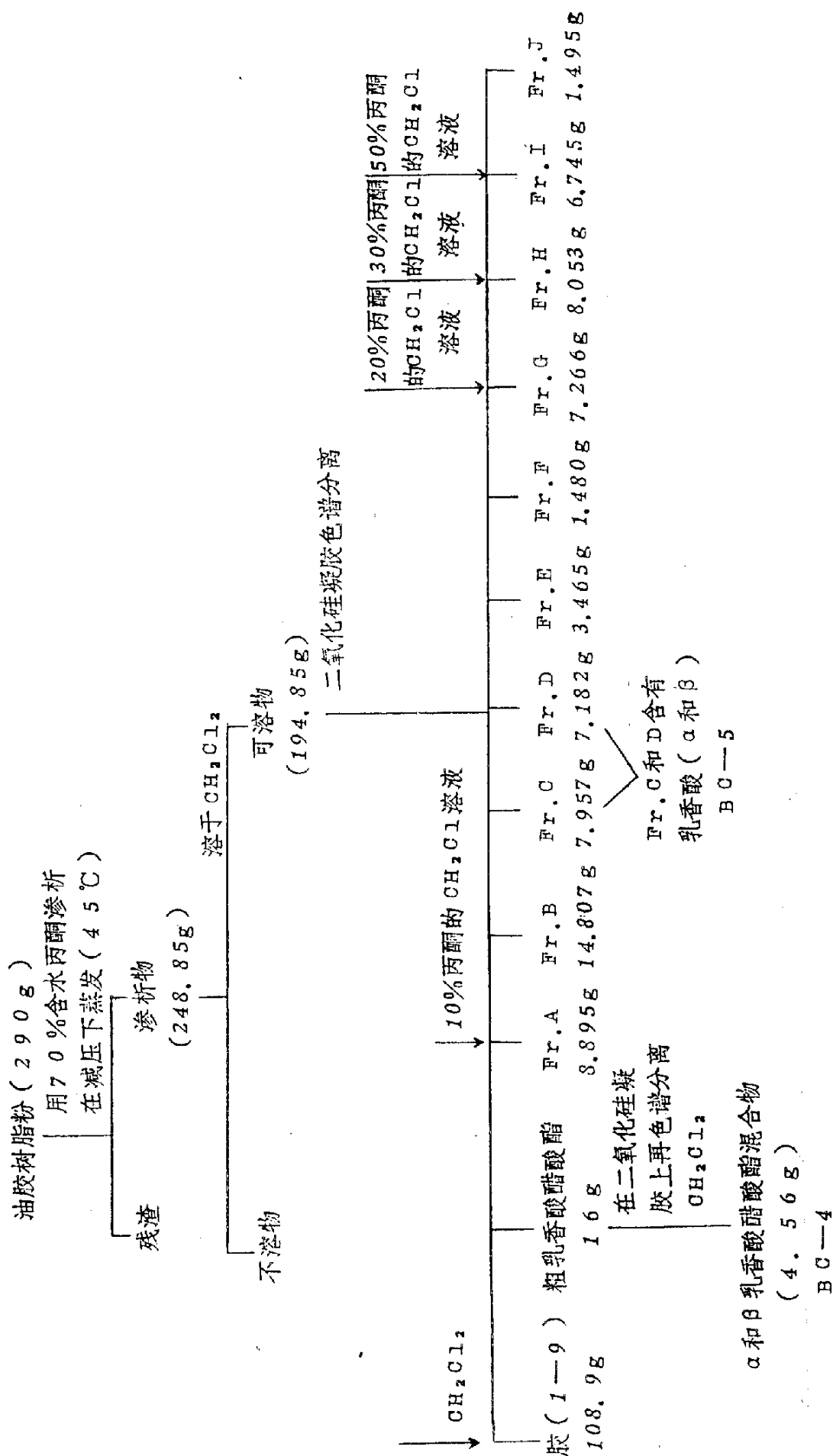
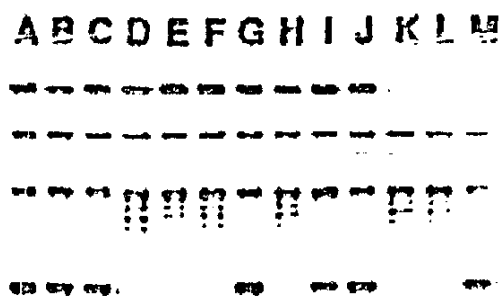


图 5

拓扑酶 I 松弛的凝胶电泳分析



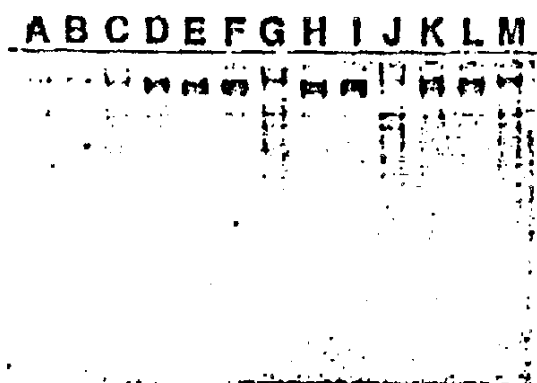
图的说明

列号	D N A	拓扑酶 I 酶 (单位)	药物浓度 (μM)	活性
A	pBR3 2 2	0	0	—
B	"	0 . 7 5	0	—
C	"	1 . 5	0	—
D	"	3 . 0	0	—
E	pBR3 2 2	3 . 0	喜树碱($1.6\mu\text{M}$)	—
F	"	3 . 0	喜树碱($4.0\mu\text{M}$)	—
G	"	3 . 0	喜树碱($10\mu\text{M}$)	++
H	pBR3 2 2	3 . 0	A—1 ($1.6\mu\text{M}$)	—
I	"	3 . 0	A—1 ($4.0\mu\text{M}$)	+
J	"	3 . 0	A—1 ($10.0\mu\text{M}$)	++
K	pBR3 2 2	3 . 0	B—1 ($1.6\mu\text{M}$)	—
L	"	3 . 0	B—1 ($4.0\mu\text{M}$)	—
M	"	3 . 0	B—1 ($10.0\mu\text{M}$)	++

* 3 . 0 单位拓扑酶 I 酶显示出完全活性，并用作药物筛选的标准条件。

图 6

拓扑酶 II 去纠结的凝胶电泳分析



图的说明

列号	D N A	拓扑酶 II 酶 (单位)	药物浓度 (μ M)	活性
A	P ₄ (纠结的)	0	0	—
B	"	0.75	0	—
C	"	1.5	0	—
D	"	3.0	0	—
E	P ₄ (纠结的)	3.0	VP-16 (25)	—
F	"	3.0	VP-16 (50)	—
G	"	3.0	VP-16 (100)	++
H	P ₄ (纠结的)	3.0	A-1 (0.625)	—
I	"	3.0	A-1 (2.5)	—
J	"	3.0	A-1 (10)	++
K	P ₄ (纠结的)	3.0	B-1 (0.625)	—
L	"	3.0	B-1 (2.5)	—
M	"	3.0	B-1 (10)	++