

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日
2009 年 4 月 2 日 (02.04.2009)

(10) 国际公布号
WO 2009/039773 A1

- (51) 国际专利分类号:
A61K 31/4412 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2008/072406
- (22) 国际申请日: 2008 年 9 月 18 日 (18.09.2008)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
200710035774.8
2007 年 9 月 19 日 (19.09.2007) CN
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 中南大学(CENTRAL SOUTH UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国湖南省长沙岳麓山南路 932 号, Hunan 410083 (CN)。
- (72) 发明人; 及
- (75) 发明人/申请人 (仅对美国): 陶立坚(TAO, Lijian) [CN/CN]; 中国湖南省长沙开福湘雅路 87 号, Hunan 410008 (CN)。 胡高云(HU, Gaoyun) [CN/CN]; 中国湖南省长沙岳麓桐梓坡路咸嘉新村明苑 4 栋 302, Hunan 410013 (CN)。
- (74) 代理人: 长沙正奇专利事务所有限责任公司 (CHANGSHA ZONEKEY PATENT LAW FIRM); 中国湖南省长沙芙蓉八一路 59 号, Hunan 410001 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。
- 本国际公布:
— 包括国际检索报告。

(54) Title: NEW MEDICINE USE OF 1-SUBSTITUTED ARYL -2(1H)-PYRIDONE

(54) 发明名称: 1-取代芳基-2(1H)-吡啶酮化合物的新医药用途

(57) Abstract: The use of 1-(3-fluorophenyl)-5-methyl-2(1H)-pyridone in manufacture of a anti-tumor medicament is provided in the present invention, wherein the said tumor is lung cancer, breast cancer, colon cancer, stomach cancer, liver cancer and prostate cancer. According to the present invention, the effect of the said compound is better than that of the pirfenidone in the prior arts.

(57) 摘要:

本发明提供了 1-(3-氟苯基)-5-甲基-2(1H)-吡啶酮在制备抗肿瘤药物中的应用, 所述肿瘤可以是肺癌, 乳腺癌, 结肠癌, 胃癌, 肝癌或前列腺癌。根据本发明, 该化合物的抗肿瘤作用优于现有技术中的吡非尼酮。

WO 2009/039773 A1

说明书

1-取代芳基-2(1H)-吡啶酮化合物的新医药用途

技术领域

本发明涉及1-取代芳基-2(1H)-吡啶酮化合物的新医药用途,具体地是氟取代苯基-2(1H)-吡啶酮的新医药用途。

背景技术

吡啶酮类化合物是一个庞大的家族,具有广泛生理活性,由于吡啶环上所取代的基团不同而具有不同的生理活性。包括具有杀虫,抗炎,抗纤维化等。

德国专利DE 4343528, 欧洲专利EP259048、EP367410、EP398499, 欧洲专利EP 216541, 欧洲专利EP488220, 美国专利US3839346A, US4052509A, US4042699以及USP3839346(1974.10.1公布)均公开了涉及上述吡啶酮类化合物的制备和用途。

美国专利US 5,310,562在1994年第一次公布了1-苯基-5-甲基-2(1H)-吡啶酮, [5-methyl-1-phenyl-2(1H)-pyridone] 又称吡非尼酮 (Pirfenidone, PFD)具有抗纤维化的生物活性, EP0383591中描述了吡非尼酮在预防和治疗纤维化疾病方面有广泛的应用。该药物是一种口服的活性小分子药物,已被美国FDA批准,对肺、肾和肝的纤维化疾病的治疗已进入II期临床。

申请号为CN200510031445.7和CN02114190.8中涉及了1-芳基-5-甲基-2(1H)-吡啶酮化合物在制备抗纤维化药物中的用途。

本申请发明人曾在《中南大学学报》(医学版)(2004, 29(2))上公开了化合物 1-(3-氟苯基)-5-甲基-2(1H)-吡啶酮 (AKF-PD)对肾成纤维细胞的细胞实验,显示其具有抑制肾成纤维细胞生长的作用。

除此之外, PCT申请W02004/110245A2公开了吡非尼酮 的在治疗癌症中的用途。将吡非尼酮用于癌症治疗时,与治疗量的IP-10联合用药。该文献中称,将治疗量的吡非尼酮与治疗量的IP-10联合用药可以减少肿瘤20%。进一步还可以与IFN- α , 抗增生剂联合用药,还可以是作为辅助治疗药。

上述现有技术中公开了上述化合物的制备方法。

发明内容

本发明的目的是提供 1-(3-氟苯基)-5-甲基-2(1H)-吡啶酮(简称氟非尼酮)的新医药用途。

本发明提供的技术方案是：1-(3-氟苯基)-5-甲基-2(1H)-吡啶酮用于制备抗肿瘤药物中的应用。

根据本发明的实施例，优选所说的肿瘤是肺癌。

根据本发明的实施例，优选所说的肿瘤是乳腺癌。

根据本发明的实施例，优选所说的肿瘤是结肠癌。

根据本发明的实施例，优选所说的肿瘤是胃癌。

根据本发明的实施例，优选所说的肿瘤是肝癌。

根据本发明的实施例，优选所说的肿瘤是前列腺癌。

本申请人通过研究发现，1-(3-氟苯基)-5-甲基-2(1H)-吡啶酮较现有技术中公开的吡非尼酮有更强的抗肿瘤作用。通过对实验结果的统计学分析，显示1-(3-氟苯基)-5-甲基-2(1H)-吡啶酮与吡非尼酮的抗肿瘤效果的差异具有显著性。

本发明公开了1-(3-氟苯基)-5-甲基-2(1H)-吡啶酮较现有技术中公开的吡非尼酮有更强的抗肿瘤作用。

具体实施方式

下面通过具体实施方案进一步说明本发明。所述实施例仅用于说明或解释本发明的实施方案，而不能限制本发明的保护范围。本发明实施例所涉及的细胞均可以从ATCC公司商业化产品中获得。

实施例 1

氟非尼酮抑制肺癌细胞增殖的试验

一、材料：

1.细胞：人肺癌细胞(A549)

2.试剂：MTT试剂盒为美国R&D公司

二、方法：

用噻唑蓝（MTT）方法，细胞用含10%小牛血清的DMEM培养基培养，将细胞制成 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 的细胞悬液，每孔100ul接种于96孔板中。待细胞贴壁后换无血清DMEM培养基，24小时后弃去无血清培养基，换含不同浓度氟非尼酮和吡非尼酮的含10%小牛血清的培养基，每个浓度设5个复孔。分别于加药后20、44、68、92、116小时后，每孔加MTT10ul，4小时后将MTT吸出，每孔加MTT溶解液100ul，15min后待MTT完全溶解，酶标仪测OD值。统计学方法，采用单因素方差分析。

三、实验结果：

氟非尼酮抑制肺癌细胞增殖的MTT结果

	1天	2天	3天	4天	5天
对照	0.1190.006	0.1690.014	0.2070.004	0.2800.009	0.3290.006
氟非尼酮 1ug/ml	0.1200.008	0.1640.018	0.2090.012	0.2750.019	0.3270.007
氟非尼酮 10ug/ml	0.1190.003	0.1690.019	0.2080.009	0.2780.011	0.3260.005
氟非尼酮 100ug/ml	0.1180.002	0.1700.015	0.2080.017	0.2730.015	0.3060.009 **
氟非尼酮 500ug/ml	0.1200.008	0.1680.012	0.1940.007 **	0.2410.008 **++	0.2890.010 ***++
吡非尼酮 1ug/ml	0.1160.006	0.1670.012	0.2080.007	0.2820.007	0.3230.007
吡非尼酮 10ug/ml	0.1160.003	0.1700.015	0.2050.007	0.2780.010	0.3230.004
吡非尼酮 100ug/ml	0.1160.002	0.1690.009	0.2040.006	0.2780.013	0.3210.005 +
吡非尼酮 500ug/ml	0.1190.006	0.1650.016	0.2000.007 *	0.2680.007 *	0.3110.005 ***

* 表示与对照组比较有统计学意义（ $p < 0.05$ ）

** 表示与对照组比较有统计学意义（ $p < 0.01$ ）

*** 表示与对照组比较有统计学意义（ $p < 0.001$ ）

△ 表示与相同剂量组吡非尼酮比较有统计学意义（ $p < 0.05$ ）

△△ 表示与相同剂量组吡非尼酮比较有统计学意义（ $p < 0.01$ ）

在第3、4天500 μ g/ml的 氟非尼酮和吡非尼酮均能抑制人肺癌细胞的增殖，但氟非尼酮500 μ g/ml的作用强于同等剂量的吡非尼酮。在第5天100 μ g/ml的 氟非尼酮能够抑制人肺癌细胞的增殖，而同等剂量的吡非尼酮不能抑制人肺癌细胞的增殖。

四、结论：氟非尼酮和吡非尼酮均能够抑制人肺癌细胞的增殖，但氟非尼酮的作用强于吡非尼酮。

实施例2

氟非尼酮抑制乳腺癌细胞增殖的试验

一、材料：

- 1.细胞：人乳腺癌细胞（MCF7细胞）。
- 2.试剂：MTT试剂盒为美国R&D公司

二、方法：

用噻唑蓝（MTT）方法，细胞用含10%小牛血清的DMEM培养基培养，将细胞制成 1×10^5 /ml的细胞悬液，每孔100 μ l接种于96孔板中。待细胞贴壁后换无血清DMEM培养基，24小时后弃去无血清培养基，换含不同浓度氟非尼酮和吡非尼酮的含10%小牛血清的培养基，每个浓度设5个复孔。分别于加药后20、44小时后，每孔加MTT10 μ l，4小时后将MTT吸出，每孔加MTT溶解液100 μ l，15min后待MTT完全溶解，酶标仪测OD值。统计学方法，采用单因素方差分析。

三、实验结果：

氟非尼酮抑制乳腺癌细胞增殖的MTT结果

	24小时	48小时
对照	0.473 $\pm$ 0.021	0.653 $\pm$ 0.065
氟非尼酮 1000 μ g/ml	0.466 $\pm$ 0.035	0.484 $\pm$ 0.057 ***
氟非尼酮 2500 μ g/ml	0.209 $\pm$ 0.118*** +++	0.077 $\pm$ 0.014*** +
吡非尼酮 1000 μ g/ml	0.462 $\pm$ 0.088	0.466 $\pm$ 0.035***
吡非尼酮 2500 μ g/ml	0.447 $\pm$ 0.042	0.148 $\pm$ 0.053***

* 表示与对照组比较有统计学意义 ($p < 0.05$)

** 表示与对照组比较有统计学意义 ($p < 0.01$)

*** 表示与对照组比较有统计学意义 ($p < 0.001$)

Δ 表示与相同剂量组吡非尼酮比较有统计学意义 ($p < 0.05$)

$\Delta\Delta$ 表示与相同剂量组吡非尼酮比较有统计学意义 ($p < 0.01$)

$\Delta\Delta\Delta$ 表示与相同剂量组吡非尼酮比较有统计学意义 ($p < 0.001$)

在24小时, 2500 $\mu\text{g/ml}$ 的 氟非尼酮能抑制人乳腺癌细胞的增殖, 在48小时, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 、2500 $\mu\text{g/ml}$ 的 氟非尼酮和吡非尼酮均能抑制人乳腺癌细胞的增殖, 但氟非尼酮 2500 $\mu\text{g/ml}$ 的作用强于同等剂量的吡非尼酮。

四、结论: 氟非尼酮和吡非尼酮均能够抑制人乳腺癌细胞的增殖, 氟非尼酮的作用强于吡非尼酮。

实施例3

氟非尼酮抑制结肠癌细胞(HT-29)增殖的试验

一、材料:

1.细胞: 人结肠癌细胞(HT-29)

2.试剂: MTT 试剂盒为美国 R&D 公司

二、方法:

用噻唑蓝 (MTT) 方法, 细胞用含 10%小牛血清的DMEM培养基培养, 将细胞制成 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 的细胞悬液, 每孔 100 μl 接种于 96 孔板中。待细胞贴壁后换无血清DMEM培养基, 24 小时后弃去无血清培养基, 换含不同浓度氟非尼酮和吡非尼酮的含 10%小牛血清的培养基, 每个浓度设 5 个复孔。分别于加药后 24、48、72 小时后, 每孔加MTT10 μl , 4 小时后将MTT吸出, 每孔加MTT溶解液 100 μl , 15min后待MTT完全溶解, 酶标仪测OD值。统计学方法, 采用单因素方差分析。

三、实验结果:

氟非尼酮抑制结肠癌细胞增殖的 MTT 结果

	24 小时	48 小时	72 小时
对照	0.531 ± 0.036	0.900 ± 0.042	1.279 ± 0.039
氟非尼酮 100ug/ml	0.522 ± 0.041	0.891 ± 0.057	1.242 ± 0.032*
氟非尼酮 200ug/ml	0.529 ± 0.030	0.839 ± 0.039**	1.202 ± 0.053***
氟非尼酮 400ug/ml	0.484 ± 0.042*	0.825 ± 0.027***	1.137 ± 0.041***△△△
氟非尼酮 800ug/ml	0.390 ± 0.026*** △	0.550 ± 0.031***△△△	0.676 ± 0.038***△△△
氟非尼酮 1600ug/ml	0.282 ± 0.032*** △	0.287 ± 0.015***△△△	0.242 ± 0.057***△△△
吡非尼酮 100ug/ml	0.527 ± 0.039	0.897 ± 0.060	1.258 ± 0.043
吡非尼酮 200ug/ml	0.534 ± 0.036	0.930 ± 0.037	1.234 ± 0.037**
吡非尼酮 400ug/ml	0.491 ± 0.071	0.806 ± 0.035***	1.206 ± 0.028***
吡非尼酮 800ug/ml	0.436 ± 0.028***	0.705 ± 0.036***	0.994 ± 0.038***
吡非尼酮 1600ug/ml	0.346 ± 0.024***	0.444 ± 0.029***	0.449 ± 0.052***

* 表示与对照组比较有统计学意义 (p<0.05)

** 表示与对照组比较有统计学意义 (p<0.01)

*** 表示与对照组比较有统计学意义 (p<0.001)

△ 表示与相同剂量组吡非尼酮比较有统计学意义 (p<0.05)

△△ 表示与相同剂量组吡非尼酮比较有统计学意义 (p<0.01)

△△△ 表示与相同剂量组吡非尼酮比较有统计学意义 (p<0.001)

1. 氟非尼酮 100ug/ml 在 72 小时可抑制人结肠癌细胞的增殖 (与对照组比较 p<0.05); 吡非尼酮 100ug/ml 在 72 小时无抑制人结肠癌细胞增殖的作用。

2. 氟非尼酮 200ug/ml 在 48、72 小时可抑制人结肠癌细胞的增殖 (与对照组比较 48 小时 p<0.01; 72 小时 p<0.001); 吡非尼酮 200ug/ml 剂量在 48 小时无抑制人结肠癌细胞增殖的作用, 在 72 小时可抑制人结肠癌细胞的增殖 (与对照组比较 p<0.01)。

3. 氟非尼酮 400ug/ml 能在 24、48、72 小时抑制人结肠癌细胞的增殖（与对照组比较 24 小时 $p<0.05$ ；48、72 小时 $p<0.001$ ）；吡非尼酮 400ug/ml 在 24 小时无抑制人结肠癌细胞增殖的作用，在 48、72 小时能抑制人结肠癌细胞的增殖（与对照组比较 $p<0.001$ ）；氟非尼酮 400ug/ml 剂量组在 72 小时对人结肠癌细胞的抑制作用大于同等剂量的吡非尼酮（ $p<0.001$ ）。

4. 氟非尼酮 800ug/ml、1600ug/ml 和吡非尼酮 800ug/ml、1600ug/ml 均能在 24、48、72 小时抑制人结肠癌细胞的增殖（与对照组比较 $p<0.001$ ），并且随着时间的延长，抑制率增加；氟非尼酮 800ug/ml、1600ug/ml 在 24、48、72 小时对结肠癌细胞的抑制作用均大于同等剂量的吡非尼酮（与同等剂量的吡非尼酮比较 24 小时 $p<0.05$ ；48、72 小时 $p<0.001$ ）。

四、结论：

氟非尼酮和吡非尼酮均能够抑制人结肠癌细胞的增殖，氟非尼酮的抑制作用强于同等剂量吡非尼酮。

实施例 4

氟非尼酮抑制胃癌细胞(BGC-803)增殖的试验

一、材料：

- 1.细胞：人胃癌细胞(BGC-803)
- 2.试剂：MTT 试剂盒为美国 R&D 公司

二、方法：

用噻唑蓝（MTT）方法，细胞用含 10%小牛血清的DMEM培养基培养，将细胞制成 1×10^5 /ml 的细胞悬液，每孔 100ul 接种于 96 孔板中。待细胞贴壁后换无血清DMEM培养基，24 小时后弃去无血清培养基，换含不同浓度氟非尼酮和吡非尼酮的含 10%小牛血清的培养基，每个浓度设 5 个复孔。分别于加药后 24、48、72 小时后，每孔加MTT10ul，4 小时后将MTT吸出，每孔加MTT溶解液 100ul，15min后待MTT完全溶解，酶标仪测OD值。统计学方法，采用单因素方差分析。

三、实验结果：

氟非尼酮抑制胃癌细胞(BGC-803)增殖的 MTT 结果

	24 小时	48 小时	72 小时
对照	0.335 ± 0.028	1.052 ± 0.037	1.252 ± 0.051
氟非尼酮 100ug/ml	0.334 ± 0.050	1.046 ± 0.043	1.244 ± 0.061
氟非尼酮 200ug/ml	0.332 ± 0.028	1.028 ± 0.037	1.210 ± 0.048
氟非尼酮 400ug/ml	0.33 ± 0.031	1.000 ± 0.027	$1.167 \pm 0.045^*$
氟非尼酮 800ug/ml	0.312 ± 0.043	0.951 ± 0.043	$1.122 \pm 0.039^{**}$
氟非尼酮 1600ug/ml	$0.216 \pm 0.038^{***}$	$0.492 \pm 0.019^{***}$	$0.485 \pm 0.019^{***}$
吡非尼酮 100ug/ml	0.334 ± 0.023	1.049 ± 0.065	1.245 ± 0.052
吡非尼酮 200ug/ml	0.333 ± 0.029	1.022 ± 0.049	1.203 ± 0.041
吡非尼酮 400ug/ml	0.329 ± 0.022	0.995 ± 0.039	$1.166 \pm 0.084^*$
吡非尼酮 800ug/ml	0.316 ± 0.027	0.943 ± 0.016	$1.111 \pm 0.044^{***}$
吡非尼酮 1600ug/ml	$0.209 \pm 0.026^{***}$	$0.627 \pm 0.056^{***}$	$0.644 \pm 0.018^{***}$

* 表示与对照组比较有统计学意义 ($p < 0.05$)

** 表示与对照组比较有统计学意义 ($p < 0.01$)

*** 表示与对照组比较有统计学意义 ($p < 0.001$)

Δ 表示与相同剂量组吡非尼酮比较有统计学意义 ($p < 0.05$)

$\Delta\Delta\Delta$ 表示与相同剂量组吡非尼酮比较有统计学意义 ($p < 0.001$)

1、氟非尼酮和吡非尼酮 1600ug/ml 剂量组均能在 24、48、72 小时抑制人胃癌细胞 (BGC-803) 的增殖 (与对照组比较 $p < 0.001$)，并且随着时间的延长，抑制率增加；

2、氟非尼酮和吡非尼酮 800ug/ml 剂量组均能在 72 小时抑制人胃癌细胞(BGC-803) 的增殖 (与对照组比较，氟非尼酮 $p < 0.01$ ，吡非尼酮 $p < 0.001$)。

3、氟非尼酮和吡非尼酮 400ug/ml 剂量组均能在 72 小时抑制人胃癌细胞(BGC-803) 的增殖 (与对照组比较 $p < 0.05$)。

4、氟非尼酮 1600ug/ml 剂量组在 72 小时对结肠癌细胞(BGC-803)的抑制作用大于同等剂量的吡非尼酮 ($p<0.001$)。

四、结论:

氟非尼酮和吡非尼酮均能够抑制人胃癌细胞(BGC-803)的增殖;氟非尼酮 1600ug/ml 的抑制作用强于同等剂量吡非尼酮。

实施例 5

氟非尼酮抑制胃癌细胞(MGC-803)增殖的试验

一、材料:

- 1.细胞: 人胃癌细胞(MGC-803)
- 2.试剂: MTT 试剂盒为美国 R&D 公司

二、方法:

用噻唑蓝 (MTT) 方法, 细胞用含 10%小牛血清的DMEM培养基培养, 将细胞制成 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 的细胞悬液, 每孔 100ul 接种于 96 孔板中。待细胞贴壁后换无血清DMEM培养基, 24 小时后弃去无血清培养基, 换含不同浓度氟非尼酮和吡非尼酮的含 10%小牛血清的培养基, 每个浓度设 5 个复孔。分别于加药后 24、48、72 小时后, 每孔加MTT10ul, 4 小时后将MTT吸出, 每孔加MTT溶解液 100ul, 15min后待MTT完全溶解, 酶标仪测OD值。统计学方法, 采用单因素方差分析。

三、实验结果:

氟非尼酮抑制胃癌细胞(MGC-803)增殖的 MTT 结果

	24 小时	48 小时	72 小时
对照	0.248 ± 0.007	0.478 ± 0.019	0.611 ± 0.036
氟非尼酮 100ug/ml	0.247 ± 0.012	0.454 ± 0.012	0.601 ± 0.032
氟非尼酮 200ug/ml	0.246 ± 0.017	0.442 ± 0.043	0.561 ± 0.029
氟非尼酮 400ug/ml	0.230 ± 0.03	0.444 ± 0.037	$0.496 \pm 0.043^{***}$
氟非尼酮 800ug/ml	$0.198 \pm 0.015^{***}$	$0.389 \pm 0.030^{***}$	$0.385 \pm 0.042^{***\Delta}$

吡非尼酮 100ug/ml	0.245±0.0	0.456±0.013	0.559±0.021
吡非尼酮 200ug/ml	0.244±0.014	0.453±0.029	0.593±0.035
吡非尼酮 400ug/ml	0.235±0.020	0.447±0.020	0.493±0.028*
吡非尼酮 800ug/ml	0.184±0.015***	0.353±0.045***	0.444±0.029***

* 表示与对照组比较有统计学意义 ($p<0.05$)

** 表示与对照组比较有统计学意义 ($p<0.01$)

*** 表示与对照组比较有统计学意义 ($p<0.001$)

Δ 表示与相同剂量组吡非尼酮比较有统计学意义 ($p<0.05$)

1、氟非尼酮和吡非尼酮 800ug/ml 均能在 24、48、72 小时抑制人胃癌细胞(MGC-803)的增殖 (与对照组比较 $p<0.001$)。

2、氟非尼酮和吡非尼酮 400ug/ml 剂量组均能在 72 小时抑制人胃癌细胞(MGC-803)的增殖 (与对照组比较氟非尼酮 $p<0.001$, 吡非尼酮 $p<0.05$)。

3、氟非尼酮 800ug/ml 剂量组在 72 小时对胃癌细胞(MGC-803)的抑制作用大于同等剂量的吡非尼酮 ($p<0.05$)。

四、结论:

氟非尼酮和吡非尼酮均能够抑制人胃癌细胞(MGC-803)的增殖, 氟非尼酮 800ug/ml 的抑制作用强于同等剂量吡非尼酮。

实施例 6

氟非尼酮抑制肝癌细胞 (Bel-7402) 增殖的试验

一、材料:

1.细胞: 人肝癌细胞 (Bel-7402)

2.试剂: MTT 试剂盒为美国 R&D 公司

二、方法:

用噻唑蓝 (MTT) 方法, 细胞用含 10%小牛血清的DMEM培养基培养, 将细胞制成 1×10^5 /ml的细胞悬液, 每孔 100ul接种于 96 孔板中。待细胞贴壁后换无血清DMEM培养基, 24 小时后弃去无血清培养基, 换含不同浓度氟非尼酮和吡非尼酮的含 10%小牛血清的培养

基, 每个浓度设 5 个复孔。分别于加药后 24、48 小时后, 每孔加MTT10ul, 4 小时后将MTT吸出, 每孔加MTT溶解液 100ul, 15min后待MTT完全溶解, 酶标仪测OD值。统计学方法, 采用单因素方差分析。

三、实验结果:

氟非尼酮抑制肝癌细胞 (Bel-7402) 增殖的 MTT 结果

	24 小时	48 小时	72 小时
对照	0.615±0.040	0.733±0.048	1.103±0.090
氟非尼酮 100ug/ml	0.577±0.038	0.688±0.030	1.036±0.045
氟非尼酮 200ug/ml	0.518±0.043	0.614±0.052	0.970±0.035
氟非尼酮 400ug/ml	0.493±0.013	0.570±0.085*	0.88±0.030**
氟非尼酮 800ug/ml	0.455±0.044*	0.508±0.009***	0.745±0.022***
氟非尼酮 1600ug/ml	0.334±0.014***	0.239±0.020***	0.112±0.028*** [△]
吡非尼酮 100ug/ml	0.559±0.016	0.661±0.042	0.995±0.013
吡非尼酮 200ug/ml	0.524±0.033	0.629±0.085	1.000±0.057
吡非尼酮 400ug/ml	0.491±0.028	0.578±0.073*	0.797±0.028**
吡非尼酮 800ug/ml	0.431±0.025**	0.512±0.048***	0.713±0.073***
吡非尼酮 1600ug/ml	0.405±0.010**	0.303±0.022***	0.254±0.018***

* 表示与对照组比较有统计学意义 (p<0.05)

** 表示与对照组比较有统计学意义 (p<0.01)

*** 表示与对照组比较有统计学意义 (p<0.001)

[△] 表示与相同剂量组吡非尼酮比较有统计学意义 (p<0.05)

1、氟非尼酮和吡非尼酮 400ug/ml 剂量组均能在 48、72 小时抑制人肝癌细胞(Bel-7402)的增殖。

2、氟非尼酮和吡非尼酮 800ug/ml 、1600ug/ml 剂量组均能在 24、48、72 小时抑制人

肝癌细胞（Bel-7402）的增殖。

3、氟非尼酮 1600ug/ml 剂量组在 72 小时对人肝癌细胞（Bel-7402）的抑制作用大于同等剂量的吡非尼酮（ $p < 0.05$ ）。

四、结论：氟非尼酮和吡非尼酮均能够抑制人肝癌细胞的增殖，氟非尼酮 1600ug/ml 的抑制作用强于同等剂量吡非尼酮。

权 利 要 求 书

1、1-(3-氟苯基)-5-甲基-2(1H)-吡啶酮用于制备抗肿瘤药物中的应用。

2、根据权利要求1所述的1-(3-氟苯基)-5-甲基-2(1H)-吡啶酮用于制备抗肿瘤药物中的应用，优选所说的肿瘤是肺癌。

3、根据权利要求1所述的1-(3-氟苯基)-5-甲基-2(1H)-吡啶酮用于制备抗肿瘤药物中的应用，优选所说的肿瘤是乳腺癌。

4、根据权利要求1所述的1-(3-氟苯基)-5-甲基-2(1H)-吡啶酮用于制备抗肿瘤药物中的应用，优选所说的肿瘤是结肠癌。

5、根据权利要求1所述的1-(3-氟苯基)-5-甲基-2(1H)-吡啶酮用于制备抗肿瘤药物中的应用，优选所说的肿瘤是胃癌。

6、根据权利要求1所述的1-(3-氟苯基)-5-甲基-2(1H)-吡啶酮用于制备抗肿瘤药物中的应用，优选所说的肿瘤是肝癌。

7、根据权利要求1所述的1-(3-氟苯基)-5-甲基-2(1H)-吡啶酮用于制备抗肿瘤药物中的应用，优选所说的肿瘤是前列腺癌。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2008/072406

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

IPC: A61K, A61P

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT, WPI, EPODOC, PAJ, CNKI, Chinese chemicals patent database, Chinese Medicine Abstract, CA, Embase: fluorenidone, fluorofenidone, AKF-PD(FMP), fluorophenyl, fluorebenzene, fluorophenyl, fluorebenzene, methyl, pyridine, cancer, tumor
STN structure search: 1-(3-fluorophenyl)-5-methyl-2(1H)-pyridone

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US6114353A(MARGOLIN S B) 05 Sep. 2000 (05.09.2000) the whole document	1-7
A	CN1846699A(UNIV XIANGYA HOSPITAL CENT SOUTH) 18 Oct. 2006 (18.10.2006) the whole document	1-7
A	TAO, Lijian et al., Effects of 1-(3-fluorophenyl)-5-methyl-2(1H)-pyridone on renal fibroblast in rats, J Cent South Univ(Med Sci), 2004,29(2), p:139-141	1-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“L” document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“&” document member of the same patent family
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 12 Dec. 2008(12.12.2008)	Date of mailing of the international search report 08 Jan. 2009 (08.01.2009)
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer FAN,Chanjuan Telephone No. (86-10)62411209

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2008/072406

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN1846699A	18.10.2006	WO2006108354A1	19.10.2006
		CN1953749A	25.04.2007
		US2007203203A1	30.08.2007
		EP1878428A1	16.01.2008
		AU2006233433A1	19.10.2006
		INDELNP200708247E	23.11.2007
		JP2008535871T	04.09.2008
		KR20080018857A	28.02.2008
US6114353A	05.09.2000	WO9627374A1	12.09.1996
		AU5300596A	23.09.1996
		ZA9607801A	25.06.1997
		EP0813409A1	29.12.1997
		BRPI9607541A	23.12.1997
		AU697742B	15.10.1998
		JP11501911T	16.02.1999
		KR19980020379A	25.06.1998
		MX9706689A1	01.06.1998
		MX214372B	22.05.2003
		EP0813409B1	06.05.2004
		DE69632396E	09.06.2004
		ES2220975TT3	16.12.2004
		USRE40155E	18.03.2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2008/072406

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER(According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC)

A61K 31/4412 (2006.01) i

A61P 35/00 (2006.01) i

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2008/072406

A. 主题的分类

参见附加页

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: A61K, A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

WPI, EPODOC, PAJ, 中国期刊网(CNKI), 中国专利检索(CNPAT), 中国药物专利数据库, 中国药学文摘,

CA, MEDLINE, EMBASE: 氟非尼酮, 氟苯基, 氟基苯基, 甲基, 吡啶酮, 肿瘤, 癌, fluofofenidone, fluorofenidone, AKF-PD(FMP), fluorophenyl, fluobenzene, fluorophenyl, fluorobenzene, methyl, pyridine, cancer, tumor

STN 结构检索: 1-(3-氟苯基)-5-甲基-2(1H)-吡啶酮

:

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	US6114353A(MARGOLIN S B) 05.9 月 2000 (05.09.2000) 全文	1-7
A	CN1846699A(中南大学湘雅学院) 18.10 月 2006 (18.10.2006) 全文	1-7
A	陶立坚等, 1-(3-氟苯基)-5-甲基-2(1H)-吡啶酮对鼠肾成纤维细胞的影响, 中南大学学报(医学版), 2004,29(2), P:139-141	1-7

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

12.12 月 2008 (12.12.2008)

国际检索报告邮寄日期

08.1 月 2009 (08.01.2009)

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

授权官员

樊婵娟

电话号码: (86-10) **62411209**

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2008/072406

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN1846699A	18.10.2006	WO2006108354A1	19.10.2006
		CN1953749A	25.04.2007
		US2007203203A1	30.08.2007
		EP1878428A1	16.01.2008
		AU2006233433A1	19.10.2006
		INDELNP200708247E	23.11.2007
		JP2008535871T	04.09.2008
		KR20080018857A	28.02.2008
US6114353A	05.09.2000	WO9627374A1	12.09.1996
		AU5300596A	23.09.1996
		ZA9607801A	25.06.1997
		EP0813409A1	29.12.1997
		BRPI9607541A	23.12.1997
		AU697742B	15.10.1998
		JP11501911T	16.02.1999
		KR19980020379A	25.06.1998
		MX9706689A1	01.06.1998
		MX214372B	22.05.2003
		EP0813409B1	06.05.2004
		DE69632396E	09.06.2004
		ES2220975TT3	16.12.2004
		USRE40155E	18.03.2008

主题的分类（按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类）

A61K 31/4412 (2006.01) i

A61P 35/00 (2006.01) i