

[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 200710112253.8

[51] Int. Cl.

C07K 7/64 (2006.01)

A61K 38/15 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 11 月 28 日

[11] 公开号 CN 101077885A

[22] 申请日 2003. 10. 20

[21] 申请号 200710112253.8

分案原申请号 200380101647.3

[30] 优先权

[32] 2002. 10. 18 [33] GB [31] PCT/GB02/004735

[32] 2003. 2. 26 [33] GB [31] 0304367.6

[32] 2003. 6. 24 [33] GB [31] 0314725.3

[71] 申请人 马尔药品公司

地址 西班牙马德里

[72] 发明人 G·T·费尔克洛思 M·埃利塞斯

H·萨萨克

P·M·阿维莱斯·马利亚诺

M·D·C·奎斯瓦斯·马尔尚特

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 程金山

权利要求书 4 页 说明书 20 页

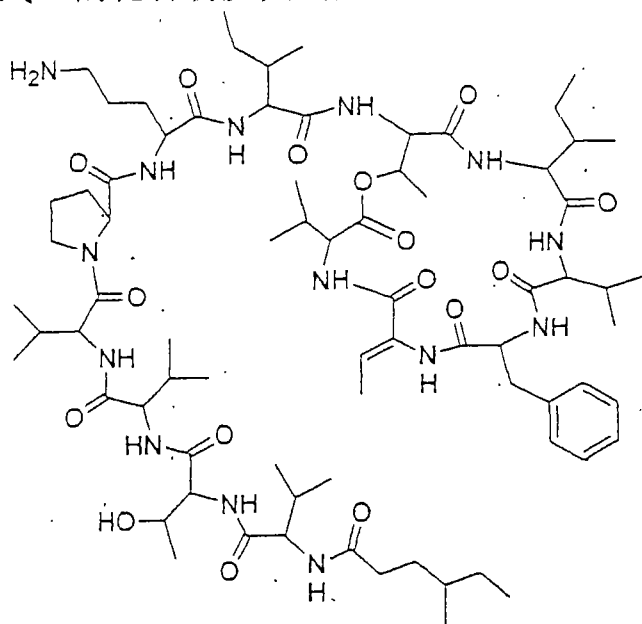
[54] 发明名称

新型抗肿瘤化合物

[57] 摘要

本发明涉及新型 kahalalide 抗肿瘤化合物，特别是 kahalalide F 的类似物，其用作抗肿瘤、抗病毒、抗真菌剂和用于治疗银屑病。

1. 式 1 的化合物及其药用盐、互变异构体及溶剂化物:



式 1

2. 根据权利要求 1 的化合物, 其中所述化合物是 (4S)-MeHex-D-Val-L-Thr-L-Val-D-Val-D-Pro-L-Orn-D-*allo*-Ile- 环 (D-*allo*- Thr-D-*allo*-Ile-D-Val-L-Phe-Z-Dhb-L-Val), 及其药用盐、互变异构体及溶剂化物。

3. 根据权利要求 1 的化合物, 其中所述化合物是 (4S)-MeHex-D-Val-L-Thr-L-Val-D-Val-D-Pro-L-Orn-D-*allo*-Ile- 环 (D-*allo*- Thr-D-*allo*-Ile-D-Val-L-Phe-Z-Dhb-L-Val), 及其药用盐。

4. 根据权利要求 3 的化合物, 其中所述的化合物包含至多 25% 的任何其他 kahalalide。

5. 根据权利要求 3 的化合物, 其中所述的化合物包含至多 10% 的任何其他 kahalalide。

6. 根据权利要求3的化合物，其中所述的化合物包含至多5%的任何其他 kahalalide。

7. 根据权利要求3的化合物，其中所述的化合物包含至多2%的任何其他 kahalalide。

8. 根据权利要求3的化合物，其中所述的化合物包含至多1%的任何其他 kahalalide。

9. 根据权利要求3的化合物，其中所述的化合物包含至多0.5%的任何其他 kahalalide。

10. 根据权利要求3的化合物，其中所述的化合物包含少于0.5%的任何其他 kahalalide。

11. 一种化合物，如根据权利要求3所定义，其中所述的化合物是基本纯的。

12. 根据权利要求4的化合物，其中所述的其他 kahalalide 是具有5-甲基己基侧链的 kahalalide F。

13. 根据权利要求5的化合物，其中所述的其他 kahalalide 是具有5-甲基己基侧链的 kahalalide F。

14. 根据权利要求6的化合物，其中所述的其他 kahalalide 是具有5-甲基己基侧链的 kahalalide F。

15. 根据权利要求7的化合物，其中所述的其他 kahalalide 是具有5-甲基己基侧链的 kahalalide F。

16. 根据权利要求 8 的化合物，其中所述的其他 kahalalide 是具有 5-甲基己基侧链的 kahalalide F。

17. 根据权利要求 9 的化合物，其中所述的其他 kahalalide 是具有 5-甲基己基侧链的 kahalalide F。

18. 根据权利要求 10 的化合物，其中所述的其他 kahalalide 是具有 5-甲基己基侧链的 kahalalide F。

19. 含有权利要求 1—18 任何一项中定义的化合物的药物组合物及药用载体或稀释剂。

20. 权利要求 1—18 中任何一项中定义的化合物，用作药物。

21. 权利要求 1—18 中任何一项中定义的化合物在药物生产中的用途。

22. 权利要求 1—18 中任何一项中定义的化合物在药物生产中的应用，所述的药物用于治疗癌症，银屑病，病毒感染或者真菌感染。

23. 根据权利要求 22 的用途，其中所述的治疗针对患癌症或者银屑病的任何哺乳动物，优选人，并且所述的治疗包括给被感染的个体施用治疗有效量的权利要求 1—18 中任何一项中定义的化合物。

24. 根据权利要求 23 的用途，其中所述的哺乳动物是人并且患有癌症。

25. 根据权利要求 24 的用途，其中所述的患者患有不有利应答于其他治疗的难治疗的癌症。

26. 根据权利要求 24 的用途, 其中所述的癌症选自前列腺癌, 乳腺癌, 肝细胞癌, 黑素瘤, 结直肠癌, 肾癌, 卵巢癌, NSCL 癌, 上皮癌, 胰腺癌及过表达 Her2/neu 癌基因的肿瘤。

27. 一种试剂盒, 其包含独立的含有药物组合物和重构试剂的容器, 所述的药物组合物包含权利要求 1—18 中任何一项中定义的化合物。

28. 一种制备权利要求 1—18 中任何一项中定义的化合物的方法。

29. 根据权利要求 28 的方法, 特征在于其使用 4 甲基己酸作为起始材料。

30. 根据权利要求 28 的方法, 特征在于其使用 (4S) -甲基己酸。

新型抗肿瘤化合物

发明领域

本发明涉及新型 kahalalide 抗肿瘤化合物,特别是 kahalalide F 的类似物,其中脂族 5-甲基己酸被 4-甲基己酸替代,含有它们的药物组合物以及作为抗肿瘤、抗病毒、抗真菌剂和在治疗中的应用。

发明背景

Kahalalide 化合物是从一种夏威夷海洋中草食性软体动物 *Elysia rufescens* 及其食物,羽藻属 (*Bryopsis. sp.*) 绿藻中分离出来的肽。关于 Kahalalides A-F 的描述见于 Hamman 等, J. Am. Chem. Soc., 1993, 115, 5825-5826。

关于 Kahalalide A-G 的描述见于 Hamann, M.等, J. Org. Chem, 1996, 61, 6594-6600: "Kahalalides : bioactive peptides from a marine mollusk *Elysia rufescens* and its algal diet *Bryopsis sp.*"。

关于 Kahalalide H 和 J 的描述见于 Scheuer P. J. 等, J. Nat. Prod. 1997, 60, 562-567: "Two acyclic kahalalides from the sacoglossan mollusk *Elysia rufescens*"。

关于 Kahalalide O 的描述见于 Scheuer P. J. 等, J. Nat. Prod. 2000, 63(1) 152-4: A new depsipeptide from the sacoglossan mollusk *Elysia ornata* and the green alga *Bryopsis species*"。

关于 kahalalide K 参见 Kan, Y.等, J. Nat. Prod. 1999 62 (8) 1169- 72: "Kahalalide K: A new cyclicdepsipeptide from the hawaiian green alga *bryopsis species*"。

相关报道还参见 Goetz 等, Tetrahedron, 1999, 55; 7739-7746: "The absolute stereochemistry of Kahalalide F" ; Albericio, F.等 Tetrahedron Letters, 2000, 41, 9765-9769: "Kahalalide B. Synthesis of a natural cyclodepsipeptide" ; Becerro 等 J. Chem. Ecol. 2001, 27 (11), 2287-99

"Chemical defenses of the sarcoglossan mollusk *Elysia rufescens* and its host *Alga bryopsis sp.*".

在 kahalalide 化合物中, kahalalide F 因其抗肿瘤活性而最具前景。其结构复杂, 包含六个氨基酸组成的环状部分和七个氨基酸组成的末端具有脂肪酸基团的环外链。其抗人肺癌 A-549 和人结肠癌 HT-29 的体外细胞培养物的活性报道于 EP 610 078。Kahalalide F 还表现出抗病毒和抗真菌性能。

体内临床前实验表明 Kahalalide F 在雌小鼠中的最大耐受剂量 (MTD) 在单剂量静脉推注下为 280 $\mu\text{g/kg}$ 。但是微高于 MTD 的单剂量静脉注射即有剧烈毒性, 动物显示神经中毒症状并死亡, 而如果依照每日一次的 5 日计划, 280 $\mu\text{g/kg}$ Kahalalide F 可重复施用而无任何明显的急性中毒迹象。参见 Supko, F. 等, Proceedings of the 1999 AACR NCI EORTC International Conference, abstract 315: "Preclinical pharmacology studies with the marine natural product Kahalalide F".

WO 02 36145 描述了含有 kahalalide F 的药物组合物以及该化合物在癌症治疗中的新应用, 因此其所有内容结合于此作为参考。

WO 03 33012, 我们要求其优先权, 描述了 Kahalalide 化合物在肿瘤学中的临床应用, 其完整地结合于此作为参考。

GB 0304367, 我们也要求其优先权, 描述了 kahalalide 化合物在治疗银屑病及相关疾病中的应用, 其完整地结合于此作为参考。

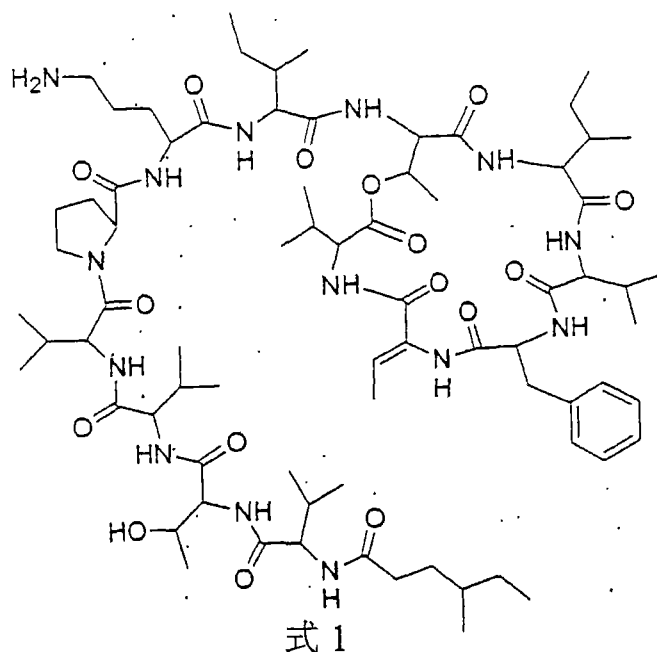
关于天然及合成 kahalalide 化合物的合成及细胞毒活性的描述参见 WO 01 58934, 其完整地结合于此作为参考。WO 01 58934 描述了 Kahalalide F 及末端脂肪酸链被其它脂肪酸替代的具有相似结构的化合物的合成。

仍需提供更多的抗肿瘤化合物, 特别是更多具有改良了的性能的 Kahalalide 化合物。

发明概述

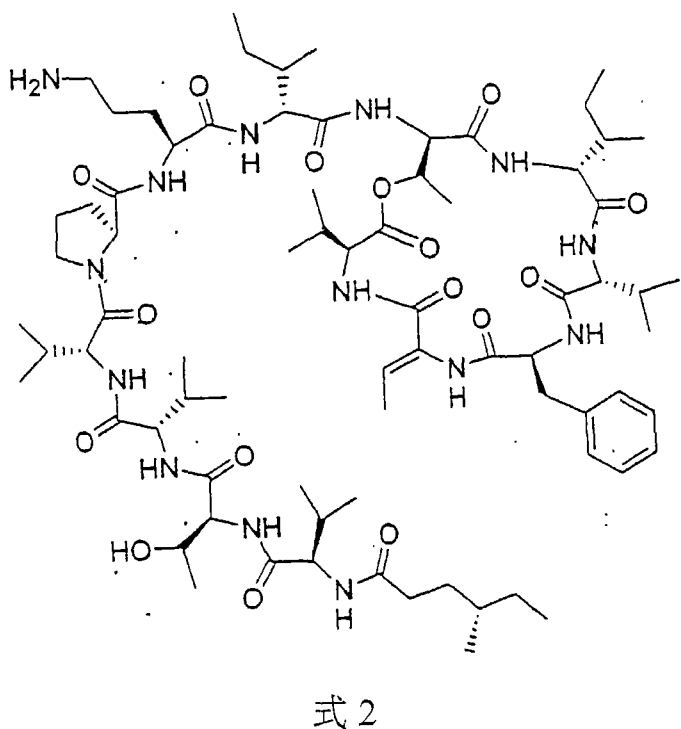
我们意外地发现一种 kahalalide 类似化合物表现出颇具前景的活性和体内模型中改善的抗肿瘤功效。

本发明涉及一种式 1 的化合物及其药用盐，前药，互变异构体和溶剂化物等。



此化合物相当于具有 4-甲基己酸末端脂肪酸链的 Kahalalide F, 并将于下文被称为 4-甲基己酸 KF。

在优选实施方案中，本发明涉及含有(4S)-甲基己酸、具有式 2 的化合物及其药用盐，前药，互变异构体和溶剂化物。此化合物将于下文中称为 (4S)-甲基己酸 KF。



本发明还涉及包含前述化合物及其药用载体，赋形剂或稀释剂的药物

组合物。

本发明进一步提供了治疗患癌症或银屑病的任何哺乳动物，尤其是人的方法，包括对患者个体施用治疗有效量的上述化合物。

本发明可特别用于治疗对其它治疗无有利应答的难治癌症。特别是，本发明的组合物可在其它化疗尝试和无效后使用。

本发明特别涉及对前列腺癌，乳腺癌，肝细胞癌，黑素瘤，结直肠癌，肾癌，卵巢癌，NSCL 癌，上皮癌，胰腺癌及过表达 Her2/neu 癌基因的肿瘤患者的治疗。

另一方面本发明涉及上述定义的化合物在制备药物中的应用。在优选实施方案中，药物用于治疗癌症，银屑病，病毒感染或真菌感染。

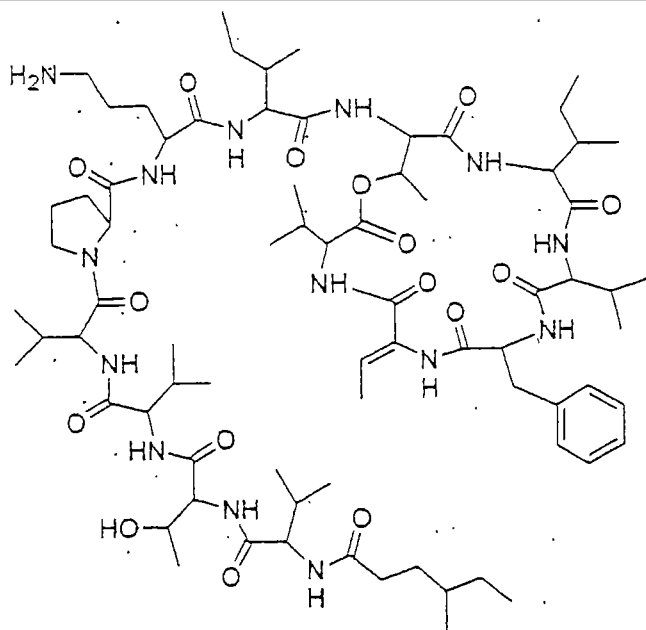
本发明另外提供包含独立容器的试剂盒，容器含有药物组合物和重构试剂，该组合物含有以上定义的化合物。还提供了重构方法。

本发明还涉及上述化合物的制备方法。优选地该方法使用 4-甲基己酸作为原材料。在一个优选实施方案中 4-甲基己酸是(4S)-甲基己酸。在最优选的实施方案中该方法为固相合成。

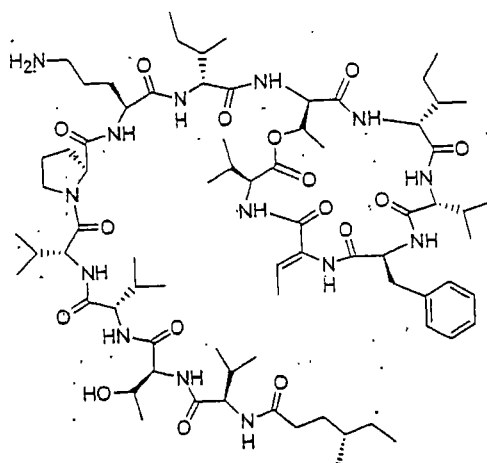
发明详述

我们鉴定了 Kahalalide F 的类似物，其表现出相对于 Kahalalide F 的显著活性改进。如比较例中所示，4-甲基己酸 KF 意外地在两个体内癌症模型中表现出显著的改进功效。考虑到 4-甲基己酸 KF 和 5-甲基己酸 KF 之间的结构差异很小，这更令人倍感惊奇。

本发明中的化合物为具有 4-甲基己酸脂肪酸链而不是 5-甲基己酸的 Kahalalide F，并具有按照式 1 的结构：



特别是我们优选该化合物具有如式 2 定义的立体化学结构：



然而本发明中的化合物具有不对称中心并因此存在不同的对映异构体和非对映异构体形式。本发明涉及本发明化合物的所有旋光异构体和立体异构体及其混合物，和涉及可以使用或含有它们的所有药物组合物 and 治疗方法。

为了方便，我们将本发明中的化合物，特别是化合物 1 和 2，称为 4-甲基己基 kahalide F 化合物，或 4-mehexKF 化合物。优选地本发明中的 4-mehexKF 化合物很大程度上不含，基本上不含或完全不含其它 kahalalide 化合物。例如，本发明中的 4-mehexKF 优选不含有具有 5-甲基己基侧链的 kahalalide F。特别地，本发明中的 4-mehexKF 优选含有最多 25%，10%，5%，2%，1% 或 0.5%，或少于 0.5% 的任何其它 kahalalide，尤其是 kahalalide

F. 从相关角度来说, 本发明中的 4mehexKF 以基本上纯的形式提供。这种在一定程度上不含其它 kahalalides 的 4-mehexKF 化合物特别适合用于本发明中的药物组合物及治疗方法。

本发明包括本发明化合物, 以及其药用盐, 其中一个或多个氢原子, 碳原子或其它原子被其同位素所替代。这样的化合物可用作药代动力学研究及结合测定中的研究和诊断工具。

如本文所用, 本发明的化合物, 包括式 1 和 2 的化合物, 定义为包括其药用衍生物或其前药。“药用衍生物或前药”指任何药用盐, 酯, 酯盐或本发明化合物的其它衍生物, 其经施用于受体后能提供(直接或间接)本发明的化合物或其代谢物或残基。尤其适宜的衍生物和前药是那些当将这些化合物施用于患者后有下列效应的物质: 能增加本发明中化合物的生物利用度(如, 通过口服施用化合物以便更容易吸收入血), 增强母体化合物向给定生物隔室的传递, 增加了溶解度以能够通过注射给药, 改变代谢或改变分泌速率。

本发明中化合物的盐可以包含式 1 或 2 化合物中氮衍生的酸加成盐。治疗活性在于衍生于本文定义的本发明化合物的部分, 其它组分的特性较不重要, 尽管出于治疗和预防目的其优选对于患者来说是药学可接受的。药用酸加成盐的例子包括衍生于无机酸和有机酸的那些, 所述无机酸如盐酸, 氢溴酸, 磷酸, 偏磷酸, 硝酸和硫酸, 所述有机酸如酒石酸, 乙酸, 三氟乙酸, 柠檬酸, 苹果酸, 乳酸, 富马酸, 安息香酸, 乙醇酸, 葡萄糖酸, 琥珀酸和甲磺酸及芳基磺酸, 如对甲苯磺酸。优选的盐是三氟乙酸盐。

本发明中化合物可依据 WO 01 58934 所述的合成方法制备, 如在 WO 01 58934 的实施例 3 中加入适当的(S)或(R) 4-甲基己酸代替 5-甲基己酸。因此本发明还包括依照式 1 或 2 的化合物的制备方法。优选该方法应用 4-甲基己酸作为初始原料。最优选初始原料是(4S)-甲基己酸。合成优选为固相合成方法。实施例中给出了合成的进一步细节。

本发明中的制备方法可由初始原料以一种立体对映的或立体控制的且快速的方式进行, 利用固相合成方法学的优点, 其中构建中的分子在整个结合操作中都与不溶性载体相结合。

本发明化合物的药物制剂可适合任何适当的途径给药, 例如通过口服

(包括口腔或舌下), 直肠, 鼻腔, 局部(包括口腔, 舌下或经皮), 阴道或非肠道(包括皮下, 肌内, 静脉内或真皮内)途径。这些制剂可通过药学领域内任何已知的方法制备, 如将载体或赋形剂与活性成分相联。

本发明化合物的优选药物组合物包括具有用于静脉给药的适当组成的液体(溶液, 混悬剂或乳剂), 它们可含有纯化合物或结合有任何载体或其它药物活性的化合物。关于药剂组合物的进一步指导可见于 WO 02 36145, 其所有内容结合在此作为参考。因此, 非离子型表面活性剂和有机酸的组合与填充剂一起适用于提供本发明化合物的冻干形式, 其适合重构(reconstitution)。重构优选通过乳化加溶剂, 链烷醇和水来实现。

冻干组合物优选主要含有填充剂, 如至少 90%或至少 95%的填充剂。填充剂的实例众所周知且包括蔗糖和甘露醇。也可使用其它填充剂。

冻干组合物中的非离子型表面活性剂优选脱水山梨糖醇酯, 更优选聚乙烯脱水山梨糖醇酯, 如聚氧乙烯山梨糖醇酐烷酸酯, 特别是聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯, 例如聚山梨糖醇酐酯 80 (polysorbate 80)。非离子型表面活性剂典型地构成一定百分比的组合物, 如 0 到 5%的组合物, 例如 2 到 3 或 4%的组合物。

冻干组合物中的有机酸典型地是脂族酸, 优选羟基羧酸, 更优选羟基多羧酸, 特别是柠檬酸。有机酸典型地构成一定百分比的组合物, 如 0 到 5%的组合物, 例如 2 到 3 或 4%的组合物。

本发明化合物在冻干组合物中的量典型地小于混合物的 1%, 或经常小于 0.1%。合适的量在 50 到 200 μg , 比如每 100 mg 组合物中有大约 100 μg 。

重构剂的乳化加溶剂适当地含有聚乙烯乙二醇酯, 特别是脂肪酸酯, 更优选的是 PEG 油酸酯如 PEG-35 油酸酯。乳化加溶剂适当地为重构剂的 0 到 10%, 典型地约 3 到 7%, 比如约 5%。链烷醇通常是乙醇, 适当地为重构剂的 0 到 10%, 典型地约 3 到 7%, 比如约 5%。重构剂的其余部分是水, 提供适于静脉注射的重构溶液。

用 0.9%盐水进一步稀释重构的溶液将更适于 kahalalide 化合物的输注。适宜的输注设备优选包括玻璃容器而不是聚乙烯容器。导管宜用聚硅氧烷导管。

因此优选的重构剂含有 2 到 7%，比如约 5% 的乳化加溶剂，2 到 7%，比如约 5% 的乙醇，以及剩余的水。

制剂可以单剂量或多剂量容器给出，例如密封的安瓿或小瓶，并存放于（冰冻-干燥）冻干条件下，使用前只需加入消毒过的液体载体，例如注射用水。

因而本发明另外提供包含独立容器的试剂盒，所述容器含有冻干组合物和重构剂。还提供重构方法。

本发明的化合物或组合物的给药可以通过静脉输注。输注时间可达 72 小时，更优选的是 1 到 24 小时，最优选约 1 或约 3 小时。输注时间短到在医院不过夜而能进行治疗就十分理想。然而，如果需要的话输注时间将会在 24 小时左右或甚至更长。

给药按周期进行，在优选应用方法中，在每个周期的第一周将本发明化合物的静脉输注提供给患者，允许患者在周期剩余部分中恢复。每个周期优选的持续时间是 1，3 或 4 周；如果需要可以提供多个周期。在备选的剂量给药方案中，本发明的化合物每 3 周内连续施用 5 天，每天约 1 小时。其它方案可根据变化设计。

根据患者个体对治疗的耐受性需要时可延迟剂量和/或减少剂量并调整用药计划，特别是对肝转氨酶或碱性磷酸酶高于正常血清水平的患者建议减少剂量。

从一个方面说，本发明提供了一种对患有癌症的人类患者的治疗方法，包含对所述患者施用本发明的化合物，剂量低于 1200 mcg/m²/天，优选低于 930 mcg/m²/天且更优选低于 800 mcg/m²/天。适宜的剂量最少为 320 mcg/m²/天。优选的剂量在 400-900 mcg/m²/天范围内，优选在 500-800 mcg/m²/天，更优选在 600- 750 mcg/m²/天。特别优选的是约 650-700 mcg/m²/天的剂量。另一方面本发明提供了一种对患有癌症的人类患者的治疗方法，包含对所述患者施用本发明的化合物，在 5 天内每天施用，剂量低于 930 mcg/m²/天，随后休息 1 到 4 周，其间不施用 kahalalide 化合物。剂量优选在 650-750 mcg/m²/天，更优选在约 700 mcg/m²/天。输注时间优选在 1 到 24 小时之间，更优选在 1 到 3 小时之间。特别优选的输注时间为大约 1 或约 3 小时。休息时间优选为 2-3 周，更优选大约 2 周。

本发明还提供了一种对患有癌症的人类患者的治疗方法，包含对所述患者施用本发明的化合物，每周一次，剂量低于 800 mcg/m²/天。该剂量优选为 600-700 mcg/m²/天，更优选 650 mcg/m²/天。输注时间优选在 1 到 24 小时之间，更优选在 1 到 3 小时之间。特别优选的输注时间为大约 1 小时。

尽管上文给出了关于剂量的指导，正确的化合物剂量将依具体的制剂，施用方式及具体的部位、宿主和治疗的肿瘤而变化。其它因素如年龄，体重，性别，饮食，给药时间，分泌速率，宿主状况，药物组合，反应灵敏性和病情严重性都要考虑。在最大耐受剂量内可连续用药或周期性用药。

本发明特别涉及对前列腺癌，乳腺癌，肝细胞癌，黑素瘤，结直肠癌，肾癌，卵巢癌，NSCL 癌，上皮癌，胰腺癌及过表达 Her2/neu 癌基因的肿瘤患者的治疗。更优选地本发明涉及对肝细胞癌，黑素瘤，乳腺癌和前列腺癌的治疗方法。

本发明还涉及一种治疗与哺乳动物真皮细胞过度增殖有关的疾病的方法，包含对该哺乳动物施用有效的、无毒性量的本发明的化合物。所述皮肤病优选银屑病。本发明优选涉及对患有银屑病，特别是严重银屑病的人类患者的治疗。

本发明中化合物和组合物可与其它药物共用以提供联合治疗。其它药物可形成同一组合物的一部分，或作为独立的组合物提供在同一时间或不同时间施用。对其它药物的特性没有特别的限制，尽管与其它化疗、激素或抗体药剂的结合要予以关注。本发明化合物和其它药物活性试剂或药剂的量以及相对用药时间要进行选择以获得期望的联合治疗效果。

实施例

实施例 1: (4S)-甲基己酸 KF 的制备

制备的一般方法及起始步骤见于 WO 01 58934 中所述。

(4S)-MeHex-D-Val-Thr(tBu)-Val-D-Val-D-Pro-Orn(Boc)-D-allo-Ile-D-allo-Thr(Val-Alloc)-D-allo-Ile-D-Val-O-TrtCl-树脂

去除 Fmoc 基团，用 DIPCDI (233 μ L, 对 1.5 mmol 和 3 当量; 310 μ L, 对 2 mmol 和 4 当量; 以及 388 μ L, 对 2.5 mmol, 5 当量)和 HOBt (230

mg, 对 1.5 mmol 和 3 当量; 307 mg, 对 2 mmol 和 4 当量; 及 395 mg, 2.5 mmol. 5 当量) 作用 90 分钟将 Fmoc-Val-OH (678 mg, 2 mmol, 4 当量), Fmoc-Thr (tBu)-OH (992 mg, 2.5 mmol, 5 当量), Fmoc-D-Val-OH (678 mg, 2 mmol, 4 当量), 和(4S)-MeHex-OH (195 mg, 1.5 mmol, 3 当量)顺序加到上述肽酰-树脂(实施例 3)中。在所有情况下, 经过 90 分钟的偶联, 茚三酮测试为阴性。Fmoc 基团的去除及洗涤如一般方法中所述进行。

(4S)-MeHex-D-Val-Thr(tBu)-Val-D-Val-D-Pro-Orn(Boc)-D-allo-Ile-D-allo-Thr(Val-Z-Dhb-Phe-Alloc)-D-allo-Ile-D-Val-O-TrtCl-树脂

在 PhSiH₃ (617 μ L, 5 mmol, 10 当量)存在时在氩气气氛中用 Pd(PPh₃)₄ (58 mg, 0.05 mmol, 0.1 当量)除去 Alloc 基团, 用 DMF (1.25 mL)溶解 Alloc-Phe-Z-Dhb-OH (666 mg, 2 mmol, 4 当量) 和 HOAt (273 mg, 2 mmol, 4 当量)并加到肽酰-树脂中, 然后加入 DIPCDI (310 μ L, 2 mmol, 4 当量)并搅拌混合物 5 小时, 茚三酮测试呈阴性。用 DMF 和 CH₂Cl₂ 洗涤后将等分部分的肽酰-树脂用 TFA-H₂O (1:99) 处理 1 分钟然后产物用 MALDI-TOF-MS 表征, 计算值: C₈₈ H₁₄₆ N₁₄ O₂₁, 1,736.18。实验值: m/z 1,758.67[M+Na]⁺, 1,774.62 1,618.2 [M+K]⁺。

(4S)-MeHex-D-Val-Thr(tBu)-Val-D-Val-D-Pro-Orn(Boc)-D-allo-Ile-D-allo-Thr(Val-Z-Dhb-Phe-H)-D-allo-Ile-D-Val-OH :

DMF 和 CH₂Cl₂ 洗涤后在 PhSiH₃ (617 μ L, 5 mmol, 10 当量)存在时在氩气气氛下用 Pd(PPh₃)₄ (58 mg, 0.05 mmol, 0.1 当量)去除 Alloc 基团。用 TFA-CH₂Cl₂ (1:99) (5 x 30 秒)从树脂上裂解被保护的肽。滤出液用水收集 (4 mL) 并用旋转蒸发除去部分水分。用 ACN 溶解除去水分时出现的固体, 然后将溶液冻干, 生成 639 mg (387 μ mol, 产率 77%)标题化合物, 用 HPLC (条件 A, t_R 10.5 分钟)测得纯度为>95%。

(4S)-MeHex-D-Val-Thr-Val-D-Val-D-Pro-Orn-D-allo-Ile-cyclo(D-allo-Thr-D-allo-Ile-D-Val-Phe-Z-Dhb-Val) = (4S)己酸 KF

被保护的肽(实施例 6)(639 mg, 387 μ mol)溶于 CH₂Cl₂(390 mL, 1mM),

HOBt (237 mg, 1.55 mmol)溶于最小体积的 DMF, 加入 DIEA (203 μ L, 1.16 mmol, 3 当量), DIPCDI(240 μ L, 1.55 mmol, 4 当量)。可搅拌混合物 1 小时, 然后用 HPLC 检查结晶过程。减压蒸发除去溶剂。用 TFA-H₂O (19:1, 85 mL)溶解被保护的环肽并搅拌混合物 1 小时。减压蒸发除去溶剂, 加入二噁烷 (30 mL)并减压蒸发除去溶剂(该过程重复了三次), 然后加入 H₂O (40 mL)并冻干。粗产物经 HPLC(Kromasil C₈ 5 μ m, 205 x 50 mm)纯化, 用含 44%乙腈(+0.05% TFA)的水(+0.05% TFA)等度洗脱, 55 mL/h, 在 220 nm 处检测, 生成标题产物 (192 mg, 0.13 mmol, 产率 26%, 92.3%)。MALDI-TOF-MS, 计算值 C₇₅H₁₂₄N₁₄O₁₆, 1,477.9. 实验值: m/z 1,500.12 [M+Na]⁺, 1,515.97 [M+K]⁺。该化合物的 ¹H-NMR (2.5 mM; 500 MHz, H₂O-D₂O (9: 1))谱见表 I。

RESIDUE	N-H	H α	H β	OTHER
(Z)-Dhb	9.59 (s)	-	6.63 (q, J =7.5 Hz)	1.19 (d, γ -CH ₃)
D-al-lo-Ile 1	8.82 (d, J =9.0 Hz)	4.42	1.87	1.25, 1.09, 0.82 (γ -CH ₂ , γ -CH ₃ , δ -CH ₃)
L-Phe	8.75 (d, J =5.5 Hz)	4.63	3.08 (m)	7.31 (2 H Ar, t), 7.25 (3H Ar, d)
D-al-lo-Thr	8.67(d, J =9.0 Hz)	4.64	5.05 (m)	1.21 (γ -CH ₃)
D-Val 3	8.13 (d, J =7.5 Hz)	4.33	2.01	0.90 (2 γ -CH ₃)
L-Orn	8.29 (d, J =7.5 Hz)	4.31	1.66 (2H)	1.88 (γ -CH ₂), 2.96 (bs, δ -CH ₂), 7.56 (ϵ -NH ₃ ⁺)

D-al-lo-Ile 2	7.92 (d)	4.18	1.80	1.25, 1.09, 0.81 (γ -CH ₂ , γ -CH ₃ , δ -CH ₃)
D-Val 5	8.01 (d)	4.08	2.07	0.87 (2 γ -CH ₃)
L-Thr	8.19 (d, J = 7.5 Hz)	4.29	4.14 (m)	1.13 (γ -CH ₃)
D-Val 2	7.89 (d, J = 7.5 Hz)	4.32	2.11	0.78 (γ -CH ₃)
L-Val 4	8.04 (d)	4.10	2.07	0.90 (2 γ -CH ₃)
L-Val 1	7.19 (d, J = 9 Hz)	4.02	1.52	0.75 (γ -CH ₃), 0.65 (d, γ -CH ₃)
D-Pro	-	4.36	2.23, 1.99 (m, β -CH ₂) 1.85 (m, γ -CH ₂), 3.83 (1H, m, δ -CH ₂), 3.64 (1H, m, δ -CH ₂)	
4(S)-MeHex	-	2.26 (2H)	1.57 (β -CH ₂), 1.26, 1.10, 1.33, 0.79 (d-CH ₂ , δ -CH ₃ , γ -CH, ϵ -CH ₃)	

用 Varian Unity Plus (500 MHz) 进行 ¹H-NMR 波谱法[1H, NOESY, TOCSY 在(278K)]。化学位移(d)表示为 TMS 下游每百万部分。相关常数表示为赫兹。

实施例 2: (4R)-甲基己酸 KF 的制备

实验方法如实施例 1 所述, 从 1g 树脂开始, 唯一的区别是, 在适当的步骤中, 用(4R)-MexHex 代替(4S)-MexHex。产物(220 mg, 0.15 mmol, 30%, 92.3%纯度)用 ES-MS 表征, C₇₅H₁₂₄N₁₄16, 1,477.9。实验值: m/z 1,499.07 [M+Na]⁺, 1,514.94 [M+K]⁺。

实施例 3: 体外细胞毒性活性

这些测定的最终目的是通过使细胞持续与待测样品接触以中断“体外”肿瘤细胞培养物的生长。

细胞系

名称	N° ATCC	种类	组织	特性
P-388	CCL-46	小鼠	腹水液	淋巴瘤
K-562	CCL-243	人	白血病	红白血病 (胸腔积液)
A-549	CCL-185	人	肺	肺癌“NSCL”
SK-MEL-28	HTB-72	人	黑素瘤	恶性黑素瘤
HT-29	HTB-38	人	结肠	结肠腺癌
LoVo	CCL-229	人	结肠	结肠腺癌
LoVo-Dox		人	结肠	结肠腺癌 (MDR)
SW620	CCL-228	人	结肠	结肠腺癌(淋巴结转移)
DU-145	HTB-81	人	前列腺	前列腺癌, 无雄激素受体
LNCaP	CRL-1740	人	前列腺	前列腺癌, 有雄激素受体
SK-BR-3	HTB-30	人	乳房	乳腺癌, Her2/neu+ , (胸腔积液)
MCF-7	HTB-22	人	乳房	乳腺癌, (胸腔积液)
MDA-MB-231	HTB-26	人	乳房	乳腺癌, Her2/neu+ , (胸腔积液)
IGROV-1		人	卵巢	卵巢癌
IGROV-ET		人	卵巢	卵巢癌, 表征为 ET-743 抗

				性细胞
SK-OV-3	HTB-77	人	卵巢	卵巢癌 (恶性腹水)
OVCAR-3	HTB-161	人	卵巢	卵巢癌
HeLa	CCL-2	人	子宫颈	子宫颈上皮 样癌
HeLa-APL	CCL-3	人	子宫颈	子宫颈上皮 样癌, 表征为 aplidine 抗性 细胞
A-498	HTB-44	人	肾	肾癌
PANC-1	CRL-1469	人	胰	胰上皮样癌
HMEC1		人	内皮	

一种利用硫代罗丹明 B (SRB)反应的显色分析用于定量测量细胞生长及活性[根据 Philip Skehan, 等(1990), New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening, *J. Natl. Cancer Inst.*, 82: 1107-1112 所述技术]。

此分析使用直径 9 mm 的 96 孔细胞微型板(Faircloth, 1988; Mosmann, 1983)。大多数细胞系来自 American Type Culture Collection (ATCC), 由人类不同的癌细胞衍生而来。

细胞保存于 RPMI 1640 10% FBS, 其中添加 0.1g/l 青霉素和 0.1g/l 硫酸链霉素, 在 37°C, 5% CO₂ 和 98%湿度下培养。实验时, 用胰蛋白酶消化分汇合的培养物以收获细胞并在平板接种前重悬于新鲜培养基中。

细胞接种于 96 孔微量滴定板, 每孔 195 μ L 培养基 5×10^3 细胞, 在无药物培养基中生长 18 小时使细胞贴壁。然后加入浓度范围在 10^{-8} 到 10^{-1} μ g/ml 的等分试样 5 μ L, 其溶于 DMSO/EtOH/PBS (0.5 : 0.5 : 99)。作用 48 小时后, 用 SRB 方法检测抗肿瘤效果: 细胞用 50 μ L 冷的 50% (wt/vol)三氯乙酸 (TCA)固定并在 4°C 下温育 60 分钟。平板用去离子水清洗并干燥。每个微量滴定孔中加入 100 μ L SRB 溶液(0.4% wt/vol 于 1% 乙酸中)并于室温温育 10 分钟。用 1%乙酸洗涤除去未结合的 SRB。平板在空气中干

燥后, 结合的染料溶于 Tris 缓冲液。用自动分光光度平板读数器在单波长 490 nm 处读取光密度值。

计算三个平行样品孔数据的平均 $\pm$ SD。可计算细胞反应的一些参数: GI=生长抑制, TGI=总生长抑制(细胞生长抑制效应)和 LC=细胞杀死(细胞毒性效应)

结果见表 II, 各化合物间无显著性差异。

表 II. 活性数据 (摩尔)

CELL LINE		5-methhex.KF	(4S)-methhex KF	(4R)-methhex KF
DU-145	GI50	7,51E-07	2,37E-07	1,20E-06
	TGI	1,64E-06	6,97E-07	2,14E-06
	LC50	3,60E-06	2,49E-06	3,82E-06
LN-caP	GI50	9,61E-07	1,12E-06	1,50E-06
	TGI	2,31E-06	2,58E-06	2,46E-06
	LC50	5,57E-06	5,93E-06	4,04E-06
SKOV-3	GI50	-	-	-
	TGI	-	-	-
	LC50	-	-	-
IGROV	GI50	4,20E-07	2,92E-07	9,41E-07
	TGI	1,40E-06	7,51E-07	1,81E-06
	LC50	3,80E-06	2,62E-06	3,50E-06
IGROV-ET	GI50	4,47E-07	2,25E-07	8,05E-07
	TGI	9,54E-07	4,79E-07	1,62E-06
	LC50	3,09E-06	2,82E-06	3,26E-06
SK-BR-3	GI50	3,98E-07	1,81E-07	1,25E-06
	TGI	4,48E-06	3,32E-07	2,20E-06
	LC50	6,77E-06	6,06E-07	3,86E-06
MEL-28	GI50	6,90E-07	1,43E-06	1,14E-06
	TGI	1,56E-06	2,60E-06	2,09E-06
	LC50	3,55E-06	4,72E-06	3,80E-06
H-MEC-1	GI50	-	-	-
	TGI	-	-	-
	LC50	-	-	-
A-549	GI50	8,66E-07	2,67E-07	1,20E-06
	TGI	1,81E-06	7,17E-07	2,26E-06
	LC50	3,78E-06	3,09E-06	4,24E-06

K-562	GI50	1,54E-06	2,52E-06	3,73E-06
	TGI	2,95E-06	6,77E-06	6,77E-06
	LC50	5,66E-06	6,77E-06	6,77E-06
PANC-1	GI50	1,38E-06	6,77E-06	4,70E-06
	TGI	2,89E-06	6,77E-06	4,24E-06
	LC50	6,07E-06	6,77E-06	4,24E-06
HT-29	GI50	1,41E-07	3,01E-07	7,38E-07
	TGI	2,81E-07	7,51E-07	1,54E-06
	LC50	5,62E-07	2,71E-06	3,22E-06
LOVO	GI50	1,20E-07	1,63E-07	2,48E-07
	TGI	2,26E-07	3,08E-07	7,78E-07
	LC50	4,28E-07	5,80E-07	2,28E-06
LOVO-DOX	GI50	1,62E-07	1,57E-07	2,88E-07
	TGI	3,17E-07	3,25E-07	7,71E-07
	LC50	6,20E-07	6,77E-07	2,19E-06
HELA	GI50	8,39E-07	1,18E-06	1,05E-06
	TGI	1,89E-06	2,42E-06	1,93E-06
	LC50	4,26E-06	4,97E-06	3,55E-06
HELA-APL	GI50	1,06E-06	1,04E-06	1,56E-06
	TGI	2,17E-06	2,13E-06	3,47E-06
	LC50	4,43E-06	4,39E-06	6,77E-06

实施例 4：体外毒性

为了评估药物对正常细胞的细胞毒性，我们依据 ATCC 的说明将正常

细胞系以 5000 细胞每孔的密度培养于 96 孔板: AML-12, 正常小鼠肝细胞和 NRK-52E, 正常大鼠肾细胞。每个板上的细胞在加入试验药物前静置过夜。将 10 μL 含不同浓度 (1×10^{-10} - 0.01mg/ml 终浓度) 药物的培养基加入每个孔中 (100 μL 培养基) 并在 37°C 及 5% CO_2 下继续温育过夜。所有的实验至少重复 3 次并一式两份分析。24 小时后依制造商 (Promega) 的说明书 (适合所有细胞类型) 进行 MTS 检测 (细胞滴定 96 含水)。通过 formazan 底物的酶促转化测定细胞生存力 (线粒体活性)。

从表 III 中的结果可见, 化合物 5 甲基己酸 KF 和 (4S)-甲基己酸 KF 之间无显著性差异。

表 III

	ALM 肝脏 IC_{50} (μM)	NRK 肾 IC_{50} (μM)
5-己基己酸 KF	3.4	2.7
(4S)-己基己酸 KF	5.4	2.7

实施例 5: 在 CD-1 小鼠和无胸腺动物中的体外 MTD

对 CD-1 小鼠和无胸腺小鼠 (两种性别) 进行单一推注给药 (single bolus administration) 和 5 个每日剂量以后确定每种药物的最大耐受剂量 (MTD)。结果见表 IV, 化合物 5 甲基己酸 KF 和 (4S)-甲基己酸 KF 之间无显著性差异。

表 IV

	5-己基己酸 KF	(4S)-己基己酸 KF
雄性 CD-1 小鼠 MTD Bolus	300	300
雌性 CD-1 小鼠 MTD Bolus	200	200
雄性 CD-1 小鼠 MTD 5DD	175-350	175-350
雌性 CD-1 小鼠 MTD 5DD	175-350	175-350
雄性无胸腺小鼠	350	350

MTD Bolus		
雌性无胸腺小鼠 MTD Bolus	325	325
雄性无胸腺小鼠 MTD 5DD	350	350
雌性无胸腺小鼠 MTD 5DD	325	325

实施例 6：对乳房异种移植（5DD）的体内药效

采用连续 5 日（即 QDx5）对雌小鼠静脉推注（第 0-4 日）的用药方案，用乳房异种移植物分析四分之三最大耐受剂量（MTD）的 5-甲基己酸 KF 和 (4S)-甲基己酸 KF 各自的药效。化合物以新鲜制备的赋形剂 [Cremophor-EL/乙醇/水 (5: 5: 90)]中的小瓶溶液形式提供。（QDx5 方案的）每日剂量依每 20 g 动物体重 0.2 ml 的注射体积静脉用药。

赋形剂对照组与对应的治疗组之间净肿瘤生长的评估(即%ΔT/ΔC)表明所有组的最小（适）值出现在开始用药后的第 3 天。另外，成对统计分析（采用 Mann-Whitney，非参数方法）显示，尽管考虑到它们相似的结构及前面的实施例会感到意外，这两个化合物的功效出现了显著性差异。

基于此处描述的功效研究及前述毒性实验（实施例 4）可赋予(4S)-甲基己酸 KF 至少 1.33 的治疗指数（1 x MTD/0.75 x MTD，有毒剂量/有效剂量）。另外，一个生物相关现象是(4S)-甲基己酸 KF 在乳房内的抗肿瘤效果在相同相对 MTD 剂量下比在前列腺异种移植（实施例 7）中持续的时间长。简言之，(4S)-甲基己酸 KF 在乳房移植物内明确表现出是更有效的异构体并且其生物作用的持续时间表明其在这类肿瘤中具有长时间的效应。

表 V

	剂量 μg/kg	净肿瘤生长 mm ³ , n=9	%ΔT/ΔC
对照	-	167	100

5-甲基己酸 KF	245	108	65
(4S)-甲基己酸 KF	245	74	44

实施例 7：前列腺异种移植（5DD）的体内功效

采用连续 5 日（即 QDx5）对雄性小鼠静脉推注（第 0-4 日）的用药方案，用前列腺异种移植物分析单剂量的 5-甲基己酸 KF 和(4S)-甲基己酸 KF 各自的药效。化合物以新鲜制备的赋形剂[Cremophor-EL/乙醇/水 (5: 5: 90)]中的小瓶溶液形式提供。（QDx5 方案的）每日剂量依每 20 g 动物体重 0.2 ml 的注射体积静脉用药。

赋形剂对照组(即%ΔT/ΔC)与对应的治疗组之间净肿瘤生长的评估表明所有组的最小（适）值出现在开始用药后的第 3 天。另外，成对统计分析（采用 Mann-Whitney，非参数方法）显示，用 262 μg/kg/天的剂量的(4S)-甲基己酸 KF 取得了显著更大的功效。基于此处描述的功效研究及前述实验（实施例 4）的毒性实验可赋予(4S)-甲基己酸 KF 至少 1.33 的治疗指数（1 x MTD/0.75 x MTD，有毒剂量/有效剂量）。结果列于下面表 IV 中。

表 IV

	剂量μg/kg	净肿瘤生长 mm ³ , n=10	%ΔT/ΔC
对照	-	236	100
5-甲基己酸 KF	262	126	53
(4S)-甲基己酸 KF	262	62	26

实施例 8：用一组人肿瘤细胞系评价 Kahalalide F 类似物在中空纤维内的抗肿瘤活性。

用一组人肿瘤细胞系，即 SK-Hep-1 (肝癌), HepG2 (肝细胞癌), Panc-1 (胰腺), 和 Mel-28 (黑素瘤), 在中空纤维 (HF) 内检测了上述 Kahalalide F 类似物的抗肿瘤活性。人肿瘤细胞被体外密封在 HF 中，然后植入到雌性

无胸腺小鼠体内。

根据前面在无胸腺小鼠上进行的MTD实验选择5-甲基己酸KF和(4S)-甲基己酸KF的剂量为325 µg/kg/天（见实施例5）。按每20 g动物0.2 ml注射体积进行5个连续日剂量的腹膜内注射给药。

总之，KF-4(S)-Met对肝癌（sc），肝细胞癌（ip和sc），胰腺（ip）显示出统计学上显著的抗肿瘤活性，并在胰腺和黑素瘤中的sc隔室内显示出有显著性的趋势（即 $P = 0.059$ ）。相反，KF-5-Met显示活性的肿瘤种类就少一些，即只有胰腺（ip和sc）和黑素瘤（sc），而对任何类型检测用的肝癌细胞都没有活性。下表列出了这些结果的概述，清楚地显示了两种化合物之间的差异。

药物	肿瘤类型/HF 定位（任意数量的细胞/HF）							
	SK-Hep-1		HepG2		Panc-1		Mel-28	
	ip	sc	ip	sc	ip	sc	ip	sc
赋形剂	0.575	0.872	0.576	0.509	0.200	0.392	2.078	1.77
KF-4(S)-Met	0.485	0.525*	0.335*	0.319*	0.129*	0.237 [§]	1.906	1.51
KF-5-Met	0.693	0.686	0.475	0.361	0.149*	0.192*	1.771	1.56

*统计学上显著， $P < 0.05$ 。[§]有显著性趋势，即 $P = 0.059$ 。