[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl[7]
A61K 31/381
A61K 31/00
A61P 35/00

[12]发明专利说明书

[21] ZL 专利号 94191960.9

[45]授权公告日 2002 年 3 月 6 日

[11]授权公告号 CN 1080117C

[22]申请日 1994.3.10 [24]颁证日 2002.3.6
[21]申请号 94191960.9
[30]优先权
[32]1993.3.11 [33]US [31]08/029,801
[86]国际申请 PCT/US94/02577 1994.3.10
[87]国际公布 WO94/20093 英 1994.9.15
[85]进入国家阶段日期 1995.10.30
[73]专利权人 阿勒根公司
地址 美国加利福尼亚州
共同专利权人 得克萨斯系统大学
[72]发明人 P·A·J·戴维斯
R·A·钱拉拉纳
[56]参考文献

EP0210929	1987. 2. 4	C07C69/76
FR2599027	1987.11.27	C07C13/45
US5084476	1992. 1.28	A61K31/38
WO9321146	1993.10.28	C07C69/76

审查员 安佩东
[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 谭明胜 王景朝

权利要求书 4 页 说明书 40 页 附图页数 7 页

[54]发明名称 用具有 RXR 类视色素受体激动剂活性的化合物治疗患肿瘤的哺乳动物

[57]摘要

作为 RXR 类视色素受体位点激动剂的类似类视色素的化合物可诱发，细胞培养物中肿瘤细胞的自然死亡，因此可用作为治疗哺乳动物(包 括人)肿瘤的药物。为 RXR 受体特异激动剂的化合物以及为 RAR 和 RXR 两者激动剂(泛激动剂)的化合物可诱发细胞自然死亡现象，不过为 了避免与 RAR 激动剂活性有关的不希望的副作用，RXR 激动剂化合物 作为药物是最好的。以适合于全身、局部或损伤区施用的药用组合物 的形式给患肿瘤的哺乳动物施用 RXR 激动剂化合物。药用组合物中活 性成分 RXR 激动剂化合物的浓度范围为约 0.001～5%(按重量计)，这样以致于该组合物为治疗的患者每天提供约 0.1～100mg 活性成分 /kg 体重。

ISSN1008-4274

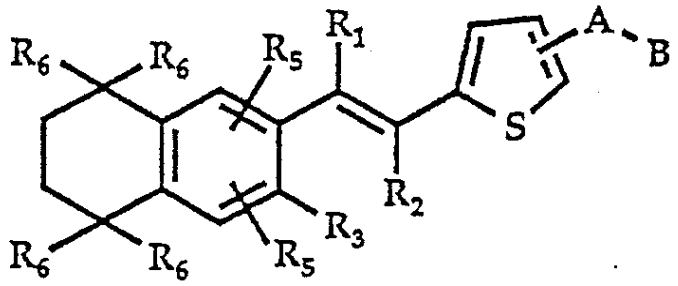
权利要求书

1．适用于诱发患肿瘤的哺乳动物中肿瘤细胞自然死亡的药用组合物，该药用组合物包括药学上可以接受的赋形剂和具有RXR 类视色素受体激动剂生物特性的活性化合物。

2．权利要求1的药用组合物，其中活性化合物的浓度约为0.001～5％（按重量计）。

3．权利要求1的药用组合物，其中与所述化合物对RAR 类视色素受体的活性相比，所述活性化合物是RXR 类视色素受体的特异激动剂，其中化合物在RAR类视色素受体的EC_{50}值是在RXR受体的EC_{50}值的至少2倍。

4．权利要求1的药用组合物，其中活性化合物具有下式结构，



R_1 为低级烷基、Cl、Br 或 I；

R_2 为H、低级烷基、Cl、Br 或 I；

R_3 为低级烷基、Cl、Br、I、OR_{11}、SR_{11}、$OCOR_{11}$、$SCOR_{11}$、NH_2、NHR_{11}、$N(R_{11})_2$、$NHCOR_{11}$ 或$NR_{11}-COR_{11}$；

各 R_5 基团独立地为H、低级烷基、Cl、Br、I、有1～6个碳原子的低级烷氧基或低级硫代烷氧基；

各 R_6 基团独立地为H或低级烷基；

A为$(CH_2)_n$（这里n为0～5）、有3～6个碳原子的低级支

链烷基、有3～6个碳原子的环烷基、有2～6个碳原子和1或2个双键的链烯基、有2～6个碳原子和1或2个三键的炔基，

B为氢、COOH 或其药学上可接受的盐、$COOR_8$ 、$CONR_9R_{10}$、$-CH_2OH$、CH_2OR_{11}、CH_2OCOR_{11}、CHO、$CH(OR_{12})_2$ 、$CHOR_{13}O$、$-COR_7$ 、$CR_7(OR_{12})_2$ 、或$CR_7OR_{13}O$，这里R_7为有1～5个碳原子的烷基、环烷基或链烯基，R_8为有1～10个碳原子的烷基，或有5～10个碳原子的环烷基，或R_8为苯基或低级烷基苯基，R_9和R_{10}独立地为氢、有1～10个碳原子的烷基、或有5～10个碳原子的环烷基、或苯基或低级烷基苯基，R_{11}为有1～10个碳原子的烷基、苯基或低级烷基苯基，R_{12}为低级烷基，以及R_{13}为有2～5个碳原子的二价烷基。

5．权利要求4的药用组合物，其中活性化合物结构式中R_1、R_3和R_6为甲基，R_2和R_5为氢，以及基团－A－B代表$COOR_8$。

6．权利要求5的药用组合物，其中R_8为氢。

7．权利要求6的药用组合物，其中$COOR_8$基团位于噻吩环的4位。

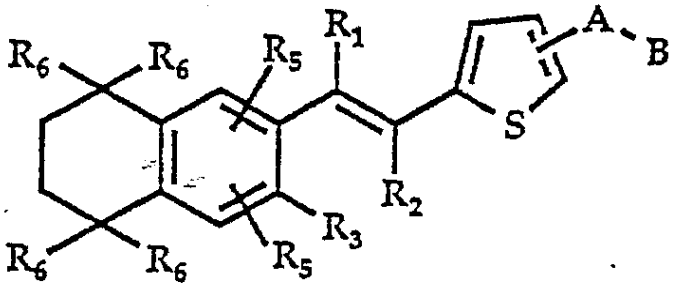
8．权利要求6的药用组合物，其中$COOR_8$基团位于噻吩环的5位。

9．一种具有类视色素样活性且为RXR 类视色素受体激动剂的活性化合物在制备用于治疗包括人在内的哺乳动物所患肿瘤的药物中的应用，当给哺乳动物给药时所述药物能诱发肿瘤细胞自然死亡。

10．权利要求9的应用，其中当与RAR 类视色素受体相比，活性化合物是RXR 类视色素受体特异性激动剂，其中化合物在RAR类视色素受体的EC_{50}值是在RXR受体的EC_{50}值的至少2倍。

11．权利要求9的应用，其中药物适于全身性给药。

12．权利要求9的应用，其中活性化合物具有下式结构，



R_1 为低级烷基、Cl、Br 或 I；

R_2 为H、低级烷基、Cl、Br 或 I；

R_3 为低级烷基、Cl、Br、I、OR_{11}、SR_{11}、$OCOR_{11}$、$SCOR_{11}$、NH_2、NHR_{11}、$N(R_{11})_2$、$NHCOR_{11}$ 或$NR_{11}-COR_{11}$；

各 R_5 基团独立地为H、低级烷基、Cl、Br、I、有1～6个碳原子的低级烷氧基或低级硫代烷氧基；

各 R_6 基团独立地为H或低级烷基；

A为$(CH_2)_n$（这里n为0～5）、有3～6个碳原子的低级支链烷基、有3～6个碳原子的环烷基、有2～6个碳原子和1或2个双键的链烯基、有2～6个碳原子和1或2个三键的炔基，

B为氢、COOH 或其药学上可接受的盐、$COOR_8$、$CONR_8R_{10}$、$-CH_2OH$、CH_2OR_{11}、CH_2OCOR_{11}、CHO、$CH(OR_{12})_2$、$CHOR_{13}O$、$-COR_7$、$CR_7(OR_{12})_2$、或$CR_7OR_{13}O$，这里 R_7 为有1～5个碳原子的烷基、环烷基或链烯基，R_8 为有1～10个碳原子的烷基，或有5～10个碳原子的环烷基，或 R_8 为苯基或低级烷基苯基，R_9 和 R_{10} 独立地为氢、有1～10个碳原子的烷基、或有5～10个碳原子的环烷基、或苯基或低级烷基苯基，R_{11} 为有1～10个碳原子

的烷基、苯基或低级烷基苯基，R_{12}为低级烷基，以及R_{13}为有2～5个碳原子的二价烷基。

13．权利要求12的方法，其中活性化合物的结构式中R_1、R_3和R_6为甲基，R_2和R_5为氢，以及基团－A－B代表$COOR_8$。

14．权利要求13的方法，其中R_8为氢。

15．权利要求14的方法，其中$COOR_8$基团位于噻吩环的4位。

16．权利要求14的方法，其中$COOR_8$基团位于噻吩环的5位。

说　明　书

用具有RXR 类视色素受体激动剂活性的化合物治疗患肿瘤的哺乳动物

本发明所属领域

本发明涉及通过施用在RXR 类视色素受体位点上具有类似激动剂活性的化合物诱使肿瘤细胞自然死亡的方法。更具体地说，本发明涉及用RXR 激动剂化合物治疗患有肿瘤的哺乳动物的方法。

背景技术

具有类视色素类似活性的化合物在先有技术中是熟知的，并且在许多美国专利和别国专利以及科学出版物中均有叙述。类视色素类似活性可用于治愈或减轻哺乳动物（包括人）的许多疾病（例如皮肤病、痤疮、毛囊角化病、牛皮癣、鱼鳞病、湿疹和特异反应性皮炎）的症状和病况；治疗和预防恶性过度增生疾病（例如上皮细胞癌、乳腺癌、前列腺癌、头部和颈部癌和骨髓白血病）；逆转或预防动脉粥样硬化和由于新内膜过度增生而引起的（心瓣）再狭窄；治疗和预防其他非恶性过度增生疾病（例如子宫内膜增生、良性前列腺肥大、增生的Vitreal 视网膜病和发育不良；治疗自动免疫疾病和免疫混乱（例如红斑狼疮）；治疗慢性炎症疾病（例如肺纤维化）；治疗和预防与脂质代谢和运输有关的疾病（例如脂质代谢障碍）；促进伤口愈合；治疗干燥眼综合症；逆转和预防太阳对皮肤损伤的影响，在先有技术中这些通常是已知的和被认可的。

但是，在先有技术中研究的具有类视色素类似性质的化合物是有缺点的。当应用于皮肤时（这是治疗皮肤病重要的应用方式），几个所述先有技术化合物可引起严重的刺激，并且当口服时同样会引起粘膜毒性。许多具有类视色素类似活性的先有技术化合物有致畸作用以及其他副作用。

除了许多先有技术专利和出版物叙述了具有类视色素类似活性的具体化合物或类型化合物之外，几份共同未决专利申请和最近公布的专利（它们已转让给本申请的受让人）也均涉及具有类视色素类似活性的其他化合物和／或用具有类视色素类似化合物治疗哺乳动物（包括人）的方法。

较近期人们在先有技术中已经认识到，在生物系统中有一种以上类视色素细胞反应途径，并且在生物系统中对于天然出现的类视色素激素至少存在二类主要的受体族。先有技术中上述较近期的研究已在下面论文中叙述：D. J. Mangelsdorf 等 . "Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway", Nature Vol 345 May 17, 1990 pp 224-229; 以及 J. N. Rottman 等 . A Retinoic Acid-responsive Element in the Apoliprotein AI Gene Distinguishes between Two Different Retinoic Acid Response Pathways, Molecular and Cellular Biology, July 1991, pp 3814 - 3820.

1991，pp 3814－3820。下述另外的参考文献涉及视黄酸受体：M. Petkovich 等 . "A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptor", Nature, Vol. 330, December 3, 1987, pp 444-450; V. Giguere 等. "identification of a receptor for the morphogen retinoic acid", Nature, Vol 330, December 17, 1987, pp 624-629; N. Brand 等 . "Identification of a second human retinoic acid receptor", Nature, Vol 332,

April 28, 1988, pp 850-853; A. Krast 等 ., "A third human retinoic acid receptor, hRAR ", Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, Vol 86, July 1989, pp 5310-5314; D. J. Mangelsdorf 等 ., "Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis-retinoic acid", Genes & Development, Vol. 6, 1992, pp. 329-344.

在先有技术中，二类主要类视色素受体族被称为RAR（视黄酸受体）和RXR（类视色素X受体），并且已知这二族中的每一类受体均有亚型，每一亚型用希腊字母标明，例如RAR$_{\alpha}$，RAR$_{\beta}$和RAR 。由D. J. Mangelsdorf 等发表的上述论文叙述，一些类视色素类似化合物（视黄酸类似物）活化RAR 受体的能力比活化RXR 受体的能力更强。

发明概要

本发明现已发现，作为RXR 类视色素受体位点激动剂的类视色素类似化合物引起细胞培养物中肿瘤细胞的自然死亡现象，因此适用于作为药物导致哺乳动物（包括人）中肿瘤细胞自然死亡。具体地说，本发明发现，作为RXR 特异激动剂的类视色素类似化合物（对RAR 受体位点没有活性）可引起肿瘤细胞自然死亡现象。既是RAR 也是RXR 激动剂的类视色素类似化合物也可引起自然死亡现象，这样的化合物称为“泛激动剂”（pan agonist）化合物。对RAR 受体位点具有特异作用的类视色素类似化合物（在RXR 受体上没有活性）表明不引起肿瘤细胞系自然死亡现象，因此RAR 特异化合物不能用在本发明的治疗方法中。

可以给患有肿瘤的哺乳动物施用本发明的RXR 激动剂化合物，本发明的RXR 激动剂化合物可以作为药用组合物用于全身性给药或局部给药或损伤区给药。在药用组合物中活性成分RXR 激动剂化合物的浓度范围约为0.001～5％（按重量计），这样，组合物每天可供给患

者约0.1mg～100mg 活性成分／kg 体重。

用作为RXR 受体激动剂的化合物的能力可以用下面详细叙述的称为“阳离子脂质体介导的转染试验”的现代试验方法进行测定。

附图的简单说明

图 1 表示EC_{50} 数据和计算的曲线图，它是用试验化合物（AGN 191701，化合物 1 ）和参考化合物反式视黄酸在RAR_{α} 受体上以阳离子脂质体介导的转染试验得到的。

图 2 表示EC_{50} 数据和计算的曲线图，它是用试验化合物（AGN 191701，化合物 1 ）和参考化合物AGN 191440（化合物 2 ）在RXR_{α} 受体上以阳离子脂质体介导的转染试验得到的。

图 3 表示EC_{50} 数据和计算的曲线图，它是用试验化合物（AGN 191659，化合物 3 ）和参考化合物反式视黄酸在RAR_{α} 受体上以阳离子脂质体介导的转染试验得到的。

图 4 表示EC_{50} 数据和计算的曲线图，它是用试验化合物（AGN 191659，化合物 3 ）和参考化合物AGN 191440（化合物 2 ）在RXR_{α} 受体上以阳离子脂质体介导的转染试验得到的。

图 5 是由用化合物 1 （AGN 191701 ）处理的HL－60 cdm－ 1 细胞得到的DNA“梯形”的照片。

图 6 是用介质处理但未用本发明的RXR 激动剂化合物处理的“对照”细胞的照片。

图 7 是用化合物 1 处理 4 小时的细胞的照片。

图 8 是用化合物 1 处理 4 8 小时的细胞的照片。

图 9 是用化合物 1 处理 6 天的细胞的照片。

本发明的详细描述

用于本发明药用组合物和治疗方法中的化合物是RXR 受体位点的

激动剂。用于本发明治疗方法的化合物优选对RXR 受体是特异的。虽然应用泛激动剂化合物是不优选的（因为RAR 激动剂活性通常与不希望的副作用有关），但是既作用于RAR 又作用于RXR 受体位点的泛激动剂类视色素类似化合物的应用也属于本发明的范围内。上述阳离子脂质体介导的转染试验基本上是按Feigner P. L. 和Holm M.（1989）Focus，11－2所述方法进行，通过该试验可测定作为RXR 和RAR 受体位点有效激动剂的试验化合物的活性，下面首先原则上叙述，然后再叙述如何进行该试验的具体程序。

关于该试验，已知视黄酸受体是甾族化合物／甲状腺受体大家族的一个成员，并且它们含有在各个受体中可交换的功能区。因此，构成了含有雌激素DNA 结合的功能区和雌激素反应元件（estrogen response element）氯霉素乙酰转移酶的嵌合的类视色素受体的质粒，并且在特定的培养细菌中生长。所述质粒分别编码 嵌合的RAR$_\alpha$、RAR$_\beta$、RAR 、RXR$_\alpha$受体蛋白，以及编码氯霉素乙酰A转移酶（CAT）酶蛋白。按照下述论文所陈述的方法可以得到具有上述质粒的细菌。“Nuclear Retinoic Acid Recepters: Cloning, Analysis, and Function”，M. Pfahl 等，Methods in Enzymology 189，p 256－270（1990），将其收编在本申请中作为参考。从有关的细菌中如何分离上述DNA质粒的详细方法，在下面在标题“超螺旋的质粒分离”下用具体的程序形式详细地陈述。

因此，按照所述的试验方法，将编码嵌合RAR$_\alpha$、RAR$_\beta$、RAR 或RXR$_\alpha$受体蛋白之一的DNA 质粒转染到赫拉细胞培养物中。为此，在下面详述的称为“阳离子质粒介导的转染试验”的第1天使赫拉细胞在培养基中生长。在转染方法中，转染在转染试验的第2天进行，除了相应编码嵌合的RAR$_\alpha$或RAR$_\beta$等的质粒之外，将编码CAT 酶的

DNA 质粒也加到各个细胞培养物中。这对熟悉本技术领域（尤其考虑到上面引用的M. Pfahl 等的论文）的专业人员是已知的和容易理解的，在本试验中涉及的嵌合类视色素包含识别和结合特异激动剂分子（例如视黄酸及其类似物）的配位体结合的功能区。所述嵌合的蛋白受体（按照M. Pfahl 等论文所述方法构成）还含有DNA 结合的功能区，它能够与编码CAT 酶的连接至DNA 质粒的“雌激素反应元件”（DNA 片段）结合。相互作用的特点是这样的，以致于只有当激动剂（例如视黄酸或其类似物）与相应的RAR_{α}、RAR_{β}等受体的配位体结合功能区结合，那么受体才通过其DNA 结合的功能区与能够激发信使RNA 转录CAT 酶的雌激素－反应－元件－氯霉素－乙酰－转移酶结构（ERE－CAT）的雌激素反应元件结合。换言之，只是在合适的激动剂配位体与相应的类视色素受体的配位体结合位点相结合的时候，由本试验中的赫拉细胞通过多级相互反应才能够制得CAT 酶。

雌激素－反应－元件－氯霉素乙酰－转染酶结构（ERE－CAT）本身可以按下面论文所述方法得到：Ryssel G. U. 等Cell, Vol, 46, p 1053－1061（1986），将其收编在本申请中作为参考。该方法本身在本技术领域是已知的。从细菌中如何分离并得到雌激素－反应－元件－氯霉素－乙酰－转染酶结构（ERE－CAT）的具体而详细的方法见“Supercoiled Plasmid Isolation”一书中所述的方法。

除了前面所述之外，还将lipofectin（LF）也加到各培养物中。加入lipofectin 的目的是促进质粒通过细胞膜的输送。用于该方法的Lipofectin 是市场上可以买得到的。

熟悉本技术领域的专业人员可以理解到，由于用编码RAR_{α}或RAR_{β}等嵌合受体的相应的DNA 质粒转染的结果，以及由于用ERA－CAT（如以上所述它编码CAT 酶）转染的结果，上述质粒掺入到本试

验培养的赫拉细胞中。类视色素受体质粒经历转录作用（成m－RNA），并且然后翻译成相应的嵌合受体蛋白。因此，按上述方法得到的赫拉细胞培养物制备了相应的RAR $_{\alpha}$、RAR $_{\beta}$、RAR 或RXR $_{\alpha}$ 嵌合的受体蛋白。由于用ERA－CAT 转染的结果，上述试验的细胞培养物还含有用于制备CAT 酶的遗传信息。但是如以上所述，后者遗传信息不被转录，并且CAT 酶不通过本试验相应的细胞培养物制备，除非合适的激动剂化合物结合并激活细胞中相应的RAR $_{\alpha}$、RAR $_{\beta}$、RAR 或RXR $_{\alpha}$ 嵌合的受体蛋白，结果该激活的激动剂－受体复合物与ERE－CAT 结构的雌激素反应元件结合。

继续进行上述试验方法，在试验的第 3 天将合适的参考化合物和试验化合物（激动剂或有希望的激动剂），最好以不同的浓度，加到相应的赫拉细胞培养物中。由于该加入的结果，如果试验化合物为一激动剂，那么它与相应的RAR $_{\alpha}$、RAR $_{\beta}$、RAR 或RXR $_{\alpha}$ 嵌合的受体蛋白结合，结果编码CAT 酶的遗传信息在细胞中转录，因此CAT 酶用上述细胞制得。

在细胞的溶胞作用之后（这在以下详述试验方法的第 4 天进行），测定溶胞产物的等份试样中CAT 酶的活性。这可通过将溶胞产物与氯霉素以及氚标记的乙酰辅酶A一起进行保温来进行。作为最终的测定，氚标记的乙酰氯霉素的量（它在涉及CAT 酶的酶促反应中生成）用闪烁计数器测定。

对于涉及RAR $_{\alpha}$、RAR $_{\beta}$、RAR受体的试验，应用的参考化合物是视黄酸（均为反式），对于涉及RXR $_{\alpha}$ 嵌合受体的试验，应用的参考化合物是 4－(E)－2－(5，6，7，8－四氢－3，5，5，8，8－五甲基萘－2－基）－丙烯－1－基］苯甲酸（AGN 191440，在本申请中也称为化合物 2 ）。下面评价和解释试验中得到的数据。对于每一

试验化合物和RAR 受体的每一亚种绘制曲线图（或曲线图的数学等式），其中闪烁计数器测定法得到的“每分钟计数”（cpm）（Y轴）对试验化合物的浓度作图。对于视黄酸同样制图（或数学等式）。试验化合物的EC_{50} 定义为能提供1／2（或50%）最大cpm 数值（最大的CAT 酶活性）的试验化合物的浓度，最大cpm 数值是用参考化合物视黄酸在同一受体同一试验中得到的。在图 1 和图 3 的曲线图中有图解。

为了评价和表示RXRα受体试验得到的数据，绘制试验化合物和参考化合物AGN 191440（化合物 2 ）的相同类似的曲线图（或数学等式）。参考化合物（化合物 2 ）是RXRα受体位点的已知激动剂。EC_{50}是指能提供1/2(50%)最大cpm （CAT 酶活性）的试验化合物的浓度，该最大cpm 是用参考化合物AGN 191440 在相同试验的同一受体上得到的。说明上述情况的曲线图见图 2 和图 4 。

超螺旋的质粒分离

1 升规模的大量制备

DNA 分离

1．将细胞置于冰上保持 1 5 分钟。用有JA 1 4 转头的Beckman J 2－21M离心机，于 4 ℃以 7 K rpm 离心 1 0 分钟；收集细菌细胞（大肠埃希氏杆菌）于250ml nalgene 试管中。除去上清液。

2．向各个细胞沉淀物中加1.0ml 溶液 I ，涡旋混合，使细胞沉淀物重新悬浮。从每个瓶子转移1.0ml 细胞至另一个50ml的Oakridge试管中。用 4 ml 溶液 I 洗涤原来的瓶子。再将洗涤液转移至上述的Oakridge 试管中。再加溶液 I 使总体积达16ml，并混合该溶液。转移 8 ml 至第 2 个Oakridge 试管中。于室温放置 5 分钟。

溶液 I

50mM 葡萄糖、25mM Tris-HCl pH 8 、10mM EDTA pH 8 。

3 . 向各试管中加入18ml 新配制的溶液 II 。缓和地翻转试管数次以混合试管内容物。于冰上放置 1 0 分钟。之后液体应该是清亮而无凝集物。（如果有凝块，那么是以前没有很好地使细胞充分混悬）。

溶液 II

1 %十二烷基硫酸钠（SDS）、0.2N NaOH（ 4 ml 1 0 %SDS、0.8ml 10N NaOH、35.2ml 水）。

4 . 加12ml（或合适量）冰冷却的溶液 III 。剧烈地翻转数次以混合试管内容物。应出现白色的绒毛状沉淀。于冰上放置 1 0 分钟。

溶液 III

制备如下：向60ml 5 M 醋酸钾中加入11.5ml 冰醋酸和28.5ml 水。

5 . 用有JA 2 0 转头的Beckman J 2 －21M 离心机，于 4 ℃以 17K rpm 离心 3 0 分钟。

6 . 从Oakridge 试管中分别吸取约12ml 上清液至 6 只烘干的 Corex 试管中。加0.6 倍体积异丙醇（ 7.2ml ），通过翻转进行混合，于室温放置 1 5 分钟，以便使DNA 沉淀。

7 . 于 2 0 ℃以14K rpm 用有JA 2 0 转头的Warm Beckman 离心机离心 1 5 分钟。

8 . 于 2 0 ℃用有JA 2 0 转头的 J 2 －21M 离心机，以10.5K rpm 离心 3 0 分钟（应用Corex 试管的管接头），使DNA 沉淀。

9 . 倾出上清液，在真空烧瓶上干燥巴斯德移液管的内部。

1 0 . 于真空干燥器内干燥 1 0 分钟（延长干燥时间将使沉淀溶解困难）。

用氯化铯密度梯度平衡离心法纯化质粒DNA。

11．加1 ml TE（10mM Tris-HCl pH 8，1 mM EDTA pH 8）到各Corex 试管中，使沉淀溶解。将各Corex 试管置于37℃水浴中以促进沉淀较迅速地溶解（15－30分钟）。

12．转移同一批液体至一个试管中。加TE 至总体积达8.5ml。

13．加100μl 没有DNA 酶的RNA 酶（2U／μl，来自Boehringer Mannheim Biochemical（BMB））。

14．加400μl 浓度为10mg／ml 的溴化3，8－二氨基－5－乙基－6－苯基菲啶鎓。

15．加9.0g CsCl，用巴斯德移液管混合。

16．加溶液至2个13×51mm 的Beckman 同质异晶聚合物（Polyallomer）快速封闭的离心管中。

17．于20℃用有VTi 62.5 转头的Beckman 超速离心机，以50K rpm 离心12小时。

18．超速离心之后，应该可以见到2条DNA 谱带。上面一条谱带由线性的细菌DNA 和有裂痕的环形质粒DNA 组成。下面一条谱带由封闭的环形质粒DNA 构成。用装有21号针头的3ml 注射器从试管中移出较低的在CsCl 中成带的DNA（用针头插入试管内部并移出1.5～2ml）。

19．为第2次氯化铯离心作准备

（9ml 体积第1条CsCl 谱带）－number g CsCl

（9ml 体积第1条谱带－100μl 10mg／ml 溴化3，8－二氨基－5－乙基－6－苯基菲啶鎓－50μl RNA 酶）－ml TE pH 8.0

合并第1条谱带、TE、CsCl、RNA 酶和EtBr。

20．将溶液加至2只快速封闭的离心管中。

21．用有VTi 65.2 转头的超速离心机，于20℃以50K rpm

离心１２小时，或以60K rpm 离心４小时。

２２．从２个管中取出在CsCl 中成带的DNA（仅为较低的谱带）到５ml Falcon Snap 试管中（同步骤１８）。

抽提溴化3，8－二氨基－５－乙基－６－菲啶鎓。

２３．在通风柜中加等体积异戊醇，涡旋混合，于室温用Beckman TJ－６离心机以1500 rpm 离心３分钟。

２４．转移底部水层到新的试管中。重复３－４次或直至水层澄清（无粉红颜色）。

２５．转移澄清的水层至Spectra／Por ３个透析袋mwco 3500中（在夹住透析袋之前在透析袋底部打个结节）。用巴斯德吸管加入液体。扎紧透析袋的顶端。用橡皮带使透析袋悬挂在2.8L TE 中（28ml 1 M Tris－HCl，pH８，5.6ml 0.500M EDTA，pH８）。总是带手套小心地操作透析袋。

２６．水相在2.8L TE pH８中透析几次（透析２－４小时，透析过夜，第２天再透析２－４小时）。

２７．在组织培养防护罩中将透析的DNA 转移到灭菌的微离心管中。标记试管并于－20℃贮存。

阳离子脂质体介导的转染

参考文献：Felgner，P. L. 和Holm，M.（1989）Focus 11，２。

自始至终应用无菌技术

用Ｔ－125 培养瓶培育赫拉细胞或CV－１细胞。

通常每周２次（星期一和星期五）传代细胞（将0.5ml 细胞接种在１５ml 培养基中）。

第１天：平板培养细胞

１．用胰蛋白酶消化并从Ｔ－162cm² 培养瓶中收集细胞。用血

球计数器计数细胞。通常细胞的数量足够16个12孔培养皿用。

2．根据细胞数量，用培养基（D－MEM 低葡萄糖，10%胎牛血清（FBS），2mM Glu）稀释细胞至浓度为每孔60,000 细胞。

细胞计算的实例：

要求40,000 细胞／孔，共有200 孔，已知（X）细胞／ml，因此40,000 细胞／孔×200孔－总数共需要# ml 细胞。

需要（X）细胞／ml

应用Nalge 250ml Filter Unit Receiver 把总数# ml 细胞加到培养基中，并使最终体积为200ml。用移液管充分地混合。

3．用无菌的12.5ml Combitip（放置在4的位置）加1.0ml 细胞至每孔。前后振摇培养皿（不要涡旋）。于37℃在恒湿和5%CO_2培养箱中温育过夜。在转染之前约40%细胞融合。

转染：第2天制备DNA／Lipofectin 复合物

1．用50ml 聚苯乙烯试管分别制备Lipofectin（LF）和DNA。确定2μg LF／孔、500ng ERE－CAT DNA／孔和100ng ER／RAR DNA／孔需要的LF 和DNA 体积。确定试验所需的总体积。（DNA 浓度对每个质粒制品是不同的，因此下面的计算需要作相应的调整。）

DNA (prep date)　μl/well　#wells　vol DNA　Vol Opti-Mem

α

β

τ

X

CAT

LF lot #　μl/well　#wells　μl LF　Vol Opti-Mem

用Opti－Men 培养基分别稀释LF 和DNA 至25μl×# 孔的体积数：Opti－Men I 体积＝（25μl×# 孔）－DNA 或LF 总体积

2．加稀释的LF 至稀释的DNA 中，并将试管缓和地涡旋混合。使其于室温放置10分钟。

3．从各孔中吸出培养基并用0.5ml Opti－Men I(无菌的12.5ml Combitip，放置在2的位置）洗涤2次。

4．加DNA／LF 复合物至Opti－Mem 中（450μl×# 孔）。翻转试管以进行混合。应用无菌的12.5ml Cmbitip（放置在2的位置）向各孔加500μl。前后振摇培养皿以便混合，但不要涡旋。

5．在恒湿和5% CO_2 培养箱中于37℃培育细胞6小时。

6．在6小时后应用调节在位置2的12.5ml Combitip，向各孔中加入0.5ml 培养基（D－MEM 低葡萄糖、20% FBS（炭处理过的）、2mM Glu），然后放回至培养箱中。

第3天：加入药物

在开始转染18小时后应用无菌的0.5ml Combitip（放置在位置

1）加入类视色素，一式三份（10ml），并在恒湿的5% CO_2 培养箱中于37℃培育20－24 小时。

药物稀释

$$\frac{\text{重量 (g)}}{\text{丙酮 mol. wt (g/mol)}} \times \frac{1}{.005\ \text{mol/L}} \times \frac{100\ \text{ml}}{\text{L}} = \text{ml}$$

举例如下：

将类视色素溶于丙酮并使其浓度为5 mM，并进一步用乙醇稀释至1 mM。如果类视色素不成为溶液，那么将试管置于热水中保持5秒种，随后使内含物剧烈地涡旋。每批试验均可以有不同的稀释方案。对于每数量级的2个浓度，采用如下的3.16 倍稀释：向标记的无菌12×75mm 试管（Falcon 2063）中加入1080μl 100% EtOH。应用500μl 该1 mM 溶液转移至下一试管中（316μM）。涡旋混合并作一系列的重复转移至下一个试管中，……。某些类视色素是光敏感的，尤其是RA 和13－顺式RA，应该用红光或很暗淡的光。应用的化合物的量以log 表示。

实例

加到孔中稀释的药物		最终：-log [conc.]
5 mM（开始）		
1 mM	10	5.0
316 μM	10	5.5
100μM	10	6.0
31.6μM	10	6.5
10μM	10	7.0
3.16μM	10	7.5
1μM	10	8.0
316nM	10	8.5
100nM	10	9.0
31.6nM	10	9.5
10nM	10	10.0
3.16nM	10	10.5
1.0nM	10	11.0

第4天 混合相CAT 试验

1．用0.50ml 1×PBS（没有Ca／Mg）将12mm 孔中的细胞洗涤1次。

2．应用5ml Combipipet（设置在位置1）加100μl 冰冷的1% Triton，1mM Tris－HCl pH 7.8，2mM EDTA pH 8，DNase Ⅰ。制备如下：

溶胞缓冲液（低渗缓冲液）

2.0 mg DNase I (Sigma)
4.925 ml 水
50.0 μl 100% Triton X-100 (BMB Lot #
5.0 μl 1M Tris-Cl pH 7.8
20.0 μl 0.5M EDTA pH 8

5.0 ml

3．置于冰上保持60分钟。偶尔地搅动。

4．应用在#1、#3和#6道装有尖头的titertrek 多道吸管，从3孔中转移50μl 溶胞产物至U形底96孔培养皿（Costar）中。置（未应用的溶胞产物）培养皿于－20℃中。

5．每孔应用1.25ml Combipipet（放置于位置1）加50μl 预混合液，缓和地振摇培养皿，并于37℃温育2小时。

每孔体积	每孔体积
空白	反应×___（#试验）＝总体积
47.0	27.0μl 缓冲液 I（250mM Tris－HCl pH 7.8，5 mM EDTA（日期：
1.5	1.5μl 1 mM HCl
***	20.0μl 5 mM 氯霉素（用缓冲液 I 新配制的）Lot #
0.75	0.75μl 4 mM 乙酰CoA 水溶液（新配制的）Sigma Lot #
0.80	0.80μl 3H－乙酰CoA(New England Nuclear # NET－290L，200mCi／mmol）

6．应用titertrek 多道吸管加100μl 7 M尿素到各个反应孔中以终止反应。同时做6批（尿素系Mallincrokt 产品，AR）。

7．应用titertrek 多道吸管转移200μl 反应混合物至5 ml 塑料闪烁瓶（Research Products International # 125514）中。

同时做3次反应（尿素系Mallinceokt 产品，AR）。

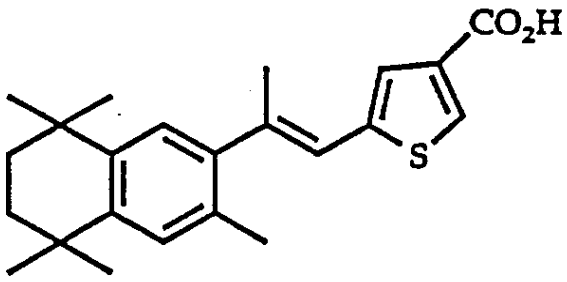
8．加1 ml 0.8% PPO／甲苯（3.2g PPO／4L 甲苯），剧烈地涡旋混合5秒钟，并使其各相分离1-5分钟。计数cpm 2.0 分钟（Beckman LS 3801）。（甲苯系Mallinckrodt Scintill产品，AR），

（PPO＝2，5－二苯基噁唑－RPI Lot #A 3071）。

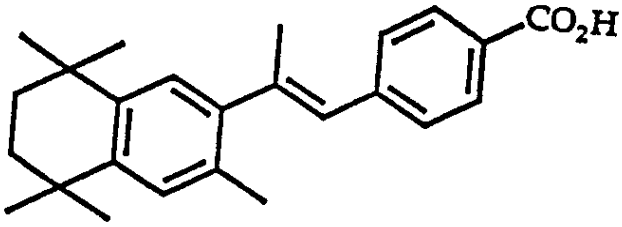
表1表明，本发明2个具体的实 例化合物相比较的RAR 和RXR激动剂活性。化合物1（AGN 191701）为2－[(E)－2－(5，6，7，8－四氢－3，5，5，8，8－五甲基萘－2－基）丙烯－1－基]噻吩－4－羧酸。化合物2（AGN 191440）为测量RXR 激动剂活性的参考化合物，该化合物是4－(E)－2－(5，6，7，8－四氢－3，5，5，8，8－五甲基萘－2－基）丙烯－1－基]苯甲酸。化合物3（AGN 191659）为2－[(E)－2－(5，6，7，8－四氢－3，5，5，8，8－五甲基萘－2－基）丙烯－1－基]－5－噻吩羧酸。本发明实 例化合物的活性分别以各自对RAR $_{\alpha}$、RAR $_{\beta}$和RAR 受体位点的活性表示。表1中各个化合物的结构在下面的叙述中会被提到。化合物4（AGN 191183）为4－(E)－2－(5，6，7，8－四氢－5，5，8，8－四甲基萘－2－基）丙烯－1－基]苯甲酸。该化合物（化合物4）不在本发明的范围内。为了进行比较，提供了该化合物的受体数据，以表明该化合物是特定的RAR 激动剂，对RXR 受体位点没有活性。根据本发明，化合物4在应用RXR 激动剂化合物治疗肿瘤细胞死亡的试验中是没有活性的。

表1

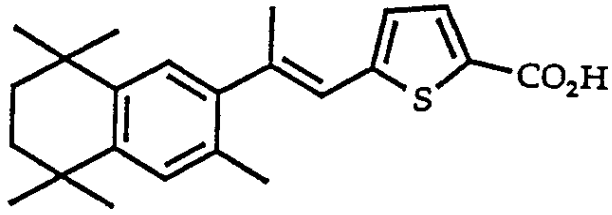
化合物号	EC_{50}			
	RAR_{α}	RAR_{β}	RAR	RXR_{α}
1	NA	3349	1073	67
2	3160	101	364	448
3	>>1000	23	153	11.2
4 (AGN 191183)	19	1.0	0.3	>10,000



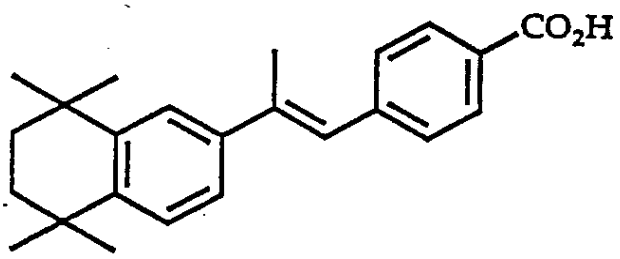
化合物 1, (AGN 191701)



化合物 2 (AGN 191440)



化合物 3 (AGN 191659)



化合物 4 (AGN 191183)

自然死亡现象在生物科学中是已知的，并可以将其描述为细胞程序性死亡。已知自然死亡现象与“坏死”是有差别的，坏死是细胞被有毒物质或其他外部作用杀死的现象。因此，自然死亡现象是“自然的”、程序性的细胞死亡。按照上述方式，人们通常知道，即使在可能威胁宿主生命的正在生长的恶性肿瘤中，大量细胞会由于自然死亡现象而自然地死亡。但是在正常生长的恶性肿瘤（未受到结果良好的化疗或其他治疗方法的影响）中，由不受控制的细胞分裂而生成的新的细胞数量超过由自然死亡现象所引起的细胞死亡的数量，结果肿瘤的体积获得了增加。如果肿瘤中自然死亡的速度超过细胞分裂的速度，那么肿瘤就会缩小或完全地消失。本发明发现，应用人骨髓白血病细胞株表型（HL－60 cdml－1）的试验表明，RXR 激动剂化合物具有诱发细胞自然死亡的能力。

在试验中，使人骨髓白血病细胞（HL－60 cdml－1）生长在培养物中，并将RXR 激动剂化合物如化合物 1（AGN 191701）或化合物 3（AGN 191659）加到培养物中。将RAR 特定的化合物 4（AGN 191183）加到平行的培养物中作为对照，而其他的“对照”培养物用乙醇处理。该试验表明，RXR 激动剂化合物（但不是RAR 特异的化合物 4（AGN 191183），也不是乙醇）可诱发大量的细胞自然死亡。细胞自然死亡的特征可以通过处理细胞形态学的变化（核固缩和破碎）、膜起泡和细胞破碎以及DNA 片段具有特征的梯形观察到。

下面详细地叙述该试验。

表明RXR 激动剂化合物AGN 191701 诱发人骨髓白血病细胞（HL－60）自然死亡的试验

试验 1

将HL－60 cdm－1 细胞的 3 ml 培养基（含牛胰岛素 5 mg／L、人

转铁蛋白 5 mg／L 和亚硒酸钠 5 μg／L 的RPMI－1640）置于 6 孔组织培养皿（Falcon）中，其密度为 1 ×10^5 细胞／ml。3 μl 1 mM 预制的AGN 191701（化合物 1 ）溶液或 1 mM AGN191183（化合物 4 ）溶液或乙醇溶液加到细胞中，然后在恒湿的培养箱（ 5 % CO_2 ）中于37℃暗处培养 7 2 小时。在培育结束时取细胞的等分试样用血球计数器计数，第 2 份等分试样（50 μ l ）用Cytospin 离心机离心沉积在显微镜载玻片上。沉积的细胞经空气干燥，用无水甲醇固定，用Diff－Quick 试剂染色，装置在Permcunt 上，并用明视场光学显微镜检查。

细胞计数如下：

对照	5.1×10^5 ／ml
AGN 191183（1 μ M）	4.6×10^5 ／ml
AGN 191701（1 μ M）	0.7×10^5 ／ml

显微镜检查显示，在对照与AGN 191183（化合物 4 ）处理的细胞之间没有区别。AGN 191701 处理的细胞表现大范围的细胞死亡，几乎所有的细胞都死了。

试验 2

将HL－60 cdm －| 细胞接种于装有 8 ml 培养基（含有牛胰岛素 5 mg／L、人转铁蛋白 5 mg／L 和亚硒酸钠 5 μg／L 的RPMT－1640）的 T－25 组织培养瓶中，其密度为 2 ×10^5 细胞／ml。加入AGN 191701（化合物 1 ），使最终浓度为 1 μM（ 8 μl 1 mM 预制的溶液），然后在恒湿的培养箱（ 5 % CO_2 ）中于37℃在暗处培养 4 8 小时。从烧瓶中移出培养基和细胞，离心沉淀细胞（用Beckman desk top Centrifuge 离心，速度为1100 rpm／ 7 min），沉淀用磷酸盐缓冲的生理盐水（PBS）洗涤 1 次，然后通过加入200 μ l 含有20mM Tris－

HCl pH 7.4、0.4mM EDTA、0.4% Triton X－100 的溶液，使沉淀细胞裂解。裂解产物于微型离心机上离心（14000 rpm）5分钟，并将上清液调至NaCl 和异丙醇的最终浓度分别为0.5M和50%。使该溶液于－20℃沉淀过夜，用微型离心机离心，使形成沉淀。（10分钟，14000 rpm）。沉淀物用70%乙醇洗涤1次，使其重新混悬于50μl Tris EDTA（10mM Tris－HCl pH 7.4，0.4mM EDTA），并与凝胶加载的缓冲液混合。将样品与1 KB 标准的梯形DNA（Bethesda Research Laboratory）一起用1%琼脂糖胶电泳1小时。用溴化3，8－二氨基－5－乙基－6－苯基菲啶鎓染色DNA，随后在紫外灯下显迹并照相。

DNA 的检查证明，经历细胞自然死亡的细胞表明特征性的DNA 碎片图形（“梯形”）。

试验3

将HL－60 cdm－1细胞接种于含3 ml 培养基（含有牛胰岛素5 mg／L、人转铁蛋白5 mg／L 和亚硒酸钠5 μg／L 的RPMI－1640）的6孔组织培养皿（Falcon）中，其密度为×10^5 细胞／ml。双份孔得到3 μl 乙醇或3 μl 预制的AGN 191701 溶液（化合物1，1 mM 的乙醇溶液）。细胞在恒湿的培养箱（5% CO_2 ）中于37℃在暗处培养4小时、48小时或6天。在指定的时间将细胞的等分试样（50μl）用Cytospin 离心机离心并沉积在显微镜玻片上。沉淀的细胞经空气干燥，用无水甲醇固定，用Diffquick 试剂染色，装置在Permcunt 上，并用明视场光学显微镜检查。

细胞的检查表明，对照细胞是许多未分化的骨髓白血病胚（blastic）细胞。与AGN 191701（化合物1）接触4小时的细胞表现出核固缩以及核和胞质浓染并形成胞质扩散（大的气泡）。48小时时有大量的细胞死亡，并有许多浓染的核片段，或者游离在培养基

中或者包含在缩小的细胞残留物中。仍有少量残留的未分化的胚细胞群。6天后检出同样浓染的核残留物，但是除此以外，在培养物中还有分散的多核合胞细胞（巨细胞）存在。在垂死细胞中形态变化的图形与在经历细胞自然死亡的细胞中所述的变化是完全一致的。

图5－9表示上述试验的结果，具体地说，图5表示在上述试验中用化合物1（AGN 191701）处理48小时，从细胞中得到的DNA“梯形”的照片。图6是“对照”组细胞的照片，即它是在上述试验中用“培养基”而不是用RXR 激动剂化合物处理细胞的照片。图7是用化合物1处理4小时的细胞的照片。图8是用化合物1处理48小时的细胞的照片，图9是用化合物1处理6天的细胞的照片。当用本发明的“泛激动剂”化合物3（AGN 191659）处理时得到了同样的结果。

正如从照片中可以看出，用RXR 激动剂处理可诱发大量细胞自然死亡。在本发明的处理方法中，与用RXR 特异的激动剂（如化合物1）相比，应用例如化合物3是较差的，因为已知RAR 激动剂活性具有副作用，而且该副作用应用RXR 特异药物是可以避免的。

治疗剂型和方法

本发明治疗方法中应用的化合物可以全身性给药，或局部地给药，这取决于需治疗的病情、需要治疗的具体位置、服用的药物数量等。

在某些恶性肿瘤的治疗中可以应用局部给药。可以应用普通的局部给药剂型如溶液剂、混悬液剂、凝胶剂、软膏剂或敷药膏剂。所述局部给药制剂的配制在药用制剂的技术中是熟知的，例如Remington's Pharmaceutical Science，17版，Mack Publishing Company，Easton，Pennsylvania。对于局部应用，所述化合物还可以作为粉剂或喷雾剂，尤其是气雾剂给药。

在大多数本发明治疗新方法的应用中，以适宜全身给药的药用组

合物给予活性成分RXR 激动剂化合物。已知如果一药物全身性地给药，那么可以将其配制成经口服给药的粉剂、丸剂、片剂等，或配制成糖浆剂或酏剂。对于静脉给药、腹腔内给药或损伤区给药，可以将所述化合物配制成能经注射给药的溶液剂或混悬液剂。在某些情况下，可以将所述化合物配制成栓剂或作为贮存在皮肤下的延释制剂，或作为肌内注射剂。

治疗浓度是指能有效的减轻具体病情或阻止其发展的浓度。给定的治疗浓度随情况而改变，在某些例子中随需治疗的病情的严重程度以及患者对治疗的敏感性而变化。因此，给定的治疗浓度最好通过给药途径实验确定给药时间和途径。然而，可以预计，在本发明恶性肿瘤的治疗中，含有0.001～5％，最好0.01～1％（按重量计）活性化合物的制剂通常为治疗上有效的浓度。当全身性给药时，在大多数例子中，按0.01～100mg／kg 体重／天，最好0.1～10mg／kg 体重／天剂量给药将达到治疗的效果。

一般的实施方案

说明

下面的叙述提供了用于治疗恶性肿瘤新方法的本发明RXR 激动剂化合物的实例。

在此提供的实例化合物的化学叙述中，所有化学术语通常具有熟悉有机化学的技术人员所认为的一般意义。因此，术语烷基是指并包括称作为正链烷基、支链烷基和环烷基的任一和所有的基团。术语链烯基是指并包括有1个或多于1个位置不饱和度的正链链烯基、支链链烯基和环链烯基团。低级烷基意指以上广义的有1～6个碳原子的烷基、有3～6个碳原子的支链烷基以及环烷基。同样，低级链烯基定义为有2～6个碳原子的正链链烯基、有3～6个碳原子的支链链

烯基和环链烯基。

这里应用的术语“酯”是指并包括作为有机化学分类上属于该术语说明范围内的任一化合物。在本发明范围内列举的羧酸较好的酯类是与有10个或更少碳原子的饱和脂肪族醇或有5～10个碳原子的环状醇或环状的饱和脂肪族醇形成的酯，尤其好的酯是与有1－10个碳原子的脂肪族醇形成的酯。如果所述酯是从本发明范围内的化合物[该化合物为伯醇（式1中的B为$-CH_2OH$）]得到的，那么该术语包括式$-CH_2OOCR_{11}$化合物，这里R_{11}为任何取代或未取代的脂肪族、芳香族或脂肪族－芳香族基团，最好在脂肪族部分有1～6个碳原子。尤其优选的脂肪族酯是从低级烷基酸或醇得到的酯。苯基或低级烷基苯基酯也是较优选的。

酰胺具有与有机化学分类上一致的意义。在该实例中它包括未取代的酰胺和所有脂肪族和芳香族单和二取代的酰胺。较优选的酰胺是从有10个或更少碳原子的饱和脂肪族基团或从有5～10个碳原子的环状基团或饱和的脂－环状基团得到的单和二取代的酰胺。尤其优选的酰胺是从低级烷基胺得到的酰胺。较优选的还有从苯基或低级烷基苯基胺得到的单和二取代的酰胺。未取代的酰胺也是较优选的。

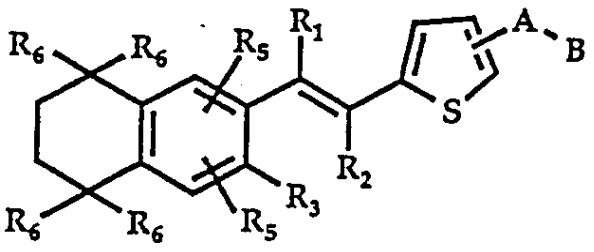
醛缩醇和酮缩醇包括式$-CH(OR_{12})_2$，$-CHOR_{13}O$，$-CR_7(OR_{12})_2$和$-CR_7OR_{13}O$基团，这里R_7为有1～5个碳原子的烷基、环烷基或链烯基，R_{12}为低级烷基，R_{13}为有2～5个碳原子的二价烷基。

如果上述化合物具有形成所述盐的官能团，例如酸或胺官能团，那么可以由本发明治疗方法中应用的任一化合物制得药学上可以接受的盐。药学上可以接受的盐可以是保持母体化合物活性的任一盐，并且当给患者施用时不会对患者产生任何有害的或不适应的作用，因此，可以施用本发明化合物的盐。

所述盐可以从任一有机或无机酸或碱得到。该盐可以是单或多价离子。其中与酸、官能团有关的特别有用的是无机离子、钠、钾、钙和镁。有机胺盐可以用胺制得，特别是铵盐如单、二和三烷基胺或乙醇胺得到的铵盐。盐也可以用咖啡碱，三甲胺和类似的分子得到。如果有能形成酸加成盐的充分碱性的氮，那么所述盐可以与任何无机或有机酸或烷基化试剂如甲基碘形成。优选的盐是与无机酸如盐酸、硫酸或磷酸形成的盐。还可以应用多种简单有机酸如单－、二－或三－酸中的任一种。

按照本发明的治疗方法，应用的实例化合物含有双键，所以有反式和顺式（E和Z）异构体。另外，用于本发明治疗方法中的一些化合物可以含有1个或多个手性中心，因此可以对映和非对映的形式存在。除非由化学命名法或化学结构特别地另有说明，否则本发明的范围意指包括所有该异构体本身以及顺式和反式异构体的混合物，以及非对映体混合物和对映体（旋光异构体）的外消旋混合物。在结构式中，关于双键取代基的反式（E）构型表示各键位于有关双键的相反方向，而关于双键取代基的顺式（Z）构型则表示各键位于有关双键的相同方向。

用于本发明药用组合物和治疗方法中的RXR 激动剂化合物的一般结构由下面通式I表示，



式1

各符号的定义如下：

R_1 为低级烷基、Cl、Br 或 I；

R_2 为H、低级烷基、Cl、Br 或 I；

R_3 为低级烷基、Cl、Br、I、OR_{11}、SR_{11}、$OCOR_{11}$、$SCOR_{11}$、NH_2、NHR_{11}、$N(R_{11})_2$、$NHCOR_{11}$ 或$NR_{11}-COR_{11}$；

各R_5 基团独立地为H、低级烷基、Cl、Br、I、有1～6个碳原子的低级烷氧基或低级硫代烷氧基（thioalkoxy）；

各R_6 基团独立地为H或低级烷基；

A为$(CH_2)_n$（这里n为0～5）、有3～6个碳原子的低级支链烷基、有3～6个碳原子的环烷基、有2～6个碳原子和1或2个双键的链烯基、有2～6个碳原子和1或2个三键的炔基，

B为氢、COOH 或其药学上可接受的盐、$COOR_8$、$CONR_9R_{10}$、$-CH_2OH$、CH_2OR_{11}、CH_2OCOR_{11}、CHO、$CH(OR_{12})_2$、$CHOR_{13}O$、$-COR_7$、$CR_7(OR_{12})_2$、或$CR_7OR_{13}O$。这里R_7为有1～5个碳原子的烷基、环烷基或链烯基，R_8为有1～10个碳原子的烷基，或有5～10个碳原子的环烷基，或R_8为苯基或低级烷基苯基，R_9和R_{10}独立地为氢、有1～10个碳原子的烷基、或有5～10个碳原子的环烷基、或苯基或低级烷基苯基，R_{11}为有1～10个碳原子的烷基、苯基或低级烷基苯基，R_{12}为低级烷基，以及R_{13}为有2～5个碳原子的二价烷基。

用于本发明药用组合物和治疗方法中的优选的化合物是下述化合物，其中R_1代表低级烷基，甲基更好。R_2优选为H或低级烷基，H更好。R_3优选为低级烷基，甲基更好。R_5优选为H或低级烷基较好，H更好。R_6优选为低级烷基，甲基更好。

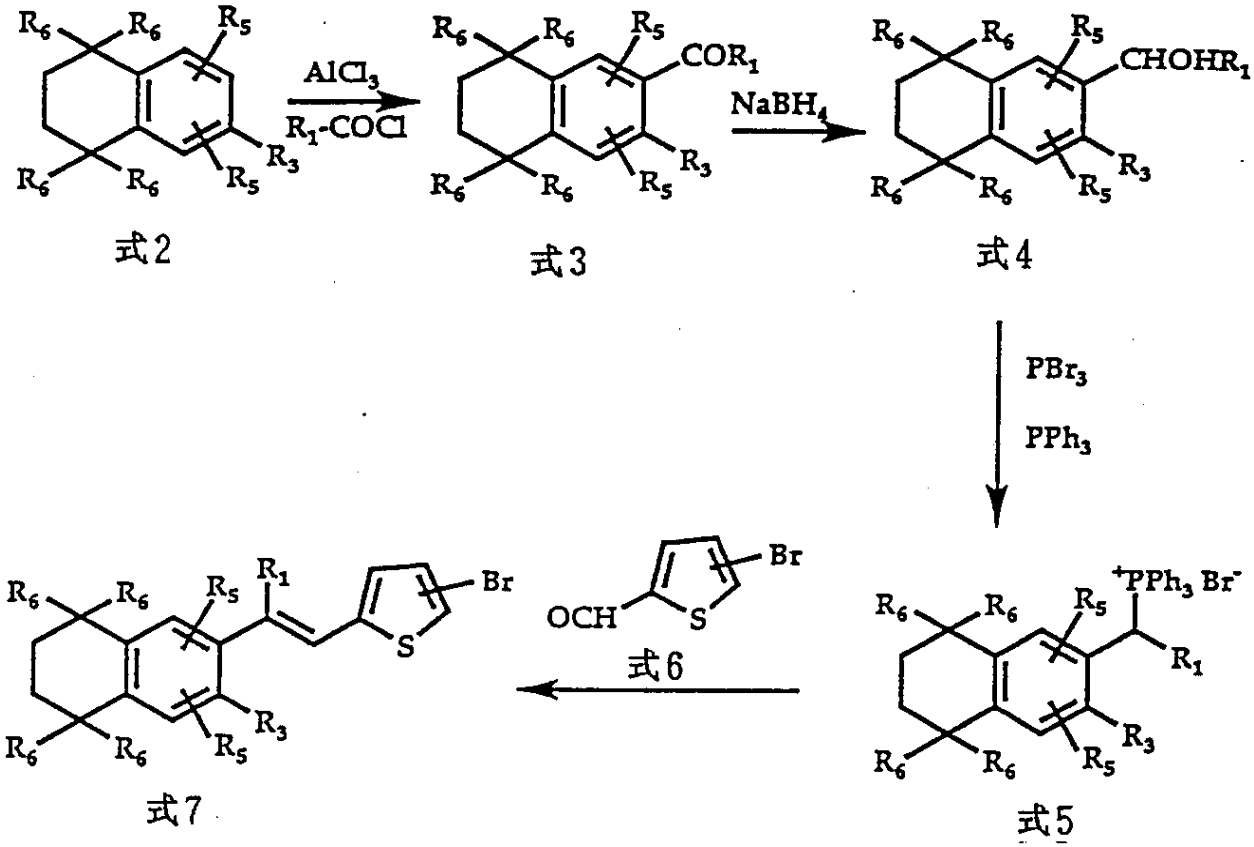
关于基团$-A-B-$，优选用于本发明的化合物是其中$-A-B-$为

$(CH_2)_n-COOR_8$ 基团，或$(CH_2)_n-CONR_9R_{10}$基团（R_8、R_9和R_{10}的定义同上），更好的是其中n为零，以及其中B基团为$COOR_8$。B为COOH 最好。

在本发明治疗方法中优选化合物的两个特定实例以其各自的结构表示如上，称为化合物1（AGN 191701）和化合物3（AGN 191659）。

制备本发明化合物的合成方法

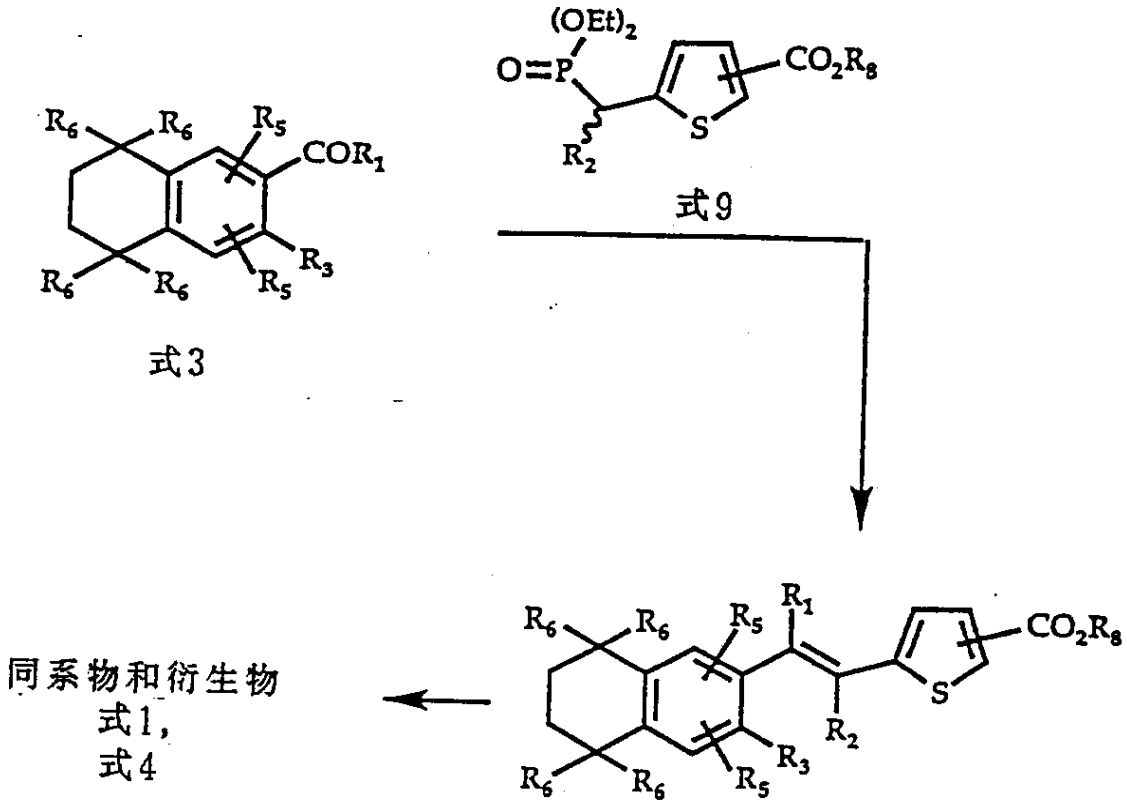
可以通过几条不同的化学合成途径制备用于本发明药用组合物和治疗方法的上述一般和具体实例化合物。为了详细叙述本发明，提供下述合成路线。合成化学家将容易地明白，这里陈述的条件是具体的实施方案，它可以在实施的合成有机化学家的技术范围以内普遍化。


AlCl3
R1-COCl
NaBH4
PBr3
PPh3
n-BuLi
CO2
式2
式3
式4
式5
式6
式7
式8
同系物和衍生物
式1，
式4

反应路线1

反应路线1叙述了得到式1化合物的合成方法。按照该合成路线，使式2的5，6，7，8－四氢萘类化合物（其中具有所需的R_3、R_5和R_6取代基（它们具有与式1相关的定义））在类似弗瑞德－克来福特条件下与下述试剂反应：例如R_1COCl（R_1具有与式1相关的定义），以便引入酮官能团R_1－CO－到四氢萘核的2位。当R_1为甲基时，那么在弗瑞德－克来福特类型反应中的试剂通常为乙酰氯。然后将生成的式3酮还原（例如用硼氢化钠）为相应的式4醇。通过用合适的试剂，例如三溴化磷或三苯基膦处理，将式4醇转变为相应的鏻盐（例如溴化三苯基鏻）。式5鏻盐是一维悌希试剂，在维悌希条件（碱，例如正丁基锂）下使其与式6的溴代噻吩醛反应，得到式7化合物。与正丁基锂和二氧化碳反应，可将式7化合物的噻吩部分的溴基团转变为羧基，结果得到式8羧酸化合物，如以上所述，可以将式8化合物进一步转变为另外的同系物和衍生物。反应路线1的合成步骤是制备本发明的化合物1（AGN 191701）和化合物3（AGN 191659）优选的合成路线。

制备式1化合物的另一合成路线见下列反应路线2，



反应路线2

按照反应路线 2，使式 3 的酮类化合物与式 9 的膦酸酯试剂进行维悌希－霍勒（Wittig－Horner）类型反应。式 9 的膦酸酯试剂带有酯取代基（$COOR_8$），但是应该认识到，一般来讲，类似的膦酸酯试剂可以携带具有与式 1 相关定义的 A－B 官能团。维悌希－霍勒类型反应通常在强碱例如$NaCH_2SOCH_3$（二甲亚砜钠）存在下，在溶剂（如四氢呋喃，THF）中进行。适当的选择以式 9 代表的芳香族类型

试剂，作为得到式2化合物（AGN 191440）的合成路线，反应路线2的合成方法是优选的，化合物2（AGN 191440）是用于RXR 受体活性试验的参考化合物。

式8和式10化合物可以经历进一步的转化，尤其是就$COOR_8$基团的合成转化而言。就其中A－B基团不同的类似于式8和式9化合物的制备而言，可通过延伸用于本发明的任一化合物或所有化合物的方法，并采用已知的和公开的一般方法以及合成的方法学。

羧酸一般按下法进行酯化：在酸性催化剂如氯化氢或亚硫酰氯存在下，将合适醇与酸的溶液进行回流。另外，可以在二环己基碳二亚胺与二甲氨基吡啶存在下将羧酸与合适的醇进行缩合。得到酯，并通过一般的方法进行回收和纯化。按March："Advanced Organic Chemistry"第2版，McGraw-Hill Book Company，P 810 所述的方法，可以容易地制得醛缩醇和酮缩醇。醇、醛和酮均可通过已知的方法，例如McOmie 的著作，Plenum Publishing Press，1973，以及Protecting Gronps，Ed. Greene，John Wiley & Sons，1981 所述的方法，使分别生成醚和酯、醛缩醇或酮缩醇进行保护。

在进行维悌希、维悌希－霍勒反应或反应路线1和反应路线2类似的偶合反应（这里相应于式6和／或式9的试剂从市场上买不到）之前，为了增加n值，可以在阿恩特－艾斯特条件下通过连续的处理，使羧酸经受同系化反应或其他的同系化反应过程。另外，不是羧酸的衍生物也可以通过合适的方法进行同系化。然后通过前面段落所述的一般方法将同系化的酸进行酯化。

制备其中A为$(CH_2)_n$（n为1～5）的化合物的另外方法是应用上述的阿恩特－艾斯特方法或其他同系化反应方法，使其中B为酸或其他功能团的式1化合物经受同系化反应。

其中A为有1个或多个双键的链烯基的式1化合物可以按下法制备，例如将具有所需数量双键结合到中间体中，使作为膦酸酯的中间体与式3的酮进行偶合。一般来讲，其中A为不饱和碳链的所述化合物可以通过对有实践经验的有机化学家已知的合成路线制得，例如通过维悌希反应或类似的反应制得，或从α－卤素－芳烷基－羧酸、酯或类似的醛中通过消除卤素而引入双键制得。其中A基团为三（炔）键的式1化合物可以通过应用相应的膦酸酯中间体制得。该中间体可以按本技术领域已知的方法制得，例如使相应的芳香族－甲基酮与强碱（例如二异丙基氨基锂）反应。

从式1化合物派生的酸和盐可以容易地由相应的酯制得。用碱金属碱进行碱性皂化，可得到所述的酸。例如，可以将酯溶于极性溶剂如链烷醇中，最好在惰性气氛中于室温下，用约3倍摩尔过量的碱（例如氢氧化钾）。将该溶液搅拌一段时间例如15～20小时，冷却，酸化，按一般方法得到水解产物。

从相应的酯或羧基中，用本技术领域已知合适的酰胺化方法，可以得到酰胺。制备该类化合物的一个方法是将酸转变为酰氯，然后用氢氧化铵或合适的胺进行处理。例如，将酸用醇的碱溶液如乙醇KOH（约10%摩尔过量）于室温下处理约30分钟。除去溶剂，残留物溶于有机溶剂（如乙醚）中，用二烷基甲酰胺处理，然后再用10倍过量的草酰氯处理。这均在适当降低的温度（约－10℃～＋10℃）下进行。然后将最后的溶液在降低的温度下搅拌1～4小时，最好2小时。除去溶剂，得到的残留物溶于惰性有机溶剂（如苯）中，冷却至约0℃，并用浓氢氧化铵处理。得到的混合物于降低的温度下搅拌1～4小时，通过一般的方法得到产物。

使相应的酸与亚硫酰氯反应或用其他方法(J. March,“Advanced Organic Chemistry”，第 2 版，McGraw－Hill Book Company），可以将相应的酸转变为酰氯，然后用硼氢化钠还原酰氯（March，同上，P．1124），得到相应的醇。另外，可以用氢化锂铝于降低的温度下将酯进行还原。用合适的烷基卤在威廉逊制醚反应条件（March，同上，P 357）下使上述醇烷基化，可以得到相应的醚。可以按下法将上述醇转变为酯：在酸性催化剂或二环己基碳二亚胺和二甲氨基吡啶存在下使上述醇与合适的酸反应。

醛可以从相应的伯醇，应用温和的氧化剂（如重铬酸吡啶鎓）于二氯甲烷中（Corey，E．J．，Schmidt，G．，Tet. Lett.，399，1979），或者用二甲基亚砜／草酰氯于二氯甲烷中（Omura，K．，Swern，D.，Tetrahedron，1978，34，1651）制得。

酮可以从合适的醛制得：将该醛用烷基格利雅试剂或类似的试剂处理，接着进行氧化。

醛缩醇或酮缩醇可以从相应的醛或酮通过March，同上，P．810所述的方法制得。

再回过来看反应路线 1 和反应路线 2，熟悉本技术领域的专业人员容易懂得，上述的维悌希－霍勒反应的进一步变化，可以得到本发明范围内应用的化合物。例如，反应路线 1 中所示维悌希反应可以用其中带有酮基的类似于式 5 四氢萘衍生物的试剂与其中带有三苯基鏻部分的类似于式 6 杂芳族化合物的试剂完成。反应路线 2 的维悌希－霍勒反应可以用其中带有二烷基膦酸酯部分的类似于式 3 四氢萘衍生物的试剂和其中带有酮基或醛基官能团的类似于式 9 杂芳族化合物的试剂完成。

具体实施例

甲基[3，5，5，8，8－五甲基（5，6，7，8－四氢萘）－2－基]酮（化合物10）

于0℃在氩气氛下，向6.71g（50.3mmol）三氯化铝的二氯甲烷混悬液中加入3.95g（3.58ml，50.3mmol）乙酰氯和10.21g（41.9 mmol）3，5，5，8，8－五甲基－5，6，7，8－四氢萘的二氯甲烷溶液。在搅拌下于3小时内将所得的混合物温至室温。再将混合物冷至0℃滴加1 N HCl。使混合物溶于水中并用二氯甲烷萃取3次。有机层用1 N HCl、水、盐水洗涤并干燥（$MgSO_4$）。在真空下除去溶剂，得到的残余物用快速色谱纯化，得标题化合物，为象牙色固体。

PMR ($CDCl_3$): δ 1.28 (6H, s), 1.30 (6H, s), 1.69 (4H, s), 2.49 (3H, s), 2.57 (3H, s), 7.15 (1H, s), 7.67 (1H, s).

（±）－1－（5，6，7，8－四氢－3，5，5，8，8－五甲基萘－2－基）乙醇（化合物11）

于0℃向4.17g（17.1mmol）甲基[3，5，5，8，8－五甲基（5，6，7，8－四氢萘－2－基]酮（化合物10）的甲醇溶液中分批加入0.77g（20.4mmol）硼氢化钠，得到的混悬液于0℃搅拌4小时。在真空下除去溶剂，所得的固体溶于水中，用1 N HCl 酸化，并用乙醚萃取3次。乙醚萃取液用水、盐水洗涤并干燥（$MgSO_4$）。在真空下除去溶剂，所得的残余物用快速色谱（SiO_2，10%乙酸乙酯的己烷溶液）纯化，得到单一异构体：标题化合物为白色固体。

PMR ($CDCl_3$): δ 1.28 (12H, m), 1.47 (3H, d, J = 6.5 Hz), 1.67 (4H, s), 2.49 (3H, s), 5.08 (1H, m), 7.10 (1H, s), 7.45 (1H, s).

[（5，6，7，8－四氢－3，5，5，8，8－五甲基萘－2－基）乙烷－1－基]溴化三苯基鏻（化合物12）

于0℃在氩气氛下，向3.87g（15.7mmol）（±）－1－（5，6，7，8－四氢－3，5，5，8，8－五甲基萘－2－基）乙醇（化合物11）的乙醚和己烷溶液中加入42.4g（14.9ml，157mmol）三溴化磷，得到的混合物搅拌2小时。然后在30分钟以内滴加水，并分离两层。水层用乙醚萃取3次。乙醚层用水、盐水洗涤并干燥（$MgSO_4$）。在真空下除去溶剂，所得的残余物溶于苯中。加入三苯膦，混合物于室温下搅拌24小时。然后混合物在真空下浓缩，所得的固体用乙腈和乙酸乙酯以及己烷重结晶，得到标题化合物，为白色固体。

PMR ($CDCl_3$): δ 0.61 (3H, s), 0.89 (3H, s), 1.27 (6H, s), 1.62 (4H, m), 1.85 (6H, d), 2.04 (3H, dd), 5.19 (2H, m), 6.62 (1H, d), 7.02 (1H, s), 7.43 (6H, m), 7.68 (6H, m), 7.87 (3H, m).

2－[(E)－2－（5，6，7，8－四氢－3，5，5，8，8－五甲基－2－萘－2－基）丙烯－1－基]－4－溴噻吩（化合物13）

于－78℃在氩气氛下，向0.56g（0.98mmol）1－（3，5，5，8，8－五甲基－5，6，7，8－四氢萘－2－基）乙烷－1－基溴化三苯基鏻（化合物12）的11ml 四氢呋喃溶液中滴加0.41g（0.61ml，0.98mmol，1.6M己烷溶液）正丁基锂。将所得的混悬液温至室温，然后滴加0.28g（1.47mmol）4－溴－2－噻吩甲醛的2ml 四氢呋喃溶液，得到的混合物于室温搅拌20小时。在真空下除去溶剂，得到的固体溶于水中，用1N HCl 酸化，并用乙醚萃取3次。乙醚萃取液用水、盐水洗涤并干燥（$MgSO_4$）。在真空下除去溶剂，得到的残余物用快速色谱（SiO_2，0.5%乙酸乙酯的己烷溶液）纯化，得到标题化合物，

为白色固体。

PMR ($CDCl_3$): δ 1.27 (6H, s), 1.29 (6H, s), 1.68 (4H, s), 2.26 (6H, m), 6.45 (1H, s), 6.75 (1H, s), 6.95 (1H, s), 7.07 (1H, s), 7.11 (1H, s), 7.17 (1H, s).

2－[(E)－2－(5，6，7，8－四氢－3，5，5，8，8－五甲基萘－2－基)丙烯－1－基]噻吩－4－羧酸(化合物1)

于－100℃在氩气氛和搅拌下，向500mg(1.24mmol) 2－[－2－(E)－(5，6，7，8－四氢－3，5，5，8，8－五甲基萘－2－基)丙烯－1－基]－4－溴噻吩(化合物13)的15ml 四氢呋喃溶液中加入0.527g(0.775ml，1.24mmol，1.6M己烷溶液)正丁基锂。将反应液搅拌2分钟并通入二氧化碳20分钟进行吹洗。然后使反应混合物温至室温，酸化并用乙醚萃取。乙醚萃取液用水、盐水洗涤并干燥($MgSO_4$)。在真空下除去溶剂，得到的残余物溶于2 N氢氧化钠水溶液中并用乙醚洗涤。得到的水层用1 N HCl 酸化并用乙醚萃取。乙醚层用水和盐水洗涤，并干燥($MgSO_4$)。在真空下除去溶剂，得到的物质经快速色谱(10%乙酸乙酯的己烷溶液)纯化，得到标题化合物，为白色固体。

PMR (d^6-DMSO): δ 1.23 (12H, s), 1.62 (4H, s), 2.21 (3H, s), 2.23 (3H, s), 6.56 (1H, s), 7.07 (1H, s), 7.13 (1H, s), 7.45 (2H, s), 8.24 (2H, s).

2－[(E)－(2)－((5，6，7，8－四氢－3，5，5，8，8－五甲基萘－2－基)－丙烯－1－基]－5－溴噻吩(化合物14)

于－78℃在氩气氛下，向3.00g(5.26mmol)[(5，6，7，8－四氢－3，5，5，8，8－五甲基萘－2－基)乙烷－1－基]溴化三苯基鏻(化合物12)的60ml 四氢呋喃溶液中滴加2.24g(3.29ml，5.26

mmol，1.6M己烷溶液）正丁基锂。将所得的混悬液温至室温，向其中滴加1.01g（0.63ml，5.26mmol）5－溴－2－噻吩甲醛的10ml 四氢呋喃溶液，得到的混合物于室温搅拌20小时，然后回流1小时。混合物用1N HCl 酸化，并用乙醚萃取3次。乙醚萃取液用水、盐水洗涤并干燥（$MgSO_4$）。在真空下除去溶剂，得到的残余物用快速色谱（SiO_2，2%乙酸乙酯的己烷溶液）纯化，得到标题化合物，为白色固体。

PMR ($CDCl_3$): δ 1.28 (12H, s), 1.67 (4H, s), 2.24 (6H, 2 x s), 6.45 (1H, s), 6.75 (1H, d, J = 3.9 Hz), 6.99 (1H, d, J = 3.8 Hz), 7.07 (1H, s), 7.09 (1H, s).

2－[(E)－2－(5，6，7，8－四氢－3，5，5，8，8－五甲基萘－2－基）丙烯－1－基]－5－噻吩羧酸（化合物3）

于－78℃在氩气氛下，向0.230g（0.57mmol）2－[(E)－2－((5，6，7，8－四氢－3，5，5，8，8－五甲基萘－2－基）丙烯－1－基]－5－溴噻吩（化合物14）的乙醚溶液中滴加0.67ml（1.14mmol，1.7M己烷溶液）叔丁基锂。所得的混合物搅拌1.5小时，用二氧化碳吹洗并在16小时以内使其温至室温。混合物用1N HCl 酸化并用乙醚萃取。然后乙醚层用水、盐水洗涤并干燥（$MgSO_4$）。在真空下除去溶剂，得到兰色固体，该固体用乙醚的己烷溶液重结晶，得到标题化合物，为淡兰色固体。

PMR (d^6-DMSO): δ 1.21 (12H, s), 1.60 (4H, s), 2.19 (3H, s), 2.24 (3H, s), 6.45 (1H, s), 6.61 (1H, s), 6.99 (1H, d, J = 3.8 Hz), 7.06 (1H, s), 7.12 (1H, s), 7.18 (1H, d, J = 3.8 Hz), 7.67 (1H, d, J = 3.8 Hz).

2－[(E)－2－(5，6，7，8－四氢－3，5，5，8，8－五甲基萘－2－基)丙烯－1－基]－5－噻吩羧酸乙基酯(化合物15)

将0.161g(0.437mmol)5－[(E)－2－(5，6，7，8－四氢－3，5，5，8，8－五甲基萘－2－基)丙烯－1－基]－2－噻吩羧酸(化合物3)在乙醇中的混悬液、0.099g(0.48mmol)1，3－二环己基碳二亚胺和5.3mg(0.044mmol)4－二甲氨基吡啶的10ml 二氯甲烷的混悬液于室温搅拌16小时。将反应混合物过滤，滤液用水和盐水洗涤。合并有机层并干燥($MgSO_4$)，在真空下除去溶剂，残余物用快速色谱(SiO_2，5%乙酸乙酯的己烷溶液)纯化，得到标题化合物。为澄清的油状物。

PMR ($CDCl_3$): δ 1.27 (12H, s), 1.39 (3H, t, J = 7.2 Hz), 1.68 (4H, s), 2.27 (3H, s), 2.34 (3H, s), 4.37 (2H, q, J = 7. Hz), 6.57 (1H, s), 7.00 (1H, d, J = 3.8 Hz), 7.09 (1H, s), 7.11 (1H, s), 7.74 (1H, d, J = 3.8 Hz).

4－乙酯基－苄基溴(化合物16)

向搅拌的16.09g(78mmol)1，3－二环己基碳二亚胺(Aldrich)的100ml 二氯甲烷溶液中加入15.4g(71mmol)4－羧基苄基溴在100ml 二氯甲烷中的混悬液，然后加入4.9g(106.5mmol)无水乙醇和0.81g(7.1mmol)4－二甲氨基吡啶。向反应混合物中再加入50ml二氯甲烷，并将混合物加热回流2小时。使混合物冷至室温，生成的白色沉淀经过滤除去。滤液用水洗涤，干燥($MgSO_4$)，然后在真空下浓缩，得到标题化合物，为无色油状物，在放置中析出结晶。PMR ($CDCl_3$); δ 1.39 (3H, t, J - 7.2 Hz), 4.38 (2H, q, J - 7.2 Hz), 4.50 (2H, s), 7.45 (2H, d, J - 7.7 Hz), 8.03 (2H, d, J -7.7 Hz).

[4－（二乙氧基氧膦基）甲基]苯甲酸乙基酯（化合物17）

将11.8g（48mmol）4－乙酯基苄基溴（化合物16）和12.0g（72mmol）新蒸馏的亚磷酸三乙酯的混合物置于装有氩气进口管和干冰冷却阱的烧瓶中。连续的氩气流通过搅拌的反应混合物，混合物于120℃左右加热3小时，在此期间不再有乙基溴生成。残余物经真空蒸馏纯化，得到标题化合物，为无色油状物（BP. 170°／0.35mm）。

PMR（$CDCl_3$）：δ 1.23 (6H, t, J - 7.1 Hz), 1.39 (3H, t, J - 6.9 Hz), 3.21 (2H, d, J - 22.1 Hz), 4.02 (4H, m), 4.37 (2H, q, J - 7.5 Hz), 7.38 (2H, d, J - 7.9 Hz), 8.00 (2H, d, J - 7.9 Hz).

4－[(E)－2－（5，6，7，8－四氢－3，5，5，8，8－五甲基萘－2－基）丙烯－1－基]苯甲酸乙基酯（化合物18）

于0℃在氩气氛下，将5.0g（21.5mmol）甲基[3，5，5，8，8－五甲基（5，6，7，8－四氢－萘）－2－基]酮（化合物10）和3.39g（11.3mmol）[4－（二乙氧基氧膦基）甲基]苯甲酸乙基酯（化合物17）的25ml 四氢呋喃溶液通过套管加入0.52g（21.5mmol）氢化钠的25ml 四氢呋喃混悬液中。将所得的混悬液温至室温并搅拌16小时。得到的淤泥状物溶于水和1 N HCl 中并用乙醚萃取。乙醚层用水、盐水洗涤，并干燥（$MgSO_4$）。在真空下除去溶剂，残余物用快速色谱（SiO_2，1%乙酸乙酯的己烷溶液）纯化，得到异构体的混合物，该混合物经HPLC 分离（0.5%乙酸乙酯的己烷溶液）得到标题化合物，为白色固体。

PMR ($CDCl_3$): δ 1.30 (12H, s), 1.38 (3H, t, J = 7.0 Hz), 1.69 (4H, s), 2.21 (3H, s), 2.30 (3H, s), 4.39 (2H, q, J = 7.1 Hz), 6.42 (1H, s), 7.12 (2H, overl. s), 7.43 (2H, d, J = 8.3 Hz), 8.05 (2H, d, J = 8.3 Hz).

4－(E)－2－(5，6，7，8－四氢－3，5，5，8，8－五甲基萘－2－基)丙烯－1－基]苯甲酸(化合物2)

将氢氧化钾的乙醇溶液加到95mg(0.25mmol)4－[(E)－2－(5，6，7，8－四氢－3，5，5，8，8－五甲基萘－2－基)丙烯－1－基]苯甲酸乙基酯(化合物18)中，所得的混合物于室温下搅拌。在真空下除去溶剂，得到的固体溶于水中，用1 N HCl酸化，并用乙醚萃取3次。乙醚萃取液用水、盐水洗涤，并干燥($MgSO_4$)。在真空下除去溶剂，得到标题化合物，为橙黄色固体。

PMR (d^6-DMSO): δ 1.23 (12H, s), 1.62 (4H, s), 2.15 (3H, s), 2.23 (3H, s), 6.37 (1H, s), 7.08 (1H, s), 7.13 (1H, s), 7.51 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.94 (2H, d, J = 8.3 Hz).

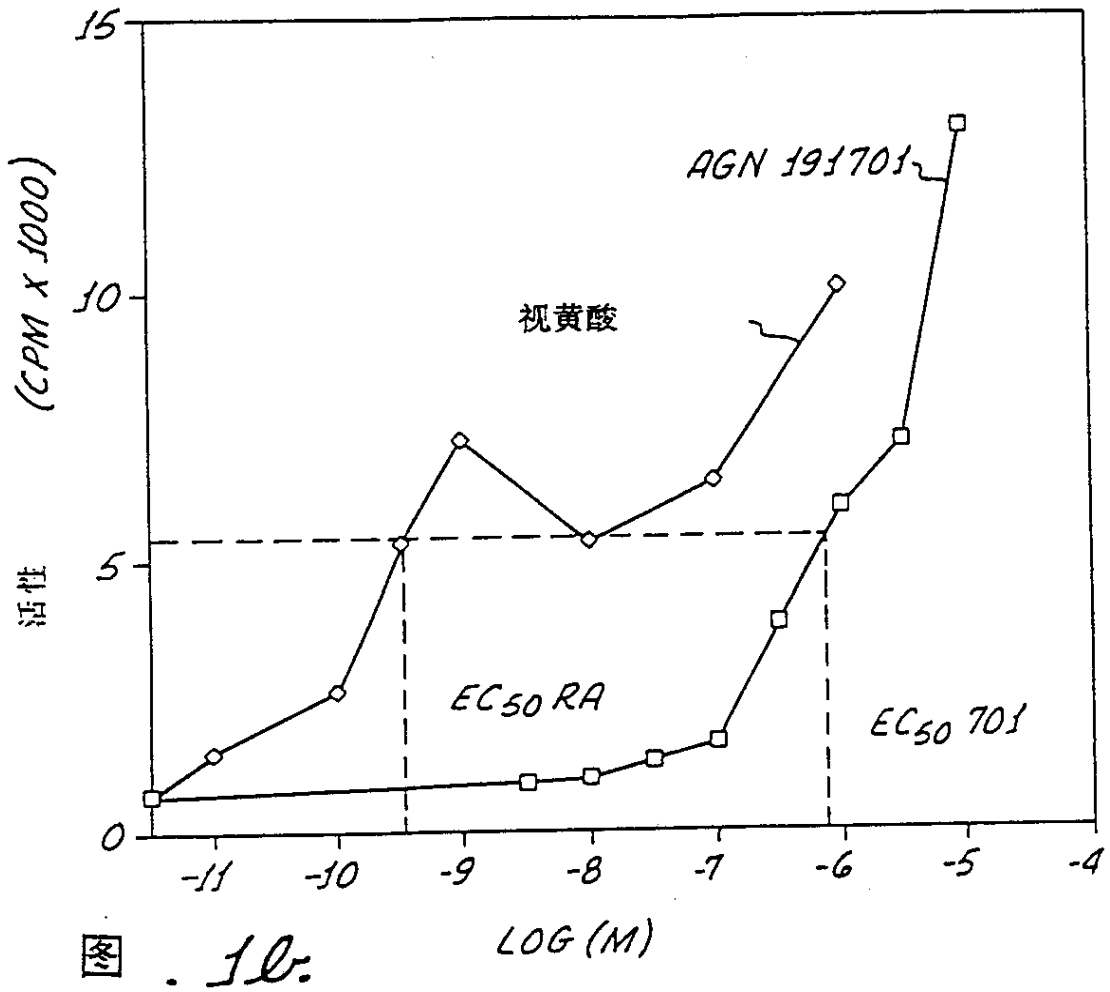

15
10
5
0
(CPM x 1000)
活性
AGN 191701
视黄酸
EC50 RA
EC50 701
-11
-10
-9
-8
-7
-6
-5
-4
LOG (M)

图 . 1b.

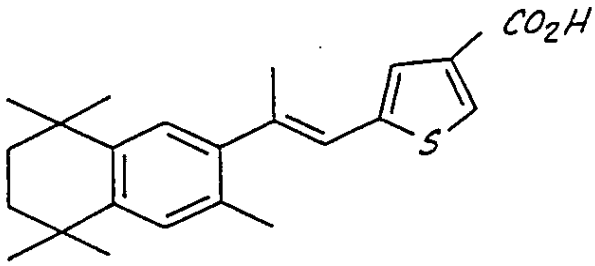

CO2H
S

图 . 1a.

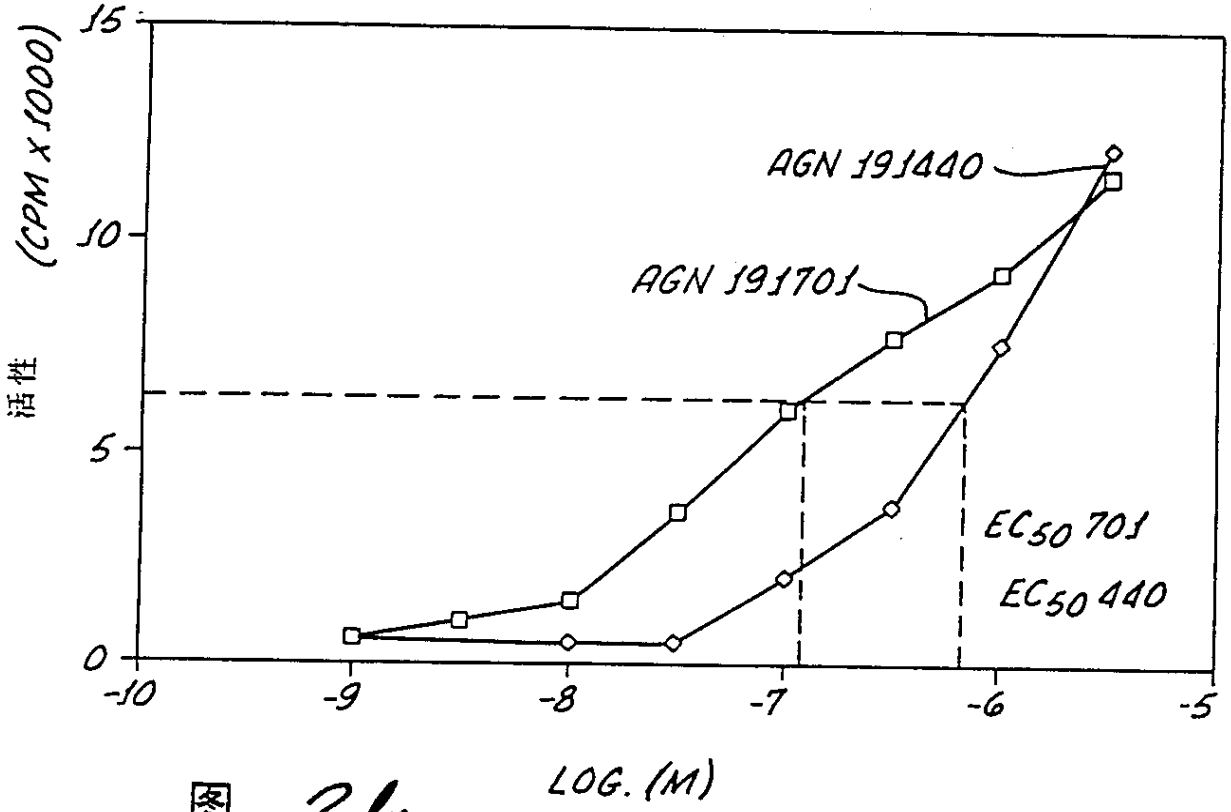

15
10
5
0
(CPM x 1000)
活性
AGN 191440
AGN 191701
EC50 701
EC50 440
-10
-9
-8
-7
-6
-5
LOG. (M)

图 . 2b.

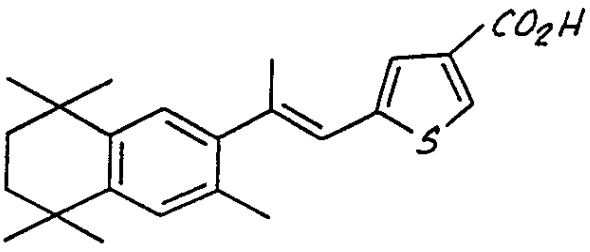

CO2H
S

图 . 2a.

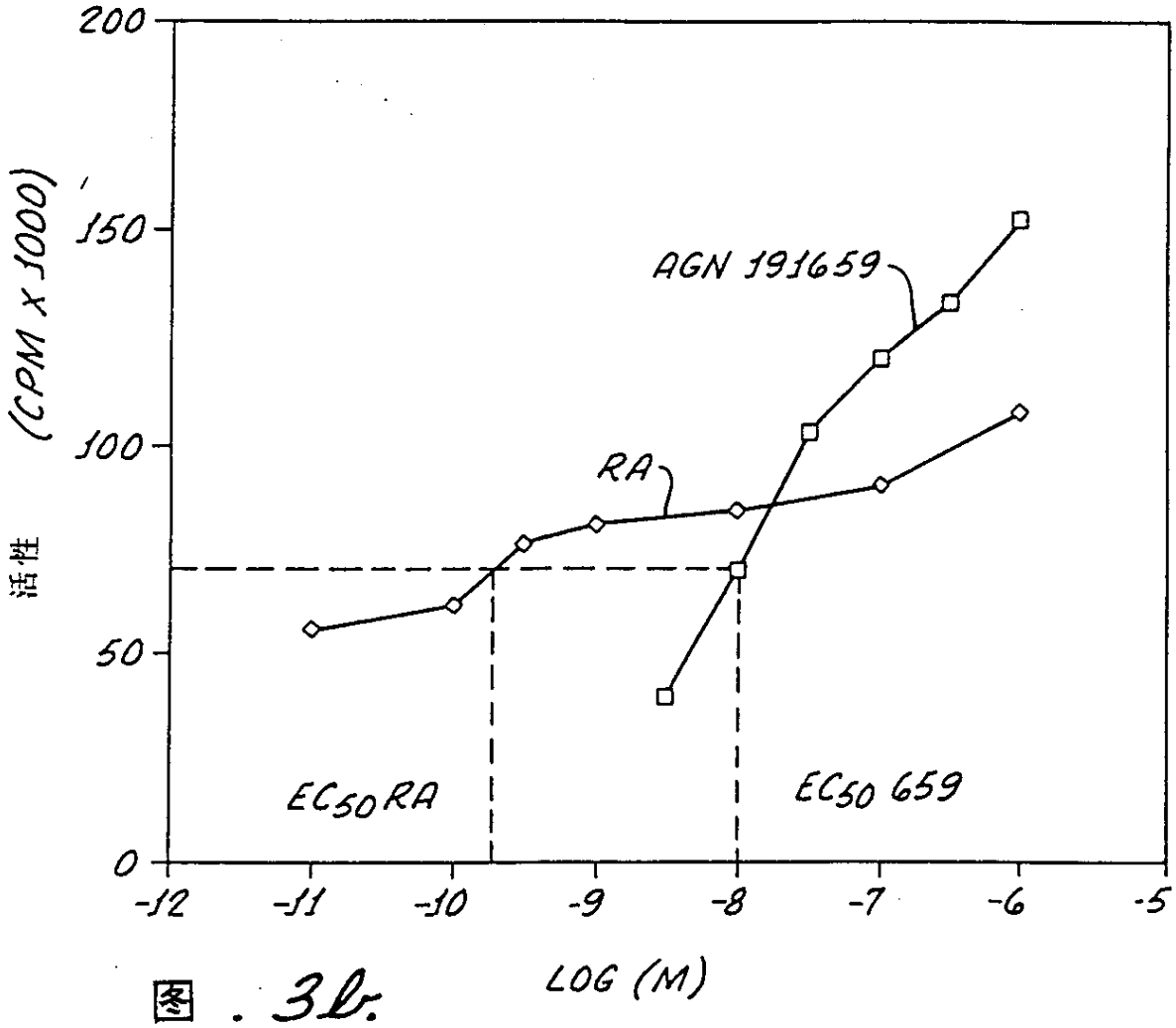

200
150
100
50
0
活性 (CPM x 1000)
AGN 191659
RA
EC50 RA
EC50 659
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
-5
LOG (M)

图 . 3b.

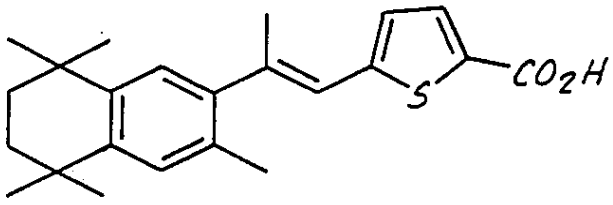

S
CO2H

图 : 3a.

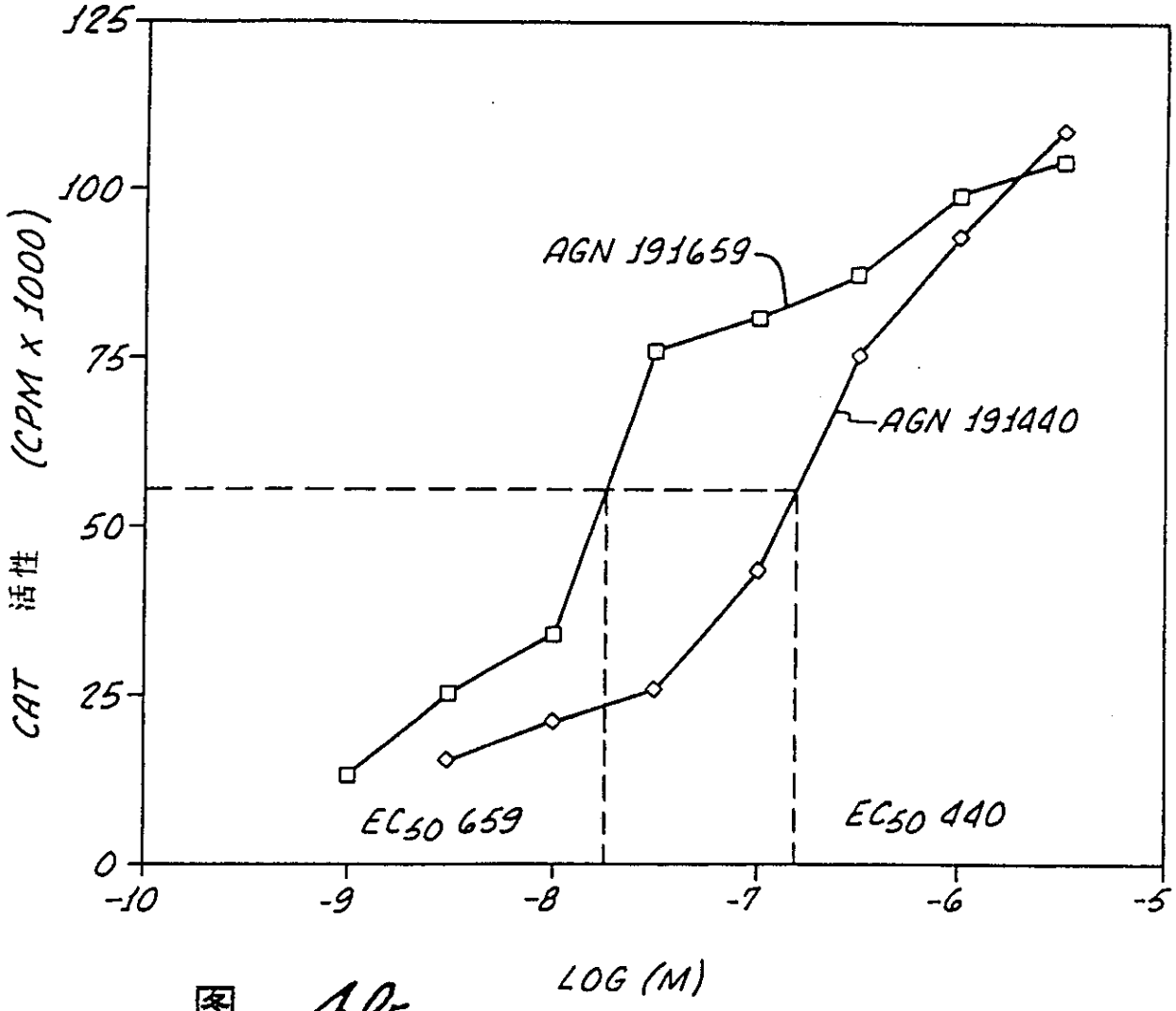

125
100
75
50
25
0
CAT 活性 (CPM x 1000)
AGN 191659
AGN 191440
EC50 659
EC50 440
-10
-9
-8
-7
-6
-5
LOG (M)

图 . 4b.

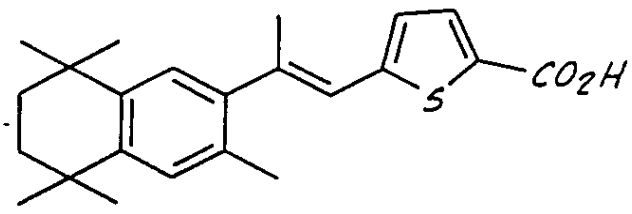

CO2H
S

图 . 4a.

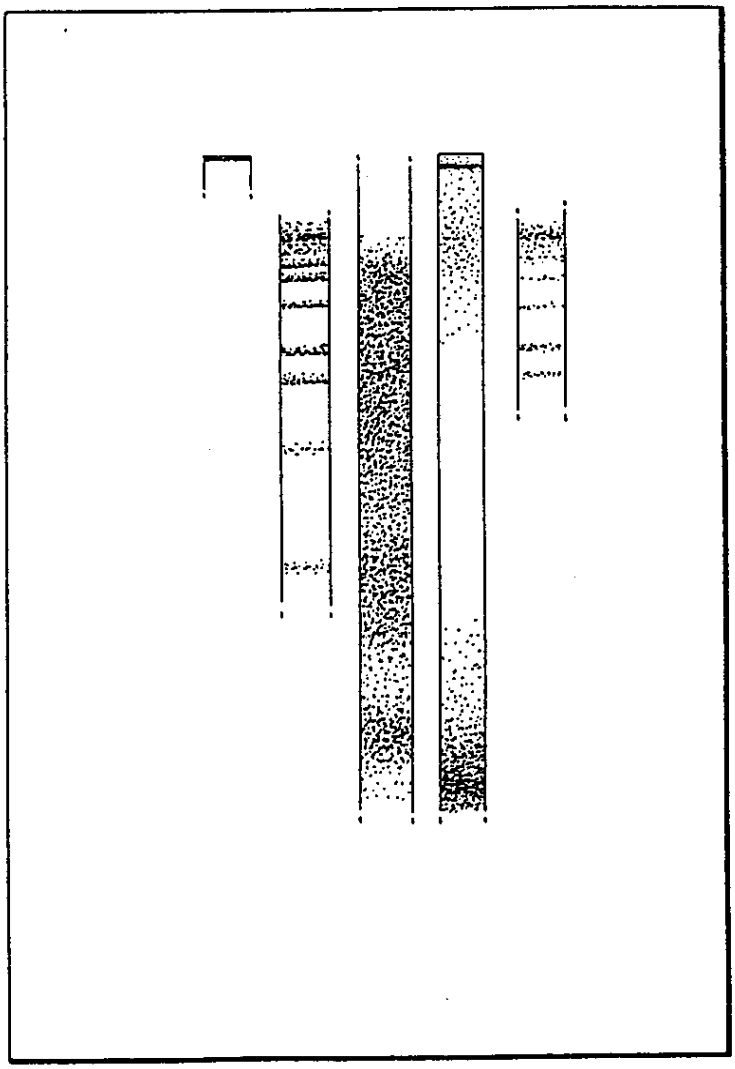


图 . 5.

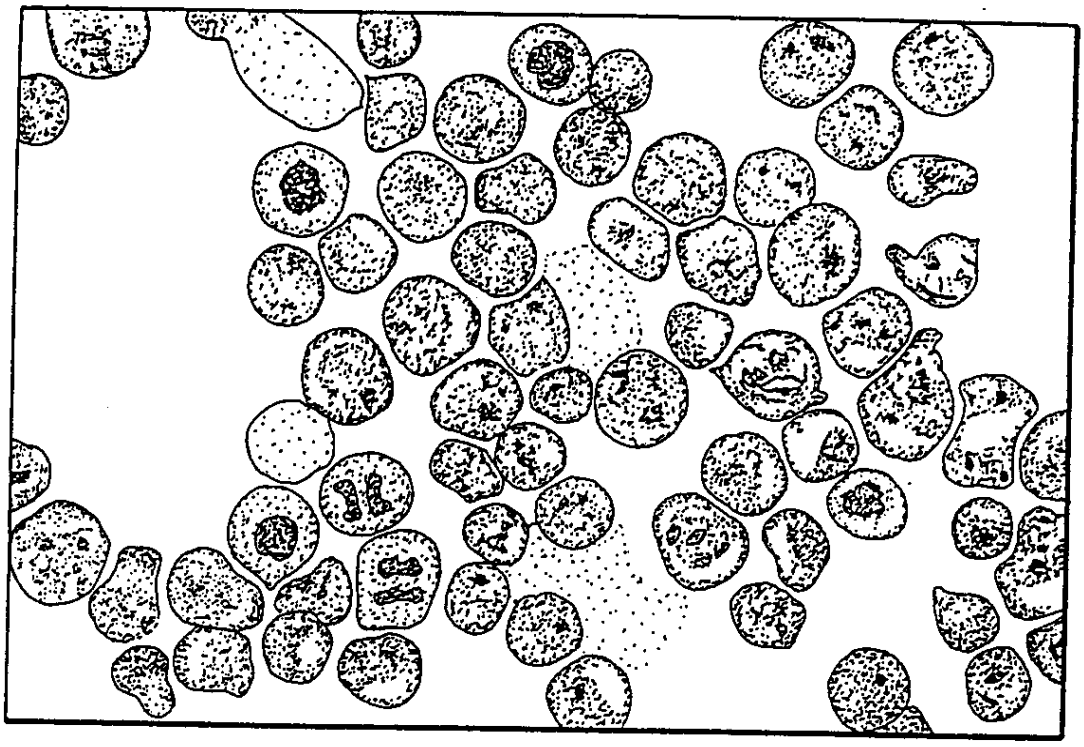


图. 6.

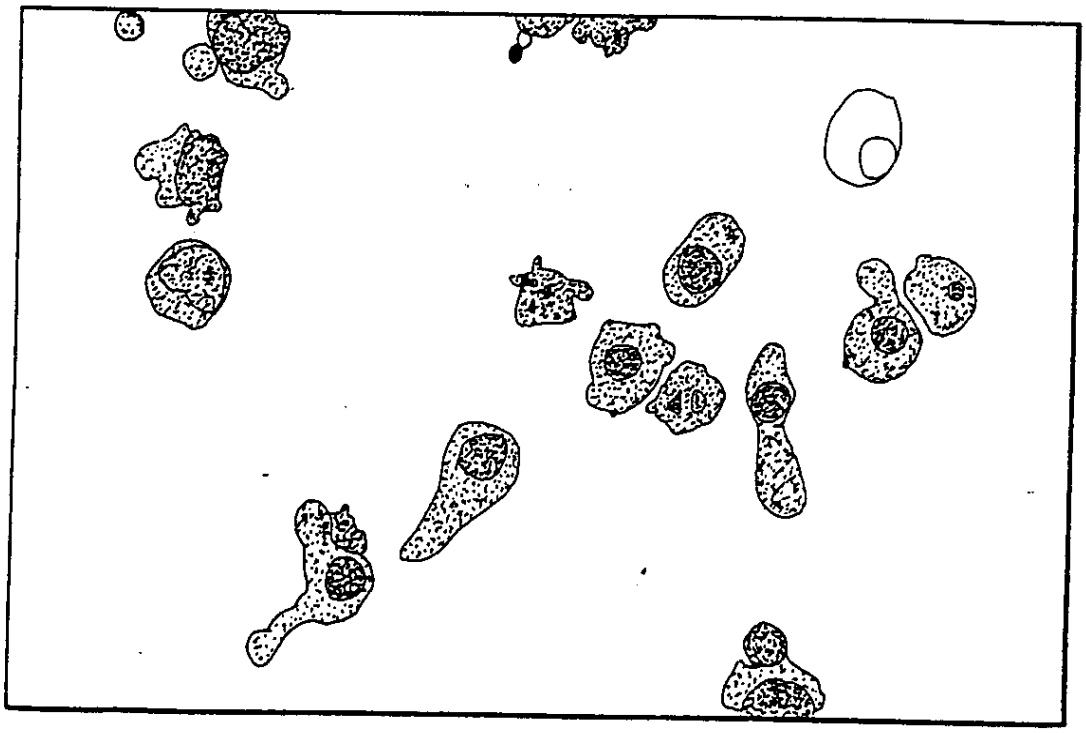


图. 7.

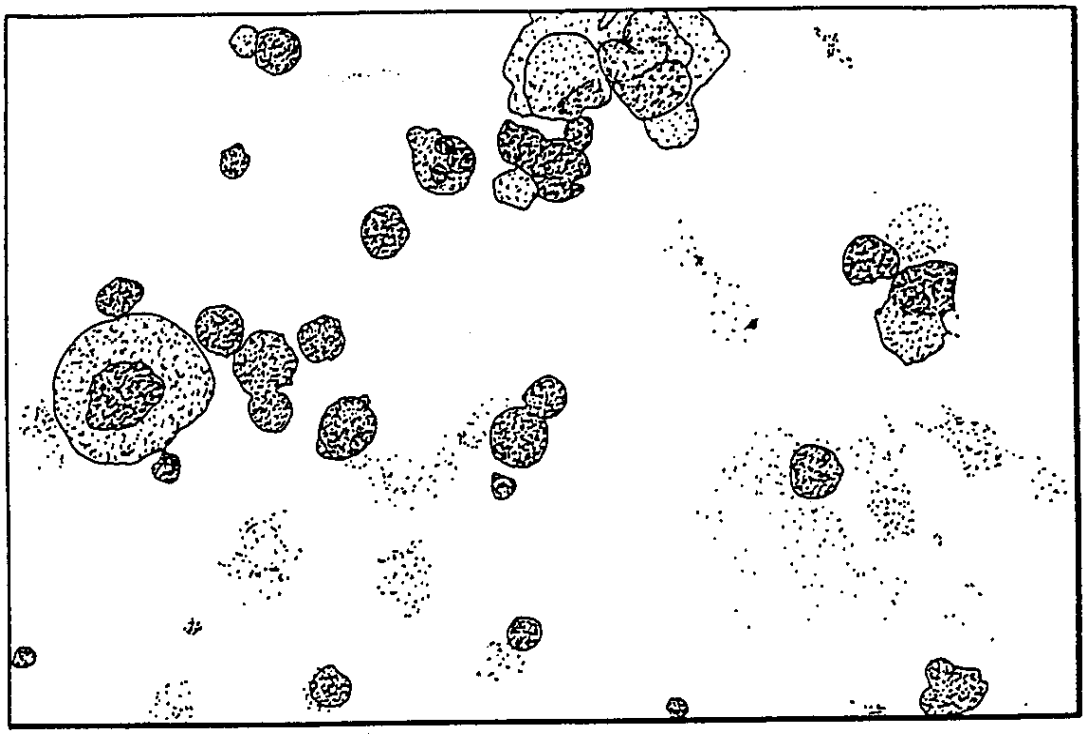


图. 8.

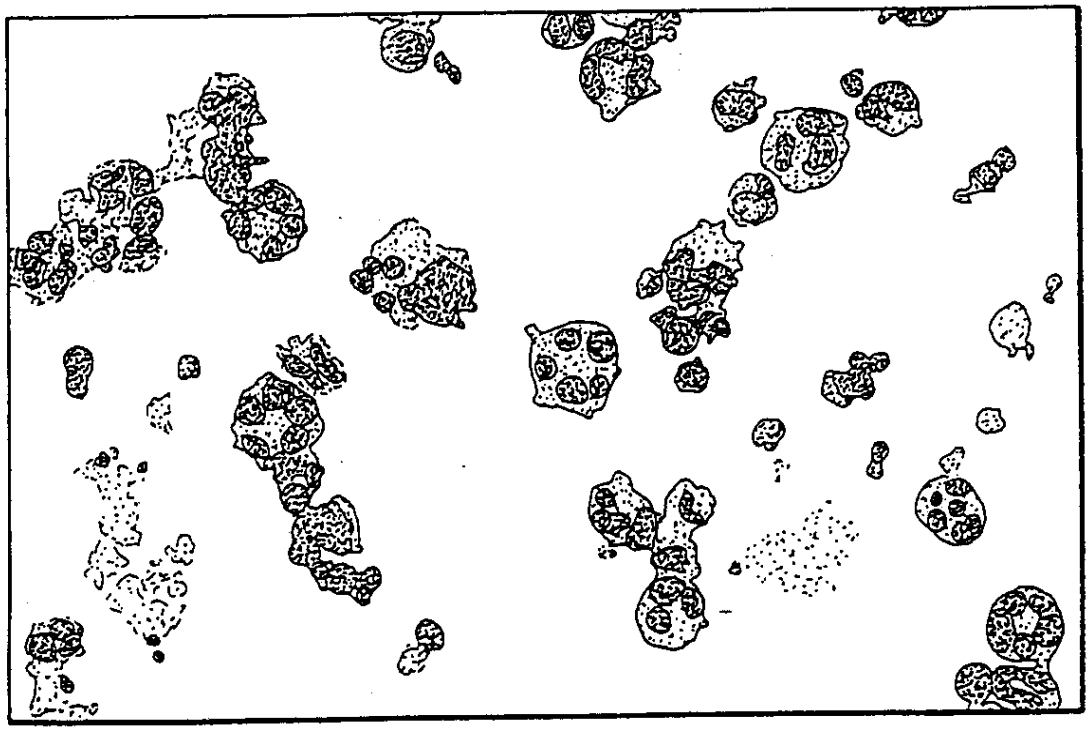


图. 9.