



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 110339203 A

(43)申请公布日 2019.10.18

(21)申请号 201910445731.X

A61P 35/00(2006.01)

(22)申请日 2014.04.08

(30)优先权数据

61/809575 2013.04.08 US

(62)分案原申请数据

201480032692.6 2014.04.08

(71)申请人 得克萨斯系统大学评议会

地址 美国得克萨斯州

(72)发明人 J.W.谢 S.M.格里亚兹诺夫

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 黄登高

(51)Int.Cl.

A61K 31/7076(2006.01)

A61K 45/06(2006.01)

权利要求书5页 说明书19页 附图12页

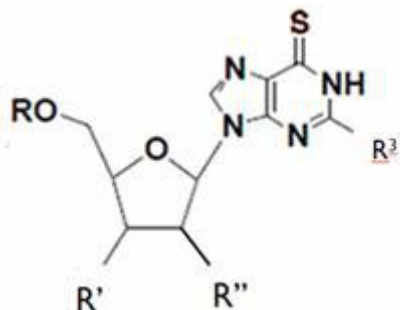
(54)发明名称

用于改变端粒酶介导的端粒的巯基嘌呤核
糖核苷类似物

(57)摘要

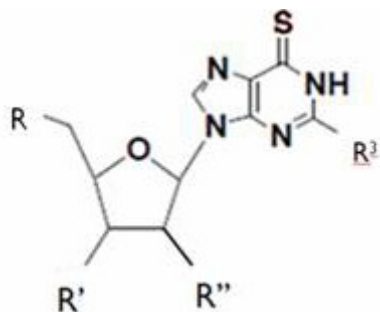
本公开涉及使用6-巯基嘌呤核苷及其类似物用于癌症和其它过度增殖疾病的治疗的药物组合物和方法。所描述的化合物可在体内转化成端粒底物并可被端粒酶识别用于合并进入端粒酶活性的细胞的端粒,导致诱导端粒酶活性的细胞的细胞死亡。

1. 药物组合物,其包含6-巯基嘌呤核糖核苷类似物,用于治疗癌症或过度增殖疾病。
2. 权利要求1所述的组合物,其中所述6-巯基嘌呤核糖核苷类似物包括6-硫代-2'-脱氧鸟嘌呤核苷。
3. 权利要求1所述的组合物,其中所述6-巯基嘌呤核糖核苷类似物是根据下式的化合物:



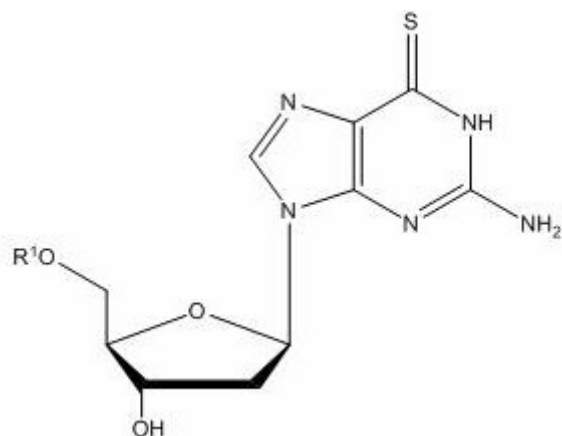
其中R可以是H、羟基、氨基、烷基氨基、氟化物、酰基、C₁-C₂₀烷基或醚基、磷酸酯基、二磷酸酯基、三磷酸酯基、磷酸酯基或磷酸二酯基;其中R'可以是H、羟基、氟化物、C₁-C₂₀烷基或醚基;其中R''可以是核糖或阿拉伯糖构型的羟基、氟化物或氨基;其中R³可以是氨基或烷基氨基;及其药学上可接受的盐、溶剂化物或多晶型物。

4. 权利要求1所述的组合物,其中所述6-巯基嘌呤核糖核苷类似物是根据下式的化合物:



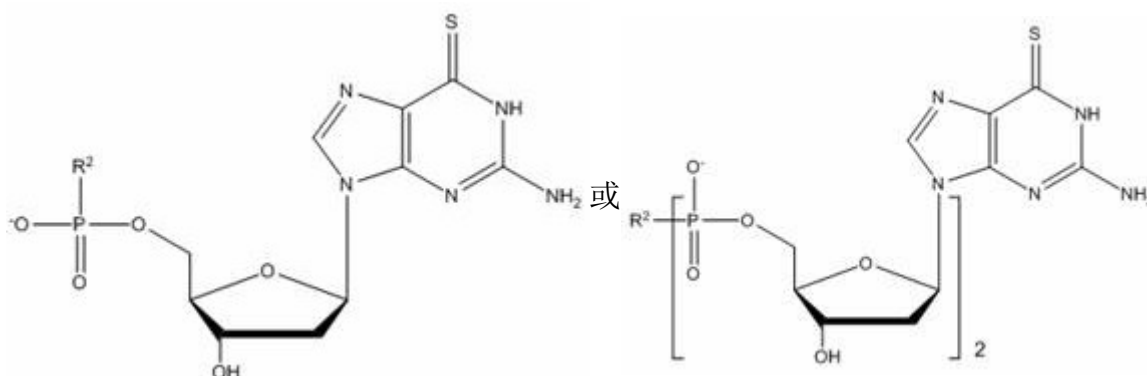
其中R可以是H、酰基、C₁-C₂₀烷基或醚基、磷酸酯基、二磷酸酯基、三磷酸酯基、磷酸酯基或磷酸二酯基;其中R'可以是H、羟基、氟化物、C₁-C₂₀烷基或醚基;其中R''可以是核糖或阿拉伯糖构型的羟基、氟化物或氨基;其中R³可以是氨基或烷基氨基;及其药学上可接受的盐、溶剂化物或多晶型物。

5. 权利要求1所述的组合物,其中所述6-巯基嘌呤核糖核苷类似物是根据下式的化合物:



其中R¹可以是H、-C(O)(CH₂)_nCH₃, 其中n = 6-16, 及其药学上可接受的盐、溶剂化物或多晶型物。

6. 权利要求1所述的组合物, 其中所述6-巯基嘌呤核糖核苷类似物是根据下式的化合物:



其中R²可以是精胺或亚精胺, 及其药学上可接受的盐、溶剂化物或多晶型物。

7. 权利要求1至6中任一项所述的组合物, 其中所述组合物含有有效量的6-巯基嘌呤核糖核苷类似物, 且所述有效量包括介于0.5 mg的类似物每1 kg的对象至3 mg的类似物每1 kg的对象之间的量。

8. 权利要求1至7中任一项所述的组合物, 其进一步包含第二抗癌剂。

9. 权利要求1至8中任一项所述的组合物, 其进一步包括含第二抗癌剂的第二药物组合物, 其中在第一治疗阶段给药所述药物组合物并在第二治疗阶段给药第二药物组合物, 其中在第一治疗阶段给药所述第二药物组合物并在第二治疗阶段输送所述药物组合物, 或其中在同一天或同时给药所述第一药物组合物和所述第二药物组合物。

10. 权利要求8和9中任一项所述的组合物, 其中所述抗癌剂包括端粒酶抑制剂。

11. 权利要求8和9中任一项所述的组合物, 其中所述抗癌剂包括Imetelstat钠。

12. 权利要求1至11中任一项所述的组合物, 其中至少每周2次、持续至少2周、至少4周、至少6周、至少8周或至少12周给药有效量的所述药物组合物。

13. 权利要求1至12中任一项所述的组合物, 其中所述药物组合物可注射或口服。

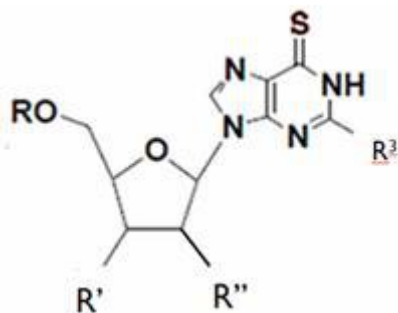
14. 权利要求1至13中任一项所述的组合物, 其中肿瘤的尺寸减小或肿瘤的生长速率降低。

15. 用于治疗有需要的对象的方法, 其包括向对象给药包含6-巯基嘌呤核糖核苷类似

物的药物组合物,其中所述对象已诊断为患有癌症或过度增殖疾病。

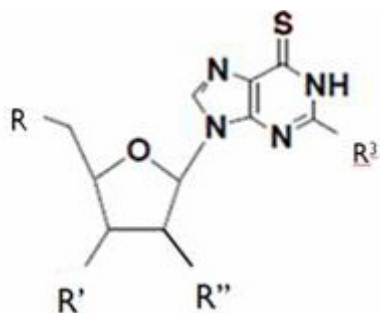
16. 权利要求15所述的方法,其中所述6-巯基嘌呤核糖核苷类似物包括6-硫代-2'-脱氧鸟嘌呤核苷。

17. 权利要求15所述的方法,其中所述6-巯基嘌呤核糖核苷类似物是根据下式的化合物:



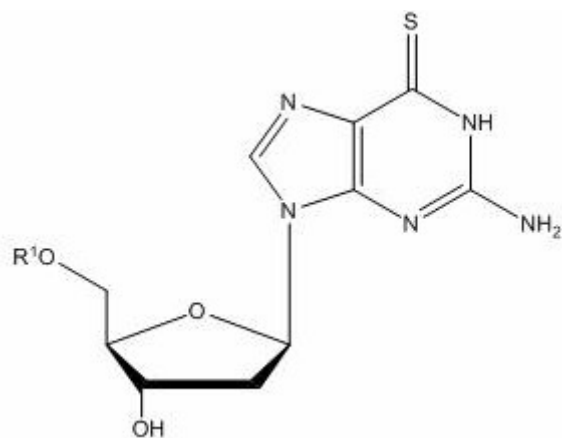
其中R可以是H、羟基、氨基、烷基氨基、氟化物、酰基、C₁-C₂₀烷基或醚基、磷酸酯基、二磷酸酯基、三磷酸酯基、膦酸酯基或磷酸二酯基;其中R'可以是H、羟基、氟基、C₁-C₂₀烷基或醚基;其中R''可以是核糖或阿拉伯糖构型的羟基、氟化物或氨基;其中R³可以是氨基或烷基氨基;及其药学上可接受的盐、溶剂化物或多晶型物。

18. 权利要求15所述的方法,其中所述6-巯基嘌呤核糖核苷类似物是根据下式的化合物:



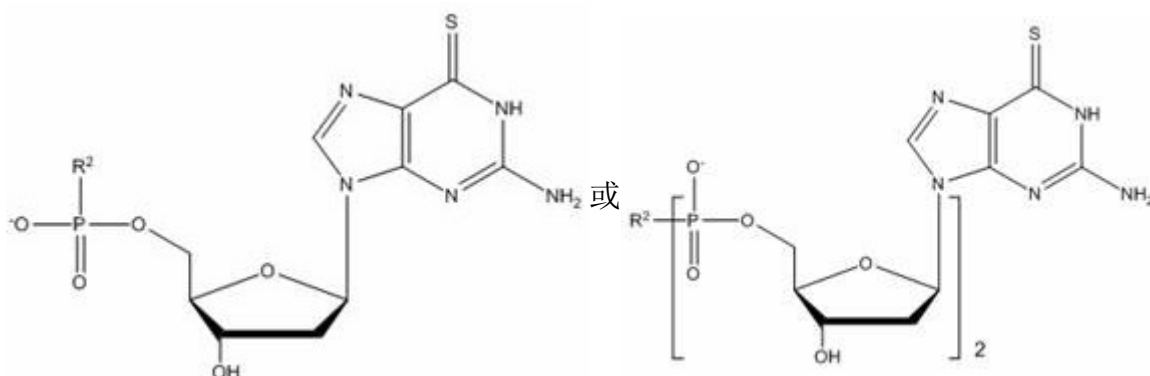
其中R可以是H、酰基、C₁-C₂₀烷基或醚基、磷酸酯基、二磷酸酯基、三磷酸酯基、膦酸酯基或磷酸二酯基;其中R'可以是H、羟基、氟化物、C₁-C₂₀烷基或醚基;其中R''可以是核糖或阿拉伯糖构型的羟基、氟化物或氨基;其中R³可以是氨基或烷基氨基;及其药学上可接受的盐、溶剂化物或多晶型物。

19. 权利要求15所述的方法,其中所述6-巯基嘌呤核糖核苷类似物是根据下式的化合物:



其中R¹可以是H、-C(O)(CH₂)_nCH₃, 其中n = 6-16, 及其药学上可接受的盐、溶剂化物或多晶型物。

20. 权利要求15所述的方法, 其中所述6-巯基嘌呤核糖核苷类似物是根据下式的化合物:



其中R²可以是精胺或亚精胺, 及其药学上可接受的盐、溶剂化物或多晶型物。

21. 权利要求15至20中任一项所述的方法, 其中每天向对象给药有效量的所述药物组合物, 且所述有效量包括介于0.5 mg的所述类似物每1 kg的对象至3 mg的所述类似物每1 kg的对象之间的量。

22. 权利要求15至21中任一项所述的方法, 其进一步包括向所述对象给药包含抗癌剂的第二药物组合物的步骤。

23. 权利要求22所述的方法, 其中在治疗的第一阶段输送所述药物组合物并在治疗的第二阶段输送所述第二药物组合物。

24. 权利要求22所述的方法, 其中在治疗的第一阶段输送所述第二药物组合物并在治疗的第二阶段输送所述药物组合物。

25. 权利要求22所述的方法, 其中在同一天或同时给药所述第一药物组合物和所述第二药物组合物。

26. 权利要求22至25中任一项所述的方法, 其中所述抗癌剂包括端粒酶抑制剂。

27. 权利要求22至25中任一项所述的方法, 其中所述抗癌剂包括Imetelstat钠。

28. 权利要求22至27中任一项所述的方法, 其中至少每周两次、持续至少2周、至少4周、至少6周、至少8周或至少12周给药有效量的所述药物组合物。

29. 权利要求15至28中任一项所述的方法, 其中所述药物组合物经口服或注射给药。

30. 权利要求15至29中任一项所述的方法,其中通过肿瘤内注射给药所述药物组合物。
31. 权利要求15至30中任一项所述的方法,其中肿瘤的尺寸减小或肿瘤的生长速率降低。
32. 权利要求15所述的方法,其中所述对象是人类。

用于改变端粒酶介导的端粒的巯基嘌呤核糖核苷类似物

[0001] 本申请是申请日为2014年4月8日,申请号为201480032692.6,发明名称为“用于改变端粒酶介导的端粒的巯基嘌呤核糖核苷类似物”的发明专利的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

本申请要求2013年4月8号提交的美国临时申请序列号61/809,575的权益,其内容特此通过引用以它们的全部并入本文。

[0003] 背景

1. 发明领域

相关领域的描述。本公开通常涉及包含特别通过抗增殖机理具有抗癌效果的化合物的药物组合物和治疗方法。

[0004] 2. 相关领域的描述

端粒是位于线性染色体的最末端的高度特异性结构。主要归因于末端复制问题,正常人类体细胞随着各个细胞分裂而逐渐失去它们的端粒。虽然大部分正常人类细胞不具有端粒酶活性,85-90%的癌细胞却具有,所述端粒酶活性稳定它们的端粒。

[0005] 端粒是在线性真核染色体的末端发现的由TTAGGG DNA重复的多拷贝构成的保护性结构。端粒与6种蛋白相关联;TRF1、TRF2、TIN2、Rap1、TPP1和POT1,其一起被称作shelterin复合体(de Lange T., “Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres,” Genes & Development 2005;19:2100-10)。shelterin复合体贯穿细胞周期存在于端粒,并已显示覆盖染色体末端使其免于被识别为DNA损伤部位。

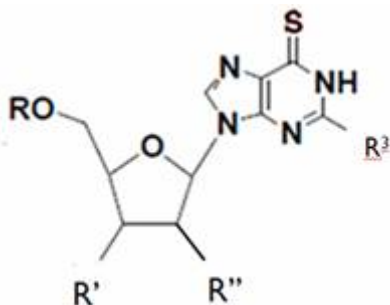
[0006] 归因于末端复制问题,在所有正常体细胞中的端粒随着各个细胞分裂经历逐渐的缩短,最终引起细胞衰老。但是,复制依赖性的端粒缩短可被核糖核蛋白酶,端粒酶所抵消。端粒酶是将TTAGGG重复添加至线性染色体末端的细胞逆转录酶。端粒酶具有两个组分,hTERT (端粒酶催化蛋白组分)和hTR或hTERC (端粒酶功能性RNA组分或模板RNA组分)(Greider CW和Blackburn EH, “Telomeres, telomerase and cancer,” Scientific American. 1996;274:92-7)。虽然大多数正常人类体细胞不具有端粒酶活性,但其几乎普遍地在初级人类癌细胞中被检测到(~85-90%)。因此,在没有端粒酶活性的正常细胞中的逐渐缩短为肿瘤发生提供了初始障碍。

[0007] 因此,在癌细胞中,端粒酶和端粒代表对于治疗方法具有吸引力的几乎通用的目标。因为大多数正常体细胞不具有端粒酶活性,所以选择性地靶向端粒酶活性的治疗可能是有益的。另外,可在端粒酶活性期间干扰端粒测序以干扰shelterin复合体的结构或功能的治疗也可能是有益的。

[0008] 概述

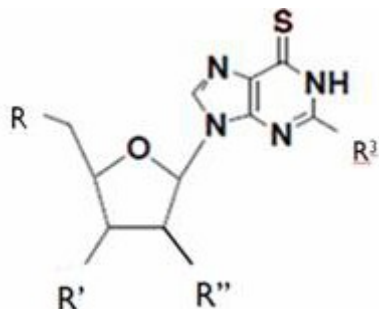
本公开涉及化合物6-巯基嘌呤核糖核苷及其类似物用于肿瘤、癌症和过度增殖疾病的治疗的用途。具体地,本公开的化合物可在体内转化成为端粒底物并可被端粒酶识别用于并入端粒酶活性的细胞的端粒中,导致诱导端粒酶活性的细胞的细胞死亡。虽然不希望受限于任何具体的理论,但是所描述的化合物并入端粒中被认为是即时的端粒DNA链终止剂和/或归因于变更的端粒结构而被识别为具有端粒的DNA损伤。

[0009] 根据本公开,可向对象给药根据下式I的化合物:



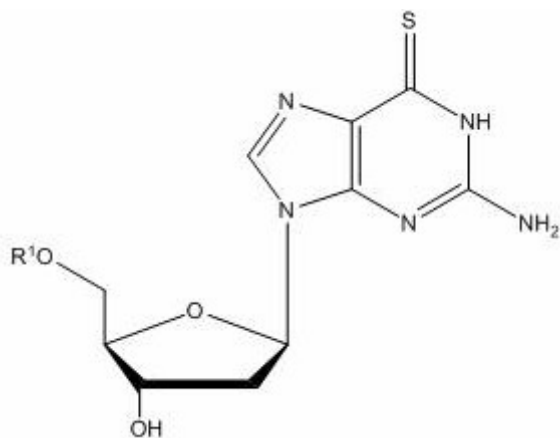
其中R可以是H、羟基、氨基、烷基氨基、氟化物、酰基、C₁-C₂₀烷基或醚基、磷酸酯基、二磷酸酯基、三磷酸酯基、膦酸酯基或磷酸二酯基;其中R'可以是H、羟基、氟基(fluoride group)、C₁-C₂₀烷基或醚基;其中R''可以是核糖(ribo)或阿拉伯糖(arabino)构型的羟基、氟化物或氨基;其中R³可以是氨基或烷基氨基;及其药学上可接受的盐、溶剂化物或多晶型物。在各种实施方式中,R是H,R'是羟基,及R''是H,且此类化合物在此称作6-硫代-2'-脱氧鸟嘌呤核苷。

[0010] 根据本公开,可向对象给药根据下式II的化合物:



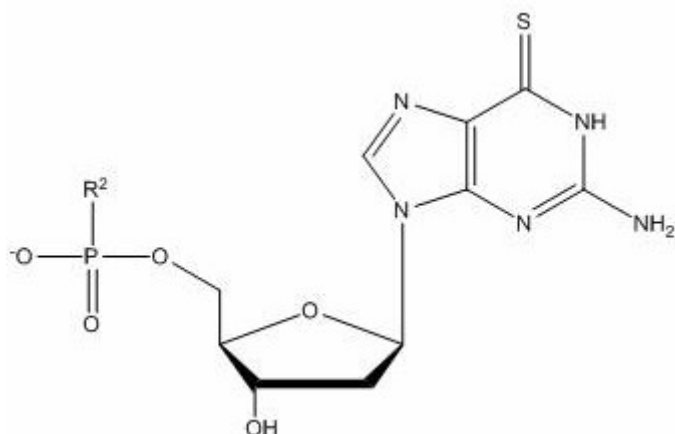
其中R可以是H、酰基、C₁-C₂₀烷基或醚基、磷酸酯基、二磷酸酯基、三磷酸酯基、膦酸酯基或磷酸二酯基;其中R'可以是H、羟基、氟化物、C₁-C₂₀烷基或醚基;其中R''可以是核糖或阿拉伯糖构型的羟基、氟化物或氨基;其中R³可以是氨基或烷基氨基;及其药学上可接受的盐、溶剂化物或多晶型物。在各种实施方式中,R是H,R'是羟基,及R''是H。

[0011] 根据本公开,可向对象给药可包含根据下式III的化合物的药物组合物:



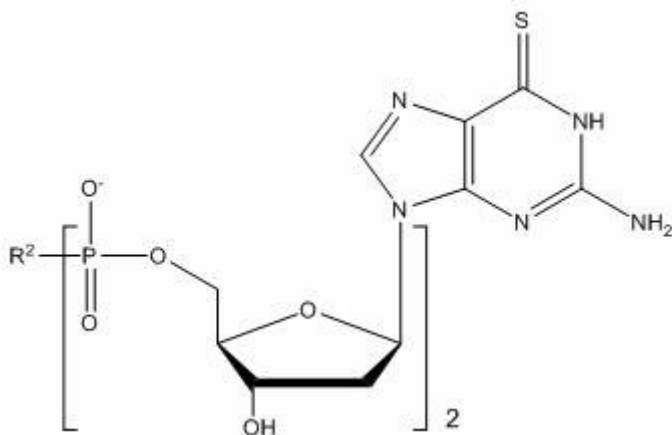
其中R¹可以是H、-C(O)(CH₂)_nCH₃,其中n = 6-16,且此类化合物在此称作6-硫代-2'-脱氧鸟嘌呤核苷。

[0012] 根据本公开,可向对象给药可包含根据下式IV的化合物的药物组合物:



其中R²可以是精胺或亚精胺,且此类化合物在此称作6-硫代-2'-脱氧鸟嘌呤核苷。

[0013] 根据本公开,可向对象给药可包含根据下式V的化合物的药物组合物:



其中R²可以是精胺或亚精胺,且此类化合物在此称作6-硫代-2'-脱氧鸟嘌呤核苷。

[0014] 本公开的另外的方面是药物组合物,其包含抗癌有效量的一种或更多种式I、II、III、IV或V的化合物,任选地与有效量的至少一种另外的抗癌剂或至少一种载体、添加剂或赋形剂组合。

[0015] 本公开进一步的方面涉及用于治疗癌症和其它过度增殖疾病,包括肿瘤,特别是恶性肿瘤和癌症和处理具有端粒酶过度活化的任何细胞的方法。

[0016] 本公开的其它的方面包括治疗方法,所述方法包括给药有效量的根据本公开的6-巯基嘌呤核糖核苷类似物及给药包含另一抗癌剂的第二药物组合物。施用可同时发生、在顺序的阶段中发生或以几个阶段给药,其中所述几个阶段在时间上至少部分重合或相隔一定的时间间隔。多重抗癌剂治疗可提供抗癌剂一者或二者的抗癌活性的累加效应或进一步的协同增强。

[0017] 在本公开的方法或组合物的上下文中讨论的实施方式可关于在此描述的任何其它的方法或组合物来使用。因此,附属于一种方法或组合物的实施方式也可应用至本发明的其它的方法和组合物。在此说明书中使用的“一”(“a”或“an”)可表示一或更多。在此权利要求(一项或更多项)中使用的,当与词语“包含”一起使用时,词语“一”可表示一或多于一。

[0018] 尽管本公开支持仅指替代物和“和/或”的界定,但是除非明确指出仅指替代物或替代物互相排斥,否则在权利要求中使用术语“或”用于表示“和/或”。在此使用的“另一”可表示至少再一或更多。

[0019] 贯穿本申请,术语“约”用于表明一个值包括对于设备、用以测定值的方法误差的固有偏差、或存在于研究对象中的偏差。

[0020] 本发明的其它目标、特征和优势将从以下详细描述中变得显而易见。然而,应当理解虽然详细描述和具体实施例表明本发明的优选实施方式,但是其仅通过举例说明的方式被给出,因为从该详细描述中,在本发明的精神和范围内的各种改变和修改对于本领域技术人员将变得显而易见。

[0021] 附图简述

以下附图形成本说明书的一部分,并被包括以进一步展示本发明的某些方面。参照这些附图中的一张或更多张,结合在此呈现的具体实施方式的详细描述,可更好地理解本发明。

[0022] 图1A. 6-硫代鸟嘌呤(6-硫代-G)和6-硫代-脱氧鸟嘌呤核苷(6-硫代-dG)的化学结构。

[0023] 图1B. 展示使用6-硫代-dG (3 μ M)和6-硫代-G (3 μ M)处理HCT116和BJ细胞1周(每3天)的细胞计数的图表。(对照;未处理)。

[0024] 图2. 不使用药物(--)、使用6-硫代-dG (6dG)、GRN163L (Im)或6-硫代-dG和GRN163L的组合(combo)的HCT116细胞处理方案的时间表。每周收集 1×10^6 个细胞/样品用于TRF分析。用10 μ M 6-硫代-dG处理HCT116细胞12-16周。在使用10 μ M 6-硫代-dG处理12周之后,使用10 μ M 6-硫代-dG和3 μ M GRN163L的组合处理所述细胞2-4周或仅使用GRN163L处理所述细胞2-4周或停药2-4周。(对照;未处理)。在各个处理方案结束时,使用TRF分析来确定端粒缩短。

[0025] 图3A和3B. (A) 显示对于具有短端粒和长端粒的细胞,端粒酶抑制剂的给药和细胞死亡之间的延迟期的对比线图。(B) 显示对于具有短端粒和长端粒的细胞,端粒变更的化合物的给药和细胞死亡之间的延迟期的对比线图。

[0026] 图4. 每细胞的DNA损伤病灶。使用6-硫代-dG (3 μ M)和6-硫代-G (3 μ M)处理的HCT116细胞($n=75$,SD来自两个独立的实验)。在未配对的Student t检验中,** $P=0.003$,*** $P=0.0005$,* $P=0.0141$ (6-硫代-G相对6-硫代-dG)。在未配对的Student t检验中,生理盐水,无显著性差异。(对照;未处理)。

[0027] 图5. 使用6-硫代-dG (3 μ M)或6-硫代-G (3 μ M)处理的HCT116细胞的TIF指数(TIF阳性细胞的百分数)。与TRF2共定位的具有四个或更多个 γ -H2AX病灶的细胞由Imaris软件记分为TIF阳性($n=75$,SD来自两个独立的实验)。在未配对的Student t检验中,* $P<0.05$,** $P=0.0063$ (与赋形剂对照相比较)。在未配对的Student t检验中,生理盐水,无显著性差异。(对照;未处理)。

[0028] 图6A和6B. (A) 显示使用6-硫代-dG (3 μ M)和6-硫代-G (3 μ M)处理、并在72小时之后使用各种剂量的电离辐射辐照的HCT116的存活分数的线图。处理之后,将细胞以不同的密度接种并培养10天。(B) 显示使用cell titer glow发光分析来确定的细胞活性的线图。

[0029] 图7A和7B. (A) 显示在使用HCT116的异种移植动物模型中的肿瘤生长速率减小的

线图。(B) 显示使用A549细胞的异种移植动物模型中的肿瘤生长速率减小的线图。

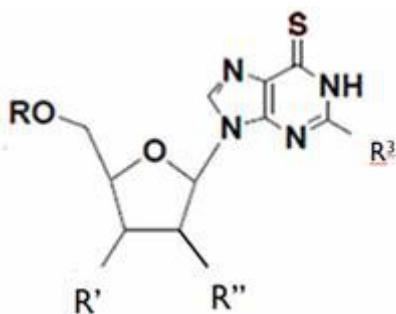
[0030] 图8A和8B. (A) 显示与对照相比较,在接受1.67 mg/kg的6-硫代-dG或6-硫代-G的WT小鼠模型中的重量减轻的线图。(B) 显示与对照相比较,在接受5 mg/kg的6-硫代-dG或6-硫代-G的WT小鼠模型中的重量减轻的线图。

[0031] 说明性实施方式的描述

本公开涉及使用6-硫代鸟嘌呤核苷类似物作为端粒扰乱化合物的药物组合物 and 治疗方法。这些类似物可在体内转化成为5'-三磷酸酯端粒酶底物,如2'-脱氧鸟嘌呤核苷5'-三磷酸酯。所描述的底物可被并入端粒,引起端粒缩短、端粒机能障碍或上述二者。

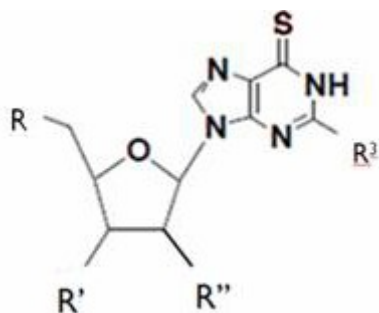
[0032] 更具体地,本公开的类似物可在癌细胞中、但是通常不(或很少)在正常端粒酶活性阴性细胞中用作端粒靶向分子。这种通常是选择性的治疗起因于本公开的类似物靶向表达端粒酶的癌细胞的事实。使用式I、II、III、IV和/或 V化合物处理端粒酶活性细胞可引起至少一部分或大多数活性细胞的急性细胞死亡。细胞死亡可能是逐渐端粒缩短或端粒机能障碍的结果,如,因为一些鸟嘌呤碱基将被6-硫代-鸟嘌呤对应物置换引起端粒相关的DNA损伤,及例如通过shelterin复合体的结构和机能的更改诱导DNA损伤应答。此外,如通过端粒重复序列扩增方案(TRAP)检验所测定的,本公开的化合物可能在体外不引起任何端粒酶活性的抑制或可能仅引起端粒酶活性的轻微抑制。最后,本公开的化合物可能引起基因组DNA损伤。因此,根据本公开的各种药物组合物的给药代表端粒酶阳性人类癌症的治疗方法,其基于具有以下特征的作用的双功能机理i) 由抗代谢性能和向基因组DNA中的合并获得的急性细胞毒性和ii) 端粒的DNA修饰和缩短。本公开还涉及包括组合治疗计划或第二药物组合物的共给药的治疗方法。

[0033] 根据本公开,药物组合物可包含用于肿瘤、癌症和过度增殖疾病的治疗的化合物6-巯基嘌呤核糖核苷及其类似物。在各种实施方式中,可向对象给药可包含根据下式I的化合物的药物组合物:



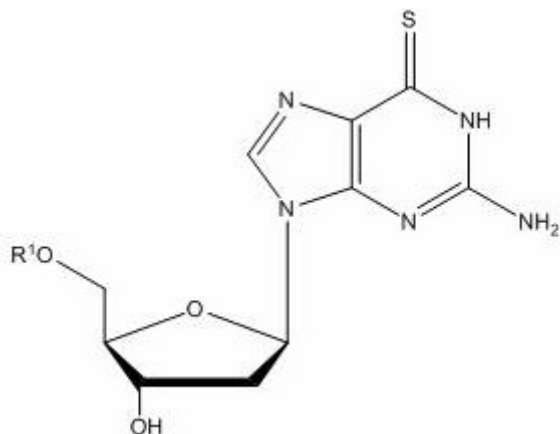
其中R可以是H、羟基、氨基、烷基氨基、氟化物、酰基、C₁-C₂₀烷基或醚基、磷酸酯基、二磷酸酯基、三磷酸酯基、磷酸酯基或磷酸二酯基;其中R' 可以是H、羟基、氟基、C₁-C₂₀烷基或醚基;其中R'' 可以是核糖或阿拉伯糖构型的羟基、氟化物或氨基;其中R³可以是氨基或烷基氨基;及其药学上可接受的盐、溶剂化物或多晶型物,且此类化合物在此称作6-硫代-2'-脱氧鸟嘌呤核苷。在各种实施方式中,R是H,R' 是羟基,及R'' 是H。

[0034] 在各种实施方式中,可向对象给药可包含根据下式II的化合物的药物组合物:



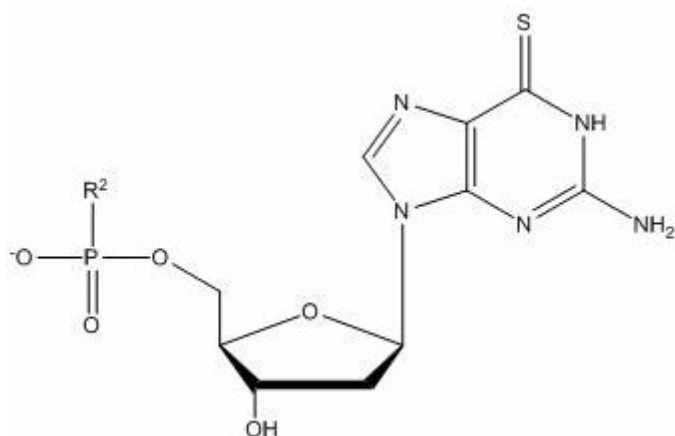
其中R可以是H、酰基、 C_1 - C_{20} 烷基或醚基、磷酸酯基、二磷酸酯基、三磷酸酯基、磷酸酯基或磷酸二酯基；其中R'可以是H、羟基、氟化物、 C_1 - C_{20} 烷基或醚基；其中R''可以是核糖或阿拉伯糖构型的羟基、氟化物或氨基；其中R³可以是氨基或烷基氨基；及其药学上可接受的盐、溶剂化物或多晶型物。在各种实施方式中，R是H，R'是羟基，及R''是H，且此类化合物在此称作6-硫代-2'-脱氧鸟嘌呤核苷。

[0035] 在各种实施方式中，可向对象给药可包含根据下式III的化合物的药物组合物：



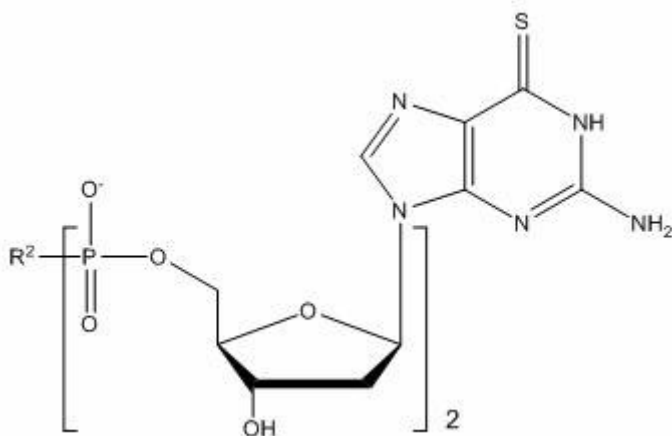
其中R¹可以是H、 $-C(O)(CH_2)_nCH_3$ ，其中 $n = 6-16$ ，及其药学上可接受的盐、溶剂化物或多晶型物，且此类化合物在此称作6-硫代-2'-脱氧鸟嘌呤核苷。

[0036] 在各种实施方式中，可向对象给药可包含根据下式IV的化合物的药物组合物：



其中R²可以是精胺或亚精胺，及其药学上可接受的盐、溶剂化物或多晶型物，且此类化合物在此称作6-硫代-2'-脱氧鸟嘌呤核苷。

[0037] 在各种实施方式中，可向对象给药可包含根据下式V的化合物的药物组合物：



其中 R^2 可以是精胺或亚精胺,及其药学上可接受的盐、溶剂化物或多晶型物,且此类化合物在此称作6-硫代-2'-脱氧鸟嘌呤核苷。

[0038] 术语“烷基”在其上下文内应当表示 C_1 - C_{20} ,优选 C_1 - C_{10} 直链、支链或环状的完全饱和的烃基,其可任选地被诸如苯基取代,例如。术语烷基还应当包括芳烷基,例如苄基,其中苯基可任选地被取代。未明确提供的官能基团理解为如在此定义的氢或烷基中的一个。术语“醚”应当表示 C_1 至 C_{20} 醚基,其由在根据本发明化合物的糖部分上的位置上的氧和烷基形成,并优选在烷基链内含有至少一个氧基。

[0039] 贯穿本说明书使用术语“酰基”来描述在核苷类似物的5'位上的基团(如在糖单元中的游离羟基位置),其含有 C_1 至 C_{20} 直链、支链或环状烷基链或另外在此描述的相关基团。在5'位(R)的酰基与相应羟基组合得到酯,其在施用之后可裂解产生本发明的游离的核苷形式。

[0040] 术语“磷酸二酯”描述在糖单元的5'位上的单磷酸酯基,其经二酯化以使得磷酸酯基变成中性,即具有中性电荷。

[0041] 式I、II、III、IV或V化合物的修饰,特别在5'位上的修饰,可影响活性物质的溶解性、生物利用度和代谢速率,从而提供对于活性物质输送的控制。此外,所述修饰可影响化合物的抗癌活性,在一些情况中增加至超过天然鸟嘌呤化合物的活性。这可通过根据在此描述的方法或本领域技术人员已知的其它方法制备衍生物并测试其抗癌活性来评估。

[0042] 在此使用的“治疗”(“treatment”和“treating”)指向对象给药或施用治疗剂或在受治疗对象上进行步骤或程式(modality),用于获得关于疾病或健康相关病症的治疗益处或关于疾病或健康相关病症的预防效果的目的。例如,治疗可包括向具有癌细胞的对象给药药学上有效量的2-氨基-6-巯基嘌呤核糖核苷类似物。在此使用的术语“治疗益处”或“治疗有效的”指促进或增强对象的健康或增加其关于疾病或健康相关病症的医学治疗的可能性。这包括,但不限于,疾病病征或症状的频率或严重性的降低。例如,癌症的治疗可包括,例如,肿瘤的尺寸减小、肿瘤的侵袭性降低、癌症的生长速率减慢、一部分表现端粒酶的不正常活化的细胞的衰老或转移或复发的预防。癌症的治疗还可指延长具有癌症的对象的存活。在此使用的短语“有效量”描述在上下文中用以产生或影响治疗益处的化合物的量。

[0043] 在此使用的短语“抗癌效果”指可包括以下效果中的一种或更多种的效果:抑制肿瘤或癌细胞的进一步生长;降低转移的可能性或消除转移;有助于肿瘤、癌细胞或具有端粒酶的不正常活化的其它细胞的细胞死亡;引起肿瘤的收缩或癌细胞的数目减少;或预防患

者的肿瘤或癌症减轻之后的肿瘤或癌症的再生长。根据本公开的组合物或其衍生物表现抗癌效果。

[0044] “对象”指人或非人，例如灵长类动物、哺乳动物和脊椎动物。在具体的实施方式中，受治疗对象是人。

[0045] 根据各种实施方式，治疗方法可包括向对象给药药物组合物，其包含一种或更多种6-巯基嘌呤核糖核苷或其类似物，如式I、II、III、IV和/或V化合物。所述方法可用于癌症或其它过度增殖疾病状态的治疗或用于表现显著的端粒酶活性的细胞的处理。癌症可能是实体瘤、转移性癌症或非转移性癌症。在一些实施方式中，癌症可能发生于膀胱、血液、骨、骨髓、脑、胸、结肠、食道、十二指肠、小肠、大肠、结肠、直肠、肛门、牙龈、头、肾、肝、肺、鼻咽、脖子、卵巢、前列腺、皮肤、胃、睾丸、舌头或子宫。肿瘤可包含恶性生长物或良性生长物或肿大物(tumefacent)。

[0046] 癌症可具体地是以下组织学类型，但不限于这些：恶性新生物；癌；未分化癌；巨细胞癌和梭形细胞癌；小细胞癌；乳头状癌；鳞状细胞癌；淋巴上皮癌；基底细胞癌；毛母质癌；移行细胞癌；乳头状移行细胞癌；腺癌；恶性胃泌素瘤；胆管癌；肝细胞癌；混合型肝细胞癌和胆管癌；小梁癌(trabecular adenocarcinoma)；腺样囊性癌；腺瘤性息肉腺癌(adenocarcinoma in adenomatous polyp)；腺癌，家族性结肠息肉病；实体癌；恶性类癌瘤；细支气管肺泡腺癌(branchiolo-alveolar adenocarcinoma)；乳头状腺癌；嫌色细胞癌(chromophobe carcinoma)；嗜酸细胞癌；嗜酸性腺癌；嗜碱细胞癌；明细胞腺癌；颗粒细胞癌；滤泡状腺癌；乳头状和滤泡状腺癌；无被囊硬化性癌；肾上腺皮质癌；子宫内膜样癌(endometroid carcinoma)；皮肤附属器癌(skin appendage carcinoma)；顶泌腺癌；皮脂腺癌；耵聍腺癌；粘液表皮样癌；囊腺癌；乳头状囊腺癌；浆液性乳头状囊腺癌；粘液性囊腺癌；粘液性腺癌；印戒细胞癌；浸润性导管癌；髓样癌；小叶癌；炎性癌；乳腺性佩吉特疾病；腺泡细胞癌；腺鳞癌；腺癌伴鳞状化生(adenocarcinoma w/squamous metaplasia)；恶性胸腺瘤；恶性卵巢基质瘤；恶性泡膜细胞瘤；恶性粒层细胞瘤；恶性男性细胞瘤；塞托利细胞瘤；恶性莱迪希细胞瘤；恶性脂细胞瘤；恶性副神经节瘤；恶性非乳腺性副神经节瘤；嗜铬细胞瘤；血管球肉瘤(glomangiosarcoma)；恶性黑色素瘤；无黑色素性黑色素瘤；表浅蔓延型黑色素瘤；巨大色素痣内恶性黑色素瘤；上皮样细胞黑色素瘤；恶性蓝痣；肉瘤；纤维肉瘤；恶性纤维组织细胞瘤；粘液肉瘤；脂肉瘤；平滑肌肉瘤；横纹肌肉瘤；胚胎性横纹肌肉瘤；肺泡状横纹肌肉瘤；间质肉瘤；恶性混合瘤；米勒混合瘤(mullerian mixed tumor)；肾母细胞瘤；肝母细胞瘤；癌肉瘤；恶性间质瘤；恶性布伦纳瘤；恶性分叶状瘤；滑膜肉瘤；恶性间皮瘤；无性细胞瘤；胚胎性癌；恶性畸胎瘤；恶性卵巢甲状腺肿；绒膜癌；恶性中肾瘤；血管肉瘤；恶性血管内皮瘤；卡波西肉瘤；恶性血管外皮细胞瘤；淋巴管肉瘤；骨肉瘤；近皮质骨肉瘤；软骨肉瘤；恶性成软骨细胞瘤；间叶软骨肉瘤；骨巨细胞瘤；尤因肉瘤；恶性牙源性肿瘤；成釉细胞性牙肉瘤；恶性成釉细胞瘤；成釉细胞纤维肉瘤；恶性松果体瘤；脊索瘤；恶性胶质瘤；室管膜瘤；星形细胞瘤；原质性星形细胞瘤；纤维性星形细胞瘤；星形母细胞瘤；成胶质细胞瘤；少突胶质瘤；成少突胶质细胞瘤；原始神经外胚叶(primitive neuroectodermal)；小脑肉瘤；成神经节细胞瘤；成神经细胞瘤；成视网膜细胞瘤；嗅觉神经原发性瘤(olfactory neurogenic tumor)；恶性脑膜瘤；神经纤维肉瘤；恶性神经鞘瘤；恶性颗粒细胞瘤；恶性淋巴瘤；霍奇金病；霍奇金；类肉芽肿；小淋巴细胞恶性淋巴瘤；大细胞、扩

散恶性淋巴瘤；滤泡性恶性淋巴瘤；蕈样肉芽肿病；其它特异性非霍奇金淋巴瘤；恶性组织细胞增生症；多发性骨髓瘤；肥大细胞肉瘤；免疫增殖性小肠病；白血病；淋巴性白血病；浆细胞性白血病；红白血病；淋巴肉瘤细胞白血病；骨髓性白血病；嗜碱细胞白血病；嗜伊红细胞白血病；单核细胞白血病；肥大细胞白血病；成巨核细胞白血病；髓系肉瘤 (myeloid sarcoma) 和多毛细胞白血病。

[0047] 尽管如此，人们也意识到本发明也可用于治疗与炎性(白细胞)细胞中的端粒酶的活化相关联的非癌性疾病(如真菌感染、细菌感染、病毒感染、急性和慢性炎性疾病例如炎性肠病(克罗恩病、溃疡性结肠炎)、类风湿性关节炎和/或与炎症相关联的神经变性疾病)。

[0048] 过度增殖疾病状态包含这样的疾病状态：在其中细胞以不受控制的方式生长，不管那种生长是癌性或非癌性的。此类疾病状态可反映在银屑病、生殖器疣(genital warts)或其它过度增殖的细胞生长疾病中，包括过度增殖的角质形成细胞疾病，包括角化过度、鱼鳞病、皮肤角化病或扁平苔藓，其所有疾病状态都可使用根据本发明的化合物来治疗。所述方法方面包括治疗过度增殖疾病，包括银屑病、生殖器疣和过度增殖的细胞生长疾病，包括过度增殖的角质形成细胞疾病，例如角化过度、鱼鳞病、皮肤角化病或扁平苔藓和其它慢性炎性疾病，例如骨关节炎丙型肝炎病毒(HCV)感染，所述方法包括向有需要的患者给药有效量的根据本公开的式I、II、III、IV和/或V化合物，任选地与至少一种另外的抗癌剂组合，任选地与药学上可接受的载体、添加剂或赋形剂组合。

[0049] 根据本公开的一些实施方式的药物组合物可包含有效量的一种或更多种式I、II、III、IV或V化合物，并任选地包含溶解或分散在药学上可接受的载体中的另外的活性成分。

[0050] 在此使用的术语“药学上可接受的”指那些化合物、材料、组合物和/或剂型，其在健全的医疗判断的范围之内适合用于与人类和动物的组织接触，而没有过度的毒性、刺激性、过敏反应或其它问题并发症，与合理的效益/风险比例相称。术语“药学上可接受的载体”表示参与运送或运输化学剂的药学上可接受的材料、组合物或赋形剂，例如液态或固态填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或封装材料。

[0051] 可通过本领域技术人员已知的任何方法向对象给药药物组合物。实例可包括，但不限于静脉内给药、皮内给药、鞘内给药、动脉内给药、腹膜内给药、肌肉内给药、皮下给药；口服、直肠内给药、粘膜给药(鼻内给药、叶鞘内给药等)、表面给药(即经皮给药)、局部给药、通过吸入(如气雾剂吸入)给药、通过注射给药、通过输注给药、通过持续输注给药、通过局部灌注直接浸浴靶细胞给药、通过导管给药、通过灌洗给药、以乳霜给药、以脂质组合物(如脂质体)给药，或通过本领域普通技术人员将知晓的其它方法或前述方法的任何组合进行给药(参见例如，Remington's Pharmaceutical Sciences，第18版，Mack Printing Company，1990，在此通过引用并入)。

[0052] 药物组合物可配制成采取游离碱形式、中性形式或盐形式的组合物。药学上可接受的盐，包括酸加成盐，如与蛋白质性质的组合物的游离氨基形成的那些，或其由无机酸形成，所述无机酸诸如，例如盐酸或磷酸，或由诸如乙酸、草酸、酒石酸或扁桃酸的有机酸形成。与游离羧基形成的盐也可由无机碱获得，所述无机碱诸如，例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁；或可由诸如异丙胺、三甲胺、组氨酸或普鲁卡因的有机碱获得。配制之后将以与剂量配方相容的方式及以治疗有效的这样的量来给药溶液。

[0053] 在其中组合物为液态形式的实施方式中，载体可为溶剂或分散介质，包括但不限

于,水、乙醇、多元醇(如丙三醇、丙二醇、液态聚乙二醇等)、脂质(如甘油三酸酯、植物油、脂质体)和它们的组合。可通过例如以下方式来维持适当的流动性:使用包衣,例如软磷脂;通过分散在载体诸如,例如液态多元醇或脂质中维持所需的颗粒尺寸;使用表面活性剂,诸如,例如羟丙基纤维素;或此类方法它们的组合。可优选包括等渗剂,诸如,例如糖、氯化钠或它们的组合。

[0054] 向对象给药的根据本公开的一些实施方式的组合物的实际剂量可通过身体因素和生理因素来确定,例如使用的具体化合物、对象的年龄、总体健康、饮食、体重、病症的严重性、治疗的疾病的类型、之前或并存的治疗干预、患者的特发病、吸收率、分配率、失活率、排泄率、给药时间、给药途径、和基于指导给药的人的判断。取决于给药的剂量和途径,优选剂量的给药数量和/或有效量可根据受治疗对象的反应来改变。活性成分可立即给药,或可分成众多较小的剂量以在变化的时间间隔给药。因而,理解对于任何特定的对象,可根据个体需要和管理或指导组合物的给药的人的专业判断随时间调节具体的给药方案,并理解在此陈述的浓度范围仅仅是示例性的,且不意欲限制要求保护的组合物的范围或实践。

[0055] 以足够向患者输送用于所需指征的治疗有效量、而不在接受治疗的患者中引起严重的毒性作用的量将式I、II、III、IV和/或V化合物包括在药学上可接受的载体或稀释剂中。对于在此提到的所有病症而言,活性化合物的优选剂量在从每天约10 ng/kg至100 mg/kg的范围内,优选每天0.1至50 mg/kg,更普遍地为每天0.5至约25 mg每千克对象的体重。通过非限制性举例的方式,典型的剂量在合适的载体中可在0.01-20% wt/wt的范围内。类似地,可以任何合适的单位剂型给药化合物,包括但不限于每单位剂型含有少于1 mg、1 mg至3000 mg或5至1000 mg的活性成分的一种单位剂型。

[0056] 可在正在进行的或持续的基础上、在所需要的基础上或1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20或更多次给药组合物。可于每1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24小时、或每1, 2, 3, 4, 5, 6, 7天、或每1, 2, 3, 4, 5周、或每1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12个月或更长时间(或在其中可推导的任何值)给药它们。类似地,特别设想可向患者一天一次、一天两次、一天三次、一天四次、一天五次或一天六次(或在其中可推导的任何范围)和/或根据需要给药组合物。可首先在疾病或健康相关的病症检测之前或之后,或在没有检测出疾病指征的测试之后给药剂量。在一些实施方式中,可向患者以几天或几周的周期给药组合物,且在各周期之间,周期之间不给药药物。各周期之间的时间可以是几天或几周,如2-8天/周。在一些实施方式中,在没有可检测的疾病或障碍的存在之后,可持续一定的时间阶段或使用一定的剂量数向患者给药组合物。

[0057] 类似地,在各种实施方式中,可约、至少约或至多约0.01-1000 μ l/min, μ l/小时, μ l/天, μ l/周, μ l/月, ml/min, ml/小时, ml/天, ml/周, ml/月, μ g/min, μ g/小时, μ g/天, μ g/周, μ g/月, mg/min, mg/小时, mg/天, mg/周, mg/月或使用在其中可推导的任何范围向患者给药组合物或由患者摄取组合物。

[0058] 为增强治疗效果,将本公开的组合物与第二治疗或药物组合物组合可能是合意的。例如,使用方法可进一步包括给药包含抗癌剂或有效用于过度增殖疾病治疗的其它药剂的第二药物组合物。抗癌剂可例如通过以下方式消极地影响对象的癌症:杀死癌细胞、诱导癌细胞的凋亡、降低癌细胞的生长速率、减小转移的发生率或数量、减小肿瘤尺寸、抑制

肿瘤生长、减少向肿瘤或癌细胞的血液供给、促进对于癌细胞或肿瘤的免疫应答、预防或抑制癌症的进展或延长患有癌症的对象的生命。更普遍地,可以有效量或组合有效量给药第二药物组合物以杀死或抑制某些细胞的增殖。

[0059] 在各种实施方式中,治疗方法可包括同时的共给药。该方法可包括在同一时间给药。这可通过使细胞与包括式I、II、III、IV和/或V化合物和另一抗癌剂二者的单一组合物或药物配方接触来实现,或通过使细胞与两种不同的组合物或配方同时接触来实现,其中一种组合物包括式I、II、III、IV和/或V化合物及另一种包括第二药剂(一种或更多种)。类似地,两种组合物的施用可不同时但在时间上互相接近,如,在同一天或同一周内。

[0060] 在各种实施方式中,治疗方法可包括第一阶段,其中给药包含式I、II、III、IV和/或V化合物的药物组合物,和第二阶段,其中给药第二药物组合物。第一阶段和第二阶段可在时间上连续、在时间上分隔开(几分钟、几天、几周或几个月)或在时间上重合。另外,可颠倒或重复治疗阶段的顺序次序。

[0061] 诚然,可使用治疗阶段的任何组合。通过举例方式,式I、II、III、IV和/或V化合物的给药是“A”,使用第二药剂的治疗是“B”:

A/B/A	B/A/B	B/B/A	A/A/B	A/B/B	B/A/A	A/B/B/B	B/A/B/B
B/B/B/A	B/B/A/B	A/A/B/B	A/B/A/B	A/B/B/A	B/B/A/A		
B/A/B/A	B/A/A/B	A/A/A/B	B/A/A/A	A/B/A/A	A/A/B/A		

[0062] 在本公开的上下文中,设想包含式I、II、III、IV和/或V化合物的药物组合物的给药可与治疗B结合使用,所述治疗B例如基因治疗、化学治疗干预、放射治疗干预或免疫治疗干预,另外还有其它促凋亡(pro-apoptotic)剂或细胞周期调节剂。还设想可将各种标准治疗以及外科手术干预与所描述的诱导端粒缩短和端粒机能障碍的治疗组合应用。

[0063] a 化学治疗

化学治疗包括,例如顺铂(CDDP)、卡铂、丙卡巴肼、氮芥、环磷酰胺、喜树碱、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥、白消安、亚硝基脲、放线菌素D、柔红霉素、多柔比星、博来霉素、普卡霉素(plicomycin)、丝裂霉素、依托泊苷(VP16)、他莫昔芬、雷洛昔芬、雌激素受体结合剂、紫杉醇、吉西他滨、诺维本、法呢基蛋白转移酶抑制剂(farnesyl-protein transferase inhibitors)、反式铂、5-氟尿嘧啶、长春新碱、长春花碱(vinblastin)和甲氨蝶呤或前述化合物的任何类似物或衍生物变体。

[0064] b 放射治疗

放射治疗可引起DNA损伤并包括通常已知为射线、X射线和/或向肿瘤细胞定向输送的放射性同位素的那些。还设想其它形式的DNA损伤因素,例如微波和UV辐照。

[0065] c 免疫治疗

通常免疫治疗依赖免疫效应细胞和分子的使用以靶向并摧毁癌细胞。因此免疫治疗可用作组合治疗的一部分,与包含式I、II、III、IV和/或V化合物的药物组合物的给药相结合。免疫治疗程式涉及通过服从靶向,即不存在于大多数其它细胞上的肿瘤细胞的一些标记物来靶向肿瘤细胞。存在许多肿瘤标记物且这些中的任何一种都可能适合伴随在本公开的上下文中的第二治疗方式用于靶向。普通的肿瘤标记物包括癌胚抗原、前列腺特异性抗原、泌尿系统肿瘤相关抗原、胚胎抗原、酪氨酸酶(p97)、gp68、TAG-72、HMFG、唾液酸化路易斯抗原(Sialyl Lewis Antigen)、MucA、MucB、PLAP、雌激素受体、层粘连蛋白受体、erb B和p155。

[0066] d 基因

在又一实施方式中,第二治疗B是基因治疗,其中在包含式I、II、III、IV和/或V化合物的药物组合物之前、之后或同时给药编码所有或部分多肽的治疗性的多核苷酸。编码与具体疾病或健康相关病症相关的某些基因产物(一种或更多种)的载体的输送可在靶组织上具有组合治疗效果,如抗增殖效果。

[0067] e 外科手术

治愈性手术是可与包含式I、II、III、IV和/或V化合物的药物组合物结合使用的癌症治疗。治愈性手术包括切除术,其中所有或部分癌性组织被物理除去、切除和/或摧毁。肿瘤切除术指至少部分肿瘤的物理去除。除了肿瘤切除术之外,通过外科手术的治疗包括激光外科手术、冷冻手术、电外科手术和显微镜控制的外科手术(莫氏手术)。进一步设想本公开的组合物可结合浅表癌、初癌或正常组织的偶然量(incidental amount)的去除来给药。在切除部分或全部的癌性细胞、组织或肿瘤之后,在身体上可能形成空洞。可通过包含式I、II、III、IV和/或V化合物的药物组合物的给药完成治疗。

[0068] f 其它抗癌剂

设想其它抗癌剂可与本公开的式I、II、III、IV和/或V组分组合使用以累加或协同地增强治疗的治疗效果。

[0069] 这些另外的药剂包括免疫调节剂、影响细胞表面受体的增量调节和缝隙连接的药剂、细胞抑制剂和分化剂、细胞黏着抑制剂、或增加过度增殖细胞对于凋亡诱导物的敏感性的药剂。免疫调节剂包括肿瘤坏死因子、干扰素 α 、 β 和 γ 、IL-2和其它细胞因子、F42K和其它细胞因子类似物或MIP-1、MIP-1 β 、MCP-1、RANTES和其它趋化因子。进一步设想细胞表面受体或它们的配体例如Fas/Fas配体、DR4或DR5/TRAIL的增量调节将通过在过度增殖的细胞上建立自分泌或旁分泌效应来加强本公开的凋亡诱导的能力。通过提高缝隙连接的数量来增加细胞间信号传导将增强对于邻近的过度增殖细胞群的抗过度增殖效果。在其它实施方式中,细胞抑制剂或分化剂可与本发明组合使用以改善治疗的抗过度增殖功效。细胞黏着抑制剂设想用于改善本发明的功效。细胞黏着抑制剂的实例是黏着斑激酶(FAK)抑制剂和洛伐他汀。进一步设想增强过度增殖细胞对于凋亡的敏感性的其它抗癌剂,例如端粒酶抑制剂,像imetelstat钠和信号转导抑制剂,像抗体c225,可与本发明组合使用,以改善治疗功效。如在实施例部分中所示,6-硫代-脱氧鸟嘌呤核苷和imetelstat钠的临床相关的组合显示对于在HCT116细胞中的端粒缩短的累加效果。在各种实施方式中,治疗方法可包括无论是同时、按顺序还是二者组合地来给药端粒靶向/修饰的组合物,例如式I、II、III、IV和/或V化合物和抑制端粒酶的组合物,例如imetelstat钠。此类实施方式可具有对于端粒缩短的累加效果。

[0070] 最后,另外的药剂也可包括抗癌剂,其可广泛地表征为:抗代谢药、拓扑异构酶I和II的抑制剂、烷基化剂和微管抑制剂(如紫杉醇)。用在本发明中的抗癌剂包括,例如阿地白介素、阿仑单抗、阿利维A酸、别嘌醇、六甲蜜胺、氨磷汀、阿那曲唑、三氧化二砷、天冬酰胺酶、活性卡介苗(BCG Live)、贝沙罗汀胶囊、贝沙罗汀凝胶、博来霉素、静脉内白消安、口服白消安、卡鲁唑酮、卡培他滨、卡铂、卡莫司汀、卡莫司汀植入膜剂(carmustine with Polifeprosan 20 Implant)、塞来考昔、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、环磷酰胺、阿糖胞苷、脂质体阿糖胞苷、达卡巴嗪、放线菌素、放线菌素D、达贝泊汀 α 、脂质体柔红霉素、柔红霉素、

道诺霉素、地尼白介素-霉素连接物、右雷佐生、多西他赛、多柔比星、脂质体多柔比星、丙酸曲他雄酮、艾略特B方案(Elliott's B Solution)、表柔比星、阿法依泊汀雌莫司汀(Epoetin alfa estramustine)、磷酸依托泊苷、依托泊苷(VP-16)、依西美坦、非格司亭、氟尿苷(动脉内的)、氟达拉滨、氟尿嘧啶(5-FU)、氟维司群、吉妥珠单抗奥佐米星、醋酸戈舍瑞林、羟基脲、替伊莫单抗、伊达比星、异环磷酰胺、甲磺酸伊马替尼、干扰素 α -2a、干扰素 α -2b、伊立替康、来曲唑、亚叶酸、左旋咪唑、洛莫司汀(CCNU)、氮芥(氮芥(nitrogen mustard))、醋酸甲地孕酮、美法仑(L-PAM)、巯嘌呤(6-MP)、美司钠、甲氨蝶呤、甲氧沙林、丝裂霉素C、米托坦、米托蒽醌、苯丙酸南诺龙、诺莫单抗、L0ddC、奥普瑞白介素、奥沙利铂、紫杉醇(paclitaxel)、帕米膦酸盐(pamidronate)、培加酶、培门冬酶、培非司亭、喷司他丁、哌泊溴烷、普卡霉素、光神霉素、吡吩姆钠、丙卡巴肼、奎纳克林、拉布立酶、利妥昔单抗、沙格司亭、链佐星、泰布韦丁(talbuvidine)(LDT)、滑石、他莫昔芬、替莫唑胺、替尼泊苷(VM-26)、睾内酯、硫鸟嘌呤(6-TG)、塞替派、托泊替康、托瑞米芬、托西莫单抗、曲妥珠单抗、维A酸(ATRA)、尿嘧啶氮芥、戊柔比星、伐托他滨(monoval LDC)、长春碱、长春瑞滨、唑来膦酸盐(zoledronate)和它们的混合物。

[0071] 也可将激素治疗与包含式I、II、III、IV和/或V化合物的药物组合物的给药组合使用。激素的使用可用在某些癌症例如乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌或宫颈癌的治疗中,以降低某些激素例如睾酮或雌激素的水平或抑制其作用。该治疗经常与至少一种其它的癌症治疗组合使用作为治疗选择或用来降低转移的风险。

[0072] 式I、II、III、IV或V的活性化合物和组合物的制备和给药可根据本领域详细公开的方法或通过本领域技术人员已知的任何其它方法来制备。在其中包含两种活性剂的混合物的情况下,可遵循标准技术容易地实现式I、II、III、IV和/或V化合物与另一活性剂的结合。可容易地使用合适的阻断基(blocking groups)和阻断剂以形成所述结合组。

[0073] 包括以下实施例以展示本发明优选的实施方式。本领域技术人员应当意识到在接下来的实施例中公开的技术代表由发明人发现的技术在本发明的实践中发挥良好的作用,并因此可被考虑为构成用于其实践的优选的模式。但是,根据本公开,本领域技术人员应当意识到可在所公开的具体实施方式中做出许多改变且仍然获得同样的或类似的结果,而没有偏离本发明的精神和范围。

实施例

[0074] 材料和方法:

细胞系

HCT116代表人类结肠癌细胞,A549模拟人类肺上皮癌细胞,H2882模拟人类肺上皮癌细胞,HCC2429模拟人类肺上皮癌细胞,HCC827模拟人类肺上皮癌细胞,HCC15模拟人类肺上皮癌细胞,H2087模拟人类肺上皮癌细胞,HCC4017模拟人类肺上皮癌细胞,HCC515模拟人类肺上皮癌细胞,H2009模拟人类肺上皮癌细胞,BJ-hTERT细胞模拟端粒酶表达正常人类成纤维细胞,及BJ人类成纤维细胞(端粒酶沉默的)在使用10%加强型小牛血清(Hyclone)补充的培养基X(Hyclone, Logan, UT)中生长。

[0075] 药物制备

将6-硫代-dG (Metkinen Oy, Kuopio, Finland)溶解在DMSO/水(1:2)中,将6-硫代-G

(Sigma, St Louis, MO) 溶解在不含血清的培养基中, 及将GRN163L (Geron Corporation, Menlo Park, CA) 溶解在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中以制备50 mM或10 mM的储液, 将其于- 80 °C下冷冻。在制备储液之后, 将它们等分成1 mM的溶液, 其进一步按需要稀释用于体外治疗实验。

[0076] GRN163L (Imetelstat钠) 是具有以下序列的13-mer 硫代-氨基磷酸酯寡核苷酸 (13-mer thio-phosphoramidate oligonucleotide): 5'-TAGGGTTAGACAA-3'。Imetelstat在5' 位末端具有棕榈酰基, 其帮助寡核苷酸穿过细胞膜。该化合物与人类端粒酶 RNA亚单位 (hTR) 的模板区域互补, 且其为端粒酶的高度有效的直接的及竞争性的抑制剂。使用 imetelstat的肿瘤细胞系处理引起端粒酶抑制和逐渐的端粒缩短, 导致体外细胞衰老或凋亡。

[0077] 长期细胞培养研究

对于长期细胞实验, 每三天使用含有6-硫代-dG (1, 3, 10 μ M) 的培养基补给HCT116 (1,000细胞/cm²) 和BJ (10,000细胞/cm²) 细胞。持续10-16周, 每周进行细胞计数并重新铺板 (replated)。另外, 每三天使用6-硫代-G (1, 3, 10 μ M) 补给HCT116细胞 (1,000细胞/cm²) 且每周进行细胞计数, 收集用于TRF (端粒限制性片段) 分析并重新铺板。在使用10 μ M 6-硫代-dG处理12周之后, HCT116细胞随后使用10 μ M 6-硫代-dG和3 μ M GRN163L的组合处理2-4周。

[0078] 端粒酶活性测定

通过TRAP分析 (端粒重复序列扩增方案, 如在Shay J.W.和Bacchetti S.的“A survey of telomerase activity in human cancer,” European Journal of Cancer 1997; 33: 787-91中所描述) 来测定端粒酶活性。简言之, 将HCT116细胞使用1或10 μ M 6-硫代-dG处理1-12周。收集1 \times 10⁵个细胞并使用冰冷的NP-40溶解缓冲液 (10 mM Tris- HCl pH 8.0、1.0 mM MgCl₂、1 mM EDTA、1% NP-40、0.25 mM脱氧胆酸钠、10%甘油、150 mM NaCl、5 mM β -巯基乙醇) 溶解30 min。各反应使用2500个细胞的1微升细胞溶解产物。希拉 (Hela) 细胞用作阳性对照, 溶解缓冲液用作阴性对照。制备样品且随后使用PCR来扩增端粒酶延伸产物 (95 °C持续5 min以使端粒酶失活, 随后95 °C持续30 s, 52 °C持续30 s, 72 °C持续30 s; 24次循环)。将样品在10%非变性丙烯酰胺凝胶上运行并使用能够读取Cy5荧光的Typhoon PhosphorImager扫描仪系统 (Molecular Dynamics, GE Healthcare, Piscataway, NJ) 来观察。

[0079] 端粒长度分析 (TRF, 末端限制性片段)

收集1 \times 10⁶个细胞并使用PBS洗涤。使用生产商的用法说明 (Qiagen, Valencia, CA) 分离DNA。使用6种不同的限制性内切酶 (HhaI, HinfI, MspI, HaeIII, RsaI, AluI) (New England Bio, Ipswich, MA) 消化2.5 μ g DNA并在37 °C下过夜培养。消化的DNA在0.7%琼脂糖凝胶上于70 V下过夜分离。末端限制性片段 (TRF) 凝胶在变性溶液 (0.5 M NaOH、1.5 M NaCl、pH 13.2) 中变性20 min并在Whatman 3MM纸上、于真空、56 °C下干燥3小时。将凝胶在中和缓冲液 (1.5 M NaCl、0.5 M Tris-HCl、pH 8.0) 中中和15分钟并随后使用放射性标记的端粒探针 (富含C) 于42 °C在5xSSC 缓冲液、5x邓哈特溶液、10 mmol/L Na₂HPO₄和1 mmol/L Na₂H₂P₂O₇中探测16小时。在室温下持续15min将凝胶用2XSSC、0.1%SDS洗涤一次、用0.5XSSC、0.1%SDS洗涤两次, 并随后用0.5XSSC、1%SDS洗涤两次。使凝胶过夜暴露于

PhosphorImager屏幕并使用Typhoon PhosphorImager扫描仪系统(Molecular Dynamics)进行分析。

[0080] 端粒机能障碍诱导的病灶(TIF)分析

TIF分析基于通过对于DNA损伤标记物例如 γ -H2AX的抗体的DNA损伤和通过端粒蛋白TRF2的端粒的共定位检测。简言之,HCT116细胞平铺在4孔腔式载玻片中,细胞附着表面后,于不同的时间点(0、30 min、12 h、24 h、48 h、72 h)将3 μ M 6-硫代-dG或3 μ M 6-硫代-G添加至培养基。用PBS冲洗载玻片一次并将之固定于在PBS中的4%多聚甲醛中10 min。随后,用PBS洗涤细胞两次并于在PBS中的0.5% Nonidet-P40中进行透化,用在PBS中的0.5%牛血清白蛋白(BSA)和0.2%鱼固胶阻断30 min。将 γ -H2AX(小鼠)(Millipore, Billerica, MA)以1:1000稀释并将TRF2(家兔)(Abcam, Cambridge, MA)以1:200稀释在阻断溶液中,且该初级Ab混合物在细胞上培养2 h。在使用PBST(1x在0.1% Triton中的PBS)洗涤3次且使用PBS洗涤3次之后,用Alexaflour 488共轭山羊抗兔(1:500)(Invitrogen, Grand Island, NY)和Alexaflour 568共轭山羊抗鼠(1:500)(Invitrogen)孵育细胞40 min,随后用PBS洗涤6次。干燥之后,用具有DAPI的Vectashield封固剂(Vector Laboratories, Burlingame, CA)来封固载玻片。用Deltavision宽场显微镜捕获图像,随后使用Autoquant X3去褶皱。使用Imaris软件确定TIF的数量。

[0081] 统计学分析

使用双尾、未配对Student t检验来分析不同组的统计学显著性对比。0.05或更小的P值被认为是显著的。

[0082] 结果

6-硫代-dG和6-硫代-G对于细胞形态的影响

在一周期间用6-硫代-dG(3 μ M)和6-硫代-G(3 μ M)处理癌症HCT116和正常的BJ成纤维细胞两次。在一周的处理之后,监测细胞形态,并随后收集细胞并进行计数。图1B显示细胞计数的结果。使用6-硫代-dG的处理引起绝大多数HCT116细胞的死亡,并且还改变了它们的形态,而正常的BJ成纤维细胞的形态和细胞计数仅受到轻微影响。

[0083] 6-硫代-dG,而不是6-硫代-G,引起癌细胞中逐渐的端粒缩短

为确定6-硫代-dG和6-硫代-G是否引起逐渐的端粒缩短,通过TRF分析来评估受处理细胞的端粒长度。使用1 μ M或10 μ M的6-硫代-dG每3天、持续1-12周处理癌症HCT116和正常的BJ成纤维细胞。另外,也使用1 μ M或10 μ M 6-硫代-G每3天、持续1-10周处理HCT116细胞,以确定该分子对于端粒长度维持是否存在任何作用。对照不经处理。每周以1x10⁶细胞/样品收集样品用于TRF分析,对于用6-硫代-dG处理的细胞,在1、5和12周收集;对于用6-硫代-G处理的细胞,在1、5和10周收集。

[0084] TRF测定的结果显示端粒缩短早在1周和5周即可检测,伴随12周的持续的6-硫代-dG处理之后更显著的端粒缩短。在12周时,1 μ M或10 μ M二者均显示显著的端粒缩短。同时,使用6-硫代-G的处理在10周之后对于HCT116细胞的端粒长度不产生任何显著的作用。这暗示6-硫代-dG和6-硫代-G的胞内代谢途径是不同的,且6-硫代-dG更加容易转化成为相应的5'-三磷酸酯,其最终被端粒酶识别并合并进入端粒。

[0085] 另外,与未处理的对照细胞比较,使用6-硫代-dG或6-硫代-G处理10周的BJ成纤维细胞(数据未显示)未显示增强的端粒缩短。当使用6-硫代-dG或6-硫代-G处理的HCT116细

胞的端粒酶活性通过TRAP分析评估时,对于任一者均未观察到端粒酶活性的抑制。(对于TRAP分析,使用1和10 μ M 6-硫代-dG每3天、持续12周处理细胞。每周以1 $\times 10^5$ 细胞/样品收集样品用于TRF分析。对照是未处理的样品。)这暗示6-硫代-dG引起与端粒酶抑制无关的端粒缩短。

[0086] 6-硫代-dG和GRN163L显示对于端粒缩短的累加作用

将HCT116细胞单独使用10 μ M 6-硫代-dG处理12-16周,或单独使用3 μ M GRN163L处理11周。随后,这些经长期6-硫代-dG处理的存活细胞使用6-硫代-dG (10 μ M) 和/或GRN163L (3 μ M) 的组合培养另外的2-4周。图2显示总结试验的处理方案类型的表。与对照相比较,使用GRN163L的处理在11周之后未显示任何显著的端粒缩短。但是,组合治疗产生对于HCT116细胞端粒缩短的累加效果,如果不是协同效果的话。具体地,在12周的6-硫代-dG处理之外,仅使用GRN163L或使用GRN163L + 6-硫代-dG处理HCT116细胞另外的2周和4周以确定是否存在对于端粒长度的作用。无论单独或是组合,除使用GRN163L处理 12周之外,使用6-硫代-dG培养这些细胞引起与使用6-硫代-dG培养12周、14周和16周的细胞相比较的HCT116细胞中增加的端粒缩短。这些结果暗示6-硫代-dG和GRN163L的组合治疗可能比使用GRN163L或6-硫代-dG的单一药剂治疗更加有效。

[0087] 与端粒酶阴性对照细胞相比较,仅使用6-硫代-dG或仅使用GRN163L处理端粒酶阳性的癌细胞确实表现出端粒缩短。但是,使用6-硫代-dG处理12周并随后继续使用6-硫代-dG处理的HCT116细胞表现出稳定的端粒。换言之,在12周和16周检测到的端粒长度近似相等。另外,当使用6-硫代-dG培养12周的细胞随后返回至不含药物的正常培养基中2-4周时,端粒保持与12周的6-硫代-dG处理之后几乎一致。这暗示6-硫代-dG处理持续至少2至4周不允许细胞逆转其对于端粒长度的作用。

[0088] 特别地,端粒酶抑制剂不立即引起细胞死亡。通过结合端粒酶并抑制其酶活性,端粒酶不能维持端粒稳态。的确,可能花费数月来促进癌细胞中本来就短的端粒变得如此之短以使得他们引发细胞死亡(凋亡)。因此,使用典型的端粒酶抑制剂,在癌细胞死亡之前存在充分的延迟期。如GRN163L的本研究所证明的,与6-硫代-dG相比较,对于GRN163L存在端粒缩短的延迟。(图3A(端粒酶抑制)和图3B(端粒酶阳性细胞中的端粒改变(例如去封端))显示引起细胞死亡的这个各自的延迟时间对比。)6-硫代-dG显著缩短该延迟期,因为引起凋亡的机理是使6-硫代-dG在细胞中转化成6-硫代-dGTP。此类转化的化合物是端粒酶的优良的且特异性的底物,并可并入端粒中。因此,本公开的化合物不抑端粒酶,而是中间端粒链中止剂(其取决于端粒酶的存在),其将被识别为受损DNA并将引起凋亡的快速引发。

[0089] 6-硫代-dG,而不是6-硫代-G,引起端粒酶表达细胞中的端粒机能障碍诱导的病灶(TIF)

将正常的BJ细胞和端粒表达BJ-hTERT细胞接种在腔式载玻片中。在细胞附着之后,将6-硫代-dG (10 μ M) 和6-硫代-G (10 μ M) 添加至各细胞类型的新鲜培养基中。与端粒表达细胞相比较,为测试6-硫代-dG和6-硫代-G在正常细胞中是否引起端粒机能障碍而进行TIF分析。对于各细胞类型同样使用对照,其中将DMSO添加至各细胞类型的新鲜培养基中。使用 γ -H2AX和TRF2免疫染色的组合,我们能够在48小时之后区分基因组DNA损伤和端粒特异性损伤。结果显示在表1中。如所示,6-硫代-dG在BJ-hTERT细胞中诱导端粒诱导的病灶并且对于端粒酶表达细胞表现出超过正常细胞的更多的特异性。相比之下,6-硫代-G不诱导端粒

诱导的病灶。这证明仅端粒酶表达细胞将受到6-硫代-dG的影响。这些包括几乎所有的人类癌细胞和某些人类疾病,包括急性炎症和慢性炎症。

[0090] 表1:

细胞类型/药物处理	评分核的数量	扣除背景每核>4 TIF
BJ-hTERT / DMSO对照	104	0
BJ-hTERT / 6-硫代-G	94	0
BJ-hTERT / 6-硫代-dG	97	14
BJ / DMSO对照	102	0
BJ / 6-硫代-G	101	0
BJ / 6-硫代-dG	100	2

[0091] 6-硫代-dG处理引起癌细胞中的端粒机能障碍

将癌症HCT116细胞接种在腔式载玻片中。在细胞附着之后,在各种时间点(0、30 min、2 h、12 h、24 h、48 h、72 h)将6-硫代-dG (3μM)和6-硫代-G (3μM)添加至新鲜的培养基中。为测试6-硫代-dG和6-硫代-G在癌细胞中是否引起端粒机能障碍,进行TIF分析。使用γ-H2AX和TRF2免疫染色的组合,我们能够区分基因组DNA损伤和端粒特异性损伤。在72 h之后,与6-硫代-G相比较,6-硫代-dG处理引起端粒DNA损伤的2.8倍的增加(图4)。与6-硫代-G相比较,除了由6-硫代-dG引起的端粒损伤的增加之外,还存在基因组DNA损伤的总体增加(图5)。γ-H2AX和TRF2的共定位显示机能障碍端粒的存在,其可使得染色体末端处于未封端状态并可诱导DNA损伤应答,例如细胞周期停滞、衰老、凋亡和染色体末端融合。

[0092] 6-硫代-dG处理减少HCT116细胞的存活和活力

如在图6A中所示,使用6-硫代-dG 处理的HCT116细胞的存活分数比使用6-硫代-G处理的细胞低。使用6-硫代-dG (3μM)和6-硫代-G (3μM)处理HCT116细胞,且在72小时之后,使用各种剂量的电离辐射对其进行辐照。处理之后,以不同的密度接种细胞并培养10天。如在图6B中所示,使用6-硫代-dG处理的HCT116细胞的细胞活力比使用6-硫代-G处理的细胞低。使用cell titer glow发光测定来确定细胞活力。

[0093] 正常细胞系和一组癌细胞系中的GI 50值证明6-硫代-dG在较低剂量下比6-硫代-G更加有效对抗各种各样的癌细胞系

将表2中列出的各类型的细胞接种在腔式载玻片中。对于6-硫代-dG和6-硫代-G二者,测定一组癌细胞系和正常的BJ 细胞系的GI 50值。如表2中所示,相比于6-硫代-dG,在除了H2087以外的所有癌细胞系中对于6-硫代-G的GI 50值均略高,而在H2087中,二者相等。因此,相比于6-硫代-G,6-硫代-dG在较低剂量下更加有效对抗各种各样的癌细胞系。这暗示相比于已获批的化合物6-硫代-G,归因于另外的作用方式,6-硫代-dG是更加有效的化学治疗剂。在下一部分中描述的异种移植和小鼠毒性研究中,6-硫代-dG不仅更加有效用于减小肿瘤负荷,而且具有更小的毒性(如更少的重量减轻)。

[0094] 表2:

细胞类型	6-硫代-dG (GI 50, μM)	6-硫代-G (GI 50, μM)
BJ	>100	>100
HCT116	1.0	1.2
A549	2.1	2.3

H2882	0.4	0.6
HCC2429	0.6	0.7
HCC827	0.8	1.7
HCC15	0.8	1.1
H2087	0.9	0.9
HCC4017	0.9	2.0
HCC515	2.4	4.9
H2009	2.6	3.3

[0095] 6-硫代-dG治疗降低具有HCT116和 A549细胞的异种移植动物模型中的肿瘤生长速率

将2 mg/kg的6-硫代-dG和2 mg/kg的6-硫代-G剂量每两天总共6次注射腹膜内 (IP) 注射进小鼠。对照使用DMSO注射。测量肿瘤的体积。图7A显示接受6-硫代-dG注射的具有HCT116细胞的动物模型的肿瘤生长速率较小。

[0096] 在肿瘤植入并提供时间用于肿瘤启动 (tumor initiation) 之后将2.5 mg/kg的6-硫代-dG和2.5 mg/kg的6-硫代-G的剂量每天注射进入小鼠。对照使用DMSO注射。测量肿瘤的体积。图7B显示相比于对照和6-硫代-G治疗的小鼠, 接受 6-硫代-dG注射的具有A549人类肺癌细胞的动物模型的肿瘤生长速率较小。另外, 基于残余肿瘤的组织学对比, 残余的6-硫代-dG 肿瘤的大多数是纤维化的, 并经常与凋亡细胞和炎性细胞相关, 而残余的6-硫代-G肿瘤和对照肿瘤表现大部分“健康”生长的癌性细胞。

[0097] 大鼠毒性试验

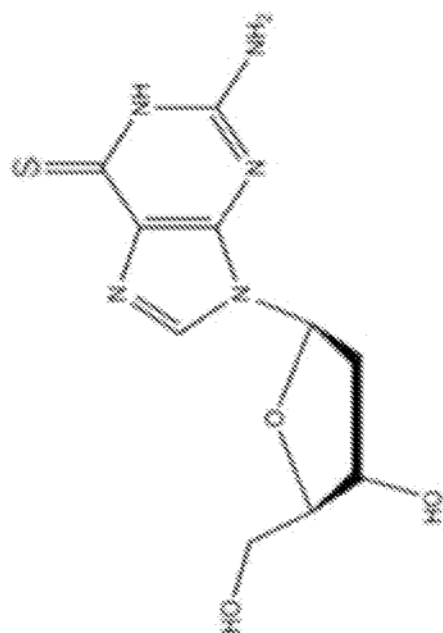
使用15mg的6-硫代-dG /kg的体重每两天治疗6只大鼠。在6次注射之后一只大鼠死亡, 剩下的5只小鼠mice未显示受损机能的迹象。使用50mg的6-硫代-dG /kg的体重每隔一天治疗另外5只大鼠。12天后所有大鼠死亡。

[0098] WT小鼠毒性-重量减轻试验

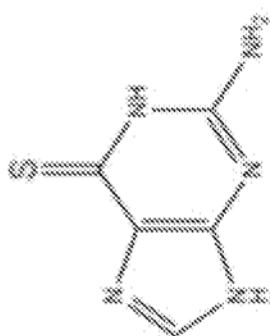
使用1.67 mg的6-硫代-dG /kg的体重每天治疗6只WT小鼠。使用1.67 mg的6-硫代-G /kg的体重每天治疗6只WT小鼠。使用5 mg的6-硫代-dG /kg的体重每天治疗6只WT小鼠。使用5 mg的6-硫代-G /kg的体重每天治疗6只WT小鼠。持续25天每天给予小鼠合适的剂量并称重。结果显示在图8A和8B中。对于给药较低的1.67 mg/kg剂量 (有效的癌症剂量的实例) 的小鼠, 对于使用6-硫代-dG治疗的那些没有观察到重量减轻。相比之下, 接受相同剂量的6-硫代-G的小鼠经过25天治疗过程减轻了1-2克 (起始重量的6-12%)。对于给药较高的5 mg/kg剂量 (超过有效的癌症剂量的2-3倍的增加) 的小鼠, 对于使用6-硫代-dG治疗的那些观察到仅仅适度的重量减轻。相比之下, 接受相同剂量的6-硫代-G的小鼠约减轻2克, 且所有小鼠在第15天治疗的时候均死亡。重要地, 在正常小鼠中的这些结果暗示相比于已获批的6-硫代-G化合物, 预计6-硫代-dG的与治疗癌症患者相关联的预期毒性显著较低。另外, 存在不引起小鼠重量减轻的~3倍更低剂量的6-硫代-dG的显著的肿瘤减小作用。

[0099] 根据本公开没有不适当的实验可以制备和实施在此公开和要求保护的所有组合物和方法。尽管根据优选的实施方式已描述本发明的组合物和方法, 但是对于本领域技术人员将显而易见的是可向在此描述的组合物和方法及所述方法的步骤或步骤的顺序应用改变, 而不偏离本发明的概念、精神和范围。更具体地, 将显而易见的是在化学和生理学上

均相关的某些试剂可替代在此描述的试剂,而将获得相同或相似的结果。对于本领域技术人员显而易见的所有此类相似的替代物和修改视为在由所附权利要求定义的本发明的精神、范围和概念之内。



6-硫代-2'-脱氧鸟嘌呤核苷



6-硫代鸟嘌呤

图 1A

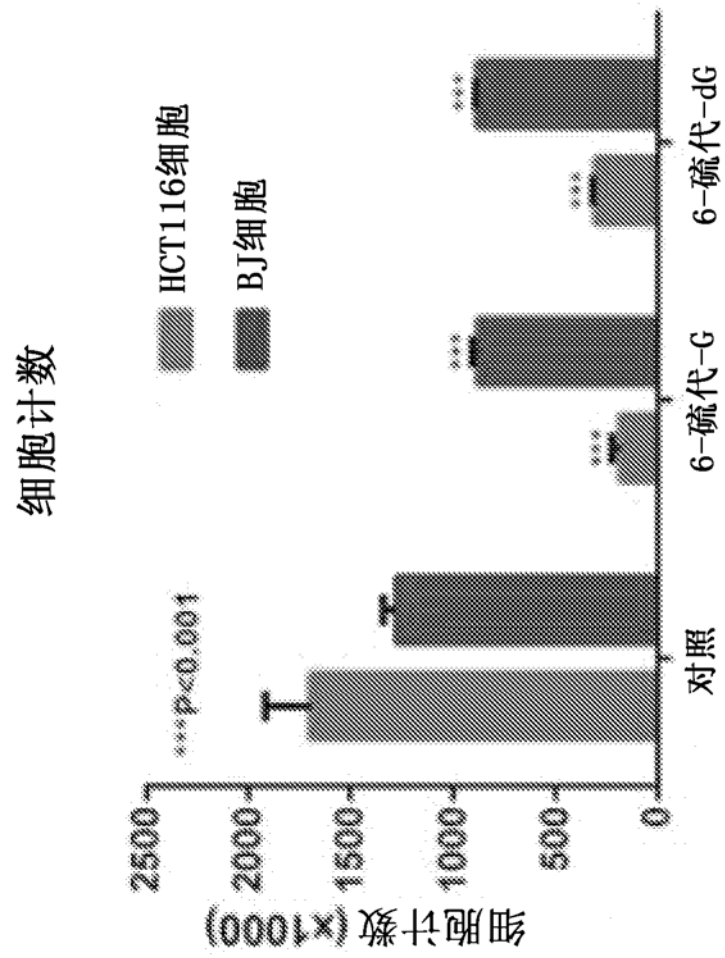


图 1B

周 / 样品	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
对照	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A	Im	Im	Im	Im	Im	Im	Im	Im	Im	Im	Im					
B	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG				
C	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG		6-dG
D	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	
E	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	--	--		
F	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	--	--	--	--
G	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	combo	combo		
H	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	combo	combo	combo	combo
I	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	Im	Im		
F	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	6-dG	Im	Im	Im	Im

图 2

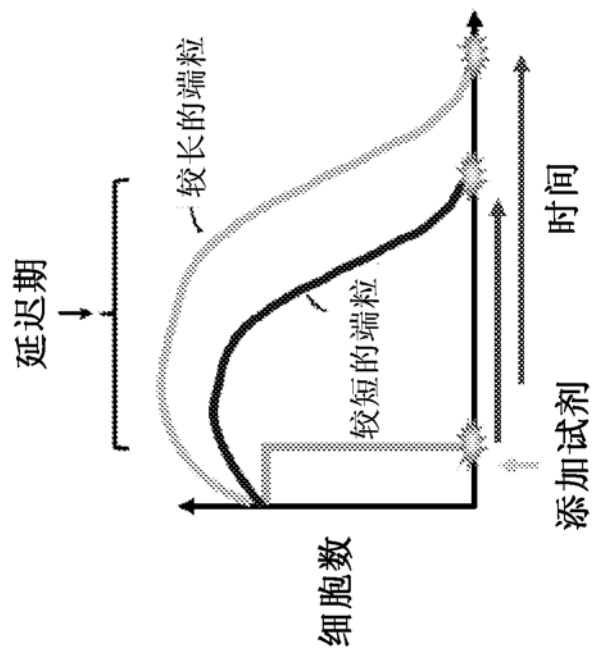


图 3A

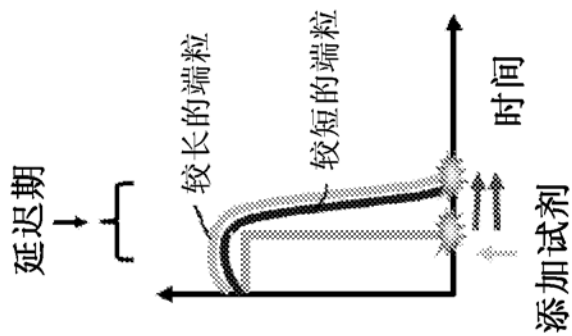


图 3B

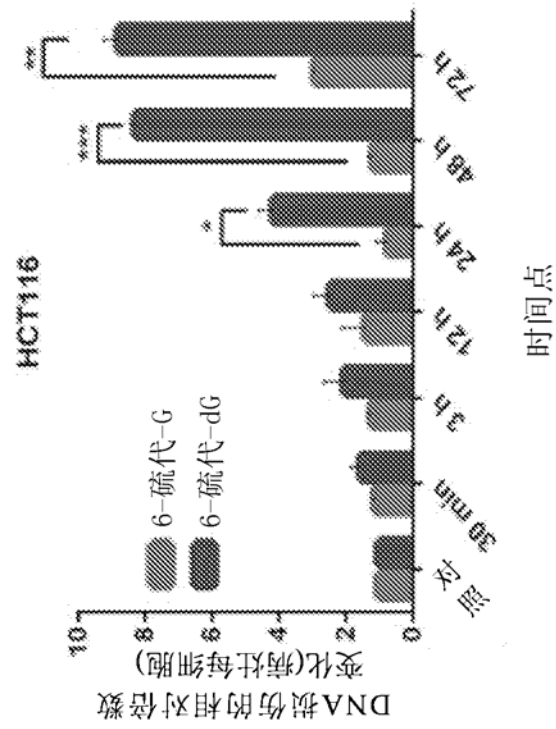


图 4

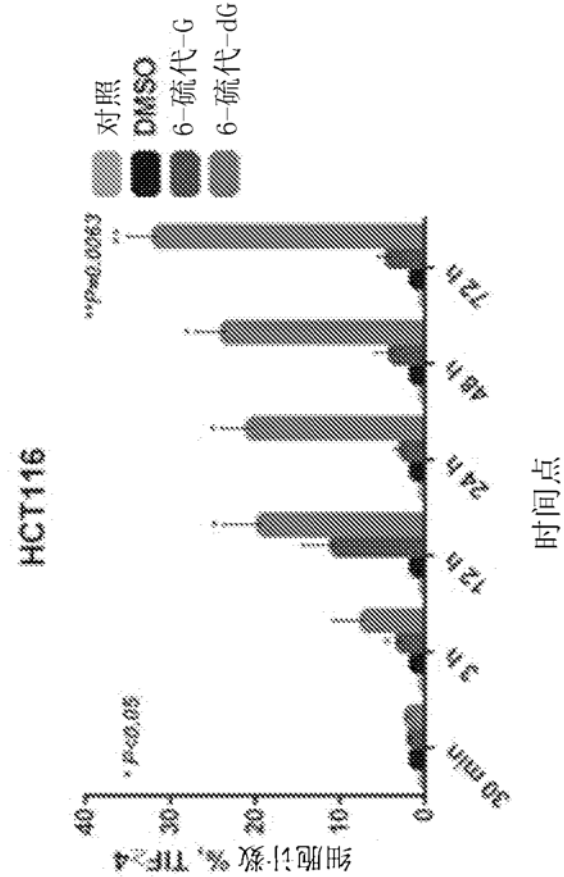


图 5

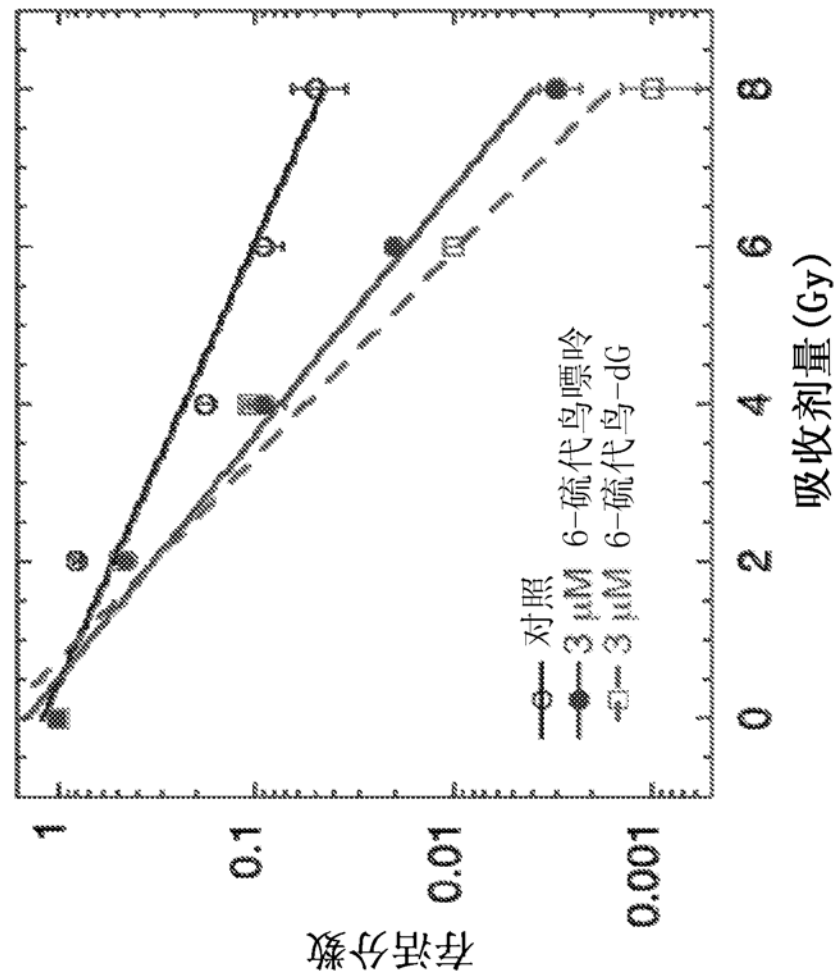


图 6A

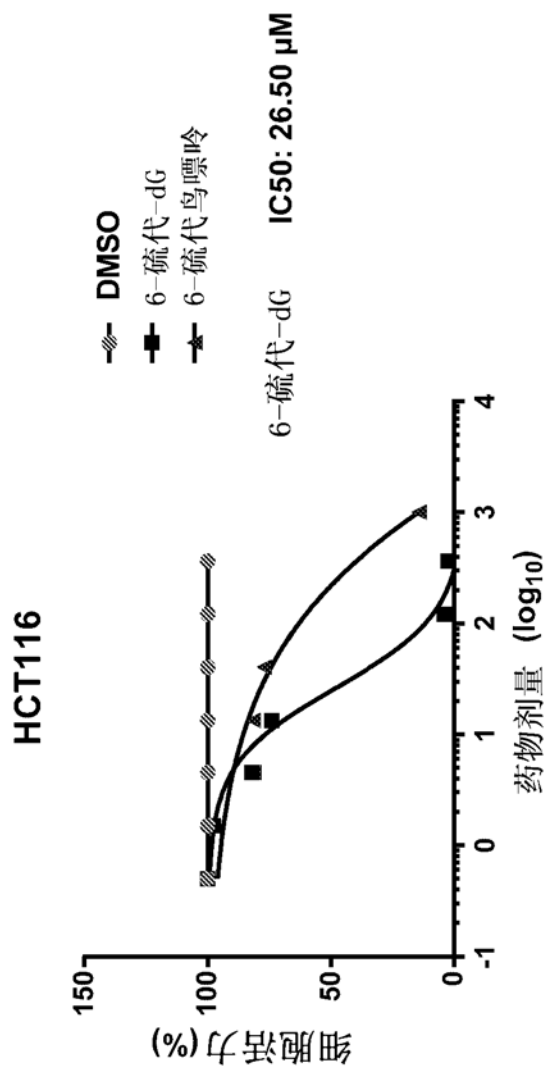


图 6B

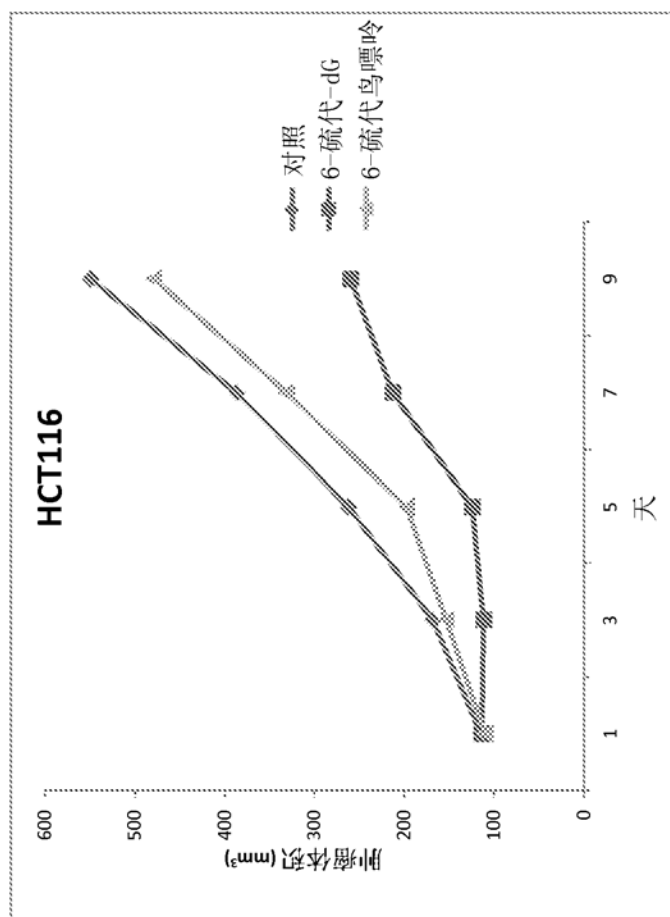


图 7A

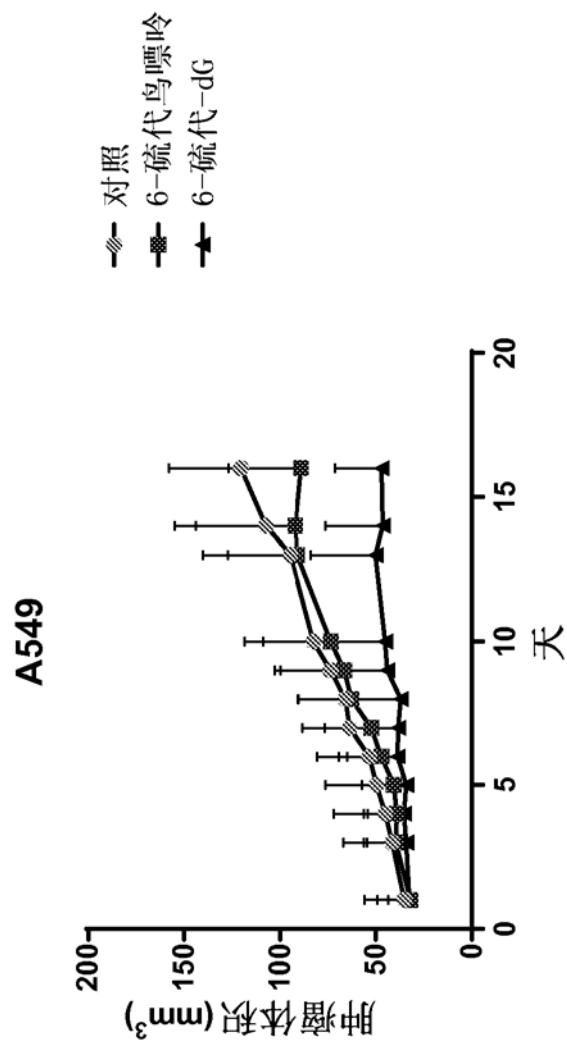


图 7B

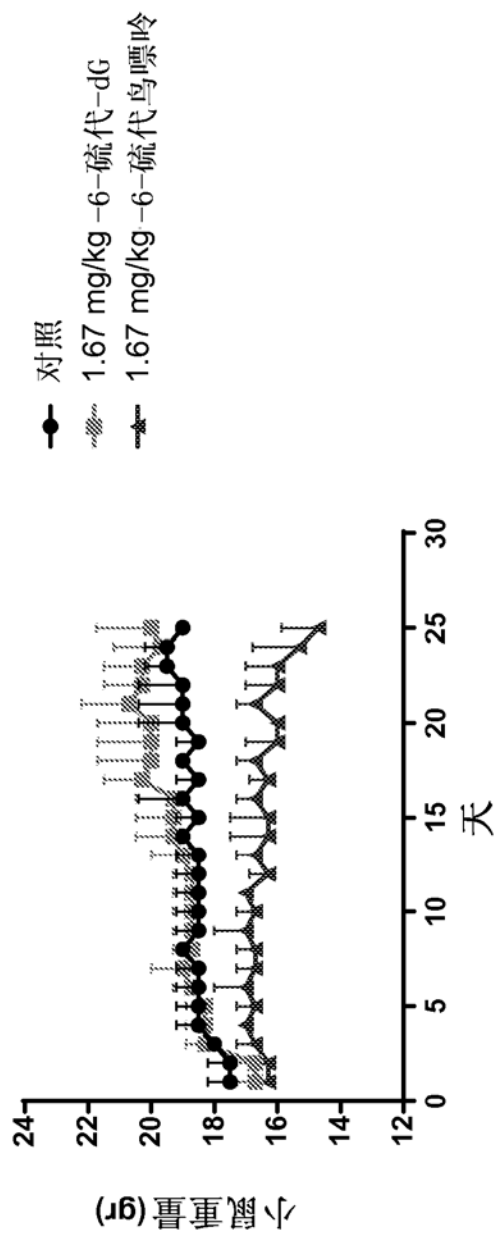


图 8A

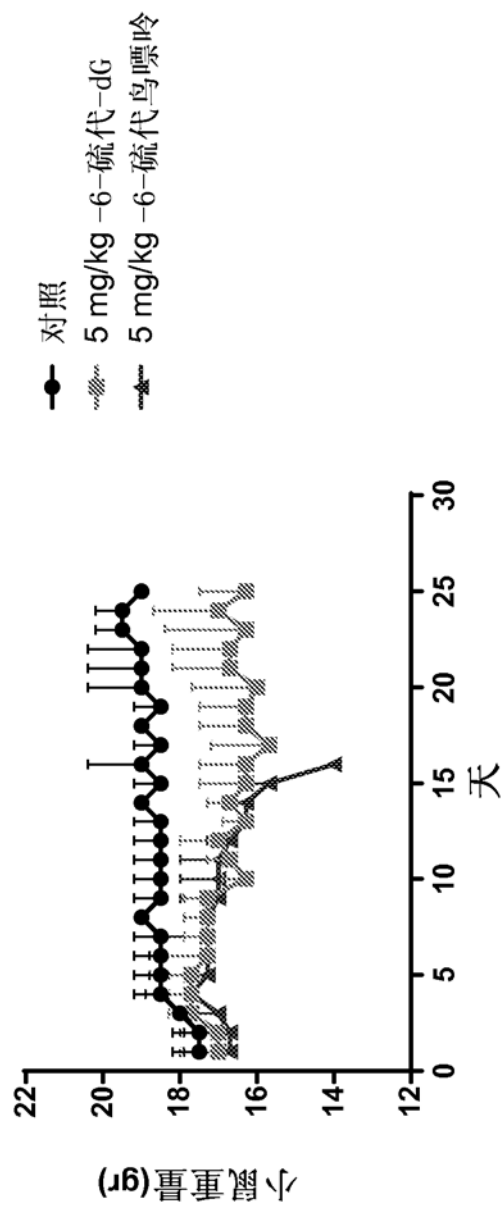


图 8B