

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07B 37/10

C07D207/20 C07D211/70

C07D265/30 C07H 15/252



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 02143919.2

[45] 授权公告日 2004 年 9 月 15 日

[11] 授权公告号 CN 1166597C

[22] 申请日 1996.11.14 [21] 申请号 02143919.2

分案原申请号 96198605.0

[30] 优先权

[32] 1995.11.27 [33] US [31] 08/562,652

[71] 专利权人 图莱尼教育基金管理处

地址 美国路易斯安那

[72] 发明人 A·V·沙利 A·A·纳吉

R-Z·凯

审查员 韩 涛

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 陈 昕

权利要求书 1 页 说明书 39 页 附图 7 页

[54] 发明名称 含氮基团的转化方法

[57] 摘要

一种将 α , β 或 α , γ -羟伯胺的伯氨基的氮转化为在具有 5-6 个原子的含氮的单不饱和杂环化合物的氮的方法, 包括 a) 将所述羟胺与过量卤代醛反应, 该卤代醛具有醛碳、带有卤素的碳, 并且在醛碳和带有卤素的碳之间具有 2 或 3 个选自 CH_2 、 CH_2CH_2 和 OCH_2 的残基, b) 相对于羟胺, 加入过量的有机碱, c) 用弱酸中和所述碱, 和 d) 用稀释酸水溶液处理。

ISSN 1008-4274

1. 一种将 α,β 或 α,γ -羟伯胺的伯氨基的氮转化为在具有 5-6 个原子的含氮的单不饱和杂环化合物的氮的方法, 包括下面的步骤:

a) 将所述羟胺与过量卤代醛反应, 该卤代醛具有醛碳、带有卤素的碳, 并且在醛碳和带有卤素的碳之间具有 2 或 3 个选自 CH_2 、 CH_2CH_2 和 OCH_2 的残基,

b) 相对于羟胺, 加入过量的有机碱,

c) 用弱酸中和所述碱, 和

d) 用稀释酸水溶液处理。

2. 权利要求 1 的方法, 其中步骤 a) 在非质子反应惰性有机溶剂中进行。

3. 权利要求 1 的方法, 其中步骤 a) 在极性非羟基反应惰性有机溶剂中进行。

4. 权利要求 2 的方法, 其中溶剂为二甲基甲酰胺。

5. 权利要求 1 的方法, 其中醛选自 ω -溴-丁醛、 ω -碘-丁醛、 ω -溴-戊醛和 ω -碘-戊醛。

含氨基团的转化方法

本案系 96198605.0 号申请的分案申请, 原发明名称“定向细胞毒性蕙环型类似物”, PCT 国际申请号 PCT/EP96/05029, 国际申请日 1996 年 11 月 14 日, 进入中国国家阶段日 1998 年 5 月 26 日。

本发明部分得到政府支助而完成。政府对本申请中有一定的权利。

技术领域

本发明属于靶向抗癌蕙环型(omthracycline)衍生物化学领域。更具体地说, 它涉及与肽激素, 如 LH-RH、铃蟾肽和促生长素抑制素类似物共价连接的阿霉素(DOX)或其道诺糖胺(daunosamine)修饰的衍生物(DM-DOX)。这些共价结合物定向于具有肽激素类似物受体的各种肿瘤。

背景技术

在 Schally、Janaky 和 Bajusz 的于 1995 年 9 月 6 授权公开的 EP 0450461B1 中揭示了在第六位上具有细胞毒部分的 LH-RH 类似物。

在 Nett 和 Glode 的于 1990 年 9 月 7 日公开的 WO 90/09799 中描述了用于损伤促性腺激素的 GnRH (LH-RH) 类似物。该申请描述了用于损伤促性腺激素的与 LH-RH 类似物相连的毒素, 如蓖麻毒蛋白, 并且因而治疗依赖于性激素的癌症。在没有说明连接化学的情况下也提到了 LH-RH 阿霉素衍生物。

在 Schally 等于 1990 年 4 月 6 日提出的美国专利申请和于 1993 年 7 月 15 日再次提出的系列申请 08/076, 846 中描述了细胞毒性促生长素抑制素类似物。

A. V. Schally 在《抗癌药物》(Anti-Cancer Drugs)5, 115-130 (1994) 的综述中详细说明了多种肿瘤的细胞膜上的 LH-RH、铃蟾肽或促生长素抑制素类似物的受体的存在。

G. Weckbecker 在他在《Farmac. Ther.》60, 245-264 (1993) 中的综述中列出了一些表明在一些正常和肿瘤组织中促生长素抑制素类似物的受体和受体亚型存在的依据。

在 N. Bunnett 《肠肽: 生物化学和生理学》423-445 (1994) 编者: J. Walsh 和 G. J. Dockray, Raven Press, 纽约和 E. Spindell 在

《激素研究的最新进展》48, (1993) (Academic Press) 的综述中讨论了铃蟾肽样肽和在各种正常和肿瘤组织中铃蟾肽/GRP 受体的存在。

阿霉素(DOX)是目前使用最广且非常有效的抗癌剂。然而,一些肿瘤根本不对它发生反应,且它的应用还受多重抗药性(MDR)和心脏毒性以及嗜中性细胞减少症的限制,这是由于慢性治疗的结果。为了克服这些缺陷并进一步开发蒽环型抗生素结构中存在的巨大的杀肿瘤潜力,已描述了数千种合成衍生物,包括它们与各种载体大分子相连的靶向类似物。

DOX 和其类似物的大部分情况描述在《阿霉素》中, David W. Henry, ACS Symposium Series, NO. 30, 《肿瘤化学治疗》, 美国化学协会, pp. 15 - 57 (1976) 和《阿霉素》, Federico Arcamone, Academic Press (1981) 中。

Mosher 等美国专利 4,464,529 (1984 年 8 月 7 日) 中描述了具有抗肿瘤活性的具有高度活性、烷基化、非交叉抗性的 3'-脱氨基-3'-(3"-氟基-4"-吗啉基)-DOX 和其衍生物。在《药物化学杂志》1984, 27, 638-645 中还描述了这些“高度有效的吗啉基蒽环型”的合成和生物学评价。

在 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 卷, pp. 4845-4849, 1991 年 6 月中, Gao 等描述了通过道诺红菌素衍生物的 DNA 序列的甲醛介导的烷基化作用。

在《药物化学杂志》35, 3208-3214 (1992) 中描述了具有潜在烷基化取代基的蒽环型类似物。

在 1989 年 12 月 12 日由 Pharmacia Carlo Erba 提出的欧洲专利 434960 中描述了用于 DOX 的道诺糖胺氮烷基化的 α, ω -二碘化合物的应用及新的吗啉基 DOX 衍生物的形成。

在 Israel 等的美国专利 4,299,822 (1981 年 11 月 10 日) 中 N-三氟乙酰基阿霉素- ^{14}O -半戊二酸酯和一半己二酸酯被公开, 作为具有改善水溶性的 N-三氟乙酰基阿霉素- ^{14}O -戊酸酯 (AD-32) 的类似物。

Horton 和 Priebe(抗生素杂志, XXXVI, 1211 - 1215)描述了一些与 14-OH 母体类似物相比, 在抗癌活性上没有很大变化的不同蒽环型类似物的 14-O-酯。

在设计靶向化学治疗剂技术中, 寻求下面的目标:

1. 载体分子和化学治疗剂之间稳定的连接, 直至达到靶。
2. 在结合物中载体分子保留生物特性, 例如保留结合特性。
3. 在结合物中化学治疗剂保留药理学活性, 例如保留细胞毒活性。
4. 作为结合的结果, 产生相对于未结合部分更强活性和/或较低外周毒性的类似物。

在 Sela 等的美国专利 4,263,279(1981 年 4 月 21 日)中描述了通过道诺糖胺部分的 NaIO_4 氧化作用及随后的包括载体分子的伯胺的还原性烷基化而进行的 DOX 的结合作用。

如在《生物化学生物物理研究通讯》1981, 102, 1048 - 1054 中所描述的, 顺乌头酸间隔区被用来借助于 pH 敏感键将道诺糖胺的氮与大分子载体相连。

Zunino 等(1981)《Tumori》67, 521 - 524 和《欧洲癌症临床研究》20, 421 - 425 中描述了 14-溴道诺红菌素和蛋白或多聚-L-氨基酸之间酯键和 C-N 连接的形成。

如《生物结合物化学》1990 1(5), 325 - 330 所描述的, 吗啉代-DOX(高活性的 DOX 的道诺糖胺修饰类似物)借助于可水解(溶菌体(lysosomotrop), pH 敏感)腓连接与抗体结合, 涉及细胞毒试剂的 C-13 氧代官能团。

如《Proc. Natl. Acad. Sci. USA》1982 79, 626 - 629 中所描述, 亮氨酸残基的羧酰胺键对酶降解的敏感性被成功地用于包含“间隔臂”肽的 DOX 结合物中, 该“间隔臂”肽优选 Ala-Leu-Ala-Leu, 其中羧基末端 Leu 酰化 DOX 中的道诺糖胺的氮, 氨基末端 Ala 通过二羧酸间隔区与载体相连。

如《Proc. Natl. Acad. Sci. USA》1992 89, 927 - 976 所描述的, DOX 的道诺糖胺氮通过戊二酸间隔区被酰化, 并伴随着严重的细胞

毒活性的丧失而与 LH-RH 类似物相连。

与根据本发明的化合物在治疗各种人类肿瘤中的应用相关的其它参考文献：

1. Schally 等(1996), 用 GnRH 类似物治疗: 矛盾和前景, 编者, Filicori, M. 和 Flamigni, C. (Parthenon, Carnforth, U. K.) pp. 33 - 44。
2. Nagy 等(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93, 7269 - 7273。
3. Yano 等(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91, 7090 - 7094。
4. Rekasi 等(1993) 内分泌学 132 (5) 1991 - 2000。
5. Srkalovic 等(1990) 癌症研究 50, 1841 - 1846。
6. Emons 等(1993) 癌症研究 53, 5439 - 5446。
7. Emons 等(1993) 临床内分泌学和代谢杂志 77(6) 1458 -)。
8. Schally, A. V. 等(1988) 促生长素抑制素类似物的肿瘤学应用, 癌症研究 48, 6977 - 6985。
9. Schally 等(1994) 国际胰腺学杂志 16, 277 - 280。
10. Srkalovic 等(1990) 临床内分泌学和代谢杂志 70(3), 661 - 669, 4 Pinski 等(1994) 国际癌症杂志 57, 574 - 580。
11. Radulovic 等(1992) 癌症通讯 62, 263 - 271。
12. Qin 等(1995) 国际癌症杂志 60, 694 - 700。
13. Radulovic 等(1992) P. S. E. B. M. 200, 394 - 401。
14. Radulovic 等(1994) Acta Oncologica 33 (6) 693 - 701。
15. Pinski 等(1993) 癌症通讯 71, 189 - 196。
16. O'Byrne 等(1994) 欧洲癌症杂志 30A (11) 1682 - 1687。
17. Pinski 等(1994) 英国癌症杂志 70, 886 - 892。
18. Pinski 等(1994) 癌症研究 54, 5895 - 5901。
19. Pinski 等(1996) 国际癌症杂志 65, 870 - 874。
20. Banks 等(1992) 抗癌药物 3, 519 - 523。
21. Reubi 和 Kvals (1992) 癌症研究 52, 6074 - 6078。

22. Schally 等(1994)国际胰腺学杂志 16, 277-280。
23. Halmos 等(1995)癌症研究 55, 280-287。
24. Halmos 等(1994)癌症通讯 85, 111-118。
25. Qin 等(1994)癌症研究临床肿瘤学杂志 120, 519-528。
26. Qin 等(1994)癌症研究 54, 1035-1041。
27. Qin 等(1995)国际癌症杂志 63, 257-262。
28. Reile 等(1994)前列腺 25, 29-38。
29. Pinski 等(1994)国际癌症杂志 57, 574-580。
30. Radulovic 等(1992) P. S. E. B. M. 200, 394-401。
31. Radulovic 等(1994) Acta Oncologica 33(6) 693-701。
32. Pinski 等(1993)癌症通讯 71, 189-196。
33. Pinski 等(1994)英国癌症杂志 70, 886-892。
34. Pinski 等(1994)癌症研究 54, 5895-5901。

所有提到的引用文献被本文引作参考。
发明内容

本发明化合物为新的靶向细胞毒性肽激素,其包含与肽激素,如 LH-RH、铃蟾肽和促生长素抑制素类似物结合的蒽环型细胞毒性剂,如 DOX 或 DM-DOX。这些细胞毒肽激素结合物被设计用来治疗具有结合物特异性受体的肿瘤,如乳腺癌,卵巢癌,子宫癌,前列腺癌,胰腺癌,结肠癌,胃癌和肺癌。本文使用的一些这种(未结合)蒽环型细胞毒性剂本质上是新的,并且是高效的,然而对于它们被以未结合物形式使用时,它们的毒性水平太高。

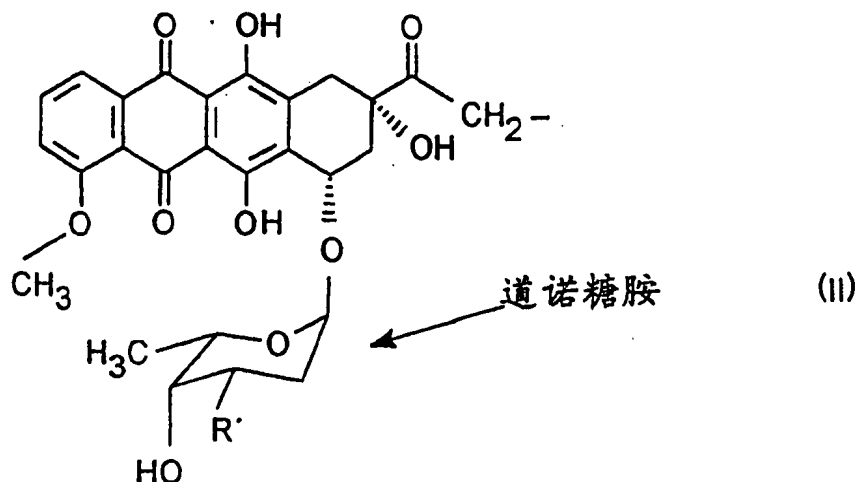
在寻找新的高活性的非交叉抗性的适宜于与肽载体形成共价结合物的 DOX 类似物中开发出了本发明提出的道诺糖胺修饰的 DOX 类似物。

通过使用二羧酸间隔区如戊二酸实现了稳定的以共价连接的其组成成员生物活性充分保留的结合物的形成。间隔区的一个羧基与 DOX 或 DM-DOX 的 14-OH 基形成一个酯键,间隔区的另一个羧基与肽载体的精心选择的游离氨基形成一个羧酰胺键。

本发明化合物用下面通式表示



其中 Q 为通式



Q^{14} 表示在 14 位上具有侧链的 Q 残基,

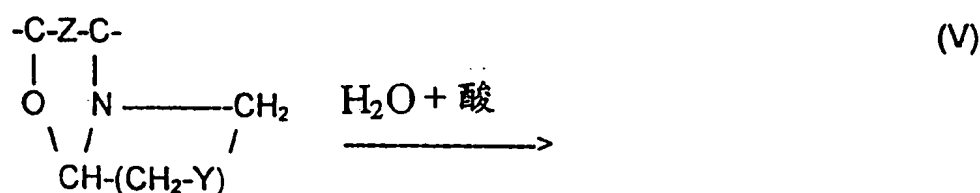
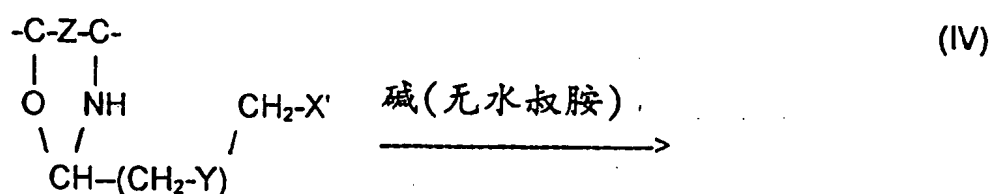
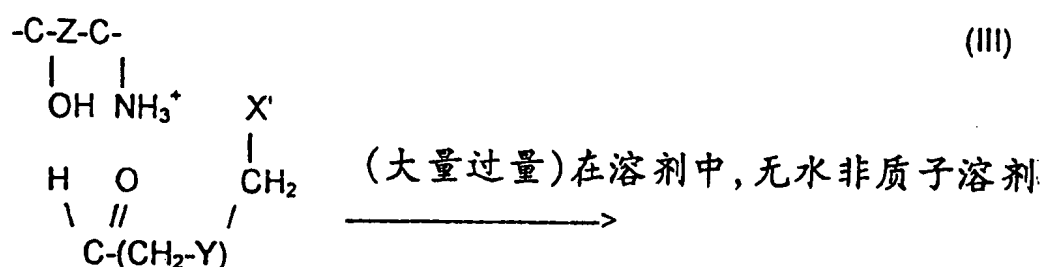
R 为 H 或 $-C(O)-(CH_2)_n-C(O)-$ 和 $n=0-7$,

R' 为 NH_2 或芳香、饱和或部分饱和的 5 或 6 元杂环化合物, 其具有至少一个环氮原子, 并任选具有与所述环的相邻碳原子结合以形成二环体系的丁二烯残基,

P 为 H 或肽部分, 适宜地为 LHRH、铃蟾肽或促生长素抑制素类似物, 但不排除其它生理活性肽。特别希望的是对肿瘤细胞受体具有亲和性的 LHRH 类似物, 尤其是在 6 位具有 D-Lys 残基的那些类似物, 以及缩短的促生长素抑制素和铃蟾肽类似物。然而当 R' 为 NH_2 时, R 和 P 不为 H。当 R 和 P 为 H 时, 那么 R' 不为 NH_2 。

在本工作的过程中发现了一种新的合成反应。不仅发现阿霉素及其衍生物可借助于二羧酸残基在 14 位上偶联以产生新的药物学有效的结合物, 而且提供了一种新的途径来从相邻和分离, 即 α, β -或 α, γ -羟基伯胺形成部分饱和的杂环残基。本发明特殊的应用在于在糖诺糖胺糖上形成 2"-吡咯啉基和 1", 3"-四氢吡啶基。然而, 此反应还具有更广的应用。当相邻或分离的羟基胺与卤素取代的醛反应时, 可形成 5 和 6 元部分饱和的杂环残基, 其中卤素取代的醛在醛碳和具有卤素基团的碳原子之间具有 2 或 3 个残基。这些残基可均为亚甲基, 或可包括杂原子如氧。此反应在三个阶段发生。合适地在极性惰性无水有机溶剂中, 非常大量过量的卤代醛与羟基胺的酸加成盐反应, 由此通过醛基与羟基和氨基缩合形成了五元噁唑烷

环(或六元 1,3-四氢恶嗪环)。将该产物与有机碱反应,适宜地为叔胺,其中在前面卤代醛的卤素部分与恶唑烷或 1,3-四氢恶嗪环的仲胺基之间消除氢卤酸以通过 5 或 6 元环的加入形成稠合环结构。接着用弱酸(适宜的有机酸)如冰醋酸中和碱。用酸的水溶液(适宜地为有机酸)处理打开稠合环的恶唑烷或 1,3-四氢恶嗪部分。本领域普通技术人员应理解,根据起始的醛,含有氮的最终环可包含至少一个上述另外的杂原子。反应通式可说明如下:



其中 X' 为卤素, 适宜地为溴或碘, 优选碘,

Y 为 CH_2 、 OCH_2 、 CH_2-CH_2 ,

Z 不存在或为 CH_2 。

当 Z 不存在时, 作为反应的第一个步骤, 醛部分形成 5 元恶唑烷环。当 Z 为 CH_2 时, 醛部分形成 6 元 1,3-四氢恶嗪环。虽然这些环的形成是熟知的, 但与通过卤代烷烃侧链在碱性介质如叔胺的无水介质中进行的闭环结合, 该反应是新的出人意料的。

附图的简要说明

图 1 为对于不同剂量水平的本发明化合物和 DOX, 雌激素依赖性 MXT 小鼠乳腺癌体积的变化。

图 2 为对于不同剂量水平的本发明的某化合物、现有技术中的化合物 DOX 和对照物, 雌激素依赖性 MXT 小鼠乳腺癌的体积变化。

图 3 为一些细胞毒 LHRH 类似物对患有雌激素依赖性 MXT 小鼠乳腺癌的小鼠存活的影响。

图 4 为在用现有技术中的激动剂和本发明的某化合物治疗期间, 带有大鼠 Dunning R-3327-H 前列腺癌移植物的雄性哥本哈根大鼠的肿瘤体积图。

图 5 为用某种本发明的化合物和相应的细胞毒性 LH-RH 类似物治疗, 对患有 Dunning R-3327-H 前列腺癌的大鼠的肿瘤体积的影响。

图 6 为用本发明的某化合物和相应的细胞毒性 LH-RH 类似物治疗, 对患有 Dunning R-3327-H 前列腺癌的哥本哈根大鼠的体重的影响。

图 7 为通过用本发明的某化合物和 DOX 治疗所获得的对肿瘤生长的抑制。

优选实施方案的描述

当在 R' 被某些优选基团取代时, Q 残基具有 Q_1 至 Q_8 亚残基的含义, 其中 Q_2 至 Q_8 为新的细胞毒性残基。

R' 具有产生如下列括号中的所示的 Q_x 残基的含义: $NH_2(Q_1)$,

吡咯烷-1-基(Q_2), 异二氢氮杂茛-2-基(Q_3), 3-吡咯啉-1-基(Q_4), 3-吡咯烷酮-1-基(Q_5), 2-吡咯啉-1-基(Q_6), 3-哌啶酮-1-基(Q_7)或1,3-四氢吡啶-1-基(Q_8)。

因此, 如果 $R-P$ 为 H , $-R'$ 为 $-NH_2$, 则 Q_1 为 DOX, 如果 $R-P$ 为 H , $-R'$ 为 吡咯烷-1-基, 则 Q_2 为 3'-脱氨基-3'-(吡咯烷-1''-基)-阿霉素(Q_2); 如 $R-P$ 为 H , $-R'$ 为 异二氢氮杂茛-2-基, 则 Q_3 为 3'-脱氨基-3'-(异二氢氮杂茛-2''-基)-阿霉素(Q_3), 如果 $R-P$ 为 H , $-R'$ 为 3-吡咯啉-1-基, 则 Q_4 为 3'-脱氨基-3'-(3''-吡咯啉-1''-基)-阿霉素(Q_4); 如果 $R-P$ 为 H , $-R'$ 为 3-吡咯烷酮-1-基, 则 Q_5 为 3'-脱氨基-3'-(3''-吡咯烷酮-1''-基)-阿霉素(Q_5); 如果 $R-P$ 为 H , $-R'$ 为 2-吡咯啉-1-基, 则 Q_6 为 3'-脱氨基-3'-(2''-吡咯啉-1''-基)-阿霉素(Q_6), 如果 $R-P$ 为 H , $-R'$ 为 3-哌啶酮-1-基, 则 Q_7 为 3'-脱氨基-3'-(3''-哌啶酮-1''-基)-阿霉素(Q_7); 如果 $R-P$ 为 H , $-R'$ 为 1,3-四氢吡啶-1-基, 则 Q_8 为 3'-脱氨基-3'-(1'',3''-四氢吡啶-1''-基)-阿霉素(Q_8)。

利用烷基化作用在 5 元环中掺入道诺糖胺氮原子的化合物体外活性比在 6 元环掺入道诺糖胺氮原子的它们的对应物高 10-50 倍(这些对比物为 Q_5 和 Q_7 以及 Q_6 和 Q_8)。

在本发明优选的具体实施方案中, 在式 $Q^{14}-O-R-P$ 物质中, R 和 P 不为氢。在 P 不为氢时, 为 P_1 、 P_2 和 P_3 , 适宜地 P_1 为 $LH-RH$ 激动剂载体、 $LH-RH$ 拮抗剂载体或缩短的 $LH-RH$ 类似物载体, P_2 为缩短的促生长素抑制素类似物, P_3 为铃蟾肽拮抗剂。

适宜地, P_1 为 $Aaa-Bbb-Ccc-Ser-Tyr-D-Lys(Xxx)-Leu-Arg-Pro-Ddd$, 其中 Xxx 为氢或二氨基取代基, 如 A_2Bu 或 A_2Pr , 其中

Aaa 为 Glp , 那么 Bbb 为 His , Ccc 为 Trp , 和 Ddd 为 $Gly-NH_2$,

Aaa 为 $Ac-D-Nal(2)$, $Ac-D-Phe$ 或 $AcD-Phe(4Cl)$, 那么 Bbb 为 $D-Phe(4Cl)$ 或 $D-Phe$, Ccc 为 $D-Pal(3)$ 和 $D-Trp$, Ddd 为 $D-Ala-NH_2$; 并且当 $Aaa-Bbb-Ccc$ 为 Ac , 那么 Ddd 为 $-NH$



P_2 为 $\text{Aaa-Cys-Bbb-D-Trp-Lys-Ccc-Cys-Ddd-NH}_2$

其中:

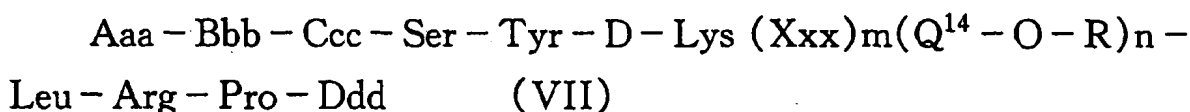
当 Aaa 为 D-Phe, 那么 Bbb 为 Tyr, Ccc 为 Val, Ddd 为 Thr 或 Trp;

当 Aaa 为 D-Trp, 那么 Bbb 为 Phe, Ccc 和 Ddd 为 Thr, 和

P_3 为 $\text{Aaa-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-LeuBbb-NH}_2$

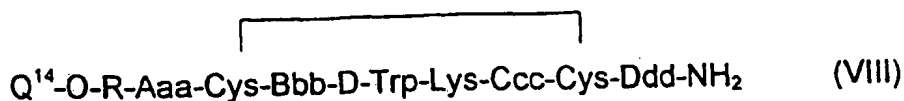
其中: Aaa 为不存在, D-Tpi 或 D-Phe, Bbb 为 $(\text{CH}_2-\text{NH})\text{Leu}$, $(\text{CH}_2-\text{NH})\text{Phe}$, $(\text{CH}_2-\text{NH})\text{Trp}$, $(\text{CH}_2-\text{N})\text{Tac}$ 或 $(\text{CH}_2-\text{N})\text{DM-Tac}$ 。

在本发明 LH-RH 结合类似物的新化合物中, 通过如式 VII 所列的二羧酸间隔区, 细胞毒基团 Q 与 LH-RH 类似物上的 D-Lys 侧链或与其上的 Xxx 基团相连:

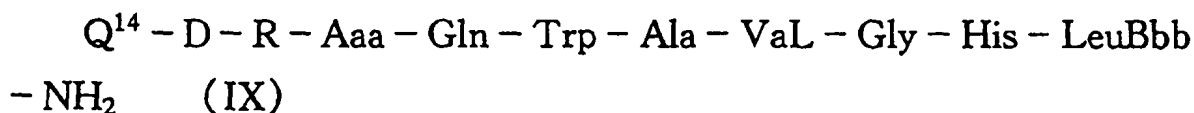


其中 m 为 1 或 0, n 为 1 或 2, 前提是当 m 为 1, 即 (Xxx) 为 A_2Bu 或 A_2Pr 时, n 为 1 或 2, 当 m 为 0, 即 (Xxx) 为 H 时, n 为 1。

在本发明促生长素抑制素结合类似物的新化合物中, 通过如下式 VIII 所列的二羧酸间隔区, 细胞毒基团 Q 与促生长素抑制素类似物的氨基末端相连:



在本发明铃蟾肽拮抗剂结合类似物的新化合物中, 通过如式 IX 所列的间隔区, 细胞毒基团 Q 与铃蟾肽拮抗剂的氨基末端相连。

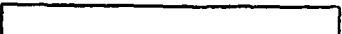


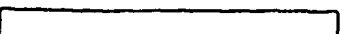
本发明尤其优选的具体实例为含有 Q_1 和 Q_6 作为细胞毒基团, 戊二酸 ($n=3$) 作为与 Q_1 (阿霉素) 或 Q_6 (2-吡咯啉并阿霉素) 形成 $14-\text{O}-$ 酯键并与肽载体形成羧酰胺键的二羧酸间隔区的那些肽结合物。

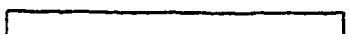
本发明的最优选的具体实例为下式的细胞毒 LH-RH 类似物:

1. Glp-His-Trp-Ser-Tyr-D-Lys(Q₁¹⁴-O-glt)-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂;
2. Glp-His-Trp-Ser-Tyr-D-Lys(Q₆¹⁴-O-glt)-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂;

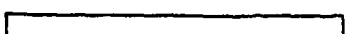
下式的细胞毒性促生长素抑制素类似物

3.  Q₁¹⁴-O-glt-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂;

4.  Q₆¹⁴-O-glt-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂;

5.  Q₁¹⁴-O-glt-D-Trp-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂;

6.  Q₆¹⁴-O-glt-D-Trp-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂;

7.  Q₁¹⁴-O-glt-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Trp-NH₂; 和

8.  Q₆¹⁴-O-glt-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Trp-NH₂;
- 和下式的细胞毒性铃蟾肽拮抗剂类似物:

9. Q₁¹⁴-O-glt-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu (CH₂-NH)Leu-NH₂;
10. Q₆¹⁴-O-glt-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu (CH₂-NH)Leu-NH₂
11. Q₁¹⁴-O-glt-D-Tpi-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu (CH₂-NH)Leu-NH₂; 和
12. Q₆¹⁴-O-glt-D-Tpi-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu (CH₂-NH)Leu-NH₂.

在与相邻或分离的, 即 α, β -或 α, γ -羟胺的氮形成部分饱和杂环的新方法中, 使用大量过量, 适宜地为过量 30 倍的卤代醛, 在无水惰性有机极性非羟基(非质子的)溶剂, 适宜地为二甲基甲酰胺中进行反应的第一个步骤, 其中 4-碘丁醛和 5-碘戊醛为尤其有效的。然而, 本发明不局限于此, 溴可被用来代替碘。此反应以及后续步骤

可在室温下进行。

使用过量,适宜地为过量2-4倍的有机碱进行碱化反应步骤。
叔胺如三烷基胺适用于此目的。

通过在水存在下,用有机酸处理将由此形成的二环打开以释放相邻或分离的羟基,可使用稀释的含水三氟乙酸,适宜地为在惰性有机溶剂如乙腈中的溶液。通过减压除去挥发物,用己烷萃取过量的卤代化合物,并在HPLC中纯化残余物来纯化产物。

缩写

为了描述本发明的肽和它们的衍生物,使用肽化学技术中普遍接受并在由IUPACIUB生物化学命名委员会推荐的常用的氨基酸缩写(欧洲生物化学杂志,138,9-37(1984))。

各氨基酸残基的缩写以氨基酸的俗名为基础,例如Glp为焦谷氨酸,His为组氨酸,Trp为色氨酸等。除非另有说明,缩写指的是L异构体形式的氨基酸,如Ser为L-丝氨酸,D-Lys为D-赖氨酸。

本发明非常见氨基酸的缩写如下:D-Nal(2)为D-3-(2-萘基)丙氨酸,D-Pal(3)为D-3-(3-吡啶基)丙氨酸,D-Phe(4Cl)为D-4-氯苯丙氨酸。

根据常规书写肽序列,其中N-末端氨基酸位于左边,C-末端氨基酸位于右边,如Glp-His-Trp。

式Leu(CH₂-NH)Leu-NH₂描述位于亮氨酸和肽序列C末端的亮氨酰胺残基之间的被还原的肽键。

使用的其它缩写为:

A₂Bu:二氨基丁酸

A₂Pr:二氨基丙酸

BN:铃蟾肽

BOP试剂:苯并三唑-1-基氧三(二甲基氨基)磷六氟磷酸盐

DIPEA:N,N-二异丙基乙胺

DM-DOX道诺糖胺修饰的阿霉素

DMF:N,N-二甲基甲酰胺

DMTac:5,5-二甲基-噻唑烷-4-羧酸

DOX:阿霉素

Fmoc:9-芴基甲氧羰基

glt: $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$, 戊二酰基

Glt₂O:戊二酸酐

HOBt:1-羟基苯并三唑

HO-glt-OH:戊二酸

HOSu:N-羟基琥珀酰亚胺

HPLC:高效液相色谱

TFA:三氟乙酸

Tac:噻唑烷-4-羧酸

Tpi:2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吡啶-3-羧酸

使用装有 168 型二极管阵列检测仪的 Beckman 分析型 HPLC 系统和 System Gold 色谱软件(Beckman)来监测化学反应并检查本发明化合物的纯度。使用的柱为 DynamaxC-18 (250×4.6mm;孔大小:300 Å;颗粒大小:12μm)。溶剂体系由两种成分组成:(i)0.1% TFA 水溶液,和(ii)0.1% TFA 的 70% 含水乙腈的溶液,并以 1 分钟增加 1% (ii)的线性梯度形式使用以监测化学反应。用于检查纯度,该体系以等梯度形式使用。

使用 Beckman 342 型半制备 HPLC 体系来分离和纯化本发明的化合物。柱为 Aquapore Octyl (250×10mm;孔大小:300 Å;颗粒大小:15μm)。溶剂体系为与上面分析型 HPLC 中的相同。

分析

使用 Bruker ARX300 NMR 分光计(300MHz ¹H 频率,75MHz ¹³C 频率)和电子喷射质谱仪 Finnigan-MAT TSQ 7000 来鉴定阿霉素衍生物的结构。

肽载体的合成

通常以药物学可接受的非毒性盐如酸加成盐的形式将本发明的化合物给药。酸加成盐的例子为氢氯化盐、氢溴酸盐、硫酸盐、磷酸盐、富马酸盐、葡糖酸盐、单宁酸盐、马来酸盐、乙酸盐、三氟乙酸盐、柠檬酸盐、苯甲酸盐、琥珀酸盐、藻酸盐, pamoate、苹果酸盐、抗坏血

酸盐、酒石酸盐等。如果以片剂形式给予活性成分,该片剂可包含药理学可接受稀释剂,包括粘合剂如黄耆胶、玉米淀粉或明胶,崩解剂如藻酸及润滑剂如硬脂酸镁。

如果需要以液体形式给药,甜味剂和/或增香剂可被用作药理学可接受稀释剂的一部分,静脉注射可以等渗生理盐水、磷酸缓冲液等形式完成。

药物组合物通常包含与常规的药理学可接受载体相结合的肽。通常,当静脉给药时,剂量为每千克宿主体重为约1-约100微克肽;口服剂量将更高。总之,通常以与使用其它LHRH、促生长素抑制素和铃蟾肽类似物的临床治疗相同方式来进行使用这些肽的治疗。

这些肽可被通过经静脉、皮下、肌肉内、口服、鼻内或阴道对哺乳动物进行给药以通过与特异受体结合而获得生物激素作用。在LHRH类似物的情况下,这些作用包括可逆的生殖腺活动的抑制,在促生长素抑制素类似物的情况下,抑制胃肠机能。有效剂量随给药形式和被治疗的哺乳动物的具体种类而变化。一个典型的剂型实例为含有该肽的生理盐水溶液,施用该溶液以提供约0.1-2.5mg/kg体重范围内的剂量。可以固体形式或液体形式进行肽的口服给药。

可通过任何肽化学领域的技术人员已知的方法进行本发明肽载体的合成。适宜方法的总汇可在M. Bodanszky,《肽合成原理》,Springer-Verlag, Heidelberg, 1984中找到。固相肽合成方法可在J. M. Stewart和J. D. Young的教科书,《固相肽合成》,Pierce Chem. CO., Rockford, IL, 1984(第二版)中以及G. Barany等的综述《国际肽和蛋白质研究杂志》30, 705-739 (1987)中查找到。

本发明所采用的LH-RH类似物载体的合成详细描述在美国专利5,258,492(Sandor Bajusz和Andrew V. Schally, 1993年11月2日)的实施例以及Bajusz等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 1637-1641 (1988)和86, 6318-6322 (1989)和Janaky等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 1023-1027和972-976 (1992)的论文

中。

本发明所采用的促生长素抑制素类似物载体的合成详细描述在美国专利 4,650,787(1987 年 3 月 17 日, Andrew V. Schally 和 Ren Z. Cai.) 的实施例中。对合成的描述也可在 Cai 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 1896-1900 (1986) 和 Proc. Natl. Sci. USA 84, 2502-2506 (1987) 的论文中查找到。

本发明所采用的铃蟾肽拮抗剂载体的合成详细描述在 Coy 等, 《生物化学杂志》263, 5056-5060 (1988) 和 264, 14691-14697 (1989) 和 Cai 等, 《肽》13, 267-271 (1992) 和 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 12664-12668 (1994) 的论文中。

本发明所采用的阿霉素衍生物的合成及它们与不同肽载体的结合物的形成在下面实施例中进行了详细描述, 其中这些实施例意在说明而不起限制作用。

具体实施方式

实施例 1

N-Fmoc-Dox¹⁴-O-半戊二酸酯的制备和分离

将 50mg (86 μ mol) DOX 盐酸盐溶解在 1ml DMF 中, 并加入 30mg (90 μ mol) Fmoc-Osu, 接着加入 31 μ l (180 μ mol) DIPEA。搅拌 3 小时后, 分析型 HPLC 检测反应完成。在 Speed Vac 高真空蒸发器中让溶剂蒸发干, 并借助于与 0.1% TFA 水溶液的摩擦将残余物结晶。将结晶过滤并用冷乙醚洗涤一次以除去痕量过量的 Fmoc-Osu。在干燥器中干燥后, 获得质量为 62mg, 98% 纯度的 N-Fmoc-Dox。产率: 94%。

在存在 26.1 μ L (150 μ mol) DIPEA 时, 将该中间体与 11.4mg (100 μ mol) Glt₂O 的 1ml 无水 DMF 溶液反应过夜。在 Speed Vac 中将溶剂蒸发掉, 并借助于与 0.1% (v/v) TFA 水溶液的摩擦将残余油状物固化。如分析型 HPLC 所检测的, 由此得到的粗物质含有 70% N-Fmoc-DOX 14-O-半戊二酸酯, 20% 未反应的 N-Fmoc-DOX 和 10% 其它不纯物。此粗产物可不经进一步纯化而用于制备肽 DOX 结合物。当此粗物质溶解于含 0.1% TFA 的 20ml 60% 乙腈水溶液中并上样于半制备性 HPLC 时, 获得了 45.7mg 98% 纯度的

N-Fmoc-DOX14-O-半戊二酸酯终产物(收率:64%)。

实施例 2

3'-脱氨基-3'-(吡咯烷-1"-基)阿霉素 TFA 盐(Q₂)和其 14-O-半戊二酸酯(AN-193)TFA 盐的制备和分离

将 50mg (86μmol) DOX 盐酸盐溶解在 1ml DMF 中, 并加入 171μl (1.3mmol) 15 倍过量的 1,4-二碘丁烷, 接着加入 45μl (260μmol) 3 倍过量的 DIPEA。室温下将反应混合物搅拌过夜。如分析型 HPLC 所检测, 在 16 小时后反应完成。在 Speed Vac 中蒸发掉溶剂, 将残余油状物溶解在 3ml 0.1% TFA 的水溶液中, 用乙醚萃取以除去过量的 1,4-二碘丁烷。接着将含水提取物上样至 HPLC 中, 获得质量为 41.6mg, 98% 纯度的 DOX 衍生物(产率 68%)。

几乎如实施例 1 所描述, 将由此获得的 41.6mg (58μmol) 3'-脱氨基-3'-(吡咯烷-1"-基)-阿霉素 TFA 盐(Q₂)与 1.2 当量 Glt₂O 的无水 DMF 溶液反应。产率为 35% (16.9mg), 纯度为 98%。

实施例 3

3'-脱氨基-3'-(异二氢氮杂茛-2"-基)阿霉素 TFA 盐(Q₃)的制备和分离

将 50mg (86μmol) DOX 盐酸盐溶解在 1ml DMF 中, 加入 226mg (1.3mmol) 15 倍过量的 α,α'-二氯-邻二甲苯, 接着加入 45μl (260μmol) 3 倍过量的 DIPEA 和催化量的 NaI。16 小时后, 用 Speed Vac 除去溶剂, 并将残余物溶解在 3ml 0.1% TFA 水溶液中, 用 3ml 乙醚萃取以除去过量的卤代化合物。将由此获得的粗物质上样至 HPLC。纯化后, 获得 36mg, 98% 纯度的最终产物(产率: 55%)。

实施例 4

3'-脱氨基-3'-(3"-吡咯啉-1"-基)-阿霉素 TFA 盐(Q₄)的制备和分离

将 50mg (86μmol) DOX 盐酸盐溶解在 1ml DMF 中, 并加入 136.8μl (1.3mmol) 15 倍过量的顺-1,4-二氯-2-丁烯

(Aldrich), 接着加入 45 μ l (260 μ mol) 3 倍过量的 DIPEA。16 小时后, 在 Speed Vac 中除去溶剂, 将残余物溶解在 3ml 0.1% TFA 水溶液中, 并用 3ml 己烷萃取以除去过量的卤代化合物。将由此获得的粗物质上样至 HPLC。纯化后, 获得 22.6mg 98% 纯度的最终产物 (产率: 37%)

实施例 5

1-氯-4-溴-2-丁酮(C_4H_6ClBrO)和 1-氯-5-溴-2-戊酮(C_5H_8ClBrO)的制备和分离

在乙醚中, 将 100.8 μ l (1mmol) 3-溴丙酰氯(Aldrich)与过量的重氮甲烷反应。1 小时后, 洗脱醚溶液并在 TLC 进行斑点试验。通过 Merck Art NO. 5554 预涂敷硅胶 60 F254 的薄层色谱铝片被用作固定相, $CHCl_3$:MeOH 95:5 (V/V) 作为流动相。为了斑点试验, 在洗脱后, 将 2,4-二硝基苯肼试剂(Vogel: 实验有机化学教材, P. 1061, 第三版, Longmans, 纽约)被喷射至 TLC 片上。由形成的重氮甲基酮衍生物显示出 R_f 为 0.3 的黄色斑点。接着在乙醚中将醚溶液与无水 HCl 反应, 将重氮甲基酮转化为所需最终产物 1-氯-4-溴-2-丁酮。该产物在相同的溶剂体系中使用上述斑点试验试剂, 显示出氧化化合物特征性的黄色斑点, R_f 为 0.8。在溶剂蒸发后, 将粗产物上柱(15cm 长, 2.5cm 直径), 其中柱填充有 15g 硅胶, Merck, 9385 级, 230-400 目, 孔大小 60 Å。液体流动相为纯 $CHCl_3$ 。混合含有所需最终产物的级份(以上面详细描述斑点试验为特征)并蒸发至干燥。获得质量为 1.5g 的清亮油状物。收率=80%。

除了采用 4-溴丁酰氯代替 3-溴丙酰氯外, 几乎与用于 1-氯-4-溴-2-戊酮相同的方法从 4-溴丁酰氯制备 1-氯-5-溴-2-戊酮。获得 1.6g 清油, 收率=80%。

实施例 6

3'-脱氨基-3'-(3"-吡咯烷酮-1'-基)阿霉素 TFA 盐(Q_5)的制备和分离

将 50mg (86 μ mol) DOX 盐酸盐溶解在 1ml DMF 中, 并加入 241mg (1.3mmol) 15 倍过量的 1-氯-4-溴-2-丁酮, 接着加入

45 μ l (260 μ mol)3 倍过量的 DIPEA。16 小时后,在 Speed Vac 中除去溶剂,并将残余物溶解在 3ml 0.1% TFA 水溶液中,用 3ml 己烷萃取以除去过量的卤代化合物。将由此获得的粗物质上样至 HPLC。纯化后,获得 20.6mg 98% 纯度的最终产物(产率:33%)。

实施例 7

3'-脱氨基-3'-(3"-哌啶酮-1"-基)-阿霉素 TFA 盐(Q₇)的制备和分离

将 50mg (86 μ mol) DOX 盐酸盐溶解在 1ml DMF 中,并加入 260mg (1.3mmol)15 倍过量的 1-氯-5-溴-2-戊酮,接着加入 45 μ l (260 μ mol)3 倍过量的 DIPEA。16 小时后,在 Speed Vac 中除去溶剂,并将残余物溶解在 3ml 0.1% TFA 水溶液中,用 3ml 己烷萃取以除去过量的卤代化合物。将由此获得的粗物质上样至 HPLC 中。纯化后,获得 18mg 95% 纯的最终产物(产率:28%)。

实施例 8

4-碘丁醛和 5-碘戊醛的制备和分离

将 1.3mL (10mmol)2-(3-氯丙基)-1,3-二氧戊环(4-氯-正丁醛乙二醇缩醛)溶解在 200ml 含 30g (200mmol, 20 倍过量) NaI 的丙酮中。将溶液回流 24 小时,接着蒸发至干燥。使用 100mL 乙醚从无机固体残余物中萃取有机物。接着用 50mL H₂O, 50mL 5% Na₂S₂O₃ 水溶液将醚溶液洗涤一次,并用 50mL H₂O 洗涤 3 次。真空除去乙醚,将残余油状物溶解在 3mL 50% 乙酸水溶液中。1 小时后,将 100ml 乙醚加至溶液中,通过用 50mL H₂O 洗涤 3 次除去乙酸以及乙二醇。在 TLC 上纯 CHCl₃ 中以 R_f 为 0.8 将主要产物洗脱。用于醛功能团的斑点试验与实施例 5 中对于酮所描述的相同。接着除去乙醚,并将黑色油状物上柱(15cm 长,2.5cm 直径),其中该柱装填有 15g 硅胶,Merck, 9385 级,230-400 目,孔大小 60 Å。液体流动相为 CHCl₃。混合含有最终产物(以上面详细描述的斑点试验来特征)的级份并蒸发至干燥。获得 1.6g 黄色油状物。产率:80%。

几乎以相同方法从 2-(4-氯丁基)-1,3-二氧戊环(5-氯-

正戊醛乙二醇缩醛)(Fluka)获得 5-碘戊醛。获得 1.65g 黄色油状物。产率:80%。

实施例 9

3'-脱氨基-3'-(2"-吡咯啉-1"-基)-阿霉素 TFA 盐(Q₆)的制备和分离

将 50mg (86 μ mol) DOX 盐酸盐溶解在 1ml DMF 中,并加入 515mg (2.6mmol) 30 倍过量的 4-碘丁醛,接着加入 45 μ l (260 μ mol, 3 倍过量)DIPEA。1 小时后,将 100 μ l 冰醋酸加入反应混合物中,接着将该反应混合物滴加至 5ml 0.1% TFA 的 70%乙腈水溶液中(HPLC 体系的溶剂 ii)。将溶液用 2mL 0.1% TFA 水溶液稀释,接着在 Speed Vac 中除去乙腈。将产生的溶液用己烷萃取以除去过量的卤代化合物。将由此获得的物质上样至 HPLC。纯化后,获得 52mg 98%纯度的最终产物。(产率:85%)。

实施例 10

3'-脱氨基-(1",3"-四氢吡啶-1"-基)-阿霉素 TFA 盐(Q₈)的制备和分离

将 50mg (86 μ mol)DOX 盐酸盐溶解在 1mL DMF 中,并加入 552mg (2.6mmol) 30 倍过量的 5-碘戊醛,接着加入 45 μ l (260 μ mol)3 倍过量的 DIPEA。1 小时后,将 100 μ l 冰醋酸加入到反应混合物中,接着将该反应混合物滴加至 5ml 0.1% TFA 的 70%乙腈水溶液中(HPLC 体系的溶剂 ii)。将溶液用 2mL 0.1% TFA 水溶液稀释,接着在 Speed Vac 中除去乙腈。将产生的溶液用己烷萃取以除去过量的卤代化合物。将由此获得的物质上样至 HPLC。纯化后,获得 46mg 98%纯度的最终产物。(产率:75%)。

实施例 11

含 DOX 的细胞毒性 LH-RH 激动剂类似物的制备和分离([D-Lys⁶(DOX¹⁴-O-glt)]LH-RH, Q₁¹⁴gL)

将 60mg (37.5 μ mol)[D-Lys⁶]LH-RH 和 52mg (64%纯度, 37.5 μ mol) N-Fmoc-DOX14-O-半戊二酸酯(参见实施例 1)溶解在 1mL DMF 中,并加入 22mg (50 μ mol)BOP 试剂(Aldrich)、13.

5mg (100 μ mol) HOBt 及 52 μ l (300 μ mol) DIPEA。室温下搅拌 1 小时后反应完毕。将溶剂蒸发, 用 3mL 乙酸乙酯将残余油状物结晶并接着用 3mL 乙酸乙酯洗涤两次。随后将 90mg 粗固体物质溶解在 3mL DMF 中并加入 300 μ l 派啉。5 分钟后, 将反应置于冰浴中, 并通过加入 300 μ l TFA、700 μ l 吡啶和 2mL DMF 的混合物将其酸化。在将溶剂蒸发后, 通过乙酸乙酯将残余油状物固化。将由此获得的粗固体溶解在含 0.1% TFA(i) 的 1mL 70% 乙腈水溶液中, 并用 3mL 0.1% TFA 水溶液(ii) 稀释, 上样至半制备性 HPLC。获得 40mg (14.8 μ mol) 98% 纯度的最终产物。产率: 48%。

实施例 12。

含 2-吡咯啉并 DOX 的细胞毒性 LH-RH 激动剂类似物的制备和分离([D-Lys⁶(2-吡咯啉并 DOX¹⁴-O-glt)]LH-RH, Q₆¹⁴gl)

将 11.2mg (5 μ mol) Q₁¹⁴gl (参见实施例 11) 溶解在 200 μ l DMF 中, 并加入 30mg (150 μ mol, 30 倍过量) 4-碘丁醛(实施例 8), 接着加入 3 μ l (17 μ mol) DIPEA。1 小时后, 反应完毕(参见实施例 9), 向反应混合物中加入 10 μ l 冰醋酸, 接着将反应混合物滴加至 1mL 0.1% TFA 的 70% 乙腈水溶液。接着将该溶液用 1mL 0.1% TFA 水溶液稀释, 并真空除去乙腈。随后将剩余水溶液用 1mL 己烷萃取, 并上样至 HPLC。获得质量为 7.6mg、99% 纯度的最终产物。(产率: 66%)。

实施例 13

含 DOX 的细胞毒性促生长素抑制素类似物的制备和分离

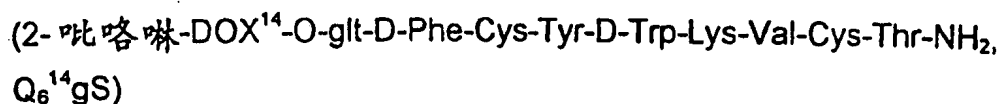
(DOX¹⁴-O-glt-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂, Q₁¹⁴gS)

将 20mg (14.5 μ mol) D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys (Fmoc)-Val-Cys-Thr-NH₂ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986, pp.1986-1990) 和 20mg (64% 纯度, 14.5 μ mol) N-Fmoc-DOX 14-O-半戊二酸酯(实施例 1) 溶解在 200 μ l DMF 中, 并加入 8.8mg (20 μ mol) BOP 试剂(Aldrich)、5.4mg (40 μ mol) HOBt 以及

17 μ l (100 μ mol) DIPEA。室温下,搅拌 1 小时后,反应完毕。在真空除去溶剂后,残余物用乙酸乙酯结晶。接着将该固体物质溶解在 1mL DMF 中,并加入 100 μ l 吡啶。7 分钟后,将反应置于冰浴中,并通过加入 100 μ l TFA、300 μ l 吡啶和 2mL DMF 的混合物将其酸化,在溶剂蒸发后,残余油物用乙酸乙酯固化。将由此获得的粗固体溶解在含 0.1% TFA (i) 的 1mL 70% 乙腈水溶液中,并用 3mL 0.1% TFA 水溶液 (ii) 稀释,上样至半制备性 HPLC。获得 9.7mg (5.1 μ mol) 95% 纯度的最终产物。

实施例 14

含 2-吡咯啉-1-基-DOX 的细胞毒性促生长素抑制素类似物的制备和分离



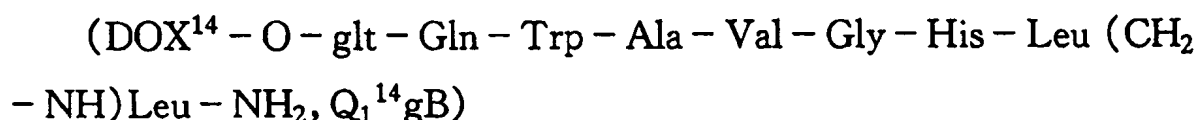
将 D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂ (6.4mg, 5 μ mol) 溶解在 100 μ l DMF 中,并加入 2-吡咯啉-1-基-DOX¹⁴-O-半戊二酸酯 (4.1mg, 5 μ mol), 接着加入 BOP 试剂 (4.4mg, 10 μ mol)、HOBt (100 μ mol) 和 DIPEA (50 μ mol)。室温下,搅拌 2 小时后,用 20 μ l AcOH 酸化反应混合物,并用含 0.1% TFA 的 500 μ l 70% 乙腈水溶液稀释,再进一步用 700 μ l 0.1% TFA 水溶液稀释,上样至 HPLC。获得 3.9mg (产率:40%) 的 99% 纯度的最终产物。

如实施例 9 中所述,通过将 DOX¹⁴-O-半戊二酸酯与 4-碘丁醛反应来制备 2-吡咯啉-1-基-DOX¹⁴-O-半戊二酸酯。

如实施例 11 所述,从 N-Fmoc-DOX¹⁴-O-半戊二酸酯,通过裂解 Fmoc 保护基制备 DOX¹⁴-O-半戊二酸酯。(产率:40%)。

实施例 15

含 DOX 的细胞毒性铃蟾肽拮抗剂的制备和分离



将 20mg (15.8 μ mol) Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu

(CH₂-NH)Leu-NH₂(国际肽蛋白质研究杂志 38, 1991, pp. 593-600)和 22mg (64% 纯度, 15.8μmol) N-Fmoc-DOX14-O-半戊二酸酯(实施例 1)溶解在 200μl DMF 中, 并加入 8.8mg (20μmol) BOP 试剂(Aldrich)、5.4mg (40μmol) HOBt 以及 17μl (100μmol) DIPEA。室温下, 搅拌 1 小时后, 反应完毕。在真空除去溶剂后, 残余物用乙酸乙酯结晶。接着将该固体物质溶于 1mL DMF 中, 并加入 100μl 哌啶。5 分钟后, 将反应置于冰浴中, 并通过加入 100μL TFA、300μL 吡啶和 2mL DMF 的混合物将其酸化。在溶剂蒸发后, 残余油状物用乙酸乙酯固化。将由此获得的粗固体溶解在含 0.1% TFA(i)的 1mL 70% 乙腈水溶液中并用 3mL 0.1% TFA 水溶液(ii)稀释, 上样至半制备型 HPLC。获得 13.5mg (7.1μmol) 98% 纯度的最终产物, 产率: 45%。

实施例 16

含 2-吡咯啉-1-基 DOX 的细胞毒性铃蟾肽拮抗剂类似物的制备和分离

2-吡咯啉-1-基-DOX¹⁴-O-glt-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu (CH₂-NH) Leu-NH₂, Q₆¹⁴gB

将 9.5mg (5μmol) Q₁¹⁴gB(实施例 15)溶解在 200μl DMF 中, 并加入 30mg (150μmol, 30 倍过量) 4-碘丁醛(实施例 8), 接着加入 3μl (17μmol) DIPEA。1 小时后, 反应完毕(实施例 9), 将 10μl 冰醋酸加入反应混合物中, 接着将反应混合物滴加至 1mL 0.1% TFA 的 70% 乙腈水溶液中。将该溶液用 1mL 0.1% TFA 水溶液稀释, 真空除去乙腈。随后将残余的水溶液用 1mL 己烷萃取, 上样至 HPLC。获得 6mg 98% 纯度的最终产物。(产率: 60%)。

体外细胞毒活性的测定

从 Dr. Gunter Berndhardt(德国 Regensburg 大学)获得 MXT 雌激素依赖型小鼠乳腺癌细胞系, 在测定本发明化合物的抗增殖活性中所采用的所有其它细胞系从美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得。

为了评价类似物的活性, 以通过结晶紫染色细胞来定量测定生

物量为基础,采用微滴定平板的比色细胞毒性分析,其中生物量的定量与细胞数目的确定极为相关(Reile 等;分析生物化学 187,262—267,1990;Bernhardt G. 等,癌症研究与临床肿瘤杂志(1992),118,35—43;Spruss Th. 等,癌症研究与临床肿瘤杂志 117,435—443,1991;Gillies R. J.,分析生物化学杂志,159,109—113,1986;Kueng, W. 等;分析生物化学,182 16—19,1989)。

分析方法

在 96 孔平板上接种细胞 1 至 2 天后,将培养基换成含待测试化合物的新鲜培养基和仅用作对照培养物的新鲜培养基。在培养一段不同的时间后,将细胞用戊二醛固定,并 4℃ 下贮存在胎牛血清(FBS)中直至实验结束。将细胞用结晶紫染色,并用 70% 乙醇水溶液提取结合的染料。分别用 ELA Reader (Bio-Tek Instruments) 或 Biomek 1000(Beckman)测定 590nm 或 600nm 处的光密度。每一数据点代表八个培养孔的平均值。用 $T/C = (T - C_0)/(C - C_0)$ 来计算 T/C 值,其中 T=处理组培养物的光密度,C=对照组(未处理)培养物的光密度,C₀=培养开始时培养物的光密度(t=0)。

实施例 17

DOX 的道诺糖胺修饰衍生物的体外细胞毒活性

表 17-1 表明在体外阿霉素及其道诺糖胺修饰衍生物对 MCF-7 人乳腺癌细胞系的影响。

其道诺糖胺 N 被结合至具有反应活性功能团的五元环中的细胞毒性基团活性比它们类似的六元环对应物高 5—50 倍,例如 3-吡咯啉-1-基-DOX (Q₅)和 3-吡啶-1-基-DOX (Q₇)以及 2-吡咯啉-1-基-DOX (Q₆)和 1,3-四氢-吡啶-1-基-DOX (Q₈)。

表 17-1: 在体外阿霉素和其道诺糖胺修饰
的衍生物对 MCF 人乳腺癌细胞系的作用

化合物	培养时间 (小时)	在下列浓度(M)时的 T/C 值					
		3×10^{-10}	10^{-9}	3×10^{-9}	10^{-8}	3×10^{-8}	10^{-7}
阿霉素 (DOX)	70				98	82	54
	120				95	66	33
吡咯烷-1-基- 阿霉素(Q ₂)	70				97	25	-26
	120				94	17	-19
哌啶-1-基-阿霉素 (AN-183)	70			114	70	4	
	120			109	67	0	
异二氢氮杂茛 -2-基-阿霉素(Q ₃)	70				118	86	-11
	120				108	77	-29
3-吡咯啉-1-基- 阿霉素(Q ₄)	70			106	72	-3	
	120			97	65	-5	
3-吡咯烷酮 -1-基-阿霉素(Q ₅)	70			87	30	-28	
	120			67	25	-10	
3-哌啶酮 -1-基-阿霉素(Q ₇)	70			96	80	59	
	120			97	70	43	
2-吡咯啉 -1-基-阿霉素(Q ₆)	70	50	-3	-18			
	120	26	2	-9			
1,3-四氢吡啶 -1-基-阿霉素(Q ₈)	70	96	88	69			
	120	99	93	62			

在 96 孔平板上将细胞培养于含 5% HI-DCC-FBS(热失活葡聚糖包被活性炭处理的胎牛血清)的 IMEM 培养基中。通过结晶紫染色法确定处理和对照平板中的相对细胞数目,并以 T/C 值表示,其中 $T/C = (T - C_0) / (C - C_0) \times 100$ [T = 处理组培养物的吸光率, C = 对照培养物的吸光率, C₀ = 培养开始时的培养物的吸光率(t = 0)。测得的吸光率与细胞数目成正比]。较低的 T/C 值说明由于处理而导致的癌细胞存活的减少。即 75 表示与对照 100% 相比,75% 的细胞存活或 25% 抑制。

实施例 18

DOX 在 LH-RH 激动剂肽结合物 $Q_1^{14}\text{gL}$ 中和超活性 2-吡咯啉-1-基-DOX(Q_6)在 LH-RH 激动剂肽结合物 $Q_6^{14}\text{gL}$ 中的体外细胞毒活性的充分保留。

表 18-1 表明在体外,分别与其与 LH-RH 激动剂类似物的结合物[D-Lys⁶]LH-RH($Q_1^{14}\text{gL}$ 和 $Q_6^{14}\text{gL}$)相比,阿霉素和其道诺糖胺修饰衍生物 2-吡咯啉-1-基-阿霉素(Q_6)对 MCF-7 人乳腺癌细胞系及 MXT 雌激素依赖小鼠乳腺癌细胞系生长的影响。

表 18-1:

化合物	培养时间 (小时)	在以下浓度(M)时的 MCF-7 细胞系的 T/C 值							
		3×10^{-11}	10^{-10}	3×10^{-10}	10^{-9}	3×10^{-9}	10^{-8}	3×10^{-8}	10^{-7}
阿霉素*	70						98	82	54
	120						95	66	33
$Q_1^{14}\text{gL}$	70						111	89	63
	120						78	55	28
Q_6	70		50		-3	-18			
	120		26		-2	-9			
$Q_6^{14}\text{gL}$	70		74		28	-24			
	120		60		16	-14			
化合物	培养时间 (小时)	在下列浓度(M)时的 MXT 细胞系的 T/C 值							
		3×10^{-11}	10^{-10}	3×10^{-10}	10^{-9}	3×10^{-9}	10^{-8}	3×10^{-8}	10^{-7}
阿霉素	26						85	90	59
	50						74	60	43
$Q_1^{14}\text{gL}$	26						87	91	73
	50						71	59	50
Q_6	28	90	78	56					
	69	52	6	-13					
$Q_6^{14}\text{gL}$	28	91	78	64					
	69	59	15	-11					

在 96 孔平板上, 将 MCF-7 细胞培养在含 5% HI-DCC-FBS 的 IMEM 培养基中。将 MXT 细胞培养在含 0.6g/L L-谷氨酰胺和 10% FBS 中的 RPMI 1640 培养基中。

* 如表 17-1 所示进行测定。

实施例 19

表 19-1 表明本发明含 DOX 的促生长素抑制素类似物的体外细胞毒活性被充分保留。

表 19-1: 在体外含阿霉素的细胞毒性促生长素抑制素类似物对 MIIA PaCa-2 人胰癌细胞系生长的作用

化合物	培养时间 (小时)	在下列在浓度(M)时的 T/C 值		
		10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}
DOX ¹⁴ -O-glt-S-98* (Q ₁ ¹⁴ gS ⁹⁸)	28	93	95	32
	76	103	11	-3
载体类似物 S-98*	28	-	-	96
	76	-	-	98
DOX ¹⁴ -O-glt-S-121** (Q ₁ ¹⁴ gS ¹²¹)	28	93	82	35
	76	97	10	-4
载体类似物 S-121**	28	-	-	76
	76	-	-	96
阿霉素	28	95	64	-28
	76	71	10	-7

在 96 孔平板上, 将细胞培养在含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中。

*D-Trp-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-NH₂;

**D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH₂;

实施例 20

在体外,含阿霉素的铃蟾肽拮抗剂的细胞毒类似物对 CFPAC-1 人胰癌细胞系生长的影响

表 20-1 表明本发明含 DOX 的铃蟾肽拮抗剂类似物的体外细胞毒活性被充分保留。

表 20-1

化合物	培养时间 (小时)	在下列浓度(M)时的 T/C 值			
		3×10^{-8}	10^{-7}	3×10^{-7}	10^{-6}
DOX ¹⁴ -O-glt	66	95	81	44	9
B-94	95	95	57	28	4
(Q ₁ ¹⁴ gB)	137	94	28	19	0
B-94*	66	99	106	104	100
	95	97	99	99	96
	137	98	98	100	96
DOX ¹⁴ -O-glt-B-50	66	102	78	39	5
	95	97	55	24	-1
	137	92	28	19	-2
B-50**	66	100	93	99	93
	95	98	100	102	98
	137	97	98	99	98
DXO	66	88	52	15	-7
	95	73	32	10	-6
	137	49	20	7	-4

在 24 孔平板上,将细胞培养在含 10% 胎牛血清的 IMDM 培养基中。

* Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu- ϕ (CH₂-N)-Leu-NH₂

* D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu- ϕ (CH₂-N)-Tac-NH₂

激素衍生物被保留的结合特性。

实施例 21

与载体肽[D-Lys⁶]LH-RH相比,细胞毒性 LH-RH 激动剂类似物 Q₁¹⁴gL(带有阿霉素的[D-Lys⁶]LH-RH)和 Q₆¹⁴gL(带有 2-吡咯啉-1-基-阿霉素的[D-Lys⁶]LH-RH)的激素活性及受体结合能力

表 21-1

化合物	激素活性* (相对于 LH-RH=1 的 LH-反应)	大鼠垂体受体的 IC ₅₀ * 值(nM)	乳腺癌受体 的 IC ₅₀ * 值(nM)
Q ₁ ¹⁴ gL	15	2.29	7.24
Q ₆ ¹⁴ gL	10	5.59	6.70
[D-Lys ⁶]LH-RH	8	2.26	1.80

在表 21-1 中

* 如 S. Vigh 和 A. V. Schally,《肽》5,241-247 (1984)中所描述,在分散的大鼠垂体细胞超灌注系统中确定 LH 对类似物的反应。

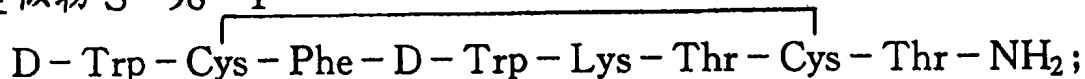
* * 如 B. Szoke 等,《肽》,15(2),359-366 (1994)中所描述,在使用[125I]标记的[D-Trp⁶]LH-RH 作为放射性配体的竞争性结合实验中测定类似物与大鼠垂体 LH-RH 受体和人乳腺癌受体的结合亲和性。结合亲和性用 IC₅₀ 值表示,即抑制 50%的放射性配体的特异性结合所需的未标记类似物的浓度。

实施例 22

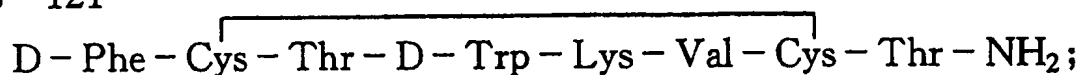
如 Carlson 等所描述,促生长素抑制素类似物抑制生长激素(GH)从灌注的大鼠垂体释放,“释放促甲状腺素的激素刺激而促生长素抑制素抑制生长激素从灌注的大鼠腺垂体释放”,《内分泌学》,94,1709 (1974)。因此,该方法被用来将本发明的细胞毒促生长素抑制素类似物与它们的母体载体分子在它们的激素活性方面进行比

较。

分别与其细胞毒衍生物 $Q_1^{14}gS^{98-1}(DOX^{14}-O-glt-S-98-1)$ 和 $Q_1^{14}gS^{121}(DOX^{14}-O-glt-S-121)$ 相比,通过促生长素抑制素类似物 S-98-1



和 S-121



对人生长激素释放激素(hGH-RH(1-29)NH₂)的抑制诱导从超灌注的大鼠垂体细胞中释放生长激素。

在大鼠垂体超灌注系统中,以1nM促生长素抑制素和同时1nM hGH-RH(1-29)NH₂的剂量给药3分钟。再保持注入促生长素抑制素类似物6分钟。在灌注促生长素抑制素期间(0分钟)及给药结束后30、60和90分钟时测定GH对1nM hGH-RH(1-29)NH₂的3分钟给药的反应。数据示于表22-1中。

表 22-1

促生长素抑制素类似物	在灌注促生长素抑制素类似物后的不同时间里通过3分钟给药1nM hGH-RH(1-29)NH ₂ 所诱导的GH的释放**			
	0分钟	30分钟	60分钟	90分钟
S-98-1	2.9	94.7	117.6	—
$Q_1^{14}gS^{98}$	0	90	89.7	—
S-121	7.8	62.2	57.3	77.9
$Q_1^{14}gS^{121}$	8.8	58.5	54.3	67.7

**以占在给予促生长素抑制素类似物之前,由注入3分钟1nM hGH-RH(1-29)NH₂所诱导的GH释放的百分数来表示。

实施例 23

使用细胞毒性铃蟾肽拮抗剂对受体结合的研究

如前面(1)所描述,使用 Bio-Rad Enzymobead Radio 碘化试剂盒进行 [Tyr^4]BN (Sigma) 的放射碘化作用和分离单碘化 [^{125}I - Tyr^4]BN。用 Kris 等(3)方法的改进方法(2),在 24 孔平板中使用铺满的 Swiss 3T3 细胞(从美国典型培养物保藏中心获得)进行标记的 [Tyr^4]BN 的结合及由细胞毒铃蟾肽拮抗剂类似物 Q_6^{14} gB 的取代。接种 3-5 天后,将铺满的细胞用 Hanks' 平衡盐溶液(HBSS)洗涤两次,并在总体积为 0.5ml 的结合缓冲液中(含有 50mM HEPES, 0.1% 牛血清白蛋白(BSA), 5mM MgCl_2 和 100ug/ml 杆菌肽的 DMEM, pH:7.4),在不存在或存在几种浓度的未标记竞争物(Q_6^{14} gB 或 BN)的情况下,在 37℃ 下将其与 50pM [^{125}I - Tyr^4]BN 保温 30 分钟。测定存在 1uM 未标记配体时的非特异性结合。在用含 0.1% BSA (pH=7.4) 的冰冷 HBSS 洗涤三次后,将细胞用 0.05% 胰蛋白酶/0.53mM EDTA 溶液洗脱并转移至试管中。用 γ -计数器 (Micromedic Systems Inc, Huntsville, AL) 测定放射性。使用 McPherson (4) 的放射配体结合分析程序评价结合数据。示于表 23-1 中的 K_i 值根据 Cheng 和 Prusoff (5) 公式计算得出。

1. Halmos 等, 癌症通讯, 85, 111-118 (1994)
2. Cai, 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 12664 - 12668, (1994)
3. Kris, 等, 生物化学杂志, 262: 11215-11220, (1987)
4. McPherson, G. A. 药理学方法杂志, 14: 213-228, (1985)
5. Cheng 和 Prusoff, 生物化学药理学, 22: 3099-3108, (1973)

表 23-1

与铃蟾肽比较,细胞毒性铃蟾肽拮抗剂 Q_6^{14} gB (2-吡咯啉-1-基- DOX^{14} -O-glt-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-leu- ψ -(CH_2 -N)Leu-NH₂ 与 Swiss 3T3 细胞系中的铃蟾肽受体的特异性结合的鉴定

化合物	Ki(nM)
铃蟾肽	1.2
Q ₁ ¹⁴ gB	1.0

与单独的细胞毒基团比较,激素结合物的有效性和细胞毒性
 实施例 24

用 2-吡咯啉-1-基-DOX(Q₆)细胞毒性 LH-RH 激动剂类似物 Q₆¹⁴gL (与 Q₆¹⁴-O-半戊二酸酯相连的[D-Lys⁶]LH-RH) 和(DOX)处理雌激素依赖性的 MXT 小鼠乳腺癌(KS-49)

为了比较细胞毒性阿霉素衍生物 Q₆ 和其被靶向细胞毒性肽结合物 Q₆¹⁴gL 以及熟知的抗肿瘤剂 DOX 的肿瘤抑制活性,并确定最佳给药方式和无毒剂量,将 LH-RH 受体阳性 MXT(3.2)ovex 肿瘤块(1mm³)移植入雌性 B₆D₂F₁ 小鼠中。移植 1 天后,将小鼠随机分成五个动物组并开始处理。将化合物溶于 0.1% 三氟乙酸(pH2)中并腹膜内给药。分组、处理方案及剂量以及平均存活时间示于表 24-1 中。结果总结在表 24-2 和图 1 中。

表 24-2 表明 Q₆ 和细胞毒性 LH-RH 类似物 Q₆¹⁴gL 处理对肿瘤体积及患有雌激素依赖性乳腺癌的小鼠的存活时间的作用。如表 24-2 所示,在第 1,2,7,8,14 和 15 天(组 2)给药 1.25nmol Q₆ 产生强烈的毒性,平均存活时间为 17.4 天,明显短于未处理对照组。相比之下,相同剂量的 Q₆¹⁴gL(组 6)产生 30.8 天的平均存活时间,这明显长于未处理对照组。也可通过比较组 2(在 16 天时为 1065mm³)和组 6(在 31 天时为 863mm³)的平均最终肿瘤体积来证明 Q₆¹⁴gL 比 Q₆ 高的功效。

在不同处理方案中,其中一周中五天给予 0.5nmol 药物并连续给药三周,比较 Q₆ 和 Q₆¹⁴gL 来证明相似的结论。

毒性剂量的阿霉素(总量:1560nmol,平均存活时间:20 天)不能根除肿瘤,而用非毒性剂量(总量:7nmol,平均存活时间:>31 天)的

Q_6^{14} gL 处理导致 5 只中 2 只动物存活, 并且肿瘤没有发展。

表 24 - 1

组号	给药	剂量/注射 (nmol)	剂量/注射 (μ g)	注射/周	注射之间 的天数	给药 周数	获得的 总量	平均存活 天数*
1	对照							22
2	Q_6	1.25	0.92	2	5	3	7.5	17.5
3	Q_6	0.5	0.37	5	2	3	7.5	19.6
4	Q_6	0.25*	0.19	5	2	3	9.5	14.6
5	Q_6	0.2	0.15	5	2	3	21	13.0
6	Q_6^{14} gL	1.25	2.9	2	5	3	7.5	30.8
7	Q_6^{14} gL	0.5	1.16	5	2	3	7.5	26.8
8	Q_6^{14} gL	0.25*	0.58	5	2	3	9.5	18.4
9	Q_6^{14} gL	0.2	0.46	5	2	3	21	13.6
10	Q_6^{14} gL	3.5	8.12	1	6	2	7	>31
11	Q_6^{14} gL	4	9.28	1	6	2	8	
12	Q_6^{14} gL	5	11.6	1	6	2	10	13.4
13	DOX	520	340	1	6	3	1560	20.0

*从第 9 天至第 12 天, 将剂量提高到 2.5nmol

从第 9 天至第 12 天, 将剂量提高到 5.0nmol

*存活

表 24-2

号	组	给药方式					最终 肿瘤 体积 (mm ³)	测量时 所处的 天数	平均存活时 间(天)	每组 5 只小 鼠中没有肿 瘤的存活小 鼠个数	
		剂量 /注 射	每周注 射的次 数	注射之 间的间 隔(天 数)	处理的 时 间 (周)	注射 的总 量				在第 18 天	在第 31 天
1	对照组						7322	21	22.0±1.6	0	0
2	Q ₆	1.25	2	5	3	7.5	1065	16	17.4±0.2	0	0
6	Q ₆ ¹⁴ gL	1.25	2	5	3	7.5	863	31	30.8±0.4 * *	2	0
3	Q ₆	0.5	5	2	3	7.5	2531	18	19.6±0.7	0	0
7	Q ₆ ¹⁴ gL	0.5	5	2	3	7.5	3978	31	26.8±2.6 * *	1	0
10	Q ₆ ¹⁴ gL	3.5	1	6	2	7	669	31	>31 * *	4	2
12	Q ₆ ¹⁴ gL	5.0	1	6	2	10	0	10	13.4	0	0
13	DOX	520	1	6	3	1560	1560	28	20	1	0

* * 使用 Duncan's 检验, 与对照数据相比存活时间明显较长($p < 0.01$), 存活时间明显较短($p < 0.01$)或($p < 0.05$)。

实施例 25

仅用(DOX)、细胞毒 LH-RH 类似物 T-107 和 Q₁¹⁴gL 处理, 对雌激素依赖性 MXT 小鼠乳腺癌的作用(KS-55)

试验化合物:

Q₁¹⁴gL: 与 [D-lys⁶]LH-RH 相连的阿霉素¹⁴-O-半戊二酸酯

T-107: 与 [D-lys⁶]LH-RH 相连的 N-戊二酰-阿霉素
Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 89. pp.972-976 (1992)); 和

DOX

分析如下进行:

为了确定最大耐受剂量并比较效果, 将 MXT(3.2)ovex 肿瘤块

(1mm³)皮下移植入雌性 B₆D₂F1 小鼠。移植 1 天后,将小鼠随机分成五个动物组,用腹膜内单次注射处理它们。分组和注射示于表 25-1 中。此表还表明当测量体积时仍患有肿瘤的小鼠的数目和组的平均存活时间。肿瘤体积变化示于图 2 中。化合物溶解在 0.1% TFA(pH:2.0)中。在第 10,13,17 和 20 天时测量肿瘤体积。

如表 25-1 和图 2 所示,剂量为 850nmol/20g 小鼠的 T-107, (即与[D-Lys⁶]LH-RH 相连的 N-戊二酰-DOX)在抑制肿瘤生长中完全无效。相反,剂量为非毒性剂量 650nm/20g 小鼠的 Q₁¹⁴gL (与[D-Lys⁶]LH-RH 相连的 14-O-戊二酰-DOX)对肿瘤生长产生强烈的抑制(图)。单剂为 650nmol/20g 小鼠的单独的 DOX 具有很高的毒性(平均存活时间:13.6 天)并且功效明显较差于 Q₁¹⁴gL (图 2)。

表 25

号	组	剂量			具肿瘤小鼠的数目/存活小鼠的数目				平均存活时间,天数
		nmol/ 20g	μg/ 20g	μmol/ kg	天 10	天 13	天 17	天 20	
1	对照组				5/5	5/5	5/5	5/5	21.2 ± 0.3
2	Q ₁ ¹⁴ gL	680	1520	34	1/4	2/4	2/4	3/4	28.6 ± 693
3	Q ₁ ¹⁴ gL	710	1587	35.5	2/4	3/4	3/4	3/4	5.3 ± 25* 26.0 ± 663
4	Q ₁ ¹⁴ gL	760	1698	38	3/5	4/5	4/5	(死亡)	2.0 ± 34* (死亡)
5	DOX	650	427	32.5	3/3	2/2	1/1	1/1	13.6 ± 25
6	DOX	700	460	35	2/3	2/3	2/2		15.2 ± 24
7	DOX	750	493	37.5	1/1				7.8 ± 1.3
8	T-107	750	1676	37.5	5/5	5/5	5/5	4/4	21.8 ± 05
9	T-107	850	1900	44.4	5/5	5/5	5/5	4/4	21.6 ± 07

* 存活时间明显短于对照组(p<0.01)

** 与对照组相比,存活时间明显较长(p<0.01)或* (p<0.05)(在

第2天意外死亡的一只小鼠从这两组中除去)。

实施例 26

细胞毒性 LH-RH 类似物对雌激素依赖性 MXT 小鼠乳腺癌的作用(KS-47)

用于处理的物质

在一个以前的实验中,日剂量为 20nmol 的 Q_2 处理 17 天对肿瘤生长仅具有中等抑制作用,并在为 40nmol 剂量时具有毒性(平均存活时间为 14.6 天)。选择了日剂量为 30nmol 用于本实验,该实验比较 $Q_2^{14}gL$ (与 $[D-Lys^6]LH-RH$ 相连的 Q_2)、 Q_2 (吡咯啉-1-基-阿霉素)、 $[D-Lys^6]LH-RH$ 和 $[D-Lys^6]LH-RH + Q_2$ 的功效和毒性。

将 MXT(3.2)ovex 肿瘤块($1mm^3$)移植入雌性 $B_6D_2F_1$ 小鼠中。移植 1 天后通过每天腹膜内注射开始处理并持续 12 天。如表 26-1 所示,所有组接受等摩尔量的化合物。在第 10、14 和 18 天测量肿瘤并计算肿瘤体积。数据示于表 26-1 和图 3 中。

用每日剂量为 30nmol 的道诺糖胺修饰的阿霉素类似物 Q_2 (吡咯啉-1-基-DOX)剂量对肿瘤生长产生强的抑制作用(肿瘤体积:在第 14 天时为 $144mm^3$,而对照组为 $1391mm^3$),但在实验结束之前,杀死了所有动物,产生严重的毒性(平均存活 17.9 天)。类似地, Q_2 与 $[D-Lys^6]LH-RH$ 混合(混合物)产生强的肿瘤抑制作用(肿瘤体积,在第 14 天时为 $80mm^3$),但平均存活时间(18.5 天)明显短于未处理对照组(23.1 天)。作为用 $Q_2^{14}gL$ (与 $[D-Lys^6]LH-RH$ 共价结合的 Q_2)的处理结果,两个动物死亡,一个在第 16 天,另一个在第 26 天死亡。从 8 个存活动物中,仅一个在第 18 天最后的测量中肿瘤发展,并且它们均看来很健康,但后来它们均开始长出肿瘤。该组的平均存活时间明显较长(28.3 天)于对照组。单独用 $[D-Lys^6]LH-RH$ 类似物处理不影响肿瘤生长。

该实验表明 $Q_2^{14}gL$ 比细胞毒性基团 Q_2 具有更高的功效和较低的外周毒性是由于细胞毒基团与靶向载体 LH-RH 类似物的共价结合的结果。

表 26-1

细胞毒 LH-RH 类似物对雌激素依赖性 MXT 小鼠乳腺癌生长及患有肿瘤的小鼠的存活时间的作用

号	处理	剂量 ($\mu\text{g}/\text{天}$)	小鼠 的数 目	在下面时间的平均 肿瘤体积(mm^3)			移植后的平均 存活时间(天 数)
				10	14	18	
1	对照组		15	253	1391	4794	23.1
2	Q_6^{14}gL	68.7	10	33	16	23	28.3*
3	Q_6	21.3	10	153	144	137	17.9
4	$[\text{D-Lys}^6]\text{LH-RH}$	48.0	10	165	1348	4003	23.5
5	$[\text{D-Lys}^6]\text{LH-RH}$ + Q_6	48.0 + 21.3	10	121	80	27	18.5

所有的日剂量为 30nmol 摩尔当量

明显短于对照组($p < 0.05$)

* 用 Duncan's 检验测得明显长于对照组($p < 0.01$)。

实施例 27

2-吡咯啉-1-基-DOX(Q_6)和细胞毒 LH-RH 激动剂类似物 Q_6^{14}gL (与 $[\text{D-Lys}^6]\text{LH-RH}$ 相连的 $\text{Q}_6^{14}-\text{O}-$ 半戊二酸酯)对雄激素依赖性大鼠 Dunning R-3327-H 前列腺癌生长的作用。

将患有激素依赖性 Dunning R-3327-H 前列腺癌的雄性哥本哈根大鼠用 Q_6^{14}gL , 一种由与 2-吡啶啉-1-基-阿霉素相连的激动剂 $[\text{D-Lys}^6]\text{LH-RH}$ 组成的促黄体生成素释放激素(LH-RH)的新细胞毒类似物进行处理。在第一个实验中, 将 2-吡咯啉-1-基-阿霉素以 50nmol/kg 的浓度作为单一药物(Q_6)和与 $[\text{D-Lys}^6]\text{LH-RH}$ 的未结合混合物或与载体 $[\text{D-Lys}^6]\text{LH-RH}$ 结合(Q_6^{14}gL)的形式给药。第二次以 50nmol/kg 单独的基团 Q_6 或与 $[\text{D-Lys}^6]\text{LH-RH}$ 混合给药后, 所有大鼠死亡, 表示全身毒性症状, 而用

细胞毒 LH-RH 结合物 Q_6^{14} gL 处理的所有动物存活。使用 150nmol/kg Q_6^{14} gL 的总剂量处理 5 周后, 将肿瘤从实验开始时的 $8.35 \pm 1.7\text{cm}^3$ 的最初体积减至 $4.47 \pm 0.8\text{cm}^3$, 而对照组的肿瘤继续生长, 并测得为 $17.84 \pm 2.2\text{cm}^3$ 。用 Q_6^{14} gL 的治疗还明显降低了肿瘤的重量和肿瘤的负担。在设计用来比较 Q_6 和 Q_6^{14} gL 的功效率和毒性的第二个实验中, 治疗方案由 3 次给予 25nmol/kg Q_6 或 25nmol/kg 和 50nmol/kg Q_6^{14} gL 组成。当处理开始时, 所有组的肿瘤体积在 $3.9 - 4.5\text{cm}^3$ 之间。处理 5 周后, 用 50nmol/kg Q_6^{14} gL 处理的大鼠中的肿瘤减少至 $2.3 \pm 0.51\text{cm}^3$, 然而与未处理动物的 $15.6 \pm 2.2\text{cm}^3$ 相比, 25nmol/kg Q_6 仍然具有毒性, 并仅可将最终肿瘤体积减少至 $6.76 \pm 1.4\text{cm}^3$, 类似于用 25nmol/kg Q_6^{14} gL 获得的结果 ($6.74 \pm \text{cm}^3$)。样本的组织学评价表明仅在 Q_6^{14} gL 处理组中有显著的有丝分裂细胞的减少。在未处理的 Dunning 肿瘤样本的膜上检测到具有高结合能力的 LH-RH 受体, 但在用 Q_6^{14} gL 处理后, 未能发现 LH-RH 的结合位点, AN-201 和 Q_6^{14} gL 的肿瘤生长的抑制还与 EGF 受体的结合能力的显著降低相关。如图 4-6 所示, 靶向的细胞毒 LH-RH 类似物 Q_6^{14} gL 为一种有效的抗肿瘤剂, 它导致大鼠 Dunning R-3327-H 前列腺癌的衰退。我们的研究还表明细胞毒 LH-RH 类似物 Q_6^{14} gL 比掺入的抗肿瘤基团(Q_6)的毒性更小, 并且在抑制肿瘤生长中明显更具活性。

实施例 27 的图说明:

图 4, 实验 I: 在由 3 次使用 50nmol/kg 激动剂 $[D-Lys^6]$ LH-RH 和 50nmol/kg 细胞毒 LH-RH 类似物 Q_6^{14} gL 组成的处理期间, 有大鼠 Dunning R-3327-H 前列腺癌移植物的雄性哥本哈根大鼠的肿瘤体积, 垂直线表示 SEM。借助于 Duncan's 新的多范围检验, 与对照相比 * $p < 0.05$; * * $p < 0.01$ 。由箭头表示的处理在第 1、8 和 29 天进行。

+ 用 Q_6 作为单一药物或与 $[D-Lys^6]$ LH-RH 的未结合混合物处理的动物在第二周死亡。在这两组中显示了在第 8 天记录的肿

瘤的体积。

图 5 实验 II: 用 25nmol/kg 2-吡咯啉-1-基-阿霉素(Q_6)、25nmol/kg 和 50nmol/kg 细胞毒 LH-RH 类似物 Q_6^{14} gL 处理, 对患有 Dunning R-3327-H 前列腺癌的大鼠的肿瘤体积的影响。垂直线表示 SEM。与对照相比 * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。由箭头表示的处理在第 1、8 和 29 天时进行了 3 次。

图 6, 实验 II: 用 25nmol/kg 2-吡咯啉-1-基-阿霉素(Q_6)、25nmol/kg 和 50nmol/kg 细胞毒 LH-RH 类似物 Q_6^{14} gL 处理, 对患有 Dunning R-3327-H 前列腺癌的哥本哈根大鼠的体重的影响。垂直线表示 SEM。与对照相比 * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。由箭头表示的处理在第 1、8 和 29 天时进行了 3 次。

实施例 28

对阿霉素(DOX)和定向细胞毒性 LH-RH 激动剂类似物 Q_1^{14} gL(与 $DOX^{14}-O-$ 半戊二酸酯相连的 $[D-Lys^6]$ LH-RH)对 OX-1063 人卵巢癌在裸鼠中生的作用的对比研究

人上皮卵巢癌细胞系 OV-1063 来自一 57 岁老年妇女卵巢的转移性乳头状囊状肿瘤(Horowitz 等(1985)肿瘤学 42, 332-337)。将 1 千万个 OV-1063 细胞皮下注射到三个裸鼠中去让肿瘤生长。将 1mm^3 的这些肿瘤块移植至 60 个动物中以用于体内抑制生长的研究。实验的目的是证实作为在 OV-1063 上存在 LH-RH 受体的结果, LH-RH 的细胞毒结合物比它所含的细胞毒基团 DOX 更为有效且毒性更小。因此, 将细胞毒 LH-RH 结合物的作用与 DOX、DOX 与载体分子的混合物、单独的载体以及未处理的对照组的作用进行比较。将化合物溶解在 0.9% 氯化钠水溶液中(生理盐水)。

将平均肿瘤大小为约 15mm^3 的小鼠分成六个组, 其中每组 9 只动物, 并在肿瘤移植七天后接受下面的处理: 组 1, 生理盐水; 组 2, Q_1^{14} gL, 剂量为 700nmol/20g 动物; 组 3, Q_1^{14} gL, 剂量为 413nmol/20g 动物(对于 DOX 的最大耐受剂量, MTD); 组 4, 413nmol/20g 动物(MTD)的 DOX; 组 5, 700nmol/20g DOX 与 700nmol/20g $[D-$

Lys⁶]LH-RH 的混合物;组 6,载体激动剂类似物[D-Lys⁶]LH-RH,剂量为 700nmol/20g 动物。

OV-1063 受体分析表明 LH-RH 的高亲和性结合位点的存在。

结果:如图 7 所示,用 413nmol/20g 剂量的 Q₁¹⁴g/L 处理(组 3)获得了对肿瘤生长的强的抑制作用。动物没有显示严重的毒性症状。与之相比,使用 413nmol/20g (12mg/kg, MTD, 组 4)相同剂量的 DOX 的处理在实验结束后仍存活的三个动物中没有产生明显的肿瘤生长的抑制。由于毒性,三个动物在第 5 天死亡,6 个动物在第 9 天死亡。在较高剂量时(700nmol/20g, 组 2),Q₁¹⁴g/L 显示出非常强的肿瘤生长抑制作用(图 7)。9 只动物中的两只死于毒性,1 只死于偶然。6 只存活动物在实验结束时从体重减少约 20% 中恢复过来。在组 6 中,将相同的大剂量(700nmol/20g)DOX 与 700nmol/[D-Lys⁶]LH-RH 混合。由于严重毒性产生的结果,这组所有动物在第 5 天时死亡。

结论:我们的结果清楚地表明由于在上皮卵巢癌 OV-1063 的细胞中存在 LH-RH 受体,靶向细胞毒性 LH-RH 结合物 Q₁¹⁴g/L 比其所含的细胞毒基团阿霉素(Q₁)显示出更低的毒性和更高的抗肿瘤活性。

图 1

KS-29中雌激素依赖性MXT小鼠乳腺癌
体积的变化 (斜体数字表示测定时存活的小鼠)

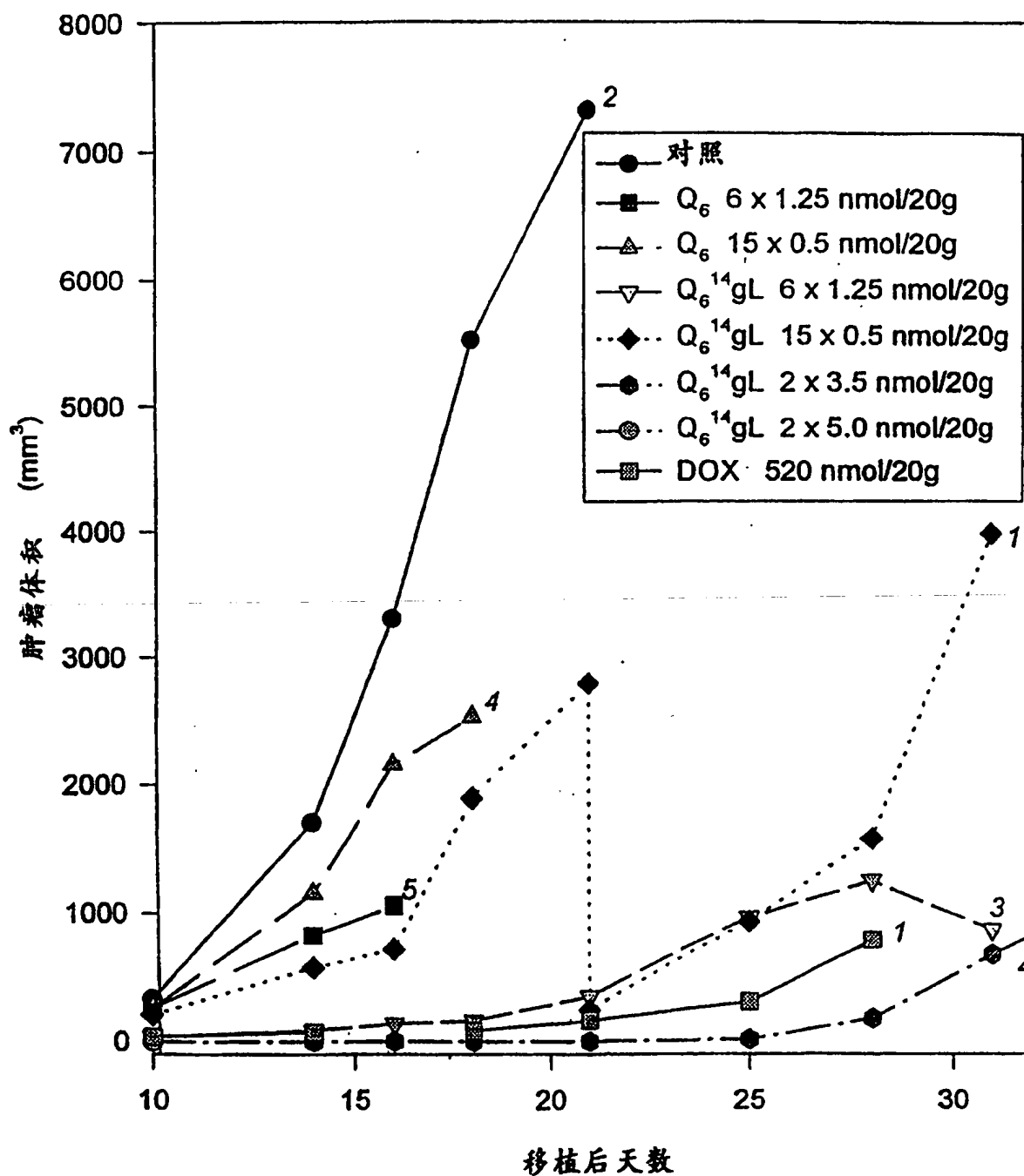


图 2

KS-55中雌激素依赖性MXT肿瘤的体积变化
(选择的组)

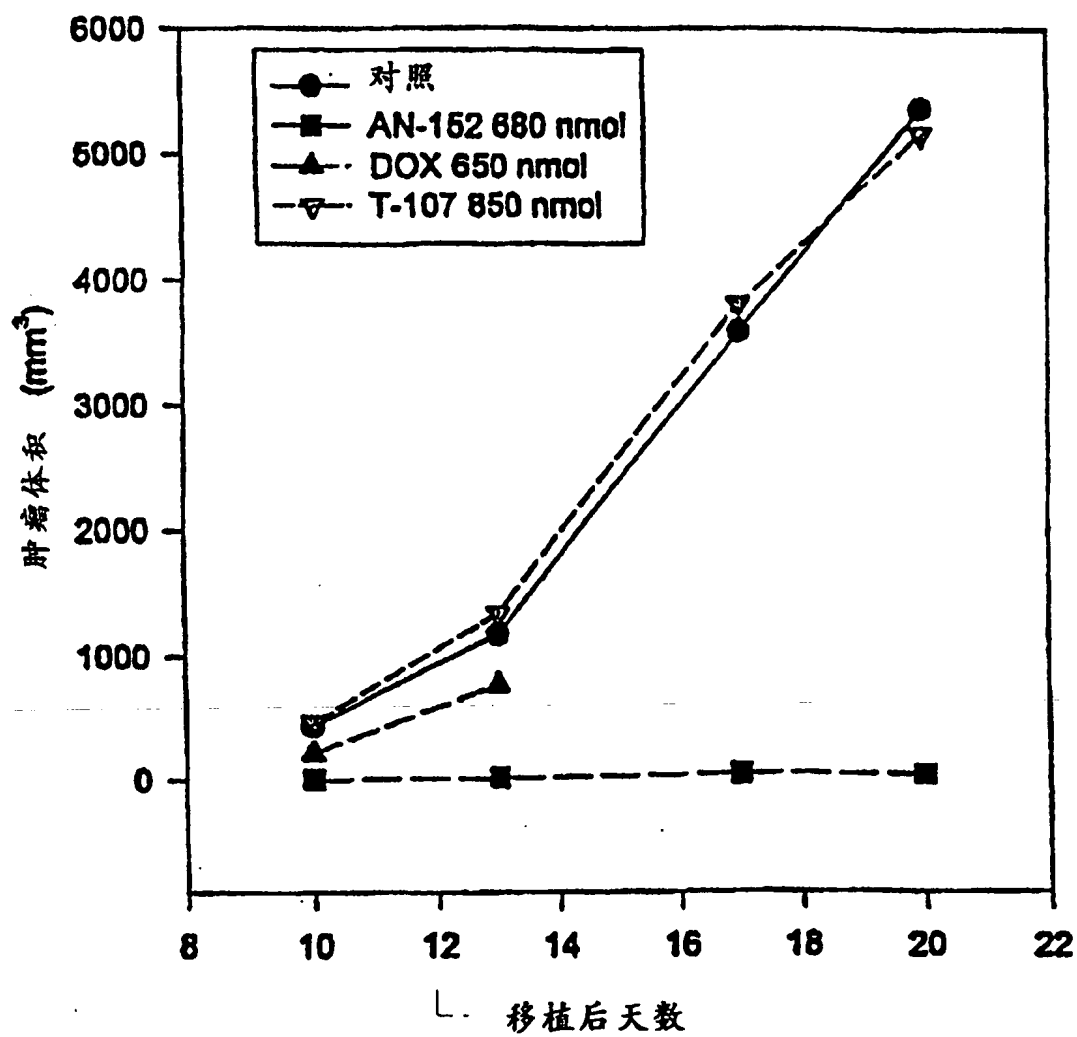


图 3

细胞毒性LH-RH类似物对雌激素依赖
性MXT肿瘤小鼠的存活影响

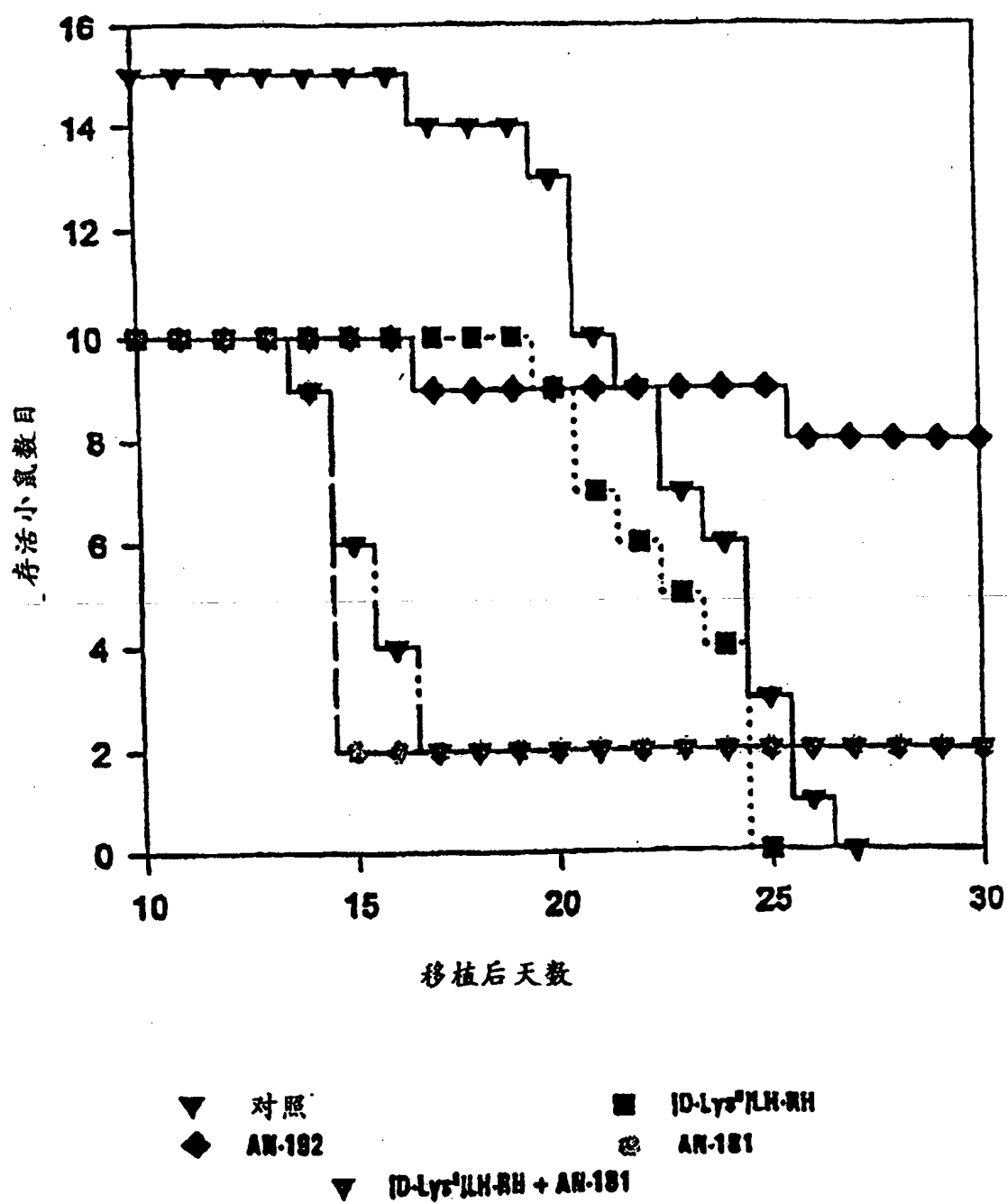


图 4

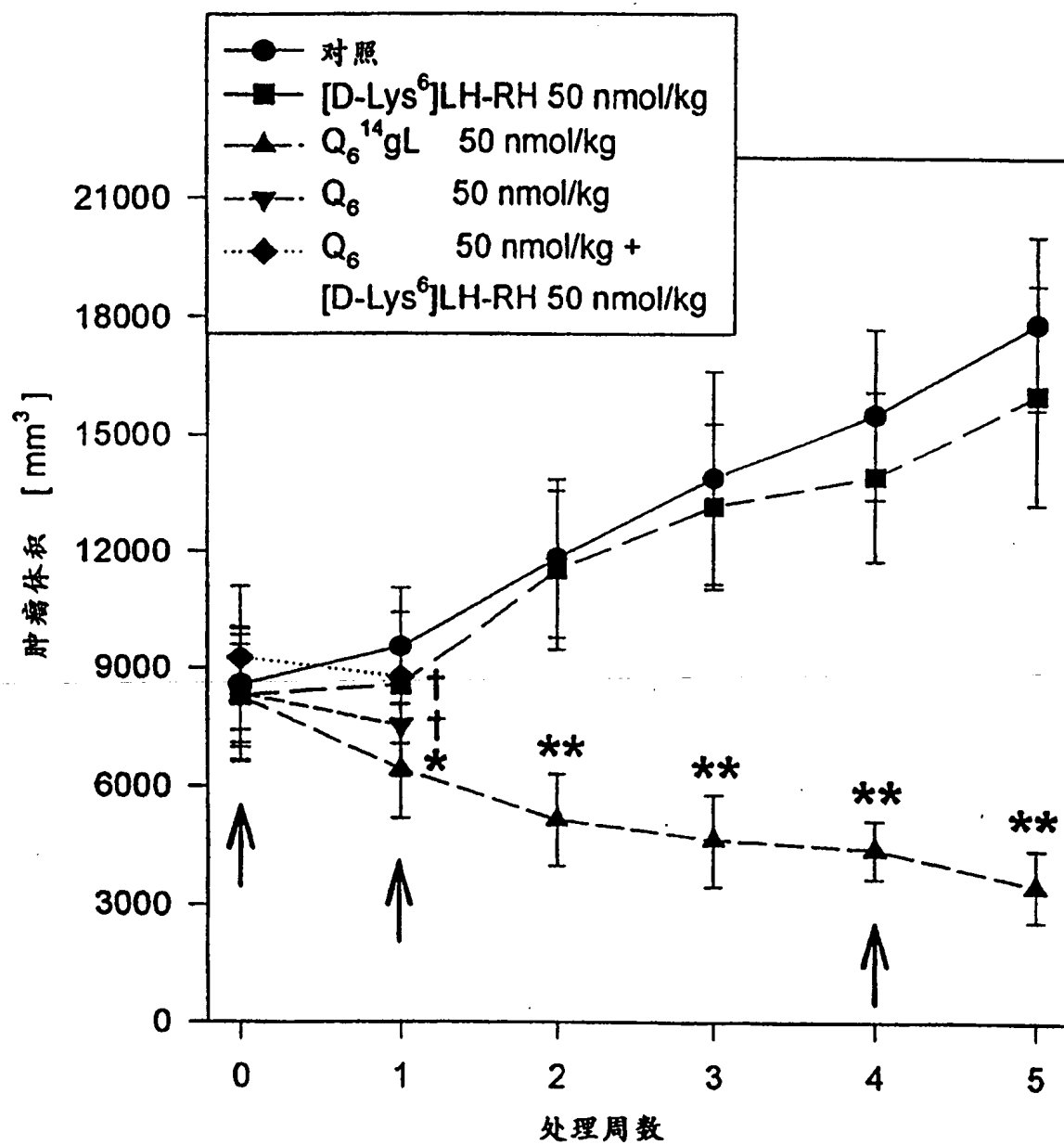


图 5

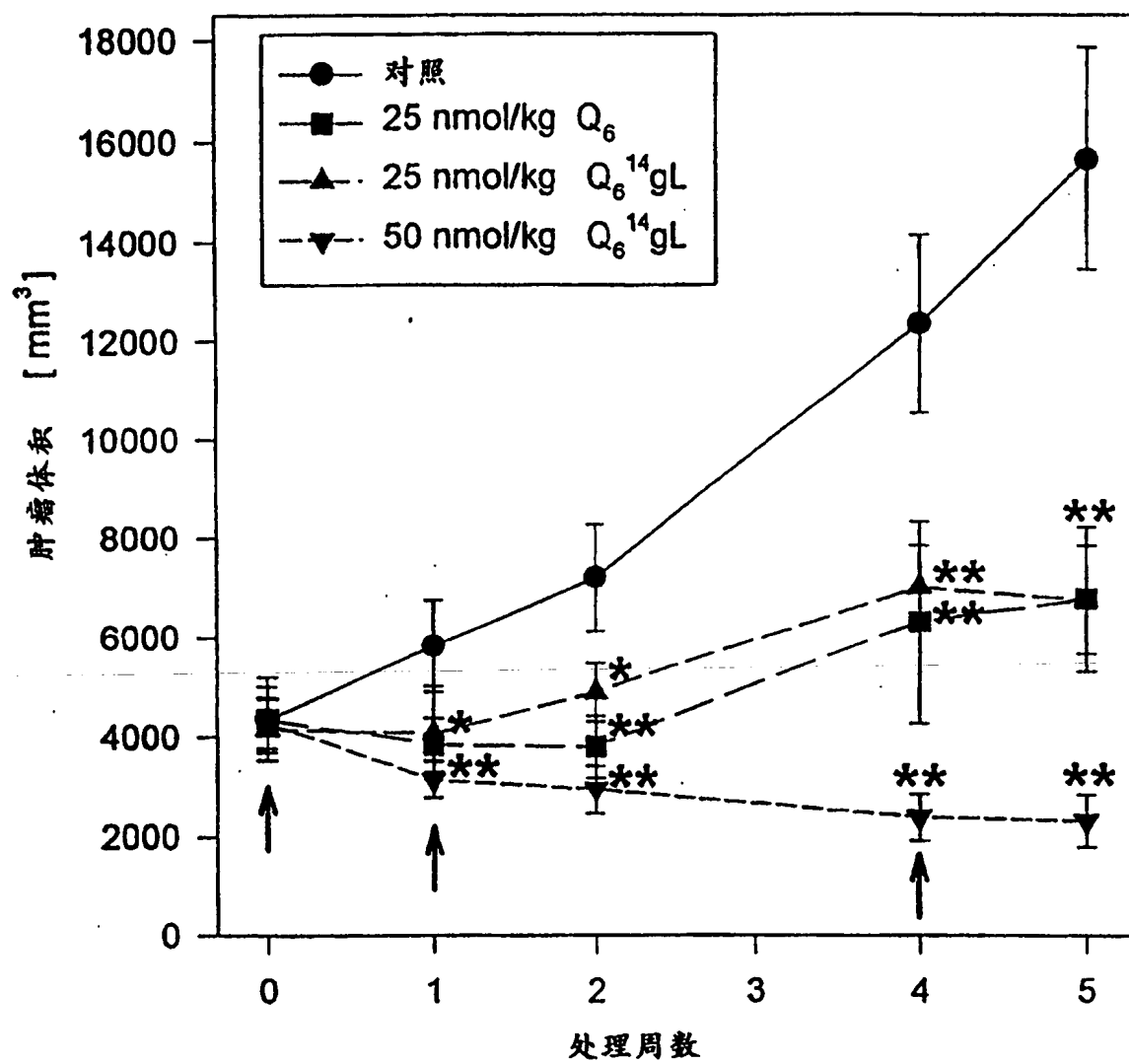


图 6

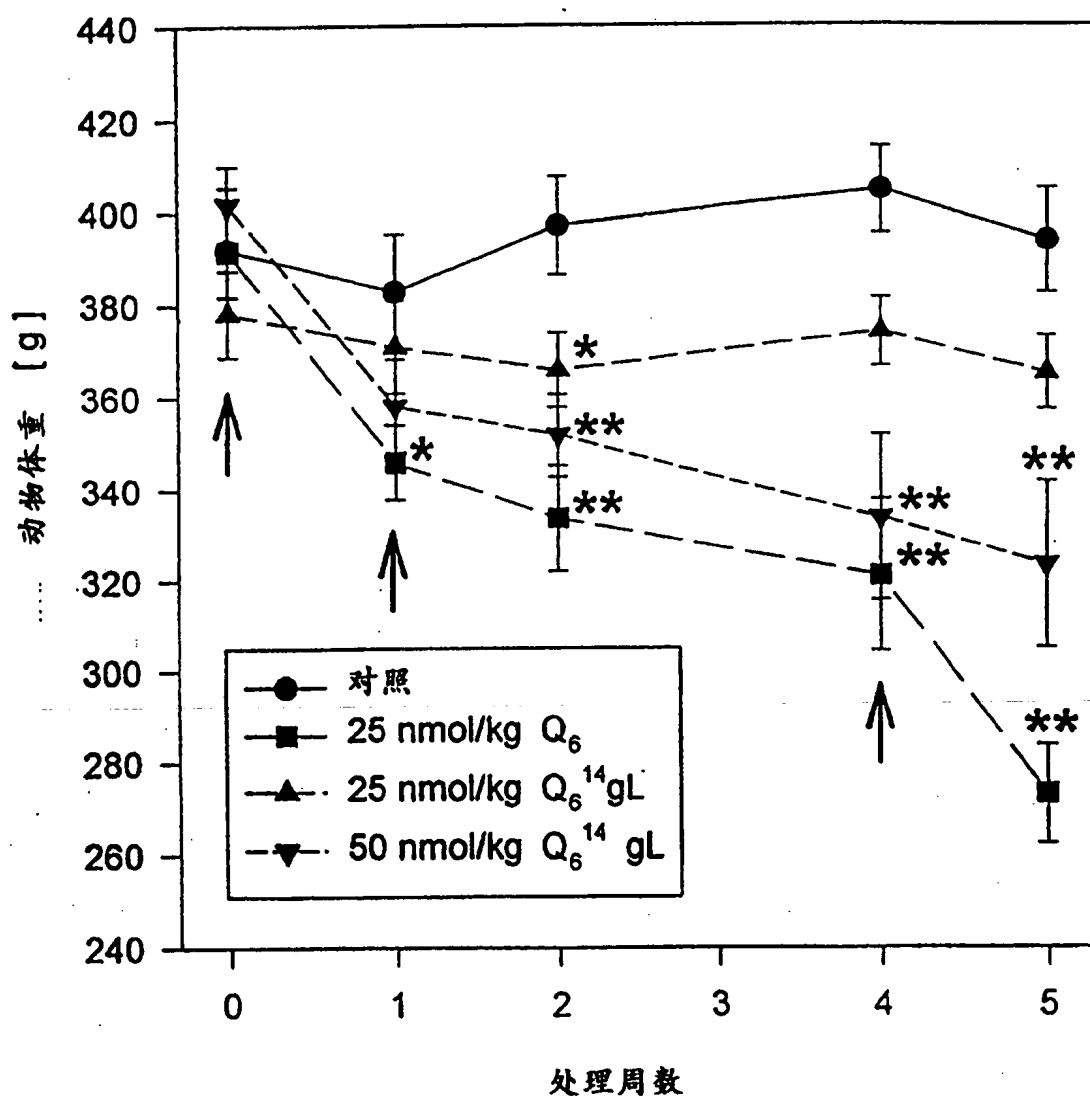
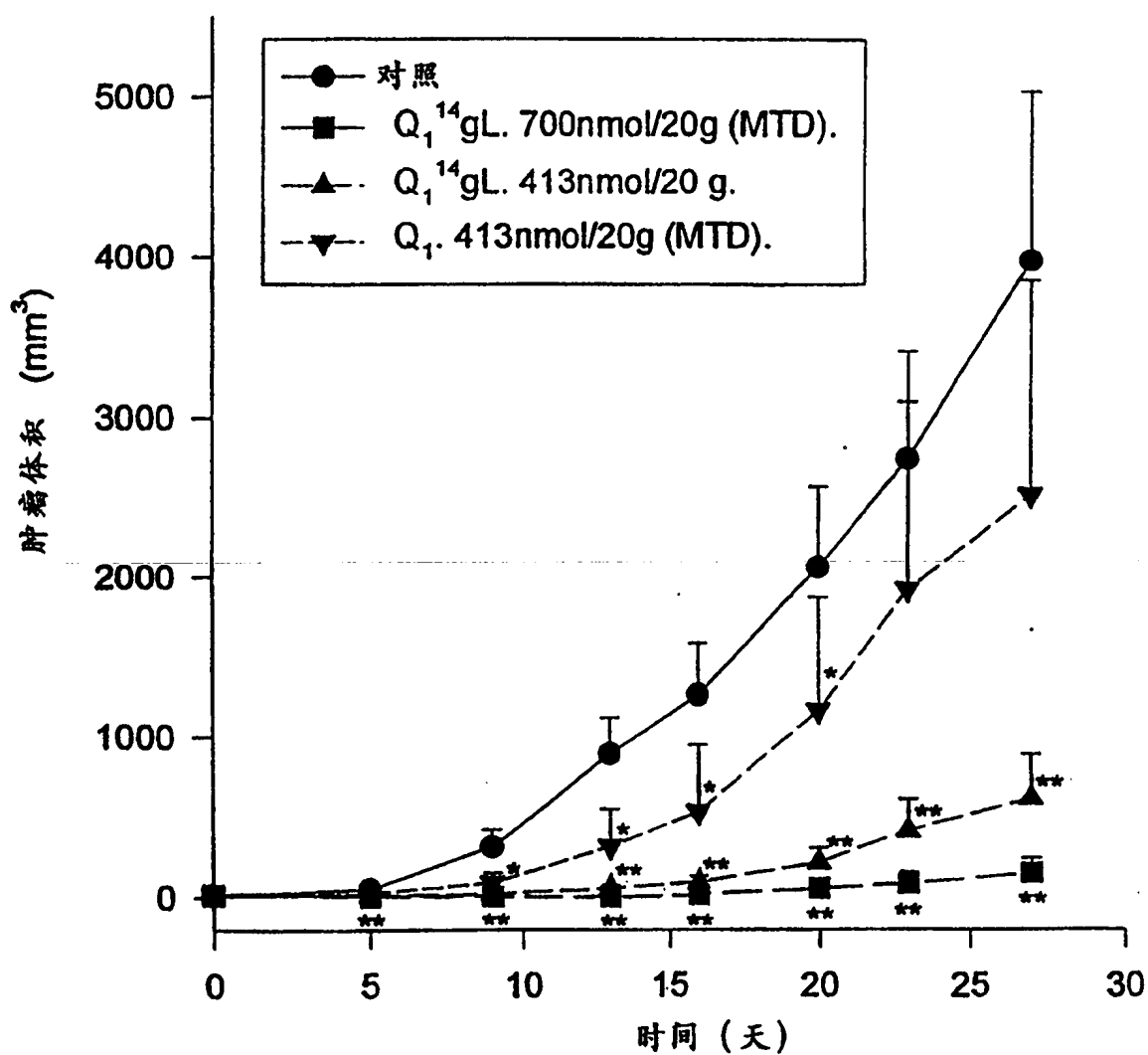


图 7

含阿霉素的LH-RH细胞毒性类似物 ($Q_1^{14}gL$)
和阿霉素 (Q_1) 对裸鼠中 OV 1063 人卵巢癌异种
移植物的生长抑制



* $p < .05$, ** $p < .01$

MTD; 最大耐受量