



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101877964 A

(43) 申请公布日 2010. 11. 03

(21) 申请号 200880108555. 0

(22) 申请日 2008. 09. 25

(30) 优先权数据

60/975, 437 2007. 09. 26 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 03. 24

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/077673 2008. 09. 25

(87) PCT申请的公布数据

W02009/042767 EN 2009. 04. 02

(71) 申请人 西乃山医学院

地址 美国纽约

申请人 克拉维斯制药股份有限公司

(72) 发明人 刘易斯·西尔弗曼 詹姆斯·霍兰

马里特·利兰·桑德沃尔德

芬恩·米伦

奥勒·亨利克·埃里克森

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

公司 11227

代理人 顾晋伟 韩宏星

(51) Int. Cl.

A01N 43/04 (2006. 01)

权利要求书 4 页 说明书 14 页 附图 1 页

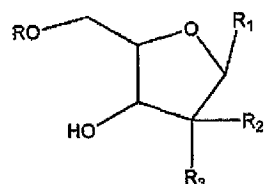
(54) 发明名称

氮杂胞苷类似物及其用途

(57) 摘要

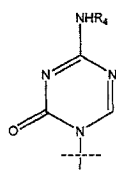
本发明涉及如下的式 (I) 化合物或其可药

用盐:

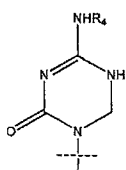


其中

(I),

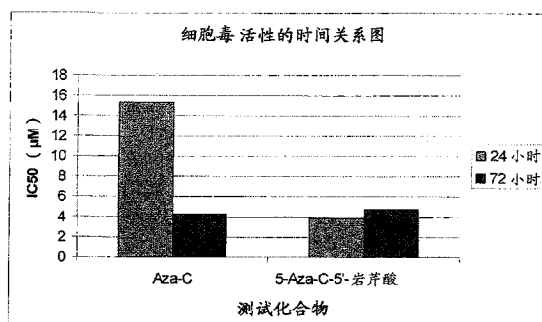
R 是 H、 $R_5C(O)$ 、 $R_5CH_2OC(O)$ 或 $R_5CH_2NHC(O)$; R_1 是

或

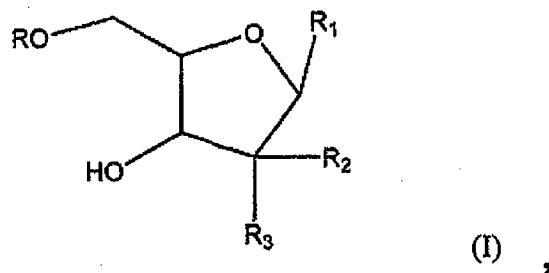


其中横虚线

表示 R_1 与式 (I) 分子相连所形成的键; R_2 和 R_3 独立地是 OH 或 H, 前提是 R_2 和 R_3 不同时是 OH; R_4 是 H、 $R_5C(O)$ 、 $R_5CH_2OC(O)$ 或 $R_5CH_2NHC(O)$, 前提是 R 和 R_4 不同时是 H; R_5 具有通式 $CH_3-(CH_2)_n-(CH=CH-CH_2)_m-CH=CH-(CH_2)_k-$; k 是 0-7 的整数; m 是 0-2 的整数; n 是 0-10 的整数。本发明还公开了制备和使用这些化合物的方法。



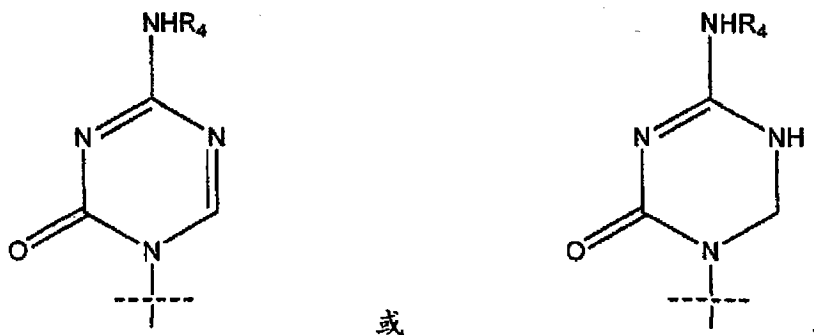
1. 式 (I) 化合物或其可药用盐：



其中

R 是 H、 $R_5C(O)$ 、 $R_5CH_2OC(O)$ 或 $R_5CH_2NHC(O)$ ，

R_1 是



其中横虚线表示 R_1 与式 (I) 分子相连所形成的键；

R_2 和 R_3 独立地是 OH 或 H, 前提是 R_2 和 R_3 不同时是 OH；

R_4 是 H、 $R_5C(O)$ 、 $R_5CH_2OC(O)$ 或 $R_5CH_2NHC(O)$, 前提是 R 和 R_4 不同时是 H；以及

R_5 具有通式 $CH_3-(CH_2)_n-(CH=CH-CH_2)_m-CH=CH-(CH_2)_k-$ ；

k 是 0-7 的整数；

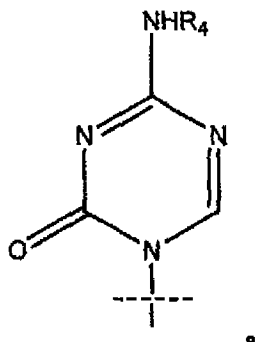
m 是 0-2 的整数；以及

n 是 0-10 的整数。

2. 权利要求 1 的化合物, 其中 k 是 4。

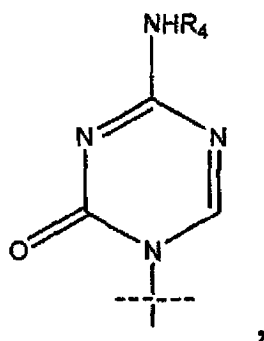
3. 权利要求 2 的化合物, 其中 n 是 10。

4. 权利要求 1 的化合物, 其中 R_1 是



5. 权利要求 4 的化合物, 其中 R_4 是 H。

6. 权利要求 1 的化合物, 其中 R 是 $R_5C(O)$, R_1 是



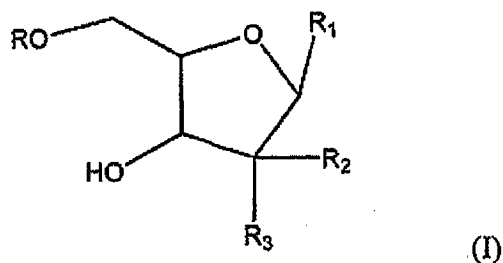
R_2 是 H, R_3 是 OH, R_4 是 H, k 是 4, m 是 0 以及 n 是 10。

7. 一种药物组合物,其含有权利要求 1 的化合物和可药用赋形剂、稀释剂和 / 或载体。

8. 一种治疗对象的肿瘤性病症的方法,所述方法包括:

选择患有肿瘤性病症的对象,以及

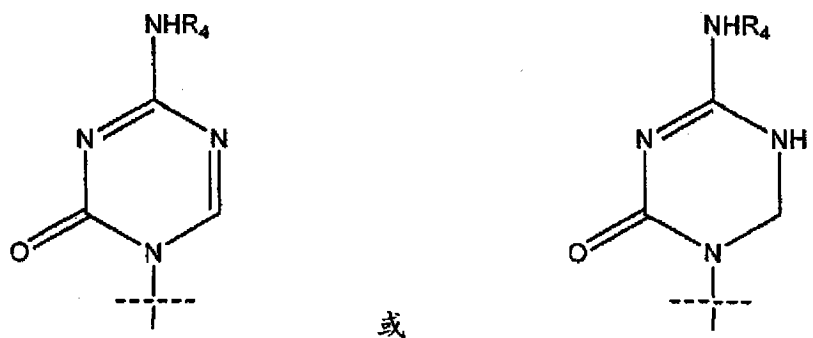
在有效治疗所述对象中所述肿瘤性病症的条件下向所述对象施用下式化合物或其可药用盐:



其中,

R 是 H、 $R_5C(O)$ 、 $R_5CH_2OC(O)$ 或 $R_5CH_2NHC(O)$;

R_1 是



其中横虚线表示 R_1 与式 (I) 分子相连所形成的键;

R_2 和 R_3 独立地是 OH 或 H, 前提是 R_2 和 R_3 不同时是 OH;

R_4 是 H、 $R_5C(O)$ 、 $R_5CH_2OC(O)$ 或 $R_5CH_2NHC(O)$, 前提是 R 和 R_4 不同时是 H; 以及

R_5 具有通式 $CH_3-(CH_2)_n-(CH=CH-CH_2)_m-CH=CH-(CH_2)_k-$;

k 是 0-7 的整数;

m 是 0-2 的整数; 以及

n 是 0-10 的整数。

9. 权利要求 8 的方法, 其中所述肿瘤性病症是癌性疾病。

10. 权利要求 9 的方法,其中所述癌性疾病是实体瘤或血液癌或恶性肿瘤。

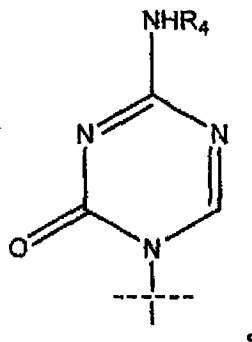
11. 权利要求 9 的方法,其中所述癌性疾病是白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤或骨髓增生异常综合征。

12. 权利要求 10 的方法,其中所述实体瘤是选自乳房、卵巢、前列腺、脑、膀胱和肺的组织癌症。

13. 权利要求 8 的方法,其中 k 是 4。

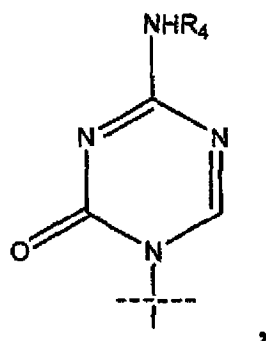
14. 权利要求 13 的方法,其中 n 是 10。

15. 权利要求 8 的方法,其中 R_1 是



16. 权利要求 15 的方法,其中 R_4 是 H。

17. 权利要求 8 的方法,其中 R 是 $R_5C(O)$, R_1 是

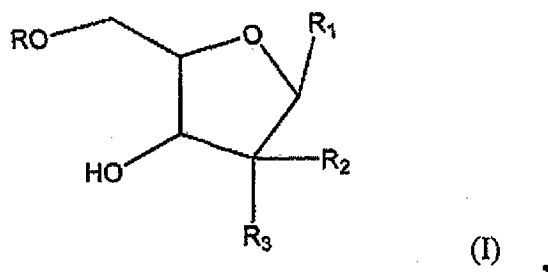


R_2 是 H, R_3 是 OH, R_4 是 H, k 是 4, m 是 0 以及 n 是 10。

18. 一种治疗对象炎症病症的方法,所述方法包括:

选择患有炎症病症的对象,以及

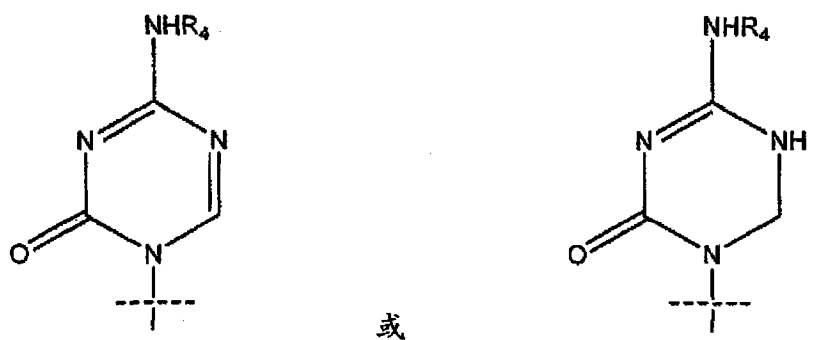
在有效治疗所述对象中所述炎症病症的条件下向所述对象施用下式化合物或其可药用盐:



其中,

R 是 H、 $R_5C(O)$ 、 $R_5CH_2OC(O)$ 或 $R_5CH_2NHC(O)$;

R_1 是



其中横虚线表示 R_1 与式 (I) 分子相连所形成的键；

R_2 和 R_3 独立地是 OH 或 H, 前提是 R_2 和 R_3 不同时是 OH；

R_4 是 H、 $R_5C(O)$ 、 $R_5CH_2OC(O)$ 或 $R_5CH_2NHC(O)$, 前提是 R 和 R_4 不同时是 H；以及

R_5 是 C_3-C_{26} 烯基, 其中 R_5 具有通式 $CH_3-(CH_2)_n-(CH=CH-CH_2)_m-CH=CH-(CH_2)_k-$ ；

k 是 0-7 的整数；

m 是 0-2 的整数；以及

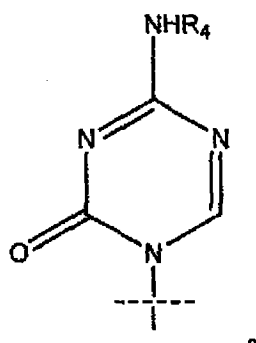
n 是 0-10 的整数。

19. 权利要求 18 的方法, 其中所述炎症病症是肺、结缔组织、胃肠道或脉管系统的炎症状态。

20. 权利要求 18 的方法, 其中 k 是 4。

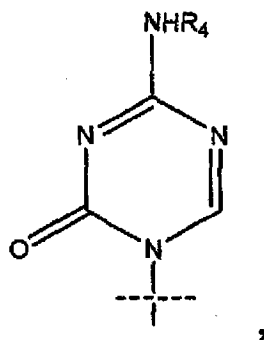
21. 权利要求 20 的方法, 其中 n 是 10。

22. 权利要求 18 的方法, 其中 R_1 是



23. 权利要求 22 的方法, 其中 R_4 是 H。

24. 权利要求 18 的方法, 其中 R 是 $R_5C(O)$, R_1 是



R_2 是 H, R_3 是 OH, R_4 是 H, k 是 4, m 是 0 以及 n 是 10。

氮杂胞苷类似物及其用途

[0001] 本申请要求 2007 年 9 月 26 日提交的美国临时专利申请 No. 60/975, 437 的权益，所述申请在此通过引用全文并入本文。

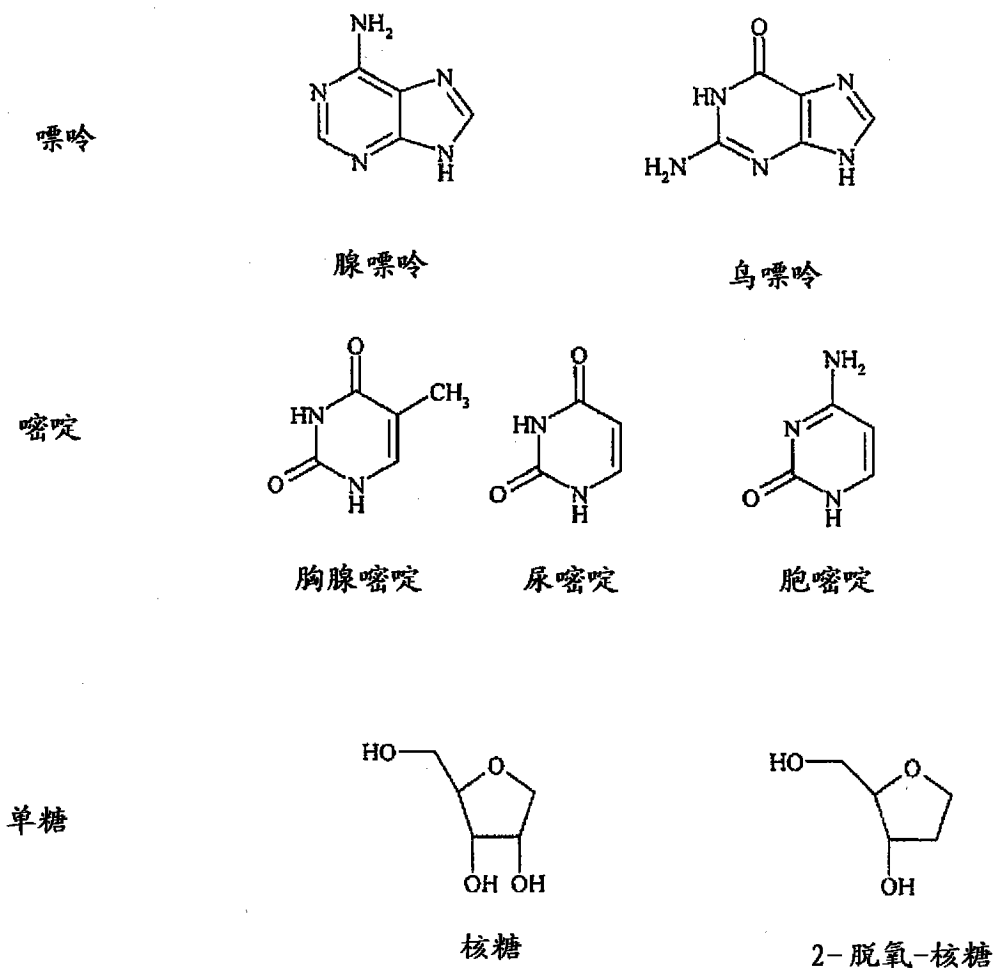
技术领域

[0002] 本申请涉及氮杂胞苷类似物及其用途。

背景技术

[0003] 核苷类似物是作为 DNA 和 RNA 构建模块的天然核苷的衍生物，其在临床上可有效治疗人癌症或病毒性疾病，但是在早些年，这些化合物是作为抗结核药被评价的。这些化合物已经注册上市有 40 多年，目前大约有 35 种产品在日常使用。下表 1 中所示的天然核苷由两类氮碱基即嘌呤（以腺嘌呤和鸟嘌呤为例）和嘧啶（以胸腺嘧啶、尿嘧啶和胞嘧啶为例）以及单糖核糖或脱氧核糖构成。

[0004]



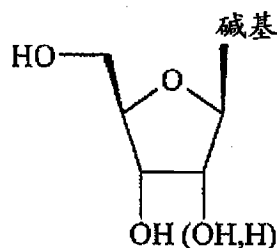
[0005]

[0006] 表 1

[0007] 天然核苷均以下述式 A 中所示的所谓 β -D 构型存在。糖环上氮碱基和羟基甲基

侧链均位于所述糖环平面的同侧（顺式）。

[0008]



[0009] 式 A

[0010] 为了获得具有抗癌或抗病毒活性的核苷衍生物,已经对氮碱基和 / 或单糖进行了化学修饰。例如,在氮碱基中添加卤素原子或其它官能团、插入其它氮原子或者在单糖环中进行立体化学变化将核糖变成阿拉伯糖或者除去羟基变成脱氧核糖可得到具有潜在治疗益处的产品。在许多产品中,所述单糖环被保留下来,而在另一些产品中,所述糖环被变成链。核苷类似物是小分子,易于具有极好的水溶性。

[0011] 由于 AIDS 世界范围内流行而导致的对核苷类似物领域进行的广泛研究和开发的努力促进了对作用机制的基本认识 and 了解,由于化学修饰等引起活性性能的改变也与癌症治疗领域相关。

[0012] 就现今疑难疾病的治疗而言,包括核苷类似物在内的许多药物的普遍缺点是活性低、特异性差。一些这些问题可能与药物物质本身的固有活性有关,一些可能与某些耐药机制(患者固有的或在治疗过程中获得的,例如在癌症治疗中的多药耐药(MDR))有关。一些问题可能与某些差的转运或细胞吸收和活化机制有关。一些问题可能与药物的快速失活和 / 或排泄有关。

[0013] 核苷类似物的效力在很大程度上取决于其模拟天然核苷的能力,从而与病毒和 / 或细胞酶相互作用并且干扰或抑制核酸代谢的关键过程。为了发挥其抗病毒或抗癌活性,必须通过病毒和 / 或细胞激酶作用将核苷类似物经其单磷酸酯和二磷酸酯形式转变为其相应的三磷酸酯形式。一般来说,所述三磷酸酯形式是活性剂,但对于某些产品例如吉西他滨而言,甚至二磷酸酯形式就可发挥显著的临床效果。

[0014] 在经肠或经胃肠外施用后,为了到达患病、癌变或病毒感染的细胞或组织,核苷类似物应当具有有利的药代动力学特征。除了所施用药物被快速排泄以外,许多核苷类似物可在血流和组织中失活。例如,胞嘧啶衍生物即使在单磷酸水平上也可通过一类称为脱氨酶的酶的作用而快速脱氨基变成无活性的尿嘧啶类似物。许多核苷类似物的细胞吸收和由此良好的疗效强烈取决于膜结合核苷转运蛋白(称为富集和平衡型核苷转运蛋白)。因此,已经在寻找不依赖于这些特异性吸收机制的化合物。但是,另一个活性限制因素(尤其在抗癌领域内)是细胞修复机制。当抗癌核苷类似物单磷酸酯被掺入到细胞 DNA 内时,其应当不被癌细胞 DNA 除去,这是由于与 p53 蛋白有关的核酸外切酶活性造成的。然而,为了限制药物的副作用,除去健康细胞 DNA 中的核苷类似物是有利的。

[0015] 过去数年中,已经开发出了许多核苷类似物,其在很大程度上克服了一些或许多活性限制特征。例如,阿昔洛韦(ACV)可作为具有高特异性的化合物的例子给出。ACV 单磷酸酯仅可通过病毒激酶形成,这意味着 ACV 在未感染细胞内不能被活化。尽管如此,但是 ACV 并不是特别有活性的产品。为了避开核苷类似物活化中常见的限速步骤即在细胞内形

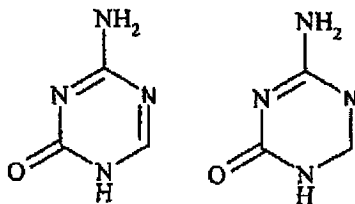
成核苷类似物单磷酸酯,已经开发出了几种磷酸酯,例如西多福韦或者甚至单磷酸酯产品。为了促进口服吸收或保证在机体内有利的药物处置,已制备了独特的前药,例如阿德福韦酯 (Hepsera)。

[0016] 除了对核苷类似物进行结构改变以促进提高临床应用以外,还进行了进一步修饰以提高活性。存在几个通过添加脂质部分得到的修饰核苷类似物的实例(美国专利 Nos. 6, 153, 594、6, 548, 486、6, 316, 425 和 6, 384, 019; 欧洲专利申请 Nos. EP-A-56265 和 EP-A-393920 以及 W099/26958)。这可通过例如通过酯键、酰胺键、碳酸酯键或氨基甲酸酯键连接脂肪酸来实现。可制备更复杂的产品,例如核苷类似物的磷脂衍生物。参见 Eur J Pharm Sci 11b Suppl 2:15-27 (2000); 欧洲专利 No. 545966; 加拿大专利 No. 2468099 以及美国专利 Nos. 6, 372, 725 和 6, 670, 341。这些类似物被描述为具有抗病毒活性,尤其适用于治疗和预防由 DNA、RNA 或逆转录病毒引起的感染。它们还适用于治疗恶性肿瘤。核苷类似物的脂质衍生物可用于几种用途。它们可被看作是前药,这些前药不是脱氨酶的底物,从而保护核苷类似物在血流中的转运过程中免于失活。所述脂质衍生物还可更有效地转运透过细胞膜,从而提高核苷类似物的细胞内浓度。脂质衍生物还可更适于用在皮肤制剂、口服产品(参见美国专利 No. 6, 576, 636 和 WO 01/18013) 或特定剂型(例如设计用于靶向肿瘤的脂质体)(参见美国专利 No. 5, 223, 263) 中。

[0017] 已经证明,就具有保守 β -D 构型的单糖环的核苷类似物或具有非环状侧链的核苷类似物而言,可通过形成单不饱和 ω -9C18 和 C20 脂肪酸的脂质衍生物而最有效地提高抗病毒或抗癌活性。参见 Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. , 53-61 (1999); Cancer Research 59:2944-2949 (1999); Gene Therapy, 5:419-426 (1998); Antiviral Research, 45:157-167 (2000) 以及 Biochemical Pharmacology, 67:503-511 (2004)。优选的单不饱和衍生物不仅比多不饱和衍生物活性更好,而且更容易结晶并且对脂质链氧化的化学稳定性更高。因此,从化学品和药物制备的观点来看,它们是更有利的化合物。还证明,单不饱和 ω -9C18 和 C20 脂肪酸适于提高大量非核苷生物活性化合物的治疗活性(参见欧洲专利 No. 0977725)。

[0018] 核苷类似物的一个相对新的亚类是所谓的氮杂胞苷 (aza-C) 衍生物。在此类化合物中,嘧啶碱基中 5 位上的 CH 基团与氮原子交换,如下文式 B 所示。

[0019]



[0020] 式 B

[0021] 被 DNA 异常甲基化导致沉默的肿瘤抑制基因是这些新化疗剂再活化的潜在靶标。DNA 甲基化的强效抑制剂和抗白血病药即氮杂胞苷和 5-氮杂-2'-脱氧胞苷衍生物(5-氮杂-C, 5-氮杂-CdR, 地西他滨)可使沉默的肿瘤抑制基因再活化。在高浓度下,化合物是细胞毒性的,但是在浓度较低时,低甲基化导致细胞系分化。所述化合物需要通过脱氧胞苷激酶进行代谢活化,产生对 DNA 甲基转移酶的抑制。这些衍生物治疗潜力的一个障碍是它们在体内被胞苷脱氨酶(CD)快速失活。在水溶液中的不稳定性以及其副作用谱限制了其临

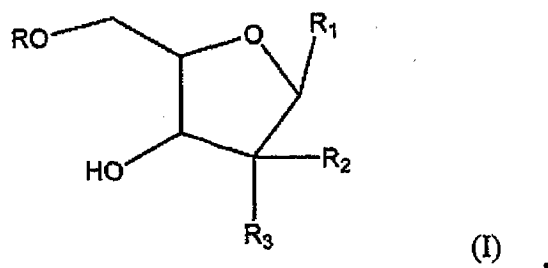
床活性。

[0022] 本发明涉及克服现有技术中这些和其它缺点。

发明内容

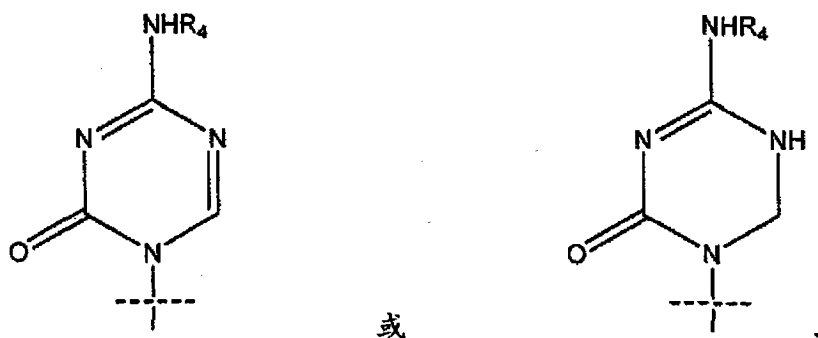
[0023] 本发明的一个方面涉及式 (I) 化合物或其可药用盐：

[0024]



[0025] 其中 R 是 H、 $R_5C(O)$ 、 $R_5CH_2OC(O)$ 或 $R_5CH_2NHC(O)$ ， R_1 是

[0026]



[0027] 其中横虚线表示 R_1 与式 (I) 分子相连所形成的键， R_2 和 R_3 独立地是 OH 或 H，前提是 R_2 和 R_3 不同时是 OH， R_4 是 H、 $R_5C(O)$ 、 $R_5CH_2OC(O)$ 或 $R_5CH_2NHC(O)$ ，前提是 R 和 R_4 不同时是 H， R_5 具有通式 $CH_3-(CH_2)_n-(CH=CH-CH_2)_m-CH=CH-(CH_2)_k-$ ；k 是 0-7 的整数；m 是 0-2 的整数；n 是 0-10 的整数。

[0028] 本发明的另一个方面涉及含有式 (I) 化合物和可药用赋形剂、稀释剂和 / 或载体的药物组合物。

[0029] 本发明的又一个方面涉及治疗对象的肿瘤性病症的方法。所述方法包括选择患有肿瘤性病症的对象，以及在有效治疗所述对象中所述肿瘤性病症的条件下向所述对象施用上文所述的式 (I) 化合物或其可药用盐。

[0030] 本发明的又一个方面涉及治疗对象的炎性病症的方法。所述方法包括选择患有炎性病症的对象，以及在有效治疗所述对象中所述炎性病症的条件下向所述对象施用上文所述的式 (I) 化合物或其可药用盐。

[0031] Aza-C 在缓冲液和血浆中的不稳定性是众所周知的（参见 Israili 等，Cancer Research 36,1453-1461(1976)；Rudek 等，J Clin Oncol,23:17,3906-3911(2005)；Rustum 等，J Chromat,421:12,387-91(1987)；Zhao 等，J Chromat B,813,81-88(2004)，其全部内容均在此通过引用并入本文）。据报道 Aza-C 在临床血浆样品中的平均终末半衰期

为 1.50 ± 2.30 小时 (参见 Rudek 等, J Clin Oncol, 23:17, 3906-3911 (2005), 其全部内容在此通过引用并入本文)。在体外, 即使在 -60°C 下贮存, 4.5 天后损失 20% 的 Aza-C, 当在室温下贮存时, 在 0.5 小时内损失 10% (参见 Zhao 等, JChromat B, 813, 81-88 (2004), 其全部内容在此通过引用并入本文)。认为 Aza-C 的主要不稳定性是由于 5-氮杂-嘧啶环快速开环 (第一个步骤是可逆的) 并且随后进行甲酸消除引起的 (参见 Chan 等, J Pharma Sci, 68;7, 807-12 (1979), 其全部内容在此通过引用并入本文)。认为其它降解途径是 4 位氨基进行脱氨并且糖苷键水解得到 D-核糖和 5-氮杂胞嘧啶。出乎意料地发现优选的 Aza-C 脂质衍生物具有比 Aza-C 本身显著更好的血浆稳定性特性。在室温和实验条件下, 所述化合物在空白人血浆基质中稳定 (初始化合物的剩余百分率 $\geq 94\%$) 至少 4 小时, 在血浆蛋白质沉淀后, 于提取后上清中未观察到明显的降解产物。还考察了优选的脂质化合物在 37°C 下贮存时的血浆稳定性。表明当脂质侧链连接到 Aza-C 上时, 该化合物 Aza- 部分的开环或其它降解显著降低。

[0032] Aza-C 的快速降解是 Aza-C 临床应用的一个缺点。相对于 Aza-C 本身而言, 脂质衍生物的血浆稳定性提高, 可使脂质衍生物的患者血浆水平高且持久。首先, 这可导致所述药物具有比 Aza-C 本身更好的组织 / 器官 / 肿瘤分布, 细胞更好地暴露于所述药物并且药物吸收更好, 其次, 在 Aza-C-5' - 酯键于细胞内水解后, 肿瘤细胞 DNA 更好地暴露于 Aza-C。

[0033] 通过对氮杂胞苷和脱氧胞苷 (例如 5-氮杂-2' - 脱氧胞苷) 进行修饰, 本发明的实施方案产生了具有出乎意料地不同于氮杂胞苷和脱氧胞苷 (例如 5-氮杂-2' - 脱氧胞苷) 的性能的新分子。这产生了一系列活性远远超出氮杂胞苷和脱氧胞苷 (例如 5-氮杂-2' - 脱氧胞苷) 抗癌活性的化合物, 所述氮杂胞苷和脱氧胞苷 (例如 5-氮杂-2' - 脱氧胞苷) 的抗癌活性局限于血液恶性肿瘤。这些新化合物对许多实体瘤包括乳癌和宫颈癌具有抗癌效力。所述化合物还出乎意料地对治疗抗性 (treatment resistant) 癌症具有活性, 因此可提供在当前治疗选择受限的实体瘤中进行治疗的优点。本发明的实施方案具有治疗用途, 以治疗选择和效力有限的癌症以及满足未能满足的需求。

[0034] 在有限的暴露之后, 这些化合物表现出活性起效较早, 因此, 在临床上可仅在短期治疗后有效。与母药相比, 这将使得治疗暴露更短、更不频繁并且降低了与药物相关的毒性。这将提供提高的治疗指数。

[0035] 添加脂质 (包括酯、酰胺、氨基甲酸酯和碳酸酯) 成分的结构改变保留了氮杂胞苷环, 并因此保留了分子对表观遗传学机制的影响。表观遗传学调节为改变癌症和炎症中的基因表达提供了重要的机制。这些新化合物在低于氮杂胞苷的浓度下具有活性, 因此更有效。活性谱改变的这些化合物可调节实体瘤和炎症疾病中的表观遗传学靶标。

[0036] 表观遗传学机制在促炎性状态中是重要的, 所述促炎性状态包括但不限于肺、结缔组织、胃肠道和脉管系统的炎性状态。这些化合物通过靶向表观遗传学机制可减少或逆转引起这些疾病的炎性过程。

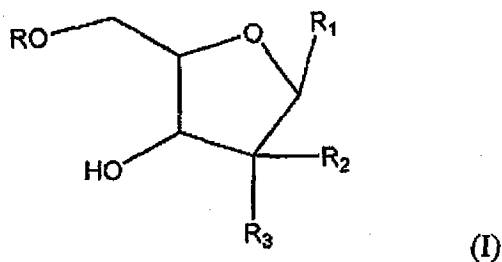
附图说明

[0037] 图 1 是显示 Aza-c 和 5-Aza-C-5' - 岩芹酸的细胞毒性活性与时间之关系的图。

具体实施方式

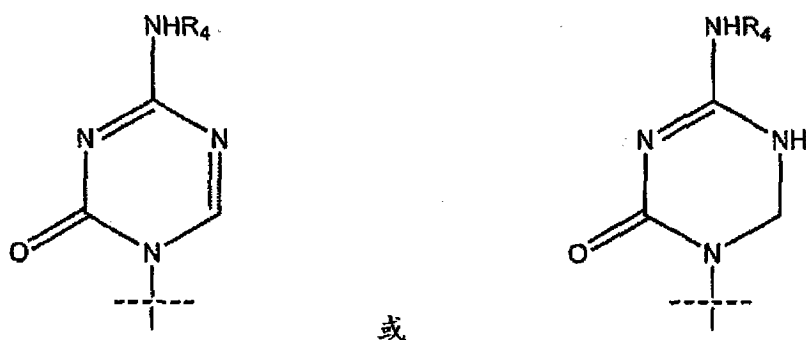
[0038] 本发明的一个方面涉及式 (I) 化合物或其可药用盐：

[0039]



[0040] 其中 R 是 H、 $R_5C(O)$ 、 $R_5CH_2OC(O)$ 或 $R_5CH_2NHC(O)$ ， R_1 是

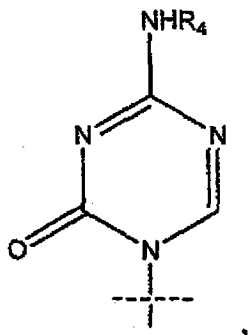
[0041]



[0042] 其中横虚线表示 R_1 与式 (I) 分子相连所形成的键， R_2 和 R_3 独立地是 OH 或 H，前提是 R_2 和 R_3 不同时是 OH， R_4 是 H、 $R_5C(O)$ 、 $R_5CH_2OC(O)$ 或 $R_5CH_2NHC(O)$ ，前提是 R 和 R_4 不同时是 H， R_5 具有通式 $CH_3-(CH_2)_n-(CH=CH-CH_2)_m-CH=CH-(CH_2)_k-$ ；k 是 0-7 的整数；m 是 0-2 的整数；n 是 0-10 的整数。

[0043] 在优选的实施方案中，k 是 4，n 是 10。在某些实施方案中， R_1 是

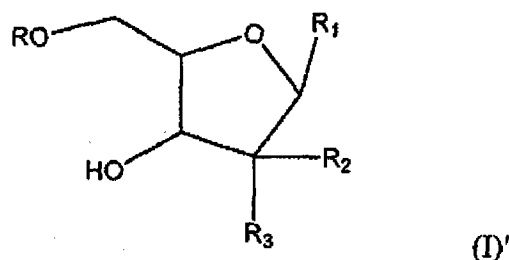
[0044]



[0045] 其中横虚线表示 R_1 与式 (I) 分子相连所形成的键。在某些实施方案中， R_4 可以是 H。在某些实施方案中，R 是 $R_5C(O)$ ，k 是 4，m 是 0，n 是 10， R_2 是 H， R_3 是 OH， R_4 是 H。

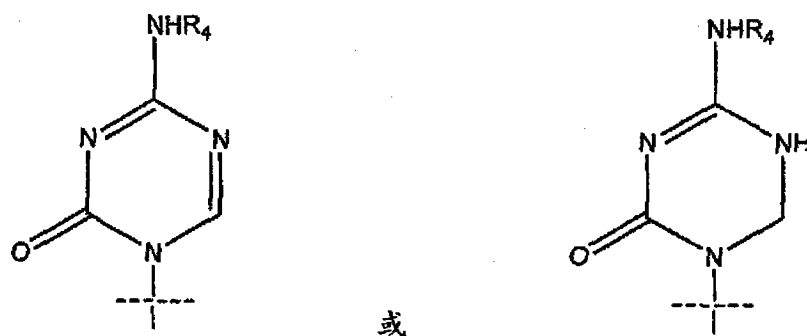
[0046] 本发明的更广泛的方面涉及式 (I)' 化合物或其可药用盐：

[0047]



[0048] 其中 R 是 H、 $R_5C(O)$ 、 $R_5CH_2OC(O)$ 或 $R_5CH_2NHC(O)$ ， R_1 是

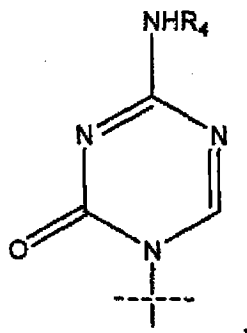
[0049]



[0050] 其中横虚线表示 R_1 与式 (I)' 分子相连所形成的键， R_2 和 R_3 独立地是 OH 或 H，前提是 R_2 和 R_3 不同时是 OH， R_4 是 H、 $R_5C(O)$ 、 $R_5CH_2OC(O)$ 或 $R_5CH_2NHC(O)$ ，前提是 R 和 R_4 不同时是 H， R_5 是 C_3-C_{26} 烯基。

[0051] 在式 (I)' 化合物的一个优选实施方案中，k 是 4，n 是 10。在某些实施方案中， R_1 是

[0052]



[0053] 其中横虚线表示 R_1 与式 (I)' 分子相连所形成的键。在一些实施方案中， R_4 可以是 H。在另一些实施方案中，R 是 $R_5C(O)$ ，k 是 4，m 是 0，n 是 10， R_2 是 H， R_3 是 OH。在某些实施方案中， R_5 是 C_9-C_{26} 烯基。

[0054] 本发明的另一个方面涉及含有式 (I) 化合物和可药用赋形剂、稀释剂和 / 或载体的药物组合物。

[0055] 本发明的药剂可口服施用，胃肠外施用，例如，皮下、静脉内、肌内、腹膜内、通过鼻内吸入或施用于粘膜如鼻粘膜、咽喉粘膜和支气管粘膜。它们可单独施用或与合适的药用载体一起施用，可以是固体或液体形式，例如片剂、胶囊剂、粉末剂、溶液剂、混悬剂或乳剂。

[0056] 本发明的活性剂可口服施用，例如与惰性稀释剂或与可吸收的可食用载体一起施用，或者可将其装在硬壳或软壳胶囊内，或者可将其压成片剂，或者可将其直接掺入膳食食物中。就口服治疗性施用而言，可在这些活性剂中掺入赋形剂，并以片剂、胶囊剂、酏剂、混

悬剂、糖浆剂等形式使用。这种组合物和制剂应当含有至少 0.1% 的活性剂。当然,这些组合物中药剂的百分数可变化,其可便利地为所述单位的重量的约 2% - 约 60%。这种治疗有用的组合物中活性剂的量使得可获得合适的剂量。制备本发明的优选组合物使得口服剂量单位含有约 1-250mg 的活性剂。

[0057] 片剂、胶囊剂等还可含有粘合剂,例如黄蓍胶、阿拉伯胶、玉米淀粉或明胶;赋形剂,例如磷酸氢钙;崩解剂,例如玉米淀粉,马铃薯淀粉、藻酸;润滑剂,例如硬脂酸镁;以及甜味剂,例如蔗糖、乳糖或糖精。当所述剂量单位形式是胶囊剂时,除了上述类型的物质外,其还可包含液体载体,例如脂肪油。

[0058] 多种其它物质可作为包衣剂存在或用于改变剂量单位的物理形式。例如,片剂可用虫胶、糖或者虫胶与糖二者进行包衣。除了活性成分以外,糖浆剂可包含作为甜味剂的蔗糖、作为防腐剂的尼泊金甲酯和尼泊金丙酯、染料和香精例如樱桃或橙子香精。

[0059] 这些活性剂还可胃肠外施用。可在水中适当地混合表面活性剂例如羟丙基纤维素来制备这些活性剂的溶液或混悬剂。还可在甘油、液体聚乙二醇和其混合物中在油中制备分散体。示例性的油是石油、动物、植物或合成来源的油,例如花生油、大豆油或矿物油。一般而言,水、盐水、右旋糖水溶液和相关的糖溶液以及二醇(例如丙二醇或聚乙二醇)是优选的液体载体,尤其是用于注射溶液。在常规贮存和使用条件下,这些制剂包含防腐剂以防止微生物生长。

[0060] 适于注射使用的药物形式包括无菌水溶液或分散体或用于临时制备无菌注射液或分散体的无菌粉末。在所有情形下,所述形式都必须是无菌的并且其流动程度必须达到易于注射。其在生产和贮存条件下必须稳定,并且必须在不受微生物例如细菌和真菌的污染作用下保存。所述载体可以是溶剂或者含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇)、其合适混合物以及植物油的分散介质。

[0061] 本发明的药剂还可以以气雾剂形式直接施用于气道。就作为气雾剂使用而言,在溶液或混悬液中的本发明药剂可与合适的抛射剂(例如碳氢化合物抛射剂,如丙烷、丁烷或异丁烷)以及常规辅助剂一起包装在密闭气雾剂容器中。本发明的物质还可以在非加压形式(例如喷雾器或雾化器)中施用。

[0062] 本发明的又一个方面涉及治疗对象的肿瘤性病症的方法。所述方法包括选择患有肿瘤性病症的对象,以及在有效治疗所述对象中的所述肿瘤性病症的条件下向所述对象施用上文所述的式(I)化合物或其可药用盐。

[0063] 在某些实施方案中,所述肿瘤性病症是癌性疾病。所述癌性疾病可以是实体瘤或血液癌或恶性肿瘤。所述癌性疾病可以是白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤或骨髓增生异常综合征。

[0064] 在某些实施方案中,所述实体瘤可以是组织的癌症,所述组织为例如乳房、卵巢、前列腺、脑、膀胱和肺组织。

[0065] 本发明的又一个方面涉及治疗对象的炎性病症的方法。所述方法包括选择患有炎性病症的对象,以及在有效治疗所述对象中所述炎性病症的条件下向所述对象施用上文所述的式(I)化合物或其可药用盐。

[0066] 在某些实施方案中,所述炎性病症是肺、结缔组织、胃肠道或脉管系统的炎性状态。

[0067] 除非另有定义,否则本申请中所用的科技术语应当具有本领域普通技术人员通常理解的意义。此外,除非上下文中另有要求,否则未限定具体数量的术语具有“一个或多个”的含义。

[0068] 实施例

[0069] 实施例 1:试剂、细胞系和细胞培养

[0070] 细胞增殖试剂 WST-1 得自 Roche Applied Science(Manheim, Germany), PI 和 Annexin V-FITC 细胞凋亡试剂盒购自 BD Biosciences, Palo Alto, CA、5-氮杂胞苷(5-AzaC)、溴化乙啶(EB)、吖啶橙(AO)、硝基蓝四氮唑(NBT)、佛波醇-12-豆蔻酸酯-13-乙酸酯(TPA)购自 SigmaChemical Co(St. Louis, MO)。

[0071] 人早幼粒细胞白血病细胞系 HL60、人组织细胞淋巴瘤 U937、人慢性髓细胞白血病 K562、人急性 T 细胞 Jurkat、乳腺癌 MCF-7、膀胱癌 5637、前列腺癌 DU-145 购自 American Type Culture Collection。除 Jurkat 以外的所有细胞系均维持在 37℃、5% CO₂ 气氛下的 RPMI 1640 培养基(Gibco, Glasgow, UK)中,所述 RPMI 1640 培养基添加有 10% 热灭活胎牛血清(FCS)、100U/ml 青霉素和 100mg/ml 链霉素。Jurkat 细胞培养在 RPMI 1640 培养基中,所述 RPMI 1640 培养基添加有 1.5g/L 碳酸氢钠、4.5g/L 葡萄糖、10mM 丙酮酸钠和 10% FCS、100U/ml 青霉素和 100mg/ml 链霉素。

[0072] 实施例 2:细胞毒性测定

[0073] 基于活细胞中线粒体脱氢酶断裂四唑盐 WST-1(4-[3-(4-碘代苯基)-2-(4-硝基苯基)-2H-5-四唑啉基]-1,3-苯二磺酸盐),通过比色检测法测定 5-氮杂胞苷脂质的细胞毒性。将细胞以 1×10^6 /ml (HL60 细胞)或 1.25×10^5 /ml (U937、K562 和 Jurkat) 的初始浓度接种在 96 孔平底微量板中的培养基中并培养 24-72 小时,所述培养基含有或不含有不同浓度的 5-氮杂胞苷脂质。将 MCF-7、DU-145 和 5637 细胞 (1×10^4 /ml) 铺板并使其贴壁铺展 24 小时。加入不同浓度的 5-氮杂胞苷脂质,再维持培养 24-72 小时。将培养物与 WST-1 试剂一起孵育 1 小时。利用酶标仪(Bio-Tek Instruments, Elx 800)于 450nm(参比波长为 650nm)测量甲臞的产生。测定相比于未处理细胞的生长抑制(%)。利用 CalcuSyn 软件(Biosoft)计算 IC₅₀ 值。

[0074] 实施例 3:凋亡细胞的定量

[0075] 采用形态学标准和利用 Annexin V-FITC 染色后的荧光激活细胞分选(FACS)鉴定凋亡细胞。就形态学分析而言,将含有 100 μg/ml AO 和 100 μg/ml EB 的 1 μl 储备液加到 25 μl 细胞悬液中。借助荧光显微镜分析凋亡细胞和凋亡体。计数总共 300 个细胞后,计算凋亡细胞的百分率。就 FACS 分析而言,用 PBS 清洗 2×10^5 至 5×10^6 个细胞,然后根据制造商提供的 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒说明书,利用 AnnexinV-FICS 和碘化丙啶(PI)在结合培养基的试剂中标记所述细胞。在 FACSCAN(Becton Dickinson, San Jose, CA)上分别于 518nm 和 620nm 处检测 FITC 和 PI 的荧光信号。Annexin V-FITC 荧光的对数值显示在 X 轴上,PI 荧光的对数值显示在 Y 轴上。通过 CellQuest 程序(Becton Dickinson)分析数据。对于每个分析来说,记录 10000 个细胞事件。

[0076] 实施例 4:细胞周期

[0077] 通过离心沉淀细胞,用 PBS 清洗两次,用 70% (v/v) 冷乙醇(-20℃)固定并于 4℃ 贮存至少 24 小时。在 PBS 中清洗细胞。将细胞团块用 PI/RNA 酶染色溶液染色。将细胞混

悬液于黑暗中在室温下孵育 30 分钟。利用 FACSCalibur 流式细胞仪 (Becton Dickinson, Mount View, CA) 测定 DNA 含量。利用 DNA 柱形图拟合程序 (Becton Dickinson) 测定处于细胞周期中亚 G₁、G₁、S 和 G₂/M 期细胞的百分数。每个样品最少记录 10000 个事件。

[0078] 实施例 5 :Aza-C-5' - 岩芹酸酯的合成

[0079] 将岩芹酸 (1.75mmol, 494mg) 溶解在甲苯 (3ml) 中。加入 DMF (10 μ l), 然后于室温下用 10 分钟加入草酰氯 (3.6mmol, 457mg)。3 小时后, 真空下除去甲苯。

[0080] 将 Aza-C (1.57mmol, 427mg) 混悬在 DMA (6ml) 中, 加入 HCl (1M, 在 Et₂O 中, 2.0mmol, 2.0ml), 5 分钟后在室温下于真空中除去 Et₂O。将所得混浊溶液于冰水浴中冷却, 用 40 分钟加入溶解在 DMA (2ml) 中的酰氯。搅拌反应混合物过夜, 同时温度慢慢达到室温。24 小时后, 在大约 0.1mbar 下除去溶剂。将残留物在饱和碳酸氢钠水溶液和乙酸乙酯 (各 25ml) 之间分配。水相用乙酸乙酯萃取 (3 $\times$ 25ml)。合并有机相, 用盐水清洗, 干燥 (MgSO₄)。真空下除去溶剂后, 将粗产物 (600mg) 通过快速色谱 (SiO₂, CH₂Cl₂ 以及 2.5%、5% 和 10% MeOH) 纯化。最后, 在大约 0.25mbar 下干燥产物过夜。产率 :210mg (24%)。

[0081] 实施例 6 :Aza-C-5' - 反式岩芹酸酯的合成

[0082] 将反式岩芹酸 (petroselaidic acid) (1.77mmol, 500mg) 溶解在甲苯 (3ml) 中。加入 DMF (10 μ l), 然后于室温下用 10 分钟加入草酰氯 (3.6mmol, 457mg)。3 小时后, 真空下除去甲苯。

[0083] 将 Aza-C (1.75mmol, 427mg) 混悬在 DMA (6ml) 中, 加入 HCl (1M, 在 Et₂O 中, 2.0mmol, 2.0ml), 5 分钟后在室温下于真空中除去 Et₂O。将所得混浊溶液于冰水浴中冷却, 用 2 小时加入溶解在 DMA (2ml) 中的酰氯。搅拌反应混合物过夜, 同时温度慢慢达到室温, 然后在 30°C 加热 2 小时。冷却至室温后, 将所得残留物在饱和碳酸氢钠水溶液和乙酸乙酯 (各 25ml) 之间分配。水相用乙酸乙酯萃取 (3 $\times$ 25ml)。合并有机相, 用水和盐水清洗, 干燥 (MgSO₄)。真空下除去溶剂后, 得到酯, 为白色粉末。产率 :500mg。

[0084] 实施例 7 :5-Aza-5' - 岩芹酸酯在合并人血浆中的代谢稳定性

[0085] 将 5 种浓度水平 (分别为 0.1、1、3、10 以及 30 μ M) 的 5-Aza-C-5' - 岩芹酸酯加到混合的人血浆中。将混合物在 37°C 下于摇动的水浴中孵育。在设定的孵育时间 (0、15、30、60 和 120 分钟) 取等量份 (100 μ l) 的孵育溶液一式三份 (n = 3), 用含有 0.1% 甲酸 (300 μ l) 的乙腈立即沉淀血浆蛋白。用测试化合物和 Aza-C 在测试缓冲液 (PBS, pH 7.4) 中以一个孵育浓度 (1 μ M) 制备阴性对照。离心后, 将上清直接用于 LC-MS-MS 分析。参见表 1。

[0086]

浓度 (μM)	初始物质的剩余 % (平均值 $\pm$ SD, n=3)					半衰期 (分钟)
	0 分钟	1 分钟	30 分钟	60 分钟	120 分钟	
0.1	100	95.0 $\pm$ 2.5	92.9 $\pm$ 2.0	83.7 $\pm$ 2.5	51.3 $\pm$ 1.2	125
1	100	96.3 $\pm$ 5.3	90.9 $\pm$ 2.5	79.9 $\pm$ 3.2	46.3 $\pm$ 2.2	107
3	100	97.5 $\pm$ 3.3	91.5 $\pm$ 3.6	83.6 $\pm$ 1.3	50.9 $\pm$ 0.7	122
10	100	97.3 $\pm$ 1.1	91.4 $\pm$ 0.6	78.6 $\pm$ 1.8	45.7 $\pm$ 0.6	104
30	100	93.6 $\pm$ 1.3	85.9 $\pm$ 2.9	71.7 $\pm$ 2.3	40.6 $\pm$ 0.5	91

[0087] 表 1

[0088] 实施例 8 :Aza-C 和 5-Aza-C-5'-岩芹酸的细胞毒性

[0089] 在乳腺癌细胞系 MT-3 和阿霉素 (adriablastin) 抗性细胞系 MT-3/ADR 中测定 Aza-C 和 5-Aza-C-5'-岩芹酸的细胞毒性。MT-3/ADR 过量表达 MDR-1/p-糖蛋白。将细胞接种在 96 孔板中含有 2mM 谷氨酸盐和 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中,其中每孔含有 5×10^3 个细胞。将所述细胞孵育 24 小时。将测试化合物溶解在 DMSO 中并在使用前在培养基中进一步稀释。每个测试浓度使用 6 个孔。将细胞与测试化合物一起孵育 24 小时。将 20 μl 新鲜制备的 MTT 溶液加到每个孔中并孵育 4 小时。由根据 0.01 μM 至 100 μM 的 8 个不同浓度绘图得到的生长曲线来测定 IC₅₀ 值。结果示于表 1 中。在 MT-3 乳腺癌细胞系中,Aza-C 和 5-Aza-C-5'-岩芹酸的活性相似,但是在 MT-3/ADR 抗性细胞系中,Aza-C 的活性丧失。在所测试的高达 100 μM 的浓度下未观察到活性,而 5-Aza-C-5'-岩芹酸在抗性细胞系与非抗性 MT-3 细胞系中均保持活性,具有相似的 IC₅₀ 值。参见表 2。

Aza-C和5-Aza-C-5'-岩芹酸在具有或不具有多 药抗性表达的乳腺癌中的细胞毒活性		
	Aza-C IC ₅₀ (μM)	5-Aza-C-5'-岩芹酸 IC ₅₀ (μM)
MT-3 乳腺癌	12.62 $\pm$ 2.35	12.32 $\pm$ 6.37
MT-3/ADR 抗性乳腺癌	>100	12.02 $\pm$ 8.30

[0091] 表 2

[0092] 实施例 9 :Aza-C 和 5-Aza-C-5'-岩芹酸的抗增殖活性

[0093] 在 HeLa 突变宫颈癌细胞系中在暴露 24 小时和 72 小时时测定 Aza-C 和 5-Aza-C-5'-岩芹酸的抗增殖活性。将细胞接种在 96 孔板中含有 2mM 谷氨酰胺和 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中,其中每孔含有 5×10^3 个细胞。将所述细胞孵育 24 和 72 小时。将测试化合物溶解在 DMSO 中并在使用前在培养基中进一步稀释。每个测试浓度使用 6 个孔。利用 MTT 法测定细胞毒性。将 20 μl 新鲜制备的 MTT 溶液加到每个孔中并孵育 4 小时。由根据 0.01 μM 至 100 μM 的 8 个不同浓度绘图得到的生长曲线来测定 IC₅₀ 值。长期暴露于两种化合物 72 小时得到相似的细胞毒活性,但是出乎意料地,暴露 24 小时后,5-Aza-C-5'-岩芹酸的细胞毒作用已经存在。观察到 Aza-C 和 5-Aza-C-5'-岩芹酸具有不同的时间曲线,

其中 5-Aza-C-5'-岩芹酸的细胞毒作用快速出现。参见图 1。

[0094] 实施例 10:核苷转运蛋白抑制对 Aza-C 和 5-Aza-C-5'-岩芹酸在癌细胞中的细胞毒活性的影响

[0095] 评价了核苷转运蛋白抑制对 Aza-C 和 5-Aza-C-5'-岩芹酸在癌细胞中的细胞毒性活性的影响。双嘧达莫用作平衡型核苷转运蛋白 hENT1 和 hENT2 的抑制剂。将细胞接种在 96 孔板中含有 2mM 谷氨酰胺和 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中,其中每孔含有 5×10^3 个细胞。将所述细胞预先孵育 24 小时。在加入测试化合物之前 30 分钟,将双嘧达莫 (10 μ M) 加到所述细胞中。将测试化合物溶解在 DMSO 中并在使用前在培养基中进一步稀释。每个测试浓度使用 6 个孔。将所述细胞与测试化合物一起孵育 72 小时。将 20 μ l 新鲜制备的 MTT 溶液加到每个孔中并孵育 4 小时。由根据 0.01 μ M 到 100 μ M 的 8 个不同浓度绘图得到的生长曲线来测定 IC₅₀ 值。结果示于表 3 中。加入核苷转运抑制剂双嘧达莫使 Aza-C 的活性降低 3 倍,表明 Aza-C 在 HeLa 细胞中的流入和流出部分取决于核苷转运蛋白 hENT1 和 hENT2。当利用双嘧达莫阻滞核苷转运蛋白 hENT1 和 hENT2 时,5-Aza-C-5'-岩芹酸的细胞毒活性不但得以维持而且提高了 10 倍。这可能对于其中由于缺少核苷转运蛋白的表达而造成 Aza-C 无活性的患者尤其重要。参见表 3。

[0096]

Aza-C和5-Aza-C-5'-岩芹酸在含有或不含有核苷转运抑制剂双嘧达莫的HeLa宫颈癌细胞中的细胞毒活性		
	氮杂胞苷 IC ₅₀ (μ M)	5-Aza-C-5'- 岩芹酸 IC ₅₀ (μ M)
HeLa	4.32	4.74
含有双嘧达莫的 HeLa	12.77	0.42

[0097] 表 3

[0098] 实施例 11:利用氮杂胞苷或 5-Aza-C-5'-岩芹酸处理后乳腺癌细胞系中雌激素受体 β (ER β) 的基因表达

[0099] 通过定量实时 PCR (TaqMan) 测定了雌激素受体 β 的基因表达 (在 RNA 水平上测定)。MCF-7 乳腺癌细胞在缺乏雌激素的培养基 (不含酚红的 RPMI, 含有 2% 谷氨酰胺和 10% 炭-右旋糖酐处理的胎牛血清) 中培养。将细胞接种在 25cm² 的培养瓶中并贴壁 24 小时,然后用 1 μ M 氮杂胞苷或 5-Aza-C-5'-岩芹酸处理。包括一个未处理的对照作为对照。暴露于所述化合物 5 天后收获细胞,通过胰蛋白酶消化来收获细胞,将其清洗并快速冷冻在液氮中。

[0100] 从约 10^6 个快速冷冻的 MCF-7 细胞中提取总 RNA,测量所述 RNA 的浓度和纯度,利用 TaqMan 反转录试剂 (N808-0234) 将 RNA 转录成 cDNA。利用标准方案和预混 PCR 试剂进行实时定量。引物-探针混合物购自 Applied Biosystems, ER β (ID Hs00230957_m1) 和管家基因羟甲基原胆色烷合成酶 HMBS (ID Hs00609297_m1)。利用比较 $\Delta - \Delta C_t$ 法计算基因表达。暴露于 5-Aza-C-5'-岩芹酸后,诱导 ER β 表达升高 4.14 倍,而暴露于氮杂胞苷后仅仅升高 2.51 倍,参见表 4。这可能与其中激素敏感性可被恢复的激素难治疗性肿瘤高度相关,参见表 4。

[0101]

	Ct ERβ	Ct HMBS	Δ	Δ-Δ	ERβ 基因的 诱导倍数
未处理	35.36	25.91	9.45		
1 μM 5' Aza-C-5' - 反油酸	32.97	25.92	7.06	-2.40	5.26
1 μM aza-C	34.31	26.18	8.13	-1.32	2.51

[0102] 表 4

[0103] 虽然本文中已经详细地描述和叙述了优选的实施方案,但是对于相关领域技术人

员显而易见的是,可在不背离本发明精神的情况下进行各种改动、增加、替换等,并且因此这些改动、增加、替换等被认为包含在下述权利要求中所定义的本发明范围内。

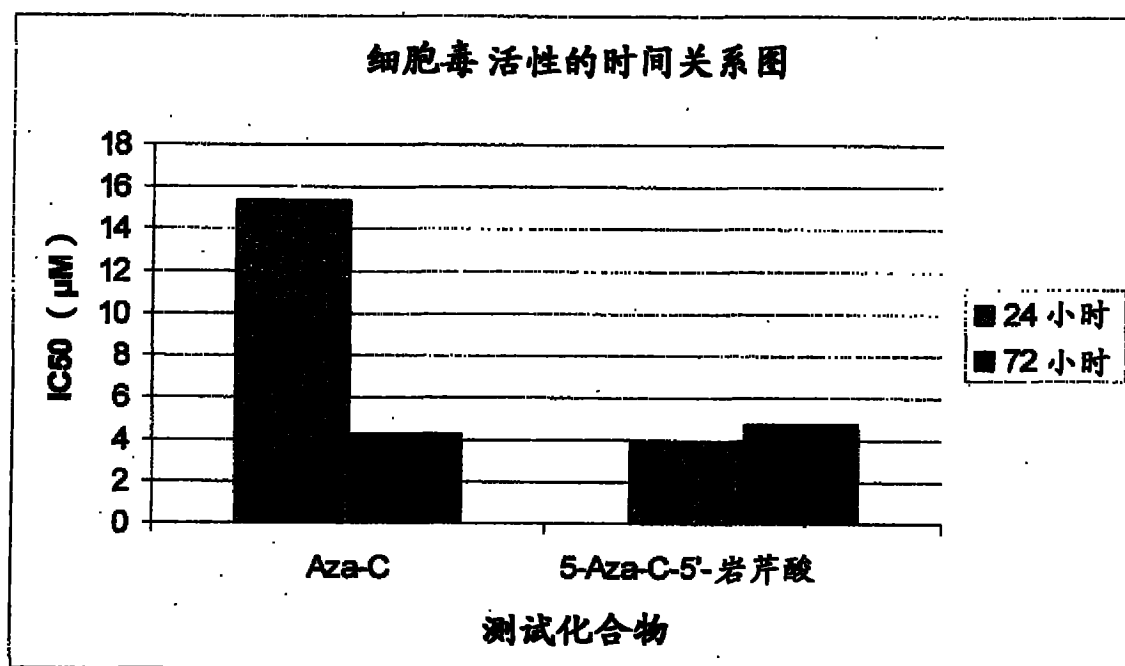


图 1