



(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2013 年 7 月 4 日 (04.07.2013)



WIPO | PCT



(10) 国际公布号
W O 2013/097752 A 1

- (51) 国转 利分类号 :
C07D 307/60 (2006.01) A61K 31/365 (2006.01)
C07D 407/04 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 国际申请号 : PCT/CN2012/087753
- (22) 国际申请日 : 2012 年 12 月 28 日 (28.12.2012)
- (25) 申 职 言 : 中文
- (26) 公布语言 : 中文
- (30) 优先权 :
201 110458196.5 201 1 年 12 月 29 日 (29.12.201 1) CN
- (71) 申请人 厦门大学 (XIAMEN UNIVESITY) [CN/CN];
中国福建省厦门市翔安区翔安南路厦门大学生命
科学学院 Fujian 361005 (CN)。
- (72) 发明人 李勇 (LI, Y o n g); 中国福建省厦门市翔安区
翔安南路厦门大学生命科学学院 ,Fujian 361005
(CN) 。 王姗姗 (WANG, Shanshan); 中国福建省厦
门市翔安区翔安南路厦门大学生命科学学院 ,Fuji -
an 361005 (CN) 。 王钊 (WANG, Zhao); 中国福建省
厦门市翔安区翔安南路厦门大学生命科学学院 ,
Fujian 361005 (CN)。
- (74) 代理人 :厦门市首创君合专利事务所有限公
(SHOUCHUANG JUNHE PATENT AGENT CO.,

LTD. XIAMEN); 中国福建省厦门市思明区长青路
191 号劳动力市场大厦五楼 Fujian 361012 (CN)。

- (81) 指定国 除另有指明, 要求每一种可提供的国家保
护):AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP,
KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY,
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST,
SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, ZA, ZM, ZW。

- (84) 指定国 除另有指明, 要求每一种可提供的地区保
护):ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA,
RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ,
BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH,
CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,
RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布 :

包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) Title: NATURAL PRODUCTS AS RETINOIC ACID RECEPTOR (RARs) EXCITOMOTORS AND USES THEREOF

(54) 发明名称 : 一类作为维甲酸受体(RARs) 激动剂的天然产物及其用途

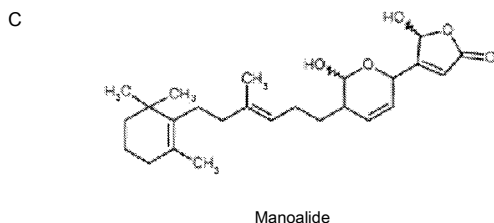
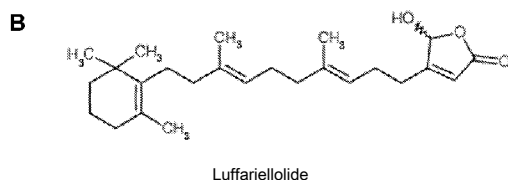
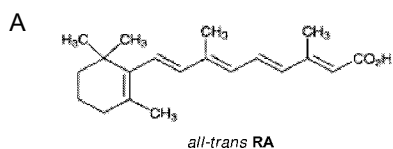


图 1 / FIG. 1

(57) Abstract: Disclosed are natural products as retinoic acid receptor (RARs) excitomoters and the uses thereof. The marine natural products Luffariellolide and Manoalide are specific excitomoters of retinoic acid receptors (RARs), able to inhibit the growth of multiple tumor cells, including colon cancer cells with drug resistance to retinoic acid, by means of retinoic acid receptors.

(57) 摘要: 一类作为维甲酸受体 (RARs) 激动剂的天然产物及其用途。海洋天然产物 Luffariellolide 和 Manoalide 是维甲酸受体 (RARs) 的特异激动剂, 能够通过维甲酸受体抑制多种肿瘤细胞的生长, 包括对维甲酸有耐药性的结肠癌细胞。

2013/09 52 A1

说明书

发明名称：一类作为维甲酸受体 (RARs) 激动剂的天然产物及其用途
技术领域

- [1] 本发明属于药物化学、生物化学与结构生物学领域。具体涉及一类维甲酸受体 (RARs) 激动剂的天然产物及其用途。

背景技术

- [2] 维甲酸类化合物，也可称之为类维生素 A，是对维生素 A 及其衍生物的统一称。这类化合物对细胞的增殖与分化具有重要的调节作用。维甲酸类化合物通过激活维甲酸受体 (RARs, 三个亚型 RAR α , β , γ) 或维甲酸 X 受体 (RXRs, 三个亚型 RXR α , β , γ) 发挥作用。这些小分子配体与受体的配体结合域 (LBDs) 结合后，RARs 与 RXRs 就会以异源二聚体的形式募集辅因子 (cofactor) 从而调控下游靶基因。RARs 这种配体依赖性的辅因子募集方式是通过 RARs 的配体结合域 (LBDs) 与辅因子的 LXXLL 基序 (motif) 的相互作用实现的，这一点与其他核受体相似。蛋白质晶体结构研究向我们展现了这种核受体与辅因子结合的经典模式：首先激动剂与受体结合，进而核受体结构发生变化会形成一个疏水区域，以便与辅因子 (如 steroid receptor coactivators, SRCs) 所含有的 LXXLL 基序结合。核受体 helix 5 和 C 端的 AF-2 螺旋所形成的 "口袋" (charge clamp pocket) 使 LXXLL 基序的结合更加稳定。
- [3] RARs 配体所具有的减缓或阻抑细胞增殖的作用已经广泛应用于多种癌症的治疗中，例如急性早幼粒白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL) 与乳腺癌。但是，过于强烈的副作用会限制维甲酸类 RARs 配体的临床应用。例如维甲酸对人体具有极为强烈的致畸作用。此外，维甲酸的临床使用还受到细胞耐药性的影响，这已经在多种癌细胞中得到证实。因此，改变针对维甲酸受体 (RARs) 配体的药物研发策略，研制不同于维甲酸类化合物的维甲酸受体 (RARs) 配体，可能会降低基于维甲酸受体 (RARs) 配体的药物的

副作用。

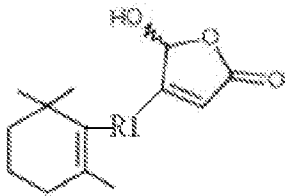
发明内容

[4] 本发明的主要目的，在于提供一种不同于维甲酸类化合物的维甲酸受体 (RARs) 配体，以降低基于维甲酸受体 (RARs) 配体的药物的副作用。

[5] 本发明的另一目的，在于提供一种维甲酸受体 (RARs) 配体药物的设计方法。

[6] 本发明的技术方案如下：

[7] 一种药物设计、药物合成和/或药物筛选的方法，其特征在于，目标药物化合物具有以下通式：



结构式 I

[8] R₁ 主要代表含有一个或多个 C=C 键的烯烃碳链，C₆~C₁₀ 烷基、C₆~C₁₀ 烷氧基、C₃~C₆ 环烷基、O、羰基、-SH、含氮杂环烷基或者任意上述结合。

[9] 一种具有结构式 I 的化合物用途，化合物通过高特异性与高结合亲和力来激活包括 RAR α，RAR β 和 RAR γ 在内的维甲酸受体 (RARs)，用作 RARs 激动剂。

[10] 前述的具有结构式 I 的化合物用途，其作为特异性的激活 RARs 靶基因的表达的药物。

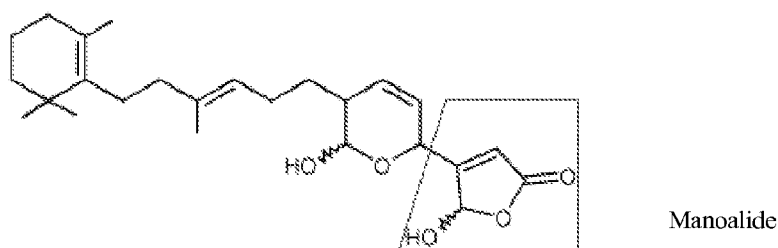
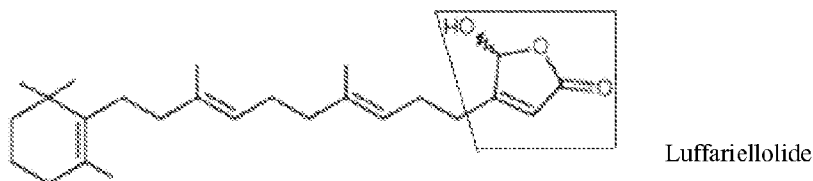
[11] 前述的具有结构式 I 的化合物用途，其作为治疗 RARs 介导的疾病的药物。

[12] 前述的具有结构式 I 的化合物用途，其作为治疗包括急性早幼粒白血病、乳腺癌和结直肠癌在内的癌症的药物。

[13] 前述的具有结构式 I 的化合物用途，其作为治疗包括结直肠癌在内的对维甲酸类药物产生耐药性的疾病的药物。

[14] 前述的具有结构式 I 的化合物用途，其中，所述化合物为

Luffariellolide 或 Manoalide, 框内基团是 γ -羟基丁烯酸内酯环:

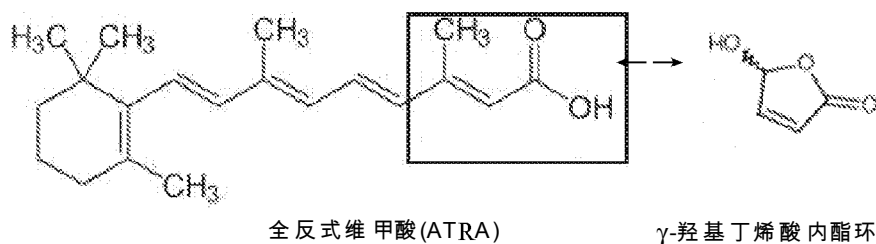


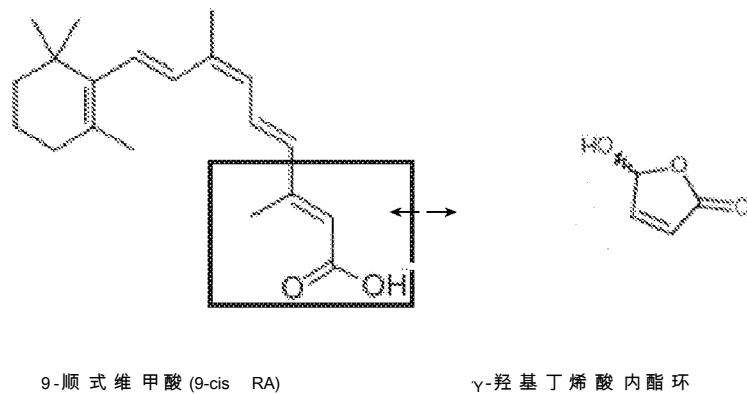
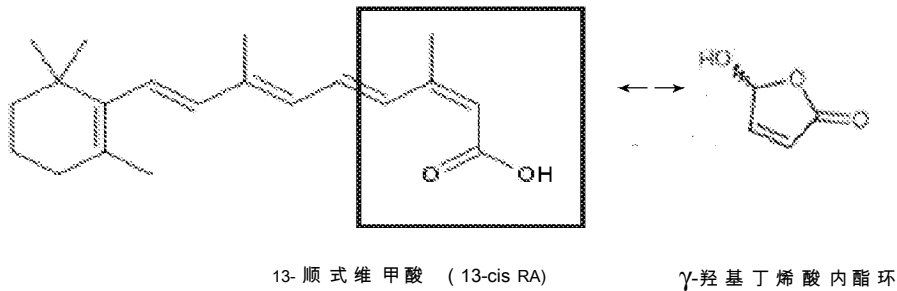
[15] 一种药物设计、药物合成和/或药物筛选的方法,其特征在于:该方法根据 Luffariellolide 与 RARs 的结合结构及位点,该晶体结构见附录 1 的结构,以 Luffariellolide 与 Manoalide 及其衍生物作为模板进行药物设计、药物合成和/或药物筛选。

[16] 前述的一种药物设计、药物合成和/或药物筛选的方法,该药物结构中包含与 RAR α , β 和 γ 通过共价键特异性结合的 γ -羟基丁烯酸内酯环。

[17] 前述的一种药物设计、药物合成和/或药物筛选的方法,该方法根据 Luffariellolide 与 Manoalide 及其衍生物的结构,将现有 RARs 配体相同位置上的基团替换为 γ -羟基丁烯酸内酯环。

[18] 前述的一种药物设计、药物合成和/或药物筛选的方法,全反式维甲酸 (ATRA), 13-顺式维甲酸 (13-cis RA) 与 9-顺式维甲酸 (9-cis RA), 框内相应位置基团被 γ -羟基丁烯酸内酯环取代,表示为以下的结构式:





[19] 本发明发现海洋天然产物 Luffariellolide 和 Manoalide 是维甲酸受体 (RARs) 的特异激动剂，并且基于分子结构水平来阐述这种特异的选择性。Luffariellolide 和 Manoalide 均来自海洋生物海绵，值得注意的是两者能够通过维甲酸受体 (RARs) 抑制多种肿瘤细胞的生长，同时降低了维甲酸类药物引起的剧烈副作用。本发明通过证明了 Luffariellolide 和 Manoalide 的医疗效果，从它与维甲酸受体 (RARs) 的相互作用揭示了迄今不明的这种多方面药效药物的信号通路机理。本发明还通过 X 射线晶体衍射，从原子水平上提供了 RARa 与 Luffariellolide 所形成的蛋白复合物的三维结构，展现了 RARa 的配体结合袋与 Luffariellolide 的共价结合模式，是配体与维甲酸受体 (RARs) 共价结合模式的首次发现。因此，本发明为以维甲酸受体 (RARs) 为靶标，Luffariellolide 为结构模板的新配体药物设计提供了药物优化和设计方法。本发明还发现 Luffariellolide 和 Manoalide 能够调节维甲酸受体 (RARs) 的重要靶向基因的表达从而抑制肿瘤细胞的生长。因此，通过实验得出的结果表明，通过优化 Luffariellolide 和 Manoalide，能够提供一种设计策略以研发用于抑制肿瘤生

长且有效减轻耐药性的药物。

附图说明

[20] 附图 1. 全反式维甲酸 (All-trans RA ATRA), Luffariellolide 和 Manoalide 的化学结构式。(A) 全反式维甲酸 (ATRA) 的化学结构式。(B) Luffariellolide 的化学结构式。(C) Manoalide 的化学结构式。

[21] 附图 2. Luffariellolide 和 Manoalide 对不同核受体转录激活作用的检测。将 pG5Luc 质粒和连接有 Gal-4 DNA 结合域的编码核受体 LBDs 的质粒转染进入 Cos7 细胞中, 分别向培养细胞中加入 $1\mu\text{M}$ 的 Luffariellolide, Manoalide 或二甲基亚砜作为对照。(图中 Luff 为 Luffariellolide 的缩写, Mano 为 Manoalide 的缩写, 下同。)

[22] 附图 3. Luffariellolide 和 Manoalide 剂量对 RAR α 的转录激活的影响。(A) 将 pG5Luc 质粒和连接有 Gal-4 DNA 结合域的编码 RAR α LBD 与 Gal4 DBD 的质粒共转染 Cos7 细胞, 向培养细胞中加入不同浓度的 Luffariellolide 或二甲基亚砜作为对照。(B) 将 pG5Luc 质粒和连接有 Gal-4 DNA 结合域的编码 RAR α LBD 与 Gal4 DBD 的质粒共转染 Cos7 细胞, 向培养细胞中加入不同浓度的 Manoalide 或二甲基亚砜作为对照。

[23] 附图 4. Luffariellolide 是一种 "泛 RAR" 激动剂。将 pG5Luc 质粒和连接有 Gal-4 DNA 结合域的编码核受体 LBDs 的质粒转染进入 Cos7 细胞中, 分别向培养细胞中加入 $1\mu\text{M}$ 的 Luffariellolide 或其他作为阳性对照核受体配体 (RARs, 全反式维甲酸; RXR α , 9-顺式维甲酸; GR, 地塞米松; PPAR γ , 罗格列酮)。此外, 一部分细胞培养液中加入拮抗剂 BMS493 以供检测 Luffariellolide 的作用机制。

[24] 附图 5. Luffariellolide 促进 SRC1 辅激活因子 LXXLL 基序与 RARs 的相互作用。利用 AlphaScreen 技术检测终浓度为 $1\mu\text{M}$ 的 Luffariellolide 对 RARs 与 RXR α 的 LBD 与 SRC1 的 LXXLL 基序相互作用的影响。另外还检测了 RARs 的拮抗剂 BMS493 对 Luffariellolide 作用的影响。

[25] 附图 6. Luffariellolide/RAR α LBD 复合体结构的示意图。绿色带状

部分表示 RAR α LBD, 红色带状部分表示 SRC1。Luffariellolide 用棒状图来表示, 黄色棒状部分表示该化合物的碳原子, 红色棒状部分表示氧原子。

[26] 附图 7. Luffariellolide/RAR α 结构与功能的联系。在下列各图中带状图表示核受体蛋白质的结构, 棒状图表示配体化合物的结构。(A) RAR α /Luffariellolide 复合体 (绿色) 与 RAR α / 全反式维甲酸复合体 (蓝色) 三维结构重叠比较, 在配体的重叠图像中, 绿色和红色分别代表全反式维甲酸的碳原子和氧原子, 黄色代表 Luffariellolide 的碳原子; (B) SRC1-4 (红色) 与 Luffariellolide/RAR LBD 复合体的结合模式图; (C) RAR LBD 与 Luffariellolide 之间的范德华力结合; (D) RAR LBD 与 Luffariellolide 共价键结合图; (E) RAR 的关键氨基酸突变后对 Luffariellolide 诱导的转录活性的影响。将编码 RAR 全长和含有 β RARE 报道基因的质粒共转染到 Cos7 细胞后用浓度为 $1\mu\text{M}$ 维甲酸受体 (RARs) 激动剂处理细胞。

[27] 附图 8. MALDI-TOF 质谱验证 Luffariellolide 与 RAR α LBD 的共价键结合作用。RAR α LBD 分别与二甲基亚砜, 全反式维甲酸, 或 Luffariellolide 孵育, 然后利用基质辅助激光解析飞行时间质谱仪 (MALDI-TOF MS) 进行分析。此外还对 RAR α LBD 与二甲基亚砜和 Luffariellolide 的混合物进行孵育后进行质谱分析。这两个峰分别是 RAR α LBD 和结合了 Luffariellolide 的 RAR α LBD。

[28] 附图 9. Luffariellolide 和 Manoalide 对急性早幼粒白血病细胞 THP-1 的影响。(A) 利用 MTT 实验检测 Luffariellolide 或 Manoalide 对 THP-1 细胞增殖的抑制作用。以细胞存活率作为检测指标 (纵坐标), 利用浓度为 $5\mu\text{M}$ 的配体或二甲基亚砜处理细胞 24 小时。(B) 利用流式细胞术检测 Luffariellolide 和 Manoalide 处理后 G1, S, and G2/M 期细胞所占比例。(C) Luffariellolide 或者 Manoalide 诱导维甲酸受体 (RARs) 关键靶基因在 THP-1 细胞中的表达。利用浓度为 $5\mu\text{M}$ 的 Luffariellolide 或 Manoalide 处理急性早幼粒白血病细胞 THP-1 然后使用荧光定量 PCR 实验检测维甲酸受体 (RARs) 关键靶基因的表达。

[29] 附图 10. Luffariellolide 和 Manoalide 对人骨髓细胞白血病细胞 HL-60

的影响。(A) 利用 MTT 实验检测 Luffariellolide 或 Manoalide 对 HL-60 细胞增殖的抑制作用。以细胞存活率作为检测指标 (纵坐标), 利用浓度为 $5 \mu\text{M}$ 的配体或二甲基亚砜处理细胞 24 小时。(B) Luffariellolide 或 Manoalide 诱导 RAR 关键靶基因在肿瘤细胞中的表达。利用浓度为 $5 \mu\text{M}$ 的 Luffariellolide 或 Manoalide 处理多种肿瘤细胞然后使用荧光定量 PCR 实验检测 RAR 关键靶基因的表达。

[30] 附图 11. Luffariellolide 和 Manoalide 对人乳腺癌细胞 MCF-7 的影响。(A) 利用 MTT 实验检测 Luffariellolide 或 Manoalide 对 MCF-7 细胞增殖的抑制作用。以细胞存活率作为检测指标 (纵坐标), 利用浓度为 $5 \mu\text{M}$ 的配体或二甲基亚砜处理细胞 24 小时。(B) Luffariellolide 或 Manoalide 诱导 RAR 关键靶基因在肿瘤细胞中的表达。利用浓度为 $5 \mu\text{M}$ 的 Luffariellolide 或 Manoalide 处理多种肿瘤细胞然后使用荧光定量 PCR 实验检测 RAR 关键靶基因的表达。

[31] 附图 12. Luffariellolide 对具有全反式维甲酸敏感性的结直肠癌细胞 HCT-15 和具有全反式维甲酸耐药性的结直肠癌细胞 HCT-116 的作用。(A) MTT 实验检测 Luffariellolide 对 HCT-15 和 HCT-116 细胞增殖的抑制作用。结果表示为相对对照组的百分比。(B-C) Luffariellolide 诱导 HCT-15 和 HCT-116 细胞 RAR 关键的靶基因 RAR β (B) 和 CRABP II (C) 的表达。使用 $1 \mu\text{M}$ Luffariellolide 和 $10 \mu\text{M}$ BMS493 分别处理 HCT-15 和 HCT-116 细胞。使用荧光实时定量 PCR 技术检测 mRNA 表达量。

具体实施方式

[32] 蛋白纯化

[33] 1. 克隆

[34] (1) 以 pcDNA-RAR 质粒为模板, $0.5 \mu\text{L}$ 50 mM 前向引物 $5' \text{ GATATGGATTC CCGGAGGTGGG}$, $0.5 \mu\text{L}$ 50 mM 反向引物 $3' \text{ GATATGCGGCCGCACTCCAACATTTCC}$ 为引物, $5 \mu\text{L}$ $10 \times \text{PCR buffer}$, $1 \mu\text{L}$ 10 mM dNTP 及 5 U pfu 酶 (Invitrogen) 加水 (Milli-Q) 补足至 $50 \mu\text{L}$ 体系进行 PCR 反应以获得含有双酶切位点 BamH

I 和 Not I 的人源 RARa LBD (配体结合域) (氨基酸残基数 182-415) 的 PCR 产物。

[35] PCR 反应程序为：

[36] 94℃ 3 分钟

94℃ 30 秒	}	30 个循环
58℃ 1 分钟		
72℃ 1 分钟		
72℃ 10 分钟		

[37] (2) 酶切克隆插入 DNA 片段和 pET24a (Novagen) 载体

[38] 用 BamH I 和 Not I 对 PCR 产物及 pET24a 载体进行酶切。

[39] 酶切体系为：

[40]	RARa LBD PCR 产物或 pET24a 载体	1 ug (10 μL)
[41]	BamH I (Thermo)	0.5 μL
[42]	Not I (Thermo)	0.5 μL
[43]	10 X Digestion Buffer (Thermo)	4 μL
[44]	ddH2O (Milli-Q)	25 μL
[45]	37℃ 1 小时。	

[46] (4) 酶切后的 PCR 产物和 pET24a 载体通过加有 SYBR DNA 染料的 1%琼脂糖凝胶分离并通过 Promega 胶回收试剂盒进行片段回收处理。

[47] (5) 将回收片段和载体以摩尔比 3: 1 连接。

[48] 连接体系为：

[49]	RARa LBD PCR 产物	2 μL
[50]	pET24a (Novagen) 载体	2 μL
[51]	5 X Ligation Buffer 连接缓冲液 (Invitrogen)	2 μL
[52]	T4 DNA Ligase (T4 DNA 连接酶-Invitrogen)	0.5 μL

[53] 加 ddH₂O 至 10 μ L

[54] 室温反应 30 分钟。

[55] (6) 取 2 μ L 连接产物转化入 50 μ L Trans 109 感受态细胞，冰浴 30 分钟后 42℃ 热激 30 秒。加入无抗生素的 LB 液体培养基 250 μ L，于 225 rpm 37℃ 预摇 40 分钟后，取 100 μ L 转化产物涂于添加有 50 μ g/ml 卡那霉素的 LB 固体培养基平板，37℃ 过夜培养。

[56] (7) 次日，挑取单克隆于 2 ml 含 50 μ g/ml 卡那霉素的 LB 液体培养基，37℃ 摇床培养 10 小时。

[57] (8) 采用 Qiagen MiniPrep 质粒小提试剂盒对所摇菌液进行质粒提取。

[58] (9) 对提取的质粒进行酶切鉴定。酶切鉴定体系：

[59] 质粒 2 μ L

[60] BamH I (Thermo) 0.5 μ L

[61] Xho I (Thermo) 0.5 μ L

[62] 10 X Digestion Buffer (Thermo) 2 μ L

[63] ddH₂O (Milli-Q) 15 μ L

[64] 37℃ 恒温箱酶切反应 30 分钟后用 1% 琼脂糖凝胶进行检测以确定目的片段成功插入表达载体。最后将获得的质粒进行测序鉴定。得到六聚组氨酸标记的人类核受体 RAR α LBD 的表达质粒，表示为 pET24a-His6- RAR α LBD。

[65] 2. 目的蛋白表达和纯化

[66] (1) 转化

[67] 将 pET24a-His6- RAR α LBD 转化进 BL21 (DE3) 感受态细胞，取 1 μ L 质粒转化入 50 μ L BL21 感受态细胞，冰浴 30 分钟后放入 42℃ 水浴锅中热激

30 秒。加入无抗生素的 LB 液体培养基 250 μ L 于 225 rpm 37 $^{\circ}$ C 预摇 40 分钟后取 15 μ L 涂于添加有 50 μ g/ml 卡那霉素的 LB 固体培养基平板，37 $^{\circ}$ C 过夜培养。

[68] (2) 摇菌

[69] 次日挑单克隆于 50 ml 含 50 μ g/ml 卡那霉素的 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C 预摇 8 小时后转入含 50 μ g/ml 卡那霉素的 1.5 L LB 液体培养基中，当 OD₆₀₀ 达到 1.0 左右时，加入 0.1 mM 的 IPTG 在 16 $^{\circ}$ C 下低温诱导表达。

[70] (3) 收集含有诱导目的蛋白的菌体细胞

[71] 诱导表达过夜的 1.5 L 菌液于 4 $^{\circ}$ C 3,000 rpm 离心 10 min 收集细菌，用纯化缓冲液 100 ml (20 mM Tris pH8.0, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 25 mM imidazole) 重悬菌液，冻存于 -80 $^{\circ}$ C。

[72] (4) 蛋白质提取

[73] 采用 Fisher Scientific Sonic Dismembrator 超声破碎仪以振幅 60%，5 秒工作 10 秒休息的频率超声波处理 8 分钟。

[74] BECKMAN 离心机以 20,000 rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 30 分钟后取上清。

[75] (5) 蛋白质纯化

[76] 将上清过 5 ml 的镍离子交换柱 (NiSO₄-loaded HisTrap HP column, GE Healthcare)，使目的蛋白质充分富集到镍柱上。

[77] 采用 GE 公司 AKTA 蛋白质纯化系统及 UNICORN 软件操作。

[78] 洗泵：先用水洗，再用缓冲液洗。操作步骤为：在 System Control 窗口中，依次选择：Manual $\rightarrow$ Pump $\rightarrow$ Pumpwashbasic $\rightarrow$ PumpA, PumpB $\rightarrow$ On $\rightarrow$ Excute。

[79] 层析柱连接：先启动系统泵，待有溶液流出时，将层析柱动态接入系统，使流出的蛋白质可以经过 UV 检测到峰值，打开 UNICORN 软件，编辑蛋白洗脱的程序：

[80] 20 ml 洗脱缓冲液进行柱平衡

[81] 25-500 mM 咪唑进行梯度竞争性结合柱子以洗脱目的蛋白质

[82] 15 ml 缓冲液进行柱平衡。

[83] 蛋白质洗脱：用洗脱缓冲液 A、B 梯度洗脱该柱子上的蛋白（洗脱缓冲液 A 成分：25 mM Tris, 150 mM NaCl, 25 mM Imidazole 和 10% 甘油，pH 7.5；洗脱缓冲液 B 成分：25 mM Tris, 150 mM Imidazole 和 10% 甘油，pH 7.5），通过控制咪唑浓度梯度变化在 25-500 mM，以在合适浓度竞争下洗脱含相似结构的组氨酸标签的目的蛋白质。

[84] 采用 Hiload26 分子筛层析柱（GE Healthcare）利用分子量不同进一步纯化目的蛋白质，步骤如下：

[85] 将收集的蛋白质盛入 Millipore 10 kD 的浓缩管，4℃ 4,000 g，20 min 离心到终体积 10 ml 后，经注射器注入 AKTA 端口后开始程序运行，方法同上。蛋白洗脱缓冲液换为含有 10 mM NaCl 的洗脱缓冲液 C（洗脱缓冲液 C：25 mM Tris, pH 7.5）。

[86] (6) 制备蛋白质复合体

[87] 采用从金斯瑞 (Genscript) 公司定制合成的 SRC1 多肽（AQQKSLLQQLLTE）与 RARα LBD 蛋白复合体：分子筛柱层析得到的 20 ml 蛋白质与 SRC1 多肽及 Luffariellolide 按摩尔比 1:1:1 混合加入 10 kD MILLIPORE 15 ml 浓缩管中浓缩，4℃ 4,000 离心浓缩，将蛋白浓缩到 10 mg/ml 的终浓度。

[88] 蛋白结晶，晶体数据收集与结构解析

[89] 采用悬滴法进行结晶筛选，RARa/Luffariellolide/SRC1 复合物在室温条件下，悬滴液成分为 1.0 μ l 上述蛋白多肽配体复合体溶液混合上 1.0 μ l 结晶缓冲液 (2% V/V Tacsimate pH7.0, 5% 2-propanol, 0.1 M Imadazole and 8% PEG 3350)。生长成熟的蛋白晶体用液氮进行急速冷冻保存。在美国先进光源 (Advanced Photon Source) 的生物 21 号实验站进行数据采集。数据使用 HKL2000 软件进行初步分析整理。具体结构解析使用由 CCP4 程序包 (<http://www.ccp4.ac.uk>) 中的 Molrep、Phaser 等通过分子置换确定出大致结构模型，通过 Coot 的人工模型精细构建及 REFMAC 和 phenix.refine 深入修饰的多次循环，得到最终蛋白复合物结构 (Otwinowski and Minor, 1997, Methods in Enzymology 276, 307-326)。

[90] 辅因子结合实验

[91] 通过 Alphascreen 分析方法，用 Alpha Screen nickel chelate detection kit 试剂盒 (Perkins-Elmer) 检测配体诱导核受体募集各种辅调节因子的结合能力是核受体功能调控的一个重要指标 (Li, Y. et al. 2005, Mol Cell 17, 491-502)。该实验的反应体系是 20 nM 的融合组氨酸标签的受体 LBD 蛋白，20 nM 生物素化标记的辅因子多肽，5 μ g/ml 的供体和受体珠子，缓冲液 (50 mM MOPS, 50 mM NaF, 0.05 mM CHAPS, and 0.1 mg/ml bovine serum albumin, pH7.4)，反应体系 50 μ L 于 384 孔板中室温反应 1 小时后用 AlphaScreen 检测仪读取 680 nm 激发光下 520-620 nm 的发射光信号。用于 Alphascreen 分析的生物素标记的多肽序列如下：

[92] SRC1-2, SPSSHSSLTERHKILHRLLQEGSP ;

[93] SRC2-3, QEPVSPKKKENALLRYLLDKDDTKD ;

[94] SRC3-3, PDAASKHKQLSELLRGGSG ;

[95] NCOR-2, GHSFADPASNLGLEDIIRKALMGFS.

[96] 瞬时转染实验

[97] 1. 质粒 :

[98] (2) 获得关键结合位点的 RAR α 点突变表达载体。使用 Quick-Change site-directed mutagenesis 试剂盒 (Stratagene) 进行突变 , 突变反应体系如下 :

[99]	野生型质粒 pCMX- RAR α (50 ng)	0.5 μ L
[100]	突变引物 (100 μ M stock)	0.2 μ L
[101]	pfu DNA 聚合酶 (Invitrogen) (2 U)	1 μ L
[102]	10 mM dNTPs	1 μ L
[103]	10 X PCR buffer	5 μ L
[104]	ddH ₂ O	43 μ L
[105]	94 °C 3 分钟	
[106]	94 °C 30 秒	} 15 个循环
[107]	55 °C 1 分钟	
[108]	72 °C 7 分钟	
[109]	4 °C forever	

[110] 20 μ L PCR 产物用 Dpn I 甲基化酶消化后取 2 μ L 消化产物转化入大肠杆菌 TransI09 感受态细胞 , 冰浴 30 分钟后 42 °C 热激 30 秒。加入无抗生素的 LB 液体培养基 250 μ L 于 225 rpm 37 °C 预摇 40 分钟后取 150 μ L 涂于添加有

100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 固体培养基平板，37°C 过夜培养。

[111] 次日，挑取单克隆于 2 ml 含 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 液体培养基，37°C 过夜培养。采用 Qiagen MiniPrep 质粒小提试剂盒对所摇菌液进行质粒提取。对质粒进行测定鉴定。

[112] (2) 各内源结合元件的报告基因直接商业购买。

[113] 2 转染：

[114] 使用含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基进行猴肾上皮细胞 COS-7 细胞培养，转染前一天在 24 孔板进行 COS-7 细胞接种，接种密度为 5×10^4 细胞/每孔，第二天进行转染。转染使用 Lipofectaraine 2000 (Invitrogen) 进行瞬时转染。在报告基因分析实验中，使用 200 ng 的核受体全长表达质粒或其突变体表达质粒与 200 ng 的内源启动子报告基因以及 30 ng 的 Renil la 荧光素酶表达质粒进行共转染。每孔添加 500 μ LOpti-MEM 培养 5 小时后，添加稀释在 Opt i -MEM 的配体药物至相应浓度，处理 18 小时。

[115] 3. 报告基因分析：

[116] 配体药物处理 18 小时后，用 Promega 公司的双荧光素梅报告基因分析试剂盒进行报告基因活性分析。裂解细胞用于荧光素酶检测实验，取 10 μ L 细胞裂解细胞转移到 96 孔板，加入 50 μ L 荧光素酶反应液后使用 EnSpireTM2300 多功能酶标仪 (Perkin Elmer) 检测在 560 nm 下的发射光信号，后加入 Stop&Glo® 反应液终止荧光素酶反应并检测 renilla 荧光素酶活力。报告基因的活性以 renilla 活性为内参。

[117] 基因表达分析

[118] HCT-15 等细胞用 1 μ M 全反式维甲酸或 Luffariel lol ide 处理 24 小时。

使用 Trizol 试剂 (Life Technologies, Inc.) 提取细胞的总 RNA。反转录采用 TAKARA 反转录试剂盒, 荧光定量 PCR 采用 SYBR 绿色荧光染料在 CFXTM96 系统 (BIO-RAD) 实时监测系统下进行基因表达量分析。

[119] 反应体系如下:

[120]	SYBR Premix Ex Taq (2*)	}	12.5 μ L	总计 25 μ L
[121]	PCR 前引物 (10 μ M)		1 μ L	
[122]	PCR 后引物 (10 μ M)		1 μ L	
[123]	cDNA 模版		2 μ L	
[124]	灭菌蒸馏水		8.5 μ L	

[125] 两步法扩增 PCR 程序:

[126] 预变性

[127] 95 °C 30 秒

[128] PCR 反应

[129] 95 °C 5 秒 } 40 个循环

[130] 60 °C 30 秒 }

[131] 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 分析

[132] 将纯化后的 RAR α LBD (30 μ M) 蛋白溶液与二甲基亚砜, 全反式维甲酸或 Luffariellolide 4 °C 共同孵育 24 小时。利用 Reflex III time-of-flight 质谱仪 (Bruker-Daltonics, Bremen, Germany) 进行基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析。利用强度为 19 keV 的脉冲 UV 激光束 (λ = 337 nm) 使其离子化并加速。所用的样品均利用过饱和的芥子酸 (3, 5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid), 50% 乙腈和 0.1% 的 TFA 作为基质。

将样品和基质按照同样的体积 (0.8 μ L) 混合后点样检测。

[133] MTT 法检测细胞增殖

[134] 按照每孔 1×10^4 的数量将细胞培养于 24 孔板。培养过夜后加入全反式维甲酸, Luffariellolide 或 Manoalide 处理 24 小时。然后加入 MTT (3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-5-diphenyltetrazolium bromide) 再处理 4 小时。最后将包括培养基, 药物和多余的 MTT 一起去除后利用二甲基亚砷溶解甲瓖, 检测 490nm 处和 630nm 处的吸光度。

[135] 流式细胞术分析细胞周期

[136] 按照每孔 5×10^5 的数量将细胞培养于 24 孔板。细胞培养 24 小时后用 5 μ M 的全反式维甲酸, Luffariellolide 或者 Manoalide 处理 24 小时。然后收集细胞, 利用 70% 乙醇固定过夜后利用碘化丙啶染色 1 小时。至少 20,000 个细胞利用 Epics XL Flow Cytometer (Beckman Coulter, Minnesota, USA) 检测。结果使用 Modfit software version 3.2 (Verity Software House, Inc., Topsham, ME) 分析。

[137] 我们的发明表明 Luffariellolide 和 Manoalide 及通过设计两者的衍生物, 能够特异地以维甲酸受体 RAR 为靶点, 作为治疗多种癌症的可选替代药物。基于我们所展示的结构与构效 (SAR) 的分析, 我们提供了一种用以提高 RAR 亲和性和特异性, 降低耐药性的合理的设计范本。

[138] 实施例 1, 证明 Luffariellolide 和 Manoalide 是维甲酸受体 RAR 的配体。

[139] 在寻找 RAR 配体的过程中, 将 RARs 的 LBD 当做"诱饵"利用 AlphaScreen 技术对化合物库进行筛选, 这一技术目前已经广泛应用于基于核受体与配体相

相互作用的药物研发中 (Lin et al., 2012, Cell Res. 22 (4):746-56)。

Luffariellolide 是一种海洋天然产物,化学本质为二倍半萜,最初分离自海绵 (包括 Luffariella sp. 和 Fascaplysinopsis)。与全反式维甲酸 (ATRA) 类似, Luffariellolide 由一条疏水的碳链和一个三甲基环己烯基团组成 (附图 1)。值得注意的是在 Luffariellolide 与全反式维甲酸的化学结构对比中,关键位置的基团是完全不同的。全反式维甲酸为丁烯酸 (羧基),而在 Luffariellolide 的相应位置上则为 γ -羟基丁烯酸内酯环。这一点不同是极其重要的,是药物研发新策略的关键所在。Manoalide 也是分离自海绵的天然产物,属于倍半萜类化合物。Manoalide 与 Luffariellolide 的结构基本相同 (附图 1),都含有三甲基环己烯环和 γ -羟基丁烯酸内酯环这两个主要基团。不同之处在于 Manoalide 中与 γ -羟基丁烯酸内酯环相连的是一个二氢吡喃环,而 Luffariellolide 不含有此二氢吡喃环。

[140] 为了进一步研究 Luffariellolide 和 Manoalide 对 RARs 的激活作用,我们将编码 Gal4 DNA 结合域、报道基因、多种核受体 LBD 的质粒共转染到 Cos7 细胞中。实验结果与最初对化合物的筛选结果一致, Luffariellolide 和 Manoalide 均可以激活维甲酸受体 RAR,但不能激活其他核受体 (包括 RXR α 、PPAR γ 、GR、RTR、ERR α 、ROR α , β , γ 以及 TR3) (附图 2),说明 Luffariellolide 和 Manoalide 是维甲酸受体 RAR 的独特配体。

[141] 为了检测了 Luffariellolide 和 Manoalide 与 RARs 的结合特性,我们使用一系列不同浓度的 RARs 配体进行荧光素酶报道基因检测来进行比较 (附图 3)。全剂量曲线表明 Luffariellolide 对 RARs 的激活具有浓度依赖性,其 EC_{50} =600nM (附图 3A)。我们同时检测了 Manoalide, 实验结果表明 Manoalide

对 RAR 的激活也具有浓度依赖性, 其 $EC_{50} = 600\text{nM}$ (附图 3B)。我们进一步利用荧光素酶报告基因实验将编码 Gal4 DNA 结合域、报道基因、多种核受体 LBD 的质粒共转染到 Cos7 细胞中。结果显示 Luffariellolide 可以激活 RAR α , RAR β , RAR γ , 表明 Luffariellolide 是一种 "泛 RAR" 激动剂 (附图 4)。此外 RARs 特异性的拮抗剂 BMS493 会抑制 Luffariellolide 对 RARs 的激活作用, 进一步证明 Luffariellolide 是通过与 RARs 直接结合的方式发挥作用的 (附图 4)。

[142] 为了研究 Luffariellolide 与 RARs 相互作用的生化机理, 我们采用 AlphaScreen 技术检测了 Luffariellolide 对 RARs 募集辅激活因子 (含 LXXLL) 的影响。如附图 5 所示, Luffariellolide 极大地增强了 RARs 对辅激活因子的募集, 但是对 RXR α 没有影响。并且 Luffariellolide 对 RARs 的这种增强作用会因为拮抗剂 BMS493 的加入而被抑制, 从而进一步说明 Luffariellolide 是直接结合于 RARs 的激动剂。

[143] 实施例 2, RAR α 配体结合域片段与 Luffariellolide 的复合物的分子结构验证实验。

[144] 为了研究 Luffariellolide 与 RARs 结合的分子基础, 我们解析了 RAR α 与 Luffariellolide 复合体的晶体结构。晶体结构表明结合 Luffariellolide 后的 RAR α LBD 形成二聚体, 其构象与 RAR/全反式维甲酸复合体相似, 配体均锚定于 RAR α 的相似位置 (附图 6 和附图 7A)。RAR/Luffariellolide 复合体的 AF-2 与 α 螺旋 H3、H4 和 H5 共同构成一个 "口袋", 与辅激活子 SRC1 的 LXXLL 基序发生相互作用 (附图 6 和附图 7B)。这是一种核受体与辅激活因子相互作用的典型模式。其中, 位于 H3 的 K244 和位于 AF-2 的 E412 是其相互作用的关键位点。对这两个关键氨基酸残基进行突变 (K244E, E412K), 然后进行报告基因检测实验

(附图 7E)。实验结果表明,任何一个关键残基的突变均会导致 RARa 被全反式维甲酸或 Luffar iellolide 的激活作用显著减弱。这一实验结果有力证明了由配体调控的 RARs 激活作用的典型机制。

[145] 将 RAR/Luffar iellolide 复合体与 RAR/全反式维甲酸复合体的结构重叠后进行对比发现与全反式维甲酸相比,Luffar iellolide 分子更大,导致所对应的配体结合口袋也增大,表现为部分 α 螺旋 H10 向外移动 1.2 Å (附图 7A)。除此之外 Luffar iellolide 在 RARa 配体结合口袋中的结合方式还有其独特之处:Luffar iellolide 通过范德华引力与 RARa 的 α 螺旋 H3 的 W225 氨基酸残基相互作用,这一作用有利于 Luffar iellolide 的结合 (附图 7C)。对这一位点进行点突变处理 (W225F) 破坏了相互作用,导致 Luffar iellolide 对 RARs 的激活作用显著降低,但是同样的点突变对全反式维甲酸的结合能力与功能均没有影响。值得注意的是,电子密度图显示 RARa 的 C235 氨基酸残基与 Luffar iellolide 的 γ -羟基丁烯酸内酯环上的酮基形成共价键,而在维甲酸类化合物相应的位置上则是一个羧基 (附图 7D)。质谱分析的结果为 Luffar iellolide 与 RARa 形成共价键提供了有力的证据 (附图 8)。为了检测这个共价修饰对 Luffar iellolide 结合以及激活囊 α 作用的影响,对 C235 残基进行点突变 (C235A, C235L),使用荧光素酶报道基因检测的方法发现:C235A 和 C235L 均会使 Luffar iellolide 对 RARa 的激活作用丧失或显著下降,而对全反式维甲酸却没用影响 (附图 7E),这说明该共价键对 Luffar iellolide 与 RARa 的结合是至关重要的。

[146] 实施例 3, Luffar iellolide 和 Manoal ide 对多种癌细胞增殖和基因表达的调控

[147] 申请人设计了一系列细胞生物学实验来进一步研究 Luffariellolide 和 Manoalide 的生理功能。通过对急性早幼粒白血病 THP-1 细胞系进行的 MTT 和流式细胞术实验, 结果发现: Luffariellolide 和 Manoalide 与全反式维甲酸相似, 可以抑制 THP-1 细胞增殖并且使 THP-1 细胞周期 G1 期的细胞所占比例上升 (附图 9A 和附图 9B)。申请人还检测了经过 Luffariellolide 或 Manoalide 处理的 THP-1 细胞 RAR 靶基因的表达情况。如附图 9C 所示, 两者均可诱导一些已知的 RAR 靶基因 (RAR α , β 和 interferon regulatory factor-1, IRF-1) 上调。这进一步证明了 Luffariellolide 和 Manoalide 对 RAR 靶基因的表达有很强的诱导作用。此外, 申请人还在人骨髓细胞白血病细胞 (HL-60) 和人乳腺癌细胞 (MCF-7) 中进行了相关实验, 进一步证明了 Luffariellolide 对多种肿瘤细胞均具有抑制增殖的作用 (附图 10 和附图 11)。

[148] 实施例 4, Luffariellolide 对具有全反式维甲酸耐药性的结直肠癌细胞的作用

[149] 申请人进一步的研究了 Luffariellolide 对结直肠癌细胞系 HCT-116 和 HCT-15 增殖的抑制作用。两种细胞系的不同之处在于: HCT-116 具有维甲酸药物耐药性, 而 HCT-15 则是维甲酸药物敏感型的。如附图 12A 所示, 全反式维甲酸和 Luffariellolide 都可以抑制 HCT-15 的增殖。对于 HCT-116 细胞而言, 全反式维甲酸对 HCT-116 的增殖没有影响, 但是 Luffariellolide 可以有效抑制 HCT-116 的增殖 (附图 12A), 这表明在抗癌方面 Luffariellolide 可能要优于全反式维甲酸。基于以往研究, RAR β 和 CRABP II 这两个基因在维甲酸药物耐药性方面有着重要指示作用, 选取这两个基因作为研究对象。正如附图 12B, 12C 所示, 全反式维甲酸和 Luffariellolide 都可以诱导 HCT-15 中这两个基因

的表达；而由于 HCT-116 细胞耐药性的影响，全反式维甲酸不能诱导该细胞中 RAR β 和 CRABP II 这两个基因的表达，但是 Luffariellolide 可以诱导 HCT-116 细胞的 RAR β 和 CRABP II 基因表达上调。另外，我们还在以上检测细胞增殖和基因表达的实验体系的基础上加入了拮抗剂 BMS493，结果发现 Luffariellolide 的作用因为 BMS493 的加入明显减弱，更进一步说明 Luffariellolide 对癌细胞发挥作用是通过 RARs 对癌细胞发挥作用的。

[150] 鉴于 RAR 配体在药物开发尤其是抗癌药物的研制方面具有重要作用，近年来针对可以调控 RARs 活性的小分子化合物（包括激动剂和拮抗剂）的研发深受相关工作者的重视。但是到目前为止，大多数已经发现的 RAR 配体都在结构上与维甲酸相似。因此，这些配体也同样面临着严重的副作用和广泛的耐药性。而本发明研究的 Luffariellolide 和 Manoalide 首先在结构上与维甲酸类化合物不同，其独特之处在于通过共价键与 RARs 结合，这一特点此前尚未在 RARs 配体中发现。更为重要的是，Luffariellolide 和 Manoalide 对已经具有维甲酸药物耐药性的癌细胞（如 HCT-116）也有治疗作用。因此，Luffariellolide 和 Manoalide 的发现对针对以 RARs 为代表的重要核受体的药物研发指明了新的方向。

工业实用性

[151] 通过实验得出的结果表明，通过优化 Luffariellolide 和 Manoalide，能够提供一种设计策略以研发用于抑制肿瘤生长且有效减轻耐药性的药物。

[152] 上述仅为本发明的具体实施例，但本发明的设计构思并不局限于此，凡利用此构思对本发明进行非实质性的改动，均应属于侵犯本发明保护范围的行为。

Case	Year	Month	Day	Time	Location	Activity	Duration	Frequency	Intensity	Notes
1	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
2	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
3	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
4	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
5	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
6	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
7	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
8	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
9	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
10	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
11	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
12	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
13	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
14	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
15	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
16	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
17	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
18	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
19	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
20	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
21	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
22	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
23	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
24	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
25	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
26	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
27	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
28	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
29	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
30	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
31	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
32	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
33	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
34	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
35	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
36	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
37	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
38	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
39	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
40	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
41	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
42	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
43	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
44	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
45	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
46	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
47	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
48	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
49	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
50	1988	1	1	12:00	LA	CB	1	1	1	1
51	1988</									

[illegible]

[illegible]

OM	1082	CB	LEU	V	19	-Z	844	-	S61	14	SZ1	1	00	S2	85	C	
OM	1083	CG	LEU	V	19	-Z	288	-	61	16	036	1	00	S3	1	C	
OM	1084	DW	LEU	V	319	-Z	841	-	024	16	S19	1	00	S1	65	C	
OM	1085	DPZ	LEU	V	319	-Z	762	-	742	16	910	1	00	66	S9	C	
OM	1086	D	na	V	319	-Z	863	-	2	184	9	10	00	52	S6	C	
OM	1087	N	GLU	V	320	-Z	983	-	32	43	11	86	1	00	S0	12	M
OM	1088	GLU	V	320	-Z	983	-	32	43	11	86	1	00	S0	12	C	
OM	1089	GLU	V	320	-Z	983	-	32	43	11	86	1	00	S0	12	C	
OM	1090	CB	GLU	V	320	-Z	369	-	1	963	10	108	1	00	S3	19	C
OM	1091	CG	GLU	V	320	-Z	369	-	1	963	10	108	1	00	S3	19	C
OM	1092	CD	GLU	V	320	-Z	369	-	1	963	10	108	1	00	S3	19	C
OM	1093	OE	GLU	V	320	-Z	369	-	1	963	10	108	1	00	S3	19	C
OM	1094	OPZ	GLU	V	320	-Z	369	-	1	963	10	108	1	00	S3	19	C
OM	1095	GLU	V	320	-Z	369	-	1	963	10	108	1	00	S3	19	C	
OM	1096	GLU	V	320	-Z	369	-	1	963	10	108	1	00	S3	19	C	
OM	1097	N	通	V	320	-Z	369	-	1	963	10	108	1	00	S3	19	C
OM	1098	D	通	V	320	-Z	369	-	1	963	10	108	1	00	S3	19	C
OM	1099	CB	通	V	320	-Z	369	-	1	963	10	108	1	00	S3	19	C
OM	1100	CG	通	V	320	-Z	369	-	1	963	10	108	1	00	S3	19	C
OM	1101	as	通	V	320	-Z	369	-	1	963	10	108	1	00	S3	19	C
OM	1102	3D	通	V	320	-Z	369	-	1	963	10	108	1	00	S3	19	C
OM	1103	0	MET	V	321	-Z	529	-	27	523	9	208	1	00	47	48	C
OM	1104	0	MET	V	321	-Z	529	-	27	523	9	208	1	00	47	48	C
OM	1105	N	VSP	V	322	-Z	529	-	27	523	9	208	1	00	47	48	C
OM	1106	DA	VSP	V	322	-Z	529	-	27	523	9	208	1	00	47	48	C
OM	1107	CB	VSP	V	322	-Z	529	-	27	523	9	208	1	00	47	48	C
OM	1108	CG	VSP	V	322	-Z	529	-	27	523	9	208	1	00	47	48	C
OM	1109	I	09	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	C
OM	1110	0	VSP	V	322	-Z	529	-	27	523	9	208	1	00	47	48	C
OM	1111	0	VSP	V	322	-Z	529	-	27	523	9	208	1	00	47	48	C
OM	1112	CB	ALA	V	324	-Z	529	-	27	523	9	208	1	00	47	48	C
OM	1123	CB	ALA	V	324	-Z	529	-	27	523	9	208	1	00	47	48	C
OM	1124	C	ALA	V	324	-Z	529	-	27	523	9	208	1	00	47	48	C
OM	1125	N	ALA	V	324	-Z	529	-	27	523	9	208	1	00	47	48	C
OM	1126	N	ALA	V	324	-Z	529	-	27	523	9	208	1	00	47	48	C
OM	1127	DA	ALA	V	324	-Z	529	-	27	523	9	208	1	00	47	48	C
OM	1128	CB	ALA	V	324	-Z	529	-	27	523	9	208	1	00	47	48	C
OM	1129	CG	ALA	V	324	-Z	529	-	27	523	9	208	1	00	47	48	C
OM	1130	0	VSP	V	324	-Z	529	-	27	523	9	208	1	00	47	48	C
OM	1131	I	130	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	C
OM	1132	0	GLU	V	325	-Z	529	-	27	523	9	208	1	00	47	48	C
OM	1133	CG2	T m	V	326	-Z	529	-	27	523	9	208	1	00	47	48	C
OM	1134	CG2	T m	V	326	-Z	529	-	27	523	9	208	1	00	47	48	C
OM	1135	N	T m	V	326	-Z	529	-	27	523	9	208	1	00	47	48	C
OM	1136	CG	T m	V	326	-Z	529	-	27	523	9	208	1	00	47	48	C
OM	1137	CG	T m	V	326	-Z	529	-	27	523	9	208	1	00	47	48	C
OM	1138	CG	T m	V	326	-Z	529	-	27	523	9	208	1	00	47	48	C
OM	1139	CG	T m	V	326	-Z	529	-	27	523	9	208	1	00	47	48	C
OM	1140	C	T m	V	326	-Z	529	-	27	523	9	208	1	00	47	48	C
OM	1141	0	THR	V	326	-Z	529	-	27	523	9	208	1	00	47	48	C
OM	1142	N	GL	V	327	-Z	529	-	27	523	9	208	1	00	47	48	C
OM	1143	CG	GL	V	327	-Z	529	-	27	523	9	208	1	00	47	48	C
OM	1144	0	GL	V	327	-Z	529	-	27	523	9	208	1	00	47	48	C
OM	1145	0	GL	V	327	-Z	529	-	27	523	9	208	1	00	47	48	C
OM	1146	N	LEU	V	328	-Z	529	-	27	523	9	208	1	00	47	48	C
OM	1147	CG	LEU	V	328	-Z	529	-	27	523	9	208	1	00	47	48	C
OM	1148	CG	LEU	V	328	-Z	529	-	27	523	9	208	1	00	47	48	C
OM	1149	CG	LEU	V	328	-Z	529	-	27	523	9	208	1	00	47	48	C
OM	1150	CG	LEU	V	328	-Z	529	-	27	523	9	208	1	00	47	48	C

[illegible]

[illegible]

[illegible]

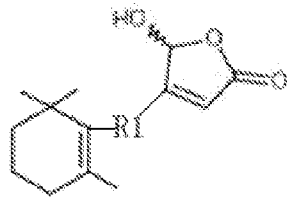
OM	1703	CB	T	m	3 9 7
OM	1704	OG	T	m	295
OM	1705	OD	T	m	3 9 7
OM	1711	CG	LEU	W	3 9 8
OM	1713	CD2	L	na	3 9 8
OM	1715	L	na	C	3 9 8
OM	1716	L	na	C	3 9 8
OM	1717	N	SAT	698	
OM	1718	C	SAT	698	
OM	1719	C	SAT	698	
OM	1720	CD	SAT	3 9 9	
OM	1721	CE	SAT	3 9 9	
OM	1722	NZ	SAT	3 9 9	
OM	1723	C	SAT	698	
OM	1724	N	SAT	698	
OM	1725	N	MET	400	
OM	1726	N	MET	400	
OM	1727	CB	MET	400	
OM	1728	CB	MET	400	
OM	1729	CB	MET	400	
OM	1730	CE	MET	400	
OM	1731	C	M	T	400
OM	1732	N	MET	400	
OM	1733	N	GLU	JOI	
OM	1734	D	LU	JOI	
OM	1735	CB	LU	JOI	
OM	1736	CB	LU	JOI	
OM	1737	CD	LU	JOI	
OM	1738	CD	LU	JOI	
OM	1739	CD	LU	JOI	
OM	1740	CD	LU	JOI	
OM	1741	CD	LU	JOI	
OM	1742	CD	LU	JOI	
OM	1743	CD	LU	JOI	
OM	1744	CB	IL	JOZ	
OM	1745	CG1	IL	JOZ	
OM	1746	CG1	IL	JOZ	
OM	1747	CG1	IL	JOZ	
OM	1748	CG1	IL	JOZ	
OM	1749	HE	0	0	
OM	1751	D	V	oad	
OM	1752	C	oad	JOZ	
OM	1753	CG	oad	402	
OM	1754	CD	oad	402	
OM	1755	PRO	0	0	
OM	1756	GLY	N	12 7	
OM	1757	GLY	N	12 7	
OM	1758	GLY	N	12 7	
OM	1759	GLY	N	12 7	
OM	1760	GLY	N	12 7	
OM	1761	GLY	N	12 7	
OM	1762	GLY	N	12 7	
OM	1763	GLY	N	12 7	
OM	1764	GLY	N	12 7	
OM	1765	GLY	N	12 7	
OM	1766	GLY	N	12 7	
OM	1767	GLY	N	12 7	
OM	1768	GLY	N	12 7	
OM	1769	GLY	N	12 7	
OM	1770	GLY	N	12 7	
OM	1771	GLY	N	12 7	
OM	1772	GLY	N	12 7	
OM	1773	GLY	N	12 7	
OM	1774	GLY	N	12 7	
OM	1775	GLY	N	12 7	
OM	1776	GLY	N	12 7	
OM	1777	GLY	N	12 7	
OM	1778	GLY	N	12 7	
OM	1779	GLY	N	12 7	
OM	1780	GLY	N	12 7	
OM	1781	GLY	N	12 7	
OM	1782	GLY	N	12 7	
OM	1783	GLY	N	12 7	
OM	1784	GLY	N	12 7	
OM	1785	GLY	N	12 7	
OM	1786	GLY	N	12 7	
OM	1787	GLY	N	12 7	
OM	1788	GLY	N	12 7	
OM	1789	GLY	N	12 7	
OM	1790	GLY	N	12 7	
OM	1791	GLY	N	12 7	
OM	1792	GLY	N	12 7	
OM	1793	GLY	N	12 7	
OM	1794	GLY	N	12 7	
OM	1795	GLY	N	12 7	
OM	1796	GLY	N	12 7	
OM	1797	GLY	N	12 7	
OM	1798	GLY	N	12 7	
OM	1799	GLY	N	12 7	
OM	1800	GLY	N	12 7	

OM	1774	CE	W	V	406	1.656	-18.803	SO	999	1.00	84.57	C
OM	1774	C	M	V	406	ZZ6	-13.652	18.216	1.00	88.08	C	
OM	1775	N	PRO	V	407	2.289	-13.881	16.962	1.00	83.29	N	
OM	1776	DA	PRO	V	407	1.485	-1.236	16.065	1.00	88.84	C	
OM	1777	CB	PRO	V	407	1.695	-13.382	16.930	1.00	88.82	C	
OM	1778	CG	PRO	V	407	1.122	-11.122	14.953	1.00	88.02	C	
OM	1779	CG	PRO	V	408	2.448	-9.819	16.477	1.00	78.47	C	
OM	1780	D	PRO	V	408	0.399	-9.613	17.255	1.00	71.54	C	
OM	1781	PRO	PRO	V	408	0.842	-9.1	18.886	1.00	71.86	N	
OM	1782	N	PRO	V	409	1.177	-9.680	16.632	1.00	76.08	C	
OM	1783	CB	PRO	V	409	1.641	-9.845	16.722	1.00	73.35	C	
OM	1784	CB	PRO	V	409	1.833	-10.074	16.074	1.00	69.28	C	
OM	1785	DA	PRO	V	409	1.663	-9.042	16.184	1.00	61.56	C	
OM	1786	DA	PRO	V	409	1.416	-8.095	16.822	1.00	74.70	C	
OM	1787	DA	PRO	V	408	1.411	-8.6	16.81	1.00	78.75	C	
OM	1788	CG	PRO	V	408	2.448	-9.819	16.477	1.00	78.47	C	
OM	1789	CB	PRO	V	408	0.399	-9.613	17.255	1.00	71.54	C	
OM	1790	PRO	PRO	V	408	0.842	-9.1	18.886	1.00	71.86	N	
OM	1791	CB	PRO	V	409	1.641	-9.845	16.722	1.00	73.35	C	
OM	1792	CB	PRO	V	409	1.833	-10.074	16.074	1.00	69.28	C	
OM	1793	CG	PRO	V	409	1.663	-9.042	16.184	1.00	61.56	C	
OM	1794	DA	PRO	V	409	1.416	-8.095	16.822	1.00	74.70	C	
OM	1795	DA	PRO	V	409	1.411	-8.6	16.81	1.00	78.75	C	
OM	1796	DA	PRO	V	410	2.448	-9.819	16.477	1.00	78.47	C	
OM	1797	DA	PRO	V	410	0.399	-9.613	17.255	1.00	71.54	C	
OM	1798	DA	PRO	V	410	0.842	-9.1	18.886	1.00	71.86	N	
OM	1799	CB	PRO	V	410	1.641	-9.845	16.722	1.00	73.35	C	
OM	1799	CG	PRO	V	410	1.833	-10.074	16.074	1.00	69.28	C	
OM	1800	CG	PRO	V	410	1.663	-9.042	16.184	1.00	61.56	C	
OM	1801	DA	PRO	V	410	1.416	-8.095	16.822	1.00	74.70	C	
OM	1802	DA	PRO	V	410	1.411	-8.6	16.81	1.00	78.75	C	
OM	1803	CB	PRO	V	410	2.448	-9.819	16.477	1.00	78.47	C	
OM	1804	CB	PRO	V	410	0.399	-9.613	17.255	1.00	71.54	C	
OM	1805	N	GLN	V	411	1.415	-2.285	19.906	1.00	74.74	N	
OM	1806	DA	GLN	V	411	1.158	-1.855	21.254	1.00	77.98	C	
OM	1807	GLN	GLN	V	411	0.072	-10.43	21.415	1.00	29.6	C	
OM	1808	CG	GLN	V	411	1.286	-10.414	20.655	1.00	90.62	C	
OM	1809	CD	GLN	V	411	2.644	-10.256	1.087	1.00	100.622	C	
OM	1810	GL	GL	V	411	0.8	-10.98	2.1	1.00	9.711	N	
OM	1811	NE2	GL	V	411	zzz	-10.061	20	1.00	9.711	N	
OM	1812	C	GLN	V	411	1.224	-1.052	1.89	1.00	76.54	C	
OM	1813	GLN	GLN	V	411	1.161	-1.915	20.965	1.00	76.38	N	
OM	1814	N	PRO	V	412	2.834	-10.160	20.165	1.00	26.38	C	
OM	1815	VD	PRO	V	412	91	-9.8	21.481	1.00	28.66	C	
OM	1816	CG	PRO	V	412	2.247	-8.524	20.524	1.00	27.62	C	
OM	1817	CG	PRO	V	412	2.36	-2.189	20.434	1.00	29.27	C	
OM	1818	CD	PRO	V	412	839	-8.86	19.883	1.00	90.25	C	
OM	1819	PRO	PRO	V	412	121	-12.692	19.947	1.00	8.704	C	
OM	1820	ao2	ao	V	412	0.2	-10.0	19.402	1.00	80.03	C	
OM	1821	C	GLU	V	412	184	-10.1	1.91	1.00	80.03	C	
OM	1822	0	LO	V	412	873	-9.618	2.81	1.00	81.12	C	
OM	1823	N	W	V	414	448	-2.285	1.1	1.00	81.48	N	
OM	1824	VD	PRO	V	413	666	-12.091	1.600	1.00	81.14	C	
OM	1825	CG	PRO	V	413	0.090	-2.934	19.156	1.00	26.1	C	
OM	1826	CG	PRO	V	413	342	-2.148	19.444	1.00	26.1	C	
OM	1827	as	MI	V	413	482	-10.81	19.444	1.00	83.88	S	
OM	1828	CE	MI	V	413	0.019	-10.650	19.691	1.00	87.89	C	
OM	1829	0	MI	V	413	606	-2.982	2.835	1.00	82.81	C	
OM	1830	0	MI	V	413	626	-3.558	2.835	1.00	81	C	
OM	1831	N	LE	V	414	588	-3.558	2.835	1.00	85.08	N	
OM	1832	CV	na	V	414	503	-1.161	24.98	1.00	88.18	C	
OM	1833	CG	na	V	414	261	-15.358	24.1	1.00	84.92	C	
OM	1834	CG	na	V	414	257	-15.829	22.50	1.00	88.40	C	
OM	1835	CD1	LE	V	414	450	-17.099	22.55	1.00	86.86	C	
OM	1836	CD2	LE	V	414	656	-15.962	22.09	1.00	90.81	C	
OM	1837	C	LE	V	414	685	-13.672	26.855	1.00	91.36	C	
OM	1838	0	na	V	415	947	-13.672	26.855	1.00	91.36	C	
OM	1839	N	GLU	V	415	999	-1.11	25.363	1.00	94.49	N	
OM	1840	CV	GLU	V	415	061	-1.061	26.284	1.00	97.55	C	

ATOM	1910	CA	GLN	C	637	-12.858	1.178	13.601	1.00	87.79	C
ATOM	1911	CB	GLN	C	637	-11.895	2.117	14.170	1.00	86.03	C
ATOM	1912	CG	GLN	C	637	-12.406	2.585	15.464	1.00	93.14	C
ATOM	1913	CD	GLN	C	637	-11.393	3.546	16.126	1.00	106.21	C
ATOM	1914	OE1	GLN	C	637	-11.729	4.276	17.068	1.00	110.04	O
ATOM	1915	NE2	GLN	C	637	-10.138	3.542	15.620	1.00	109.91	N
ATOM	1916	C	GLN	C	637	-12.945	1.413	12.138	1.00	90.78	C
ATOM	1917	O	GLN	C	637	-13.843	2.112	11.687	1.00	91.92	O
ATOM	1918	N	GLU	C	638	-11.998	0.847	11.389	1.00	94.03	N
ATOM	1919	CA	GLU	C	638	-12.031	0.900	9.915	1.00	95.88	C
ATOM	1920	CB	GLU	C	638	-11.134	-0.194	9.310	1.00	96.35	C
ATOM	1921	CG	GLU	C	638	-11.915	-1.580	9.006	1.00	94.59	C
ATOM	1922	CD	GLU	C	638	-10.957	-2.756	8.751	1.00	89.19	C
ATOM	1923	OE1	GLU	C	638	-11.440	-3.861	8.373	1.00	84.03	O
ATOM	1924	OE2	GLU	C	638	-9.730	-2.537	8.929	1.00	89.39	O
ATOM	1925	C	GLU	C	638	-13.478	0.685	9.396	1.00	97.42	C
ATOM	1926	O	GLU	C	638	-14.260	-0.113	9.975	1.00	98.82	O
ATOM	3846	O3	LIG	F	1	-7.776	-22.170	6.971	1.00	31.61	O
ATOM	3847	C25	LIG	F	1	-8.207	-21.464	7.868	1.00	33.33	C
ATOM	3848	O1	LIG	F	1	-7.961	-20.033	7.950	1.00	33.71	O
ATOM	3849	C24	LIG	F	1	-9.026	-21.932	8.987	1.00	27.65	C
ATOM	3850	C22	LIG	F	1	-9.266	-20.839	9.712	1.00	34.77	C
ATOM	3851	C23	LIG	F	1	-8.637	-19.596	9.140	1.00	32.24	C
ATOM	3852	O2	LIG	F	1	-7.680	-19.075	10.069	1.00	25.76	O
ATOM	3853	C20	LIG	F	1	-10.087	-20.848	10.980	1.00	30.41	C
ATOM	3854	C18	LIG	F	1	-10.284	-22.284	11.449	1.00	32.32	C
ATOM	3855	C19	LIG	F	1	-9.337	-22.576	12.588	1.00	32.29	C
ATOM	3856	C17	LIG	F	1	-8.132	-21.992	12.638	1.00	30.70	C
ATOM	3857	C21	LIG	F	1	-7.715	-21.040	11.556	1.00	27.55	C
ATOM	3858	C16	LIG	F	1	-7.194	-22.292	13.782	1.00	24.82	C
ATOM	3859	C15	LIG	F	1	-7.997	-22.466	15.065	1.00	30.43	C
ATOM	3860	C13	LIG	F	1	-7.068	-22.844	16.194	1.00	30.55	C
ATOM	3861	C12	LIG	F	1	-6.184	-21.959	16.673	1.00	35.09	C
ATOM	3862	C14	LIG	F	1	-6.112	-20.579	16.088	1.00	30.84	C
ATOM	3863	C10	LIG	F	1	-5.260	-22.349	17.801	1.00	35.64	C
ATOM	3864	C7	LIG	F	1	-5.120	-21.181	18.770	1.00	34.13	C
ATOM	3865	C3	LIG	F	1	-4.057	-21.501	19.794	1.00	35.77	C
ATOM	3866	C1	LIG	F	1	-2.811	-22.242	19.380	1.00	30.95	C
ATOM	3867	C9	LIG	F	1	-3.166	-23.706	19.152	1.00	35.74	C
ATOM	3868	C8	LIG	F	1	-2.279	-21.623	18.093	1.00	32.49	C
ATOM	3869	C6	LIG	F	1	-4.219	-21.129	21.060	1.00	33.76	C
ATOM	3870	C11	LIG	F	1	-5.514	-21.410	21.764	1.00	34.26	C
ATOM	3871	C5	LIG	F	1	-3.100	-20.425	21.789	1.00	34.99	C
ATOM	3872	C4	LIG	F	1	-1.779	-20.716	21.089	1.00	36.91	C
ATOM	3873	C2	LIG	F	1	-1.775	-22.118	20.491	1.00	33.86	C

权利要求书

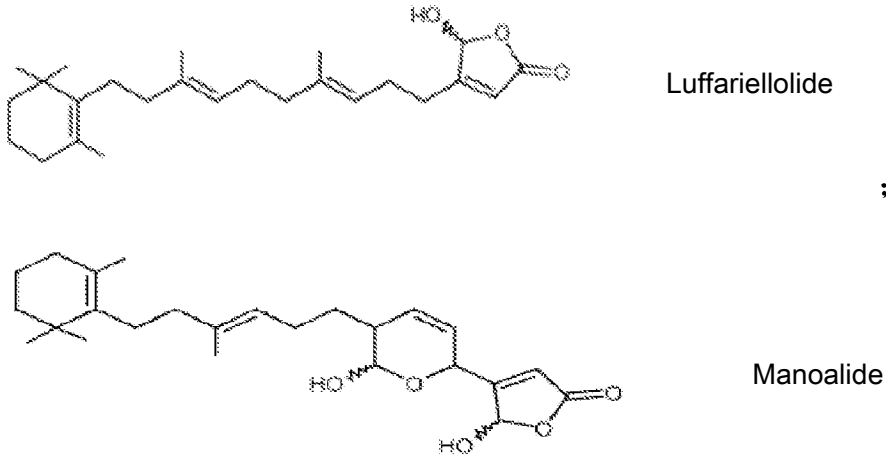
- [权利要求 1] 一种药物设计、药物合成和/或药物筛选的方法，其特征在于，
目标药物为具有以下通式的化合物：



结构式 I

- R₁ 主要代表含有一个或多个 C=C 键的烯烃碳链，C₆~C₁₀ 烷基、C₆~C₁₀ 烷氧基、C₃~C₆ 环烷基、O、羰基、-SH、含氮杂环烷基或者任意上述结合。
- [权利要求 2] 一种具有结构式 I 的化合物用途，该化合物通过高特异性与高结合亲和力来调控包括 RAR α ，RAR β 和 RAR γ 在内的维甲酸受体 (RARs)，用作 RARs 激动剂。
- [权利要求 3] 如权利要求 2 所述的具有结构式 I 的化合物用途，其特征在于：作为特异性的激活 RARs 靶基因的表达的药物。
- [权利要求 4] 如权利要求 2 所述的具有结构式 I 的化合物用途，其特征在于：作为治疗 RARs 介导的疾病的药物。
- [权利要求 5] 如权利要求 2 所述的具有结构式 I 的化合物用途，其特征在于：作为治疗包括急性早幼粒白血病、乳腺癌和结直肠癌在内的癌症的药物。
- [权利要求 6] 如权利要求 2 所述的具有结构式 I 的化合物用途，其特征在于：作为治疗包括结直肠癌在内的对维甲酸类药物产生耐药性的疾病的药物。

[权利要求 7] 如权利要求 2-6 所述的具有结构式 I 的化合物用途，其特征在于，所述化合物为 Luffariellolide 或 Manoalide，为以下结构式，具有 γ -羟基丁烯酸内酯环基团：



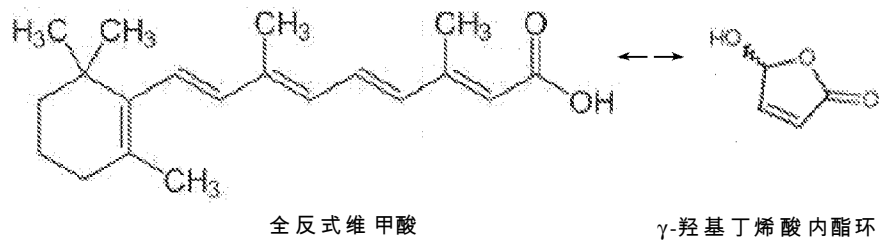
[权利要求 8] 一种药物设计、药物合成和/或药物筛选的方法，其特征在于：该方法根据 Luffariellolide 与 RARs 的结合结构及位点，该晶体结构见附录 1 的结构，以 Luffariellolide 与 Manoalide 及其衍生物作为模板进行药物设计、药物合成和/或药物筛选。

[权利要求 9] 如权利要求 8 所述的一种药物设计、药物合成和/或药物筛选的方法，其特征在于，该药物结构中包含与 RAR α ， β 和 γ 通过共价键特异性结合的 γ -羟基丁烯酸内酯环。

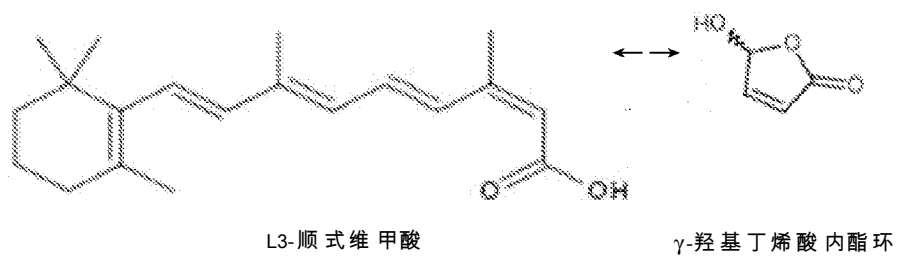
[权利要求 10] 如权利要求 8 所述的一种药物设计、药物合成和/或药物筛选的方法，其特征在于：该方法根据 Luffariellolide 与 Manoalide 及其衍生物的结构，将现有 RARs 配体对应位置上的基团替换为 γ -羟基丁烯酸内酯环。

[权利要求 11] 如权利要求 8 所述的一种药物设计、药物合成和/或药物筛选

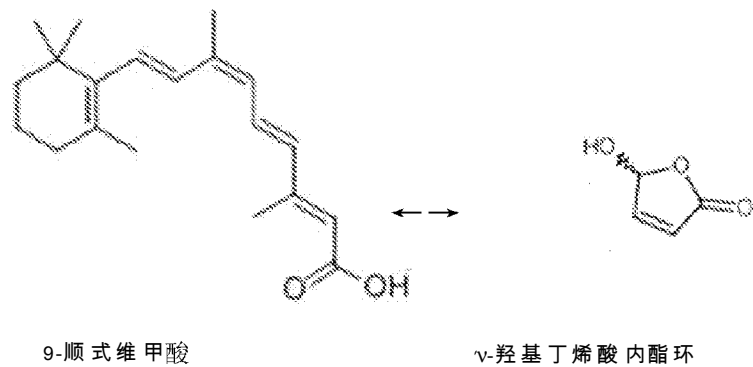
的方法，其特征在于：全反式维甲酸，13-顺式维甲酸与9-顺式维甲酸，相应位置基团被 γ -羟基丁烯酸内酯环取代，表示为以下的结构式：



;



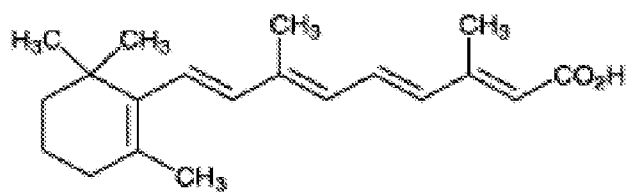
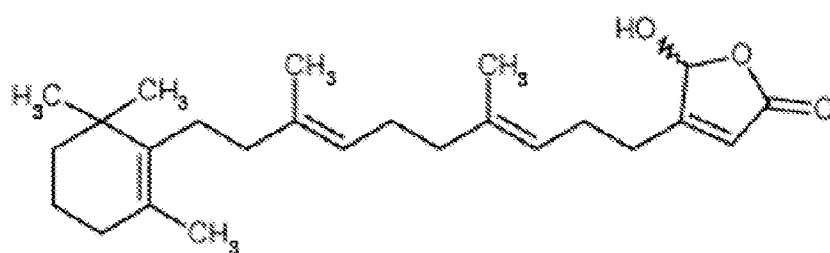
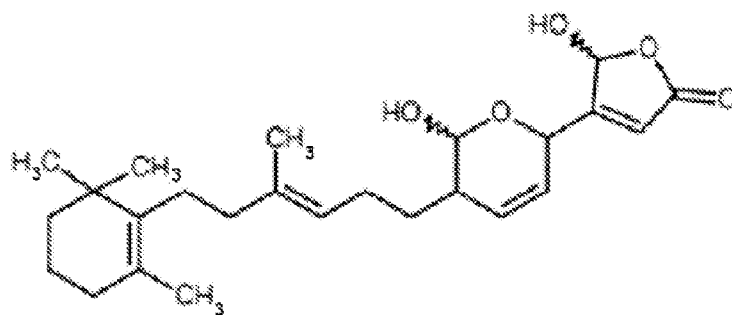
;



。

[权利要求 12] 如权利要求 1, 7, 8, 9, 10, 11 所述的化合物，还包括在药学上可接受的盐。

[权利要求 13] 如权利要求 1, 7, 8, 9, 10, 11 所述的化合物，还包括在药学上可接受的赋型剂。

A*all-trans RA***B****Luffariellolide****C****Manoalide****图 1**

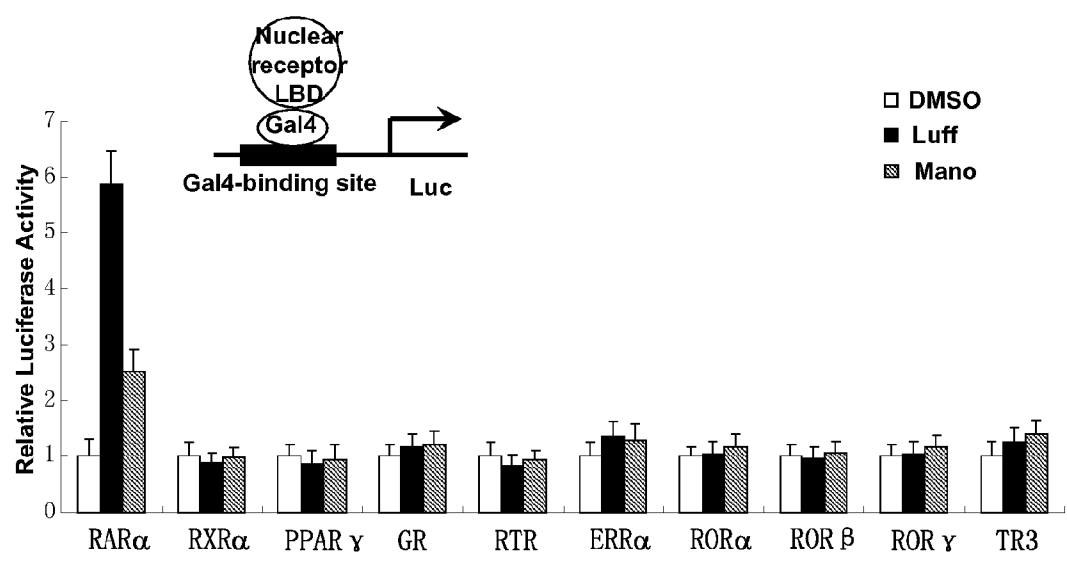


图2

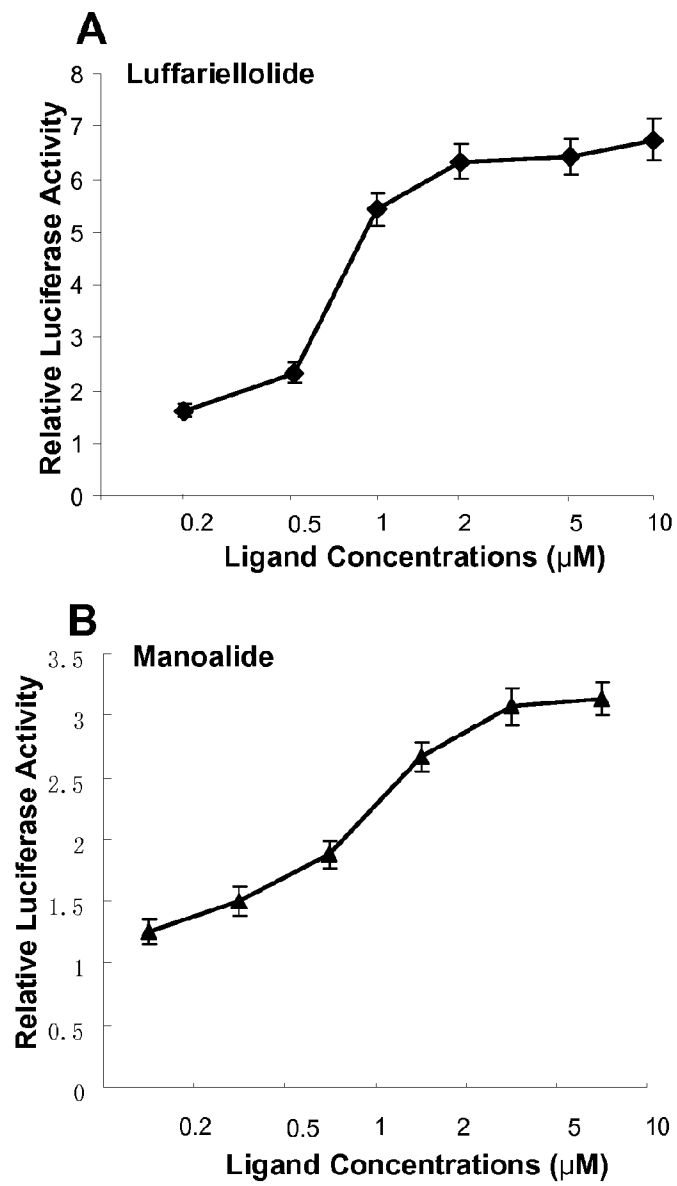


图 3

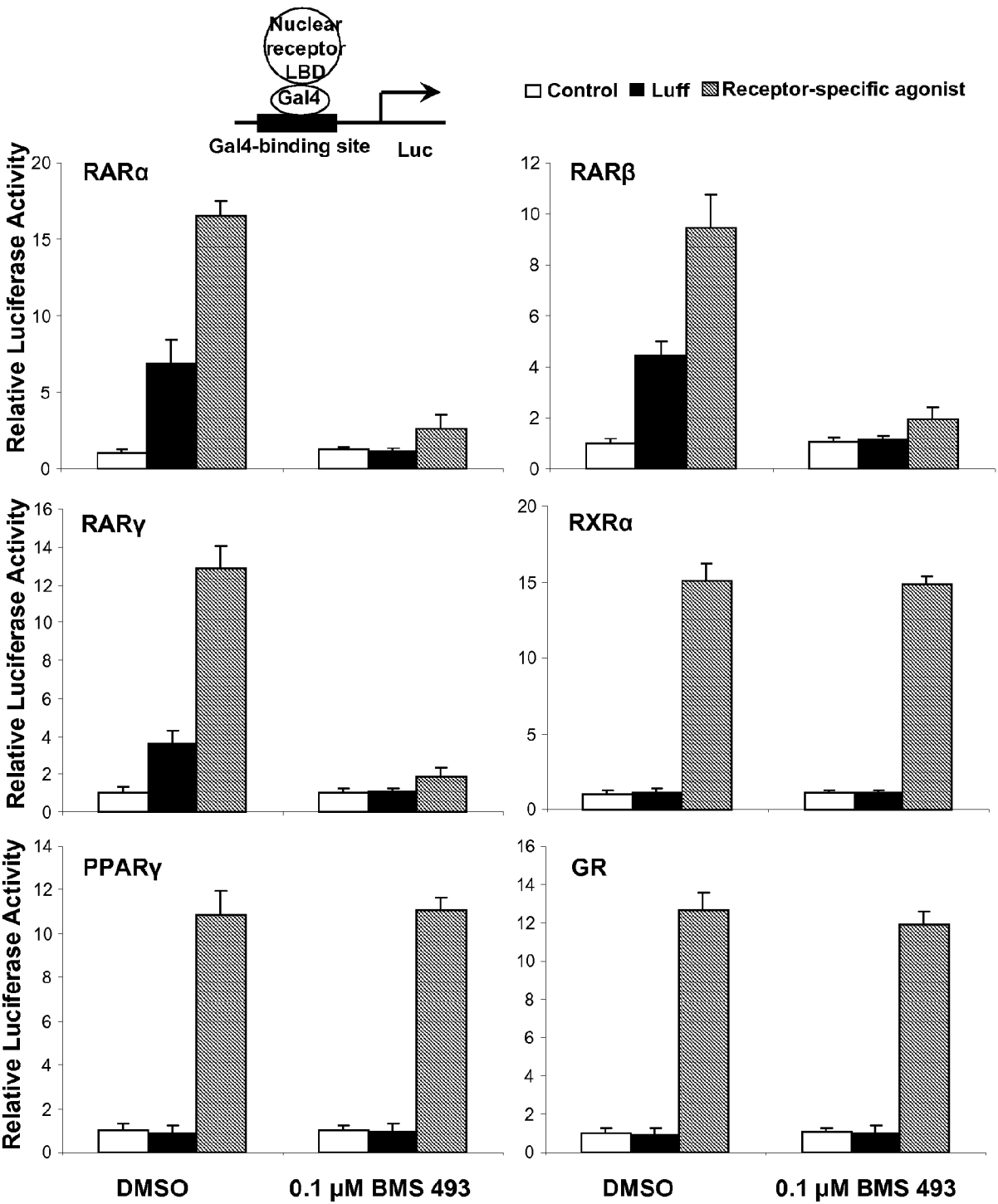


图 4

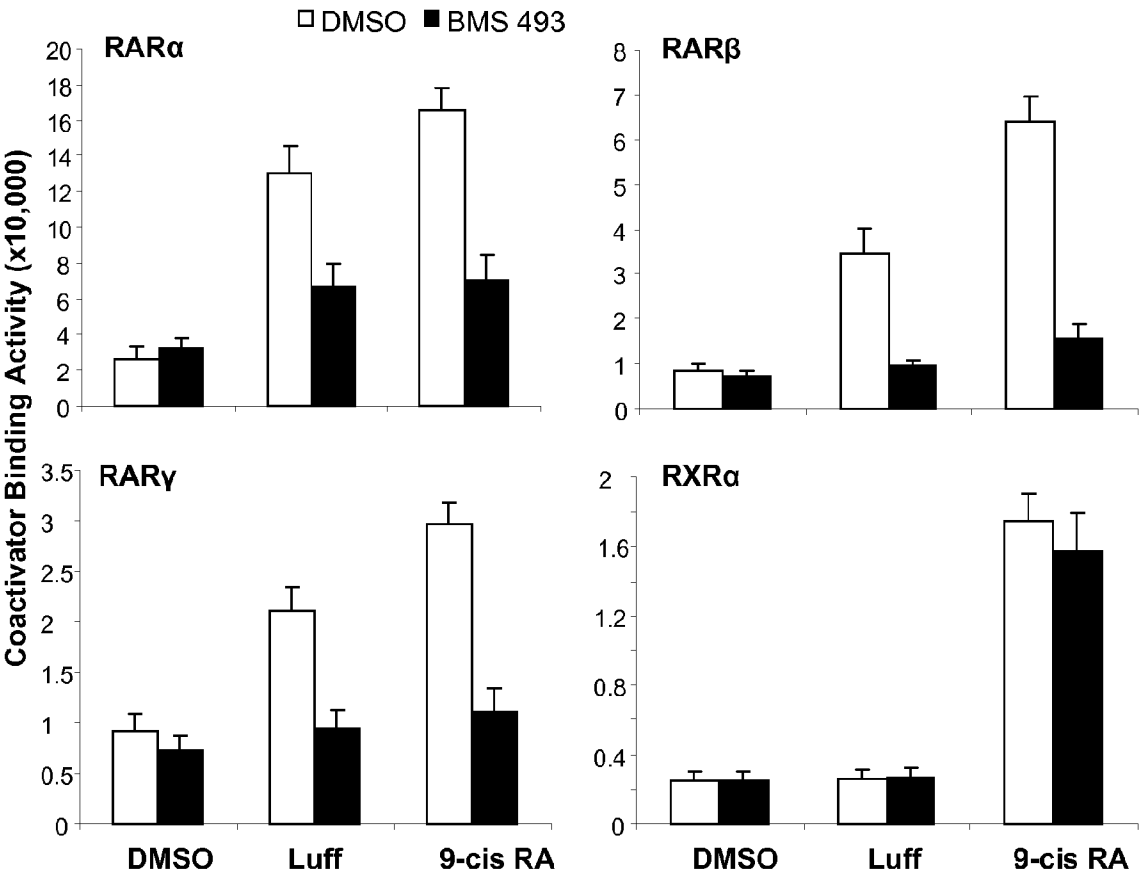


图 5

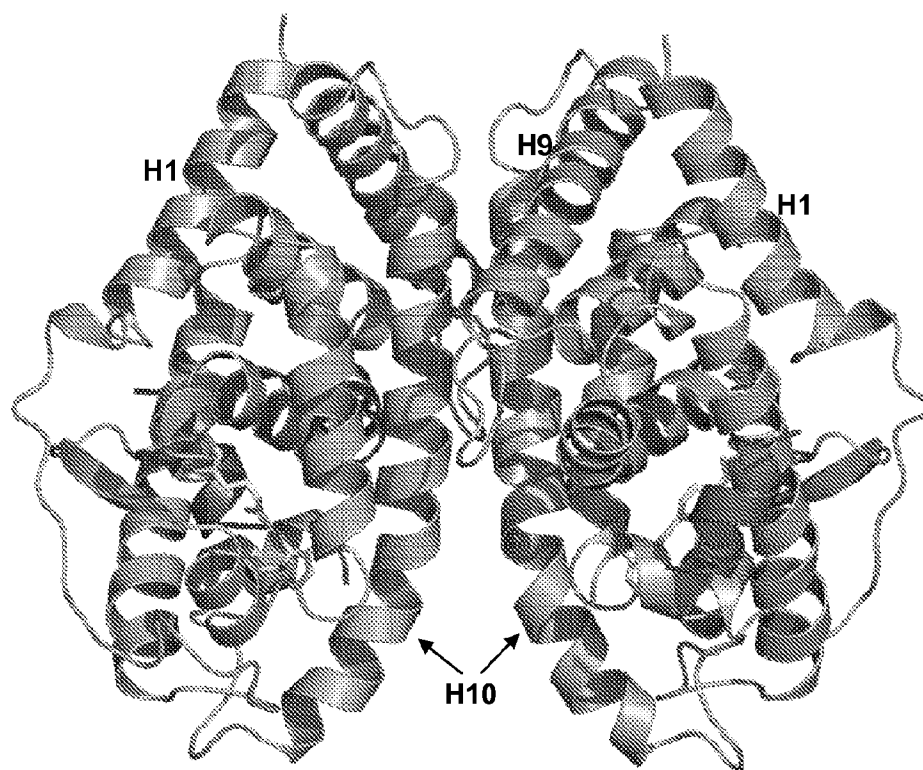


图 6

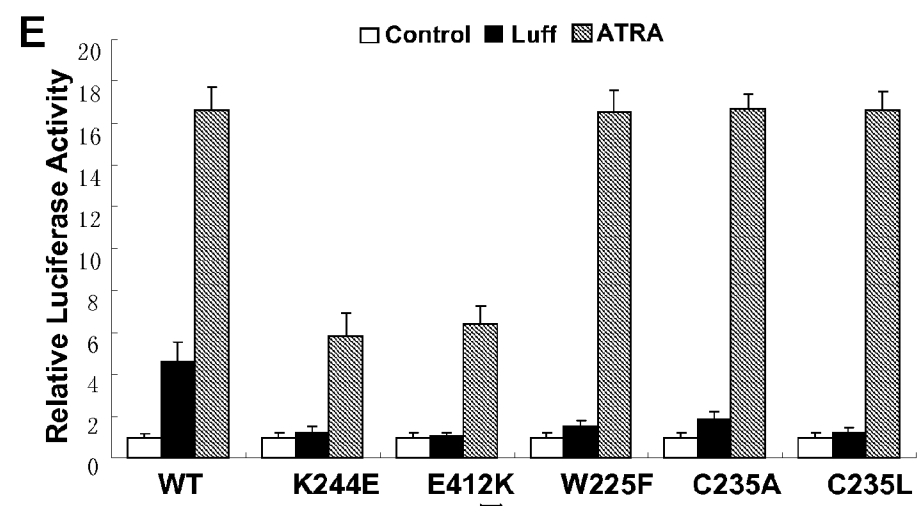
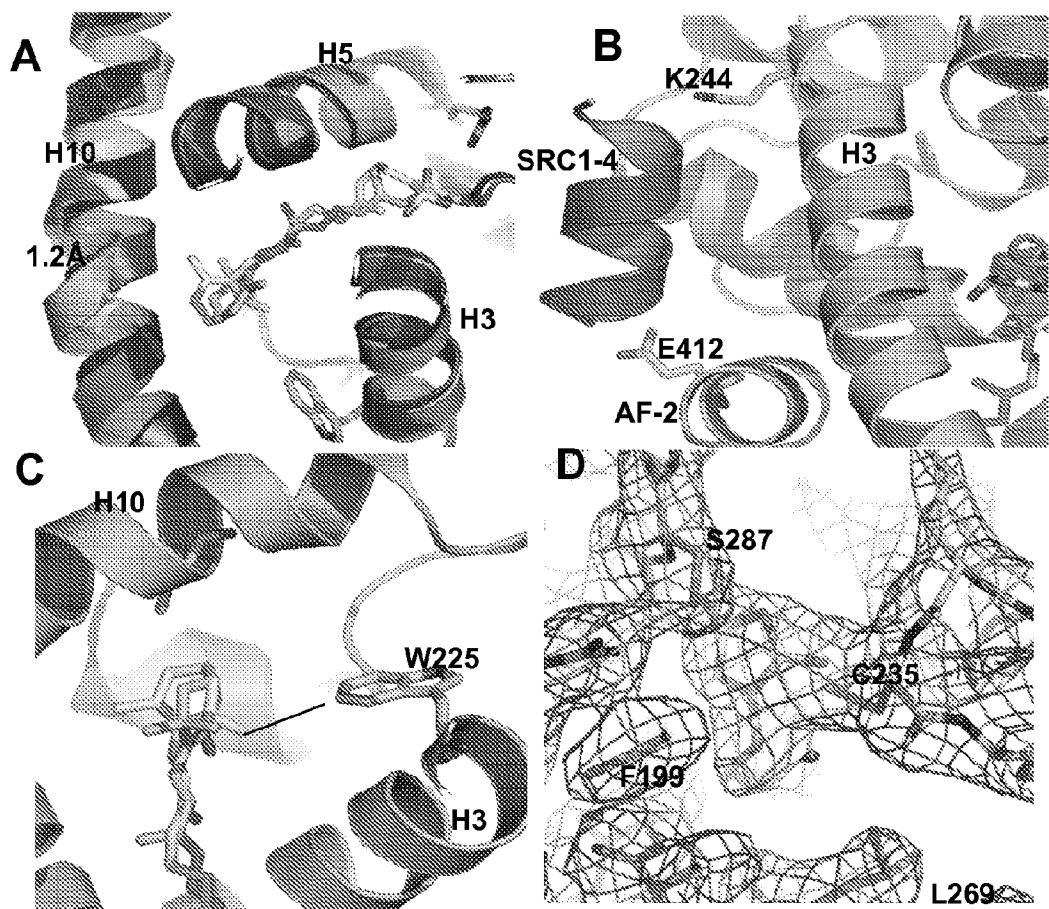


图 7

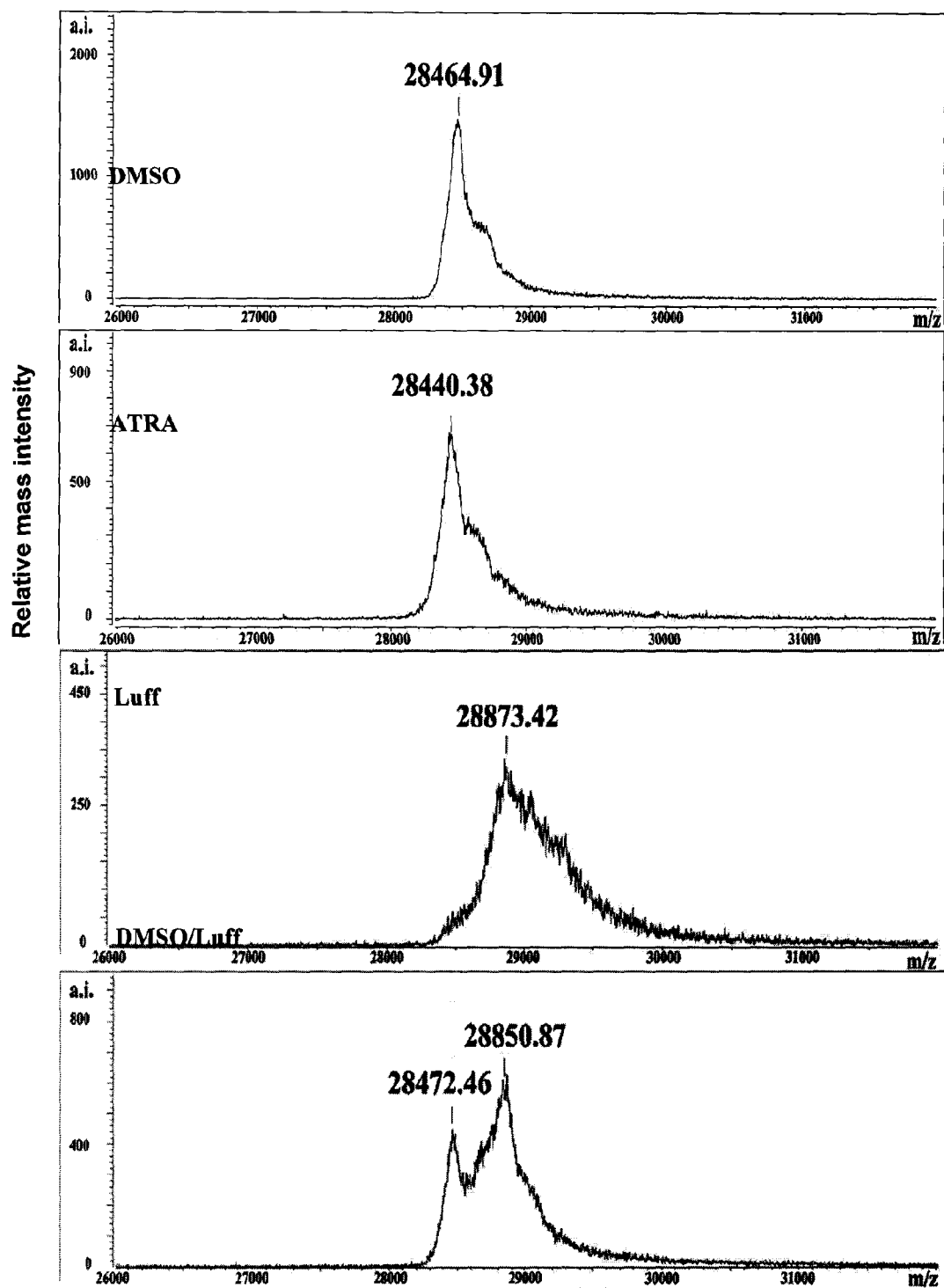


图8

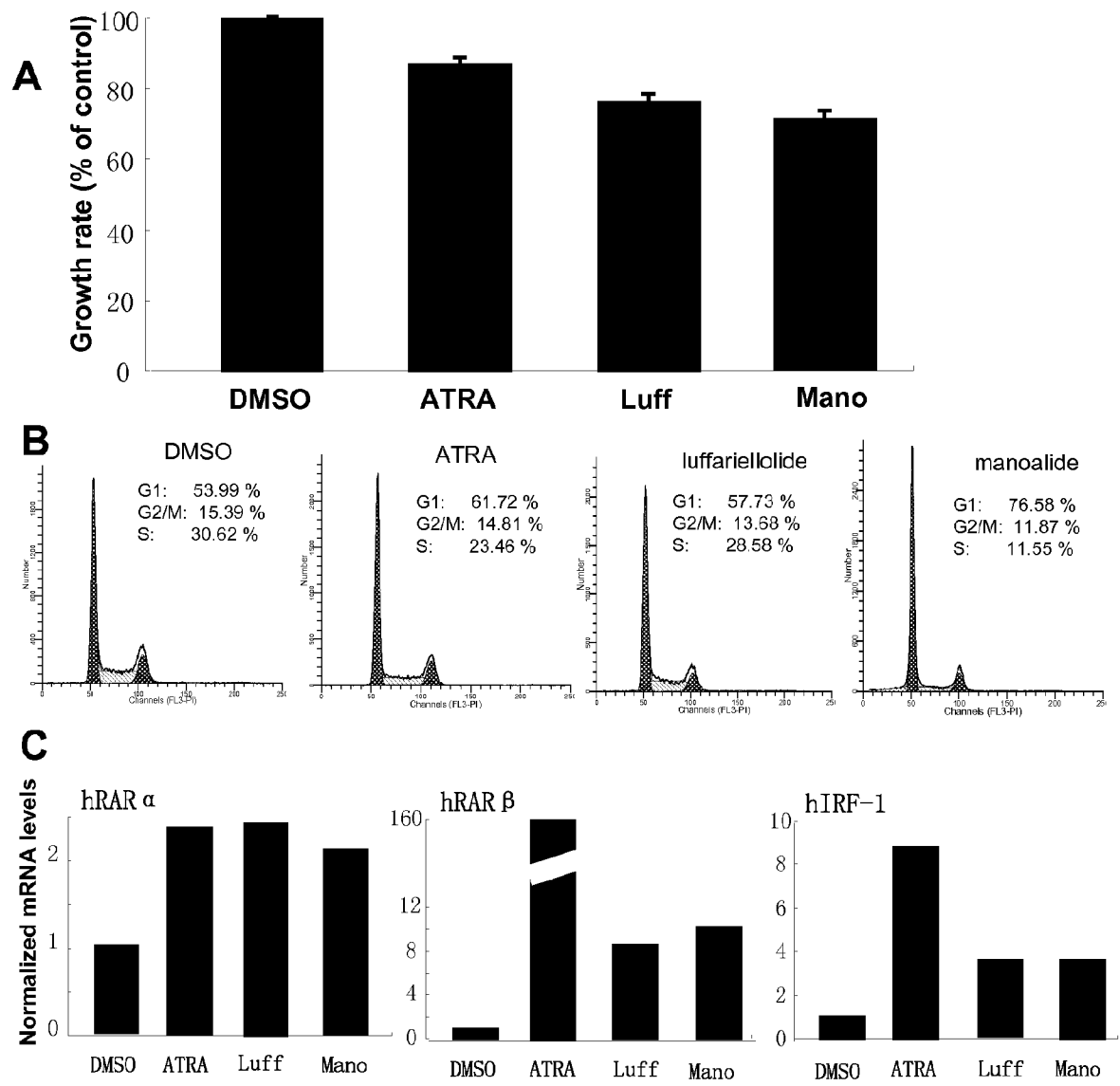


图 9

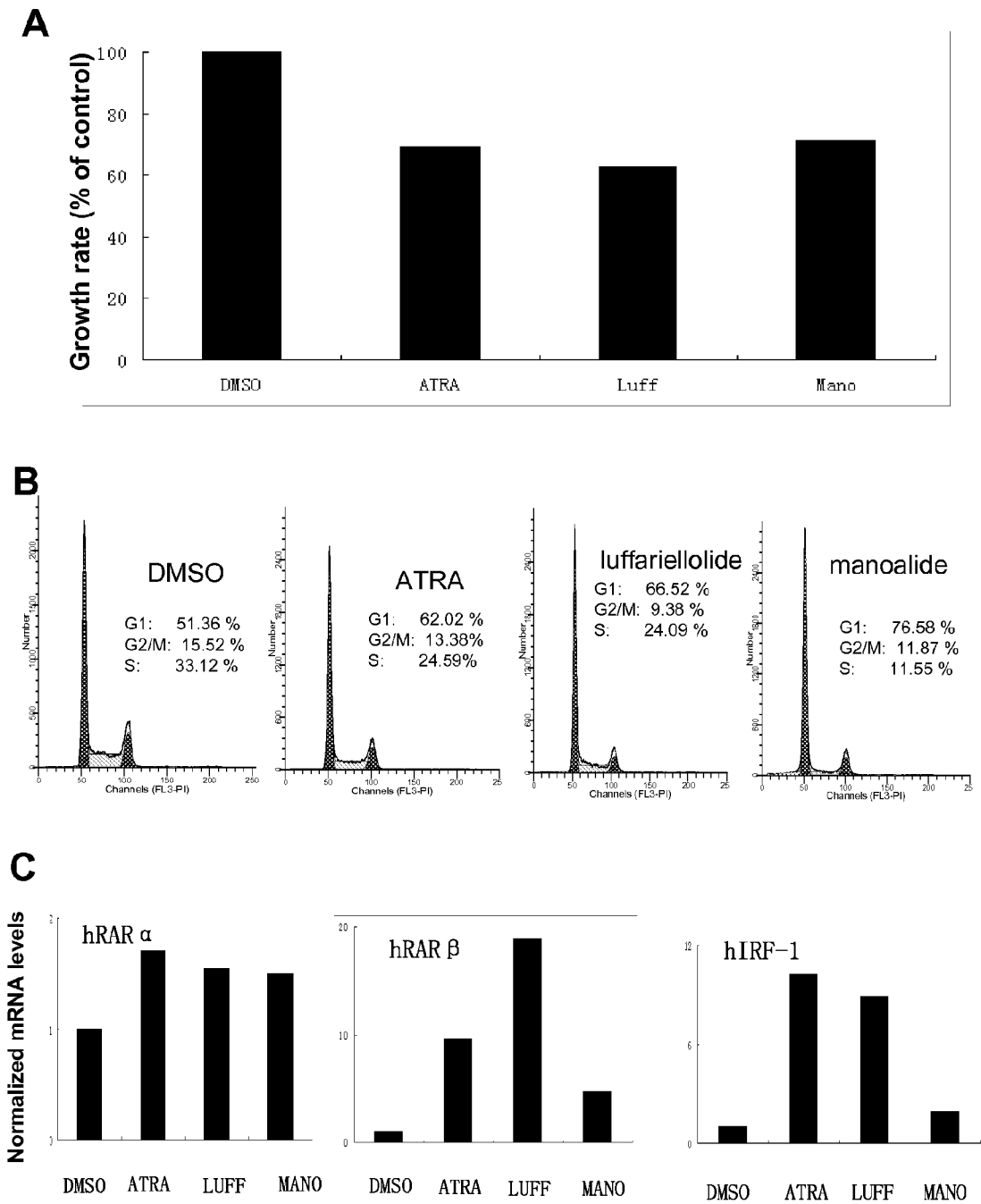


图10

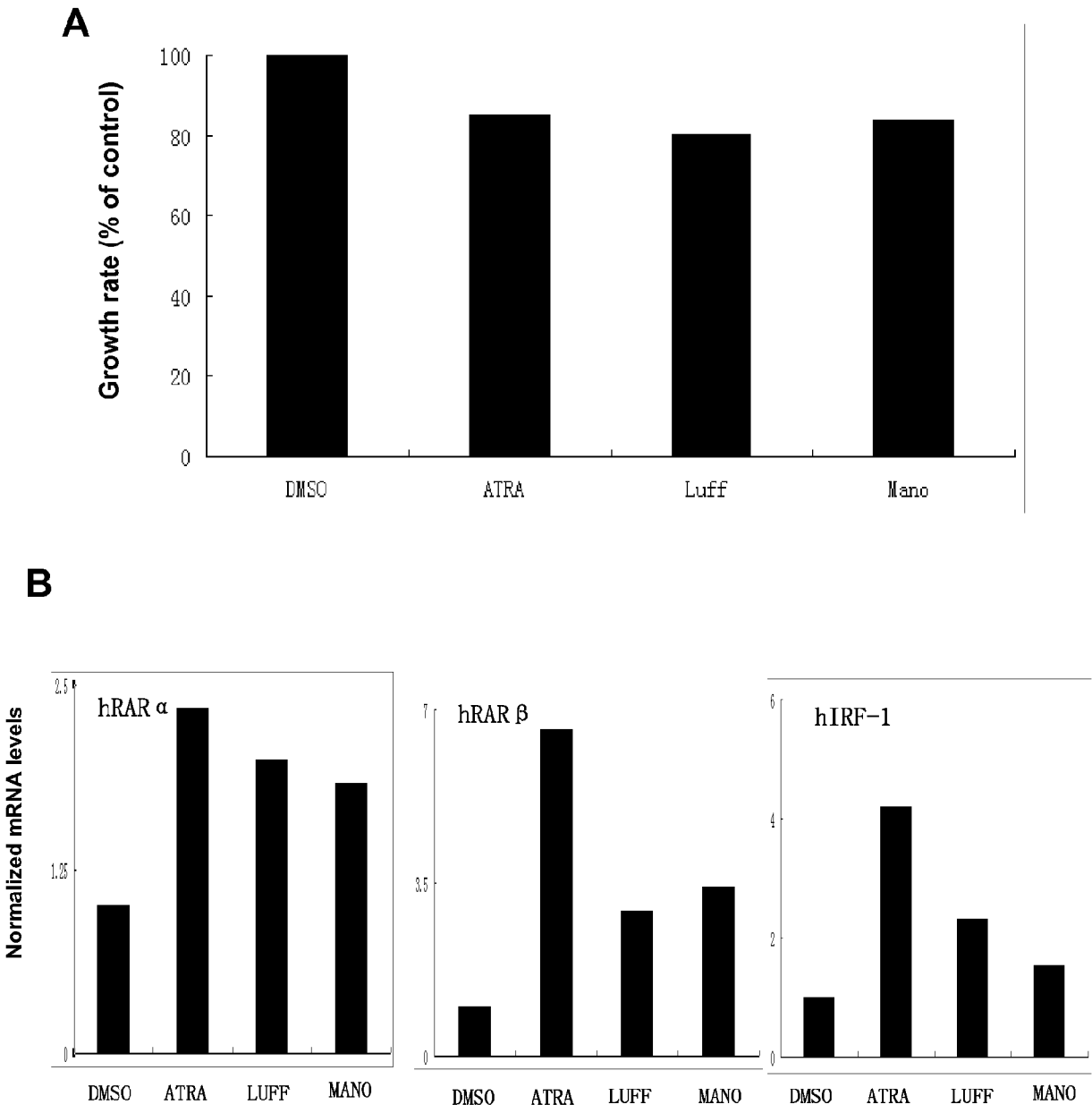


图11

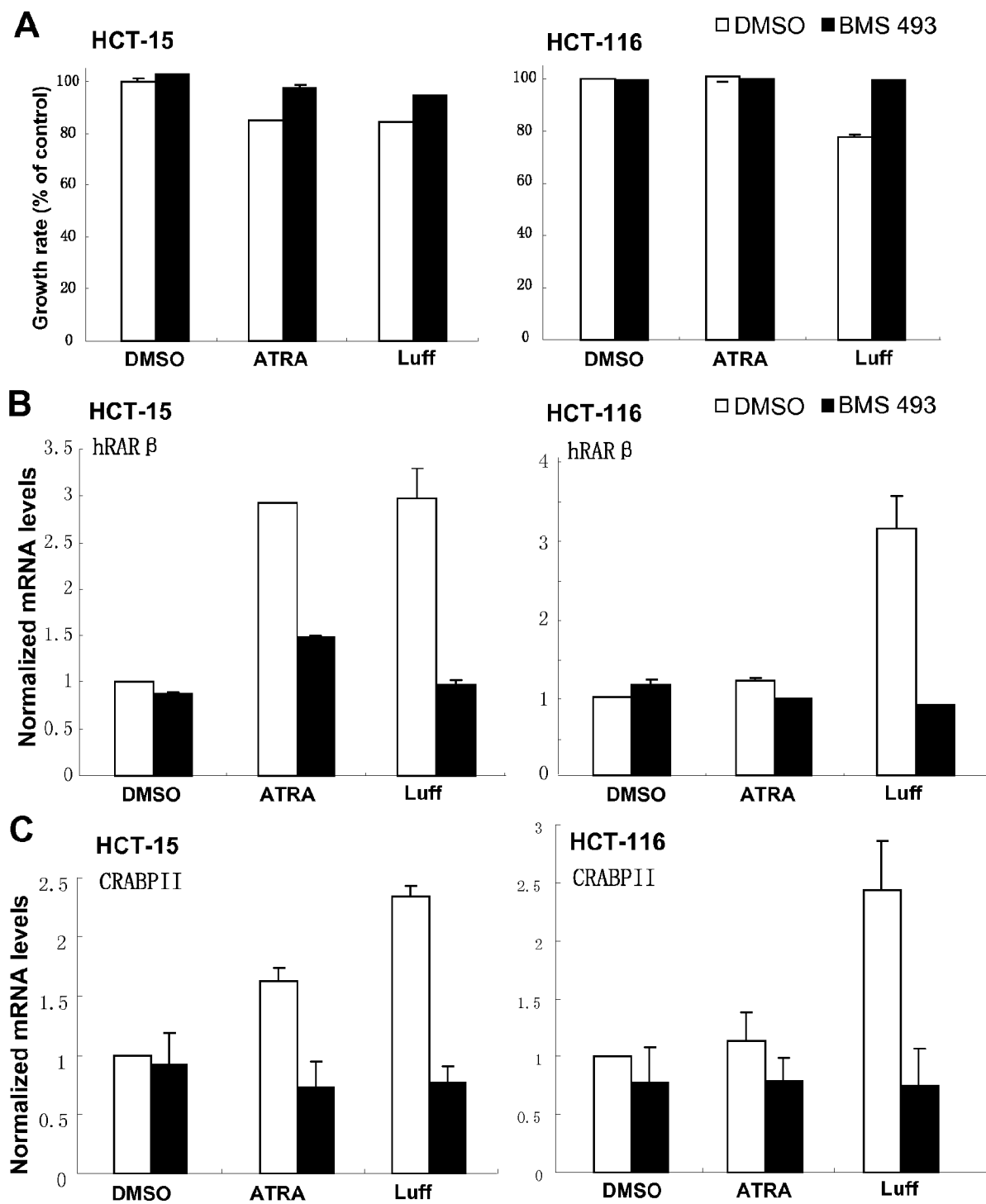


图12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2012/087753

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra Sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C07D 307/-, C07D 407/-, A61K 31/-, A61P 35/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS; REG: WPI: EPODOC: CNKI: CPRS: luffariellolide, manoalide, rar, 75088-80-1, 111149-87-2

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011094708 A2 (DANAFARBER CANCER INSTITUTE, INC et al.) 04 August 2011 [(04.08.2011) see page 13, paragraph [0003], page 22, paragraph [0004], page 24, paragraphs [0002] to [0004], page 25, paragraph [0001], page 104, line 2 of the description.	2-7, 12-13
PX	CN 102532070 A (XIAMEN UNIVERSITY) 04 July 2012 (04.07.2012), see claims 1-11	2-7, 12-13
X	BARBARA C.M. POTTS et al. Chemical Mechanism of Inactivation of Bee Venom Phospholipase A2 by the Marine Natural Products Manoalide, Luffariellolide, and Scalaradial J. Am. Chem. SOC. 1992, volume 114, pages 5093-5100, especially see page 5093 compounds 1-2	12-13

1 Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 14 March 2013 (14.03.2013)	Date of mailing of the international search report 28 March 2013 (28.03.2013)
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China [Facsimile No. (86-10) 62019451]	Authorized officer CHEN, Weiliang Telephone No. (86-10) 62086307

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2012/087753

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1, 8-11
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 1, 8-11 are directed to a method of performing purely mental acts and therefore are not required to be searched by this Authority.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☒ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2012/087753

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
W O 2011094708 A 2	04.08.2011	W O 2011094708 A 3	12.01 .2012
		A U 2011210567 A I	09.08.2012
		CA 2787784 A I	04.08.2011
CN 102532070 A	04.07.2012	None	

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 307/60 (2006.01) i

C07D 407/04 (2006.01) i

A61K 31/365 (2006.01) i

A61P 35/00 (2006.01) i

A. 主题的分类

参见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC:C07D307/-,C07D407/-, A61K3 1/-, A61P35/-

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称,和使用的检索词(如使用))

CAPLUS;REG:WPI:EPODOC:CNKI:CPRS: 维甲酸, 丁烯酸内酯, luffariellolide, manoolide, rar, 75088-80-1, 111149-87-2

C. 相关文件

类 型 *	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	W O 201 1094708 A2(DANAFARBER CANCER INSTITUTE, INC 等) 04.8 月 201 1 (04.08.201 1),参见说明书 13 页第 3 段, 22 页第 4 段, 24 页 2-4 段, 25 页第 1 段, 104 页第 2 行	2-7、12-13
PX	CN 102532070 A (厦 门 大 学) 04.7 月 2012 (04.07.2012), 参见权利要求 1-11	2-7、12-13
X	BARBARA C. M. POTTS 等 Chemical Mechanism of Inactivation of Bee Venom Phospholipase A 2 by the Marine Natural Products Manoalide, Luffariellolide, and Scalaradiol J. Am. Chem. SOC. 1992 年, 第 114 卷, 5093-5100 页, 特别是参见 5093 页化合物 1-2	12-13



其余文件在 C 栏的续页中列出。



见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之前公布的在先申请或锡 j

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触!, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

14.3 月 20 13 (14.03.2013)

国际检索报告邮寄日期

28.3 月 2013 (28.03.2013)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

陈炜梁

电话号码: (86-10) 62086307

国际检索报告

关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2012/087753

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
W O 201 1094708 A 2	04.08.201 1	W O 201 1094708 A 3	12.01.2012
		A U 201 1210567 A 1	09.08.2012
		C A 2787784 A 1	04.08.2011
CN 102532070 A	04.07.2012	无	

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(3), 对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1. ☒ 权利要求: 1, 8-11

因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题, 即:

权利要求1, 8-11涉及纯粹智力行为, 因此, 权利要求1, 8-11的主题属于不需要国际检索单位进行检索的主题。

2. ☒ 权利要求:

因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分, 以致不能进行任何有意义的国际检索, 具体地说-

3. ☐ 权利要求:

因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费, 本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。

2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索, 本单位未通知缴纳任何附加费。

3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费, 本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。具体地说, 是权利要求:

4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明; 包含该发明的权利要求是:

关于异议的说明: ☐ 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 适用时, 缴纳了异议费。

☐ 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。

☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

续主题的分类：

C07D 307/60(2006.01) ; i

C07D 407/04(2006.01) ; i

A61K 31/365(2006.01) ; i

A61P 35/00(2006.01) ; i