

承辦人代碼：
大類：
I P C 分類：

本案已向：

日本國(地區) 申請專利，申請日期： 案號 ， 有 無主張優先權

2000.6.29 特願 2000-195434

有關微生物已寄存於： ，寄存日期： ，寄存號碼：

五、發明說明 (1)

技術領域

本發明為關於含有 X 型 sPLA₂ (分泌型 PLA₂) 抑制劑為有效成分之癌症預防或治療劑。

背景技術

Cell. (1996) 87 803-809 期刊中記載花生烯酸級聯機制中，位於 PLA₂ 下流位置之 COX-2 抑制劑可期望治療直腸結腸癌。又文獻 W098/05349 (特開 2001-500847) 中記載使用為檢測 sPLA₂ 蛋白質或 sPLA₂ mRNA 含量用之定量而定性診斷分析，檢測含前列腺癌之癌存在之方法。然而並未有任何文獻記載具有 X 型 sPLA₂ 抑制作用之化合物為有效治療癌症者。

發明揭示

本發明人等以抗 X 型 sPLA₂ 抗體，調查各病理組織中之 X 型 sPLA₂ 表現，確認於癌組織中 X 型 sPLA₂ 為高表現者。

當進行癌組織之免疫組織化學分析時，首先將健康成人組織及來自癌症患者之癌組織作成玻片樣本，加入抗 X 型 sPLA₂ 抗體，反應數小時。其次，以標識等之方法，將 X 型 sPLA₂ 的表現可視化，而檢測出 X 型 sPLA₂ 訊號，調查組織中 X 型 sPLA₂ 的表現。其結果，由癌組織作成之玻片樣本中檢測出 X 型 sPLA₂ 訊號，暗示癌組織中 X 型 sPLA₂ 之高表現。

尚且，本發明人等再進行 X 型 sPLA₂ 訊號之中和試驗。即在將抗 X 型 sPLA₂ 抗體添加於玻片前，使純化之 X 型

五、發明說明 (2)

sPLA₂ 蛋白質反應數小時，其後進行上述相同之操作，調查 X 型 sPLA₂ 訊號。其結果，由癌組織作成之玻片樣本中，X 型 sPLA₂ 訊號消失。

由以上確知，人類癌組織中，X 型 sPLA₂ 為高表現者。

本發明人等再調查 sPLA₂ 抑制劑對癌細胞中 X 型 sPLA₂ 所導致十八烯酸游離之抑制效果。其結果確認，sPLA₂ 抑制劑為刻意抑制癌細胞中 X 型 sPLA₂ 所導致之十八烯酸游離。

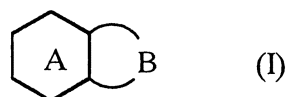
另一方面，PGE₂ 與癌症的發生具有密切關係之事記載於 Cancer Research 59, 5093-5096, 1999。此處，本發明人等調查 sPLA₂ 抑制劑對癌細胞中 X 型 sPLA₂ 所導致 PGE₂ 產生作用之抑制效果。其結果確認，sPLA₂ 抑制劑為刻意抑制癌細胞中人類 X 型 sPLA₂ 所導致之 PGE₂ 產生作用。

由以上之實驗事實，本發明人等遂完成以下本發明。

即本發明為關於 I) 含有 X 型 sPLA₂ 抑制劑為有效成分之癌症預防或治療劑。

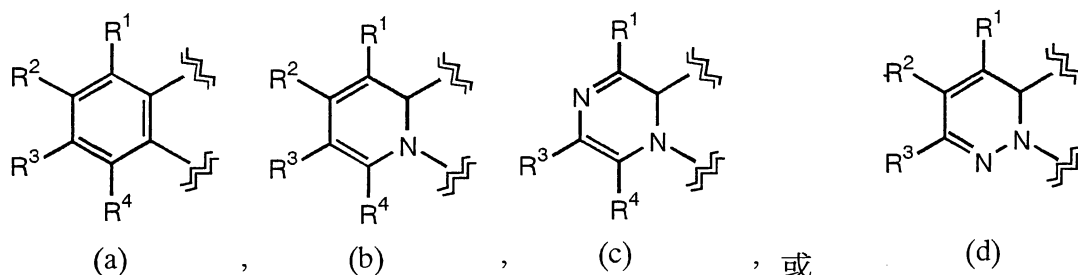
更詳細為關於以下 II)~XV)。

II) 一般式 (I) :



(式中，A 環為以下 (a)~(d) 所表之環：

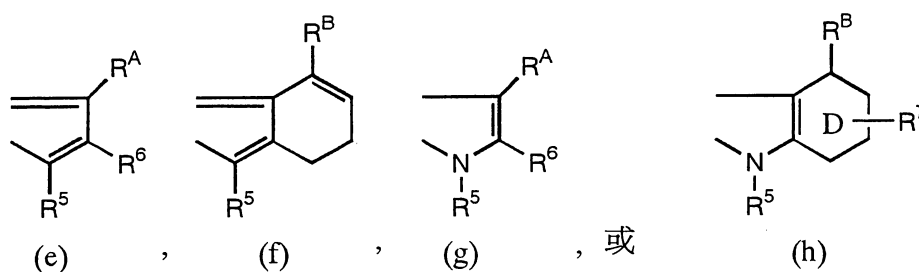
五、發明說明 (3)



(式中， R^1 及 R^2 各自獨立為氫、非妨礙性取代基、或 $-(L^1)-$ (酸性基)(式中， L^1 為與酸性基鍵結之鍵結基，長為 1~5)。但 R^1 或 R^2 任一方為 $-(L^1)-$ (酸性基)。

R^3 及 R^4 各自獨立為氫、非妨礙性取代基、碳環基、經非妨礙性取代基取代之碳環基、雜環基或經非妨礙性取代基取代之雜環基)；

-B- 為選自以下 (e)~(h) 所表之基：



(式中， R^5 為選自 (j) C1-C20 烷基、C2-20 烯基、C2-C20 炔基、碳環基、或雜環基、(k) 一或其以上各自獨立，經選自非妨礙性取代基所取代之 (j) 所示之基、或 $-(L^2)-R^8$ (式中， L^2 為選自氫、氮、碳、氧、及硫原子中 1~18 原子之二價鍵結基； R^8 為選自 (j) 或 (k) 之基)；

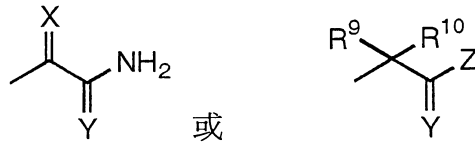
R^6 為氫、鹵素、C1-C3 烷基、C3-C4 環烷基、C3-C4 環烯

五、發明說明 (4)

基、C1-C3 烷氧基、或 C1-C3 烷硫基；

R^7 為氫或非妨礙性取代基

R^A 為式：



(式中， R^9 及 R^{10} 各自獨立為氫、C1-C3 烷基、或鹵素；

X 及 Y 各自獨立為氧或硫原子；

Z 為 $-NH_2$ 或 $-NHNH_2$) 所表之基；

R^B 為 $-CONH_2$ 或 $-CONHNH_2$ ；

D 環為環己烯環或苯環)；

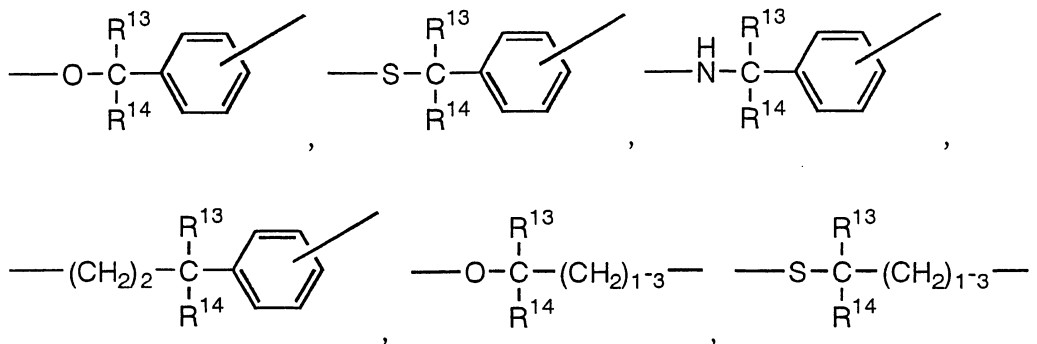
但 -B- 為 (e) 或 (f) 時，A 環為 (b)、(c) 或 (d))

所示之化合物、其前藥、或其製藥上容許鹽、或彼等之溶劑合物為有效成分之癌症預防或治療劑。

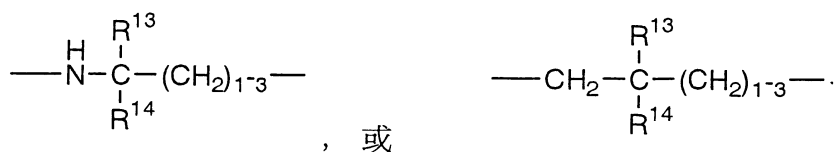
III) R^1 為氫或 $-(L^3)-R^{11}$ (式中， L^3 為 $-OCH_2-$ 、 $-SCH_2-$ 、 $-NH-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-$ 、 $-O-CH(CH_3)-$ 、或 $-O-CH(CH_2CH_2C_6H_5)-$ 、

R^{11} 為 $-COOH$ 、 $-CONHSO_2C_6H_5$ 、 $-SO_3H$ 、或 $-P(O)(OH)_2$)；

R^2 為氫或 $-(L^4)-R^{12}$ (式中， L^4 為式：



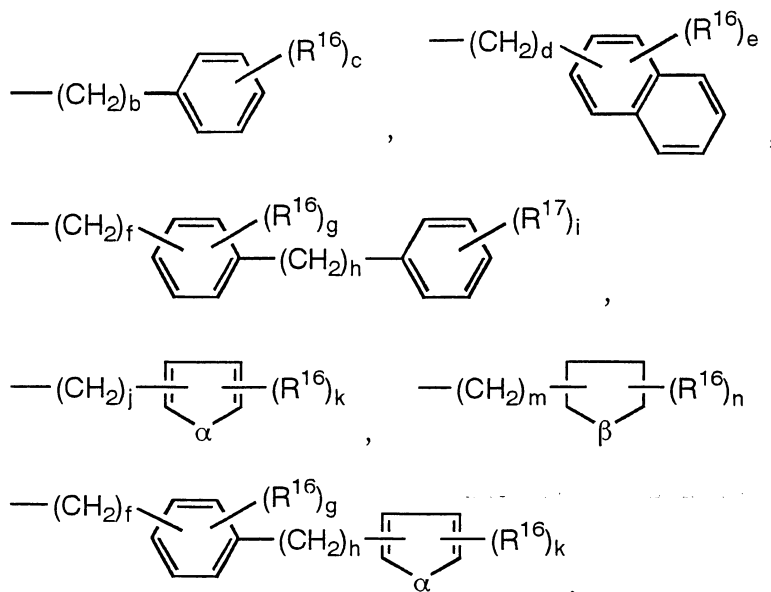
五、發明說明(5)



(式中， R^{13} 及 R^{14} 各自獨立為氫、C1-C10 烷基、C1-C10 芳烷基、羧基、烷氧羰基、或鹵素)、 R^{12} 為 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、或 $-\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ ；但 R^1 及 R^2 不可同時為氫)之 II) 化合物、其前藥、或彼等之製藥上容許鹽、或彼等之溶劑合物為有效成分之癌症預防或治療劑。

IV) R^3 為氫、C1-C6 烷基、C3-C6 環烷基、芳基、或雜環基、 R^4 為氫或鹵素之 II) 或 III) 之化合物、其前藥、或彼等之製藥上容許鹽、或彼等之溶劑合物為有效成分之癌症預防或治療劑。

V) R^5 為 $-(\text{CH}_2)_{1-6}-R^{15}$ (R^{15} 為式：



五、發明說明 (7)

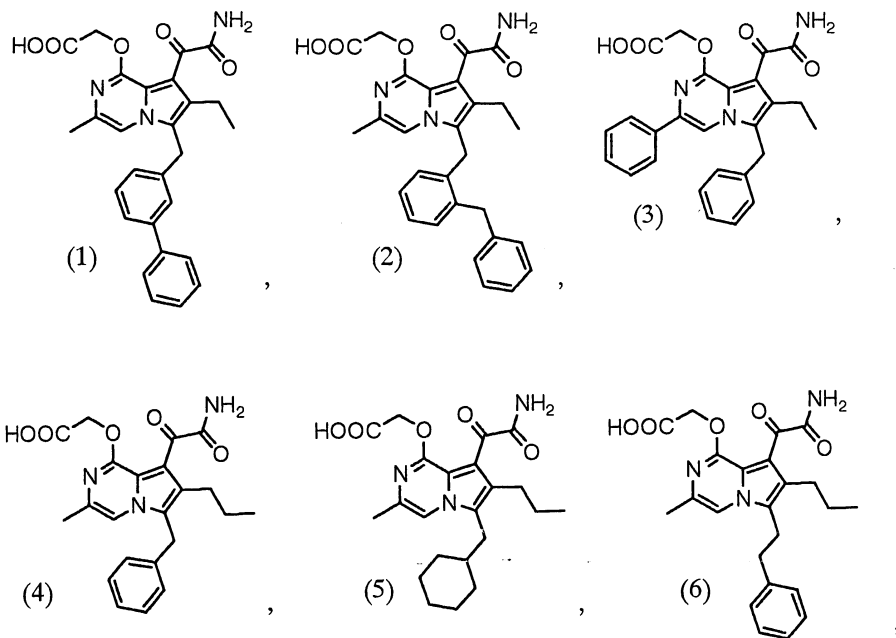
其前藥、或彼等之製藥上容許鹽、或彼等之溶劑合物為有效成分之癌症預防或治療劑。

VIII) R^2 為氫之 II)~VII)任一項記載之化合物、其前藥、或彼等之製藥上容許鹽、或彼等之溶劑合物為有效成分之癌症預防或治療劑。

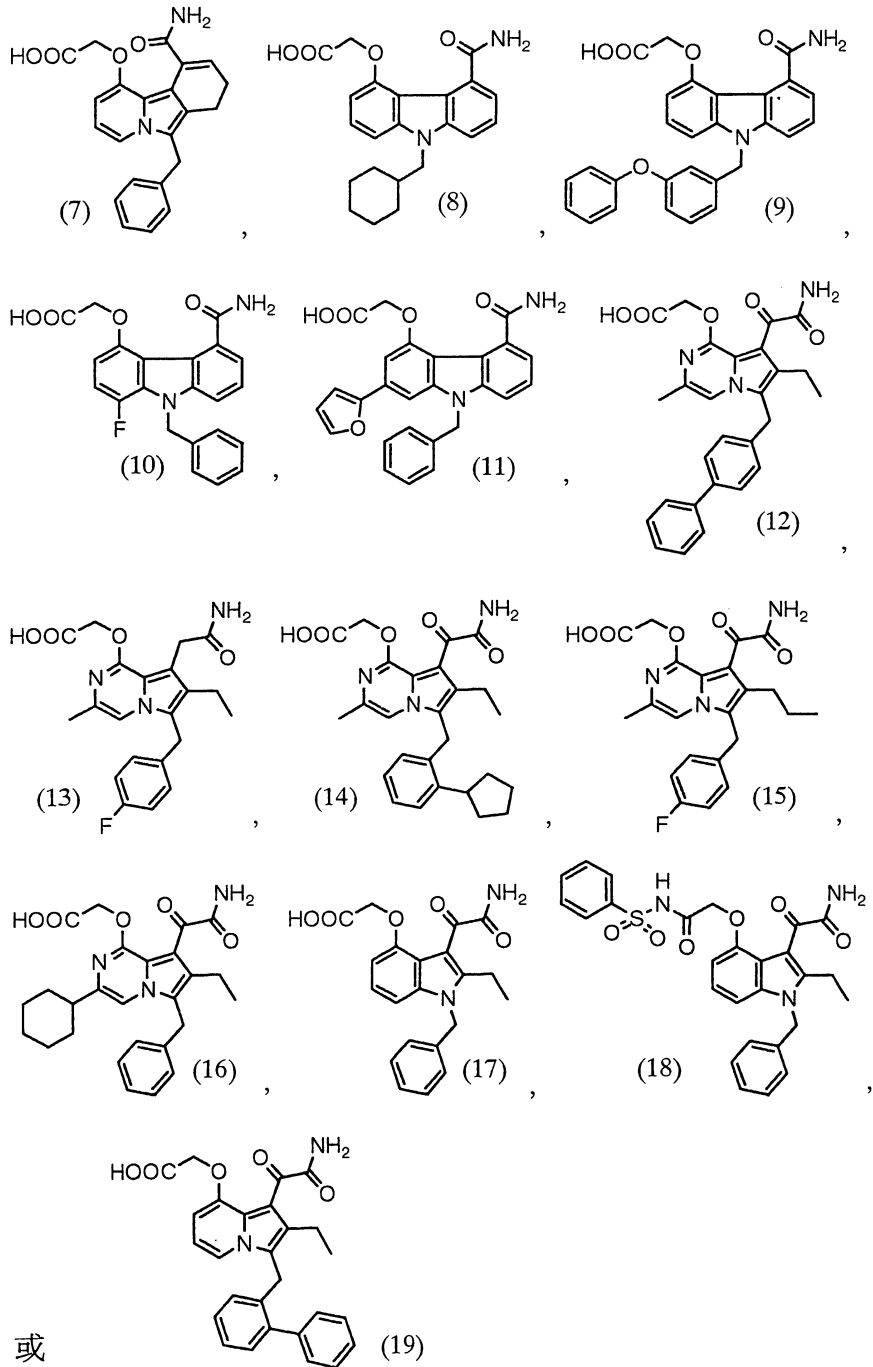
IX) R^6 為 C1-C3 烷基之 II)~VIII)任一項記載之化合物、其前藥、或彼等之製藥上容許鹽、或彼等之溶劑合物為有效成分之癌症預防或治療劑。

X) R^A 為 $-CH_2CONH_2$ 或 $-COCONH_2$ 之 II)~IX)任一項記載之化合物、其前藥、或彼等之製藥上容許鹽、或彼等之溶劑合物為有效成分之癌症預防或治療劑。

XI) 式：



五、發明說明 (8)



所示之化合物、其前藥、或彼等之製藥上容許鹽、或彼等之溶劑合物為有效成分之癌症預防或治療劑。

XII) 癌症為大腸癌、肺癌、肝癌、胃癌、腎臟癌、膽囊

五、發明說明 (9)

癌、前列腺癌、胰臟癌、睪丸癌、卵巢癌、或皮膚癌之 I)~XI)任一項記載之化合物、其前藥、或彼等之製藥上容許鹽、或彼等之溶劑合物為有效成分之癌症預防或治療劑。

XIII) 癌症為大腸癌之 I)~XI)任一項之癌症預防或治療劑。

XIV) 為製造治療癌症之醫藥的 X 型 sPLA₂ 抑制劑之使用。

XV) X 型 sPLA₂ 抑制劑為 II)~XI)任一項之化合物的 XIV) 之使用。

XVI) 以顯示 X 型 sPLA₂ 抑制劑之治療上效果量投予含人之哺乳類動物，以緩和癌症影響之治療哺乳類動物之方法。

XVII) X 型 sPLA₂ 抑制劑為 II)~XI)任一項之化合物的 XVI) 之治療哺乳類動物之方法。

以下詳細說明本發明。

X 型 sPLA₂ 抑制劑為具有 X 型 sPLA₂ 抑制作用之化合物，亦可具有 X 型 sPLA₂ 抑制作用以外之作用(如其他酵素之抑制作用、對受體之親和作用)。即於評估 X 型 sPLA₂ 抑制作用之試驗中，可為較未具有 X 型 sPLA₂ 抑制作用之化合物具有強 X 型 sPLA₂ 抑制作用之化合物者，無特別之限定。且本發明之 X 型 sPLA₂ 抑制劑較佳特別為具有 X 型 sPLA₂ 抑制作用之化合物。又 X 型 sPLA₂ 抑制作用較佳為實

五、發明說明 (10)

施例 2 之實驗等中 IC_{50} 為 $1 \mu M$ 以下之化合物，更可為 IC_{50} 為 $100nM$ 以下之化合物。

X 型 sPLA₂ 抑制劑，即具有 X 型 sPLA₂ 抑制作用之化合物，具有一或其以上之對掌中心時，可有光學活性體存在。相同地，該化合物含有烯基或伸烯基時，可存在順式或反式異構體。包含 R-及 S-異構體、順式或反式異構體之混合物、或外消旋體之 R-及 S-異構體混合物包含於本發明範圍中。不對稱碳原子之烷基亦可為取代基。此異構物與彼等之混合物同樣地全包含於本發明中。特定之立體異構體為所預定者時，將具有預先分割之不對稱中心的起始物質，依當業者公知之方法使立體專一性反應而製造，或由製造立體異構體之混合物依公知方法予以分割而製造。

前藥為具有可化學性或代謝性分解之基的 X 型 sPLA₂ 抑制作用之化合物衍生物，經加溶劑分解或於生理條件下生體內藥學活性之化合物所形成之化合物。該化合物衍生物具有酸衍生物或鹼衍生物兩者活性，但酸衍生物有利於哺乳類生物中之溶解性、組織結合性、釋出控制 (Bungard, H., Design of Prodrugs, pp. 7-9, 21-24, Elsevier, Amsterdam 1985)。如經原本之酸性化合物與適當之醇類反應所製造之酯類、或經原本之酸性化合物與適當之胺類反應所製造之醯胺之酸性衍生物的前藥已被當業者所熟知。由該化合物具有之酸性基所衍生之單純脂肪族酯或芳族酯為較佳之前藥。更佳為酸性基之 C1-C6 烷基酯 (如甲基

五、發明說明（12）

磷酸酯、聚乳酸脲酯、水楊酸酯、硬脂酸酯、鹼式醋酸鹽、醋酸酯、丹寧酸酯、酒石酸酯、對甲苯磺酸酯、三氟乙酯、三氟甲磺醯酯、戊醛酯等鹽。

溶劑合物包含與有機溶劑及/或水之溶劑合物。形成水合物時，亦可與任意數之水分子配位。

「製藥上容許」之語為與製劑中其他成分合適、對接受者無害者。

「癌症」為由各部位上皮組織所發生之各種惡性腫瘤者，如大腸癌、肺癌、肝癌、胃癌、腎臟癌、膽囊癌、前列腺癌、胰臟癌、睪丸癌、卵巢癌、皮膚癌、食道癌、喉頭癌、乳癌、或子宮癌。本發明人等以實驗確認於大腸癌、肺癌、肝癌、胃癌、腎臟癌、膽囊癌、前列腺癌、胰臟癌、睪丸癌、卵巢癌、或皮膚癌之癌組織中 X 型 sPLA₂ 的高表現，尤其於大腸癌、肺癌、肝癌、胃癌、腎臟癌、膽囊癌、前列腺癌、胰臟癌、睪丸癌、卵巢癌、或皮膚癌之預防或治療上，本發明特別有效。

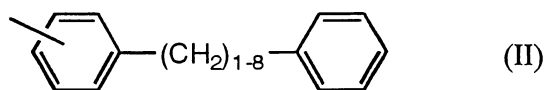
本說明書中單獨或與其他用語組合之「烷基」為具有指定數範圍之碳原子數的直鏈或支鏈之一價烴基。如甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、異丁基、第二丁基、第三丁基、正戊基、正己基、正庚基、正辛基、正壬基、正癸基、正十一基、正十二基、正十三基、正十四基、正十五基、正十六基、正十七基、正十八基、正十九基、正二十基等。

五、發明說明 (13)

本說明書中單獨或與其他用語組合之「烯基」為具有指定數範圍之碳原子數，及 1 個或 2 個以上雙鍵的直鏈或支鏈之一價烴基。如乙烯基、烯丙基、丙烯基、2-丁烯基、異戊烯基、各種丁烯基之異構物等。

本說明書中「炔基」為具有指定數範圍之碳原子數，及 1 個或 2 個以上三鍵的直鏈或支鏈之一價烴基。亦可有雙鍵。如乙炔、丙炔、6-己炔、7-辛炔、8-壬炔等。

本說明書中「碳環基」為飽和或不飽和、經取代或未經取代之僅氫或碳原子形成之 5~14 員環、較佳為 5~10 員環、更佳為 5~7 員環之有機結構所衍生之基。上述之碳環亦包含 2~3 個連續環。代表的碳環基如環烷基(如環丙基、環丁基、環戊基、環己基、環庚基、及環辛基)、環烯基(如環丁烯基、環戊烯基、環己烯基、環庚烯基、及環辛烯基)、苯基、萘基、二環[2.2.1]庚烷基、二環庚烯基、茛基、茛基、三聯苯、苯駢環己烯基、茚基、蔥基、二苯基、二苯甲基、及式(II)：



所表之苯烷基苯基衍生物。

R^3 及 R^4 中碳環基較佳為苯基、環己基等。

本說明書中「雜環基」為單環或多環、飽和或不飽和，含有選自氮、氧、硫原子中 1~3 個雜原子之 5~14 員環之經取代或未經取代之雜環結構所衍生之基。如吡啶基、吡

五、發明說明 (17)

基、芳氧基、芳硫基、碳環基、或雜環基。更佳為 C1-C6 烷基、芳烷基、羧基、C1-C6 羧烷基、苯基、或 C1-C6 烷氧羰基。

本說明書中「鹵素」為氟、氯、溴、碘。

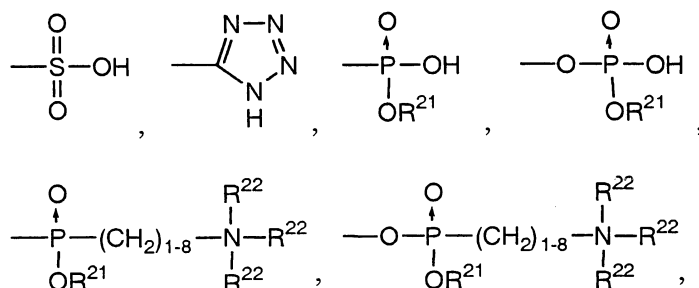
本說明書中「環烷基」為具有指定數範圍之碳原子數的環狀一價烴基。如環丙基、環丁基、環戊基、環己基、環庚基、環辛基等。

本說明書中「環烯基」為具有指定數範圍之碳原子數，及 1 或 2 個以上之雙鍵的環狀一價烴基。如 1-環丙烯基、2-環丙烯基、1-環丁烯基、2-環丁烯基等。

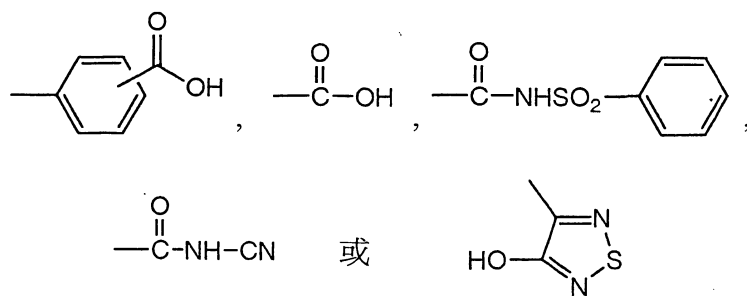
本說明書中「烷氧基」為甲氧基、乙氧基、正丙氧基、異丙氧基、正丁氧基、正戊氧基、正己氧基等。

本說明書中「烷硫基」為如甲硫基、乙硫基、正丙硫基、異丙硫基、正丁硫基、正戊硫基、正己硫基等。

本說明書中「酸性基」為具適當鍵結原子(其後定義為「與酸性基之鍵結基」)結合於基本結構時，作為可與氫結合之質子供給者而作用之有機基。如式：

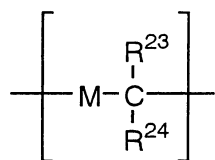


五、發明說明 (18)



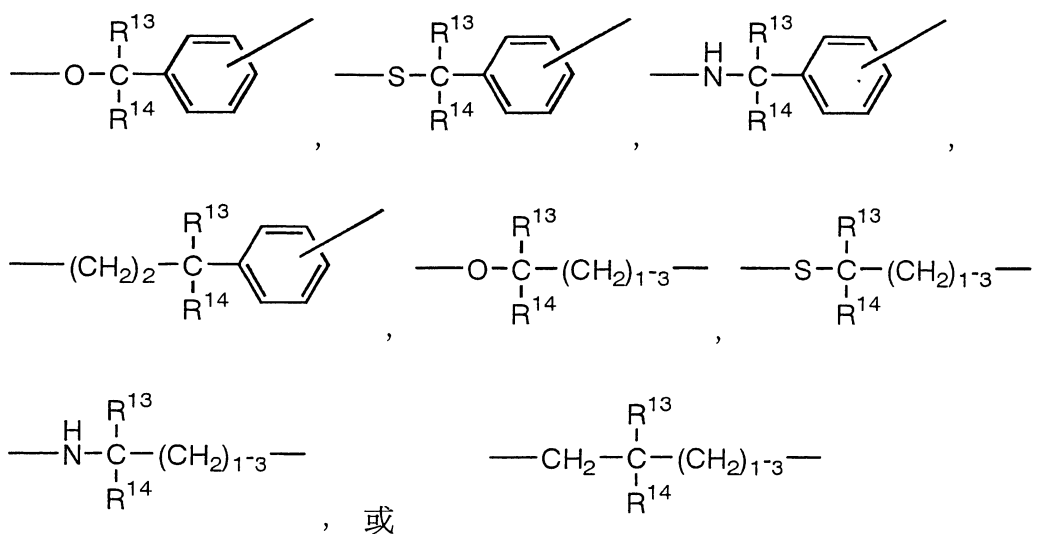
(式中 R^{21} 為氫、金屬、或 C1-C10 烷基， R^{22} 為各自獨立之氫或 C1-C10 烷基，但當酸性基同時具有 R^{21} 及 R^{22} 時， R^{21} 及 R^{22} 至少一個為氫) 所表之基。較佳為 $-COOH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-CONHSO_2C_6H_5$ 、或 $P(O)(OH)_2$ 。更佳為 $-COOH$ 。

本說明書中「與酸性基之鍵結基」為 $-(L^1)-$ 記號所表之二價鍵結基，以通常之關係與基本結構之「酸性基」鍵結。如式：



(式中，M 為 $-CH_2-$ 、 $-O-$ 、 $-N(R^{25})-$ 、或 $-S-$ ， R^{23} 及 R^{24} 各自獨立為氫、C1-C10 烷基、芳基、芳烷基、羧基、或鹵素) 所表之基，及式：

五、發明說明 (19)



(式中， R^{13} 及 R^{14} 各自獨立為氫、C1-C10 烷基、C1-C10 芳烷基、羧基、烷氧羰基、或鹵素)所表之基。較佳為 -O- CH_2 -、-S- CH_2 -、-N(R^{25})- CH_2 -、- CH_2 - CH_2 -、-O-CH(CH_3)-、或 -O-CH((CH_2)₂C₆H₅)- (式中， R^{25} 為 C1-C6 烷基)。較佳如為 -O- CH_2 - 或 -S- CH_2 -。

本說明書中「與酸性基之鍵結基之長」一詞為基本結構與「酸性基」連結之鍵結基 -(L^1)- 的最短鏈之原子數 (除氫以外)。-(L^1)- 為碳環時，以所算出之碳環直徑大約相等數之原子計數。因此，與酸性基之鍵結基中，苊環及環己基環計算 -(L^1)- 長度為 2 原子。較佳長度為 2~3。

本說明書中「鹵烷基」為經上述「鹵素」以任意位置取代之上述「烷基」。如氯甲基、三氟甲基、2-氯乙基、2-溴乙基等。

本說明書中「羥烷基」為經上述羥基以任意位置取代之

五、發明說明 (20)

上述「烷基」。如羥甲基、2-羥乙基、3-羥丙基等。羥甲基較佳。

本說明書中「鹵烷氧基」之「鹵烷基」同上述定義。如2-氯乙氧基、2-三氟乙氧基、2-氯乙氧基等。

本說明書中「芳基」為單環或縮環狀芳族烴基。如苯基、1-萘基、2-萘基、蒽基。較佳為苯基、1-萘基。

本說明書中「芳烷基」為上述「烷基」以「芳基」取代者，此等可取代全部之位置。如苄基、二甲苯基、苯丙基(如3-苯丙基)、萘甲基(如1-萘甲基)等。

本說明書中「烷氧羰基」為如甲氧羰基、乙氧羰基、正丙氧羰基等。

本說明書中「芳氧基」為如苯氧基等。

本說明書中「芳硫基」為如苯硫基等。

本說明書中「鹵苯基」包含以上述「鹵素」取代1或2個位置以上之苯基。如氟苯基、氯苯基、溴苯基、碘苯基、二氟苯基、二氯苯基、二溴苯基、三氟苯基、三氯苯基、三溴苯基、氯氟苯基、溴氯苯基等。

本說明書中，D環中「環己烯環」為於環內具有與鄰接環之縮合部分所具有的僅一個雙鍵之環己烯環。

A環及-B-之較佳組合為以下所示(m)~(r)所表之組合為佳。

五、發明說明 (23)

Mixed Micelles : Development of a Spectrophotometric Assay Suitable for a Microtiterplate Reader」 (Analytical Biochemistry, 204, pp 190-197, 1992)。

一般式 (I) 所表之化合物可經由 PCT/JP00/07024、EP-620214 (特開平 7-010838、US-5578634)、EP-620215 (特開平 7-025850、US-5684034)、EP-675110 (特開平 7-285933、US-5654326)、W096/03120 (特開平 10-505336)、W096/03383 (特開平 10-505584)、W098/18464 (EP839806)、W099/51605、W099/59999 等之方法合成。

本發明之癌症預防或治療劑可經由經口、氣溶膠、直腸、經皮、皮下、靜脈內、肌肉內、鼻腔內各種路徑投予。本發明之製劑由治療上有效量之化合物與製藥上容許載體或稀釋劑組合 (如混合) 予以製造。本發明之製劑以周知、可輕易獲得之成分，以既知之方法製造。

製造本發明之組成物時，活性成分與載體混合或以載體稀釋，置入作成膠囊、藥囊、紙或其他容器形態之載體中。載體為稀釋劑作用時，載體為媒介體作用之固體、半固體、或液體材料，可作成錠劑、丸劑、粉末劑、口中劑、酏劑、懸濁劑、乳劑、溶液劑、糖漿劑、氣溶膠劑 (液體媒介質中之固體)、軟膏之形式，如含有至 10% 之活性化合物。具有本發明之癌症預防或治療劑作用之化合物較佳為投藥前先行製劑化。

當業者可使用任何此製劑用之公知適當載體。此種製劑

五、發明說明 (24)

之載體為固體、液體、或固體與液體之混合物。如靜脈注射用之具 X 型 sPLA₂ 抑制作用之化合物以 2mg/ml 濃度溶解於 4%右旋糖 / 0.5%檸檬酸鈉水溶液中。固體製劑包含粉末、錠劑及膠囊。固體載體為香料、潤滑劑、溶解劑、懸濁劑、結合劑、錠劑崩壞劑、膠囊劑作成之材料中之一或以上之物質。經口投予用之錠劑含有玉米澱粉、藻酸等之崩壞劑、及 / 或明膠、阿拉伯膠等之結合劑、及硬脂酸鎂、硬脂酸、滑石等之潤滑劑與碳酸鈣、碳酸鈉、乳酸、磷酸鈣等之適當賦形劑。

粉末狀之載體為與細粉碎之活性成分混合的細粉碎固體。錠劑之活性成分以適當之比例，與必要結合性之載體混合，固定成預定形式之大小。粉末劑與錠劑含有約 1-約 99 重量%之本發明新穎化合物之活性成分。適當之固體載體為碳酸鎂、硬脂酸鎂、滑石、砂糖、乳糖、果膠、糊精、澱粉、明膠、西黃耆膠 (tragacanth)、甲基纖維素、羧甲基鈉纖維素、低熔點蠟、椰子油。

無菌液體製劑包含懸浮劑、乳劑、糖漿劑、及酏劑。活性成分可為溶解或懸浮於滅菌水、滅菌有機溶劑、或兩者之混合物等之製藥上可容許之載體者。活性成分可為每每適當之有機溶劑，如溶解於丙二醇水溶液中者。經由散佈細粉碎之活性成分於水性澱粉、羧甲基鈉纖維素溶液、或適當之油中，亦可製造其他組成物。

投予量因疾病狀態、投予路徑、患者年齡、或體重而異

五、發明說明 (26)

將受測化合物(或溶劑混合物)依預先設定之盤順序添加，反應於 Tris 緩衝液(25mM, pH7.5)、CaCl₂(10mM)、KCl(100mM)、牛血清蛋白(1.0mg/ml)中，在 Triton-X 100(0.3mM)、5,5'-二硫雙(2-硝基苯甲酸)(125 μ M)存在下，使二己醯硫 PC (1mM)與人 X 型 sPLA₂ 反應(15 μ l/位、40°C、30 分鐘)，測定 405nm 吸光度之變化，算出抑制作用。

IC₅₀ 為將上述化合物(1)~(19)之 log 濃度，對 10~90%抑制範圍之抑制值為原始資料計算者。

X 型 sPLA₂ 抑制試驗之結果如表 1 所示。

表 1

化合物號碼	IC ₅₀ (nM)	化合物號碼	IC ₅₀ (nM)
1	10	11	10
2	10	12	16
3	5	13	19
4	27	14	9
5	12	15	17
6	17	16	7
7	5	17	12
8	3	18	16
9	13	19	26
10	12		

五、發明說明 (27)

實施例 3 使用抗 X 型 sPLA₂ 抗體之人大腸癌組織之免疫組織化學分析

本試驗中使用 The Journal of Biological Chemistry Vol. 274, No. 48, pp.34203-34211, 1999記載之抗 X 型 sPLA₂抗體。健康成人大腸組織與來自大腸癌患者之大腸癌組織標本買自 Biochain Inc.(San Leandro, CA)。組織切片之玻片標本去除石蠟，於含有 0.3% H₂O₂之甲醇中反應 30分鐘，去除內因性過氧化酶之活性後，以 5% 正常羊血清處理 20分鐘。其後，在 4°C 含有 0.1% 牛血清蛋白之 PBS 中與抗 X 型 sPLA₂抗體 (6 μg/mL) 反應 14 小時。以 PBS 洗淨後，與接有生物素之羊抗兔 IgG 抗體反應 30 分鐘，以過氧化氫酶標識之抗生物素蛋白-生物素複合體試藥 (Vector Laboratories) 處理。洗淨後，經由於含有 200 μg/mL 之二胺基聯苯胺與 0.006% H₂O₂之 50mmol/L Tris-HCl (pH7.6) 緩衝液中反應 10 分鐘，使過氧化氫酶活性呈色，而使組織標本中之 X 型 sPLA₂ 可視化。又經 0.4% 蘇木精水溶液反應，對比染色細胞核。以 X 型 sPLA₂ 陽性訊號為濃茶色二胺基聯苯胺檢測。X 型 sPLA₂ 訊號之中和實驗為在添加抗體於玻片上前，與純化之 X 型 sPLA₂ 蛋白質 (60 μg/mL) 反應 2 小時而進行之。

其結果為，X 型 sPLA₂ 陽性訊號於正常大腸組織中完全未被檢測出，在大腸腺癌組織之癌細胞中則被強烈檢測出。此等之訊號由 X 型 sPLA₂ 蛋白質的添加而消失確認為對

五、發明說明 (28)

X 型 sPLA₂ 專一性。又此等陽性訊號不被認為是來自非免疫兔調製之 IgG。由以上之結果暗示大腸癌中 X 型 sPLA₂ 蛋白質明顯地高度表現。

實施例 4 使用抗 X 型 sPLA₂ 抗體之人肺組織之免疫組織化學分析

本試驗中使用 The Journal of Biological Chemistry Vol. 274, No. 48, pp. 34203-34211 1999 記載之抗 X 型 sPLA₂ 抗體。健康成人肺組織與來自肺癌患者之肺癌組織標本買自 Biochain Inc. (San Leandro, CA)。組織切片之玻片標本去除石蠟，於含有 0.3% H₂O₂ 之甲醇中反應 30 分鐘，去除內因性過氧化酶之活性後，以 5% 正常羊血清處理 20 分鐘。其後，在 4°C 含有 0.1% 牛血清蛋白之 PBS 中與抗 X 型 sPLA₂ 抗體 (6 μg/mL) 反應 14 小時。以 PBS 洗淨後，與接有生物素之羊抗兔 IgG 抗體反應 30 分鐘，以過氧化氫酶標識之抗生物素蛋白-生物素複合體試藥 (Vector Laboratories) 處理。洗淨後，經由於含有 200 μg/mL 之二胺基聯苯胺與 0.006% H₂O₂ 之 50mmol/L Tris-HCl (pH7.6) 緩衝液中反應 10 分鐘，使過氧化氫酶活性呈色，而使組織標本中之 X 型 sPLA₂ 可視化。又經與 0.4% 蘇木精水溶液反應，對比染色細胞核。以 X 型 sPLA₂ 陽性訊號為濃茶色二胺基聯苯胺檢測。X 型 sPLA₂ 訊號之中和實驗為在添加抗體於玻片上前，與純化之 X 型 sPLA₂ 蛋白質 (60 μg/mL) 反應 2 小時而進行之。

五、發明說明 (29)

其結果為，X 型 sPLA₂ 陽性訊號於正常肺組織中 II 型肺泡上皮組織檢測出低量，但在來自肺癌患者之肺組織的癌細胞中被強烈檢測出。此等之訊號由 X 型 sPLA₂ 蛋白質的添加而消失，確認為對 X 型 sPLA₂ 專一性。又此等陽性訊號不被認為是來自非免疫兔調製之 IgG。由以上之結果暗示肺癌中 X 型 sPLA₂ 蛋白質明顯地高度表現。

實施例 5 使用抗 X 型 sPLA₂ 抗體之人肝臟組織之免疫組織化學分析

本試驗中使用 The Journal of Biological Chemistry Vol. 274, No. 48, pp. 34203-34211 1999 記載之抗 X 型 sPLA₂ 抗體。健康成人肝臟組織與來自肝癌患者之肝臟組織標本買自 Biochain Inc. (San Leandro, CA)。組織切片之玻片標本去除石蠟，於含有 0.3% H₂O₂ 之甲醇中反應 30 分鐘，去除內因性過氧化酶之活性後，以 5% 正常羊血清處理 20 分鐘。其後，在 4°C 含有 0.1% 牛血清蛋白之 PBS 中與抗 X 型 sPLA₂ 抗體 (6 μg/mL) 反應 14 小時。以 PBS 洗淨後，與接有生物素之羊抗兔 IgG 抗體反應 30 分鐘，以含有過氧化氫酶之抗生物素蛋白-生物素複合體試藥 (Vector Laboratories) 處理。洗淨後，經由於含有 200 μg/mL 之二胺基聯苯胺與 0.006% H₂O₂ 之 50mmol/L Tris-HCl (pH 7.6) 緩衝液中反應 10 分鐘，使過氧化氫酶活性呈色，而使組織標本中之 X 型 sPLA₂ 可視化。又經與 0.4% 蘇木精水溶液反應，對比染色細胞核。以 X 型 sPLA₂ 陽性訊號為濃茶色

五、發明說明 (31)

二胺基聯苯胺與 0.006% H_2O_2 之 50mmol/L Tris-HCl(pH7.6) 緩衝液中反應 10 分鐘，使過氧化氫酶活性呈色，而使組織標本中之 X 型 sPLA₂ 可視化。又經與 0.4%蘇木精水溶液反應，對比染色細胞核。以 X 型 sPLA₂ 陽性訊號為濃茶色二胺基聯苯胺檢測。X 型 sPLA₂ 訊號之中和實驗為在添加抗體於玻片上前，與純化之 X 型 sPLA₂ 蛋白質 (60 μ g/mL) 反應 2 小時而進行之。

其結果為，X 型 sPLA₂ 陽性訊號於正常胃組織中完全未檢測出，但在來自胃癌患者之胃組織的癌細胞中被強烈檢測出。此等之訊號由 X 型 sPLA₂ 蛋白質的添加而消失，確認為對 X 型 sPLA₂ 專一性。又此等陽性訊號不被認為是來自非免疫兔調製之 IgG。由以上之結果暗示胃癌中 X 型 sPLA₂ 蛋白質明顯地高度表現。

實施例 7 使用抗 X 型 sPLA₂ 抗體之人腎臟組織之免疫組織化學分析

本試驗中使用 The Journal of Biological Chemistry Vol. 274, No. 48, pp. 34203-34211 1999 記載之抗 X 型 sPLA₂ 抗體。健康成人腎臟組織與來自腎臟癌患者之腎臟組織標本買自 Biochain Inc.(San Leandro, CA)。組織切片之玻片標本去除石蠟，於含有 0.3% H_2O_2 之甲醇中反應 30 分鐘，去除內因性過氧化酶之活性後，以 5% 正常羊血清處理 20 分鐘。其後，在 4°C 含有 0.1% 牛血清蛋白之 PBS 中與抗 X 型 sPLA₂ 抗體 (6 μ g/mL) 反應 14 小時。以 PBS 洗淨後，

五、發明說明 (32)

與接有生物素之羊抗兔 IgG 抗體反應 30 分鐘，以含有過氧化氫酶之抗生物素蛋白 - 生物素複合體試藥 (Vector Laboratories) 處理。洗淨後，經由於含有 $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ 之二胺基聯苯胺與 $0.006\% \text{H}_2\text{O}_2$ 之 $50 \text{mmol}/\text{L}$ Tris-HCl (pH 7.6) 緩衝液中反應 10 分鐘，使過氧化氫酶活性呈色，而使組織標本中之 X 型 sPLA₂ 可視化。又經與 0.4% 蘇木精水溶液反應，對比染色細胞核。以 X 型 sPLA₂ 陽性訊號為濃茶色二胺基聯苯胺檢測。X 型 sPLA₂ 訊號之中和實驗為在添加抗體於玻片上前，與純化之 X 型 sPLA₂ 蛋白質 ($60 \mu\text{g}/\text{mL}$) 反應 2 小時而進行之。

其結果為，X 型 sPLA₂ 陽性訊號於正常腎臟組織中腎小球膜細胞檢測出低量，但在來自腎臟癌患者之腎臟組織的癌細胞中被強烈檢測出。此等之訊號由 X 型 sPLA₂ 蛋白質的添加而消失，確認為對 X 型 sPLA₂ 專一性。又此等陽性訊號不被認為是來自非免疫兔調製之 IgG。由以上之結果暗示腎臟癌中 X 型 sPLA₂ 蛋白質明顯地高度表現。

實施例 8 使用抗 X 型 sPLA₂ 抗體之人膽囊組織之免疫組織化學分析

本試驗中使用 The Journal of Biological Chemistry Vol. 274, No. 48, pp. 34203-34211 1999 記載之抗 X 型 sPLA₂ 抗體。健康成人膽囊組織與來自膽囊癌患者之膽囊組織標本買自 Biochain Inc. (San Leandro, CA)。組織切片之玻片標本去除石蠟，於含有 $0.3\% \text{H}_2\text{O}_2$ 之甲醇中反應

五、發明說明 (33)

30 分鐘，去除內因性過氧化酶之活性後，以 5% 正常羊血清處理 20 分鐘。其後，在 4°C 含有 0.1% 牛血清蛋白之 PBS 中與抗 X 型 sPLA₂ 抗體 (6 μg/mL) 反應 14 小時。以 PBS 洗淨後，與接有生物素之羊抗兔 IgG 抗體反應 30 分鐘，以過氧化氫酶標識之抗生物素蛋白-生物素複合體試藥 (Vector Laboratories) 處理。洗淨後，經由於含有 200 μg/mL 之二胺基聯苯胺與 0.006% H₂O₂ 之 50mmol/L Tris-HCl (pH7.6) 緩衝液中反應 10 分鐘，使過氧化氫酶活性呈色，而使組織標本中之 X 型 sPLA₂ 可視化。又經與 0.4% 蘇木精水溶液反應，對比染色細胞核。以 X 型 sPLA₂ 陽性訊號為濃茶色二胺基聯苯胺檢測。X 型 sPLA₂ 訊號之中和實驗為在添加抗體於玻片上前，與純化之 X 型 sPLA₂ 蛋白質 (60 μg/mL) 反應 2 小時而進行之。

其結果為，X 型 sPLA₂ 陽性訊號於正常膽囊組織中完全未檢測出，但在來自膽囊癌患者之膽囊組織的癌細胞中被強烈檢測出。此等之訊號由 X 型 sPLA₂ 蛋白質的添加而消失，確認為對 X 型 sPLA₂ 專一性。又此等陽性訊號不被認為是來自非免疫兔調製之 IgG。由以上之結果暗示膽囊癌中 X 型 sPLA₂ 蛋白質明顯地高度表現。

實施例 9 使用抗 X 型 sPLA₂ 抗體之人前列腺組織之免疫組織化學分析

本試驗中使用 The Journal of Biological Chemistry Vol. 274, No. 48, pp. 34203-34211 1999 記載之抗 X 型

五、發明說明 (34)

sPLA₂ 抗體。健康成人前列腺組織與來自前列腺癌患者之前列腺組織標本買自 Biochain Inc. (San Leandro, CA)。組織切片之玻片標本去除石蠟，於含有 0.3% H₂O₂ 之甲醇中反應 30 分鐘，去除內因性過氧化酶之活性後，以 5% 正常羊血清處理 20 分鐘。其後，在 4°C 含有 0.1% 牛血清蛋白之 PBS 中與抗 X 型 sPLA₂ 抗體 (6 μg/mL) 反應 14 小時。以 PBS 洗淨後，與接有生物素之羊抗兔 IgG 抗體反應 30 分鐘，以過氧化氫酶標識之抗生物素蛋白-生物素複合體試藥 (Vector Laboratories) 處理。洗淨後，經由於含有 200 μg/mL 之二胺基聯苯胺與 0.006% H₂O₂ 之 50mmol/L Tris-HCl (pH7.6) 緩衝液中反應 10 分鐘，使過氧化氫酶活性呈色，而使組織標本中之 X 型 sPLA₂ 可視化。又經與 0.4% 蘇木精水溶液反應，對比染色細胞核。以 X 型 sPLA₂ 陽性訊號為濃茶色二胺基聯苯胺檢測。X 型 sPLA₂ 訊號之中和實驗為在添加抗體於玻片上前，與純化之 X 型 sPLA₂ 蛋白質 (60 μg/mL) 反應 2 小時而進行之。

其結果為，X 型 sPLA₂ 陽性訊號於正常前列腺組織中完全未檢測出，但在來自前列腺癌患者之前列腺組織的癌細胞中被強烈檢測出。此等之訊號由 X 型 sPLA₂ 蛋白質的添加而消失，確認為對 X 型 sPLA₂ 專一性。又此等陽性訊號不被認為是來自非免疫兔調製之 IgG。由以上之結果暗示前列腺癌中 X 型 sPLA₂ 蛋白質明顯地高度表現。

五、發明說明 (35)

實施例 10 使用抗 X 型 sPLA₂ 抗體之人胰臟組織之免疫組織化學分析

本試驗中使用 The Journal of Biological Chemistry Vol. 274, No. 48, pp. 34203-34211 1999 記載之抗 X 型 sPLA₂ 抗體。健康成人胰臟組織與來自胰臟癌患者之胰臟組織標本買自 Biochain Inc. (San Leandro, CA)。組織切片之玻片標本去除石蠟，於含有 0.3% H₂O₂ 之甲醇中反應 30 分鐘，去除內因性過氧化酶之活性後，以 5% 正常羊血清處理 20 分鐘。其後，在 4°C 含有 0.1% 牛血清蛋白之 PBS 中與抗 X 型 sPLA₂ 抗體 (6 μg/mL) 反應 14 小時。以 PBS 洗淨後，與接有生物素之羊抗兔 IgG 抗體反應 30 分鐘，以過氧化氫酶標識之抗生物素蛋白-生物素複合體試藥 (Vector Laboratories) 處理。洗淨後，經由於含有 200 μg/mL 之二胺基聯苯胺與 0.006% H₂O₂ 之 50mmol/L Tris-HCl (pH 7.6) 緩衝液中反應 10 分鐘，使過氧化氫酶活性呈色，而使組織標本中之 X 型 sPLA₂ 可視化。又經與 0.4% 蘇木精水溶液反應，對比染色細胞核。以 X 型 sPLA₂ 陽性訊號為濃茶色二胺基聯苯胺檢測。X 型 sPLA₂ 訊號之中和實驗為在添加抗體於玻片上前，與純化之 X 型 sPLA₂ 蛋白質 (60 μg/mL) 反應 2 小時而進行之。

其結果為，X 型 sPLA₂ 陽性訊號於正常胰臟組織中完全未檢測出，但在來自胰臟癌患者之胰臟組織的癌細胞被強烈檢測出。此等之訊號由 X 型 sPLA₂ 蛋白質的添加而消失

五、發明說明 (36)

， 確 認 為 對 X 型 sPLA₂ 專 一 性 。 又 此 等 陽 性 訊 號 不 被 認 為 是 來 自 非 免 疫 兔 調 製 之 IgG 。 由 以 上 之 結 果 暗 示 胰 臟 癌 中 X 型 sPLA₂ 蛋 白 質 明 顯 地 高 度 表 現 。

實 施 例 11 使 用 抗 X 型 sPLA₂ 抗 體 之 人 睪 丸 組 織 之 免 疫 組 織 化 學 分 析

本 試 驗 中 使 用 The Journal of Biological Chemistry Vol. 274, No. 48, pp. 34203-34211 1999 記 載 之 抗 X 型 sPLA₂ 抗 體 。 健 康 成 人 睪 丸 組 織 與 來 自 睪 丸 癌 患 者 之 睪 丸 組 織 標 本 買 自 Biochain Inc. (San Leandro, CA) 。 組 織 切 片 之 玻 片 標 本 去 除 石 蠟 ， 於 含 有 0.3% H₂O₂ 之 甲 醇 中 反 應 30 分 鐘 ， 去 除 內 因 性 過 氧 化 酶 之 活 性 後 ， 以 5% 正 常 羊 血 清 處 理 20 分 鐘 。 其 後 ， 在 4°C 含 有 0.1% 牛 血 清 蛋 白 之 PBS 中 與 抗 X 型 sPLA₂ 抗 體 (6 μ g/mL) 反 應 14 小 時 。 以 PBS 洗 淨 後 ， 與 接 有 生 物 素 之 羊 抗 兔 IgG 抗 體 反 應 30 分 鐘 ， 以 過 氧 化 氫 酶 標 識 之 抗 生 物 素 蛋 白 - 生 物 素 複 合 體 試 藥 (Vector Laboratories) 處 理 。 洗 淨 後 ， 經 由 於 含 有 200 μ g/mL 之 二 胺 基 聯 苯 胺 與 0.006% H₂O₂ 之 50mmol/L Tris-HCl (pH7.6) 緩 衝 液 中 反 應 10 分 鐘 ， 使 過 氧 化 氫 酶 活 性 呈 色 ， 而 使 組 織 標 本 中 之 X 型 sPLA₂ 可 視 化 。 又 經 與 0.4% 蘇 木 精 水 溶 液 反 應 ， 對 比 染 色 細 胞 核 。 以 X 型 sPLA₂ 陽 性 訊 號 為 濃 茶 色 二 胺 基 聯 苯 胺 檢 測 。 X 型 sPLA₂ 訊 號 之 中 和 實 驗 為 在 添 加 抗 體 於 玻 片 上 前 ， 與 純 化 之 X 型 sPLA₂ 蛋 白 質 (60 μ g/mL) 反 應 2 小 時 而 進 行 之 。

五、發明說明 (37)

其結果為，X 型 sPLA₂ 陽性訊號於正常睪丸組織中極少部分細精管被檢測出，但在來自睪丸癌患者之睪丸組織中，細精管及精囊上皮所生成之癌細胞中被強烈檢測出。此等之訊號由 X 型 sPLA₂ 蛋白質的添加而消失，確認為對 X 型 sPLA₂ 專一性。又此等陽性訊號不被認為是來自非免疫兔調製之 IgG。由以上之結果暗示睪丸癌中 X 型 sPLA₂ 蛋白質明顯地高度表現。

實施例 12 使用抗 X 型 sPLA₂ 抗體之人卵巢組織之免疫組織化學分析

本試驗中使用 The Journal of Biological Chemistry Vol. 274, No. 48, pp. 34203-34211 1999 記載之抗 X 型 sPLA₂ 抗體。健康成人卵巢組織與來自卵巢癌患者之卵巢組織標本買自 Biochain Inc. (San Leandro, CA)。組織切片之玻片標本去除石蠟，於含有 0.3% H₂O₂ 之甲醇中反應 30 分鐘，去除內因性過氧化酶之活性後，以 5% 正常羊血清處理 20 分鐘。其後，在 4°C 含有 0.1% 牛血清蛋白之 PBS 中與抗 X 型 sPLA₂ 抗體 (6 μg/mL) 反應 14 小時。以 PBS 洗淨後，與接有生物素之羊抗兔 IgG 抗體反應 30 分鐘，以過氧化氫酶標識之抗生物素蛋白-生物素複合體試藥 (Vector Laboratories) 處理。洗淨後，經由於含有 200 μg/mL 之二胺基聯苯胺與 0.006% H₂O₂ 之 50mmol/L Tris-HCl (pH7.6) 緩衝液中反應 10 分鐘，使過氧化氫酶活性呈色，而使組織標本中之 X 型 sPLA₂ 可視化。又經與 0.4% 蘇

五、發明說明 (38)

木精水溶液反應，對比染色細胞核。以 X 型 sPLA₂ 陽性訊號為濃茶色二胺基聯苯胺檢測。X 型 sPLA₂ 訊號之中和實驗為在添加抗體於玻片上前，與純化之 X 型 sPLA₂ 蛋白質 (60 μg/mL) 反應 2 小時而進行之。

其結果為，X 型 sPLA₂ 陽性訊號於正常卵巢組織中完全未被檢測出，但在來自卵巢癌患者之卵巢組織中，由濾泡上皮至輸卵管附近所生成之癌細胞中被強烈檢測出。此等之訊號由 X 型 sPLA₂ 蛋白質的添加而消失，確認為對 X 型 sPLA₂ 專一性。又此等陽性訊號不被認為是來自非免疫兔調製之 IgG。由以上之結果暗示卵巢癌中 X 型 sPLA₂ 蛋白質明顯地高度表現。

實施例 13 使用抗 X 型 sPLA₂ 抗體之人皮膚組織之免疫組織化學分析

本試驗中使用 The Journal of Biological Chemistry Vol. 274, No. 48, pp. 34203-34211 1999 記載之抗 X 型 sPLA₂ 抗體。健康成人皮膚組織與來自皮膚癌 (惡性黑色腫瘤) 患者之皮膚組織標本買自 Biochain Inc. (San Leandro, CA)。組織切片之玻片標本去除石蠟，於含有 0.3% H₂O₂ 之甲醇中反應 30 分鐘，去除內因性過氧化酶之活性後，以 5% 正常羊血清處理 20 分鐘。其後，在 4°C 含有 0.1% 牛血清蛋白之 PBS 中與抗 X 型 sPLA₂ 抗體 (6 μg/mL) 反應 14 小時。以 PBS 洗淨後，與接有生物素之羊抗兔 IgG 抗體反應 30 分鐘，以含有過氧化氫酶之抗生物素蛋白-生物素複合

五、發明說明 (39)

體試藥 (Vector Laboratories) 處理。洗淨後，經由於含有 $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ 之二胺基聯苯胺與 $0.006\% \text{H}_2\text{O}_2$ 之 $50\text{mmol}/\text{L}$ Tris-HCl (pH7.6) 緩衝液中反應 10 分鐘，使過氧化氫酶活性呈色，而使組織標本中之 X 型 sPLA₂ 可視化。又經與 0.4% 蘇木精水溶液反應，對比染色細胞核。以 X 型 sPLA₂ 陽性訊號為濃茶色二胺基聯苯胺檢測。X 型 sPLA₂ 訊號之中和實驗為在添加抗體於玻片上前，與純化之 X 型 sPLA₂ 蛋白質 ($60 \mu\text{g}/\text{mL}$) 反應 2 小時而進行之。

其結果為，X 型 sPLA₂ 陽性訊號於正常皮膚組織中於由表皮之棘細胞層至基底層之黑色素細胞 (melanocyte) 檢測出低量，但在來自皮膚癌患者之皮膚組織的異型之黑色素細胞中被強烈檢測出。此等之訊號由 X 型 sPLA₂ 蛋白質的添加而消失，確認為對 X 型 sPLA₂ 專一性。又此等陽性訊號不被認為是來自非免疫兔調製之 IgG。由以上之結果暗示皮膚癌 (惡性黑色腫瘤) 中 X 型 sPLA₂ 蛋白質明顯地高度表現。

實施例 14 對經由人大腸癌細胞株 HT-29 細胞中之人 X 型 sPLA₂ 導致之十八烯酸游離的 sPLA₂ 抑制劑之抑制效果

受驗化合物使用化合物 (1) 及化合物 (19)。

將培養於含 10% 胎牛血清之 DMEM 培養基的人大腸癌細胞株 HT-29 細胞株 (買自 ATCC) 以磷酸緩衝生理食鹽水 (PBS) 洗淨後，以胰蛋白酶 • EDTA 溶液自盤中剝離，再以 PBS 洗

五、發明說明 (40)

淨後，形成 12.5×10^6 cells/ml 細胞密度懸浮於含有 0.1% 牛血清蛋白 (BSA) 之 Hanks 緩衝生理食鹽水中。隨後，取 0.4ml 聚丙烯管，添加溶解於二甲基亞砷 (DMSO) 之受驗化合物 (最終濃度 $10 \mu\text{M}$ ；溶解於 DMSO)， 37°C 保溫 10 分鐘。其後，添加 100nM 純化之人 X 型 sPLA₂ 酵素 (Hanasaki 等, J. Biol. Chem. (1999) 274, 34203-34211)，再於 37°C 保溫 30 分鐘後，藉由添加 2ml 之 Dorze 試藥 (己烷：2-丙醇：1M 硫酸 = 10：40：1, v/v/v) 終止反應。其後，以 Tojo 等人之方法為準 (J. Lipid. Res. (1993) 34, 837-844)，抽出脂肪酸，以 9-蔥基二偶氮甲烷 (Hanacosh) 標識脂肪酸後，以逆相高速液體層析法 (LiChroCART 125-4 Superspher 100 RP-18 柱 (Merck)) 定量十八烯酸。數據為除以未添加 X 型 sPLA₂ 時之值後，以添加 X 型 sPLA₂ 所增加之十八烯酸量為 100%，對此之各受驗化合物存在下的游離量以 % 表示。如表 2 所示，各受驗化合物為刻意抑制經 X 型 sPLA₂ 導致之十八烯酸游離反應。

實施例 15 對經由人大腸癌細胞株 HT-29 細胞中之人 X 型 sPLA₂ 導致之 PGE₂ 產生作用的 sPLA₂ 抑制劑之抑制效果

將 HT-29 細胞播於 2.5×10^5 cells/ml 細胞密度之 24 位盤中，24 小時後，以 PBS 洗淨細胞後，再於含 30ng/ml 之腫瘤壞死因子 - α (R&D Systems, Inc.) 之具 10% 胎牛血清之 DMEM 培養基中培養 18 小時。以 PBS 洗淨後，添加含

五、發明說明 (42)

製劑例 1

硬質明膠囊由以下成分製造：

	用量 (mg / 膠囊)
活性成分	250
澱粉(乾燥)	200
硬脂酸鎂	<u>10</u>
合計	460mg

製劑例 2

錠劑由以下成分製造：

	用量 (mg / 膠囊)
活性成分	250
纖維素(微結晶)	400
二氧化矽(潮濕)	10
硬脂酸鎂	<u>5</u>
合計	665mg

混合、壓縮成份，作成各重量 665mg 錠劑。

五、發明說明 (43)

製劑例 3

製造含有以下成分之氣溶膠溶液：

	<u>重量</u>
活性成分	0.25
乙醇	25.75
Properant22(氯二氟甲烷)	<u>74.00</u>
合計	100.00

將活性成分與乙醇混合，將此混合物添加於部分 Properant22，冷卻至 -30℃，一至填充裝置。其次提供必要量於不鏽鋼容器，以剩下之 Properant22 稀釋。以氣泡單位取自容器中。

製劑例 4

含活性成分 60mg 之錠劑由以下製造：

活性成分	60 mg
澱粉	45 mg
微結晶性纖維素	35 mg
聚丙烯吡咯酮(水中 10%溶液)	4 mg
羧甲基鈉纖維素	4.5mg
硬脂酸鎂	0.5mg
滑石	<u>1 mg</u>
合計	150 mg

五、發明說明 (44)

活性成分、澱粉、級纖維素通過 45 號網孔 U.S. 篩，充分混合。與得自含聚丙烯吡咯酮水溶液之粉末混合，其次將混合物通過 14 號網孔 U.S. 篩。如此獲得之顆粒於 50°C 乾燥，通過 18 號網孔 U.S. 篩。將預先通過 60 號網孔 U.S. 篩之羧甲基鈉澱粉、硬脂酸鎂、及滑石加入此顆粒中，混合後，以打錠機壓縮，獲得各重量 150mg 之錠劑。

製劑例 5

含活性成分 80mg 之膠囊劑由以下製造：

活性成分	80mg
澱粉	59mg
微結晶性纖維素	59mg
硬脂酸鎂	<u>2mg</u>
合計	200mg

混合活性成分、澱粉、微結晶性纖維素、硬脂酸鎂，通過 45 號網孔 U.S. 篩，每 200mg 填充於硬質明膠囊。

製劑例 6

含活性成分 225mg 之塞劑由以下製造：

活性成分	225mg
飽和脂肪酸甘油	2000mg
合計	2225mg

將活性成分通過 60 號網孔 U.S. 篩，懸浮於預先加熱至必要最小限度使溶解之飽和脂肪酸甘油。其次將此混合物裝入外觀 2g 型中冷卻。

五、發明說明 (45)

製劑例 7 含活性成分 50mg 之懸浮劑由以下製造：

活性成分	50mg
羧甲基鈉纖維素	50mg
糖漿	1.25mg
苯甲酸溶液	0.10mg
香料	q.v.
色素	q.v.
加純水合計	5ml

將活性成分通過 45 號網孔 U.S. 篩，與羧甲基鈉纖維素及糖漿混合，作成潤滑之糊。添加以部份水稀釋之苯甲酸溶液及香料，予以攪拌。再加入充分水量形成必要之體積。

製劑例 8

靜脈用製劑如以下製造：

活性成分	100mg
飽和脂肪酸甘油	1000ml

上述成分通常以 1 分鐘 1ml 速度靜脈內投予患者。

產業上可利用性

X 型 sPLA₂ 抑制劑發現可有效為癌症之預防或治療劑。

公告本

92年8月21日
修正
補充

申請日期	90. 6. 27
案 號	90115543
類 別	AB1K ^{45/00} , 31/4985, 31/427, 31/5025, 31/403, 31/404, AB1P ^{35/00} , 0070 ^{487/04}

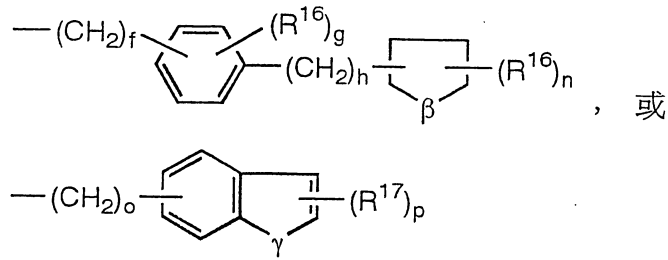
(以上各欄由本局填註)

(92年8月21日修正)

發 明 專 利 說 明 書		583000
一、發明 新 型 名 稱	中 文	作為癌症治療劑之 X 型 sPLA ₂ 抑制劑
	英 文	X-type sPLA ₂ inhibitor as a cancer therapeutical agent
二、發明 創 作 人	姓 名	1. 花崎浩二 2. 池田稔 3. 小野隆
	國 籍	1. ~ 3. 日本
	住、居所	1. ~ 3. 日本國大阪府大阪市福島區鷺洲 5 丁目 12 番 4 號 塩野義製藥株式會社內
三、申請人	姓 名 (名稱)	鹽野義製藥股份有限公司 (塩野義製藥株式會社)
	國 籍	日本
	住、居所 (事務所)	大阪府大阪市中央區道修町 3 丁目 1 番 8 號
	代 表 人 姓 名	鹽野元三 (塩野元三)

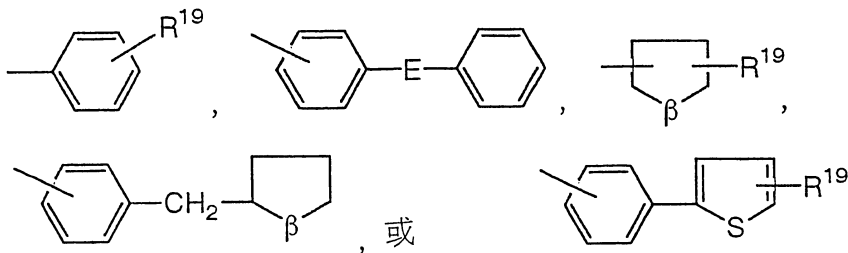
471/04, 209/86, 405/04

五、發明說明 (6)



(式中，b、d、f、h、j、m、及 o 各自獨立為 0~2 整數， R^{16} 及 R^{17} 為選自各自獨立之鹵素、C1-C10 烷基、C1-C10 烷氧基、C1-C10 烷硫基、芳氧基、及 C1-C10 鹵烷基之基， α 為氧或硫原子， β 為 $-\text{CH}_2-$ 或 $-(\text{CH}_2)_2-$ ， γ 為氧或硫原子，c、i、及 p 為 0~5 整數，e 為 0~7 整數，g 為 0~4 整數，k 及 n 各自獨立為 0~3 整數) 所表之基之 II)~IV) 任一項所記載之化合物、其前藥、或彼等之製藥上容許鹽、或彼等之溶劑合物為有效成分之癌症預防或治療劑。

VI) R^5 為 $-\text{CH}_2-\text{R}^{18}$ (R^{18} 為式：



(式中， β 為 $-\text{CH}_2-$ 或 $-(\text{CH}_2)_2-$ ； R^{19} 為氫、C1-C3 烷基、或鹵素；E 為單鍵、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-$) 所表之基之 V) 之化合物、其前藥、或彼等之製藥上容許鹽、或彼等之溶劑合物為有效成分之癌症預防或治療劑。

VII) R^1 為 $-\text{OCH}_2\text{COOH}$ 之 II)~VI) 任一項記載之化合物、

五、發明說明 (11)

酯、乙基酯)。根據情形，亦可製造(醯氧基)烷基酯或((烷氧基羰基)氧基)烷基酯之二重酯型前藥。

具有 X 型 sPLA₂ 抑制作用之化合物為具酸性或鹼性官能基之化合物時，較其原本之化合物的水溶性高，且可形成生理上適當之各種鹽。代表的製藥上容許鹽包含鋰、鈉、鉀、鈣、鎂、鋁等之鹼金屬及鹼土金屬鹽，但不限於此等。經由將溶液中之酸以鹼處理，或將酸以離子交換樹脂接觸所形成之游離酸簡單製造鹽。具有 X 型 sPLA₂ 抑制作用之化合物的較無毒之無機鹼及有機鹼之加成鹽，如由具有形成該化合物及鹽之充分鹼性之氮鹼基，所衍生之胺陽離子、銨、四級銨包含於製藥上容許鹽的定義中(如 S. M. Berge 等，"Pharmaceutical Salts," J. Phar. Sci., 66, 1-19 (1977))。又具有 X 型 sPLA₂ 抑制作用之化合物的鹼性基與適當之有機或無機酸反應，形成乙酯、苯磺酸酯、苯甲酸酯、二碳酸酯、二硫酸酯、二酒石酸酯、硼酸酯、溴化物、過肉蔻酯、碳酸酯、氯化物、克拉布蘭酸酯 (clavulanate)、檸檬酸酯、腺苷酯、乙二胺四醋酸酯、雌激素酯、乙烯酯、氟化物、福馬林酯、七糖酯 (gluseptate)、葡糖酯、麩胺酸酯、糖對氨基苯基伸酸酯、己基間苯二酚酯、羥萘酯、碘化物、異硫酯、乳酸酯、乳糖酸酯、氨基甲酸酯、蘋果酸酯、石油酯、扁桃酸酯、甲磺醯酯、甲基溴、甲基硝酸鹽、甲基磺酸酯、無機酯、萘酯、硝酸鹽、十八烯酸酯、草酸酯、棕櫚酸酯、泛高鋁鹽、

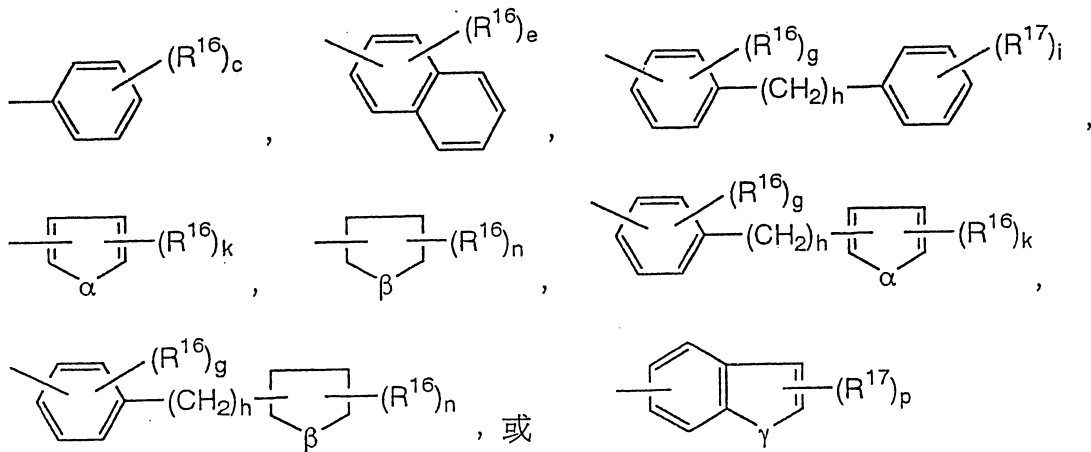
修正
 9月8日
 補充

五、發明說明 (14)

咯基、呋喃基、苯駢呋喃基、噻吩基、苯駢噻吩基、吡啶基、咪唑基、苯基咪唑基、三唑基、異噁唑基、噁唑基、噻唑基、噻二唑基、吡啶基、呋啶基、原哈馬拉鹼基 (norhamalinylyl)、偶氮吡啶基、苯駢呋喃基、二苯駢呋喃基、二苯駢噻吩基、吡啶基、咪唑 [1,2-a] 吡啶基、苯駢三唑基、苯鄰甲內醯胺基、1,2-苯甲醯基噁唑基、苯駢噁唑基、呋喃基、噁吩基、二吡啶基、苯基吡啶基、苄基吡啶基、噻啶基、苯基噻啶基、噻啶基、1,3,5-三連氮基、喹啉基、酞嗪基、喹啉基、喹噁啉基等。

R^3 及 R^4 之雜環基較佳為呋喃基、噻吩基。

R^5 之碳環基及雜環基為式：

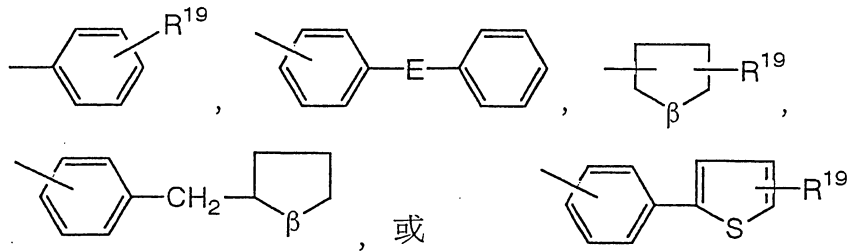


(式中， h 為 0~2 整數， R^{16} 及 R^{17} 為各自獨立選自鹵素、C1-C10 烷基、C1-C10 烷氧基、C1-C10 烷硫基、及 C1-C10 鹵烷基中之基， α 為氧或硫原子， β 為 $-\text{CH}_2-$ 或 $-(\text{CH}_2)_2-$ ， γ 為氧或硫原子， c 、 i 、及 p 為 0~5 整數， e 為 0~7 整

五、發明說明 (15)

數， g 為 0~4 整數， k 及 n 各自獨立為 0~3 整數) 所表之基為佳。 c 、 e 、 g 、 i 、 k 、 n 、及 / 或 p 為 2 以上時，數個 R^{16} 及數個 R^{17} 亦可為各自不同。 R^{16} 為萘基之取代基時，可取代於該萘基上任意之位置。

更佳者為，式：



(式中， R^{19} 為氫、C1-C3 烷基、或鹵素； E 為單鍵、 $-CH_2-$ 或 $-O-$ ； β 為 $-CH_2-$ 或 $-(CH_2)_2-$) 所表之基。

R^5 較佳為上述之「碳環」C1-C3 烷基及上述「雜環」C1-C3 烷基。

本說明書中「非妨礙性取代基」為上述之「碳環基」、「雜環基」、及基本結構之取代基的適當之基。如 C1-C10 烷基、C2-C6 烯基、C2-C6 炔基、C7-C12 芳烷基(如苄基及苯乙基)、C7-C12 烷芳基、C3-C8 環烷基、C3-C8 環烯基、苯基、甲苯基、二甲苯基、聯苯基、C1-C10 環烷氧基、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷基(如甲氧基甲基、乙氧基甲基、甲氧基乙基、及乙氧基乙基)、C1-C6 烷氧基 C1-C6 烷氧基(如甲氧基甲氧基、及甲氧基乙氧基)、C1-C6 烷羰基(如甲羰基及乙羰基)、C1-C6 烷羰胺基(如甲羰胺基及乙羰胺基)、C1-C6 烷氧胺基(如甲氧胺基及乙氧胺基)、

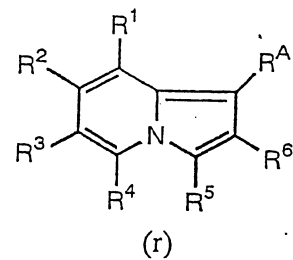
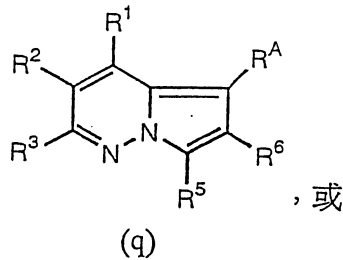
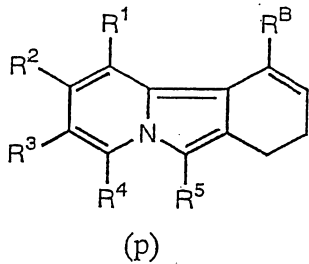
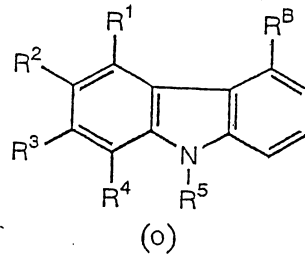
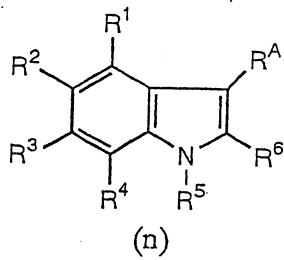
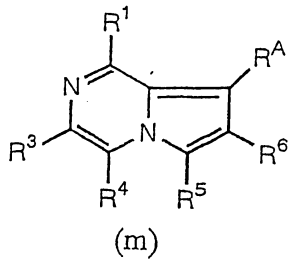
五、發明說明 (16)

C1-C6 烷氧胺羰基 (如甲氧胺羰基及乙氧胺羰基)、單或二 C1-C6 烷胺基 (如甲胺基、乙胺基、二甲胺基、及乙基甲胺基)、C1-C10 烷硫基、C1-C6 烷硫羰基 (如甲硫羰基及乙硫羰基)、C1-C6 烷亞磺醯基 (如甲基亞磺醯基及乙基亞磺醯基)、C2-C6 鹵烷氧基 (如 2-氯乙氧基及 2-溴乙氧基)、C1-C6 鹵烷磺醯基 (如氯甲磺醯基及溴甲磺醯基)、C1-C10 鹵烷基、C1-C6 羥烷基 (如羥甲基及羥乙基)、C1-C6 烷氧羰基 (如甲氧羰基及乙氧羰基)、 $-(CH_2)_{1-8}-O-(C1-C6 \text{ 烷基})$ 、苄氧基、芳氧基 (如苯氧基)、芳硫基 (如苯硫基)、 $-(CONHSO_2R^{20})$ (R^{20} 為 C1-C6 烷基或芳基)、 $-CHO$ 、胺基、甲月米基、鹵素、胺甲醯基、羧基、烷氧甲醯基、 $-(CH_2)_{1-8}-COOH$ (如羧甲基、羧乙基、及羧丙基)、氰基、氰胍基、胍基、胍基、脛基、脛胺基、硝基、磷基、 $-SO_3H$ 、硫縮醛基、硫羰基、C1-C6 羰基、碳環基、雜環基等。此等亦可以選自 C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、C2-C6 鹵烷氧基、C1-C6 鹵烷基及鹵素中 1 或 2 種以上之取代基取代。

R^3 、 R^4 、及 R^5 之「經非妨礙性取代基取代」之「非妨礙性取代基」較佳為鹵素、C1-C6 烷基、C1-C6 烷氧基、C1-C6 烷硫基、C1-C6 鹵烷基。更佳為鹵素、C1-C3 烷基、C1-C3 烷氧基、C1-C3 烷硫基、C1-C3 鹵烷基。

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、及 R^7 之「非妨礙性取代基」較佳為 C1-C6 烷基、芳烷基、C1-C6 烷氧基、C1-C6 烷硫基、C1-C6 羥烷基、C2-C6 鹵烷氧基、鹵素、羧基、C1-C6 烷氧羰

五、發明說明 (21)



特別以 (m)~(p) 所表之組合為佳。

更者，以構造式 (1)~(19) 所式之化合物為特佳。

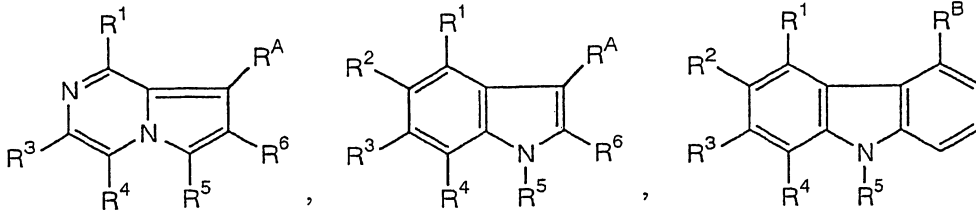
為實施發明之最佳形態

本發明為經 X 型 sPLA₂ 抑制劑預防或治療癌症者。X 型 sPLA₂ 抑制劑亦可使用公知之 X 型 sPLA₂ 抑制劑。如 EP-620214(特開平 7-010838、US-5578634)、EP-620215(特開平 7-025850、US-5684034)、EP-675110(特開平 7-285933、US-5654326)、W096/03120(特開平 10-505336)、W096/03376(特開平 10-503208、US-5641800)、W096/03383(特開平 10-505584)、W097/21664(EP-779271)、W097/21716(EP-779273)、W098/18464(EP839806)、W098/24437(EP846687)、W098/24756、W098/24794、W098/25609、W099/51605、W099/59999 等記載之化合物、對溴苯醯溴化物、麥克柏林(mepacrine)、美諾阿賴德(manoallayde)、塞諾辛 A1(Therosin A1)等之 X 型 sPLA₂ 抑

五、發明說明 (22)

制劑中，亦可使用具有 X 型 sPLA₂ 抑制作用之化合物等。

X 型 sPLA₂ 抑制劑為如 PCT/JP00/07024 中記載式：



(式中，R¹、R²、R³、及 R⁴ 各自獨立為氫、非妨礙性取代基等，R⁵ 為碳環基、雜環基等，R⁶ 為氫、C1-C3 烷基等，R^A 為 -COCONH₂ 等，R^B 為 -CONH₂ 等)所示之化合物，亦可使用此等。

又由以下之順序確認為 X 型 sPLA₂ 抑制劑者，亦可使用於本發明。

首先，作成人 X 型 sPLA₂ 表現細胞。即，將編碼人 X 型 sPLA₂ 之 cDNA 序列 (Cupillard 等，J. Biol. Chem, 1997, 272, 15745-15752) 插入動物細胞用表現載體。將所得之表現載體轉移感染宿主細胞，獲得穩定表現之人 X 型 sPLA₂ 細胞。

其次，抑制活性之檢定，將上述表現細胞培養於培養基中，以酵素活性測定該培養上清液。且為了確認及評估 X 型 sPLA₂ 抑制劑，使用以下之發色分析 (chromogenic assay)。此分析之一般說明記載於 Laure J. Reynolds, Lori L. Hughes 及 Edward A. Dennis 所寫之「Analysis of Human Synovial Fluid Phospholipase A₂ on Short Chain Phosphatidylcholine-

五、發明說明 (25)

，以成人靜脈注射投予時，通常為 0.01~10mg/kg/hr。較佳為 0.1~1 mg/kg/hr。

實施例

實施例 1 人 X 型 sPLA₂ 表現細胞之製作及其培養上清液之調製

將編碼人 X 型 sPLA₂ 之 cDNA 序列 (Cupillard 等, J. Biol. Chem, 1997, 272, 15745-15752) 以順方向插入動物細胞用表現載體 pSVL SV40 後啓動基因表現載體 (pSVL SV40 Late Promoter Expression Vector) (Amersham Pharmacia Biotech 公司) 之啓動基因下流。將所得之表現載體以 LipofectAMINE 試藥 (Gibco BRL 公司) 依說明書轉移感染至宿主細胞 CHO 中，獲得穩定表現人 X 型 sPLA₂ 之 CHO 細胞。將表現細胞於含有 10% 胎牛血清之 α -MEM 培養基中培養 3 日，以酵素活性測定該培養上清液。

實施例 2 抑制活性之檢定

使用以下發色分析鑑定及評估 X 型 sPLA₂ 抑制劑。此分析適用於以 96 位微滴定盤之高容量篩選。此分析之一般說明記載於 Laure J. Reynolds, Lori L. Hughes 及 Edward A. Dennis 所寫之「Analysis of Human Synovial Fluid Phospholipase A₂ on Short Chain Phosphatidylcholine-Mixed Micelles: Development of a Spectrophotometric Assay Suitable for a Microtiterplate Reader」(Analytical Biochemistry, 204, pp 190-197, 1992)。

五、發明說明 (30)

二胺基聯苯胺檢測。X 型 sPLA₂ 訊號之中和實驗為在添加抗體於玻片上前，與純化之 X 型 sPLA₂ 蛋白質 (60 μg/mL) 反應 2 小時而進行之。

其結果為，X 型 sPLA₂ 陽性訊號於正常肝臟組織中之肝小葉及庫弗氏細胞 (Kupffer cells) 檢測出低量，但在來自肝癌患者之肝臟組織的癌細胞中被強烈檢測出。此等之訊號由 X 型 sPLA₂ 蛋白質的添加而消失，確認為對 X 型 sPLA₂ 專一性。又此等陽性訊號不被認為是來自非免疫兔調製之 IgG。由以上之結果暗示肝癌中 X 型 sPLA₂ 蛋白質明顯地高度表現。

實施例 6 使用抗 X 型 sPLA₂ 抗體之人胃組織之免疫組織化學分析

本試驗中使用 The Journal of Biological Chemistry Vol. 274, No. 48, pp. 34203-34211 1999 記載之抗 X 型 sPLA₂ 抗體。健康成人胃組織與來自胃癌患者之胃組織標本買自 Biochain Inc. (San Leandro, CA)。組織切片之玻片標本去除石蠟，於含有 0.3% H₂O₂ 之甲醇中反應 30 分鐘，去除內因性過氧化酶之活性後，以 5% 正常羊血清處理 20 分鐘。其後，在 4°C 含有 0.1% 牛血清蛋白之 PBS 中與抗 X 型 sPLA₂ 抗體 (6 μg/mL) 反應 14 小時。以 PBS 洗淨後，與接有生物素之羊抗兔 IgG 抗體反應 30 分鐘，以過氧化氫酶標識之抗生物素蛋白-生物素複合體試藥 (Vector Laboratories) 處理。洗淨後，經由於含有 200 μg/mL 之

五、發明說明 (41)

有溶解於 DMSO 之受驗化合物 (最終濃度 $10 \mu\text{M}$; 溶解於 DMSO) 之含 0.1% BSA 之 Hanks 緩衝生理食鹽水, 37°C 保溫 10 分鐘後, 添加 100nM 純化之人 X 型 sPLA₂ 酵素, 再於 37°C 保溫 3 小時。其後, 回收培養上清液, 離心去除浮游細胞後, 將上清液之 PGE₂ 量以市售酵素免疫測定套件 (Cayman Chemicals Co.) 定量。數據為除以未添加 X 型 sPLA₂ 時之值後, 以添加 X 型酵素所產生之 PGE₂ 量為 100%, 對此之各受驗化合物存在下的產生量以 % 表示。如表 2 所示, 各受驗化合物為刻意抑制經 X 型 sPLA₂ 所導致之 PGE₂ 產生反應。

PGE₂ 與癌的發生具密切關係記載於 Cancer Research 59, 5093-5096, 1999。本發明化合物由刻意抑制經 X 型 sPLA₂ 所導致之 PGE₂ 產生反應, 可使用為抗癌劑。

表 2

化合物 ($10 \mu\text{M}$)	十八烯酸游離	PGE ₂ 產生
無處理群	100±2.8	100±22.7
(1)	-3.0±3.9**	-4.1±12.6**
(19)	1.8±4.6**	42.1±9.7**

Student's t-test (*P < 0.05, **P < 0.01)

製劑例

以下所示製劑例 1~8 為未超過例示, 不意圖限定發明範圍。「活性成分」一語為具 X 型 sPLA₂ 抑制作用之化合物、其前藥、或彼等之製藥上容許鹽、或彼等之水合物。

92年8月1日 修正
補充

四、中文發明摘要（發明之名稱： 作為癌症治療劑之 X 型 sPLA₂ 抑制劑 ）

發現 X 型 sPLA₂ 抑制劑為有效預防或治療癌症者。

英文發明摘要（發明之名稱： X-type sPLA₂ inhibitor as a cancer
therapeutical agent ）

X-type sPLA₂ inhibitor useful in preventing or curing cancers
is discovered.

六、申請專利範圍

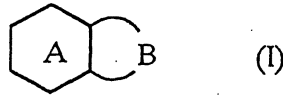
第 90115543 號「作為癌症治療劑之 X 型 sPLA₂ 抑制劑」

專利案

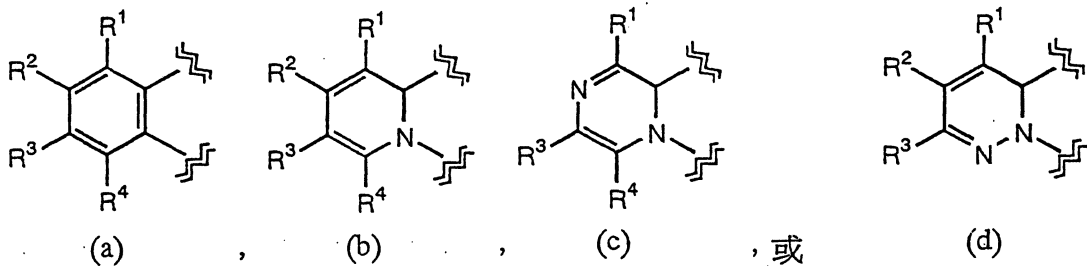
(92 年 8 月 21 日修正)

六申請專利範圍：

1. 一種用於癌症治療之醫藥組成物，其含有一般式 (I) 所示化合物、其酯類前藥、或彼等之製藥上容許鹽、或彼等之溶劑合物作為有效成分，



(式中，A 環為以下 (a)~(d) 所表之環：

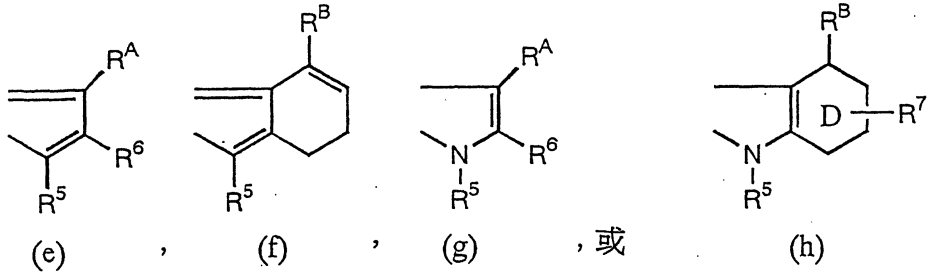


(式中 R¹ 為 - (L³) - R¹¹ (式中 L³ 為 -OCH₂- , R¹¹ 為 -COOH 或 -CONHSO₂C₆H₅) ;

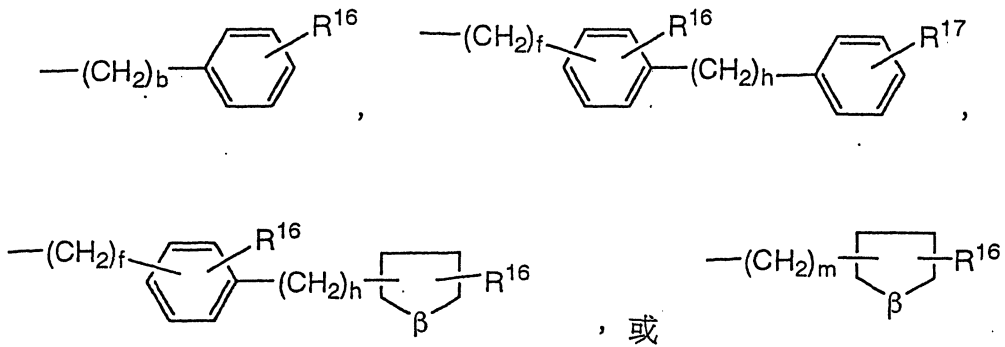
R² 為氫；R³ 為氫、C₁-C₆ 烷基、C₃-C₆ 環烷基、苯基或呋喃基；R⁴ 為氫或鹵素) ；

-B- 為選自以下 (e)~(h) 所表之基：

六、申請專利範圍



(式中， R^5 為 $-(CH_2)_{1-6}-R^{15}$ ，式中 R^{15} 為下式所示之基：

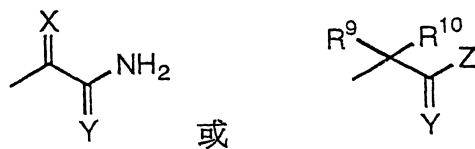


(式中 b 、 f 、 h 、 m 各自獨立為 0 至 2 之整數， R^{16} 為氫、鹵素、或苯氧基， R^{17} 為氫， β 為 $-CH_2-$ 或 $-(CH_2)_2-$)

R^6 為 C_1-C_3 烷基；

R^7 為氫；

R^A 為式：



(式中， R^9 及 R^{10} 各自獨立為氫；

六、申請專利範圍

X 及 Y 各自獨立為氧；

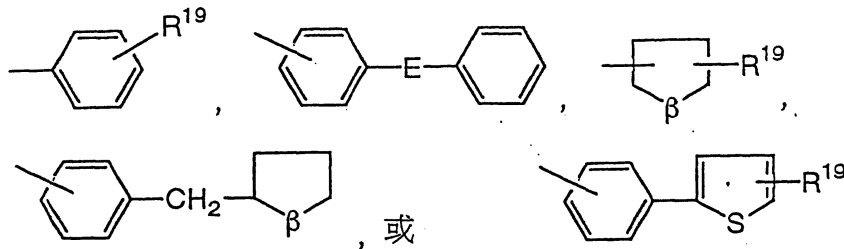
Z 為 $-NH_2$) 所表之基；

R^B 為 $-CONH_2$ ；

D 環為環己烯環)；

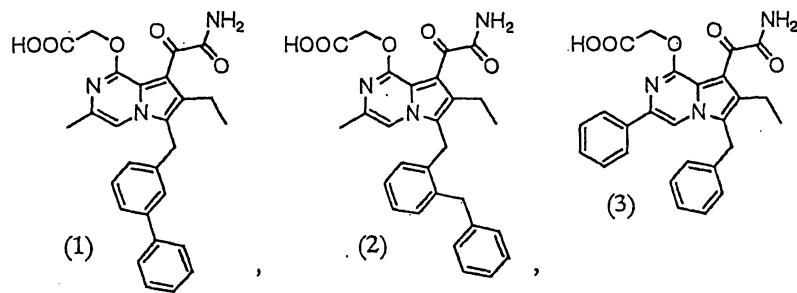
但 -B- 為 (e) 或 (f) 時，A 環為 (b)、(c) 或 (d)。

2. 如申請專利範圍第 1 項之用於癌症治療之醫藥組成物，其中 R^5 為 $-CH_2-R^{18}$ (R^{18} 為式：

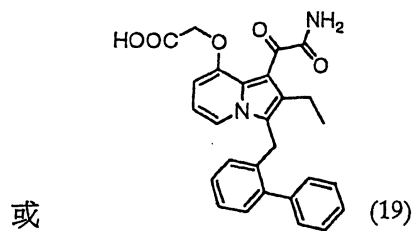
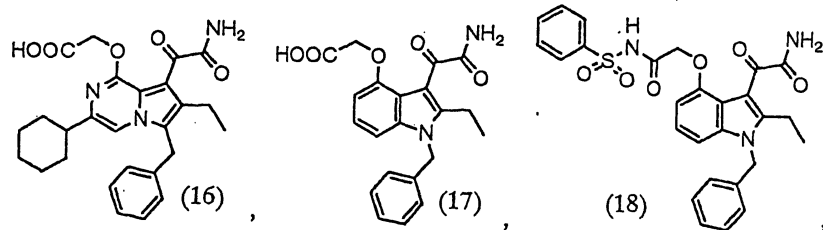
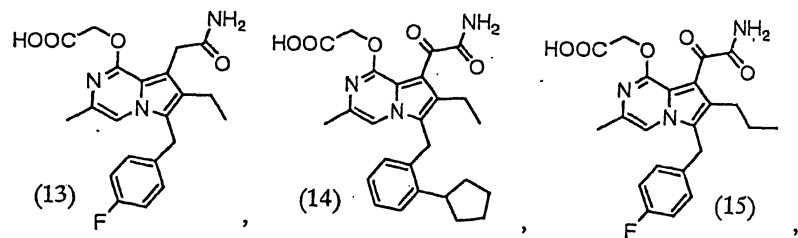
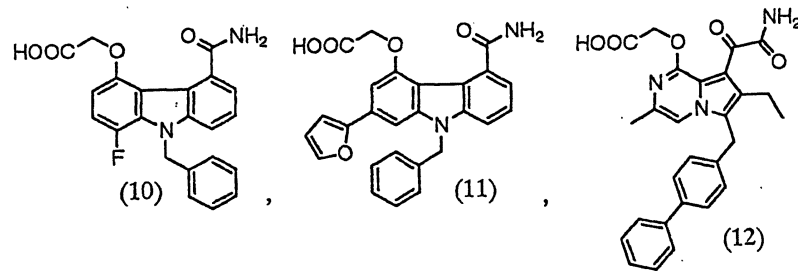
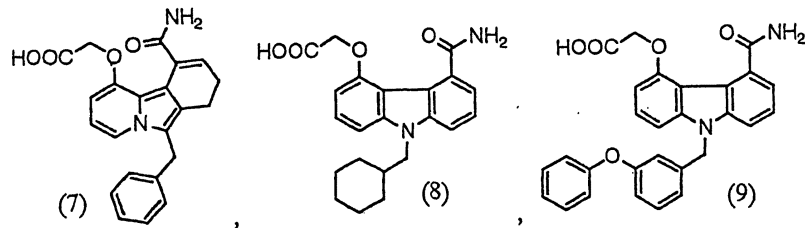
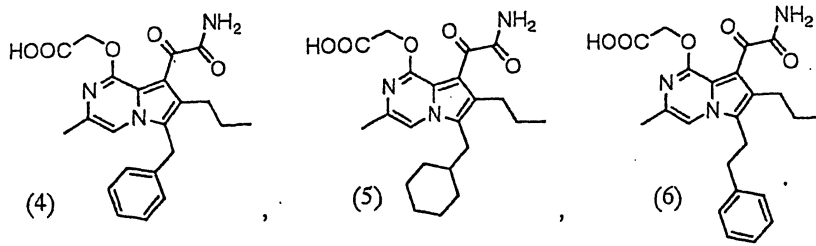


(式中， β 為 $-CH_2-$ 或 $-(CH_2)_2-$ ； R^{19} 為氫或鹵素；E 為單鍵、 $-CH_2-$ 或 $-O-$) 所表之基。

3. 如申請專利範圍第 1 項之用於癌症治療之醫藥組成物，其中 R^1 為 $-OCH_2COOH$ 。
4. 如申請專利範圍第 1 項之用於癌症治療之醫藥組成物，其含有下式：



六、申請專利範圍



六、申請專利範圍

所示之化合物、其酯類前藥、或彼等之製藥上容許鹽、或彼等之溶劑合物為有效成分。

5. 如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之用於癌症治療之醫藥組成物，其中癌症為大腸癌、肺癌、肝癌、胃癌、腎臟癌、膽囊癌、前列腺癌、胰臟癌、睪丸癌、卵巢癌、或皮膚癌。
6. 如申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之用於癌症治療之醫藥組成物，其中癌症為大腸癌。