

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580016842.5

[51] Int. Cl.

A61K 31/70 (2006.01)

C07H 19/02 (2006.01)

[43] 公开日 2007年6月20日

[11] 公开号 CN 1984663A

[22] 申请日 2005.3.29

[21] 申请号 200580016842.5

[30] 优先权

[32] 2004.3.29 [33] US [31] 60/557,599

[86] 国际申请 PCT/US2005/010422 2005.3.29

[87] 国际公布 WO2005/094322 英 2005.10.13

[85] 进入国家阶段日期 2006.11.24

[71] 申请人 南佛罗里达大学

地址 美国佛罗里达州

[72] 发明人 J·Q·程 S·M·塞卜蒂

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 刘金辉

权利要求书 11 页 说明书 79 页 附图 16 页

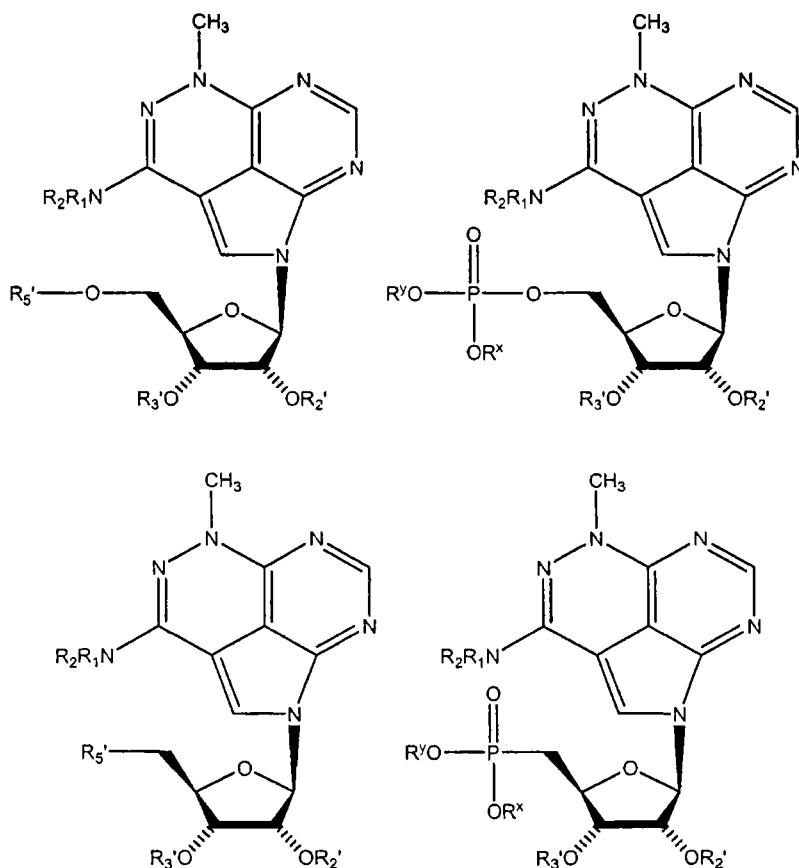
[54] 发明名称

用曲西瑞宾和相关化合物有效治疗肿瘤和癌症

[57] 摘要

与现有技术和经验相反，本发明人已经确定怎样通过如下操作的一种或它们的组合成功地使用曲西瑞宾治疗肿瘤和癌症：(i) 对根据下述的诊断试验，显示出对曲西瑞宾敏感的患者仅施用曲西瑞宾；(ii) 使用所描述的剂量水平，其将该药物的毒性减到最小并且仍然显示出功效；或者(iii) 使用所描述的给药方案，其将药物的毒性减到最小。

1. 治疗哺乳动物中肿瘤或者癌的方法，其包括：(i)从肿瘤或者癌得到生物样品；(ii)确定该肿瘤或者癌是否过表达 Akt 激酶；(iii)如果该肿瘤或者癌过表达 Akt 激酶，那么用有效量的下式化合物治疗所述肿瘤或癌：



其中每个  $R_2'$ 、 $R_3'$  和  $R_5'$  独立地为氢，任选取代的磷酸酯或者磷酯(包括单-、二-或者三磷酸酯或者稳定化的磷酸酯前体药物)；酰基(包括低级酰基)；烷基(包括低级烷基)；酰胺，包括烷基或者芳基烷基的磺酸酯；磺酰基，包括甲磺酰基，和苄基，其中苄基任选用如本文给出的芳基的定义中描述的一个或多个取代基取代；任选取代的芳基磺酰基；脂类，包括磷脂；氨基酸；糖类；肽；或者胆固醇；或者其他药学上可接受的离去基团，其在体内提供了一种化合物，其中  $R_2'$ 、 $R_3'$  或者  $R_5'$  独立地为 H 或者单-、二-或者三磷酸酯；

其中  $R^x$  和  $R^y$  独立地为氢、任选取代的磷酸酯；酰基(包括低级酰基)；酰胺，烷基(包括低级烷基)；芳族，聚氧化烯，如聚乙二醇，任选取代的

芳基磺酰基；脂类，包括磷脂；氨基酸、糖类；肽；或者胆固醇；或者其他药学上可接受的离去基团。在一个实施方案中，该化合物作为 5'-磷酸醚脂类或者 5'-醚脂类施用。

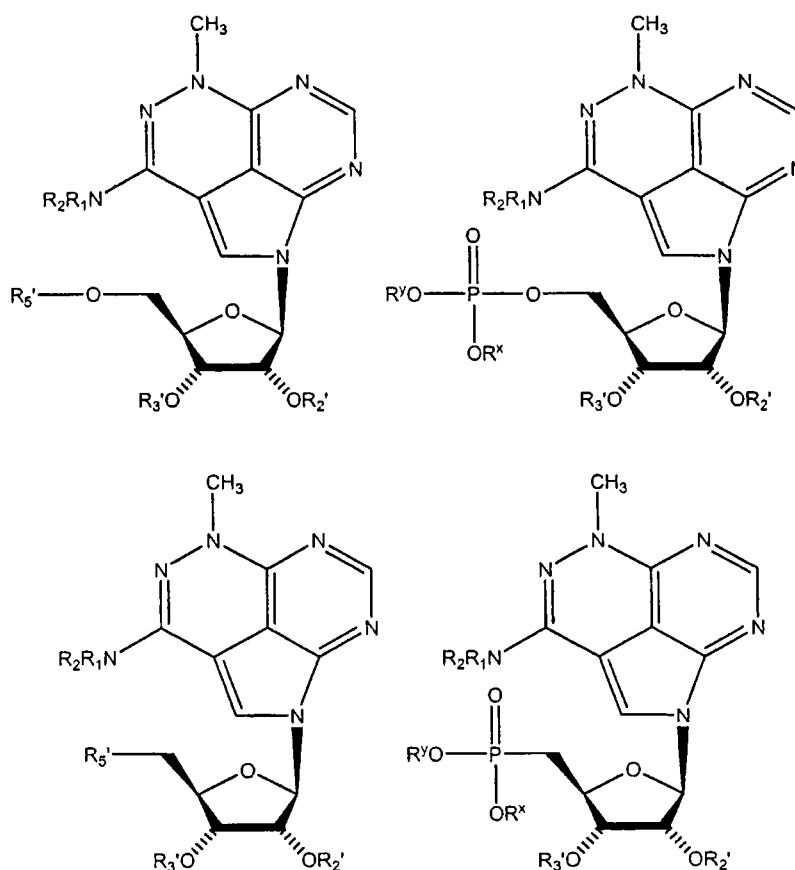
$R_1$  和  $R_2$  各自独立地为 H，任选取代的直链、支链或者环状烷基(包括低级烷基)、烯基或者炔基、CO-烷基、CO-烯基、CO-炔基、CO-芳基或者杂芳基、CO-烷氧基烷基、CO-芳氧基烷基、CO-取代的芳基、磺酰基、烷基磺酰基、芳基磺酰基、芳烷基磺酰基。

2. 权利要求 1 的方法，其中受试者已经被诊断为患有选自乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌和结肠直肠癌的癌症。

3. 权利要求 1 的方法，其中通过测定癌中磷酸化的 Akt 激酶的存在测定 Akt 激酶表达水平。

4. 权利要求 1 的方法，其中通过用抗体测定癌中磷酸化的 Akt 激酶的存在测定 Akt 激酶表达水平。

5. 治疗哺乳动物中肿瘤或者癌的方法，其包括对该哺乳动物施用有效量的下式化合物



其中每个  $R_2'$ 、 $R_3'$  和  $R_5'$  独立地为氢, 任选取代的磷酸酯或者磷酯(包括单-、二-或者三磷酸酯或者稳定化的磷酸酯前体药物); 酰基(包括低级酰基); 烷基(包括低级烷基); 酰胺, 包括烷基或者芳基烷基的磺酸酯; 磺酰基, 包括甲磺酰基, 和苄基, 其中苄基任选用如本文给出的芳基的定义中描述的一个或多个取代基取代; 任选取代的芳基磺酰基; 脂类, 包括磷脂; 氨基酸; 糖类; 肽; 或者胆固醇; 或者其他药学上可接受的离去基团, 其在体内提供了一种化合物, 其中  $R_2'$ 、 $R_3'$  或者  $R_5'$  独立地为 H 或者单-、二-或者三磷酸酯;

其中  $R^x$  和  $R^y$  独立地为氢、任选取代的磷酸酯; 酰基(包括低级酰基); 酰胺, 烷基(包括低级烷基); 芳族, 聚氧化烯, 如聚乙二醇, 任选取代的芳基磺酰基; 脂类, 包括磷脂; 氨基酸、糖类; 肽; 或者胆固醇; 或者其他药学上可接受的离去基团。在一个实施方案中, 该化合物作为 5'-磷酸醚脂类或者 5'-醚脂类施用。

$R_1$  和  $R_2$  各自独立地为 H, 任选取代的直链、支链或者环状烷基(包括低级烷基)、烯基或者炔基、CO-烷基、CO-烯基、CO-炔基、CO-芳基或者杂芳基、CO-烷氧基烷基、CO-芳氧基烷基、CO-取代的芳基、磺酰基、烷基磺酰基、芳基磺酰基、芳烷基磺酰基;

其中该化合物每周施用一次, 持续 3 周, 接着一周不施用所述化合物。

6. 权利要求 5 的方法, 其中给药方案重复至少两次。

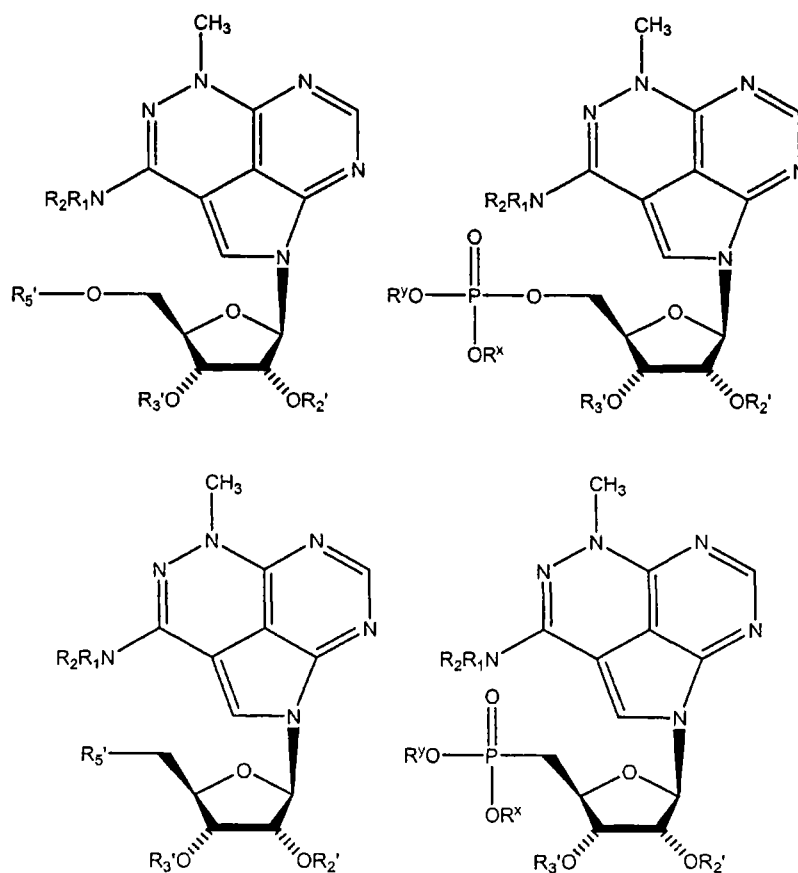
7. 权利要求 5 的方法, 其中给药方案重复至少 4 次。

8. 权利要求 5 的方法, 其中肿瘤选自乳腺、胰腺、卵巢和结肠直肠的肿瘤。

9. 权利要求 5 的方法, 其中施用至少  $10 \text{ mg/m}^2$  的所述化合物。

10. 权利要求 5 的方法, 其中施用  $10 \text{ mg/m}^2$  或者更少的所述化合物。

11. 治疗哺乳动物中肿瘤的方法, 其包括对该哺乳动物施用  $10 \text{ mg/m}^2$  或者更少的下式化合物:



其中每个  $R_2'$ 、 $R_3'$  和  $R_5'$  独立地为氢, 任选取代的磷酸酯或者磷酯(包括单-、二-或者三磷酸酯或者稳定化的磷酸酯前体药物); 酰基(包括低级酰基); 烷基(包括低级烷基); 酰胺, 包括烷基或者芳基烷基的磺酸酯; 磺酰基, 包括甲磺酰基, 和苄基, 其中苄基任选用如本文给出的芳基的定义中描述的一个或多个取代基取代; 任选取代的芳基磺酰基; 脂类, 包括磷脂; 氨基酸; 糖类; 肽; 或者胆固醇; 或者其他药学上可接受的离去基团, 其在体内提供了一种化合物, 其中  $R_2'$ 、 $R_3'$  或者  $R_5'$  独立地为 H 或者单-、二-或者三磷酸酯;

其中  $R^x$  和  $R^y$  独立地为氢、任选取代的磷酸酯; 酰基(包括低级酰基); 酰胺, 烷基(包括低级烷基); 芳族, 聚氧化烯, 如聚乙二醇, 任选取代的芳基磺酰基; 脂类, 包括磷脂; 氨基酸、糖类; 肽; 或者胆固醇; 或者其他药学上可接受的离去基团。在一个实施方案中, 该化合物作为 5'-磷酸酯脂类或者 5'-醚脂类施用。

$R_1$  和  $R_2$  各自独立地为 H, 任选取代的直链、支链或者环状烷基(包括低级烷基)、烯基或者炔基、CO-烷基、CO-烯基、CO-炔基、CO-芳基或

者杂芳基、CO-烷氧基烷基、CO-芳氧基烷基、CO-取代的芳基、磺酰基、烷基磺酰基、芳基磺酰基、芳烷基磺酰基；

其中该化合物每周施用一次。

12. 权利要求 11 的方法，其中给药方案重复至少 2 周。

13. 权利要求 11 的方法，其中给药方案重复 3 周，并且其中三周期间接着是不施用药物的一周期间。

14. 权利要求 13 的方法，其中给药方案代表给药循环。

15. 权利要求 14 的方法，其中给药循环重复至少 2 次。

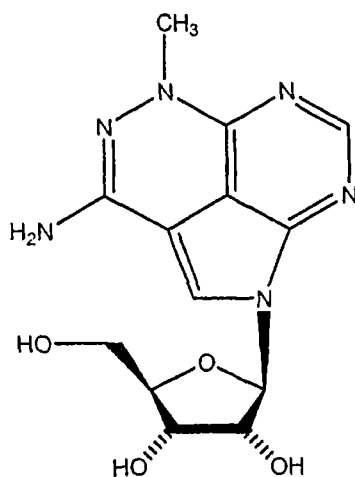
16. 权利要求 14 的方法，其中重复给药循环直到实现癌症的消退。

17. 权利要求 1、5 或者 11 的方法，其中静脉内施用所述药物。

18. 权利要求 1、5 或者 11 的方法，其中受试者已经诊断为癌、肉瘤、淋巴瘤、白血病或者骨髓瘤。

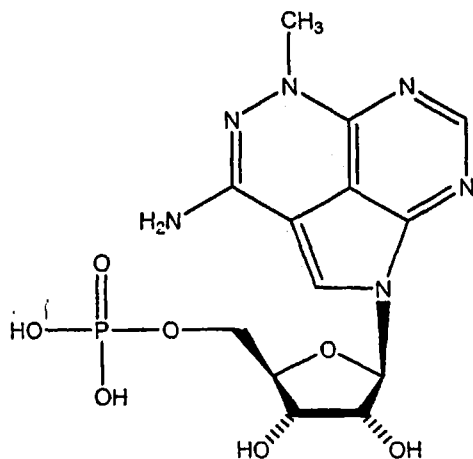
19. 权利要求 1、5 或者 11 的方法，其中哺乳动物是人。

20. 权利要求 1、5 或者 11 的方法，其中所述化合物是式 IB 的化合物：



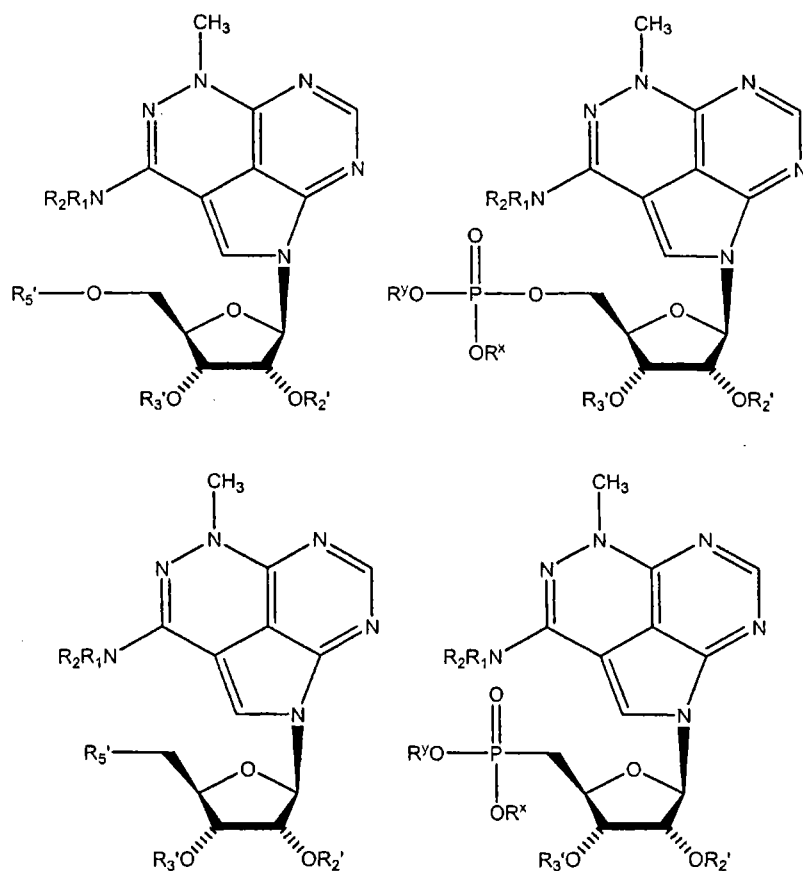
IB.

21. 权利要求 1、5 或者 11 的方法，其中所述化合物是式 IIA 的化合物：



IIA.

22. 下式化合物治疗肿瘤或者癌的用途, 该用途还包括(i)从肿瘤或者癌得到生物样品; (ii)确定该肿瘤或者癌是否过表达 Akt 激酶; (iii)如果该肿瘤或者癌过表达 Akt 激酶, 那么用有效量的下式化合物治疗所述肿瘤或癌:



其中每个  $R_2'$ 、 $R_3'$  和  $R_5'$  独立地为氢, 任选取代的磷酸酯或者磷酯(包括单-、二-或者三磷酸酯或者稳定化的磷酸酯前体药物); 酰基(包括低级酰

基); 烷基(包括低级烷基); 酰胺, 包括烷基或者芳基烷基的磺酸酯; 磺酰基, 包括甲磺酰基, 和苄基, 其中苯基任选用如本文给出的芳基的定义中描述的一个或多个取代基取代; 任选取代的芳基磺酰基; 脂类, 包括磷脂; 氨基酸; 糖类; 肽; 或者胆固醇; 或者其他药学上可接受的离去基团, 其在体内提供了一种化合物, 其中  $R_2'$ 、 $R_3'$  或者  $R_5'$  独立地为 H 或者单-、二-或者三磷酸酯;

其中  $R^x$  和  $R^y$  独立地为氢、任选取代的磷酸酯; 酰基(包括低级酰基); 酰胺, 烷基(包括低级烷基); 芳族, 聚氧化烯, 如聚乙二醇, 任选取代的芳基磺酰基; 脂类, 包括磷脂; 氨基酸、糖类; 肽; 或者胆固醇; 或者其他药学上可接受的离去基团。在一个实施方案中, 该化合物作为 5'-磷酸醚脂类或者 5'-醚脂类施用。

$R_1$  和  $R_2$  各自独立地为 H, 任选取代的直链、支链或者环状烷基(包括低级烷基)、烯基或者炔基、CO-烷基、CO-烯基、CO-炔基、CO-芳基或者杂芳基、CO-烷氧基烷基、CO-芳氧基烷基、CO-取代的芳基、磺酰基、烷基磺酰基、芳基磺酰基、芳烷基磺酰基。

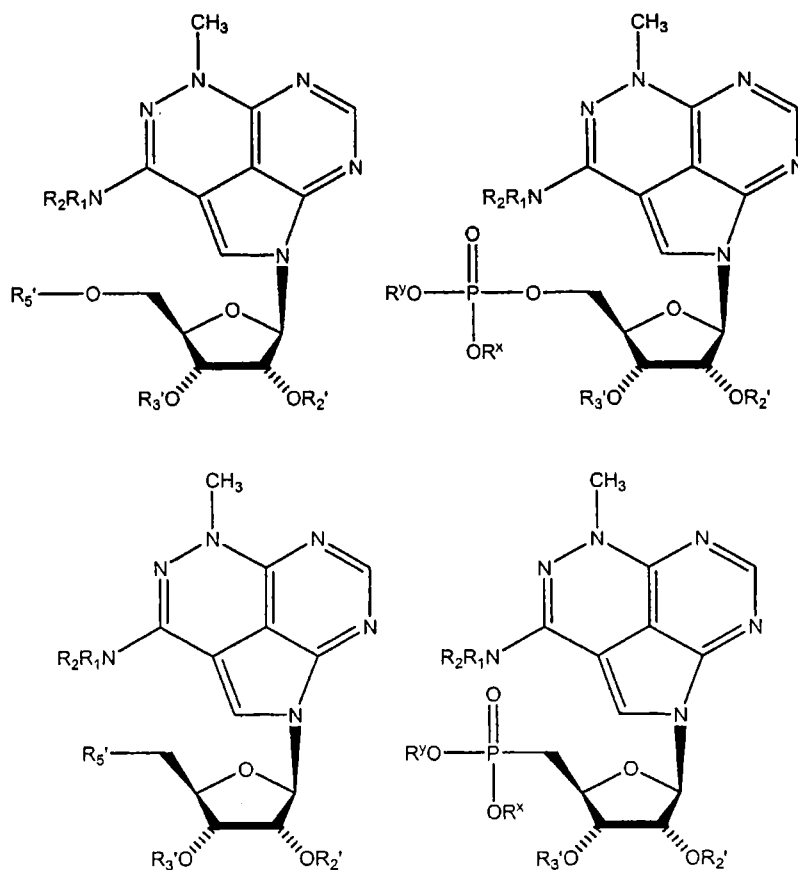
23. 权利要求 22 的用途, 其中受试者已经诊断为选自乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌和结肠直肠癌的癌症。

24. 权利要求 22 的用途, 其中通过测定癌中磷酸化的 Akt 激酶的存在来测定 Akt 激酶表达水平。

25. 权利要求 22 的用途, 其中通过用抗体测定癌中磷酸化的 Akt 激酶的存在来测定 Akt 激酶表达水平。

26. 下式化合物用于治疗肿瘤或者癌的用途:





其中每个  $R_2'$ 、 $R_3'$  和  $R_5'$  独立地为氢, 任选取代的磷酸酯或者磷酯(包括单-、二-或者三磷酸酯或者稳定化的磷酸酯前体药物); 酰基(包括低级酰基); 烷基(包括低级烷基); 酰胺, 包括烷基或者芳基烷基的磺酸酯; 磺酰基, 包括甲磺酰基, 和苄基, 其中苯基任选用如本文给出的芳基的定义中描述的一个或多个取代基取代; 任选取代的芳基磺酰基; 脂类, 包括磷脂; 氨基酸; 糖类; 肽; 或者胆固醇; 或者其他药学上可接受的离去基团, 其在体内提供了一种化合物, 其中  $R_2'$ 、 $R_3'$  或者  $R_5'$  独立地为 H 或者单-、二-或者三磷酸酯;

其中  $R^x$  和  $R^y$  独立地为氢、任选取代的磷酸酯; 酰基(包括低级酰基); 酰胺, 烷基(包括低级烷基); 芳族, 聚氧化烯, 如聚乙二醇, 任选取代的芳基磺酰基; 脂类, 包括磷脂; 氨基酸、糖类; 肽; 或者胆固醇; 或者其他药学上可接受的离去基团。在一个实施方案中, 该化合物作为 5'-磷酸醚脂类或者 5'-醚脂类施用。

$R_1$  和  $R_2$  各自独立地为 H, 任选取代的直链、支链或者环状烷基(包括低级烷基)、烯基或者炔基、CO-烷基、CO-烯基、CO-炔基、CO-芳基或

者杂芳基、CO-烷氧基烷基、CO-芳氧基烷基、CO-取代的芳基、磺酰基、烷基磺酰基、芳基磺酰基、芳烷基磺酰基；

其中该化合物每周施用一次，持续三周，接着一周不施用所述化合物。

27. 权利要求 26 的用途，其中给药方案重复至少 2 次。

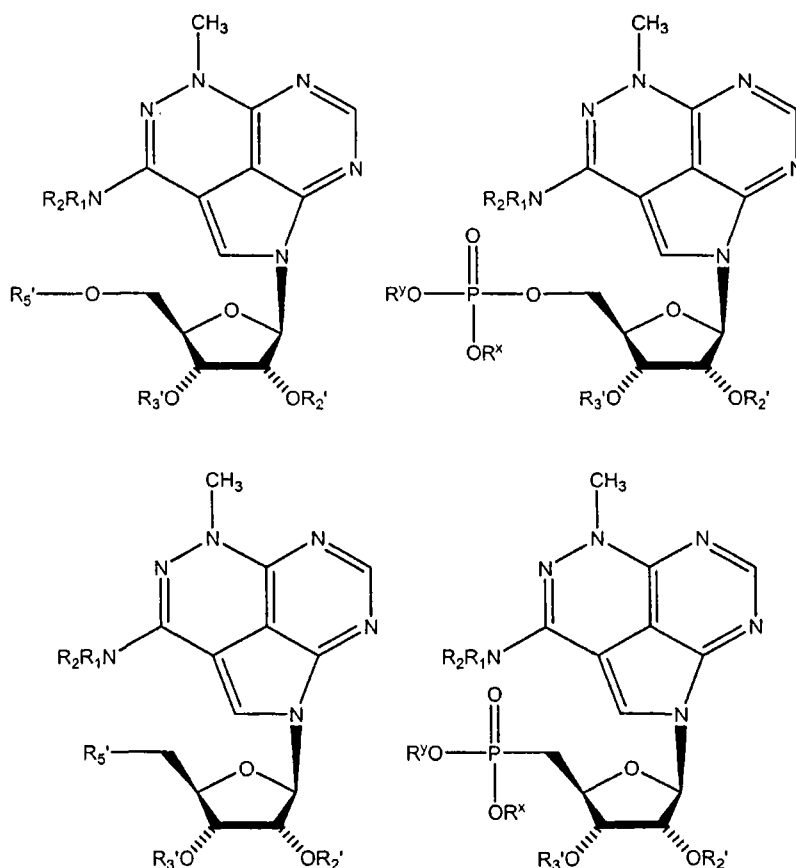
28. 权利要求 26 的用途，其中给药方案重复至少 4 次。

29. 权利要求 26 的用途，其中肿瘤选自乳腺、胰腺、卵巢和结肠直肠的肿瘤。

30. 权利要求 26 的用途，其中施用至少  $10 \text{ mg/m}^2$  的所述化合物。

31. 权利要求 26 的用途，其中施用  $10 \text{ mg/m}^2$  或者更少的所述化合物。

32. 下式化合物以  $10 \text{ mg/m}^2$  或者更少的剂量用于治疗肿瘤或者癌  
的用途：



其中每个  $R_2'$ 、 $R_3'$  和  $R_5'$  独立地为氢，任选取代的磷酸酯或者磷酯(包括单-、二-或者三磷酸酯或者稳定化的磷酸酯前体药物)；酰基(包括低级酰基)；烷基(包括低级烷基)；酰胺，包括烷基或者芳基烷基的磺酰基；磺酰基，包括甲磺酰基，和苄基，其中苄基任选用如本文给出的芳基的定义中

描述的一个或多个取代基取代；任选取代的芳基磺酰基；脂类，包括磷脂；氨基酸；糖类；肽；或者胆固醇；或者其他药学上可接受的离去基团，其在体内提供了一种化合物，其中  $R_2'$ 、 $R_3'$  或者  $R_5'$  独立地为 H 或者单-、二-或者三磷酸酯；

其中  $R^x$  和  $R^y$  独立地为氢、任选取代的磷酸酯；酰基(包括低级酰基)；酰胺，烷基(包括低级烷基)；芳族，聚氧化烯，如聚乙二醇，任选取代的芳基磺酰基；脂类，包括磷脂；氨基酸、糖类；肽；或者胆固醇；或者其他药学上可接受的离去基团。在一个实施方案中，该化合物作为 5'-磷酸醚脂类或者 5'-醚脂类施用。

$R_1$  和  $R_2$  各自独立地为 H，任选取代的直链、支链或者环状烷基(包括低级烷基)、烯基或者炔基、CO-烷基、CO-烯基、CO-炔基、CO-芳基或者杂芳基、CO-烷氧基烷基、CO-芳氧基烷基、CO-取代的芳基、磺酰基、烷基磺酰基、芳基磺酰基、芳烷基磺酰基；

其中该化合物每周施用一次。

33. 权利要求 32 的用途，其中给药方案重复至少 2 周。

34. 权利要求 32 的用途，其中给药方案重复 3 周，并且其中三周期间接着是不施用药物的一周期间。

35. 权利要求 32 的用途，其中给药方案代表给药循环。

36. 权利要求 32 的用途，其中给药循环重复至少 2 次。

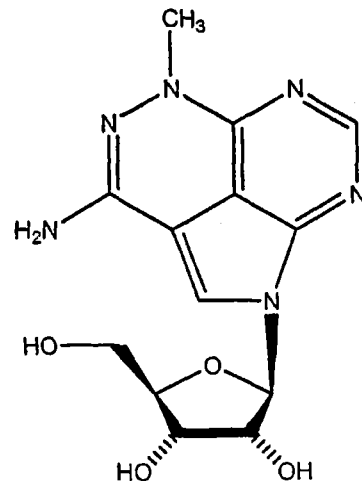
37. 权利要求 36 的用途，其中重复给药循环直到实现癌症的消退。

38. 权利要求 26、32 或者 36 的用途，其中静脉内施用所述药物。

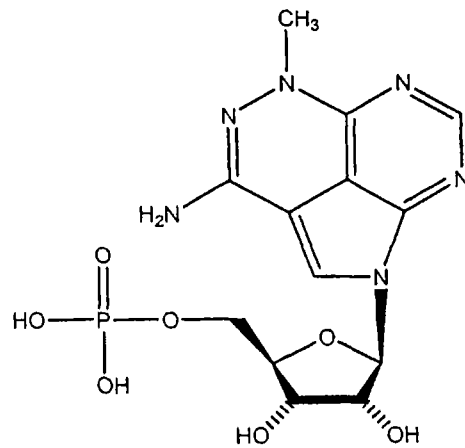
39. 权利要求 26、32 或者 36 的用途，其中受试者已经诊断为癌、肉瘤、淋巴瘤、白血病或者骨髓瘤。

40. 权利要求 26、32 或者 36 的用途，其中所述哺乳动物是人。

41. 权利要求 26、32 或者 36 的用途，其中所述化合物是式 IB 的化合物：

**IB.**

42. 权利要求 26、32 或者 36 的用途，其中所述化合物是式 IIA 的化合物：

**IIA.**

## 用曲西瑞宾和相关化合物有效治疗肿瘤和癌症

### 相关申请的交叉参照

本申请要求 2004 年 3 月 29 日申请的美国临时申请号 60/557,599 的优先权，将该临时申请的公开引入本文作为参考。

### 技术领域

本申请提供了曲西瑞宾和相关化合物和毒性减小的组合物的具体治疗方案，用于治疗肿瘤、癌症和其他与异常细胞增殖有关的疾病。

### 背景

癌是细胞的异常生长。尽管受到空间、其他细胞分享的营养，或者身体发出的中止繁殖的信号的限制，但是癌细胞还是快速繁殖。癌细胞的形状通常与健康细胞不同，不正确地发挥功能，并且可以扩散到身体的许多区域。组织的异常生长，称作肿瘤，是能够不受控制地生长和分裂的细胞簇。肿瘤可以是良性的(非癌性的)或者恶性的(癌性的)。良性肿瘤倾向于缓慢生长并且不扩散。恶性肿瘤可以快速生长、侵入并且破坏附近的正常组织，并且扩散到全身。

根据癌症所起源的体液或者组织的种类或者根据身体中它们首先发生的位置将癌症分类。此外，某些癌症是混合型的。癌症可以分成 5 大类：癌、肉瘤、淋巴瘤、白血病，和骨髓瘤，它们表明癌症的组织分类。癌是在称作上皮组织的身体组织中发现的癌症，上皮组织覆盖或者衬在器官、腺体或者身体结构的表面。例如，胃的被覆层的癌症称作癌。许多癌影响涉及分泌的器官或者腺体，如产生奶的乳腺。癌占有所有癌症病例的约 80 到 90%。肉瘤是从结缔组织，如软骨、脂肪、肌肉、腱和骨生长的恶性

肿瘤。最常见的肉瘤——骨上的肿瘤通常在青年人中发生。肉瘤的实例包括骨肉瘤(骨)和软骨肉瘤(软骨)。淋巴瘤指在淋巴系统(其功能是产生白细胞和清洁体液)的结节或者腺体中起源的癌症,或者在诸如脑和乳腺的器官中起源的癌症。将淋巴瘤分成两类:霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤。白血病也称作血癌,是骨髓的癌症,其阻碍骨髓产生正常的红细胞和白细胞和血小板。需要白细胞来抵抗感染。需要红细胞来防止贫血。血小板避免身体容易擦伤和出血。白血病的实例包括急性髓性白血病、慢性髓性白血病、急性淋巴细胞白血病和慢性淋巴细胞白血病。术语髓性的和淋巴细胞的指出涉及的细胞类型。最后,骨髓瘤在骨髓的浆细胞中生长。在一些情况中,骨髓瘤细胞在一块骨中聚集并形成一肿瘤,称作浆细胞瘤。然而,在其他情况中,骨髓瘤细胞在许多骨中聚集,形成许多骨肿瘤。这称作多发性骨髓瘤。

肿瘤诱导和发展通常是肿瘤细胞基因组中积累的变化的结果。许多变化可以包括细胞生长抑制基因或者肿瘤抑制基因的失活,以及细胞生长促进基因或者癌基因的活化。迄今已经在动物模型中鉴定了数百种活化的细胞癌基因,然而,仅少数这些基因已经证明与人类癌症有关(Weinberg 等人 1989 *Oncogenes and the Molecular Origins of Cancer* Cold Spring Harbor, NY, Stanbridge and Nowell 1990 *Cell* 63 867-874, Godwin 等人 1992 *Oncogenes and antioncogenes in gynecological malignancies*. In WJ Hoskins, CA Perez and RC Young (eds), *Gynecological oncology : principles and practice*, pp 87-116, Lippincott, Philadelphia)。人类癌症中癌基因的活化可以从诸如增加的基因拷贝数或者结构改变引起。这些因子可以导致许多细胞效应,例如,它们可以导致基因产物的过表达。一些涉及人类癌症的癌基因可以通过基因过表达活化。

已经变得显然的是,癌细胞获得的连续的遗传畸变导致控制正常细胞增殖、分化和程序性细胞死亡的调节信号转导的缺陷(Hanahan, D. 和 R. A. Weinberg, *Cell*, 2000.100(1) : p. 57-700)。这又导致细胞生理的根本缺陷,其控制恶性肿瘤。这些缺陷包括: a)生长信号的自给(例如,过量表达生长

因子受体酪氨酸激酶, 如 EGFR 和下游信号转导途径如 Ras/Raf/Mek/Erk<sub>1/2</sub> 和 Ras/PI3K/Akt 的异常活化), b) 对抗生长信号的抗性(例如, TGF $\beta$  和其受体的较低表达), c) 逃避细胞凋亡(例如, 促凋亡的 p53 的丧失; 过表达促存活的 Bcl-2; 存活途径如 PI3K/Akt 介导的存活途径的超活化), d) 持续血管发生(例如, 高水平分泌 VEGF) 和 e) 组织侵入和转移(例如, 细胞外蛋白酶和促转移的整联蛋白)(Hanahan, D. 和 R. A. Weinberg, Cell, 2000. 100(1): p. 57-700)。

受体酪氨酸激酶如 EGFR、ErbB2、VEGFR 和胰岛素样生长因子 I 受体(IGF-1R) 密切涉及许多人类癌症, 包括结肠直肠癌、胰腺癌、乳腺癌和卵巢癌的发育(Khaleghpour, K., 等人 Carcinogenesis, 2004. 25 (2): p.241-8.; Sekharam, M., 等人, Cancer Res, 2003. 63 (22): p. 7708-16)。配体如 EGF、VEGF 和 IGF-1 与它们的受体的结合促进内在的酪氨酸激酶活性的刺激、受体的细胞质结构域中特定酪氨酸的自磷酸化和信号蛋白的募集, 其引发多种复杂的信号转导途径(Olayioye, M. A., 等人, Embo J, 2000. 19 (13): p. 3159-67, Porter, A. C. 和 R. R. Vaillancourt, Oncogene, 1998.17 (11 Reviews): p. 1343-52)。这又导致许多幸存肿瘤和癌基因途径如 Ras/Raf/Mek/Erk<sub>1/2</sub>、JAK/STAT3 和 PI3K/Akt 途径的活化。尽管所有三种途径都涉及结肠、胰腺、乳腺和卵巢的肿瘤生成, 但是已经表明 Akt 介导的途径在恶性转化的许多步骤中是关键性的, 所述步骤包括细胞增殖、抗细胞凋亡/存活、侵入和转移和血管发生(Datta, S. R. 等人 Genes Dev, 1999.13 (22): p. 2905-27)。

Akt 是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(也称作 PK<sub>B</sub>), 其具有 3 个家族成员 Akt1、Akt2 和 Akt3。用生长或者存活因子刺激细胞导致脂类激酶磷酸肌醇-3-OH 激酶(PI3K)的受体的募集, PI3K 将磷酸肌醇-4,5-二磷酸(PIP<sub>2</sub>)磷酸化成 PIP<sub>3</sub>, 其将 Akt 募集到质膜, 在这里它可以在 Thr308 和 Ser473 (Akt1)、Thr308 和 Ser474 (Akt2) 和 Thr308 和 Ser472 (Akt3) 上被磷酸化而活化(Datta, S. R. 等人 Genes Dev, 1999.13 (22): p. 2905-27)。从而, PI3K 通过磷酸化 PIP<sub>2</sub> 并转化成 PIP<sub>3</sub> 而活化 Akt。磷酸酶 PTEN 将 PIP<sub>3</sub> 脱磷酸

成 PIP2 并因此防止 Akt 的活化。

多数人的癌症含有超活化的 Akt(Datta, S. R.等人 Genes Dev, 1999.13 (22): p. 2905-27, Bellacosa, A. ,等人, Int J Cancer, 1995.64 (4): p. 280-5 ; Sun, M. ,等人, Am J Pathol, 2001. 159 (2): p. 431-7)。具体地, Akt 分别在 57%、32%、27%和 36%的人结肠直肠癌、胰腺癌、乳腺癌和卵巢癌中过表达和/或超活化(Roy, H. K. ,等人 Carcinogenesis,2002. 23(1) : p. 201-5, Atomare, D. A. ,等人, J Cell Biochem, 2003. 88(1) : p. 470-6., Sun, M. ,等人, Cancer Res, 2001.61(16) : p. 5985-91., Stal,O.,等人 Breast Cancer Res, 2003.5(2) : p. R37-44, Cheng, J. Q. ,等人, Proc Natl Acad Sci U S A, 1992.89 (19): p. 9267-71, Yuan, Z. Q. ,等人, Oncogene, 2000.19 (19): p. 2324-30)。Akt 的超活化是由于 Akt 自身的扩增和/或过表达以及 Akt 上游的遗传改变,包括受体酪氨酸激酶和/或它们的配体的过表达(Khaleghpour, K. ,等人 Carcinogenesis, 2004. 25 (2): p.241-8. ; Sekharam, M. ,等人, Cancer Res, 2003.63 (22): p. 7708-16, Cohen, B. D. ,等人, Biochem Soc Symp, 1998. 63: p. 199-210., Muller, W. J. ,等人 Biochem Soc Symp, 1998. 63: p. 149-57, Miller, W. E. ,等人 J Virol, 1995.69 (7): p. 4390-8, Slamon, D. J. ,等人, Science, 1987. 235 (4785): p. 177-82, Andrulis, I. L. ,等人, J Clin Oncol, 1998.16 (4): p. 1340-9)和磷酸酶 PTEN 的缺失。通过证明 Akt 的异位表达诱导恶性转化并促进细胞存活(Sun, M. ,等人 Am J Pathol, 2001.159 (2): p. 431-7, Cheng, J. Q., 等人, Oncogene, 1997.14 (23): p. 2793-801)并且 Akt 途径的破坏抑制细胞生长并诱导细胞凋亡(Jetzt, A. ,等人 Cancer Res, 2003.63 (20): p. 6697-706), 已经阐明 Akt 涉及肿瘤生成的概念证明。

当前癌症和相关疾病的治疗只有有限的有效性和许多严重的不希望的副作用。尽管证明了许多抗癌药物的临床功效,但是严重的全身毒性通常使得有希望的化学治疗剂的临床开发停止。此外,受体酪氨酸激酶如 EGFR 和它们的配体如 IGF-1 的过表达、Akt 过表达和/或 PTEN 的丧失(它们所有都导致 Akt 的超活化)与差的预后、对化学疗法的耐受性和癌症患者的存活时间缩短有关。当前的研究策略强调寻找具有较低风险的有效的治疗方



式。

### 曲西瑞宾

最初在20世纪70年代鉴定了曲西瑞宾(TCN, NSC-154202, 3-氨基-1,5-二氢-5-甲基-1-β-呋喃核糖基-1,4,5,6,8-五氮杂茛)和其5'-磷酸酯: 磷酸曲西瑞宾(TCN-P, NSC-280594) (Townsend & Milne (1975) *Ann Acad Sci*, 255: 92-103)。TCP-N 是进入临床试验的化学个体, 因为它比亲本药物更稳定。到80年代早期, TCN-P 已经对白血病和癌显示出临床前活性。到80年代早期, TCN-P 被鉴定为DNA、RNA和蛋白质合成的抑制剂, 其显示出对细胞周期的S期细胞的选择性(Roti-Roti 等人 1978 *Proc Am Assoc Cancer Res and ASCO* 19: 40)。已经提出不像那时的核苷抗肿瘤剂, TCN-P 不在单磷酸酯水平上继续磷酸化并且不掺入多核苷酸中(Bennett 等人 1978 *Biochem Pharmacol* 27: 233-241, Plagemann *JNCI* 1976 57: 1283-95)。已经确立, 在体内, TCN-P 被血浆酶和被细胞外-5'-核苷酸酶脱磷酸化成TCN。在细胞内, TCN 可以被腺苷激酶再磷酸化成TCN-P(Wotring 等人 1981 *Proc Am Assoc Cancer Res* 22:257, Basseches 等人 *J Chromatogr* 1982 233: 227-234)。

在1982年, Mittelman 和同事用患有晚期顽固性恶性肿瘤的20名患者将TCN-P 进行临床试验(Mittelman 等人 1983 *Cancer Treat Rep* 67: 159-162)。将TCN-P 作为静脉内(i.v.)灌注以25到350 mg/m<sup>2</sup>的剂量在15分钟内施用, 每3周1次。该试验中的患者被诊断为乳腺癌、头/颈癌、肺癌、胰腺癌、甲状腺癌、黑素瘤或者未确定的癌症。仅发现有限的治疗反应并且存在显著毒性。Mittelman 的小组断定使用他们的给药方案进行进一步临床试验是不受保证的, 但是催促其他小组检查TCN-P 在某些特定癌症类型中的作用。也在1983年, Lu 等人(ASCO Abstracts, *Clinical Pharmacology*, p 34 C-133)检查了TCN 在患者中的临床药理学, 所述患者通过以30-40mg/m<sup>2</sup> 静脉内连续灌注5天。Lu 等人报导TCN 造成肝脏毒性和贫血并且建议患者应该监视这些毒性。

Cobb 等人(Cancer Treat Reports 1983 67: 173)报导了在 6 天的小鼠肾包膜下移植模型测定中 TCN-P 对人肿瘤的手术外植体的活性。他们检查了 8 种肿瘤类型, 它们代表乳腺、肺、结肠、卵巢和宫颈肿瘤。Cobb 等人报导 TCN 在不同肿瘤中产生从 21% (乳腺) 到 88%(宫颈)的不同的应答率。

Feun 等人在 1984 年(Cancer Research 44 (8) 3608-12)报导了另一个 I 期。Feun 等人施用 10、20、30 和/或 40 mg/m<sup>2</sup>; 通过连续灌注静脉内施用 5 天, 每 3 到 4 周或者 6 周一次。试验中的患者已经被诊断为结肠癌、肉瘤、黑素瘤、肺癌或者“其他”癌症。Feun 等人报导看到显著的毒性, 包括高血糖、肝毒性和血小板减少。作者推荐 II 期试验方案为每天 20 mg/m<sup>2</sup>, 持续 5 天, 共 6 周, 并且还推荐由于毒性, 将密切监视患者的肝脏和胰腺功能, 并且应该排除患有糖尿病、肝功能异常或者大块肝转移的患者。

在 1986 年, Schilcher 等人(Cancer Research 1986 46: 3147-3151)报导了 TCN-P 的 I 期评估, 其使用每周静脉内方案。在患有晚期实体瘤的 24 名患者中通过 42 天循环的第 1、8、15 和 22 天内在 5 分钟内缓慢静脉内注射进行研究, 循环内有两周停止。用在每种水平用所施用的共 106 剂治疗的 3-12 名患者研究 12 到 96 mg/m<sup>2</sup> 的 5 种剂量水平。试验中的患者已经被诊断为结肠癌、直肠癌、膀胱癌、肾上腺癌、卵巢癌、胰腺癌、肉瘤、黑素瘤、肺癌或者“其他”癌症。Schilcher 等人断定:

“该每周方案产生了出乎意料的临床毒性并且应该不再进行。”

“此时我们的小组很气馁而不再用 TCN-P 以每周或者间歇方案进行进一步的研究。如果证明 TCN-P 对治疗抗性原发性胰腺和肝脏肿瘤有明显的体外活性, 那么可以恢复用不同的方案(例如, 单次应用, 每月一次)进行进一步的 I-II 期研究。

在 1986 年, Powis 等人(Cancer Treatment Reports 70: 359-362)报导了在 I 期和 II 期临床试验中 TCN-P 在患者的血液和血浆中的处理。I 期试验使用日剂量 24-55mg/m<sup>2</sup>, 为期 5 天, 而 II 期临床试验使用 250mg/m<sup>2</sup> 的单次剂量。Powis 等人未能鉴定 TCN-P 药物动力学参数和 TCN-P 的毒性之间的相关性。

在 20 世纪 80 年代晚期, TCN-P 进入转移性结肠直肠腺癌、非小细胞肺癌、宫颈的晚期鳞状细胞癌和转移性乳腺癌的 II 期试验。在 1987 年, O'Connell 等人(Cancer Treat Reports 71, No. 3,333-34)公布了转移性结肠直肠腺癌的患者中 II 期临床的结果。患者在 15 分钟内静脉内施用 165 或者 250 mg/m<sup>2</sup> TCN-P, 以三周的间隔, 每周一次。O'Connell 等人断定, 试验表明 TCN-P 在治疗转移性结肠直肠腺癌患者中缺乏临床有用性。此外, 在 1991 年, Lyss 等人(Proc Annu Meet Am Soc Clin Oncol, (1996) 15 A1151)报导了对晚期非小细胞肺癌患者每天施用 35 mg/m<sup>2</sup>, 持续 5 天, 每 6 周一一次的试验的结果。

Feun 等人(Am J Clin Oncol 1993 16: 506-508)报导了在晚期宫颈鳞状细胞癌的患者中 TCN-P 的 II 期试验的结果。每 6 周重复用至少 35 mg/m<sup>2</sup> 连续灌注 5 天。在 21 名可评估的患者中, 仅观察到 2 名应答。Fuen 等人等人断定“使用该剂量和方案, TCN-P 似乎在宫颈的转移性和复发性鳞状细胞癌中有有限的活性”。

1996 年, Hoffman 等人(Cancer Chemother Pharmacol 37: 254-258)报导 TCN-P 用于转移性乳腺癌的 I-II 期研究的结果。在一个研究中, 将 14 名患者每天用 20 mg/m<sup>2</sup> 通过连续灌注 5 天, 每 6 周一次进行治疗。当作者未能看到该剂量下的应答时, 将剂量升高到至少 35 mg/m<sup>2</sup>, 使用相同的 5 天连续灌注方案。Hoffman 等人断定“TCN 在所有测试的剂量下无效并且在大于或者等于 35mg/m<sup>2</sup> 的剂量下具有不可接受的毒性作用。”

从而, 有限的功效和不可接受的毒性组合防止了 TCN-P 和相关化合物的进一步临床开发。

加利福尼亚大学董事会(Regents of the University of California)的 WO 03/079748 公开了某些 ZNF217 抑制剂, 如曲西瑞宾, 与额外的化学治疗剂, 如阿霉素组合。

本发明的一个目的是提供曲西瑞宾和相关化合物和具有减小的毒性的组合物的施用, 用于治疗肿瘤、癌症、和其他与异常细胞增殖有关的疾病。

本发明的另一个目的是提供用曲西瑞宾和相关化合物治疗受试者中肿

瘤或者癌症的改进方法。

### 发明概述

本发明提供了曲西瑞宾、磷酸曲西瑞宾和相关化合物治疗受试者中肿瘤或者癌症而限制全身性毒性的新的治疗方案。本发明基于如下发现：过表达 Akt 激酶的肿瘤或者癌症对于 TCN 和相关化合物的细胞毒性作用尤其敏感。与现有技术和经验相反，发明人已经确定怎样通过如下操作的一种或它们的组合成功地使用曲西瑞宾治疗肿瘤和癌症：(i)对根据下述的诊断试验，显示出对曲西瑞宾敏感的患者仅施用曲西瑞宾；(ii)使用所描述的剂量水平，其将该药物的毒性减到最小并且仍然显示出功效；或者(iii)使用所描述的给药方案，其将该药物的毒性减到最小。

在本发明的一方面，提供了鉴定对 TCN、TCN-P 和/或相关化合物尤其敏感的肿瘤和癌症的方法。在一个实施方案中，提供了用于治疗哺乳动物，尤其人中肿瘤的方法，其包括(i)从肿瘤得到生物样品；(ii)确定该肿瘤是否过表达 Akt 激酶，和(iii)用如本文描述的曲西瑞宾、磷酸曲西瑞宾或者相关化合物治疗过表达 Akt 激酶的肿瘤。在一个实施方案中，通过测定肿瘤或者癌中磷酸化的 Akt 激酶的存在，例如通过使用可以检测磷酸化形式的抗体，可以测定 Akt 激酶表达水平。在另一实施方案中，通过测定从受试者得到的肿瘤或者癌细胞并将其水平与对照组织比较，可以确定 Akt 表达水平。在一些实施方案中，与对照相比，癌样品中 Akt 可以过表达至少 2、2.5、3 或者 5 倍。在一些实施方案中，过表达的 Akt 激酶可以是超活化并且磷酸化的 Akt 激酶。

在本发明的另一方面，提供了给药方案，其限制 TCN 和相关化合物的毒副作用。在一个实施方案中，此类给药方案减小或者消除了毒副作用，包括但不限于，肝脏毒性、血小板减少、高血糖、呕吐、低血钙、贫血、血清蛋白减少 (hypoalbuminemia)、骨髓抑制、高甘油三酯血症、血内淀粉酶过多、腹泻、stomachitis 和/或发热。在另一实施方案中，施用 TCN、TCN-P 或者相关化合物在至少 15、20 或者 25%受试者中提供了至少部分

应答，如至少 15、20 或者 30% 应答，或者完全应答。

在一个实施方案中，提供了治疗已经诊断为具有肿瘤的受试者的方法，该方法包括根据给药方案对受试者施用有效量的 TCN、TCN-P 或者相关化合物，例如，本文描述的化合物，所述给药方案包括大约每周一次施用所述药物，持续约 3 周，然后一周期间内不施用所述药物。在另一实施方案中，提供了治疗受试者中肿瘤或者癌症的方法，该方法包括对该受试者每周一次施用  $10 \text{ mg/m}^2$  或者更少的 TCN、TCN-P 或者相关化合物的给药方案。在一个实施方案中，所述化合物可以作为单次快速浓注剂量在短时间内，例如，约 5、10 或者 15 分钟内施用。在其他实施方案中，提供了给药方案，其中化合物通过连续灌注至少 24、48、72、96 或者 120 小时施用。在一些实施方案中，连续施用可以以每周至少一次，每两周一次和/或每月一次重复。在其他实施方案中，化合物可以以每三周至少一次施用。在其他实施方案中，化合物可以以每天至少一次施用，为期至少 2、3、4 或者 5 天。

在其他实施方案中，本文公开的 TCN、TCN-P 和相关化合物可以以有效导致肿瘤消退的量施用于患者。TCN、TCN-P 或者相关化合物的施用可以在至少 15-20% 受试者中提供至少部分应答，如至少 15、20 或者 30% 或者完全应答。在一些实施方案中，可以对受试者施用至少 2、5、10、15、20、30 或者  $50 \text{ mg/m}^2$  的本文公开的化合物。化合物的施用可以根据本文公开的治疗方案的任一种进行。在特定实施方案中，给药方案可以包括施用小于  $20 \text{ mg/m}^2$  TCN 和相关化合物。在一个实施方案中，可以每周一次施用小于  $10 \text{ mg/m}^2$  TCN 或相关化合物。在其他实施方案中，可以对受试者施用小于  $2 \text{ mg/m}^2$ 、 $5 \text{ mg/m}^2$ 、 $10 \text{ mg/m}^2$ 、和/或  $15 \text{ mg/m}^2$  TCN 或者相关化合物。在另一实施方案中，可以通过连续灌注对受试者施用小于  $10 \text{ mg/m}^2$ ，为期至少 5 天。在特定实施方案中，本文公开的 TCN 或者相关化合物可以用于治疗胰腺癌、前列腺癌、结肠直肠癌和/或卵巢癌。

在一个实施方案中，本发明的化合物和/或治疗方案可以用于预防和/或治疗癌、肉瘤、淋巴瘤、白血病和/或骨髓瘤。在本发明的其他实施方案

中，本文公开的化合物可以用于治疗实体瘤。在其他实施方案中，本文公开的化合物和组合物可以用于治疗肿瘤或者癌症，如，但不限于，下面器官或者组织的癌症：乳腺、前列腺、骨、肺、结肠，包括但不限于：结肠直肠、泌尿的、膀胱、非霍奇金淋巴瘤、黑素瘤、肾、肾脏、胰腺、咽、甲状腺、胃、脑和/或卵巢。在特定实施方案中，本文公开的 TCN 或者相关化合物可以用于治疗胰腺癌、乳腺癌、结肠直肠癌和/或卵巢癌。在本发明的其他实施方案中，本文公开的化合物可以用于治疗血管发生相关的疾病。在一些实施方案中，提供了通过 TCN、TCN-P 或者相关化合物连续灌注至少 24、48、72 或者 96 小时来治疗白血病的方法。在其他实施方案中，连续灌注可以重复，例如，至少每 2 周、3 周或者 4 周 1 次。

在特定实施方案中，提供了治疗宿主中肿瘤、癌症和其他与异常细胞增殖有关的疾病的方法，该方法包括对宿主施用有效量的本文公开的化合物，任选组合药学上可接受的载体。

一方面，所述化合物和组合物可以与至少一种额外化学治疗剂组合或者交替施用。药物可以形成相同组合物的部分，或者可以作为单独的组合物用于在同时或者不同时间施用。在一个实施方案中，本发明的组合物可以与抗血管生成剂组合。在本发明的其他实施方案中，本文公开的化合物和组合物可以与下面类型的药物组合或者交替施用，这些药物包括但不限于：抗增殖药物、抗有丝分裂剂、抗代谢药、烷化剂或者氮芥、靶定拓扑异构酶的药物、靶定肿瘤细胞中信号转导的药物、基因疗法和反义治疗剂、抗体治疗剂、类固醇、类固醇类似物、止吐药和/或非类固醇剂。

在其他实施方案中，本文公开的 TCN、TCN-P 或者相关化合物可以用于治疗耐受一种或多种药物的肿瘤或者癌症，包括本文公开的肿瘤或癌症和药物的实施方案。在一个实施方案中，本文公开的 TCN、TCN-P 或者相关化合物以有效量施用，用于治疗患有药物耐受性肿瘤或者癌症的患者，所述肿瘤或者癌症为例如，多种药物耐受性的肿瘤或者癌症，包括但不限于，耐紫杉醇、雷帕霉素、他莫昔芬、顺铂和/或 gefitinib(iressa)的肿瘤或者癌症。在一个实施方案中，本文公开的 TCN、TCN-P 或者相关化

合物可以与额外化学治疗剂一起施用，所述额外化学治疗剂可以为 P-糖蛋白抑制剂，如维拉帕米、环孢菌素(如环孢菌素 A)、他莫昔芬、钙调蛋白拮抗剂、右维拉帕米(dexverapamil)、右尼古地平(dexniguldipine)、伐司朴达 (PSC S33)、比立考达 (VX-710)、 tariquidar(XR9576)、 zosuquidar(LY335979)、laniquidar(R101933)，和/或 ONT-093。

在一些实施方案中，提供了方法，其包括对需要其的宿主施用有效量的本文公开的化合物，或者包含有效量的该化合物的药物组合物，用于治疗宿主中的肿瘤、癌症和其他与异常细胞增殖有关的疾病。

在一个实施方案中，提供了治疗肿瘤或者癌症的方法，其包括对需要其的个体施用有效量的本文公开的化合物，或者其盐、异构体、前体药物或者酯，其中所述癌症为例如癌、肉瘤、淋巴瘤、白血病或者骨髓瘤。所述化合物、其盐、异构体、前体药物或者酯任选以药学上可接受的组合物提供，该组合物包括合适的载体，如水，配制该组合物用于对需要其的个体以希望的途径施用。任选地，化合物与至少一种额外的治疗剂组合或者交替施用，用于治疗肿瘤或者癌症。

本发明的范围还包括本文公开的化合物、或者其盐、前体药物或者酯任选在药学上可接受的载体中用于治疗肿瘤或癌症的用途，和本文公开的化合物、或者其盐、前体药物或者酯任选在药学上可接受的载体中用于生产治疗癌症或者肿瘤的药物用途。

### 附图简述

图 1 图解了从 NCI 多样性集合(NCI Diversity Set)鉴定 API-2(曲西瑞宾)作为 Akt 抑制剂的候选者。A 图解了 API-2(曲西瑞宾)的化学结构。B 图解了 API-2 抑制 AKT-2 转化的 NIH3T3 细胞中 AKT2 的磷酸化水平。将野生型 AKT2-转化的 NIH3T3 细胞用 API-2(1  $\mu$ M)处理指定的时间并进行免疫印迹分析，该分析使用抗-磷酸-Akt-T308 和-S473 抗体(顶部和底部栏)。底部栏显示了总 AKT2 的表达。在 C 中，显示 API-2 抑制 Akt 的三种同种型。将 HEK293 细胞用 HA-Akt1、-AKT2 和- AKT3 转染并用

API-2 (1  $\mu$ M)或者渥曼青霉素(15  $\mu$ M)处理后进行 EGF 刺激, 将细胞裂解并用抗-HA 抗体免疫沉淀。免疫沉淀物进行体外激酶测定(顶部)并用抗-磷酸-Akt-T308(底部)抗体进行免疫印迹分析。中部栏显示了经转染的 Akt1、Akt2 和 Akt3 的表达。D 图解了 API-2 不在体外抑制 Akt。在含有 1  $\mu$ M API-2 的激酶缓冲液中组成性活性 AKT2 重组蛋白质的体外激酶测定(泳道 3)。

图 2 图解 API-2 不抑制 PI3K、PDK1 和 AGC 激酶家族的密切相关的成员。A 图解了体外 PI3K 激酶测定。将 HEK293 细胞用血清饥饿并用 API-2(1  $\mu$ M)或者渥曼青霉素(15  $\mu$ M)处理 30 分钟后进行 EGF 刺激。将细胞裂解并用抗-p110  $\alpha$  抗体免疫沉淀。免疫沉淀物进行体外激酶测定, 使用 PI-4-P 作为底物。B 图解了 API-2 对体外 PDK1 活化的影响(顶部栏), 实心圆显示了被 API-2 抑制。空心圆显示了被阳性对照星形孢菌素抑制, 星形孢菌素是有效的 PDK1 抑制剂(IC<sub>50</sub>=5 nM)。底部栏是 HEK293 细胞的免疫印迹分析, 所述细胞在 EGF 刺激前用 Myc-PDK1 转染并用渥曼青霉素或者 API-2 处理。C 图解了用 API-2 或者非选择性 PKC 抑制剂 Ro31-8220 处理后, 用抗-磷酸-PKC  $\alpha$ -T638 (顶部)和总的 PKC  $\alpha$ (底部)抗体对 PKC  $\alpha$  的磷酸化水平的免疫印迹分析。D 显示了体外 SGK 激酶测定。将 HEK293 细胞用 HA-SGK 转染并用 API-2 或者渥曼青霉素处理后进行 EGF 刺激。用 HA-SGK 免疫沉淀物进行体外激酶测定, 使用 MBP 作为底物(顶部)。底部栏显示了转染的 HA-SGK 的表达。E 图解了 PKA 激酶测定的结果。将免疫纯化的 PKA 在含有所指出的抑制剂(API-2 或者 PKAI)和底物肯普肽的 ADB 缓冲液(Upstate Biotechnology Inc)中温育。定量激酶活性。在 F 中, 显示了蛋白质印迹。将 OVCAR3 用 API-2 处理指定的时间。使用指出的抗-磷酸-抗体(1-4 栏)和抗肌动蛋白抗体(底部)进行免疫印迹。

图 3 图解了在 Akt 升高的人癌细胞中, API-2 抑制 Akt 活性和细胞生长并且诱导细胞凋亡。A 是用 API-2 处理后的蛋白质印迹, 用抗-磷酸-Akt-T308 抗体检测所指示的人癌细胞系中 Akt 的磷酸化水平。将印迹用抗-总 Akt 抗体再探测(底部栏)。在 B 中, 显示了细胞增殖测定。如图中指



出的细胞系用不同剂量的 API-2 处理 24 小时和 48 小时，然后用 CellTiter 96 Cell Proliferation Assay 试剂盒(Promega)分析。C 提供了细胞凋亡分析。将细胞用 API-2 处理并用膜联蛋白 V 和 PI 染色并通过 FACScan 分析。

图 4 显示小鼠异种移植物中 Akt 升高的癌细胞系中，API-2 抑制 Akt 的下游靶标并且显示出抗肿瘤活性。在 A 中，阐明了 API-2 抑制马铃薯球蛋白(tuberin)、Bad、AFX 和 GSK-3 $\beta$  的 Akt 磷酸化。用 API-2 处理后，将 OVAR3 细胞裂解并用指出的抗体免疫印迹。B 显示 API-2 抑制肿瘤生长。将肿瘤细胞皮下注射到裸鼠中，裸鼠的左边具有低水平的 Akt 细胞，右边具有高水平的 Akt 细胞。当肿瘤达到约 100-150mm<sup>3</sup> 的平均大小时，将动物用载体或者 1 mg/kg/天 API-2 处理。每个测量代表 10 个肿瘤的平均值。C 图解了用 API-2 或者载体(对照)处理的具有 OVCAR3(右边)和 OVCAR5(左边)异种移植物的老鼠的表示。D 显示了实验结束时肿瘤大小(底部)和重量(顶部)的实例。在 E 中，用抗-磷酸-Akt-S473 (顶部) 和抗-AKT2(底部)抗体对肿瘤裂解物进行免疫印迹分析，使用用 API-2 处理的(T3 和 T4)和未处理的(T1 和 T2)OVCAR-3-来源的肿瘤。

图 5 表明 API-2(曲西瑞宾)在体外抑制 Akt 激酶活性。在含有磷脂酰肌醇-3,4-5-P3(PIP3)、API-2 和组蛋白 H2B 作为底物的激酶缓冲液中，用 PDK1 和 Akt 的重组体进行体外激酶测定。温育 30 分钟后，通过 SDS-PAGE 分离反应物并对胶片曝光。

图 6 提供了人 Akt1 的 mRNA 和氨基酸序列，还提到了限制酶位点。

图 7 提供了人 Akt2 的 mRNA 和氨基酸序列，还提到了限制酶位点。

图 8 提供了人 Akt3 的 mRNA 和氨基酸序列，还提到了限制酶位点。

### 详细描述

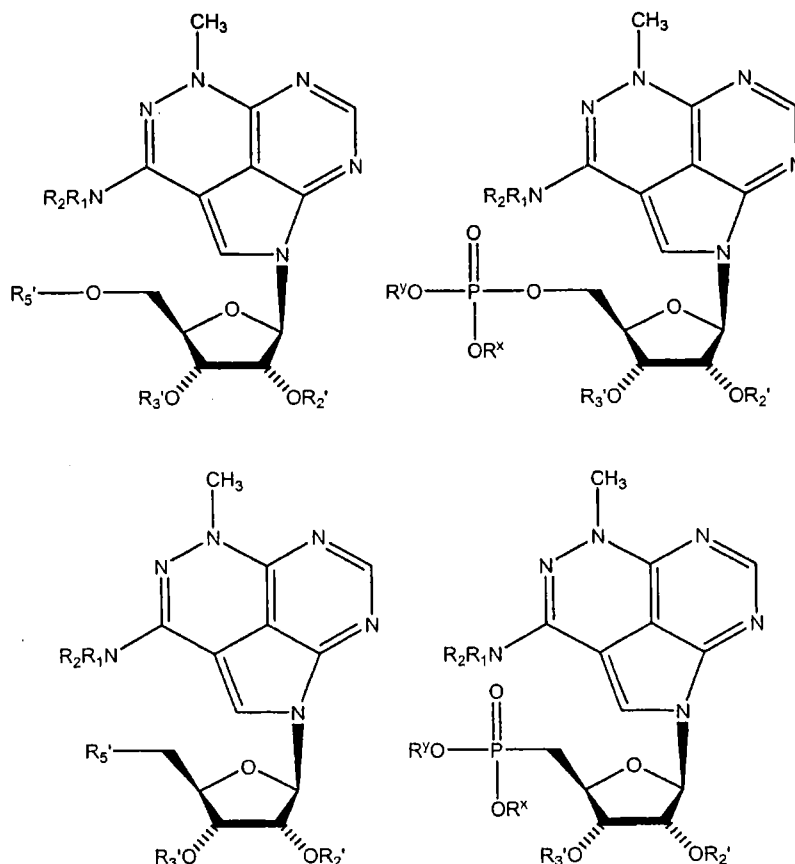
与现有技术和经验相反，发明人已经确定怎样成功地使用曲西瑞宾治疗肿瘤和癌症，包括通过如下操作的一种或它们的组合：(i)对根据下述的诊断试验，显示出对曲西瑞宾敏感的患者仅施用曲西瑞宾；(ii)使用所描述的剂量水平，其将所述药物的毒性减到最小并且仍然显示出功效；或者(iii)

使用所描述的给药方案，将其所述药物的毒性减到最小。

## I. 化合物

本发明提供了 TCN、TCN-P 和相关化合物的用途，尤其用于治疗增殖性疾病的治疗方案。

在一个实施方案中，本文提供的化合物具有下面的结构：



其中每个  $R_2'$ 、 $R_3'$  和  $R_5'$  独立地为氢，任选取代的磷酸酯或者磷酯(包括单-、二-或者三磷酸酯或者稳定化的磷酸酯前体药物)；酰基(包括低级酰基)；烷基(包括低级烷基)；酰胺，包括烷基或者芳基烷基的磺酸酯；磺酰基，包括甲磺酰基，和苄基，其中苄基任选用如本文给出的芳基的定义中描述的一个或多个取代基取代；任选取代的芳基磺酰基；脂类，包括磷脂；氨基酸；糖类；肽；或者胆固醇；或者其他药学上可接受的离去基团，其在体内提供了一种化合物，其中  $R_2'$ 、 $R_3'$  或者  $R_5'$  独立地为 H 或者单-、二-或者三磷酸酯；

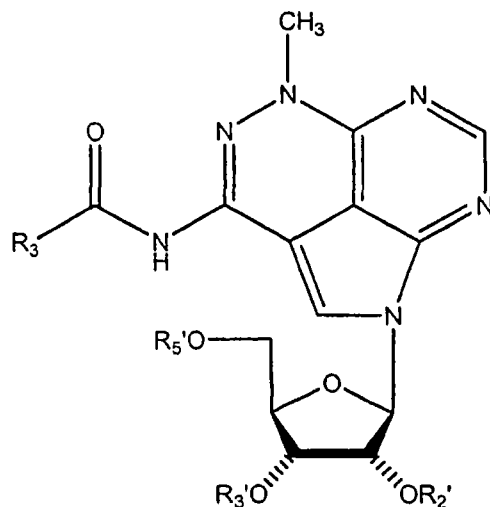
其中  $R^x$  和  $R^y$  独立地为氢、任选取代的磷酸酯；酰基(包括低级酰基)；

酰胺, 烷基(包括低级烷基); 芳族, 聚氧化烯, 如聚乙二醇, 任选取代的芳基磺酰基; 脂类, 包括磷脂; 氨基酸、糖类; 肽; 或者胆固醇; 或者其他药学上可接受的离去基团。在一个实施方案中, 该化合物作为 5'-磷酸酯脂类或者 5'-醚脂类施用。

$R_1$  和  $R_2$  各自独立地为 H, 任选取代的直链、支链或者环状烷基(包括低级烷基)、烯基或者炔基、CO-烷基、CO-烯基、CO-炔基、CO-芳基或者杂芳基、CO-烷氧基烷基、CO-芳氧基烷基、CO-取代的芳基、磺酰基、烷基磺酰基、芳基磺酰基、芳烷基磺酰基。

在一个实施方案中,  $R_2'$  和  $R_3'$  为氢。在另一实施方案中,  $R_2'$  和  $R_5'$  为氢。在再一个实施方案中,  $R_2'$ 、 $R_3'$  和  $R_5'$  为氢。在再一个实施方案中,  $R_2'$ 、 $R_3'$ 、 $R_5'$ 、 $R_1$  和  $R_2$  为氢。

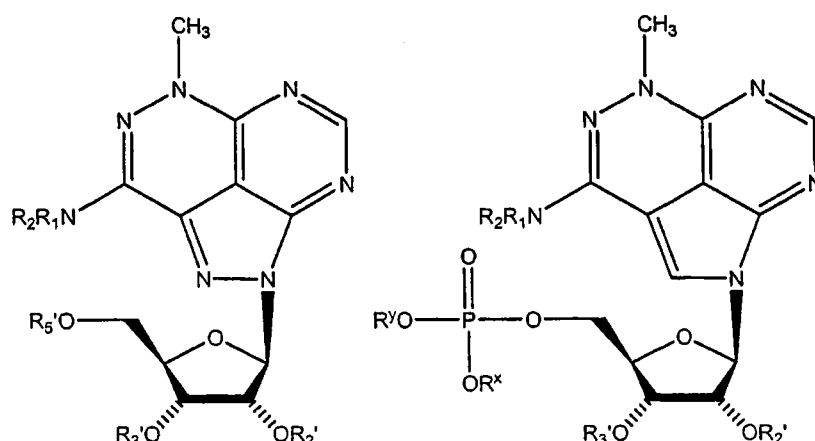
在另一实施方案中, 化合物具有下面的结构:



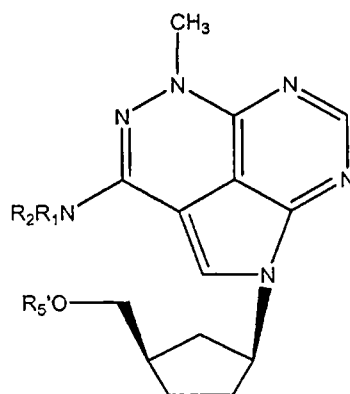
其中  $R_3$  为氢, 任选取代的直链、支链或者环状烷基(包括低级烷基)、烯基或者炔基, 或者  $NH_2$ 、 $NHR^4$ 、 $N(R^4)_2$ 、芳基、烷氧基烷基、芳氧基烷基, 或者取代的芳基, 并且

每个  $R^4$  独立地为 H、酰基, 包括低级酰基, 烷基, 包括低级烷基, 如但不限于, 甲基、乙基、丙基和环丙基、烯基、炔基、环烷基、烷氧基、烷氧基烷基、羟基烷基, 或者芳基。在子实施方案(subembodiment)中,  $R_3$  是直链的  $C_{1-11}$  烷基、异丙基、叔丁基, 或者苯基。

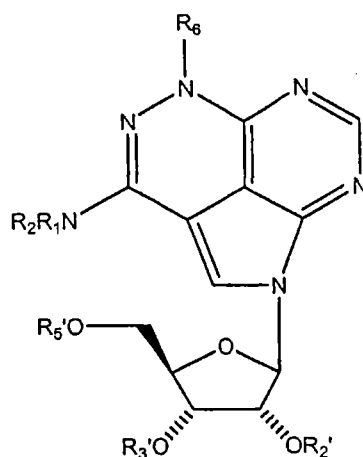
在一个实施方案中，本文提供的化合物具有下面的结构：



在另一实施方案中，本文提供的化合物具有下面的结构：



在另一实施方案中，本文提供的化合物具有下面的结构：

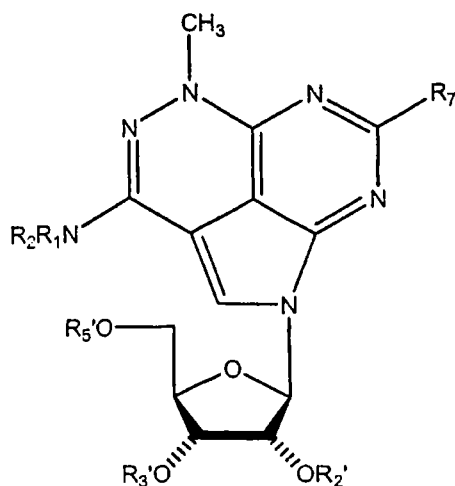


其中  $R_6$  为氢、烷基(包括低级烷基)、烯基、炔基、烷氧基烷基、羟基烷基、芳基烷基、环烷基、 $\text{NH}_2$ 、 $\text{NHR}^4$ 、 $\text{NR}^4\text{R}^4$ 、 $\text{CF}_3$ 、 $\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $\text{CH}_2\text{F}$ 、 $\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $\text{CH}_2\text{CF}_3$ 、 $\text{C}(\text{Y}^3)_3$ 、 $\text{C}(\text{Y}^3)_2\text{C}(\text{Y}^3)_3$ 、 $\text{C}(=\text{O})\text{OH}$ 、 $\text{C}(=\text{O})\text{OR}^4$ 、 $\text{C}(=\text{O})$ -烷基、 $\text{C}(=\text{O})$ -芳基、 $\text{C}(=\text{O})$ -烷氧基烷基、 $\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$ 、 $\text{C}(=\text{O})\text{NHR}^4$ 、 $\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^4)_2$ ，其中每个  $\text{Y}^3$  独立地为氢或者卤；并且

每个  $R^4$  独立地为 H; 酰基, 包括低级酰基; 烷基, 包括低级烷基, 如但不限于, 甲基、乙基、丙基和环丙基; 烯基、炔基、环烷基、烷氧基、烷氧基烷基、羟基烷基或者芳基。

在一个子实施方案中,  $R_6$  为乙基、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$  或者  $\text{CH}_2$ -苯基。

在另一实施方案中, 本文提供的化合物具有下面的结构:

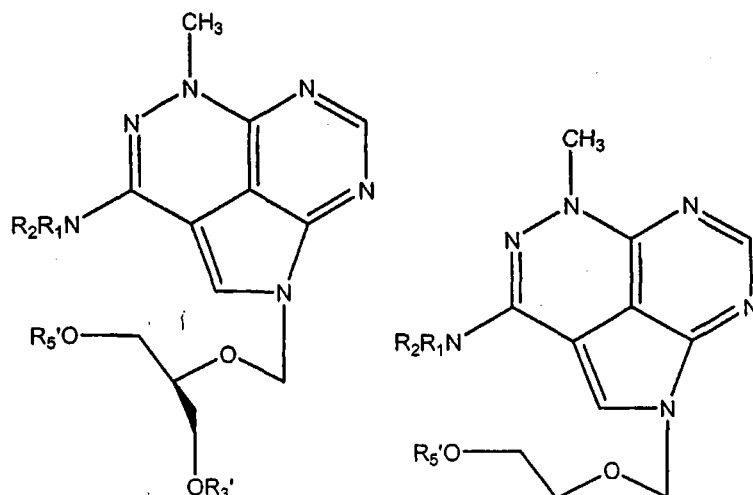


其中  $R_7$  为氢、卤、烷基(包括低级烷基)、烯基、炔基、烷氧基、烷氧基烷基、羟基烷基、环烷基、硝基、氰基、 $\text{OH}$ 、 $\text{OR}^4$ 、 $\text{NH}_2$ 、 $\text{NHR}^4$ 、 $\text{NR}^4\text{R}^4$ 、 $\text{SH}$ 、 $\text{SR}^4$ 、 $\text{CF}_3$ 、 $\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $\text{CH}_2\text{F}$ 、 $\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $\text{CH}_2\text{CF}_3$ 、 $\text{C}(\text{Y}^3)_3$ 、 $\text{C}(\text{Y}^3)_2\text{C}(\text{Y}^3)$ 、 $\text{C}(=\text{O})\text{OH}$ 、 $\text{C}(=\text{O})\text{OR}^4$ 、 $\text{C}(=\text{O})$ -烷基、 $\text{C}(=\text{O})$ -芳基、 $\text{C}(=\text{O})$ -烷氧基烷基、 $\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$ 、 $\text{C}(=\text{O})\text{NHR}^4$ 、 $\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^4)_2$ 、或者  $\text{N}_3$ , 其中每个  $\text{Y}^3$  独立地为 H 或者卤; 并且

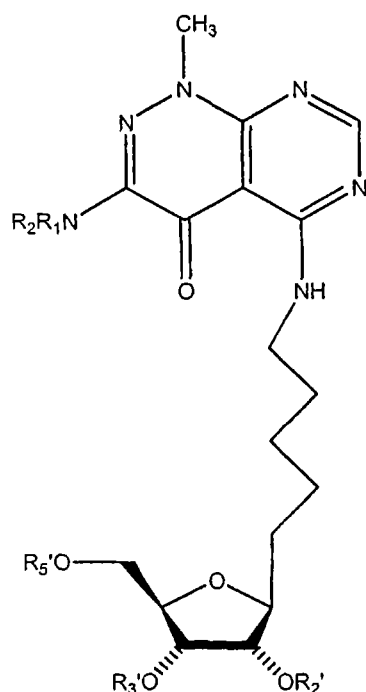
每个  $R^4$  独立地为 H; 酰基, 包括低级酰基; 烷基, 包括低级烷基, 如但不限于, 甲基、乙基、丙基和环丙基; 烯基、炔基、环烷基、烷氧基、烷氧基烷基、羟基烷基。

在子实施方案中,  $R_7$  为甲基、乙基、苯基、氯或者  $\text{NH}_2$ 。

在另一实施方案中, 本文提供的化合物具有下面的结构:



在另一实施方案中，本文提供的化合物具有下面的结构：



将理解，本文公开的化合物可以含有手性中心。此类手性中心可以是(R)或者(S)构型，或者可以是其混合物。从而，本文提供的化合物可以是对映异构纯的，或者可以是立体异构体或者非对映异构体混合物。将理解，本文化合物的公开包括任意外消旋的、旋光的、多晶型的，或者立体异构形式，或者它们的混合物，其优选具有本文描述的有用性质，本领域公知怎样制备旋光形式和怎样用本文描述的标准测试，或者使用本领域将已知的其他类似测试测定活性。可用于得到化合物的旋光异构体的方法的实例包括下面的方法：

- i) 晶体的物理分离-一种借以手工分离单个对映异构体的宏观晶体的技术。如果存在单独的对映异构体的晶体,即,该物质是凝聚成团的,并且晶体是在视觉上分离的;那么可以使用该技术;
- ii) 同时结晶-一种借以从外消旋物的溶液单独结晶各自对映异构体的技术,仅当外消旋物在固态时是凝聚成团的时候,才可以使用该方法;
- iii) 酶法拆分-一种通过对映异构体与酶的不同反应速率,部分或者完全分离外消旋物的技术;
- iv) 酶促不对称合成-一种合成技术,其中至少一个合成步骤使用酶促反应得到所希望的对映异构体的对映异构纯的或者富集的合成前体;
- v) 化学不对称合成-一种合成技术,其中在产物中产生不对称性(即,手性)的条件下,从无手性前体合成所希望的对映异构体,这可以使用手性催化剂或者手性助剂实现;
- vi) 非对映异构体分离-一种技术,其中外消旋化合物与对映异构纯的试剂(手性助剂)反应,该对映异构纯的试剂将各自对映异构体转化成非对映异构体。所得非对映异构体然后由于它们现在更加明显的结构差异通过层析或者结晶分离,并且以后除去手性助剂以得到所希望的对映异构体;
- vii) 第一级和第二级不对称转化-一种技术,借此来自外消旋物的非对映异构体平衡而从所希望的对映异构体产生非对映异构体溶液中的优势,或者非对映异构体从所希望的对映异构体的优先结晶扰乱了平衡,从而最终原则上所有物质都从希望的对映异构体转化成结晶的非对映异构体。然后从非对映异构体释放希望的对映异构体;
- viii) 动力学拆分-该技术指在动力学条件下,用手性、非外消旋试剂或者催化剂,通过对映异构体的不相等的反应速率,实现外消旋物的部分或者完全拆分(或者部分拆分的化合物的进一步拆

- 分);
- ix) 从非外消旋前体对映特异(enantiospecific)合成-一种合成技术, 其中从非手性原料得到所希望的对映异构体, 并且其中在合成过程中, 立体化学完整性不受损或者仅最小程度地受损;
  - x) 手性液体层析-一种技术, 其中外消旋物的对映异构体在液体移动相中通过它们与静止相的不同相互作用分离。静止相可以由手性材料制造, 或者移动相可以含有额外的手性材料以引起不同的相互作用;
  - xi) 手性气体层析-一种技术, 其中挥发外消旋物并且使用含有固定的非外消旋的手性吸附相, 对映异构体通过它们在气态移动相中的不同相互作用分离;
  - xii) 用手性溶剂萃取-一种技术, 其中通过一种对映异构体的优先溶解将对映异构体分离到特定手性溶剂;
  - xiii) 跨手性膜迁移-一种技术, 其中将外消旋物与薄膜屏障接触。该屏障通常分开两种可混液体, 一种含有外消旋物, 并且一种驱动力如离心或者压力差导致跨膜屏障优先迁移。由于膜的非外消旋手性性质而发生分离, 所述性质仅允许外消旋物的一种对映异构体穿过。

在一些实施方案中, 提供了曲西瑞宾、磷酸曲西瑞宾(TCN-P)、曲西瑞宾 5'-磷酸(TCN-P)或者曲西瑞宾的 DMF 加合物(TCN-DMF)。可以通过本领域技术人员已知的任意技术, 如 *Tetrahedron Letters*, vol. 49, pp.4757-4760 (1971)中描述的技术合成 TCN。可以通过本领域技术人员已知的任意技术, 如美国专利号 4,123, 524 中描述的技术制备 TCN-P。TCN-DMF 的合成例如在 *INSERM*, vol. 81, pp.37-82 (1978)中描述。其他涉及本文描述的 TCN 的化合物可以例如根据 Gudmundsson, K. S., 等人, "Synthesis of carbocyclic analogs of 2',3'-dideoxysangivamycin, 2',3'-dideoxytoyocamycin, and 2',3'-dideoxytricyribine," *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 20 (10-11): 1823-1830 (October-November 2001);



Porcari, A. R., 等人, "6-N-Acyltricyriline analogues: structure-activity relationship between acyl carbon chain length and activity against HIV-1," *J. Med. Chem.*, 43 (12): 2457-2463 (June 15, 2000); Porcari, A. R., 等人, "Acyclic sugar analogs of tricyriline: lack of antiviral and antiproliferative activity correlate with low intracellular phosphorylation," *Nucleosides Nucleotides*, 18 (11-12): 2475-2497 (November-December 1999), Porcari, A. R., 等人, "Deoxy sugar analogues of tricyriline : correlation of antiviral and antiproliferative activity with intracellular phosphorylation," *J. Med. Chem.*, 43 (12): 2438-2448 (June 15, 2000), Porcari, A. R., 等人, "Synthesis and antiviral activity of 2-substituted analogs of tricyriline," *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 22 (12): 2171-2193 (December 2003), Porcari, A. R., 等人, "An improved total synthesis of tricyriline : a tricyclic nucleoside with antineoplastic and antiviral properties," *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 23 (1-2): 31-39(2004), Schweinsberg, P. D., 等人 "Identification of the metabolites of an antitumor tricyclic nucleoside(NSC-154020)," *Biochem. Pharmacol.*, 30 (18): 2521-2526 (September 15, 1981). , Smith, K. L., 等人, "Synthesis of new 2'-beta-C-methyl related tricyriline analogues as anti-HCV agents," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14 (13): 3517-3520 (July 5, 2004), Townsend, L. B., 等人, "The synthesis and biological activity of certain pentaazaacenaphthylenes, hexaazaacenaphthylenes and their corresponding nucleosides," *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 1986 (17): 41-44 (1986), and/or Wotring, L. L., 等人, "Mechanism of activation of tricyriline phosphate(TCN-P) as a prodrug form of TCN," *Cancer Treat Rep.*, 70 (4): 491-7 (April 1986)中公开的方法合成。

药学上可接受的盐和前体药物

在化合物为足够碱性或者酸性以形成稳定的无毒加酸或碱盐的情况

下，以药学上可接受的盐形式施用化合物是合适的。药学上可接受的盐包括衍生自药学上可接受的无机或者有机碱和酸的盐。合适的盐包括衍生自碱金属如钾和钠，碱土金属如钙和镁，以及制药领域中公知的无数其他酸的盐。具体地，药学上可接受的盐的实例为与酸形成的有机酸加成盐，其形成生理学上可接受的阴离子，例如，甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、丙二酸盐、酒石酸盐、琥珀酸盐、苯甲酸盐、抗坏血酸盐、 $\alpha$ -酮戊二酸盐、和 $\alpha$ -甘油磷酸盐。还可以形成适宜的无机盐，包括硫酸盐、硝酸盐、碳酸氢盐，和碳酸盐。

使用本领域公知的标准步骤，例如，通过将足够碱性化合物如胺与提供生理上可接受的阴离子的适宜的酸反应，可以得到药学上可接受的盐。还可以制备羧酸的碱金属(例如，钠、钾或者锂)或者碱土金属(例如，钙)盐。

本文描述的任何核苷酸可以作为核苷酸前体药物施用以增加活性、生物利用率、稳定性或者改变核苷的性质。许多核苷酸前体药物配体是已知的。通常，核苷的单、二或者三磷酸酯的烷化、酰化或者其他亲脂修饰将增加核苷酸的稳定性。可以置换磷酸部分上的一个或多个氢的取代基的实例是烷基、芳基、类固醇、糖类，包括糖，1,2-二酰基甘油和醇。许多在 R. Jones 和 N.Bischofberger, *Antiviral Research*, 27 (1995) 1-17 中描述。这些任一种可以与公开的核苷组合以实现所希望的效果。

在一个实施方案中，提供曲西瑞宾或者相关化合物作为 5'-羟基亲脂前体药物。公开可以共价掺入核苷，优选在核苷或者亲脂制备物的 5'-OH 位掺入的合适的亲脂取代基的美国专利的非限制性实例包括美国专利号 5,149, 794 (Sep. 22, 1992, Yatvin, 等人)；5,194, 654 (mar. 16, 1993, Hostetler, 等人)；5,223, 263 (June 29, 1993, Hostetler, 等人)；5,256, 641 (Oct. 26, 1993, Yatvin, 等人)；5,411, 947 (May 2, 1995, Hostetler, 等人)；5,463, 092 (Oct. 31, 1995, Hostetler, 等人)；5,543, 389 (Aug. 6, 1996, Yatvin, 等人)；5,543, 390 (Aug. 6, 1996, Yatvin, 等人)；5,543, 391 (Aug. 6, 1996, Yatvin, 等人)；和 5,554, 728 (Sep. 10, 1996, Basava, 等人)，将它们都引入本文作为参考。

公开可以连接到本发明的曲西瑞宾或者相关化合物，或者亲脂制备物的亲脂取代基的外国专利申请包括 WO 89/02733、WO 90/00555、WO 91/16920、WO91/18914、WO 93/00910、WO 94/26273、WO/15132、EP 0 350287、EP 93917054.4 和 WO 91/19721。

曲西瑞宾衍生物或者相关化合物的额外的非限制性实例为含有如在下面的出版物中公开的取代基的那些。这些衍生的曲西瑞宾或者相关化合物可以用于文献中描述的适应症或者作为抗病毒剂，包括抗-HIV 或者抗 HBV 剂。Ho, D.H.W. (1973) Distribution of Kinase and deaminase of 1 $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine in tissues of man and mouse. *Cancer Res.* **33**, 2816-2820; Holy, A. (1993) Isopolar phosphorous-modified nucleotide analogues. In: De Clercq (ed.), *Advances in Antiviral Drug Design*, Vol. I, JAI Press, pp. 179-231; Hong, C.I., Nechaev, A., and West, C.R. (1979a) Synthesis and antitumor activity of 1 $\beta$ -3-arabinofuranosylcytosine conjugates of cortisol and cortisone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **88**, 1223-1229; Hong, C.I., Nechaev, A., Kirisits, A.J. Buchheit, D.J. and West, C.R. (1980) Nucleoside conjugates as potential antitumor agents. 3. Synthesis and antitumor activity of 1-( $\beta$ -D-arabinofuranosyl)cytosine conjugates of corticosteroids and selected lipophilic alcohols. *J. Med. Chem.* **28**, 171-177; Hostetler, K.Y., Stuhmiller, L.M., Lenting, H.B.M. van den Bosch, H. and Richman, D.D. (1990) Synthesis and antiretroviral activity of phospholipid analogs of azidothymidine and other antiviral

nucleosides. *J. Biol. Chem.* 266, 11714-11717; Hostetler, K.Y., Korba, B. Sridhar, C., Gardener, M. (1994a) Antiviral activity of phosphatidyl-dideoxycytidine in hepatitis B-infected cells and enhanced hepatic uptake in mice. *Antiviral Res.* 24, 59-67; Hostetler, K.Y., Richman, D.D., Sridhar, C.N. Felgner, P.L., Felgner, J., Ricci, J., Gardener, M.F. Selleseth, D.W. and Ellis, M.N. (1994b) Phosphatidylazidothymidine and phosphatidyl-ddC: Assessment of uptake in mouse lymphoid tissues and antiviral activities in human immunodeficiency virus-infected cells and in raucher leukemia virus-infected mice. *Antimicrobial Agents Chemother.* 38, 2792-2797; Hunston, R.N., Jones, A.A. McGuigan, C., Walker, R.T., Balzarini, J., and De Clercq, E. (1984) Synthesis and biological properties of some cyclic phosphotriesters derived from 2'-deoxy-5-fluorouridine. *J. Med. Chem.* 27, 440-444; Ji, Y.H., Moog, C., Schmitt, G., Bischoff, P. and Luu, B. (1990); Monophosphoric acid diesters of 7 $\beta$ -hydroxycholesterol and of pyrimidine nucleosides as potential antitumor agents; synthesis and preliminary evaluation of antitumor activity. *J. Med. Chem.* 33, 2264-2270; Jones, A.S., McGuigan, C., Walter, R.T., Balzarini, J. and DeClercq, E. (1984) Synthesis, properties, and biological activity of some nucleoside cyclic phosphoramidates. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1471-1474; Juodka, B.A. and Smart, J. (1974) Synthesis of ditribonucleoside a (P $\square$ N) amino acid derivatives. *Coll. Czech. Chem. Comm.* 39, 363-968; Kataoka, S., Imai, J., Yamaji, N., Kato, M., Saito, M., Kawada, T. and Imai, S. (1989) Alkylated cAMP derivatives; selective synthesis and biological activities. *Nucleic Acids Res. Sym. Ser.*, 21, 1-2; Kataoka, S., Uchida, R. and Yamaji, N. (1991) A convenient synthesis of adenosine 3',5' cyclic phosphate (cAMP) benzyl and methyl triesters. *Heterocycles* 32, 1351-1356; Kinchington, D., Harvey, J.J., O'Connor, T.J., Jones, B.C.N.M., Devine, K.G., Taylor-Robinson, D., Jeffries, D.J. and McGuigan, C. (1992) Comparison of antiviral effects of

zidovudine phosphoramidate and phosphorodiamidate derivatives against HIV and ULV *in vitro*. *Antiviral Chem. Chemother.* **3**, 107-112; Kodama, K., Morozumi, M., Saitoh, K.I., Kuninaka, H., Yoshino, H. and Saneyoshi, M. (1989) Antitumor activity and pharmacology of 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine-5'-stearylphosphate; an orally active derivative of 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine. *Jpn. J. Cancer Res.* **80**, 679-685; Korty, M. and Engels, J. (1979) The effects of adenosine- and guanosine 3',5'-phosphoric and acid benzyl esters on guinea-pig ventricular myocardium. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **310**, 103-111; Kumar, A., Goe, P.L., Jones, A.S. Walker, R.T. Balzarini, J. and De Clercq, E. (1990) Synthesis and biological evaluation of some cyclic phosphoramidate nucleoside derivatives. *J. Med. Chem.* **33**, 2368-2375; LeBec, C., and Huynh-dinh, T. (1991) Synthesis of lipophilic phosphate triester derivatives of 5-fluorouridine and arabinocytidine as anticancer prodrugs. *Tetrahedron Lett.* **32**, 6553-6556; Lichtenstein, J., Barner, H.D. and Cohen S.S. (1960) The metabolism of exogenously supplied nucleotides by *Escherichia coli.*, *J. Biol. Chem.* **235**, 457-465; Luchty, J., Von Daeniken, A., Friederich, J. Manthey, B., Zweifel, J., Schlatter, C. and Benn, M.H. (1981) Synthesis and toxicological properties of three naturally occurring cyanoepithioalkanes. *Mitt. Geg. Lebensmittelunters. Hyg.* **72**, 131-133 (*Chem. Abstr.* **95**, 127093); McGuigan, C. Tollerfield, S.M. and Riley, P.A. (1989) Synthesis and biological evaluation of some phosphate triester derivatives of the anti-viral drug Ara. *Nucleic Acids Res.* **17**, 6065-6075; McGuigan, C., Devine, K.G., O'Connor, T.J., Galpin, S.A., Jeffries, D.J. and Kinchington, D. (1990a) Synthesis and evaluation of some novel phosphoramidate derivatives of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) as anti-HIV compounds. *Antiviral Chem. Chemother.* **1**, 107-113; McGuigan, C., O'Connor, T.J., Nicholls, S.R. Nickson, C. and Kinchington, D. (1990b) Synthesis and anti-HIV activity

of some novel substituted dialkyl phosphate derivatives of AZT and ddCyd. *Antiviral Chem. Chemother.* 1, 355-360; McGuigan, C., Nicholls, S.R., O'Connor, T.J., and Kinchington, D. (1990c) Synthesis of some novel dialkyl phosphate derivative of 3'-modified nucleosides as potential anti-AIDS drugs. *Antiviral Chem. Chemother.* 1, 25-33; McGuigan, C., Devine, K.G., O'Connor, T.J., and Kinchington, D. (1991) Synthesis and anti-HIV activity of some haloalkyl phosphoramidate derivatives of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT); potent activity of the trichloroethyl methoxyalaninyl compound. *Antiviral Res.* 15, 255-263; McGuigan, C., Pathirana, R.N., Mahmood, N., Devine, K.G. and Hay, A.J. (1992) Aryl phosphate derivatives of AZT retain activity against HIV1 in cell lines which are resistant to the action of AZT. *Antiviral Res.* 17, 311-321; McGuigan, C., Pathirana, R.N., Choi, S.M., Kinchington, D. and O'Connor, T.J. (1993a) Phosphoramidate derivatives of AZT as inhibitors of HIV; studies on the carboxyl terminus. *Antiviral Chem. Chemother.* 4, 97-101; McGuigan, C., Pathirana, R.N., Balzarini, J. and De Clercq, E. (1993b) Intracellular delivery of bioactive AZT nucleotides by aryl phosphate derivatives of AZT. *J. Med. Chem.* 36, 1048-1052.

抗 HIV 剂 AZT 的磷酸一烷基酯衍生物比亲本核苷类似物的毒性低。

*Antiviral Chem. Chemother.* 5, 271-277;

Meyer, R.B., Jr., Shuman, D.A. and Robins, R.K. (1973) Synthesis of purine nucleoside 3',5'-cyclic phosphoramidates. *Tetrahedron Lett.* 269-272; Nagyvary, J. Gohil, R.N., Kirchner, C.R. and Stevens, J.D. (1973) Studies on neutral esters of cyclic AMP, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55, 1072-1077; Namane, A. Goyette, C., Fillion, M.P., Fillion, G. and Huynh-Dinh, T. (1992) Improved brain delivery of AZT using a glycosyl phosphotriester prodrug. *J. Med. Chem.* 35, 3939-3044; Nargeot, J. Nerbonne, J.M. Engels, J. and Leser, H.A. (1983) *Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 2395-2399; Nelson, K.A.,

Bentrude, W.G., Stser, W.N. and Hutchinson, J.P. (1987) The question of chair-twist equilibria for the phosphate rings of nucleoside cyclic 3',5'-monophosphates. <sup>1</sup>HNMR and x-ray crystallographic study of the diastereomers of thymidine phenyl cyclic 3',5'-monophosphate. *J. Am. Chem. Soc.* 109, 4058-4064; Nerbonne, J.M., Richard, S., Nargeot, J. and Lester, H.A. (1984) New photoactivatable cyclic nucleotides produce intracellular jumps in cyclic AMP and cyclic GMP concentrations. *Nature* 301, 74-76; Neumann, J.M., Hervè, M., Debouzy, J.C., Guerra, F.I., Gouyette, C., Dupraz, B. and Huynh-Dinh, T. (1989) Synthesis and transmembrane transport studies by NMR of a glucosyl phospholipid of thymidine. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 4270-4277; Ohno, R., Tatsumi, N., Hirano, M., Imai, K. Mizoguchi, H., Nakamura, T., Kosaka, M., Takatuski, K., Yamaya, T., Toyama, K., Yoshida, T., Masaoka, T., Hashimoto, S., Ohshima, T., Kimura, I., Yamada, K. and Kimura, J. (1991) Treatment of myelodysplastic syndromes with orally administered 1-β-D-rabinofuranosylcytosine-5'-stearylphosphate. *Oncology* 48, 451-455. Palomino, E., Kessle, D. and Horwitz, J.P. (1989) A dihydropyridine carrier system for sustained delivery of 2',3'dideoxynucleosides to the brain. *J. Med. Chem.* 32, 622-625; Perkins, R.M., Barney, S., Wittrock, R., Clark, P.H., Levin, R. Lambert, D.M., Petteway, S.R., Serafinowska, H.T., Bailey, S.M., Jackson, S., Harnden, M.R., Ashton, R., Sutton, D., Harvey, J.J. and Brown, A.G. (1993) Activity of BRL47923 and its oral prodrug, SB203657A against a rauscher murine leukemia virus infection in mice. *Antiviral Res.* 20 (Suppl. I). 84; Piantadosi, C., Marasco, C.J., Jr., Morris-Natschke, S.L., Meyer, K.L., Gumus, F., Surles, J.R., Ishaq, K.S., Kucera, L.S. Iyer, N., Wallen, C.A., Piantadosi, S. and Modest, E.J. (1991) Synthesis and evaluation of novel ether lipid nucleoside conjugates for anti-HIV-1 activity. *J. Med. Chem.* 34, 1408-1414; Pompon, A., Lefebvre, I., Imbach, J.L., Kahn, S. and Farquhar, D. (1994)

Decomposition pathways of the mono- and bis(pivaloyloxymethyl) esters of azidothymidine-5'-monophosphate in cell extract and in tissue culture medium; an application of the on-line ISRP-cleaning' HPLC technique. *Antiviral Chem. Chemother.* 5, 91-98; Postemark, T. (1974) Cyclic AMP and cyclic GMP. *Anu. Rev. Pharmacol.* 14, 23-33; Prisbe, E.J., Martin, J.C.M., McGee, D.P.C., Barker, M.F., Smee, D.F. Duke, A.E., Matthews, T.R. and Verheyden, J.P.J. (1986) Synthesis and antiherpes virus activity of phosphate and phosphonate derivatives of 9-[(1,3-dihydroxy-2-propoxy)methyl] guanine. *J. Med. Chem.* 29, 671-675; Pucch, F., Gosselin, G., Lefebvre, I., Pompon, A., Aubertin, A.M. Dim, A. and Imbach, J.L. (1993) Intracellular delivery of nucleoside monophosphate through a reductase-mediated activation process. *Antiviral Res.* 22, 155-174; Pugaeva, V.P., Kochkeva, S.I., Mashbits, F.D. and Eizengart, R.S. (1969). Toxicological assessment and health standard ratings for ethylene sulfide in the industrial atmosphere. *Gig. Trf. Prof. Zabol.* 13, 47-48 (Chem. Abstr. 72, 212); Robins, R.K. (1984) The potential of nucleotide analogs as inhibitors of retroviruses and tumors. *Pharm. Res.* 11-18; Rosowsky, A., Kim, S.H., Ross and J. Wick, M.M. (1982) Lipophilic 5'-(alkylphosphate) esters of 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine and its  $N^4$ -acyl and 2,2'-anhydro-3'0-acyl derivatives as potential prodrugs. *J. Med. Chem.* 25, 171-178; Ross, W. (1961) Increased sensitivity of the walker turnout towards aromatic nitrogen mustards carrying basic side chains following glucose pretreatment. *Biochem. Pharm.* 8, 235-240; Ryu, E.K., Ross, R.J., Matsushita, T., MacCoss, M., Hong, C.I. and West, C.R. (1982). Phospholipid-nucleoside conjugates 3. Synthesis and preliminary biological evaluation of 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine 5'diphosphate[-], 2-diacylglycerols. *J. Med. Chem.* 25, 1322-1329; Saffhill, R. and Hume, W.J. (1986) The degradation of 5-iododeoxyuridine and 5-bromoeoxyuridine by serum from different



sources and its consequences for the use of these compounds for incorporation into DNA. *Chem. Biol. Interact.* 57, 347-355; Saneyoshi, M., Morozumi, M., Kodama, K., Machida, J., Kuninaka, A. and Yoshino, H. (1980) Synthetic nucleosides and nucleotides XVI. Synthesis and biological evaluations of a series of 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine 5'-alkyl or arylphosphates. *Chem. Pharm. Bull.* 28, 2915-2923; Sastry, J.K., Nehete, P.N., Khan, S., Nowak, B.J., Plunkett, W., Arlinghaus, R.B. and Farquhar, D. (1992) Membrane-permeable dideoxyuridine 5'-monophosphate analogue inhibits human immunodeficiency virus infection. *Mol. Pharmacol.* 41, 441-445; Shaw, J.P., Jones, R.J. Arimilli, M.N., Louie, M.S., Lee, W.A. and Cundy, K.C. (1994) Oral bioavailability of PMEA from PMEA prodrugs in male Sprague-Dawley rats. 9th Annual AAPS Meeting. San Diego, CA (Abstract). Shuto, S., Ueda, S., Imamura, S., Fukukuawa, K. Matsuda, A. and Ueda, T. (1987) A facile one-step synthesis of 5'-phosphatidyl nucleosides by an enzymatic two-phase reaction. *Tetrahedron Lett.* 28, 199-202; Shuto, S., Itoh, H., Ueda, S., Imamura, S., Kukukawa, K., Tsujino, M. Matsuda, A. and Ueda, T. (1988) A facile enzymatic synthesis of 5'-(3-sn-phosphatidyl)nucleosides and their antileukemic activities. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 209-217.

一种优选的磷酸酯前体药物基团是 S-酰基-2-硫代乙基基团，也称作“SATE”。

可是使用的前体药物的额外实例是下面的专利和专利申请中描述的那些：美国专利号 5,614,548、5,512,671、5,770,584、5,962,437、5,223,263、5,817,638、6,252,060、6,448,392、5,411,947、5,744,592、5,484,809、5,827,831、5,696,277、6,022,029、5,780,617、5,194,654、5,463,092、5,744,461、4,444,766、4,562,179、4,599,205、4,493,832、4,221,732、5,116,992、6,429,227、5,149,794、5,703,063、5,888,990、4,810,697、5,512,671、6,030,960、2004/0259845、6,670,341、2004/0161398、2002/082242、5,512,671、2002/0082242 和/或

PCT 公布号 WO 90/11079、WO96/39197 和/或 WO 93/08807。

## 定义

本文中所述的术语“癌症”和“癌的”是指或者描述哺乳动物中特征是不受调节的细胞生长的生理状况，即，增殖性疾病。此类增殖性疾病的实例包括诸如癌、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤和白血病的癌症，以及本文公开的其他癌症。此类癌症的更具体的实例包括乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胃肠癌、胰腺癌、宫颈癌、卵巢癌、肝癌，例如，肝癌、膀胱癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、肾癌，和甲状腺癌。

癌症的其他非限制性实例是基底细胞癌、胆管癌、骨癌、脑和 CNS 癌、绒毛膜癌、结缔组织癌、食管癌、眼癌、头颈癌、胃癌、上皮内瘤、喉癌、淋巴瘤，包括霍奇金和非霍奇金淋巴瘤；黑素瘤、骨髓瘤、成神经细胞瘤、口腔癌(例如，唇、舌、口和咽)、胰腺癌、成视网膜细胞瘤、横纹肌肉瘤、直肠癌、呼吸系统癌、肉瘤、皮肤癌、胃癌、睾丸癌、子宫癌、泌尿系统癌，以及其他癌和肉瘤。

本文所用的术语“肿瘤”指所有赘生细胞生长和增殖(不管是良性的还是恶性的)，和所有癌前和癌细胞和组织。例如，特定的癌症的特征可以是实质性肿块瘤。实质性肿块如果存在，可以是原发性肿块。原发性肿块是指由于组织的正常细胞的转化导致的该组织中癌细胞的生长。在多数情况中，通过包囊的存在可以鉴定原发性肿块，通过目视或者触诊方法，或者通过组织的形状的不规则性、质地或者重量，可以鉴定包囊。然而，某些原发性肿瘤不能触诊到并且只可以通过医学成像技术，如 X 射线(例如，乳房造影法)或者通过针抽吸检测到。后面这些技术的使用在早期检测中更普遍。组织内癌细胞的分子和表型分析通常证实癌症是否该组织内生的或者该病变是由于来自另一部位的转移。

本文所用的术语烷基除非另外说明，包括例如 C<sub>1</sub> 到 C<sub>24</sub> 的饱和直链、支链或者环状的伯、仲或者叔烃，并且特别包括甲基、三氟甲基、乙基、

丙基、异丙基、环丙基、丁基、异丁基、叔丁基、戊基、环戊基、异戊基、新戊基、己基、异己基、环己基、环己基甲基、3-甲基戊基、2,2-二甲基丁基, 和 2,3-二甲基丁基。烷基还任选用例如一个或多个取代基取代, 所述取代基为诸如卤(F、Cl、Br 或者 I), (例如,  $\text{CF}_3$ 、2-Br-乙基、 $\text{CH}_2\text{F}$ 、 $\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $\text{CH}_2\text{CF}_3$  或  $\text{CF}_2\text{CF}_3$ ), 羟基(例如,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 氨基(例如,  $\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、 $\text{CH}_2\text{NHCH}_3$  或者  $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 烷基氨基, 芳基氨基, 烷氧基, 芳氧基, 硝基, 叠氨基(例如,  $\text{CH}_2\text{N}_3$ ), 氰基(例如,  $\text{CH}_2\text{CN}$ ), 磺酸, 硫酸酯, 膦酸, 磷酸酯, 或者膦酸酯, 它们为不受保护的或者如果需要, 为受保护的, 如本领域技术人员已知, 如 Greene, 等人, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, Second Edition, 1991 中教导, 将其引入本文作为参考。

除非另外指出, 本文所用的术语低级烷基指  $\text{C}_1$  到  $\text{C}_4$  饱和的直链的、支链的或者如果合适, 环状(例如, 环丙基)烷基, 包括取代的和未取代的形式。

术语烷基氨基或者芳基氨基包括分别具有一个或两个烷基或者芳基取代基的氨基。

术语氨基酸包括天然发生的和合成的  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  或  $\delta$  氨基酸, 并且包括但不限于, 在蛋白质中发现的氨基酸, 即, 甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸和组氨酸。在优选实施方案中, 氨基酸为 L-构型。备选地, 氨基酸可以是丙氨酰基、缬氨酰基、亮氨酰基、异亮氨酰基、脯氨酰基、苯丙氨酰基、色氨酰基、甲硫氨酰基、甘氨酰基、丝氨酰基、苏氨酰基、半胱氨酰基、酪氨酰基、天冬酰胺酰基、谷氨酰胺酰基、天冬氨二酰基 (aspartoyl)、戊二酰基、赖氨酰基、精氨酰基、组氨酰基、 $\beta$ -丙氨酰基、 $\beta$ -缬氨酰基、 $\beta$ -亮氨酰基、 $\beta$ -异亮氨酰基、 $\beta$ -脯氨酰基、 $\beta$ -苯丙氨酰基、 $\beta$ -色氨酰基、 $\beta$ -甲硫氨酰基、 $\beta$ -甘氨酰基、 $\beta$ -丝氨酰基、 $\beta$ -苏氨酰基、 $\beta$ -半胱氨酰基、 $\beta$ -酪氨酰基、 $\beta$ -天冬酰胺酰基、 $\beta$ -谷氨酰胺酰基、

$\beta$ -天冬氨酸二酰基、 $\beta$ -戊二酰基、 $\beta$ -赖氨酸酰基、 $\beta$ -精氨酸酰基、或 $\beta$ -组氨酸酰基的衍生物。当使用术语氨基酸时，认为它是天然的或者合成氨基酸的每种酯的特定且独立的公开，包括但不限于D和L构型的 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 或 $\delta$ 甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸和组氨酸。

除非另外定义，本文所用的术语“保护的”包括加入到氧、氮、硫、或者磷原子以防止它进一步反应或者为了其他目的加入的基团。多种氧和氮保护基团是有机合成领域技术人员已知的(见Greene和Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*. 第三版, John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, 1999)。

除非另外说明，本文所用的术语芳基包括苯基、联苯或者萘基，优选苯基。芳基任选用一个或多个部分取代，这些部分为诸如卤、羟基、氨基、烷基氨基、芳基氨基、烷氧基、芳氧基、硝基、氰基、磺酸、硫酸酯、磷酸、磷酸酯、或者膦酸酯，它们为不受保护的或者如果需要，为受保护的，如本领域技术人员已知，如Greene,等人, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, 第三版, 1999中教导。

术语烷芳基或者烷基芳基包括具有芳基取代基的烷基基团。术语芳烷基或者芳基烷基包括具有烷基取代基的芳基基团。

本文所用的术语卤包括氟、溴、碘和氯。

术语酰基包括羧酸酯，其中酯基的非羰基部分选自直链的、分枝的、或者环状烷基或者低级烷基，烷氧基烷基，包括甲氧基甲基、芳烷基，包括苄基，芳氧基烷基，如苯氧基甲基，芳基，包括任选用卤素、C1到C4烷基或者C1到C4烷氧基取代的苯基，磺酸酯，如烷基或者芳烷基磺酰基，包括甲磺酰基，单、二或者三磷酸酯，三苯甲基或者单甲氧基三苯甲基，取代的苄基，三烷基甲硅烷基(例如，二甲基-叔-丁基甲硅烷基)或者二苯基甲基甲硅烷基。酯中的芳基最好包括苯基。术语“低级酰基”指其中非羰基部分为低级烷基的酰基。

本文所用的术语“基本上无”或者“基本上不存在”关于对映异构纯时，指组合物，其包括按重量计至少 85%或者 90%，优选按重量计 95%到 98%，甚至更优选按重量计 99%到 100%的所指定的对映异构体。在优选实施方案中，在本发明的方法和化合物中，化合物基本上无其他对映异构体。

类似地，术语“分离的”指化合物组合物，其包括按重量计至少 85%或者 90%，优选按重量计 95%到 98%，甚至更优选按重量计 99%到 100%的所述化合物，剩余的包含其他化学种类或者对映异构体。

术语“独立地”在本文中用于表示独立应用的变量在应用到应用之间独立地改变。从而，在化合物如 R''XYR''，其中 R''“独立地为碳或者氮”中，两个 R''可以都为碳，两个 R''可以都为氮，或者一个 R''为碳，另一个 R''为氮。

术语“药学上可接受的盐或者前体药物”在说明书全文中用于描述化合物的任何药学上可接受的形式(如酯、磷酸酯、酯的盐，或者相关基团)，其当施用于受试者时，提供所述化合物。药学上可接受的盐包括衍生自药学上可接受的无机或者有机碱和酸的盐。适宜的盐包括衍生自碱金属如钾和钠，碱土金属如钙和镁，以及制药领域中公知的无数其他酸的盐。药学上可接受的前体药物指在宿主中代谢，例如，水解或者氧化而形成本发明化合物的化合物。前体药物的典型的实例包括在活性化合物的功能部分上具有生物学不稳定的保护基的化合物。前体药物包括可以氧化、还原、氨基化、脱氨基化、羟基化、脱羟基化、水解、脱水、烷基化、脱烷基化、酰化、脱酰化、磷酸化、脱磷酸化以产生活性化合物的化合物。

除非另外指出，本文所用的术语“药学上可接受的酯”包括一种或多种化合物的那些酯，其在合理的医学判断内，适于与宿主的组织接触而无过度毒性、刺激性、过敏反应等等，与合理的益处/风险比相称，并且对于它们的预期用途有效。

本文所用的术语“受试者”指动物，优选哺乳动物，最优选人。哺乳动物可以包括非人哺乳动物，包括，但不限于，猪、绵羊、山羊、奶牛(牛)、

鹿、骡、马、猴和其他非人灵长类动物、狗、猫、大鼠、小鼠、兔或者任何其他已知或者本文公开的动物。

## II. 体内功效/给药方案

在本发明的另一方面，提供了给药方案，其限制 TCN 和相关化合物的毒副作用。在一个实施方案中，此类给药方案使下面的毒副作用减到最小，这些毒副作用包括，但不限于，肝脏毒性、血小板减少、高血糖、呕吐、低血钙、贫血、血清蛋白减少（hypoalbuminemia）、骨髓抑制、高甘油三酯血症、血内淀粉酶过多、腹泻、stomachitis 和/或发热。

在另一实施方案中，TCN、TCP 或者相关化合物的施用在至少 15-20% 受试者中提供至少部分或者完全的体内应答。在特定实施方案中，部分应答可以为至少 15、20、25、30、35、40、50、55、60、65、70、75、80 或 85% 的肿瘤消退。在其他实施方案中，该应答在用所述疗法治疗的至少 15、20、25、30、35、40、50、55、60、65、70、75、80、85 或者 90% 受试者中是明显的。在其他实施方案中，通过本文公开的任意治疗方案可以得到此类应答率。

在其他实施方案中，提供了治疗已经诊断为患有癌症的受试者的方法，该方法为根据给药方案对所述受试者施用有效量的 TCN、TCN-P 或者相关化合物，所述给药方案包括每周一次施用所述药物，持续 3 周，接着在一周内不施用该药物（即，通过 28 天的循环）。在其他实施方案中，这种 28 天循环可以重复至少 2、3、4 或者 5 次或者直到肿瘤的消退是明显的。

在其他实施方案中，提供了 42 天的循环，其中本文公开的化合物可以每周一次施用，持续 4 周，然后在两周不施用该药物。在其他实施方案中，这种 42 天的循环可以重复 2、3、4 或者 5 次，或者直到肿瘤的消退是明显的。在特定实施方案中，可以根据 42 天循环施用小于 12、小于 11 或者小于 10 mg/m<sup>2</sup> TCN、TCN-P 或者相关化合物。在其他特定实施方案中，可以根据 42 天循环施用 2、3、4、5、6、7、8、9、10 或者 11 mg/m<sup>2</sup> TCN、TCN-P 或者相关化合物。

在另一实施方案中，提供了治疗受试者中癌症的方法，该方法为对该受试者每周一次施用  $10 \text{ mg/m}^2$  或者更少的 TCN、TCN-P 或者相关化合物的给药方案。在特定实施方案中，可以每周一次施用 0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5 或者  $10 \text{ mg/m}^2$  本文公开的 TCN、TCN-P 或者相关化合物。

在本发明的实施方案中，本文公开的化合物可以作为单次快速浓注剂量在短时间内，例如，约 5、10、15、20、30 或者 60 分钟内施用。在其他实施方案中，提供了给药方案，其中化合物通过连续灌注施用至少 24、48、72、96 或者 120 小时。在一些实施方案中，通过连续或者快速浓注灌注施用药物可以以一定频率重复，该频率为至少：每周一次、每两周一次、每三周一次、每月一次、每五周一次、每六周一次、每八周一次、每十周一次和/或每十二周一次。施用类型和频率可以以本文公开的任意方式组合以产生给药循环。药物可以通过某种给药循环重复施用，例如，作为快速浓注每两周一次，持续 3 个月。给药循环可以施用至少：1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18 或者 24 个月。备选地，可以对患者施用至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、15 或者 20 个给药循环。可以根据本文公开的任意组合施用药物，例如，药物可以每三个月每周一次，进行三个循环。

在其他实施方案中，化合物可以至少每天一次施用，持续至少 2、3、4、5、6、7、8、9 或者 10 天。此类施用可以接着是对应的不施用该药物的期间。

本文公开的 TCN、TCN-P 和相关化合物可以以有效导致肿瘤消退的量施用于患者。TCN、TCN-P 或者相关化合物的施用可以在至少 15-20% 的受试者中在体内提供至少部分应答，如至少 15、20 或者 30% 或者完全应答。在一些实施方案中，可以对受试者施用至少 2、5、10、15、20、30 或者  $50 \text{ mg/m}^2$  本文公开的化合物。在一些实施方案中，可以对受试者施用至少约 0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、12、15、17、20、25、30、35、40、45、50、55、60、

65、70、75、80、85、90、95、100、150、165、175、200、250、300 或 350mg/m<sup>2</sup> 本文公开的 TCN、TCN-P 或相关化合物。

可以根据本文公开的任一种治疗方案进行化合物的施用。在特定实施方案中，给药方案包括施用小于 20 mg/m<sup>2</sup> TCN 和相关化合物。在一个实施方案中，可以每周一次施用小于 20 mg/m<sup>2</sup> TCN 或相关化合物。在其他实施方案中，可以对受试者施用 2mg/m<sup>2</sup>、5mg/m<sup>2</sup>、10mg/m<sup>2</sup> 和/或 15mg/m<sup>2</sup> TCN 或相关化合物。在另一实施方案中，可以通过连续灌注至少 5 天对受试者施用小于 10 mg/m<sup>2</sup>。本发明提供了本文公开的给药类型、频率、循环数和剂量的任意组合。

### III. 患者群体的筛选

在本发明的另一方面，提供了鉴定对曲西瑞宾(TCN)和相关化合物的毒性作用敏感的癌或者肿瘤的方法。在一个实施方案中，提供了治疗哺乳动物中癌或者肿瘤的方法，该方法包括(i)从肿瘤得到生物组织样品；(ii)确定癌或者肿瘤是否过表达 Akt 激酶或者超活化和磷酸化的 Akt 激酶，和(iii)用本文描述的曲西瑞宾或者相关化合物治疗癌症或者肿瘤。在一个实施方案中，生物样品可以是活组织检查。在其他实施方案中，生物样品可以是来自肿瘤或者癌得到的液体、细胞和/或抽吸物。

可以根据本领域技术人员已知的任意技术得到生物样品。在一个实施方案中，可以进行活组织检查以得到生物样品。活组织检查是为了检查而从身体除去组织或者细胞的操作。一些活组织检查可以在医生的诊所进行，而其他的需要在医院 (hisptal setting) 中进行。此外，一些活组织检查需要使用麻醉剂麻醉区域，而其他的不需要任何镇静作用。在一些实施方案中，可以进行内窥镜活组织检查。该类型的活组织检查通过纤维内镜(长细管，其在末端有近焦内窥镜用于观察)穿过天然身体孔(例如，直肠)或者小切口(例如，关节内窥镜检查)进行。内窥镜用于观察所谈论的器官的异常或者有怀疑的区域，以便得到小量组织用于研究。内窥镜步骤以将观察和/或处理的器官或者身体区域命名。医生可以将内窥镜插入胃肠道(消化道内



窥镜检查)、膀胱(膀胱镜检查)、腹腔(腹腔镜检查)、关节腔(关节镜检查)、胸的中部(纵隔镜检查), 或者气管和支气管系统(喉镜检查 and 支气管镜检查)。

在另一实施方案中, 可以进行骨髓活组织检查。该类型的活组织检查可以从胸骨或者髂嵴髌骨(下背区上骨盆任一边上的骨区)进行。清洁皮肤并进行局部麻醉以使该区域麻木。向骨髓中插入长的硬质针, 并抽出细胞用于研究; 该步骤有时候让人不安。抽吸后可以进行组织芯活检(从骨髓除去小骨“碎片”)。

在另一实施方案中, 可以对哺乳动物进行切除和切开式活组织检查。当需要更宽或者更深部分的皮肤时, 通常使用该类型的活组织检查。使用解剖刀(手术刀), 除去完全厚度的皮肤用于进一步检查, 并缝合伤口(用手术线缝合)。当除去整个肿瘤时, 其称作切除活组织检查技术。如果仅仅除去部分肿瘤, 其称作切开式活组织检查技术。切除活组织检查通常是优选的方法, 例如, 当怀疑有黑素瘤(一种皮肤癌)时。

在其他实施方案中, 可以使用细针抽吸(FNA)活组织检查。该类型的活组织检查涉及使用细针从肿瘤除去非常小的块。局部麻醉有时用于麻木该区域, 但是试验很少导致很大的不适并且不留伤痕。例如, FNA 不用于诊断可疑的痣, 但是可以用于例如对黑素瘤附近的大淋巴结进行活组织检查以观察黑素瘤是否已经转移(扩散)。计算机化断层显像(CT 或者 CAT 扫描)可以用于将针头引导到内部器官如肺或者肝中的肿瘤中。

在其他实施方案中, 可以进行打孔刮取(punch shave)和/或皮肤活组织检查。打孔活组织检查包括用活组织检查仪器取皮肤的较深的样品, 该仪器除去短的圆柱状组织, 或者组织的“苹果核”。施用局部麻醉后, 将仪器在皮肤的表面旋转直到它切入所有层, 包括真皮、表皮和皮下组织(脂肪)的最表面部分。刮取活组织检查包括通过刮取除去皮肤的顶层。用局部麻醉剂进行刮取活组织检查。皮肤活组织检查包括在显微镜下除去皮肤样品用于检查以确定例如, 是否存在黑素瘤。在局部麻醉下进行活组织检查。

在特定实施方案中, 提供了确定肿瘤是否过表达 Akt 激酶的方法。Akt

激酶过表达可以指激酶的磷酸化状态。可以根据本文描述的方法检测 Akt 的超磷酸化。在一个实施方案中，可以将肿瘤活组织检查与对照组织比较。对照组织可以是来自哺乳动物的正常组织，其中从健康哺乳动物得到活组织检查或者正常组织。如果肿瘤活组织检查比对照组织含有更大量的 Akt 激酶和/或 Akt 激酶磷酸化，如比对照组织中所含的大至少约 1.5、2、2.25、2.5、2.75、3、3.25、3.5、3.75、4、4.25、4.5、4.75、5、5.5、6、7、8、9、或者 10 倍量的 Akt 激酶和/或 Akt 激酶磷酸化，那么可以确定 Akt 激酶过表达或者超磷酸化。

在一个实施方案中，本发明提供了检测受试者中或者来自该受试者的生物样品中异常 Akt 激酶表达的方法，通过将来自该受试者或者所述生物样品的细胞、细胞提取物、血清或者其他样品与对 Akt 激酶或者其抗原性部分特异的免疫相互作用分子接触，并筛选免疫相互作用分子-Akt 激酶复合体形成的水平来进行所述方法，其中相对于正常细胞，复合体的升高的存在指示表达或者过表达 Akt 的异常细胞。在一个实例中，可以用免疫学方法筛选细胞或者细胞提取物中升高水平的 Akt 激酶的存在。

在备选实施方案中，通过筛选编码 Akt 激酶的基因的表达水平，在基因水平上检测细胞中 Akt 的异常表达，其中与正常细胞比较，转录表达产物(即 mRNA)的升高的水平指示异常细胞。在一些实施方案中，可以用实时 PCR 以及其他 PCR 操作测定转录活性。在一个实施方案中，可以从受试者的细胞或者从受试者的生物样品得到 mRNA 并任选产生 cDNA。该 mRNA 或者 cDNA 可以与能够与编码 Akt 激酶的核苷酸序列或者其互补核苷酸序列的全部或者部分杂交和/或扩增该核苷酸序列的基因探针接触，并可以检测该 mRNA 或者 cDNA 的水平，其中可以评估与对照相比，该 mRNA 或者 cDNA 的升高的水平的存在。

本发明的再一个实施方案预期定量或者半定量诊断试剂盒中针对 Akt 激酶的单克隆或者多克隆抗体用于确定来自患者的可疑的癌细胞中 Akt 激酶的相对水平的用途，所述试剂盒可以包括进行该测定必需的所有试剂。在一个实施方案中，提供了利用进行 ELISA 测定必需的试剂和材料的试剂

盒。试剂可以包括例如，洗涤缓冲液、抗体稀释缓冲液、封闭缓冲液、细胞染色液、显影溶液、终止溶液、抗磷酸-蛋白特异的抗体、抗 Pan 蛋白特异的抗体、二级抗体，和蒸馏水。试剂盒还可以包括使用说明书并且可以任选自动化或者半自动化或者为与自动化机器或者软件相容的形式。在一个实施方案中，检测 AKT 的活化形式(丝氨酸 474 处磷酸化的 Akt)的磷酸-ser-473 Akt 抗体可以用作诊断试剂盒中的抗体。见，例如，Yuan 等人(2000) "Frequent Activation of AKT2 and induction of apoptosis by inhibition of phosphoinositide-3-OH kinase/Akt pathway in human ovarian cancer," *Oncogene* 19: 2324-2330。

### Akt 激酶

Akt，也称作 PKB<sup>3</sup>，代表丝氨酸/苏氨酸激酶的亚家族。已经鉴定了该亚家族中的三个成员：AKT1、AKT2 和 AKT3。Akt 被细胞外刺激物以依赖 PI3K 的方式激活(Datta, S. R., 等人 *Genes Dev.*13 : 2905-2927, 1999)。Akt 的完全活化需要活化环中 Thr<sup>308</sup> 和 C-末端活化结构域中 Ser<sup>473</sup> 的磷酸化。Akt 受到 PTEN 肿瘤抑制物的负调节。已经在多种肿瘤中鉴定了 PTEN 中的突变，其导致 Akt 途径的活化(Datta, S. R., 等人 *Genes Dev.*13 : 2905-2927, 1999)。此外，已经在许多人类恶性肿瘤中检测到 Akt 的扩增、过表达和/或活化(Datta, S. R., 等人 *Genes Dev.* 13 : 2905-2927, 1999, Cheng, J. Q., 和 Nicosia, S. V. AKT signal transduction pathway in oncogenesis. In Schwab D, editor. *Encyclopedic Reference of Cancer*. Berlin Heidelberg and New York: Springer;2001. pp35-7)。Akt 的异位表达，特别是组成性活性 Akt 的异位表达，诱导细胞存活和恶性转化，而 Akt 活性的抑制刺激许多哺乳动物细胞中的细胞凋亡(Datta, S. R., 等人 *Genes Dev.*13 : 2905-2927, 1999, Cheng, J. Q., 和 Nicosia, S. V. AKT signal transduction pathway in oncogenesis. In Schwab D, editor. *Encyclopedic Reference of Cancer*. Berlin Heidelberg and New York : Springer ; 2001.pp35-7, Sun, M.,等人 *Am. J. Path.*, 159 : 431-437,2001, Cheng, J. Q.,

等人 *Oncogene*, 14 : 2793-2801,1997)。此外, 已经表明, Akt 的活化与肿瘤侵入力和化学耐受性有关 (West, K. A. , 等人 *Drug Resist. Updat.*, 5 :234-248, 2002)。

Akt 途径的激活通过诱导细胞存活、生长、迁移和血管发生而在恶性转化和化学耐受性中起关键作用。本发明提供了确定 Akt 激酶过表达和/或超活化和磷酸化的 Akt 激酶水平的方法。

Akt 激酶可以是任意已知的 Akt 家族激酶, 或者其相关激酶, 包括, 但不限于 Akt1、Akt2、Akt3。人 Akt1、Akt2 和 Akt3 的 mRNA 和氨基酸序列分别在图 6a-c、7a-d 和 8a-c 中图解。

#### 诊断测定法

#### 免疫学测定法

在一个实施方案中, 提供了检测哺乳动物细胞中或者来自该哺乳动物的生物样品中 Akt 激酶异常表达的方法, 该方法包括将来自该哺乳动物或者生物样品的细胞、细胞提取物或者血清或者其他样品与对 Akt 激酶或者其抗原部分特异的免疫相互作用分子接触并筛选免疫相互作用分子-Akt 激酶复合物形成的水平, 并确定是否存在相对于正常细胞, 复合物的升高的存在。

免疫相互作用分子可以是对 Akt 激酶或者其抗原性部分或者其同源物或者类似物有特异性和结合亲和性的分子。在一个实施方案中, 免疫相互作用分子可以是免疫球蛋白分子。在其他实施方案中, 免疫相互作用分子可以是抗体片段、单链抗体, 和/或脱免疫的分子, 包括人源化抗体和 T 细胞相关的抗原结合分子(TABM)。在一个特定实施方案中, 抗体可以是单克隆抗体。在另一特定实施方案中, 抗体可以是多克隆抗体。免疫相互作用分子可以显示出对 Akt 激酶或者更具体地, 对 Akt 激酶上的抗原决定簇或者表位显示出特异性。Akt 激酶上的抗原决定簇或者表位包括免疫应答针对的分子的部分。抗原决定簇或者表位可以是 B 细胞表位或者合适时, 是 T 细胞表位。在一个实施方案中, 抗体是磷酸(phosphor)-ser 473 Akt 抗

体。

本发明的一个实施方案提供了诊断哺乳动物中癌症或者癌症样生长的存在的方法，其中所述癌症或者癌症样生长中存在异常 Akt 活性，该方法包括将来自哺乳动物或者受试者的生物样品的细胞或者细胞提取物与 Akt 激酶结合有效量的对 Akt 激酶或者其上的抗原决定簇或者表位特异的抗体接触，然后定量或者定性地测定 Akt 激酶-抗体复合体的水平，其中确定与正常细胞比较，所述复合体的升高的水平的存在。

可以通过本领域技术人员已知的多种方法的任一种制备抗体。例如，为了检测人 Akt 激酶，抗体可以一般但不是必须来自非人动物，如灵长类、家畜动物(例如，绵羊、奶牛、猪、山羊、马)、实验室试验动物(例如，小鼠、大鼠、豚鼠、兔)和/或陪伴动物(例如，狗、猫)。还可以在原核或者真核宿主细胞中重组产生抗体。通常，可以在体外对细胞或者组织活组织检查进行基于抗体的测定。然而，如果将抗体适宜的脱免疫，或者对于人用，将抗体人源化，那么抗体可以用例如，核标签标记，施用于患者并通过放射学技术测定核标记积累的部位。Akt 激酶可以是癌靶定剂。因此，本发明的另一实施方案提供了抗体的脱免疫形式，其用于人和非人患者中的癌成像。

通常，为了产生针对 Akt 激酶的抗体，需要从生物样品提取酶，该酶可以来自动物，包括人组织，或者如果通过重组方法产生，那么来自细胞培养物。通过任意合适的方法从生物样品分离 Akt 激酶。例如，分离可以利用 Akt 激酶的表面电荷性质、大小、密度、生物活性和其对另一实体(例如，它结合或者连接的另一蛋白质或者化合物)的亲亲和性的任意一种和多种。从而，例如，Akt 激酶从生物液体的分离可以通过如下一种或多种方法实现：超速离心、离子交换层析(例如，阴离子交换层析)、阳离子交换层析)、电泳(例如，聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电聚焦)、大小分离(例如，凝胶过滤、超滤)和亲和性介导的分离(例如，免疫亲和分离，包括但不限于，磁珠分离，如 Dynabead(商标)分离、免疫层析、免疫沉淀)。Akt 激酶从生物液体的分离可以保存激酶上存在的构象表位，并且从而适宜地避免了导

致酶变性的技术。在另一实施方案中，可以用亲和分离、凝胶过滤和/或超滤的任意一种或多种从生物液体分离激酶。

可以用本领域已知的标准方案进行免疫和随后单克隆抗体的产生，所述标准方法为如 Kohler 和 Milstein (Kohler 和 Milstein, *Nature* 256: 495-499, 1975 ; Kohler 和 Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6 (7): 511-519, 1976), Coligan 等人("Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., 1991-1997) 或 Toyama 等人(*Monoclonal Antibody, Experiment Manual*", Kodansha Scientific 出版, 1987)描述。基本上，将动物用含有 Akt 激酶的生物液体或者其级分或者 Akt 激酶的重组形式通过标准方法免疫，以产生抗体的细胞，尤其产抗体的体细胞(例如，B 淋巴细胞)。这些细胞可以从经免疫的动物除去用于永生化。在一些实施方案中，Akt 激酶的片段可以用于产生抗体。该片段可以与载体结合。载体可以是通常高分子量的物质，其天然地或者人工地连接非免疫原性或者弱免疫原性物质(例如，半抗原)以增强它的免疫原性。

产抗体的细胞的永生化可以用本领域公知的方法进行。例如，可以通过用 EB 病毒(EBV)通过转化方法实现永生化(Kozbor 等人, *Methods in Enzymology* 121: 140, 1986)。在另一实施方案中，用细胞融合方法(在 Coligan 等人, 1991-1997, 上文中描述)永生化产抗体的细胞，细胞融合方法广泛用于产生单克隆抗体。在该方法中，具有产生抗体的产抗体的体细胞，尤其 B 细胞与骨髓瘤细胞系融合。这些体细胞可以来自已接触抗原的动物，优选啮齿动物，如小鼠和大鼠的淋巴结、脾脏和外周血。在特定实施方案中，可以使用小鼠脾细胞。在其他实施方案中，可以使用大鼠、兔、绵羊或者山羊细胞。已经从淋巴细胞肿瘤开发了特化的骨髓瘤细胞系用于产生杂交瘤的融合步骤(Kohler 和 Milstein, 1976, 上文; Shulman 等人, *Nature* 276: 269-270, 1978 ; Volk 等人, *J. Virol.* 42(1) : 220-227, 1982)。许多骨髓瘤细胞系也可以用于产生融合的杂交细胞，包括例如，P3.times. 63-Ag8、P3.times.63-AG8.653 、 P3/NS1-Ag4-1 (NS-1) 、 Sp2/0-Ag14 和 S194/5.XXO.Bu.1。Kohler 和 Milstein (1976, 上文)已经描述了 P3.

times.63-Ag8 和 NS-1 细胞系。Shulman 等人(1978, 上文)开发了 Sp2/0-Ag14 骨髓瘤细胞系。Trowbridge (J. Exp. Med. 148(1): 313-323, 1978) 报导了 S194/5. XXO. Bu.1 细胞系。产生抗体的脾脏或者淋巴结细胞和骨髓瘤杂交细胞的方法通常包括将体细胞与骨髓瘤细胞分别在促进细胞膜融合的一种或多种媒介物(化学的、病毒的或者电的)的存在下以 10:1 的比例(尽管该比例可以从约 20:1 到约 1:1 改变)混合。已经描述了融合方法(Kohler 和 Milstein, 1975, 上文; Kohler 和 Milstein, 1976, 上文; Gefter 等人, Somatic Cell Genet. 3: 231-236, 1977; Volk 等人, 1982, 上文)。那些研究人员使用的融合促进剂是仙台病毒和聚乙二醇(PEG)。在一些实施方案中, 提供了从剩余的未融合的细胞, 尤其从未融合的骨髓瘤细胞选择融合的杂交细胞的方法。一般地, 将细胞培养在维持杂交瘤的生长但是防止未融合的骨髓瘤细胞生长的培养基中, 可以完成融合的杂交细胞的选择, 所述杂交瘤通常将继续不确定的分裂。用于融合的体细胞在体外培养中不保持长期生活力, 因此不产生问题。需要几周来选择性培养融合的杂交细胞。在该时期的早期, 必须鉴定产生所希望的抗体的杂交细胞, 从而它们可以随后克隆并增殖。通常, 约 10% 所得杂交细胞产生所希望的抗体, 尽管约 1 到 30% 的范围不是罕见的。通过一些标准测定方法的任一种可以实现产生抗体的杂交细胞的检测, 所述方法包括酶联免疫吸附测定和放射免疫技术, 如 Kennet 等人描述(Monoclonal Antibodies and Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, pp 376-384, Plenum Press, New York, 1980)和通过 FACS 分析(O'Reilly 等人, Biotechniques 25 : 824-830, 1998)。

一旦已经选择了所希望的融合杂交细胞并克隆成各自的产抗体的细胞系, 就可以以两种标准方法的任一种增殖每种细胞系。可以将杂交瘤细胞的悬浮物注射到组织相容的动物。然后经注射的动物将产生肿瘤, 该肿瘤分泌融合的杂交细胞产生的特异单克隆抗体。可以穿刺动物的体液, 如血清或者腹水, 以提供高浓度单克隆抗体。备选地, 可以在实验室培养容器中体外增殖各细胞系。含有高浓度的一种特异的单克隆抗体的培养基可以通过倾析、过滤或者浓缩收获, 并随后纯化。

然后可以测试细胞系的特异性以通过合适的免疫检测方式检测目的 Akt 激酶。例如，可以将细胞系等分到许多孔中并温育，并通过酶联免疫吸附测定(ELISA)、间接荧光抗体技术等等分析每个孔的上清液。鉴定产生能够识别目标 LIM 激酶但是不识别非目标表位的单克隆抗体的细胞系，然后在体外直接培养或者注射到组织相容的动物中以形成肿瘤，并产生、收集和纯化需要的抗体。

因此，本发明提供了检测样品中 Akt 激酶或者其片段、变体或者衍生物的方法，其包括将样品与抗体或者其片段或者衍生物接触并检测含有所述抗体和 Akt 激酶或者其片段、变体或者衍生物的复合体与正常对照相比的水平，其中测定 Akt 激酶的升高的水平。可以使用用于确定形成复合体的合适的技术。例如，根据本发明的抗体(具有与其结合的报导分子)可以用于免疫测定。此类免疫测定可以包括但不限于本领域技术人员熟知的放射免疫测定(RIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫层析技术(ICT)，和蛋白质印迹。免疫测定还可以包括竞争测定。本发明包括定性和定量免疫测定。

合适的免疫测定技术例如在美国专利号 4,016,043、4,424,279 和 4,018,653 中描述。这些包括非竞争型的单位点和双位点测定，以及常规的竞争结合测定。这些测定还包括经标记的抗原结合分子与目标抗原的直接结合。

本发明还提供了对从动物，如人类癌症患者或者怀疑患有癌症的个体得到的细胞或者组织样品中 Akt 蛋白质表达和活化水平定量的方法。在一个实施方案中，本发明提供了使用成像系统定量地定量 Akt 蛋白质表达或者活化水平的方法。该成像系统可以用于接受、增强和处理已经用 AKT 蛋白质特异的染料染色的细胞或者组织样品的图像，以便确定在从这种动物得到的细胞或者组织样品中表达的 AKT 蛋白质的量或者活化水平。在本发明的方法的实施方案中，可以对表达不同量的 AKT 蛋白质的至少两种细胞系产生 AKT1 和 AKT2 蛋白质表达的校准曲线。校准曲线然后可以用于定量确定在细胞或者组织样品中表达的 AKT 蛋白质的量。使用对激



活特征特异的试剂，可以为激活的 AKT 蛋白质制作类似的校准曲线。它还可以用于确定临床癌症治疗之前和之后 AKT 的量和激活状态的改变。

在本发明方法的一个特定实施方案中，可以用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 定量细胞或者组织样品中的 AKT 蛋白质表达以确定样品中 AKT 蛋白质的量。此类方法例如在美国专利公布号 2002/0015974 中描述。

在其他实施方案中，酶免疫测定可以用于检测 Akt 激酶。在此类测定中，通常通过戊二醛或者高碘酸盐将酶缀合到另一种抗体。特定酶将使用的底物通常选择用来当对应的酶水解时产生可检测的颜色改变。还可以使用荧光底物，其产生荧光产物而不是显色底物。可以将酶标记的抗体加到第一种抗体-抗原复合物，允许结合，然后洗除过量试剂。然后将含有合适底物的溶液加入抗体-抗原-抗体的复合物。底物可以与连接第二种抗体的酶反应，得到定性的可见信号，其可以进一步定量，通常使用分光光度计进行定量，得到样品中存在的抗原的量的指示。备选地，荧光化合物，如荧光素、罗丹明和镧系元素铕(EU)可以化学偶联到抗体而不改变它们的结合能力。当用特定波长的光通过光照激活时，荧光染料标记的抗体吸收光能，在分子中诱导激发态，然后发出用光学显微镜可以在视觉上检测到的特征性颜色的光。允许荧光标记的抗体结合到第一种抗体-抗原复合物。洗除未结合的试剂后，让剩余的三级复合物暴露于合适波长的光下。观察到的荧光指出目的抗原的存在。免疫荧光测量法(IFMA)是本领域中成熟的并且尤其可用于本发明的方法。然而，也可以使用其他报导分子，如放射性同位素、化学发光分子或者生物发光分子。

在特定实施方案中，针对 Akt 激酶的抗体可以用于 ELISA 介导的 Akt 激酶检测，特别是血清或者其他循环体液中 Akt 激酶的检测。这可以通过将抗-Akt 激酶抗体免疫固定到固相支持体并将这些与生物提取物，如血清、血液、淋巴或者其他体液、细胞提取物或者细胞活组织检查接触来实现。经标记的抗-Akt 激酶抗体然后可以用于检测固定化的 Akt 激酶。该测定法可以以任意多种方式改变并且所有变通方案都被本发明包括并且是本领域技术人员已知的。该方法可以使得用例如，基于血清的测定法快速检测和

定量 Akt 激酶水平。

在一个实施方案中，Akt ELISA 测定试剂盒可以用于本发明中。例如，来自 SuperArray Bioscience 的用于 Akt S473 的 Cellular Activation of Signaling ELISA 试剂盒可以用于本发明中。在一个实施方案中，抗体可以是识别 Akt S473 的抗-pan 抗体。ELISA 测定试剂盒含有抗-Akt 抗体和额外的试剂，包括但不限于，洗涤缓冲液、抗体稀释缓冲液、封闭缓冲液、细胞染色溶液、显影液、终止液、二级抗体，和蒸馏水。

### 核苷酸检测

在另一实施方案中，通过检测细胞中编码 Akt 激酶的多核苷酸的表达水平，提供了检测 Akt 激酶的方法。用本领域技术人员已知的任意合适的技术可以确定多核苷酸的表达。在一个实施方案中，编码 Akt 激酶的经标记的多核苷酸可以用作从细胞得到的 RNA 提取物的 RNA 印迹中的探针。在其他实施方案中，来自动物的核酸提取物可以与对应于编码所述激酶的多核苷酸或者其侧翼序列的有义和反义序列的寡核苷酸引物结合用于核酸扩增反应，如 RT-PCR 中。多种自动化的固相检测技术是本领域技术人员可以得到的，如 Fodor 等人(Science 251: 767-777, 1991)和 Kazal 等人(Nature Medicine 2: 753-759, 1996)所述。

在其他实施方案中，提供了检测编码 RNA 转录物的 akt 激酶的方法。可以从怀疑含有 Akt 激酶 RNA 的细胞样品分离 RNA，例如，从人癌组织分离总 RNA。可以通过本领域已知的方法，例如，使用 TRIZOL 试剂(GIBCO-BRL/Life Technologies, Gaithersburg, Md.)可以分离 RNA。寡聚 dT，或者随机序列寡核苷酸，以及序列特异的寡核苷酸可以用作逆转录酶反应中的引物以从分离的 RNA 制备第一链 cDNA。然后将所得第一链 cDNA 用序列特异的寡核苷酸在 PCR 反应中扩增，得到扩增产物。

聚合酶链式反应或者“PCR”指一种程序或者技术，其中如美国专利号 4,683, 195 中描述的扩增核酸、RNA、和/或 DNA 的预选的片段的量。通常，来自目的区域的末端或者之外的序列信息用于设计寡核苷酸引物。

这些引物将与待扩增的模板的相反链在序列上相同或者相似。PCR 可以用于扩增特异 RNA 序列和从总细胞 RNA 转录的 cDNA。一般见 Mullis 等人 (Quant. Biol. 51 : 263,1987 ; Erlich, eds. , PCR Technology, Stockton Press, NY, 1989)。从而, 通过 PCR 扩增特异核苷酸序列取决于具有保守核苷酸序列的寡核苷酸或者“引物”, 其中从相关基因或者蛋白质序列的比对, 例如, 哺乳动物 Akt 激酶基因的序列比较推导所述保守序列。例如, 制备一种引物, 预测其与反义链退火, 制备另一种引物, 预测其与编码 Akt 激酶的 cDNA 分子的有义链退火。为了检测扩增产物, 通常将反应混合物进行琼脂糖凝胶电泳或者其他方便的分离技术并检测 Akt 激酶特异扩增的 DNA 的相对存在。例如, 使用与特异寡核苷酸探针的 DNA 杂交或者将其电泳迁移率与已知分子量的 DNA 标准比较, 可以检测 Akt 激酶扩增的 DNA。通过从凝胶切除或者洗除片段(例如, 见参考文献 Lawn 等人, Nucleic Acids Res. 2: 6103,1981; Goeddel 等人, Nucleic acids Res. 8 : 4057-1980), 将扩增的产物克隆到合适载体如 pCRII 载体(Invitrogen)的克隆位点, 测序所克隆的插入序列并将 DNA 序列与 LIM 激酶的已知序列比较, 可以完成所扩增的 Akt 激酶 DNA 的分离、纯化和表征。然后可以确定 LIM 激酶 mRNA 和 cDNA 的相对量。

在一个实施方案中, 可以用实时 PCR 测定 Akt 核苷酸的转录水平。转录活性的测定还可以包括基于可获得的 mRNA 转录物测量潜在的翻译活性。实时 PCR 以及其他 PCR 方法使用许多用于检测 PCR 产物的化学, 包括 DNA 结合荧光团的结合、5'内切核酸酶、邻近的线性和发夹寡聚探针 (oligoprobe) 和自身发荧光的扩增子。这些化学和实时 PCR 一般例如在 Mackay 等人, Nucleic Acids Res 30 (6): 1292-1305, 2002; Walker, J. Biochem. Mol. Toxicology 15 (3): 121-127,2001 ; Lewis 等人, J. Pathol. 195: 66-71,2001 中讨论。

在备选实施方案中, 通过将生物样品分离的核苷酸序列与选自图 6a-c、7a-d 或者 8a-c 的核苷酸序列的 Akt 序列或者其片段互补的序列的寡核苷酸探针接触, 然后通过探针与所述序列杂交检测该序列, 并将结果与

正常样品的结果比较,可以鉴定 Akt 的异常表达。通过使用任意可检测的试剂标记所述探针,可以检测探针与生物样品的杂交。探针可以例如用放射性同位素,或者用生物素、荧光染料、电子密度试剂、酶、半抗原或者可以得到其抗体的蛋白质来标记。可以通过任意希望的方法,包括光谱的、光化学的、生物化学的、免疫化学的、放射性同位素的、或者化学方法测定可检测的标记。该探针还可以用诸如寡聚体限制技术、斑点印迹测定、逆向斑点印迹测定、线探针测定,和 5'核酸酶测定来检测。备选地,可以使用通常应用的 DNA 阵列技术,包括大阵列 (macroarray)、微阵列和 DNA 芯片技术,可以检测探针。寡核苷酸探针通常包括与选自图 6a-c、7a-d 或者 8a-c 的核苷酸或者其片段杂交的约至少 14、15、16、18、20、25 或者 28 个核苷酸。通常不优选使用大于长约 25 或者 28 个核苷酸的探针。设计寡核苷酸探针来鉴定 Akt 核苷酸序列。

### 激酶测定法

可以使用本领域已知的任意合适的激酶测定法测量 Akt 激酶的活性。例如,并且不作为限制,可以使用 Hogg 等人(Oncogene 1994 9:98-96), Mills 等人(J. Biol. Chem. 1992 267 : 16000-006)和 Tomizawa 等人 2001 (FEBS Lett. 2001 492: 221-7), Schmant 等人, (J. Immunol. 1994,152 : 96-105)描述的方法。在 Ausubel 等人(Short Protocols in Molecular Biology, 1999, unit 17.6)中描述了其他丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸激酶测定法。

Akt 激酶测定法可以一般使用 Akt 多肽、经标记的供体底物,和对 Akt 特异或非特异的受体底物。在此类测定法中, Akt 将经标记的部分从供体底物转移到受体底物,并通过标记的部分从供体底物向受体底物转移的量测量激酶活性。Akt 多肽可以用多种表达系统产生,可以从细胞纯化,可以为切割的或者未切割的重组融合蛋白的形式和/或可以具有非-Akt 多肽序列,例如,在其 N-或者 C-末端具有 His 标记或者  $\beta$ -半乳糖苷酶。如果癌细胞系用作待测定的 Akt 的来源,那么可以在癌细胞系中测定 Akt 活性。Akt 测定的合适的供体底物包括对 Akt 的脱磷酸化敏感的任意分子,如包

括  $\gamma$ -标记的 ATP 和 ATP 类似物, 其中标记物为  $^{33}\text{P}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$  或者任意其他放射性同位素或者合适的荧光标记物。Akt 测定法的合适的受体底物包括对 Akt 的磷酸化敏感的任意多肽或者其他分子。受体底物可以来自 Akt 的体内靶标的片段。受体底物片段可以长为 8 到 50 个氨基酸, 通常长为 10 到 30 个氨基酸, 尤其约 10、12、15、18、20 和 25 个氨基酸。使用一组不同的多肽或者其他分子, 可以通过经验确定其他受体底物。一旦已经形成了反应物, 那么 TTK 的受体底物的靶标可以能够从反应物的其他组分纯化。该纯化通常通过分子相互作用进行, 其中受体底物经生物素化并通过其与链霉抗生物素蛋白的相互作用纯化, 或者可以利用特异抗体, 其可以特异识别受体底物。可以在多种条件下, 如在固相支持体、在凝胶中、在溶液中或者在活细胞中进行反应。检测方法的选择取决于用于供体分子的标记的类型, 并且可以包括例如, 通过放射自显影法、闪烁、扫描或者荧光自显影测量掺入的辐射或者荧光。

#### IV. 治疗方法

本文提供的化合物和药物组合物可以用于治疗包括肿瘤、癌症和其他与异常细胞增殖有关的疾病的状况。在一个实施方案中, 本发明的化合物可以用于治疗癌、肉瘤、淋巴瘤、白血病, 和/或骨髓瘤。在本发明的其他实施方案中, 本文公开的化合物可以用于治疗实体瘤。

本发明的化合物可以用于治疗癌症, 如但不限于, 下面器官或者组织的癌症: 乳腺、前列腺、肺、支气管、结肠、泌尿器、膀胱、非霍奇金淋巴瘤、黑素瘤、肾、肾脏、胰腺、咽、甲状腺、胃、脑、多发性骨髓瘤、食管、肝脏、肝内胆管、子宫颈、喉、急性髓性白血病、慢性淋巴细胞白血病、软组织, 如心脏、霍奇金淋巴瘤、睾丸、小肠、慢性髓性白血病、急性淋巴细胞白血病、肛门、肛管、肛门直肠、甲状腺、阴户、胆囊、侧甲、眼、鼻、鼻腔、中耳、鼻咽、输尿管、腹膜、网膜、肠系膜和胃肠、高级神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、结肠、直肠、胰腺、胃癌、肝细胞癌、头颈癌、癌、肾细胞癌、腺癌、肉瘤、血管内皮瘤、淋巴瘤、白血病、葶

样肉芽肿病 (mycosis fungoides)。在额外实施方案中, 本发明的化合物可以用于治疗皮肤病, 包括但不限于, 恶性疾病血管肉瘤、血管内皮瘤、基底细胞癌、鳞状细胞癌、恶性黑素瘤和卡波西肉瘤, 和非恶性疾病或者状况, 如银屑病、lymphangiogenesis、儿童血管瘤、斯-韦综合征、寻常疣、神经纤维瘤病、结节性硬化、脓性肉芽肿、隐性营养不良性大疱性表皮松懈、静脉曲张性溃疡、痤疮、红斑痤疮、湿疹、传染性软疣、脂溢性角化病和光化性角化病。

本发明的组合物可以用于治疗从癌症发现到晚期任何阶段的这些癌症和其他癌症。此外, 本发明的组合物可以用于治疗原发性癌症和其转移瘤。

在本发明的其他实施方案中, 本文描述的化合物可以用于治疗癌症, 包括, 但不限于下面表 2 中描述的癌症。

表 2: 癌症类型	
成人急性淋巴细胞白血病, 儿童急性淋巴细胞白血病, 成人急性髓性白血病, 儿童急性髓性白血病, 肾上腺皮质癌 儿童肾上腺皮质癌, 艾滋病-相关癌 艾滋病-相关淋巴瘤 肛门癌 儿童小脑星细胞瘤, 儿童大脑星细胞瘤, 基底细胞癌 肝外胆管癌 膀胱癌 儿童膀胱癌, 骨癌	毛细胞性白血病 头颈癌 成人(原发性)肝细胞(肝)癌, 儿童(原发性)肝细胞(肝)癌, 成人霍奇金淋巴瘤, 儿童霍奇金淋巴瘤, 妊娠期间霍奇金淋巴瘤 下咽癌 儿童下丘脑和视通路神经胶质瘤, 眼内黑素瘤 胰岛细胞癌(内分泌胰腺) 卡波西肉瘤 肾(肾细胞)癌 儿童肾癌, 喉癌 儿童喉癌

骨肉瘤/恶性纤维的 组织细胞瘤	成人急性淋巴细胞白血病 儿童急性淋巴细胞白血病
儿童脑干神经胶质瘤	成人急性髓性白血病
成人脑肿瘤	儿童急性髓性白血病
儿童脑肿瘤、脑干神经胶质瘤	慢性淋巴细胞白血病
小脑脑肿瘤	慢性髓细胞白血病
儿童星细胞瘤	B 细胞白血病
大脑脑肿瘤	唇和口腔癌
儿童星细胞瘤/恶性神经胶质瘤	成人(原发性)肝癌
儿童脑肿瘤, 室管膜瘤	儿童(原发性)肝癌
儿童脑肿瘤, 成神经管细胞瘤	非小细胞肺癌
幕上脑肿瘤	小细胞肺癌
儿童原始神经外胚层肿瘤	艾滋病相关的淋巴瘤
儿童脑肿瘤、视通路和下丘脑神经 胶质瘤	伯基特淋巴瘤
儿童脑肿瘤	表皮 T 细胞淋巴瘤, see
乳腺癌	蕈样肉芽肿病和塞泽里综合征
儿童乳腺癌	成人霍奇金淋巴瘤
男性乳腺癌	儿童霍奇金淋巴瘤
儿童支气管腺瘤/类癌瘤	妊娠期间霍奇金淋巴瘤
伯基特淋巴瘤	成人非霍奇金淋巴瘤
儿童类癌瘤	儿童非霍奇金淋巴瘤
胃肠类癌瘤	妊娠期间非霍奇金淋巴瘤
未知的主要中枢神经系统癌	主要中枢神经系统淋巴瘤
原发性淋巴瘤	瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症
儿童小脑星细胞瘤	骨的恶性纤维组织细胞瘤/骨肉瘤
儿童大脑星细胞瘤/恶性神经胶质 瘤	儿童成神经管细胞瘤
	黑素瘤
	眼内(眼)黑素瘤

<p>           子宫颈癌            儿童癌症            慢性淋巴细胞白血病            慢性髓细胞白血病            慢性骨髓增生性疾病            结肠癌            儿童结肠直肠癌            表皮 T 细胞淋巴瘤,see            蕈样肉芽肿病和塞泽里综合征            子宫内膜癌            儿童室管膜瘤            食管癌            儿童食管癌            Ewing 家族肿瘤            儿童颅外生殖细胞瘤            性腺外生殖细胞瘤            肝外胆管癌            眼癌, 眼内黑素瘤            眼癌, 视网膜成神经细胞瘤            胆囊癌            胃癌            儿童胃癌            胃肠类癌瘤            儿童颅外生殖细胞瘤            性腺外生殖细胞瘤            卵巢生殖细胞瘤            妊娠性滋养层细胞瘤            成人神经胶质瘤         </p>	<p>           Merkel 细胞癌            成人恶性间皮瘤            儿童间皮瘤            隐蔽原发的转移性鳞状颈癌            儿童多发性内分泌瘤形成综合征            多发性骨髓瘤/浆细胞赘生物            蕈样肉芽肿病            骨髓增生异常综合征            骨髓增生异常/骨髓组织增生病            慢性髓细胞性白血病            成人急性髓性白血病            儿童急性髓性白血病            多发性骨髓瘤            慢性骨髓增生病            鼻腔和鼻旁窦癌            鼻咽癌            儿童鼻咽癌            成神经细胞瘤            成人非霍奇金淋巴瘤            儿童非霍奇金淋巴瘤            妊娠期间非霍奇金淋巴瘤            非小细胞肺癌            儿童口腔癌            唇和口腔癌            口咽癌            恶性纤维骨肉瘤            骨的组织细胞瘤            儿童卵巢癌         </p>
---	---



<p>           儿童脑干神经胶质瘤            儿童大脑神经胶质瘤            星细胞瘤            儿童视通路和下丘脑神经胶质瘤            皮肤癌(黑素瘤)            Merkel 细胞皮肤癌            小细胞肺癌            小肠癌            成人软组织肉瘤            儿童软组织肉瘤            鳞状细胞癌, see            皮肤癌(非黑素瘤)            转移性隐蔽原发性鳞状颈癌            胃癌            儿童胃癌            儿童幕上原始性神经外胚层瘤            表皮 T 细胞淋巴瘤, see            蕈样肉芽肿病和塞泽里综合征            睾丸癌            儿童胸腺瘤            胸腺瘤和胸腺癌            甲状腺癌            儿童甲状腺癌            肾盂和输尿管移行细胞癌            妊娠期滋养层细胞瘤            成人未知原发部位癌            儿童未知原发部位癌            儿童罕见癌         </p>	<p>           卵巢上皮癌            卵巢生殖细胞瘤            卵巢低恶性潜力肿瘤            胰腺癌            儿童胰腺癌            胰岛细胞胰腺癌            鼻窦和鼻腔癌            甲状旁腺癌            阴茎癌            嗜铬细胞瘤            儿童成松果体细胞瘤和幕上原始神经            外胚层瘤            垂体瘤            浆细胞赘生物/多发性骨髓瘤            胸膜肺胚细胞瘤            妊娠和乳腺癌            妊娠和霍奇金淋巴瘤            原发性中枢神经系统淋巴瘤            前列腺癌            直肠癌            肾细胞(肾)癌            儿童肾细胞(肾)癌            肾盂和输尿管、移行细胞癌            视网膜成神经细胞瘤            儿童横纹肌肉瘤            唾液腺癌            儿童唾液腺            肉瘤, ewing 家族肿瘤         </p>
---	--

肾盂和输尿管移行细胞癌	卡波西肉瘤
尿道癌	成人软组织肉瘤
子宫内膜尿道癌	儿童软组织肉瘤
子宫肉瘤	子宫肉瘤
阴道癌	塞泽里综合征
儿童视通路和下丘脑神经胶质瘤	皮肤癌(非黑素瘤)
外阴癌	儿童皮肤癌
瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症	
维尔姆斯瘤	

在本发明的另一实施方案中，本文公开的化合物可以用于治疗血管发生相关的疾病。

抗血管发生的小分子包括沙立度胺，其部分通过抑制 NF  $\kappa$  B 起作用；2-甲氧基雌二醇，其影响微管活化和缺氧诱导因子(HIF1a)活化；环加氧酶2(COX2)抑制剂，和低剂量的常规化学治疗剂，包括环磷酰胺、紫杉烷类和长春花生物碱(长春新碱、长春碱)(D'Amato, R. J.等人(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 91,3964-3968, D'Amato, R. J.等人(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 91,40S2-4085)。此外，某些酪氨酸激酶抑制剂通过降低肿瘤和基质细胞的 VEGF 和其他促血管发生因子的产生，间接减少血管发生。这些药物包括 Herceptin、伊马替尼(Glivec)和 Iressa(Bergers, G.等人(2003)Journal of Clinical Investigation 111, 1287-1295, Ciardiello, F.等人(2001) Clinical Cancer Research 7,1459-1465, Plum, S. M.等人 (2003) Clinical Cancer Research 9, 4619-4626)。

最近，血管生成抑制剂已经从动物模型转移到人类患者。血管生成抑制剂代表多种癌症的有希望的治疗。最近，已经表明针对血管内皮生长因子(VEGF)的高亲和性抗体作为单一活性剂延长晚期肾细胞癌患者的寿命并且与化学疗法组合在晚期结肠癌中延长寿命(Yang, J. C.等人(2003) New England Journal of Medicine 349,427-434, Kabbinar, F. 等人(2003) Journal of Clinical Oncology 21,60-65)。

血管发生相关的疾病包括,但不限于,炎性、自身免疫和传染性疾病;依赖血管发生的癌,包括例如,实体瘤、血液发生的肿瘤,如白血病,和肿瘤转移;良性肿瘤,例如,血管瘤、听神经瘤、神经纤维瘤、沙眼和脓性肉芽肿;类风湿性关节炎;银屑病;湿疹;眼血管发生疾病,例如,糖尿病视网膜病、早熟性视网膜病、黄斑变性、角膜移植片排斥、新生血管性青光眼、晶状体后纤维组织形成、发红; Osler-Webber 综合征; 心肌血管发生; 斑块新生血管形成; 毛细血管扩张; 血友病性关节 (hemophiliac joint); 血管纤维瘤; 和伤口肉芽。此外,本发明的组合物可以用于治疗疾病,如,但不限于,肠粘连、动脉粥样硬化、硬皮病、疣突和肥大性癥(即癥痕瘤)。本发明的组合物还可以用于治疗由于病理学结果而具有血管发生的疾病,如猫抓病((*Rochela minalia quintosa*))、溃疡(*Helobacter pylori*)、结核病和麻风病。

#### 药物耐受性肿瘤或者癌症

本发明提供了可以用于治疗药物耐受性癌症的化合物,包括本文公开的癌症和药物的实施方案。在一个实施方案中,如本文公开的化合物,如 TCN、TCN-P 或者相关化合物可以与另一种药物共同施用。

多药物耐受性(MDR)可以在人类癌症中发生并且可以是化学疗法的成功的严重障碍。多药物耐受性是这样的现象,其中在体外暴露于一种细胞毒性剂的肿瘤细胞产生了对一系列结构上和功能上不相关化合物的交叉耐受性。此外,MDR 可以不预先暴露于化学治疗剂而内在地发生在一些癌症中。从而,在一个实施方案中,本发明提供了通过施用如本文公开的 TCN、TCN-P 或者相关化合物治疗患有药物耐受性癌症,如多药物耐受性癌症的患者的方法。在一些实施方案中,TCN、TCN-P 和相关化合物可以用于治疗耐受紫杉醇、雷帕霉素、他莫昔芬、顺铂和/或 gefitinib(iressa)的癌症。

在一个实施方案中,如本文公开的 TCN、TCN-P 或者相关化合物可以用于治疗结肠、骨、肾、肾上腺、胰腺、肝脏的药物耐受性癌症和/或本

领域已知的或者本文描述的任意其他癌症。

### 组合疗法

在本发明的一方面，本文公开的化合物和组合物可以与至少一种额外化学治疗剂组合。额外治疗剂可以与本文公开的化合物组合或者交替施用。药物可以形成相同组合物的部分，或者作为单独组合物提供以在同时或者不同时间施用。

在一个实施方案中，本文公开的化合物可以与抗血管发生剂组合以增强它们的有效性，或者与其他抗血管发生剂组合或者与其他细胞毒性剂一起施用。在另一实施方案中，化合物和组合物当用于治疗实体瘤时，可以与选自但不限于如下治疗剂一起施用：IL-12、类视黄醇、干扰素、血管他丁(angiostatin)、内皮他丁(endostatin)、沙立度胺、血小板反应蛋白-1、血小板反应蛋白-2、captopryl、抗-肿瘤形成剂，如 $\alpha$ 干扰素、COMP(环磷酰胺、长春新碱、氮甲喋呤和泼尼松)、依托泊苷、mBACOD(氮甲喋呤、博来霉素、阿霉素、环磷酰胺、长春新碱和地塞米松)、PRO-MACE/MOPP(泼尼松、氮甲喋呤(w/ leucovin rescue)、阿霉素、环磷酰胺、紫杉醇、依托泊苷/氮芥、长春新碱、泼尼松和甲基苄胍)、长春新碱、长春碱、angiinhibins、TNP-470、多硫酸戊聚糖、血小板因子4、血管他丁、LM-609、SU-101、CM-101、Techgalan、沙立度胺、SP-PG 和放射。在其他实施方案中，本文公开的化合物和组合物可以与例如，具有抗有丝分裂作用的药物组合或者交替施用，所述药物为诸如靶定细胞骨架成分的药物，包括微管调节剂，如紫杉烷药物(如，紫杉酚、紫杉醇、多西他赛(taxotere)、多西他赛(docetaxel))、鬼臼毒素或者长春花生物碱(长春新碱、长春碱)；抗代谢药(如5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷、吉西他滨、嘌呤类似物，如喷司他丁、氮甲喋呤)；烷化剂或者氮芥(如亚硝脲、环磷酰胺或者异环磷酰胺)；靶定DNA的药物，如蒽环类药物阿霉素、阿霉素、表柔比星或者表阿霉素；靶定拓扑异构酶的药物，如依托泊苷；激素和激素激动剂或者拮抗剂，如雌激素、抗雌激素药(他莫昔芬和相关化合物)和雄

激素、氟他米特、亮丙瑞林、性瑞林、环丙孕酮酯 (cyprotrone) 或者奥曲肽; 靶定肿瘤细胞中的信号转导的药物, 包括抗体衍生物, 如 herceptin; 烷基化药物, 如铂药物(顺铂、碳铂、奥沙利铂、卡铂)或者亚硝脲; 潜在影响肿瘤的转移的药物, 如基质金属蛋白酶抑制剂; 基因治疗和反义剂; 抗体治疗剂; 其他海洋来源的生物活性化合物, 特别是膜海鞘素 (didemnin), 如 aplidine; 类固醇类似物, 尤其是地塞米松; 抗炎药物, 包括非类固醇剂(如扑热息痛或者布洛芬), 或者类固醇和它们的衍生物, 尤其地塞米松; 止吐药, 包括 5HT-3 抑制剂 (如 gramisetron 或者 ondasetron), 和类固醇和它们的衍生物, 尤其地塞米松。在其他实施方案中, 化合物和组合物可以与下面表 3 中公开的化学治疗剂组合或者交替使用。

表 3: 化学治疗剂	
-13-顺式-视黄酸	-Neosar
-2-氨基-6-巯嘌呤	-Neulasta
-2-CdA	-Neumega
-2-氟脱氧腺苷	-Neupogen
-5-氟尿嘧啶	-Nilandron
-5-FU	-Nilutamide
-6-TG	-氮芥
-6-硫鸟嘌呤	-Novaldex
-6-巯嘌呤	-Novantrone
-6-MP	-奥曲肽
-Accutane	-醋酸奥曲肽
-放线菌素 D	-Oncospar
-阿霉素	-Oncovin
-Adrucil	-Ontak
-Agrylin	-Onxal

-Ala-Cort	-Oprevelkin
-阿地白介素	-Orapred
-阿仑单抗	-Orasone
-阿利维 A 酸	-奥沙利铂
-Alkaban-AQ	-紫杉醇
-Alkeran	-氨基二磷酸二钠
-全反式视黄酸	-Panretin
- $\alpha$ 干扰素	-卡铂
-六甲密胺	-Pediapred
-甲氧蝶呤	-PEG 干扰素
-阿米斯丁	-天门冬酰胺酶
-氨鲁米特	-Peg 非格司亭
-阿那格雷	-PEG-INTRON
-尼鲁米特	-PEG-L-天冬酰胺酶
-阿那曲唑	-苯丙氨酸氮芥
-阿糖胞苷	-顺铂
-Ara-C	-顺铂-AQ
-Aranesp	-泼尼松龙
-Aredia	-泼尼松
-Arimidex	-Prelone
-Aromasin	-甲基苄肼
-三氧化二砷	-PROCRIT
-天冬酰胺酶	-阿地流津
-ATRA	-Prolifeprospan 20with Carmustine
-Avastin	implant
-BCG	-巯嘌呤
-BCNU	-雷洛昔芬
-贝伐单抗	-Rheumatrex

-贝沙罗汀	-Rituxan
-比卡鲁胺	-利妥昔单抗
-BiCNU	-Roveron-A(干扰素-2a)
-硫酸博来霉素	-Rubex
-博来霉素	-盐酸柔红霉素
-Bortezomib	-善得定
-白消安	-善得定 LAR
-Busulfex	-沙格司亭
-C225	-Solu-Cortef
-亚叶酸钙	-Solu-Medrol
-Campath	-STI-571
-Camptosar	-链脲霉素
-喜树碱-11	-他莫昔芬
-卡培他滨	-Targretin
-Carac	-紫杉酚
-卡铂	-多西紫杉醇
-卡氮芥	-替莫唑胺
-卡氮芥糯米纸囊剂	-替莫唑胺
-Casodex	-替尼泊苷
-CCNU	-TESPA
-CDDP	-沙立度胺
-CeeNU	-Thalomid
-柔红霉素	-TheraCys
-西妥昔单抗	-硫鸟嘌呤
-苯丁酸氮芥	-硫鸟嘌呤片剂
-顺铂	-Thioplex
-嗜橙菌因子	-塞替派
-克拉屈滨	-TICE

-可的松	-Toposar
-更生霉素	-拓扑替康
-CPT-11	-托瑞米芬
-环磷酰胺	-曲妥单抗
-氟鲁米特	-维甲酸
-阿糖胞苷	-Trexall
-阿糖胞苷脂质体	-三氧二砷
-Cytosar-U	-TSPA
-环磷酰胺	-VCR
-达卡巴嗪	-Velban
-更生霉素	-Velcade
-Darbepoetin alfa	-VePesid
-道诺霉素	-Vesanoid
-柔红霉素	-Viadur
-盐酸柔红霉素	-长春碱
-柔红霉素脂质体	-硫酸长春碱
-枸橼酸柔红霉素脂质体	-Vincasar Pfs
-地卡特隆	-长春新碱
-Delta-Cortef	-长春烯碱
-Deltasone	-长春瑞滨
-Denileukin diftitox	-VLB
-DepoCyt	-VP-16
-地塞米松	-Vumon
-醋酸氟美松	-Xeloda
-dexamethasone sodium phosphate	-Zanosar
-Dexasone	-Zevalin
-右丙亚胺	-Zinecard
-DHAD	-Zoladex



-DIC	-唑来膦酸
-Diodex	-Zometa
-多西他赛	-卡氮芥糯米纸胶囊剂
-Doxil	-Glivec
-阿霉素	-GM-CSF
-阿霉素脂质体	-性瑞林
-Droxia	-粒细胞集落刺激因子
-DTIC	-粒细胞巨噬细胞集落刺激因子
-DTIC-Dome	-Halotestin
-Duralone	-Herceptin
-氟尿嘧啶	-地塞米松
-Eligard	-Hexalen
-Ellence	-六甲密胺
-奥沙利铂	-HMM
-Elspar	-Hycamtin
-Emeyt	-Hydrea
-表阿霉素	-Hydrocort Acetate
-阿法依伯汀	-氢化可的松
-Erbitux	-氢化可的松磷酸酯钠
-Erwinia L-门冬酰胺酶	-氢化可的松琥珀酸酯钠
-雌莫司汀	-Hydrocortone phosphate
-Ethyol	-羟基脲
-凡毕复	-Ibritumomab
-依托泊苷	-替伊莫单抗
-依托泊苷	-伊达比星
-Eulexin	-伊达比星
-Evista	-Ifex
-依西美坦	-IFN-alpha

-Fareston	-异环磷酰胺
-Faslodex	-IL-2
-Femara	-IL-11
-非格司亭	-甲磺酸伊马替尼
-氟尿苷	-咪唑羧酰胺
-Fludara	- $\alpha$ 干扰素
-氟达拉滨	-干扰素 $\alpha$ -2b(PEG 缀合物)
-Fluoroplex	-白细胞介素 2
-氟尿嘧啶	-I 白细胞介素-11
-氟尿嘧啶(乳膏剂)	-Intron A(干扰素 $\alpha$ -2b)
-氟氢甲睾酮	-亚叶酸
-氟他米特	-苯丁酸氮芥
-亚叶酸	-Leukine
-FUDR	-醋酸亮丙瑞林
-氟维司群	-长春新碱
-G-CSF	-克拉立平
-Gefitinib	-脂质体 Ara-C
-吉西他滨	-Liquid Pred
-Gemtuzumab ozogamicin	-罗氮芥
-Gemzar	-L-PAM
-Gleevec	-L-溶肉瘤素
-醋酸亮丙瑞林	-Meticorten
-Lupron Depot	-丝裂霉素
-Matulane	-丝裂霉素 C
-Maxidex	-米托蒽醌
-氮芥	-M-Prednisol
-盐酸氮芥	-MTC
-Medralone	-MTX

-Medrol	-氮芥
-Megace	-盐酸氮芥
-甲地孕酮	-丝裂霉素
-醋酸甲地孕酮	-马利兰
-苯丙氨酸氮芥	-Iressa
-巯嘌呤	-伊立替康
-美司钠	-异维甲酸
-Mesnex	-门冬酰胺酶
-甲氧喋呤	-Lanacort
-甲氧喋呤钠	-L-天门冬氨酸酰胺酶
-甲基氢化泼尼松	-LCR
-Mylocel	
-来曲唑	

在一些实施方案中，干扰素(IFN)可以与本发明的化合物组合使用。合适的干扰素包括：干扰素 $\alpha$ -2a、干扰素 $\alpha$ -2b、PEG化的干扰素 $\alpha$ ，包括干扰素 $\alpha$ -2a和干扰素 $\alpha$ -2b、

干扰素 $\beta$ 、干扰素 $\gamma$ 、干扰素 $\tau$ 、干扰素 $\omega$ 、InterMune的INFERGEN(干扰素 $\alpha$ con-1)、Viragen的OMNIFERON(天然干扰素)、Human Genome Sciences的ALBUFERON、Ares-Serono的REBIF(干扰素 $\beta$ -1a)、BioMedicine的 $\omega$ 干扰素、Amarillo Biosciences的口服干扰素 $\alpha$ ，和InterMune的干扰素 $\gamma$ 、干扰素 $\tau$ 和/或干扰素 $\gamma$ -1b。

在一个实施方案中，本文公开的TCN、TCN-P或者相关化合物可以与额外化学治疗剂，如本文描述或者表3中描述的化学治疗剂组合或者交替使用，用于治疗药物耐受性癌症，例如，多种药物耐受性癌症。药物耐受性癌症包括结肠癌、骨癌、肾癌、肾上腺癌、胰腺癌、肝癌和/或本领域已知的或者本文中描述的任意其他癌症。在一个实施方案中，额外的化学治疗剂可以是P-糖蛋白抑制剂。在一些非限制性实施方案中，P-糖蛋白抑

制剂可以是选自下面的药物：维拉帕米、环孢菌素(如环孢菌素 A)、他莫昔芬、钙调蛋白拮抗剂、右维拉帕米、右尼古地平、伐司朴达(PSC 833)、比立考达(VX-710)、tariquidar (XR9576)、zosuquidar (LY335979)、laniquidar(R101933)，和/或 ONT-093。

## V. 药物组合物

适于施用本文提供的化合物的药物载体包括本领域技术人员已知的适于特定施用方式的任何此类载体。可以将化合物配制成组合物中的唯一药学活性成分或者可以与其他活性成分组合。

包含本文公开的化合物的组合物可以适于经口、直肠、鼻、局部(包括口含和舌下)、阴道或者肠胃外(包括皮下、肌内、皮下、静脉内、皮内、眼内、气管内、池内、腹膜内和硬膜外)施用。

组合物可以方便地以单位剂型存在或者可以通过常规的制药技术制备。此类技术包括将本发明的一种或多种组合物和一种或多种药物载体或者赋形剂接触。

可以将化合物配制成合适的药物制剂，如溶液剂、混悬剂、片剂、溶散片、丸剂、胶囊剂、粉剂、缓释制剂或者酏剂，用于经口施用或者在无菌溶液或者混悬剂中用于肠胃外施用，以及透皮贴剂制剂和干粉吸入器。在一个实施方案中，使用本文中熟知的技术和步骤将上述化合物配制成药物组合物(见，例如，Ansel Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, Fourth Edition 1985,126)。

在组合物中，可以将有效浓度的一种或多种化合物或者其药学上可接受的衍生物与一种或多种合适的药物载体混合。化合物可以在配制前衍生为对应的盐、酯、烯醇醚或者酯、缩醛、缩酮、原酸酯、半缩醛、半缩酮、酸、碱、溶剂化物、水合物或者前体药物。组合物中的化合物的浓度在施用时有有效递送治疗、预防、或者减轻目标疾病或者病症的一种或多种症状的量。在一个实施方案中，配制组合物用于单剂量施用。为了配制组合物，将化合物的重量部分溶解、混悬、分散或者与所选的载体在有效浓度下混

合，使得减轻、预防所治疗的状况，或者减轻一种或多种症状。

适于经口施用的组合物可以作为离散单位存在，如但不限于，片剂、小胶囊、丸剂或者糖锭胶囊剂，或者扁囊剂，每种含有预定量的一种或多种组合物；作为粉剂或者粒剂；作为水性液体或者非水性液体中的溶液剂或者混悬剂；或者作为水包油乳剂或者油包水乳剂，或者作为大丸剂，等等。

例如，通过将如上定义的活性化合物和任选地药物佐剂在载体，如水、盐水、葡萄糖水溶液、甘油、二元醇、乙醇等等中溶解、分散，或者混合形成溶液或者悬浮液，可以制备液态的药学上可施用的组合物。如果希望，待施用的药物组合物可以还含有少量非毒性辅助物质，如增湿剂、乳化剂、增溶剂、pH缓冲剂、防腐剂、调味剂，等等，例如，乙酸盐、柠檬酸钠、环糊精衍生物、脱水山梨醇单月桂酸酯、三乙醇胺乙酸钠、三乙醇胺油酸酯和其他此类物质。制备此类剂型的方法是本领域技术人员已知或者将显而易见的；例如，见 *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 15th Edition, 1975。

适于在口中局部施用的本发明的组合物包括例如，锭剂，其在调味基底(通常蔗糖和阿拉伯树胶或者西黄蓍胶)中含有成分；软锭剂，其在惰性基底，如明胶和甘油，或者蔗糖和阿拉伯树胶中含有一种或多种本发明的组合物；和漱口剂，其在合适的液态载体中含有施用的一种或多种本发明的组合物。

片剂、丸剂、胶囊剂、含片等等含有一种或多种下面的成分，或者相似性质的化合物：粘合剂、润滑剂、稀释剂、助流剂、崩解剂、着色剂、增甜剂、芳香剂、增湿剂、催吐包衣，和膜包衣。粘合剂的实例包括微晶纤维素、西黄蓍胶、葡萄糖溶液、阿拉伯胶浆、明胶溶液、糖蜜、聚乙烯吡咯烷酮、聚维酮、交聚维酮、蔗糖和淀粉糊剂。润滑剂包括滑石粉、淀粉、硬脂酸镁或者硬脂酸钙、*lycopodium* 和硬脂酸。稀释剂包括例如，乳糖、蔗糖、淀粉、高岭土、盐、甘露醇和磷酸二钙。助流剂包括但不限于，二氧化硅胶体。崩解剂包括 *crosscarmellose* 钠、淀粉羟乙酸钠、海藻酸、

玉米淀粉、马铃薯淀粉、膨润土、甲基纤维素、琼脂和羧甲基纤维素。着色剂包括例如，批准的经过检验的水溶性 FD 和 C 染料的任一种，其混合物；悬浮在氢氧化铝上的水不溶的 FD 和 C 染料。增甜剂包括蔗糖、乳糖、甘露醇和人工增甜剂，如糖精，和任意多种喷雾干燥的香料。增香剂包括从植物如水果提取的天然香料和产生令人愉快的感觉的化合物的合成混合物，如，但不限于，薄荷油和水杨酸甲酯。增湿剂包括丙二醇单硬脂酸酯、去水山梨糖醇单油酸酯、二甘醇单硬脂酸酯和聚氧乙烯月桂醚。催吐包衣包括脂肪酸、脂肪、蜡、虫胶、氨化的虫胶和醋酸邻苯二甲酸纤维素。膜包衣包括羟乙基纤维素、羧甲基纤维素钠、聚乙二醇 4000 和醋酸邻苯二甲酸纤维素。

适于局部施用于皮肤的组合物可以以软膏剂、乳膏和糊剂存在，具有在药学上可接受的载体中施用的一种或多种组合物。

用于直肠施用的组合物可以用合适的基底作为栓剂存在，所述基底包含例如，可可脂或者水杨酸盐。

当载体是固体时，适于经鼻施用的组合物包括具有例如 20 到 500 微米范围的颗粒大小的粗粉，其以鼻剂的方式施用(即，通过从接近鼻子拿着的粉剂容器快速吸入通过鼻道)。当载体是液体(例如，鼻喷雾剂或者鼻滴剂)时，一种或多种组合物可以在水性或者油性溶液中混合，并吸入或者喷雾到鼻道中。

适于阴道施用的组合物可以以阴道栓剂、棉塞、乳膏、凝胶剂、糊剂、泡沫剂或者喷雾剂制剂存在，其含有一种或多种组合物和合适的载体。

适于肠胃外施用的组合物包括水性和非水性无菌注射溶液，其可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使得制剂与预期的接受者的血液等渗的溶质；和水性和非水性无菌混悬剂，其可以包括悬浮剂和增稠剂。组合物可以存在于单位剂量或者多剂量容器，如密封的安瓿和小瓶中，并且可以保存在冷冻干燥(冻干)条件下，仅需要在临使用前加入无菌液态载体，如注射用水。可以从上文前面描述的类型的不菌粉剂、粒剂和片剂制备临时注射溶液和悬浮液。

适于经肠或者肠胃外施用的药学有机或者无机固态或者液态载体可以用于制备组合物。明胶、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、滑石粉、植物和动物脂肪和油、树脂、聚(亚烷基)二醇、水或者其他已知的载体都适于作为载体介质。

组合物可以作为活性成分与一种或多种药学上可接受的载体介质和/或赋形剂组合施用。本文所用的“药学上可接受的载体介质”包括任意和所有载体、溶剂、稀释剂或其他液体赋形剂、分散或者悬浮助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂或者乳化剂、防腐剂、固体粘合剂、润滑剂、佐剂、赋形剂、递送系统、崩解剂、吸收剂、防腐剂、表面活性剂、着色剂、香料或者增甜剂等等，只要适合所希望的具体剂型。

此外，组合物可以与药学上可接受的赋形剂，和任选地缓释基质，如生物可降解的聚合物组合，形成治疗组合物。“药学上可接受的赋形剂”包括任意类型的无毒性固态、半固态或者液态填充剂、稀释剂、包胶材料或者配制辅料。

然而，将理解组合物的总的每日使用将由主治医生在合理的医学判断内决定。任何具体宿主的特定治疗有效剂量水平将取决于多种因素，包括例如，所治疗的病症和病症的严重性；所用的特定组合物的活性；所用的特定组合物、患者的年龄、体重、一般健康、性别和饮食；施用时间；施用途径；所用的特定化合物的排泄速率；治疗持续时间；与所用的特定组合物组合或者碰巧一起使用的药物；和医学领域熟知的类似因素。例如，本领域熟知在低于需要实现所希望的治疗效果的剂量水平的水平下开始组合物剂量，并逐渐增加剂量，直到实现所希望的效果。

组合物优选以剂量单位形式配制以容易施用和剂量的均匀性。本文所用的“剂量单位形式”指适于将治疗的宿主的组合物的物理上离散的单位。每个剂量将含有经计算组合物单独或者与所选的药物载体介质一起产生所希望的治疗效果所需的组合物的量。

优选的单位剂量制剂为含有日剂量或者单位、日亚剂量或者其合适部分的所施用的成分的单位剂量制剂。例如，每天约 1-5mg 本文公开的化合

物可以减小小鼠中实体瘤的体积。

剂量将取决于宿主因素，如体重、年龄、表面积、代谢、组织分布、吸收速率和排泄速率。在一个实施方案中，每天约 0.5 到 7g 本文公开的化合物可以施用于人。任选地，每天约 1 到 4g 化合物可以施用于人。在一些实施方案中，将 0.001-5mg/天施用于人。治疗有效剂量水平将取决于如上提到的许多因素。此外，本领域技术领域内已知以相对低的水平开始组合物的剂量，并增加剂量直到实现希望的效果。

包含本文公开的化合物的组合物可以与缓释基质一起使用，该缓释基质通常由聚合物材料制成，可以由通过酶促水解或者基于酸的水解或者通过溶解而降解。一旦插入到身体，该基质就受到酶和体液的作用。缓释基质例如选自生物相容的材料，如脂质体、聚丙交酯(聚乳酸)、聚乙醇酸交酯(乙醇酸的聚合物)、聚丙交酯共聚乙交酯(乳酸和乙醇酸的共聚物)、聚酞、聚原酸酯、多肽、透明质酸、胶原、硫酸软骨素、羧酸、脂肪酸、磷脂、多糖、核酸、聚氨基酸、氨基酸，如苯丙氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、多核苷酸、聚乙烯基丙烯 (polyvinyl propylene)、聚乙烯吡咯烷酮和硅酮。优选的生物可降解的基质是聚丙交酯、聚乙醇酸交酯、聚丙交酯共聚乙交酯(乳酸和乙醇酸的共聚物)之一的基质。

化合物还可以以脂质体形式施用。如本领域已知的，脂质体通常来自磷脂或者其他脂类物质。通过分散在水性介质中的单层或多层水合的液态晶体形成脂质体。可以使用能够形成脂质体的任意无毒的、生理上可接受的和可代谢的脂类。除了本发明的一种或多种组合物之外，脂质体可以含有稳定剂、防腐剂、赋形剂等等。脂类的实例是天然和合成的磷脂和磷脂酰胆碱(卵磷脂)。形成脂质体的方法是本领域已知的。

可以将化合物配制成气溶胶用以如通过吸入应用。这些施用到呼吸道的制剂可以为用于喷雾器的气溶胶或者溶液的形式，或者作为吹入法的细微粉剂的形式，它们单独或者与惰性载体如乳糖组合。在这种情况下，制剂的颗粒在一个实施方案中将具有小于 50 微米的直径，在一个实施方案中，具有小于 10 微米的直径。



包含本文公开的化合物的组合物可以与其他组合物和/或用于治疗上述状况的步骤组合使用。例如，肿瘤可以常规地用手术、辐射或者化学疗法组合一种或多种本发明的组合物治疗，然后一种或者多种本发明的组合物可以随后施用于患者以延长微转移的休眠并稳定、抑制或者减少残留的原发肿瘤的生长。

### 额外实施方案

主题发明的药物组合物可以根据制备药学上有用的组合物的已知方法配制。制剂在本领域公知并且本领域技术人员容易得到的许多来源中描述。例如，Renaington's Pharmaceutical Sciences (Martin EW [1995] Easton Pennsylvania, Mack Publishing Company, 19 版)描述了可以结合主题发明使用的制剂。适于施用的制剂包括例如，水性无菌注射溶液，其可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂，和使得制剂与预期的接受者的血液等渗的溶质；和水性和非水性无菌混悬液，其可以包括悬浮剂和增稠剂。制剂可以存在于单位剂量或者多剂量容器，如密封的安瓿和小瓶中，并且可以保存在冷冻干燥(冻干)条件下，仅需要在使用前加入无菌液态载体，如注射用水。可以从无菌粉剂、粒剂和片剂等制备临时注射溶液和悬浮液。将理解除了上面特别提到的成分外，主题发明的制剂还可以包括关于所讨论的制剂的类型在本领域中常规的其他活性剂。

本发明的例如抑制癌细胞生长的方法可以与至少一种额外治疗方法有利地组合，所述额外治疗方法包括但不限于，化学疗法、放射疗法，选择性抑制 Ras 致癌信号传递的疗法，或者治疗和控制癌症，如抗癌剂的施用领域中技术人员中已知的任意其他疗法。

可以进行作为盐的 API-2(曲西瑞宾)的施用。药学上可接受的盐的实例是与形成生理上可接受的阴离子的酸形成的有机酸加成盐，例如，甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、丙二酸盐、酒石酸盐、琥珀酸盐、苯甲酸盐、抗坏血酸盐、 $\alpha$ -酮戊二酸盐、和 $\alpha$ -甘油磷酸盐。还可以形成适宜的无机盐，包括盐酸盐、硫酸盐、硝酸盐、碳酸氢盐，和碳酸盐。

使用本领域公知的标准步骤，例如，通过将足够碱性化合物如胺与提供生理上可接受的阴离子的合适的酸反应，可以得到药学上可接受的盐。也可以制备羧酸的碱金属(例如，钠、钾或者锂)或者碱土金属(例如，钙)盐。

本发明的化合物可以配制成药物组合物并施用于受试者，如人或者兽医患者，可以以适于所选施用途径的多种途径，例如，经口或者肠胃外，通过静脉内、肌内、局部或者皮下途径施用。

从而，本发明的化合物可以与药学上可接受的赋形剂(即，载体)如惰性稀释剂或者可同化的可食用载体组合进行全身施用，例如，经口施用。它们可以封闭在硬或者软壳的明胶胶囊中，可以压缩成片剂，或者可以与患者膳食的食物直接掺合。对于经口治疗施用，化合物可以与一种或多种赋形剂组合并且以可摄入的片剂、含片、糖锭、胶囊剂、酞剂、混悬剂、糖浆剂、糯米纸囊剂等的形式使用。此类组合物和制剂将含有至少 0.1% 活性剂。组合物和制剂的百分数当然可以改变并且可以方便地为给定单位剂型重量的约 2 到约 60%。这种治疗上有用的组合物中活性化合物的量使得将获得有效剂量水平。

片剂、糖锭、丸剂、胶囊剂等等也可以含有下面的：粘合剂，如西黄蓍胶、阿拉伯树胶、玉米淀粉或者明胶；赋形剂，如磷酸二钙；崩解剂，如玉米淀粉、马铃薯淀粉、海藻酸等等；润滑剂，如硬脂酸镁；和增甜剂，如蔗糖、果糖、乳糖或者阿斯巴甜或者增香剂，如薄荷油、冬青油，或者樱桃香料。当单位剂型是胶囊剂时，它除了上面类型的物质外，还可以含有液态载体，如植物油或者聚乙二醇。多种其他物质可以作为包衣存在或者改变固体单位剂型的物理形式。例如，片剂、丸剂或者胶囊剂可以用明胶、蜡、虫胶或者糖等包衣。糖浆剂或者酞剂可以含有本发明的化合物、作为增甜剂的蔗糖或乳糖、作为防腐剂的羟苯基苯甲酸甲酯和羟苯基苯甲酸丙酯，染料和香料，如樱桃或者橙子香料。当然，用于制备任意单位剂型的任何物质将是药学上可接受的并且在所用的量下基本上无毒。此外，本发明的化合物可以掺入到缓释制剂和装置中。

活性剂(即, API-2 和其药学上可接受的盐)还可以通过灌注或者注射静脉内或者腹膜内施用。活性剂或者其盐的溶液可以用水制备, 任选与无毒性表面活性剂混合。可以用甘油、液态聚乙二醇、三醋精和其混合物和用油制备分散体。在普通储存和使用条件下, 这些制剂含有用于防止微生物生长的防腐剂。

适于注射或灌注的药物剂型可以包括无菌水性溶液剂或者分散剂或者无菌粉剂, 其包含适于无菌注射溶液或者灌注溶液或者分散体的临时制备的活性成分, 其任选封装在脂质体中。在所有情况下, 最终的剂型必须在生产和储存条件下是无菌的、液态和稳定的。液体载体或者运载体可以是溶剂或者液体分散介质, 其包含例如, 水、乙醇、多元醇(例如, 甘油、丙二醇、液体聚乙二醇, 等等)、植物油、无毒性甘油酯和其合适的混合物。例如, 通过形成脂质体, 对于分散体通过保持所需的颗粒大小或者通过使用表面活性剂, 可以保持适当的流动性。微生物活性的防止可以通过多种抗细菌和抗真菌剂, 例如, 对羟基苯甲酸酯、氯代丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等等进行。在许多情况中, 优选包括等渗剂, 例如, 糖、缓冲剂或者氯化钠。通过在组合物中使用延迟吸收的试剂, 例如, 单硬脂酸铝和明胶, 可以引起可注射组合物的延长吸收。

通过将本发明的化合物以所需的量与多种如上列举的其他成分掺入合适的溶剂, 如果需要, 接着过滤除菌, 来制备无菌注射溶液。对于用于制备无菌注射溶液的无菌粉剂的情况, 优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术, 其产生活性成分的粉剂加上前面的无菌过滤的溶液中存在的任何额外希望的成分。

对于局部施用, 本发明的化合物可以以纯的形式应用, 即, 当它们为液体时。然而, 通常希望将它们与皮肤病学上可接受的载体组合作为组合物或者制剂施用于皮肤, 所述载体可以是固体或者液体。

有用的固态载体包括细微的固体, 如滑石粉、粘土、微晶纤维素、二氧化硅、氧化铝等等。有用的液态载体包括水、醇或者二元醇或者水-醇/二元醇混合物, 其中本发明的化合物可以以有效水平溶解或者分散, 任选

借助无菌表面活性剂进行溶解或者分散。佐剂，如芳香剂和额外的抗微生物剂可以加入以优化给定用途的性质。所得液体组合物可以从吸收垫应用，用于浸渍绷带和其他敷料，或者使用泵类型或者气溶胶喷雾器喷雾到受影响的区域。

增稠剂，如合成聚合物、脂肪酸、脂肪酸盐和酯、脂肪醇、改性纤维素或者改性矿物材料也可以与液态载体使用以形成可扩散的糊剂、凝胶剂、软膏剂、肥皂等等，以直接应用于使用者的皮肤。可以用于将本发明的化合物递送到皮肤的有用的皮肤组合物的实例在 Jacquet 等人(美国专利号 4,608,392)、Geria (美国专利号 4,992,47S)、Smith 等人 (美国专利号 4,559,157) 和 Woltzman(美国专利号 4,820,508)中公开。

本发明的药物组合物的有用剂量可以通过将它们的体外活性和在动物模型中的体内活性比较来确定。用于将小鼠和其他动物中的有效剂量外推到人的方法是本领域已知的，例如，见美国专利号 4,938,949。

在一个非限制性实例中，液态组合物如洗剂中活性剂的浓度可以为约 0.1-25 wt-%，或者约 0.5-10 wt-%。在一个实施方案中，半固态或者固态组合物如凝胶或者粉剂中的浓度可以为约 0.1-5 wt-%，优选约 0.5-2.5wt-%。在一个实施方案中，对于成人，注射、灌注或者摄入的单次剂量将通常为 5-1500 mg，并且可以例如每天施用 1-3 次，以得到约 0.1-50 mg/kg 的水平。本发明的一个非限制性剂量可以为 7.5 到 45mg/天，经口施用，对于个体的体重进行适当调整。

因此，本发明包括如本文描述的 API-2 或者其药学上可接受的盐，与药学上可接受的载体组合的药物组合物。适于经口、局部或者肠胃外施用、包含一定量的 API-2 或者其药学上可接受的盐的药物组合物构成了本发明的优选实施方案。在本发明的上下文中，施用于受试者，尤其人的剂量将足以在患者中在合理的时间范围内实现治疗应答。本领域技术人员将认识到剂量将取决于多种因素，包括动物的状况、动物的体重，以及癌症的严重性和阶段。

合适的剂量是将在肿瘤组织中已知实现所希望的应答的活性剂的浓度

的剂量。优选的剂量是导致癌细胞生长的最大抑制，而没有难以控制的副作用的量。API-2(或者其药学上可接受的盐)的施用可以是连续的或者以不同的间隔施用，如本领域技术人员可以确定的。

从用于抑制癌症生长的所公开的方法受益的哺乳动物种类包括，但不限于，灵长类，如猿、黑猩猩、猩猩、人、猴子；驯养动物(例如，宠物)，如狗、猫、豚鼠、仓鼠、越南 pot-bellied 猪 (Vietnamese pot-bellied pigs)、兔、和雪貂；驯养的农场动物，如奶牛、水牛、野牛、马、猴、猪、绵羊和山羊；通常在动物园中发现的外来动物，如熊、狮、虎、豹、象、河马、犀牛、长颈鹿、羚羊、树懒、瞪羚、斑马、非洲大羚、草原土拨鼠、考拉、袋鼠、负鼠、浣熊、熊猫、土狼、海豹、海狮、海象、水獭、海豚、海豚、和鲸。本文所用的术语“患者”和“受试者”可以互换使用并且意在包括人和非人哺乳动物物种。同样地，本发明的体外方法可以应用于(earned out on)此类哺乳动物种类的细胞。

使用本发明的方法，可以用医药领域中技术人员已知的标准技术鉴定需要治疗的患者。

下面的实施例为了阐明而提供并且不作为限定。

## 实施例

### 实施例 1: 体外筛选

#### 材料

细胞系和 NCI 多样性集合。用于该研究的所有细胞系都从 ATCC 购买或者在以前描述(Cheng, J. Q., 等人 *Oncogene*, 14 : 2793-2801, 1997, West, K. A., 等人 *Drug Resist. Updat.*, 5 :234-248, 2002, Satyamoorthy, K., 等人 *Cancer Res.* 61 : 7318-7324, 2001)。NCI 结构多样性集合(NCI Structural Diversity Set)是选自约 140,000 种化合物-NCI 药物保藏所的 1,992 种化合物。对这些多样性集合化合物的选择、结构和活性的深入数据可以在 NCI Developmental Therapeutics Program 网站上找到。

Akt 转化的细胞生长的抑制的筛选。将 AKT2 转化的 NIH3T3 细胞或

者 LXSXN 载体转染的 NIH3T3 对照细胞(Cheng, J. Q., 等人 *Oncogene*,14: 2793-2801, 1997)接种在 96 孔组织培养板中。用 5  $\mu$ M NCI 多样性集合化合物处理后,用 CellTier 96 One Solution Cell Proliferation 试剂盒 (Promega)检测细胞生长。抑制 AKT2 转化的但不抑制 LXSXN 转染的 NIH3T3 细胞生长的化合物认为是 Akt 抑制剂的候选物并进行进一步分析。

体外蛋白质激酶、细胞存活和细胞凋亡测定。 如以前描述的进行体外激酶(见,例如, Jiang, K., Coppola, 等人 *Mol. Cell. Biol.*,20:139-148, 2000)。用 MTS (Promega)测定细胞存活。用膜联蛋白 V 检测细胞凋亡,如以前描述的进行(Jiang, K., Coppola, 等人 *Mol. Cell. Biol.*,20 : 139-148, 2000)。重组 Akt 和 PDK1 购自 Upstate Biotechnology Inc。

## 结果

Akt 信号传递途径的小分子抑制剂 API-2 的鉴定。 已经在人类癌症中检测到 Akt 的频繁改变,并且 Akt 途径的破坏诱导细胞凋亡并且抑制肿瘤生长(Jetzt, A., 等人 *Cancer Res.*, 63 : 697-706,2003)。从而,已经将 Akt 认为是开发新的癌症治疗剂的有吸引力的分子靶标。为了鉴定 Akt 的小分子抑制剂,如“材料和方法”中描述的,对来自 NCI(NCI 多样性集合)的 1992 种化合物的化学文库评估能够抑制 AKT-2 转化的但是不抑制空白载体 LXSXN 转染的 NIH3T3 的生长的活性剂。重复实验表明 32 种化合物仅抑制 AKT-2 转化的细胞中的生长。这些化合物的最强烈的化合物 API-2(NCI 标识符: NSC 154020)在 50 nM 浓度下抑制细胞生长。图 1A 显示了 API-2 的化学结构,API-2 也已知为曲西瑞宾(Schweinsberg, P. D., 等人 *Biochem Pharmacol.*,30 : 2521-2526, 1981)。相对于未转化的亲代细胞,API-2 选择性抑制 AKT-2 转化的细胞这一事实促使我们确定 API-2 是否是 AKT2 激酶的抑制剂。为此,用 API-2 处理后,将 AKT2 用来自 AKT-2 转化的 NIH3T3 细胞的抗-AKT2 抗体免疫沉淀。将 AKT2 免疫沉淀物用抗-磷酸-Akt 抗体免疫印迹。如图 1B 中所示,API-2 显著抑制苏氨酸-309 和丝氨酸-474 处 AKT2 磷酸化,其是 AKT2 的完全活化所需的(Datta, S. R.,

等人 *Genes Dev.* 13 : 2905-2927, 1999)。由于 Akt 的三种同种型具有高同源性和相似的结构，所以评估 API-2 对它们的激酶活性的影响。将 HEK293 细胞用 HA-Akt1、HA-AKT2 和 HA-AKT3 转染，血清饥饿过夜并用 API-2 处理 60 分钟后用 EGF(50 ng/ml)刺激。一式三份实验表明 API-2 抑制 Akt1、AKT2 和 AKT3 的 EGF 诱导的激酶活性和磷酸化(图 1C)。然而，在体外激酶反应中，API-2 不抑制重组组成性活性 AKT2(Myr-AKT2)的激酶活性(图 1D)，提示 API-2 不直接抑制体外 Akt 并且 API-2 既不作为 ATP 竞争剂也不作为结合 Akt 的活性部位的底物竞争剂。

API-2 不抑制 Akt 的已知的上游活化剂。 已经详细记载 Akt 被细胞外刺激物和细胞内信号分子，如活性 Ras 和 Src，通过依赖 PI3K 的方式活化。因此，Akt 的 API-2 抑制可以从靶定 Akt 上游分子引起。由于 PI3K 和 PDK1 是 Akt 的直接上游调节物(Datta, S. R. , 等人 *Genes Dev.* 13 : 2905-2927, 1999)，所以检查 API-2 抑制 PI3K 和/或 PDK1。将 HEK293 细胞用血清饥饿，然后用 API-2 或者 PI3K 抑制剂渥曼青霉素处理 30 分钟后进行 EGF 刺激。将 PI3K 用抗-p110  $\alpha$  抗体免疫沉淀。用 PI-4-P 作为底物将免疫沉淀物进行体外 PI3K 激酶测定。如图 2A 中所示，EGF 诱导的 PI3K 活性受到渥曼青霉素抑制，但不受 API-2 抑制。为了评估 API-2 对 PDK1 的影响，使用在含有磷脂酰肌醇的脂囊泡的存在下的测定法，其中重组 PDK1 促进 AKT2 肽的苏氨酸-309 磷酸化。如图 2B 中所示，该测定受到对照 PDK1 抑制剂星形孢菌素的强烈抑制(IC<sub>50</sub>=5nM)。相比，API-2 在测试的最高浓度(5.1  $\mu$ M)下仅显示出该测定的 21%抑制。这些数据表明 API-2 不是 PDK1 的强烈抑制剂。为了进一步评估 API-2 对 PDK1 激活的作用，用 API-2 处理 HEK293 细胞后，检查了 PDK1 在丝氨酸-241 的自磷酸化水平，丝氨酸-241 是自身磷酸化的残基并且对于 PDK1 的活性是关键(Datta, S. R. , 等人 *Genes Dev.* 13 : 2905-2927, 1999)。一式三份的实验表明 PDK1 的磷酸化水平不受到 API-2 的抑制(图 2B)。然而，PI3K 抑制剂渥曼青霉素如所预期的抑制 EGF-刺激的 PDK1(图 2B)。

API-2 对于 Akt 相对于 PKC、PKA、SGK、STAT、JNK、p38 和 ERK

信号传递途径具有高度选择性。Akt 属于 AGC (PKA/PKG/PKC) 激酶家族, 其也包括 PKA、PKC、血清和糖皮质激素可诱导的激酶(SGK)、p90 核糖体 S6 激酶、p70<sup>S6K</sup>、促分裂原和胁迫激活的蛋白激酶和 PKC 相关的激酶。在 AGC 激酶家族中, PKA、PKC 和 SGK 的蛋白质结构相对于其他成员更接近 Akt 激酶。因此, 接着检查的是 API-2 对这三种激酶的酶活性的影响。将 HEK293 细胞用 HA 标记的 PKA、PKC $\alpha$  或者 SGK 转染。体外激酶测定和免疫印迹分析表明 PKA 和 PKC $\alpha$  的激酶活性分别受到 PKAI 和 Ro 31-8220(一种 PKC 抑制剂)的抑制, 而 API-2 对它们的活性不显示出作用(图 2C 和 2E)。此外, 血清诱导的 SGK 激酶活性受到渥曼青霉素但不受到 API-2 的减弱(图 2D)。此外, 确定了 API-2 对其他致癌存活途径具有影响。用通过商业途径可获得的抗-磷酸-抗体进行蛋白质印迹分析揭示 Stat3、JNK、p38 和 Erk1/2 的磷酸化水平不受到 API-2 处理的影响(图 2F)。这些数据表明 API-2 特异抑制 Akt 信号途径。

API-2 抑制 Akt 过表达/活化的人癌细胞系中细胞生长并诱导细胞凋亡。API-2 选择性抑制 Akt 途径的能力提示它将在 Akt 的异常表达/活化的那些肿瘤细胞中优先抑制增殖和/或诱导细胞凋亡。由于人恶性肿瘤中 Akt 的活化通常由 Akt 或者 PTEN 突变的过表达引起, 所以用 API-2 处理由于 AKT2 的过表达引起的组成性表达活性 Akt 的细胞(OVCAR3、OVCAR8、PANC1 和 AKT2-转化的 NIH3T3)或者 PTEN 基因的突变引起的组成性表达活性 Akt 的细胞(PC-3、LNCaP、MDA-MB-468), 和不表达活性 Akt 的细胞(OVCAR5、DU-145、T47D、COLO357 和 LXSN-NIH3T3)以及被 IGF-1 活化而激活 Akt 或者不应答 IGF-1 的生长刺激的黑素瘤细胞(Satyamoorthy, K., 等人 Cancer Res. 61 : 7318-7324, 2001)。免疫印迹分析表明仅在表达升高的 Akt 或者应答 IGF-1 刺激的细胞中, API-2 抑制 Akt 的磷酸化水平(图 3A)。因此, 与具有低水平的 Akt 的细胞相比, 在 Akt 过表达/活化的细胞中, API-2 抑制细胞生长的程度更高。如图 3B 中所示, 在过表达/激活 Akt 的细胞系 LNCaP、PG-3、OVCAR3、OVCA8、PANC1、MDA-MB-468 和 WM35 中, API-2 处理抑制约 50-60%的细胞增殖, 而在



显示出低水平 Akt 或者不应答 IGF-1 的生长刺激的 DU145、OVCAR5、COLO357、T47D 和 WM852 细胞中仅抑制约 10-20%。此外, API-2 诱导 8 倍(OVCAR3)、6-倍 (OVCAR8)、6-倍(PANC1)和 3-倍(AKT2-NIH3T3)的细胞凋亡。在 OVCAR5、COLO357 和 LXSNIH3T3 细胞中, API-2 和载体(DMSO)处理之间没有观察到细胞凋亡的显著差异。从而, API-2 抑制细胞生长并且在表达异常 Akt 的细胞中优先诱导细胞凋亡。

API-2 抑制 Akt 的下游靶标。 已经表明 Akt 通过许多蛋白质的磷酸化发挥其细胞作用(Datta, S. R., 等人 Genes Dev.13 : 2905-2927,1999)。已经鉴定了 20 种以上的蛋白质为 Akt 底物, 包括 Forkhead 蛋白质家族成员(FKHR、AFX 和 FKHL1)、tuberlin/TSC2、p70<sup>S6K</sup>、GSK-3 $\beta$ 、p21<sup>WAF1/Cip1</sup>、p27<sup>kip1</sup>、MDM2、Bad、ASK1 和 IKK $\alpha$  等。接下来检查 API-2 是否抑制 Akt 的下游靶标。由于抗-磷酸-tuberlin、-Bad、-AFX 和-GSK-3 $\beta$  抗体可以通过商业途径获得, 所以, 确定了 API-2 对它们的 Akt 诱导的磷酸化的影响。API-2(1  $\mu$ M)处理后, 将 OVCAR3 细胞裂解并用单独的抗-磷酸抗体免疫印迹。图 4A 表明 API-2 显著抑制 tuberlin 的磷酸化水平, 导致 tuberlin 的稳定和上调(Dan, H.C., 等人 J. Biol. Chem.,277 : 35364-35370, 2002)。Bad、GSK-3 $\beta$  和 AFX 的磷酸化水平被 API-2 部分减弱。这些数据提示 API-2 通过抑制其下游靶标的磷酸化诱导细胞死亡和细胞生长抑制。Akt 下游靶标在不同程度上的 API-2 抑制可以是因为这些靶标的磷酸化部位也受到其他激酶的调节这一事实, 例如, Bad 丝氨酸-136 除了被 Akt 之外还被 PAK1 磷酸化(Schurmann, A., 等人 Mol. Cell. Biol. , 20: 453-461,2000)。

#### 实施例 2: 裸鼠肿瘤异种移植物模型中抗肿瘤活性

收获肿瘤细胞, 重悬浮在 PBS 中, 并皮下注射到 8 周龄的雌性裸鼠的右和左肋( $2 \times 10^6$  个细胞/肋)中, 如以前报导(Sun, J., Blaskovic, 等人 Cancer Res., 59:4919-4926, 1999)。当肿瘤达到约 100-150mm<sup>3</sup> 时, 将动物随机化并用 0.2ml 药物载体每天腹腔内给药。对照动物接受 DMSO(20%)

载体，而处理的动物用 20%DMSO 中的 API-2(1 mg/kg/天)注射。

API-2 抑制过表达 Akt 的裸鼠中肿瘤的生长。显示了人卵巢癌和胰腺癌中 AKT1 和 AKT2 的频繁过表达/活化和/或扩增(Cheng, J. Q., 和 Nicosia, S. V. AKT signal transduction pathway in oncogenesis. In Schwab D, Editor, Encyclopedic Reference of Cancer. Berlin Heidelberg and New York : Springer; 2001. pp 35-7). PI3K、HSP70、Src 和法尼基转移酶的抑制剂对 Akt 途径的抑制导致细胞生长抑制和细胞凋亡的诱导(Solit, D. B., 等人 Cancer Res., 63 : 2139-2144, 2003, Xu, W., 等人 Cancer Res., 63: 7777-7784,2003)。最近的研究表明通过肿瘤内注射显性失活的 Akt 腺病毒，也显著抑制了具有升高的 Akt 的异种移植物的肿瘤生长(Jetzt, A., 等人 Cancer Res., 63 : 697-706, 2003)。因为 API-2 抑制 Akt 信号传递并且诱导细胞凋亡并且仅在 Akt 水平升高的癌细胞中细胞生长受到抑制(图 3)，所以在裸鼠中，具有升高水平的 Akt 的肿瘤的生长比具有低水平 Akt 的肿瘤对 API-2 更敏感。为此，将过表达 Akt 的细胞(OVCAR3、OVCAR8 和 PANC-1)皮下植入小鼠右肋，并将表达低水平的 Akt 的那些细胞系(OVCAR5 和 COLO357)植入小鼠的左肋。当肿瘤达到约 100-150mm<sup>3</sup> 的平均大小时，将动物随机化并用载体或者 API-2(1mg/kg/天)腹膜内处理。

如在图 4B 中图解的，用载体处理的 OVCAR-5 和 COLO357 肿瘤在肿瘤植入后 49 天生长到约 800-1,000 mm<sup>3</sup>。用载体对照处理的 OVCAR3、OVCAR8 和 PANC1 肿瘤在肿瘤植入后 49 天生长到约 700-900mm<sup>3</sup>。API-2 将 OVCAR3、OVCAR8 和 PANC1 肿瘤生长分别抑制 90%、88%和 80%。相比，API-2 对裸鼠中 OVCAR5 和 COLO357 细胞的生长没有影响(图 4B-4D 并且数据未显示)。在剂量 1mg/kg/天下，API-2 对小鼠的血糖水平、体重、活动和食物摄入没有影响。在处理的肿瘤样品中，Akt 活性受到 API-2 抑制，总的 Akt 含量没有改变(图 4E)。总之，这些结果表明 API-2 选择性抑制具有升高水平的 Akt 的肿瘤的生长。

### 实施例 3: TCN 直接抑制野生型 Akt 激酶活性

API-2(TCN)可以直接抑制体外 PDK 诱导的野生型 Akt 激酶活性(图 1)。该结果支持 API-2 是直接 Akt 抑制剂这一论断并且根本的机制可能是 API-2 对 Akt 的 PH 结构域和/或苏氨酸-308 的结合。在含有磷脂酰肌醇-3,4,5-P3(PIP3)、API-2 和组蛋白 H2B 作为底物的激酶缓冲液中,用 PDK1 和 Akt 的重组体进行体外激酶测定。温育 30 分钟后,通过 SDS-PAGE 分离反应物并对胶片曝光。

#### 实施例 4: TCN 在癌症耐受性细胞中有效

在顺铂、紫杉醇和他莫昔芬耐受的 A270CP、C-13、OVCAR433 和 MCF7/TAM 细胞中测试了 TCN (API-2)的效果。API-2 克服了这些细胞中顺铂、紫杉醇和他莫昔芬耐受性。

本发明已经参考其优选实施方案进行了描述。根据本发明前面的详细描述,本发明的变通方案和修改将是本领域技术人员显而易见的。所有这些变通方案和修改都将意在包括在本发明的范围内。

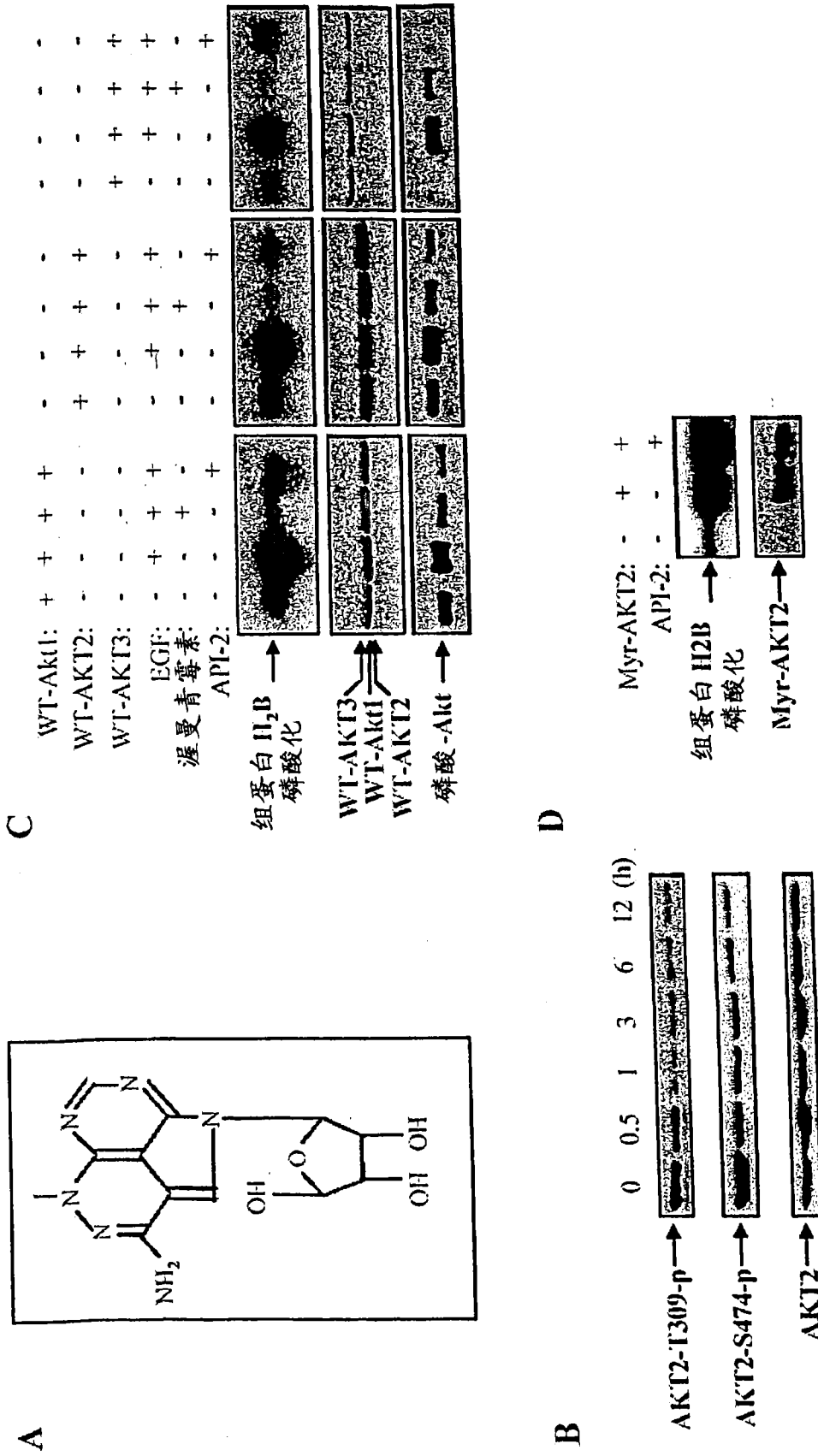


图 1

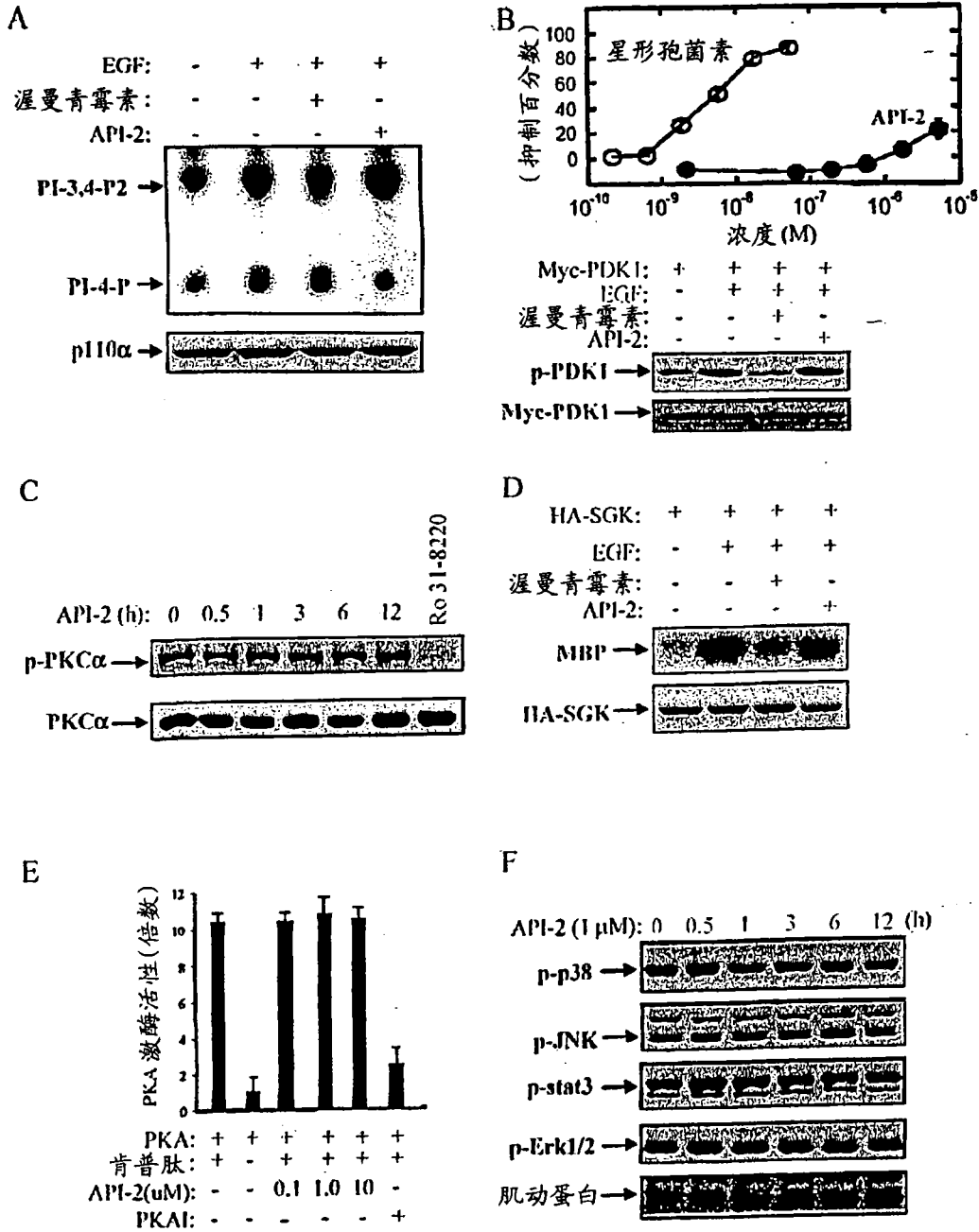
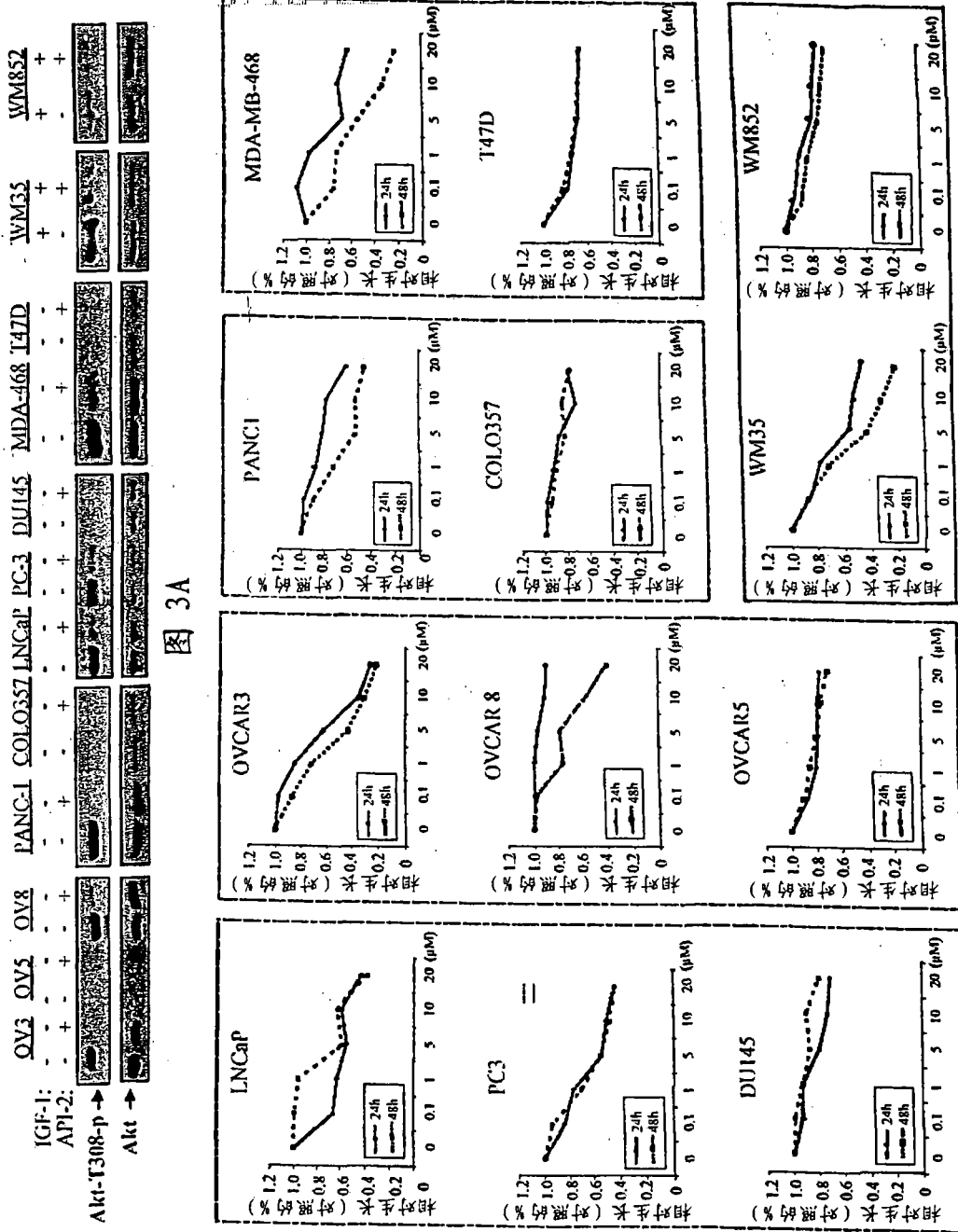


图 2



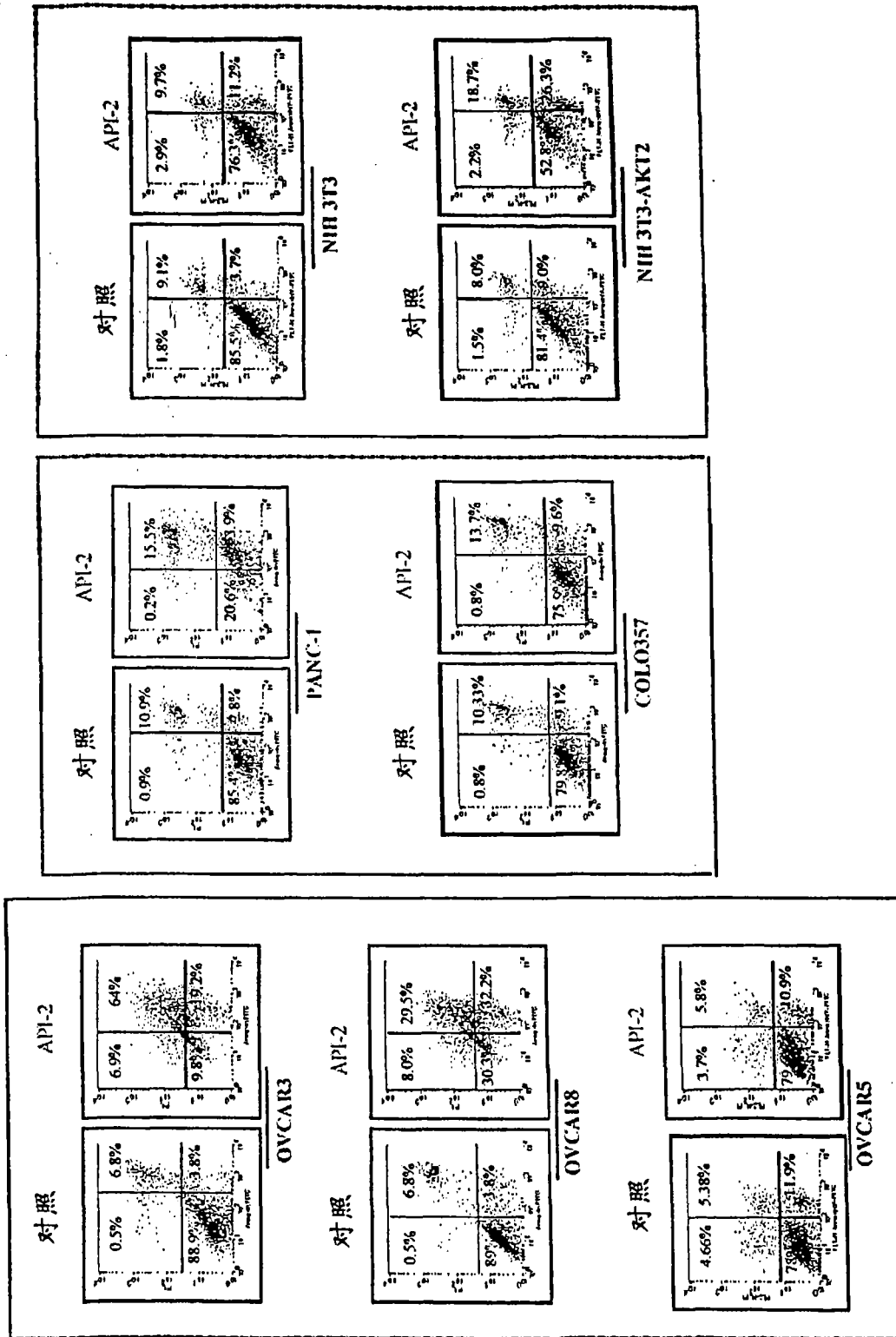


图 3C

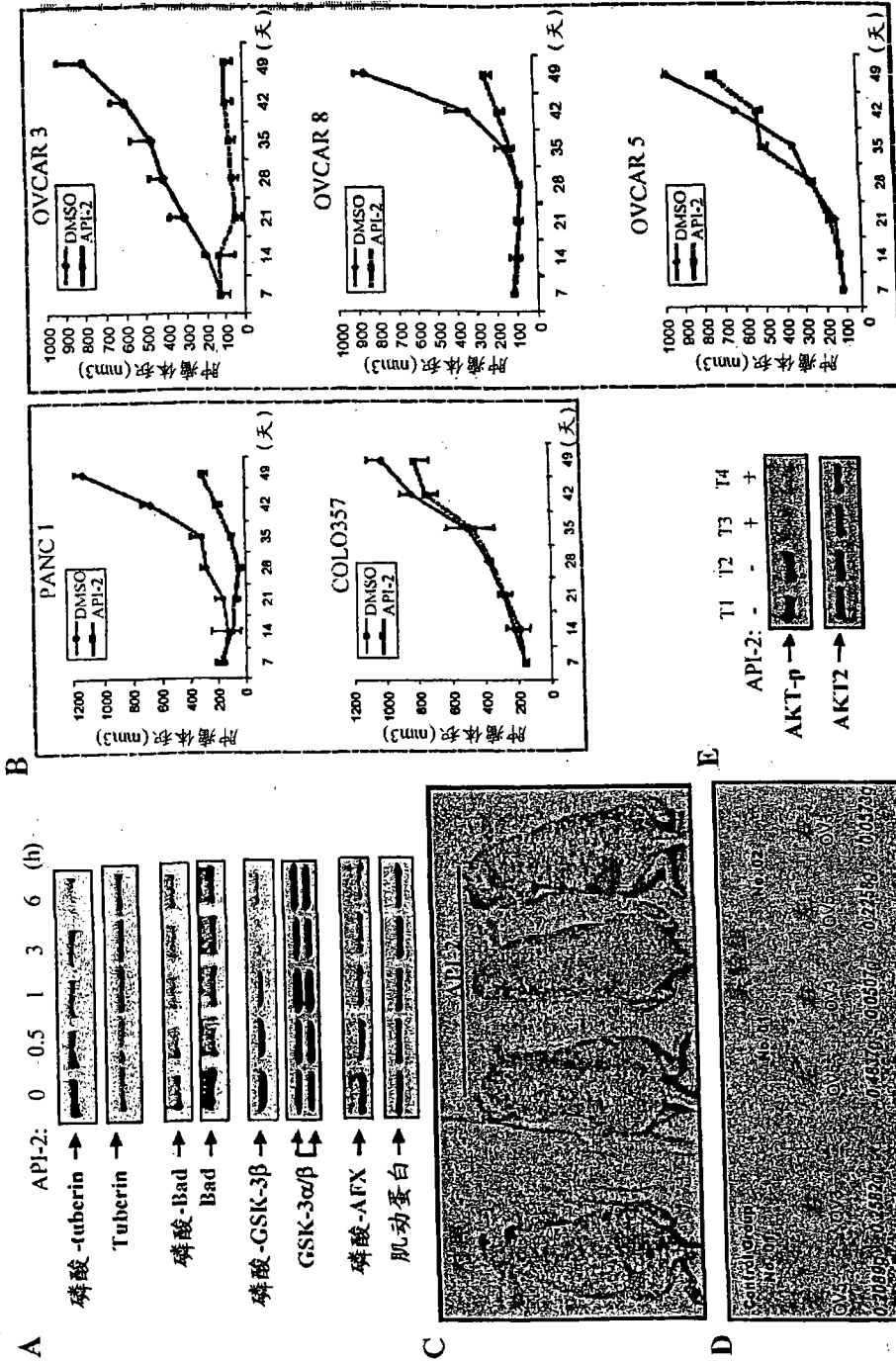


图 4



PIP3:	-	+	+	+	+
PDK1:	-	+	+	+	+
Akt:	+	+	+	+	+
API-2:	-	-	-	25	10 ( $\mu$ M)



图 5

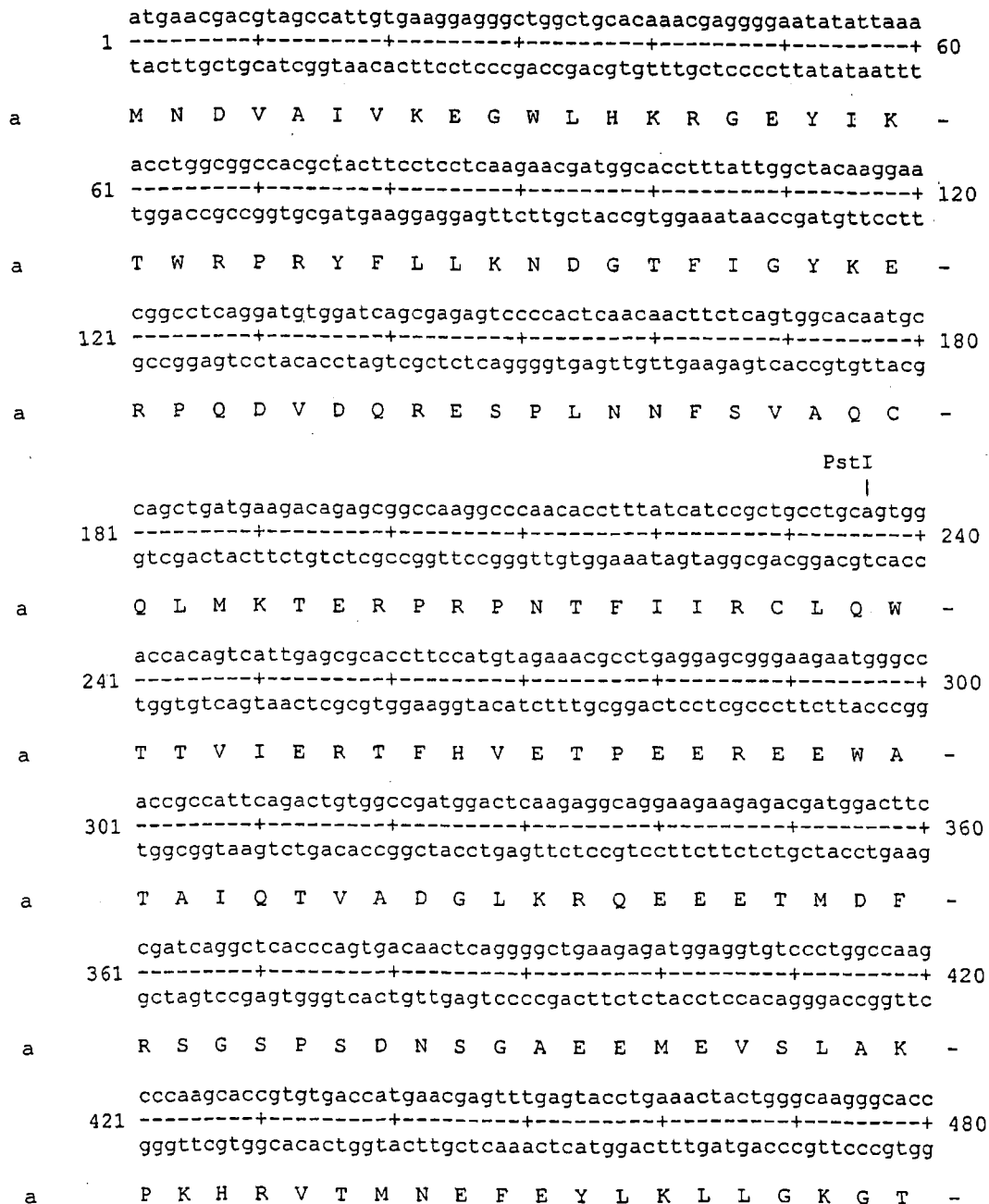


图 6a

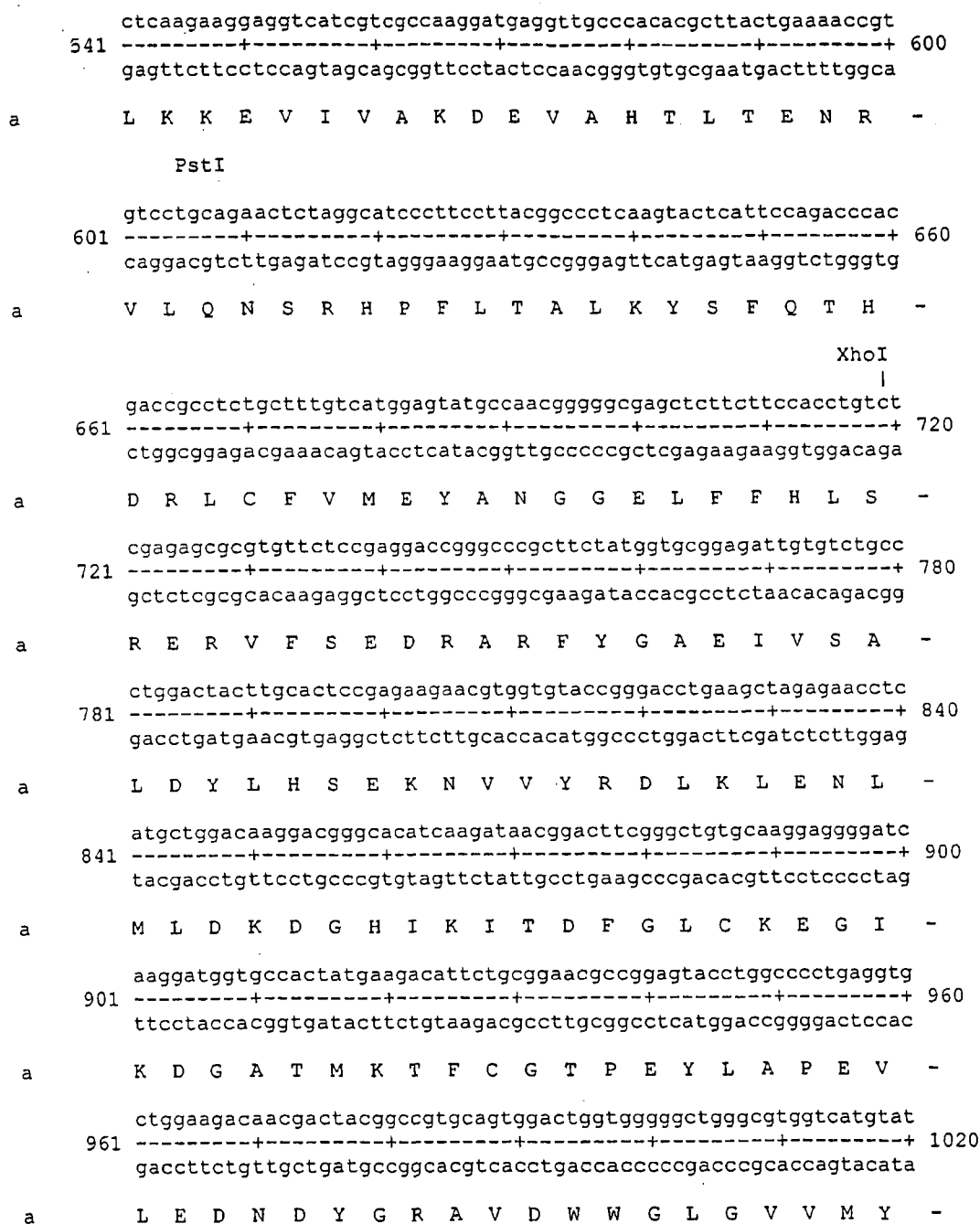


图 6b

```

gagatgatgtgtggccgcctgccccttctacaaccaggaccacgagaagctgttcgagctg
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
ctctactacacaccggcgacgggaagatgttggtcctggtgctcttcgacaagctcgac
a      E M M C G R L P F Y N Q D H E K L F E L -

atcctcatggaggagatccgcttcccgcgcacactcggccctgaggccaagtccttgctc
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
taggagtacctcctctaggcgaagggcgcggtgtgagccgggactcgggttcagggacgag
a      I L M E E I R F P R T L G P E A K S L L -

tccgggctgctcaagbaggacctacacagaggctcgggtggggctctgaggatgccaaag
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
aggcccgcagagttcttctcgggatgtgtctccgagccacccccgagactcctacggttc
a      S G L L K K D P T Q R L G G G S E D A K -

gagatcatgcagcaccggttctttgccaacatcgtgtggcaggatgtgtatgagaagaag
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
ctctagtacgtcgtggccaagaaacgggtgtagcacaccgtcctacacatactcttcttc
a      E I M Q H R F F A N I V W Q D V Y E K K -

ctgagcccacctttcaagccccagggtcacctctgagactgacaccaggatatttcgatgag
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320
gactcgggtggaaagtccggggtccagtgaggactctgactgtggtccataaagctactc
a      L S P P F K P Q V T S E T D T R Y F D E -

gagttcacagctcagatgatcaccatcacgccgectgatcaagatgacagcatggagtgt
1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
ctcaagtgtcgagtctactagtggtagtgccggcgactagttctactgtcgtacctcaca
a      E F T A Q M I T I T P P D Q D D S M E C -

gtggacagtgagcggaggccgcacttccccagttctcctactcagccagtggcacagcc
1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
cacctgtcactcgcctccggcgtgaaggggggtcaagaggatgagtcggtcaccgtgtcgg
a      V D S E R R P H F P Q F S Y S A S G T A -

tga
1441 --- 1443
act
a      * -

```

图 6c

```

ATGAATGAGGTGTCTGTCATCAAAGAAGGCTGGCTCCACAAGCGTGGTGAATACATCAAG
328 --+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 387
TACTTACTCCACAGACAGTAGTTTCTCCGACCGAGGTGTTCCGCACCACTTATGTAGTTC
a      M N E V S V I K E G W L H K R G E Y I K -
ACCTGGAGGCCACGGTACTTCTGCTGAAGAGCGACGGCTCCTTCATTGGGTACAAGGAG
388 --+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 447
TGGACCTCCGGTGCCATGAAGGACGACTTCTCGCTGCCGAGGAAGTAACCCATGTTTCCTC
a      T W R P R Y F L L K S D G S F I G Y K E -
AGGCCCGAGGCCCTGATCAGACTCTACCCCCCTTAAACAACCTTCTCCGTAGCAGAATGC
448 --+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 507
TCCGGGCTCCGGGGACTAGTCTGAGATGGGGGAATTTGTTGAAGAGGCATCGTCTTACG
a      R P E A P D Q T L P P L N N F S V A E C -
                                           PstI
                                           |
CAGCTGATGAAGACCGAGAGGCCGCGACCCAACACCTTTGTCATACGCTGCCTGCAGTGG
508 --+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 567
GTCGACTACTTCTGGCTCTCCGGCGCTGGGTTGTGGAACAGTATGCGACGGACGTCACC
a      Q L M K T E R P R P N T F V I R C L Q W -
ACCACAGTCATCGAGAGGACCTTCCACGTGGATTCTCCAGACGAGAGGGAGGAGTGGATG
568 --+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 627
TGGTGTCTAGTACTCTCCTGGAAGGTGCACCTAAGAGGTCTGCTCTCCCTCCTCACCTAC
a      T T V I E R T F H V D S P D E R E E W M -
                                           ApaI
                                           |
CGGGCCATCCAGATGGTCGCCAACAGCCTCAAGCAGCGGGCCCCAGGCGAGGACCCCATG
628 --+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 687
GCCCCGTAGGTCTACCAGCGGTTGTCGGAGTTCGTGCGCCCGGGTCCGCTCCTGGGGTAC
a      R A I Q M V A N S L K Q R A P G E D P M -
GACTACAAGTGTGGCTCCCCCAGTACTCCTCCAGACTGAGGAGATGGAAGTGGCGGTC
688 --+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 747
CTGATGTTACACCGAGGGGGTCACTGAGGAGGTGCTGACTCCTCTACCTTACCGCCAG
a      D Y K C G S P S D S S T T E E M E V A V -
AGCAAGGCACGGGCTAAAGTGACCATGAATGACTTCGACTATCTCAAACCTCCTTGGCAAG
748 --+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 807
TCGTTCCGTGCCCCGATTTCACTGGTACTTACTGAAGCTGATAGAGTTTGAGGAACCGTTC

```

图 7a



```

a      V L E D N D Y G R A V D W W G L G V V M -
      TACGAGATGATGTGCGGCCGCTGCCCTTCTACAACCAGGACCACGAGCGCTCTTCGAG
1348  ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1407
      ATGCTCTACTACACGCCGGCGGACGGGAAGATGTTGGTCCTGGTGCTCGCGGAGAAGCTC

a      Y E M M C G R L P F Y N Q D H E R L F E -
      SacI
      |
      CTCATCCTCATGGAAGAGATCCGCTTCCC CGCAGCAGCTCAGCCCCGAGGCCAAGTCCCTG
1408  ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1467
      GAGTAGGAGTACCTTCTCTAGGCGAAGGGCGCGTGCAGTCGGGGCTCCGGTTCAGGGAC
      |

a      L I L M E E I R F P R T L S P E A K S L -
      ApaI
      |
      CTTGCTGGGCTGCTTAAGAAGGACCCCAAGCAGAGGCTTGGTGGGGGGCCCAGCGATGCC
1468  ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1527
      GAACGACCCGACGAATTCTTCCCTGGGGTTCGTCTCCGAACCACCCCCGGGTTCGTACGG

a      L A G L L K K D P K Q R L G G G P S D A -
      AAGGAGGTCATGGAGCACAGGTTCTTCCTCAGCATCAACTGGCAGGACGTGGTCCAGAAG
1528  ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1587
      TTCCTCCAGTACCTCGTGTCCAAGAAGGAGTCGTAGTTGACCGTCCTGCACCAGGTCTTC

a      K E V M E H R F F L S I N W Q D V V Q K -
      SalI
      |
      AAGCTCCTGCCACCCTTCAAACCTCAGGTCACGTCCGAGGTCGACACAAGGTACTTCGAT
1588  ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1647
      TTCGAGGACGGTGGGAAGTTTGGAGTCCAGTGCAGGCTCCAGCTGTGTTCATGAAGCTA

a      K L L P P F K P Q V T S E V D T R Y F D -
      GATGAATTTACCGCCCAGTCCATCACAATCACACCCCTGACCGCTATGACAGCCTGGGC
1648  ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1707
      CTACTTAAATGGCGGGTCAGGTAGTGTAGTGTGGGGACTGGCGATACTGTCGGACCCG

a      D E F T A Q S I T I T P P D R Y D S L G -
      TTACTGGAGCTGGACCAGCGGACCCACTTCCCCAGTTCTCCTACTCGGCCAGCATCCGC
1708  ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1767
      AATGACCTCGACCTGGTCGCCTGGGTGAAGGGGTCAAGAGGATGAGCCGGTCGTAGGCG

a      L L E L D Q R T H F P Q F S Y S A S I R -
      GAGTGAGCAGTCTGCCCACGCAGAGGACGCACGCTCGCTGCCATCACCGCTGGGTGGTTT
1768  ---+-----+-----+-----+-----+-----+----- 1827
      CTCACTCGTCAGACGGGTGCGTCTCCTGCGTGCAGGACGGTAGTGGCGACCCACCAAA

a      E * A V C P R R G R T L A A I T A G W F -
      TTTACCCCTGCCCCG

```

图 7c

1820 ---+-----+ 1842  
AAATGGGGACGGCC  
a           F T P A R -

图 7d



```

    gggctcagaggggagtcacatcatgagcggatgttaccattgtgaaagaagggtgggttcaga
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
    cccgagtcctcccctcagtagtactcgctacaatggtaaacactttcttccaaccaagtct

c      A Q R G V I M S D V T I V K E G W V Q K -
    agaggggagaatatataaaaaactggaggccaagatacttcttttgaagacagatggct
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
    tctcccctcttatatattttttgacctccggttctatgaaggaaaacttctgtctaccga

c      R G E Y I K N W R P R Y F L L K T D G S -
    cattcataggatataaagagaaacctcaagatgtggatttaccttatcccctcaacaact
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
    gtaagtatcctatatttctctttggagttctacacctaataatggaataggggagttgttga

c      F I G Y K E K P Q D V D L P Y P L N N F -
    tttcagtggaataatgccagttaatgaaaacagaacgaccaaagccaaacacatttataa
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
    aaagtcaccggttttacggccaattacttttcttctgtctggttccggttctgtgtaaatatt

c      S V A K C Q L M K T E R P K P N T F I I -
    tcagatgtctccagtgactactgttatagagagaacatttcatgtagatactccagagg
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
    agtctacagaggtcacctgatgacaatatctctcttgtaaagtacatctatgaggtctcc

c      R C L Q W T T V I E R T F H V D T P E E -
                                     PstI
                                     |
    aaaggaagaatggacagaagctatccaggctgtagcagacagactgcagaggcaagaag
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
    tttccctcttacctgtcttcgataggtccgacatcgtctgtctgacgtctccgttcttc

c      R E E W T E A I Q A V A D R L Q R Q E E -
    aggagagaatgaattgtagtccaacttcacaaattgataatataggagaggaagagatgg
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
    tcctctcttacttaacatcaggttgaagtgttactattatctctctctctctctacc

c      E R M N C S P T S Q I D N I G E E E M D -
    atgcctctacaaccatcataaaagaaagacaatgaatgattttgactatttgaaactac
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
    tacgagatgttgggtagtattttcttctgttacttactaaaactgataaactttgatg

c      A S T T H H K R T M N D F D Y L K L L -

```

图 8a

```

taggtaaaggcacttttgggaaagtatttttggttcgagagaaggcaagtggaaaactc
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
atccatttccgtgaaaaccctttcaataaaaccaagctctcttccgttcacctttatga
c      G K G T F G K V I L V R E K A S G K Y Y -
atgctatgaagattctgaagaaagaagtcattattgcaaaggatgaagtggcacacactc
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
tacgatacttctaagacttctttcttcagtaataacgtttcctacttcaccgtgtgtgag
c      A M K I L K K E V I I A K D E V A H T L -
taactgaaagcagagttattaagaacactagacatccctttttaacatccttgaaatatt
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
attgactttcgtctcataatttcttctgtgatctgtagggaaaaattgttaggaactttataa
c      T E S R V L K N T R H P F L T S L K Y S -
ccttccagacaaaagaccgtttgtggtttgtgatggaatatgttaatggggcgagctgt
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
ggaaggtctgttttctggcaaacacaaaactaccttatacaattacccccgctcgaca
c      F Q T K D R L C F V M E Y V N G G E L F -
ttttccatttgtcgcgagagagcgggtgttctctgaggaccgcacacgtttctatggtgcag
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
aaaaggtaaacagctctctcgcgccacaagagactcctggcgtgtgcaaagataccacgtc
c      F H L S R E R V F S E D R T R F Y G A E -
aaattgtctctgccttggactatctacattccggaaagattgtgtaccgtgatctcaagt
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
tttaacagagacggaacctgatagatgtaaggcctttctaacacatggcactagagttca
c      I V S A L D Y L H S G K I V Y R D L K L -
tggagaatctaattgctggacaaaagatggccacataaaaattacagattttggactttgca
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
acctcttagattacgacctgtttctaccgggtgatttttaatgtctaaaacctgaaacgt
c      E N L M L D K D G H I K I T D F G L C K -
aagaagggatcacagatgcagccaccatgaagacattctgtggcactccagaatatctgg
901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
ttcttccctagtgtctacgtcgggtgacttctgtaagacaccgtgaggtcttatagacc
c      E G I T D A A T M K T F C G T P E Y L A -
caccagaggtgttagaagataatgactatggccgagcagtagactggtggggcctagggg
961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
gtggtctccacaatcttctattactgataaccggctcgtcatctgaccaccccgatcccc
c      P E V L E D N D Y G R A V D W W G L G V -
ttgtcatgtatgaaatgatgtgtggagggttacctttctacaaccaggaccatgagaaac
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080

```

图 8b

```

aacagtacatactttactacacaccctccaatggaaagatggtggfcttggtactccttg
c      V M Y E M M C G R L P F Y N Q D H E K L -
      ttttgaattaatattaatggaagacattaaatttcctcgaacactctcttcagatgcaa
1081 -----+-----+-----+-----+-----+ 1140
      aaaaacttaattataattacctctgtaatttaaaggagcttgtagagaagtctacgtt
c      F E L I L M E D I K F P R T L S S D A K -
      BamHI
      |
      aatcattgctttcagggctcttgataaaggatccaaataaacgccttggaggaccag
1141 -----+-----+-----+-----+-----+ 1200
      ttagtaacgaaagtcgagaaactatttcctaggtttatttgcggaaccacctcctggtc
c      S L L S G L L I K D P N K R L G G G P D -
      atgatgcaaaagaaattatgagacacagtttctctctggagtaaacggcaagatgtat
1201 -----+-----+-----+-----+-----+ 1260
      tactacgttttctttaataactctgtgtcaaagaagagacctcatttgaccgttctacata
c      D A K E I M R H S F F S G V N W Q D V Y -
      HindIII
      |
      atgataaaaagcttgtacctccttttaaacctcaagtaacatctgagacagatactagat
1261 -----+-----+-----+-----+-----+ 1320
      tactatthttcgaacatggaggaaaatttggagttcattgtagactctgtctatgatcta
c      D K K L V P P F K P Q V T S E T D T R Y -
      attttgatgaagaatttacagctcagactattacaataacaccacctgaaaaatgatg
1321 -----+-----+-----+-----+-----+ 1380
      taaaactacttcttaaatgtcgagtctgataatgttattgtggtggactttttatactac
c      F D E E F T A Q T I T I T P P E K Y D E -
      NotI
      |
      aggatggtatggactgcatggacaatgagagggcgccgcatthccctcaattttcctact
1381 -----+-----+-----+-----+-----+ 1440
      tcctaccatacctgacgtacctgttactctccgccggtaaaggagttaaaaggatga
c      D G M D C M D N E R R P H F P Q F S Y S -
      ctgcaagtggacgagaataagtctctttcattctgctacttcactgtcatcttcaattta
1441 -----+-----+-----+-----+-----+ 1500
      gacgttcacctgctcttattcagagaaagtaagacgatgaagtgacagtagaagttaaat
c      A S G R E * V S F I L L L H C H L Q F I -
      ttactgaaaa
1501 -----+ 1510
      aatgactttt
c      T E -

```

图 8c