



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107513089 A

(43)申请公布日 2017.12.26

(21)申请号 201710858124.7

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2015.04.09

C07H 19/09(2006.01)

(66)本国优先权数据

C07H 1/00(2006.01)

201410652724.4 2014.11.17 CN

A61K 31/7084(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(62)分案原申请数据

201510167580.8 2015.04.09

(71)申请人 常州方圆制药有限公司

地址 213125 江苏省常州市新北区辽河路  
1018号

申请人 内蒙古普因药业有限公司

(72)发明人 达丽亚杨 王海东 王慧娟

(74)专利代理机构 常州市江海阳光知识产权代  
理有限公司 32214

代理人 孙培英

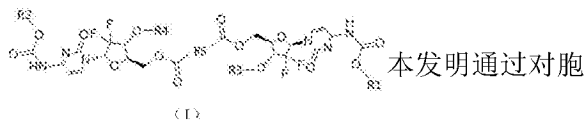
权利要求书2页 说明书21页 附图5页

(54)发明名称

一种新型胞苷衍生物二聚体及其应用

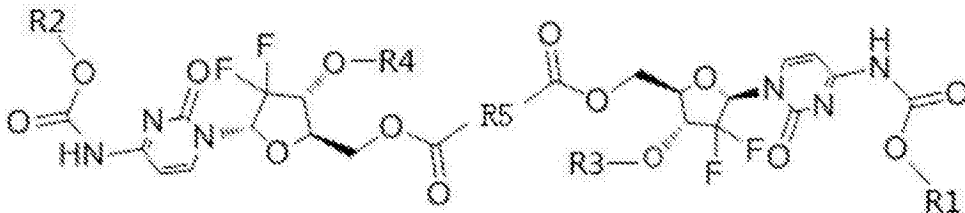
(57)摘要

本发明公开了一种新型胞苷衍生物二聚体及其应用,具有下述通式(I):



苷化合物进行分子优化设计,制备的新型的胞苷衍生物二聚体对人结肠癌HCT-116肿瘤细胞有明显的抑制作用,同时对荷瘤裸小鼠人结肠癌HCT-116移植瘤具有强烈的生长抑制作用;本发明的新型胞苷衍生物二聚体化合物的抗肿瘤活性非常高,同时化合物的毒性很低。

1. 一种新型胞苷衍生物二聚体,具有下述通式(I):



(I)

其中,R1是C<sub>1</sub>至C<sub>10</sub>的烷基、C<sub>1</sub>至C<sub>10</sub>的取代烷基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Ph、或取代-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Ph;所述的-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Ph,其中n=0、1、2、3~10,Ph为苯环;所述的取代烷基,其碳链上独立地由一个或两个或三个卤素、氰基、硝基、氨基、羟基或羧基取代;所述的取代-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Ph,其中n=0、1、2、3~10,其碳链上或苯环上独立地由一个或两个或三个卤素、氰基、硝基、氨基、羟基或羧基取代;

R2是C<sub>1</sub>至C<sub>10</sub>的烷基、C<sub>1</sub>至C<sub>10</sub>的取代烷基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Ph、或取代-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Ph;所述的-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Ph,其中n=0、1、2、3~10;所述的取代烷基,其碳链上独立地由一个或两个或三个卤素、氰基、硝基、氨基、羟基或羧基取代;所述的取代-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Ph,其中n=0、1、2、3~10,其碳链上或苯环上独立地由一个或两个或三个卤素、氰基、硝基、氨基、羟基或羧基取代;

R3是H、烷氧羰基、取代烷氧羰基,所述的取代烷氧羰基的取代基为卤素、氰基、硝基、氨基、羟基或羧基;

R4是H、烷氧羰基、或取代烷氧羰基,所述的取代烷氧羰基的取代基为卤素、氰基、硝基、氨基、羟基或羧基;

R5是-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-,其中n=1至15,或者是碳链上有取代基的-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-,所述的取代基是苯基、取代苯基、卤素、氰基、硝基、氨基、羟基、羧基,或者是-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-;所述的-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-,其中n=0、1、2或3,X<sub>1</sub>是O、S,X<sub>2</sub>是-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Ph,其中n=0、1、2或3,或者X<sub>2</sub>是嘧啶基、吡喃基、咪唑基、吡嗪基或吡啶基;

且当R1是正丁基、R2是正丁基、R3是正丁氧羰基、R4是正丁氧羰基时,R5不为-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-。

2. 根据权利要求1所述的新型胞苷衍生物二聚体,其特征在于:R3为H,并且R4为H。

3. 根据权利要求2所述的新型胞苷衍生物二聚体,其特征在于:R1与R2相同。

4. 权利要求1所述的新型胞苷衍生物二聚体或其盐在制备抑制肿瘤的药物中的应用。

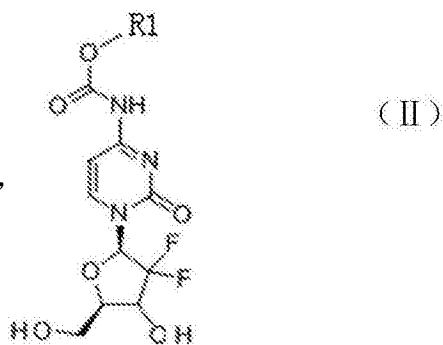
5. 根据权利要求4所述的新型胞苷衍生物二聚体或其盐在制备抑制肿瘤的药物中的应用,其特征在于所述肿瘤为血液肿瘤或恶性实体性肿瘤。

6. 一种药物组合物,其特征在于:其中含有作为活性成分的权利要求1所述的通式(I)所示的胞苷衍生物二聚体或其药学上可接受的盐,以及一种或多种药用载体或赋形剂。

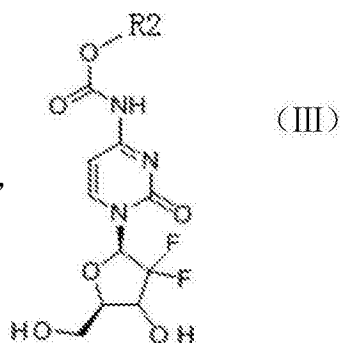
7. 权利要求6所述的药物组合物,其特征在于:组合物的剂型是注射剂,或者是口服剂型,其中口服剂型包括片剂、散剂、颗粒剂、胶囊剂、微丸制剂、溶液剂、混悬剂、乳剂、糖浆剂或酏剂;注射剂包括溶液型注射剂、混悬型注射剂、乳剂型注射剂、或注射用无菌粉末。

8. 一种如权利要求1所述的新型胞苷衍生物二聚体的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

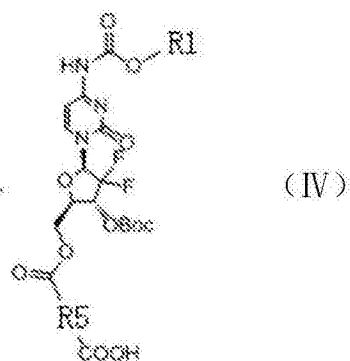
①制备通式(II)的化合物,



②制备通式(III)的化合物,



③将通式(II)的化合物与碳酸钠混合加入到1,4-二氧六环和水的体系中,然后加入(Boc)<sub>2</sub>O, TLC检测,待反应结束后萃取洗涤,干燥后减压浓缩至干;将得到的化合物加入到三氯甲烷中,加入吡啶和二酞酐R<sub>5</sub>(CO)<sub>2</sub>O,反应过夜,浓缩得黏稠油,柱层析得到通式(IV)化合物待用;



④将得到的通式(IV)化合物与通式(III)化合物、DCC混合后加入到二氯甲烷中,加入DMAP, TLC检测,待反应结束后洗涤干燥,浓缩至干,再加入TFA和DCM,室温搅拌,冰浴冷却后滤去白色固体,浓缩得黏稠油,柱层析得到产物。

## 一种新型胞苷衍生物二聚体及其应用

[0001] 本申请是申请号为2015101675808,申请日为2015年4月9日,发明创造名称为“新型胞苷衍生物二聚体及其应用”的发明专利申请的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及一种抗肿瘤化合物,具体涉及一种新型胞苷衍生物二聚体及其应用。

### 背景技术

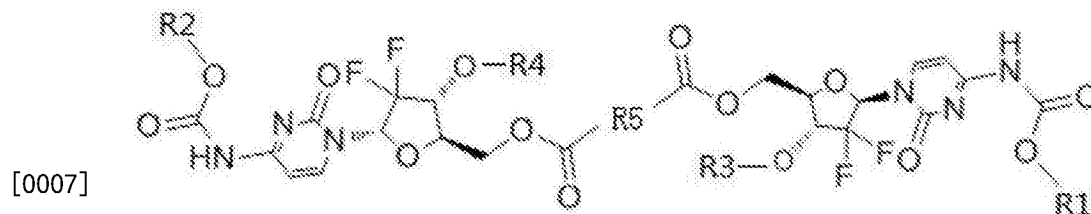
[0003] 恶性肿瘤是威胁人类健康的常见疾病之一,肿瘤死亡率居于各种疾病之首。目前临床使用的抗肿瘤药物,其毒性是困扰肿瘤化疗的突出问题。提高肿瘤治疗效果同时降低药物毒性,是当前治疗肿瘤药物的重要研究课题。

[0004] 现有的胞苷化合物主要用于治疗血液肿瘤,也有用于实体肿瘤的胞苷化合物,但是存在毒性大、适用范围窄、效果差的问题。另外,对于现有的胞苷化合物人体易产生抗药性,治疗失败,导致肿瘤复发。

### 发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是提供一种高效能、高活性同时毒副作用低的新型胞苷衍生物二聚体及其应用。

[0006] 实现本发明目的的技术方案是一种新型胞苷衍生物二聚体,具有下述通式(I):



(I)

[0008] 其中,R1是C<sub>1</sub>至C<sub>10</sub>的烷基、C<sub>1</sub>至C<sub>10</sub>的取代烷基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Ph、或取代-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Ph;所述的-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Ph,其中n=0、1、2、3~10,Ph为苯环;所述的取代烷基,其碳链上独立地由一个或两个或三个卤素、氰基、硝基、氨基、羟基或羧基取代;所述的取代-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Ph,其中n=0、1、2、3~10,其碳链上或苯环上独立地由一个或两个或三个卤素、氰基、硝基、氨基、羟基或羧基取代。优选为C<sub>1</sub>至C<sub>10</sub>的烷基或者-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Ph,n=0、1、2、3~10;进一步优选为C<sub>1</sub>至C<sub>4</sub>的烷基或者-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Ph,n=0、1、2、3;更进一步优选为正丁基或者苄基。

[0009] R2是C<sub>1</sub>至C<sub>10</sub>的烷基、C<sub>1</sub>至C<sub>10</sub>的取代烷基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Ph、或取代-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Ph;所述的-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Ph,其中n=0、1、2、3~10;所述的取代烷基,其碳链上独立地由一个或两个或三个卤素、氰基、硝基、氨基、羟基或羧基取代;所述的取代-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Ph,其中n=0、1、2、3~10,其碳链上或苯环上独立地由一个或两个或三个卤素、氰基、硝基、氨基、羟基或羧基取代。优选

为C<sub>1</sub>至C<sub>10</sub>的烷基或者-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Ph, n=0、1、2、3~10;进一步优选为C<sub>1</sub>至C<sub>4</sub>的烷基或者-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Ph, n=0、1、2、3;更进一步优选为正丁基或者苄基。

[0010] 作为再进一步的优选, R<sub>1</sub>与R<sub>2</sub>相同。

[0011] R<sub>3</sub>是H、烷氧羰基、取代烷氧羰基,所述的取代烷氧羰基的取代基为卤素、氰基、硝基、氨基、羟基或羧基;优选为H或者烷氧羰基;进一步优选为H或者正丁氧羰基。

[0012] R<sub>4</sub>是H、烷氧羰基、或取代烷氧羰基,所述的取代烷氧羰基的取代基为卤素、氰基、硝基、氨基、羟基或羧基;优选为H或者烷氧羰基;进一步优选为H或者正丁氧羰基。

[0013] 作为再进一步的优选, R<sub>3</sub>和R<sub>4</sub>均为H。

[0014] R<sub>5</sub>是-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, 其中n=1至15, 或者是碳链上有取代基的-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, 所述的取代基是苯基、取代苯基、卤素、氰基、硝基、氨基、羟基、羧基, 或者是-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-; 所述的-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-, 其中n=0、1、2或3, X<sub>1</sub>是O、S, X<sub>2</sub>是-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Ph, 其中n=0、1、2或3, 或者X<sub>2</sub>是噻啉基、吡喃基、咪唑基、吡嗪基或吡啶基; 优选为-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, n=1至15或者-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-, n=0、1、2或3, X<sub>1</sub>为O、S, X<sub>2</sub>为Ph; 进一步优选为-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, n=1至5或者-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-Ph-; 更进一步优选为-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-或者-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-。

[0015] 进一步的, 当R<sub>1</sub>是正丁基、R<sub>2</sub>是正丁基、R<sub>3</sub>是正丁氧羰基、R<sub>4</sub>是正丁氧羰基时, R<sub>5</sub>不为-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-; 即通式(I)化合物中不包括R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>均是正丁基同时R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>均是正丁氧羰基同时R<sub>5</sub>为-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-的化合物, 也即不包括实施例1中D1所示的化合物。

[0016] 上述的新型胞苷衍生物二聚体或其盐在制备抑制肿瘤的药物中的应用。

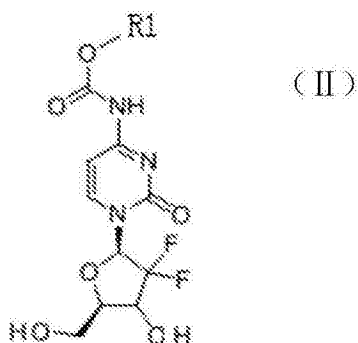
[0017] 所述肿瘤为血液肿瘤或恶性实体性肿瘤。

[0018] 一种药物组合物, 其中含有作为活性成分的通式(I)所示的胞苷衍生物二聚体或其药学上可接受的盐, 以及一种或多种药用载体或赋形剂。

[0019] 所述组合物的剂型是注射剂, 或者是口服剂型, 其中口服剂型包括片剂、散剂、颗粒剂、胶囊剂、微丸制剂、溶液剂、混悬剂、乳剂、糖浆剂或酞剂; 注射剂包括溶液型注射剂、混悬型注射剂、乳剂型注射剂、或注射用无菌粉末。

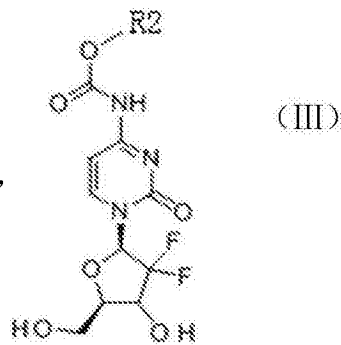
[0020] 一种如上所述的新型胞苷衍生物二聚体的制备方法, 包括以下步骤:

[0021] ①制备通式(II)的化合物,

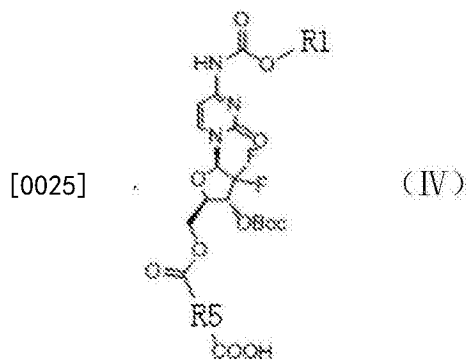


[0022]

[0023] ②制备通式(III)的化合物,



[0024] ③将通式(II)的化合物与碳酸钠混合加入到1,4-二氧六环和水的体系中,然后加入(Boc)<sub>2</sub>O,TLC检测,待反应结束后萃取洗涤,干燥后减压浓缩至干;将得到的化合物加入到三氯甲烷中,加入吡啶和二酞酐R<sub>5</sub>(CO)<sub>2</sub>O,反应过夜,浓缩得黏稠油,柱层析得到通式(IV)化合物待用;



[0026] ④将得到的通式(IV)化合物与通式(III)化合物、DCC混合后加入到二氯甲烷中,加入DMAP,TLC检测,待反应结束后洗涤干燥,浓缩至干,再加入TFA和DCM,室温搅拌,冰浴冷却后滤去白色固体,浓缩得黏稠油,柱层析得到产物。

[0027] 本发明还涉及癌症的治疗,具体地说,本发明针对治疗患有肿瘤的受试者,包括哺乳动物,尤其是人类,通过在一段时间内对受试者施用达到有效治疗剂量的新型化合物(I),产生抗肿瘤的效果。

[0028] 按照最广泛的定义,癌症一般指恶性赘生物(neoplasm),是一种异常的组织,其生长速度与正常组织不同,并在诱发刺激停止后,持续以相同的方式过度生长。另外,这种异常组织没有目的,吸取宿主的营养,并且几乎是自治的。癌症也可以指恶性肿瘤(neoplasm),关于neoplasm的进一步讨论可以参照罗宾斯病理学基础Robbins Pathologic Basis of Disease一书第六版第八章,作者是R.S.Cotran,V.Kumar,和T.Collins RS Cotran(由W.B.Saunders Company出版)。该书第8章的信息在此被引用作为参考。通过施用本发明的化合物可治疗的癌症,例如恶性肿瘤或赘生物的类型示例。

[0029] 本发明的新型化合物可以有效治疗赘生物,包括白血病和实体瘤等。实体肿瘤包括结肠,结肠,直肠,卵巢,乳腺,前列腺,肺,肾和黑素瘤肿瘤。药物剂量范围取决于给药途径和患者的年龄,体重和病人的状况。化合物的给药方式可通过肠胃外途径,包括肌肉注射,静脉内注射或静脉推注。

[0030] 本文所指的患者或受试者是患有癌症或其它疾病的脊椎动物。优选地,受试者是温血动物,特别是哺乳动物,包括人类和非人类哺乳动物。非人哺乳动物的实例包括但不限于农场动物,如牛,绵羊,猪,山羊,马,和美洲驼,和宠物,如狗和猫。更优选地,受试者是人。

本发明通过在一段时间内对受试者施用达到有效治疗剂量的化合物,产生抗肿瘤的效果。

[0031] 对于哺乳动物,包括人来说,有效量可以根据体表面积确定。E.J.Freireich等人在Cancer Chemother.Rep.,50(4):219(1966)中说明了剂量大小根据不同尺寸或种类的动物和人类(在体表面积mg/m<sup>2</sup>的基础上)而改变的关系。体表面积可根据个体的身高和体重大致确定(例如参考Scientific Tables,Geigy pharmaceuticals,Ardsley,N.Y.pp.537-538(1970))。合适的剂量范围可以是平均每平方米的体表面积使用本发明化合物1至1000毫克。也就是说,剂量为50-500mg/m<sup>2</sup>。

[0032] 本发明具有积极的效果:(1)本发明通过对胞苷化合物进行分子优化设计,制备的新型的胞苷衍生物二聚体对人结肠癌HCT-116肿瘤细胞有明显的抑制作用,同时对荷瘤裸小鼠人结肠癌HCT-116移植瘤具有强烈的生长抑制作用;本发明的新型胞苷衍生物二聚体化合物的抗肿瘤活性非常高,同时化合物的毒性很低。

### 附图说明

[0033] 图1为实施例1的胞苷衍生物二聚体的合成路线图,图中TBSCl为叔丁基二甲基氯硅烷,pyr为吡啶,DCM为二氯甲烷,rt为室温,butyl carbonochloridate为氯甲酸丁酯,HF.Et<sub>3</sub>N为三乙胺三氢氟酸盐,overnight为过夜,DCC为N,N'-二环己基碳二亚胺,DMAP为4-二甲氨基吡啶;

[0034] 图2为实施例2的胞苷衍生物二聚体的合成路线图,图中HMDS为六甲基二硅氮烷,reflux为回流,chloridate为氯化物,TEA为三乙胺,(Boc)<sub>2</sub>O为二碳酸二叔丁酯,dioxane为1,4-二氧六环,succinic anhydride为丁二酸酐,pyr为吡啶,DCC为N,N'-二环己基碳二亚胺,DMAP为4-二甲氨基吡啶,TFA为三氟乙酸,DCM为二氯甲烷;

[0035] 图3为实施例3的胞苷衍生物二聚体的合成路线图,图中HMDS为六甲基二硅氮烷,reflux为回流,chloridate为氯化物,TEA为三乙胺,(Boc)<sub>2</sub>O为二碳酸二叔丁酯,dioxane为1,4-二氧六环,Glutaric anhydride为戊二酸酐,pyr为吡啶,DCC为N,N'-二环己基碳二亚胺,DMAP为4-二甲氨基吡啶,TFA为三氟乙酸,DCM为二氯甲烷;

[0036] 图4为实施例4的胞苷衍生物二聚体的合成路线图,图中DCC为N,N'-二环己基碳二亚胺,DMAP为4-二甲氨基吡啶,TFA为三氟乙酸,DCM为二氯甲烷;

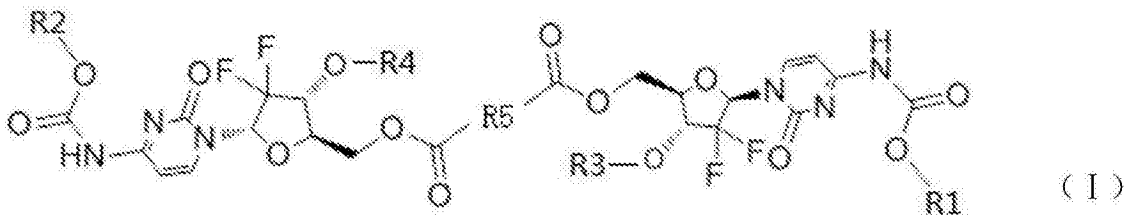
[0037] 图5为应用例1的4种化合物在作用浓度为50nM,150nM和450nM对人结肠癌细胞株HCT-116细胞的克隆形成抑制率柱形图;

[0038] 图6为应用例1的4种化合物对人结肠癌细胞株HCT-116细胞的抑制率与化合物浓度的关系曲线图。

### 具体实施方式

[0039] 本发明的胞苷衍生物二聚体的结构式如式(I):

[0040]



[0041] 其中R1为C<sub>1</sub>至C<sub>10</sub>的烷基、C<sub>1</sub>至C<sub>10</sub>的取代烷基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Ph, n=0、1、2、3~10或取代-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Ph, n=0、1、2、3~10, Ph为苯;取代烷基的碳链上独立地由一个或两个或三个卤素、氰基、硝基、氨基、羟基或羧基取代;取代-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Ph的碳链上或苯环上独立地由一个或两个或三个卤素、氰基、硝基、氨基、羟基或羧基取代。

[0042] R2为C<sub>1</sub>至C<sub>10</sub>的烷基、C<sub>1</sub>至C<sub>10</sub>的取代烷基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Ph, n=0、1、2、3~10或取代-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Ph, n=0、1、2、3~10, Ph为苯;取代烷基的碳链上独立地由一个或两个或三个卤素、氰基、硝基、氨基、羟基或羧基取代;取代-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Ph的碳链上或苯环上独立地由一个或两个或三个卤素、氰基、硝基、氨基、羟基或羧基取代。

[0043] R3为H、烷氧羰基、取代烷氧羰基,取代烷氧羰基的取代基为卤素、氰基、硝基、氨基、羟基或羧基。

[0044] R4为H、烷氧羰基、取代烷氧羰基,取代烷氧羰基的取代基为卤素、氰基、硝基、氨基、羟基或羧基。

[0045] R5为-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, n=1至15。或者是碳链上有取代基的-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, 取代基为卤素、氰基、硝基、氨基、羟基或羧基。或者是-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-, n=0、1、2或3; X<sub>1</sub>为O、S; X<sub>2</sub>为-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Ph, n=0、1、2或3, 或者X<sub>2</sub>为嘧啶基、吡喃基、吡啶基。

[0046] 对于本发明的胞苷衍生物二聚体,在表1中给出如下化合物,但本发明的胞苷衍生物二聚体不限于这些化合物。

[0047] 表1



[0048]

化合物编号	取代基
101	R1、R2 为正丁基, R3、R4 为正丁氧羰基, R5 为-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -
102	R1、R2 为正丁基, R3、R4 为正丁氧羰基, R5 为-CH <sub>2</sub> -
103	R1、R2 为正丁基, R3、R4 为正丁氧羰基, R5 为-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -
104	R1、R2 为正丁基, R3、R4 为正丁氧羰基, R5 为-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -
105	R1、R2 为正丁基, R3、R4 为正丁氧羰基, R5 为-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -
106	R1、R2 为叔丁基, R3、R4 为正丁氧羰基, R5 为-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -
107	R1、R2 为正丁基, R3、R4 为 H, R5 为-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -
108	R1、R2 为正丁基, R3、R4 为 H, R5 为-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -
109	R1、R2 为正丁基, R3、R4 为 H, R5 为-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -O-Ph-
110	R1、R2 为正丁基, R3、R4 为 H, R5 为-(CH <sub>2</sub> )-O-Ph-
111	R1、R2 为叔丁基, R3、R4 为 H, R5 为-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -O-Ph-
112	R1、R2 为苄基, R3、R4 为 H, R5 为-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -
113	R1、R2 为苄基, R3、R4 为 H, R5 为-CHBr(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -

[0049]

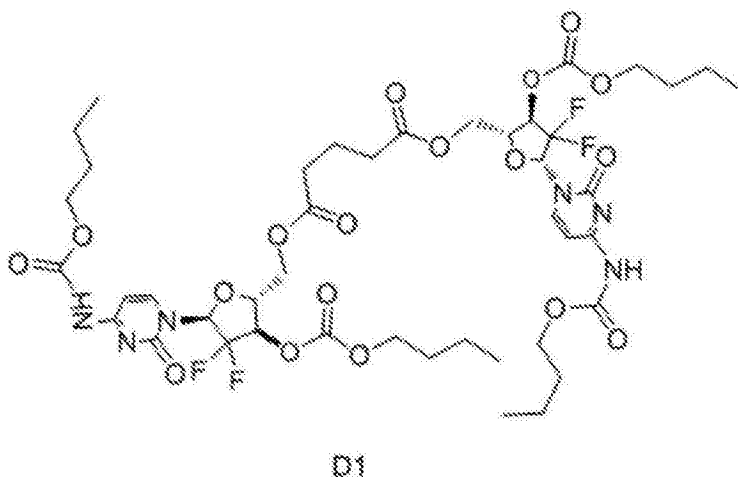
114	R1、R2 为苄基, R3、R4 为 H, R5 为-CHPh(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -
115	R1、R2 为苄基, R3、R4 为 H, R5 为-CHCNCH <sub>2</sub> -
116	R1、R2 为苄基, R3、R4 为 H, R5 为-CHBrCH <sub>2</sub> -
117	R1 为苄基, R2 为正丁基, R3、R4 为 H, R5 为-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -
118	R1 为苄基, R2 为正丁基, R3、R4 为 H, R5 为-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -
119	R1 为苄基, R2 为正丁基, R3、R4 为 H, R5 为-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -O-Ph-
120	R1 为苄基, R2 为正丁基, R3、R4 为 H, R5 为-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -O-Ph-, 苯环的对位由硝基取代

[0050] 对上表中的化合物进行制备,合成过程中所用到的固体试剂没有经过进一步处理直接使用,液体试剂经过重蒸干燥后使用。

[0051] (实施例1)

[0052] 本实施例的胞苷衍生物二聚体为1.5-二-[4-N-正丁氧羰基-3'-O-正丁氧羰基-2'-脱氧-2',2'-二氟代胞苷]戊二酸酯(代号D1,表1中编号101),结构式如下:

[0053]



[0054] D1的合成路线见图1,具体制备过程如下:

[0055] 将2'-脱氧-2',2'-二氟代胞苷盐酸盐(3g,10mmol)、咪唑(0.875g,12.8mmol)加入到10mL的无水吡啶中,冰浴降温,在0℃下加入叔丁基二甲基氯硅烷(3.3g,21mmol,叔丁基二甲基氯硅烷以下简称TBSCl),搅拌0.5h,升至室温,继续反应12h,用甲醇(8.0mL)处理,搅拌60min后,减压除去溶剂,得到化合物2。反应体系继续加入50mL二氯甲烷(DCM)和10mL吡啶,在冰浴和氮气保护条件下加入氯甲酸丁酯(5.46g,40mmol),室温下搅拌反应12h,旋干,残留物溶于乙酸乙酯(100mL),用冷饱和碳酸氢钠溶液(30mL×2)、浓盐水(30mL)洗涤;溶液使用无水硫酸钠干燥3h并过滤,滤液经柱层析(二氯甲烷/甲醇,40:1)得到中间体3(3.6g,两步产率62%)。

[0056] 将化合物3(3.6g,6.23mmol)加入到40mL四氢呋喃(THF),冰浴降温至0℃,慢慢加入三乙胺三氢氟酸盐(HF·Et<sub>3</sub>N)4mL,反应24h,将溶剂真空旋干得到橙色固体,直接过柱(二氯甲烷/甲醇,20:1)得到化合物4(1.68g,产率58%)。

[0057] 将得到的中间体4(1.68g,3.62mmol)加入到30mL的三氯甲烷中,加入吡啶30mL,再加入戊二酸酐(620mg,5.44mmol),将反应搅拌过夜,再加入4-二甲氨基吡啶(DMAP,7mg,0.057mmol)后,搅拌3h,然后浓缩得黏稠油状物,柱层析得到化合物5(1.11g,产率53%)。

[0058] 将化合物5(58mg,0.1mmol)与化合物4(92mg,0.2mmol)、N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC,42mg,0.2mmol)混合后加入到15mL二氯甲烷中,加入DMAP(6mg,0.049mmol),反应在24℃搅拌24h。TLC检测,待反应结束后加入50mL二氯甲烷,使用10mL水和20mL饱和食盐水洗涤,使用无水硫酸钠干燥,浓缩至干。柱层析(二氯甲烷/甲醇,20:1)得到化合物6(49mg,产率48%)。

[0059] <sup>1</sup>H-NMR(MeOD-d<sub>4</sub>,400MHz) δ:7.97(d,2H,J=7.68Hz,H6-1,H6-2),7.40(d,2H,J=7.68Hz,H5-1,H5-2),6.35(t,2H,J=7.24Hz,H1'-1,H1'-2),4.47(m,6H,H5a'-1,H5a'-2,H5b'-1,H5b'-2,H4'-1,H4'-2),4.21(m,8H,O-CH<sub>2</sub>×4),2.53(t,4H,J=7.16Hz,CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>),1.97(m,2H,CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>),1.64(m,8H,O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>×4),1.42(m,8H,O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>×4),0.98(m,12H,CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>×4)。

[0060] <sup>13</sup>C NMR(MeOD-d<sub>4</sub>,100MHz) δ:172.83,164.51,153.87,144.53,96.26,77.52,69.13,65.89,61.94,32.42,30.66,30.47,18.83,18.67,12.79,12.74,8.48。

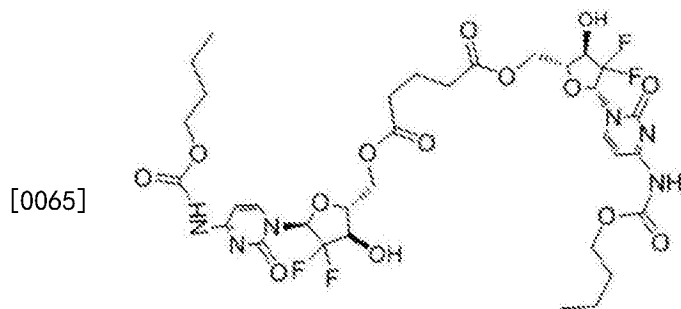
[0061] ESIMS:calcd for C<sub>43</sub>H<sub>58</sub>F<sub>4</sub>N<sub>6</sub>O<sub>18</sub>m/z 1023.37(M+H)<sup>+</sup>,found 1023.66。

[0062] 按照上述合成路线,将戊二酸酐改为其他对应的二酸酐,即可制备获得表1中的化

合物102至105。将氯甲酸叔丁酯替代氯甲酸丁酯,即可制得表1中化合物106。

[0063] (实施例2)

[0064] 本实施例的胞苷衍生物二聚体为1.5-二-[4-N-正丁氧羰基-2'-脱氧-2',2'-二氟代胞苷]戊二酸酯(代号D2,表1中编号107),结构式如下:



D2

[0066] 首先制备中间体8,反应过程见图2,制备过程如下:

[0067] 将300mg (1mmol) 2'-脱氧-2',2'-二氟代胞苷盐酸盐(结构式1)、5mL (0.023mmol) 六甲基二硅氮烷HMDS,催化量硫酸铵5mg溶于5mL 1,4-二氧六环中,加热回流反应2h,反应产物化学结构式为19。回流反应结束后反应液浓缩,向其中加入甲苯,浓缩至干2次,浓缩所得产物溶于10mL二氯甲烷中。

[0068] 向上述二氯甲烷溶液中加入0.24mL (3mmol) N-甲基咪唑、0.32mL (3mmol) 氯甲酸丁酯,室温搅拌反应4h,反应液浓缩得粘稠油状物。

[0069] 将上述粘稠油状物溶于3mL三乙胺和20mL甲醇组成的混合溶液中,室温搅拌4h。减压蒸馏除去溶剂,粗产品用硅胶层析柱纯化,用二氯甲烷/甲醇(20:1)洗脱得到230mg的化合物7,三步反应产率55.5%。

[0070] 化合物7核磁共振表征:

[0071]  $^1\text{H-NMR}$  (MeOD- $d_4$ , 400MHz)  $\delta$ : 8.30 (d, 1H,  $J=7.68\text{Hz}$ , H6), 7.34 (d, 1H,  $J=7.68\text{Hz}$ , H5), 6.28 (t, 1H,  $J=7.08\text{Hz}$ , H1'), 4.33 (m, 1H, H5a'), 4.0 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 3.81 (m, 1H, H5b'), 3.79 (m, 1H, H4'), 1.68 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.45 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 0.98 (t, 3H,  $J=7.4\text{Hz}$ , -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)。

[0072]  $^{13}\text{C-NMR}$  (MeOD- $d_4$ , 100MHz)  $\delta$ : 164.28, 156.27, 153.50, 144.39, 128.33, 122.72, 95.81, 84.90, 81.71, 74.87, 68.88, 63.69, 59.15, 30.66, 32.40, 18.81, 11.23, 8.06。

[0073] 取60mg (0.16mmol) 化合物7和106mg (1mmol) 碳酸钠,混合后加入到5mL 1,4-二氧六环和水(体积比4:1)的混合溶液中。向溶液中加入44mg (0.2mmol) 二碳酸二叔丁酯(Boc)<sub>2</sub>O,然后在24℃下搅拌反应,反应过程中TLC检测化合物7是否完全反应完毕。待反应结束后向反应后的体系中加入2mL水稀释,然后用乙酸乙酯萃取2次,每次用量30mL。萃取得到的有机相用5mL水和5mL饱和食盐水依次洗涤,洗涤完毕无水硫酸钠干燥,接着减压浓缩至干;浓缩后用硅胶层析柱纯化,用二氯甲烷/丙酮/甲醇(1:1:0.02)洗脱得到51mg的化合物8,上述反应产率76%。

[0074] D2的合成路线见图2,制备过程如下:

[0075] 将得到的化合物8 (223mg, 0.25mmol) 溶解到6mL的三氯甲烷中,加入吡啶5mL,再加入丁二酸酐(100mg, 1mmol),在45℃下反应过夜,浓缩得黏稠油,柱层析(DCM-MeOH 20:1至

10:1) 得到化合物9 (211mg, 产率75%)。

[0076] 将化合物9 (56mg, 0.1mmol) 与化合物8 (92mg, 0.2mmol)、DCC (42mg, 0.2mmol) 混合后加入到15mL二氯甲烷中, 加入DMAP (6mg, 0.049mmol), 反应在24℃搅拌24h。TLC检测, 待反应结束后加入50mL二氯甲烷, 使用10mL水和20mL饱和食盐水洗涤, 使用无水硫酸钠干燥, 浓缩至干。再加入三氟乙酸 (TFA, 5mL) 和二氯甲烷 (DCM, 10mL), 室温搅拌0.5h; 冰浴冷却后滤去白色固体。浓缩得黏稠油, 柱层析 (DCM-MeOH 20:1至10:1) 得到产物D2 (30mg, 产率35%)。

[0077]  $^1\text{H-NMR}$  (MeOD- $d_4$ , 400MHz)  $\delta$  7.85 (d, 2H,  $J=7.68\text{Hz}$ , H6-1, H6-2), 7.37 (d, 2H,  $J=7.68\text{Hz}$ , H5-1, H5-2), 6.26 (t, 2H,  $J=7.24\text{Hz}$ , H1'-1, H1'-2), 4.53 (m, 2H, H5a'-1, H5a'-2), 4.40 (m, 4H, H5b'-1, H5b'-2, H4'-1, H4'-2), 4.20 (m, 2H, H3-1, H3-2), 2.73 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.64 (m, 4H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.37 (m, 4H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 0.93 (m, 6H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)。

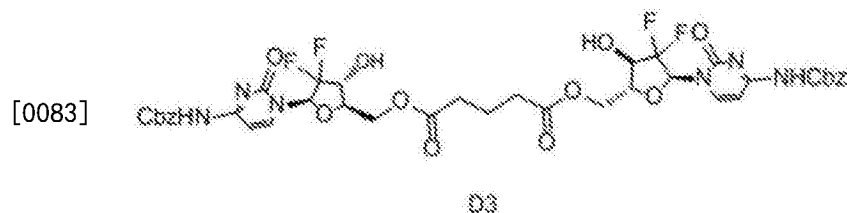
[0078]  $^{13}\text{C-NMR}$  (MeOD- $d_4$ , 100MHz)  $\delta$  172.41, 164.01, 155.95, 153.52, 144.36, 96.56, 70.53, 66.29, 62.49, 30.74, 28.76, 19.01, 13.49。

[0079] ESIMS: calcd for C<sub>32</sub>H<sub>40</sub>F<sub>4</sub>N<sub>6</sub>O<sub>14</sub>m/z 809.25 (M+H)<sup>+</sup>, found 809.34。

[0080] 按照上述制备方法, 将化合物8与其他二酸酐反应, 如戊二酸酐等反应即可制得表1中的化合物108至110。将氯甲酸叔丁酯替代氯甲酸丁酯, 即可制得表1中化合物111。

[0081] (实施例3)

[0082] 本实施例的胞苷衍生物二聚体为1.5-二-[4-N-(苄氧羰基)-2'-脱氧-2', 2'-二氟代胞苷]戊二酸酯(代号D3),



[0084] D3的合成路线见图3, 制备过程如下:

[0085] 首先制备化合物13: 将300mg (1mmol) 2'-脱氧-2', 2'-二氟代胞苷盐酸盐、5mL (0.023mmol) 六甲基二硅氮烷, 催化量硫酸铵5mg溶于5mL 1,4-二氧六环中, 加热回流反应2h; 回流反应结束后反应液浓缩, 向其中加入甲苯, 浓缩至干2次, 浓缩所得产物溶于10mL二氯甲烷中。

[0086] 向上述二氯甲烷溶液中加入0.24mL (3mmol) N-甲基咪唑、340mg (3mmol) 氯甲酸苄酯, 室温搅拌反应4h, 反应产物化学结构式20, 反应液浓缩得粘稠油状物。

[0087] 将上述粘稠油状物溶于3mL三乙胺和20mL甲醇组成的混合溶液中, 室温搅拌下过夜。然后减压蒸馏除去溶剂, 粗产品用硅胶层析柱纯化, 用二氯甲烷/甲醇 (20:1) 洗脱得到162mg的化合物12, 三步反应产率41%。

[0088] 化合物12核磁共振表征:

[0089]  $^1\text{H-NMR}$  (MeOD- $d_4$ , 400MHz)  $\delta$ : 8.31 (d, 1H,  $J=7.64\text{Hz}$ , H6), 7.39 (m, 5H,  $J=7.68\text{Hz}$ , Ph), 6.25 (t, 1H,  $J=7.12\text{Hz}$ , H1'), 5.21 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.31 (m, 1H, H5a'), 3.82 (m, 2H, H5b, H4'), 3.79 (m, 1H, H3')。

[0090]  $^{13}\text{C-NMR}$  (MeOD- $d_4$ , 100MHz)  $\delta$ : 164.22, 156.22, 153.27, 144.48, 135.87, 128.42, 128.10, 125.31, 122.74, 120.16, 95.89, 85.35, 84.91, 81.7, 81.66, 68.87, 67.54, 58.31。

[0091] 将化合物12 (80mg, 0.2mmol) 与碳酸钠 (106mg, 1mmol) 混合加入到1,4-二氧六环和水的体系中(体积比4:1, 5mL)。后加入 (Boc)<sub>2</sub>O (44mg, 0.2mmol), 反应在24℃搅拌48h, TLC检测, 待反应结束后加入2mL水稀释, 使用2\*30mL乙酸乙酯萃取, 有机相使用5mL水和5mL饱和食盐水洗涤, 使用无水硫酸钠干燥后减压浓缩至干, 柱层析(二氯甲烷-丙酮-乙醇1:1:0.02) 得到化合物13 (64mg, 产率64%)。

[0092] 将得到的化合物13 (248mg, 0.5mmol) 加入到15mL三氯甲烷中, 加入吡啶5mL, 再加入戊二酸酐 (100mg, 1mmol), 在45℃下反应过夜, 浓缩得黏稠油, 柱层析(二氯甲烷/甲醇, 20:1至10:1) 得到化合物14 (223mg, 产率73%)。

[0093] 将得到的化合物14 (61mg, 0.1mmol) 与化合物13 (99mg, 0.2mmol)、DCC (42mg, 0.2mmol) 混合后加入到15mL二氯甲烷中, 加入DMAP (6mg, 0.049mmol), 反应在24℃搅拌24h。TLC检测, 待反应结束后加入50mL二氯甲烷, 使用10mL水和20mL饱和食盐水洗涤, 使用无水硫酸钠干燥, 浓缩至干。再加入TFA (5mL) 和DCM (10mL), 室温搅拌0.5h。冰浴冷却后滤去白色固体。浓缩得黏稠油, 柱层析(DCM-MeOH20:1至10:1) 得到产物D3 (30mg, 产率35%)。

[0094] <sup>1</sup>H-NMR (MeOD-d<sub>4</sub>, 400MHz) δ: 8.31 (d, 1H, J=7.64Hz, H<sub>6</sub>), 7.39 (m, 5H, J=7.68Hz, Ph), 6.27 (t, 2H, J=7.8Hz, H<sub>1'</sub>-1, H<sub>1'</sub>-2), 5.17 (s, 4H, CH<sub>2</sub>-Ph×2), 4.46 (m, 4H, H<sub>5a'</sub>-1, H<sub>5a'</sub>-2, H<sub>5b'</sub>-1, H<sub>5b'</sub>-2), 4.21 (m, 2H, H<sub>4'</sub>-1, H<sub>4'</sub>-2), 4.10 (m, 2H, H<sub>3'</sub>-1, H<sub>3'</sub>-2), 2.53 (t, 4H, J=7.16Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.99 (q, 2H, J=7.2Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-)。

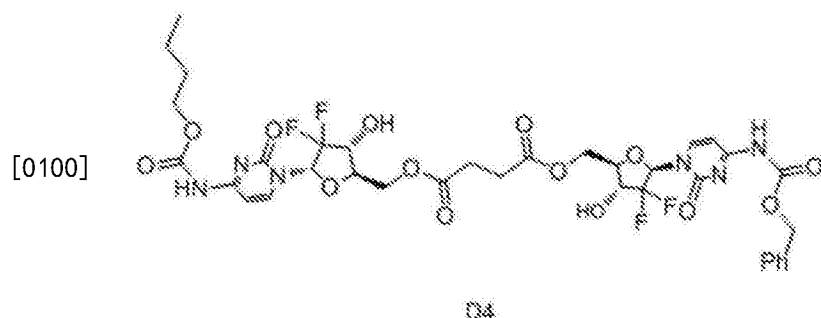
[0095] <sup>13</sup>C NMR (MeOD-d<sub>4</sub>, 100MHz) δ 172.90, 164.21, 155.90, 153.31, 144.25, 141.03, 135.86, 128.41, 128.28, 128.10, 124.85, 123.25, 122.26, 96.14, 79.17, 74.97, 67.59, 62.06, 33.19, 32.51, 19.96。

[0096] ESIMS: calcd for C<sub>39</sub>H<sub>38</sub>F<sub>4</sub>N<sub>6</sub>O<sub>14</sub>m/z 891.24 (M+H)<sup>+</sup>, found 891.31。

[0097] 按照上述制备方法, 将化合物14与其他二酸酐反应, 如COOHCHBr (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH、COOHCHPh (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH、COOH-CHCNCH<sub>2</sub>COOH等反应即可制得表1中的化合物113至116。

[0098] (实施例4)

[0099] 本实施例的胞苷衍生物二聚体为1-0-(4-N-(苄氧羰基)-2'-脱氧-2', 2'-二氟代胞苷)-5-0-(4-N-正丁氧羰基-2'-脱氧-2', 2'-二氟代胞苷)-琥珀酸酯(1-0-(4-N-(Benzyloxycarbonyl)-gemcitabine)-4-0-(4-N-(n-Butoxycarbonyl)-gemcitabine)-succinate, 代号D4), 结构式如下:



[0101] D4的合成路线见图4, 具体制备过程如下:

[0102] 将化合物9 (56mg, 0.1mmol) 与化合物13 (99mg, 0.2mmol)、N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC, 42mg, 0.2mmol) 混合后加入到15mL二氯甲烷中, 加入DMAP (6mg, 0.049mmol), 反应在24℃搅拌24h。TLC检测, 待反应结束后加入50mL二氯甲烷, 使用10mL水和20mL饱和食盐水洗

涤,使用无水硫酸钠干燥,浓缩至干。再加入TFA (5ml) 和DCM (10ml),室温搅拌0.5h。冰浴冷却后滤去白色固体。浓缩得黏稠油,柱层析(DCM-MeOH20:1至10:1)得到产物D4 (30mg,产率36%)。

[0103]  $^1\text{H-NMR}$  (MeOD- $d_4$ , 400MHz)  $\delta$ 7.98 (m, 2H, H6-1, H6-2), 7.40 (d, 2H,  $J=7.68\text{Hz}$ , H5-1, H5-2), 7.38 (m, 6H, Ph), 6.26 (t, 2H,  $J=8\text{Hz}$ , H1'-1, H1'-2), 5.21 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-Ph), 4.43 (m, 2H, H5a'-1, H5a'-2), 4.29 (m, 2H, H5b'-1, H5b'-2), 4.21 (m, 6H, H4'-1, H4'-2, H3'-1, H3'-2), 2.74 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.43 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1.28 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 0.97 (t, 3H,  $J=7.4\text{Hz}$ , -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)。

[0104]  $^{13}\text{C NMR}$  (MeOD- $d_4$ , 100MHz)  $\delta$ 172.56, 164.19, 155.89, 153.52, 144.61, 135.86, 128.09, 122.22, 96.21, 79.38, 78.91, 70.83, 67.60, 65.92, 62.11, 56.72, 30.64, 28.66, 28.51, 25.93, 18.82, 14.26, 12.77。

[0105] ESIMS: calcd for C<sub>35</sub>H<sub>38</sub>F<sub>4</sub>N<sub>6</sub>O<sub>14</sub>m/z 843.24 (M+H)<sup>+</sup>, found 843.33。

[0106] 按照上述制备方法,将其他二酸酐代替丁二酸酐与化合物8反应,得到的中间体与化合物13反应即可制得表1中的化合物118至120。

[0107] (实施例5、胞苷衍生物二聚体的盐酸盐)

[0108] 本实施例制备实施例1的胞苷衍生物二聚体的盐酸盐。

[0109] 取1.5-二-[4-N-正丁氧羰基-3'-O-正丁氧羰基-2'-脱氧-2',2'-二氟代胞苷]戊二酸酯0.50g溶解于60mL乙酸乙酯中,冰浴下通入干燥的盐酸气,搅拌15分钟后去除溶剂得到白色固体产物。

[0110] 其他胞苷衍生物二聚体的盐酸盐的制备方法同上。

[0111] 除了上述盐酸盐外,还可以制备胞苷衍生物二聚体的磷酸盐、硫酸盐、碳酸盐、硝酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、马来酸盐、琥珀酸盐、磺酸盐、对甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、苯甲酸盐或富马酸盐。

[0112] (实施例6、胞苷衍生物二聚体的注射用冻干粉针剂)

[0113] 本实施例制备实施例3的化合物D3的冻干粉针剂。

[0114] D3的冻干粉针剂包括30g的化合物D3、甘露醇(20%w/v) 300g,缓冲剂二水合磷酸二氢钠7克、表面活性剂泊洛沙姆188 (F68) 4.0g。

[0115] 将按照上述处方量准确称取的二水合磷酸二氢钠、泊洛沙姆188 (F68) (CAS号: 9003-11-6)、甘露醇(20%w/v)加入300g预冷至10℃以下的注射用水中溶解后,用0.1mol/L的NaOH调节溶液pH值为7.3~7.5;再向上述溶液中加入处方量的D3混合均匀,用0.1mol/L的NaOH溶液或0.1mol/L的HCl调节pH值为7.3±0.2(本实施例为7.5);加水至2000g,溶液用0.22μm微孔滤膜过滤除菌;按每瓶2.0g将滤液分装于管制瓶中,半加塞后置于冷冻干燥机中冻干,待干燥后真空压塞,轧盖,贴标签,即得冻干粉针剂1000支,保存在2~8℃温度下。

[0116] 除了上述冻干粉针剂即注射用无菌粉末外,本发明的胞苷衍生物二聚体还可制备成其他形式的注射剂,如溶液型注射剂、混悬型注射剂、乳剂型注射剂。

[0117] (实施例7、胞苷衍生物二聚体的药物组合物)

[0118] 本实施例的胞苷衍生物二聚体的药物组合物由活性组分和辅料组成,其中的药物活性组分为上述实施例制备的胞苷衍生物二聚体或其对应的盐。药物活性组分的重量在组合物中所占比例为1%~95%(本实施例为30%)。辅料由水、乳糖、玉米淀粉、羟丙基甲基纤

纤维素和硬脂酸镁组成。本实施例的药物组合物的剂型为片剂。

[0119] 药物组合物的适用剂型除上述涉及的片剂形式外,药物活性组分可以被制成口服的散剂、颗粒剂、胶囊剂、微丸制剂、溶液剂、混悬剂、乳剂、糖浆剂或酏剂,或者是口服形式的缓释及控释制剂,或者是其他口服形式的药物组合物,这些口服剂型含有常见的相应的辅料(根据不同的作用分为添加剂、附加物等),如添加剂有药物等级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精盐、纤维素或硫酸镁等。

[0120] 在实现上述口服剂型中,可以选择药学上的附加物作为药物活性组分的载体,包括已有技术成熟的物质,例如:惰性固体稀释液、水溶剂、脂质体、微球体或/和无毒有机溶剂等;优选的附加物有:加湿剂、乳化剂、pH缓冲液、人血清白蛋白、抗氧化剂、防腐剂、抑菌剂、葡萄糖、蔗糖、海藻糖、麦芽糖、卵磷脂、甘氨酸、山梨酸、丙烯醇、聚乙烯、鱼精蛋白、硼酸、氯化钠、或者氯化钾、矿物油、植物油等;可从中选择一种或几种组合作为药物载体。

[0121] 本发明的药物组合物的靶肿瘤包括血液肿瘤或恶性实体性肿瘤;具体的,靶肿瘤包括肺癌、前列腺癌、乳腺癌、结肠癌、胃癌、胰腺癌、肝癌、食道癌、脑肿瘤、卵巢癌、子宫癌、肾癌、头颈癌、皮肤癌、膀胱癌、外阴癌、睾丸瘤、直肠癌、绒毛癌、生殖细胞瘤、恶性淋巴瘤、白血病和多发性骨髓瘤,并且甚至更优选的靶肿瘤可包括胰腺癌(一、二线治疗)、非小细胞性肺癌、乳腺癌、卵巢癌和头颈部鳞癌、结肠癌,但本发明不限于此。

[0122] (应用例1、系列化合物对HCT-116细胞集落形成的抑制实验)

[0123] 1、通过细胞集落形成抑制试验评估4个候选化合物(D1,D2,D3,D4)在作用浓度为50nM,150nM和450nM对人结肠癌细胞株HCT-116细胞的增殖抑制作用。

[0124] 2、试验材料:细胞株:HCT-116人结肠癌细胞株订购于中科院上海细胞资源中心,Cat#TChu 99。

[0125] 3、试剂配制

[0126] HCT-116人结肠癌细胞培养基:DMEM+10%FBS。

[0127] 化合物的准备:用DMSO稀释化合物使终浓度为100 $\mu$ M。

[0128] 细胞染色液的配制:用无水乙醇配制0.5%结晶紫溶液避光保存;染色前与PBS按体积比1:4的比例配成细胞染色液。

[0129] 4、细胞培养:收集对数生长期细胞,计数,用完全培养基重新悬浮细胞;调整细胞浓度至合适浓度,接种6孔板培养皿,每孔接种约300个细胞,1.8ml培养基;细胞在37 $^{\circ}$ C,100%相对湿度,5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育5小时。

[0130] 5、细胞克隆形成抑制实验和数据处理

[0131] ①收集对数生长期细胞,计数,用含5%FBS的培养基重新悬浮细胞,计数,按300个细胞/孔接种6孔板培养皿;细胞在37 $^{\circ}$ C,100%相对湿度,5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育5小时。

[0132] ②用培养基(含5%FBS)将化合物稀释至0.5 $\mu$ M,1.5 $\mu$ M和4.5 $\mu$ M。按200 $\mu$ L/孔加入细胞,使化合物终浓度为50nM,150nM和450nM,每个浓度点进行3次重复测试。

[0133] ③细胞在37 $^{\circ}$ C,100%相对湿度,5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育72小时。

[0134] ④吸弃皿中培养基(含化合物的培养基),用Hank's Balance Salt Solution (HBSS)溶液润洗两遍,更换新鲜培养基(15%FBS的DMEM培养基)。

[0135] ⑤细胞在37 $^{\circ}$ C,100%相对湿度,5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育7至10天,直到形成肉眼可见的克隆斑。

- [0136] ⑥吸弃皿中培养基,用PBS溶液润洗两遍。
- [0137] ⑦吸净残余PBS,加入无水乙醇1ml/皿,固定30分钟。
- [0138] ⑧吸净乙醇,加入细胞染色液,染色3分钟。
- [0139] ⑨吸弃染色液,用PBS润洗三遍后计数。
- [0140] 数据处理:
- [0141] 克隆形成率 =  $[As/Ac] \times 100\%$ ; 克隆形成抑制率 =  $1 - \text{克隆形成率}$ 。
- [0142]  $A_s$ : 样品处理的细胞克隆数目 (细胞+待测化合物)。
- [0143]  $A_c$ : 阴性对照 (不加样品处理) 的细胞克隆数目 (细胞+1% DMSO)。
- [0144] 6、结果和讨论
- [0145] 四种化合物对人结肠癌细胞株HCT-116细胞的克隆数目见下表2。
- [0146] 表2

HCT-116 细胞的克隆数目								
	DG-1		DG-2		DG-3		DG-4	
	mean	% inhibition	mean	% inhibition	mean	% inhibition	mean	% inhibition
[0147] 空白组	251		255		241		256	
50nM	242	3.58%	243	4.70%	237	1.66%	235	8.20%
150nM	188	25.10%	191	25.10%	20	91.70%	75	70.70%
450nM	52	79.28%	36	85.88%	4	98.34%	11	95.70%

- [0148] % inhibition: 抑制率。
- [0149] 4种化合物在作用浓度为50nM, 150nM和450nM对人结肠癌细胞株HCT-116细胞的克隆形成抑制率见图5。
- [0150] 由表2及图5可见本发明化合物对肿瘤细胞有明显的抑制作用。
- [0151] 4种化合物对人结肠癌细胞株HCT-116细胞的抑制率与抑制剂浓度的关系曲线见图6,由图6可看到,D1的IC50值为245.3nM,D2的IC50值为226.6nM,D3的IC50值为99.80nM,D4的IC50值为111.7nM。
- [0152] (应用例2、系列化合物对肿瘤的生长抑制作用)
- [0153] 本应用例通过观察接种部位肿瘤的形成情况和受试动物的体重变化来评价单次腹腔注射化合物D1至D4对结肠癌HCT-116荷瘤裸小鼠移植瘤的生长抑制作用及其毒性。
- [0154] 1、试验目的
- [0155] 测定本发明的胞苷衍生物二聚体样品对结肠癌HCT-116荷瘤裸小鼠移植瘤的生长抑制作用及其毒性。
- [0156] 2、受试物的配制
- [0157] 受试物溶解所用溶剂来源如下:



[0158]

溶剂	批号	厂商
无水乙醇	10009218	国药集团化学试剂有限公司
Cremophor EL	27963	Sigma
0.9%生理盐水	13083004	华裕制药有限公司

[0159] 称取定量对应的受试物于5mL玻璃试管中,在5mm的磁力搅拌子搅拌下溶解于乙醇中,全部溶解后加入Cremophor EL,保持搅拌,临用前加入标示量的生理盐水搅拌均匀,配置时乙醇、Cremophor EL、生理盐水的体积比为5:5:90。

[0160] 3、实验动物

[0161] 品种和品系:Balb/c Nude小鼠;级别:SPF;性别:雌性。

[0162] 来源:上海西普尔-毕凯实验动物有限公司。

[0163] 动物数量:订购40只,选择其中健康状况良好的用于实验。

[0164] 动物合格证号:0123627。

[0165] 实验开始时动物年龄:7-9周龄。

[0166] 实验开始时动物体重:18-22克。

[0167] 适应环境时间:5-7天。

[0168] 动物编号方式:尾号。

[0169] 动物房环境保持温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,湿度40-70%,12小时明暗交替。

[0170] 动物饲料(SLAC-M01)购自北京科澳协力有限公司。实验动物用水采用过滤灭菌水。实验过程中动物自由饮食和饮水。

[0171] 4、实验方法

[0172] 4.1肿瘤细胞:结肠癌HCT-116细胞,购于中科院细胞生物研究所。用F-12培养基,(含10%的FBS)培养在 $37^{\circ}\text{C}$ ,饱和湿度,含体积分数为5% $\text{CO}_2$ 、95%空气的二氧化碳培养箱内。接种前取对数生长期细胞,以0.25%胰蛋白酶消化后,PBS洗涤1次,PBS重新悬浮计数,用不含血清的培养基重新悬浮细胞,调整细胞浓度至约 $3 \times 10^7$  cell/mL。

[0173] 4.2动物接种及分组:每个裸鼠在无菌状态下,右侧后肢皮下接种0.1mL细胞悬液( $3 \times 10^6$  cell/mouse)。待肿瘤长至体积60-150 $\text{mm}^3$ 左右时,选出肿瘤体积相近、形状较好的裸鼠(形状尽量为单一圆球形,无不规则的形状或多个肿瘤聚在一起),分组,每组6只,分组情况如下:

[0174] 表3

组别	给药	动物数	剂量 (mg/kg)	给药 方式	给药方案
1	D1	6	400	IP	QD×1
2	D2	6	400	IP	QD×1
3	D3	6	350	IP	QD×1
4	D4	6	300	IP	QD×1
13	Control	6	-	IP	QD×1

[0175]

[0176] IP:腹腔注射;QD×1:注射一次。

[0177] Control控制组即模型对照组的小鼠注射5:5:90的乙醇、Cremophor EL、生理盐水组成的混合溶液。

[0178] 4.3动物给药和观察

[0179] 观察各组裸鼠接种部位肿瘤的形成状况,每周3次用圆洞尺测量肿瘤结节的直径(D),并按如下公式计算肿瘤结节的体积(V): $V=3/4\pi(D/2)^3$ 。

[0180] 抗肿瘤活性的评价指标为肿瘤生长抑制率TGI(%),相对肿瘤增殖率T/C(%)。

[0181] 肿瘤生长抑制率TGI(%)的计算公式为: $TGI(\%)=(V_{control}-V_{Treatment})/V_{control}\times 100\%$ 。

[0182] 相对肿瘤体积(relative tumor volume,RTV)计算公式为: $RTV=V_t/V_0$ 。其中V<sub>0</sub>为分组给药时的肿瘤体积,V<sub>t</sub>为测量时的肿瘤体积。

[0183] 相对肿瘤增殖率T/C(%),计算公式为: $T/C(\%)=T_{RTV}/C_{RTV}\times 100\%$ 。

[0184] T<sub>RTV</sub>:治疗组RTV;C<sub>RTV</sub>:阴性对照组RTV。

[0185] 每周3次称量小鼠体重。

[0186] 4.4临床症状

[0187] 在实验开始和实验过程中每个动物所有的临床症状都应记录。观察应在每天的同一时间进行。

[0188] 给予受试物后如出现体重减低>20%,濒死动物或肿瘤体积超过2800mm<sup>3</sup>,则CO<sub>2</sub>处死,分离肿瘤并称重,尸检,肉眼观察是否有病变器官并记录。

[0189] 4.5数据统计

[0190] 实验数据除特别指出外,均以Mean±SEM表示;两组间数据采用非配对T检验,P<0.05认为有显著性差异。

[0191] 5试验结果

[0192] (1)受试化合物对人结肠癌HCT-116荷瘤小鼠体重的影响。

[0193] 各组动物平均体重见表4。

[0194] 表4不同日期小鼠体重(g,Mean±SEM)

[0195]

组	剂 量 (mg/kg)	Day 0 (g)	Day 1 (g)	Day 2 (g)	Day 4 (g)	Day 7 (g)
D1	400	19.98±0.49	19.48±0.58	17.45±0.81*	16.15±1.08**	19.80±1.40
D2	400	19.87±0.25	19.85±0.28	18.17±0.31**	17.75±0.44**	18.48±0.40
D3	350	19.95±0.09	19.23±0.31	17.70±0.26**	18.24±0.58*	19.51±0.48
D4	300	20.15±0.29	19.90±0.19	18.48±0.2**	19.07±0.36	19.85±0.38
Control	(NA)	20.55±0.37	20.43±0.45	20.07±0.38	20.02±0.29	19.33±0.26
组	剂 量 (mg/kg)	Day 9 (g)	Day 11 (g)	Day 14 (g)	Day 16 (g)	Day 18 (g)
D1	400	20.75±1.05	21.25±1.55	21.35±1.35*	21.75±1.25*	23.30±1.60**
D2	400	19.92±0.45	20.42±0.53	20.85±0.60*	21.13±0.51**	21.63±0.51**
D3	350	20.74±0.38	21.12±0.41	21.26±0.21**	22.00±0.40**	22.58±0.38**
D4	300	20.73±0.29*	21.05±0.31	20.90±0.34**	21.48±0.34**	21.95±0.27**
Control	(NA)	19.85±0.23	20.23±0.25	19.42±0.19	19.62±0.29	19.68±0.23
组	剂 量 (mg/kg)	Day 21 (g)	Day 23 (g)	Day 25 (g)	Day 28 (g)	Day 30 (g)
D1	400	22.30±1.30**	22.60±1.50*	23.20±1.70	23.80±1.50	23.60±1.20
D2	400	20.72±0.46*	20.60±0.40	20.88±0.48	20.18±0.44	20.33±0.55
D3	350	21.98±0.41**	22.44±0.41**	22.50±0.53**	22.12±0.48*	22.90±0.60
D4	300	21.63±0.30**	22.03±0.43**	22.30±0.49**	21.88±0.59	22.03±0.53
Control	(NA)	19.30±0.24	19.55±0.18	20.08±0.30	19.75±0.05	N/A

[0196] 表格中Day:天;\*p&lt;0.05,\*\*p&lt;0.01vs对照组。

[0197] 表5体重改变率

[0198]

组	剂 量	Day0 (%)	Day1 (%)	Day2 (%)	Day4 (%)	Day7 (%)
---	-----	----------	----------	----------	----------	----------

[0199]

	(mg/kg)					
D1	400	0.00	-2.55±0.77	-12.18±2.63**	-18.58±4.66**	-4.23±3.77
D2	400	0.00	-0.08±0.74	-8.54±1.31**	-10.63±2.13**	-6.98±1.43
D3	350	0.00	-3.59±0.66	-11.25±0.96**	-8.10±2.84	-1.68±2.50
D4	300	0.00	-1.17±1.27	-8.18±1.56**	-5.33±1.78	-1.43±1.92
Control	(NA)	0.00	-0.60±0.59	-2.35±0.75	-2.55±0.82	-5.85±1.13
组	剂 量 (mg/kg)	Day9 (%)	Day11 (%)	Day14 (%)	Day16 (%)	Day18 (%)
D1	400	0.42±1.92	2.77±4.27	3.29±3.29	5.24±2.74	12.70±4.20**
D2	400	0.21±1.42	2.72±1.85	4.87±2.08**	6.32±1.65**	8.83±1.43**
D3	350	4.50±1.93*	6.38±1.68*	7.12±1.19**	10.78±0.88**	13.71±0.63**
D4	300	2.91±0.55**	4.47±0.52*	3.72±0.73**	6.62±0.79**	8.99±1.38**
Control	(NA)	-3.30±1.54	-1.39±2.07	-5.39±1.69	-4.38±2.27	-4.05±2.20
组	剂 量 (mg/kg)	Day21 (%)	Day23 (%)	Day25 (%)	Day28 (%)	Day30 (%)
D1	400	7.90±2.90*	9.32±3.82*	12.20±4.70	15.14±3.64	14.22±2.22
D2	400	4.22±1.23**	3.66±1.05**	5.07±1.44	1.57±1.50	2.28±1.75
D3	350	10.72±1.67**	13.08±2.31**	13.34±2.34**	11.44±2.29**	15.37±2.93
D4	300	7.41±1.37**	9.37±1.82**	10.69±2.14**	8.62±2.68	9.36±2.21
Control	(NA)	-5.94±2.02	-3.59±1.66	-0.97±2.53	-2.68±5.27	N/A

[0200] 表格中Day:天;\*p<0.05,\*\*p<0.01vs对照组

[0201] 由上表中数据可看到,对结肠癌HCT-116荷瘤裸小鼠腹腔注射各化合物之后,D1组400mg/kg在给药第4天动物体重显著降低,其后体重稳定增长,在第14-30天与模型对照组比较体重显著升高。其他给药组动物体重与模型对照比较无显著性差异。

[0202] (2) 受试化合物对人结肠癌HCT-116荷瘤小鼠肿瘤体积的影响

[0203] 表6各组肿瘤体积具体数据 (mm<sup>3</sup>, Mean ± SEM)

[0204]

组	剂量 (mg/kg)	Day0 (mm <sup>3</sup> )	Day1 (mm <sup>3</sup> )	Day2 (mm <sup>3</sup> )	Day4 (mm <sup>3</sup> )	Day7 (mm <sup>3</sup> )
D1	400	39.36±6.16**	58.20±17.45**	58.20±17.45**	37.24±9.27**	36.82±28.63**

[0205]

D2	400	53.09±9.33**	50.78±14.16**	55.89±18.82**	45.96±20.25**	35.87±21.79**
D3	350	38.77±4.33**	36.40±3.98**	36.40±3.98**	23.00±3.08**	12.62±3.10**
D4	300	44.09±5.99**	52.03±12.91**	52.03±12.91**	37.37±10.46**	25.46±8.17**
Control	(NA)	109.55±8.60	180.51±9.97	221.87±11.44	296.98±22.98	432.47±39.48
组	剂量 (mg/kg)	Day9 (mm <sup>3</sup> )	Day11 (mm <sup>3</sup> )	Day14 (mm <sup>3</sup> )	Day16 (mm <sup>3</sup> )	Day18 (mm <sup>3</sup> )
D1	400	50.63±36.49**	101.02±78.57**	285.66±237.94*	495.95±408.83**	647.07±503.28**
D2	400	30.75±16.74**	57.29±33.03**	116.87±66.85**	169.73±88.15**	262.10±111.14**
D3	350	12.62±3.10**	14.28±3.69**	36.98±4.82**	80.10±11.07**	120.40±23.44**
D4	300	22.50±5.31**	26.19±5.79**	70.28±18.37**	142.77±49.34**	228.58±76.92**
Control	(NA)	590.34±60.83	976.15±83.07	1440.15±144.73	1811.14±119.30	1998.33±136.40
组	剂量 (mg/kg)	Day21 (mm <sup>3</sup> )	Day23 (mm <sup>3</sup> )	Day25 (mm <sup>3</sup> )	Day28 (mm <sup>3</sup> )	Day30 (mm <sup>3</sup> )
D1	400	1017.61±749.53	1017.61±749.53	1044.35±722.80	1296.79±847.87	1589.29±983.15
D2	400	489.13±174.91	501.98±170.25	569.05±189.18	689.78±203.52	900.52±250.44
D3	350	204.05±36.25	229.06±36.15	266.11±39.63	347.17±60.84	479.01±75.54
D4	300	375.06±86.27	420.73±76.08	491.29±83.78	608.08±85.37	781.78±105.33
Control	(NA)	2444.84±167.64	2361.69±146.79	2582.36±155.95	2689.30±116.86	N/A

[0206] \*p&lt;0.05,\*\*p&lt;0.01 vs 体积对照组。

[0207] 由上述各组肿瘤体积的数据可见,本发明的胞苷衍生物对肿瘤生长具有明显的抑制作用。

[0208] (3) 受试化合物对人结肠癌HCT-116荷瘤小鼠肿瘤的生长抑制率(TGI%)

[0209] 受试化合物对人结肠癌HCT-116荷瘤小鼠肿瘤的生长抑制率(TGI)见如下表7:

[0210] 表7 D1-D4对人结肠癌HCT-116荷瘤小鼠肿瘤的生长抑制率

[0211]

组	剂 量 (mg/kg)	Day 0 (TGI%)	Day 1 ( TGI%)	Day 2 (TGI%)	Day 4 ( TGI%)	Day7 ( TGI%)
D1	400	0.00	67.76	73.77	87.46	91.49

[0212]

D2	400	0.00	71.87	74.81	84.53	91.71
D3	350	0.00	79.83	83.59	92.26	97.08
D4	300	0.00	71.17	76.55	87.42	94.11
组	剂 量 (mg/kg)	Day 9 (TGI%)	Day 11 ( TGI%)	Day 14 (TGI%)	Day 16 (TGI%)	Day 18 (TGI%)
D1	400	91.42	89.65	80.16	72.62	67.62
D2	400	94.79	94.13	91.88	90.63	86.88
D3	350	97.86	98.54	97.43	95.58	93.97
D4	300	96.19	97.32	95.12	92.12	88.56
组	剂 量 (mg/kg)	Day 21 (TGI%)	Day 23 ( TGI%)	Day 25 (TGI%)	Day 28 (TGI%)	Day 30 (TGI%)
D1	400	58.38	56.91	59.56	51.78	43.36
D2	400	79.99	78.74	77.96	74.35	67.91
D3	350	91.65	90.30	89.70	87.09	82.93
D4	300	84.66	82.19	80.98	77.39	72.14

[0213] 化合物D1 400mg/kg组肿瘤抑制率最大值在Day 7,为91.49%,到16天为72.62%,到30天为43.36%;化合物D2 400mg/kg组肿瘤抑制率最大值在Day 9,为94.79%,到16天为90.63%,到30天为67.91%;化合物D3 350mg/kg组肿瘤抑制率最大值在Day 11,为98.54%,到16天为95.58%,到30天为82.93%;化合物D4 300mg/kg组肿瘤抑制率最大值在Day 11,为97.32%,到16天为92.12%,到30天为72.14%。

[0214] (4) 受试化合物对人结肠癌HCT-116荷瘤小鼠的肿瘤相对体积(RTV)

[0215] 受试化合物D1-D4对人结肠癌HCT-116荷瘤小鼠的肿瘤相对体积见如下表8:

[0216] 表8受试化合物对人结肠癌HCT-116荷瘤小鼠的肿瘤相对体积(Mean±SEM)

[0217]

组	剂量 (mg/kg)	Day 0 (RTV)	Day 1 (RTV)	Day2 (RTV)	Day 4 (RTV)	Day 7 (RTV)
D1	400	1.00	1.35±0.24	1.35±0.24*	0.89±0.12**	1.16±0.79*
D2	400	1.00	0.89±0.10**	0.95±0.15**	0.73±0.19**	0.52±0.23**
D3	350	1.00	0.98±0.12**	0.98±0.12**	0.65±0.10**	0.34±0.06**
D4	300	1.00	1.12±0.12	1.12±0.12	0.79±0.11*	0.55±0.10*
Control	(NA)	1.00	1.68±0.13	2.07±0.16	2.76±0.24	4.09±0.53

[0218]

组	剂量 (mg/kg)	Day 9 (RTV)	Day 11 (RTV)	Day 14 (RTV)	Day 16 (RTV)	Day 18 (RTV)
D1	400	1.61±0.98	3.18±2.18*	8.88±6.75	15.44±11.56	20.37±13.96
D2	400	0.46±0.17**	0.87±0.35**	1.80±0.69**	2.66±0.88**	4.20±1.02**
D3	350	0.32±0.05**	0.37±0.09**	1.00±0.00**	2.17±0.14**	3.16±0.39**
D4	300	0.55±0.12*	0.69±0.20*	1.81±0.54*	3.29±0.82 *	5.11±1.12 *
Control	(NA)	5.61±0.83	9.22±1.16	13.84±2.21	17.26±2.18	19.09±2.45
组	剂量 (mg/kg)	Day21RTV)	Day 23 (RTV)	Day 25 (RTV)	Day 28 (RTV)	Day 30 (RTV)
D1	400	32.34±20.40	32.34±20.40	33.53±19.21	42±22	51.88±24.88
D2	400	8.09±1.52	8.48±1.37	9.62±1.48	12.03±1.50	15.85±1.92
D3	350	5.55±0.66	6.21±0.61	7.22±0.53	9.28±0.73	12.93±0.90
D4	300	8.73±1.39	9.89±1.30	11.61±1.51	14.73±2.18	19.08±2.98
Control	(NA)	23.41±3.10	19.77±1.73	21.62±1.86	21.13±1.62	N/A

[0219] \*p&lt;0.05,\*\*p&lt;0.01vs体积对照组。

[0220] (5) 受试化合物对人结肠癌HCT-116荷瘤小鼠的相对肿瘤增殖率(T/C%)

[0221] 受试化合物对人结肠癌HCT-116荷瘤小鼠的相对肿瘤增殖率数据见如下表9:

[0222] 表9受试化合物对人结肠癌HCT-116荷瘤小鼠的相对肿瘤增殖率

[0223]

组	剂 量 (mg/kg)	Day 0 (T/C %)	Day 1 (T/C %)	Day 2 (T/C %)	Day 4 (T/C %)	Day 7 (T/C %)
D1	400	0.00	80.13	65.15	32.20	28.36
D2	400	0.00	53.10	46.01	26.55	12.76
D3	350	0.00	58.03	47.18	23.61	8.21
D4	300	0.00	66.57	54.13	28.56	13.41
组	剂 量 (mg/kg)	Day 9 (T/C %)	Day 11 (T/C %)	Day 14 (T/C %)	Day 16 (T/C %)	Day 18 (T/C %)

[0224]

D1	400	28.77	34.47	64.15	89.47	106.69
D2	400	8.24	9.44	12.98	15.42	21.99
D3	350	5.77	4.05	7.23	12.60	16.55
D4	300	9.76	7.43	13.07	19.05	26.76
组	剂 量 (mg/kg)	Day 21 (T/C %)	Day 23 (T/C %)	Day 25 (T/C %)	Day 28 (T/C %)	Day 30 (T/C %)
D1	400	138.14	163.55	155.09	198.76	209.10
D2	400	34.57	42.87	44.51	56.94	63.87
D3	350	23.70	31.41	33.40	43.93	52.09
D4	300	37.28	50.04	53.68	69.72	76.91

[0225] 化合物D1 400mg/kg组相对肿瘤增殖率在Day 7达到最小值28.36%，至Day 16天肿瘤增殖率为89.47%。化合物D2 400mg/kg组相对肿瘤增殖率在Day 9达到最小值14.41%，至Day 16天肿瘤增殖率为21.64%。化合物D3 350mg/kg组相对肿瘤增殖率在Day 11达到最小值3.41%，至Day 16天肿瘤增殖率为10.49%。化合物D4300mg/kg组相对肿瘤增殖率在Day 11达到最小值25.94%，至Day 16天肿瘤增殖率为37.96%。

[0226] 在系列化合物对人结肠癌HCT-116荷瘤裸小鼠移植瘤的生长抑制实验中，化合物D2、D3、D4对结肠癌HCT-116荷瘤裸小鼠移植瘤的肿瘤抑制率较好，一次性腹腔给药后至16天有显著的肿瘤抑制作用，对动物体重无明显影响，说明本发明的胞苷衍生物二聚体抗肿瘤活性高同时毒副作用小。



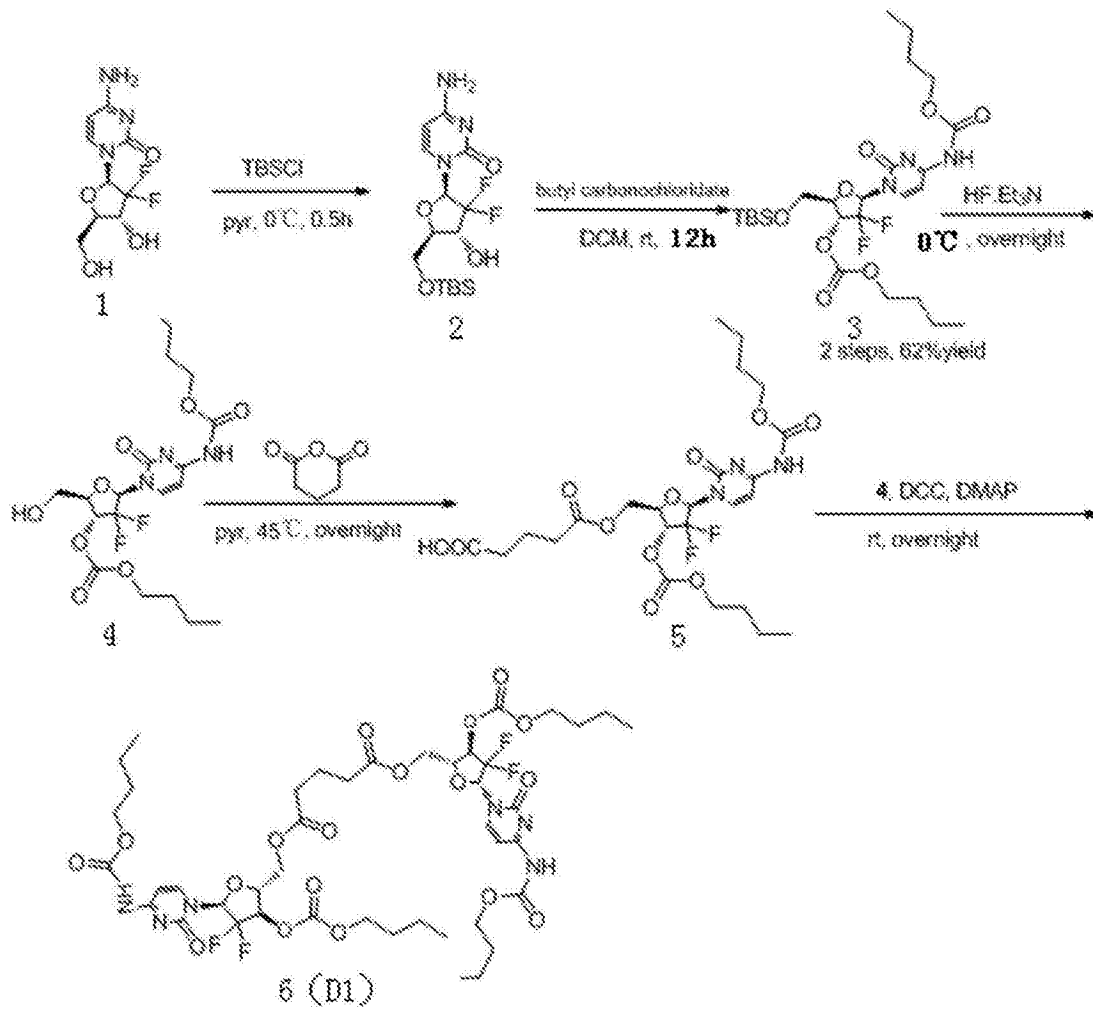


图1

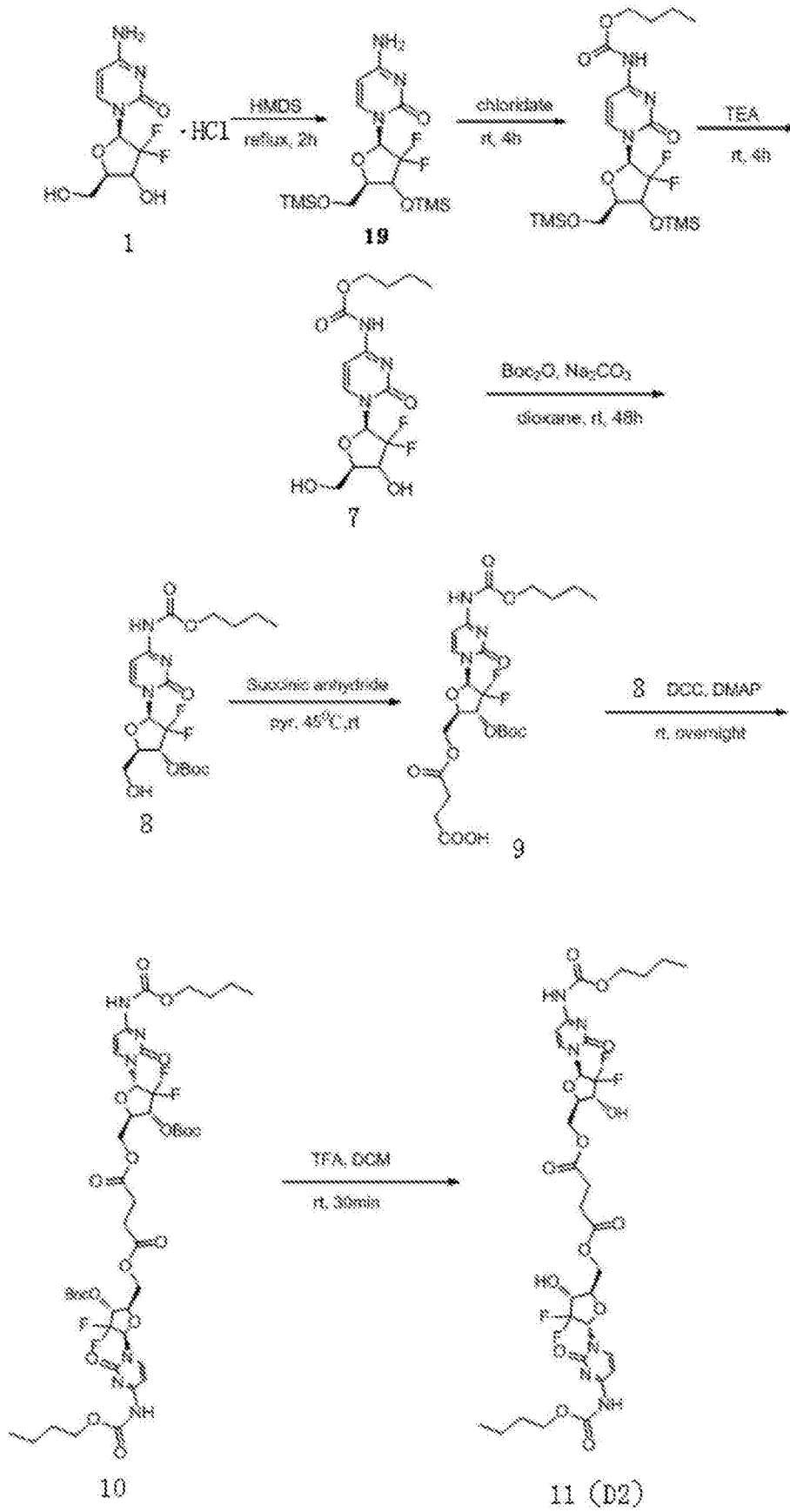


图2

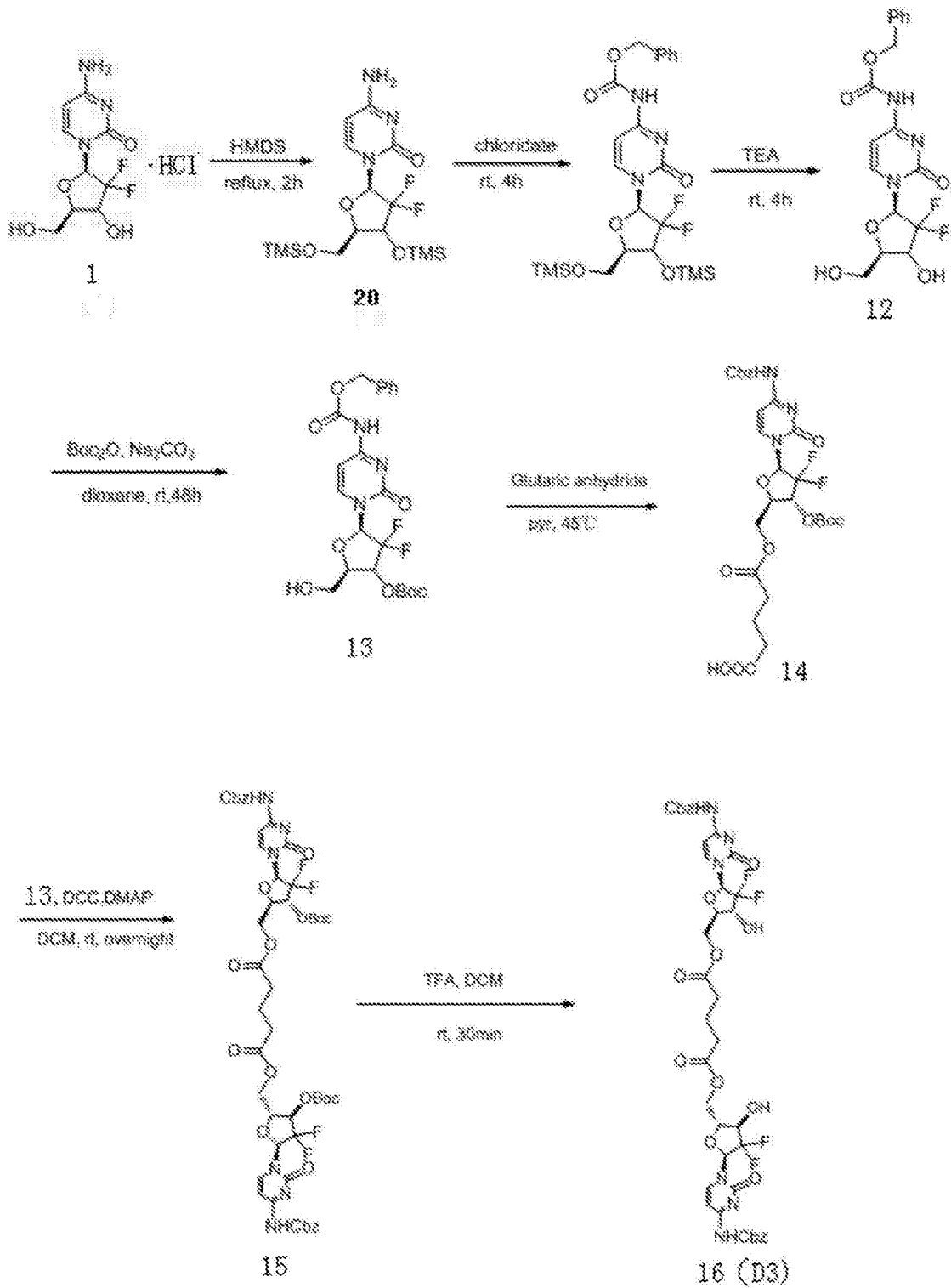


图3

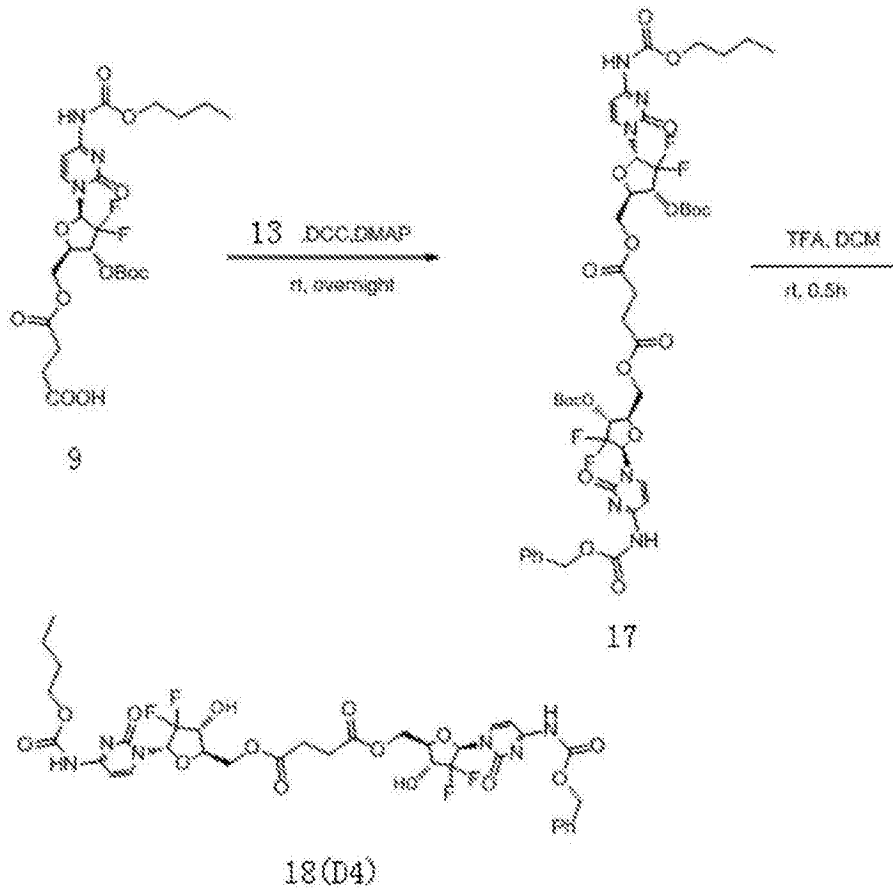


图4

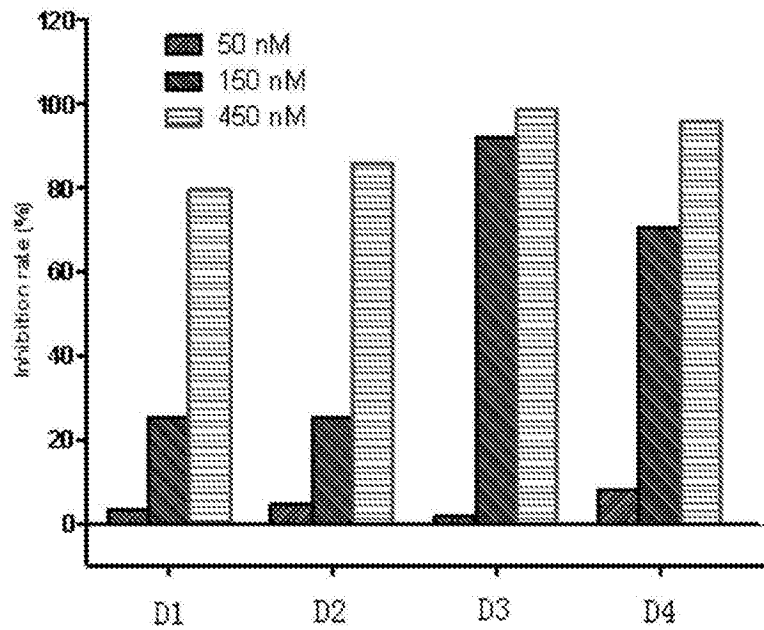


图5

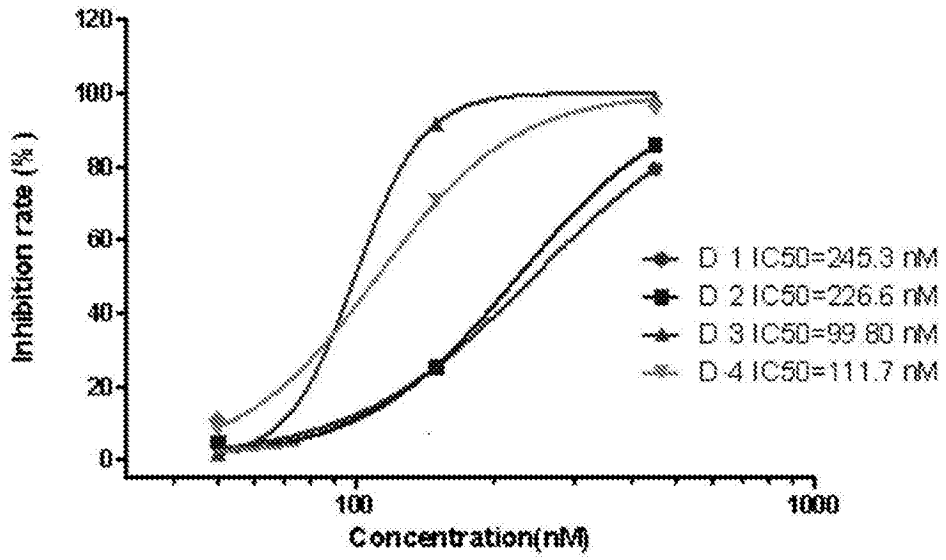


图6