

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 31/496 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200610157157.0

[45] 授权公告日 2008 年 12 月 24 日

[11] 授权公告号 CN 100444842C

[22] 申请日 2006.11.30

[21] 申请号 200610157157.0

[73] 专利权人 四川大学华西医院

地址 610041 四川省成都市武侯区国学巷
37 号

[72] 发明人 郑 鸿

[56] 参考文献

US2005/0130989A1 2005.6.16

WO2004/078732A1 2004.9.14

CN1826319A 2006.8.30

审查员 卞志家

[74] 专利代理机构 北京律诚同业知识产权代理有限公司

代理人 黄韧敏

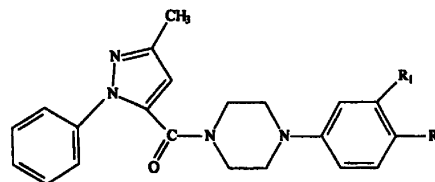
权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 19 页

[54] 发明名称

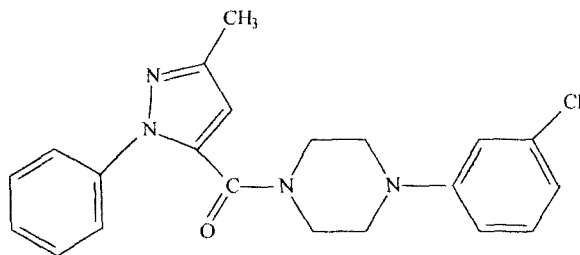
N-芳基杂环族化合物的制药用途

[57] 摘要

本发明涉及式(I)化合物以及含有它们的药物组合物在制备抑制肿瘤转移药物中的新用途。

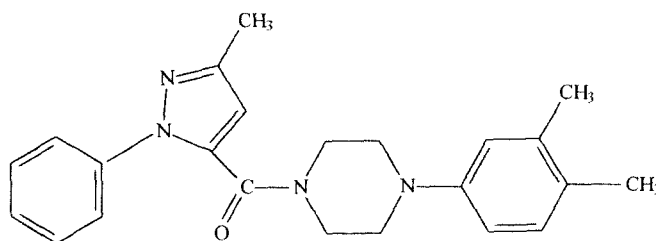


1、具有下述式 (II) 结构的化合物在制备抑制肿瘤转移的药物中的应用



(II)。

2、具有下述式 (III) 结构的化合物在制备抑制肿瘤转移的药物中的应用



(III)。

3、含有权利要求 1 或 2 所述的式 (II) 或式 (III) 所示结构化合物的药物组合物在制备抑制肿瘤转移的药物中的应用。

N-芳基杂环化合物的制药用途

技术领域

本发明涉及化合物的新用途，特别是涉及 N-芳基杂芳族化合物以及含有它们的药物组合物在抑制肿瘤转移中的新用途。

背景技术

恶性肿瘤是一类对人类健康威胁最大的疾病，尽管投入了大量的人力和物力，但肿瘤的发病率和死亡率仍呈不断上升趋势。肿瘤组织和细胞具有很多不同于正常组织和细胞的特性，其中转移(metastasis)是恶性肿瘤的最主要的生物学特征和标志，也是肿瘤患者治疗失败和死亡的根本原因。临床统计90%以上的恶性肿瘤患者死于肿瘤转移的相关并发症。过去40年对肿瘤细胞生长调控机制的认识及取得的成就要远远大于对肿瘤细胞侵袭转移机制的认识。由于对肿瘤转移机制缺乏根本了解，目前已有的治疗药物和方法仍限于针对肿瘤本身，而缺乏针对肿瘤转移的药物和方法。肿瘤转移是极其复杂的多基因调控和多步骤发展过程，并涉及到肿瘤细胞、机体、靶组织的相互影响和作用；涉及到一系列肿瘤相关基因的激活或失活。粘附分子、移动因子、细胞骨架、基质降解酶及其抑制物、转移抑制基因、血管形成因子和细胞游走因子等都在肿瘤侵袭和转移中起重要作用。肿瘤的侵袭和转移机制中，肿瘤血管形成和细胞游走是最重要的因素，它们又受多种血管形成因子和细胞游走因子的调节。因此，抑制血管内皮细胞的分裂增殖和肿瘤细胞游走，是治疗和预防肿瘤生长和转移的重要靶点。

目前已开发的抗肿瘤药物，从其作用机制上可分为：①抑制或阻断肿瘤细胞与外界间的信号传导通路；②干扰肿瘤细胞骨架系统的合成；③破坏或抑制肿瘤细胞的代谢过程；④阻断或抑制由肿瘤细胞诱导的新生血管形成过程。从其来源上可分为：①人工合成化合物；②重组蛋白质；③天然提取物。

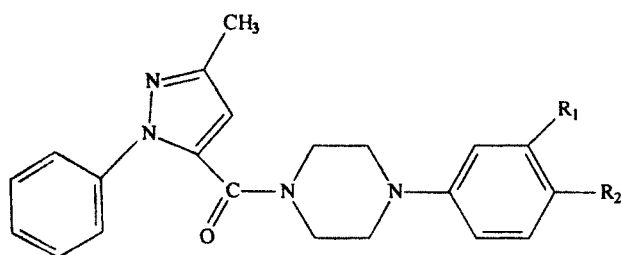
在专利WO/2004/078732和US2005/0130989A1中详细公开了包括本发明通式化合物在内的 N-芳基杂芳族化合物的制备方法及其抑制肿瘤细胞生长

的作用。

本发明所涉及的有关化合物由法国公司 Aventis Pharma S.A. 的 Le-Brun, Alain 等人于 2004 年化学合成并专利了其合成方法。目前已知的该化合物的用途仅限于对体外培养的细胞系的生长状态的影响：0.2 M 浓度时抑制 HCT116 内微管蛋白的聚合；0.002 M 浓度时抑制 HCT116 细胞的增殖；1 M 浓度时可抑制 22% 被处理的 HDMEC 细胞的附壁。而人们对该化合物对在体肿瘤生长状态的影响尤其是对肿瘤转移的影响则一无所知¹¹。

发明内容

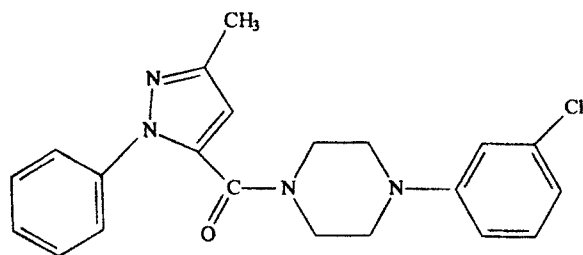
本发明的一个目的在于提供下述式 (I) 化合物在制备治疗肿瘤转移药物中的应用，



(I)

其中， R_1 为 Cl、 CH_3 ， R_2 为 Cl、 CH_3 、H。

优选的化合物是其中， R_1 为 Cl， R_2 为 H，具有如式 (II) 所示的结构：



(II)

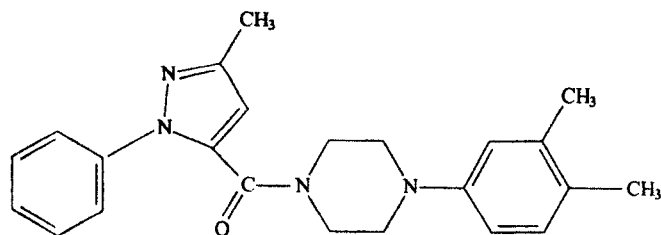
分子式 $C_{21}H_{21}ClN_4O$ (下称：WCH44)

化学名称 [4-(3-氯苯)哌嗪-1-基](5-甲基-2-苯基-2H-吡唑-3-基)-甲酮

[4-(3-Chlorophenyl)piperazin-1-yl](5-methyl-2-phenyl-2H-pyrazol-3-yl)-methanone

另一优选的化合物是其中， R_1 为 CH_3 ， R_2 为 CH_3 ，具有如式 (III) 所示

结构:



(III)

分子式: C₂₃H₂₆N₄O (下称: WCH57)。

体外细胞实验表明, 式 (II) 化合物 (下称 WCH44) 和式 (III) 化合物 (下称 WCH57) 对体外培养的肠癌细胞 HCT116 和 RAS 基因恶性转化细胞 C11-RAS 具有显著的生长抑制作用, 而对正常细胞 NIH/3T3 和 C11 则抑制作用较弱, WCH44 和 WCH57 对肿瘤细胞的生长具有选择性抑制作用。体内动物实验显示, WCH44 和 WCH57 能显著抑制人脑神经胶质瘤细胞 (C6) 和人非小细胞肺癌细胞系细胞 (CCL-256) 的裸鼠体内移植瘤的生长, 更重要的是, WCH44 能非常显著地抑制裸鼠移植瘤肺转移的发生。体外血管环生长试验和体内毛细血管侵入试验显示 WCH44 和 WCH57 可显著抑制由 b-FGF 诱导的体内外新生血管的形成; 细胞周期分析显示 WCH44 和 WCH57 显著影响人前列腺癌细胞 (Dul45) 的细胞周期分布, 使细胞周期阻断在 G2/M 期, 和已知的血管形成抑制剂 Combratastatin 的作用完全相似, WCH44 对小鼠血管内皮细胞 (SEND) 具有上述相似的作用, 但 WCH57 对 SEND 细胞周期的影响不明显, 而是具有显著的诱导细胞凋亡的作用。WCH44 和 WCH57 能有效抑制 bFGF 诱导的参与调控新生血管形成的转录因子 Net 的磷酸化过程, 而对 MAP 激酶信号通路的其他激酶分子 p42/44、P-JNK、P-p38 的磷酸化没有影响, *net* 基因是一种与血管形成及细胞增殖相关的基因²⁻⁹, 并通过对 PAI-1 基因表达的调控调节细胞的游走¹⁰。基因芯片分析显示体内外实验中, WCH44 和 WCH57 可使一系列基因的 mRNA 的表达发生改变: 抑制癌基因的表达水平; 抑制多种蛋白酶及蛋白激酶的表达水平, 如 MAPK13、MMP3 从而降低细胞增殖活性和转移能力; 增强多种蛋白酶及蛋白激酶抑制剂的表达水平; 增加肿瘤细胞凋亡, 提高 Bcl2、BAD、BAX、及 P53 的表达水平; 降低肿瘤细胞分泌 VEGF 和 VEGFB 的能力, 抑制血管形成及肿瘤的

生长的转移。因此本发明的化合物具有抑制肿瘤转移的作用。

附图简要说明

图 1 显示 WCH44 对转录因子 Net 磷酸化水平的影响；

其中，左图为肿瘤细胞，右图为在 b-FGF 诱导调件下的正常细胞；44 代表 WCH44；45 代表 WCH45；

图 2 显示 WCH44 和 WCH57 对转录因子 Net 磷酸化水平的影响(20nM)；

其中，左图为在 b-FGF 诱导调件下的正常成纤维细胞，右图为 3T3 细胞，44：WCH44、45：WCH45、58：WCH58、57：WCH57；

图 3 显示 WCH44 (50nM) 对正常细胞、恶性转化细胞和肿瘤生长的不同作用效果；

图 4 显示 WCH44 和 WCH57 (50nM) 对前列腺癌细胞系 (Dul45) 细胞周期的影响；

图 5 显示 WCH44 和 WCH57 (50nM) 对小鼠血管内皮细胞 (SEND) 细胞周期的影响；

图 6 显示 WCH44 对肿瘤细胞 (非小细胞肺癌 CCL 细胞系) 多种基因表达的作用；

图 7 显示 WCH44 和 WCH57 对新生血管的生成的影响；

图 8 显示 WCH44 对新生血管形成的影响；

图 9 显示 WCH44 对裸鼠皮下种植肿瘤生长的影响；

图 10 显示 WCH44 和 WCH57 对裸鼠皮下种植肿瘤所致肺转移的影响(非小细胞肺癌 CCL)；

图 11 显示 WCH44 对裸鼠皮下种植肿瘤所致肺转移的影响 (神经胶质瘤 C6)；

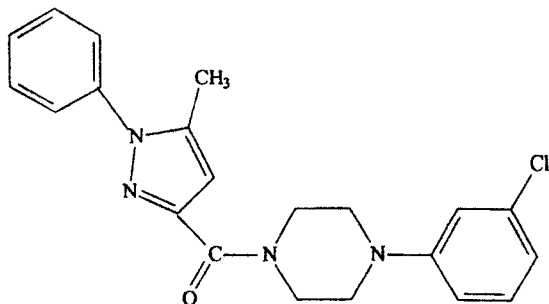
图 12 显示 WCH44 对肿瘤实体中多种基因表达水平的影响，其中肿瘤由非小细胞肺癌 CCL 细胞系在裸鼠体内生成。

具体实施方式

以下通过药效学试验证明本发明的有益效果。

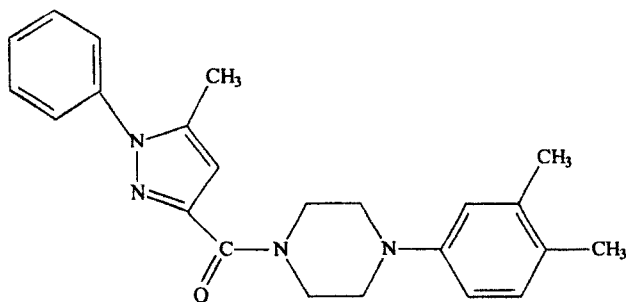
为了更好地说明本发明的效果，分别选择了式 (II) 化合物的无效同分异

构体式 (IV) 化合物 (以下简称 WCH45) 和式 (III) 化合物的无效同分异构体式 (V) 化合物 (以下简称 WCH58) 作为药效实验的对照组, 式 (IV) 和式 (V) 化合物的结构式如下:



WCH45 (C₂₁H₂₁ClN₄O)

(IV)



WCH58 (C₂₃H₂₆N₄O)

(V)

以下实验中所使用的材料如无特别说明均为市售购买。

本发明化合物的制备:

式 (II) 化合物的制备方法: 参见专利申请 WO/2004/078732 中 “Schema 1”, “Schema 2”, “Schema 3”, “Schema 4”, “Schema 5”, “Schema 6”, “Schema 7”, “Schema 8”, “Schema 9”, “Schema 10”, “Schema 11”, “Schema 12”, “Schema 13”, “Schema 14”, “Schema 15”, “Schema 16”, “Schema 17”, “Schema 18”, “Schema 19”, 以及 “Exemple 1”, “Exemple E14”。

式 (III) 化合物的制备方法: 参见专利申请 WO/2004/078732 中 “Schema 1”, “Schema 2”, “Schema 3”, “Schema 4”, “Schema 5”, “Schema 6”, “Schema 7”, “Schema 8”, “Schema 9”, “Schema 10”, “Schema 11”, “Schema 12”, “Schema 13”, “Schema 14”, “Schema 15”, “Schema 16”, “Schema 17”, “Schema 18”, “Schema 19”, 和 “Exemple 2”。

式(IV)及式(V)化合物的制备方法:参见专利申请 WO/2004/078732: “Schema 1”, “Schema 2”, “Schema 3”, “Schema 4”, “Schema 5”, “Schema 6”, “Schema 7”, “Schema 8”, “Schema 9”, “Schema 10”, “Schema 11”, “Schema 12”, “Schema 13”, “Schema 14”, “Schema 15”, “Schema 16”, “Schema 17”, “Schema 18”, “Schema 19”。

【实施例 1】本发明化合物选择性抑制 *net* 基因所编码蛋白的磷酸化

已知 Net 的磷酸化状态对肿瘤的发生,肿瘤的血管生成过程和细胞游走都有极为重要的作用²⁻¹⁰,降低 Net 的磷酸化水平对肿瘤生长的抑制效果明显⁹。

方法:对 Net 磷酸化本底水平极低的 NIH3T3 小鼠成纤维细胞,分别用 WCH44 及其无效同分异构体 WCH45 进行处理,10nM 处理 3 小时及 20 小时;处理后的细胞再接受 40ng/ml bFGF (R&D Systems) 的处理 15 分钟,收获细胞后将其裂解物作免疫印记 (Western blotting) 分析。结果见图 1、图 2。

结果显示:WCH44 能有效抑制 b-FGF 诱导的 Net 磷酸化过程,而对 MAP 激酶信号通路的其他激酶分子 p42/44、P-JNK、P-p38 的磷酸化没有影响。

类似地,对 Net 磷酸化本底水平较高的人脑神经胶质瘤细胞 C6、人非小细胞肺癌细胞系 CCL 细胞,分别用 WCH44, WCH57 及其无效同分异构体 WCH45, WCH58 进行处理。结果显示:WCH44 及 WCH57 能有效抑制肿瘤细胞内本底较高的 Net 磷酸化水平。结果见图 1。

【实施例 2】本发明化合物选择性抑制恶性转化细胞和肿瘤细胞的生长

将细胞周期阻断于 G2/M 期,不能进入下一周期,并增加单个细胞中染色质的含量,最终导致细胞死亡;并使细胞增殖相关基因 mRNA 的表达发生改变:①抑制一系列癌基因的表达水平;②抑制多种蛋白酶及蛋白激酶的表达水平,从而降低细胞增殖活性;③增强多种蛋白酶及蛋白激酶抑制剂的表达水平;④增加肿瘤细胞凋亡,提高 Bcl₂、BAD、BAX、及 P₅₃ 的表达水平;⑤降低肿瘤细胞分泌 VEGF 和 VEGFB 的能力(见表 1)。

表1:

化合物名称	分子式及分子量	IC50 Net	IC50 VEGF	IC50 细胞毒性
WCH44	$C_{21}H_{21}ClN_4O$; 380.88	11.94nM	7nM	229nM
WCH45	$C_{21}H_{21}ClN_4O$; 380.88	670.5nM	442nM	1404nM
WCH57	$C_{23}H_{26}N_4O$; 374.49	22.4nM	72nM	>1111nM
WCH58	$C_{23}H_{26}N_4O$; 374.49	600.99nM	1499nM	>3333nM

方法:

A. 生长曲线: 正常小鼠成纤维细胞 NIH3T3 (3T3 ATCC), 由 pRas CTBX2 (Ras-V₁₂) (或其对照 p Δ Ras 空载体转染) (Wasylyk et al 1987), 然后由 750 μ g/ml G418 筛选出稳定表达 Ras-V₁₂ 的 NIH3T3 克隆细胞系 C11-Ras, 转染对照 p Δ Ras 空载体的 NIH3T3 克隆细胞系 (C11) (*Institute de Genetique et de Biologie Moleculaire et Cellulaire, France*), 人结肠癌细胞系 HCT116 (ATCC), 共同组成一组 (四个) 生长曲线基本一致的实验组。在各自相应的培养条件下, 以相同的细胞数量开始培养及实验 (起始细胞浓度为 20% 铺满状态)。然后每组细胞系分别培养于含 10~100nm 浓度的 WCH44 的培养基中, 并于第 1-5 天收获细胞, 进行 MTT 分析, 以测算相同 WCH44 培养条件下各细胞系从第 1 天至第 5 天的细胞数量。结果见图 3。结果显示, 100nM 的 WCH44 能显著抑制结肠癌细胞 HCT116 和 RAS 基因恶性转化细胞 C11-RAS 的生长, 而对正常细胞 NIH/3T3 和 C11 则抑制作用较弱, 肿瘤细胞较正常细胞对 WCH44 的生长抑制作用更敏感, 说明 WCH44 对肿瘤细胞的生长具有选择性抑制作用。

B. 细胞周期分析: 人前列腺癌细胞系 (Du145 (ATCC)) 和小鼠血管内皮细胞系 (SEND (*Institute de Genetique et de Biologie Moleculaire et Cellulaire, France*))。用 WCH44, WCH57 及其无效同分异构体 WCH45, WCH58 分别对其进行处理 (相同浓度 50 μ M 和时间 24h)。处理后的细胞进行固定和 PI 染色, 进入流式细胞仪进行细胞染色质含量与细胞周期的分析。结果见图 4, 5。结果显示 WCH44 和 WCH57 显著影响二种细胞的细胞周期

分布, 可使人前列腺癌细胞系 (Dul45) 的细胞周期阻断在 G2/M 期, 而且 G0/G1 期细胞明显减少, 这与已知的血管形成抑制剂 Combratastatin 的作用完全相似; WCH44 对小鼠血管内皮细胞 (SEND) 具有上述相似的作用, 但化合物 WCH57 对 SEND 细胞对 G2/M 期的阻断不明显, 而主要诱导细胞凋亡。

C. 基因芯片分析: 选择人非小细胞肺癌细胞系 CCL-256 (ATCC)。培养至 80% 铺满时, 换成含 5 μ M WCH44 的培养基培养 30 分钟后, 收获细胞, 提取 RNA, 与以下 Chip 杂交并分析结果: “Atlas Mouse Cancer 1,2 Array” 和 “Atlas Mouse cDNA Expression Array” (Clontech)。结果见图 6, 表达上调的基因包括: 蛋白激酶或蛋白酶抑制剂 (蛋白 C 抑制剂、丝氨酸蛋白酶抑制剂 3、细胞周期素依赖的蛋白激酶抑制剂 1); 细胞周期和凋亡相关基因 (Bcl-x、bcl-2 相关死亡蛋白、BAX- α 、TP53; 其他基因 (淋巴毒受体、内质网分子伴侣 ERp72、DNA 双链断裂修复基因 RAD2 同源序列、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C3、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 B)。表达下调的基因包括: 蛋白酶和蛋白激酶 (MAPKK1、MAPKK5、MAPK14、丝氨酸/苏氨酸激酶 5、丝氨酸/苏氨酸激酶 6、蛋白质酪氨酸激酶 9、EGF 受体底物、蛋白酶 B、MAP 激酶 p38、p44-MAPK(ERK1)、整合素结合蛋白激酶、细胞周期素依赖的蛋白激酶 7、蛋白激酶 C 底物、IL-1 受体激酶相关受体、MAPK A PK2), 整合素基因 (β 1 整合素、 β 7 整合素、 α 3 整合素); 癌基因和转化相关基因 (fyn 原癌基因、SHC 转化蛋白、c-myc 原癌基因、禽肉瘤病毒 CT10 癌基因同源序列、ski 原癌基因、abl 原癌基因); 生长因子基因 (VEGF、VEGF-B); 磷酸化酶基因 (蛋白质酪氨酸磷酸化酶); 层粘蛋白 β 1 亚单位 1、层粘蛋白 B2 亚单位、层粘蛋白 α 5 亚单位前体。

【实施例 3】本发明化合物抑制新生毛细血管的生长

A. 小鼠主动脉环毛细血管生成实验

小鼠胸主动脉全段分离后切为 1mm 长的小段, 每小段置于 400 μ l “Matrigel[®]” 中 (R&D System), 先在 EGM-2 培养液 (Clontech) 中培养 24 小时, 然后再在 EBM 培养液 (Clontech) 中培养 3 天。然后分别于 EBM 培养液中加入 5nM, 50nM WCH44 或其无效同分异构体 WCH45; 1 μ M, 10 μ M

WCH57 或其无效同分异构体 WCH58。于第 5 天用相差显微镜观察毛细血管生长状态。然后彻底洗去该培养液，换入新的 EBM 培养液培养 2 天，继续观察毛细血管生长状态。结果见图 7，结果显示，WCH44 对小鼠主动脉环新生毛细血管的生长具有显著的抑制作用，可完全抑制新生毛细血管的生长，并且这种生长抑制作用在去药两天后，也不可逆。

B. 毛细血管侵入试验

将 20ng b-FGF 与 200 μ l“Matrigel[®]”混合，然后分别加入 WCH44(200nM) 及其无效同分异构体 WCH45 (2 μ M)。注入正常小鼠皮下，形成半固体的球形。4 天后取出球形，固定，石蜡包埋切片，作免疫组化分析：用抗 CD31 抗体标记血管内皮细胞，VECTASTAIN Elite ABC Kit 呈深灰色染色。结果见图 8，分别为球体的纵横切面，图中箭头所指为免疫组化染色阳性的血管内皮细胞。结果显示 200 μ M 的 WCH44 可显著抑制由 b-FGF 诱导的体内“Matrigel[®]”中的新生血管的形成，使新生毛细血管的生长阻断于“Matrigel[®]”球体的外周区域，而不继续向内部侵入，而其无效同分异构体 WCH45 作为则缺乏此作用，新生血管在“Matrigel[®]”球体内部和中心大量生长。

【实施例 4】本发明化合物抑制小鼠肿瘤生长

人非小细胞肺癌细胞系 CCL-256 (ATCC) 和人脑神经胶质瘤细胞 C6 细胞系 (ATCC)。使用 Bulb C nu/nu 小鼠，体重 20-20g 雌性。每组动物将最终肿瘤最大与最小的老鼠排除在统计之外，取所剩下的动物进入统计。用 10%DMSO/PBS 分别溶解 WCH44, WCH45; 和 WCH57, WCH58 至所需浓度。无菌操作，腹腔内注射 200 μ g/kg 体重，每日一次，持续 4 周。

A. CCL256 细胞系：4 只实验鼠， 1×10^6 细胞分别皮下注射 (100 μ l)。20 天后处死动物，剥离肿瘤，在 PBS 溶液中制成细胞匀浆，再将 $1 \times 10^6/100$ μ l 上述制备的细胞匀浆分别接种至 60 只实验鼠背部皮下，细胞接种后当天开始分实验组和对照组 (各 12 只鼠) 分别行腹腔内注射 WCH44, WCH45; 和 WCH57, WCH58。

B. C6 细胞系： 1×10^6 细胞皮下注射 (100 μ l)。20 天后处死动物，剥离肿瘤，在 PBS 溶液中制成细胞匀浆，再将 $1 \times 10^6/100$ μ l 细胞匀浆分别接种至

14 只实验鼠皮下，细胞接种后第 8-10 天，当肿瘤直径平均达到 0.5cm。此时，再开始分别向实验组和对照组（各 7 只鼠）腹腔内注射 WCH44 及 WCH45。

肿瘤细胞接种四周后停药，处死动物，解剖剥离肿瘤。称瘤重，取双侧肺，及全肝。将双肺，全肝及 80% 体积肿瘤用 10%PFA 固定，石蜡包埋切片（全器官每隔 30 μ m 制 10 μ m 切片一张，HE 染色，10 倍光镜观察计数双肺及全肝镜下转移灶数量。结果见图 9, 10, 11。结果显示，WCH44 能显著抑制 CCL256 细胞和 C6 细胞裸鼠移植瘤的体内生长（图 9）；更重要的是，WCH44 和 WCH57 能显著抑制 CCL256 细胞和 C6 细胞裸鼠移植瘤的肺转移的发生；在 C6 细胞裸鼠移植瘤中，对照的无效同分异构体 WCH45 处理组的平均肺转移数为 23 个，而 WCH44 处理组仅为 2 个（图 11）；在 CCL 细胞裸鼠移植瘤中，WCH45 处理组的平均肺转移数为 18 个，而 WCH44 处理组仅为 2 个。

另 20% 体积肿瘤，置入“Trizol[®]”溶液，机械匀浆提取 RNA，与“Atlas Mouse Cancer 1.2 Array”和“Atlas Mouse cDNA Expression Array”杂交，结果见图 12。结果发现经 WCH44 处理的 CCL 移植瘤中的一些蛋白酶和蛋白激酶、生长增殖相关因子等基因表达下调，包括 MAPK13、MMP3、丝氨酸/苏氨酸激酶 25、MAPKAPK2、蛋白质酪氨酸磷酸化酶、巨噬细胞刺激因子 1 受体、克隆形成因子 1 受体、酪氨酸激酶受体 1、PI3 激酶、FGFR1、IGFBP1 等；而另一些可能抑制细胞增殖和生长有关的基因表达上调，包括：ephrinB1、Tolloid-like 1、细胞周期素 E2、抑瘤素 M（oncostatin M）、卵泡抑素、INF γ 受体 2。

参考文献：

1. Patent: WO2004/078732.
2. Patent: US2005/0130989A1
3. Patent: EP1332372
4. Patent: US2004053833
5. Ayadi, A., Suelves, M., Dolle, P., and Wasyluk, B., 2001a. Net, an Ets ternary complex transcription factor, is expressed in sites of vasculogenesis, angiogenesis, and chondrogenesis during mouse development. *Mech. Dev.* **102**: 205-208.

6. Ayadi, A., Zheng, H., Sobieszczuk, P., Buchwalter, G., Moerman, P., Alitalo, K., and Wasylyk B. 2001b. Net-targeted mutant mice develop a vascular phenotype and up-regulate *egr-1*. *EMBO J.* **20**: 5139-5152.
7. Giovane, A., Pintzas, A., Maira, S.M., Sobieszczuk, P., and Wasylyk, B. 1994. Net, a new ets transcription factor that is activated by Ras. *Genes & Dev.* **8**: 1502-1513.
8. Grugel, S., Finkenzeller, G., Weindel, K., Barleon, B., and Marme, D. 1995. Both v-Ha-Ras and v-Raf stimulate expression of the vascular endothelial growth factor in NIH 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 25915-25919.
9. Zheng, H., C. Wasylyk, A. Ayadi, J. Abecassis, J. A. Schalken, H. Rogatsch, N. Wernert, S. M. Maira, M. C. Multon, and B. Wasylyk. 2003. The transcription factor Net regulates the angiogenic switch. *Genes Dev.* **17**:2283-2297.
10. Buchwalter G, Gross C, Wasylyk B. 2005. The ternary complex factor Net regulates cell migration through inhibition of PAI-1 expression. *Mol Cell Biol.* 2005 Dec;25(24):10853-62.
11. "Preparation of N-arylheteroaryls, in particular N-phenylpiperazinyl methanones, as inhibitors of tubulin polymerization and their compositions for treatment of cancer."

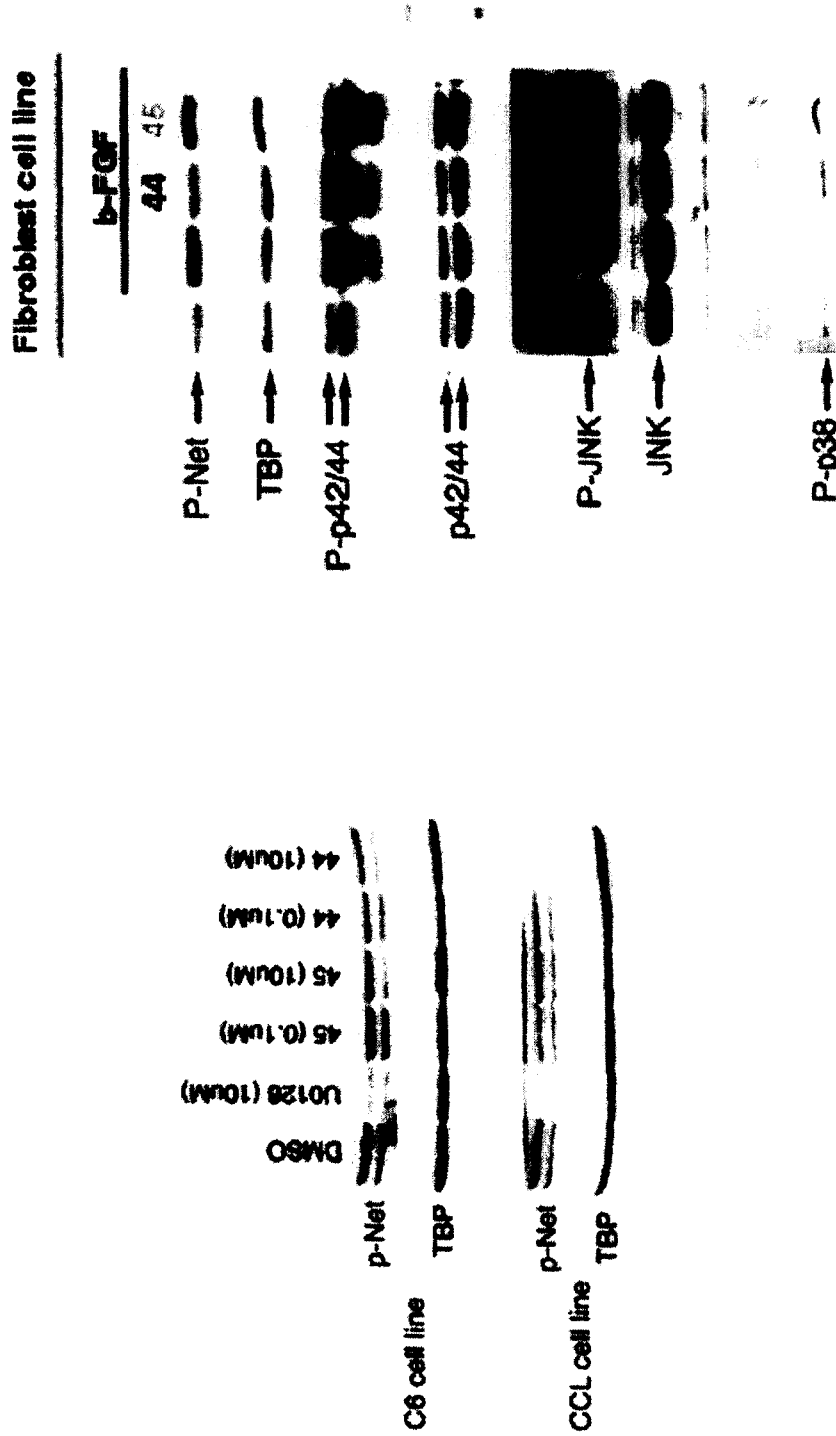


图 1

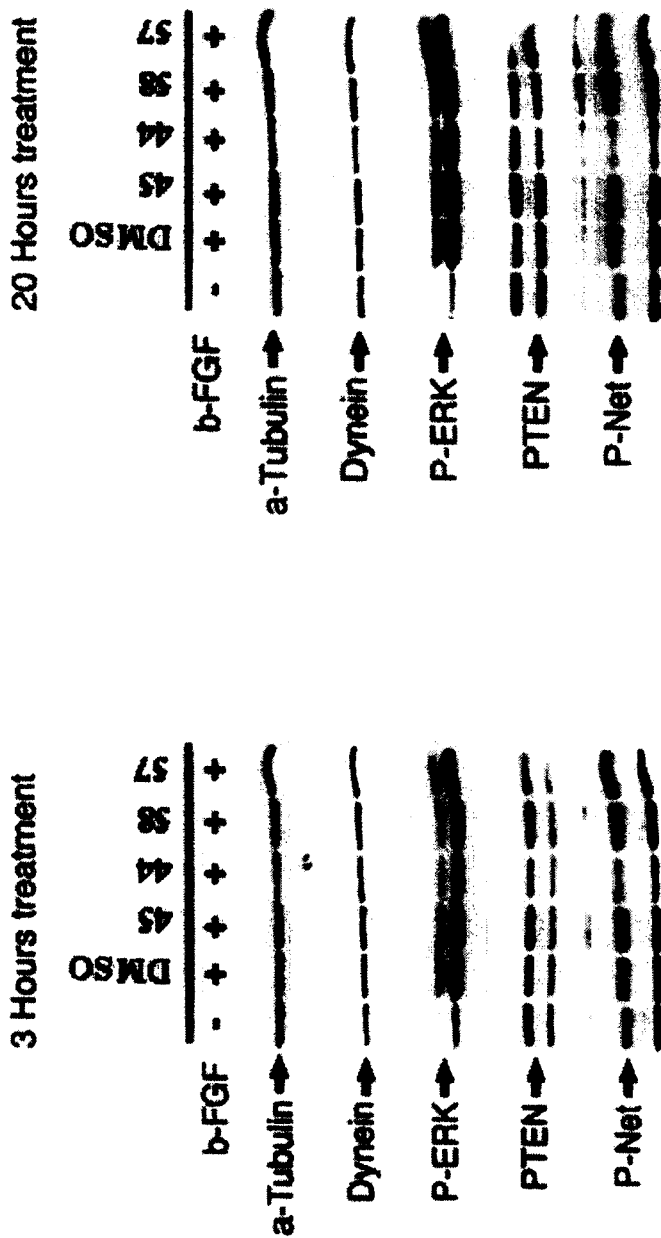


图 2

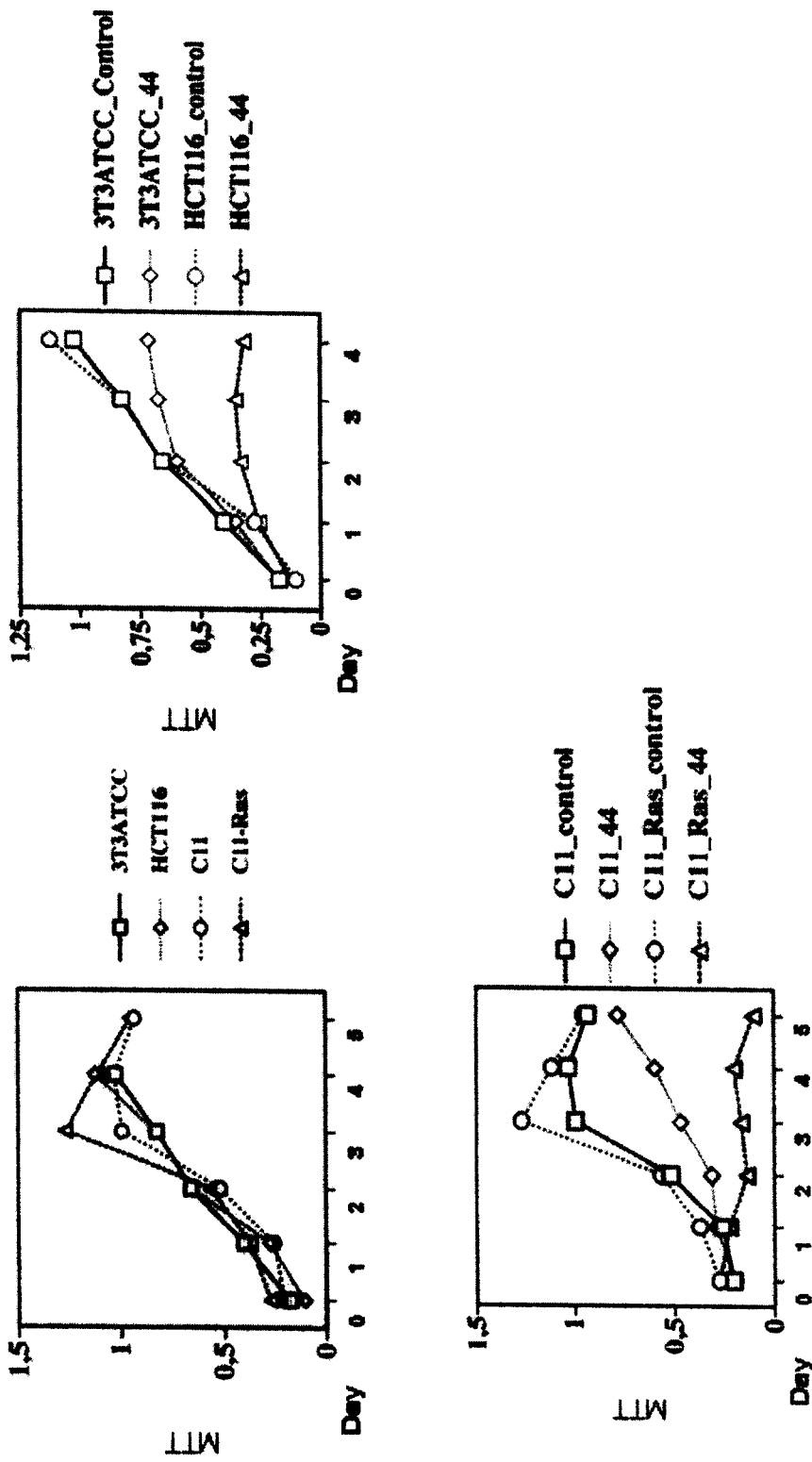
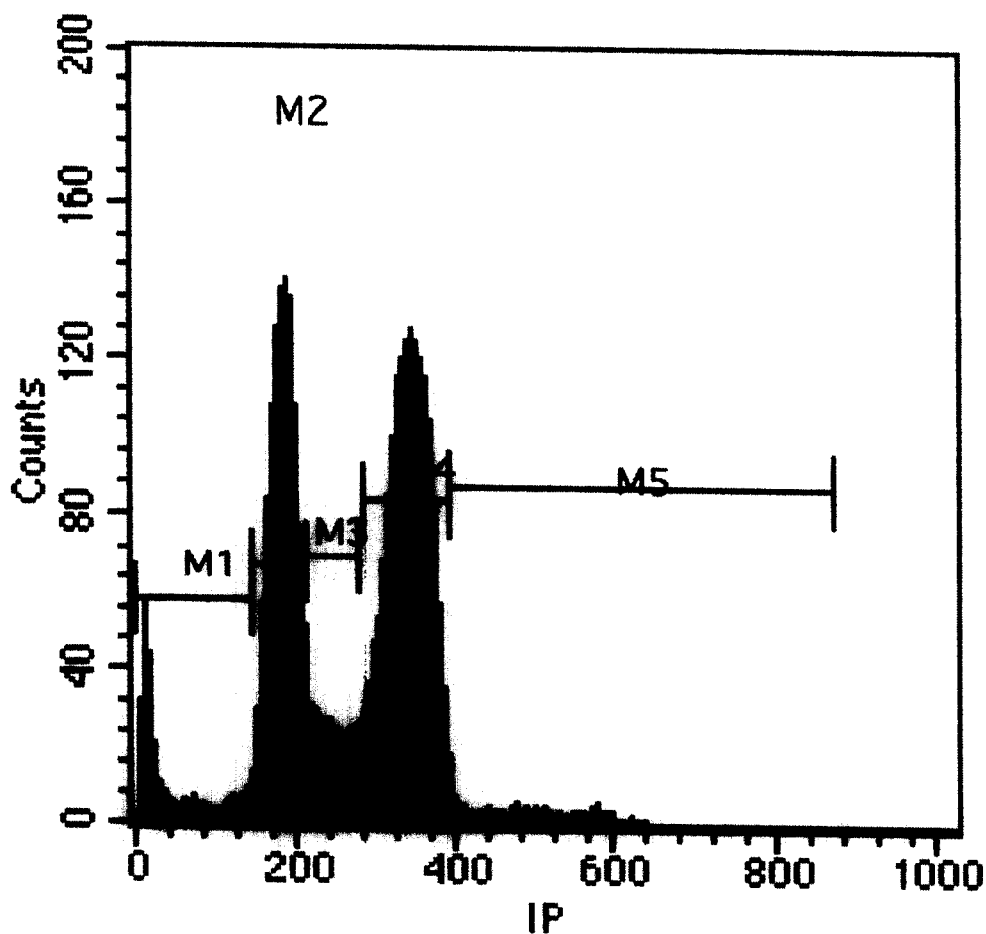


图 3



File: 145621/01/06.003

Sample ID: DU14544 50NM

Tube: Untitled

Acquisition Date: 21-Jan-06

Gated Events: 13833

X Parameter: FL3-H IP (Linear)

Histogram Statistics

Log Data Units: Linear Values

Patient ID:

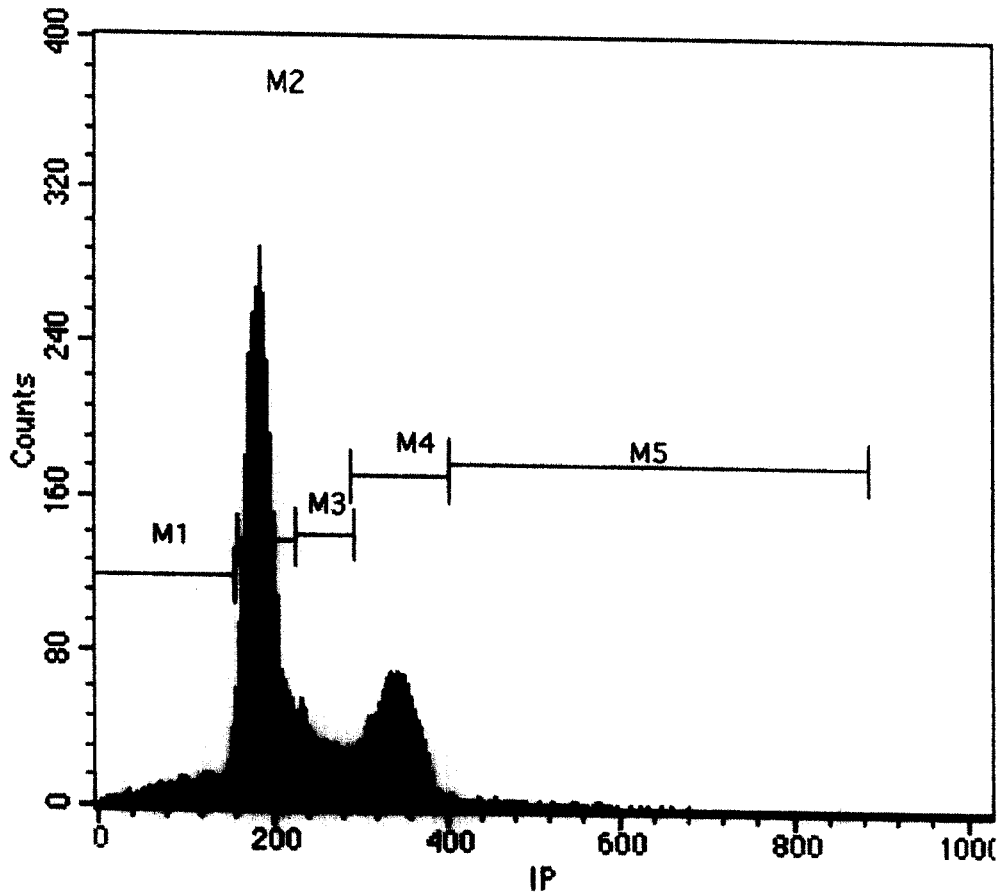
Panel: Acquisition Tube List

Gate: G2

Total Events: 20000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean
All	0, 1023	13833	100.00	69.16	264.81
M1	0, 143	648	4.68	3.24	42.10
M2	142, 209	4599	33.25	22.99	181.08
M3	213, 279	1185	8.57	5.92	243.56
M4	281, 392	7046	50.94	35.23	335.38
M5	391, 871	272	1.97	1.36	488.89

图 4-1

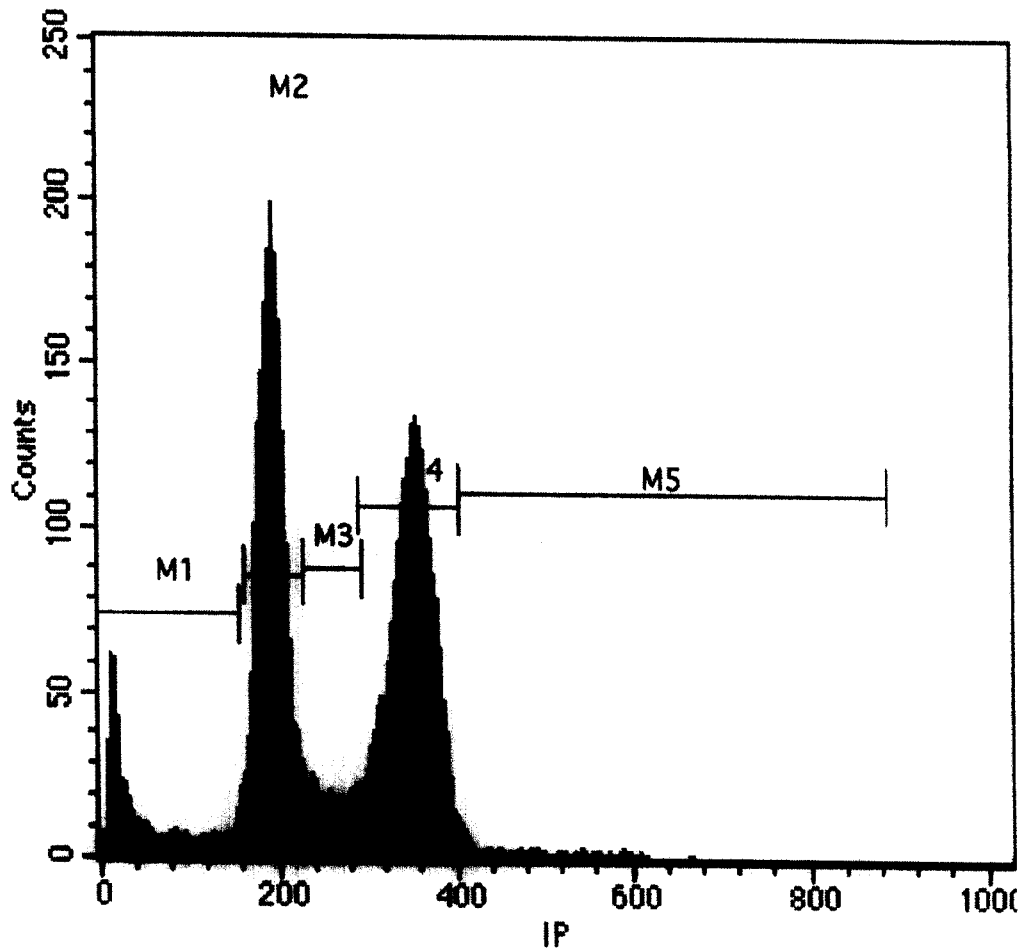


File: du145621/01/06.010
 Sample ID: DU145 45 50NM
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 21-Jan-06
 Gated Events: 14974
 X Parameter: FL3-H IP (Linear)

Histogram Statistics
 Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Acquisition Tube List
 Gate: G2
 Total Events: 20000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean
All	0, 1023	14974	100.00	74.87	228.78
M1	0, 158	1032	6.89	5.16	114.48
M2	159, 226	8423	56.25	42.12	186.02
M3	227, 293	1762	11.77	8.81	255.83
M4	291, 402	3657	24.42	18.29	336.07
M5	405, 884	165	1.10	0.83	483.59

图 4-2

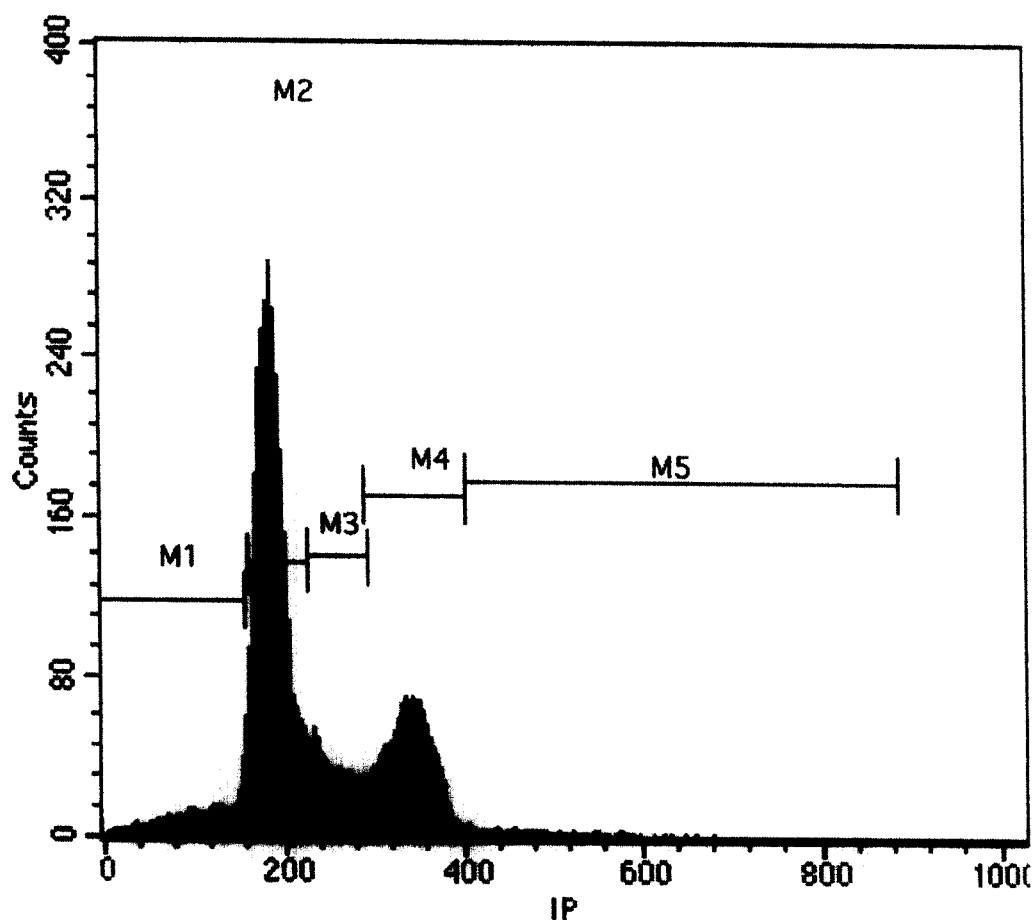


File: 145621/01/06.008
 Sample ID: DU145 57 50NM
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 21-Jan-06
 Gated Events: 14203
 X Parameter: FL3-H IP (Linear)

Histogram Statistics
 Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Acquisition Tube List
 Gate: G2
 Total Events: 20000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean
All	0, 1023	14203	100.00	71.02	258.39
M1	0, 158	1169	8.23	5.85	54.21
M2	159, 226	5501	38.73	27.51	190.86
M3	227, 293	928	6.53	4.64	258.80
M4	291, 402	6481	45.63	32.41	346.67
M5	405, 884	163	1.15	0.81	489.91

图 4-3

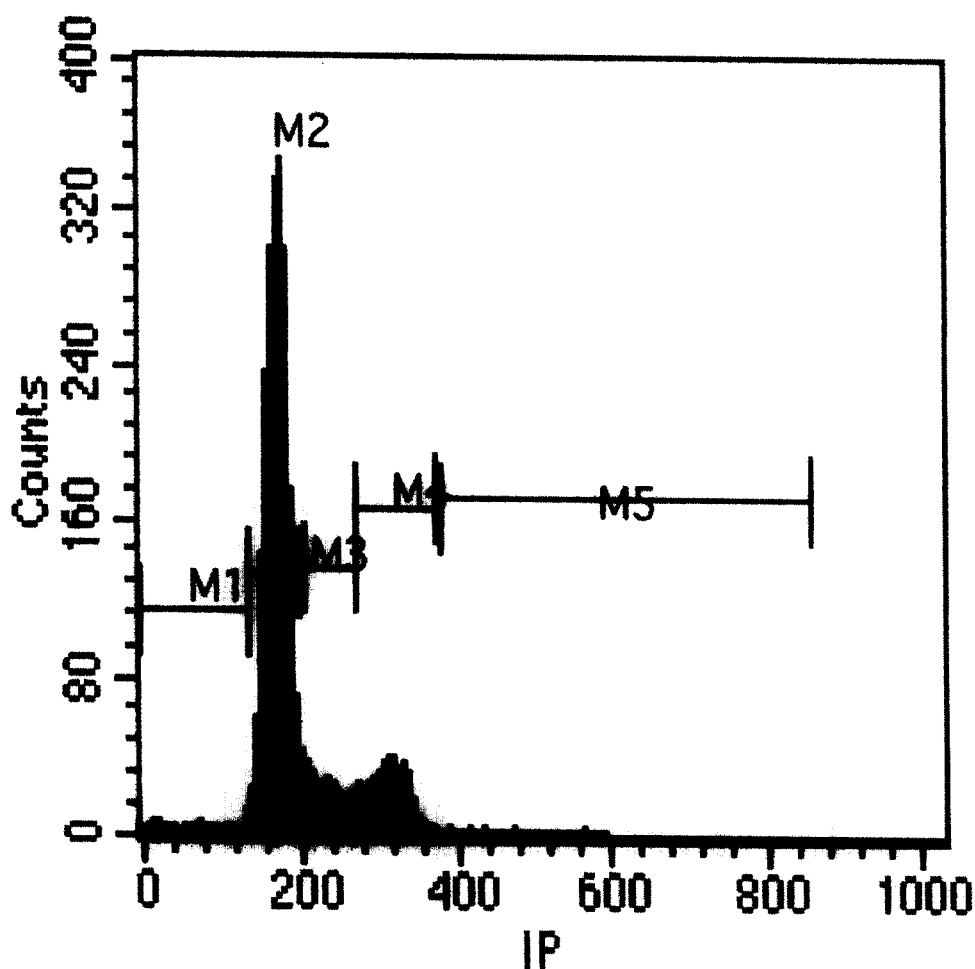


File: du145621/01/06.010
 Sample ID: DU145 58 50NM
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 21-Jan-06
 Gated Events: 14974
 X Parameter: FL3-H IP (Linear)

Histogram Statistics
 Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Acquisition Tube List
 Gate: G2
 Total Events: 20000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean
All	0, 1120	14974	100.00	74.89	227.86
M1	0, 162	1101	7.89	5.48	113.56
M2	159, 218	8465	58.25	43.01	185.97
M3	219, 269	1773	10.77	8.92	256.02
M4	281, 414	3567	22.42	17.99	335.96
M5	415, 897	168	1.10	0.79	482.03

图 4-4



File: 145621/01/06.001

Sample ID: DU145 DMSO

Tube: Untitled

Acquisition Date: 21-Jan-06

Gated Events: 12342

X Parameter: FL3-H IP (Linear)

Histogram Statistics

Log Data Units: Linea

Patient ID:

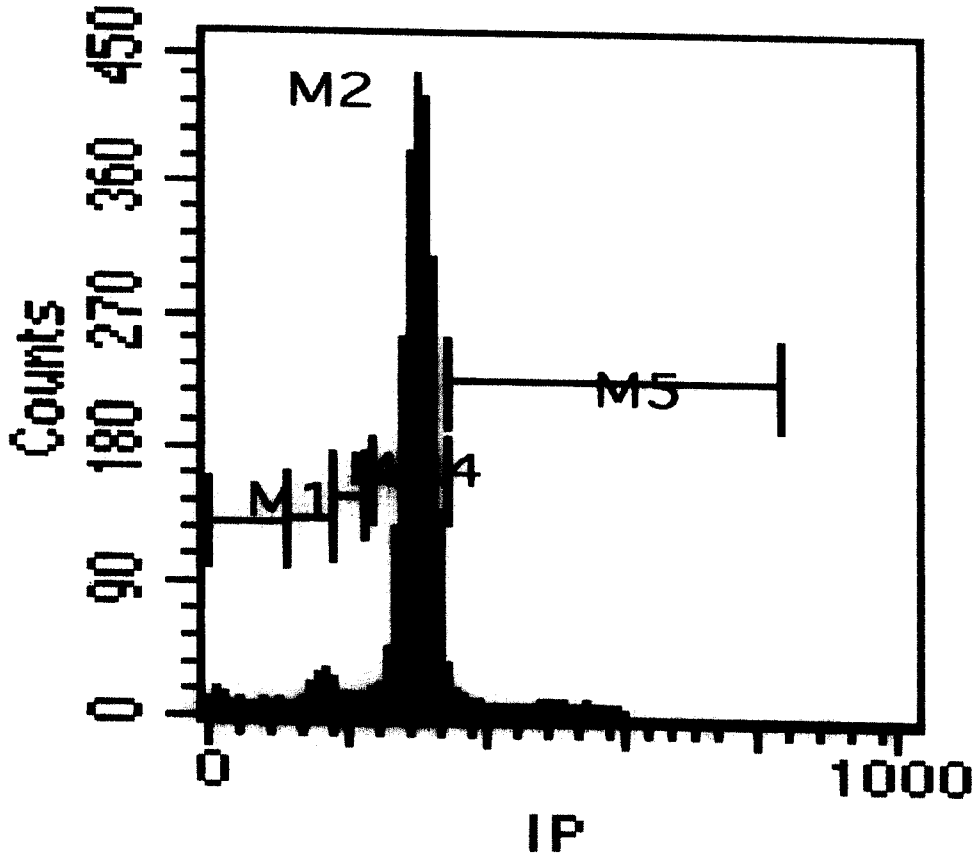
Panel: Acquisition Tube List

Gate: G2

Total Events: 20000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean
All	0, 1023	12342	100.00	61.71	195.92
M1	0, 135	297	2.41	1.49	67.90
M2	134, 201	8932	72.37	44.66	169.19
M3	205, 271	1190	9.64	5.95	232.71
M4	271, 381	1755	14.22	8.77	311.06
M5	381, 860	116	0.94	0.58	469.00

图 4-5

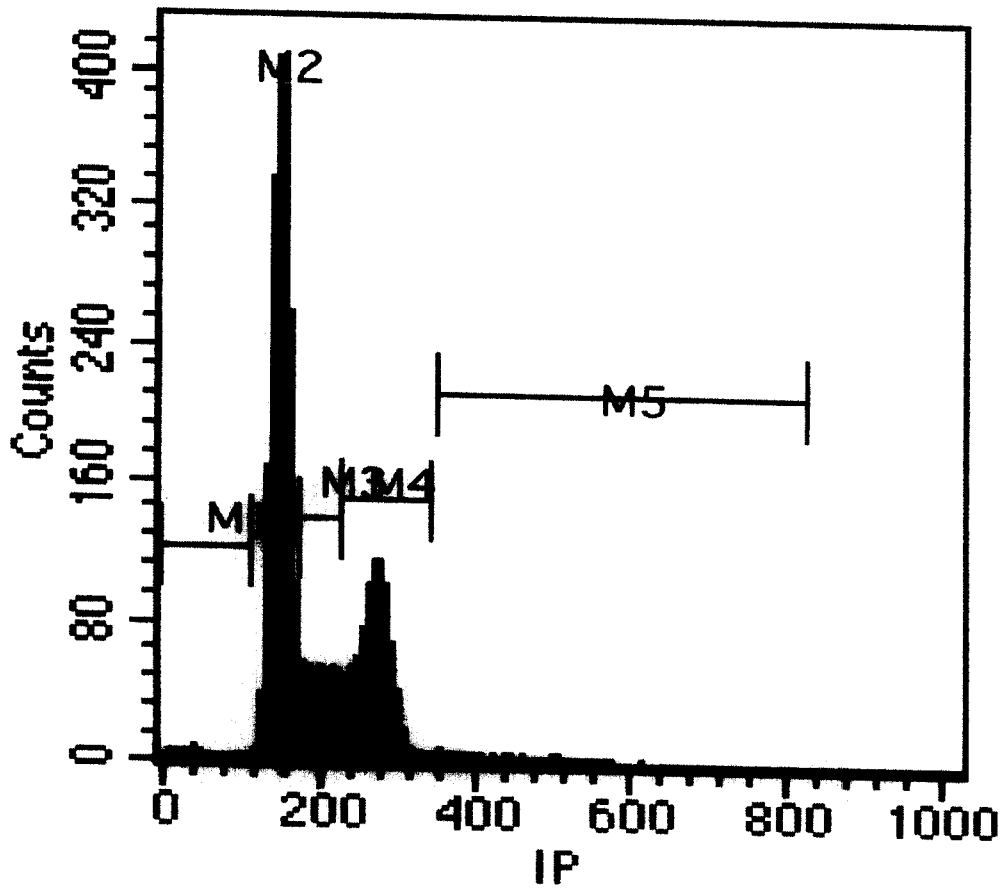


File: 180106.004
 Sample ID: SEND 44 50
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 18-Jan-06
 Gated Events: 17155
 X Parameter: FL3-H IP (Linear)

Histogram Statistics
 Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Acquisition Tube List
 Gate: G2
 Total Events: 20000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean
All	0, 1023	17155	100.00	85.78	292.78
M1	0, 118	432	2.52	2.16	54.80
M2	117, 176	629	3.67	3.15	156.22
M3	175, 229	454	2.65	2.27	202.24
M4	232, 348	14744	85.95	73.72	298.18
M5	353, 832	865	5.04	4.32	462.61

图 5-1

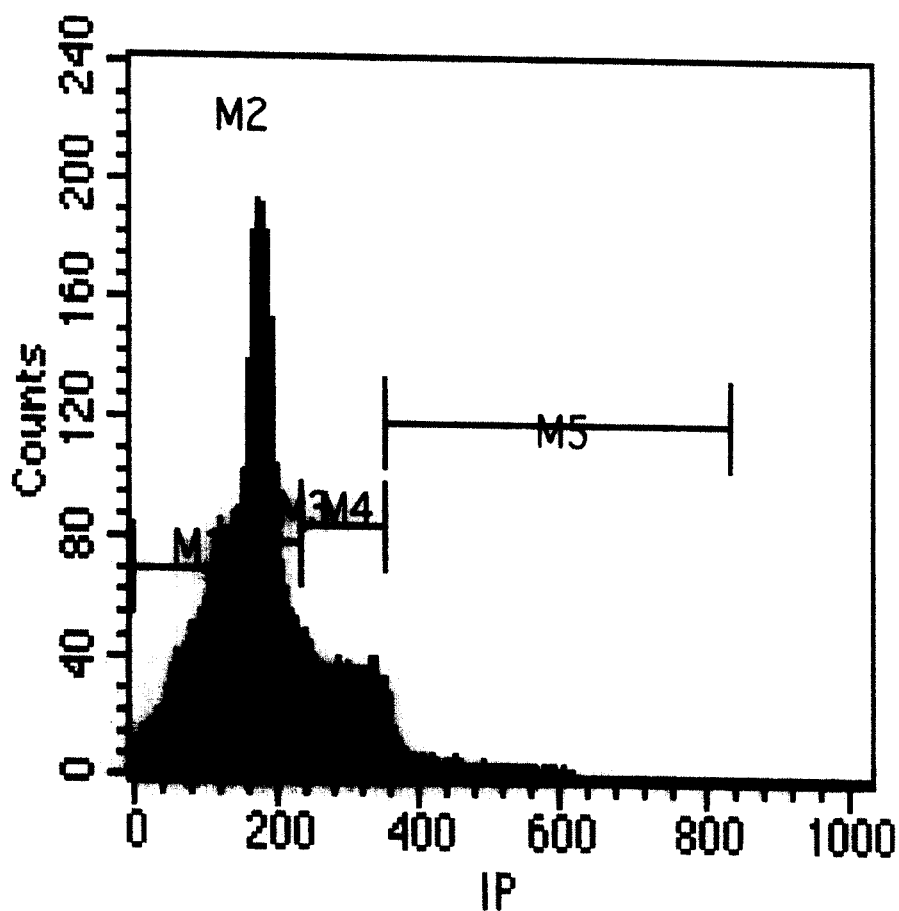


File: 180106.001
 Sample ID: SEND 45 50
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 18-Jan-06
 Gated Events: 14596
 X Parameter: FL3-H IP (Linear)

Histogram Statistics
 Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Acquisition Tube List
 Gate: G2
 Total Events: 20000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean
All	0, 1023	14687	100.00	72.98	196.05
M1	0, 118	112	0.71	0.53	49.93
M2	117, 176	7757	54.22	39.34	146.84
M3	175, 229	2243	16.39	12.05	205.07
M4	232, 348	4243	30.17	21.96	261.19
M5	353, 832	202	1.41	1.10	432.13

图 5-2

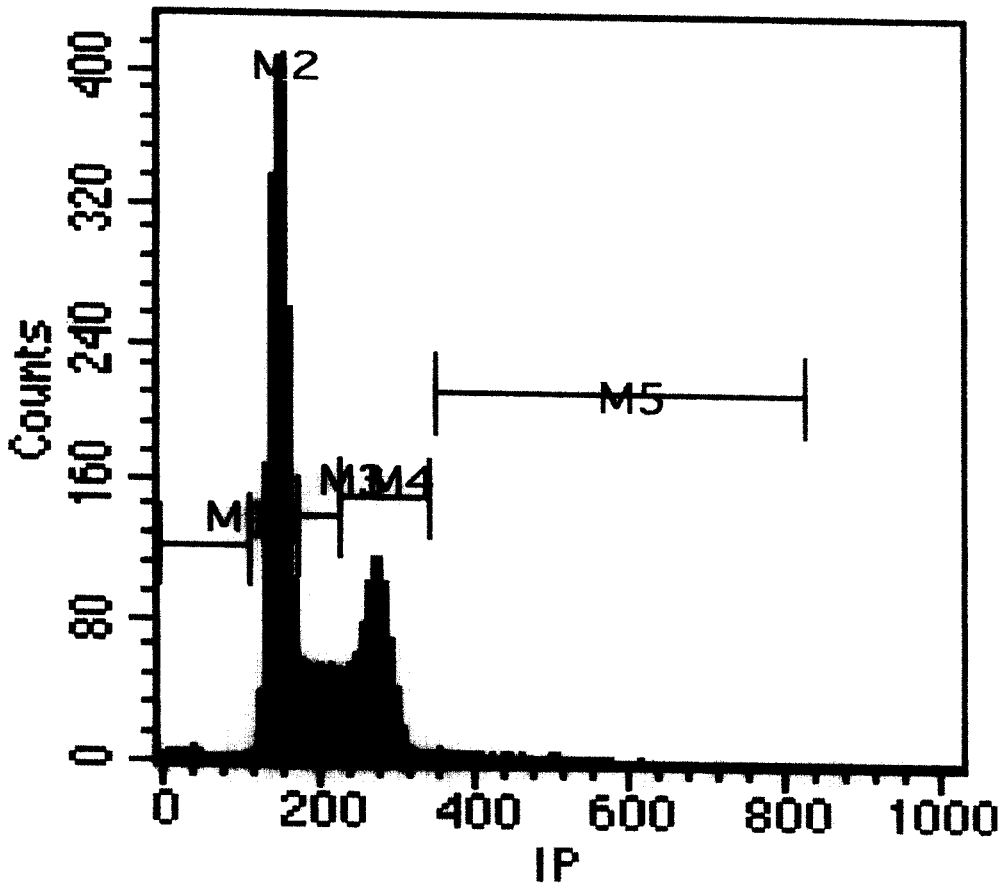


File: 180106.007
 Sample ID: SEND 57 50
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 18-Jan-06
 Gated Events: 16930
 X Parameter: FL3-H IP (Linear)

Histogram Statistics
 Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Acquisition Tube List
 Gate: G2
 Total Events: 20000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean
All	0, 1023	16930	100.00	84.65	184.61
M1	0, 118	3310	19.55	16.55	80.80
M2	117, 176	5683	33.57	28.42	152.89
M3	175, 229	4474	26.43	22.37	193.56
M4	232, 348	3323	19.63	16.61	287.03
M5	353, 832	504	2.98	2.52	422.64

图 5-3

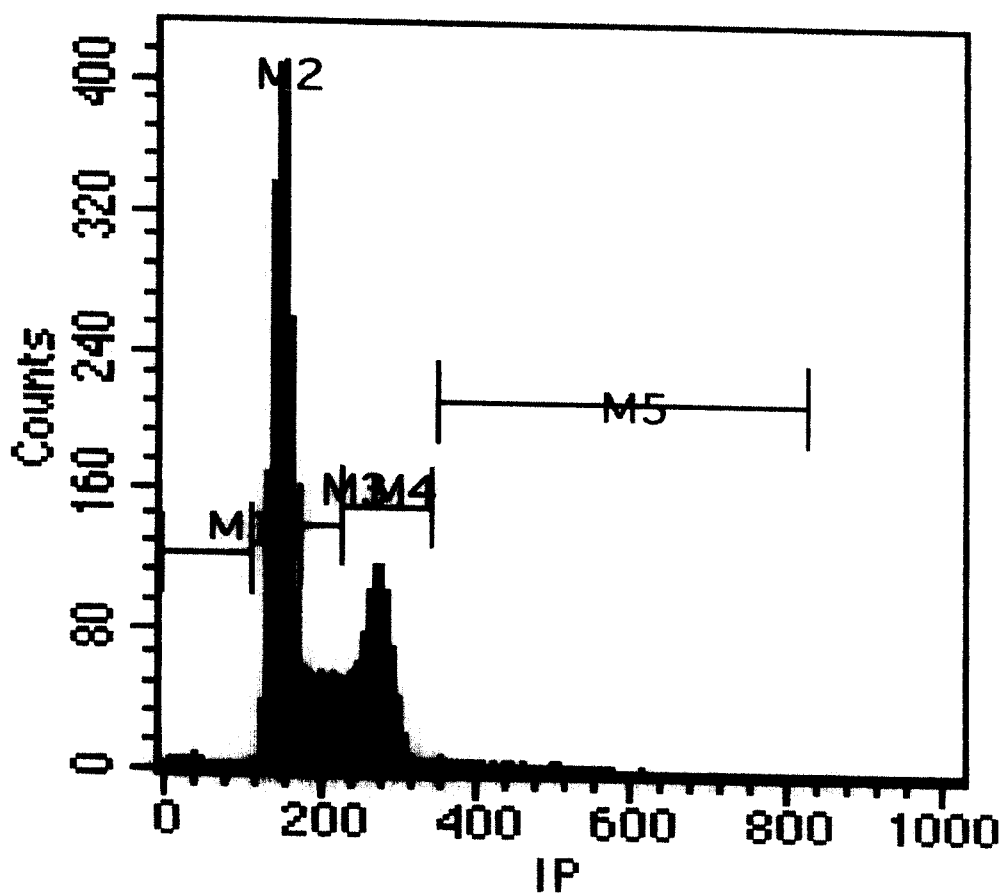


File: 180106.001
 Sample ID: SEND 58 50
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 18-Jan-06
 Gated Events: 14596
 X Parameter: FL3-H IP (Linear)

Histogram Statistics
 Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Acquisition Tube List
 Gate: G2
 Total Events: 20000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean
All	0, 1023	14606	100.00	72.77	195.12
M1	0, 118	103	0.66	0.48	51.96
M2	117, 176	7759	55.06	39.56	149.74
M3	175, 229	2261	13.47	11.58	200.85
M4	232, 348	4246	30.03	21.94	267.04
M5	353, 832	197	1.28	1.01	430.37

图 5-4



File: 180106.001
 Sample ID: SEND dms050
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 18-Jan-06
 Gated Events: 14596
 X Parameter: FL3-H IP (Linear)

Histogram Statistics
 Log Data Units: Linear Values
 Patient ID:
 Panel: Acquisition Tube List
 Gate: G2
 Total Events: 20000

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean
All	0, 1023	14596	100.00	72.98	194.91
M1	0, 118	101	0.69	0.51	51.03
M2	117, 176	7788	53.36	38.94	148.54
M3	175, 229	2252	15.43	11.26	201.97
M4	232, 348	4250	29.12	21.25	266.89
M5	353, 832	199	1.36	1.00	431.84

图 5-5

"Atlas Mouse Cancer 1.2 Array" and "Atlas Mouse cDNA Expression Array"

0,5	Net		
3,4	tubulin cofactor A		
Protein kinase or proteinase inhibitors			
8	protein kinase C inhibitor (tumor suppressor)		
3,5	serine proteinase inhibitor 3		
3,2	cyclic-dependent kinase inhibitor 1		
Other			
3,02	Lymphotactin receptor (TNFR family)		
3,3	EBP72		
2,02	DNA double-strand break repair RAD21 homolog		
2,6	cyclatin 3		
1,5	cyclatin B		
0,28	laminin beta 1 subunit 1		
0,28	laminin B2 subunit		
0,21	laminin alpha 5 subunit precursor		
Cell cycle and apoptosis			
2	bcl-x		
2	bcl-2 associated death promotor (BAD)		
2,1	BAX_alpha		
1,7	TP53		
Integrins			
0,52	integrin beta 1		
0,75	integrin beta 7		
0,46	integrin alpha 3		
Kinases and substrates			
0,28	MAPK11		
0,46	MAPK25		
0,28	MAPK14		
0,28	mitogen-activated kinase 6		
0,28	mitogen-activated kinase 5		
0,18	protein tyrosine kinase 9		
0,28	EGF receptor kinase substrate		
0,4	protein kinase B		
0,46	MAP kinase JNK		
0,22	p44-kinase(MAPK1)		
0,7	integrin-binding protein kinase		
0,5	cyclic-dependent kinase 7		
0,48	protein kinase C substrate		
0,28	IL-1 receptor-associated kinase		
0,18	MAPKAPK 2		
Onco-protein and transforming protein			
0,5	lyn proto-oncogene		
0,46	SHC-transforming protein		
0,37	c-myc proto-oncogene		
0,46	avian sarcoma virus GT10 oncogene homolog		
0,33	abl proto-oncogene		
0,3	abl proto-oncogene		
Growth factors			
0,46	VEGF		
0,66	VEGF-B		
phosphatase			
0,3	protein tyrosine phosphatase		

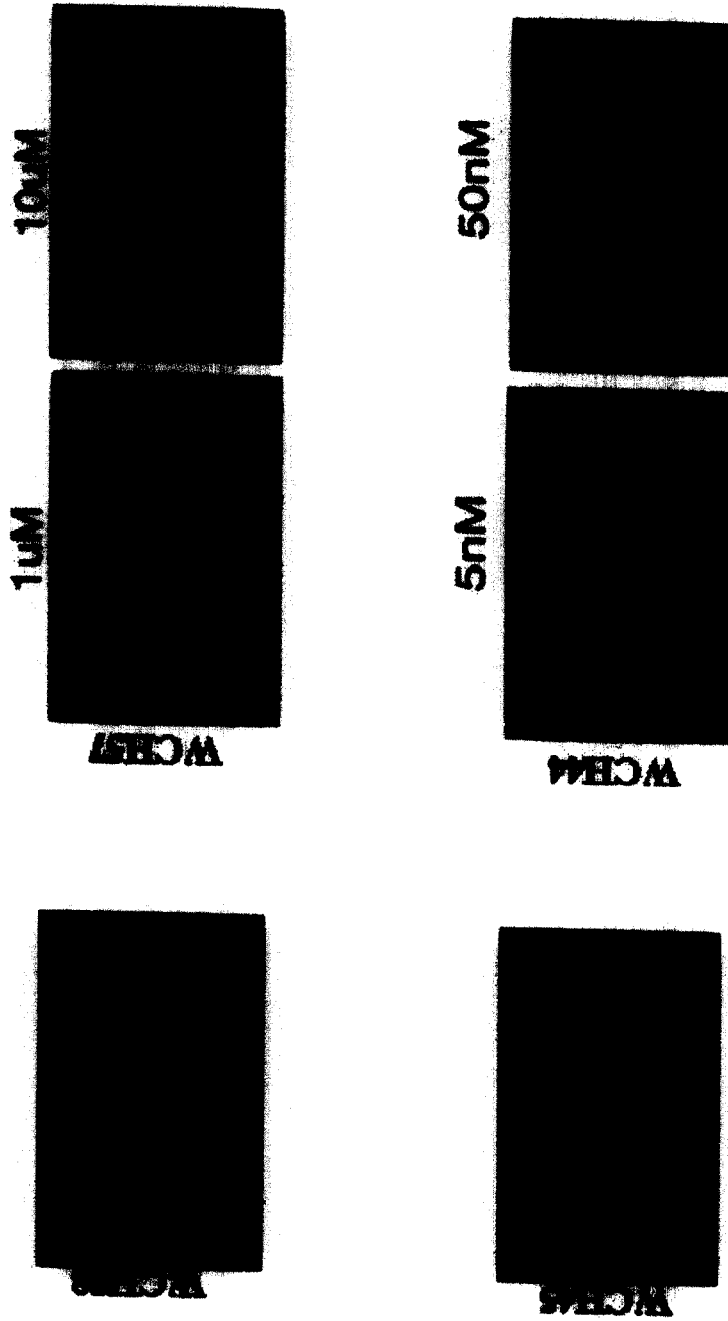
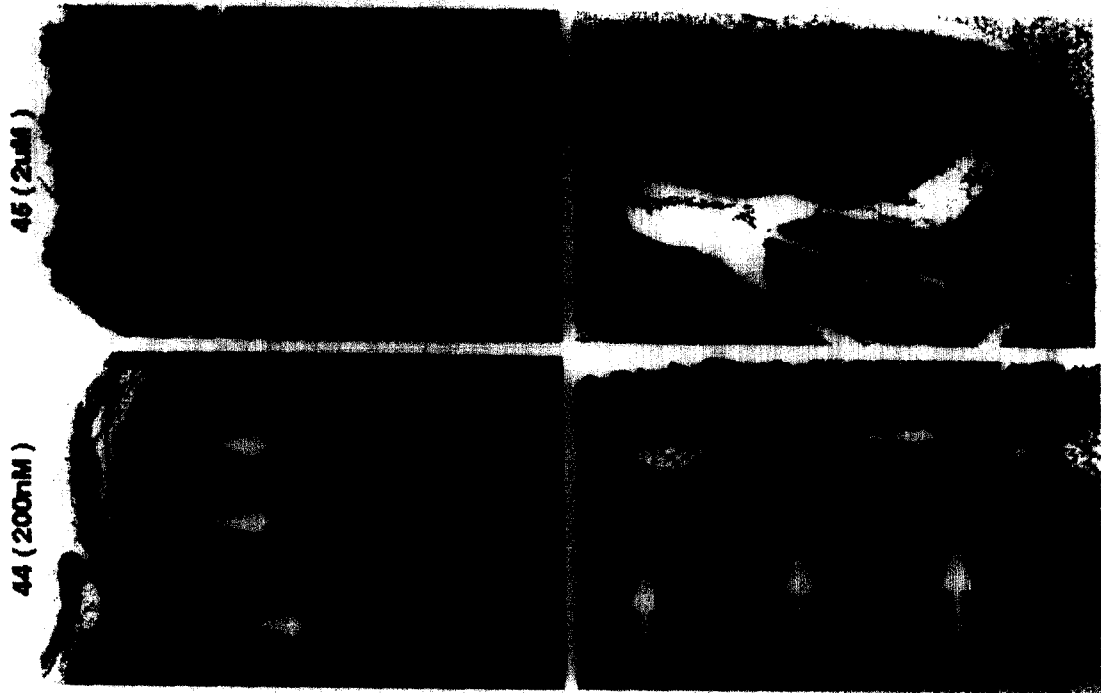


图 7

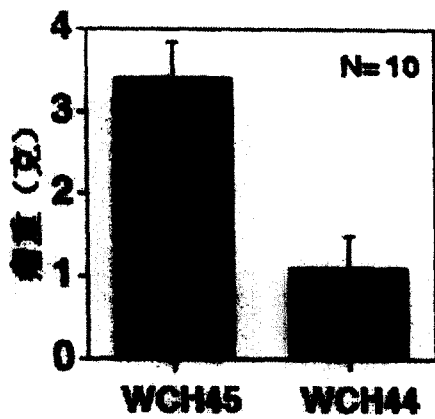
新生毛细血管瘤（黑色染色）在植入小鼠皮下的“FGF-2 Matrigel”中的生成



WCH44 (“44”)抑制新生毛细血管瘤在植入小鼠皮下的“b-FGF Matrigel”中的生成

图 8

非小细胞肺癌（CCL）细胞系



神经胶质瘤（C6）细胞系 (Half-way)

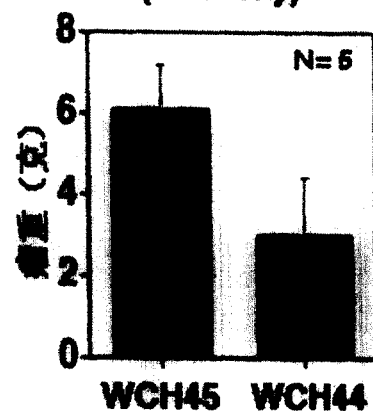


图 9

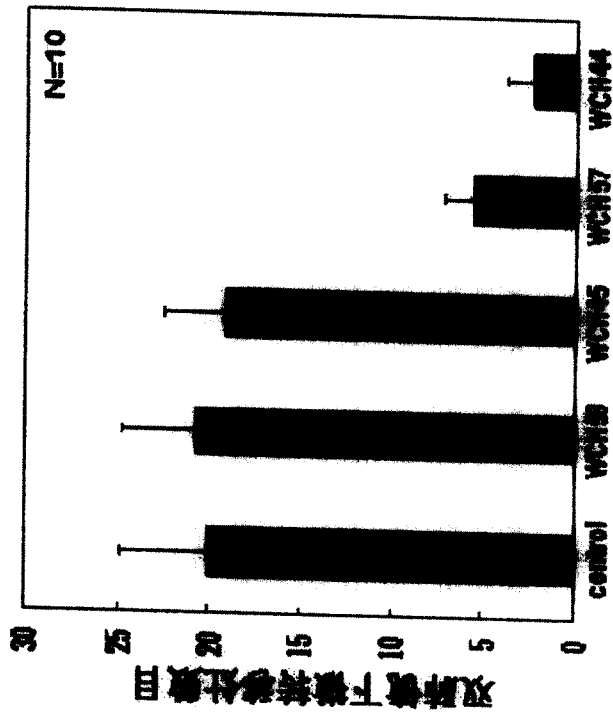
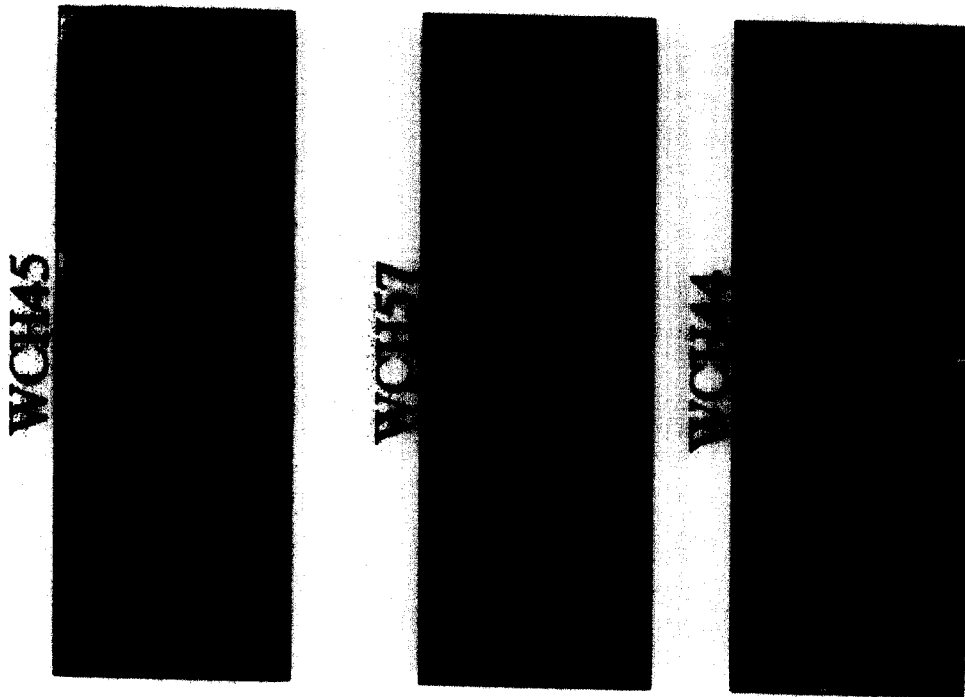


图 10

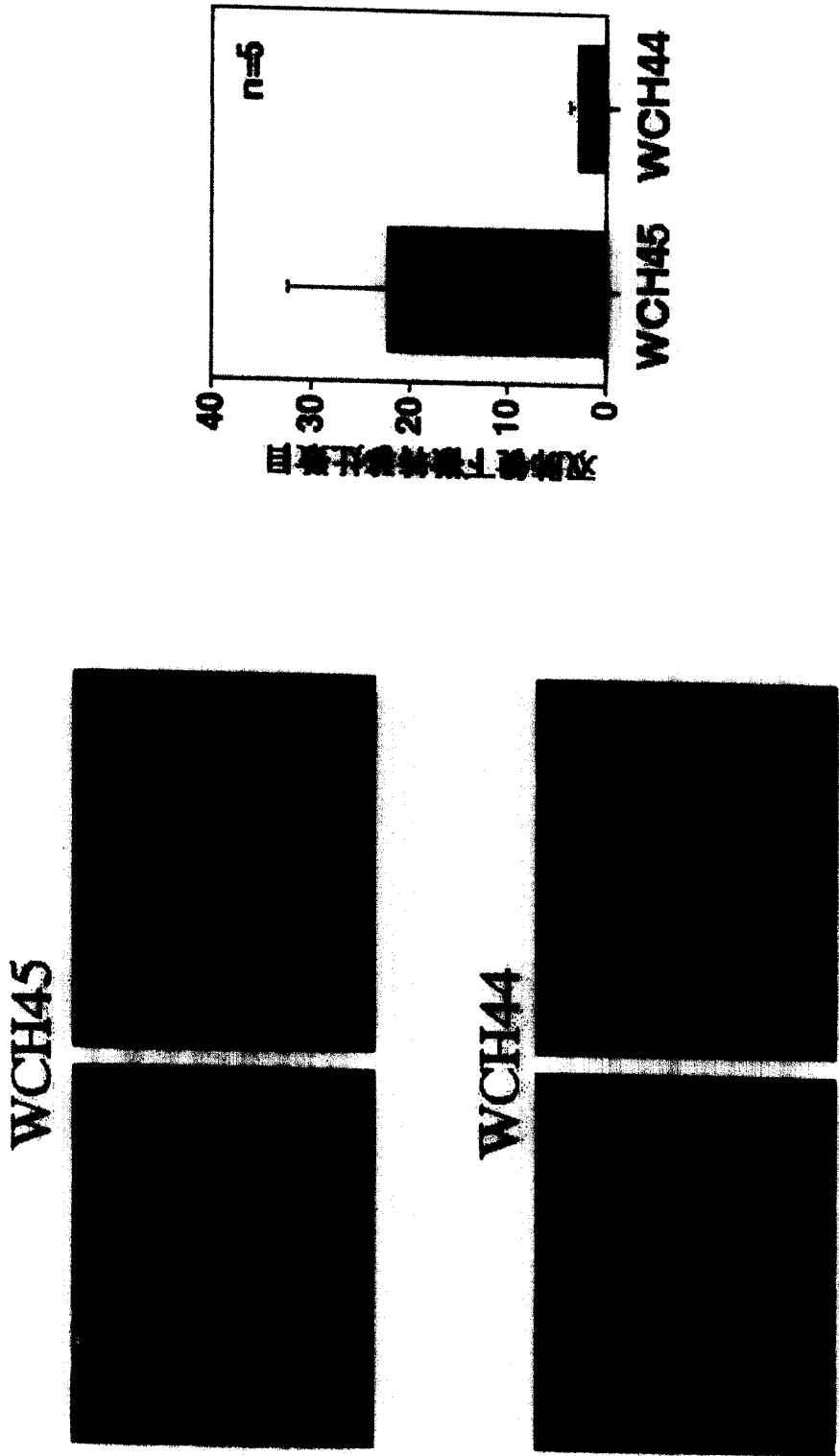


图 11

WCH44对肿瘤实体中多种基因表达水平的影响

(肿瘤由非小细胞肺癌CCL细胞系在裸鼠体内生成)

Genes up-regulated

3,95	ephrin B1
3,33	tolloid-like 1
3,2	cyclin E2
2,5	oncostatin M
2,5	folliculin
1,7	interferon gamma receptor 2

Genes down-regulated

0,4	cysteine proteinase inhibitor
0,48	MAPK 13
0,51	MMP 3
0,52	serine/threonine kinase 25
0,54	MAPKAPK 2
0,54	protein tyrosine phosphatase
0,56	macrophage stimulating 1 receptor
0,6	colony stimulating factor 1 receptor
0,6	tyrosine kinase receptor 1
0,63	PI 3 kinase
0,65	FGFR1
0,65	IGFBP1

图 12