



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112601527 A

(43) 申请公布日 2021. 04. 02

(21) 申请号 201980036058.2

(22) 申请日 2019.04.01

(30) 优先权数据

62/651,133 2018.03.31 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.11.27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/025234 2019.04.01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/191776 EN 2019.10.03

(71) 申请人 分子国际研究公司

地址 美国纽约市

(72) 发明人 约翰·霍尔 西尔维·贝尔扬斯基

(74) 专利代理机构 北京聿宏知识产权代理有限公司 11372

代理人 吴大建 邓树山

(51) Int.Cl.

A61K 31/475 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

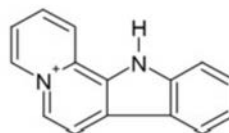
权利要求书1页 说明书44页 附图28页

(54) 发明名称

用于有效预防和治疗的选择性抗癌剂

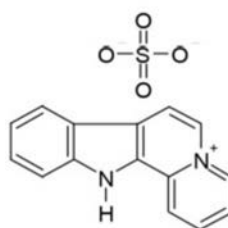
(57) 摘要

去乙基黄酮哌丁胺 (De-ethylflavopereirine)、其药学上可接受的盐、其溶剂化物或水合物、或其溶剂化物或水合物的药学上可接受的盐可用于有需要的受试者的癌症治疗 (即预防和/或治疗), 所述有需要的受试者包括例如炎症, 特别是慢性的, 或癌症 (例如癌、肉瘤、黑素瘤、白血病、淋巴瘤), 尤其是实体瘤和/或其转移瘤的病理状态。特别地, 有效量的这种改良抗癌药的全身给药可选择性地破坏实体瘤和/或转移部位的癌细胞 (包括癌干细胞)。即使是大剂量的全身给药以及在循环中由此产生的高浓度下, 它们能被受试者很好地耐受, 且能提供安全有效的抗癌药剂。



分子式

$C_{30}H_{22}N_4O_4S$



分子量

534.60

1. 一种治疗方法,包括以一种或多种剂量向患有癌症或处于癌症高风险的受试者施用去乙基黄酮哌丁胺化合物;其中所述化合物是去乙基黄酮哌丁胺、其盐、其溶剂化物、其水合物、或溶剂化物或水合物的盐。

2. 用作药物的去乙基黄酮哌丁胺、化合物;其中所述化合物是去乙基黄酮哌丁胺、其盐、其溶剂化物、其水合物、或溶剂化物或水合物的盐。

3. 用于治疗癌症或慢性炎症的去乙基黄酮哌丁胺、化合物;其中所述化合物是去乙基黄酮哌丁胺、其盐、其溶剂化物、其水合物、或溶剂化物或水合物的盐。

4. 去乙基黄酮哌丁胺化合物在制造用于治疗患有癌症或慢性炎症患者的药物组合物或医疗装置包括试剂盒中的应用;其中所述化合物是去乙基黄酮哌丁胺、其盐、其溶剂化物、其水合物、或溶剂化物或水合物的盐。

5. 一种药物组合物或医疗装置包括试剂盒,其根据权利要求4制备。

6. 根据权利要求4或5,其中所述药物组合物或医疗装置配制为用于全身给药。

7. 根据权利要求4或5,其中所述药物组合物或医疗装置配制为用于局部给药。

8. 根据权利要求4或5,其中所述药物组合物或医疗装置配制为用于至少肠内给药。

9. 根据权利要求4或5,其中所述药物组合物或医疗装置配制为用于至少肠外给药。

10. 根据权利要求4或5,其中所述药物组合物或医疗装置制造用于至少局部应用、吸入、眼内或舌下给药。

11. 根据权利要求4至10中的任一项或多项,其中所述医疗装置是可植入的。

12. 根据权利要求4至12中的任一项或多项,其进一步包含除乙基黄酮哌丁胺以外的药剂,其中所述药剂在癌症治疗中具有活性且以与去乙基黄酮哌丁胺相同或不同的途径给药。

13. 根据前述权利要求中的任一项或多项,其中所述癌症为选自癌、肉瘤、黑色素瘤、白血病和淋巴瘤组成的组中的至少一种疾病。

14. 根据前述权利要求中的任一项或多项,其中所述癌症选自肺癌、脾脏癌、结肠癌、肾癌、肝癌、胰腺癌和卵巢癌组成的组。

15. 一种药物组合物或医疗装置,包括试剂盒,其包含治疗有效量的一种或多种去乙基黄酮哌丁胺化合物;其中所述一种或多种化合物为去乙基黄酮哌丁胺、其盐、其溶剂化物、其水合物、溶剂化物或水合物的盐,或它们的任意组合。

## 用于有效预防和治疗的选择性抗癌剂

### 技术领域

[0001] 本发明涉及癌症,特别是实体瘤的治疗,以及癌症复发风险的降低。特别地,本发明涉及去乙基黄酮哌丁胺(de-ethylflavopereirine)或其盐、或溶剂化物(例如水合物)或其溶剂化物或水合物的盐(即本发明的化合物)对受试者的给药以治疗癌症。本发明的化合物可以选择性地破坏癌细胞,特别是在实体瘤和/或其转移瘤中,而对非癌细胞没有明显的有害作用,并且没有与其他细胞毒性化疗剂相关的副作用。当以大剂量给药并达到高全身浓度时,该化合物能被很好地耐受。因此,当其他细胞毒性的化疗剂被撤回以改善受试者的生活质量时,从而降低由微转移、残余癌细胞或癌症干细胞的生长引起的复发的风险时,可将其给药于缓解状态的受试者。本发明的一种或多种化合物可以单独使用或与其他治疗剂和癌症疗法组合使用。

### 背景技术

[0002] 几十年来已经证实,从癌细胞中提纯的DNA与正常细胞中提纯的DNA的二级结构和一级结构是不同的。二级结构是指DNA的两条链形成由氢键稳定的双螺旋。一级结构是指DNA的序列,即蛋白质的遗传密码。癌细胞DNA与正常细胞DNA之间的差异几乎完全与肿瘤细胞DNA序列的突变有关。也就是说,DNA一级结构的改变被认为是并且经常被证明是癌症发展的原因。

[0003] 癌细胞DNA的二级结构与正常的结构不同:两个独立的实验室使用UV或IR光谱证明,癌症DNA与正常DNA发生了物理变化。他们的分析表明,在癌细胞的DNA中,稳定DNA双链的氢键被破坏,分子键被拉伸,原子被取代或不存在。这些实验室提供的证据表明,这种“不稳定的”或“混乱的”的DNA是在长期暴露于致癌物和氧化损伤后发生的。

[0004] 去乙基黄酮哌丁胺(de-ethylflavopereirin)靶向癌细胞DNA改变的特征结构。由于这些结构改变发生在两种性别的所有肿瘤的癌细胞中,因此去乙基黄酮哌丁胺(de-ethylflavopereirin)的抗癌作用是广谱的。当然,这是相对于其他靶向疗法的巨大优势,其他靶向疗法可能集中于具有致癌潜力的突变蛋白,而不同类型的癌细胞则携带多种突变。去乙基黄酮哌丁胺(de-ethylflavopereirin)不靶向由DNA突变造成改变的蛋白质,而是靶向癌细胞DNA本身受损的物理结构。

[0005] 这种特异性靶向二级结构受损的癌症DNA是抗癌策略的一项重大突破。该现象可能解释了去乙基黄酮哌丁胺(de-ethylflavopereirin)没有毒性或明显的副作用,因为具有正常DNA结构的健康细胞不具有该化合物的靶标。

[0006] 如本文中所示,去乙基黄酮哌丁胺(de-ethylflavopereirin)表现出针对癌细胞中改变的DNA的化疗剂的广谱活性。在此,体内的临床前研究集中于胰腺癌和结肠癌。前者通常是侵袭性和棘手的;后者更为常见,而且通常是致命的。两者均能用这种新疗法有效预防或治疗。对于这两种癌症,药代动力学数据表明了去乙基黄酮哌丁胺(de-ethylflavopereirin)在胰腺和结肠中的定位,这证明在相关动物模型中研究该化合物的抗癌和抗肿瘤活性是合理的。去乙基黄酮哌丁胺(de-ethylflavopereirin)还可以在其他

器官(例如肺、脾、肾、肝和卵巢)中积累并持续存在。这样的结果表明这些癌症是基于去乙基黄酮哌丁胺(de-ethylflavopereirin)治疗的极好的靶标。

#### [0007] 胰腺癌

[0008] 胰腺癌是美国癌症死亡的第七大主要原因。在2018年,美国癌症协会对美国胰腺癌的估计为:约55,440人(29,200名男性和26,240名女性)将被诊断为胰腺癌;大约44,330人(23,020名男性和21,310名女性)将死于胰腺癌。在过去的十年中,胰腺癌的发病率一直在缓慢增长。2013年患胰腺癌的终生风险约为1/78(1.47%),而2017年的终生风险约为1/65(1.5%)。

[0009] 与大多数癌症一样,一个人患胰腺癌的风险取决于行为因素与遗传或环境因素的综合作用。与大多数癌症不同的是,常规治疗对这种疾病进程影响不大。几乎所有被诊断为胰腺癌的患者都会发生转移并死亡。其五年生存率少于4%,并且该比率在25年内没有显著变化。

[0010] 胰腺癌通常在早期无症状,因此其通常在无法切除的晚期、更具侵袭性的阶段被诊断出。吉西他滨(Gemcitabine)是胰腺癌的一线药物,其初次使用时可能减慢疾病的进程,但肿瘤会对该药产生耐药性,使其无效。然后治疗选择缩减至姑息治疗。

[0011] 因此,迫切需要一种新的抗胰腺癌治疗方法,该方法可缩小肿瘤,避免耐药性并延长寿命,同时对生活质量的影响最小。本发明描述了这种新的治疗方法。

#### [0012] 结直肠癌

[0013] 除皮肤癌外,结直肠癌是在美国男性和女性中诊断出的第三大常见癌症。美国癌症协会对2018年美国结直肠癌病例的估计为:97,220例结肠癌新病例和42,030例直肠癌新病例。结直肠癌的终生风险约为1/21(4.7%),如果将男女数据综合起来,其是美国癌症死亡的第三大主要原因。预计在2018年其将导致50,630人死亡。

[0014] 筛查技术现在可以及早检测出息肉,这些息肉在癌变之前可以去除。通常,早期发现的癌症更适合治疗,因此过去20年中,男女结直肠癌的死亡率(每年每10万人的死亡人数)均下降了。在过去的几年中,治疗方法的改进使美国超过一百万患结直肠癌的人存活。尽管如此,预计2018年结直肠癌死亡人数将超过50,000。

[0015] 本发明解决了开发新一代癌症治疗方法的挑战,该癌症治疗为具有II、III和IV期癌症的患者提供了显著更好的生存率,并通过新颖的结构关联的化合物避免了与当前治疗方式相关的副作用,且该化合物是安全的、耐受良好且有效的抗癌剂。尽管W0 2005/1211143、EP 1758905和US 2010/0256177涉及用于癌症治疗的黄酮哌丁胺衍生物(flavopereirine derivatives),但其未公开本发明的化合物。更重要的是,现有技术化合物的安全性和有效性尚未确定。

## 发明内容

[0016] 本发明的活性药物成分(API)是合成的(即人工的和非天然的)化合物,其实例有去乙基黄酮哌丁胺(de-ethylflavopereirin)及其药学上可接受的盐、其溶剂化物(例如水合物)和该溶剂化物和水合物的药学上可接受的盐,其任选地呈无定形、结晶或其他多晶状干燥形态,其相对无毒且至少对一种或多种肿瘤或恶性肿瘤具有抗癌活性。去乙基黄酮哌丁胺(de-ethylflavopereirin)的化学名称为12H-吡啶并[2,3-a]喹啉-5-鎓(12H-

indolo[2,3-a]quinolizin-5-ium) 或 12H-吡啶并[2,1-a]β-咔啉-5-鎓 (12H-pyrido[2,1-a]β-carbolin-5-ium)。本发明的合成化合物在结构上与被称为黄酮哌丁胺 (flavopereirine) 的β-咔啉生物碱相关, 其从某些植物中获得, 但比天然化合物更有效。本发明的合成化合物可以是至少适合于均匀溶解到溶剂中、分散到悬浮液中、混合成组合物、掺混、均化、乳化、压缩、压片、封装或它们的任意组合的干燥形式 (例如, 压缩或疏松粉末、细碎的或颗粒状的) 或液体形式 (特别是溶解或悬浮在水性或油性、稀或稠、乳化或多相、各向同性或近晶相的溶液中)。合成后, 可以通过进一步的步骤进行处理, 以化学或物理方式改变其性质 (但不改变其抗癌活性), 在无菌条件下配以非活性成分 (例如, 用作载体的介质如注射用水、盐、缓冲液、糖、稳定剂、抗氧化剂或其他防腐剂、液体稀释剂或固体填充剂、粘合剂、润滑剂、表面活性剂、干燥剂、分散剂、包衣剂、聚合物基体或载体、或它们的任意组合) 以制成药物组合物, 任选地冻干或冷冻干燥, 无菌包装至带有使用标签的试剂盒 (例如, 粉剂或颗粒剂的密封容器、多剂量泡罩包装, 可配制的单个单位剂量的容器、用于输液或注射的包装), 并以适于将来对受试者 (即, 人类患者或动物受试者) 给药的液体或固体形式保存直至需要。

[0017] 去乙基黄酮哌丁胺 (de-ethylflavopereirin) 可以作为药物或其他治疗物质使用。它代表了一类新的化疗药剂。不受限于本发明的操作所需的任何作用机理, 而是理解如何在多步骤致癌作用及其在本发明未具体描述的医学应用中的有效性的背景下理解该化合物, 这些化合物可以选择性地靶向由于基因组的不稳定性和/或基因突变从而逐步发展为恶性肿瘤的细胞中物理损伤的DNA结构。因此, 这类新型化疗药剂可对许多不同类型的癌前状况 (例如, 慢性炎症)、癌症、实体瘤、转移瘤和癌干细胞发挥广谱作用。它们可以选择性地杀死源自结肠、胰腺、肺、肾、卵巢和脑以及其他器官或其内的癌细胞。

[0018] 癌症可以是癌 (例如, 腺癌或鳞状细胞癌)、肉瘤 (例如, 骨或软组织)、黑色素瘤、白血病或淋巴瘤。更具体地, 本发明涉及癌症治疗, 其中原发性肿瘤源自或存在于骨髓、血液、淋巴结、乳房、前列腺、结肠、直肠、肺、子宫、卵巢、膀胱、皮肤、肌肉、肾脏、口腔、胰腺、肝、胃、食道、子宫颈、甲状腺、骨骼、脑、脊髓或睾丸其中之一。虽然原发性实体瘤起源于上述器官之一, 但是继发性肿瘤 (即转移瘤) 会在另一个部位被发现。通过核医学或放射学成像要求肿瘤的大小足以被检测到。即使是仔细的病理检查也可能无法检测到小的肿瘤或微转移瘤。因此, 在外科手术切除原发肿瘤之后, 本发明化合物的全身给药能够使得覆盖受试者身体的全身循环的极限, 包括没有癌细胞可见的位置。类似地, 在治疗白血病或淋巴瘤直至受试者缓解后, 在血液中循环的本发明化合物杀死或至少抑制残留癌细胞的生长。如本文所述的癌症治疗方法可以在确定的治疗 (例如, 单独手术、单独放射或一个之后进行另一个) 之前作为新辅助剂进行, 或者在放疗或化疗期间和/或之后作为辅助剂进行, 或通过其本身或作为一部分用作癌症复发或复发后的抢救治疗进行, 或其本身或作为一部分用作姑息治疗进行。本发明的化合物可以通过肠内 (例如经口)、肠外 (例如分别插入静脉或动脉的针或管的静脉内或动脉内、腹腔内或膀胱内输注、皮下或肌肉内注射、鞘内给药, 透皮用于经皮肤扩散以实现全身分布, 经粘膜如吸入、吹入、舌下或唇下) 或局部给药 (透皮用于皮肤以达到局部分布、吸入)。优选肠内或肠外给药; 更优选肠内给药。优选自我给药, 并且可以以固体形式 (例如, 含有本发明的化合物的药物组合物片剂, 包括包衣片剂、含有延迟胶囊或缓释胶囊的胶囊剂) 或液体形式形式 (例如以滴剂乳液、泡沫、凝胶、脂质体、冲洗剂或喷雾

形式提供的乙醇基或水基溶液；乳剂、霜剂或软膏；吸收到人造聚合物、口香糖、海绵或栓剂中)自我给药每天一次或两次,任选地还可以在其中包括一种或多种其他化疗药剂。否则,训练有素的医疗健专业人员可以每天两次或三次、或每天、隔日、每周、每两周或每月一次施用本发明的化合物。

[0019] 可以通过以一种或多种剂量向需要治疗的受试者给药去乙基黄酮哌丁胺(de-ethylflavopereirin)化合物来治疗癌症。该治疗化合物是去乙基黄酮哌丁胺(de-ethylflavopereirin)、其盐、其溶剂化物、其水合物或其溶剂化物或水合物的盐。因此,所述去乙基黄酮哌丁胺(de-ethylflavopereirin)化合物可用于治疗受试者,或者可选地,用于制备用于治疗受试者的药物组合物和/或医疗器械,包括试剂盒。

[0020] 慢性炎症也可以通过向有需要的受试者施用一种或多种剂量去乙基黄酮哌丁胺(de-ethylflavopereirin)化合物来治疗。所述治疗化合物是去乙基黄酮哌丁胺(de-ethylflavopereirin)、其盐、其溶剂化物、其水合物或其溶剂化物或水合物的盐。因此,所述去乙基黄酮哌丁胺(de-ethylflavopereirin)化合物可用于治疗受试者,或者可选地,用于制备用于治疗受试者的药物组合物和/或医疗器械,包括试剂盒。特别地,减轻受试者慢性炎症可以预防癌症,因为前者会引起DNA损伤、基因组不稳定、基因突变或其任意组合,并且是癌症发展的危险因素。例如,通过至少去乙基黄酮哌丁胺(de-ethylflavopereirin)化合物、组合物或器械的施用来治疗慢性胰腺炎、胃炎、肝炎或溃疡性结肠炎/克罗恩病(Crohn disease),可以分别降低胰腺癌、胃癌、肝癌或结肠癌的发生率。

[0021] 治疗可以以固体或液体形式进行1、2、3、4、6、9、12、18、24、36或更多个月(例如,包含本发明化合物的药物组合物可以在无菌和稳定的条件下从制造商通过供应链分配给达医疗保健提供者或配混者;该固体形式重新配制为适合通过泵或储液器注入、注射或输送的形式;任选地,与一种或多种其他化疗药剂组合)。例如,持续一或两个月每天给药,然后在再次开始之前停止一或两个月。

[0022] 还提供了包含治疗有效量的一种或多种去乙基黄酮哌丁胺(de-ethylflavopereirin)的药物组合物或医疗器械,其包括试剂盒。所述一种或多种治疗化合物是去乙基黄酮哌丁胺(de-ethylflavopereirin)、其盐、其溶剂化物、其水合物,其溶剂化物或水合物的盐、或他们的任意组合。

[0023] 本发明是癌症治疗的重大进展,包括预防和治疗侵袭性癌症。诸如系统毒性之类的负面副作用可降至最低甚至可不计。

## 附图说明

[0024] 去乙基黄酮哌丁胺(De-Ethylflavopereirine)的合成、结构和纯度

[0025] 图1. 去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)的有机合成步骤:

[0026] 色胺(1)、2-(1H-吲哚-3-基)-乙基胺的氨基被乙酸酐乙酰化,得到N-[2-(1H-吲哚-3-基)-乙基]-乙酰胺(2);随后在磷酰氯介导下环化生成1-甲基-4,9-二氢-3H-b-咔啉(3);与1,2-二溴丙烷桥进行C-N偶联反应生成含D环DE化合物2,3,4,6,7,12-六氢-1H-吲哚并[2,3-a]喹啉-5-鎓高氯酸盐(4);随后与10%Pd/C发生氧化反应生成去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)(5),12H吲哚并[2,3-a]喹啉-5-鎓;任选地,在甲醇/硫酸中生成硫酸盐12H-吲哚并[2,3-a]喹啉-5-鎓硫酸盐(6)。

[0027] 图2.去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)(顶部)和其硫酸盐(底部)的化学结构;后者的化学式和分子量。

[0028] 图3.合成的去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)的特征紫外(UV)吸收光谱。以吸收(y轴)相对于以nm为单位的波长(x轴)绘制。

[0029] 图4.合成的去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)的高效液相色谱(HPLC)分析。在此,所需产物的纯度超过97%。

[0030] 图5.合成的去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)的质谱(MS)分析。 $m/z = 219.3$ 处的单一主峰对应于所需产物。

[0031] 图6.去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)(右边)和在去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)中缺失乙基的黄酮哌丁胺(flavopereirine)(左边)的结构比较。

[0032] 去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)的抗癌活性:卵巢癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤和结肠癌细胞系

[0033] 图7.暴露于去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)的人卵巢癌细胞系OVCAR-5(三角形)、SHIN-3(正方形)和OVCAR-8(菱形)的细胞活力的剂量-反应曲线。在浓度增加的化合物存在下培养细胞48小时,并通过MTT测定法测定细胞活力。以MRC-5(十字形),一种无限增值的、正常人体上皮细胞系,作为对照。

[0034] 图8.暴露于去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)的人胰腺癌细胞系MIA PaCa(正方形)、PANC-1(菱形)、BxPc(十字形)和AsPc(三角形)的细胞活力的剂量-反应曲线。在浓度增加的化合物存在下培养细胞48小时,并通过MTT测定法测定细胞活力。以MRC-5(星号)作为对照。

[0035] 图9.用去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)治疗后进行胶质母细胞瘤体外细胞活力和增值测定。测定胶质母细胞瘤细胞系U-87MG、BTRG-05MG、A172和AM-38。替莫唑胺,一种已知可治疗某些脑癌的口服化疗药剂,被用作对照。所用的替莫唑胺(圆圈)或化合物13-9-1(正方形)的浓度为3nM、10nM、30nM、100nM、1 $\mu$ M、3 $\mu$ M、10 $\mu$ M和30 $\mu$ M。在测定细胞毒性和细胞增殖抑制之前,将每种细胞系用去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)处理72小时。培养的活细胞数基于ATP定量。IC<sub>50</sub>的确定如下各图所示。

[0036] 图10.人结肠癌细胞系HT-29暴露于去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)(正方形)或包含黄酮哌丁胺(flavopereirine)和至少一种其他抗癌药物二氢黄酮哌丁胺(dihydroflavopereirine)的Pao-pereira植物提取物(三角形)中的剂量-反应曲线。使用生物发光HT-29细胞系。

[0037] 去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)的抗胰腺癌活性

[0038] 图11.去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)诱导胰腺癌细胞系PANC-1(上)、MIA PaCa(中)和BxPc(下)的细胞凋亡。在将细胞暴露于浓度为0.5 $\mu$ M、10 $\mu$ M和20 $\mu$ M的去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)中后,使用流式细胞仪评估经历早期凋亡(透明)、晚期凋亡(实心)或坏死(点画)的细胞百分比。如图中在10 $\mu$ M和20 $\mu$ M浓度下所有三种细胞系的最高柱状图所示,早期凋亡是由去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)诱导的主要结果。值是平均值 $\pm$ SEM(n=3)。\*使用学生t检验,与对照组相比, $p \leq 0.05$ ;\*\*使用学生t检验,与对照组相比, $p \leq 0.01$ 。

[0039] 图12. Caspase-3、Caspase-8和PARP的裂解证实了去乙基黄酮哌丁胺 (De-ethylflavopereirine) 诱导PANC-1胰腺癌细胞凋亡。以 $\beta$ -肌动蛋白作为对照。这种效应是剂量和时间依赖性的。左图显示的是在相同时间段 (48小时) 内化合物在0.5 $\mu$ M、10 $\mu$ M和20 $\mu$ M下的结果。右图显示了在相同浓度的化合物 (20 $\mu$ M) 下0.6小时, 12小时, 24小时和48小时的结果。

[0040] 图13. 有或没有用去乙基黄酮哌丁胺 (De-ethylflavopereirine) 处理的PANC-1胰腺癌细胞在软琼脂中的集落形成。去乙基黄酮哌丁胺 (De-ethylflavopereirine) 在10 $\mu$ M或15 $\mu$ M浓度下完全抑制肿瘤细胞的集落形成。

[0041] 图14. 与用吉西他滨 (Gem) 加吉西他滨+去乙基黄酮哌丁胺 (De-ethylflavopereirine) (Gem+13-9-1) 联合治疗相比, 单独用吉西他滨 (Gem) 治疗胰腺癌细胞的生长抑制作用。如每个剂量-反应图的顶部曲线所示, 胰腺癌细胞系MIA-PaCa (左上)、PANC-1 (右上)、AsPc (左下) 和BxPc (右下) 表现出一定的对吉西他滨 (菱形) 的耐药性。如每个剂量-反应图的底部曲线所示, 无论癌细胞对单独使用吉西他滨的耐药性如何, 吉西他滨和去乙基黄酮哌丁胺 (De-ethylflavopereirine) (正方形) 联合使用对癌细胞具有接近100%的细胞毒性作用。

[0042] 图15. 静脉给药或口服给药后去乙基黄酮哌丁胺 (De-ethylflavopereirine) 的血浆浓度: 以20mg/kg静脉给药 (菱形), 在约2小时达到峰值, 口服100mg/kg (方形), 或口服200mg/kg (三角形), 在约4小时达到峰值。

[0043] 图16. 动物研究。将含有荧光素酶基因的PANC-1细胞原位移植到裸鼠胰腺内, 用活体动物成像技术对肿瘤进行监测。通过量化治疗组 (菱形,  $n=9$ ) 和未治疗组 (正方形,  $n=10$ ) 的所有图像显示纵向的肿瘤生长。肿瘤负荷由平均总光子通量 (顶部) 及其对数变换 (底部) 表示。

[0044] 图17. 未治疗动物。将含有荧光素酶基因的PANC-1细胞原位移植到6只裸鼠胰腺内, 用荧光成像技术对肿瘤进行监测。

[0045] 图18. 用去乙基黄酮哌丁胺 (De-ethylflavopereirine) 治疗的动物。将含有荧光素酶基因的PANC-1细胞原位移植到6只裸鼠胰腺内, 用荧光成像技术对肿瘤进行监测。

[0046] 图19. 通过用去乙基黄酮哌丁胺 (De-ethylflavopereirine) 治疗消除了PANC-1肿瘤的#480或#486裸鼠的生物发光成像。因此, 21只动物中有2只没有肿瘤 (标记为“治愈”)。每隔一周为每只动物成像。

[0047] 图20. 治疗或未治疗动物尸检时的最终PANC-1肿瘤重量: 左侧显示平均重量, 右侧显示个体重量 (图20A)。治疗和未治疗动物尸检时的最终转移病灶数 (图20B): 左侧为有转移病灶的小鼠百分比, 右侧为转移病灶的数量。

[0048] 图21. 在第0天到第40天, 未经治疗 (方形) 或去乙基黄酮哌丁胺 (De-ethylflavopereirine) (菱形) 治疗的携带原位PANC-1肿瘤的小鼠的平均体重。对照组和治疗组小鼠重量无明显差异。

[0049] 去乙基黄酮哌丁胺 (De-ethylflavopereirine) 的抗胰腺癌干细胞活性

[0050] 图22. 将PANC-1细胞悬液用浓度为0 $\mu$ M (阴性对照)、2.5 $\mu$ M、5.0 $\mu$ M和10.0 $\mu$ M的去乙基黄酮哌丁胺 (De-ethylflavopereirine) 处理, 然后检查是否存在球体。如图中的条形和图像下方表格中的P值所示, 在第一轮治疗中, 5 $\mu$ M和10 $\mu$ M浓度显著抑制初级球体的形成。



[0051] 图23.收集第一轮如初生球体并接种,以形成二级球体。用浓度为0 $\mu$ M(阴性对照)、2.5 $\mu$ M、5.0 $\mu$ M和10.0 $\mu$ M的去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)处理后,检查细胞悬液。如图中的条形和图像下方表格中的P值所示,在5 $\mu$ M和10 $\mu$ M处理完全抑制了二级球体的形成,而在2.5 $\mu$ M处理中显示出显著的抑制作用。

[0052] 图24.去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)降低了胰腺癌细胞群中癌干细胞的百分比(24小时)。这些图显示24小时后去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)浓度分别为0 $\mu$ M(左上)、2.5 $\mu$ M(右上)、5 $\mu$ M(左下)和10 $\mu$ M(右下角)时在CD24(PE)门中CD44(PE-Cy7)阳性细胞和EpCam(APC)阳性细胞。“Q1”=CD24<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>,“三重(Triple)<sup>+</sup>”=CD24<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>/EpCam<sup>+</sup>,“Q3”=CD24<sup>+</sup>,“Q4”=CD24<sup>+</sup>/EpCam<sup>+</sup>。在治疗后24小时,去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)减少了PANC-1细胞中的CD24<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>/EpCam<sup>+</sup>细胞群。柱状图(底部)显示了暴露于0、2.5 $\mu$ M,5 $\mu$ M和10 $\mu$ M去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)后,体细胞群中三重阳性细胞的百分比。

[0053] 图25.去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)降低了胰腺癌细胞群中癌干细胞的百分比(48小时)。这些图显示48小时后去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)浓度分别为0 $\mu$ M(左上)、2.5 $\mu$ M(右上)、5 $\mu$ M(左下)和10 $\mu$ M(右下角)时在CD24(PE)门中CD44(PE-Cy7)阳性细胞和EpCam(APC)阳性细胞。“Q1”=CD24<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>,“三重(Triple)<sup>+</sup>”=CD24<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>/EpCam<sup>+</sup>,“Q3”=CD24<sup>+</sup>,“Q4”=CD24<sup>+</sup>/EpCam<sup>+</sup>。在治疗后48小时,化合物13-9-1减少了PANC-1细胞中的CD24<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>/EpCam<sup>+</sup>细胞群。柱状图(底部)显示了暴露于去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)后,体细胞群中三重阳性细胞的百分比。10 $\mu$ M去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)的结果具有统计学意义(\*P<0.05,通过学生t-检验)。

[0054] 图26.去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)对胰腺癌形成和生长的影响。图26A显示接种1 $\times 10^6$ PANC-1细胞后的肿瘤形成率(左)和肿瘤生长率(右)。对照组中(左图顶行),86.67%(13/15)的未经治疗的小鼠形成肿瘤。化合物13-9-1(10 $\mu$ M)使该速率降低到80%(4/5);对肿瘤形成时间无影响(左图底行)。与对照组未治疗小鼠(右图顶行)肿瘤生长相比,化合物13-9-1显著减少了在治疗小鼠中接种1 $\times 10^6$ 个PANC-1细胞形成的肿瘤的生长(右图底行)(P=0.04)。在接种2 $\times 10^5$ 个PANC-1细胞后,图26B显示化合物13-9-1对其有明显的抑制作用。在对照组中(左图顶行),80%(12/15)的未治疗小鼠形成肿瘤。化合物13-9-1(10 $\mu$ M)使肿瘤形成率降低至60%(3/5);这表明胰腺癌干细胞引发的肿瘤形成减少(左图底行)。此外,化合物13-9-1(10 $\mu$ M)的单剂量治疗减少了所形成肿瘤的生长。对照组未治疗小鼠的肿瘤体积增加(右图顶行),而化合物13-9-1显著减少了治疗组小鼠的肿瘤生长(右图底行)(P=0.02)。在图26C中,接种2 $\times 10^4$ 个PANC-1细胞后,在观察的38天,对照组(3/15)和治疗组(1/5)中均有20%的小鼠形成肿瘤。治疗小鼠的肿瘤生长与未治疗的小鼠无明显差异。

[0055] 图27.通过去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)减少肿瘤形成。化合物13-9-1减少了PANC-1癌干细胞的肿瘤形成。在接种2 $\times 10^5$ 个未经处理的PANC-1细胞后,对照组(实心顶线)在第20天观察到100%(20/20)肿瘤形成。当用化合物13-9-1预处理接种的PANC-1细胞时,在第20天治疗组(虚线底线)仅观察到55%的肿瘤形成。治疗组在第39天达到最大成瘤率80%,其与对照组比有显著性差异(P<0.001通过对数秩检验)。

[0056] 图28. 去乙基黄酮哌丁胺 (De-ethylflavopereirine) 对 $\beta$ -链蛋白在PANC-1细胞核定位的影响。处理后24小时, 化合物13-9-1对PANC-1胰腺癌细胞核 $\beta$ -链蛋白水平无影响。处理后48小时, 化合物13-9-1显著降低了细胞核 $\beta$ -链蛋白水平。在这些条件下, 细胞质 $\beta$ -链蛋白水平不受影响。黏着斑蛋白可以标记细胞质蛋白, 这种蛋白质在细胞核中含量很低。

[0057] 去乙基黄酮哌丁胺 (De-ethylflavopereirine) 的抗炎作用可减少胰腺炎和胰腺癌的后续发展

[0058] 图29. 去乙基黄酮哌丁胺 (De-ethylflavopereirine) 对酒精诱导的慢性胰腺炎小鼠模型的影响。胰腺石蜡切片用苏木素和伊红染色。图29A显示给予乙醇的小鼠的正常组织(左图)、水肿和炎性细胞浸润(中图), 以及给予乙醇和化合物13-9-1的小鼠无损伤组织(右图)。用损伤评分量化组织保护(图29B)。在给予乙醇的小鼠胰腺中, Ly6G升高了4倍, 而在给予乙醇和化合物13-9-1的小鼠中, 中性粒细胞的数量没有增加(图29C)。

[0059] 去乙基黄酮哌丁胺 (De-ethylflavopereirine) 的抗结肠癌活性

[0060] 图30. 去乙基黄酮哌丁胺 (De-ethylflavopereirine) 对HT-29结肠癌肿瘤体积的影响。将具有人HT-29结肠癌细胞皮下异种移植物的裸鼠分组为未治疗的对照组(正方形)、给药化合物13-9-1组(三角形)或作为常规化疗方案给药的IFL(圆圈)组。IFL是常用于治疗结直肠癌的伊立替康、氟尿嘧啶和亚叶酸钙的组合物。图中显示了肿瘤体积(mm<sup>3</sup>)与以天为单位的时间的关系。动物接受了两周半的治疗。由于IFL组的动物在两周半时就开始死亡而停止了实验。用化合物13-9-1治疗的动物没有死亡。

[0061] 图31-33显示了从图31中的未治疗小鼠(对照)、图32中施用去乙基黄酮哌丁胺 (De-ethylflavopereirine) 的小鼠或图33中施用IFL的小鼠中去除的HT-29肿瘤的TUNEL染色。图31-33中的每一个显示了来自每种处理的两个独立的样品(顶部和底部)。治疗结束后, 将肿瘤从动物体内取出, 固定, 切片, TUNEL法染色, 以鉴定细胞凋亡。在图31中, 对照组动物肿瘤的边界显示完整的组织且无TUNEL染色。在图32中, 给药13-9-1的动物的肿瘤边界显示肿瘤周围区域有凋亡。图32(顶部)的样本也示出了肿瘤组织左下方边缘附近的一个区域, 该区域在细胞凋亡后被破坏。彩色图像清楚地区分了经历凋亡细胞的深紫色/棕色与完整肿瘤细胞的蓝色。在图33中, IFL治疗动物肿瘤的边界显示, 周围组织的重要区域被完全破坏。

## 具体实施方式

[0062] 癌变被理解为一个多步骤过程。因此, 由于难以消除残留病灶或癌干细胞, 特别是在细胞毒性药物剂较少或不再有效的癌症晚期, 本发明的一个目的是针对增殖失调发展的早期时间和事件。出于这个原因, 我们认为, 本发明所述的去乙基黄酮哌丁胺 (de-ethylflavopereirin) 及其衍生物可以提供补充其他化疗药剂的治疗(例如同时提供药物混合物), 该治疗通过它们靶向癌细胞代谢的不同方面、使癌细胞对其他化疗药剂的活性敏感、允许有效使用较低剂量的其他化疗药剂以减轻其一种或多种不良副作用、延长其他在晚期癌症中失效的化疗药剂的有效性, 或它们的任意组合。

[0063] DNA的失稳会导致癌细胞表型的发展, DNA的失稳可以被去乙基黄酮哌丁胺 (de-ethylflavopereirin) 靶向。例如, 致癌物早在观察到肿瘤之前就改变了正常的DNA结构。Malins等表明, 检测前列腺细胞DNA的结构变化可以区分正常组织, 良性前列腺增生(BPH)

和腺癌是由于它们的脱氧核糖和磷酸二酯结构发生了改变(Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 94:259-264,1997)。正常细胞向BPH或腺癌的发展可通过DNA中相同的结构修饰来追踪。它们还在肉瘤中显示出一种已知的致癌物使细胞DNA的核苷酸碱基和磷酸二酯主链产生了结构变化(Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 101:10721-10725,2004)。该化学DNA损伤对稳定DNA双螺旋的氢键的影响最初在对致癌物的间接测定中显示(Beljanski, I R C S Med.Sci.Biochem.7:476,1979)。本发明所述的合成化合物可以通过特异性靶向具有不稳定DNA的细胞并诱导其细胞凋亡来延迟或降低肿瘤形成的速率。

[0064] 不受特定作用机制的束缚,去乙基黄酮哌丁胺(de-ethylflavopereirin)及其衍生物通过阻断细胞增殖在癌变的早期阶段,例如,在DNA失稳过程的早期,作为抗癌药剂是有效的。由于没有毒性,即使在高剂量下,也可能对有风险或高癌症风险的受试者施用去乙基黄酮哌丁胺(de-ethylflavopereirine)及其衍生物,如暴露于诱变剂、致癌物或其他环境危害下;在原癌基因或抑癌基因、DNA损伤反应或DNA修复机制中有遗传突变;或通过癌症筛查发现有癌前病变,不需要进行有严重副作用的治疗。美国预防医学工作组已经建议了一种低剂量乙酰水杨酸在某些具有高CVD风险的人群中对心血管疾病(CVD)和结肠癌的一级预防的类似应用(Ann.Intern.Med.164:836-845;也参见JAMA Oncol.2:762-769,2016),其可能是通过抑制炎症的长期影响发挥作用。对于降低卵巢癌(J.Nat'l Cancer Inst.106:djt431,2014)、胰腺癌(Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.26:68-74,2017)和其他诸如胃癌、食道癌、子宫内膜癌、乳腺癌和前列腺癌(BMC Cancer18:288,2018)的风险的也有较弱的支持。

[0065] 因为这种DNA去稳定化在整个癌变过程中是连续的病理过程,所以本发明在癌症发展的不同阶段都是有效的(如实施例所示)。一种可能性是本发明的化合物可以靶向含有不稳定DNA的细胞(cf.PLOS Genet.11:e1004901,2015),并比现有的癌症治疗方法更有效地诱导细胞凋亡(cf.J.Cell Biochem.117:279-288,2016)。

[0066] 基于细胞的测定表明,所述合成化合物以剂量依赖性的方式选择性抑制癌细胞的生长。该合成化合物似乎通过引起癌细胞破坏而不损害非癌细胞从而选择性地对癌细胞起作用。体外和体内研究表明,去乙基黄酮哌丁胺(de-ethylflavopereirin)还破坏了即使在通过抗癌疗法减少了肿瘤体积后,也能使恶性肿瘤持续存在和复发的癌干细胞。

[0067] 在使用异种移植人胰腺或结肠癌细胞的小鼠进行的临床前研究中,所述合成化合物可显著缩小肿瘤,有时可完全消除肿瘤。它也抑制了转移瘤的出现,且没有引起动物体内可检测到的毒性,如其正常的体重增加和其内部器官的正常组织学所显示。

[0068] 去乙基黄酮哌丁胺(de-ethylflavopereirin)可以经肠内或肠外给药(优选口服、静脉内或输注),并且在宽的剂量范围内表现出良好的耐受性。在相似或更低的浓度下,它的抗癌细胞活性与其结构上相关的天然化合物黄酮哌丁胺(flavopereirine)相同,但去乙基黄酮哌丁胺(de-ethylflavopereirin)的毒性更小。因此,尽管从黄酮哌丁胺(flavopereirine)中除去乙基不会改变其抗肿瘤活性,但是其毒性可以显著降低。不同于黄酮哌丁胺(flavopereirine),去乙基黄酮哌丁胺(de-ethylflavopereirin)可以以每kg受试者体重的施用数百上千毫克的口服剂量,没有明显的毒性。因此,作为必须限制黄酮哌丁胺(flavopereirine)剂量问题的解决方案,去乙基黄酮哌丁胺(de-ethylflavopereirin)可以是比黄酮哌丁胺(flavopereirine)更有效的抗癌药,因为尽管

化学修饰不会显着增加活性,但可以实现更高的全身浓度。

[0069] 在肠内给药的情况下,可包封药物组合物可用于保护去乙基黄酮哌丁胺(de-ethylflavopereirin)免受消化道中遇到的酸或酶的降解和/或增强去乙基黄酮哌丁胺(de-ethylflavopereirin)在体循环中的吸收。施用脂质体组合物的优点可通过比较去乙基黄酮哌丁胺(de-ethylflavopereirin)或其代谢产物的循环量来显示。

[0070] 溶液或固体形式的去乙基黄酮哌丁胺(de-ethylflavopereirin)及其盐可满足对化疗药剂安全有效的需求。去乙基黄酮哌丁胺(de-ethylflavopereirin)的生理学作用似乎是选择性的:它可以选择性地靶向癌细胞以消除(例如细胞凋亡或被外部因素杀死),但不会明显干扰非癌细胞,包括那些正在迅速分裂的细胞的生存能力。当与其他化疗药剂组合使用时,去乙基黄酮哌丁胺(de-ethylflavopereirin)也有效。这样的组合是协同的,并引发癌细胞(包括已变成耐药性的细胞)死亡。由于其独特的作用机理和广谱有效性,去乙基黄酮哌丁胺(de-ethylflavopereirin)将成为新一代化学组合疗法的锚定化合物,该疗法增强癌症治疗的功效并减少对接受该化合物、其药学上可接受的盐、溶剂化物(例如水合物)或其溶剂化物或水合物的药学上可接受的盐的受试者的伤害。

[0071] 定义

[0072] 除非本文另有定义,否则技术术语具有与本发明相关领域的技术人员(即,肿瘤学家或其他癌症专家)所理解的不同含义。根据特定的技术,此类人员还可能具有药物化学和/或药理学方面的知识、培训和经验。

[0073] 如在说明书和权利要求书中使用的,术语“一种”(“a”)包括其名词的单数和复数形式,除非其中之一与使用该术语的上下文相反。例如,一种化合物(a compound)可以是一种或多种化合物,而式(I)的化合物是指去乙基黄酮哌丁胺(de-ethylflavopereirin)。

[0074] 当本文中将范围用于物理性质如分子量或化学性质如化学式时,其旨在包括范围内的所有组合和子组合以及其中的具体实施方式。如本文中所使用的,当在文中在数值或其范围中使用术语“约”或符号“~”,意味着该值或范围可以偏离本领域技术人员认为在情况下合理的量,例如,在测量或观察的可变性范围内(或在实验误差之内)。或者,数值或范围在规定值或范围的10%变化。例如,对于观察到的温度计读数变化,“约23℃”表示温度在22℃至24℃范围内,或者 $23^{\circ}\text{C} \pm 2.3^{\circ}\text{C}$ 。

[0075] 术语“药剂”是指一种或多种生物或化学化合物。非限制性实例包括小的(小于1000Da)有机或无机分子、寡肽(20个或更少的氨基酸)、其模拟物、多肽(包括但不限于抗体、酶、可溶性受体、或其配体)、寡核苷酸(50个或更少的核苷酸)、其适配体,或多核苷酸。所述药剂可以从天然来源例如植物或动物提取物等合成或获得。以下,将本发明所述化合物以外的药剂称为“其他药剂”或“第二药剂”。

[0076] 术语“抗癌药剂”或“抗肿瘤药剂”是指用于治疗癌症恶性肿瘤或其他肿瘤性疾病的药剂。化疗药剂包括此类抗癌药或抗肿瘤药。将一种或多种化疗药剂作为活性药物成分(API)施用给受试者包括癌症化疗。在此,本发明的几个实施方式给出了一种或多种化疗药在剂化疗和用于其给药的药物中的新应用。

[0077] 术语“激动剂”是指能够在体外细胞或体内增加靶标的化合物,其通过激活或增强靶标的生物活性或通过激发或增强靶标的表达进行。相反,术语“拮抗剂”是指能够在体外细胞或体内降低靶标的生物活性的化合物,其通过灭活或抑制靶标的生物活性或通过终止

或沉默降低靶标的表达进行。在靶标的生理环境中,它可能是参与代谢或分解代谢的酶、酶复合物、配体或其受体的组分,配体-受体的信号通路的组分以及其他不受限制的细胞调节或结构性组分。尽管激动剂或拮抗剂可以直接与靶标特异性相互作用(例如结合),但是此类化合物还可以通过不是靶点的其他组分与复合物或信号通路相互作用。在不遵循任何特定机制或理论的情况下,本发明中所述的一种或多种化疗药剂可以作用于癌细胞内的靶标或通过非癌细胞中的靶标起作用。靶标的生物活性可能与确定干细胞变为定向细胞、癌细胞的分化、癌细胞的增殖以及癌细胞的转移有关。根据作用机理,本发明中所述的一种或多种化疗药剂可用作单个靶标的拮抗剂或激动剂、或多个不同靶标的拮抗剂和/或激动剂的组合。

[0078] 术语“细胞增殖”是指由于细胞分裂增强(以及细胞生长和DNA复制)和/或程序性细胞死亡(即凋亡)减少而导致细胞数量增加的现象。在体外癌细胞培养中,可以通过核分裂指数、细胞数目增加的速率、细胞倍增的数目或其速率来测量细胞增殖。在某些情况下,细胞增殖可能伴随着异常的生长控制和/或形态、基因组不稳定、基因突变和/或表观遗传改变;新抗原表达、肿瘤相关自身抗原的过表达、原癌基因的激活突变和/或其表达抑癌基因的失活诱变和/或其低表达或在另一个与细胞增殖一致的癌症/肿瘤生物标记物的改变。

[0079] 术语“共同给药”和“组合给药”可互换使用,并且包括同时或依次向受试者施用两种或更多种药剂。例如,两种或更多药剂和/或其代谢产物同时存在于动物中。在一个实施方式中,共同给药包括在分开的组合物中同时给药、在分开的组合物中在不同时间给药、或以两种药剂都存在于一个组合物中给药。

[0080] 术语“有效量”和“治疗有效量”可互换使用,其指足以导致预期的应用或效果的本发明所述化合物的量,包括但不限于治疗如本文所述癌症或肿瘤(或肿瘤(neoplasm),特别是恶性的)。治疗有效量可以根据预期的应用(癌细胞的体内或体外培养)或受试者和所治疗的癌症病况而变化,例如需要治疗的受试者的体重和/或年龄、癌症的类型和/或分期、其侵袭性和/或严重性(尤其是转移瘤)、癌细胞数量或肿瘤大小(即肿瘤负荷)、给药途径和/或频率等,或它们的任意组合,其可以由本领域技术人员确定。该术语适用于给药受试者的剂量或其所达到的浓度,该剂量或浓度将导致增殖指数、核分裂指数、细胞绝对数量随时间的变化和/或其倍增、细胞凋亡、植入物行为或其任何组合的特定反应。具体剂量或浓度将根据所选择的特定治疗方案而变化,是否将癌症药物剂与另一种药剂组合施用、使用的辅助剂、给药时间或频率药剂的靶细胞或靶组织,以及承载药物的物理传递系统。

[0081] 如本文所用,术语“治疗”包括治疗被诊断为癌症的受试者、预防接受治疗的受试者的复发或恶化、以及改善或减轻接受治疗的受试者的症状,并且指获得有益或治疗效果的方法,包括但不限于缓解、预防复发、部分缓解、减少症状的数量和/或严重程度以及姑息治疗。术语“一线治疗”和“初级治疗”可互换使用,以描述针对受试者计划的初始治疗,其可以在考虑或不考虑癌症分期的情况下根据特定的癌症类型选择治疗方案。与之相关但又不同的是“确定性治疗”一词,用于描述根据受试者的特定诊断从不同的替代治疗方案中选择的最佳治疗方案。与此相关,本发明的化合物被用作“新辅助剂”,并且通常是护理标准(或最佳实践)的一部分。

[0082] “治疗效益”是指至少减少或消除癌症和/或肿瘤、至少改善与癌症或肿瘤相关的生理症状、至少降低通过癌症和/或肿瘤的生物标记物测量的风险,或它们的组合。因此,尽

管癌细胞和/或肿瘤仍可以被检测到或仍然存在于受试者中,仍可以实现在受试者中观察到的治疗效益。在预防方面,已经对本发明或其他疗法产生反应的、被诊断为罹患癌症的风险增加、或患有癌前病变的受试者通过在较长时间内避免复发、降低罹患癌症的风险、提高疾病特异性生存率或改善预后而获得治疗效益。本领域技术人员将理解,治疗效益可能难以在特定个体中确定,且可能需要研究大量高危个体,例如在临床试验中。

[0083] 如本文所用,“治疗效果”涵盖如本文所述的治疗效益和/或预防效益。预防效果包括延迟或消除疾病或病况的出现;延迟或消除疾病或病况症状的发作;减缓、停止或逆转疾病或病况的发展;或它们的任意组合。减少器官中的慢性炎症(例如胰腺炎、胃炎、肝炎或溃疡性结肠炎/克罗恩病)可以预防癌症(例如胰腺癌、胃癌、肝癌或结肠癌),因为前者具有DNA损伤表型,并且是癌症发展的风险因素。可以通过组织病理学、遗传分析或监测炎症标志物在细胞水平上观察到癌变的抑制作用。如本领域中已知的,可以实现治疗效果,而不必在每个接受治疗的受试者中治愈疾病或完全预防疾病。

[0084] 术语“体内”和“体外”分别指发生在受试者完整身体内部或外部的事件。例如,体外试验包括在受试者体外进行的任何试验。体外试验包括基于细胞的试验,其使用活细胞或死细胞。在一个实施方式中,体外试验还包括不使用细胞的无细胞试验。

[0085] 术语“受试者”可以是人:即,男性或女性,例如儿科受试者(例如,从出生到2岁的婴儿,2~12岁的儿童,12~18岁的青少年)或成年受试者(例如,18~25岁的年轻成年人,25~40岁的成熟成年人,30~60岁的中年成年人或60岁以上的老年人)。或者,可以是像另一种(非人类)灵长类动物或另一种(非人类)哺乳动物的动物,包括但不限于牛、猪、马、绵羊、山羊、兔子、啮齿动物(例如,小鼠、仓鼠、豚鼠或大鼠)、猫和/或狗。

[0086] 术语“放射治疗”是指使用本领域技术人员已知的方法和组合物将受试者暴露于高能辐射中,包括但不限于使用外部光束治疗或近距离放疗的X射线或 $\gamma$ 射线光子、电子、质子和中子。放射线可以靶向特定的癌性器官或肿瘤,并且如果存在,也可以靶向转移瘤。根据癌症的类型选择放射线的种类和提供放射线的方案。放射治疗可以有不同的目的(例如,治疗性的,化疗前的新辅助,化疗或手术后的辅助或姑息治疗)。

[0087] 术语“反应”是指一种或多种反应物的分子或离子结构通过电子的失去、获得、转移或共享而重新排列的化学过程,而不仅仅是物理形式的改变。化学反应可以包括但不限于一种或多种化合物与另一种或多种化合物(相同的或其他化学实体)反应(例如,通过键的形成或裂解、盐的形成、溶剂化物的形成、螯合作用、或其他非键改变的缔合)的过程。化学反应之后可以进行进一步的化学反应、分离和收集(包括但不限于结晶以从母液中分离出晶体、沉淀以从溶液中回收沉淀物、过滤以分离固体和滤液、倾析以分离固体和溶液,通过沸点蒸馏分离、蒸发以分离溶质和溶剂)、洗涤和纯化的步骤。化学反应的产物可以分离为固体形式(例如粉末、颗粒)或溶液形式(例如溶解在溶剂中的溶质)的化合物的混合物或基本上纯的化合物。分离一种或多种化疗化合物可包括制备化疗药剂的盐、溶剂化物、水合物或另一种复合物,然后如上所述收集或分离。

[0088] 术语化疗药剂的“药学上可接受的形式”包括但不限于药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、非共价复合物、前药或其同位素标记的衍生物,以及它们的混合物。药学上可接受的形式可以包含药学上可接受的盐,是指在本领域技术人员的判断下,适于施用于受试者而无过度毒性、刺激性、过敏反应等且与合理的收益/风险比相称的盐。药学上可接受的

盐是本领域已知的(参见,例如,J.Pharmaceutical Sciences 66:1-19,1977)。药学上可接受的盐可以衍生自合适的无机或有机酸。无机酸包括但不限于盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等。有机酸包括但不限于乙酸、丙酸、羟基乙酸、丙酮酸、草酸、马来酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸,对甲苯磺酸、水杨酸等。药学上可接受的无毒酸加成盐的例子是与无机酸(例如盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸或高氯酸)或有机酸(例如乙酸、草酸、马来酸、酒石酸、柠檬酸、琥珀酸或丙二酸)或通过使用本领域中使用的其他方法例如离子交换形成的氨基盐。其他药学上可接受的盐包括己二酸盐、藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐(benzenesulfonate)、苯磺酸盐(besylate)、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、地戊二酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、甲酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、葡萄糖酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢碘酸盐、2-羟基乙烷磺酸盐、乳清酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、十二烷基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐,对甲苯磺酸盐、十一烷酸盐、戊酸盐等。

[0089] 在某些实施方式中,药学上可接受的形式是“溶剂化物”(例如水合物)。如本文所用,术语“溶剂化物”是指进一步包括通过非共价分子间力结合的化学计量或非化学计量的溶剂的化合物。溶剂化物可以是公开的化合物或其药学上可接受的盐。当溶剂是水时,溶剂化物是“水合物”。药学上可接受的溶剂化物和水合物是例如可以包含1至约100、或1至约10、或1至约2、3或4种溶剂或水分子的复合物。在一些实施方式中,溶剂化物可以是通道型溶剂化物。可以理解的是,本文所用的术语“化合物”涵盖化合物及其溶剂化物,以及它们的混合物。

[0090] 如本文所用,术语“溶剂”、“有机溶剂”或“惰性溶剂”各自是指在结合其描述的反应条件下为惰性的溶剂,包括但不限于苯、甲苯、乙腈、乙酸乙酯、乙酸异丙酯、己烷、庚烷、二恶烷,四氢呋喃(“THF”)、二甲基甲酰胺(“DMF”)、二甲基乙酰胺(“DMA”)、氯仿、二氯甲烷(dichloromethane)、乙醚、甲醇、丁醇、甲基叔丁基醚(“MTBE”或“TBME”)、2-丁酮(“MEK”)、N-甲基吡咯烷酮(“NMP”)、吡啶等。除非另有规定,否则本文所述反应中使用的溶剂是惰性有机溶剂。除非另有规定,否则对于每克限量试剂,一立方厘米(或mL)的溶剂构成了等效的体积。

[0091] 术语“药学上可接受的载体”或“药学上可接受的赋形剂”包括但不限于介质(例如注射用水、等渗盐水)、盐、缓冲液、糖、稳定剂、抗氧化剂或其他防腐剂、液体稀释剂或固体填充剂、粘合剂、润滑剂、表面活性剂、干燥剂、分散剂、包衣剂和聚合物基质或载体。这种药学上可接受的载体和/或赋形剂的使用是本领域已知的。参见,例如,Remington:The Science and Practice of Pharmacy and The United States Pharmacopeia。

[0092] 术语“固态形式”描述了物理状态基本上不是液体或气体的化疗药剂。固态形式可以是结晶的、无定形的或它们的任意混合物。晶体形式是一种结晶的固态形式,包括但不限于多晶型物、溶剂化物或水合物以及盐、盐的溶剂化物、盐的水合物及其多晶型物。多晶型物具有两种或更多种基本上由相同的化疗药剂组成的晶体形式。溶剂化物是含有溶剂的晶体形式;水合物是溶剂包含水的溶剂化物。对于特定的溶剂化物组合物,溶剂化物的多晶型

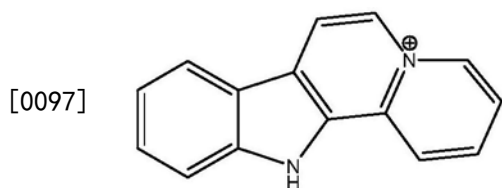
物具有一种以上的晶形。类似地,对于特定的水合物组成,水合物的多晶型物具有一种以上的晶体形式。去溶剂化的溶剂化物是由溶剂制备的去除溶剂的晶体形式。

[0093] 具体的官能团和化学术语在下文中进行更详细的描述。化学元素按《化学与物理手册》(Handbook of Chemistry and Physics)内页的元素周期表(CAS版)确定,具体官能团一般按其中所述进行定义。此外,有机化学的一般原理,以及特定的功能部分和反应性在有机化学教科书Carey's Advanced Organic Chemistry、Carruther's Modern Methods of Organic Synthesis、Greene's Protective Groups in Organic Synthesis、Harrold's Basic Concepts in Medicinal Chemistry、Larock's Comprehensive Organic Transformations和March's Advanced Organic Chemistry中描述。

[0094] 药学上可接受的固体可以为晶体或无定形形式或其混合物。每种的可取性取决于具体的应用:无定形固体可能更易于溶解,而结晶固体可能更稳定。固态形式的改变可能影响各种物理和化学性质,这可能在加工、配制、稳定性和/或生物利用度方面带来利弊。

[0095] 可以向受试者施用包含一种或多种化疗药剂的药物组合物。可以直接向受试者施用从合成步骤分离的具有或不具有药学上可接受的载体和/或赋形剂的固体形式。可选地,固体形式可以是压制成片剂的粉末、包被以延迟释放的片剂或填充胶囊的颗粒。该片剂或胶囊以单位剂量的形式可由受试者自行施用。

[0096] 在一些实施方式中,提供了式(I)所示化合物:



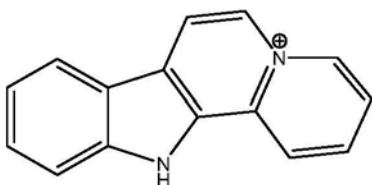
[0098] 或盐、或溶剂化物、或水合物、或其溶剂化物或水合物的盐,或它们的任意混合物的一种或多种固体形式。在一个实施方式中,式(I)所示化合物的固体形式可以是结晶形式、无定形形式或结晶形式和无定形形式的混合物。固体形式可以包括式(I)所示的化合物、或其盐、溶剂化物、水合物、其溶剂化物或水合物的盐,或它们的任意混合物的结晶形式。

[0099] 本发明提供了一种或多种式(I)所示化合物或其溶剂化物(例如水合物)的盐。该盐是药学上可接受的盐。该盐可以是H-X盐,其中X是F、Cl、Br、I、RSO<sub>3</sub>或RCO<sub>2</sub>,其中R是烷基、芳基、取代的烷基或取代的芳基。一种或多种式(I)所示化合物的盐,所述盐为氢溴酸盐、盐酸盐、硫酸盐、1,2-乙烷二磺酸盐、对甲苯磺酸盐、甲烷磺酸盐、草酸盐、2-羟丙基乙磺酸盐(即羟乙磺酸盐)、L-天冬氨酸盐、马来酸盐、磷酸盐或乙烷磺酸盐。

[0100] 在其他实施方式中,提供了式(I)所示化合物或其溶剂化物(例如水合物)的游离碱的固体形式。其中,术语“游离”和“无电荷”可以互换使用。本文提供的固体形式可以是式(I)所示化合物的游离碱的溶剂化物。在一个实施方式中,所述溶剂化物是水合物。在一些实施方式中,本文提供了一种药物组合物,其包含式(I)所示化合物:



[0101]



[0102] 或盐、或溶剂化物、或水合物、或溶剂化物或水合物的盐、或它们的任意混合物的固体形式,以及一种或多种药学上可接受的载体和/或赋形剂。进一步地,提供了一种药物组合物,其包含治疗有效量的式(I)所示化合物、或其盐、溶剂化物、水合物、其溶剂化物或水合物的盐、或它们的任意混合物的固体形式以及一种或多种药学上可接受的载体和/或赋形剂。

[0103] 在药物制剂生产中有用的固体形式,可通过结晶过程获得结晶和半结晶态,或通过凝固过程获得无定形态。在某些实施方式中,通过在反应混合物中产生式(I)所示的化合物或其盐并从反应混合物中回收固体形式或通过式(I)所示的化合物或其盐溶解在溶剂中,任选地加热,然后通过冷却和/或加入反溶剂一段时间以使产物结晶/凝固来进行结晶。结晶或凝固之后,可以在受控条件下进行干燥,直至最终固体形式的达到一定的溶剂或水含量。

[0104] 在一个实施方式中,该过程包括在合成式(I)所示的化合物或其盐之后回收固体形式。在另一个实施方式中,该方法包括从式(I)所示的化合物或其盐的在前固体形式中回收固体形式作为过渡(例如,首先回收式(I)所示的化合物或其盐的第一固体形式。然后在合适的条件下将回收的第一固体形式转化为第二固体形式)。从一种固体形式(例如,第一)到另一种固体物(例如,第二)的转变是本发明范围内的方法。这样的转变可以用作获得用于制备药物组合物的固体形式的制备方法。

[0105] 在一些实施方式中,本文提供了制备式(I)所示的化合物或其溶剂化物(例如水合物)的盐的固体形式的方法,其包括:(a)使式(I)所示的化合物在溶剂体系中与酸接触,和(b)从步骤(a)得到的混合物中产生和/或回收式(I)所示化合物的盐的固体形式。

[0106] 在一些实施方式中,本文提供了制备式(I)所示的化合物或其溶剂化物(例如水合物)的盐的固体形式的方法,其包括:(a)将含有式(I)所示化合物的盐的材料暴露于溶剂体系,和(b)从步骤(a)得到的混合物中产生和/或回收式(I)所示化合物的盐的固体形式。

[0107] 在一些实施方式中,本文提供了制备式(I)所示化合物或其溶剂化物(例如水合物)的游离碱的固体形式的方法,其包括:(a)将含有式(I)所示化合物的盐或游离碱的材料暴露于溶剂体系,和(b)从步骤(a)得到的混合物中产生和/或回收式(I)所示化合物的游离碱的固体形式。

[0108] 在某些实施方式中,步骤(b)可包括以下一种或多种:(i)冷却含有式(I)所示化合物的盐或游离碱的溶液;(ii)在有或没有冷却步骤的情况下添加反溶剂,以引起包含式(I)所示的化合物的盐或游离碱的固体材料的沉淀;(iii)蒸发含有式(I)所示化合物的盐或游离碱的溶液;(iv)将包含式(I)所示化合物的盐或游离碱的材料在溶剂体系中制浆;和/或(v)使包含式(I)化合物的盐或游离碱的材料在溶剂体系中熟化。

[0109] 式(I)所示化合物的硫酸盐

[0110] 在一些实施方式中,本文提供了式(I)化合物的硫酸盐。设想式(I)所示化合物的硫酸盐可以以多种固体形式存在。此类固体形式包括结晶固体,例如式(I)所示化合物的结

晶硫酸盐的多晶型物、溶剂化物和水合物,以及无定形固体,或它们的任意混合物。式(I)所示化合物的硫酸盐的所有此类固体形式均在本发明范围内。

[0111] 如本文所用,“硫酸盐”是指包含至少一种衍生自硫酸( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )的反离子的盐。衍生自硫酸的反离子包括但不限于: $\text{HSO}_4^-$ (例如,硫酸氢盐(hydrogen sulfate)、硫酸氢盐(hydrosulfate)或重硫酸盐(bisulfate))和 $\text{SO}_4^{2-}$ (例如,硫酸盐)。在硫酸盐中,正离子与衍生自硫酸的反离子的摩尔比可以是本领域已知的任何比率。示例性的摩尔比包括但不限于约1:2(即,双硫酸盐)、约1:1(即,单硫酸盐)和约2:1(即,半硫酸盐)。术语“硫酸盐”包括该盐的所有形式,包括但不限于该盐的结晶形式、无水形式、盐的溶剂化物(例如,水合物)形式、无定形形式或它们的任意混合物。

[0112] 在一个实施方式中,本文提供了包含式(I)所示化合物或其溶剂化物(例如水合物)的硫酸盐的固体形式。在一个实施方式中,本文提供了包含式(I)所示化合物的硫酸盐的溶剂化物的固体形式。在一个实施方式中,本文提供了包含式(I)所示化合物的硫酸盐的水合物的固体形式。在一个实施方式中,本文提供了包含式(I)所示化合物或其溶剂化物(例如水合物)的硫酸盐的结晶态的固体形式。在一个实施方式中,本文提供了包含式(I)所示化合物的硫酸盐的溶剂化物的结晶态的固体形式。在一个实施方式中,本文提供了包含式(I)所示化合物的硫酸盐的水合物的结晶态的固体形式。在一个实施方式中,式(I)所示的化合物的硫酸盐是硫酸盐。在另一个实施方式中,式(I)所示化合物的硫酸盐是重硫酸盐(bisulfate)(即,硫酸氢盐(hydrosulfate))。

[0113] 药物组合物

[0114] 药物组合物包含一种或多种作为活性成分的本文所提供的化合物、该化合物的立体异构体、对映异构体、对映异构体或非对映异构体的混合物或它们的任意组合(例如,药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物)和药学上可接受的赋形剂,其包括惰性介质(例如水或有机溶剂)、载体,固体填充剂、液体稀释剂、缓冲液、盐、糖等。在一些实施方式中,所述组合物可以包含第二活性成分,例如另外的化疗药剂。

[0115] 剂型

[0116] 药物组合物可以配制为液体或固体形式进行给药,包括溶液、混悬剂、胶囊剂、乳膏剂、乳剂、泡沫剂、软膏剂、糊剂、颗粒剂、微粉或片剂;通过诸如口服、肠内、肠外(例如,静脉内、动脉内、皮下、肌内、血管内、腹腔内、鞘内)、眼科、舌下、经皮或局部;阴道内或直肠内的途径;并通过医疗设备如吸入器、雾化器、贴剂、子宫托、支架或栓剂进行。

[0117] 药物介质可以是水性的或非水性的,包括水、甘油、油、醇、多元醇(例如甘油、聚乙二醇、聚乙二醇)及其混合物。载体的实例包括脂质体、水凝胶、稳定的乳液、聚合物胶束、环糊精、树状聚合物、微球和纳米颗粒或纳米纤维。

[0118] 该组合物还可包含赋形剂,例如防腐剂、表面活性剂、润湿剂、粘合剂、分散剂、润滑剂、稳定剂和/或干燥剂。可以通过包括抗微生物剂例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚山梨酸等来防止微生物对本发明所述化合物的作用。还可能需要在组合物中包括等渗剂,例如葡萄糖和/或氯化钠。另外,通过包含延迟吸收的试剂,可以使输注或注射的药物组合物的吸收延长。

[0119] 配制药物组合物的方法包括使本发明的化合物和赋形剂结合的步骤。更特别地,可以通过使本发明的化合物与介质或载体以及任选的其他赋形剂接触来配制药物组合物。

可以将液体形式在有或没有干燥组合物的中间步骤的情况下无菌地分配到无菌容器中。或者,可以将干燥形式在有或没有将组合物形成多个单位剂量的中间步骤情况下无菌地分配到无菌容器中。可以进行批量测试以确认不存在病毒、热原或其他污染物。用于配制药物组合物或将其进一步加工成下游产品(例如,用于肠内自我给药的单位剂量的片剂或胶囊剂、多剂量泡罩包装、用于单次肠外给药的可配制的单位剂量)的方法是本领域常规的。除非载体或赋形剂与化疗药剂不兼容,例如通过导致不良的生理作用或以有害的方式与药物组合物的另一种成分相互作用,否则载体或赋形剂的使用包括在本发明的范围内。

[0120] 口服给药制剂

[0121] 可以将包含式(I)所示的化合物和药学上可接受的载体和/或赋形剂的药物组合物配制用于口服给药。口服给药的药物组合物包含有效量的一种或多种式(I)所示的化合物;任选地,有效量的一种或多种第二药剂;以及适于口服给药的一种或多种药物载体和/或赋形剂。有时,药物组合物还包含有效量的第三药剂。

[0122] 适于口服给药的药物组合物可以离散剂型存在,例如片剂或胶囊、或含有预定量细粉或颗粒状粉末活性成分的酏剂或糖浆、溶液、悬浮液或乳液。所述药物组合物可以通过常规方法来配制,包括使活性成分与由一种或多种非活性成分组成的药学上可接受的载体和/或赋形剂结合。例如,可以将活性成分与细分的固体载体、液体载体或其两者均匀且充分混合,然后,如果需要,将产品成型为所需剂型。例如,可以通过压制或模制来制造片剂。可以通过在合适的机器中将API压缩成自由流动的形式如粉末或颗粒来制备压制片剂,任选地将其与赋形剂例如但不限于盐、缓冲液、稳定剂、防腐剂、填充剂、粘合剂、润滑剂、表面活性剂和/或分散剂混合。任选地,可以将载体添加到所得混合物中。片剂可以通过在合适的机器中模制API、惰性赋形剂和任选的以介质润湿载体的类似混合物来制备。如果需要改善药物的输送或储存,则可以添加用于延迟释放或缓释的包衣以制备包衣片剂。

[0123] 包含活性成分的无水药物组合物可能是优选的,因为水可以促进某些化合物的降解。例如,在制药领域中可以添加水(例如,约5%)作为模拟长期存储的手段,以确定诸如保存期限或制剂随时间的稳定性的特征。可以使用无水或低水分含量的成分以及在低水分或低湿度条件来制备无水药物组合物。例如,如果期望在制造、包装和/或储存期间与水分和/或湿气充分接触,则可以使包含乳糖的药物组合物无水。可以制备和储存无水药物组合物,以保持其无水特性。因此,可以使用已知的可防止暴露于水的材料来包装无水药物组合物,使得它们可以被包括在合适的配方试剂盒中。合适的包装的例子包括但不限于气密容器、泡罩包装、小瓶和瓶子、袋子等。

[0124] 可以根据常规药物混合技术将活性成分与药学上可接受的载体组合在混合物中。载体可以采取多种形式,这取决于给药所需的制剂形式。在制备用于口服剂型的药物组合物中,任何常用的药物介质都可以用作载体,例如在口服液体制剂(如酏剂、糖浆或混悬液)的情况下用水、乙二醇、油、醇、矫味剂、防腐剂、着色剂等;或在口服固体制剂的情况下用淀粉、糖、微晶纤维素、稀释剂、造粒剂、润滑剂、粘合剂和崩解剂,在一些不使用乳糖的实施方式中。例如,适合于固体口服制剂的载体包括粉剂、胶囊剂和片剂。在一些实施方式中,可以通过标准的水性或非水性技术将片剂包衣。

[0125] 适用于药物组合物的粘合剂包括但不限于玉米或马铃薯淀粉、明胶、阿拉伯树胶、海藻酸或其盐、黄芪树胶、瓜尔胶、预糊化淀粉、纤维素或其衍生物(例如,甲基纤维素、乙基

纤维素、醋酸纤维素、羧甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、微晶纤维素)、聚乙烯吡咯烷酮及它们的任意混合物。

[0126] 用于药物组合物中的合适填充剂的实例包括但不限于滑石粉、碳酸钙(例如颗粒或粉末)、微晶纤维素、粉状纤维素、糊精、高岭土、甘露醇、硅酸、山梨糖醇、淀粉、预糊化淀粉及其混合物。

[0127] 崩解剂可用于形成药物组合物,以提供当暴露于水性环境时崩解的片剂。崩解剂过多会导致片剂在运输过程中容易破碎;太少可能不足以引起崩解,从而改变活性成分的释放速率和程度。因此,可以使用既不会太少也不会太多以至于不利地改变活性成分释放的足够量的崩解剂来形成式(I)化合物的单位剂量。崩解剂的用量可根据制剂类型和给药方式而变化。可以在药物组合物中使用约0.5至约15重量百分比的崩解剂,或约1至约5重量百分比的崩解剂。可用于形成药物组合物的崩解剂包括但不限于琼脂、海藻酸、碳酸钙、微晶纤维素、交联羧甲基纤维素钠、交联聚维酮、聚克利林钾、羧甲淀粉钠、马铃薯或木薯淀粉、其他淀粉、预糊化淀粉、其他淀粉、粘土、其他藻类、其他纤维素、树胶或它们的混合物。

[0128] 可用于形成药物组合物的润滑剂包括但不限于硬脂酸钙、硬脂酸镁、矿物油、轻矿物油、甘油、山梨糖醇、甘露醇、聚乙二醇、其他二醇、硬脂酸、月桂基硫酸钠、滑石粉、氢化植物油(例如,花生油、棉籽油、向日葵油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油)、硬脂酸锌、油酸乙酯、乙基金酸酯(ethylaureate)、琼脂或它们的混合物。另外的润滑剂包括,例如,消光(syloid)硅胶、凝结的合成二氧化硅气溶胶或其混合物。可以任选地以小于药物组合物的约1重量百分比的量添加润滑剂。

[0129] 当需要水性混悬剂、糖浆剂或酏剂用于口服给药时,其中的活性成分可以与各种甜味剂或矫味剂、色素或染料及例如乳化剂和/或助悬剂与诸如水、乙醇、丙二醇、甘油及其各种组合的稀释液一起组合使用。

[0130] 可以通过已知技术对片剂进行包衣或不包衣,以延迟其在胃肠道中的崩解和吸收,从而在更长的时间内提供持续的作用。例如,可以使用延时材料如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。口服制剂也可以以硬胶囊剂形式存在,其中活性成分与惰性固体稀释剂如碳酸钙、磷酸钙或高岭土混合,或者以软胶囊剂形式存在,其中活性成分与水或油介质如花生油、液体石蜡或橄榄油混合。

[0131] 可用于形成药物组合物的表面活性剂包括但不限于亲水性或亲脂性表面活性剂及其混合物。即,可以使用亲水性表面活性剂的混合物,可以使用亲脂性表面活性剂的混合物,或者可以使用至少一种亲水性表面活性剂和至少一种亲脂性表面活性剂的混合物。

[0132] 亲水性表面活性剂可以是离子或非离子的。合适的离子表面活性剂包括但不限于烷基铵盐;夫西地酸盐;氨基酸、寡肽和多肽的脂肪酸衍生物;氨基酸、寡肽和多肽的甘油酯衍生物;卵磷脂和氢化卵磷脂;溶血卵磷脂和氢化溶血卵磷脂;磷脂及其衍生物;溶血磷脂及其衍生物;肉毒碱脂肪酸酯盐;烷基硫酸盐;脂肪酸盐;多库酯钠;酰基乳酸酯;单和双甘油酯的单和二乙酰化酒石酸酯;琥珀酰甘油单酯和甘油二酯;甘油一酸酯和甘油二酸酯的柠檬酸酯及它们的混合物。

[0133] 在上述组中,离子表面活性剂包括例如:卵磷脂、,溶血卵磷脂、磷脂、溶血磷脂及其衍生物;肉毒碱脂肪酸酯盐;烷基硫酸盐;脂肪酸盐;多库酯钠;酰基乳酸酯;单和双甘油酯的单和二乙酰化酒石酸酯;琥珀酰甘油单酯和甘油二酯;甘油一酸酯和甘油二酸酯的柠

檬酸酯及其混合物。

[0134] 离子表面活性剂可以是卵磷脂、溶血卵磷脂、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、磷脂酸、磷脂酰丝氨酸、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺、溶血磷脂酰甘油、溶血磷脂酸、溶血磷脂酰丝氨酸、PEG-磷脂酰乙醇胺、PVP-磷脂酰乙醇胺、脂肪酸的乳酸酯、硬脂酰-2-乳酸酯、硬脂酰乳酸酯、琥珀酰单甘油酯、单/二甘油酯的单/二乙酰化酒石酸酯、单/二甘油酯的柠檬酸酯、胆碱肌氨酸、己酸、辛酸、癸酸、月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、油酸、蓖麻油酸、亚油酸、亚麻酸、硬脂酸、月桂基硫酸盐、对苯二甲酸硫酸盐、多库酯、月桂酰基肉碱、棕榈酰肉碱、肉豆蔻酰基肉碱及其盐和它们的混合物的离子形式。

[0135] 亲水性非离子表面活性剂可包括但不限于烷基葡糖苷；烷基麦芽糖苷；烷基硫代葡萄糖苷；月桂基大分子甘油酯；聚氧化烯烷基醚如聚乙二醇烷基醚；聚氧化烯烷基酚如聚乙二醇烷基酚；聚氧化烯烷基酚脂肪酸酯如聚乙二醇二酯脂肪酸单酯和聚乙二醇二酯脂肪酸二酯；聚乙二醇甘油脂肪酸酯；聚甘油脂肪酸酯；聚氧化烯脱水山梨糖醇酐脂肪酸酯如聚乙二醇脱水山梨糖醇酐脂肪酸酯；多元醇与甘油酯、植物油、氢化植物油、脂肪酸和甾醇中至少一种的亲水性酯交换产物；聚氧乙烯甾醇及其衍生物及类似物；聚氧乙烯化维生素及其衍生物；聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物及其混合物；聚乙二醇失水山梨糖醇脂肪酸酯和多元醇与甘油三酯、植物油和氢化植物油中至少一种的亲水性酯交换产物。多元醇可以是甘油、山梨糖醇、乙二醇、丙二醇、季戊四醇或糖。

[0136] 其他亲水-非离子型表面活性剂包括但不限于PEG-10月桂酸酯、PEG-12月桂酸酯、PEG-20月桂酸酯、PEG-32月桂酸酯、PEG-32二月桂酸酯、PEG-12油酸酯、PEG-15油酸酯、PEG-20油酸酯、PEG-20二油酸酯、PEG-32油酸酯、PEG-200油酸酯、PEG-400油酸酯、PEG-15硬脂酸酯、PEG-32二硬脂酸酯、PEG-40硬脂酸酯、PEG-100硬脂酸酯、PEG-20二月桂酸酯、PEG-25三油酸甘油酯、PEG-32二油酸酯、PEG-20甘油月桂酸酯、PEG-30甘油月桂酸酯、PEG-20甘油硬脂酸酯、PEG-20甘油油酸酯、PEG-30甘油油酸酯、PEG-30甘油月桂酸酯、PEG-40甘油月桂酸酯、PEG-40棕榈仁油、PEG-50氢化蓖麻油、PEG-40蓖麻油、PEG-35蓖麻油、PEG-60蓖麻油、PEG-40氢化蓖麻油、PEG-60氢化蓖麻油、PEG-60玉米油、PEG-6癸酸/辛酸甘油酯、PEG-8癸酸/辛酸甘油酯、聚甘油-10月桂酸酯、PEG-30胆固醇、PEG-25植物甾醇、PEG-30大豆甾醇、PEG-20三油酸酯、PEG-40脱水山梨糖醇酸酯、PEG-80脱水山梨糖醇月桂酸酯、聚山梨酸酯20、聚山梨酯80、POE-9月桂基醚、POE-23月桂基醚、POE-10油基醚、POE-20油基醚、POE-20硬脂基醚、生育酚基PEG-100琥珀酸酯、PEG-24胆固醇、聚甘油-10-油酸酯、吐温40、吐温60、蔗糖单硬脂酸酯、蔗糖单月桂酸酯、蔗糖单棕榈酸酯、PEG 10-100壬基酚系列、PEG 15-100辛基酚系列和泊洛沙姆。

[0137] 仅作为例子，合适的亲脂性表面活性剂包括：脂肪醇；甘油脂肪酸酯；乙酰化甘油脂肪酸酯；低级醇脂肪酸酯；丙二醇脂肪酸酯；脱水山梨糖醇脂肪酸酯；聚乙二醇失水山梨糖醇脂肪酸酯；甾醇和甾醇衍生物；聚氧乙烯化甾醇及其衍生物；聚乙二醇烷基醚；糖酯；糖醚；甘油一酸酯和甘油二酸酯的乳酸衍生物；多元醇与甘油酯、植物油、氢化植物油、脂肪酸和甾醇中的至少一种的疏水性酯交换产物；油溶性维生素/维生素衍生物，及它们的混合物。在这一组中，亲脂性表面活性剂的非限制性实例包括甘油脂肪酸酯、丙二醇脂肪酸酯及其混合物，或者是多元醇与植物油、氢化植物油和甘油三酸酯中的至少一种的疏水性酯交换产物。

[0138] 在一个实施方式中,药物组合物可包含增溶剂,以确保本文提供的化合物良好的增溶和/或溶解性并使该化合物的沉淀最小化。对于非口服使用的药物组合物,例如注射用药物组合物,这尤其重要。也可以添加增溶剂以增加亲水性药物和/或其他组分如表面活性剂的溶解度,或使药物组合物保持为稳定或均匀的溶液或分散体。

[0139] 合适的增溶剂的实例包括但不限于以下物质:醇和多元醇,例如乙醇、异丙醇、丁醇、苄醇、乙二醇、丙二醇、丁二醇及其异构体、甘油、季戊四醇、山梨糖醇、甘露醇、卡必醇、二甲基异山梨醇、聚乙二醇、聚丙二醇、聚乙烯醇、羟丙基甲基纤维素和其他纤维素衍生物、环糊精和环糊精衍生物;平均分子量为约200至约6000的聚乙二醇的醚,例如四氢糠醇PEG醚(聚乙二醇)或甲氧基PEG;酰胺和其他含氮化合物,例如2-吡咯烷酮、2-哌啶酮、 $\epsilon$ -己内酰胺、N-烷基吡咯烷酮、N-羟基烷基吡咯烷酮、N-烷基哌啶酮、N-烷基己内酰胺、二甲基乙酰胺和聚乙烯基吡咯烷酮;酯例如丙酸乙酯、柠檬酸三丁酯、乙酰基三乙-N-羟乙基吡咯烷酮柠檬酸盐、乙酰基柠檬酸三丁酯、柠檬酸三乙酯、油酸乙酯、辛酸乙酯、丁酸乙酯、三醋精、丙二醇单乙酯、丙二醇二乙酯, $\epsilon$ -己内酯及其异构体、 $\delta$ -戊内酯及其异构体、 $\beta$ -丁内酯及其异构体;以及本领域已知的其他增溶剂,例如二甲基乙酰胺、二甲基异山梨醇、N-甲基吡咯烷酮、单辛精,二甘醇单乙醚和水。

[0140] 也可以使用增溶剂的混合物。实例包括但不限于三醋精、柠檬酸三乙酯、油酸乙酯、辛酸乙酯、二甲基乙酰胺、N-甲基吡咯烷酮、N-羟乙基吡咯烷酮、聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基甲基纤维素、羟丙基环糊精、乙醇、聚乙二醇200-100、糖基糠醇、卡必醇、丙二醇和二甲基异山梨醇。在一些实施方式中,增溶剂包括山梨糖醇、甘油、三醋精、乙醇、PEG-400、糖基糠醇、和丙二醇。

[0141] 可以包含的增溶剂的量没有特别限制。给定的增溶剂的量可以限于生物可接受量,其可以由本领域技术人员容易地确定。在某些情况下,例如为了使药物的浓度最大化,加入远远超过生物可接受量的增溶剂是有利的,在向受试者提供药物组合物之前,使用常规技术如蒸馏或蒸发去除多余的增溶剂。

[0142] 药物组合物可以进一步包含一种或多种药学上可接受的添加剂和/或赋形剂。所述添加剂和/或赋形剂包括但不限于去粘剂、消泡剂、缓冲剂、聚合物、抗氧化剂、防腐剂、螯合剂、粘度调节剂、增渗剂、调味剂、着色剂、油、增香剂、遮光剂、助悬剂、粘合剂、填充剂、增塑剂、润滑剂及其混合物。

[0143] 示例性的防腐剂可包括抗氧化剂、螯合剂、抗微生物防腐剂、抗真菌防腐剂、醇防腐剂、酸防腐剂和其他防腐剂。示例性的抗氧化剂包括但不限于 $\alpha$ -生育酚、抗坏血酸、棕榈酸抗坏血酸酯、丁基羟基茴香醚、丁基羟基甲苯、单硫代甘油、焦亚硫酸氢钾、丙酸、没食子酸丙酯、抗坏血酸钠、亚硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠和亚硫酸钠。示例性的螯合剂包括乙二胺四乙酸(EDTA)、柠檬酸一水合物、依地酸二钠、依地酸二钾、依地酸、富马酸、苹果酸、磷酸、依地酸钠、酒石酸和依地酸三钠。示例性的抗微生物防腐剂包括但不限于苯扎氯铵、苄索氯铵、苄醇、布罗波尔、西曲溴铵、氯化十六烷基吡啶、氯己定、氯丁醇、氯甲酚、氯二甲酚、甲酚、乙醇、甘油、海克替啶(hexetidine)、咪唑烷脒、苯酚、苯氧乙醇、苯乙醇、硝酸苯汞、丙二醇和硫柳汞。示例性的抗真菌防腐剂包括但不限于尼泊金丁酯、尼泊金甲酯、尼泊金乙酯、尼泊金丙酯、苯甲酸、羟基苯甲酸、苯甲酸钾、山梨酸钾、苯甲酸钠、丙酸钠和山梨酸。示例性的醇防腐剂包括但不限于乙醇、聚乙二醇、苯酚、酚类化合物、双酚、氯丁醇、羟基苯甲酸酯

和苯乙醇。示例性酸防腐剂包括但不限于维生素A、维生素C、维生素E、β-胡萝卜素、柠檬酸、乙酸、脱氢乙酸、抗坏血酸、山梨酸和植酸。其他防腐剂包括但不限于生育酚、乙酸生育酚、甲磺酸去氧肟、西曲溴铵(cetrimide)、丁基羟基茴香醚(BHA)、丁基羟基甲苯(BHT)、乙二胺、十二烷基硫酸钠(SLS)、十二烷基醚硫酸钠(SLES)、亚硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠、亚硫酸钾、偏亚硫酸氢钾和对羟基苯甲酸甲酯。在某些实施方式中,防腐剂是抗氧化剂。在其他实施方式中,防腐剂是螯合剂。

[0144] 示例性的油包括但不限于扁桃仁、杏仁、鳄梨、巴巴苏、佛手柑、黑加仑种子、琉璃苣、蒲公英、甘菊、油菜籽、香菜、巴西棕榈、蓖麻、肉桂、可可脂、椰子、鱼肝、咖啡、玉米、棉籽、鹌鹑、桉树、月见草、鱼、亚麻籽、香叶醇、葫芦、葡萄籽、榛子、牛膝草、肉豆蔻酸异丙酯、荷荷巴油、苦瓜仁、薰衣草、柠檬、山苍子、澳洲坚果、锦葵、芒果种子、绣线菊籽、水貂、肉豆蔻、橄榄、橘子、橙子、棕榈、棕榈仁、桃仁、花生、罂粟种子、南瓜籽、油菜籽、米糠、迷迭香、红花、檀香木、莎草(sasquana)、香薄荷、沙棘、芝麻、乳木果油、硅酮、大豆、向日葵、茶树、蓟、椿、香根草、核桃和小麦胚芽油。示例性的油还包括但不限于硬脂酸丁酯、辛酸甘油三酯、癸酸甘油三酯、环甲基硅油、癸二酸二乙酯、二甲硅油360、肉豆蔻酸异丙酯、矿物油、辛基十二烷醇、油醇、硅油及其组合。

[0145] 另外,为促进加工、增强稳定性或出于其他原因,可以将酸或碱掺入药物组合物中。药学上可接受的碱的实例包括氨基酸、氨基酸酯、氢氧化铵、氢氧化钾、氢氧化钠、碳酸氢钠、氢氧化铝、碳酸钙、氢氧化镁、硅酸铝镁、合成硅酸铝、合成方解石、氢氧化铝镁、二异丙基乙胺、乙胺、乙二胺、三乙醇胺、三乙胺、三异丙醇胺、三甲基胺、三(羟甲基)-氨基甲烷(TRIS)等。那些作为药学上可接受的酸的盐的碱也适用,例如乙酸、丙烯酸、己二酸、海藻酸、链烷磺酸、氨基酸、抗坏血酸、苯甲酸、硼酸、丁酸、碳酸、柠檬酸、脂肪酸、甲酸、富马酸、葡萄糖酸、对苯二酚磺酸、异抗坏血酸、乳酸、马来酸、草酸、对溴苯磺酸、丙酸、对甲苯磺酸、水杨酸、硬脂酸、琥珀酸、单宁酸、酒石酸、巯基乙酸、甲苯磺酸、尿酸等。也可以使用多质子酸盐,例如磷酸钠、磷酸氢二钠和磷酸二氢钠。当碱是盐时,阳离子可以是任何方便且药学上可接受的阳离子,例如铵、碱金属、碱土金属等。实例包括但不限于钠、钾、锂、镁、钙和铵。

[0146] 合适的酸是药学上可接受的有机或无机酸。合适的无机酸的例子包括盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、硝酸、硼酸、磷酸等。合适的有机酸的例子包括乙酸、丙烯酸、己二酸、海藻酸、链烷磺酸、氨基酸、抗坏血酸、苯甲酸、硼酸、丁酸、碳酸、柠檬酸、脂肪酸、甲酸、富马酸、葡萄糖酸、对苯二酚磺酸、异抗坏血酸、乳酸、马来酸、甲磺酸、草酸、对溴苯磺酸、丙酸、对甲苯磺酸、水杨酸、硬脂酸、琥珀酸、单宁酸、酒石酸、巯基乙酸、甲苯磺酸、尿酸等。

[0147] 肠外给药制剂

[0148] 在一些实施方式中,提供了包含本发明所述化合物的用于肠外给药的药物组合物,以及适于肠外给药的药物赋形剂。在一些实施方式中,本文提供的所述用于肠外给药的药物组合物包含:有效量的公开的化合物;任选的有效量的一种或多种第二药剂;和一种或多种适于肠外给药的药学上可接受的载体和/或赋形剂。在一些实施方式中,所述药物组合物还包含:有效量的第三药剂。

[0149] 盐水中的水溶液通常用于输注或注射。可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等来防止微生物的作用。

[0150] 无菌溶液是通过将有效量的式(I)化合物与上述各种其他非活性成分(视情况而



定)混合在合适的溶剂中,然后进行过滤灭菌来制备的。通常,通过将各种灭菌的活性成分混合在无菌介质中来制备分散剂,所述无菌介质包含基本分散介质和上述合适的其他非活性成分。对于用于制备无菌可输注或注射溶液的无菌粉末,某些制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,其从先前的无菌过滤溶液中产生活性成分和任何其他成分的粉末。

[0151] 可以将可输注或可注射制剂在使用前进行灭菌,例如,通过微生物保持过滤器过滤,或通过以无菌固体组合物的形式加入灭菌剂,该无菌固体组合物可以在溶解或分散于无菌水或其他无菌可注射介质中。可输注或可注射药物组合物可包含约0.1%w/w至约5%w/w的本发明所述的化合物。

[0152] 本发明所述的药物组合物可以被配制成固体、半固体或液体形式的制剂;例如软膏、凝胶、乳霜、洗剂、糊剂、浆液、油、乳剂或泡沫。通常,具有高密度的载体能够提供对活性成分保持长时间暴露的区域。相反,溶液制剂可以使活性成分更直接地暴露于所选区域。

[0153] 局部给药制剂可例如包含相对于药剂总重量约1%至约10%(w/w)的本发明提供的化合物,尽管制剂中的本发明提供的浓度可以高达该化合物在溶剂中的溶解度极限。在一些实施方式中,局部给药制剂可包含例如约1%至约9%(w/w)的本发明所述的化合物,包含例如约1%至约8%(w/w),进一步例如约1%至约7%(w/w),进一步例如约1%至约6%(w/w),进一步例如约1%至约5%(w/w),进一步例如约1%至约4%(w/w),进一步例如约1%至约3%(w/w),和进一步例如约1%至约2%(w/w)的本发明提供的化合物。局部给药制剂可进一步包含一种或多种另外的本发明所述的药学上可接受的载体和/或赋形剂。

[0154] 吸入给药制剂

[0155] 在一些实施方式中,本文提供了用于吸入给药的药物组合物,其包含本发明提供的化合物和适于局部给药的药物赋形剂。在一些实施方式中,本文提供了用于吸入给药的药物组合物,其包含:有效量的本发明提供述的化合物;任选地,有效量的一种或多种第二药剂;以及一种或多种适于吸入给药的药学上可接受的载体和/或赋形剂。在一些实施方式中,所述药物组合物还包含:有效量的第三药剂。

[0156] 用于吸入的药物组合物可以是本发明提供的化合物溶解或悬浮于一种或多种药学上可接受的水性和/或有机溶剂或其混合物中的溶液;或含有压缩粉末的片剂,含有颗粒的胶囊,或可用于配制的粉末。液体或固体形式的药物组合物可包含一种或多种本文所述的药学上可接受的载体和/或赋形剂。它可以通过肠内或肠外;通过选自口服(优选)、静脉内、腹腔内或鞘内注射、皮下或肌肉注射的适当途径给药,以产生局部或全身作用。

[0157] 肠外给药制剂

[0158] 可以配制用于肠外给药(例如,静脉内输注、动脉内或囊内、皮下或肌肉注射,通过导管或通过端口的输送,或它们的任意组合)的药物组合物。其可以包含有效量的式(I)所示的化合物和适于肠外给药的药学上可接受的载体。适于肠外给药的药物组合物可以为离散单位剂量的形式,例如玻璃小瓶、真空瓶或塑料袋,每个均包含预定量的活性成分,其以干燥形式、溶解于溶液中、悬浮液中或乳液形式存在。全身给药是可以实现的。

[0159] 药物组合物可以通过在将活性成分溶解在无菌水溶液如注射用水、生理盐水或其他盐水溶液、平衡盐溶液或其他缓冲溶液等中,或通过使用前将要溶解的粉末组合物组合来制备。其他载体包括但不限于水溶性聚醚,例如聚乙二醇;乙烯类聚合物,例如聚乙烯醇或聚维酮;纤维素衍生物,例如甲基纤维素或羟丙基甲基纤维素;石油衍生物例如矿物油



和白凡士林、动物脂肪例如羊毛脂、丙烯酸类聚合物例如羧基聚亚甲基凝胶、植物脂肪例如花生油和多糖例如右旋糖酐,以及糖胺聚糖例如透明质酸钠。在一些实施方式中,可添加通常在滴眼剂使用的添加剂。此类添加剂包括等渗剂(例如氯化钠等)、缓冲剂(例如硼酸、磷酸一氢钠、磷酸二氢钠等)、防腐剂(例如苯扎氯铵、苄索氯铵、氯丁醇等)、增稠剂(例如乳糖、甘露醇、麦芽糖等糖类;透明质酸或其盐例如透明质酸钠、透明质酸钾等;粘多糖例如硫酸软骨素等等;例如聚丙烯酸钠、羧乙烯基聚合物、交联聚丙烯酸酯、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟乙基纤维素、羧甲基纤维素、羟丙基纤维素或本领域技术人员已知的其他试剂)。

[0160] 在一些情况下,胶体颗粒包含至少一种阳离子剂和至少一种非离子表面活性剂,例如泊洛沙姆、替洛沙泊、聚山梨酯、聚氧乙烯蓖麻油衍生物、失水山梨醇酯或聚氧硬脂酸酯。在一些情况下,所述阳离子剂是烷基胺、叔烷基胺、季铵化合物、阳离子脂质体、氨基醇、双胍盐、阳离子化合物或它们的任意混合物。在一些情况下,所述阳离子剂是双胍盐,例如双氯苯双胍己烷、聚氨基丙基双胍、苯乙双胍、烷基双胍或其任意混合物。在一些情况下,所述季铵化合物是苯扎氯铵、月桂酰卤、西曲溴铵、十六烷基三甲基卤化铵、十四烷基三甲基卤化铵、十二烷基三甲基卤化铵、卤化西曲铵(cetrimonium halide)、苄索卤铵、苯扎卤铵、西他卤安、鲸蜡基乙基二甲基卤化铵、西吡卤铵、苯度卤铵、卤化氯烯丙基六亚甲基四胺、rnyristylalkonium halide、司拉卤铵或其两种或两种以上的混合物。在某些情况下,阳离子剂是苯扎氯铵、月桂酰氯、苯并十二溴铵、苯并氯化铵、十六烷基三甲基溴化铵、十四烷基三甲基溴化铵、十二烷基三甲基溴化铵或其两种或多种混合物。在某些情况下,油相是矿物油和轻质矿物油、中链甘油三酸酯(MCT)、椰子油;氢化油,包含氢化棉籽油、氢化棕榈油、氢化蓖麻油或氢化大豆油;聚氧乙烯加氢蓖麻油衍生物,包含聚氧乙烯-40氢化蓖麻油、聚氧乙烯-60氢化蓖麻油或聚氧-100氢化蓖麻油。

[0161] 控释给药制剂

[0162] 在一些实施方式中,本文提供了用于控释给药的药物组合物,其包含本发明提供的化合物,以及适于控释给药的药物赋形剂。在一些实施方式中,本文提供了用于控释给药的药物组合物,其包含:有效量的公开的化合物;任选地,有效量的一种或多种第二药剂;和一种或多种适于控释给药的药物赋形剂。在一些实施方式中,所述药物组合物还包含:有效量的第三药剂。

[0163] 例如式(I)所示的化合物的活性药剂可以通过使用递送装置(例如,可生物降解的聚合物,乳液,包囊,肠溶衣)或本领域技术人员已知的其他方式通过持续、延迟或其他控制释放来给药。此类剂型可用于一种或多种活性药物的控制,从而提供不同比例的所需的释放曲线,其通过使用例如乳剂、凝胶、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、脂质体或胶束、多层包衣、渗透系统、颗粒或球体、可渗透膜、聚乳酸或另一种可生物降解的聚合物,或其它它们的任意组合来实现。适合的控释制剂是本领域已知的,其包括本文所述的,可以容易地选择用于本文提供的活性药剂。因此,所提供的药物组合物包含适合于口服给药的单一单位剂量,例如但不限于适于控释的片剂、囊片、胶囊和凝胶胶囊。

[0164] 所有控释药品的共同目标是改善其较对应的非控释药品的药物治疗。在一些实施方式中,控释制剂在医学治疗中的应用的特征在于,在最短的时间内使用最小量的药物来治愈或控制疾病、病症或病状。控释制剂的优点包括延长药物活性、降低给药频率和增加受

试者依从性。另外,控释制剂可用于影响起效时间或其他特性,例如血药浓度,从而影响副作用(例如,不良反应)的发生。

[0165] 在一些实施方式中,控释制剂被设计成最初释放一定量的如本文所提供的化合物,其立即产生所需的治疗效果,并逐渐和持续释放其他量的化合物以在较长的时间内保持该水平的治疗或预防效果。为了保持该化合物在体内的这种恒定水平,该化合物应保持一个能接替从体内代谢和排出的药物量的释放速率。活性药剂的控释可以通过各种条件刺激,包括但不限于pH、温度、酶、水或其他生理条件或化合物。

[0166] 在某些实施方式中,可以使用静脉输注、可植入的渗透泵、透皮贴剂、脂质体或其他给药方式来施用该药物组合物。在一个实施方式中,可以使用泵(参见Sefton,CRC Crit.Ref Biomed.Eng.14:201(1987);Buchwald et al.,Surgery 88:507(1980);Saudek et al.,N.Engl.J.Med.321:574(1989))。在另一个实施方式中,可以使用聚合物材料。在又一个实施方式中,可将控释系统放置在技术人员确定的受试者的适当部位,即,因此仅需要全身剂量的一小部分(参见例如Goodson,Medical Applications of Controlled Release,2:115-138,1984)。Langer,Science249:1527-1533(1990)的综述中讨论了其他控释系统。可以将一种或多种活性药物分散在固体基质中,例如,聚甲基丙烯酸甲酯、聚甲基丙烯酸丁酯、增塑或未增塑的聚氯乙烯、增塑的尼龙、增塑的聚对苯二甲酸乙二醇酯、天然橡胶、聚异戊二烯、聚异丁烯、聚丁二烯、聚乙烯、乙烯-乙酸乙烯酯共聚物、硅橡胶、聚二甲基硅氧烷、碳酸硅酯共聚物、亲水性聚合物如丙烯酸和甲基丙烯酸酯的水凝胶、胶原蛋白、交联的聚乙烯醇和交联的部分水解的聚乙酸乙烯酯,其被外部的不溶于体液的聚合物膜包围,所述聚合物膜如聚乙烯、聚丙烯、乙烯/丙烯共聚物、乙烯/丙烯酸乙酯共聚物、乙烯/乙酸乙烯酯共聚物、硅橡胶、聚二甲基硅氧烷、氯丁橡胶、氯化聚乙烯、聚氯乙烯、氯乙烯乙酸乙烯酯共聚物、偏二氯乙烯、乙烯和丙烯的共聚物、聚对苯二甲酸乙二醇酯共聚物、丁基橡胶环氧氯丙烷橡胶、乙烯/乙烯醇共聚物、乙烯/乙酸乙烯酯/乙烯醇三元共聚物和乙烯/乙烯氧基乙醇共聚物。然后,一种或多种活性药剂以释放速率控制步骤扩散到聚合物外膜。这种肠外组合物中活性药剂的百分比高度依赖于其特定的性质以及受试者的需要。

#### [0167] 脂质体

[0168] 减少活性药物成分的降解和/或增加其肠内吸收的实施方式将本发明的化合物包封在脂质体中。对于总体的大小分布,大多数脂质体的直径可小于400nm。大多数脂质体的直径可以在约100和约150nm之间。脂质体可以被包覆或稳定化。

[0169] 脂质体因其有用性质而用于药物递送。溶解的亲水性溶质不能轻易通过脂质。疏水性化学物质可以溶解在膜中,这样,脂质体可以同时携带疏水性分子和亲水性分子。为了将分子传送至作用部位,脂质双分子层可以与其他双分子层例如细胞膜融合,从而传送脂质体内容物。通过在包含本文提供的化合物的溶液中制备脂质体,它们可以改善化合物通过消化系统内衬细胞的传送。

[0170] 脂质体的另一个有趣特性是它们靶向肿瘤组织的能力。血管内皮细胞被紧密连接在一起的内皮细胞包裹。这些紧密的连接阻止了血液中的任何大颗粒从血管中流出。肿瘤血管在细胞间的密封程度不一样,而且是渗漏的。一定大小的脂质体,通常小于400nm,可以从血液中迅速进入肿瘤部位,但通过健康组织血管系统中的内皮细胞壁保留在血流中。

[0171] 脂质体也可以被设计成以其他方式递送本发明的化合物。可以构建含低pH的脂质

体,使溶解的水性药物在溶液中带电(即pH值超出药物的pI范围)。随着脂质体中的pH值自然中和(质子可以通过一些膜),本发明的化合物将被中和,允许其自由通过膜。这些脂质体通过扩散而不是直接细胞融合来递送药物。脂质体递送药物的另一种策略是靶向内吞作用。脂质体可以制成特定的尺寸范围,以使其成为天然巨噬细胞吞噬作用的活性靶点。这些脂质体可在细胞吞噬体中被消化,从而释放本文提供的化合物。脂质体还可以用调理素和配体修饰以激活其他细胞类型的内吞作用。

[0172] 脂质体可以根据已知的实验室技术来制备。脂质体可以通过将脂质体脂质溶解在容器中的溶剂中来制备。该容器的体积可以是脂质体预期悬浮液体积的十倍。使用旋转蒸发器,在大约40℃的负压下除去溶剂。溶剂通常在5分钟到2小时内被去除,其取决于所需的脂质体体积。该组合物可进一步在真空下的干燥器中干燥。干燥的脂质可通过摇动在无菌、无热原的水中以约25mM-50mM的磷脂水化,直到所有脂质膜重新悬浮。然后可以将水性脂质体分成等分试样,每个等分试样置于小瓶中,冻干并在真空下密封。

[0173] 脂质可以是磷脂,例如磷脂酰乙醇胺和胆固醇。磷脂是两亲的,其分子的烃尾是疏水的,而其极性头是亲水的。当脂质体在两侧接触水溶液时,磷脂通过形成一个与疏水尾端彼此相对的磷脂双分子层来适应这种情况。它们可以带有净正电荷、净负电荷或中性。例如,磷酸二鲸蜡酯可用于在脂质体上赋予负电荷,而硬脂胺可用于在脂质体上赋予正电荷。

[0174] 脂质可以非限制性地选自固醇脂类、脂肪酸、脂肪醇、甘油酯(例如、单甘油酯、甘油二酯和甘油三酯)、磷脂、甘油磷脂、鞘脂、烯醇脂、糖脂、聚酮或其任意组合。脂质可以是多不饱和脂肪酸或醇。术语多不饱和脂肪酸和多不饱和脂肪醇分别是指在其烃链中具有两个或更多个碳-碳双键的脂肪酸或醇。脂质也可以是高度不饱和的脂肪酸或醇。术语高度多不饱和脂肪酸和高度多不饱和脂肪醇分别是指具有至少18个碳原子和至少3个双键的脂肪酸或醇。

[0175] 脂质可以选自胆固醇、1,3-丙二醇二辛酸酯/二癸酸酯;10-十一烯酸、1-三十二烷醇、1-庚二十烷醇、1-二十九烷醇、2-乙基己醇、雄甾烷、花生四烯酸、花生四烯酸、花生醇、山萘酸、山萘醇、癸酸、癸醇、辛醇、辛酸、C12-C18饱和脂肪醇的辛酸/癸酸酯、辛酸/癸酸甘油三酯、辛酸/癸酸甘油三酯、神经酰胺磷酸胆碱、神经酰胺磷酸乙醇胺、神经酰胺磷酸甘油、硅铝酸、蜡酸、蜡醇、鲸蜡硬脂醇、鲸蜡醇、胆烷、胆甾烷、胆固醇、顺式-11-二十碳烯酸、顺式-11-十八碳烯酸、顺式-13-二十二碳烯酸、二十二碳六烯酸、卵磷脂、二十碳五烯酸、二十碳烯酸、花生酸、反亚麻醇、反亚油醇、反油醇、芥酸、芥子醇、雌二醇、二硬脂酸乙二醇酯、乙二醇、十八烷醇、三辛酸甘油酯/癸酸酯、三辛酸甘油酯/癸酸酯、单辛酸甘油酯、三乙酸甘油酯、三辛酸甘油酯、三辛酸甘油酯/癸酸酯/月桂酸酯、三辛酸甘油酯/三癸酸酯、三棕榈酸甘油酯、三十一烷酸、二十一烷醇、二十一烷酸、二十七烷酸、十七烷酸、十七醇、三十六烷酸、异硬脂酸、异硬脂醇、山萘酸、月桂酸、月桂醇、木质素酸、木质素醇、亚麻油酸、亚油酸、亚麻醇、亚油醇、十七烷酸、蜂花酸、蜜香酸、褐煤醇、肉豆蔻醇、肉豆蔻酸、肉豆蔻油酸、肉豆蔻油醇、新癸酸、新庚酸、新壬酸、神经酸、壬酸、十九烷醇、壬二酸、壬二酸、油酸、油醇、棕榈酸、棕榈油酸、棕榈油醇、壬酸、壬醇、二十五酸、十五烷醇、戊二酸、磷脂酸、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、二磷酸磷脂酰肌醇、磷酸磷脂酰肌醇、三磷酸磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸、聚甘油-6-二硬脂酸酯、孕甾烷、丙二醇二癸酸酯、丙二醇二辛酸酯、丙二醇二辛酸酯、叶虱酸、视黄酸、环油醇、烯酸、大豆卵磷脂、硬脂酸、十八碳四烯酸

(stearidonc)、硬脂醇、二十三烷酸、十三烷醇、十三烷酸、十一烷醇、十一烯酸；十一碳酸、 $\alpha$ -亚麻酸和 $\gamma$ -亚麻酸。

[0176] 磷脂可以是磷脂酰胆碱,具有6至22个碳原子的酰基的磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、磷脂酸、磷脂酰丝氨酸、鞘磷脂、磷脂酰甘油或它们的任意组合中的一种或多种。更具体地,磷脂可以是磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油、卵磷脂、鞘磷脂、磷脂酰丝氨酸、磷脂酸、磷脂酰乙醇胺、溶血卵磷脂、溶血磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、脑磷脂、心磷脂、脑苷脂、磷酸二鲸蜡脂、二油酰基-磷脂酰胆碱、二棕榈酰基-磷脂酰胆碱、二棕榈酰基-磷脂酰甘油、二油酰基-磷脂酰甘油、棕榈酰基-油酰基-磷脂酰胆碱、二硬脂酰基磷脂酰胆碱、硬脂酰基-棕榈酰基磷脂酰胆碱、二棕榈酰基磷脂酰乙醇胺、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺、二肉豆蔻酰基磷脂酰丝氨酸、二油酰基磷脂酰胆碱、二肉豆蔻酰基磷脂酰胆碱、油酰基磷脂酰乙醇胺、棕榈酰油酰基磷脂酰胆碱、卵磷脂酰胆碱、二硬脂酰基磷脂酰胆碱、二油酰基磷脂酰胆碱、二棕榈酰基磷脂酰胆碱、二油酰基磷脂酰甘油、二棕榈酰基磷脂酰甘油、磷脂酰乙醇胺、或它们的任意组合中的一种或多种。

[0177] 在一些实施方案中,所述脂质是与聚乙二醇(PEG)缀合的脂质。所述PEG缀合的脂质可以是PEG缀合的二酰基甘油和二烷基甘油、PEG缀合的磷脂酰乙醇胺和磷脂酸、PEG缀合的神经酰胺、PEG缀合的二烷基胺、PEG缀合的1,2-二酰氧基丙烷-3-胺及它们的任意组合中的任何一种或多种。

[0178] 剂量

[0179] 本文所述的化合物可以以药学上可接受的组合物的形式递送,所述药学上可接受的组合物包含治疗有效量的本文提供的化合物和/或一种或多种其他化疗药剂,与一种或多种药学上可接受的载体和/或赋形剂一起配制。在一些情况下,如本文所提供的化合物和其他的化疗药剂在分开的药物组合物中给药,并且可以(例如由于不同的物理和/或化学特性)通过不同的途径(例如一种化疗药剂通过口服给药,而另一种通过静脉内给药)给药。在另一些情况下,本文所提供的化合物和其他的化疗药剂可以分开给药,但是经由相同的途径(例如,均口服或均静脉内)给药。在其他另一些情况下,本文所述的化合物和其他的化疗药剂可以在相同的药物组合物中给药。

[0180] 所选择的剂量水平将取决于多种因素,包括例如所用特定化合物的活性、给药途径、给药时间、所用特定化合物的排泄或代谢速率、吸收速率和程度、治疗的持续时间、与所使用的特定化合物组合使用的其他药物、化合物和/或材料、被治疗患者的年龄、性别、体重、状况、总体健康以及既往病史,以及医学领域众所周知的因素。

[0181] 通常,本发明所述的化合物和/或化疗药的合适的日剂量可以是,在一些实施方式中,产生有效治疗作用的最低剂量的该化合物的量。此有效剂量通常将取决于上述因素。一般地,当用于所需效果时,用于患者的本文所述化合物的剂量范围为每天约0.0001mg至约100mg、或每天约0.001mg至约100mg、或每天约0.01mg至约100mg、或每天约0.1mg至约100mg、或每天约0.0001mg至约500mg、或每天约0.001mg至约500mg、或每天约0.01mg至约1000mg、或每天约0.01mg至约500mg、或每天约0.1mg至约500mg、或每天约1mg至50mg、或约5mg至40mg。示例性的剂量是每天约10至30mg。在一些实施方式中,对于70kg的人,合适的剂量是约0.05至约7g/天,例如约0.05至约2.5g/天。可以改变本文所述的药物组合物中的活性成分的实际剂量水平,以便获得对特定病人实现期望的有效治疗效果的化合物的量、组

合物和给药方式,且其对患者无毒。在某些情况下,低于上述范围下限的剂量水平可能超过足够的量,而在其他情况下,可以采用不会引起任何有害副作用的更大剂量,例如,将该更大剂量分成几个小剂量在一整天给药。

[0182] 在一些实施方式中,化合物可以每天、每隔一天、每周三次、每周两次、每周一次或每两周一次施用。给药时间表可以包括“药物停用期”,例如,药物可以连续服用两周,停药一周,或连续服用三周,停药一周,或连续服用四周,停药一周等,或者连续给药而没有“药物停用期”。该化合物可以通过口服、静脉内、腹腔内、鞘内,局部、经皮、肌内、腹腔内、鼻内、耳下或任何其他途径施用。

[0183] 在一些实施方式中,本文所提供的化合物以多剂量给药。剂量可以是每天约一次、两次、三次、四次、五次、六次或六次以上。剂量可以是约每月一次、约每两周一次、约每周一次或约每隔一天一次。在另一个实施方式中,将本文提供的化合物和另一种药物一起以约每天一次至每天6次给药。在另一个实施方式中,本文提供的化合物和药剂的给药持续少于7天。在又一个实施方式中,给药持续超过约6天、约10天、约14天、约28天、约两个月、约六个月或约一年。在某些情况下,可连续给药并在必要时保持。

[0184] 如有需要,本发明提供的药物组合物可持续给药。在一些实施方式中,本文提供的药剂给药超过约1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约7天、约14天、约21天或约28天。在一些实施方式中,本文提供的药剂给药少于约28天、约21天、约14天、约7天、约6天、约5天、约4天、约3天、约2天或约1天。在一些实施方式中,本文提供的药剂给药1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约7天、约14天、约21天或约28天。在一些实施方式中,本文提供的药剂长期持续给药,例如用于治疗慢性作用时。

[0185] 由于本发明所述的化合物可以与其他治疗(例如其他化学疗法,放射疗法或外科手术)联合给药,因此每种药剂或疗法的剂量可以低于单药治疗的相应剂量。单药治疗的剂量范围可以是例如每kg体重每天约0.0001至约200mg、或约0.001至约100mg、或约0.01至约100mg、或约0.1至约100mg、或约1至约50mg。

[0186] 试剂盒

[0187] 在一些实施方式中,本文提供了试剂盒。试剂盒包括采用适当包装的本文提供的化合物或药物组合物,以及包括使用说明书、临床研究讨论、副作用列表等的书面材料。此试剂盒还可包括如科学参考文献、包装插页材料、临床试验结果和/或这些内容的摘要等信息,这些信息指示或确定药物组合物的活性和/或优点,和/或描述剂量、给药、副作用、药物相互作用,或其他对医疗服务提供者有用的信息。这些信息可以基于各种研究的结果,例如,使用涉及体内模型的实验动物的研究和基于人类临床试验的研究。

[0188] 在一些实施方式中,与试剂盒一起提供了记忆辅助设置,例如以在片剂或胶囊剂旁边的数字形式,其中数字对应于片剂或胶囊如指定的应被摄取的疗程天数。“每日剂量”可以在给定的一天服用的单一片剂或胶囊剂或数个片剂或胶囊剂。

[0189] 该试剂盒可以进一步包含另一种药剂。在一些实施方式中,本文提供的化合物和所述药剂以试剂盒中单独容器中的单独药物组合物提供。在一些实施方式中,本发明的化合物和所述药物以试剂盒中容器内的单一药物组合物提供。合适的包装和使用的其他物品(例如,用于液体制剂的量杯,用于使在空气中暴露最小化的箔包装等)在本领域中是已知的,并且可以包括在试剂盒中。在其他实施方式中,试剂盒可进一步包括用于施用活性药物

的装置。所述装置的例子包括但不限于注射器、滴灌袋、贴剂和吸入器。可以向包括医师、护士、药剂师、处方员等的健康服务提供者提供、销售和/或推广本文所述的试剂盒。

[0190] 这种试剂盒的一个例子是泡罩包装,其在本领域中是已知的,并且用于制药工业中的单剂量包装(片剂、胶囊等)。泡罩包装可包括第一层坚硬但可变形的材料,优选透明塑料。在包装过程中,塑料板上会形成凹陷。它们具有片剂或胶囊的大小和形状,然后将其放置在这些凹陷处。泡罩包装还可以包括第二层结实但可撕裂的材料,优选具有与第一层相同的尺寸和形状的金属箔或涂层纸。接下来,将两层对齐,压在一起并在凹陷的边缘周围密封以形成泡罩包装的相对的顶侧和底侧,其中片剂或胶囊被松散地保持在它们的位置。结果,片剂或胶囊被包装到泡罩包装中。通过手动按压第一层的任何凹陷处,将凹陷压平,将片剂或胶囊剂推入直到遇到第二层的阻力,使片剂或胶囊剂在第二层中撕裂开口,然后片剂和胶囊剂可以通过该开口取出且不会影响其他片剂或胶囊。

[0191] 试剂盒可进一步包含可用于施用一种或多种活性药剂的药学上可接受的载体。例如,如果活性药剂以固体形式存在且必须重新配制以用于肠外给药,那么该试剂盒可以包含合适载体的密封容器,在其中活性药剂可以溶解以形成适于肠外给药的无颗粒无菌溶液。药学上可接受的载体的实例包括但不限于:注射用水USP和其他水性介质,例如但不限于氯化钠注射液、林格氏注射液、右旋糖注射液、右旋糖和氯化钠注射液和乳酸林格氏注射液。

[0192] 无水药物组合物包含活性成分,由于水可以促进某些化合物的降解。例如,在制药领域可以添加水(例如,约5%)作为模拟长期存储的手段,以确定诸如保存期限或制剂随时间的稳定性的特征。可以使用无水或低水分含量的成分以及低水分或低湿度条件来制备无水药物组合物。例如,如果期望在制备、包装和/或储存期间与水分和/或湿气充分接触,则可以使包含乳糖的药物组合物无水。可以制备和储存无水药物组合物,从而保持其无水性质。因此,可以使用已知的防止暴露于水的材料来包装无水药物组合物,使得它们可以被包括在合适的配方试剂盒中。合适的包装的例子包括但不限于气密容器、塑料等、单位剂量容器、泡罩包装等。

[0193] 接受本发明所述癌症治疗的受试者可能已被诊断出患有包括但不限于以下一种或多种癌症:脑癌(胶质母细胞瘤)、胰腺癌、结直肠癌、子宫癌、宫颈癌、卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌、睾丸癌、肺癌、黑色素瘤、骨肉瘤、肾细胞癌、软组织肉瘤和甲状腺癌。

[0194] 更特别地,受益于本发明所述的癌症治疗的实体瘤和/或其转移瘤包括但不限于以下一种或多种:软组织肉瘤;乳腺癌,例如浸润性小叶癌;浸润性导管癌,如肾小管癌、髓样癌、胶质癌或筛状癌;卵巢癌,例如上皮性卵巢肿瘤,如腺癌;子宫癌;子宫颈癌,例如子宫颈上皮中的腺癌,包括鳞状细胞癌和腺癌;前列腺癌,如腺癌或转移到骨骼的腺癌;胰腺癌,例如胰管组织中的上皮样癌和胰管中的腺癌;膀胱癌,例如膀胱移行细胞癌、尿路上皮癌(移行细胞癌)、膀胱行尿路上皮细胞肿瘤、鳞状细胞癌、腺癌或小细胞癌;骨癌,例如软骨肉瘤、脊索瘤、骨肉瘤、尤因肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤或纤维肉瘤;肺癌,例如非小细胞肺癌,如鳞状细胞癌、腺癌和大细胞未分化癌,或小细胞肺癌;皮肤癌,例如基底细胞癌、黑色素瘤、鳞状细胞癌和光化性角化病,其是一种皮肤病,有时会发展成鳞状细胞癌;眼视网膜母细胞瘤;皮肤或眼内(眼)黑色素瘤;原发性肝癌(始于肝脏的癌症);肾癌;甲状腺癌,如乳头状、滤泡状、髓样和间变性;卡波西氏肉瘤;病毒引起的癌症,包括乙型肝炎病毒(HBV)、丙型

肝炎病毒 (HCV) 和肝细胞癌;人乳头瘤病毒 (HPV) 和子宫颈癌;中枢神经系统癌症 (CNS) 如原发性脑肿瘤,包括神经胶质瘤(星形胶质瘤、间变性星形细胞瘤或多形胶质母细胞瘤)、少突胶质细胞瘤、室管膜瘤、脑膜瘤、神经鞘瘤和髓母细胞瘤;周围神经系统癌症如听神经瘤或恶性周围神经鞘瘤,包括神经纤维瘤和神经鞘瘤、恶性纤维细胞瘤、恶性纤维组织细胞瘤、恶性脑膜瘤、恶性间皮瘤或恶性混合瘤;口腔和口咽癌,例如下咽癌、喉癌、鼻咽癌或口咽癌;胃癌,例如胃间质瘤或类癌瘤;睾丸癌,例如包括精原细胞瘤和非精原细胞瘤的生殖细胞肿瘤,以及性腺间质瘤,其包括Leyding细胞瘤和Sertoli细胞瘤;胸腺癌,例如胸腺瘤、胸腺癌或直肠癌;和结肠癌。

#### [0195] 联合治疗

[0196] 在一些实施方式中,本文提供的化合物与一种或多种其他疗法联合施用。例如,本文提供了用于联合治疗的方法,其中将已知可调节其他途径、或相同途径的其他部分、或甚至与本发明的化合物或其药学上可接受的形式(例如,药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物、异构体、前药和同位素标记衍生物)联合使用的重叠的靶标酶的重叠部分。一方面,这种治疗包括但不限于将受试化合物与化疗药剂、治疗性抗体和/或放射治疗组合以提供协同或累加的治疗效果。

[0197] “与……联合”并不意味着暗示其他治疗药必须同时施用和/或配制以一起递送,尽管这些递送方法在本发明的范围内。本文提供的化合物可以在使用一种或多种其他药剂的与一种或多种其他疗法同时、在其之前(例如5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周、12周或16周之前)或之后(例如5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周、12周或16周后)施用。一般来说,每种化疗药剂都将按照为该特定药物确定的剂量和/或时间表进行给药。其他化疗药剂可与本发明的化合物以单一组合物或以不同组合物单独给药。

[0198] 一般而言,预计使用其他化疗药剂联合用药的水平不超过其单独使用的水平。在一些实施方式中,联合使用的水平将低于其单独使用的水平。

[0199] 另一方面,本文提供了用于抑制受试者异常细胞生长的药物组合物,其包含有效量的式(I)所示的化合物或其药学上可接受的形式(例如盐、溶剂化物、水合物、溶剂化物或水合物的盐)与一定量的抗癌药剂(例如化疗药剂)联合使用。许多化学及生物疗法是本领域已知的,且其可与本文提供的化合物联合使用。

[0200] 在一些实施方式中,一种或多种其他化疗药剂(例如,第二药剂)可选自以下物质:抗体、DNA烷基化和/或插层剂、其他非特异性或序列特异性DNA结合剂、核苷类似物、铂化合物、抗雄激素、抗雌激素、其他抗激素、抗代谢物、血管生成抑制剂、有丝分裂抑制剂、细胞周期抑制剂、生长因子抑制剂、组蛋白脱乙酰酶抑制剂、激酶抑制剂、聚(ADP-核糖)聚合酶抑制剂、蛋白酶体抑制剂、拓扑异构酶抑制剂和其他酶抑制剂。

[0201] 其他化疗药剂的非限制性的例子包括烷基磺酸盐(例如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)、哌泊舒凡(piposulfan));蒽环类(例如蒽二酮、比生群(bisantrene)、阿霉素(doxorubicin)、伊达比星(idarubicin)、表柔比星(epirubicin)、米托蒽醌、吡柔比星(pirarubicin)、佐柔比星(zorubicin));抗肾上腺素(例如氨基谷氨酰胺、米托烷(mitotane)、曲洛司坦(trilostane));抗生素(例如阿柔比星(aclarubicin)、放线菌素

(actinomycin)、安曲霉素(authramycin)、重氮丝氨酸、贝卡卡林(becatecarin)、博来霉素(bleomycin)、放线菌素C(cactinomycin)、卡奇霉素(calicheamicin)、洋红霉素(caminomycin)、卡拉比霉素(carabycin)、卡佐菲林(carzinophilin)、色霉素(chromomycin)、放线菌素D(dactinomycin)、德柔比星(detorubicin)、重氮氧代己氨酸(diazooxonorleucine)、埃索比星(esorubicin)、埃斯帕米星(esperamicin)、马赛霉素(marcellomycin)、丝裂霉素(mitomycin)、诺加霉素(nogalamycin)、寡霉素(olivomycin)、倍洛霉素(peplomycin)、匹克蒽醌(pixantrone)、普卡霉素(plicamycin)、泊非罗霉素(porfiromycin)、波菲霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素(puromycin)、三铁阿霉素(quelamycin)、蝴蝶霉素(ebeccamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑霉素(streptonigrin)、链佐星(streptozocin)、结核菌素(tubercidin)、佐柔比星(zorubicin);抗雌激素药(例如橡比芬(acolbifene)、阿非莫西芬(afimoxifene)、阿那曲唑(anastrozole)、氯米芬(clomifene)、表硫甾醇(epitiostanol)、甲地孕酮(megestrol)、甲孕酮(mepitiostane)、奥那普利酮(onapristone)、他莫西芬(tamoxifen)、替拉普斯通(telapristone)、托瑞米芬(toremifene));抗叶酸剂(例如氨基蝶呤(aminopterin)、二甲叶酸(denopterin)、依达曲塞(edatrexate)、氮甲蝶呤(methotrexate)、培美曲塞(pemetrexed)、普拉妥特(pralatrexate)、蝶罗呤(pteropterin)、拉替曲塞(ratitrexed)、曲美曲塞(trimetrexate));抗雄激素药(例如阿帕鲁胺(apalutamide)、比卡鲁胺(bicalutamide)、达罗鲁胺(darolutamide)、恩杂鲁胺(enzalutamide)、氟他胺(flutamide)、尼鲁米特(nilutamide));LHRH激动剂(例如,布塞林(buserelin)、戈舍瑞林(goserelin)、亮丙瑞林(leuprolide)、曲普瑞林(triptorelin));氮丙啶类(例如,苯并多巴(benzodopa)、羧甲基酮(carboquone)、米特多巴(meturedopa)、优多巴(uredopa));BTK抑制剂(例如依鲁替尼(ibrutinib)、ARQ 531、BGB-3111、CC-292、CT-1530、DTRMWXHS-12、GDC-0853、M7583、SNS-062);DNA拓扑异构酶抑制剂(例如氨基喜树碱(aminocamptothecin)、贝洛特坎(belotecan)、喜树碱(camptothecin)、依托泊苷(etoposide)、依西替康(exatecan)、伊立替康(irinotecan)、卢托替康(lurtotecan)、鲁贝替康(rubitecan)、替尼泊苷(teniposide)、托泊替康(topotecan));HDAC抑制剂(例如阿司匹司他(abrexinostat)、贝利司他(belinostat)、恩替司他(entinostat)、加维司他(gavinostat)、酮维林(kevetrin)、莫西司他(mocetinostat)、帕比司他(panobinostat)、普拉西诺司他(prracinostat)、奎斯诺斯司他(quisinostat)、雷米司他(resminostat)、雷克林诺司他(ricolinostat)、罗米地辛(romidepsin)、帕比司他(panobinostat)、丙戊酸、伏立诺他(vorinostat)、4SC-202、ACY-241、ACY-241、AR-42、CG200745、CHR-2845、CHR-3996、CUDC-101、CXD101、MPT0E028、OBP-801、SHP-141);JAK1/JAK2或STAT抑制剂(例如巴瑞克替尼(baricitinib)、福他替尼(fostamatinib)、依他替尼(itacitinib)、莱斯塔替尼(lestaurtinib)、莫米洛替尼(momelotinib)、帕克里替尼(pacritinib)、磷酸鲁索替尼(ruxolitinib phosphate)、托法西替尼(tofacitinib)、AZD1480、BMS-911543、CYT387、GLPG-0636、INB047986、INCB16562、NS-018、TG101348、WP1066、XL019);酪氨酸激酶抑制剂(例如玻玛西林(abemaciclib)、阿法替尼(afatinib)、阿莫替尼(amuvatinib)、阿昔替尼(axitinib)、博舒替尼(bosutinib)、西地那尼(cediranib)、克唑替尼(crizotinib)、达沙替尼(dasatinib)、非昔替尼(defactinib)、多维替尼(dovitinib)、厄洛替尼(erlotinib)、



吉非替尼(gefitinib)、依鲁替尼(ibrutinib)、伊马替尼(imatinib)、二甲苯磺酸拉帕替尼(lapatinib ditosylate)、左旋替尼(lestaurtinib)、利非尼布(linifanib)、那拉替尼(neratinib)、尼洛替尼(nilotinib)、尼达尼布(nintedanib)、尼拉帕布(niraparib)、奥拉帕尼(olaparib)、帕波西利布(palbociclib)、帕唑帕尼(pazopanib)、帕纳替尼(ponatinib)、瑞巴司替尼(rebastinib)、瑞戈非尼(regorafenib)、瑞博西尼(ribociclib)、卢卡帕尼(rucaparib)、索拉非尼(sorafenib)、星形孢菌素(staurosporine)、舒尼替尼(sunitinib)、替沃扎尼(tivozanib)、托卡尼布(toceranib)、凡德他尼(vandetanib)、瓦他拉尼(vatalanib)、BMS-777607、CEP-11981、JNJ-26483327、OSI-930、PCI-32765、PF-04217903、XL228);mTOR抑制剂(例如达克利司(dactolisib)、依维莫司(everolimus)、雷帕霉素(rapamycin)、地磷莫司(ridaforolimus)、沙潘替尼(sapanisertib)、西罗莫司(sirolimus)、替莫罗莫司(temsirolimus)、AZD8055、BEZ235、BGT226、GDC0980、OSI-027、PF-4691502、SF1126、XL765);氮芥类(例如,阿特莫司汀(atrimustine)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、异环磷酰胺(ifosfamide)、雌莫司汀(estramustine)、马磷酰胺(mafosfamide)、甘露莫司汀(mannomustine)、美法仑(melphalan)、凡那明(phenamet)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、噻替派(thiophosphamide));亚硝基脲(例如卡莫司汀(carmustine)、氯唑啉(carmustine)、铁莫司汀(fotemustine)、洛莫斯汀(lomustine)、尼莫斯汀(nimustine)、拉米斯汀(ranimustine)、司马汀(semustine));铂化合物(例如卡铂、顺铂、奈达铂、奥沙利铂、硝酸四铂(triplatin tetranitrate));嘌呤类似物(例如氟达拉滨(fludarabine)、硫嘌呤、硫咪嘌呤(thiamiprine)、硫鸟嘌呤(thioguanine));嘧啶类似物(例如阿西他滨(ancitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、阿扎尿苷(azauridine)、卡培他滨(capecitabine)、卡莫呋(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、双脱氧尿苷、多西氟啉(doxifluridine)、恩西他滨(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine)、氟达拉滨(fludarabine)、氟尿嘧啶(flurouracil)、吉西他滨(gemcitabine)、替加氟(tegafur));紫杉烷类(例如卡巴他赛(cabazitaxel)、多西他赛(docetaxel)、拉罗他赛(larotaxel)、奥他他赛(ortataxel)、紫杉醇、替塞他赛(tesetaxel));三嗪类(例如利他胺(altretamine)、氮烯唑胺(dacarbazine)、甲基苄肼(procarbazine)、替莫唑胺(temozolomide)、三亚安三嗪(triethylenemelamine)、三羟甲基三聚氰胺);长春花生物碱(例如长春花碱、长春新碱、长春地辛、长春氟宁、长春瑞滨、长春罗定);阿莫那肽(amonafide)、阿帕齐醌(apaziquone)、溴霉素(brostallicin)、地美辛星(demecolcine)、地嗪酮(diaziquone)、依利铵(elliptinium)、埃博霉素(epothilone)、艾立布林(eribulin)、依托糖苷(etoglucid)、依昔舒林(exisulind)、铁氮苄醇(ferruginol)、氯尼达明(lonidamine)、多米托溴尼醇(mitobronitol)、米托瓜酮(mitoguazone)、丝裂霉素(mitolactol)、莫匹达莫(mopidamol)、硝曲克林(nitracrine)、哌波罗曼(pipobroman)、鬼臼酸(podophyllinic acid)、西索非兰(sizofiran)、替奴酸(tenuazonic acid)、曲贝替定(trabectedin)和瓦迪梅赞(vadimezan)。

[0202] 示例性的生物药包括但不限于细胞因子(例如肿瘤坏死因子 $\alpha$ )、干扰素(例如 $\alpha$ 干扰素、 $\beta$ 干扰素、 $\gamma$ 干扰素)、造血生长因子(例如促红细胞生成素、GM-CSF、G-CSF、IL-11)、白细胞介素(例如IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21)和抗体(例如阿巴伏单

抗(abagovomab)模拟CA125肿瘤抗原以诱导免疫反应、阿德木单抗(adecatumumab)结合EpCAM触发免疫反应、阿特朱单抗(atezolizumab)结合PD-L1、阿维鲁单抗(avelumab)结合PD-L1、抗VEGF贝伐单抗抑制血管生成、西妥昔单抗(cetuximab)抑制EGFR活性、抗GD2达妥昔单抗(dinutuximab)触发免疫反应、德瓦鲁单抗(durvalumab)结合PD-L1、伊匹单抗(ipilimumab)结合CTLA4、纳武(nivolumab)单抗结合PD-1、奥瑞戈单抗(Oregovomab)结合CA125肿瘤抗原以诱导免疫反应、帕尼单抗(panitumumab)抑制EGFR活性、派姆单抗(pembrolizumab)结合PD-1、帕妥珠单抗(pertuzumab)结合HER2、抗VEGFR2雷莫卢单抗(ramucirumab)抑制血管生成、抗-VEGF雷珠单抗(ranibizumab)抑制血管生成、司里班妥(seriban-tumab)单抗抑制HER3活性、曲妥珠单抗(trastuzumab)抑制HER2活性、替西木单抗(tremelimumab)结合CTLA4)、癌症疫苗、CAR T细胞或肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)以及其他细胞治疗。

[0203] 在Bragalone's Drug Information Handbook for Oncology、Chu's Physicians' Cancer Chemotherapy Drug Manual、Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics和Polovich's Chemotherapy and Biotherapy Guidelines and Recommendations for Practice中对可以与本发明化合物结合的其他化疗药剂、生物药或小化合物进行了描述,并且发现了其对一种或多种类型癌症的效用,所有这些通过整体引用并入本文。

[0204] 在一些实施方式中,本文提供了使用式(I)的化合物或其药学上可接受的形式(例如,盐、溶剂化物、水合物、溶剂化物或水合物的盐)或本文提供的药物组合物与放疗结合以抑制受试者中异常细胞生长或治疗癌症的方法。放射治疗的方案是已知的(例如,近距离放射疗法或外部束疗法),并且它们中的任何一种都可以用作本文提供的联合治疗的一部分。在联合治疗中,可以在放射治疗之前、期间和/或之后施用本文提供的药物组合物。

[0205] 对于卵巢癌或肿瘤的治疗,式(I)所示的化合物或其药学上可接受的形式(例如盐、溶剂化物、水合物、溶剂化物或水合物的盐)或本文提供的药物组合物可以与另一种治疗方法联合。标准的治疗方法是手术切除肿瘤、手术减积、或姑息性手术后进行化疗(如卡铂联合紫杉醇,或吉西他滨联合顺铂)。可以用顺铂代替卡铂;可以用多西他赛代替紫杉醇。本文提供的化合物可在手术减积之前或在化疗期间及之后施用。由于去乙基黄酮哌啶胺(De-ethylflavopereirine)无毒性且口服时可产生全身性影响,优选患者每日一次或两次肠内给药片剂或胶囊。或者,本文提供的化合物可输注(静脉或腹腔内)或注射(皮下或肌肉内)给药。任选地,抗体(例如,贝伐单抗(bevacizumab)、派姆单抗(pembrolizumab))和/或小分子(例如,尼拉帕尼(niraparib)、奥拉帕尼(olaparib)、卢卡帕尼(rucaparib))抑制剂也可在多个治疗周期中施用,有或没有单轮疫苗/免疫细胞疗法以引起对来自患者肿瘤的一种或多种抗原的免疫反应。任选地,在卵巢癌的化疗期间,也可施用六甲蜜胺(al tretamine)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、多柔比星(doxorubicin)、表阿霉素(epirubicin)、依托泊苷(etoposide)、异环磷酰胺(ifosfamide)、美法仑(melphalan)、培美曲塞(pemetrexed)、三苯氧胺(tamoxifen)、硫代磷酰胺(thiophosphamide)、拓扑替康(topotecan)或长春瑞滨(vinorelbine)。

[0206] 对于胰腺癌或肿瘤的治疗,式(I)所示的化合物或其药学上可接受的形式(例如盐、溶剂化物、水合物、溶剂化物或水合物的盐)或本文提供的药物组合物可以与另一种治

疗方法联合使用。一期和二期胰腺癌的标准治疗方法是手术切除肿瘤(除了整个胰腺或其一部分外,可能涉及胃肠道的其他器官),然后进行有或没有放疗的化疗。对于III期和IV期胰腺癌,最多进行姑息性手术。化疗方案包括但不限于:亚叶酸(leucovorin)、氟尿嘧啶(flourouracil)、伊立替康(irinotecan)和奥沙利铂(FOLFIRINOX);吉西他滨联合顺铂或奥沙利铂;亚叶酸、氟尿嘧啶和奥沙利铂(OFF方案)。本文提供的化合物可在化学放疗或化疗期间施用。由于去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)无毒性且口服时可产生全身性影响,优选患者每日一次或两次肠内给药片剂或胶囊。或者,本发明的化合物可以注射(皮下或肌内)或输注(静脉或腹腔内)给药。任选地,抗体(例如,贝伐单抗(bevacizumab)、伊普利木单抗(ipilimumab)、尼伐单抗(nivolumab)、彭布罗利珠单抗(pembrolizumab)、特莫利单抗(tremelimumab))和/或小分子(例如,塞地拉尼(cediranib)、厄洛替尼(erlotinib)、依维莫司(everolimus)、奥帕里布(olaparib)、帕佐帕尼(pazopanib)、舒尼替尼(sunitinib)、替米罗莫司(temsirolimus))抑制剂也可在多个治疗周期中施用,有或没有单轮疫苗/免疫细胞疗法以引起对来自患者肿瘤的一种或多种抗原的免疫反应。任选地,卡培他滨(capecitabine)、米曲霉素C(capecitabine)、紫杉醇或链霉素也可在胰腺癌化疗或化学放疗期间给药。

[0207] 对于脑癌或肿瘤(胶质母细胞瘤)的治疗,式(I)所示的化合物或其药学上可接受的形式(例如盐、溶剂化物、水合物、溶剂化物或水合物的盐)或本文提供的药物组合物可以与另一种治疗方法联合使用。标准的治疗方法是手术切除肿瘤,然后是放疗和替莫唑胺(temozolomide)治疗。本发明的化合物可在手术后开始,然后在放疗和化疗期间继续。化疗方案包括但不限于:洛莫司汀(lomustine)、普罗卡巴嗪(procarbazine)和长春新碱(PCV)。由于去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)无毒性且口服时可产生全身性影响,优选患者每日一次或两次肠内给药片剂或胶囊。或者,本发明的化合物可以注射(皮下或肌内)或输注射(静脉或鞘内)给药。任选地,在放疗后,抗体(例如,贝伐单抗(bevacizumab)、派姆单抗(pembrolizumab))和/或小分子(例如,依维莫司(everolimus))抑制剂可与替莫唑胺一起在几个治疗周期内施用,有或没有单轮疫苗/免疫细胞疗法以引起对来自患者肿瘤的一种或多种抗原的免疫反应。任选地,卡莫司汀(carmustine)也可以在脑癌化疗期间给药。

[0208] 对于乳腺癌或肿瘤的治疗,式(I)所示的化合物或其药学上可接受的形式(例如盐、溶剂化物、水合物、溶剂化物或水合物的盐)或本文提供的药物组合物可以与另一种治疗方法联合使用。标准疗法是手术切除肿瘤,然后进行放射治疗(外照射或近距离放射治疗)、激素治疗(如阿那曲唑(anastrozole)、依西美坦(exemestane)、富维司坦(fulvestrant)、来曲唑(letrozole)、他莫西芬(tamoxifen)、托瑞米芬(toremifene))和两种或两种以上化疗药剂(如贝伐单抗(bevacizumab)、卡铂(carboplatin)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、多西他赛(docetaxel)或紫杉醇、柔红霉素(daunorubicin)或阿霉素(doxorubicin)、表阿霉素(epirubicin)、氟尿嘧啶(flourouracil)、吉西他滨(gemcitabine)、甲氨蝶呤(methotrexate)、聂拉替尼(neratinib)、噻替帕(thiotepa)、曲妥珠单抗(trastuzumab))的混合治疗。本发明的化合物可在手术后开始,然后在放疗、激素治疗和化疗期间继续。由于去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)无毒性且口服时可产生全身性影响,优选患者每日一次或两次肠内给药片剂或胶囊。或者,本发明的化合物

可以注射(皮下或肌内)或输注(静脉或腹腔内)给药。任选地,阿贝西酞(abemaciclib)、卡培他滨(capecitabine)、厄里布林(eribulin)、依维莫司(everolimus)、吉西他滨(gemcitabine)、伊克沙比隆(ixabepilone)、拉帕替尼(lapatinib)、丝裂霉素(mitomycin)、米托蒽醌(mitoxantrone)、帕博西利(palbociclib)、百日咳单抗(pertuzumab)、核糖利布(ribociclib)、长春新碱(vincristine)或长春瑞滨(vinorelbine)也可在晚期或转移性乳腺癌的化疗期间单独或联合用药。

[0209] 对于结直肠癌或肿瘤的治疗,式(I)所示的化合物或其药学上可接受的形式(例如盐、溶剂化物、水合物、溶剂化物或水合物的盐)或本文提供的药物组合物可以与另一种治疗方法联合使用。标准的治疗方法是手术切除肿瘤,然后进行放射治疗(外照射或近距离放射治疗)和两种或两种以上化疗药剂(如贝伐单抗(bevacizumab)、卡培他滨(capecitabine)、西妥昔单抗(cetuximab)、氟尿嘧啶(flourouracil)、伊立替康(irinotecan)、亚叶酸(leucovorin)、奥沙利铂(oxaliplatin)、帕尼图姆单抗(panitumumab)、瑞格拉芬尼(ramucirumab)、瑞戈非尼(regorafenib))的混合治疗。本发明的化合物可在手术前、手术中或手术后的任何时间开始,然后在放疗、化疗或放化疗期间继续。由于去乙基黄酮哌啶胺(De-ethylflavopereirine)无毒性且口服时可产生全身性影响,优选患者每日一次或两次肠内给药片剂或胶囊。或者,本发明的化合物可以注射(皮下或肌内)或输注(静脉或腹腔内)给药。选择性地,纳武单抗(nivolumab)、派姆单抗(pembrolizumab)、三氟尿苷/替吡拉西(tipiracil)也可在结直肠癌的化疗或放化疗期间施用。

[0210] 在联合治疗中,化疗药物可以同时、依次或单独施用。对于肺癌或肿瘤的治疗,本发明的化合物或其药学上可接受的形式(例如盐、溶剂化物、水合物、溶剂化物或水合物的盐)或本发明所述的药物组合物可以与贝伐单抗(bevacizumab)、顺铂或卡铂、厄洛替尼(erlotinib)、吉西他滨(gemcitabine)和培美曲塞(pemetrexed)中的一种或多种联合使用。对于肾癌或肿瘤的治疗,本发明的化合物或其药学上可接受的形式(例如盐、溶剂化物、水合物、溶剂化物或水合物的盐)或本发明所述的药物组合物可以与贝伐单抗(bevacizumab)和/或索拉非尼(sorafenib)联合使用。对于子宫内膜癌或肿瘤的治疗,本发明的化合物或其药学上可接受的形式(例如盐、溶剂化物、水合物、溶剂化物或水合物的盐)或本发明所述的药物组合物可以与顺铂或卡铂、多西他赛(docetaxel)和阿霉素(doxorubicin)中的一种或多种联合使用。对于乳腺癌或肿瘤的治疗,本发明的化合物或其药学上可接受的形式(例如盐、溶剂化物、水合物、溶剂化物或水合物的盐)或本发明所述的药物组合物可以与贝伐单抗(bevacizumab)、卡培他滨(capecitabine)、厄洛替尼(erlotinib)、依维莫司(everolimus)、吉西他滨(gemcitabine)、拉帕替尼(lapatinib)、来曲唑(letrozole)、他莫昔芬(tamoxifen)、紫杉烷和曲妥珠单抗(trastuzumab)中的一种或多种联合使用。对于前列腺癌或肿瘤的治疗,本发明的化合物或其药学上可接受的形式(例如盐、溶剂化物、水合物、溶剂化物或水合物的盐)或本发明所述的药物组合物可以与贝伐单抗(bevacizumab)、卡培他滨(capecitabine)、依维莫司(everolimus)、吉西他滨(gemcitabine)、拉帕替尼(lapatinib)、来曲唑(letrozole)、他莫昔芬(amoxifen)、他赛瓦(tarceva)、紫杉烷(taxane)和曲妥珠单抗(trastuzumab)中的一种或多种联合使用。

[0211] 根据所处理的条件,本文提供的化合物可与本文提供的药剂或其他合适的药剂组

合使用。因此,在一些实施方式中,本文提供明的化合物将与上述的其它药剂共同给药。当用于联合治疗时,本文提供的化合物可与第二药剂同时或单独给药。这种联合给药可包括以相同单位剂量同时给药、以不同单位剂量同时给药和单独给药这两种药物。也就是说,本文所述的化合物和上述任一药剂可以以相同单位剂量一起配制并同时给药。或者,本文提供的化合物和上述任一药剂可以同时给药,其中两种药物存在于分开的制剂中。在另一个替代方案中,本文提供的化合物可以在上述任何药物给药之后紧随其后给药,反之亦然。在单独的给药方案中,可以将本文提供的化合物和上述任何药物分开数分钟、或数小时或数天给药。

[0212] 式(I)所示的化合物可以通过任何能够将化合物递送至作用部位(例如局部或全身)的方法(例如肠内、肠外、局部)给药。有效量的化合物可以通过任何途径以单剂量或多剂量给药,包括但不限于:口服、口腔、舌下、直肠、鼻内、透皮、静脉内、动脉内、肌肉内、皮下、肌肉内或腹腔内。

[0213] 实施例

[0214] 去乙基黄酮哌丁胺(De-Ethylflavopereirine)的合成与结构

[0215] 合成去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine),并分析其活性有两个原因。首先,通过去除乙基来简化黄酮哌丁胺(flavopereirine)的结构,从而消除化学作用的可能来源。其次,维持该化合物的三维形式-黄酮哌丁胺(flavopereirine)和去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)都是平面的-这被认为是与癌细胞DNA发生堆叠相互作用的关键性质。

[0216] 去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)的化学合成、分子结构和纯度如图1至5所示。用于合成的起始化合物是色胺,使用所示的反应方法(图1)获得的纯度大于97%。选择去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)的硫酸盐是因为它稳定且可溶于水(图2)。通过紫外吸收光谱法、高效液相色谱法和质谱法确认结构和纯度(图3至5)。

[0217] 图6中比较了去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)和黄酮哌丁胺(flavopereirine)的化学结构。在去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)中,黄酮哌丁胺(flavopereirine)D环上的乙基(-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>)缺失。

[0218] 与黄酮哌丁胺(flavopereirine)相比,去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)在相似或更低的浓度抑制癌细胞的生长

[0219] 合成去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)(化合物13-9-1)的主要目的是生成一种仍保留黄酮哌丁胺(flavopereirine)(化合物13-7-2)的抗癌细胞活性的不同的化合物。比较这两种化合物对多种癌细胞增殖影响证实了这一目标的实现。例如,分析了去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)对两种人乳腺癌细胞系和两种人前列腺癌细胞系的作用。对于乳腺癌细胞,这两种化合物在相同浓度下(相同IC<sub>50</sub>s)抑制增殖的程度相同。对于前列腺癌细胞系,去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)在浓度为一半的情况下与黄酮哌丁胺(flavopereirine)活性相同,这表明其对前列腺癌细胞生长的抑制作用更强。

[0220] 表1

[0221]	测定	受试化合物*	细胞系	生长抑制	最小剂量 **
	细胞增殖 (抗癌)	13-7-2	LnCap	Yes	$1 \times 10^{-5}$ M
	细胞增殖 (抗癌)	13-7-2	RPWE-1	Yes	$1 \times 10^{-5}$ M
	细胞增殖 (抗癌)	13-9-1	LnCap	Yes	$5 \times 10^{-6}$ M
	细胞增殖 (抗癌)	13-9-1	RPWE-1	Yes	$5 \times 10^{-6}$ M

[0222] \* 化合物13-9-1是去乙基黄酮哌丁胺 (De-ethylflavopereirine), 化合物13-7-2是黄酮哌丁胺 (flavopereirine)。

[0223] \*\*在任何治疗期后,与对照组(仅含补充剂的培养基)相比,剂量(IC<sub>50</sub>)需要使生长降低50%或更多。

[0224] 在动物中,去乙基黄酮哌丁胺 (De-ethylflavopereirine) 的毒性明显低于黄酮哌丁胺 (flavopereirine)

[0225] 1. 小鼠毒性:腹腔给药

[0226] 毒性研究表明,在所有测试剂量(100mg/kg、150mg/kg和200mg/kg)下,腹腔(IP)注射黄酮哌丁胺 (flavopereirine) 后,有50%的小鼠死亡。相同剂量下,腹腔注射去乙基黄酮哌丁胺 (De-ethylflavopereirine) 的小鼠无死亡:有统计学意义的结果,  $P < 0.05$ 。

[0227] 进行了一项关于合成化合物13-7-2(黄酮哌丁胺)和13-9-1(去乙基黄酮哌丁胺)的研究,以比较这两种化合物对动物的毒性。将化合物溶解在磷酸盐缓冲盐水中用于给药。对雄性免疫缺陷(纯合隐性scid/scid, beige/beige)小鼠腹腔注射两种化合物。在注射化合物后的15分钟、1小时、2小时、6小时、24小时和48小时的时间点观察所有小鼠的潜在不良反应。

[0228] 在分为两组的小鼠中以100mg/kg、150mg/kg和200mg/kg的剂量注射化合物13-7-2。注射150mg/kg和200mg/kg剂量的所有小鼠在注射后15分钟都表现出嗜睡行为。注射150mg/kg的一只小鼠在6小时死亡,而注射200mg/kg的一只小鼠在24小时死亡。注射100mg/kg剂量的一只小鼠在48小时死亡。从6小时到48小时它们被安乐死时,所有注射150和200mg/kg剂量的小鼠均表现出心律减慢、浅呼吸和体温过低。100mg/kg剂量组存活小鼠腹部肿胀,在48小时被安乐死。

[0229] 在分为两组的小鼠中以100mg/kg、150mg/kg和200mg/kg的剂量注射化合物13-9-1。注射化合物13-9-1的小鼠均未死亡。在注射后24小时至48小时的所有剂量组中均观察到腹泻,除了150mg/kg组中的一只小鼠在32小时后未表现出这种作用。

[0230] 2. 小鼠毒性:口服给药

[0231] 口服给药时,小鼠对去乙基黄酮哌丁胺 (De-ethylflavopereirine) 耐受性良好:即使剂量达300mg/kg。相比之下,黄酮哌丁胺 (flavopereirine) 的耐受剂量仅为100mg/kg。

[0232] 为了估计化合物13-7-2和13-9-1在小鼠中的最大耐受剂量,将两种化合物溶解在PBS中并通过灌胃给药SCID小鼠。在给药化合物或仅给药介质后15分钟、1小时、2小时、6小

时、24小时和48小时观察所有小鼠的任何不良反应。

[0233] 将化合物13-7-2以剂量100mg/kg、150mg/kg或200mg/kg给药。每个剂量组由三只小鼠组成。在150mg/kg治疗组中,两只小鼠在给药化合物后15分钟死亡,一只小鼠在给药化合物48小时死亡。该在48小时死亡的小鼠表现出危难征兆,包括心动过缓、体温过低、结痂闭眼和嗜睡。在200mg/kg治疗组中,两只小鼠表现出危难征兆,包括呼吸急促、心动过缓、闭眼和嗜睡。该组的一只小鼠在给药化合物后24小时死亡。除了一只小鼠在给药化合物15分钟心动过缓外,100mg/kg小鼠组中没有观察到危难征兆。

[0234] 将化合物13-9-1以100mg/kg、150mg/kg或200mg/kg的剂量灌胃给药(每个剂量组三只小鼠)。200mg/kg组的一只小鼠在给药该化合物15分钟后死亡(显然是由于灌胃引起的创伤)。在100mg/kg、150mg/kg或200mg/kg治疗组的任何其他小鼠中均未观察到危难征兆。

[0235] 在使用化合物13-9-1进行的单独的剂量查找/毒性测试中,三只小鼠接受了50mg/kg/天,持续3天;100mg/kg/天,持续7天;200mg/kg/天,持续7天;300mg/kg/天,持续3天的递增剂量的灌胃给药。密切监测小鼠的毒性迹象。没有观察到异常。尸检时未发现腹腔器官异常。这些结果表明口服13-9-1对小鼠的低毒性作用。

[0236] 3. 小鼠毒性:静脉给药

[0237] 在20mg/kg和40mg/kg剂量下,小鼠对化合物13-9-1静脉给药具有良好的耐受性。20mg/kg剂量为该化合物发挥抗肿瘤作用提供了足够的血清浓度。

[0238] 去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)的抗癌活性:基于细胞的研究

[0239] 测试了去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)抗卵巢、胰腺、脑和结肠癌细胞系的活性。结果如图7至10所示。在每种情况下,数据均显示出抗癌活性,并且还揭示了有关该抗癌药剂的行为的更多细节。通过将黄色的四唑染料3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基溴化四唑(MTT)还原为不溶的紫色甲臞来测定细胞毒性。MTT测定法用于确定活细胞数量的比色测定法。

[0240] 卵巢癌细胞系的结果如图7所示。胰腺癌细胞系的结果如图8所示。随着去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)(化合物13-9-1)的浓度增加,癌细胞活力呈剂量依赖性下降。相反,该化合物对非癌性上皮细胞系MRC-5的毒性明显较低。这是重要的一点:去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)选择性地靶向卵巢癌和胰腺癌细胞,而不靶向正常细胞。

[0241] 图9显示了去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)(化合物13-9-1)对胶质母细胞瘤细胞系U-87MG、DBTRG-05、A172和AM-38的作用。化合物13-9-1浓度的增加会导致胶质母细胞瘤细胞生存能力的剂量依赖性降低。为了比较,显示了抗脑癌药物替莫唑胺的剂量反应曲线。对于大多数胶质母细胞瘤细胞系而言,化合物13-9-1杀死50%细胞的浓度(IC<sub>50</sub>)比替莫唑胺高1.4至2.8倍。AM38例外,化合物13-9-1对其的IC<sub>50</sub>低于替莫唑胺的IC<sub>50</sub>(0.66倍)。这些剂量-反应曲线表明,通过直接比较,化合物13-9-1对胶质母细胞瘤细胞系的活性类似于众所周知的抗脑癌药物替莫唑胺。

[0242] 结肠癌细胞系HT-29的结果如图10所示。使用一种生物发光细胞系,通过发光来评估活力。在这种情况下,将化合物13-9-1的活性与含有黄酮哌丁胺(flavopereirine)和至少一种其他抗癌化合物的Pao pereira提取物进行比较。正如所预期的,纯合成化合物比植物提取物在更低的浓度下具有活性。

[0243] 去乙基黄酮哌丁胺 (De-ethylflavopereirine) 诱导癌细胞凋亡

[0244] 图11所示的流式细胞仪分析结果表明,合成化合物13-9-1杀死癌细胞的一种作用机制是诱导细胞凋亡。此诱导是剂量依赖性的;化合物的浓度越高,胰腺癌细胞发生凋亡的百分比越高。与由未经处理的细胞组成的对照相比,差异具有统计学意义 ( $p < 0.01$ )。

[0245] Caspase-8、Caspase-3和PARP裂解产物的检测也显示了诱导细胞凋亡的作用。切割的蛋白质产物在图12中通过右侧附近的箭头标识。这些蛋白水解片段的累积是凋亡细胞死亡的生化标志。

[0246] 诱导细胞凋亡也是在卵巢癌和结肠癌细胞中的作用机制。

[0247] 去乙基黄酮哌丁胺 (De-ethylflavopereirine) 完全抑制胰腺癌细胞集落形成

[0248] 在软琼脂中进行锚定独立集落形成试验,来测试致癌性胰腺癌细胞在暴露于去乙基黄酮哌丁胺 (De-ethylflavopereirine) 后的长期存活 (20天)。未进行处理时,PANC-1细胞以12%的速率形成集落。去乙基黄酮哌丁胺 (De-ethylflavopereirine) 完全抑制PANC-1集落在软琼脂中形成。暴露于化合物13-9-1后,没有致癌癌细胞存活 (图13)。

[0249] 去乙基黄酮哌丁胺 (De-ethylflavopereirine) 与吉西他滨联用可导致对吉西他滨有抗性的胰腺癌细胞100%死亡

[0250] 有效抗癌治疗最有效的策略之一就是联合用药。由于去乙基黄酮哌丁胺 (De-ethylflavopereirine) 可通过特异性靶向癌细胞受损的DNA结构来诱导癌细胞凋亡,因此其可以与诸多具有多种作用机理的抗癌药物形成潜在的协同组合。

[0251] 图14所示的剂量反应曲线显示了去乙基黄酮哌丁胺 (De-ethylflavopereirine) 与吉西他滨联用的结果,吉西他滨是胰腺癌的常用药物。单独使用吉西他滨的曲线表明,所有四种胰腺癌细胞系均对该药具有抗性。当与去乙基黄酮哌丁胺 (De-ethylflavopereirine) 联合使用时,耐药性会得到有效逆转,并且100%的癌细胞会被杀死。这些数据表明去乙基黄酮哌丁胺 (De-ethylflavopereirine) /吉西他滨联用具有协同作用,并为进一步评估去乙基黄酮哌丁胺 (De-ethylflavopereirine) 联合用药提供了坚实的基础。

[0252] 体内研究:药代动力学

[0253] 化合物13-9-1在小鼠中的给药

[0254] 在小鼠中建立最佳给药途径和给药范围的初步试验表明,静脉给药在20mg/kg和40mg/kg时具有良好的耐受性,而口服给药在100mg/kg、200mg/kg甚至300mg/kg时耐受性良好 (图15)。小鼠实验选择口服给药,因为通过避免需要尾静脉注射而简化了给药。

[0255] 去乙基黄酮哌丁胺 (De-ethylflavopereirine) 的组织分布

[0256] 口服给药 (200mg.kg) 后,在所有受试器官和组织 (包括大脑) 中都发现了化合物13-9-1。在肾脏、结肠和脾脏发现了最高浓度 (最高 $C_{max}$ )。肺的AUC最高,其次是脾脏、结肠和肾脏。

[0257] 肺的AUC最高,且 $T_{max}$ 最快。在肺中,在2小时内达到 $C_{max}$  ( $T_{max} = 2hr$ ),而在大多数其他器官中, $T_{max}$ 为4小时。化合物13-9-1在肺中累积相对较快,且相对较慢地被清除。相对于其他器官,该浓度在肺中维持较长时间。在24hr时,肺中的浓度仍达6.67nmol/mg蛋白质,为2hr时峰值17.50的38%。

[0258] 在所有测试的器官中,结肠的 $C_{max}$ 位居第二,且AUC仅低于肺和脾。在结肠中观察到



与肺中相同的快速分布和缓慢消除。 $T_{max}$ 为3hr时。在24hr时,浓度为9.31nmol/mg蛋白质,是峰值31.63的29%。

[0259] 表2

[0260]	器官	AUC (0-24hr)	$C_{max}$ (nmol/mg蛋白)	$T_{max}$ (hr)
	肺	258.70	17.50	2
	脾脏	241.49	30.01	4
	结肠	194.72	31.63	3
	肾脏	185.07	55.69	4
	肝脏	102.14	22.21	4
	肾上腺	74.80	17.62	4
	胰腺	63.41	16.95	4
	心脏	53.21	7.82	4
	卵巢	42.48	11.17	4
	肌肉	19.54	5.67	4
	大脑	7.91	1.20	4

[0261] AUC=曲线下面积

[0262] 组织分布数据显示,肺、脾脏、结肠、肾脏和肝脏对化合物的暴露最佳。值得注意的是,胰腺在200mg/kg后达到的水平具有显著的抗癌作用(参见下一部分)。

[0263] 去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)抑制体内PANC-1肿瘤的生长

[0264] 已经证明,用于测试抗癌化合物活性的小鼠模型非常强大,并且为预测该化合物在人类癌症患者中的有效性提供了极好的基础。当将人类癌细胞的异种移植原位移植时尤其如此,这意味着肿瘤在与之相关的器官中生长,并且其生理环境模仿了人类的临床状况。

[0265] 用荧光素酶基因转染人PANC-1胰腺癌细胞,使其能够在体对它们通过灌胃给药去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)进行治疗。肿瘤纵向进展后进行活体动物成像。实验结果如图16至21所示。

[0266] 图16显示,与未经治疗的对照组的所有图像相比,用去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)治疗的动物的所有图像量化结果显示,去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)的抗肿瘤作用是显著的。图17和图18示出了试验结束时未经治疗的小鼠与用去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)治疗的小鼠的代表性图像。

[0267] 图19示出了两只小鼠(2/9或22%)的纵向图像,其通过用去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)治疗彻底消除了肿瘤。对于其他小鼠,与未经治疗的对照组相比,治疗组中的小鼠肿瘤大小显著减小。图20A比较了经治疗或未经治疗的动物的最终肿瘤重量,以确认由去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)引起的统计学上的显著减少。图20B显示,去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)也可减少转移病灶。

[0268] 图21中显示了去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)没有毒性作用。治疗组小鼠体重与未经治疗的对照组小鼠体重没有区别。两组小鼠在试验过程中均显示出正常的体重增加。两组小鼠内部器官的检测也未显示任何毒性作用。

[0269] 去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)具有抗胰腺癌干细胞活性

[0270] 通过放疗和化疗治疗的癌症患者通常会在治疗后进入缓解期。缓解可能持续数月或数年,但尽管持续治疗,癌症复发、转移并最终变得更具侵袭性是很常见的。癌症干细胞是化学抗性、放射抗性和复发的基础。肿瘤细胞的一个子集,癌症干细胞,能够抵抗抗癌治疗的破坏作用,随着时间的推移而持续存在,然后使肿瘤再生。一种具有证明的抗癌干细胞活性的药物将有助于开发新的成功的癌症疗法。

[0271] 进行了数个实验,示出了去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)的抗胰腺癌干细胞活性。

[0272] 在体外,癌干细胞形成球体:围绕癌干细胞的癌细胞簇。对球体形成的抑制是检测化合物的抗癌干细胞活性。去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)显示出有效的抗胰腺癌干细胞活性(图22和23)。该化合物在5 $\mu$ M和10 $\mu$ M的浓度下能显著抑制初级球体的形成。二级球体在5 $\mu$ M和10 $\mu$ M时被完全抑制,而2.5 $\mu$ M显示出明显的抑制作用。

[0273] 癌干细胞可以通过特定的细胞表面标记物进行鉴定。三种标记物CD24、CD44和EpCam的组合用于检测胰腺癌干细胞。这些标记物可以用不同的荧光团标记,并通过流式细胞仪同时检测。三重阳性细胞(即表达所有三个标记的细胞)被认为是胰腺癌干细胞。去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)减少了胰腺癌细胞群中胰腺癌干细胞的百分比。用2.5 $\mu$ M、5.0 $\mu$ M和10 $\mu$ M浓度的化合物处理PANC-1细胞24小时或48小时。在流式细胞仪输出的象限Q2(“Triple+”)中鉴定出三重阳性细胞。在24小时观察到三重阳性(CD24<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>/EpCam<sup>+</sup>)癌干细胞减少(图24)。在48小时,所述减少具有统计学意义(图25)。

[0274] 在体内,癌干细胞是肿瘤形成和生长的主要来源。因此,肿瘤形成和生长的速率是癌干细胞活性的指标。当给动物接种有限数量的癌细胞时,肿瘤形成和生长的速率可以准确地测量出来。然后可以据此确定一种前瞻性药物是否能减缓肿瘤的形成和生长速度,这表明它是否对抗癌干细胞起作用。将PANC-1癌细胞悬浮培养,并在接种至小鼠之前,用10 $\mu$ M浓度的去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)预处理。作为阴性对照组,PANC-1癌细胞未用该化合物预处理。接种后,测定肿瘤形成和生长的速率。

[0275] 1) 接种10<sup>6</sup>个PANC-1细胞后,在对照组的87%的小鼠和治疗组的80%的小鼠中形成肿瘤。去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)显著抑制所形成的PANC-1肿瘤的生长(图26A)。

[0276] 2) 接种2 $\times$ 10<sup>5</sup>个PANC-1细胞后,80%的小鼠形成肿瘤(对照组)。去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)可将肿瘤形成率降低至60%,表明其可抑制胰腺癌干细胞。单剂量的去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)也减慢了所形成的肿瘤的生长速率(图26B)。

[0277] 3) 接种2 $\times$ 10<sup>4</sup>个PANC-1细胞后,在对照组和治疗组中有20%的小鼠形成了肿瘤。两组中肿瘤的生长速率没有显著差异(图26C)。

[0278] 去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)抑制体内PANC-1肿瘤形成:抗癌干细胞活性

[0279] 图27显示了在注射已经用所述化合物处理的PANC-1细胞后,去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)对小鼠胰腺肿瘤形成的影响。注射后,将小鼠用去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)治疗20天。20天后,在注射了用化合物13-9-1处理的PANC-1的动物中观察到55%的肿瘤形成,而在对照(未治疗)组中100%的动物肿瘤形成。在第39

天,最大肿瘤形成率达到80%,其与对照组相比有显著差异(对数秩检验 $P=0.001$ )。这项实验证明去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)抑制PANC-1癌症干细胞的决定性活性:它们形成新肿瘤的能力。

[0280] 去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)靶向胰腺癌细胞中的Wnt信号通路

[0281] 健康的干细胞通常代表一个器官中的一小部分细胞。它们是一种特殊的体细胞,能够自我更新和分化,从而调节组织的生长和维持。干细胞受一种称为Wnt信号的生化途径控制。

[0282] 癌干细胞强行控制了正常的干细胞控制机制:Wnt信号通路在癌干细胞中异常激活,从而导致肿瘤的发生、癌症的持续和转移。安全靶向Wnt信号通路的能力为癌症治疗提供了巨大的前景。

[0283] Wnt途径激活包括 $\beta$ -链蛋白从细胞质向细胞核内的转运,以及随后的靶基因转录的变化。当 $\beta$ -链蛋白进入细胞核的转运被抑制时,Wnt激活受到抑制。图28显示,去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)通过减少 $\beta$ -链蛋白从细胞质到细胞核的转运而抑制Wnt激活。因此,去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)在某种程度上抑制胰腺癌干细胞的生长,是因为它特异性抑制Wnt信号传导。

[0284] 去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)的抗炎作用:保护胰腺组织免受慢性炎症的影响,有可能预防胰腺癌

[0285] 慢性炎症是许多类型癌症的诱因。胰腺的慢性炎症,即慢性胰腺炎,与胰腺癌的高风险有关。由于这个原因,测试了去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)的抗炎活性,看它是否能抑制胰腺炎,从而有预防慢性炎症向胰腺癌的转变的潜力。结果是肯定的:去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)对胰腺炎具有显著的抗炎作用,这证明其可用于患有胰腺炎或其他癌症危险因素的患者的胰腺癌预防。

[0286] 胰腺炎是由于胰腺的外分泌、内分泌和导管细胞受损所致。在人体中,这种情况通常是由过量饮酒引起的。由于浸润的白细胞对胰腺腺泡细胞造成进一步的损伤,炎症反应大大加重了胰腺炎相关的组织损伤。这种慢性炎症导致人胰腺癌。

[0287] 通过动物模型研究了酒精诱导的胰腺炎,以测试去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)对抑制病况潜力并确定涉及哪些炎症途径。

[0288] 每天给小鼠施用乙醇,随后是大量施用乙醇,这是一种与人类饮食有关的方案。在实验组中,在整个实验过程中,每日饮食中均包含去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)。有两个对照组:不给予酒精的动物组(阴性对照)和给予酒精但不接受化合物13-9-1的动物组(阳性对照)。酒精处理10天后,动物灌服酒精8小时,然后安乐死,收集胰腺组织。胰腺组织切片进行组织学分析,分离的RNA用于定量PCR。

[0289] 与健康样本相比(图29A左图),施用酒精的动物的胰腺组织显示出水肿和炎性细胞浸润(图29A中图)。在还接受了化合物13-9-1的动物中,施用了酒精的动物胰腺组织中的组织损伤得到了预防(图29A右图)。量化组织损伤的损伤评分也显示了去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)的保护作用。用去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)进行治疗可完全防止损伤,并保持了在未接受任何酒精的动物组织中看到的健康评分(图29B)。

[0290] 去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)也降低了接受酒精的动物胰腺中

炎性细胞的浸润(图29C)。Ly6G,嗜中性粒细胞的标志物,在酒精受体的胰腺中升高了四倍。加入去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)作为治疗性化合物可得到完全正常的Ly6G水平,这意味着这些酒精暴露组织中的中性粒细胞数是正常的。

[0291] 数据表明,胰腺可以免受酒精性炎症作用-如果存在去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine),则组织不会受到酒精的伤害,并且可以防止酒精引起的中性粒细胞浸润对细胞的损害。去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)提供了组织保护和直接的抗炎作用。去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)可以减少因饮酒引起的胰腺炎,因此可以阻止慢性胰腺炎向胰腺癌的发展。

[0292] 去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)抑制体内HT-29结肠癌肿瘤的生长

[0293] 如图30所示,去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)减少了接受这些人结肠癌细胞皮下异种移植的小鼠的HT-29肿瘤体积。在本实施例中,将去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)的抗肿瘤活性与IFL(伊立替康、氟尿嘧啶和亚叶酸钙的组合)进行比较。IFL已常规用于治疗结直肠癌,但具有明显的毒性。其毒性如此严重,以至于有些人将伊立替康包裹在脂质体内,以减少不良副作用。

[0294] IFL在降低HT-29肿瘤体积方面更有效,并且比去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)更具有侵略性,但IFL对小鼠也具有严重毒性。去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)对肿瘤的作用较慢,但对小鼠没有毒性作用。

[0295] 图32和33显示了去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)和IFL对肿瘤的直接影响的比较。末端脱氧核苷酸转移酶dUTP缺口末端标记(TUNEL)是一种通过标记在细胞凋亡过程中产生的双链DNA断裂中3'-羟基末端来检测DNA片段的方法。通过TUNEL方法对两组和未经治疗的对照组的肿瘤切片进行免疫染色,以特异性鉴定经历细胞凋亡的细胞。未经治疗的动物的肿瘤切片(图31)未显示TUNEL染色,因为未诱导细胞凋亡。施用IFL的小鼠肿瘤切片外围细胞表现出更广泛的损伤;有一些细胞被TUNEL染色,周围的细胞被破坏。在图32中,用去乙基黄酮哌丁胺(De-ethylflavopereirine)治疗的小鼠的肿瘤切片显示,外围细胞正在经历由该化合物诱导的细胞凋亡。

[0296] 相关申请的交叉引用

[0297] 本申请要求于2018年3月31日提交的美国临时申请62/651,133的优先权;其通过引用并入本文。

[0298] 参考资料

[0299] American Cancer Society.[www.cancer.org](http://www.cancer.org)

[0300] <https://training.seer.cancer.gov/disease/cancer/>

[0301] Abramovitch R.A.,Shapiro D.“880.Tryptamines,carboline, and related compounds.Part II.A convenient synthesis of tryptamines and $\beta$ -carboline” J.Chem.Soc.4589-4592 (1956) .

[0302] Beljanski M.,Le Goff L.,Beljanski M.S.“Differential susceptibility of cancer and normal DNA templates allows the detection of carcinogens and anticancer drugs.Third NCI-EORTC Symposium on new drugs in cancer therapy” Institut Bordet,Brussels (1981) .

[0303] Beljanski M.,Bourgarel P.,Beljanski M.S.“Correlation between in vitro

DNA synthesis,DNA strand separation and in vivo multiplication of cancer cells”Exp.Cell Biol.49:220-231(1981) .

[0304] Beljanski M.,Beljanski M.S.“Selective inhibition of in vitro synthesis of cancer DNA by alkaloids of $\beta$ -carboline class”Exp.Cell Biol.50:79-87(1982) .

[0305] Beljanski M.,Beljanski M.S.“Three alkaloids as selective destroyers of the proliferative capacity of cancer cells”IRCS Med.Sci.12:587-588(1984) .

[0306] Beljanski M.,Beljanski M.S.“Three alkaloids as selective destroyers of cancer cells in mice.Synergy with classic anticancer drugs”Oncology 43:198-203(1986) .

[0307] Beljanski M.“The anticancer agent pB-100,selectively active on malignant cells,inhibits multiplication of sixteen malignant cell lines,even multidrug resistant”Genet.Mol.Biol.23:29-33(2000) .

[0308] Herve C.“Flavopereirine is an intercalating agent for non-supercoiled DNA”Cancer Detect.Prev.22(suppl.1)(1998) .

[0309] Denayer T.,Stöhr T.,Van Roy M.“Animal models in translational medicine:Validation and prediction”New Horiz.Transl.Med.2:5-11(2014) .

[0310] Fürstner A.,Ernst A.“Syntheses of camalexin,indolopyridocoline and flavopereirine”Tetrahedron 51:773-786(1995) .

[0311] Kraus G.A.,Malpert J.H.“Synthesis of indolo[2,3-a]quinolizine alkaloids via nucleophilic additions of metallated pyridines”Synlett 107-108(1997) .

[0312] Malins D.C.,Gunselman S.J.“Fourier-transform infrared spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry reveal a remarkable degree of structural damage in the DNA pf wild fish exposed to toxic chemicals”Proc.Nat’l Acad.Sci.USA91:13038-13041(1994) .

[0313] Malins D.C.,Polissar N.L.,Gunselman S.J.“Infrared spectral models demonstrate that exposure to environmental chemicals leads to new forms of DNA”Proc.Nat’l Acad.Sci.USA 94:3611-3615(1997) .

[0314] Malins D.C.,Polissar N.L.,Schaefer S.,Su Y.,Vinson M.“A unified theory of carcinogenesis based on order-disorder transitions in DNA structure as studied in the human ovary and breast”Proc.Nat’l Acad.Sci.USA 95:7637-7642(1998) .

[0315] Malins D.C.,Polissar N.L.,Gunselman S.J.“Tumor progression to the metastatic state involves structural modifications in DNA markedly different from those associated with primarytumor formation”Proc.Nat’l Acad.Sci.USA 93:14047-14052(1996) .

[0316] Malins D.C.,Polissar,N.L.,Gunselman,S.J.“Models of DNA structure achieve almost perfect discrimination between normal prostate,benign

prostatic hyperplasia (BPH), and adenocarcinoma and have a high potential for predicting BPH and prostate cancer" Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 94:259-264 (1997).

[0317] Malins D.C., Johnson P.M., Barker E.A., Polissar N.L., Wheeler T.M., Anderson K.M. "Cancer-related changes in prostate DNA as men age and early identification of metastasis in primary prostate tumors" Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 100:5401-5406 (2003).

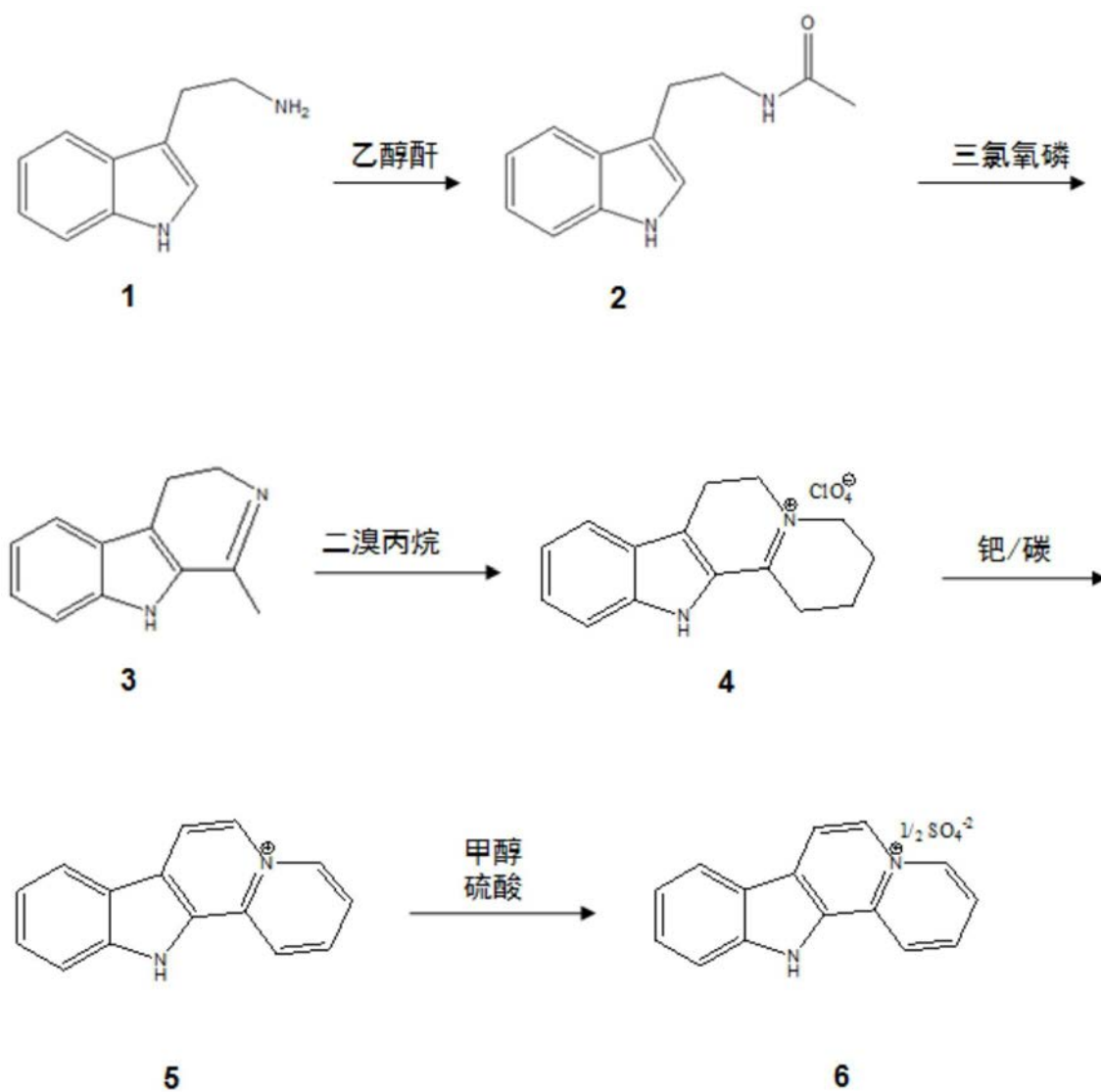


图1

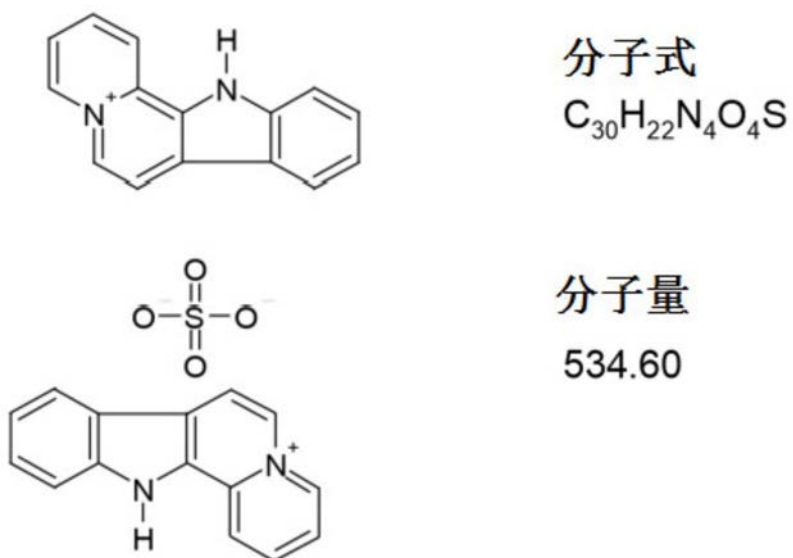


图2

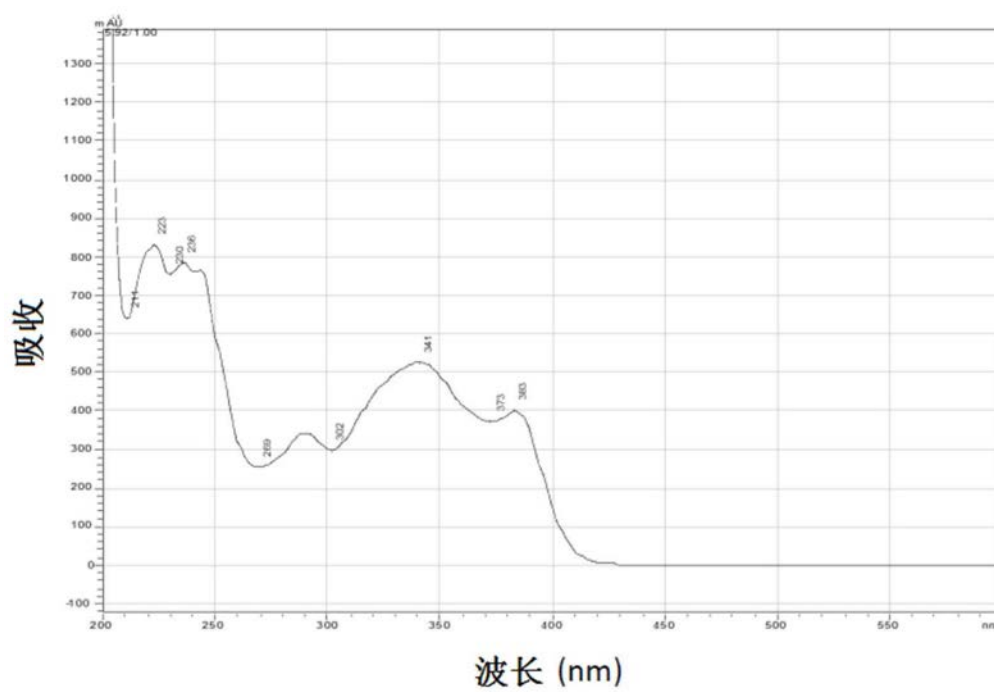


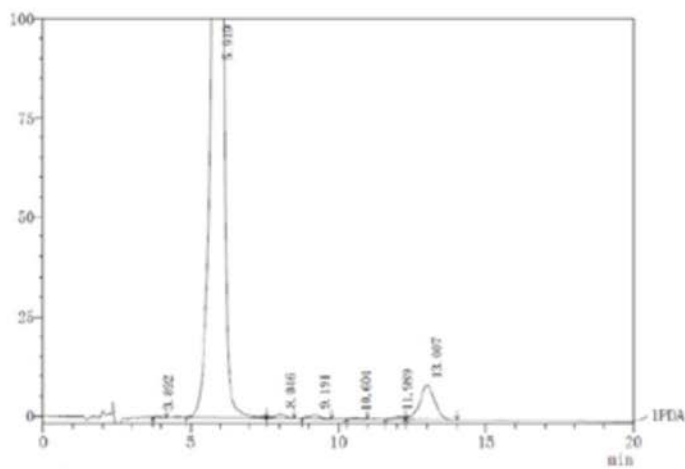
图3



@E:\data\LC-20A\business\2014\201401\20140126\

样品名称: 13-9-1  
样品 ID: APWJ20131201DES  
样品瓶#: 1  
进样体积: 10 $\mu$ L  
数据文件名: 13-9-1APWJ20131201DES-01.1cd  
方法文件名: 13-9-1.1cm  
批处理文件名: 110.1cb  
报告文件名: template20100719-2.1cr  
数据采集: 2014-1-26 11:30:52  
数据处理: 2014-1-26 12:19:17

@E:\data\LC-20A\business\2014\201401\20140126\



更多色谱图1

IPDA 更多色谱图1\240nm 4nm

PDA Ch1 240nm 4nm

峰	保留时间	峰面积	峰高	峰面积 %	分离度	拖尾因子	理论塔板数
1	3.892	1755	141	0.013	0.000	1.258	1896.646
2	5.919	13189298	770468	97.317	5.133	0.905	2997.644
3	8.046	19725	774	0.146	3.929	0.000	2450.613
4	9.191	18345	687	0.135	1.652	1.033	2485.957
5	10.601	5661	269	0.042	2.142	1.030	5367.573
6	11.989	14631	498	0.108	1.133	0.000	656.107
7	13.007	303517	8576	2.239	0.731	0.000	3247.173
总		13552932	781412	100.000			

图4

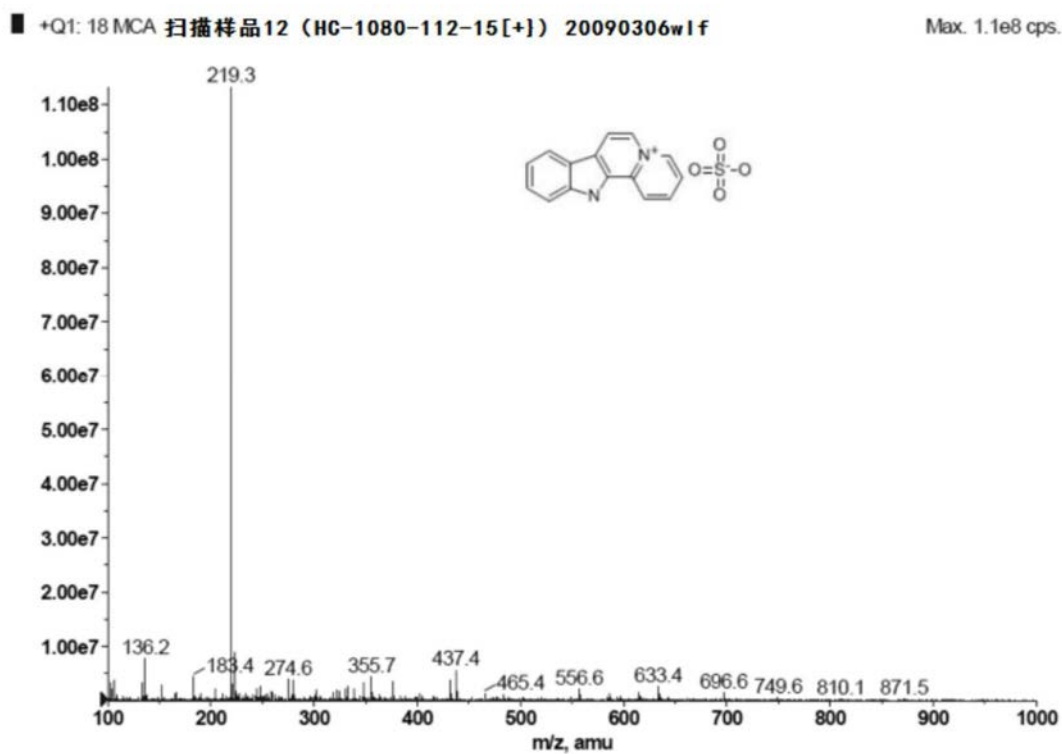


图5

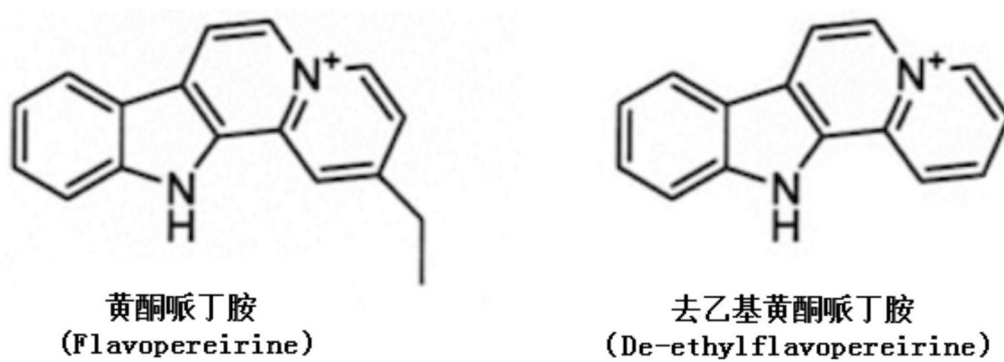


图6

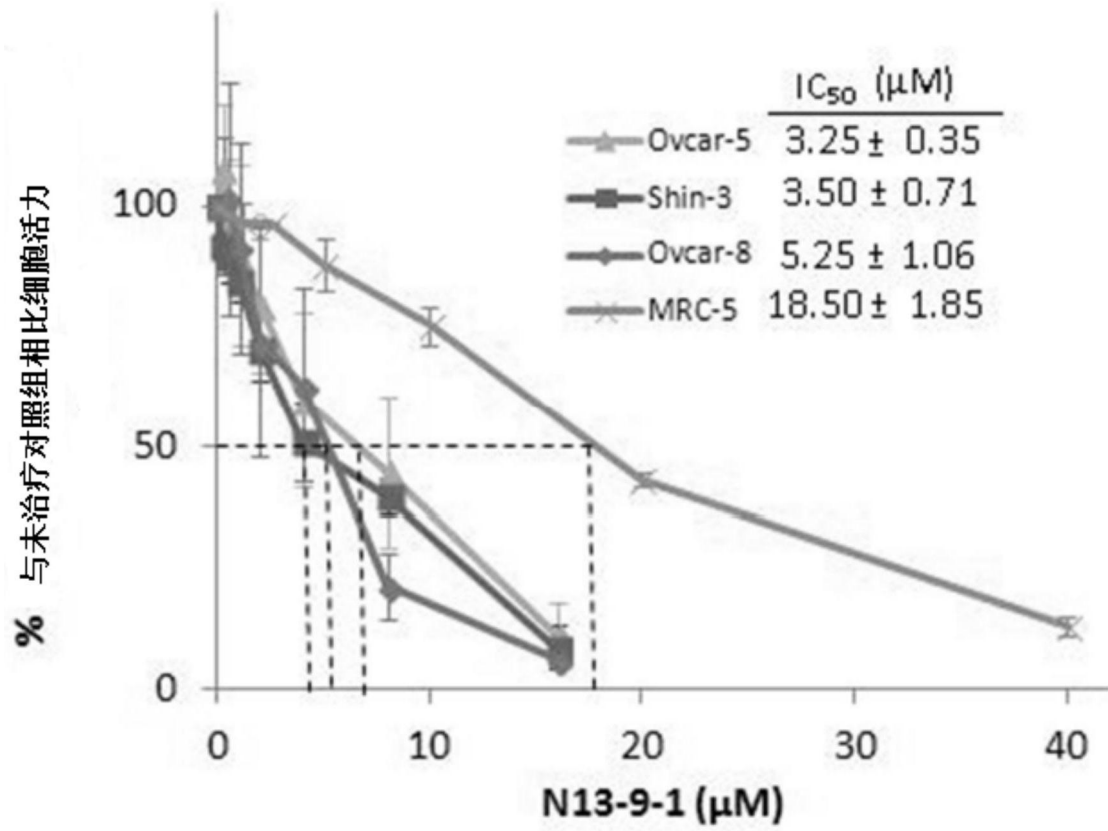


图7

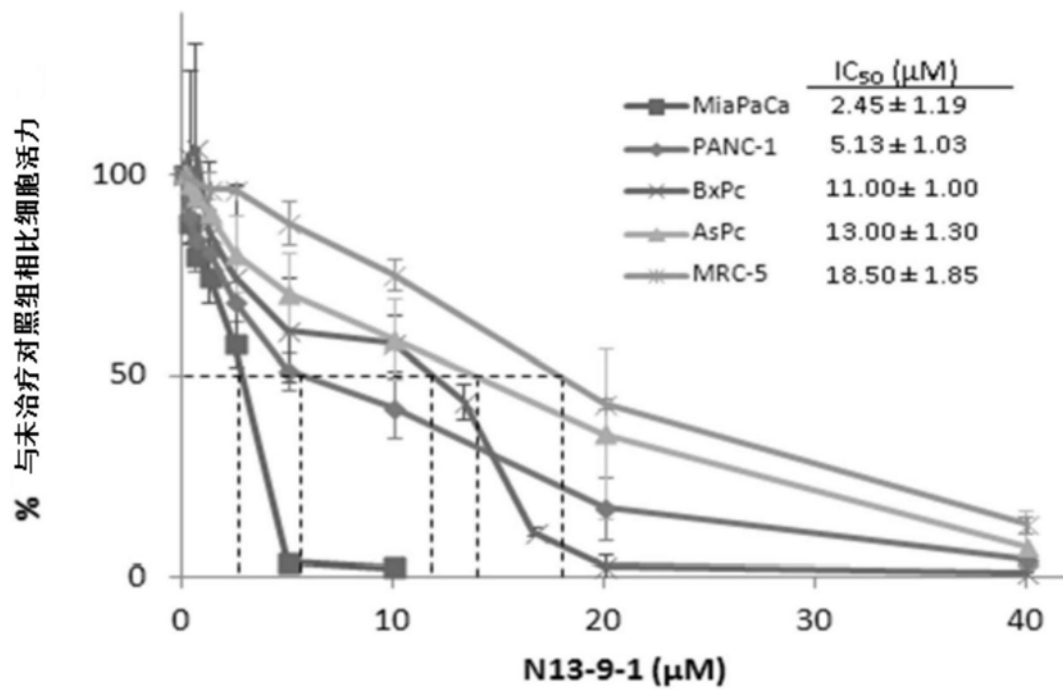


图8

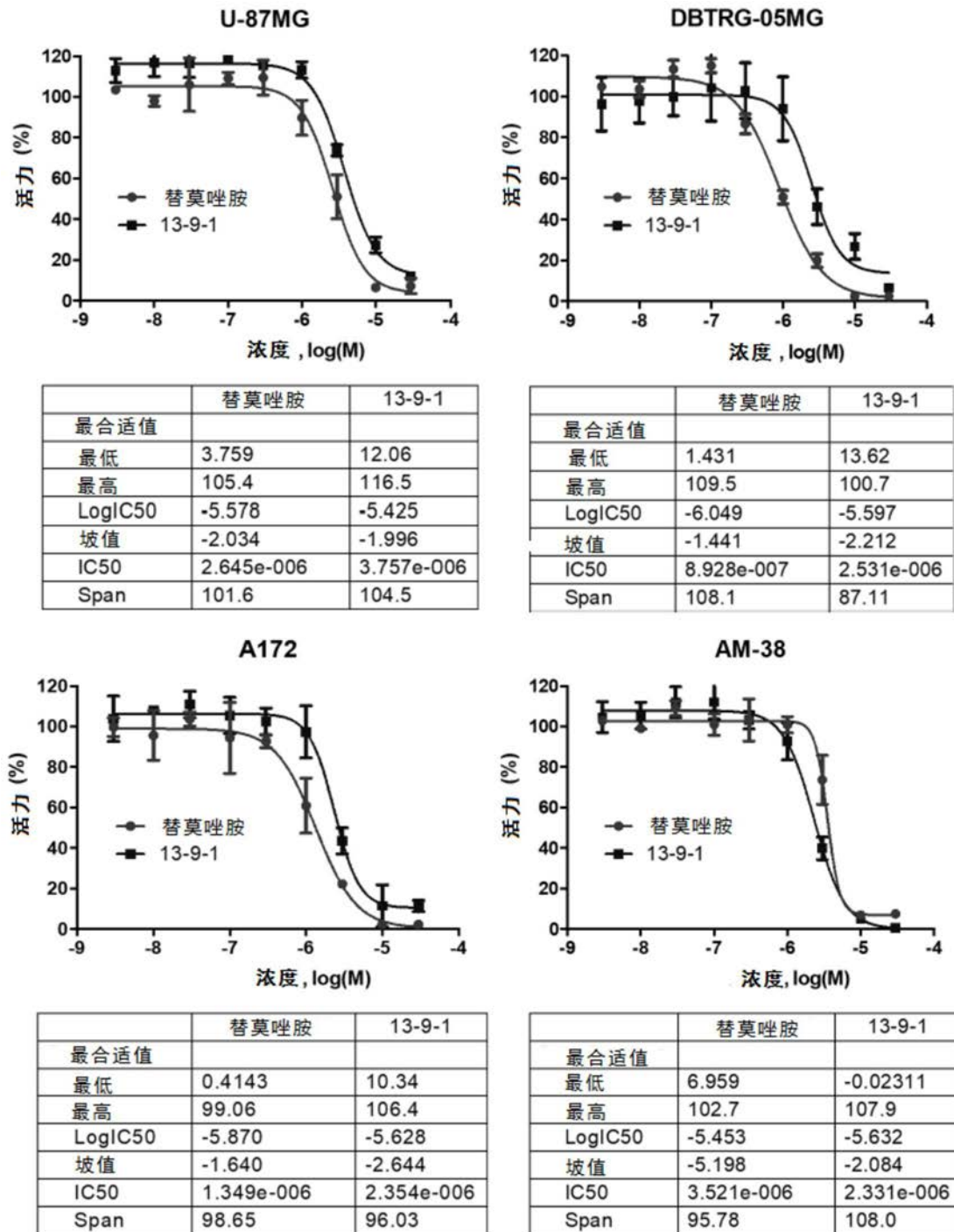


图9

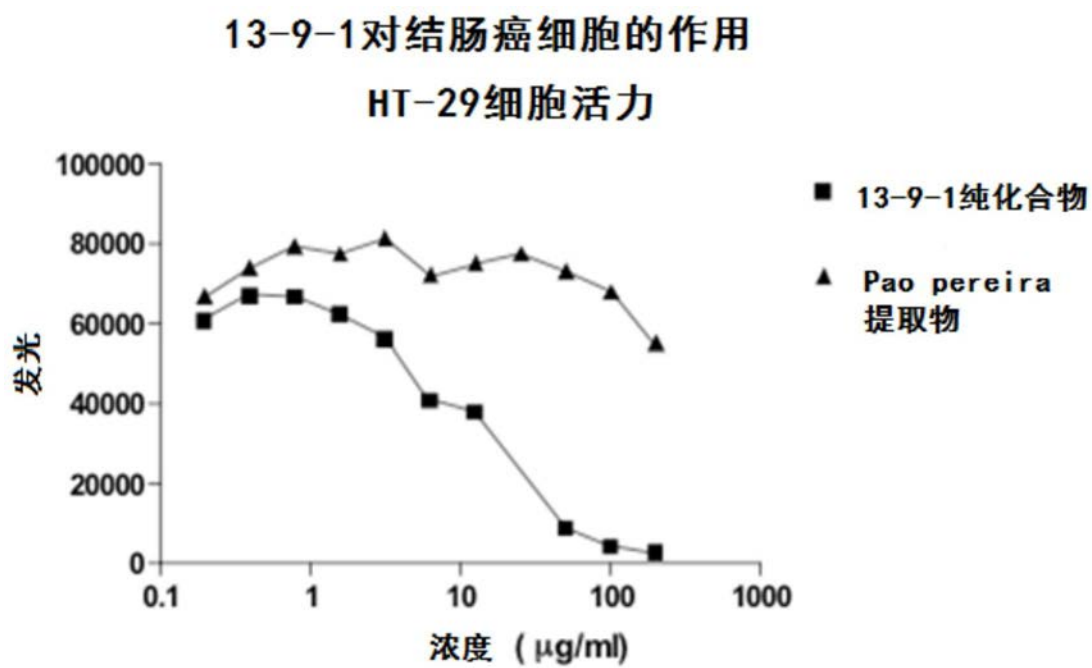
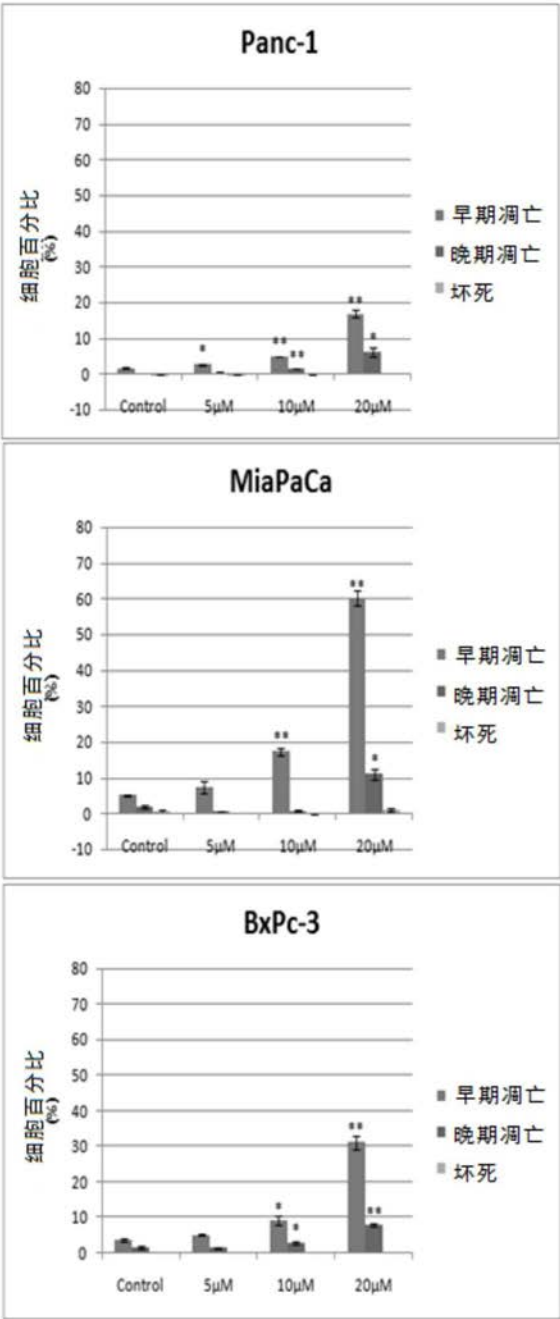


图10



值表示为平均值±SEM (n = 3)  
\*p≤0.05, 使用 学生t检验 ,  
与对照组比较  
\*\*p≤0.01使用 学生t检验 ,  
与对照组比较

图11

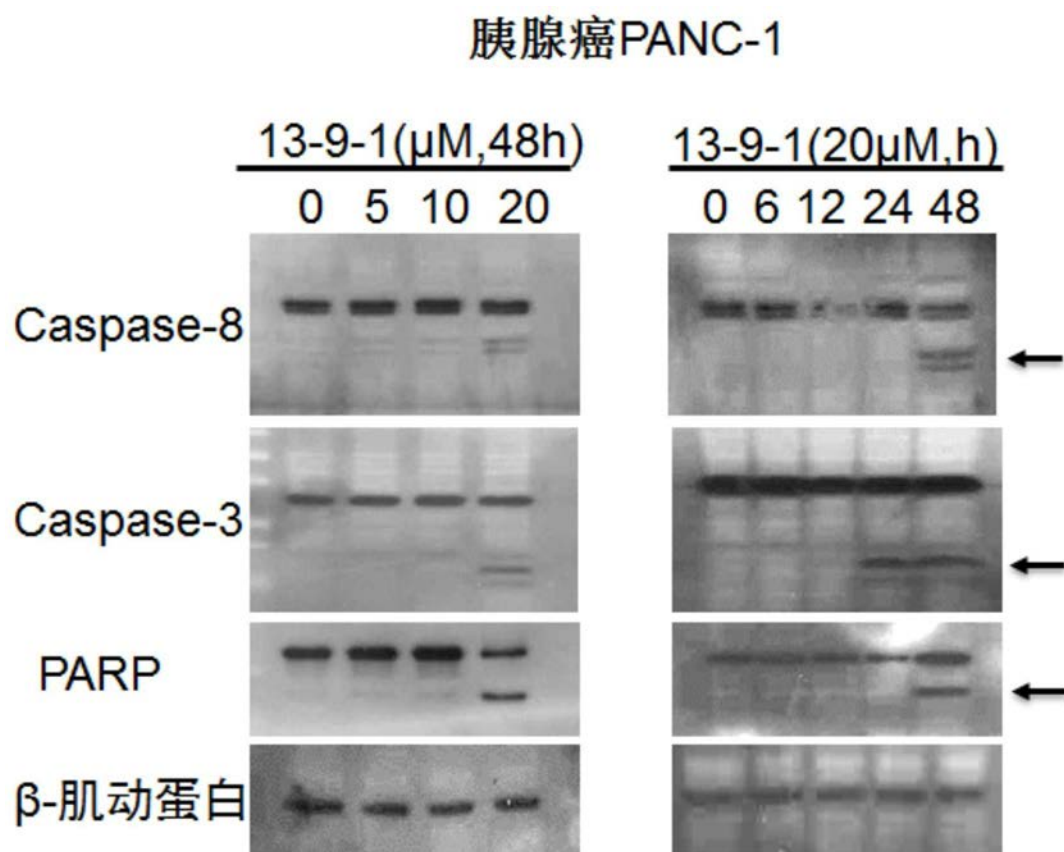


图12

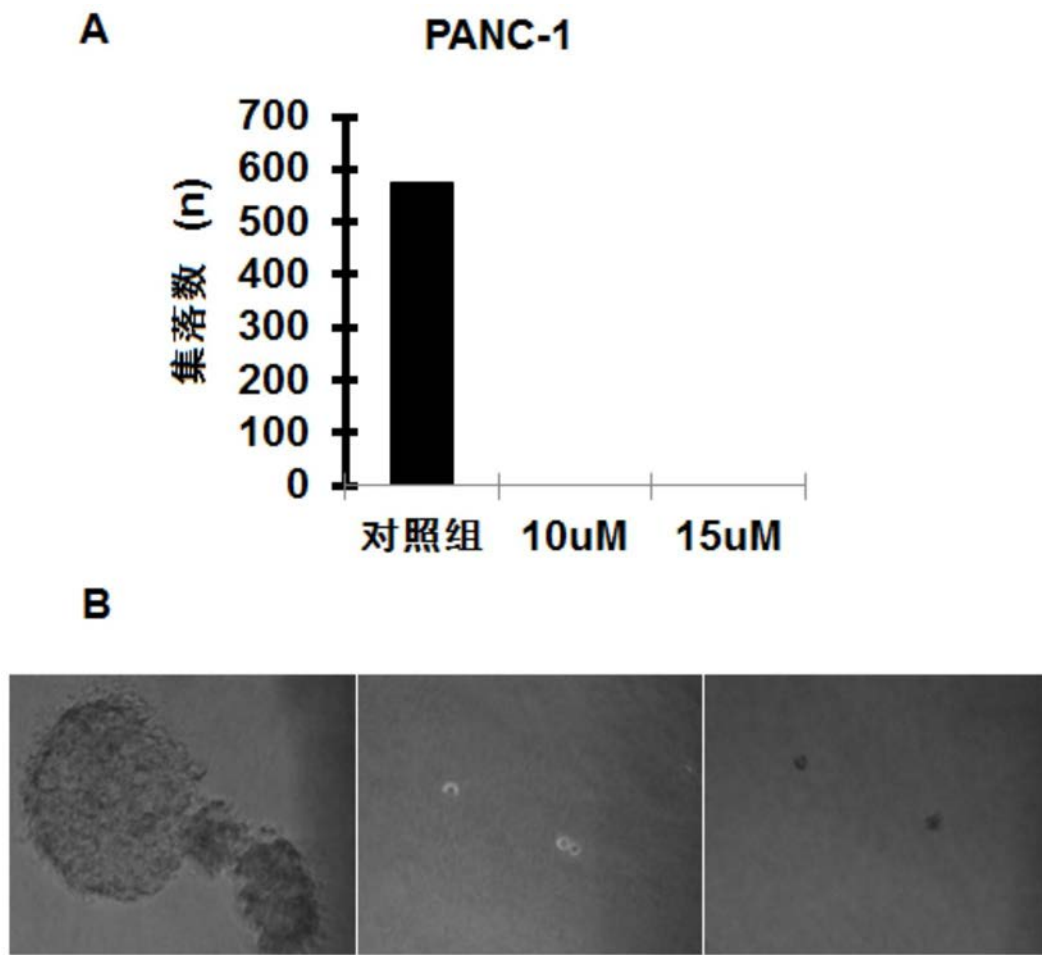


图13



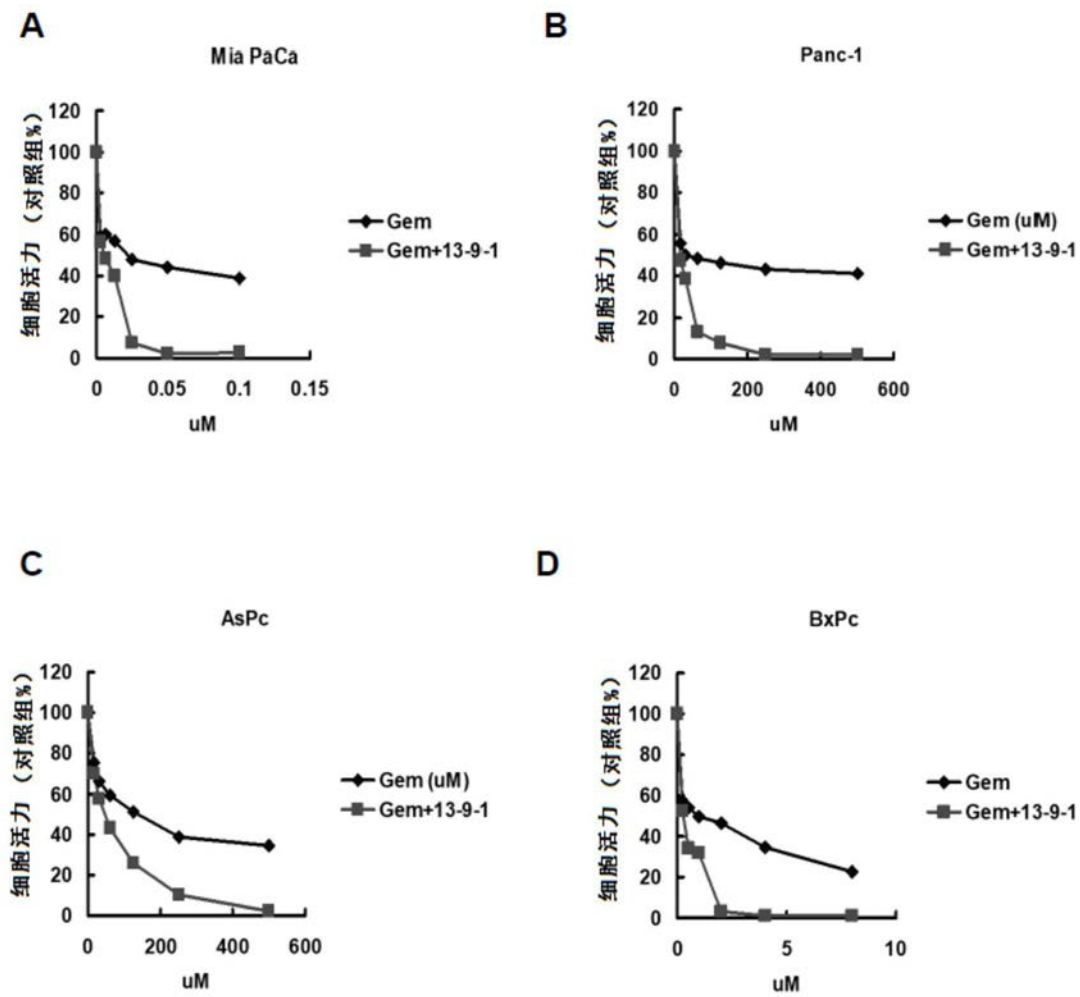


图14

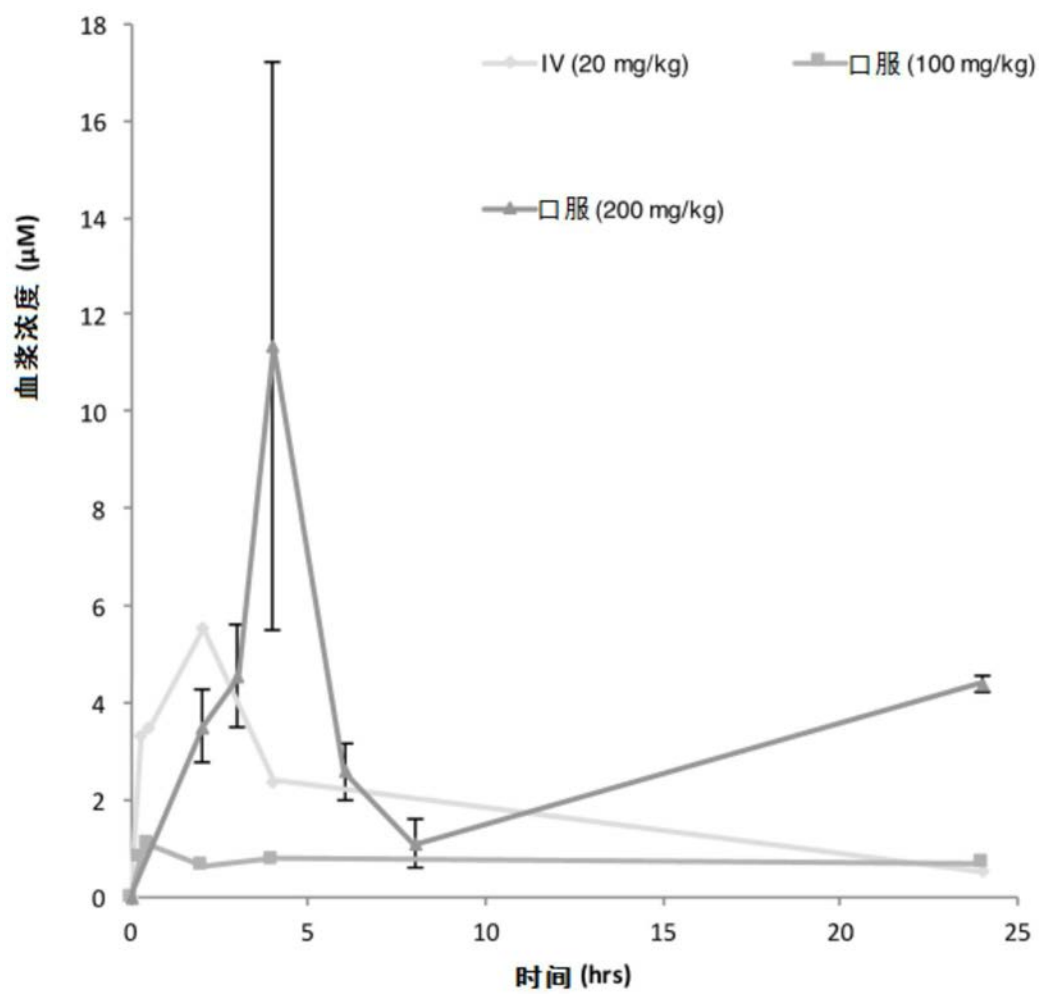


图15

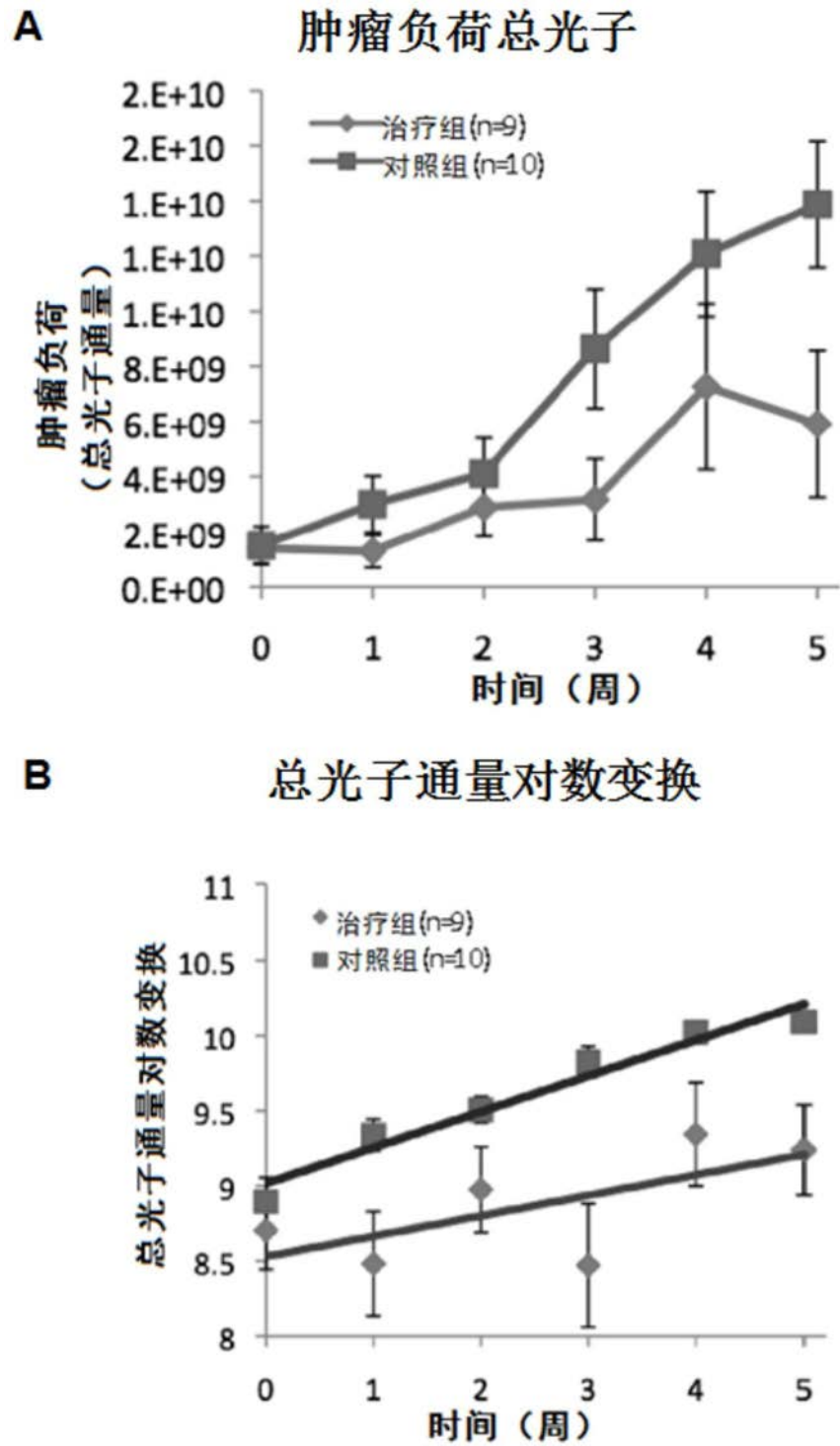


图16

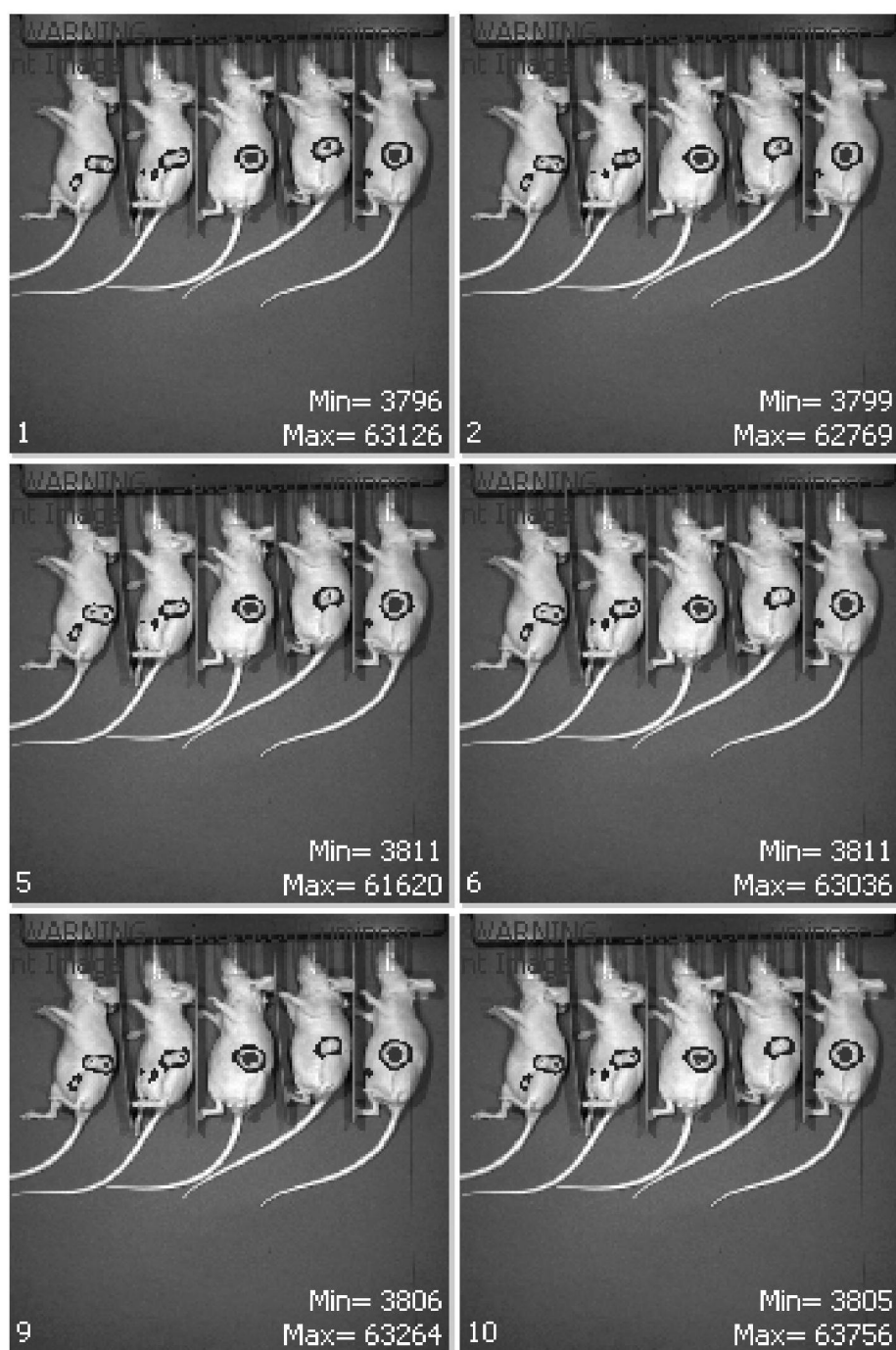


图17

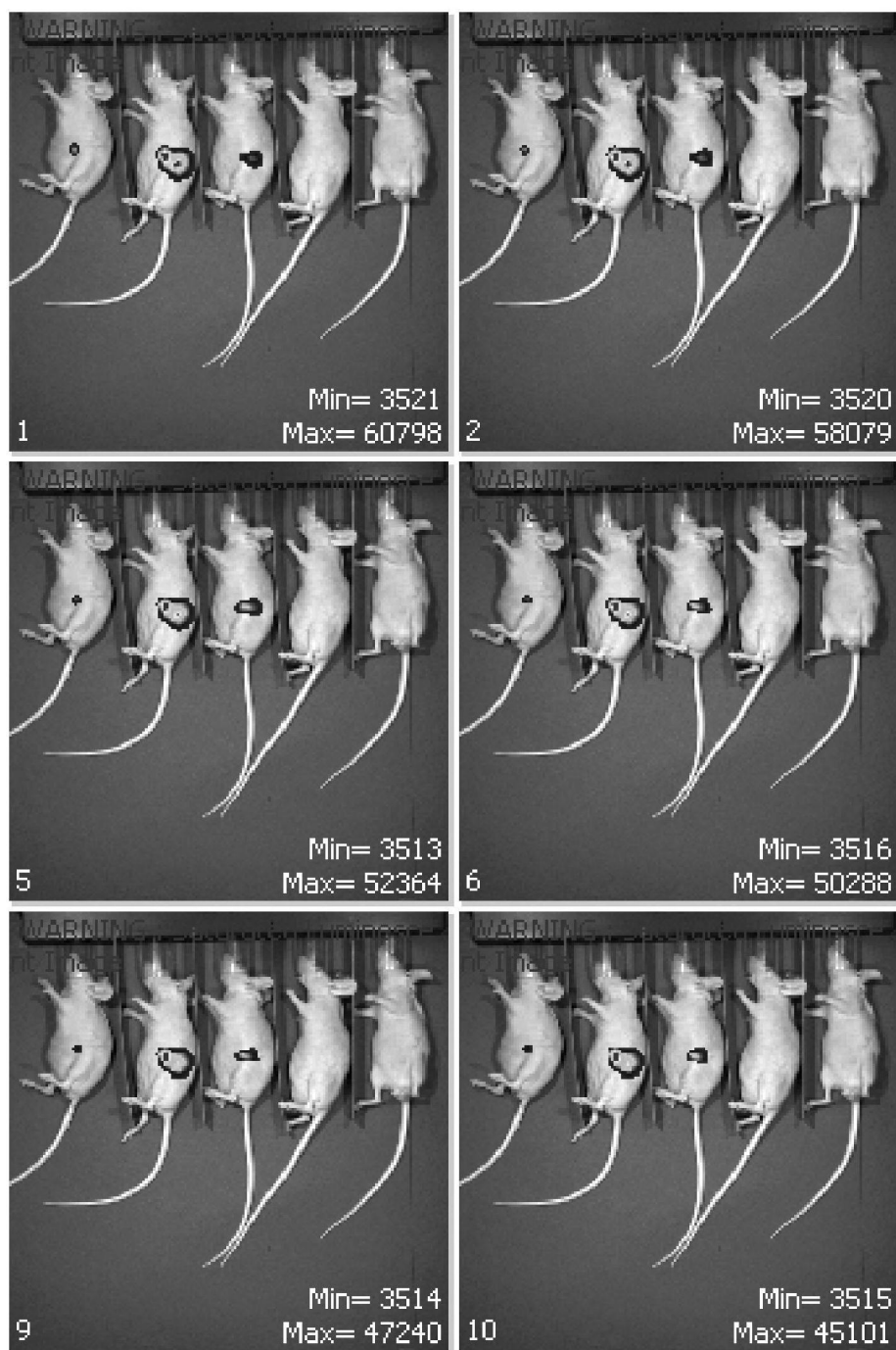


图18

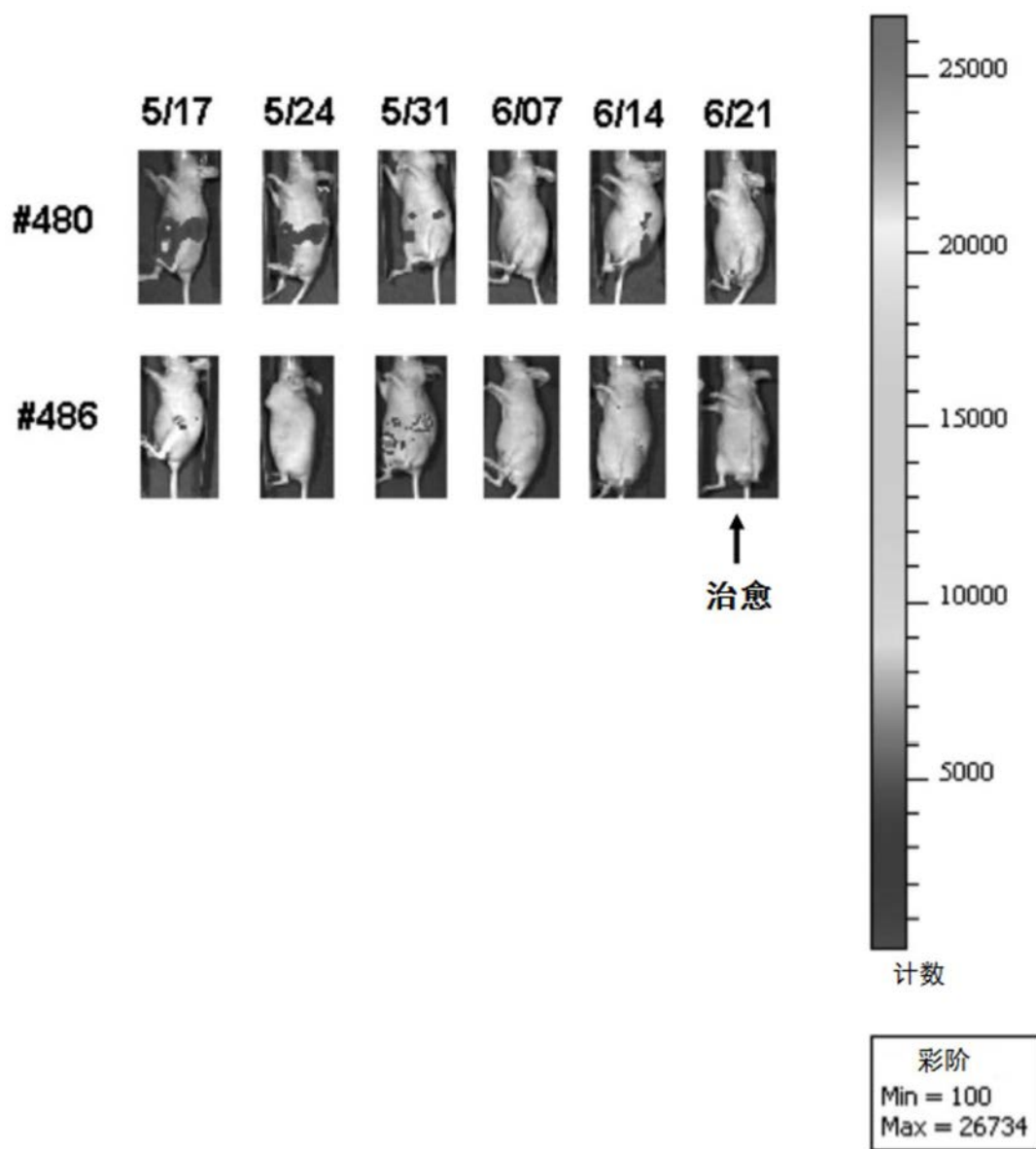


图19

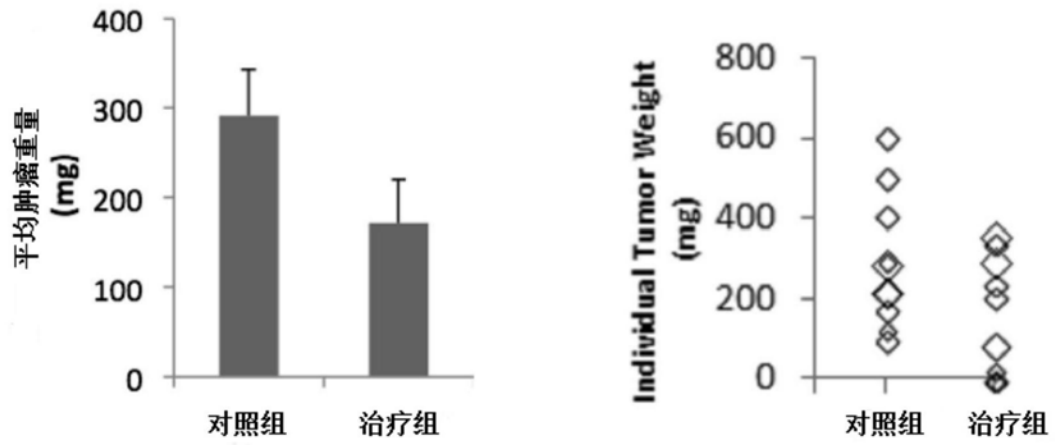


图20A

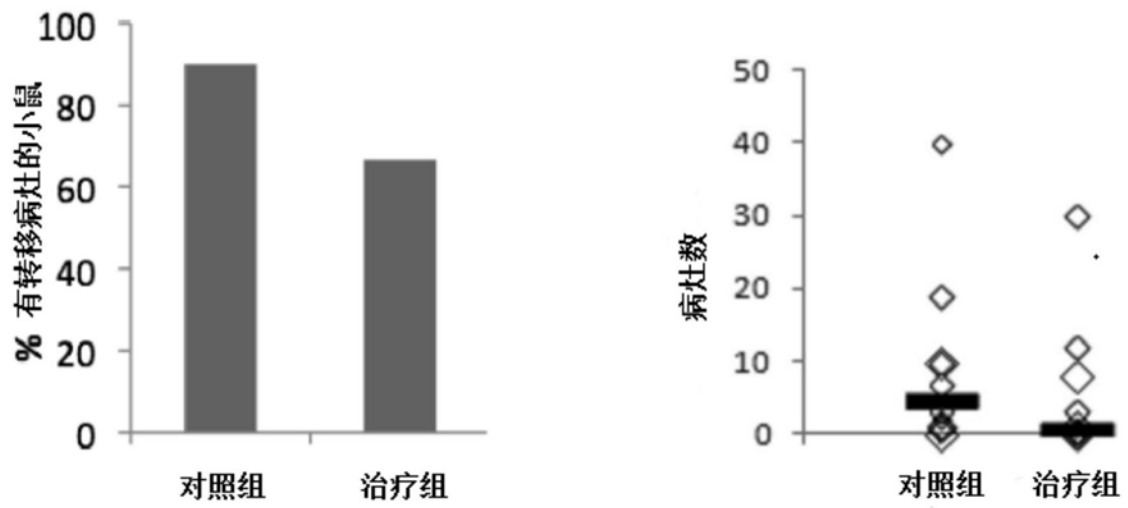


图20B

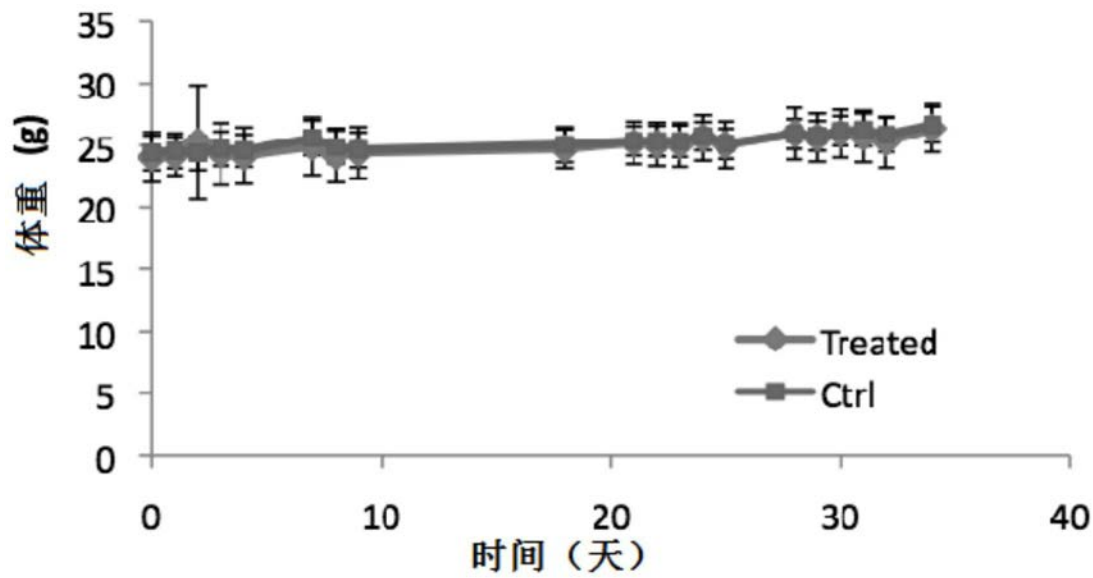


图21

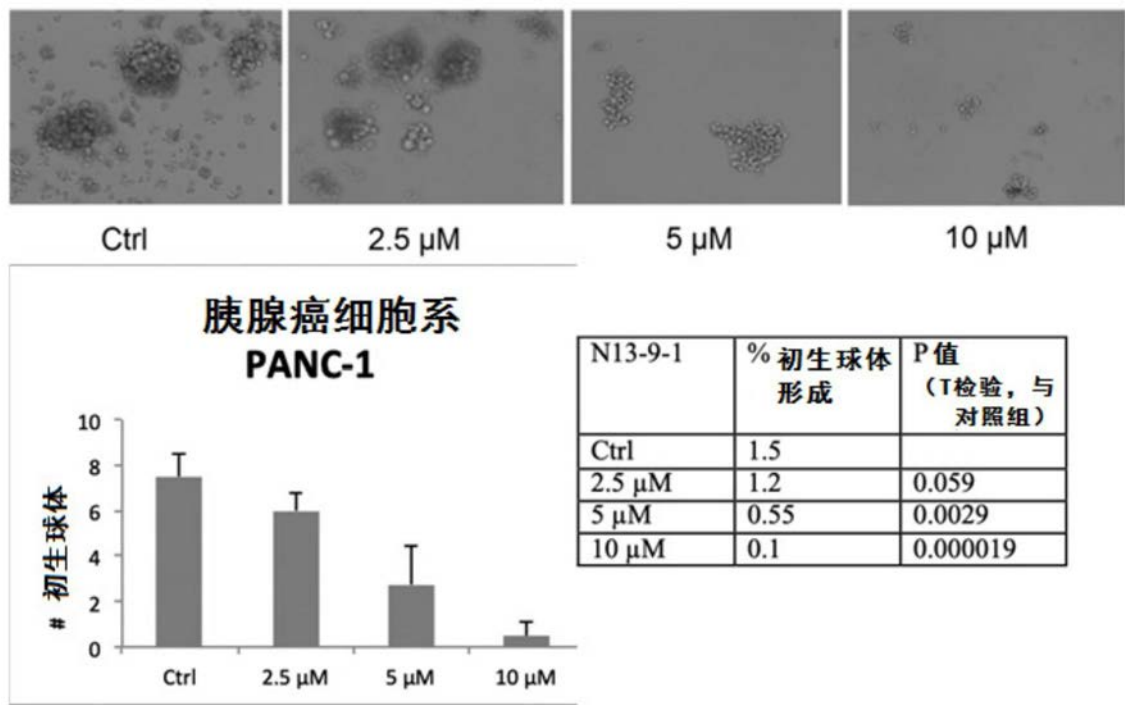


图22



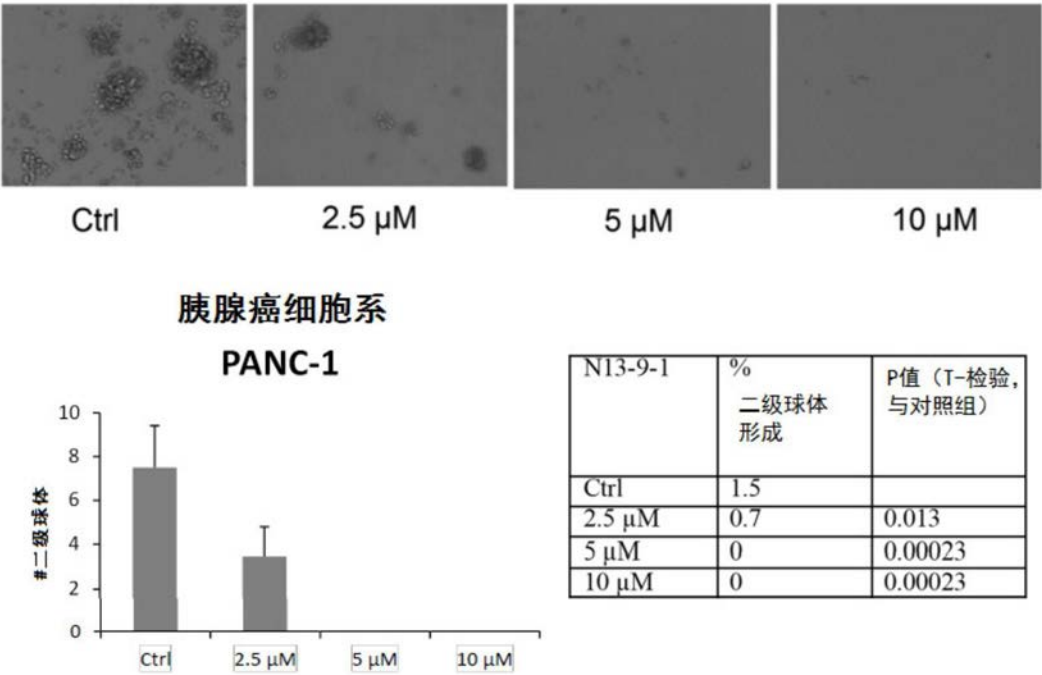


图23

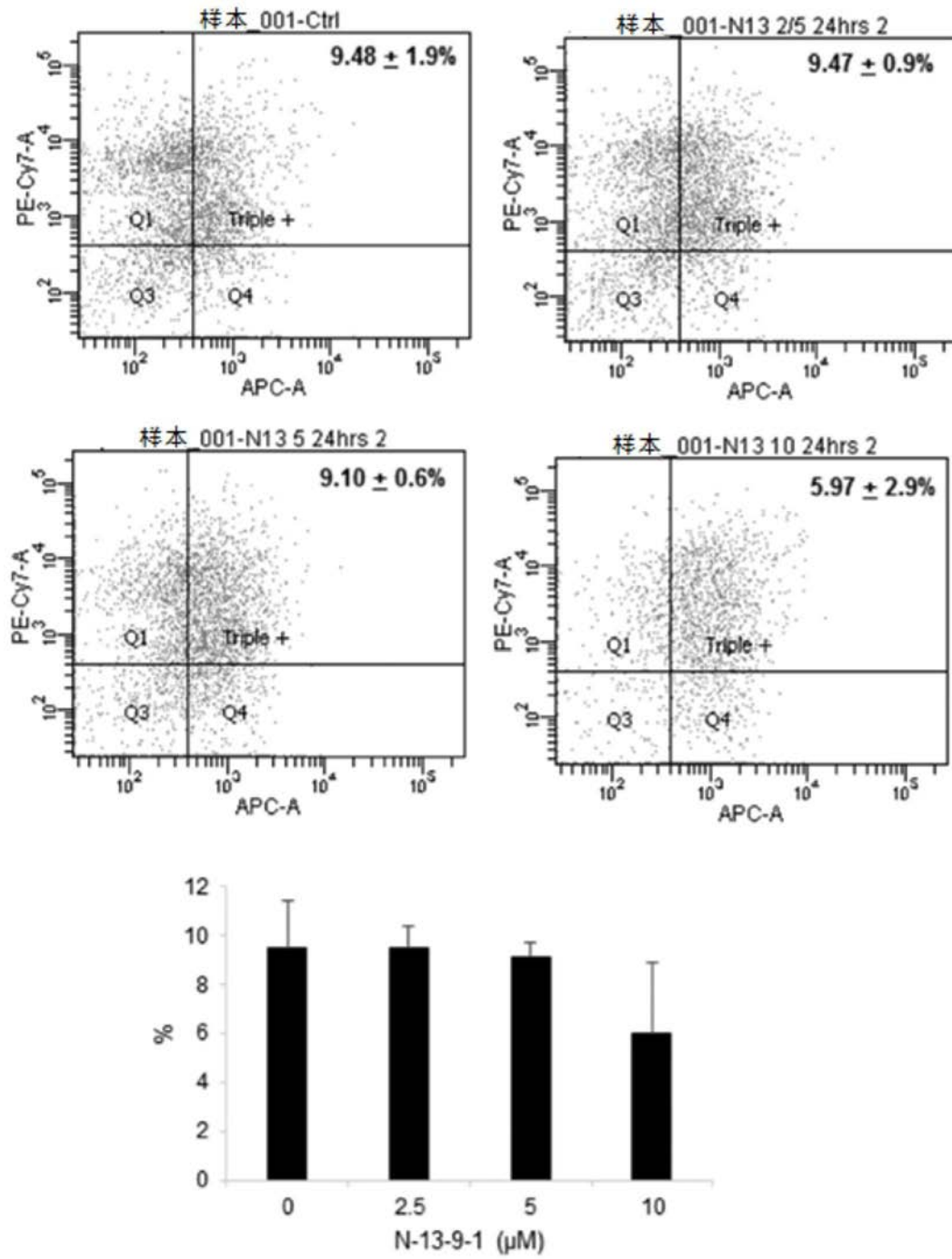


图24

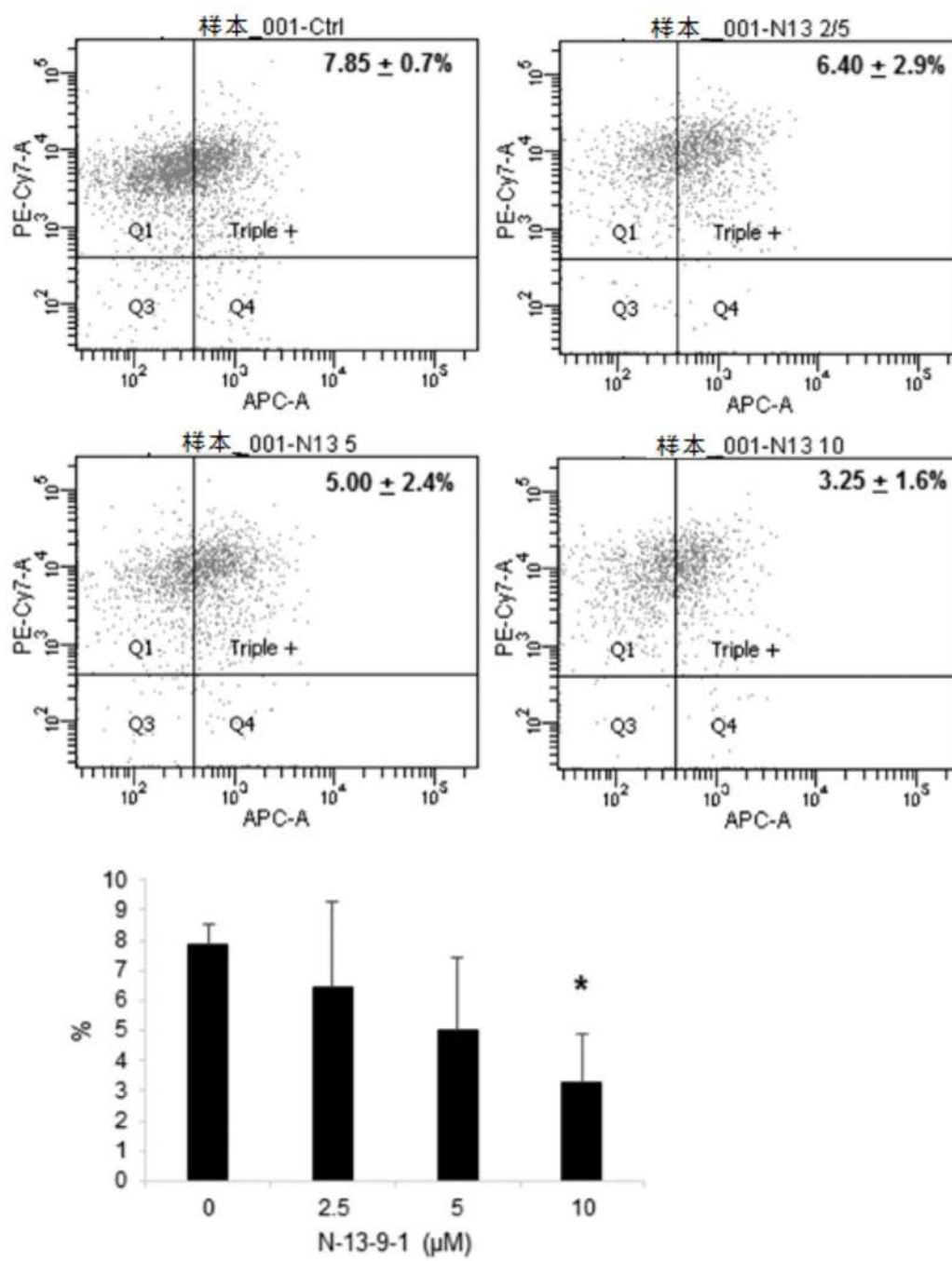


图25

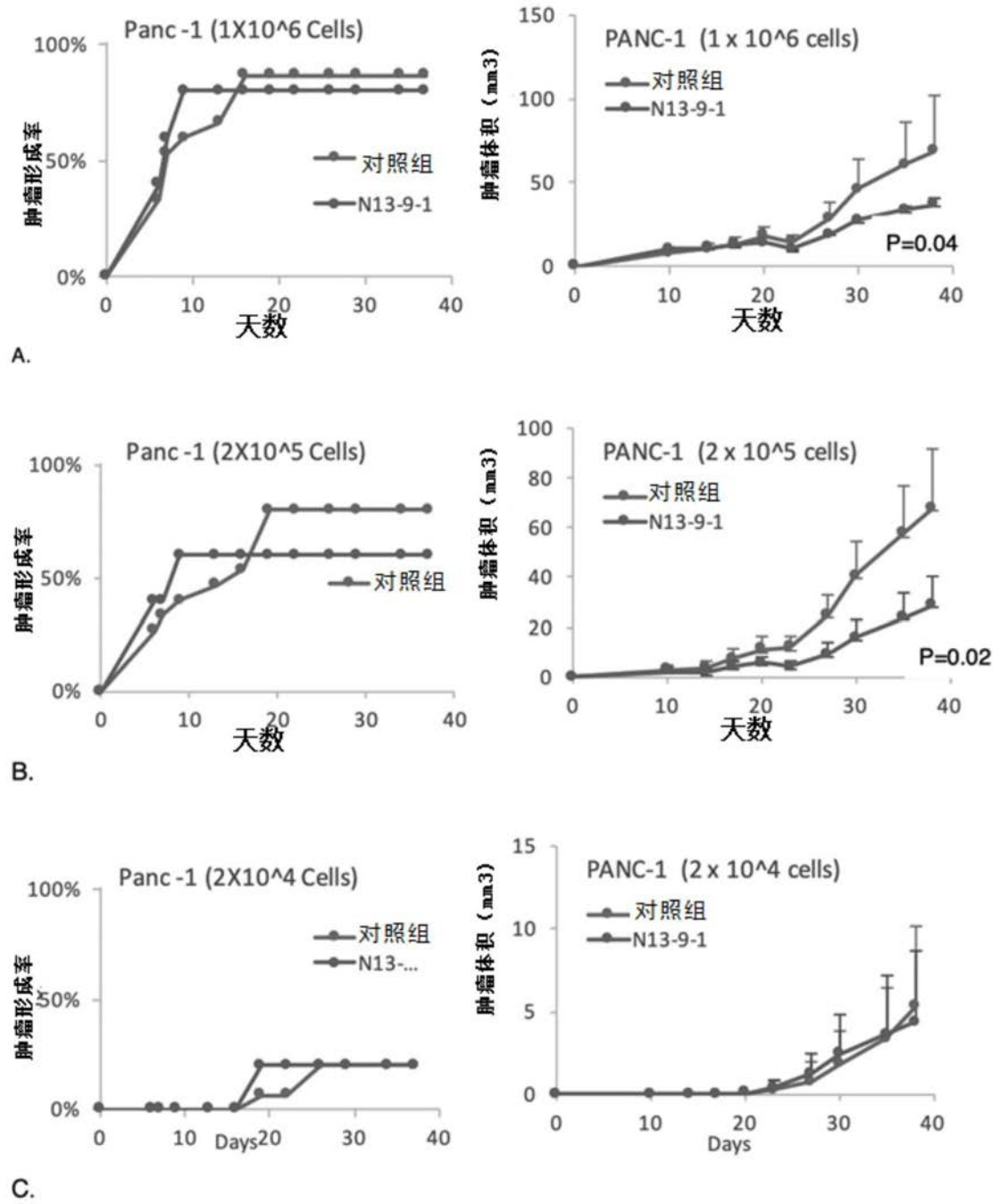


图26

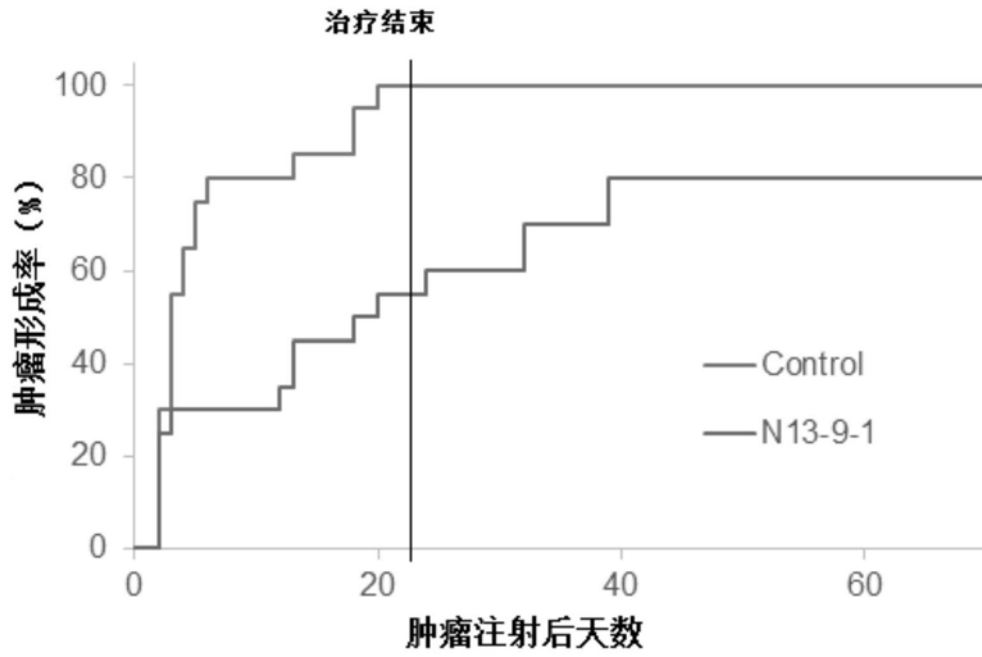


图27



图28

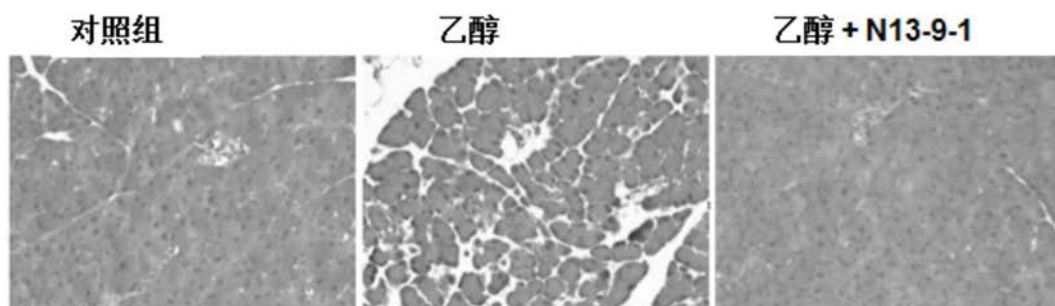
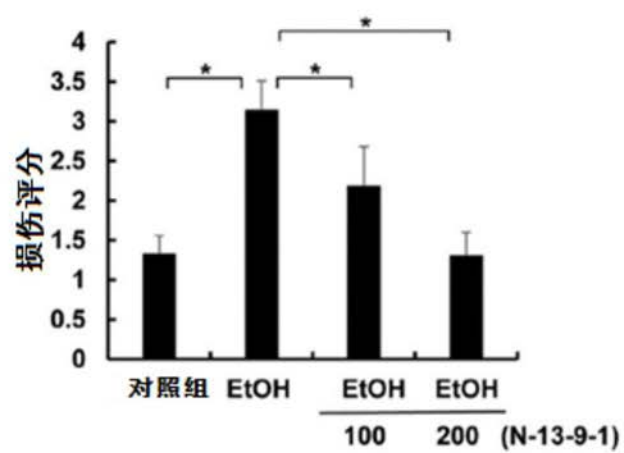
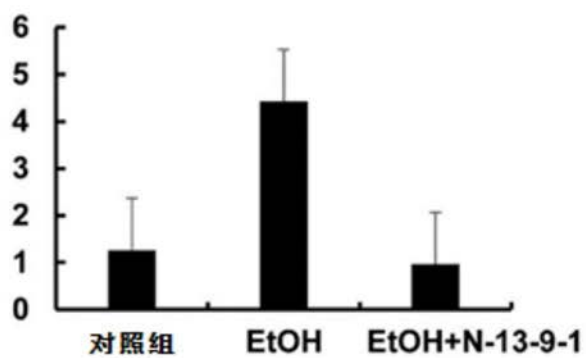
**A 组织保护:组织学****B 损伤评分****C 抗炎**

图29

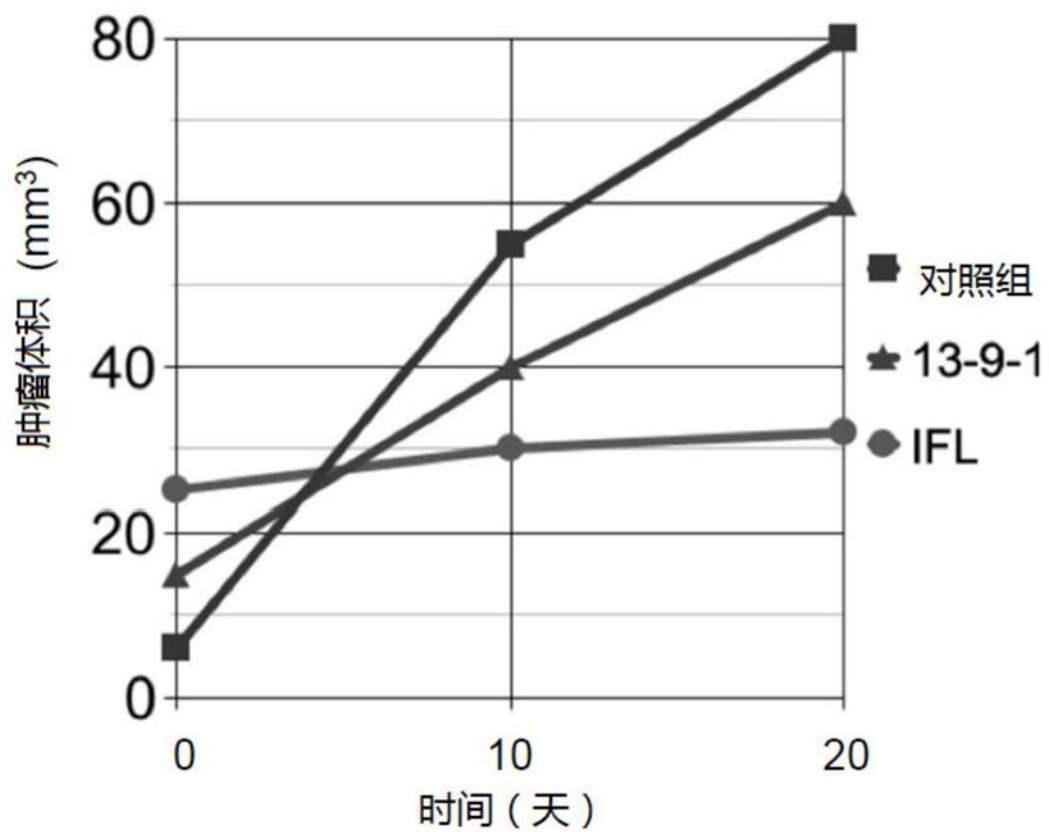


图30

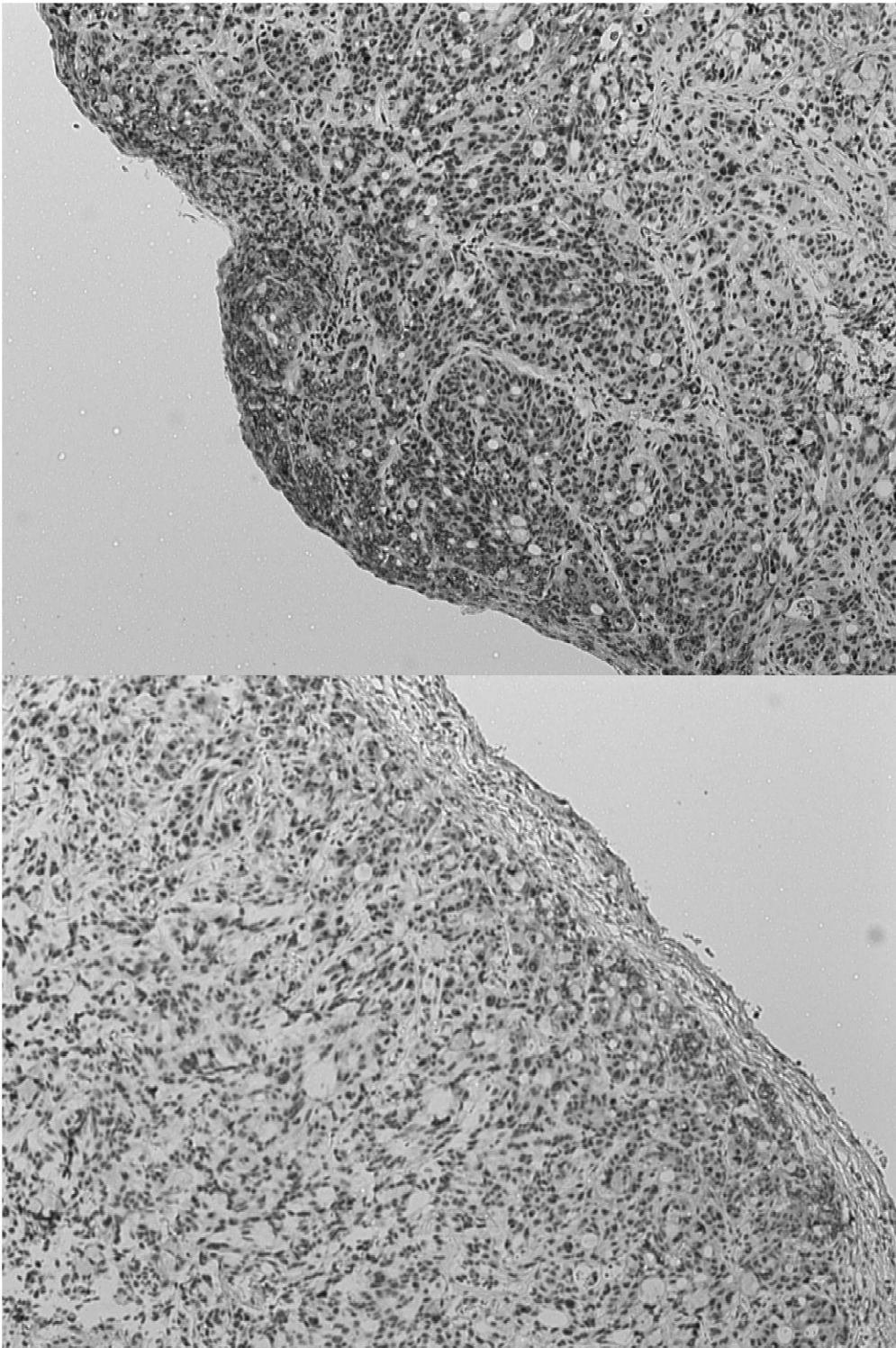


图31



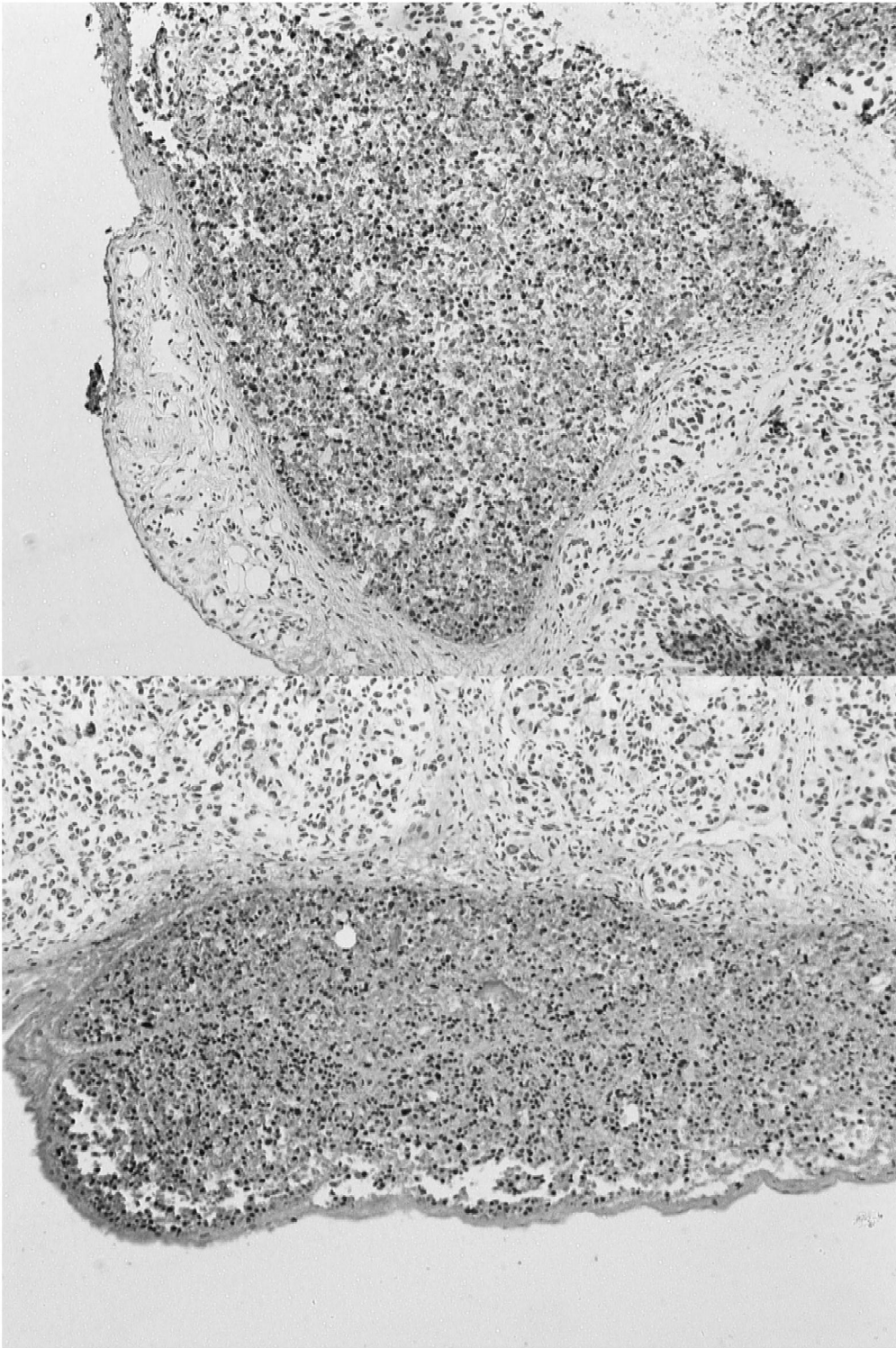


图32

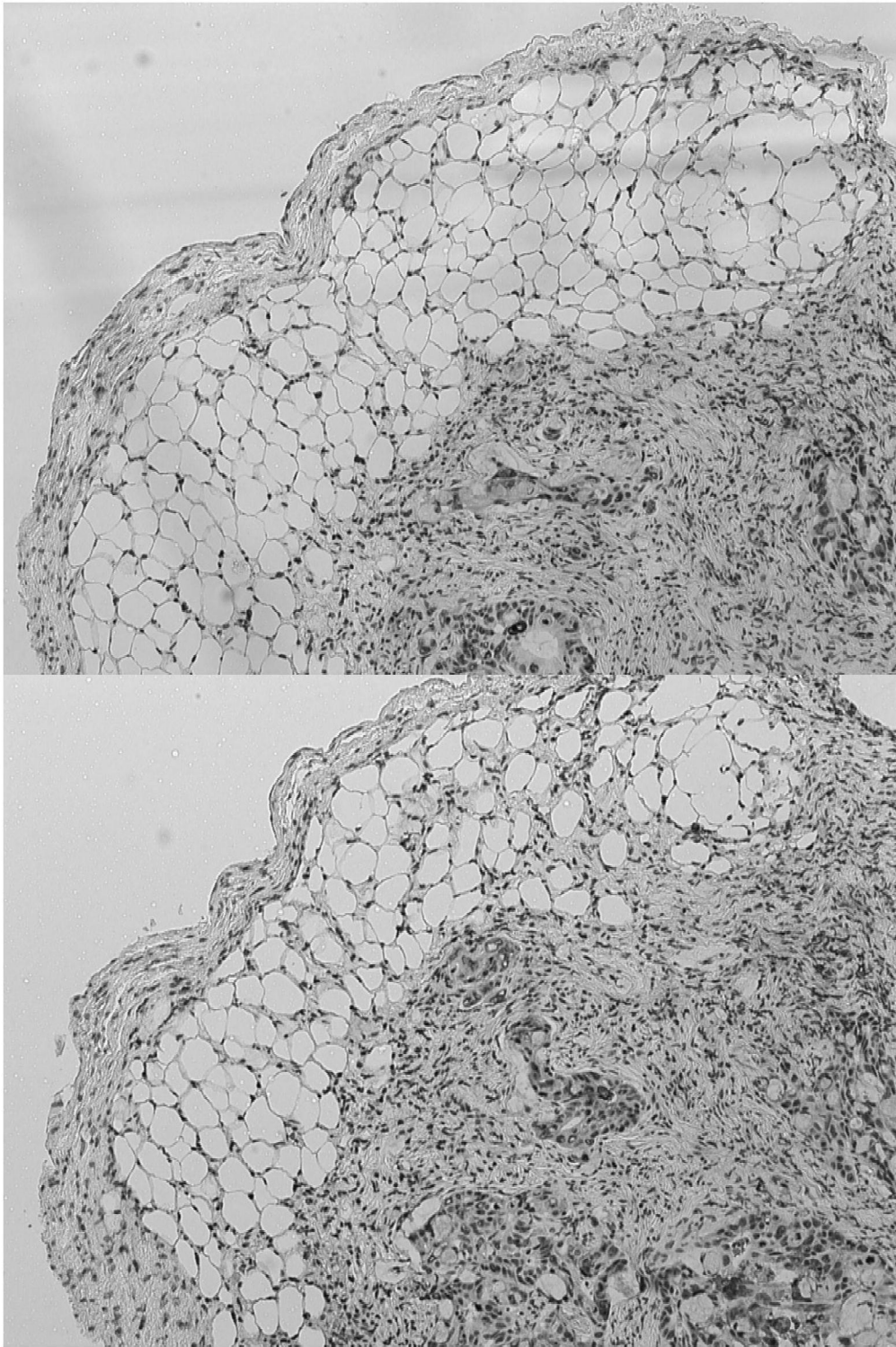


图33