



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112672741 A

(43) 申请公布日 2021.04.16

(21) 申请号 201980038420.X

(22) 申请日 2019.06.19

(30) 优先权数据

2018902181 2018.06.19 AU

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.12.09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2019/055130 2019.06.19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/244050 EN 2019.12.26

(71) 申请人 阿玛切蒂卡有限公司

地址 美国德克萨斯州

(72) 发明人 雷纳托·阿奎莱拉

(74) 专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事务  
所(普通合伙) 11201

代理人 张润

(51) Int.Cl.

A61K 31/395 (2006.01)

A61K 31/40 (2006.01)

A61K 31/44 (2006.01)

A61K 31/4427 (2006.01)

A61K 31/4706 (2006.01)

A61K 31/4709 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 31/02 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

权利要求书3页 说明书24页 附图10页

(54) 发明名称

用于治疗癌症的双功能组合物

(57) 摘要

本发明涉及双功能组合物在癌症治疗或预防方法中的应用该组合物包含用于治疗或预防癌症的DNA配体和蛋白质配体,其中该DNA配体干扰DNA代谢,该蛋白质配体干扰信号通路。特别地,本发明涉及咯萘啶在癌症治疗或预防方法中的应用。本发明还涉及包含DNA配体和蛋白质配体的组合物、化合物和药剂,例如包含咯萘啶的组合物、化合物和药剂。

1. 一种通过诱导增殖癌细胞凋亡来治疗或预防哺乳动物体内癌症的方法,所述方法包括向所述哺乳动物给服含治疗有效量的咯萘啶 (PND) 或其衍生物或药学上可接受的盐的组合物的步骤。

2. 一种诱导哺乳动物体内肿瘤中的增殖癌细胞凋亡的方法,所述方法包括向所述哺乳动物给服含治疗有效量的咯萘啶 (PND) 或其衍生物或药学上可接受的盐的组合物的步骤。

3. 一种诱导哺乳动物体内肿瘤中的癌细胞死亡的方法,所述方法包括向所述哺乳动物给服含治疗有效量的咯萘啶 (PND) 或其衍生物或药学上可接受的盐的组合物的步骤。

4. 一种通过诱导癌细胞死亡来治疗或预防哺乳动物体内癌症的方法,所述方法包括向所述哺乳动物给服含治疗有效量的咯萘啶 (PND) 或其衍生物或药学上可接受的盐的组合物的步骤。

5. 一种减小哺乳动物体内肿瘤的尺寸的方法,所述方法包括向所述哺乳动物给服含治疗有效量的咯萘啶 (PND) 或其衍生物或药学上可接受的盐的组合物的步骤,其中所述给服通过诱导肿瘤中的增殖癌细胞凋亡来减小肿瘤的尺寸。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述癌症或肿瘤系由下列各项所组成的群组中选出的癌:胰腺癌、膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、间皮瘤、肾癌、肝癌、肺癌(包括小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、头颈癌、食道癌、胆囊癌、卵巢癌、胃癌、宫颈癌、甲状腺癌、前列腺癌和皮肤癌,或系由下列各项所组成的群组中选出的肉瘤肉瘤:纤维肉瘤、横纹肌肉瘤、软骨肉瘤、平滑肌肉瘤、间皮肉瘤、血管肉瘤和脂肪肉瘤,或系由下列各项所组成的群组中选出的中枢和周围神经系统肿瘤:星形细胞瘤、神经母细胞瘤、神经胶质瘤和神经鞘瘤,或系由下列各项所组成的群组中选出的其他肿瘤:黑色素瘤、精原细胞瘤、畸胎瘤、骨肉瘤、着色性干皮病、角化棘皮瘤、滤泡状甲状腺癌和卡波西氏肉瘤,或系由下列各项所组成的群组中选出的非实体瘤(血癌):B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、毛细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、骨髓瘤、伯克特淋巴瘤、胃结外淋巴瘤、乳腺肿瘤或脑瘤、浆细胞骨髓瘤、卡勒氏病、多发性骨髓瘤、骨髓性白血病、粒细胞性白血病、淋巴性白血病、淋巴细胞性白血病和淋巴母细胞性白血病。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述癌症为乳腺癌。

8. 根据权利要求6所述的方法,其中所述癌症为淋巴瘤。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述组合物进一步包含由下列各项所组成的群组中选出的治疗有效量的化疗药物,或与所述治疗有效量的化疗药物联合给药:醋酸阿比特龙、白蛋白结合型(nab)紫杉醇、阿仑单抗、六甲蜜胺、天冬酰胺酶、苯达莫司汀、贝伐单抗、博来霉素、硼替佐米、本妥昔单抗、白消安、卡巴他赛、卡培他滨、卡铂、卡莫司汀、西妥昔单抗、瘤可宁、顺铂、克拉屈滨、克唑替尼、环磷酰胺、阿糖胞苷(Ara-C)、达卡巴嗪、更生霉素、达沙替尼、道诺霉素、DaunoXome(脂质体柔红霉素)、DepoCyt(脂质体阿糖胞苷)、多西他赛、Doxil(脂质体多柔比星)、多柔比星、甲磺酸艾日布林、埃罗替尼、雌莫司汀、依托泊苷、依维莫司、氟尿苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、吉非替尼、吉西他滨、卡莫司汀植入膜剂、羟基脲、替伊莫单抗、伊达比星、异环磷酰胺、伊马替尼、易普利姆玛、伊立替康、伊沙匹隆、拉帕替尼、来那度胺、洛莫司汀、氮芥、美法仑、巯嘌呤、甲氨蝶呤、丝裂霉素、米奥蒽醌、MG132、尼罗替尼、奥沙利铂、紫杉醇、帕尼单抗、帕唑帕尼、聚乙二醇干扰素 $\alpha$ -2b、培美曲塞、喷司他丁、普拉曲沙、甲茆肼、利妥昔单抗、罗米地辛、鲁索利替尼、西普鲁塞-T、索拉非尼、链脲菌

素、舒尼替尼、替莫唑胺、替西罗莫司、替尼泊昔、沙利度胺、硫鸟嘌呤、噻替帕、拓扑替康、托西莫单抗、曲妥珠单抗、戊柔比星、凡德他尼、维莫非尼、长春碱、长春新碱和长春瑞滨,或其组合。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述化疗药物系由下列各项所组成的群组中选出:硼替佐米、顺铂、吉西他滨和MG132。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述化疗药物为顺铂。

12. 根据权利要求10所述的方法,其中所述化疗药物为吉西他滨。

13. 一种治疗或预防癌症的方法,所述方法包括向有此需要的受试者给服含治疗有效量的DNA配体和蛋白质配体的组合物的步骤。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述DNA配体为拓扑异构酶I和/或拓扑异构酶II抑制剂或毒物。

15. 根据权利要求13或14所述的方法,其中所述蛋白质配体抑制由下列各项所组成的群组中选出的蛋白激酶:MEK、Raf、ERK、PI3K、Akt、PDK1、GSK-3、Wee1、Myt1、CHK1、CHK2、ATR、ATM、mTOR、CDK2、PIP5K、RIPK3、RIPK1、TAK1、FADD和PCK,和/或其同工酶。

16. 根据权利要求14所述的方法,其中所述DNA配体为1,5-二氮杂-蒽。

17. 根据权利要求13-16中任一项所述的方法,其中所述蛋白质配体包含一种或多种吡咯烷分子。

18. 根据权利要求13-17中任一项所述的方法,其中所述DNA配体和所述蛋白质配体为单一化合物的组分。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述化合物为咯萘啶。

20. 根据权利要求13-19中任一项所述的方法,其中所述癌症或肿瘤系由下列各项所组成的群组中选出的癌:胰腺癌、膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、间皮瘤、肾癌、肝癌、肺癌(包括小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、头颈癌、食道癌、胆囊癌、卵巢癌、胃癌、宫颈癌、甲状腺癌、前列腺癌和皮肤癌,或系由下列各项所组成的群组中选出的肉瘤肉瘤:纤维肉瘤、横纹肌肉瘤、软骨肉瘤、平滑肌肉瘤、间皮肉瘤、血管肉瘤和脂肪肉瘤,或系由下列各项所组成的群组中选出的中枢和周围神经系统肿瘤:星形细胞瘤、神经母细胞瘤、神经胶质瘤和神经鞘瘤,或系由下列各项所组成的群组中选出的其他肿瘤:黑色素瘤、精原细胞瘤、畸胎瘤、骨肉瘤、着色性干皮病、角化棘皮瘤、滤泡状甲状腺癌和卡波西氏肉瘤,或系由下列各项所组成的群组中选出的非实体瘤(血癌):B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、毛细细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、骨髓瘤、伯克特淋巴瘤、胃结外淋巴瘤、乳腺肿瘤或脑瘤、浆细胞骨髓瘤、卡勒氏病、多发性骨髓瘤、骨髓性白血病、粒细胞性白血病、淋巴性白血病、淋巴细胞性白血病和淋巴母细胞性白血病。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中所述癌症为乳腺癌。

22. 根据权利要求20所述的方法,其中所述癌症为淋巴瘤。

23. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述组合物进一步包含由下列各项所组成的群组中选出的治疗有效量的化疗药物,或与所述治疗有效量的化疗药物联合给药:醋酸阿比特龙、白蛋白结合型(nab)紫杉醇、阿仑单抗、六甲蜜胺、天冬酰胺酶、苯达莫司汀、贝伐单抗、博来霉素、硼替佐米、本妥昔单抗、白消安、卡巴他赛、卡培他滨、卡铂、卡莫司汀、西妥昔单抗、瘤可宁、顺铂、克拉屈滨、克唑替尼、环磷酰胺、阿糖胞苷(Ara-C)、达卡巴

嗪、更生霉素、达沙替尼、道诺霉素、DaunoXome (脂质体柔红霉素)、DepoCyt (脂质体阿糖胞苷)、多西他赛、Doxil (脂质体多柔比星)、多柔比星、甲磺酸艾日布林、埃罗替尼、雌莫司汀、依托泊苷、依维莫司、氟尿苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、吉非替尼、吉西他滨、卡莫司汀植入膜剂、羟基脲、替伊莫单抗、伊达比星、异环磷酰胺、伊马替尼、易普利姆玛、伊立替康、伊沙匹隆、拉帕替尼、来那度胺、洛莫司汀、氮芥、美法仑、硫嘌呤、甲氨蝶呤、丝裂霉素、米奥蒽醌、MG132、尼罗替尼、奥沙利铂、紫杉醇、帕尼单抗、帕唑帕尼、聚乙二醇干扰素 $\alpha$ -2b、培美曲塞、喷司他丁、普拉曲沙、甲苄肼、利妥昔单抗、罗米地辛、鲁索利替尼、西普鲁塞-T、索拉非尼、链脲菌素、舒尼替尼、替莫唑胺、替西罗莫司、替尼泊苷、沙利度胺、硫鸟嘌呤、噻替帕、拓扑替康、托西莫单抗、曲妥珠单抗、戊柔比星、凡德他尼、维莫非尼、长春碱、长春新碱和长春瑞滨,或其组合。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述化疗药物系由下列各项所组成的群组中选出:硼替佐米、顺铂、吉西他滨和MG132。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述化疗药物为顺铂。

26. 根据权利要求24所述的方法,其中所述化疗药物为吉西他滨。

## 用于治疗癌症的双功能组合物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及癌症治疗或预防方法。特别地,本发明考虑了双功能组合物和化合物在癌症治疗或预防中的应用。更具体地,本发明涉及包含DNA配体和蛋白质配体的组合物在癌症治疗或预防中的应用。本发明还涉及包含DNA嵌入剂和蛋白质抑制剂的组合物、化合物和药剂。

### 背景技术

[0002] 在说明书中对现有技术的任何讨论都不应被视为承认该等现有技术是众所周知的或构成本领域公知常识的一部分。

[0003] 癌症的存活率通常与早期诊断频率、癌症的侵袭性、针对癌症的有效抗癌疗法的可用性、正在接受治疗的受试者的总体健康状况和/或是否可通过手术或其他办法去除肿瘤和癌细胞密切相关。

[0004] 所有类型的癌症通常以通过异常分子信号传导的不受控制的细胞分裂为特征,该异常分子信号传导允许细胞避开细胞周期停滞/凋亡。细胞持续增殖通常归因于,或至少部分归因于促成程序性细胞死亡的细胞机制失效。

[0005] 然而,许多癌症的共同之处在于治疗剂无区别的靶向性和治疗剂的毒性限制了抗癌疗法在癌症治疗中的疗效。

[0006] 为避开靶向问题,同时得出具有广泛适用性的疗法,靶向与癌症相关的细胞增殖中显著增加的细胞进程,例如细胞分裂期间所需的DNA转录和复制,可能是有用的。该等疗法的作用模式通常与随后发生的启动细胞凋亡途径而导致细胞死亡的DNA损伤有关。增殖癌细胞的选择性凋亡是有效治疗癌症的关键。

[0007] 结合DNA的分子可通过阻断DNA与例如转录因子、聚合酶、连接酶、核酸酶、拓扑异构酶和解旋酶等之间的相互作用来干扰DNA合成。特别地,插入DNA链碱基对之间的DNA配体在干扰转录和复制期间与DNA相关联并沿其长度移动的细胞机制和复合物方面特别有效。

然而,虽然该等DNA配体可以靶向癌细胞,但是它们也可以影响经历正常细胞分裂的细胞,并且影响非分裂细胞中的表达,导致广泛的潜在副作用。

[0008] 此外,DNA配体的作用可能还不够,因为尽管干扰DNA合成以触发细胞凋亡具有潜在治疗作用,但癌细胞逃避细胞死亡的能力可能会抵消对癌细胞造成DNA损伤而产生的治疗益处。

[0009] 因此,将DNA配体的活性与阻碍信号级联的手段相结合将是有利的,信号级联可加快肿瘤进展,并促进细胞逃避死亡和通常可能由例如DNA损伤应答触发的免疫应答。

[0010] 参与逃避细胞死亡和促进肿瘤的一类分子是蛋白激酶,其中许多是具有大量底物的多产混杂激酶。不幸的是,抑制参与多种途径的蛋白激酶通常会产生严重的副作用,这种副作用可能会阻碍药物的成功开发和商业化。

[0011] 加快新疗法药物开发进程的一个策略是针对新的适应症再利用(或重新定位)现有已获许可的药物。再利用实际上是在利用现有知识和安全性数据的同时,将用于特定适

应症的药物重新用于新用途。近期有望成功的再利用药物治疗和预防癌症的例子包括使用抗寄生虫和抗精神病药物。还进行了一些抗疟疾药物的体外研究,研究显示,这些药物可有效对抗耐药性疟疾菌株,被再利用与化疗药物联合给药,以通过对抗或逆转对化疗药物的耐药性来增强疗效。当然,尽管就安全性数据而言,再利用可能允许考察药物开发的某些方面,但这并不表示无需通过体内研究和人体试验证明再利用的药物实际上对新应用有效,因为体外数据通常不能代表体内结果。

[0012] 例如,在US20110300137中描述了抗疟疾药物苯芴醇与化疗药物的联合使用,其中苯芴醇通过抑制自噬来强化癌症治疗。自噬是癌症干细胞对抗化疗药物的一种已知机制,其允许细胞保持静止状态,但是一旦化疗药物从体内消除,细胞就会再次增殖。在这种静止状态下,癌细胞免受化疗药物的影响,而化疗药物通常靶向增殖细胞,从而促成癌症对化疗药物的耐药性。通过抑制自噬,癌细胞无法避开化疗药物,其耐药性减弱,但治疗癌症的仍然是化疗药物的活性。然而,尽管US20110300137中的体外研究显示苯芴醇具有抗自噬活性,但是无论是苯芴醇还是所列举的众多抗疟疾药物中的任何一种(其中一些药物,如咯萘啶,与声称具有相同活性的群组中的其他成员具有非常小的结构相似性)都没有表现出或显示出任何能够单独有效治疗或预防癌症分裂细胞的抗增殖活性或促凋亡活性,也没有任何体内研究来验证该等发现。

[0013] 在另一实施例中,CN1135977C描述了另一种抗疟疾药物咯萘啶在制备用于治疗多药耐药性肿瘤的联合抗肿瘤药物中的应用。同样,该公开涉及与阿霉素(ADR:多柔比星)联合或预先给服咯萘啶改善对ADR具有特异性耐药性的多药耐药性细胞系,以增强ADR的细胞毒性作用。尽管体外研究中显示,在存在咯萘啶的情况下,通过ADR诱导的MDR细胞系凋亡可以得到增强,但未证明或显示PND可以单独在增殖细胞中诱导细胞凋亡,且咯萘啶的任何声称活性在实际肿瘤中均不可转移或复制。因此,CN1135977C中要求保护的发明仅涉及咯萘啶与抗肿瘤药物联合用于体外耐药性肿瘤中MDR的逆转。

[0014] 能够将一种同时具有DNA和蛋白质结合活性的已知药(例如具有长期耐受使用历史的抗疟药物)再利用于新型治疗应用以加快癌症治疗的药物开发进展将是非常有用的。

[0015] 本发明的目的是克服或改善现有技术的至少一个缺点,或提供一种有用的替代方案。

## 发明内容

[0016] 令人惊讶的是,研究发现含DNA配体和蛋白质配体的分子有助于治疗和预防癌症。特别地,本发明人发现,含DNA配体和蛋白质配体的抗疟疾药物咯萘啶具有先前未知的针对活跃分裂癌细胞的抗增殖活性,其中该活性是选择性的,从而使副作用最小。本发明人率先在体内研究中证明咯萘啶具有选择性细胞毒性,并且可用于治疗和/或预防癌症,而不仅仅是增强化疗药物对MDR永生化癌细胞系的作用。

[0017] 因此,根据本发明的第一方面,提供了一种通过诱导增殖癌细胞凋亡来治疗或预防哺乳动物体内癌症的方法,该方法包括向所述哺乳动物给服含治疗有效量的咯萘啶(PND)或其衍生物或药学上可接受的盐的组合物的步骤。

[0018] 根据本发明的第二方面,提供了一种诱导哺乳动物体内肿瘤中的增殖癌细胞凋亡的方法,该方法包括向所述哺乳动物给服含治疗有效量的咯萘啶(PND)或其衍生物或药学

上可接受的盐的组合物的步骤。

[0019] 根据本发明的第三方面,提供了一种诱导哺乳动物体内肿瘤中的癌细胞死亡的方法,该方法包括向所述哺乳动物给服含治疗有效量的咯萘啶(PND)或其衍生物或药学上可接受的盐的组合物的步骤。

[0020] 根据本发明的第四方面,提供了一种通过诱导癌细胞死亡治疗或预防哺乳动物体内癌症的方法,该方法包括向所述哺乳动物给服含治疗有效量的咯萘啶(PND)或其衍生物或药学上可接受的盐的组合物的步骤。

[0021] 根据本发明的第五方面,提供了一种减小哺乳动物体内肿瘤的尺寸的方法,该方法包括向所述哺乳动物给服含治疗有效量的咯萘啶(PND)或其衍生物或药学上可接受的盐的组合物的步骤,其中该给服通过诱导肿瘤中的增殖癌细胞凋亡来减小肿瘤的尺寸。

[0022] 根据本发明的第六方面,提供了一种治疗或预防癌症的方法,该方法包括向有此需要的受试者给服含DNA配体和蛋白质配体的组合物的步骤。

[0023] 该DNA配体可以是任何能与DNA结合并干扰DNA代谢的分子。DNA代谢是指维持DNA或使用DNA的任何细胞进程,包括例如DNA复制和修复以及转录中涉及的DNA合成和降解反应。复制是指复制DNA序列的任何过程。配体可以通过静电相互作用、特异性沟槽结合相互作用和/或碱基对之间的插入非特异性地结合DNA。在优选实施例中,该DNA配体为DNA嵌入剂。该DNA嵌入剂可通过DNA大沟或DNA小沟嵌入碱基对和/或通过螺旋嵌入来发挥作用。

[0024] 该DNA配体可包含平面环系统,该系统通过允许在DNA双链中的两个相邻碱基对之间插入来促进DNA嵌入,从而扭曲DNA双螺旋和/或通过干扰DNA解旋、延伸和/或连接来阻碍DNA复制和/或转录。干扰增殖细胞(例如癌细胞)中的DNA合成可减缓或停止DNA复制和细胞增殖,干扰细胞周期,降低细胞活力和/或导致细胞死亡。

[0025] 在特定情况下,DNA嵌入剂可通过抑制拓扑异构酶活性来启动细胞凋亡途径。这些DNA嵌入剂可分为拓扑异构酶抑制剂或拓扑异构酶毒物,并可靶向拓扑异构酶I和/或拓扑异构酶II。这些DNA嵌入剂也可与拓扑异构酶蛋白结合。优选地,该等DNA嵌入剂还能够结合并抑制拓扑异构酶II的活性。不希望受理论束缚,申请人提出通过在正在经历DNA合成的增殖细胞中与DNA和拓扑异构酶II形成复合物,使DNA和拓扑异构酶II被捕获在“可剪切复合物”中。这防止最初被拓扑异构酶剪切以促进解旋的双链DNA重新连接。随后内源性DNA链断裂,触发DNA损伤应答,导致细胞凋亡。这种作用模式可以通过稳定双链断裂和/或防止两条DNA链重新退火的DNA嵌入剂来促进或促成。

[0026] 在该DNA配体为DNA嵌入剂的情况下,本发明提供的组合物的蛋白质配体也可以通过与DNA和/或拓扑异构酶相互作用来促进细胞凋亡途径的启动。

[0027] 该DNA嵌入剂的平面环系统可以包含两个或更多稠环。优选地,该等稠环为芳环。该等稠环可以是任何5或6元芳族化合物,并且它们可以是取代环和/或杂环。取代芳环是指环上的氢原子被另一个原子或基团取代的环。杂环芳族化合物是指其中环结构包含碳和至少一个其他原子(例如氮、氧和/或硫原子)的化合物。例如,该DNA嵌入剂可以包含苯环和/或6元杂环化合物,例如吡啶、嘧啶、吡嗪、磷杂苯、二嗪和/或噻嗪。在其他实施例中,该DNA嵌入剂可以包含5元杂环化合物,例如吡咯、咪唑、呋喃、噻唑和/或噻吩。

[0028] 在优选实施例中,该平面环系统包含至少一个吡啶环,但该环系统可以包含2个或多个吡啶环。该平面环系统可以包含三个稠合芳环。该等三个稠环可以是5或6元环。在一

个实施例中,该平面环系统包含三个稠合6元芳环,其中至少一个、优选两个芳环是杂环。每个环可以是苯,在这种情况下,该平面环系统可以称为蒽。一个或多个苯环可以被卤化、硝化、磺化、烷基化、酰化和/或其空间上允许的组合取代。该DNA嵌入剂可以是蒽的杂环衍生物,其中至少一个环具有包含碳和至少氮的环结构。具有包含碳和一个、两个以及三个氮的环结构的蒽的衍生物可分别称为单氮杂蒽、二氮杂蒽和三氮杂蒽。

[0029] 可以形成该DNA嵌入剂的一部分的蒽/蒽基团的非限制性实例包括1-单氮杂蒽、2-单氮杂蒽、5-单氮杂蒽、1,2-二氮杂蒽、1,3-二氮杂蒽、1,4-二氮杂蒽、1,5-二氮杂蒽、1,6-二氮杂蒽、1,7-二氮杂蒽、1,8-二氮杂蒽、1,9-二氮杂蒽、1,10-二氮杂蒽、2,3-二氮杂蒽、2,5-二氮杂蒽、2,7-二氮杂蒽、2,8-二氮杂蒽以及5,10-二氮杂蒽。在本发明的优选实施例中,该DNA嵌入剂的平面环系统为1,5-二氮杂蒽(又名苯并(b)-1,5-甲状旁腺素)或其衍生物。

[0030] 在本发明的优选实施例中,该DNA嵌入剂的平面环系统为蒽、二氮杂蒽,或更优选地为具有一个或多个由下列各项所组成的群组中选出的取代基的1,5-二氮杂蒽: $-O^{(-)}$ 、 $-OH$ 、 $-OR$ 、 $-OC_6H_5$ 、 $-OCOCH_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NR_2$ 、 $-NHC_6H_5$ 、 $-R$ 、 $-C_6H_5$ 、 $-NO_2$ 、 $-NR^{(+)}$ 、 $-PR^{(+)}$ 、 $-SR^{(+)}$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_2R$ 、 $-CO_2H$ 、 $-CO_2R$ 、 $-CONH_2$ 、 $-CHO$ 、 $-COR$ 、 $-CN$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH=CHNO_2$ , 其中R为任意烷基。

[0031] 该蛋白质配体可以是结合并干扰蛋白质的活性的任何分子,并且可以阻碍涉及所述蛋白质的任何信号通路。应当理解,细胞内和细胞间的通信是通过信号通路(也称为信号转导)的信号传输来实现的。在本发明的优选实施例中,该蛋白质配体结合一种蛋白质,这种蛋白质参与导致或增强/允许癌症进展的信号通路。该信号通路可以是导致与癌症相关的任何表型的任何通路,包括但不限于细胞增殖、细胞逃避凋亡和/或坏死、细胞逃避免疫应答、整合和传播DNA损伤、增强细胞运动和促进细胞代谢。通过阻碍导致与癌症相关的表型的信号通路,该蛋白质配体可以通过减少、最小化、逆转、预防、阻滞或消融与癌症相关的表型或表型的任何效应来帮助治疗或预防癌症。

[0032] 该蛋白质配体可以通过结合蛋白质并阻止该蛋白质的翻译后修饰来阻碍信号通路,所述翻译后修饰包括例如特异性剪切反应、形成二硫键、通过例如乙酰化、酰胺化、生物素化、半胱氨酸化、脱酰胺化、甲酰化、谷胱甘肽化、糖化、糖基化、羟基化、甲基化、氧化、棕榈酰化或磷酸化和/或与其他类型的分子偶联来加成低分子量基团。在其他实施例中,信号通路可能被结合蛋白质并阻止任何前述翻译后修饰过程中加成的低分子量基团被脱去的蛋白质配体阻碍。

[0033] 本领域技术人员应当理解信号转导最常见的细胞机制之一是激酶的蛋白磷酸化和磷酸酶的蛋白脱磷酸化。因此,在本发明的优选实施例中,该蛋白质配体通过干扰信号通路中蛋白质的磷酸化状态来阻碍导致或增强/允许癌症进展的信号通路。“干扰”是指(a)该蛋白质配体可以结合信号通路中的蛋白质,并阻止或允许该蛋白质磷酸化或脱磷酸化;或(b)该蛋白质配体可以结合信号通路中的蛋白质并阻止或允许该蛋白质使信号通路中的其他底物磷酸化或脱磷酸化。

[0034] 癌症的一个特别普遍的特征是蛋白激酶的活性增加、过表达或负调控丧失,这可以被统称为蛋白激酶上调。在本发明的优选实施例中,该蛋白质配体结合蛋白激酶,并且更优选地,该蛋白质配体结合参与导致或增强/允许癌症进展的信号通路的蛋白激酶。该蛋白质配体可以结合该蛋白激酶,并阻止、干扰或降低该蛋白激酶使信号通路中涉及的靶标磷

酸化的能力。该蛋白激酶的作用可以通过暂时、可逆、永久或为响应特定刺激而结合该蛋白质配体来予以阻止、干扰或降低。该蛋白激酶的作用可以通过结合该蛋白质配体来予以阻止、干扰或降低,例如,通过该蛋白质配体诱导该蛋白激酶的构象变化、通过该蛋白质配体占据该蛋白激酶上的结合位点、通过该蛋白质配体阻断通常会触发磷酸化事件的其他受体位点和/或通过该蛋白质配体对该激酶的活性产生空间位阻。因此,该蛋白质配体可以被称为蛋白激酶抑制剂。

[0035] 该蛋白质配体可以结合并抑制在导致或增强/允许癌症进展的信号通路中上调的任何蛋白激酶。在本发明的某些实施例中,该蛋白激酶为参与MAP(丝裂原活化蛋白)激酶途径(也称为Ras/MAPK途径,或Ras/Raf/MAPK途径,或MAP/Erk途径,或Ras/Raf/Mek/Erk途径)的激酶,其参与细胞增殖、细胞存活和细胞转移。特别地,该蛋白质配体可以结合并抑制MEK(MAPK/Erk激酶),可以结合并抑制Raf激酶,或可以结合并抑制Erk(细胞外受体激酶)或其同工酶。

[0036] 在其他实施例中,该蛋白质配体与PI3K/Akt(磷酸肌醇3-激酶/蛋白激酶B)激酶途径中的蛋白激酶结合,该途径是参与细胞增殖、代谢、细胞存活和DNA损伤应答的许多单独途径的组合。特别地,该蛋白质配体可以结合并抑制PI3K、Akt、PDK1、GSK-3、Wee1、Myt1、CHK1、CHK2、ATR、ATM、mTOR、CDK2或PIP5K,或其同工酶。

[0037] 在另一个实施例中,该蛋白质配体与RIPK3/RIPK1(受体相互作用丝氨酸/苏氨酸激酶3/1;又称RIP1和/或RIP3激酶途径)激酶途径中的蛋白激酶结合,该激酶途径参与细胞凋亡和坏死性凋亡。特别地,该蛋白质配体可以结合并抑制RIPK3、RIPK1、TAK1或FADD,或其同工酶。在其他实施例中,该蛋白质配体结合并抑制参与细胞增殖、运动和存活的PKC(蛋白激酶C)或其同工酶。

[0038] 在本发明的实施例中,该蛋白质配体为蛋白激酶抑制剂,其中该蛋白激酶系由下列各项所组成的群组中选出:MEK、Raf、ERK、PI3K、Akt、PDK1、GSK-3、Wee1、Myt1、CHK1、CHK2、ATR、ATM、mTOR、CDK2、PIP5K、RIPK3、RIPK1、TAK1、FADD和PCK,和/或其同工酶。

[0039] 该蛋白质配体可以结合一种以上蛋白激酶。因此,在本发明的实施例中,该蛋白质配体结合并抑制一种或多种由下列各项所组成的群组中选出的蛋白激酶:MEK、Raf、ERK、PI3K、Akt、PDK1、GSK-3、Wee1、Myt1、CHK1、CHK2、ATR、ATM、mTOR、CDK2、PIP5K、RIPK3、RIPK1、TAK1、FADD和PCK,和/或其同工酶。

[0040] 在本发明的实施例中,该蛋白质配体结合名为糖原合成酶激酶-3(GSK-3)的激酶,可被称为GSK-3配体。在这种情况下,该蛋白质配体可以是结合GSK3 $\alpha$ 和/或GSK3 $\beta$ 的任何分子,其中,应当理解的是,GSK3 $\alpha$ 和GSK3 $\beta$ 是具有不同且重叠的磷酸化底物的旁系同源体,并且应答不同且重叠的分子信号。为便于参考,这两种分子将统称为GSK-3,但应当理解的是,为了应答不同的刺激和/或当用于治疗或预防不同的癌症时,该GSK-3配体可以优先结合该等旁系同源体之一,可以不同的特异性和亲和力结合该等旁系同源体,和/或可以例如在特定细胞位置优先结合该等旁系同源体之一。替代地,该GSK-3配体可以在相同位点以相似的特异性和亲和力结合该等旁系同源体中的每一个。

[0041] GSK-3是一种多产混杂激酶,已知其通过增强细胞代谢和形成抗凋亡蛋白复合物参与肿瘤促进。GSK-3存在于整个细胞,包括细胞核中。因此,不希望受理论束缚,申请人提出GSK-3信号在例如癌细胞等增殖细胞中的干扰可以破坏许多相关细胞过程,从而减慢或

停止细胞增殖和/或支持细胞死亡。

[0042] 在一个或多个实施例中,该蛋白质配体可以包含一个或多个芳族5或6元环,其中该等环可以是取代环和/或杂环。在其他实施例中,该蛋白质配体可以包含非芳族5或6元环,并且该等环可以在环结构中的任意一个原子上被取代。在本发明的实施例中,该蛋白质配体可以包含一个或多个苯或苯基环,并且这些环可以被卤化、硝化、磺化、烷基化、酰化和/或其空间上允许的组合取代。在另外的实施例中,该蛋白质配体可以包含一个或多个吡咯烷环。该蛋白质配体可以包含一个或多个芳族6元环和/或一个或多个5元环,并带有一个或多个由下列各项所组成的群组中选出的取代基: $-O^{(-)}$ 、 $-OH$ 、 $-OR$ 、 $-OC_6H_5$ 、 $-OCOCH_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NR_2$ 、 $-NHC_6H_5$ 、 $-R$ 、 $-C_6H_5$ 、 $-NO_2$ 、 $-NR_3^{(+)}$ 、 $-PR_3^{(+)}$ 、 $-SR_2^{(+)}$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_2R$ 、 $-CO_2H$ 、 $-CO_2R$ 、 $-CONH_2$ 、 $-CHO$ 、 $-COR$ 、 $-CN$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH=CHNO_2$ 、 $-C_2H_5$ 、 $-CR_2H$ 、 $-CR_3$ ,其中R为任意烷基。在优选的实施例中,该蛋白质配体可以包含苯基环和一个或多个吡咯烷环,该苯基环和/或该吡咯烷环可以被一个或多个由下列各项所组成的群组中选出的取代基取代: $-O^{(-)}$ 、 $-OH$ 、 $-OR$ 、 $-OC_6H_5$ 、 $-OCOCH_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NR_2$ 、 $-NHC_6H_5$ 、 $-R$ 、 $-C_6H_5$ 、 $-NO_2$ 、 $-NR^{(+)}$ 、 $-PR^{(+)}$ 、 $-SR_2^{(+)}$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_2R$ 、 $-CO_2H$ 、 $-CO_2R$ 、 $-CONH_2$ 、 $-CHO$ 、 $-COR$ 、 $-CN$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-CH_2Cl$ 、 $-CH=CHNO_2$ 、 $-C_2H_5$ 、 $-CR_2H$ 、 $-CR_3$ ,其中R为任意烷基。

[0043] 该蛋白质配体可以与特定残基的蛋白质结合或相互作用。例如,这些残基可能是该蛋白质上的一个或多个结合或磷酸化位点的一部分。或者,这些残基可能对蛋白质对接或蛋白质底物磷酸化至关重要。

[0044] 在本发明的实施例中,该蛋白质配体可以与GSK-3上的特定残基结合或相互作用。例如,该GSK-3配体可以通过与缬氨酸135、谷氨酰胺185氢键以及与其他几种氨基酸发生范德华相互作用结合GSK-3p活性位点。

[0045] 在本发明的方法中,可以通过给服含DNA配体和蛋白质配体的组合物来治疗或预防癌症,其中该等配体是单独的分子。这将允许该组合物包含不同摩尔比的两种配体,并允许该等配体定位在细胞的不同部位,和/或共定位。例如,该组合物可以包含过量的DNA配体(即DNA配体与蛋白质配体的摩尔比为1000:1至1.1:1),或过量的蛋白质配体(即DNA配体与蛋白质配体的摩尔比为1:1000至1:1.1),或等摩尔量的DNA配体和蛋白质配体。该DNA配体与蛋白质配体的比例可以根据诸如所治疗的癌症的类型、癌症阶段、受试者的年龄和总体健康状况以及对该DNA配体和/或蛋白质配体作用的敏感性等因素进行修改和调整。

[0046] 在其他实施例中,该DNA配体和蛋白质配体是偶联在一起的单独分子,其比例通常为1:1,但该等配体可以允许DNA配体或蛋白质配体过量的方式偶联。例如,1-10个DNA配体分子可以与单个蛋白质配体偶联,或者1-10个蛋白质配体分子可以与单个DNA配体偶联。偶联是指该DNA配体和蛋白质配体分别制造,并通过适当的且药学上可接受的间隔基或交联剂连接,或通过静电或共价相互作用连接,以设定的比例给药。该间隔基或交联剂在某些刺激下可能是可剪切的,或偶联可能是不可逆的。

[0047] 在本发明的优选实施例中,该DNA配体和蛋白质配体是单一化合物的组分。该DNA配体和蛋白质配体可以通过任何适当的连接子连接在单一化合物中。该连接子可以是刚性的或柔性的,和/或可以是有利于该DNA配体能够结合DNA和该蛋白质配体能够结合蛋白质的任何长度。该连接子无需允许DNA和蛋白质同时结合,但在一些实施例中这是优选的。该连接子可以包含胺基。该化合物可以包含其他配体和/或活性位点。

[0048] 如果该DNA配体和蛋白质配体偶联或为单一化合物的一部分,应当理解这将导致该DNA配体和蛋白质配体共定位。在任何给定时间,该化合物或共轭配体可以被定位,使得只有该DNA配体或只有该蛋白质配体可以分别结合DNA或蛋白质。或者,可以定位该化合物或共轭配体,使得该DNA配体和蛋白质配体能够同时结合其各自的靶分子。该化合物或该共轭配体中的该DNA配体和蛋白质配体分别同时或依次结合DNA和蛋白质的能力可能随时间流逝或因应答细胞活动而波动。

[0049] 在优选的实施例中,该DNA配体和蛋白质配体为咯萘啶(PND)或其衍生物或药学上可接受的盐的形式。咯萘啶的化学式为 $C_{29}H_{32}ClN_5O_2$ ,化学名为4-[ (7-氯-2-甲氧基-1,5-二氢苯并[b][1,5]萘啶-10-基) 亚氨基]-2,6-双(吡咯烷-1-基甲基) 环己基-2,5-二烯-1-酮(先前为2-甲氧基-7-氯-10-(3',5'-双(吡咯烷-1-基甲基)-4'-羟基苯氨基) 苯并(b)-1,5-萘啶)。咯萘啶又称疟乃停和苯并萘啶7351。

[0050] 在治疗应用中,优选地使用咯萘啶作为磷酸盐,或咯萘啶四磷酸盐,其化学式为 $C_{29}H_{44}ClN_5O_{18}P_4$ ,化学名为4-[ (7-氯-2-甲氧基-1,5-二氢苯并[b][1,5]萘啶-10-基) 亚氨基]-2,6-双(吡咯烷-1-基甲基) 环己基-2,5-二烯-1-酮;磷酸。

[0051] 四磷酸咯萘啶是一种常见的抗疟剂,已获批并已有效用于治疗疟疾达30年以上。近年来,已发现当靶向多药耐药性癌症时,四磷酸咯萘啶可增强一些常用化疗药物的抗肿瘤活性,但在体内研究中从未将其单独用于治疗或预防癌症,也未将其作为可靶向增殖细胞的独立抗癌疗法提出。令人惊讶的是,本发明发现咯萘啶是一种含DNA配体和蛋白质配体的有效抗癌剂。尽管该化合物具有两个治疗靶点,但其通常耐受性良好且使用安全。不希望受理论束缚,申请人假设咯萘啶选择性靶向增殖癌细胞以使其凋亡并干扰通常可能允许癌细胞逃避细胞死亡的分子机制。咯萘啶在靶向增殖细胞方面具有选择性,这一点很重要,因为它可减少通常与选择性较低的癌症治疗相关的副作用。

[0052] 咯萘啶含DNA结合配体和蛋白质配体,该DNA结合配体是三个稠合苯环的萘衍生物,该蛋白质配体含一个6元芳环和两个5元环。在咯萘啶中,该DNA结合配体是取代的1,5-二氮杂-萘,但在本发明的实施例中,该方法依赖于咯萘啶衍生物,该衍生物在该等环结构的备选位置处可具有备选取代基。在咯萘啶的其他衍生物中,该DNA配体是杂环萘衍生物,其中氮原子位于稠合芳环的环结构的不同位置。有人提出,咯萘啶的这种结构特征(即三个稠合苯环在一个平面上的性质)使咯萘啶的DNA配体可以作为DNA嵌入剂,促进细胞凋亡的启动。

[0053] 该特征与其他抗疟剂形成对比,后者被建议用于增强化疗药物对耐药细胞系的活性,如阿莫地喹、甲氟喹、萘酚喹、扑疟喹、伯氨喹、哌喹、塔芬喹、米帕林、卤泛群、咯萘啶、硝唑尼特和阿托伐醌。与其他抗疟剂相比(即通过抑制自噬增强对耐药细胞中癌症的治疗),咯萘啶和这些药剂之间缺乏结构相似性可能是咯萘啶具有不同功能(即单独治疗癌症)的原因。

[0054] 在咯萘啶中,该蛋白质结合配体包含苯基,但在本发明的实施例中,该方法依赖于咯萘啶衍生物,该衍生物在苯环上的备选位置处可具有备选取代基。在其他咯萘啶衍生物中,该蛋白质配体包含一个杂环6元环。在咯萘啶中,该蛋白质结合配体还包含2个吡咯烷环,但在本发明的实施例中,该方法依赖于咯萘啶衍生物,该衍生物可以具有一个或多个取代的吡咯烷环,和/或可以包含芳族5元环,或在环结构中有除碳和氮之外的其他分子的5元

环。

[0055] 在本发明的其他优选实施例中,该方法包括向有此需要的受试者给服含四磷酸咯萘啶的组合物。

[0056] 在本发明的方法中,该癌症可以是以实体瘤或血(非实体)癌形式存在的任何癌症,包括但不限于肉瘤、癌、淋巴瘤、白血病、骨髓瘤和循环肿瘤细胞(CTC)。例如,癌可以是胰腺癌、膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、间皮瘤、肾癌、肝癌、肺癌(包括小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、头颈癌、食道癌、胆囊癌、卵巢癌、胃癌、宫颈癌、甲状腺癌、前列腺癌或皮肤癌。一般而言,该癌症的特征是细胞增殖不受控制。

[0057] 在其他实施例中,淋巴瘤可以是B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、毛细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、骨髓瘤、伯克特淋巴瘤、或胃、乳腺或胰腺结外淋巴瘤。

[0058] 肉瘤可以是例如纤维肉瘤、横纹肌肉瘤、软骨肉瘤、平滑肌肉瘤、间皮肉瘤、血管肉瘤、脂肪肉瘤、骨肿瘤以及中枢和周围神经系统肿瘤,包括星形细胞瘤、神经母细胞瘤、神经胶质瘤和神经鞘瘤,或其他肿瘤,包括黑素瘤、精原细胞瘤、畸胎瘤、骨肉瘤、着色性干皮病、角化棘皮瘤、滤泡状甲状腺癌和卡波西氏肉瘤。

[0059] 骨髓瘤可以是例如浆细胞性骨髓瘤、卡勒氏病、多发性骨髓瘤等。在其他实施例中,白血病可以是骨髓性白血病、粒细胞性白血病、淋巴性白血病、淋巴细胞性白血病或淋巴瘤母细胞性白血病、真性红细胞增多症或红细胞增多症。

[0060] 在其他非限制性实施例中,该癌症可以是例如急性淋巴细胞性白血病、急性髓细胞性白血病、肾上腺皮质癌、HIV和AIDS相关癌症、原发性CNS淋巴瘤、肛门癌、胃肠道类癌、脑星形细胞瘤、非典型畸胎样/横纹肌样瘤、基底细胞癌、胆管癌、尤文肉瘤、骨肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、脑胶质瘤、支气管肿瘤、心脏肿瘤、胚胎瘤、生殖细胞瘤、胆管癌、脊索瘤、慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病、慢性骨髓增生性肿瘤、结直肠癌、颅咽管瘤,皮肤T细胞淋巴瘤、蕈样真菌病、塞泽里综合征、导管原位癌(DCIS)、子宫癌、室管膜瘤、鼻腔神经胶质瘤、性腺外生殖细胞瘤、眼癌、眼内黑色素瘤、视网膜母细胞瘤、输卵管癌、胃癌、胃肠道间质瘤、睾丸癌、下咽癌、唇、口和口腔癌、男性乳腺癌、梅克尔细胞癌、伴NUT基因改变的中线道癌、多发性内分泌腺肿瘤综合征、骨髓增生异常综合征、鼻腔和副鼻窦癌、鼻咽癌、口咽癌、胰腺神经内分泌肿瘤、乳头状瘤、副神经节瘤、副神经节瘤、阴茎癌、咽喉癌、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、胸膜肺母细胞瘤、原发性腹膜癌、唾液腺癌、血管肿瘤、尿道癌、子宫肉瘤、阴道癌、外阴癌和维尔姆氏瘤。

[0061] 本发明的方法可以预防、延缓或阻滞癌症的发展,该等癌症通常可由例如任何上述癌症的转移发展而来。该方法还可预防、延缓或阻滞治疗后上述任何癌症的复发。

[0062] 该癌症还可以是其中癌细胞的增殖能力始终都由蛋白质调节的任何癌症。在一些实施例中,该癌症可以是其中癌细胞过表达蛋白质的任何癌症。应当理解,“过表达”是指癌细胞比相同组织或细胞类型的健康细胞表达更多的蛋白质。例如,如果与非癌性乳腺组织细胞相比,乳腺肿瘤中癌细胞的蛋白表达水平更高,则认为乳腺肿瘤中的癌细胞过表达蛋白质。细胞中蛋白质的表达水平可由本领域技术人员使用众所周知的技术测定,例如但不限于mRNA定量、免疫荧光分析和蛋白质印迹分析。

[0063] 虽然本发明的组合物可单独用于癌症的有效治疗和预防,但在本发明的一些实施

例中,该方法包括向有此需要的受试者给服含DNA配体和蛋白质配体的组合物以及附加生物活性剂。该生物活性剂可以包含在该含DNA配体和蛋白质配体的组合物中,或者该生物活性剂可以与该含DNA配体和蛋白质配体的组合物联合给药。联合给药是指该生物活性剂和该组合物可以同时给药,或者该组合物和该生物活性剂可以例如交替给药,或先于彼此给药,或后于彼此给药,或其组合(即给药前或给药后包含在术语“联合给药”的含义中)。例如,该生物活性剂可以在该组合物之前给药,也可以与该组合物同时给药或持续相同时间给药。“同时”并不表示限定于实际时间点,而是指时间范围或持续时间。例如,可以向受试者同时给服生物活性剂和本发明的组合物,因此这意味着可根据任何合适的时间表在特定时期(天、周、月或年)给服该生物活性剂,而该受试者也在相同的特定时期以相同或不同的时间表接受本发明的组合物(即,可以每日一剂、持续三个月向该受试者给服本发明的组合物,同时在该三个月期间,每周向该受试者给服一剂该生物活性剂)。

[0064] 该生物活性剂可以是对该癌症具有生物活性(包括治疗活性)的任何化合物。该生物活性剂可能能够与该癌症的细胞结合或发生相互作用。该生物活性剂可以是可用于检测、预防和/或治疗癌症的任何药剂、药物、化合物或组合物。在本发明的实施例中,该生物活性剂为治疗剂,更优选低为化疗剂。在本发明的实施例中,该DNA配体和蛋白质配体为咯萘啶(PND)或其衍生物或药学上可接受的盐的形式,并且该生物活性剂包含在含咯萘啶的组合物中,或者该生物活性剂与含咯萘啶的组合物联合给药。

[0065] 在本发明的特别优选实施例中,该生物活性剂系由下列各项所组成的群组中选出的化疗剂:醋酸阿比特龙、白蛋白结合型(nab)紫杉醇、阿仑单抗、六甲蜜胺、天冬酰胺酶、苯达莫司汀、贝伐单抗、博来霉素、硼替佐米、本妥昔单抗、白消安、卡巴他赛、卡培他滨、卡铂、卡莫司汀、西妥昔单抗、瘤可宁、顺铂、克拉屈滨、克唑替尼、环磷酰胺、阿糖胞苷(Ara-C)、达卡巴嗪、更生霉素、达沙替尼、道诺霉素、DaunoXome(脂质体柔红霉素)、DepoCyt(脂质体阿糖胞苷)、多西他赛、Doxil(脂质体多柔比星)、多柔比星、甲磺酸艾日布林、埃罗替尼、雌莫司汀、依托泊苷、依维莫司、氟尿苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、吉非替尼、吉西他滨、卡莫司汀植入膜剂、羟基脲、伊莫单抗、伊达比星、异环磷酰胺、伊马替尼、易普利姆玛、伊立替康、伊沙匹隆、拉帕替尼、来那度胺、洛莫司汀、氮芥、美法仑、巯嘌呤、甲氨蝶呤、丝裂霉素、米奥蒽醌、MG132、尼罗替尼、奥沙利铂、紫杉醇、帕尼单抗、帕唑帕尼、聚乙二醇干扰素 $\alpha$ -2b、培美曲塞、喷司他丁、普拉曲沙、甲苄肼、利妥昔单抗、罗米地辛、鲁索利替尼、西普鲁塞-T、索拉非尼、链脲菌素、舒尼替尼、替莫唑胺、替西罗莫司、替尼泊苷、沙利度胺、硫鸟嘌呤、噻替帕、拓扑替康、托西莫单抗、曲妥珠单抗、戊柔比星、凡德他尼、维莫非尼、长春碱、长春新碱和长春瑞滨本领域技术人员应当理解,这绝非穷尽列表,并且将来开发的其他化疗剂可能适用于本发明的方法。

[0066] 在本发明的更优选实施例中,该DNA配体和蛋白质配体为咯萘啶(PND)或其衍生物或药学上可接受的盐的形式,并且该生物活性剂包含在含咯萘啶的组合物中,或者该生物活性剂与含咯萘啶的组合物联合给药,其中该生物活性剂系由下列各项所组成的群组中选出:顺铂、吉西他滨、硼替佐米和MG132。

[0067] 在本发明的实施例中,该方法包括给服含两种或更多种生物活性剂的组合物。

[0068] 在本发明的其他优选实施例中,该DNA配体、蛋白质配体和/或该附加生物活性剂为前体药物。该前体药物为活性药物的药物衍生物,可以是惰性的,也可以比该活性药物的

毒性低,并可以在体内加工成该活性药物。该加工可以通过化学酶促手段进行,和/或该加工可以由生物信号触发,例如pH值的变化,和/或可以是对细胞组分结合的应答。

[0069] 在本发明的另一方面,提供了DNA配体和蛋白质配体在制备癌症治疗或预防用药剂中的应用。

#### 组合物和药剂、剂量以及用法

[0070] 本发明的组合物、化合物和药剂可以通过口服、局部或肠胃外途径给药,包括静脉内、肌内、腹膜内和皮下给药。它们可以通过直接注射递送到肿瘤中。也可对器官、组织和细胞进行离体给药。

[0071] 对于肌内、腹膜内、皮下和静脉内给药,本发明的组合物和药剂通常以无菌水溶液或混悬液提供,并缓冲至合适的pH和等渗性。合适的水性溶媒包括林格氏溶液和等渗氯化钠。根据本发明的水性混悬液可以包含诸如纤维素衍生物、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮和黄耆胶等悬浮剂,以及诸如卵磷脂等润湿剂。适用于水性混悬液的防腐剂包括对羟基苯甲酸乙酯和正丙基酯。

[0072] 对于口服给药,本发明的组合物通常以片剂或胶囊的形式或以水溶液或混悬液的形式提供。口服片剂可以包含与药学上可接受的赋形剂混合的活性成分,该等赋形剂包括例如惰性稀释剂、崩解剂、粘合剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、着色剂和防腐剂。合适的惰性稀释剂包括碳酸钠和碳酸钙、磷酸钠和磷酸钙以及乳糖。合适的崩解剂包括例如玉米淀粉和海藻酸。粘合剂可以包括淀粉和明胶。润滑剂(如有)通常为硬脂酸镁、硬脂酸或滑石粉。如果需要,该等片剂可涂上一层材料,如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯,以延缓该等片剂在胃肠道中的吸收。

[0073] 口服用胶囊包括其中活性成分与固体稀释剂混合的硬明胶胶囊和其中活性成分与水或诸如花生油、液体石蜡或橄榄油等油混合的软明胶胶囊。

[0074] 对于局部给药,本发明的组合物通常以液体、洗剂、乳液、摩丝、糊剂、乳膏、软膏或凝胶的形式提供,并且可用于治疗或预防皮肤癌或皮肤表面附近的癌症,使得该DNA配体和蛋白质配体能够扩散至受影响的细胞。用于局部给药的本发明组合物还包含药学上可接受的防腐剂、湿润剂、润肤剂、增湿剂、增稠剂、螯合剂、赋形剂、稀释剂和着色剂。

[0075] 本发明中所使用的组合物、化合物和药剂的有效剂量可以通过常规方法确定,并且通常取决于所使用的治疗剂。任何特定受试者所需的特定剂量水平将取决于多种因素,包括所治疗的疾病的严重程度、给药途径和受试者的体重。

[0076] 例如,1单位剂量可以包括约0.1mg至约10000mg的单一化合物,该单一化合物包含DNA配体和蛋白质配体,或其替代形式、衍生物或盐,或其组合,和/或在本发明的任何方面和/或实施例中所述的其来源。在另一个实施例中,单位剂量包括约50mg至约10000mg、约100mg至约10000mg、约200mg至约10000mg、约500mg至约10000mg、约1000mg至约10000mg、约2000mg至约10000毫克、约4000mg至约10000mg、约8000mg至约10000mg、约5mg至约1000mg、约10mg至约1000mg、约20mg至约1000mg、约50mg至约1000mg、约100mg至约1000mg、约200mg至约1000mg、约400mg至约1000mg、约800mg至约1000mg、约0.5mg至约100mg、约1mg至约100mg、约2mg至约100mg、约5mg至约100mg、约10mg至约100mg、约20mg至约100mg、约40mg至约100mg、或约80mg至约100mg。优选地,该单位剂量包括约25mg、约100mg、约200mg、约300mg、约400mg、约500mg、约600mg、约700mg、约800mg、约900mg、或约1000mg的单一化合物,

该单一化合物包含DNA配体和蛋白质配体,或其替代形式、衍生物或盐,或其组合,和/或在本发明的任何方面和/或实施例中所述的其来源。

[0077] 在其他实施例中,1单位剂量可以包括约0.1mg至约10000mg的DNA配体和约0.1mg至约10000mg的蛋白质配体,或其替代形式、衍生物或盐,或其组合,和/或在本发明的任何方面和/或实施例中所述的其来源。在另一个实施例中,该单位剂量包括约50mg至约10000mg、约100mg至约10000mg、约200mg至约10000mg、约500mg至约10000mg、约1000mg至约10000mg、约2000mg至约10000mg、约4000mg至约10000mg、约8000mg至约10000mg、约5mg至约1000mg、约10mg至约1000mg、约20mg至约1000mg、约50mg至约1000mg、约100mg至约1000mg、约200mg至约1000mg、约400mg至约1000mg、约800mg至约1000mg、约0.5mg至约100mg、约1mg至约100mg、约2mg至约100mg、约5mg至约100mg、约10mg至约100mg、约20mg至约100mg、约40mg至约100mg、或约80mg至约100mg的DNA配体,和约50mg至约10000mg、约100mg至约10000mg、约200mg至约10000mg、约500mg至约10000mg、约1000mg至约10000mg、约2000mg至约10000mg、约4000mg至约10000mg、约8000mg至约10000mg、约5mg至约1000mg、约10mg至约1000mg、约20mg至约1000mg、约50mg至约1000mg、约100mg至约1000mg、约200mg至约1000mg、约400mg至约1000mg、约800mg至约1000mg、约0.5mg至约100mg、约1mg至约100mg、约2mg至约100mg、约5mg至约100mg、约10mg至约100mg、约20mg至约100mg、约40mg至约100mg、或约80mg至约100mg的蛋白质配体。优选地,该单位剂量包括约25mg、约100mg、约200mg、约300mg、约400mg、约500mg、约600mg、约700mg、约800mg、约900mg或约1000mg的DNA配体和约25mg、约100mg、约200mg、约300mg、约400mg、约500mg、约600mg、约700mg、约800mg、约900mg或约1000mg的蛋白质配体,或其替代形式、衍生物、或盐,或其组合,和/或在本发明的任何方面和/或实施例中所述的其来源。

[0078] 该单位剂量可以每日给药一次、两次、三次、四次或五次,或每二天或每三天给药一次,或每周给药一次、每两周给药一次或每四周给药一次。

[0079] 在一些实施例中,该等组合物、化合物和药剂可单独或与其他附加生物活性剂联合给予受试者。在此类实施例中,给药可以同时或依次进行。

[0080] 通常,在治疗应用中,该等组合物、化合物和药剂可在癌症持续期间给药。此外,对本领域普通技术人员显而易见的是,单次剂量的最佳剂量和给药间隔可以由所治疗的疾病的状态或病症的性质和程度、给药形式、途径和部位以及所治疗的特定受试者的性质来确定。使用常规技术可确定最佳剂量。

[0081] 本发明的一些实施例可能涉及该组合物或药剂的多剂分次给药。因此,本文所述的治疗和预防方法包括对受试者的多剂分次给药,例如,在限定时间段内。

[0082] 本发明的组合物和药剂也可以与一种或多种诸如放射治疗等附加治疗处理和/或一种或多种附加治疗剂联合(一起或依次给药)使用,该等附加治疗剂系由下列不同类型的各项所组成的群组中选出:化疗药物、抗肿瘤抗生素、拓扑异构酶抑制剂、有丝分裂抑制剂、皮质类固醇、靶向疗法、分化剂、激素疗法和免疫疗法。

#### 定义

[0083] 除非上下文另有明确要求,否则在整个说明书和权利要求书中,词语“包括”、“包含”等应被解释为包容性的意义,而非排他性或穷尽性的意义;也就是说,意指“包括但不限于”。

[0084] 在本说明书的上下文中,术语“治疗”等包括减轻癌症相关症状、癌症消退和/或缓解。在某些实施例中,治疗将减缓、延缓或停止癌细胞的增殖或癌症的转移,减缓、延缓或停止通常由肿瘤内的细胞增殖导致的肿瘤尺寸的增加,防止细胞系的分化,减小肿瘤尺寸,或至少暂时逆转一个或多个肿瘤的进展。该治疗可以治愈癌症,或延缓发病。因此,在本发明的上下文中,当用于治疗应用时,词语“治疗”或其衍生词包括疗法的所有方面,例如减轻与所治疗的癌症相关的疼痛、减轻所治疗的癌症的严重性、改善所治疗的癌症的一种或多种症状、改善所治疗的受试者的总体健康状况。词语“治疗”或其派生词的使用应理解为意指被“治疗”的受试者可经历任何一种或多种上述益处。一般而言,该治疗可以与存于在该癌症中的增殖细胞的死亡有关。

[0085] 在本说明书的上下文中,术语“预防”等是指预防与癌症相关的所有或一些症状在所述癌症缓解后复发,以及预防由于例如癌症的转移而形成一种或多种癌症。该预防可以预防由一种或多种癌症引起的发病,或延缓由一种或多种癌症引起的发病。一般而言,该预防可以与可能导致癌症或促使癌症扩散或复发的增殖细胞的死亡有关。

[0086] 在本说明书的上下文中,术语“大约”应理解为指示本领域技术人员将对给定值赋予的通常容差。

[0087] 在本说明书的上下文中,如果说明了参数的范围,应理解为该参数包含所述范围内的所有值,包括该范围的所述端点。

[0088] 在本发明的上下文中,术语“受试者”是指经历和/或表现出至少一种与癌症相关的症状的动物,优选为哺乳动物,最优选为人。通常,该受试者为患有癌症的个体,并接受执业医师的临床护理。该受试者可以是人或非人,因此对受试者或个体的提及是指人或非人,例如具有社会、经济或研究意义的任何物种的个体,包括但不限于绵羊、牛、马、猪、猫、犬、灵长类、啮齿动物,尤其是这些分类的家养成员,例如绵羊、牛、马和狗。此外,如本文中所使用的,“有此需要的受试者”还可以是未表现出任何癌症症状、但被医生、临床医生或其他医务人员认为具有发展成癌症的风险的受试者。例如,由于该受试者的病史,包括但不限于家族史、易染病体质、共存/促成癌症,该受试者可以被视为具有发展成癌症的风险(因此需要预防或预防性治疗)。

[0089] 在本发明的上下文中,“药学上可接受的赋形剂或稀释剂”是指非生物学上不受欢迎的任何赋形剂或稀释剂,即该物质可以掺入本发明的药物组合物中并向受试者给药而不引起任何不利的或不当的生物学效应,包括但不限于不利的或不当的毒性、不相容性、不稳定性、刺激性、过敏反应等。在一个优选实施例中,该赋形剂或稀释剂是经监管机构或部门(该监管机构或部门为,例如,联邦或州政府)批准或可批准的,或在《美国药典》或其他普遍认可的药典中列出用于受试者的。

## 附图说明

[0090] 下面将参考附图仅以示例方式描述本发明的实施例,附图图例如下所述:

图1. 四磷酸咯萘啶(PND)的化学结构。

图2. 咯萘啶(PND)激活的可能途径的转录组分析。

HL-60细胞接受PND治疗后上调最多(标记为正方形)的基因的子网络。将PND转录标记与存储于LINCS项目中的标记进行比较的皮尔逊相关性分析。标记的化合物与PND的影

响相关,其中填充颜色越深,相关性越好。

图3. 咯萘啶 (PND) 激活的可能途径的转录组分析与靶标确认。(A) MDA-MB-231 细胞接受PND治疗后上调最多(标记为正方形)的基因的子网络。将PND转录标记与存储于LINCS项目中的标记进行比较的皮尔逊相关性分析。标记的化合物与PND的影响相关,其中填充颜色越深,相关性越好。(B) SDS-PAGE分析显示,PND以剂量依赖性方式对拓扑异构酶II活性产生抑制作用。泳道1,连环动基体DNA (kDNA);泳道2,脱连环化kDNA;泳道3,线性kDNA;泳道4,kDNA加拓扑异构酶II;泳道5,kDNA加拓扑异构酶加5 $\mu$ M PND;泳道6,kDNA加拓扑异构酶加50 $\mu$ M PND;泳道7,kDNA加拓扑异构酶加500 $\mu$ M PND;泳道8,kDNA加拓扑异构酶II加1mM依托泊苷(拓扑异构酶II抑制剂);泳道9,kDNA加拓扑异构酶II加PBS;泳道10,kDNA加拓扑异构酶II加DMSO。

图4. PND的分子对接研究。预测PND和喹那克林对糖原合成酶激酶3 $\beta$ 的氨基酸残基相互作用(A),以及PND在GSK3 $\beta$ 的预测结合口袋内的特异性相互作用(B)。

图5. PND对一组人细胞系的半数细胞毒性浓度(CC50)和选择性细胞毒性指数(SCI)。SCI的计算方法如下:SCI=非癌细胞的CC50/癌细胞的CC50。

图6. 用于测定CC50值的代表性PND剂量反应曲线。对于这些分析,将细胞暴露于PND 72h,并通过DNS分析测定其存活率。例如,用PND浓度梯度处理MDA-MB-231(A)和HL-60(B),如x轴上所示;以细胞毒性(死细胞)的百分比为y轴。在这一系列实验中,包括几个对照组:PND稀释剂PBS,如实验样本中所含(0.5%v/v);作为阴性对照组的未处理细胞;以及作为细胞毒性阳性对照组的1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。每个实验点表示四个副本的平均值,误差线表示其相应的标准偏差。以微摩尔( $\mu$ M)为单位的半数细胞毒性浓度(CC50)定义为培养72h后扰乱50%细胞群的质膜所需的PND浓度。

图7. 培养24h后,PND导致MDA-MB-231(A)和HL-60(B)癌细胞上的磷脂酰丝氨酸外部化。使用膜联蛋白V-FITC和PI对细胞进行双染色后,研究了细胞死亡机制,并通过流式细胞仪进行监测。(A-B)凋亡细胞的总百分比(y轴)表示为凋亡早期和晚期的总和(绿条);而仅用PI染色的细胞(膜联蛋白V-FITC阴性)被计数为坏死细胞群(黑条)。对经PND处理的细胞与经PBS处理的(\*)和未处理的(‡)的细胞对照组进行了双尾司徒顿配对t检验,计算结果显示,在两种情况下,一致提供了<0.001的P值。每个条形表示三个副本的平均值,误差条表示标准偏差。PND通过线粒体膜去极化对MDA-MB-231(C)和HL-60(D)细胞产生细胞毒性作用。用PND处理细胞6h,通过JC-1(一种形成聚集体的亲脂性荧光染料试剂)染色监测线粒体膜电位( $\Delta \Psi_m$ )的变化;并通过流式细胞仪检查。JC-1试剂在线粒体去极化后发出绿色荧光信号。(C-D)示出了发出绿色荧光信号的细胞的百分比(y轴)与不同处理(x轴)的变化曲线。作为线粒体膜电位( $\Delta \Psi_m$ )阳性对照组的干扰物,使用了1mM的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。每个条形表示三个副本的平均值,误差条表示标准偏差。此外,对经PND处理的细胞与经PBS处理的(\*)和未处理的(‡)细胞对照组进行的双尾司徒顿配对t检验分析一致提供了分别<0.01和<0.001的P值。

图8. PND扰乱了两种癌细胞MDA-MB-231(A-D)和HL-60(E-H)的细胞周期特征,还以剂量依赖性方式表现出凋亡诱导性DNA断裂。PND处理72h后,收获24孔培养板中的细胞,进行固定、透化、DAPI染色和流式细胞仪分析。每个细胞周期阶段的百分比用y轴表示,而不同的处理用x轴表示。对于该系列实验,涉及以下对照组:1mM的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作为细胞周期微扰剂;0.1%的PBS作为赋形剂/溶剂对照组;以及未处理的细胞。每个条形表示三个副本的平均

值,误差条表示相应的标准偏差。为了获取分析数据和进行分析,使用了FL 9检测器、单细胞门和Kaluzza流式细胞术分析软件(Beckman Coulter)。

图9. PND以剂量依赖性方式引起DNA迁移阻滞。将三种不同浓度的PND和喹那克林分别与100ng质粒DNA一起培养,并通过琼脂糖凝胶电泳分析形成复合物的可能性。在Tris/醋酸盐/EDTA缓冲液中,通过1% (w/v) -琼脂糖凝胶电泳分离反应产物,并用溴化乙啶染色。PI和游离质粒DNA分别用作DNA迁移率的阳性和阴性对照组。装载孔位于图像的顶部,由两个蓝色箭头表示(左上角和右上角)。黄色虚线指示作为参考的游离超螺旋DNA的最大迁移率。三次DNA迁移率变动由蓝线和箭头表示(图像左侧)。此外,DNA的迁移方向由箭头指示(图像右侧);从阴极(负)到阳极(正)。图中示出了用于回顾DNA复合物潜在形成的代表性图像。

图10. 小牛胸腺DNA对PND最大吸光度产生减色和增色效应。连续加入小牛胸腺(CT) DNA (10.1mM)后,在Tris/HCl缓冲液中进行PND (22.8 $\mu$ M)的紫外-可见分光光度滴定(300-650nm)。箭头指示添加DNA时的谱变化。(B)来自PND和CT DNA相互作用的紫外-可见滴定数据总结。

图11. PND引起小牛胸腺DNA圆二色光谱的正、负带强度增加。小牛胸腺(CT) DNA的圆二色(CD)光谱变化。在与PND(摩尔比为0.03、0.06、0.2和0.3)一起培养30分钟(A)或20h(B)后,对Tris/HCl缓冲液中的CT DNA (150 $\mu$ M)进行了CD分析。箭头指示了在PND浓度递增梯度下CT DNA的CD光谱变化。在不含CT DNA的情况下,将具有相同PND浓度梯度的CD光谱空白培养20h(C)。mdeg=毫度。

图12. 采用PND治疗小鼠减少了肿瘤生长。在对照组小鼠(750mm<sup>3</sup>)中,转移性乳腺癌肿瘤的平均生长量大于接受PND治疗的小鼠(430mm<sup>3</sup>),第1天至第15天的差异有统计学意义,f检验P值为0.01。在(A)中,第1-9天是每只鼠的单独条形图(从左到右)。

图13. PND治疗增加了低剂量化疗药物对MDA-MB-231乳腺癌细胞系的活性。

#### 实施例1——转录组分析

[0091] 使用一系列不同的细胞系,通过转录组分析比较了PND与已知药物转录调节标志基因的作用。

[0092] HL-60细胞(6孔板中400,000个细胞/2mL/孔)用5.6 $\mu$ M或PBS溶剂对照组处理6h。第二天,在德克萨斯大学艾尔帕索分校(University of Texas at El Paso)的基因组分析核心实验室提取了RNA并进行了全转录组分析。针对每种处理进行了3次生物重复试验。

[0093] 用两倍CC50浓度的PND或PBS溶剂对照组处理MDA-MB-231细胞6h。第二天提取了RNA并进行了全转录组分析。

[0094] 为了探索PND的可能作用机制(MoA),将获得的每种细胞系的转录组结果与LINCS项目(<http://www.lincsproject.org>)的基因表达数据进行了比较,该项目包含用FDA批准和撤销的化合物以及得到充分表征的不同化学试剂处理的各种人细胞的基因表达谱。推断出每种先导化合物的表达谱还应诱导与存储于LINCS中的药物的已知MoA一致的细胞基因表达应答。通过使用这种方法,将经PND处理的细胞的转录调节标志基因与LINCS中的476,251个基因组特征图谱中的每一个进行了比较。图2和图3A中的结果表明,PND可以分别是GSK抑制剂和拓扑异构酶抑制剂。使用TopoGen拓扑异构酶II检测试剂盒确认了PND作为拓扑异构酶抑制剂的活性,结果见图3B。

### 实施例2——GSK-3对接

[0095] GSK的晶体结构来自蛋白质数据库(5OY4),用于模拟与PND和喹那克林的相互作用(见图4A)。研究显示PND在GSK3 $\beta$ 的预测结合口袋内特异性相互作用(见图4B)。使用Schrodinger软件包中的GLIDE 5.0进行了对接实验。分子对接研究显示,PND可在GSK3 $\beta$ 内相互作用,对接得分较高(-9.4Kcal/mol),而SB 216763(来自实施例1;见图2)的得分相似(-9.2Kcal/mol)。喹那克林的结合得分较低,为-7.6Kcal/mol,表明PND侧基可能在结合口袋内提供额外接触(见图4A),使其能够更好地与GSK-3结合。

### 实施例3——PND对人乳腺和血液癌细胞的毒性分析

[0096] 药物咯萘啶(PND)是一种苯并萘啶衍生物,最初于1970年在中国寄生虫病研究所合成,在中国用于治疗疟疾已有30多年的历史。基于体外对恶性疟原虫K1的研究,先前的报告表明PND抑制 $\beta$ -血红蛋白形成,该 $\beta$ -血红蛋白形成促进 $\beta$ -血红蛋白诱导的红细胞裂解。此外,之前已在多药耐药性(MDR)K562/A02和MCF-7/ADR癌细胞上对PND与多柔比星(DOX)联合给药进行了检测,发现PND可增加细胞对多柔比星的敏感性。然而,从未确定或提示PND本身在癌症治疗中有作用。

#### 材料和方法

##### 四磷酸咯萘啶-PND的制备

[0097] 使用杜氏磷酸盐缓冲盐水(PBS;Sigma-Aldrich,St Louis,MO,USA)作为溶剂新制备了四磷酸咯萘啶(PND;2-甲氧基-7-氯-10[3,5-双(吡咯烷基-1-甲基)-4-羟基苯基]氨基苄基-(b)-1,5-萘啶;APExBIO,Houston,TX,USA)储备溶液和PND稀释液。将储备溶液及其稀释液直接添加到培养基中含有细胞的孔中。四磷酸咯萘啶的化学结构如图1所示。

##### 细胞系和培养条件

[0098] 本研究共利用了19种人细胞系:包括七种人乳腺癌细胞系(MDA-MB-468、MCF-7、T47D、HCC1419、HCC70、MDA-MB-231(三阴性)及其肺转移(LM)衍化细胞系MDA-MB-231LM2)、四种人白血病/淋巴瘤细胞系(HL-60、Ramos、Jurkat和CEM)、三种人卵巢癌细胞系(Ovcar 8、Ovcar 5和Ovcar 3)、一种肺癌细胞系(A549)、一种黑色素瘤细胞系(A375)和一种胰腺癌细胞系(Panc-1)。此外,出于选择性/比较性目的,还包括了非癌来源的细胞系,即MCF-10A、HS-27。用于MDA-MB-231、MDA-MB-231LM2、MDA-MB-468、MCF-7、A549、A375、Panc-1和HS-27的培养基为DMEM(Hyclone,Logan UT),而用于T47D、HCC-1419、HCC-70、HL-60、Ramos、Jurkat、CEM、Ovcar 8和Ovcar 5的培养基为RPMI-1640(Hyclone,Logan UT)。持续向DMEM和RPMI培养基添加10%热灭活胎牛血清(FBS:Hyclone)、100U/mL青霉素和100 $\mu$ g/mL链霉素(Thermo Fisher Scientific Inc.,Rockford,IL)。MCF-10A细胞在添加有10%FBS、10 $\mu$ g/mL重组人胰岛素(Sigma)、0.5 $\mu$ g/mL氢化可的松(Sigma)、20 $\mu$ g/mL表皮生长因子、2.5mM L-谷氨酰胺、100U/mL青霉素和100 $\mu$ g/mL链霉素的DMEM/F12培养基中生长。此外,对HL-60和Ovcar 3细胞系的培养基进行了细微修改,将20%的FBS添加到培养基中(ATCC,Manassas,VA,USA)。此外,Ovcar 3细胞系培养基需要添加10 $\mu$ g/mL的重组人胰岛素(Sigma)。通过使用HyQtase酶(Thermo Fisher Scientific Inc.)分离了在60-75%汇合度处于对数生长期的贴壁细胞,进行了计数并以10,000个细胞/100 $\mu$ L培养基/孔的密度接种于96孔板中。除添加了HyQtase之外,以与上述类似的方式处理了在混悬液中生长的细胞。通常,所有细胞的培养条件为5%CO<sub>2</sub>加湿空气环境,37 $^{\circ}$ C。

### 使用差异细胞核染色法进行细胞死亡定量测定

[0099] 为了分析PND的潜在细胞毒性活性,使用了经活细胞生物成像高通量筛选(HTS)验证的差异细胞核染色(DNS)分析法。对于该分析,将细胞以10,000个细胞/孔的密度接种于100 $\mu$ L培养基中的96孔板中,培养过夜,并用PND浓度梯度处理72h。成像前2h,向每个孔中加入两种荧光核酸嵌入剂Hoechst 33342和碘化丙啶(PI;Invitrogen);两种荧光核酸嵌入剂的最终浓度为1 $\mu$ g/mL。由于渗透性高,Hoechst可对所有细胞(全部死亡和存活)进行染色,而PI仅可对死亡或垂死细胞进行染色。使用多孔板读取器IN Cell 2000分析仪(一种HTS和高含量分析(HCA)系统(GE Healthcare Life Sciences,Pittsburgh,PA))从培养板的每个单独孔中直接采集了2 $\times$ 2图像的蒙太奇。每块板中均包括以下对照组:PBS作为溶剂/溶媒对照组,过氧化氢作为细胞毒性阳性对照组,未处理的细胞用于测定由细胞操作和通常与培养方案相关的内源性因素引起的毒性背景。对每个实验数据点以及对照组进行了三组评估。根据线性插值方程计算了半数细胞毒性浓度(CC50)值。CC50定义为与经溶剂处理的细胞相比,破坏50%细胞群的质膜完整性所需的PND浓度。

### 选择性细胞毒性指数计算

[0100] 选择性细胞毒性指数(SCI)表示给定实验化合物在对非癌源细胞产生最小毒性的同时更有效地杀死癌细胞的能力。因此,PND的SCI计算如下:SCI=非癌细胞的CC50/癌细胞的CC50。

### 通过膜联蛋白V/PI分析磷脂酰丝氨酸外化

[0101] 为了测定PND诱导的细胞死亡是通过凋亡还是坏死发生,采用膜联蛋白V-FITC和PI对MDA-MB-231和HL-60细胞进行染色,并采用流式细胞术进行监测。以100,000个细胞/1mL培养基的密度将贴壁细胞MDA-MB-231和200,000HL-60接种于24孔板中。培养过夜后,用PND处理细胞,并再培养24h。对于MDA-MB-231细胞,在冰冷试管中收获未附着细胞,同时使用HyQtase(Thermo Fisher)分离贴壁细胞,并在37 $^{\circ}$ C下培养约5分钟。用冰冷的PBS洗涤从每个单独孔中收获的未附着和分离细胞,并在260xg下离心5分钟。培养期结束后,直接对生长于混悬液中的HL-60细胞进行离心处理。然后,按照制造商的说明(Beckman Coulter),在100 $\mu$ L的结合缓冲液用膜联蛋白V-FITC和PI混合物对细胞进行染色,并在冰上避光培养15分钟。最后,通过添加400 $\mu$ L的冰冷结合缓冲液重新悬浮细胞,并通过流式细胞术进行分析(Cytomics FC500;Beckman Coulter)。对于本系列实验,用PBS处理的细胞作为溶剂对照组;用H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理的细胞作为细胞毒性阳性对照组;与未处理的细胞同时平行处理。对于每份样本,收集了10,000个事件/细胞,并使用CXP软件(Beckman Coulter)进行了分析。以类似方式处理实验样本及其对照组,并重复评估三次。计算凋亡早期和晚期的凋亡细胞总数,以获得凋亡细胞的总百分比。

### 线粒体膜电位多色分析

[0102] 按照上一节所述接种MDA-MB-231和HL-60细胞,并用PND处理7h。处理后,按照制造商的说明(MitoProbe;Life Technologies,Grand Island,NY,USA)收获细胞并用2 $\mu$ M荧光团5,5',6,6'-四氯-1,1',3,3'-四乙基苯并咪唑羰花青碘化物(JC-1)染色。具有健康极化线粒体的细胞有利于JC-1形成聚集体,该聚集体发出红色信号。由于JC-1单体分散,具有去极化线粒体的细胞显示绿色信号。同时分析了与上述相似的对照组。数据采集与分析采用CXP软件(Beckman Coulter)完成。对每个数据点重复分析三次。

### 细胞周期阶段之间的转换分析

[0103] 用几种剂量的PND处理24孔板中MDA-MB-231和HL-60细胞的指数生长期的不同步培养物。培养72h后,如上一节所述离心处理细胞,用DNA嵌入荧光团4,6-二氨基-2-苯基吡啶(DAPI)固定、透化和染色;这三个步骤是通过向细胞中加入200 $\mu$ L的单核分离培养基(NIM)-DAPI溶液(Beckman Coulter)完成的。然后将细胞悬液在室温下再避光培养3分钟。该系列实验中包括的对照组与上述实验中所述的对照组相似。使用配备405nm固态激光器的流式细胞仪(Gallios;Beckman Coulter)对每个样本收集大约20,000个事件/细胞。使用Kaluzal流式细胞术分析软件(Beckman Coulter)完成了每个细胞周期方面细胞亚群的采集和分布。此外,通过在采集细胞周期方案中加入单细胞门,有效消除了双粘体。

### DNA迁移率变动分析

[0104] 通常,与未处理的双链(ds)DNA相比,嵌入或结合dsDNA的实验化合物会增加形成复合物的分子质量,降低其在琼脂糖凝胶中的电泳迁移率。为了探索PND和dsDNA之间的潜在相互作用,进行了DNA迁移率变动分析。每种反应混合物在pH 7.4的PBS中的总体积为10 $\mu$ L。PND(Sigma-Aldrich)和奎纳克林(Sigma-Aldrich)均分别在浓度为1 $\mu$ M、0.5 $\mu$ M或0.25 $\mu$ M的情况下进行检测。向每种反应混合物中加入100ng质粒dsDNA(pCMV-dR8.91;Addgene, Cambridge, MA),然后将该混合物在37 $^{\circ}$ C下培养30分钟,通过添加2 $\mu$ L的6X凝胶上样缓冲液停止培养,并置于冰上。使用溶于pH 8.0的TAE缓冲液(0.04M Tris碱、0.04M醋酸盐和0.001M EDTA)中的1% (w/v) 琼脂糖凝胶电泳分析了PND和奎纳克林与dsDNA之间的潜在结合相互作用。为了对dsDNA复合物进行染色,在整个电泳过程中向琼脂糖凝胶中加入浓度为0.5 $\mu$ g/mL的溴化乙啶。使用凝胶成像系统使DNA迁移可视化,并使用紫外透照仪(Alpha Innotech, San Leandro, CA)捕捉图片。向每个反应中加入了1 $\mu$ g众所周知的DNA嵌入剂——荧光化合物碘化丙啶(PI)——作为阳性对照组。作为对照,还加入了未处理的质粒DNA以测定其在凝胶中的正常电泳迁移率。使用紫外-可见光谱法分析PND与小牛胸腺DNA的相互作用

[0105] 在Varian Cary 100分光光度计中进行了紫外-可见吸光度测量。

小牛胸腺(CT)DNA和缓冲液购自Sigma Aldrich。在室温下,逐步将处于缓冲液(5mM Tris/HCl, 50mM NaCl, pH=7.39)中的CT DNA溶液(10.1mM;每次添加5 $\mu$ L)加入处于相同缓冲液中的2mL PND工作溶液(22.8 $\mu$ M),通过吸收滴定法测定PND与CT DNA的结合常数。在424nm处记录吸收光谱,达到饱和时终止滴定。为了测定结合亲和力,将数据拟合至斯卡查德方程 $r/C_f = K(n-r)$ (McGhee和von Hippel图),其中r表示与1mol CT DNA结合的PND的摩尔数,n表示等效结合位点的数量,K表示复合物对这些结合位点的亲和力。分别根据 $C_f = C(1-\alpha)$ 和 $C_b = C - C_f$ 计算出游离( $C_f$ )和结合( $C_b$ )复合物的浓度,其中C表示PND的总浓度。结合复合物( $\alpha$ )的分数由 $\alpha = (A_f - A) / (A_f - A_b)$ 计算出,其中 $A_f$ 和 $A_b$ 表示游离和完全结合药物在选定波长下的吸光度,A表示在滴定期间任何给定点的吸光度。 $r/C_f$ 与r的关系图中给出了作为图[16]的斜率的结合常数 $K_b$ 。所有实验进行了三次,并对 $K_b$ 值进行了平均。

### 使用圆二色光谱法分析PND与小牛胸腺DNA的相互作用

[0106] 圆二色性(CD)光谱测量采用配备有氙灯的JASCO-1100分光偏振仪(JASCO, Easton, MD)进行。CT DNA和缓冲液购自Sigma Aldrich。在Tris/HCl缓冲液(5mM Tris/HCl, 50mM NaCl, pH=7.39)中制备CT DNA储备溶液,并使用260nm处的摩尔消光系数 $6600\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

通过分光光度法测定其浓度(4.325mM)。用Tris/HCL缓冲液制备150 $\mu$ M稀释液,并用于实验。使用前,在MQ水中新制备PND的2.0mM储备溶液。将适当体积的该溶液加入3mL含150 $\mu$ M CT DNA的工作溶液中,使该工作溶液中的PND/DNA摩尔比达到0.03、0.06、0.2和0.3。制备一式三份样品,分别培养30分钟和20h。在25 $^{\circ}$ C下记录205-380nm范围内DNA和DNA/PND的所有CD光谱,最后使用空白和降噪进行校正。最终数据取三次实验的平均值,以毫度(mdeg)表示。

#### 统计分析

[0107] 对于每个数据点,报告三次重复实验的平均值及其相应的标准偏差。通过双尾司徒顿配对t检验测定统计学意义,P值<0.05视为具有统计学意义。

#### 结果

PND表现出对癌细胞系的选择性强细胞毒性

[0108] 对十一种人癌细胞系和一种非癌对照细胞系(MCF-10A;图5)进行了差异细胞核染色(DNA),通过活细胞成像分析了PND的潜在细胞毒性作用。对于每一个单独的细胞系,还使用DNS分析法创建了剂量反应曲线,以测定这些细胞系上PND的CC<sub>50</sub>。总体而言,PND对所有受试细胞均产生了强细胞毒性,在1.6 $\mu$ M至9.4 $\mu$ M的低微摩尔浓度范围内CC<sub>50</sub>值一致(图5)。如图6A-B所示,不同浓度的PND对MDA-MB-231三阴性乳腺癌细胞系和HL-60急性早幼粒细胞白血病细胞系的影响显示,PND的CC<sub>50</sub>值分别为1.6 $\mu$ M和1.9 $\mu$ M(图6A-B)。在这些和其他分析中,使用未处理的细胞来定义由细胞操作和细胞培养导致的死亡细胞的基础水平。经溶剂处理的细胞还用作非特异性细胞死亡的对照和用于归一化目的,经H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理的细胞用作细胞毒性的阳性对照(图6)。与非癌乳腺MCF-10A细胞相比,PND对受试的六种乳腺癌细胞系中的四种具有较大选择性细胞毒性(SCI)指数,这四种细胞系分别为MDA-MB-231、MDA-MB-231LM2、MDA-MB-468和MCF-7,PND对这四种细胞系的SCI值分别为4.13、2.54、3.88和4.13(图5)。有趣的是,PND对T47D和HCC-70的SCI值(<1)不利,低于1(图5)。此外,在受试白血病/淋巴瘤细胞系中,SCI值最高(3.5)的细胞系为HL-60细胞系(图5)。另外,在Ramos和Jurkat细胞中,PND的SCI值分别为3和3.3,但在CEM细胞系中观察到了较差的选择性(图5)。在黑色素瘤细胞系(SCI=3.2)和受试的三种卵巢癌细胞系中的两种(SCI=3.9)中检测到良好的选择性。然而,在胰腺癌和肺癌细胞系中检测到较差的选择性(<2.0)(图5)。由于PND对MDA-MB-231和HL-60细胞系均表现出较低的CC<sub>50</sub>值和显著的选择性(SCI>3),因此选择这两种细胞系进行进一步分析。

PND引起MDA-MB-231和HL-60细胞上的磷脂酰丝氨酸外化

[0109] 为了辨别PND是否通过细胞凋亡或坏死诱导其细胞毒性,使用两种不同浓度的PND处理细胞24h,其中针对HL-60细胞系的浓度为34 $\mu$ M和68 $\mu$ M,针对MDA-MB-231细胞系的浓度为11 $\mu$ M和22 $\mu$ M。然后,用膜联蛋白V-FITC和PI对细胞进行染色,并通过流式细胞术进行分析。与阳性和阴性对照组相比,PND在两种细胞系中均诱导显著的磷脂酰丝氨酸(PS)外化(P<0.001;图7A-B)。PND以剂量依赖性方式诱导HL-60细胞发生显著PS外化,在34 $\mu$ M和68 $\mu$ M浓度下分别有14.8%和30.2%的细胞凋亡(P=0.0033,图7A)。此外,在两种试验浓度下,PND在MDA-MB-231细胞中诱导的PS外化百分比均高于HL-60细胞,在11 $\mu$ M和22 $\mu$ M浓度下,膜联蛋白阳性细胞分别为67.2%和71.1%(图7B)。正如预期,经溶剂处理和未处理的细胞在凋亡或坏死死亡方面未表现出任何显著增加(图7A-B)。此外,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>分别通过细胞凋亡和坏死诱导其对MDA-MB-231和HL-60细胞的细胞毒性效应(图7A-B)。因此,PND在MDA-MB-231和HL-60细

胞中均诱导了PS外化,这是细胞凋亡激活中一个众所周知的早期事件。

#### PND诱导癌细胞线粒体去极化

[0110] 触发内源性凋亡途径的早期生化事件是线粒体去极化,该去极化可使用多色JC-1试剂和流式细胞术进行定量测定。当线粒体被极化或去极化时,JC-1会分别发出红色或绿色荧光信号。因此,将MDA-MB-231和HL-60细胞与PND一起培养6h,并记录线粒体膜电位( $\Delta\Psi_m$ )状态。根据PS外化数据可以预期,与未处理的和经溶剂处理的细胞相比,经PND处理的癌细胞均表现出明显的线粒体去极化(图7C-D)。这些结果表明,PND能够在两种癌细胞类型中引起线粒体去极化,进一步表明PND通过内源性凋亡途径诱导细胞死亡。PND破坏MDA-MB-231和HL-60细胞的细胞周期特征并表现出DNA断裂

[0111] 为了检查在存在PND的情况下MDA-MB-231和HL-60细胞如何增殖,通过流式细胞术检查了细胞周期分布特征(图8)。为了确定PND对细胞周期进程的影响,采用了一种依赖于紫色激发DNA嵌入荧光团(DAPI(4',6-二氨基-2-苯基吡啶))的策略来定量测定细胞DNA含量。用PND处理MDA-MB-231细胞后,观察到G0/G1细胞亚群显著减少;但是在HL-60细胞中未观察到这种效应(图8B和F)。与PBS和未处理对照组相比,PND减少了MDA-MB-231和HL-60细胞中的S和G2/M亚群(图8B-D和F-H)。此外,PND以浓度依赖性方式在两种癌细胞系中引起显著DNA断裂,表现为G0/G1亚群显著增加( $P < 0.0005$ ;图8A和E)。对于经PBS处理的细胞和未处理的细胞,在细胞周期的每个阶段中两种细胞的百分比差异基本上是不可分辨的。这些实验显示,PND破坏了两种癌细胞类型中的细胞周期分布特征并诱导DNA断裂(G0/G1亚群)。

#### PND直接与dsDNA相互作用

[0112] 使用以质粒DNA为结合底物的DNA迁移率变动分析检查了PND和dsDNA之间的潜在相互作用,并将其与奎纳克林(一种结构相当的化合物)和一种众所周知的DNA嵌入剂的相互作用进行了比较。当将1mM的PND与DNA一起培养时,与游离质粒DNA相比,观察到经PND处理的DNA的迁移显著减小(图9左侧显示了迁移变动)。DNA总上样量的大约一半位于上样孔处,在琼脂糖凝胶中的迁移率最小。此外,当将0.5和0.25mM的PND与DNA一起培养时,迁移率明显降低(如图9左侧所示)。此外,基于不存在小于游离超螺旋DNA的DNA片段,PND处理未导致DNA降解(图9)。在之前的研究中,还发现奎纳克林(化学结构与PND相似)可通过嵌入作用与DNA发生相互作用。如图9所示,喹那克林在最高试验浓度(1mM)下引起DNA迁移的最大阻滞,这一点通过涂片得到证实,表明喹那克林与超螺旋DNA形成了复合物。此外,当在0.5和0.25mM浓度下试验时,喹那克林引起明显的DNA迁移阻滞,这与PND类似(图9)。与经PND处理的DNA的情况一样,喹那克林未表现出任何DNA降解活性(图9)。PI用作DNA结合的阳性对照,也会引起DNA迁移阻滞。我们的结果清楚表明,PND可以直接与DNA相互作用,引起其在琼脂糖凝胶中的迁移变动,这种与喹那克林类似的行为可能表明,PND也具有嵌入到dsDNA碱基之间的能力。

#### 通过紫外-可见分光光度滴定测定PND的DNA嵌入

[0113] 为了进一步证明PND与CT DNA之间的嵌入相互作用,在Tris/HCl缓冲液中进行了分光光度滴定。PND在300-500nm区域出现强吸收带,这是共轭芳香环电子能级间跃迁的典型吸收带。一般而言,在最大紫外-可见吸光度时观察到的减色和增色效应可作为嵌入DNA核碱基的共轭芳香体系之间堆积相互作用的证据。图10A示出了连续加入CT DNA后研究区

域的PND吸收光谱。研究了424nm处的最大吸光度,以判断化合物与DNA之间的相互作用。我们的结果显示存在显著减色效应(39%)和8nm红移。此外,使用斯卡查德方程测定了PND与CT DNA的结合亲和力 $[8.5 \pm 0.7 \times 10^5 \text{M}^{-1}]$ 。如图10B所示,PND与CT DNA的所有结合数据均与具有相似结构的已知嵌入剂的结合数据相当,正如迁移率变动分析所示,这表明PND也能够嵌入DNA碱基之间。

通过圆二色光谱法观察到,PND稳定了CT DNA的B构象

[0114] 此外,在Tris/HCl缓冲液中,通过圆二色光谱法研究了详细的DNA构象变化。B型CT DNA的典型CD光谱显示,由于碱基堆积,在275nm处出现最大阳性条带,由于右旋螺旋,在248nm处出现最小阴性条带。因此,CD信号的变化可以归因于DNA二级结构的相应变化。图11A和11B示出了CT DNA的CD光谱,以及分别用递增剂量的PND处理30分钟和20h的效果。我们的结果显示,PND能够以浓度依赖性方式增加阴性和阳性条带的强度,但其中任何条带都没有显著红移。这些结果与之前报告的类似化合物相当,表明PND能够稳定DNA的右旋B型,且无显著的构象变化。培养30分钟和20h后观察到相同光谱变化,这一事实表明这种相互作用在几分钟内发生,证实了嵌入结合模式。此外,在300-340nm(DNA不吸收光的区域)范围内出现阳性信号,表明在与CT DNA结合时可能在PND上诱导了一些不对称变化,因为在不存在核酸的情况下没有观察到PND的信号(见图10C)。

讨论

[0115] 在所分析的所有癌细胞系中,发现PND处理在低微摩尔浓度(1.6 $\mu\text{M}$ 至9.4 $\mu\text{M}$ )下会导致细胞死亡。除了对非癌细胞的毒性较低之外(MCF-10A;CC50为6.6 $\mu\text{M}$ ),与非癌细胞相比,PND对几种乳腺癌细胞表现出有利的选择性,SCI值 $>2.5$ 。PND还表现出对白血病/淋巴瘤细胞的有利SCI值(从1.43到3.47),对HL-60癌细胞的选择性最高。

[0116] 分析了PND在MDA-MB-231和HL-60癌细胞系中的作用模式。暴露于毒剂后,细胞可经历两种主要途径:坏死或凋亡途径。磷脂酰丝氨酸(PS)优先位于质膜小叶内侧,面向胞质,在细胞启动凋亡途径时,转运至质膜小叶外侧,是细胞凋亡的生化标志。当使用碘化丙啶和对PS具有高亲和力的FITC共轭膜联蛋白V时,流式细胞术鉴定出这种凋亡面。经PND处理的MDA-MB-231和HL-60细胞一致表现出PS外化,这表明PND利用凋亡途径以剂量依赖性方式产生细胞毒性。

[0117] 此外,细胞凋亡可以通过内源性或外源性生化途径启动。触发内源性途径激活的一个关键生化事件是线粒体去极化。因此,将MDA-MB-231和HL-60细胞暴露于PND下,用多色JC-1试剂染色,以探讨线粒体去极化是否参与PND诱导细胞死亡的机制。我们的数据清楚表明,两种癌细胞系在暴露于PND后均表现出明显的线粒体去极化,这表明内源性凋亡途径参与了PND的细胞毒性机制。

[0118] 研究细胞周期特征的既定策略依赖于通过流式细胞术定量测定细胞DNA含量。使用这种策略时,可以区分细胞周期的三个阶段,即G0/G1、S和G2/M。此外,不论使用哪种起始信号激活凋亡级联,死亡信号最终都将导致DNA断裂,这是细胞凋亡的晚期生化标志。当通过流式细胞术进行细胞周期分析时,基于G0/G1亚群(位于细胞周期直方图左侧的特征峰)的存在,可以轻易识别经历DNA断裂的细胞。因此,在将细胞与PND一起培养72h后,同时分析了凋亡诱导的DNA断裂以及细胞周期。这些分析表明,PND能够扰乱MDA-MB-231和HL-60细胞上的细胞周期特征进展,检测出每种细胞系的不同模式。此外,PND还以剂量依赖性方式对

MDA-MB-231和HL-60细胞造成一致的DNA断裂,证实了之前得出的PND诱导细胞凋亡的结果。

[0119] 在通过凝胶电泳进行的迁移率变动分析中,通过DNA迁移阻滞,可以轻易检测出DNA与药物或蛋白质之间的相互作用。在这些DNA结合分析中,实验化合物-DNA复合物的迁移速度比游离DNA(未复合的DNA对照)的慢,这导致DNA的分子量更大。此外,当将化合物与质粒DNA一起培养时,可以检测是否有任何导致DNA降解或断裂的有害作用。结果表明,PND与DNA直接相互作用,因为它会在琼脂糖凝胶中以浓度依赖性方式造成显著的DNA迁移阻滞,但不会导致DNA降解。通过紫外-可见分光光度滴定法以及CT DNA的圆二色光谱确定了PND与DNA的嵌入结合模式。此外,CD光谱提供了B型CT DNA稳定的证据,在与PND相互作用时未检测到构象变化。总的来说,迁移率变动分析、紫外-可见光谱和CD系列实验提供了令人信服的证据,证明PND通过嵌入DNA碱基来结合DNA。

[0120] 在该临床前研究中,研究发现表明,PND对一组人癌细胞系表现出强细胞毒性,具有低微摩尔CC50值和有利的选择性细胞毒性指数,对三阴性乳腺癌MDA-MB-231细胞(一类侵袭性肿瘤)和白血病HL-60细胞表现出显著的选择性。PND及相关化合物和衍生物具有抗癌药物活性,因为PND通过激活凋亡途径显著且持续地产生细胞毒性效应,这可通过PS外化、线粒体去极化、DNA断裂和干扰细胞周期得到证明。此外,发现PND与DNA直接相互作用,在琼脂糖凝胶电泳期间引起DNA迁移阻滞,PND的紫外-可见光谱和DNA的CD光谱均发生变化,表明嵌入结合模式。

#### 实施例4——PND对小鼠体内转移性乳腺癌的活性分析

##### 材料和方法

[0121] 使用饲管强饲法,每天向具有源自MDA-MB-231LM2-LUC4细胞系的转移性乳腺癌细胞的12只可比小鼠注射咯萘啶(PND)水溶液或安慰剂(水)。在肿瘤尺寸达到150至300mm<sup>3</sup>时(即第1天),开始治疗。

[0122] 在PND治疗组(n=6),从第1天到第9天,对所有6只小鼠按160mg/kg的剂量给药。在整个研究期间,PND治疗组的2、4和5号小鼠按160mg/kg的剂量给药;而在第9天,PND治疗组的1、3和6号小鼠的肿瘤最大,在第10天,他们的给药剂量增加到240mg/kg,在第13天增加到320mg/kg。在整个研究过程中,对照组小鼠(n=6)被给予安慰剂。每天测量每个肿瘤的尺寸。该方案的终点是当肿瘤尺寸达到1500mm<sup>3</sup>时,对小鼠进行安乐死。该分析的显著性水平设置为P<0.05。

##### 结果

[0123] 从第1天到第9天的肿瘤尺寸比较可以看出,平均而言,对照组小鼠(750mm<sup>3</sup>)所患肿瘤比PND治疗组小鼠(430mm<sup>3</sup>)所患肿瘤更大。差异显著,f检验P值为0.01(见图12A)从第1天到第15天(当时所有12只小鼠都存活)的肿瘤尺寸比较可以看出,平均而言,与PND治疗组小鼠相比,安慰剂组小鼠所患肿瘤长得更大,差异显著,f检验P值为0.0001(见图12B)。

[0124] PND治疗组小鼠的生存期明显比安慰剂组小鼠的长,但在第15天之后,PND治疗组中3只小鼠的剂量增加以及安慰剂组小鼠安乐死使得比较变得更复杂。

[0125] 在研究过程中,除了第15天之后行走不适外,未报告任何其他负面不良事件。在约第20天,PND治疗组的所有6只小鼠的眼睛、皮肤、耳朵和爪子都发黄,这可能是由于PND是一种强力黄色素导致的。未观察到体重下降、饮食失调或仪容整洁问题。对PND治疗组的6只小鼠进行了解剖,未发现PND在任何部位(包括胃、肠或肝脏)积聚的迹象。

[0126] 结果清楚表明,与安慰剂组小鼠相比,PND治疗组小鼠的转移性乳腺癌肿瘤更小,并且小鼠存活时间更久。

#### 实施例5——结合化疗时PND的活性分析

##### 材料和方法

[0127] 在用一系列已知商业化化疗药物对细胞进行治疗后24小时,且在对细胞进行细胞死亡分析之前,将PND加入MDA-MB-231乳腺癌细胞系的培养物中。已知在常见的癌症治疗给药剂量下,每种商业化化疗药物都会产生严重的副作用。将这些化疗药物的剂量减少到初始剂量的一半、四分之一、八分之一和十六分之一;而PND的剂量则保持不变。根据达到至少半数细胞毒性浓度(CC50)所需的每种化合物的浓度来衡量这些联合疗法的效果。顺铂、吉西他滨、硼替佐米和MG132的初始剂量(CC50)分别为95.42 $\mu$ M、0.44 $\mu$ M、0.01 $\mu$ M和0.5 $\mu$ M,而PND的剂量始终为5.5 $\mu$ M。

##### 结果

[0128] 图12所示的结果表明,联合给服PND(其中,在化疗药物之后给服PND)可以大大减少有效杀死癌细胞所需的药量。

#### 实施例6——使用PND治疗犬晚期癌症

##### 材料和方法

[0129] 进行了一项开放标签研究,以评估口服四磷酸咯萘啶(PND)在延长五只癌症晚期犬类受试者寿命方面的疗效和安全性。

[0130] 符合条件的受试者患有转移性或不可切除的恶性肿瘤,并且对于它们来说,不存在标准治疗或姑息措施,或标准治疗或姑息措施不再有效。由于治疗癌症晚期犬涉及到伦理问题,没有安慰剂组。

[0131] PND从Mangalam Drugs and Organics,Ltd.获得,封装在明胶胶囊中,口服给药,每天两次。

[0132] 评估的主要结局是受试者在开始研究时的预期存活时间与其实际存活时间之间的差异。次要结局是:抗肿瘤活性、恶性肿瘤相关症状缓解以及PND的安全性和耐受性。

[0133] 五只犬的研究如下:

[0134] 病例1,肥大细胞癌:犬(金毛猎犬),雌性,6岁,28.7kg。组织病理学报告证实患有癌症。2019年5月中旬开始口服PND,此后没有接受过其他癌症药物治疗。在开始研究时,兽医预计存活时间为4至6个月。该受试者按每天每公斤体重23mg的剂量口服PND(早上325mg,晚上325mg)。

[0135] 病例2,骨肉瘤:犬(圣伯纳犬),雄性,5岁,49.7kg。2019年5月17日开始口服PND,此后没有接受过其他癌症药物治疗。在开始研究时,兽医预计存活时间为4至6个月。该受试者按每天每公斤体重20mg的剂量口服PND(早上325mg,晚上650mg)。

[0136] 病例3,梭细胞肉瘤:犬(边境牧羊犬),雄性,9岁,28.5kg。2014年,该犬确诊患有低度梭细胞肉瘤,本来预定于2019年2月11日实施安乐死,预期寿命为1到2周。但兽医于2019年2月11日开始让其口服PND,此后该受试者没有接受过其他癌症药物治疗。该受试者按每天每公斤体重15mg的剂量口服PND(早上215mg,晚上215mg)。

[0137] 病例4,非霍奇金淋巴瘤:犬(拳师犬),雌性,27kg,11岁。活检报告证实患有癌症。2018年12月开始口服PND,此后没有接受过其他癌症药物治疗。该受试者按每天每公斤体重

15mg的剂量口服PND(早上210mg,晚上210mg)。然而,在2019年2月停止服用PND(由于从美国到加拿大的运输问题),并且再也没有继续。

[0138] 病例5,肥大细胞瘤:犬,雄性,27.9kg。组织病理学报告证实患有癌症。手术切除了舌头上的肿瘤,边界不清楚。2018年12月开始口服PND,此后没有接受过其他癌症药物治疗。该受试者按每天每公斤体重15mg的剂量口服PND(早上210mg,晚上210mg)。

#### 结果

[0139] 病例1:未报告任何与研究药物有关的不良事件。在开始研究时对四个肿瘤的体积进行了测量,并与随访测量进行了比较。右下颌淋巴结2.5cm X2cm对2cm X1cm;左下颌淋巴结3cm X2cm对2.2cm X1cm;右腭(膝弯)淋巴结0.5cm X0.5cm对0.2cm X0.2cm;左腭淋巴结:0.5cm X0.5cm对0.2cm X0.2cm。当时该犬仍然存活,从2019年6月起,恶性肿瘤相关症状得到缓解,允许进行日常活动。在所有病例的随访测量中发现,肿瘤尺寸在临床上明显减小。

[0140] 病例2:唯一报告的可能与研究药物相关的不良事件是流涎、面部肿胀和呕吐,服用苯海拉明可以解决呕吐问题。开始研究时肿瘤尺寸为3.7cm X2.6cm。截至2019年6月,该犬仍存活并且状态良好,由于恶性肿瘤相关症状得到缓解,可以进行日常活动。

[0141] 病例3:除了最初的呕吐外,没有报告任何与研究药物相关的不良事件,呕吐也得到了控制。开始研究时对三个肿瘤的尺寸进行了测量:2cm X2.5cm;3cm X3.8cm;和3cm X4cm。据报告,在随访时发现每个肿瘤的体积减少了约20%。2019年5月中旬,该犬被安乐死,其存活时间延长了3个月。

[0142] 病例4:未报告任何与研究药物有关的不良事件。在开始研究时对受试者颈部的一个肿瘤的体积进行了测量,并与随访测量值进行了比较。到2019年3月,肿瘤缩小了70%。2019年4月20日,该犬被安乐死,其存活时间延长了2.5个月。

[0143] 病例5:患者左下颌增大。在开始研究时对一个肿瘤的体积进行了测量,并与随访测量值进行了比较。肿瘤体积保持不变:2cm X1cm对2cm X1cm。当时该犬仍然存活,从2019年6月起,恶性肿瘤相关症状得到缓解,允许进行日常活动。

#### 实施例7——使用PND治疗人类晚期癌症

##### 材料和方法

[0144] 进行了一项开放标签、剂量递增研究,以评估口服四磷酸咯萘啶(PND)在延长五名患有选定癌症的晚期癌症人类受试者的寿命方面的疗效和安全性。符合条件的受试者患有转移性或不可切除的恶性肿瘤,并且对于他们来说,不存在标准治疗或姑息措施,或标准治疗或姑息措施不再有效。排除标准包括在临床上明显的活动性感染、存在不可控的其他疾病、中性粒细胞减少症和妊娠。

[0145] PND从Mangalam Drugs and Organics,Ltd.获得,粉状PND封装在“00”号明胶胶囊中,口服给药。每个胶囊含有125mg PND和惰性填料微晶纤维素(MCC)或200mg PND(无填料)。

[0146] 在开始研究之前以及每次增加剂量之前,验证受试者的全血计数(CBC)和血生化全项检查(CMP)实验室结果是否在正常参考范围内。

[0147] 如果不存在不可接受的毒性,则指示受试者增加剂量。研究组1开始时每日剂量为250mg,持续2周,随后增加至375mg,持续2周,然后一直为500mg。研究组2开始时每日剂量为200mg,持续2周,随后增加至400mg,持续2周,然后一直为600mg。由于治疗癌症晚期患者涉

及到伦理问题,所以没有安慰剂组。

[0148] 评估的主要结局是受试者在开始研究时(预计每位受试者的存活时间为2至4周)的预期存活时间与其实际存活时间之间的差异。次要结局是:恶性肿瘤相关症状缓解、抗肿瘤活性、安全性以及PND的耐受性。

[0149] 五个人的研究如下:

[0150] 病例1,男性,65岁,2018年3月确诊患有肝胆管克拉茨金瘤(或肝门部胆管癌)。2018年12月20日,该受试者开始按照方案服用PND,每天2粒。

[0151] 病例2,男性,43岁,第四期肺癌,于2017年5月确诊。该受试者在2018年12月接受了最后一个周期的化疗,并于2019年1月22日开始服用PND,每天2粒。

[0152] 病例3,女性,55岁,第四期卵巢癌,于2017年6月确诊。该受试者在2018年11月接受了最后一个周期的化疗,并于2019年1月15日开始服用PND,每天2粒。

[0153] 病例4,女性,54岁,第四期乳腺癌,于2017年9月确诊。2019年1月20日,该受试者开始服用PND,每天2粒。

[0154] 病例5,女性,40岁,第四期小细胞肺癌,于2017年4月确诊。受试者在2018年12月接受了最后一个周期的化疗,并于2019年1月29日开始服用PND,每天2粒。

#### 结果

[0155] 病例1:未报告任何与研究药物有关的不良事件。2019年6月,该受试者仍然存活,其最新CBC和CMP结果均在正常参考范围内,恶性肿瘤相关症状得到缓解,允许进行日常活动。

[0156] 病例2:未报告任何与研究药物有关的不良事件。该受试者于2019年2月22日死于肺癌。

[0157] 病例3:未报告任何与研究药物有关的不良事件。该受试者于2019年1月29日死于卵巢癌。

[0158] 病例4:该受试者于2019年2月15日死于乳腺癌。

[0159] 病例5:唯一报告的与研究药物相关的不良事件是治疗第一周出现皮肤刺激,但该症状于一周内消除,可能与研究药物有关。截至2019年6月,该受试者仍然存活,其最新CBC和CMP结果均在正常参考范围内,恶性肿瘤相关症状得到缓解,允许进行日常活动。

[0160] PND似乎具有良好的耐受性(任何受试者均没有达到最大耐受剂量),并且延长了5名癌症受试者中2名的寿命,因此有理由进行充分严格的对照研究,从而获得一种获批的基于PND的癌症药物,该药物可以提高存活率而不会产生严重副作用。



图1

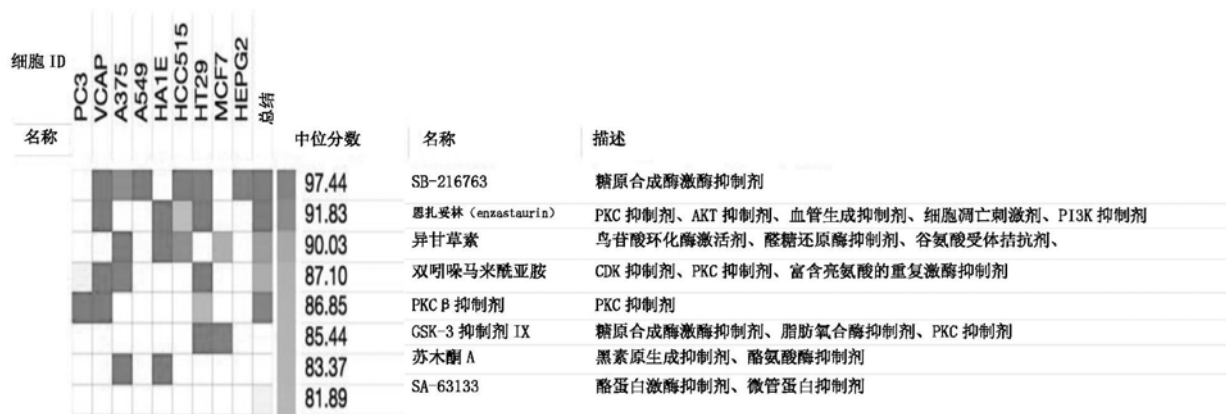
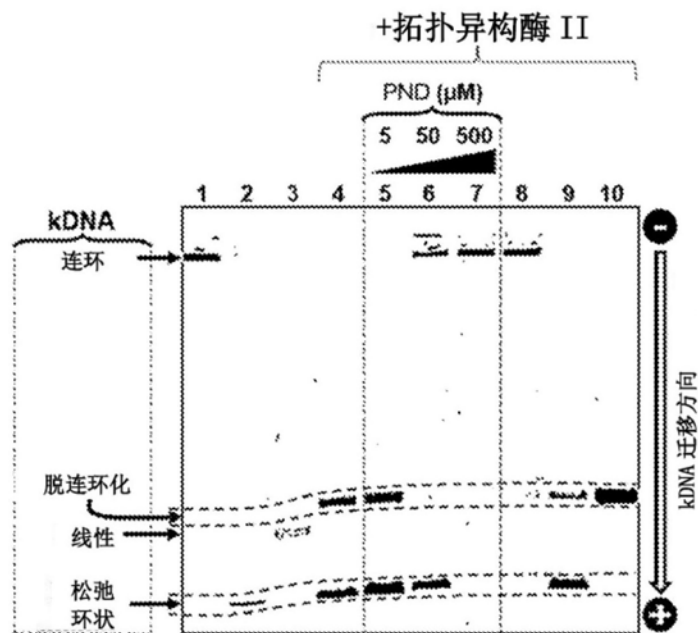


图2

细胞 ID	PC3	VCAP	A375	A549	H1A1E	HCC515	HT29	MCF7	HEPG2	总结	#	中位分数	类型	名称	描述
1											1	99.58		BRD-K77681376	酪蛋白激酶抑制剂、FLT3 抑制剂
2											2	99.56		雷公藤甲素	RNA 聚合酶抑制剂
3											3	99.56		吡嗪柔比星 (pidorubicine)	拓扑异构酶抑制剂、DNA 嵌入药物
4											4	99.49		ER-27319	介体释放抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂
5											5	99.49		PIK-75	DNA 蛋白激酶抑制剂、P110 抑制剂
6											6	99.46		多柔比星	拓扑异构酶抑制剂、DNA 嵌入药物
7											7	99.46		吡柔比星	拓扑异构酶抑制剂
8											8	99.45		AT-7519	CDK 抑制剂、细胞周期抑制剂
9											9	99.44		柔红霉素	RNA 合成抑制剂、拓扑异构酶抑制剂
10											10	99.44		ZG-10	JNK 抑制剂
11											11	99.40		双咪喹马来酰亚胺-ix	PKG 抑制剂、糖原合成酶抑制剂
12											12	99.35		阿沃地昔布	CDK 抑制剂、细胞凋亡刺激剂、BCL 抑制剂、
13											13	99.31		PF-562271	黏着斑激酶抑制剂
14											14	99.22		BMS-34541	IKK 抑制剂
15											15	99.11		拓扑异构酶抑制剂	
16											16	98.96		更生霉素	DNA 导向的 RNA 聚合酶抑制剂
17											17	98.93		BRD-K85853281	自由基形成刺激剂
18											18	98.89		JNJ-7706621	CDK 抑制剂、极光激酶抑制剂
19											19	98.82		更生霉素	DNA 导向的 RNA 聚合酶抑制剂
20											20	98.77		BRD-K53780220	酪蛋白激酶抑制剂、FLT3 抑制剂
21											21	98.76		色霉素 A3	DNA 结合
22											22	98.73		THM-1-94	HDAC 抑制剂、细胞凋亡刺激剂
23											23	98.73		拓扑替康	拓扑异构酶抑制剂
24											24	98.73		BI-2536	PLX 抑制剂、细胞凋亡刺激剂
25											25	98.68		萘发酰胺	谷胱甘肽转移酶抑制剂
26											26	98.68		米托蒽醌	拓扑异构酶抑制剂、DNA 嵌入药物
27											27	98.64		柔红霉素	RNA 合成抑制剂、拓扑异构酶抑制剂
28											28	98.63		多柔比星	拓扑异构酶抑制剂、DNA 嵌入药物
29											29	98.59		TG-101348	JAK 抑制剂、FLT3 抑制剂、RET 酪氨酸激酶
30											30	98.56		伏立诺他	HDAC 抑制剂、细胞周期抑制剂
31											31	98.53		曲古菌素 A	HDAC 抑制剂、CDK 表达增强剂
32											32	98.39		曲古菌素 A	HDAC 抑制剂、CDK 表达增强剂
33											33	98.28		多索吗啡	AMPK 抑制剂、DNA 损伤
34											34	98.00		CGP-60474	CDK 抑制剂、PKC 抑制剂
35											35	97.99		拓扑替康	拓扑异构酶抑制剂
36											36	97.94		HDAC 抑制剂	
37											37	97.83		柔红霉素	RNA 合成抑制剂、拓扑异构酶抑制剂
38											38	97.83		5-碘杀结核菌素	酪氨酸激酶抑制剂
39											39	97.77		喜树碱	拓扑异构酶抑制剂
40											40	97.64		AS-601245	JNK 抑制剂
41											41	97.61		伊达比星	拓扑异构酶抑制剂
42											42	97.30		溴多姆抑制剂	
43											43	97.14		贝利司他	HDAC 抑制剂、细胞周期抑制剂

A



B

图3

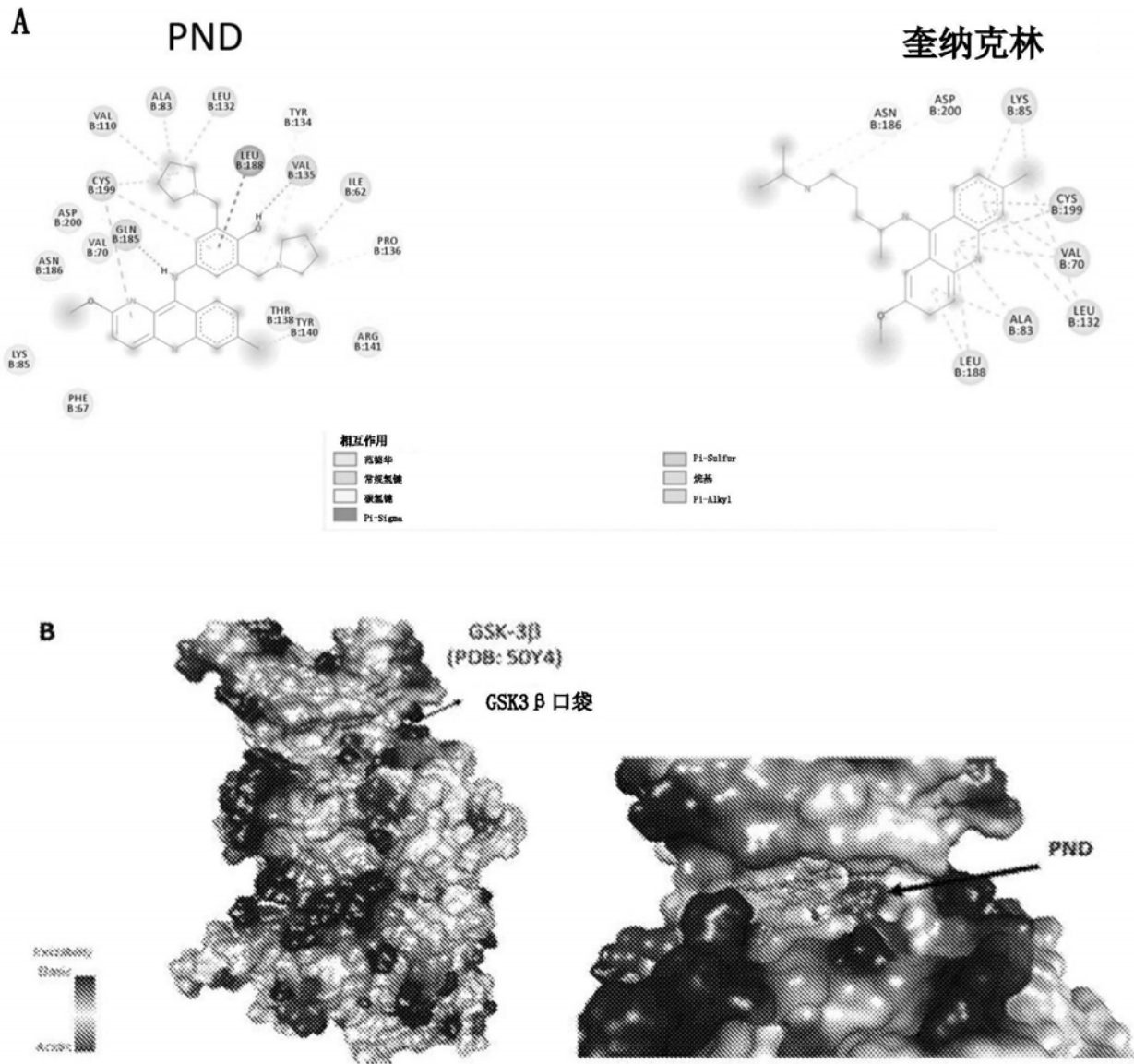


图4

细胞类型	细胞系名称	CC <sub>50</sub> μM	SCI
乳腺癌细胞	MDA-MB-231	1.6 ± 0.20	4.1
乳腺癌细胞	MDA-MB-231 LM2*	2.6 ± 0.18	2.5
乳腺癌细胞	MDA-MB-468	1.7 ± 0.60	3.9
乳腺癌细胞	T47D	9.4 ± 1.41	0.7
乳腺癌细胞	HCC1419	7.0 ± 0.33	0.9
乳腺癌细胞	MCF-7	1.6 ± 0.40	4.1
乳腺癌细胞	HCC-70	1.5 ± 0.51	4.4
乳腺上皮细胞	MCF-10A	6.6 ± 0.42	1.0
正常成纤维细胞	HS-27	3.1 ± 0.39	2.1
白血病细胞	HL-60	1.9 ± 0.07	3.5
伯基特淋巴瘤细胞	RAMOS	2.2 ± 0.16	3.0
T 细胞淋巴瘤细胞	Jurkat	2.0 ± 0.11	3.3
T 细胞淋巴瘤细胞	CBM	4.6 ± 0.09	1.4
黑色素瘤细胞	A375	2.0 ± 0.03	3.2
卵巢癌细胞	Ovcar 8	1.7 ± 0.22	3.9
卵巢癌细胞	Ovcar 5	1.7 ± 0.06	3.9
卵巢癌细胞	Ovcar 3	3.3 ± 0.02	2.0
肺癌细胞	A549	3.5 ± 0.21	1.9
胰腺癌细胞	Panc-1	6.5 ± 0.07	1.0

†均值±标准偏差

‡MDA-MB-231 的肺转移 (LM) 变体

图5

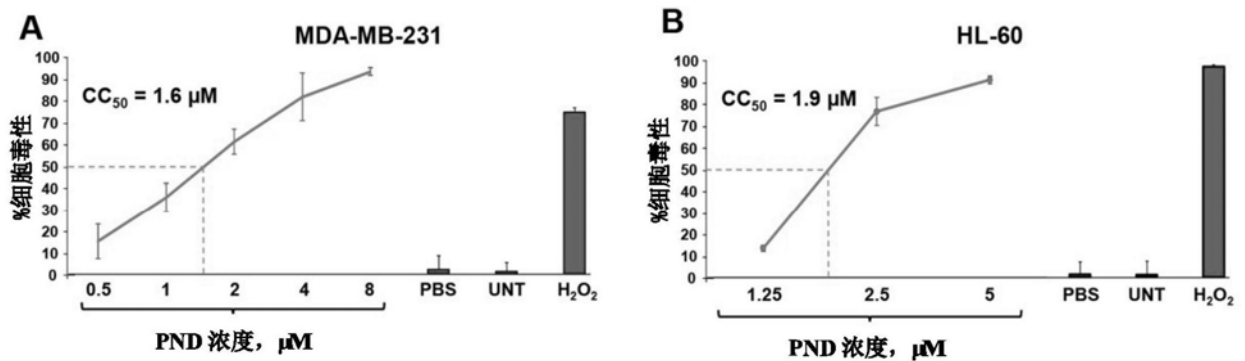


图6

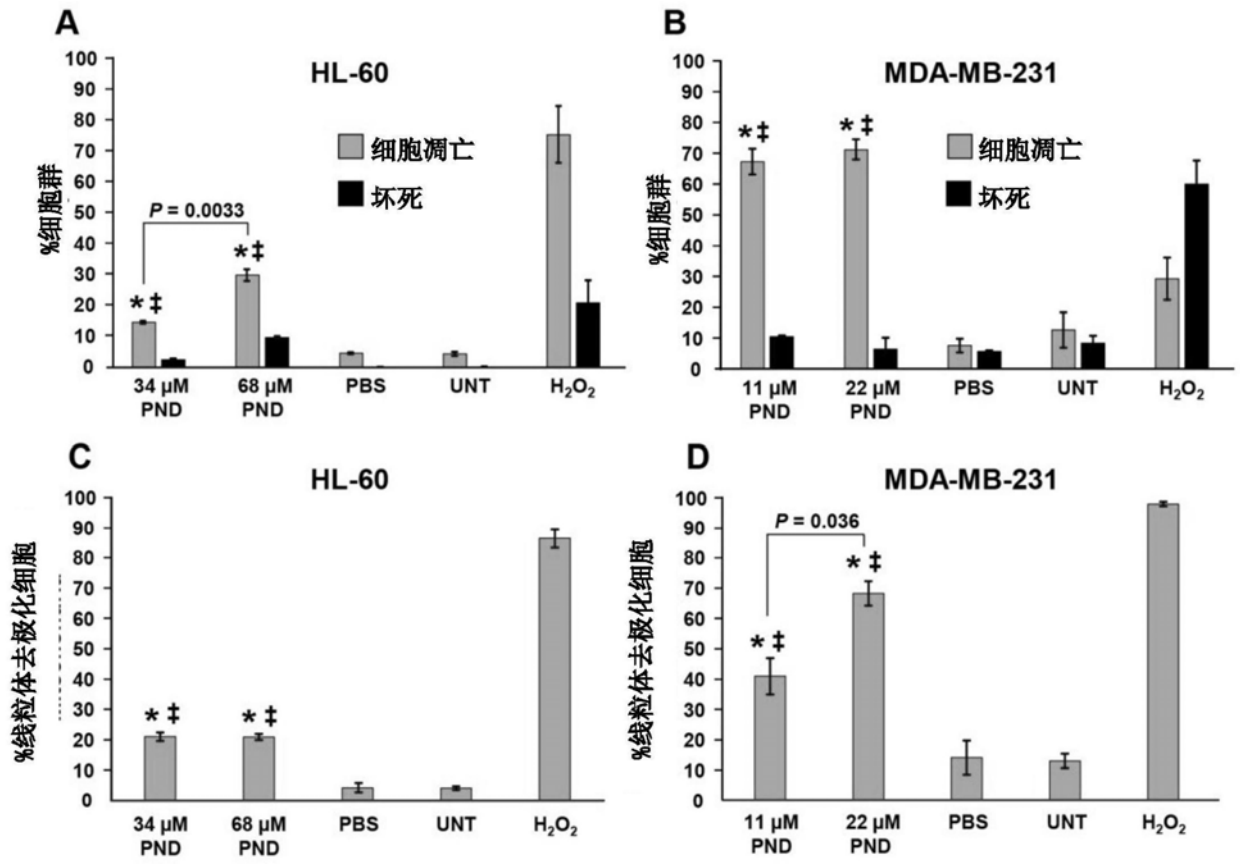


图7

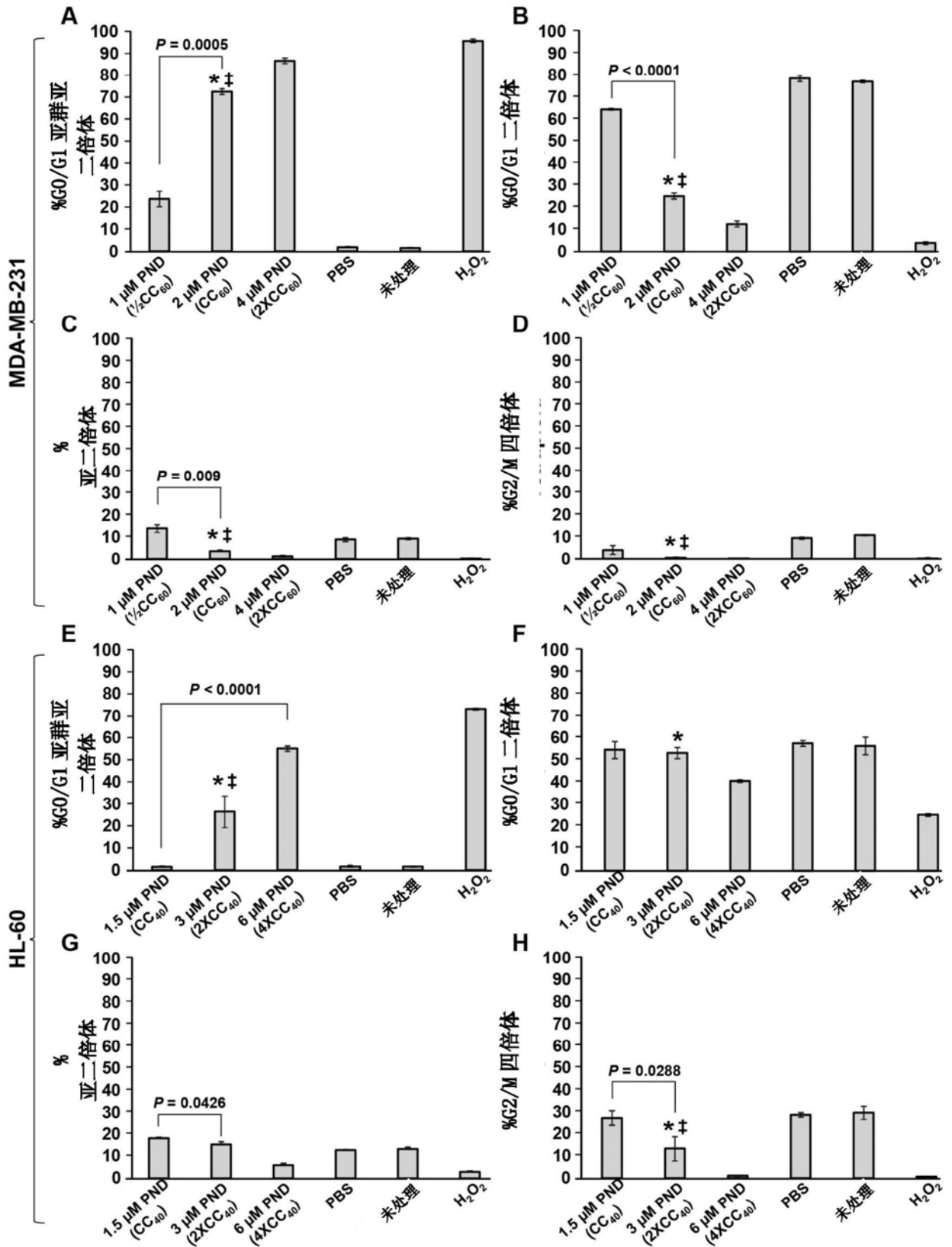


图8

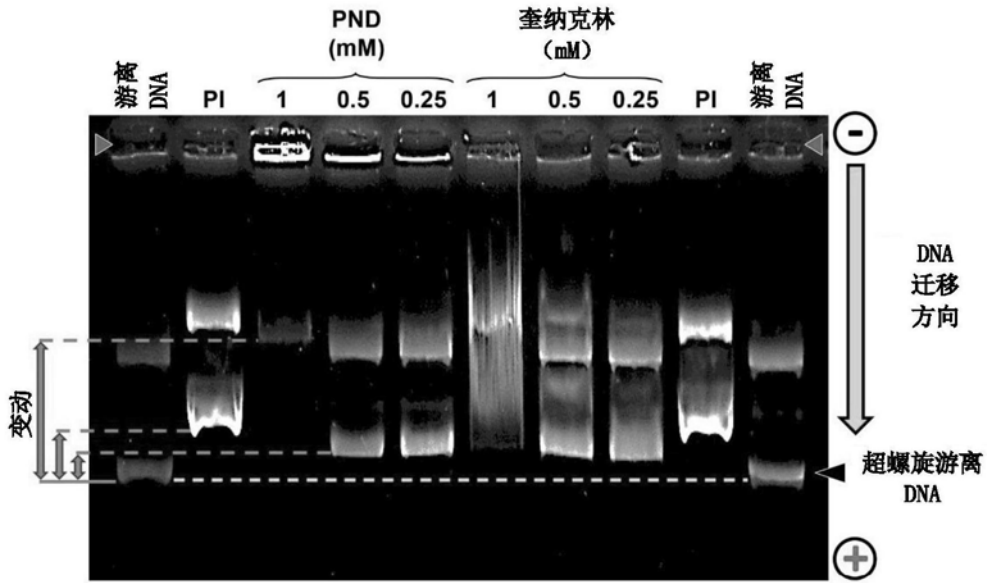
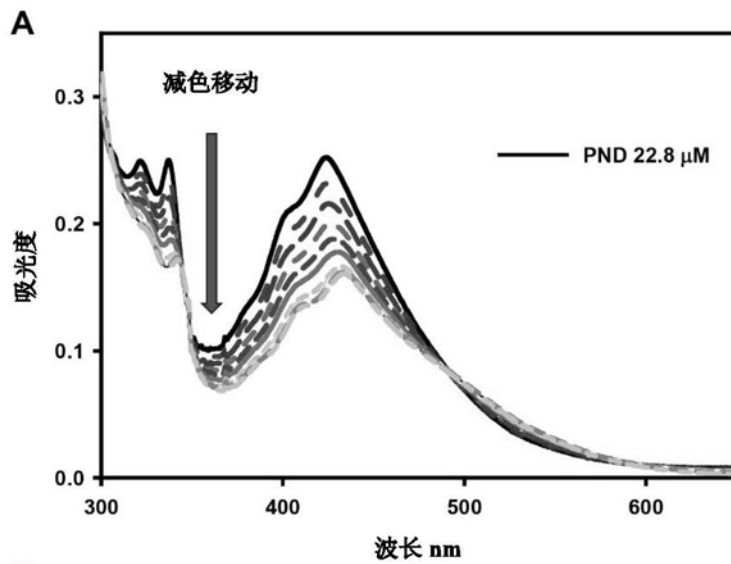


图9



B  
PND 与 CT DNA 相互作用的紫外-可见吸光数据

化合物	游离 $\lambda$ 最大值 (nm)	结合 $\lambda$ 最大值 (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	$K [ \times 10^5 M^{-1} ]$	减色性 (%)
PND	424	432	8	$8.5 \pm 0.7$	39

图10

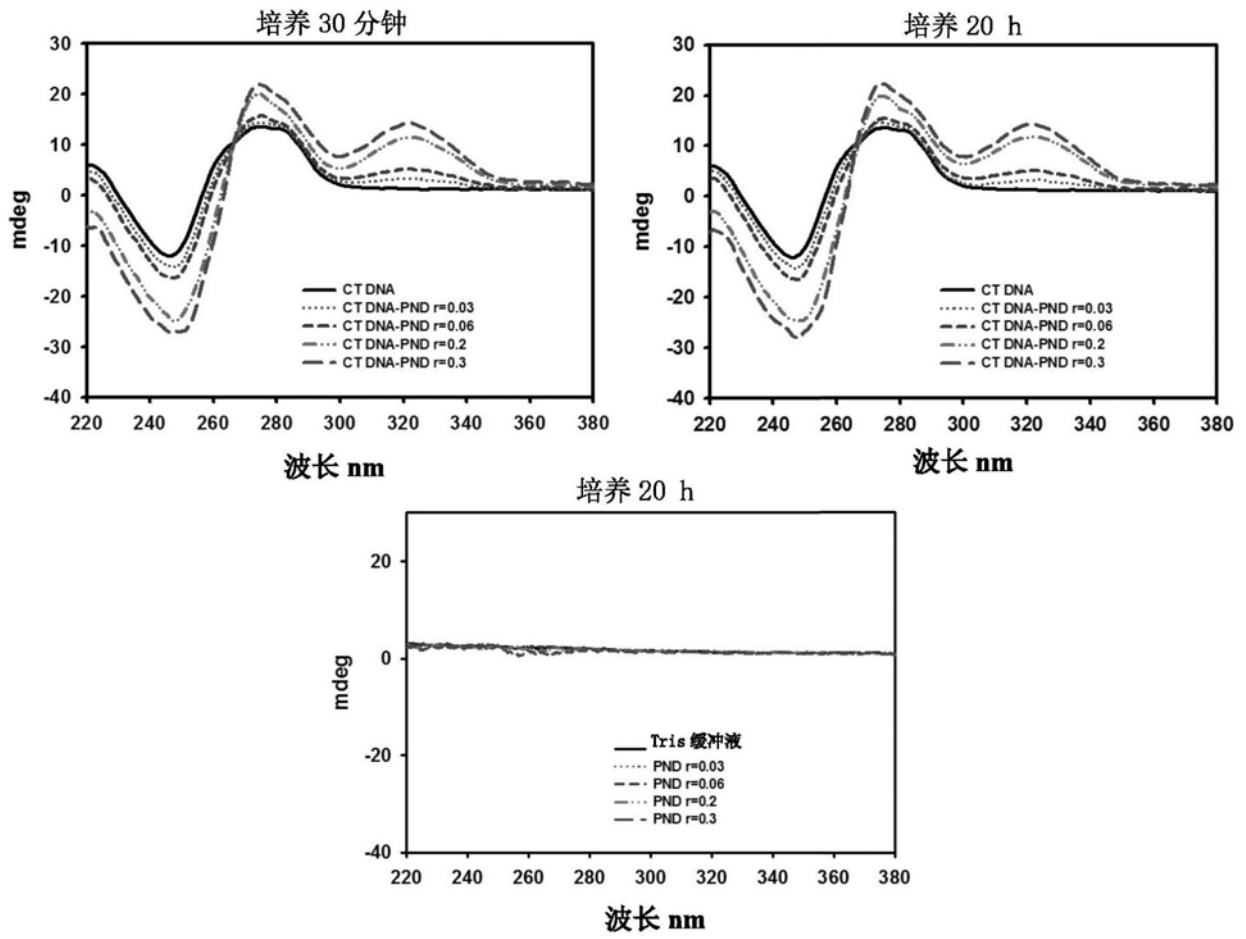


图11

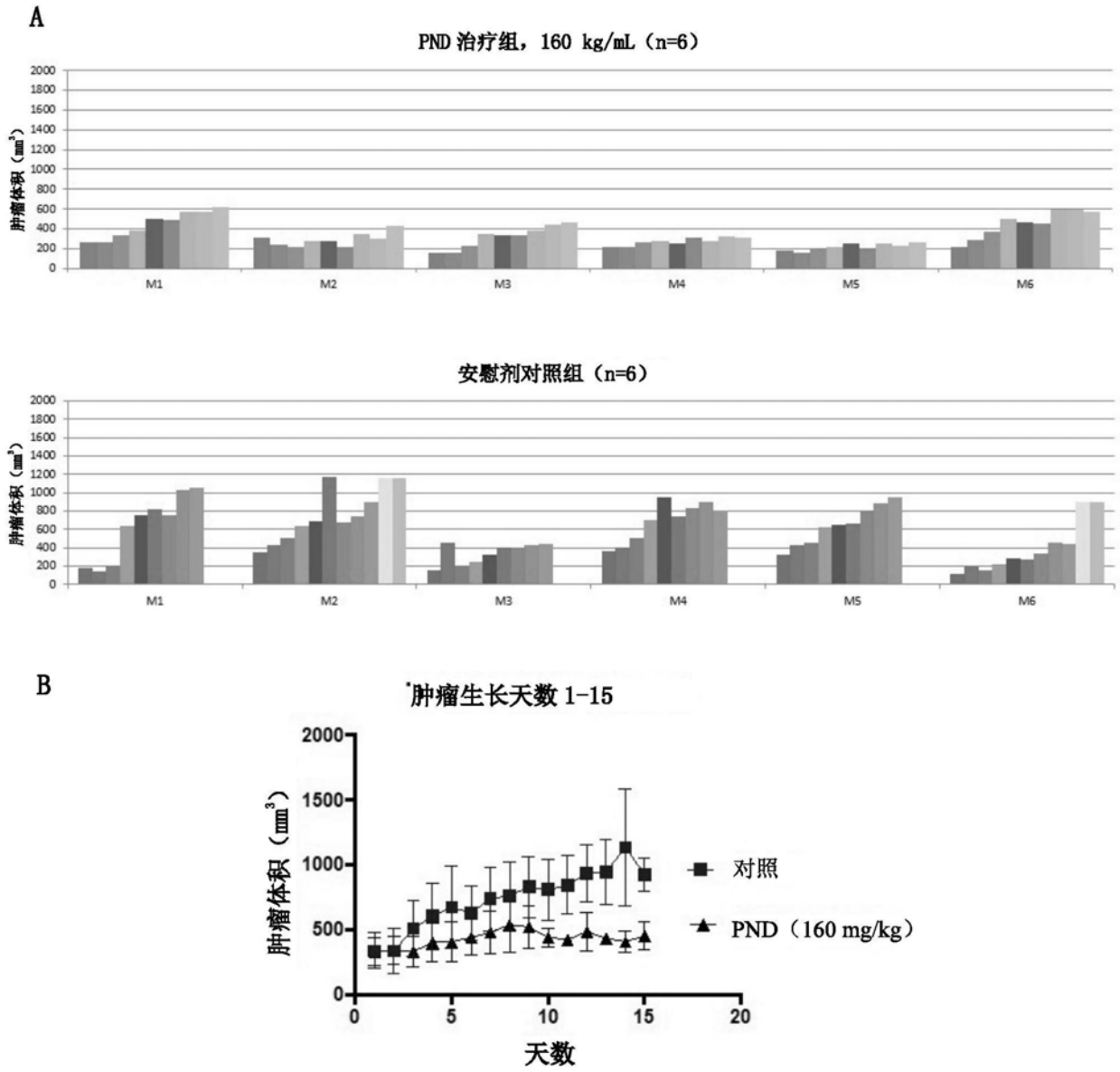


图12

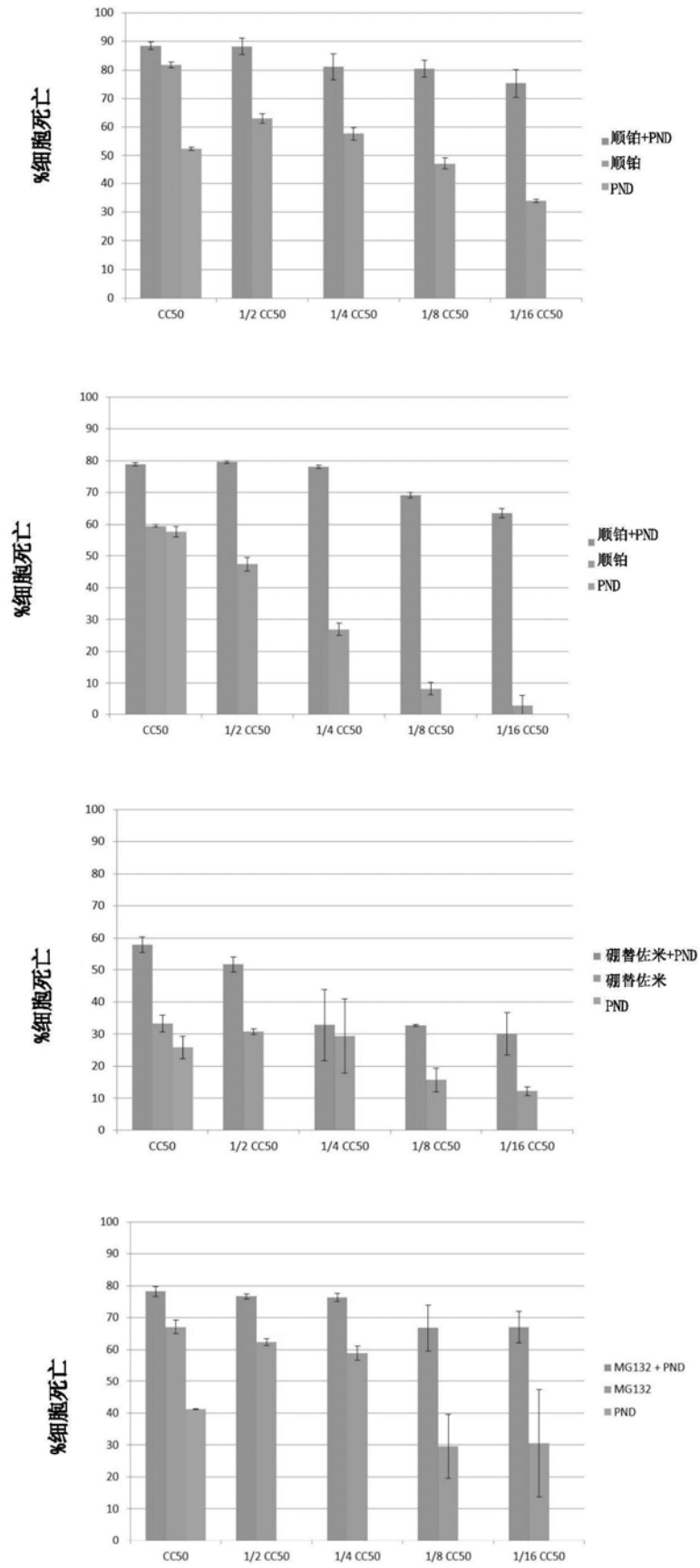


图13