



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101854802 B

(45) 授权公告日 2014. 12. 03

(21) 申请号 200880115249. X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008. 09. 10

A61K 31/343 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

60/971, 144 2007. 09. 10 US

61/013, 372 2007. 12. 13 US

审查员 李虎强

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 05. 07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2008/075906 2008. 09. 10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/036101 EN 2009. 03. 19

(73) 专利权人 北京强新生物科技有限公司

地址 100871 北京市海淀区海淀大街 3 号 1
幢 2016 室

(72) 发明人 C·J·李 K·米库尔 Y·李

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

代理人 黄革生 林柏楠

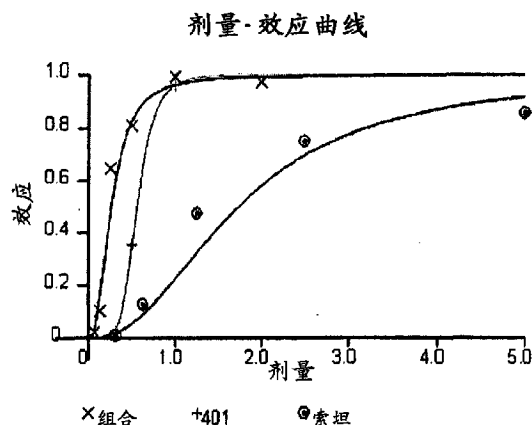
权利要求书1页 说明书28页 附图13页

(54) 发明名称

用于癌症治疗的组合物和方法

(57) 摘要

本发明涉及应用 Stat3 通路抑制剂或癌干细胞抑制剂组合治疗癌症的组合物和方法。



1. 包含 2-乙酰基萘并 [2,3-b] 呋喃 -4,9-二酮或其可药用盐和第二药剂的组合物在制备用于受试者中治疗癌症的药物中的用途,其中,所述组合物被配制为口服施用,且第二药剂选自:紫杉醇/泰素、厄洛替尼、舒尼替尼、拉帕替尼、索拉非尼、卡铂、多柔比星、多烯紫杉醇、吉西他滨、和依托泊苷。

2. 权利要求 1 的用途,其中所述癌症是转移性的、标准一线癌症治疗顽固性的或复发性的。

3. 权利要求 2 的用途,其中所述癌症选自下组:乳腺癌、头颈部癌、肺癌、卵巢癌、胰腺癌、结直肠癌、前列腺癌、肾细胞癌、黑素瘤、肝细胞癌、宫颈癌、肉瘤、脑瘤、胃癌、胃肠癌、多发性骨髓瘤、白血病和淋巴瘤。

4. 权利要求 1 的用途,其中所述癌症是胃癌。

5. 权利要求 1 的用途,其中所述癌症是胃肠癌。

6. 权利要求 1 的用途,其中所述癌症是结直肠癌。

用于癌症治疗的组合物和方法

[0001] 对相关申请的引用

[0002] 本申请要求分别于 2007 年 9 月 10 日和 2007 年 12 月 13 日递交的美国临时专利申请 No. 60/971, 144 和 61/013, 372 的优先权和权益, 所述申请的全部内容并入本文作为参考。

发明领域

[0003] 本发明涉及应用 Stat3 通路抑制剂和癌干细胞抑制剂组合治疗癌症及其他紊乱的组合物和方法。

[0004] 发明背景

[0005] 癌干细胞 (CSC)

[0006] 近年来, 一种新的肿瘤发生模型得到了广泛认可, 其中提出假说, 在全部肿瘤物质中仅一小部分负责肿瘤内的致癌活性, 而老的模型或者说克隆遗传模型却假定所有突变的肿瘤细胞均同等地贡献于此致癌活性。根据新模型, 这小部分肿瘤发生细胞是具有干细胞样性能的转化细胞, 并称为“癌干细胞” (CSC)。在 20 世纪 90 年代, Bonnet 和 Dick 首先在体内证明了急性髓性白血病 (AML) 中 CSC 的存在。他们的数据表明, 仅小亚群的人 AML 细胞在移植到免疫缺陷小鼠中时具有转移 AML 的能力, 而其他 AML 细胞不能够诱发白血病。后来, 证明这些 CSC 具有与原始造血干细胞相同的细胞标志 $CD34^+/CD38^-$ [1]。从那以后, 研究人员已经确凿地在多种类型的肿瘤 (包括脑、乳腺、皮肤、前列腺等的肿瘤) 中发现 CSC。

[0007] 肿瘤发生的 CSC 模型能够解释为什么为了确立肿瘤移植, 需要将几万或几十万的肿瘤细胞注射到试验动物体内。在人 AML 中, 这些 CSC 细胞的频率低于万分之一 [2]。尽管 CSC 在一个给定的肿瘤细胞群体中是稀少的, 但有增加的证据表明此类细胞存在于几乎所有肿瘤类型中。然而, 由于癌细胞系是从特异地适应于在组织培养中生长的癌细胞亚群中选择的, 所以癌细胞系的生物学及功能特性可能经历显著的变化。因此, 并非所有的癌细胞系都含有 CSC。

[0008] 癌干细胞与正常干细胞享有许多相似的性状。例如, CSC 具有自我更新能力, 即产生其他的肿瘤发生癌干细胞的能力, 一般速率比其他分裂肿瘤细胞低, 但非有限次数的分裂。CSC 还具有分化成多种细胞类型的能力, 这就解释了如下组织学现象——许多肿瘤不仅含有多种对宿主器官而言天然的细胞类型, 而且肿瘤转移中常常保持异质性。已经证明 CSC 根本性地负责肿瘤发生、癌症转移和癌症复发。CSC 也称为肿瘤起始细胞、癌干细胞样细胞、干细胞样癌细胞、高致瘤性细胞、肿瘤干细胞、实体瘤干细胞或超级恶性细胞。

[0009] 癌干细胞的存在对于未来的癌症治疗和疗法具有根本性的意义。目前癌症治疗的功效在检验的初始阶段往往以肿瘤大小的缩减来衡量, 即去掉的肿瘤物质的量。由于 CSC 构成肿瘤的一个极小部分, 且具有与其更为分化的子代显著不同的生物学特征, 所以对肿瘤质量的测量可能不一定能够选择出特异地作用于此干细胞的药物。事实上, 癌干细胞呈现出抵抗放疗 (XRT), 并且对化疗剂和靶向药物也表现出顽固性 [3-5]。正常的体干细胞天然地对化疗剂具有耐药性——他们具有将药物泵出的多种泵 (例如 MDR) 以及有效的 DNA 修

复机制。而且,他们还具有缓慢的细胞更新速率,而化疗剂靶向快速复制的细胞。癌干细胞为正常干细胞的突变对应物,可能也具有类似的机制使之幸免于药物治疗和放射治疗。换言之,传统的化疗法和放疗法杀死不能再生肿瘤的分化了的或分化中的细胞,这些细胞构成肿瘤的大部分。另一方面,产生所述分化了的或分化中的细胞的癌干细胞群可能保持原样并引起疾病复发。传统抗癌疗法的另一危险在于所述治疗(例如化疗)可能导致仅仅留下耐受化疗的癌干细胞,由此使得继发的复发肿瘤很可能也是化疗耐受的。

[0010] 由于存活的癌干细胞能够使肿瘤重新建殖故而造成复发,所以在抗癌 疗法中纳入抗 CSC 策略是绝对必要的(见图 1)。这就类似于斩草需除根 [6]。通过选择性地靶向癌干细胞,可以治疗患有侵袭性不可切除肿瘤和顽固性或复发性癌症的患者,以及防止肿瘤转移和复发。因此,开发靶向癌干细胞的特异性疗法为癌症患者、尤其是转移性癌症患者的存活和改善生活质量提供了希望。开启这股未被利用的潜力的关键在于鉴定和验证对于癌干细胞自我更新和存活具有选择的重要性的通路。虽然在过去已阐述过位于胚胎干细胞或成体干细胞的自我更新或癌症的肿瘤发生背后的多个通路,但是尚未鉴定和验证用于癌干细胞自我更新和存活的通路。

[0011] 也有许多鉴定和分离癌干细胞的研究。所用的方法主要是利用 CSC 外排药物的能力,或是基于癌干细胞相关表面标志的表达。

[0012] 例如,由于 CSC 对许多化疗剂具有耐药性,那么 CSC 几乎普遍地过表达药物外排泵如 ABCG2 (BCRP-1) [7-11] 及其他 ATP 结合盒 (ABC) 超家族成员 [12,13],就不足为奇。从而,也采用最初用来富集造血和白血病干细胞的侧群 (side population, SP) 技术来鉴定和分离 CSC [14]。这种技术首先由 Goodell 等人描述,利用荧光染料如 Hoechst 33342 的差异性 ABC 转运蛋白依赖性外排来确定和分离富含 CSC 的细胞群 [10,15]。具体而言,通过用戊脉安 (verapamil) 阻断药物外排来揭示该 SP,此时染料不再能够泵出该 SP。

[0013] 研究人员还集中于寻找使癌干细胞区别于大部分肿瘤的特异性标志。最常表达的 CSC 表面标志包括 CD44、CD133 和 CD166 [16-24]。通过主要基于这些表面标志的差异表达来分选肿瘤细胞,已经导致了迄今描述的高致瘤性 CSC 的大多数。因此,对于从癌细胞系和大块肿瘤组织中鉴定和分离癌干细胞而言,这些表面标志是被充分验证了的。

[0014] Stat3 通路

[0015] 哺乳动物或人癌细胞中有许多不同的遗传缺陷,且有许多已被研究以寻求治愈癌症。例如,已经发现 p53 肿瘤阻遏蛋白在半数以上的人类癌症中是缺陷型的或者全然无存。STAT (信号转导及转录活化因子) 蛋白家族 是潜伏的转录因子,响应细胞因子 / 生长因子而被激活以促进增殖、存活及其他生物过程。其中,Stat3 通过由生长因子受体酪氨酸激酶、Janus 激酶或 Src 家族激酶等介导的关键酪氨酸残基磷酸化而激活。这些激酶包括但不限于 EGFR、JAK、Abl、KDR、c-Met、Src 和 Her2 [25]。一旦酪氨酸磷酸化,Stat3 形成同源二聚体,转位至细胞核,结合靶基因启动子区中的特异性 DNA 效应元件,诱导基因表达 [26] (见图 2)。

[0016] 在正常细胞中,Stat3 激活是瞬时的,受到严密的调控,持续 30 分钟至数小时。然而,发现 Stat3 在广泛种类的人类癌症 (包括所有主要的癌症以及一些血液肿瘤) 中异常激活。Stat3 在癌症进展中起多种作用。作为一种有力的转录调控因子,它靶向参与许多重要细胞功能的基因,例如 Bcl-x1、c-Myc、细胞周期蛋白 D1、Vegf、MMP-2 和生存素 [27-32]。

它也是肿瘤免疫监视和免疫细胞募集的关键负调控因子 [33-35]。

[0017] 通过反义、siRNA、显性失活形式的 Stat3 和 / 或阻断酪氨酸激酶, 消除 Stat3 信号传递, 在体外和 / 或体内可以抑制某些癌细胞系或肿瘤 [26, 28, 36, 37]。但是尚未经验性地提供 Stat3 和癌干细胞功能之间的清楚关联。研究人员也尚未发现有效的 Stat3 通路抑制剂以开发针对已经发现含有癌干细胞的癌症的潜在治疗应用。如早先所说明的那样, 最近已经证明癌干细胞 (CSC) 根本性地负责肿瘤发生、癌症转移和癌症复发, 故而在设计靶向已知具有这些细胞的肿瘤的任何治愈性疗法时, 不论 CSC 可能占该肿瘤物质的多小比例, 都应将其考虑在内。

[0018] 在除癌症以外的疾病中, 已经在许多自身免疫疾病和炎性疾病中证明了多种细胞因子如白介素 6 (IL6) 对 Stat3 的过度激活 [38]。最近已经揭示, Stat3 通路还通过其在产生 TH17T 细胞应答中的基本作用而促进病理性免疫反应 [39]。另外, 已经发现 IL6-Stat3 通路介导的炎症是动脉粥样硬化、外周血管疾病、冠状动脉疾病、高血压、骨质疏松症、2 型糖尿病和痴呆的共同病因。

[0019] 发明概述

[0020] 本发明部分地基于本文提供的经验性证据, 即, Stat3 在广谱癌症中对癌干细胞 (CSC) 的存活和自我更新能力均起着关键作用。本发明还提供数据确认了某些化合物可以起 Stat3 通路抑制剂作用, 并且它们在体外和体内均有效地抑制 CSC。

[0021] 从而, 本发明的第一方面提供了治疗患有异常 Stat3 通路活性相关紊乱的受试者的方法, 该方法包括步骤: (a) 向受试者施用第一量的第一药剂, 以抑制至少一些异常 Stat3 通路活性; 和 (b) 向受试者施用第二量的、包含信号转导抑制剂的第二药剂。

[0022] 第一药剂可以通过至少一种如下的作用抑制 Stat3 通路活性: 基本上抑制 Stat3 蛋白的磷酸化、基本上抑制 Stat3 蛋白的二聚化、基本上抑制 Stat3 蛋白的核转位 (translocation)、基本上抑制 Stat3 蛋白的 DNA 结合活性、和基本上抑制 Stat3 蛋白的转录活性。

[0023] 在一个实施方案中, 第一药剂选自: 2-(1-羟乙基)-萘并 [2,3-b] 呋喃-4,9-二酮、2-乙酰基-7-氯-萘并 [2,3-b] 呋喃-4,9-二酮、2-乙酰基-7-氟-萘并 [2,3-b] 呋喃-4,9-二酮、2-乙酰基萘并 [2,3-b] 呋喃-4,9-二酮、2-乙基-萘并 [2,3-b] 呋喃-4,9-二酮、其对映异构体、非对映异构体、互变异构体、盐或溶剂化物 (下文称作“本发明的化合物”)。

[0024] 能够通过本发明第一方面的方法治疗的非癌症紊乱包括但不限于: 自身免疫性疾病、炎性疾病、炎性肠病、关节炎、哮喘、和系统性红斑狼疮、自身免疫性脱髓鞘疾病、阿尔茨海默病、中风、缺血再灌注损伤和多发性硬化症。能够通过该方法治疗的癌症包括但不限于: 乳腺癌、头颈部癌、肺癌、卵巢癌、胰腺癌、结直肠癌、前列腺癌、肾细胞癌、黑素瘤、肝细胞癌、宫颈癌、肉瘤、脑瘤、胃癌、多发性骨髓瘤、白血病和淋巴瘤。已知这些非癌和癌的紊乱与异常的 Stat3 通路活性相关。

[0025] 在一个特征中, 第二药剂是靶向剂, 其可为生长因子受体靶向剂、激酶靶向剂或血管生成抑制剂。

[0026] 第二方面, 本发明提供了治疗患有异常 Stat3 通路活性相关癌症的受试者的方法, 所述方法包括步骤: (a) 向受试者施用第一量的第一药剂, 以抑制至少一些异常 Stat3

通路活性 ;和 (b) 向受试者施用第二量的第二抗癌药剂。

[0027] 有关第一药剂的特征可类似于就本发明第一方面描述的那些特征,而第二抗癌药剂可为细胞毒性剂或化疗剂。在一个实施方案中,第二药剂是用于至少一种癌症的标准一线治疗。

[0028] 在一个特征中,该抗癌药剂是 DNA 损伤剂、抗有丝分裂剂和 / 或抗代谢物。例如, DNA 损伤剂可为烷化剂、拓扑异构酶抑制剂或 DNA 嵌入剂。在一个实施方案中,第二药剂是卡铂、多柔比星、吉西他滨、多烯紫杉醇 (docetaxel) 或依托泊苷之一。

[0029] 能够通过本发明第二方面的方法治疗的癌症包括已知与异常 Stat3 通路活性相关的那些,在上文已经列出,不在此重复。

[0030] 由于癌干细胞一般抵抗放疗和传统化疗,因此靶向癌干细胞的药物在与其他抗癌疗法组合应用时应具有协同效应。因此,根据本发明的第三方面,治疗受试者癌症的方法包括步骤:(a) 向受试者施用第一量的第一抗癌药剂,以抑制癌干细胞 (CSC) 群 ;和 (b) 向受试者施用第二量的第二抗癌药剂,以抑制多数的普通癌细胞。

[0031] 在多个实施方案中,该方法的步骤 (a) 抑制至少一种 CSC 自我更新,和 / 或杀死至少一种 CSC。在一实施方案中,第一量的第一抗癌药剂也杀死多数的普通癌细胞。在一实施方案中,步骤 (a) 抑制癌干细胞中的至少一些 Stat3 通路活性。第一抗癌药剂可以与根据本发明第一方面的方法中的第一药剂享有相同的特征和特点,因为本发明已经提供了 Stat3 通路抑制剂能够有效抑制 CSC 的证据。共享的特征可以包括,例如,本文所述的第一抗癌药剂能够靶向的多个 Stat3 通路步骤。在多个实施方案中,第一抗癌药剂可为小分子 Stat3 抑制剂、针对 Stat3 的 RNAi 药剂、针对 Stat3 的反义药剂、肽模拟物 Stat3 抑制剂、或 G 四联体寡脱氧核苷酸 Stat3 抑制剂。

[0032] 能够通过该方法治疗的癌症优选是已知或确认含有 CSC 的那些,包括但不限于:乳腺癌、头颈部癌、肺癌、卵巢癌、胰腺癌、多发性骨髓瘤、结直肠癌、前列腺癌、黑素瘤、卡波西肉瘤、尤文氏肉瘤、肝癌、胃癌、成神经管细胞瘤、脑瘤和白血病。

[0033] 根据本发明第三方面的方法中的“第二抗癌药剂”可与根据本发明第二方面的方法中的“第二抗癌药剂”相同,故所有共享的特征不在此重复。

[0034] 在一个实施方案中,第二药剂是用于至少一种癌症的标准一线治疗。第二药剂可为细胞毒性剂。在一个特征中,该抗癌药剂为 DNA 损伤剂、抗有丝分裂剂和 / 或抗代谢物。例如, DNA 损伤剂可为烷化剂、拓扑异构酶抑制剂或 DNA 嵌入剂。在一个实施方案中,第二药剂是卡铂、多柔比星、吉西他滨、多烯紫杉醇或依托泊苷之一。

[0035] 根据本发明的第四方面,提供了治疗受试者癌症的方法,包括步骤:(a) 向受试者施用第一量的第一癌干细胞抑制剂,以抑制 Stat3 通路活性 ;和 (b) 向受试者施用第二量的第二癌干细胞抑制剂,以抑制不同通路的活性。

[0036] 在一实施方案中,第二癌干细胞抑制剂是拉帕替尼 (lapatinib)。在一些实施方案中,第二量的第二抗癌药剂本身对癌干细胞群不是治疗有效的。能够通过此方法治疗的癌症优选是已知或确认含有 CSC 的那些,上文列出了一些实例。在多个实施方案中,癌症是转移性的、标准一线癌症治疗顽固性的或复发性的。

[0037] 根据本发明的第五方面,提供了治疗受试者癌症的方法,包括步骤:(a) 向受试者施用治疗有效量的第一抗癌药剂,其选自下组化合物:2-(1-羟乙基)-萘并 [2,3-b] 呋

喃-4,9-二酮、2-乙酰基-7-氯-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮、2-乙酰基-7-氟-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮、2-乙酰基萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮、2-乙基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮、其可药用盐或溶剂化物;和(b)施用并非选自该相同组的第二抗癌药剂。

[0038] 第二抗癌药剂可为在本发明其他方面描述的任何药剂,包括任何细胞毒性剂或化疗剂及任何靶向剂。

[0039] 第六方面,本发明提供了药物组合物,包含治疗有效量的第一抗癌药剂,其选自下组化合物:2-(1-羟乙基)-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮、2-乙酰基-7-氯-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮、2-乙酰基-7-氟-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮、2-乙酰基萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮、2-乙基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮、其可药用盐或溶剂化物;和第二抗癌治疗,其选自:细胞毒性剂、靶向剂、放疗剂、生物药(biologic agent)、激素药、HDAC抑制剂、视黄醇类药(retinoid agent)、检查点激活物(checkpoint activator)、蛋白酶体抑制剂、辅剂(adjuvant agent)或辅助药(adjunctive agent)。

[0040] 在一实施方案中,组合物还包含可药用的赋形剂、载体或稀释剂。

[0041] 本发明的其他方面(包括与本文所述方法相关的所有组合物和试剂盒)和实施方案在如下发明详述中阐释,或将会因其变得显而易见。

[0042] 附图的简短说明

[0043] 图1图示了癌干细胞特异性癌症疗法和传统癌症疗法之间的差异。

[0044] 图2显示了癌中的Stat3通路。

[0045] 图3A显示了Stat3在Hoechst侧群细胞中组成型地激活。

[0046] 图3B显示了Stat3在CD133⁺细胞中组成型地激活。

[0047] 图4A和4B显示了癌干细胞中的Stat3敲低(knockdown)诱导凋亡。

[0048] 图5显示了癌干细胞中的Stat3敲低抑制癌干细胞球体形成。

[0049] 图6显示了化合物401抑制Stat3的转录激活活性。

[0050] 图7A显示了化合物401抑制核提取物中Stat3的DNA结合活性。

[0051] 图7B显示了化合物401、416和418抑制核提取物中Stat3的DNA结合活性。

[0052] 图8A显示了化合物401抑制异种移植肿瘤组织中Stat3的DNA结合活性。

[0053] 图8B显示了化合物401抑制异种移植肿瘤组织中Stat3的下游效应子的表达水平。

[0054] 图9A显示了Hoechst侧群的分选和分析。

[0055] 图9B显示了Hoechst侧群对化合物401与非侧群一样敏感。

[0056] 图10A显示了化合物401使Hoechst侧群细胞凋亡。

[0057] 图10B显示了化合物401使CD133⁺细胞凋亡。

[0058] 图11显示了化合物401阻断CD44^{high}球体形成。

[0059] 图12显示了体内化合物401处理降低异种移植肿瘤细胞的球体形成。

[0060] 图13显示了化合物401在ISMS模型中抑制转移。

[0061] 图14显示了化合物401在A549人肺癌细胞中与索拉非尼(sorafenib)具有协同效应。

[0062] 图15显示了化合物401在A549人肺癌细胞中与厄洛替尼(erlotinib)具有协同效应。

[0063] 图 16 显示了化合物 401 在 A549 人肺癌细胞中与拉帕替尼具有协同效应。

[0064] 图 17 显示了化合物 401 在 A549 人肺癌细胞中与索坦 (sutent) 具有协同效应。

[0065] 图 18 显示了化合物 401 在 Paca-2 人胰腺异种移植模型中与吉西他滨具有协同效应。

[0066] 发明详述

[0067] 如本文所用,单数形式的“一”、“一个”和“该”包括复数引述,除非上下文另有清楚说明。例如,术语“细胞”包括多个细胞,包括其混合物。

[0068] 如本文所用的术语“分离的”或“纯化的”是指物质实质上或基本上不含在其天然状态下与其正常相伴的成分。纯度和均质性一般可以利用分析化学技术来确定,例如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱。

[0069] 如本文所用,术语“癌干细胞”和“CSC”可互换。CSC 是哺乳动物的,并且在优选的实施方案中,这些 CSC 是人类来源的,但它们并非旨在限于此。癌干细胞定义为、并在功能上表征为:源于实体瘤的细胞群,其:(1) 具有广泛的增殖能力;(2) 能够进行不对称细胞分裂,生成一种或多种类型具有减小的增殖或发育潜力的分化子代;和(3) 能够进行对称细胞分裂用于自我更新或自我维持。其他表征 CSC 的常见方法包括形态学和检查细胞表面标志、转录谱、和药物反应。CSC 在研究文献中也称作肿瘤/癌症起始细胞、癌干细胞样细胞、干细胞样癌细胞、高致瘤细胞、肿瘤干细胞、实体瘤干细胞、药物存活细胞(DSC)、耐药性细胞(DRC)或超级恶性细胞。

[0070] 如本文所用,术语“自我更新”是指癌干细胞产生新的致瘤性癌干细胞以补充或增加其数量的能力。

[0071] 如本文所用,术语“癌症”和“癌变的”是指或者描述的是,哺乳动物中一群细胞以失控的细胞生长为特征的生理状况。如本文所用的“癌细胞”和“肿瘤细胞”是指源于肿瘤的总细胞群,既包括构成肿瘤细胞群体的大部分的非肿瘤发生性细胞,又包括肿瘤发生性干细胞(癌干细胞)。癌症的实例包括但不限于:癌(carcinoma)、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤和白血病。此类癌症更具体的实例包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠癌、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝癌、乳腺癌、结肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、涎腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌和各种类型的头颈部癌。

[0072] 如本文所用的“肿瘤”是指由于过度细胞生长或增值而产生的任何组织块,或良性(非癌变)或恶性的(癌变),包括癌前病变。

[0073] 如本文所用的“转移”(metastasis)是指癌症由起源位点扩散或转移到身体其他区域、在新位置上形成类似的癌性病变的过程。“转移性”或“转移”细胞是丧失与邻近细胞的粘附接触、并借助血流或淋巴由疾病的原发部位迁移而浸润邻近身体结构的细胞。

[0074] 如本文所用,术语“受试者”是指任何将作为特定治疗的接受者的动物(例如,哺乳动物),包括但不限于人、非人灵长类动物、啮齿类动物等。一般,术语“受试者”和“患者”就人类受试者而言在本文可互换使用。

[0075] 如本文所用的诸如“治疗”或“缓解”等术语既指 1) 治愈、减缓、减轻所诊断病情(condition)或紊乱的症状,和/或中断其进展的治疗性措施,又指 2) 防止或减缓所靶向病情或紊乱的发展的防范性或预防性措施。因而,需要治疗的包括已经患有紊乱的那些;易

于患有紊乱的那些 ; 以及欲预防紊乱的那些。如果患者显示出如下一种或多种状况, 则该受试者被本发明的方法成功地“治疗”: 癌细胞数量的减小或完全不存在癌细胞; 肿瘤大小的减小; 癌细胞向周围器官的浸润、包括癌向软组织和骨的扩散, 的抑制 或不存在; 肿瘤转移的抑制或不存在; 肿瘤生长的抑制或不存在; 与具体癌症相关的一种或多种症状的减轻; 减小的发病率和死亡率; 和生活质量的提高。

[0076] 如本文所用, 当用在生物活性的语境中时, 术语“抑制”及其语法等同体是指生物活性的下调, 这可以减小或消除所靶向的功能, 例如蛋白质的生产或分子的磷酸化。在特别的实施方案中, 抑制可以指所靶向活性的约 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 的减小。当用于紊乱或疾病的语境中时, 该术语是指成功地防止症状发作、缓解症状或消除疾病、病情或紊乱。

[0077] 如本文所用的单数或复数形式的“普通癌细胞”是指非癌干细胞的癌细胞。

[0078] 如本文所用的“组合”疗法或治疗表示施用至少两种不同的治疗, 以处理紊乱、病情或症状, 例如癌症病情。此类组合疗法可以包括在施用一种治疗之前、期间和 / 或之后施用另一种治疗。这些治疗的施用可以在时间上分开长达数周, 但最常见的是 48 小时之内, 且最常见的是 24 小时之内。

[0079] 如本文所用的术语“可药用的赋形剂、载体或稀释剂”表示可药用的材料、组合物或媒介物, 例如参与将主题药物活性剂由一种器官或身体部分携带或运输至另一器官或身体部分的液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或包封材料。就与制剂中的其他成分相容且对患者无害这一意义上, 各载体必须是“可接受的”。能够作为可药用载体的材料的一些实例包括: 糖, 例如乳糖、葡萄糖和蔗糖; 淀粉, 例如玉米淀粉和马铃薯淀粉; 纤维素及其衍生物, 例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素; 黄芪胶粉; 麦芽; 明胶; 滑石; 赋形剂, 例如可可脂和栓剂蜡; 油, 例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油; 甘醇, 例如丙二醇; 多元醇, 例如甘油、山梨糖醇、甘露醇和聚乙二醇; 酯, 例如油酸乙酯和月桂酸乙酯; 琼脂; 缓冲剂, 例如氢氧化镁和氢氧化铝; 褐藻酸; 无热原水; 等渗盐水; 林格液; 乙醇; 磷酸盐缓冲液; 以及其他在药制剂中采用的无毒相容物质。润湿剂、乳化剂和润滑剂 (例如十二烷基硫酸钠、硬脂 酸镁和聚环氧乙烷-聚环氧丙烷共聚物)、以及着色剂、释放剂、包衣剂、甜味剂、矫味剂和香料剂、防腐剂和抗氧化剂也可存在于组合物中。

[0080] 本发明的化合物可以形成盐, 这也落在本发明的范围内。本文述及本发明的化合物应理解为包括述及其盐, 除非另有说明。如本文所采用的术语“盐”, 表示与无机和 / 或有机酸和碱形成的酸加成盐和 / 或碱加成盐。另外, 当本发明的化合物既含有碱性部分 (例如但不限于吡啶或咪唑)、又含有酸性部分 (例如但不限于羧酸) 时, 可以形成两性离子 (“内盐”), 并包括在如本文所用的术语“盐”中。优选可药用的 (即, 无毒、生理上可接受的) 盐, 不过其他盐也是有用的, 例如用于制备期间可能采用的分离或纯化步骤中。本发明化合物的盐可以, 例如, 通过使化合物 I、II 或 III 与一定量 (例如等量) 的酸或碱在介质 (例如盐在其中沉淀的介质或在水性介质) 中反应并之后冻干而形成。

[0081] 本文也考虑本发明化合物的溶剂化物。本发明化合物的溶剂化物包括例如水合物。

[0082] 靶向 Stat3 通路

[0083] 本发明提供了为 Stat3 通路活性有效抑制剂的化合物（实施例 2）。由于 Stat3 通路是经激活可以促进增殖、存活和许多其他生物学过程的潜伏转录因子，其牵涉到广泛种类的人类癌症以及非癌症紊乱，包括许多自身免疫病和炎性疾病（表 1）。从而，本发明第一方面提供了与异常（例如过表达的）Stat3 通路活性相关的紊乱的组合治疗。特别地，向患者受试者施用第一量的第一药剂以抑制至少一些异常的 Stat3 通路活性，以及还施用第二量、包括信号转导抑制剂的第二药剂。在多个实施方案中，抑制一些（例如 20%、30%、40%）、大多数（约 50% 以上）、或基本上所有（例如 60%、70%、80%、90%、95% 或 100%）的异常 Stat3 通路活性。第一量和第二量之一或两者可为组合应用前（即自身针对紊乱应用时）相应药剂的治疗有效量，或者由于组合的突出协同效应而低于该量。第一药剂可以靶向 Stat3 通路中的一个或多个步骤。在一个实施方案中，第一药剂是本发明的化合物。

[0084] 表 1. 人类疾病中 STAT3 通路的激活

[0085]

疾病			参考文献	
肿瘤疾病	实体瘤	乳腺癌	[40]	
		头颈部癌(SCCHN)	[41]	
		肺癌	[42]	
		卵巢癌	[43]	
		胰腺癌	[44]	
		结直肠癌	[45]	
		前列腺癌	[46]	
		肾细胞癌	[47]	
		黑素瘤	[48]	
		肝细胞癌	[36]	
		宫颈癌	[49]	
		子宫内膜癌	[49]	
		肉瘤	[50, 51]	
		脑瘤	[52]	
		胃癌	[29]	
		血液肿瘤	多发性骨髓瘤	
	白血病		HTLV-1依赖性白血病	[54]
			慢性髓性白血病	[47]
			急性髓性白血病	[55]
			大颗粒淋巴细胞白血病	[56]
	淋巴瘤		EBV相关/伯基特病	[57]
			蕈样肉芽肿	[47]
			HSV Saimiri依赖性(T细胞)	[47]
			皮肤T细胞淋巴瘤	[58]
			霍奇金病	[47]
		间变性大细胞淋巴瘤	[59]	
免疫疾病	炎症性疾病	炎症肠病	[60]	
		炎症性关节炎	[61-63]	
		克罗恩病	[64]	
		慢性炎症	[65]	
	自身免疫病	类风湿性关节炎	[61, 62, 66-68]	
		系统性红斑狼疮	[69]	
	哮喘		[70]	
	变态反应		[71]	
	感染		[72]	
增生性紊乱	银屑病		[73]	
	瘢痕疙瘩		[74]	
	疣		[75]	
	骨髓增生异常综合症		[76]	
	真性红细胞增多症		[77]	
CNS疾病	阿尔茨海默病		[38, 78, 79]	
	多发性硬化症(MS)		[38, 78, 80]	

[0086] 第二药剂,即信号转导抑制剂,可用来靶向与第一药剂所抑制的通路不相同的通路、相关的通路或者相同 Stat3 通路中不同的步骤。通常,当组合疗法中的两类药剂靶向相同的通路(即使是不同的步骤)时,预期的协同作用量是有限的。然而,下文实施例 5 提供的数据显示出在本发明化合物与推测靶向相同通路中的其他步骤的第二药剂(例如酪氨酸激酶和 GFR 靶向剂)之间令人惊讶地高的协同作用量,提示意料不到的抑制机制在起作用。

用。

[0087] 具体地, Stat3 通过由生长因子受体酪氨酸激酶、Janus 激酶或 Src 家族激酶等介导的关键酪氨酸残基磷酸化而激活;一旦酪氨酸磷酸化, Stat3 形成同源二聚体,转位至细胞核,结合靶基因启动子区中的特定 DNA 效应元件,诱导基因表达。本发明的实施例 2 显示了在 Stat3 通路中,通过该 DNA 结合步骤,本发明化合物的抑制效应是明显的。而且,由于此类效应见于组成型激活的 Stat3,故很可能本发明的化合物抑制 Stat3 蛋白的二聚化和/或核转位。因此,当其与也靶向相同 Stat3 通路的酪氨酸激酶 (TKI) 和 GFR 靶向剂组合时,观察到的协同作用量令人惊讶地高。例如,当化合物 401 与 TKI 索拉非尼组合时,实现了来自胰腺癌细胞系的细胞 100% 的抑制,而当化合物 401 和索拉非尼单独施用,两者均仅能分别实现相同细胞系 66% 的抑制——已知胰腺癌牵涉到 Stat3 的过表达 [44]。事实上,所有四种与化合物 401 组合检验的 TKI 均显示出显著的协同作用。在本发明优选的实施方案中,组合治疗实现癌细胞超过约 50%、或 70%、或 90% 的抑制。

[0088] 根据本发明第一方面的方法可应用于治疗癌症或非癌症紊乱,优选已知与异常 Stat3 通路活性相关的那些。与异常 Stat3 通路活性相关的非癌症紊乱的实例包括但不限于:自身免疫性疾病、炎症疾病、炎症肠病、关节炎、哮喘、和系统性红斑狼疮、自身免疫性脱髓鞘病、阿尔茨海默病、中风、缺血再灌注损伤和多发性硬化症。与异常 Stat3 通路活性相关的癌症的实例包括但不限于:乳腺癌、头颈部癌、肺癌、卵巢癌、胰腺癌、结直肠癌、前列腺癌、肾细胞癌、黑色素瘤、肝细胞癌、宫颈癌、肉瘤、脑瘤、胃癌、多发性骨髓瘤、白血病和淋巴瘤。

[0089] 根据本发明第一方面的第二药剂可为靶向剂,例如生长因子受体靶向剂(见实施例 5 中厄洛替尼(特罗凯)的数据)、激酶靶向剂(见实施例 5 中拉帕替尼、厄洛替尼、舒尼替尼和索拉非尼的数据)或血管生成抑制剂(见实施例 5 中舒尼替尼和索拉非尼的数据)。

[0090] 在一个实施方案中,第二药剂是生长因子受体靶向剂,例如靶向与激酶相关的生长因子受体[例如,表皮生长因子受体(EGFR)或血管内皮生长因子受体(VEGFR)]的抗体。例如,靶向剂可为吉非替尼(艾瑞沙)厄洛替尼(特罗凯)、PD153035、西妥昔单抗(爱必妥)、阿瓦斯丁、帕尼单抗、曲妥珠单抗和抗 c-Met 抗体。

[0091] 在一个实施方案中,第二药剂是激酶靶向剂,其可为激酶抑制剂,例如酪氨酸激酶抑制剂(TKI)。例如,TKI 可为厄洛替尼(erlotinib)(特罗凯(Tarceva))、索坦(Sutent)(舒尼替尼(sunitinib))、拉帕替尼(lapatinib)、索拉非尼(sorafenib)(多吉美(nexavar))、凡德他尼(vandetanib)、阿西替尼(axitinib)、伯舒替尼(bosutinib)、西地尼布(cediranib)、达沙替尼(dasatinib)(扑瑞赛(sprycel))、吉非替尼(gefitinib)(艾瑞沙(irressa))、伊马替尼(imatinib)(格列卫(gleevec))、来他替尼(lestaurtinib)、和/或 ARQ197。

[0092] 在多个实施方案中,激酶靶向剂为如下之一:吉非替尼(艾瑞沙)、ZD6474(AZD6474)、EMD-72000(马妥珠单抗(matuzumab))、帕尼单抗(panitumab)(ABX-EGF)、ICR-62、CI-1033(PD183805)、拉帕替尼(lapatinib)(泰克泊(tykerb))、AEE788(吡咯并嘧啶)、EKB-569、EXEL7647/EXEL 0999、厄洛替尼(特罗凯)、伊马替尼(格列卫)、索拉非尼(多吉美)、舒尼替尼(索坦)、达沙替尼(扑瑞赛)、凡德他尼(ZACTIMA)、temsirolimus(馱瑞塞尔(torisel))、PTK787(瓦他拉尼(vatalanib))、

帕唑帕尼 (pazopanib)、AZD2171、依维莫司 (everolimus)、seliciclib、AMG706、阿西替尼、PD0325901、PKC-412、CEP701、XL880、伯舒替尼、BIBF1120、BIBF1120、尼罗替尼 (nilotinib)、AZD6244、HKI-272、MS-275、BI2536、GX15-070、AZD0530、enzastaurin、MLN-518 和 ARQ197。

[0093] 在一个实施方案中,第二药剂是血管生成抑制剂,其可为如下之一:CM101、IFN- α 、IL-12、血小板因子-4、苏拉明 (suramin)、SU5416、血小板反应蛋白、VEGFR 拮抗剂、血管生成抑制性甾醇 (angiostatic steroids)+ 肝素、软骨源性血管生成抑制因子、基质金属蛋白酶抑制剂、巴马司他 (batimastat)、马立马司他 (marimastat)、制管张素 (angiostatin)、内皮抑素 (endostatin)、2- 甲氧基雌二醇、替可加兰 (tecogalan)、血小板反应蛋白、 α V β 3 抑制剂、利诺胺 (linomide) 和 ADH-1。

[0094] 在相关的第二方面,本发明提供了治疗异常 Stat3 通路活性相关癌症受试者的方法,所述方法包括步骤:(a) 向受试者施用第一量的第一药剂,以抑制至少一些异常 Stat3 通路活性;和 (b) 向受试者施用第二量的第二抗癌药剂。可用此方法治疗的癌症包括已知与异常通路活性相关(例如至少部分地由之引起)的那些,在上文就本发明第一方面提供了其列表。

[0095] 有关第一药剂的特征可类似于就本发明第一方面所描述的那些,而第二抗癌药剂可为细胞毒性剂或化疗剂。在一个实施方案中,第二药剂是用于至少一种癌症的标准一线治疗。在该方法中使用的第一药剂和第二药剂的量可为组合应用前相应药剂的治疗有效量或者低于该量。

[0096] 在一个特征中,抗癌药剂是 DNA 损伤剂、抗有丝分裂剂、和 / 或抗代谢物。DNA 损伤剂可为烷化剂、拓扑异构酶抑制剂、和 / 或 DNA 嵌入剂。如实施例 5 所示,将本发明的化合物 401 分别与如下每一种一起添加到 Paca2 胰腺癌细胞中:卡铂 (DNA 烷化剂)、依托泊苷 (拓扑异构酶 II 抑制剂)、多柔比星 (DNA 嵌入剂)、多烯紫杉醇 (抗有丝分裂剂) 和健择 (Gemzar) / 吉西他滨 (抗代谢物)。每种组合中都发现了显著的协同作用量。例如,当化合物 401 与健择 / 吉西他滨组合时,实现了胰腺癌细胞 96% 的抑制,而当单独施用,化合物 401 和健择仅能分别实现相同细胞系 66% 和 36% 的抑制。

[0097] 烷化剂可为如下之一:苯丁酸氮芥 (chlorambucil)、环磷酰胺 (cyclophosphamide)、异环磷酰胺 (ifosfamide)、氮芥 (mechlorethamine)、美法仑 (melphalan)、尿嘧啶氮芥 (uracil mustard)、塞替派 (thiotepa)、白消安 (busulfan)、卡莫司汀 (carmustine)、洛莫司汀 (lomustine)、链佐星 (streptozocin)、卡铂 (carboplatin)、顺铂 (cisplatin)、沙铂 (satraplatin)、奥沙利铂 (oxaliplatin)、六甲蜜胺 (altretamine)、ET-743、XL119 (becatecarin)、达卡巴嗪 (dacarbazine)、氮芥 (chlormethine)、苯达莫司汀 (bendamustine)、曲磷胺 (trofosfamide)、乌拉莫司汀 (uramustine)、福莫司汀 (fotemustine)、尼莫司汀 (nimustine)、泼尼莫司汀 (prednimustine)、雷莫司汀 (ranimustine)、司莫司汀 (semustine)、奈达铂 (nedaplatin)、triplatintetranitrate、甘露舒凡 (mannosulfan)、曲奥舒凡 (treosulfan)、替莫唑胺 (temozolomide)、卡波醌 (carboquone)、三亚胺醌 (triaziquone)、三亚乙基蜜胺 (triethylenemelamine)、和丙卡巴肼 (and procarbazine)。

[0098] 拓扑异构酶抑制剂可为如下之一:多柔比星 (doxorubicin, doxil)、柔红

霉素 (daunorubicin)、表柔比星 (epirubicin)、依达比星 (idarubicin)、二羟蒽二酮 (anthracenedione, 诺肖林 (novantrone))、米托蒽醌 (mitoxantrone)、丝裂霉素 C (mitomycin C)、博来霉素 (bleomycin)、放线菌素 D (dactinomycin)、plicatamycin、伊立替康 (irinotecan) (开普拓 (camptosar))、喜树碱 (camptothecin)、鲁比替康 (rubitecan)、贝洛替康 (belotecan)、依托泊苷 (etoposide)、替尼泊苷 (teniposide) 和拓扑替康 (topotecan) (和美新 (hycamptin))。

[0099] DNA 嵌入剂可为原黄素 (proflavine)、多柔比星 (阿霉素 (adriamycin))、柔红霉素、放线菌素 D 和沙立度胺 (thalidomide)。

[0100] 抗有丝分裂剂可为如下之一：紫杉醇 (paclitaxel, abraxane)/ 泰素 (taxol)、多烯紫杉醇 (docetaxel) (泰索帝 (taxotere))、BMS-275183、聚谷氨酸紫杉醇 (xyotax)、tocosal、异长春碱 (vinorelbine)、长春新碱 (vincristine)、长春碱 (vinblastine)、长春地辛 (vindesine)、长春利定 (vinzolidine)、依托泊苷 (VP-16)、替尼泊苷 (teniposide) (VM-26)、伊沙匹隆 (ixabepilone)、larotaxel、ortataxel、tesetaxel 和伊斯平斯 (ispinesib)。

[0101] 抗代谢物可为如下之一：氟脲嘧啶 (5-FU)、氟尿苷 (5-FUdR)、甲氨蝶呤、希罗达 (xeloda)、阿仑恩 (arranon)、亚叶酸 (leucovorin)、羟基脲、硫鸟嘌呤 (6-TG)、巯嘌呤 (6-MP)、阿糖胞苷、喷司他丁 (pentostatin)、磷酸氟达拉滨、克拉屈滨 (cladribine) (2-CDA)、天冬酰胺酶 (asparaginase)、吉西他滨、培美曲塞 (pemetrexed)、硼替佐米 (bortezomib)、氨基喋呤 (aminopterin)、雷替曲塞 (raltitrexed)、氯法拉滨 (clofarabine)、依诺他滨 (enocitabine)、sapacitabine 和阿扎胞苷 (azacitidine)。

[0102] 在一个实施方案中，第二抗癌药剂是如下之一：卡铂、多柔比星、吉西他滨、多烯紫杉醇和依托泊苷。由于此方法抑制 Stat3 通路，本文证明该通路对于 CSC 的自我更新和存活均至关重要 (见实施例 1 中的数据)，且已经发现 CSC 根本性地负责药物耐药性、肿瘤复发和转移，所以在优选的实施方案中，此方法用来治疗或预防顽固性癌症、复发性癌症、和/或转移性癌症。

[0103] 抗癌化疗和生物疗法的更多讨论以及适宜治疗方案的实例可见于诸如 Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice, 第三版 (2001), Chabner 和 Longo 编辑, 以及 Handbook of Cancer Chemotherapy, 第六版 (2003), Skeet 编辑 (两者均来自 Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa., U. S. A.) 的书籍; 而且抗癌治疗, 尤其是化疗的方案可见于诸如美国癌症研究所 (National Cancer Institute, www.cancer.gov)、美国临床肿瘤学会 (American Society for Clinical Oncology, www.asco.org) 和美国综合癌症网 (National Comprehensive Cancer Network, www.nccn.org) 维护的那些网站。

[0104] 靶向癌干细胞

[0105] 本发明还提供了本发明的化合物抑制 CSC 的自我更新并使 CSC 凋亡的体外和体内数据 (实施例 3)。此外, 本发明经验性地确认了本发明化合物对转移性癌症的功效 (实施例 4)。

[0106] 癌症疗法 (抗癌疗法) 的目的在于防止癌细胞增殖、浸润、转移及最终杀死其宿主生物体, 例如人或其他哺乳动物。由于细胞增殖是许多正常细胞以及癌细胞的特征, 大多数

既有的抗癌疗法对正常细胞也具有毒性作用,特别是对具有快速周转率的那些正常细胞,例如骨髓和粘膜细胞。因此,有效的癌症疗法需要对癌细胞具有显著的生长抑制或控制作用,同时对宿主的正常细胞施加最小的毒性作用。

[0107] 自从 20 世纪 40 年代第一代有效的抗癌化合物进入临床试验以来,癌症复发和药物耐药性依然是癌症治疗中一些最大的问题。往往是能够获得症状的消退,但反应屡屡为部分性的,且仅有很短的持续时间,而且复发的癌症倾向于对原来的药物具有耐药性。现在这可通过癌干细胞(CSC)的存在来解释。如上文所述,全部肿瘤物质中的这一小群细胞能够躲避对其余癌细胞有效的药物和放疗,这是因为 CSC 大概与正常体干细胞享有相同类型的生物机制,这些细胞对大多数(如果不是所有的话)化疗剂具有天然的耐药性。作为癌物质中肿瘤发生活性的真正根源,CSC 能够重新支持癌症的再生,或者如果不予治疗的话导致转移。由于初始治疗仅留下药物耐药性癌干细胞,整个再生的或转移的肿瘤变得对初始“有效”疗法具有耐受性的几率显著增加。

[0108] 目前,抗癌疗法由于若干原因而组合应用。其一,用两种或更多种无交叉抵抗性的疗法治疗可以防止肿瘤中抗性克隆的形成。对一种抗癌药物(例如铂抗癌化合物,如顺铂)的耐药性往往伴随着对同类其他药物(例如其他铂化合物)的交叉耐药性。而且,还存在着多药耐药性,也称为多效耐药性,即用一种药物治疗不仅赋予对该药物及对其类别的其他药物的耐药性,而且还赋予对无关药剂的耐药性。其二,对处于不同生长期的细胞具有活性的两种或更多种疗法的组合可以杀死缓慢分裂的细胞以及活跃分裂的细胞,和/或募集细胞进入更为活跃的分裂状态,使它们对多种抗癌疗法更加敏感。其三,组合治疗可以通过影响不同的通路或单一生化通路中的不同步骤来创建生化增强效应。

[0109] 这些组合抗癌治疗的基本理论没有考虑到近来在确认和表征癌干细胞方面获得的进展。未能在组合疗法中并入 CSC 特异性疗法能够解释为何目前的组合疗法不能治愈常见癌症如转移性结肠癌和前列腺癌。鉴于本文提供的数据确认了本发明化合物针对 CSC 的功效(实施例 3),本发明能够设计组合 CSC 靶向剂和靶向普通癌细胞的其他药剂的癌症治疗方法。而且,虽然不希望束缚于特定的理论,本发明提供了药物方案取代如下情形,在该情形中当原始的 CSC 由于仅靶向 CSC 的单一药物治疗而被耗竭时,一些未被治疗或未充分治疗的普通癌细胞会回复成或产生 CSC(目前这得到一些初步数据的支持)。

[0110] 由于癌干细胞一般抵抗放疗和传统化疗,因此靶向癌干细胞的药物在与其他抗癌疗法组合应用时应具有协同效应。因此,本发明提供了治疗受试者癌症的方法,其包括步骤:(a) 向受试者施用第一量的第一抗癌药剂,以抑制癌干细胞群;和(b) 向受试者施用第二量的第二抗癌药剂,以抑制多数的普通癌细胞。

[0111] 在多个实施方案中,抑制一些(例如 20%、30%、40%)、大多数(约 50%以上)、或基本上所有(例如 60%、70%、80%、90%、95%或 100%)的 CSC.,第一量和第二量之一或两者可为相应药剂在组合应用前(即自身针对癌症应用时)的治疗有效量,或者由于组合的突出协同效应而低于该量。在一个实施方案中,第一药剂是本发明的化合物,即,2-(1-羟乙基)-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮、2-乙酰基-7-氯-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮、2-乙酰基-7-氟-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮、2-乙酰基萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮、2-乙基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮、及其可药用盐或溶剂化物。

[0112] 此处的“第二抗癌药剂”可为上述方法中相同的“第二抗癌药剂”,故所有共享的特

征不在此重复。在一个特征中,第二抗癌药剂为 DNA 损伤剂、抗有丝分裂剂和 / 或抗代谢物。例如, DNA 损伤剂可为烷化剂、拓扑异构酶抑制剂或 DNA 嵌入剂。适宜的烷化剂、拓扑异构酶抑制剂、DNA 嵌入剂、抗有丝分裂剂和抗代谢物在上文列出,故不在此重复。在癌抑制实验中在本发明化合物与每一种上述类别的化疗剂组合应用的情况下观察到显著的协同作用(见实施例 5)。在一个实施方案中,第二药剂是卡铂、多柔比星、吉西他滨、多烯紫杉醇和依托泊苷之一。

[0113] 在另一特征中,第二抗癌药剂是靶向剂,例如生长因子受体靶向剂(见实施例 5 中厄洛替尼(特罗凯)的数据)、激酶靶向剂(见实施例 5 中拉帕替尼、厄洛替尼、舒尼替尼和索拉非尼的数据)或血管生成抑制剂(见实施例 5 中舒尼替尼和索拉非尼的数据)。在癌抑制实验中在本发明化合物与每一种上述类别的靶向剂组合应用的情况下观察到显著的协同作用。适宜的生长因子受体靶向剂、激酶靶向剂(尤其是 TKI)、以及血管生成抑制剂在上文列出,故不在此重复。

[0114] 由于此方法采用特异性地靶向肿瘤中的 CSC 细胞(其根本性地负责药物耐药性、肿瘤复发和转移)的治疗剂,所以在优选的实施方案中,此方法用来治疗或预防顽固性癌症、复发性癌症、和 / 或转移性癌症。

[0115] 在以组合治疗靶向 CSC 方面,一个策略应当旨在靶向牵涉 CSC 关键生物学功能(如自我更新和存活)的一个以上通路。为此,本发明提供了治疗受试者癌症的方法,包括步骤:(a) 向受试者施用第一量的第一癌干细胞抑制剂,以抑制 Stat3 通路活性;和(b) 向受试者施用第二量的第二癌干细胞抑制剂,以抑制不同通路的活性。在一实施方案中,此方法中第一和 / 或第二抗癌药剂的量就其自身对癌干细胞群并非治疗有效的——但是由于通过该组合实现的显著协同作用,较低的量能够在此方法中应用以引发患者的反应。

[0116] 在一个实施方案中,第二抗癌干细胞剂是拉帕替尼(INN)或二甲苯磺酸拉帕替尼(USAN)——其被 FDA 于 2007 年批准用于患有晚期转移性乳腺癌的患者。拉帕替尼是 ATP 竞争性表皮生长因子受体(EGFR)和 HER2/neu(ErbB-2)双重酪氨酸激酶抑制剂。其通过与 EGFR/HER2 蛋白激酶结构域的 ATP 结合口袋结合而抑制受体的自磷酸化和激活。下文实施例 5 呈现的数据显示,针对 Paca2 胰腺癌细胞实现了显著的协同作用:组合前,化合物 401 和拉帕替尼的抑制率分别为 32%和 27%,而组合后的抑制率暴涨至 74%,高于两抑制率之和。由于此方法额外关注 CSC(其根本性地负责药物耐药性、肿瘤复发和转移),所以在优选的实施方案中,此方法用来治疗或预防顽固性癌症、复发性癌症、和 / 或转移性癌症。

[0117] 本发明的制剂包括适于口服、经鼻、局部(包括口腔和舌下)、直肠、阴道和 / 或肠胃外施用的那些。制剂可以便利地以单位剂型的形式提供,并且可以通过任何药学领域公知的方法制备。可与载体材料混合以生产单剂型的活性成分量将根据待治疗的哺乳动物和具体的施用方式而变。可与载体材料混合以生产单剂型的活性成分量一般是产生治疗效果的化合物量。一般而言,在 100%中,该量的范围是例如约 1%至约 99%活性成分、约 5%至约 70%、约 10%至约 30%。

[0118] 材料和方法

[0119] 生物学测定法

[0120] 本发明的化合物可根据上文所述的方案进行检查。表 2 显示了在该方案中描述的化合物的列表。

[0121] 表 2

[0122]

化合物名称	化合物代码
2-(1-羟乙基)-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮	301
2-乙酰基-7-氯-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮	416
2-乙酰基-7-氟-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮	418
2-乙酰基萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮	401
2-乙基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮	101

[0123] 细胞培养:HeLa、DU145、H1299、DLD1、SW480、A549、MCF7、LN18、HCT116、HepG2、Paca2、Panc1、LNCap、FaDu、HT29 和 PC3 细胞(ATCC, Manassas, VA) 在补充有 10% 胎牛血清(FBS)(Gemini Bio-Products, West Sacramento, CA) 和 5% 青霉素/链霉素/两性霉素 B(Invitrogen) 的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM)(Invitrogen, Carlsbad, CA) 中维持。

[0124] Hoechst 侧群:为鉴定和分离侧群(SP) 和非 SP 级分,用胰蛋白酶和 EDTA 自培养皿中取出 SW480 细胞,离心沉淀,以磷酸缓冲盐水(PBS) 洗涤,并重悬于 37℃ 含 2% FBS 和 1mM HEPES 的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM) 中。然后用 Hoechst 33342(Invitrogen) 以 5 μg/mL 的浓度标记细胞。标记的细胞单独或与 50 μM 戊脉安(verapamil, Sigma-Aldrich, St. Louis) 一起于 37℃ 孵育 120 分钟。染色后,使细胞悬浮于含 2% FBS 和 1mM HEPES 的 Hanks 平衡盐溶液(HBSS;Invitrogen) 中,流经 40 μm 滤网,并维持在 4℃ 直至进行流式细胞术分析。Hoechst 染料在 350nm 激发,并利用 450DF10(450/20nm 带通滤光片) 和 675LP(675nm 长波通截止滤光片) 光学滤光片在两个波长测量其荧光。正向和侧向散射光设门并不严格,仅排除碎片[15]。

[0125] 以表面标志进行 CSC 分离:通过主要基于表面标志(例如 CD44 或 CD133) 的差异表达来分选肿瘤细胞,已经产生了大多数迄今描述的高致瘤性 CSC。CD133 基于稍加修改的 Ricci-Vitiani 等人的方法[21] 分离。CD133⁺ 细胞通过荧光激活细胞分选(FACS) 或基于磁纳米颗粒的分离法进行分离。简言之,对于基于 FACS 的细胞分选,以 CD133/1(AC133)-PE 标记 10⁷ 细胞/mL;或对于基于磁场的分离,利用 **EasySep®** 生物素选择试剂盒(MiltenyiBiotec) 按照生产商的建议以 CD133/1(AC133)-生物素(Miltenyi Biotec, Auburn, CA) 标记 10⁷ 细胞/mL。非特异性标记用提供的 FcR 阻断试剂来阻断,而抗体孵育(1:11) 在冰上于具有 2% FBS 和 1mM EDTA 的 PBS 中进行 15 分钟。对于 **EasySep®** 分离进行 5 次洗涤,而在 FACS 分选前细胞在 400×g 沉淀 5 分钟,并重悬至 2×10⁷/mL。

[0126] CD44^{high} 细胞根据稍加修改的 Ponti 等人所述的方法[81] 通过 FACS 分离。简言之,经胰蛋白酶消化和 37℃ 生长培养基中 30 分钟的细胞恢复之后,细胞在 400×g 沉淀,并于具有 2% FBS 和 1mM EDTA 的 PBS 中重悬至 1×10⁶ 细胞/mL。细胞随之在冰上与 1:100 稀释的 CD44-FITC(BD Biosciences, San Diego, CA) 孵育 15 分钟。或者,利用 CD24-PE(BD Biosciences, San Diego, CA) (1:100) 进行负选择。洗涤 3 次之后,细胞重悬至 2×10⁶/mL,并流经 40 μm 滤网,之后进行分选。

[0127] 球体测定试验:一种测量细胞群自我更新能力的可靠方法是在不存在血清或贴壁的情况下被培养为球体的能力。CD44^{high} FaDu 或 Hoechst 侧群癌干细胞在超低附着板中于癌干细胞培养基(DMEM/F12, B27Neurobasal 增补物, 20ng/ml EGF, 10ng/ml FGF, 4 μg/ml 胰岛素和 0.4% BSA) 中培养以允许球体形成。一般,10-14 天培养后通过显微镜评估球体

形成,并记录具有> 50 个细胞的球体。

[0128] 萤光素酶报告试验:HeLa 细胞用 Stat3- 萤光素酶 (Stat3-Luc) 报告载体 (Panomics, Fremont, CA) 和海肾萤光素酶 (Promega, Madison, WI) 通过 Lipofectamine 2000 如生产商 (Invitrogen) 所述进行共转染。转染之后,细胞在含 0.5% FBS 的培养基中维持 24 小时。细胞随之用所示的化合物处理 30 分钟,之后向培养基中添加 25ng/ml 制瘤素 M(OSM) (R&D Systems, Minneapolis, MN)。继 OSM 添加后 6 小时,收获细胞,并利用 Dual-Glo 萤光素酶测定系统如生产商 (Promega) 所述测量萤火虫和海肾萤光素酶的水平。

[0129] 凋亡分析:用或未用化合物处理的细胞在处理 5 小时后收获,进行膜联蛋白-V 染色。收集的细胞以 PBS 洗涤,重悬于含膜联蛋白-V-FITC 的缓冲液中,并按照生产商 (Roche) 的说明染色。膜联蛋白-V 阳性细胞通过流式细胞术确定。

[0130] STAT3DNA 结合测定试验:如生产商 (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE) 所述进行电泳迁移率变动分析 (EMSA)。简言之,利用 NucBuster 蛋白质提取试剂盒如生产商 (EMD Biosciences, San Diego, CA) 所述由 HeLa 细胞制备核提取物。5 μ g 核提取物与所示剂量的所示化合物一起预孵育 30 分钟,之后再与 IR700 标记的共有 Stat3 寡核苷酸一起孵育 15 分钟。样品随之在聚丙烯酰胺凝胶上电泳,并应用 Odyssey 红外成像系统 (Li-Cor Biosciences) 直接扫描。对于酶联免疫吸附试验 (ELISA),5 μ g 核提取物与所示浓度的所示化合物预孵育 30 分钟,之后添加生物素化的寡聚体 (5'-生物素-GATCCTTCTGGGAATTCCTA GATC-3' SEQ ID NO. 1)。Stat3-DNA 复合物随之被捕获到链亲和素包被的 96 孔板 (Pierce, Rockford, IL) 上。结合的复合物随之与 Stat3 多克隆抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、接着是抗兔 HRP 缀合的二抗 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA) 进行孵育。结合的抗体随之通过添加 TMB 底物 (Pierce) 并在 450nm 测量吸光值而观察。

[0131] 细胞生存力确定:对于 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑鎓 (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 分析,细胞以 10,000 细胞/孔接种在 96 孔板中。种板后 24 小时,以所示剂量向细胞中添加化合物。化合物添加后 22 小时,向各孔添加 MTT (0.5mg/ml 终浓度),并使板在 37°C 再孵育 2 小时。然后吸出培养基,并使甲臯产物溶解在 100 μ l 异丙醇中。各孔的吸光值利用微板读数器在 570nm 测量。

[0132] 免疫荧光:用所示化合物处理所示时间的细胞在 4% 甲醛或冷甲醇中固定,分别用于检测膜联蛋白-V、裂解的胱天蛋白酶 3 (cleaved caspase 3) 或 stat3。盖片风干,在 PBS 中室温重新水合 10 分钟。样品之后在封闭缓冲液 (PBS, 5% FBS) 中在潮湿箱中室温孵育 10 分钟。细胞与一抗在 4°C 孵育过夜。洗涤后,细胞与 1:500 稀释的 FITC 缀合的抗兔抗体室温孵育 1 小时。用配备有落射荧光和 SPOT 镶嵌 CCD 相机的 Nikon TE200 显微镜捕获图像。多克隆抗裂解的胱天蛋白酶 3 抗体 (1:100) 获自 Cell Signaling Technology, Danvers, MA. 公司。膜联蛋白-V-FITC 获自德国 Penzberg 的罗氏 (Roche) 公司。多克隆抗 Stat3 抗体获自 Santa Cruz 公司。

[0133] 通过 **TPIV[®]** 技术敲低基因:**TPIV[®]** (治疗通路鉴定和验证) 技术 (Boston Biomedical Inc., Norwood, MA, USA) 提供了能够用来首先转染细菌、进而被哺乳动物受试者摄取的质粒。在细菌裂解后,由 **TPIV[®]** 质粒编码并由细菌加工的 dsRNA 被释放到哺乳动物细胞的细胞质中,实现所靶向基因的敲低。**TPIV[®]** 技术在共同拥有的于 2008 年 6 月 30 日递交的 PCT 专利申请 PCT/US08/68866 中描述,其全部内容并入本文作为参考。

具体而言,编码针对 Stat3 的有效 siRNA 序列的 **TPIV[®]**质粒利用如下引物通过 PCR 克隆购自 Origene Technologies (Rockville, MD, USA) 的 Stat3 质粒来构建 :TPIV-Stat3 (300bp 插入物)

[0134] 引物:

[0135] Stat3TPIV For 5' -GGATCTAGAATCAGCTACAGCAGC (SEQ ID NO. 2)

[0136] Stat3TPIV Rev 5' -TCCTCTAGAGGGCAATCTCCATTG (SEQ ID NO. 3)

[0137] 对照质粒应用购自 Promega (Madison, WI, USA) 的 pGL2 质粒来构建。TPIV-GL2 (300bp 插入物)

[0138] 引物:

[0139] GL2TPIV For 5' -CCCTCTAGATGGTTCCTGGAAC (SEQ ID NO. 4)

[0140] GL2TPIV Rev 5' -GCTCTAGAAACCCCTTTTGG (SEQ ID NO. 5)

[0141] 化学感受态大肠杆菌 (E. coli) BL21 (DE3) pLYSe 细菌 (50 ~ 100 μ l) 用对照或 100ng 靶向 Stat3 的 **TPIV[®]**质粒按照生产商 (Stratagene) 的说明进行转化。然后将单菌落接种到含 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 BHI 培养基中,并于 37°C 生长过夜。第二天,将 5ml 各过夜培养物 1 : 40 稀释至含 100 μ g/ml 氨苄青霉素的新鲜 BHI 培养基中,并再生长 2-4 小时 (直至 OD₆₀₀ = 0.5)。各培养物随之用 IPTG (1mM 终浓度) 处理 2-4 小时,以诱导长双链 RNA 转录,其会被细菌加工为混合 siRNA。在 IPTG 诱导之后,通过测量 OD₆₀₀ 值来计算各培养物中的细菌总数 (8 $\times$ 10⁸ 细菌 /ml 培养物具有 OD₆₀₀ = 1)。然后根据细胞汇合度和在适当反应体积中所需的感染复数 (MOI ;尝试 20 : 1 至 2000 : 1 的细菌比细胞范围),计算用于细胞处理的细菌数目。根据经验,应选择反应体积以导致对于 1000 : 1MOI 为 3 $\times$ 10⁸/ml。所需体积的细菌培养物随之在 2500g 4°C 离心 10 分钟,沉淀用无血清培养基 (用于细菌感染的细胞,加上 100 μ g/ml 氨苄青霉素和 1mM IPTG) 洗涤一次,并以细菌感染 (bactofection) 所需的密度重悬于相同的培养基中。

[0142] 同时分离癌细胞或癌干细胞,在细菌感染前 30 分钟,将细胞培养基替换为 2ml 含 100 μ g/ml 氨苄青霉素和 1mM IPTG 的新鲜无血清培养基。上文制备的细菌随之以期望的 MOI 添加到细胞中,37°C 感染 2 小时。

[0143] 感染期过后,细胞用无血清细胞培养基洗涤 3 次。细胞随之与 2ml 含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素和 150 μ g/ml 庆大霉素的新鲜完全细胞培养基孵育 2 小时,以杀死任何残留的胞外细菌。在氨苄青霉素和庆大霉素处理后,细胞与 3ml 含 10 μ g/ml 氧氟沙星的新鲜完全 RPMI 1640 培养基孵育,以杀死任何胞内细菌。随之收获细胞或在各时间点进行分析,以评估靶基因沉默的程度和产生的表型。

[0144] 活体评价 (in life evaluations) :还对每只动物的健康状态进行了每日检查。每三天检查体重。按照机构的动物管理方法每日供应食物和水。引起 > 20% 致死率和 / 或 > 20% 净体重损失的处理视为有毒性。结果表达为平均肿瘤体积 (mm³) $\pm$ SE。P 值 < 0.05 视为统计学相关。

[0145] 动物管理 :4-5 周龄的雄性或雌性无胸腺裸鼠 (Charles River Laboratories, Wilmington, MA.) 在研究开始前适应动物畜舍设施至少一周。所利用的所有实验方法与美国生理学会 (American Physiology Society) 所给出的指南以及实验动物护理和使用指南 (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) 相符,并且也得到了波士顿生物医

学公司 (BostonBiomedical Inc.) 研究所动物护理和使用委员会 (Institutional Animal Care and Use Committee) 的批准。动物 4 只一组关进木屑铺底的笼中,置于具有控制的温度 (68° F-72° F)、光照 (12 小时光 - 暗周期) 和湿度 (45-55%) 的房间。实验期间动物自由饮水摄食。

[0146] 脾内裸鼠模型系统 (ISMS 模型): 雌性裸鼠麻醉并置于无菌条件,在左侧腹切割以露出脾脏。利用 27 号针在脾被膜下注射 0.1ml PBS 中的 100 万人结肠癌 HT29 细胞。将脾重置于腹膜腔内,并闭合切口。移植后第二天开始处理直至检查当天。处理策略为每周 5 天一天一次 (5qd/wk) 的腹膜内注射。小鼠在垂死时或注射后 30 天处死。取出脾和肝进行检查,并记录肿瘤病变数。

[0147] 实施例 1

[0148] 鉴定 Stat3 作为抗癌干细胞靶标

[0149] 在 CSC 中 Stat3 的敲低可以诱导凋亡。为确定癌干细胞是否表达 Stat3,以及 Stat3 是否组成型激活,我们进行了免疫荧光显微镜检,这不仅允许分析罕见细胞群,而且还提供了有关蛋白质定位的额外信息,以及能够将染色与表型 (即凋亡) 相关联。在通过 FACS 自 SW480 结肠癌细胞分离的 NSP 和 SP 细胞中对 p-Stat3 和 Stat3 进行了免疫荧光检测后,我们确定了 Stat3 确实存在于 SP 细胞中,且在细胞核中适度富集 (图 3A)。另外,我们还在 SP 细胞中观察到比 NSP 细胞增加的 p-Stat3 染色,提示 SP 细胞的存活可能更大比重地依赖于 Stat3。

[0150] 还评价了自 FaDu 人头颈部癌细胞和 LN18 人成胶质细胞瘤细胞分离的 CD133⁺ 细胞中的 Stat3 状态。如图 3B 所示,Stat3 在这些细胞中也具有组成型活性。综上所述,这些数据提示 Stat3 是对于癌干细胞特别重要的靶标。

[0151] 我们接下来利用 **TPIV[®]** 检验了在 CSC 中 Stat3 敲低的效应。免疫荧光分析揭示,在新鲜分离的 CSC (SP) 上感染 24 小时之内 (图 4A) 能够实现 Stat3 的显著耗竭,并发现靶向 Stat3 的 **TPIV[®]** 质粒处理的大多数细胞在感染 24 小时之内经历凋亡,而对照 **TPIV[®]** 质粒并不诱导高于对照未感染细胞的凋亡水平 (图 4B)。这些数据证明癌干细胞依赖于 Stat3 用于存活。

[0152] 在 CSC 中敲低 Stat3 抑制 CSC 球体形成。通过 FACS 分离 CD44^{high}/CD24^{low} FaDu 或 Hoeschst 侧群癌干细胞,并在超低附着板中于癌干细胞培养基 (DMEM/F12, B27Neurobasal 增补物, 20ng/mL EGF, 10ng/mL FGF, 4 μg/mL 胰岛素和 0.4% BSA) 中培养以允许球体形成。收集初级球体 (primary spheres), 用胰蛋白酶解聚,并在 **TPIV[®]** 处理之前分配至 96 孔超低附着板中。以 1000 的 MOI 施加细菌两小时,之后添加抗生素混合物 (青 - 链霉素混合物 (penstrep)、庆大霉素、氧氟沙星)。10-14 天培养后评估球体形成。在添加台盼蓝鉴定死细胞之前 (图 5, 左上图) 或之后 (图 5, 左下图) 获取代表性的球体图像。相对球体形成示于图 5 的右图。数据清楚地表明,在癌干细胞中 Stat3 敲低抑制球体形成,证明 Stat3 是癌干细胞的关键自我更新因子。

[0153] 实施例 2

[0154] 鉴定抑制 Stat3 通路活性的化合物

[0155] Stat3 转录活性的抑制。利用 Stat3- 萤光素酶 (Stat3-luc) 报告分子构建体检验了化合物在细胞中抑制 Stat3 转录激活活性的能力。转染了 Stat3-luc 的细胞在减少

血清的培养基中培养,之后再添加所示的化合物孵育 30 分钟。细胞随之用 25ng/ml 制瘤素 M(OSM) 刺激 6 小时,之后检测 Stat3-luc 报告分子活性。细胞与化合物 401 孵育抑制了 OSM 刺激的 Stat3 报告分子活性(图 6,左图)。纳入 AG490(一种已知的 Jak-Stat 通路抑制剂)作为 Stat3 抑制的阳性对照。依托泊苷纳入作为遗传毒性活性对照,其显示出很小或无 Stat3 抑制作用。化合物 1001 为萘而非作为本发明化合物的萘醌,其即便是在高得多的浓度也不抑制 OSM 刺激的 Stat3 报告分子活性(图 6,右图)。

[0156] 在 Stat3 萤光素酶报告分子测定中检验了其他化合物,且结果总结于表 3。

[0157] 表 3

[0158]

化合物 #	Stat3-Luc 测定中的 IC ₅₀
401	~ 0.25 μ M
416	~ 0.75 μ M
418	~ 0.75 μ M
301	~ 2 μ M

[0159] Stat3DNA 结合活性的抑制。应用来自 HeLa 细胞的核提取物(如通过酪氨酸 705 残基磷酸化所检测的那样,其含有组成型激活的 Stat3)进行 Stat3EMSA 以监测 Stat3DNA 结合活性。核提取物与所示化合物孵育,之后再与 IR700 标记的 Stat3 共有寡核苷酸孵育。Stat3 与寡核苷酸的结合通过凝胶电泳监测,并利用 LiCor Odyssey 红外扫描仪检测。鉴定到 Stat3 滞后条带,并通过抗 Stat3 抗体的超级迁移(图 7A,左图)和 Stat3 肽的剂量依赖性抑制进行了确认(图 7A,中图)。在孵育标记的探针和化合物 401 之后观察到 Stat3DNA 结合的剂量依赖性抑制(图 7A,右图)。

[0160] 在 EMSA 测定中检验了其他化合物。如图 7B 所示,化合物 401、416 和 418 能够抑制 Stat3 的 DNA 结合活性。

[0161] 异种移植肿瘤组织中 Stat3 下游效应子的抑制。从在收获前 4 小时用化合物 401 或载体对照处理过的异种移植 Paca2 肿瘤中制备提取物。样品通过 western 印迹和 EMSA 分析,以评价 Stat3 下游效应子表达水平和 Stat3DNA 结合活性。化合物 401 处理的样品(T)与对照(V)相比显示出 Stat3 DNA 结合活性下降(图 8A)。另外,化合物 401 处理导致 Stat3 下游效应子细胞周期蛋白 D1 和生存素的表达水平下降(图 8B)。

[0162] 实施例 3

[0163] 鉴定靶向癌干细胞的化合物

[0164] 鉴定使癌干细胞凋亡的化合物。由于已经证明癌干细胞活跃地外排 Hoechst,故用 Hoechst 染色 SW480 细胞,分选侧群(如图 9A 所示,左图围起来的区域)以富集癌干细胞。为确认此侧群富集癌干细胞,对照组的 SW480 细胞首先用戊脉安(verapamil,ABC 转运蛋白抑制剂)处理,之后用 Hoechst 染色。如图 9A 右图所示,戊脉安处理导致侧群丧失。

[0165] 在 MTT 测定中评估了化合物 401 对 Hoechst 侧群的 IC₅₀,并与对非侧群的 IC₅₀ 进行了比较。结果显示,侧群对化合物 401 与非侧群一样敏感(图 9B,右图)。然而,侧群对多柔比星比非侧群耐药性大得多(图 9B,左图),这与之前的公开一致[7,82]。这些数据提示化合物 401 杀死癌干细胞。

[0166] Hoechst 侧群细胞用化合物 401 处理,并通过膜联蛋白 V(凋亡的早期标志)染色来评估细胞死亡模式。结果显示,垂死细胞为膜联蛋白 V 阳性(图 10A),证明化合物 401 使

癌干细胞凋亡。

[0167] 可选地,我们进行了 CD133(常见的癌干细胞表面标志之一)抗体磁珠沉降以富集癌干细胞。CD133⁺细胞随之用化合物 401 处理,接着用抗裂解的胰天蛋白酶 3(凋亡标志)的抗体染色。如图 10B 所示,许多 CD133⁺细胞在化合物 401 处理后变成裂解型胰天蛋白酶 3 阳性的,证实化合物 401 使癌干细胞凋亡。

[0168] 鉴定在体外抑制 CSC 球体形成的化合物。癌干细胞的标志之一是其自我更新的能力。一种测量细胞群自我更新能力的可靠方法是其在不存在血清或附着的情况下培养为球体的能力。为比较化合物 401 与其他靶向及化疗剂的该能力,FACS 分离的 CD44^{high} CSC 作为球体培养 72 小时,之后用一组治疗剂进行攻击。所检验的药剂中,只有化合物 401 有效防止球体增殖(图 11)。注意,尽管施加的多柔比星和多烯紫杉醇的量大约十倍于其在类似测定中导致细胞死亡的 IC₅₀ 浓度,但球体还是具有耐药性。添加的特罗凯(Tarceva)、索坦(Sutent)和格列卫(Gleevec)大约三倍于其报告的治疗浓度。这证明虽然癌干细胞对传统化疗剂和靶向剂具有耐药性,但化合物 401 高度有效地抑制其生长。

[0169] 鉴定在体内抑制 CSC 球体形成的化合物。六周龄雌性无胸腺 nu/nu 小鼠获自 Charles River Labs(Wilmington,MA)。小鼠在腰窝处皮下注射处于 0.2mL 无血清 DMEM 中的 6×10⁶FaDu 或 Paca2 癌细胞。在异种移植瘤大小达到~200mm³后,携带 Paca2 异种移植肿瘤的动物通过腹膜内施用载体、吉西他滨(120mg/kg,一周两次)或化合物 401(20mg/kg)一周,而携带 FaDu 异种移植肿瘤的动物通过腹膜内每日施用载体、卡铂(30mg/kg)或化合物 401(20mg/kg)两周,之后处死。然后分别针对 Paca2 和 FaDu 细胞,收集肿瘤。在动物处死并无菌取出肿瘤后制备单细胞悬液。简言之,用无菌解剖刀将肿瘤切成 0.1mm³的碎块,之后在 1mg/mL 胶原酶/HBSS 中持续震荡消化 15-30 分钟。在流经 40 μm 滤网后,将细胞悬液层放在 1mL Histopaque 上,并在 1440×g 离心 30 分钟后收集界面层,而除去 RBC、死细胞和细胞碎片。然后计数活细胞,并用来测量其形成球体的能力。细胞以 100 细胞/孔的密度分配到超低附着 96 孔板的癌干细胞培养基中(DMEM/F12, B27Neurobasal 增补物,20ng/mL EGF,10ng/mL FGF,4 μg/mL 胰岛素和 0.4% BSA)。每三天添加新鲜培养基,并在 10-14 天培养后测定球体形成。记录具有>50 个细胞的球体。实验结束时,添加台盼蓝以鉴定死细胞。如图 12 所示,如增加的球体形成所证明的,标准化疗吉西他滨(上图)和卡铂(下图)富集了癌干细胞。相反地,如减少的球体形成所证明的那样,化合物 401 处理减少了癌干细胞。

[0170] 实施例 4

[0171] 抗转移功效

[0172] 还检验了化合物 401 在 ISMS 模型中抑制转移的能力。脾内裸鼠模型系统(ISMS 模型)适于研究结直肠癌的恶性行为,因为此技术能够在肝中产生实验性转移。在此模型中,在裸鼠脾被膜下注射处于 0.1mL PBS 中的 100 万 HT29 细胞。将脾重置于腹膜腔内,并闭合切口。小鼠在垂死时或注射后 30 天处死。取出脾和肝进行检查,并记录肿瘤病变数(number of tumor lesions)。小鼠分成 2 组,对照组给予载体(n=4),而另一组接受 20mg/kg 化合物 401(n=4)。在 i. s. 注射后第 2 天起至第 30 天,5 天/周腹膜内施用药物。显微镜检估算原发性肿瘤和转移性肝肿瘤的数目。代表性照片示于图 13。在载体对照组中,脾脏处有重负荷的原发性肿瘤(图 13,上左图)。还观察到大量的自发肝转移(图 13,上

右图)。化合物 401 处理显著降低了原发性肿瘤病灶数和自发肝转移数(图 13, 下图)。

[0173] 实施例 5

[0174] 组合活性

[0175] Paca2 人胰腺癌细胞、A549 人肺癌细胞和 HepG2 人肝癌细胞(美国典型培养物保藏中心)在含有 10% 胎牛血清、100 单位/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素和 2mM L-谷氨酰胺的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基中培养。化合物 401 和索坦由 Boston Biomedical, Inc. 有限公司合成。卡铂、多柔比星、多烯紫杉醇、依托泊苷获自 Sigma(St. Louis, MO), 并以 10mM 溶于水或 DMSO 中。厄洛替尼来自 American Custom Chemicals(San Diego, CA)。吉西他滨来自 Eli Lilly(Indianapolis, IN), 为水性 20mM 贮液的形式。索拉非尼购自 LKT(St. Paul, MN)。拉帕替尼来自 LC Laboratories(Woburn, MA)。除非另行指出, 所有化合物以 10mM 溶于 DMSO 中, 并等份贮存于 -20°C 呈指数生长的 Paca2 胰腺癌细胞以 1,000 细胞/孔接种在 6 孔板中, 并允许其贴壁 24 小时。然后向培养基中添加渐增浓度的个体药物及组合药物, 再过 24 小时。24 小时接触后, 除去药物, 并在接下来的 10-14 天添加新鲜培养基, 允许集落形成。固定细胞, 并用 GIEMSA(Gibco BRL) 染色。大于 50 个细胞的集落记录为存活者, 并针对未处理的对照就细胞存活百分数进行标准化。结果为一式两份实验的平均值。可选地, 在 A549 和 HepG2 细胞中在处理 72 小时进行 MTT 测定。

[0176] 我们的数据证明, 化合物 401 与所有检验的化合物组合时均具有有益效果。其中, 与酪氨酸激酶抑制剂(TKI)组合显示出最出色的结果。例如, 如图 14 所示, 化合物 401 与索拉非尼组合时在人肺 A549 细胞中 72 小时具有协同效应。与此类似, 图 15 至 17 表明化合物 401 分别与厄洛替尼、拉帕替尼和舒尼替尼(索坦[®])组合时在人肺 A549 细胞中 72 小时也具有协同效应。其余数据总结于表 4, 证明化合物 401 与所有检验药物组合时均表现出有益效果。

[0177] 表 4

[0178]

化合物401 (%抑制)	X (%抑制)	化合物401+X (%抑制)	组合药物(X)	例示性功能
7天集落形成 PACA2细胞				
32 [66nM]	-	-	-	
66 [133nM]	-	-	-	
32	43 [16μM]	80	卡铂	DNA烷化剂、DNA损伤
32	89 [16nM]	100	多柔比星	DNA嵌入剂、 抗生素、DNA损伤
32	48 [0.33nM]	62	多烯紫杉醇	抗有丝分裂
32	58 [660nM]	81	依托泊苷	拓扑异构酶II抑制剂、 DNA损伤
32	27 [6.75μM]	74	拉帕替尼	TKI
32	26 [16μM]	40	厄洛替尼	TKI
32	52 [12μM]	73	舒尼替尼	TKI
66	36 [33nM]	96	吉西他滨	抗代谢物
66	66 [2μM]	100	索拉非尼	TKI
72小时MTT A549细胞				
35 [500nM]	43 [2.5μM]	88	厄洛替尼	TKI
36 [250nM]	29 [12.5nM]	54	多柔比星	DNA嵌入剂、 抗生素、DNA损伤
35 [500nM]	75 [2.5μM]	81	舒尼替尼	TKI
35 [500nM]	40 [2.5μM]	74	索拉非尼	TKI
35 [500nM]	66 [2.5μM]	85	拉帕替尼	TKI
72小时MTT HepG2细胞				
43 [250nM]	23 [12.5nM]	72	多柔比星	DNA嵌入剂、 抗生素、DNA损伤
43	51 [2.5μM]	68	索拉非尼	TKI
7 [125nM]	34 [625nM]	42	索拉非尼	TKI

[0179] 而且,我们还检验了化合物 401 与吉西他滨在人胰腺癌异种移植模型中的组合效应。简言之,无胸腺雌性裸鼠 (Ncr) 皮下接种 8×10^6 MIA PaCa-2 人胰腺癌细胞,并使肿瘤生长至约 150mm^3 的大小。将动物随机分成 4 组,每组 6 只动物,并用载体对照处理、每日口服 100mg/kg 临床制剂 (20% Gelucire) 形式的化合物 401、每三天腹膜内注射 120mg/kg (溶于 PBS 中) 吉西他滨 (健择[®])、或施用后两者。小鼠接受总计两周的处理,并分析肿瘤的平均体积。

[0180] 如图 18 所示,用化合物 401(100mg/kg) 或是吉西他滨(120mg/kg) 单独处理在处理期间以类似的程度延迟肿瘤生长。用化合物 401(100mg/kg) 组合吉西他滨(120mg/kg) 处理的动物显示出对肿瘤生长的协同效应。对于任何处理策略,未观察到明显的毒性。我们的数据提示,化合物 401 组合吉西他滨在治疗胰腺癌方面具有临床益处。

[0181] 本文引述的所有参考文献在适用法律允许的程度上整体并入本文作为参考,并在相同的程度上用于所有目的,就如同明确单独地说明将各单个出版物或专利或专利申请全文并入作为参考用于所有目的一样。在并入作为参考的出版物和专利或专利申请与本说明书所含公开内容相悖的程度上,本说明书旨在替换和 / 或优先于任何这样的矛盾材料。

[0182] 在本说明书和权利要求书中所用的表达成分、反应条件、分析结果等等数量的数字在所有情况下应理解为受术语“约”修饰。从而,除非有相反说明,本说明书和所附权利要求书中阐述的数值参数为近似值,其可以根据本发明寻求获得的期望性能而变。各数值参数应按照有效数字和普通舍入方法加以解释,但丝毫、也不应试图限制等同原则对权利要求范围的适用。

[0183] 可对本发明进行修饰和改变而不偏离其精神和范围,这对本领域技术人员是显而易见的。本文所述的具体实施方案仅仅是作为举例提供,而不意味着以任何方式加以限制。意思是说明书和实施例应视为仅仅是例示性的,而本发明的真正范围和精神由如下权利要求表明。

[0184] 参考文献

[0185] 1. Bonnet, D., Normal and leukaemic stem cells. Br J Haematol, 2005. 130(4) : p. 469-79.

[0186] 2. Bonnet, D. 和 J.E. Dick, Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat Med, 1997. 3(7) : p. 730-7.

[0187] 3. Baumann, M., M. Krause 和 R. Hill, Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. Nat Rev Cancer, 2008. 8(7) : p. 545-54.

[0188] 4. Hambardzumyan, D., M. Squatrito 和 E.C. Holland, Radiation resistance and stem-like cells in brain tumors. Cancer Cell, 2006. 10(6) : p. 454-6.

[0189] 5. Dean, M., T. Fojo 和 S. Bates, Tumour stem cells and drug resistance. Nat Rev Cancer, 2005. 5(4) : p. 275-84.

[0190] 6. Jones, R. J., W. H. Matsui 和 B. D. Smith, Cancer stem cells: are we missing the target? J Natl Cancer Inst, 2004. 96(8) : p. 583-5.

[0191] 7. Ho, M. M. 等人, Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. Cancer Res, 2007. 67(10) : p. 4827-33.

[0192] 8. Wang, J. 等人, Identification of cancer stem cell-like side population cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line. Cancer Res, 2007. 67(8) : p. 3716-24.

[0193] 9. Haraguchi, N. 等人, Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system. Stem Cells, 2006. 24(3) : p. 506-13.

[0194] 10. Doyle, L. A. 和 D. D. Ross, Multidrug resistance mediated by the

breastcancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene*, 2003. 22 (47) :p. 7340-58.

[0195] 11. Alvi, A. J. 等 人, Functional and molecular characterisation of mammaryside population cells. *Breast Cancer Res*, 2003. 5(1) :p. R1-8.

[0196] 12. Frank, N. Y. 等 人, ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res*, 2005. 65(10) :p. 4320-33.

[0197] 13. Schatton, T. 等人, Identification of cells initiating human melanomas. *Nature*, 2008. 451(7176) :p. 345-9.

[0198] 14. Kondo, T. , T. Setoguchi 和 T. Taga, Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004. 101(3) :p. 781-6.

[0199] 15. Goodell, M. A. 等 人, Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med*, 1996. 183(4) :p. 1797-806.

[0200] 16. Al-Hajj, M. 等 人, Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003. 100(7) :p. 3983-8.

[0201] 17. Collins, A. T. 等 人, Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*, 2005. 65(23) :p. 10946-51.

[0202] 18. Li, C. 等人, Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*, 2007. 67(3) :p. 1030-7.

[0203] 19. Ma, S. 等 人, Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology*, 2007. 132(7) :p. 2542-56.

[0204] 20. Prince, M. E. 等 人, Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(3) :p. 973-8.

[0205] 21. Ricci-Vitiani, L. 等 人, Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, 2007. 445(7123) :p. 111-5.

[0206] 22. Singh, S. K. 等 人, Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, 2003. 63(18) :p. 5821-8.

[0207] 23. Dalerba, P. 等 人, Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(24) :p. 10158-63.

[0208] 24. Klein, W. M. 等 人, Increased expression of stem cell markers in malignant melanoma. *Mod Pathol*, 2007. 20(1) :p. 102-7.

[0209] 25. Yu, H. Stat3: Linking oncogenesis with tumor immune evasion. in AACR2008 Annual Meeting. 2008. San Diego, CA.

[0210] 26. Pedrazzini, L. , A. Leitch 和 J. Bromberg, Stat3 is required for the development of skin cancer. *J Clin Invest*, 2004. 114(5) :p. 619-22.

[0211] 27. Catlett-Falcone, R. 等人, Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity*, 1999. 10(1) :p. 105-15.

- [0212] 28. Bromberg, J. F. 等人, Stat3 as an oncogene. *Cell*, 1999. 98(3) :p. 295-303.
- [0213] 29. Kanda, N. 等人, STAT3 is constitutively activated and supports cell survival in association with survivin expression in gastric cancer cells. *Oncogene*, 2004. 23(28) :p. 4921-9.
- [0214] 30. Schlette, E. J. 等人, Survivin expression predicts poorer prognosis in anaplastic large-cell lymphoma. *J Clin Oncol*, 2004. 22(9) :p. 1682-8.
- [0215] 31. Niu, G. 等人, Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene*, 2002. 21(13) :p. 2000-8.
- [0216] 32. Xie, T. X. 等人, Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis. *Oncogene*, 2004. 23(20) :p. 3550-60.
- [0217] 33. Kortylewski, M. 等人, Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat Med*, 2005. 11(12) :p. 1314-21.
- [0218] 34. Burdelya, L. 等人, Stat3 activity in melanoma cells affects migration of immune effector cells and nitric oxide-mediated antitumor effects. *J Immunol*, 2005. 174(7) :p. 3925-31.
- [0219] 35. Wang, T. 等人, Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med*, 2004. 10(1) :p. 48-54.
- [0220] 36. Darnell, J. E., Validating Stat3 in cancer therapy. *Nat Med*, 2005. 11(6) : p. 595-6.
- [0221] 37. Zhang, L. 等人, Intratumoral delivery and suppression of prostate tumor growth by attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium carrying plasmid-based small interfering RNAs. *Cancer Res*, 2007. 67(12) :p. 5859-64.
- [0222] 38. Campbell, I. L., Cytokine-mediated inflammation, tumorigenesis and disease-associated JAK/STAT/SOCS signaling circuits in the CNS. *Brain Res Brain Res Rev*, 2005. 48(2) :p. 166-77.
- [0223] 39. Harris, T. J. 等人, Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. *J Immunol*, 2007. 179(7) :p. 4313-7.
- [0224] 40. Watson, C. J. 和 W. R. Miller, Elevated levels of members of the STAT family of transcription factors in breast carcinoma nuclear extracts. *Br J Cancer*, 1995. 71(4) :p. 840-4.
- [0225] 41. Song, J. I. 和 J. R. Grandis, STAT signaling in head and neck cancer. *Oncogene*, 2000. 19(21) :p. 2489-95.
- [0226] 42. Song, L. 等人, Activation of Stat3 by receptor tyrosine kinases and cytokines regulates survival in human non-small cell carcinoma cells. *Oncogene*, 2003. 22(27) :p. 4150-65.
- [0227] 43. Savarese, T. M. 等人, Coexpression of oncostatin M and its receptors

and evidence for STAT3 activation in human ovarian carcinomas. *Cytokine*, 2002. 17(6) :p. 324-34.

[0228] 44. Toyonaga, T. 等人, Blockade of constitutively activated Januskinase/signal transducer and activator of transcription-3 pathway inhibits growth of human pancreatic cancer. *Cancer Lett*, 2003. 201(1) :p. 107-16.

[0229] 45. Corvinus, F.M. 等人, Persistent STAT3 activation in colon cancer is associated with enhanced cell proliferation and tumor growth. *Neoplasia*, 2005. 7(6) :p. 545-55.

[0230] 46. Gao, B. 等人, Constitutive activation of JAK-STAT3 signaling by BRCA1 in human prostate cancer cells. *FEBS Lett*, 2001. 488(3) :p. 179-84.

[0231] 47. Buettner, R., L. B. Mora 和 R. Jove, Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res*, 2002. 8(4) :p. 945-54.

[0232] 48. Carson, W.E., Interferon-alpha-induced activation of signal transducer and activator of transcription proteins in malignant melanoma. *Clin Cancer Res*, 1998. 4(9) :p. 2219-28.

[0233] 49. Chen, C.L. 等人, Stat3 activation in human endometrial and cervical cancers. *Br J Cancer*, 2007. 96(4) :p. 591-9.

[0234] 50. Lai, R. 等人, STAT3 is activated in a subset of the Ewing sarcoma family of tumors. *J Pathol*, 2006. 208(5) :p. 624-32.

[0235] 51. Punjabi, A.S. 等人, Persistent activation of STAT3 by latent Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection of endothelial cells. *J Virol*, 2007. 81(5) :p. 2449-58.

[0236] 52. Schaefer, L.K. 等人, Constitutive activation of Stat3alpha in brain tumors: localization to tumor endothelial cells and activation by the endothelial tyrosine kinase receptor (VEGFR-2). *Oncogene*, 2002. 21(13) :p. 2058-65.

[0237] 53. Puthier, D., R. Bataille 和 M. Amiot, IL-6 up-regulates mcl-1 in human myeloma cells through JAK/STAT rather than ras/MAP kinase pathway. *Eur J Immunol*, 1999. 29(12) :p. 3945-50.

[0238] 54. Migone, T.S. 等人, Constitutively activated Jak-STAT pathway in T cells transformed with HTLV-I. *Science*, 1995. 269(5220) :p. 79-81.

[0239] 55. Spiekermann, K. 等人, Constitutive activation of STAT transcription factors in acute myelogenous leukemia. *Eur J Haematol*, 2001. 67(2) :p. 63-71.

[0240] 56. Epling-Burnette, P.K. 等人, Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. *J Clin Invest*, 2001. 107(3) :p. 351-62.

[0241] 57. Weber-Nordt, R.M. 等人, Constitutive activation of STAT proteins in primary lymphoid and myeloid leukemia cells and in Epstein-Barr

virus(EBV)-related lymphoma cell lines. *Blood*, 1996. 88(3) :p. 809-16.

[0242] 58. Sommer, V.H. 等人, In vivo activation of STAT3 in cutaneous T-cell lymphoma. Evidence for an antiapoptotic function of STAT3. *Leukemia*, 2004. 18(7) :p. 1288-95.

[0243] 59. Lai, R. 等人, Signal transducer and activator of transcription-3 activation contributes to high tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large cell lymphoma. *Am J Pathol*, 2004. 164(6) :p. 2251-8.

[0244] 60. Fu, X.Y., STAT3 in immune responses and inflammatory bowel diseases. *Cell Res*, 2006. 16(2) :p. 214-9.

[0245] 61. Feldmann, M., F.M. Brennan 和 R.N. Maini, Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol*, 1996. 14 :p. 397-440.

[0246] 62. Krause, A. 等人, Rheumatoid arthritis synoviocyte survival is dependent on Stat3. *J Immunol*, 2002. 169(11) :p. 6610-6.

[0247] 63. Pfitzner, E. 等人, The role of STATs in inflammation and inflammatory diseases. *Curr Pharm Des*, 2004. 10(23) :p. 2839-50.

[0248] 64. Lovato, P. 等人, Constitutive STAT3 activation in intestinal T cells from patients with Crohn's disease. *J Biol Chem*, 2003. 278(19) :p. 16777-81.

[0249] 65. Ishihara, K. 和 T. Hirano, IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2002. 13(4-5) :p. 357-68.

[0250] 66. Ivashkiv, L.B. 和 I. Tassiulas, Can SOCS make arthritis better? *J Clin Invest*, 2003. 111(6) :p. 795-7.

[0251] 67. Sengupta, T.K. 等人, Activation of monocyte effector genes and STAT family transcription factors by inflammatory synovial fluid is independent of interferon gamma. *J Exp Med*, 1995. 181(3) :p. 1015-25.

[0252] 68. Shouda, T. 等人, Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis. *J Clin Invest*, 2001. 108(12) :p. 1781-8.

[0253] 69. Harada, T. 等人, Increased expression of STAT3 in SLE T cells contributes to enhanced chemokine-mediated cell migration. *Autoimmunity*, 2007. 40(1) :p. 1-8.

[0254] 70. Simeone-Penney, M.C. 等人, Airway epithelial STAT3 is required for allergic inflammation in a murine model of asthma. *J Immunol*, 2007. 178(10) :p. 6191-9.

[0255] 71. Hagler, M., Smith-Norowitz, T., Chice, S., Wallner, S., Viterbo, D., Mueller, C., Groos, R., Nowakowski, M., Schulze, R., Zenilman, M., Sphorolipids decrease IgE production in U266 cells by downregulation of BSAF(Pax5), TLR-2, STAT3 and IL-6. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2007. 119(S1) :

p. S263-S263.

[0256] 72. Benkhart, E.M. 等 人, Role of Stat3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression. *J Immunol*, 2000. 165(3) :p. 1612-7.

[0257] 73. Sano, S. 等 人, Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nat Med*, 2005. 11(1) :p. 43-9.

[0258] 74. Lim, C.P. 等 人, Stat3 contributes to keloid pathogenesis via promoting collagen production, cell proliferation and migration. *Oncogene*, 2006. 25(39) :p. 5416-25.

[0259] 75. Arany, I. 等 人, Correlation between pretreatment levels of interferon response genes and clinical responses to an immune response modifier (Imiquimod) in genital warts. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000. 44(7) : p. 1869-73.

[0260] 76. Tefferi, A., Classification, diagnosis and management of myeloproliferative disorders in the JAK2V617F era. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2006 :p. 240-5.

[0261] 77. Roder, S. 等 人, STAT3 is constitutively active in some patients with Polycythemia rubra vera. *Exp Hematol*, 2001. 29(6) :p. 694-702.

[0262] 78. Kim, O.S. 等 人, JAK-STAT signaling mediates gangliosides-induced inflammatory responses in brain microglial cells. *J Biol Chem*, 2002. 277(43) : p. 40594-601.

[0263] 79. Wyss-Coray, T., Inflammation in Alzheimer disease : driving force, bystander or beneficial response ? *Nat Med*, 2006. 12(9) :p. 1005-15.

[0264] 80. Stelmasiak, Z. 等 人, Interleukin-6 concentration in serum and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis patients. *Med Sci Monit*, 2000. 6(6) : p. 1104-8.

[0265] 81. Ponti, D. 等 人, Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res*, 2005. 65(13) :p. 5506-11.

[0266] 82. Szotek, P.P. 等 人, Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(30) :p. 11154-9.

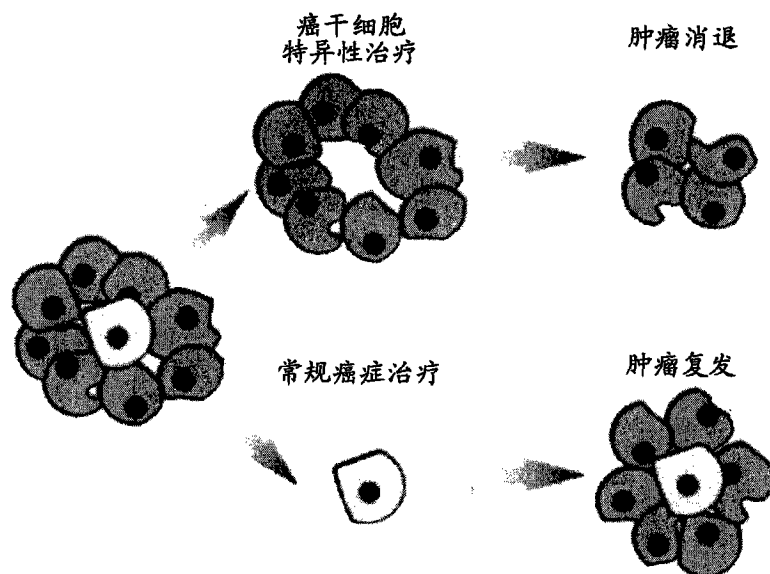


图 1

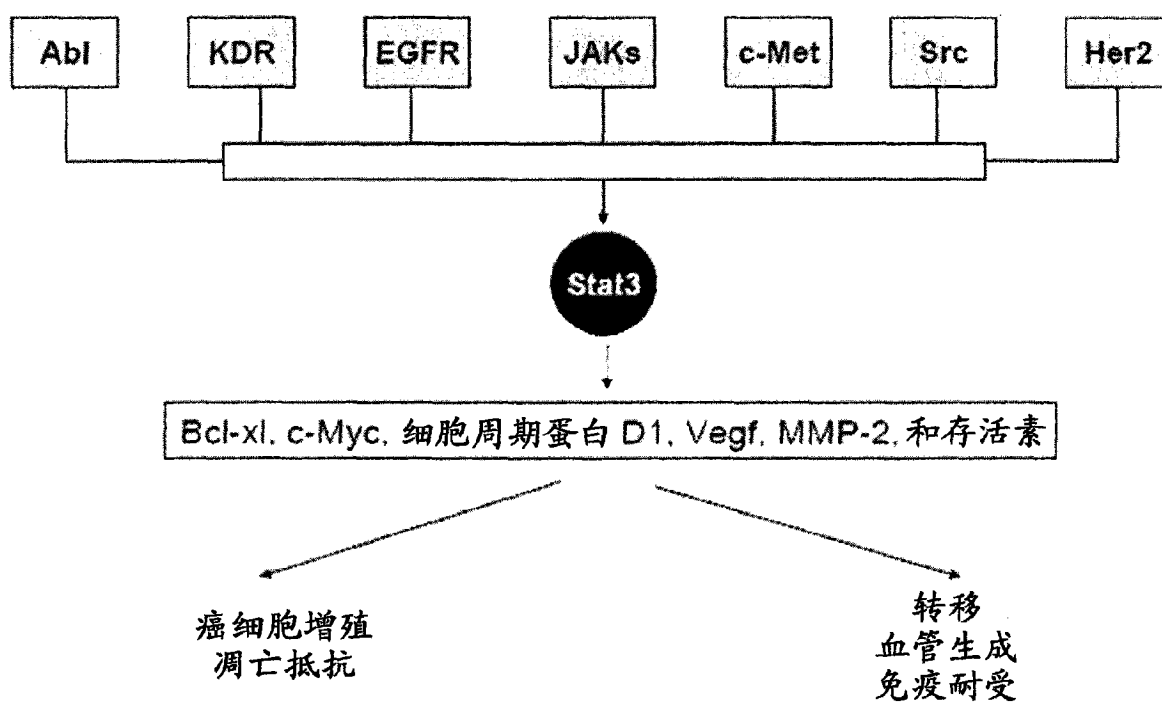


图 2

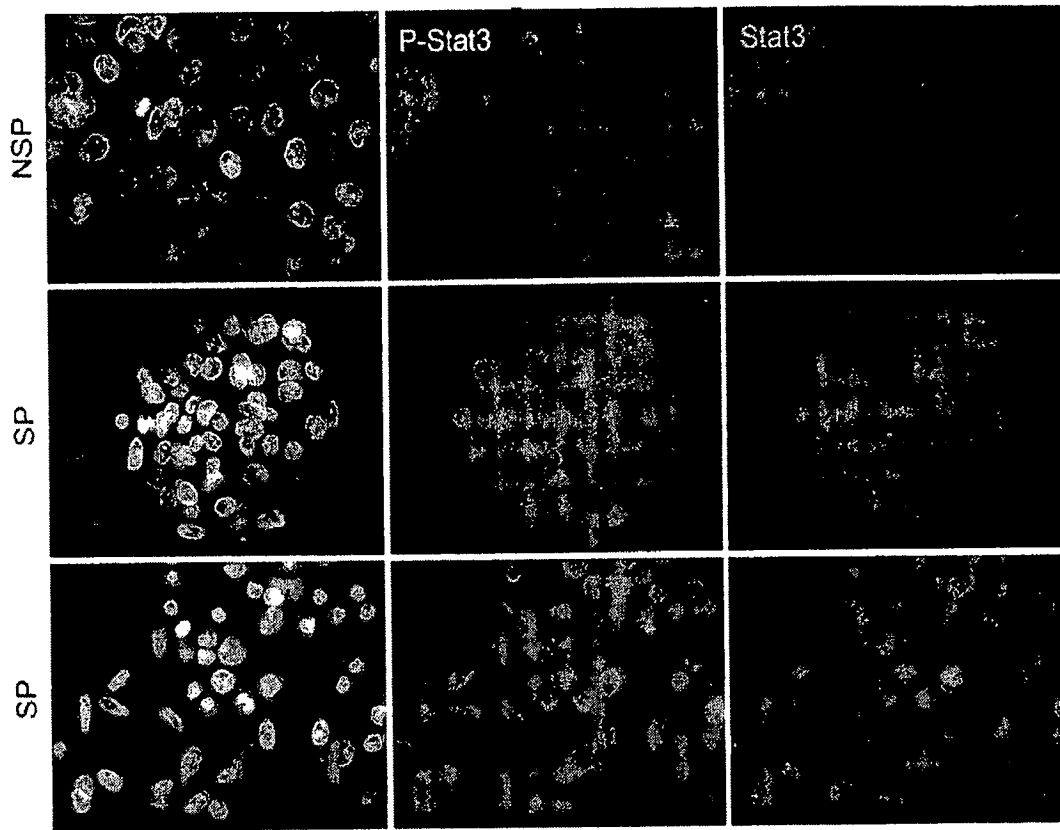


图 3A

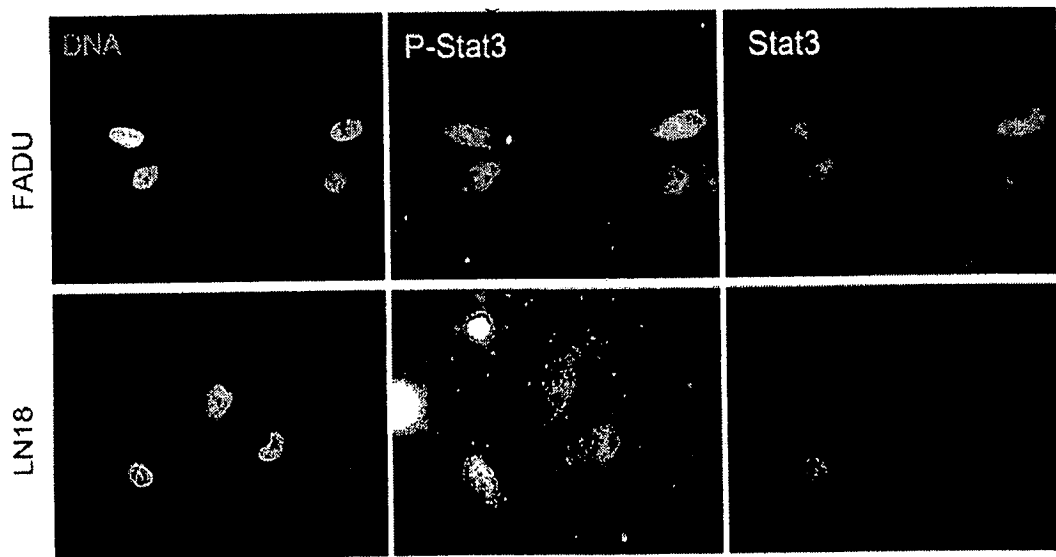


图 3B

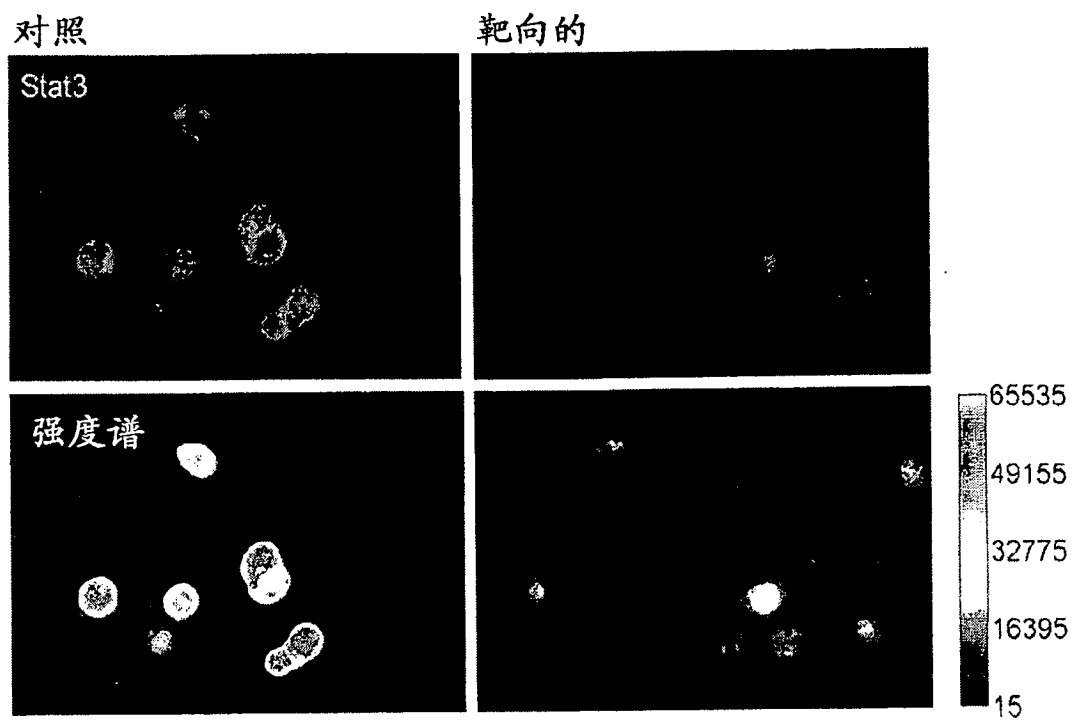


图 4A

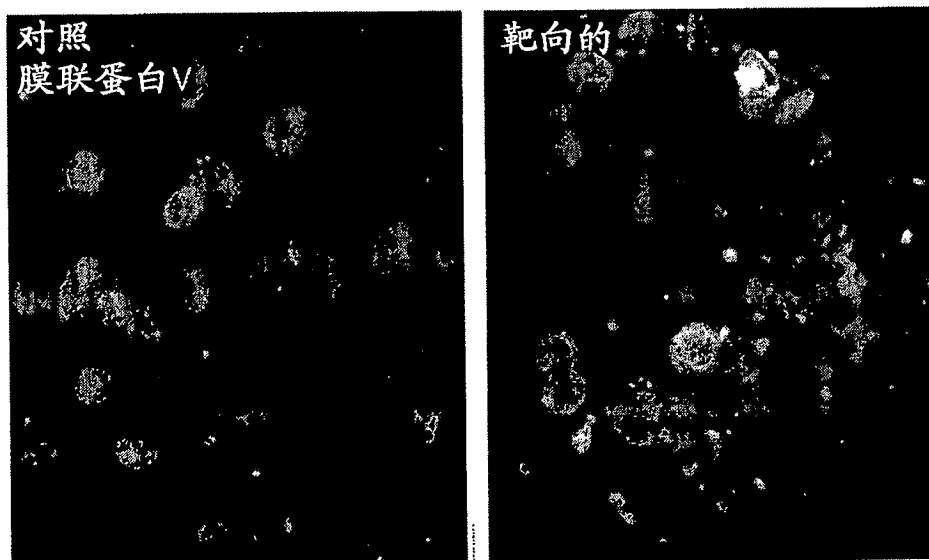


图 4B

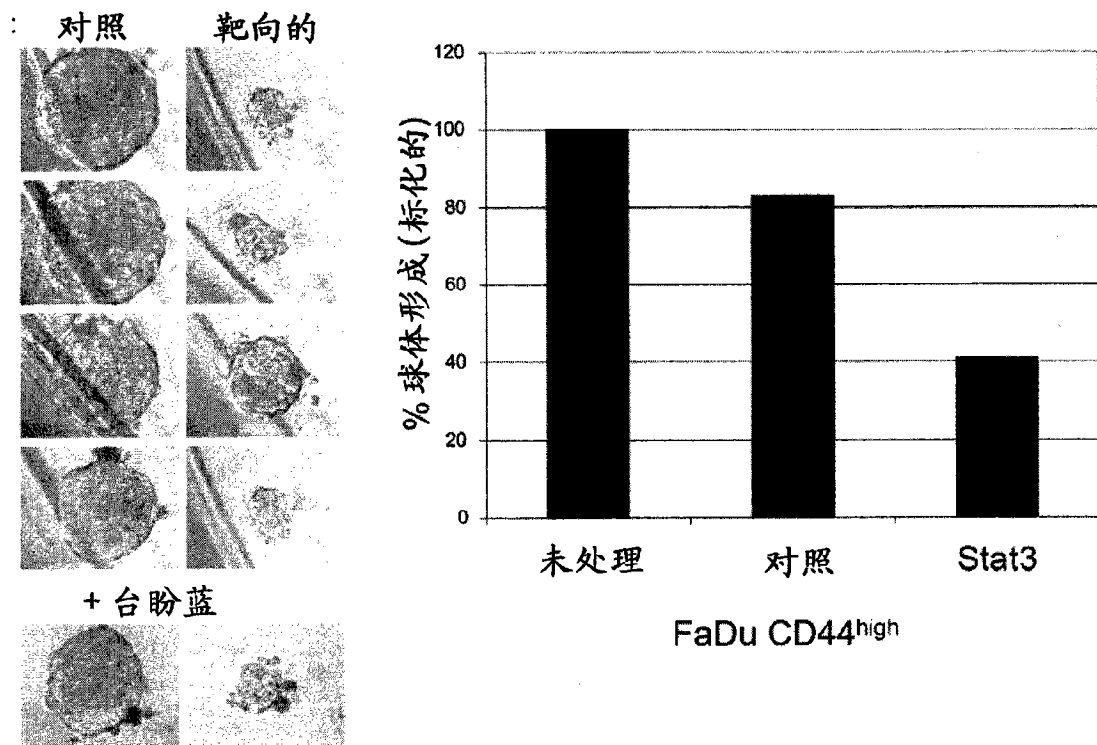


图 5

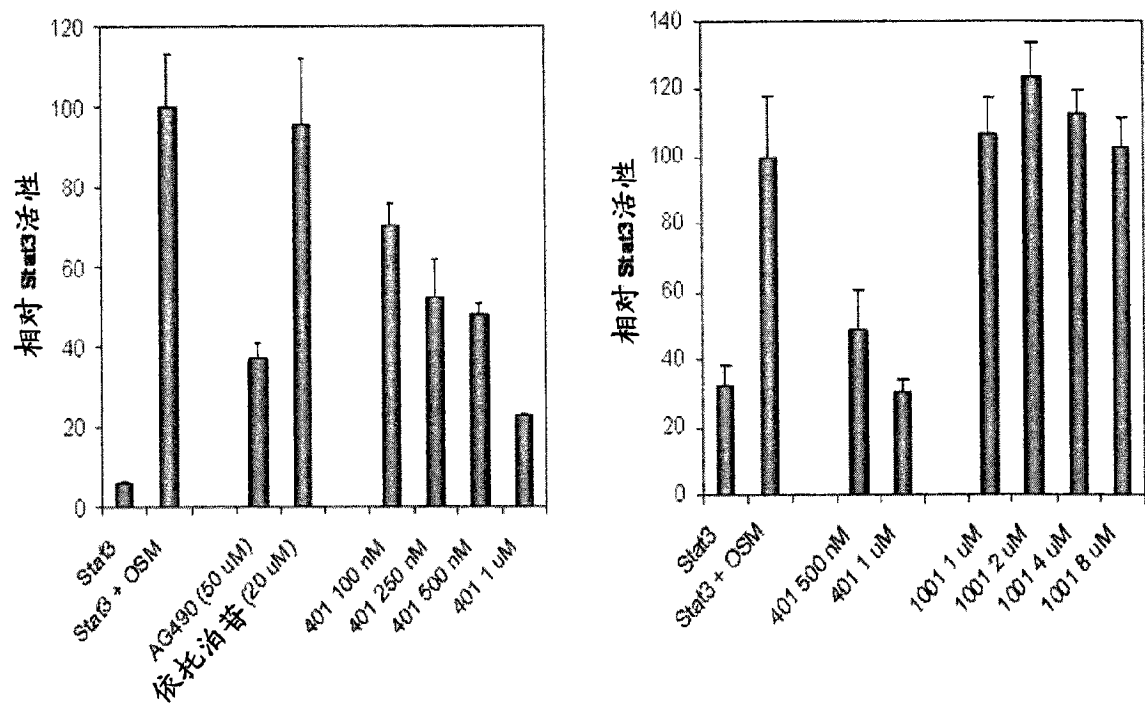


图 6

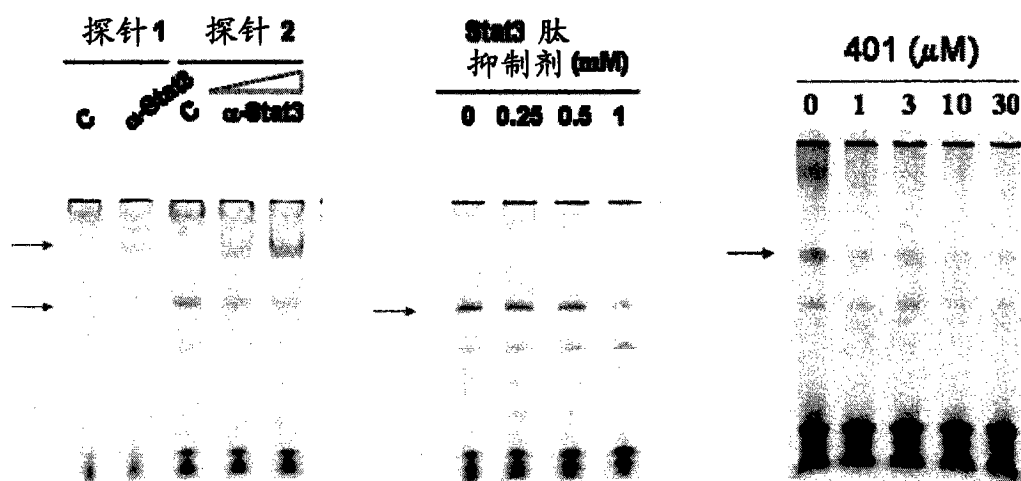


图 7A

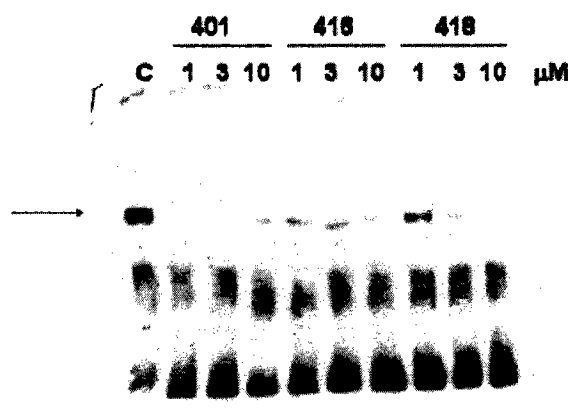


图 7B

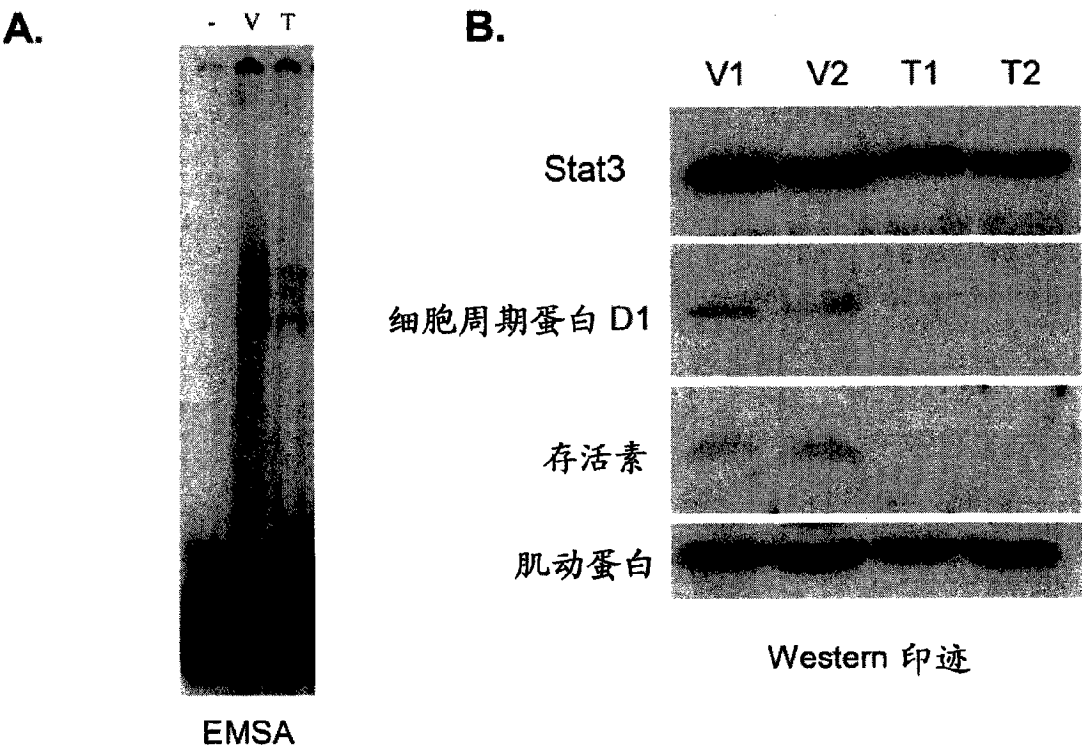
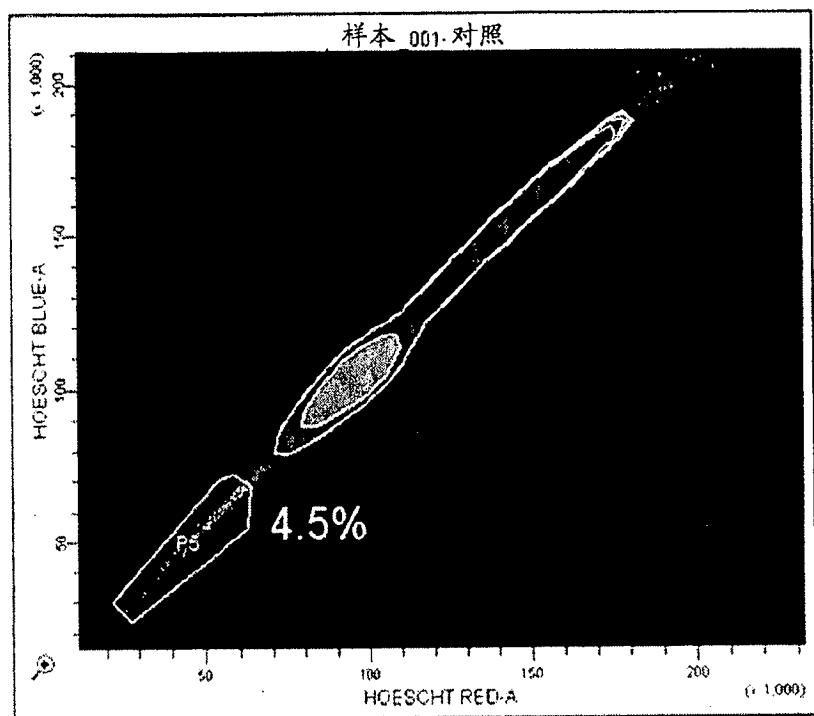
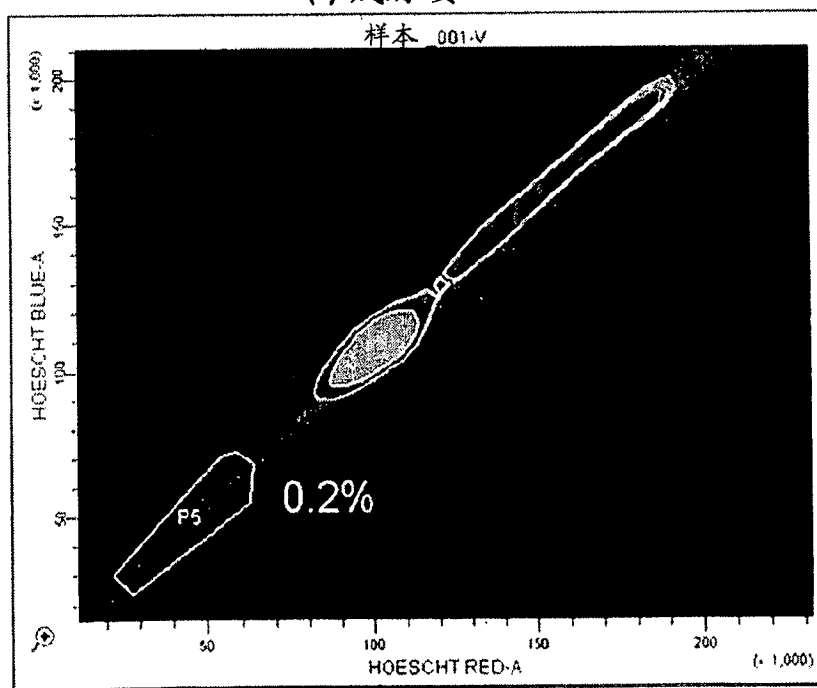


图 8



(-) 戊脉安



(+) 戊脉安

图 9A

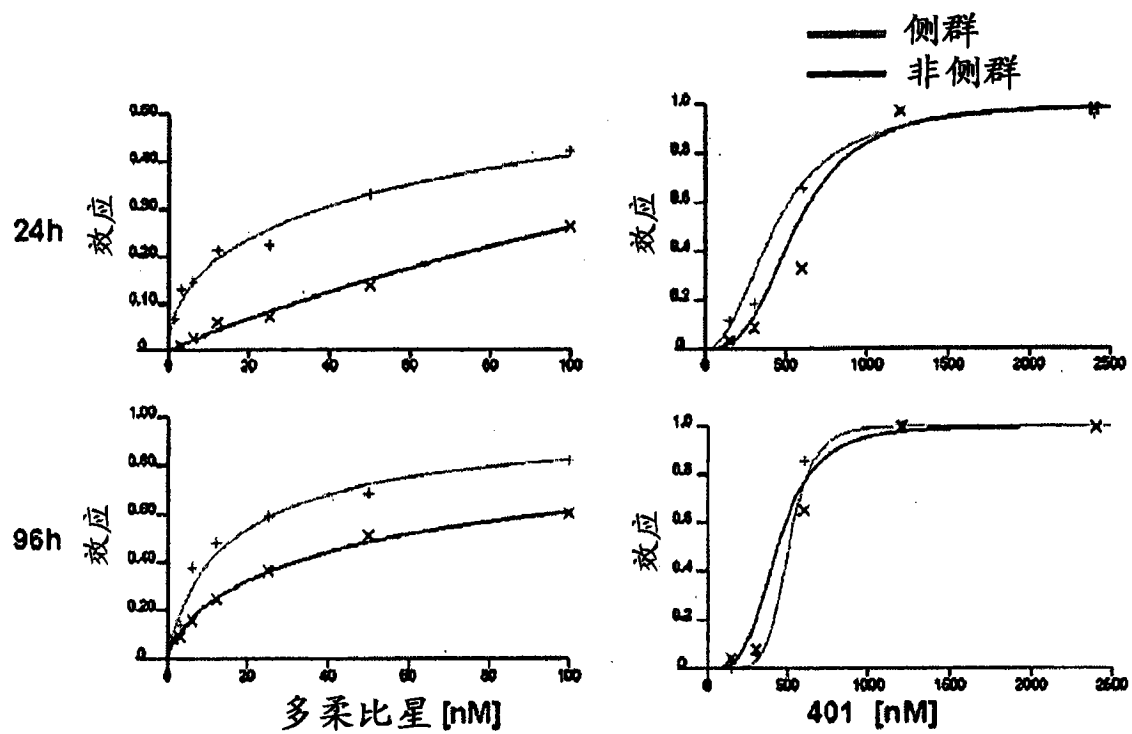


图 9B

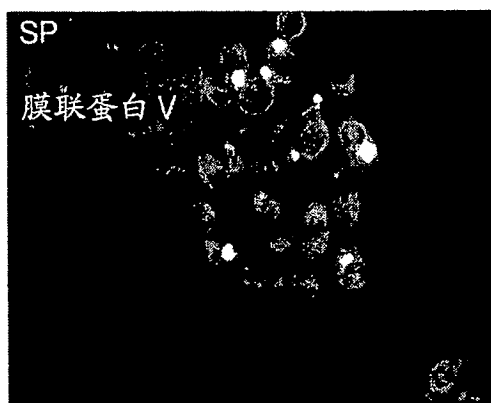


图 10A

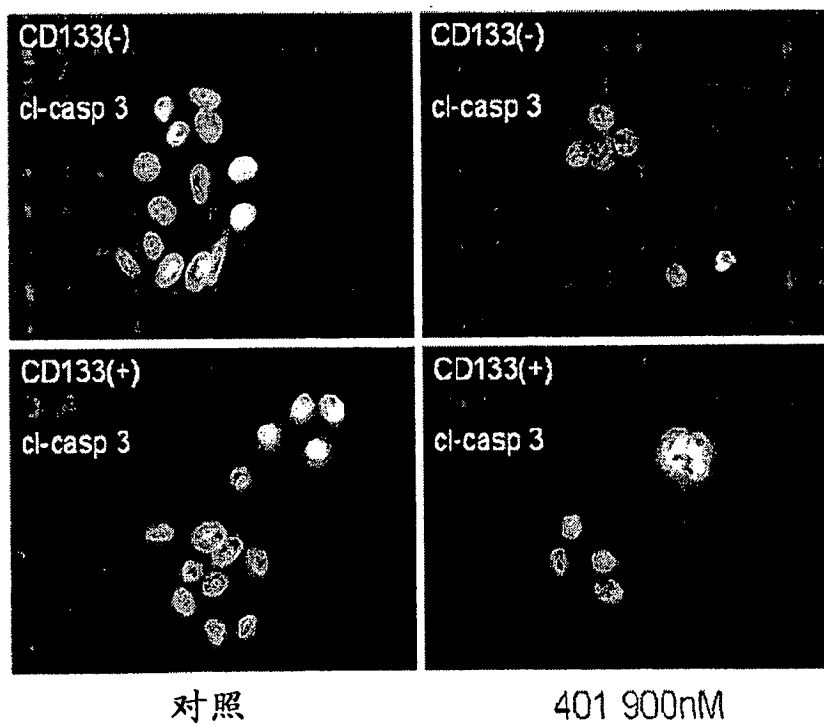


图 10B

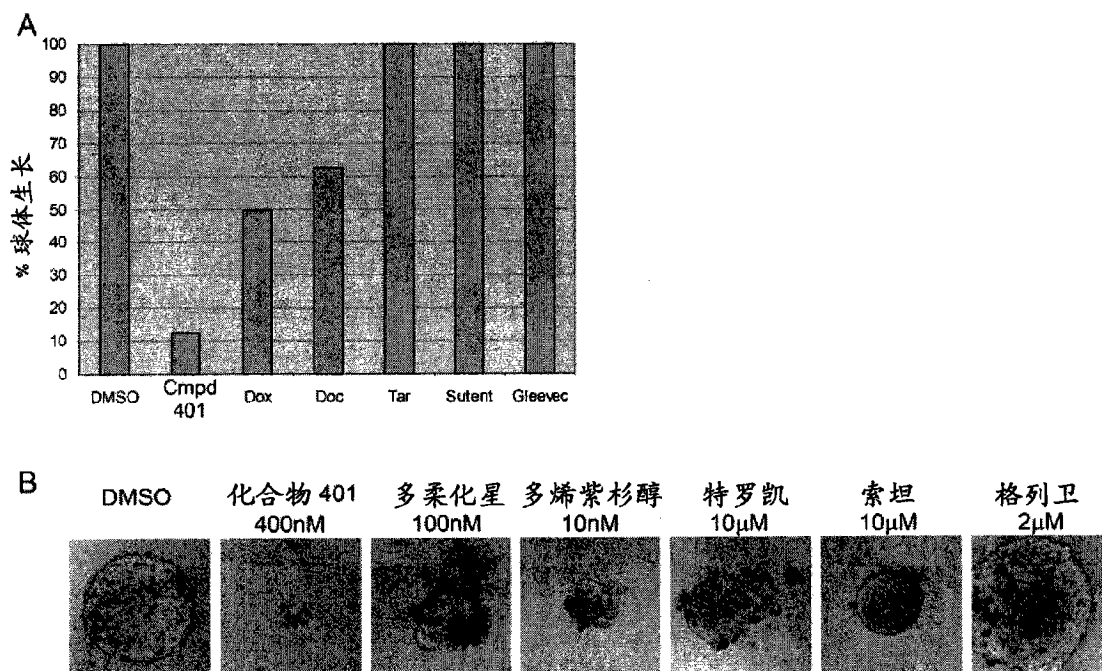


图 11

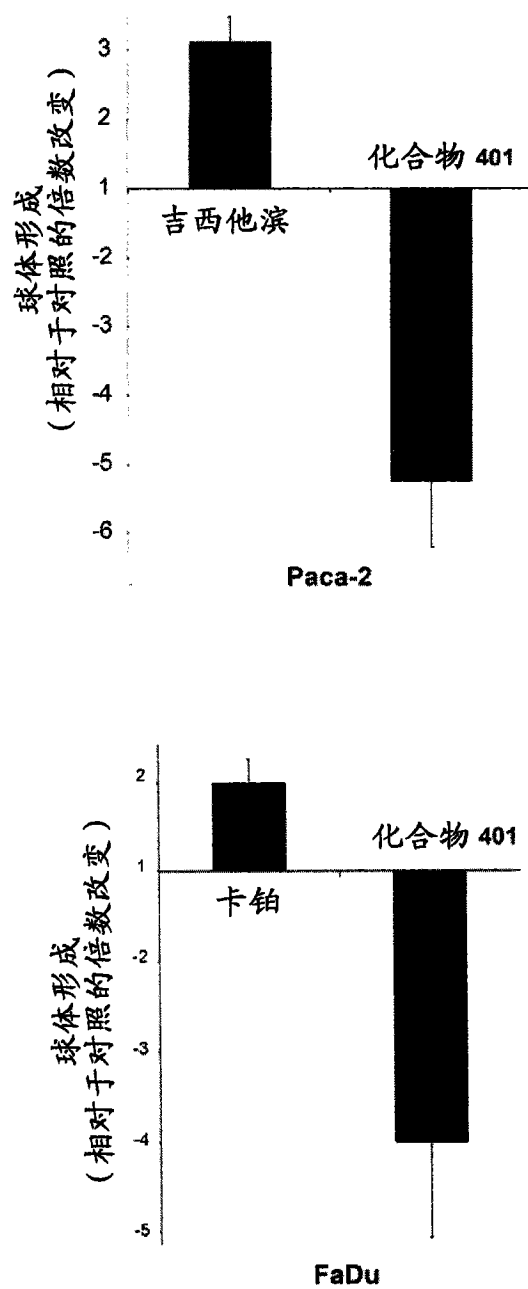


图 12

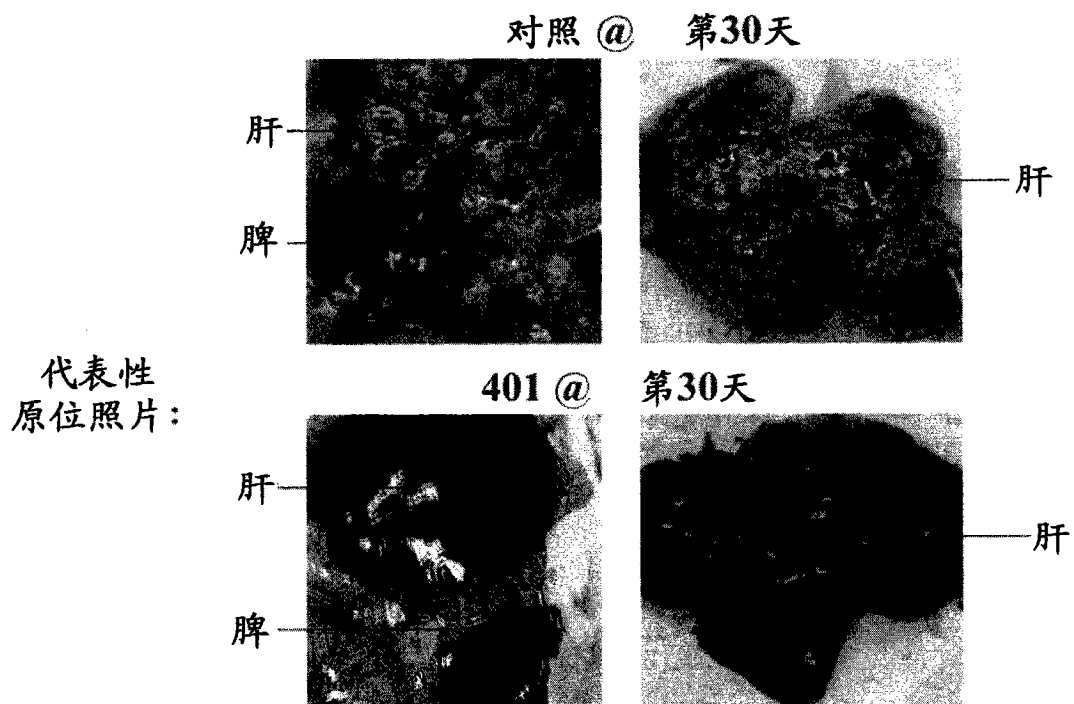


图 13

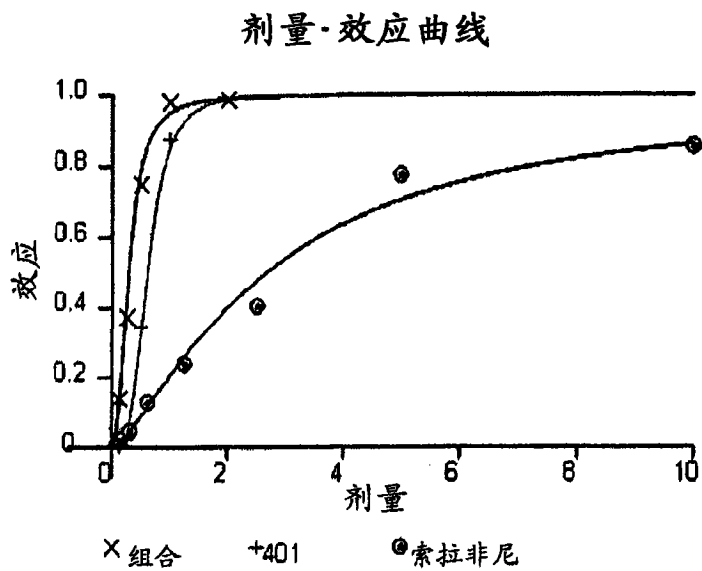


图 14

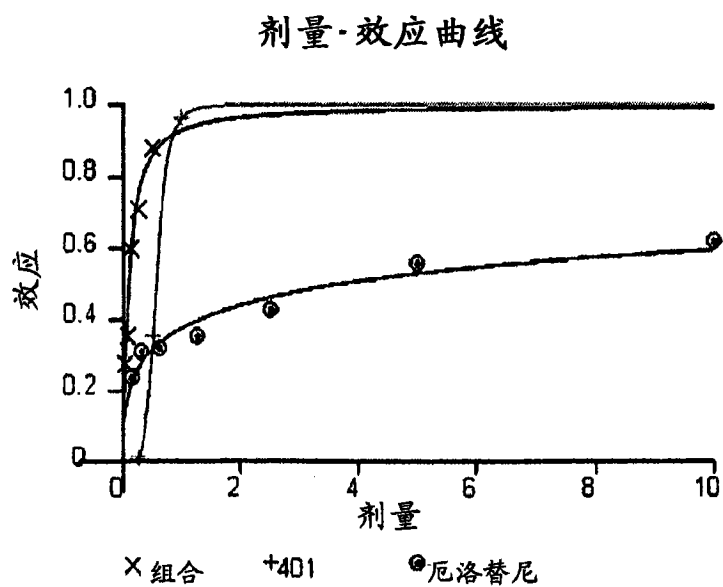


图 15

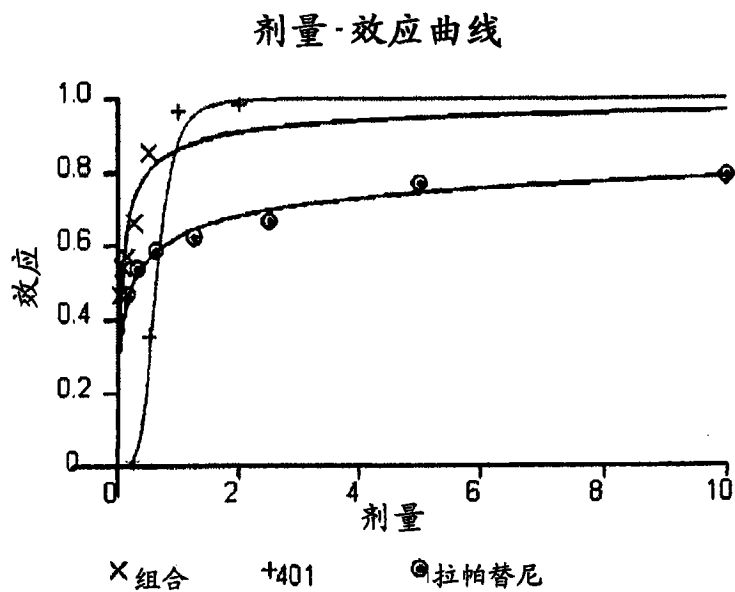


图 16

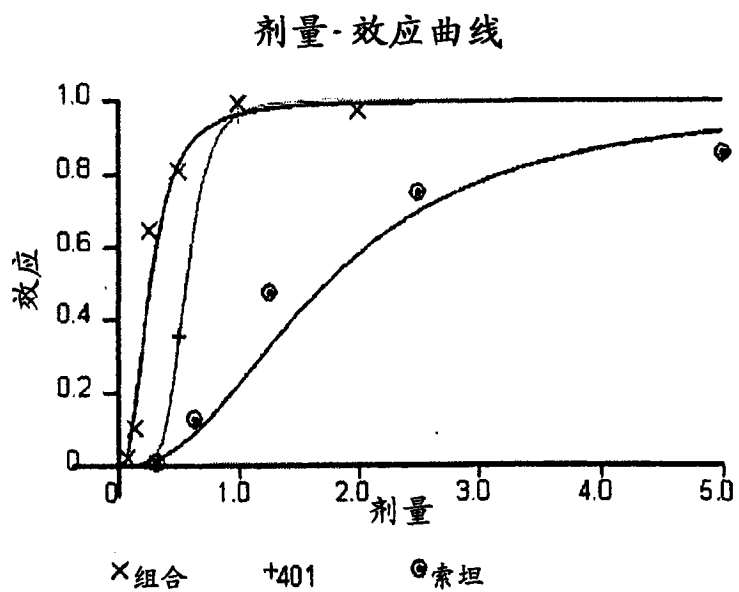


图 17

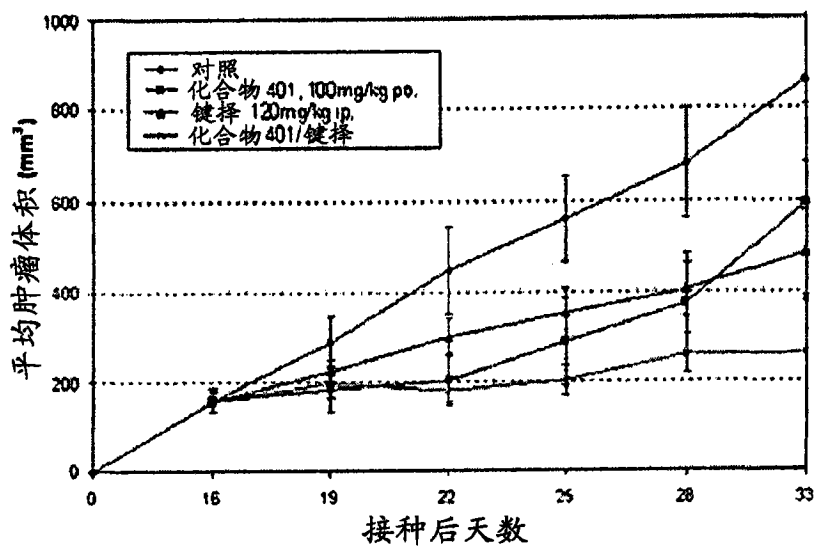


图 18