(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106211758 B
(45)授权公告日 2021.03.23

(21)申请号 201480031527.9
(22)申请日 2014.04.09
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106211758 A
(43)申请公布日 2016.12.07
(30)优先权数据
61/810117 2013.04.09 US
61/830068 2013.06.01 US
61/932179 2014.01.27 US
61/938386 2014.02.11 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.12.02
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/033566 2014.04.09
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2014/169078 EN 2014.10.16
(73)专利权人 北京强新生物科技有限公司
地址 100083 北京市海淀区学院路30号科大天工大厦B座8层01-15室
(72)发明人 C·J·李 W·李 D·莱格特 Y·李 D·科斯坦 M·希尔顿
(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002
代理人 王文君
(51)Int.Cl.
A61K 31/343(2006.01)
A61K 45/06(2006.01)
A61K 31/337(2006.01)
A61K 9/48(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 35/04(2006.01)
(56)对比文件
CN 101854930 A,2010.10.06
CN 103025159 A,2013.04.03
CN 103025159 A,2013.04.03
WO 2011116398 A1,2011.09.22
审查员 洪梦实

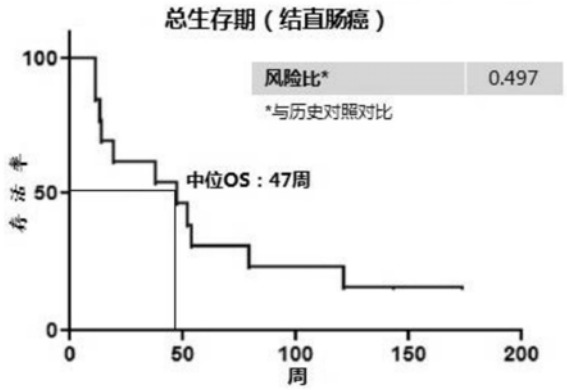
权利要求书1页 说明书65页 附图8页

(54)发明名称

2-乙酰基萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮用于治疗癌症的用途

(57)摘要

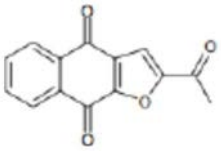
本发明提供了萘并呋喃化合物、萘并呋喃化合物的多晶型物、颗粒形式的萘并呋喃化合物、含有一种或多种萘并呋喃化合物的纯组合物、含有颗粒形式的一种或多种萘并呋喃化合物的纯组合物和使用这些萘并呋喃化合物、多晶型物、纯组合物和/或颗粒形式来治疗有此需要的受试者的方法。



CN 106211758 B

1.一种药物组合物,作为胶囊剂施用,其包含:

(a)按重量计从5%到50%范围内的,治疗有效量的活性组分,其具有结构



(b)按重量计从5%到80%范围内的,HLB值介于10和17之间的聚氧甘油酯;和

(c)按重量计从5%到80%范围内的,HLB值介于2和8之间的聚氧甘油酯;和

(d)按重量计从0.05%到5%范围内的表面活性剂,选自月桂基硫酸钠或十二烷基硫酸钠,

其中所述活性组分的颗粒具有小于20微米的D_{50},其中所述HLB值介于10和17之间的聚氧甘油酯选自月桂酰聚氧甘油酯和硬脂酰聚氧甘油酯,其中所述HLB值介于2和8之间的聚氧甘油酯是亚油酯酰聚氧甘油酯。

2.根据权利要求1所述的药物组合物,其进一步由按重量27.18%的活性组分、0.27%的表面活性剂、14.51%的月桂酰聚氧甘油酯和58.04%的亚油酯酰聚氧甘油酯组成。

3.根据权利要求1所述的药物组合物,其进一步由约125mg的活性组分、约1.2mg的表面活性剂、约66.8mg的月桂酰聚氧甘油酯和约267mg的亚油酯酰聚氧甘油酯组成。

4.根据权利要求1所述的药物组合物,其进一步由约80mg的活性组分、约0.8mg的表面活性剂、约42.7mg的月桂酰聚氧甘油酯和约170.9mg的亚油酯酰聚氧甘油酯组成。

5.根据权利要求2-4任一项所述的药物组合物,其中所述的表面活性剂是月桂基硫酸钠。

6.根据权利要求2-4任一项所述的药物组合物,其中所述的月桂酰聚氧甘油酯是Gelucire™44/14。

7.根据权利要求2-4任一项所述的药物组合物,其中所述的亚油酯酰聚氧甘油酯是Labrafil M2125CS。

8.一种制备的物品,其包含容纳在胶囊中的权利要求1-7任一项所述的药物组合物。

9.根据权利要求8所述的制备的物品,其中所述胶囊是型号1或更小。

2-乙酰基萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮用于治疗癌症的用途

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2013年4月9日申请的美国临时专利申请号61/810,117、2013年6月1日申请的美国临时专利申请号61/830,068、2014年1月27日申请的美国临时专利申请号61/932,179和2014年2月11日申请的美国临时专利申请号61/938,386的优先权。这些申请的内容各自全部并入本文作为参考。

技术领域

[0003] 本发明提供了萘并呋喃化合物、萘并呋喃化合物的多晶型物、颗粒形式的萘并呋喃化合物、含有一种或多种萘并呋喃化合物的纯组合物、含有颗粒形式的一种或多种萘并呋喃化合物的纯组合物和使用这些萘并呋喃化合物、多晶型物、纯组合物和/或颗粒形式来治疗有此需要的受试者的方法。

背景技术

[0004] 仅仅在美国,癌症造成的死亡数量每年就有数十万人。虽然在通过手术、放疗和化疗治疗某些形式的癌症上取得了进展,但许多类型的癌症基本上是不能治愈的。即使对特定癌症的有效治疗是可用的,这种治疗的副作用可能是严重的,并且导致生活质量的显著降低。

[0005] 大部分常规化疗药剂具有毒性和有限效果,尤其对于晚期实体瘤患者。化学治疗剂损伤非癌性以及癌性细胞。这种化合物的治疗指数(区分癌性细胞和正常细胞的治疗能力的量度)可能非常低。通常,有效杀死癌细胞的化疗药物的剂量还杀死正常细胞,尤其是进行频繁细胞分裂的那些正常细胞(例如上皮细胞)。当正常细胞受到治疗的影响时,可能出现副作用,例如脱发、抑制血细胞生成和恶心。根据患者的常规健康情况,这种副作用妨碍化疗的实施,或至少对于患者来说是极其不愉快和不舒服的,并且严重地降低癌症患者剩余生命的生活质量。即使对于对化疗作出响应的癌症患者出现肿瘤消退,这种肿瘤响应通常不会伴随无疾病进展生存期(PFS)的延长或总生存期(OS)的延长。事实上,在对化疗产生初始响应之后,癌症通常快速发展,并且形成更多的转移。这种复发性的癌症变得对化疗药物高度顽固,或用化疗药物难以治疗。化疗之后的这种快速复发和顽固性被认为是由癌症干细胞所引起的。

[0006] 最近的研究证明了具有自我更新能力的癌症干细胞(CSC,还称为肿瘤起始细胞或癌症干细胞样细胞)的存在,并且认为其根本性地对恶性生长、复发和转移负责。重要的是,CSC固有地抵抗常规治疗。因此,对于癌症患者来说,针对癌症干细胞的具有活性的靶向药剂是巨大的希望(J Clin Oncol.2008 Jun 10;26(17))。因此,虽然常规化疗可以杀死大部分癌细胞,但留下癌症干细胞。通过化疗减少非干性普通癌细胞之后,癌症干细胞可以生长更快,这被认为是化疗之后快速复发的机理。

[0007] 相应地,还需要发现选择性靶向癌细胞、靶向癌干细胞的化合物和药物组合物,及制备临床应用的这些化合物和药物组合物的方法,及给有此需要的患者施用这些的方法。

[0008] 本文所列举的参考文献不被认为是所要求保护的发明的现有技术。

[0009] 发明概述

[0010] 在公布为WO 2009/036099、WO 2009/036101和WO 2011/116399的共同所有的PCT申请中，其全部内容并入本文作为参考，公开了新型萘并呋喃化合物、萘并呋喃化合物的多晶型物、含有一种或多种萘并呋喃化合物的纯组合物和颗粒形式的萘并呋喃化合物。这些萘并呋喃化合物(包括颗粒形式的)、多晶型物和纯组合物是癌干细胞和STAT3的选择性抑制剂。WO 2009/036099和WO 2009/036101公开了萘并呋喃化合物靶向癌干细胞。通过抑制STAT3，它们还抑制非干性的癌细胞。在某些暴露条件下，那些化合物能够杀死许多不同类型的癌细胞，不引起正常细胞损害。因此，该化合物可以用于治疗癌症，尤其用于治疗和预防难治疗的、复发性的、转移性的癌症，或表达STAT3的癌症。本公开还描述了制备萘并呋喃化合物、其衍生物、其中间体和相关化合物的药物组合物的方法。

[0011] 本发明提供了配制这些萘并呋喃化合物(包括颗粒形式的)、多晶型物和纯组合物和使用其应用于各种适应症的新方法，适应症包括，例如，治疗细胞增殖紊乱、延迟细胞增殖紊乱的进展，防止细胞增殖紊乱的复发，或减轻细胞增殖紊乱的症状。例如，该萘并呋喃化合物(包括颗粒形式的)、多晶型物和纯组合物可有效用于治疗癌症、延迟癌症的进展、防止癌症的复发、减轻癌症的症状或者另一方面改善癌症。在一些实施方案中，癌症选自食管癌、胃食管结合部癌、胃食管结合部腺癌、软骨肉瘤、结直肠癌、结肠腺癌、直肠腺癌、结直肠腺癌、乳腺癌、卵巢癌、头颈癌、黑素瘤、胃腺癌和肾上腺类皮质激素癌。在一些实施方案中，癌症是食管癌。在一些实施方案中，癌症是胃食管结合部癌。在一些实施方案中，癌症是胃食管结合部腺癌。在一些实施方案中，癌症是难治疗的。在一些实施方案中，癌症是复发性的。在一些实施方案中，癌症是转移性的。在一些实施方案中，癌症与STAT3的过表达有关。

[0012] 根据本发明的对人、哺乳动物或动物受试者癌症(或赘生物)的治疗、延迟其进展、防止其复发、抑制其复发及转移、减轻其症状和/或使其得到改善的方法可以包括：施用治疗有效量的化合物、产品和/或药物组合物，使得出现抗赘生物活性。例如，抗赘生物活性可以是抗癌活性。例如，抗赘生物活性可以包括：减缓赘生物体积的生长、终止赘生物体积的生长或减小赘生物体积。赘生物可以包括实体瘤、恶性肿瘤、转移性细胞、癌症干细胞。赘生物可以包括癌、肉瘤、腺癌、淋巴瘤或血液恶性肿瘤。赘生物可以是通过化疗、放疗和/或激素治疗难以治疗的。可以施用化合物、产品和/或药物组合物，以便防止赘生物的复发。可以施用化合物、产品和/或药物组合物作为手术切除的辅助治疗。例如，可以口服和/或静脉施用化合物、产品和/或药物组合物。在一些实施方案中，药物组合物包含本发明的化合物与至少以下结合：(i)表面活性剂，其包含月桂基硫酸钠(SLS)或十二烷基硫酸钠(SDS)；(ii)Gelucire(月桂酰聚氧甘油酯)；和Labrafil(亚油酯酰聚氧甘油酯)。

[0013] 在本说明书中，术语“治疗癌症”可以包括延迟癌症(或赘生物)进展、防止癌症(或赘生物)复发、抑制癌症(或赘生物)复发及转移、减轻癌症(或赘生物)症状和/或使癌症(或赘生物)得到改善。

[0014] 在一些实施方案中，药物组合物包含本发明的化合物与至少以下结合：(i)表面活性剂，其包含月桂基硫酸钠(SLS)或十二烷基硫酸钠(SDS)；(ii)Gelucire(月桂酰聚氧甘油酯)；和(iii)Labrafil(亚油酯酰聚氧甘油酯)。

[0015] 在一些实施方案中，药物组合物包括(按重量)约27.18％的活性组分、约0.27％的

表面活性剂、约14.51％的Gelucire和约58.04％的Labrafil。在一些实施方案中，药物组合物包括约125mg的活性组分、约1.2mg的表面活性剂、约66.8mg的Gelucire和约267mg的Labrafil。在一些实施方案中，药物组合物包括约80mg的活性组分、约0.8mg的表面活性剂、约42.7mg的Gelucire和约170.9mg的Labrafil。在一些实施方案中，药物组合物容纳在胶囊中。在一些实施方案中，胶囊为型号1或更小。

[0016] 根据本发明的方法还包括对患有疾病或病症的人、哺乳动物或动物受试者的疾病或病症的治疗、延迟其发展、防止其复发、减轻其症状或者使其得到改善。在一些实施方案中，疾病或病症是本文所述的任何癌症(或赘生物)。在一些实施方案中，癌症选自食管癌、胃食管结合部癌、胃食管结合部腺癌、软骨肉瘤、结直肠癌、结肠腺癌、直肠腺癌、结直肠腺癌、乳腺癌、卵巢癌、头颈癌、黑素瘤、胃腺癌和肾上腺类皮质激素癌。

[0017] 在一些实施方案中，方法还包括检测患者组织中磷酸化STAT3(p-STAT3)的水平的步骤，其中p-STAT3的水平用作患者选择的生物标志物。在一些实施方案中，组织磷酸化STAT3水平高于基准水平(超过10％的肿瘤细胞具有中度水平p-STAT3)。在一些实施方案中，癌症与β-catenin定位在细胞核中而不是细胞膜中有关。在一些实施方案中，方法包括检测患者组织中β-catenin表达的定位，其中这种β-catenin表达的定位用作患者选择的生物标志物。在一些实施方案中，在细胞核中检测到显著的β-catenin表达。在一些实施方案中，在20％或更多肿瘤细胞中检测到β-catenin中度到强表达。

[0018] 如果给患有疾病或病症的患者施用化合物、产品和/或药物组合物，各种实验室或临床效果能够达到任何，则认为这种给药是成功的。例如，如果与疾病或病症相关的一种或多种症状得到减轻、减少、抑制或没有进一步发展(即，更坏的，状态)，则认为给药是成功的。如果病症(例如，癌症或赘生物)进入症状缓解状态或没有进一步发展(即，更坏的，状态)，则认为给药是成功的。

[0019] 在一些实施方案中，本文所述的化合物、产品和/或药物组合物与各种已知的治疗(包括，例如化学治疗及其它抗赘生物药剂、抗炎症化合物和/或免疫抑制化合物)中的任何联合施用。在一些实施方案中，本文所描述的化合物、产品和/或药物组合物可与各种已知的治疗中的任何结合使用，已知的治疗包括(非限制性实例)：外科治疗和方法，放射治疗，化疗和/或激素或其它内分泌相关的治疗。

[0020] 可以顺序或同时施用这些“联合治疗”。可以在同样的药物组合物中给受试者(优选地，受试者为人)施用本文所述的化合物、产品和/或药物组合物和第二种治疗。或者，可以用单独的药物组合物同时、分开或顺序给受试者施用本文所描述的化合物、产品和/或药物组合物和第二种治疗。可以通过相同或不同的给药途径施用本文所述的化合物、产品和/或药物组合物和第二种治疗。可以首先给受试者施用本文所述的化合物、产品和/或药物组合物，然后给受试者施用第二种治疗。可以首先给受试者施用第二种治疗，然后给受试者施用本文所述的化合物、产品和/或药物组合物。在一些实施方案中，本发明的联合治疗包含有效量的本文所述的化合物、产品和/或药物组合物和有效量的至少一种其它治疗(例如，预防剂或治疗剂)，这种其它治疗与本文所述的化合物、产品和/或药物组合物的作用机理不同。在一些实施方案中，本发明的联合治疗可以提高本文所述的化合物、产品和/或药物组合物和第二种治疗的预防或治疗效果，通过它们一起起作用，具有加和效应或协同效应。在某些实施方案中，本发明的联合治疗可以降低与第二种治疗(例如，预防剂或治疗剂)相

关的副作用。

[0021] 在一些实施方案中，可以通过如下方法施用化合物、产品和/或药物组合物来治疗疾病或病症。化合物的血液摩尔浓度可以至少为第一个连续时间周期的有效浓度，并且小于有害浓度，这种连续时间周期应该至少与有效时间周期一样长，并且短于有害时间周期。第一个连续时间周期之后，血液摩尔浓度可以小于有效浓度。例如，有效浓度可以是约0.1μM、约0.2μM、约0.5μM、约1μM、约2μM、约3μM、约4μM、约5μM、约6μM、约10μM，或者本领域技术人员确定的其它有效浓度。例如，有害浓度可以是约1μM、约3μM、约10μM、约15μM、约30μM、约100μM，或者本领域技术人员确定的其它有害浓度。例如，有效时间周期可以是约1小时、2小时、约4小时、约6小时、约8小时、约10小时、约12小时、约24小时，或者是本领域技术人员确定的其它有效时间周期。例如，有害时间周期可以是约12小时、约24小时、约48小时、约72小时、约144小时，或者本领域技术人员确定的其它有害时间周期。

[0022] 在一些实施方案中，选择化合物、产品和/或药物组合物的治疗有效量，以便产生大于肿瘤细胞的IC_{50}值并且小于正常细胞的IC_{50}值的血液浓度。在一些实施方案中，选择治疗有效量，以便产生足以杀死肿瘤细胞并且小于正常细胞的IC_{50}值的血液浓度。

[0023] 在一些实施方案中，利用下列剂型口服施用化合物、产品和/或药物组合物：例如，片剂，丸剂，胶囊剂(硬或软胶囊)，胶囊片，粉剂，颗粒剂，混悬剂，溶液剂，凝胶剂，扁囊剂，锭剂，糖锭，糖浆剂，酏剂，乳剂，水包油乳剂，油包水乳剂和/或吸饮剂。

[0024] 在多个联合治疗的实施方案中，本发明的化合物以在约400mg至约1000mg的范围内的总日剂量给患者施用。在一些实施方案中，本发明的化合物以在约800mg至约1000mg的范围内的总日剂量给患者施用，优选地以两个日剂量形式施用，例如，以约480mg BID。给药间隔可以从约4小时至约16小时的范围变化，如，约12小时。

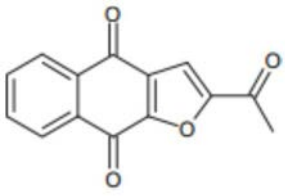
[0025] 在一些实施方案中，本发明的化合物可出现剂量修改，使总日剂量减小至每日共400至800mg。在一些实施方案中，可出现进一步剂量修改，使总日剂量减小至每日共50mg至400mg范围。在一些实施方案中，本发明的化合物也可以每日施用一次。在一些每日施用一次的实施方案中，给药间隔可以是18至30小时(如，约24小时)。在一些实施方案中，本发明的化合物也可以每日施用三次，总剂量约240至1000mg。当每日施用三次时，给药间隔可以是约4小时至8小时。

[0026] 在本发明的一个特征中，本发明的萘并呋喃化合物与抗有丝分裂剂联合使用，特别是那些证明有效的化疗药剂，或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物或前药。可用作与本发明的化合物联合治疗的抗有丝分裂剂的实例包括且不限于：紫杉醇(Abraxane/泰素)、多烯紫杉醇(泰索帝)、BMS-275183、聚谷氨酸紫杉醇、tocosal、异长春碱、长春新碱、长春碱、长春地辛、长春利定、依托泊苷(VP-16)、替尼泊苷(VM-26)、伊沙匹隆、拉洛他赛、沃塔紫杉醇、tesetaxel和ispinesib。

[0027] 在一些实施方案中，在联合治疗中与本发明的化合物一起使用的第二药剂是紫杉醇(Abraxane/泰素)，或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物或前药。在一些实施方案中，紫杉醇以在约40mg/m^2至约100mg/m^2的范围内的总周剂量给受试者施用。在一些实施方案中，紫杉醇以约80mg/m^2的总周剂量给受试者施用。在一些实施方案中，紫杉醇通过静脉注射给受试者施用。在一些实施方案中，紫杉醇每周给药一次，每四周三次，即，3周给药，1周不给药。

[0028] 在一些实施方案中，可以首先给受试者施用本发明的化合物，然后给受试者施用紫杉醇。可以首先给受试者施用紫杉醇，然后给受试者施用本发明的化合物。在此情况下，可以包括本发明的化合物和紫杉醇之间的某些给药间隔。在一些实施方案中，本发明指通过给受试者施用紫杉醇的癌症治愈性或预防性治疗方法，方法包含给有癌症治愈性或预防性治疗需要的受试者施用一定剂量的本发明的化合物和一定剂量的紫杉醇的步骤；其中第一剂量在给受试者施用紫杉醇之前或之后施用。

[0029] 在一方面，本发明提供了在优选地，人受试者的癌症治愈性或预防性治疗，方法包含给由此需要的受试者施用治疗有效量的萘并呋喃化合物，本文称为“化合物1”，其具有下面显示的结构，或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物或前药

[0030]  (1)。

[0031] 在一些实施方案中，化合物以从约80mg至约2000mg的范围的总日剂量给受试者施用。在一些实施方案中，化合物以选自约80mg、约160mg、约320mg、约480mg、约640mg、约800mg和约960mg的总日剂量给受试者施用。在一些实施方案中，化合物以约960mg的总日剂量给受试者施用。

[0032] 在一些实施方案中，化合物每日两次(BID)施用。在一些实施方案中，化合物以从约80mg BID至约480mg BID的剂量给受试者施用。在一些实施方案中，化合物以选自约80mg BID、约160mg BID、约320mg BID、约400mg BID和约480mg BID的剂量给受试者施用。在一些实施方案中，化合物以约480mg BID的剂量给受试者施用。

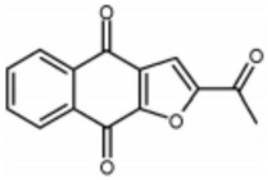
[0033] 在一些实施方案中，化合物以BID施用，其中化合物的给药间隔在约4小时至约16小时的范围内。在一些实施方案中，化合物以BID施用，其中化合物的给药间隔为至少4小时、至少5小时、至少6小时、至少7小时、至少8小时、至少9小时、至少10小时、至少11小时、至少12小时、至少13小时、至少14小时、至少15小时和/或至少16小时。在一些实施方案中，化合物以从约80mg BID至约480mg BID的剂量给受试者施用，其中化合物的给药间隔在约4小时至约16小时的范围内。在一些实施方案中，化合物以BID施用，其中化合物的给药间隔为至少4小时、至少5小时、至少6小时、至少7小时、至少8小时、至少9小时、至少10小时、至少11小时、至少12小时、至少13小时、至少14小时、至少15小时和/或至少16小时。在一些实施方案中，化合物以选自约80mg BID、约160mg BID、约320mg BID、约400mg BID和约480mg BID的剂量给受试者施用，其中化合物的给药间隔在约4小时至约16小时的范围内。在一些实施方案中，化合物以BID施用，其中化合物的给药间隔为至少4小时、至少5小时、至少6小时、至少7小时、至少8小时、至少9小时、至少10小时、至少11小时、至少12小时、至少13小时、至少14小时、至少15小时和/或至少16小时。在一些实施方案中，化合物以约480mg BID的剂量给受试者施用，其中化合物的给药间隔为约12小时。在一些实施方案中，化合物以约80mg BID的剂量给受试者施用，其中化合物的给药间隔为约12小时。在一些实施方案中，化合物以约400mg BID的剂量给受试者施用，其中化合物的给药间隔为约12小时。在一些实施方案中，化合物以约320mg BID的剂量给受试者施用，其中化合物的给药间隔为约12小时。在一些实

施方案中，化合物以BID施用，其中化合物的给药间隔为至少4小时、至少5小时、至少6小时、至少7小时、至少8小时、至少9小时、至少10小时、至少11小时、至少12小时、至少13小时、至少14小时、至少15小时和/或至少16小时。在一些实施方案中，化合物以约80mg BID、约160mg BID、约320mg BID、约400mg BID和约480mg BID的剂量给受试者施用，其中化合物的给药间隔为至少5小时，优选地，为从约5小时至约15小时的范围。

[0034] 在一些实施方案中，本发明的化合物以片剂或胶囊施用。在一些实施方案中，片剂或胶囊包含剂量约80mg。

[0035] 在一些实施方案中，本发明的化合物与液体结合空腹经口服施用。在一些实施方案中，液体为乳汁或水。

[0036] 在一些实施方案中，萘并呋喃化合物是如下所示的化合物的多晶型物，本文称为“化合物1”，

[0037]  (1)

[0038] 例如，在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图基本上与WO 2011/116398和WO2011/116399所列出的相似，其内容各自全部并入本文作为参考。进行WO2011/116398和WO 2011/116399的图1所示的X射线粉末衍射分析：使用Philips PW1800衍射器，使用Cu辐射，40KV/30mA，在5°至70°范围内，步长0.03°，统计时间3小时。使用下列条件，从2-45°2θ进行分析：发散狭缝：0.6mm，防散射狭缝：0.6mm，接收狭缝：0.1mm，探测器狭缝：0.6mm，步长：0.02°，脉冲时间(step time)：5秒钟。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图基本上与WO2011/116398和WO 2011/116399所列出的相似。使用Bruker D8 Advance衍射器，进行WO 2011/116398和WO 2011/116399的图2和3所示的X射线粉末衍射分析。使用下列条件，从2-45°2θ进行分析：发散狭缝：0.6mm，防散射狭缝：0.6mm，接收狭缝：0.1mm，探测器狭缝：0.6mm，步长：0.02°，脉冲时间：5秒钟。

[0039] 例如，在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约下列2θ角度处包括一个或多个峰：10.2、11.4、11.9、14.1、14.5、17.3、21.0、22.2、24.0、26.0和28.1度。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约下列2θ角度处包括一个或多个峰：10.2、11.9、14.1、14.5、17.3、22.2和/或28.1度。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约10.2度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约11.9度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约14.1度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约14.5度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约17.3度2θ处包括峰。

在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约22.2度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约28.1度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰：至少在约10.2度2θ处的峰，至少在约11.9度2θ处的峰，至少在约14.1度2θ处的峰，至少在约14.5度2θ处的峰，至少在约17.3度2θ处的峰，至少在约22.2度2θ处的峰，至少在约28.1度2θ处的峰和其任何组合。

[0040] 例如，在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约下列2θ角度处包括一个或多个峰：7.5、9.9、11.4、12.3、15.0、23.0、23.3、24.1、24.6、25.0、26.1、27.0和28.4度。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约下列2θ角度处包括一个或多个峰：7.5、9.9、12.3、15、23.0、23.3、24.6和/或28.4度。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约7.5度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约9.9度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约12.3度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约15度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约23度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约23.3度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约24.6度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约28.4度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰：至少在约7.5度2θ处的峰，至少在约9.9度2θ处的峰，至少在约15度2θ处的峰，至少在约12.3度2θ处的峰，至少在约23.0度2θ处的峰，至少在约23.3度2θ处的峰，至少在约24.6度2θ处的峰和至少在约28.4度2θ处的峰和其任何组合。

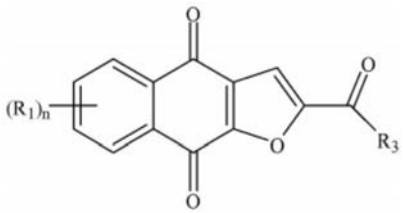
[0041] 本发明还提供了颗粒形式的萘并呋喃化合物。例如，颗粒形式的萘并呋喃化合物是如下所示的式I化合物的颗粒，其是活性的，即，具有体内抗肿瘤效果和/或抗肿瘤活性。有效的颗粒对粒径具有限定要求，例如，具有小于或等于约200μm、约150μm、约100μm、约40μm或约20μm、约10μm、约5μm、约4μm、约3μm、约2μm、约1μm、约0.5μm或约0.2μm的直径。比限定粒径大的颗粒是非活性的或活性较小。

[0042] 在一些实施方案中，化合物在包含该化合物的颗粒群的药物组合物中，且其中颗粒累积总数的一部分具有0.2μm至20μm范围内的直径。

[0043] 在一些实施方案中，化合物在包含该化合物的颗粒群的药物组合物中，且其中颗粒累积总数的50％(D_{50})具有在约0.5至约5μm范围内的直径。

[0044] 在一些实施方案中，化合物在包含该化合物的颗粒群的药物组合物中，且其中颗粒累积总数的50％(D_{50})具有约2μm的直径。

[0045] 在一些实施方案中，颗粒形式的萘并呋喃化合物是按照式I的化合物或其盐或溶剂化物的颗粒，

[0046] 

式I

[0047] 其中颗粒具有小于或等于约200μm的直径；其中每个(R_1)独立地选自：氢、卤素、氟、氰基、硝基、CF_3、OCF_3、烷基、甲基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、杂环、取代的杂环、芳基、取代的芳基、OR_a、SR_a和NH_2；其中n是4；其中R_3选自：氢、卤素、氟、，氰基、CF_3、OCF_3、烷基、甲基、取代的烷基、卤素取代的烷基、羟基取代的烷基、胺取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、，取代的环烯基、杂环、取代的杂环、芳基、取代的芳基、OR_a、SR_a和NR_bR_c；其中R_a独立地选自：氢、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、环烷基、取代的环烷基、环烯基、取代的环烯基、杂环、取代的杂环、芳基和取代的芳基；其中R_b和R_c独立地选自：氢、烷基、取代的烷基、环烷基、取代的环烷基、杂环、取代的杂环、芳基和取代的芳基，或R_b和R_c与它们键合的N一起形成杂环或取代的杂环。

[0048] 在一些实施方案中，每个(R1)独立地选自：氢，甲基，F(氟)，Cl，Br，I，OH和NH_2；R_3选自甲基和$C(R_8)_3$，每个(R_8)独立地选自氢，甲基，F(氟)，Cl，Br，I，OH和NH_2。在一些实施方案中，(R_1)和(R_8)中至多两个是F(氟)，其余的是氢。在一些实施方案中，R_3是甲基。在进一步实施方案中，化合物选自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，其对映体、非对映体、互变异构体和盐或溶剂化物。

[0049] 在一些实施方案中，颗粒形式的萘并呋喃化合物是化合物1的颗粒。

[0050] 在一些实施方案中，颗粒形式的萘并呋喃化合物是化合物1的多晶型物的颗粒。例如，在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图基本上与WO 2011/116398和WO2011/116399的图1所列出的相似。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图基本上与WO 2011/116398和WO 2011/116399的图2所列出的相似。例如，在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图基本上与WO 2011/116398和WO 2011/116399的图3所列出的相似。

[0051] 例如，在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约下列2θ角度处包括一个或多个峰：10.2，11.4，11.9，14.1，14.5，17.3，21.0，22.2，24.0，26.0和28.1度。在一些实施方案中，多晶型

物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约下列2θ角度处包括一个或多个峰:10.2,11.9,14.1,14.5,17.3,22.2和/或28.1度。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约10.2度2θ处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约11.9度2θ处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约14.1度2θ处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约14.5度2θ处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约17.3度2θ处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约22.2度2θ处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约28.1度2θ处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰:至少在约10.2度2θ处的峰,至少在约11.9度2θ处的峰,至少在约14.1度2θ处的峰,至少在约14.5度2θ处的峰,至少在约17.3度2θ处的峰,至少在约22.2度2θ处的峰,至少在约28.1度2θ处的峰和其任何组合。

[0052] 例如,在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约下列2θ角度处包括一个或多个峰:7.5,9.9,11.4,12.3,15.0,23.0,23.3,24.1,24.6,25.0,26.1,27.0和28.4度。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约下列2θ角度处包括一个或多个峰:7.5,9.9,12.3,15,23.0,23.3,24.6和/或28.4度。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约7.5度2θ处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约9.9度2θ处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约12.3度2θ处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约15度2θ处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约23度2θ处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约23.3度2θ处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约24.6度2θ处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约28.4度2θ处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰:至少在约7.5度2θ处的峰,至少在约9.9度2θ处的峰,至少在约15度2θ处的峰,至少在约12.3度2θ处的峰,至少在约23.0度2θ处的峰,至少在约

23.3度2θ处的峰，至少在约24.6度2θ处的峰和至少在约28.4度2θ处的峰和其任何组合。

[0053] 在一些实施方案中，颗粒具有小于或等于约160μm、约150μm、约120μm、约100μm、约50μm、约40μm或约20μm的直径。在进一步实施方案中，颗粒具有小于或等于约10μm、约5μm、约4μm、约3μm、约2μm、约1μm、约0.5μm、约0.2μm或约0.1μm的直径。

[0054] 在一些实施方案中，化合物在包含该化合物的颗粒群的药物组合物中，且其中颗粒累积总数的一部分具有0.2μm至20μm范围内的直径。

[0055] 在一些实施方案中，化合物在包含该化合物的颗粒群的药物组合物中，且其中颗粒累积总数的50％(D_{50})具有在约0.5至约5μm范围内的直径。

[0056] 在一些实施方案中，化合物在包含该化合物的颗粒群的药物组合物中，且其中颗粒累积总数的50％(D_{50})具有约2μm的直径。

[0057] 本发明提供了萘并呋喃化合物(例如，式I的化合物)的颗粒，其是活性的，即，具有抗肿瘤效果和/或抗肿瘤活性。活性颗粒具有一定的规格，例如，具有小于或等于约200μm、约150μm、约100μm、约40μm或约20μm、约10μm、约5μm、约4μm、约3μm、约2μm、约1μm、约0.5μm、约0.2μm或约0.1μm的直径。比这种一定规格大的颗粒是非活性的，或比本文所描述颗粒的活性小。

[0058] 在按照本发明的一些实施方案中，药物组合物包括化合物(例如，按照式I的萘并呋喃或其盐或溶剂化物)的颗粒。例如，在一些实施方案中，药物组合物包括化合物1的颗粒。例如，在一些实施方案中，药物组合物包括化合物1的多晶型物的颗粒。例如，在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图基本上与WO 2011/116398和WO 2011/116399的图1所列出的相似。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图基本上与WO 2011/116398和WO 2011/116399的图2所列出的相似。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图基本上与WO 2011/116398和WO 2011/116399的图3所列出的相似。

[0059] 例如，在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约下列2θ角度处包括一个或多个峰：10.2，11.4，11.9，14.1，14.5，17.3，21.0，22.2，24.0，26.0和28.1度。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约下列2θ角度处包括一个或多个峰：10.2，11.9，14.1，14.5，17.3，22.2和/或28.1度。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约10.2度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约11.9度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约14.1度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约14.5度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约17.3度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约22.2度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙

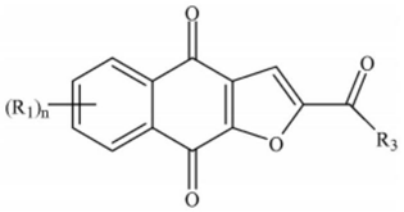
酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约28.1度2θ处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰:至少在约10.2度2θ处的峰,至少在约11.9度2θ处的峰,至少在约14.1度2θ处的峰,至少在约14.5度2θ处的峰,至少在约17.3度2θ处的峰,至少在约22.2度2θ处的峰,至少在约28.1度2θ处的峰和其任何组合。

[0060] 例如,在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约下列2θ角度处包括一个或多个峰:7.5,9.9,11.4,12.3,15.0,23.0,23.3,24.1,24.6,25.0,26.1,27.0和28.4度。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约下列2θ角度处包括一个或多个峰:7.5,9.9,12.3,15,23.0,23.3,24.6和/或28.4度。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约7.5度2θ处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约9.9度2θ处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约12.3度2θ处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约15度2θ处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约23度2θ处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约23.3度2θ处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约24.6度2θ处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约28.4度2θ处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰:至少在约7.5度2θ处的峰,至少在约9.9度2θ处的峰,至少在约15度2θ处的峰,至少在约12.3度2θ处的峰,至少在约23.0度2θ处的峰,至少在约23.3度2θ处的峰,至少在约24.6度2θ处的峰和至少在约28.4度2θ处的峰和其任何组合。

[0061] 颗粒累积总数的一部分可以具有小于或等于约200μm的直径。在一些实施方案中,颗粒组的一部分可以至少为这组颗粒总数的至少约1%,至少约约5%,至少约10%,至少约20%,或至少约30%。在某些实施方案中,该部分是相当大的部分。例如,颗粒组的“相当大的部分”可以为该组颗粒总数的至少约99%,至少约95%,至少约90%,至少约85%,至少约80%,至少约75%,至少约70%,至少约60%,或至少约50%。每个(R_1)独立地选自:氢,卤素,氟,氰基,硝基,CF_3,OCF_3,烷基,甲基,取代的烷基,烯基,取代的烯基,炔基,取代的炔基,环烷基,取代的环烷基,环烯基,取代的环烯基,杂环,取代的杂环,芳基,取代的芳基,OR_a,SR_a和NH_2。n可以是正整数;例如,n可以是4。R_3可以选自:氢,卤素,氟,氰基,CF_3,OCF_3,烷基,甲基,取代的烷基,卤素取代的烷基,羟基取代的烷基,胺取代的烷基,烯基,取代的烯基,炔基,取代的炔基,环烷基,取代的环烷基,环烯基,取代的环烯基,杂环,取代的杂环,芳基,取代的芳基,OR_a,SR_a和NR_bR_c。R_a可以独立地选自:氢,烷基,取代的烷基,烯基,取代的烯基,炔

基，取代的炔基，环烷基，取代的环烷基，环烯基，取代的环烯基，杂环，取代的杂环，芳基和取代的芳基。R_b和R_c可以独立地选自：氢，烷基，取代的烷基，环烷基，取代的环烷基，杂环，取代的杂环，芳基和取代的芳基，或R_b和R_c与它们键合的N一起形成杂环或取代的杂环。

[0062] 在根据本发明的一些实施方案中，每个(R_1)可以独立地选自氢，甲基，F(氟)，Cl，Br，I，OH，和NH_2。R_3可以选自甲基和$C(R_8)_3$。每个(R_8)可以独立地选自氢，甲基，F(氟)，Cl，Br，I，OH和NH_2。在一些实施方案中，(R_1)和R_8中至多两个可以是F(氟)，其余的是氢。

[0063] 

式I

[0064] 在按照本发明的某些实施方案中，按照式I的化合物选自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，和2-乙基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮。在某些实施方案中，按照式I的化合物是化合物1。在一些实施方案中，按照式I的化合物是化合物1的多晶型物。例如，在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图基本上与WO 2011/116398和WO 2011/116399的图1所列出的相似。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图基本上与WO 2011/116398和WO 2011/116399的图2所列出的相似。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图基本上与WO 2011/116398和WO 2011/116399的图3所列出的相似。

[0065] 例如，在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约下列2θ角度处包括一个或多个峰：10.2，11.4，11.9，14.1，14.5，17.3，21.0，22.2，24.0，26.0和28.1度。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约下列2θ角度处包括一个或多个峰：10.2，11.9，14.1，14.5，17.3，22.2和/或28.1度。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约10.2度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约11.9度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约14.1度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约14.5度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约17.3度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约22.2度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约

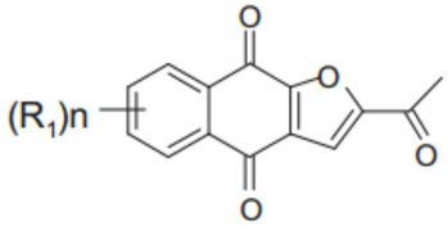
28.1度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰：至少在约10.2度2θ处的峰，至少在约11.9度2θ处的峰，至少在约14.1度2θ处的峰，至少在约14.5度2θ处的峰，至少在约17.3度2θ处的峰，至少在约22.2度2θ处的峰，至少在约28.1度2θ处的峰和其任何组合。

[0066] 例如，在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约下列2θ角度处包括一个或多个峰：7.5，9.9,11.4,12.3,15.0,23.0,23.3,24.1,24.6,25.0,26.1,27.0和28.4度。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约下列2θ角度处包括一个或多个峰：7.5,9.9,12.3,15,23.0,23.3,24.6和/或28.4度。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约7.5度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约9.9度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约12.3度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约15度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约23度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约23.3度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约24.6度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约28.4度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰：至少在约7.5度2θ处的峰，至少在约9.9度2θ处的峰，至少在约15度2θ处的峰，至少在约12.3度2θ处的峰，至少在约23.0度2θ处的峰，至少在约23.3度2θ处的峰，至少在约24.6度2θ处的峰和至少在约28.4度2θ处的峰和其任何组合。

[0067] 例如，该药物组合物可以具有至少约90％的颗粒累积总数具有小于或等于约160μm、100μm、40μm、20μm、10μm、5μm、3μm或2μm的粒径。例如，该药物组合物可以具有至少约50％的颗粒累积总数具有小于或等于160μm、100μm、40μm、20μm、10μm、5μm、3μm、2μm、1μm或0.5μm的粒径。例如，该药物组合物可以具有至少约10％的颗粒累积总数具有小于或等于160μm、100μm、40μm、20μm、5μm、2μm、1μm、0.5μm或0.1μm的粒径。在药物组合物中，颗粒可以具有例如小于或等于约160μm、40μm、20μm、10μm、5μm、4μm、3μm、2μm、1μm、0.5μm、0.3μm或0.2μm的中值直径。例如，颗粒可以具有约0.2μm至约50μm的中值直径，或约0.5μm至约30μm的中值直径。例如，该药物组合物可以具有累积颗粒总数，平均直径与中值直径的比例至多为约2。该药物发明可以具有包括结晶状态化合物的颗粒，以至少两种不同的多晶型状态存在。

[0068] 在一些实施方案中，药物组合物包括颗粒形式的式I的化合物或其多晶型物，其中颗粒小于20微米，10微米，5微米，2微米，1微米或0.5微米。

[0069] 本发明提供了基本上纯的式II化合物，

[0070] 

(II)

[0071] 其中每个R_1独立地是H、Cl或F;n是0、1、2、3或4。在一些实施方案中,式II的化合物是颗粒形式的化合物。

[0072] 在一些实施方案中,基本上纯的化合物是化合物1。在一些实施方案中,化合物1是颗粒形式的化合物。

[0073] 在一些实施方案中,基本上纯的化合物选自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,磷酸单[1-(4,9-二氧代-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙烯基]酯,磷酸1-(4,9-二氧代-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙烯基酯二甲酯,其对映体、非对映体、互变异构体和盐或溶剂化物。

[0074] 在一些实施方案中,基本上纯的化合物是化合物1的多晶型物。例如,在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图基本上与WO 2011/116398和WO 2011/116399的图1所列出的相似。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图基本上与WO 2011/116398和WO 2011/116399的图2所列出的相似。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图基本上与WO 2011/116398和WO 2011/116399的图3所列出的相似。

[0075] 例如,在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约下列2θ角度处包括一个或多个峰:10.2,11.4,11.9,14.1,14.5,17.3,21.0,22.2,24.0,26.0和28.1度。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约下列2θ角度处包括一个或多个峰:10.2,11.9,14.1,14.5,17.3,22.2和/或28.1度。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约10.2度2θ处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约11.9度2θ处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约14.1度2θ处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约14.5度2θ处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约17.3度2θ处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约22.2度2θ处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在约28.1度2θ处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,

9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰：至少在约10.2度2θ处的峰，至少在约11.9度2θ处的峰，至少在约14.1度2θ处的峰，至少在约14.5度2θ处的峰，至少在约17.3度2θ处的峰，至少在约22.2度2θ处的峰，至少在约28.1度2θ处的峰和其任何组合。

[0076] 例如，在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约下列2θ角度处包括一个或多个峰：7.5，9.9,11.4,12.3,15.0,23.0,23.3,24.1,24.6,25.0,26.1,27.0和28.4度。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约下列2θ角度处包括一个或多个峰：7.5,9.9,12.3,15,23.0,23.3,24.6和/或28.4度。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约7.5度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约9.9度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约12.3度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约15度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约23度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约23.3度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约24.6度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约28.4度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰：至少在约7.5度2θ处的峰，至少在约9.9度2θ处的峰，至少在约15度2θ处的峰，至少在约12.3度2θ处的峰，至少在约23.0度2θ处的峰，至少在约23.3度2θ处的峰，至少在约24.6度2θ处的峰和至少在约28.4度2θ处的峰和其任何组合。

[0077] 在一些实施方案中，化合物1的多晶型物是颗粒形式。

[0078] 在某些实施方案中，化合物、产物和/或药物组合物具有至少约80％、约85％、约90％、约95％或约99％的纯度。在一些实施方案中，化合物、产物和/或药物组合物具有至少约95.5％、约96％、约96.5％、约97％、约97.5％、约98％、约98.5％、约99％或约99.5％的纯度。在一些实施方案中，化合物、产物和/或药物组合物具有至少约99.1％、约99.2％、约99.3％、约99.4％、约99.5％、约99.6％、约99.7％、约99.8％或约99.9％的纯度。

[0079] 在某些实施方案中，化合物、产物和/或药物组合物具有至多约10％、约5％、约1％、约0.15％或约0.5％的杂质。在一些实施方案中，化合物、产物和/或药物组合物含有至多约0.5％、约0.2％、约0.15％或约0.1％的各种单一杂质。在进一步实施方案中，杂质是一种或多种选自下列的杂质：2-乙酰基-2,3-二氢萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮，2,6-二乙酰基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮，2,7-二乙酰基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮，3-乙酰基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮，萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮，萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二醇和1-(4,9-二羟基-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙酮。

[0080] 在一些实施方案中，杂质包括残余溶剂。在一些实施方案中，溶剂选自乙酸乙酯(EtOAc)，甲苯，乙醇，甲醇，氯仿和CH_2Cl_2/己烷。

[0081] 在一些实施方案中，纯度是用HPLC(高效液相色谱)测定的。在一些实施方案中，纯度是用NMR(核磁共振)测定的。在进一步实施方案中，纯度是用HPLC和NMR两者测定的。

[0082] 本发明还提供了颗粒形式的化合物1的多晶型物、产品和/或药物组合物，其中该化合物是高度纯化的形式。例如，在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图基本上与WO 2011/116398和WO 2011/116399的图1所列出的相似。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图基本上与WO 2011/116398和WO 2011/116399的图2所列出的相似。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图基本上与WO 2011/116398和WO 2011/116399的图3所列出的相似。

[0083] 例如，在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约下列2θ角度处包括一个或多个峰：10.2，11.4，11.9，14.1，14.5，17.3，21.0，22.2，24.0，26.0和28.1度。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约下列2θ角度处包括一个或多个峰：10.2，11.9，14.1，14.5，17.3，22.2和/或28.1度。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约10.2度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约11.9度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约14.1度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约14.5度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约17.3度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约22.2度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约28.1度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰：至少在约10.2度2θ处的峰，至少在约11.9度2θ处的峰，至少在约14.1度2θ处的峰，至少在约14.5度2θ处的峰，至少在约17.3度2θ处的峰，至少在约22.2度2θ处的峰，至少在约28.1度2θ处的峰和其任何组合。

[0084] 例如，在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约下列2θ角度处包括一个或多个峰：7.5，9.9，11.4，12.3，15.0，23.0，23.3，24.1，24.6，25.0，26.1，27.0和28.4度。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约下列2θ角度处包括一个或多个峰：7.5，9.9，12.3，15，23.0，23.3，24.6和/或28.4度。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的

多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约7.5度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约9.9度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约12.3度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约15度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约23度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约23.3度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约24.6度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约28.4度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰：至少在约7.5度2θ处的峰，至少在约9.9度2θ处的峰，至少在约15度2θ处的峰，至少在约12.3度2θ处的峰，至少在约23.0度2θ处的峰，至少在约23.3度2θ处的峰，至少在约24.6度2θ处的峰和至少在约28.4度2θ处的峰和其任何组合。

[0085] 化合物1的多晶型物是颗粒形式的多晶型物。在一些实施方案中，化合物1的多晶型物是颗粒形式的多晶型物，其中颗粒具有小于或等于约160μm、约150μm、约120μm、约100μm、约50μm、约40μm或约20μm的直径。在一些实施方案中，颗粒形式的化合物1的多晶型物是颗粒群，其中颗粒群具有小于或等于约160μm、约150μm、约120μm、约100μm、约50μm、约40μm或约20μm的D_{50}(即粒径分布中值点，其将粒径分布分为两个相等部分)。在一些实施方案中，化合物1的多晶型物是颗粒形式的多晶型物，其中颗粒具有小于或等于约10μm、约5μm、约4μm、约3μm、约2μm、约1μm、约0.5μm、约0.2μm或约0.1μm的直径。在一些实施方案中，颗粒形式的化合物1的多晶型物是颗粒群，其中该颗粒群具有小于或等于约10μm、约5μm、约4μm、约3μm、约2μm、约1μm、约0.5μm或约0.2μm的D_{50}。

[0086] 本发明提供了化合物1的多晶型物的颗粒或颗粒群，其是活性的，即，具有抗肿瘤效果和/或抗肿瘤活性。活性颗粒具有一定的规格，例如，具有小于或等于约200μm、约150μm、约100μm、约40μm、或约20μm、约10μm、约5μm、约4μm、约3μm、约2μm、约1μm、约0.5μm或约0.2μm的直径或D_{50}。比这种一定规格大的颗粒是非活性的，或比本文所描述颗粒的活性小。

[0087] 化合物1的多晶型物的颗粒累积总数的一部分可以具有小于或等于约200μm的直径或D_{50}。在一些实施方案中，颗粒组的一部分可以至少为这组颗粒总数的约1％，至少约5％，至少约10％，至少约20％，或至少约30％。在某些实施方案中，该部分是相当大的部分。例如，颗粒组的“相当大的部分”可以为该组颗粒总数的至少约99％，至少约95％，至少约90％，至少约85％，至少约80％，至少约75％，至少约70％，至少约60％，或至少约50％。

[0088] 在一些实施方案中，化合物1的多晶型物的颗粒群可以具有至少约90％的颗粒累积总数具有小于或等于约160μm、100μm、40μm、20μm、10μm、5μm、3μm或2μm、1μm或0.5μm的粒径。例如，化合物1的多晶型物的颗粒群可以具有至少约50％的颗粒累积总数具有小于或等于约160μm、100μm、40μm、20μm、10μm、5μm、3μm、2μm、1μm或0.5μm的粒径。例如，化合物1的多晶型物的颗粒群可以具有至少约10％的颗粒累积总数具有小于或等于160μm、100μm、40μm、

20μm、5μm、2μm、1μm、0.5μm或0.1μm的粒径。在化合物1的多晶型物的颗粒群中，颗粒可以具有例如小于或等于约160μm、40μm、20μm、10μm、5μm、4μm、3μm、2μm、1μm、0.5μm或0.2μm的中值直径。例如，颗粒可以具有约0.002μm至约50μm的中值直径，或约0.2μm至约30μm的中值直径。例如，化合物1的多晶型物的颗粒群可以具有颗粒累积总数，其中颗粒的平均直径(mean diameter)与中值直径的比例至多为约2。化合物1的多晶型物的颗粒群可以具有包括结晶状态的化合物的颗粒，这种结晶状态化合物以至少两种不同的多晶型状态存在。

[0089] 在一些实施方案中，化合物1的多晶型物是颗粒形式的多晶型物，其中颗粒具有小于或等于约20微米、约10微米、约5微米或约3微米、2微米、1微米、0.5微米、0.2微米或0.1微米的直径。在一些实施方案中，颗粒形式的化合物1的多晶型物是颗粒群，其中颗粒群具有小于或等于约20微米、10微米、5微米、4微米、3微米、2微米、1微米、0.5微米或0.2微米的D_{50}。

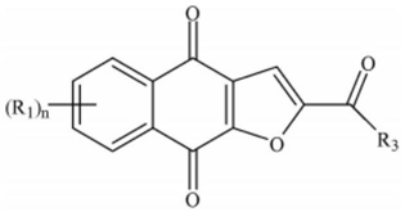
[0090] 本发明还提供了药物组合物，其包含治疗有效量的基本上纯的萘并呋喃化合物和可药用载体、赋形剂或稀释剂。赋形剂可以包括，例如，脂肪酸的甘油酯，饱和脂肪酸的甘油酯，具有8至18个碳的饱和脂肪酸的甘油酯，月桂酸甘油酯，聚乙二醇，纤维素，微晶纤维素，羧甲纤维素，卵磷脂(phosphatidylcholine)，脂质，甾醇，胆固醇，表面活性剂，聚山梨酸酯和/或聚氧乙烯失水山梨糖醇烷基化物。

[0091] 在按照本发明的一些实施方案中，制备的物品可以包括含有治疗有效量的药物组合物和可药用赋形剂的容器。

[0092] 制备按照本发明的一些实施方案的化合物、产品和/或药物组合物的方法可以包括：将化合物研磨，形成颗粒。例如，可以将化合物球磨、辊轧、喷磨、润磨、超声研磨、研磨或用这些方法的组合方法和/或其它研磨方法来处理。可以降低化合物的温度，例如，降低至低温，并研磨。温度的这种降低可以使化合物变得更脆，且更顺利通过研磨来降低粒径。

[0093] 制备按照本发明的一些实施方案的化合物、产品和/或药物组合物的方法可以包括结晶。在结晶期间获得的粒径分布(PSD)受到结晶期间存在的各种机理的组合的影响，例如成核、生长、聚集、磨耗、破裂，等等。当在结晶期间不能始终控制粒径来满足目标规格时，可以包括额外工艺步骤，例如，干磨。

[0094] 在根据本发明的一些实施方案中，降低或抑制赘生性细胞的复制或扩散的组合物包括通过下列方法选择的颗粒组。可以提供按照式I的化合物或其盐或溶剂化物。

[0095] 

式I

[0096] 在一些实施方案中，可以提供化合物1或其盐或溶剂化物。在一些实施方案中，可以提供化合物1的多晶型物。例如，在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图基本上与WO 2011/116398和WO 2011/116399的图1所列出的相似。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图基本上与WO 2011/116398和WO

2011/116399的图2所列出的相似。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图基本上与WO 2011/116398和WO 2011/116399的图3所列出的相似。

[0097] 例如，在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约下列2θ角度处包括一个或多个峰：10.2，11.4，11.9，14.1，14.5，17.3，21.0，22.2，24.0，26.0和28.1度。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约下列2θ角度处包括一个或多个峰：10.2，11.9，14.1，14.5，17.3，22.2和/或28.1度。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约10.2度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约11.9度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约14.1度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约14.5度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约17.3度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约22.2度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约28.1度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰：至少在约10.2度2θ处的峰，至少在约11.9度2θ处的峰，至少在约14.1度2θ处的峰，至少在约14.5度2θ处的峰，至少在约17.3度2θ处的峰，至少在约22.2度2θ处的峰，至少在约28.1度2θ处的峰和其任何组合。

[0098] 例如，在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约下列2θ角度处包括一个或多个峰：7.5，9.9，11.4，12.3，15.0，23.0，23.3，24.1，24.6，25.0，26.1，27.0和28.4度。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约下列2θ角度处包括一个或多个峰：7.5，9.9，12.3，15，23.0，23.3，24.6和/或28.4度。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约7.5度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约9.9度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约12.3度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约15度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约23度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约23.3度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙

酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约24.6度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约28.4度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰：至少在约7.5度2θ处的峰，至少在约9.9度2θ处的峰，至少在约15度2θ处的峰，至少在约12.3度2θ处的峰，至少在约23.0度2θ处的峰，至少在约23.3度2θ处的峰，至少在约24.6度2θ处的峰和至少在约28.4度2θ处的峰和其任何组合。

[0099] 可以制备至少一组包括化合物的颗粒。可以测定至少一组颗粒的各自的粒径分布。可以以预定浓度给肿瘤细胞和正常细胞施用至少一组颗粒，并且施用预定的一段时间。可以观察颗粒对肿瘤细胞和正常细胞的代谢和/或分裂效果。基于颗粒对肿瘤细胞的效果，可以确定每组颗粒的有效性评级。基于颗粒对正常细胞的效果，可以确定每组颗粒的毒性评级。可以将具有第一个粒径分布的至少一组颗粒的有效性评级和/或毒性评级与具有不同于第一个粒径分布的粒径分布的至少其它一组颗粒的有效性评级和/或毒性评级进行比较。可以选择有效性评级大于至少一组其它颗粒的有效性评级、毒性评级小于至少其它一组颗粒的毒性评级和/或加权有效性评级和毒性评级的和大于至少其它一组颗粒的加权有效性评级和毒性评级的和的颗粒组作为最佳颗粒组。例如，可以将最佳颗粒组的粒径分布确定为最佳粒径分布。例如，最佳颗粒组可以包括在组合物中。例如，有效性评级可以与抗肿瘤活性成正比。例如，有效性评级可以基于抑制肿瘤细胞的代谢和/或分裂。例如，毒性评级可以与耐受性成反比。例如，毒性评级可以基于抑制正常细胞的代谢和/或分裂。例如，可以体外给肿瘤细胞和正常细胞施用至少一组颗粒。例如，有效性评级可以是肿瘤细胞的IC_{50}值。例如，毒性评级可以是正常细胞的IC_{50}值。例如，可以在试验动物中体内给肿瘤细胞和正常细胞施用至少一组颗粒。试验动物可以是，例如，哺乳动物，灵长类动物，小鼠，大鼠，豚鼠，兔或狗。有效性评级可以是肿瘤细胞体积减小，毒性评级可以是试验动物质量降低。

[0100] 在一些实施方案中，制备含有化合物的一组颗粒可以包括：通过溶解和分散化合物、用微流体技术溶解和分散化合物、用空穴化或喷雾方法溶解和分散化合物、研磨化合物、球磨化合物、辊轧化合物、喷射研磨化合物、湿磨化合物、超声研磨化合物、研磨化合物和/或筛分化合物，从而将预定粒径分布的颗粒分离。可以将颗粒悬浮在可药用赋形剂中。测定粒径分布可以包括使用选自下列的技术：筛分分析，光学显微计数，电子显微照片统计，电阻统计，沉降时间，激光衍射，声谱和组合技术。

[0101] 治疗赘生物或其它细胞增殖紊乱的方法可以包括：给患有赘生物的人、哺乳动物或动物施用治疗有效量的组合物，该组合物包含具有最佳粒径和分布的最佳组合物颗粒组。

[0102] 本发明提供了制备萘并呋喃化合物的方法。该方法包括：在第一个溶剂中，使萘并二氢呋喃化合物或包括萘并二氢呋喃化合物的混合物与氧化剂反应。在一些实施方案中，该混合物进一步包括萘并呋喃化合物。在一些实施方案中，萘并呋喃化合物选自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，磷酸单[1-(4,9-二氧代-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙烯基]酯，磷酸1-(4,9-二氧代-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙烯基酯二甲

酯，其对映体、非对映体、互变异构体和盐或溶剂化物。在一些实施方案中，氧化剂是二氧化锰。在一些实施方案中，第一个溶剂是甲苯。在一些实施方案中，该方法进一步包括：通过活性炭的垫过滤氧化产物。在一些实施方案中，该方法进一步包括：通过蒸发第一个溶剂，使萘并呋喃化合物结晶。在一些实施方案中，该方法进一步包括：将萘并呋喃化合物用第二个溶剂重结晶。在一些实施方案中，第二个溶剂是乙酸乙酯。在一些实施方案中，该方法进一步包括：使萘并呋喃化合物与第二个溶剂一起形成浆液，加热该浆液，并将该浆液冷却。

[0103] 本发明提供了制备基本上纯的萘并呋喃化合物的方法。该方法包括：将萘并呋喃化合物用第一个溶剂结晶，用第二个溶剂将该萘并呋喃化合物重结晶。本发明提供了制备基本上纯的萘并呋喃化合物的另一个方法。该方法包括：将萘并呋喃化合物用第一个溶剂结晶，使晶体萘并呋喃化合物与第二个溶剂形成浆液，将该浆液加热，并冷却该浆液。在一些实施方案中，萘并呋喃化合物选自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，磷酸单[1-(4,9-二氧代-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙烯基]酯，磷酸1-(4,9-二氧代-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙烯基酯二甲酯，其对映体、非对映体、互变异构体和盐或溶剂化物。在一些实施方案中，第一个溶剂是甲苯。在一些实施方案中，第二个溶剂是乙酸乙酯。

[0104] 本发明提供了通过上述任何一个方法制备的萘并呋喃化合物。在一些实施方案中，萘并呋喃化合物选自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，磷酸单[1-(4,9-二氧代-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙烯基]酯，磷酸1-(4,9-二氧代-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙烯基酯二甲酯，其对映体、非对映体、互变异构体和盐或溶剂化物。在某些实施方案中，该萘并呋喃化合物具有至少约80％、约85％、约90％、约95％或约99％的纯度。在一些实施方案中，该萘并呋喃化合物具有至多约10％、约5％、约2％、或约1％、约0.5％、约0.2％、约0.15％或约0.1％的杂质。

[0105] 本发明提供了制备化合物1的颗粒的方法，包括化合物1的多晶型物的颗粒、高纯度形式的化合物1的颗粒和高纯度形式的化合物1的多晶型物的颗粒。在一些实施方案中，具有目标中值粒径(例如，约20微米)的颗粒是通过研磨化合物1的晶体来制备的，所述晶体包括纯化形式的化合物1的晶体、化合物1的多晶型物的晶体和/或纯化形式的化合物1的多晶型物的晶体。例如，使用喷射研磨方法研磨晶体，其中喷射管压力为约40，研磨压力为约100，进料速度是约1304g/小时。

[0106] 本发明还提供了通过检测一种或多种与癌症干性相关的生物标志物的表达来治疗适合治疗施用本公开化合物的特定的、选定的患者群体的试剂盒和/或方法。当在患有已知具有癌症干细胞的和/或已知具有异常Stat3通路活性的癌症的患者或患者的样本中，生物标志物的表达与相同标志物的基线、对照或正常表达水平(例如，在未患有已知具有癌症干细胞的和/或已知具有异常Stat3通路活性的患者中的水平。)相比升高时，认为生物标志物与癌症干性相关。

[0107] 在一些实施方案中，与癌症干性相关的生物标志物是磷酸化STAT3(p-STAT3)。在

一些实施方案中，与癌症干性相关的生物标志物是β-catenin。在一些实施方案中，与癌症干性相关的生物标志物是NANOG。在一些实施方案中，使用了与癌症干性相关的生物标志物的组合，其中组合选自p-STAT3、β-catenin和NANOG中的两个或多个。在一些实施方案中，使用了与癌症干性相关的生物标志物的组合，其中组合选自p-STAT3、β-catenin和NANOG中的三个。

[0108] 在本公开的方法和/或试剂盒中，在患者或患者的样本中检测一种或多种癌症干性标志物的表达水平，其中患者或样本具有与对照表达水平相比升高的一种或多种癌症干性标志物的水平，然后给患者施用治疗有效量的本公开的化合物。

[0109] 在这些方法的一些实施方案中，方法是体内方法。在这些方法的一些实施方案中，方法是原位方法。在这些方法的一些实施方案中，方法是离体方法。在这些方法的一些实施方案中，方法是体外方法。

[0110] 本发明还提供了通过检测一种或多种与癌症干性相关的生物标志物的表达来鉴定或细化(例如，分类)适合治疗施用本公开化合物的患者群体的试剂盒和/或方法。当在患有已知具有癌症干细胞和/或已知具有异常Stat3通路活性的癌症的患者或患者的样本中生物标志物的表达与相同标志物的基线、对照或正常表达水平(例如，在未患有已知具有癌症干细胞和/或已知具有异常Stat3通路活性的患者中的水平。)相比升高时，认为生物标志物与癌症干性相关。

[0111] 在一些实施方案中，与癌症干性相关的生物标志物是磷酸化STAT3(p-STAT3)。在一些实施方案中，与癌症干性相关的生物标志物是β-catenin。在一些实施方案中，与癌症干性相关的生物标志物是NANOG。在一些实施方案中，使用了与癌症干性相关的生物标志物的组合，其中组合选自p-STAT3、β-catenin和NANOG中的两个或多个。在一些实施方案中，使用了与癌症干性相关的生物标志物的组合，其中组合选自p-STAT3、β-catenin和NANOG中的三个。

[0112] 在本公开的方法和/或试剂盒中，在患者或患者的样本中检测一种或多种癌症干性标志物的表达水平，其中患者或样本具有与对照表达水平相比升高的一种或多种癌症干性标志物的水平，然后给患者施用治疗有效量的本公开的化合物。

[0113] 在这些方法的一些实施方案中，方法是体内方法。在这些方法的一些实施方案中，方法是原位方法。在这些方法的一些实施方案中，方法是离体方法。在这些方法的一些实施方案中，方法是体外方法。

[0114] 附图简述

[0115] 图1是比较了患者BID给药与QD给药的药物代谢动力学的图，患者每次给药剂量为500mg。对于500mg BID方案，在同一日施用药物的两个剂量之间为4小时的间隔。

[0116] 图2是比较了本发明化合物的两种不同制剂的药物代谢动力学的图，两种制剂得到不同尺寸的胶囊。

[0117] 图3A由通过用抗磷酸化的STAT3抗体和DAPI(下一行)的免疫组织化学法观察的CRC患者肿瘤组织样本的拍摄图像组成。

[0118] 图3B是显示了具有高水平p-STAT3的患者存活率改善的趋势的图表(与具有低水平p-STAT3或p-STAT3为阴性的患者相比)。

[0119] 图4A由通过用抗β-catenin抗体和DAPI(下一行)的免疫组织化学法观察的CRC患

者肿瘤组织样本的拍摄图像组成。

[0120] 图5显示了本发明的化合物对$CD44^{高}$细胞的生长抑制。通过FACS(FaDu)分离$CD44^{高}$细胞并在无附着和无血清条件下培养5天形成初步的球。在Accumax(eBioscience,San Diego,CA)中将初步的球分离成单个细胞,并在加入指定浓度的治疗药剂前在上述条件下培养72小时。经过5天的治疗,捕获代表性的成球图像。

[0121] 图6显示在人结肠癌肿瘤组织移植瘤裸鼠体内研究中本发明的化合物显示出可以有效降低或清除p-STAT3和β-catenin水平。将甲醛固定的来自小鼠的肿瘤进行切片并通过特异性人STAT3抗体和β-catenin抗体免疫荧光染色分析,小鼠每日通过口服灌胃本发明的化合物或对照物(对照)治疗15天。

[0122] 图7显示在小鼠研究中本发明的化合物靶向癌症干细胞。通过腹腔注射给带有移植瘤的小鼠施用对照物、吉西他滨(120mg/kg(MIA PaCa-2))、卡铂(30mg/kg(FaDu))或20mg/kg的本发明化合物。经过7天或14天的治疗后处死小鼠收集肿瘤,PaCa-2细胞和FaDu细胞分别地收集。动物处死,且肿瘤无菌切除后获得单细胞悬浮液。然后进行活细胞计数并用于测定它们在癌症干细胞培养基(DMEM/F12,B27 Neurobasal补充剂,20ng/mL EGF,10ng/mL FGF,4ng/mL胰岛素和0.4%BSA)中培养时的成球能力。每3天加入新鲜培养基,培养10-14天后确定球形成。>50个细胞的计作球。

[0123] 图8A,8B和8C是一系列描述了在人体临床研究中发现本发明的化合物在CRC患者中有效的图。图8A描述了在结直肠癌(CRC)患者中无进展生存期(PFS)与本发明的化合物的暴露的关系。在本发明的化合物的血浆浓度大于2.0uM持续时间大于4小时的CRC患者与那些未达到上述暴露水平的CRC患者之间,PFS具有统计学上的显著差异。图8B描述了可评价的CRC患者的总生存期(OS)。用本发明的化合物治疗的(定义为施用本发明化合物≥4周,依从性80%)可评价CRC患者的OS与历史对照[Cetuximab for the treatment of colorectal cancer,2007,N.Engl.J.Med.357 2040-2048]对比。图8C描述了可评价的CRC患者的PFS。用本发明的化合物治疗的(定义为施用本发明化合物≥4周,依从性80%)可评价CRC患者的PFS与历史对照[Open-Label Phase III Trial of Panitumumab Plus Best Supportive Care Compared with Best Supportive Care Alone in Patients with Chemotherapy-Refractory Metastatic Colorectal Cancer,2007,J.Clin.Onc.25:1658-1665]对比。

[0124] 发明详述

[0125] 下面详细地讨论本发明的实施方案。在描述实施方案过程中,为了清楚起见,使用特定术语。然而,本发明不限于如此选择的特定术语。相关领域的技术人员能够认识到,可以使用在不背离本发明的精神和范围下形成的其它等效部分及其它方法。本文以引证的方式结合所列举的所有参考文献,好像每个参考文献被单独地结合一样。

[0126] 在本文中,“相当大部分”的颗粒组可以至少为该组颗粒总数的约99%,至少约95%,至少约90%,至少约85%,至少约80%,至少约75%,至少约70%,至少约60%或至少约50%。

[0127] 可以体外或体内测定组合物的抗癌症干细胞活性。例如,通过施用化合物并测定癌症干细胞的自我更新和存活率,可以体外测定组合物的抗肿瘤活性。例如,将已经施用化合物的肿瘤细胞的特性与没有施用化合物(对照)的肿瘤细胞的特性进行比较,由此可以体

外评价化合物的抗肿瘤活性。例如，使用转移模型和/或使用原位模型，测定已经施用化合物的动物的肿瘤体积变化，可以体内测定组合物的抗肿瘤活性。例如，通过对已经施用化合物的动物与没有施用化合物的动物(对照)进行比较，可以体内评价化合物的抗肿瘤活性。

[0128] 可以体外或体内测定组合物的耐受性。例如，通过给正常细胞施用化合物并测定其分裂率、通过测定正常细胞的营养吸收、通过测定正常细胞不同于营养吸收的代谢率指标、通过测定正常细胞的生长和/或通过测定正常细胞的其它生命指标，可以体外测定组合物的耐受性。例如，将已经施用化合物的正常细胞的特性与没有施用化合物的正常细胞(对照)的特性进行比较，可以体外评价化合物的耐受性。例如，通过测定已经施用化合物的动物的体重或食物摄入或获得临床观察结果(例如毛发保持或丧失、活力和/或对刺激的敏感性)，可以体内测定组合物的耐受性。例如，通过对已经施用化合物的动物与没有施用化合物的动物(对照)进行比较，可以体内评价化合物的耐受性。

[0129] 可以确定化合物、产物和/或药物组合物的有效性评级和/或毒性评级。例如，有效性评级可以与抗肿瘤活性成正比，或可以是相对于抗肿瘤活性的单调递增函数。例如，毒性评级可以与耐受性成反比，或可以是相对于耐受性的单调递减函数。据报道，萘并呋喃化合物缺乏体内抗肿瘤活性。参见M.M.Rao和D.G.I.Kingston,J.Natural Products,45(5)(1982)600-604。此外，据报道，该化合物对癌细胞和正常细胞具有同等毒性。也就是说，报道该化合物可以同等地杀死癌细胞和正常细胞，结论为该化合物没有治疗癌症的潜力。参见K.Hirai K.et al.,Cancer Detection andPrevention,23(6)(1999)539-550;Takano A.et al.,Anticancer Research 29:455-464,2009。

[0130] 然而，本文报道的实验研究表明，当以具有合适粒径分布的颗粒形式施用该化合物时，可以实现本公开中描述的某些药物动力学暴露，使得该化合物的确具有选择性的抗肿瘤活性。

[0131] 对于本发明的目的，药物的“生物利用率”定义为：给药剂型中进入系统循环中的药物相对数量，和出现在血液中的药物的比率。生物利用率取决于至少三个因素：(i)控制生物利用率的吸收，而后(ii)它的组织再分布，和(iii)消除(代谢性降解加上肾及其它机理)。

[0132] 通过考虑组织再分布和生物转化(即，消除)(这也可以通过静脉内施用药物来评估)，可以评估“绝对生物利用率”。除非另有陈述，否则，“HPLC”是指高效液相色谱；“可药用”是指生理学耐受的物质，当给哺乳动物施用时，其不会典型地产生过敏或其它不良反应，例如，胃紊乱、眩晕等等；“哺乳动物”是指高级脊椎动物，包括人和用乳腺分泌的乳汁抚养幼崽并且通常在不同程度上用毛发覆盖皮肤的所有其它动物；“治疗”包括解除、减轻或消除哺乳动物疾病的至少一种症状。

[0133] 本文使用的术语“治疗”包括施用按照本发明的化合物，预防性地防止或抑制不希望有的病症，并且治疗性地消除或降低该病症的程度或症状。治疗还包括防止不希望有的病症的复发、延迟不希望有的病症的发展和防止或延迟不希望有的病症的发病。将按照本发明的治疗给患有需要这种治疗的疾病或病症的人或其它哺乳动物施用。治疗还包括对细胞或器官体外应用化合物。治疗可以通过系统或局部给药来进行。

[0134] 有效量是实现目标药理学效果所必需的、用单一剂量或多剂量施用的活性组分的数量。利用熟练的临床医师熟知的常规实验和滴定法(titration)，熟练的医师可以确定个

体患者或治疗个体病症的有效剂量。然而，患者群体对药物制剂或组合物的意外的临床响应可能对治疗的一方面指示无法预料的改变或调整，例如剂量、给药间隔和/或给药方式。实际剂量和计划可以根据下列而变化：是否与其它药物联合施用组合物，或药物动力学的个别差异，药物处置和代谢。类似地，对于体外应用，数量也可以变化。本文公开的剂量范围(除非另外说明)不必妨碍使用更高或更低的、可以在申请中批准的组分剂量。

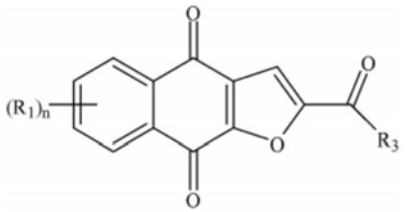
[0135] 本文提供的药物组合物的性状包括适合于给人施用的药物组合物。基于本公开，熟练的技术人员可以理解，这种组合物通常适合于给任何哺乳动物或其它动物施用。适合于给各种动物施用的组合物的制备方法已经被充分了解，普通兽医药理学家基于给人施用的药物组合物可以用常规实验来设计和进行这种改进。

[0136] 化合物结构和性质

[0137] 式I的萘并呋喃化合物，例如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，实际上不溶于水和宽范围的试验溶剂，包括DMSO(二甲亚砜)，N-甲基吡咯烷，DMA(二甲基乙酰胺)，乙醇，PEG400(聚乙二醇400)，丙二醇，Cremophor EL(聚乙氧基蓖麻油)，Labrasol(辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯(聚氧甘油酯))，Labrafil M(植物油PEG-6(聚乙二醇)酯)和Capryol(丙二醇辛酸酯)。该萘并呋喃化合物可溶于一定范围的极性有机溶剂中，例如某些卤代烃(例如，氯烃，例如二氯甲烷)，酯(例如乙酸乙酯)，羧酸(例如乙酸)，酮(例如丙酮)，和醇(例如甲醇)。发现萘并呋喃化合物可溶于二氯甲烷和乙酸乙酯中。

[0138] 本文所述的、发现选择性抗肿瘤活性的实验研究是通过施用小颗粒形式的药物组合物的活性化合物实现的，使得集中于萘并呋喃化合物上的选择性抗癌活性达到一定的药物动力学暴露。由于目前讨论的、由化合物得出的观察结果，当以小直径的颗粒形式施用时，其它萘并呋喃(例如萘并呋喃)可以类似地显示出它们达到一定药物动力学暴露(从而获得选择性的抗癌活性)的药物动力学特性的有利改变。可以实验测定以一种或多种不同粒径分布形式施用的其它萘并呋喃的药物动力学特性。

[0139] 可以显示药物动力学特性和效果提高的、以给动物、哺乳动物或人施用的形式的粒径减小的一些其它化合物包括以式I呈现的那些化合物、和其盐和溶剂化物(如对实施例中所试验的化合物所看到的)。

[0140] 

式I

[0141] 在式I中，符号$(R_1)_n$表示(R_1)取代基在沿着苯环的每个合适位置独立地取代。例如，对于n等于4，四个R_1取代基可以全部相同，或它们可以各自不同。例如，每个(R_1)可以独立地选自氢，卤素，氟，氰基，硝基，CF_3，OCF_3，烷基，甲基，取代的烷基，烯基，取代的烯基，炔基，取代的炔基，环烷基，取代的环烷基，环烯基，取代的环烯基，杂环，取代的杂环，芳基，取代的芳基，OR_a，SR_a和NH_2。烷基可以包括具有例如1至8个通过单键连接的碳原子的部分，烯

基可以包括具有例如2至8个通过一个或多个双键连接的碳原子的部分，炔基可以包括具有例如2至8个通过一个或多个三键连接的碳原子的部分。取代基可以包括下列部分，例如氢，卤素，氰基，硝基，芳基，OR_a，SR_a和NH_2。例如，每个(R_1)可以独立地选自氢，甲基，F(氟)，Cl(氯)，Br(溴)，I(碘)，OH(羟基)和NH_2(胺)。例如，R_3可以选自氢，卤素，氟，氰基，CF_3，OCF_3，烷基，甲基，取代的烷基，卤素取代的烷基，羟基取代的烷基，胺取代的烷基，烯基，取代的烯基，炔基，取代的炔基，环烷基，取代的环烷基，环烯基，取代的环烯基，杂环，取代的杂环，芳基，取代的芳基，OR_a，SR_a和NR_bR_c。例如，R_3可以选自甲基和$C(R_8)_3$。每个(R_8)可以独立地选自氢，甲基，F(氟)，Cl，Br，I，OH和NH_2。例如，至多两个独立选择的(R_1)取代基和(R_8)取代基可以选为F(氟)，其余的选为氢。

[0142] 在一些实施方案中，式I的化合物选自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，其对映体、非对映体、互变异构体和盐或溶剂化物。例如，可以选择每个(R_1)是氢，可以选择R_3是甲基，使得式I的化合物是2-乙酰基萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮。例如，每个R_a可以独立地选自氢，烷基，取代的烷基，烯基，取代的烯基，炔基，取代的炔基，环烷基，取代的环烷基，环烯基，取代的环烯基，杂环，取代的杂环，芳基和取代的芳基。例如，每个R_b和R_c可以独立地选自氢，烷基，取代的烷基，环烷基，取代的环烷基，杂环，取代的杂环，芳基和取代的芳基。或者，R_b和R_c与它们键合的N一起可以形成杂环或取代的杂环。

[0143] 多晶型物

[0144] 本发明的萘并呋喃化合物包括多晶型物。在一些实施方案中，多晶型物是按照式I的化合物的多晶型物。在一些实施方案中，多晶型物是化合物1的多晶型物。例如，在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图基本上与WO 2011/116398和WO 2011/116399的图1所列出的相似。在本文中，这种多晶型物称为“晶体形式1”、“形式1”或“XRPD1”，这些术语可互换使用。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图基本上与WO 2011/116398和WO 2011/116399的图2所列出的相似。在本文中，这种多晶型物称为“晶体形式2”、“形式2”或“XRPD2”，这些术语可互换使用。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图基本上与WO 2011/116398和WO 2011/116399的图3所列出的相似。在本文中，这种多晶型物称为“晶体形式3”、“形式3”或“XRPD3”，这些术语可互换使用。

[0145] 例如，在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约下列2θ角度处包括一个或多个峰：10.2，11.4，11.9，14.1，14.5，17.3，21.0，22.2，24.0，26.0和28.1度。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约下列2θ角度处包括一个或多个峰：10.2，11.9，14.1，14.5，17.3，22.2和/或28.1度。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约10.2度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约11.9度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,

9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约14.1度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约14.5度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约17.3度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约22.2度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约28.1度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰：至少在约10.2度2θ处的峰，至少在约11.9度2θ处的峰，至少在约14.1度2θ处的峰，至少在约14.5度2θ处的峰，至少在约17.3度2θ处的峰，至少在约22.2度2θ处的峰，至少在约28.1度2θ处的峰和其任何组合。

[0146] 例如，在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约下列2θ角度处包括一个或多个峰：7.5，9.9,11.4,12.3,15.0,23.0,23.3,24.1,24.6,25.0,26.1,27.0和28.4度。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约下列2θ角度处包括一个或多个峰：7.5,9.9,12.3,15,23.0,23.3,24.6和/或28.4度。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约7.5度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约9.9度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约12.3度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约15度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约23度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约23.3度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约24.6度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图至少在约28.4度2θ处包括峰。在一些实施方案中，多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰：至少在约7.5度2θ处的峰，至少在约9.9度2θ处的峰，至少在约15度2θ处的峰，至少在约12.3度2θ处的峰，至少在约23.0度2θ处的峰，至少在约23.3度2θ处的峰，至少在约24.6度2θ处的峰和至少在约28.4度2θ处的峰和其任何组合。

[0147] 已经在各种溶剂和条件下检测了晶体形式1，但已经表明它的抗肿瘤活性低(WO 2011/116398和WO 2011/116399的图8)。在WO 2011/116398和WO 2011/116399的图8所示的研究中，对形成皮下FaDu人头颈癌的免疫抑制小鼠口服(po)施用指定数量的、手工研磨的、具有晶体形式1的化合物1或赋形剂对照物。将化合物1配制在GELUCIRE™中。每天(qd)施用所有方案。在治疗期间，周期性地评估肿瘤大小。

[0148] 在杂质的存在下意外地获得晶体形式2，并且已表明这种多晶型物显示了有效的抗肿瘤活性(WO 2011/116398和WO 2011/116399的图9)。在WO 2011/116398和WO 2011/116399的图9所示的研究中，对形成皮下FaDu人头颈癌的免疫抑制小鼠口服(po)施用100mg/kg微粉化的化合物1(利用WO 2011/116398和WO 2011/116399的图5A和5B所描述的合成方法制备(第一批))或赋形剂对照物。将化合物1配制在GELUCIRE™中。每天(qd)施用所有方案。在治疗期间，周期性地评估肿瘤大小。已经利用现行良好的生产实践(cGMP)方法成功地制备了形式2，并且被FDA和Health Canada批准用于临床试验。在癌症患者中，形式2显现了目标药物动力学(WO 2011/116398和WO 2011/116399的图11)、安全性和强的抗肿瘤活性信号。

[0149] 晶体形式3显现了与形式1类似但不同的X射线粉末衍射(XRPD)图，并且表现出与形式1非常不同的晶体习性(WO 2011/116398和WO 2011/116399的图7A和B)。形式3只可以使用本文所描述的特别设计的浆液方法、由形式1产生。形式3显示了有效的抗肿瘤活性(WO 2011/116398和WO 2011/116399的图10)。在WO 2011/116398和WO 2011/116399的图10所示的研究中，对形成皮下FaDu人头颈癌的免疫抑制小鼠口服(po)施用200mg/kg的、手工研磨的、具有晶体形式1或形式3的化合物1或赋形剂对照物。将化合物1配制在gelucire中。每天(qd)施用所有方案。在治疗期间，周期性地评估肿瘤大小。这种多晶型物已经成功地利用cGMP方法制备，并且被FDA和Health Canada批准用于临床试验。在癌症患者中，形式3也显现了目标药物动力学(WO 2011/116398和WO 2011/116399的图12)、安全性和强的抗肿瘤活性信号。

[0150] 制备晶体形式2的合成方法示于WO 2011/116398和WO 2011/116399的图5A-5B中。简要地说，将3-丁烯-2-酮(451.2克)加入到2升3颈圆底烧瓶中，圆底烧瓶配备有机械搅拌器、温度计和加入漏斗。向加入漏斗中加入溴(936.0克)。将烧瓶中的内含物冷却至-5℃之后，将溴滴入烧瓶中，同时强烈搅拌，并将温度在-5℃下保持30分钟。将该混合物在-5℃额外搅拌15分钟，而后分成4个等份。将每份混合物以及四氢呋喃(2133.6克)加入到22升4颈圆底烧瓶中，圆底烧瓶配备有机械搅拌器、温度计和加入漏斗。将DBU(1,3-二氮杂双环[5.4.0]十一-7-烯，222.9克)加入到加入漏斗中。将DBU滴入烧瓶中，同时强烈搅拌，并将温度在0℃-5℃保持30分钟。在0℃-5℃，将该混合物额外搅拌15分钟。然后将2-羟基-1,4-萘醌(231克)加入到烧瓶中。将额外的DBU(246.0克)加入到加入漏斗中，而后滴入到烧瓶中的混合物中，滴入速度应该使反应混合物的温度不超过40℃。完全加入DBU之后，将得到的混合物在室温下搅拌过夜，并获取反应混合物的样品进行HPLC分析。向该反应混合物中加入水(10.8升)，并将得到的混合物冷却至0℃-3℃，保持至少30分钟，而后通过真空过滤器过滤。用5％碳酸氢钠水溶液(3升)、水(3升)、1％乙酸水溶液(3升)和乙醇(2X 1升，两次)依次冲洗过滤的固体。将冲洗的固体保存，与其它批料收集在一起。将合并的粗品(28.73kg)以及乙酸乙酯(811.7kg)加入到配备有机械搅拌器、温度计和冷凝器的500加仑容器中。在氮气氛围中，将该混合物加热至回流(72℃)，保持2小时，而后用含有活性炭层的10微米过滤筒过滤，除去不溶性物质。用新的热乙酸乙酯(10kg)冲洗容器、传输管线和过滤器。将合并的滤液冷却至0-5℃，并在此温度下保持2小时，而后用20英寸Buchner过滤器进行过滤。将过滤的固体产物用0-5℃的乙酸乙酯(5.7kg)冲洗，在40℃真空干燥至恒重。将剩余的滤液蒸发，使体积减少63％，并再次重复结晶过程，产生第二批产物，也将其在与第一批产物相

同的条件下干燥。获得的两批都是晶体形式2。制备的第一批(0.5kg)具有99.5％纯度(HPLC;NMR纯度～95％)。制备的第二批(1.09kg)具有98.9％纯度(HPLC;NMR纯度～90％)。

[0151] 制备晶体形式3的合成方法示于WO 2011/116398和WO 2011/116399的图6A-6D中。本文简要地列出步骤。步骤1:使用溴将3-丁烯-2-酮(甲基乙烯基酮,MVK)溴化。不使用额外的溶剂。将中间体3,4-二溴丁-2-酮溶于四氢呋喃(THF)中,并使其与1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一-7-烯(DBU)反应,形成第二个中间体3-溴-3-丁烯-2-酮。一旦该反应完成,加入2-羟基-1,4-萘醌(HNQ)。加入第二份DBU,并使该混合物暴露在空气中。用水淬灭该反应,并过滤收集固体。用碳酸氢钠水溶液、乙酸水溶液、水和乙醇洗涤这些固体。通过在乙醇中形成浆液并收集固体来分离产物。步骤2:用活化的二氧化锰(在甲苯中)将伴随目标2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮(化合物1)的剩余量的2-乙酰基-2,3-二氢萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮氧化为化合物1。通过炭和硅藻土饼过滤该混合物。浓缩滤液,使产物沉淀,将其过滤并干燥。步骤3:在75℃-80℃,使固体在乙酸乙酯(25mL/g纯化的化合物1)中成浆约5小时,过滤收集,干燥。用这种方法制备的化合物1是晶体形式3。用这种方法但没有形成浆液过程所制备的化合物1产生晶体形式1。

[0152] 化合物粒径分布对血浆药物浓度和选择性抗肿瘤活性的效果

[0153] 在本发明之前,没有形成和/或评估化合物1的微颗粒。先前的研究已经表明,在动物模型中,化合物1对正常细胞和癌细胞具有同样毒性,并且没有观察到抗肿瘤活性。本文提供的研究表明,减小化合物1的粒径不但提高了生物利用率、而且提高了选择性的抗肿瘤活性,没有毒性迹象。由于生物利用率提高将会同样地增加癌细胞和正常细胞与化合物1的暴露,所以,这种结果是意想不到的。选择性提高抗癌活性同时没有增加对正常细胞的毒性的机理还不清楚。在这些研究中,当D_{50}(即,将分布分为两个相等部分的粒径分布的中值点)为约20μm时,化合物1的生物利用率提高似乎达到最佳。然而,对于D_{50}值约为2μm的情况进行了进一步研究。与具有20微米的D_{50}的颗粒相比较,具有2微米的D_{50}的化合物1的微颗粒意外地提高了抗肿瘤活性,尽管没有提高药物动力学暴露。在其它研究中,产生了具有约100纳米的D_{50}(D_{50}＝110.4纳米)的化合物1的纳米颗粒,但意外的是,观察到该粒径的化合物1的抗肿瘤活性降低。相应地,在一个优选实施方案中,含有化合物1的颗粒(例如,微颗粒)的组合物具有等于或低于20微米的D_{50}和等于或高于0.2微米的D_{50},并且意外地具有有效的抗肿瘤活性,同时对正常细胞的细胞毒性没有增加。

[0154] 在WO 2011/116398和WO 2011/116399的图15中说明了不同粒度范围的化合物1的颗粒的抗肿瘤活性,并且在WO 2011/116398和WO 2011/116399的图16-18中说明了不同粒度范围的化合物1的颗粒的药物动力学数据。在WO 2011/116398和WO 2011/116399的图15所示的研究中,对形成皮下FaDu人头颈癌的免疫抑制小鼠口服(po)施用指定数量的、具有指定粒径的化合物1或赋形剂对照物。每天(qd)施用所有方案。周期性地评估肿瘤大小。

[0155] 发现施用限定粒径(例如,减小粒径)的颗粒形式的萘并呋喃化合物可提高体内血浆药物浓度。除非另作说明,否则本文的术语“粒径”和“直径”可互换地用于描述颗粒。应该理解,使用术语“直径”未必意味着颗粒具有绝对或近似的球形。例如,“直径”可以用作颗粒粒径的近似值,例如,与非球形颗粒体积相等的圆球的直径。

[0156] 在意外的效果中,发现施用限定粒径分布的萘并呋喃化合物颗粒(例如,小颗粒)(在药物组合物中)产生选择性的抗肿瘤活性。例如,在小鼠异种移植模型中,以具有20μm

(即,微米,这些术语可在本文中互换使用)中值粒径的颗粒形式施用的化合物显示了效果(选择性的抗肿瘤活性),虽然效果相对较弱。比较起来,150μm(微米)的颗粒没有显示效果。施用较小颗粒形式的萘并呋喃化合物可以产生选择性抗肿瘤活性的发现是意外发现,不能仅仅基于溶解性或生物利用率提高来解释。也就是说,通常,溶解性提高与药物口服生物利用率提高有关,这可以增加对正常细胞的毒性以及抗肿瘤活性。正如以上的讨论,如果不是在WO 2009/036099和WO 2009/036101中描述的限定条件下进行暴露,萘并呋喃化合物可以同等地对肿瘤细胞和正常细胞产生毒性。

[0157] 在进一步的意外效果中,发现在药物组合物中施用粒径进一步减小的萘并呋喃化合物颗粒可产生显著提高的抗肿瘤活性,但几乎不会改变药物动力学特性,即,生物利用率没有改变。例如,在小鼠异种移植模型中,以具有2μm(微米)中值粒径的颗粒形式施用的化合物显示了显著提高的效果。与20μm的颗粒相比,2μm的颗粒显示了显著提高的效果,但药物动力学特性非常类似。换句话说,这种提高的效果与药物动力学特性(即,生物利用率)无关。这种结果是非常意外的,因为对于这种溶解性差的化合物来说,效果提高通常与药物的口服生物利用率提高相关。

[0158] 因此,观察到选择性抗肿瘤活性提高是意外和意想不到的结果。本发明提供了萘并呋喃化合物(例如,式I的化合物)的颗粒,其是活性的,即,具有抗肿瘤效果和/或选择性的抗肿瘤活性。该活性颗粒具有限定粒径,例如,具有小于或等于约200μm、约150μm、约100μm、约40μm、或约20μm、约10μm、约5μm、约4μm、约3μm、约2μm、约1μm、约0.5μm、约0.2μm或约0.1μm的直径。比这种限定粒径大的颗粒是非活性的,或比本文所描述颗粒的活性小。

[0159] 由此,施用较小颗粒形式的萘并呋喃化合物或另一种按照式I的化合物可以提高它的选择性的抗肿瘤活性。在给药过程中使用具有限定粒径分布的按照式I化合物的颗粒可以建立目标选择性的抗肿瘤活性。例如,使用具有限定粒径分布的萘并呋喃化合物,例如,较小颗粒,可以在较短的时段产生更高的血液浓度,并且产生选择性的抗肿瘤活性,虽然活性相对较弱。进一步减小化合物的粒径,可以显著地提高效果,同时不改变化合物的血浆浓度。

[0160] 除非另有陈述,否则,本文的术语“血浆浓度”、“血液摩尔浓度”和“血液浓度”可互换使用。术语“赘生物”可用于描述显示异常生长型的细胞。这种赘生物可以包括良性肿瘤和恶性肿瘤,例如实体瘤,以及其它细胞生长紊乱,例如白血病,其没有确定的形状,并且不限于人或动物体的特定区域。由此,“赘生物”包括癌性和非癌性的赘生性细胞和组织。除非另作说明,否则,在本文中交代的或提及的特定研究或实验中,术语“肿瘤”和“癌症”指的是更宽范围的所有赘生物,包括不限于人体或动物体特定区域的赘生物。然而,更具限制性的术语“实体瘤”不包括没有确定形状并且不限于人体或动物体特定区域的细胞生长紊乱,例如白血病。

[0161] 赘生物可以没有下列特征或具有一个或一个以上下列特征:固态(实体瘤),恶性肿瘤,转移病变或Stat3通路活性。赘生物可以包括例如癌症干细胞。赘生物可以是例如癌、肉瘤、腺癌、淋巴瘤或血液恶性肿瘤。

[0162] 已经将吸收定义为从给药位点获取的药物到达身体之内要测定的位点的过程。参见M.Rowland,T.N.Tozer(1995)Clinical pharmacokinetics:Concepts and applications.Lippincott Williams&Wilkins。口服药物吸收通常指的是药物穿过肠上皮

细胞的顶膜的转运过程，因为认为顶膜是膜渗透的速率限制步骤。参见U.Fagerholm&H. Lennernäs(1995)Experimental estimation of the effective unstirred water layer thickness in the human jejunum,and its importance in oral drug absorption,Eur J Pharm Sci 3:247-253;M.B.Lande,J.M.Donovan&M.L.Zeidel(1995)The relationship between membrane fluidity and permeabilities to water,solutes,ammonia,and protons,J Gen Physiol 106:67-84。渗透性是描述药物如何容易地通过膜转运的普通术语。药物的比渗透率特征取决于它的理化性质，包括亲油性、电荷、粒径和极性表面积。参见Rowland&Tozer 1995;C.A.Lipinski,F.Lombardo,B.W.Dominy&P.J.Feeney(2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings,Adv Drug Deliv Rev 46:3-26。吸收率取决于药物的渗透性、膜的表面积和经过膜的浓度梯度。浓度梯度是被动扩散的驱动力，是药物膜转运的最常见的机理。对口服给药来说，药物主要为肠管所吸收。人肠管约为5-8米长，具有将近200平方米的总表面积，而小鼠肠管只有约10-20cm长。因此，虽然更大粒径的药物的渗透性比较小粒径药物的渗透性低，但可以预测，作为人用药物的更大粒径的药物可以比小鼠中较小粒径药物具有更高的吸收率或与其相同的吸收率。

[0163] 例如，当以药物制剂形式给药时，例如，用于治疗癌症或肿瘤，可以预测中值直径小于或等于约200μm、150μm、100μm、80μm、60μm、40μm、20μm、10μm、5μm、4μm、3μm、2μm、1μm、0.5μm或0.2μm的按照式I化合物的粒度分布能够产生选择性的抗肿瘤活性。例如，粒度分布应该使颗粒具有约0.02μm至约5μm或约0.2μm至约4μm的中值直径。例如，粒度分布应该使颗粒具有小于或等于约5μm的中值直径、平均直径与中值直径的比例至多为约2和众数直径(mode diameter)与中值直径的比例至少为约0.25。

[0164] 术语“颗粒”可以指的是式I化合物的团聚体。术语“平均”可以指的是所有颗粒大小的和除以颗粒总数。术语“中间值”可以指的是，例如直径，其中一半颗粒具有更大的直径、一半颗粒具有更小的直径。术语“众数”可以表示最通常出现的粒径值。术语“累积总数”可以指的是所有颗粒。

[0165] 通过施用萘并呋喃化合物颗粒所获得的选择性抗肿瘤活性不但取决于颗粒的粒径分布，例如，颗粒的体积或代表那些体积的特征的直径，而且取决于颗粒的形状和形状的分布。例如，与球形颗粒组相比，针状颗粒组可以产生不同的药物动力学特性。由此，合乎需要的是，测定所施用颗粒的形状和形状分布特征，和/或，使用一定的方法，制备具有预定形状和形状分布特征的颗粒，例如，接近均匀形状，例如，近似于圆球的颗粒。例如，颗粒的球形度Ψ可以定义为：

[0166] $$\Psi = \frac{\pi^{1/3}(6V_P)^{2/3}}{A_P},$$

[0167] 其中V_p是颗粒的体积，A_p是颗粒的表面积。圆球具有Ψ＝1的球形度，颗粒的球形度越接近1(unity)，颗粒的形状越接近圆球。作为对比，四面体具有约0.671的球形度，立方体具有约0.806的球形度，八面体具有约0.846的球形度，十二面体具有约0.910的球形度，二十面体具有约0.939的球形度。因为对于给定体积来说，圆球的表面积最小，所以，可以预计，接近球形的颗粒比更不接近球形的相同体积的颗粒溶解得更慢。圆球组的平均球形度

可以定义为

[0168] $$\Psi_m = \frac{\pi^{1/3}\left(6\sum V_P\right)^{2/3}}{\sum A_P},$$

[0169] 其中ΣVp是所有颗粒的总体积，ΣAp是所有颗粒的总表面积。例如，所施用的按照式I化合物的颗粒可以具有至少约0.8的平均球形度，或至少约0.9的平均球形度。

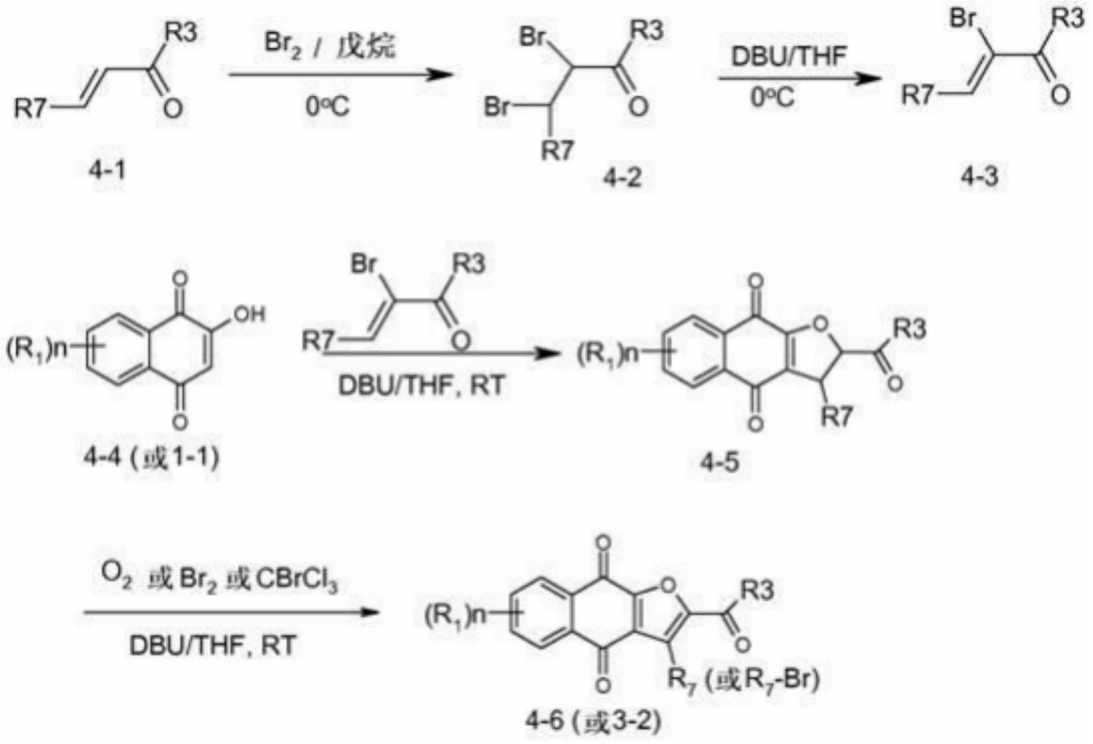
[0170] 颗粒的粒径、粒径分布、形状、形状分布特征和其它因素例如表面粗糙度或不规则度可以影响所施用的药物制剂中的化合物1颗粒组的平均比表面积。平均比表面积可以定义为：ΣAp/Σmp，其中ΣAp是颗粒的总表面积，Σmp是颗粒的总质量。颗粒的平均比表面积越大，预期颗粒溶解的越快。

[0171] 按照式I化合物在药物制剂中的颗粒可以包括跨越不同颗粒之间或在相同颗粒内的结晶状态的萘并呋喃化合物。结晶状态可以在跨越不同颗粒之间或在相同颗粒内包括一种或多种多晶型物。正如本领域技术人员所理解的那样，预期颗粒的溶解速率受到化合物颗粒中的物质状态影响，例如，第一个多晶型物或第二个多晶型物是否是晶体。

[0172] 一种或多种技术可以用于测定药物制剂中的按照式I化合物的颗粒的粒径和/或粒径分布。例如，可以使用筛分分析、光学显微计数、电子显微照片统计、电阻统计、沉降时间、激光衍射和/或声谱。一些或所有这些技术或其变体可以用于测定药物制剂中的萘并呋喃化合物颗粒的形状、形状分布特征和/或比表面积。BET等温线和/或透气性比面积技术可以用于测定药物制剂中的按照式I化合物的颗粒的比表面积。

[0173] 形成萘并呋喃化合物的方法

[0174] WO 2009/036099和WO 2009/036101公开了制备式II的萘并呋喃化合物的方法如下。

[0175] 

[0176] DBU：1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一-7-烯；

[0177] THF:四氢呋喃;

[0178] RT:室温。

[0179] 在该方法中,使3-溴-3-丁烯-2-酮(4-3)与2-羟基-1,4-萘醌(4-4)在一个空气开放的容器中反应,产生2,3-二氢萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮(4-5)。用外界空气中的氧气氧化2,3-二氢萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮(4-5),变成萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮(4-6)。用该方法制备萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮。然而,在进一步形成该化合物期间,测出该方法仍然产生显著的各种杂质,这种杂质妨碍这些化合物的临床应用潜力。在一些实施方案中,杂质之一是2,3-二氢萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮(4-5)。

[0180] 在一方面,本发明提供了制备萘并呋喃的改进方法。该改进方法可以使杂质最少,并由此制备基本上纯的萘并呋喃。本文使用的术语"基本上纯"是指制备品包括至少约80%或80%以上的本发明的化合物(以面积HPLC%形式测定)。在一些实施方案中,萘并呋喃是萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮和它的相关化合物(4-6)。

[0181] 在一些实施方案中,本发明的方法包括在本文提供的操作实例中显示的一种或多种方法。在一些实施方案中,方法包括在本文提供的实施例1、2和/或5中显示的一种或多种方法。

[0182] 在一些实施方案中,本发明的方法包括:在第一个溶剂中,用氧化剂氧化3-溴-3-丁烯-2-酮(4-3)和2-羟基-1,4-萘醌(4-4)的偶合的粗品。在进一步实施方案中,氧化剂是二氧化锰(MnO_2)。在更进一步的实施方案中,分离粗品,而后将其氧化。在一些实施方案中,第一个溶剂是甲苯或氯仿。

[0183] 在一些实施方案中,本发明的方法进一步包括:用炭处理老化的氧化混合物,除去某些杂质。在进一步实施方案中,用活性炭的垫过滤老化的氧化混合物。在更进一步的实施方案中,在约100℃过滤混合物。

[0184] 在一些实施方案中,本发明的方法进一步包括:从滤液中结晶出产物。在进一步实施方案中,蒸发浓缩滤液,并冷却,使产物结晶。

[0185] 在一些实施方案中,本发明的方法进一步包括:用第二个溶剂将产物重结晶。在进一步实施方案中,第二个溶剂是乙酸乙酯。

[0186] 在另一个实施方案中,本发明的方法进一步包括:使从第一个溶剂中结晶出的产物在第二个溶剂中形成浆液,将该浆液加热,并冷却该浆液。在进一步实施方案中,第二个溶剂是乙酸乙酯。在一些实施方案中,使产物形成浆液,并只加热至部分溶解。在进一步实施方案中,用于使产物形成浆液的第二个溶剂的体积为在加热条件下完全溶解产物所需体积的1/10,1/5,1/4,1/3,1/2或2/3。

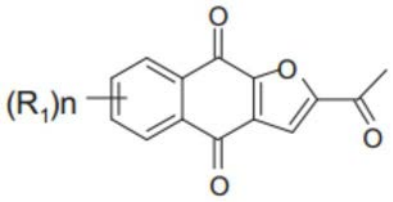
[0187] 本发明还提供了通过本发明的方法制备的萘并呋喃化合物。在一些实施方案中,萘并呋喃化合物选自2-(1-羟乙基)-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙酰基-7-氯-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙酰基-7-氟-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙酰基萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,磷酸单[1-(4,9-二氧代-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙烯基]酯,磷酸1-(4,9-二氧代-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙烯基酯二甲酯,其对映体、非对映体、互变异构体和盐或溶剂化物。在进一步实施方案中,用下列方法制备萘并呋喃化合物:包括在甲苯的存在下,使2-羟基-1,4-萘醌(4-4)和3-溴-3-丁烯-2-酮(4-3)的偶合的、分离的粗品与二氧化锰反应。在更进一步

的实施方案中，该方法进一步包括：用活性炭的垫过滤老化的反应混合物。

[0188] 在另一个方面，本发明提供了基本上纯的萘并呋喃化合物。

[0189] 在一些实施方案中，本发明提供了基本上纯的化合物，其选自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，磷酸单[1-(4,9-二氧代-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙烯基]酯，磷酸1-(4,9-二氧代-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙烯基酯二甲酯，其对映体、非对映体、互变异构体和盐或溶剂化物。

[0190] 在一些实施方案中，本发明提供了基本上纯的式II化合物，

[0191] 

(II)

[0192] 其中每个R_1独立地是H、Cl或F；n是0、1、2、3或4。

[0193] 本文使用的“基本上纯”是指至少约80％的纯度。在一些实施方案中，本发明化合物的纯度具有至少约约85％、约90％、约95％或约99％的纯度。在进一步实施方案中，本发明化合物的纯度具有至少约99.5％或约99.8％的纯度。在更进一步的实施方案中，本发明化合物的纯度具有至少约99.85％、约99.90％、约99.94％、约99.95％或约99.99％的纯度。在一些实施方案中，本发明的化合物选自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，磷酸单[1-(4,9-二氧代-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙烯基]酯，磷酸1-(4,9-二氧代-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙烯基酯二甲酯，其对映体、非对映体、互变异构体和盐或溶剂化物。在一些实施方案中，本发明的化合物是多晶型物。在一些实施方案中，本发明的化合物是按照式I的化合物的多晶型物。在一些实施方案中，本发明的化合物是化合物1的多晶型物。

[0194] 可能存在于本发明化合物中的典型的杂质包括一种或多种选自下列的杂质：副产物，异构体，中间体和溶剂。在一些实施方案中，相对于式II的化合物，可能存在于本发明化合物中的杂质至多为约10％、约8％、约5％、约2％或约1％。在进一步实施方案中，相对于式II的化合物，可能存在于本发明化合物中的杂质至多为约0.5％、约0.2％、约0.15％或约0.1％。在更进一步的实施方案中，相对于式II的化合物，可能存在于本发明化合物中的杂质至多为约0.05％、约0.02％或约0.01％。在一些实施方案中，相对于式II的化合物，基本上纯的式II化合物具有至多百万分之(p.p.m.)500、200、100、50、20、10、5、2、1、0.5、0.2、0.15、0.1或0的残余的一种副产物或多种副产物。

[0195] 在一些实施方案中，杂质包括一种或多种选自下列的副产物：2-乙酰基-2,3-二氢萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮，2,6-二乙酰基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮，2,7-二乙酰基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮，3-乙酰基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮，萘并[2,3-b]呋喃-4,

9-二酮，萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮，萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二醇和1-(4,9-二羟基-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙酮。

[0196] 在一些实施方案中，杂质包括锰(Mn)。

[0197] 可以用各种仪器测定本发明化合物的纯度。在一些实施方案中，纯度是用HPLC(高效液相色谱)测定的。在一些实施方案中，纯度是用NMR(核磁共振)测定的。在进一步实施方案中，纯度是用HPLC和NMR测定的。

[0198] 在动物试验中，相比于含有化合物1的纯度更小的组合物，含有化合物1的这些高纯度组合物显示出显著提高的安全特性。在小鼠中，没有观察到高纯度化合物1的任何副作用迹象。另外，含有化合物1的这些高纯度组合物已经在患者中进行了试验，并且表现了卓越的安全性。例如，WO 2011/116398和WO 2011/11639的图13说明了所观察到的含有约90％纯度化合物1的组合物的毒性，而WO 2011/116398和WO 2011/11639的图14说明，含有约95％或更大纯度的化合物1的高纯度组合物是安全和有效的。在WO 2011/116398和WO 2011/11639的图13所示的研究中，对形成皮下FaDu人头颈癌(上图)或MDA-231人乳腺癌(下图)的免疫抑制小鼠口服(po)施用指定数量的化合物1或赋形剂对照物。将化合物1配制在GELUCIRE™中。每天(qd)施用所有方案。在治疗期间，周期性地评估体重。每个点代表八个肿瘤的平均值±SEM。对于约90％纯度的化合物，观察到显著的毒性。在第一个实验(上图)中，在治疗期间，总共有4只小鼠死亡(一个在第16天死亡，2个在第19天死亡，1个在第23天死亡)，因此，它们死亡之后，它们的体重未包括在图内。在第二个实验(下图)中，在治疗期间，总共有3只小鼠死亡(1个在第14天死亡，2个在第21天死亡)，因此，它们死亡之后，它们的体重未包括在图内。在WO 2011/116398和WO 2011/11639的图14所示的研究中，对形成皮下FaDu人头颈癌(上图)或MDA-231人乳腺癌(下图)的免疫抑制小鼠口服(po)施用指定数量的化合物1或赋形剂对照物。将化合物1配制在GELUCIRE™中。每天(qd)施用所有方案。在治疗期间，周期性地评估体重。每个点代表八个肿瘤的平均值±SEM。高纯度的化合物1耐受性很好，并且没有毒性迹象。在两个实验中，所有的小鼠在整个治疗过程中保持健康状态。在一期研究中，将化合物1的剂量从20mg/天逐步升高至2000mg/天，并且不达到最大耐受剂量(MTD)。没有观察到剂量限制性毒性。患者能够很好地耐受化合物1，没有药物诱导的副作用，这与癌症化疗药物形成鲜明对照。在历史记录的肿瘤药物当中，基本上纯的化合物1的组合物的临床安全特性处于最好的水平。

[0199] 药物制剂

[0200] 在药物制剂中，发现某些赋形剂或增强剂提高了给定粒径分布的按照式I化合物的颗粒的口服生物利用率。例如，加入药学相容的赋形剂GELUCIRE™44/14(Gattefossé生产的聚乙二醇甘油基月桂酸酯)，可以提高具有小于或等于约20微米的中值粒径的化合物1的生物利用率。可用于提高或控制口服生物利用率的其它赋形剂的例子包括：表面活性剂，例如TWEEN 80™或TWEEN 20™(聚山梨酸酯，即，聚氧乙烯失水山梨醇单月桂酸酯)或某些脂质，例如卵磷脂，例如，二豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)。表面活性剂包括两亲的并含有疏水与亲水基的化合物。其它赋形剂可以包括，例如，脂肪酸的甘油酯，饱和脂肪酸的甘油酯，具有8至18个碳的饱和脂肪酸的甘油酯，月桂酸甘油酯，聚乙二醇，聚氧乙烯失水山梨糖醇烷基化物，纤维素或纤维素衍生物，例如微晶纤维素和羧甲基纤维素(CMC)，以及脂质，例如甾醇，例如，胆固醇。其它赋形剂可以包括抗氧化剂，例如维生素E。本领域技术人员可以理解，

其它赋形剂和其它组分可以包括在按照本发明的药物制剂中。例如，可以包括其它活性剂，标准赋形剂，载体，液体载体，盐水，水溶液，稀释剂，表面活性剂，分散剂，惰性稀释剂，造粒和崩解剂，粘合剂，润滑剂，助流剂，脱色剂，甜味剂，调味剂，着色剂，防腐剂，生理可降解的组合物例如明胶，水赋形剂和溶剂，油性赋形剂和溶剂，悬浮剂，分散或湿润剂，悬浮剂，乳化剂，缓和剂，缓冲剂，盐，增稠剂，明胶，填料，乳化剂，抗氧化剂，抗菌剂，抗真菌剂，稳定剂，水，二醇，油剂，醇，结晶阻滞剂(例如，抑制糖结晶的阻滞剂)，淀粉，糖，蔗糖，表面活性剂，提高任何其它组分的溶解性的试剂，例如多羟基醇，例如甘油或山梨糖醇，可药用聚合的或疏水性的物质，及其它组分。本领域技术人员可以理解，根据剂型(例如，注射溶液剂，胶囊剂或丸剂)加入合适的其它试剂。

[0201] 可以将本发明的按照式I的化合物配制为“药物组合物”。按照本发明的实施方案包括各种剂型，这种剂型包括可以例如用于治疗患者的化合物。例如，口服剂型可以包括片剂，丸剂，胶囊剂(硬或软胶囊剂)，胶囊片，粉剂，颗粒剂，混悬剂(例如，在水或油赋形剂中的混悬剂)，溶液剂(例如，在水或油赋形剂中的溶液剂)，凝胶，扁囊剂，锭剂，糖锭，糖浆剂，酏剂，乳剂，吸饮剂，水包油乳剂或油包水乳剂。因为片剂和胶囊剂容易给药，所以，它们代表优选的口服剂型。可以用标准技术将固体口服剂型包糖衣或肠溶包衣。例如，鼻部及其它粘膜喷涂制剂(例如，吸入形式)可以包括活性化合物与防腐剂和等渗药剂的纯水溶液。优选，调节这种制剂的pH值，并且达到与鼻或其它粘膜相适合的等渗压的状态。或者，它们可以是悬浮在载气中的细分的固体粉剂、吸入剂或气雾剂形式。这种制剂可以用任何合适的装置或方法递送，例如，雾化器，喷射器，定量吸入器，等等。例如，可以局部施用按照本发明的药物组合物，例如，软膏剂、乳剂或栓剂形式。例如，可以用注射注射剂形式施用按照本发明的药物组合物。由此，按照本发明的剂型可以具有例如固体、半固体、液体或气体形式。合适的剂型包括但不局限于：口服、直肠、舌下、粘膜、鼻部、眼睛、皮下、肌内、静脉内、肠胃外、透皮、脊椎、鞘内、关节内、动脉内、蛛网膜下、支气管、淋巴管和子宫内(intra-uterile)给药，及用于系统递送活性组分的其它剂型。活性组分，例如，按照式I的化合物，可以包含在给受试者(患者)施用之后提供快速释放、持续释放、延迟释放或本领域技术人员已知的任何其它释放特性的制剂中。对于给定治疗来说，选择的给药模式和剂型与合乎给定治疗需要并且有效的化合物或组合物的治疗数量以及其它因素例如受试者(患者)的精神状态和身体条件紧密相关。

[0202] 可以按散装、单一单位剂量形式、多个单一单位剂量形式或多剂量形式制备、包装或出售本发明的药物组合物。本文使用的“单位剂量”是药物组合物的离散数量，其包括预定数量的活性组分。每个单位剂量中的活性组分数量通常等于所施用的活性组分的总数量，或总剂量的适当部分，例如，这种剂量的一半或三分之一。适合于口服给药的本发明的药物组合物的制剂可以是离散固体剂量单位形式。每个固体剂量单位含有预定数量的活性组分，例如，单位剂量或其一部分。本文使用的“油性”液体是包括极性比水小的碳或硅基液体的液体。在这种药物剂型中，优选，活性剂与一种或多种其可药用载体和任选的任何其它治疗组分一起使用。载体必须是可药用载体，其应该与制剂的其它组分相容，并且不会过度地危害其接受者。本发明的组合物可以提供于单位剂型中，其中每个剂量单位，例如一茶匙、片剂、胶囊剂、溶液剂或栓剂，仅仅含有预定数量的活性药物或前体药物，或与其它药学活性剂适当地联用。术语“单位剂型”是指适合作为人和动物受试者的单位剂量的物理离散

单位，每个单位仅仅含有预定数量的本发明的组合物，或与其它活性剂联用，计算的该数量应该足以产生目标效果。

[0203] 可以用本领域已知的技术制备本发明药物组合物的剂型，并且该剂型含有治疗有效量的活性化合物或组分。已知的或下文公开的任何技术可以用于制备按照本发明的药物组合物或制剂。通常，制备方法包括：使活性组分与载体或一种或多种其它额外的组分结合，而后如有必要或需要的话，使产物成型或包装为目标单或多剂量单位。可以使用公开的方法或要研发的方法制备按照本发明的粉剂和颗粒制剂。这种制剂可以直接给受试者施用，或用以形成例如片剂形式、填充的胶囊剂形式，或向其中加入水或油性赋形剂，制备成水或油性混悬剂或溶液剂。片剂可以通过压制或模塑或用湿法造粒来制备，任选与一种或多种助剂一起制备。压制片可以如下制备：在合适的机械中，挤压自由流动形式的活性组分(例如粉末或颗粒制剂)。模制片可以如下制备：在合适机械中，将活性组分、可药用载体和最低限度的足够液体(使混合物湿润)的混合物模制。片剂可以是非包衣片剂，或可以使用本领域已知的方法或要研发的方法将它们包衣。可以配制包衣片剂，使其在受试者的胃肠道中延迟崩解，例如，使用肠溶衣，由此使活性组分持续释放和吸收。片剂可以进一步包括能够提供药学精美和适口的制剂的组分。包括活性组分的硬胶囊剂可以使用生理可降解的成分(例如明胶)来制备。这种硬胶囊剂包括活性组分。包括活性组分的软胶囊剂可以使用生理可降解的成分(例如明胶)来制备。这种软胶囊包括活性组分，活性组分可以与水或油介质混合。可以以液态或干燥产物形式制备、包装和销售适合于给药的本发明的药物组合物的液体制剂，这种干燥产物在使用之前与水或其它合适的赋形剂重组。可以使用常规方法或要研发的方法制备液体混悬剂(其中活性组分分散在水或油性赋形剂中)和液体溶液(其中活性组分溶于水或油性赋形剂中)。活性组分的液体混悬剂可以在水或油性赋形剂中。活性组分的液体溶液可以在水或油性赋形剂中。为了制备这种药物剂型，可以按照常规药物配制技术，使活性组分(例如，萘并呋喃)与药物载体密切地混合。根据希望施用的制剂形式，载体可以采用多种形式。在制备口服剂型的组合物过程中，可以使用任何常规药物介质。

[0204] 在按照本发明的一些实施方案中，制备的物品包括含有治疗有效量的药物组合物的容器，其中药物组合物包括按照式I的化合物。容器可以包括可药用赋形剂。容器可以包括印刷的标签说明书。例如，印刷的标签可以标明施用药物组合物应该采用的剂量和频率、该组合物是否应该与食品一起施用或是否在摄入食品前或后的限定时段内施用。组合物可以包含在能够容纳和分配剂型的任何合适的容器中，并且其应该不会与该组合物显著地相互作用。标签说明书可以与本文所描述的治疗方法一致。利用使标签和容器保持物理邻近的方法，可以使标签与容器结合在一起。作为非限制性实例，容器和标签两者可以都包含在包装材料中，例如盒子或塑料收缩包装，或可以与说明书结合，其中说明书与容器结合，例如，利用不会使标签说明书模糊的胶液或其它结合或固定方法。

[0205] 在一些本发明的实施方案中，药物组合物包括(a)治疗有效量的活性组分，其为本发明的化合物，例如，根据式I的化合物，(b)亲水亲油平衡值(HLB)大于10的聚氧甘油酯，和(c)亲水亲油平衡值(HLB)小于10的聚氧甘油酯。更优选地，药物组合物进一步包括(d)表面活性剂的。

[0206] HLB值大于10的聚氧甘油酯的优选的实例包括HLB值介于10和17之间的聚氧甘油

酯，更优选地HLB值介于12和15之间的聚氧甘油酯。进一步优选的实例包括在25摄氏度下为固体或半固体的聚氧甘油酯，优选地熔点高于30摄氏度的聚氧甘油酯，更优选地熔点介于33-64摄氏度的聚氧甘油酯，甚至更优选地熔点介于40-55摄氏度的聚氧甘油酯。具体实例包括月桂酰聚氧甘油酯，更具体地月桂酸聚乙二醇甘油酯，例如Gelucire™44/14，和硬脂酰聚氧甘油酯，更具体地硬脂酸聚乙二醇甘油酯，例如优选Gelucire™50/13。更优选的具体实例包括月桂酰聚氧甘油酯，更具体地月桂酸聚乙二醇甘油酯，例如Gelucire™44/14。

[0207] HLB值小于10的聚氧甘油酯的优选的实例包括HLB值介于2和8之间的聚氧甘油酯，更优选地HLB值介于3和7之间的聚氧甘油酯。具体实例包括亚油酯酰聚氧甘油酯，例如Labrafil™M2125CS，油酰聚氧甘油酯，例如Labrafil™ M1944CS，和月桂酸聚乙二醇-6甘油酯，例如Labrafil™M2130CS。更优选的具体实例包括亚油酯酰聚氧甘油酯和油酰聚氧甘油酯。

[0208] 表面活性剂的实例包括月桂基硫酸钠(SLS)或十二烷基硫酸钠(SDS)，聚氧乙烯失水山梨醇脂肪酸酯(聚山梨醇酯，优选地聚氧乙烯失水山梨醇单油酸酯(吐温80™)或聚氧乙烯失水山梨醇单月桂酸酯(吐温20™))，某些脂质，例如卵磷脂，如，二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)。表面活性剂包括两亲的并含有疏水与亲水基的化合物。优选的表面活性剂是月桂基硫酸钠(SLS)或十二烷基硫酸钠(SDS)。

[0209] 制剂包括(按重量)从5％到50％范围内的活性组分。制剂包括(按重量)从0.05％到5％范围内的表面活性剂。制剂可包括(按重量)从5％到80％范围内的HLB值大于10的聚氧甘油酯。制剂可包括(按重量)从5％到80％范围内的HLB值小于10的聚氧甘油酯。HLB值大于10的聚氧甘油酯和HLB值小于10的聚氧甘油酯的比例为从约90/10到约10/90。优选地，比例为从约80/20到约20/80，更优选地，为从约40/60到约80/20。组合物可由(按重量)约27.18％的活性组分、约0.27％的表面活性剂、约14.51％的HLB值大于10的聚氧甘油酯和约58.04％的HLB值小于10的聚氧甘油酯组成。125mg的胶囊实施方案可由约125mg的活性组分、约1.2mg的表面活性剂、约66.8mg的HLB值大于10的聚氧甘油酯和约267mg的HLB值小于10的聚氧甘油酯组成。80mg的胶囊实施方案可由约80mg的活性组分、约0.8mg的表面活性剂、约42.7mg的HLB值大于10的聚氧甘油酯和约170.9mg的HLB值小于10的聚氧甘油酯组成。本发明的实施方案包括制备的物品，其中任意上面的药物组合物容纳在胶囊中，例如，LIcap胶囊。胶囊优选为型号1或更小，例如，型号2。

[0210] 制备具有选定的粒径分布的药物制剂和确定最佳粒径分布的方法

[0211] 研磨方法

[0212] 在按照本发明的方法中，研磨或碾磨方法可用于减小活性组分或按照式I的化合物的粒径。例如，研磨或碾磨方法可以适合于制备具有200μm、150μm、100μm、40μm、20μm、5μm、2μm或更大或更小中值粒径的颗粒。这种研磨或碾磨方法可以包括，例如，球磨，辊轧，喷射研磨，湿磨，超声研磨、碾磨和组合方法。例如，该方法可以通过用硬面冲击颗粒或使颗粒处于高压状态下(例如，在两个表面之间挤压颗粒)来减小粒径。例如，在喷射研磨过程中，气流携带颗粒，并将它们加速至高速。然后，颗粒撞击其它颗粒和壁，并破碎为更小的颗粒。例如，在湿磨过程中，颗粒与液体混合，并使得到的浆液通过高剪切混合器，从而使颗粒破碎。例如，在超声研磨过程中，例如，浆液中的颗粒暴露于超声辐射中。超声诱导的空穴化作用可以使颗粒破碎为更小粒径的颗粒。

[0213] 有利的是，在研磨或碾磨颗粒操作之前，降低颗粒的温度。例如，温度可以降低到低温，例如，使颗粒与低温流体(例如液氮)接触或将颗粒浸渍在其中。这种温度降低可以使颗粒变得更脆，并且容易使它们的粒径在研磨或碾磨操作过程中减小。在研磨或碾磨过程之后，可用选择方法，例如筛分，以缩小粒径的范围。

[0214] 结晶方法

[0215] 结晶是制备药物的主要分离和纯化步骤。结晶还可以用于控制粒径。在结晶期间获得的粒径分布(PSD)受到结晶期间存在的各种机理的组合的影响，例如成核、生长、聚集、磨耗、破裂，等等。在结晶期间，为了获得目标产物性能，控制PSD是很关键的。当在结晶期间不能始终控制粒径来满足目标规格时，可以包括额外工艺步骤，例如，干磨。(Braat et al.,Crystallization:Particle Size Control,Encyclopedia of Pharmaceutical Technology:Third Edition,2006年10月2日出版)。

[0216] 治疗癌症的方法

[0217] 按照本发明的对受赘生物折磨的人、哺乳动物或动物受试者的治疗、延迟发展、防止复发、减轻症状或者使其得到改善的方法包括：施用治疗有效量的、包含预定粒径分布的颗粒的药物组合物，例如，按照式I的化合物，例如化合物1，纯化合物，纯产物和/或纯药物组合物，使得赘生物体积的生长得到减缓，终止赘生物体积的生长，减小赘生物体积和/或杀死恶性肿瘤。可以用该方法治疗的赘生物的类型的一些例子包括：实体瘤，恶性肿瘤，癌症，难治性癌症，复发性癌症，转移性肿瘤，含有癌症干细胞的赘生物，涉及STAT3通路的赘生物，癌和肉瘤。在一些实施方案中，可以通过施用按照式I化合物的颗粒来治疗的癌症选自食管癌、胃食管结合部癌、胃食管结合部腺癌、软骨肉瘤、结直肠癌、结肠腺癌、直肠腺癌、结直肠腺癌、乳腺癌、卵巢癌、头颈癌、黑素瘤、胃腺癌和肾上腺类皮质激素癌。在这些癌症中，可能涉及STAT3通路。在这些癌症中，可能涉及CSC通路。

[0218] 在本发明的实施方案中，给诊断为癌症的患者或受试者施用治疗有效量的本发明的化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物或前药，其中癌症是胃食管结合部癌、食管癌或胃食管腺癌。可选地，抗有丝分裂剂(例如紫杉醇)作为用于联合治疗的第二/组合药剂施用。在一个特征中，本发明的化合物以总剂量在约160mg到约1000mg的范围内的两个日剂量给受试者施用，优选地BID具有化合物的给药间隔为从约4小时至约16小时的范围，更优选地约12小时。可选的组合药剂紫杉醇可以在约40mg/m^2至约100mg/m^2的范围内的总周剂量给受试者施用，例如，约80mg/m^2。

[0219] 癌症干细胞

[0220] 近年来，肿瘤生成的新模式已经获得广泛承认，在这种模式中，假设整个肿瘤块当中只有一小部分在肿瘤内决定致瘤活性，而以前的或克隆遗传模式认为所有突变的肿瘤细胞同等地促进这种致瘤活性。按照新模式，这种小部分致瘤细胞是具有干细胞性质的转型的细胞，并且被称作“癌症干细胞”(CSCs)。在九十年代期间，Bonnet和Dick首先证明了CSCs体内存在于急性骨髓性白血病(AML)中。他们的数据表明，当移植到免疫缺陷小鼠中时，只有少量人AML细胞的亚种群能够转运AML，而其它AML细胞不能诱导白血病。随后，这些CSCs显示出具有与原始造血干细胞相同的细胞标志物($CD34^+/CD38^-$)。(Bonnet,D.,Normal and leukaemic stem cells.Br J Haematol,2005.130(4):p.469-79)。从那以后，研究人员发现，CSCs确实存在于各种型式的肿瘤中，包括脑、乳房、皮肤、前列腺、结肠直肠癌，等等。

[0221] 肿瘤生成的CSC模式可以解释为了形成肿瘤移植物而需要将几万或几十万肿瘤细胞注射到实验动物中的原因。在人AML中，这些细胞在10,000个之中的出现率小于1(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)。尽管在给定肿瘤细胞群中非常稀少，但有证据表明，这种细胞存在于几乎所有的肿瘤类型中。然而，由于癌细胞系选自特异性适合于生长在组织培养物中的癌细胞的子群，所以，癌细胞系的生物和功能性可以进行显著的改变。因此，不是所有的癌细胞系都含有CSCs。

[0222] 癌症干细胞与正常干细胞享有许多类似的特性。例如，CSCs具有自我更新能力，也就是说，能够引起其它致瘤的癌症干细胞，与有限的分裂数量相反，它的速度典型地比其它肿瘤细胞分裂慢。CSCs还能够分化为多种细胞类型，这可以解释下列组织学证据：不但许多肿瘤包含宿主器官固有的多种细胞类型，而且通常在肿瘤转移过程中保持异质性。已经证明，CSCs根本上负责肿瘤生成、癌症转移和癌症复发。CSCs还称为肿瘤起始细胞，癌症干细胞样细胞，干细胞样癌细胞，高度致瘤的细胞，肿瘤干细胞，实体瘤干细胞或超级恶性细胞。

[0223] 对于将来的癌症治疗和疗法，癌症干细胞的存在具有根本性的意义。这些意义表现在疾病鉴定，选择性的药物靶向，预防癌症转移和复发，形成新的对抗癌症的策略。

[0224] 在试验初期，现行癌症治疗的效果常常测定肿瘤皱缩的大小(即，被杀死的肿瘤块的数量)来确定。由于CSCs形成很小比例的肿瘤，并且比它们的更加分化的子代具有显著不同的生物特征，所以，对于对干细胞特异性起作用的药物来说，测定肿瘤块可能不是必然的选择。事实上，癌症干细胞似乎对放疗(XRT)有抗性，并且利用化学疗法和靶向药物难以治疗。(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;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;Ailles,L.E.和I.L.Weissman,Cancer stem cells in solid tumors.Curr Opin Biotechnol,2007.18(5):p.460-6)。正常成体(somatic)干细胞天然地对化学治疗剂有抗性，它们具有泵出药物的各种泵(例如MDR)和DNA修复蛋白。进一步的，它们还具有缓慢的细胞更新速度，而化学治疗剂靶向快速复制的细胞。癌症干细胞(是正常干细胞的突变对应物)也具有类似的机理，使它们幸免于药物治疗和辐射治疗。换句话说，常规化疗和放疗杀死那些形成肿瘤大部分的且其不能产生新的高度致瘤的癌症干细胞的分化的或正在分化的细胞。相反，另一方面，引起分化的和正在分化的细胞的癌症干细胞群可能未受影响，并且导致疾病的复发。常规抗癌症治疗的进一步危害是：化学治疗只保留化疗抗性的癌症干细胞的可能性，接下来的复发性肿瘤可能也对化疗有抗性。

[0225] 由于幸存的癌症干细胞可以恢复肿瘤并导致复发，所以，重要的是，抗癌症治疗应该包括针对CSCs的策略(参见WO 2011/116398和WO 2011/116399的图18)。这与为了防止蒲公英再生长而消除根源类似(即使已经割了草地表面的物质)。(Jones,R.J.,W.H.Matsui和B.D.Smith,Cancer stemcells:are we missing the target?J Natl Cancer Inst,2004.96(8):p.583-5)。通过选择性的靶向癌症干细胞，使得治疗患有侵入性肿瘤、不可切除的肿瘤和难治疗的或复发性的癌症的患者以及防止肿瘤转移和复发成为可能。研发靶向癌症干细胞的特定治疗可以提高癌症患者的存活率和生活质量，尤其是对于转移性癌症患者。开启这种未开发的潜力的关键是鉴定和验证对于癌症干细胞自我更新和存活的选择性

重要的途径。令人遗憾的是,虽然过去已经说明了癌症中潜在的致瘤性或胚胎和成体干细胞的自我更新的多种途径,但只确定和验证了癌症干细胞自我更新和存活的很少数途径。

[0226] 还有许多探究癌症干细胞的鉴定和分离的方法。主要使用的方法探讨CSCs排出药物的能力,或基于与癌症干细胞结合的表面标志物的表达。

[0227] 例如,由于CSCs对许多化学治疗剂有抗性,不令人惊讶的是,CSCs几乎普遍过表达药物外排泵,例如ABCG2(BCRP-1)(Ho,M.M.et al.,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;Wang,J.et al.,Identification of cancer stem cell-like side population cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line.Cancer Res,2007.67(8):p.3716-24;Haraguchi,N.et al.,Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system.Stem Cells,2006.24(3):p.506-13;Doyle,L.A.和D.D.Ross,Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP(ABCG2).Oncogene,2003.22(47):p.7340-58;Alvi,A.J.et al.,Functional and molecular characterization of mammary side population cells.Breast Cancer Res,2003.5(1):p.R1-8)及其它ATP结合盒(ABC)超家族成员(Frank,N.Y.et al.,ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma.Cancer Res,2005.65(10):p.4320-33;Schatton,T.et al.,Identification of cells initiating human melanomas.Nature,2008..451(7176):p.345-9)。相应地,最初用于富集造血和白血病干细胞的侧群(SP)技术还用于鉴定和分离CSCs。(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 U S A,2004.101(3):p.781-6)。首先由Goodell等人描述的这种技术利用了不同的ABC转运体依赖性荧光染料流出物,例如Hoechst 33342,确定并分离了富集了CSCs(enriched in CSCs)的细胞群(Doyle,L.A.和D.D.Ross,Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP(ABCG2).Oncogene,2003.22(47):p.7340-58;Goodell,M.A.et al.,Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo.J Exp Med,1996.183(4):p.1797-806)。具体地说,通过阻断含有维拉帕米的药物流来显示SP,此时染料不再能够被泵出SP。

[0228] 研究人员还集中在发现能够从大多数肿瘤中辨别出癌症干细胞的特定标志物方面。癌症干细胞最普遍表达的表面标志物包括CD44、CD133和CD166。(Collins,A.T.et al.,Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells.Cancer Res,2005..65(23):p.10946-51;Li,C.et al.,Identification of pancreatic cancer stem cells.Cancer Res,2007.67(3):p.1030-7;Ma,S.et al.,Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells.Gastroenterology,2007.132(7):p.2542-56;Prince,M.E.et al.,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;Ricci-Vitiani,L.et al.,Identification and expansion of human colon-cancer-

initiating cells.Nature,2007.445(7123):p.111-5;Singh,S.K.et al.,Identification of a cancer stem cell in human brain tumors.Cancer Res,2003.63(18):p.5821-8;Dalerba,P.et al.,Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells.Proc Natl Acad Sci U S A,2007.104(24):p.10158-63)。主要基于这些表面标志物的差异表达来分类的肿瘤细胞占到至今所描述的高度致瘤的CSCs的大部分。因此,对这些表面标志物很好地加以验证,以从癌细胞系和从大多数肿瘤组织中鉴定和分离癌症干细胞。

[0229] 最近的研究表明,存在具有可使肿瘤复发的排它性能力的癌症干细胞(CSCs)。这些CSCs存在于几乎所有肿瘤类型中,并且与持续恶性生长、癌症转移、复发和抗癌症药物性功能上相关。CSCs和其更加分化的子代似乎具有显著不同的生物特征。常规癌症药物筛选依赖于测定肿瘤块的数量,因此,对于特异性地作用于CSCs的药物来说,它们可能不是必然的选择。事实上,已经证明CSCs对标准化疗和放疗有抗性,并且在标准抗癌症治疗之后变得富集,这导致癌症难以治疗和复发。分离这些细胞的方法包括但不局限于:通过它们排出Hoechst 33342的能力进行鉴定,通过这些细胞表达的表面标志物,例如CD133、CD44、CD166等进行鉴定,和通过它们致瘤性能进行富集。癌症干细胞与肿瘤生成有关的证据阐明了靶向癌症干细胞的巨大的治疗机会。

[0230] 本文提供的数据(与近来CSC研究中的突破相结合)使得本发明提供了旨在抑制CSCs的一系列方法、旨在抑制CSCs和异种癌细胞二者的一系列方法和治疗特定具有CSCs的癌症或一般癌症的一系列方法。本发明还提供了相关的方法(例如,制备和筛选药物候选物的方法)、物质、组合物和试剂盒。该方法可以防止CSCs自我更新,这样就可以使它不再能够通过分裂为致瘤CSC细胞来补充它的数量。或者,该方法可以诱导在CSCs中或在CSCs与异种癌细胞两者中的细胞死亡。

[0231] 这种方法可用于治疗受试者的癌症。作为这种治疗的良好候选者的癌症包括的癌症选自食管癌、胃食管结合部癌、胃食管结合部腺癌、软骨肉瘤、结直肠癌、结肠腺癌、直肠腺癌、结直肠腺癌、乳腺癌、卵巢癌、头颈癌、黑素瘤、胃腺癌和肾上腺类皮质激素癌。

[0232] 进一步的,由于已经证明CSCs根本上对肿瘤生成、癌症转移和癌症复发负责,所以,可以实施旨在抑制CSCs或CSCs与异种癌细胞两者的本发明的任何方法,用于治疗转移性的、化疗或放疗难以治疗的癌症,或者在受试者中初始治疗之后复发的癌症。

[0233] 在一些实施方案中,按照本发明的癌症干细胞抑制剂是:式1的化合物,化合物1,化合物1的多晶型物,2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图基本上与WO 2011/116398和WO 2011/116399的图1所列出的相似,2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图基本上与WO 2011/116398和WO 2011/116399的图2所列出的相似,2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰:至少在约10.2度2θ处的峰,至少在约11.9度2θ处的峰,至少在约14.1度2θ处的峰,至少在约14.5度2θ处的峰,至少在约17.3度2θ处的峰,至少在约22.2度2θ处的峰和至少在约28.1度2θ处的峰和其任何组合,2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图基本上与WO 2011/116398和WO 2011/116399的图3所列出的X射线衍射图相似,2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图包括两个或多个选自

下列的峰:至少在约7.5度2θ处的峰,至少在约9.9度2θ处的峰,至少在约12.3度2θ处的峰,至少在约15度2θ处的峰,至少在约23度2θ处的峰,至少在约23.3度2θ处的峰,至少在约24.6度2θ处的峰和至少在约28.4度2θ处的峰和其任何组合,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,磷酸单[1-(4,9-二氧代-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙烯基]酯,磷酸1-(4,9-二氧代-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙烯基酯二甲酯,其对映体、非对映体、互变异构体和盐或溶剂化物;式1化合物的多晶型物,化合物1,化合物1的多晶型物,2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图基本上与WO 2011/116398和WO 2011/116399的图1所列出的相似,2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图基本上与WO 2011/116398和WO 2011/116399的图2所列出的相似,2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰:至少在约10.2度2θ处的峰,至少在约11.9度2θ处的峰,至少在约14.1度2θ处的峰,至少在约14.5度2θ处的峰,至少在约17.3度2θ处的峰,至少在约22.2度2θ处的峰和至少在约28.1度2θ处的峰和其任何组合,2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图基本上与WO 2011/116398和WO 2011/116399的图3所列出的相似,2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰:至少在约7.5度2θ处的峰,至少在约9.9度2θ处的峰,至少在约12.3度2θ处的峰,至少在约15度2θ处的峰,至少在约23度2θ处的峰,至少在约23.3度2θ处的峰,至少在约24.6度2θ处的峰和至少在约28.4度2θ处的峰和其任何组合,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,磷酸单[1-(4,9-二氧代-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙烯基]酯,磷酸1-(4,9-二氧代-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙烯基酯二甲酯,其对映体、非对映体、互变异构体和盐或溶剂化物;或基本上纯形式的式1化合物,化合物1,化合物1的多晶型物,2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图基本上与WO 2011/116398和WO 2011/116399的图1所列出的相似,2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图基本上与WO 2011/116398和WO 2011/116399的图2所列出的相似,2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰:至少在约10.2度2θ处的峰,至少在约11.9度2θ处的峰,至少在约14.1度2θ处的峰,至少在约14.5度2θ处的峰,至少在约17.3度2θ处的峰,至少在约22.2度2θ处的峰和至少在约28.1度2θ处的峰和其任何组合,2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图基本上与WO 2011/116398和WO 2011/116399的图3所列出的相似,2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰:至少在约7.5度2θ处的峰,至少在约9.9度2θ处的峰,至少在约12.3度2θ处的峰,至少在约15度2θ处的峰,至少在约23度2θ处的峰,至少在约23.3度2θ处的峰,至少在约24.6度2θ处的峰和至少在约28.4度2θ处的峰和其任何组合,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,磷酸单[1-(4,9-二氧代-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙烯基]酯,磷酸1-(4,9-二氧代-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙烯基酯二甲酯,其对映体、非对映体、互变异构体和盐或溶剂化物;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、磷酸单[1-(4,9-二氧代-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙烯基]酯、磷酸1-(4,9-二氧代-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙烯基酯二甲酯、其对映体、非对映体、互变异构体和盐或溶剂化物的颗粒形式(本文还称为“本发明的化合物”)。

[0234] 本发明提供了鉴定能够抑制癌症干细胞的药物候选物的方法。在一些实施方案中,药物候选物能够在CSC中诱导细胞死亡或至少抑制其自我更新。在进一步实施方案中,药物候选物能够在CSC中诱导细胞死亡或至少抑制其自我更新,并且在异种癌细胞中诱导细胞死亡。对于筛选药物候选物,可以靶向该途径的各个阶段。

[0235] 相应地,在另一个方面,本发明的化合物可用于配制治疗或预防病症或病症的药物组合物。在一些实施方案中,癌症选自食管癌、胃食管结合部癌、胃食管结合部腺癌、软骨肉瘤、结直肠癌、结肠腺癌、直肠腺癌、结直肠腺癌、乳腺癌、卵巢癌、头颈癌、黑素瘤、胃腺癌和肾上腺类皮质激素癌。

[0236] 相应地,在一个方面,本发明提供了抑制癌症干细胞的方法,在这种方法中,给细胞施用有效量的本发明的化合物。已知具有CSCs的癌症是这种治疗的良好候选者,并且包括但不局限于:癌症选自食管癌、胃食管结合部癌、胃食管结合部腺癌、软骨肉瘤、结直肠癌、结肠腺癌、直肠腺癌、结直肠腺癌、乳腺癌、卵巢癌、头颈癌、黑素瘤、胃腺癌和肾上腺类皮质激素癌。

[0237] 进一步的,由于已经证明CSCs根本上负责肿瘤生成、癌症转移和癌症复发,所以,可以实践旨在抑制CSCs的本发明的任何方法,用于治疗转移性的、化疗或放疗难以治疗的癌症,或者初始治疗患者之后复发的癌症。

[0238] 在该方法的一些实施方案中,治疗的癌症选自下列:食管癌、胃食管结合部癌、胃食管结合部腺癌、软骨肉瘤、结直肠癌、结肠腺癌、直肠腺癌、结直肠腺癌、乳腺癌、卵巢癌、头颈癌、黑素瘤、胃腺癌和肾上腺类皮质激素癌。癌症可能涉及异常STAT3、Nanog和/或β-catenin通路。

[0239] 在一方面,本发明提供了治疗患者癌症的方法,在该方法中,给患者施用治疗有效量的包含本发明化合物的药物组合物。癌症可以是转移性的、难治疗的或复发性的。患者可以是哺乳动物,例如,人。

[0240] 对于下列病症,可以通过给患有赘生物的受试者(患者)施用例如按照式I化合物的颗粒来治疗。赘生物可以是通过化疗、放疗和/或激素治疗难以治疗的。赘生物可以是不能用手术切除的。赘生物可以在受试者(患者)中已经复发。癌症干细胞与赘生物的复发有关;利用按照本发明的方法来杀死癌症干细胞或抑制它们的自我更新可以防止赘生物本身重新产生。通过施用萘并呋喃颗粒来进行治疗,可以减缓或终止赘生物体积生长,或通过例如诱导赘生性细胞的死亡、抑制其生长和/或分裂和/或选择性地杀死赘生性细胞,可以减小赘生物的体积。例如,按照本发明的治疗可以诱导赘生性细胞的细胞死亡。例如,该治疗

可以起到抑制赘生性细胞的STAT3、Nanog和/或β-catenin通路的作用。

[0241] 通过给患有赘生物的受试者(患者)施用例如本发明化合物的颗粒来进行治疗,可用以防止赘生物的复发和/或作为手术切除的辅助治疗。

[0242] 可以口服施用包含例如本发明化合物的颗粒的药物组合物,因为这是方便的治疗形式。例如,可以口服施用药物组合物,每天不超过四次。或者,可以静脉内或腹膜内施用药物组合物。

[0243] 使用推定的生物标志物进行患者筛选

[0244] 基于可以将磷酸化STAT3(p-STAT3)阳性和细胞核中表达β-catenin同时(单独或组合)用作对使用本发明的化合物有更高治疗有效的可能性的预测性生物标志物的发现(参见实施例9和10),本发明提供了筛选推荐包含本发明化合物的癌症治疗的患者的方法。我们的数据表明了治疗之前肿瘤组织中的p-STAT3水平与使用本发明化合物的存活或治疗成功机会间直接相关。换言之,治疗之前在癌症患者中发现的p-STAT3水平越高(至少在结肠直肠癌(CRC)患者中),使用本发明的化合物和相关组合物进行治疗的总存活率(OS)越高(图3B)。相应地,本发明提供了在选定患者群体中治疗癌症或筛选潜在癌症治疗患者的方法,方法包含以下步骤:测定在从被诊断为癌症(例如,结直肠腺癌)的患者候选人获得的生物样本(例如,治疗前肿瘤组织)中磷酸化STAT3(p-STAT3)的水平;确定患者候选人的p-STAT3水平高于基准水平;和给患者候选人施用治疗有效量的本发明的化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物或前药。基准水平对不同人口群体可能不同,可以由熟练的技术人员通过常规实验确定。

[0245] 相似地,因为我们的数据表明了在细胞核中β-catenin(与STAT3密切相关的癌基因)的表达水平或定位与使用本发明化合物的存活或治疗成功机会间直接相关。换言之,β-catenin在在癌症患者中的癌细胞核中而不是细胞膜中的表达水平越高(至少在CRC患者中),总存活率(OS)越高。相应地,本发明提供了在选定患者群体中治疗癌症或筛选潜在癌症治疗患者的方法,方法包含以下步骤:检测在从被诊断为癌症的患者候选人获得的生物样本(例如,治疗前肿瘤组织)中β-catenin的表达定位;确定在该患者候选人的样本中的细胞核中检测到显著的β-catenin表达;和给患者候选人施用治疗有效量的本发明的化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物或前药。认为临床上显著的β-catenin核表达水平对不同人口群体可能不同,可以由熟练的技术人员通过常规实验确定。

[0246] 本发明还提供了通过检测一种或多种与癌症干性相关的生物标志物的表达来鉴定或细化(例如,分类)适合治疗性施用本公开化合物的患者群体的试剂盒和/或方法。在本公开的方法和/或试剂盒中,在患者或患者的样本中检测一种或多种癌症干性标志物的表达水平,其中患者或样本具有与对照表达水平相比升高的一种或多种癌症干性标志物的水平,然后给患者施用治疗有效量的本公开的化合物。在一些这些方法的实施方案中,方法是体内方法。在一些这些方法的实施方案中,方法是原位方法。在一些这些方法的实施方案中,方法是离体方法。在一些这些方法的实施方案中,方法是体外方法。

[0247] 了解癌症干性标志物的临床相关性并识别其对本发明化合物的预测性反应在此通过选择将会最可能取得临床益处的患者用于辅助临床开发。在一些实施方案中,本文提供的方法使用一种或多种公知的癌症干性标志物,例如,p-STAT3和/或其他癌症干细胞相关蛋白(例如β-catenin和NANOG)的表达。所有这些蛋白可使用多种本领域公认的技术的任

一种容易地检测。在一些实施方案中，癌症干性标志物用抗体采用免疫组织化学法检测。使用从使用本发明的化合物的I期临床试验采集的入库组织样本，基于生物标志物状态分析患者对本发明化合物的反应。对用本发明化合物治疗的CRC患者的分析证明了具有高水平p-STAT3或NANOG的患者与具有低或阴性水平p-STAT3或NANOG的患者相比增加的存活率的趋势。检测到了具有细胞核β-Catenin定位的患者与具有细胞膜β-Catenin定位的患者相比显著提高的存活率，HR＝0.043，p value<0.001。进一步的证据，在筛选癌细胞组的体外研究中，具有β-Catenin的细胞系显示了对于本发明的化合物更低的IC_{50}。另外，通过本发明的化合物抑制STAT3在体外癌细胞系中和在人CRC移植瘤小鼠模型中均降低了β-catenin蛋白水平。因此，STAT3活化参与核β-catenin调控。此外，β-catenin状态是预测CRC患者对本发明化合物反应的生物标志物。

[0248] 在上述治疗方法的不同实施方案中，癌症可能是下列之一：食管癌、胃食管结合部癌、胃食管结合部腺癌、软骨肉瘤、结直肠癌、结肠腺癌、直肠腺癌、结直肠腺癌、乳腺癌、卵巢癌、头颈癌、黑素瘤、胃腺癌和肾上腺类皮质激素癌。癌症可能是难治疗的、复发性的或转移性的。

[0249] 给药方案、剂量和间隔

[0250] 在按照本发明的方法中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量可以是在下列范围内的总的日剂量：约20mg至约2000mg，约100mg至约1500mg，约160mg至约1400mg，或约180mg至1200mg。在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量是在下列范围内的总的日剂量：约200mg至约1500mg，或约360mg至1200mg。在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量是在下列范围内的总的日剂量：约400mg至约1000mg。在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量是约1000mg的总的日剂量。

[0251] 每个剂量间的间隔可以变化或保持不变，依据如组合物的药物动力学、摄入或不摄入液体或食物的药物代谢、耐受性和其他药物依从性因素(例如，方便性)等因素。优选的间隔维持在体内有效水平的药物组合物，而引起极小的不良副作用。在一些实施方案中，每个剂量间的间隔从约4小时到约24小时的范围变化。在一些实施方案中，每个剂量间的间隔从约8小时到约14小时的范围变化。在一些实施方案中，每个剂量间的间隔从约10小时到约13小时的范围变化，或，约12小时。相应地在那些实施方案中，化合物约每日两次给受试者施用，例如，平均方案的持续时间。

[0252] 在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量为从约160mg到约960mg或约1000mg的范围的总日剂量。在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量为选自约160mg，约320mg，约640mg，约800mg和约960mg的总日剂量。在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量以以约960mg的总日剂量给受试者施用。

[0253] 在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量每日两次施用。在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量以从约80mg BID到约480mg BID的范围的剂量

给受试者施用。在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量以选自约80mg BID，约160mg BID，约320mg BID，约400mg BID和约480mg BID的剂量给受试者施用。在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量以约480mg BID的剂量给受试者施用。

[0254] 在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量每日两次施用，其中化合物的给药间隔在约4小时至约16小时的范围内。在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量每日两次施用，其中化合物的给药间隔为至少4小时、至少5小时、至少6小时、至少7小时、至少8小时、至少9小时、至少10小时、至少11小时、至少12小时、至少13小时、至少14小时、至少15小时和/或至少16小时。在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量以从约80mg BID至约480mg BID的剂量给受试者施用，其中化合物的给药间隔在约4小时至约16小时的范围内。在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量每日两次施用，其中化合物的给药间隔为至少4小时、至少5小时、至少6小时、至少7小时、至少8小时、至少9小时、至少10小时、至少11小时、至少12小时、至少13小时、至少14小时、至少15小时和/或至少16小时。在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量以选自约80mg BID、约160mg BID、约320mg BID、约400mg BID和约480mg BID的剂量给受试者施用，其中化合物的给药间隔在约4小时至约16小时的范围内。在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量每日两次施用，其中化合物的给药间隔为至少4小时、至少5小时、至少6小时、至少7小时、至少8小时、至少9小时、至少10小时、至少11小时、至少12小时、至少13小时、至少14小时、至少15小时和/或至少16小时。在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量以约480mg BID的剂量给受试者施用，其中化合物的给药间隔在约4小时至约16小时的范围内。在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量以约80mg BID的剂量给受试者施用，其中化合物的给药间隔在约4小时至约16小时的范围内。在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量以约400mg BID的剂量给受试者施用，其中化合物的给药间隔在约4小时至约16小时的范围内。在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量以约320mg BID的剂量给受试者施用，其中化合物的给药间隔在约4小时至约16小时的范围内。在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量每日两次施用，其中化合物的给药间隔为至少4小时、至少5小时、至少6小时、至少7小时、至少8小时、至少9小时、至少10小时、至少11小时、至少12小时、至少13小时、至少14小时、至少15小时和/或至少16小时。

[0255] 在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量以约480mg BID的剂量给受试者施用，其中化合物的给药间隔为约12小时。在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量以约80mg BID的剂量给受试者施用，其中化合物的给药间隔为约12小时。在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗

有效量以约400mg BID的剂量给受试者施用,其中化合物的给药间隔为约12小时。在一些实施方案中,包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量以约320mg BID的剂量给受试者施用,其中化合物的给药间隔为约12小时。

[0256] 本发明的化合物或其药物组合物可以通过任何一种途径或通过组合途径给药,例如,口服、静脉内或腹膜内。例如,在一些实施方案中,口服施用本发明的化合物。在一些实施方案中,可以利用包括月桂酰聚氧甘油酯(例如Gelucire)和吐温80的制剂或包括月桂酰聚氧甘油酯(例如Gelucire)、亚油酯酰聚氧甘油酯(如Labrafil)和表面活性剂(例如月桂基硫酸钠(SLS)或十二烷基硫酸钠(SDS))的制剂口服施用本发明的化合物。

[0257] 本发明化合物的施用剂量应该能够在受试者(例如,患者)中获得至少约0.002μM至约30μM的化合物的血液浓度,保持时间至少2小时至不超过24小时。在一些实施方案中,本发明化合物的施用剂量应该能够在受试者中获得至少约0.2μM至约1μM的化合物的血液浓度,保持时间至少2小时至不超过24小时。等于或高于约0.2μM,0.5μM,1.0μM,1.5μM,2.0μM,2.5μM,3.0μM,4.0μM,5.0μM,6.0μM,7.0μM,8.0μM,9.0μM,10.0μM,15.0μM,保持至少2小时,并且少于24小时。在一些实施方案中,本发明化合物的施用剂量应该能够在受试者中获得等于或高于约1.0μM、1.5μM、2.0μM、3.0μM、5.0μM、10.0μM、15.0μM的化合物的血液浓度,保持时间至少2小时,并且少于24小时。在一些实施方案中,本发明化合物的施用剂量应该能够在受试者中获得等于或高于约2.0μM、3.0μM、5.0μM、10.0μM的化合物的血液浓度,保持时间至少2小时,并且少于24小时。在一些实施方案中,本发明化合物的施用剂量应该能够在受试者中获得等于或高于约3.0μM或5.0μM的化合物的血液浓度,保持时间至少2小时,并且少于24小时。

[0258] 本发明化合物的施用剂量应该能够在24小时中使受试者(例如,患者)获得至少约0.002μM.h至约300μM.h的化合物的血液浓度。在一些实施方案中,本发明化合物的施用剂量应该能够在受试者中、在24小时内获得等于或高于约0.2μM、0.5μM、1.0μM、1.5μM、2.0μM、2.5μM、3.0μM、4.0μM、5.0μM、6.0μM、7.0μM、8.0μM、9.0μM、10.0μM、15.0μM的曲线下的面积(AUC24),保持时间至少2小时,并且少于24小时。在一些实施方案中,本发明化合物的施用剂量应该能够在受试者中获得等于或高于约1.0μM、1.5μM、2.0μM、3.0μM、5.0μM、10.0μM、15.0μM的化合物的血液浓度,保持时间至少2小时,并且少于24小时。在一些实施方案中,本发明化合物的施用剂量应该能够在受试者中获得等于或高于约2.0μM、3.0μM、5.0μM、10.0μM的化合物的血液浓度,保持时间至少2小时,并且少于24小时。在一些实施方案中,本发明化合物的施用剂量应该能够在患者中获得等于或高于约3.0μM或5.0μM的化合物的血液浓度,保持时间至少2小时,并且少于24小时。在一些实施方案中,本发明化合物的施用剂量应该能够在受试者中、在24小时内获得等于或高于约2μM*hr、10μM*hr、20μM*hr、30μM*hr、40μM*hr、50μM*hr、60μM*hr、70μM*hr、80μM*hr、90μM*hr、100μM*hr、125μM*hr、150μM*hr、200μM*hr、250μM*hr、300μM*hr、400μM*hr和500μM*hr的曲线下的面积(AUC_{0-24hr})。

[0259] 如果受试者(患者)的病症需要的话,可以以持续或脉动输液形式施用药物组合物的剂量。治疗时间可以是几十年、几年、几个月、几周或几天,只要持续获益即可。提供的上述范围只是作为指导原则,并使其最佳化。

[0260] 在按照本发明的方法中,通过施用药物组合物,使得化合物的血液摩尔浓度至少为有效浓度,并且小于第一个连续时间周期的有害浓度,这种连续时间周期应该至少与有

效时间周期一样长，并且短于有害时间周期，由此可以选择性地杀死瘤的细胞。第一个连续时间周期之后，血液摩尔浓度可以小于有效浓度。有效浓度可以是足够高的浓度，使得肿瘤细胞(例如，癌细胞)被杀死。有效时间周期可以足够长，使得肿瘤细胞(例如，癌细胞)被杀死。有害浓度可以是正常细胞受到损伤或被杀死时的浓度。有害时间周期可以是正常细胞受到损伤或被杀死的足够长的时间周期。例如，有效浓度可以等于高于约0.02μM，约0.05μM，约0.1μM，约0.2μM，约0.5μM，约1μM，约3μM，约10μM或约20μM。例如，无害浓度可以等于或低于约3μM，约10μM，约14μM，约30μM或约100μM。例如，有效时间周期可以等于或高于约2小时，约4小时，约6小时，约12小时，约24小时或约48小时。例如，为了达到正常细胞的无害暴露，化合物1的药物浓度必须在约12小时、约24小时之内基本上从血液中廓清。“基本上从血液中廓清”是指血液药物浓度降低至少约50％、至少约60％、至少约80％、至少约90％。例如，当施用一段时间的化合物时，有效浓度可以是超过癌细胞的IC_{50}值的浓度。例如，当至少以有效浓度施用化合物时，有效时间周期可以是经过这一周期癌细胞受到选择性抑制或被杀死时的时间周期。例如有害浓度可以是，当以任何时间周期施用化合物时，超过正常细胞的IC_{50}值的浓度。例如，当以有效浓度施用化合物时，有害时间周期可以是经过这一周期正常细胞以及癌细胞受到抑制或被杀死时的时间周期。

[0261] 本领域技术人员可以通过选择剂量和频率(以便达到本文所描述的、认为选择性杀死肿瘤细胞(例如癌细胞)并且保留(sparing)正常细胞所必需的“选择性药物动力学特性”(SPP))，施用药物组合物。对SPP的这种考虑还可以指导药物组合物的设计，例如，颗粒的粒径分布和形状分布。

[0262] 在按照本发明的方法中，用下列剂型口服施用药物组合物：例如，片剂，丸剂，胶囊剂(硬或软胶囊)，胶囊片，粉剂，颗粒剂，混悬剂，溶液剂，凝胶，扁囊剂，锭剂，糖锭，糖浆剂，酏剂，乳剂，水包油型乳剂，油包水型乳剂或吸饮剂。

[0263] 鉴定最佳粒径分布

[0264] 在按照本发明的方法中，可以如下测定用于治疗患有赘生物的人、哺乳动物或动物的按照式I化合物、化合物1、化合物1的多晶型物和/或基本上纯形式的化合物1的最佳粒径分布。可以制备至少一组包括化合物的颗粒。在制备该颗粒组的过程中，例如，固体化合物样品的粒径可以利用下列方法减小：例如，将化合物溶解并使溶液雾化，将化合物溶解并将溶液超声处理，将固体化合物球磨，辊轧固体化合物，研磨固体化合物和/或筛分固体化合物。可以利用本领域技术人员已知的方法或组合方法来测定至少一组颗粒的粒径分布。例如，可以使用下列技术来测定粒径分布：例如，筛分分析，光学显微计数，电子显微照片统计，电阻统计，沉降时间，激光衍射，声谱，其它技术或组合技术。可以以预定浓度给肿瘤细胞和正常细胞施用至少一组颗粒，并且施用预定的一段时间。可以观察颗粒对肿瘤细胞和正常细胞的代谢、分裂和/或其它生命指标的效果。观察到的颗粒对肿瘤细胞的效果可用于确定每组颗粒的有效性评级。例如，抑制肿瘤细胞的代谢和/或分裂、损伤或杀死肿瘤细胞或者另外显示高的抗肿瘤活性的颗粒组，可以认为其有效性评级高。观察到的颗粒对正常细胞的效果可用于确定每组颗粒的毒性评级。例如，抑制正常细胞的代谢和/或分裂、损伤或杀死正常细胞或者正常细胞对颗粒组另外显示低耐受性的颗粒组，可以认为其毒性评级高。

[0265] 例如，可以将颗粒组体外给细胞和正常细胞施用。例如，有效性评级可以等于赘生

性细胞的IC_{50}值、与其成正比或是其的单调递增函数。例如，毒性评级可以等于正常细胞的IC_{50}值、与其成正比或是其的单调递增函数。

[0266] 例如，可以将颗粒组在试验动物体内给赘生性细胞和正常细胞施用。例如，试验动物可以是哺乳动物，灵长类动物，小鼠，大鼠，豚鼠，兔或狗。例如，有效性评级可以等于施用颗粒组之后的赘生性细胞体积的减小、与其成正比或是其的单调递增函数。例如，毒性评级可以等于施用颗粒组之后的试验动物质量的降低、与其成正比或是其的单调递增函数。例如，可以在临床研究中给人施用颗粒组。治疗肿瘤的方法可以包括：给患有肿瘤的人、哺乳动物或动物施用治疗有效量的按照式I化合物、化合物1、化合物1的多晶型物和/或基本上纯形式的化合物1的颗粒组。在体外给动物或人或细胞施用化合物、按照式I的化合物、化合物1、化合物1的多晶型物和/或基本上纯形式的化合物1的颗粒之前，可以将颗粒悬浮在可药用赋形剂中。

[0267] 可以将具有第一个粒径分布的每组颗粒的有效性评级和/或毒性评级与具有不同于第一个粒径分布的粒径分布的其它颗粒组的有效性评级和/或毒性评级进行比较。具有高有效性评级和低毒性评级的化合物的颗粒组可以有效抑制或杀死肿瘤细胞，例如癌症，但保留(sparing)正常细胞。本领域技术人员可以选择最佳颗粒组，这种最佳颗粒组的有效性评级大于、毒性评级小于和/或加权有效性评级和毒性评级的和大于至少一个其它颗粒组(例如，有效性评级可以用正系数加权，毒性评级可以用负系数加权)。本领域技术人员还可以使用其它标准来选择最佳颗粒组，例如，具有加权有效性评级之和以及具有相对于毒性评级的加权有效性评级比率的颗粒。可以认为最佳颗粒组的粒径分布为试验化合物的最佳粒径分布。一个化合物(例如，化合物1)与另一个化合物(例如，按照式I的化合物，其不是化合物1)可以具有不同的最佳粒径分布。当通过体外给细胞、小型试验动物和大型试验动物施用指定化合物来测定最佳粒径分布时，指定化合物的最佳粒径分布可以不同。然而，通过体外或体内给有机体施用指定化合物所测定的最佳粒径分布，可以代表另一个化合物或给另一个有机体施用的最佳粒径分布的合理起点。

[0268] 按照式I的化合物、化合物1、化合物1的多晶型物和/或基本上纯形式的化合物1的最佳颗粒组可以包括在组合物中，以减少或抑制赘生性细胞的复制或扩散。

实施例

[0269] 提供下列实施例，进一步说明本发明的不同特征。该实施例还说明了实践本发明所使用的方法。这些实施例不限制所要求保护的发明。

[0270] 实施例1：制备萘并呋喃化合物

[0271] 萘并呋喃化合物(2-乙酰基萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮)的制备方法概括如下：

[0272] 步骤1：溴化

[0273] 向配备有机械搅拌器、温度计和加入漏斗的2升3颈圆底烧瓶中加入3-丁烯-2-酮(451.2克)。向加入漏斗中加入溴(936.0克)。将烧瓶中的内含物冷却至-5℃之后，将溴滴入烧瓶中，同时强烈搅拌，并将温度在-5℃下保持30分钟。将该混合物在-5℃额外搅拌15分钟，而后分成4个等份。

[0274] 步骤2：脱溴

[0275] 将每份混合物以及四氢呋喃(2133.6克)一起加入到22升4颈圆底烧瓶中，圆底烧

瓶配备有机械搅拌器、温度计和加入漏斗。向加入漏斗中加入DBU(1,3-二氮杂双环[5.4.0]十一-7-烯,222.9克)。将DBU滴入烧瓶中,同时强烈搅拌,并将温度在0℃-5℃保持30分钟。在0℃-5℃,将该混合物额外搅拌15分钟。

[0276] 步骤3:偶合反应

[0277] 然后将2-羟基-1,4-萘醌(231克)加入到烧瓶中。将额外的DBU(246.0克)加入到加入漏斗中,而后滴入到烧瓶中的混合物中,滴入速度应该使反应混合物的温度不超过40℃。完全加入DBU之后,将得到的混合物在室温下搅拌过夜,并获取反应混合物的样品进行HPLC分析。

[0278] 步骤4:结晶

[0279] 向该反应混合物中加入水(10.8升),并将得到的混合物冷却至0℃-3℃,保持至少30分钟,而后通过真空过滤器过滤。用5%碳酸氢钠水溶液(3升)、水(3升)、1%乙酸水溶液(3升)和乙醇(2X1升,两次)依次冲洗过滤的固体。

[0280] 将冲洗的固体保存,与其它批料收集在一起。将合并的粗品(28.73kg)以及乙酸乙酯(811.7kg)加入到配备有机械搅拌器、温度计和冷凝器的500加仑容器中。在氮气氛围中,将该混合物加热至回流(72℃),保持2小时,而后用含有活性炭层的10微米过滤筒过滤,除去不溶性物质。

[0281] 将新的热乙酸乙酯(10kg)用于冲洗容器、传输管线和过滤器。将合并的滤液冷却至0-5℃,并在此温度下保持2小时,而后用20英寸Buchner过滤器进行过滤。将过滤的固体产物用0-5℃的乙酸乙酯(5.7kg)冲洗,在40℃真空干燥至恒重。将剩余的滤液蒸发,使体积减少63%,并再次重复结晶过程,产生第二批产物,也将其在与第一批产物相同的条件下干燥。

[0282] 按照该方法获得一批(a lot of)萘并呋喃化合物。该批化合物的纯度是95.44%面积(HPLC)。

[0283] 实施例2:制备萘并呋喃化合物

[0284] 萘并呋喃化合物(2-乙酰基萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮)的另一个制备方法概括如下:

[0285] 步骤1:溴化

[0286] 向12升RBF(圆底烧瓶)(用紫外线滤光镜避光保护)中加入MVK(2,160ml,26.4mol),并在干冰/丙酮浴中冷却至-9.6℃。用2小时20分钟慢慢地加入溴(1,300ml,25.3mol),保持T＝<-2.6℃($T_{最大}$)。将得到的黄色混合物额外搅拌28分钟。

[0287] 步骤2:脱溴化氢

[0288] 向含有预先冷却的THF(四氢呋喃)(20升)的72升RBF中加入上述溴化产物,并将得到的溶液冷却至-4.8℃。用2小时20分钟慢慢地加入DBU(4,200ml,28.1mol)(溶于THF(4,200ml)中),保持T<0.3℃($T_{最大}$)。将得到的悬浮液搅拌42分钟。

[0289] 步骤3:偶合

[0290] 在-1.8℃,将一份2-羟基-1,4-萘醌(4,003g,23.0mol)加入到上述反应混合物中。放到冷却浴中,同时用48分钟加入第二份DBU(3,780ml,25.3mol),将反应温度调到40℃。除去冷却浴,并将该反应混合物搅拌度过周末(对空气开放)。

[0291] 步骤4:分离粗品

[0292] 向含有预先冷却的水(100升,25ml/g HNQ)的200升反应器中加入上述反应混合物。将得到的悬浮液冷却至6.0℃,而后在T＝3±3℃下搅拌～1小时。然后将得到的悬浮液过滤,并将收集的固体转移回到200升反应器中。

[0293] 在5％$NaHCO_3$水溶液(26升,6.5ml/g HNQ)中搅拌1小时之后,将该悬浮液过滤。将收集的固体转移回到200升反应器中,在水(26升)中搅拌1小时,而后过滤。

[0294] 将湿润的固体转移回到200升反应器中,在1％乙酸水溶液(26升)中搅拌～1小时,过滤,而后在过滤漏斗上用水(10升)洗涤。将收集的固体转移回到200升反应器中,在乙醇(17.5升;4.3ml/g HNQ)中加热至轻微回流(77.4℃)。将得到的悬浮液冷却至4.2℃,过滤。

[0295] 将湿润的固体转入100升反应器中,在乙醇(17.5升;4.3ml/g HNQ)中加热至回流(77.6℃)。将得到的悬浮液冷却至4.5℃,过滤。将湿滤饼过夜除去液体。获取^{1}H NMR和HPLC样品。^{1}H NMR:化合物1/NDHF(2-乙酰基-2,3-二氢萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮)42:58％;HPLC:化合物1/NDHF 74:11面积％。

[0296] 将固体在真空烘箱中、在50℃干燥4天,得到2,268g粗品化合物1。^{1}H NMR:化合物1/NDHF 41:59％;HPLC:化合物1/NDHF 67:11面积％。

[0297] 步骤5:萘并二氢呋喃的氧化

[0298] 使粗品化合物1(2.268kg)在甲苯(77升)中形成浆液。加入MnO_2(9536g),并将该混合物加热至轻微回流。1小时之后,TLC(1:1EA:己烷)显示反应完成。

[0299] 然后,将该反应混合物趁热通过硅藻土(1530g,底层)、活性炭(2230g,中间层)和硅藻土(932g,表层)的预热垫过滤。收集橙黄色滤液。

[0300] 将滤液在旋转蒸发器上浓缩至约1/10体积。将浆液过滤,并用甲苯洗涤。然后将晶体在50℃干燥,得到952g(42％)暗黄色固体。HPLC:99.94％。^{1}H NMR显示没有萘并二氢呋喃。

[0301] 将晶体在50℃、在真空条件下额外干燥46-65小时,从而减少该物质中的残余甲苯的数量。

[0302] 步骤6:乙酸乙酯处理

[0303] 将化合物1(5816g)加入到200升反应容器中。加入乙酸乙酯(145升,25ml/g),并将该溶液用2小时26分钟加热至回流。使回流保持5小时30分钟,然后将该混合物冷却,并过夜保持至17℃。

[0304] 将该浆液在聚乙烯玻璃料上过滤。将黄色晶体空气干燥,然后放入盘中,在真空烘箱中保持75小时,得到5532g(95.1％产率)黄色固体。HPLC:99.86％。^{1}H NMR与化合物1的结构相符。

[0305] 步骤7:乙酸乙酯重结晶

[0306] 向2升RBF中加入粗品(10g)和乙酸乙酯(900ml)。将该混合物在～77℃回流,而后加入更多的乙酸乙酯(100ml),达到完全溶解。将得到的清澈的浅黄色溶液回流搅拌～30分钟,而后取消加热。将该混合物在室温下搅拌过夜。

[0307] 将得到的悬浮液过滤,并将收集的黄色固体在漏斗上用乙酸乙酯(30ml)冲洗。将湿润固体在真空烘箱中、在40-50℃干燥4小时,获得8.53g黄色晶体产物(总产率～17％)。

[0308] ^{1}H NMR:与结构一致;HPLC:99.94面积％;DSC:228.68℃,151J/g。

[0309] 实施例3:萘并呋喃化合物的微粉化

[0310] 例如,研磨化合物1晶体,并使其通过160微米(μm)筛(筛#100,150μm筛孔),产生约160微米或更小的晶体。

[0311] 例如,研磨化合物1晶体(Retsch超离心研磨机ZM 200;单程,18,000rpm,使用0.25mm筛网),达到约20微米的中值粒径。表3提供了所得到的粒径分布(Malvern 2000,带有Hydro 2000S湿润辅助设备)。纵行提供了颗粒的总累积百分数的最大粒径,在纵行标题的角注中提供。例如,纵行D_{90}表示90%的颗粒等于该粒径,或具有更小的粒径。纵行D_{50}表示中值粒径:一半颗粒具有更大的粒径,一半颗粒具有相等或更小的粒径。

[0312] 表3.研磨的化合物1的粒径分布。

[0313]

	粒径(微米)		
	D_{90}	D_{50}	D_{10}
样品 B	48.9	20.2	2.3

[0314] 例如,使用喷射研磨方法(4"喷射碾机,喷射管压力=40,研磨压力=100,进料速度=1304g/小时)将化合物1晶体微粉化,达到约2微米的中值粒径,如表4所提供的数据。使用干燥颗粒方法(Sympatec Helos/KF粒度分析器)进行粒径分析。

[0315] 表4.微粉化的化合物1的粒径分布。

[0316]

	粒径(微米)		
	D_{90}	D_{50}	D_{10}
样品 A	4.63	2.07	0.53

[0317] 得自于粒径分布的对数正态模式的累积分布函数很符合于表4所提供的数据。累积分布函数表示为

[0318] $$\mathrm{CDF(d)} = \frac{1}{2}\left(1 + \mathrm{erf}\left(\frac{\ln(d) - \ln(d_{中值})}{\sigma\sqrt{2}}\right)\right),$$

[0319] 其中erf是误差函数,d是粒径变量,$d_{中值}$是中值粒径,σ是与累积分布函数的宽度相关的参数。CDF(d)代表粒径小于或等于d的颗粒部分。将$d_{中值}$设定为观察到的2.07微米的中值,拟合该模型,得到σ=1.06的值。该模型显示了3.6微米的平均直径和0.67微米的众数直径。该模型还显示了2200m^2/kg的颗粒的比面积,不过这不考虑某些因素,例如表面粗糙度。

[0320] 实施例4:HPLC试验

[0321] 这种HPLC方法用于评价萘并呋喃的纯度,例如,2-乙酰基萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮(化合物1),并通过HPLC检测反应完成情况。所有的组分用色谱图中的全部峰的面积百分比来表示。

[0322] 1.装置和物质(表5A)

[0323]

装置	带有 UV 检测器和整合系统的 HPLC 系统
柱	Phenomenex Luna C18(2) 5-μm，4.6-mm x 250-mm (P/N 00G-4252-E0)或同等的柱
酸度计	使用当天进行校正
乙腈	HPLC 级
二甲亚砜(DMSO)	ACS 级或更好
磷酸	ACS 试剂
磷酸氢二钾	ACS 试剂
化合物 1	参考物质

[0324] 2.溶液制备

[0325] 10mM磷酸盐缓冲液

[0326] 称量1.74g磷酸氢二钾,并用1升净化水稀释(根据需要的数量调节重量和体积)。用磷酸将pH值调节至pH 6.8。

[0327] 流动相A

[0328] 制备流动相A:将10mM磷酸盐缓冲液和乙腈混合,缓冲液与乙腈的比例为80:20。脱气。

[0329] 流动相B

[0330] 制备流动相B:将10mM磷酸盐缓冲液和乙腈混合,缓冲液与乙腈的比例为20:80。脱气。

[0331] 稀释剂

[0332] 流动相A用作所有样品和标准制剂的稀释剂。

[0333] 3.标准制剂

[0334] 化合物1储备溶液标准(浓度≈1.0mg/ml)

[0335] 制备:将10mg化合物1参考物质称量到20mL闪烁管中;记录重量±0.01mg。加入10mL DMSO,并超声处理,直到固体溶解为止。

[0336] $$浓度=\frac{(参考标准重量，mg)\times 标准小数纯度}{(储备溶液的体积，mL)}$$

[0337] 储备溶液试验样品(浓度≈1.0mg/ml)

[0338] 制备试验溶液:将10mg样品称量到20mL闪烁管中,并用10mL DMSO稀释。

[0339] $$浓度=\frac{(样品重量，mg)}{(储备溶液的体积，mL)}$$

[0340] 工作试验样品(浓度≈0.01mg/ml)

[0341] 制备该溶液:将1mL转移到100mL容量瓶中,用稀释剂溶液稀释。

[0342] $$浓度=\frac{储备溶液试验样品浓度\times(转移的体积，mL)}{(工作溶液的体积，mL)}$$

[0343] 4.仪器操作条件(表5B)

[0344]

流速	0.8 mL/分
柱温	30℃
检测器波长	270 nm
注射体积	40 μL
梯度	0-5 分—0% B 至 0% B 5-19 分—0% B 至 90% B 19-24 分—90% B 至 90% B 24-29 分—90% B 至 0% B

[0345]

	注释：在 100% A 条件下，在注射之间有 5 分钟平衡时间
运行时间	29 分

[0346] 5.操作程序

[0347] 按以下顺序注射溶液：

[0348] 1.稀释剂空白(1X)

[0349] 2.化合物1工作标准(5X)

[0350] 3.试验溶液(每个2X)

[0351] 4.工作标准(每个1X)。

[0352] 6.系统适用性

[0353] 如果满足下列标准,适合使用该系统。

[0354] 1.在顺序开始时注射稀释剂空白,没有任何鉴定杂质的干扰峰

[0355] 2.开始的时候,5个重复注射的化合物1工作标准具有:(1)%$RSD_{峰面积}$<3.0%;(2)%$RSD_{保留时间}$<3.0%;和(3)平均拖尾因子<2.0。

[0356] 3.在同等标准(bracketed standard)的色谱中,(1)保留时间是从起始的适当注射开始的平均保留时间的97.0-103.0%,和(2)它的面积%是初始值的97.0-103.0%。

[0357] 7.计算

[0358] 所有的峰以色谱图中的全部峰的面积%形式报道,这可以利用组合软件通过下式来计算：

[0359] $$面积\% = \frac{峰的面积统计}{所有峰的总面积} \times 100$$

[0360] NMR和TLC

[0361] NMR(表5C)

[0362]

装置	Varian Inova 500 NMR 光谱仪
脉冲序列	S2pul
溶剂	CDC13
温度	25.0℃/298.1 K

[0363]

弛豫延迟	1.000 秒
脉冲	45.0 度
采集时间	2.732 秒
宽度	11992.2 Hz
	32 次重复
OBSERVE H1	499.7029706 MHz
FT 大小	65536
总时间	1 分, 50 秒

[0364] 硅胶TLC(表5D)

[0365]

洗脱液	乙酸乙酯:己烷,1:1
显影	UV
Rf_{401}	约0.7
Rf_{NDHF}	约0.6

[0366] 实施例5:制备粗品2-乙酰基萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮

[0367] 制备化合物1的另一个方法概括如下。

[0368] 在-20至-15℃,通过加入漏斗向甲基乙烯基酮(MVK,1.0当量)中加入溴(0.95当量),同时保持反应温度低于0℃。然后在-10至0℃将反应混合物额外搅拌2至3小时,而后加入四氢呋喃(6体积),冷却反应混合物到-20至-10℃。而后加入三乙胺(1.1当量)强烈搅拌,同时保持反应温度低于0℃。将得到的浆液在-15至-5℃搅拌至少10小时,然后温热到-5至5℃,过滤。而后通过过程(in-process)^{1}H NMR分析滤液,确定中间产物溴甲基乙烯基酮(BrMVK)的存在量(重量%),在-25至-10℃保存直至进一步使用。

[0369] 接着,向干净反应容器中的四氢呋喃(3.15体积)加入2-羟基-1,4-萘醌(1.0当量,相对于从过程(in-process)^{1}H NMR对BrMVK的计算量)。将得到的橙色浆液简单搅拌,而后加入1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一-7-烯(DBU,1.1当量),同时保持温度在或低于45℃。而后将反应混合物在40至45℃搅拌至少1小时,加热到50至55℃,通过加入漏斗加入BrMVK溶液,同时保持反应温度在50至60℃。而后将反应混合物在50至55℃搅拌约18小时,直至剩余2-羟基-1,4-萘醌少于5%。然后将反应混合物浓缩,与乙醇共蒸发两次,用乙醇/水(1:1)重结晶。将固体在35至45℃真空干燥。而后将粗制固体和活性炭G-60(100重量%)在乙腈中悬浮,在70至75℃加热2小时,过滤并用热乙腈洗涤。将滤液浓缩至1/3体积,冷却到0至5℃,过滤。而后将固体在45至50℃真空干燥。然后将粗制固体在乙酸乙酯中再成浆,回流6小时,冷却至室温,过滤,并用乙酸乙酯洗涤。然后将物质在45至50℃真空干燥,封装用于最终释放。

[0370] 实施例6:临床试验:安全性和有效性

[0371] 接到US FDA和Health Canada批准的IND之后,选择化合物2-乙酰基萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮进入一期临床试验,其是在患有晚期癌症(用标准治疗失败)的成年患者中进行的剂量递增研究。每一个循环包括:每天两次口服施用化合物,施用4周。每4周(28天)重复循环,直到满足疾病的发展、无法接受的毒性或其它停止标准为止。按照开放标记和多中心试验来进行剂量递增试验。改进的Simon加速滴定方案用于剂量递增。

[0372] 试验的主要目标是测定安全性、耐受性和推荐二期剂量(RP2D)。该试验的第二目标是测定化合物的药物动力学特性、化合物的药效和化合物的初期抗肿瘤活性。

[0373] 入组标准包括:组织学或细胞学确定的转移性的、不可切除的或复发性的实体瘤;≥18岁;RECIST可测量的疾病;Karnofsky≥70%。排除标准包括:在首次剂量前4周内进行化疗、放疗、免疫治疗或试验药剂;在首次剂量前4周内手术;和已知的脑转移。

[0374] 在上述标准下选择的患者的人口统计数据和基本疾病特征概括在表6中。

[0375] 表6.人口统计数据和基本疾病特征

[0376]

中位年龄,岁(范围)	58 (28-91)	**肿瘤类型,N (%)**	
性别,N (%)		结直肠癌	18 (44%)
男	30 (73%)	胃/胃食管结合部癌	3 (7%)
女	11 (27%)	非小细胞肺癌	3 (7%)
人种,N (%)		胰腺癌	3 (7%)
高加索人	34 (83%)	前列腺癌	3 (7%)
亚洲人	4 (10%)	头颈癌	2 (5%)
黑人	1 (2%)	黑素瘤	2 (5%)
其它/未知	2 (5%)	其它*	7 (17%)
预先治疗			
≥3	32 (78%)		

[0377]

2	5 (12%)
1	4 (10%)

[0378] 评价了那些剂量从20mg至2000mg/天的10组患者,。没有观察到剂量限制性毒性。最常见的不良事件是:腹泻、恶心和疲劳。3级或大于3级的状况包括:疲劳和腹泻。不良事件概括在表7中。

[0379] 表7.不良事件的概述

[0380]

器官系统	不良事件*	任何等级		3 级	
		#受试者	%	#受试者	%
消化	腹泻	30	73.2%	2	4.9%
	呕吐	20	48.8%	0	0.0%
	恶心	20	48.8%	0	0.0%
	腹部痉挛/腹痛	22	53.7%	0	0.0%
	厌食	14	34.1%	0	0.0%
	稀便/软便	8	19.5%	0	0.0%
	味觉异常	5	12.2%	0	0.0%
	反流	4	9.8%	0	0.0%
体质	疲劳	18	43.9%	1	2.4%
	虚弱	6	14.6%	0	0.0%
	体重减轻	5	12.2%	0	0.0%
泌尿	尿变色	10	24.4%	0	0.0%
代谢	脱水	3	7.3%	0	0.0%
神经	眩晕	5	12.2%	0	0.0%

[0381] *在10％或更多的试验受试者中观察到;不良事件用CTCAE v3.0分级在每天给药20mg的条件下,在患者的尿中惊奇地观察到高浓度的化合物。进一步地,我们检测在患者尿中的本发明化合物的抗肿瘤活性,发现化合物仍能有效的抗癌细胞。

[0382] 在给药的患者中,65％的可评价患者在原本化疗难治的各种肿瘤(包括结肠腺癌、头颈癌、乳腺癌、胃癌、卵巢癌、软骨肉瘤、肾上腺类皮质激素癌和黑素瘤)的肿瘤应答上观察到疾病控制(疾病稳定和肿瘤消退)。有一例患者结肠癌转移至肾脏的病变完全消退(患者0001)。用化合物1治疗的患者展现出极少的新的转移性的肿瘤病变。在24例可评价的患有晚期难治癌症的患者中,80％显示无转移性的肿瘤。

[0383] 登记的有活性迹象的患者概括在表8中。

[0384] 表8.有活性迹象的受试者概述

[0385]

总的日剂量（mg）	肿瘤类型	试验周数	最佳响应（RECIST 1.1）
20	结肠腺癌	76	SD（22%消退）
80	头颈癌	17	SD
320	结肠腺癌	24	SD
320	结肠腺癌	12	SD
400	胃腺癌	19	SD
400	卵巢癌	16	SD（CA125 标准化）
400	结肠腺癌	11	SD（CEA↓50%）
600	乳腺癌（三阴）	29	SD（剩下的病变出现凹穴，手术切除，患者无病）
800	软骨肉瘤	13	SD
800	肾上腺类皮质激素癌	17	SD
1000	直肠腺癌	16	SD
1000	结肠腺癌	16	SD
1400	黑素瘤	16	SD

[0386] 我们还发现，在使用抗p-STAT3抗体进行免疫组织化学治疗之前，在肿瘤组织中有高水平的p-STAT3，预示他们的肿瘤对化合物1有良好的响应。

[0387] 还研究了口服bid给药的药物动力学特性。如表9中所示，药物的血浆浓度达到有效浓度的几倍(体外IC_{50})。然而，药物浓度没有在高水平维持长久，很快降低到有效浓度之下。

[0388] 表9.不同剂量水平药物动力学概述

[0389]

总的日剂量	给药计划	$t_{最大}$ (h)	$C_{最大}$ (uM)	C_{24h} (uM)	AUC_{0-24} (uM·h)	$T_{1/2,z}$ (h)	AUC (uM·h)
20	qd	3.0	0.49	0.03	2.01	18.5	2.70
40	qd	0.5	0.50	0.03	3.44	4.5	3.62
80	qd	1.5	2.24	0.07	12.77	5.2	13.32
80	bid q4h	8.1	0.90	0.03	7.95	3.6	8.13
160	bid q4h	3.9	1.33	nd	nd	nd	nd

[0390]

320	bid q4h	3.8	2.92	0.24	33.12	5.7	38.26
400	bid q4h	7.9	3.75	0.62	40.25	6.9	48.17
600	bid q4h	3.2	2.67	0.42	27.76	9.0	37.15
800	bid q4h	4.3	3.04	0.16	26.06	4.0	27.00
1000	bid q4h	6.6	4.97	0.29	45.11	6.6	50.71
1000	bid q6h	5.7	1.36	0.33	15.84	12.7	22.90
1400	bid q4h	2.9	2.05	0.65	28.20	13.6	45.04
1500	tid q4h	7.3	3.75	0.94	46.43	8.2	59.85
2000	bid q4h	6.3	1.69	0.80	25.90	17.2	45.80

[0391] 为了使药物血浆浓度在或高于有效水平维持理想的时间，进一步增加峰值血浆浓度，我们研究了500mg BID方案(同一天的两个剂量之间间隔4小时，或“q4h”)的药物动力学，与500mg QD方案比较(图1)。令人惊奇的是，观察到两种给药方案之间的药物动力学无显著差异。之前预期，采用BID方案，由于同一天内与QD方案相比给药加倍，因此在患者血浆中的药物水平应展现出另一明显峰值。然而，在相同24小时期间内第一次给药后，两次q4h施用化合物1未能维持药物水平至理想时长。在另一合适的给药方案中，给人受试者施用500mg化合物1，每天三次(TID)。令人失望的是，与每天给药两次相比，每天给药三次并未显著提高患者对化合物1的暴露水平。

[0392] 实施例7:给药方案和新制剂

[0393] 包括本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量可以是在约160mg至约1000mg的范围内的总的日剂量，例如，约960mg。然而，为了达到有效剂量水平，临床研究面临着患者遭受药丸负担的挑战。为了克服药丸负担问题，解决使药物浓度在或高于最小有效水平维持理想时长的问题，在新制剂(DP2A)中设计了更高强度胶囊。

[0394] 然而，使用更高强度胶囊，我们在患者中发现恶化的胃肠道不良反应，包括恶心、呕吐和腹泻。当我们在另一项I期临床试验中研究血浆药物浓度和不良反应之间的关系时，部分概括在下列表10中，令我们惊奇的是，数据显示胃肠道不良事件的严重性似乎与血浆药物动力学参数没有关联，这是通常会怀疑的(见表10和11)。

[0395] 表10.药物动力学和观察到的不良事件的临床对比

[0396]

患者	血浆 PK 参数	AE 概述

[0397]

	（单一 500 mg 剂量-进食）	
0053	更高暴露（$C_{最大}$：6.61 uM；AUC_{0-24}：79.64 uM*hr）	500 mg bid q4h 没有显著胃肠道问题
0054	更高暴露（$C_{最大}$：6.25 uM；AUC_{0-24}：49.82 uM*hr）	500 mg bid q4h 没有显著胃肠道问题
0061	更低暴露（$C_{最大}$：1.54 uM；AUC_{0-24}：10.61 uM*hr）	500 mg bid q4h 开始不耐受 2 级疲劳、痉挛、腹泻和恶心，在 375 mg/250 mg/250 mg q4h 持续
0070	更低暴露（$C_{最大}$：2.25uM；AUC_{0-24}：20.09 uM*hr）	375 mg/250 mg/250 mg 3 级腹泻

[0398] 表11：试验中给药方案的不良事件概述

[0399]

		q4h 给药（N=17）				q12h 给药（N=11）			
器官系统	不良事件	1 或 2 级		3 级		1 或 2 级		3 级	
		#受试者	%	#受试者	%	#受试者	%	#受试者	%
消化	腹泻	14	82.4%	4	23.5%	7	63.6%	0	0.0%
	呕吐	7	41.2%	0	0.0%	1	9.1%	0	0.0%
	恶心	8	47.1%	1	5.9%	2	18.2%	0	0.0%
	腹部痉挛/腹痛	13	76.5%	1	5.9%	5	45.5%	0	0.0%
	腹胀	4	23.5%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%
	疲劳/虚弱	10	58.8%	3	17.6%	4	36.4%	1	9.1%
	厌食	10	58.8%	3	17.6%	1	9.1%	0	0.0%
	反流/胃灼热	1	5.9%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%
	味觉异常	1	5.9%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%
	口干燥	4	23.5%	0	0.0%	2	18.2%	0	0.0%
	直肠/肛门灼热	3	17.6%	0	0.0%	1	9.1%	0	0.0%
	肠胃气胀	2	11.8%	0	0.0%	2	18.2%	0	0.0%
体质	体重减轻	8	47.1%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%
泌尿	尿变色	2	11.8%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%
代谢	脱水	1	5.9%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%
	低磷血症	1	5.9%	1	5.9%	0	0.0%	0	0.0%
神经	抑郁	0	0.0%	0	0.0%	1	9.1%	0	0.0%

[0400] 在用尽传统的解决方案后，我们从对药物摄入方案的意外改变中得到突破。令人惊奇的是，我们已经发现，根据本发明的一些优选实施方案，剂量的摄入间隔被证明是同时延长药物暴露时间和减少胃肠道副作用的关键因素。更令人吃惊的是，当难题是快速降低血流中药物浓度时，当难题是血流中药物浓度的快速降低时，我们发现延长每次摄入间的

间隔实际上解决了难题，而不是如人们会直观地尝试那样通过缩短每次摄入间的间隔压缩药物的施用。例如，优选的给药间隔被证明是从约8小时至约14小时的范围的时间，更优选地，从约10小时至约13小时。在特定实施方案中，本发明的化合物或相关组合物和形式，在一段时间内平均每天给药两次，剂量之间间隔12小时，每个剂量约480-500mg BID。

[0401] 在又一合适的给药方案中，给人受试者施用约20mg或以上的化合物1，每天一次。这种给药方案，在本文中指20mg QD，虽然在患者中显示出了治疗活性水平，但药物在人血液中被快速地清除。然而，因为药物通过肾脏从血流清除到尿，由于药物在尿中浓度非常高，在有结肠癌病变的肾脏中显示出特别有效的抗肿瘤活性的迹象。总之，这种剂量方案在人中显示出了良好的耐受性。

[0402] 在又一合适的给药方案中，空腹与液体(例如，乳汁或水)一起施用化合物1，其提高了药物动力学暴露(表12)。违反直觉的是，乳汁对患者的胃肠道不良反应有帮助。

[0403] 表12.乳汁对化合物1药物动力学的效果

[0404]

PK 参数	禁食	与乳汁一起	倍数变化
$C_{最大}$ (uM)	2.01	3.05	1.52
$AUC_{0\text{-}24hrs}$	20.12	31.40	1.56
$C_{最大}$ (uM)	2.55	2.89	1.13
$AUC_{0\text{-}24hrs}$	20.72	32.16	1.55

[0405] 在又一合适的给药方案中，与食物一起施用化合物1，造成$T_{最大}$延迟(表13)。

[0406] 表13.与食物一起摄入化合物1导致$T_{最大}$延迟

[0407]

	$T_{最大}$（小时）		
患者	禁食	与乳汁一起	与食物一起
20	2	2	8
21	6	6	6

[0408]

22	8	8	10
24	-	6.3	10
27	-	0.5	6
28	-	6	10

[0409] 在又一合适的给药方案中，药丸负担问题通过新的药物制剂(DP2A)解决了。新制剂用另一表面活性剂Labrafil代替了很大一部分在DP1制剂中使用的表面活性剂GELUCIRE™44/14，减小胶囊型号，从型号00降低到型号1或型号2，这是显著的降低。新制剂能够维持相似的生物利用度(表2)。这两种制剂的组分概括如下(表14)：

[0410] 表14:新药物制剂(DP2A)降低药丸型号

[0411]

组分	级别	作用	50 mg 胶囊（DP1）		125 mg 胶囊（DP2A）		80 mg 胶囊（DP2A）	
			mg/胶囊	%	mg/胶囊	%	mg/胶囊	%
本发明的化合物	In House	活性	50	8.34%	125	27.18%	80	27.18%
SLS	USP/NF	表面活性剂	-		1.2	0.27%	0.8	0.27%
Gelucire 44/14（月桂酰聚氧甘油酯）	USP/NF	稀释剂	522.5	87.08%	66.8	14.51%	42.7	14.51%
Tween 80（聚山梨醇酯 80）	NF	表面活性剂	27.5	4.58%	-		-	
Labrafil M2125CS（亚油酯酰聚氧甘油酯）	USP/NF	稀释剂	-		267	58.04%	170.9	58.04%
白色不透明 Licap 胶囊	In House	封装	1（型号 00）		1（型号 1）		-	
金色不透明 Licap 胶囊	In House	封装	-		-		1（型号 1 或型号 2）	

[0412] 另外的研究用本发明化合物的口服制剂进行，特别是更高强度的胶囊制剂(DP2A)。如本文所述，本发明的化合物通过抑制Stat3、β-catenin和Nanog通路阻止癌症干细胞(CSC)的自我更新，诱导癌症干细胞和非干性的癌细胞的死亡，在临床前显示出有效的抗肿瘤和抗转移活性。在如上所述的I期临床试验中，化合物在实体瘤患者中证明有耐受性和抗癌活性的迹象。本文所述的试验设计成1期的延伸研究，为了评估针对在癌症晚期患者中确定药物动力学(PK)的关键性试验设计的制剂。

[0413] 在第1天，患者接受本发明化合物的口服给药制剂(DP1)单一500mg剂量。在第4天和第8天，为关键试验设计的更高强度的胶囊(DP2A)空腹服用，然后进食。而后每天施用DP2A直至疾病进展或不可接受毒性。终点是安全性、PK和初步的抗癌活性。

[0414] 评价了DP2A在24位患者中的情况。DP1和DP2A之间的血浆暴露无显著差异，未发现显著食物效应。9位患者接受化合物DP2A 500mg，每天两次4小时间隔(DP2A-4h)，15位患者接受化合物DP2A 500mg，bid 12小时间隔(DP2A-12h)。即使PK等同于化合物DP1，与上述之前的研究观察到的相比，DP2A-4h关联更高频率的胃肠道(GI)不良事件(AE)，包括腹泻、腹部痉挛、恶心/呕吐、厌食和疲劳。相反，DP2A-12h有更少的GI AE，被选择用于延伸研究。在接受DP2A-12h的15位患者中，登记的8位CRC患者，在67％的评估响应(4/6)中观察到疾病控制，无进展生存期和总生存期分别在17周和39周。

[0415] 在关键试验中，化合物的推荐给药方案确定是约500mg bid q12h。在CRC患者和卵巢癌患者中观察到抗癌活性的迹象。

[0416] 实施例8：与抗有丝分裂剂联合治疗

[0417] 本发明化合物与抗有丝分裂剂联合使用(特别是那些被证明是有效的化疗药剂)以成功治疗患者。可以用于与本发明化合物联合治疗的抗有丝分裂剂的实例包括但不限于:紫杉醇(Abraxane/泰素)、多烯紫杉醇(泰索帝)、BMS-275183、聚谷氨酸紫杉醇、tocosal、异长春碱、长春新碱、长春碱、长春地辛、长春利定、依托泊苷(VP-16)、替尼泊苷(VM-26)、伊沙匹隆、拉洛他赛、沃塔紫杉醇、tesetaxel和ispinesib。

[0418] 设计了Ib期临床试验来评估本发明的化合物与紫杉醇在晚期恶性肿瘤患者中的联合使用。设计的试验是Ib期剂量递增试验,以确定当本发明化合物与紫杉醇单周疗法联合使用时的安全性、耐受性、RP2D和初步抗癌活性。施用该化合物3个递增剂量组(200mg BID、400mg BID、500mg BID)与紫杉醇联合(80mg/m^2每周;每4周3次)直到疾病进展、不可接受毒性或遇到其它终止标准。

[0419] 在这个试验中登记了24位患者。本发明化合物的单药治疗RP2D可全剂量与紫杉醇联合施用。未确定最大耐受剂量(MTD)。未观察到新的不良事件,安全性与每个药剂单药治疗时相似。最常见的不良事件包括1级和2级的腹泻、腹部痉挛、恶心、呕吐。方案涉及到的3级不良事件在4位患者中发生,包括腹泻、脱水和虚弱。未发现显著的药物动力学相互作用。在15个可评价患者中有10位(67%)观察到疾病控制(即,完全响应(CR)+部分响应(PR)+疾病稳定(SD)的总和)。如下表15中显示,登记的5位胃/胃食管结合部(GEJ)腺癌患者中,2位有PR(48%和44%消退),1位有SD(25%消退)和2位(前期taxane治疗失败)有延长SD≥24周。

[0420] 这个Ib期试验证明了本发明化合物与紫杉醇单周疗法可以以全剂量安全地联合。在胃腺癌和GEJ腺癌患者中观察到鼓舞人心的抗肿瘤活性。

[0421] 表15:本发明化合物与紫杉醇联合治疗的抗肿瘤活性迹象

[0422]

患者	诊断	紫杉醇剂量*	最佳响应
0006	胃腺癌	80 mg/m^2	SD（25%病变消退，CEA 90%降低）
0018	GEJ 腺癌	80 mg/m^2	PR（44%病变消退）
0019	GEJ 腺癌	80 mg/m^2	PR（48%病变消退）
0021	GEJ 腺癌	80 mg/m^2	SD（0%病变消退）
0024	GEJ 腺癌	80 mg/m^2	SD（5%病变消退）

[0423] *静脉注射施用紫杉醇,一周一次,每四周给药3次

[0424] 从Ib期试验延伸的Ⅱ期试验正在进行,并继续登记胃/GEL腺癌患者。

[0425] 表16.胃/GEJ腺癌Ⅱ期数据

[0426]

患者	诊断	紫杉醇剂量	最佳响应
0037	GEJ腺癌	80mg/m^2	PR(100%肿瘤病变消退)
0044	GEJ腺癌	80mg/m^2	SD(17%生长)
0046	GEJ腺癌	80mg/m^2	PR(36%肿瘤病变消退)
0047	GEJ腺癌	80mg/m^2	SD/PR(约30%消退)
0051	GEJ腺癌	80mg/m^2	SD(测量未定)

0054	GEJ腺癌	80mg/m^2	SD(测量未定)
0059	胃腺癌	80mg/m^2	PR/CR(100％肿瘤病变消退)

[0427] 在这些试验中,9位可评价胃/GEJ患者有7位显示出对本发明化合物与紫杉醇联合治疗响应的活性。

[0428] 实施例9:P-STAT3作为预测的生物标志物

[0429] 用抗磷酸化STAT3(p-STAT3)的标记抗体通过免疫组化(IHC)分析CRC患者的入库肿瘤组织样本。如图3A中显示的,本发明化合物十分有效地抑制p-STAT3表达。即使使用100QD(每天单剂量)的低剂量,治疗后在患者组织中几乎不再检测出p-STAT3。如图3B的图表中显示,接受本发明化合物治疗的患者中(N＝13),之前展现出相对高水平的p-STAT3的那些的总存活期(OS)更加乐观。例如,在治疗前具有高p-STAT3水平的患者中,有40％存活长于100周,然而,在治疗前具有低p-STAT3水平或p-STAT3为阴性的那些只有10％的存活超过100周。这进一步证实了本发明化合物下调STAT3通路,STAT3通路与结直肠癌有关。

[0430] p-STAT3水平与接受本发明化合物治疗的CRC患者的OS之间直接相关,使p-STAT3成为有前景的诊断生物标志物,可以用于预测治疗效果。相应地,p-STAT3水平可以被用于筛选用本发明化合物治疗的患者群。

[0431] 实施例10:核β-catenin作为预测的生物标志物

[0432] 用抗β-catenin的标记抗体通过免疫组化(IHC)分析CRC患者的入库肿瘤组织样本。如图4A中显示,本发明的化合物有效的移除或预防β-catenin在肿瘤组织细胞核中的积累。接受本发明化合物治疗的患者中(N＝13),发现那些治疗前预先展现出高核β-catenin水平的总存活期(OS)更加乐观。例如,在治疗前具有高核β-catenin水平的患者中,有接近40％存活长于100周,然而具有高膜β-catenin水平的那些没有存活长于25周的。这进一步证实了本发明化合物扰乱或以某种方式调节β-catenin的功能,β-catenin通路与结直肠癌有关。

[0433] 核β-catenin水平与接受本发明化合物治疗的CRC患者的OS之间直接相关,使核β-catenin水平成为有前景的诊断生物标志物,可以用于预测治疗效果。相应地,核β-catenin水平可以被用于筛选用本发明化合物治疗的患者群。

[0434] 实施例11:体外和体内分析本发明的化合物

[0435] 用FACS(FaDu)分离$CD44^{高}$细胞,本发明化合物抑制它们的生长(图5)。

[0436] 在移植了人结肠癌肿瘤组织的裸鼠的体内试验中,本发明的化合物也显示出有效地降低或清除p-STAT3和β-catenin水平(图6)。

[0437] 小鼠试验也显示出本发明的化合物靶向癌症干细胞(图7)。

[0438] 在人临床试验中,本发明的化合物在CRC患者中被发现是有效的(图8)。

[0439] 在本说明书中举例和讨论的实施方案仅意在教导本领域技术人员发明人已知的制备和使用本发明的最佳方法。在本说明书中,不应该认为有限制本发明范围的内容。提供的所有实施例是代表性的实施例,而不是限制性实施例。在不背离本发明的条件下,本领域技术人员按照上面的教导,可以对本发明的上述实施方案进行改进或改变。因此可以理解,在权利要求和其等效内容的范围内,可以按照不同于具体描述的方式来实施本发明。

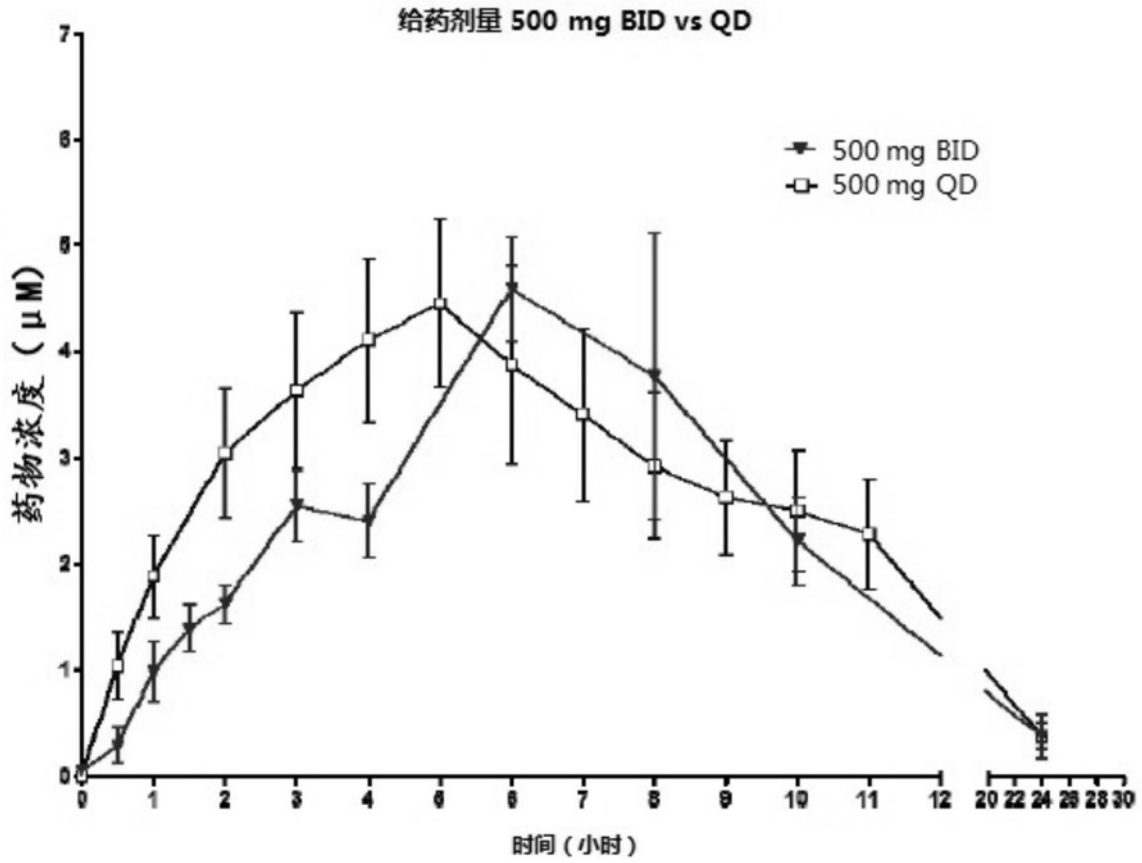

给药剂量 500 mg BID vs QD
500 mg BID
500 mg QD
药物浓度（μM）
时间（小时）

图1

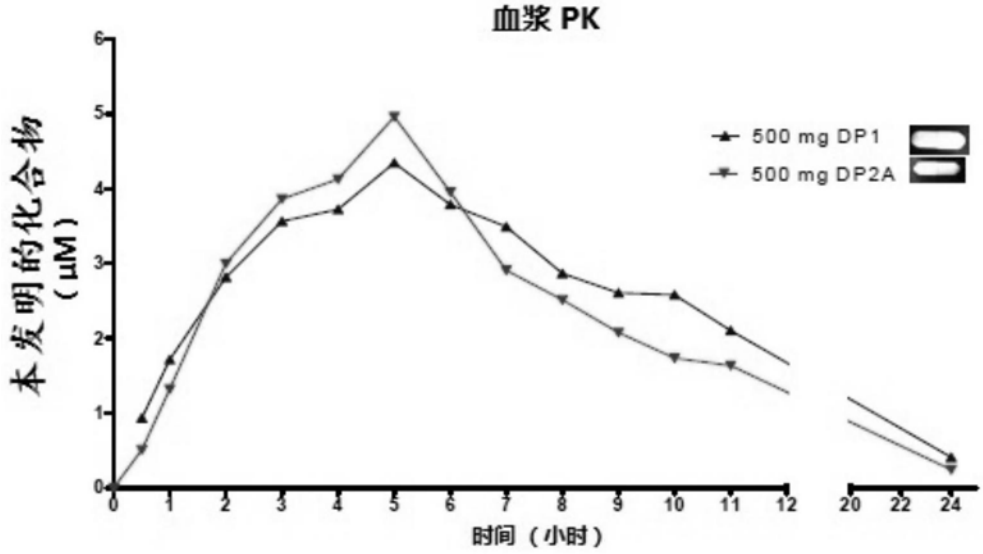

血浆 PK
500 mg DP1
500 mg DP2A
本发明的化合物（uM）
时间（小时）

图2

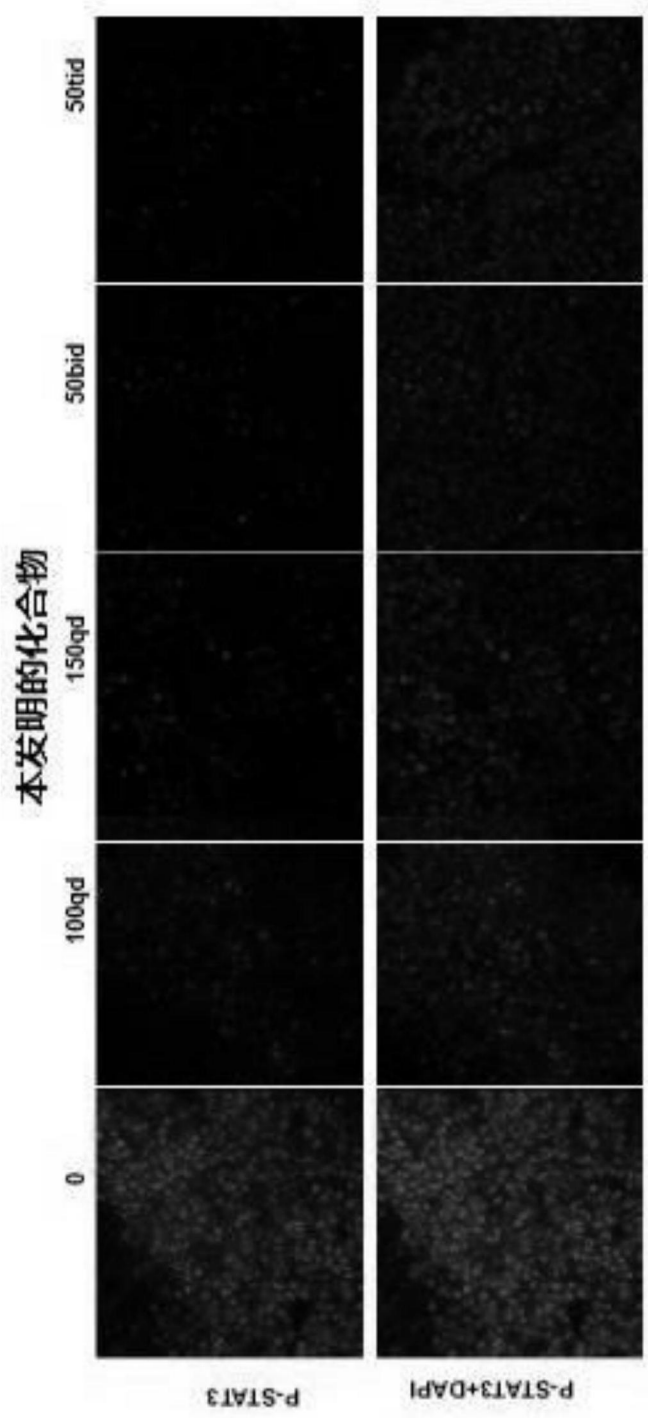
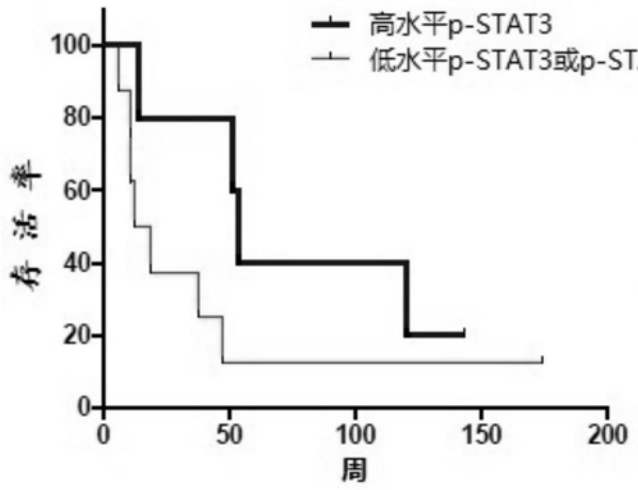


图3A



p-STAT3水平	OS（周）
高	54
阴性或低	15.64

P值=0.152

图3B

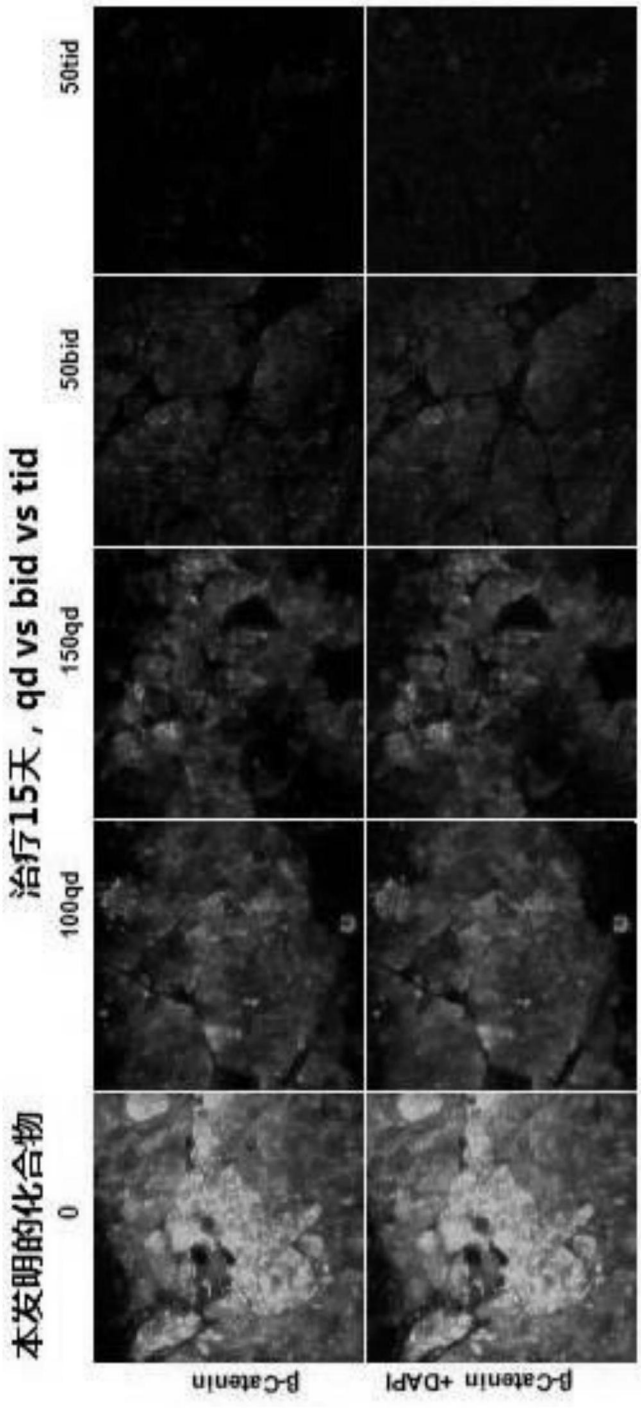

本发明的化合物
治疗15天，qd vs bid vs tid
0
100qd
150qd
50bid
50tid
β-Catenin
β-Catenin +DAPI

图4A

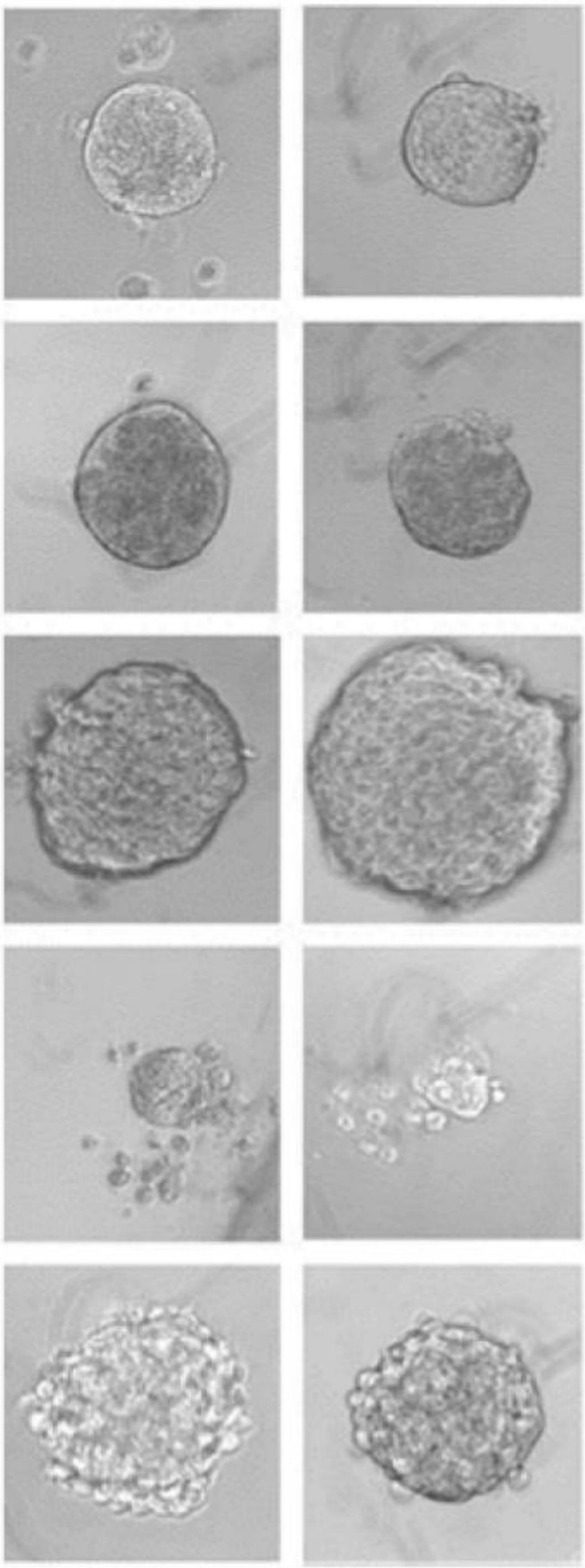


图5

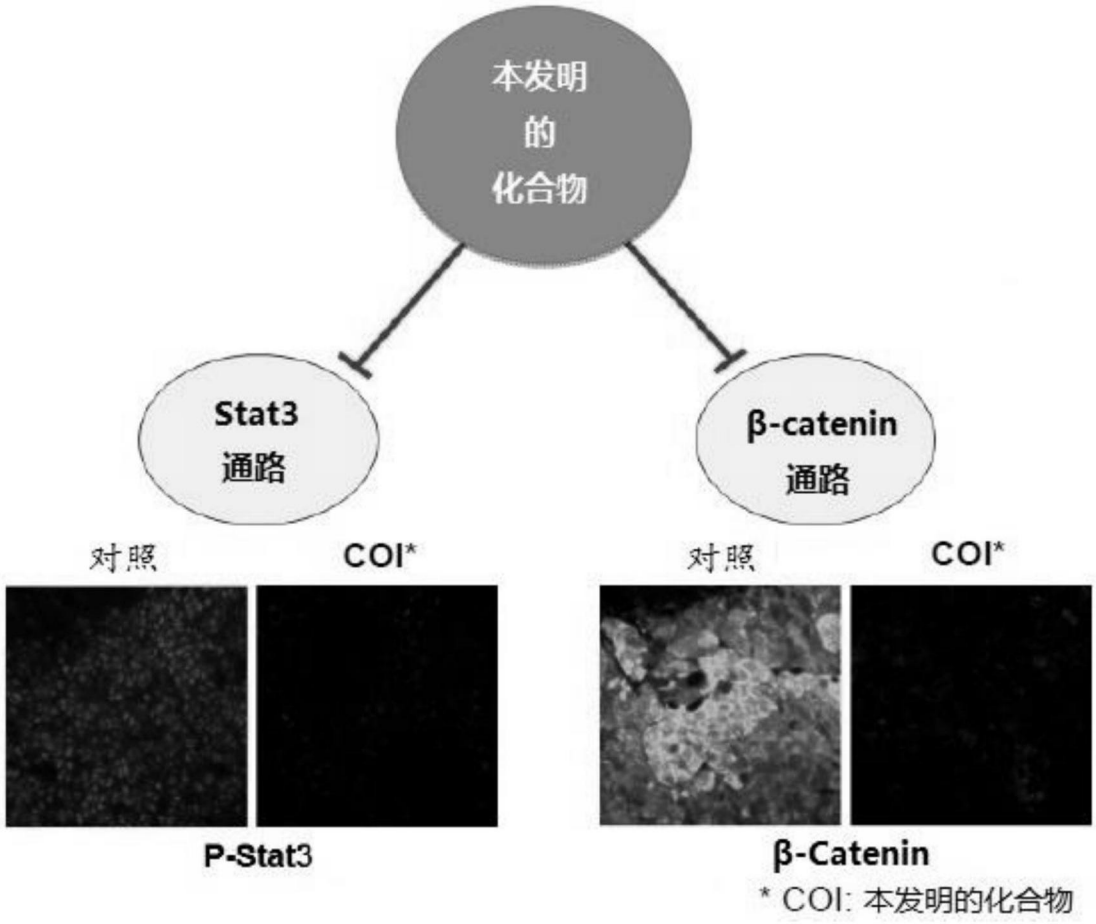

本发明
的
化合物
Stat3
通路
β-catenin
通路
对照
COI*
对照
COI*
P-Stat3
β-Catenin
* COI: 本发明的化合物

图6

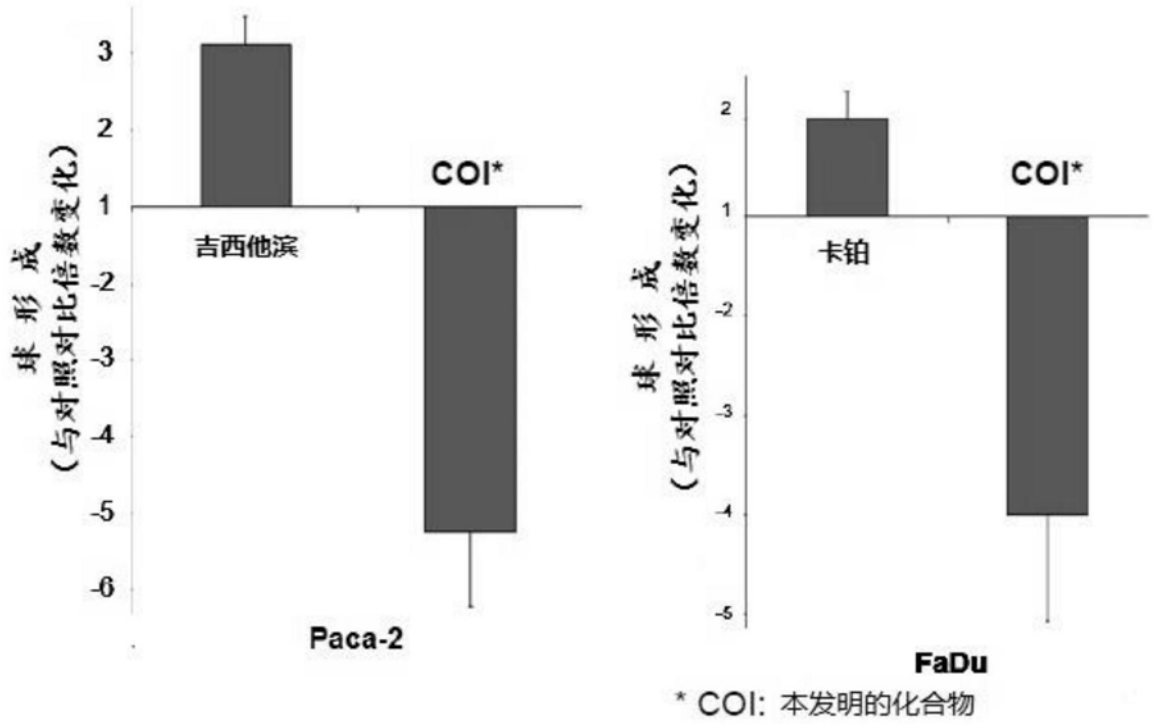

球形成（与对照对比倍数变化）
3
2
1
-2
-3
-4
-5
-6
COI*
吉西他滨
Paca-2
球形成（与对照对比倍数变化）
2
1
-2
-3
-4
-5
COI*
卡铂
FaDu
* COI: 本发明的化合物

图7

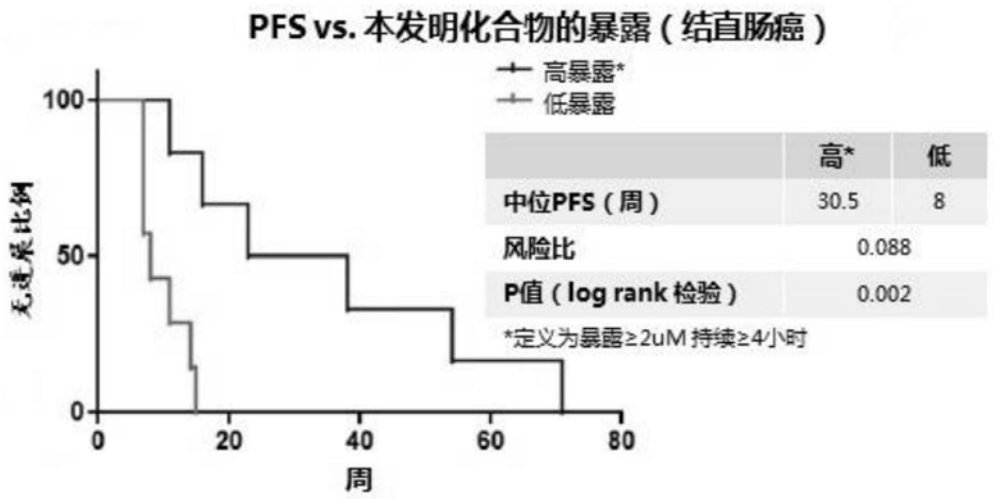

PFS vs. 本发明化合物的暴露（结直肠癌）
高暴露*
低暴露
无进展比例
100
50
0
0
20
40
60
80
周
高*
低
中位PFS（周）
30.5
8
风险比
0.088
P值（log rank 检验）
0.002
*定义为暴露≥2uM 持续≥4小时

图8A

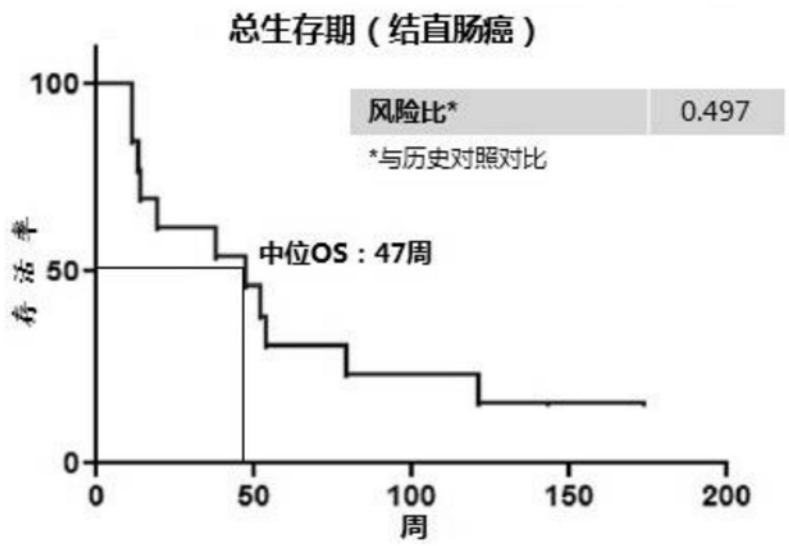

总生存期（结直肠癌）
风险比*
0.497
*与历史对照对比
中位OS：47周
存活率
100
50
0
0
50
100
150
200
周

图8B

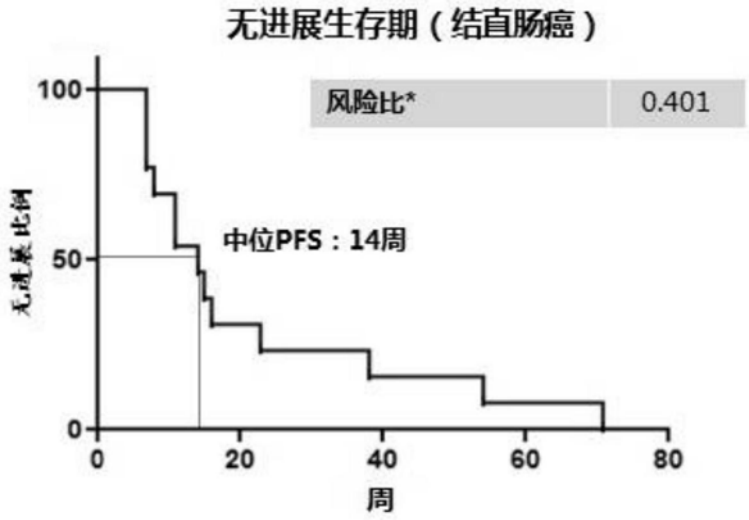

无进展生存期（结直肠癌）
风险比*
0.401
中位PFS：14周
无进展比例
100
50
0
0
20
40
60
80
周

图8C