



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107750160 B

(45) 授权公告日 2021.06.22

(21) 申请号 201680034667.0

霍德弗里德斯·J·彼得斯 (续)

(22) 申请日 2016.06.09

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107750160 A

代理人 张英 沈敬亭

(43) 申请公布日 2018.03.02

(51) Int.CI.

A61K 31/513 (2006.01) (续)

(30) 优先权数据

62/173,174 2015.06.09 US
62/210,708 2015.08.27 US
62/289,801 2016.02.01 US
62/319,369 2016.04.07 US

(56) 对比文件

CN 1980898 A, 2007.06.13

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.12.07

CN 1980898 A, 2007.06.13

(86) PCT国际申请的申请数据

US 2014275537 A1, 2014.09.18

PCT/US2016/036768 2016.06.09

Won Jun Choi等.Fluorocyclopentenyl-cytosine with Broad Spectrum and Potent Antitumor Activity.《J. Med. Chem.》.2012, 第55卷(第9期), 4521-4525.

(87) PCT国际申请的公布数据

W02016/201146 EN 2016.12.15

Yang MY等.A novel cytidine analog, RX-3117, shows potent efficacy in xenograft models, even in tumors that are resistant to gemcitabine.《Anticancer Research》.2014, 第34卷(第12期), 6951-6959.

(73) 专利权人 百禧药业(苏州)有限公司

地址 215000 江苏省苏州市工业园区星湖街218号生物产业园A14-514单元

审查员 万光

(72) 发明人 李永福 金德中

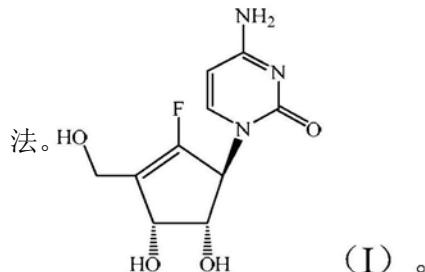
权利要求书4页 说明书45页 附图34页

(54) 发明名称

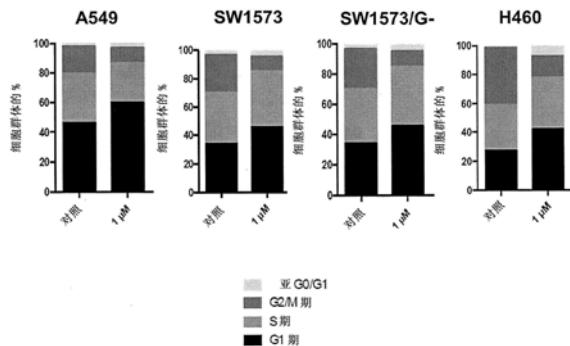
氟代环戊烯基胞嘧啶的用途及制备方法

(57) 摘要

所公开的主题提供了使用式(I)的化合物或其水合物、溶剂化物或药用盐的方法和包含式(I)的化合物或其水合物、溶剂化物或药用盐的试剂盒。所公开的主题进一步提供了治疗癌症的一种或多种症状的方法，包括向需要其的受试者给予式(I)的化合物，以及制备式(I)化合物的方法。



CN 107750160 B



[转续页]

[接上页]

(72) 发明人 德扎玛·萨尔基西扬
雷扎·马扎里

A61P 35/00 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

(51) Int.Cl.

C07D 239/47 (2006.01)

1. 一种制备4-氨基-1-((1S,4R,5S)-2-氟-4,5-二羟基-3-(羟基甲基)环戊-2-烯-1-基)嘧啶-2(1H)-酮 H_2O (RX-3117-MH)的方法,包括在不分离任何中间体的情况下在具有多个步骤的连续过程中将叔丁基(((3aR,4R,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-基)氧基)二苯基硅烷(ASM11)转化成4-氨基-1-((3aS,4S,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-基)嘧啶-2(1H)-酮(INT14),其中所述方法进一步包括以下步骤:

将叔丁基(((3aR,4R,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-基)氧基)二苯基硅烷(ASM11)溶解于2-甲基四氢呋喃中;

加入四正丁基氟化铵从而在反应溶液中形成((3aS,4R,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-醇)(INT12);

在有机相中回收((3aS,4R,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-醇)(INT12);

向在所述有机相中的((3aS,4R,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-醇)(INT12)中加入在2-甲基四氢呋喃中的三乙胺和甲磺酰氯从而在第二反应溶液中形成((3aR,4R,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-基甲磺酸盐)(INT13);

在DMSO中回收((3aR,4R,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-基甲磺酸盐)(INT13);以及

向在DMSO中的((3aR,4R,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-基甲磺酸盐)(INT13)中加入2.5当量的碳酸铯和胞嘧啶,维持反应温度于33~37°C,从而在第三反应溶液中形成4-氨基-1-((3aS,4S,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-基)嘧啶-2(1H)-酮(INT14),

其中所述4-氨基-1-((3aS,4S,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-基)嘧啶-2(1H)-酮(INT14)具有超过95:5的N-异构体与O-异构体的比率。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述在有机相中回收((3aS,4R,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-醇)(INT12)包括以下步骤:

用水溶液洗涤所述反应溶液;

从具有((3aS,4R,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-醇)(INT12)的所述有机相中分离出水性提取物;

用2-甲基四氢呋喃洗涤所述水性提取物从而从所述水性提取物中提取((3aS,4R,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-醇)(INT12);以及

将所提取的((3aS,4R,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-醇)(INT12)与具有((3aS,4R,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-

6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-醇) (INT12) 的有机相合并。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述在DMSO中回收 ((3aR,4R,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基甲磺酸盐) (INT13) 包括以下步骤:

向具有 ((3aR,4R,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基甲磺酸盐) (INT13) 的第二反应溶液中加入DMSO;和通过蒸馏除去至少90%w/w的2-甲基四氢呋喃。

4. 根据权利要求1所述的方法,进一步包括以下步骤:

向具有4-氨基-1-((3aS,4S,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)嘧啶-2(1H)-酮 (INT14) 的所述第三反应溶液中加入酸从而形成4-氨基-1-((1S,4R,5S)-2-氟-4,5-二羟基-3-(羟基甲基)环戊-2-烯-1-基)嘧啶-2(1H)-酮 (RX-3117);

用甲基叔丁基醚和水洗涤所述4-氨基-1-((1S,4R,5S)-2-氟-4,5-二羟基-3-(羟基甲基)环戊-2-烯-1-基)嘧啶-2(1H)-酮 (RX-3117) 从而形成有机相和具有4-氨基-1-((1S,4R,5S)-2-氟-4,5-二羟基-3-(羟基甲基)环戊-2-烯-1-基)嘧啶-2(1H)-酮 (RX-3117) 的水相;以及

纯化所述4-氨基-1-((1S,4R,5S)-2-氟-4,5-二羟基-3-(羟基甲基)环戊-2-烯-1-基)嘧啶-2(1H)-酮 (RX-3117) 从而形成4-氨基-1-((1S,4R,5S)-2-氟-4,5-二羟基-3-(羟基甲基)环戊-2-烯-1-基)嘧啶-2(1H)-酮 1H₂O (RX-3117-MH)。

5. 根据权利要求4所述的方法,进一步包括:

向反应混合物中加入甲醇并蒸馏反应混合物以除去丙酮化物直到在洗涤的步骤之前检测到小于1.0%面积的丙酮化物。

6. 根据权利要求4所述的方法,其中洗涤的步骤进一步包括:

将具有4-氨基-1-((1S,4R,5S)-2-氟-4,5-二羟基-3-(羟基甲基)环戊-2-烯-1-基)嘧啶-2(1H)-酮 (RX-3117) 的所述水相与所述有机相分离;

用甲基叔丁基醚洗涤具有4-氨基-1-((1S,4R,5S)-2-氟-4,5-二羟基-3-(羟基甲基)环戊-2-烯-1-基)嘧啶-2(1H)-酮 (RX-3117) 的水相直至在具有4-氨基-1-((1S,4R,5S)-2-氟-4,5-二羟基-3-(羟基甲基)环戊-2-烯-1-基)嘧啶-2(1H)-酮 (RX-3117) 的水相中检测到小于0.5%w/w的三苯甲醇;

向具有4-氨基-1-((1S,4R,5S)-2-氟-4,5-二羟基-3-(羟基甲基)环戊-2-烯-1-基)嘧啶-2(1H)-酮 (RX-3117) 的所述水相中加入碱性阴离子树脂从而形成浆液;

过滤所述浆液从而保留母液;

浓缩所述母液从而形成浓缩物;以及

向所述浓缩物中加入乙腈从而形成纯化的4-氨基-1-((1S,4R,5S)-2-氟-4,5-二羟基-3-(羟基甲基)环戊-2-烯-1-基)嘧啶-2(1H)-酮 1H₂O (RX-3117-MH)。

7. 一种用于由叔丁基(((3aR,4R,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)氧基)二苯基硅烷 (ASM11) 制备4-氨基-1-((3aS,4S,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d]

[1,3]二氧化杂环戊烯-4-基) 嘧啶-2(1H)-酮(INT14)的连续方法,包括以下步骤:

将叔丁基((3aR,4R,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-基)氧基)二苯基硅烷(ASM11)溶解于2-甲基四氢呋喃中;

加入四正丁基氟化铵从而形成((3aS,4R,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-醇)(INT12);

向所述((3aS,4R,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-醇)(INT12)中加入在2-甲基四氢呋喃中的三甲胺和甲磺酰氯从而形成((3aR,4R,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-基甲磺酸盐)(INT13);以及

将2.5当量的碳酸铯和胞嘧啶加入到所述((3aR,4R,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-基甲磺酸盐)(INT13)中,维持反应温度于33~37℃,从而形成4-氨基-1-((3aS,4S,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-基)嘧啶-2(1H)-酮(INT14);

其中在不分离((3aS,4R,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-醇)(INT12)或((3aR,4R,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-基甲磺酸盐)(INT13)的情况下,在一个或多个固定反应器中进行全部上述步骤,

其中所述4-氨基-1-((3aS,4S,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-基)嘧啶-2(1H)-酮(INT14)具有超过95:5的N-异构体与O-异构体的比率。

8.一种用于由通过权利要求7所述的方法制备的4-氨基-1-((3aS,4S,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-基)嘧啶-2(1H)-酮(INT14)制备4-氨基-1-((1S,4R,5S)-2-氟-4,5-二羟基-3-(羟基甲基)环戊-2-烯-1-基)嘧啶-2(1H)-酮 RX-3117-MH 的连续方法,包括以下步骤:

使所述4-氨基-1-((3aS,4S,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-基)嘧啶-2(1H)-酮(INT14)与酸反应从而形成4-氨基-1-((1S,4R,5S)-2-氟-4,5-二羟基-3-(羟基甲基)环戊-2-烯-1-基)嘧啶-2(1H)-酮(RX-3117);

用甲基叔丁基醚和水洗涤所述4-氨基-1-((1S,4R,5S)-2-氟-4,5-二羟基-3-(羟基甲基)环戊-2-烯-1-基)嘧啶-2(1H)-酮(RX-3117)从而形成有机相和具有4-氨基-1-((1S,4R,5S)-2-氟-4,5-二羟基-3-(羟基甲基)环戊-2-烯-1-基)嘧啶-2(1H)-酮(RX-3117)的水相;

将具有4-氨基-1-((1S,4R,5S)-2-氟-4,5-二羟基-3-(羟基甲基)环戊-2-烯-1-基)嘧啶-2(1H)-酮(RX-3117)的所述水相与所述有机相分离;

用甲基叔丁基醚洗涤具有4-氨基-1-((1S,4R,5S)-2-氟-4,5-二羟基-3-(羟基甲基)环戊-2-烯-1-基)嘧啶-2(1H)-酮(RX-3117)的所述水相直至在具有4-氨基-1-((1S,4R,5S)-2-氟-4,5-二羟基-3-(羟基甲基)环戊-2-烯-1-基)嘧啶-2(1H)-酮(RX-3117)的所述水相中检测到小于0.5%w/w的三苯基甲醇;

将强碱性阴离子树脂加入到具有4-氨基-1-((1S,4R,5S)-2-氟-4,5-二羟基-3-(羟基甲基)环戊-2-烯-1-基)嘧啶-2(1H)-酮(RX-3117)的所述水相中从而形成浆液；

过滤所述浆液从而保留母液；

浓缩所述母液从而形成浓缩物；

向所述浓缩物中加入乙腈从而形成纯化的4-氨基-1-((1S,4R,5S)-2-氟-4,5-二羟基-3-(羟基甲基)环戊-2-烯-1-基)嘧啶-2(1H)-酮 $1H_2O$ (RX-3117-MH)；和

分离纯化的4-氨基-1-((1S,4R,5S)-2-氟-4,5-二羟基-3-(羟基甲基)环戊-2-烯-1-基)嘧啶-2(1H)-酮 $1H_2O$ (RX-3117-MH)；

其中在一个或多个固定反应器中进行全部上述步骤。

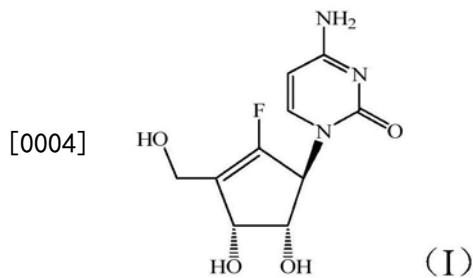
氟代环戊烯基胞嘧啶的用途及制备方法

[0001] 优先权

[0002] 本申请要求享有2015年6月9日提交的美国临时申请No.62/173,174;2015年8月27日提交的美国临时申请No.62/210,708;2016年2月1日提交的美国临时申请No.62/289,801;和2016年4月7日提交的美国临时申请No.62/319,369的优先权,这些专利申请的内容以其全部内容结合于本文中作为参考。

背景技术

[0003] 美国专利No.7,405,214(2008年7月29日公布)公开了式(I)的化合物



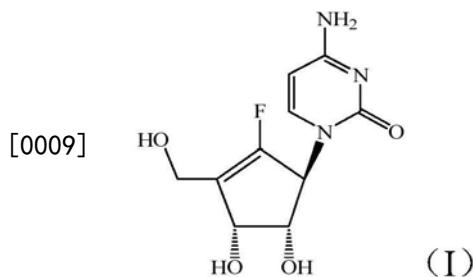
[0005] 也称为RX-3117,氟代环戊烯基胞嘧啶或4-氨基-1-((1S,4R,5S)-2-氟-4,5-二羟基-3-羟基甲基-环戊-2-烯基)-1H-嘧啶-2-酮。美国专利7,405,214也公开了由D-核糖总计11步合成RX-3117,所述合成使用了昂贵的催化剂,这对在植物生产中的实施提出了挑战。

[0006] 美国专利No.9,150,520(2015年10月6日公布)公开了通过(3R,4R,6aR)-叔丁基-(5-氟-2,2-二甲基-6-三苯甲基氧基甲基-4,6a-二氢-3aH-环戊[1,3]二氧杂环戊烯(dioxol)-4-基氧基)-二苯基-硅烷至4-氨基-1-(3aS,4S,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-(三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)嘧啶-2(1H)-酮制备RX-3117的短路径。所述合成要求在每个步骤中分离出中间体。因此,由于时间和成本的限制,所述方法对于最终产品的规模放大生产而言并不是令人满意的。因此,需要提供一种改进的方法,例如,通过减少步骤数量和/或去除对于纯化每种中间体的需要。

发明内容

[0007] 本发明涉及使用式(I)化合物的新用途和方法。本发明还提供了一种改进的方法,除了别的事物之外,通过组合多个步骤,不用分离和纯化中间体物质从而显著降低生产成本。另外,本发明提供了在受试者中使用式(I)化合物的剂量和暴露水平。

[0008] 本公开的一个方面提供了用于治疗肿瘤的式(I)化合物,其中将有效量的包含式(I)化合物



[0010] 或其水合物、溶剂化物或药用盐的口服剂型以约300~2000mg/天的剂量给药于需要其的受试者。

[0011] 在这些实施方式中,式(I)的所述化合物以一水合物的形式给药。在其它实施方式中,所述式(I)化合物以无溶剂化物、水合物和盐的形式给药。

[0012] 所述方法的实施方式能够包括每周5~7天的口服给药。所述方法的实施方式能够包括每周5~7天口服给药连续4周或连续3周,接着1周停止给药(off-week) (期间不给予所述口服剂型)。

[0013] 所述方法的实施方式能够包括由连续3周治疗随后1周停止给药,或连续4周治疗构成的剂量给药周期(dosing cycle),并且给予所述口服剂型最多达12个剂量给药周期。

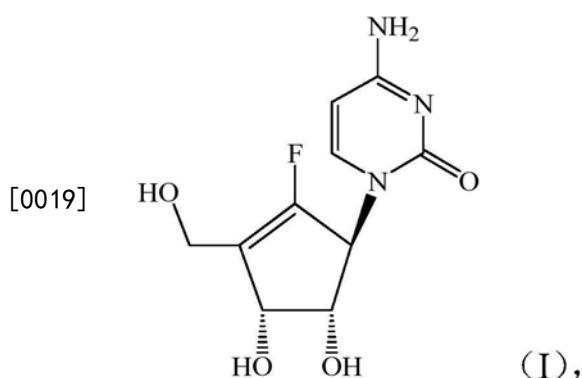
[0014] 所述方法的实施方式能够包括在单次给药后提供约700~1,100ng/mL的C_{最大}的口服剂型。所述方法的实施方式能够包括单次给药后提供约8,000~10,000hr • mg/mL的AUC_{0-t}(0~24h)的口服剂型。

[0015] 所述方法的实施方式能够用于治疗肿瘤,包括治疗胰腺癌,膀胱癌或结肠直肠癌。

[0016] 所述方法的实施方式能够包括将所述口服剂型与选自由抗代谢物,DNA-断裂剂,DNA-交联剂,插入剂(intercalating agent),蛋白合成抑制剂,拓扑异构酶I毒物(poison),拓扑异构酶II毒物,微管导向剂(microtubule-directed agent),激酶抑制剂,多酚类,激素类,激素拮抗剂,死亡受体激动剂,免疫检查点抑制剂,抗程序性细胞死亡1(PD-1)受体抗体和抗程序性细胞死亡配体1(PD-L1)抗体组成的组中的第二试剂或抗肿瘤剂一起给药。所述方法的实施方式能够包括向所述受试者给药PD-L1抗体。所述方法的实施方式能够包括向所述受试者给药PD-1抗体。所述方法的实施方式能够包括给予固体口服剂型。所述第二试剂或抗肿瘤剂能够以相同的口服剂型或单独的口服剂型给药。

[0017] 在这些实施方式中,需要其的所述受试者是人受试者。

[0018] 本公开的另一个方面提供了预测采用式(I)化合物或其水合物、溶剂化物或药用盐治疗需要其的受试者的疗效的方法

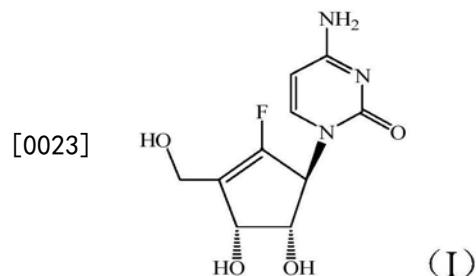


[0020] 包括以下步骤: (i)从所述受试者采集肿瘤细胞或组织的样品; 和 (ii)测定所述肿

瘤细胞或组织中的UCK2表达的水平;其中UCK2的表达水平指示采用式(I)化合物治疗的疗效的可能性。

[0021] 本公开的另一个方面是通过使用测定在肿瘤细胞样品中激酶p53或UCK2蛋白的水平的测试用于测试式(I)化合物或其水合物、溶剂化物或药用盐在治疗肿瘤中的潜在疗效的试剂盒。

[0022] 本公开的另一个方面提供了用于治疗癌症的一种或多种症状的式(I)的化合物，其中式(I)的所述化合物



[0024] 或其水合物、溶剂化物或药用盐以有效抑制甲基转移酶并上调所述受试者中至少一种低甲基化靶标的量进行给药。在一些实施方式中，式(I)的所述化合物以一水合物形式给药。在其它实施方式中，式(I)的化合物进行无溶剂化物、水合物和盐形式给药。

[0025] 本公开的另一个方面提供了在连续过程中以多于一个步骤无需分离任何中间体通过将叔丁基(((3aR,4R,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-基)氧基)二苯基硅烷(ASM11)转化成4-氨基-1-((3aS,4S,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-基)嘧啶-2(1H)-酮(INT14)从而制备4-氨基-1-((1S,4R,5S)-2-氟-4,5-二羟基-3-(羟基甲基)环戊-2-烯-1-基)嘧啶-2(1H)-酮 $1\text{H}_2\text{O}$ (RX-3117-MH)。

[0026] 所述方法的实施方式能够包括将叔丁基(((3aR,4R,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)氧基)二苯基硅烷(ASM11)溶解于2-甲基四氢呋喃中；加入四正丁基氟化铵从而在反应溶液中形成((3aS,4R,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-醇)(INT12)；和在有机相中回收INT12。

[0027] 在所述有机相中回收INT12的实施方式能够包括用水性溶液洗涤所述反应溶液；从具有INT12的所述有机相中分离水性提取物；用2-甲基四氢呋喃洗涤所述水性提取物从而从所述水性提取物中提取INT12；和将所述提取的INT12与具有INT12的所述有机相合并。

[0028] 所述方法的实施方式能够包括将在2-甲基四氢呋喃中的三乙胺和甲磺酰氯加入到所述有机相中的INT12中从而在第二反应溶液中形成((3aR,4R,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基甲磺酸盐)(INT13)；和在DMSO中回收INT13。

[0029] 在DMSO中回收INT13的实施方式能够包括将所述DMSO加入到具有INT13的所述第二反应溶液中；和通过蒸馏除去至少90% w/w的2-甲基四氢呋喃。

[0030] 所述方法的实施方式能够包括将2.5当量的碳酸铯和胞嘧啶加入到在DMSO中的INT13中从而在第三反应溶液中形成4-氨基-1-((3aS,4S,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)胞嘧啶-2(1H)-酰胺。

(INT14)。

[0031] 所述方法的实施方式能够包括将反应温度保持于约33~37℃。

[0032] 在这些实施方式中,所述INT14具有超过约95:5的N-和O-异构体比率。

[0033] 所述方法的实施方式能够包括向具有INT14的所述第三反应溶液中加入酸从而形成4-氨基-1-((1S,4R,5S)-2-氟-4,5-二羟基-3-(羟基甲基)环戊-2-烯-1-基)嘧啶-2(1H)-酮(RX-3117),用甲基叔丁基醚和水洗涤所述RX-3117从而形成有机相和具有RX-3117的水相;和纯化所述RX-3117从而形成RX-3117-MH。

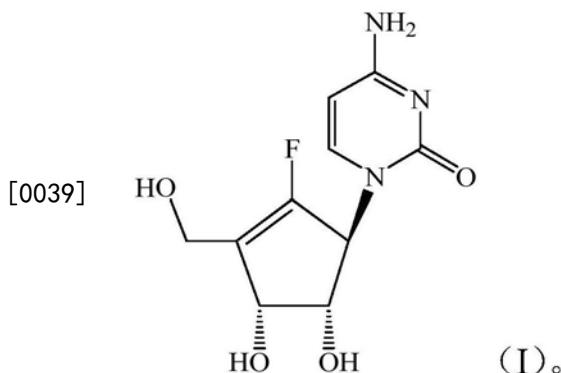
[0034] 所述方法的实施方式能够包括将所述反应混合物加入甲醇并蒸馏所述反应混合物以除去丙酮化物(acetonide)直到在洗涤步骤之前检测到小于约1.0%的丙酮化物面积。

[0035] 所述洗涤步骤的实施方式能够包括将具有RX-3117的所述水相与所述有机相分离;用甲基叔丁基醚洗涤具有RX-3117的所述水相直至在所述水相中检测到小于约0.5%w/w的三苯甲醇;向具有RX-3117的所述水相中加入碱性阴离子树脂从而形成浆液;过滤所述浆液从而保留母液;浓缩所述母液从而形成浓缩物;和向所述浓缩物中加入乙腈从而形成纯化的RX-3117-MH。

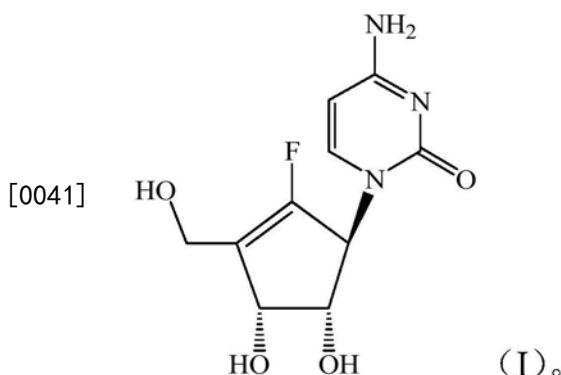
[0036] 本公开的另一个方面提供了由叔丁基(((3aR,4R,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-基)氨基)二苯基硅烷(ASM11)制备4-氨基-1-((3aS,4S,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-基)嘧啶-2(1H)-酮(INT14)的连续方法,包括以下步骤:将所述ASM11溶解于2-甲基四氢呋喃中;加入四正丁基氟化铵从而形成((3aS,4R,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-醇)(INT12)。向所述INT12中加入在2-甲基四氢呋喃中的三甲胺和甲磺酰氯从而生成((3aR,4R,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-基甲磺酸盐)(INT13),和向所述INT13中加入碳酸铯和胞嘧啶从而形成4-氨基-1-((3aS,4S,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-基)嘧啶-2(1H)-酮(INT14);其中所述步骤在一个或多个固定反应器中进行而无需分离INT12或INT13。

[0037] 本公开的另一个方面提供了由4-氨基-1-((3aS,4S,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-基)嘧啶-2(1H)-酮(INT14)制备4-氨基-1-((1S,4R,5S)-2-氟-4,5-二羟基-3-(羟基甲基)环戊-2-烯-1-基)嘧啶-2(1H)-酮 H_2O (RX-3117-MH)的连续方法,包括以下步骤:使所述INT14与酸反应从而生成4-氨基-1-((1S,4R,5S)-2-氟-4,5-二羟基-3-(羟基甲基)环戊-2-烯-1-基)嘧啶-2(1H)-酮(RX-3117);用甲基叔丁基醚和水洗涤所述RX-3117从而形成有机相和具有RX-3117的水相;将具有RX-3117的所述水相与所述有机相分离;用甲基叔丁基醚洗涤具有RX-3117的所述水相直至在所述水相中检测到小于约0.5%w/w的三苯甲醇;将强碱性阴离子树脂加入到具有RX-3117的水相中从而形成浆液;过滤所述浆液从而保留母液;浓缩所述母液从而形成浓缩物;向所述浓缩物中加入乙腈从而形成纯化的RX-3117-MH;和分离所述纯化的RX-3117-MH;其中所述步骤在一个或多个固定反应器中进行。

[0038] 本公开的另一方面提供了通过使细胞与有效量的式(I)化合物或其水合物、溶剂化物或药用盐接触在所述细胞中诱导细胞凋亡的方法



[0040] 本公开的另一个方面提供了通过使细胞与有效量的式(I)化合物或其水合物、溶剂化物或药用盐接触使所述细胞对细胞凋亡信号敏化(sensitize)的方法



[0042] 本公开的另一个方面提供了通过使细胞与有效量的式(I)化合物或其水合物、溶剂化物或药用盐接触调节所述细胞中的蛋白激酶的方法。

[0043] 本公开的另一个方面提供了通过以下步骤治疗非小细胞肺癌的方法：(i)诊断具有非小细胞肺癌细胞的受试者；和(ii)向所述受试者给予有效量的式(I)化合物或其水合物、溶剂化物或药用盐。

附图说明

[0044] 图1是显示RX-3117(1 μ M)在24h后对所述G1期内的A549, SW1573, SW1573/G-和H460细胞的影响的一系列柱状图。以1 μ M的剂量，24h暴露后，RX-3117诱导了在G1期内A549, SW1573, SW1573/G-和H460细胞的累积。

[0045] 图2是显示在24h和48h后，RX-3117(5 \times IC₅₀)对所述S-期内的A549, SW1573和SW1573/G-细胞的影响的一系列柱状图。在5 \times IC₅₀的较高剂量下，RX-3117诱导了所述S期内A549, SW1573和SW1573/G-细胞的累积。

[0046] 图3是显示增加浓度的RX-3117对SW1573细胞中的前半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶(pro-caspase)9活化的影响的一系列蛋白质印迹。RX-3117会降低SW1573细胞中的前半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶9。前半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶9的降低表明半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶(caspase)的活化和随后的细胞凋亡诱导。

[0047] 图4是显示浓度渐增的RX-3117对A549细胞中前半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶9活化的影响的一系列蛋白质印迹。RX-3117会降低A549细胞中的前半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶9。

[0048] 图5是显示在48h后如SW1573细胞中生物标志物 γ H2A.X(phosphoS139)指示的由

RX-3117诱导的双链断裂(DSB)的一系列蛋白质印迹。在48h后RX-3117会诱导由DSB磷光体(phosphor)S139H2A.X的标记物指示的DSB。C*是指2天后通过50μM依托泊昔(etoposide)的DNA损伤,这作为阳性对照。

[0049] 图6是显示24h后通过浓度渐增的RX-3117诱导的切割的PARP的一系列蛋白印迹。

[0050] 图7是显示1μM和5μM的RX-3117对A549细胞中p53表达水平的影响的一系列蛋白印迹。在1μM和5μM下,RX-3117在A549细胞系中会提高p53表达水平。

[0051] 图8是显示在24和48h后10μM的RX-3117对SW1573细胞中的Chk1,Chk2,Cdk1,Cdk2和p-Cdc25C表达水平的影响的一系列蛋白质印迹。在SW1573细胞中暴露于10μM RX-3117 48h后Chk1会增加,pCDC25C降低而Cdk2会增加。

[0052] 图9是显示在24h后RX-3117浓度渐增对SW1573细胞中wee1表达水平的影响的一系列蛋白印迹。浓度渐增的RX-3117对wee1具有影响,这24h后在SW1573细胞系中会下降。

[0053] 图10是显示在24h(d1)和48h(d2)后,在 $5 \times IC_{50}$ 下RX-3117对所述亚G1期(sub-G1phase)内的染色PI、细胞凋亡A549和SW1573细胞的影响的柱状图。

[0054] 图11是显示在24h(d1),48h(d2),72h(d3)和96h(d4)之后5μM(对于A549)和10μM(对于SW1573)的RX-3117对在亚G1期内的染色膜联蛋白(Annexin) V,细胞凋亡A549和SW1573细胞的影响的柱状图。

[0055] 图12是显示剂量1(dose 1)和剂量7(dose 7)后的所述峰值血浆浓度C_{最大}(ng/mL)的曲线图。

[0056] 图13是显示剂量1和剂量7后以AUC_{0-t}(ng • h/mL)计的所述血浆暴露(plasma exposure)的曲线图。

[0057] 图14显示了胞苷、吉西他滨(Gemcitabine)和新型胞苷类似物RX-3117的结构式。

[0058] 图15是显示用RX-3117孵育之前或之后的所述放射敏化作用(radiosensitizing effect)的柱状图。所述灰色条棒代表对照,用4Gy照射的A2780细胞,所述黑色条棒代表用4Gy照射后24h用1μM RX-3117孵育。在用4Gy照射之前,所述白色/灰色条棒代表用1μM RX-3117孵育24h。P.E.代表铺板效率(plating efficiency)。

[0059] 图16A-图16F是显示使用克隆源性测定(clonogenic assay)以不同剂量照射的1μM RX-3117(5μM RX-3117,用于SW1573细胞)的放射敏化作用的一系列曲线图。细胞用RX-3117预孵育24h。图16A:A2780细胞具有1.8的剂量修饰因子(dose modifying factor)(DMF)。图16B:A549细胞具有1.8的DMF。图16C:H460细胞表现出的放射敏化效果较差。图16D:SW1573细胞具有1.5的DMF。图16E:SW1573/G-细胞具有1.4的DMF。图16F:采用1μM RX-3117孵育后24h用2Gy分次(fractionated)照射SW1573细胞5天。

[0060] 图17是显示RX-3117对球状体(spheroid)的放射敏化作用的一系列曲线图。图17中的A:SW1573,15天内标准化的球状体体积。对照;1μMRX-3117处理;2Gy RT处理5天;2Gy RT处理5天和用1μM RX-3117预孵育。图17中的B:A549球体,在15天内标准化的球状体体积。对照;1μM RX-3117处理;5天内2Gy RT处理;2Gy RT处理5天和用1μMRX-3117预孵育24h。

[0061] 图18显示了DNA损伤的蛋白印迹分析。图18中的A:在暴露于0.1μM~10μM浓度渐增的RX-3117长达48h的A2780细胞中所述DSB损伤标志物γ H2A.X的表达。图18中的B:与辐射组合的SW1573细胞中所述DNA损伤的时间依赖性诱导。C*是指2天后通过50μM依托泊昔的DNA损伤,其作为阳性对照。

[0062] 图19是一系列柱状图(图19中的A)柱状图和蛋白印迹(图19中的B),显示了细胞系中由RX-3117和辐射所致细胞周期分布中的干扰。图19中的A:在有或无4Gy辐射下用1 μ M RX-3117处理24h的细胞系的细胞期(cell phase)的柱状图。处理后24h收获细胞。图19中的B:药物孵育24h后和辐射射后30分钟采用蛋白印迹法的细胞周期蛋白分析。

[0063] 图20是显示RX-3117和辐射对SW1573细胞中细胞周期蛋白表达的影响的一系列蛋白印迹。在存在和不存在RX-3117的情况下,对细胞进行辐射(RT)。使用所述Odyssey系统通过蛋白印迹法测定表达。

[0064] 图21显示了RX-3117的概述代谢途径。

[0065] 图22显示了由RX-3117维持DNA甲基转移酶(DNMT1)的下调机制的示意图。

[0066] 图23是显示1 μ M,5 μ M,25 μ M和75 μ M的RX-3117对A549细胞中的DNMT1,DNMT3A,DNMT3B和 β -肌动蛋白表达水平的影响的一系列蛋白印迹。RX-3117下调DNA甲基转移酶1的维持。

[0067] 图24是显示对细胞周期蛋白的潜在影响的图:在损伤诱导后由检查点激酶Chk1和Chk2对细胞周期调节。

[0068] 图25是显示5 μ M,10 μ M,20 μ M和50 μ M的RX-3117对A549和SW1573细胞长达24或48h的影响的一系列曲线图和相关的蛋白印迹。收获细胞并使用蛋白印迹(图25中的A和图25中的B)测定蛋白表达。分离RNA并使用RT-PCR(图25中的C和图25中的D)测定基因表达。RX-3117下调DNMT1蛋白和基因表达。

[0069] 图26是显示RX-3117(1 μ M)和氮杂-dC(5 μ M)对A2780卵巢癌细胞长达24h的影响的蛋白印迹和曲线图。分离核提取物,并通过蛋白印迹法测定DNMT1表达(图26中的A)和通过这些方法中所述的商业试剂盒测定活性(图26中的B)。

[0070] 图27显示了RX-3711和氮杂-dC对A549细胞的影响。使用FACS(图27中的A)或免疫荧光(图27中的B)采用抗5-甲基胞嘧啶的抗体测定全甲基化(global methylation)。对照细胞设定为100%(图27中的A)。蛋白印迹(图27中的C)显示了在暴露于RX-3117和氮杂-dC后MGMT和E-钙粘蛋白(cadherin)在A549细胞中和p16在SW1573细胞中的表达。

[0071] 图28显示了RX-3117对PCFT介导的MTX转运长达24h的影响。加入叶酸(FA)以抑制PCFT和L-LV以抑制RFC介导的MTX转运。将氮杂-CdR和氮杂-CR包括在内作为阳性对照。

[0072] 图29是使用实施例9中描述的所述方法制备的RX-3117的¹H NMR。

[0073] 图30是使用实施例9中描述的方法制备的RX-3117的¹³C NMR。

[0074] 图31是使用实施例9中描述的方法制备的RX-3117的¹⁹F NMR。

[0075] 图32是使用实施例9中描述的方法制备的RX-3117的质谱。

[0076] 图33是使用实施例9中描述的方法制备的RX-3117的质谱(采用ES-过滤器(ES-filter))。

[0077] 图34是使用平板偏振光(plain polarized light)(左列)和正交偏振光(cross polarized light)(右列)下根据实施例9的所述方法制备的RX-3117(上排)和使用实验室规模方法制备RX-3117(下排)的显微比较。

[0078] 图35是比较使用实验室规模方法制备的RX-3117(顶部光谱)和使用实施例9中描述的方法制备的RX-3117(底部光谱)的X射线粉末衍射数据。

具体实施方式

[0079] 定义

[0080] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语的含义是所公开的主题所属领域的普通技术人员通常理解的那些含义。本领域的普通技术人员将会理解的是,与本文描述的那些类似或等同的任何方法和材料也可以用于实践或测试所公开的主题。

[0081] 除非另外明确指出,否则本文使用的以下术语具有以下所示的含义。这些含义旨在补充而不是改变本领域中所理解的这些术语的含义。

[0082] “ $C_{\text{最大}}$ ”是指观察到的最大血浆浓度。

[0083] “ $T_{\text{最大}}$ ”是指达到 $C_{\text{最大}}$ 的时间。

[0084] “ $T_{1/2}$ ”是指药物的血浆浓度达到其原始值的一半所需的时间。“末期 $T_{1/2}$ (terminal $T_{1/2}$)”是指所述末期 (terminal phase) 中的 $T_{1/2}$ 。

[0085] “ AUC_{0-t} ”是指从时间零到时间t的血浆浓度相对于时间曲线下的面积 (AUC), 其中“t”是具有可测定浓度的最后采样时间点。例如, AUC_{0-24} 或 AUC_{0-t} ($0 \sim 24\text{h}$) 是指零时至24h的AUC。

[0086] “口服剂型”是指配制用于口服给药的药物组合物。口服剂型能够经过配制从而提供即时 (immediate), 持续 (sustained), 延长 (extended), 延迟 (delayed) 或受控 (controlled) 的释放。口服剂型的例子包括片剂, 胶囊剂, 颗粒剂和凝胶帽 (gel-cap)。

[0087] “有效量”是指基于其疗效和潜在毒性参数以及本领域技术人员的知识产生所需效果如治疗或预防病症的化合物或药物组合物的用量。有效量能够以一个或多个剂量进行给药。

[0088] “接触”是指直接或间接地使化合物和细胞足够接近从而产生所需效果, 如诱导细胞凋亡或调节蛋白激酶。所述接触可以在体外或体内进行。例如, 使细胞与化合物接触能够包括使用已知技术如显微注射将化合物直接递送至所述细胞中, 将所述化合物给予携带所述细胞的受试者, 或将所述细胞孵育于包含所述化合物的培养基中。

[0089] “治疗”是指获得有益的或所需的结果, 如临床结果。在一些实施方式中, 所述有益的或所需的结果是以下中的任何一种或多种: 抑制 (inhibit) 或阻碍 (suppress) 病症的发作或发展, 降低所述病症的严重程度, 减少与病症相关的症状数量或严重度, 提高患有该病症的受试者的生活质量, 降低治疗该病症所需的另一种药物的剂量, 增强受试者针对该病症正在服用的另一种药物的效果, 以及延长患有该病症的受试者的生存期。

[0090] “预防”是指降低受试者发展受试者未患有但有发展风险的病症的可能性。“具有风险”表示所述受试者具有一个或多个风险因素, 它们是与疾病发展相关的可测定参数, 并是本领域内熟知的。具有一种或多种风险因素的受试者比没有这类风险因素的受试者具有更高的发展该病症的可能性。

[0091] “受试者”是指动物, 例如, 哺乳动物, 包括但不限于人类。因此, 本文公开的所述方法能够用于人类治疗和兽医应用。在一个实施方式中, 所述受试者是哺乳动物。在其他实施方式中, 所述受试者是人。

[0092] “禁食的”是指在治疗之前已经禁食食物至少8h的受试者。

[0093] “细胞凋亡”或“细胞凋亡过程”是指当细胞接收内部或外部信号 (细胞凋亡信号) 时开始的程序性细胞死亡过程, 并且通过一系列触发执行阶段 (execution phase) 的生物

化学事件(信号传导通路阶段)进行。在所述执行阶段,效应物半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶切割重要的细胞蛋白,导致表征细胞凋亡的形态变化。这些变化能够包括,例如,细胞收缩,内质网扩张,细胞碎片化,膜囊泡(凋亡小体)的形成,脱氧核糖核酸(DNA)碎片化,染色质凝集(chromatin condensation),染色体迁移,细胞核中边缘化(margination),线粒体肿胀,线粒体脊膜(mitochondrial cristae)加宽,线粒体可渗透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore)的打开,线粒体质子梯度的消散,和/或质膜起泡(blebbing)。用于检测和测定细胞凋亡的示例性测定法包括致密体(pyknotic bodies)的显微镜检查以及酶促测定法,如末端脱氧核苷酸转移酶dUTP缺口末端(nick end)标记(TUNEL),半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶测定,膜联蛋白测定和DNA梯(DNA laddering)。凋亡细胞能够定量,例如,通过对用针对DNA低倍性(hypoploidy)的碘化丙啶染色的细胞进行FACS分析。

[0094] “诱导细胞凋亡”是指直接或间接引起细胞凋亡,其特征可以是给定细胞群体中经历细胞凋亡的细胞数量增加,细胞发生凋亡的速率增加,或细胞凋亡的一种或多种形态特征发生的强度,数量或速率增加。

[0095] “敏化”是指增加细胞对细胞凋亡信号的敏感性,或降低细胞对细胞凋亡信号的应答的抗性。

[0096] “凋亡信号”是指激活凋亡信号传导通路的刺激物。

[0097] “凋亡信号传导通路(apoptotic signaling pathway)”是指触发细胞凋亡的细胞死亡的一系列分子信号。所述通路从接收信号开始,并在触发凋亡的执行阶段时结束。

[0098] “调节”是指改变生物分子如蛋白激酶的表达和/或活性。在一个实施方式中,调节是指增加生物分子的表达和/或活性。在其他实施方式中,调节是指降低生物分子的表达和/或活性。

[0099] “蛋白激酶”是指通过磷酸化修饰其他蛋白的激酶。蛋白激酶的实例包括丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(例如,检查点激酶1,检查点激酶2),酪氨酸特异性蛋白激酶,组氨酸特异性蛋白激酶和混合激酶(例如,有丝分裂原(mitogen)活化的蛋白激酶激酶)。在一个实施方式中,所述蛋白激酶是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。在一个实施方式中,所述蛋白激酶是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。在其他实施方式中,所述蛋白激酶是检查点激酶1(Chk1)或检查点激酶2(Chk2)。在其他实施方式中,所述蛋白激酶是Chk1。在其他实施方式中,所述蛋白激酶是Chk2。

[0100] “p53”是指由p53肿瘤抑制基因编码的蛋白。

[0101] “UCK2”是指主要在肿瘤细胞或组织中表达的尿苷胞嘧啶激酶2。

[0102] “肿瘤细胞”是指来源于肿瘤的细胞。

[0103] “肿瘤”是指组织或细胞的异常生长,无论是良性的还是恶性的。实例包括前列腺,肺,脑,乳腺,肾,肝,肺,肠,淋巴,肌肉,骨,骨髓,子宫,卵巢,阴道,外阴,胰腺,肾上腺,中枢神经系统,外周神经系统,子宫颈,膀胱,子宫内膜,咽喉,食道,喉,甲状腺,血液,penal,睾丸,胸腺,皮肤,脊椎,胃,胆管,小肠,肝胆道,结直肠,结肠,直肠,肛门,内分泌,眼睛和胆囊中发现的肿瘤。

[0104] “癌症”是指恶性肿瘤。癌细胞可能侵入或未侵入所述周围组织,因此可能转移或可能未转移到新的身体部位。癌症包括癌瘤,其是上皮细胞的癌症;癌瘤包括鳞状细胞癌,

腺癌,黑素瘤和肝癌。癌症还包括肉瘤,它们是间充质源的肿瘤;肉瘤包括成骨肉瘤,白细胞瘤和淋巴瘤。癌症可以涉及一种或多种肿瘤细胞类型。

[0105] “抗肿瘤剂”是指用于治疗或预防肿瘤的任何试剂。抗肿瘤剂的实例包括下文在药物组合物中所述的活性剂。在这些实施方式中,除了RX-3117之外的抗肿瘤剂选自抗代谢物,DNA-断裂剂,DNA-交联剂,插入剂,蛋白合成抑制剂,拓扑异构酶I毒物,拓扑异构酶II毒物,微管导向剂,激酶抑制剂,多酚类,激素类,激素拮抗剂,死亡受体激动剂,免疫检查点抑制剂,抗程序性细胞死亡1(PD-1)受体抗体和抗程序性细胞死亡配体1(PD-L1)抗体。在其他实施方式中,所述附加的抗肿瘤剂是PD-1受体抗体。在其他实施方式中,所述附加的抗肿瘤剂是派姆单抗(pembrolizumab)。在其他实施方式中,所述附加的抗肿瘤剂是纳武单抗(nivolumab)。在其他实施方式中,所述附加的抗肿瘤剂是德亚单抗(duryalumab)。在其他实施方式中,所述附加的抗肿瘤剂是纳武单抗和派姆单抗的组合。

[0106] “辐射”是指用于治疗或预防肿瘤的任何辐射。辐射的实例包括X射线, γ 射线和带电粒子。所述辐射可以通过任何形式的放射疗法如外部线束放射疗法(EBRT,XBRT或远程放射疗法),近程放射疗法(内部放射疗法或密封源疗法),术中放射疗法(intraoperative radiotherapy)或全身放射疗法进行递送。

[0107] “分离”是指通过纯化如通过色谱法,蒸馏,过滤,提取,干燥或重结晶将中间体与反应混合物分离的任何方法。

[0108] “固定反应器或容器”是指在设计中的固定位置不能移动的反应器系统。

[0109] “诸如”具有与“例如,但不限于”相同的含义。类似地,“包括”具有与“包括但不限于”相同的含义,而“包含”具有与“包含但不限于”的相同含义。

[0110] 除非上下文另外指出,否则单数形式“一个”,“或”和“该”包括复数指示物。因此,例如,提及“化合物”可以包括一种或多种化合物和/或其等价物。

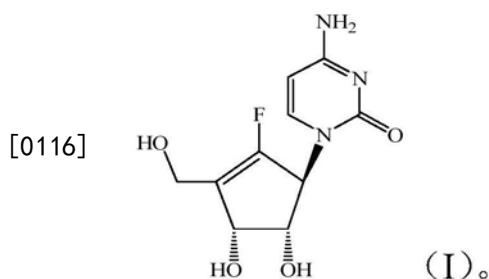
[0111] 除非另外指明,否则本文公开的任何数值范围包括上限和下限以及每个中间值。

[0112] 除了在工作实施例中,或在另外指出之处,在本说明书和权利要求书中使用的数值(如表示成分的量,反应条件的数字)由术语“约”修饰。因此,除非有相反的指出,否则这些数字都是近似值,其可以根据所希望获得的性质而变化。至少,而不是试图限制权利要求范围的等同物的原则的应用,每个数字参数应该根据有效数字的数目和普通的四舍五入技术进行解释。

[0113] 尽管阐述所公开的主题的范围的数字参数是近似值,但是在工作实施例中阐述的数值是尽可能精确地报告的。然而,任何数值固有地包含必然由其相应的测试测定中发现的标准偏差所导致的某些误差。

[0114] 诱导细胞凋亡或使细胞对凋亡信号敏化的方法

[0115] 本公开的一个方面提供了通过给予有效量的式(I)化合物(RX-3117)或其水合物、溶剂化物或药用盐的步骤诱导细胞凋亡的方法



[0117] 在一些实施方式中,所述式(I)化合物可以以一水合物或游离形式给药。

[0118] 本公开的另一个方面提供了通过使细胞与有效量的式(I)化合物或其水合物、溶剂化物或药用盐接触的步骤诱导细胞中的细胞凋亡的方法。

[0119] 在一个实施方式中,所述方法通过单链断裂(SSB)或双链断裂(DSB)诱导细胞凋亡。在其他实施方式中,所述方法通过SSB诱导细胞凋亡。在其他实施方式中,所述方法通过DSB诱导细胞凋亡。

[0120] 本公开的另一个方面提供了通过使细胞与有效量的式(I)化合物或其水合物,溶剂化物或药用盐接触使细胞对细胞凋亡信号敏化的方法。

[0121] 在本文提供的任何方法的一个实施方式中,所述细胞是肿瘤细胞。在其他实施方式中,所述细胞是恶性肿瘤细胞。在其他实施方式中,所述细胞是肺癌细胞。在其他实施方式中,所述细胞是非小细胞肺癌细胞。在其他实施方式中,所述细胞是胰腺癌细胞。在其他实施方式中,所述细胞是膀胱癌细胞。在其他实施方式中,所述细胞是结直肠癌细胞。在其他实施方式中,所述细胞是哺乳动物细胞或哺乳动物中的细胞。在其他实施方式中,所述细胞是人细胞或人中的细胞。

[0122] 调节蛋白激酶的方法

[0123] 本公开的另一个方面提供了调节细胞中的蛋白激酶的方法,其中所述方法包括使所述细胞与有效量的式(I)化合物或其水合物、溶剂化物或药用盐接触。在这些实施方式中,通过增加蛋白激酶调节所述蛋白激酶。所述增加,例如,可以为5%或更高,10%或更高,20%或更高,25%或更高,30%或更高,40%或更高,50%或更高,60%或更高,70%或更高,75%或更高,80%或更高,90%或更高,或95%或更高。

[0124] 在这些实施方式中,所述蛋白激酶是检查点蛋白激酶。在其他实施方式中,所述蛋白激酶是检查点激酶1(Chk1)或检查点激酶2(Chk2)。在其他实施方式中,所述蛋白激酶是Chk1。在其他实施方式中,所述蛋白激酶是Chk2。

[0125] 在这些实施方式中,所述细胞是哺乳动物中的细胞。在其他实施方式中,所述细胞是人体内的细胞。

[0126] 在这些实施方式中,所述方法会提高蛋白激酶表达水平。

[0127] 治疗或预防非小细胞肺癌的方法

[0128] 本公开的另一个方面提供了通过以下步骤治疗或预防非小细胞肺癌的方法:

[0129] (i) 诊断具有非小细胞肺癌细胞的受试者;和

[0130] (ii) 向所述受试者给予有效量的式(I)化合物或其水合物、溶剂化物或药用盐。

[0131] 预测治疗的疗效的方法

[0132] 本公开的另一个方面提供了通过以下步骤预测采用式(I)化合物或其水合物、溶剂化物或药用盐治疗需要其的受试者的疗效的方法:

- [0133] (i) 从受试者收集肿瘤细胞或组织样品；
- [0134] (ii) 测定所述样品中的蛋白激酶或p53表达水平之一，
- [0135] (iii) 使所述肿瘤细胞或组织与式(I)的化合物接触；
- [0136] (iv) 在与式(I)化合物接触后测定所述肿瘤细胞或组织中的蛋白激酶或p53表达水平之一，其中蛋白激酶或p53表达水平的增加指示疗效的可能性。

[0137] 在这些实施方式中，使所述肿瘤细胞或组织与式(I)的化合物接触通过与所述肿瘤细胞或组织的样品接触而完成。在这样的实施方式中，对样品实施与式(I)化合物接触后测定所述肿瘤细胞或组织中的蛋白激酶或p53表达水平之一。在其他实施方式中，使式(I)化合物与所述肿瘤细胞或组织接触是通过将式(I)化合物给药于受试者而实现。在这样的实施方式中，在与式(I)化合物接触之后测定所述肿瘤细胞或组织中的蛋白激酶或p53表达水平之一是通过从所述受试者收集肿瘤细胞或组织的第二样品并测定所述第二样品中蛋白激酶或p53表达水平之一而进行的。

[0138] 在这些实施方式中，所述方法进一步包括如果检测到蛋白激酶或p53表达水平之一增加，则用式(I)的化合物向所述受试者给药。如果蛋白激酶的量增加了统计显著量，则认为蛋白激酶已经增加。因此，所述增加可以是5%或更多，10%或更多，20%或更多，或25%或更多。在其他实施方式中，所述方法进一步包括在步骤(i i)和(iv)中测定所述样品中的蛋白Cdc25C或p-Cdc25C表达水平的步骤，其中蛋白Cdc25C或p-Cdc25C表达水平的降低指示疗效的可能性。如果蛋白Cdc25C或p-Cdc25C表达水平降低了统计学显著量，则认为蛋白Cdc25C或p-Cdc25C表达水平降低。因此，所述降低可以是5%或更多，10%或更多，20%或更多，或25%或更多。在其它实施方式中，所述方法进一步包括如果检测到蛋白激酶或p53表达水平之一增加和蛋白Cdc25C或p-Cdc25C表达水平降低，则向所述受试者给药式(I)的化合物。在这些实施方式中，式(I)的所述化合物以一水合物形式给药。在其它实施方式中，式(I)的所述化合物以无溶剂化物、水合物和盐的形式给药。

[0139] 在这些实施方式中，所述方法包括在步骤(i i)和(iv)中测定蛋白激酶的表达水平。在其他实施方式中，所述蛋白激酶是检查点激酶。在其他实施方式中，所述蛋白激酶是Chk1或Chk2。在其他实施方式中，所述蛋白激酶是Chk1。在其他实施方式中，所述蛋白激酶是Chk2。

[0140] 本公开的另一个方面提供了通过以下步骤预测用式(I)化合物或其水合物、溶剂化物或药用盐治疗需要其的受试者的疗效的方法：

- [0141] (i) 从所述受试者采集肿瘤细胞或组织的样品；和
- [0142] (ii) 测定所述肿瘤细胞或组织中的UCK2表达的水平；
- [0143] 其中UCK2的所述表达水平指示用式(I)化合物治疗的疗效的可能性。

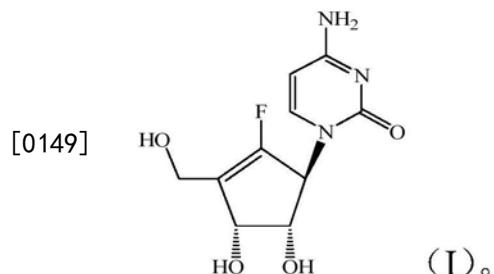
[0144] 在一些实施方式中，所述方法进一步包括如果在肿瘤细胞或组织中测得UCK2的表达增加，则用式(I)化合物给药于所述受试者。在这些实施方式中，UCK2表达通过免疫印迹针对β-肌动蛋白标准化的UCK2的蛋白质水平进行测定。如果与预定水平相比，所述UCK2表达的量增加了统计学显著量，则认为所述UCK2具有增加的表达水平。因此，所述增加可以是5%或更多，10%或更多，20%或更多，或25%或更多。在这些实施方式中，所述预定水平可以是非肿瘤细胞上的UCK2表达的水平。在这些实施方式中，所述预定水平可以是所述受试者的非肿瘤细胞上的UCK2表达的水平。

[0145] 在这些实施方式中,所述受试者是哺乳动物。在其他实施方式中,所述受试者是人。

[0146] 在这些实施方式中,所述肿瘤细胞是肺癌细胞。在其他实施方式中,所述肿瘤细胞是非小细胞肺癌细胞。

[0147] 治疗或预防肿瘤的方法

[0148] 本公开的另一个方面提供了通过向需要其的受试者给予包含有效量的式(I)化合物或其水合物、溶剂化物或药用盐,剂量约300~2000mg/天的口服剂型的步骤治疗或预防肿瘤的方法



[0150] 在其他实施方式中,所述剂量为约400~800mg/天。在其他实施方式中,所述剂量为约500~700mg/天。在其他实施方式中,所述剂量为约300mg/天。在其他实施方式中,所述剂量为约400mg/天。在其他实施方式中,所述剂量为约500mg/天。在其他实施方式中,所述剂量为约600mg/天。在其他实施方式中,所述剂量为约700mg/天。在其他实施方式中,所述剂量为约800mg/天。

[0151] 约300~2000mg/天的剂量是基于体重或身体质量约60~80kg的成年人。因此,所述剂量能够处于约5~33mg/kg/天的范围内。基于受试者重量的其他剂量能够很容易地由这些值计算。类似地,本领域技术人员将能够基于与人类剂量的已知相关性计算其他物种的剂量。

[0152] 在这些实施方式中,所述口服剂型每周给药3~7天。在其他实施方式中,所述口服剂型每周给药4~7天。在其他实施方式中,所述口服剂型每周给药5~7天。在其他实施方式中,所述口服剂型每周给药5或7天。在其他实施方式中,所述口服剂型每周给药3天。在其他实施方式中,所述口服剂型每周给药4天。在其他实施方式中,所述口服剂型每周给药5天。在其他实施方式中,所述口服剂型每周给药6天。在其他实施方式中,所述口服剂型每周给药7天。

[0153] 在这些实施方式中,所述总日剂量以一个或多个剂量给药。在其他实施方式中,所述口服剂型每天给药一次。在其他实施方式中,所述口服剂型每天给药两次。在其他实施方式中,所述口服剂型每天给药三次。在其他实施方式中,所述口服剂型每天给药四次。

[0154] 在这些实施方式中,所述口服剂型以最高达约20,000mg/月的剂量给药。所述每月总剂量可以每周1~7天给药三周,然后停止一周(“停药一周”),或无停止地给药四周。对于治疗的每一周,所述口服剂型可以每周给药1~7天。在一个实施方式中,所述口服剂型给药三周,然后停止一周。在其它实施方式中,所述口服剂型每周给药3~7天,持续三周,接着停止一周。在其他实施方式中,所述口服剂型每周给药5~7天,持续三周,然后停止一周。在其他实施方式中,所述口服剂型每天给药持续三周,接着停止一周。在其他实施方式中,所述口服剂型每天给药持续28天。每个给药周期由以下构成:3周的治疗,然后是停止1周,或4个

连续/持续周治疗。正如本领域技术人员所确定的那样，所述给药周期可以按需要的频率重复进行。在一个实施方式中，所述口服剂型给药最多达12个给药周期。在其他实施方式中，所述口服剂型给药最多达6个给药周期。

[0155] 在这些实施方式中，所述口服剂型以每周5~7天约300~2000mg/天的剂量给药。在其他实施方式中，所述剂量为约400~800mg/天，每周5~7天。在其它实施方式中，所述剂量为约500~700mg/天，每周5~7天。在其他实施方式中，所述剂量为约500~700mg/天，每周5或7天。在其他实施方式中，所述剂量是约500mg/天，每周5天。在其他实施方式中，所述剂量为约500mg/天，每周7天。在其他实施方式中，所述剂量为约600mg/天，每周5天。在其他实施方式中，所述剂量为约600mg/天，每周7天。在其他实施方式中，所述剂量为约700mg/天，每周5天。在其他实施方式中，所述剂量为约70mg/天，每周7天。

[0156] 在这些实施方式中，所述口服剂型每天一次以约400mg/天给药，每周5天。在其他实施方式中，所述口服剂型每天一次以约500mg/天给药，每周5天。在其他实施方式中，所述口服剂型每天一次以约600mg/天给药，每周5天。在其他实施方式中，所述口服剂型每天一次以约700mg/天给药，每周5天。在其他实施方式中，所述口服剂型每天一次以约800mg/天给药，每周5天。

[0157] 在这些实施方式中，所述口服剂型每天一次以约400mg/天给药，每周7天。在其他实施方式中，所述口服剂型每天一次以约500mg/天给药，每周7天。在其他实施方式中，所述口服剂型每天一次以约600mg/天给药，每周7天。在其他实施方式中，所述口服剂型每天一次以约700mg/天给药，每周7天。在其他实施方式中，所述口服剂型每天一次以约800mg/天给药，每周7天。

[0158] 在这些实施方式中，所述口服剂型每周5~7天以约3~35mg/kg/天给药。在其他实施方式中，所述口服剂型每周5天以约3~35mg/kg/天给药。在其它实施方式中，所述口服剂型每周6天以约3~35mg/kg/天给药。在其他实施方式中，所述口服剂型每周7天以约3~35mg/kg/天给药。在其他实施方式中，所述口服剂型每周5~7天以约6~12mg/kg/天给药。在其他实施方式中，所述口服剂型每周5天以约6~12mg/kg/天给药。在其他实施方式中，所述口服剂型每周6天以约6~12mg/kg/天给药。在其他实施方式中，所述口服剂型每周7天以约6~12mg/kg/天给药。

[0159] 在一些实施方式中，所述口服剂型是固体。在其他实施方式中，所述口服剂型是片剂。在其他实施方式中，所述口服剂型是胶囊。在其他实施方式中，所述口服剂型是立即释放的。在其他实施方式中，所述口服剂型是延时释放的。

[0160] 在这些实施方式中，所述口服剂型在受试者禁食食物至少约8h后给药。在其它实施方式中，所述受试者在给药后继续禁食食物至少约1h。在其他实施方式中，所述口服剂型与食物一起给药于所述受试者。

[0161] 在一些实施方式中，式(I)的所述化合物以一水合物形式给药。在其它实施方式中，式(I)的所述化合物以无溶剂化物、水合物和盐形式的给药。

[0162] 在这些实施方式中，所述口服剂型在单次给药后提供约3~20h的T_{1/2}。在其他实施方式中，所述口服剂型在单次给药后提供约5~10h的T_{1/2}。在其它实施方式中，所述口服剂型在单次给药后提供约6~9h的T_{1/2}。在其它实施方式中，所述口服剂型在单次给药后提供约9~11h的T_{1/2}。在其它实施方式中，所述口服剂型在单次给药后提供约6~7h的T_{1/2}。在其

他实施方式中，所述口服剂型在单次给药后提供约6h的 $T_{1/2}$ 。在其他实施方式中，所述口服剂型在单次给药后提供约7h的 $T_{1/2}$ 。在其它实施方式中，所述口服剂型在单次给药后提供约8h的 $T_{1/2}$ 。在其它实施方式中，所述口服剂型在单次给药后提供约9h的 $T_{1/2}$ 。在其它实施方式中，所述口服剂型在单次给药后提供约10h的 $T_{1/2}$ 。在其他实施方式中，所述口服剂型在单次给药后提供约11h的 $T_{1/2}$ 。

[0163] 在这些实施方式中，所述口服剂型在单次给药后提供约2~6h的 $T_{\text{最大}}$ 。在其他实施方式中，所述口服剂型在单次给药后提供约4~6h的 $T_{\text{最大}}$ 。在其它实施方式中，所述口服剂型在单次给药后提供约2~4h的 $T_{\text{最大}}$ 。在其他实施方式中，所述口服剂型在单次给药后提供约2h的 $T_{\text{最大}}$ 。在其他实施方式中，所述口服剂型在单次给药后提供约3h的 $T_{\text{最大}}$ 。在其他实施方式中，所述口服剂型在单次给药后提供约4h的 $T_{\text{最大}}$ 。在其他实施方式中，所述口服剂型在单次给药后提供约5h的 $T_{\text{最大}}$ 。在其他实施方式中，所述口服剂型在单次给药后提供约6h的 $T_{\text{最大}}$ 。

[0164] 在这些实施方式中，所述口服剂型在单次给药后提供约30~3000ng/mL的 $C_{\text{最大}}$ 。在其他实施方式中，所述口服剂型在单次给药后提供约600~2000ng/mL的 $C_{\text{最大}}$ 。在其他实施方式中，所述口服剂型在单次给药后提供约700~1,500ng/mL的 $C_{\text{最大}}$ 。在其它实施方式中，所述口服剂型在单次给药后提供约600~1,100ng/mL的 $C_{\text{最大}}$ 。在其他实施方式中，所述口服剂型在单次给药后提供约700~1,100ng/mL的 $C_{\text{最大}}$ 。在其它实施方式中，所述口服剂型在单次给药后提供约600~700ng/mL的 $C_{\text{最大}}$ 。在其他实施方式中，所述口服剂型在单次给药后提供约700~800ng/mL的 $C_{\text{最大}}$ 。在其它实施方式中，所述口服剂型在单次给药后提供约800~900ng/mL的 $C_{\text{最大}}$ 。在其它实施方式中，所述口服剂型在单次给药后提供约900~1,000ng/mL的 $C_{\text{最大}}$ 。在其他实施方式中，所述口服剂型在单次给药后提供约1,000~1,100ng/mL的 $C_{\text{最大}}$ 。

[0165] 在这些实施方式中，所述口服剂型在单次给药后提供约200~18,000h·ng/mL的 AUC_{0-t} (0~24h)。在其他实施方式中，所述口服剂型在单次给药后提供约7,000~14,000h·ng/mL的 AUC_{0-t} (0~24h)。在其它实施方式中，所述口服剂型在单次给药后提供约8,000~12,000h·ng/mL的 AUC_{0-t} (0~24h)。在其他实施方式中，所述口服剂型在单次给药后提供约8,000~10,000h·ng/mL的 AUC_{0-t} (0~24h)。在其它实施方式中，所述口服剂型在单次给药后提供约8,000~9,000h·ng/mL的 AUC_{0-t} (0~24h)。在其它实施方式中，所述口服剂型在单次给药后提供约9,000~10,000h·ng/mL的 AUC_{0-t} (0~24h)。在其他实施方式中，所述口服剂型在单次给药后提供约10,000~11,000h·ng/mL的 AUC_{0-t} (0~24h)。在其它实施方式中，所述口服剂型在单次给药后提供约11,000~12,000h·ng/mL的 AUC_{0-t} (0~24h)。

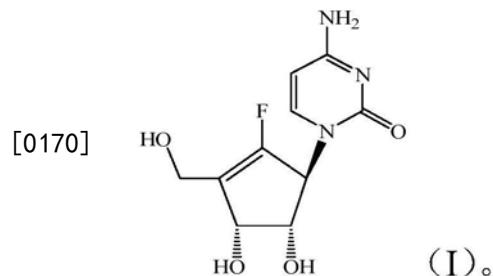
[0166] 在这些实施方式中，所述肿瘤是卵巢癌；转移性乳腺癌；胰腺的腺癌；胃肠癌如结肠直肠腺癌或食道癌，胃癌，胰腺癌，小肠癌，肝胆道癌，结肠癌，直肠癌或肛门癌；膀胱癌如转移性膀胱癌，肌肉侵入性膀胱癌(muscle invasive bladder cancer)或非肌肉侵入性膀胱癌；宫颈癌；肺癌；非小细胞肺癌；或肾细胞癌。在其他实施方式中，所述肿瘤是胰腺癌，膀胱癌或结肠直肠癌。在其他实施方式中，所述肿瘤是胰腺癌。在其他实施方式中，所述癌症是膀胱癌。在其他实施方式中，所述癌症是结肠直肠癌。在其他实施方式中，所述癌症是结肠癌。在其他实施方式中，所述癌症是直肠癌。在其他实施方式中，所述肿瘤是非小细胞肺癌，并且式(I)的所述化合物或其水合物、溶剂化物或药用盐与顺铂(cisplatin)一起给药。在其他实施方式中，所述肿瘤是吉西他滨(gemcitabine)抗药性的。参见Yang et al., Anticancer Research, 34:6951-6960 (2014) (显示了RX-3117在各种异种移植植物模型中，甚

至在对吉西他滨抗药性的肿瘤中的疗效)。

[0167] 在这些实施方式中,所述受试者是哺乳动物。在其他实施方式中,所述受试者是人。

[0168] 测试治疗的疗效的试剂盒

[0169] 本公开的另一个方面提供了使用在肿瘤细胞的样品中测定蛋白激酶、p53或UCK2表达水平之一的测试来测试式(I)化合物或其水合物、溶剂化物或药用盐在肿瘤治疗中的潜在疗效的试剂盒



[0171] 在这些实施方式中,所述试剂盒进一步包含测定肿瘤细胞样品中的蛋白Cdc25C或p-Cdc25C表达水平的测试。

[0172] 在任何实施方式中,所述肿瘤细胞是肺癌细胞。在其他实施方式中,所述肿瘤细胞是非小细胞肺癌细胞。在其他实施方式中,所述肿瘤细胞是胰腺癌细胞或膀胱癌细胞。

[0173] 药物组合物

[0174] 在本文提供的任何方法和试剂盒中,式(I)的所述化合物可以在药物组合物中。这种药物组合物可以制备成任何适当的单位剂量形式。例如,所述药物组合物能够配制成以固体或液体形式给药,包括适用于以下的那些:(1)口服给药,例如作为湿润剂(drenches),片剂(如针对用于口腔、舌下和全身吸收的那些,包括完全包封(over-encapsulation)片剂),胶囊(诸如干填充的,硬明胶,软明胶或完全包封胶囊),囊片,丸剂,散剂,囊剂,颗粒剂,糊剂,口腔喷雾剂,片锭剂(troch),锭剂(lozenge),丸剂,糖浆剂,悬浮剂,酏剂,液体,脂质体,乳剂和微乳剂;或(2)通过例如皮下、肌肉内、静脉内或硬膜外注射,例如,作为无菌溶液或悬浮液非肠道给药。另外,所述药物组合物能够配制成立即,持续,延长,延迟或受控释放。

[0175] 在一个实施方式中,所述药物组合物配制成用于口服给药。在这些实施方式中,所述药物组合物呈片剂或胶囊形式。在其他实施方式中,所述药物组合物是片剂形式。在其他实施方式中,所述药物组合物呈胶囊形式。在其他实施方式中,所述片剂或胶囊配制成用于立即释放。在其他实施方式中,所述片剂或胶囊配制成用于持续,延长,延迟或受控释放。

[0176] 片剂能够通过可选地与一种或多种辅助成分一起压制或模制而制备。压制片剂能够通过在合适的机器中以自由流动形式如,可选地与粘合剂,润滑剂,惰性稀释剂,防腐剂,表面活性剂或分散剂混合的粉末或颗粒压制化合物(I)而制备。模制片剂能够通过在合适的机器中模制用惰性液体稀释剂润湿的所述粉状化合物的混合物进行制备。所述片剂能够可选地包衣(coat)或刻痕(score),并能够经过配制从而提供化合物(I)的持续、延长、延迟或受控释放。配制这种持续、延长、延迟或受控释放组合物的方法在本领域内是已知的,并公开于所公布的美国专利,包括但不限于,美国专利No.4,369,174;4,842,866;和其中引用的参考文献中。涂层(包衣,coating)能够用于将化合物递送至肠(参见,例如,美国专利

No. 6,638,534; 5,217,720; 6,569,457; 和其中引用的参考文献)。除了片剂之外,可以配制其它剂型如胶囊,颗粒剂和凝胶帽,以提供化合物(I)的持续、延长、延迟或受控释放。

[0177] 在这些实施方式中,所述药物组合物配制成用于肠胃外给药。适合肠胃外给药的药物组合物的实例包括水性无菌注射溶液和非水性无菌注射溶液,各自含有例如抗氧化剂,缓冲剂,抑菌剂和/或使得所述制剂与预期接受者的血液等渗的溶质;和水性无菌悬浮液和非水性无菌悬浮液,各自含有例如悬浮剂和/或增稠剂。所述制剂能够以单位剂量或多剂量容器(例如,密封的安瓿或小瓶)存在,并能够以即将使用时仅需要添加无菌液体载体如水的冷冻干燥(冻干)条件进行储存。在一个实施方式中,所述药物组合物配制成用于静脉内给药。

[0178] 在这些实施方式中,所述药物组合物进一步包含药用赋形剂。药用赋形剂可以是用作用于将治疗剂递送给患者,或加入到药物组合物中以改善其处理或储存特性或允许或促进化合物或药物组合物形成为用于给药的单位剂型的载体、稀释剂、佐剂、粘合剂和/或运载体而其本身不是治疗剂的任何物质。药用赋形剂在制药领域是已知的,并公开于例如 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第21版 (Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2005) 中。正如本领域技术人员所知,药用赋形剂能够提供多种功能并能够描述为润湿剂,缓冲剂,悬浮剂,润滑剂,乳化剂,崩解剂,吸收剂,防腐剂,表面活性剂,着色剂,调味剂和甜味剂。药用赋形剂的实例包括,但不限于:(1)糖,如乳糖,葡萄糖和蔗糖;(2)淀粉,如玉米淀粉和马铃薯淀粉;(3)纤维素及其衍生物,如羧甲基纤维素钠,乙基纤维素,乙酸纤维素,羟丙基甲基纤维素和羟丙基纤维素;(4)黄蓍胶粉末;(5)麦芽;(6)明胶;(7)滑石粉;(8)赋形剂,如可可脂和栓剂蜡;(9)油,如花生油,棉籽油,红花油,芝麻油,橄榄油,玉米油和大豆油;(10)二醇,如丙二醇;(11)多元醇,如甘油,山梨醇,甘露醇和聚乙二醇;(12)酯,如油酸乙酯和月桂酸乙酯;(13)琼脂;(14)缓冲剂,如氢氧化镁和氢氧化铝;(15)海藻酸;(16)无热原水;(17)等渗盐水;(18)林格氏溶液 (Ringer's solution);(19)乙醇;(20)pH缓冲溶液;(21)聚酯,聚碳酸酯和/或聚酐;和(22)药物制剂中使用的其他无毒相容物质。

[0179] 在一些实施方式中,所述药物组合物除了RX-3117之外进一步包含至少一种活性剂。所述活性剂可以是抗肿瘤剂,化学疗法药物,细胞毒剂,放射治疗剂(外部线束放射疗法,内部放射疗法或全身放射疗法)或能够诱导细胞凋亡,使细胞对细胞凋亡敏化,调节蛋白激酶或治疗赘生物、肿瘤或癌症的任何其它试剂。所述活性剂的实例包括:(1)抗代谢物,如阿糖胞苷,氟达拉滨,5-氟-2'-脱氧尿苷,吉西他滨,羟基脲或甲氨蝶呤;(2)DNA断裂剂,如博来霉素,(3)DNA-交联剂,如苯丁酸氮芥(chlorambucil),顺铂,环磷酰胺和氮芥;(4)插入剂,如阿霉素(多柔比星)和米托蒽醌;(5)蛋白质合成抑制剂,如L-天冬酰胺酶,放线菌酮(cycloheximide),嘌呤霉素(puromycin)和白喉毒素(diphtheria toxin);(6)拓扑异构酶I毒物,如喜树碱(camptothecin)和托泊替康(topotecan);(7)拓扑异构酶II毒物,如依托泊苷(etoposide)(VP-16)和替尼泊苷(teniposide);(8)微管导向剂,如秋水仙胺(colcemid),秋水仙碱(colchicine),紫杉醇,长春碱和长春新碱;(9)激酶抑制剂,如夫拉平度(flavopiridol),星形孢菌素(staurosporin)和7-羟基星孢菌素;(10)多酚,如槲皮素(quercetin),白藜芦醇(resveratrol),白皮杉醇(piceatannol),表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechine gallate),茶黄素(theaflavin),黄烷醇(flavanol),原花青素

(procyanidins), 桦木酸(betulinic acid)及其衍生物; (11) 激素, 如糖皮质激素(glucocorticoids)和芬维A胺(fenretinide); (12) 激素拮抗剂, 如他莫昔芬(tamoxifen), 非那斯提(fenretinide)和LHRH拮抗剂; 和 (13) 死亡受体激动剂, 如肿瘤坏死因子 α (TNF- α), 肿瘤坏死因子 β (TNF- β), LT- β (淋巴毒素- β), TRAIL(Apo2L, DR4配体), CD95(Fas, AP0-1)配体, TRAMP(DR3, Apo-3)配体, DR6配体及其片段和衍生物。

[0180] 在这些实施方式中, 所述药物组合物中式(I)化合物或其水合物、溶剂化物或药用盐的量为约0.1wt%~约100wt%。在其它实施方式中, 所述用量为约0.5wt%~约99.5wt%。在这些实施方式中, 所述用量为约10wt%~约95wt%。在这些实施方式中, 所述用量为约15wt%~约90wt%。在这些实施方式中, 所述用量为约80wt%~约90wt%。在这些实施方式中, 所述用量为约80wt%~约85wt%。在这些实施方式中, 所述用量为至少30%, 至少40%, 至少50%, 至少60%, 至少70%, 或至少80%。在这些实施方式中, 所述药物组合物是口服剂型。在这些实施方式中, 所述药物组合物是片剂。

[0181] 给药的方法

[0182] 在本文提供的任何方法中, 化合物或药物组合物的给药可以通过本领域已知的任何可接受的模式, 例如, 口服或胃肠外给药。所述术语“胃肠外”包括, 但不限于, 皮下, 静脉内, 肌内, 腹膜内, 膀胱内, 鞘内, 心室内, 胸骨内(intrasternally), 颅内, 通过骨内注射和通过输注技术。在一个实施方式中, 所述化合物或药物组合物经口服给药。在其他实施方式中, 所述化合物或药物组合物肠胃外给药。在其他实施方式中, 所述化合物或药物组合物静脉内给药。

[0183] 在一个实施方式中, 所述化合物或药物组合物以本文公开的, 如在前文“治疗或预防肿瘤的方法”中的剂量(dose)或试剂量(dosage)口服给药。在本文公开的任何方法中, 所述化合物或药物组合物可以基于重量基剂量(weight based dose)进行给药。在其它实施方式中, 所述有效量为约0.01~约100mg/kg/天或约3~约35mg/kg/天。在这些实施方式中, 所述有效量为约6~12mg/kg/天。

[0184] 所述剂量水平可以经过调节而用于静脉内给药。在这种情况下, 所述化合物或药物组合物可以以约0.01 μ g/kg/min~约100 μ g/kg/min的量给药。

[0185] 联合疗法

[0186] 在本文提供的治疗或预防肿瘤的任何方法中, 所述方法可以进一步包括与一种或多种另外的抗肿瘤剂或辐射一起向受试者给药RX-3117。在一个实施方式中, 所述方法进一步包括向所述受试者给予辐射。在其它实施方式中, 所述方法进一步包括向所述受试者给予一种或多种另外的抗肿瘤剂。

[0187] 所述另外的抗肿瘤剂或辐射可以在给予式(I)的所述化合物或其水合物、溶剂化物或药用盐之前、之后或期间进行给予。在一个实施方式中, 所述另外的抗肿瘤剂或辐射在给予式(I)的所述化合物或其水合物、溶剂化物或药用盐之前进行给予。在其他实施方式中, 所述另外的抗肿瘤剂或辐射在给予式(I)化合物或其水合物、溶剂化物或药用盐之后给予。在其它实施方式中, 所述另外的抗肿瘤剂或辐射在给予式(I)的化合物或其水合物、溶剂化物或药用盐期间给予。在其他实施方式中, 所述另外的抗肿瘤剂和式(I)的化合物或其水合物、溶剂化物或药用盐配制到所述药物组合物中用于同时给药。

[0188] 放射敏化作用

[0189] 在A2780卵巢癌细胞和NSCLC细胞系中研究了RX-3117的放射敏化作用。据发现，RX-3117具有时间表依赖性(schedule dependent) 放射敏化作用,但仅在预孵育时(剂量修正系数(dose modifying factor):1.4~1.8),在脉冲和分次照射下观察到。在三维球状体模型中也可以看到放射敏化作用。在低放射敏化浓度下,RX-3117与辐射组合导致S期细胞的累积,这伴随着所有细胞周期蛋白如p-Chk2和p-cdc25C的增加。另外,由于DNA损伤,RX-3117引起细胞杀灭。综上所述,所述体外实验表明RX-3117具有放射敏化作用。

[0190] 肺癌患者接受标准手术治疗,而晚期患者(those in advanced disease)接受化疗(Baas P,Belderbos JSA,Senan S,Kwa HB,van Bochove A,van Tinteren H,Burgers JA and van Meerbeeck JP:Concurrent chemotherapy(carboplatin,paclitaxel,etoposide)and involved-field radiotherapy in limited stage small cell lung cancer:a Dutch multicenter phase II study.Br J Cancer 94:625-30,2006)。在临床中使用所述胞苷类似物、吉西他滨和顺铂的组合治疗所述疾病(E1-Naggar M,Ebbing E,Bijnnsdorp I,van den Berg J and Peters GJ:Radiosensitization by thymidine phosphorylase inhibitor in thymidine phosphorylase negative and overexpressing bladder cancer cell lines.Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids 33:413-21,2014)。然而,耐药性是一个限制因素,因此需要新型药物绕过所述耐药机制,并理想地显示出有效的组合特性。

[0191] RX-3117作用的机制

[0192] RX-3117是胞苷类似物(图14)。它具有对由碳-氟键代替氧和双键组成的所述核糖分子的修饰作用(Choi WJ,Chung H-J,Chandra G,Alexander V,Zhao LX,Lee HW,Nayak A,Majik MS,Kim HO,Kim J-H,Lee YB,Ahn CH,Lee SK and Jeong LS:fluorocyclopentenyl-cytosine with broad spectrum and potent antitumor activity.J Med Chem 55:4521-5,2012)。如图21所示,RX-3117通过人平衡核苷转运蛋白(hENT)进入所述细胞(Peters GJ,Smid K,Vecchi L,Kathmann I,Sarkisjan D,Honeywell RJ,Losekoot N,Ohne O,Orbach A,Blaugrund E,Jeong LS,Lee YB,Ahn C-H and Kim DJ:Metabolism,mechanism of action and sensitivity profile of fluorocyclopentenylcytosine(RX-3117).Invest New Drugs 31:1444-57,2013)。在所述细胞中,RX-3117被尿苷/胞苷激酶2(UCK2)磷酸化成其单磷酸酯形式,即RX-3117被UCK2激活成RX-3117MP。RX-3117三磷酸酯(RX-3117TP)结合到所述RNA中。通过核糖核苷酸还原酶(RR)将其RX-3117二磷酸酯(RX-3117DP)还原成脱氧二磷酸酯(dRX-3117DP),然后引入所述DNA中。RX-3117是胞苷脱氨酶(CDA)的较差的底物(id.)。最近证实了RX-3117在吉西他滨抗药性小鼠模型中的强效肿瘤生长抑制作用(Yang MY,Lee YB,Ahn C-H,Kaye J,Fine T,Kashi R,Ohne O,Smid K,Peters GJ and Kim DJ:A novel cytidine analog,RX-3117,shows potent efficacy in xenograft models,even in tumors that are resistant to gemcitabine.Anticancer Res 34:6951-9,2014)。已经研究了RX-3117的放射敏化作用,结果如下所示。

[0193] RX-3117被分类为嘧啶类似物(Peters GJ:Novel developments in the use of antimetabolites.Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids 33:358-74,2014),类似于其它类似物如吉西他滨和氮杂胞苷,其广泛用于临床。吉西他滨是一种有效的放射敏化剂,其会提高电

离诱导的DNA损伤修复(Morgan M A,Parsels L A,Maybaum J and Lawrence TS:Improving gemcitabine-mediated radiosensitization using molecularly targeted therapy:a review.Clin Cancer Res 14:6744-50,2008)。

[0194] 此外,所述胞苷类似物5-氮杂胞苷(氮杂-C,VidazaTM)和5-氮杂-2'-脱氧-胞苷(地西他滨,Dacogen[®])正用于临床中用于治疗骨髓增生异常综合征(MDS)(Peters GJ:Novel developments in the use of antimetabolites.Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids 33:358-74,2014)。这些药物的抗肿瘤作用的两个主要机制是RNA和/或DNA中的DNA甲基转移酶(DNMT)抑制作用和细胞毒性的引入(Kaminskas E,Farrell A,Abraham S,Baird A,Hsieh L-S,Lee S-L,Leighton JK,Patel H,Rahman A,Sridhara R,Wang Y-C and Pazdur R:Approval summary:azacitidine for treatment of myelodysplastic syndrome subtypes.Clin Cancer Res 11:3604-8,2005)。在摄入所述细胞后,通过UCK2将氮杂-C磷酸化为5-氮杂胞苷单磷酸酯(氮杂-CMP),并通过嘧啶核苷酸激酶磷酸化成氮杂-CDP和氮杂-CTP。然而,通过CDA的脱氨作用,使氮杂-C失活。RR将氮杂-CDP还原成氮杂-dCDP,其被核苷二磷酸酯激酶磷酸化成氮杂-dCTP。然后,将氮杂-dCTP引入DNA中,导致DNA合成抑制(Vesely J:Mode of action and effects of 5-azacytidine and of its derivatives in eukaryotic cells.Pharmacol Ther 28:227-35,1985)。氮杂-dCTP与DNMT的化学计量结合将会导致DNA低甲基化(Jones PA:Effects of 5-azacytidine and its 2'-deoxyderivative on cell differentiation and DNA methylation.Pharmacol Ther 28:17-27,1985)。氮杂-dCTP也能够由5-氮杂-2'-脱氧胞苷通过由脱氧胞苷激酶(dCK)和核苷酸激酶催化的直接磷酸化作用而形成。CpG岛处的DNA低甲基化已经描述于包括MDS的不同恶性肿瘤中(Kaminskas E,Farrell A,Abraham S,Baird A,Hsieh L-S,Lee S-L,Leighton JK,Patel H,Rahman A,Sridhara R,Wang Y-C and Pazdur R:Approval summary:azacitidine for treatment of myelodysplastic syndrome subtypes.Clin Cancer Res 11:3604-8,2005)。在另一方面中,氮杂-CTP引入RNA中会破坏细胞质和核RNA蛋白质合成的代谢(Glover AB and Leyland-Jones B:Biochemistry of azacitidine:a review.Cancer Treat Rep 71:959-64,1987)。氮杂胞苷耐药的一种机制是所述UCK2基因中的点突变,这会导致失活的代谢物(Sripayap P,Nagai T,Uesawa M,Kobayashi H,Tsukahara T,Ohmine K,Muroi K and Ozawa K:Mechanisms of resistance to azacitidine in human leukemia cell lines.Exp Hematol 42:294-306.e2,2014)。氮杂-dCTP抗性的机制是dCK的缺陷(Peters GJ:Novel developments in the use of antimetabolites.Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids 33:358-74,2014)。

[0195] 正如图22所示,RX-3117也能够下调DNMT1(Peters GJ,Smid K,Vecchi L,Kathmann I,Sarkisjan D,Honeywell RJ,Losekoot N,Ohne O,Orbach A,Blaugrund E,Jeong LS,Lee YB,Ahn C-H and Kim DJ:Metabolism,mechanism of action and sensitivity profile of fluorocyclopentenylcytosine(RX-3117).Invest New Drugs 31:1444-57,2013),但似乎与氮杂-C作用方式不同。此外,多种胞苷类似物,但不是全部,显示出放射敏化作用。因此,评估了RX-3117的潜在放射敏化作用以及所述潜在的机制,如细胞周期效应和细胞杀灭。据此显示出RX-3117具有放射敏化作用。

[0196] 与RX-3117一起预孵育具有最佳放射敏化作用,所测试的5个细胞系中有4个被RX-

3117敏化。所述吉西他滨耐药性SW1573/G-被RX-3117敏化,其疗效与其野生型几乎相同。RX-3117在两个球状体模型中也表现出放射敏化作用。

[0197] 核苷类似物已经证明会增强辐射诱导的细胞杀灭(Shewach DS and Lawrence TS:Antimetabolite radiosensitizers.J Clin Oncol 25:4043-50,2007)。所述放射敏化作用据认为通过靶向脱氧核糖核苷酸生物合成(DNA复制所需的)或DNA聚合酶而进行(Shewach DS and Lawrence TS:Antimetabolite radiosensitizers.J Clin Oncol 25:4043-50,2007;Lawrence TS,Blackstock AW and McGinn C:The mechanism of action of radiosensitization of conventional chemotherapeutic agents.Semin Radiat Oncol 13:13-21,2003)。脱氧核苷酸库去调节作用(deregulation)的一个实例是所述TS抑制剂5-氟-2'-脱氧尿苷(FdUrd)。TS抑制剂会引起脱氧核苷酸库失衡,导致DNA合成抑制和S期停滞(Hwang HS,Davis TW,Houghton J a and Kinsella TJ:Radiosensitivity of thymidylate synthase-deficient human tumor cells is affected by progression through the G1restriction point into S-phase:implications for fluoropyrimidine radiosensitization.Cancer Res 60:92-100,2000)。脱氧核苷酸库中的不平衡会引起不正确的核苷酸引入(Ingraham HA,Tseng BY and Goulian M:Nucleotide levels and incorporation of 5-fluorouracil and uracil into DNA of cells treated with 5-fluorodeoxyuridine.Mol Pharmacol 21:211-6,1982)。要实现的放射敏化作用所需的所述浓度不一定是细胞毒性作用所需的所述浓度。更低浓度的药物能够建立所述放射敏化作用(Hwang HS,Davis TW,Houghton J a and Kinsella TJ:Radiosensitivity of thymidylate synthase-deficient human tumor cells is affected by progression through the G1restriction point into S-phase:implications for fluoropyrimidine radiosensitization.Cancer Res 60:92-100,2000)。低剂量RX-3117在所述克隆源性测试中,在三维模型和分次照射时间表中会诱导放射敏化作用。而且,由RX-3117诱导的所述双链DNA断裂也是剂量依赖性的。

[0198] RX-3117据证实在五个细胞系中的四个中是强效的时间表依赖性放射敏化剂,在NSCLC中考虑联合治疗的情况下具有临床应用潜力。这种联合治疗可能适用于其他肿瘤类型(如前列腺癌,皮肤癌,头颈癌,喉癌(throat),喉癌(larynx),乳腺癌,脑癌,结直肠癌,骨癌,白血病,卵巢癌和子宫癌)。

[0199] 制备RX-3117的方法的改进

[0200] 美国专利No.7,405,214公开了由D-核糖合成RX-3117的11-步骤。所述合成使用了昂贵的催化剂,这对于大规模工厂生产中实施是一个挑战。美国专利No.9,150,520改进了所述合成,公开了通过(3R,4R,6aR)-叔丁基-(5-氟-2,2-二甲基-6-三苯甲基氨基甲基-4,6a-二氢-3aH-环戊[1,3]二氧化杂环戊烯-4-基氧基)-二苯基-硅烷(ASM11)至4-氨基-1-(3aS,4S,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氨基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-基)嘧啶-2(1H)-酮(INT14)的RX-3117制备的更短路径。然而,ASM11至INT14的现有技术合成法需要在每个步骤中分离所述中间体。因此,所述方法特别是如果规模放大商业生产时会造成成本和时间限制。

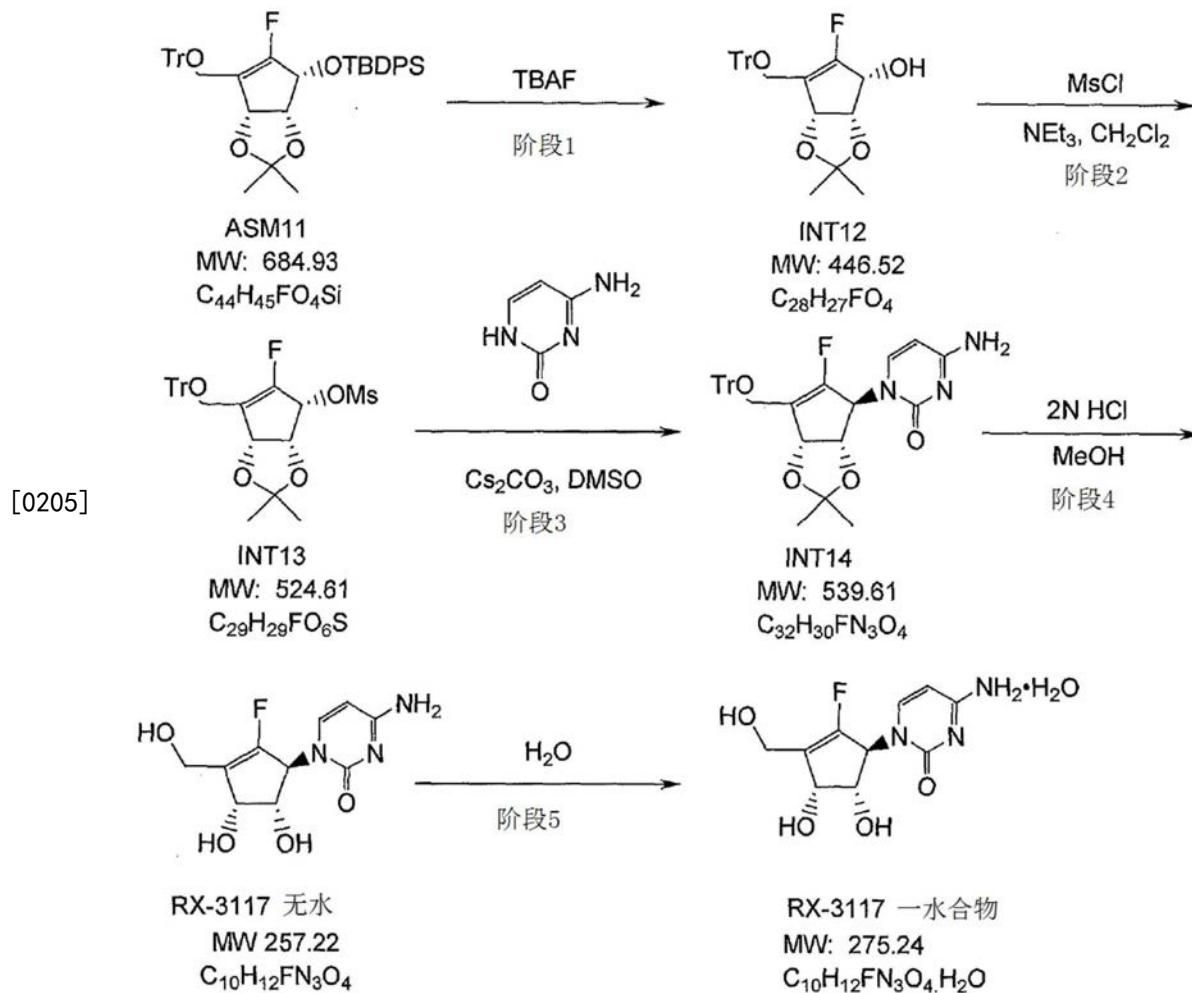
[0201] 本发明提供了制备RX-3117的改进方法,其在商业上用于大规模生产是可行的。所述方法将ASM11至INT14的合成缩短,无需分离每一种所述中间物质,从而降低了成本,同时

提高了效率。更具体而言，本发明提供了具有三个阶段的连续过程从而将ASM11至INT14的合成缩短。本发明还提供了在固定容器中获得RX-3117单水合物(RX-3117-MH)从而显著降低生产成本的方法。通过将三个步骤缩成单一步骤，本方法消除了将所述中间体浓缩成残余物的需求。当替换本领域技术人员不容易明白的试剂时，这些改进是基于意想不到的受益的。

[0202] 此外，本发明提供了优化的反应和分离条件从而提高阶段3中的氮至氧(N/O)选择性，在这种情况下将胞嘧啶加入(3aR,4R,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-((三苯甲基氨基)甲基)-4,6a-二氢-3H-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-基甲磺酸酯(INT13)中从而制备INT14。在所述改进的方法中，所述N-和O-异构体比率由此前优化的88:12的值提高到99.03:0.97。本发明的所述固定容器生产方法实现了以单水合物形式的所需产品的规模放大生产的操作的成本益处。

[0203] 以下方案1说明了制备RX-3117MH的改进方法。

[0204] 方案1



[0206] 阶段1—ASM11去保护形成INT12的方法改进

[0207] 在所述方法的阶段1中，使用2-甲基-四氢呋喃作为所述过程的溶剂。这种修改容许实施后处理(work-up)而无需浓缩所述中间体(3aS,4R,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氨基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-醇(INT12)并避免了所述中间体的溶剂交换至甲基叔丁基醚(MTBE)中(这在现有技术的方法中使用)。

[0208] 另外,所述反应过程内控制(IPC)由使用TLC转变为定量¹H NMR方法。通过使用共沸去除水而不是化学干燥,进一步优化所述方法。使用2-甲基-四氢呋喃作为过程溶剂,使溶液中的INT12直接用于所述过程的阶段2,而无需进一步分离或纯化。

[0209] 阶段2—INT12甲磺酰化以形成INT13的方法改进

[0210] 将在2-甲基-四氢呋喃中INT12的所述溶液直接缩减到阶段2中从而制备(3aR,4R,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氨基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基甲磺酸盐(INT13)。这种改进的方法消除了对环境有害的二氯甲烷作为反应溶剂的使用。此外,所述方法使用氯化铵洗涤从而进一步控制残留的三乙胺。所述后处理体积减少到12.5体积的最大过程体积,具有从14体积的降低。再次,通过使用共沸除水而不是化学干燥进一步优化了所述过程。使用2-甲基-四氢呋喃作为过程溶剂使溶液中的INT13直接用于所述方法的阶段3。

[0211] 阶段3—胞嘧啶加入INT13中从而形成INT14的方法改进

[0212] 将在2-甲基-四氢呋喃中的INT13溶液直接缩减到阶段3中制成INT14。保留二甲基亚砜(DMSO)作为反应溶剂,并通过蒸馏除去2-甲基-四氢呋喃。发现27%w/w的2-甲基-四氢呋喃相对于产物的规格允许阶段3反应良好地执行。本发明人进行了碱(无机和胺)的筛选,发现碳酸铯提供了最高的化学选择性和最快的反应速率。本发明人还进行了反应溶剂的筛选,发现DMSO是最适合的反应溶剂。

[0213] 此外,本发明人研究了试剂的电荷、温度和浓度对INT14的所述N-异构体相对于O-异构体的选择性的影响。根据本发明的改进方法,使用溶剂萃取和重结晶/沉淀,将所述N-与O-异构体比率由所述先前优化的88:12(这是使用SiO₂柱色谱进行分离)改进至99.03:0.97。本发明的方法消除了对柱色谱法的需要,并还提供了超过99%的所需N-异构体。具体而言,本发明人发现主要通过所述反应温度实现化学选择性。具体而言,降低所述反应温度会减慢转化为产物的速度。通过将碱和胞嘧啶的加入量从2.0当量增加到2.5当量进一步改进了所述反应条件。所述反应温度从40°C降低至35°C。此外,所述后处理过程经过修改从而将所述总过程体积从22体积减小到12.5体积,从而提高了通量。所述后处理溶剂从乙酸乙酯变为乙酸异丙酯,从而使所述反应混合物直接进入分离而不需要交换溶剂。所述后处理过程也经过修改从而以互变异构开始,因为据发现INT14在乙酸处理后更易溶解。对INT14的分离进行了改变,以使产物从乙酸异丙酯中开始以高体积沉淀,之后降低所述体积并加入正庚烷。据发现这种改进能够防止在分离之前起油(oiling)和粘附于所述容器上。因此,通过同时改变多个反应参数实现了具有增加的选择性的总体改进合成。据发现,温度和浓度的改变对N/O-烷基化的转化率和化学选择性具有正向的影响。

[0214] 阶段4—INT14脱保护从而生成无水RX-3117的方法

[0215] 乙醇中的2M HCl的原始条件据发现对于所述产物是最稳定的并被保留。然而,通过将所述反应温度从60°C降低至50°C以有助于溶解性从而改善所述过程。使用甲基叔丁基醚(MTBE)洗涤除去所述三苯甲醇副产物。所述树脂盐释放后,将所述水相中的产物直接缩减至阶段5分离。

[0216] 阶段5—分离RX-3117—水合物的方法

[0217] RX-3117MH的所述溶液直接缩减至阶段5。所述合并的阶段4和阶段5(对所述过程具有少量修改)优化了规模上的产率和可操作性。所述RX-3117-MH在空气下在过滤器上进

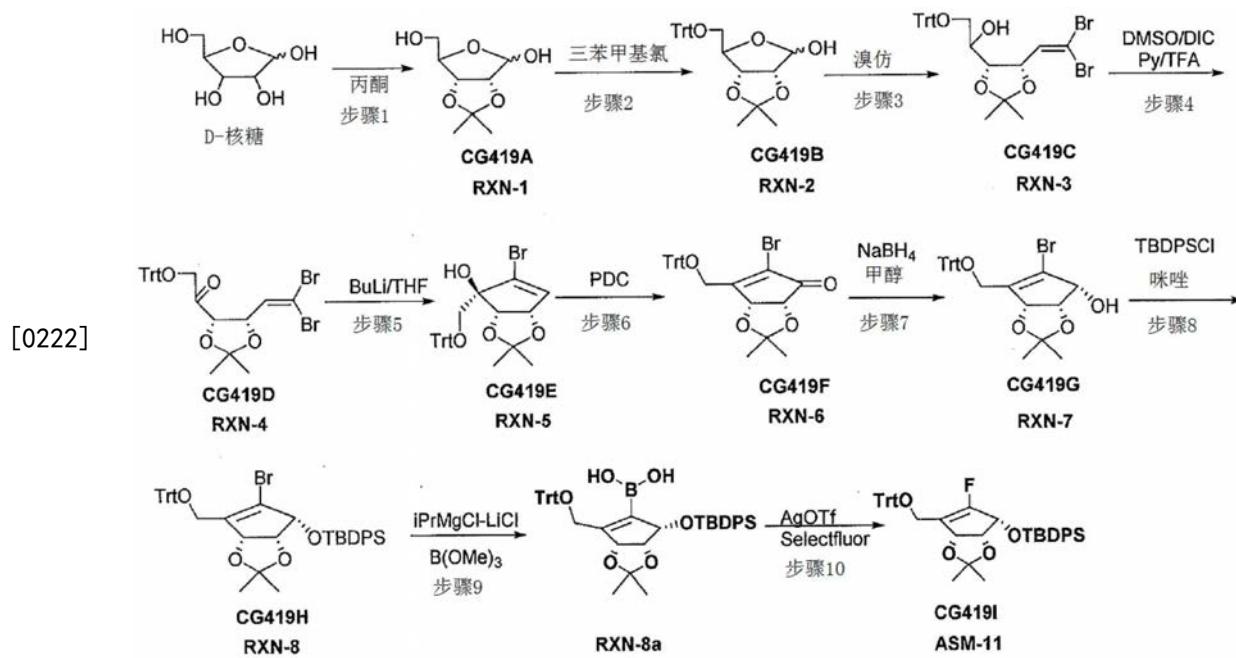
行干燥,这会将乙腈量控制于所述ICH指南以下,同时保持所述含水量。这种改进的方法消除了第一干燥的所述时间苛刻的需求,随后再水合所述产物以获得结晶产物。使用所述改进的方法的所述分离的产物具有(99.83%)的纯度,其纯度与少量定制合成产物的纯度是可比较的。

[0218] RX-3117起始原料制备方法的其他改进

[0219] 用于合成RX-3117起始原料的其它方法的改进是可能的。以下方案2和3中分别显示了使用不同中间体和保护基的ASM11的合成。

[0220] 通过溴代中间体合成ASM11

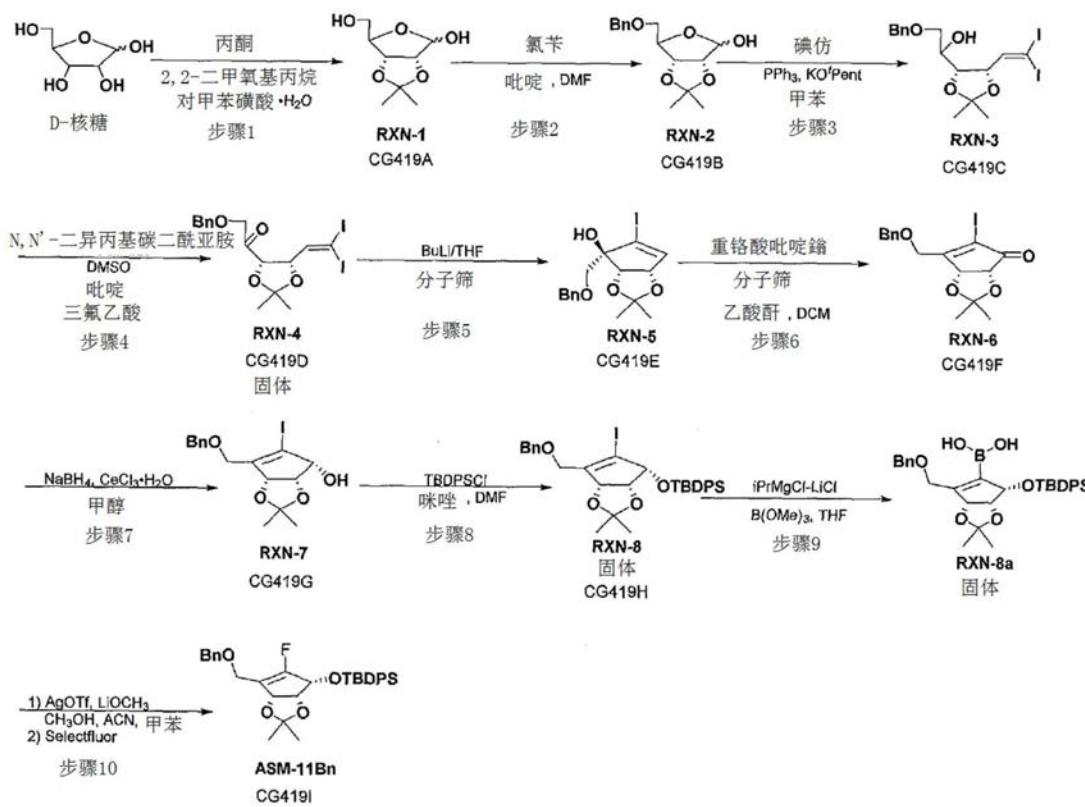
[0221] 方案2

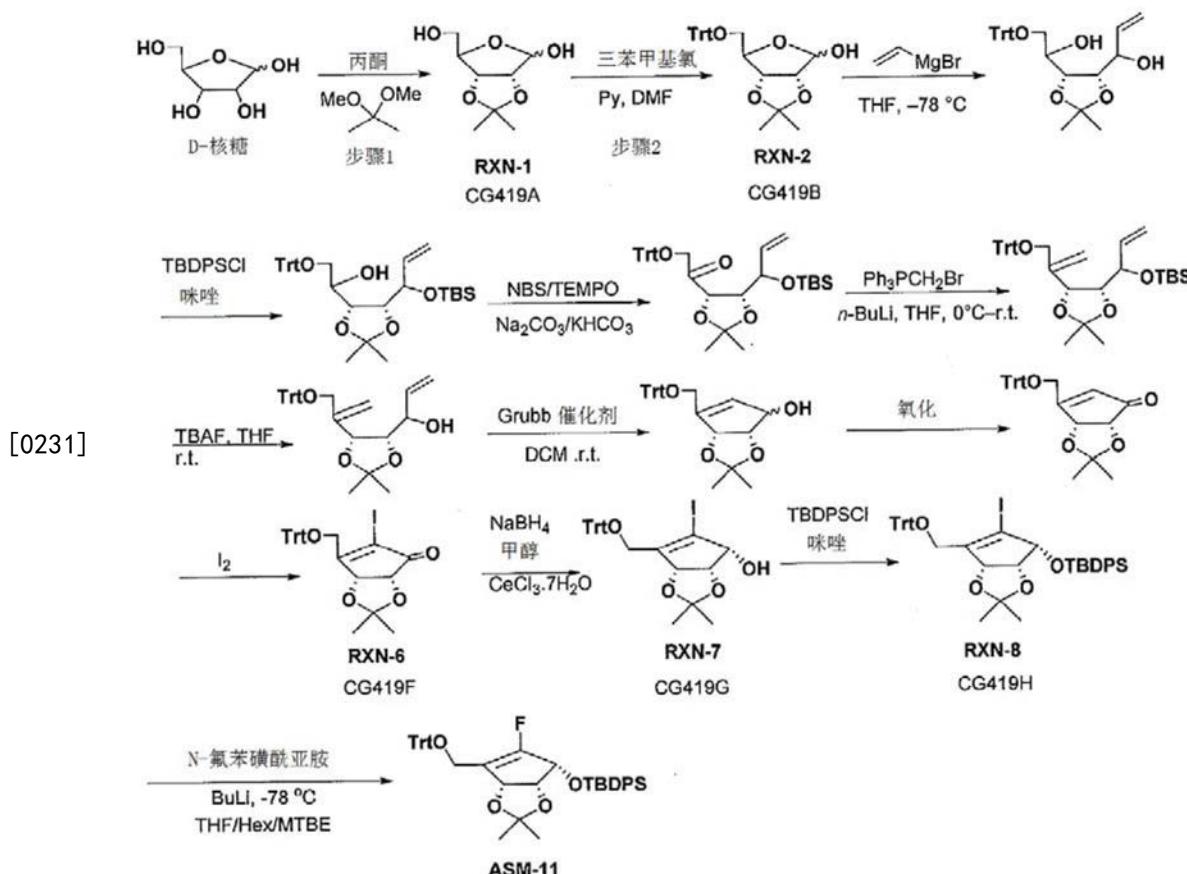


[0223] 在美国专利No.9,150,520中,在所述反应的步骤3中使用碘仿将RXN-2转化为RXN-3。在本发明中,使用溴仿或混合的溴-碘甲烷从而提供溴代中间体而不是碘代中间体。溴代中间体能够比其碘代衍生物更稳定。因此,所述总产率和纯度可能因此增加。

[0224] 通过5-羟基的苯甲基保护合成ASM11Bn

[0225] 方案3

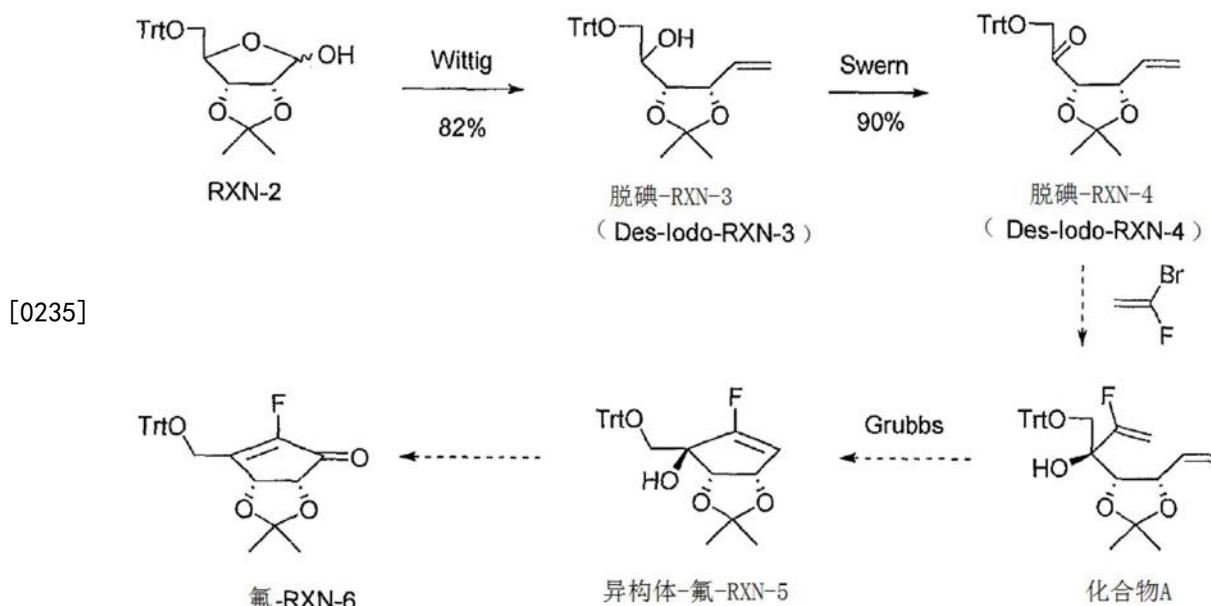




[0232] 通过闭环复分解合成中间体RXN-6

[0233] 中间体RXN-6的合成都能够通过闭环复分解反应完成,包括RXN-5,并通过制备氟化的RXN-6将所述氟原子引入到五元环中。正如方案5所示,使用闭环复分解反应形成所述5-元环部分(氟-RXN-6)。正如方案4中,所述Grubbs催化剂(格拉布催化剂)的钉是可回收的。

[0234] 方案5

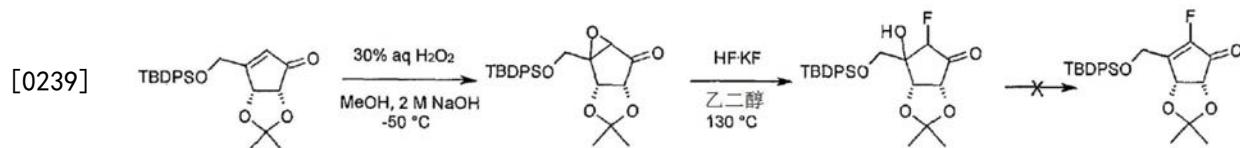


[0236] 经由环氧化物通过亲核氟化合成中间体RXN-6

[0237] 经由环氧化物通过替代亲核氟化(alternative nucleophilic fluorination)合

成中间体RXN-6。方案6显示了由所述原料(3aR,6aR)-6-(((叔丁基二苯基甲硅烷基)氧基)甲基)-2,2-二甲基-3a,6a-二氢-4H-环戊[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-酮生成环氧化物环。例如,使用氟化钾通过亲核氟化将所述环氧化物开环。作为替代,也可以使用其它氟化物源,例如,四丁基氟化铵对环氧化物环开环。在这种方法中除水是一个困难的步骤,并能够使用替代的脱水剂,例如,甲氧甲酰基(carbomethoxy)氨磺酰基三乙基铵盐从而获得所述改性的中间体氟-RXN6-TBDPS。

[0238] 方案6



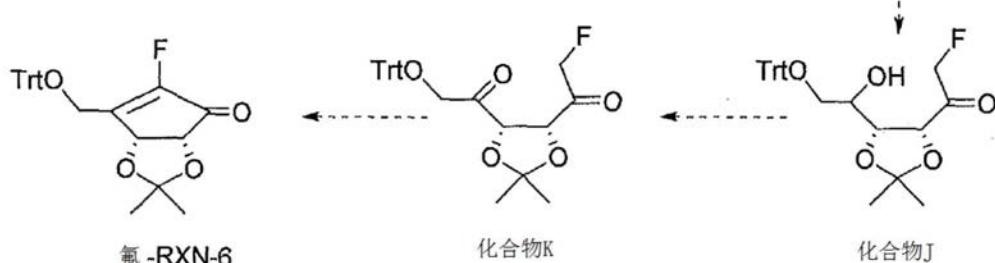
[0240] 通过醇醛缩合合成中间体RXN6

[0241] 中间体RXN6的合成也能够使用醇醛缩合通过制备氟化的RXN-6将氟原子引入所述五元环而实现。正如方案7所示,早期将氟原子引入其上从而形成RXN6的所述氟化衍生物(氟-RXN6)。内部醛醇缩合能够形成在合适位置上具有所述乙烯基氟部分的所述5-元环。

[0242] 方案7



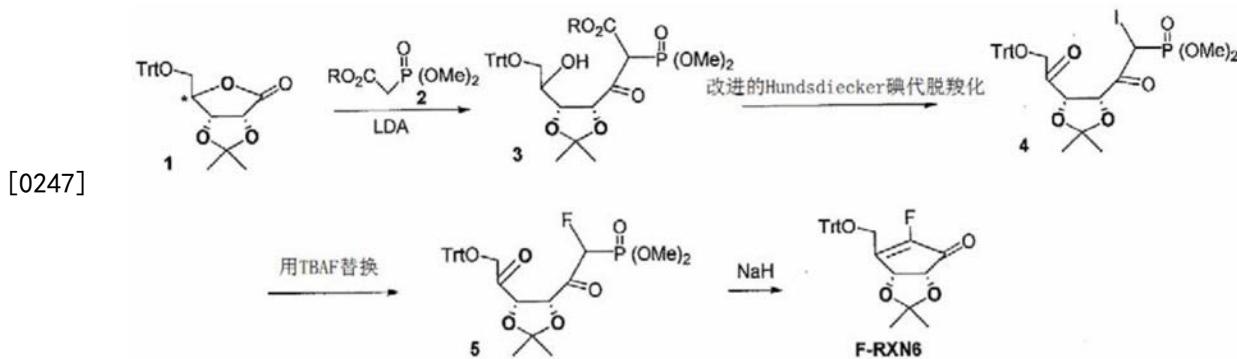
[0243]



[0244] 中间体氟-RXN6的替代合成

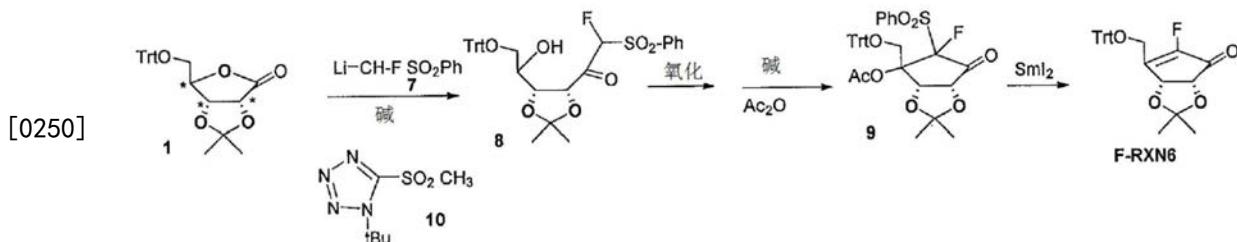
[0245] 方案8和9中显示了用于合成中间体氟-RXN-6的其它替代方案。在方案8中,通过使D-核糖内酯1与膦酸酯2反应产生中间体3以获得更短的途径。本发明人发现,所述D-核糖内酯衍生物1不容易与氟代烷基膦酸二甲酯反应,但使用烷酯基(carbalkoxy)甲基膦酸二甲酯能够获得更好的反应性。然后所述中间体3经历Hundsdiecker(汉斯迪克)碘代脱羧化从而形成中间体4,随后所述中间体4能够使用四正丁基氟化铵(TBAF)进行亲核取代。

[0246] 方案8



[0248] 方案9(下文)通过使D-核糖内酯1与通过亲电子氟化试剂制备的烷基苯基砜7反应从而生成中间体8以提供甚至更短的路线。与氟烷基膦酸盐相比,所述D-核糖内酯衍生物更容易与锂氟代烷基砜7反应。所述中间体8能够转化为中间体9,所述中间体9将经历消除从而形成F-RXN6。另外,更有效但更昂贵的选项是使用氟代四唑基砜10代替锂氟代烷基砜7。

[0249] 方案9

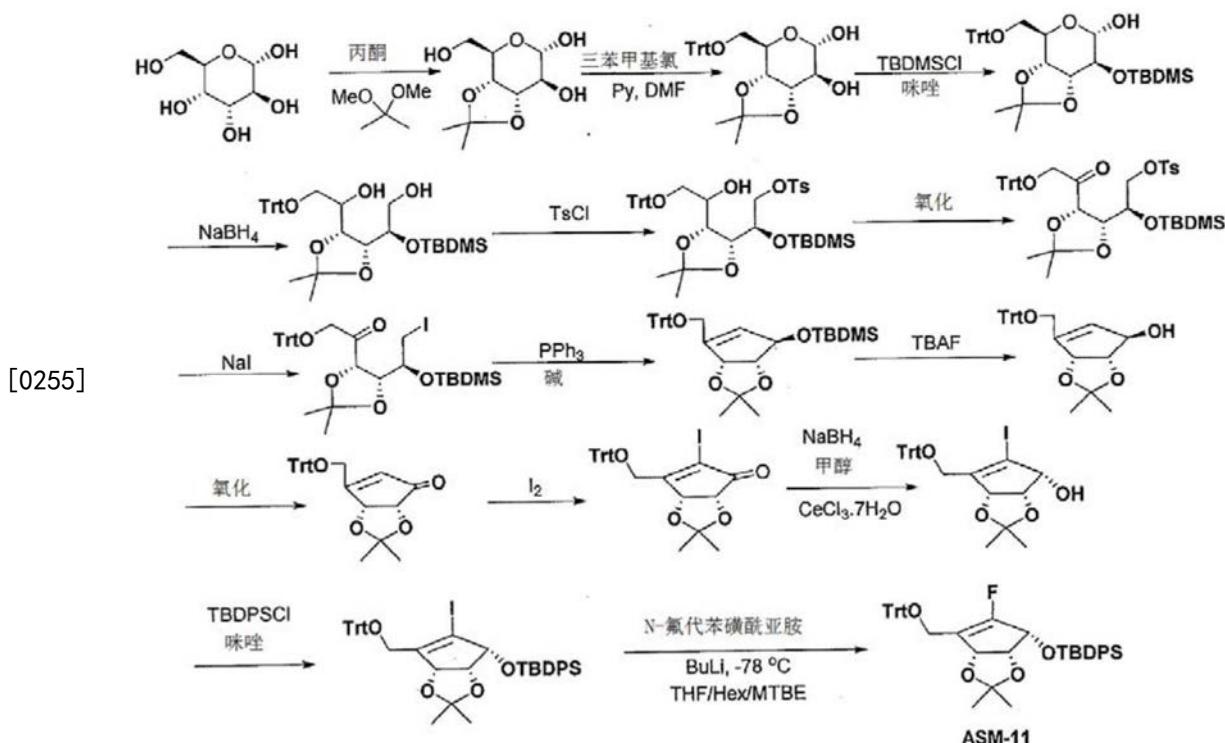


[0251] 使用不同手性源的合成

[0252] 本合成也能够通过使用不同的手性源作为起始材料而实现。

[0253] 在方案10(如下)中,使用(2S,3S,4R,5S,6R)-6-(羟基甲基)四氢-2H-吡喃-2,3,4,5-四醇作为替代的手性起始材料从而产生ASM-11。

[0254] 方案10



[0256] 实施例

[0257] 以下实施例是为了举例说明的目的而提供，并不应该用来限制所公开的主题的范围。

[0258] 正如文献Peters et al., “Metabolism, mechanism of action and sensitivity profile of fluorocyclopentenylcytosine (RX-3117) ,” Investigational New Drugs, December 2013, Vol. 31, No. 6, pp. 1444-1457 (可在<http://link.springer.com/article/10.1007/s10637-013-0025-x>在线得到) 中的报道,本文中使用的细胞系A549、SW1573和SW1573/G的IC₅₀值分别为8.3μM,13.7μM和7.3μM。

[0259] 实施例1:RX-3117对非小细胞肺癌细胞系的影响

[0260] RX-3117对人非小细胞肺癌 (NSCLC) 细胞系A549 (腺癌) 、SW1573 (肺泡癌) 、SW1573/G- (吉西他滨耐药性的SW1573细胞系) 和H460 (大细胞癌) 中细胞周期调控和细胞死亡的影响进行了评价。所述A549和H460细胞系获自美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection) (Manassas, VA, 美国)。获自Johan van Rijn博士(参见,Keiser et al., Cancer Research, 49:2988-2993 (1989)) 的SW1573细胞系也用作SW1573/G-的亲本细胞系。将A549, SW1573和SW1573/G- 和H460在T25烧瓶 (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, 德国) 中保持指数生长,并培养于杜尔贝科 (Dulbecco) 最小基本培养基 (DMEM) 或RPMI 1640 (A549) 中 (补充有10%热灭活胎牛血清 (FBS) 1%链霉素和青霉素20mM HEPES), 并保持于37℃5%CO₂水饱和气氛中。对于所述细胞周期分布,将1.5×10⁵个细胞接种于T25烧瓶 (Greiner Bio-One GmbH) 中并培养72h,然后加入1μM RX-3117并培养24h。然后,收获所述细胞。在所述处理后,将所述培养基收集于15mL管 (Greiner Bio-One GmbH) 中。所述细胞用冰冷PBS洗涤并在37℃下用胰蛋白酶消化 (Lonza)。所述收集的培养基用于失活所述相应样品的胰蛋白酶,并再次收集于15mL管中。所述细胞用标准离心程序,在4℃和12,000rpm下离心5分钟。除去所述培养基,用1mL PBS/0.01%BSA对所述颗粒进行洗涤并离心。除去所述上清液后,所述细胞用1mL 70%乙醇固定,并在-20℃下孵育至少24h。随后,将所述细胞离心,用1mL PBS/0.1%BSA洗涤并转移至FALCON FACS管 (BD, Franklin Lakes, NJ, 美国) 中。所述细胞进行离心,并除去所述上清液,然后加入0.5μg碘化丙啶 (PI) (Sigma, St. Louis, MO, 美国), 0.1% 柠檬酸三钠 (Riedel-deHaen, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, St. Louis, MO, 美国), 0.1% Triton X-100TM (Merck) 和0.1mg/mL RNase (Sigma) (PI溶液) 至样品。随后,在至少15分钟内,将所述细胞与所述PI溶液在冰上孵育从而染色所述DNA之后才开始分析。通过FACSCalibur™ (BD Biosciences, Mount View, CA, 美国) 分析用所述PI溶液染色的所述细胞。数据采用CellQuest™ Pro软件分析。

[0261] 通过使用蛋白印迹法测定细胞周期蛋白表达从而研究细胞周期停滞的机制。通过蛋白印迹分析了RX-3117对不同处理条件期间的蛋白表达的影响。使用含有4%蛋白酶抑制剂混合物 (cocktail) (Roche Diagnostics, Mannheim, 德国) 的细胞溶解缓冲液1× (Cell Signaling, Danvers, MA, 美国) 在冰上溶解细胞30分钟,并在4℃以14,000rpm离心10分钟。收集所述含蛋白上清液,并根据文献Lemos et al., Pharmacogenomics, 12 (2) :159-70 (2011) 中所述进行所述Bio-Rad测试从而测定蛋白的量。所述以下抗体用于蛋白表达: DNMT1 (Cell Signaling, 1:1000#5032S) ,DNMT3A (Cell Signaling 1:1000#2160S) ,DNMT3B (Abcam, 1:1000) ,Chk2 (Cell Signaling 1:1000#6334P) ,Chk1 (Cell Signaling 1:1000) ,

p-CDC25C (Cell Signaling 1:1000#4901S) ,Cdk1 (Cell Signaling 1:1000#9112S) ,Cdk2 (Cell Signaling 1:1000#2546S) ,wee1 (Cell Signaling 1:1000) ,S139- γ H2A.X (Cell Signaling, 1:1000) , β 肌动蛋白 (Sigma, 1:10,000) ,半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶9 (Cell Signaling, 1:1000) ,PARP (Roche 2003, 1:1000) ,p53 (Cell Signaling, 1:1000, #9282) 。所述抗体稀释于1:1Rockland缓冲液 (Rockland Inc., Philadelphia, PA, 美国) 和补充有0.05% Tween[®] 20的PBS中。所述蛋白于20% SDS-PAGE中分离并转移至PVDF膜。对于荧光信号二抗, 使用了山羊抗小鼠 InfraRedDye 和山羊抗兔 InfraRedDye。通过Odyssey InfraRed Imager (Li-COR Bioscience, Lincoln, NE, 美国) 检测所述蛋白。

[0262] 本文中使用的缩写表示如下:

[0263] BSA=牛血清白蛋白

[0264] HEPES=2-[4-(2-羟乙基)哌嗪-1-基]乙磺酸

[0265] PBS=磷酸盐缓冲盐水

[0266] PVDF=聚偏二氟乙烯

[0267] RPM=每分钟转数

[0268] SDS-PAGE=十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳

[0269] 细胞周期

[0270] 在1 μ M的剂量下,暴露24h后RX-3117诱导在所述G1期中A549、SW1573、SW1573/G-和H460细胞的累积(图1)。在5 \times IC₅₀的更高剂量下,RX-3117诱导所述S期中的A549、SW1573和SW1573/G-细胞的累积(图2)。

[0271] 半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶激活

[0272] 在针对渐增浓度的RX-3117暴露24h后,RX-3117降低了SW1573细胞和A549细胞中的前半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶9。前半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶9的降低表明半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶的激活和随后的细胞凋亡诱导(图3和图4)。

[0273] DNMT蛋白

[0274] 在更高剂量下RX-3117调低A549细胞中DNA甲基转移酶1(DNMT1)的维持(图23),并增加了A549细胞中的DNMT3A和DNMT3B表达水平。对于这种下调所提出的机制如图22中所示。

[0275] DNA损伤

[0276] 在暴露48h后,RX-3117诱导通过SW1573细胞中生物标志物 γ H2A.X (phospho S139) 所示的双链断裂(DSB)(图5)。暴露于渐增浓度的RX-3117 24h后,RX-3117诱导切割的PARP(图6)。切割的PARP指示凋亡细胞中活化的半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶活性。在1 μ M和5 μ M时,RX-3117提高了A549细胞中的p53表达水平(图7)。在10 μ M时,暴露48h后,RX-3117提高Chk1和Cdk2表达水平,同时降低SW1573细胞中的p-Cdc25C表达水平(图8)。RX-3117诱导的DNA损伤会触发所述Chk1途径。所述ATR/Chk1途径由DNA复制应激(replication stress)和DSB进行诱导。暴露于渐增浓度的RX-3117 24h后,RX-3117会降低SW1573细胞中的wee1表达水平(图9)。图24是显示损伤诱导后检查点激酶Chk1和Chk2对细胞周期蛋白的潜在影响和对所述细胞周期的调节的图,RX-3117可以沿着这些途径中的多种途径具有活性。

[0277] 细胞凋亡诱导

[0278] 在 $5 \times IC_{50}$ 的剂量下,暴露24和48h后,RX-3117会诱导所述亚-GI期中的PI染色A549和SW1573细胞中的细胞凋亡(图10)。在 $5\mu M$ (对于A549)和 $10\mu M$ (对于SW1573)时,在24、48、72和96h暴露后,RX-3117会诱导所述亚-GI期中的膜联蛋白V染色A549和SW1573细胞中的凋亡(图11)。

[0279] 结果

[0280] 所述结果表明细胞周期停滞是时间、浓度和细胞系依赖性的。在A549,H460和SW1573细胞中,24h暴露于 $1\mu M$ RX-3117会提高在所述G1期(约20%~40%)和S期(至较小程度)中细胞的累积,但降低了所述G2/M期中的细胞的累积。因此,低剂量RX-3117会诱导G1累积,而高剂量RX-3117会诱导S期累积。在24h暴露下没有观察到细胞杀伤,但在伴随 γ H2AX诱导的48h暴露(SW1573中15%和A549细胞中8%)下观察到细胞杀伤。在A549细胞中,RX-3117对所述细胞周期分布的影响在暴露48h时最为显著,在S期中累积45%。S期累积是时间依赖性的。采用RX3117的处理会提高p53,Chk1,Chk2和Cdk2表达水平,但会降低Cdc25C和p-Cdc25C表达水平。RX-3117主要在48h后提高了wee1表达水平。RX-3117看起来通过SSB和DSB诱导了细胞凋亡。在SW1573细胞中的切割的PARP指示了凋亡细胞中上调的半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶活性。在A549细胞中前半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶9的减少指示半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶的激活和随后的凋亡诱导。总之,RX-3117诱导的DNA损伤一方面触发了细胞凋亡,而另一方面提高了Chk1和Chk2表达水平。不受限于任何作用机制,据信所述磷酸化的Chk1和Chk2可以触发Cdc25C的磷酸化并引起其降解,这导致Cdk1水平降低,由此使S期中的细胞累积。

[0281] 实施例2:RX-3117在同系(syngeneic)MC38鼠结肠癌异种移植模型中的疗效

[0282] 按照下述方案,检测了RX-3117对使用患有MC38鼠结肠癌的雌性C57BL/6小鼠的同系模型中的肿瘤生长的影响。与对照(载体处理的)组相比,测定了治疗组中的肿瘤生长(参见下面的表1的剂量方案和治疗方案)。这项研究的结果(表2)证明了向程序性死亡受体1(PD-1)抑制剂RMP1-14中加入RX-3117在抑制肿瘤生长中具有累加效应(additive effect)(单独RX-3117是80%,单独RMP1-14是93%,相对于两种试剂的组合是99%)。与单独RMP1-14组的4只动物具有部分消退和完全消退,2只动物显示无瘤生存相比,所述两种试剂的组合也导致更高质量的小鼠(9只小鼠)具有部分消退和完全消退,7只动物显示无肿瘤存活。获得所有结果,在所述组合组中对小鼠没有任何不利影响。

[0283] 简而言之,所述方法描述如下。在指数生长期间收获所述细胞并用磷酸盐缓冲盐水重新悬浮。每只测试动物会接收皮下(s.c.)注射 1×10^6 个肿瘤细胞于右侧腹,并且随着所述平均肿瘤尺寸接近 $60 \sim 100 mm^3$ 的目标范围监测肿瘤生长。基于表1,随着每只动物达到该目标范围时就开始计量剂量(dosing)。

[0284] 表1.药物和治疗时间表

[0285]	组数	方案 1	方案 2
--------	----	------	------

	量	试剂	mg/kg	途径	时间表	试剂	mg/kg	途径	时间表
[0286]	1#	10载体	-	Po	(5/2) x 3-	-	-	-	-
	2	10RX-3117	60	Po	(5/2) x 3-	-	-	-	-
	4	10抗-PD-1 RMP1-14	100*	Ip	双周×2	-	-	-	-
	5	10RX-3117	60	Po	(5/2)×3	抗-PD-1 RMP1-14	100*	Ip	双周×2

[0287] #-对照组,*-μg/动物

[0288] 表2. 将RX-3117与PD-1抑制剂组合的肿瘤生长抑制和存活益处

组	治疗组	TGI第28天	PR	CR	TFS
1	载体	-	2	0	0
2	RX-3117 (60mg/kg)	80%	0	0	0
3	抗-PD-1RMP1-14 (100g)	93%	1	3	2
4	RX-3117+抗-PD-1	99%	2	7	7

[0289] [0290] TGI: 肿瘤生长抑制; 在第28天; PR: 部分消退的数量; CR: 完整消退的数量; TFS: 无瘤存活者数量; 全部都在第45天

[0291] 使用游标卡尺在二维上测定肿瘤, 并使用以下方程计算体积:

$$[0292] \text{肿瘤体积 } (\text{mm}^3) = \frac{w^2 \times l}{2}$$

[0293] 其中w=肿瘤的宽度, l=肿瘤的长度, 单位mm。假定1mg等于1mm³的肿瘤体积, 则就可以估计肿瘤重量。

[0294] 使用来自第45天的数据测定治疗疗效。对于每组测定所述MTV (n), 即第45天的动物数量n的所述中值肿瘤体积。将肿瘤生长抑制百分数 (%TGI) 定义为所述指定对照组(载体给药)的所述MTV与所述药物治疗组的所述MTV之间的差异, 表示为所述对照组的所述MTV的百分比:

$$[0295] \% \text{TGI} = \left(\frac{\text{MTV}_{\text{对照}} - \text{MTV}_{\text{药物治疗}}}{\text{MTV}_{\text{对照}}} \right) \times 100 = \left[1 - \left(\frac{\text{MTV}_{\text{药物治疗}}}{\text{MTV}_{\text{对照}}} \right) \right] \times 100$$

[0296] 用于TGI分析的所述数据集(data set)包括组中的所有动物, 除了因治疗相关(TR)或非治疗相关(NTR)原因死亡的那些。在这项测试中产生至少60% TGI的试剂就认为具有潜在的治疗活性。

[0297] 所述研究方案基于治疗组相对于对照组的至终点的中值时间(TTE)指定了肿瘤生长延迟测试法。当其肿瘤达到1500mm³体积终点时, 对于肿瘤进展(TP)将每只动物实施安乐死。到达每只小鼠的终点的时间(TTE)用以下方程计算:

$$[0298] \text{TFE} = \frac{\log_{10}(\text{终点体积}) - b}{m}$$

[0299] 其中b是通过对数转换的肿瘤生长数据集的线性回归获得的线的截距而m是的斜

率。所述数据集包括超过所述研究终点体积的第一个观察结果和紧接着在达到终点体积之前的三个连续观察结果。在研究结束时将任何未达到终点的动物安乐死，并将TTE值设定为等于所述研究的最后一天(71天)。在其中所述对数转换的所计算的TTE在达到终点之前先于所述天或超过达到肿瘤体积终点的所述天的情况下，进行线性内插从而近似TTE。任何确定要死于治疗相关(TR)原因的动物都指定等于死亡日的TTE值。由非治疗相关(NTR)原因死亡的任何动物都排除于TTE分析之外。

[0300] 治疗效果由消退响应的数量确定。治疗可能导致动物中肿瘤的部分消退(partial regression) (PR) 或完全消退(complete regression) (CR)。在PR响应中，在所述研究过程期间，对于三次连续的测定，所述肿瘤体积为其D1体积的50%或更少，而对于这些三次测定中的一个或多个测定，所述肿瘤体积等于或大于 13.5mm^3 。在CR响应中，对于所述研究过程期间的三次连续测定，所述肿瘤体积小于 13.5mm^3 。在所述研究的最后一天具有CR响应的任何动物都另外分类为无肿瘤存活者。

[0301] 对于毒性评价，动物在研究的前五天每天称重，然后每周两次。所述小鼠经常观察任何不良的治疗相关副作用的明显迹象，并在观察时记录毒性的临床迹象。

[0302] 可接受的毒性定义为所述研究期间小于20%的组平均体重减轻，并且在10只治疗的动物中不超过一个治疗相关(TR)死亡。导致更大毒性的任何给药方案都认为是超过最大耐受剂量(MTD)。如果由于临床迹象和/或尸体解剖证实的治疗副作用，或如果由于在所述剂量给药期间或最后一次剂量的十四天内的未知原因，则将死亡分类为TR。如果没有证据表明死亡与治疗副作用有关，则将死亡分类为非治疗相关(NTR)。

[0303] 用于Windows的Prism 6.05(GraphPad)用于统计和图形分析。将多组的MTV值与所述非参数Kruskal-Wallis检验和事后Dunn's多重比较检验进行比较。所述双尾统计分析在P=0.05下进行。Prism报告P<0.05时的结果是非显著性的(ns)，在 $0.01 < P \leq 0.05$ 时是显著性的(用“*”表示)，在 $0.001 < P \leq 0.01$ 时是非常显著性的(“**”)，而在 $P \leq 0.001$ 时是极度显著性的(“***”)。由于统计检验是显著性检验，并且没有提供组间差异大小的估计，则在本报告正文中所有显著性水平都描述为显著性的或非显著性的。

[0304] 构建了“盒子和须线(box and whisker)”图，从而显示在D15时以组计的单独的肿瘤体积的分布。所述盒子(box)表示观察值的所述第25到第75百分位数，所述水平线对应于所述中值，而所述“须线(whisker)”表示最大值和最小值。将组中值肿瘤体积作为时间的函数进行作图。组平均BW变化作为从D1百分比变化， \pm SEM作图。NTR原因死亡的动物排除于所有的图形表示之外。

[0305] 基于TTE值，通过所述Kaplan-Meier方法分析生存率。基于TTE值，所述logrank (Mantel-Cox) 和Gehan-Breslow-Wilcoxon测试确定了两组的所述总体存活体验(存活曲线)之间差异的显著性。所述Kaplan-Meier图和统计检验共享相同的数据集，并排除记录为NTR死亡的任何动物。构建散点图以显示以组计的单独的小鼠的TTE值；这个图显示了NTR死亡，它们是从所有其他图中排除的。将组均肿瘤体积作为时间的函数作图。当动物由于肿瘤大小或TR死亡而退出研究时，其最终记录的肿瘤体积与用于计算随后时间点的中值体积的所述数据一起包括在内。在两个TR死亡发生于同一组中之后，肿瘤生长曲线被截短。在所述研究过程中的组均BW变化绘制为从第1天开始百分比变化 \pm SEM。在组中超过半数的可评价小鼠退出所述研究之后，肿瘤生长和体重变化曲线被截短。

[0306] 实施例3:RX-3117在人中的药代动力学、安全性和耐受性

[0307] 在首次人类开放标签的探索性研究中,对RX-3117的药代动力学,安全性和耐受性进行了评价。所述研究持续时间为14~15天(7天筛选期;3天治疗期;4(+1)天安全性随访期)。9名具有组织学证实实体瘤的成年男性和女性受试者入选并完成所述研究。所述受试者接受RX-3117(n=3个受试者/剂量)作为单次口服剂量(50mg或100mg)或单次静脉内剂量(20mg)。

[0308] 药代动力学(PK)

[0309] 口服RX-3117的所述绝对生物利用度(F)分别为对于50和100mg剂量的55.67%和33.42%。对于所述50mg和100mg剂量的平均 $T_{\text{最大}}$ 分别是2.16h和2.49h。对于所述50mg和100mg剂量的平均 $C_{\text{最大}}$ 分别为303.3ng/mL和311.43ng/mL。与100mg剂量相比,所述50mg剂量的更大绝对生物利用度和 $C_{\text{最大}}$ 结果表明RX-3117在血浆中的口服生物利用度可能不是剂量成比例的。对于所述50mg和100mg剂量的所述 $T_{1/2}$ 分别为13.95h和20.92h,表明RX-3117在一些参数上可能显示出剂量比例性,而在测试的剂量下对其它参数并未显示出剂量比例性。

[0310] 所述静脉内RX-3117的血浆PK曲线与所述口服RX-3117的血浆PK曲线不同。大丸输注(bolus infusion)后所述20mg剂量的静脉RX-3117迅速恢复($T_{\text{最大}}=0.25\text{h}$)。所述20mg剂量的静脉内RX-3117具有1143.63ng/mL的平均 $C_{\text{最大}}$,这比所述口服剂量的峰值浓度约4倍增加。

[0311] 安全性和耐受性

[0312] RX-3117在所有受试者中是安全且耐受良好。没有发生不良事件(AE),治疗紧急不良事件(TEAE)或严重不良事件(SAE)。

[0313] 所述结果表明RX-3117是安全的且与口服生物利用度是良好耐受的,并支持更高剂量的研究。

[0314] 实施例4:RX-3117在不同口服剂量下的药代动力学,安全性和耐受性

[0315] 在开放标签的剂量范围研究中,评价了RX-3117在不同口服剂量下的药代动力学(PK)。患有晚期恶性肿瘤的受试者以30mg(N=1),60mg(N=1),100mg(N=3),150mg(N=3),200mg(N=3),500mg(N=3),1000mg(N=3),1500mg(N=4)和2000mg(N=5至日期)的每日剂量,每周3次(TIWK)持续3周,每4-周周期期间停止1周,给予含RX-3117的胶囊。基于所述持续的安全性曲线,并加强每周RX-3117暴露,也实施了更频繁的剂量给药。除了上面讨论的TIWK剂量给药方案之外,受试者还接受每周5次500mg和700mg,并接受每周7次500mg长达3周,每4-周周期期间停止1周。剂量增加始于每剂量治疗1个受试者的加速设计(Simon et al., J.Natl.Cancer Inst., 89(15):1138-47(1997),随后是在发生单个相关2级或更高级别不良事件后使用修改的斐波拉契(Fibonacci)序列的标准3+3设计。表3总结了所述剂量给药方案。

[0316] 表3:剂量逐步增加-每周3次

[0317]	剂量分组	实际剂量(mg)	频率	总周剂量 (mg)	总周期剂量(mg)
--------	------	----------	----	-----------	-----------

[0318]	1	30	3 次/周	90	270
	2	60	3 次/周	180	540
	3	100	3 次/周	300	900
	4	150	3 次/周	450	1,350
	5	200	3 次/周	600	1,800
	6	500	3 次/周	1,500	4,500
	7	1,000	3 次/周	3,000	9,000
	8	1,500	3 次/周	4,500	13,500
	9	2,000	3 次/周	6,000	18,000
	10	500	5 次/周	2,500	7,500
	11	700	5 次/周	3,500	10,500
	12	500	7 次/周	3,500	10,500

[0319] 药代动力学(PK)

[0320] PK数据列于表4中。

[0321] RX-3117被迅速吸收而没有显著的滞后时间,通常在2~3h时观察到中值 $T_{\text{最大}}$ 。在 $T_{\text{最大}}$ 后,消除是双相的,前8h内观察到 AUC_{0-t} (0~24h)的约一半,到24h超过80%。表观末期(terminal) $T_{1/2}$ 没有表现出剂量依赖性或时间依赖性的药代动力学,在第一剂量后在60~2000mg剂量范围内平均值处于11.6~16.7h范围内,并且第七剂量(第15天的剂量给药)后为12.3~20.2h。 $C_{\text{最大}}$ 和 AUC_{0-t} (0~24h)随剂量适当地呈线性增加,但以不太成比例的方式,有可能达到1500mg剂量的平台(图12和图13)。在30~2000mg的剂量范围内,所述第一剂量后平均 $C_{\text{最大}}$ 为32~1858ng/mL,而所述第七剂量后平均 $C_{\text{最大}}$ 为99~1703ng/mL(图12)。在相同剂量范围内,平均 AUC_{0-t} (0~24h)在所述第一剂量后为164~20,544h·ng/mL,而所述第七剂量后为702~20,919h·ng/mL(图13)。累积一般是最小的。

[0322] 所述PK数据显示出剂量最高达1000mg TIWK暴露时的剂量依赖性增加。在剂量大于500mg TIWK时,所述第7剂量后的 $C_{\text{最大}}$ 和 AUC_{0-t} (0~24h)始终低于所述第一剂量后测得的那些(图12和图13)。由于剂量超过1000mg时的 $C_{\text{最大}}$ 和 AUC_{0-t} (0~24h)值的平台期,更频繁的剂量给药方案用于增强每周暴露(表4)。基于该研究的所述结果,RX-3117的最大耐受剂量(MTD)被确定为每周5天每天700mg,给药三周,每4-周周期停止一周。然后将这个MTD用于随访效能研究。

[0323] 表4. 研究的第1天和第15天后的PK数据

频率	剂量 (mg)	剂量给药日	剂量数	C _{最大} (ng/mL)	T _{最大} (h)	T _{1/2} (h)	AUC ₀₋₂₄ (h*ng/mL)
3 次/周	30	1	1	31.6	2	3.87	252
3 次/周	60	1	1	139	2	16.2	1164
3 次/周	100	1	1	357	2	15.4	2714
3 次/周	150	1	1	511	3	13.9	3546
3 次/周	200	1	1	637	2	13.3	4719
3 次/周	500	1	1	1104	2	16.7	7916
3 次/周	1000	1	1	1635	2	11.6	12218
3 次/周	1500	1	1	1622	3	11.8	15322
3 次/周	2000	1	1	1858	3	13.3	17044
5 次/周	500	1	1	1441	2	7.31	12373
5 次/周	700	1	1	989	3	9.05	8663
7 次/周	500	1	1	1269	3	8.28	10097
3 次/周	30	15	7	98.9	2	8.23	702
3 次/周	60	15	7	113	4	15.7	1566
3 次/周	100	15	7	460	2	20.2	3289
3 次/周	150	15	7	360	3	15.1	2437
3 次/周	200	15	7	643	3	16.2	4574
3 次/周	500	15	7	941	3	15.3	8275
3 次/周	1000	15	7	1210	3	14.9	9753
3 次/周	1500	15	7	883	2	13.8	7050
3 次/周	2000	15	7	1703	3	12.1	17403
5 次/周	500	15	11	1212	2	8.71	9201

5 次/周	700	15	11	674	4	11.2	6321
7 次/周	500	15	15	1363	2.5	9.45	14467

[0326] 安全性和耐受性

[0327] 最常见的不良事件是轻度至中度疲劳和恶心,轻度腹泻,轻度呕吐,轻度厌食和中度脱水。剂量限制性毒性限于3级贫血,血小板减少症。

[0328] 实施例5:RX-3117在人类中的疗效、安全性和耐受性

[0329] 评估RX-3117在各种剂量和频率下的所述疗效、安全性和耐受性(参见以上实施例4)。患有晚期恶性肿瘤的受试者给予含有不同剂量的RX-3117的胶囊,从TIWK到7次/周,持

续3周,每4-周周期期间停止1周。剂量逐步升高始于每剂量治疗1个受试者的加速设计(Simon et al., J.Natl.Cancer Inst., 89 (15) :1138-47 (1997),接着在发生单一相关2级或更高级别的不良事件之后使用修改的斐波拉契(Fibonacci)序列的标准3+3设计。表4(以上)总结了所述剂量给药方案。

[0330] 对受试者进行RX-3117的疗效、安全性和耐受性评价。共有48名受试者入选(30名女性,18名男性)。17名受试者经历1~10个周期的稳定疾病;10名受试者从82天到276天接受治疗。3名胰腺癌(肿瘤体积和CA19-9生物标志物),乳腺癌和间皮瘤癌症的患者中观察到肿瘤负荷降低。最常见的相关不良事件是中度至重度贫血,轻度至中度疲劳和恶心,轻度腹泻,呕吐和厌食。

[0331] 在本研究的另一个阶段,RX-3117正在Ib/IIa期临床试验中用于复发或难治性胰腺癌或晚期膀胱癌(包括肌肉侵入性膀胱癌)的癌症患者中进行评价。所述Ib/IIa期临床试验是一项多中心研究,其评价RX-3117在这些目标患者群体中的安全性和疗效。次要终点包括安全性和药代动力学分析。所述试验中的患者在28天周期和4个治疗周期中每周口服5次700mgRX-3117的日剂量,持续3周,或直到其疾病进展。

[0332] 实施例6:氟代环戊烯基胞嘧啶(RX-3117)在卵巢癌和肺癌细胞系中的放射敏化作用

[0333] 药物和化学品

[0334] 在去离子水中制备RX-3117的原液。所有使用的其他化学品都是标准质量和商业可获得的。

[0335] 细胞培养

[0336] 将人NSCLC细胞系A549(腺癌)、H460(大细胞癌)、SW1573(肺泡癌),和SW1573/G-(吉西他滨耐药性SW1573细胞系)和卵巢癌细胞系A2780在T25烧瓶(Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, 德国)中保持指数生长并培养于杜尔贝科(Dulbecco)最小必需培养基(DMEM)或RPMI 1640中(补充有10%热灭活胎牛血清(FBS)、1%链霉素和青霉素),并37°C保持于5%CO₂饱和气氛下。使用胰蛋白酶EDTA(Invitrogen, Paisley, 英国)收获细胞。使用Coulter®Z™系列计数器计数细胞。

[0337] 克隆源性测试

[0338] 将指数生长的A2780、SW1573、A549、H460和SW1573/G-细胞暴露于1μM RX-3117或未处理(对照)24h,并以使用Co源(Gammacell 200, Atomic Energy of Canada, Ltd)用单剂量γ辐射(0~6Gy)照射。随后,将500个细胞/T25烧瓶铺板并使其形成菌落。十天后,将菌落用100%乙醇固定,并用10%吉姆萨染色溶液(Merck Chemicals BV, Amsterdam, 荷兰)染色进行菌落计数。通过将形成的菌落数量除以对照铺板并对于对照诱导的毒性进行标准化的细胞数目计算铺板效率(PE)。为了举例说明RX-3117对辐射的影响,如前所述计算剂量修改因子(DMF) (Bijnnsdorp IV, van den Berg J, Kuipers GK, Wedekind LE, Slotman BJ, van Rijn J, Lafleur MVM and Sminia P: Radiosensitizing potential of the selective cyclooxygenase-2(COX-2) inhibitor meloxicam on human glioma cells. J Neurooncol 85:25-31, 2007)。

[0339] 球状体测试

[0340] 将所述NSCLC细胞系A549和SW1573以100,000个细胞/孔的密度铺板于低附着24孔

板(Corning Incorporated,Corning,NY)中,并使其形成球状体。三天后,将单个球状体转移至新的24孔低附着孔板(一个球状体/孔)。在对于A549和SW1573细胞开始转移处理后立即1μMRX-3117与分次2Gy辐射(5天单一2Gy剂量)组合。在第0天(照射前)和3、6、9和15天后,使用相差显微镜(LeicaDMI300B Universal Grab 6.3版软件,Digital Cell Imaging Labs)拍摄照片。如Galvani等人(Galvani E,Giovannetti E,Saccani F,Cavazzoni A,Leon LG,Dekker H,Alfieri R,Carmi C,Mor M,Ardizzoni A,Petronini PG and Peters GJ:Molecular mechanisms underlying the antitumor activity of 3-amino-propanamide irreversible inhibitors of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer.Neoplasia 15:61-72,2013)早期所述,通过ImageJ软件(ImageJ 1.45s,Wayne Rasband,National Institutes of Health,Bethesda,MD)进行测定用于球状体体积计算($V=4/3\pi(D/2)^3$)。

[0341] 流式细胞术分析

[0342] 通过将细胞以5,000个细胞的密度铺板于平底6孔板(Greiner Bio-One GmbH,Frickenhausen,德国)并使其附着24h从而分析细胞周期分布和凋亡。此后加入 $5\times IC_{50}$ 的细胞毒性浓度。所述暴露时间为24h和48h,并为了比较将所述对照组包括在内。在每个时间点上,在圆底FALCON管(BD,Franklin Lakes,NJ,美国)中收获总量的贴壁细胞和漂浮细胞。离心后,将细胞颗粒重新悬浮于1.0mL碘化丙啶(PI)溶液(50μg/mL PI,0.1%柠檬酸钠,0.1% Triton X-100,0.1mg/mL核糖核酸酶A)或10μL膜联蛋白V(目录号31490014,Immunotools)并在冰上放置30分钟。随后,使用FACSCalibur(BD Biosciences,Mount View,CA,美国)分析样品。为了进行数据分析,使用DNA直方图上的门(gate)估计亚G1期细胞(凋亡细胞)的数量,运行CELLQuestTM软件。

[0343] 蛋白表达分析

[0344] 通过蛋白印迹分析RX-3117对不同处理条件期间的蛋白表达的影响。使用含有4%蛋白酶抑制剂混合物(Roche Diagnostics,Mannheim,德国)的1×细胞溶解缓冲液(Cell Signaling,Danvers,MA,美国)在冰上溶解细胞30分钟,并在4℃以14,000rpm离心10分钟。正如以前所述(Lemos C,Kathmann I,Giovannetti E,Calhau C,Jansen G and Peters GJ:Impact of cellular folate status and epidermal growth factor receptor expression on BCRP/ABCG2-mediated resistance to gefitinib and erlotinib.Br J Cancer 100:1120-7,2009),进行Bio-Rad测试从而确定所述收集的上清液中的蛋白量。所述以下抗体用于蛋白表达: γ H2A.X(目录#9718,Cell Signaling,1:1000), β -肌动蛋白(Sigma,1:10,000),Cdc25C Ser216(目录#4901,Cell Signaling,1:1000),Cdk1Tyr15(目录#9111,Cell Signaling,1:1000),Chk1Thr68(目录#2197S,Cell Signaling,1:1000),组蛋白3(目录#4499,Cell Signaling)。抗体稀释于具有Rockland缓冲液(Rockland Inc,Philadelphia,PA)和补充有0.05%吐温20的磷酸盐缓冲盐水(PBS)的1:1溶液中。蛋白在20%SDS-PAGE凝胶中分离并转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜。对于荧光信号,使用了二级抗体山羊抗小鼠InfraRedDye和山羊抗兔InfraRedDye。蛋白通过Odyssey InfraRed Imager(Li-COR Bioscience,Lincoln,NE)进行检测。

[0345] 结果

[0346] RX-3117的放射敏化作用

[0347] 为了研究RX-3117对辐射的影响,进行了克隆源性测试。首先,本发明人检查了用RX-3117预孵育或后孵育是否增强辐射的作用。在A2780细胞中比较了采用RX-3117和4Gy的预处理和后处理。

[0348] 克隆源性测试数据表明用RX-3117预孵育是放射敏化作用的最有效条件。与对照相比,用1 μ M RX-3117预孵育具有5倍更低的铺板效率(图15)。

[0349] 使用所述预孵育方案,在A2780细胞和非小细胞肺癌细胞系A549、SW1573和SW1573/G-和H460中研究了潜在的放射敏化作用。一般而言,所有细胞系在用RX-3117和辐射处理时均表现出放射敏化作用。观察到最大放射敏化作用,在所述A2780和A549细胞系中DMF为1.8以及在SW1573中DMF为1.5(图16A,图16B,图16D)。吉西他滨耐药性细胞系SW1573/G-具有1.4的DMF(图16E),但H460细胞显示出较差的放射敏化作用。由于分次照射是临床中的标准程序,因此也研究了SW1573细胞中在5天内2Gy辐射的分次剂量。在5次2Gy的分次放射疗法之前用1 μ M的RX-3117孵育显示出最低的集落生长(图16F)。

[0350] 还研究了RX-3117与辐射组合在使用球状体测试的三维模型中的放射敏化能力。所述球体形成测试揭示了RX-3117对SW1573和A549球状体中的球体的放射敏化作用(图17)。SW1573球体受到单独1 μ M RX-3117和单独放疗(RT)(2Gy 5天)的高度影响,并且采用所述组合增强了所述效果。在A549细胞中,单独RX-3117处理或照射对所述体积生长只有很小的影响,而1 μ M RX-3117却会增强2Gy照射5天的效果(图17)。

[0351] 细胞凋亡引发

[0352] 在所述NSCLC细胞系中研究了RX-3117诱导凋亡的潜力。在暴露24h,48h和72h后,通过膜联蛋白V染色测定凋亡细胞的量(图18)。膜联蛋白V细胞膜染色显示A549细胞和SW1573细胞的凋亡细胞逐渐增加,与A549相比,这对于SW1573细胞更显著。

[0353] DNA损伤引发

[0354] DNA损伤是细胞死亡的标志。通过评价 γ H2A.X表达来研究DNA损伤。在所述A2780细胞系中,从0.1 μ M开始至10 μ M RX-3117的渐增RX-3117浓度显示出以剂量依赖性方式诱导 γ H2A.XS139(图18中的A)。在所述SW1573细胞系中,在暴露于0.3 μ M RX-3117 48h后,所述双链断裂损伤标志物增加(图18中的B)。0.3 μ M RX-3117和辐射的组合显示出更显著的 γ H2A.XS139蛋白表达(图18中的B)。如预期的那样,辐射引起 γ H2A.X的表达立即增加;在RX-3117的存在下所述修复被延迟。

[0355] 采用RX-3117和辐射的处理对细胞周期分布和细胞死亡的影响

[0356] 因为在细胞周期分布中的扰动据报道会影响其它核苷类似物的放射敏化作用(Shewach DS and Lawrence TS:Antimetabolite radiosensitizers.J Clin Oncol 25: 4043-50,2007),RX-3117与辐射组合的效应在NSCLC细胞中使用FACS分析进行了研究。在1 μ M RX-3117的相对低浓度下,在4个细胞系中的3个细胞系中发现了所述S期的小且刚好显著($p<0.05$)的细胞系依赖性增加。在所有细胞系中均发现了所述G1期增加(图19中的A),并发现G2/M期强烈降低。4Gy辐射导致所述S-期细胞量明显降低,在这这两种SW1573细胞中所述G2/M期增加而在A549细胞中没有影响,但在所述H460细胞中降低(图19中的A)。辐射和RX-3117的组合导致两种SW1573变体中的所述S期细胞数量增加,但H460细胞降低。在A549细胞中细胞杀灭(亚G1)明显增加,但是在其他细胞中却没有(图19中的A)。

[0357] 为了理解一些这些现象,还研究了RX-3117和辐射对一些基本细胞周期蛋白的表

达的影响(图19中的B和图20)。在SW1573中,检测了RX-3117和辐射对各种细胞周期检查点蛋白的影响(图20)。48h后,辐射导致了wee1,Chk2,CDC25c和p-CDC25c的感兴趣的降低。在两种SW1573细胞中,辐射都引起了Chk2磷酸化的增加(图19中的B)。在几乎所有的细胞系(除了吉西他滨耐药性SW-1573/G外)中,RX-3117都降低了Cdk1的磷酸化作用;类似地,辐射在24h内提高了cdc-25C的磷酸化作用(但在SW1573/G-中却没有)(图19中的B)。与RX-3117组合,这种效果被维持(图19中的B)。

[0358] 实施例7:RX-3117抑制DNA甲基转移酶导致高甲基化靶标上调

[0359] RX-3117类似于氮胞昔(氮杂-CR)和氮杂-脱氧胞昔(氮杂-CdR)。RX-3117被所述人平衡核苷转运蛋白(hENT)占有(take up)并被尿苷-胞昔激酶2(UCK2)激活成RX-3117-MP(图21)。RX-3117被所述人平衡核苷转运蛋白(hENT)占有并被尿苷-胞昔激酶2(UCK2)激活成RX-3117-MP。RX-3117下调DNA甲基转移酶1(DNMT1)(Choi W.J.,et al.,J.Med.Chem.55(2012)4521-4525;Peters G.J.,et al.,Invest New Drugs 31(2013)1444-1457)。DNMT1负责维持所述S期新合成的DNA的甲基化,并使半甲基化DNA中的胞嘧啶残基甲基化。RX-3117的脱氨速率比吉西他滨慢得多。

[0360] RX-3117是口服生物可利用的新型胞昔类似物,目前正在I期临床研究中进行评价。最大耐受剂量高于2000mg/天。在具有不同组织学背景的各种细胞系中已经显示RX-3117会下调DNMT1。目前UCK2和DNMT1都被评价为潜在的生物标志物。在这个实施例中,测定了RX-3117对DNMT1在所述DNA、RNA、蛋白和酶活性上,以及包括p16INK4A、甲基鸟嘌呤甲基转移酶(MGMT)和所述质子偶联叶酸转运蛋白(PCFT)在内的受抑制靶基因的重新激活的影响。PCFT包括在pH 5.5和7.4下转运叶酸,甲氨蝶呤(MTX)和培美曲塞(pemetrexed)(PMX),并且该基因是高度甲基化的。此外,研究了已知受甲基化调控的所述基因的蛋白的功能,包括:质子偶联的叶酸转运蛋白(PCFT)。还研究了E-钙黏蛋白(粘附分子)、p16INK(肿瘤抑制蛋白)和O-6甲基鸟嘌呤DNA甲基转移酶(MGMT)(DNA修复基因)在A549细胞系中的表达。

[0361] 方法

[0362] 在该研究中,使用了以下细胞系:(1)CCRF-CEM细胞及其MTX抗性变体CEM-MTX,其特征在于所述还原的叶酸载体的缺乏(RFC)(Jansen G.,et al.,JBC 273(1998)30189-30198)。CEM细胞中的所述PCFT基因是高度甲基化的。(Gonen N.,et al.,BBRC 376(2008)787-92.);(2)在含有10%胎牛血清(FBS)的RPMI培养基中培养的CEM细胞;和(3)在含有10%FBS的DMEM培养基中培养的A549和SW1573非小细胞肺癌(NSCLC)和A2780卵巢癌细胞系。

[0363] 在暴露于RX-3117长达24或48h后,通过蛋白印迹法测定DNMT1蛋白表达。在暴露于RX-3117长达24和48h后,通过实时PCR测定DNMT1RNA表达。使用由EpiGentek提供的DNA甲基转移酶测试试剂盒,利用CpG结合结构域与甲基化DNA结合的能力,在暴露1μM RX-3117或5μM氮杂-CdR后,在分离的核中测定DNMT酶活性。在A549细胞中,用针对5-甲基-胞嘧啶的特异性抗体测定了5μM RX-3117对总甲基化的影响。蛋白印迹上的条带利用合适的InfraRedDye使用Odyssey InfraRed成像仪可视化。

[0364] 使用放射标记的MTX在CEM野生型和CEM-MTX细胞系中测定MTX转运。CEM细胞具有很高的RFC活性。在RFC介导的转运中CEM-MTX完全缺乏。CEM细胞具有高度甲基化的PCFT转运蛋白和非常低的PCFT介导的转运(Gonen N.,et al.,BBRC 376(2008)787-92)。在pH 7.4

下MTX转运主要是RFC介导的,且通过PCFT小于2%。叶酸用于抑制PCFT介导的转运。加入L-甲酰四氢叶酸(leucovorin)(L-LV)以完全抑制RFC介导的转运。将CEM和CEM-MTX细胞暴露于29.6 μ M RX-3117和0.19 μ M氮杂-CdR作为阳性对照。使用2 μ M[3',5',7-3H]-MTX在3分钟摄取测试中暴露于所述药物24h后测定MTX转运。

[0365] 使用学生t-检验完成统计。

[0366] 结果

[0367] 在所述中等敏感的非小细胞肺癌(NSCLC)细胞系如A549和SW1573中,24h暴露后5~50 μ M RX-3117下调DNMT1蛋白表达达5%~20%,48h后为>90%(图25中的A和图25中的B)。DNMT1mRNA在暴露24h后不受影响,但在48h后受到中度影响(图25中的C和图25中的D)。

[0368] 在所述敏感的卵巢癌细胞系A2780中,在1 μ M RX-3117下24h后已经观察到蛋白下调(图26中的A和图26中的B)。DNMT1活性受1 μ M RX-3117抑制达32%,这与用5 μ M参比化合物5-氮杂-2'-脱氧胞昔(DAC,31%)抑制百分比相似。

[0369] 在A549细胞中,暴露48h后5 μ M RX-3117使DNA的总甲基化(通过抗5-甲基胞嘧啶的抗体检测)降低了25%,而5 μ M DAC仅抑制9%(图27中的A)。对于已知受甲基化影响的多种基因,蛋白表达和活性都进行了评价。将A549细胞暴露于RX-3117并使用针对5-甲基-胞嘧啶的抗体进行免疫荧光进行测定(图27中的B)。在A549和SW1573细胞中,24h暴露于5 μ M RX-3117提高了细胞周期蛋白p16INK4A和所述DNA修复酶MGMT的表达。图27中的C显示了暴露于RX-3117和氮杂-dC后的MGMT、E-钙粘蛋白和p16INK4的表达。

[0370] 对于PCFT,RX-3117的功能活性在具有高度甲基化PCFT启动子的CCRF-CEM白血病细胞中和所述还原叶酸载体(RFC)缺乏的CEM-MTX细胞中进行评价。PCFT是负责摄取叶酸和叶酸类似物甲氨蝶呤(MTX)和培美曲塞的特异性叶酸转运蛋白。使用29.6 μ M RX-3117或DAC作为阳性对照的CEM和CEM-MTX细胞的孵育显著提高了MTX的PCFT介导的转运。这在CEM-MTX细胞中更明显,相对于CEM细胞中的4倍增加,RX-3117和DAC都提高了10~11倍。添加叶酸(FA)以抑制PCFT和L-LV以抑制RFC介导的MTX转运。将氮杂-CdR和氮杂-CR包括在内作为阳性对照。(图28中的A,图28中的B和图28中的C)。

[0371] 结论

[0372] 总之,RX-3117通过降低DNA甲基化下调DNMT1蛋白和RNA表达。RX-3117介导的低甲基化作用会提高MGMT、E-钙粘蛋白、PCFT和肿瘤抑制基因p16INK4A的表达。PCFT介导MTX转运。这些数据强调了作为RX-3117的新机制的DNMT1抑制作用。RX-3117是一种新的表观遗传(epigenetic)调节剂。

[0373] 实施例8:UCK2蛋白表达作为RX-3117的潜在预测性生物标志物的评价

[0374] 背景

[0375] 一种新型口服生物可利用的核昔类似物RX-3117是被认为主要表达于肿瘤组织中的尿昔胞嘧啶激酶2(UCK2)在胞内激活的前体药物。RX-3117目前正在Ib/IIa期多中心开放标签临床研究中在晚期胰腺癌和膀胱癌患者中进行评价。在这项研究中,研究了UCK2组织蛋白表达与RX-3117在小鼠异种移植模型中的疗效之间的关系,以及相对于正常组织在一组人类癌症组织中的UCK2蛋白表达。

[0376] 方法

[0377] 使用克隆22-1兔单克隆抗体通过免疫印迹法分析了肿瘤组织中的UCK2蛋白表达。

在一组人福尔马林固定的石蜡包埋(FFPE)癌和正常组织中进行UCK2与克隆22-1的免疫组织化学(IHC)的验证程序。

[0378] 结果

[0379] 针对β-肌动蛋白标准化的UCK2的免疫印迹蛋白质水平和对应的肿瘤生长抑制作用(500mg/kg的口服RX-3117剂量, TIWK)在MiaPaCa2中分别为57%和67%, 在BxPC3中分别为30%和-5%, 在Coli-205中分别为199%和92%, 在Caki-1中分别为21%和90%, 在A549中分别为2%和39%, 而在H460中分别为146%和79%。这些数据指示了UCK2依赖性方式的抗肿瘤效能趋势。UCK2的所述IHC表明, 在20/20膀胱癌组织(100%频率)、19/20CRC组织(95%频率)、18/20NSCLC组织(90%频率)和19/20胰腺癌组织(95%频率)中观察到UCK2在癌组织中的阳性染色。UCK2在癌组织中相对于正常组织中的平均H-评分分别为肺中的104比9, 膀胱中的97比20, 胰腺中的67比41和结肠中的39比21。

[0380] 结论

[0381] 目前的数据显示了UCK2蛋白表达水平与RX-3117在异种移植模型中的抗肿瘤活性程度之间的相关性趋势。这还支持了与其正常组织相比, 在人癌症组织中UCK2蛋白表达水平更高。这表明RX-3117活性可能对肿瘤组织是特异性的, 并且在未来的临床研究中, 人类癌症组织中的UCK2表达的定量可以用作对RX-3117的敏感性的患者选择的预测性生物标志物。

[0382] 实施例9: RX-3117—水合物的合成

[0383] 在固定反应器中通过阶段1至阶段3的连续反应由ASM11制备INT14

[0384] ASM 11, 叔丁基(((3aR,4R,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-基)氧基)二苯基硅烷(37.65kg, 1wt, 1当量, 55mol)溶解于2-甲基四氢呋喃(4.0体积, 3.4wt)中。在15~45分钟内将THF(四氢呋喃, 1.61体积, 1.45wt, 1.1当量)中的1.0M TBAF(四正丁基氟化铵)一次性(in one portion)加入到所述反应容器中(温和放热的受控加料), 保持18~23℃。向所述容器中充入2-甲基四氢呋喃(1.0体积, 0.9wt)作为管路冲洗, 保持18~23℃, 并将所获得的溶液在18~23℃下搅拌6h, 直到通过¹H NMR监测反应完全。向所述反应混合物中加入8%w/w碳酸氢钠(3.0体积), 并在18~23℃下搅拌5~10分钟(小心: 温和放热), 并容许相分离从而除去下层水相(2×2.0体积)。所述第一8% (w/w) 的碳酸氢钠提取物提供乳状水层, 而延长的沉降时间却并未澄清乳液。研究表明所述乳液被限制于水层中, 并具有低的有机含量, 由此继续进行所述过程。所述第一提取的总分离为5小时29分钟。所述第二8%w/w碳酸氢钠萃取分离在没有问题的情况下(without issue)只需要52分钟。所述水相用2-甲基四氢呋喃(2.0体积, 1.7wt)萃取, 而管道用2-甲基四氢呋喃(2.0体积, 1.7wt)冲洗。将含有INT12的所述合并的有机相加热至40~50℃并在40~50℃下减压浓缩至约4体积。采样进行分析并通过Karl-Fischer进行分析, 直到含水量(contentwa)≤0.2%w/w。所述过程在含有15.3%w/w INT12ASM11-醇的2-甲基四氢呋喃中获得158.8kg净重的INT12ASM11-醇, 相当于总收率99.0%。通过HPLC分析测得92.83%面积纯度的INT12ASM11-醇((3aS,4R,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧化杂环戊烯-4-醇)。

[0385] 将所述INT12溶液返回容器中, 冷却至0~5℃并加入三乙胺(0.41体积, 0.30wt, 2.0当量)。在用2-甲基四氢呋喃(1.0体积, 0.9wt)冲洗管道后, 向所述溶液中加入稀释于2-

甲基四氢呋喃(1.0体积,0.9wt)中的甲磺酰氯(0.17体积,0.25wt,1.5当量)(小心混合于所述头容器(header vessel))在至少30分钟内保持0~5℃(放热)。另外的2-甲基四氢呋喃(0.5体积,0.4wt)作为管道冲洗加入,保持0~5℃。在0~5℃下搅拌所述容器中的内容物,直到1h后¹H NMR监测所述反应完成。1h后取出代表性的样品,如果需要,此后约每隔2h从所述反应容器检查一次,并分析从而检查所述剩余的INT12。在通过¹H NMR分析检查100%转化后,保持在0~10℃下加入水(4.0体积),并将所述反应混合物温热至18~23℃,并在18~23℃下搅拌5~10分钟。将所述容器中的上部有机相分离出来并加入8%w/w碳酸氢钠溶液(4.0体积),保持18~23℃。将所获得的两相溶液在18~23℃下搅拌1~2h,并向所述分离的有机相中加入20%w/w氯化铵水溶液(2.0体积)和2-甲基四氢呋喃(2.0体积,1.7wt)。根据需要,将所述温度调至18~23℃。所述20%w/w氯化铵洗涤导致剧烈的气体逸出,可能是由于与来自前一步的残留的碳酸氢钠反应所致。在18~23℃下搅拌5~10分钟后,分离出上部有机相并加入调至18~23℃的纯水(2.0体积)。将含有INT13的所述分离的有机相在35~45℃下减压浓缩至约2体积。采样进行分析。该过程在含有34.9%w/w INT13ASM11-甲磺酸酯的2-甲基四氢呋喃中产生净重78.4kg的INT13ASM11-甲磺酸酯,等同于总收率94.9%。通过HPLC分析测得62.91%面积纯度的INT13ASM11-甲磺酸酯((3aR,4R,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基甲磺酸酯),并存在32.23%面积的TBDPS副产物。

[0386] 连续地向所述INT13溶液中加入DMSO(3.8体积,4.2wt)并加热至40~45℃从而在≤45℃下减压浓缩所述有机相直至不再有溶剂(2-甲基四氢呋喃)蒸馏。继续所述浓缩5小时25分钟并由¹H NMR测得所述IPC显示8.3%w/w的2-甲基四氢呋喃含量。将所述溶液冷却至27~33℃后,加入碳酸铯(1.2wt)和胞嘧啶(0.41wt)。将所述反应混合物加热至33~37℃并搅拌至通过HPLC监测反应完成。在24h之后并在此后适当时间点从所述反应容器采样进行N/O-烷基化比率分析。在33小时47分钟后,认为所述反应完成,IPC结果为99.5%转化率。N-和O-异构体比率为99.03:0.97。完成后,向所述混合物中加入乙酸异丙酯(2.0体积,1.7wt)和纯化水(4.0体积,4.0wt),保持≤50℃(加水是放热的)。搅拌5~15分钟后,使所述两相混合物沉降10分钟,并随后分离出上层有机相。所述水相通过在40~50℃下搅拌5~15分钟并再次沉降10分钟之后分离而重新萃取两次,从而用乙酸异丙酯(2.0体积,每次1.7wt)回收所有产物。所述合并的有机相冷却至25~30℃,并加入10%v/v乙酸(3.0体积)和26%w/w盐水溶液(1.0体积),维持25~30℃,并在25~30℃下搅拌所述两相溶液30~60分钟。所述上层有机相用10%v/v乙酸(3.0体积)和26%w/w盐水溶液(1.0体积)洗涤三次,保持25~30℃。在每个洗涤步骤中,所述上层有机溶液通过¹H NMR分析取样。所述有机相再次用约3%w/w的盐水溶液(3×2.0体积)在25~30℃下洗涤,并通过¹H NMR对乙酸含量进行取样。将含有INT14的所述有机相加热至35~45℃并在35~45℃下减压浓缩至约5体积。向所述溶液中加入乙酸异丙酯(3.0体积,2.6wt)并在35~45℃下减压浓缩至约5体积。再次向所述溶液中加入乙酸异丙酯(5.0体积,4.4wt),调节至57~63℃,在57~63℃下搅拌1.5~3h,并通过HPLC检查结晶/沉淀。将所述浆液冷却至35~45℃并在35~45℃下减压浓缩至约5体积。在1.0~2.0h内将所述浆液进一步冷却至18~23℃,并在30~90分钟内加入正庚烷(7.0体积,4.8wt),保持18~23℃。在18~23℃下1~2h和在0~5℃下1~2h后,将所述浆液通过20μm布过滤,并用预混的正庚烷/乙酸异丙酯(5:1,2×1.0体积)在0~5℃下洗涤。将含

有INT14的所述产物在最高达55℃下真空干燥并通过¹H NMR进行检测。通过标准为≤2.0% w/w乙酸异丙酯和≤2.0% w/w正庚烷。所述过程获得净重24.27kg的INT14,4-氨基-1-((3aS,4S,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)嘧啶-2(1H)-酮(45mol,93.25%纯度),相当于82%总收率和64%w/w产率。

[0387] 在固定反应器中通过阶段4至阶段5的连续反应由INT14制备RX-3117—水合物

[0388] INT14,4-氨基-1-((3aS,4S,6aR)-5-氟-2,2-二甲基-6-((三苯甲基氧基)甲基)-4,6a-二氢-3aH-环戊[d][1,3]二氧杂环戊烯-4-基)嘧啶-2(1H)-酮(24.27kg,45mol,1.0wt)加入到容器中,随后加入甲醇(7.5体积,5.9wt),并将所述反应混合物的温度调至18~23℃。向所述反应容器中加入2M HCl(1.1体积,1.2当量),保持温度<50℃。将所述浆状混合物加热至45~55℃,并在45~55℃(目标50℃)下搅拌2~2.5h。记下所述容器的体积,并保持45~55℃将所述反应混合物在减压下蒸馏,并通过加入MeOH(5.0体积,4.0wt)保持体积恒定。对所述混合物进行取样并继续加入MeOH(2.5体积,2.0wt)在45~50℃下通过蒸馏保持体积恒定,直到通过HPLC监测存在≤1.0%面积的丙酮化物中间体。一旦转化完成,将所述反应混合物冷却至25~30℃。将所述反应混合物保持在35~45℃下减压浓缩至5体积。将所述反应混合物冷却至25~30℃。向所述反应容器中加入TBME(甲基叔丁基醚)(5.0体积,3.7wt)和水(5.0体积),维持25~30℃。将所述两相溶液在25~30℃下搅拌10~20分钟,并在25~30℃下分离所述相,保留所述下层水相。将所述保留的下层相转移至所述容器中,并再加入TBME(5.0体积,3.7wt),保持25~30℃。在25~30℃下搅拌所述两相溶液10~20分钟后,分离出下层水相。将所述下层水相返回到所述容器中,并用注射用水(0.5体积,0.5wt)冲洗所述管道。通过¹H NMR测试检查三苯甲醇的去除,三苯甲醇含量为0.3%w/w。如果所述测定结果不是≤0.5%w/w三苯甲醇,则向所述水相中加入TBME(5.0体积,3.7wt)并在25~30℃下搅拌10~20分钟,然后重复所述分离。将所述合并的水溶液调至18~23℃,加入预处理的Ambersep 900(OH形式)树脂(5/6所述批量处理的材料)并搅拌15分钟从而检查所述pH。如果pH<8.0,则加入更多的Ambersep900树脂(OH形式),并在18~23℃下将所述溶液搅拌30~45分钟。将所述浆液过滤并用注射用水(2×4.0体积)洗涤每次15~30分钟。所述过滤器上的树脂滤饼用注射用水(3×4.0体积)进一步洗涤,每次洗涤15~30分钟,直到每次洗涤通过HPLC测定获得≤1.0%的结果。通过1μm过滤器澄清所述母液和任何含有≥1.0%的获得洗涤液。将所述溶液加热到40~45℃,并在40~45℃减压浓缩至1.5体积。在2~3h内将所述水溶液冷却至18~23℃后将所述混合物老化60分钟并且在1.5~2h内以大致恒定的速率加入保持18~23℃的乙腈(9.5体积)。将所述浆液在18~23℃老化2h,并在0~5℃冷却90分钟。通过20μm布过滤所述固体并用MeCN/水(5:1,1.5体积)洗涤并在空气气氛下干燥直至通过GC测定MeCN含量<400ppm。所述过程获得8.20kg(99.83%纯度)净重的RX-3117—水合物,4-氨基-1-((1S,4R,5S)-2-氟-4,5-二羟基-3-(羟基甲基)环戊-2-烯-1-基)嘧啶-2(1H)-酮·1H₂O(29.8mol,99.83%纯度),相当于66%总收率和34%w/w产率。

[0389] 图29是证明使用实施例9中所述的方法制备的RX-3117的¹H NMR。¹H-NMR(400MHz,DMSO-d₆),δ7.40ppm,(d,J=7.3Hz,1H)CH胞嘧啶,δ7.20ppm,(宽d,J=9.1Hz,2H)NH₂,δ5.74ppm,(d,J=7.3Hz,1H)CH胞嘧啶,δ5.30ppm,宽s,1H,CH,δ5.15ppm,(d,J=7.1Hz,1H)(OH),δ5.00ppm,(d,J=6.1Hz,1H)(OH),δ4.80ppm,(q,J=5.3Hz,1H)(OH),δ4.48ppm,(q,J=

5.3Hz, 1H) CH, δ4.17ppm, (dd, J=9.1Hz, 3.8Hz, 1H) CH, δ4.13ppm, (dt, J=6.1Hz, 5.8Hz, 1H) CH, δ3.91ppm, (宽d, J=12.9Hz, 2.8Hz, 1H) CH。

[0390] 图30是使用实施例9中描述的方法制备的RX-3117的¹³C NMR。

[0391] 图31是使用实施例9中描述的方法制备的RX-3117的¹⁹F NMR。

[0392] 图32是使用实施例9中描述的方法制备的RX-3117的质谱。所述质谱使用显示RX-3117 (M+H) 以及m/z=280.0的RX-3117+钠加合物 (M+钠) (在该分析方法期间所见的常见物质) 的质子化物质的ES+过滤器完成。所述钠来自所述分析方法,而不是所述制备过程。

[0393] 图33是使用实施例9中描述的方法制备的RX-3117的质谱。使用在所述分析过程期间显示RX-3117的所述M-H物质的ES-过滤器完成所述质谱。所述ES-和ES+过滤器方法一起为RX-3117提供了完整的质谱证据。

[0394] 为了验证根据上述大规模合成方法制备的材料的结晶性质,对由实验室规模的高纯度方法制备的晶体进行显微比较,并且比较了所述X-射线粉末衍射图。图34是根据实施例9的所述方法(上排) 和在平面偏振光(左列) 下和正交偏振光(右列) 下使用实验室规模方法(下排) 制备的RX-3117的显微镜比较。图35是比较使用实验室规模制备的RX-3117(顶部光谱) 和使用实施例9中描述的方法(底部光谱) 制备的RX-3117的X-射线粉末衍射数据。正如所见,所述晶体结构没有显著差异。

[0395] 对于本领域技术人员而言,显而易见的是,所公开的主题的具体实施方式可以以任何组合针对一个或多个以上和以下所指的实施方式。

[0396] 虽然已经通过举例说明和实施例的方式较详细地公开了本发明,但是对于本领域技术人员而言显而易见的是,在不脱离本发明的真实精神和范围的情况下可以进行改变并且可以替换等同物。因此,所述描述和实施例不应被解释为限制本发明的范围。

[0397] 本文所公开的所有参考文献,出版物,专利和专利申请均以其全部内容结合于本文中作为参考。

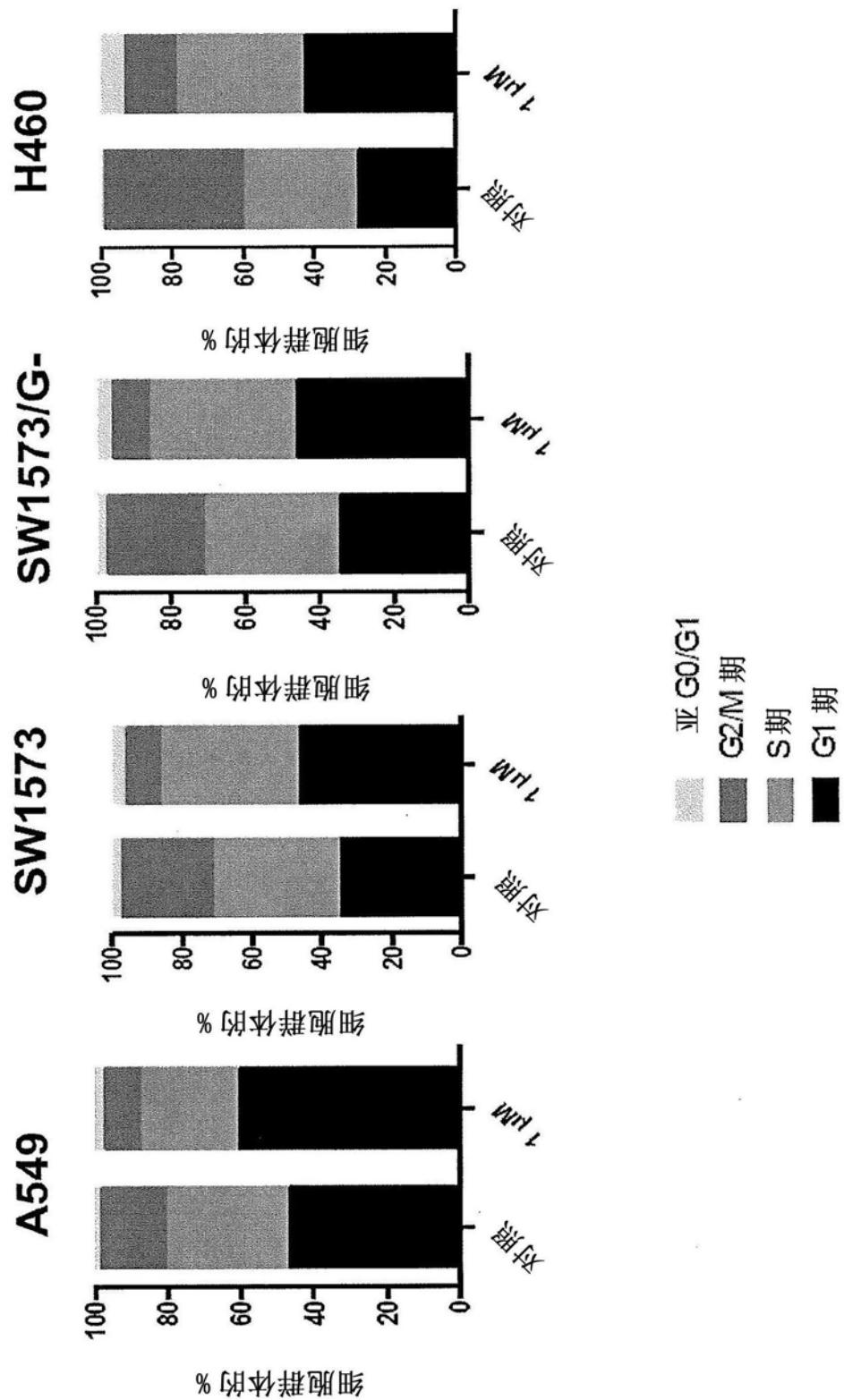


图1

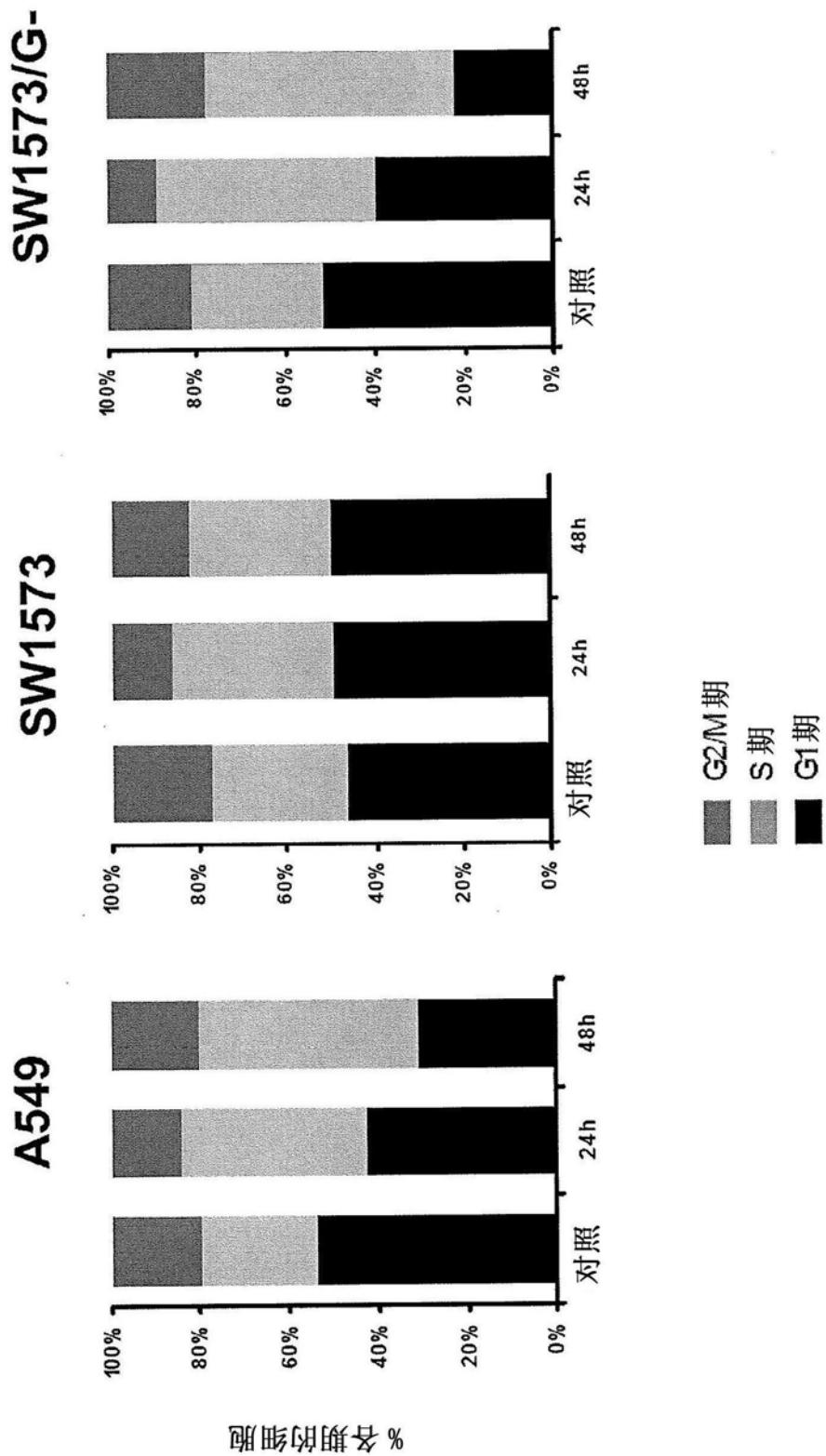


图2

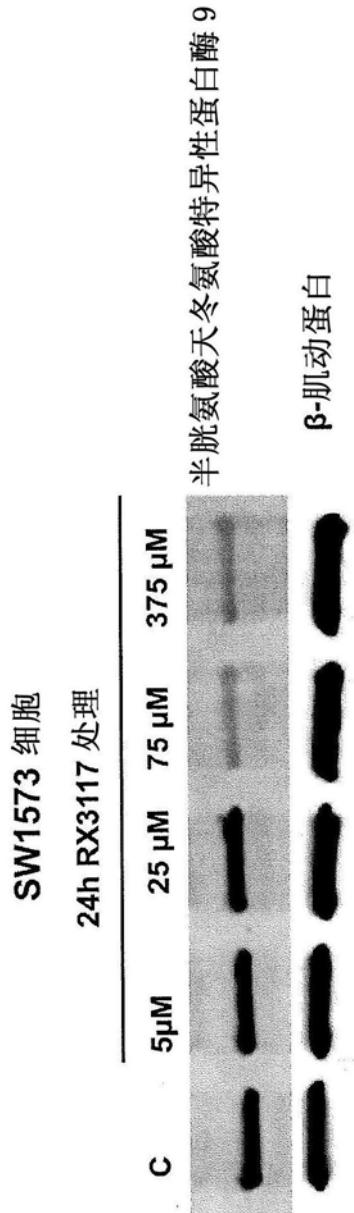


图3

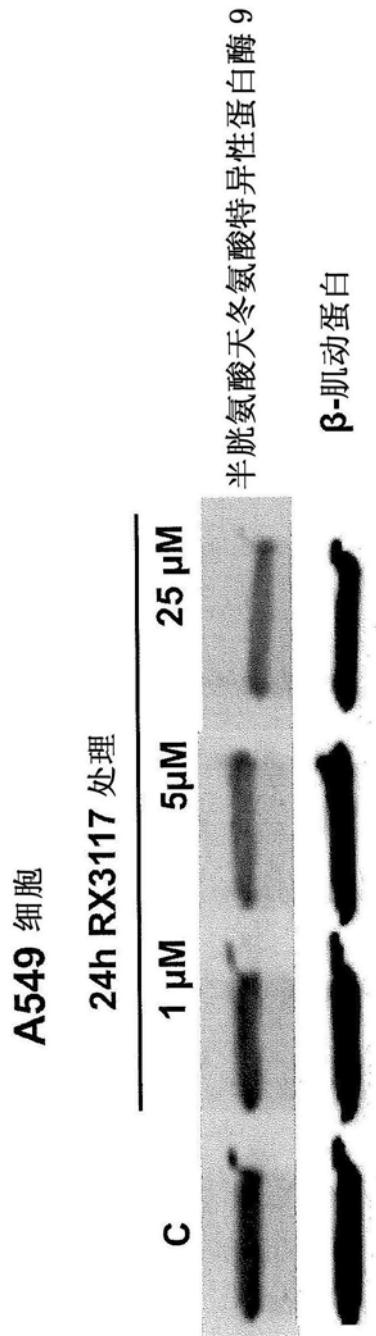


图4

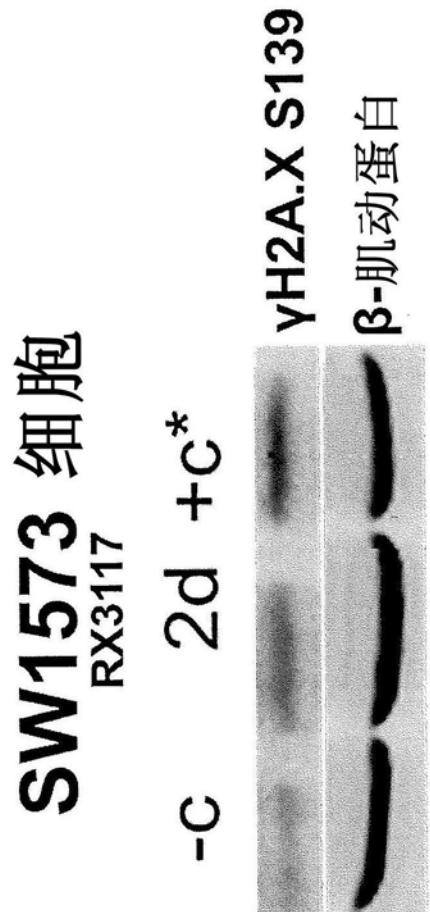


图5

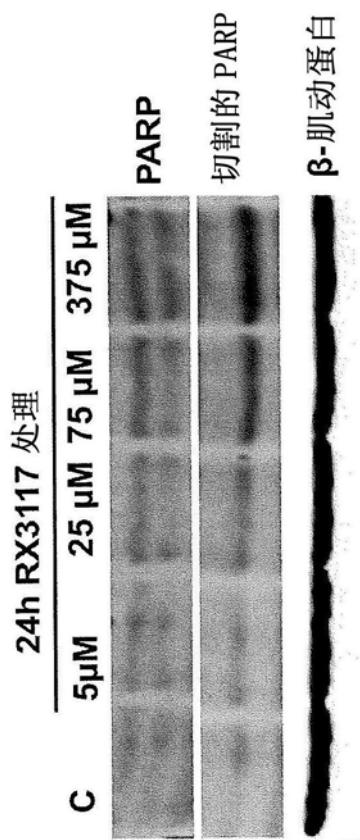


图6

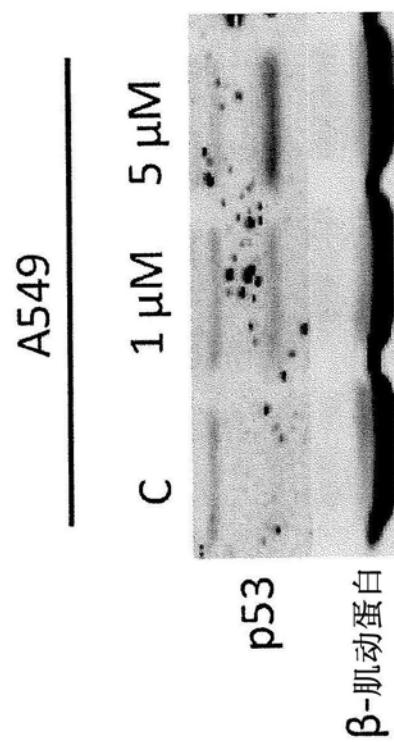


图7

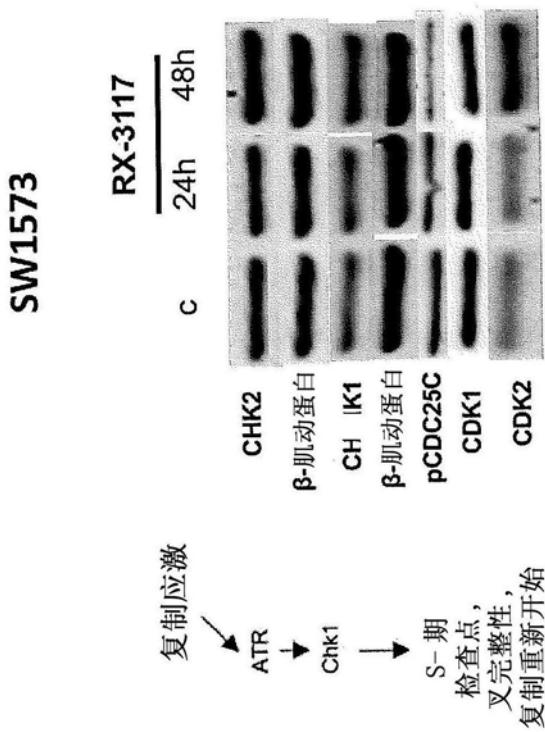


图8

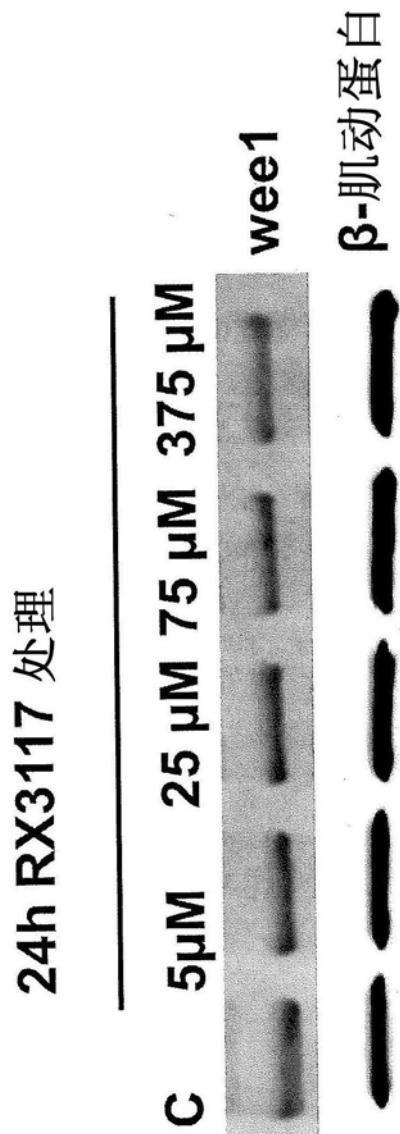


图9

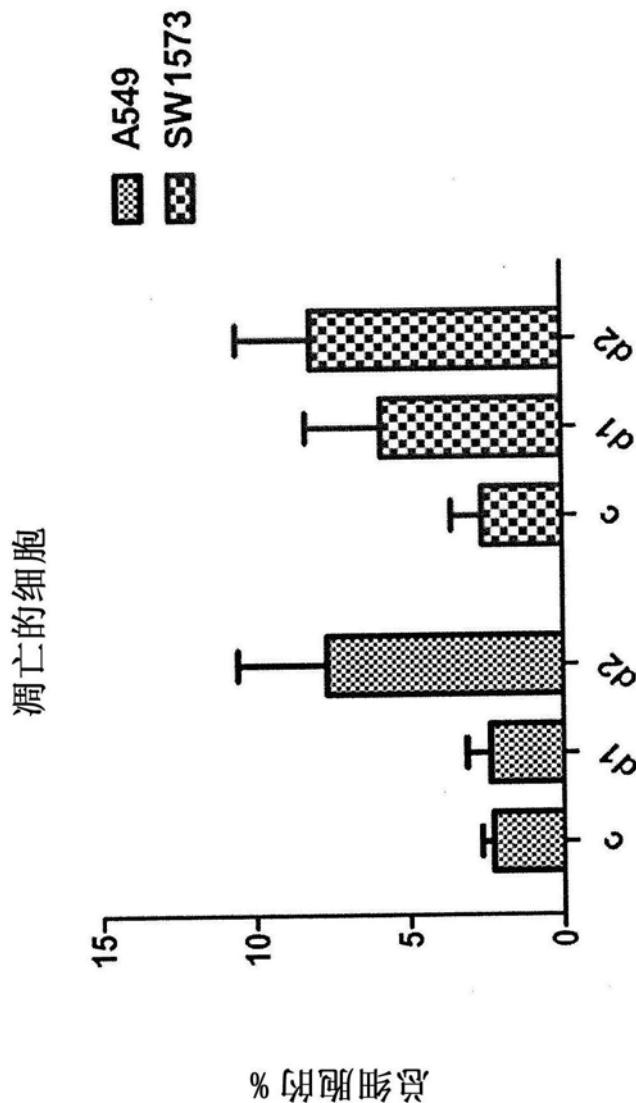


图10

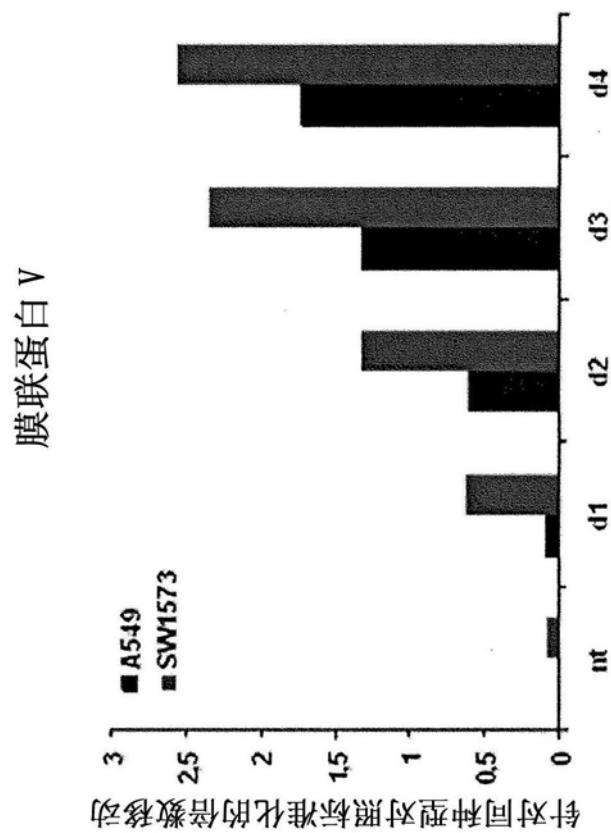


图11

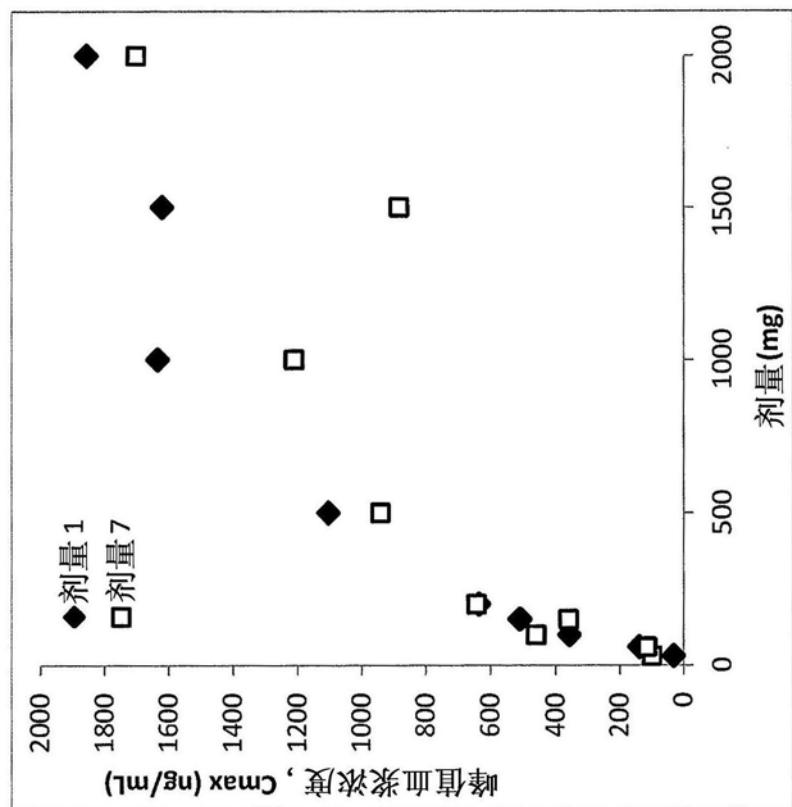


图12

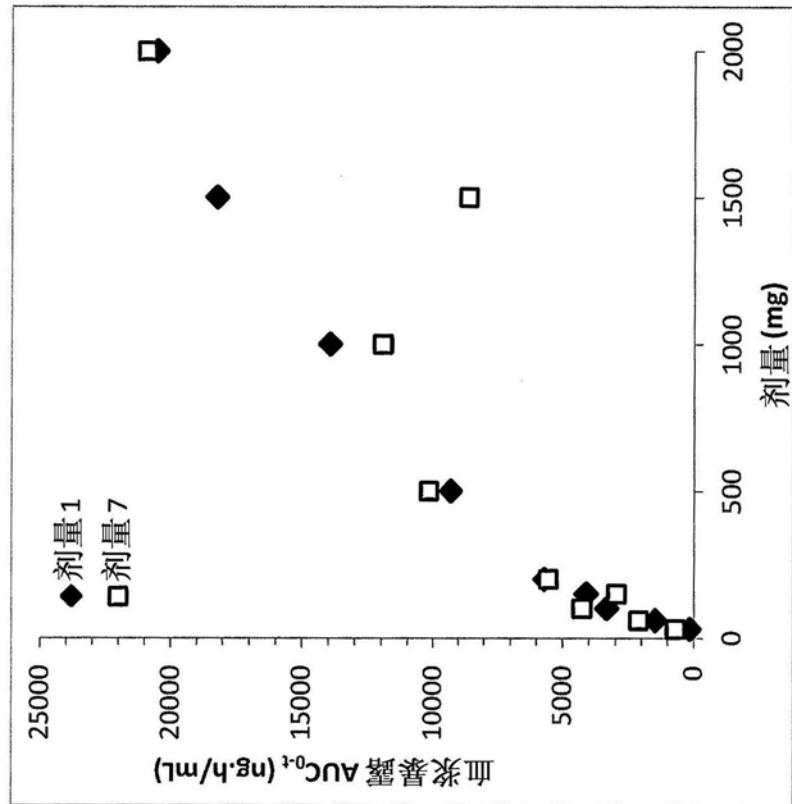
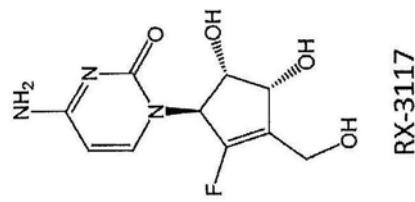
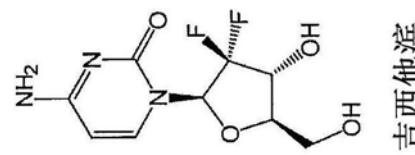


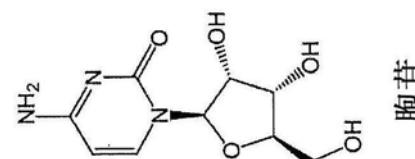
图13



RX-3117



吉西他滨



胞昔

图14

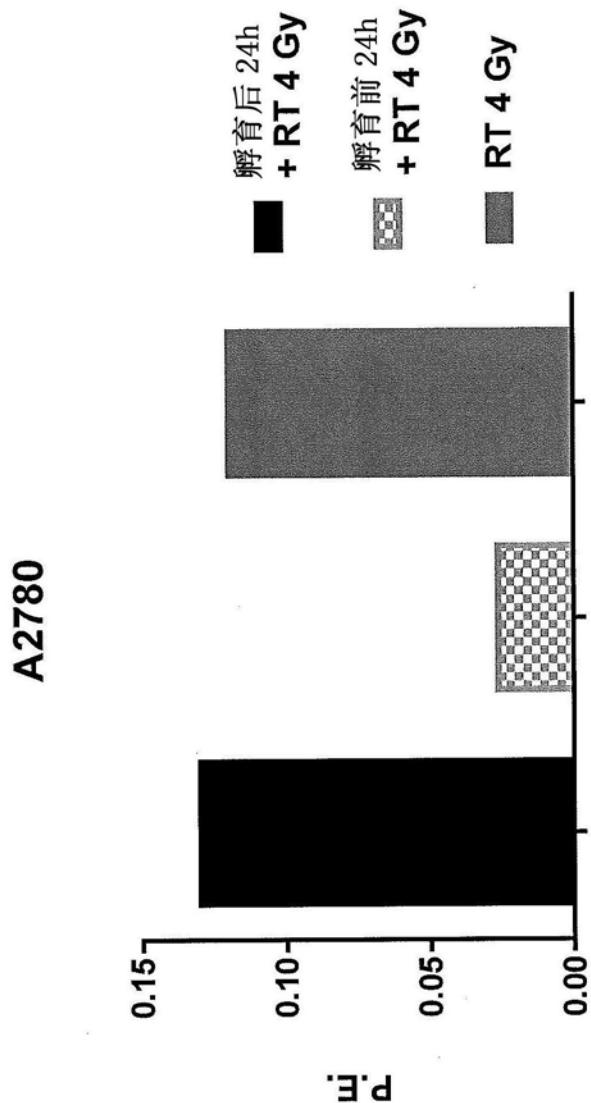


图15

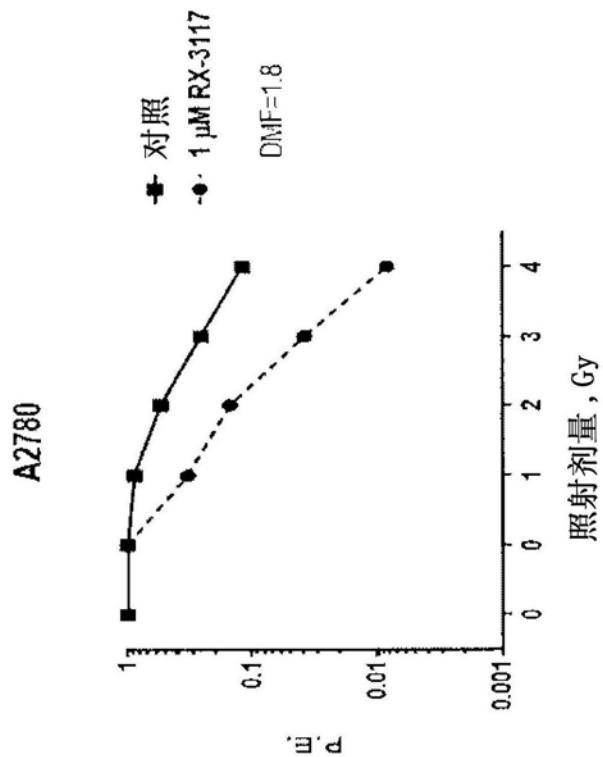


图16A

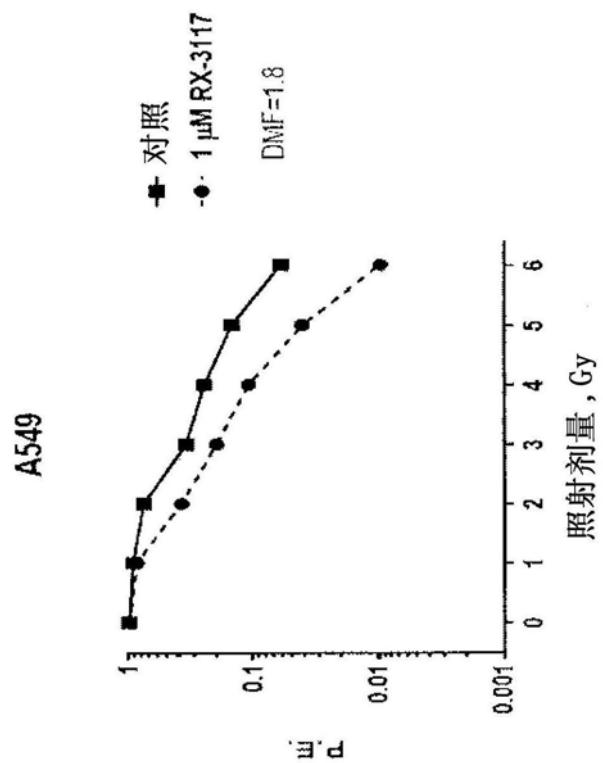
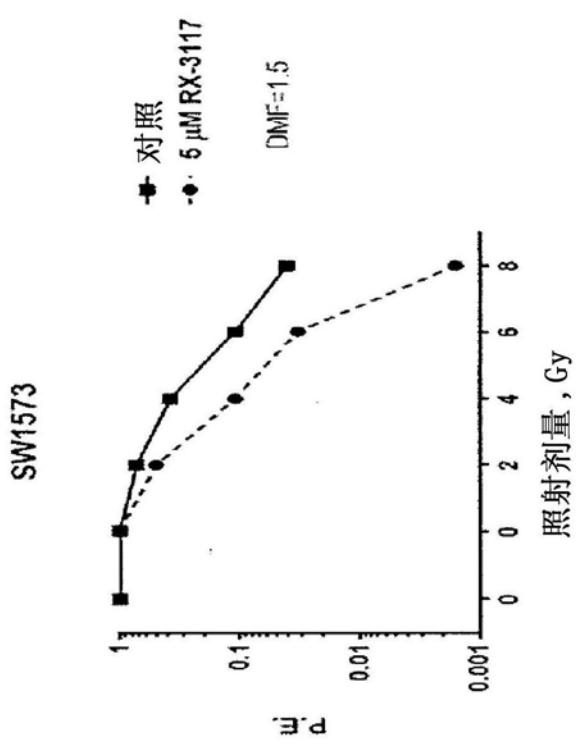
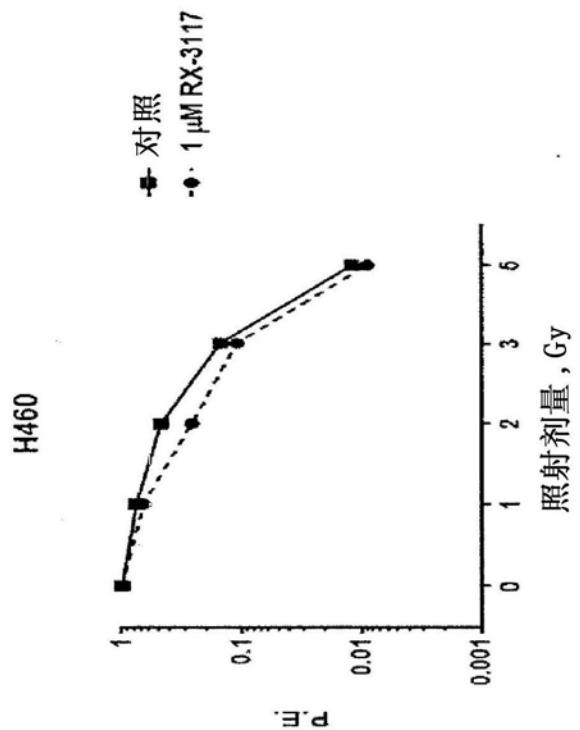


图16B



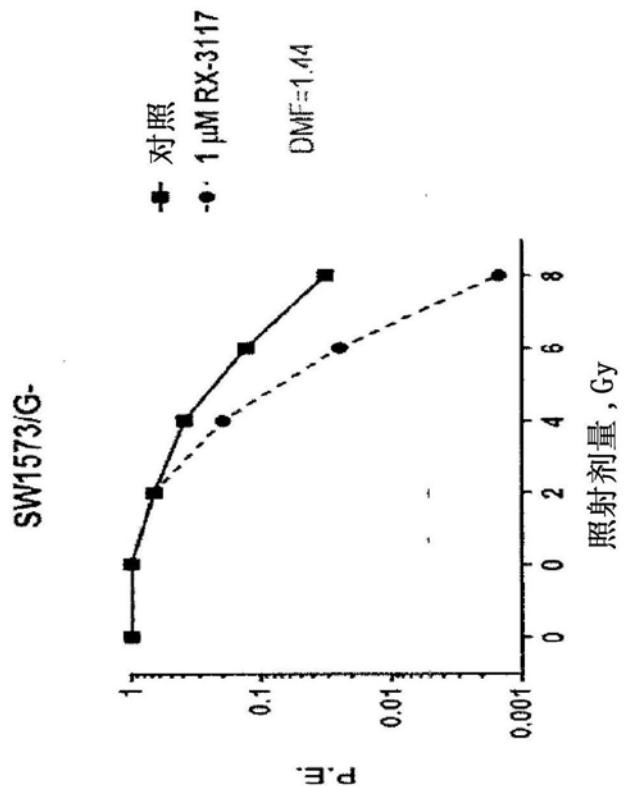


图16E

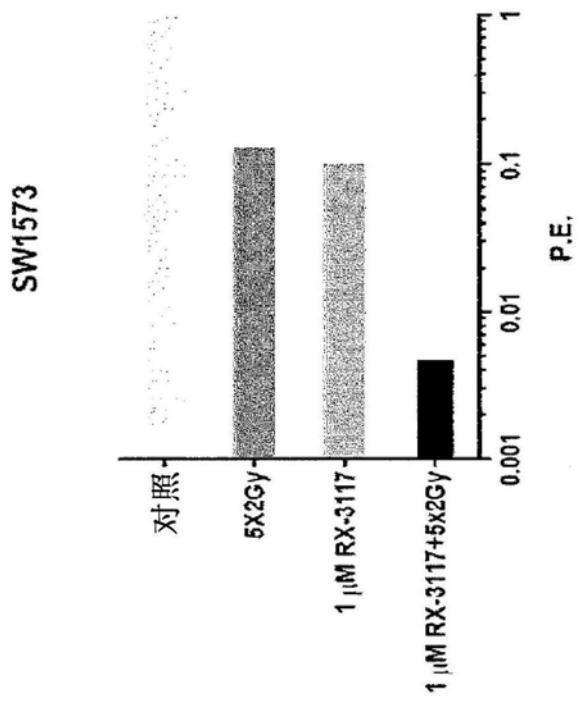


图16F

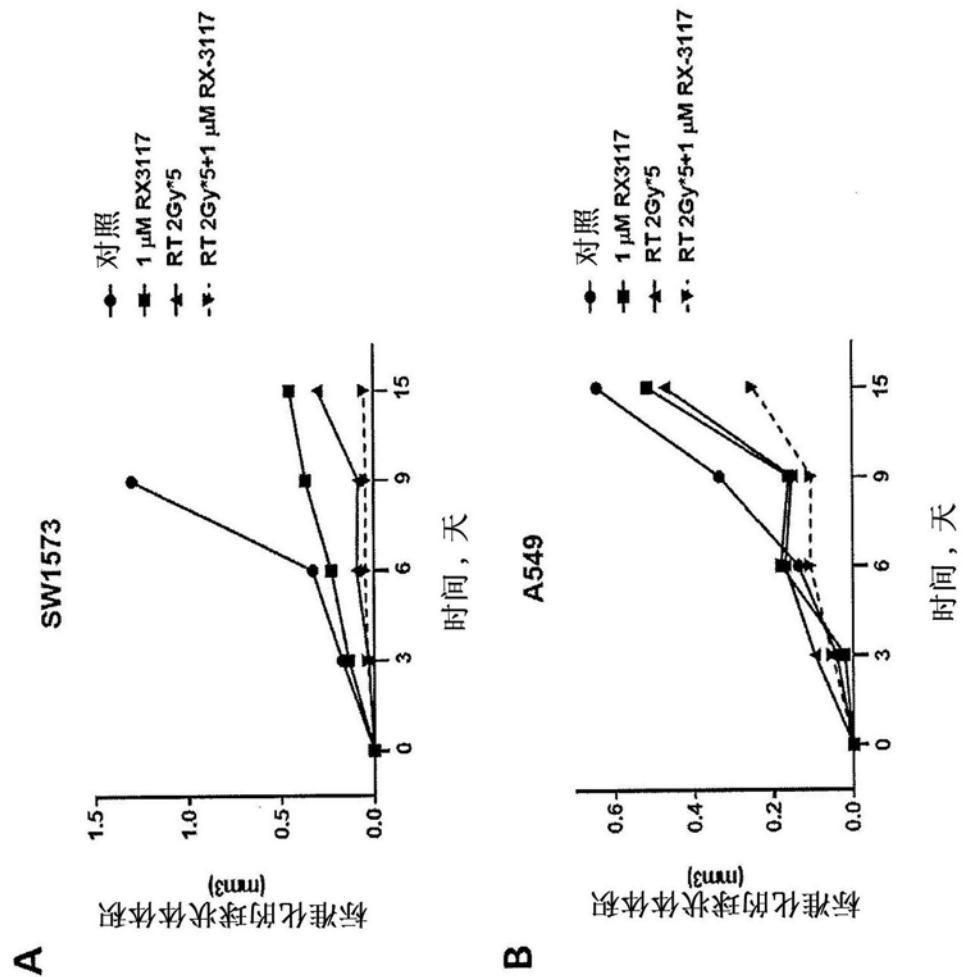


图17

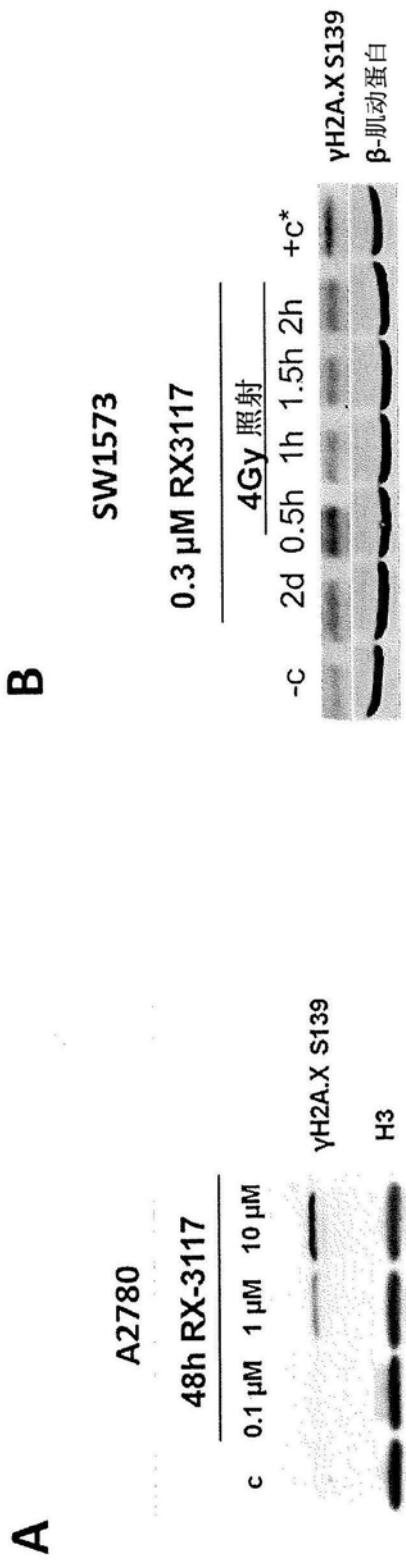


图18

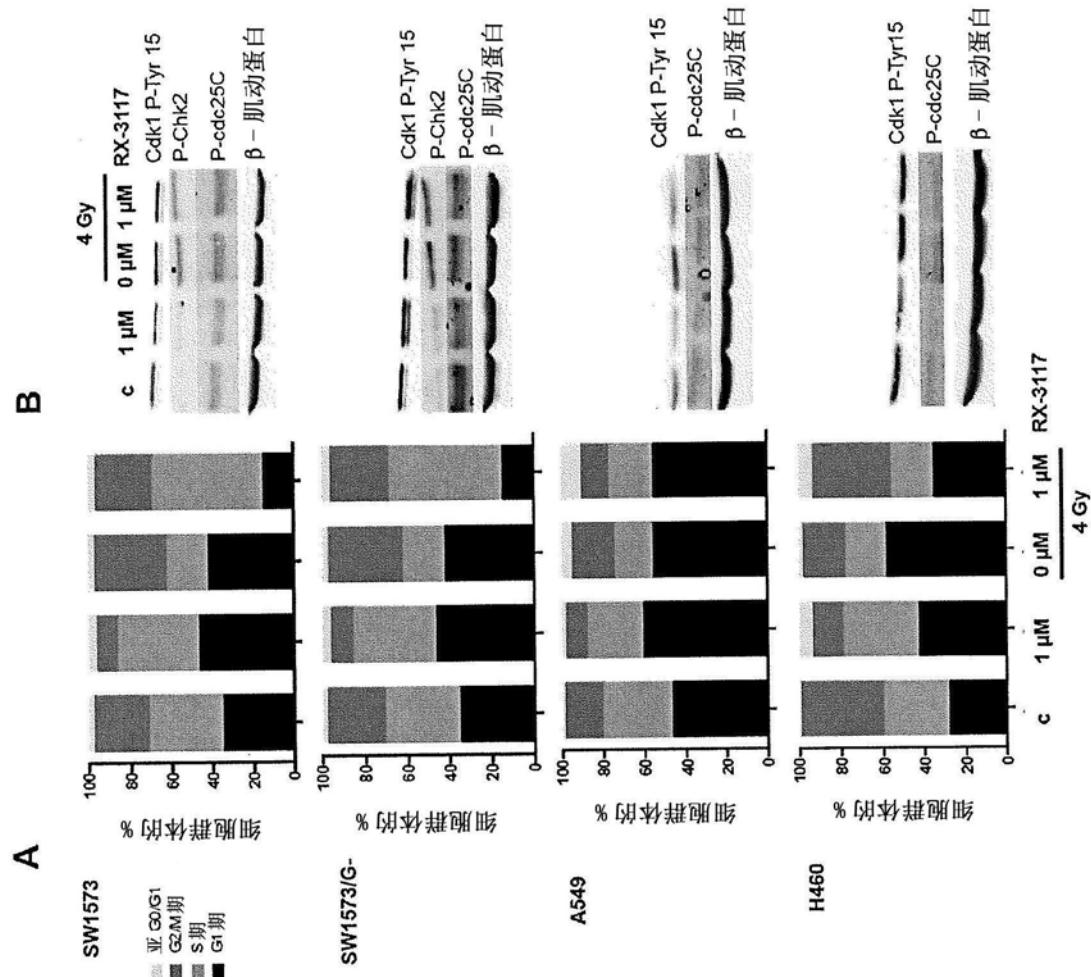


图19

SW1573

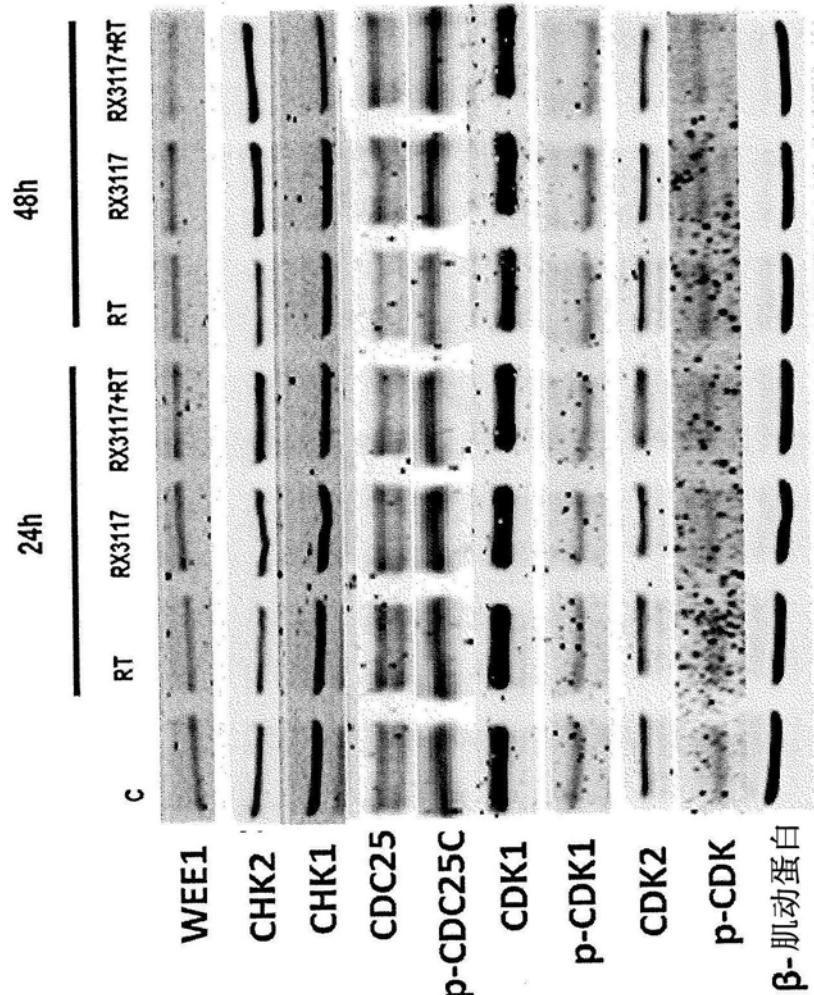


图20

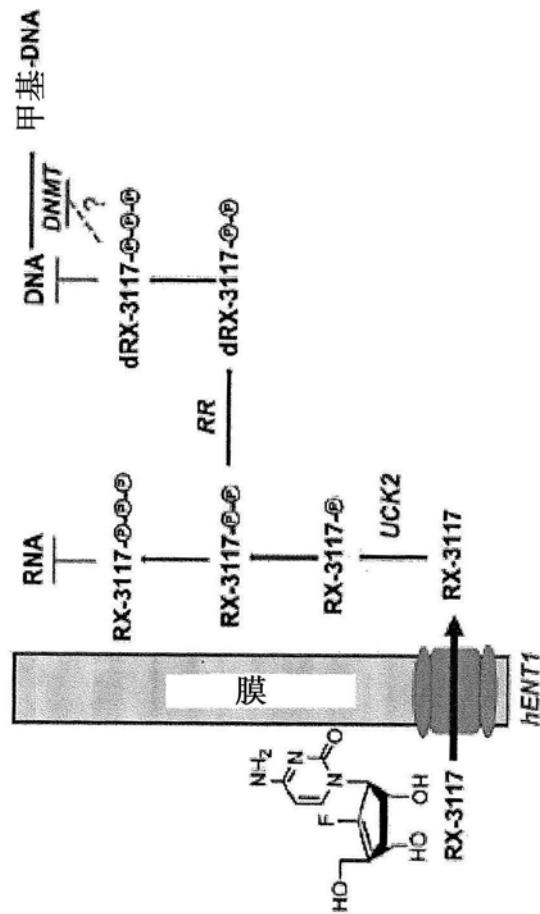


图21

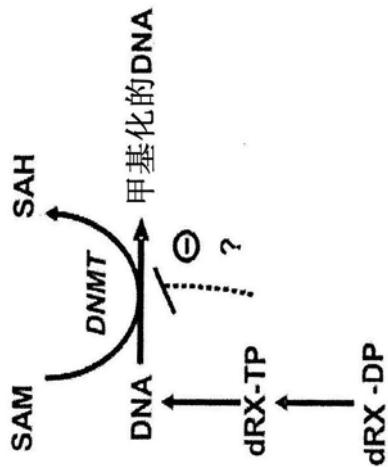


图22

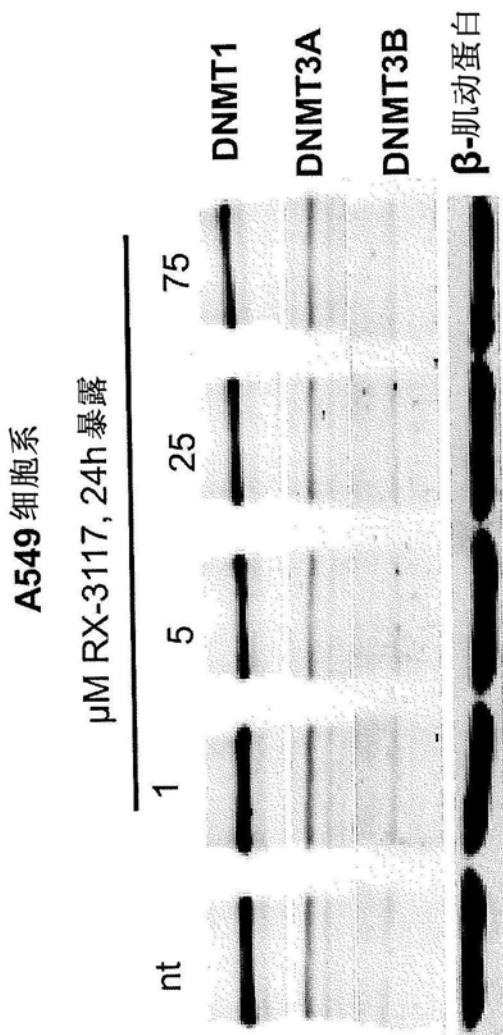


图23

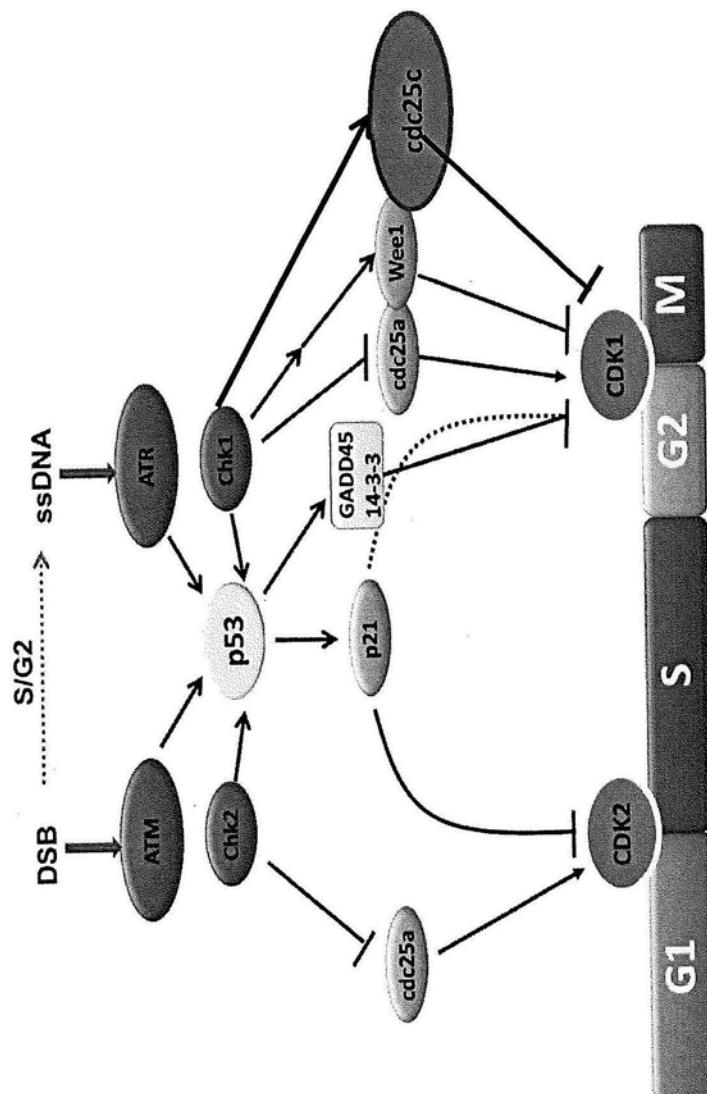


图24

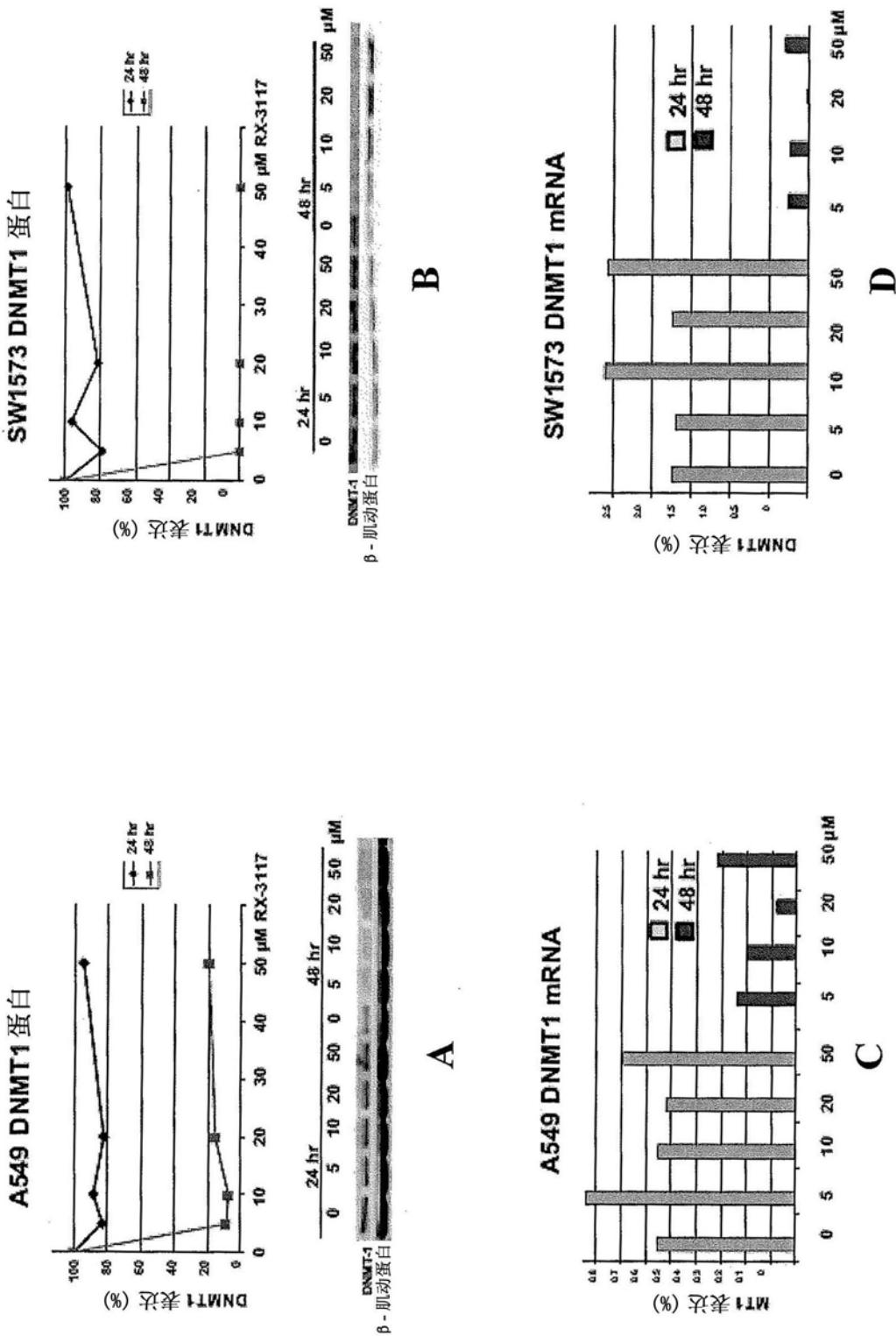


图25

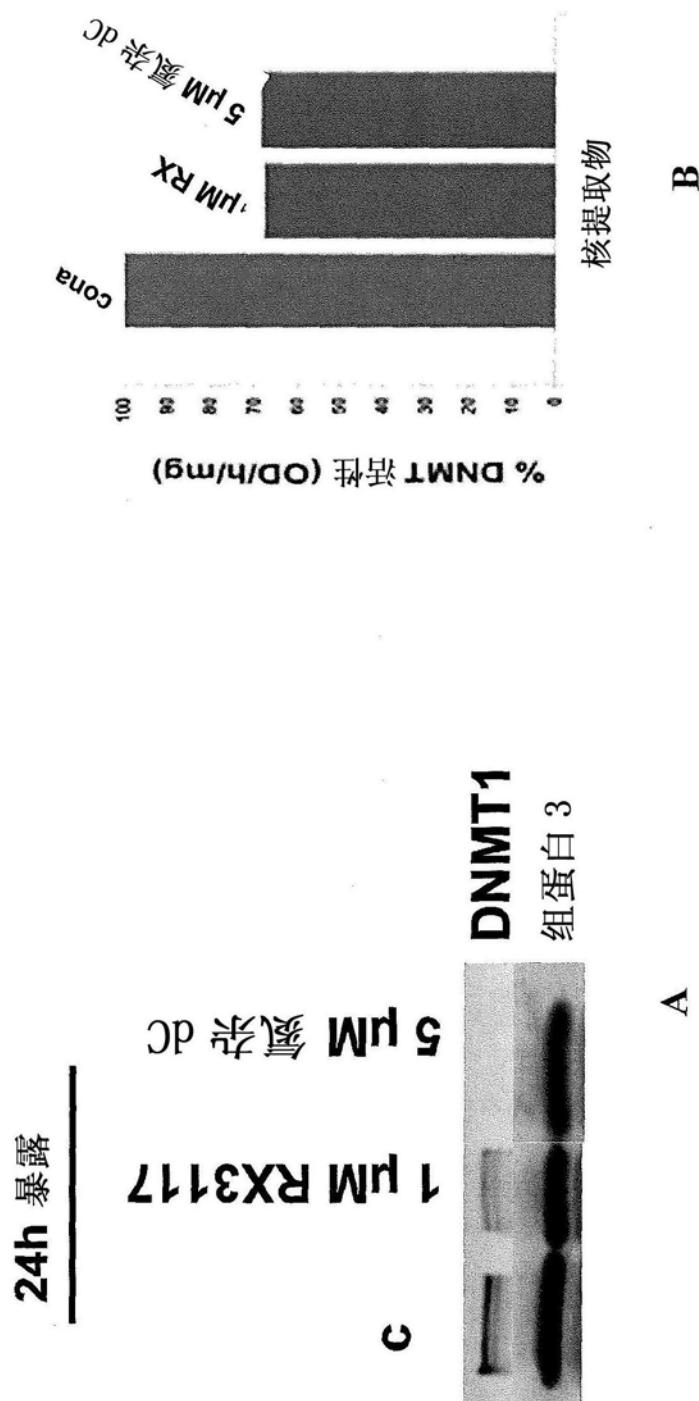
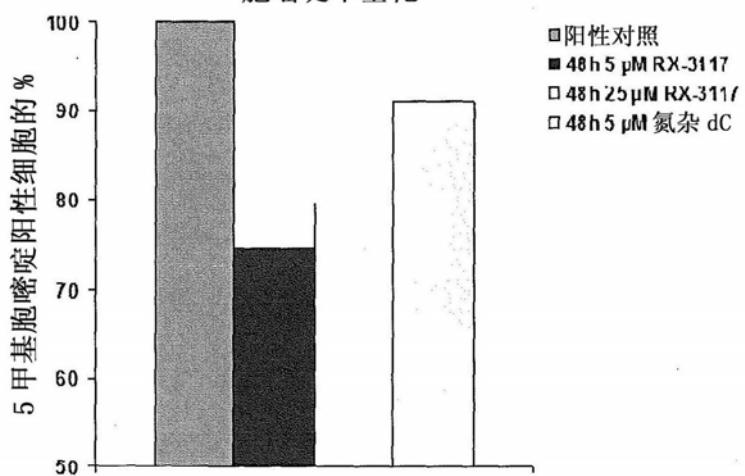


图26

通过 FACS 分析在 A549 细胞系中
胞嘧啶甲基化

**A****A549**

对照

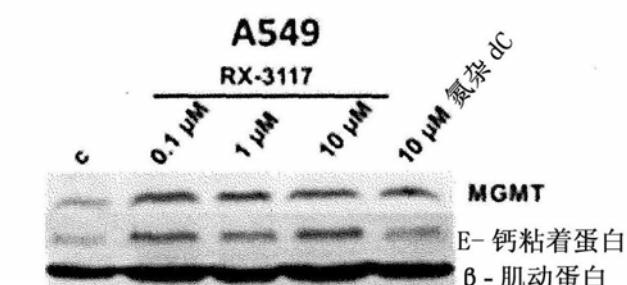
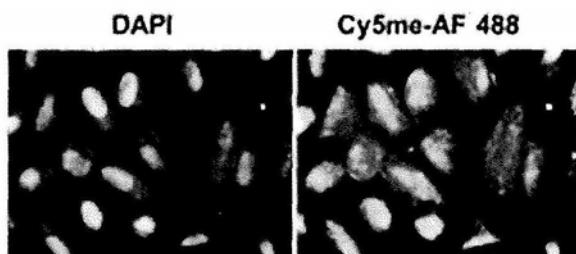
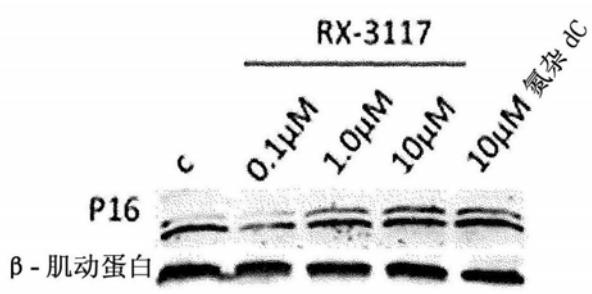
**B****SW1573****RX-3117****C**

图27

	CEM	CEM/MTX
pH 水平	MTX 摄取 ($\text{pmol}/\text{min}/1*10^7$ 细胞)	
pH 5.5	1.11 ± 0.14	0.49 ± 0.13
pH 5.5 + 1 mM FA	0.66 ± 0.11	0.51 ± 0.21
pH 7.4	2.8 ± 0.52	0.03 ± 0.02
pH 7.4 + 1 mM L-LV	0.046 ± 0.01	0.01 ± 0.01

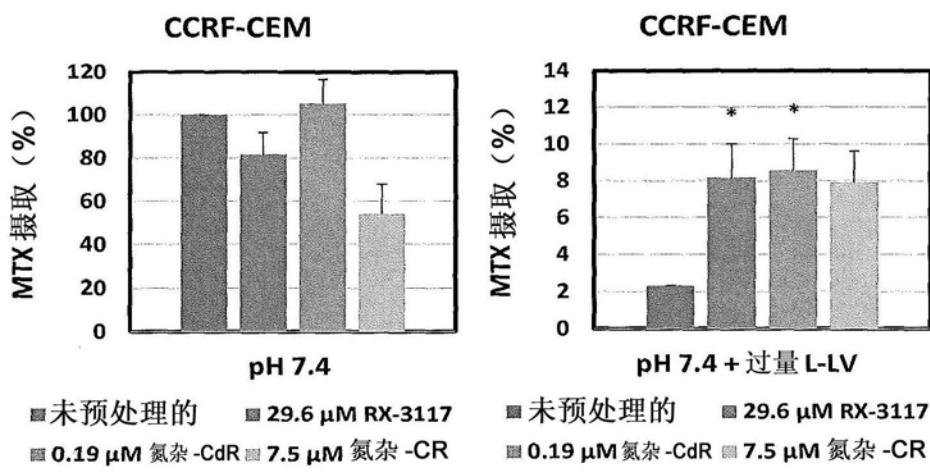
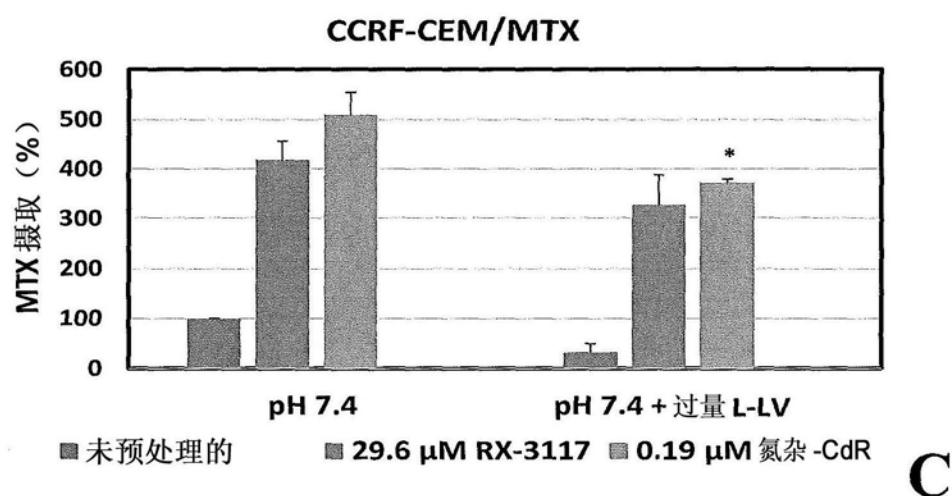
A**B**

图28

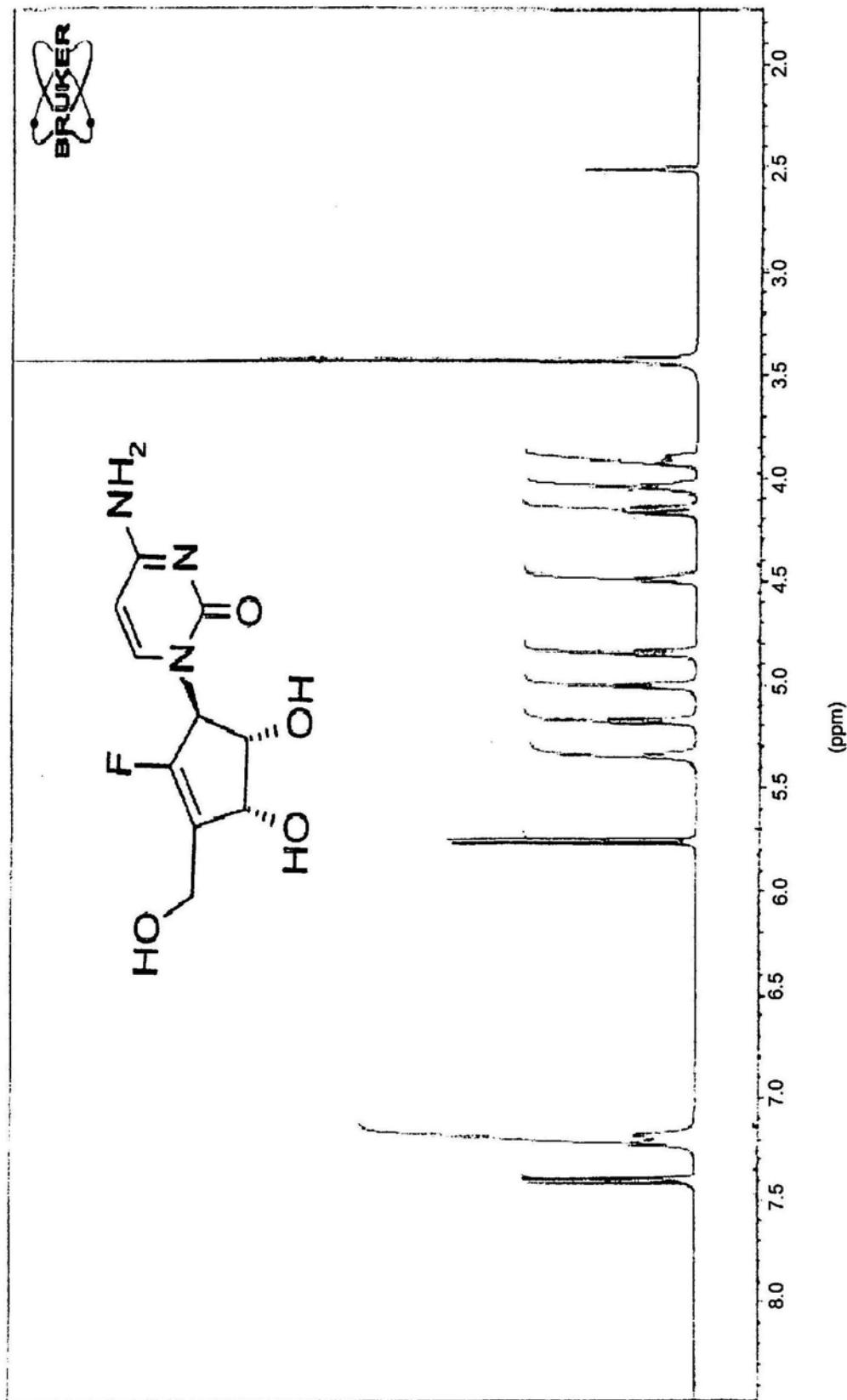


图29

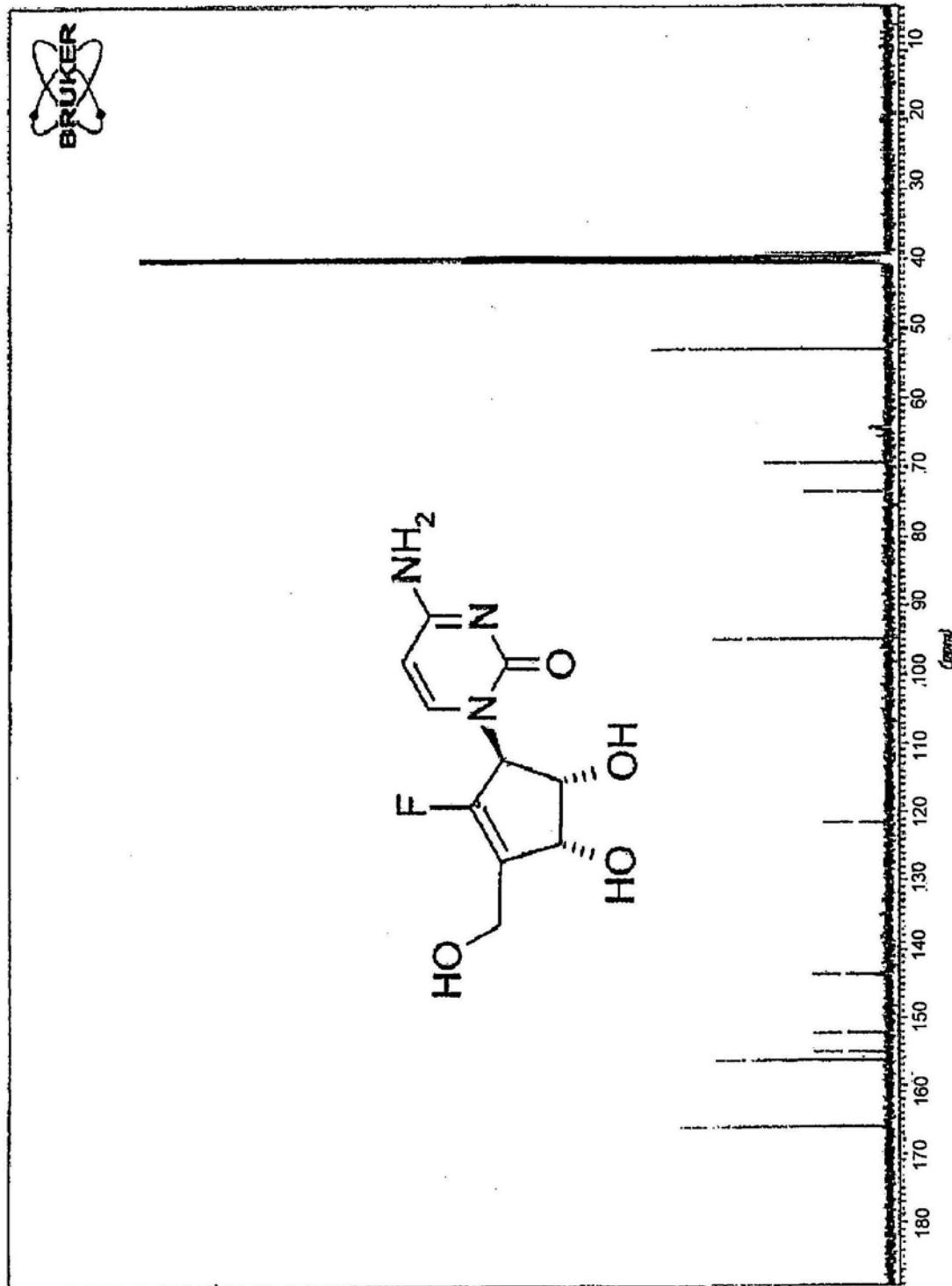


图30

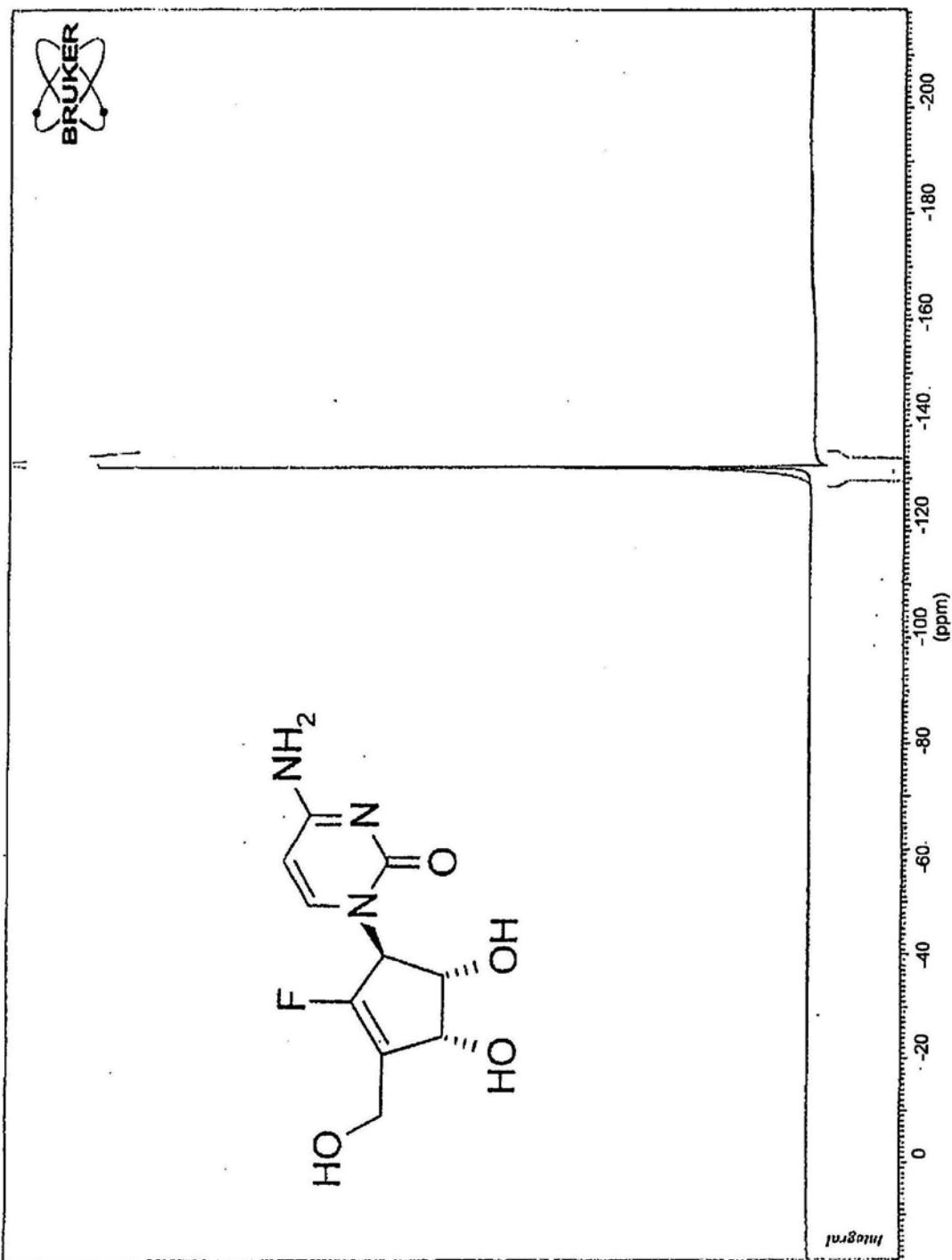


图31

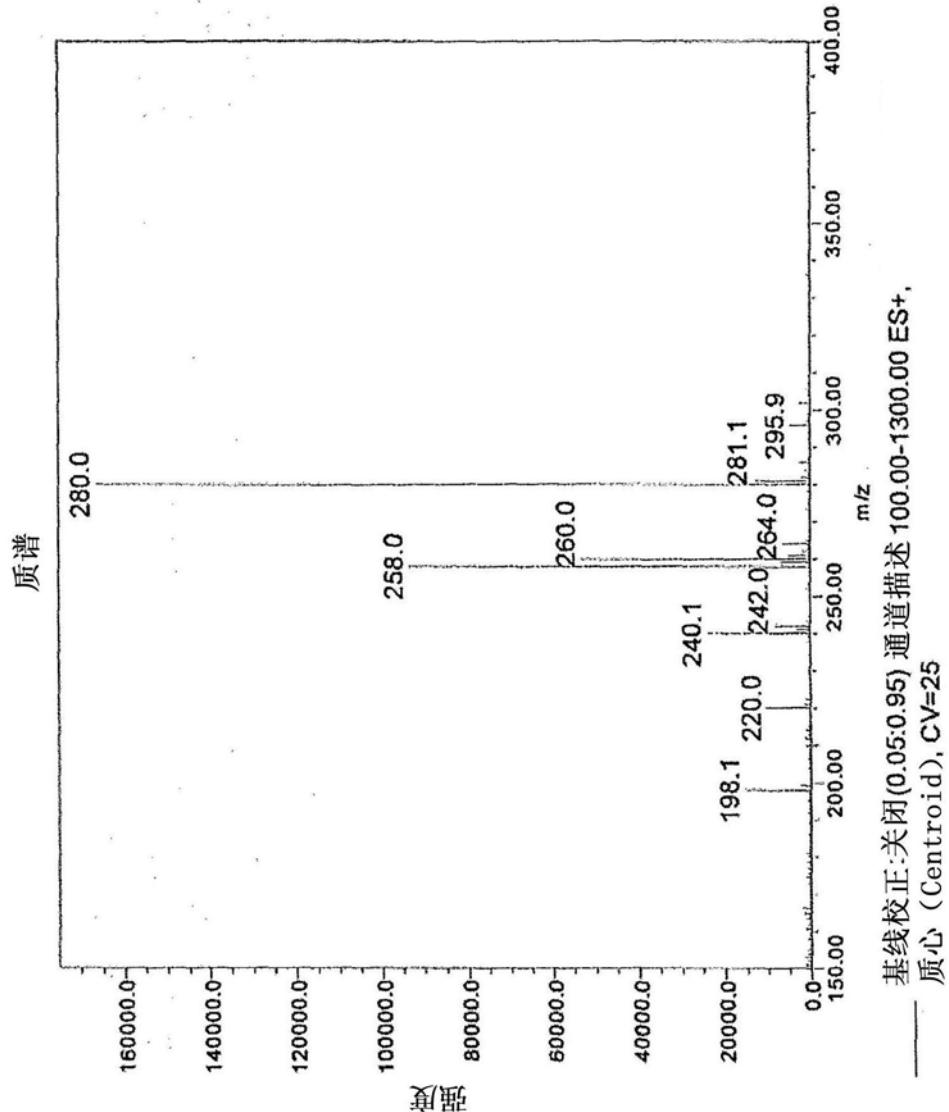


图32

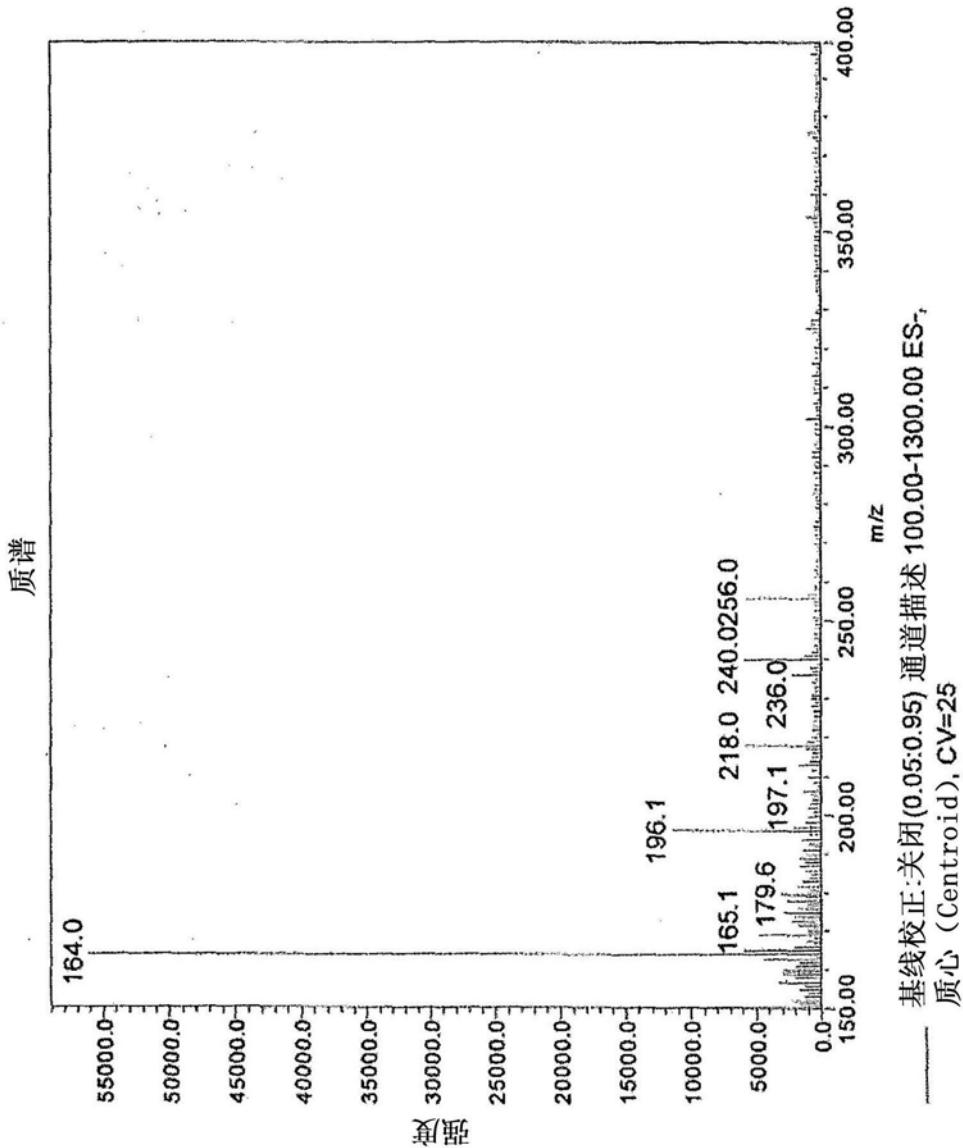


图33

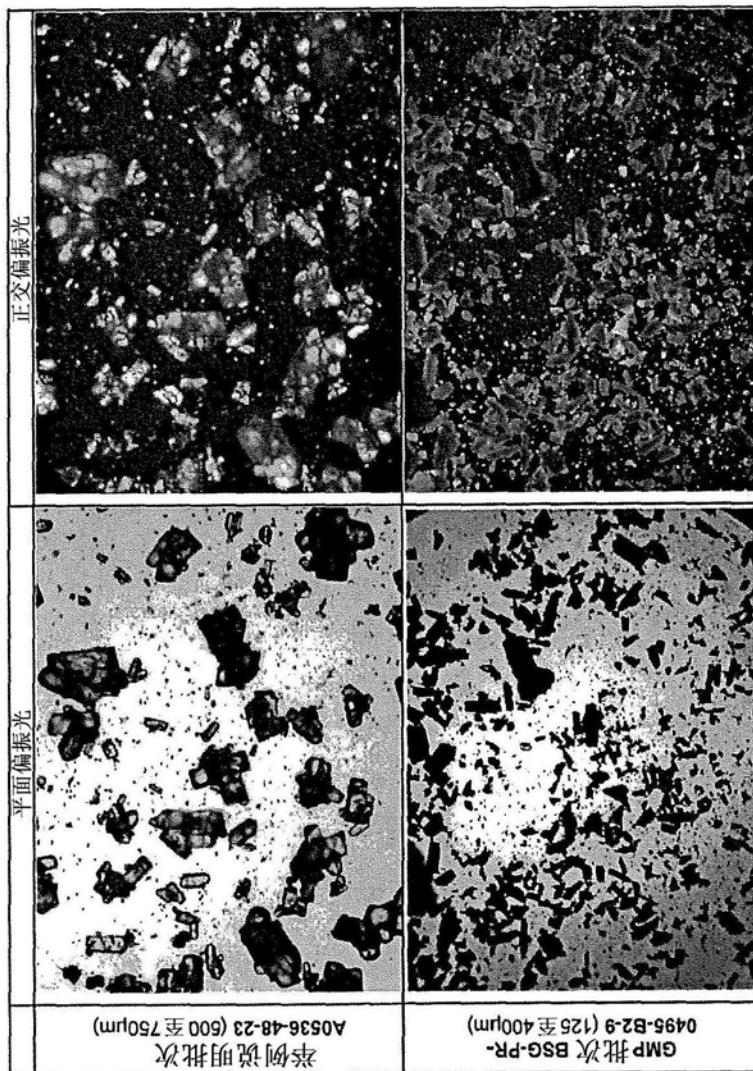


图34

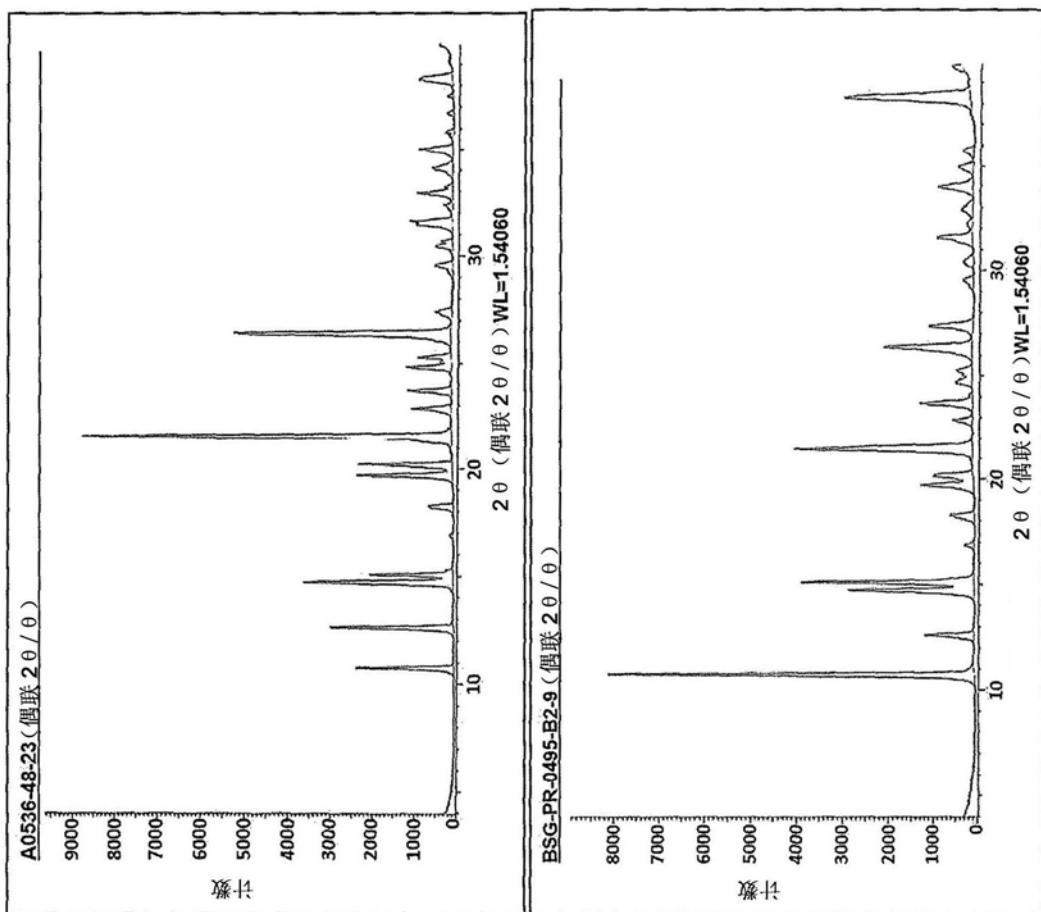


图35