



# (12)发明专利



(10)授权公告号 CN 105764511 B

(45)授权公告日 2019.01.11

(21)申请号 201480064470.2

A61K 31/496(2006.01)

(22)申请日 2014.10.03

A61K 31/5377(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105764511 A

(43)申请公布日 2016.07.13

(30)优先权数据

61/887,285 2013.10.04 US

61/919,023 2013.12.20 US

62/017,505 2014.06.26 US

62/037,868 2014.08.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.05.25

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/059140 2014.10.03

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/051302 EN 2015.04.09

(73)专利权人 艾普托斯生物科学公司

地址 加拿大安大略省多伦多市

(72)发明人 W·G·莱斯

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 封新琴

(51)Int.Cl.

A61K 31/475(2006.01)

(56)对比文件

CN 101248072 A,2008.08.20,

CN 101248072 A,2008.08.20,

Rob Goldman.LORUS THERAPEUTICS, INC.

The Next Major Oncology Player.《http://www.baystreet.ca/articles/research\_reports/goldman\_research/LOR-10.9.12-[3].pdf》.2012,第1-13页.

Rob Goldman.LORUS THERAPEUTICS, INC.

The Next Major Oncology Player.《http://www.baystreet.ca/articles/research\_reports/goldman\_research/LOR-10.9.12-[3].pdf》.2012,第1-13页.

Peter L. Greenberg等人

.Myelodysplastic Syndromes.《Journal of the National Comprehensive Cancer Network》.2011,第9卷(第1期),第30-56页.

Peter L. Greenberg等人

.Myelodysplastic Syndromes.《Journal of the National Comprehensive Cancer Network》.2011,第9卷(第1期),第30-56页.

审查员 李濯冰

权利要求书2页 说明书54页 附图20页

(54)发明名称

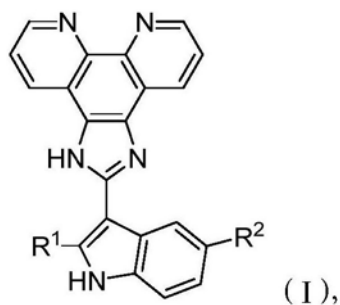
用于治疗癌症的组合物和方法

(57)摘要

本发明涉及用于治疗癌症的组合物和方法。

在一些实施方案中,本发明涉及可调节CDX2-KLF4信号传导路径中的组分用以治疗骨髓增生异常综合征(MDS)、急性髓细胞白血病(AML)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、成人T细胞白血病(ATLL)、淋巴瘤、胃癌、多发性骨髓瘤或其组合、或与CDX2-KLF4信号传导路径的异常活性相关的病状的药剂用途。

1. 化合物或其药理学上可接受的盐或溶剂合物在制备用于治疗被鉴定为患有MDS的人受试者的骨髓增生异常综合征 (MDS) 的药物中的用途, 所述化合物具有式I:



其中

R<sup>1</sup>是C1-C4烷基; 并且

R<sup>2</sup>是卤素。

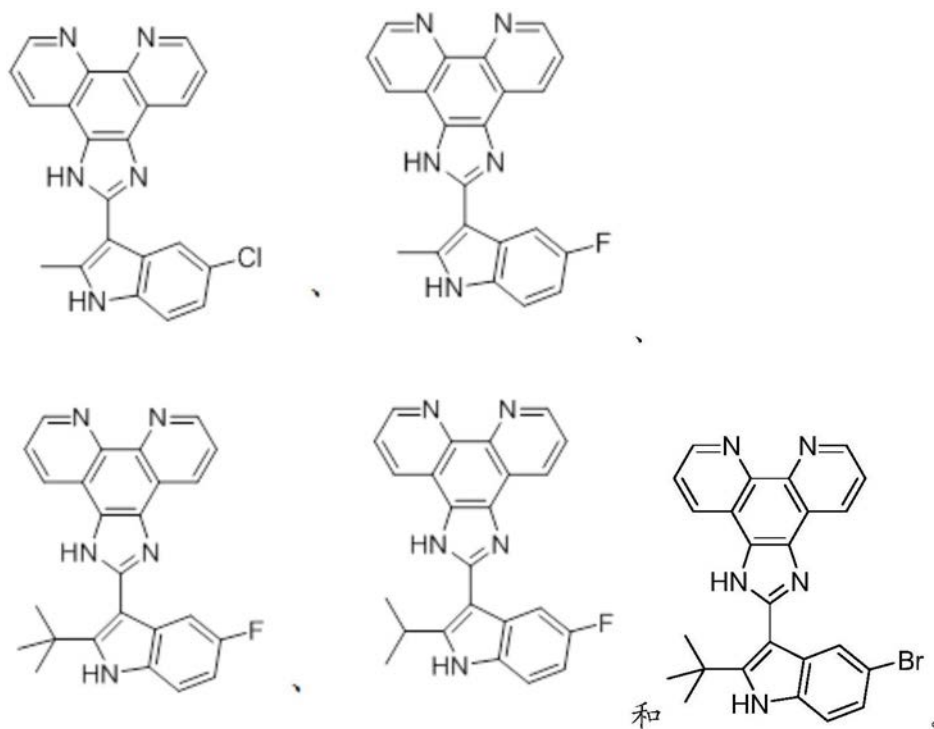
2. 如权利要求1所述的用途, 其中所述人受试者的骨髓血细胞产生失效。

3. 如权利要求1所述的用途, 其中所述人受试者患有贫血。

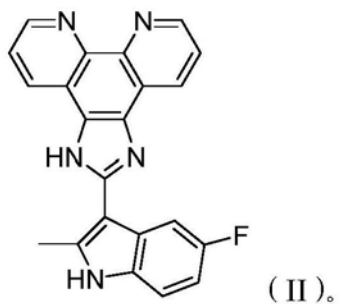
4. 如权利要求1所述的用途, 其中所述人受试者具有由骨髓衰竭引起的低血球计数。

5. 如权利要求1所述的用途, 其中R<sup>1</sup>是甲基、异丙基或叔丁基。

6. 如权利要求5所述的用途, 其中所述化合物具有选自由以下组成的组的式:



7. 如权利要求5所述的用途, 其中所述化合物具有式II:



8. 如权利要求1所述的用途,其中所述人受试者具有MDS的一种或多种症状。
9. 如权利要求1所述的用途,其中所述MDS是高风险MDS。
10. 如前述权利要求中任一项所述的用途,其中所述化合物作为组合疗法的一部分施用。
11. 如权利要求10所述的用途,其中所述组合疗法包括放射疗法。
12. 如权利要求10所述的用途,其中所述组合疗法包括化学疗法。

## 用于治疗癌症的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2013年10月4日提交的美国临时申请号61/887,285、2013年12月20日提交的美国临时申请号61/919,023、2014年6月26日提交的美国临时申请号62/017,505以及2014年8月15日提交的美国临时申请号62/037,868的权益,所述临时申请全部据此以引用的方式整体并入本文。

### 发明领域

[0003] 本发明大体上涉及用于治疗癌症的组合物和方法。

[0004] 发明背景

[0005] 已开发用于治疗各种癌症的许多药物或药物候选物,包括一些小分子化合物。然而,当前针对许多癌症的治疗在患有特定子组的癌症的患者中并非十分有效,或在所述患者中或一般来说毒性太大。

[0006] 骨髓增生异常综合征(MDS)是一组影响骨髓和血液的疾病。一些类型的MDS是轻度和易于管理的,而其它类型是重度 and 危及生命的。骨髓增生异常综合征(MDS)很少会被治愈;大多数患者从未得到实际上完全治疗。当前对MDS的治疗基于支配疾病进程的特定阶段的疾病的时期和机理。骨髓移植已用于具有不良预后或晚期MDS的患者中。Epstein和Slease,1985,Surg. Ann. 17:125。然而,由于涉及创伤性手术,所以这个类型的疗法对于供者和接受者均是疼痛的,并且可对接受者导致重度乃至致命性并发症,特别是在同种异体移植的情况下并且产生相关移植物抗宿主疾病(GVHD)。因此,GVHD的风险限制骨髓移植用于患有另外致命性疾病的患者。此外,因为大多数患者是年长的,并且仅少许年轻MDS患者将具有匹配供者,所以骨髓移植的使用受到限制。对更有效用于治疗MDS和它的相关病症的方法仍然存在需要。

[0007] 轻度MDS可随时间变得更加严重。它也可发展成快速进展性重度白血病,即急性髓细胞白血病(AML)。AML是一个子组的白血病。它是最常见形式的成人白血病(血癌),在5年之后的存活率<20%,并且如果患者年龄>65岁,那么存活率小于5%。当前针对AML的治疗是生硬和苛刻的化学疗法(即,阿糖胞苷(cytarabine)、蒽环霉素(anthracycline)等),其不具有靶向性,并且具有限制性脱靶毒性。因此,对将可能对某一治疗敏感的患者与不敏感的患者区分存在迫切未满足的医学需要。

[0008] 本发明满足这个需要,并且提供用于有效治疗癌症的组合物和方法。

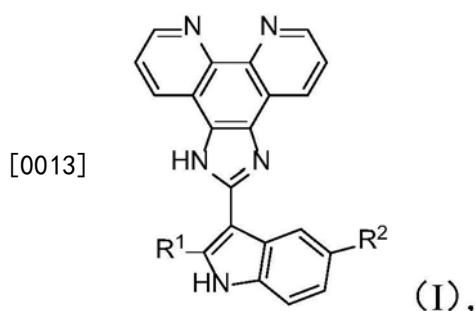
[0009] 发明概述

[0010] 本发明提供用于治疗癌症的组合物和方法。在一些实施方案中,本发明部分地基于如下发现:尾相关同源框蛋白(Caudal-related Homeobox protein)CDX2-Krüppel样因子4(KLF4)信号传导路径(“CDX-KLF4信号传导路径”)对于一组癌症的发病机理是重要的,并且能够调节CDX2-KLF4信号传导路径的活性剂可用于有效治疗所述癌症。

[0011] 在一个方面,本发明提供用于治疗癌症的组合物。在一些实施方案中,组合物包含至少一种可调节人受试者中的CDX2-KLF4信号传导路径的抗癌活性剂。在不希望受任何特

定理论束缚下,本发明的抗癌剂可通过一种或多种机理起作用。所述机理包括但不限于:(1)抑制CDX2活性;(2)诱导KLF4活性;(3)诱导p21CDK抑制剂;(4)诱导G1/S细胞周期阻滞;(5)诱导半胱天冬酶(Caspase)3;以及(6)诱导凋亡。如本文所用,术语CDX2-KLF4信号传导路径中的组分的“活性”可为在基因组DNA水平、转录水平、转录后水平、翻译水平、翻译后水平上的参数,包括但不限于基因活性、RNA活性和蛋白质活性。基因活性可为基因拷贝数、基因扩增数或启动子活性等。RNA活性可为mRNA丰度、合成速率和/或稳定性等。蛋白质活性可为蛋白质丰度、合成速率、稳定性、酶活性、磷酸化速率、修饰、结合活性等。

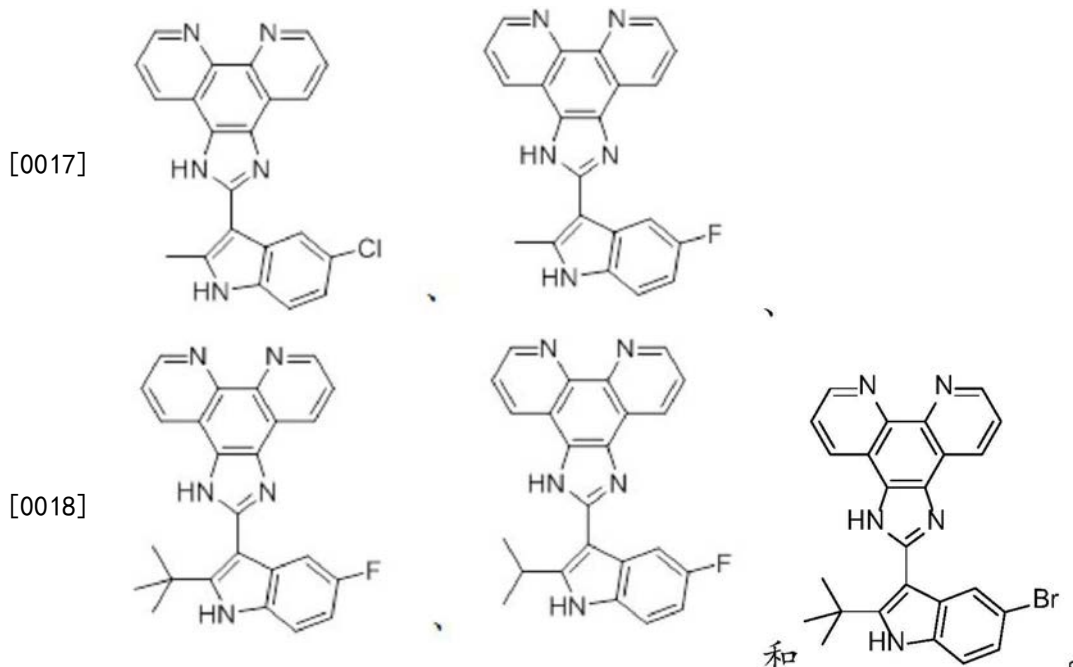
[0012] 在一些实施方案中,活性剂是小分子药物化合物。在一些实施方案中,药物化合物是US 2007/0123553A1中所述的2,4,5-三取代的咪唑化合物,或US 8,148,392中所述的2-吲哚基咪唑并[4,5-d]菲咯啉化合物,或其功能性衍生物。在一些实施方案中,药物化合物具有式I结构:



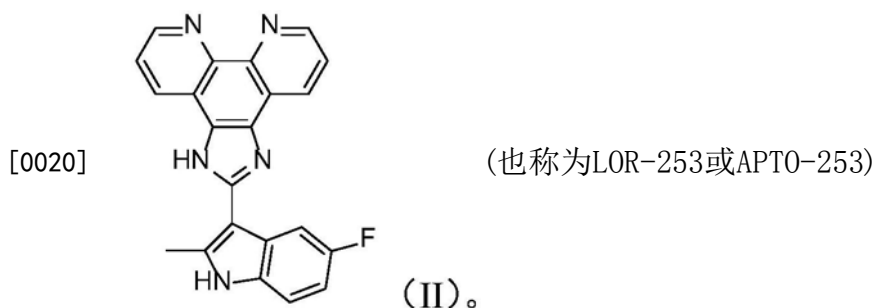
[0014] 其中R1是C1-C4烷基;并且R2是卤素。

[0015] 在一些实施方案中,R1是甲基、异丙基或叔丁基。

[0016] 在一些实施方案中,药物化合物选自由以下组成的组:



[0019] 在一些实施方案中,药物化合物具有式II结构:



[0021] 在一些实施方案中,癌症与人受试者中的CDX2-KLF4信号传导路径的异常活性相关。在一些实施方案中,当相较于对照组的活性时,CDX2-KLF4信号传导路径中的一种或多种组分具有异常活性。在一些实施方案中,癌症是白血病/淋巴瘤。在一些实施方案中,癌症是骨髓增生异常综合征(MDS)。在一些实施方案中,MDS是高风险MDS。在一些实施方案中,癌症是急性髓细胞白血病(AML)。在一些实施方案中,AML是难治性AML。在一些实施方案中,AML是年长性AML。在一些其它实施方案中,癌症是急性淋巴细胞性白血病(ALL)。在一些实施方案中,ALL是儿科ALL。在一些实施方案中,儿科ALL是儿科T细胞ALL或儿科B细胞ALL。在一些其它实施方案中,癌症是慢性髓细胞白血病(CML)。在一些实施方案中,癌症是成人T细胞白血病(ATLL)。在一些实施方案中,癌症由1型人嗜T淋巴细胞病毒引起。在一些实施方案中,癌症是淋巴瘤、胃癌或多发性骨髓瘤。在一些实施方案中,淋巴瘤是霍奇金淋巴瘤(Hodgkin lymphoma)、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、伯基特氏淋巴瘤(Burkitts lymphoma)或B细胞淋巴瘤。在一些实施方案中,癌症是任何本文所述的癌症的组合。

[0022] 在一些实施方案中,人受试者具有MDS的一种或多种症状。在一些实施方案中,待治疗的人受试者的血细胞(诸如骨髓血细胞)产生失效。在一些实施方案中,人受试者患有贫血。在一些实施方案中,人受试者具有由骨髓衰竭引起的低血球计数。

[0023] 在一些实施方案中,癌症是急性髓细胞白血病(AML)。在一些实施方案中,AML是难治性AML。在一些实施方案中,AML是年长性AML。如本文所用,年长性AML患者是年龄超过60岁,患有或可能患有AML的那些患者。在一些实施方案中,年长性AML患者处于他们的首次复发中。在一些实施方案中,AML不是年长性AML。如本文所用,非年长性AML患者是年龄等于或低于60岁,患有或可能患有AML的那些。在一些实施方案中,非年长性AML患者处于他们的第二次复发中。

[0024] 在一些实施方案中,癌症是急性淋巴细胞性白血病(ALL)。在一些实施方案中,ALL是儿科或儿童ALL。如本文所用,儿科或儿童ALL患者是年龄低于21岁,患有或可能患有ALL的那些患者。在一些实施方案中,ALL不是儿科或儿童ALL。如本文所用,非儿科ALL患者是年龄等于或超过21岁,患有或可能患有ALL的那些。

[0025] 在一些实施方案中,本发明的抗癌化合物作为组合疗法的一部分向有需要的人受试者施用。在一些实施方案中,组合疗法包括放射疗法。在一些实施方案中,组合疗法包括化学疗法。

[0026] 在一些实施方案中,向人受试者施用有效量的本发明的抗癌剂或其药理学上可接受的盐或溶剂合物。在一些实施方案中,当向易感性受试者和/或可发展癌症或所述癌症的症状的受试者施用时,有效量的抗癌剂有效用以治疗所述癌症或所述癌症的症状,有效抑制癌细胞增殖,或有效预防癌症的未来发生或减轻其严重性。在一些实施方案中,施用抗癌

剂提供治疗癌症的统计显著治疗作用或临床功效。在一些实施方案中,本发明的抗癌化合物以约0.01至约200mg的剂量施用。在一些实施方案中,本发明的抗癌化合物以约0.05至约100mg的剂量施用。在一些实施方案中,本发明的抗癌化合物以约1.0至约50mg的剂量施用。在一些实施方案中,本发明化合物的每天剂量通常在每kg体重约0.01至约100mg的范围内,或在约20mg/m<sup>2</sup>至约400mg/m<sup>2</sup>的范围内,呈单次或分次剂量形式。在一些实施方案中,本发明的抗癌化合物每天一次、两次、三次或大于三次加以施用。

[0027] 在一些实施方案中,治疗持续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个循环。在一些实施方案中,各循环持续至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10天或更多天。在一些实施方案中,两个循环之间的间隔是至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10天或更多天。

[0028] 在一些实施方案中,抗癌剂是单位剂型。

[0029] 在一些实施方案中,待治疗的癌症是AML,化合物是LOR-253(也称为APTO-253),并且化合物以约125mg/m<sup>2</sup>的剂量施用。在某些实施方案中,每周两次持续四周施用化合物。

[0030] 本发明提供用于治疗与CDX2-KLF4信号传导路径的异常活性相关的病状的方法。在一些实施方案中,病状与人受试者中的CDX2-KLF4信号传导路径的一种或多种组分的异常活性相关,所述组分诸如CDX2、KLF4、p21和/或p53。在一些实施方案中,病状与KLF4活性的异常(例如,低于正常)水平相关。在一些实施方案中,病状与CDX2活性的异常(例如,高于正常)水平相关。在一些实施方案中,CDX2的异常水平归因于CDX2的遗传改变。

[0031] 在一些实施方案中,本发明方法进一步包括在治疗之前、期间和/或之后测定人受试者中的CDX2-KLF4信号传导路径中的组分的活性,诸如KLF4活性和/或CDX2活性。在一些实施方案中,本发明的方法进一步包括确定CDX2的遗传改变的存在或不存在。

[0032] 根据随后详细描述,本发明的其它方面和实施方案将显而易见。

[0033] 附图简述

[0034] 图1是本发明的活性剂(例如,式I,也称为LOR-253或APTO-253)如何治疗癌症的非限制性机理的图解。在不希望受任何特定理论束缚下,在诸如实体肿瘤的某些癌症类型中,KLF4被下调,此为达成加速的细胞增殖、上皮-间质转化(EMT)和转移所必需;在某些血液学癌症中:KLF4被下调,此为白血病发生所必需。LOR-253诱导KLF4表达,此转而抑制癌细胞增殖、EMT和转移,和/或触发凋亡。

[0035] 图2是显示CDX2在某些癌症中如何起作用以及LOR-253如何治疗所述癌症的非限制性机理的图解。在不希望受任何特定理论束缚下,在造血系统的正常细胞中,CDX2基因被关闭或以相对较低的水平表达。在包括AML的某些癌症中,CDX2被开启或增加,从而导致CDX2转录因子异常表达。CDX2结合KLF4基因的启动子区域并抑制KLF4表达,此是为促进白血病发生所必需的步骤。LOR-253诱导KLF4表达,此转而触发癌性白细胞的凋亡。

[0036] 图3是LOR-253对许多癌细胞系的体外增殖的影响的图解表示。如实施例所述,使各种癌细胞系的细胞与LOR-253一起孵育,并且测定由LOR-253引起各种细胞系的最大细胞增殖抑制的50%(GI<sub>50</sub>)的细胞浓度,并且显示于图中。

[0037] 图4是LOR-253对KLF4在两种细胞系THP-1和HL60中的表达水平的影响的图解表示。

[0038] 图5描绘用DMSO或LOR-253处理的THP1和HL-60AML细胞系的BD FACSCalibur流式细胞仪测定结果(左侧图)。图5也显示LOR-253处理导致THP1和HL-60细胞系中G1/S细胞周

期阻滞(右侧图)。

[0039] 图6描绘用DMSO、0.5或1 $\mu$ M LOR-253处理的THP-1细胞的BD FACSCanto流式细胞术获取图。用LOR-253处理的THP-1细胞显示膜联蛋白V染色增加,从而指示对凋亡的诱导(Q3:膜联蛋白V+/PI-)。

[0040] 图7描绘用DMSO或LOR-253处理的THP1和HL-60AML细胞系中的半胱天冬酶3表达水平。

[0041] 图8描绘用DMSO或0.5 $\mu$ M LOR-253处理的THP1细胞中的BAX和BCL2的表达的倍数变化

[0042] 图9描绘LOR-253 HCL在H226异种移植模型小鼠中的体内功效。显示用LOR-253 HCL或阴性对照处理的H226\_异种移植小鼠的在指示天数测量的肿瘤尺寸。

[0043] 图10描绘由LOR-253以1、5或15mg/kg的剂量下治疗的CD-1裸小鼠中的药代动力学(PK)。LOR-253的血清水平具有剂量相关增加。

[0044] 图11描绘连续5天用1、5和15mg/kg LOR-253治疗的小鼠中的药效动力学(PD)响应。在末次剂量之后16小时测量KLF4蛋白水平。

[0045] 图12描绘在治疗之前(参见上部图)以及在治疗之后(参见下部图),患有NSCLC(分化不良的腺癌)的患者中的肿瘤缩减。

[0046] 图13是显示使KLF4基因或基因产物沉默如何在各种血红素恶性肿瘤中起主要作用的非限制性机理的图解。举例来说,KLF4基因的表观遗传甲基化涉及成人T细胞淋巴瘤患者,KLF4基因或蛋白中的突变涉及儿科T细胞ALL患者,微小RNA-2909升高涉及儿科B细胞ALL患者,CDX2的异常表达涉及AML、ALL和MDS患者,此全都导致KLF4活性(包括但不限于表达和功能活性)沉默。也已在各种淋巴瘤中观察到KLF4的沉默。图解的下部分说明KLF4沉默导致通过各种“细胞命运基因”达成癌细胞增殖增加。

[0047] 图14是显示KLF4基因活性可如何通过遗传突变或表观遗传事件而被沉默以及LOR-253/APTO-253可如何诱导KLF4表达的非限制性机理的图解。所述表观遗传事件包括但不限于DNA低甲基化或脱甲基化,可导致klf4基因的上游调控区中的脱甲基酶KDM5B的存在增加的CDX2表达异常/升高,以及miR-2909的量升高。LOR-253/APTO-253可通过缓和至少由CDX2/KDM5B和/或其它机理引起的基因沉默来诱导KLF4表达。

[0048] 图15描绘LOR-253 HCL在Kasumi-1异种移植模型小鼠中的体内功效。显示用LOR-253 HCL或阴性对照治疗的Kasumi-1异种移植小鼠的在指示天数测量的肿瘤尺寸。

[0049] 图16描绘用LOR-253 HCL或阴性对照治疗的携带Kasumi-1肿瘤的小鼠在指示天数的体重测量结果。

[0050] 图17描绘LOR-253 HCL作为单一药剂或与阿扎胞苷组合在HL-60异种移植模型小鼠中的体内功效。显示用指示条件治疗的HL-60异种移植小鼠的在指示天数测量的肿瘤尺寸。

[0051] 图18和图19分别描绘个别动物的在图17的研究开始(第1天)和结束(第19天)时的肿瘤尺寸。

[0052] 图20描绘LOR-253 HCL在KG-1异种移植模型小鼠中的体内功效。显示用LOR-253 HCL或阴性对照治疗的KG-1异种移植小鼠的在指示天数测量的肿瘤尺寸。

[0053] 图21描绘LOR-253 HCL作为单一药剂或与阿扎胞苷组合在THP-1异种移植模型小



鼠中的体内功效。显示用指示条件治疗的THP-1异种移植小鼠的在指示天数测量的肿瘤尺寸。

[0054] 详细描述

[0055] 定义

[0056] 如本描述中以及权利要求中所用的动词“包含”和它的词形变化在它的非限制性意义上用于意指包括在所述用词之后的条目,但不排除未明确提及的条目。

[0057] 术语“一(a/an)”是指一个(种)或多个(种)那个实体;举例来说,“一基因”是指一个(种)或多个(种)基因或至少一个(种)基因。因此,术语“一”、“一个(种)或多个(种)”和“至少一个(种)”在本文中可互换使用。此外,通过不定冠词“一”来提及“一要素”不排除存在超过一个(种)要素的可能性,除非上下文明确要求存在并且仅存在一个(种)要素。

[0058] 本发明提供分离的、嵌合、重组或合成多核苷酸序列。如本文所用,术语“多核苷酸”、“多核苷酸序列”、“核酸序列”、“核酸片段”和“分离的核酸片段”在本文中可互换使用,并且涵盖单链或双链DNA、RNA、cDNA以及其化学修饰形式。这些术语涵盖核苷酸序列等。多核苷酸可为任选含有合成、非天然或改变的核苷酸碱基的单链或双链RNA或DNA的聚合物。呈DNA的聚合物形式的多核苷酸可由cDNA、基因组DNA、合成DNA或其混合物的一个或多个区段组成。核苷酸(通常以它们的5'-单磷酸形式得见)通过如下单字母符号来提及:“A”代表腺苷酸或脱氧腺苷酸(分别针对RNA或DNA),“C”代表胞苷酸或脱氧胞苷酸,“G”代表鸟苷酸或脱氧鸟苷酸,“U”代表尿苷酸,“T”代表脱氧胸苷酸,“R”代表嘌呤(A或G),“Y”代表嘧啶(C或T),“K”代表G或T,“H”代表A或C或T,“I”代表肌苷,并且“N”代表任何核苷酸。在一些实施方案中,分离的、嵌合、重组或合成多核苷酸序列源于本发明的基因标志物。

[0059] 本发明也提供蛋白质或多肽。在一些实施方案中,蛋白质或多肽是分离的、纯化的、嵌合的、重组的或合成的。如本文所用,术语“多肽”或“蛋白质”是指具有任何长度的氨基酸聚合物。聚合物可为线性的或分支的,它可包含经修饰的氨基酸,并且它可间隔有非氨基酸。所述术语也涵盖已天然地或通过干预;例如形成二硫键、糖基化、脂质化、乙酰化、磷酸化或任何其它操作或修饰(诸如与标记组分缀合)加以修饰的氨基酸聚合物。也包括例如含有氨基酸的一种或多种类似物(包括例如非天然氨基酸等)的多肽以及本领域中已知的其它修饰形式。多肽可以单链或缔合链的形式存在。本发明的多肽可采用各种形式(例如天然、融合、糖基化、非糖基化、脂质化、非脂质化、磷酸化、非磷酸化、肉豆蔻酰化、非肉豆蔻酰化、单体、多聚、颗粒、变性等)。在一些实施方案中,蛋白质或多肽的序列源于本发明的基因标志物。

[0060] 本文所用的单字母氨基酸缩写具有它们在本领域中的标准含义,并且本文所述的所有肽序列都根据惯例加以书写,以N末端在左侧,并且C末端在右侧。

[0061] 如本文所用,术语“CDX2-KLF4信号传导路径中的组分”是指CDX2;KLF4;或可直接或间接调节CDX2和/或KLF4的活性的其它基因、基因产物(包括但不限于RNA和蛋白质)或其它生物分子;或可由CDX2和/或KLF4直接或间接调节的基因、基因产物或其它生物分子。调节可增加或降低给定基因的活性水平。所述组分包括但不限于CDX2、KLF4、KDM5B、miR-2909、p53、p21、半胱天冬酶-3、膜联蛋白V、BAX、BCL2、BCL3、BMP、Wnt、HNF4α、Fgf、Hox、SP1、MYC、CCND1、AATF和以下中所述的那些:Scho11等(“The homeobox gene CDX2 is aberrantly expressed in most cases of acute myeloid leukemia and promotes

leukemogenesis”, J. Clin. Invest. 117:1037-1048 (2007).); Yoon等 (Krüppel-like Factor 4 mediates p53-dependent G1/S Cell Cycle Arrest in Response to DNA Damage, 第278卷, 第4期, 1月24日那期, 第2101-2105页, 2003); Faber等 (CDX2-driven leukemogenesis involves KLF4 repression and deregulated PPAR $\gamma$  signaling, J Clin Invest, doi:10.1172/JCI64745.); Rouhi等 (“Deregulation of the CDX2-KLF4 axis in acute myeloid leukemia and colon cancer”, Oncotarget. 2013年2月; 4(2):174-175.); Lengerke等 (“BMP and Wnt specify hematopoietic fate by activation of the Cdx-Flox pathway”, Cell Stem Cell. 2008年1月10日; 2(1):72-82.); Saandi等 (“Regulation of the tumor suppressor homeogene Cdx2 by HNF4 $\alpha$  in intestinal cancer”, Oncogene. 2013年8月8日; 32(32):3782-8.); Malik等 (miR-2909-mediated regulation of KLF4: a novel molecular mechanism for differentiating between B-cell and T-cell pediatric acute lymphoblastic leukemias. Mol Cancer. 13:175, 2014); 以及 Rowland等 (“KLF4, p21 and context-dependent opposing forces in cancer”, Nat Rev Cancer. 2006年1月; 6(1):11-23), 所述文献各自出于所有目的以引用的方式整体并入本文。KLF4直接或间接负性调控(或抑制) SP1、MYC、BCL3、CCND1和AATF的活性, 但正性调控p21的活性。此外, 在一些癌症类型(例如乳腺癌, 如由Rowland等, The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. Nat Cell Biol. 2005. 7:1074-82所述)中, KLF4负性调控p53的活性, 但在一些其它癌症类型(例如结肠癌和多发性骨髓瘤, 如由Ghaleb等 (Krüppel-like factor 4 exhibits antiapoptotic activity following gamma-radiation-induced DNA damage. Oncogene. 2007. 26:2365-73) 和 Schoenhals等 (Krüppel-like factor 4 blocks tumor cell proliferation and promotes drug resistance in multiple myeloma. Haematologica. 2013. 98:1442-9) 所述)中, 正性调控p53的活性。由KLF4调控的许多基因被称为“细胞命运基因”。沉默的KLF4基因表达或活性对由KLF4调节的一些基因的一些可能影响的图解可见于图13中。CDX2-KLF4信号传导路径中的一些其它组分可调节KLF4的表达。所述组分的实例包括但不限于CDX2、KDM5B(脱甲基酶)和miRNA“miR-2909”。这些KLF4调节剂在各种癌症类型中可如何影响KLF4基因表达或活性的一些可能机理的图解可见于图13和图14中。CDX2-KLF4信号传导路径中的组分可根据本文所述的方法作为生物标志物用于治疗癌症, 尤其用于通过本发明的抗癌剂, 诸如LOR-253/APT0-253来治疗癌症。

[0062] 如本文所用,术语“调节CDX2-KLF4信号传导路径”是指其中通过药剂或事件(包括突变)来调节CDX2-KLF4信号传导路径中的一种或多种组分的过程。在一些实施方案中,所述调节导致CDX2-KLF4信号传导路径中的一种或多种组分的活性增加、降低、正常化和/或稳定化。

[0063] 术语低级烷基是指(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基。低级烷基包括甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、戊基、3-戊基、己基、(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)环烷基(例如,环丙基、环丁基、环戊基或环己基)、(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)环烷基(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷基(例如,环丙基甲基、环丁基甲基、环戊基甲基、环己基甲基、2-环丙基乙基、2-环丁基乙基、2-环戊基乙基或2-环己基乙基)、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)烷氧基(例如,甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、戊氧基、3-戊氧基或己氧基)、(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)烯基(例如,乙烯基、烯丙基、1-丙烯基、2-丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、3-丁烯基、1,-戊烯

基、2-戊烯基、3-戊烯基、4-戊烯基、1-己烯基、2-己烯基、3-己烯基、4-己烯基或5-己烯基)、(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) 炔基(例如,乙炔基、1-丙炔基、2-丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、3-丁炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、3-戊炔基、4-戊炔基、1-己炔基、2-己炔基、3-己炔基、4-己炔基或5-己炔基)、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) 烷酰基(例如,乙酰基、丙酰基或丁酰基)、卤代(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) 烷基(例如,碘甲基、溴甲基、氯甲基、氟甲基、三氟甲基、2-氯乙基、2-氟乙基、2,2,2-三氟乙基或五氟乙基)、羟基(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) 烷基(例如,羟甲基、1-羟乙基、2-羟乙基、1-羟丙基、2-羟丙基、3-羟丙基、1-羟丁基、4-羟丁基、1-羟戊基、5-羟戊基、1-羟己基或6-羟己基)、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) 烷氧基羰基(例如,甲氧基羰基、乙氧基羰基、丙氧基羰基、异丙氧基羰基、丁氧基羰基、戊氧基羰基或己氧基羰基)、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) 烷基硫基(例如,甲基硫基、乙基硫基、丙基硫基、异丙基硫基、丁基硫基、异丁基硫基、戊基硫基或己基硫基)和/或(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) 烷酰基氧基(例如,乙酰基氧基、丙酰基氧基、丁酰基氧基、异丁酰基氧基、戊酰基氧基或己酰基氧基)。

[0064] 本文所述的化合物或它的功能衍生物可根据本发明加以使用。如本文所用的术语“衍生物”包括给定化合物的衍生物、类似物、前药和非天然前体。

[0065] 如本文所用,术语“治疗功效”及其变化形式通常通过一种或多种与疾病相关的征象或症状的减轻来指示,并且可易于由本领域技术人员确定。“治疗功效”也可指预防或改善通常与对疾病的标准或非标准治疗相关的毒性的征象和症状。对治疗功效的确定通常是适应症和疾病特异性的,并且可包括本领域中已知用于或可用于确定治疗正对受试者提供有益作用的任何方法。举例来说,治疗功效的证据可包括但不限于受试者的总体健康状况的大体上改进,诸如但不限于患者生活质量提高,预测受试者存活率增加,抑郁减轻,降低一种或多种由疾病所致的症状的严重性和/或发生次数,减弱疾病的程度,使疾病稳定(例如,防止或延迟疾病的恶化),延迟或减缓疾病的进展,改善疾病状态等。在本发明的一些实施方案中,治疗功效是临床功效或统计显著的。

[0066] 如本文所用的术语“治疗(treating/treatment)”是指用于获得包括临床结果的有益或所需结果的方法,并且可包括在所治疗的疾病或病状的一个或多个可测量标志方面的即使最小变化或改进。治疗通常有效减轻病状、疾病、病症、损伤或损害的至少一种症状。临床改进的示例性标志将为本领域技术人员显而易见。实例包括但不限于以下中的一个或多个:降低一种或多种由疾病所致的症状的严重性和/或发生次数,减弱疾病的程度,使疾病稳定(例如,防止或延迟疾病的恶化),延迟或减缓疾病的进展,改善疾病状态,降低一种或多种为治疗疾病所需的其它药物的剂量,和/或增加生活质量等。

[0067] “防治”、“防治性治疗”或“预防性治疗”是指预防或减轻一种或多种症状和/或它们的潜伏病因的发生或严重性,例如预防易于发展疾病或病状(例如,由于遗传倾向性、环境因素、易患疾病或病症等而处于较高风险下)的受试者的疾病或病状。

[0068] 在本文中可互换使用的术语“病症”或“疾病”是指身体或它的一个器官和/或组织的状态的打断或扰乱器官功能和/或组织功能的执行(例如导致器官功能障碍)和/或对受疾病折磨的受试者导致症状(诸如不适、功能障碍、痛苦或甚至死亡)的任何改变。

[0069] 就“药学上可接受”来说,其意指某一物质不是在生物学上或在其它方面不合需要的,即所述物质可被并入向患者施用的药物组合物中而不导致任何显著不合需要生物作用或以有害方式与它含于其中的组合物的任何其它组分相互作用。当术语“药学上可接受”用于提及药物载体或赋形剂时,暗示的是所述载体或赋形剂已满足毒理学和制造测试的所需

标准,或它根据由美国食物与药品管理局(U.S.Food and Drug administration)制定的非活性成分指南(Inactive Ingredient Guide)而加以包括。

[0070] 术语“有效量”是指一种或多种化合物的致使得到所需治疗结果的量。有效量可包含在一次或多次剂量内,即单次剂量或多次剂量可为达到所需治疗终点所需。

[0071] 如本文所用的术语“治疗有效量”是指一种或多种药剂的为任选在不导致显著负性或不副作用下治疗病状,或减轻或预防损伤或损害所需的水平或量。

[0072] “防治有效量”是指药剂的在向易感性受试者和/或可发展疾病或病状的受试者施用足时足以预防未来疾病或病状或减轻其严重性的量。

[0073] 根据本发明的方法,如本文所用的术语“受试者”及其变化形式包括患有疾病或病状,被怀疑患有疾病或病状,或处于患有疾病或病状的风险下的任何受试者。适合受试者(或患者)包括哺乳动物,诸如实验室动物(例如,小鼠、大鼠、兔、豚鼠)、农场动物和家养动物或宠物(例如猫、狗)。包括非人灵长类动物以及优选人患者。“处于风险下的”受试者可或可不患有可检测疾病,并且在本文所述的诊断或治疗方法之前可已或可尚未发展可检测疾病。“处于风险下”表示受试者具有一种或多种所谓风险因素,其是本文所述的与本文所述的病状的发展相关联的可测量参数。具有这些风险因素中的一个或多个的受试者发展本文所述的病状的概率高于无这些风险因素的受试者。这种风险因素的一个实例是相较于临床正常样本,本发明的生物标志物增加或降低。

[0074] 在某些实施方案中,当测量治疗的CDX2-KLF4信号传导路径中的组分的活性水平时,“增加的”或“降低的”量或水平可包括“统计显著”量。在一些实施方案中,施用诸如LOR-253的抗癌剂提供治疗癌症的“统计显著”治疗作用或临床功效。在一些实施方案中,所述统计显著治疗作用或临床功效包括相较于对照媒介物,由抗癌剂引起的较缓慢癌细胞增殖或肿瘤生长。如果结果不可能已偶然发生,那么它通常被称为具有统计显著性。测试或结果的显著性水平在传统上与接受事件不可能已偶然发生所需的证据的量相关。在某些情况下,统计显著性可被定义为当无效假设实际上是真实的时,作出拒绝无效假设的决定的概率(称为第1型错误或“假阳性判定”的决定)。这个决定常使用p值来作出:如果p值小于显著性水平,那么无效假设被拒绝。p值越小,结果越显著。贝叶斯因子(Bayes factor)也可用于确定统计显著性(参见例如,Goodman S., Ann Intern Med. 130:1005-13, 1999)。在一些实施方案中,“增加的”或“降低的”量或水平比预定标准的量或相对于先前或较早时间点确定的时间点的量大或小约1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、40倍或50倍。

[0075] 根据本发明的一些实施方案,根据本发明方法施用诸如LOR-253的抗癌剂提供统计显著治疗作用。在一个实施方案中,统计显著治疗作用基于由美国(例如FDA)或其它国家的一个或多个管理机构提供的一种或多种标准或准则来确定。在其它实施方案中,统计显著治疗作用基于由管理机构核准的临床试验设置和/或程序获得的结果来确定。

[0076] 在一些实施方案中,统计显著治疗作用基于至少300、400、500、600、700、800、900、1000或2000名患者群体来确定。在一些实施方案中,统计显著治疗作用基于由随机化和双盲临床试验设置获得的数据来确定。在一些实施方案中,统计显著治疗作用基于p值小于或等于约0.05、0.04、0.03、0.02或0.01的数据来确定。在一些实施方案中,统计显著治疗作用基于置信区间大于或等于95%、96%、97%、98%或99%的数据来确定。在一些实施方案中,

统计显著治疗作用根据例如由美国FDA对由本发明提供的方法的III期临床试验的核准来确定。

[0077] 在一些实施方案中,统计显著治疗作用通过用诸如LOR-253的抗癌剂与标准护理组合治疗的至少300或350名患者群体的随机化双盲临床试验来确定。在某一实施方案中,统计显著治疗作用通过至少300或350名患者群体的随机化临床试验,以及使用28天死亡率、住院时死亡率、ICU死亡率、ICU持续时间、不处于ICU中的天数、序贯性器官衰竭评估评分(SOFA)、相对死亡风险、ICU频率、通气的持续时间、通气的频率、不通气天数或其任何组合或任何其它通常接受的用于败血症评估的准则来确定。

[0078] 一般来说,统计分析可包括由管理机构,例如美国或中国或任何其它国家的FDA允许的任何适合方法。在一些实施方案中,统计分析包括非分层分析、对数秩分析(例如根据Kaplan-Meier、Jacobson-Truax、Gulliken-Lord-Novick、Edwards-Nunnally、Hageman-Arrindel)以及分层线性建模(HLM)和Cox回归分析。

[0079] 如本文所用,短语“每天”描述在施用药剂所处的那些天施用的量。短语“每天”不指示某一量是每天施用的。

[0080] 除非另外指示,否则如本文所用的短语“药学上可接受的盐”包括可存在于化合物中的酸性或碱性基团的盐。在性质上是碱性的化合物能够与各种无机和有机酸形成广泛多种盐。可用于制备所述碱性化合物的药学上可接受的酸加成盐的酸是形成无毒酸加成盐的那些,所述盐即含有药理学上可接受的阴离子的盐,诸如乙酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、碳酸氢盐、硫酸氢盐、双甲苯磺酸盐、酒石酸氢盐、硼酸盐、溴化物、乙二胺四乙酸钙盐、右旋樟脑磺酸盐、碳酸盐、氯化物、克拉维酸盐(clavulanate)、柠檬酸盐、二盐酸盐、依地酸盐(edetate)、乙二磺酸盐、依托酸盐、乙磺酸盐、乙基丁二酸盐、反丁烯二酸盐、葡庚糖酸盐、葡萄糖酸盐、谷氨酸盐、对羟乙酰氨基苯胂酸盐、己基间苯二酚盐、海卓胺(hydrabamine)、氢溴酸盐、盐酸盐、碘化物、异硫代硫酸盐、乳酸盐、乳糖酸盐、月桂酸盐、苹果酸盐、顺丁烯二酸盐、杏仁酸盐、甲磺酸盐、甲基硫酸盐、粘酸盐、萘磺酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、双羟萘酸盐(pamoate/embonate)、棕榈酸盐、泛酸盐、磷酸盐/二磷酸盐、聚半乳糖醛酸盐、水杨酸盐、硬脂酸盐、次乙酸盐、丁二酸盐、丹宁酸盐(tannate)、酒石酸盐、茶氯酸盐(teoclolate)、甲苯磺酸盐、三乙基铵三碘化物和戊酸盐。

[0081] 除非另外指示,否则如本文所用的术语“前药”意指是药物前体的化合物,其在施用之后在体内通过某一化学或生理过程来释放药物(例如,前药在被使得达到生理pH时转化成所需药物形式)。

[0082] 除非另外指示,否则如本文所用的“连续给药时程”是指其中本发明化合物或包含所述化合物的剂型在治疗时期期间在无休息时期下施用的给药时程。在连续给药时程的整个治疗时期期间,可例如每天、每隔一天、每三天、每四天、每五天等施用化合物或包含化合物的剂型。在施用化合物或包含化合物的剂型所处的某一天,它可以单次剂量或全天以多次剂量加以施用。

[0083] 除非另外指示,否则如本文所用的“间歇给药时程”是指包括治疗时期和休息时期的给药时程。在间歇给药时程的整个治疗时期期间,可例如每天、或每隔一天、每三天、每四天、每五天等施用本发明化合物或包含所述化合物的剂型。在施用化合物或包含化合物的剂型所处的某一天,它可以单次剂量或全天以多次剂量加以施用。在休息时期期间,不施用

化合物或包含所述化合物的剂型。在一些实施方案中, 休息时期持续至少一天、至少两天、至少三天、至少四天、至少五天、至少六天、至少1周、至少1.5周、至少2周、至少3周、至少4周、至少一个月、至少两个月、至少三个月、至少四个月、至少五个月、至少半年、至少一年、至少两年或更长时间。在一些间歇给药方案中, 治疗时期通常是约1天至30天, 诸如约10天至30天, 例如约2、3或4周, 并且休息时期通常是1至30天, 诸如3至15天, 例如1或2周。涵盖从10至30天的任何治疗时期与从3至15天的任何休息时期的组合。间歇给药方案可表示为以周数计的治疗时期/以周数计的休息时期。举例来说, 4/1间歇给药时程是指其中治疗时期是四周, 并且休息时期是一周的间歇给药时程。4/2间歇给药时程是指其中治疗时期是四周, 并且休息时期是两周的间歇给药时程。类似地, 3/1间歇给药时程是指其中治疗时期是四周, 并且休息时期是一周的间歇给药时程。

[0084] 由本发明的抗癌剂治疗的人受试者可显示完全响应或部分响应。除非另外指示, 否则如本文所用的完全响应 (CR) 是指处于治疗下的患者中所有可测量和非可测量症状都消失, 并且不出现新症状。除非另外指示, 否则如本文所用的部分响应 (PR) 是指处于治疗下的患者中至少一种可测量和非可测量症状被显著减轻, 或不出现新症状。

[0085] 应进一步了解给药方案可由本领域技术人员调整以更合宜地提供给药方案和其它治疗剂的调协作用, 条件是所述调整是治疗可接受的。

[0086] 如本文所用, “ $C_{\max}$ ”是指最大血浆浓度;  $t_{\max}$ 是指在施用剂量之后出现 $C_{\max}$ 所处的时间; AUC是指从时间零至无穷的血浆浓度-时间曲线下面积;  $t_{1/2}$ 是指血浆消除半衰期; CV%是指变异系数百分比;  $C_{(谷底24小时)}$ 是指在给药之后24小时的谷底血浆浓度; 并且QD指示每天一次。

[0087] 癌症

[0088] 因此, 可根据本发明的一个实施方案治疗的癌症包括但不限于白血病; 腺癌和癌瘤, 包括鳞状细胞癌。癌瘤也常被称为如上所述的“实体肿瘤”, 并且通常存在的可根据本发明治疗的实体肿瘤的实例包括但不限于肛门癌、膀胱癌、结肠癌、结肠直肠癌、十二指肠癌、胃 (gastric/stomach) 癌、肺 (非小细胞) 癌、食道癌、前列腺癌、直肠癌和小肠癌。因此, 本发明的一个实施方案提供式I化合物治疗选自白血病、膀胱癌、肺 (非小细胞) 癌、前列腺癌和胃肠道癌的组的癌症的用途, 其中胃肠道癌包括但不限于肛门癌、结肠癌、结肠直肠癌、十二指肠癌、胃癌、食道癌、直肠癌和小肠癌。如本文所用, “ $C_{\max}$ ”是指最大血浆浓度;  $t_{\max}$ 是指在施用剂量之后出现 $C_{\max}$ 所处的时间; AUC是指从时间零至无穷的血浆浓度-时间曲线下面积;  $t_{1/2}$ 是指血浆消除半衰期; CV%是指变异系数百分比;  $C_{(谷底24小时)}$ 是指在给药之后24小时的谷底血浆浓度; 并且QD指示每天一次。

[0089] 术语“白血病 (leukaemia/leukemia)”广泛指代形成血液的器官的进行性恶性疾病。白血病的特征通常在于血液和骨髓中的白细胞和它们的前体的增殖和发育扭曲, 但也可指代其它血细胞的恶性疾病, 诸如影响不成熟红血细胞的红白血病。白血病通常基于以下加以临床分类: (1) 疾病的持续时间和特性-急性或慢性; (2) 涉及的细胞的类型-骨髓性 (髓细胞性)、淋巴性 (淋巴细胞性) 或单核细胞性; 以及 (3) 血液中的异常细胞的数目增加或不增加-白血病性或非白血病性 (亚白血病性)。白血病包括例如急性白血病、慢性白血病、成人白血病、儿科/儿童白血病、淋巴细胞性白血病、骨髓性白血病、急性淋巴细胞性白血病 (ALL)、急性非淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、急性粒细胞性白血病、慢性粒细

胞性白血病、急性前髓细胞性白血病、慢性髓细胞白血病 (CML)、T细胞白血病、B细胞白血病、成人T细胞白血病、儿科T细胞ALL、儿科B细胞ALL、非白血病性白血病、白细胞不增多性白血病、嗜碱粒细胞性白血病、母细胞白血病、牛白血病、慢性髓细胞性白血病、皮肤白血病、胚性白血病、嗜酸粒细胞性白血病、格罗斯白血病 (Gross leukaemia)、毛细胞白血病、血母细胞性白血病、造血母细胞性白血病、组织细胞性白血病、干细胞白血病、急性单核细胞性白血病、白细胞减少性白血病、淋巴白血病、淋巴母细胞性白血病、淋巴细胞性白血病、淋巴源性白血病、淋巴样白血病、淋巴肉瘤细胞白血病、肥大细胞白血病、巨核细胞性白血病、小髓母细胞性白血病、单核细胞性白血病、髓母细胞性白血病、髓细胞性白血病、骨髓性粒细胞性白血病、髓单核细胞性白血病、内格利白血病 (Naegeli leukaemia)、浆细胞白血病、浆细胞性白血病、前髓细胞性白血病、里德尔细胞白血病 (Rieder cell leukaemia)、席林氏白血病 (Schilling's leukaemia)、干细胞白血病、亚白血病性白血病和未分化细胞白血病。

[0090] 术语“癌瘤”是指由倾向于浸润周围组织并导致转移的上皮细胞组成的恶性新生物。术语“癌瘤”也涵盖腺癌。腺癌是起源于构成具有腺性 (分泌) 性质的器官的细胞中,或起源于内衬于中空内脏,诸如胃肠道或支气管上皮的细胞中的癌瘤,并且包括肺腺癌和前列腺腺癌。

[0091] 本发明方法可应用于治疗可为较小,增长缓慢,局部化和/或非侵袭性的早期癌症,包括早期赘瘤形成,以意图治愈疾病或导致癌症消退;以及可应用于治疗中期和治疗晚期癌症,包括晚期和/或转移性和/或侵袭性赘瘤形成,例如以减缓疾病进展,减少转移或增加患者的存活期。类似地,组合可用于治疗低级癌症、中级癌症和/或高级癌症。

[0092] 本发明方法也可用于治疗无痛性癌症;复发性癌症,包括局部复发性、远端复发性,和/或难治性癌症 (即尚未对治疗起响应的癌症);转移性癌症;局部晚期癌症和侵袭性癌症。因此,“晚期”癌症包括局部晚期癌症和转移性癌症,并且是指患者的外显性疾病,其中所述外显性疾病不顺从通过局部治疗模态 (诸如手术或放射疗法) 来治愈。术语“转移性癌症”是指已从身体的一个部分扩散至另一部分的癌症。晚期癌症也可不可切除的,也就是说它们已扩散至周围组织,并且不能通过手术移除。

[0093] 本发明方法也可用于治疗抗药性癌症,包括多药物抗性肿瘤。如本领域中已知,癌细胞对化学疗法的抗性是管理癌症中的一个主要问题。

[0094] 本领域技术人员将了解这些种类中的许多可重叠,例如侵袭性癌症通常也具有转移性。如本文所用的“侵袭性癌症”是指快速增长的癌症。本领域技术人员将了解对于一些癌症,诸如乳腺癌或前列腺癌,术语“侵袭性癌症”将指已在给定癌症的复发时间范围的大约前三分之二时间内复发的晚期癌症,而对于其它类型的癌症,几乎所有病例都呈现快速增长的被视为具有侵袭性的癌症。因此,所述术语可涵盖某一癌症类型的子段,或它可涵盖其它癌症类型的全部。

[0095] 在一些实施方案中,癌症是白血病/淋巴瘤。在一些实施方案中,癌症是急性髓细胞白血病 (AML)。在一些实施方案中,癌症是淋巴瘤、胃癌、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征或其组合。在一些其它实施方案中,癌症是与KLF4基因的表观遗传甲基化相关的T细胞白血病,例如成人T细胞白血病。在一些其它实施方案中,癌症是ALL,例如儿科ALL。在一些其它实施方案中,癌症是与KLF4基因或蛋白质中的一个或多个突变相关的儿科T细胞ALL。

在一些其它实施方案中,癌症是与miRNA-2902升高相关的儿科B细胞ALL。在一些其它实施方案中,癌症是AML、ALL或MDS,例如高风险MDS,其全部与高于正常CDX2活性相关。在一些其它实施方案中,癌症是霍奇金氏、伯基特氏或B细胞淋巴瘤,其全部与KLF4基因的甲基化相关。

[0096] 急性骨髓性白血病(AML):也称为急性髓细胞白血病或急性非淋巴细胞性白血病(ANLL),是一种髓系血细胞的癌症,特征在于在骨髓中积累并干扰正常血细胞的产生的异常白血细胞快速生长。AML的症状由正常骨髓被白血病细胞替换引起,所述替换导致红细胞、血小板和正常白血细胞下降。这些症状包括疲劳、呼吸短促、容易瘀伤和流血以及感染风险增加。已鉴定若干风险因素和染色体异常,但特定病因并不明确。作为一种急性白血病,AML快速进展,并且如果听任未治疗,那么通常在数周或数月内致命。发展AML的若干风险因素包括但不限于白血病前血液病症,诸如骨髓增生异常综合征或骨髓增生性疾病;暴露于抗癌化学疗法;辐射,诸如高量离子辐射暴露;和遗传原因,诸如以下中所述的那些: Taylor等("The hereditary basis of human leukemia".Henderson ES,Lister TA,Greaves MF.Leukemia(第6版).Philadelphia:WB Saunders,第210页.ISBN0-7216-5381-2);Horwitz等("Anticipation in familial leukemia".Am.J.Hum.Genet.59(5):990-8.PMC 1914843.PMID 8900225);Crittenden("An interpretation of familial aggregation based on multiple genetic and environmental factors".Ann.N.Y.Acad.Sci.91(3):769-80);以及Horwitz("The genetics of familial leukemia".Leukemia 11(8):1347-59)。世界卫生组织(WHO)急性骨髓性白血病分类试图比FAB准则更具临床适用性,并且产生更有意义的预后信息。WHO种类各自含有为血液病理学家和肿瘤学家所关注的众多描述性子种类;然而,WHO方案中大多数临床重要信息通过归类至下列亚型中的一个来传达:

名称	描述	ICD-O (国际疾病分类肿瘤学分册)
伴有复发性遗传异常的急性骨髓性白血病	包括: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 伴有染色体 8 与 21 之间的易位的 AML [t(8;21)] (ICD-O 9896/3); RUNX1/RUNX1T1</li> <li>• 伴有染色体 16 中的倒位的 AML [inv(16)] (ICD-O 9871/3); CBFB/MYH11</li> <li>• 伴有染色体 15 与 17 之间的易位的 APL [t(15;17)] (ICD-O 9866/3); RARA; PML</li> <li>• 伴有染色体 9 和 11 中的易位的 AML [t(9;11)];</li> </ul>	多发性

[0097]



[0098]

	MLLT3-MLL 相较于其它类型的 AML，患有这个种类中的 AML 的患者通常具有高缓解率和更好预后。	
伴有多谱系发育不良的 AML	这个种类包括已患有转变成 AML 的先前骨髓增生异常综合征 (MDS) 或骨髓增生性疾病 (MPD) 的患者。这个种类的 AML 最常发生在年长患者中，并且常具有更糟预后。	M9895/3
疗法相关的 AML 和 MDS	这个种类包括已进行先前化学疗法和/或放射，并且随后发展 AML 或 MDS 的患者。这些白血病的特征可在于具有特定染色体异常，并且常携有更糟预后。	M9920/3
未另外分类的 AML	包括 AML 的不属于以上种类的亚型。	M9861/3

[0099] 法国-美国-英国 (FAB) 分类系统基于白血病发展所来自的细胞的类型和它的成熟程度将 AML 分成八个亚型 M0 至 M7。尽管 WHO 分类 (参见上文) 可更适用，但 FAB 系统仍然被广泛使用。

[0100]

类型	名称	细胞遗传学	成人 AML 患者的百分比
M0	最小程度分化的急性髓母细胞性白血病		5%
M1	不伴有成熟的急性髓母细胞性白血病		15%
M2	伴有粒细胞性成熟的急性髓母细胞性白血病	t(8;21)(q22;q22), t(6;9)	25%
M3	前髓细胞性或急性前髓细胞性白血病 (APL)	t(15;17)	10%
M4	急性髓单核细胞白血病	inv(16)(p13q22), del(16q)	20%
M4eo	髓单核细胞性以及骨髓嗜酸粒细胞增多	inv(16), t(16;16)	5%
M5	急性单核母细胞性白血病 (M5a) 或急性单核细胞性白血病 (M5b)	del (11 q), t(9;11), t(11; 19)	10%
M6	急性红系白血病，包括红白血病 (M6a) 和极其罕见的纯红系白血病 (M6b)		5%

[0101]

M7	急性巨核母细胞性白血病	t(1;22)	5%
----	-------------	---------	----

[0102] 用于治疗AML的先前方法描述于以下中:Bishop J("The treatment of adult acute myeloid leukemia".Semin Oncol 24(1):57-69,1997);Weick等("A randomized investigation of high-dose versus standard-dose cytosine arabinoside with daunorubicin in patients with previously untreated acute myeloid leukemia:a Southwest Oncology Group study"(PDF).Blood 88(8):2841-51,1996);Bishop等("A randomized study of high-dose cytarabine in induction in acute myeloid leukemia"Blood 87(5):1710-7,1996);Huang等("Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia".Blood 72(2):567-72,1988);Tallman等("All-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia".N.Engl.J.Med.337(15):1021-8,1997);Fenaux等("A randomized comparison of all transretinoic acid(ATRA)followed by chemotherapy and ATRA plus chemotherapy and the role of maintenance therapy in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia.The European APL Group".Blood 94(4):1192-200,1999);Estey E("Treatment of acute myelogenous leukemia".Oncology(Williston Park)16(3):343-52,355-6;discussion 357,362,365-6,2002);以及Cassileth等("Maintenance chemotherapy prolongs remission duration in adult acute nonlymphocytic leukemia".J Clin Oncol 6(4):583-7,1988)。

[0103] 急性淋巴细胞性白血病(ALL):也称为急性淋巴母细胞性白血病,是一种特征在于骨髓和各种髓质外部位中白血病淋巴细胞/淋巴母细胞(不成熟白血细胞,诸如早期B和T淋巴细胞祖细胞)的增殖和积累调控异常的急性白血病。ALL是儿童中最常见类型的癌症,并且它是成人中相对不常见的癌症。发展ALL的风险因素包括但不限于遗传病症/突变和各种表观遗传修饰,诸如由Iacobucci等("Cytogenetic and molecular predictors of outcome in acute lymphocytic leukemia:recent developments",Curr Hematol Malig Rep.2012年6月;7(2):133-43.)和Florea等("Epigenomics of leukemia:from mechanisms to therapeutic applications".Epigenomics.2011年10月;3(5):581-609)所述的那些。

[0104] 慢性髓细胞白血病(CML):也称为慢性骨髓性白血病,是一种特征在于外周血液中各种血细胞(主要是髓细胞)以及骨髓中它们的前体的增殖调控异常/增加,从而导致它们在血液中积累的慢性白血病。在西方世界在成人中,它的发生率小于慢性淋巴细胞性白血病(CLL),并且CML发作的中值年龄是50-60岁。发展CML的风险因素也包括但不限于遗传病症/突变和各种表观遗传修饰,诸如由Florea等所述的那些。疾病过程具有三个阶段,以早期起始,也称为慢性期(CP)疾病。接着,白血病干细胞可获得其它遗传缺陷。

[0105] 成人T细胞白血病(ATLL):也称为成人T细胞淋巴瘤,是成熟CD4+T细胞的不常见的淋巴组织增生性病症,由逆转录病毒1型人嗜T淋巴细胞病毒(HTLV-1)引起,如由Qayyum等("Adult T-cell leukemia/lymphoma".Arch Pathol Lab Med.2014年2月;138(2):282-6)所综述。目前,全世界约2000万人是HTLV-1携带者,其中大多数受感染个体居住在地方性区域,诸如日本南部、非洲、加勒比盆地和拉丁美洲。在HTLV-1感染之后终生病毒携带状态和长久潜伏时间(20-40年)是常见的,因此这个类型的白血病/淋巴瘤几乎仅见于成人中,而在儿童中极其罕见。HTLV-1阳性患者中进展成ATLL的终生风险对于女性是2.1%,而对于男

性是6.6%。平均发作年龄是60岁(范围是20-80岁)。绝大多数ATLL病例发生在早年生活期间被感染的患者中,推测是由于这个年龄组中的免疫应答效率较低。此外,长期感染可增加积累后续突变以及最终恶性转化的机会。病毒传播的主要路径是哺乳、血液暴露和无保护的性交。在2008年,世界卫生组织造血性和淋巴组织肿瘤分类根据下山(Shimoyama)分类将ATLL再分成4种不同变型:急性(60%)、淋巴瘤性(20%)、慢性(15%)和郁积性(5%)。各种变型不存在绝对必要的特征,并且观察到重叠。急性变型显现为显著白细胞增多,伴有非典型淋巴细胞以及嗜酸粒细胞增多。症状包括高钙血症伴有或不伴有溶骨性病变、肾功能障碍和神经精神病紊乱、乳酸脱氢酶水平升高、中枢神经环增强病变和继发性呼吸并发症。淋巴瘤性变型是一种类似于急性发作亚型的侵袭性晚期疾病,并且不伴有白血病的显著淋巴结病是这个变型的突出特征。慢性变型通常呈现有皮疹、伴有绝对淋巴细胞增多的白细胞增多、轻度淋巴结病和高钙血症。郁积性变型是无症状的,并且特征在于白血球计数正常,伴有小于5%的循环非典型淋巴样细胞,并且不伴有相关高钙血症或器官巨大症,但常发生皮肤和肺牵连。可发生从郁积性变型向急性变型的进展。

[0106] **淋巴瘤**:淋巴瘤是一种类型的血液癌症,其在B或T淋巴细胞(即形成免疫系统的一部分并帮助保护身体免遭感染和疾病的白血细胞)分裂快于正常细胞或寿命长于它们被设想的寿命时发生。通常,淋巴瘤呈现为淋巴样细胞的实体肿瘤。于2001年公布并在2008年更新的当前WHO分类是最新淋巴瘤分类,并且基于“修订的欧洲-美国淋巴瘤分类”(Revised European-American Lymphoma classification,REAL)内所奠定的基础:

[0107] A.成熟B细胞赘瘤:

[0108] • 慢性淋巴细胞性白血病/小淋巴细胞性淋巴瘤

[0109] • B细胞前淋巴细胞性白血病

[0110] • 淋巴浆细胞性淋巴瘤(诸如瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(Waldenstrom macroglobulinemia))

[0111] • 脾边缘区淋巴瘤

[0112] • 浆细胞赘瘤:

[0113] ○浆细胞骨髓瘤

[0114] ○浆细胞瘤

[0115] ○单克隆免疫球蛋白沉积病

[0116] ○重链病

[0117] • 结外边缘区B细胞淋巴瘤,也称为MALT淋巴瘤

[0118] • 结节边缘区B细胞淋巴瘤(NMZL)

[0119] • 滤泡性淋巴瘤

[0120] • 套膜细胞淋巴瘤

[0121] • 弥漫性大B细胞淋巴瘤

[0122] • 纵隔(胸腺)大B细胞淋巴瘤

[0123] • 血管内大B细胞淋巴瘤

[0124] • 原发性渗出淋巴瘤

[0125] • 伯基特淋巴瘤/白血病

[0126] B.成熟T细胞和自然杀伤(NK)细胞赘瘤

- [0127] • T细胞前淋巴细胞性白血病
- [0128] • T细胞大颗粒淋巴细胞性白血病
- [0129] • 侵袭性NK细胞白血病
- [0130] • 成人T细胞白血病/淋巴瘤
- [0131] • 鼻型结外NK/T细胞淋巴瘤
- [0132] • 肠病型T细胞淋巴瘤
- [0133] • 肝脾T细胞淋巴瘤
- [0134] • 母细胞性NK细胞淋巴瘤
- [0135] • 蕈样真菌病/西泽里综合征 (Sezary syndrome)
- [0136] • 原发性皮肤CD30阳性T细胞淋巴组织增生性病症
- [0137] ○原发性皮肤间变性大细胞淋巴瘤
- [0138] ○淋巴瘤样丘疹病
- [0139] • 血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤
- [0140] • 未指定的外周T细胞淋巴瘤
- [0141] • 间变性大细胞淋巴瘤
- [0142] C. 霍奇金淋巴瘤
- [0143] • 经典霍奇金淋巴瘤：
- [0144] ○结节性硬化
- [0145] ○混合细胞性
- [0146] ○富含淋巴细胞
- [0147] ○淋巴细胞消减或未消减
- [0148] • 结节性淋巴细胞占优性霍奇金淋巴瘤
- [0149] D. 免疫缺陷相关的淋巴组织增生性病症
- [0150] • 与原发性免疫病症相关
- [0151] • 与人免疫缺陷病毒 (HIV) 相关
- [0152] • 移植后
- [0153] • 与甲氨蝶呤 (methotrexate) 疗法相关
- [0154] • 原发性中枢神经系统淋巴瘤最常发生在免疫损害患者,特定来说患有AIDS的那些中,但它也可发生在具有免疫能力的患者中。它具有不良预后,特别是在患有AIDS的患者中。治疗可由皮质类固醇、放射疗法和化学疗法组成,常常与甲氨蝶呤一起。
- [0155] 将淋巴瘤亚型与相对发病率、组织病理学、免疫表型、总体t年存活率一起显示在下文中 (Robbins basic pathology (第8版). Philadelphia:Saunders/Elsevier.2007.表12-8页.):

[0156]

淋巴瘤 类型	相对发 病率 [13]	组织病理 学 [13]	免疫表型	总体5年 存活率	其它注释
<u>前体T细胞白血病/淋巴</u>	儿童期淋巴瘤的40%	淋巴母细胞，具有不规则核轮廓、凝聚染色质、小核仁和不足细胞质，无颗粒。	<u>TdT</u> 、 <u>CD2</u> 、 <u>CD7</u>		由于涉及胸腺，所以它常呈现为 <u>纵隔团块</u> 。它与 <u>NOTCH1</u> 突变高度相关。最常见于 <u>青少年</u> 男性中。
<u>滤泡性淋巴瘤</u>	成人淋巴瘤的40%	小“卵裂”细胞（ <u>中心细胞</u> ）与大活化细胞（ <u>中心母细胞</u> ）混合。通常具有结节性（“滤泡性”）生长样式	<u>CD10</u> 、表面 Ig	72-77%	发生在年长成人中。通常涉及淋巴结、骨髓和脾。与 t(14;18) <u>易位</u> 过度表达 <u>Bcl-2</u> 相关。 <u>无痛性</u>
<u>弥漫性大B细胞淋巴瘤</u>	成人淋巴瘤的40至50%	可变。大多数类似于大生发中心的B细胞。弥漫性生长样式。	可变表达 <u>CD10</u> 和表面 Ig	60%	发生在所有年龄，但最通常发生在年长成人中。常发生在淋巴结外部

[0157]

<b><u>套膜细胞淋巴瘤</u></b>	成人淋巴瘤的3至4%	小尺寸至中等尺寸的淋巴细胞以弥漫性样式生长	<u>CD5</u>	50% 至 70%	。侵袭性。 主要发生在成年男性中。通常涉及淋巴结、骨髓、脾和 <u>胃肠道</u> 。与t(11; 14)易位过度表达细胞 <u>周期素D1</u> 相关。中度侵袭性。
<b><u>B 细胞慢性淋巴细胞性白血病/淋巴瘤</u></b>	成人淋巴瘤的3至4%	小静息淋巴细胞与可变数目的大活化细胞混合。淋巴结被弥漫性 <u>消除</u>	<u>CD5</u> 、 <u>表面免疫球蛋白</u>	50%	发生在年长成人中。通常涉及淋巴结、骨髓和脾。大多数患者具有外周血液牵连。 <u>无痛性</u> 。
<b><u>MALT 淋巴瘤</u></b>	成人淋巴瘤的约5%	可变细胞尺寸和分化。40%显示 <u>浆细胞</u> 分化。B 细胞向上皮 <u>归巢</u> 产生淋巴上皮病变。	<u>CD5</u> 、 <u>CD10</u> 、 <u>表面 Ig</u>		常常发生在淋巴结外部。极其无痛性。可通过局部切除来治愈。
<b><u>伯基特氏淋巴瘤</u></b>	美国淋巴瘤的<1%	具有若干核仁的中等尺寸圆形淋巴样细胞。因弥漫性分布有散置凋亡而具有 <u>星空外观</u> 。	<u>CD10</u> 、 <u>表面 Ig</u>	50%	具有非洲地方性，在其它地方具有偶发性。更常见于免疫损害患者和儿童中。常涉及内脏。高度侵袭性。
<b><u>蕁样真菌病</u></b>	最常见皮肤淋巴性恶性肿瘤	通常是具有回旋核的小淋巴样细胞，其常浸润表皮，从而产生 <u>波特利微脓肿</u> （Pautrier	<u>CD4</u>	75%	局部化或更全身化皮肤症状。通常无痛。在更具侵袭性的变型 <u>西泽里氏病</u> 中，存

[0158]

		microabscesses )			在皮肤 <u>红斑</u> 和外周血液牵连。
<u>未另外指定的外周T细胞淋巴瘤</u>	最常见T细胞淋巴瘤	可变。通常是小至大淋巴样细胞的混合物，具有不规则核轮廓。	<u>CD3</u>		可能由若干罕见肿瘤类型组成。它常被散播，并且通常具有侵袭性。
<u>霍奇金淋巴瘤的结节性硬化形式</u>	最常见的霍奇金淋巴瘤	<u>里德-施滕贝格</u> (Reed-Stenberg) 细胞变型和炎症。通常具有由胶原蛋白组成的宽广硬化性条带。	<u>CD15、CD30</u>		最常见于年轻人中。它常出现在 <u>纵隔</u> 或 <u>颈部淋巴结</u> 中。
<u>霍奇金淋巴瘤的混合细胞性亚型</u>	第二最常见的霍奇金淋巴瘤	许多典型里德-施滕贝格细胞和炎症。	<u>CD15、CD30</u>		最常见于男性中。比结节性硬化形式更可能在晚期被诊断。 <u>艾伯斯坦-巴尔</u> (Epstein-Barr) <u>病毒</u> 涉及于 70% 病例中。

[0159] 胃癌 (Gastric cancer): 也称为胃癌 (stomach cancer), 其是指产生于胃的任何部分的癌症。胃癌常常是无症状的 (不产生可觉察的症状), 或它可在它的早期仅导致非特异性症状 (不为只是胃癌所特有, 而是也为其它相关或无关病症所具有的症状)。它可通过胃镜检查、上部胃肠系列检查或计算机断层摄影术或CT扫描来诊断。先前它通过手术、化学疗法和放射来治疗。

[0160] 结肠直肠癌: 也称为结肠癌、直肠癌、肠癌或结肠直肠腺癌, 是一种由结肠或直肠 (大肠的部分) 中或阑尾中细胞生长不受控制所致的癌症。大于75-95%的结肠癌发生在具有少许或不具有遗传风险的人员中。其它风险因素包括年龄增长、男性性别、高量摄取脂肪、酒精或红肉、肥胖、抽烟以及缺乏身体锻炼。约10%病例与活动不足相关联。在每天饮酒大于1次的情况下, 酒精风险似乎增加。结肠直肠癌是一种起源于内衬于胃肠道的结肠或直肠的上皮细胞的疾病, 最常由于Wnt信号传导路径中使信号传导活性非自然地增加的突变所致。突变可为遗传的或获得的, 并且最可能发生在肠隐窝干细胞中。Wnt信号传导路径中与结肠直肠癌相关的基因包括但不限于APC、 $\beta$ -连环蛋白 ( $\beta$ -catenin)、AXIN1、AXIN2、TCF7L2或NKD1。除Wnt-APC- $\beta$ -连环蛋白信号传导路径中的缺陷之外, 必须发生其它突变以使细胞变为癌性。通过TP53基因产生的p53蛋白通常监视细胞分裂, 并且如果细胞具有Wnt

路径缺陷,那么将它们杀灭。最终,细胞系获得TP53基因中的突变,并且将组织从腺瘤转化成侵袭性癌瘤。在结肠直肠癌中通常去活化的其它凋亡蛋白质是TGF- $\beta$ 和DCC。在结肠直肠癌中过度表达的其它致癌基因包括编码通常刺激细胞应答于生长因子而分裂的蛋白质KRAS、RAF和PI3K的基因,可获得导致细胞增殖过度活化的突变。除对于以上基因所述的致癌性和失活性突变之外,非高突变样本也含有突变CTNNB1、FAM123B、SOX9、ATM和ARID1A。通过一组不同遗传事件而进展,高突变肿瘤显示突变形式的ACVR2A、TGFB2、MSH3、MSH6、SLC9A9、TCF7L2和BRAF。在两种肿瘤类型之间,在这些基因之中的共同主题是它们涉及于WNT和TGF- $\beta$ 信号传导路径中,此转而导致作为结肠直肠癌中的主要参与者的MYC的活性增加。

[0161] 多发性骨髓瘤:也称为浆细胞骨髓瘤或卡勒氏病(Kahler's disease),是一种浆细胞癌症,所述浆细胞是通常负责产生抗体的一种类型的白血细胞。它可为有症状的骨髓瘤、无症状的骨髓瘤和MGUS(意义未确定的单克隆 $\gamma$ 球蛋白病)。骨髓瘤用血液测试(血清蛋白电泳、无血清 $\kappa/\lambda$ 轻链测定)、骨髓检查、尿蛋白电泳和通常涉及的骨的X射线诊断。先前它通过类固醇、化学疗法、蛋白酶体抑制剂、免疫调节药物(IMiD)(诸如沙利度胺(thalidomide)或来那度胺(lenalidomide))和干细胞移植来治疗。

[0162] 骨髓增生异常综合征(MDS):骨髓增生异常综合征("MDS")是指一组不同造血干细胞病症,其是伴有髓类血细胞的低效产生(或发育不良)的血液学(血液相关)医学病状。MDS的特征在于细胞髓质的形态和成熟受损(骨髓组织生成异常),外周血液血细胞减少,以及由低效血细胞产生所致而进展成急性白血病的风险可变。The Merck Manual 1953(第17版1999)以及List等,1990,J.Clin.Oncol.8:1424。被称为"低风险MDS"的一些类型的MDS进展缓慢,并且可导致轻度至中度贫血,或导致其它类型的细胞减少。一些其它类型的MDS被称为"高风险MDS",并且可导致严重问题。在患有高风险MDS的患者中,称为母细胞的不成熟细胞构成髓质中超过5%的细胞,并且不发育成正常红细胞、白细胞和血小板,从而常常导致更重度缺乏那些细胞/血小板。当MDS患者产生超过20%母细胞时,他们被重新分类为患有AML伴三谱系发育不良(AML-TLD)。

[0163] 初始造血干细胞损伤可由于诸如但不限于细胞毒性化学疗法、辐射、病毒、化学暴露和遗传倾向性的原因。克隆突变支配骨髓,从而抑制健康干细胞。在MDS的早期,血细胞减少的主要病因是程序化细胞死亡(凋亡)增加。当疾病进展并转变成白血病时,很少发生基因突变,并且白血病细胞的增殖压倒健康髓质。疾病过程具有差异,其中一些病例表现为无痛性疾病,而其它病例以侵袭性方式进行表现,以极短临床过程转变成急性形式的白血病。MDS患者可发展重度贫血,并且需要输血。在一些情况下,疾病恶化,并且患者发展由进行性骨髓衰竭引起的血细胞减少症(低血球计数)。

[0164] 根据于1976年公布,在1982年修订的法国-美国-英国分类,将病例分类成五个种类:



[0165]

ICD-O	名称	描述
M9980/3	难治性贫血 (RA)	特征在于骨髓中的原始血细胞 (髓母细胞) 小于 5%, 并且主要在红细胞前体中观察到病理性异常
M9982/3	伴有环形含铁母细胞的难治性	特征也在于骨髓中的髓母细

[0166]

	贫血 (RARS)	胞小于 5%, 但区别在于髓质中存在 15%或更多的是异常铁填充细胞 (称为“环形含铁母细胞”) 的红细胞前体
M9983/3	伴有过量母细胞的难治性贫血 (RAEB)	特征在于髓质中有 5-20%髓母细胞
M9984/3	伴有处于转化中的过量母细胞的难治性贫血 (RAEB-T)	特征在于髓质中有 21-30%髓母细胞 (母细胞>30%定义为急性骨髓性白血病)
M9945/3	不应与慢性髓细胞白血病或 CML 混淆的慢性髓单核细胞性白血病 (CMML)	特征在于骨髓中的髓母细胞小于 20%, 以及大于 $1 \times 10^9/L$ 个单核细胞 (一种类型的白血细胞) 在外周血液中循环。

[0167] 世界卫生组织 (WHO) 修改了这个分类, 引入若干新疾病种类并消除其它种类。最近, WHO 已制订更大程度基于遗传研究结果的新分类流程 (2008):

[0168]

旧系统	新系统
难治性贫血 (RA)	伴有单谱系发育不良的难治性血细胞减少症 (难治性贫血、难治性嗜中性白细胞减少症和难治性血小板减少症)
伴有环形含铁母细胞的难治性贫血 (RARS)	伴有环形含铁母细胞的难治性贫血 (RARS) 伴有环形含铁母细胞的难治性贫血-血小板增多症 (RARS-t) (临时病种), 其本质上是骨髓增生异常/骨髓增生性病症, 并且通常具有 JAK2 突变 (janus 激酶) -新 WHO 分类 2008
	伴有多谱系发育不良的难治性血细胞减少症 (RCMD) 包括子组: 伴有多谱系发育不良和环形含铁母细胞的难治性血细胞减少症(RCMD-RS)。RCMD 包括病理性变化不局限于红细胞 (即主

[0169]

	要白细胞前体和血小板前体（巨核细胞）发育不良的患者。
伴有过量母细胞的难治性贫血（RAEB）	伴有过量母细胞的难治性贫血 I 和 II。RAEB 被分成*RAEB-I（5-9%母细胞）和预后比 RAEB-I 不良的 RAEB-II（10-19%母细胞）。奥尔棒状小体（Auer rod）可见于可难以与急性骨髓性白血病区分的 RAEB-II 中。
伴有处于转化中的过量母细胞的难治性贫血（RAEB-T）	RAEB-T 的种类被消除；所述患者现被视为患有急性白血病。通常见于具有正常或高血小板计数以及骨髓细胞中的染色体 5 的长臂的孤立缺失的年长女性中的 5q 综合征被添加至该分类中。
慢性髓单核细胞性白血病（CMML）	CMML 被从骨髓增生异常综合征移除，并放置于骨髓增生异常-骨髓增生性重叠综合征的新种类中。
	5q 综合征
	不可分类的骨髓增生异常（见于伴有纤维化的巨核细胞发育不良的那些病例和其它病例中）
	儿童期难治性血细胞减少症（儿童期发育不良）-新 WHO 分类 2008

[0170] MDS 的征象和症状包括但不限于贫血（红血球计数较低或血红蛋白降低），伴有长期疲劳，呼吸短促，感觉寒冷，有时胸痛；虚弱或感觉疲劳，皮肤较苍白，容易瘀伤或流血，有瘀斑，发热，嗜中性白细胞减少（嗜中性白细胞计数较低），伴有对感染的易感性增加；血小板减少（血小板计数较低），伴有对流血和皮下血肿（瘀伤）的易感性增加，以及导致紫癜或瘀斑的皮下出血；脾肿大或罕见肝肿大；细胞中的颗粒异常，核形状和尺寸异常；和/或染色体异常，包括染色体易位和异常染色体数目。

[0171] 许多因素可增加 MDS 的风险，其包括但不限于是男性或白种人，年长于 60 岁，过去用化学疗法或放射疗法治疗，暴露于某些化学物质（包括烟草烟雾、杀虫剂和溶剂，诸如苯），以及暴露于重金属，诸如汞或铅。

[0172] 针对 MDS 的先前治疗方法包括骨髓移植，使用造血性生长因子或细胞因子来刺激

接受者中的血细胞发育,所述生长因子或细胞因子诸如红细胞生成素(erythropoietin, EPO)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和粒细胞集落刺激因子(G-CSF)(Metcalf, 1985, Science 229:16; Dexter, 1987, J. Cell Sci. 88:1; Golde和Gasson, 1988, Scientific American, 7月:62; Tabbara和Robinson, 1991, Anti-Cancer Res. 11:81; Ogawa, 1989, Environ. Health Persp. 80:199; 以及Dexter, 1989, Br. Med. Bull. 45:337.)。不幸的是,骨移植对于供者和接受者是疼痛的,并且造血性生长因子尚未被证明在许多临床环境中有效。其它方法包括5-氮杂胞苷、地西他滨(decitabine)、来那度胺、免疫抑制、白血病疗法和探究性方法。

[0173] 在一些实施方案中,在治疗之前、期间或之后确定癌症的组织学。任何适合测试都可用于确定癌症的组织学。所述测试和检查包括但不限于食道癌的常见征象和症状,包括但不限于食物通过食道以及可能口腔向后移动(反流),不与进食相关的胸痛,固体或液体吞咽困难,胃灼热,吐血,嗝声,久咳,打嗝,肺炎,骨痛,向食道中流血,以及重量减轻,医疗历史和身体检查,影像测试,胸部X射线,计算机断层摄影术(CT)扫描,磁共振成像(MRI)扫描,正电子发射断层摄影术(PET)扫描,骨扫描,痰细胞学分析,穿刺活检,支气管镜检查,支气管内超声,内窥镜食道超声,纵隔镜检查 and 纵隔切开术,胸腔穿刺术,胸腔镜检,免疫组织化学分析,分子测试,血液测试,钡吞咽,内窥镜超声,食道胃十二指肠镜检查(EGD)和活检,或由其获得的任何适合方法。

#### [0174] CDX2-KLF4信号传导路径

[0175] 如本文所用的术语“CDX2-KLF4信号传导路径”是指通过CDX2和/或KLF4,或通过直接或间接影响如本文所述的CDX2或KLF4的表达或活性来共同地起作用以控制一种或多种细胞功能的作用的一组生物分子。有时,CDX2和/或KLF4的表达水平和/或活性也被称为“CDX2-KLF4轴”。

[0176] CDX2,也称为尾型同源框2、CDX3、尾型同源框转录因子2、尾型同源框蛋白2或同源框蛋白CDX-2,是尾相关同源框转录因子基因家族的成员。所编码的蛋白质是细胞生长和分化中涉及的肠特异性基因的主要调控剂。这种蛋白质也在肠道的早期胚胎发育中起作用。这个基因的异常表达与肠炎症和肿瘤发生相关。与CDX2相关的疾病包括萎缩性胃炎和印戒细胞腺癌,并且在它的相关总路径之中的是VDR在调控骨质疏松中涉及的基因方面具有转录作用以及由Rho GTP酶达成对肌动蛋白细胞骨架的细胞骨架重塑调控。与这个基因相关的GO注解包括具有转录调控区序列特异性DNA结合性和序列特异性DNA结合转录因子活性。这个基因的一个重要旁系同源物是CDX1。它涉及于在肠上皮中表达的多个基因的转录调控中,并且在从早期分化直至维持小肠与大肠两者的肠上皮内衬的广泛范围的功能方面是重要的。先前报道了人CDX2的DNA和蛋白质序列,参见GenBank号NC\_000013.10、NC\_018924.2、NT\_024524.14、NP\_001256.3、ENSP00000370408以及Uniprot号Q99626,其各自出于所有目的以引用的方式整体并入本文。所述序列可用于设计通过为本领域技术人员所知的方式来检测和分析CDX2活性的水平的程序。在急性骨髓性白血病的大多数情况下,CDX2被异常表达,并且促进白血病生成(Scholl等, The Journal of Clinical Investigation, 17(4): 1037-1048),其中mRNA拷贝数在约30拷贝至约89,000拷贝之间变化。如本文所用,短语“CDX2基因被开启”或“CDX2活性处于开启中”是指人受试者中的CDX2的mRNA拷贝是至少约30拷贝。否则,CDX2基因被视为被关闭。

[0177] Krüppel样因子4 (KLF4),也称为胃肠Krüppel样因子4、EZF、GKLF、上皮锌指蛋白EZF、胃肠富集的Krueppel样因子、内皮Krüppel样锌指蛋白或Krueppel样因子4,与包括但不限于白血病、皮肤鳞状细胞癌和家族性腺瘤性息肉病的疾病相关。这个基因的一个重要旁系同源物是KLF1。KLF4可充当活化子与阻遏子两者。它结合5'-CACCC-3'核心序列,诸如它自身基因的启动子区域。它调控胚胎发育期间关键转录因子的表达,并且在维持胚胎干细胞方面以及在防止它们的分化方面起重要作用。它为建立皮肤的屏障功能以及为眼表面的出生后成熟和维持所需。它也涉及于上皮细胞的分化中,并且也可在骨骼和肾发育中起作用。它进一步促进p53/TP53转录的下调以及对p21的诱导。先前报道了人KLF4的DNA和蛋白质序列,参见GenBank号NC\_000009.11、NT\_008470.19、NC\_018920.2和Uniprot号043474,其各自出于所有目的以引用的方式整体并入本文。所述序列可用于设计通过为本领域技术人员所知的方式来检测和分析KLF4活性的水平的程序。

[0178] p21,也称为细胞周期素依赖性激酶抑制剂1A、Cip1、CDJN1、CIP1、WAF1、CAP20、MDA-6、SDI1、CDK相互作用蛋白1、CDK相互作用蛋白1、细胞周期素依赖性激酶抑制剂1、DNA合成抑制剂、黑素瘤分化相关蛋白、p21CIP、野生型P53活化的片段、mda6或PC11,编码强力周期素依赖性激酶抑制剂。编码的蛋白质结合细胞周期素-CDK2或细胞周期素-CDK4复合物并抑制其活性,并且因此充当在G1时细胞周期进展的调控剂。这个基因的表达由肿瘤抑制蛋白p53严密控制,通过p53,这个蛋白质介导应答于多种应激刺激物的p53依赖性细胞周期G1期阻滞。这个蛋白质可与作为DNA聚合酶辅助因子的增殖细胞核抗原(PCNA)相互作用,并且在S期DNA复制和DNA损伤修复中起调控作用。报道这个蛋白质由CASP3样半胱天冬酶特异性裂解,此因此导致CDK2显著活化,并且可有助于在半胱天冬酶活化之后执行凋亡。已发现这个基因的多种选择性剪接变体。先前报道了人p21的DNA和蛋白质序列,参见GenBank号NC\_000006.11、NT\_007592.15、NC\_018917.2和Uniprot号P38936,其各自出于所有目的以引用的方式整体并入本文。所述序列可用于设计通过为本领域技术人员所知的方式来检测和分析p21活性的水平的程序。

[0179] CDX2-KLF4信号传导路径的一些其它组分是H3K4脱甲基酶Jarid1b (KDM5B,也称为Plu-1或Rbp2-h1)、微小RNA miR-2909、肿瘤抑制子p53(也称为TP53或肿瘤蛋白(EC:2.7.1.37))、半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶半胱天冬酶-3、膜联蛋白V、B细胞CLL/淋巴瘤2(BCL2)、B细胞CLL/淋巴瘤3(BCL3)、BCL2相关X蛋白(BAX)、骨形态发生蛋白质(BMP)、Wnt(也称为鼠类int-1)、肝细胞核因子4 $\alpha$ (HNF4 $\alpha$ )、纤维母细胞生长因子(Fgf)、同源框(Hox)、转录因子SP1、转录因子MYC、细胞周期素D1(CCND1,也称为PRAD1)和凋亡拮抗性转录因子(AATF)。

[0180] 本发明的活性剂可调节CDX2KLF4信号传导路径中的一种或多种组分的活性。在一些实施方案中,活性剂是小分子。在一些实施方案中,活性剂是多肽,诸如抗体。在一些实施方案中,活性剂是多核苷酸,诸如siRNA。

[0181] 在一些实施方案中,活性剂调节CDX2-KLF4信号传导路径中的组分的基因拷贝数。在一些实施方案中,当相较于在治疗之前的基因拷贝数时,活性剂可使基因拷贝数增加或降低0.5倍、1.0倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、100倍、1000倍、10000倍或更多。

[0182] 在一些实施方案中,活性剂调节CDX2-KLF4信号传导路径中的组分的mRNA丰度。在

一些实施方案中,当相较于在治疗之前的mRNA丰度时,活性剂可使mRNA丰度增加或降低0.5倍、1.0倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、100倍、1000倍、10000倍或更多。

[0183] 在一些实施方案中,活性剂调节CDX2-KLF4信号传导路径中的组分的蛋白质水平。在一些实施方案中,当相较于在治疗之前的蛋白质水平时,活性剂可使蛋白质水平增加或降低0.5倍、1.0倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、100倍、1000倍、10000倍或更多。

[0184] 在一些实施方案中,活性剂调节CDX2-KLF4信号传导路径中的组分的mRNA和/或蛋白质稳定性。在一些实施方案中,当相较于在治疗之前的稳定性时,活性剂可使稳定性增加或降低。

[0185] 在一些实施方案中,活性剂调节CDX2-KLF4信号传导路径中的组分的酶活性。在一些实施方案中,当相较于在治疗之前的稳定性时,活性剂可使酶活性增加或降低。

[0186] CDX2-KLF4信号传导路径中的组分的活性可通过为本领域技术人员所知的任何适合方法来测定。在一些实施方案中,从受试者获取生物样本并对其进行分析。在一些实施方案中,接着测定生物样本中CDX2-KLF4信号传导路径中的组分的活性,诸如基因扩增数、RNA、mRNA、cDNA、crRNA、蛋白质等。

[0187] 在一些实施方案中,来自生物样本的mRNA直接用于测定活性水平。在一些实施方案中,通过杂交来测定水平。在一些实施方案中,使用本领域中已知的方法使RNA转化成cDNA(互补DNA)。在一些特定实施方案中,将cDNA用荧光标记或其它可检测标记加以标记。接着使cDNA与含有多种目标探针的基质杂交。目标探针通常在严格杂交条件下与基因标志的至少一个DNA序列杂交。在某些实施方案中,多种探针能够在杂交条件下与源于基因生物标志物的序列杂交。在一些实施方案中,条件包括在65℃下使用6×SSC(0.9M NaCl、0.09M 柠檬酸钠,pH 7.4)。探针可包括核酸。术语“核酸”涵盖已知核苷酸类似物或修饰的骨架残基或键联,其是合成的,天然存在的,以及非天然存在的,其与参照核酸具有类似结合性质,并且其以与参照核苷酸类似的方式被代谢。所述类似物的实例包括但不限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、甲基膦酸酯、手性甲基膦酸酯、肽-核酸(PNA)。用于检测的方法可包括但不限于RT-PCR、RNA印迹分析、基因表达分析、微阵列分析、基因表达芯片分析、杂交技术(包括FISH)、表达珠粒芯片阵列和色谱法以及本领域中已知的任何其它技术。用于检测DNA的方法可包括但不限于PCR、实时PCR、数字PCR、杂交(包括FISH)、微阵列分析、SNP检测测定、SNP基因型测定和色谱法以及本领域中已知的任何其它技术。

[0188] 在一些实施方案中,蛋白质表达水平用于确定活性水平。CDX2-KLF4信号传导路径中的组分的蛋白质表达水平可通过为本领域技术人员所知的任何适合方法来测定。可使用任何适合的蛋白质检测、量化和比较方法,诸如Tschesche(*Methods in Protein Biochemistry*, ISBN Walter de Gruyter, 2011, ISBN 3110252368, 9783110252361)、Goluch等(*Chip-based detection of protein cancer markers*, proQuest, 2007, ISBN 0549463453, 9780549463450)、Speicher(*Proteome Analysis: Interpreting the Genome*, Elsevier, 2004, ISBN 0080515304, 9780080515304)、Albala等(*Protein Arrays, Biochips and Proteomics*, CRC Press, 2003, ISBN 0203911121, 9780203911129)、Walker(*The Protein Protocols Handbook*, Springer, 2002, ISBN 0896039404, 9780896039407)、Fung

(Protein Arrays:Methods and Protocols, Springer, 2004, ISBN 1592597599, 9781592597598) 和 Bienvenut (Acceleration and Improvement of Protein Identification by Mass Spectrometry, Springer, 2005, ISBN 1402033184, 9781402033186) 中所述的那些, 所述书籍各自出于所有目的以引用的方式整体并入本文。在一些实施方案中, 通过免疫组织化学分析 (IHC)、蛋白质印迹、蛋白质免疫染色、蛋白质免疫沉淀、免疫电泳、免疫印迹、BCA 测定、分光光度测定法、质谱测定法或酶测定或其组合来检测和测量生物标志物的蛋白质表达水平。对于与检测、定量和比较生物标志物水平相关的其它方法, 参见例如 Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, Frederick M. 编 (2010); Current Protocols in Protein Science 最新版, Coligan, John E. 等编 (2010); Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, Egli, Martin 编 (2010); Current Protocols in Bioinformatics, Baxevanis, Andreas D. 编 (2010); 以及 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3版, Sambrook, Joseph (2001), 其全部以引用的方式整体并入本文。

[0189] 在一些实施方案中, CDX2-KLF4 信号传导路径中的组分的抗体可用作活性剂。在一些实施方案中, CDX2-KLF4 信号传导路径中负性控制 KLF4 和/或 p21 的组分或 CDX2-KLF4 信号传导路径中由 KLF4 和/或 p21 负性控制的组分的抗体可用作活性剂。举例来说, CDX2 的抗体可用于治疗本发明的癌症。

[0190] 在一些实施方案中, CDX2-KLF4 信号传导路径中的组分的抗体可用于检测所述组分的蛋白质水平。在一些实施方案中, 使用检测试剂盒。所述抗体和试剂盒可从 EMD Millipore、OriGene Custom Assay Services、R&D Systems for biochemical assays、GenScript Custom Assay Services、Enzo Life Sciences for kits&assays、Cloud-Clone Corp. ELISAs 或 Cloud-Clone Corp. CLIAs 获得。如本文所用的术语“抗体”意图包括单克隆抗体、多克隆抗体和嵌合抗体。抗体可来自重组来源和/或在转基因动物中产生。如本文所用的术语“抗体片段”意图包括 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、dsFv、ds-scFv、二聚体、微抗体、双链抗体及其多聚体和生物特异性抗体片段。抗体可使用常规技术加以片段化。举例来说, F(ab')<sub>2</sub> 片段可通过用胃蛋白酶处理抗体来产生。可处理所得 F(ab')<sub>2</sub> 片段以还原二硫桥来产生 Fab' 片段。木瓜蛋白酶消化可导致形成 Fab 片段。Fab、Fab' 及 F(ab')<sub>2</sub>、scFv、dsFv、ds-scFv、二聚体、微抗体、双链抗体、生物特异性抗体片段和其它片段也可通过重组技术合成。

[0191] 根据本发明进行的免疫测定可为均质测定或非均质测定。在均质测定中, 免疫反应通常涉及特异性抗体、标记的分析物和目标样本。在抗体与标记的分析物结合后, 由标记产生的信号被直接或间接改变。免疫反应与其程度检测两者均可在均质溶液中进行。可采用的免疫化学标记包括自由基、放射性同位素、荧光染料、酶、噬菌体或辅酶。

[0192] 在非均质测定方法中, 试剂通常是样本、抗体和用于产生可检测信号的手段。可使用如上所述的样本。可将抗体固定在载体, 诸如珠粒 (诸如蛋白 A 和蛋白 G 琼脂糖珠粒)、板或载片上, 并且在液相中与被怀疑含有抗原的试样接触。接着使载体与液相分离, 并且采用用于产生可检测信号的手段检查载体相或液相的所述信号。信号与样本中分析物的存在相关。用于产生可检测信号的手段包括使用放射性标记、荧光标记或酶标记。举例来说, 如果待检测的抗原含有第二结合位点, 那么可使结合那个位点的抗体缀合于可检测基团, 并且

在分离步骤之前添加至液相反应溶液中。在固体载体上存在可检测基团指示在测试样本中存在抗原。适合的免疫测定的实例包括但不限于寡核苷酸、免疫印迹、免疫沉淀、免疫荧光方法、化学发光方法、电化学发光 (ECL) 或酶联免疫测定。

[0193] 本领域技术人员将熟悉可适用于执行本文公开的方法的众多特异性免疫测定形式及其变化形式。大体上参见E. Maggio, Enzyme-Immunoassay, (1980) (CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.); 也参见美国专利号4,727,022、美国专利号4,659,678、美国专利号4,376,110、美国专利号4,275,149、美国专利号4,233,402、美国专利号4,230,767,其各自出于所有目的以引用的方式整体并入本文。

[0194] 可根据已知技术,诸如被动结合来使抗体缀合于适于诊断测定的固体载体(例如,珠粒(诸如蛋白A或蛋白G琼脂糖)、微球体、板、载片或孔,由诸如乳胶或聚苯乙烯的材料形成)。同样可根据已知技术使如本文所述的抗体缀合于检测标记或基团,诸如放射性标记(例如,35S、125I、131I)、酶标记(例如,辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶)和荧光标记(例如,荧光素、Alexa、绿色荧光蛋白、若丹明(rhodamine))。

[0195] 抗体也可适用于检测蛋白质、多肽、突变和多态性的翻译后修饰,诸如酪氨酸磷酸化、苏氨酸磷酸化、丝氨酸磷酸化、糖基化(例如,0-GlcNAc)。所述抗体特异性检测一种或多种目标蛋白质中的磷酸化氨基酸,并且可用于本文所述的免疫印迹、免疫荧光和ELISA测定中。这些抗体为本领域技术人员所熟知,并且可商购获得。也可在反射器基质辅助激光解吸离子化-飞行时间质谱测定法(MALDI-TOF)中使用亚稳态离子测定翻译后修饰(Wirth,U.等(2002)Proteomics2(10):1445-51)。

[0196] 在一些实施方案中,可将检测试剂固定在诸如多孔带材的固体基质上以形成至少一个检测位点。在一些实施方案中,利用多核苷酸或多肽阵列或微阵列,其含有与生物标志物的核苷酸或多肽杂交的多种检测剂。或者,基质阵列可处于例如固体基材,例如如美国专利号5,744,305中所述的“芯片”上。或者,基质阵列可为溶液阵列。

[0197] 用于检测CDX2-KLF4信号传导路径中的组分的组合物和方法的非限制性实例描述于美国专利号4762706、5081230、5300631、5443956、7695926、7785817、7479376、7364868以及美国专利公布号20050196793、20110281277、20120251509、20050186642、20140011279、20110171221、20040235073、20130011411和20130034862中,所述专利各自出于所有目的以引用的方式整体并入本文。

#### [0198] 抗癌组合物

[0199] 可用于本发明中的抗癌组合物包含至少一种活性剂。在一些实施方案中,活性剂可调节CDX2-KLF4信号传导路径的活性。如本文所用,术语“调节”是指组合物可增加、降低、消除、增强、延迟、减小或阻断CDX2-KLF4信号传导路径中的组分的活性。在一些实施方案中,在人受试者中,化合物可降低CDX2活性,和/或增加KLF4活性。在一些实施方案中,化合物可增加或降低信号传导路径中的一种或多种上游或下游组分的活性。在一些实施方案中,化合物可增加一种或多种由KLF4正性调控的下游组分(例如,p21)的活性,或降低信号传导路径中的一种或多种由KLF4负性调控的下游组分(例如,SP1)的活性。在一些实施方案中,化合物可降低一种或多种由CDX2正性调控的下游组分的活性,或增加信号传导路径中的一种或多种由CDX2负性调控的下游组分的活性。

[0200] 在不希望受任何特定理论束缚下,本发明的抗癌剂可通过一种或多种机理起作



用。所述机理包括但不限于：(1) 抑制CDX2活性；(2) 诱导KLF4活性；(3) 诱导p21CDK抑制剂；(4) 诱导G1/S细胞周期阻滞；(5) 诱导半胱天冬酶3；以及(6) 诱导凋亡。

[0201] 活性剂可为化学化合物或组合物、生物分子或其组合。在一些实施方案中，活性剂是小分子。如本文所用，术语“小分子”是指分子量小于500MW的分子，其中药物是非肽基或肽药剂。在一些实施方案中，活性剂是抗体。在一些实施方案中，活性剂是抗体。在一些实施方案中，活性剂是多核苷酸，诸如siRNA。

[0202] 在一些实施方案中，活性剂含有一种或多种可例如在DNA、RNA、蛋白质水平或其组合水平上抑制或降低CDX2的活性的实体。

[0203] 在一些实施方案中，活性剂含有一种或多种可降低、抑制或延迟CDX2-KLF4信号传导路径中负性调控KLF4或由KLF4负性调控的组分的活性的抗体。在一些实施方案中，组分可为CDX2、p53、p21、半胱天冬酶-3、膜联蛋白V、BAX、BCL2、BCL3、BMP、Wnt、HNF4 $\alpha$ 、Fgf、Hox、SP1、MYC、CCND1或AATF。在一些实施方案中，活性剂是抗体。在一些实施方案中，活性剂是siRNA。举例来说，抗CDX2剂是抗CDX2抗体。根据本发明，抗CDX2抗体至少包含一个或多个抗CDX2CDR。

[0204] 举例来说，反义RNA、核糖酶、dsRNAi、RNA干扰(RNAi)技术可在本发明中用于靶向CDX2-KLF4信号传导路径中的一种或多种组分的RNA转录物。反义RNA技术涉及在细胞中表达或向细胞中引入与见于细胞中特定mRNA中的序列互补或反义的RNA分子(或RNA衍生物)。通过与mRNA缔合，反义RNA可抑制所编码的基因产物的翻译。举例来说，抗CDX2剂可为小干扰RNA分子，诸如由Wang等(“siRNA targeting of Cdx2 inhibits growth of human gastric cancer MGC-803 cells”, *World J Gastroenterol.* 2012年4月28日; 18(16):1903-1914.)公开的那些。

[0205] RNA干扰(RNAi)是动物和植物中，由在序列方面与沉默的基因同源的双链RNA(dsRNA)引发的序列特异性转录后基因沉默或转录基因沉默的过程。RNAi技术例如讨论于Elbashir等, *Methods Enzymol.* 26:199 (2002); McManus和Sharp, *Nature Rev. Genetics* 3: 737 (2002); PCT申请WO 01/75164; Martinez等, *Cell* 110:563 (2002); Elbashir等(上文); Lagos-Quintana等, *Curr. Biol.* 12:735 (2002); Tuschl等, *Nature Biotechnol.* 20:446 (2002); Tuschl, *Chembiochem.* 2:239 (2001); Harborth等, *J. Cell Sci.* 114:4557 (2001); 等, *EMBO J.* 20:6877 (2001); Lagos-Quintana等, *Science* 294:8538 (2001); Hutvagner等, *loc cit.* 834; Elbashir等, *Nature* 411:494 (2001) 中。

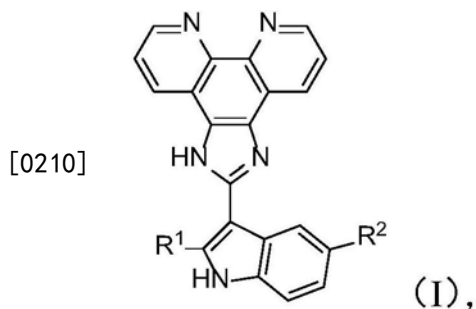
[0206] 术语“dsRNA”或“dsRNA分子”或“双链RNA效应物分子”是指含有呈双链构象的至少约19个或更多个核苷酸的区域的至少部分双链核糖核酸分子。双链RNA效应物分子可为由两个单独RNA链形成的双链体双链RNA，或它可为具有能够采用至少部分双链发夹构象的自身互补性区域的单一RNA链(即发夹dsRNA或茎-环dsRNA)。在各个实施方案中，dsRNA完全由核糖核苷酸组成，或由核糖核苷酸和脱氧核苷酸的混合物，诸如RNA/DNA杂交物组成。dsRNA可为具有自身互补性区域的单一分子，以致所述分子的一个区段中的核苷酸与所述分子的另一区段中的核苷酸碱基配对。在一个方面，自身互补性区域由具有至少约3-4个核苷酸或约5、6、7、9至15个核苷酸或更多个核苷酸，与分子的另一部分缺乏互补性，并且因此保持单链的区域(即“环区域”)连接。这种分子将采用部分双链茎-环结构，任选具有短单链5'末端和/或3'末端。在一个方面，发夹dsRNA的自身互补性区域或双链体dsRNA的双链区域将包含

效应物序列和效应物互补序列(例如,在发夹dsRNA中由单链环区域连接)。效应物序列或效应物链是双链区域或双链体的并入RISC中或与RISC缔合的那个链。在一个方面,双链RNA效应物分子将包含至少19个连续核苷酸的效应物序列,优选是19至29、19至27、或19至21个核苷酸,所述序列是靶标基因的RNA的反向互补序列、或所述靶标基因的相对链复制中间体、或反基因组正链或非mRNA正链序列。

[0207] 在一些实施方案中,本发明的dsRNA效应物分子是“发夹dsRNA”、“dsRNA发夹”、“短发夹RNA”或“shRNA”,即小于约400至500个核苷酸(nt)或小于100至200nt的RNA分子,其中至少一个至少15至100个核苷酸(例如17至50nt、19至29nt)的链段与位于相同RNA分子(单一RNA链)上的互补序列碱基配对,并且其中所述序列和互补序列由至少约4至7个核苷酸(或约9至约15nt、约15至约100nt、约100至约1000nt),在由两个碱基互补性区域产生的茎结构上方形成单链环的未配对区域分隔。shRNA分子包含至少一个茎-环结构,其包含约17至约100bp;约17至约50bp;约40至约100bp;约18至约40bp;或约19至约29bp;与待抑制的靶标序列同源和互补的双链茎区域;以及至少约4至7个核苷酸、或约9至约15个核苷酸、约15至约100nt、约100至约1000nt,在由两个碱基互补性区域产生的茎结构上方形成单链环的未配对环区域。然而,将认识到,并不严格必要包括“环区域”或“环序列”,因为包含某一序列,紧接着继之它的反向互补序列的RNA分子将倾向于采用茎-环构象,即使当不由无关“填充”序列分隔时也是这样。

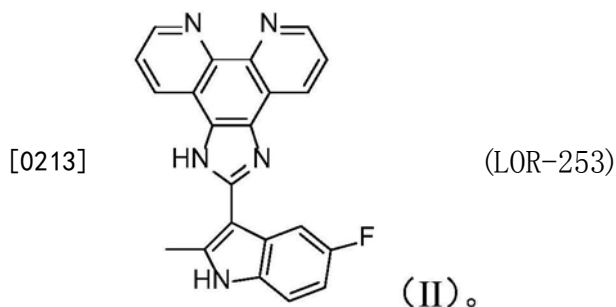
[0208] 在一些实施方案中,活性剂含有一种或多种可例如在DNA、RNA、蛋白质水平或其组合水平上增加KLF4的活性,或增加CDX2-KLF4信号传导路径中由KLF4正性调控的实体的活性,或增加可正性调控KLF4的实体的活性的实体。在一些实施方案中,本发明的活性剂是2-吡啶基咪唑并[4,5-d]菲咯啉衍生物,诸如美国专利号8,148,392或美国专利公布号2007/0123553A1中所述的那些,所述专利各自出于所有目的以引用的方式整体并入本文。

[0209] 在一些实施方案中,化合物具有式I的结构,或其盐:

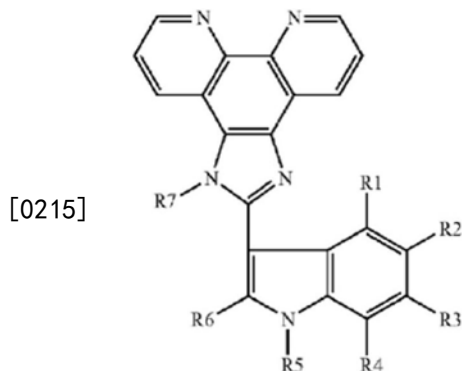


[0211] 其中R1是C1-C4烷基;并且R2是卤素。在一些实施方案中,R<sup>1</sup>是甲基、异丙基或叔丁基。

[0212] 在一些实施方案中,化合物具有式II的结构,或其盐:



[0214] 在一些实施方案中,化合物具有结构式(III),或其盐:

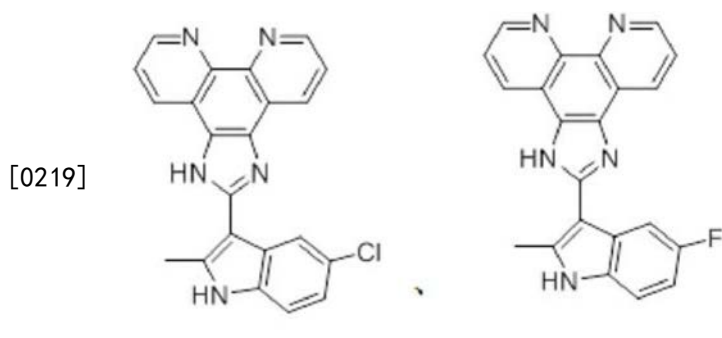


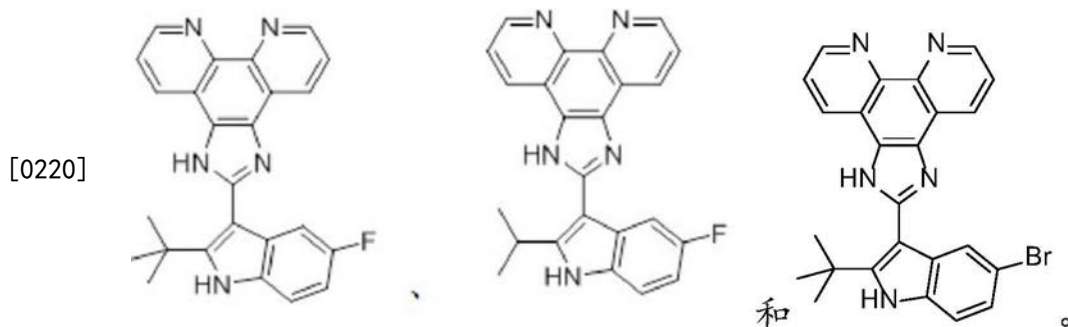
(III),

[0216] 其中:R1、R2、R3、R4、R6和R7独立地选自氢、卤素、羟基、硫醇、低级烷基、取代的低级烷基、低级烯基、取代的低级烯基、低级炔基、取代的低级炔基、烷氧基、烷基硫基、酰基、芳氧基、氨基、酰胺基、羧基、芳基、取代的芳基、杂环、取代的杂环、杂烷基、取代的杂烷基、杂芳基、取代的杂芳基、环烷基、取代的环烷基、硝基或氰基或-S(O)1-2R,其中R是烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、杂环、杂芳基、取代的杂环或取代的杂芳基;并且其中R5是H、烷基、取代的烷基、烯基、取代的烯基、炔基、取代的炔基、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、酰基、-CH2-芳基、-CH2-杂芳基。

[0217] 在一些实施方案中,R1、R2、R3、R4独立地是氢;卤素;C1-C4烷基;C1-C4烷氧基;或C6-C14芳基;R5是氢;C1-C4烷基;被C6-C14芳基取代的C1-C4烷基;或C4-C6环烷基;R6是氢;卤素;C1-C4烷基;被C5-C6杂环烷基取代的C1-C4烷基,其中杂原子是N;C6-C14芳基;被C1-C4烷基或卤代基取代的C6-C14芳基;C5-C6环烷基;C5-C6杂环烷基;或多环烷基。在一些其它实施方案中,R1、R2、R3、R4独立地是氢;卤素;C1-C4烷基;C1-C4烷氧基;或苯基;R5是氢;C1-C4烷基;被苯基取代的C1-C4烷基;或环戊基;R6是氢;卤素;C1-C4烷基;被C5-C6杂环烷基取代的C1-C4烷基,其中杂原子是N;苯基;被C1-C4烷基或卤代基取代的苯基;C5-C6环烷基;C5-C6杂环烷基;或金刚烷;并且R7是H。

[0218] 在一些实施方案中,所述化合物具有选自由以下组成的组的式:





[0221] 本发明的活性剂通常在施用之前加以配制。因此，本发明提供包含一种或多种本发明的活性剂的药物组合物。在一些实施方案中，药物组合物包含药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。使用熟知和可易于获得的成分，通过已知程序制备药物组合物。

[0222] 本发明的活性剂或包含活性剂的药物组合物可通过任何适合方法以剂量单位制剂形式施用，所述方法包括但不限于口服、局部、胃肠外、通过吸入或喷雾、或经直肠。在一个实施方案中，经胃肠外、癌旁侧、经粘膜、经皮、肌肉内、静脉内、皮内、皮下、腹膜内、室内、颅内和肿瘤内施用药物组合物。在一些实施方案中，剂量单位制剂含有常规无毒药学上可接受的载体、佐剂和媒介物。在通常疗程中，活性剂被并入可接受的媒介物中以形成用于向受影响区域局部施用的组合物，诸如疏水性或亲水性乳膏剂或洗剂；或形成适于口服、经直肠或胃肠外施用的形式，诸如糖浆、酏剂、片剂、锭剂、糖锭、硬质或软质胶囊、丸剂、栓剂、油性或水性混悬液、可分散粉末或颗粒剂、乳液、可注射剂或溶液。如本文所用的术语胃肠外包括但不限于皮下注射、皮内、关节内、静脉内、肌肉内、血管内、胸骨内、鞘内注射或输注技术。

[0223] 本发明也提供包含一种或多种本发明的活性剂以及媒介物的药物组合物，诸如人工膜囊泡（包括脂质体、脂质胶束等）、微粒或微胶囊。

[0224] 意图用于口服使用的组合物可以固体或流体单位剂型制备。流体单位剂型可根据本领域中已知用于制造药物组合物的程序制备，并且所述组合物可含有一种或多种选自甜味剂、调味剂、着色剂和防腐剂组成的组的试剂以提供药学上精致以及适口的制剂。通过连同芳香调味剂一起使用水醇性（例如乙醇）媒介物以及诸如糖和糖精的适合甜味剂来制备酏剂。可用水性媒介物，借助于诸如阿拉伯胶、黄蓍胶、甲基纤维素等的混悬剂制备混悬液。

[0225] 诸如片剂的固体制剂含有与适于制造片剂的无毒药学上可接受的赋形剂掺合的活性成分。这些赋形剂可为例如惰性稀释剂，诸如碳酸钙、碳酸钠、乳糖、磷酸钙或磷酸钠；粒化剂和崩解剂，例如玉米淀粉或海藻酸；粘合剂，例如淀粉、明胶或阿拉伯胶；和润滑剂，例如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石；以及其它常规成分，诸如磷酸二钙、硅酸铝镁、硫酸钙、淀粉、乳糖、甲基纤维素和功能类似物质。片剂可为未包覆的，或它们可通过已知技术包覆以延迟在胃肠道中的崩解和吸收，并且由此提供历经较长时期的持续作用。举例来说，可采用延时物质，诸如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。

[0226] 供口服使用的制剂也可呈现为硬质明胶胶囊，其中活性成分与惰性固体稀释剂，例如碳酸钙、磷酸钙或高岭土混合；或呈现为软质明胶胶囊，其中活性成分与水或油介质，例如花生油、液体石蜡或橄榄油混合。通过机器囊封化合物与可接受的植物油、轻质液体矿物或其它惰性油的浆液来制备软质明胶胶囊。

[0227] 水性混悬液含有与适于制造水性混悬液的赋形剂掺合的活性物质。所述赋形剂是混悬剂,例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄蓍胶和阿拉伯胶;分散剂或湿润剂可为天然存在的磷脂,例如卵磷脂;或氧化烯与脂肪酸的缩合产物,例如聚氧化乙烯硬脂酸酯;或氧化乙烯与长链脂族醇的缩合产物,例如十七烯氧基鲸蜡醇;或氧化乙烯与由脂肪酸和己糖醇获得的偏酯的缩合产物,诸如聚氧化乙烯山梨糖醇单油酸酯;或氧化乙烯与由脂肪酸和己糖醇酐获得的偏酯的缩合产物,例如聚乙烯脱水山梨醇单油酸酯。水性混悬液也可含有一种或多种防腐剂,例如对羟基苯甲酸乙酯或对羟基苯甲酸正丙酯;一种或多种着色剂;一种或多种调味剂或一种或多种甜味剂,诸如蔗糖或糖精。

[0228] 油性混悬液可通过将活性成分混悬于植物油(例如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油)中或矿物油(诸如液体石蜡)中来配制。油性混悬液可含有增稠剂,例如蜂蜡、固体石蜡或鲸蜡醇。可添加甜味剂(诸如上述那些)和调味剂以提供适口的口服制剂。这些组合物可通过添加诸如抗坏血酸的抗氧化剂来防腐。

[0229] 适于通过添加水来制备水性混悬液的可分散粉末和颗粒剂提供与分散剂或湿润剂、混悬剂和一种或多种防腐剂掺合的活性成分。适合的分散剂或湿润剂以及混悬剂由以上已提及的那些例示。也可存在其它赋形剂,例如甜味剂、调味剂和着色剂。

[0230] 本发明的药物组合物也可呈水包油乳液形式。油相可为植物油,例如橄榄油或花生油;或矿物油,例如液体石蜡;或这些油的混合物。适合的乳化剂可为天然存在的树胶,例如阿拉伯胶或黄蓍胶;天然存在的磷脂,例如大豆、卵磷脂;以及由脂肪酸和己糖醇获得的酯或偏酯;酐,例如脱水山梨醇单油酸酯;和所述偏酯与氧化乙烯的缩合产物,例如聚氧化乙烯脱水山梨醇单油酸酯。乳液也可含有甜味剂和调味剂。

[0231] 药物组合物可呈无菌可注射水性或油性混悬液形式。这个混悬液可根据已知技术,使用以上已提及的那些适合分散剂或湿润剂以及混悬剂配制。无菌可注射制剂也可用于无毒胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或混悬液,例如呈于1,3-丁二醇中的溶液形式。在可采用的可接受的媒介物和溶剂之中的是水、林格氏溶液(Ringer's solution)和等渗氯化钠溶液。此外,无菌不挥发性油常规用作溶剂或混悬介质。出于这个目的,可采用任何温和不挥发性油,包括合成甘油单酯或甘油二酯。此外,诸如油酸的脂肪酸适用于制备可注射剂。诸如局部麻醉剂、防腐剂和缓冲剂的佐剂也可包括在可注射溶液或混悬液中。

[0232] 在一些实施方案中,适合的递送系统包括定时释放、延迟释放、持续释放或控制释放递送系统。在一些实施方案中,本发明组合物可于控制释放系统,诸如维持释放基质中加以递送。维持释放基质的非限制性实例包括聚酯、水凝胶(例如,如由Langer等,1981, J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277以及Langer, 1982, Chem. Tech., 12:98-105所述的聚(甲基丙烯酸2-羟乙酯)、或聚(乙烯醇))、聚交酯(美国专利号3,773,919;EP 58,481)、L-谷氨酸和L-谷氨酸 $\gamma$ 乙酯的共聚物(Sidman等,1983, Biopolymers, 22:547-556)、非可降解乙烯-乙酸乙烯酯(Langer等(上文))、可降解乳酸-乙醇酸共聚物(诸如LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和乙酸亮丙瑞林(leuprolide acetate)组成的可注射微球体)) 和聚D-(-)-3-羟丁酸(EP 133,988)。在一些实施方案中,可使用静脉内输注、可植入渗透泵、经皮贴片、脂质体或其它施用模式施用组合物。在一个实施方案中,可使用泵(参见Langer(上

文); Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald等, Surgery 88:507 (1980); Saudek等, N. Engl. J. Med. 321:574 (1989)。在另一实施方案中, 可使用聚合材料。在另一实施方案中, 可接近于例如肝的治疗靶标放置控制释放系统, 由此仅需要全身性剂量的一部分(参见例如 Goodson, Medical Applications of Controlled Release, 上文, 第2卷, 第115-138页(1984))。其它控制释放系统讨论于由 Langer (Science 249:1527-1533 (1990)) 的综述中。

[0233] 在一些实施方案中, 组合物的释放以爆发方式发生。其中释放以爆发方式发生的系统的实例包括例如其中组合物包埋于囊封在聚合物基质中的脂质体中的系统, 其中脂质体对特定刺激(例如温度、pH、光或降解酶)敏感; 以及其中组合物由具有微胶囊核心降解酶的离子涂布微胶囊囊封的系统。

[0234] 在一些实施方案中, 组合物的释放是渐进的/连续的。其中抑制剂的释放是渐进和连续的系统的实例包括例如侵蚀系统, 其中组合物以某一形式含于基质内; 以及流出系统, 其中组合物例如通过聚合物以控制速率渗透。所述持续释放系统可例如呈丸粒或胶囊形式。

[0235] 根据本发明施用的组合物的其它实施方案并有针对性各种施用途径(诸如胃肠外、经肺、经鼻和口服)的颗粒形式、保护性包衣、蛋白酶抑制剂或渗透增强剂。

[0236] 本发明的药物组合物可以用于经直肠施用药物的栓剂形式共同或分开施用。这些组合物可通过混合药物与适合的非刺激性赋形剂来制备, 所述赋形剂在常温下是固体, 但在直肠温度下是液体, 并且因此将在直肠中融化以释放药物。所述材料包括可可脂和聚乙二醇。

[0237] 其它药物组合物和制备药物组合物的方法在本领域中是已知的, 并且例如描述于“Remington.: The Science and Practice of Pharmacy”(先前是“Remingtons Pharmaceutical Sciences”); Gennaro, A., Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. (2000) 中。

[0238] 视待治疗的癌症而定, 本发明的药物组合物可通过多种途径向受试者施用, 例如组合物可以剂量单位制剂形式口服、经表面、胃肠外、通过吸入或喷雾、或经直肠施用。在一个实施方案中, 例如通过向受试者的血流中团注或输注或通过口服施用来向受试者全身性施用化合物。当与一种或多种已知化学治疗剂联合使用时, 化合物可在施用化学治疗剂之前或之后施用, 或它们可并行施用。一种或多种化学治疗剂也可例如通过团注、输注或口服施用来全身性施用。

[0239] 本发明的药物组合物可作为新辅助疗法(针对于主要疗法)的一部分, 或作为辅助疗法方案的一部分加以使用。本发明预期本发明的药物组合物在肿瘤发展和进展中的各个阶段使用, 包括但不限于用于治疗晚期和/或侵袭性赘瘤形成(即受试者的不顺从通过局部治疗模式(诸如手术或放射疗法)来治愈的外显性疾病)、转移性疾病、局部晚期疾病和/或难治性肿瘤(即尚未对治疗响应的癌症或肿瘤)。如本文所用, 术语“主要疗法”是指在受试者中初始诊断出癌症后的第一线治疗。示例性主要疗法可涉及手术、广泛范围的化学疗法和放射疗法。“辅助疗法”是指在主要疗法之后, 并且向处于复发风险下的受试者施用的疗法。辅助全身性疗法通常在主要疗法之后马上开始以延迟复发, 延长存活期或治愈受试者。

[0240] 本发明的药物组合物可作为主要疗法或辅助疗法的一部分单独或与一种或多种

其它抗癌剂,诸如化学治疗剂组合使用。本发明的药物组合物和标准化学治疗剂的组合可发挥改进化学治疗剂的功效的作用,并且因此可用于改进标准癌症疗法。这个应用在治疗不对标准治疗起响应的抗药性癌症方面可为重要的。抗药性癌症可例如起因于肿瘤细胞群体的异质性、对化学疗法的响应的改变以及恶性潜力增加。所述变化在疾病晚期时常常更加显著。

[0241] 本发明的药物组合物可单独或与放射治疗剂组合使用。在一些实施方案中,以约40Gy至约80Gy的剂量施用放射治疗剂。在一些实施方案中,剂量是约50Gy至约70Gy,在一些实施方案中,剂量是约50Gy至约65Gy。在一些实施方案中,以约50Gy、约55Gy、约60Gy或约65Gy的剂量施用放射疗法。

[0242] 待施用的剂量不经受确定限制,但它将通常是有效量。基于摩尔数,它将通常是由剂量制剂在代谢释放活性游离药物以实现它的所需药理学作用和生理作用后产生的药理学活性游离形式的相等量。组合物可以单位剂型配制。术语“单位剂型”是指适合作为用于人受试者和其它哺乳动物的单一剂量的物理离散单元,各单元含有被计算以产生所需治疗作用的预定量的活性物质以及适合的药物赋形剂。

[0243] 在一些实施方案中,活性剂是具有本文所述的各式的结构化合物。然而,应了解待施用的化合物的实际量将由医师鉴于相关事项确定,所述事项包括待治疗的病状、所选施用途径、施用的实际化合物、个别患者的年龄、重量和响应、以及患者的症状的严重性。以上剂量范围仅通过举例方式给出,并且不意图以任何方式限制本发明的范围。在一些情况下,低于上述范围的下限的剂量水平可为绰绰有余的,而在其它情况下,可在不导致有害副作用下,例如通过首先将较大剂量分成用于全天施用的若干较小剂量来采用还要更大的剂量。

[0244] 用于特定个体的剂量可由本领域普通技术人员使用常规考虑事项(例如借助于适当常规药理学方案)确定。医师可例如首先指定相对较低剂量,随后递增剂量直至获得适当响应。视应用而定,向个体施用的剂量应足以随时间在个体中实现有益治疗响应,或例如应足以减轻症状或实现其它适当活性。剂量由特定制剂的功效、和组合物的活性、稳定性或血清半衰期及个体的病状、以及待治疗的个体的体重或表面积决定。剂量大小也由特定个体中伴随施用特定载体、制剂等的任何不利副作用的存在、性质和程度决定。

[0245] 在一些实施方案中,本发明化合物的剂量单位可为约0.001mg、约0.002mg、约0.003mg、约0.004mg、约0.005mg、约0.006mg、约0.007mg、约0.008mg、约0.009mg、约0.01mg、约0.02mg、约0.03mg、约0.04mg、约0.05mg、约0.06mg、约0.07mg、约0.08mg、约0.09mg、约0.1mg、约0.2mg、约0.3mg、约0.4mg、约0.5mg、约0.6mg、约0.7mg、约0.8mg、约0.9mg、约1mg、约2mg、约3mg、约4mg、约5mg、约6mg、约7mg、约8mg、约9mg、约10mg、约15mg、约20mg、约30mg、约35mg、约40mg、约45mg、约50mg、约60mg、约70mg、约80mg、约90mg、约100mg、约200mg、约300mg、约400mg、约500mg或更多。

[0246] 在一些实施方案中,本发明化合物的每天剂量将通常是每kg体重约0.001mg、约0.002mg、约0.003mg、约0.004mg、约0.005mg、约0.006mg、约0.007mg、约0.008mg、约0.009mg、约0.01mg、约0.02mg、约0.03mg、约0.04mg、约0.05mg、约0.06mg、约0.07mg、约0.08mg、约0.09mg、约0.1mg、约0.2mg、约0.3mg、约0.4mg、约0.5mg、约0.6mg、约0.7mg、约0.8mg、约0.9mg、约1mg、约2mg、约3mg、约4mg、约5mg、约6mg、约7mg、约8mg、约9mg、约10mg、约



15mg、约20mg、约30mg、约35mg、约40mg、约45mg、约50mg、约60mg、约70mg、约80mg、约90mg、约100mg、约200mg、约300mg、约400mg、约500mg或更多。可使用单次或分次剂量。

[0247] 在一些实施方案中,本发明的剂型在所述人受试者中有效提供至多约1pg/mL、约5pg/mL、约10pg/mL、约50pg/mL、约100pg/mL、约500pg/mL、约1ng/mL、约5ng/mL、约10ng/mL、约50ng/mL、约100ng/mL、约500ng/mL、约1μg/mL、约5μg/mL、约10μg/mL、约50μg/mL、约100μg/mL、约500μg/mL、约1mg/mL或大于1mg/mL的最大总血浆浓度的化合物游离碱等效物。

[0248] 在任何如本文所述的剂型的另一方面,剂型是口服剂型。在另一方面,剂型是静脉内剂型。剂型特别适于向人受试者施用以用于治疗任何本文所述的病症。在一些实施方案中,剂型是皮下剂型。

[0249] 也可使用包含一种或多种本文所述的化合物与一种或多种其它抗癌剂组合的药物组合物。所述联合治疗可通过用治疗的个别组分同时、依序或分开给药的方式来实现。

[0250] 在一些实施方案中,抗癌剂是化学治疗剂。在一些实施方案中,化学治疗剂选自烷基化剂、抗代谢剂、抗微管剂、拓扑异构酶抑制剂和细胞毒性抗生素。化学治疗剂的实例包括但不限于太平洋紫杉醇 (paclitaxel) (**Taxol®**)、多西他赛 (docetaxel) (**Taxotere®**)、顺铂 (cisplatin)、卡铂 (carboplatin) (**Paraplatin®**)、盐酸吉西他滨 (gemcitabine hydrochloride) (**Gemzar®**)、多柔比星 (doxorubicin)、依托泊苷 (etoposide) (**Etopophos®**、**Vepesid®**)、培美曲塞 (pemetrexed) (**Alimta®**)、拓扑替康 (topotecan) (**Hycamtin®**)、长春花碱 (vinblastine) (**Velbe®**)、长春地辛 (Vindesine) (**Eldisine®**)、长春瑞滨 (vinorelbine) (**Navelbine®**)、异环磷酰胺 (ifosfamide) (**Mitoxana®**)、丝裂霉素 (Mitomycin) 和吉西他滨。这些药剂可以组合形式给出,例如长春瑞滨和顺铂或卡铂;吉西他滨与顺铂或卡铂或太平洋紫杉醇;MIC (丝裂霉素、异环磷酰胺和顺铂);MVP (丝裂霉素、长春花碱和顺铂);以及EC (依托泊苷和卡铂)。适用化学治疗药物的实例包括但不限于羟基脲 (hydroxyurea)、白消安 (busulphan)、顺铂、卡铂、苯丁酸氮芥 (chlorambucil)、关法仑 (melphalan)、环磷酰胺 (cyclophosphamide)、异环磷酰胺、道诺霉素 (danorubicin)、多柔比星、表柔比星 (epirubicin)、米托蒽醌 (mitoxantrone)、长春新碱 (vincristine)、长春花碱、**Navelbine®** (长春瑞滨)、依托泊苷、替尼泊苷 (teniposide)、太平洋紫杉醇、多西他赛、吉西他滨、胞嘧啶、阿拉伯糖苷 (arabinoside)、博莱霉素 (bleomycin)、新制癌菌素 (neocarcinostatin)、苏拉明 (suramin)、泰素 (taxol)、丝裂霉素C (mitomycin C) 等。

[0251] 如本文所用,术语“烷基化剂”是指能够在受试者中使包括蛋白质、RNA和DNA的分子烷基化的药剂。烷基化剂的非限制性实例包括氮芥 (nitrogen mustard)、亚硝基脲 (nitrosourea)、四嗪 (tetrazine)、氮丙啶 (aziridine)、顺铂和衍生物、以及非经典烷基化剂。氮芥包括二氯甲基二乙胺 (mechlorethamine)、环磷酰胺、关法仑、苯丁酸氮芥、异环磷酰胺和白消安。亚硝基脲包括N-亚硝基-N-甲脲 (MNU)、卡莫司汀 (carmustine) (BCNU)、洛莫司汀 (lomustine) (CCNU) 和司莫司汀 (semustine) (MeCCNU)、福莫司汀 (fotemustine) 和链脲佐菌素 (streptozotocin)。四嗪包括达卡巴嗪 (dacarbazine)、米托唑胺 (mitozolomide) 和替莫唑胺 (temozolomide)。氮丙啶包括噻替派 (thiotepa)、丝裂霉素 (mytomycin) 和地吡醌 (diaziquone) (AZQ)。顺铂和衍生物包括顺铂、卡铂和奥沙利铂 (oxaliplatin)。它们通过与生物重要分子中的氨基、羧基、巯基和磷酸酯基团形成共价键来损害细胞功能。[20] 非



经典烷基化剂包括丙卡巴肼 (procarbazine) 和六甲蜜胺 (hexamethylmelamine)。

[0252] 如本文所用,术语“抗代谢剂”是指阻碍DNA、RNA或蛋白质合成的分子。在一些实施方案中,抗代谢剂类似于核碱基或核苷(无磷酸酯基团的核苷酸),但具有改变的化学基团。这些药物通过阻断为DNA合成所需的酶或变为并入DNA或RNA中来发挥它们的作用。通过抑制DNA合成中涉及的酶,它们阻止有丝分裂,因为DNA不能使它自身复制。此外,在分子错误并入DNA中之后,DNA损伤可发生,并且程序化细胞死亡(凋亡)被诱导。在一些实施方案中,抗代谢剂是抗叶酸剂、氟嘧啶、脱氧核苷类似物和硫代嘌呤。在一些实施方案中,抗代谢剂选自甲氨蝶呤、培美曲塞 (pemetrexed)、氟尿嘧啶 (fluorouracil)、卡培他滨 (capecitabine)、阿糖胞苷 (cytarabine)、吉西他滨、地西他滨 (decitabine)、维达扎 (Vidaza)、氟达拉滨 (fludarabine)、奈拉滨 (nelarabine)、克拉屈滨 (cladribine)、氯法拉滨 (clofarabine)、喷司他汀 (pentostatin)、硫鸟嘌呤 (thioguanine) 和巯基嘌呤 (mercaptopurine)。

[0253] 如本文所用,术语“抗微管剂”是指通过阻止微管功能来阻断细胞分裂的化学物质。所述药剂的代表性实例包括紫杉烷 (taxane) (例如太平洋紫杉醇 (以下更详细讨论) 和多西他赛) (Schiff等, *Nature* 277:665-667, 1979; Long和Fairchild, *Cancer Research* 54:4355-4361, 1994; Ringel和Horwitz, *J. Natl. Cancer Inst.* 83 (4) :288-291, 1991; Pazdur等, *Cancer Treat. Rev.* 19 (4) :351-386, 1993)、喜树碱 (camptothecin)、米托蒽醌、软珊瑚醇 (eleutherobin) (例如美国专利号5,473,057)、匍枝珊瑚醇 (sarcodictyin) (包括匍枝珊瑚醇A)、埃博霉素 (epothilone) A和B (Bollag等, *Cancer Research* 55:2325-2333, 1995)、盘皮海绵内酯 (discodermolide) (ter Haar等, *Biochemistry* 35:243-250, 1996)、氧化氘 (D20) (James和Lefebvre, *Genetics* 130 (2) :305-314, 1992; Sollott等, *J. Clin. Invest.* 95:1869-1876, 1995)、己二醇 (2-甲基-2,4-戊二醇) (Oka等, *Cell Struct. Funct.* 16 (2) :125-134, 1991)、杀结核菌素 (tubercidin) (7-脱氮腺苷) (Mooberry等, *Cancer Lett.* 96 (2) :261-266, 1995)、LY290181 (2-氨基-4-(3-吡啶基)-4H-茚并(1,2-b)吡喃-3-甲腈) (Panda等, *J. Biol. Chem.* 272 (12) :7681-7687, 1997; Wood等, *Mol. Pharmacol.* 52 (3) :437-444, 1997)、氟化铝 (Song等, *J. Cell. Sci. Suppl.* 14:147-150, 1991)、乙二醇双-(丁二酰亚胺基丁二酸酯) (Caplow和Shanks, *J. Biol. Chem.* 265 (15) :8935-8941, 1990)、甘氨酸乙酯 (Mejillano等, *Biochemistry* 31 (13) :3478-3483, 1992)、诺考达唑 (nocodazole) (Ding等, *J. Exp. Med.* 171 (3) :715-727, 1990; Dotti等, *J. Cell Sci.* 增刊15:75-84, 1991; Oka等, *Cell Struct. Funct.* 16 (2) :125-134, 1991; Weimer等, *J. Cell. Biol.* 136 (1) :71-80, 1997)、细胞松弛素B (cytochalasin B) (Illinger等, *Biol. Cell* 73 (2-3) :131-138, 1991)、秋水仙碱 (colchicine) 和CI 980 (Allen等, *Am. J. Physiol.* 261 (4Pt. 1) :L315-L321, 1991; Ding等, *J. Exp. Med.* 171 (3) :715-727, 1990; Gonzalez等, *Exp. Cell. Res.* 192 (1) :10-15, 1991; Stargell等, *Mol. Cell. Biol.* 12 (4) :1443-1450, 1992; Garcia等, *Anticancer Drugs* 6 (4) :533-544, 1995)、秋水仙胺 (colcemid) (Barlow等, *Cell. Motil. Cytoskeleton* 19 (1) :9-17, 1991; Meschini等, *J. Microsc.* 176 (Pt. 3) :204-210, 1994; Oka等, *Cell Struct. Funct.* 16 (2) :125-134, 1991)、鬼臼毒素 (podophyllotoxin) (Ding等, *J. Exp. Med.* 171 (3) :715-727, 1990)、苯来特 (benomyl) (Hardwick等, *J. Cell. Biol.* 131 (3) :709-720, 1995; Shero等, *Genes Dev.* 5 (4) :549-560,

1991)、氨磺乐灵(oryzalin)(Stargell等,Mol.Cell.Biol.12(4):1443-1450,1992)、巨鞘丝藻酰胺C(majusculamide C)(Moore,J.Ind.Microbiol.16(2):134-143,1996)、地关可辛(demecolcine)(Van Dolah和Ramsdell,J.Cell.Physiol.166(1):49-56,1996;Wiemer等,J.Cell.Biol.136(1):71-80,1997)、2-苯并咪唑氨基甲酸甲酯(MBC)(Brown等,J.Cell.Biol.123(2):387-403,1993)、LY195448(Barlow和Cabral,Cell Motil.Cytoskel.19:9-17,1991)、枯草杆菌蛋白酶(subtilisin)(Saoudi等,J.Cell Sci.108:357-367,1995)、1069C85(Raynaud等,Cancer Chemother Pharmacol.35:169-173,1994)、斯的甘辛(steganacin)(Hamel,Med.Res.Rev.16(2):207-231,1996)、考布他汀(combretastatins)(Hamel,Med Res.Rev.16(2):207-231,1996)、库瑞辛(curacins)(Hamel,Med.Res.Rev.16(2):207-231,1996)、雌二醇(estradiol)(Aizu-Yokata等,Carcinogen.15(9):1875-1879,1994)、2-甲氧雌二醇(Hamel,Med.Res.Rev.16(2):207-231,1996)、黄烷醇(flavanol)(Hamel,Med.Res.Rev.16(2):207-231,1996)、鱼藤酮(rotenone)(Hamel,Med Res.Re v.16(2):207-231,1996)、灰黄霉素(griseofulvin)(Hamel,Med Res.Rev.16(2):207-231,1996)、长春花生物碱,包括长春花碱和长春新碱(Ding等,J.Exp.Med 171(3):715-727,1990;Dirk等,Neurochem.Res.15(11):1135-1139,1990;Hamel,Med.Res.Rev.16(2):207-231,1996;Illinger等,Biol.Cell 73(2-3):131-138,1991;Wiemer等,J.Cell.Biol.136(1):71-80,1997)、关登木素(maytansinoid)和安丝菌素(ansamitocin)(Hamel,Med Res.Re v.16(2):207-231,1996)、根霉素(rhizoxin)(Hamel,Med.Res.Re v.16(2):207-231,1996)、拟茎点霉毒素A(phomopsin A)(Hamel,Med.Res.Re v.16(2):207-231,1996)、稻曲菌素(ustiloxin)(Hamel,Med.Res.Re v.16(2):207-231,1996)、多拉司他汀10(dolastatin 10)(Hamel,Med Res.Re v.16(2):207-231,1996)、多拉司他汀15(Hamel,Med.Res.Re v.16(2):207-231,1996)、大田软海绵素(halichondrin)和哈里司汀(halistatin)(Hamel,Med.Res.Rev.16(2):207-231,1996)、海绵抑制素(spongistatin)(Hamel,Med.Res.Rev.16(2):207-231,1996)、念珠藻素(cryptophycin)(Hamel,Med.Res.Rev.16(2):207-231,1996)、rhazinilam(Hamel,Med.Res.Rev.16(2):207-231,1996)、甜菜碱(betaine)(Hashimoto等,Zool.Sci.1:195-204,1984)、牛磺酸(Hashimoto等,Zool.Sci.1:195-204,1984)、羟乙基磺酸盐(Hashimoto等,Zool.Sci.1:195-204,1984)、H0-221(Ando等,Cancer Chemother Pharmacol.37:63-69,1995)、阿多西亚硫酸盐-2(adociasulfate-2)(Sakowicz等,Science 280:292-295,1998)、雌氮芥(estramustine)(Panda等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:10560-10564,1997)、单克隆抗独特型抗体(Leu等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91(22):10690-10694,1994)、微管组装促进蛋白(泰素样蛋白TALP)(Hwang等,Biochem.Biophys.Res.Commun.208(3):1174-1180,1995)、由低渗(190mosmol/L)条件:胰岛素(100mmol/L)或谷氨酰胺(10mmol/L)诱导的细胞肿胀(Haussinger等,Biochem.Cell.Biol.72(1-2):12-19,1994)、动力蛋白(dynein)结合剂(Ohba等,Biochim.Biophys.Acta 1158(3):323-332,1993)、赤霉素(gibberelin)(Mita和Shibaoka,Protoplasma 119(1/2):100-109,1984)、XCHOI(驱动蛋白样蛋白)(Yonetani等,Mol.Biol.Cell 7(增刊):211A,1996)、溶血磷脂酸(lysophosphatidic acid)(Cook等,Mol.Biol.Cell 6(增刊):260A,1995)、锂离子(Bhattacharyya和Wolff,Biochem.Biophys.Res.Commun.73(2):383-390,1976)、植物细胞

壁组分(例如,聚L-赖氨酸和伸展蛋白(extensin))(Akashi等,Planta 182(3):363-369,1990)、甘油缓冲剂(Schilstra等,Biochem.J.277(Pt.3):839-847,1991;Farrell和Keates,Biochem.Cell.Biol.68(11):1256-1261,1990;Lopez等,J.Cell.Biochem.43(3):281-291,1990)、曲通X-100(Triton X-100)微管稳定缓冲剂(Brown等,J.Cell Sci.104(Pt.2):339-352,1993;Safiejko-Mroccka和Bell,J.Histochem.Cytochem.44(6):641-656,1996)、微管相关蛋白(例如,MAP2、MAP4、 $\tau$ 蛋白、大 $\tau$ 蛋白、上皮细胞微管相关蛋白7(ensconsin)、延伸因子-1- $\alpha$ (EF-1 $\alpha$ )和E-MAP-115)(Burgess等,Cell Motil.Cytoskeleton 20(4):289-300,1991;Saoudi等,J.Cell.Sci.108(Pt.1):357-367,1995;Bulinski和Bossler,J.Cell.Sci.107(Pt.10):2839-2849,1994;Ookata等,J.Cell Biol.128(5):849-862,1995;Boyne等,J.Comp.Neurol 358(2):279-293,1995;Ferreira和Caceres,J.Neurosci.11(2):392-400,1991;Thurston等,Chromosoma 105(1):20-30,1996;Wang等,Brain Res.Mol.Brain Res.38(2):200-208,1996;Moore和Cyr,Mol.Biol.Cell 7(增刊):221-A,1996;Masson和Kreis,J.Cell Biol.123(2):357-371,1993)、细胞实体(例如,组蛋白H1、髓磷脂碱性蛋白和动粒)(Saoudi等,J.Cell.Sci.108(Pt.1):357-367,1995;Simerly等,J.Cell Biol.111(4):1491-1504,1990)、内源性微管结构(例如,轴丝结构、栓(plug)和GTP帽)(Dye等,Cell Motil.Cytoskeleton 21(3):171-186,1992;Azhar和Murphy,Cell Motil.Cytoskeleton 15(3):156-161,1990;Walker等,J.Cell Biol.114(1):73-81,1991;Drechsel和Kirschner,Curr.Biol.4(12):1053-1061,1994)、稳定性小管惟一多肽(例如,STOP145和STOP220)(Pirollet等,Biochim.Biophys.Acta 1160(1):113-119,1992;Pirollet等,Biochemistry 31(37):8849-8855,1992;Bosc等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93(5):2125-2130,1996;Margolis等,EMBO J.9(12):4095-4102,1990)和由有丝分裂力引起的拉伸(Nicklas和Ward,J.Cell Biol.126(5):1241-1253,1994)以及以上任一个的任何类似物和衍生物。所述化合物可通过使微管解聚(例如,秋水仙碱和长春花碱),或通过使微管形成稳定(例如,太平洋紫杉醇)来起作用。

[0254] 在一些实施方案中,抗肿瘤剂包括有丝分裂抑制剂,例如长春花生物碱衍生物,诸如长春花碱、长春瑞滨、长春地辛(vindesine)和长春新碱;秋水仙碱、别秋水仙碱(allochochine)、软海绵素(halichondrine)、N-苯甲酰基三甲基-甲基醚秋水仙酸、多拉司他汀10、关登素(maytansine)、根霉素(rhizoxine)、紫杉烷(诸如泰素(太平洋紫杉醇)、多西他赛(泰索帝(Taxotere))、2'-N-[3-(二甲基氨基)丙基]葡萄糖紫杉醇酯(泰素衍生物))、硫代秋水仙碱(thiocholchicine)、三苯甲基半胱氨酸、替尼泊苷、甲氨蝶呤、咪唑硫嘌呤(azathioprine)、氟尿嘧啶、阿糖胞苷(cytocine arabinoside)、2'2'-二氟脱氧胞苷(吉西他滨)、阿霉素(adriamycin)和丝裂霉素(mitomycin)。烷基化剂,例如顺铂、卡铂、氧铂(oxiplatin)、异丙铂(iproplatin)、N-乙酰基-DL-肌氨酰基-L-亮氨酸的乙酯(阿赛勒(Asaley)或阿赛勒克斯(Asalex))、14-环己二烯-1,4-二氨基甲酸、2,5-双(1-氮杂环丙烷基)-3,6-二氧代-二乙酯(亚丝醌(diaziquone))、1,4-双(甲磺酰氧基)丁烷(白消安(bisulfan)或亮硫凡(leucosulfan))、氯脲菌素(chlorozotocin)、克洛关酮(clomesone)、氰基吗啉代多柔比星(cyanomorpholinodoxorubicin)、环迪松(cyclodisone)、二脱水卫矛醇(dianhydroglactitol)、氟多潘(fluorodopan)、亥舒凡(hepsulfam)、丝裂霉素C、羟甲硫蒽酮丝裂霉素C(hycantheonemitomycin C)、米托唑胺(mitozolamide)、1-(2-氯乙基)-4-

(3-氯丙基)-哌嗪二盐酸盐、哌嗪二酮、哌泊溴烷 (pipobroman)、波福霉素 (porfiromycin)、螺乙内酰脲芥 (spirohydantoin mustard)、环氧三嗪酮 (teroxirone)、四铂 (tetraplatin)、噻替派、三亚乙基蜜胺、尿嘧啶氮芥、双(3-甲磺酰氧基丙基)胺盐酸盐、丝裂霉素、亚硝基脲药剂(诸如环己基-氯乙基亚硝基脲、甲基环己基-氯乙基亚硝基脲、1-(2-氯乙基)-3-(2,6-二氧化-3-哌啶基)-1-亚硝基-脲、双(2-氯乙基)亚硝基脲)、丙卡巴肼、达卡巴嗪、氮芥相关化合物(例如二氯甲基二乙胺、环磷酰胺、异环磷酰胺、关法仑、苯丁酸氮芥、雌氮芥磷酸钠)、链佐星 (strptozoin) 和替莫唑胺 (temozolamide)。DNA抗代谢剂,例如5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷、羟基脲、2-[(3-羟基-2-吡啶基)亚甲基]-胍硫代甲酰胺、脱氧氟尿苷 (deoxyfluorouridine)、5-羟基-2-甲酰基吡啶缩氨基硫脲、 $\alpha$ -2'-脱氧-6-硫代鸟苷、甘氨酸阿非迪霉素 (aphidicolin glycinate)、5-氮杂脱氧胞苷、 $\beta$ -硫鸟嘌呤脱氧核苷、环胞苷、胍唑 (guanazole)、肌苷乙二醇二醛、麦克白素 (macbecin) II、吡唑咪唑、克拉屈滨、喷司他汀、硫鸟嘌呤、巯基嘌呤、博来霉素、2-氯脱氧腺苷、胸苷酸合成酶的抑制剂,例如雷替曲塞 (raltitrexed) 和培美曲塞二钠 (pemetrexed disodium)、氯法拉滨 (clofarabine)、氟尿苷及氟达拉滨。DNA/RNA抗代谢剂,例如L-丙氨酸 (L-alanosine)、5-氮杂胞苷、阿西维辛 (acivicin)、氨基蝶呤 (aminopterin) 及其衍生物,诸如N-[2-氯-5-[[ (2,4-二氨基-5-甲基-6-喹唑啉基) 甲基]氨基]苯甲酰基]-L-天冬氨酸、N-[4-[[ (2,4-二氨基-5-乙基-6-喹唑啉基) 甲基]氨基]苯甲酰基]-L-天冬氨酸、N-[2-氯-4-[[ (2,4-二氨基-5-乙基-6-喹唑啉基) 甲基]氨基]苯甲酰基]-L-天冬氨酸、可溶性贝克氏抗叶酸剂 (Baker's antifol)、二氯烯丙基指甲花醌 (dichloroallyl lawsone)、布喹那 (brequinar)、替加氟 (ftoraf)、二氢-5-氮杂胞苷、甲氨基蝶呤、N-(膦乙酰基)-L-天冬氨酸四钠盐、吡唑并咪唑、三甲曲沙 (trimetrexate)、光神霉素 (plicamycin)、放线菌素D、念珠藻素及类似物,诸如念珠藻素-52或例如欧洲专利申请号239362中公开的优选抗代谢剂中的一个,诸如N-(5-[N-(3,4-二氢-2-甲基-4-氧代喹唑啉-6-基甲基)-N-甲基氨基]-2-噻吩甲酰基)-L-谷氨酸;生长因子抑制剂;细胞周期抑制剂;插入性抗生素,例如阿霉素和博来霉素;蛋白质,例如干扰素;以及抗激素剂,例如抗雌激素剂,诸如Nolvadex<sup>TM</sup> (他莫西芬 (tamoxifen)),或例如抗雄激素剂,诸如Casodex<sup>TM</sup> (4'-氰基-3-(4-氟苯基磺酰基)-2-羟基-2-甲基-3'-(三氟甲基)丙酰苯胺)。

[0255] 如本文所用,术语“拓扑异构酶抑制剂”是指可调节拓扑异构酶I和/或拓扑异构酶II的活性的药剂。在一些实施方案中,本发明的拓扑异构酶抑制剂可为拓扑异构酶I抑制剂,在一些实施方案中,其可为喜树碱衍生物。本发明的喜树碱衍生物可为但不限于贝洛替康 (Belotecan) (CKD602)、喜树碱、7-乙基-10-羟基-CPT、10-羟基-CPT、卢比替康 (Rubitecan) (9-硝基-CPT)、7-乙基-CPT、拓扑替康、伊立替康 (Irinotecan)、斯类替康 (Silatecan) (DB67) 及其任何组合。在本发明的一些实施方案中,拓扑异构酶I抑制剂可为茚并异喹啉衍生物,其可为但不限于NSC706744、NSC725776、NSC724998及其任何组合。在本发明的其它实施方案中,拓扑异构酶抑制剂是拓扑异构酶II抑制剂,在一些实施方案中,其可为吡啶衍生物,其可为但不限于安吡啶 (Amsacrine),在一些实施方案中,拓扑异构酶II抑制剂可为鬼臼毒素衍生物,其可为但不限于依托泊苷,并且在一些实施方案中,拓扑异构酶II抑制剂可为双二氧化哌嗪衍生物,其可为但不限于ICRF-193、右雷佐生 (dexrazoxane) (ICRF-187) 及其任何组合。在本发明的其它实施方案中,拓扑异构酶抑制剂可为白藜芦醇 (Resveratrol) (PMID:20304553; PMID:15796584) 41、没食子酸表没食子儿茶素

(Epigallocatechin gallate) (PMID:18293940;PMID:11594758;PMID:11558576;PMID:1313232) 42、43、染料木素 (Genistein) (PMID:17458941) 44、黄豆苷元 (Daidzein) (PMID:17458941) 45、槲皮素 (Quercetin) (PMID:1313232;PMID:16950806;PMID:15312049)、与槲皮素相关的抑制拓扑异构酶的天然黄酮,诸如刺槐黄素 (acacetin)、洋元荜黄素 (apigenin)、堪非醇 (kaempferol) 和桑色素 (morin) (PMID:8567688) 46-48、木犀草素 (Luteolin) (PMID:12027807;PMID:16950806;PMID:15312049) 46;杨梅黄酮 (Myricetin) (PMID:20025993) 49及其任何组合。在某些实施方案中,拓扑异构酶抑制剂可为靶向拓扑异构酶I、拓扑异构酶II或两者的干扰RNA (RNAi) 分子。RNAi分子的非限制性实例包括如本领域中熟知的小干扰RNA (siRNA)、短发夹RNA (shRNA)、微小RNA (miRNA)、反义核酸分子等。本发明的siRNA和shRNA的非限制性实例提供于表2中。在一些实施方案中,锌指核酸酶、抗体和/或核糖酶可在本发明方法中用于抑制拓扑异构酶活性。

[0256] 如本文所用,术语“细胞毒性抗生素”是指包括但不限于放线菌素、博来霉素、丝裂霉素、光神霉素等的细胞毒性抗生素。酪氨酸激酶抑制剂的实例包括但不限于尼罗替尼 (nilotinib)、伊马替尼 (imatinib)、吉非替尼 (gefitinib)、埃罗替尼 (erlotinib)、西妥昔单抗 (cetuximab)、帕尼单抗 (panitumumab)、扎鲁木单抗 (zalutumumab)、尼妥珠单抗 (nimotuzumab)、马妥珠单抗 (matuzuman) 等。

[0257] 在一些实施方案中,其它抗癌剂是单克隆抗体,诸如阿来珠单抗 (alemtuzumab)、贝伐单抗 (bevacizumab)、西妥昔单抗、吉妥单抗 (gemtuzumab)、利妥昔单抗 (rituximab) 和曲妥珠单抗 (trastuzumab);光敏剂,诸如氨基乙酰丙酸、氨基乙酰丙酸甲酯、卟吩姆钠 (porfimer sodium) 和维替泊芬 (verteporfin);以及其它药剂,诸如阿利维甲酸 (alitretinoin)、六甲蜜胺 (altretamine)、安吡啶、阿那格雷 (anagrelide)、三氧化二砷 (arsenic trioxide)、天冬酰胺酶、蓓萨罗丁 (bexarotene)、硼替佐米 (bortezomib)、塞来昔布 (celecoxib)、地尼介白素 (denileukin diftitox)、埃罗替尼、雌氮芥、吉非替尼、羟基脲、伊马替尼、喷司他汀、马丙考 (masoprocol)、米托坦 (mitotane)、培加帕酶 (pegaspargase) 和维甲酸 (tretinoin)。

[0258] 在一些实施方案中,其它抗癌剂是可用于治疗白血病的那些,诸如用于急性淋巴细胞性白血病 (ALL)、急性骨髓性白血病 (AML)、慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、慢性髓细胞白血病 (CML) 和脑膜白血病的药物,包括但不限于阿比曲特 (Abitrexate) (甲氨蝶呤)、阿霉素 PFS (盐酸多柔比星)、阿霉素 RDF (盐酸多柔比星)、阿仑恩 (Arranon) (奈拉滨 (Nelarabine))、菊欧文氏菌 (*Erwinia chrysanthemi*) 天冬酰胺酶、柔红霉素 (Cerubidine) (盐酸道诺霉素)、克拉芬 (Clafen) (环磷酰胺)、氯法拉滨 (Clofarabine)、克洛法里 (Clolarex) (氯法拉滨)、克洛拉 (Clolar) (氯法拉滨)、环磷酰胺、阿糖胞苷、赛德萨-U (Cytosar-U) (阿糖胞苷)、癌得星 (Cytosan) (环磷酰胺)、达沙替尼 (Dasatinib)、盐酸道诺霉素、盐酸多柔比星、欧文纳斯 (Erwinaze) (菊欧文氏菌天冬酰胺酶)、福勒克斯 (Folex) (甲氨蝶呤)、福勒克斯 PFS (甲氨蝶呤)、格列卫 (Gleevec) (甲磺酸伊马替尼)、伊库斯格 (Iclusig) (盐酸泊那替尼 (Ponatinib Hydrochloride))、甲磺酸伊马替尼、玛其波 (Marqibo) (硫酸长春新碱脂质体)、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、甲氨蝶呤 LPF (甲氨蝶呤)、麦沙特 (Mexate) (甲氨蝶呤)、麦沙特-AQ (甲氨蝶呤)、奈拉滨、尼奥沙 (Neosar) (环磷酰胺)、温卡斯帕 (Oncaspar) (培加帕酶)、培加帕酶、巯嘌呤 (Purinethol) (巯基嘌呤)、红比霉素

(Rubidomycin) (盐酸道诺霉素)、斯普瑞赛 (Sprycel) (达沙替尼 (Dasatinib))、塔拉滨 (Tarabine) PFS (阿糖胞苷)、维卡萨 (Vincasar) PFS、长春新碱 (硫酸盐)、硫酸长春新碱、硫酸长春新碱脂质体、Hyper-CVAD、阿霉素PFS (盐酸多柔比星)、阿霉素RDF (盐酸多柔比星)、三氧化二砷、柔红霉素 (盐酸道诺霉素)、克拉芬 (环磷酰胺)、环磷酰胺、阿糖胞苷、赛德萨-U (阿糖胞苷)、癌得星 (环磷酰胺)、盐酸道诺霉素、盐酸多柔比星、尼奥沙 (环磷酰胺)、红比霉素 (盐酸道诺霉素)、塔拉滨PFS (阿糖胞苷)、曲森洛 (Trisenox) (三氧化二砷)、维卡萨PFS (硫酸长春新碱)、硫酸长春新碱、ADE、阿来珠单抗 (Alemtuzumab)、瘤可宁 (Ambochlorin) (苯丁酸氮芥)、流克伦 (Amboclorin) (苯丁酸氮芥)、阿泽那 (Arzerra) (奥法珠单抗 (Ofatumumab))、盐酸苯达莫司汀 (Bendamustine Hydrochloride)、坎帕斯 (Campath) (阿来珠单抗)、苯丁酸氮芥、克拉芬 (环磷酰胺)、环磷酰胺、癌得星 (环磷酰胺)、福达华 (Fludara) (磷酸氟达拉滨)、磷酸氟达拉滨、格兹瓦 (Gazyva) (奥滨尤妥珠单抗 (Obinutuzumab))、依布替尼 (Ibrutinib)、依布维卡 (依布替尼)、瘤克宁 (Leukeran) (苯丁酸氮芥)、林弗里 (Linfolizin) (苯丁酸氮芥)、尼奥沙 (环磷酰胺)、奥滨尤妥珠单抗、奥法珠单抗、曲安达 (Treanda) (盐酸苯达莫司汀)、苯丁酸氮芥-泼尼松 (CHLORAMBUCIL-PREDNISONE)、CVP、博舒福 (Bosulif) (博舒替尼 (Bosutinib))、博舒替尼、白消安、白舒非 (Busulfex) (白消安)、克拉芬 (环磷酰胺)、环磷酰胺、阿糖胞苷、赛德萨-U (阿糖胞苷)、癌得星 (环磷酰胺)、达沙替尼、格列卫 (甲磺酸伊马替尼)、伊库斯格 (盐酸泊那替尼)、甲磺酸伊马替尼、麦里浪 (Myleran) (白消安)、尼奥沙 (环磷酰胺)、尼罗替尼 (Nilotinib)、麦普丁二酸奥玛他辛 (Omacetaxine Mepesuccinate)、盐酸泊那替尼、斯普瑞赛 (Sprycel) (达沙替尼)、斯瑞博 (Synribo) (麦普丁二酸奥玛他辛)、塔拉滨PFS (阿糖胞苷)、塔斯格那 (尼罗替尼)、阿糖胞苷、赛德萨-U (阿糖胞苷) 和塔拉滨PFS (阿糖胞苷)。

[0259] 在一些实施方案中,可连同本发明化合物一起使用的其它抗癌剂包括可抑制EGFR (表皮生长因子受体) 应答的药剂,诸如EGFR抗体、EGF抗体和作为EGFR抑制剂的分子;VEGF (血管内皮生长因子) 抑制剂;以及erbB2受体抑制剂,诸如结合erbB2受体的有机分子或抗体。EGFR抑制剂例如描述于WO 95/19970、WO 98/14451、WO 98/02434以及美国专利号5,747,498中。EGFR抑制剂包括但不限于单克隆抗体C225和抗EGFR 22Mab (ImClone Systems Incorporated of New York, N.Y., USA)、化合物ZD-1839 (AstraZeneca)、BIBX-1382 (Boehringer Ingelheim)、MDX-447 (Medarex Inc. of Annandale, N.J., USA) 以及OLX-103 (Merck&Co. of Whitehouse Station, N.J., USA)、VRCTC-310 (Ventech Research) 和EGF融合毒素 (Seragen Inc. of Hopkinton, Mass.)。例如AG-13736 (Pfizer, Inc.) 的VEGF抑制剂也可与组合物组合或共同施用。VEGF抑制剂例如描述于WO 99/24440、WO 95/21613、WO 99/61422、美国专利号5,834,504、WO 98/50356 (1998年11月12日公布)、美国专利号5,883,113、美国专利号5,886,020、美国专利号5,792,783、美国专利号6,534,524、WO 99/10349、WO 97/32856、WO 97/22596、WO 98/54093和WO 98/02437中,所述专利全部以引用的方式整体并入本文。一些特异性VEGF抑制剂的其它实例是IM862 (Cytran Inc. of Kirkland, Wash., USA); Avastin™或贝伐单抗,即一种抗VEGF单克隆抗体 (Genentech, Inc. of South San Francisco, Calif.); 以及血管酶 (angiozyme), 即一种来自核酶 (Ribozyme) (Boulder, Colo.) 和Chiron (Emeryville, Calif.) 的合成核糖酶。ErbB2受体抑制剂, 诸如Gw-282974 (Glaxo Wellcome plc) 和单克隆抗体AR-209 (Aronex Pharmaceuticals Inc. of The

Woodlands, Tex., USA) 和 2B-1 (Chiron), 可与组合物组合施用。所述 erbB2 抑制剂包括 WO 98/02434、WO 99/35146、WO 99/35132、WO 98/02437、WO 97/13760、WO 95/19970、美国专利号 5,587,458 和美国专利号 5,877,305 中所述的那些, 所述专利各自以引用的方式整体并入本文。

[0260] 在一些实施方案中, 连续给药时程用于治疗。在一些实施方案中, 每天一次, 每天两次, 每天三次, 或每天更多次, 或在一天中的某一时期期间连续, 或全天连续, 按照每天时程, 或每隔一天, 每三天, 每四天, 每五天, 每六天或每周施用呈包含本发明化合物的某一剂型的化合物。治疗可持续由医生确定的一段时期, 或直至癌细胞被完全或显著抑制。

[0261] 在一些实施方案中, 间歇给药时程用于治疗。如果存在毒性顾虑, 那么所述治疗是尤其适用的。在一些实施方案中,

[0262] 以下实施例说明本发明的各个方面。当然, 所述实施例应被理解为仅说明本发明的仅某些实施方案, 并且不构成对本发明的范围的限制。

## 实施例

[0263] 实施例 1-LOR-253 在白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤细胞系中的体外抗增殖活性

[0264] 如下通过 XTT 测定来测定 LOR-253 的抗增殖活性。将细胞 ( $4 \times 10^3$ /孔) 于 100  $\mu$ L 生长培养基中接种于 96 孔细胞培养板中, 并且在 37°C 下孵育过夜。移除培养基, 并且用 100  $\mu$ L 总体积的含有 LOR-253 (或 0.1% DMSO 媒介物对照) 的生长培养基替换, 如相应实验中所述。将混悬细胞接种 ( $4-6 \times 10^3$ /孔) 于 50  $\mu$ L 生长培养基中, 并且添加 50  $\mu$ L 含有 LOR-253 (或 0.1% DMSO 媒介物对照) 的生长培养基至各孔中。在 37°C 下孵育细胞 5 天之后, 借助于 3'-[1-(苯基氨基-羰基)-3,4-二唑啉]-双(4-甲氧基-6-硝基) 苯磺酸钠水合物 (XTT) 比色测定 (Roche) 定量细胞活力。遵循制造商说明书使 XTT 标记试剂 (1 mg/mL) 与电子偶联试剂混合, 并且直接添加 50  $\mu$ L 混合物至细胞中。在 37°C 下再孵育各板 4 小时, 并且用多孔分光光度计 (Bio-Tek Instruments Inc.) 在 490 nm 下测量各孔的吸光度。相对于空白调整数据, 并且表示为相较于媒介物对照的细胞生长百分比。(参考 Huesca 等, Mol Cancer Ther. 2009.8:2586-96; Lorus 关于 LOR-133 的公布)

[0265] 体外测定结果 (图 3) 指示白血病/淋巴瘤, 包括 AML 细胞系, 诸如 HL-60、MV 411、THP-1、HEL92.1.7、CCRF-CEM、MOLT-4、Jurkat、K-562、Ramos 和 Raji, 是对 LOR-253 最敏感的细胞系, 而其它肺癌、膀胱癌、结肠癌、前列腺癌、黑素瘤和乳腺癌细胞系对 LOR-253 的敏感性较小。对 LOR-253 的敏感性的可变性可归因于先天性 KLF4 抑制的程度。以下显示 LOR-253 对于各白血病和淋巴瘤细胞系的 IC<sub>50</sub> 值。

[0266]

癌症类型	细胞系	IC <sub>50</sub> (μM)
急性骨髓性白血病	Kasumi-1	0.0069
	KG-1	0.033
	HL-60	0.046
	EOL-1	0.058
	NB4	0.06
	MV-4-11	0.069
	OCI-AML2	0.076
	THP-1	0.077
	MOLM13 (CD47+)	0.13
	NOMO-1	0.121
	SKM-1	0.145
	HEL92.1.7	0.305
急性淋巴母细胞性白血病	CCRF-CEM	0.039
	MOLT-4	0.07
	Jurkat	0.071

[0267]

慢性髓细胞白血病	K562	0.25
非霍奇金氏淋巴瘤	Ramos	0.125
	Raji	0.011
	CA46	0.19
	Toledo	0.077
	DB	0.099
	Mino	0.14
	RL	0.19
多发性骨髓瘤	MM.1R	0.15
	U266B1	0.18
	HuNS1	0.072

[0268] 实施例2-体外AML细胞系中的KLF4/p21诱导

[0269] 为确定KLF4和/或p21表达是否由LOR-253诱导,用DMSO(媒介物对照)或0.5μM LOR-253处理AML细胞(THP1、HL-60)16小时。根据制造商说明书使用TRIzol Plus RNA纯化试剂盒(Ambion,Life Technologies)提取总RNA。使用随机六聚体引物(Invitrogen)和SuperScript II逆转录酶试剂盒(Invitrogen)从1-2ug总RNA合成第一链cDNA。使用cDNA以及针对Krüppel样因子4(KLF4)、细胞周期素依赖性激酶抑制剂1A(p21)的人TaqMan基因表达测定引物/探针组和ABI TaqMan通用PCR主混合物方案,在ABI Prism 7000序列检测系统中进行定量RT-PCR。用同一样本中的β-肌动蛋白基因表达使基因表达标准化,并且使用比较CT方法,相对于DMSO处理样本中的相应表达水平来表示KLF4或p21的倍数变化。用LOR-253处理THP1和HL-60AML细胞系导致KLF4和p21表达增加(参见图4)。

[0270] 实施例3-用LOR-253处理导致AML细胞系中G1/S细胞周期阻滞。

[0271] 用DMSO(媒介物对照)或0.5μM LOR-253处理THP1和HL-60AML细胞系16小时。将细胞于PBS+1%FCS中洗涤一次,并且使用冰冷70%乙醇固定过夜。将固定细胞洗涤两次,再混悬于含有20μg/mL碘化丙啶和250μg/mL RNA酶A的PI/RNA酶A溶液中,并且在37℃下染色30分钟。使用BD FACSCalibur流式细胞仪分析染色细胞。结果指示用LOR-253处理导致AML细胞系中G1/S细胞周期阻滞(图5)



[0272] 实施例4-用LOR-253处理诱导细胞系中凋亡。

[0273] 用DMSO、0.5或1 $\mu$ M LOR-253处理THP-1细胞16小时。用冷PBS洗涤细胞两次,并且再混悬于膜联蛋白V结合缓冲液中。用FITC-膜联蛋白V和碘化丙啶染色于100 $\mu$ L中的 $1 \times 10^5$ 个细胞,并且在室温下孵育15分钟。在染色之后,添加400 $\mu$ L结合缓冲液,并且使细胞保持在冰上直至于BD FACSCanto流式细胞仪上加以分析。用LOR-253处理的THP-1细胞显示膜联蛋白V染色增加,从而指示对凋亡的诱导。增加用于处理细胞的LOR-253的浓度导致早期凋亡群体增加(Q3:膜联蛋白V+/PI-)。结果指示用LOR-253处理诱导AML细胞系中凋亡(图6)。

[0274] 用DMSO(媒介物对照)或0.5 $\mu$ M LOR-253处理THP1和HL-60细胞48小时。使用1%曲通-X100溶解来收集细胞溶解产物。根据制造商方案使用EnzChek半胱天冬酶-3测定试剂盒#1(Life Technologies),用5 $\mu$ g细胞溶解产物测量半胱天冬酶3活性。用LOR-253处理THP1和HL-60细胞导致半胱天冬酶3活性升高,从而指示对凋亡的诱导(图7)。

[0275] 用DMSO(媒介物对照)或0.5 $\mu$ M LOR-253处理THP1细胞48小时。根据制造商说明书使用TRIzol Plus RNA纯化试剂盒(Ambion,Life Technologies)提取总RNA。使用随机六聚体引物(Invitrogen)和SuperScript II逆转录酶试剂盒(Invitrogen)从1-2 $\mu$ g总RNA合成第一链cDNA。使用cDNA以及针对BCL2相关X蛋白(BAX)、B细胞CLL/淋巴瘤2(BCL2)的人TaqMan基因表达测定引物/探针组和ABI TaqMan通用PCR主混合物方案,在ABI Prism 7000序列检测系统中进行定量RT-PCR。用同样样本中的 $\beta$ -肌动蛋白基因表达使基因表达标准化,并且使用比较CT方法,相对于DMSO处理样本中的相应表达水平来表示BAX或BCL2的倍数变化。在用LOR-253处理THP1细胞后BAX升高以及BCL2阻遏指示对凋亡的诱导(图8)。

[0276] 实施例5-LOR-253 HCL在H226异种移植模型中的体内功效-剂量和时程。

[0277] 根据如下表中所示的若干施用时程治疗H226模型小鼠。

组		剂量水平	施用时程/循环 (天数)	治疗 (1个循环=28天)
[0278]	1 n=8	10mg/kg-静脉内	2T-12B-2T	2个循环
	2 n=8	10mg/kg-静脉内	3T-12B-3T	2个循环
	3 n=8	10mg/kg-静脉内	2T-5B-2T	2个循环
	4 n=8	10mg/kg-静脉内	3T-5B-3T	2个循环
	5 n=8	单独媒介物	3T-5B-3T	2个循环
T=连续治疗天数 B=间歇1天				

[0279] 结果显示组2、3和4由LOR-253有效治疗(图9)。结果指示以1周为间隔的时程优于2周间隔,并且表明每周施用时程是优选的。

[0280] 实施例6-由LOR-253 HCL治疗的异种移植CD-1裸小鼠中的体内剂量依赖性药代动力学(PK)和药效动力学(PD)响应

[0281] 为研究由LOR-253处理的肿瘤细胞中的药代动力学(PK),通过以1、5和15mg/kg静脉内团注LOR-253HCL来治疗CD-1裸小鼠。测量LOR-253的血清水平。结果指示LOR-253的血清水平具有剂量相关增加(图10)。

[0282] 为研究药效动力学(PD)响应,连续5天用1、5和15mg/kg LOR-253治疗小鼠。在末次剂量之后16小时测量肿瘤,并且测量KLF-4蛋白水平。平均KLF4蛋白水平以剂量依赖性方式

增加,与肿瘤生物分布和剂量-应答抗肿瘤活性相关联(图11)。

[0283] 实施例7-LOR-253用于治疗AML,I期临床试验

[0284] 临床前测试确定LOR-253具有宽泛治疗指数:在异种移植模型中证明LOR-253针对多种肿瘤类型具有功效;在大鼠和狗中进行广泛GLP安全性和PK研究;在狗的重复剂量毒性研究中在最高测试剂量下未观察到治疗相关的心血管影响(数据未显示);对hERG尾电流密度或CYP450酶无显著抑制;并且GLP血液相容性研究确认静脉内制剂的适合性。

[0285] I期:这是开放标签I期研究,其用以确定最大耐受剂量(MTD)或如果未达到MTD那么确定适当靶标剂量以鉴定LOR-253HCl在患有晚期或转移性实体肿瘤的患者中的推荐2期剂量。在第一组剂量中,以上升剂量给予LOR-253HCl直至达到最大施用剂量或适当靶标剂量。在另一组剂量中,从20mg/m<sup>2</sup>开始以上升剂量给予LOR-253HCl直至达到最大施用剂量或适当靶标剂量。用LOR-253HCl持续2个循环治疗患者以进行评估。

[0286] 其它名称:未使用其它名称。

[0287] 研究类型:介入

[0288] 研究设计:终点分类:安全性研究

[0289] 介入模型:单组分配

[0290] 掩蔽:开放标签

[0291] 主要目的:治疗

[0292] 官方标题:LOR-253HCl在患有晚期或转移性实体肿瘤的

[0293] 患者中的开放标签I期研究

[0294] 主要结果量度:

[0295] • 确定最大耐受剂量(MTD)或如果未达到MTD那么确定适当靶标剂量以鉴定LOR-253HCl在患有晚期或转移性实体肿瘤的患者中的推荐2期剂量。[时间范围:8周]

[0296] 次要结果量度:

[0297] • 表征LOR-253HCl在向患有晚期或转移性实体肿瘤的患者施用时的安全性概况。

[[时间范围:8周]

[0298] 纳入准则:

[0299] 1.18岁或大于18岁的男性或女性。

[0300] 2.组织学确诊无有效疗法可用或对常规疗法不响应的实体肿瘤。

[0301] 3.在进入研究时满足实验室参数要求。

[0302] 排除准则:

[0303] 1.在用LOR-253HCl开始研究治疗的21天内采用化学疗法、放射疗法、生物疗法、免疫疗法或任何其它探究性药物。

[0304] 2.患有恶性血液病。

[0305] 3.具有脑或其它中枢神经系统转移史。

[0306] 4.存在重大感染。

[0307] 5.患有临床重大自体免疫疾病。

[0308] 6.间发性疾病不受控制。

[0309] 7.患有铁或铜过载综合征。

[0310] 8.妊娠或哺乳。

- [0311] 在I期试验中证明的安全性和抗肿瘤活性：
- [0312] • 在患有晚期实体肿瘤的患者中进行剂量逐步提高研究
- [0313] • 跨越7个剂量水平具有卓越安全性概况 (N=27 名患者)
- [0314] • 最常见的AE和SAE: 疲劳和1例可逆低磷酸盐血症
- [0315] • 在41%的可评估患者中实现疾病稳定; 无RECIST PR
- [0316] • 在患有为先前标准和探究性疗法所难治的NSCLC (分化不良的腺癌) 和广泛转移的患者中实现肿瘤缩减 (图12)
- [0317] I期试验结果证明LOR-253是一种用于治疗实体肿瘤的安全和活性药物。
- [0318] 实施例8-LOR-253在骨髓增生异常综合征 (MDS)、急性淋巴细胞性白血病 (ALL)、慢性髓细胞白血病 (CML)、成人T细胞白血病 (ATLL)、淋巴瘤、胃癌和多发性骨髓瘤细胞系中的体外抗增殖活性。
- [0319] 如实施例1中所述, 通过XTT测定来测定LOR-253在MDS、ALL、CML、ATLL、淋巴瘤、胃癌和多发性骨髓瘤细胞系中的抗增殖活性。
- [0320] 在测定中测试的MDS细胞系包括但不限于TER-3 (Mishima等, New human myelodysplastic cell line, TER-3: G-CSF specific downregulation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase IV, J Cell Physiol. 2002年5月; 191 (2): 183-90)、MDS92 (Tohyama等, A novel factor-dependent human myelodysplastic cell line, MDS92, contains haemopoietic cells of several lineages, Br J Haematol. 1995年12月; 91 (4): 795-9) 和SKM-1 (Kimura等, Antiproliferative and Antitumor Effects of Azacitidine Against the Human Myelodysplastic Syndrome Cell Line SKM-1, Anticancer Research 32: 795-798, 2002), 所述文献各自以引用的方式整体并入本文。
- [0321] 在测定中测试的ALL细胞系包括但不限于CCRF-CEM (Foley等, Continuous culture of human lymphoblasts from peripheral blood of a child with acute leukemia. Cancer 1965 18: 522-529)、MOLT-4 (Minowada等, Rosette-forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes. Journal of the National Cancer Institute 1972 49 (3): 891-895) 和Jurkat (Schneider等, Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. Int J Cancer. 1977年5月15日; 19 (5): 621-6)。
- [0322] 在测定中测试的CML细胞系包括但不限于K562 (Drexler, Leukemia cell lines: in vitro models for the study of chronic myeloid leukemia. Leuk Res. 1994年12月; 18 (12): 919-27)。
- [0323] 在测定中测试的淋巴瘤细胞系包括但不限于Ramos、Raji、CA46、Toledo、DB、Mino和RL。
- [0324] 在测定中测试的胃癌细胞系包括但不限于AGS (ATCC登记号CRL-1739TM)、SNU-1 (ATCC登记号CRL-5971TM)、SNU-5 (ATCC登记号CRL-5973TM)、SNU-16 (ATCC登记号CRL-5974TM)、Hs746T (ATCC登记号HTB-135TM)、NCI-N87 (N87; ATCC登记号CRL-5822TM)、KATO III (ATCC登记号HTB-103TM)、SNU-520、SNU-719、NUGC-4、STKM-2、MKN-45、MKN-74、20M、AKG、ECC4、G42LATE、GCIY、GCIY、GT3TKB、H-111、H-162、H-30、H-55、HGC-27、HSC-39、HUG-1N、JR1、

KWS、MKN-1、MKN-28、MKN-7、MKN-74、MKN-74、MKN-74、NCI-N87、NUGC-3、OKAJIMA、SK-GT-1、SK-GT-2、SK-GT-5、SNU-16、SNU-216、SNU-484、SNU-55、SNU-601、SNU-638、SNU-668、TGBC11TKB、TGBC11TKB、TMK-1和YCC-3。

[0325] 在测定中测试的多发性骨髓瘤细胞系包括但不限于Lombardi等 (Molecular characterization of human multiple myeloma cell lines by integrative genomics: insights into the biology of the disease. Genes Chromosomes Cancer. 2007年3月; 46 (3) : 226-38.) 中所述的HMCL、XG、NAN、BCN、MDN、SBN HMCL、U266、RPMI8226、RPMI1640、ANBL-6、KMS-11、KMS12-BM、KMS12-PE、KMM1、LP1、L363、OPM2、NCI-H929、JIM3、MO-1、LP1、L363、NCIH929、OPM2、UHKT-89、SKMM2、U266B 1 (Nilsson等, Established immunoglobulin producing myeloma (IgE) and lymphoblastoid (IgG) cell lines from an IgE myeloma patient. Clin Exp Immunol. 1970年10月; 7 (4) : 477-89)、MM.1R (Greenstein等, Characterization of the MM.1 human multiple myeloma (MM) cell lines: a model system to elucidate the characteristics, behavior, and signaling of steroid-sensitive and-resistant MM cells. Exp Hematol. 2003年4月; 31 (4) : 271-82) 和HuNS 1 (Winkelhake, Myelomas for producing human/human hybridomas. 美国专利 4,720,459, 日期是1988年1月19日)。

[0326] 体外测定结果指示MDS、ALL、CML、ATLL、淋巴瘤、胃癌或多发性骨髓瘤细胞系中的一种或多种细胞系对LOR-253敏感。

[0327] 实施例9-体外骨髓增生异常综合征 (MDS)、ALL、CML、ATLL、淋巴瘤、胃癌和多发性骨髓瘤细胞系中的KLF4/p21诱导。

[0328] 为确定KLF4和/或p21表达是否由LOR-253诱导, 用DMSO (媒介物对照) 或0.1、0.2、0.5或1 $\mu$ M LOR-253处理实施例8中所述的骨髓增生异常综合征 (MDS)、ALL、CML、ATLL、淋巴瘤、胃癌和多发性骨髓瘤细胞系16小时。根据制造商说明书使用TRIzol Plus RNA纯化试剂盒 (Ambion, Life Technologies) 提取总RNA。使用随机六聚体引物 (Invitrogen) 和SuperScript II逆转录酶试剂盒 (Invitrogen) 从1-2 $\mu$ g总RNA合成第一链cDNA。使用cDNA以及针对Krüppel样因子4 (KLF4)、周期素依赖性激酶抑制剂1A (p21) 的人TaqMan基因表达测定引物/探针组和ABI TaqMan通用PCR主混合物方案, 在ABI Prism 7000序列检测系统中进行定量RT-PCR。用同一样本中的 $\beta$ -肌动蛋白基因表达使基因表达标准化, 并且使用比较CT方法, 相对于DMSO处理样本中的相应表达水平来表示KLF4或p21的倍数变化。用LOR-253处理一种或多种骨髓增生异常综合征 (MDS)、ALL、CML、ATLL、淋巴瘤、胃癌或多发性骨髓瘤细胞系导致KLF4和/或p21表达增加。

[0329] 实施例10-用LOR-253处理导致骨髓增生异常综合征 (MDS)、ALL、CML、ATLL、淋巴瘤、胃癌和多发性骨髓瘤细胞系中G1/S细胞周期阻滞。

[0330] 用DMSO (媒介物对照) 或0.1、0.2、0.5或1 $\mu$ M LOR-253处理实施例8中所述的骨髓增生异常综合征 (MDS)、ALL、CML、ATLL、淋巴瘤、胃癌和多发性骨髓瘤细胞系16小时。将细胞于PBS+1%FCS中洗涤一次, 并且使用冰冷70%乙醇固定过夜。将固定细胞洗涤两次, 再混悬于含有20 $\mu$ g/mL碘化丙啶和250 $\mu$ g/mL RNA酶A的PI/RNA酶A溶液中, 并且在37 $^{\circ}$ C下染色30分钟。使用BD FACSCalibur流式细胞仪分析染色细胞。结果指示用LOR-253处理导致一种或多种骨髓增生异常综合征 (MDS)、ALL、CML、ATLL、淋巴瘤、胃癌或多发性骨髓瘤细胞系中G1/S细

胞周期阻滞。

[0331] 实施例11-用LOR-253处理诱导骨髓增生异常综合征(MDS)、ALL、CML、ATLL、淋巴瘤、胃癌和多发性骨髓瘤细胞系中凋亡

[0332] 用DMSO、0.1、0.2、0.5或1 $\mu$ M LOR-253处理实施例8中所述的骨髓增生异常综合征(MDS)、ALL、CML、ATLL、淋巴瘤、胃癌和多发性骨髓瘤细胞系16小时。用冷PBS洗涤细胞两次,并且再混悬于膜联蛋白V结合缓冲液中。用FITC-膜联蛋白V和碘化丙啶染色100 $\mu$ L中的1 $\times 10^5$ 个细胞,并且在室温下孵育15分钟。在染色之后,添加400 $\mu$ L结合缓冲液,并且使细胞保持在冰上直至于BD FACSCanto流式细胞仪上进行分析。一种或多种用LOR-253处理的细胞系显示膜联蛋白V染色增加,从而指示对凋亡的诱导。增加用于处理细胞的LOR-253的浓度导致早期凋亡群体增加(Q3:膜联蛋白V+/PI-)。

[0333] 也用DMSO(媒介物对照)或0.1、0.2、0.5或1 $\mu$ M LOR-253处理细胞系48小时。使用1%曲通-X100溶解来收集细胞溶解产物。根据制造商方案使用EnzChek半胱天冬酶-3测定试剂盒#1(Life Technologies),用5 $\mu$ g细胞溶解产物测量半胱天冬酶3活性。用LOR-253处理一种或多种细胞系导致半胱天冬酶3活性升高,从而指示对凋亡的诱导。

[0334] 根据制造商说明书使用TRIzol Plus RNA纯化试剂盒(Ambion, Life Technologies)提取处理的细胞系的总RNA。使用随机六聚体引物(Invitrogen)和SuperScript II逆转录酶试剂盒(Invitrogen)从1-2 $\mu$ g总RNA合成第一链cDNA。使用cDNA以及针对BCL2相关X蛋白(BAX)、B细胞CLL/淋巴瘤2(BCL2)的人TaqMan基因表达测定引物/探针组和ABI TaqMan通用PCR主混合物方案,在ABI Prism7000序列检测系统中进行定量RT-PCR。用同一样本中的 $\beta$ -肌动蛋白基因表达使基因表达标准化,并且使用比较CT方法,相对于DMSO处理样本中的相应表达水平来表示BAX或BCL2的倍数变化。在用LOR-253处理一种或多种骨髓增生异常综合征(MDS)、ALL、CML、ATLL、淋巴瘤、胃癌或多发性骨髓瘤细胞系后BAX升高以及BCL2阻遏指示对凋亡的诱导。

[0335] 实施例12-LOR-253 HCL在骨髓增生异常综合征(MDS)、ALL、CML、ATLL、淋巴瘤、胃癌和多发性骨髓瘤的异种移植模型中的体内功效

[0336] 根据标准程序产生骨髓增生异常综合征(MDS)、ALL、CML、ATLL、淋巴瘤、胃癌和多发性骨髓瘤的模型小鼠。根据如下表中所示的若干施用时程治疗模型小鼠。

组	剂量水平	施用时程/ 循环	治疗 (1 个循环=7、14 、21 或 28 天)
1 n=8	1mg/kg-静脉内	2T-12B-2T	1、2、3 或 4 个循环
2 n=8	1mg/kg-静脉内	3T-12B-3T	1、2、3 或 4 个循环
3 n=8	1mg/kg-静脉内	2T-5B-2T	1、2、3 或 4 个循环
4 n=8	1mg/kg-静脉内	3T-5B-3T	1、2、3 或 4 个循环
5 n=8	5mg/kg-静脉内	2T-12B-2T	1、2、3 或 4 个循环
6 n=8	5mg/kg-静脉内	3T-12B-3T	1、2、3 或 4 个循环
7 n=8	5mg/kg-静脉内	2T-5B-2T	1、2、3 或 4 个循环
8 n=8	5mg/kg-静脉内	3T-5B-3T	1、2、3 或 4 个循环
[0337] 9 n=8	10mg/kg-静脉内	2T-12B-2T	1、2、3 或 4 个循环
10 n=8	10mg/kg-静脉内	3T-12B-3T	1、2、3 或 4 个循环
11 n=8	10mg/kg-静脉内	2T-5B-2T	1、2、3 或 4 个循环
12 n=8	10mg/kg-静脉内	3T-5B-3T	1、2、3 或 4 个循环
13 n=8	20mg/kg-静脉内	2T-12B-2T	1、2、3 或 4 个循环
14 n=8	20mg/kg-静脉内	3T-12B-3T	1、2、3 或 4 个循环
15 n=8	20mg/kg-静脉内	2T-5B-2T	1、2、3 或 4 个循环
16 n=8	20mg/kg-静脉内	3T-5B-3T	1、2、3 或 4 个循环
17 n=8	单独媒介物	3T-5B-3T	1、2、3 或 4 个循环
T=连续治疗天数 B=间歇 1 天			

[0338] 结果显示一个或多个组由LOR-253有效治疗。

[0339] 实施例13-由LOR-253 HCL治疗的患有骨髓增生异常综合征 (MDS)、ALL、CML、ATLL、淋巴瘤、胃癌和多发性骨髓瘤的异种移植模型小鼠中的体内剂量依赖性药代动力学 (PK) 和药效动力学 (PD) 响应

[0340] 为研究由LOR-253处理的骨髓增生异常综合征 (MDS)、ALL、CML、ATLL、淋巴瘤、胃癌和多发性骨髓瘤肿瘤细胞中的药代动力学 (PK)，通过以1、5和15mg/kg静脉内团注LOR-253HCl来治疗CD-1裸小鼠。测量各治疗中的血清LOR-253水平。

[0341] 为研究药效动力学 (PD) 响应，连续5天用1、5和15mg/kgLOR-253治疗小鼠。在末次剂量之后16小时测量肿瘤，并且测量KLF-4蛋白水平。这个结果显示在一种或多种治疗中，平均KLF4蛋白水平以剂量依赖性方式增加，与肿瘤生物分布和剂量-应答抗肿瘤活性相关联。

[0342] 实施例14-LOR-253 HCL在Kasumi-1AML异种移植模型中的体内功效

[0343] 在人AML的另一体内动物模型中评估LOR-253HCl的抗肿瘤活性。将人AML细胞系Kasumi-1皮下植入无胸腺裸小鼠中。每周连续2天持续4周，用LOR-253HCl以30mg/kg (每天两次15mg/kg) 治疗一些携带肿瘤的小鼠 (“LOR-253治疗组”)。通过静脉内 (i.v.) 团注以于

含20%聚乙二醇400、10%丙二醇和10%Solutol HS的60%水中配制的盐酸盐形式(LOR-253-HCl)施用LOR-253。用不具有LOR-253的制剂治疗其它携带肿瘤的小鼠(“媒介物对照组”)。

[0344] 主要终点在于在用LOR-253HCl治疗之后观察肿瘤生长抑制,并且比较不同给药时程的抗肿瘤作用。从肿瘤细胞接种之后第10天开始,每周3次测量肿瘤尺寸。使用测径规三维测量肿瘤,并且使用公式: $V=0.5a \times b \times c$ 以立方毫米表示体积,其中a、b和c分别是肿瘤的长度、宽度和高度。由各测量结果计算平均肿瘤体积 $\pm$ 标准误差(SE),接着绘制于标准图中以将药物治疗的抗肿瘤功效与对照的抗肿瘤功效进行比较(图15)。通过临床观察以及通过历经研究过程每周两次测量以克计的小鼠体重来评估毒性。由各测量结果计算平均体重,接着绘图以将药物治疗组中的体重变化与对照的体重变化进行比较(图16)。

[0345] 如图15中所示的肿瘤抑制结果证明相较于媒介物对照组,在这个模型中,LOR-253治疗组产生统计显著增加的抑制作用( $p=0.028$ ,根据学生t检验(Student's t-test))。此外,如图16中所示的毒性结果证明治疗组中的小鼠不显示体重减轻。治疗组中的小鼠也不显示其它明显毒性征象。这些结果指示这个治疗时程被良好耐受。作为单一药剂,以每周两次给药,LOR-253HCl显示显著肿瘤生长抑制而无明显毒性征象,从而表明LOR-253HCl具有足够治疗窗,并且这个药剂是一种用于治疗AML的潜在化学治疗剂。

[0346] 实施例15-LOR-253 HCl在HL-60AML异种移植模型中的体内功效

[0347] 在人AML的另一体内动物模型中评估LOR-253HCl作为单一药剂以及与阿扎胞苷(azacitidine)组合的抗肿瘤活性。将人AML细胞系HL-60皮下植入无胸腺裸小鼠中。用单独LOR-253HCl或与阿扎胞苷组合、单独阿扎胞苷、或阴性对照媒介物治疗携带肿瘤的小鼠。详细治疗条件如下。

[0348] 组1:阴性对照组。LOR-253HCl对照媒介物,2次/天,3个连续2天循环,在循环之间间隔5天,静脉内,每四天通过皮下注射外加1%D-甘露糖醇

[0349] 组2:阿扎胞苷(于1%D-甘露糖醇中),以10mg/kg,在第1、4、8、11、15和18天1次,通过皮下(s.c.)注射

[0350] 组3:LOR-253HCl,以15mg/kg,每天两次,持续3个循环,各循环是每周连续2天给药,5天不给药,静脉内, $n=9$ (2T-5B)

[0351] 组4:LOR-253HCl,以15mg/kg2次/天(bid),持续3个循环,各循环是每周1天给药,6天不给药,静脉内, $n=9$ (1T-6B)

[0352] 组5:LOR-253(2T-5B)和阿扎胞苷的组合。LOR-253HCl,以15mg/kg,每天两次,持续3个循环,各循环是每周连续2天给药,5天不给药,静脉内, $n=9$ (2T-5B),外加阿扎胞苷,每四天1次以10mg/kg通过皮下注射

[0353] 组6:LOR-253(1T-6B)和阿扎胞苷的组合。LOR-253HCl,以15mg/kg,每天两次,持续3个循环,各循环是每周1天给药,6天不给药,静脉内, $n=9$ (1T-6B),外加阿扎胞苷,每四天1次以10mg/kg通过皮下注射

[0354] 主要终点在于在用LOR-253HCl与阿扎胞苷组合治疗之后观察肿瘤生长抑制。每周3次测量肿瘤尺寸。使用测径规三维测量肿瘤,并且使用公式: $V=0.5a \times b \times c$ 以立方毫米表示体积,其中a、b和c分别是肿瘤的长度、宽度和高度。由各测量结果计算平均肿瘤体积 $\pm$ 标准误差(SE),接着绘制于标准图中以将药物治疗的抗肿瘤功效与对照的抗肿瘤功效

进行比较(图17)。

[0355] 如图17中所示的肿瘤抑制结果证明每周1天(组4)或连续2天(组3)每天两次以15mg/kg单独施用的LOR-253HCl抑制HL-60肿瘤生长的程度大致相同于或略微大于单独阿扎胞苷。相较于单独单一药剂,与阿扎胞苷组合每周一次LOR-253HCl给药与每周两次LOR-253HCl给药两者(分别是组6和组5)均产生显著较高水平的肿瘤生长抑制(对于1次和2次LOR-253HCl治疗分别是 $p=0.0002$ 和 $p=0.0006$ ;相较于对照,如通过学生t检验所确定)。图18和图19显示来自个别动物的在这个研究开始(第1天)和结束(第19天)时的肿瘤尺寸数据。

[0356] 因为LOR-253HCl与阿扎胞苷组合产生还要高于任一单独单一药剂的肿瘤生长抑制水平,所以LOR-253HCl也可针对恶性血液病的护理标准化学治疗剂提供累加抗癌功效。

[0357] 实施例16-LOR-253 HCl在KG-1AML异种移植模型中的体内功效

[0358] 在人AML的另一体内动物模型中评估LOR-253HCl的抗肿瘤活性。用与实施例14和15中相同的方法产生AML细胞系KG-1的异种移植模型小鼠,并且根据以下方案用LOR-253HCl或对照治疗。

[0359] 对照-静脉内-第1天

[0360] LOR-253-15mg/kg-静脉内,每天两次,2天/周-第1天

[0361] 对照-静脉内-第8天

[0362] LOR-253-15mg/kg-静脉内,每天两次,2天/周-第8天

[0363] 对照-静脉内-第13天

[0364] LOR-253-15mg/kg-静脉内,每天两次,2天/周-第13天

[0365] 对照-静脉内-第16天

[0366] LOR-253-15mg/kg-静脉内,每天两次,2天/周-第16天

[0367] 对照-静脉内-第20天

[0368] LOR-253-15mg/kg-静脉内,每天两次,2天/周-第20天

[0369] 对照-静脉内-第26天

[0370] LOR-253-15mg/kg-静脉内,每天两次,2天/周-第26天

[0371] 如实施例14和15中所述测量肿瘤尺寸,并且结果显示于图20中。在这个AML动物模型中,LOR-253HCl作为单一药剂也显示显著肿瘤生长抑制。

[0372] 实施例17-LOR-253 HCl在THP-1AML异种移植模型中的体内功效

[0373] 在人AML的另一体内动物模型中评估LOR-253HCl作为单一药剂以及与阿扎胞苷组合的抗肿瘤活性。用与实施例14和15中相同的方法产生AML细胞系THP-1的异种移植模型小鼠,并且用单独LOR-253HCl或与阿扎胞苷组合、单独阿扎胞苷、或阴性对照媒介物治疗,并如实施例14和15中所述测量肿瘤尺寸。详细治疗条件显示如下,并且结果显示于图21中。

[0374] 组1对照:在第1、2、8、9、15和16天接受用LOR-253对照媒介物(CV)静脉内治疗;在第1、4、8、11、15、18、22、25、29和32天接受用阿扎胞苷对照媒介物皮下(SC)治疗;以及在第22、23、24、25、29和30天接受用LOR-253-CV腹膜内(IP)治疗。

[0375] 组2-LOR-253:在第1、2、8、9、15和16天接受静脉内治疗;在第22、23、24、25、29和30天接受腹膜内治疗



[0376] 组3-阿扎胞苷：在第1、4、8、11、15、18、22、25、29和32天接受皮下治疗。

[0377] 组4-组合：在第1、2、8、9、15和16天接受用LOR-253静脉内治疗；在第22、23、24和25天接受用LOR-253腹膜内治疗；以及在第1、4、8、11、15、18、22和25天接受用阿扎胞苷皮下治疗

[0378] 这个实施例的肿瘤抑制结果证明单独施用的LOR-253HC1抑制THP-1肿瘤生长的程度大约相同于或略微大于单独阿扎胞苷。当与阿扎胞苷组合使用时，LOR-253HC1再次产生显著较高水平的肿瘤生长抑制。

[0379] 本文引用的各篇和每篇专利、专利申请和公布的公开内容，包括权利要求、图表和/或附图，据此以引用的方式整体并入本文。

[0380] 除非另外定义，否则本文所有技术和科学术语都具有与由本发明所属领域中的普通技术人员通常理解相同的含义。尽管与本文所述的方法和材料类似或等效的任何方法和材料都可用于实施或测试本发明，但本文描述优选的方法和材料。引用的所有公布、专利和专利公布都出于所有目的以引用的方式整体并入本文。

[0381] 本文讨论的公布仅由于它们的公开内容在本申请的提交日期之前而加以提供。本文中没有内容应解释为承认本发明由于先前发明而无权先于所述公布。

[0382] 尽管本发明已结合其特定实施方案加以描述，但应了解能够进一步修改，并且本申请意图涵盖本发明的一般来说遵循本发明的原理并包括与本公开的偏离的任何变化形式、用途或改适，所述偏离诸如在本发明所属领域内的已知或惯用规范的范围内，以及诸如可应用于在上文中阐述以及如下在随附权利要求的范围内的基本特征。

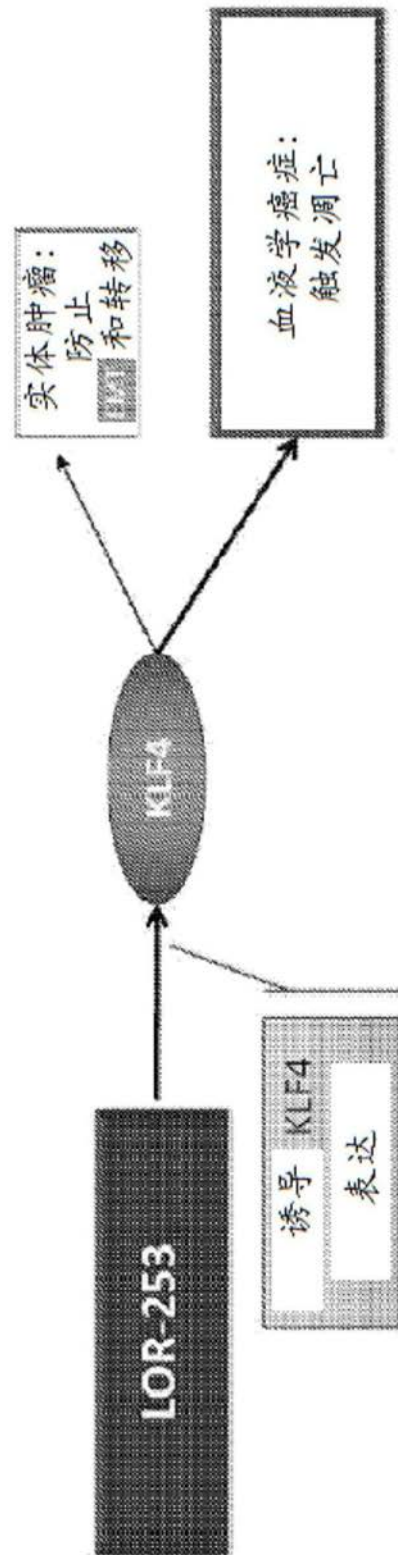


图1

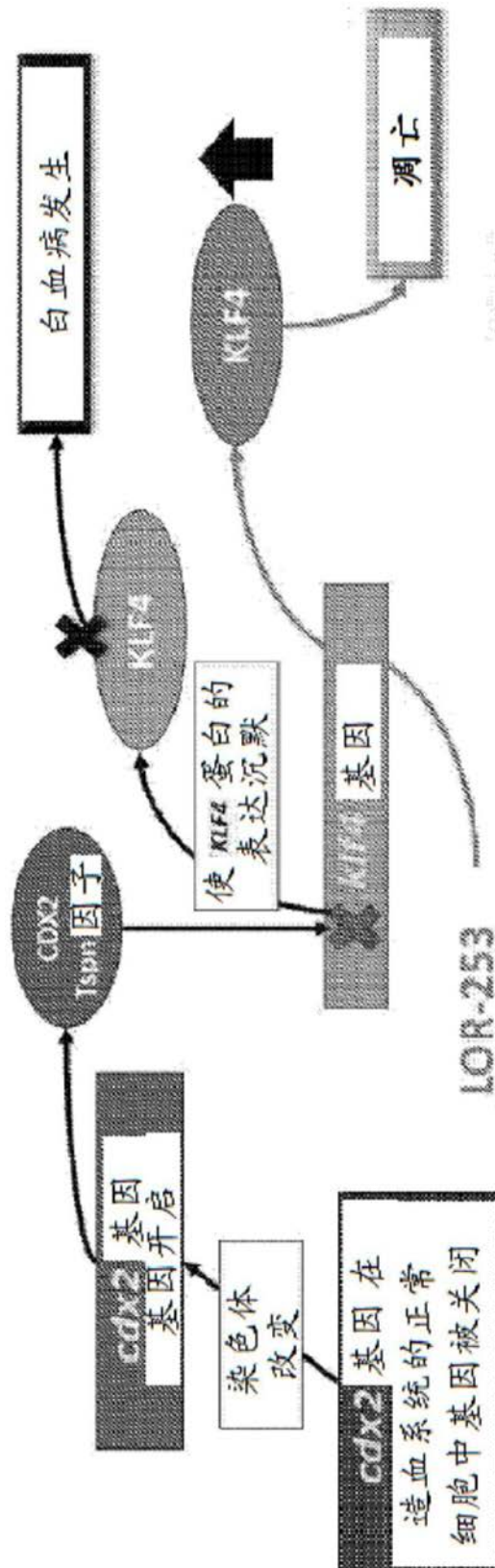


图2

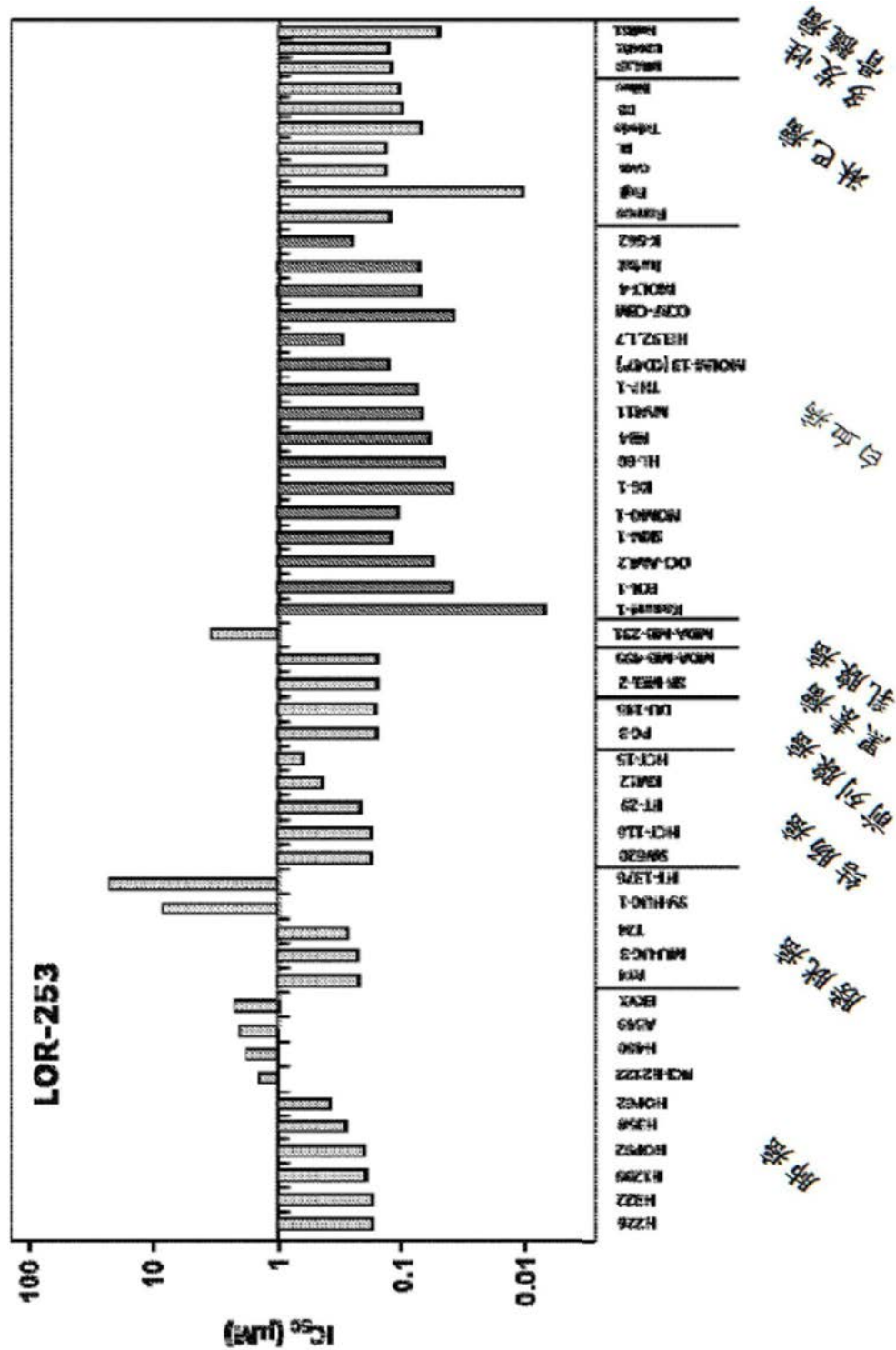


图3

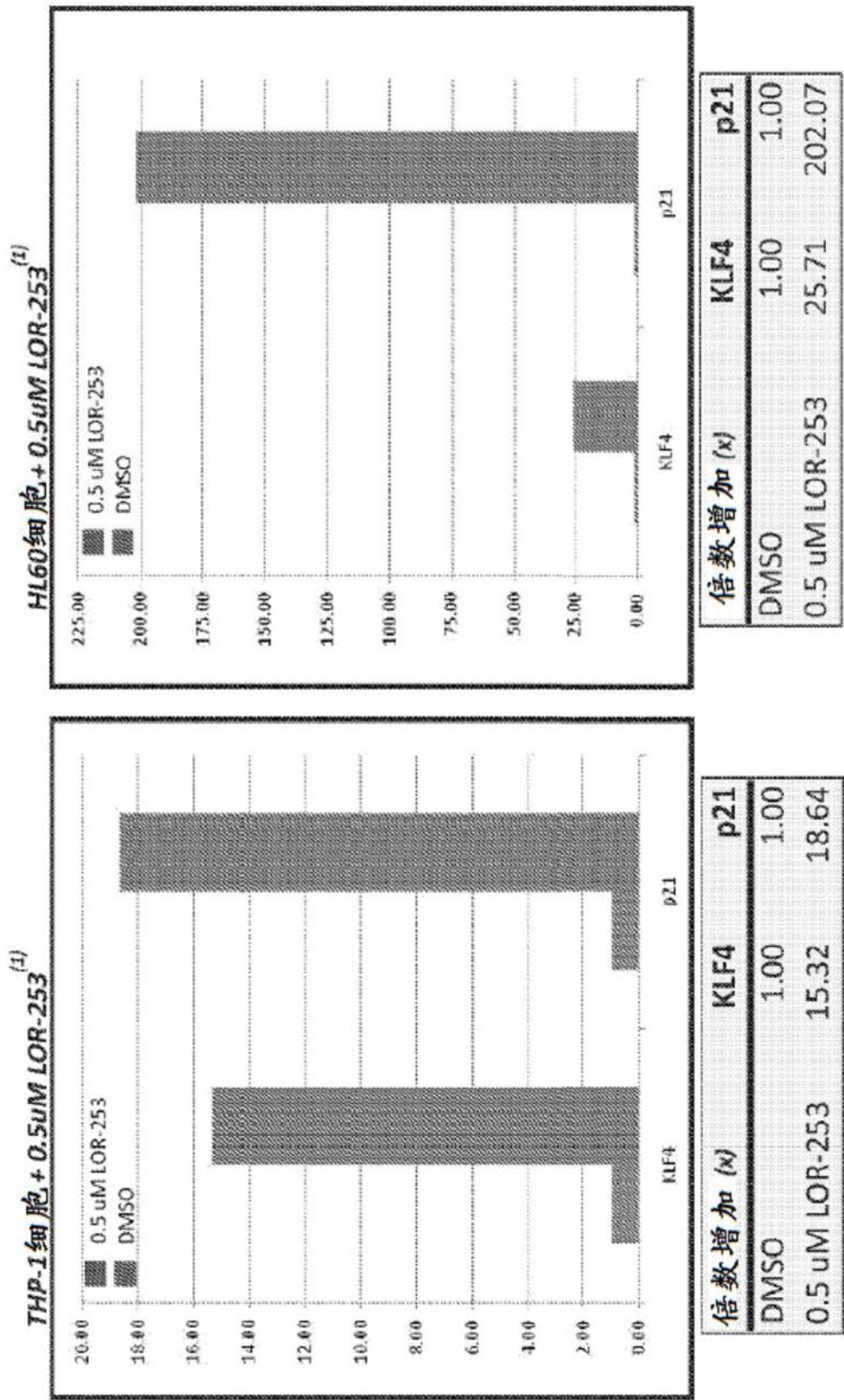


图4

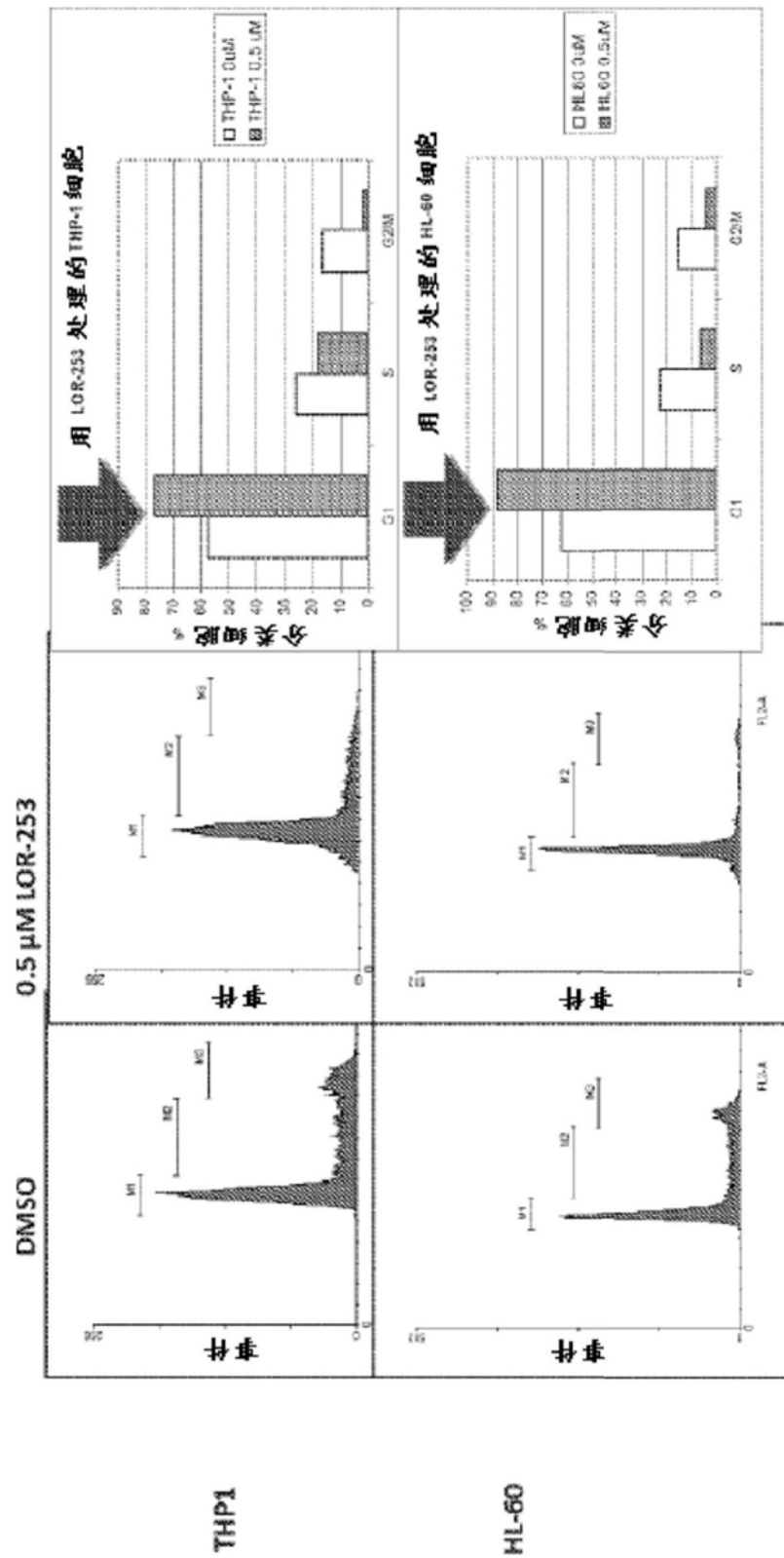


图5



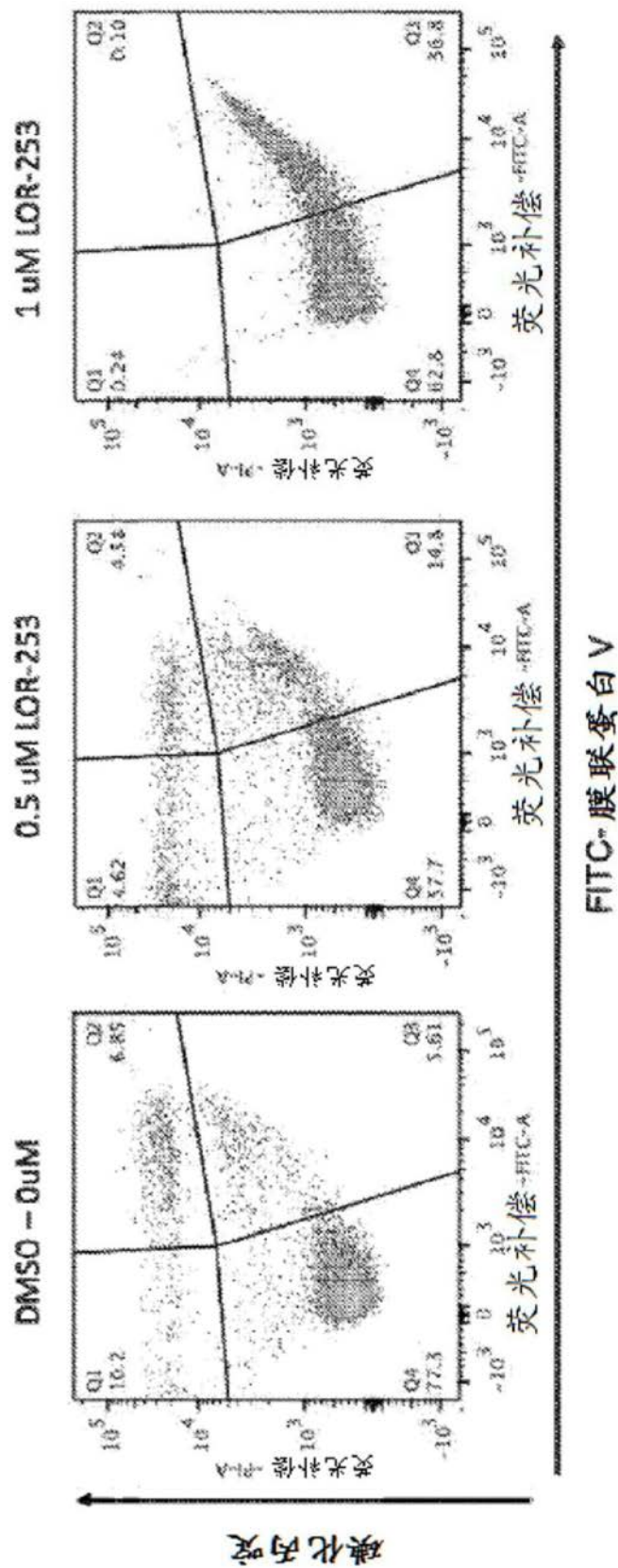


图6

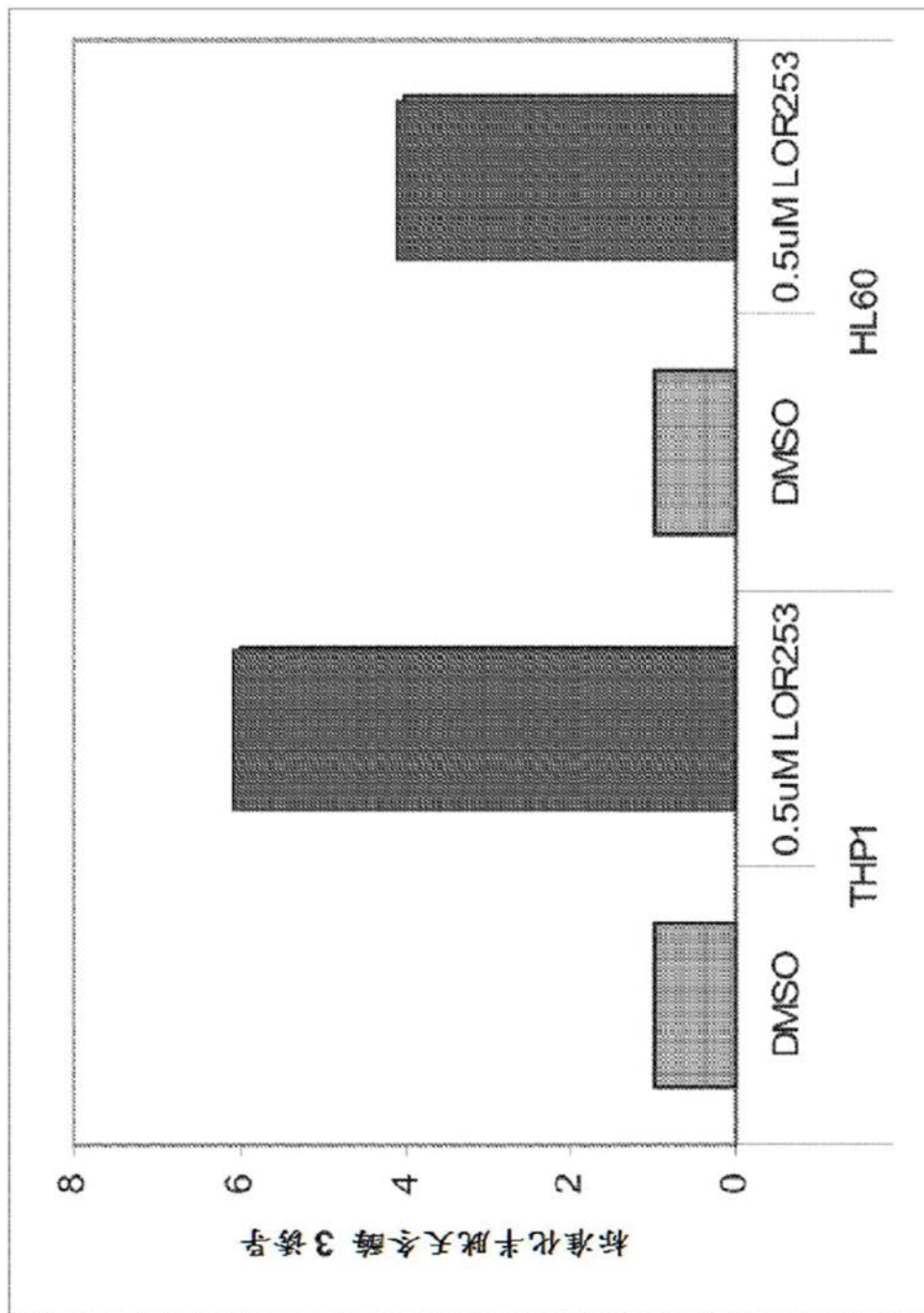


图7



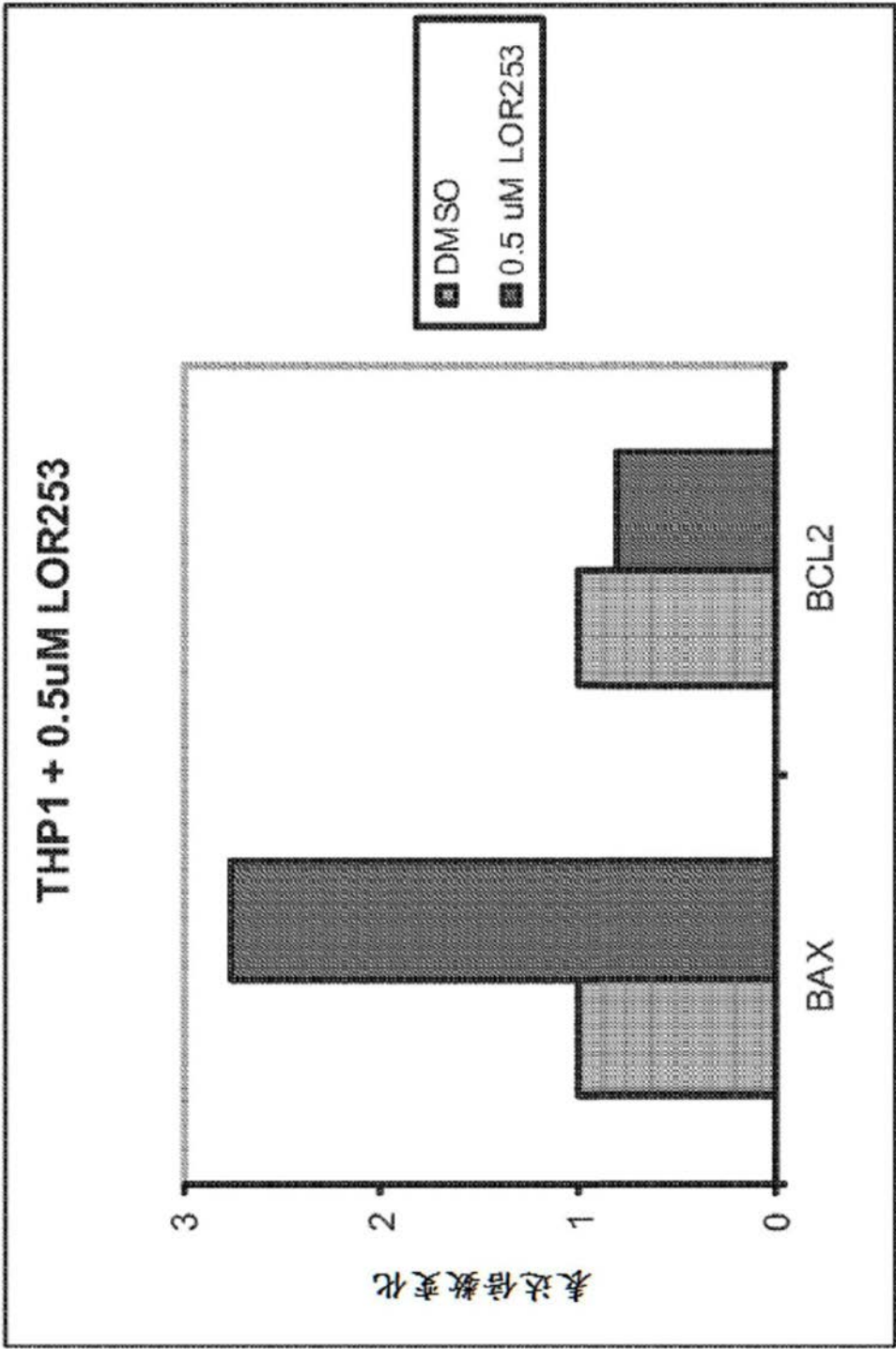


图8

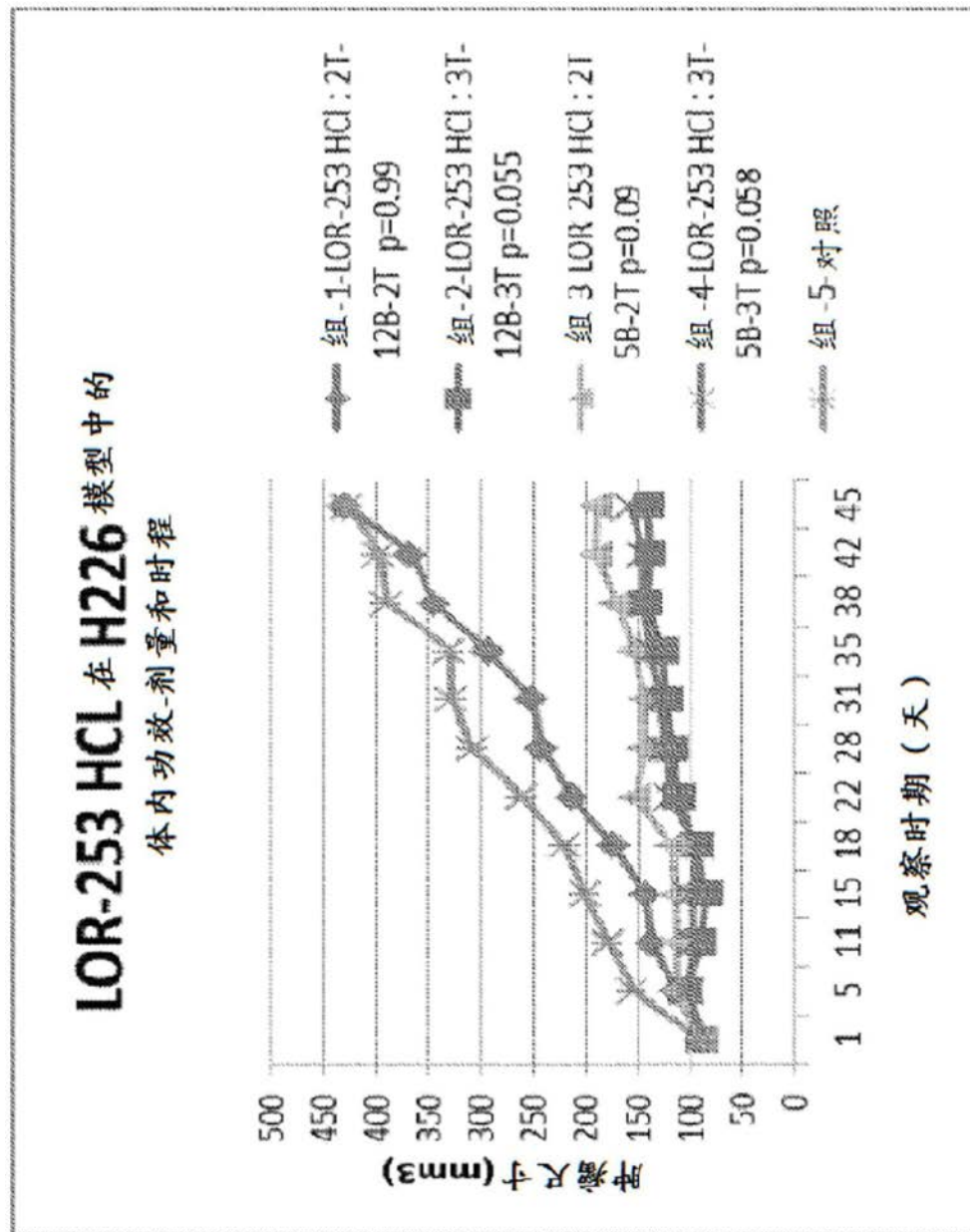


图9

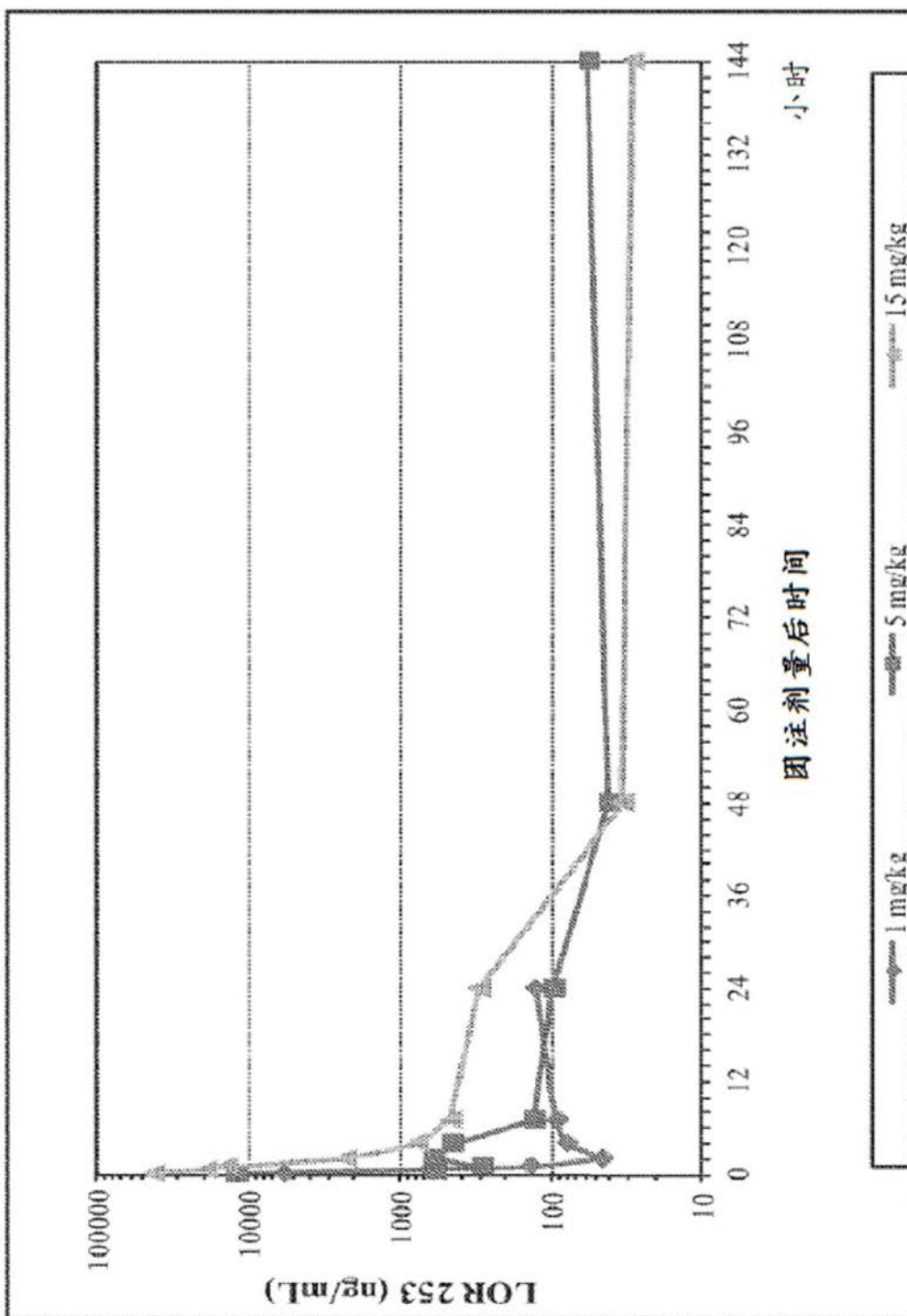


图10

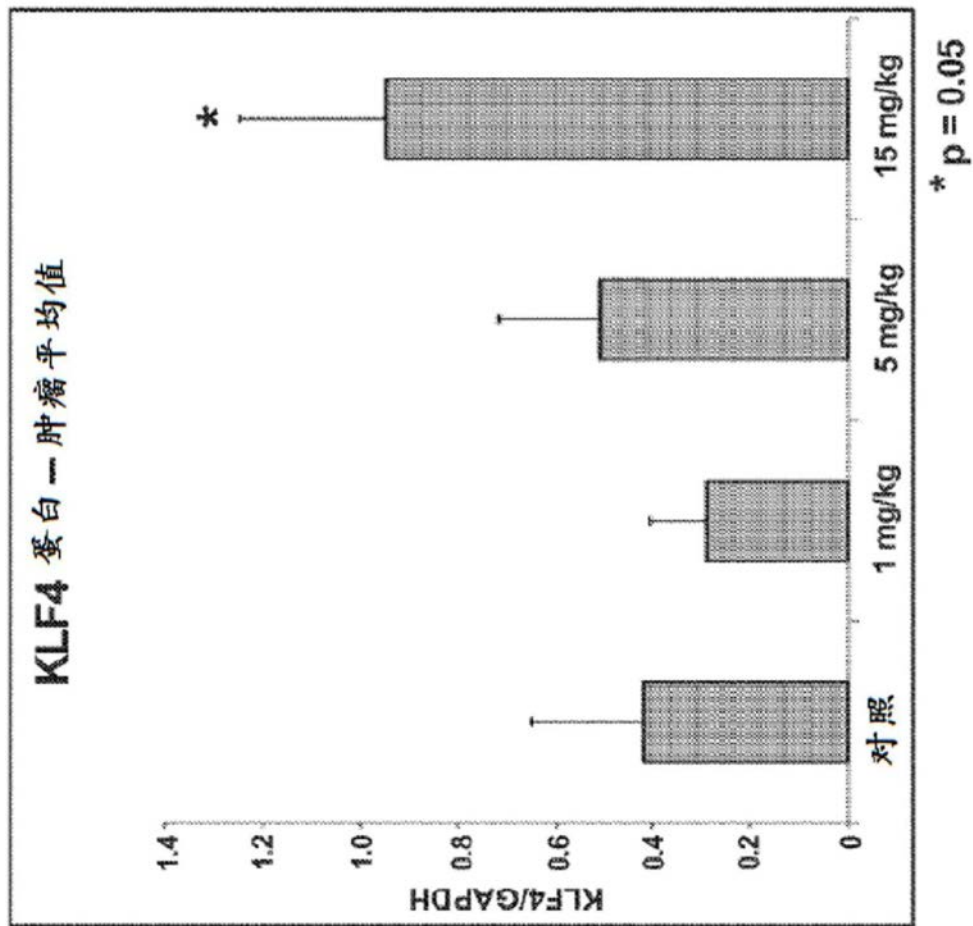


图11

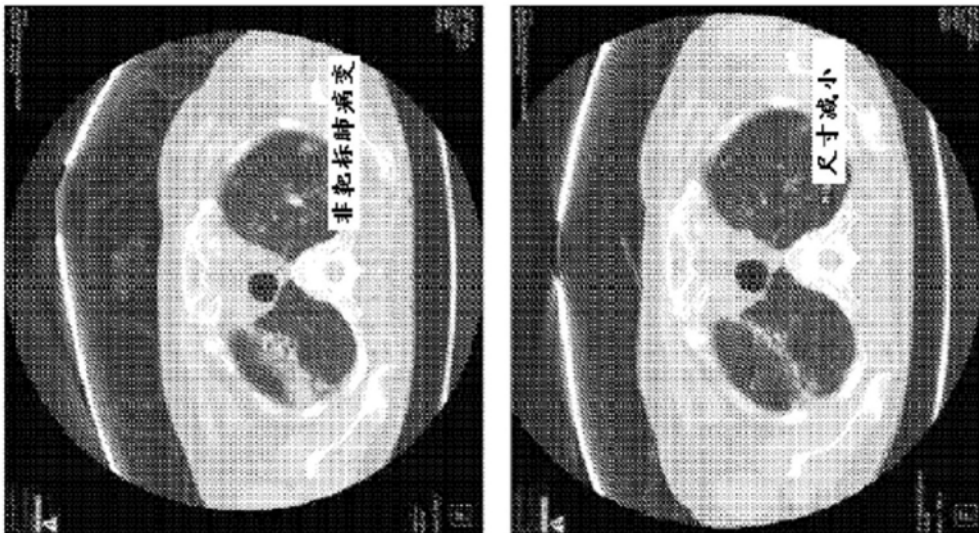


图12

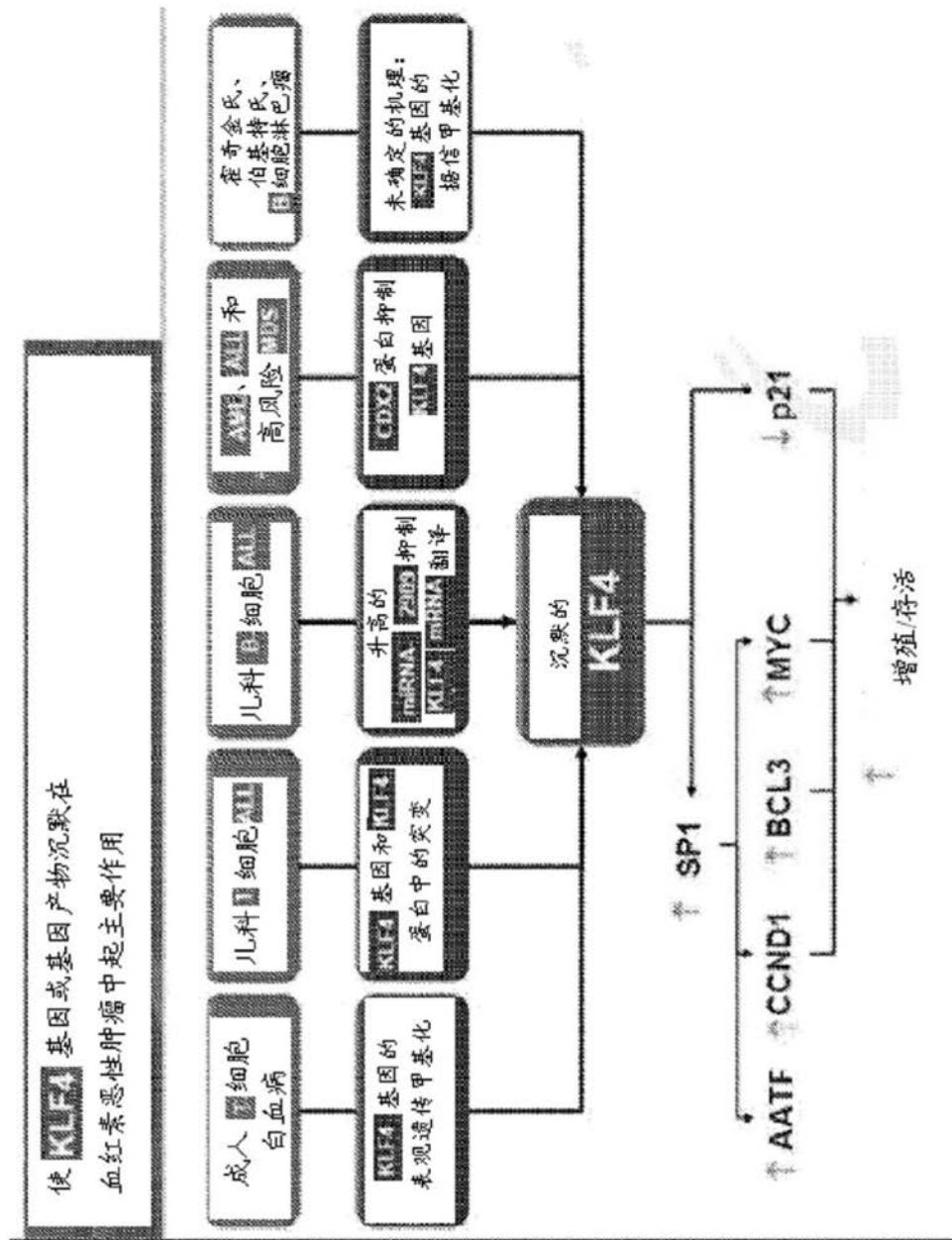


图13





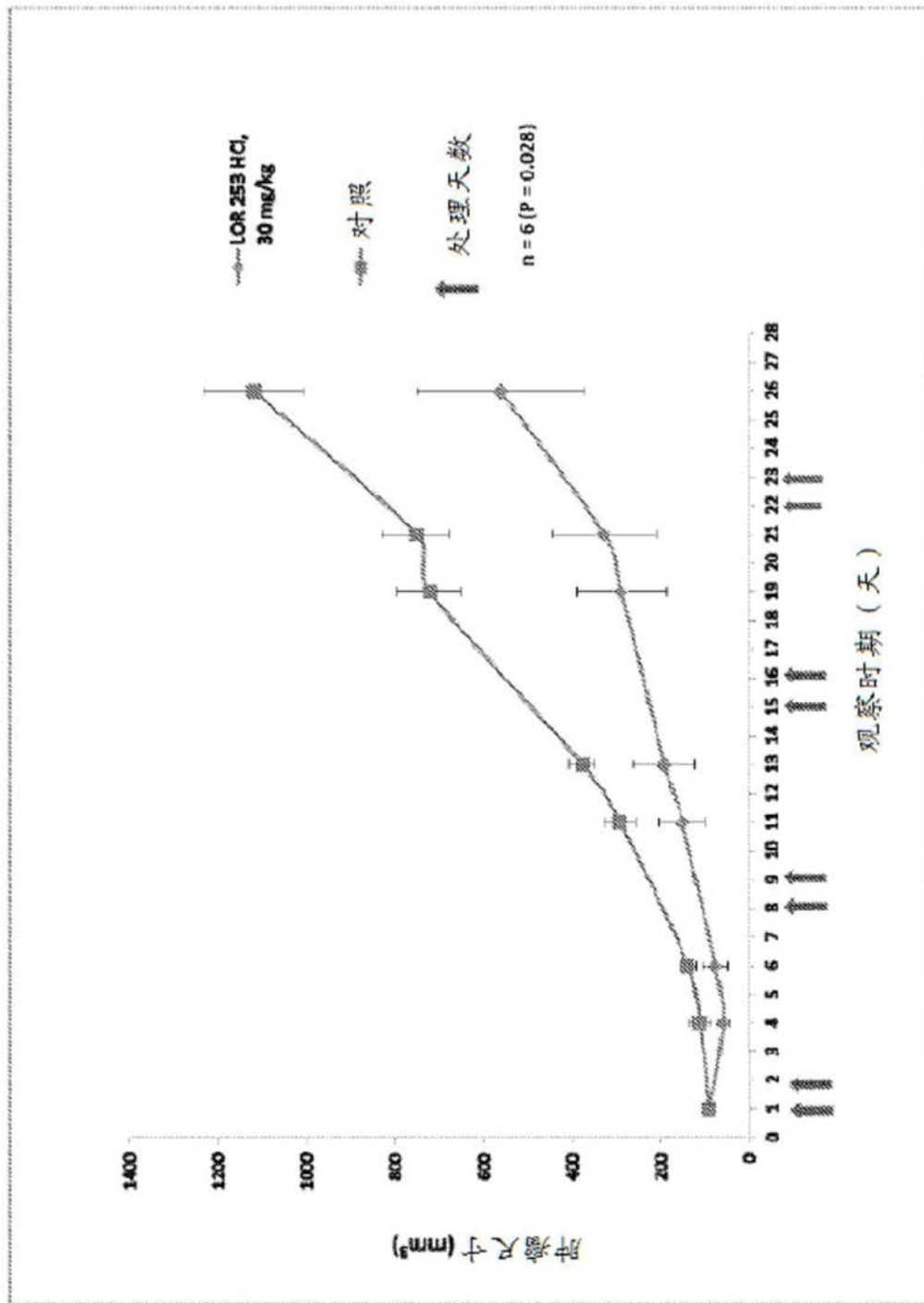


图15

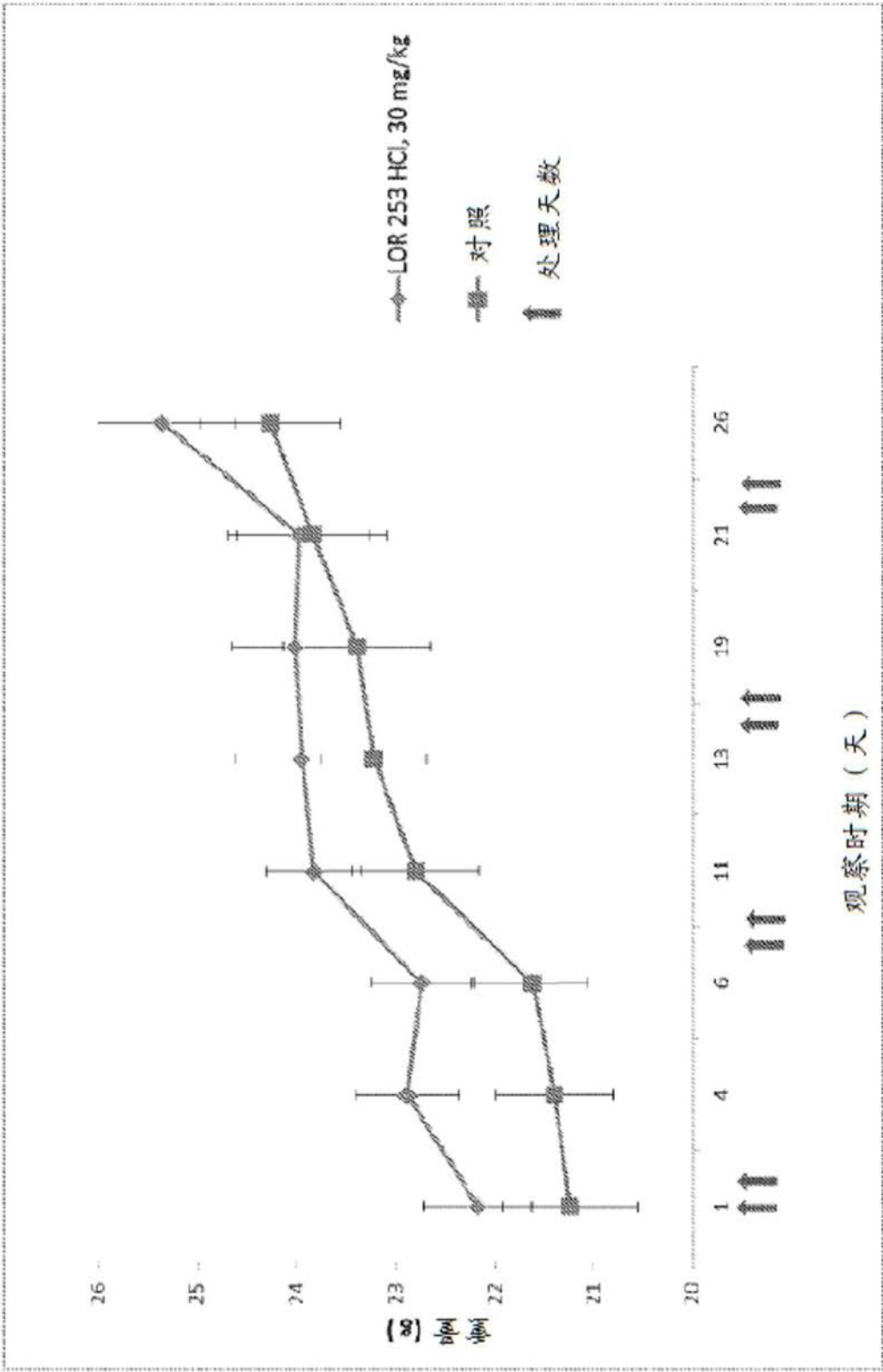


图16



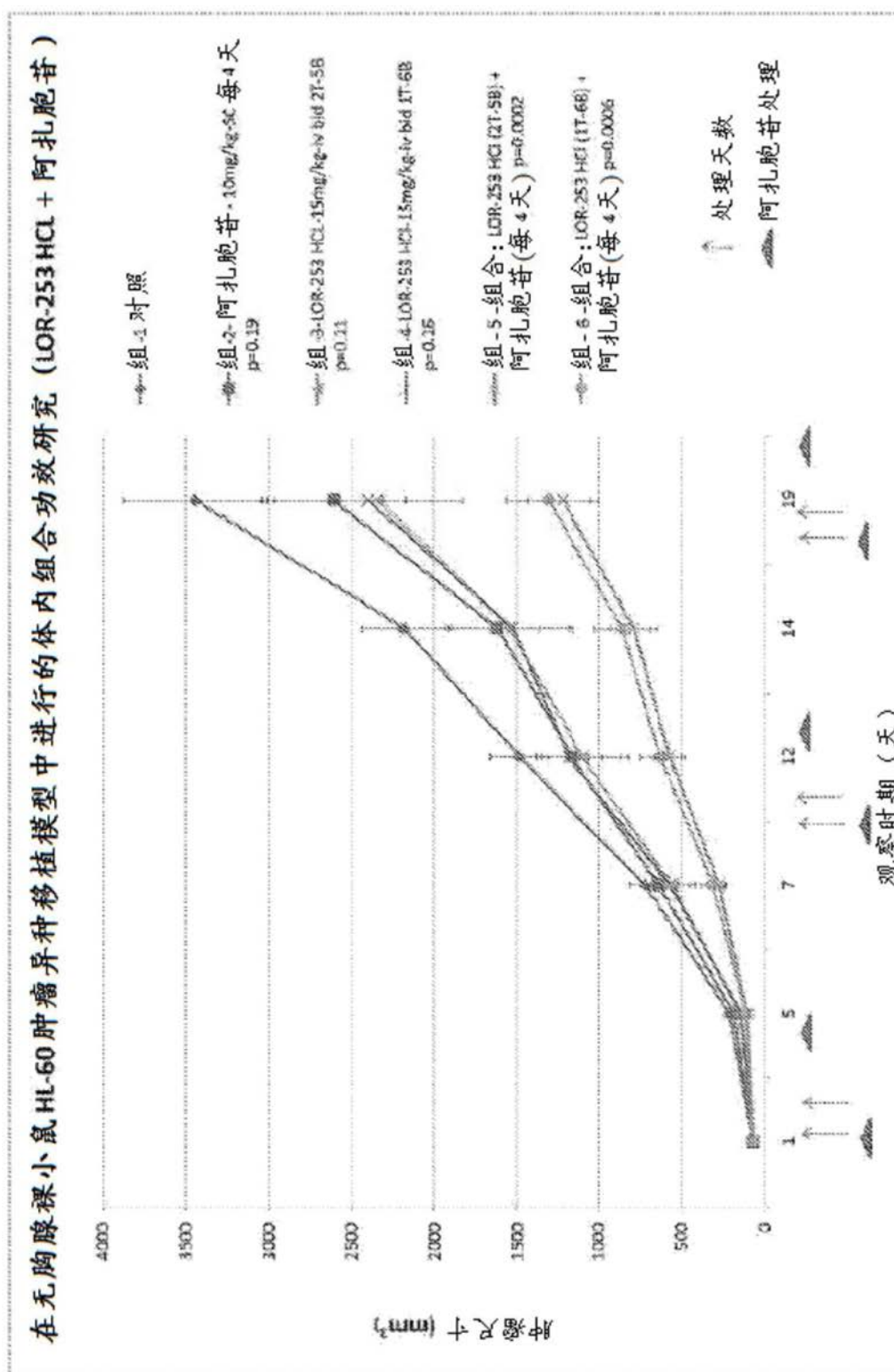


图17

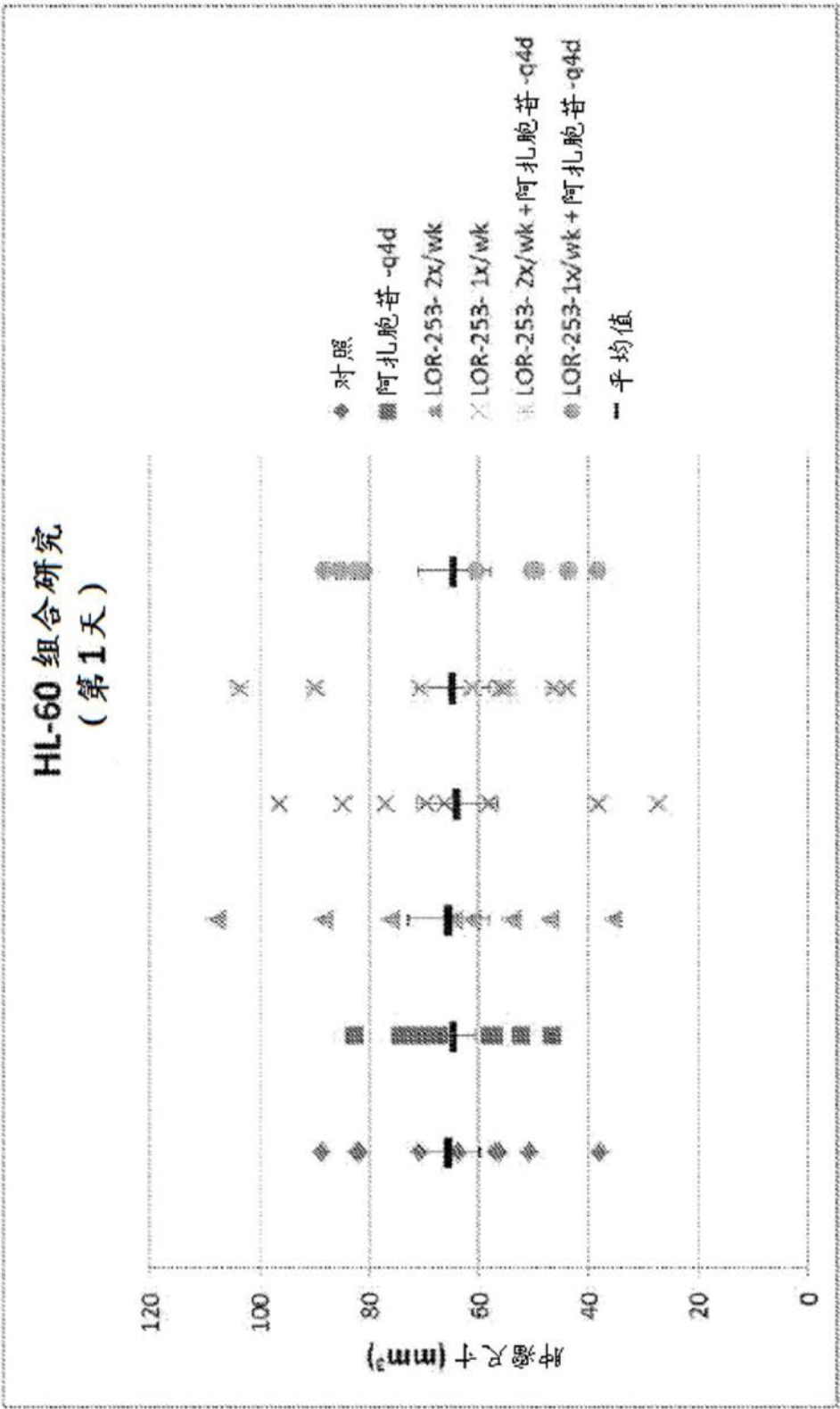


图18

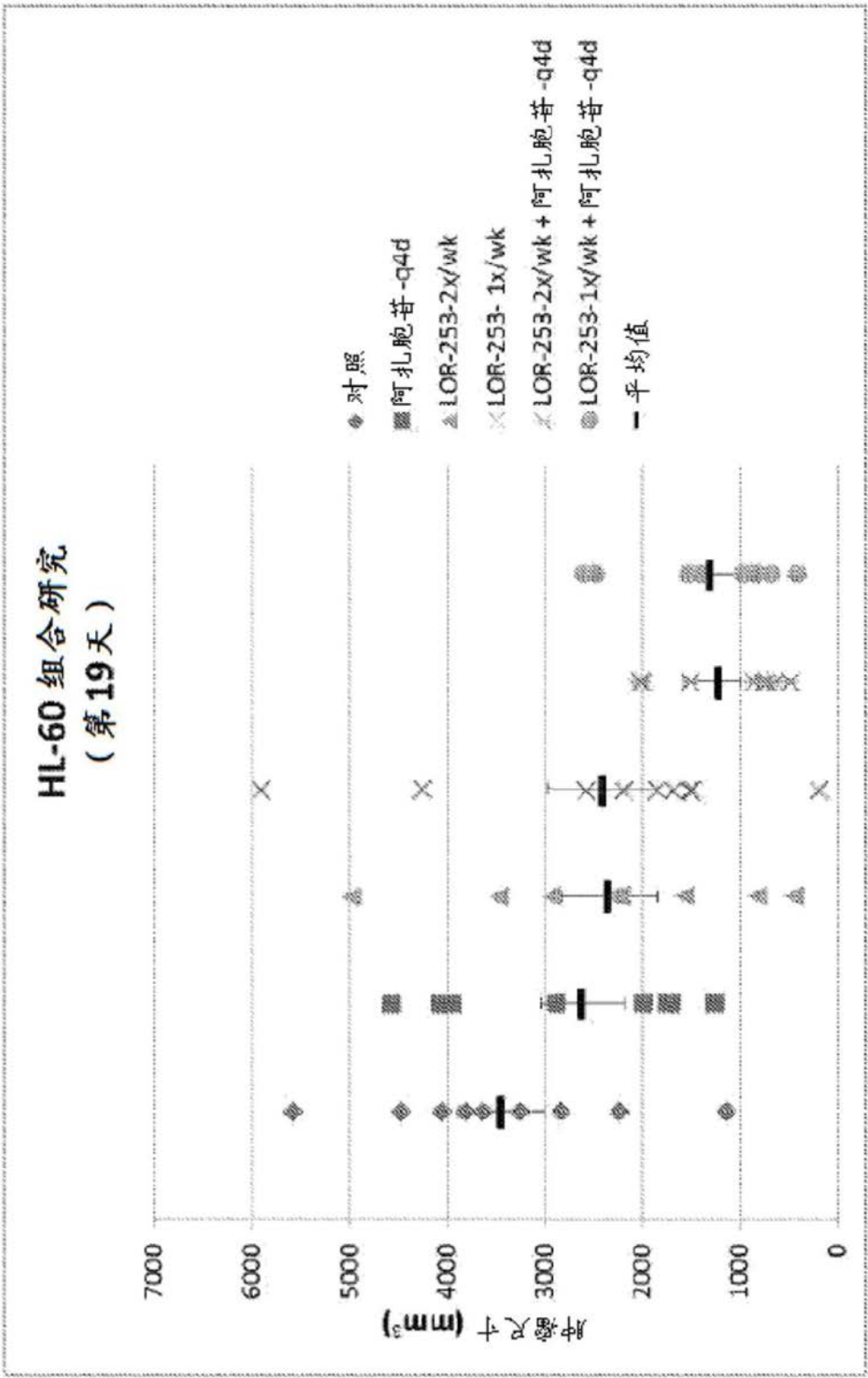


图19

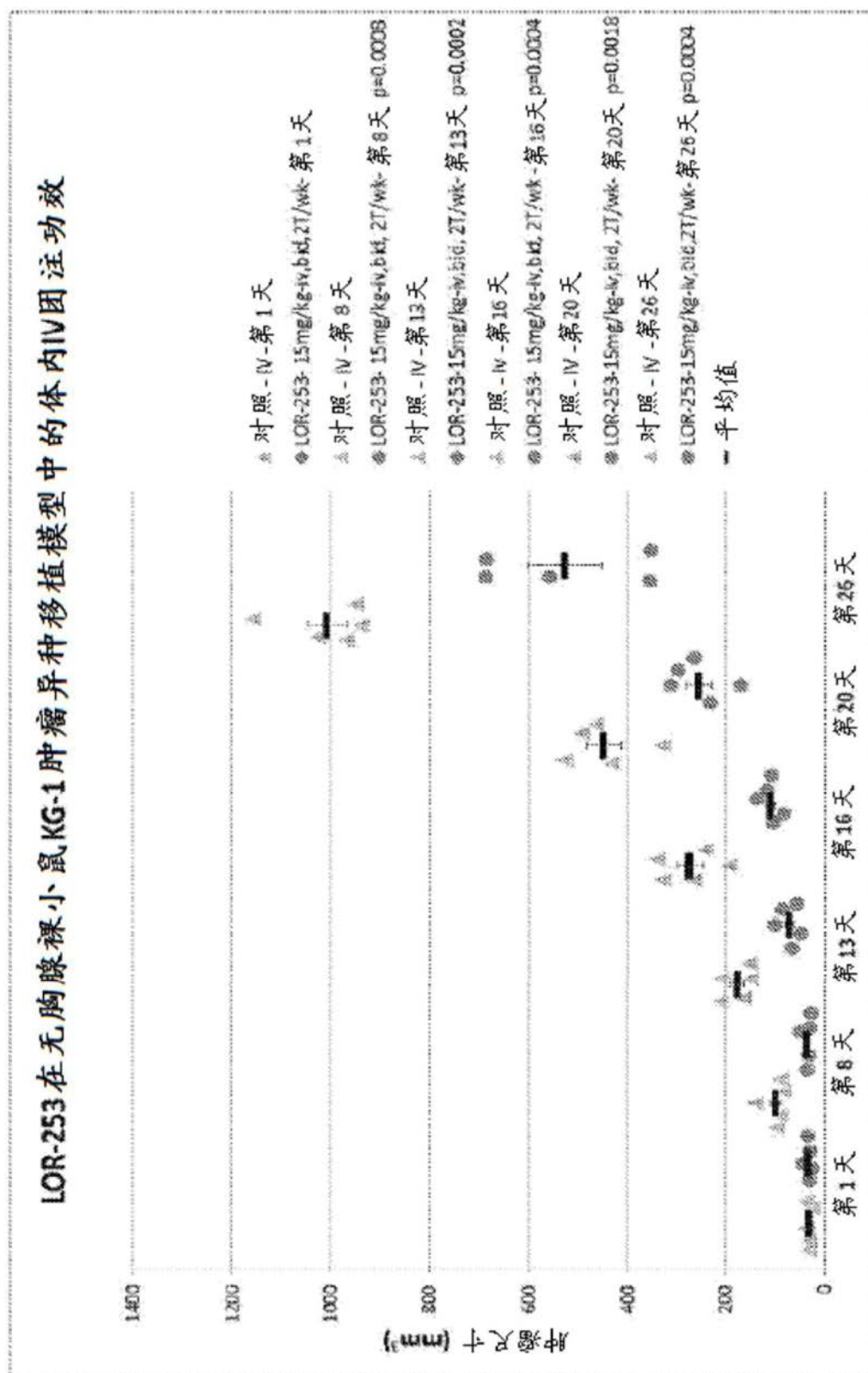


图20

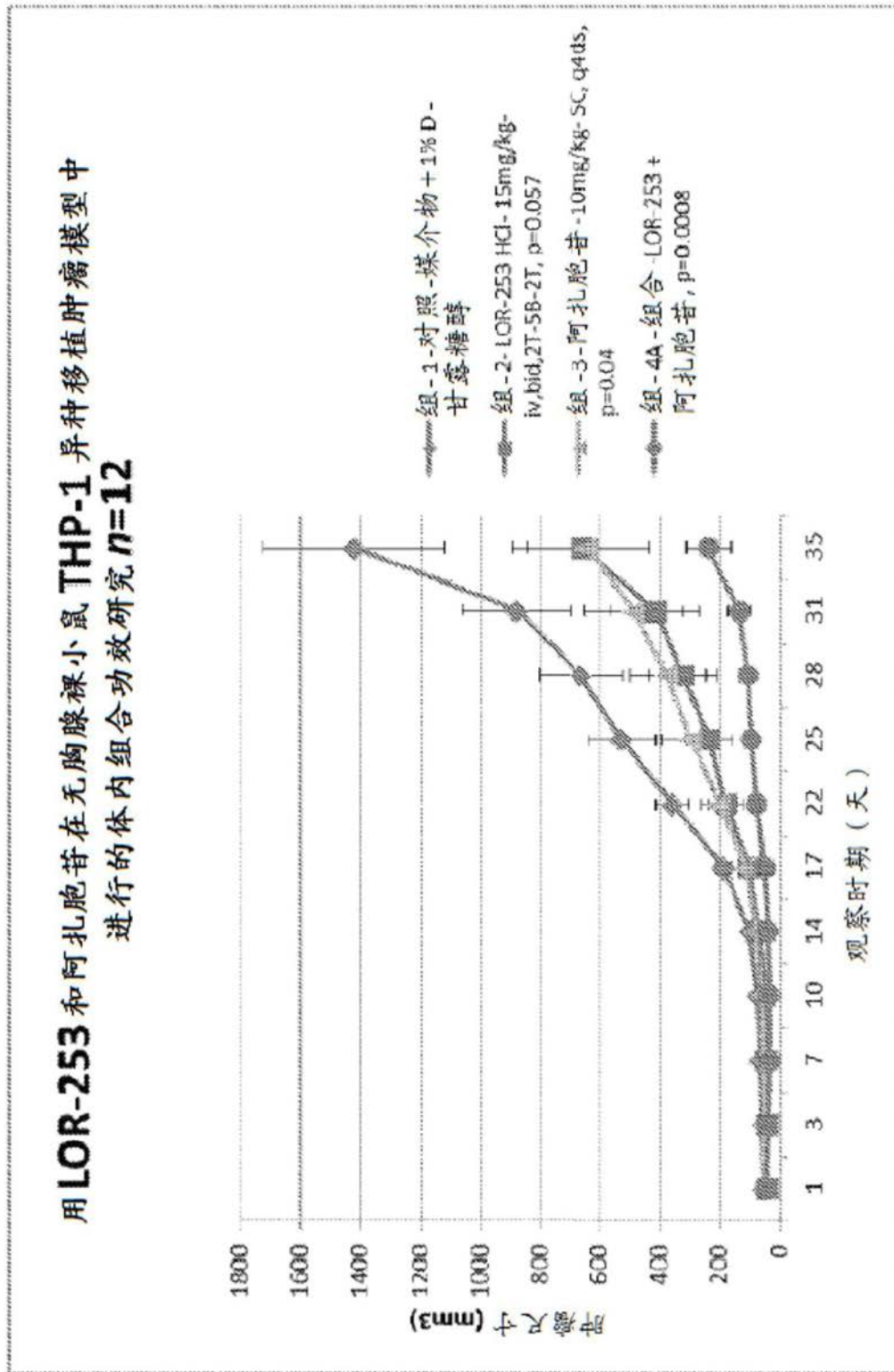


图21