(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106232581 A
(43)申请公布日 2016.12.14

(21)申请号 201480066862.2

(22)申请日 2014.10.08

(30)优先权数据
61/887988 2013.10.08 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.06.07

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CA2014/050974 2014.10.08

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2015/051458 EN 2015.04.16

(71)申请人 卢庆彬
地址 加拿大安大略省

(72)发明人 卢庆彬

(74)专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理有限公司 11280
代理人 郭广迅 李渤

(51)Int.Cl.
C07D 213/73(2006.01)
A61K 31/136(2006.01)
A61K 31/44(2006.01)
A61K 31/495(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
C07D 241/20(2006.01)
C07C 211/52(2006.01)

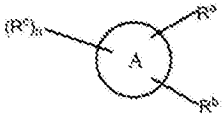
权利要求书5页 说明书31页 附图29页

(54)发明名称

用于靶向化疗的非铂基抗癌化合物

(57)摘要

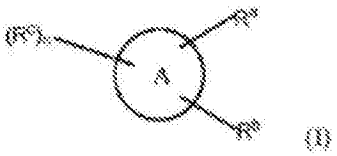
本文公开了可用于靶向化疗的非铂基(NPB)抗癌化合物，例如，以产生治疗癌症和其他障碍的抗癌效果，同时没有或具有最低的毒性。所述化合物具有通式I：(I)其中A表示芳核；R^a和R^b中至少一个为如本文所定义的电子转移促进基团，例如，NH_2；并且至少一个R^c为如本文所定义的离去基团，例如，卤素；并且所述分子的其余部分如本文所定义。还公开了包含所述抗癌化合物的药物组合物、方法、用途、试剂盒和商业包装产品。



(I)

CN 106232581 A

1.一种非铂基(NPB)抗癌化合物或其药学上可接受的盐，所述化合物具有通式I：



其中A为含有0至2个选自N、O和S的环杂原子的5元或6元芳环或杂芳环，其余的环原子为碳，

R^a和R^b独立地为H、OH、烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基、杂芳基或电子转移促进基团，其中R^a和R^b中至少一个为电子转移促进基团；

R^c在每次出现时独立地为H、OH、烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基、杂芳基、离去基团，或两个相邻的R^c基团连同其所连接的环原子一起形成5元或6元饱和的、部分饱和的或不饱和的环，所述环含有0至2个选自N、O和S的环杂原子并且任选地被1至4个R^d取代；其中至少一个R^c为离去基团；

R^d独立地为OH、烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基或杂芳基；并且

n＝1至4，

其中所述烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基和杂芳基部分各自任选地被取代。

2.权利要求1所述的化合物，其中所述电子转移促进基团选自$-NH_2$、-NHR、$-NR_2$、-OH、$-NHCOCH_3$、-NHCOR、$-OCH_3$和-OR，其中R为取代或未取代的烷基。

3.权利要求2所述的化合物，其中R^a和R^b各自为电子转移促进基团。

4.权利要求1至3中任一项所述的化合物，其中R^a和R^b在相邻的环碳上。

5.权利要求1至4中任一项所述的化合物，其中所述电子转移促进基团为$-NH_2$。

6.权利要求1至5中任一项所述的化合物，其中所述离去基团为卤素。

7.权利要求1至6中任一项所述的化合物，其中环A上的一个或两个R^c基团为选自Cl、Br、I和F的卤素。

8.权利要求6或7所述的化合物，其中所述卤素为Cl、Br或I。

9.权利要求1至8中任一项所述的化合物，其中环A为6元芳环或杂芳环。

10.权利要求9所述的化合物，其中环A为苯、吡啶或吡嗪。

11.权利要求1至10中任一项所述的化合物，其中环A为苯。

12.权利要求1至10中任一项所述的化合物，其中环A为苯、吡啶或吡嗪；R^a和R^b各自为NH_2；环A上的两个R^c取代基为卤素，其各自在环A上位于R^a和R^b的间位和对位；并且任何其余的R^c基团如权利要求1中所定义。

13.权利要求12所述的化合物，其中环A为苯。

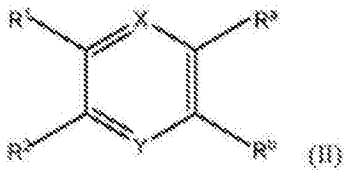
14.权利要求13所述的化合物，其中环A上其余的碳为未取代的碳。

15.权利要求12所述的化合物，其中环A为吡啶。

16.权利要求15所述的化合物，其中环A上其余的碳为未取代的。

17.权利要求12所述的化合物，其中环A为吡嗪。

18.权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐，所述化合物具有通式II：



(II)

其中：

X和Y独立地为C-R^3或N；

R^3为H、OH、卤素、烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基或杂芳基；

R^a和R^b独立地为H、OH、烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基、杂芳基或电子转移促进基团，其中R^a和R^b中至少一个为电子转移促进基团；

R^1和R^2独立地为H、OH、烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基、杂芳基或离去基团；其中R^1和R^2中至少一个为离去基团，

其中所述烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基和杂芳基部分各自任选地被取代。

19.权利要求18所述的化合物，其中所述电子转移促进基团选自-NH_2、-NHR、-NR_2、-OH、-$NHCOCH_3$、-NHCOR、-OCH_3和-OR，其中R为取代或未取代的烷基。

20.权利要求19所述的化合物，其中所述电子转移促进基团为-NH_2、-NHR或-NR_2。

21.权利要求18至20中任一项所述的化合物，其中所述电子转移促进基团为-NH_2。

22.权利要求18至21中任一项所述的化合物，其中R^a和R^b各自为电子转移促进基团。

23.权利要求18至22中任一项所述的化合物，其中所述离去基团为卤素。

24.权利要求18至23中任一项所述的化合物，其中R^1和R^2各自为选自Cl、Br、I和F的卤素。

25.权利要求23或24所述的化合物，其中所述卤素为Cl、Br或I。

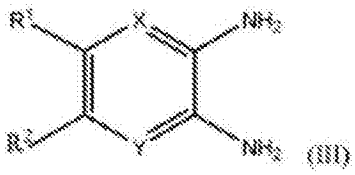
26.权利要求18至25中任一项所述的化合物，其中X和Y为C-R^3。

27.权利要求18至25中任一项所述的化合物，其中X为C-R^3并且Y为N。

28.权利要求26或27所述的化合物，其中R^3为H。

29.权利要求18至25中任一项所述的化合物，其中X和Y各自为N。

30.权利要求1或18所述的化合物或其药学上可接受的盐，所述化合物具有通式III，



(III)

其中

X和Y独立地为C-R^3或N；

R^3为H、OH、卤素、烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基或杂芳基；

R^1和R^2独立地为H、OH、烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基、杂芳基或离去基团；其中R^1和R^2中至少一个为离去基团，

其中所述烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基和杂芳基部

分各自任选地被取代。

31.权利要求30所述的化合物，其中所述离去基团为卤素。

32.权利要求30或31所述的化合物，其中R^1和R^2各自为选自Cl、Br、I和F的卤素。

33.权利要求31或32所述的化合物，其中所述卤素为Cl、Br或I。

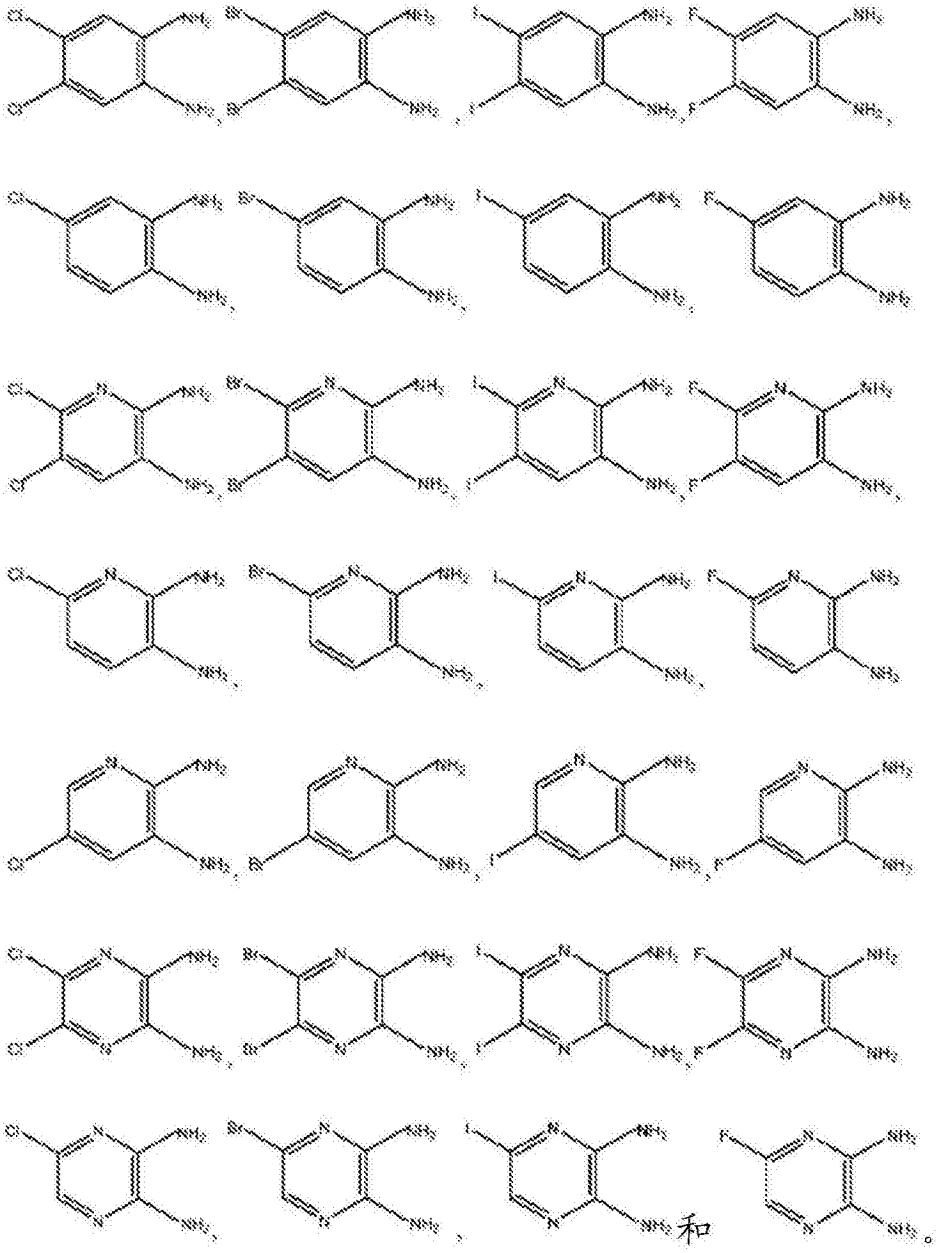
34.权利要求30至33中任一项所述的化合物，其中X和Y为C-R^3。

35.权利要求30至33中任一项所述的化合物，其中X为C-R^3并且Y为N。

36.权利要求34或35所述的化合物，其中R^3为H。

37.权利要求30至33中任一项所述的化合物，其中X和Y各自为N。

38.权利要求1、18和30中任一项所定义的化合物，其选自以下：



和。

39.权利要求1至38中任一项所述的化合物，所述化合物具有大于0eV的电子亲和力。

40.权利要求1至39中任一项所述的化合物，所述化合物具有介于约+0.2eV与约+5eV之间的电子亲和力。

41.权利要求1至40中任一项所述的化合物，所述化合物具有介于约+0.5eV与约+2.5eV之间的电子亲和力。

42.权利要求1至41中任一项所述的化合物，其用于处理癌细胞(例如在癌细胞中诱导抗癌作用)。

43.权利要求1至41中任一项所述的化合物，其用于治疗受试者的可通过化疗治疗的疾病或病症。

44.权利要求1至41中任一项所述的化合物，其用于治疗受试者的癌症。

45.权利要求1至41中任一项所述的化合物，其用于制备用于治疗受试者的癌症的药物。

46.权利要求42至45中任一项所述的化合物，其中所述治疗排除放射治疗。

47.权利要求44至46中任一项所述的化合物，其中所述癌症对铂基抗癌药物(例如顺铂)敏感。

48.权利要求44至46中任一项所述的化合物，其中所述癌症对铂基抗癌药物(例如顺铂)有耐药性。

49.权利要求1至41中任一项所述的化合物治疗受试者的可通过化疗治疗的疾病或病症的用途。

50.权利要求1至41中任一项所述的化合物在治疗受试者的癌症中的用途。

51.权利要求1至41中任一项所述的化合物在制备用于治疗受试者的癌症的药物中的用途。

52.权利要求49或50所述的用途，其中所述治疗排除放射治疗。

53.权利要求50至52中任一项所述的用途，其中所述癌症对铂基抗癌药物(例如顺铂)敏感。

54.权利要求50至52中任一项所述的用途，其中所述癌症对铂基抗癌药物(例如顺铂)有耐药性。

55.一种药物组合物，其用于治疗癌症或可通过化疗治疗的其他疾病或病症，其包括：

有效量的根据权利要求1至41中任一项所述的化合物；和

药学上可接受的载体或稀释剂。

56.一种用于癌症的靶向化学疗法，其包括如权利要求1至41中任一项所定义的化合物。

57.一种治疗有需要的受试者的癌症或可通过化疗治疗的其他疾病或病症的方法，其包括：

将有效量的如权利要求1至41中任一项所定义的抗癌化合物给予受试者。

58.一种在癌细胞中诱导抗癌作用的方法，其包括：

将有效量的根据权利要求1至41中任一项所述的化合物给予癌细胞，从而提供抗癌作用。

59.权利要求58所述的方法，其中所述抗癌作用为杀伤癌细胞。

60.权利要求57至59中任一项所述的方法，其中所述方法排除放射治疗。

61.权利要求57至60中任一项所述的方法，其中所述癌症对铂基抗癌药物(例如顺铂)敏感。

62.权利要求57至60中任一项所述的方法，其中所述癌症对铂基抗癌药物(例如顺铂)有耐药性。

63.一种在癌细胞中诱导凋亡的方法，其包括将有效量的根据权利要求1至41中任一项所述的化合物给予所述细胞。

64.一种在有需要的受试者中产生化疗作用的方法，其包括：

将有效量的如权利要求1至41中任一项所定义的化合物给予受试者。

65.一种用于治疗癌症或可通过化疗治疗的其他疾病的组合疗法，其包括：

将有效量的如权利要求1至41中任一项所定义的化合物给予受试者；和

给予受试者一种或多种另外的治疗剂。

66.权利要求65所述的组合疗法，其中所述另外的治疗剂为化疗剂。

67.一种商业包装产品或试剂盒，其包括如权利要求1至41中任一项所定义的化合物；以及使用说明书。

68.权利要求67所述的商业包装产品或试剂盒，其中所述说明书用于治疗癌症。

用于靶向化疗的非铂基抗癌化合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2013年10月8日提交的第61/887,988号美国临时专利申请的优先权的权益,将其整体通过引用并入本文。

[0003] 背景

[0004] 癌症是遍及全球的重大健康问题,战胜癌症向医学科学提出了巨大挑战。化疗是癌症治疗的主要方式之一,并且通常涉及使用一种或多种抗癌剂(化疗剂)治疗癌症。一些化疗剂还用于治疗其他的疾病和病症,例如关节炎、系统性红斑狼疮、AL型淀粉样变性、强直性脊柱炎、多发性硬化症、克罗恩病、牛皮癣和硬皮病。

[0005] 许多抗癌剂通过破坏有丝分裂起作用,并且因此靶向快速分裂的细胞,快速分裂的细胞是大多数癌细胞的特征属性。一些试剂阻止细胞分裂,并且其他的例如通过引发凋亡杀伤细胞。正在开发某些新的药剂(例如各种单克隆抗体),以提供更有靶向性治疗(与传统的化疗不同),例如靶向在某些类型的癌细胞中过表达并且是它们的生长所必需的具体蛋白的那些。在抗肿瘤治疗方案中,这样的治疗经常与传统化疗剂组合使用。

[0006] 化疗可以一次使用一种抗癌剂(单药化疗或单化疗)或一次使用多种药剂(组合化疗)。增强癌症对放射疗法(电离辐射)的放射敏感性的化学试剂被称为放射增敏剂。使用仅在暴露到光时转化为细胞毒性活性的化学物质(被称为光敏剂)的治疗被称为光能疗法。

[0007] 尽管可获得各种抗癌剂,但是它们几乎全部有毒性。化疗通常引起明显的并且通常是危险的副作用,包括肾毒性、肝毒性、严重的恶心和呕吐、骨髓抑制(bone marrow depression)、骨髓抑制(myelosuppresion)/免疫抑制、粘膜炎(消化道内膜的炎症)、秃头(脱发)、血球减少、疼痛和疲劳。另外的副作用可以包括精神萎顿;皮肤并发症,如超敏反应;以及神经系统、肺、心脏、生殖和内分泌并发症。与抗癌剂相关的副作用通常是限定药剂的剂量限制性毒性(DLT)的主要因素。在癌症治疗的临床管理中,管理由化疗引起的不良副作用具有主要的和关键的重要性。此外,许多肿瘤细胞例如通过多药耐药性,对抗癌剂有耐药性,或形成耐药性。

[0008] 顺铂(顺式-$Pt(NH3)_2Cl_2$)是一种铂基抗肿瘤药物并且是最广泛使用的用于癌症治疗的药物之一。顺铂也已被用作放射增敏剂以增强癌细胞对电离辐射的放射敏感性[Rose等,1999]。尽管顺铂被广泛使用,但它有两个主要缺点:严重的毒副作用以及固有的耐药性和获得性耐药性。这些缺点甚至导致终止重金属Pt基抗癌药物的临床应用的呼声[Reese,1995]。仍需要鉴别减少顺铂毒性和/或阻止或克服耐药性的毒性较低的类似物。

[0009] 尽管制药公司增加了成本,但在过去十年中被美国食品和药物管理局和世界各地的其他主要监管机构批准的真正创新的新药的数量有所减少。新抗癌剂的鉴别仍然是有点经验主义的过程,为了鉴别用于进一步研究的非常少量的潜在候选分子,通常涉及筛选大量化合物。因此需要更合理和有效的方法来设计新型抗癌剂。虽然可以使用各种药物发现工具,例如基于结合的筛选、基于抑制因子的筛选和基于结构的药物设计,但是突出的问题是缺乏对当前使用或在临床试验中的大多数抗癌药物的作用的精确分子机制的理解。不理解具体的机制,就难以从个体疗法的成功或失败中学习。因此已证明,通过传统方法搜寻新

的抗癌药物是昂贵的、困难的以及低效的。为了最终战胜癌症，对于创新的癌症研究有强烈的需求，该研究聚焦于对DNA损伤/修复、细胞凋亡、肿瘤发生和以分子表述的疗法的基础机制的十分深入的理解[Varmus,2006;Alberts,2008,2011]，其进而将在癌症疗法中实现突破。

[0010] 在从化学和生物到医药的不同领域中，分子反应的直接观察非常重要。飞秒(fs)(1fs＝10^{-15}s)时间分辨激光光谱(fs-TRLS)是实时将分子反应可视化的直接技术。其关键优势在于许多分子反应真正发生之际的时间标度的短持续时间的激光闪光。它在化学和生物系统的应用形成了飞秒化学和飞秒生物学的新领域[Zewail,2000]。

[0011] 在过去十年中，本发明人创造了新兴的跨学科前沿，分秒医学(FMD)，其涉及超快激光技术与生物医学科学的融合，以推进对重大人类疾病的基本理解和疗法[Lu,2010]。事实上，飞秒医学对重大人类疾病，尤其是癌症的加速发现和疗法的新进步是有希望的。

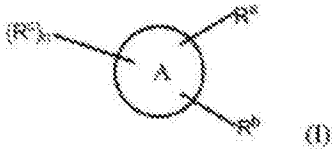
[0012] 本发明人研究的FMD导致细胞中的还原损害机制的发现，这可能与人类疾病，尤其是癌症密切相关[Lu等,2013]，还发现了作为抗癌药和与放疗结合的放疗增敏剂的顺铂的游离的电子转移(DET)反应机制[Lu,2007;Lu等,2007;Lu,2010]。这些机制的理解提供了改善现有药物的治疗和开发新的有效药物的机会。

[0013] 标题为用于与放射组合使用的放射增敏剂化合物(Radiosensitizer Compounds for Use in Combination With Radiation的PCT/CA2013/051005)(本发明人的)公开了一类与放射疗法结合的非铂基化合物，其使用电离辐射以增强放疗的抗癌疗效。该化合物显示增强了癌细胞对电离辐射的放射敏感性(也参见Lu,2014)。

[0014] 发明概述

[0015] 总的来说，本发明涉及一类非铂基抗癌化合物(下文缩写为NPB)，其是通过飞秒医学方法发现的。该化合物在体外和体内诱导抗癌作用，并且发现其对于正常细胞毒性很小至没有毒性。该化合物可以用作靶向化疗中的抗癌试剂，因为它们能够杀伤癌细胞，同时对正常细胞具有最低的毒性。因此，本发明还涉及用于癌症和可通过化疗治疗的其他病症的靶向化疗。本文还公开了与本文公开的NPB化合物有关的组合物、剂型、方法、用途、商业包装产品和试剂盒。

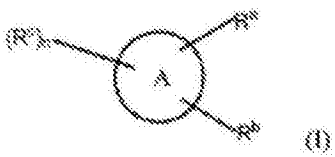
[0016] 在一个方面，提供了一种NPB抗癌化合物，其具有通式I：

[0017] 

(I)

[0018] 其中A表示芳核；R^a和R^b中至少一个为如本文所定义的电子转移促进基团(promoter)；并且至少一个R^c为如本文所定义的离去基团。

[0019] 在一个方面，NPB抗癌化合物具有通式I：

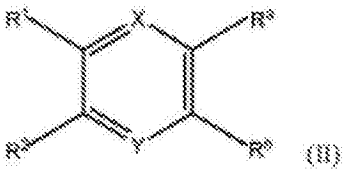
[0020] 

(I)

[0021] 其中A为含有0至2个选自N、O和S的环杂原子的5元或6元芳环或杂芳环，其余环原子为碳；R^a和R^b独立地为H、OH、烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环

基、杂芳基或电子转移促进基团，其中R^a和R^b中至少一个为电子转移促进基团；R^c在每次出现时独立地为H、OH、烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基、杂芳基或离去基团，或两个相邻的R^c基团连同其所连接的环原子一起形成5元或6元饱和、部分饱和或不饱和环，所述环含有0至2个选自N、O和S的环杂原子并且可以任选地被1至4个R^d取代；其中至少一个R^c为离去基团；R^d独立地为OH、烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基或杂芳基；并且n＝1至4，其中所述烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基和杂芳基部分各自任选地被取代；或其药学上可接受的盐。

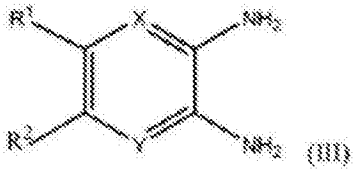
[0022] 在另一个方面，提供了一种具有通式II的NPB抗癌化合物：

[0023] 

(II)

[0024] 其中：X和Y独立地为C-R^3或N；R^3为H、OH、卤素、烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基或杂芳基；R^a和R^b独立地为H、OH、烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基、杂芳基或电子转移促进基团，其中R^a和R^b中至少一个为电子转移促进基团；R^1和R^2独立地为H、OH、烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基、杂芳基或离去基团；其中R^1和R^2中至少一个为离去基团，其中所述烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基和杂芳基部分各自任选地被取代；或其药学上可接受的盐。

[0025] 在另一个方面，提供了一种具有通式III的NPB抗癌化合物，

[0026] 

(III)

[0027] 其中X和Y独立地为C-R^3或N；R^3为H、OH、卤素、烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基或杂芳基；R^1和R^2独立地为H、OH、烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基、杂芳基或离去基团；其中R^1和R^2中至少一个为离去基团，其中所述烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基和杂芳基部分各自任选地被取代；或其药学上可接受的盐。

[0028] 在式I或II的一些实施方案中，R^a和R^b各自为电子转移促进基团。在本文所述的一些实施方案中，电子转移促进基团选自-NH_2、-NHR、-NR_2、-OH、-$NHCOCH_3$、-NHCOR、-OCH_3和-OR。在一些实施方案中，电子转移促进基团为-NH_2、-NHR或-NR_2。在一些实施方案中，R为取代或未取代的烷基。在一些实施方案中，R^a和R^b各自为电子转移促进基团。在一些实施方案中，R^a和R^b处于相邻的环碳原子上。在一些实施方案中，电子转移促进基团为-NH_2。

[0029] 在一些实施方案中，离去基团为卤素。在式I的一些实施方案中，环A上的一个或两个R^c基团为卤素。在式I的一些实施方案中，环A上的两个R^c基团为卤素。在一些实施方案中，卤素为Cl、Br、I或F。在一些实施方案中，卤素为Cl、Br或I。

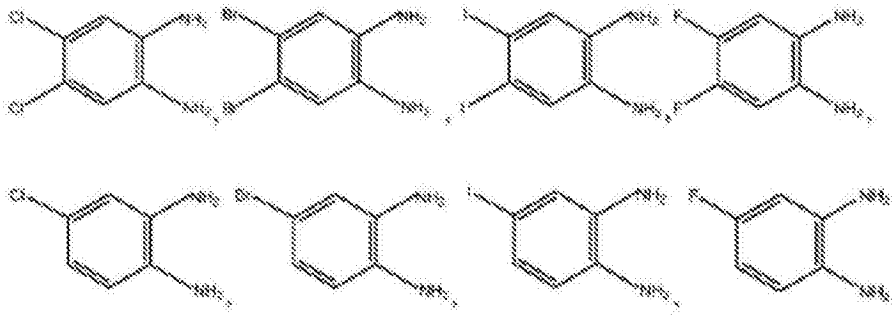
[0030] 在式I的一些实施方案中，环A为6元芳环或杂芳环，例如，苯、吡啶或吡嗪。在一些实施方案中，环A为苯。

[0031] 在式I的一些实施方案中，环A为苯、吡啶或吡嗪；R^a和R^b各自为NH_2；环A上的两个R^c取代基为卤素，其各自在环A上位于R^a和R^b的间位；并且任何其余R^c基团皆如本文所定义。在一些实施方案中，环A为苯，并且在另一些实施方案中，环A上的其余碳为未取代的碳。在一些实施方案中，环A为吡啶，并且在其他实施方案中，环A上的其余碳是未取代的。在一些实施方案中，环A为吡嗪。

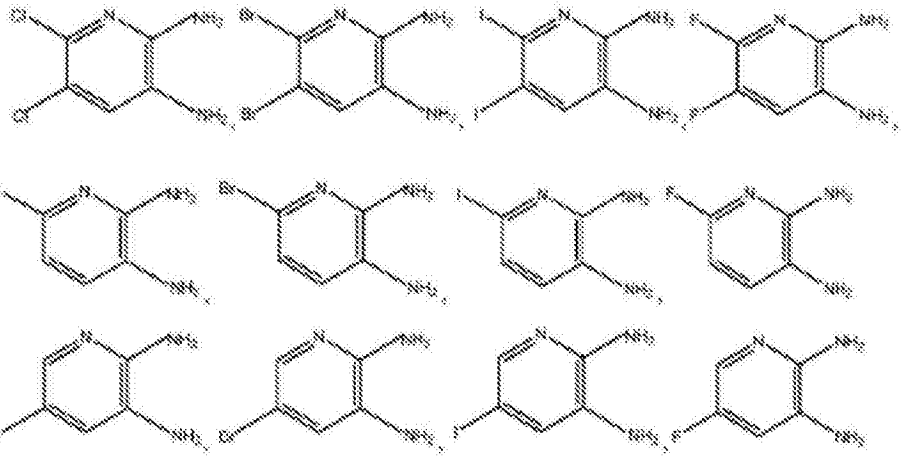
[0032] 在式II或III的一些实施方案中，R^1和R^2均为离去基团，例如卤素。在一些实施方案中，各卤素选自Cl、Br、I或F。

[0033] 在式II或III的一些实施方案中，X和Y为C-R^3。在式II或III的一些实施方案中，X为C-R^3并且Y为N。在一些实施方案中，R^3为H、OH、卤素、烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基或杂芳基。在一些实施方案中，其中环碳是未取代的，R为H。在式II或III的一些实施方案中，X和Y各自为N。

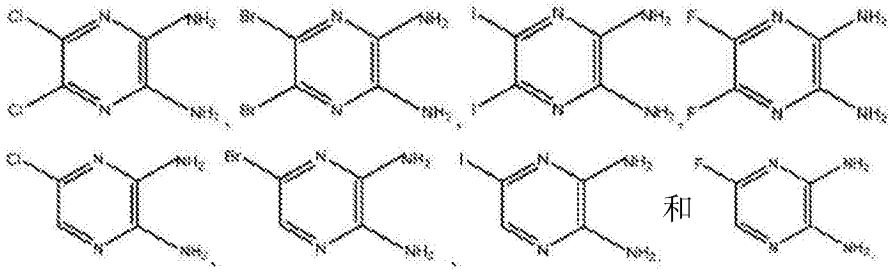
[0034] 在一些实施方案中，NPB化合物为选自以下的化合物：



[0035]



[0036]



[0037]

和

[0038] 在一些实施方案中，本文公开的NPB化合物具有大于0eV的电子亲和力。在一些实施方案中，本文公开的化合物具有介于约+0.0eV至+5eV之间的电子亲和力。在一些实施方案中，本文公开的化合物具有介于约+0.5eV与约+2.5eV之间的电子亲和力。

[0039] 在另一个方面，提供如本文所定义的NPB化合物，其用于治疗癌细胞(例如在癌细胞中诱导抗癌作用)。

[0040] 在另一个方面，提供如本文所定义的NPB化合物，其用于治疗受试者的可通过化疗治疗的疾病或病症。该疾病或病症可以为非癌症疾病或病症。

[0041] 在另一个方面，提供如本文所定义的NPB化合物，其用于治疗受试者的癌症。在一些实施方案中，所述方法可以用于预防、控制、抑制或完全治愈受试者的癌症。

[0042] 在另一个方面，提供如本文所定义的NPB化合物，其用于制造用于治疗受试者的癌症的药物。

[0043] 在另一个方面，提供如本文所定义的NPB化合物的用途，以治疗受试者可通过化疗治疗的疾病或病症。在一些情况下，该疾病或病症可以是非癌症疾病或病症，例如本文别处所列举的那些。在一些情况下，该疾病或病症是癌症。

[0044] 在另一个方面，提供了如本文所定义的NPB化合物治疗受试者的癌症中的用途。在另一个方面，提供了如本文所定义的NPB化合物在制备用于治疗受试者的癌症的药物中的用途。

[0045] 在另一个方面，提供了用于治疗癌症或可通过化疗治疗的其他疾病或病症的药物组合物，其包含：有效量的如本文所定义的NPB化合物；和药学上可接受的载体或稀释剂。

[0046] 在另一个方面，提供了用于癌症的靶向化疗，其包括如本文所定义的NPB化合物。

[0047] 在另一个方面，提供了治疗有需要的受试者的癌症或可通过化疗治疗的其他疾病或病症的方法，其包括：给予有效量的如本文所定义的抗癌化合物。

[0048] 在另一个方面，提供了在癌细胞中诱导抗癌作用的方法，其包括：给予所述癌细胞有效量的如本文所定义的NPB化合物。在一些实施方案中，抗癌作用为杀伤癌细胞。在一些实施方案中，癌细胞为肿瘤细胞。

[0049] 在另一个方面，提供了在癌细胞中诱导凋亡的方法，其包括：给予所述癌细胞有效量的如本文所定义的化合物。

[0050] 在另一个方面，提供了在有需要的受试者中产生化疗作用的方法，其包括：给予有效量的如本文所定义的化合物。

[0051] 在另一个方面，提供了用于治疗癌症或可通过化疗治疗的其他疾病的组合疗法，其包括：给予所述受试者有效量的如本文所定义的化合物；并给予所述受试者一种或多种另外的治疗剂。在一些实施方案中，所述治疗剂为化疗剂。

[0052] 在另一个方面，提供了商业包装产品或试剂盒，其包括如本文所定义的NPB化合物；和用于化疗的说明书。

[0053] 在本文所描述的方法、化合物、组合物、用途和试剂盒的一些实施方案中，所述治疗不包括放射。换句话说，所述化合物在没有放射时使用，使得它们被用作抗癌剂而不是放射致敏剂。这表明受试者不以将与NPB抗癌活性相互作用的方式接受放射治疗。然而，受试者可以在不与本发明的化合物相互作用的其他时间接受放射治疗。

[0054] 在本文所描述的方法、化合物、组合物、用途和试剂盒的一些实施方案中，癌症对铂基抗癌药物(例如顺铂)或具有毒副作用的其他抗癌药物敏感。在一些实施方案中，癌症对铂基抗癌药物(例如顺铂)或具有毒副作用的其他抗癌药物有耐药性。

[0055] 在结合附图阅读以下对具体实施方案的描述后，本发明的其他方面和特征将对本

领域普通技术人员变得显而易见。

[0056] 附图简述

[0057] 现将参照附图仅以举例的方式来描述本发明的实施方案。

[0058] 图1.12种示例性NPB化合物的分子结构:A:(4,5-)二氯-(1,2-)二氨基-苯(4,5-二氯-1,2-苯二胺);B:(4,5-)二溴-(1,2-)二氨基-苯(4,5-二溴-1,2-苯二胺);C:(4,5-)二碘-(1,2-)二氨基-苯(4,5-二碘-1,2-苯二胺);D:溴-(1,2-)二氨基-苯;E:氯-(1,2-)二氨基-苯;F:碘-(1,2-)二氨基-苯;G:(4,5-)二氯-(1,2-)二氨基-吡嗪;H:(4,5-)二溴-(1,2-)二氨基-吡嗪;I:(4,5-)二碘-(1,2-)二氨基-吡嗪;J:溴-(1,2-)二氨基-吡嗪;K:氯-(1,2-)二氨基-吡嗪;L:碘-(1,2-)二氨基-吡嗪。

[0059] 图2.NPB化合物[$B(NH_2)_2X_n$,n=1,2]与弱束缚电子($e_{弱束缚}^-$)的游离的电子转移(DET)反应的示意图。当吸引电子的NPB分子围绕癌细胞中的$e_{弱束缚}^-$时,可以发生DET以形成瞬态分子阴离子NPB^{*-},所述阴离子NPB^{*-}然后经历化学键断裂(解离)以形成反应性自由基:$e_{弱束缚}^-$+NPB→NPB^{*-}→自由基形成。随后后者可以引起生物作用,例如DNA损伤和凋亡(细胞死亡)。

[0060] 图3.由NPB化合物(化合物B)与弱束缚电子$e_{弱束缚}^-$形成的超快DET反应产生的NPB^{*-}的飞秒(fs)激光光谱观察。在这里,$e_{弱束缚}^-$由fs泵浦激光脉冲通过极性溶剂分子(例如,水)的双UV光解容易地产生。在极性液体中,生成的电子快速经过类p激发的(弱束缚)前体状态($e_{弱束缚}^-$),具有约0.5皮秒的超短寿命,在此期间,可以发生与NPB化合物的有效的DET反应。A.广泛地暴露到350nm下的泵浦fs激光脉冲之前和之后,NPB溶液的静态电子(UV)吸收光谱。它们的不同的光谱显示了三条可见的吸收带,其可以分别合理地归属为在350-600nm处稳定的$[B(NH_2)_2X_n]^-$、在~280nm处的质子化的脱卤化的芳环、和在~200nm处的卤素阴离子。B.NPB溶液的瞬态吸收动力学轨迹,在350nm处使用最低的和高的功率泵浦(3μW和5μW,分别相当于0.006和0.07μJ/脉冲)并在400nm处探测,之后扣除纯溶剂(乙醇)的动力学轨迹。在最低泵浦功率下,仅检测到中性单质子激发态NPB*,其显示τ_1=0.43ps的快速衰退,而在高泵浦功率下检测到NPB*和NPB^{*-}(τ_2=6.0ps)两种状态。C.扣除具有线性功率依赖性的NPB*态的动力学轨迹后,获得具有不同的泵浦功率的NPB^{*-}的动力学轨迹。实线与获得的NPB^{*-}的动力学轨迹最佳拟合,给出-0.56ps的上升时间,对应于$e_{弱束缚}^-$的寿命,并且解离寿命为-6.0ps。D.NPB^{*-}的峰值强度的平方根相对于泵浦功率,证实了NPB^{*-}产量的二次方依赖于泵浦功率来产生$e_{弱束缚}^-$。注意到在相同的条件下,没有观察到BrdU/IdU与$e_{弱束缚}^-$的DET反应,表明NPB化合物的DET反应比BrdU/IdU的强得多。

[0061] 图4说明了在经不同浓度的顺铂处理72小时后,人正常细胞(GM05757)的细胞存活率。通过MTT分析来测量96孔板中细胞的活力。该结果证实,作为化疗药物,顺铂本身具有高毒性。

[0062] 图5说明了在经不同浓度的化合物A处理96小时后,人正常细胞(GM05757)的细胞存活率。通过MTT分析来测量96孔板中细胞的活力。该结果显示,化合物A在高达200μM时本身显示低毒性。

[0063] 图6说明了在经不同浓度的化合物B处理96小时后,人正常细胞(GM05757)的细胞存活率。通过MTT分析来测量96孔板中细胞的活力。该结果显示,化合物B在高达200μM时本身显示低毒性。

[0064] 图7说明了在经不同浓度的化合物C处理96小时后，人正常细胞(GM05757)的细胞存活率。通过MTT分析来测量96孔板中细胞的活力。该结果显示，化合物C在高达200μM时本身显示低毒性。

[0065] 图8说明了在经不同浓度的化合物D处理96小时后，人正常细胞(GM05757)的细胞存活率。通过MTT分析来测量96孔板中细胞的活力。该结果显示，化合物D在高达200μM时本身显示低毒性。

[0066] 图9说明了在经不同浓度的化合物A处理96小时后，人宫颈癌(HeLa)细胞的细胞存活率。通过MTT分析来测量96孔板中细胞的活力。观察到化合物A显著杀伤癌细胞。

[0067] 图10说明了在经不同浓度的化合物A处理96小时后，人宫颈癌(ME-180)细胞的细胞存活率。通过MTT分析来测量96孔板中细胞的活力。观察到化合物A显著杀伤癌细胞。

[0068] 图11说明了在经不同浓度的化合物A处理96小时后，人乳腺癌细胞(MDA-MB-231)的细胞存活率。通过MTT分析来测量96孔板中细胞的活力。观察到化合物A显著杀伤癌细胞。

[0069] 图12说明了在经不同浓度的化合物A处理96小时后，人肺癌(A549)细胞的细胞存活率。通过MTT分析来测量96孔板中细胞的活力。观察到化合物A显著杀伤癌细胞。

[0070] 图13说明了在经不同浓度的化合物A处理96小时后，顺铂耐药性人卵巢癌(HTB-161)细胞的细胞存活率。通过MTT分析来测量96孔板中细胞的活力。观察到化合物A显著杀伤顺铂耐药性癌细胞。

[0071] 图14说明了在经不同浓度的化合物B处理96小时后，人宫颈癌(HeLa)细胞的细胞存活率。通过MTT分析来测量96孔板中细胞的活力。观察到化合物B显著杀伤癌细胞。

[0072] 图15说明了在经不同浓度的化合物B处理96小时后，人宫颈癌(ME-180)细胞的细胞存活率。通过MTT分析来测量96孔板中细胞的活力。观察到化合物B显著杀伤癌细胞。

[0073] 图16说明了在经不同浓度的化合物B处理96小时后，人乳腺癌(MDA-MB-231)细胞的细胞存活率。通过MTT分析来测量96孔板中细胞的活力。观察到化合物B显著杀伤癌细胞。

[0074] 图17说明了在经不同浓度的化合物B处理96小时后，人肺癌(A549)细胞的细胞存活率。观察到化合物B显著杀伤癌细胞。

[0075] 图18说明了在经不同浓度的化合物B处理96小时后，顺铂耐药性人肺癌(HTB-161)细胞的细胞存活率。通过MTT分析来测量96孔板中细胞的活力。观察到化合物B显著杀伤癌细胞。

[0076] 图19说明了在经不同浓度的化合物C处理96小时后，人宫颈癌(HeLa)细胞的细胞存活率。通过MTT分析来测量96孔板中细胞的活力。观察到化合物C显著杀伤癌细胞。

[0077] 图20说明了在经不同浓度的化合物C处理96小时后，人乳腺癌(MDA-MB-231)细胞的细胞存活率。通过MTT分析来测量96孔板中细胞的活力。观察到化合物C显著杀伤癌细胞。

[0078] 图21说明了在经不同浓度的化合物C处理72小时后，人肺癌(A549)细胞的细胞存活率。观察到化合物C显著杀伤癌细胞。

[0079] 图22说明了在经不同浓度的化合物C处理96小时后，顺铂耐药性人卵巢癌(HTB-161)细胞的细胞存活率。观察到化合物C显著杀伤癌细胞。

[0080] 图23说明了在经不同浓度的化合物D处理96小时后，人宫颈癌(HeLa)细胞的细胞存活率。通过MTT分析来测量96孔板中细胞的活力。观察到化合物D显著杀伤癌细胞。

[0081] 图24说明了在经不同浓度的化合物D处理96小时后，人宫颈癌(ME-180)细胞的细

胞存活率。通过MTT分析来测量96孔板中细胞的活力。观察到化合物D显著杀伤癌细胞。

[0082] 图25说明了在经不同浓度的化合物D处理96小时后，人乳腺癌(MDA-MB-231)细胞的细胞存活率。通过MTT分析来测量96孔板中细胞的活力。观察到化合物D显著杀伤癌细胞。

[0083] 图26说明了在经不同浓度的化合物D处理96小时后，人肺癌(A549)细胞的细胞存活率。观察到化合物D显著杀伤癌细胞。

[0084] 图27说明了在经不同浓度的化合物D处理96小时后，顺铂耐药性人卵巢癌(HTB-161)细胞的细胞存活率。通过MTT分析来测量96孔板中细胞的活力。观察到化合物D显著杀伤顺铂耐药性癌细胞。

[0085] 图28显示了在ME-180细胞中的DNA双链断裂(DSB)的产量(γ-H2AX强度)随化合物B浓度的变化。在37℃，5％CO_2下，使用不同浓度的化合物B处理ME-180细胞12小时。使用HCS DNA Damage试剂盒获得在人宫颈癌(ME-180)细胞中双链断裂(DSB)的成像。通过使用Image J软件对激活的γ-H2AX定量分析获得DNA DSB的产量随化合物B浓度的变化。结果显示在使用化合物B处理过的ME-180细胞中观察到显著量的DNA DSB。

[0086] 图29显示了经历通过0-200μM化合物B处理48小时诱导的半胱天冬酶的活化和凋亡的人宫颈癌(ME-180)细胞的典型图像，如由CellEvent™半胱天冬酶-3/7绿色检测试剂盒(Invitrogen)使用荧光显微镜检测到的：A.对照(0μM)；B.50μM；C.100μM；D.200μM。具有活化的半胱天冬酶的凋亡细胞由绿色荧光表示。尽管在这里示出的黑白图像中的绿色荧光是不可见的，但是凋亡晚期典型的核固缩是清晰可见的。已显示的是，200μM的化合物B造成明显的凋亡细胞群体(≥60％)。

[0087] 图30显示了在小鼠异种移植宫颈(ME-180)癌症模型中的肿瘤生长延迟。通过IP注射，以7mg/kg每日给予小鼠化合物B，持续5天。随着照组和治疗组中的肿瘤达到500mm^3，测量数次之间的肿瘤生长延迟。在对照组和化疗组之间观察到超过30天的生长延迟，表明了高的药物功效。

[0088] 图31显示了以7mg/kg每日给予化合物B持续5天的治疗对小鼠的重量的变化。在对照组和治疗组之间没有显著的变化，表明化合物B没有总体毒性。

[0089] 图32显示了化合物B在小鼠中的体内毒性。由血液样本测量肝毒性(ALT、ALP、TBIL)、肾毒性(血液尿素、肌酸酐)和电解质(Na、K等)以显示急性毒性，该血液样本是在每日以5mg/kg化合物B治疗持续5天的末期收集的。ALP＝碱性磷酸酶，ALT＝丙氨酸转氨酶，TBIL＝总胆红素。结果显示了在对照组和治疗组之间没有显著的变化，表明化合物B没有诱导急性毒性。

[0090] 详述

[0091] 一般而言，本发明涉及一类通过飞秒医学方法发现的非铂基(NPB)抗癌化合物。该化合物在体外和体内诱导抗癌作用，并且已发现对正常细胞毒性很小至没有毒性。令人吃惊地发现，它们对正常细胞的毒性比含铂的抗癌药顺铂低得多，即使在高达200μM的剂量下。因为它们在能够杀伤癌细胞的同时，对正常的细胞具有最小的毒性，所以该化合物可以用作靶向化疗的抗癌剂。因此，本发明还涉及癌症和可通过化疗治疗的其他病症的靶向化疗。本发明还公开了与本文公开的NPB化合物有关的组合物、剂型、方法、用途、商业包装产品和试剂盒。

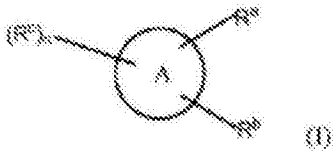
[0092] 非铂基(NPB)抗癌化合物

[0093] 术语“NPB化合物”是指例如在癌细胞的治疗中或在癌症或可通过化疗治疗的其他障碍的治疗中，可用于在体外或体内产生抗癌作用的如本文所定义的非含铂抗癌化合物。该化合物基本上可以被认为是没有铂核的顺铂类似物。术语“化合物”、“分子”和“药剂”在本文中可互换使用。

[0094] 本发明的NPB化合物能够产生抗癌作用，同时具有最低毒性。在不期望受理论限制的情况下，认为所述NPB化合物与弱束缚电子具有高反应性，其在癌细胞的特征性还原性微环境中固有地富集。后者近期被本发明人阐明[Lu等,2013]。本发明的化合物的一些普遍特征是它们包含与一个或多个电子转移促进基团(例如NH_2基团)和一个或多个受电子离去基团，例如卤素偶联的芳环(而不是铂配位离子)。

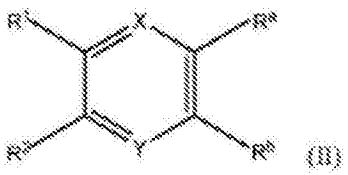
[0095] 已出乎意料地证明，本文公开的NPB化合物即使在高达200μM的极高剂量下也对正常细胞无毒，而它们在体外或体内可以独自诱导明显的DNA双链断裂和凋亡并有效地杀伤癌细胞。该化合物对正常细胞是基本上惰性的，这可能是因为在正常细胞内缺少弱束缚电子(即还原性胞内环境)[Lu等,2013]，因此在体内没有全身或急性毒性，或者具有低的全身和急性毒性。它们是可以优先杀伤癌细胞的高效抗癌剂，并因此用于癌症和可能的其他可通过化疗治疗的障碍的天然靶向化疗。预期所公开的化合物优于由于含有重金属(Pt)而具有高毒性的顺铂，和由于其结构中缺少用于有效的DET反应[Lu,2007,2010]的电子转移促进基团(例如二氨基)而作为抗癌剂无效的卤代嘧啶[Prados等,1999]。

[0096] 在一些实施方案中，NPB抗癌化合物具有通式I：

[0097] 

[0098] 其中A为含有0至2个选自N、O和S的环杂原子的5元或6元芳环或杂芳环，其余环原子为碳，R^a和R^b独立地为H、OH、烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基、杂芳基或电子转移促进基团，其中R^a和R^b中至少一个为电子转移促进基团；R^c在每次出现时独立地为H、OH、烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基、杂芳基、离去基团，或两个相邻的R^c基团连同其所连接的环原子一起形成5元或6元饱和、部分饱和或不饱和环，所述环含有0至2个选自N、O和S的环杂原子并且可以任选地被1至4个R^d取代；其中至少一个R^c为离去基团；R^d独立地为OH、烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基或杂芳基；并且n＝1至4，其中所述烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基和杂芳基部分各自任选地被取代；或其药学上可接受的盐。

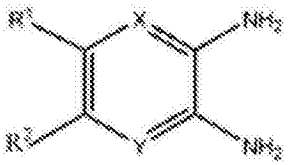
[0099] 在一些实施方案中，NPB抗癌化合物具有通式II：

[0100] 

[0101] 其中：X和Y独立地为C-R^3或N；R^3为H、OH、卤素、烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基或杂芳基；R^a和R^b独立地为H、OH、烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基、杂芳基或电子转移促进基团，其中R^a和R^b中至少一个为电子转移促进基团；R^1和R^2独立地为H、OH、烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、

芳基、杂环基、杂芳基或离去基团；其中R^1和R^2中至少一个为离去基团，其中所述烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基和杂芳基部分各自任选地被取代；或其药学上可接受的盐。

[0102] 在一些实施方案中，NPB抗癌化合物具有通式III，

[0103] 

[0104] 其中X和Y独立地为C-R^3或N；R^3为H、OH、卤素、烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基或杂芳基；R^1和R^2独立地为H、OH、烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基、杂芳基或离去基团；其中R^1和R^2中至少一个为离去基团，其中所述烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基和杂芳基部分各自任选地被取代；或其药学上可接受的盐。

[0105] 芳环系统

[0106] 在通式I、II和III中的每一个中，分子的核是可由一个芳环或杂芳环(单环)组成或可由多个环(多环)组成的共轭或芳环系统。在一些情况下，芳核可包含2个或3个稠环以分别形成双环核或三环核。芳环系统能够将通过与弱束缚的电子反应获得的经电子转移促进基团，例如NH_2基团暂时稳定的电子传输到离去基团的位点。当形成该分子的暂时性阴离子时，它可迅速地导致失去离去基团，例如稳定的阴离子，并产生高反应性自由基。

[0107] 芳核可为单个5元或6元芳环，例如芳基或杂芳基。6元单环的一些实例包括但不限于苯、吡啶和吡嗪。5元杂芳基环的一些实例包括但不限于呋喃、吡咯、噻吩和噁唑。

[0108] 在一些实施方案，例如通式I、II或III的实施方案中，所述化合物包含5元或6元芳环或杂芳环，所述环含有0至2个选自N、O和S的环杂原子，其余环原子为碳。在一些情况下，所述核为含有0个、1个或2个选自N的环杂原子的6元芳环，例如苯(0个N)、吡啶(1个N)或吡嗪(2个N)。在一些情况下，所述核为含有0个环杂原子的6元芳基环，例如苯。在一些情况下，所述核是含有1个或2个选自N的环杂原子的6元杂芳环，例如吡啶(1个N)或吡嗪(2个N)。

[0109] 在一些实施方案中，核环上彼此相邻的取代基(例如式I中的R^c)可连同其所连接的环原子一起形成5元或6元饱和、部分饱和或不饱和环，从而形成多环系统。稠合的双环6元环的一些实例包括但不限于萘、喹诺酮、异喹啉、喹喔啉、喹唑啉、噌啉和酞嗪。稠合的三环6元环的一些实例包括但不限于蒽、菲(phenanthracene)和吖啶。在一些情况下，多环系统可包含5元环部分与6元环部分的组合。在核是多环系统的情况下，期望所述化合物整体保持其暂时稳定电子并将电子传输到离去基团的位点的能力，以便能够形成产生生物作用的反应性自由基。

[0110] 电子转移促进基团

[0111] 本发明的抗癌化合物包含与芳环系统偶联的一个或多个电子转移促进基团(例如式I或II中的R^a和R^b中的一个或两个，和式III中的-NH_2)。如本文所使用的“电子转移促进基团”是有助于俘获并瞬时稳定弱束缚电子的原子或官能团。电子然后通过芳环系统传输以使环碳原子与离去基团之间的键断裂。一旦离去基团从环上断开，所生成的中性自由基例如与DNA具有高度反应性，从而导致癌细胞的DNA损伤和死亡。因此，认为电子转移促进基

团，优选彼此紧密靠近的两个电子转移促进基团增强NPB分子的电子吸引能力，从而使其与在癌细胞中存在的弱束缚电子具有更大的反应性。

[0112] 在分子上存在多个电子转移促进基团的情况下(例如R^a和R^b均为电子转移促进基团)，电子转移促进基团可相同或不同。在一些实施方案中，电子转移促进基团是相同的。在优选的实施方案中，两个电子转移促进基团彼此紧密靠近地位于环上，例如位于相邻的环碳上。这是用于俘获和转移电子的特别有效的设置，特别是当环上存在强离去基团时。

[0113] 电子转移促进基团的实例包括但不限于-NH_2、-NHR、-NR_2、-OH、-OR、-O-、-$NHCOCH_3$、-NHCOR、-OCH_3、-OR、-CH_3、-C_2H_5、R和-C_6H_5。

[0114] 在一些实施方案，例如式I、II或III的实施方案中，电子转移促进基团选自-NH_2、-NHR、-NR_2、-OH、-OR、-O-、-$NHCOCH_3$、-NHCOR、-OCH_3、-OR、-CH_3、-C_2H_5、R和-C_6H_5。在一些实施方案，例如式I、II或II的实施方案中，电子转移促进基团选自-NH_2、-NHR、-NR_2、-OH、-$NHCOCH_3$、-NHCOR、-OCH_3和-OR。在一些实施方案，例如式I、II或II的实施方案中，电子转移促进基团选自-NH_2、-NHR、-NR_2、-OH和-O-。在一些实施方案中，电子转移促进基团选自-NH_2、-NHR、-NR_2和-OH。在一些实施方案中，电子转移促进基团选自-NH_2、-NHR、-NR_2。在一些实施方案中，电子转移促进基团为-NH_2。在一些实施方案中，电子转移促进基团为-NHR。在一些实施方案中，电子转移促进基团为-NR_2。在一些实施方案，例如式I、II或II的实施方案中，电子转移促进基团选自-$NHCOCH_3$、-NHCOR、-OCH_3和-OR。

[0115] 上述任一个中的R可为，例如，取代或未取代的烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基或杂芳基。在R_2的情况下，每个R可以相同或不同。在一些实施方案中，R为取代或未取代的烷基。

[0116] 在一些实施方案，例如式I或II的实施方案中，R^a和R^b中的一个为电子转移促进基团。在一些实施方案中，R^a和R^b均为电子转移促进基团。在一些实施方案中，R^a和R^b为相同的电子转移促进基团。在一些实施方案中，R^a和R^b位于相邻的环原子上。在一些实施方案中，离去基团位于电子转移促进基团的间位、邻位或对位。在一些实施方案中，离去基团位于电子转移促进基团的间位。在一些实施方案中，离去基团位于电子转移促进基团的邻位。在一些实施方案中，离去基团位于电子转移促进基团的对位。

[0117] 离去基团

[0118] 本发明的NPB化合物包含与芳环系统偶联的一个或多个离去基团(例如式I、II或III中的R^1和R^2中的一个或两个)。也可提供另外的离去基团作为芳环上的取代基。在存在多个离去基团的情况下，离去基团可以相同或不同。在一些实施方案中，离去基团是相同的。分子上存在强离去基团(例如高氧化性的原子，例如卤素原子)可增强该分子与在癌细胞中存在的弱束缚电子的反应性，特别是当离去基团相对于电子转移促进基团可操作地定位时(例如，在1个、2个或3个环原子内)。

[0119] 如本文所使用的，离去基团是从异裂键裂解中脱离的分子片段。其可为阴离子或中性的原子/分子，但在任一种情况下，至关重要的是NPB分子的键断裂(解离)，即形成离去基团，在NPB分子的剩余(环)部分或离去基团(例如卤素原子)处产生孤电子，即形成反应性自由基。常见的阴离子型离去基团包括但不限于：卤化物，如Cl、Br、I和F(例如Cl^-、Br^-、I^-、F^-)；以及磺酸酯，如甲苯磺酸酯、硝基苯磺酸酯、甲磺酸酯和三氟甲磺酸酯。

[0120] 其他离去基团包括但不限于双氮、二烷基醚、醇、硝酸酯、磷酸酯和其他无机酯。

[0121] 在一些实施方案，例如式I、II或II的实施方案中，离去基团为阴离子型离去基团。在一些实施方案中，离去基团为卤素。在一些实施方案中，离去基团为Cl、Br、I或F。在一些实施方案中，离去基团为Cl。在一些实施方案中，离去基团为Br。在一些实施方案中，离去基团为I。在一些实施方案中，离去基团为F。在一些实施方案中，离去基团为选自Cl、Br和I的卤素。在一些实施方案中，离去基团为这些离去基团之一的中性物质。

[0122] 在式I的一些实施方案中，环A上的一个或两个R^c基团为离去基团。在式I的一些实施方案中，环A上的两个R^c基团为离去基团。

[0123] 在式I的一些实施方案中，环A是6元芳环或杂芳环，如苯、吡啶或吡嗪，R^a和R^b各自为NH_2；环A上的两个R^c取代基为卤素，其各自在环A上位于R^a和R^b中的一个的间位；并且任何其余R^c基团皆如本文所定义。在一些实施方案中，环A为苯。在一些实施方案中，在环A为苯的情况下，环A上的其余碳为未取代的碳。在一些实施方案中，环A为吡啶。在一些实施方案中，在环A为吡啶的情况下，环A上的其余碳是未取代的。在一些实施方案中，环A为吡嗪。

[0124] 在一些实施方案中，离去基团位于电子转移促进基团的邻位(例如在1个环原子之内)、间位(例如在2个环原子之内)或对位(例如在3个环原子之内)。

[0125] 取代基

[0126] 在式I、II或III的实施方案中，除非另有说明，否则碳原子可为未取代或取代的。

[0127] 在式I、II或III的实施方案中，除非另有说明，否则环碳原子可为未取代或取代的。取代基可包括，例如，OH、卤素、烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基或杂芳基。碳基取代基(例如烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基或杂芳基)可以各自任选地被进一步取代。

[0128] 在式I的实施方案中，R^c在每次出现时独立地为H、OH、烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基、杂芳基、离去基团，或两个相邻的R^c基团连同其所连接的环原子一起形成5元或6元饱和、部分饱和或不饱和环，所述环含有0至2个选自N、O和S的环杂原子并且任选地被1至4个R^d取代；其中至少一个R^c为离去基团。R^d独立地为OH、烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基或杂芳基；并且n＝1至4(例如1、2、3或4)。所述烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基和杂芳基部分各自任选地被取代。

[0129] 在式I和II的实施方案中，R^a和R^b独立地为H、OH、烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基、杂芳基或电子转移促进基团，其中R^a和R^b中至少一个为电子转移促进基团。所述烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基和杂芳基部分可以各自任选地被取代。

[0130] 在式II或III的实施方案中，其中X和Y独立地为C-R^3或N，R^3可以为H、OH、卤素、烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基或杂芳基。所述烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基和杂芳基部分可以各自任选地被取代。

[0131] 在式II或III的实施方案中，R^1和R^2独立地为H、OH、烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基、杂芳基或离去基团。所述烷基、烷氧基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂环基和杂芳基部分可以各自任选地被取代。在上文中，R^1和R^2中至少一个为离去基团。在一些实施方案中，R^1和R^2均为离去基团，其中R^1和R^2可以相同或不同。

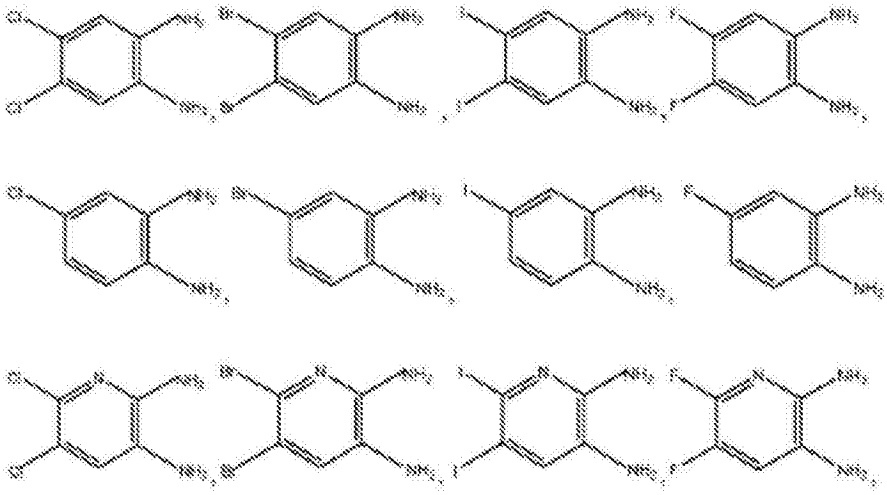
[0132] 除非另有说明，否则上述任选地取代的碳基基团可进一步包括在取代基上的一个或多个官能团，如羟基、氨基、酰胺基、氰基、硝基、羧基、酯基、醚基、酮基、醛基、芳基和杂芳基或其组合。

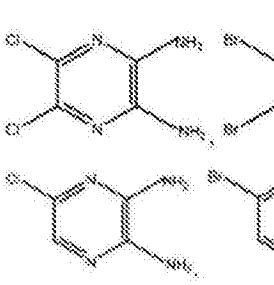
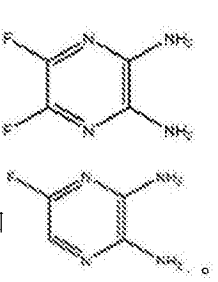
[0133] 技术人员将能够对本文公开的化合物进行修饰以产生许多根据本发明的抗癌化合物。当选择取代基时，应考虑在众多因素中诸如所得化合物的稳定性、水溶解性、毒性和反应性(例如与电子的反应性)等因素。

[0134] 非限制性示例性NPB化合物

[0135] 本发明的一些示例性非限定性NPB化合物如下所示：

[0136]



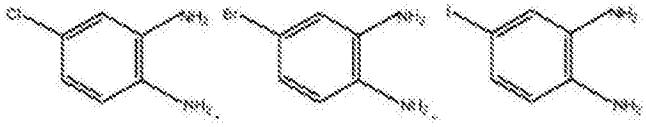
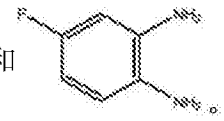
[0137]  和  。

[0138] 在上述各示例性实施方案中，化合物包含选自苯、吡啶和吡嗪的6元芳环或杂芳环；两个NH_2电子转移促进基团彼此相邻地位于环上，并且至少一个卤素离去基团位于NH_2基团之一的间位。在一些实施方案中，卤素离去基团位于各个NH_2基团的间位。已发现具有该结构的化合物是非常有效的抗癌剂。在不受理论限制的情况下，认为该类实施方案特别有效，因为芳环系统上彼此紧密相邻的两个强电子转移促进基团的组合能够俘获弱束缚电子并通过环将其传输到附近离去基团的位点，从而形成可攻击DNA并导致癌细胞死亡的高反应性自由基。

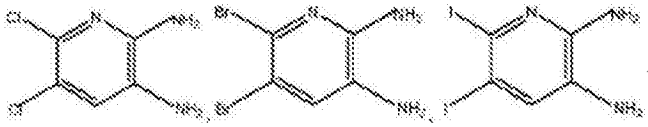
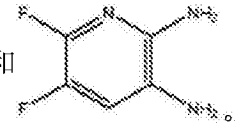
[0139] 在一些实施方案中,NPB化合物选自:

[0140]  和 。

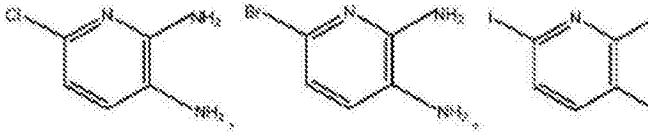
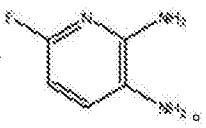
[0141] 在一些实施方案中,NPB化合物选自:

[0142]  和 。

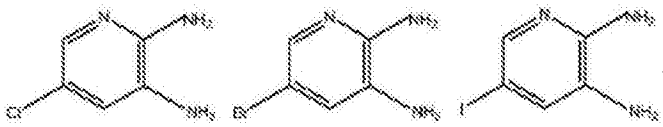
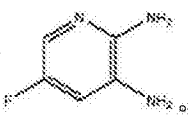
[0143] 在一些实施方案中,NPB化合物选自:

[0144]  和 。

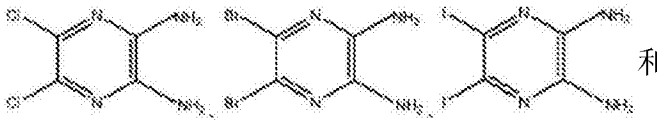
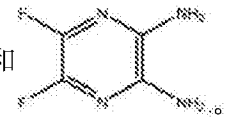
[0145] 在一些实施方案中,NPB化合物选自:

[0146]  和 。

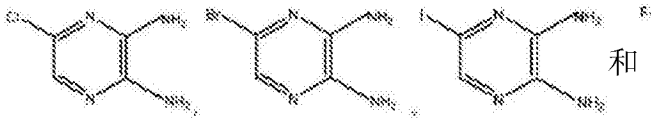
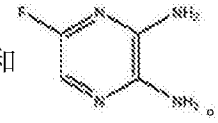
[0147] 在一些实施方案中,NPB化合物选自:

[0148]  和 。

[0149] 在一些实施方案中,NPB化合物选自:

[0150]  和 。

[0151] 在一些实施方案中,NPB化合物选自:

[0152]  和 。

[0153] 电子亲和力

[0154] 原子或分子的电子亲和力(E_A)通常被定义为当电子加至中性原子或分子以形成负离子时的能量变化:

[0155] $X+e^{-}\rightarrow X^{-}$+能量。

[0156] 具有正电子亲和力(例如>0eV)的分子比具有负电子亲和力(例如<0.0eV)的分子更易接受电子。根据本发明,正电子亲和力是期望的性质,因为它关系到NBP化合物与在癌细胞中存在的弱束缚电子的反应性。因此优选的是,NBP化合物具有大于0.0eV的电子亲和力。

[0157] 在一些实施方案,例如式I、II或III的实施方案中,本文公开的NPB化合物的电子亲和力为正值(例如>0.0eV)。在一些实施方案中,NPB的电子亲和力介于约0.0eV与约+5.0eV之间,介于约0.0eV与约+4.0eV之间,介于约0.0eV与约+3.0eV之间,或介于约0.0eV与约+2.5eV之间。

[0158] 在一些实施方案中，NPB的电子亲和力介于约+0.2eV与约+5.0eV之间，或介于约+0.2eV与约+4.0eV之间，或介于约+0.2eV与约+3.0之间，或介于约+0.2eV与约+2.0eV之间。

[0159] 在一些实施方案中，NPB的电子亲和力介于约+0.5eV与约+3.0eV之间，介于约+0.5eV与约+2.5eV之间，介于约+0.5eV与约+2.0eV之间，或介于约+0.5eV与约+1.5eV之间。

[0160] 分子的电子亲和力可由技术人员使用本领域已知的方法来确定。

[0161] 放射性标记的NBP化合物

[0162] 本发明的NPB化合物可被放射性标记，即所述化合物可含有一个或多个原子，所述原子含有的原子质量或质量数不同于通常在自然界中发现的原子质量或质量数。氢、碳、磷、氟和氯的示例性放射性同位素分别包括^{3}H、^{14}C、^{32}P、^{35}S、^{43}F和^{36}Cl。放射性标记的化合物通常可通过本领域技术人员公知的方法来制备。在一些情况下，此类放射性标记的化合物可通过进行通用合成步骤以及用容易获得的放射性标记的试剂代替非放射性标记的试剂来制备。

[0163] 化学定义

[0164] 除非另有说明，否则以下公知的化学术语具有下列通用含义。

[0165] 如本文所使用的，术语“芳基”意指具有6至14个环原子，例如，6个环原子的取代或未取代的芳烃环系统，其可为单环、双环或三环芳环系统，包括但不限于本文公开或例示的分子中的那些芳基。在本文公开的一些实施方案中，“芳基”表示6元芳环，其任选地与一个或多个芳环或非芳环稠合。

[0166] 术语“烷基”表示含有例如1至10个碳原子、例如1至6个碳原子或1至4个碳原子的饱和直链或支链烃基，例如甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、2-丁基、叔丁基，包括但不限于本文公开或例示的分子中的那些烷基。也可使用术语“低级烷基”并且它通常是指含有1至6个碳原子的直链或支链烃基(例如C_1-C_6烷基)。C_1-C_6烷基旨在包括C_1、C_2、C_3、C_4、C_5和C_6烷基。此外，烷基可为取代或未取代的。

[0167] 术语“烷氧基”表示其中烷基残基如上文所定义并且其通过氧原子连接的基团，例如甲氧基和乙氧基。烷氧基可以任选地被一个或多个取代基取代。例如，“烷氧基”是指基团-O-烷基，其中烷基如上文所定义。“烷氧基”的实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、叔丁氧基、正丁氧基、仲戊氧基等。此外，烷氧基可为取代或未取代的。

[0168] 术语“烯基”表示链中包含双键的2至12个，例如2至6个碳原子的碳链。例如，C_{2-6}-烯基包括，例如乙烯基、丙烯-1-基、丙烯-2-基、丁烯-1-基、丁烯-3-基、戊烯-1-基、戊烯-2-基、戊烯-3-基、戊烯-4-基、己烯-1-基、己烯-2-基、己烯-3-基、己烯-4-基和己烯-5-基。此外，烯基可为取代或未取代的。

[0169] 术语“炔基”旨在包括具有一个或多个可能出现在沿着链的任何稳定点上的碳-碳三键的直链或支链构型的烃链。除非另有说明，否则“炔基”是指具有2至8个，例如2至6个碳的基团。“炔基”的实例包括但不限于丙-2-炔基、丁-2-炔基、丁-3-炔基、戊-2-炔基、3-甲基戊-4-炔基、己-2-炔基、己-5-炔基等。此外，炔基可为取代或未取代的。

[0170] 术语“环烷基”表示含有3至13个碳，例如3至6个碳的任何稳定的环状或多环烃基。如在其他烷基部分的情况下，环烷基可以任选地被一个或多个取代基取代。

[0171] 术语“环烯基”包括任何稳定的3至13个碳原子，例如，5至8个碳原子的环状或多环烃基，其含有一个或多个可出现在沿着所述环的任何点上的不饱和碳-碳双键。如在其他烯

基部分的情况下，环烯基可以任选地被取代。

[0172] 环炔基包括任何稳定的5至13个碳原子的环状或多环烃基，其含有一个或多个可出现在沿着所述环的任何点上的不饱和碳-碳三键。如在其他炔基部分的情况下，环炔基可以任选地被取代。

[0173] 术语“杂环基”是指具有5至14个环原子，例如5至10个环原子的非芳环系统，其中一个或多个环碳，例如1至4个各自被诸如N、O或S的杂原子替代，其余环成员是碳原子。杂环基可以任选地在每个位置上独立地被一个或多个取代基取代。

[0174] 术语“杂芳基”是指具有5至14个环原子，例如5或6个环原子的单环或多环芳环系统，其含有至少一个选自N、O或S的环杂原子，其余环成员是碳原子。杂芳基部分可以任选地在每个位置上独立地被取代。杂芳基部分的实例包括但不限于本文公开或例示的分子中的那些。

[0175] 术语“脂族基团”是指，例如，烷基、烯基、炔基、烷氧基、卤代烷基、环烷基、环烯基、环炔基或非芳族杂环基。脂族基团可含有一个或多个取代基。

[0176] 术语“胺”可以指含有具有孤电子对的碱性氮原子的有机化合物或官能团(即氨基)，包括伯胺(NRH_2)、仲胺(NR_1R_2H)和叔胺($NR_1R_2R_3$)，其中每个R可相同或不同。此外，两个R基团可表示环成员，例如，在N为杂环或杂芳基环中的杂原子的情况下。

[0177] 本文公开的化合物的药学上可接受的盐也包括在本发明的范围内。

[0178] 对本申请的化合物的描述受本领域技术人员已知的化学键合原则的限制。因此，在基团可被一个或多个取代基取代的情况下，对这些取代加以选择以便符合化学键合的原则，并且产生不是本身不稳定的和/或将是本领域普通技术人员已知可能在环境条件，例如含水、中性和若干已知生理条件下不稳定的化合物。

[0179] 药物组合物和剂型

[0180] 本文公开的NPB化合物可存在于药物组合物中，或者在适于给予至受试者的不同药物剂型中的一种中。包含本发明的NPB化合物的药物组合物和剂型用于靶向化疗。

[0181] “药物组合物”是指有助于向受试者给予一种或多种目标试剂(例如NPB化合物)的成分的组合。药物组合物通常包含一种或多种目标药剂与一种或多种药学上可接受的载体或稀释剂的混合物。许多药学上可接受的“载体”和“稀释剂”是本领域已知的并且这些通常是指药学上可接受的材料、组合物或媒介物，包括液体或固体填料、稀释剂、赋形剂、溶剂、粘合剂或包封材料。

[0182] 组合物中各组分必须是“药学上可接受的”，其含义是与药物制剂的其他成分相容。组合物中各组分，包括NPB化合物还必须是“生物相容的”，以使得该组合物适于与受试者的组织或器官接触而没有过度的毒性、刺激、变态反应、免疫原性或其他问题或并发症，与合理的利益/风险比相当。

[0183] 关于药物组合物的更多信息参见，例如，Remington:The Science and Practice of Pharmacy，第21版；Lippincott Williams&Wilkins:Philadelphia,PA,2005；Handbook of Pharmaceutical Excipients，第5版；Rowe等编，The Pharmaceutical Press and the American Pharmaceutical Association:2005；和Handbook of Pharmaceutical Additives，第3版；Ash和Ash编，Gower Publishing Company:2007；Pharmaceutical Preformulation and Formulation，Gibson编，CRC Press LLC:Boca Raton,FL,2004)。

[0184] 本文公开的药物组合物可配制成任何适合的剂型，包括单个单位剂型和多个单位剂型。示例性剂型包括，例如，液体剂、溶液剂、混悬剂、乳剂、浓缩剂、散剂、糊剂、凝胶剂、口胶剂(gum)、滴剂、片剂、胶囊或微胶囊。在一些实施方案中，剂型是液体剂。在一些实施方案中，所述液体是溶液剂、混悬剂或乳剂。

[0185] 给予途径

[0186] NPB化合物和含有它们的药物组合物可通过任何适合的给予途径给予。例如，NPB化合物被局部给予(例如至肿瘤中)、区域性给予(例如，至体腔中)或全身性给予(例如至血管，例如静脉或动脉中)。

[0187] 在一些实施方案中，NPB化合物经配制用于肠内给予、局部给予、肠胃外给予或鼻腔给予。肠内给予可包括，例如，口服给予。

[0188] 在一些实施方案中，NPB化合物或组合物经配制用于肠胃外给予。肠胃外给予可包括，例如，静脉内给予、动脉内给予、脑内给予、腹膜内给予、肌内给予、皮下给予、心内给予或骨内给予。在一些实施方案中，肠胃外给予是静脉内给予，例如注射或输注。在一些实施方案中，胃肠外给予是动脉内给予。在一些实施方案中，胃肠外给予是腹膜内给予。

[0189] 在一些实施方案中，胃肠外给予是全身性的或区域性的。在一些实施方案中，胃肠外给予是全身性的。在一些实施方案中，NPB化合物或组合物是静脉内给予的。

[0190] NPB化合物的剂量

[0191] NPB化合物或组合物可根据技术工作者(例如临床医生)认为适当的任何治疗方案给予。

[0192] NPB化合物和含有它们的药物组合物的剂量要求将随所用的具体化合物或组合、给予途径、所治疗的具体疾病或病症(包括癌症和其他的疾病或病症)和将被治疗的患者而变化。治疗将通常以低于化合物的最佳剂量的小剂量开始。此后，增加剂量直至在该环境下达到最佳效果。一般来说，根据本发明的NPB化合物和组合物以将提供有效结果而不引起任何有害或有毒副作用的浓度给予。与任何化放疗一样，一定程度的毒副作用可被视为可接受的。

[0193] 一般来说，应使用足够量的NPB化合物以有效地杀伤癌细胞。通常，会选择NPB化合物的剂量以使NPB化合物不会造成对该治疗(受试者)的明显的不希望的作用。

[0194] 当被给予来预防或治疗或抑制特定疾病或病症时，NPB化合物的有效剂量可根据所用的具体化合物、给予模式、病症及其严重程度、所治疗的病症、以及与待治疗的个体相关的各种身体因素而改变。在许多情况下，当所述化合物以介于约0.01mg/kg与约500mg/kg之间、介于约0.1mg/kg与约125mg/kg之间、介于1mg/kg与约50mg/kg之间、介于1mg/kg与约25mg/kg之间、介于约0.3mg/kg与约15mg/kg之间或介于约0.5mg/kg与5mg/kg之间或介于约5mg/kg与10mg/kg之间的日剂量给予时可获得满意的结果。在某些情况下，受试者可以接受单剂量治疗或多剂量治疗。在一些实施方案中，NPB化合物对正常细胞基本上无毒并因此在相对高剂量下(例如10mg/kg至约50mg/kg，或介于约10mg/kg至约30mg/kg之间)可耐受。期望计划的日剂量将随给予途径而变化。因此，肠胃外给药将通常在口服给药水平的约10％至20％的水平下。

[0195] 治疗方法

[0196] 本发明包含治疗癌症和可通过化疗治疗的(或被认为是可治疗的)的其他疾病和

病症的方法。在一个方面，本发明涉及治疗癌症的方法。在另一个方面，本发明涉及用于癌症的靶向化疗。通常将本文公开的方法和靶向化疗给予至已被诊断患有癌症的个体。然而，在某些情况下，可将所述靶向化疗给予至尚未显示癌症的临床迹象，但处于患癌症的风险中的个体，或给予至先前已被诊断为癌症，但是在缓解期间或处在复发风险中的受试者。为此，本发明还涉及防止或降低患癌症的风险的方法以及治疗复发或延长缓解期的方法。

[0197] 在一个方面，提供了在有需要的受试者中产生化疗作用的方法，其包括给予有效量的如本文所定义的化合物。在一个方面，本发明涉及治疗有需要的受试者的癌症的方法，其通过给予受试者有效量的如本文所定义的NBP化合物。在一些实施方案中，所述方法可以用于预防、控制、抑制或完全治愈受试者的癌症。

[0198] 在一些实施方案中，所述治疗不包括放射。换句话说，所述化合物在没有放射时使用，因此它们用作抗癌剂而不是放射致敏剂。这表明受试者不以将与NPB抗癌活性相互作用的方式接受放射治疗。然而，受试者可以在不与本发明的化合物相互作用的其他时间接受放射治疗。

[0199] 在一些实施方案中，癌症是对铂基抗癌药物(例如顺铂)或具有毒副作用的其他癌症疗法敏感的癌症。在一些实施方案中，癌症是对铂基抗癌药物(例如顺铂)或具有毒副作用的其他癌症疗法有耐药性的癌症。

[0200] 本文所公开的化合物还可以用于治疗可通过化疗治疗的其他疾病或病症，例如AL型淀粉样变性、强直性脊柱炎、多发性硬化症、克罗恩病、牛皮癣、牛皮癣关节炎、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、硬皮病、自身免疫性疾病、非癌性浆细胞失调、三叉神经痛、听神经瘤、重度甲状腺眼病、翼状胬肉、色素沉着绒毛结节性滑膜炎，以及预防瘢痕疙瘩生长、血管再狭窄和异位骨化。NPB化合物还可以用作骨髓移植(造血干细胞移植)之前的预处理方案。因此，在另一个方面，提供了治疗受试者的可通过化疗治疗的疾病或病症的方法，其采用给予受试者有效量的如本文所定义的化合物。所述疾病或病症可以是非癌症疾病或病症。在一些实施方案中，所述疾病是癌症。

[0201] 在另一个方面，提供了减轻或克服铂基药物(例如顺铂)毒性的方法，其中上述任意方法施加到对铂基药物(顺铂)治疗敏感的细胞或癌症，或施加到具有对铂基药物(顺铂)治疗敏感的细胞或癌症的受试者。

[0202] 在另一个方面，提供了克服铂基药物(例如顺铂)耐药性的方法，其中上述任意方法施加到对铂基药物(顺铂)治疗有耐药性的细胞或癌症，或施加到具有对铂基药物(顺铂)治疗有耐药性的细胞或癌症的受试者。

[0203] 在另一个方面，所述方法包括给予有需要的受试者治疗有效量的与电子有高反应性的化合物。在优选的靶向和自由基形成和反应中，所述药剂能够显示抗癌作用并且没有系统或急性毒性作用。

[0204] 在另一个方面，提供了在癌细胞中诱导抗癌作用的方法，其包括给予癌细胞有效量的如本文所定义的NPB化合物。在一些实施方案中，抗癌作用是杀伤癌细胞。在一些实施方案中，癌细胞是肿瘤细胞。

[0205] 在另一个方面，提供了在癌细胞中诱导凋亡的方法，其包括给予细胞有效量的如本文所定义的化合物。

[0206] 所述疗法为以治疗有效量给予。化疗的特征如本文所公开的任何实施方案所描述

的。

[0207] 应理解，本文中使用的术语的目的仅在于描述特定实施方案而非意在限制。还应理解，除非本文中明确定义，否则本文中使用的术语应被赋予相关领域技术人员已知的其普遍含义。

[0208] 如本文所使用的术语“受试者”是指待治疗的人或动物，特别是哺乳动物。哺乳动物可包括，例如，灵长类动物、牛、绵羊、山羊、马、狗、猫、兔、大鼠或小鼠。在一些实施方案中，受试者是人，尽管本文公开的化合物也可用于兽医应用。术语“受试者”与“患者”可互换使用。

[0209] 本文的术语“障碍”和“疾病”可以互换使用并且可以包括病症。

[0210] 如本文所使用的术语“癌症”(例如肿瘤性障碍)是指涉及异常细胞生长、增殖或分裂的障碍(例如瘤形成)。当癌细胞生长和分裂时，它们将其基因突变和增殖特性传给后代细胞。“肿瘤”(例如赘生物)是癌细胞的积累。本文公开的方法和组合可用于治疗癌症、癌细胞、肿瘤和/或其伴随症状。

[0211] 可根据本发明的方法、用途和组合治疗的示例性癌症类型包括但不限于睾丸癌、膀胱癌、宫颈癌、卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌、头部癌症、颈部癌症、肺癌(例如非小细胞肺癌)、子宫内膜癌、胰腺癌、卡波西氏肉瘤(Kaposi’ssarcoma)、肾上腺癌、白血病、胃癌、结肠癌、直肠癌、肝癌、胃癌、食道癌、肾癌、甲状腺癌、子宫癌、皮肤癌、口腔癌、脑癌、脊髓癌、胆囊癌。例如，癌症可包括肉瘤、上皮癌、黑素瘤、淋巴瘤、骨髓瘤或生殖细胞肿瘤。在一些实施方案中，癌症是睾丸癌、膀胱癌、宫颈癌、卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌、头部癌症、颈部癌症或肺癌(例如非小细胞肺癌)。

[0212] “抗癌剂”是指例如通过触发凋亡直接或间接地杀伤癌细胞，或直接或间接地阻止、终止或减少癌细胞增殖的治疗剂。在一些情况下，“抗肿瘤剂”可包括不止一种治疗剂。

[0213] 术语“副作用”是指化疗的作用之一，例如肾毒性、肝毒性、严重的恶心和呕吐、骨髓抑制、骨髓抑制/免疫抑制、粘膜炎(消化道内壁的炎症)、秃头(脱发)、血球减少、疼痛和疲劳、恶病质、皮肤并发症，如过敏性反应、和神经系统、肺、心脏、生殖和内分泌的并发症。

[0214] 如本文所使用的，术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”和“治疗(treatment)”通常包括预防、减少或根除待治疗的疾病或病症的症状。关于癌症，术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”和“治疗(treatment)”可以包括，例如预防、根除、去除、改善、改变、减少、管理或控制肿瘤、癌症(肿瘤)细胞或癌症，最小化、预防或延缓转移，预防或延缓复发发作，或延长受试者的存活。

[0215] 如本文所使用的术语“转移”是指肿瘤细胞通过淋巴管或血管的传播。转移也指肿瘤细胞通过直接延伸通过浆膜腔、或蛛网膜下腔或其他空间的迁移。通过转移过程，肿瘤细胞迁移至身体的其他区域而在远离初始出现部位的区域中形成赘生物。

[0216] 术语“有效量”或“治疗有效量”意指治疗性组分或组合疗法中的组分将在细胞、组织、肿瘤、系统或受试者中引起期望的生物或医学反应的量，其结果通常是研究人员、兽医、医生或其他临床医生或技术人员寻求的。当提及在化疗中给予的NPB抗癌化合物的有效量时，化合物的有效量可为足以提供期望的抗癌作用的量。

[0217] “抗癌作用”可包括但不限于癌细胞、肿瘤或癌症的减少、预防、抑制的生长或消除；减少或抑制癌细胞增殖；增加或增强癌细胞的杀伤或凋亡；转移的减少或预防；和/或延

长的受试者的存活。在一些情况下，期望的生物或医学反应可为一种或多种癌症症状的改善、减缓、减轻或去除；或与具体癌症治疗相关的一种或多种毒副作用的减少。

[0218] “抑制”或“减少”例如癌细胞增殖通常是指当与未处理或未经历本申请的方法和组合的增殖细胞比较时，如使用本领域普通技术人员已知的方法所测量的细胞增殖的量减缓、降低，或例如终止，例如10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％或100％。

[0219] “减小”肿瘤通常是指当与治疗前的肿瘤尺寸相比或与未经历本申请的方法和NPB抗癌化合物的肿瘤相比时，如使用本领域普通技术人员已知的方法所测量的肿瘤尺寸减小，例如10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％或100％。

[0220] “增加”或“增强”的癌细胞的杀伤或凋亡通常是指当与未处理或未经历本申请的方法和NPB抗癌化合物的细胞相比时，如使用本领域普通技术人员已知的方法所测量的死亡或凋亡细胞的数量增加，例如10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、95％、100％、200％、300％或更多。细胞杀伤或凋亡的增加也可被测量为细胞活力的降低，如使用标准细胞活力分析所测量的。

[0221] 如本文所使用的，术语“凋亡”是指固有的细胞自我毁灭或自杀程序。响应于触发刺激，细胞经历包括细胞皱缩、细胞膜空泡化以及染色质固缩和碎裂在内的一连串事件。这些事件最终使细胞转化成膜结合的粒子簇(凋亡小体)，其随后被巨噬细胞吞噬。

[0222] 如本文所使用的，除非另有说明，否则单数形式“一(a)”、“一(an)”和“该(the)”包括指代复数。

[0223] 如本文所使用的诸如“基本上”、“约”和“大约”的程度术语是指使得最终结果不被显著改变的所修饰术语的合理偏差量。如果该偏差不会否定其所修饰的词的含义，这些程度术语应被解释为包括所修饰的术语的至少±5％的偏差。

[0224] 组合疗法

[0225] 本文公开的NPB抗癌化合物可作为单独疗法给予或者可与一种或多种另外的疗法，例如手术或药物或放射疗法联合使用。例如，另外的疗法可为包括手术在内的癌症疗法，例如去除原发性肿瘤的手术；或治疗剂，例如，抗生素、抗炎剂或抗癌剂。抗癌剂可包括，例如，经典化疗剂、以及分子靶向治疗剂、生物治疗剂和放射治疗剂。与本发明的化疗进一步组合使用的抗癌剂可包括选自本领域普通技术人员已知的任一类别的药剂，包括，例如，供电子剂、烷化剂、抗代谢药、植物生物碱和萜类化合物(例如，紫杉烷类)、拓扑异构酶抑制剂、抗肿瘤抗生素、激素治疗药、分子靶向剂等。在一些实施方案中，抗癌剂为烷化剂、抗代谢药、供电子剂、长春花生物碱、紫杉烷、拓扑异构酶抑制剂、抗肿瘤抗生素、酪氨酸激酶抑制剂或大环内酯类免疫抑制剂。应理解，所选另外的药物应不会显著降低NPB化合物的有效性或诱导/增强不希望的毒副作用。

[0226] 在另一个方面，本发明提供了组合疗法，其包括如本文所公开的NPB化合物和其它的治疗试剂或疗法(例如手术或放射)。在优选的实施方案中，组合的净抗癌作用大于组合的单个组分单独给予时的抗癌作用。优选地，抗癌作用的增加未伴随着毒副作用的增加。

[0227] 在一个方面，提供了用于治疗癌症或可通过化疗治疗的其他疾病的组合疗法，其包括给予受试者有效量的如本文所定义的化合物，并给予受试者一种或多种另外的治疗剂。在一些实施方案中，所述治疗剂为化疗剂。

[0228] 协同组合是特别希望的。在一些实施方案中，该组合呈现出协同抗癌作用。术语“协同的”和“协同作用”意味着该组合的组合组分的作用大于单个组分单独给予时的作用的总和。

[0229] 用途

[0230] 本文公开的NPB抗癌化合物可用于靶向化疗，例如在接受治疗的受试者中产生抗癌作用，同时具有最低的毒性。因此，在一个方面，提供了如本文所定义的抗癌化合物，其用于在受试者中产生化疗抗癌作用。

[0231] 在另一个方面，提供了用于治疗受试者的癌症的如本文所定义的NPB抗癌化合物。在另一个方面，提供了用于与其他药剂/疗法组合治疗癌症的如本文所定义的NPB抗癌化合物。在另一个方面，用于制备用来治疗癌症的药物的提供了如本文所定义的NPB抗癌化合物。在另一个方面，提供了用于制备用来与其他药剂/疗法组合用于治疗癌症的药物的如本文所定义的NPB抗癌化合物。在另一个方面，提供了用于治疗受试者的可通过化疗治疗的疾病或病症的如本文所定义的NPB抗癌化合物。

[0232] 在一些实施方案中，所述用途不包括放射。

[0233] 在一些实施方案中，所述受试者具有对铂基药剂(例如顺铂)治疗敏感但具有显著的毒性作用的癌症。在一些实施方案中，所述受试者具有对铂基药剂(例如顺铂)治疗有耐药性的癌症。

[0234] 根据所述用途，所述化疗用于以治疗有效量给予。

[0235] 本文所公开的NPB抗癌化合物可以在体外或体内使用，以诱导抗癌作用。在一个方面，提供了用于治疗癌细胞(例如，在癌细胞中诱导抗癌作用)的如本文所定义的NPB抗癌化合物。

[0236] 所述用途的另外特征如本文公开的任何实施方案中描述。

[0237] 试剂盒和商业包装产品

[0238] 在另一个方面，提供了涉及如本文公开的用于化疗的NPB抗癌化合物的试剂盒和商业包装产品。在一些实施方案中，提供了试剂盒或商业包装产品，所述试剂盒或商业包装产品包括如本文公开的NPB化合物。在一些实施方案中，所述说明书用于与癌症治疗中的其它药剂/疗法组合使用。

[0239] 解离性电子转移(DET)反应

[0240] 本发明人最近推导出顺铂在化疗中和与放疗组合中的分子作用机制[Lu，2007；2010；Lu等2007]。尽管顺铂是众所周知的DNA攻击剂，但其确切的分子作用机制仍热是难懂的。通过利用飞秒时间分辨激光光谱(fs-TRLS)，证明了顺铂是对与由水的辐射分解产生的弱束缚电子，例如预水化电子($e_{预}^-$)的解离性电子转移(DET)反应非常有效的分子：

[0241] $$e_{预}^- + Pt(NH_3)_2Cl_2 \rightarrow [Pt(NH_3)_2Cl_2]^{*-} \rightarrow Cl^- + Pt(NH_3)_2Cl^{\bullet}$$

[0242] $$e_{预}^- + Pt(NH_3)_2Cl \rightarrow [Pt(NH_3)_2Cl]^{*-} \rightarrow Cl^- + Pt(NH_3)_2^{\bullet} \quad (1)$$

[0243] 所生成的顺式$Pt(NH_3)_2$自由基高效地导致DNA链断裂[Lu，2007]。众所周知，在细胞中未配对的DSB是DNA损伤最致命的形式，并直接涉及凋亡和最终的克隆源性细胞死亡。

[0244] 本发明人现已惊奇地发现，某些非铂基有机分子也可参与可能存在于癌细胞内的还原环境中的弱束缚电子的DET反应，实质上充当顺铂类似物。本发明的NPB抗癌化合物的

一些普遍特征是，它们包含与一个或多个电子转移促进基团(例如NH_2基团)和一个或多个离去基团(例如卤素)偶联的芳环(而不是铂配位离子)。本文中证明了此类化合物是用于化疗的有效的抗肿瘤化合物。

[0245] 有利地，本文还证明了此类化合物对正常细胞的毒性显著低于铂基药剂(例如顺铂)。事实上，本文所提供的实施例证明，示例性化合物对正常细胞基本上无毒，即使在非常高的剂量(200μM)下。

[0246] 本文证明，在体外或体内使癌细胞与本发明的非铂基NPB抗癌化合物接触可提供化疗的抗癌功效，而该化合物本身在可用剂量内基本上无毒。

[0247] 基于上述推导出的顺铂的解离性电子转移(DET)机制，认为非铂基抗癌化合物(NPB)通过如下的DET反应与在癌细胞中的弱束缚电子($e_{弱束缚}^-$)反应：

[0248] $e_{弱束缚}^-$+NPB→自由基→DNA损伤/细胞死亡。

[0249] 该DET反应机制在图2中图示示出。所生成的自由基能有效地导致DNA损伤和凋亡(细胞死亡)，例如癌细胞或肿瘤中的DNA损伤和细胞死亡。

[0250] 进行研究以说明以上化合物的DET机制并探究其体外和体内抗肿瘤效果。下面讨论一些结果。

[0251] NPB抗癌化合物的FS-TRLS研究

[0252] 通过fs-TRLS测量研究NPB与弱束缚电子($e_{弱束缚}^-$)的反应性，如实施例1中所概述的。图3显示了化合物B作为示例性NPB的DET反应与卤代嘧啶中的那些，例如溴脱氧尿苷(BrdU)或碘脱氧尿苷(IdU)相比确实是高反应性的。后者作为潜在抗癌剂被测试，但是没有通过III期临床试验[Prados等，1999]，其在相同的实验条件下，显示没有检测到DET反应，可能是由于在BrdU和IdU的结构中缺少电子转移促进基团。这表明本发明公开的NPB作为用于癌症化疗的有效抗癌剂是非常有前途的。

[0253] NPB抗癌化合物的体外毒性测试

[0254] 在人(皮肤)正常细胞(GM05757)中研究了单独的顺铂或NBP抗癌化合物的体外毒性，如实施例2中所概述的。GM05757细胞系已在癌症研究中，特别是在测试新抗癌剂中被广泛用作人正常细胞[Choudhury等，2009]。图4显示了通过以剂量依赖性方式的72小时顺铂处理，有效地杀伤正常细胞，测得的IC50为约10μM(此时相对于未经处理的细胞，细胞存活率为50％)，证实了顺铂作为化疗药物确实具有高毒性。相比之下，图5至8中描绘的结果显示，NPB抗癌化合物A、B、C和D在高达200μM的剂量下处理多达96小时对正常细胞基本上没有毒性。因此，预期的是，与重金属(Pt)基化疗药物(顺铂)相比，这些NPB在动物和人中几乎不会或不会诱导毒副作用。通过MTT分析，即最常用的细胞活力测定之一，来测量细胞的活力。该方法涉及通过代谢活性细胞(活细胞)将MTT(3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四氮唑溴化物)转化为不溶性甲臜。使用增溶剂溶解甲臜并测量其吸光度，得到对存活细胞的数目的指示。这是公认的定量方法，就所需药物治疗时间以及总方案时间而言，其比在长期范围内测量细胞存活的克隆形成分析更为迅速。

[0255] NPB抗癌化合物的体外抗癌作用测试

[0256] 在人宫颈癌(HeLa或ME-180)、乳腺癌(MDA-MB-231)和肺癌(A549)细胞系以及顺铂耐药性人卵巢癌(NIH:OVCAR-3，HTB-161)细胞系中研究了NBP的体外抗癌作用，如实施例3中所概述的。图9-27显示了在经不同浓度的每种NPB处理96小时后，不同的人癌细胞的细胞

存活率。这些结果显示化合物A、B、C和D以剂量依赖的方式导致癌细胞的有效杀伤。清楚地观察到NPB的显著抗癌作用。例如，在约150-200μM化合物B或C或D的存在下，几乎所有的宫颈癌细胞(ME-180)或乳腺癌细胞(MDA-MB-231)被杀伤，其显示对人正常细胞没有毒性。

[0257] NPB抗癌化合物的体外DNA双链断裂和凋亡测试

[0258] 在人宫颈癌(ME-180)细胞系中研究了由作为示例性NPB化合物的化合物B诱导的DNA双链断裂(DSB)和凋亡，如实施例4和5中所概述的。分别通过γ H2A X DNA损伤分析和CellEvent™半胱天冬酶-3/7绿色检测试剂盒(均从Invitrogen购买)检测处理过的癌细胞中的DNA DSB和凋亡。图28显示了在处理过的癌细胞中，化合物B诱导显著量的DNA DSB，而图29显示在由0-200μM的化合物B处理过的癌细胞中，它还相应地导致了显著百分比的凋亡。

[0259] 本文提供的体外结果显著地证明了NPB化合物的存在通过诱导在癌细胞中的显著的DNA DSB和凋亡有效杀伤肿瘤细胞而不是正常细胞。因此，预期NPB在动物和人中产生足够的抗癌作用，而诱导最低的毒副作用或不诱导毒副作用。

[0260] NPB抗癌化合物的体内抗癌作用

[0261] 在人宫颈癌(ME-180)的异种移植小鼠肿瘤模型中研究了作为示例性NPB化合物的化合物B的体内抗癌作用，如实施例6中所概述的。与在肿瘤模型中未接受化合物的对照组相比，给予化合物B显著抑制肿瘤生长，如从图30所示的肿瘤(体积)生长曲线可见的。所有这些结果显示化合物B在小鼠中导致肿瘤的显著的生长抑制和再生长延迟。考虑到使用的化合物B仅为小的每日剂量(7mg/kg，在小鼠中等于约50μM的估算浓度)并且化合物B在高达200μM的浓度下具有最小总体和急性毒性，可以推测这些结果可以外推到更大的化合物剂量或更频繁的治疗，从而可以达到最大的治疗效果。

[0262] NPB抗癌化合物的体内毒性研究

[0263] 通过存活分析和体重测量在6至8周SCID小鼠中研究了总体药物毒性，并且通过以下参数来测量急性药物毒性：采血和组织学，如实施例7中所概述的。通过生物化学方法或HPLC-质谱法分析肝毒性(ALT、ALP、总胆红素)、肾毒性(血液尿素、肌酸酐)和电解质(Na、K、Cl)。在本研究中，因体外细胞系实验中观察到无毒性，故将作为示例性NPB化合物的化合物B以每日0mg/kg和7mg/kg通过IP注射特意给予至小鼠体内，持续5天。观察小鼠的任何机体毒性。在研究结束时，收获整个器官以评估肝和肾毒性。还采集了血液。图31显示，小鼠的重量随时间的变化不受影响，即化合物B未呈现机体毒性。此外，图32中描绘的结果显示，化合物B即使以高剂量(5天×7mg/kg/天＝35mg/kg)给予时，也未诱导可观察到的急性毒性，即无肝毒性、无肾毒性且电解质无变化。

[0264] 认为来自本文提供的实施例的体外和体内结果可外推到所例示的那些以外的其他化合物和组合、癌细胞、癌症模型和人癌症。利用本文所提供的信息，可使用合理的方法来鉴别除本文所例示的那些以外的可用于化疗以产生其抗癌作用的其他新抗癌剂。本领域技术人员已知的各种筛选分析均可用于评估特定药剂的效果，如同实施例中所阐述的体外和体内实验一样。显示抗癌作用的那些药剂以及与铂基抗癌剂的治疗相比没有产生毒副作用的那些将是特别优选的。这种鉴别有效抗癌剂的合理方法代表随机筛选分析的有效且经济的替代方案。

[0265] 熟练的专业人员将能够容易地确定体内化疗所需的有效量，例如以便实现期望的

抗癌作用而同时具有最小的毒副作用。有效剂量可根据癌症的类型和阶段、给予途径、治疗方案等因素而改变。熟练的专业人员可另外进行研究以确定所使用的最佳药物剂量。

[0266] 本文公开的NPB的一个优点是所公开的DET反应机制被设计成优先在肿瘤细胞处具有活性。与在正常细胞中的情况相反，在正常细胞中NPB将具有低反应性，因此DET由于缺乏还原性细胞内环境而将不会在正常组织中发生或其反应效率将显著降低[Lu等，2013]。因此，所公开的化合物将实现许多类型的癌症的天然靶向化疗，包括(但不限于)宫颈癌、卵巢癌、乳腺癌、肺癌、前列腺癌、脑癌和脊髓癌、头颈癌、肝癌、胃癌、白血病以及结肠直肠癌。

[0267] NPB的一些期望特征包括以下的一个或组合：(1)是生物相容的；(2)与弱束缚电子的有效反应；(3)有效地杀伤癌细胞，以便可使用特定的剂量；(4)对正常细胞是惰性的，因此在给予剂量下毒性最小(理想地，基本上无毒)；(5)在还原或低氧肿瘤环境下具有反应性；(6)优先与癌细胞反应；(7)能够进入细胞且优选进入细胞核；和/或(8)适用于多种类型的肿瘤。

[0268] 应用本文公开的原理，本领域技术人员将能够鉴别可诱导靶向化疗的抗癌作用的抗癌化合物。因此，本发明的范围延伸到所公开的示例性NPB化合物以外。

[0269] 本文论述了许多理论、假说、观念和假设。此类理论、假说、观念和假设并非意图约束或限制本发明的范围。

实施例

[0270] 以下阐述的实施例旨在说明而非限制本发明的范围。

[0271] 实施例1.抗癌化合物(NPB)与弱束缚电子的DET反应的飞秒激光光谱观察

[0272] 1.1 fs-TRLS方法

[0273] 飞秒(fs)时间分辨激光光谱(fs-TRLS)是用于实时观察分子反应的最通用且强大的技术。它采用短持续时间-飞秒(fs)(1fs＝10^{-15}秒)的激光闪光，这样的短持续时间被我们降至反应实际发生的时间尺度上。通过fs-TRLS方法研究新NPB抗癌化合物与弱束缚电子的DET反应，其在之前已有说明[Lu，2007；2010]。对于后者，简言之，我们的fs激光放大系统(Spectra-Physics，Spitfire)在500Hz的重复频率下产生脉冲宽度为100至120fs的激光脉冲。使用350nm的强泵浦脉冲来产生弱束缚电子($e_{弱束缚}^-$)，通过对H_2O分子进行双光子激发使之成为更高能态的H_2O^*，然后H_2O^*电离以产生$e_{弱束缚}^-$；使用以一定延迟到来的400nm的探针脉冲，通过检测反应中间体阴离子态的瞬态吸光度来监测与电子的DET反应。

[0274] 1.2结果

[0275] 新NPB抗癌化合物(例如，化合物B)的DEA反应的代表性fs-TRLS观察结果示于图3中。结果显示，化合物B与$e_{弱束缚}^-$的DET反应高度有效，其比溴脱氧尿苷(BrdU)或碘脱氧尿苷(IdU)强得多。后者没有电子转移促进基团(二氨基)并且观察到在相同的试验条件下，它的DET反应可以忽略。该观察结果说明了所公开的化合物是潜在的抗癌剂。

[0276] 1.3讨论

[0277] 所公开的NPB化合物中存在(单-或二-)卤素基团和二氨基确实可增强它们与弱束缚电子的DET反应，所述弱束缚电子存在于癌细胞的还原性细胞内环境中。

[0278] 实施例2.NPB在处理人正常细胞中的毒性的体外测试

[0279] 2.1材料和方法

[0280] 2.1.1化学品和试剂

[0281] 顺铂、二氯-二氨基-苯(化合物A)、溴-二氨基-苯(化合物D)、胰岛素和3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四氮唑溴化物(MTT)获得自Sigma-Aldrich。二溴-二氨基-苯(二溴-苯二胺,化合物B)获得自TCI-America。二碘-二氨基苯(化合物C)在我们的实验室合成、纯化并结晶,并且通过NMR和质谱检测了结构和纯度。MEM和胎牛血清(FBS)、青霉素G和链霉素获得自HycloneLaboratories(UT,USA)。在超纯水或盐水中新鲜制备顺铂的储备溶液,并且在纯乙醇中制备化合物A、B、C、D的储备溶液,其中在处理细胞时乙醇的最终浓度为≤1%。

[0282] 2.1.2细胞培养

[0283] 人皮肤二倍体成纤维细胞(GM05757细胞系)直接获得自Coriell Cell Repository。胎牛血清(FBS)获自Hyclone Laboratories(UT,USA)。用补充有10%FBS、100单位/mL青霉素G和100μg/mL链霉素(Hyclone)的MEM(Hyclone)培养GM05757正常细胞。将细胞在37℃下保持于含5%CO_2的潮湿气氛中。

[0284] 2.1.3通过MTT测量细胞活力

[0285] 通过3-[4,5-二甲基噻唑-2-基]-2,5-二苯基四氮唑溴化物(MTT)分析来确定NPB对细胞活力的毒性作用。将细胞在96孔板(5×10^3个细胞/孔)中培养24h。将培养基更换为新鲜培养基并用不同的药物浓度孵育72或96小时。然后对细胞活力进行MTT分析。简言之,将不含酚红而含有1.2mM MTT(sigma)(即在PBS中添加10μl 12mM MTT储备溶液)的100μl新培养基添加至每个孔并孵育4h。然后移除培养基,并用100μL/孔的DMSO溶解甲臜晶体(或供选择地用100μl/孔的SDS溶解并再孵育4h)。通过使用Multiskan紫外/可见光谱微孔板读数器(Thermo Scientific)测量540nm处(对于SDS溶解为570nm处)的吸光度来确定存活分数,存活分数与活细胞数成正比。

[0286] 2.2结果

[0287] 为了测试NPB对人正常细胞的毒性,利用标准MTT分析并使用顺铂作为对照。用不同的药物浓度(对于顺铂为0至50μM且对于化合物A/B/C/D为0至200μM)处理人正常(GM05757)细胞。结果示于图4至8中。首先,在图4中可清楚地看到,顺铂呈现严重的毒性,即使在≤30μM的低浓度下处理72小时,测得的IC50为约10μM。该结果证实,顺铂作为抗癌剂确实具有高毒性。相比之下,在图5至8中清楚地显示,本发明公开的NPB化合物A、B、C和D对正常细胞基本上没有毒性,即使在200μM的极高浓度下处理96小时。这些结果显示了重金属(Pt)基化疗药物(顺铂)与NPB之间的对比差异。因此,预期这些NPB分子在动物和人中不会诱导全身毒副作用或者诱导最小的全身毒副作用。

[0288] 2.3讨论

[0289] 如本发明人所推测的,正常细胞由于缺乏还原性胞内环境而对高度氧化性的所公开的化合物具有低反应性。因此,NPB没有对正常细胞显示出毒性或对正常细胞显示出低毒性。所公开的化合物与临床上使用的顺铂形成了对比,顺铂对人正常细胞具有高亲和力并具有高毒性。因此,这些NPB有可能成为优异的非毒性抗癌剂。

[0290] 实施例3.NPB在处理各种癌细胞中的体外抗癌结果

[0291] 3.1材料和方法

[0292] 3.1.1化学品和试剂

[0293] 顺铂、二氯-二氨基-苯(化合物A)、溴-二氨基-苯(化合物D)、胰岛素和3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四氮唑溴化物(MTT)获得自Sigma-Aldrich。二溴-二氨基-苯(二溴-苯二胺,化合物B)获得自TCI-America。二碘-二氨基苯(化合物C)在我们的实验室合成、纯化并结晶,并且通过NMR和质谱检验了结构和纯度。MEM和胎牛血清(FBS)、青霉素G和链霉素获自Hyclone Laboratories(UT,USA)。在超纯水或盐水中新鲜制备顺铂的储备溶液,并且在纯乙醇中制备化合物A、B、C、D的储备溶液,其中在处理细胞时乙醇的最终浓度为≤1%。

[0294] 3.1.2细胞培养

[0295] 人皮肤二倍体成纤维细胞(GM05757细胞系)直接获自Coriell Cell Repository,而人宫颈癌细胞系(HeLa,ATCC号:CCL-2;或ME-180)、人乳腺癌细胞系(MDA-MB-231)、人卵巢癌细胞系(NIH:OVCAR-3,ATCC号:HTB-161)和人肺癌细胞系(A549,ATCC号:CCL-185™)、以及RPMI1640、F-12K、McCoy 5A和L-15培养基直接获自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。胎牛血清(FBS)获自Hyclone Laboratories(UT,USA)。用补充有10%FBS、100单位/mL青霉素G和100μg/mL链霉素(Hyclone)的MEM(Hyclone)培养GM05757正常细胞及HeLa细胞。用于ME-180、NIH:OVCAR-3、A549和MDA-MB-231细胞的完全生长培养基分别为ATCC配制的补充有10%FBS的McCoy 5A培养基、含20%FBS的RPMI 1640培养基、含10%FBS的F-12K培养基和含10%FBS的L-15培养基(Leibovitz)。将细胞在37℃下保持于含5%CO_2的潮湿气氛中。

[0296] 3.1.3通过MTT测量细胞活力

[0297] 通过3-[4,5-二甲基噻唑-2-基]-2,5-二苯基四氮唑溴化物(MTT)分析来确定NPB对细胞活力的抗癌作用。将细胞在96孔板(5×10^3个细胞/孔)中培养24h。将培养基更换为新鲜培养基并用不同的药物浓度孵育96h。然后对细胞活力进行MTT分析。简言之,将不含酚红而含有1.2mM MTT(sigma)(即在PBS中加入10μl 12mM MTT储备溶液)的100μl新培养基添加至每个孔并孵育4h。然后移除培养基,并用100μL/孔的DMSO溶解甲臜晶体(或供选择地用100μl/孔的SDS溶解并再孵育4h)。通过使用Multiskan紫外/可见光谱微孔板读数器(ThermoScientific)测量540nm处(对于SDS溶解为570nm处)的吸光度来确定存活分数,存活分数与活细胞数成正比。

[0298] 3.2结果

[0299] 在人宫颈癌(HeLa或ME-180)、乳腺癌(MDA-MB-231)和肺癌(A549)细胞系以及顺铂耐药性人卵巢癌(NIH:OVCAR-3,HTB-161)细胞系中研究了NBP的体外抗癌作用。图9-27显示了在经不同浓度的NPB处理96小时后,不同的人癌细胞的细胞存活率。这些结果显示化合物A、B、C和D以剂量依赖的方式杀伤癌细胞,与人正常细胞的结果形成鲜明对比(图5-8)。清楚地显示NPB的存在有效杀伤癌细胞。例如,在约200μM化合物B或C或D的存在下,几乎所有的宫颈癌细胞(ME-180)和乳腺癌细胞(MDA-MB-231)被杀伤,其显示对人正常细胞没有毒性。

[0300] 3.3讨论

[0301] 本文提供的体外结果证明了NPB化合物(化合物A/B/C/D)的存有效杀伤肿瘤细胞而不是正常细胞,如图5-27所示。因此,NPB预期在动物和人中具有显著的化疗抗癌功效,同时引起最小的毒副作用或不引起毒副作用。

[0302] 实施例4.NPB化合物(B)在癌细胞中诱导DNA双链断裂

[0303] 4.1材料和方法

[0304] 4.1.1化学品和试剂

[0305] 使用刚从Barnstead Nanopure水系统获得的用于生命科学的超纯水，其电阻率>18.2MΩ/cm并且TOC<1ppm。γH2AX DNA损伤分析试剂盒购自Invitrogen。

[0306] 4.1.2 γH2AX DNA损伤分析

[0307] 使用γH2AX DNA损伤分析(Invitrogen)以检测在癌细胞中基因组DNA的DSB。磷酸化的H2AX焦点(foci)为DNA DSB的生物标志物。通过在核中的磷酸化的H2AX(γH2AX)的基于特异性抗体的检测来测量DNA DSB。简言之，在上述细胞培养条件下，使用不同浓度的化合物B处理人宫颈癌(ME-180)细胞12h。然后根据由制造商提供的方案中所述的详细的实验程序，我们进行了处理过的细胞HCS DNA损伤分析。使用Nikon Eclipse TS100荧光显微镜获得细胞的图像，使用Image J软件进行在细胞中的活化的γ-H2AX的定量分析(DNA DBS产量)。

[0308] 4.2.结果

[0309] 如图28所示，化合物B处理在宫颈癌细胞的基因组DNA中诱导显著量的DSB。

[0310] 4.3.讨论

[0311] 该结果特别有趣，因此熟知的是，DNA DSB对细胞而言难于修复，并且因此是细胞死亡的潜在诱导物。这与观察到的化合物B的治疗的细胞毒性一致，如图9-27中所示，并且与提出的用于NPB化合物与癌细胞中的弱束缚电子的解离电子转移(DET)机制一致(图2和3)。

[0312] 实施例5.化合物B在人宫颈癌(ME-180)细胞中诱导显著的凋亡

[0313] 5.1材料和方法

[0314] 5.1.1化学品和试剂

[0315] CellEvent™半胱天冬酶-3/7绿色检测试剂盒购自Invitrogen。

[0316] 5.1.2细胞培养

[0317] 人宫颈癌(ME-180)细胞购自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection，ATCC)。使用补充了10％胎牛血清(Hyclone)、100单位/mL青霉素G和100μg/mL链霉素(Hyclone)的MEM(Hyclone)培养细胞。将细胞保持在37℃下的含5％CO_2的湿润环境中。

[0318] 5.1.3使用荧光显微法的凋亡分析

[0319] 根据供应商的方案，使用CellEvent™半胱天冬酶-3/7绿色检测试剂盒(Invitrogen)检测活化的半胱天冬酶和凋亡细胞。该试剂盒提供了对半胱天冬酶-3和-7的特异性半胱天冬酶(FLICA)的荧光抑制剂；对于活化的半胱天冬酶-3和-7，细胞显示绿色荧光。该试剂由偶联到核酸结合染料的四种氨基酸多肽(DEVD)组成。该细胞渗透的底物本质上是非荧光的，因为DEVD多肽抑制了染料结合到DNA的能力。在凋亡细胞中的半胱天冬酶-3或半胱天冬酶-7活化后，DEVD多肽裂解，使染料能够结合到DNA并产生绿色荧光。简言之，为了使用CellEvent™半胱天冬酶-3/7绿色检测试剂，向在完全生长培养基中的细胞添加底物，孵育30分钟，并成像。具有活化的半胱天冬酶-3/7的凋亡细胞显示明亮的绿色核，而没有活化的半胱天冬酶3/7的细胞显示了最小的荧光信号。已显示的是，该强大的分析对半胱天冬酶-3/7的活化是高特异性的，并且可以使用活细胞荧光成像技术监测半胱天冬酶-3或-7的活化。由于裂解剂标记半胱天冬酶3/7-阳性细胞的细胞核，因此该染色还可以提供

核形态的信息，包括晚期细胞凋亡的典型的固缩的核。ME-180细胞生长至60％汇合，然后使用0-200μM化合物B处理48h。使用Nikon Eclipse TS 100显微镜检测荧光。使用连接的摄像头捕捉图像。

[0320] 5.2结果

[0321] 为了测试由NPB化合物介导的癌细胞杀伤的原因是否是诱导细胞凋亡，我们使用了CellEvent™半胱天冬酶-3/7绿色检测试剂盒。在图29中的结果显示化合物B处理导致半胱天冬酶-3和-7的显著激活，其由绿色荧光的显著增强证明。此外，化合物B还导致核形态的显著变化，显示在处理过的癌细胞中的固缩的核，这是晚期凋亡的特征。该结果表明当使用0-200μM化合物B处理细胞时，显著诱导细胞凋亡。

[0322] 5.3讨论

[0323] 化合物B的细胞毒性作用与处理过的细胞显示的活化的半胱天冬酶3/7的量增加相关。该结果表明化合物B导致在处理过的癌细胞中的凋亡显著增加。这与化合物B诱导DNA DSB的结果一致，如图28所示。

[0324] 实施例6.化合物B在雌性SCID小鼠的人宫颈癌(ME-180)的异种移植小鼠模型中的体内测试

[0325] 6.1材料和方案

[0326] 6.1.1研究组

[0327] 本实验中的两个组为：(1)对照品(5％EtOH/培养基)；(2)每日化合物B以7mg/kg在5％EtOH/培养基中，持续5天，如表1所示。

[0328] 表1.实施例6中的研究组

[0329]

组号	组名	小鼠数量	药物剂量	给予途径	体积 (μL/20g)	安排
1	对照	5	N/A	i.p.	200	每日，持续5天
2	化合物B	5	7 mg/kg	i.p.	200	每日，持续5天

[0330] 6.1.2小鼠和化合物B溶液的制备

[0331] 本研究中使用6-8周的SCID小鼠；化合物B作为示例性NPB溶于5％EtOH:95％细胞培养基(≈1:20)中。

[0332] 6.1.3细胞的制备(用于皮下注射)

[0333] 将ME-180(人宫颈癌)细胞在ATCC配制的补充有10％FBS的McCoy's5A培养基中培养。将培养瓶中的细胞在37℃下保持于含5％CO_2的潮湿气氛中。将细胞用PBS冲洗，用胰蛋白酶消化以便与培养瓶底部脱离，与新鲜生长培养基混合，并且离心以去除上清液。用新鲜培养基将细胞重新悬浮到适当的浓度用于皮下注射到小鼠中。注射体积为每只动物50μl(1.5×10^6个细胞)。

[0334] 6.1.4通过皮下注射的异种移植宫颈癌模型

[0335] 使用27号针将体积为50μL的ME-180肿瘤细胞皮下注射到雌性SCID小鼠(6至8周龄)左侧内。如此建立人宫颈癌的皮下(SC)异种移植小鼠模型。

[0336] 6.1.5药物剂量给予

[0337] 对小鼠进行单个称重并按照体重腹膜内注射，注射浓度如上研究组表中列出的。注射体积按200μL/20g小鼠计。用70％异丙醇彻底擦拭皮肤表面以清洁注射部位。

[0338] 6.1.6数据收集

[0339] 使用游标卡尺测量肿瘤尺寸作为时间的函数，以评估与治疗相关的肿瘤生长延迟。测量肿瘤时也对动物称重。在终止前允许小鼠肿瘤生长至最大1000mm^3。

[0340] 6.1.7在小鼠中药物诱导的应激的评价

[0341] 在预处理和治疗期期间，在给予后并且至少每天一次，如果认为有必要则更多次观察所有动物的死亡率和发病率。具体地，监测动物的不健康迹象，例如体重下降、食欲改变，行为改变例如改变步态、嗜睡以及总应激表现。

[0342] 6.2结果

[0343] 在人宫颈癌(ME-180)的异种移植小鼠肿瘤模型中研究了作为示例性NPB化合物的化合物B的体内抗癌作用。如图30所示，清楚地看到，与在肿瘤模型中没有处理的对照组相比，单独给予化合物B显著抑制肿瘤生长。该结果还显示该化合物B导致体内多于30天的显著的肿瘤再生长延迟。

[0344] 6.3讨论

[0345] 鉴于在本实验中每天仅使用小剂量(7mg/kg，在小鼠中等于50μM)的化合物B持续5天，并且化合物B在较高的剂量(200μM体外)下未观察到或观察到最小的总体毒性和急性毒性，合理地预期这些结果可以外推到更大的剂量或更频繁的治疗，从而可以实现最大的治疗效果。

[0346] 实施例7.化合物B在SCID小鼠中的毒性的体内测试

[0347] 7.1材料和方案

[0348] 7.1.1研究组

[0349] 本实验中的两个组(5只6-8周的SCID小鼠/组)为：(1)对照品(在5％EtOH培养基中)；和(2)化合物B以7mg/kg在5％EtOH/培养基中，如表2所示。每天IP注射化合物B持续五天。

[0350] 表2.实施例7中的研究组

[0351]

组号	组名	小鼠数量	TA/CA* 剂量（mg/kg）	给予途径	体积（μL/20g）	安排（天）
1	对照	5	N/A	i.p.	200	每日，持续5天
2	化合物B	5	7	i.p.	200	每日，持续5天

[0352] *TA：测试品；CA：对照品

[0353] 7.1.2小鼠和化合物B溶液的制备

[0354] 本研究中使用6-8周的SCID小鼠；化合物B作为示例性NPB溶于5％EtOH:95％细胞培养基中(≈1:20)。

[0355] 7.1.3剂量给予

[0356] 将6-8周的SCID小鼠单个称重，并按照体重腹膜内注射(IP)，注射浓度如以上研究组表中列出的。每日以0和7mg/kg通过腹膜内注射给予化合物B，持续5天。注射体积按200μ

L/20g小鼠计。用70％异丙醇彻底擦拭皮肤表面以清洁注射部位。

[0357] 7.1.4数据收集和分析

[0358] 通过生存分析和体重测量观察小鼠中的总体药物毒性，并且通过血液收集和组织学测量急性药物毒性。通过生物化学方法或HPLC-质谱法分析肝毒性(ALT、ALP、总胆红素)、肾毒性(血液尿素、肌酸酐)和电解质(Na、K、Cl)。观察小鼠的任何机体毒性。在药物注射后的不同时间点从隐静脉收集血液样品。在研究结束时，收获整个器官以评估肝和肾毒性。

[0359] 7.1.5在小鼠中药物诱导的应激的评价

[0360] 在预处理和治疗期期间，在给予后并且至少每天一次，如果认为有必要则更多次观察所有动物的死亡率和发病率。具体地，监测动物的不健康迹象，例如体重下降、食欲改变，行为改变例如改变步态、嗜睡以及总体应激表现。

[0361] 7.2结果

[0362] 通过生存分析和体重测量研究在6-8周的SCID小鼠中的总体药物毒性，并通过测量肝毒性(ALT、ALP、总胆红素)、肾毒性(血液尿素、肌酸酐)和电解质(Na、K、Cl)研究急性药物毒性。如图31所示，化合物B显示随时间推移对小鼠的重量没有影响，未呈现机体毒性。有趣的是，图32中还清楚地显示，化合物B即使以高剂量(5天×7mg/kg/天＝35mg/kg)，即在小鼠实验和人中使用的顺铂剂量的约5倍给予时，也未在小鼠中诱导可观察到的急性毒性，即无肝毒性、无肾毒性且电解质无变化。

[0363] 7.3讨论

[0364] 图30-32中呈现的体内结果清楚地证明，在小鼠中，化合物B显示了显著的抗癌作用，而几乎没有诱导毒性或诱导最小的毒性，没有诱导整体药物毒性(对小鼠的存活和体重没有影响)以及没有诱导急性毒性(没有肝毒性、没有肾毒性且电解质没有变化)。该结果与在人正常细胞(图5-8示出)和人癌细胞(图9-29)中观察到的体外结果十分一致。从而证明了化合物B作为NPB是无毒并且有效的抗癌剂。

[0365] 在任何被治疗的动物中均未注意到毒性或不健康的迹象，既无整体药物毒性(对小鼠存活期和体重无影响)，也无急性毒性(无肝毒性、无肾毒性且电解质无变化)。

[0366] 本文引用的参考文献均整体通过引用并入。

[0367] 上述实施方案仅旨在示例。在不背离仅由所附权利要求限定的本发明的范围的情况下，本领域技术人员可实现特定实施方案的变更、修改和变化。

[0368] 参考文献

[0369] 1.WO/2014/094178,"RADIOSENSITIZER COMPOUNDS FOR USE EST COMBINATION WITH RADIATION"(Q.-B.Lu;2014年6月26日公开).

[0370] 2.P G.Rose,B N.Bundy,E.B.Watkins,J.T.Thigpen,G.Deppe,M.A.Maiman,D.L.Clarke-Pearson,S.Insalaco.Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer.N.Engl.J.Med.340,1144-53(1999).

[0371] 3.D.M.Reese,Anticancer drugs,Nature 378,532(1995).

[0372] 4.H.Varmus,The New Era in Cancer Research.Science 312,1162(2006).

[0373] 5.B.Alberts,The Promise of Cancer Research,Science 320,19(2008);The Challenge of Cancer.Science 331,1491(2011).

[0374] 6.A.H.Zewail,Femtochemistry:Atomic-Scale Dynamics of the Chemical bond using ultrafast lasers(Nobel Lecture).Angew.Chem.Int.Ed.39,2587-2631(2000).

[0375] 7.Q.-B.Lu,Effects of Ultrashort-Lived Prehydrated Electrons in Radiation Biology and Their Applications for Radiotherapy of Cancer.Mutat.Res.:Rev.Mutat.Res.704,190-199(2010).

[0376] 8.L.Y.Lu,N.Ou,&Q.-B.Lu,Antioxidant Induces DNA Damage,Cell Death and Mutagenicity in Human Lung and Skin Normal Cells.Sci.Rep.3,3169(1-11)(2013)

[0377] 9.Q.-B.Lu,Molecular Reaction Mechanisms of Combination Treatments of Low-Dose Cisplatin with Radiotherapy and Photodynamic Therapy,J.Med.Chem.50,2601-2604(2007).

[0378] 10.Q.-B.Lu,S.Kalantari,&C.-R.Wang,Electron Transfer Reaction Mechanism of Cisplatin with DNA at the Molecular Level.Mol.Pharmaceutics 4,624-628(2007).

[0379] 11.M.D.Prados等"A phase 3randomized study of radiotherapy plus procarbazine,CCNU,and vincristine(PCV)with or without BUdR for the treatment of anaplastic astrocytoma:a preliminary report of RTOG 9404",Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.45,1109(1999).

[0380] 12.A.Choudhury等,Targeting homologous recombination using imatinib results in enhanced tumor cell chemosensitivity and radiosensitivity,Mol Cancer Ther 8,203-2013(2009).

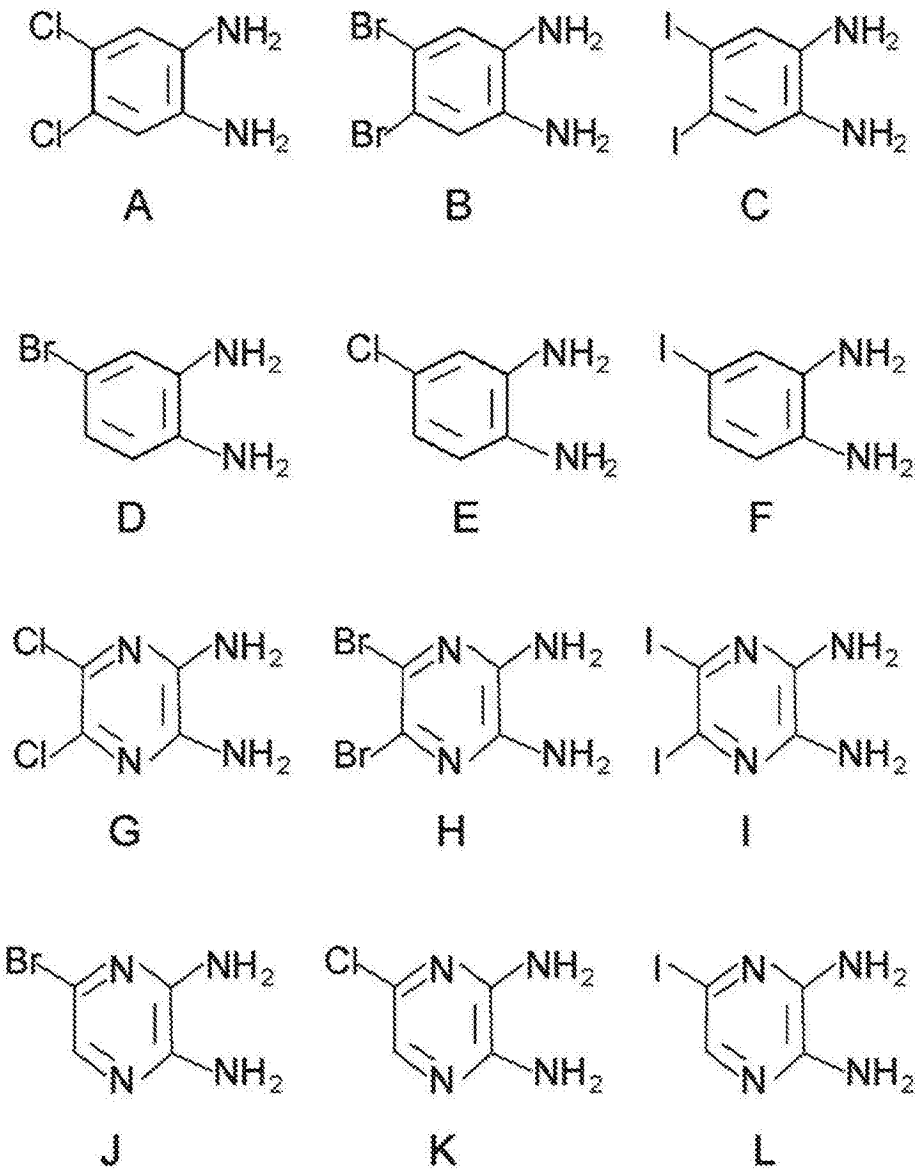

A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L

图1

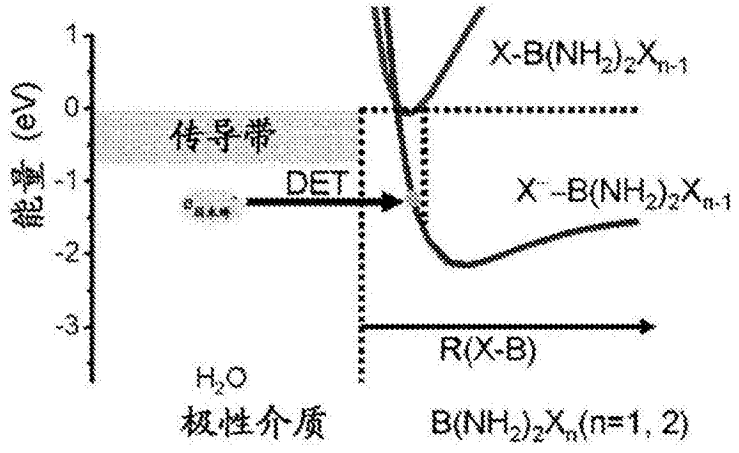

能量 (eV)
1
0
-1
-2
-3
传导带
DET
X-B(NH2)2Xn-1
X--B(NH2)2Xn-1
R(X-B)
H2O
极性介质
B(NH2)2Xn(n=1, 2)

图2

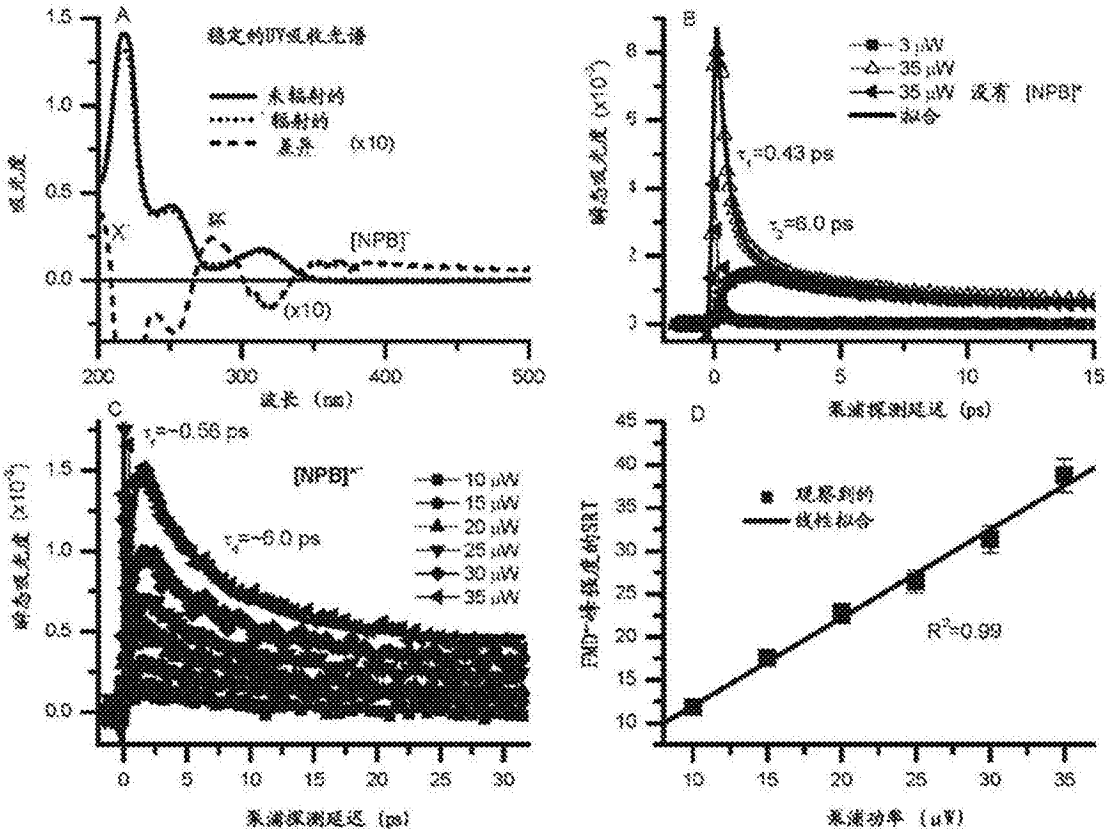

A
稳定的ITO纳秒光谱
未标时间
标时间
差异
(x10)
X
K
[NPB]*
(x10)
荧光强度
波长 (nm)
B
3 μW
35 μW
35 μW 没有 [NPB]*
拟合
τ1=0.43 ps
τ2=6.0 ps
瞬态吸光度 (x10⁻³)
泵浦探测延迟 (ps)
C
τ1=~0.56 ps
[NPB]*
τ2=~6.0 ps
10 μW
15 μW
20 μW
25 μW
30 μW
35 μW
瞬态吸光度 (x10⁻³)
泵浦探测延迟 (ps)
D
观察到的
线性拟合
R²=0.99
泵浦功率 (μW)

图3

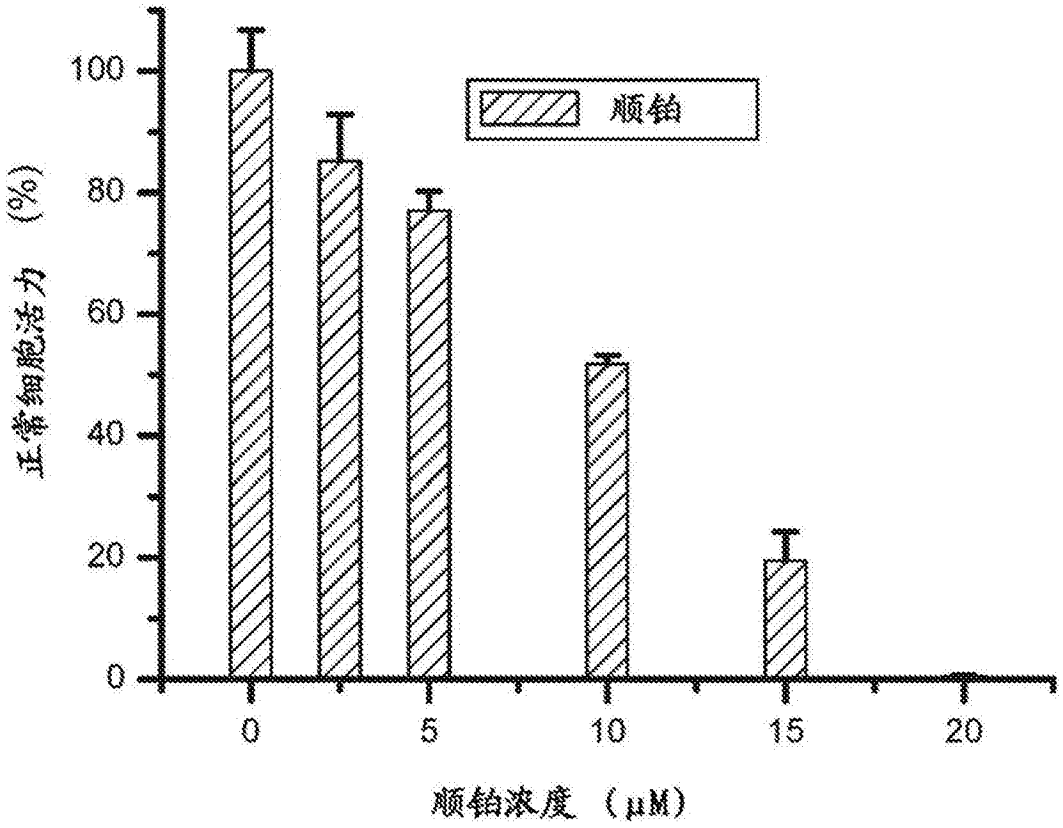


图4

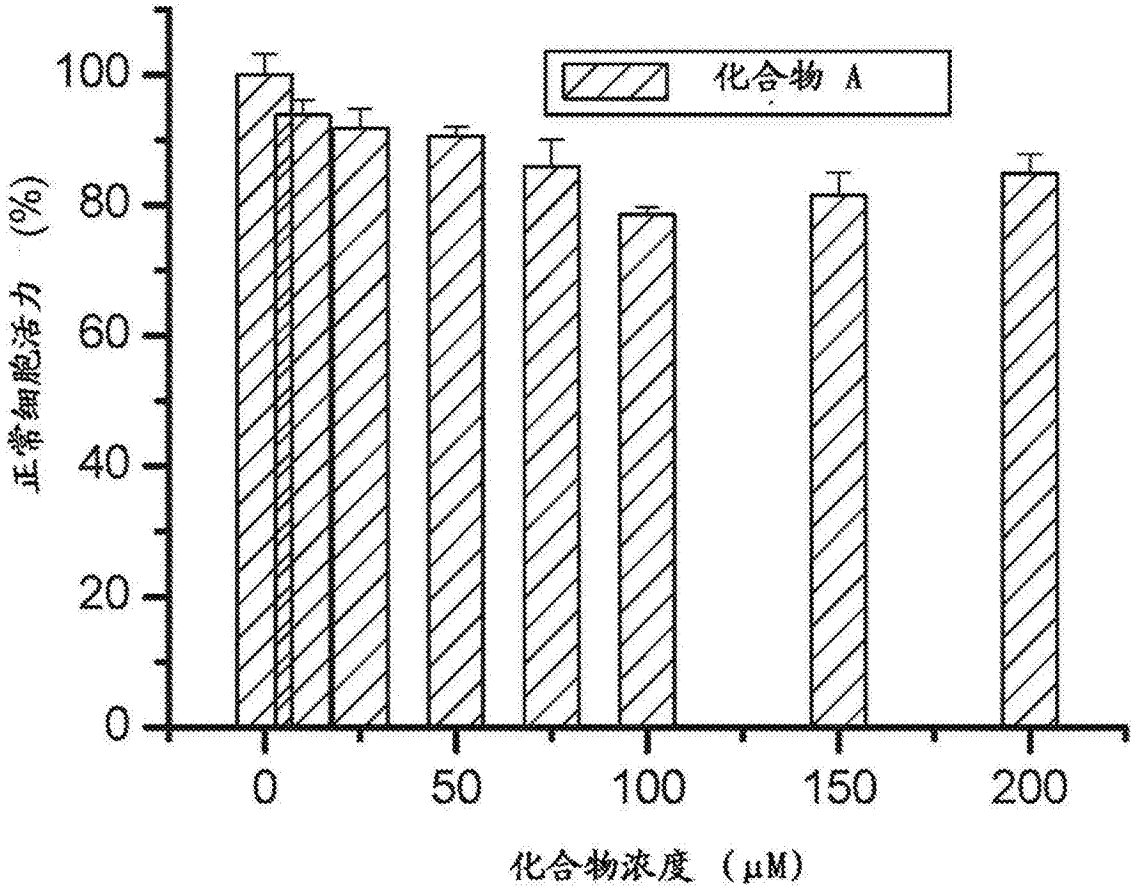


图5

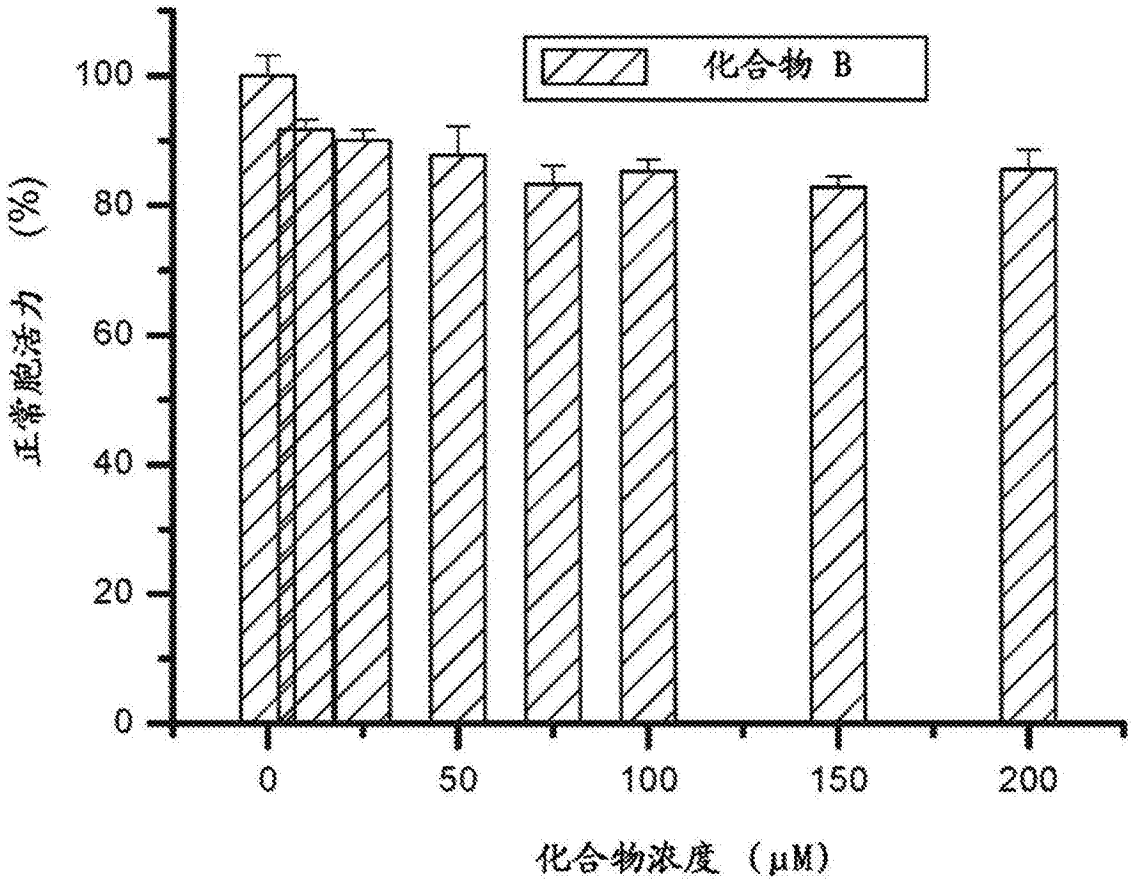


图6

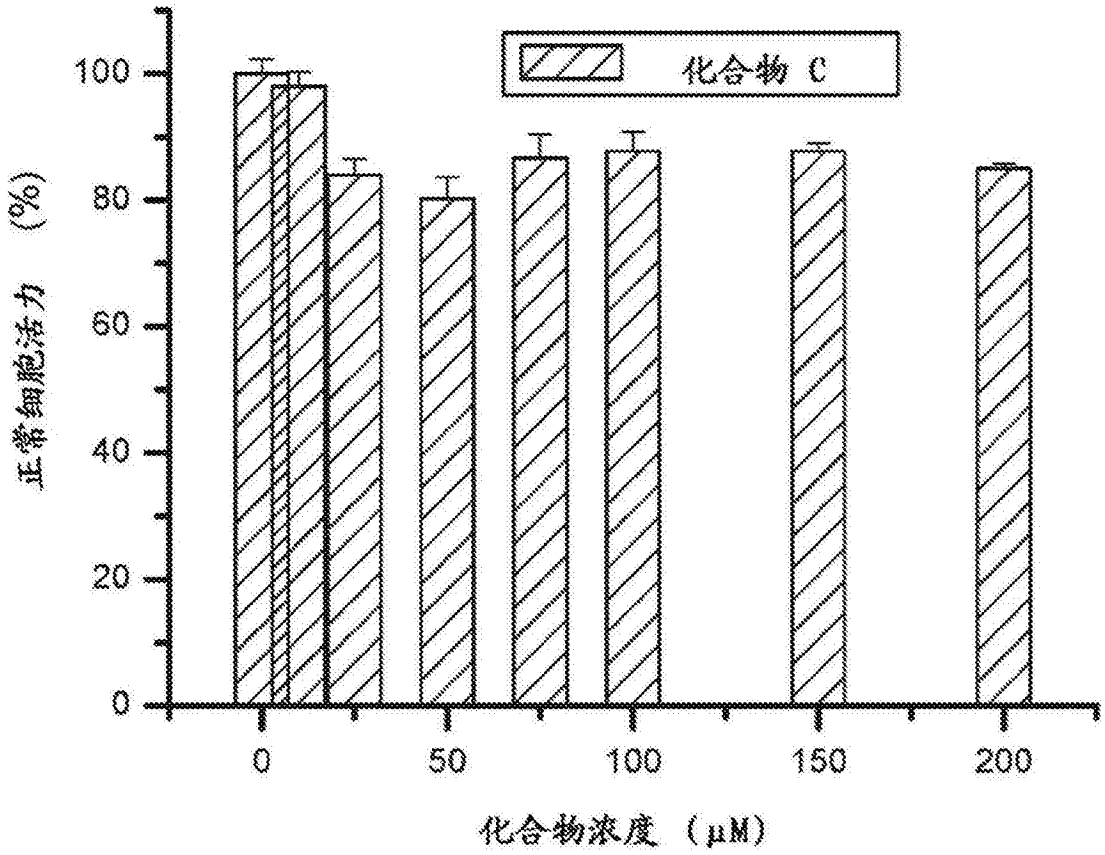


图7

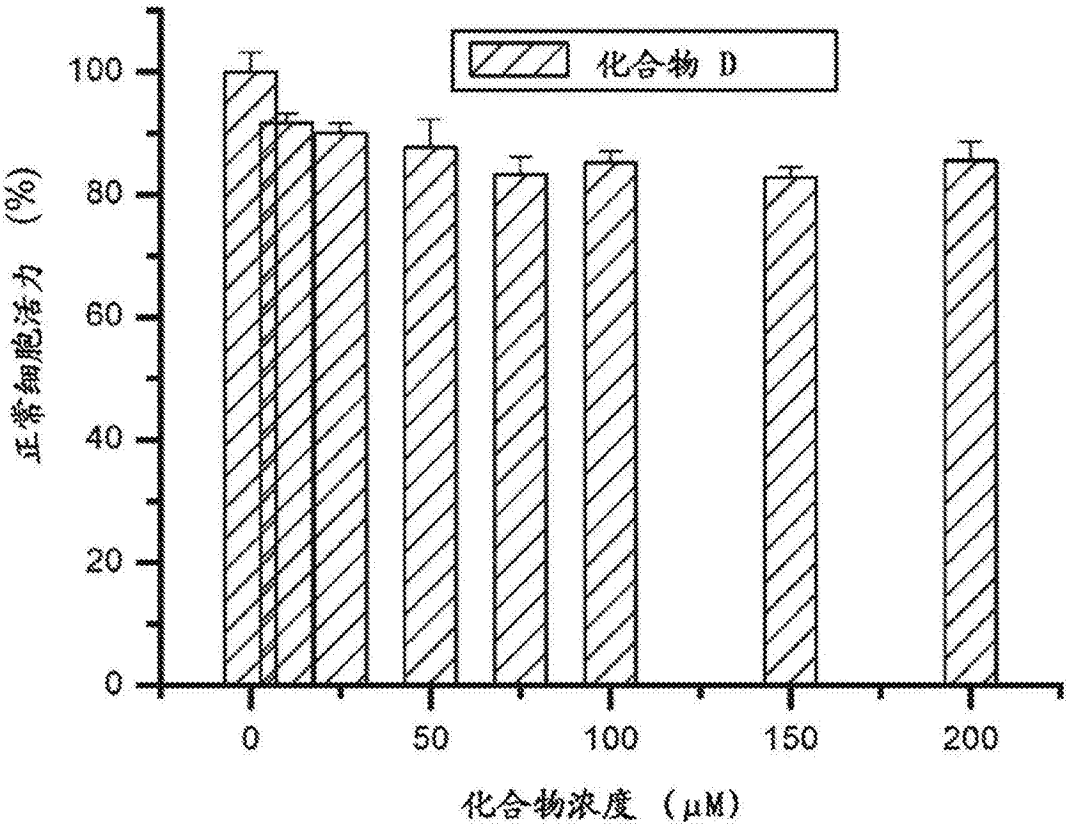


图8

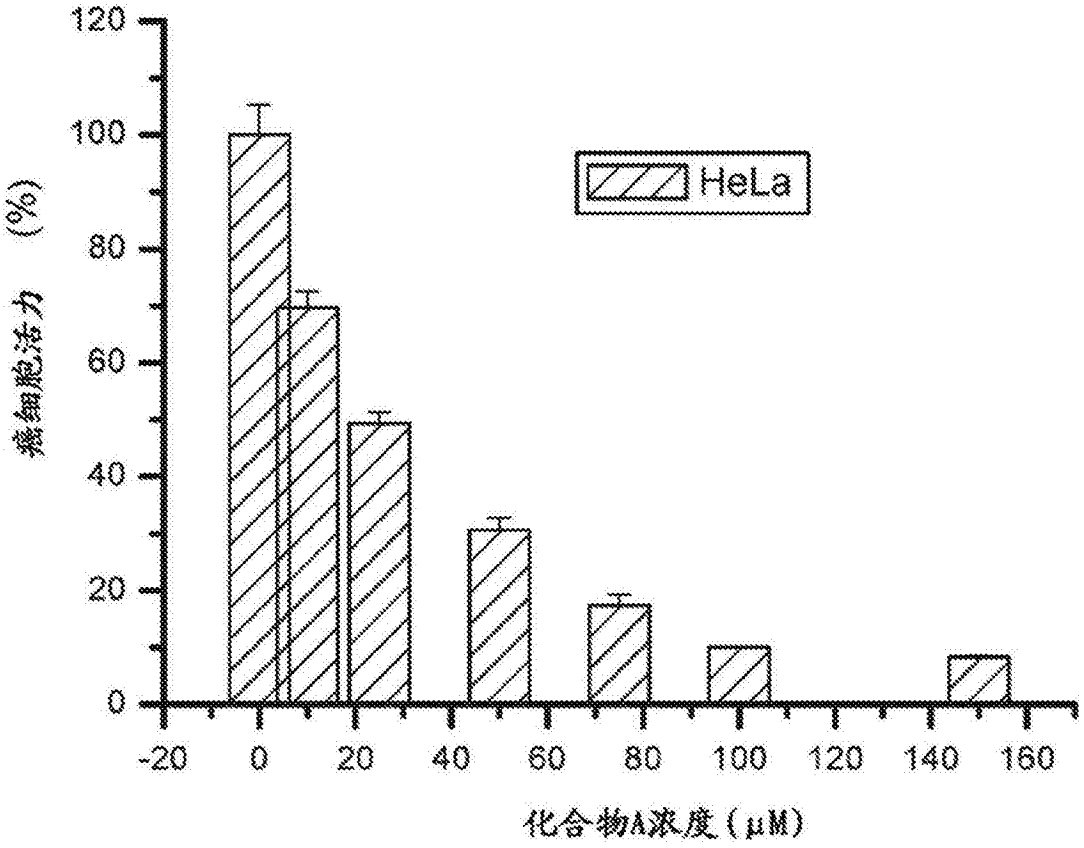

120
100
80
60
40
20
0
癌细胞活力 (%)
HeLa
-20
0
20
40
60
80
100
120
140
160
化合物A浓度(μM)

图9

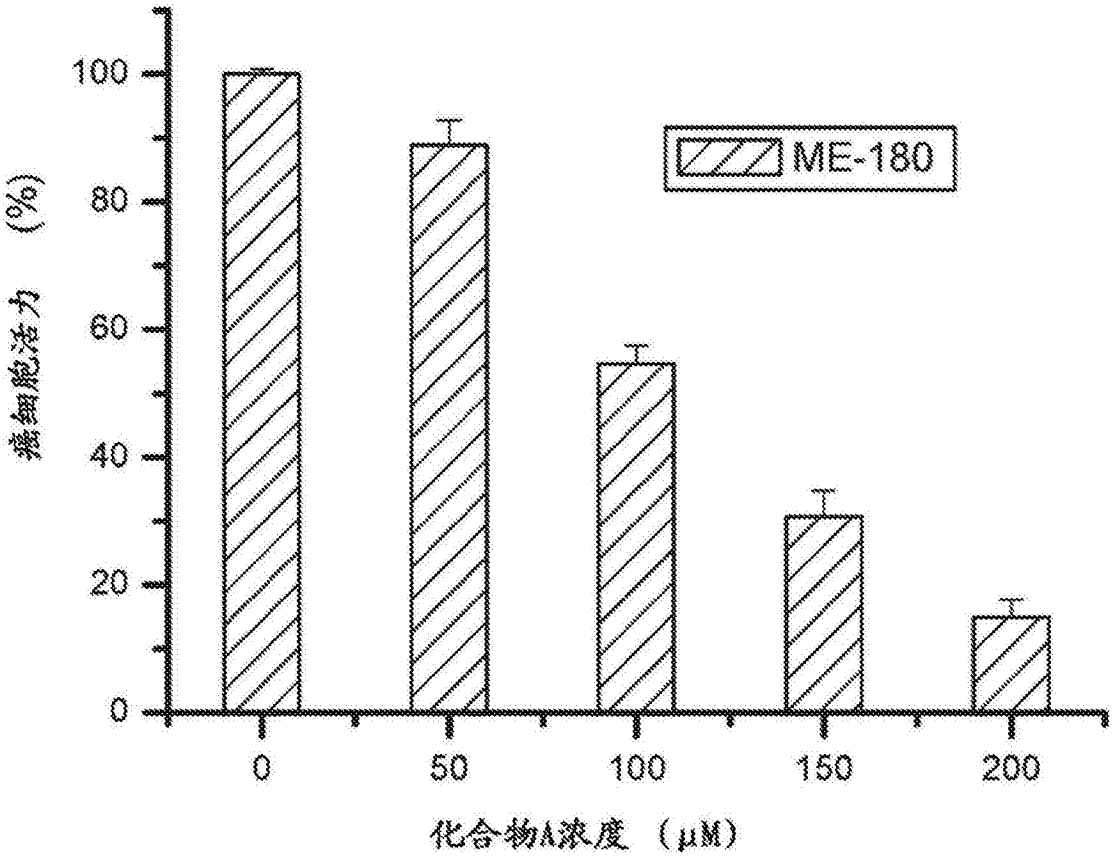


图10

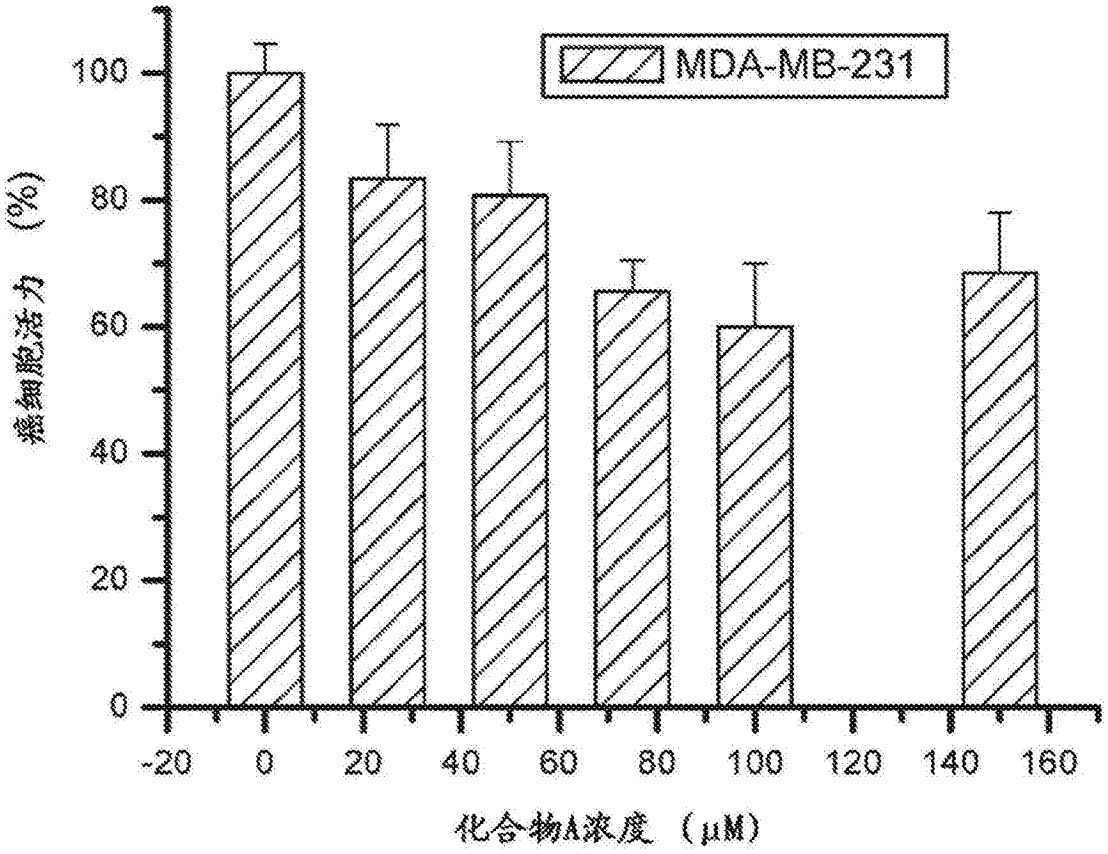

MDA-MB-231
癌细胞活力 (%)
100
80
60
40
20
0
-20
0
20
40
60
80
100
120
140
160
化合物A浓度 (μM)

图11

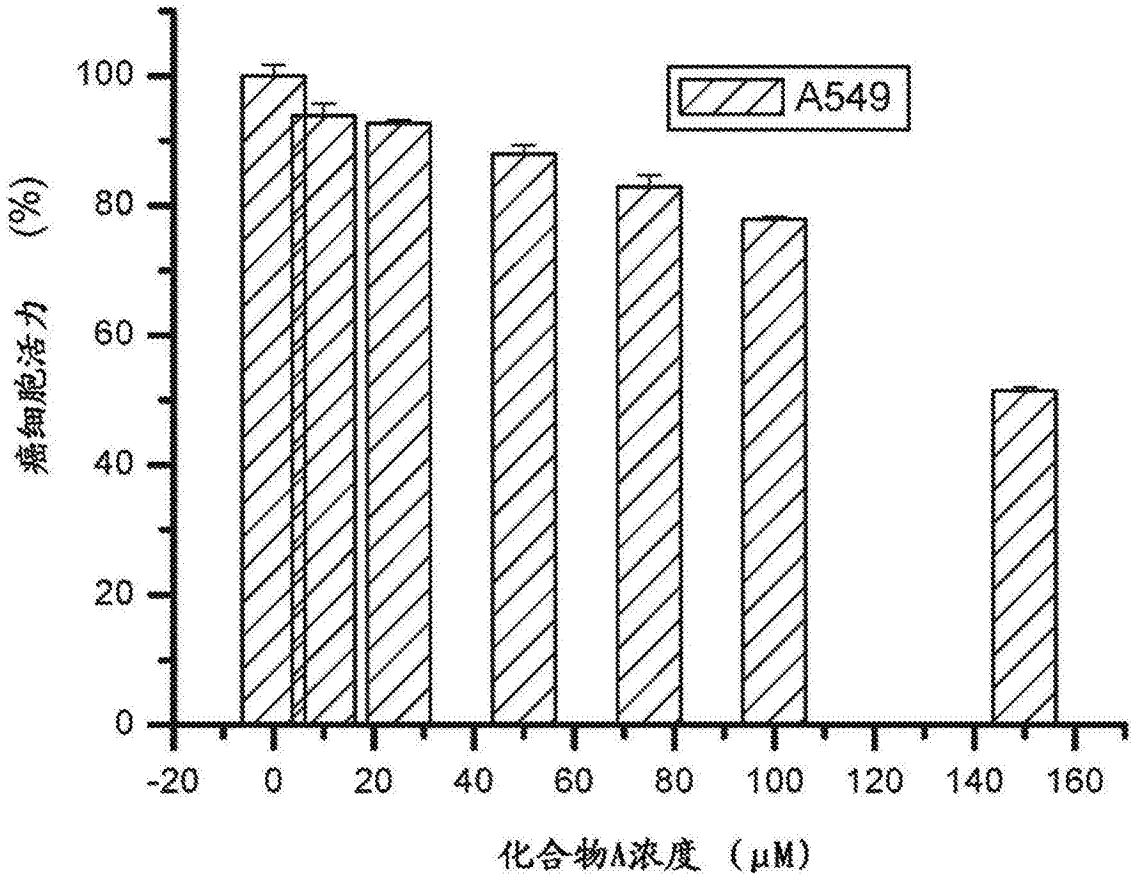

A549
癌细胞活力 (%)
100
80
60
40
20
0
-20
0
20
40
60
80
100
120
140
160
化合物A浓度 (μM)

图12

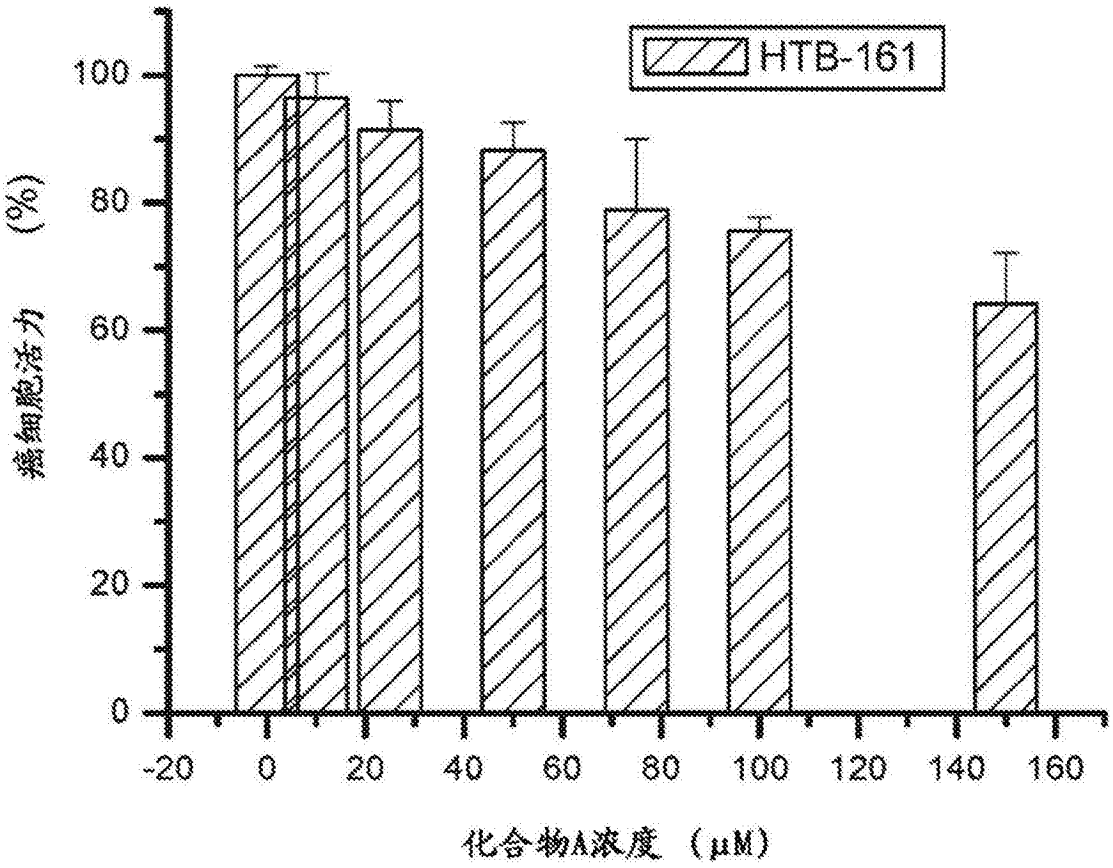

HTB-161
癌细胞活力 (%)
100
80
60
40
20
0
-20
0
20
40
60
80
100
120
140
160
化合物A浓度 (μM)

图13

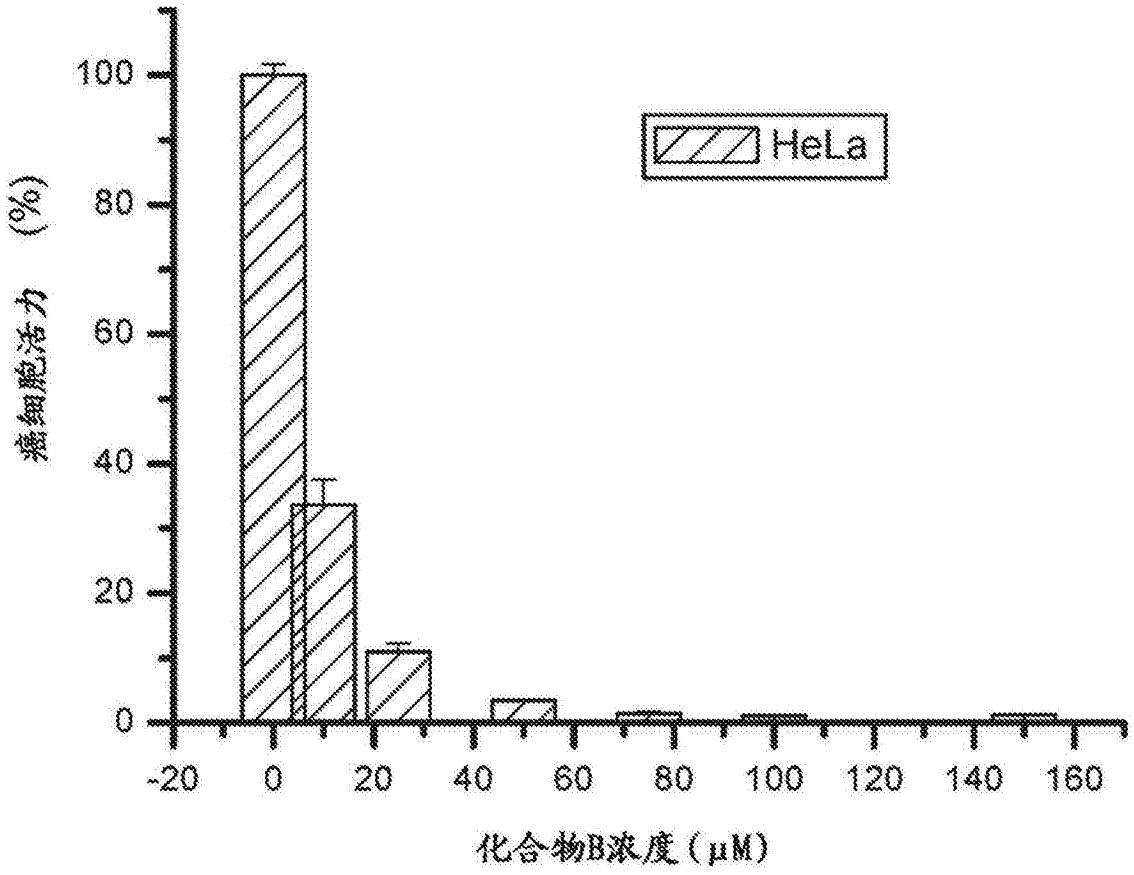

100
80
60
40
20
0
癌细胞活力 (%)
HeLa
-20
0
20
40
60
80
100
120
140
160
化合物B浓度(μM)

图14

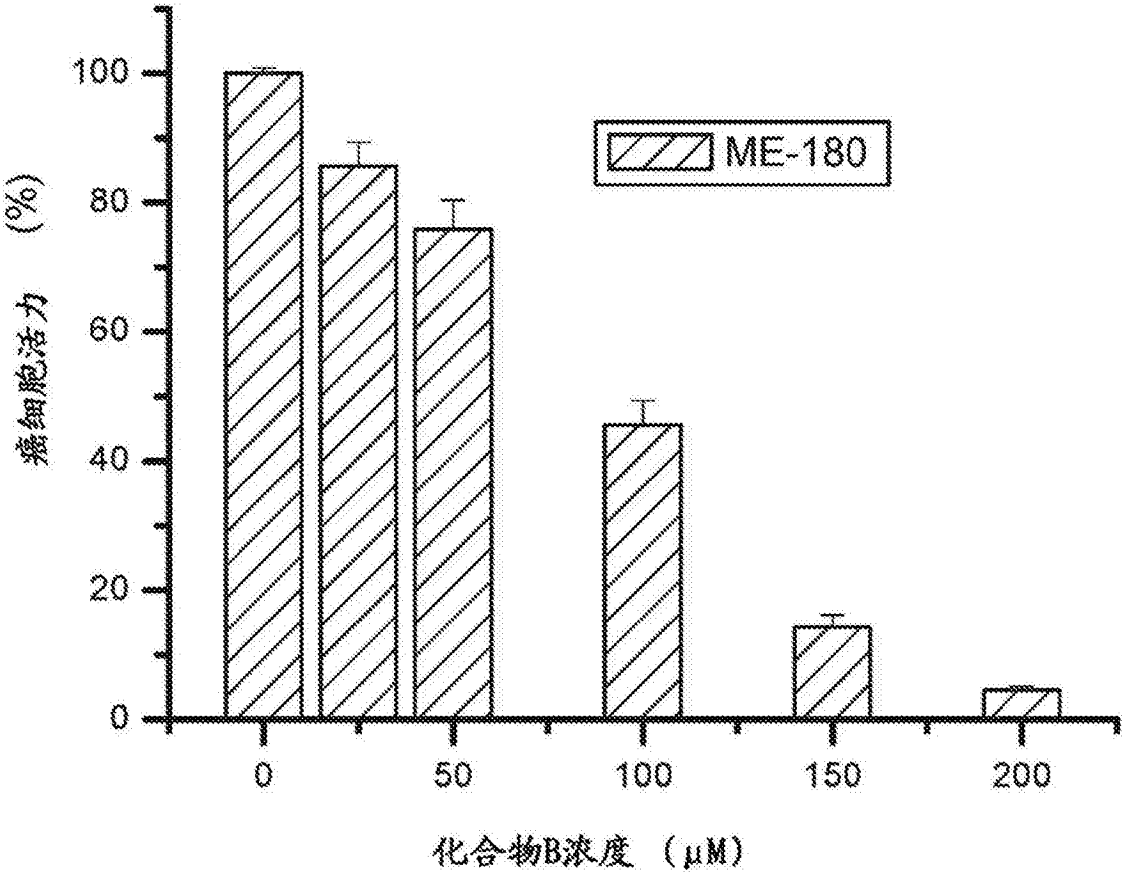


图15

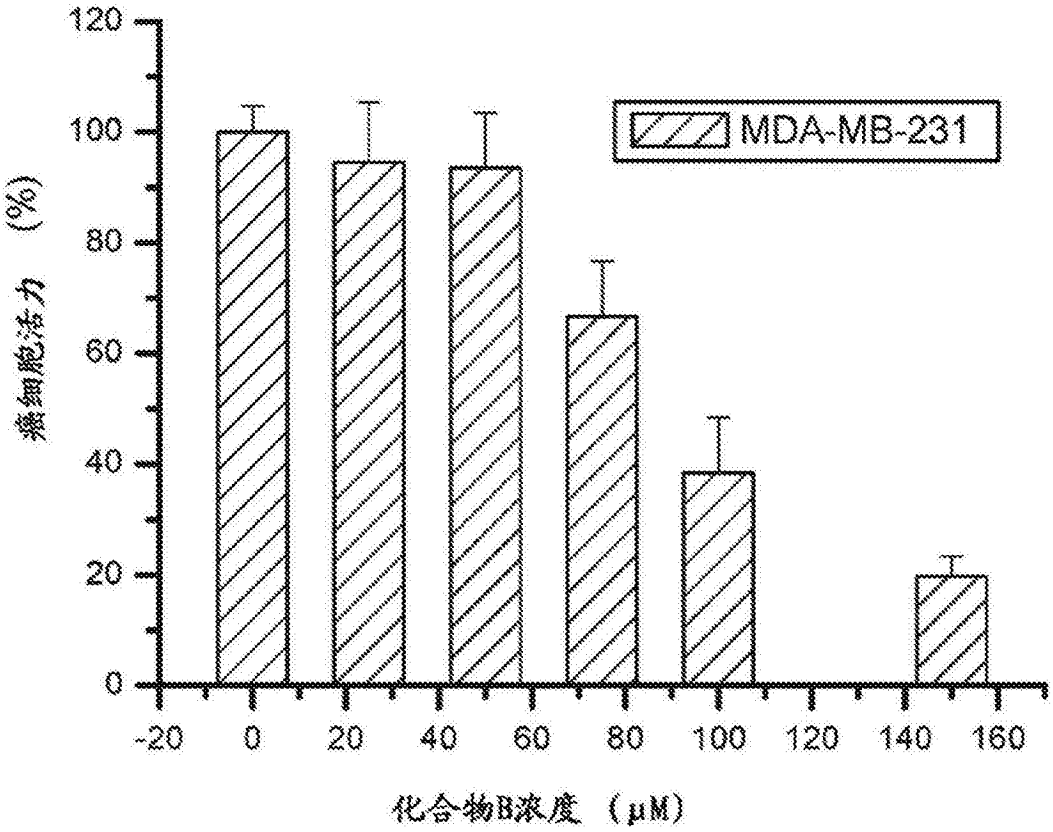

120
100
80
60
40
20
0
癌细胞活力 (%)
MDA-MB-231
-20
0
20
40
60
80
100
120
140
160
化合物B浓度 (μM)

图16

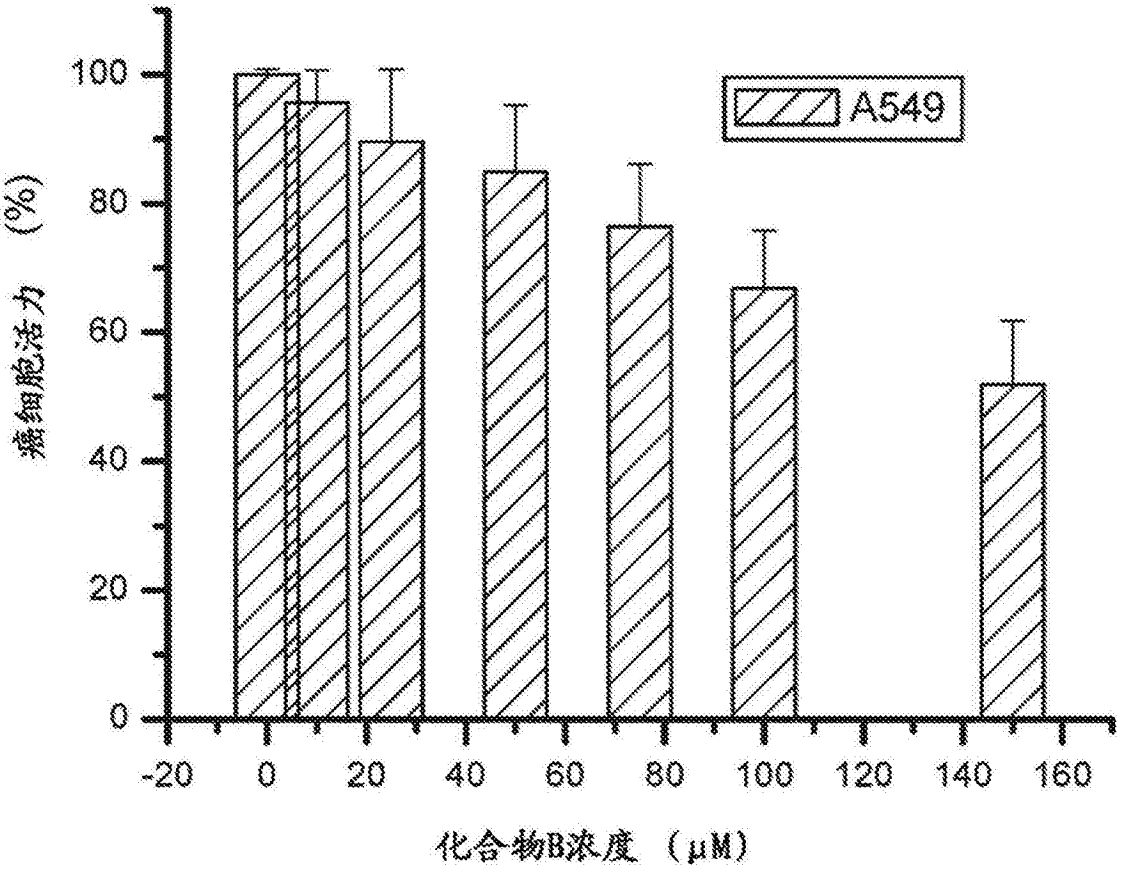

癌细胞活力 (%)
100
80
60
40
20
0
A549
-20
0
20
40
60
80
100
120
140
160
化合物B浓度 (μM)

图17

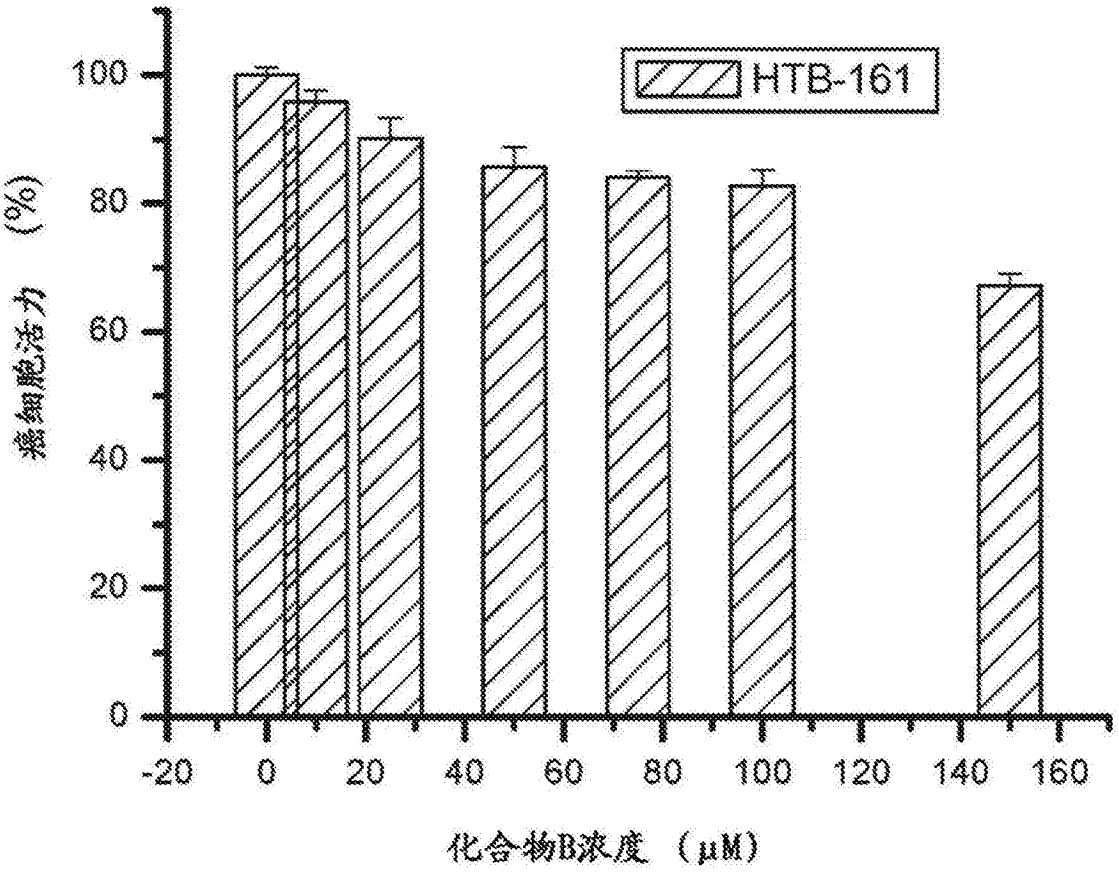

HTB-161
癌细胞活力 (%)
100
80
60
40
20
0
-20
0
20
40
60
80
100
120
140
160
化合物B浓度 (μM)

图18

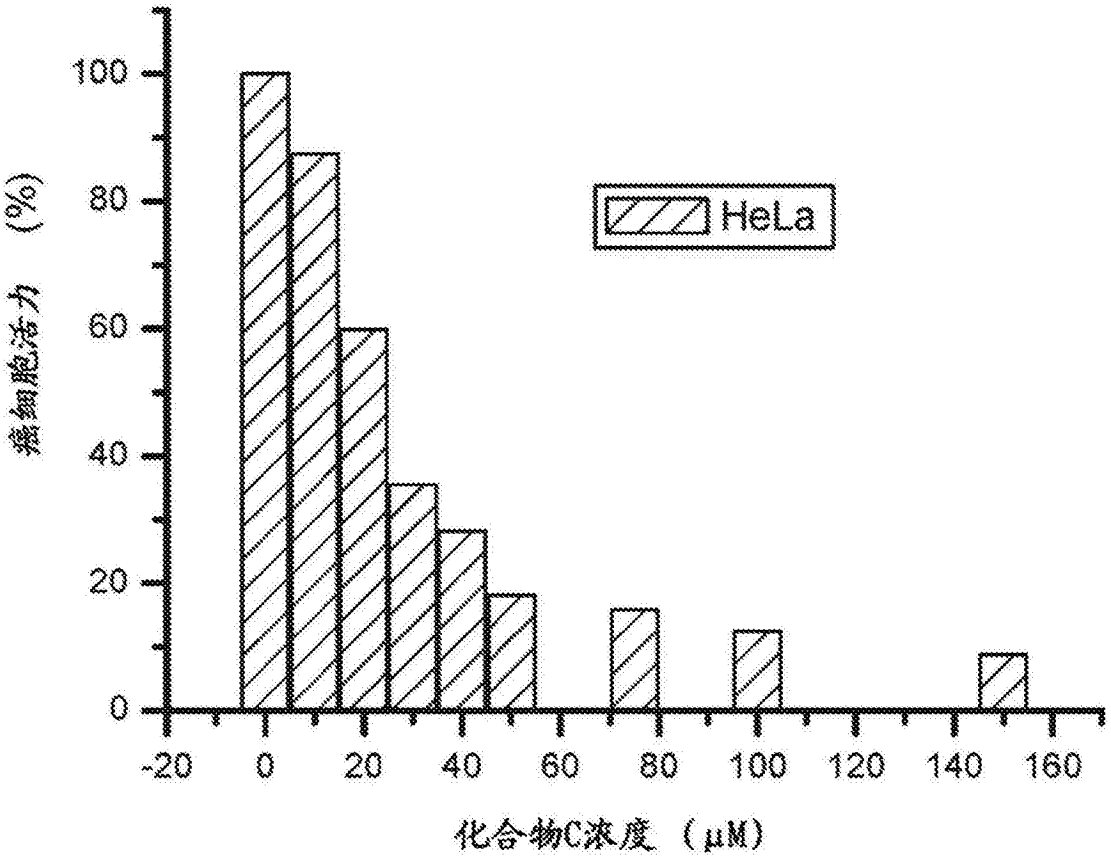

癌细胞活力 (%)
100
80
60
40
20
0
HeLa
-20
0
20
40
60
80
100
120
140
160
化合物C浓度 (μM)

图19

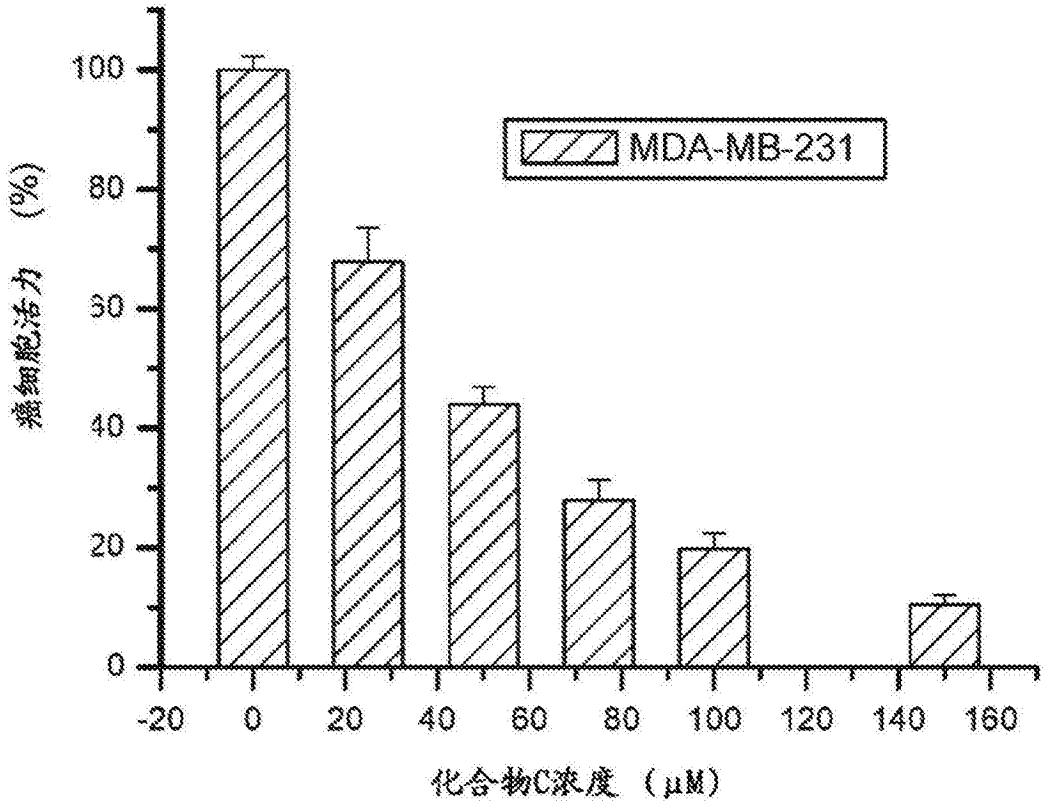

100
80
60
40
20
0
癌细胞活力 (%)
MDA-MB-231
-20
0
20
40
60
80
100
120
140
160
化合物C浓度 (μM)

图20

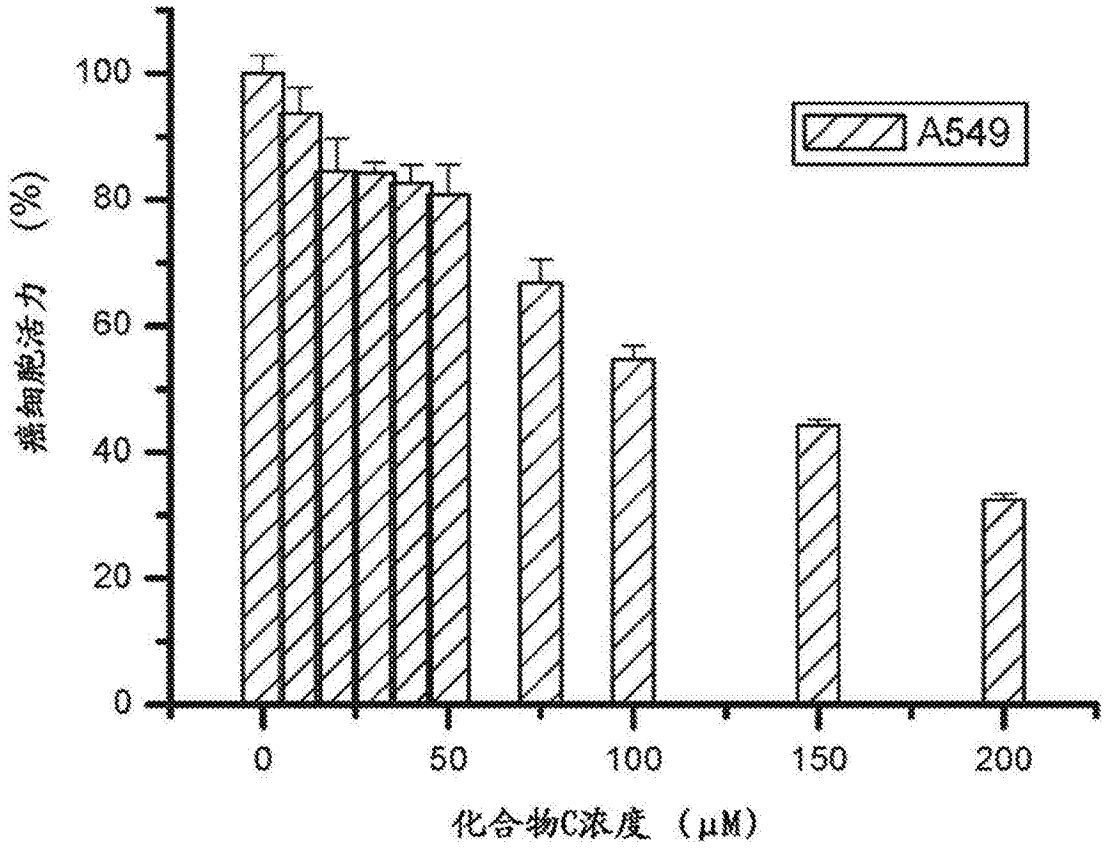


图21

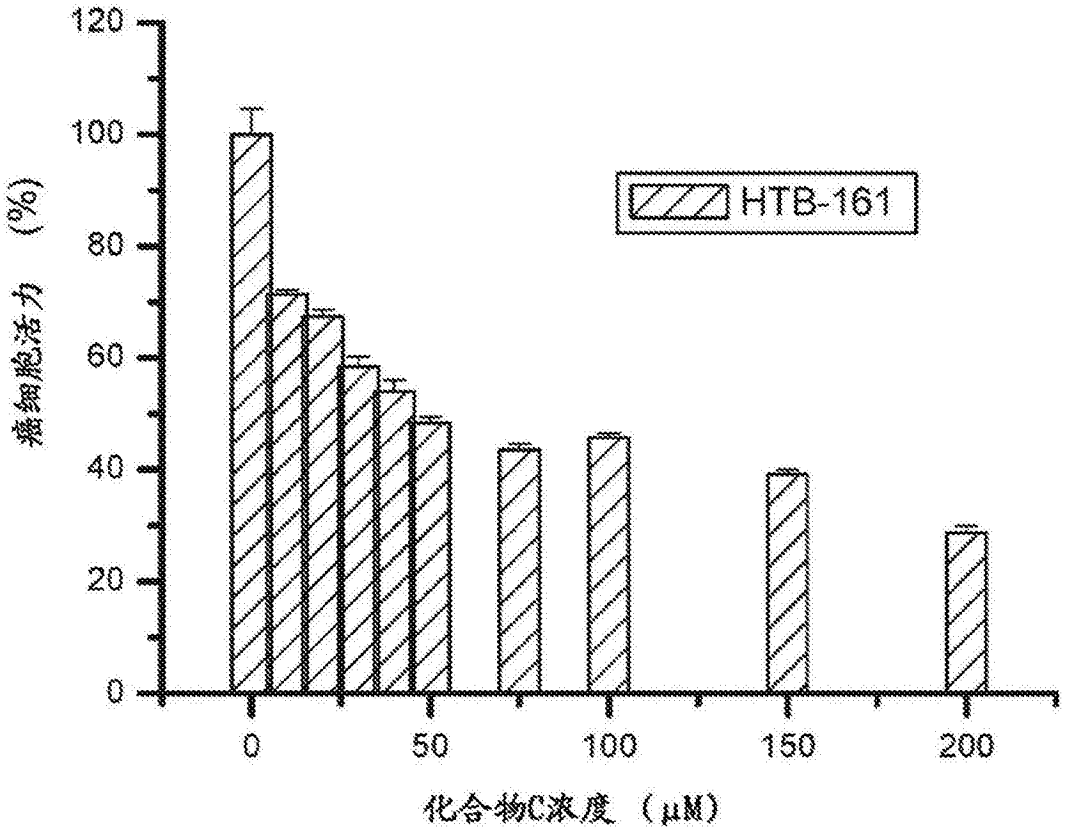


图22

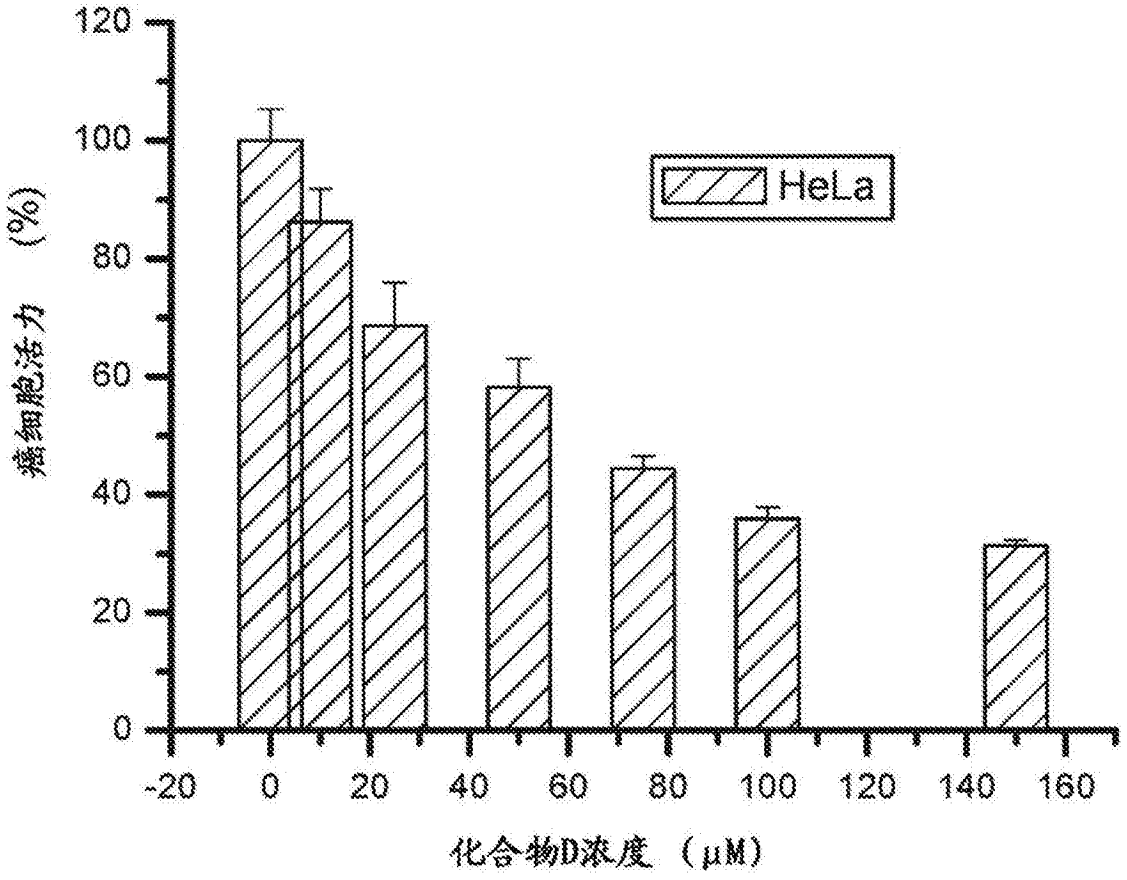

120
100
80
60
40
20
0
癌细胞活力 (%)
HeLa
-20
0
20
40
60
80
100
120
140
160
化合物D浓度 (μM)

图23

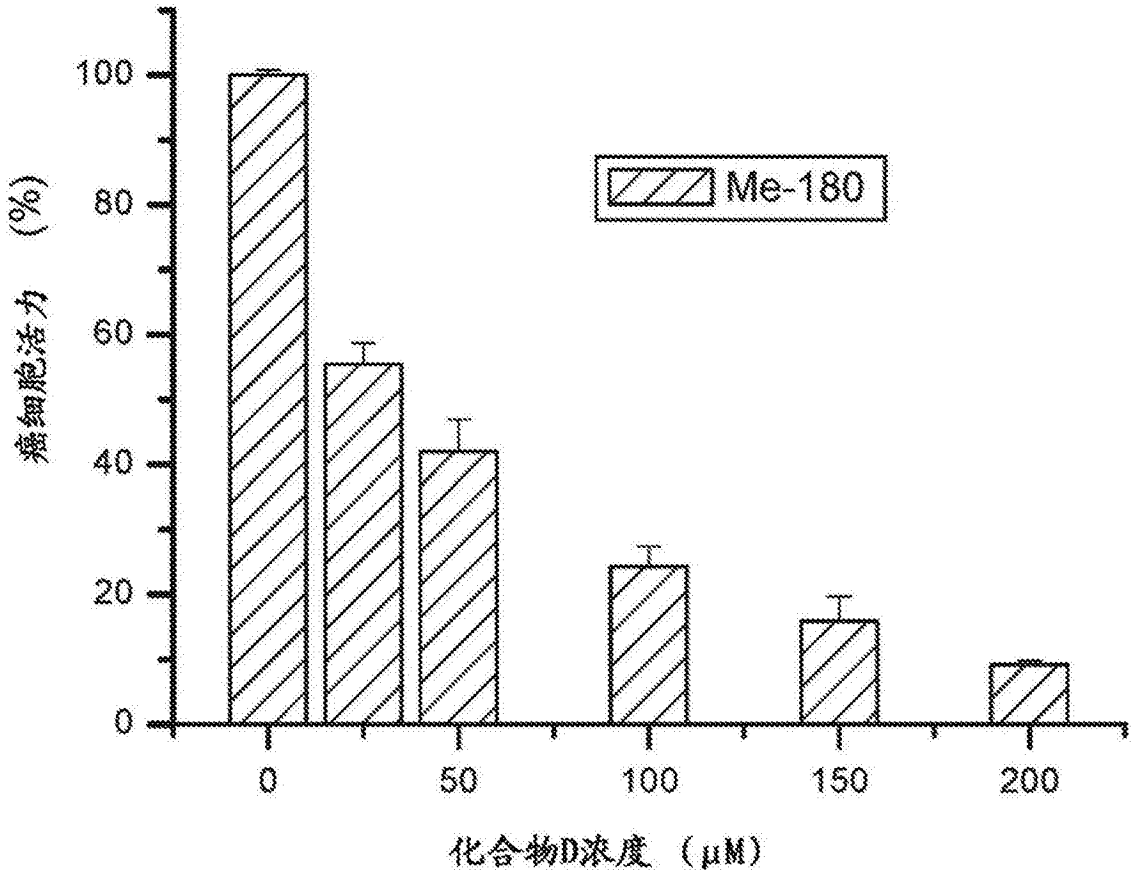


图24

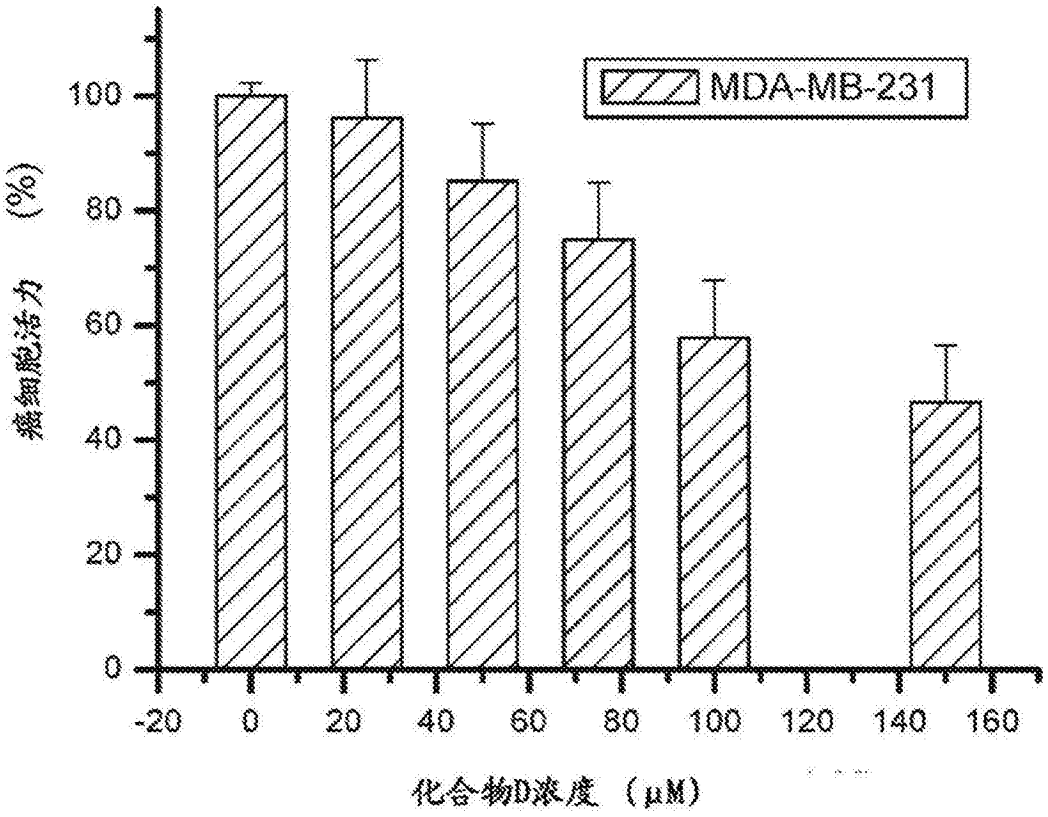

MDA-MB-231
癌细胞活力 (%)
100
80
60
40
20
0
-20
0
20
40
60
80
100
120
140
160
化合物D浓度 (μM)

图25

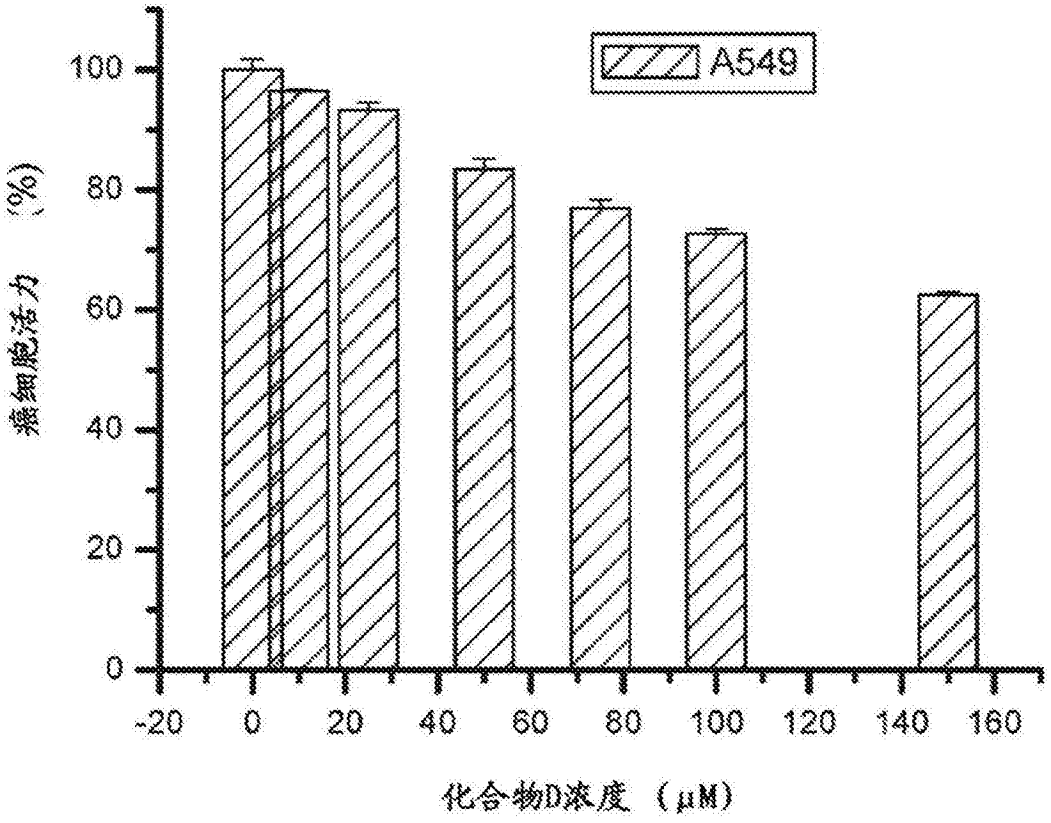

A549
100
80
60
40
20
0
癌细胞活力 (%)
-20
0
20
40
60
80
100
120
140
160
化合物D浓度 (μM)

图26

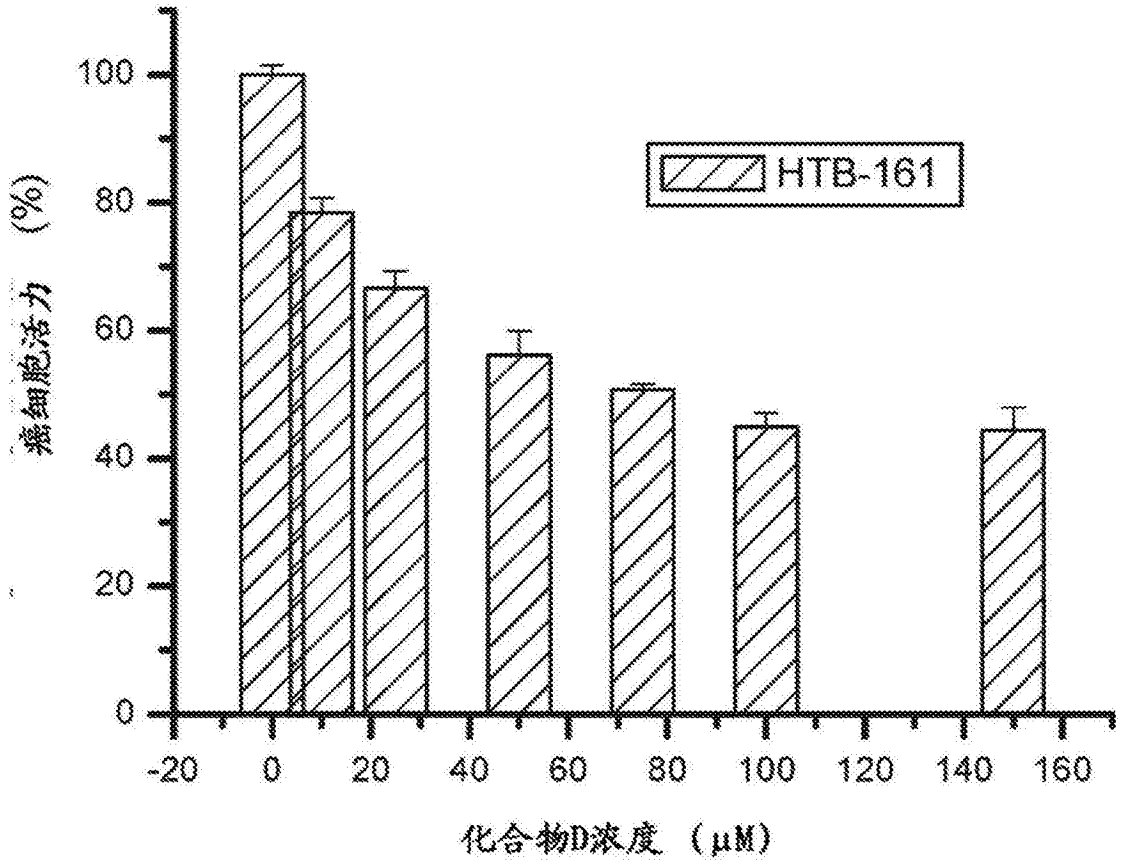

癌细胞活力 (%)
100
80
60
40
20
0
HTB-161
-20
0
20
40
60
80
100
120
140
160
化合物D浓度 (μM)

图27

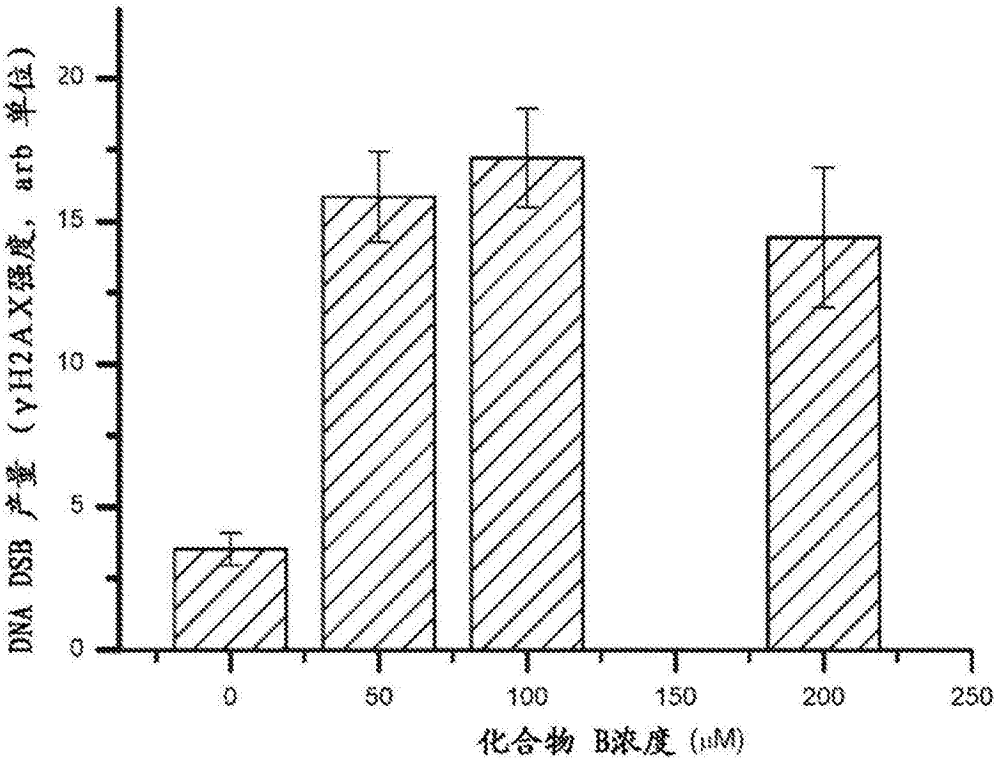

DNA DSB 产量（γH2AX强度，arb 单位）
20
15
10
5
0
0
50
100
150
200
250
化合物 B浓度 (μM)

图28

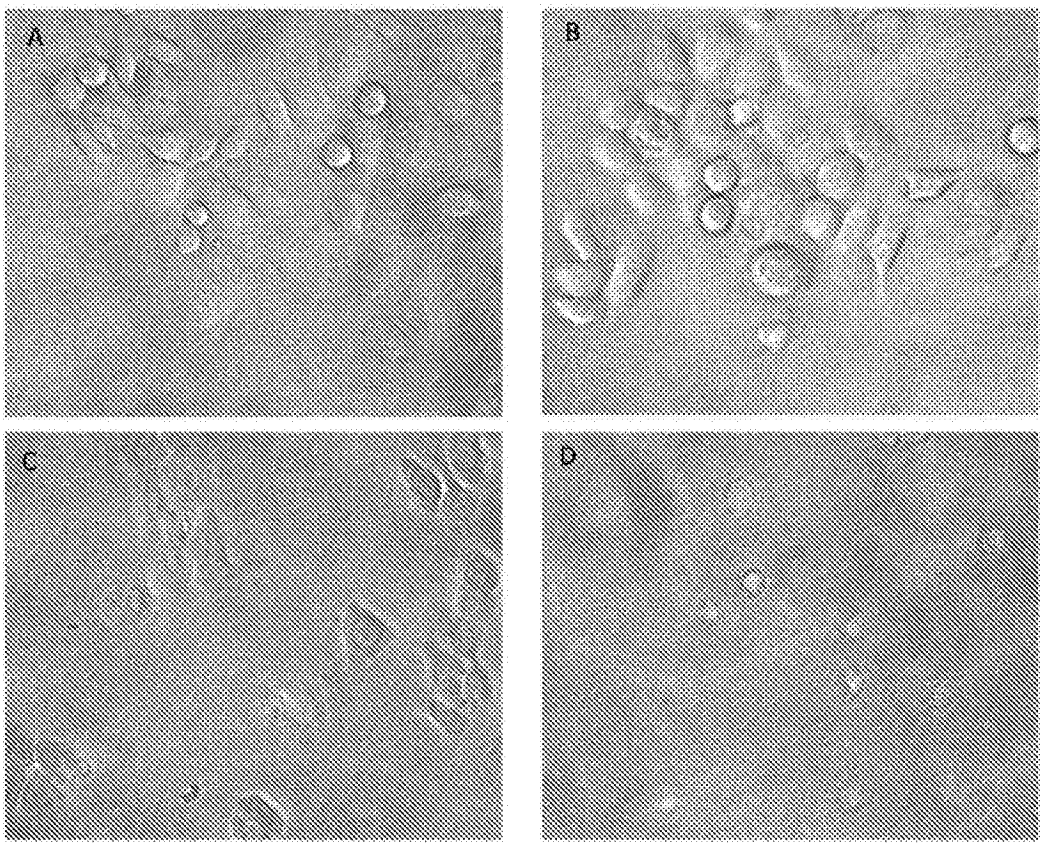
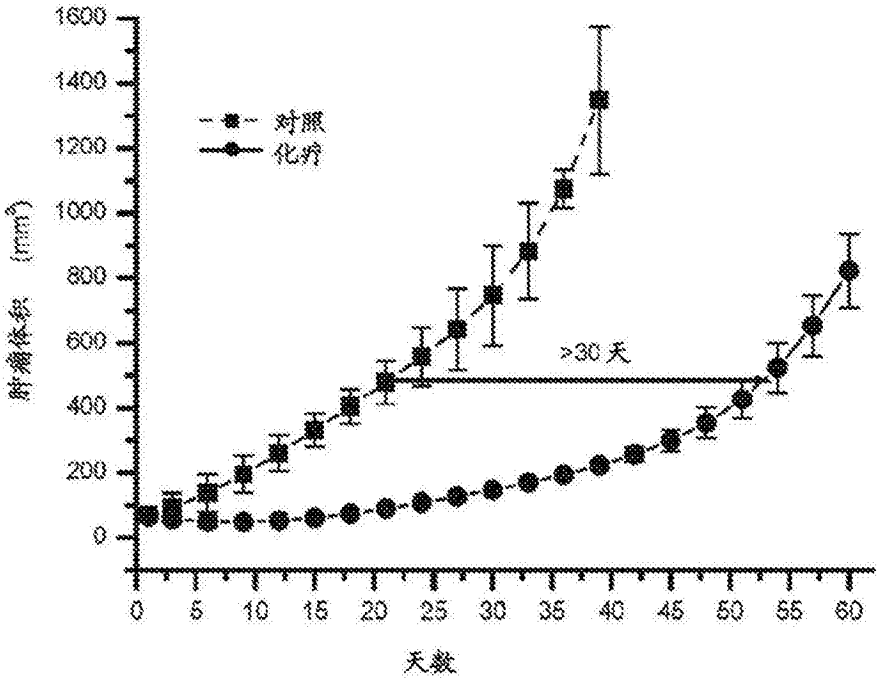
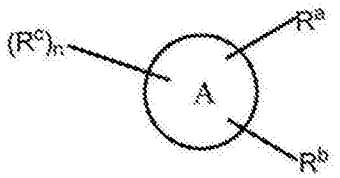


图29


1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
肿瘤体积 (mm³)
对照
化疗
>30 天
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60
天数


(R^c)n
A
R^a
R^b

(I)

图30

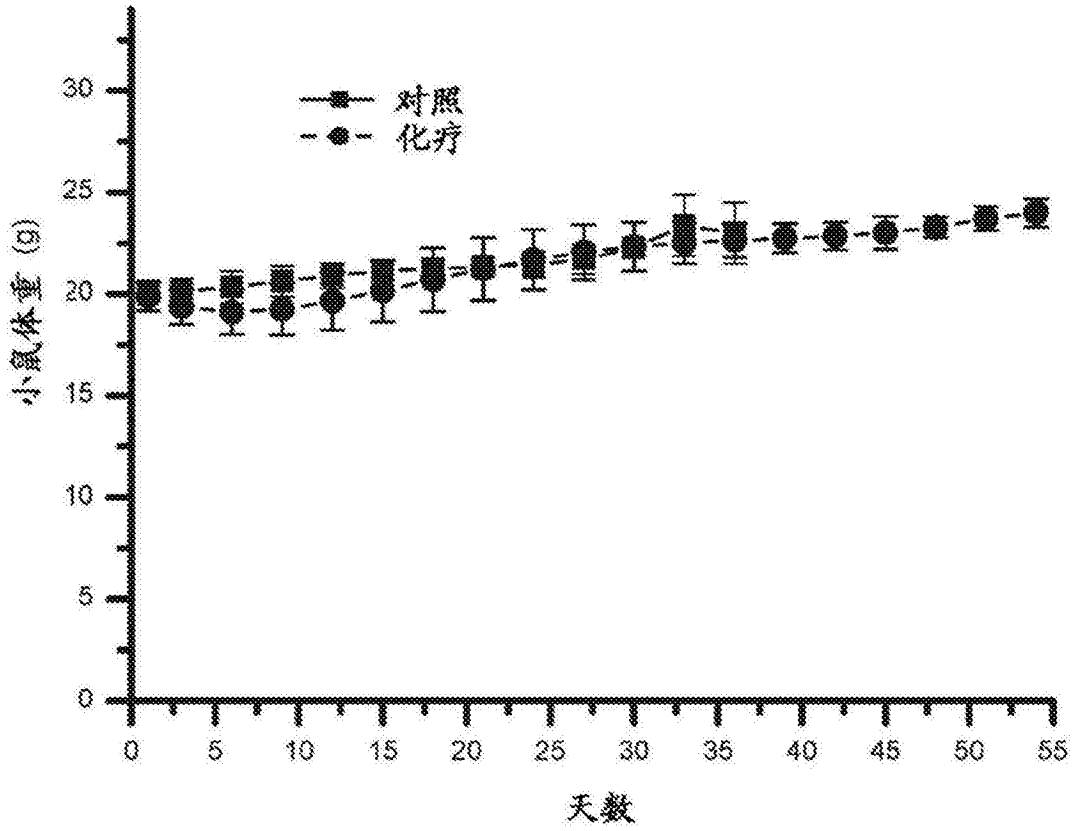


图31

毒性测试结果		
肝毒性		
	0mg/kg	7mg/kg
ALP	68 (+/-4)U/L	67 (+/-11)U/L
ALT	132(+/-64)U/L	172 (+/-88)U/L
TBIL	1 (+/-0) umol/L	1 (+/-0)umol/L
肾毒性		
	0mg/kg	7mg/kg
肌酸酐	6 (+/-1)umol/L	7(+/-1)umol/L
尿素	6.9 (+/-2.1)mmol/L	6.0(+/-1.1) mmol/L
电解质		
	0mg/kg	7mg/kg
氯	111.7 (+/-1.5)mmol/L	110 (+/-3.0)mmol/L
钾	6.3 (+/-0.3)mmol/L	8.4 (+/-3.6)mmol/L
钠	148.7 (+/-1.2)mmol/L	144.7 (+/-4.5)mmol/L

图32