



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115023418 B

(45) 授权公告日 2024. 11. 19

(21) 申请号 202080080553.6

(22) 申请日 2020.09.18

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 115023418 A

(43) 申请公布日 2022.09.06

(30) 优先权数据
62/902,156 2019.09.18 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2022.05.18

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/051430 2020.09.18

(87) PCT国际申请的公布数据
W02021/055705 EN 2021.03.25

(73) 专利权人 加利福尼亚大学董事会
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 李源培 马朝

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266

专利代理师 徐迅 崔佳佳

(51) Int. Cl.
C07D 401/12 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 103687853 A, 2014.03.26

WO 2016022956 A1, 2016.02.11

WO 2016196393 A2, 2016.12.08

REGISTRY.RN:1349611-33-1.《RN:1349611-33-1》.2011,第1页.

Zhao Ma等.“A pH-Driven Small-Molecule Nanotransformer Hijacks Lysosomes and Overcomes Autophagy-Induced Resistance in Cancer”.《Angew. Chem. Int. Ed. 》.2022,第61卷第1-11页.

Yuanhao Wang等.“Anticancer properties of bisaminoquinolines with modified linkers”.《Bioorg. Med. Chem. Lett. 》.2021,第49卷第1-6页.

Zhao Ma等.“Pharmacophore hybridisation and nanoscale assembly to discover self-delivering lysosomotropic new-chemical entities for cancer therapy”.《NATURE COMMUNICATIONS》.2020,第11卷第4615-4626页.

审查员 安艳妮

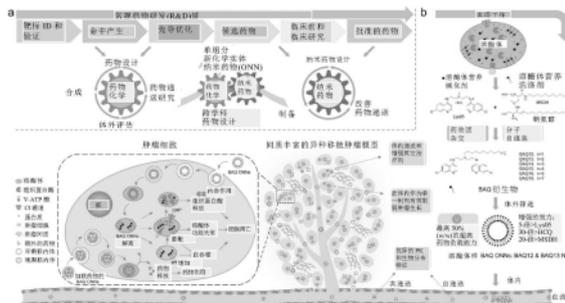
权利要求书4页 说明书52页 附图48页

(54) 发明名称

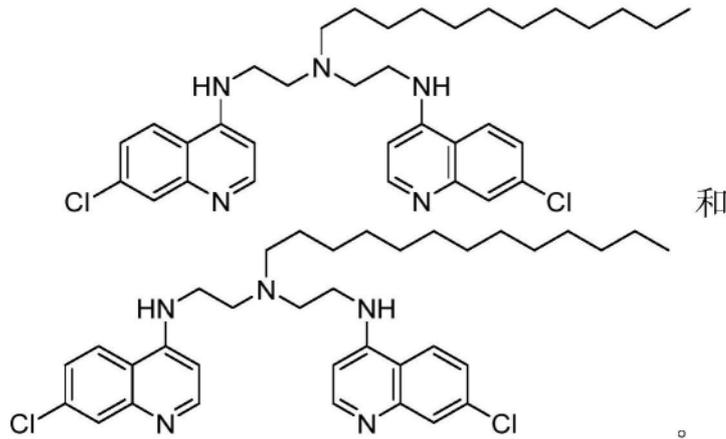
用于癌症治疗的双氨基喹啉和纳米制剂

(57) 摘要

本发明提供了式(I)的双氨基喹啉化合物。本发明还提供了包含本发明的化合物的纳米载体,以及使用所述纳米载体治疗疾病和成像的方法。



1. 一种化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物选自由以下项组成的组:



2. 一种具有内部和外部的纳米载体,所述纳米载体包含多种根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中每种化合物在水性溶剂中自组装以形成所述纳米载体,使得疏水袋在所述纳米载体的所述内部形成,并且亲水基团在所述纳米载体的所述外部自组装。

3. 根据权利要求2所述的纳米载体,其中所述纳米载体还包含一种或多种螯合在所述纳米载体的所述疏水袋中的疏水性药物或显像剂。

4. 根据权利要求3所述的纳米载体,其中所述疏水性药物为化学治疗剂、分子靶向剂、免疫治疗剂、放射治疗剂或其组合。

5. 根据权利要求4所述的纳米载体,其中所述疏水性药物为免疫治疗剂。

6. 根据权利要求4所述的纳米载体,其中所述疏水性药物为放射治疗剂。

7. 根据权利要求4所述的纳米载体,其中所述疏水性药物为化学治疗剂或分子靶向剂。

8. 根据权利要求3所述的纳米载体,其中所述疏水性药物为FLT-3抑制剂、VEGFR抑制剂、EGFR TK抑制剂、极光激酶抑制剂、PIK-1调节剂、Bcl-2抑制剂、HDAC抑制剂、c-MET抑制剂、PARP抑制剂、Cdk抑制剂、EGFR TK抑制剂、IGFR-TK抑制剂、抗HGF抗体、PI3激酶抑制剂、AKT抑制剂、JAK/STAT抑制剂、检查点-1或2抑制剂、局灶性粘附激酶抑制剂、MAP激酶(mek)抑制剂、VEGF捕获抗体、依维莫司、曲贝替定、白蛋白紫杉醇(abraxane)、TLK 286、AV-299、DN-101、帕唑帕拉尼、GSK690693、RTA 744、ON 0910、Na、AZD 6244(ARRY-142886)、AMN-107、TKI-258、GSK461364、AZD 1152、恩扎妥林、凡德他尼、ARQ-197、MK-0457、MLN8054、PHA-739358、R-763、AT-9263、培美曲塞、厄洛替尼、达沙替尼、尼洛替尼、德卡坦尼(decatanib)、帕尼单抗、氨柔比星、奥戈伏单抗、Lep-etu、诺拉曲塞、azd2171、巴他布林、奥法木单抗、扎木单抗、艾特哇林、粉防己碱、卢比替康、替米利芬、奥利默森(oblimersen)、替西木单抗、伊匹单抗、棉子酚、Bio 111、131-I-TM-601、ALT-110、BIO 140、CC 8490、西仑吉肽、吉马替康、IL13-PE38QR; INO 1001、IPdR1 KRX-0402、硫蒽酮、LY 317615、neuradiab、维特斯潘(vitespan)、Rta 744、Sdx 102、他仑帕奈、阿曲生坦、Xr 311、罗米地辛、ADS-100380、舒尼替尼、5-氟尿嘧啶、伏立诺他、依托泊苷、吉西他滨、阿霉素、伊立替康、阿霉素脂质体、5'-脱氧-5-氟尿苷、长春新碱、替莫唑胺、ZK-304709、塞利西利; PD0325901、AZD-6244、卡培他滨、L-谷氨酸、N-[4-[2-(2-氨基-4,7-二氢-4-氧代-1H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)乙基]苯甲酰基]-二钠盐七水合物、喜树碱、PEG-标记的伊立替康、他莫昔芬、柠檬酸托瑞米芬、阿那曲

唑、依西美坦、来曲唑、DES(己烯雌酚)、雌二醇、雌激素、结合雌激素、贝伐单抗、IMC-1C11、CHIR-258;3-[5-(甲磺酰基哌啶甲基)-吡啶基辛-喹诺酮、伐他拉尼、AG-013736、AVE-0005、[D-Ser(Bu t)6,Azgly 10]的乙酸盐(pyro-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(Bu t)-Leu-Arg-Pro-Azgly-NH₂乙酸盐[C₅₉H₈₄N₁₈O₁₄-(C₂H₄O₂)_X,其中X=1至2.4]、醋酸戈舍瑞林、醋酸亮丙瑞林、双羟萘酸曲普瑞林、醋酸甲羟孕酮、己酸羟孕酮、醋酸甲地孕酮、雷洛昔芬、比卡鲁胺、氟他胺、尼鲁米特、醋酸甲地孕酮、CP-724714;TAK-165、HKI-272、厄洛替尼、拉帕替尼、卡奈替尼、ABX-EGF抗体、爱必妥、EKB-569、PKI-166、GW-572016、洛那法尼(Ionafarnib)、BMS-214662、替吡法尼;氨磷汀、NVP-LAQ824、辛二酰苯胺异羟肟酸、丙戊酸、曲古抑菌素A、FK-228、SU11248、索拉非尼、KRN951、氨鲁米特、安吡啶、阿那格雷、L-天冬酰胺酶、卡介苗(BCG)疫苗、博来霉素、布舍瑞林、白消安、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、氯膦酸盐、环丙孕酮、阿糖胞苷、达卡巴嗪、放线菌素、柔红霉素、己烯雌酚、表柔比星、氟达拉滨、氟氢可的松、氟甲睾酮、氟他胺、吉西他滨、格列卫(gleevec)、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、伊马替尼、亮丙瑞林、左旋咪唑、环己亚硝脲、氮芥、美法仑、6-巯基嘌呤、美司钠、甲氨蝶呤、丝裂霉素、米托坦、米托蒽醌、尼鲁米特、奥曲肽、奥沙利铂、帕米膦酸盐、喷司他丁、普卡霉素、吡吩姆钠、丙卡巴肼、雷替曲塞、利妥昔单抗、链脲菌素、替尼泊苷、睾酮、沙利度胺、硫鸟嘌呤、噻替派、维甲酸、长春地辛、13-顺-视黄酸、苯丙氨酸氮芥、乌拉莫司汀、雌莫司汀、六甲蜜胺、氟尿苷、5-脱氧尿苷、阿糖胞苷、6-巯基嘌呤、脱氧助间型霉素、骨化三醇、戊柔比星、光神霉素、长春碱、长春瑞滨、拓扑替康、雷佐生(razoxin)、马立马司他、COL-3、新伐司他(neovastat)、BMS-275291、角鲨胺、内皮抑素、SU5416、SU6668、EMD121974、白介素-12、IM862、血管抑素、维他信(vitaxin)、屈洛昔芬、艾多昔芬(idoxyfene)、螺内酯、非那雄胺、西咪替丁、曲妥珠单抗、地尼白介素、吉非替尼、硼替佐米、紫杉醇、伊立替康、拓扑替康、阿霉素、多西他赛、长春瑞滨、贝伐单抗(单克隆抗体)和爱必妥、不含氢化蓖麻油的紫杉醇、埃博霉素B、BMS-247550、BMS-310705、屈洛昔芬、4-羟基他莫昔芬、哌喷昔芬、ERA-923、阿佐昔芬、氟维司群、阿考比芬、拉索昔芬、艾多昔芬、TSE-424、HMR-3339、ZK186619、PTK787/ZK222584、VX-745、PD184352、雷帕霉素、40-0-(2-羟乙基)-雷帕霉素、替西罗莫司、AP-23573、RAD001、ABT-578、BC-210、LY294002、LY292223、LY292696、LY293684、LY293646、渥曼青霉素、ZM336372、L-779,450、PEG-非格司亭(filgrastim)、阿法达贝泊汀、促红细胞生成素、粒细胞集落刺激因子、唑仑二膦酸盐(zolendronate)、泼尼松、西妥昔单抗、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、组氨瑞林、聚乙二醇化干扰素 α -2a、干扰素 α -2a、聚乙二醇化干扰素 α -2b、干扰素 α -2b、阿扎胞苷、PEG-L-天冬酰胺酶、来那度胺、吉妥珠单抗、氢化可的松、白介素-11、右雷佐生、阿仑单抗、全反式维甲酸、酮康唑、白介素-2、甲地孕酮、免疫球蛋白、氮芥、甲泼尼龙、替伊莫单抗、雄激素、地西他滨、六甲蜜胺、贝沙罗汀、托西莫单抗、三氧化二砷、可的松、editronate、米托坦、环孢菌素、脂质体柔红霉素、埃德温娜-天冬酰胺酶、锶89、卡索匹坦、奈妥吡坦、NK-1受体拮抗剂、帕洛诺司琼、阿瑞匹坦、苯海拉明、羟嗪、甲氧氯普胺、劳拉西泮、阿普唑仑、氟哌啶醇、氟哌利多、屈大麻酚、地塞米松、甲泼尼龙、丙氯拉嗪、格拉司琼、昂丹司琼、多拉司琼、托烷司琼、sspeg非格司亭(sspegfilgrastim)、促红细胞生成素、依泊汀 α 和达依泊汀 α 、伊匹单抗、维莫非尼或它们的组合。

9. 根据权利要求2所述的纳米载体,其中所述纳米载体包含多种根据权利要求1所述的化合物。

10. 一种如权利要求2所述的纳米载体在制备用于通过溶酶体抑制自噬治疗疾病的药物中的用途,其中所述药物包含治疗有效量的所述的纳米载体,其中所述疾病为癌症、疟疾、抗磷脂抗体综合征、狼疮、类风湿性关节炎、慢性荨麻疹或干燥综合征。

11. 根据权利要求10所述的用途,所述药物还包括一种或多种附加药剂,其中所述附加药剂为化学治疗剂、分子靶向剂、免疫治疗剂、放射治疗剂或它们的组合。

12. 根据权利要求11所述的用途,其中所述附加药剂为免疫治疗剂。

13. 根据权利要求11所述的用途,其中所述附加药剂为放射治疗剂。

14. 根据权利要求11所述的用途,其中所述附加药剂为化学治疗剂或分子靶向剂。

15. 根据权利要求11所述的用途,其中所述附加药剂为FLT-3抑制剂、VEGFR抑制剂、EGFR TK抑制剂、极光激酶抑制剂、PIK-1调节剂、Bcl-2抑制剂、HDAC抑制剂、c-MET抑制剂、PARP抑制剂、Cdk抑制剂、EGFR TK抑制剂、IGFR-TK抑制剂、抗HGF抗体、PI3激酶抑制剂、AKT抑制剂、JAK/STAT抑制剂、检查点-1或2抑制剂、局灶性粘附激酶抑制剂、MAP激酶(mek)抑制剂、VEGF捕获抗体、依维莫司、曲贝替定、白蛋白紫杉醇(abraxane)、TLK 286、AV-299、DN-101、帕唑帕拉尼、GSK690693、RTA 744、ON 0910.Na、AZD 6244 (ARRY-142886)、AMN-107、TKI-258、GSK461364、AZD 1152、恩扎妥林、凡德他尼、ARQ-197、MK-0457、MLN8054、PHA-739358、R-763、AT-9263、培美曲塞、厄洛替尼、达沙替尼、尼洛替尼、德卡坦尼(decatanib)、帕尼单抗、氨柔比星、奥戈伏单抗、Lep-etu、诺拉曲塞、azd2171、巴他布林、奥法木单抗、扎木单抗、艾特味林、粉防己碱、卢比替康、替米利芬、奥利默森(oblimersen)、替西木单抗、伊匹单抗、棉子酚、Bio 111、131-I-TM-601、ALT-110、BIO 140、CC 8490、西仑吉肽、吉马替康、IL13-PE38QQR; INO 1001、IPdR1 KRX-0402、硫蒽酮、LY 317615、neuradiab、维特斯潘(vitespan)、Rta 744、Sdx 102、他仑帕奈、阿曲生坦、Xr 311、罗米地辛、ADS-100380、舒尼替尼、5-氟尿嘧啶、伏立诺他、依托泊苷、吉西他滨、阿霉素、伊立替康、阿霉素脂质体、5'-脱氧-5-氟尿苷、长春新碱、替莫唑胺、ZK-304709、塞利西利; PD0325901、AZD-6244、卡培他滨、L-谷氨酸、N-[4-[2-(2-氨基-4,7-二氢-4-氧代-1H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)乙基]苯甲酰基]-二钠盐七水合物、喜树碱、PEG-标记的伊立替康、他莫昔芬、柠檬酸托瑞米芬、阿那曲唑、依西美坦、来曲唑、DES(己烯雌酚)、雌二醇、雌激素、结合雌激素、贝伐单抗、IMC-1C11、CHIR-258; 3-[5-(甲磺酰基哌啶甲基)-吡啶基辛-喹诺酮、伐他拉尼、AG-013736、AVE-0005、[D-Ser(Bu t)₆, Azgly₁₀]的乙酸盐(pyro-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(Bu t)-Leu-Arg-Pro-Azgly-NH₂乙酸盐[C₅₉H₈₄N₁₈O₁₄-(C₂H₄O₂)_X, 其中X=1至2.4]、醋酸戈舍瑞林、醋酸亮丙瑞林、双羟萘酸曲普瑞林、醋酸甲羟孕酮、己酸羟孕酮、醋酸甲地孕酮、雷洛昔芬、比卡鲁胺、氟他胺、尼鲁米特、醋酸甲地孕酮、CP-724714; TAK-165、HKI-272、厄洛替尼、拉帕替尼、卡奈替尼、ABX-EGF抗体、爱必妥、EKB-569、PKI-166、GW-572016、洛那法尼(Ionafarnib)、BMS-214662、替吡法尼; 氨磷汀、NVP-LAQ824、辛二酰苯胺异羟肟酸、丙戊酸、曲古抑菌素A、FK-228、SU11248、索拉非尼、KRN951、氨鲁米特、安吡啶、阿那格雷、L-天冬酰胺酶、卡介苗(BCG)疫苗、博来霉素、布舍瑞林、白消安、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、氯膦酸盐、环丙孕酮、阿糖胞苷、达卡巴嗪、放线菌素、柔红霉素、己烯雌酚、表柔比星、氟达拉滨、氟氢可的松、氟甲睾酮、氟他胺、吉西他滨、格列卫(gleevec)、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、伊马替尼、亮丙瑞林、左旋咪唑、环己亚硝脲、氮芥、美法仑、6-巯基嘌呤、美司钠、甲氨蝶呤、丝裂霉素、米托坦、米托蒽醌、尼鲁米特、奥曲肽、奥沙利铂、帕米膦酸盐、喷司他丁、普卡霉

素、吡吩姆钠、丙卡巴肼、雷替曲塞、利妥昔单抗、链脲菌素、替尼泊苷、睾酮、沙利度胺、硫鸟嘌呤、噻替派、维甲酸、长春地辛、13-顺-视黄酸、苯丙氨酸氮芥、乌拉莫司汀、雌莫司汀、六甲蜜胺、氟尿苷、5-脱氧尿苷、阿糖胞苷、6-巯基嘌呤、脱氧助间型霉素、骨化三醇、戊柔比星、光神霉素、长春碱、长春瑞滨、拓扑替康、雷佐生(razoxin)、马立马司他、COL-3、新伐司他(neovastat)、BMS-275291、角鲨胺、内皮抑素、SU5416、SU6668、EMD121974、白介素-12、IM862、血管抑素、维他信(vitaxin)、屈洛昔芬、艾多昔芬(idoxyfene)、螺内酯、非那雄胺、西咪替丁、曲妥珠单抗、地尼白介素、吉非替尼、硼替佐米、紫杉醇、伊立替康、拓扑替康、阿霉素、多西他赛、长春瑞滨、贝伐单抗(单克隆抗体)和爱必妥、不含氢化蓖麻油的紫杉醇、埃博霉素B、BMS-247550、BMS-310705、屈洛昔芬、4-羟基他莫昔芬、哌喷昔芬、ERA-923、阿佐昔芬、氟维司群、阿考比芬、拉索昔芬、艾多昔芬、TSE-424、HMR-3339、ZK186619、PTK787/ZK222584、VX-745、PD 184352、雷帕霉素、40-0-(2-羟乙基)-雷帕霉素、替西罗莫司、AP-23573、RAD001、ABT-578、BC-210、LY294002、LY292223、LY292696、LY293684、LY293646、渥曼青霉素、ZM336372、L-779,450、PEG-非格司亭(filgrastim)、阿法达贝泊汀、促红细胞生成素、粒细胞集落刺激因子、唑仑二膦酸盐(zolendronate)、泼尼松、西妥昔单抗、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、组氨瑞林、聚乙二醇化干扰素 α -2a、干扰素 α -2a、聚乙二醇化干扰素 α -2b、干扰素 α -2b、阿扎胞苷、PEG-L-天冬酰胺酶、来那度胺、吉妥珠单抗、氢化可的松、白介素-11、右雷佐生、阿仑单抗、全反式维甲酸、酮康唑、白介素-2、甲地孕酮、免疫球蛋白、氮芥、甲泼尼龙、替伊莫单抗、雄激素、地西他滨、六甲蜜胺、贝沙罗汀、托西莫单抗、三氧化二砷、可的松、editronate、米托坦、环孢菌素、脂质体柔红霉素、埃德温娜-天冬酰胺酶、锶89、卡索匹坦、奈妥吡坦、NK-1受体拮抗剂、帕洛诺司琼、阿瑞匹坦、苯海拉明、羟嗪、甲氧氯普胺、劳拉西泮、阿普唑仑、氟哌啶醇、氟哌利多、屈大麻酚、地塞米松、甲泼尼龙、丙氯拉嗪、格拉司琼、昂丹司琼、多拉司琼、托烷司琼、sspeg非格司亭(sspegfilgrastim)、促红细胞生成素、依泊汀 α 和达依泊汀 α 、伊匹单抗、维莫非尼或它们的组合。

16. 根据权利要求10所述的用途,其中所述疾病为癌症。

17. 根据权利要求16所述的用途,其中所述癌症为膀胱癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管癌、结肠直肠癌、食管癌、胆囊癌、胃癌、成胶质细胞瘤、肠癌、头颈癌、白血病、肝癌、肺癌、黑色素瘤、骨髓瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌和子宫癌。

18. 根据权利要求10所述的用途,其中所述疾病为疟疾、抗磷脂抗体综合征、狼疮、类风湿性关节炎、慢性荨麻疹或干燥综合征。

19. 一种如权利要求2所述的纳米载体在制备用于成像的药物中的用途,其中所述药物包含有效量的所述的纳米载体。

用于癌症治疗的双氨基喹啉和纳米制剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求在2019年9月18日提交的美国临时申请第62/902,156号的优先权,其整体并入本文用于所有目的。

[0003] 关于在联邦资助的研发下进行的发明的权利的声明

[0004] 本发明是在政府支持下完成的,由美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)和美国国家癌症研究所(National Cancer Institute)授予的授权号为R01CA199668和5R01CA232845,由美国国立卫生研究院和美国国立牙颌颅研究所(National Institute of Dental and Craniofacial Research)授予的授权号为R01DE029237,以及由美国国立卫生研究院和国家儿童健康与人类发展研究所(National Institute of Child Health and Human Development)授予的授权号为R01HD086195。美国政府拥有本发明的某些权利。

背景技术

[0005] 在过去的几十年里,对纳米医学的不断探索为癌症治疗做出了巨大贡献。正在开发载体辅助的纳米药物和无载体的纳米药物,以改善药物本征动力学和安全性。然而,这些纳米治疗方法存在一些局限性。首先,由于它们的多组分性质所导致的复杂性和毒性严重阻碍了许多纳米制剂的临床转化。其次,用于常规递送研究的大多数药物是几十年前批准的,并且一些不再是一线治疗药物。第三,为最近开发的治疗剂(尤其是新化学实体)设计的纳米制剂可能会遇到专利问题。最后,不是所有的药物都可进行结构修饰。这些限制可以在药物化学的背景下解决。与集中于药物递送特性的研发的纳米医学相比,药物化学致力于在早期阶段发现药物实体。尽管药物发现技术已经产生了许多药物先导物和候选物,但是围绕药物动力学、代谢和毒理学的问题仍然具有挑战性。这些挑战也可通过纳米医学领域的纳米技术相对容易地解决。为了利用这种跨学科联系,将纳米技术的原理整合到初始药物设计中,并开发了单组分非前药纳米药物(ONN)策略(图1)。在这种策略中,药物设计既遵循常规药物设计策略,又遵循分子自组装原理,使得所设计的药物从药物发现和药物递送的角度来看均具有优势。

[0006] 选择溶酶体作为治疗癌症靶标。癌细胞溶酶体肥大,容易破裂,并且比正常溶酶体更脆弱。溶酶体膜透化(LMP)可通过使蛋白水解酶(即,组织蛋白酶)能够释放到细胞质中而直接触发细胞死亡;因此,可诱导LMP的亲溶酶体去污剂已被开发用于肿瘤治疗。此外,溶酶体抑制作为抗癌策略具有相当大的潜力,因为它干扰自噬,而自噬是已确定的肿瘤的应激反应和耐药性的重要途径。亲溶酶体碱化剂氯喹(CQ)和羟氯喹(HCQ)是常用的自噬抑制剂,已在针对各种癌症类型的多个临床试验中进行了测试。然而,它们的功效被认为是不足的,特别是当它们作为单一药剂使用时。

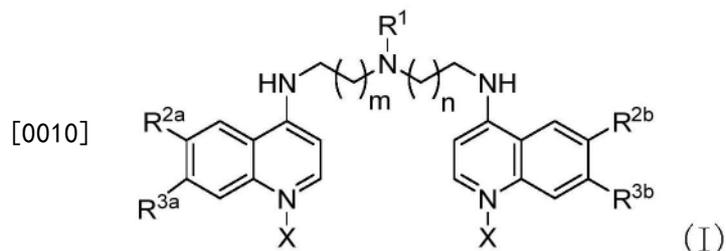
[0007] 采用药效团杂交和分子自组装来设计一系列亲脂性阳离子BAQ衍生物(图1和图7)。选择BAQ12和BAQ13来构建ONN是因为它们具有作为治疗剂和自组装结构单元的潜力。这些BAQ ONN在体外显示出优异的抗癌活性,对溶酶体破坏、溶酶体功能障碍和自噬抑制具有

增强的效果。此外,作为纳米药物,BAQ ONN表现出预期的自递送特性。从药物发现和药物递送的两种角度来看,这些优势最终有助于这些化合物作为单一药剂在体内胃肠癌模型中的显著抗癌活性。此外,BAQ ONN显示了在与那布卡辛的联合疗法中的应用前景,因为它们作为治疗剂和递送载体发挥双重作用。凭借其多学科整合和巧妙的功能叠加,BAQ ONN将成为改善癌症治疗的良好替代方案。

[0008] 药物发现领域和药物递送领域的独特优势的整合对于药物开发的进步是非常有价值的。本文描述了自递送单组分新化学实体纳米药物 (ONN) 策略,以通过将自组装原理纳入药物设计中来改善癌症治疗。使亲溶酶体去污剂 (MSDH) 和自噬抑制剂 (Lys05) 杂交,以开发能够固有地形成纳米组装体的双氨基喹啉衍生物。所选择的BAQ12和BAQ13 ONN在诱导溶酶体破坏、溶酶体功能障碍和自噬阻断方面非常有效,并且表现出为临床试验中使用的羟氯喹的30倍高的抗增殖活性。这些单一药物纳米颗粒在体内表现出优异的药代动力学和毒理学特性以及显著的抗肿瘤功效。此外,它们能够包封额外的药物并将其递送至肿瘤部位,因此是基于自噬抑制的联合疗法的有前景的药剂。考虑到它们的跨学科优势,这些BAQ ONN具有改善癌症治疗的巨大潜力。所需要的是新的BAQ ONN。令人惊讶的是,本发明满足了该需求以及其他需求。

发明内容

[0009] 在一个实施方案中,本发明提供了式 (I) 的化合物:



[0011] 或其药学上可接受的盐,其中: R^1 为氢、 C_{1-40} 烷基、 C_{2-40} 烯基、 C_{2-40} 炔基、-W、-(L-Y)_p-Z或-C(O) R^{1a} ,其中每个烷基、烯基和炔基任选地被 C_{1-20} 烷氧基、羟基或-NR^{1b}R^{1c}取代;W为 C_{3-12} 环烷基、 C_{6-12} 芳基或具有1至4个各自独立地为N、O或S的杂原子的5至12元杂芳基,并且其中每个环烷基、芳基和杂芳基任选地被 C_{1-40} 烷基、 C_{2-40} 烯基或 C_{2-40} 炔基取代;每个L独立地为不存在、 C_{1-20} 亚烷基、 C_{2-20} 亚烯基或 C_{2-20} 亚炔基;每个Y独立地为不存在、-O-、-NH-、-NHC(O)-、-NHC(O)NH-、-NHSO₂-、-OC(O)-、-OC(O)NH-、-C(O)-或-SO₂-;Z为荧光团、光敏剂、卟啉、化学治疗药物、甾醇、 C_{3-12} 环烷基、具有1至4个各自独立地为N、O或S的杂原子的3至12元杂环烷基、 C_{6-12} 芳基、具有1至4个各自独立地为N、O或S的杂原子的5至12元杂芳基、-OH或-NH₂;R^{1a}为 C_{1-40} 烷基、 C_{2-40} 烯基或 C_{2-40} 炔基,其中每个烷基、烯基和炔基任选地被 C_{1-40} 烷氧基、羟基或-NR^{1b}R^{1c}取代;R^{1b}为氢、 C_{1-40} 烷基、 C_{2-40} 烯基或 C_{2-40} 炔基;R^{1c}为氢、 C_{1-40} 烷基、 C_{2-40} 烯基、 C_{2-40} 炔基或-L-W;R^{2a}、R^{2b}、R^{3a}和R^{3b}各自独立地为氢、 C_{1-40} 烷基、 C_{2-40} 烯基、 C_{2-40} 炔基、 C_{1-40} 烷氧基、卤素、-CN或-NO₂;R^{2a}、R^{2b}、R^{3a}和R^{3b}各自独立地为氢、 C_{1-40} 烷基、 C_{2-40} 烯基、 C_{2-40} 炔基、 C_{1-40} 烷氧基、卤素、-CN或-NO₂;m和n独立地为1至10的整数;p独立地为1至20的整数;并且每个X独立地为不存在或-O⁻,其中当X不存在时,R^{2a}和R^{2b}为氢,并且R^{3a}和R^{3b}各自独立地为氢、-OMe、氟、氯、溴或-NO₂,则R¹为 C_{2-40} 烷基、 C_{2-40} 烯基、 C_{4-40} 炔基、-W、-(L-Y)_p-Z或-C(O) R^{1a} ,并且其中当X

不存在时, R^1 为 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ (7-氯-4-喹啉基), 并且 R^{2a} 和 R^{2b} 为氢, 则 R^{3a} 和 R^{3b} 独立地选自氢、 C_{1-20} 烷基、 C_{2-40} 烯基、 C_{2-40} 炔基、 C_{1-40} 烷氧基、氟、溴、碘、-CN或 -NO_2 。

[0012] 在另一个实施方案中, 本发明提供了具有内部和外部的纳米载体, 该纳米载体包含多种本发明的化合物或其药学上可接受的盐, 其中每种化合物在水性溶剂中自组装以形成该纳米载体, 使得疏水袋在该纳米载体的内部形成, 并且亲水基团在该纳米载体的外部自组装。

[0013] 在另一个实施方案中, 本发明提供了治疗疾病的方法, 该方法包括向对其有需要的受试者施用治疗有效量的本发明的纳米载体。

[0014] 在另一个实施方案中, 本发明提供了成像方法, 该方法包括向待成像的受试者施用有效量的本发明的纳米载体。

附图说明

[0015] 图1示出了所提出的药物设计策略和当前工作的示意图。路径(a)显示, 提出了跨学科的药物设计策略, 以整合药物化学和纳米医学的常规领域。药物被命名为单组分非前药纳米药物(ONN), 它们根据常规药物设计和分子自组装的策略设计, 使得它们可同时从药物发现和药物递送的角度获得优势。路径(b)示出了这项工作中的概念验证实验: 发现自递送的亲溶酶体双氨基喹啉(BAQ)衍生物用于癌症治疗。由亲溶酶体去污剂和基于BAQ的自噬抑制剂杂交产生的BAQ衍生物可自组装成BAQ ONN, 其作为单一药剂显示出增强的体外功能、优异的递送特性和显著的体内治疗效果。此外, 它们还具有高的载药效率以将额外的药物递送至肿瘤部位, 从而产生联合疗法的有前景的应用。

[0016] 图2A至图2G示出了BAQ ONN的表征。图2A示出了BAQ NP ($10\mu\text{M}$) 在具有不同pH值的乙酸盐缓冲液中的尺寸变化; 数据为平均值 \pm SD; $n=3$ 个独立的纳米颗粒样品。图2B示出了PBS缓冲液中由BAQ NP ($50\mu\text{M}$, 4h) 诱导的pH依赖性溶血; 数据为平均值 \pm SD; $n=3$ 个独立的纳米颗粒样品。图2C示出了盐酸(HCl, 0.1M) 滴定中BAQ NP (1mM) 的pH变化。图2D至图2E示出了在pH 7.4下的代表性TEM显微照片(图2D) 和在pH 5.0下的代表性TEM显微照片(图2E); 插图显示了尺寸分布(左) 和廷德耳效应(右); 实验均独立地重复三次。图2F示出了在pH 7.4和pH 5.0下的体外药物释放模式; 数据为平均值 \pm SD; $n=3$ 个独立的纳米颗粒样品。图2G示出了水中各种浓度的BAQ NP的计数率; 两条线的交点是指BAQ12NP的CAC ($0.45\mu\text{g mL}^{-1}$, $0.76\mu\text{M}$) 和BAQ13 NP的CAC ($0.15\mu\text{g mL}^{-1}$, $0.25\mu\text{M}$); 数据为平均值 \pm SD; $n=3$ 个独立的纳米颗粒样品。

[0017] 图3A至图3K示出了BAQ ONN在MIA PaCa-2细胞中诱导的溶酶体破坏和抑制的自噬。图3A示出了纳米颗粒的细胞摄取的代表性图像; 将负载有葡聚糖-AF488的细胞与DiD标记的BAQ ONN一起孵育2h; 实验独立地重复三次。图3B示出了细胞按指示处理($10\mu\text{M}$, 2h) 并用LysoTracker Green染色; 实验独立地重复三次。图3C示出了在所示处理($5\mu\text{M}$, 12h) 中细胞的AO染色; 实验独立地重复三次。图3D示出了按指示处理($5\mu\text{M}$, 12h) 的负载有葡聚糖-AF488的细胞的代表性图像; 实验独立地重复三次。图3E示出了在按指示处理($25\mu\text{M}$, 12h) 后组织蛋白酶B从分离的溶酶体的释放; 数据表示为平均值 \pm SD; $n=3$ 。图3F示出了蛋白质印迹。图3G示出了图3F中凝胶印迹的归一化定量分析; 数据表示为平均值 \pm SD; $n=3$ 。图3H示出了所示4h处理的代表性LC3B-GFP图像; 实验独立地重复三次。图3I示出了每个细胞中

LC3B-GFP斑点的定量,单位为h;数据表示为平均值 \pm SD;n=3。图3J示出了按指示处理(2 μ M,48h)的细胞的代表性TEM图像;橙色矩形:感兴趣区域;紫色箭头:自噬囊泡;红色箭头:溶酶体。图3K示出了溶酶体的平均直径;数据表示为平均值 \pm SD;n=7。所有统计p值通过单向方差分析(ANOVA)和Tukey多重比较检验计算。ns.,不显著;*p<0.05;**p<0.01;****p<0.0001。

[0018] 图4A至图4J示出了BAQ ONN改变溶酶体基因的表达并通过凋亡引起细胞死亡。图4A示出了GSEA,证明用BAQ13 NP处理(5 μ M,24h)的MIA PaCa-2细胞中溶酶体基因集的富集。用n=1,000个排列进行GSEA,其中p-调节<0.05和FDR<0.05被认为是显著的。图4B示出了来自a的代表性上调溶酶体基因。图4C示出了Lys05和BAQ13 NP之间基因上调的比较。图4D至图4E示出了所示处理(5 μ M,24h)中涉及的V-ATPase基因(图4D)的qPCR分析和Cl-通道基因(图4E)的qPCR分析;数据为平均值 \pm SD;n=3。图4F示出了暴露于48h处理的细胞的活力曲线和对应的IC50值;数据为平均值 \pm SD;n=3。图4G示出了连续处理中MIA PaCa-2(1.5 μ M)和HT29(1.0 μ M)细胞生长曲线;数据为平均值 \pm SD;n=3个独立实验。图4H示出了MIA PaCa-2细胞和HT29细胞的克隆形成测定;n=3。图4I示出了分别处理6h和12h的MIA PaCa-2细胞和HT29细胞中的半胱天冬酶3/7活性;数据为平均值 \pm SD;n=4。图4J示出了处理24h的MIA PaCa-2细胞(左)和HT29细胞(右)凋亡群体的百分比。所有统计p值通过单向ANOVA和Tukey多重比较检验计算;ns.,不显著;*p<0.05;**p<0.01;***p<0.001;****p<0.0001。

[0019] 图5A至图5H示出了BAQ ONN的药代动力学、生物分布和体内抗肿瘤效果。图5A示出了静脉内注射后负载DiD的BAQ ONN和游离DiD的血浆浓度-时间曲线;数据为平均值 \pm SD;n=3。图5B示出了在注射后24h携带HT29肿瘤的小鼠中BAQ13NP的体内和离体生物分布。图5C示出了在注射后12h和24h获得的组织的定量荧光强度;数据为平均值 \pm SD;n=3。图5D示出了每三天按指示处理的小鼠中MIA PaCa-2肿瘤生长曲线;数据为平均值 \pm SD;n=每组6个肿瘤。图5E示出了治疗期间小鼠的体重;数据为平均值 \pm SD;n=每组6只小鼠。图5F示出了在治疗结束时收获的肿瘤的重量;数据为平均值 \pm SD;n=每组6个肿瘤。(g-j)图5G至图5J示出了在治疗结束时收获的肿瘤的代表性H&E结果(图5G)、IHC结果(图5H)、免疫印迹结果(图5I)和TEM结果(图5J);在i的每组中的印迹来自每组的三个单独的肿瘤;图5J中的紫色箭头:自噬囊泡;图5G至图5J中的实验都独立地重复三次。所有统计p值通过单向ANOVA和Tukey多重比较检验计算;*p<0.05;****p<0.0001。

[0020] 图6A至图6L示出了BAQ ONN在联合治疗中具有双重作用。图6A示出了患者来源的胰腺癌干细胞(PCSC)模型的建立。图6B示出了组织学分析,显示了PCSC肿瘤的高水平基质;实验独立地重复三次。图6C示出了处理48h的PCSC的活力曲线和IC50值;n=3个独立实验。图6D示出了A0染色,以显示处理12h的PCSC的LMP;实验独立地重复三次。图6E示出了在按指示处理(2.5 μ M,48h)的PCSC中自噬蛋白的免疫印迹分析;实验独立地重复三次。图6F示出了BAQ13 NP和那布卡辛(48h)的协同作用。图3G示出了每三天静脉内施用的皮下MIA PaCa-2异种移植模型中的肿瘤生长曲线;数据为平均值 \pm SD;n=每组10个肿瘤。图3H示出了在治疗结束时收获的肿瘤的图像。图3I示出了处理期间小鼠体重的变化;数据为平均值 \pm SD;n=每组5只小鼠。图3J示出了PCSC肿瘤切片的代表性图像;实验独立地重复三次。图3K示出了静脉内注射(10mg kg⁻¹)后48h,PCSC模型中共负载有那布卡辛和DiD的BAQ13 NP的体内和

离体荧光成像。图3L示出了图3K中组织的定量荧光强度,数据为平均值 \pm SD;n=每组3只小鼠。所有统计p值通过双尾学生t检验计算。ns.,不显著;*p<0.05;**p<0.01;****p<0.0001。

[0021] 图7示出了这项工作中涉及的化合物的化学结构和BAQ12-BAQ18的合成路线。

[0022] 图8A至图8C示出了BAQ NP的体外评估。图8A示出了尺寸分布。图8B示出了对pH依赖性溶血作用的观察;红细胞按指示处理(50 μ M,4h)。图8C示出了分别暴露于不同化合物24h的各种细胞系的活力曲线。数据表示为平均值 \pm SD;n=3个独立实验。

[0023] 图9A至图9G示出了BAQ NP的稳定性测量和TEM表征。图9A至图9B示出了在中性条件下BAQ12 NP和BAQ13 NP的动态光散射(DLS)测量;数据表示为平均值 \pm SD;n=3。图9C示出了第10天和第30天时BAQ12 NP和BAQ13 NP的整体外观。图9D至图9E示出了在存在10% FBS的情况下BAQ12 NP和BAQ13 NP的DLS测量;数据表示为平均值 \pm SD;n=3。图9F示出了与0.5mM BSA一起孵育后24h,BAQ12 NP(左)和BAQ13 NP(右)的尺寸分布。图9G示出了负载不同药剂的BAQ13 NP的代表性TEM图像;实验独立地重复三次。

[0024] 图10A至图10F示出了BAQ NP对溶酶体和细胞水平自噬的影响。图10A示出了用于图3A的共定位分析的皮尔逊相关系数。图10B示出了在按指示处理的MIA PaCa-2细胞中LysoTracker Green的荧光定量;数据表示为平均值 \pm SD;n=3个独立实验;统计学显著性通过双尾学生t检验计算;**p<0.01。图10C示出了HT29细胞按指示处理(10 μ M,2h)然后用LysoTracker Red染色;实验独立地重复三次。图10D示出了按指示处理(5 μ M,12h)的HT29细胞的AO染色;实验独立地重复三次。图10E示出了按指示处理12h的MIA PaCa-2细胞中525nm和650nm处的荧光强度比;数据表示为平均值 \pm SD;n=3个独立实验;统计学显著性通过单向ANOVA和Tukey多重比较检验计算;ns.,不显著;****p<0.0001。图10F示出了在对应处理(5 μ M,4h)内细胞中的代表性LC3B-GFP图像;实验独立地重复三次。

[0025] 图11A至图11F示出了BAQ NP对基因表达和脂质代谢的影响。图11A示出了RNA-seq的火山图,显示在由Lys05(下图)和BAQ13 NP(上图)诱导的MIA PaCa-2细胞中的差异表达基因。图11B示出了根据RNA-seq结果的自噬相关基因的变化。图11C示出了按指示处理(5 μ M,24h)的MIA PaCa-2细胞的代表性自噬相关基因和凋亡相关基因的qPCR分析;数据表示为平均值 \pm SD;n=3;统计学显著性通过单向ANOVA和Tukey多重比较检验计算;*p<0.05;**p<0.01;***p<0.001;****p<0.0001。图11D示出了按指示处理(5 μ M,12h)的MIA PaCa-2细胞的凋亡相关基因的变化;数据表示为平均值 \pm SD;n=3;统计学显著性通过双尾学生t检验计算;*p<0.05;**p<0.01。图11E至图11F示出了处理或未处理(2.5 μ M,48h)的MIA PaCa-2细胞中酸性鞘磷脂酶(ASM)底物(图11E)和磷脂酶A(PLA)底物(图11F)的浓度变化;数据表示为平均值 \pm SD;n=4。

[0026] 图12示出了按指示处理48h的各种细胞系的活力曲线。数据表示为平均值 \pm SD;n=3个独立实验。

[0027] 图13A至图13F示出了BAQ NP的生物分布和毒性研究。图13A示出了在用游离DiD(上图)和负载DiD的BAQ13 NP(下图)注射(i.v.)后12h,携带HT29肿瘤的小鼠的体内和离体成像,n=每组3只小鼠。图13B示出了a中器官的定量荧光强度;数据表示为平均值 \pm SD;n=每组3只小鼠;数据表示为平均值 \pm SD;n=3;统计学显著性通过双尾学生t检验计算;***p<0.001;****p<0.0001。图13C示出了在生理pH下通过对应处理诱导的浓度依赖性溶血;

数据表示为平均值 \pm SD; $n=3$ 个独立的纳米颗粒样品; 统计学显著性通过单向ANOVA和Tukey多重比较检验计算; ns., 不显著; *** $p<0.001$; **** $p<0.0001$ 。图13D示出了每两天静脉内注射对应药剂的FVB/ n 小鼠的存活; $n=$ 每组6只小鼠。图13E示出了按指示每两天处理的小鼠的体重; 数据表示为平均值 \pm SD; $n=$ 每组4只小鼠。图13F示出了脂质体@Lys05的动态光散射(DLS)测量和代表性TEM图像; 实验独立地重复三次。

[0028] 图14A至图14E示出了组织切片和血液学的分析。图14A示出了来自用溶媒(盐水)、Lys05(20mg kg^{-1} , ip)、BAQ12 NP(20mg kg^{-1} , iv)和BAQ13 NP(20mg kg^{-1} , iv)处理24天的小鼠的主要器官的H&E分析。比例尺为100 μ m。实验独立地重复三次。图14B示出了a中小鼠的对应血清化学分析。1. 丙氨酸转氨酶U L^{-1} , 2. 天冬氨酸转氨酶U L^{-1} , 3. 血尿素氮mg dL^{-1} , 4. 肌酸酐mg dL^{-1} , 5. 总胆红素mg dL^{-1} , 6. 溶血。图14B至图14E示出了a中小鼠的对应全血细胞计数(CBC)分析; 数据表示为平均值 \pm SD; $n=$ 每组3只小鼠。1. 绝对嗜中性粒细胞($k\mu L^{-1}$), 2. 绝对单核细胞($k\mu L^{-1}$), 3. 绝对嗜酸性粒细胞($k\mu L^{-1}$), 4. 绝对嗜碱性粒细胞($k\mu L^{-1}$), 5. 嗜酸性粒细胞%, 6. 嗜碱性粒细胞%, 7. MPV(fL), 8. 绝对淋巴细胞($k\mu L^{-1}$), 9. WBC($k\mu L^{-1}$), 10. RBC($M\mu L^{-1}$), 11. 血红蛋白(g dL^{-1}), 12. MCH(pg), 13. 单核细胞(%), 14. RDW(%), 15. 嗜中性粒细胞%, 16. 淋巴细胞%, 17. 血细胞比容%, 18. MCV(fL), 19. MCHC(g dL^{-1}), 20. 血小板($k\mu L^{-1}$), 21. 血凝块的存在。

[0029] 图15A至图15C示出了在HT29小鼠模型中BAQ NP的体内评估。图15A示出了每两天静脉内施用的皮下HT29异种移植模型中的肿瘤生长曲线; 数据表示为平均值 \pm SD; $n=$ 每组12个肿瘤。统计学显著性通过双尾学生t检验计算; ns., 不显著; * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$ 。图15B示出了治疗期间小鼠的体重; 数据表示为平均值 \pm SD; $n=$ 每组6只小鼠。图15C示出了小鼠的存活曲线; $n=$ 每组6只小鼠。在第24天终止处理。

[0030] 图16示出了用于分离胰腺癌干细胞(PCSC)的门控策略。

[0031] 图17A至图17F示出了在胰腺癌干细胞(PCSC)的模型中对BAQ NP的评估。图17A示出了溶酶体脱酸测定。将PCSC处理2h(10 μ M), 然后用LysoTracker Red染色; 实验独立地重复三次。图17B示出了按指示处理(5 μ M, 4h)的表达LC3B-GFP的PCSC的代表性图像; 实验独立地重复三次。图17C示出了所示处理(5 μ M, 24h)中PCSC的凋亡群体的百分比。图17D示出了按指示处理8h的PCSC的免疫印迹测定; 实验独立地重复三次。图17E示出了在处理结束时收获的主要器官的H&E分析; 实验独立地重复三次。图17F示出了尾静脉注射24h后, 小鼠中游离DiD和BAQ13 NP@那布卡辛+DiD的生物分布; 红圈: 肿瘤。

[0032] 图18A至图18G示出了在生理和溶酶体pH中PBC NP的表征。图18A示出了PBC单体的化学结构。图18B示出了在各种pH下可转化性的示意图。图18C示出了在pH 7.4和pH 5.0下PBC NP的超滤分析和TEM观察。图18D示出了PBC纳米颗粒的pH依赖性DLS测量。图18E在pH 5.0下PBC纳米颗粒的时程DLS测量。图18F示出了PBC纳米颗粒的pH依赖性TEM测量。图18G示出了PBC纳米颗粒的时间依赖性TEM测量。

[0033] 图19A至图19H示出了PBC纳米颗粒的可转化性诱导溶酶体功能障碍并引起OSC-3细胞的凋亡。图19A示出了可转化的PBC纳米颗粒和不可转化的BAQ纳米颗粒的化学结构。图19B示出了细胞活力, 图19C示出了自噬分析, 图19D示出了凋亡分析, 并且图19E示出了TEM图像, 其显示溶酶体中形成的PBC纳米纤维。图19F示出了吖啶橙(AO)染色, 以显示由PBC NP

诱导的溶酶体膜 (LMP)。图19G示出了葡聚糖染色,以显示PBC NP诱导的LMP。(h) PBC NP在OSC-3细胞中诱导了明显的空泡形成。

[0034] 图20A至图20L示出了PBC NP,其显示出高的光动力学治疗功效,并能克服自噬相关的耐药性。图20A至图20B示出了传统的光敏剂脱镁叶绿酸a (Pa) 在OSC-3细胞中诱导的自噬,这通过LC3-GFP-RFP成像 (图20A) 和免疫印迹 (图20B) 证实。图20C至图20D示出了Pa介导的光动力学治疗通过自噬抑制剂Lys05敏化,这从细胞活力 (图20C) 和免疫印迹 (图20D) 得到证实。图20E示出了单线态氧的产量。图20F示出了OSC-3细胞中ROS的产量。图20G示出了在不同处理后OSC-3口腔细胞的DiO/PI的活/死染色。图20H示出了细胞活力。图20I示出了凋亡测定。图20J示出了凋亡途径的免疫印迹测定。图20K示出了不同处理后OSC-3细胞的TEM图像。图20L示出了自噬过程的免疫印迹测定。

[0035] 图21示出了OSC-3细胞中的其他合成的BAQ衍生物及其细胞活力结果 (48h)。

[0036] 图22A至图22B示出了BAQ0衍生物的初步筛选。图22A示出了化学结构。图22B示出了处理72小时的胰腺癌干细胞 (PCSC) 的活力结果。

[0037] 图23A至图23F示出了BAQ120 NP的表征。图23A示出了BAQ120 NP的DLS测量。图23B示出了BAQ120 NP的代表性TEM图像。图23C示出了BAQ120 NP的临界聚集浓度 (CAC) 的测量。图23D至图23E示出了BAQ120 NP和游离BAQ120溶液的吸光度 (图23D) 和荧光 (图23E) 光谱。图23F BAQ120 NP的稳定性。

[0038] 图24A至图24F示出了BAQ120 NP在携带PCSC肿瘤的小鼠中的抗肿瘤活性的评估。图24A示出了每三天 (iv) 处理的小鼠中的肿瘤生长曲线。图24B治疗结束时收集的肿瘤重量。图24C治疗期间小鼠的体重。图24D小鼠中自噬过程的免疫印迹。图24E至图24F示出了不同组中肿瘤的代表性HE图像 (图24E) 和Ki67-IHC图像 (图24F)。

[0039] 图25示出了设计的BAQ0衍生物的化学结构。

具体实施方式

[0040] I. 概述

[0041] 本发明提供了双氨基喹啉衍生物化合物,以及由这些化合物形成的纳米载体,它们可用于治疗疾病。这些化合物和纳米载体可靶向溶酶体,导致溶酶体破坏、溶酶体功能障碍和/或自噬抑制。此外,纳米载体可通过包封额外的药物用于联合疗法,或与额外的药物共同施用,这可用于克服耐药性。纳米载体还可用于对感兴趣的细胞或生物体进行成像。

[0042] II. 定义

[0043] 除非另外明确指出,否则本文所用的所有技术和科学术语的含义与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同。此外,与本文所述的方法或材料类似或等同的任何方法或材料可用于本发明的实践中。为了本发明的目的,定义了以下术语。

[0044] 如本文所用的“一个”、“一种”或“该”不仅包括具有一个成员的方面,而且包括具有多于一个成员的方面。例如,除非上下文另有明确规定,否则单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数指代。因此,例如,提及“一个细胞”包括多个这样的细胞,并且提及“该试剂”包括提及本领域技术人员已知的一种或多种试剂,等等。

[0045] “烷基”是指具有所示碳原子数的直链或支链的饱和脂族基团。烷基可包括任何数量的碳,诸如C₁₋₂、C₁₋₃、C₁₋₄、C₁₋₅、C₁₋₆、C₁₋₇、C₁₋₈、C₁₋₉、C₁₋₁₀、C₁₋₂₀、C₁₋₃₀、C₁₋₄₀、C₂₋₃、C₂₋₄、C₂₋₅、

C_{2-6} 、 C_{3-4} 、 C_{3-5} 、 C_{3-6} 、 C_{4-5} 、 C_{4-6} 和 C_{5-6} 。例如， C_{1-6} 烷基包括但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、异戊基、己基等。烷基还可指具有至多40个碳原子的烷基，诸如但不限于庚基、辛基、壬基、癸基等。烷基可以是取代的或未取代的。

[0046] “亚烷基”是指具有所示碳原子数并且连接至少两个其他基团的直链或支链的饱和脂族基团，即二价烃基。与亚烷基连接的两个部分可与亚烷基的相同原子或不同原子连接。例如，直链亚烷基可为 $-(CH_2)_n-$ 的二价基团，其中n为1、2、3、4、5或6。代表性的亚烷基包括但不限于亚甲基、亚乙基、亚丙基、亚异丙基、亚丁基、亚异丁基、亚仲丁基、亚戊基和亚己基。亚烷基可以是取代的或未取代的。

[0047] “烯基”是指具有至少2个碳原子和至少一个双键的直链或支链烃。烯基可包括任何数量的碳，诸如 C_2 、 C_{2-3} 、 C_{2-4} 、 C_{2-5} 、 C_{2-6} 、 C_{2-7} 、 C_{2-8} 、 C_{2-9} 、 C_{2-10} 、 C_{2-20} 、 C_{2-30} 、 C_{2-40} 、 C_3 、 C_{3-4} 、 C_{3-5} 、 C_{3-6} 、 C_4 、 C_{4-5} 、 C_{4-6} 、 C_5 、 C_{5-6} 和 C_6 。烯基可具有任何合适数量的双键，包括但不限于1、2、3、4、5或更多个。烯基的示例包括但不限于乙烯基、丙烯基、异丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、异丁烯基、丁二烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、异戊烯基、1,3-戊二烯基、1,4-戊二烯基、1-己烯基、2-己烯基、3-己烯基、1,3-己二烯基、1,4-己二烯基、1,5-己二烯基、2,4-己二烯基或1,3,5-己三烯基。烯基可以是取代的或未取代的。

[0048] “亚烯基”是指如上定义的连接至少两个其他基团的烯基，即二价烃基。与亚烯基连接的两个部分可与亚烯基的相同原子或不同原子连接。亚烯基包括但不限于亚乙烯基、亚丙烯基、亚异丙烯基、亚丁烯基、亚异丁烯基、亚仲丁烯基、亚戊烯基和亚己烯基。亚烯基可以是取代的或未取代的。

[0049] “炔基”是指具有至少2个碳原子和至少一个三键的直链或支链烃。炔基可包括任何数量的碳，诸如 C_2 、 C_{2-3} 、 C_{2-4} 、 C_{2-5} 、 C_{2-6} 、 C_{2-7} 、 C_{2-8} 、 C_{2-9} 、 C_{2-10} 、 C_{2-20} 、 C_{2-30} 、 C_{2-40} 、 C_3 、 C_{3-4} 、 C_{3-5} 、 C_{3-6} 、 C_4 、 C_{4-5} 、 C_{4-6} 、 C_5 、 C_{5-6} 和 C_6 。炔基的示例包括但不限于乙炔基、丙炔基、1-丁炔基、2-丁炔基、丁二炔基、1-戊炔基、2-戊炔基、异戊炔基、1,3-戊二炔基、1,4-戊二炔基、1-己炔基、2-己炔基、3-己炔基、1,3-己二炔基、1,4-己二炔基、1,5-己二炔基、2,4-己二炔基或1,3,5-己三炔基。炔基可以是取代的或未取代的。

[0050] “亚炔基”是指如上定义的连接至少两个其他基团的炔基，即二价烃基。与亚炔基连接的两个部分可与亚炔基的相同原子或不同原子连接。亚炔基包括但不限于亚乙炔基、亚丙炔基、亚异丙炔基、亚丁炔基、亚仲丁炔基、亚戊炔基和亚己炔基。亚炔基可以是取代的或未取代的。

[0051] “环烷基”是指含有3至12个环原子或所示原子数的饱和或部分不饱和的单环、稠合双环或桥接多环的集合环。环烷基可包括任何数量的碳，诸如 C_{3-6} 、 C_{4-6} 、 C_{5-6} 、 C_{3-8} 、 C_{4-8} 、 C_{5-8} 、 C_{6-8} 、 C_{3-9} 、 C_{3-10} 、 C_{3-11} 和 C_{3-12} 。饱和单环环烷基环包括，例如，环丙基、环丁基、环戊基、环己基和环辛基。饱和双环和多环环烷基环包括，例如，降冰片烷、[2.2.2]双环辛烷、十氢萘和金刚烷。环烷基也可以是部分不饱和的，在环中具有一个或多个双键或三键。部分不饱和的代表性环烷基包括但不限于环丁烯、环戊烯、环己烯、环己二烯(1,3-异构体和1,4-异构体)、环庚烯、环庚二烯、环辛烯、环辛二烯(1,3-异构体、1,4-异构体和1,5-异构体)、降冰片烯和降冰片二烯。当环烷基是饱和单环 C_{3-8} 环烷基时，示例性基团包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基和环辛基。当环烷基是饱和单环 C_{3-6} 环烷基时，示例性基团包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基和环己基。环烷基可以是取代的或未取代的。

[0052] “杂环烷基”是指具有3至12个环成员和1至4个N、O和S杂原子的饱和环系。杂原子也可被氧化,诸如但不限于-S(O)-和-S(O)₂-。杂环烷基可包括任何数量的环原子,诸如3至6、4至6、5至6、3至8、4至8、5至8、6至8、3至9、3至10、3至11或3至12个环成员。杂环烷基中可包括任何合适数量的杂原子,诸如1、2、3或4,或1至2、1至3、1至4、2至3、2至4或3至4。杂环烷基可包括基团诸如氮丙啶、氮杂环丁烷、吡咯烷、哌啶、氮杂环庚烷、氮杂环辛烷、奎宁环、吡唑烷、咪唑烷、哌嗪(1,2-异构体、1,3-异构体和1,4-异构体)、环氧乙烷、氧杂环丁烷、四氢呋喃、噁烷(四氢吡喃)、氧杂环庚烷、硫杂环丙烷、硫杂环丁烷、硫杂环戊烷(四氢噻吩)、噻烷(四氢噻喃)、噁唑烷、异噁唑烷、噻唑烷、异噻唑烷、二氧戊环、二硫戊环、吗啉、硫代吗啉、二噁烷或二噻烷。杂环烷基也可与芳族或非芳族环系稠合以形成包括但不限于二氢吲哚的成员。杂环烷基可以是未取代的或取代的。例如,杂环烷基可被C₁₋₆烷基或氧代基(=O)等等取代。

[0053] “芳基”是指具有任何合适数量的环原子和任何合适数量的环的芳环系。芳基可包括任何合适数量的环原子,诸如6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16个环原子,以及6至10、6至12或6至14个环成员。芳基可以是单环的,稠合形成双环或三环基团,或通过键连接形成联芳基。代表性的芳基包括苯基、萘基和联苯基。其他芳基包括具有亚甲基连接基团的苄基。一些芳基具有6至12个环成员,诸如苯基、萘基或联苯基。其他芳基具有6至10个环成员,诸如苯基或萘基。一些其他芳基具有6个环成员,诸如苯基。芳基可以是取代的或未取代的。

[0054] “杂芳基”是指含有5至16个环原子的单环或稠合的双环或三环芳族集合环,其中1至5个环原子是杂原子诸如N、O或S。杂原子也可被氧化,诸如但不限于-S(O)-和-S(O)₂-。杂芳基可包括任何数量的环原子,诸如5至6、3至8、4至8、5至8、6至8、3至9、3至10、3至11或3至12个环成员。杂芳基中可包括任何合适数量的杂原子,诸如1、2、3、4或5,或1至2、1至3、1至4、1至5、2至3、2至4、2至5、3至4或3至5。杂芳基可具有5至8个环成员和1至4个杂原子,或5至8个环成员和1至3个杂原子,或5至6个环成员和1至4个杂原子,或5至6个环成员和1至3个杂原子。杂芳基可包括基团诸如吡咯、吡啶、咪唑、吡唑、三唑、四唑、吡嗪、嘧啶、哒嗪、三嗪(1,2,3-异构体、1,2,4-异构体和1,3,5-异构体)、噻吩、呋喃、噻唑、异噻唑、噁唑和异噁唑。杂芳基也可与芳环系诸如苯环稠合,以形成包括但不限于苯并吡咯诸如吲哚和异吲哚、苯并吡啶诸如喹啉和异喹啉、苯并吡嗪(喹喔啉)、苯并嘧啶(喹唑啉)、苯并哒嗪诸如酞嗪和噌啉、苯并噻吩和苯并呋喃的成员。其他杂芳基包括通过键连接的杂芳基环,诸如联吡啶。杂芳基可以是取代的或未取代的。

[0055] “烷氧基”是指具有将烷基连接到连接点的氧原子的烷基:烷基-O-。至于烷基,烷氧基可具有任何合适的碳原子数,诸如C₁₋₆。烷氧基包括,例如,甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、丁氧基、2-丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、戊氧基、己氧基等。烷氧基可进一步被本文所述的各种取代基取代。---烷氧基可以是取代的或未取代的。

[0056] “羟基”是指-OH官能团。

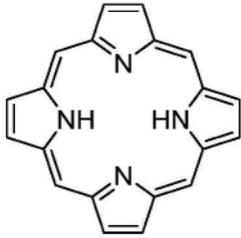
[0057] “卤素”是指氟、氯、溴和碘。

[0058] “荧光团”是指在化合物激发后通常在300nm-700nm范围内发光的化合物。在吸收转移的光能(例如,光子)时,荧光团进入激发态。当分子退出激发态时,它会以较低能量光子的形式发射光能(例如,发射荧光),并使染料分子返回到其基态。荧光团可以是天然化合物或合成化合物。荧光团包括但不限于DAPI、溴化乙锭、吖啶橙、GFP、mCherry、羟基香豆素、

荧光素、LysoTracker (red&green)、葡聚糖-Alexa Fluor 488、Premo™自噬传感器LC3B-GFP和Ac-DEVD-AMC。

[0059] “光敏剂”是指可被光活化以产生活性自由基的化合物,该活性自由基通常是用于光动力学治疗的活性氧(ROS),但也可产生用于聚合、交联或降解的活性自由基。光敏剂可通过产生单线态氧以破坏肿瘤而用于治疗疾病。光敏剂包括但不限于卟啉、染料和叶绿素。

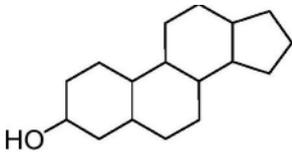
[0060] “卟啉”是指具有以下卟吩核心的任何化合物:



[0061]

[0062] 其中卟吩核心可以是取代的或未取代的。

[0063] “甾醇”是指具有以下核心结构的化合物:



[0064]

[0065] 其中核心可进一步被取代。

[0066] “药物”是指能够治疗和/或改善病症或疾病的药剂。药物可以是疏水性药物,即任何排斥水的药物。可用于本发明的疏水性药物包括但不限于氢氯喹(HCQ)、Lys05、硼替佐米、 β -拉帕酮、JQ1、那布卡辛、雷帕霉素、紫杉醇、SN38、依托泊苷、来那度胺和阿波唑。其他药物包括非甾体抗炎药和长春花生物碱,诸如长春碱和长春新碱。本发明的药物还包括前药形式。本领域技术人员将理解,其他药物可用于本发明。

[0067] “显像剂”或“造影剂”是指增加细胞或身体部位内的结构对比度的化合物,用于包括但不限于MRI、PET、SPECT和CT的成像方法。显像剂可发射辐射、荧光、磁场或无线电波。显像剂包括但不限于放射性金属螯合剂、放射性金属原子或离子和荧光团。

[0068] “化学治疗剂”是指可用于治疗疾病诸如但不限于癌症、肿瘤和赘生物的化学药物。在一些实施方案中,化学治疗剂可以是可被活化成细胞毒性形式的前药形式。本领域普通技术人员通常已知的化学治疗剂可用于本发明。化学治疗剂包括但不限于柔红霉素、阿霉素、紫杉醇、多西他赛、abraxane、硼替佐米、依托泊苷、来那度胺、阿波唑、卡铂、顺铂、奥沙利铂、长春碱和长春新碱。

[0069] “分子靶向剂”是指可靶向参与肿瘤和癌症进化、生长和扩散的特定分子的药物。靶向参与肿瘤和癌症进化的特定分子可杀死或抑制肿瘤和癌症的生长和扩散。分子靶向剂包括但不限于曲妥珠单抗、厄洛替尼、伊马替尼、尼洛替尼和维莫非尼。

[0070] “免疫治疗剂”是指可通过刺激或抑制免疫系统来改变免疫反应的一类药物。免疫调节剂包括但不限于HCQ、Lys05、JQ1、雷帕霉素、那布卡辛、伊匹单抗、纳武单抗、帕博利珠单抗、阿替利珠单抗、阿维鲁单抗和德瓦鲁单抗。

[0071] “放射治疗剂”是指可用于通过放射疗法治疗疾病的药物。放射疗法是使用辐射来杀死或抑制肿瘤和癌细胞的疾病治疗方法。放射治疗剂包括但不限于 β -拉帕酮、顺铂、尼莫

拉唑、西妥昔单抗、米索硝唑和替拉扎明。

[0072] “纳米载体”或“纳米颗粒”是指由本发明化合物的聚集产生的胶束。本发明的纳米载体可具有疏水核心和亲水外部。

[0073] “抑制”和“抑制剂”是指抑制特定作用或功能的化合物或抑制特定作用或功能的方法。

[0074] “治疗”是指治疗或改善损伤、病理、病症或症状(例如疼痛)的任何成功迹象,包括任何客观或主观参数,诸如减少、缓解、减轻症状或使症状、损伤、病理或病症对患者来说更可耐受;降低症状或病症的频率或持续时间;或者在一些情况下,预防症状的发作。症状的治疗或改善可基于任何客观或主观参数;包括,例如体检的结果。

[0075] “疾病”是指生物体中的异常细胞功能,这不是由于物理或外部损伤的直接结果。疾病可指引起痛苦、功能障碍、残疾、紊乱、感染、疼痛或甚至死亡的任何病症。疾病包括但不限于遗传病诸如遗传性和非遗传性疾病、感染性疾病、非感染性疾病诸如癌症、缺陷性疾病和生理学疾病。

[0076] “施用”是指向受试者口服施用、以栓剂形式施用、局部接触、肠胃外施用、静脉内施用、腹膜内施用、肌肉施用、病灶内施用、鼻内或皮下施用、鞘内施用或植入缓释装置,例如微型渗透泵。--

[0077] “受试者”是指动物诸如哺乳动物,包括但不限于灵长类动物(例如人)、牛、绵羊、山羊、马、狗、猫、兔、大鼠、小鼠等。在某些实施方案中,受试者是人。

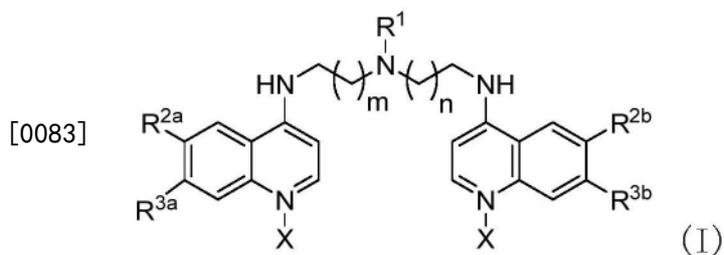
[0078] “治疗有效量或剂量”或“治疗足够量或剂量”或“有效或足够量或剂量”是指产生其施用的治疗效果的剂量。确切的剂量将取决于治疗的目的,并且本领域技术人员可使用已知技术来确定(参见,例如Lieberman,《药物剂型》(Pharmaceutical Dosage Forms)(第1-3卷,1992年);Lloyd,《药物复合的领域、科学和技术》(The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding)(1999年);Pickar,《剂量计算》(Dosage Calculations)(1999年);以及《雷明顿:药学科学和实践》(Remington: The Science and Practice of Pharmacy),第20版,2003年,Gennaro编辑,利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司)。在敏化细胞中,治疗有效剂量通常可低于非敏化细胞的常规治疗有效剂量。

[0079] “靶”或“靶向”是指使用特异性或优先结合细胞、病毒颗粒、病毒蛋白、抗原或生物分子,或定位于特定细胞类型、组织类型、微生物类型或病毒类型的化合物、蛋白质或抗体。

[0080] “成像”是指使用受试者体外的装置来确定显像剂(诸如本发明的化合物)的位置。成像工具的示例包括但不限于正电子发射断层扫描(PET)、磁共振成像(MRI)、超声、单光子发射计算机断层扫描(SPECT)、x-射线计算机断层扫描(CT)。正电子发射断层扫描通过显像剂检测来自正电子发射的辐射。

[0081] III. 化合物

[0082] 在一些实施方案中,本发明提供式(I)的化合物:



[0084] 或其药学上可接受的盐,其中: R^1 为氢、 C_{1-40} 烷基、 C_{2-40} 烯基、 C_{2-40} 炔基、-W、-(L-Y)_p-Z或-C(O) R^{1a} ,其中每个烷基、烯基和炔基任选地被 C_{1-20} 烷氧基、羟基或-NR^{1b}R^{1c}取代;W为 C_{3-12} 环烷基、 C_{6-12} 芳基或具有1至4个各自独立地为N、O或S的杂原子的5至12元杂芳基,并且其中每个环烷基、芳基和杂芳基任选地被 C_{1-40} 烷基、 C_{2-40} 烯基或 C_{2-40} 炔基取代;每个L独立地为不存在、 C_{1-20} 亚烷基、 C_{2-20} 亚烯基或 C_{2-20} 亚炔基;每个Y独立地为不存在、-O-、-NH-、-NHC(O)-、-NHC(O)NH-、-NHSO₂-、-OC(O)-、-OC(O)NH-、-C(O)-或-SO₂-;Z为荧光团、光敏剂、卟啉、化学治疗药物、甾醇、 C_{3-12} 环烷基、具有1至4个各自独立地为N、O或S的杂原子的3至12元杂环烷基、 C_{6-12} 芳基、具有1至4个各自独立地为N、O或S的杂原子的5至12元杂芳基、-OH或-NH₂;R^{1a}为 C_{1-40} 烷基、 C_{2-40} 烯基或 C_{2-40} 炔基,其中每个烷基、烯基和炔基任选地被 C_{1-40} 烷氧基、羟基或-NR^{1b}R^{1c}取代;R^{1b}为氢、 C_{1-40} 烷基、 C_{2-40} 烯基或 C_{2-40} 炔基;R^{1c}为氢、 C_{1-40} 烷基、 C_{2-40} 烯基、 C_{2-40} 炔基或-L-W;R^{2a}、R^{2b}、R^{3a}和R^{3b}各自独立地为氢、 C_{1-40} 烷基、 C_{2-40} 烯基、 C_{2-40} 炔基、 C_{1-40} 烷氧基、卤素、-CN或-NO₂;m和n独立地为1至10的整数;p独立地为1至20的整数;并且每个X独立地为不存在或-O⁻,其中当X不存在时,R^{2a}和R^{2b}各自独立地为氢,并且R^{3a}和R^{3b}各自独立地为氢、-OMe、氟、氯、溴或-NO₂,则R¹为 C_{2-40} 烷基、 C_{2-40} 烯基、 C_{4-40} 炔基、-W、-(L-Y)_p-Z或-C(O) R^{1a} ,并且其中当X不存在时,R¹为-CH₂CH₂NH(7-氯-4-喹啉基),并且R^{2a}和R^{2b}为氢,则R^{3a}和R^{3b}独立地选自氢、 C_{1-20} 烷基、 C_{2-40} 烯基、 C_{2-40} 炔基、 C_{1-40} 烷氧基、氟、溴、碘、-CN或-NO₂。

[0085] 在一些实施方案中,本发明提供了式(I)的化合物,其中: R^1 为氢、 C_{1-20} 烷基、 C_{2-20} 烯基、 C_{2-20} 炔基、-W、-(L-Y)_p-Z或-C(O) R^{1a} ,其中每个烷基、烯基和炔基任选地被 C_{1-20} 烷氧基、羟基或-NR^{1b}R^{1c}取代;W为 C_{3-12} 环烷基、 C_{6-12} 芳基或 C_{4-12} 杂芳基,其中每个环烷基、芳基和杂芳基任选地被 C_{1-20} 烷基、 C_{2-20} 烯基或 C_{2-20} 炔基取代;每个L独立地为不存在、 C_{1-10} 亚烷基、 C_{2-10} 亚烯基或 C_{2-10} 亚炔基;每个Y独立地为不存在、-O-、-NH-、-NHC(O)-、-NHC(O)NH-、-NHSO₂-、-OC(O)-、-OC(O)NH-、-C(O)-或-SO₂-;Z为荧光团、光敏剂、卟啉、化学治疗药物或甾醇;R^{1a}为 C_{1-20} 烷基、 C_{2-20} 烯基或 C_{2-20} 炔基,其中每个烷基、烯基和炔基任选地被 C_{1-20} 烷氧基、羟基或-NR^{1b}R^{1c}取代;R^{1b}为氢、 C_{1-20} 烷基、 C_{2-20} 烯基或 C_{2-20} 炔基,并且R^{1c}为氢、 C_{1-20} 烷基、 C_{2-20} 烯基、 C_{2-20} 炔基或-L-W;R^{2a}、R^{2b}、R^{3a}和R^{3b}各自独立地为氢、 C_{1-20} 烷基、 C_{2-20} 烯基、 C_{2-20} 炔基、 C_{1-20} 烷氧基、卤素、-CN或-NO₂;m和n独立地为1至10的整数;p独立地为1至20的整数;每个X独立地为不存在或-O⁻,其中当X不存在时,R^{2a}和R^{2b}为氢,并且R^{3a}和R^{3b}各自独立地为氢、-OMe、氟、氯、溴或-NO₂,则R¹为 C_{2-20} 烷基、 C_{2-20} 烯基、 C_{4-20} 炔基、-W、-(L-Y)_p-Z或-C(O) R^{1a} ;并且其中当X不存在时,R¹为-CH₂CH₂NH(7-氯-4-喹啉基),并且R^{2a}和R^{2b}为氢,则R^{3a}和R^{3b}独立地选自氢、 C_{1-20} 烷基、 C_{2-20} 烯基、 C_{2-20} 炔基、 C_{1-20} 烷氧基、氟、溴、碘、-CN或-NO₂。

[0086] 在一些实施方案中, R^1 为氢、 C_{1-20} 烷基、 C_{2-20} 烯基、 C_{2-20} 炔基、-W、-(L-Y)_p-Z或-C(O) R^{1a} ,其中每个烷基、烯基和炔基任选地被 C_{1-20} 烷氧基、羟基或-NR^{1b}R^{1c}取代;W为 C_{3-12} 环烷基、 C_{6-12} 芳基或5至12元杂芳基,其中5至12元杂芳基具有1至4个为N、O和S的杂原子,并且其中

每个环烷基、芳基和杂芳基任选地被 C_{1-20} 烷基、 C_{2-20} 烯基或 C_{2-20} 炔基取代；每个L独立地为不存在、 C_{1-10} 亚烷基、 C_{2-10} 亚烯基或 C_{2-10} 亚炔基；每个Y独立地为不存在、-O-、-NH-、-NHC(O)-、-NHC(O)NH-、-NHSO₂-、-OC(O)-、-OC(O)NH-、-C(O)-或-SO₂-；Z为荧光团、光敏剂、卟啉、化学治疗药物或甾醇；R^{1a}为 C_{1-20} 烷基、 C_{2-20} 烯基或 C_{2-20} 炔基，其中每个烷基、烯基和炔基任选地被 C_{1-20} 烷氧基、羟基或-NR^{1b}R^{1c}取代；R^{1b}为氢、 C_{1-20} 烷基、 C_{2-20} 烯基或 C_{2-20} 炔基；R^{1c}为氢、 C_{1-20} 烷基、 C_{2-20} 烯基、 C_{2-20} 炔基或-L-W；R^{2a}、R^{2b}、R^{3a}和R^{3b}各自独立地为氢、 C_{1-20} 烷基、 C_{2-20} 烯基、 C_{2-20} 炔基、 C_{1-20} 烷氧基、卤素、-CN或-NO₂；m和n独立地为1至10的整数；p独立地为1至20的整数；并且每个X独立地为不存在或-O⁻，其中当X不存在时，R^{2a}和R^{2b}为氢，并且R^{3a}和R^{3b}各自独立地为氢、-OMe、氟、氯、溴或-NO₂，则R¹为 C_{2-20} 烷基、 C_{2-20} 烯基、 C_{4-20} 炔基、-W、-(L-Y)_p-Z或-C(O)R^{1a}；并且其中当X不存在时，R¹为-CH₂CH₂NH(7-氯-4-喹啉基)，并且R^{2a}和R^{2b}为氢，则R^{3a}和R^{3b}独立地选自氢、 C_{1-20} 烷基、 C_{2-20} 烯基、 C_{2-20} 炔基、 C_{1-20} 烷氧基、氟、溴、碘、-CN或-NO₂。

[0087] 在一些实施方案中，R¹为氢、 C_{1-40} 烷基、 C_{2-40} 烯基、 C_{2-40} 炔基、-W、-(L-Y)_p-Z或-C(O)R^{1a}。在一些实施方案中，R¹为 C_{1-40} 烷基、 C_{2-40} 烯基、-(L-Y)_p-Z或-C(O)R^{1a}。

[0088] 在一些实施方案中，R¹为 C_{1-40} 烷基。在一些实施方案中，R¹为 C_{1-25} 烷基。在一些实施方案中，R¹为 C_{1-20} 烷基。在一些实施方案中，R¹为 C_{10-25} 烷基。在一些实施方案中，R¹为 C_{10-20} 烷基。在一些实施方案中，R¹为 C_{12-22} 烷基。在一些实施方案中，R¹为 C_{12-18} 烷基。

[0089] 在一些实施方案中，R¹为 C_{2-40} 烯基。在一些实施方案中，R¹为 C_{20-40} 烯基。在一些实施方案中，R¹为 C_{30-40} 烯基。在一些实施方案中，R¹为 C_{2-40} 炔基。在一些实施方案中，R¹为 C_{20-40} 炔基。在一些实施方案中，R¹为 C_{30-40} 炔基。

[0090] 在一些实施方案中，R¹为W。在一些实施方案中，W为 C_{3-12} 环烷基、 C_{6-12} 芳基或具有1至4个各自独立地为N、O或S的杂原子的5至12元杂芳基，并且其中每个环烷基、芳基和杂芳基任选地被 C_{1-40} 烷基、 C_{2-40} 烯基或 C_{2-40} 炔基取代。在一些实施方案中，W为 C_{5-12} 环烷基、 C_{6-12} 芳基或具有1至4个各自独立地为N、O或S的杂原子的5至12元杂芳基。在一些实施方案中，W为 C_{5-12} 环烷基。在一些实施方案中，W为 C_{5-8} 环烷基。在一些实施方案中，W为环戊基或环己基。

[0091] 在一些实施方案中，R¹为-(L-Y)_p-Z。在一些实施方案中，p为1至20的整数。在一些实施方案中，p为1至10的整数。在一些实施方案中，p为1至5的整数。在一些实施方案中，p为1、2、3、4或5。在一些实施方案中，p为1。

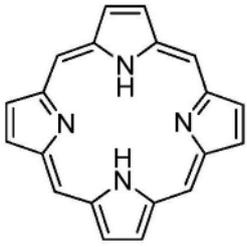
[0092] 在一些实施方案中，L为 C_{1-20} 亚烷基、 C_{2-20} 亚烯基或 C_{2-20} 亚炔基。在一些实施方案中，L为 C_{1-20} 亚烷基。在一些实施方案中，L为 C_{1-10} 亚烷基。在一些实施方案中，L为 C_{1-5} 亚烷基。

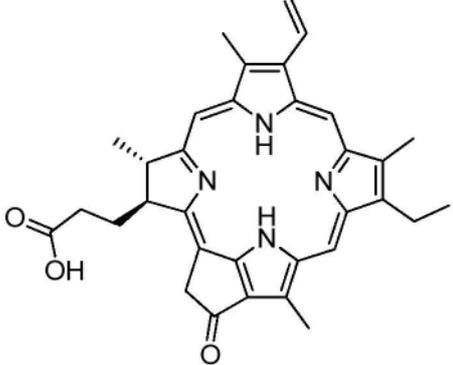
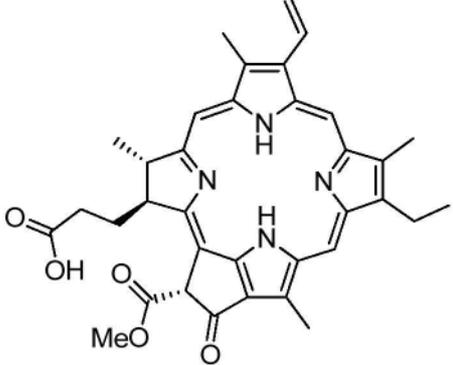
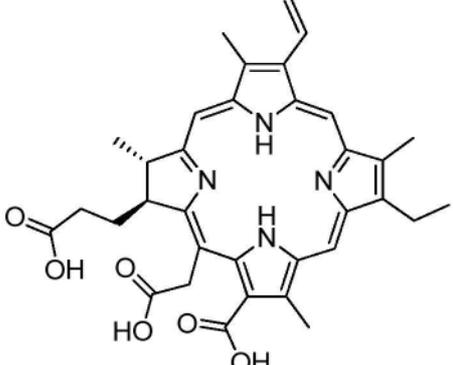
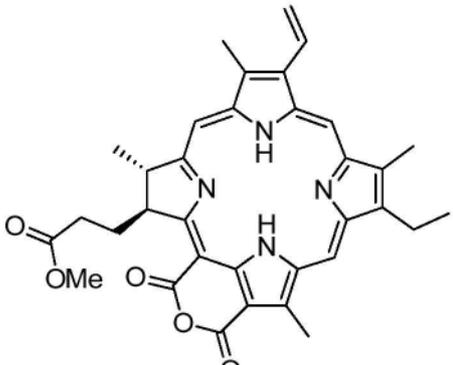
[0093] 在一些实施方案中，Y为不存在、-O-、-NH-、-NHC(O)-、-NHC(O)NH-、-NHSO₂-、-OC(O)-、-OC(O)NH-、-C(O)-或-SO₂-。在一些实施方案中，Y为不存在、-NH-、-NHC(O)-、-NHC(O)NH-、-OC(O)-、-OC(O)NH-或-C(O)-。在一些实施方案中，Y为不存在、-NH-、-NHC(O)-或-NHC(O)NH-。在一些实施方案中，Y为不存在、-NH-或-NHC(O)-。

[0094] 在一些实施方案中，Z为荧光团、光敏剂、卟啉、化学治疗药物、甾醇、 C_{3-12} 环烷基、具有1至4个各自独立地为N、O或S的杂原子的3至12元杂环烷基、 C_{6-12} 芳基、具有1至4个各自独立地为N、O或S的杂原子的5至12元杂芳基、-OH或-NH₂。

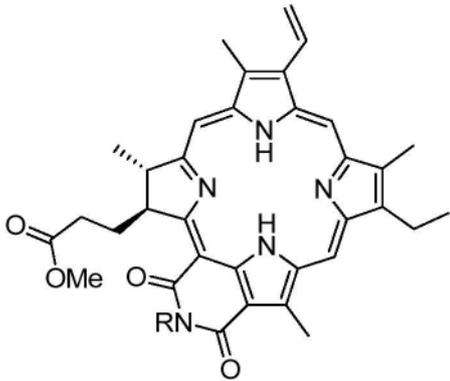
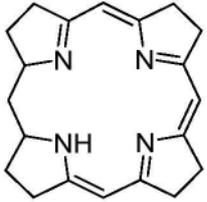
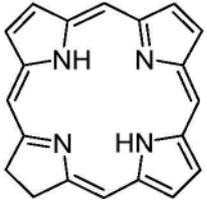
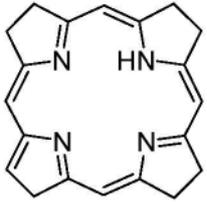
[0095] 可用于本发明的光敏剂包括但不限于卟啉、苯并卟啉、咕啉、二氢卟吩、细菌叶绿素、咕吩(corphin)或它们的衍生物。代表性的光敏剂如下所示：

[0096]

| 光敏剂 | 结构 |
|-----|--|
| 卟啉 |  <p>The image shows the chemical structure of Porphyrin, a macrocyclic ring consisting of four pyrrole rings linked by methine bridges. The structure is symmetrical and contains two nitrogen atoms, each with a hydrogen atom attached, forming a central cavity.</p> |

| 光敏剂 | 结构 |
|---------|---|
| 焦脱镁叶绿酸a |  <p>The structure shows a central magnesium atom coordinated by four nitrogen atoms in a porphyrin-like ring. The ring is substituted with a vinyl group, a methyl group, and a phytyl side chain. A propionic acid side chain is attached to one of the pyrrole rings.</p> |
| 脱镁叶绿酸 |  <p>The structure is similar to Protochlorophyllide a, but the central magnesium atom is replaced by a methoxy group (MeO) coordinated to the nitrogen atoms.</p> |
| 二氢卟吩e6 |  <p>The structure is similar to Protochlorophyllide a, but the central magnesium atom is replaced by two hydrogen atoms (H) coordinated to the nitrogen atoms.</p> |
| 红紫素 |  <p>The structure is similar to Protochlorophyllide a, but the central magnesium atom is replaced by an oxygen atom coordinated to the nitrogen atoms.</p> |

[0097]

| 光敏剂 | 结构 |
|-----------|---|
| 红紫素二酰亚胺 |  |
| [0098] 咕啉 |  |
| 二氢卟吩 |  |
| 咕吩 |  |

[0099] 在一些实施方案中,光敏剂是卟啉、苯并卟啉、咕啉、二氢卟吩、细菌叶绿素、咕吩或它们的衍生物。在一些实施方案中,光敏剂化合物是卟啉、焦脱镁叶绿酸a、脱镁叶绿酸、二氢卟吩e6、红紫素、红紫素二酰亚胺、维替泊芬、光卟啉、罗他泊芬、塔拉泊芬(talporfin)或替莫泊芬。在一些实施方案中,光敏剂是焦脱镁叶绿酸a。在一些实施方案中,光敏剂是脱镁叶绿酸a。在一些实施方案中,光敏剂是卟啉。

[0100] 任何合适的卟啉都可用于本发明的化合物中。适用于本发明的代表性卟啉包括但不限于焦脱镁叶绿酸a、脱镁叶绿酸、二氢卟吩e6、红紫素或红紫素二酰亚胺。在一些实施方案中,卟啉可以是脱镁叶绿酸a。在一些实施方案中,卟啉可以是焦脱镁叶绿酸a。

[0101] 在一些实施方案中,Z为卟啉、甾醇、6至12元杂环烷基、8至12元杂芳基、-OH或-NH₂,其中6至12元杂环烷基和8至12元杂芳基具有1至4个为N、O和S的杂原子。在一些实施方案中,Z为卟啉、胆酸、吲哚啉、异吲哚啉、1-异吲哚啉酮、邻苯二甲酰亚胺、邻苯二甲酸酐、-OH或-NH₂。

[0102] 在一些实施方案中,p为1;L为C₄₋₅亚烷基;Y为不存在、-NH-或-NHC(O)-;Z为卟啉、胆酸、异吲哚啉、邻苯二甲酰亚胺、-OH或-NH₂。

[0103] 在一些实施方案中, R^1 为 $-C(O)R^{1a}$ 。在一些实施方案中, R^{1a} 为 C_{1-40} 烷基、 C_{2-40} 烯基或 C_{2-40} 炔基, 其中每个烷基、烯基和炔基任选地被 C_{1-40} 烷氧基、羟基或 $-NR^{1b}R^{1c}$ 取代。在一些实施方案中, R^{1a} 为 C_{1-20} 烷基、 C_{2-20} 烯基或 C_{2-20} 炔基, 其中每个烷基、烯基和炔基任选地被 C_{1-20} 烷氧基、羟基或 $-NR^{1b}R^{1c}$ 取代。在一些实施方案中, R^{1a} 为 C_{1-10} 烷基、 C_{2-10} 烯基或 C_{2-10} 炔基。在一些实施方案中, R^{1a} 为 C_{1-10} 烷基。在一些实施方案中, R^{1a} 为 C_{1-5} 烷基。在一些实施方案中, R^{1a} 为甲基、乙基、丙基或丁基。

[0104] 在一些实施方案中, R^{1b} 为 C_{1-40} 烷基、 C_{2-40} 烯基或 C_{2-40} 炔基。在一些实施方案中, R^{1b} 为 C_{1-20} 烷基、 C_{2-20} 烯基或 C_{2-20} 炔基。在一些实施方案中, R^{1b} 为 C_{1-10} 烷基。在一些实施方案中, R^{1b} 为 C_{1-5} 烷基。在一些实施方案中, R^{1b} 为甲基、乙基、丙基或丁基。

[0105] 在一些实施方案中, R^{1c} 为 C_{1-40} 烷基、 C_{2-40} 烯基、 C_{2-40} 炔基或 $-L-W$ 。在一些实施方案中, R^{1c} 为 C_{1-20} 烷基、 C_{2-20} 烯基、 C_{2-20} 炔基或 $-L-W$ 。在一些实施方案中, R^{1c} 为 C_{1-10} 烷基。在一些实施方案中, R^{1c} 为 C_{1-5} 烷基。在一些实施方案中, R^{1c} 为甲基、乙基、丙基或丁基。

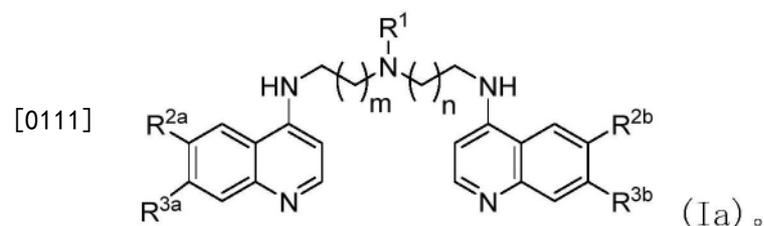
[0106] 在一些实施方案中, R^{2a} 和 R^{2b} 各自独立地为氢、 C_{1-20} 烷基、 C_{2-20} 烯基、 C_{2-20} 炔基、 C_{1-20} 烷氧基、卤素、 $-CN$ 或 $-NO_2$ 。在一些实施方案中, R^{2a} 和 R^{2b} 各自独立地为氢、 C_{1-20} 烷基或卤素。在一些实施方案中, R^{2a} 和 R^{2b} 各自独立地为氢或卤素。在一些实施方案中, R^{2a} 和 R^{2b} 各自独立地为氢、氟、氯、溴或碘。在一些实施方案中, R^{2a} 和 R^{2b} 各自独立地为氢。

[0107] 在一些实施方案中, R^{3a} 和 R^{3b} 各自独立地为氢、 C_{1-20} 烷基、 C_{2-20} 烯基、 C_{2-20} 炔基、 C_{1-20} 烷氧基、卤素、 $-CN$ 或 $-NO_2$ 。在一些实施方案中, R^{3a} 和 R^{3b} 各自独立地为氢、 C_{1-20} 烷基或卤素。在一些实施方案中, R^{3a} 和 R^{3b} 各自独立地为氢或卤素。在一些实施方案中, R^{3a} 和 R^{3b} 各自独立地为氢、氟、氯、溴或碘。在一些实施方案中, R^{3a} 和 R^{3b} 各自独立地为氯。

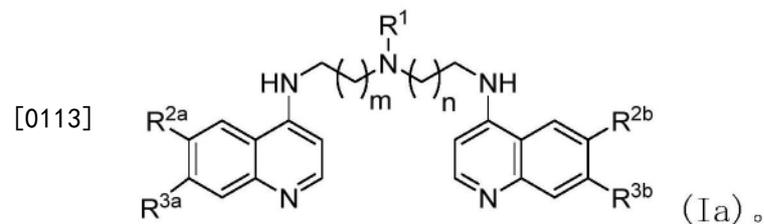
[0108] 在一些实施方案中, m 和 n 独立地为 1 至 10 的整数。在一些实施方案中, m 和 n 独立地为 1 至 5 的整数。在一些实施方案中, m 和 n 独立地为 1、2、3、4 或 5。在一些实施方案中, m 和 n 各自独立地为 1。

[0109] 在一些实施方案中, 每个 X 独立地为不存在或 $-O^-$ 。在一些实施方案中, 每个 X 不存在。在一些实施方案中, 每个 X 为 $-O^-$ 。

[0110] 在一些实施方案中, 每个 X 不存在。在一些实施方案中, 化合物为式 (Ia) 的化合物:

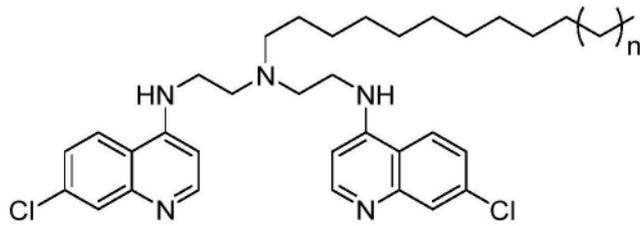


[0112] 在一些实施方案中, R^1 为 C_{1-20} 烷基, 并且化合物为式 (Ia) :



[0114] 在一些实施方案中, 化合物具有以下结构:

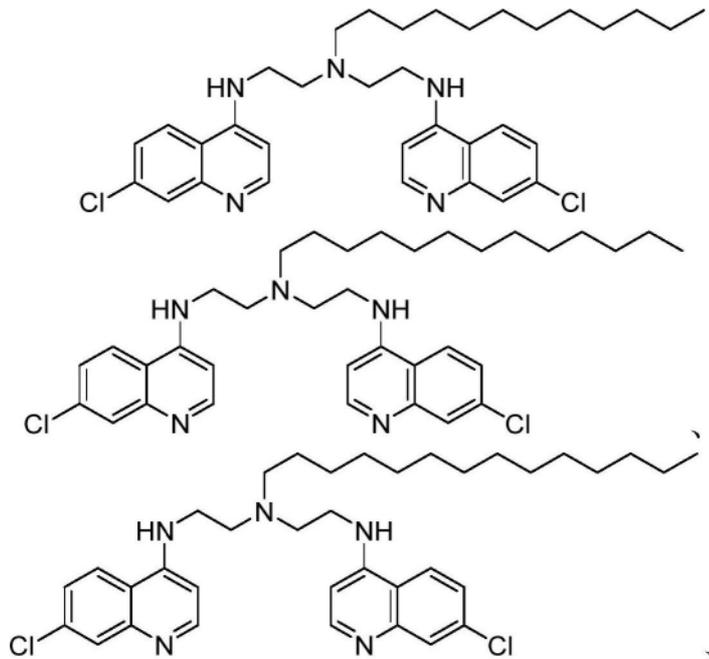
[0115]

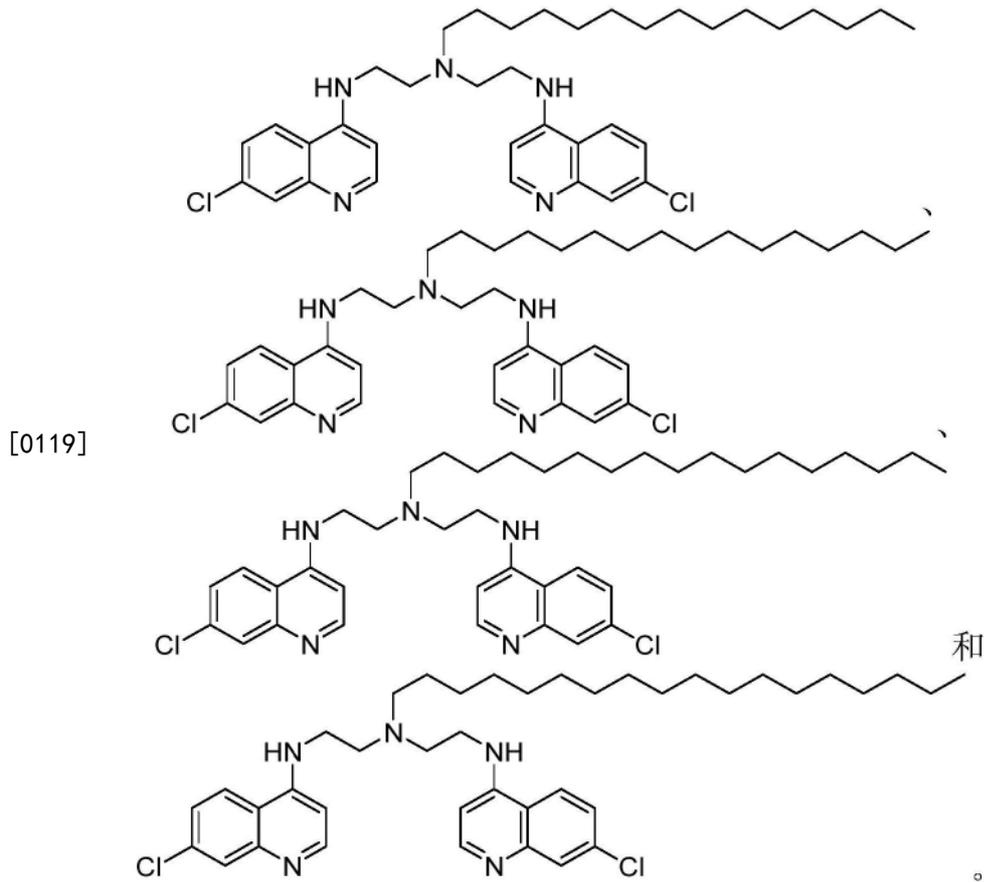


[0116] 其中n为1至7的整数。

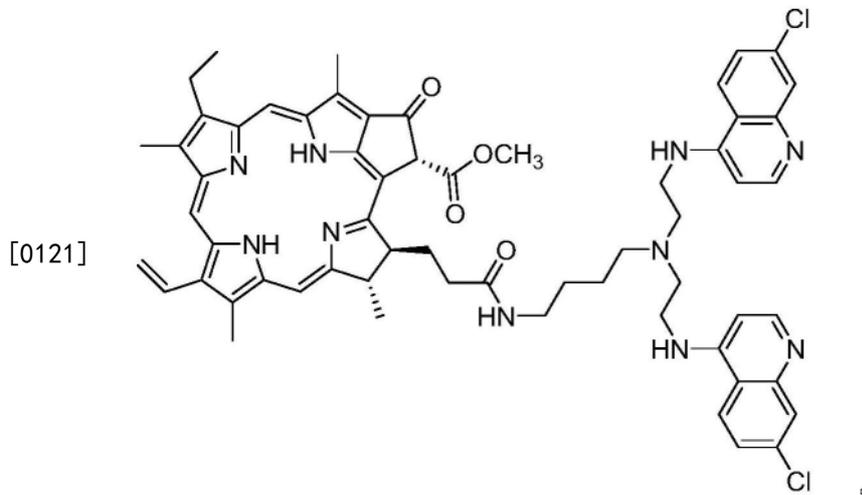
[0117] 在一些实施方案中,化合物选自由以下项组成的组:

[0118]

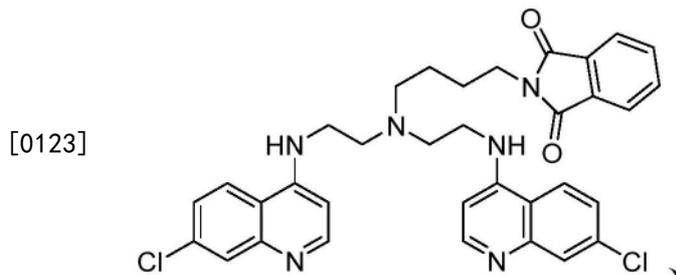




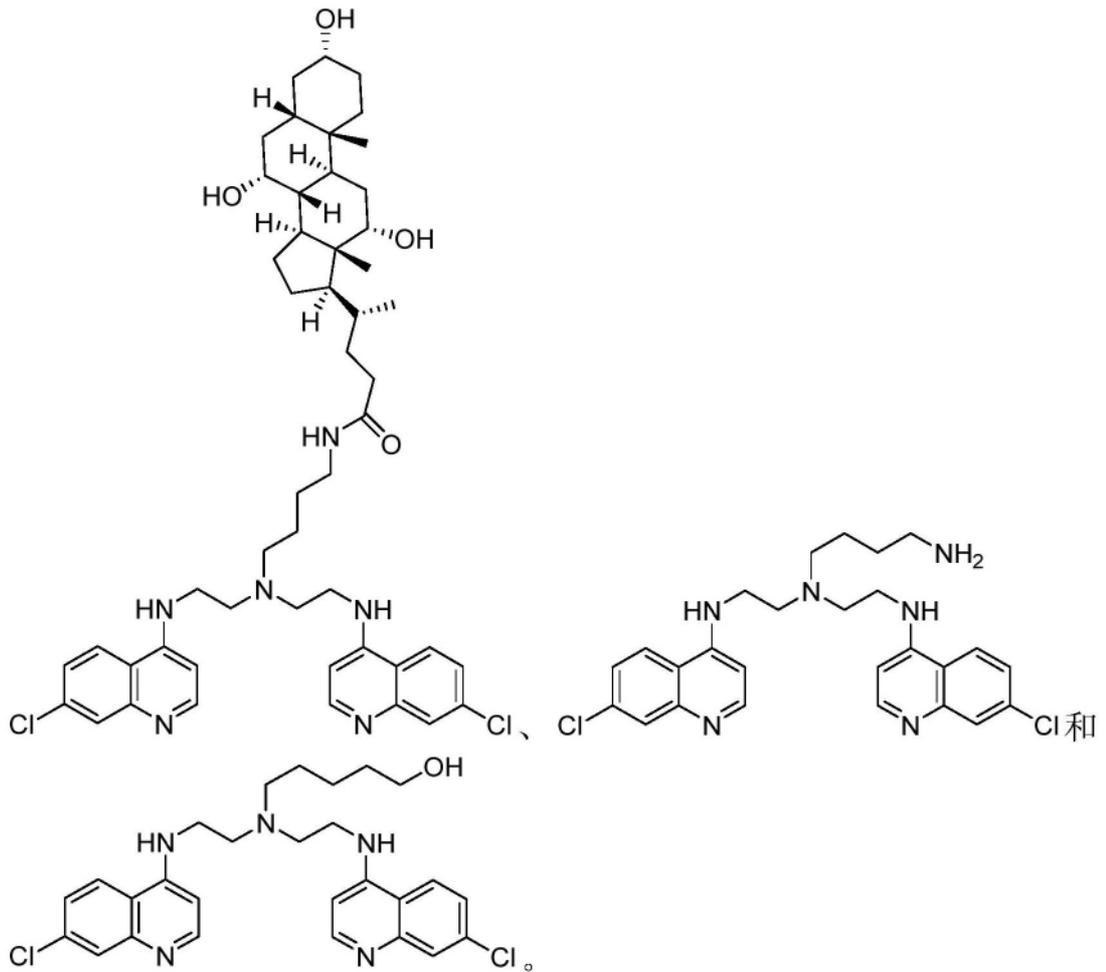
[0120] 在一些实施方案中,化合物为:



[0122] 在一些实施方案中,化合物选自由以下项组成的组:

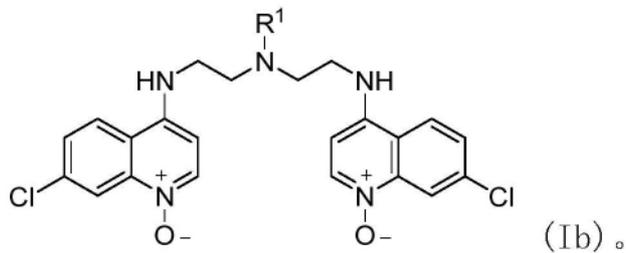


[0124]



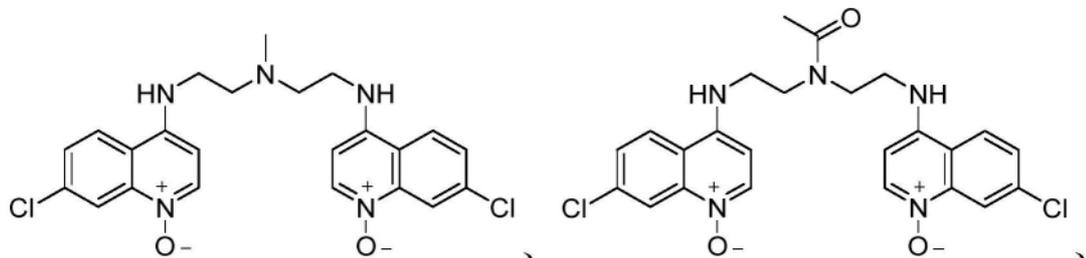
[0125] 在一些实施方案中,每个X为-O⁻。在一些实施方案中,化合物为式(Ib)的化合物:

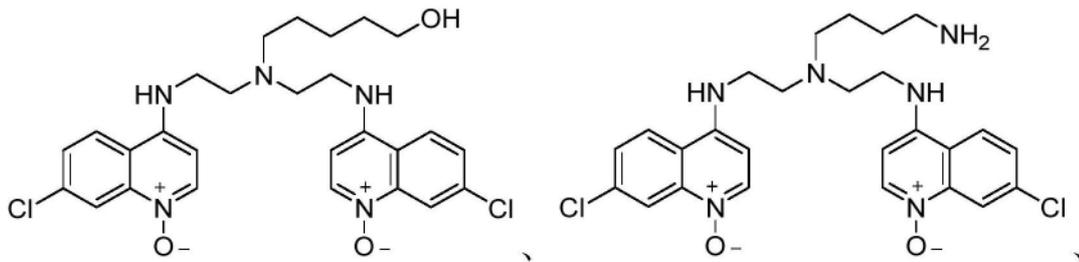
[0126]



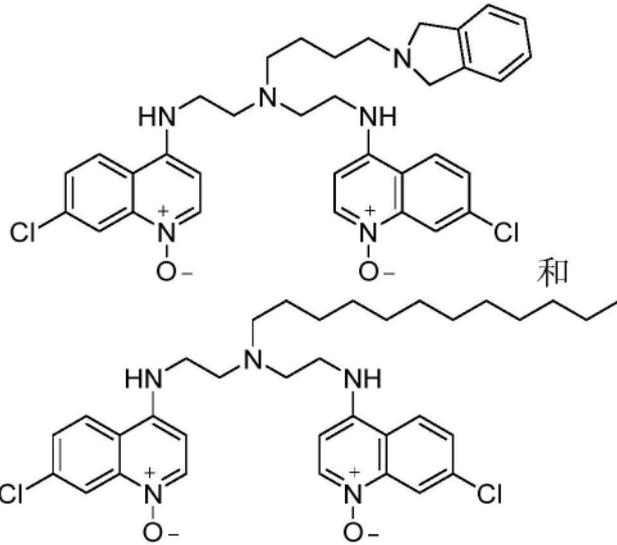
[0127] 在一些实施方案中,化合物选自由以下项组成的组:

[0128]

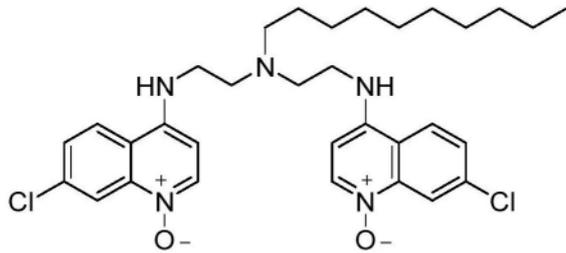




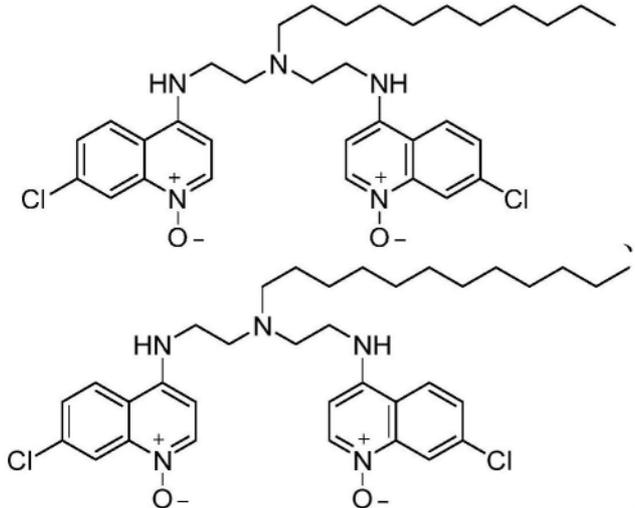
[0129]



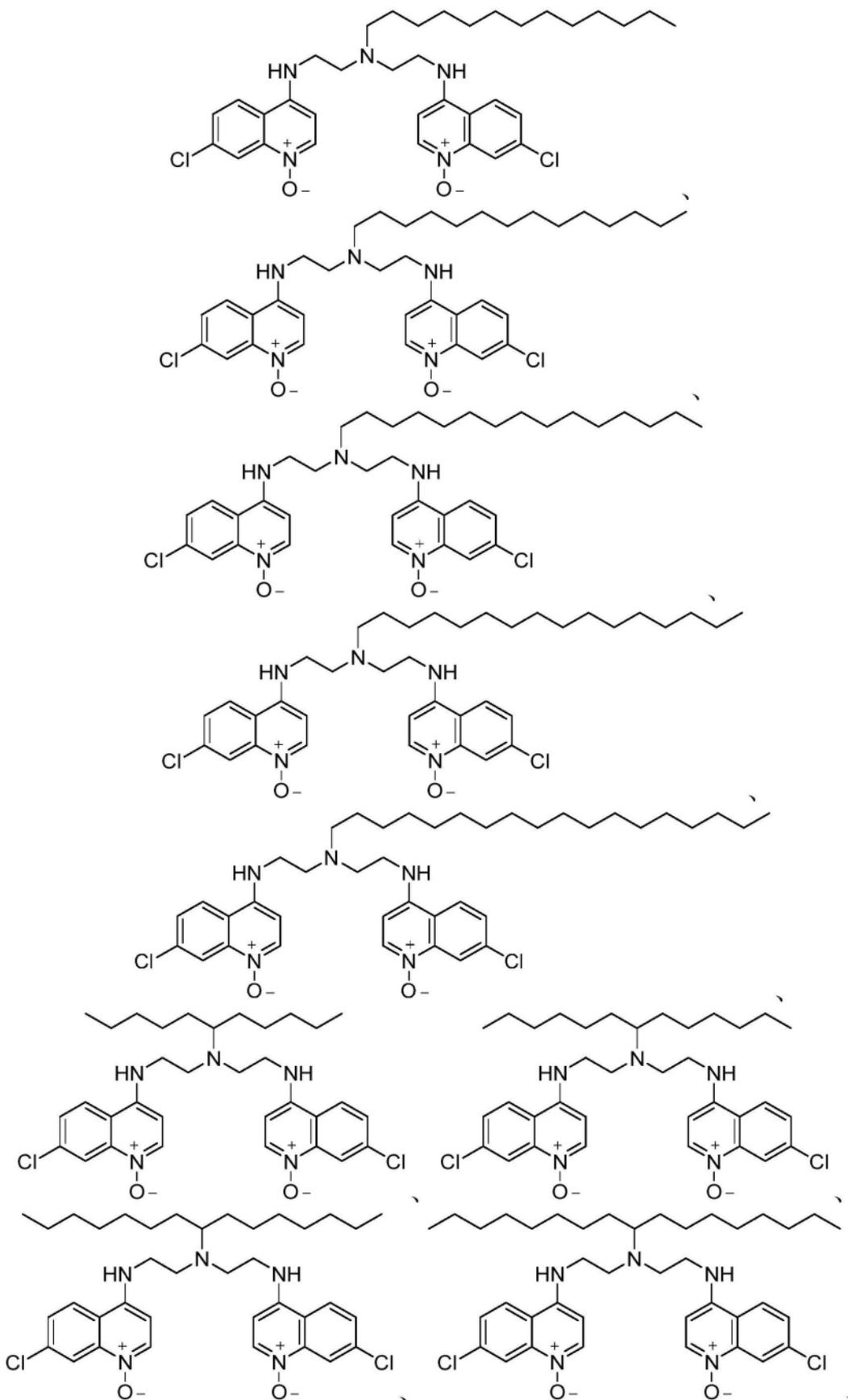
[0130] 在一些实施方案中,化合物选自由以下项组成的组:



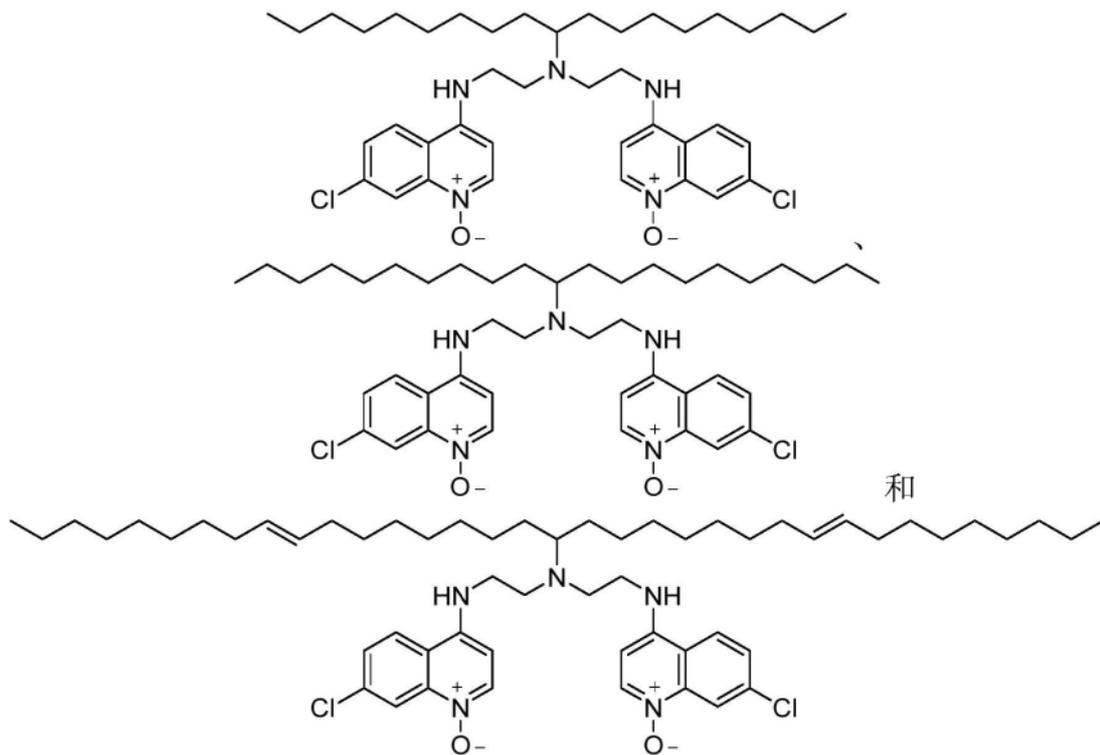
[0131]



[0132]



[0133]



[0134] 本发明包括本发明的化合物的所有互变异构体和立体异构体,其为混合物形式或为纯的或基本上纯的形式。本发明的化合物可在碳原子上具有不对称中心,因此本发明的化合物可以非对映体形式或对映体形式或其混合物存在。所有构象异构体(例如,顺式和反式异构体)和所有光学异构体(例如,对映异构体和非对映异构体)、此类异构体的外消旋混合物、非对映异构混合物和其他混合物,以及溶剂化物、水合物、同晶体、多晶型物和互变异构体都在本发明的范围内。根据本发明的化合物可使用非对映异构体、对映异构体或外消旋混合物作为起始原料来制备。此外,非对映异构体产物和对映异构体产物可通过色谱法、分级结晶或本领域技术人员已知的其他方法分离。

[0135] 本发明还包括本发明的同位素标记化合物,其中一个或多个原子被一个或多个具有特定原子质量或质量数的原子取代。可掺入本发明化合物中的同位素的示例包括但不限于氢、碳、氮、氧、氟、硫和氯的同位素(诸如 ^2H 、 ^3H 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{18}O 、 ^{17}O 、 ^{18}F 、 ^{35}S 和 ^{36}Cl)。本发明的同位素标记化合物可用于测定化合物及其前药和代谢物的组织分布;用于此类测定的优选同位素包括 ^3H 和 ^{14}C 。此外,在某些情况下,用较重的同位素诸如氘(^2H)取代可提供增加的代谢稳定性,这提供了治疗优势诸如延长的体内半衰期或减少的剂量需求。本发明的同位素标记化合物通常可根据本领域技术人员已知的方法通过用同位素标记的试剂代替非同位素标记的试剂来制备。本发明的化合物可在芳环中邻近碱性胺的位置和甲氧基取代基的甲基上进行同位素标记。

[0136] 本发明的化合物还可以是药学上可接受的盐形式,诸如本发明化合物的酸盐或碱盐。药学上可接受的盐的例示性示例是无机酸(盐酸、氢溴酸、磷酸等)盐、有机酸(富马酸、乙酸、丙酸、谷氨酸、柠檬酸等)盐、季铵(甲基碘、乙基碘等)盐。应当理解,药学上可接受的盐是无毒的。关于合适的药学上可接受的盐的其他信息可见于《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences),第17版,宾夕法尼亚州伊斯顿的Mack出版公司,1985年,该文献以引用方式并入本文。

[0137] IV. 纳米载体

[0138] 在一些实施方案中,本发明提供了具有内部和外部的纳米载体,该纳米载体包含多种本发明的化合物或其药学上可接受的盐,其中每种化合物在水性溶剂中自组装以形成该纳米载体,使得疏水袋在该纳米载体的内部形成,并且亲水基团在该纳米载体的外部自组装。

[0139] 本发明的纳米载体的直径可以是任何合适的尺寸。在一些实施方案中,纳米载体可具有5nm至200nm的直径。在一些实施方案中,纳米载体可具有10nm至150nm的直径。在一些实施方案中,纳米载体可具有50nm至150nm的直径。在一些实施方案中,纳米载体可具有100nm至150nm的直径。在一些实施方案中,纳米载体可具有约80nm、90nm、100nm、110nm、120nm或130nm的直径。在一些实施方案中,纳米载体可具有约100nm的直径。

[0140] 纳米载体的外部可用于细胞或溶酶体靶向。纳米载体可靶向细胞或溶酶体以抑制自噬。在一些实施方案中,纳米载体可靶向溶酶体破坏、溶酶体功能障碍、自噬抑制或它们的组合。在一些实施方案中,纳米载体靶向溶酶体。

[0141] 在一些实施方案中,疏水袋由本发明的化合物的R¹基团形成。在一些实施方案中,纳米载体还包含一种或多种螯合在纳米载体的疏水袋中的疏水性药物或显像剂。

[0142] 可用于本发明的疏水性药物可以是本领域技术人员已知的任何疏水性药物。可用于本发明的疏水性药物包括但不限于脱氧胆酸、脱氧胆酸盐、瑞喹莫德、加德里莫德(gardiquimod)、咪喹莫特、紫杉烷类(例如,紫杉醇、多西他赛、卡巴他赛、巴卡丁III、10-脱乙酰基巴卡丁、红豆杉A、红豆杉B或红豆杉C)、阿霉素、依托泊苷、伊立替康、SN-38、环孢素A、鬼臼毒素、卡莫司汀、两性霉素、伊沙匹隆、帕土匹龙(埃博霉素类)、雷帕霉素和铂类药物。其他药物包括非甾体抗炎药和长春花生物碱,诸如长春碱和长春新碱。

[0143] 可用于本发明的其他疏水性药物包括但不限于化学治疗剂、分子靶向剂、免疫调节剂、免疫治疗剂、放射治疗剂或它们的组合。

[0144] 在一些实施方案中,疏水性药物为化学治疗剂、分子靶向剂、免疫治疗剂、放射治疗剂或它们的组合。在一些实施方案中,疏水性药物为免疫治疗剂。可用于本发明的免疫治疗剂包括但不限于HCQ、Lys05、JQ1、雷帕霉素、那布卡辛、伊匹单抗、纳武单抗、帕博利珠单抗、阿替利珠单抗、阿维鲁单抗和德瓦鲁单抗。

[0145] 在一些实施方案中,疏水性药物为放射治疗剂。可用于本发明的放射治疗剂包括但不限于 β -拉帕酮、顺铂、尼莫拉唑、西妥昔单抗、米索硝唑和替拉扎明。

[0146] 在一些实施方案中,疏水性药物为化学治疗剂或分子靶向剂。化学治疗剂或分子靶向剂包括但不限于柔红霉素、阿霉素、紫杉醇、多西他赛、abraxane、硼替佐米、依托泊苷、来那度胺、阿波唑、卡铂、顺铂、奥沙利铂、长春碱、长春新碱、曲妥珠单抗、厄洛替尼、伊马替尼、尼洛替尼和维莫非尼。

[0147] 在一些实施方案中,疏水性药物为FLT-3抑制剂、VEGFR抑制剂、EGFR TK抑制剂、极光激酶抑制剂、PIK-1调节剂、Bcl-2抑制剂、HDAC抑制剂、c-MET抑制剂、PARP抑制剂、Cdk抑制剂、EGFR TK抑制剂、IGFR-TK抑制剂、抗HGF抗体、PI3激酶抑制剂、AKT抑制剂、JAK/STAT抑制剂、检查点-1或2抑制剂、局灶性粘附激酶抑制剂、MAP激酶(mek)抑制剂、VEGF捕获抗体、依维莫司、曲贝替定、abraxane、TLK 286、AV-299、DN-101、帕唑帕拉尼、GSK690693、RTA744、ON 0910.Na、AZD 6244(ARRY-142886)、AMN-107、TKI-258、GSK461364、AZD 1152、恩扎妥林、

凡德他尼、ARQ-197、MK-0457、MLN8054、PHA-739358、R-763、AT-9263、培美曲塞、厄洛替尼、达沙替尼、尼洛替尼、德卡坦尼(decatanib)、帕尼单抗、氨柔比星、奥戈伏单抗、Lep-etu、诺拉曲塞、azd2171、巴他布林、奥法木单抗、扎木单抗、艾特唑林、粉防己碱、卢比替康、替米利芬、奥利默森(oblimersen)、替西木单抗、伊匹单抗、棉子酚、Bio 111、131-I-TM-601、ALT-110、BIO 140、CC 8490、西仑吉肽、吉马替康、IL13-PE38QQR; INO 1001、IPdR1 KRX-0402、硫蒽酮、LY 317615、neuradiab、维特斯潘(vitespan)、Rta 744、Sdx 102、他仑帕奈、阿曲生坦、Xr 311、罗米地辛、ADS-100380、舒尼替尼、5-氟尿嘧啶、伏立诺他、依托泊苷、吉西他滨、阿霉素、伊立替康、阿霉素脂质体、5'-脱氧-5-氟尿苷、长春新碱、替莫唑胺、ZK-304709、塞利西利; PD0325901、AZD-6244、卡培他滨、L-谷氨酸、N-[4-[2-(2-氨基-4,7-二氢-4-氧代-1H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)乙基]苯甲酰基]-二钠盐七水合物、喜树碱、PEG-标记的伊立替康、他莫昔芬、柠檬酸托瑞米芬、阿那曲唑、依西美坦、来曲唑、DES(己烯雌酚)、雌二醇、雌激素、结合雌激素、贝伐单抗、IMC-1C11、CHIR-258; 3-[5-(甲磺酰基哌啶甲基)-吡啶基辛-喹诺酮、伐他拉尼、AG-013736、AVE-0005、[D-Ser(Bu t)6, Azgly 10]的乙酸盐(pyro-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(Bu t)-Leu-Arg-Pro-Azgly-NH2)乙酸盐 $[C_{59}H_{84}N_{18}O_{14}-(C_2H_4O_2)_X]$, 其中X=1至2.4]、醋酸戈舍瑞林、醋酸亮丙瑞林、双羟萘酸曲普瑞林、醋酸甲羟孕酮、己酸羟孕酮、醋酸甲地孕酮、雷洛昔芬、比卡鲁胺、氟他胺、尼鲁米特、醋酸甲地孕酮、CP-724714; TAK-165、HKI-272、厄洛替尼、拉帕替尼、卡奈替尼、ABX-EGF抗体、爱必妥、EKB-569、PKI-166、GW-572016、洛那法尼(Ionafarnib)、BMS-214662、替吡法尼; 氨磷汀、NVP-LAQ824、辛二酰苯胺异羟肟酸、丙戊酸、曲古抑菌素A、FK-228、SU11248、索拉非尼、KRN951、氨鲁米特、安吡啶、阿那格雷、L-天冬酰胺酶、卡介苗(BCG)疫苗、博来霉素、布舍瑞林、白消安、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、氯膦酸盐、环丙孕酮、阿糖胞苷、达卡巴嗪、放线菌素、柔红霉素、己烯雌酚、表柔比星、氟达拉滨、氟氢可的松、氟甲睾酮、氟他胺、吉西他滨、格列卫(gleevec)、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、伊马替尼、亮丙瑞林、左旋咪唑、环己亚硝脲、氮芥、美法仑、6-巯基嘌呤、美司钠、甲氨蝶呤、丝裂霉素、米托坦、米托蒽醌、尼鲁米特、奥曲肽、奥沙利铂、帕米膦酸盐、喷司他丁、普卡霉素、吡吩姆钠、丙卡巴肼、雷替曲塞、利妥昔单抗、链脲菌素、替尼泊苷、睾酮、沙利度胺、硫鸟嘌呤、噻替派、维甲酸、长春地辛、13-顺-视黄酸、苯丙氨酸氮芥、乌拉莫司汀、雌莫司汀、六甲蜜胺、氟尿苷、5-脱氧尿苷、阿糖胞苷、6-巯基嘌呤、脱氧助间型霉素、骨化三醇、戊柔比星、光神霉素、长春碱、长春瑞滨、拓扑替康、razoxin、马立马司他、COL-3、新伐司他(neovastat)、BMS-275291、角鲨胺、内皮抑素、SU5416、SU6668、EMD121974、白介素-12、IM862、血管抑素、vitaxin、屈洛昔芬、idoxifene、螺内酯、非那雄胺、西咪替丁、曲妥珠单抗、地尼白介素、吉非替尼、硼替佐米、紫杉醇、伊立替康、拓扑替康、阿霉素、多西他赛、长春瑞滨、贝伐单抗(单克隆抗体)和爱必妥、不含氢化蓖麻油的紫杉醇、埃博霉素B、BMS-247550、BMS-310705、屈洛昔芬、4-羟基他莫昔芬、哌喷昔芬、ERA-923、阿佐昔芬、氟维司群、阿考比芬、拉索昔芬、艾多昔芬、TSE-424、HMR-3339、ZK186619、PTK787/ZK 222584、VX-745、PD 184352、雷帕霉素、40-0-(2-羟乙基)-雷帕霉素、替西罗莫司、AP-23573、RAD001、ABT-578、BC-210、LY294002、LY292223、LY292696、LY293684、LY293646、渥曼青霉素、ZM336372、L-779,450、PEG-filgrastim、阿法达贝泊汀、促红细胞生成素、粒细胞集落刺激因子、唑仑二膦酸盐(zolendronate)、泼尼松、西妥昔单抗、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、组氨瑞林、聚乙二醇化干扰素 α -2a、干扰素 α -2a、聚乙二

醇化干扰素 α -2b、干扰素 α -2b、阿扎胞苷、PEG-L-天冬酰胺酶、来那度胺、吉妥珠单抗、氢化可的松、白介素-11、右雷佐生、阿仑单抗、全反式维甲酸、酮康唑、白介素-2、甲地孕酮、免疫球蛋白、氮芥、甲泼尼龙、替伊莫单抗、雄激素、地西他滨、六甲蜜胺、贝沙罗汀、托西莫单抗、三氧化二砷、可的松、editronate、米托坦、环孢菌素、脂质体柔红霉素、埃德温娜-天冬酰胺酶、锝89、卡索匹坦、奈妥吡坦、NK-1受体拮抗剂、帕洛诺司琼、阿瑞匹坦、苯海拉明、羟嗪、甲氧氯普胺、劳拉西泮、阿普唑仑、氟哌啶醇、氟哌利多、屈大麻酚、地塞米松、甲泼尼龙、丙氯拉嗪、格拉司琼、昂丹司琼、多拉司琼、托烷司琼、sspegfilgrastim、促红细胞生成素、依泊汀 α 和达依泊汀 α 、伊匹单抗、维莫非尼或它们的组合。在一些实施方案中，疏水性药物为HCQ、Lys05、JQ1、雷帕霉素、那布卡辛、伊匹单抗、纳武单抗、帕博利珠单抗、阿替利珠单抗、阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗、 β -拉帕酮、顺铂、尼莫拉唑、西妥昔单抗、米索硝唑、替拉扎明、柔红霉素、阿霉素、紫杉醇、多西他赛、abraxane、硼替佐米、依托泊苷、来那度胺、阿波唑、卡铂、顺铂、奥沙利铂、长春碱、长春新碱、曲妥珠单抗、厄洛替尼、伊马替尼、尼洛替尼、维莫非尼或它们的组合。

[0148] 在一些实施方案中，纳米载体包含多种本发明的化合物，具有如上所述的化合物结构。

[0149] V. 制剂和施用

[0150] 本发明的化合物、纳米载体和组合物可制备成多种口服、肠胃外和局部剂型。口服制剂包括片剂、丸剂、散剂、糖衣丸、胶囊、液体剂、锭剂、扁囊剂、凝胶、糖浆剂、浆剂、混悬剂等，适合患者摄入。本发明的组合物也可通过注射施用，即静脉内、肌肉内、皮内、皮下、十二指肠内或腹膜内注射。此外，本文所述的组合物可通过吸入施用，例如鼻内施用。另外，本发明的组合物可经皮施用。本发明的组合物也可通过眼内、阴道内和直肠内途径施用，包括栓剂、吹入剂、散剂和气雾剂制剂（例如类固醇吸入剂，参见Rohatagi，《临床药理学杂志》(J.Clin.Pharmacol.)，第35卷：第1187-1193页，1995年；Tjwa，《过敏、哮喘和免疫学年鉴》(Ann.Allergy Asthma Immunol.)，第75卷：第107-111页，1995年)。因此，本发明还提供了包含药学上可接受的载体或赋形剂和本发明的化合物的药物组合物。

[0151] 为了从本发明的化合物制备药物组合物，药学上可接受的载体可以是固体或液体。固体形式的制剂包括散剂、片剂、丸剂、胶囊、扁囊剂、栓剂和可分散颗粒剂。固体载体可以是一种或多种物质，它们也可用作稀释剂、调味剂、粘合剂、防腐剂、片剂崩解剂或封装材料。关于配制和施用技术的细节在科学和专利文献中有详细描述，参见例如最新版的《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences)，宾夕法尼亚州伊斯顿的Mack出版公司("Remington's")。

[0152] 在散剂中，载体是细碎的固体，其与细碎的活性组分混合。在片剂中，活性组分与具有必要粘合特性的载体以合适的比例混合，并压制成所需的形状和尺寸。散剂和片剂优选地含有5%或10%至70%的本发明化合物。

[0153] 合适的固体赋形剂包括但不限于碳酸镁、硬脂酸镁；滑石；果胶；糊精；淀粉；黄耆胶；低熔点蜡；可可脂；碳水化合物；糖，包括但不限于乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇，来自玉米、小麦、大米、马铃薯或其他植物的淀粉；纤维素，诸如甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素或羧甲基纤维素钠；和树胶，包括阿拉伯树胶和黄耆胶；以及蛋白质，包括但不限于明胶和胶原。如果需要，可加入崩解剂或增溶剂，诸如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂、藻酸或其盐诸如藻

酸钠。

[0154] 糖衣丸芯具有合适的包衣,诸如浓缩糖溶液,其也可含有阿拉伯胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、卡波普凝胶、聚乙二醇和/或二氧化钛、漆溶液和合适的有机溶剂或溶剂混合物。可向片剂或糖衣丸包衣中加入染料或色素,用于产品鉴定或表征活性化合物的量(即剂量)。本发明的药物制剂也可口服使用,例如使用由明胶制成的推入配合式胶囊,以及由明胶和包衣诸如甘油或山梨醇制成的密封软胶囊。推入配合式胶囊可含有与填充剂或粘合剂诸如乳糖或淀粉、润滑剂诸如滑石或硬脂酸镁以及任选的稳定剂混合的本发明的化合物。在软胶囊中,本发明的化合物可溶解或悬浮在合适的液体中,诸如脂肪油、液体石蜡或者含或不稳定剂的液体聚乙二醇。

[0155] 为了制备栓剂,首先将低熔点蜡诸如脂肪酸甘油酯或可可脂的混合物熔化,并通过搅拌将本发明的化合物均匀分散在其中。然后将熔融的均匀混合物倒入合适尺寸的模具中,使其冷却,从而固化。

[0156] 液体形式的制剂包括溶液剂、混悬剂和乳剂,例如水或水/丙二醇溶液剂。对于肠胃外注射,液体制剂可配制在聚乙二醇水溶液中的溶液中。

[0157] 通过将本发明的化合物溶解在水中并根据需要加入合适的着色剂、调味剂、稳定剂和增稠剂,可制备适合口服使用的水溶液。适合口服使用的水性混悬剂可通过将细碎的活性组分分散在含有粘性物质和分散剂或润湿剂的水中来制备,该粘性物质诸如天然或合成的树胶、树脂、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄蓍胶和阿拉伯树胶,该分散剂或润湿剂诸如天然存在的磷脂(例如,卵磷脂)、环氧乙烷与脂肪酸的缩合产物(例如,聚氧乙烯硬脂酸酯)、环氧乙烷与长链脂肪醇的缩合产物(例如,十七碳亚乙基氧基鲸蜡醇)、环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇的偏酯的缩合产物(例如,聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯)、或环氧乙烷与衍生自脂肪酸和己糖醇酐的偏酯的缩合产物(例如,聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯)。水性混悬剂还可含有一种或多种防腐剂,诸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、一种或多种调味剂和一种或多种甜味剂诸如蔗糖、阿斯巴甜或糖精。可针对摩尔渗透压调节剂。

[0158] 还包括固体形式的制剂,其在使用前不久转化为用于口服施用的液体形式的制剂。这样的液体形式包括溶液剂、混悬剂和乳剂。除了活性组分之外,这些制剂可含有着色剂、调味剂、稳定剂、缓冲剂、人工和天然甜味剂、分散剂、增稠剂、增溶剂等。

[0159] 可通过将本发明的化合物悬浮在植物油(诸如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油)中,或者悬浮在矿物油(诸如液体石蜡)中,或者它们的混合物中配制油性混悬剂。油性混悬剂可含有增稠剂诸如蜂蜡、硬石蜡或鲸蜡醇。可加入甜味剂以提供可口的口服制剂,诸如甘油、山梨醇或蔗糖。这些制剂可通过添加抗氧化剂(诸如抗坏血酸)来保存。作为可注射用油溶媒的示例,参见Minto,《药理学与实验治疗学杂志》(J.Pharmacol.Exp.Ther.),第281卷:第93-102页,1997年。本发明的药物制剂还可呈水包油型乳剂的形式。油相可以是如上所述的植物油或矿物油,或这些的混合物。合适的乳化剂包括天然存在的树胶,诸如阿拉伯树胶和黄蓍胶;天然存在的磷脂,诸如大豆卵磷脂;衍生自脂肪酸和己糖醇酐的酯或偏酯,诸如脱水山梨糖醇单油酸酯;和这些偏酯与环氧乙烷的缩合产物,诸如聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯。乳剂还可含有甜味剂和调味剂,诸如在糖浆和酞剂的制剂中。此类制剂还可含有缓和剂、防腐剂或着色剂。

[0160] 在另一个实施方案中,本发明的组合物可被配制用于肠胃外施用,诸如静脉内(IV)施用或施用到体腔或器官内腔中。用于施用的制剂通常将包括溶解在药学上可接受的载体中的本发明的组合物的溶液。可采用的可接受溶媒和溶剂是水和林格氏溶液(一种等渗氯化钠)。此外,无菌不挥发性油通常可用作溶剂或悬浮介质。为此目的,可采用任何温和的不挥发性油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。此外,脂肪酸诸如油酸可同样用于制备注射剂。这些溶液是无菌的并且通常不含不期望的物质。这些制剂可通过常规的、众所周知的灭菌技术灭菌。制剂可含有接近生理条件所需的药学上可接受的辅助物质,诸如pH调节剂和缓冲剂、毒性调节剂,例如乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠等。本发明的组合物在这些制剂中的浓度可广泛地变化,并且将主要基于流体体积、粘度、体重等并根据所选择的特定施用模式和患者的需要来选择。对于IV施用,制剂可以是无菌可注射制剂,诸如无菌可注射水性或油性混悬剂。该混悬剂可根据已知技术使用那些合适的分散剂或润湿剂和助悬剂配制。无菌可注射制剂也可为在无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液剂或混悬剂,诸如作为1,3-丁二醇中的溶液。

[0161] 本发明的组合物可通过任何合适的方式递送,包括口服、肠胃外和局部方法。通过局部途径的透皮施用方法可配制成涂药棒、溶液剂、混悬剂、乳剂、凝胶、乳膏剂、软膏剂、糊剂、凝胶剂、油漆、散剂和气雾剂。

[0162] 药物制剂优选为单位剂型。在这种形式中,制剂被细分成含有适量本发明的化合物的单位剂量。单位剂型可以是包装的制剂,该包装含有离散量的制剂,诸如包装的片剂、胶囊和小瓶或安瓿中的散剂。此外,单位剂型可以是胶囊、片剂、扁囊剂或锭剂本身,或者它可以是适当数量的任何这些包装形式。

[0163] 本发明的化合物和纳米载体可以任何合适的量存在,并且可取决于多种因素,包括但不限于受试者的体重和年龄、疾病的状态等。本发明的化合物的合适剂量范围包括约0.1mg至约10,000mg,或约1mg至约1000mg,或约10mg至约750mg,或约25mg至约500mg,或约50mg至约250mg。本发明的化合物的合适剂量包括约1mg、5mg、10mg、20mg、30mg、40mg、50mg、60mg、70mg、80mg、90mg、100mg、200mg、300mg、400mg、500mg、600mg、700mg、800mg、900mg或1000mg。

[0164] 本发明的化合物和纳米载体可以任何合适的频率、间隔和持续时间施用。例如,本发明的化合物可每小时一次、或每小时两次、三次或更多次、每天一次、或每天两次、三次或更多次、或每2、3、4、5、6或7天一次施用,以提供优选的剂量水平。当本发明的化合物每天施用超过一次时,代表性的间隔包括5、10、15、20、30、45和60分钟,以及1、2、4、6、8、10、12、16、20和24小时。本发明的化合物可施用一次、两次或三次或更多次,持续1小时、1至6小时、1至12小时、1至24小时、6至12小时、12至24小时、1天、1至7天、1周、1至4周、1个月、1至12个月、1年或更长时间,或者甚至无限期。

[0165] 该组合物还可含有其他相容的治疗剂。本文所述的化合物可彼此组合使用,与已知可用于调节糖皮质激素受体的其他活性剂组合使用,或与单独可能无效但可有助于活性剂的功效的辅助剂组合使用。

[0166] 本发明的化合物可与另一种活性剂共同施用。共同施用包括在彼此的0.5、1、2、4、6、8、10、12、16、20或24小时内施用本发明的化合物和活性剂。共同施用还包括同时、大致同时(例如,在彼此的约1、5、10、15、20或30分钟内)或以任何顺序依次施用本发明的化合物和

活性剂。此外,本发明的化合物和活性剂可各自每天一次,或每天两次、三次或更多次施用,以便提供优选的每天剂量水平。

[0167] 在一些实施方案中,共同施用可通过共同配制完成,即制备包含本发明的化合物和活性剂两者的单一药物组合物。在其他实施方案中,本发明的化合物和活性剂可分开配制。

[0168] 本发明的化合物和活性剂可以任何合适的重量比存在于本发明的组合物中,诸如约1:100至约100:1(w/w),或约1:50至约50:1,或约1:25至约25:1,或约1:10至约10:1,或约1:5至约5:1(w/w)。本发明的化合物和其他活性剂可以任何合适的重量比存在,诸如约1:100(w/w)、1:50、1:25、1:10、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、10:1、25:1、50:1或100:1(w/w)。本发明的化合物和活性剂的其他剂量和剂量比也适用于本发明的组合物和方法。

[0169] VI. 治疗方法

[0170] 在一些实施方案中,本发明提供了治疗疾病的方法,该方法包括向对其有需要的受试者施用治疗有效量的本发明的纳米载体。

[0171] 在一些实施方案中,该方法还包括通过使用用于治疗该疾病的附加药剂的联合疗法。该附加药剂为治疗剂。本发明的联合疗法包括但不限于使用本发明的纳米载体和一种或多种附加药剂。

[0172] 联合疗法可包括但不限于免疫疗法、放射疗法、化学疗法、分子靶向疗法或它们的组合。

[0173] 在一些实施方案中,该方法还包括一种或多种附加药剂,其中该附加药剂为化学治疗剂、分子靶向剂、免疫治疗剂、放射治疗剂或它们的组合。在一些实施方案中,该附加药剂为免疫治疗剂。上面列出了可用于本发明的免疫治疗剂。在一些实施方案中,该附加药剂为放射治疗剂。上面列出了可用于本发明的放射治疗剂。在一些实施方案中,该附加药剂为化学治疗剂或分子靶向剂。上面列出了可用于本发明的化学治疗剂和分子靶向剂。

[0174] 在一些实施方案中,所述一种或多种附加药剂包括两种附加药剂。在一些实施方案中,附加药剂为免疫治疗剂和放射治疗剂。在一些实施方案中,附加药剂为免疫治疗剂和化学治疗剂。在一些实施方案中,附加药剂为免疫治疗剂和分子靶向剂。在一些实施方案中,附加药剂为放射治疗剂和化学治疗剂。在一些实施方案中,附加药剂为放射治疗剂和分子靶向剂。

[0175] 在一些实施方案中,附加药剂为FLT-3抑制剂、VEGFR抑制剂、EGFR TK抑制剂、极光激酶抑制剂、PIK-1调节剂、Bcl-2抑制剂、HDAC抑制剂、c-MET抑制剂、PARP抑制剂、Cdk抑制剂、EGFR TK抑制剂、IGFR-TK抑制剂、抗HGF抗体、PI3激酶抑制剂、AKT抑制剂、JAK/STAT抑制剂、检查点-1或2抑制剂、局灶性粘附激酶抑制剂、MAP激酶(mek)抑制剂、VEGF捕获抗体、依维莫司、曲贝替定、abraxane、TLK 286、AV-299、DN-101、帕唑帕拉尼、GSK690693、RTA 744、ON 0910.Na、AZD 6244(ARRY-142886)、AMN-107、TKI-258、GSK461364、AZD1152、恩扎妥林、凡德他尼、ARQ-197、MK-0457、MLN8054、PHA-739358、R-763、AT-9263、培美曲塞、厄洛替尼、达沙替尼、尼洛替尼、德卡坦尼(decatanib)、帕尼单抗、氨柔比星、奥戈伏单抗、Lep-etu、诺拉曲塞、azd2171、巴他布林、奥法木单抗、扎木单抗、艾特啡林、粉防己碱、卢比替康、替米利芬、奥利默森(oblimersen)、替西木单抗、伊匹单抗、棉子酚、Bio 111、131-I-TM-601、ALT-

110、BIO 140、CC 8490、西仑吉肽、吉马替康、IL13-PE38QQR; INO 1001、IPdR1 KRX-0402、硫蒽酮、LY 317615、neuradiab、维特斯潘 (vitespan)、Rta 744、Sdx 102、他仑帕奈、阿曲生坦、Xr 311、罗米地辛、ADS-100380、舒尼替尼、5-氟尿嘧啶、伏立诺他、依托泊苷、吉西他滨、阿霉素、伊立替康、阿霉素脂质体、5'-脱氧-5-氟尿苷、长春新碱、替莫唑胺、ZK-304709、塞利西利; PD0325901、AZD-6244、卡培他滨、L-谷氨酸、N-[4-[2-(2-氨基-4,7-二氢-4-氧代-1H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)乙基]苯甲酰基]-二钠盐七水合物、喜树碱、PEG-标记的伊立替康、他莫昔芬、柠檬酸托瑞米芬、阿那曲唑、依西美坦、来曲唑、DES(己烯雌酚)、雌二醇、雌激素、结合雌激素、贝伐单抗、IMC-1C11、CHIR-258; 3-[5-(甲磺酰基哌啶甲基)-吡啶基辛-喹诺酮、伐他拉尼、AG-013736、AVE-0005、[D-Ser(Bu t)6, Azgly 10]的乙酸盐(pyro-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(Bu t)-Leu-Arg-Pro-Azgly-NH₂乙酸盐[C₅₉H₈₄N₁₈O₁₄-(C₂H₄O₂)_X,其中X=1至2.4]、醋酸戈舍瑞林、醋酸亮丙瑞林、双羟萘酸曲普瑞林、醋酸甲羟孕酮、己酸羟孕酮、醋酸甲地孕酮、雷洛昔芬、比卡鲁胺、氟他胺、尼鲁米特、醋酸甲地孕酮、CP-724714; TAK-165、HKI-272、厄洛替尼、拉帕替尼、卡奈替尼、ABX-EGF抗体、爱必妥、EKB-569、PKI-166、GW-572016、洛那法尼(Ionafarnib)、BMS-214662、替吡法尼; 氨磷汀、NVP-LAQ824、辛二酰苯胺异羟肟酸、丙戊酸、曲古抑菌素A、FK-228、SU11248、索拉非尼、KRN951、氨鲁米特、安吡啶、阿那格雷、L-天冬酰胺酶、卡介苗(BCG)疫苗、博来霉素、布舍瑞林、白消安、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、氯膦酸盐、环丙孕酮、阿糖胞苷、达卡巴嗪、放线菌素、柔红霉素、己烯雌酚、表柔比星、氟达拉滨、氟氢可的松、氟甲睾酮、氟他胺、吉西他滨、格列卫(gleevec)、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、伊马替尼、亮丙瑞林、左旋咪唑、环己亚硝脲、氮芥、美法仑、6-巯基嘌呤、美司钠、甲氨蝶呤、丝裂霉素、米托坦、米托蒽醌、尼鲁米特、奥曲肽、奥沙利铂、帕米膦酸盐、喷司他丁、普卡霉素、吡吩姆钠、丙卡巴肼、雷替曲塞、利妥昔单抗、链脲菌素、替尼泊苷、睾酮、沙利度胺、硫鸟嘌呤、噻替派、维甲酸、长春地辛、13-顺-视黄酸、苯丙氨酸氮芥、乌拉莫司汀、雌莫司汀、六甲蜜胺、氟尿苷、5-脱氧尿苷、阿糖胞苷、6-巯基嘌呤、脱氧助间型霉素、骨化三醇、戊柔比星、光神霉素、长春碱、长春瑞滨、拓扑替康、razoxin、马立马司他、COL-3、新伐司他(neovastat)、BMS-275291、角鲨胺、内皮抑素、SU5416、SU6668、EMD121974、白介素-12、IM862、血管抑素、vitaxin、屈洛昔芬、idoxyfene、螺内酯、非那雄胺、西咪替丁、曲妥珠单抗、地尼白介素、吉非替尼、硼替佐米、紫杉醇、伊立替康、拓扑替康、阿霉素、多西他赛、长春瑞滨、贝伐单抗(单克隆抗体)和爱必妥、不含氢化蓖麻油的紫杉醇、埃博霉素B、BMS-247550、BMS-310705、屈洛昔芬、4-羟基他莫昔芬、哌喷昔芬、ERA-923、阿佐昔芬、氟维司群、阿考比芬、拉索昔芬、艾多昔芬、TSE-424、HMR-3339、ZK186619、PTK787/ZK 222584、VX-745、PD 184352、雷帕霉素、40-0-(2-羟乙基)-雷帕霉素、替西罗莫司、AP-23573、RAD001、ABT-578、BC-210、LY294002、LY292223、LY292696、LY293684、LY293646、渥曼青霉素、ZM336372、L-779,450、PEG-filgrastim、阿法达贝泊汀、促红细胞生成素、粒细胞集落刺激因子、唑仑二膦酸盐(zolendronate)、泼尼松、西妥昔单抗、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、组氨瑞林、聚乙二醇化干扰素 α -2a、干扰素 α -2a、聚乙二醇化干扰素 α -2b、干扰素 α -2b、阿扎胞苷、PEG-L-天冬酰胺酶、来那度胺、吉妥珠单抗、氢化可的松、白介素-11、右雷佐生、阿仑单抗、全反式维甲酸、酮康唑、白介素-2、甲地孕酮、免疫球蛋白、氮芥、甲泼尼龙、替伊莫单抗、雄激素、地西他滨、六甲蜜胺、贝沙罗汀、托西莫单抗、三氧化二砷、可的松、editronate、米托坦、环孢菌素、脂质体柔红霉素、埃德温娜-天冬酰胺

酶、锇89、卡索匹坦、奈妥吡坦、NK-1受体拮抗剂、帕洛诺司琼、阿瑞匹坦、苯海拉明、羟嗪、甲氧氯普胺、劳拉西泮、阿普唑仑、氟哌啶醇、氟哌利多、屈大麻酚、地塞米松、甲泼尼龙、丙氯拉嗪、格拉司琼、昂丹司琼、多拉司琼、托烷司琼、sspegfilgrastim、促红细胞生成素、依泊汀 α 和达依泊汀 α 、伊匹单抗、维莫非尼或它们的组合。在一些实施方案中,附加药剂为HCQ、Lys05、JQ1、雷帕霉素、那布卡辛、伊匹单抗、纳武单抗、帕博利珠单抗、阿替利珠单抗、阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗、 β -拉帕酮、顺铂、尼莫拉唑、西妥昔单抗、米索硝唑、替拉扎明、柔红霉素、阿霉素、紫杉醇、多西他赛、abraxane、硼替佐米、依托泊苷、来那度胺、阿波唑、卡铂、顺铂、奥沙利铂、长春碱、长春新碱、曲妥珠单抗、厄洛替尼、伊马替尼、尼洛替尼、维莫非尼或它们的组合。

[0176] 通过本发明的方法治疗的疾病包括冠状病毒、疟疾、抗磷脂抗体综合征、狼疮、类风湿性关节炎、慢性荨麻疹或干燥综合征和癌症,诸如但不限于:癌、神经胶质瘤、间皮瘤、黑素瘤、淋巴瘤、白血病、腺癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、成胶质细胞瘤、白血病、淋巴瘤、前列腺癌和伯基特淋巴瘤、头颈癌、结肠癌、结肠直肠癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、肝胆癌、胆囊癌、小肠癌、直肠癌、肾癌、膀胱癌、前列腺癌、阴茎癌、尿道癌、睾丸癌、宫颈癌、阴道癌、子宫癌、卵巢癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、胰腺内分泌癌、类癌、骨癌、皮肤癌、视网膜母细胞瘤、多发性骨髓瘤、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤(对于另外的癌症参见,《癌症:原理与实践》(CANCER:PRINCIPLES AND PRACTICE)(DeVita,V.T.等人编辑,2008年))。

[0177] 可由本发明的纳米载体治疗的其他疾病包括:(1)炎性或过敏性疾病,诸如全身性过敏反应或超敏反应、药物过敏、昆虫叮咬过敏;炎性肠病,诸如克罗恩病、溃疡性结肠炎、回肠炎和肠炎;阴道炎;银屑病和炎性皮肤病,诸如皮炎、湿疹、特应性皮炎、过敏性接触性皮炎、荨麻疹;血管炎;脊柱关节病;硬皮病;呼吸道过敏性疾病,诸如哮喘、过敏性鼻炎、过敏性肺病等,(2)自身免疫性疾病,诸如关节炎(类风湿病和银屑病)、骨关节炎、多发性硬化症、系统性红斑狼疮、糖尿病、肾小球性肾炎等,(3)移植排斥(包括同种异体移植排斥和移植植物抗宿主病),和(4)其他需要抑制不希望的炎症反应的疾病(例如,动脉粥样硬化、肌炎、神经系统病症诸如中风和闭头损伤、神经退行性疾病、阿尔茨海默病、脑炎、脑膜炎、骨质疏松症、痛风、肝炎、肾炎、败血症、结节病、结膜炎、耳炎、慢性阻塞性肺病、鼻窦炎和白塞综合征)。

[0178] 在一些实施方案中,该疾病为癌症。在一些实施方案中,癌症为膀胱癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管癌、结肠直肠癌、食管癌、胆囊癌、胃癌、成胶质细胞瘤、肠癌、头颈癌、白血病、肝癌、肺癌、黑素瘤、骨髓瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌和子宫癌。在一些实施方案中,癌症为膀胱癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、胆管癌、结肠直肠癌、食管癌、胆囊癌、胃癌、成胶质细胞瘤、肠癌、头颈癌、白血病、肝癌、肺癌、黑素瘤、骨髓瘤、卵巢癌、胰腺癌和子宫癌。

[0179] 在一些实施方案中,该疾病为冠状病毒、疟疾、抗磷脂抗体综合征、狼疮、类风湿性关节炎、慢性荨麻疹或干燥综合征。

[0180] 在一些实施方案中,治疗疾病的方法包括靶向细胞自噬和/或溶酶体。靶向自噬可导致自噬抑制或自噬激活。靶向溶酶体可导致溶酶体破坏、溶酶体功能障碍或两者。

[0181] 在一些实施方案中,治疗方法靶向溶酶体破坏、溶酶体功能障碍和/或自噬抑制。在一些实施方案中,治疗方法靶向溶酶体。

[0182] 在一些实施方案中,纳米载体靶向溶酶体破坏、溶酶体功能障碍和/或自噬抑制。在一些实施方案中,纳米载体靶向溶酶体。

[0183] VII. 成像方法

[0184] 在一些实施方案中,本发明提供了成像方法,该方法包括向待成像的受试者施用有效量的本发明的纳米载体。

[0185] 可用于本发明的显像剂可以是本领域技术人员已知的任何显像剂。显像剂包括但不限于顺磁剂、光学探针和放射性核素。顺磁剂是在外加磁场下具有磁性的显像剂。顺磁剂的示例包括但不限于包括纳米颗粒的铁颗粒。光学探针是荧光化合物,其可通过在一个辐射波长激发并在第二个不同的辐射波长检测来检测。可用于本发明的光学探针包括但不限于Cy5.5、Alexa 680、Cy5、DiD(1,1'-双十八烷基-3,3,3',3'-四甲基吡啶二羧花青高氯酸盐)和DiR(1,1'-双十八烷基-3,3,3',3'-四甲基吡啶三羧花青碘化物)。其他光学探针包括量子点。放射性核素是经历放射性衰变的元素。可用于本发明的放射性核素包括但不限于³H、¹¹C、¹³N、¹⁸F、¹⁹F、⁶⁰Co、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、⁶⁸Ga、⁸²Rb、⁹⁰Sr、⁹⁰Y、⁹⁹Tc、^{99m}Tc、¹¹¹In、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹²⁹I、¹³¹I、¹³⁷Cs、¹⁷⁷Lu、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、²¹¹At、Rn、Ra、Th、U、Pu和²⁴¹Am。

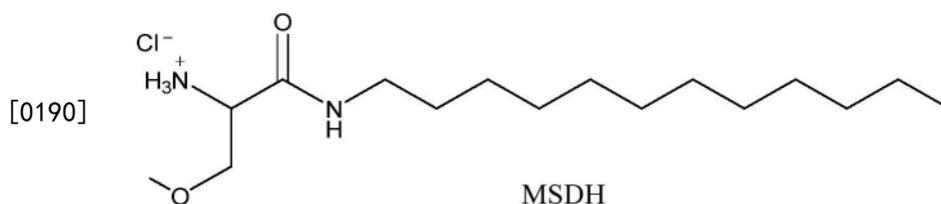
[0186] 可用于本发明的成像方法包括但不限于荧光显微术、正电子发射断层扫描(PET)、磁共振成像(MRI)、超声、单光子发射计算机断层扫描(SPECT)、x-射线计算机断层扫描(CT)、超声心动图和功能近红外光谱。

[0187] VIII. 实施例

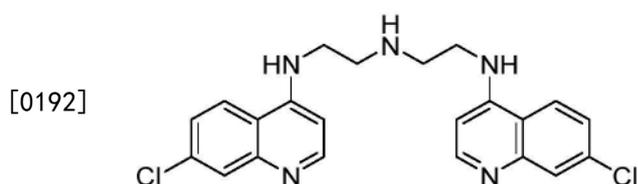
[0188] 实施例1:化合物

[0189] 材料和仪器. 化学品如二亚乙基三胺、十二醛、脂肪醇、重铬酸吡啶鎓、氰基硼氢化钠、氢氧化铵溶液、氟化溶剂、无水溶剂和Z-Arg-Arg-AMC购自美国密苏里州的密理博西格玛公司(Millipore-Sigma, MO, USA)。4,7-二氯喹啉、无水硫酸盐和大部分溶剂购自美国马萨诸塞州的赛默飞世尔科技公司(Fisher Scientific, MA, USA)。所有溶剂无需进一步纯化直接使用。所有实验中使用的水用Mill-Q过滤系统净化。其他试剂或药物按指示购买:十三醛(阿法埃莎公司(Alfa Aesar))、HCQ(Spectrum)、Lys05(MCE公司(MedchemExpress))、硼替佐米(eNovation chemical)、DiD高氯酸盐和β-拉帕酮(Tocris Bioscience)、JQ1和那布卡辛(ApExBIO)、雷帕霉素、紫杉醇和长春碱(LC实验室(LC Laboratory))、CN38(Acros Organics)、依托泊苷(Adipogen)、来那度胺(Matrix Scientific)、那布卡辛(ApExBIO)和阿波唑(Selleck)。溶酶体富集试剂盒、LysoTracker(red&green)、吖啶橙、葡聚糖-Alexa Fluor 488、Premo™自噬传感器LC3B-GFP购自美国马萨诸塞州的赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher)。SensoLyte®均相AMC半胱天冬酶3/7测定试剂盒和FITC-膜联蛋白V/PI凋亡检测试剂盒分别购自美国加利福尼亚州的安肽生技公司(AnaSpec)和美国加利福尼亚州的Biolegend。通过用600MHz NMR光谱仪(德国布鲁克公司(Bruker, German))测定NMR谱并用LTQ-Orbitrap XL混合离子阱质谱仪(美国马萨诸塞州的赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher))测定ESI-HRMS谱来表征化合物。通过荧光显微镜(日本东京的奥林巴斯公司(Olympus, Tokyo, Japan))或LSM800共聚焦显微镜(德国上科亨的卡尔蔡司公司(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany))进行细胞成像研究。用SpectraMax M2酶标仪(美国加利福尼亚州的美谷分子仪器(Molecular Devices))测定吸光度和荧光强度。蛋白质印迹通过Power Pac200电泳仪(美国加利福尼亚州的Bio-Rad)显影。在ChemiDoc™ MP成像系统(美

国加利福尼亚州的Bio-Rad) 上进行研究, 包括WB成像、体内和离体荧光成像。用Zetasizer Nano ZS (英国伍斯特郡马尔文仪器公司 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK)) 进行DLS实验。TEM在Talos L120C TEM (美国俄勒冈州 (OR, USA) 的FEI公司) 上以80kV加速电压进行。通过使用BD FACSCanto II流式细胞仪 (美国新泽西州的BD生物科学公司 (BD Biosciences, NJ, USA)) 进行凋亡测定。通过BD FACSAria II细胞分选仪 (美国新泽西州的BD生物科学公司 (BD Biosciences)) 进行癌症干细胞的分离。用于3D培养的Matrigel (目录号354230) 和用于异种移植模型建立的Matrigel (目录号354234) 均购自美国纽约的康宁公司 (Corning, NY, USA)。LC3B抗体 (1:1000, 目录号2775)、SQSTM1/p62抗体 (1:1000, 目录号39749) 和 β -肌动蛋白抗体 (1:1000, 目录号4970) 购自Cell Signaling, 并且Pacific Blue抗CD44抗体 (每百万细胞5 μ L, 100 μ L染色体积, 目录号338823)、APC抗CD326 (EpCAM) 抗体 (每百万细胞5 μ L, 100 μ L染色体积, 目录号324207)、PE/Cy7抗CD24抗体 (每百万细胞5 μ L, 100 μ L染色体积, 目录号311119) 均购自Biolegend。

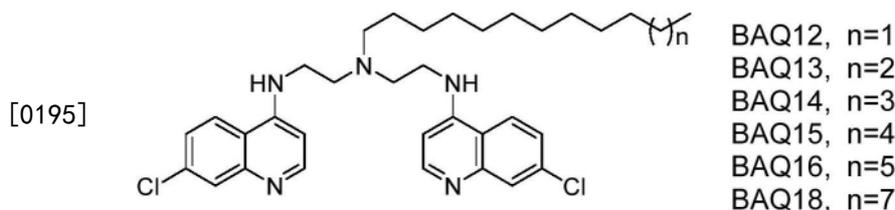


[0191] O-甲基-丝氨酸-十二烷基酰胺盐酸盐 (MSDH) 的合成。MSDH根据公开的文献 (Bioorg. Med. Chem. Lett., 1995年, 第5卷, 第893-898页) 合成。¹H NMR (600MHz, CDCl₃): δ 7.40 (s, 1H), 3.63 (m, 1H), 3.58 (m, 2H), 3.70 (s, 3H), 3.26 (m, 2H), 1.74 (s, 2H), 1.51 (m, 2H), 1.29 (m, 18H), 0.89 (t, 3H, J=7.2Hz)。ESI-HRMS: C₁₆H₃₅N₂O₂⁺的m/z [M+H]⁺计算值为287.2693, 实测值287.2690。



[0193] BAQ的合成。将10mL烧瓶中的4,7-二氯喹啉 (1.2g, 6.00mmol) 在不搅拌的情况下在80 $^{\circ}$ C下保持2h, 随后加入二亚乙基三胺 (0.22mL, 2.00mmol)。将反应溶液在130 $^{\circ}$ C下搅拌6h。将残余物用30mL甲醇溶解, 得到白色固体, 为BAQ化合物。收率: 470mg, 55%。¹H NMR (600MHz, DMSO-d₆): δ 8.38 (d, 2H, J=6.0Hz), 8.23 (d, 2H, J=10.8Hz), 7.78 (d, 2H, J=1.8Hz), 7.42 (dd, 2H, J₁=10.8Hz, J₂=2.4Hz), 7.25 (s, 1H), 6.51 (d, 2H, J=6.6Hz), 3.40 (t, 4H, J=7.2Hz), 2.94 (t, 4H, J=7.8Hz)。ESI-HRMS: C₂₂H₂₂Cl₂N₅⁺的m/z [M+H]⁺计算值为426.1247, 实测值426.1243。

[0194] BAQ12-18的一般合成方法。向BAQ (426mg, 1.0mmol) 在30mL无水甲醇和10mL无水二氯甲烷的溶液中加入对应的醛 (2mmol) 和乙酸 (20 μ L), 然后在室温下搅拌20分钟, 随后加入氰基硼氢化钠 (126mg, 2mmol)。将混合物搅拌12h, 并用氯仿 (100mL) 稀释。收集有机相, 用水洗涤, 并用无水硫酸钠干燥过夜。将粗产物通过硅胶色谱纯化, 用含有0.1% 三乙胺的洗脱液 (二氯甲烷: 甲醇=30:1-10:1), 得到对应化合物。



[0196] BAQ12. 收率:320mg, 53.8%。¹H NMR (600MHz, CD₃OD) : δ8.27 (d, 2H, J=5.4Hz) , 7.67 (d, 2H, J=2.4Hz) , 7.55 (d, 2H, J=9.0Hz) , 6.95 (dd, 2H, J₁=9.0Hz, J₂=1.8Hz) , 6.46 (d, 2H, J=5.4Hz) , 3.41 (t, 4H, J=6.0Hz) , 2.90 (t, 4H, J=6.0Hz) , 2.66 (t, 2H, J=6.6Hz) , 1.55 (m, 2H) , 1.33 (m, 20H) , 0.91 (t, 3H, J=7.2Hz) 。¹³C NMR (150MHz, CD₃OD) : δ150.9, 150.8, 147.9, 134.8, 126.3, 124.4, 121.9, 117.0, 98.4, 54.1, 51.9, 40.3, 31.6, 29.5, 29.5, 29.4, 29.4, 29.1, 27.4, 27.3, 22.4, 13.1。ESI-HRMS: C₃₄H₄₆Cl₂N₅⁺的m/z [M+H]⁺计算值为594.3125, 实测值594.3134。

[0197] BAQ13. 收率:350mg, 57.5%。¹H NMR (600MHz, CD₃OD) : δ8.27 (d, 2H, J=5.4Hz) , 7.67 (d, 2H, J=1.8Hz) , 7.56 (d, 2H, J=9.0Hz) , 6.96 (dd, 2H, J₁=9.0Hz, J₂=2.4Hz) , 6.46 (d, 2H, J=5.4Hz) , 3.42 (t, 4H, J=6.0Hz) , 2.90 (t, 4H, J=6.0Hz) , 2.66 (t, 2H, J=7.2Hz) , 1.56 (m, 2H) , 1.32 (m, 23H) , 0.92 (t, 3H, J=7.2Hz) 。¹³C NMR (150MHz, CD₃OD) : δ151.0, 150.7, 147.8, 134.8, 126.1, 124.5, 121.9, 117.0, 98.4, 54.6, 51.9, 40.3, 31.7, 29.5, 29.5, 29.5, 29.4, 29.1, 27.4, 27.3, 22.3, 13.1。ESI-HRMS: C₃₅H₄₈Cl₂N₅⁺的m/z [M+H]⁺计算值为608.3281, 实测值608.3274。

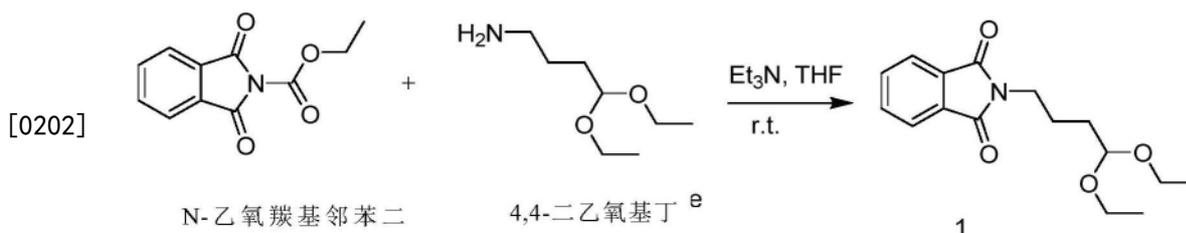
[0198] BAQ14. 收率:295mg, 47.4%。¹H NMR (600MHz, CD₃OD) : δ8.56 (d, 2H, J=9.0Hz) , 8.48 (d, 2H, J=4.8Hz) , 7.86 (d, 2H, J=1.2Hz) , 7.60 (dd, 2H, J₁=9.0Hz, J₂=1.2Hz) , 7.06 (d, 2H, J=5.4Hz) , 4.16 (s, 4H) , 3.82 (s, 4H) , 3.48 (s, 2H) , 1.92 (s, 2H) , 1.44 (s, 2H) , 1.35 (m, 23H) , 0.93 (t, 3H, J=6.6Hz) 。¹³C NMR (150MHz, CD₃OD) : δ155.9, 143.0, 139.8, 138.2, 127.4, 125.3, 118.7, 115.5, 98.9, 54.6, 51.1, 38.3, 31.5, 29.2, 29.2, 29.2, 29.2, 29.1, 29.0, 28.9, 28.7, 26.1, 23.0, 22.2, 12.9。ESI-HRMS: C₃₆H₅₀Cl₂N₅⁺的m/z [M+H]⁺计算值为622.3438, 实测值622.3505。

[0199] BAQ15. 收率:290mg, 45.5%。¹H NMR (600MHz, CD₃OD) : δ8.56 (d, 2H, J=9.0Hz) , 8.48 (d, 2H, J=6.0Hz) , 7.86 (d, 2H, J=1.2Hz) , 7.59 (dd, 2H, J₁=9.0Hz, J₂=1.2Hz) , 7.07 (d, 2H, J=6.0Hz) , 4.16 (s, 4H) , 3.82 (s, 4H) , 3.48 (s, 2H) , 1.92 (s, 2H) , 1.44 (s, 2H) , 1.35 (m, 25H) , 0.93 (t, 3H, J=6.6Hz) 。¹³C NMR (150MHz, CD₃OD) : δ155.8, 143.0, 139.7, 138.1, 127.3, 125.3, 118.7, 115.4, 98.9, 54.5, 51.0, 38.2, 31.5, 29.2, 29.2, 29.2, 29.1, 29.0, 28.9, 28.7, 26.1, 23.0, 22.2, 12.9。ESI-HRMS: C₃₇H₅₂Cl₂N₅⁺的m/z [M+H]⁺计算值为636.3594, 实测值636.3661。

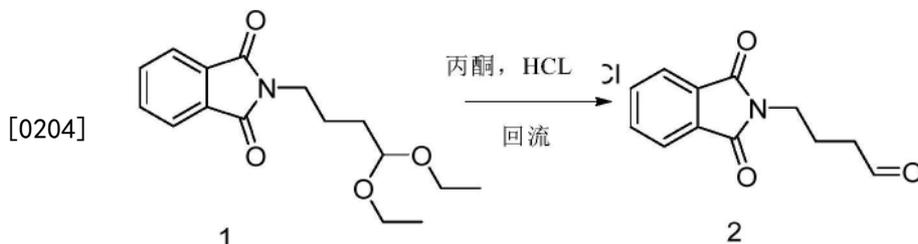
[0200] BAQ16. 收率:280mg, 43.0%。¹H NMR (600MHz, CD₃OD) : δ8.56 (d, 2H, J=9.0Hz) , 8.48 (d, 2H, J=6.6Hz) , 7.86 (d, 2H, J=1.8Hz) , 7.59 (dd, 2H, J₁=9.0Hz, J₂=1.8Hz) , 7.07 (d, 2H, J=7.2Hz) , 4.17 (m, 4H) , 3.84 (m, 4H) , 3.50 (t, 2H, J=7.8Hz) , 1.92 (m, 2H) , 1.44 (m, 2H) , 1.30 (m, 27H) , 0.93 (t, 3H, J=7.2Hz) 。¹³C NMR (150MHz, CD₃OD) : δ155.9, 143.0, 139.7, 138.1, 127.3, 125.2, 118.7, 115.4, 98.8, 54.5, 51.0, 38.2, 31.5, 29.2, 29.2, 29.2, 29.1, 28.9, 28.9, 28.7, 26.1, 23.0, 22.1, 12.9。ESI-HRMS: C₃₈H₅₄Cl₂N₅⁺的m/z [M+H]⁺计算值为

650.3751, 实测值650.3774。

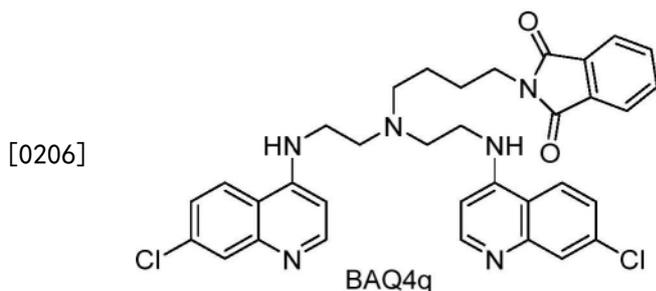
[0201] BAQ18. 收率: 290mg, 42.7%。¹H NMR (600MHz, CD₃OD): δ8.56 (d, 2H, J=9.0Hz), 8.48 (d, 2H, J=5.4Hz), 7.86 (s, 2H, J=1.8Hz), 7.56 (d, 2H, J₁=8.4Hz), 7.06 (d, 2H, J=6.6Hz), 4.16 (s, 4H), 3.82 (m, 4H), 3.48 (s, 2H), 1.91 (s, 2H), 1.43 (m, 2H), 1.30 (m, 29H), 0.93 (s, 3H)。¹³C NMR (150MHz, CD₃OD): δ155.9, 143.0, 139.8, 138.2, 127.4, 125.2, 118.7, 115.5, 98.8, 54.5, 51.1, 38.2, 31.5, 29.2, 29.1, 28.9, 28.9, 28.7, 26.1, 23.0, 22.2, 12.9。ESI-HRMS: C₃₈H₅₄Cl₂N₅⁺的m/z [M+H]⁺计算值为650.3751, 实测值650.3774。ESI-HRMS: C₄₀H₅₆Cl₂N₅⁺的m/z [M+H]⁺计算值为678.4064, 实测值678.4069。



[0203] 化合物1的合成. 向4,4-二乙氧基丁胺 (1.84mL, 10.7mmol, 1.00当量) 的THF (30mL) 溶液中加入N-乙氧羰基邻苯二甲酰亚胺乙酯 (2.34g, 10.7mmol, 1.00当量) 和三乙胺 (1.49mL, 10.7mmol, 1.00当量)。将所得反应混合物在室温下搅拌12h。减压除去溶剂后, 将所得粗物质在硅胶柱上纯化, 用1:20EtOAc/己烷洗脱, 得到澄清油状物。(2.9g, 94.0mmol, 93%收率)。¹H NMR (600MHz, DMSO-d₆) δ7.87-7.83 (m, 4H), 4.47 (t, J=5.4Hz, 1H), 3.58-3.51 (m, 4H), 3.43-3.38 (m, 2H), 1.61-1.60 (m, 2H), 1.54-1.51 (m, 2H)。ESI-HRMS m/z 314.1361 [M+Na]⁺。



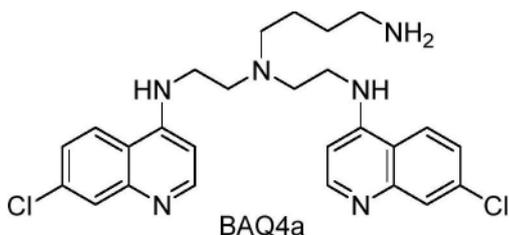
[0205] 化合物2的合成. 将化合物1 (2.2g, 7.6mmol, 1.00当量) 在丙酮 (20mL) 和1M HCl水溶液 (15.2mL, 15.2mmol, 2.00当量) 中的溶液在回流 (80℃) 下剧烈搅拌1h。减压蒸发丙酮, 并且将所得水层用Et₂O萃取3次。将合并的有机层用水洗涤一次, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 并减压蒸发, 通过柱色谱纯化, 用1:2EtOAc/己烷洗脱, 得到蜡状白色固体。(1.2g, 74%收率)。¹H NMR (600MHz, DMSO-d₆) δ9.64 (t, J=1.2Hz, 1H, NH₂), 7.88-7.83 (m, 4H), 3.61 (t, J=7.2Hz, 2H), 2.54-2.51 (m, 2H), 1.85-1.83 (m, 2H)。



[0207] BAQ4q的合成. 向BAQ (426.5mg, 1.0mmol, 1.00当量) 的甲醇 (40mL) 溶液中加入化合

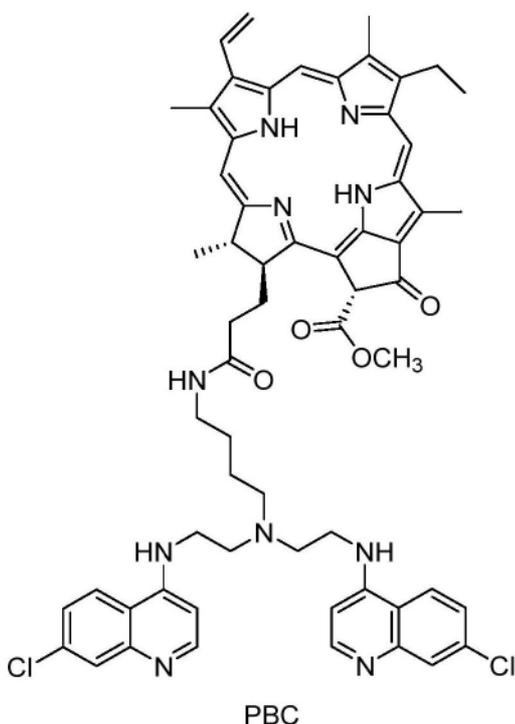
物2(434mg, 2mmol, 2.0当量)和乙酸(10 μ L), 将其在室温下搅拌30分钟。缓慢加入氰基硼氢化钠(126mg, 2mmol, 2当量), 并搅拌24h。用二氯甲烷(150mL)稀释反应溶液, 然后用饱和碳酸钠、水和盐水洗涤, 用无水硫酸钠干燥。过滤并减压浓缩后, 混合物用硅胶色谱纯化, 用20:1二氯甲烷/甲醇洗脱, 得到白色固体。(520mg, 83%收率)。¹H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 8.27 (d, $J=5.4$ Hz, 2H), 7.97 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 7.78 (s, 4H), 7.67 (d, $J=2.4$ Hz, 2H), 7.19 (dd, $J_1=9.0$ Hz, $J_2=2.4$ Hz, 2H), 7.09 (m, 2H), 6.39 (d, $J=6.0$ Hz, 2H), 3.51 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 3.31 (t, $J=6.0$ Hz, 4H), 2.77 (t, $J=6.6$ Hz, 4H), 2.58 (t, $J=6.6$ Hz, 2H), 1.60-1.55 (m, 2H), 1.45-1.40 (m, 2H)。ESI-HRMS 627.2035 [M+H]⁺。

[0208]



[0209] BAQ4a的合成. 将BAQ4q(314mg, 0.5mmol, 1.0当量)溶于乙醇, 并在加入胍(2.5mmol, 5.0当量)后, 将反应溶液回流搅拌12h。然后让反应混合物处于室温。过滤除去沉淀后, 将滤液浓缩, 然后加入乙醚(100mL)中, 产生白色沉淀, 将其收集为化合物5。(200mg, 80%收率)。¹H NMR 8.30 (d, $J=5.4$ Hz, 2H), 8.03 (d, $J=9.6$ Hz, 2H), 7.78 (s, 4H), 7.71 (d, $J=2.4$ Hz, 2H), 7.27 (dd, $J_1=9.0$ Hz, $J_2=2.4$ Hz, 2H), 7.05 (t, $J=5.4$ Hz, 2H), 6.40 (d, $J=5.4$ Hz, 2H), 3.31 (t, $J=6.6$ Hz, 2H), 3.31 (t, $J=6.0$ Hz, 4H), 2.78 (t, $J=7.2$ Hz, 4H), 2.54 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 2.42 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 1.41-1.38 (m, 2H), 1.29-1.26 (m, 2H)。ESI-HRMS 497.1981 [M+H]⁺。

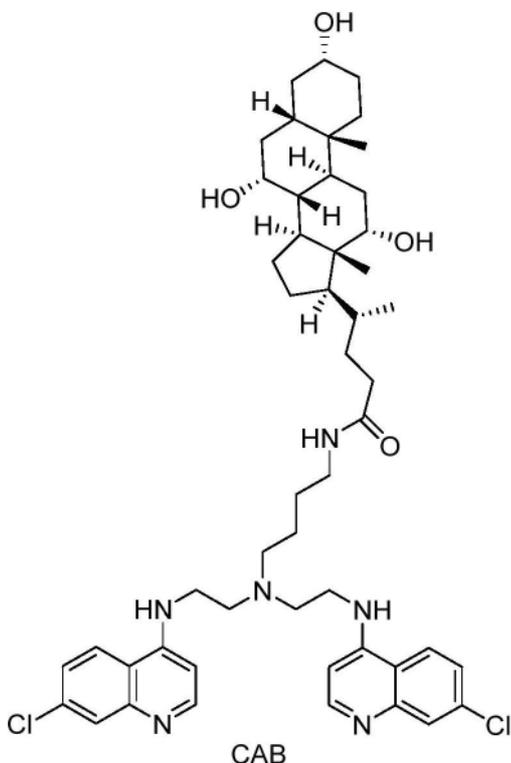
[0210]



[0211] PBC的合成. 将脱镁叶绿酸a(296mg, 0.5mmol, 1.0当量)、6-氯-1-羟基苯并三唑(102mg, 0.6mmol, 1.2当量)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(93mg, 0.6mmol, 1.2

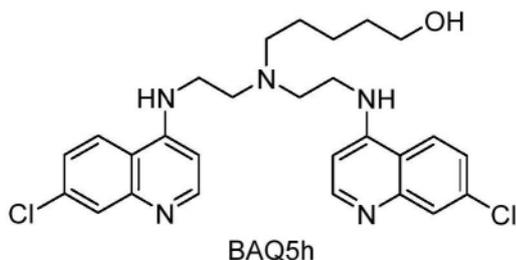
当量)和N,N-二异丙基乙胺(174 μ L,1.0mmol,2当量)悬浮于无水二氯甲烷(75mL)中,并在室温下搅拌30分钟。将化合物5(314mg,0.5mmol,1.0当量)加入反应混合物中,然后搅拌48h。将混合物通过硅胶色谱纯化,用20:1二氯甲烷/甲醇洗脱,得到黑色固体。(200mg,37%收率)。¹H NMR(600MHz,CD₃OD) δ 8.94(s,1H),8.78(s,1H),8.58(s,1H),7.86(dd, $J_1=6.0$ Hz, $J_2=3.6$ Hz,2H),7.86(dd, $J_1=6.0$ Hz, $J_2=3.6$ Hz,2H),7.81(dd, $J_1=18.0$ Hz, $J_2=11.4$ Hz,2H),7.63(m,1H),7.54(d, $J=6.0$ Hz,2H),7.18(dd, $J_1=9.0$ Hz, $J_2=2.4$ Hz,1H),6.88(m,2H),6.55(d, $J=8.4$ Hz,2H),6.22(dd, $J_1=8.4$ Hz, $J_2=1.8$ Hz,2H),6.17(d, $J=18.0$ Hz,1H),6.10(d, $J=11.4$ Hz,1H),5.55(d, $J=18.0$ Hz,1H),4.52-4.51(m,1H),4.15-4.14(m,1H),3.88(s,3H),3.72-3.67(m,2H),3.30(s,3H),3.2(q, $J_2=7.2$ Hz,4H,三乙胺),2.89(m,1H),2.80(s,3H),2.75(m,1H),2.63-2.61(m,2H),2.56-2.53(m,1H),2.50-2.43(m,4H),2.3-2.16(m,8H),1.94(s,1H),1.82(d, $J=7.2$ Hz,3H),1.47(t, $J=7.8$ Hz,3H),1.35(m,10H+6H三乙胺),1.11(m,4H)。ESI-HRMS 1071.4576[M+H]⁺。

[0212]



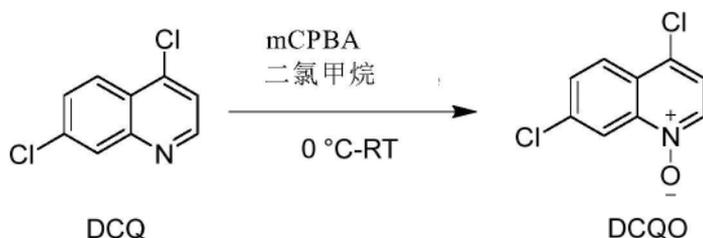
[0213] CAB的合成.将胆酸(204mg,0.5mmol,1.0当量)、6-氯-1-羟基苯并三唑(102mg,0.6mmol,1.2当量)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(93mg,0.6mmol,1.2当量)和N,N-二异丙基乙胺(174 μ L,1.0mmol,2当量)悬浮于无水二氯甲烷(75mL)中,并在室温下搅拌30分钟。将BAQ4a(314mg,0.5mmol,1.0当量)加入反应混合物中,然后搅拌48h。将混合物通过硅胶色谱纯化,用20:1二氯甲烷/甲醇洗脱,得到黑色固体。(220mg,49.5%收率)。ESI-HRMS887.4774[M+H]⁺。

[0214]



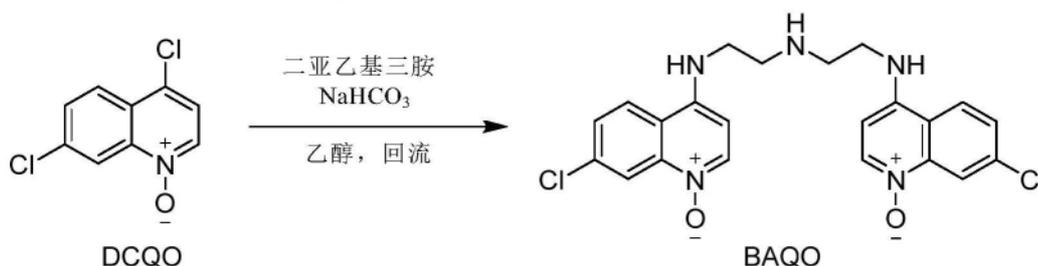
[0215] BAQ5h的合成.向BAQ(426.5mg,1.0mmol,1.00当量)的甲醇(40mL)溶液中加入戊二醛(211 μ L,2.0mmol,2.00当量)和乙酸(10 μ L),将其在室温下搅拌30分钟.缓慢加入氰基硼氢化钠(126mg,2mmol,2当量),并搅拌24h.用二氯甲烷(150mL)稀释反应溶液,然后用饱和碳酸钠、水和盐水洗涤,用无水硫酸钠干燥.过滤并减压浓缩后,混合物用硅胶色谱纯化,用20:1二氯甲烷/甲醇洗脱,得到白色固体.(520mg,83%收率).¹H NMR(600MHz,CD₃OD) δ 8.23(d, J=5.4Hz, 2H), 7.60-7.56(m, 4H), 7.02(dd, J₁=9.0Hz, J₂=1.8Hz, 2H), 6.44(t, J=5.4Hz, 2H), 3.58(t, J=6.6Hz, 2H), 3.42(t, J=5.4Hz, 4H), 2.91(t, J=6.0Hz, 4H), 2.75-2.72(m, 2H), 1.66-1.57(m, 4H), 1.51-1.47(m, 2H). ESI-HRMS 512.1961[M+H]⁺.

[0216]



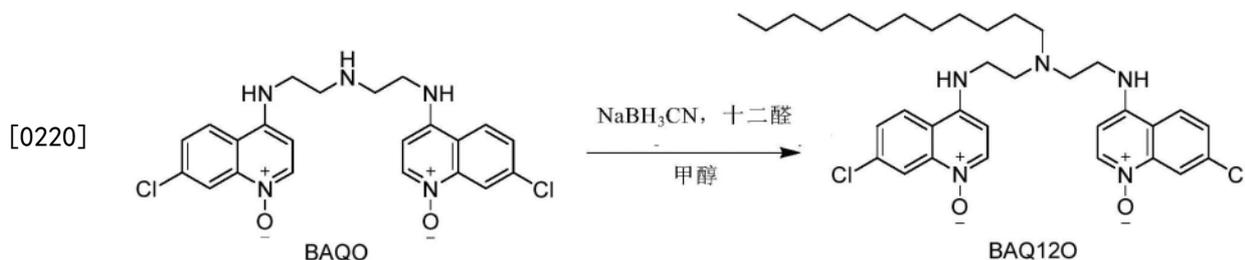
[0217] DCQO的合成.将4,7-二氯喹啉(DCQ)(2g,10mmol)溶于50mL中,并在冰水浴上剧烈搅拌(500rpm)15分钟.将mCPBA(2.7g,12mmol)在冰水浴中小心加入(4次)反应溶液中.将所得反应混合物在室温下搅拌(500rpm)12小时.TLC表明起始原料完全转化为一个主斑点.向反应溶液中加入二氯甲烷(100mL)和碳酸钾(4.1g,30mmol),将其在室温下搅拌(300rpm)1小时.将混合物倒入装有200mL水的500mL烧杯中,并再搅拌(300rpm)1小时.收集有机相,分别用饱和碳酸钠(75mL \times 3)、水(75mL \times 3)、盐水(75mL \times 3)洗涤,并用无水硫酸钠干燥过夜.过滤后,减压蒸发溶剂,并且所得粗物质用80mL乙腈重结晶.过滤所得固体产物以供收集,然后真空干燥,得到1.8g DCQO,为白色固体.¹H NMR(600MHz,CDCl₃) δ 8.79(d, J=1.8Hz, 2H), 8.44(d, J=6.6Hz, 2H), 8.44(d, J=8.4Hz, 2H), 7.71(d, J₁=9.0Hz, J₂=2.4Hz, 2H), 7.38(d, J=6.0Hz, 2H). HRMS(ESI): C₉H₆Cl₂NO[M+H]⁺的m/z计算值为213.9821,实测值为213.9834.

[0218]

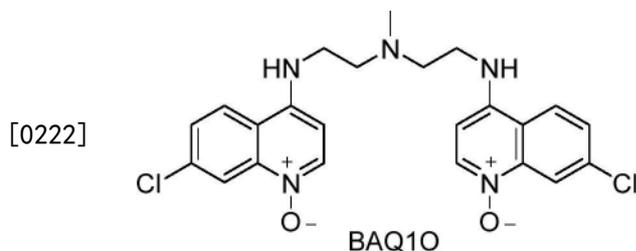


[0219] BAQO的合成.向DCQO(2.14g,10mmol)的30mL无水乙醇溶液中加入碳酸氢钠(840mg,10mmol)和二亚乙基三胺(432 μ L,4mmol).将混合物在95 $^{\circ}$ C下回流48小时.TLC用于指示靶物质(TM,黄色斑点)的产生.减压蒸发乙醇,并将残余物用30mL甲醇重悬,将其缓慢滴入装有100mL盐酸(1M)和50mL二氯甲烷的混合溶液的300mL烧杯中.收集水相,用二氯甲

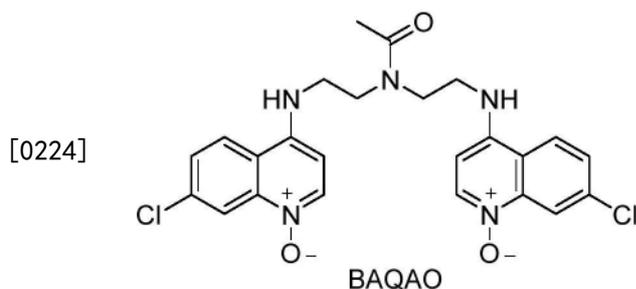
烷(50mL×2)洗涤,用10M NaOH(12mL)碱化至pH 10,产生黄色沉淀。收集沉淀,用水(30mL×3)洗涤并真空干燥,得到850mg BAQ0,为黄色固体。¹HNMR (600MHz, CD₃OD) δ8.51 (d, J=1.8Hz, 2H), 8.35 (d, J=7.2Hz, 2H), 8.14 (d, J=9.0Hz, 2H), 7.55 (d, J₁=9.0Hz, J₂=2.4Hz, 2H), 6.63 (d, J=7.2Hz, 2H), 3.58 (t, J=6.0Hz, 4H), 2.94 (t, J=6.0Hz, 4H)。HRMS (ESI): C₂₂H₂₂Cl₂N₅O₂ [M+H]⁺的m/z计算值为458.1145,实测值为458.1126。



[0221] BAQ120的合成.将BAQ0(916mg, 2mmol)、十二醛(1.8mL, 8mmol)和乙酸(20μL)的混合物在室温下剧烈搅拌(500rpm)30分钟。然后缓慢加入氰基硼氢化钠(377mg, 6mmol)。将反应混合物在室温下再搅拌12小时。TLC表明起始原料完全转化为一个主斑点。将溶剂浓缩至25mL,然后将所得残余物用75mL二氯甲烷稀释。将有机相用100mL饱和碳酸氢钠洗涤三次。收集乳液层,然后过滤得到黄色固体,用水(30mL×3)和乙醚(30mL×3)洗涤。真空干燥收集的黄色固体,得到1.2g BAQ120。¹HNMR (CD₃OD, 600MHz) δ8.43 (d, J=1.8Hz, 2H), 8.31 (d, J=7.2Hz, 2H), 7.82 (d, J=9.0Hz, 2H), 7.31 (d, J₁=9.0Hz, J₂=2.4Hz, 2H), 6.56 (d, J=7.2Hz, 2H), 3.50 (t, J=6.0Hz, 4H), 2.94 (t, J=6.0Hz, 4H), 2.71 (t, J=7.2Hz, 2H), 1.55 (m, 2H), 1.32 (m, 18H), 0.92 (t, J₁=6.6Hz, 3H)。CNMR (CD₃OD, 150MHz) δ148.0, 140.1, 139.9, 138.4, 127.6, 123.9, 118.7, 117.9, 98.09, 54.9, 52.3, 41.5, 32.4, 30.2, 30.1, 30.1, 29.8, 28.1, 27.7, 23.1, 13.8。HRMS (ESI): C₃₄H₄₆C₁₂N₅O₂ [M+H]⁺的m/z计算值为626.3023,实测值为626.3060。

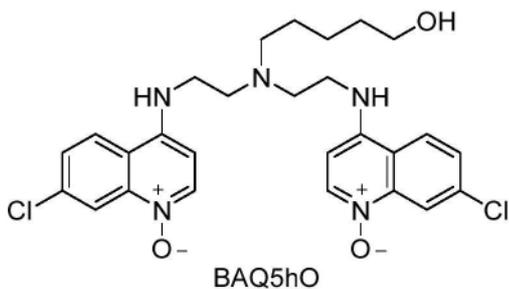


[0223] BAQ10的合成.该化合物使用BAQ120的方法来制备。甲醛用作起始原料。ESI-HRMS 472.1325 [M+H]⁺。



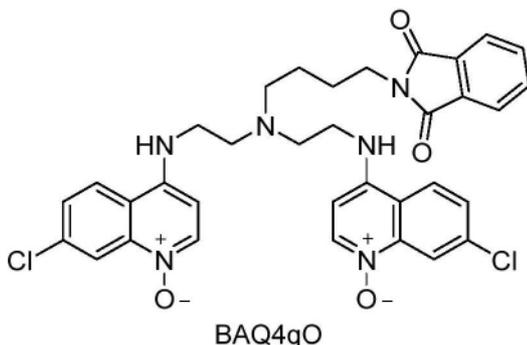
[0225] BAQAO的合成.将BAQ0(229mg, 0.5mmol)的5mL乙酸酐溶液回流6h。减压除去过量的乙酸酐。残余物用冷乙醚溶解,得到黄色固体作为产物(180mg)。ESI-HRMS 500.1246 [M+H]⁺。

[0226]



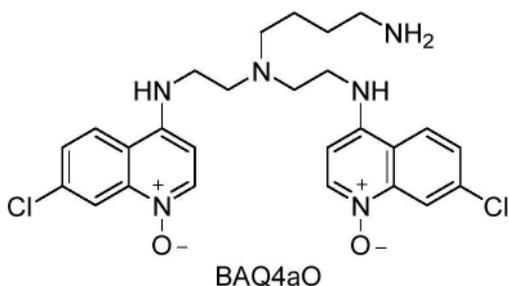
[0227] BAQ5hO的合成. 该化合物使用BAQ5h的方法来制备. BAQO用作起始原料. ESI-HRMS 544.1870[M+H]⁺.

[0228]



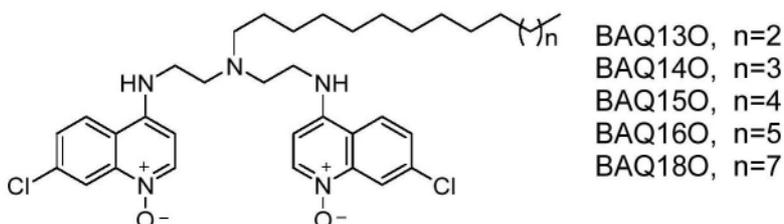
[0229] BAQ4qO的合成. 该化合物使用BAQ4q的方法来制备. BAQO用作起始原料. ESI-HRMS 659.1946[M+H]⁺.

[0230]



[0231] BAQ4aO的合成. 该化合物使用BAQ4a的方法来制备. BAQ4qO用作起始原料. ESI-HRMS 529.1884[M+H]⁺.

[0232]



[0233] BAQ130的合成. 该化合物使用BAQ120的方法来制备. 十三醛用作起始原料. ¹HNMR (800MHz, DMSO-d₆) δ 9.79 (s, 2H), 8.91 (d, J=7.2Hz, 2H), 8.78 (d, J=9.6Hz, 2H), 8.16 (d, J=1.6Hz, 2H), 7.80 (dd, J₁=9.6Hz, J₁=1.8Hz, 2H), 6.97 (d, J=8.0Hz, 2H), 4.04 (s, 4H), 3.68-3.62 (m, 6H), 1.70 (s, 2H), 1.27-1.17 (m, 21H), 0.87 (t, J=7.2Hz, 3H).

[0234] BAQ140的合成. 该化合物使用BAQ120的方法来制备. 十四醛用作起始原料. ¹HNMR (800MHz, DMSO-d₆) δ 9.62 (s, 2H), 8.88 (d, J=8.0Hz, 2H), 8.70 (d, J=9.6Hz, 2H), 8.15 (d, J=2.4Hz, 2H), 7.77 (dd, J₁=8.8Hz, J₁=1.6Hz, 2H), 6.95 (d, J=7.2Hz, 2H), 4.02 (s, 4H), 3.68-3.62 (m, 6H), 1.68 (s, 2H), 1.27-1.15 (m, 23H), 0.86 (t, J=5.4Hz, 3H).

[0235] BAQ150的合成.该化合物使用BAQ120的方法来制备.十五醛用作起始原料.¹HNMR (800MHz, DMSO-d₆) δ9.63 (s, 2H), 8.88 (d, J=8.0Hz, 2H), 8.70 (d, J=8.8Hz, 2H), 8.15 (d, J=2.4Hz, 2H), 7.77 (dd, J₁=8.8Hz, J₂=1.6Hz, 2H), 6.95 (d, J=8.8Hz, 2H), 4.01 (s, 4H), 3.68-3.62 (m, 6H), 1.68 (s, 2H), 1.28-1.15 (m, 25H), 0.86 (t, J=5.4Hz, 3H).

[0236] BAQ160和BAQ180的合成.该化合物使用BAQ120的方法来制备.十六醛用作BAQ160的起始原料,并且十八醛用作BAQ180的起始原料。

[0237] 使用BAQ120的方法,使用合适的醛和酮起始原料,可制备另外的BAQ0衍生物。

[0238] 实施例2:纳米载体

[0239] BAQ ONN的制备和表征.通过再沉淀法制备NP.将BAQ衍生物的甲醇溶液滴加到MilliQ水中,同时搅拌5分钟(体积比,1:10),然后在旋转蒸发(40℃,20分钟)后获得均匀的NP,随后用Zetasizer Nano ZS(马尔文仪器公司(Malvern))表征.TEM样品通过将0.5mM NP滴在碳方形网上制备并自然干燥,然后在Talos L120C TEM(FEI)下在80kV的加速电压下观察.为了测定纳米制剂中的药物含量,通过离心过滤器(ultracel-10kDa, Millipore)将制备的载药NP切下,并测量滤液(用DMSO稀释,1:10,体积比)的吸光度以计算药物浓度。

[0240] BAQ衍生物作为潜在ONN的发现.BAQ12-BAQ18是通过亲溶酶体自噬抑制剂Lys05和亲溶酶体去污剂MSDH的关键结构元件杂交以实现药理学融合而设计的(图1)。基于自组装原理,设想将长的疏水尾与阳离子BAQ头包含在一起会驱使它们形成纳米颗粒(NP)。由于BAQ头的计算pKa为8.4,因此这种自组装应取决于环境的pH,其中NP在中性条件下形成,并且在酸性环境中质子化后解离成游离的结构单元。

[0241] 化合物(BAQ12-BAQ18)被合成,并通过¹H NMR谱、¹³C NMR谱和HRMS谱在结构上证实(图7)。与Lys05和MSDH相反,BAQ12-BAQ18不能以游离碱或盐酸盐的形式完全溶于水。然而,亲脂性阳离子允许通过纳米沉淀在水中自发自组装,从而产生均匀的乳白色NP溶液。BAQ12-BAQ18的组装的NP具有相似的纳米级特征,包括它们的尺寸(100nm-140nm)、小于0.1的多分散指数(PDI)值和正表面电荷(约+40mV)(表1和图8A)。然后通过监测颗粒的尺寸变化来评估pH响应性解离行为(图2A)。所有BAQ NP在近中性的条件下是完整的,并且仅在相对酸性的条件下解离。BAQ12-BAQ14的临界离解pH为5.5-6.0,并且BAQ15-BAQ18的临界离解pH为5.0-5.5。当在酸性环境中质子化时,BAQ12-BAQ18亲脂性阳离子变成两亲分子并获得表面活性。然后利用溶血试验来评价化合物的pH响应性生物膜破坏能力。在近中性的条件(pH≥6.5)下,没有一种NP具有溶血作用,但当pH低于6.0时,NP开始诱导溶血(图2B和图8B)。在这些化合物中,BAQ12 NP和BAQ13 NP表现出最强的溶血活性,在模拟溶酶体条件(pH 4.0~5.5)下诱导高达90%的溶血;相比之下,BAQ14 NP诱导中度溶血(70%),并且BAQ15-BAQ18 NP仅产生约50%的溶血。在对照组中,常规溶酶体去污剂MSDH对pH仅表现出弱溶血反应,并且没有去污力的Lys05在相同浓度下、在整个pH范围内没有引起可观察到的溶血。因为LMP是凋亡的潜在刺激物,所以去污力可在溶酶体中被激活的BAQ12和BAQ13可能直接有效地诱导癌细胞死亡。此外,在用盐酸(HCl)滴定后,BAQ12 NP和BAQ13 NP在窄的pH范围内(在约pH 6.0)显示出明显的pH平稳期,表明它们的强pH缓冲能力(图2C)。相比之下,其他NP(BAQ14-BAQ18)的pH值成比例地降低,并且对于Lys05(pH 7.2)和MSDH(pH6.2)仅观察到短暂的pH平稳期。由于溶酶体降解需要充分的酸化,因此BAQ12和BAQ13因其强H⁺缓冲能力,显示出比其他化合物更大的诱导溶酶体功能障碍的潜力,并因此可能损害肿瘤细胞生长。

[0242] 表1:BAQ衍生物的纳米颗粒表征以及对癌细胞的IC₅₀值。

| (数据为平均值±SD, n=3) | | | | | | | | | |
|------------------|-----------|-------|-------------------|------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 化合物 | 尺寸 (nm) | PDI | ζ 电位(mV) | 24h处理中的IC ₅₀ (μM) | | | | | |
| | | | | MIA PaCa-2 | PANC-1 | BXPC-3 | HT29 | H460 | MCF-7 |
| BAQ12 | 102.5±3.1 | 0.069 | 36.4±1.5 | 4.1±0.8 | 4.5±0.9 | 2.9±0.6 | 3.5±1.2 | 2.7±0.5 | 3.1±0.1 |
| BAQ13 | 99.1±2.1 | 0.097 | 39.7±1.9 | 4.2±1.0 | 4.3±1.0 | 3.1±0.2 | 3.0±1.1 | 2.2±0.4 | 3.7±0.3 |
| [0243] BAQ14 | 137.9±4.6 | 0.069 | 39.1±0.4 | 16.0±1.8 | 10.4±1.8 | 7.5±0.7 | 9.6±2.0 | 24.0±0.3 | 28.5±3.5 |
| BAQ15 | 107.3±2.6 | 0.086 | 38.0±2.9 | 42.0±11.7 | 34.5±3.9 | 17.2±2.0 | 16.1±2.5 | 24.1±0.4 | >60 |
| BAQ16 | 119.7±2.1 | 0.082 | 40.4±0.5 | 60.7±13.9 | >90 | 27.6±2.8 | >80 | >90 | >90 |
| BAQ18 | 96.7±1.6 | 0.093 | 39.5±0.8 | >90 | >90 | >90 | >100 | >90 | >90 |
| Lys05 | -- | -- | -- | 16.7±4.7 | 13.3±2.0 | 7.8±0.9 | 10.6±3.4 | 11.1±0.6 | 12.3±0.7 |
| HCQ | -- | -- | -- | 79.6±8.5 | -- | -- | >75 | -- | -- |
| MSDH | -- | -- | -- | 55.5±7.1 | -- | -- | 30.3±4.8 | -- | -- |

[0244] 为了验证BAQ12-BAQ18的治疗效果,使用MTS测定对各种癌细胞系进行了初步筛选。在24小时处理内,这些衍生物表现出不同程度的抗增殖作用。BAQ12和BAQ13高度有效,并且分别显示为Lys05、HCQ和MSDH的约3倍、约20倍和约10倍高的效力,但随着疏水尾部从14个碳延伸至18个碳,活性稳步降低(表1和图8C)。这种降低是由于化合物的去污力和H⁺缓冲能力的逐渐下降。基于上述结果,BAQ12和BAQ13然后被选为后续研究中构建BAQ ONN的代表。

[0245] pH响应性组装和高载药效率。然后通过透射电子显微镜(TEM)确定BAQ ONN的pH响应性组装解离相变。在pH 7.4下,NP表现出强廷德耳效应,并显示出直径约100nm且双层厚度约5nm的脂质体样纳米结构(图2D)。这些结果与动态光散射(DLS)测量一致。相比之下,在pH 5.0下,溶液失去其廷德耳效应,并且在TEM下不存在囊泡,这证明了NP在此条件下是解离的(图2E)。然后研究了BAQ ONN在生理pH(7.4)和溶酶体pH(5.0)下的释放行为。如图2F所示,BAQ12 NP和BAQ13 NP在pH 5.0下在8h内几乎完全释放(约90%),但在中性条件下在24h内仅释放约10%的药剂。考虑到溶酶体将pH保持在4.0-5.5的范围内,据信BAQ ONN在到达这些隔室后会解离成游离小分子,从而发挥治疗效果。BAQ12NP和BAQ13 NP的临界聚集浓度(CAC)经测量分别为0.76μM和0.25μM(图2G)。在它们之间观察到的3倍差异表明BAQ13可比BAQ12更容易形成NP,尽管它们的分子结构之间仅有一个亚甲基单元的差异。即使在10%血清或0.5mM牛血清白蛋白存在下,两种NP在室温下在相对长的持续时间内也表现出良好的粒径稳定性(图9A至图9F)。此外,BAQ13 NP在这种长期储存中显示出比BAQ12 NP更高的稳定性,这可能是由于它们不同的CAC。

[0246] 下一个研究是脂质体样BAQ ONN是否可包封附加药剂。在BAQ13和各种药剂纳米沉淀后,自发形成具有单峰尺寸分布的均匀NP(表2和图9G)。BAQ13 NP表现出高载药含量(高达50%,质量比)以及约90%的药物包封效率(表2),这表明BAQ13 NP可超过传统的基于脂质体和基于聚合物的药物递送系统的载药限制。非常令人鼓舞的是,这些由单个小分子治疗实体组成的简单NP表现出如此强的载药能力。

[0247] 表2:使用BAQ13 NP的载药参数。

| 药物或染料 | NP:药物 (质量比) | 载药含量 | 包封效率 | 尺寸/ 直径 | PDI |
|--------------|----------------|------|------|-----------|-------|
| DiD (染料) | 1:1 | 50% | 100% | 120nm | 0.1 |
| 硼替佐米 | 1:1 | 50% | 89% | 92nm | 0.09 |
| β -拉帕酮 | 2:1 | 33% | 95% | 128nm | 0.047 |
| [0248] JQ1 | 1:1 | 50% | 92% | 110nm | 0.048 |
| 雷帕霉素 | 1:1 | 50% | 90% | 85nm | 0.15 |
| 依托泊苷 | 1:1 | 50% | 86% | 69nm | 0.104 |
| 阿波唑 | 1:1 | 50% | 93% | 85nm | 0.099 |
| 长春碱 | 1:1 | 50% | 95% | 60nm | 0.133 |
| 来那度胺 | 1:1 | 50% | 88% | 85nm | 0.069 |
| 那布卡辛 | 4:1 | 20% | 85% | 110nm | 0.101 |

[0249] 溶酶体中的积累和溶酶体破坏. 为了证实BAQ ONN的溶酶体积累, 装载近红外荧光染料1,1'-双十八烷基-3,3,3',3'-四甲基吲哚二-羧花青 (DiD) 用于标记和追踪。如所预期的, 葡聚糖-Alexa Fluor 488 (AF488) 染色的MIA PaCa-2细胞中的溶酶体斑点 (绿色) 与DiD标记的NP (红色) 一致地重叠, 表明BAQ ONN被细胞快速摄取并积累在溶酶体中 (图3A和图10A)。在这种积累后, BAQ ONN减少了LysoTracker阳性斑点, 显示出它们类似于Lys05和MSDH的使溶酶体脱酸的能力 (图3B和图10B至图10C)。

[0250] 通过使用染料吖啶橙 (AO) 的活细胞染色研究BAQ12和BAQ13对LMP的诱导。与用Lys05和MSDH处理的细胞相比, 用BAQ12 NP或BAQ13 NP处理的细胞表现出减少的红色斑点数量和增加的绿色荧光与红色荧光的比率, 这表明BAQ ONN在癌细胞中诱导溶酶体破坏的能力增加。 (图3C和图10D至图10E)。通过检测葡聚糖-AF488从溶酶体的释放进一步证实该LMP效应。如图3D所示, 用BAQ ONN处理导致整个细胞质出现弥漫性染色模式, 表明溶酶体渗漏, 而对照细胞中的荧光似乎仅限于点状结构, 代表完整的溶酶体。利用它们的LMP功能, BAQ ONN被证明诱导组织蛋白酶B从分离的溶酶体释放, 这是凋亡的重要触发因素 (图3E)。由于在MSDH处理的细胞中没有观察到LMP, 因此结果表明BAQ12和BAQ13代表了下一代亲溶酶体去污剂。

[0251] 自噬抑制. 为了探索BAQ ONN对自噬的影响, 测量了微管相关蛋白1轻链3 (LC3) 和Sequestosome 1 (SQSTM1)/p62蛋白的水平, 其通常用于监测自噬过程中的变化。在自噬期间, LC3的细胞溶质形式 (LC3-I) 转化为脂质修饰形式 (LC3-II), 然后被募集到自噬体膜。同时, 自噬底物SQSTM1/p62蛋白通过选择性掺入自噬体而被降解。因此, 当自噬被抑制时, 应观察到LC3-II和SQSTM1/p62水平升高, 而如果自噬被激活, 则应观察到LC3-II水平升高和SQSTM1/p62水平降低。如图3F至图3G所示, 与未处理的细胞和Lys05处理的细胞相比, 用BAQ ONN处理的MIA PaCa-2细胞在LC3-II和SQSTM1/p62蛋白水平上都显示出显著的浓度依赖性增加。在用已知的自噬抑制剂巴佛洛霉素A1 (BfA1) 处理也观察到了这种增加。这些发现表明, BAQ ONN可比Lys05更有效地抑制细胞自噬。

[0252] 然后通过使用LC3B-GFP成像证实自噬抑制作用,因为细胞中荧光LC3-II斑点的形成可用于可视化自噬体的积累。用BAQ ONN处理的细胞以浓度依赖性方式产生明显的LC3B-GFP斑点(图3H和图10F)。定量每个细胞的LC3B-GFP斑点,这揭示了BAQ ONN的自噬抑制效力高于Lys05(图3I)。为了进一步验证,使用TEM监测细胞的微形态变化。如所预期的,与Lys05和MSDH相比,BAQ ONN诱导了细胞中更大的自噬囊泡(AV)或自噬体的形成,这进一步证实了BAQ ONN自噬抑制作用的改善(图3J至图3K)。总之,发现表明BAQ12 NP和BAQ13 NP在抑制自噬方面超过亲本Lys05;因此,BAQ ONN代表了一代纳米配制的自噬抑制剂。

[0253] 质子海绵效应和溶酶体功能障碍。作为阳离子分子,BAQ12和BAQ13都具有很强的H⁺缓冲能力,这是具有质子海绵效应的材料的基本特征(图2C)。上述TEM结果表明BAQ ONN可显著扩大溶酶体(图3J至图3K),证明了BAQ ONN的质子海绵效应。为了进一步研究这些效应,使用RNA测序(RNA-seq)表征了MIA PaCa-2细胞在处理后的转录组学变化。测试了总共13234个基因,并比较了它们在溶媒组、Lys05组和BAQ13组中的表达水平。使用火山图分析,与溶媒组相比,在Lys05组中发现了165个差异表达的基因(DEG)(倍数变化 ≥ 2 且p值 ≤ 0.05),包括62个上调基因和103个下调基因。相比之下,在BAQ13处理的细胞中发现了390个DEG,包括209个上调基因和181个下调基因(图11A)。用京都基因与基因组百科全书(KEGG)对该基因集进行的富集分析揭示,BAQ13 NP诱导溶酶体相关基因的强烈上调,溶酶体相关基因诸如V-ATP酶基因、Cl-通道基因、蛋白酶基因和溶酶体相关膜蛋白(LAMP)基因(图4A至图4C和图11B)。qPCR分析还证实了V-ATP酶基因和Cl-通道基因的上调,这显著表明BAQ ONN具有强的质子海绵性质(图4D至图4E)。

[0254] 重要溶酶体酶基因诸如组织蛋白酶和NEU1的上调也强调了BAQ ONN引起的溶酶体功能障碍(图4B至图4C)。被认为部分负责维持溶酶体完整性的LAMP基因也被上调,这表明BAQ ONN在溶酶体破坏中的功能(图11C)。BAQ ONN处理组表现出促凋亡基因(BAX、BAK1、BAD、BIM和PUMA)的高转录水平,揭示了增强的促凋亡作用(图11C至图11D)。然后使用脂质组学分析证实了BAQ ONN诱导的溶酶体功能障碍。BAQ13 NP诱导酸性鞘磷脂酶(ASM)前体鞘磷脂(SM)的积累,并导致其产物神经酰胺(Cer)水平的降低(图11E)。此外,包括磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)和磷脂酰丝氨酸(PI)在内的磷脂酶A(PLA)前体的水平降低,并且它们对应的产物溶血磷脂酰胆碱(LPC)、溶血磷脂酰乙醇胺(LPE)和溶血磷脂酰丝氨酸(LPI)的水平增加(图11F)。

[0255] 本发明的纳米载体还可包括其中R¹是脱镁叶绿酸a的偶联物,以形成脱镁叶绿酸a双氨基喹啉偶联物(PBC)。PBC纳米颗粒是溶酶体靶向的形态可转化的纳米组装体。PBC纳米颗粒在生理条件下具有脂质体样形态,并且在溶酶体中积累后可转化为纳米纤维。溶酶体中形成的纳米纤维可引起溶酶体功能障碍并触发癌细胞的凋亡。由于在结构中包含光敏基团,因此这种纳米颗粒还支持基于溶酶体的高效光动力治疗,该治疗可本质上克服自噬相关的耐药性。

[0256] 实施例3:体外研究

[0257] 细胞系和细胞培养物。人胰腺癌细胞系(MIA PaCa-2、BXPC3和PANC-1)最初购自ATCC,并且由Shiro Urayama博士的实验室友情提供。HT29、HCT116、H460、MCF7、NIH/3T3和IMR-90细胞系均购自ATCC。从FVB/N小鼠的腿骨髓中收集骨髓细胞。根据ATCC方案,在37°C下,在5%CO₂/95%空气的湿润气氛中,使用补充有10%胎牛血清、100 μ g \cdot mL⁻¹青霉素和100

单位·mL⁻¹链霉素的对应培养基培养所有细胞。所有细胞系均已常规检测支原体污染。

[0258] 患者来源的胰腺癌干细胞(PCSC)的建立.胰腺患者组织由加州大学戴维斯分校(UC Davis)医学中心的Shiro Urayama博士的实验室捐赠。根据机构审查委员会(加州大学戴维斯分校IRB协议#244896),获得了使用“残留临床生物样本”的患者同意。使用胶原酶IV和分散酶(加拿大温哥华的干细胞技术公司(Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada))收集患者肿瘤组织,并通过70 μ m过滤器过滤。通过用下列抗体(美国加利福尼亚州的Biologend)标记:抗CD44(IM7,目录号338823)、抗CD326(9C4,目录号324207)和抗CD24(ML5,目录号311119),并使用BD FACSAria II细胞分选仪来分离细胞(图16)。收集纯化的PCSC并将其维持在Essential 8Flex培养基(赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher))中,并使用温和细胞解离试剂(加拿大温哥华的干细胞技术公司(Stem Cell Technologies))进行胰蛋白酶消化。在肿瘤球形成测定中,将PCSC在Essential 8Flex培养基中的冷单细胞悬浮液与冷Matrigel(1:1,体积比)混合,然后将它们(100 μ L)缓慢且均匀地滴入24孔板上的孔中心(每孔5,000个细胞)。使Matrigel在37 $^{\circ}$ C的加湿培养箱中固化45分钟-60分钟,并将温热培养基(500 μ L)加入到每个孔中。允许肿瘤球在两周内形成。对于体内致瘤性,对PCSC进行计数并将其重悬于PBS和Matrigel(1:1)的混合物中,随后皮下注射到NRG小鼠的侧腹。

[0259] 细胞活力、细胞生长和集落形成.通过MTS测定评估细胞活力。简而言之,96孔板中的细胞(每孔4,000个细胞)按指示处理,然后与MTS试剂一起孵育4h。通过酶标仪测定OD值(490nm)。结果显示为由公式 $[(OD_{\text{治疗}} - OD_{\text{空白}}) / (OD_{\text{对照}} - OD_{\text{空白}})] \times 100\%$ 计算的平均细胞活力。通过Combobenefit 2.02分析药物组合数据。在细胞生长测定中,6孔板中的细胞(每孔50,000个细胞)按指示处理并每24h手动计数。集落形成测定也在6孔板上进行,起始密度为每孔1,000个-2,000个细胞。按指示孵育10天-20天后,用PBS洗涤细胞,并用结晶紫和甲醇的溶液染色20分钟。

[0260] 凋亡和半胱天冬酶3/7活性.使用FITC-膜联蛋白V/PI凋亡检测试剂盒(安肽生技公司(AnaSpec))测量细胞凋亡。简而言之,根据制造商的说明书对处理过的细胞染色,并在BD FACSCanto II流式细胞仪上检测。通过FlowJo 7.6.1分析数据。在半胱天冬酶3/7活性测定中,96孔板中的细胞(每孔10,000个细胞)按指示处理,随后加入AMC半胱天冬酶3/7测定试剂盒(每孔50 μ L,安肽生技公司(AnaSpec))。通过酶标仪记录荧光强度($\lambda_{\text{ex}} = 356\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 442\text{nm}$)。

[0261] 细胞摄取和脱酸.对于细胞摄取,用Alexa Fluor 488-葡聚糖(10kDa,100 μ g mL⁻¹,赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher))标记溶酶体36h,然后与负载DiD的BAQ NP(10 μ M,1:10,质量比)一起孵育2h。在溶酶体脱酸分析中,处理细胞2h并与LysoTracker Red(100nM,赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher))一起孵育1h。使用Zeiss共聚焦显微镜获得细胞图像并通过Zen 2.3和ImageJ 1.51s分析。

[0262] 溶酶体完整性.通过使用A0(赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher))或Alexa Fluor 488-葡聚糖(10kDa)染色来测量活细胞中的溶酶体完整性。对于A0染色,将处理的细胞与A0(2 μ g mL⁻¹)孵育1h。对于葡聚糖染色,将负载葡聚糖的细胞暴露于处理12h。在Zeiss共聚焦显微镜下捕获图像,并通过Zen2.3和ImageJ 1.51s分析。

[0263] LC3B-GFP成像.96孔板中的细胞(每孔5,000个细胞)通过自噬传感器LC3B-GFP(赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher))转染12h。如所示处理4h后,通过荧光显微镜(奥林巴

斯公司(Olympus))可视化细胞。每孔的斑点使用ImageJ 1.51s来定量。

[0264] 溶酶体分离和组织蛋白酶释放. 根据制造商的方案,使用溶酶体富集试剂盒(赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher))分离溶酶体。将等份的分离溶酶体按指示在37°C下孵育12h,然后在4°C下以 $15,000 \times g$ 离心30分钟以沉淀完整的溶酶体。在与 $200 \mu\text{M}$ 荧光组织蛋白酶B底物III(Z-Arg-Arg-AMC)一起孵育2h后,测定组织蛋白酶B释放到上清液中的量($E_x = 380\text{nm}$, $E_m = 460\text{nm}$)。

[0265] 溶血. 将溶于PBS(10mM, pH 7.4)中的红细胞(2%)与NP在37°C下一起孵育4h。以 $500 \times g$ 离心5分钟后,根据上清液中血红蛋白的量(540nm)用分光光度法测定溶血程度。溶血试验用于评估NP的pH依赖性去污能力和毒性。

[0266] 蛋白质印迹. 用RIPA缓冲液(赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher))裂解细胞或肿瘤样品。在4°C下离心(15分钟, $12,000 \times g$)后,通过Bradford蛋白质测定染料(Bio-Rad)测定上清液中蛋白质的浓度。常规进行免疫印迹,并使用ChemiDoc™ MP成像系统进行显影。

[0267] 细胞和肿瘤组织的TEM. 将8孔载玻片中的MIA PaCa-2细胞(每孔30,000个细胞, Lab-Tek)按指示处理48h。将新鲜收获的肿瘤切成 1mm^3 的块。用含有2.5%戊二醛和2%多聚甲醛的0.1M二甲胍缓冲液固定样品,并转移到碳方形网上,然后在Talos L120C TEM下观察。

[0268] RNA-seq. 用RNeasy迷你试剂盒(德国凯杰公司(Qiagen, Germany))从处理的MIA PaCa-2细胞($5 \mu\text{M}$, 24h)中提取总RNA。将样品提交到加州大学戴维斯分校综合癌症中心的基因组学共享资源(GSR)进行RNA-Seq分析。使用NEBNext Ultra定向RNA文库制备试剂盒(New England BioLabs)从100ng总RNA制备链RNA-seq文库。随后,将文库组合以在Illumina HiSeq 4000系统上进行多重测序($2 \times 150\text{bp}$, 双端, $> 20 \times 10^6$ 个读段/样品)。使用倍数变化和t检验分析归一化基因读数计数的数据。通过Funrich软件3.1.3收集差异表达的基因(DEG)用于信号传导途径富集。基因集来自MSigDB数据库(布罗德研究所(Broad Institute))。使用KEGG基因集类别中的GSEA版本3.0在线进行GSEA,使用以下参数: $n=1,000$ 个排列,其中p-调节 < 0.05 和FDR < 0.05 被认为是显著的。

[0269] qPCR. 使用TRIZOL试剂(英杰公司(Invitrogen))和苯酚-氯仿提取法分离总RNA。使用SuperScript II逆转录酶(英杰公司(Invitrogen))在 $20 \mu\text{L}$ 反应物中用 $2 \mu\text{g}$ 总RNA合成cDNA。将所得cDNA在无核酸酶的水中以1:20稀释,并且每个qPCR反应物使用 $4 \mu\text{L}$,一式三份。使用Power SYBR Green PCR预混液(赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher))在包括非模板阴性对照的CFX96实时PCR检测系统(Bio-Rad)上进行qPCR。GAPDH的扩增用于归一化mRNA表达的水平。引物序列在表3中列出。

[0270] 表3:用于RT-PCR分析的引物和序列。

| 基因 | 引物 |
|------------|------------------------------------|
| BAD | 5'-CCCAGAGTTTGAGCCGAGTG-3' (正向) |
| | 5'-CCCATCCCTTCGTCGTCCT-3' (反向) |
| BAX | 5'-CCCGAGAGGTCTTTTCCGAG-3' (正向) |
| | 5'-CCAGCCCATGATGGTTCTGAT-3' (反向) |
| BAK1 | 5'-GAGAGCCTGCCCTGCCCTCT-3' (正向) |
| | 5'-CCACCCAGCCACCCCTCTGT-3' (反向) |
| BIM | 5'-GGCAAAGCAACCTTCTGATG-3' (正向) |
| | 5'-TAACCATTTCGTGGGTGGTCT-3' (反向) |
| PUMA | 5'-GACCTCAACGCACAGTACGAG-3' (正向) |
| | 5'-AGGAGTCCCATGATGAGATTGT-3' (反向) |
| ATP6AP1 | 5'-CAGCGACTTGCAGCTCTCTAC-3' (正向) |
| | 5'-TGAAATCCTCAATGCTCAGCTTG-3' (反向) |
| ATP6V0D1 | 5'-TTCCCGGAGCTTTACTTTAACG-3' (正向) |
| | 5'-CAAGTCCTCTAGCGTCTCGC-3' (反向) |
| ATP6V1E1 | 5'-AACATAGAGAAAGGTCGGCTTG-3' (正向) |
| | 5'-GACTTTGAGTCTCGCTTGATTCA-3' (反向) |
| ATP6V0E1 | 5'-GTCCTAACCGGGGAGTTATCA-3' (正向) |
| | 5'-AAAGAGAGGGTTGAGTTGGGC-3' (反向) |
| LAMP2 | 5'-GAAAATGCCACTTGCCCTTATGC-3' (正向) |
| | 5'-AGGAAAAGCCAGGTCCGAAC-3' (反向) |
| LAMP3/CD63 | 5'-CAGTGGTCATCATCGCAGTG-3' (正向) |
| | 5'-ATCGAAGCAGTGTGGTTGTTT (反向) |
| SQSTM1/p62 | 5'-GACTACGACTTGTGTAGCGTC-3' (正向) |
| | 5'-AGTGTCCTGTGTTTCACCTTCC-3' (反向) |
| ATG2A | 5'-TGTCCCTGTAGCCATGTTTCG-3' (正向) |
| | 5'-TCAGGATCTCCGTGTACTCAG-3' (反向) |
| CLCN5 | 5'-ATAGGCACCGAGAGATTACCAA-3' (正向) |
| | 5'-CTAACGAACCTGATAAAAGCCCA-3' (反向) |
| CLCN6 | 5'-TCTCCTTACGGAAGATCCAGTT-3' (正向) |
| | 5'-AAGGTGGCAGACATGGAACAA-3' (反向) |
| CLCN7 | 5'-CCACGTTACCCCTGAATTTTGT-3' (正向) |
| | 5'-AAACCTTCCGAAGTTGATGAGG-3' (反向) |
| GAPDH | 5'-TGTGGGCATCAATGGATTTGG-3' (正向) |
| | 5'-ACACCATGTATTCCGGGTCAAT-3' (反向) |

[0273] 脂质组学.MIA PaCa-2细胞用化合物(2.5 μ M)处理48h,收集每组150万个细胞以制备用于RPLC-QTOF分析的常规样品。样品在Vanquish UHPLC系统上运行,然后使用Q-Exactive HF混合四极杆-轨道阱质谱仪进行数据采集。使用MS-DIAL 3.70处理LC-MS数据。通过首先使用已知值的总和或mTIC归一化对数据归一化以缩放每个样品来进行统计分析。然后将归一化峰高提交给R 3.5.1进行统计分析。用FDR校正和事后检验进行ANOVA分析。

[0274] BAQ衍生物的体外抗肿瘤活性.为了系统地研究体外抗肿瘤效果,选择三种胰腺癌细胞系(MIA PaCa-2、BxPC-3和PANC-1)和两种结肠癌细胞系(HT29和HCT116)用于48h MTS测定.BAQ ONN表现出 $1\mu\text{M} \sim 3\mu\text{M}$ 的 IC_{50} 值,因此效力分别为Lys05、HCQ和MSDH的约5倍、30倍和20倍(图4F、图12和表4)。这些结果还表明单独用BAQ12或BAQ13治疗比用Lys05和MSDH联合治疗更有效,表明药效团融合时发生了显著的药效协同作用。细胞生长和集落形成测定的结果进一步证明了BAQ ONN对肿瘤细胞的抑制作用(图4G至图4H)。BAQ ONN的改善的抗癌活性可归因于它们在癌细胞中诱导LMP、溶酶体功能障碍和自噬抑制的多种功能;这些作用被认为是凋亡的重要触发因素。为了检查BAQ ONN的促凋亡作用,随后检测MIA PaCa-2和HT29细胞中的凋亡信号。BAQ ONN处理导致半胱天冬酶3/7活性和凋亡水平显著升高(图4I至图4J)。对照Lys05以浓度依赖性方式增加凋亡信号,但其在接近 IC_{50} 的高浓度下的作用仍然比低浓度BAQ ONN的作用温和。这些结果表明,与用主要功能是自噬抑制的Lys05处理时相比,用多功能BAQ实体处理时癌细胞更可能经历凋亡。此外,与一组癌细胞系相比,包括IMR-90细胞、NIH/3T3细胞和骨髓细胞在内的非癌细胞系显示出对BAQ ONN的相对不敏感性,从而表明这些化合物的相对高安全性(图12和表4)。

[0275] 表4:计算的 IC_{50} 值。数据表示为平均值 \pm SD。

| 药物或纳米颗粒 | 48h MTS测定的 IC_{50} 值 (μM) | | | | | |
|----------|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | HCT116 | PANC-1 | BXPC-3 | IMR-90 | NIH/3T3 | 骨髓 |
| Lys05 | 8.0 \pm 0.7 | 10.8 \pm 0.9 | 11.1 \pm 1.7 | 15.5 \pm 2.5 | 12.6 \pm 0.9 | 14.0 \pm 1.1 |
| BAQ12 NP | 1.6 \pm 0.1 | 1.9 \pm 0.4 | 2.6 \pm 0.3 | 6.23 \pm 0.8 | 6.5 \pm 0.7 | 7.8 \pm 0.8 |
| BAQ13 NP | 1.6 \pm 0.1 | 2.6 \pm 0.3 | 3.1 \pm 0.1 | 6.7 \pm 0.5 | 7.0 \pm 0.5 | 8.0 \pm 0.8 |
| 伊立替康 | 17.0 \pm 1.0 | -- | -- | -- | -- | -- |

[0277] BAQ0衍生物的体外抗肿瘤活性.在胰腺癌干细胞(PCSC)中进行BAQ0衍生物的体外抗肿瘤效果.BAQ120 ONN显示出小于 $5\mu\text{M}$ 的 IC_{50} 值(图22B),而其他BAQ0衍生物在高达 $100\mu\text{M}$ 的浓度下没有显示出毒性。这些结果表明,BAQ0衍生物可为多用途的,用作治疗剂或药物递送剂,而不会产生细胞毒性。

[0278] 实施例4:体内研究

[0279] 动物模型.为了建立皮下异种移植模型,分别将用Matrigel(康宁公司(Corning))和PBS的混合物(1:1,体积比)悬浮的 5×10^6 个MIA PaCa-2细胞、 2×10^6 个HT29细胞或 2×10^4 个PCSC皮下注射到裸鼠或NRG小鼠的右侧腹。

[0280] 动物饲养.所有动物实验均按照加州大学戴维斯分校的机构动物护理和使用委员会批准的方案(#20265)进行。购买了包括BALB/c裸鼠(恩维戈公司(Envigo))、NRG小鼠(杰克森实验室(Jackson Laboratory))和FVB/N小鼠(查尔斯河实验室(Charles River))在内的雌性小鼠(4周-6周),并在标准条件($22 \pm 1^\circ\text{C}$,湿度50%-60%,12h光照/12h暗周期,自由获取食物和水)下分组饲养。

[0281] 体内治疗方案.将携带MIA PaCa-2异种移植肿瘤(约 100mm^3)的NRG小鼠随机分成5组($n=6$),然后按指示每三天进行iv注射。对于HT29异种移植模型,每三天对具有 100mm^3 肿瘤的六组裸鼠($n=6$)分别施用溶媒(盐水,iv)、Lys05(ip)、BAQ12 NP(iv)、BAQ13 NP

(iv)、伊立替康(ip)。对HT29模型的治疗在第24天停止,然后记录每组小鼠的存活,其中具有大于 $1,000\text{mm}^3$ 肿瘤的小鼠被认为死亡。对于共递送研究,携带PCSC肿瘤的NRG小鼠($n=5$)每三天用溶媒(盐水,iv)、那布卡辛(ip)、BAQ13 NP(iv)、BAQ13 NP+那布卡辛(分别为iv和ip)和BAQ13 NP@那布卡辛(iv)处理。每次药物施用前记录肿瘤体积和体重。在治疗结束时,处死小鼠并收集肿瘤以用于进一步分析。

[0282] 体内毒性研究.通过iv注射对雌性FVB/N小鼠研究BAQ NP的毒性。每两天向小鼠施用各种浓度(10mg kg^{-1} 、 20mg kg^{-1} 或 40mg kg^{-1})的Lys05、脂质体@Lys05、BAQ12 NP和BAQ13 NP。每天监测小鼠的状态,并且每两天记录它们的体重。收集血液样品并送到UCD比较病理学实验室进行全血细胞计数(CBC)和血清化学测试。

[0283] 体内药代动力学研究.向雌性Sprague-Dawley大鼠(200g-250g)的颈静脉中植入用于药物注射和血液收集的导管(美国印第安纳州印第安纳波利斯的哈兰德公司(Harland, Indianapolis, IN, USA))。分别给大鼠($n=3$)注射游离的DiD、BAQ12 NP@DiD(10:1,质量比)和BAQ13 NP@DiD(10:1,质量比),其中含有等效剂量的DiD(0.5mg kg^{-1})。在指定的时间点收集血液样品,然后离心以获得血浆。用DMSO(1:100)稀释血浆,并通过酶标仪(SpectraMax M2)测量荧光强度($\lambda_{\text{Ex}}=595\text{nm}$, $\lambda_{\text{Em}}=665\text{nm}$)。

[0284] 体内/离体生物分布.对携带HT29肿瘤的裸鼠以 1.0mg kg^{-1} DiD的剂量iv施用BAQ13 NP@DiD(10:1,质量比)。在对应的时间点进行体内成像研究。从小鼠收集器官(脑、心脏、肺、肝、脾、肾、肠和肌肉)和肿瘤用于离体成像。在携带PCSC肿瘤的NRG小鼠上研究BAQ13 NP@NAPA+DiD($10/2.5/1.0\text{mg kg}^{-1}$,iv)的生物分布。如上所述进行体内和离体成像研究。

[0285] 统计.使用GraphPad Prism 7.0进行统计分析。数据表示为平均值 \pm SD, n =生物学重复或独立的纳米颗粒样品重复。使用具有Tukey多重比较检验或双尾学生t检验的单向ANOVA来计算p值,如在每个图例中所示。ns.,不显著;* $p<0.05$;** $p<0.01$ *** $p<0.001$;**** $p<0.0001$ 。

[0286] 数据可用性.RNA-seq数据已以登录代码GSE154323[<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE154323>]保存在基因表达综合(GEO)数据库中。

[0287] 药代动力学、生物分布和毒性.在Sprague-Dawley大鼠中,通过静脉内(iv)注射研究BAQ ONN的药代动力学。如图5A和表5所示,BAQ ONN的血清浓度在相同的时间点均高于游离DiD的血清浓度,直至48h,这表明由于BAQ ONN的纳米级特征,BAQ ONN的血浆清除率比DiD慢。DiD标记的BAQ13 NP也用于研究NP在携带HT29肿瘤的裸鼠中的生物分布。如所预期的,体内和离体成像均显示,在注射后12h和24h,BAQ13 NP的荧光信号在肿瘤区域而不是周围正常组织中清晰可辨,表明BAQ ONN的肿瘤靶向生物分布(图5B至图5C和图13A至图13B)。这种靶向能力可能是由于肿瘤血管的相对较高的通透性,这使得纳米治疗剂能够被动积累。游离DiD(对照)组在肺中而不是在肿瘤部位中显示高信号(图13A至图13B)。特别地,BAQ13 NP组中肿瘤与肺的荧光比率为游离DiD组中的约4倍。这些结果表明,BAQ ONN具有肿瘤靶向生物分布。

[0288] 表5.使用Kinetica 5.0计算的药代动力学参数。

| 纳米颗粒 | C _{max} (ng mL ⁻¹) | AUC ₀₋₄₈ | T _{1/2} (h) |
|--------------|---|---------------------|----------------------|
| [0289] 游离DiD | 8.6 | 34.9 | 0.8 |
| BAQ12 NP@DiD | 10.6 | 124.7 | 12.4 |
| BAQ13 NP@DiD | 11.0 | 182.0 | 15.9 |

[0290] 接着进行溶血试验,以评价BAQ ONN的安全性。在生理条件下,用浓度为0.25mg mL⁻¹-1mg mL⁻¹的Lys05、BAQ12 NP或BAQ13 NP处理红细胞,接近用于动物处理研究的工作浓度(图13C)。与用浓度高于0.5mg mL⁻¹的BAQ12 NP或BAQ13NP的处理相比,使用对照药物Lys05的处理导致显著更高的溶血率,表明BAQ ONN比Lys05更安全。在以下对FVB/N小鼠的动物毒性研究中,发现在iv施用后,即使在10mg kg⁻¹的低浓度下,Lys05处理也导致小鼠急性死亡;相比之下,BAQ ONN处理导致低死亡率和无体重减轻,揭示了BAQ ONN当通过iv注射施用是安全的(图13D至图13E)。由于BAQ13 NP在40mg • kg⁻¹下不会导致任何死亡,因此小鼠对BAQ13 NP的耐受性比BAQ12 NP更好。这一结果可能是由于BAQ13 NP的高稳定性和低CAC。脂质体用于包封Lys05(脂质体@Lys05),并且发现该制剂对于iv注射是安全的(图13E至图13F)。因为自噬在肠道稳态中起重要作用,所以导致自噬抑制作用增强的BAQ12 NP或BAQ13 NP的腹膜内(ip)施用可能引起小鼠的肠紊乱和体重减轻。在通过尾静脉用20mg kg⁻¹BAQ NP处理的小鼠中,组织切片的H&E染色和血液学指标没有显示出明显的异常变化,这进一步表明BAQ ONN的iv施用是良好耐受的(图14A至图14E)。因此,BAQ ONN应通过iv注射而不是通过ip注射施用,以研究它们在体内的优势。

[0291] 作为单一药剂对小鼠的抗肿瘤效果。在证明BAQ ONN的安全性之后,在MIA PaCa-2细胞的胰腺异种移植模型中评价NP的抗癌功效。将带有MIA PaCa-2肿瘤(约100mm³)的NRG小鼠随机分配为五组(n=6):盐水(iv)组、Lys05(ip)组、脂质体@Lys05(iv)组、BAQ12 NP(iv)组和BAQ13 NP(iv)组。然后每三天以20mg kg⁻¹的剂量处理小鼠。图5D至图5F中的结果显示用BAQ12 NP或BAQ13NP处理显著减缓肿瘤生长而不干扰体重。对照药物Lys05在这种条件下没有显示治疗效果,但其纳米制剂脂质体@Lys05引起增加的肿瘤抑制,这突出了纳米药物在药物递送中的优势。还应强调的是,自组装BAQ12 NP或BAQ13 NP的单组分制剂明显比游离Lys05或纳米配制的Lys05更有效。这些发现清楚地说明了BAQ ONN在药物发现和药物递送方面的潜在优势。

[0292] 为了进一步了解BAQ ONN的体内作用,收获肿瘤组织用于组织学评估。在两个BAQ ONN组中都观察到显著的细胞破坏、裂解的半胱天蛋白酶-3水平增加和Ki67表达降低,表明用BAQ ONN处理的肿瘤倾向于死亡或变得凋亡或静止(图5G至图5H)。在两个BAQ ONN组中LC3表达都增加(图5H);这一发现是解释两种BAQ ONN的体内自噬抑制作用的重要线索。随后的免疫印迹分析进一步证明肿瘤中的自噬被BAQ ONN阻断(图5I)。另外,通过TEM观察组织超微结构并且发现BAQ ONN处理的肿瘤比肿瘤组含有更多的大AV(图5J)。在上述测定中,Lys05纳米制剂脂质体@Lys05也表现出一些用溶媒或游离Lys05未观察到的作用。然而,脂质体@Lys05的作用比BAQ12 NP或BAQ13 NP的作用弱得多。这些组织水平的结果揭示了BAQ ONN在体内优异的自噬抑制作用。

[0293] BAQ ONN在体内的治疗效应在由携带结肠HT29肿瘤的小鼠组成的另一动物模型中得到进一步证明。与溶媒或Lys05施用相比,BAQ ONN施用显著抑制肿瘤生长(图15A至图15B)。并且BAQ13 NP比BAQ12 NP显示出更好的功效。有趣的是,这个结果与体外增殖试验中获得的结果相矛盾,体外增殖试验证明BAQ12 NP比BAQ13 NP更有效。这种差异可通过BAQ ONN之间的自组装行为和药代动力学特性的差异来解释(图2G、图5A)。此外,在已报告的治疗剂量下,BAQ13 NP也比FDA批准的伊立替康更有效,而BAQ12 NP显示出与伊立替康相似的作用。生存分析揭示,BAQ13 NP处理导致比溶媒组和伊立替康组(中位生存期分别为21天或36天)显著更长的生存时间(中位生存期为48天)(图15C和表6)。由于它们在药效学作用和药代动力学特性方面的多种优势的整合,因此杂交BAQ ONN作为单一药剂在体内癌症治疗方面显示出巨大的潜力。

[0294] 表6:携带HT29肿瘤的小鼠的中位生存期。n=每组6只小鼠。

[0295]

| 组别 | 中位生存期(天数) |
|------------|-----------|
| 溶媒 | 21 |
| Lys05 | 28 |
| BAQ12NP | 34 |
| BAQ13NP(低) | 36 |
| BAQ13NP(高) | 48 |
| 伊立替康 | 36 |

[0296] BAQ ONN在联合疗法中的双重作用。基于自噬抑制的联合疗法可使肿瘤对常规治疗敏感,但是目前的限制是自噬抑制剂的功效不足。此外,在联合疗法中使用的药物的不同药代动力学和不同给药方案是不方便的。考虑到BAQ ONN为HCQ的30倍高的抗癌效力以及它们相当大的包封额外药物的潜力,BAQ ONN可能能够同时解决这两种药效学和药代动力学问题。为了检验该假设,通过使用来自患者来源的胰腺腺癌组织的胰腺癌干细胞(PCSC)系,建立了具有高异质性和高肿瘤基质比例的异种移植物模型(图6A至图6B和图16)。体外结果表明,BAQ ONN在抑制PCSC中的溶酶体和自噬方面具有相似的功能,因此表现出有效的促凋亡和抗增殖活性(图6C至图6E和图17A至图17C)。选择可包封在BAQ13 NP中的STAT3抑制剂那布卡辛用于联合疗法,因为它可诱导自噬并与BAQ13 NP协同作用(图6F和图17D)。将小鼠随机分成5组,包括溶媒(盐水)组、那布卡辛组、BAQ13 NP组、混合物(BAQ13 NP+那布卡辛)组和BAQ13 NP@那布卡辛组(图6G至图6I)。BAQ13 NP适度抑制肿瘤生长,而那布卡辛自身在这些条件下没有表现出抗肿瘤效果。尽管观察到那布卡辛和BAQ13 NP的体外协同作用,但混合组在体内没有表现出增强的作用。这种体内作用的缺乏可能是由于那布卡辛的溶解度差和递送效率低。当负载在BAQ13 NP(BAQ13 NP@那布卡辛)中时,纳米配制的那布卡辛通过与BAQ13 NP协同作用实现了令人满意的抗肿瘤效果。在BAQ13 NP@那布卡辛组中也观察到肿瘤组织学的显著变化,其中细胞显示低增殖活性(图6J)。此外,没有治疗组的小鼠表现出明显的全身毒性(图6I和图17E)。为了进一步验证BAQ13 NP递送那布卡辛的能力,通过使用DiD标记的BAQ13 NP@那布卡辛,对PCSC模型进行了另一项成像研究。结果显示NP在肿瘤部位而不是在正常器官中明显积累(图6K至图6L和图17F)。这些有趣的结果表明,在联合疗法中,BAQ13 NP不仅可用作治疗剂,而且还可用作递送载体;因此,它们显示出改善癌症治疗的前景。

[0297] BAQO衍生物在小鼠中的抗肿瘤效果. BAQO衍生物可形成纳米颗粒, 并且可用于体内小鼠研究。例如, BAQ120 NP用于治疗携带PCSC肿瘤的小鼠。如图24A所示, 用BAQ100 NP处理的小鼠具有较低的肿瘤体积, 到第27天时肿瘤体积有显著差异。图24B显示用BAQ120 NP处理结束时的肿瘤重量比对照的肿瘤重量轻50%。这些有趣的结果表明, BAQO衍生物可用作药物发现和药物递送的有前景的试剂。

[0298] 基于ONN策略以及药效团杂交和分子自组装的原理, 开发了自递送新化学实体BAQONN。除了改善的药物递送和肿瘤靶向生物分布的特性外, 这些实体还具有增强的诱导溶酶体破坏、溶酶体功能障碍和自噬阻断的能力; 因此, 它们在体外和体内都表现出显著的抗癌功效。引人注目的是, 发现简单的BAQ13 NP显示出高载药效率, 并且可有效地协同并递送额外的药物, 从而显示出在联合疗法中的应用前景。

[0299] 与通常具有低于20%的活性药物成分(API)含量且合成复杂的常规NP相比, BAQONN具有100%的API含量并且易于合成和放大。由于它们是非前药化学实体, 因此它们也优于新出现的单组分前药NP。所有这些优势将极大地促进它们转化为临床试验。这是将纳米技术扩展到新化学实体设计中的重要尝试。药物发现和纳米技术辅助的药物递送之间的无缝连接将使研究人员能够开发越来越先进的纳米药物, 这些药物对癌症靶向具有广泛的治疗和商业益处。

[0300] 尽管为了清楚理解的目的, 已通过说明和示例的方式相当详细地描述了前述发明, 但是本领域技术人员将理解, 在所附权利要求的范围内可以实施某些改变和修改。此外, 本文提供的每篇参考文献均全文以引用方式并入, 其程度与每篇参考文献单独以引用方式并入的程度相同。在本申请与本文提供的参考文献之间存在冲突时, 应以本申请为准。

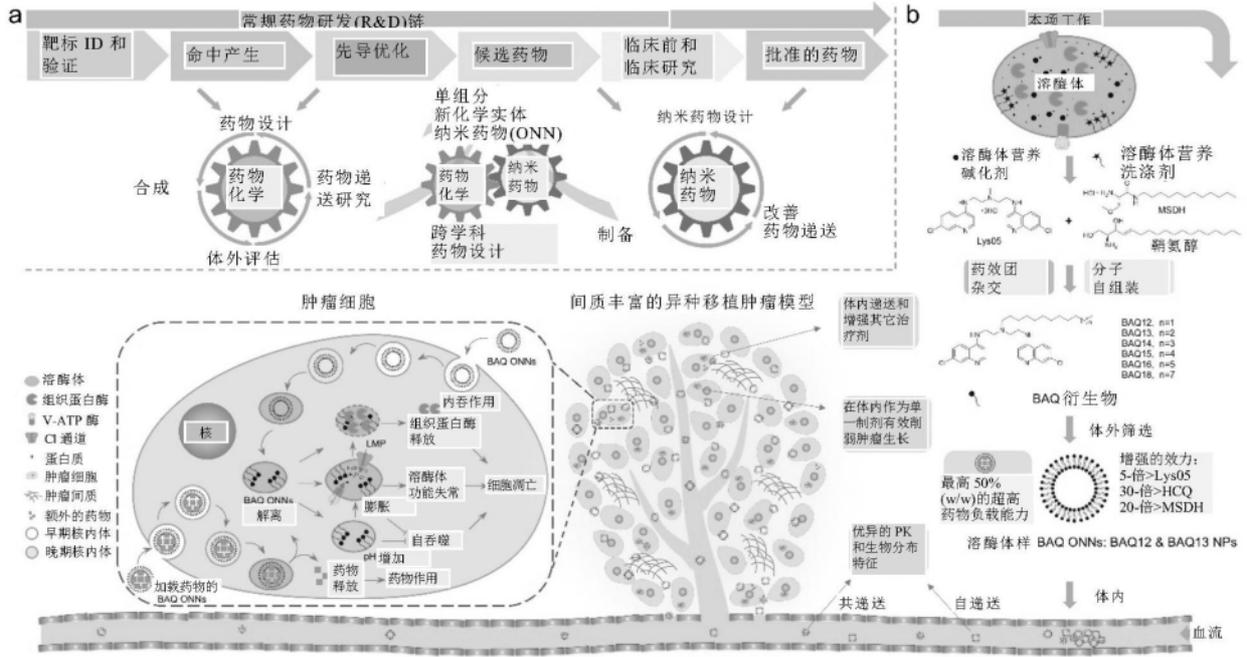


图1

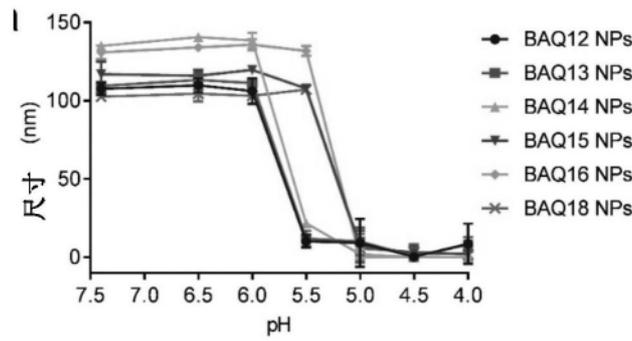


图2A

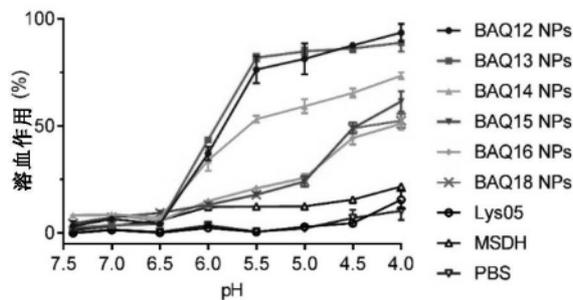


图2B

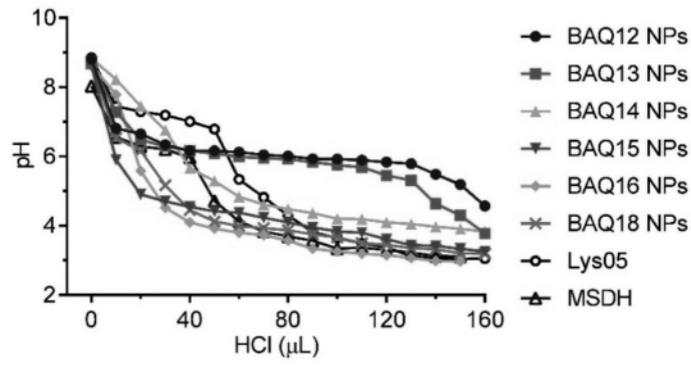


图2C

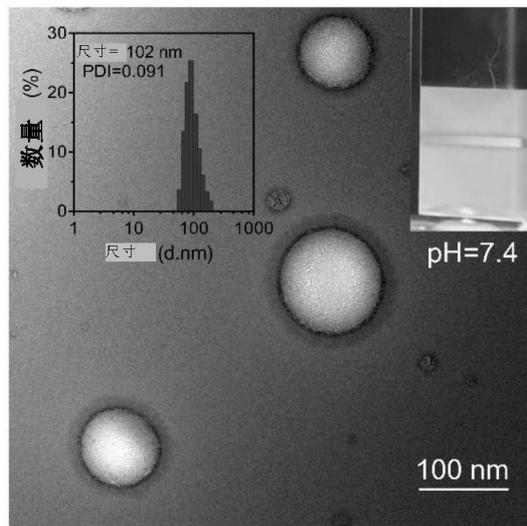


图2D

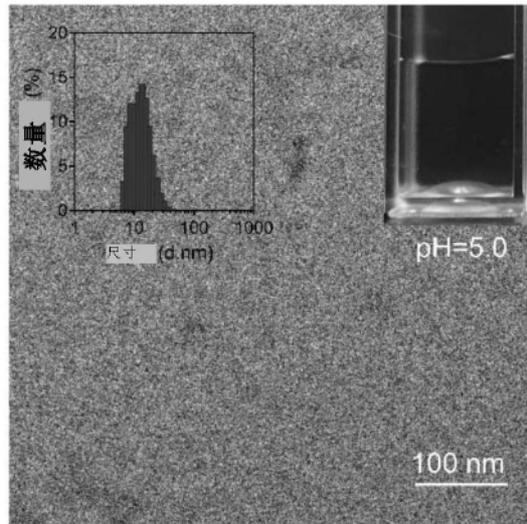


图2E

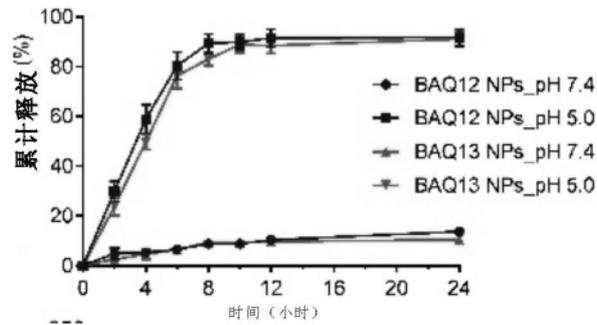


图2F

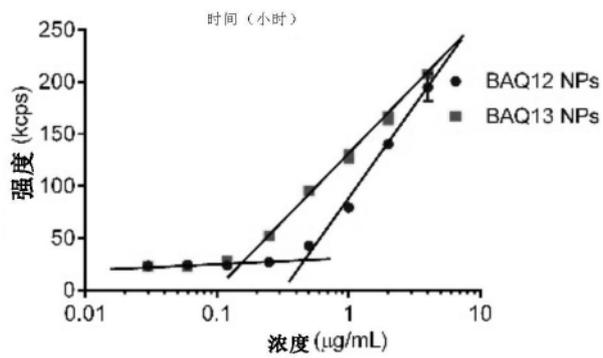


图2G

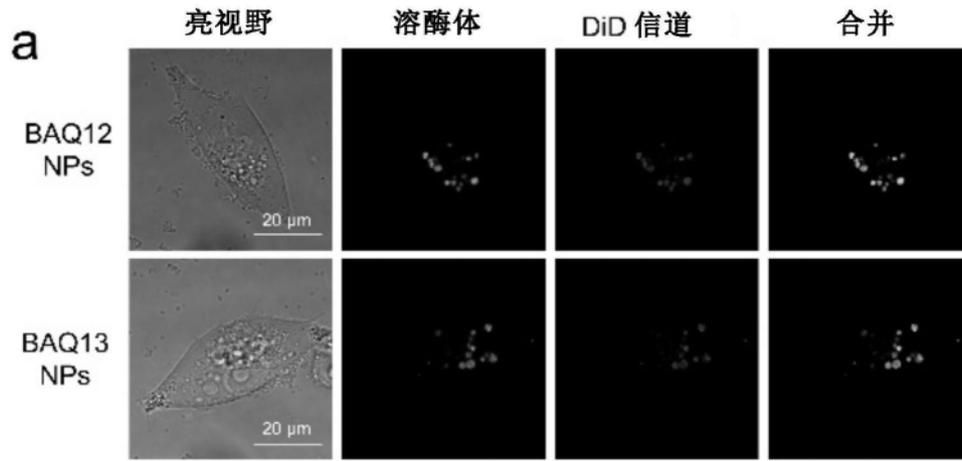


图3A

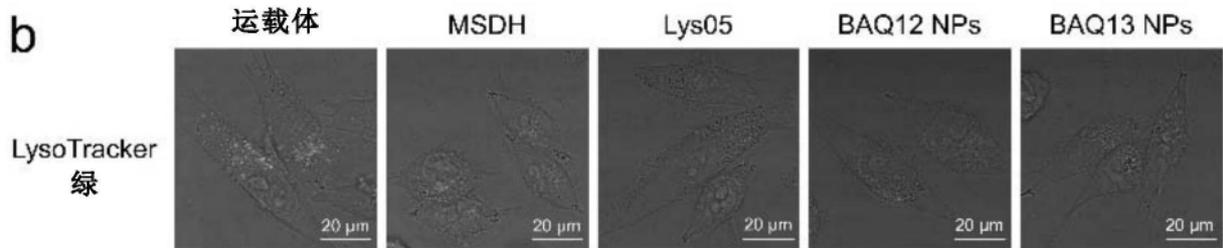


图3B

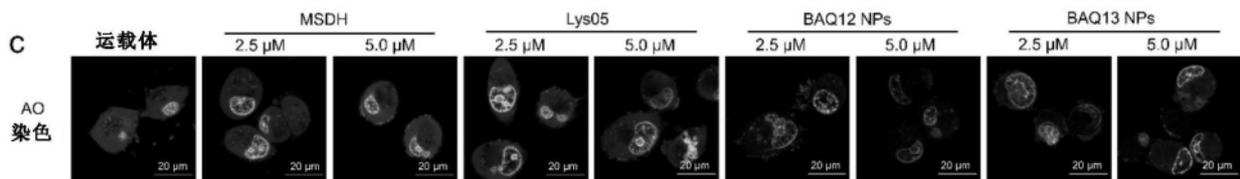


图3C

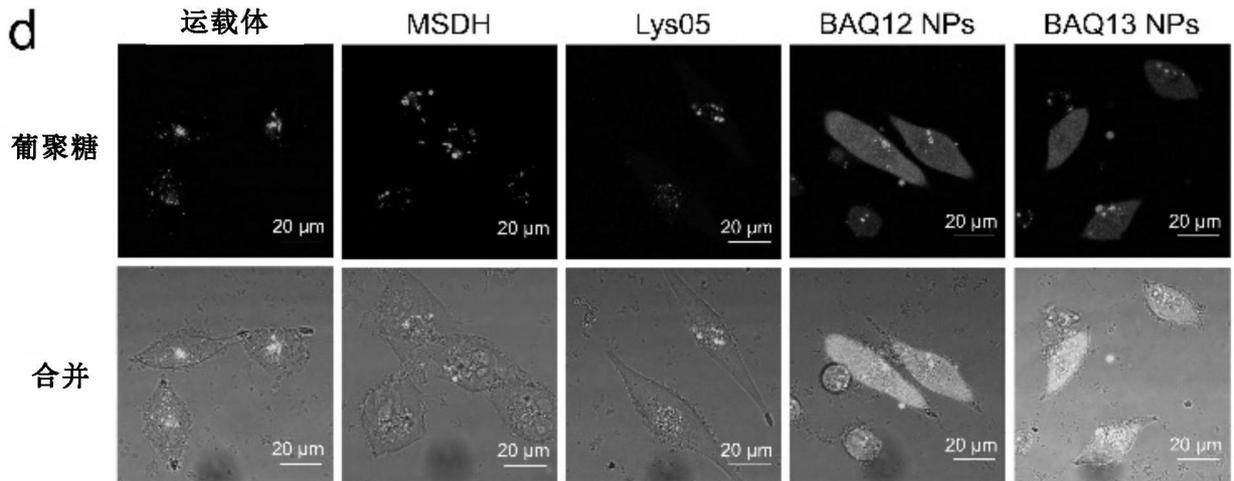


图3D

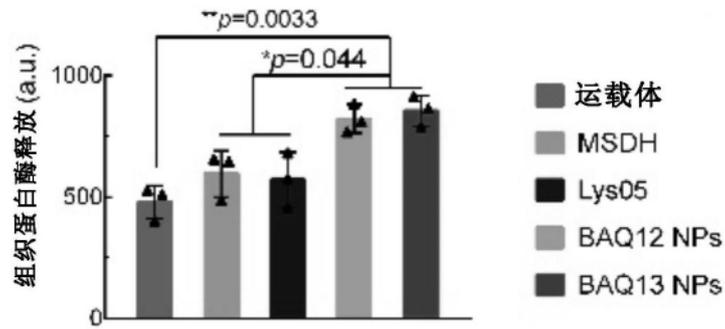


图3E

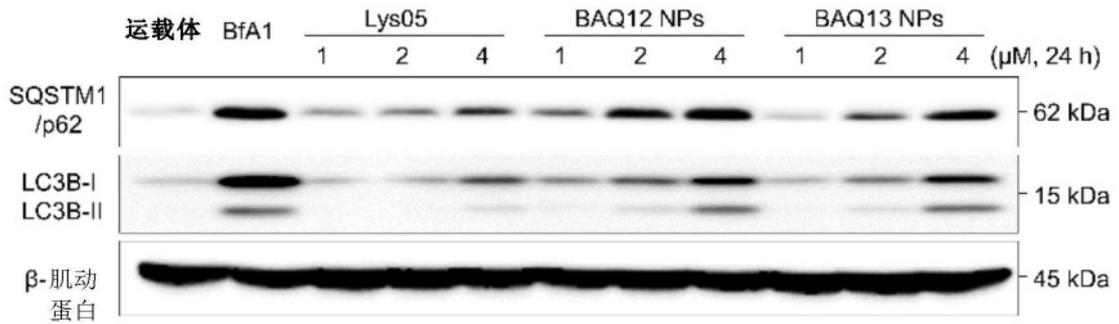


图3F

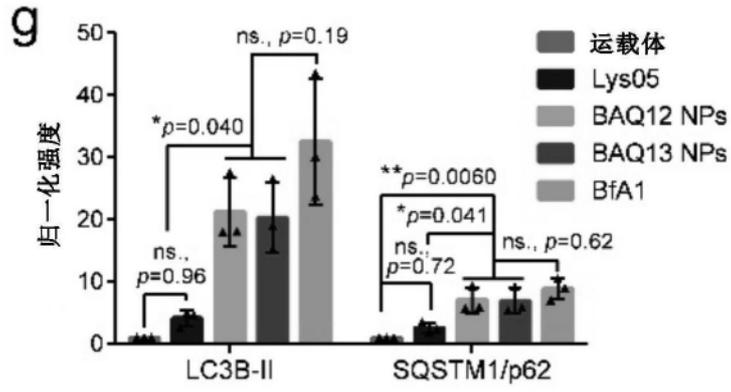


图3G

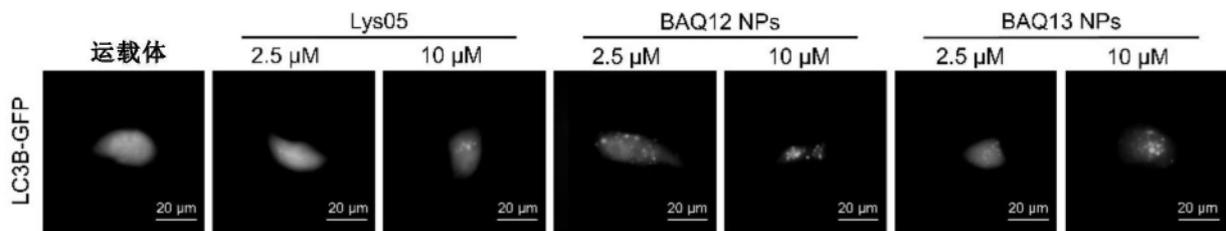


图3H

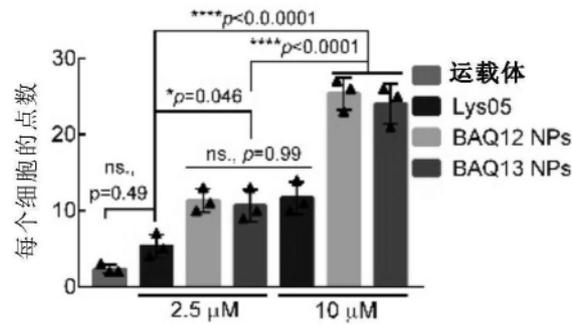


图3I

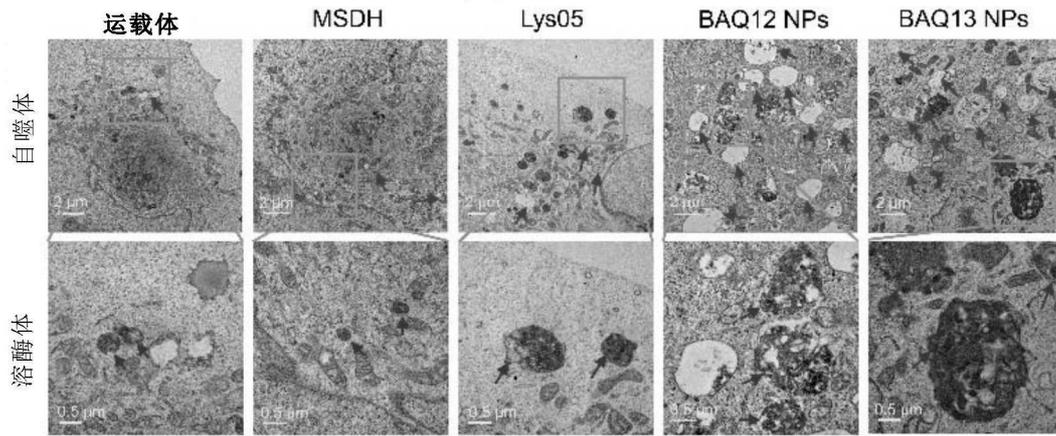


图3J

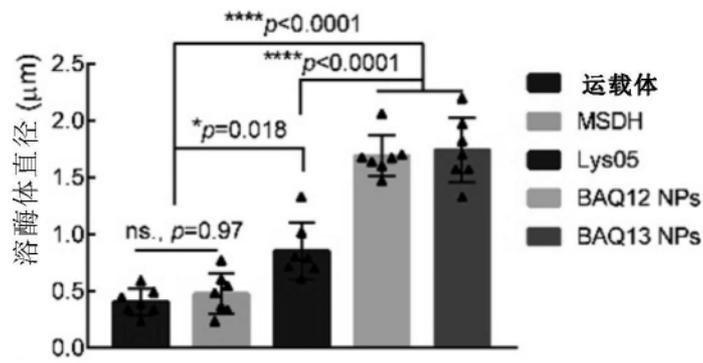


图3K

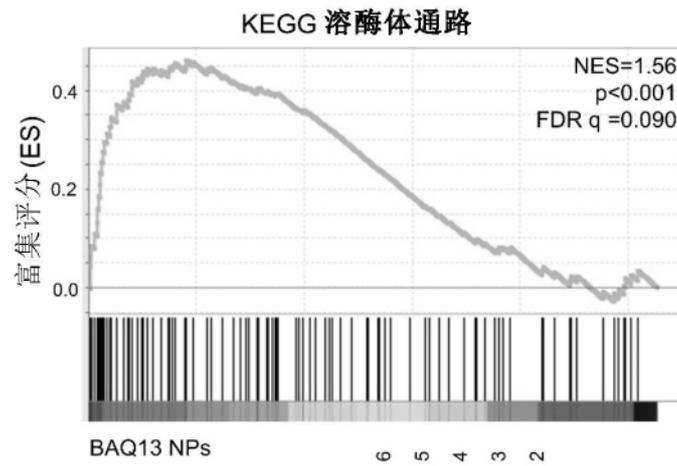


图4A

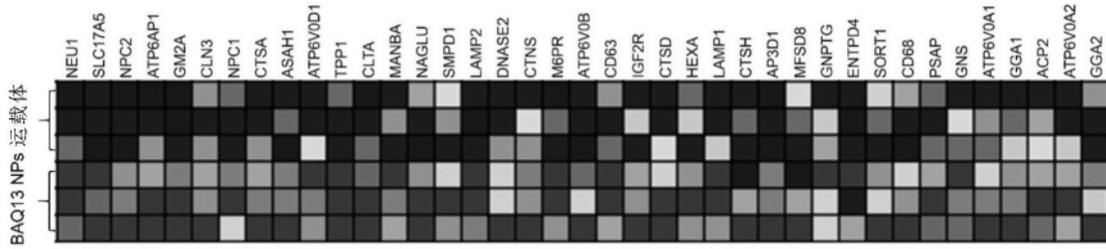


图4B

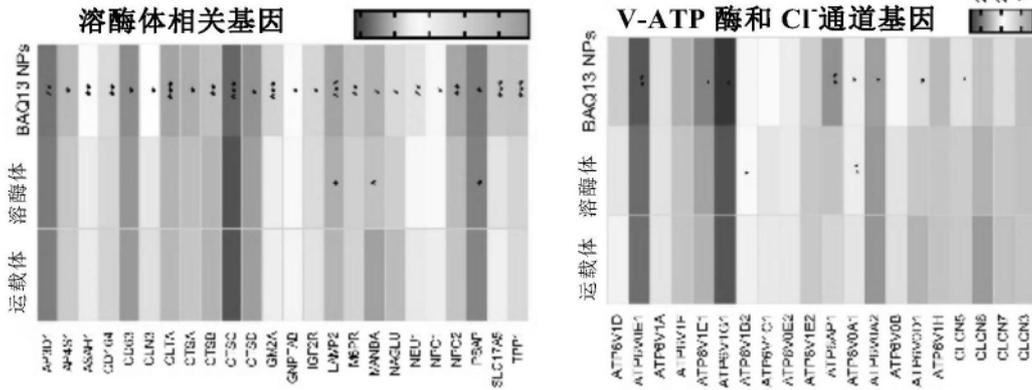


图4C

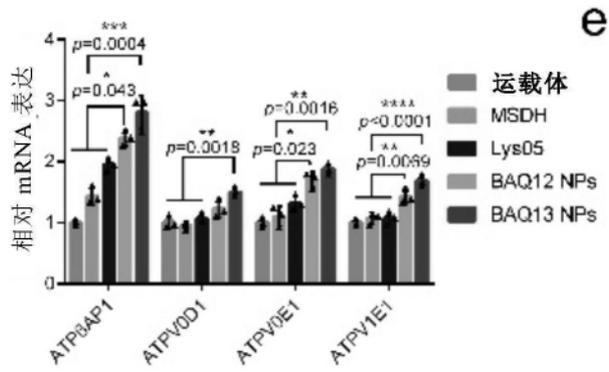


图4D

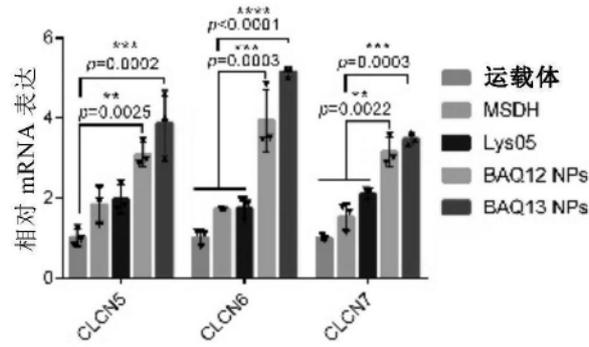


图4E

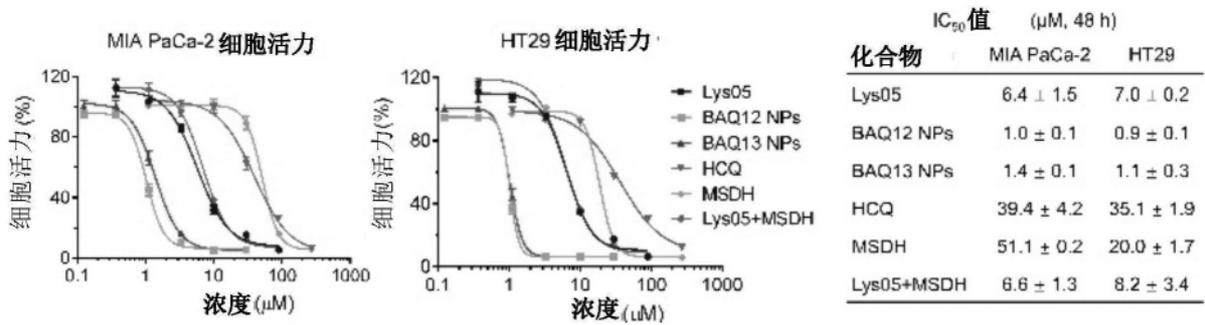


图4F

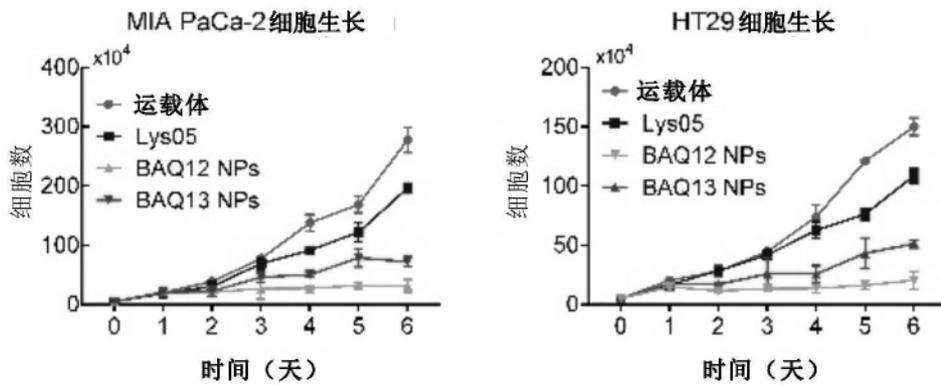


图4G

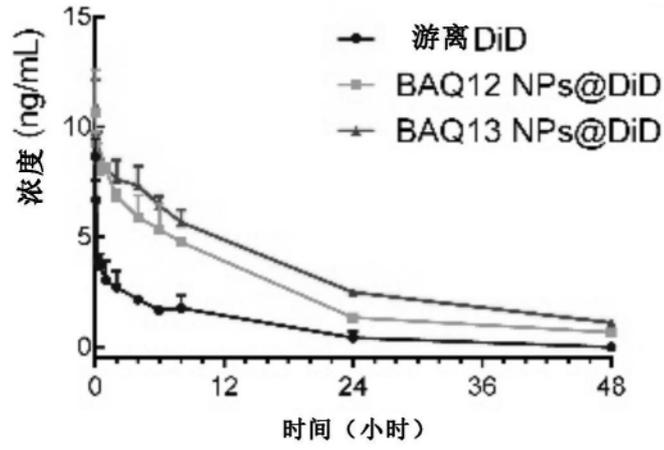


图5A

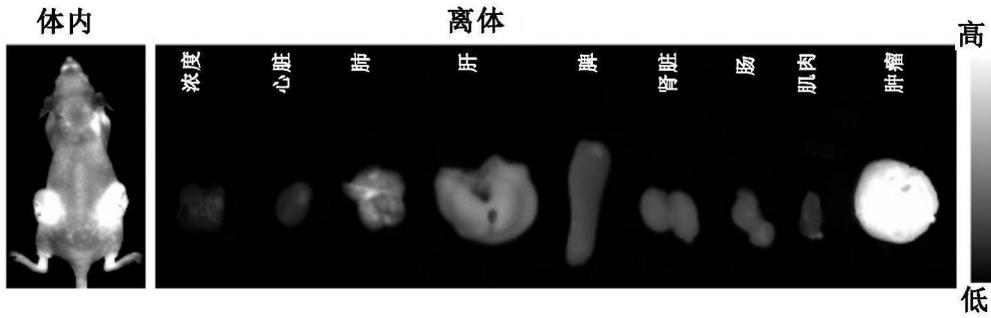


图5B

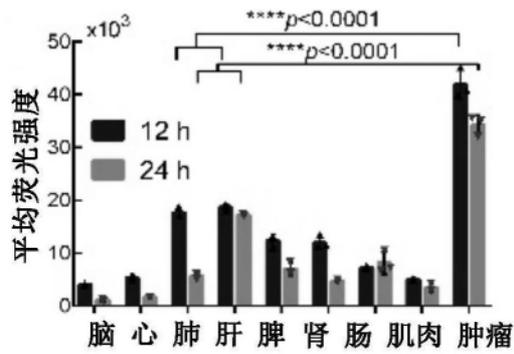


图5C

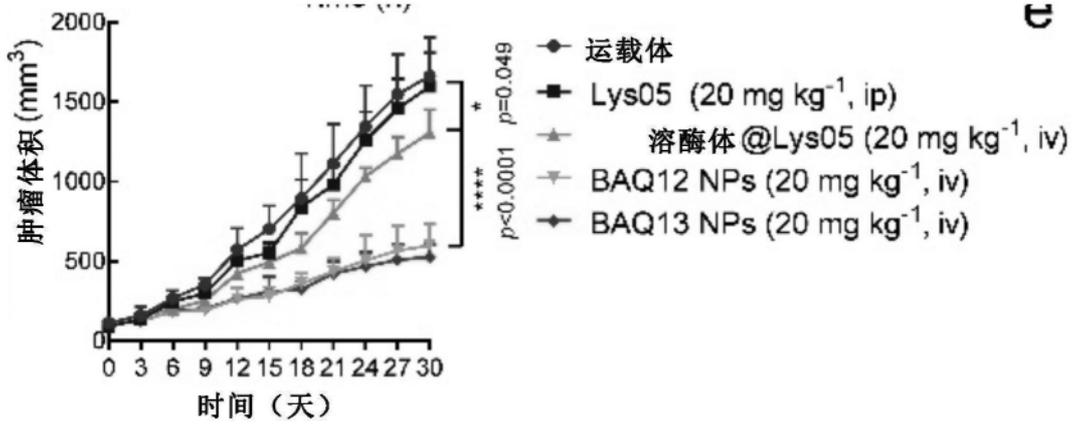


图5D

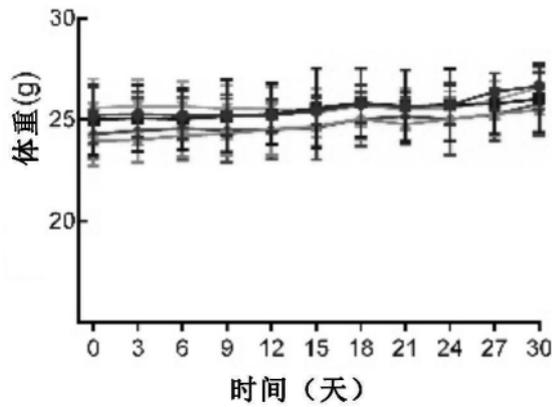


图5E

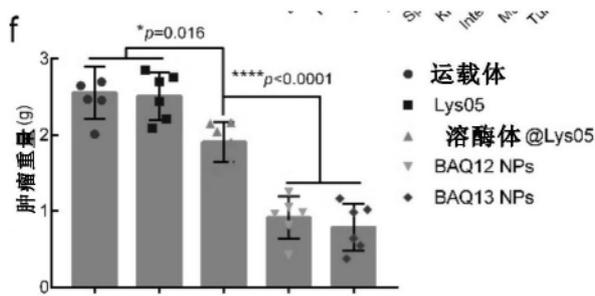


图5F

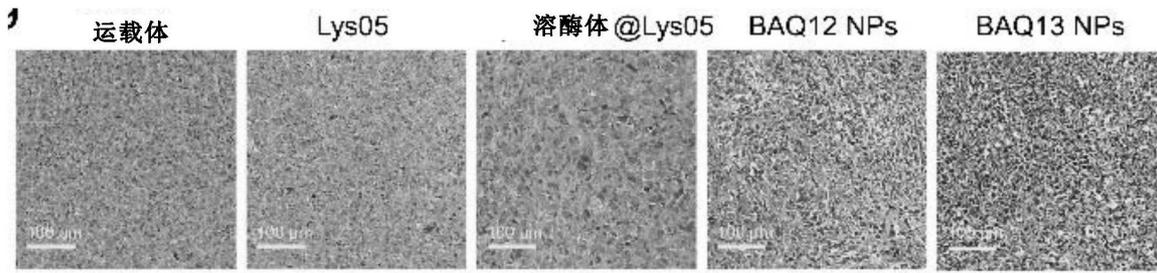


图5G

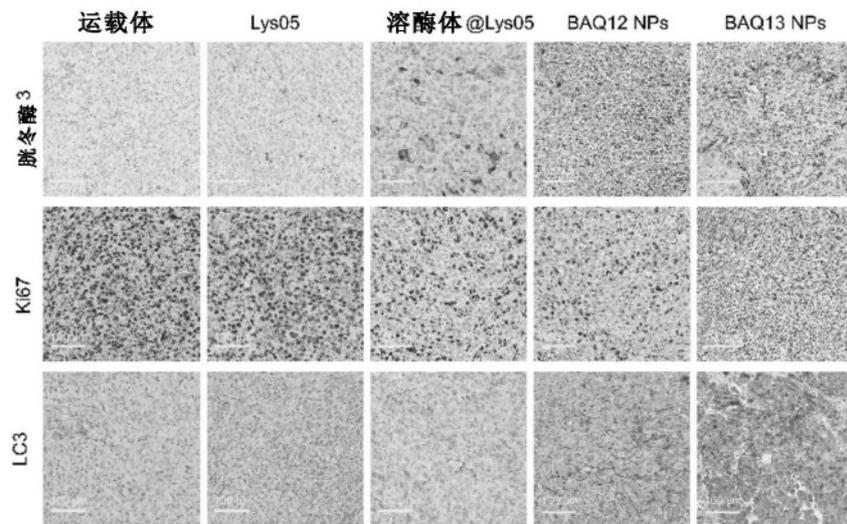


图5H

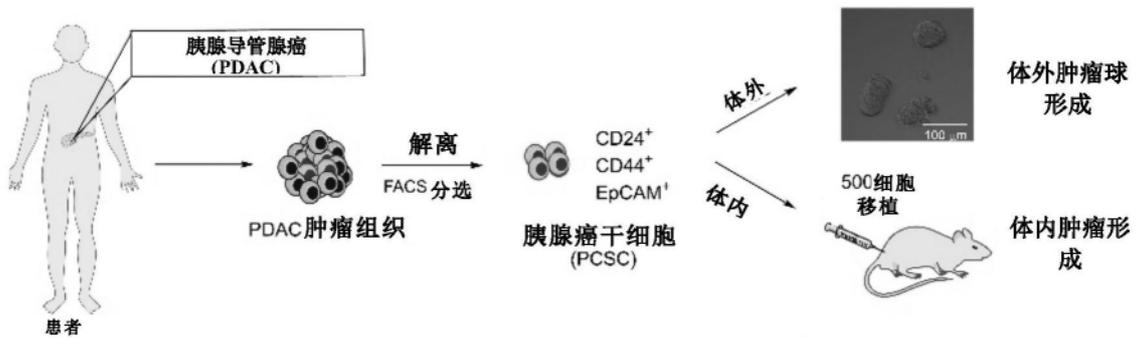


图6A

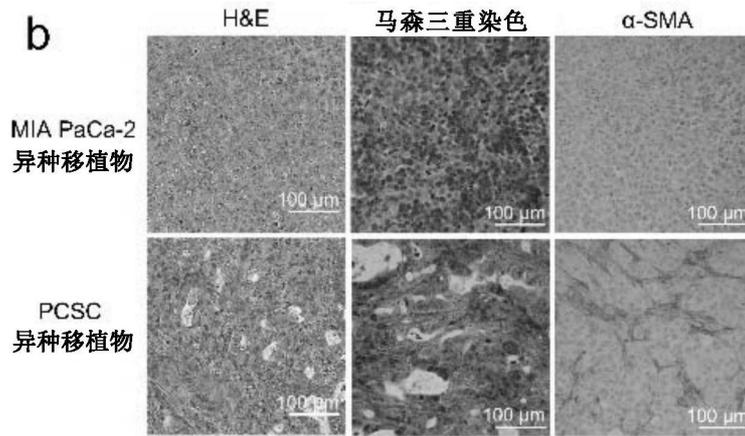


图6B

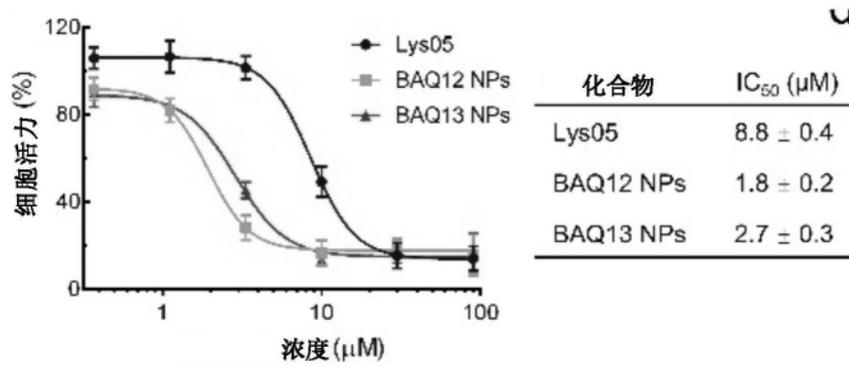


图6C

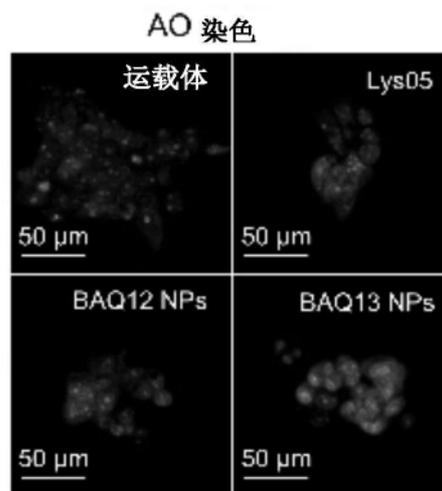


图6D

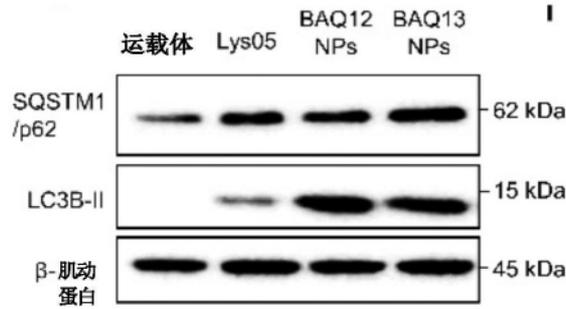


图6E

根据 D-R(HSA)作图的多药联用效应
BAQ13 NP 和 Napa 的组合

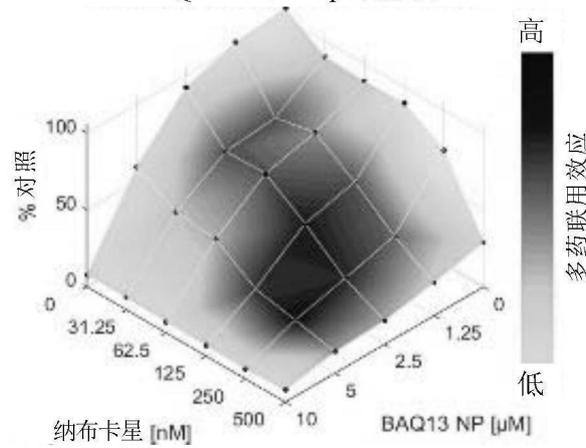


图6F

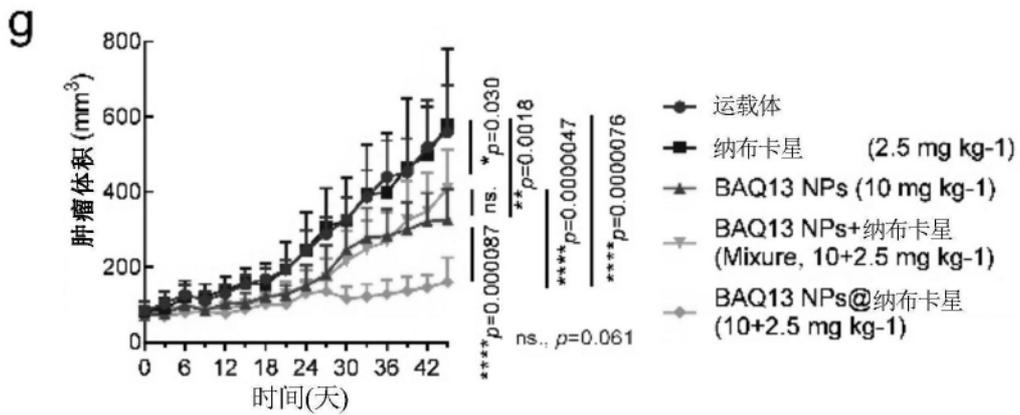


图6G

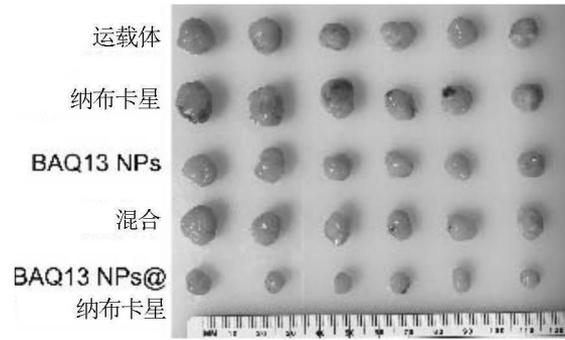


图6H

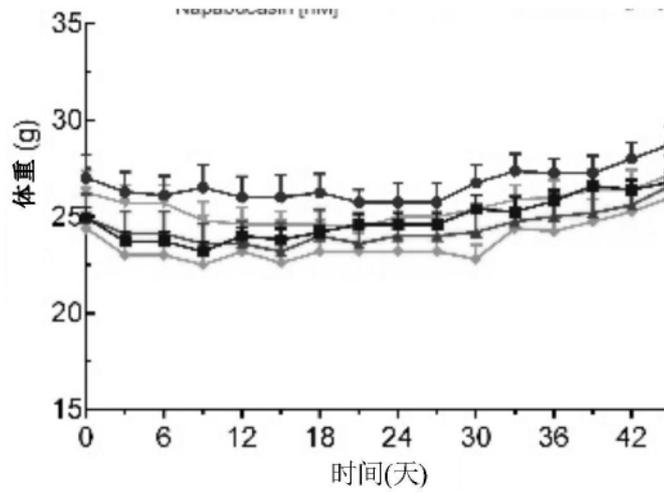


图6I

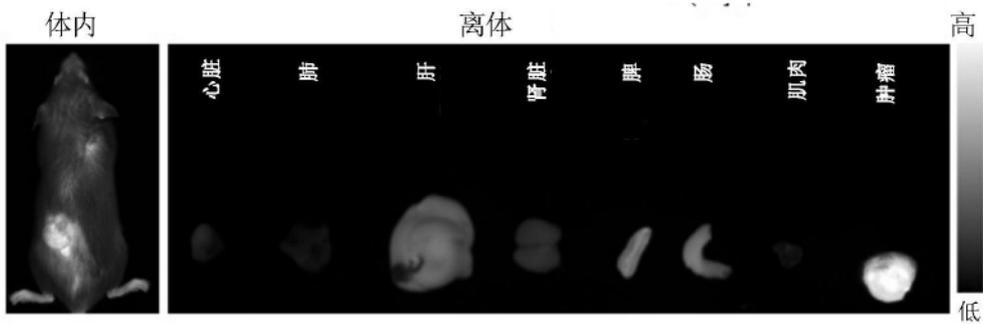


图6K

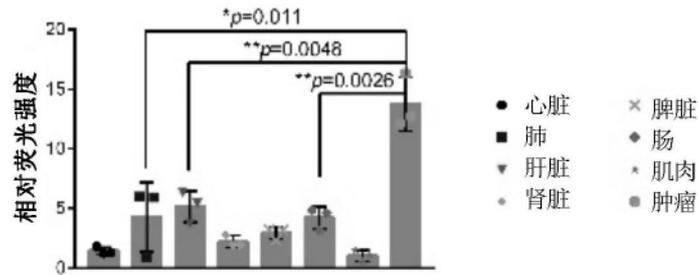


图6L

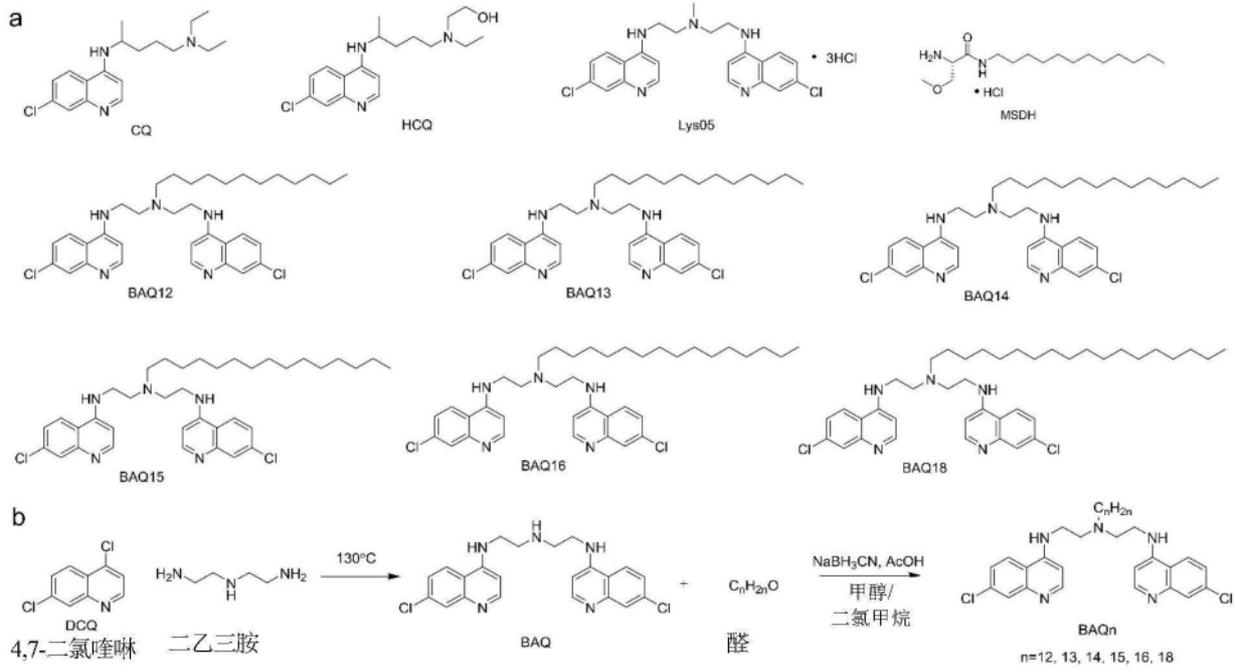


图7

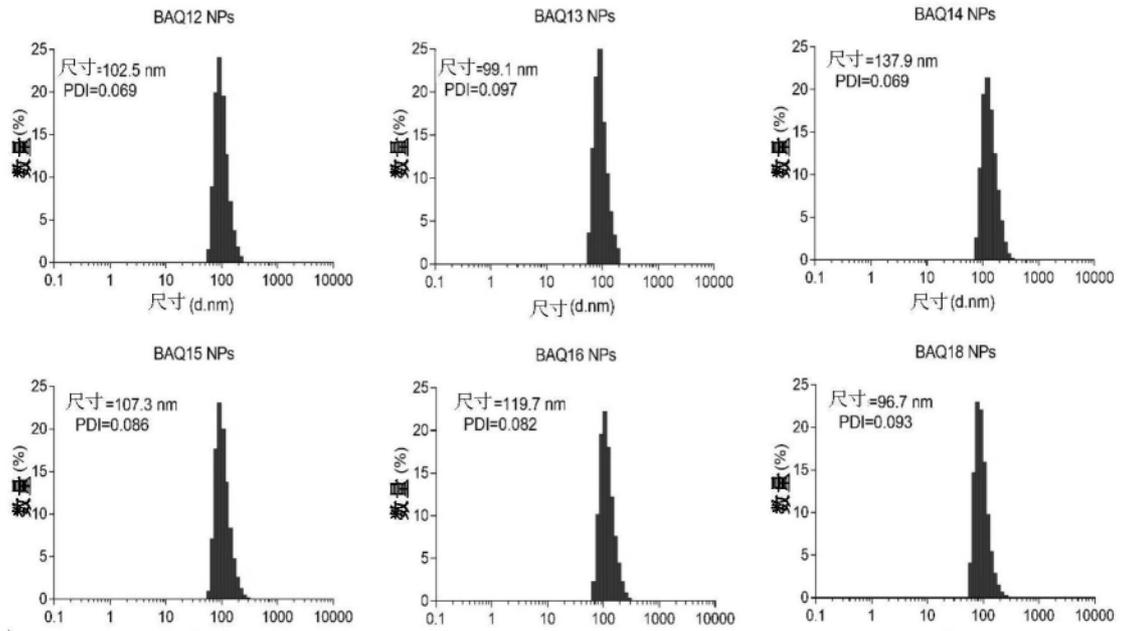


图8A

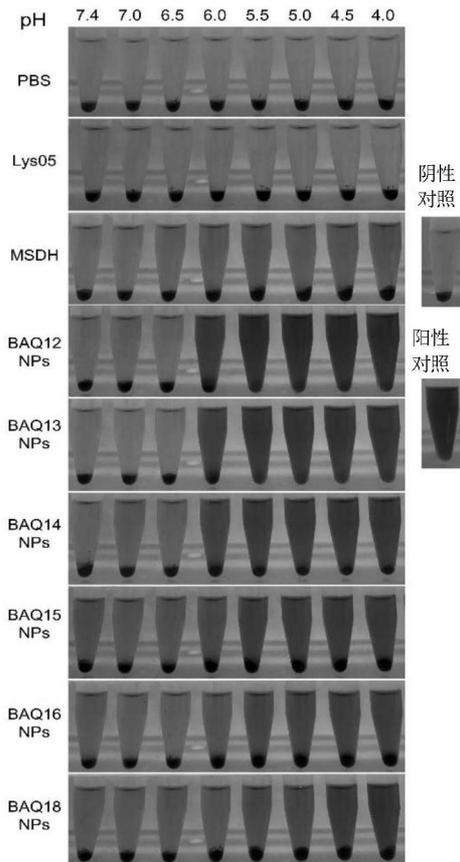


图8B

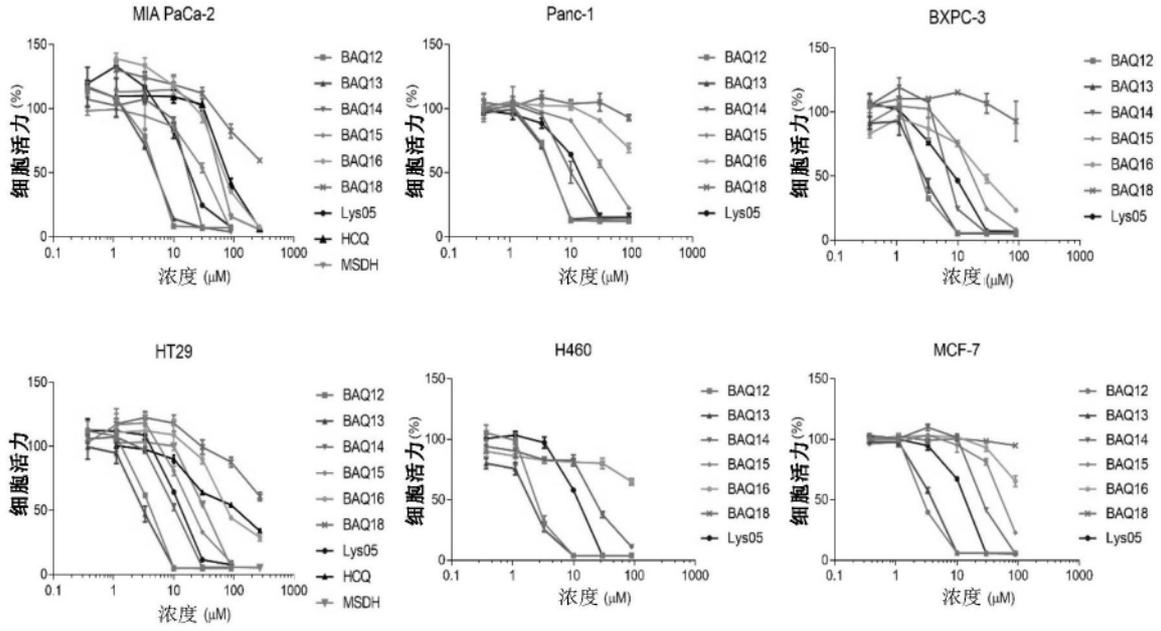


图8C

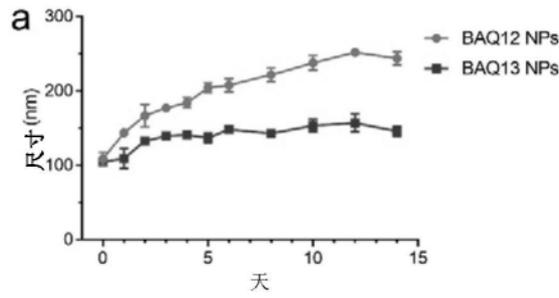


图9A

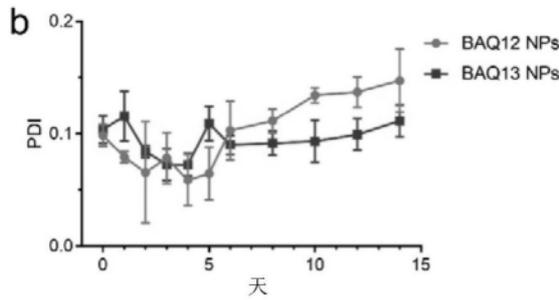


图9B

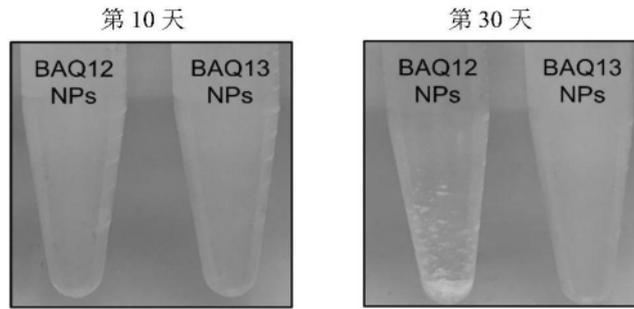


图9C

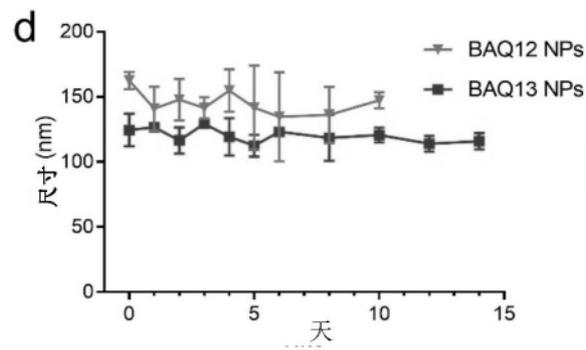


图9D

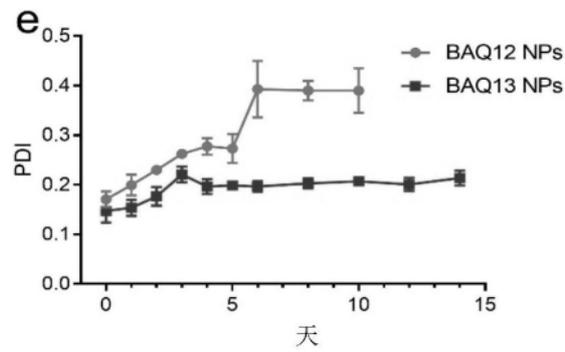


图9E

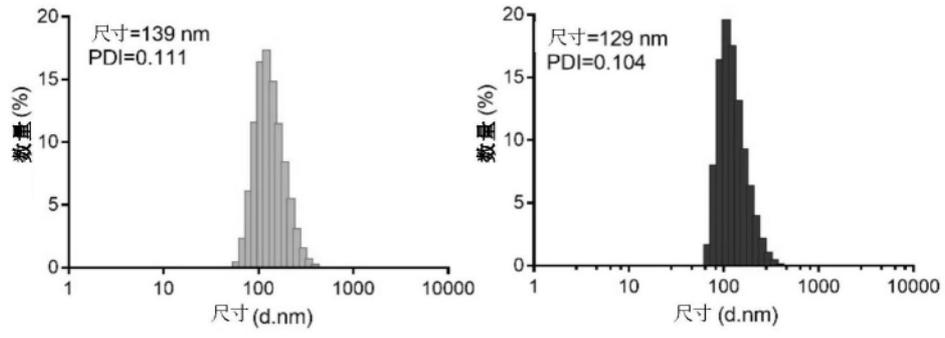


图9F

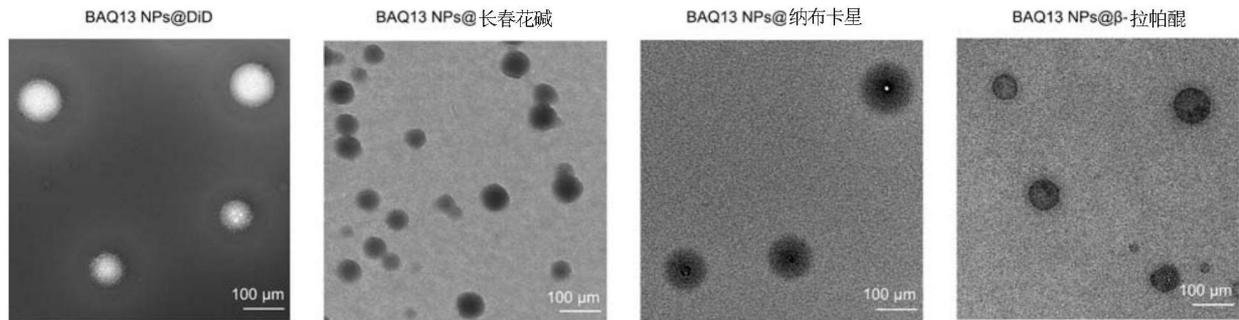


图9G

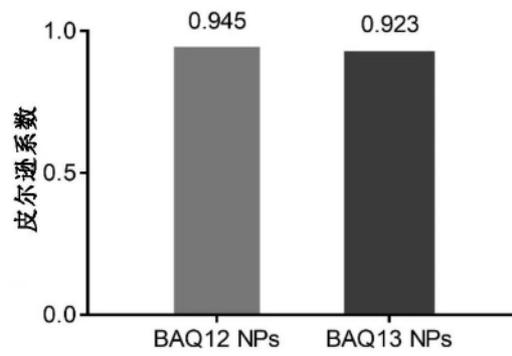


图10A

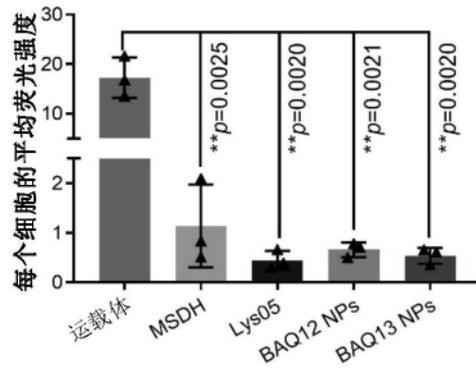


图10B

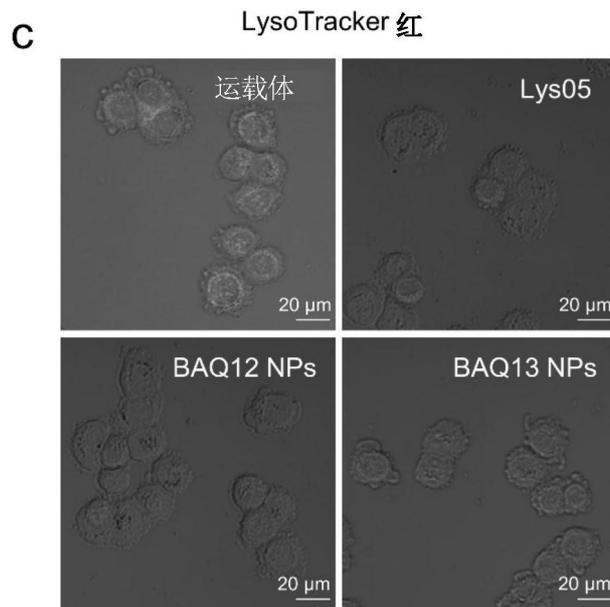


图10C

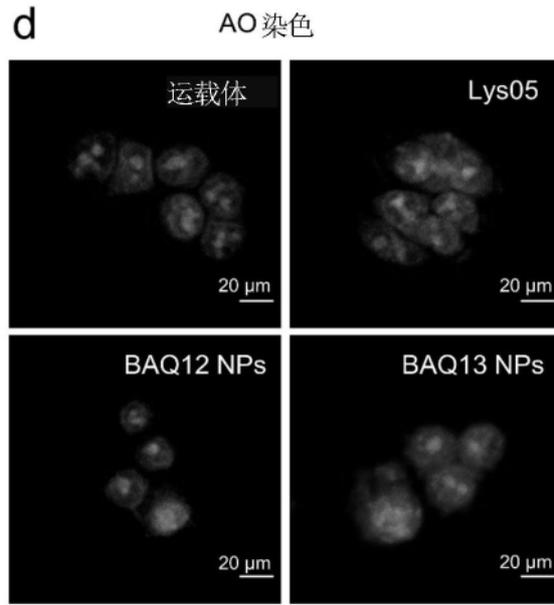


图10D

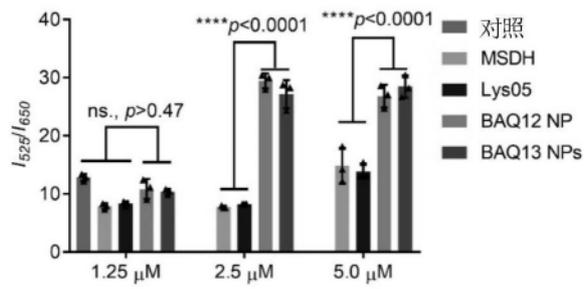


图10E

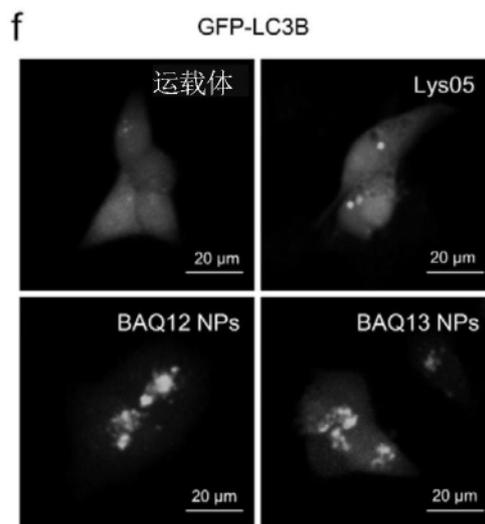


图10F

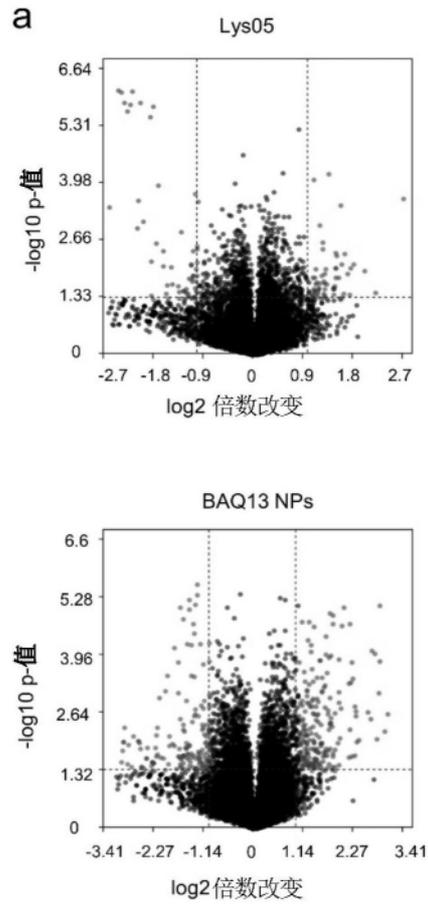


图11A

b

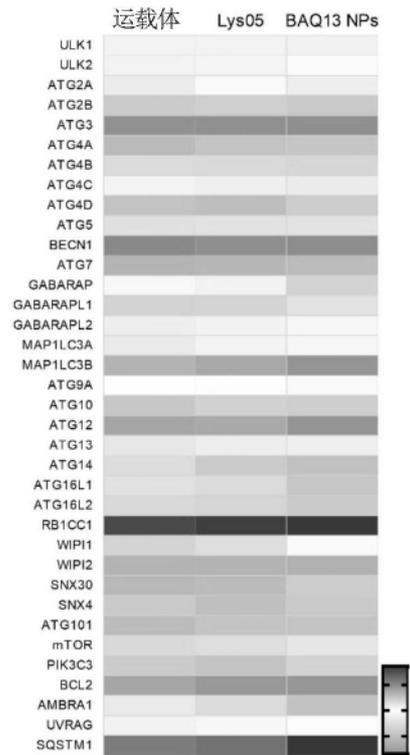


图11B

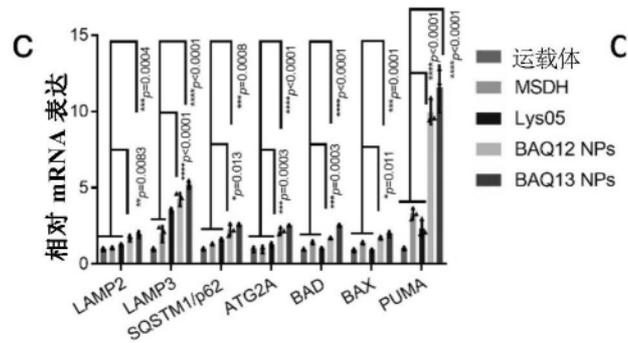


图11C

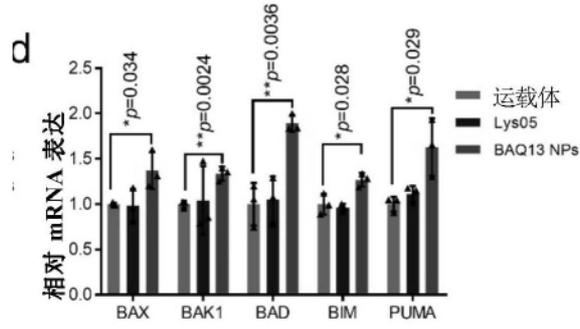


图11D

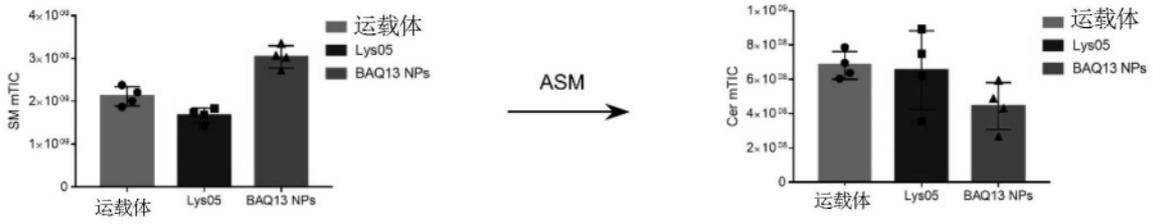


图11E

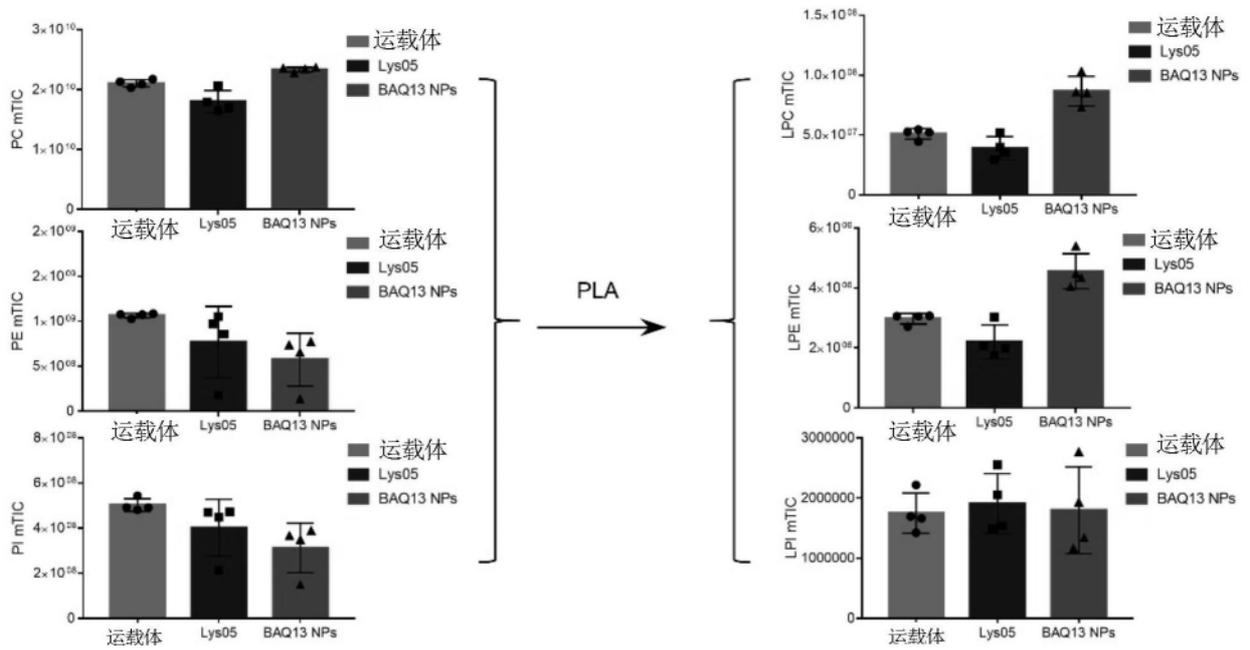


图11F

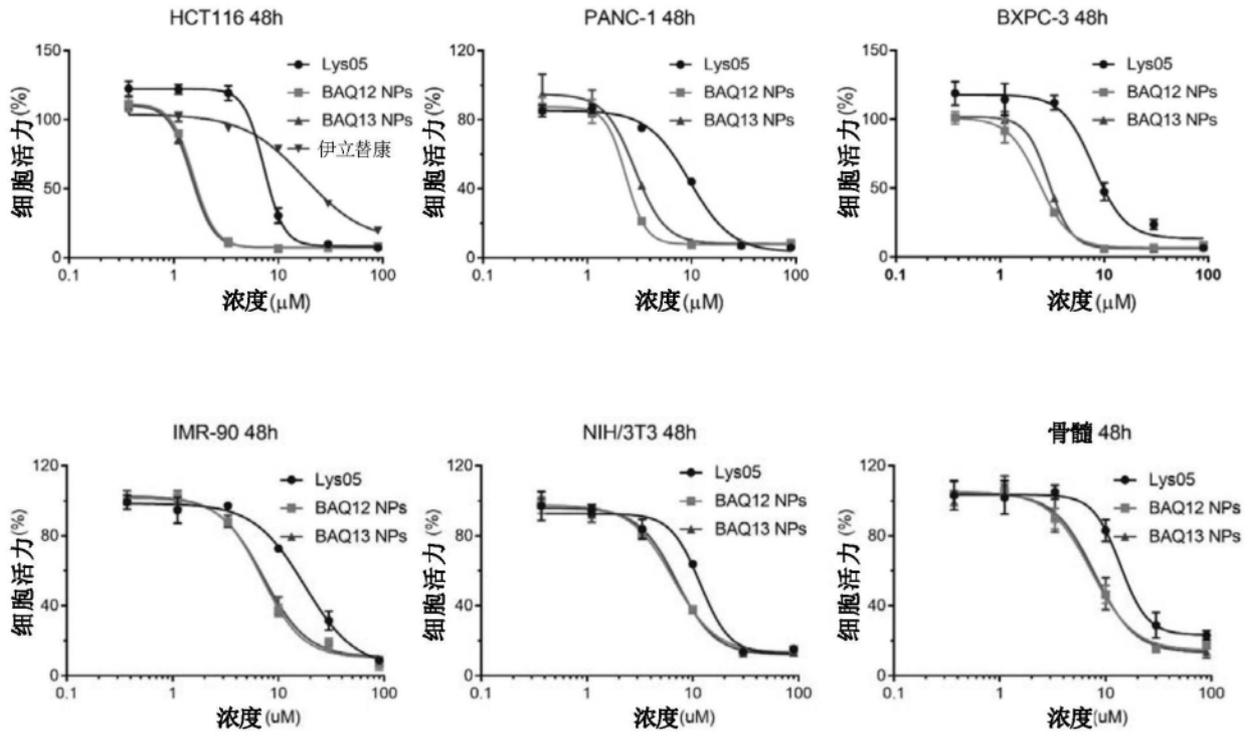


图12

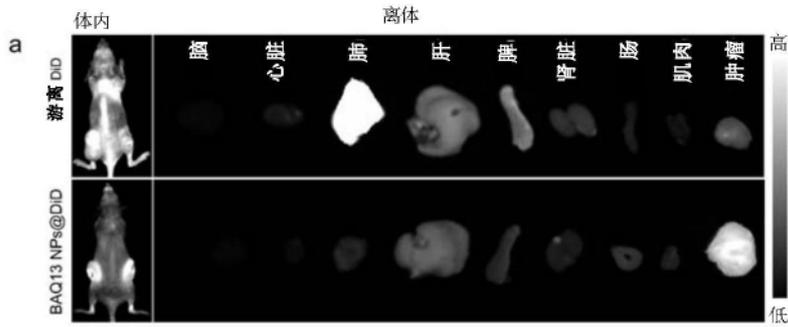


图13A

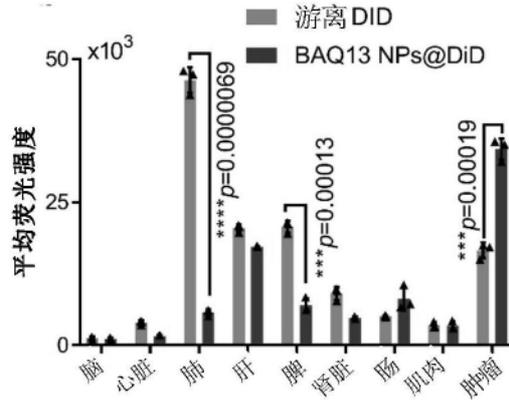


图13B

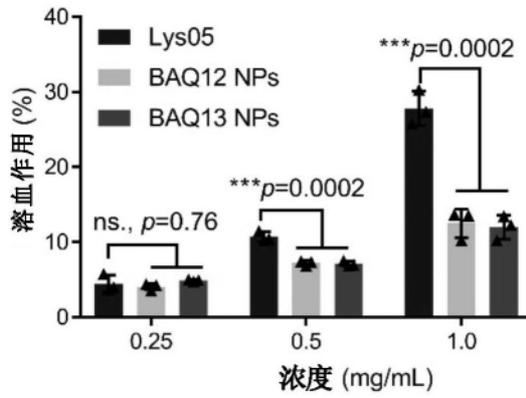


图13C

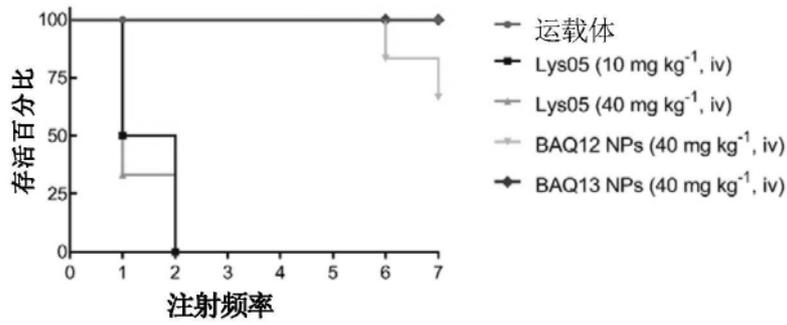


图13D

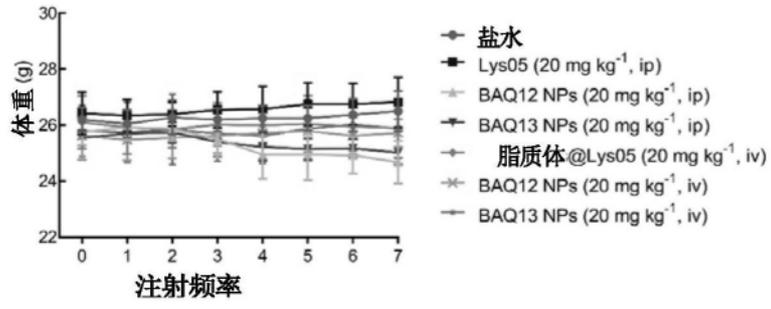


图13E

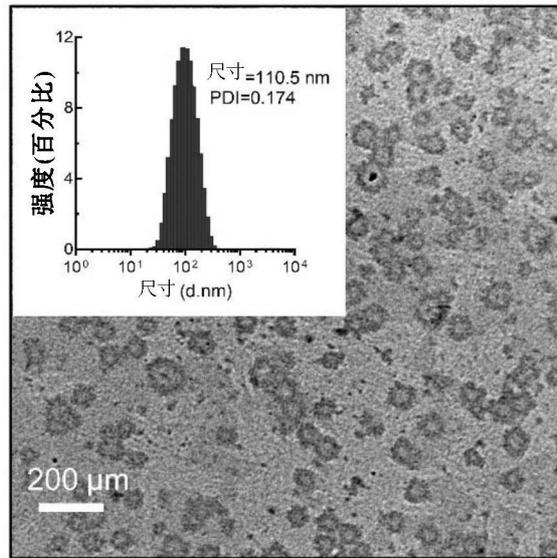


图13F

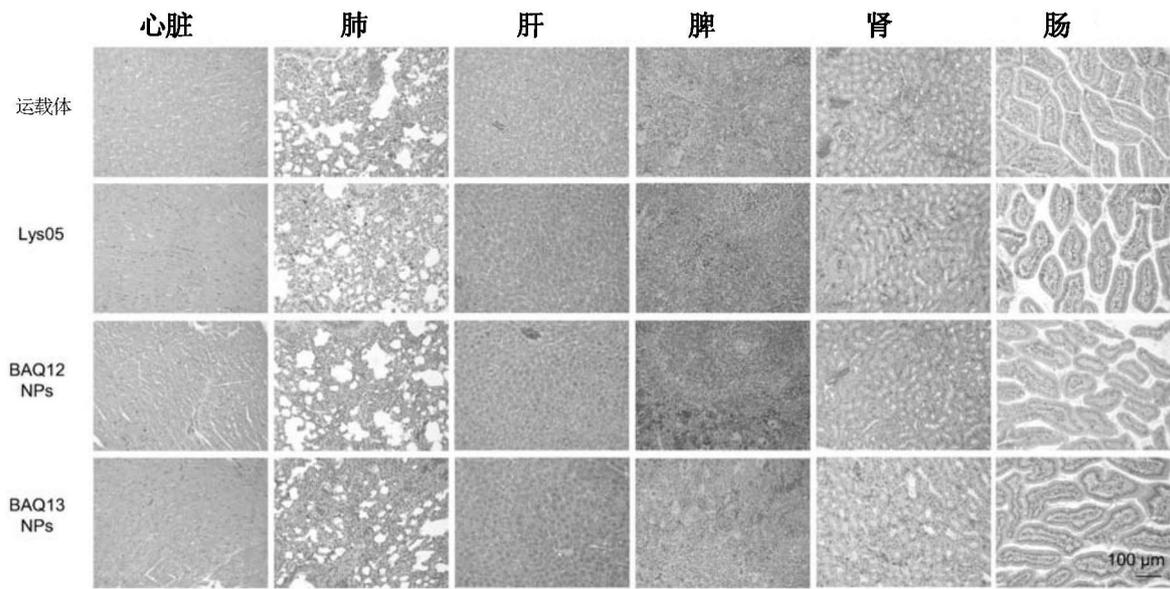


图14A

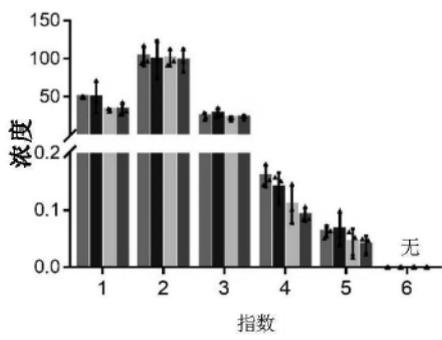


图 14B

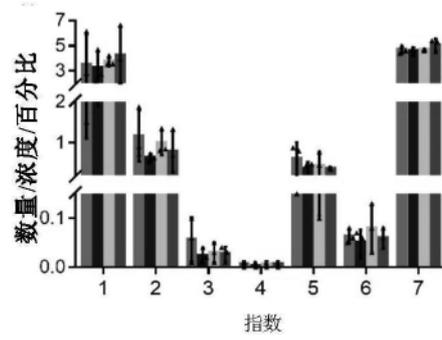


图 14C

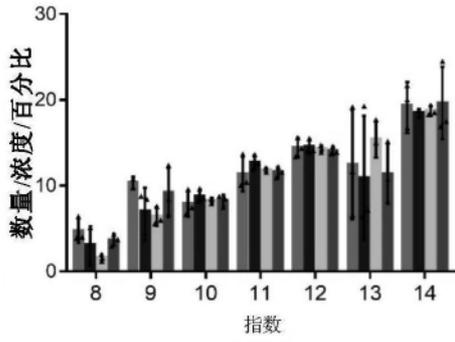


图 14D

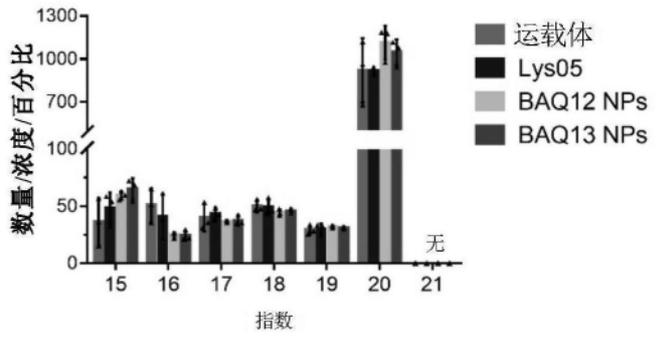


图 14E

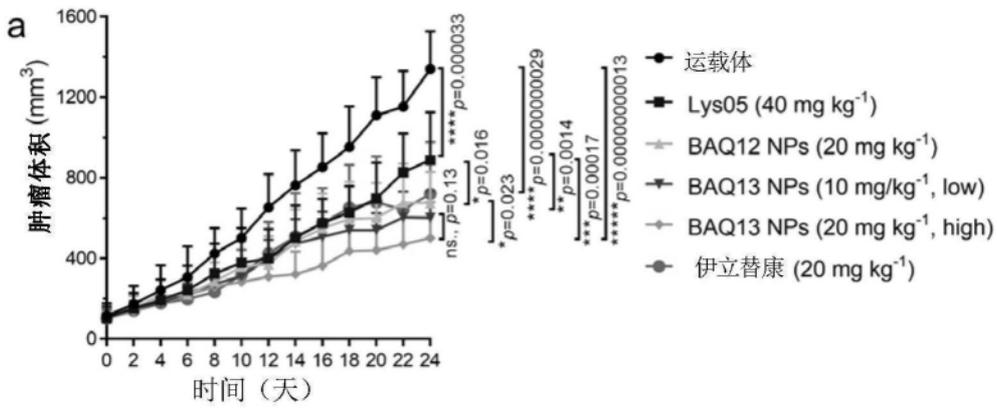


图15A

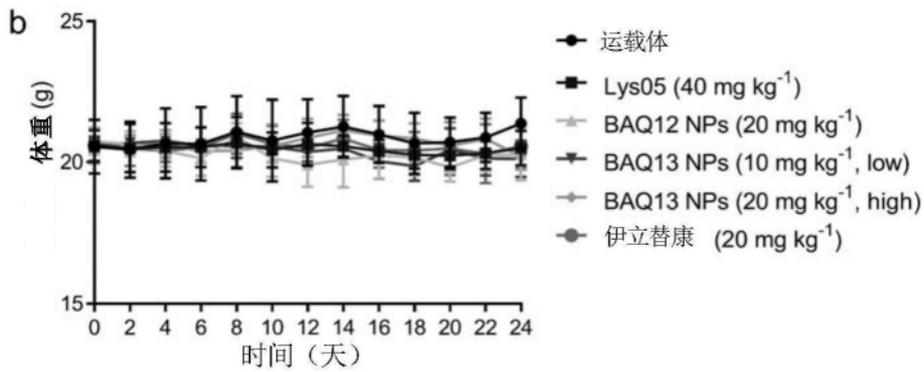


图15B

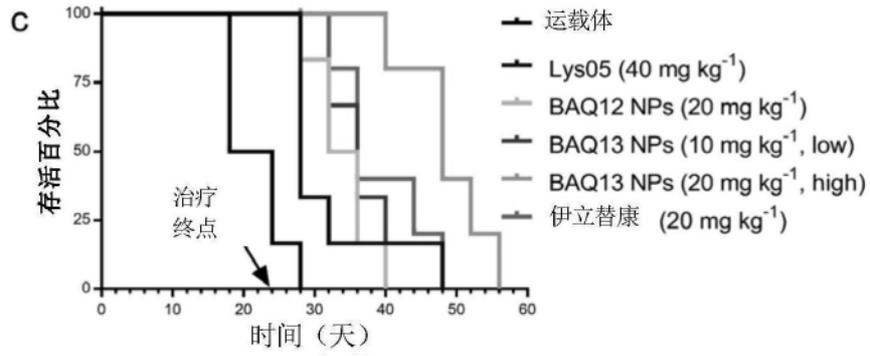


图15C

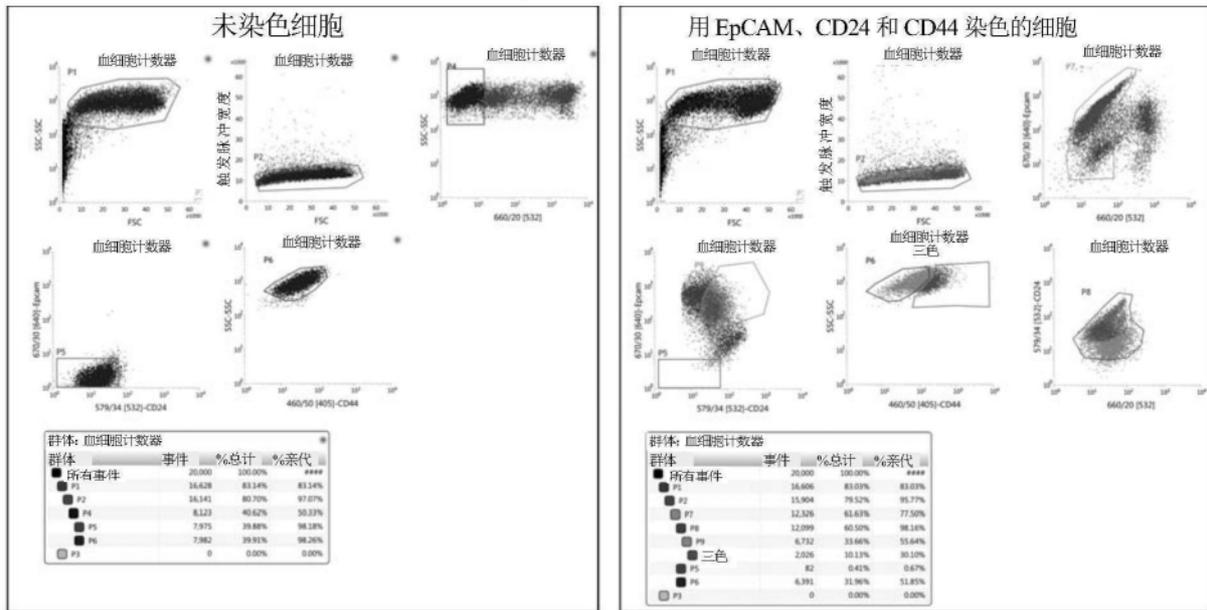


图16

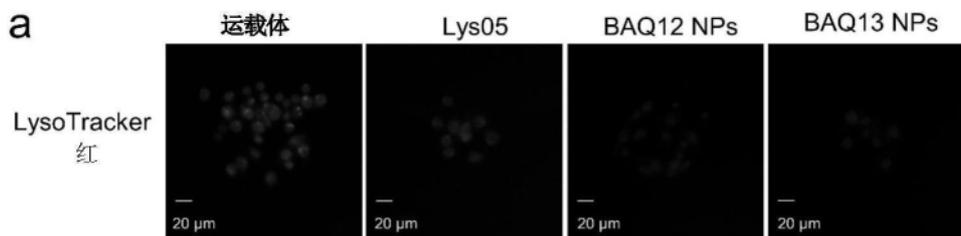


图17A

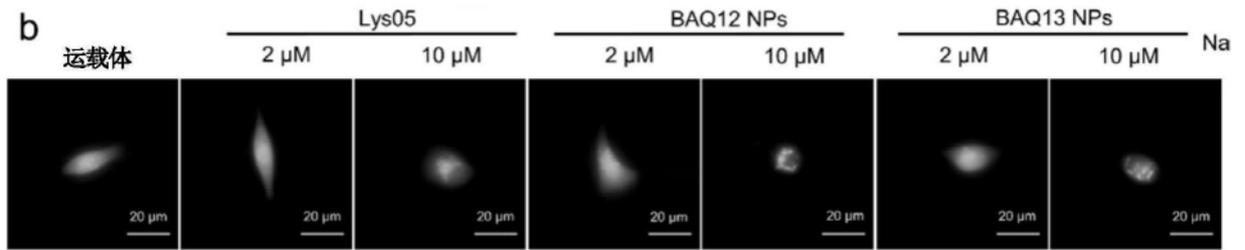


图17B

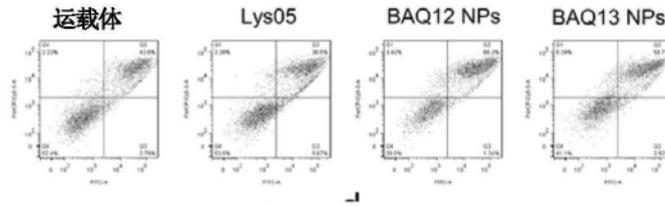


图17C

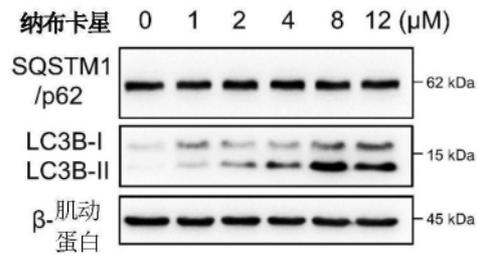


图17D

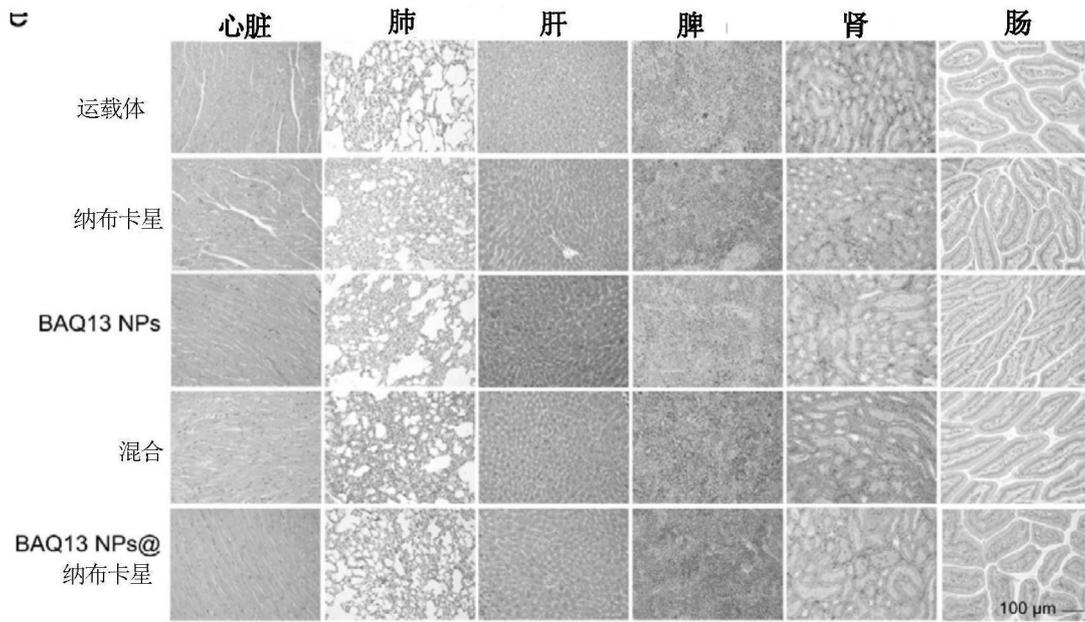


图17E

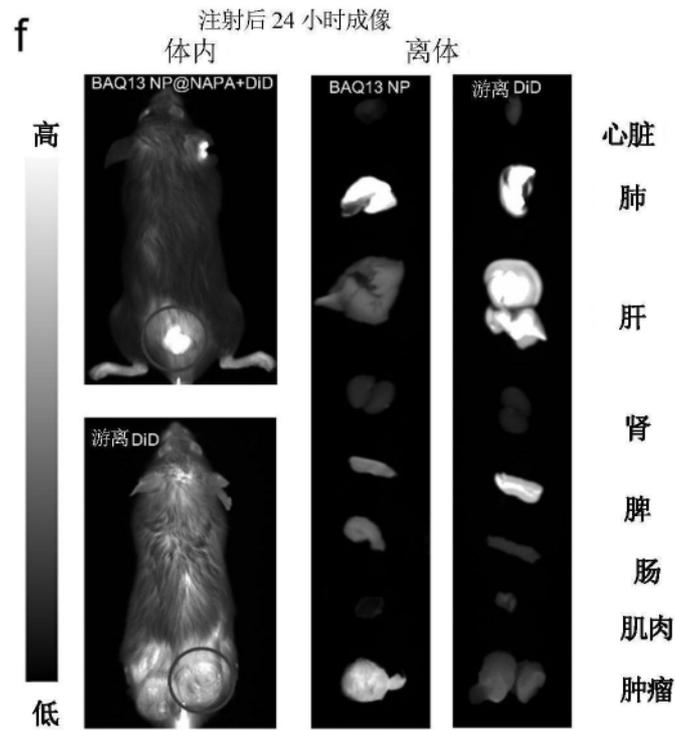


图17F

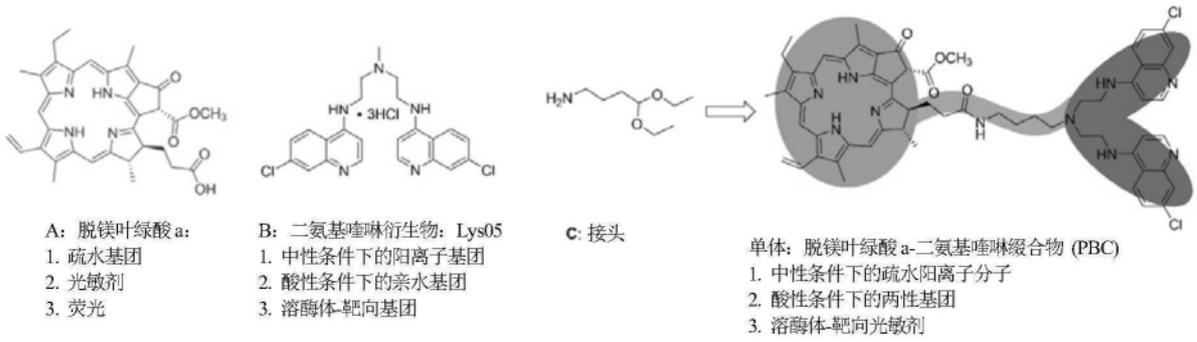


图18A

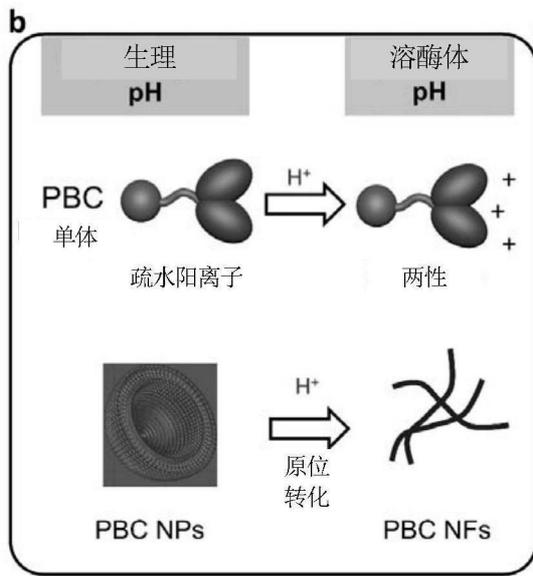


图 18B

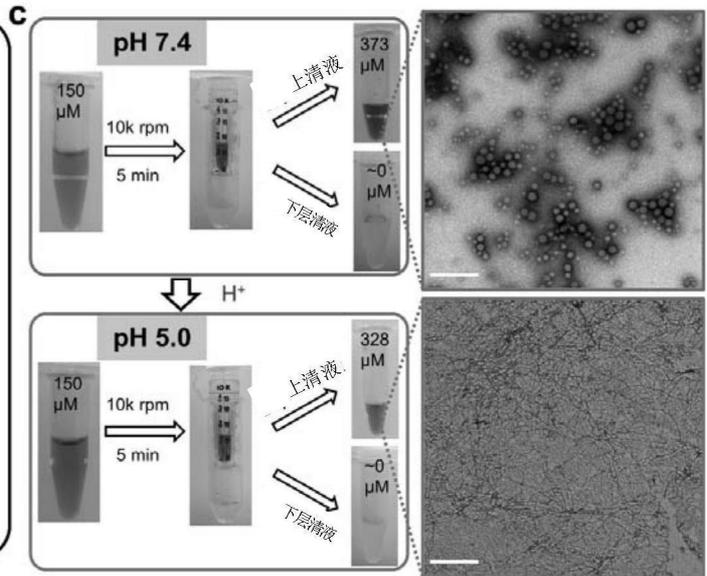


图 18C

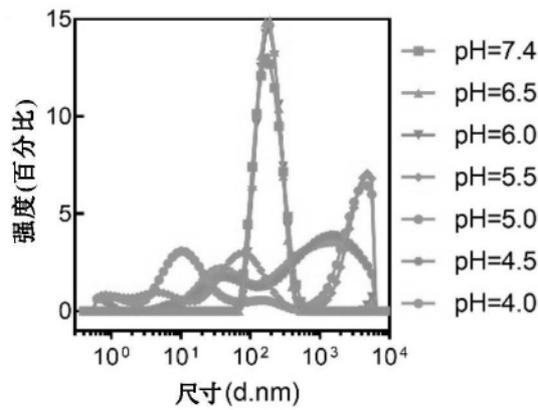


图18D

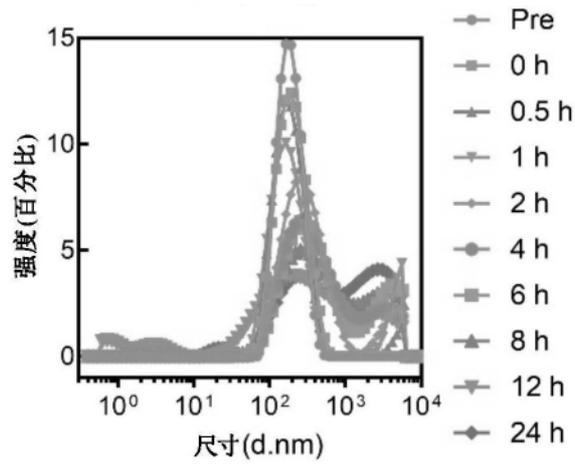


图18E

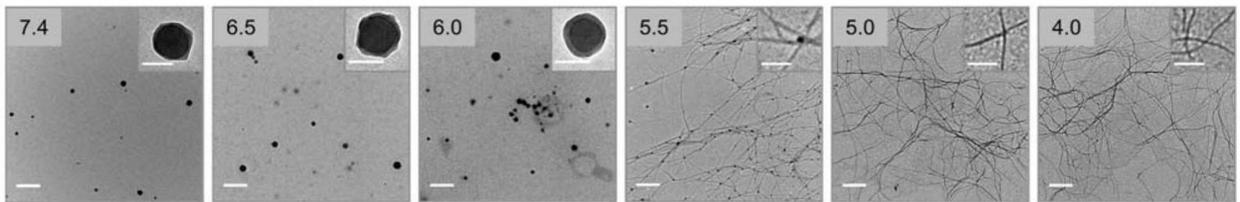


图18F

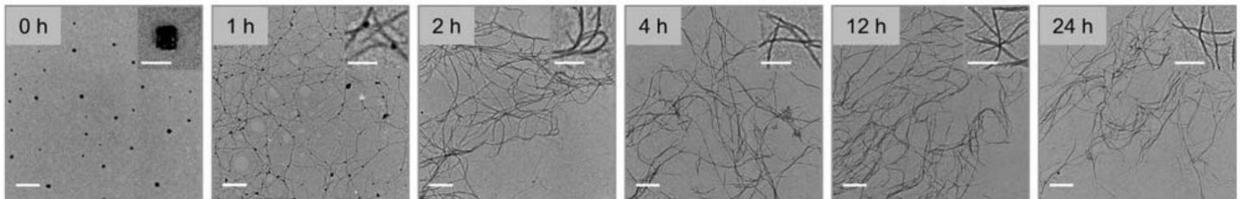


图18G

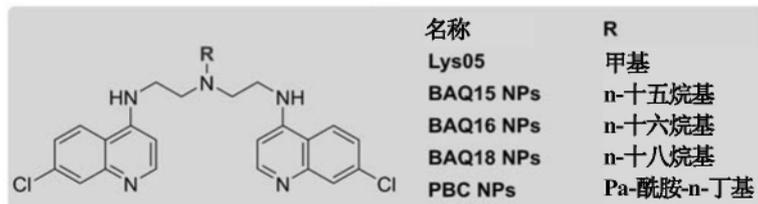


图19A

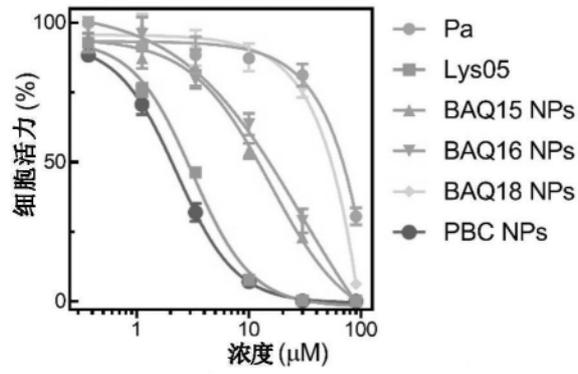


图19B

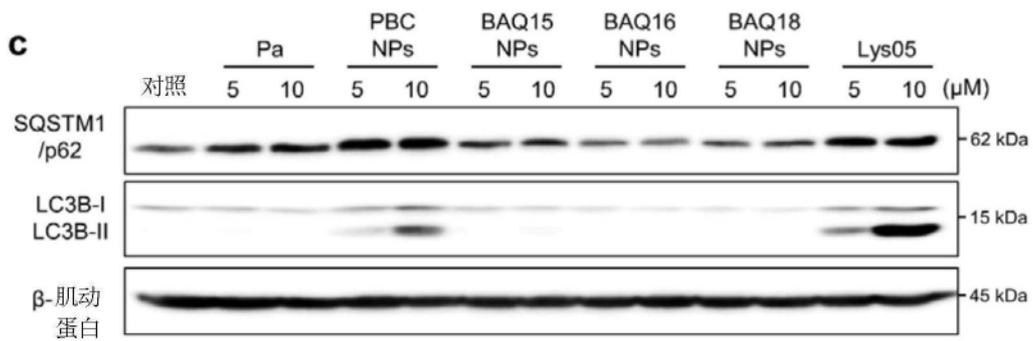


图19C

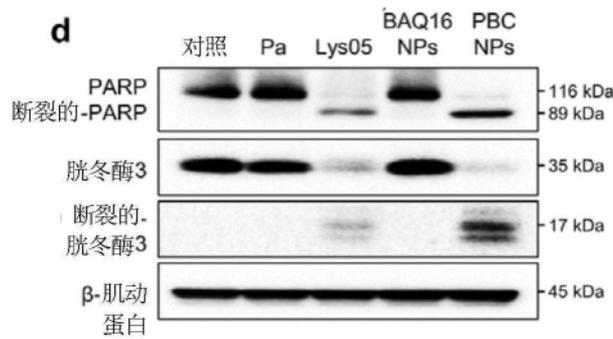


图19D

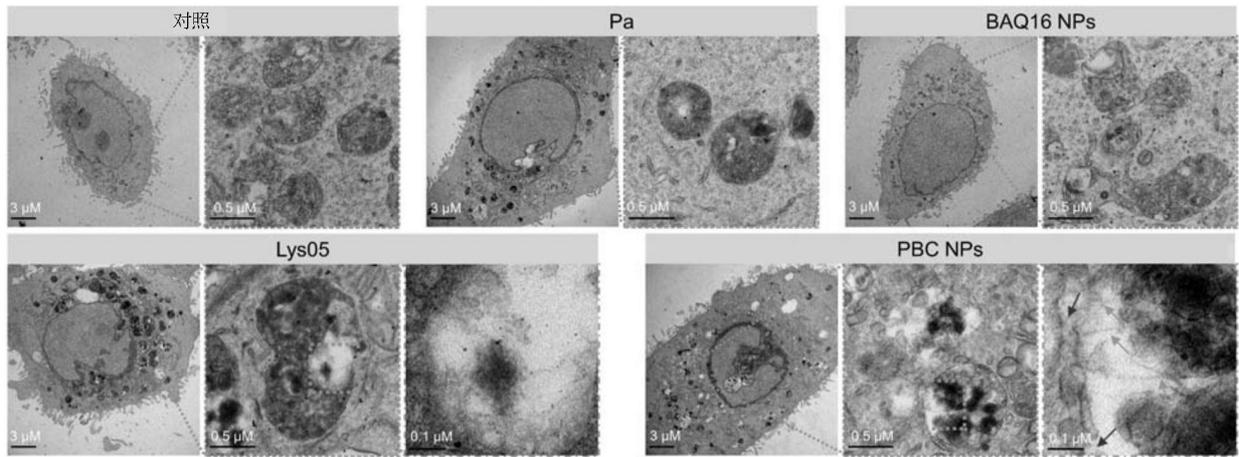


图19E

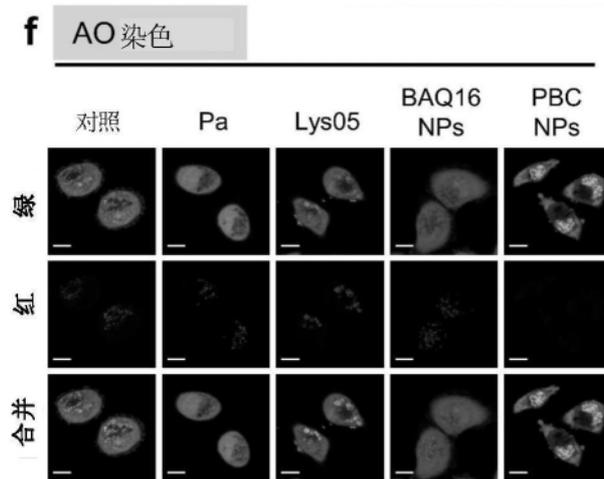


图19F

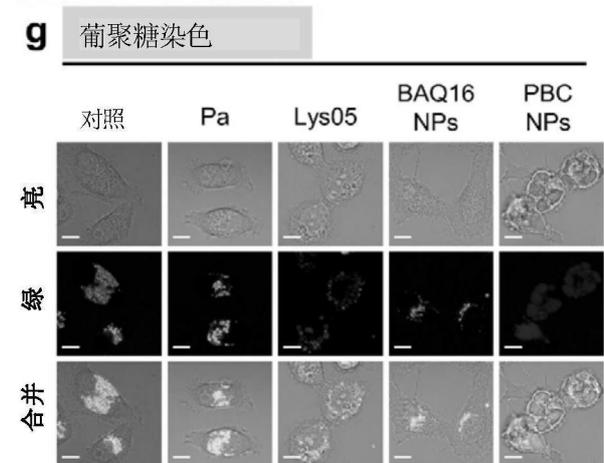


图19G

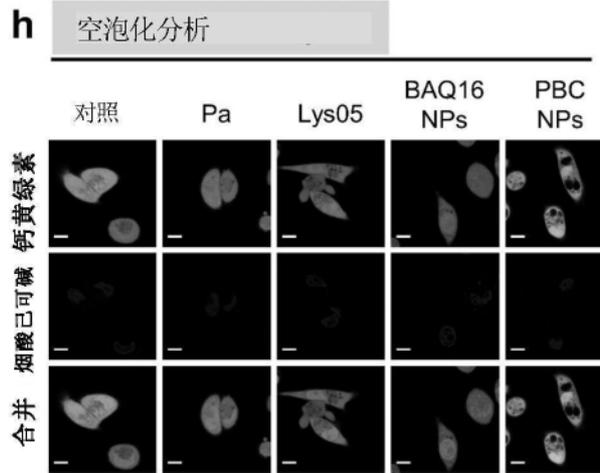


图19H

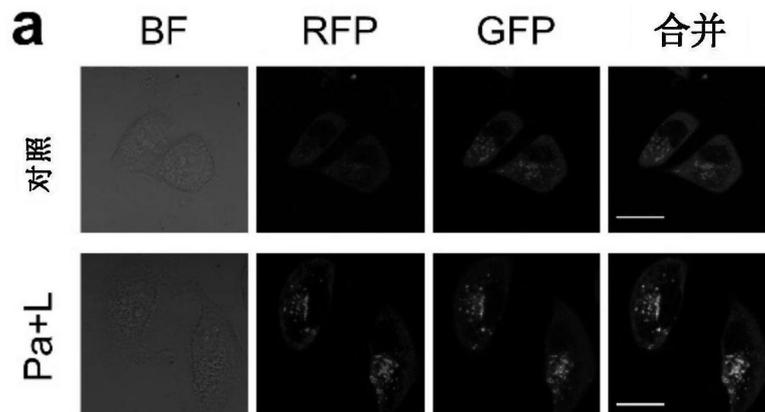


图20A

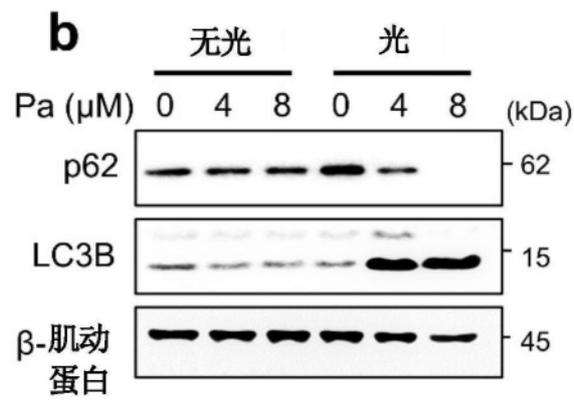


图20B

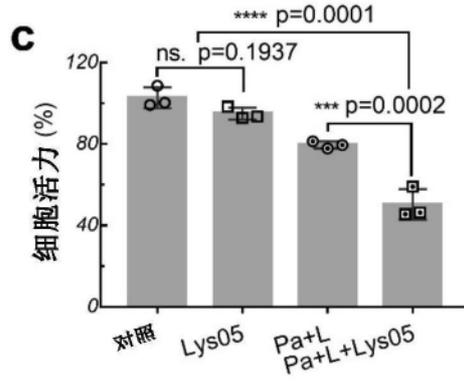


图20C

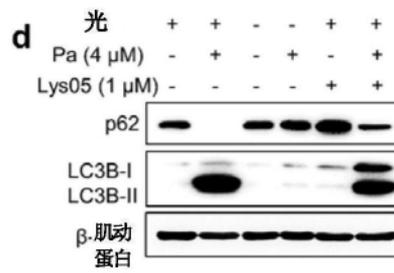


图20D

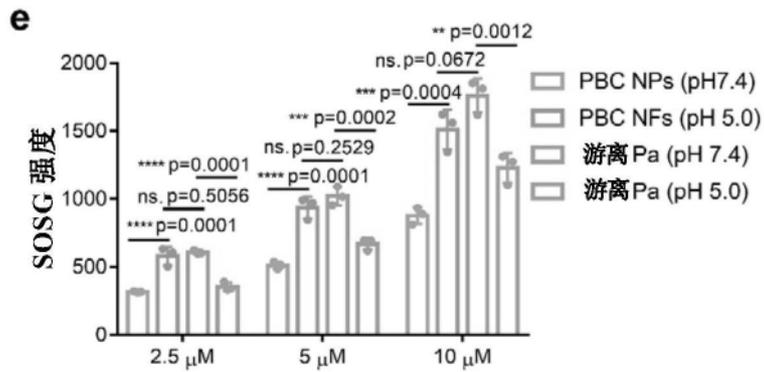


图20E

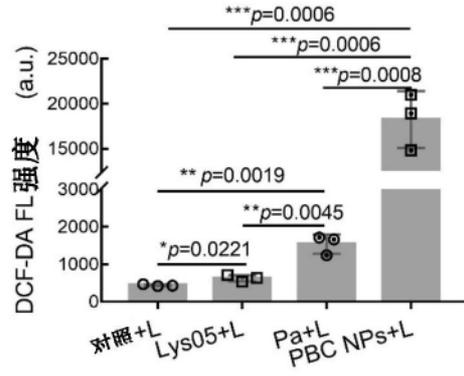


图20F

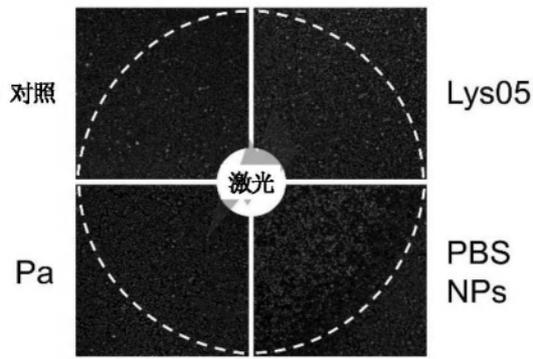


图20G

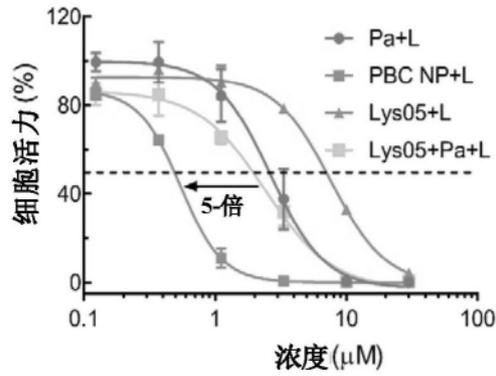


图20H

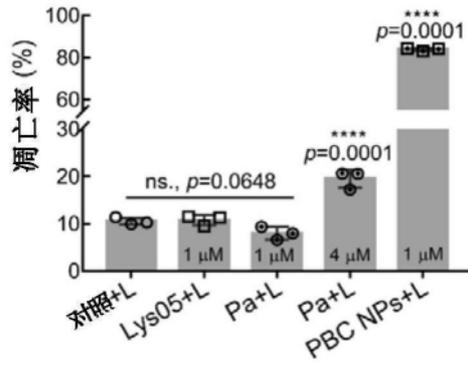


图20I

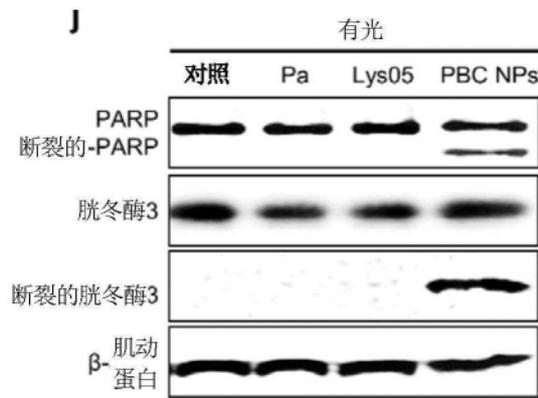


图20J

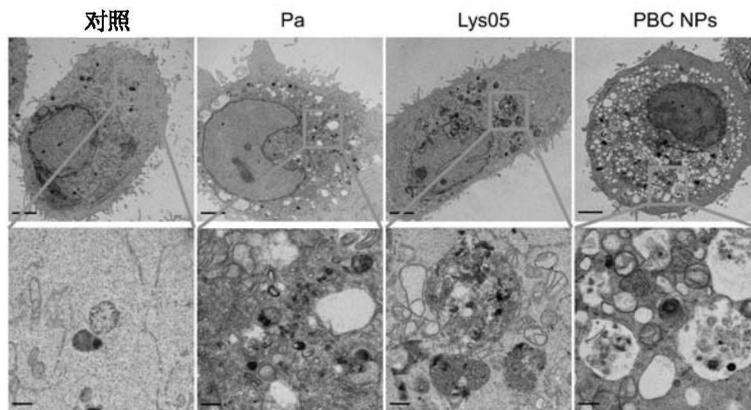


图20K

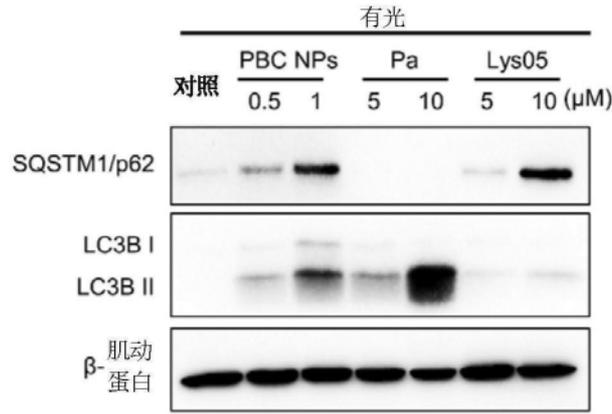


图20L

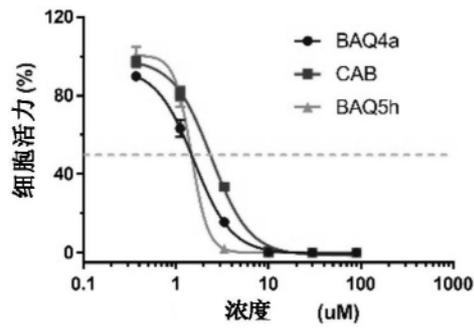
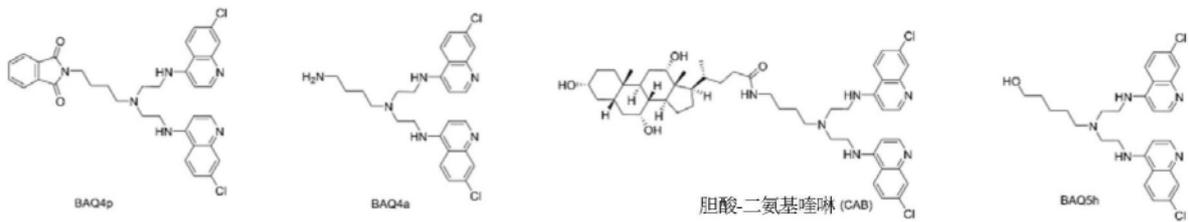


图21

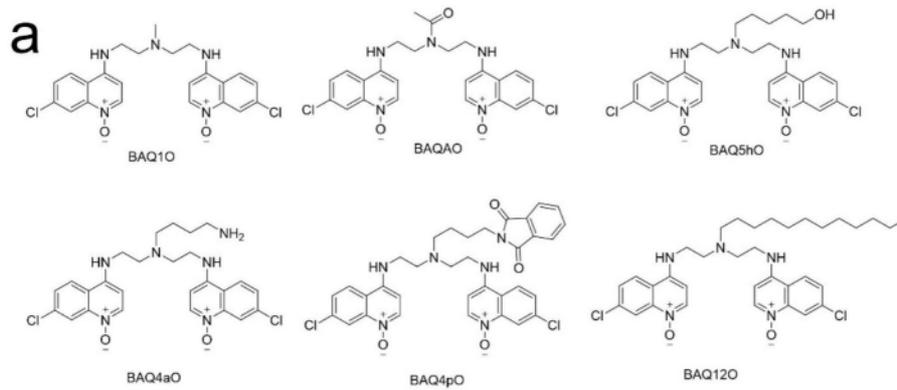


图22A

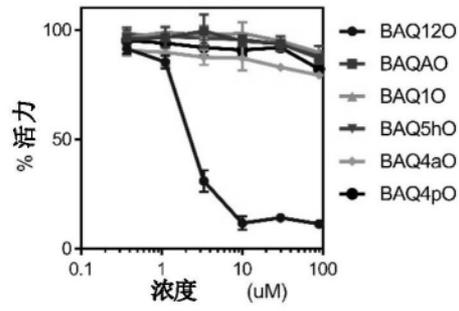


图22B

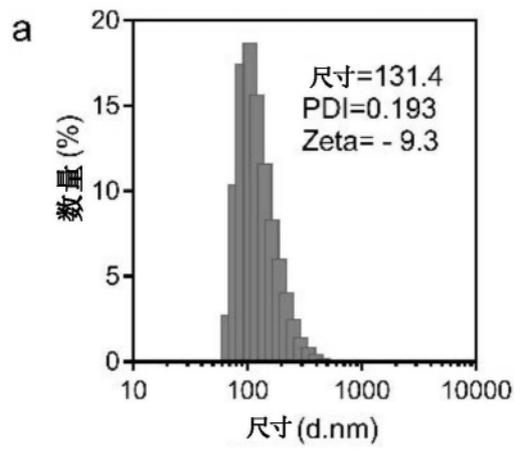


图23A

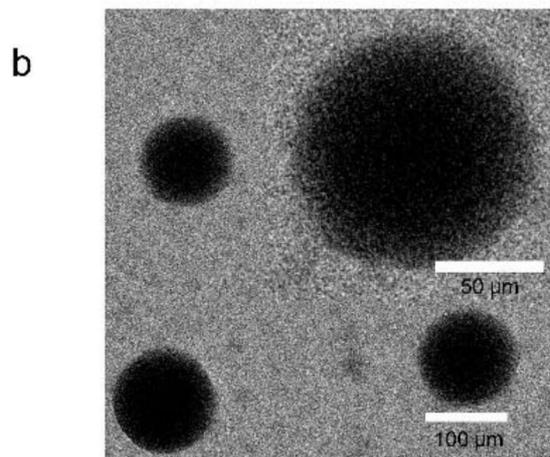


图23B

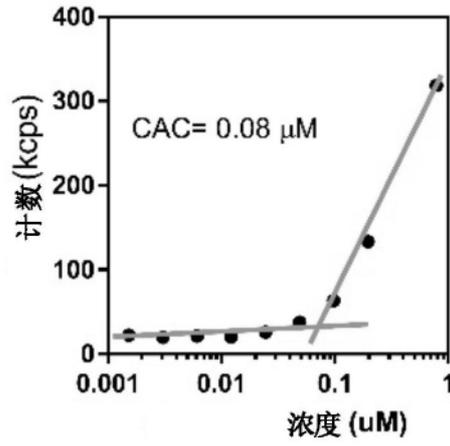


图23C

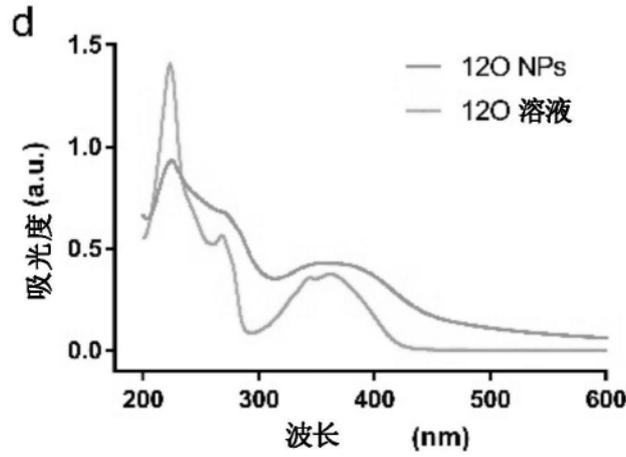


图23D

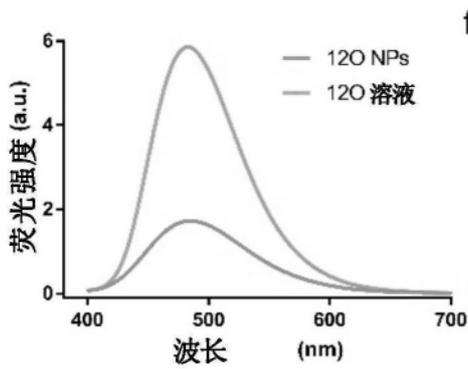


图 23E

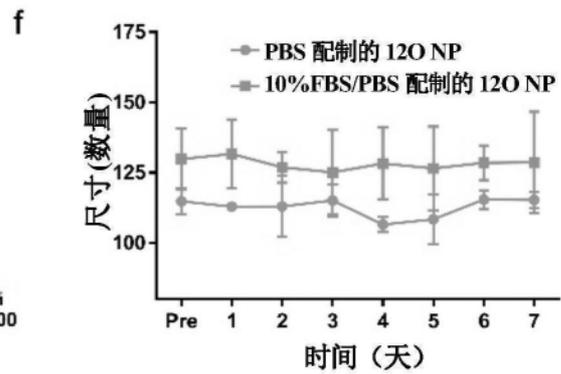


图 23F

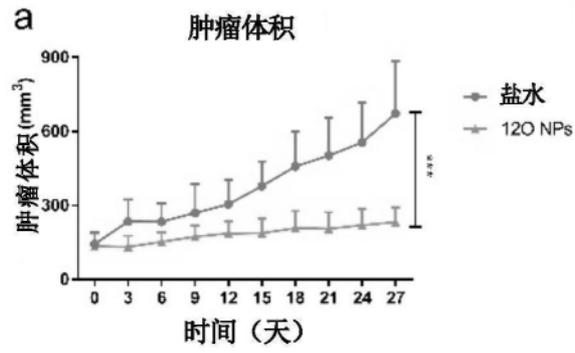


图24A

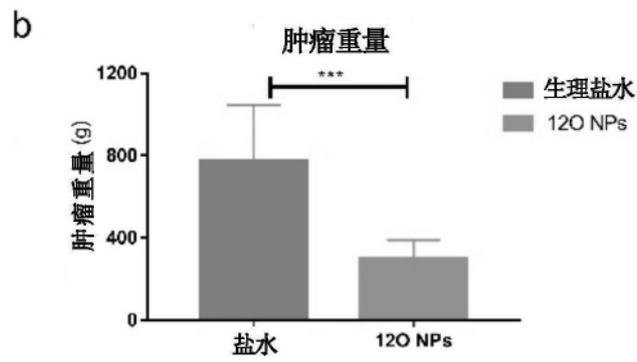


图24B

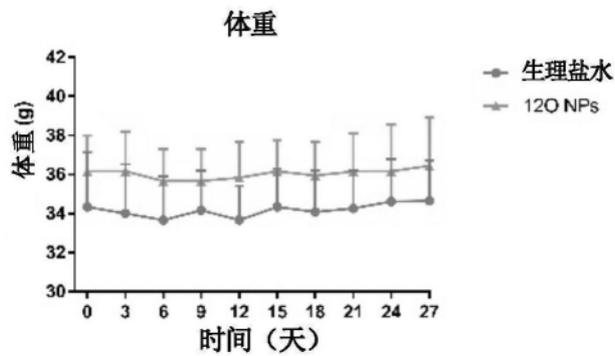


图24C

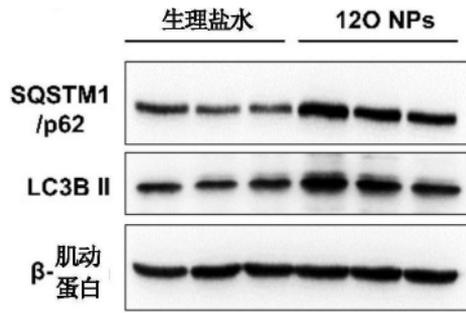


图24D

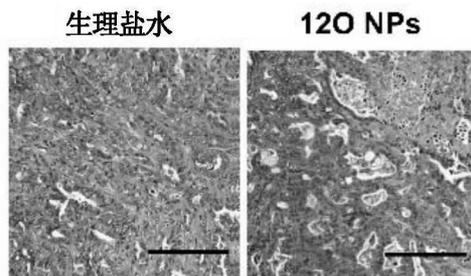


图24E

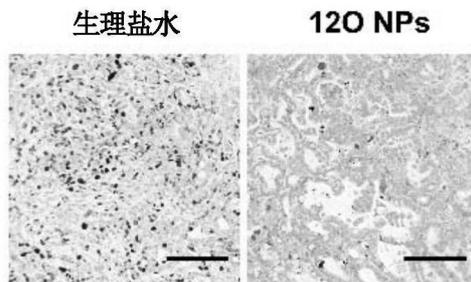


图24F

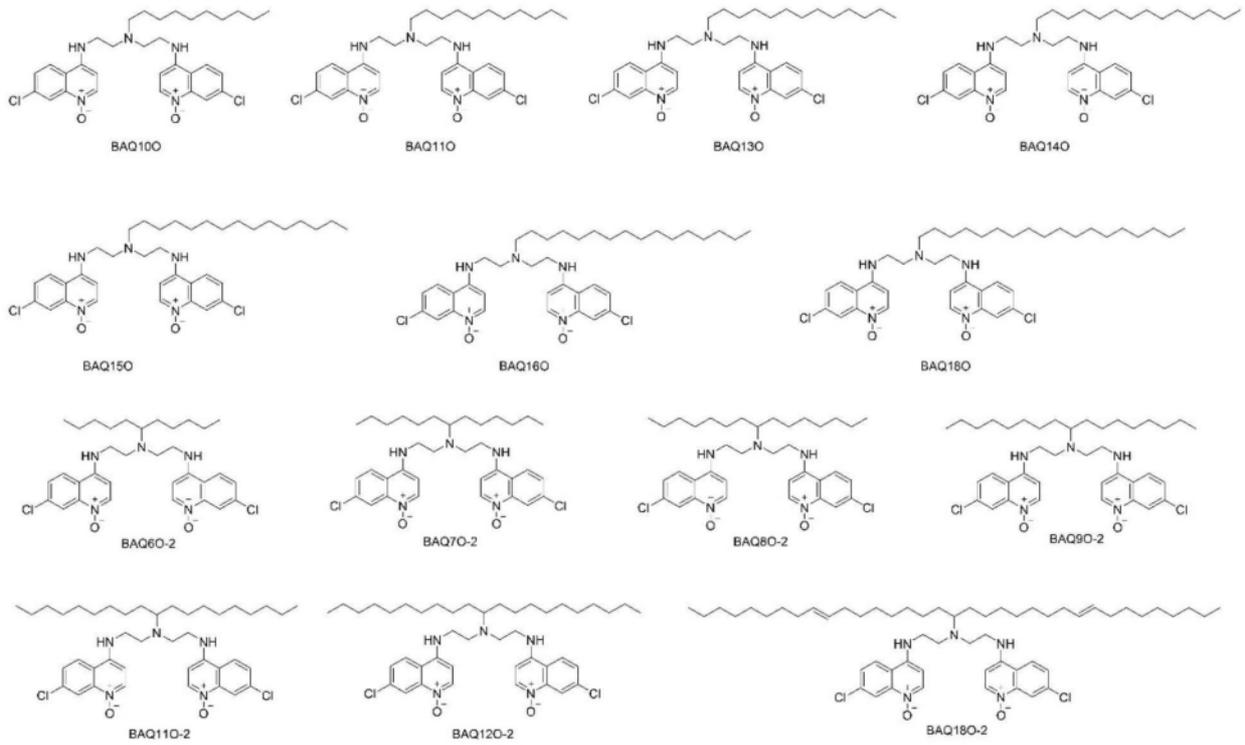


图25