



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115054698 B

(45) 授权公告日 2024.11.08

(21) 申请号 202210378454.7

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22) 申请日 2015.01.14

专利代理人 初明明

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 115054698 A

(51) Int.CI.

A61K 47/40 (2006.01)

(43) 申请公布日 2022.09.16

A61K 31/19 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 35/00 (2006.01)

61/927259 2014.01.14 US

(56) 对比文件

61/992572 2014.05.13 US

CN 102131389 A, 2011.07.20

(62) 分案原申请数据

US 2013216531 A1, 2013.08.22

201580013842.3 2015.01.14

审查员 张若曦

(73) 专利权人 约翰斯·霍普金斯大学

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 J-F.格施温德

S.加纳帕蒂-坎尼亞庞 S.苏

B.沃格斯泰恩 K.W.金兹勒

权利要求书1页 说明书34页 附图14页

(54) 发明名称

包封选择性ATP抑制剂的环糊精组合物及其  
应用

(57) 摘要

本发明提供包含包封选择性ATP抑制剂的环  
糊精的组合物,以及其应用。

1. 一种组合物,其包含 $\beta$ -环糊精和药物,其中所述药物是3-卤代丙酮酸,其中该环糊精的至少一个 $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖昔单元具有用可电离的化学基团替代的至少一个羟基化学基团,所述可电离的化学基团是琥珀酰基,且其中所述环糊精包封所述药物。
2. 权利要求1的组合物,其中所述至少一个 $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖昔单元的至少一个羟基化学基团选自C2、C3和C6羟基化学基团。
3. 权利要求1的组合物,其中所述环糊精的至少一个 $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖昔单元的C2、C3和C6羟基化学基团用琥珀酰基替代。
4. 权利要求1-3的任一项的组合物,其中所述环糊精的至少一个 $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖昔单元选自所述环糊精的2、3、4、5、6、7、8个和所有的 $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖昔单元。
5. 权利要求1-3的任一项的组合物,其中组合物是液体或固体药物制剂。
6. 权利要求1-3的任一项的组合物,其中药物是不带电荷的或疏水的。
7. 权利要求1-3的任一项的组合物,其中药物是3-溴代丙酮酸。
8. 权利要求1-3的任一项的组合物,其中组合物被配制用于系统给予。
9. 权利要求1-3的任一项的组合物,其还包含抗-癌治疗剂。
10. 一种药剂盒,其包含权利要求1-9的任一项的组合物,和使用说明书。
11. 权利要求1-9的任一项的组合物在生产治疗患有癌症的受试者的药物中的用途,其中所述组合物以治疗有效量给予所述受试者。
12. 权利要求11的用途,其中组合物经系统给予。
13. 权利要求12的用途,其中所述系统给予选自口服、静脉内、腹膜内、皮下和肌内给予。
14. 权利要求11-13的任一项的用途,其中所述受试者用至少一种另外的抗-癌疗法治疗。
15. 权利要求14的用途,其中所述至少一个另外的抗-癌疗法是放射疗法。
16. 权利要求11-13的任一项的用途,其中所述癌症是实体瘤。
17. 权利要求11-13的任一项的用途,其中所述癌症选自肝癌、胰腺癌、肺癌和乳腺癌。
18. 权利要求17的用途,其中所述癌症是肝癌。
19. 权利要求11-13的任一项的用途,其中所述受试者是哺乳动物。
20. 权利要求19的用途,其中所述哺乳动物是人。

## 包封选择性ATP抑制剂的环糊精组合物及其应用

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2014年1月14日提交的美国临时申请号61/927,259,和2014年5月13日提交的美国临时申请号61/992,572的优先权益,其通过引用结合到本文中。

### 发明背景

[0003] 癌细胞为了生存依赖于增加的糖酵解而不是氧化磷酸化的知识已知为“沃伯格假说(Warburg hypothesis)”(Warburg (1956) *Science* 123:309-314)。这个概念构成使用糖酵解及其相关的酶作为新抗癌治疗剂开发的独特靶标的基础(Shaw (2006) *Curr. Opin. Cell Biol.* 18:598-608; Gatenby和Gillies (2007) *Biochem. Cell Biol.* 39:1358-1366)。一个这样的药物是3-溴代丙酮酸(3-BrPA),一种合成的用作不可逆的糖酵解抑制剂的丙酮酸的溴化衍生物(Ko等(2001) *Cancer Lett.* 173:83-91; Geschwind等(2002) *Cancer Res.* 62:3909-3913)。它通过靶向糖酵解酶,甘油醛-3磷酸脱氢酶(GAPDH)影响能量代谢(Ganapathy-Kanniappan等(2009) *AntiCancer Res.* 29:4909-4918)。此外,3-BrPA的抗癌作用在体外和体内针对多个肿瘤模型都是一致的和可重复的。各种各样的肿瘤已被证明对3-BrPA治疗是敏感的,包括,例如,肝癌(Geschwind等(2002) *Cancer Res.* 62:3909-3913; Vali等(2007) *J. Vasc. Interv. Radiol.* 18:95-101; 和Ganapathy-Kanniappan等(2012) *Radiology* 262:834-845)、胰腺癌(Cao等(2008) *Clin. Cancer Res.* 14:1831-1839; Bhardwaj等(2010) *AntiCancer Res.* 30:743-749; 和Ota等(2013) *Target Oncol.* 8:145-151)、脑瘤(El Sayed等(2012) *J. Bioenerg. Biomembr.* 44:61-79; Davidescu等(2012) *J. Bioenerg. Biomembr.* 44:51-60)和乳腺癌(Buijs等(2013) *J. Vasc. Interv. Radiol.* 24:737-743)。总之,GAPDH的抑制和3-BrPA的分子特异性已经确定,经由3-BrPA靶向肿瘤糖酵解可能是治疗癌症,特别是实体恶性肿瘤的一个可行的策略(Ganapathy-Kanniappan等(2012) *Oncotarget* 3:940-95; Ganapathy-Kanniappan等(2013) *AntiCancer Res.* 33:13-20)。

[0004] 不管选择性ATP抑制剂,例如3-卤代丙酮酸像3-BrPA对于治疗应用的潜在性,然而,有几个因素妨碍了系统给予制剂的开发。例如,3-卤代丙酮酸及相关化合物的烷基化(化学)特性赋予它们与亲电分子的极强反应性,这一般地需要增加剂量,其具有增加毒性,特别是增加注射部位附近的烷基化的负面作用。特别是,水或通常发现于蛋白质中的任何亲核基团,例如氨基或巯基的存在,在化学上失活该化合物。同样,这样的化合物的体内稳定性受多个因素包括血和循环系统中的谷胱甘肽、NADH和其它还原分子的影响。因此,重要的是,保持这些化合物不受这样的因素的影响,至少直至首次循环通过。

[0005] 虽然认识到保护选择性ATP抑制剂,例如3-卤代丙酮酸像3-BrPA,直至它们被传递至器官或组织对于它们在系统传递下的抗肿瘤效果是至关重要的,实现这样的保护的许多方法,例如在脂质体、微球、纳米球、纳米颗粒、液泡等中包封它们,尚未成功。例如,已知分子如3-BrPA不合需要地迅速从聚乙二醇化(PEGylated)脂质体渗出或与蛋白质如白蛋白-基纳米颗粒中的白蛋白反应。虽然零星的报告已记录3-BrPA在临床前模型中的腹膜内传

递,疗效和剂量方案是非常有限的。由于这些失败,3-BrPA疗法目前退居于局部区域传递(例如,经皮消融、动脉内传递,和肿瘤内注射)而不是系统传递(Kunjithapatham等(2013) *BMC Res. Notes*6: 277)。

[0006] 因此,本领域对鉴定适合于系统给予的选择性ATP抑制剂例如3-卤代丙酮酸像3-BrPA的组合物有很大的需求。

## 发明概述

[0007] 本发明部分地基于这样的发现,即将ATP产生的选择性抑制剂,例如3-卤代丙酮酸(例如,3-BrPA),包封在环糊精内:a) 通过保护卤素部分远离将使所述化合物失效的水性和亲核环境,在体内稳定烷化剂,和b) 提供维持体内化合物的合理半寿期所必需的化合物的稳定释放。

[0008] 在一方面,提供包含环糊精和以下通式表示的药物的组合物:  $\text{XH}_2\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{C}(=\text{O})-\text{R}_1$ ,

其中,各自独立地出现:X表示卤化物、磺酸酯、羧酸酯、烷氧化物或胺氧化物;R<sub>1</sub>表示OR、H、N(R")<sub>2</sub>、C1-C6烷基、C6-C12芳基、C1-C6杂烷基,或C6-C12杂芳基;R"表示H、C1-C6烷基,或C6-C12芳基;R表示H、碱金属、C1-C6烷基、C6-C12芳基或C(0)R';和R'表示H、C1-C20烷基或C6-C12芳基,其中环糊精包封药物。在一个实施方案中,环糊精的至少一个 $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷单元的至少一个羟基化学基团用可电离的化学基团替代。在另一个实施方案中,至少一个 $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷单元的至少一个羟基化学基团选自C2、C3和C6羟基化学基团。在又一个实施方案中,环糊精的至少一个 $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷单元的C2、C3和C6羟基化学基团用可电离的化学基团替代。在还有一个实施方案中,环糊精的至少一个 $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷单元选自环糊精的2、3、4、5、6、7、8个,和所有的 $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷单元。在另一个实施方案中,可电离的化学基团在所有替代的位置是相同的。在又一个实施方案中,可电离的化学基团是弱碱性官能团或弱酸性官能团。例如,弱碱性官能团(X)可具有依据 $\text{CH}_3-\text{X}^-$ 的在6.5和8.5之间的pK<sub>a</sub>或弱酸性官能团(Y)可具有依据 $\text{CH}_3-\text{Y}$ 的在4.0和6.5之间的pK<sub>a</sub>。在还有一个实施方案中,弱碱性或弱酸性官能团选自氨基、乙二氨基、二甲基乙二氨基、二甲基苯氨基、二甲基萘氨基、琥珀酰基、羧基、磺酰基,和硫酸官能团。在另一个实施方案中,环糊精具有在4.0和8.5之间的pK<sub>a1</sub>。在又一个实施方案中,组合物是液体或固体药物制剂。在还有一个实施方案中,药物是不带电荷的或疏水的。在另一个实施方案中,环糊精选自 $\beta$ -环糊精、 $\alpha$ -环糊精,和 $\gamma$ -环糊精。在又一个实施方案中,环糊精是 $\beta$ -环糊精。在还有一个实施方案中,药物是3-卤代丙酮酸。在另一个实施方案中,药物是3-溴代丙酮酸。在又一个实施方案中,组合物被配制用于系统给予。在还有一个实施方案中,组合物还包含抗-癌治疗剂。

[0009] 在另一方面,提供一种包含本文描述的组合物,和使用说明书的药剂盒。

[0010] 在又一方面,提供一种治疗患有癌症的受试者的方法,其包括给予受试者治疗有效量的本文描述的组合物。在一个实施方案中,组合物经系统给予。在另一个实施方案中,系统给予选自口服、静脉内、腹膜内、皮下,和肌内给予。在又一个实施方案中,受试者用至少一种另外的抗-癌疗法治疗。在还有一个实施方案中,至少一种另外的抗-癌疗法是放射疗法。在另一个实施方案中,癌症是实体瘤。在又一个实施方案中,癌症选自肝癌、胰腺癌、肺癌和乳腺癌。在还有一个实施方案中,癌症是肝癌。在另一个实施方案中,受试者是哺乳动物。

在另一个实施方案中,哺乳动物是人。

## 附图简述

- [0011] 图1显示 $\beta$ -环糊精分子的化学结构和环状拓扑结构(见,例如Rasheed等(2008) *Sci. Pharm.* 76: 567-598)。
- [0012] 图2A-2B显示3-BrPA或 $\beta$ -CD-3-BrPA在治疗24小时后对MiaPaCa2细胞(图2A)和Suit-2细胞(图2B)的影响。
- [0013] 图3显示3-BrPA或 $\beta$ -CD-3-BrPA在治疗72小时后对MiaPaCa2细胞的影响。
- [0014] 图4显示 $\beta$ -CD-3-BrPA对体内肿瘤生长的影响。
- [0015] 图5显示在用 $\beta$ -CD-3-BrPA治疗的3只小鼠中的完全肿瘤反应。
- [0016] 图6显示如在图4和5中治疗的原位MiaPaCa-2肿瘤的组织病理学分析结果。
- [0017] 图7显示NMR光谱法的结果。放大的插图表明亚甲基质子的高场位移(0.1 ppm),这是在 $\beta$ -CD-3-BrPA的络合作用后观察到的。
- [0018] 图8显示在MiaPaCa-2(上排)和Suit-2(中排)细胞中,根据基于发光的细胞成活力的2D和3D器官型细胞培养的杀死曲线。使细胞在常氧和缺氧条件下培养72小时,然后暴露于3-溴代丙酮酸(3-BrPA)、1:1- $\beta$ -环糊精(CD)-3-BrPA,或仅作为对照的 $\beta$ -CD持续24小时。使细胞培养24小时,然后用吉西他滨处理72小时。对于3D器官型细胞培养(下排),*luc*MiaPaCa-2细胞在常氧或缺氧条件下培养总共6天。用3-BrPA或 $\beta$ -CD-3-BrPA单次处理在第5天进行,持续24小时。在第3天开始暴露于吉西他滨72小时。生物发光成像在第6天进行以评价药物渗透和对细胞成活力的影响。右下框含有对HIF-1 $\alpha$ 的免疫-印迹以证实缺氧存在。
- [0019] 图9显示3-溴代丙酮酸在3D器官型细胞培养中的作用。均匀的嵌入胶原I-基质的*luc*MiaPaCa-2细胞通过共聚焦光学显微镜确认(第1天)。3D器官型细胞培养物在常氧条件下培养并用3-BrPA每隔一天处理,累计三次。相差显微术和生物发光成像(后者仅用于MiaPaCa-2细胞)在第6天进行,以评价对细胞形态学和成活力的影响。F-肌动蛋白和裂解的胱天蛋白酶-3的免疫荧光染色在3D器官型细胞培养物的冷冻切片中进行。DAPI用作核酸复染剂。
- [0020] 图10显示3-溴代丙酮酸在3D器官型细胞培养中的进一步的作用。均匀嵌入胶原I-基质的Suit-2细胞通过共聚焦光学显微镜确认(第1天)。3D器官型细胞培养物在常氧条件下培养并用3-BrPA每隔一天处理,累计三次。相差显微术和生物发光成像(后者仅用于MiaPaCa-2细胞)在第6天进行,以评价对细胞形态学和成活力的作用。F-肌动蛋白和裂解的胱天蛋白酶-3的免疫荧光染色在3D器官型细胞培养的冷冻切片中进行。DAPI被用作核酸复染剂。
- [0021] 图11A-11D显示3-溴代丙酮酸对细胞侵袭性的影响。MiaPaCa-2(图11A)和Suit-2(图11B)细胞被接种到Boyden侵袭小室中。培养过夜后接着用3-溴代丙酮酸处理48小时(MiaPaCa-2)或72小时(Suit-2)。侵袭插入物的膜底侧的侵入细胞使用姬姆萨样染色(Giemsa-like staining)进行染色。图像显示按4x、10x,和20x放大倍率的侵袭的细胞。侵袭的相对量化通过测量在10x的全视野中染色细胞的面积来计算。MMP-9活性和分泌在MiaPaCa-2和Suit-2细胞的浓缩上清液中,通过酶谱法(图11C)和蛋白质印迹法(图11D)测

定。(\*) 表示统计学上的显著性 (p-值<0.05)。

[0022] 图12A-12D显示 $\beta$ -环糊精-3-溴代丙酮酸的体内效力。用总共 $1.5 \times 10^6$ 个 $lucMiaPaCa-2$ 细胞原位植入总共42只雄性裸鼠。异种移植物生长1周后,使用生物发光成像(BLI)证实肿瘤。代表性数目的动物显示于图12A中。动物随机接受 $\beta$ -CD-3-BrPA (N = 21)、游离3-BrPA (N = 7)、吉西他滨 (N = 7), 和 $\beta$ -CD (N = 7)。动物每周成像一次, 经28天的过程。信号总体进展显示于图12B中。依据Kaplan-Meier分析, 用游离3-BrPA治疗的动物显示过度的治疗-相关的毒性, 导致在实验结束时5/7的动物的损失, 以致统计学相关的数目不能存活而包括在最终的图像分析中(图12C)。媒介-对照( $\beta$ -CD)当腹膜内给予时, 未表现出任何治疗-相关的毒性并且是惰性的(图12C)。在完成实验时, 处死所有的动物并进行探索性验尸, 以提取器官并评价潜在的损害。对于 $\beta$ -CD-3-BrPA, 当与惰性媒介比较时(图12D), 未观察到器官毒性(组织作用)。

[0023] 图13显示离体病理和免疫组织化学肿瘤分析。用 $\beta$ -CD、吉西他滨, 或 $\beta$ -CD-3-BrPA (3种代表性的肿瘤被示出)处理的肿瘤的H&E染色表明 $\beta$ -CD-3-BrPA的治疗作用。在H&E-染色的全-肿瘤概观内的方块指示为进一步分析药物的抗-肿瘤作用而放大的区域, 其被对裂解的胱天蛋白酶-3和Ki67的染色所证实。另外, 测定了作为3-BrPA的主要靶标的GAPDH, 以及作为特定的转运蛋白的MCT-1的显著减少。

## 发明详述

[0024] 本文已确定环糊精可包封ATP产生的选择性抑制剂如3-卤代丙酮酸(例如, 3-BrPA), 以在水性环境中稳定烷基化化合物, 以及减少蛋白质中的亲核实体接近它的能力, 从而降低其系统毒性并维持其烷基化能力。本文在多个体外细胞系中, 使用不同形式的环糊精(例如,  $\beta$ 和 $\alpha$ )和活性剂包囊相对于环糊精的不同的比率, 和在体内动物肿瘤模型中证实了这样的组合物。例如, 这样的组合物在此已表明维持ATP产生的选择性抑制剂在体外和体内杀死癌细胞的功能特征, 以致为了系统给予, 它们的活性可被保存和保护直至它抵达靶组织、器官, 和/或肿瘤, 同时最大限度减少毒性。这种测定是出乎意料的, 因为已知环糊精通过直接催化作用, 特别是增加pH, 具有对许多化合物的破坏稳定的作用(Rasheed等(2008) *Sci. Pharm.* 76: 567-598)。虽然已预期环糊精的这种催化作用对于3-卤代丙酮酸(因为它们是丙酮酸的卤化衍生物)是大的, 令人惊讶地确定环糊精实际上保护和稳定3-BrPA。还令人惊讶地确定, 用产生负电荷(阴离子)的可电离基团替代一个或多个其 $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖昔单元上的一个或多个羟基而修饰的环糊精, 比那些具有产生正电荷(阳离子)的可电离的基团的环糊精或未修饰的环糊精, 例如未修饰的 $\alpha$ -或 $\beta$ -环糊精更好地稳定3-卤代丙酮酸。不受理论的束缚, 相信环糊精上的阴离子部分迫使卤代丙酮酸(例如, 3-BrPA)的卤原子(例如, 溴)坐落在空腔中。也令人惊讶地确定 $\beta$ -环糊精包封呈保护和稳定3-BrPA的形式的3-BrPA, 特别是在体内疗效并且也在体外疗效方面显著优于 $\alpha$ -环糊精。

[0025] 因此, 本发明提供包含这样的包封在环糊精内的3-卤代丙酮酸化合物的组合物和药剂盒, 以及制备和使用这样的组合物和药剂盒的方法。

[0026] A. 定义

[0027] 为了更容易理解本发明, 某些术语和短语在下文和整个说明书中定义。

[0028] 冠词“一”和“一个”在本文用来指物体的一个或超过一个(即, 至少一个)语法对

象。举例来说,“一个要素”意指一个要素或超过一个要素。

[0029] 术语“3-溴代丙酮酸”或“3-BrPA”指3-溴代丙酮酸、3-溴代丙酮酸的类似物和衍生物、3-溴代丙酮酸的前药、3-溴代丙酮酸的代谢产物及其盐。

[0030] 术语“给予”意指提供药物或组合物给受试者,并包括,但不限于,通过医学专业人员给予和自我-给予。

[0031] 术语“癌症”包括,但不限于,实体瘤和血源性肿瘤。术语癌症包括皮肤、组织、器官、骨、软骨、血和血管的疾病。术语“癌症”还包括原发性和转移性癌症。

[0032] 术语“抑制(inhibit)”或“抑制(inhibits)”意指与未治疗的对照受试者、细胞、生物学途径,或生物学活性比较或与靶标,例如在治疗受试者之前的受试者中实体恶性肿瘤的生长比较,降低、抑制、减弱、削弱、阻止,或稳定疾病、病症或病况的发展或进展,生物学途径的活性,或生物学活性,例如实体恶性肿瘤的生长,例如,达至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%,或甚至100%。所谓术语“降低”意指抑制、压制、减弱、削弱、阻止,或稳定癌症疾病、病症或病况的症状。应该意识到,虽然不被排除,但治疗疾病、病症或病况不需要所述疾病、病症、病况或与之相关的症状完全地消除。

[0033] 术语“调节”指反应的上调(即,激活或刺激)、下调(即,抑制或阻止),或两者的组合或分开。

[0034] 术语“药学上可接受的”在本文被用来指在合理的医学判断范围内,适合用于与人和动物的组织接触,而无过度的毒性、刺激性、过敏反应,或其它问题或并发症,与合理的利益/风险比相称的那些化合物、材料、组合物,和/或剂型。

[0035] 术语“药学上-可接受的载体”在本文被用来指药学上-可接受的材料、组合物或媒介,例如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂,或溶剂包囊材料,涉及携带或转运主题化合物从身体的一个器官,或部分到身体的另一个器官,或部分。每种载体在与制剂的其它成分适配且对患者无害的意义上必须是“可接受的”。一些可用作药学上-可接受的载体的材料的实例包括:(1) 糖,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;(2) 淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;(3) 纤维素,和其衍生物,例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;(4) 粉末状黄蓍胶;(5) 麦芽;(6) 明胶;(7) 滑石粉;(8) 赋形剂,例如可可酯和栓剂蜡;(9) 油,例如花生油、棉籽油、葵花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;(10) 二醇,例如丙二醇;(11) 多元醇,例如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;(12) 酯,例如油酸乙酯和月桂酸乙酯;(13) 琼脂;(14) 缓冲剂,例如氢氧化镁和氢氧化铝;(15) 藻酸;(16) 无热原水;(17) 等渗盐水;(18) 林格氏溶液;(19) 乙醇;(20) pH缓冲液;(21) 聚酯、聚碳酸酯和/或聚酐;和(22) 其它用于药物制剂的非-毒性相容物质。

[0036] 术语“药学上-可接受的盐”指化合物的相对无-毒的、无机和有机盐。

[0037] “受试者”可包括为了医学目的,例如为了治疗已有疾病、病症、病况或为了预防疾病、病症或病况的发生的预防性治疗的人类受试者或为了医学、兽医目的,或发展目的的动物受试者。合适的动物受试者包括哺乳动物包括,但不限于,灵长类动物,例如,人、猴、猿、长臂猿、黑猩猩、猩猩、短尾猿等;牛,例如,牛、公牛等;羊,例如,绵羊等;公山羊,例如,山羊等;猪,例如,小猪、公猪等;马,例如,马、驴、斑马等;猫科动物,包括野猫和家猫;犬科动物,包括狗;兔类动物,包括兔、野兔等;和啮齿动物,包括小鼠、大鼠、豚鼠等。动物可以是转基因动物。在一些实施方案中,受试者是人,包括,但不限于,胎儿、新生儿、婴儿、少年,和成年

受试者。此外，“受试者”可包括患有或怀疑患有疾病、病症或病况的患者。因此，术语“受试者”和“患者”可在此互换使用。受试者还包括动物疾病模型(例如，用于实验的大鼠或小鼠等)。

[0038] 术语“预防”、“防止”、“阻止”、“预防性治疗”等指减少受试者发生疾病、病症或病况的可能性，所述受试者没有罹患，但处于发生疾病、病症或病况的风险中或易患这些疾病、病症或病况。

[0039] 术语“怀疑患病的受试者”意指受试者表现出疾病或病症的一个或多个临床指征。在某些实施方案中，疾病或病症是癌症。在某些实施方案中，癌症是白血病或淋巴瘤。

[0040] 术语“有需要的受试者”意指被鉴定需要医治或治疗的受试者。

[0041] 术语“系统给予”、“全身给药”、“外周给予”和“外周给药”意指给予化合物、药物或其它材料(并非直接进入中枢神经系统)，以致它进入患者的系统，因而经受代谢和其它类似过程，例如，皮下给药。

[0042] 术语“治疗剂”或“药物”指能够对宿主产生所需生物学作用的药剂。化疗剂和基因毒性剂是治疗剂的实例，它们是通常已知的化学来源的物质，而不是生物学物质，或分别通过特定的作用机理产生治疗作用。生物学来源的治疗剂的实例包括生长因子、激素，和细胞因子。各种治疗剂是本领域已知的并可通过它们的作用鉴定。某些治疗剂能够调节红细胞增殖和分化。实例包括化疗核苷酸、药物、激素、非-特异性(如，非-抗体)蛋白质、寡核苷酸(例如，结合于目标核酸序列(例如，mRNA序列)的反义寡核苷酸)、肽，和拟肽。

[0043] 术语“治疗作用”指在动物，特别是哺乳动物，和更特别是人中，由药理活性物质引起的局部或系统作用。因此该术语指意欲用于在动物或人中诊断、治愈、缓解、治疗或预防疾病或用于提高所需的身体或精神发育和状态的任何物质。短语“治疗有效量”意指以适用于任何治疗的合理的利益/风险比，产生一些所需的局部或系统作用的此类物质的量。在某些实施方案中，化合物的治疗有效量将取决于其治疗指数、溶解性等。例如，由本发明的方法发现的某些化合物可以产生适用于这样治疗的合理利益/风险比的足够量给予。

[0044] 如本文所用的术语“治疗有效量”和“有效量”意指包含本发明化合物的化合物、材料或组合物的量，其有效地用于在动物的至少细胞亚群中，以适用于任何医学治疗的合理利益/风险比产生一些所需的治疗作用。

[0045] 术语“治疗”受试者的疾病或“治疗”患有疾病的受试者指使受试者经受药物治疗，例如，给予药物，以致所述疾病的至少一个症状减轻或防止恶化。

[0046] 术语“肿瘤”、“实体恶性肿瘤”或“赘生物”指细胞的异常或不受控制的生长所形成的病变。优选地，肿瘤是恶性肿瘤，例如由癌症形成的恶性肿瘤。

[0047] B. 环糊精

[0048] 术语“环糊精”指由5个或更多个 $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷单元组成的一个环状寡糖家族，所述糖苷单位通过具有环状拓扑结构的C1-C4键连接在一起，其中环状结构的较大和较小开口使 $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷单元的某些羟基暴露于周围的环境(例如，溶剂)(见，例如图1)。术语“惰性环糊精”指含有具有基本式 $C_6H_{12}O_6$ 的 $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷单元且没有任何另外的化学取代的葡萄糖结构的环糊精(例如，具有6个葡萄糖单体的 $\alpha$ -环糊精、具有7个葡萄糖单体的 $\beta$ -环糊精，和具有8个葡萄糖单体的 $\gamma$ -环糊精)。术语“环糊精内相”指包含在(即，被包封在)环糊精结构的环状拓扑布局内的相对较少亲水性的区域。术语“环糊精外相”指不被环糊精

结构的环状拓扑布局环绕的区域并可包括,例如,在系统体内给药期间存在的水性环境或指自我包封选择性ATP产生抑制剂/环糊精复合物的结构内相。环糊精被用来溶解疏水组分(见,例如,Albers和Muller(1995)*Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Syst.* 12:311-337; Zhang和Ma (2013)*Adv. Drug Delivery Rev.* 65:1215-1233; Laza-Knoerr等(2010)*J. Drug Targ.* 18:645-656; Challa等(2005)*AAPS PharmSci. Tech.* 6:E329-357; Uekama等(1998)*Chem. Rev.* 98:2045-2076; Szejtli (1998)*Chem. Rev.* 98: 1743-1754; Stella和He (2008)*Toxicol. Pathol.* 36:30-42; Rajewski和Stella (1996)*J. Pharm. Sci.* 85: 1142-1169; Thompson (1997)*Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Sys.* 14:1-104;和Irie和Uekama (1997)*J. Pharm. Sci.* 86:147-162)。位于环糊精内相内的任何物质被认为是“包封的”。

[0049] 如本文所用的,依据本发明的环糊精是有用的,只要环糊精可包封选择性ATP产生抑制剂即可。在一些实施方案中,环糊精还携带可电离的(例如,弱碱性和/或弱酸性)官能团以提高选择性ATP产生抑制剂的稳定性。所谓保护选择性ATP产生抑制剂的稳定性,意指选择性ATP产生抑制剂/环糊精复合物使选择性ATP产生抑制剂分子更稳定,如通过与不和环糊精复合的选择性ATP产生抑制剂分子的稳定性比较的光稳定性、货架寿命的稳定性、热稳定性、抗分子内环化的稳定性、对酸水解的稳定性、抗一般降解的稳定性等所示的。

[0050] 为了包封所需的治疗剂,环糊精可根据所需的治疗剂的特征和有效的、高-浓度加载于其中的参数进行选择和/或被化学修饰。例如,优选环糊精本身具有在水中的高溶解性,以促进治疗剂,例如3-卤代丙酮酸的加载。在一些实施方案中,环糊精的水溶性是至少10 mg/mL, 20 mg/mL, 30 mg/mL, 40 mg/mL, 50 mg/mL, 60 mg/mL, 70 mg/mL, 80 mg/mL, 90 mg/mL, 100 mg/mL或更高。实现这样的提高的水溶性的方法是本领域熟知的。

[0051] 在一些实施方案中,一个大的与治疗剂有关的缔合常数是优选的并通过基于治疗剂的尺寸选择环糊精中的葡萄糖单位的数目而获得(见,例如,Albers和Muller (1995)*Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Syst.* 12:311-337; Stella和He (2008)*Toxicol. Pathol.* 36:30-42;和Rajewski和Stella (1996)*J. Pharm. Sci.* 85:1142-1169)。结果,在环糊精的存在下,治疗剂的溶解性(名义溶解度)可得到进一步的提高。例如,环糊精与治疗剂的缔合常数可以是100、200、300、400、500、600、700、800、900、1,000,或更高。

[0052] 通过与环糊精羟基(例如,衬在惰性环糊精环面的上下脊的那些羟基)反应所形成的衍生物可被容易地制备并提供一种修饰母体(惰性)环糊精的物理化学性质的方法。在一些实施方案中,惰性环糊精分子或未与选择性ATP产生抑制剂复合的环糊精分子的理化性质不同于与选择性ATP产生抑制剂复合的环糊精分子的性质。因此,与环糊精复合的选择性ATP产生抑制剂分子可通过观察溶解性、化学反应性、UV/VIS吸光度、药物滞留、化学稳定性等的改变而鉴定。例如,本文已确定修饰羟基,例如面向远离环糊精内相的那些羟基,可用可电离的化学基团替代以促进治疗剂,例如难溶性或疏水性药物在修饰环糊精内的加载及其稳定。在一个实施方案中,具有至少一个用可电离的化学基团取代的羟基的修饰环糊精将导致在某些溶剂(例如,pH)条件下的荷电部分。术语“荷电的环糊精”指具有一个或多个其羟基被荷电部分和携带电荷的部分取代的环糊精。这样的部分本身可以是荷电的基团或它可包含用一个或多个荷电部分取代的有机部分(例如,C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基或C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基醚部分)。

[0053] 在一个实施方案中,“可电离的”或“荷电的”部分是弱可电离的。弱可电离的部分

是那些为或者弱碱性或者弱酸性的部分。弱碱性官能团(X)具有依据 $\text{CH}_3\text{-X}$ 的在约6.0-9.0、6.5-8.5、7.0-8.0、7.5-8.0之间,和包含在任何范围之间的 $\text{pK}_a$ 。类似地,弱酸性官能团(Y)具有依据 $\text{CH}_3\text{-Y}$ 的在约3.0-7.0、4.0-6.5、4.5-6.5、5.0-6.0、5.0-5.5之间,和包含在任何范围之间的 $\log$ 解离常数( $\text{pK}_a$ )。 $\text{pK}_a$ 参数是一种物质的酸/碱性质的熟知的量度, $\text{pK}_a$ 测定的方法在本领域是传统的和常规的。例如,许多弱酸的 $\text{pK}_a$ 值被列表于化学和药理学的参考书中。见,例如,药用盐的IUPAC手册(IUPAC Handbook of Pharmaceutical Salts),由P. H. Stahl和C. G. Wermuth, Wiley-VCH, 2002编辑;化学和物理的CRC手册,第82版,由D. R. Lide编辑, CRC Press, Florida, 2001, p. 8-44至8-56。因为带有超过一个可电离的基团的环糊精具有各自用下标表示的第二个和随后的基团的 $\text{pK}_a$ 。

[0054] 代表性的阴离子部分包括,而无任何限制,琥珀酰基、羧酸根、羧甲基、磺酰基、磷酸根、磺基烷基醚、硫酸根、碳酸根、硫代碳酸根、硫代碳酸根、磷酸根、膦酸根、磺酸根、硝酸根和硼酸根基团。

[0055] 代表性的阳离子部分包括,但不限于,氨基、胍和季铵基团。

[0056] 在另一个实施方案中,修饰的环糊精是“聚阴离子”或“聚阳离子”。聚阴离子是具有一个以上的、导致超过两个单位的净负离子电荷的、带负电荷基团的修饰环糊精。聚阳离子是具有一个以上的、导致超过两个单位的净阳离子电荷的、带正电荷基团的修饰环糊精。

[0057] 在另一个实施方案中,修饰的环糊精是“可荷电的两亲物”。所谓“可荷电的”意指两亲物具有在pH 4-pH 8或8.5范围内的 $\text{pK}$ 。因此可荷电的两亲物可以是一种弱酸或弱碱。所谓“两性的”在这里指的是一种具有既有阴离子性质,又有阳离子性质的可电离基团的修饰环糊精,其中:1) 阳离子和阴离子两亲物的至少一个,且任选两个都是可荷电的,具有至少一个具有在4和8至8.5之间的 $\text{pK}$ 的荷电的基团,2) 阳离子电荷最好在pH 4,和3) 阴离子电荷最好在pH 8-8.5。

[0058] 在一些实施方案中,“可电离的”或“荷电的”环糊精作为一个整体,无论聚离子、两性分子的,或者另外的,都是弱可电离的(即,具有在约4.0-8.5、4.5-8.0、5.0-7.5、5.5-7.0、6.0-6.5之间,和包含在其中的任何范围的 $\text{pK}_a$ )。

[0059] 环糊精的任何一个、一些或全部 $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖昔单元的任何一个、一些或全部羟基可如本文所述被修饰为可电离的化学基团。由于各个环糊精羟基在化学反应性方面不同,与修饰部分的反应可产生一种位置和光学异构体的无定形混合物。作为选择,某些化学可允许预-修饰的 $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖昔单元反应以形成均匀的产物。

[0060] 发生的总取代由称为取代度的术语描述。例如,具有取代度为7的6-乙二氨基- $\beta$ -环糊精将由6-乙二氨基- $\beta$ -环糊精的异构体的分布组成,其中每个6-乙二氨基- $\beta$ -环糊精分子的乙二氨基的平均数是7。取代度可通过质谱或核磁共振波谱确定。理论上,对于 $\alpha$ -环糊精,最大取代度是18,对于 $\beta$ -环糊精是21,而对于 $\gamma$ -环糊精是24,然而,具有羟基的取代本身存在对另外的羟基烷基化的可能性。取代度可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24,或更多并可包括完全取代。

[0061] 另一个参数是给定的羟基取代的立体化学定位。在一个实施方案中,至少一个面向远离环糊精内部的羟基被可电离的化学基团取代。例如,至少一个 $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖昔单元的C2-C3-C6羟基的C2、C3、C6、C2和C3、C2和C6、C3和C6,和所有3个被可电离的化学基团取代。这样的碳位置是本领域熟知的。例如,每个 $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖昔单元的在图1中所示的 $\text{CH}_2\text{OH}$

部分代表C6碳。羟基的任何这样的组合可类似地与修饰环糊精的至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11,直至全部的 $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖单元组合以及与本文描述的任何取代度组合。

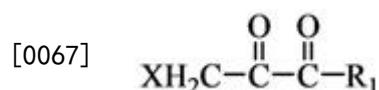
[0062] 合并一个或多个本文描述的环糊精也是可接受的。

[0063] C. ATP产生的选择性抑制剂及相关化合物

[0064] 本发明的一些实施方案涉及ATP产生的选择性抑制剂在环糊精内的包封。术语“ATP产生的选择性抑制剂”指通过干扰生成ATP的酶促过程抑制ATP生产的抗代谢物剂(例如,GAPDH抑制剂如3-卤代丙酮酸像3-溴代丙酮酸)。在一些实施方案中,ATP产生的选择性抑制剂是“抗肿瘤烷化剂”,其指用于癌症治疗的造成氢被烷基替代的药物。如本文所用的术语“烷基”指C<sub>1-20</sub>(包括1和20端值)线性(即,直链)、支链,或环状、饱和的或至少部分地和在一些情况下完全不饱和的(即,烯基和炔基)烃基,其源自含有1和20个碳原子之间的、通过除去单个氢原子的烃部分。代表性的烷基包括,但不限于,甲基、乙基、正-丙基、异丙基、正-丁基、异丁基、仲-丁基、叔-丁基、正-戊基、仲-戊基、异-戊基、新戊基、正-己基、仲-己基、正-庚基、正-辛基、正-癸基、正-十一烷基、十二烷基等、乙烯基、丙烯基、丁烯基、戊烯基、己烯基、辛烯基、丁二烯基、丙炔基、丁炔基、戊炔基、己炔基、庚炔基,和丙二烯基(allenyl)基团。“分支的”指烷基,其中低级烷基,例如甲基、乙基或丙基,连接于线性烷基链。“低级烷基”指具有1-约8个碳原子(即,C<sub>1-8</sub>烷基),例如,1、2、3、4、5、6、7或8个碳原子的烷基。“高级烷基”指具有约10-约20个碳原子,例如,10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个碳原子的烷基。在某些实施方案中,“烷基”特别是指C<sub>1-8</sub>直链烷基。在其它实施方案中,“烷基”特别是指C<sub>1-8</sub>支链烷基。

[0065] 烷基基团可任选地被一个或多个烷基取代基取代(“取代的烷基”),所述取代基可以是相同的或不同的。术语“烷基取代基”包括但不限于烷基、取代的烷基、卤代、芳基氨基、酰基、羟基、芳氧基、烷氧基、烷基硫基、芳基硫基、芳烷基氧基、芳烷基硫基、羧基、烷氧基羰基、氧代,和环烷基。沿着烷基链可任选地插入一个或多个氧、硫或取代的或未取代的氮原子,其中氮取代基是氢、低级烷基(在此也称为“烷基氨基烷基”),或芳基。因此,如本文所用的,术语“取代的烷基”包括如本文定义的烷基基团,其中烷基的一个或多个原子或官能团用另一个原子或官能团,包括例如,烷基、取代的烷基、卤素、芳基、取代的芳基、烷氧基、羟基、硝基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、硫酸酯和巯基替代。

[0066] 在一个实施方案中,ATP产生的选择性抑制剂一般地由下式表示:



[0068] 其中X表示卤化物、磺酸酯、羧酸酯、烷氧化物或胺氧化物。在某些实施方案中,X是选自以下的卤化物:氟化物、溴化物、氯化物和碘化物。在一个实施方案中,抑制剂是3-卤代丙酮酸。在某些其它实施方案中,3-卤代丙酮酸选自:3-氟代丙酮酸、3-氯代丙酮酸、3-溴代丙酮酸和3-碘代丙酮酸。在一个实施方案中,3-卤代丙酮酸是3-溴代丙酮酸。在其它实施方案中,X是磺酸酯并可选自:三氟甲磺酸酯、甲磺酸酯和甲苯磺酸酯。在还有一个实施方案中,X是胺氧化物如二甲基胺氧化物。在某些实施方案中,R<sub>1</sub>表示OR、H、N(R')<sub>2</sub>、C<sub>1-C6</sub>烷基、C<sub>6-C12</sub>芳基、C<sub>1-C6</sub>杂烷基,或C<sub>6-C12</sub>杂芳基。独立地,在其它实施方案中,R"表示H、C<sub>1-C6</sub>烷基,或C<sub>6-C12</sub>芳基。独立地,在还有的其它实施方案中,R表示H、碱金属、C<sub>1-C6</sub>烷基、C<sub>6-C12</sub>芳基或C(O)R';和R'表示H、C<sub>1-C20</sub>烷基或C<sub>6-C12</sub>芳基。

[0069] 在一优选的实施方案中,本发明还提供由以下通式表示的ATP产生的抑制剂:

[0070]  $X-CH_2-CO-COOH$ ,

[0071] 其中X表示卤化物、磺酸酯、羧酸酯、烷氧化物或胺氧化物。在某些实施方案中,X是卤化物并可选自:氟化物、溴化物、氯化物和碘化物。在一个实施方案中,抑制剂是3-卤代丙酮酸。在某些实施方案中,3-卤代丙酮酸选自:3-氟代丙酮酸、3-氯代丙酮酸、3-溴代丙酮酸和3-碘代丙酮酸。在一个实施方案中,3-卤代丙酮酸是3-溴代丙酮酸。在其它实施方案中,X是选自以下的磺酸酯:三氟甲磺酸酯、甲磺酸酯和甲苯磺酸酯。在还有一个实施方案中,X是胺氧化物如二甲基胺氧化物。

[0072] 也可使用3-溴代丙酮酸的其它类似物、衍生物、前药、代谢物及其盐,只要这些化合物或组合物具有统计学类似于3-溴代丙酮酸的抗癌作用。当本文提及使用3-溴代丙酮酸治疗时,应该理解,在适用时治疗也可用3-溴代丙酮酸的类似物、衍生物、前药、代谢物和盐进行。

[0073] D. 环糊精/ATP抑制剂组合物

[0074] 本发明提供包含包封在惰性和/或修饰的环糊精内的、上述的ATP产生的选择性抑制剂的药物组合物。这样的复合物在此被称为环糊精/ATP抑制剂组合物。ATP产生的选择性抑制剂与环糊精的比例可以是1:1,以使一个抑制剂分子与一个环糊精分子形成复合物。或者,所述比例可以是2:1、3:1、4:1、5:1,或更多。

[0075] 在一方面,本发明提供药学上可接受的组合物,其包含与一个或多个药学上可接受的载体(添加剂)和/或稀释剂配制在一起的、治疗有效量的上述一个或多个这样的环糊精/ATP抑制剂。在另一方面,所述组合物可原样或与药学上可接受的载体混合给予并也可与其它抗-癌疗法,例如化疗剂、清除剂化合物、放射疗法,生物疗法等联合给予。因此,联合疗法包括顺序、同时和分开,或共同给予所述组合物,其中当给予随后的化合物时,第一次给药的治疗作用尚未完全消失。

[0076] 如下文所详细描述的,为了以固体或液体形式给予,本发明的药物组合物可被特别地配制,包括那些适合于以下途径给予的形式:(1) 口服给予,例如,口服药水(drenches)(水性或非-水性溶液或悬浮液)/片剂,例如,那些针对口腔、舌下、和全身吸收、大药丸、散剂、颗粒剂、应用于舌头的糊剂;(2) 胃肠外给予,例如,经皮下、肌内、静脉内或硬脑膜注射作为,例如,无菌溶液或悬浮液,或缓释制剂;(3) 局部应用,例如,作为一种霜剂、软膏剂,或控释贴剂或应用于皮肤的喷雾剂;(4) 阴道内或直肠内,例如,作为一种阴道栓剂、霜剂或泡沫剂;(5) 舌下含服;(6) 眼内;(7) 经皮;或(8) 经鼻。

[0077] 如上所提出的,选择性ATP抑制剂或环糊精/ATP抑制剂组合物的某些实施方案可含有碱性官能团,例如氨基或烷基氨基,并因此能够与药学上-可接受的酸形成药学上-可接受的盐。这些盐可在给予媒介或剂型制备过程中原位制备,或通过使其游离碱形式的本发明的纯化化合物分别与合适的有机或无机酸反应,并在随后的纯化期间分离如此形成的盐。代表性的盐包括氢溴酸盐、盐酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐,磷酸盐、硝酸盐、乙酸盐、戊酸盐、油酸盐、棕榈酸盐、硬脂酸盐、月桂酸盐、苯甲酸盐、乳酸盐、磷酸盐、甲苯磺酸盐、柠檬酸盐、马来酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、萘酸盐、甲磺酸盐、葡萄糖酸盐、乳糖酸盐,和十二烷基磺酸盐等(见,例如,Berge等(1977)“药用盐(Pharmaceutical Salts)”,*J. Pharm. Sci.* 66:1-19)。

[0078] 本化合物的药学上可接受的盐包括例如,来自无-毒性有机或无机酸的化合物的常规无毒性盐或季铵盐。例如,这样的常规无毒性盐包括源自无机酸如盐酸、氢溴酸、硫酸、氨基磺酸、磷酸、硝酸等的那些盐;以及从有机酸如乙酸、丙酸、琥珀酸、乙醇酸、硬脂酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、棕榈酸、马来酸、羟基马来酸、苯乙酸、谷氨酸、苯甲酸、水杨酸、对氨基苯磺酸、2-乙酰氧基苯甲酸、富马酸、甲苯磺酸、甲磺酸、乙二磺酸、羟乙磺酸(isothionic)等制备的盐。

[0079] 在其它情况中,本发明的选择性ATP抑制剂或环糊精/ATP抑制剂组合物可含有一个或多个酸性官能团,因此,能够与药学上-可接受的碱形成药学上-可接受的盐。这些盐可同样在给予媒介或剂型制备过程中原位制备,或通过使其游离酸形式的纯化化合物分别与合适的碱,例如药学上-可接受的金属阳离子的氢氧化物、碳酸盐或碳酸氢盐,与氨,或与药学上-可接受的有机伯胺、仲胺或叔胺反应。代表性的碱金属或碱土金属盐包括锂、钠、钾、钙、镁,和铝盐等。对形成碱加成盐有用的代表性有机胺包括乙胺、二乙胺、乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、哌嗪等(见,例如,Berge等,同上)。

[0080] 湿润剂、乳化剂和润滑剂,例如十二烷基硫酸钠和硬脂酸镁,以及着色剂、脱模剂、包衣剂、增甜剂、矫味剂和增香剂、防腐剂和抗氧化剂也可存在于所述组合物中。

[0081] 药学上-可接受的抗氧化剂的实例包括:(1)水溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠、亚硫酸钠等;(2)油-可溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸棕榈酸酯、丁羟甲苯(BHA)、丁羟回醚(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 $\alpha$ -生育酚等;和(3)金属螯合剂,例如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸等。

[0082] 环糊精/ATP抑制剂组合物制剂包括适合于口服、经鼻、局部(包括颊下和舌下)、直肠、阴道和/或胃肠外给予的那些。制剂可便利地以单位剂型存在并可通过制药领域熟知的任何方法制备。可与载体材料结合以产生单一剂型的活性成分的量将根据要治疗的宿主和特定的给药模式而变化。可与载体材料结合以产生单一剂型的活性成分的量将通常为产生治疗作用的化合物的量。

[0083] 在某些实施方案中,环糊精/ATP抑制剂组合物的制剂可包含其它载体以允许更加稳定,不同的体内释放特性,靶向特定的位点,或将允许更有效传递复合物至受试者或受试者体内的靶标的任何其它所需的特性,例如,但不限于,脂质体、微球、纳米球、纳米颗粒、液泡、胶束形成剂,例如,胆酸,和聚合物载体,例如,聚酯和聚酐。在某些实施方案中,前述制剂赋予本发明的化合物的口服生物利用性。

[0084] 环糊精/ATP抑制剂组合物的液体剂量制剂包括药学上可接受乳剂、微乳剂、溶液剂、混悬剂、糖浆剂和酏剂。除了活性成分,液体剂型可含有通常用于本领域的惰性稀释剂,例如,水或其它溶剂,增溶剂和乳化剂,例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油(特别是,棉籽油、花生油、玉米油、胚油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢呋喃甲醇、聚乙二醇和脱水山梨醇的脂肪酸酯,及其混合物。

[0085] 除了惰性稀释剂,口服组合物也可包括辅助剂如湿润剂、乳化剂和助悬剂、甜味剂、矫味剂、着色剂、香料和防腐剂。

[0086] 混悬剂,除了活性化合物外,还可含有助悬剂例如,乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇和脱水山梨醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂-琼脂和黄蓍胶,及其混合物。

[0087] 适合于口服给予的制剂可呈现为胶囊剂、扁囊剂、丸剂、片剂、含片(使用调味的基质,通常为蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶)、散剂、颗粒剂,或作为一种在水性或非-水性液体中的溶液剂或混悬剂,或作为一种水包油或油包水液体乳剂,或作为一种酏剂或糖浆剂,或作为为锭剂(使用惰性碱,例如明胶和甘油,或蔗糖和阿拉伯胶)和/或作为漱口液等形式,各自含有预定量的活性成分。本发明的环糊精/ATP抑制剂组合物也可作为大药丸、干药糖剂或糊剂给予。

[0088] 在固体剂型(例如,胶囊剂、片剂、丸剂、糖衣丸、散剂、颗粒剂等)中,活性成分与一个或多个药学上-可接受的载体,例如柠檬酸钠或磷酸二钙,和/或任何以下物质混合:(1)填充剂或增量剂,例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇,和/或硅酸;(2)粘合剂,例如,羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿卡胶;(3)保湿剂,例如甘油;(4)崩解剂,例如琼脂-琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、藻酸、某些硅酸盐,和碳酸钠;(5)溶液迟滞剂,例如石蜡;(6)吸收加速剂,例如季铵化合物;(7)湿润剂,例如,十六醇、一硬脂酸甘油酯,和非-离子表面活性剂;(8)吸收剂,例如高岭土和膨润土;(9)润滑剂,如滑石粉、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠,及其混合物;和(10)着色剂。在胶囊剂、片剂和丸剂的情况下,组合物也可包含缓冲剂。类似类型的固体组分也可用作软和硬-壳明胶胶囊剂中的填充剂,使用这样的赋形剂如乳糖或奶糖,以及高分子量聚乙二醇等。

[0089] 片剂可任选地用一个或多个辅助成分通过压制或模塑制得。压制的片剂可使用粘合剂(例如,明胶或羟丙基甲基纤维素)、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂(例如,羟基乙酸淀粉钠或交联羧甲基纤维素钠)、表面-活性剂或分散剂制备。模塑成型片剂可通过在合适的机器模压用惰性液体稀释剂湿润的粉末状化合物的混合物制得。

[0090] 片剂,和其它固体剂型,例如糖衣丸、胶囊剂、丸剂和颗粒剂,可任选被划痕或用包衣料和壳层制备,例如肠溶衣和在药物配制领域中熟知的其它包衣料。它们也可被配制以提供活性成分缓慢或控制释放,其中以变化的比例使用例如羟丙基甲基纤维素(以提供所需的释放特性)、其它聚合物基体、脂质体和/或微球。组合物也可被配制用于快速释放,例如,冷冻干燥。它们可通过,例如,通过细菌滤器过滤,或通过结合呈无菌固体组合物形式的、可溶于无菌水中的灭菌剂,或一些其它的在临用前使用的无菌的可注射介质灭菌。这些组合物也可任选地含有遮光剂并且可具有使它们仅(或优选地)在胃肠道的某些部分,任选地以延迟的方式释放活性成分的组成。可使用的包埋组分的实例包括聚合物物质和蜡。如果适合时,活性成分也可呈现为含有一种或多种上述赋形剂的微包囊的形式。

[0091] 用于直肠或阴道给予的制剂可作为栓剂存在,其可通过混合一个或多个本发明的化合物与一个或多个合适的非刺激性赋形剂或载体(包括,例如,可可酯、聚乙二醇、栓剂蜡或水杨酸酯)制备,并且其于室温下为固体,但在体温下为液体,因此,将在直肠或阴道腔内融化并释放活性化合物。

[0092] 适合于阴道给予的制剂也包括含有如本领域已知的为适当的此类载体的阴道栓剂、阴道塞(tampons)、霜剂、凝胶剂、糊剂、泡沫剂或喷雾剂制剂。

[0093] 用于局部或经皮给予本发明的环糊精/ATP抑制剂组合物的剂型包括散剂、喷雾剂、软膏剂、糊剂、霜剂、洗剂、凝胶剂、溶液剂、贴剂和吸入剂。活性化合物可在无菌条件下与药学上-可接受的载体,和与任何防腐剂、缓冲液,或可能需要的抛射剂混合。

[0094] 除了本发明的活性化合物外,软膏剂、糊剂、霜剂和凝胶剂还可含有赋形剂,例如动物和植物脂肪、油、蜡、石蜡、淀粉、黄蓍胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅酮、膨润土、硅酸、滑石粉和氧化锌,或其混合物。

[0095] 散剂和喷雾剂可含有赋形剂如乳糖、滑石粉、硅酸、氢氧化铝、硅酸钙和聚酰胺粉末,或这些物质的混合物。喷雾剂可另外地含有常用的抛射剂,例如氯代氟代烃和挥发性的未取代的烃,例如丁烷和丙烷。

[0096] 经皮贴剂具有提供控制传递至身体的附加的优点。这样的剂型可通过溶解或分散化合物在适当的介质中制得。吸收增强剂也可被用来增加化合物越过皮肤的通量。这样的通量的速率可通过提供速率控制膜或将所述化合物分散于聚合物基质或凝胶中来控制。

[0097] 眼用制剂、眼膏剂、粉末剂、溶液剂等也被包括在本发明的范围内。

[0098] 适用于胃肠外给予的药物组合物可包含无菌等渗水性或非水性溶液剂、分散剂、混悬剂或乳剂,或无菌粉末剂,其可在临用前重新构成为无菌可注射溶液剂或分散液,其可含有糖、醇、抗氧化剂、缓冲液、抑菌剂、使制剂与预定接受者的血液等渗的溶质或助悬剂或增稠剂。

[0099] 可用于本发明的药物组合物的合适水性和非水性载体的实例包括水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等),及其合适的混合物,植物油,例如橄榄油,和可注射的有机酯,例如油酸乙酯。适当的流动性可例如,通过使用包衣材料,例如卵磷脂,在分散液的情况下通过维持所需的粒度,和通过使用表面活性剂维持。

[0100] 在某些实施方案中,上述药物组合物可依据本文提供的方法和组合物与本领域已知的其它药理活性化合物(“第二个活性剂”)结合。第二个活性剂可以是大分子(例如,蛋白质)或小分子(例如,合成的无机、有机金属,或有机分子)。在一个实施方案中,第二个活性剂独立地或协同地帮助治疗癌症。

[0101] 例如,化疗剂是抗-癌剂。术语化疗剂包括,但不限于,铂-基药物,例如卡铂和顺铂;氮芥烷化剂;硝基脲烷化剂,例如卡莫司汀(BCNU)和其它烷化剂;抗代谢物剂,例如氨甲喋呤;嘌呤类似物抗代谢物剂;嘧啶类似物抗代谢物剂,例如氟尿苷(5-FU)和吉西他滨;激素抗肿瘤剂,例如戈舍瑞林、亮丙立德,和他莫昔芬;天然抗肿瘤剂,例如紫杉烷类(例如,多西他赛和紫杉醇)、阿地白介素、白介素-2、依托泊苷(VP-16)、干扰素 $\alpha$ 、和维A酸(ATRA);抗生素天然抗肿瘤剂,例如博来霉素、放线菌素D、柔红霉素、多柔比星,和丝裂霉素;和长春生物碱天然抗肿瘤剂,例如长春碱和长春新碱。

[0102] 此外,以下药物也可与抗肿瘤剂组合使用,即使未考虑抗肿瘤剂本身:放线菌素D;柔红霉素HCl;多西他赛;多柔比星HCl;依泊汀(epoetin)  $\alpha$ ;依托泊苷(VP-16);更昔洛韦钠;硫酸庆大霉素;干扰素 $\alpha$ ;乙酸亮丙立德;哌替啶(meperidine) HCl;美沙酮(methadone) HCl;雷尼替丁HCl;硫酸长春碱;和齐多夫定(AZT)。例如,氟尿苷最近已与肾上腺素和牛胶原蛋白结合配制以形成一种特别有效的组合。

[0103] 更进一步地,以下氨基酸、肽、多肽、蛋白质、多糖,和其它大分子的列表也可采用:白介素1-18,包括包括突变体和类似物;干扰素或细胞因子,例如干扰素 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ ;激素,例如黄体生成素释放激素(LHRH)和类似物和,促性腺素释放激素(GnRH);生长因素,例如转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )、成纤维细胞生长因子(FGF)、神经生长因子(NGF)、生长激素释放因子(GHRF)、表皮生长因子(EGF)、成纤维细胞生长因子同源因子(FGFHF)、肝细胞生长因子

(HGF), 和胰岛素生长因子(IGF); 肿瘤坏死因子- $\alpha$ & $\beta$  (TNF- $\alpha$ & $\beta$ ); 侵袭抑制因子-2 (IIF-2); 骨形态发生蛋白1-7 (BMP 1-7); 生长抑素; 胸腺素- $\alpha$ -1;  $\gamma$ -球蛋白; 超氧化物歧化酶 (SOD); 补体因子; 抗血管生成因子; 抗原材料; 和前药。

[0104] 与本文描述的治疗组合物和方法一起使用的化疗剂包括, 但不限于烷化剂如塞替派和环磷酰胺; 烷基磺酸盐如白消安、胺丙磺酯(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan); 氮杂环丙烷如苯佐替派(benzodopa)、卡波醌、美妥替哌(meturedopa), 和乌瑞替派(uredopa); 乙基蜜胺类(ethylenimines)和甲基蜜胺类(methylamelamines)包括六甲蜜胺、曲他胺、三乙撑磷酰胺、三乙撑硫化磷酰胺和三羟甲蜜胺; 多聚乙酰类(acetogenins) (特别是布拉他辛和布拉他辛酮); 喜树碱(包括合成的类似物托泊替康); 苔藓抑素(bryostatin); callystatin; CC-1065 (包括其阿多来新、卡折来新和比折来新合成类似物); 隐藻素类(cryptophycins) (特别是隐藻素1和隐藻素8); 多拉司他汀(dolastatin); 倍癌霉素(duocarmycin) (包括合成的类似物, KW-2189和CB1-TM1); 软珊瑚醇(eleutherobin); 水鬼蕉碱(pancratistatin); 驴枝珊瑚醇(sarcodictyin); 海绵抑制素(spongistatin); 氮芥类如苯丁酸氮芥、蔡氮芥(chlornaphazine)、cholophosphamide、雌莫司汀、异环磷酰胺、氮芥、盐酸氧氮芥、美法仓、新氮芥(novembichin)、苯芥胆甾醇、泼尼莫司汀、曲磷胺、尿嘧啶氮芥; 亚硝基脲类如卡莫司汀、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)和雷莫司汀(ranimustine); 抗生素如烯二炔(enediyne)抗生素(例如, 刺孢霉素(calicheamicin), 特别是刺孢霉素 $\gamma$ 1I和刺孢霉素 $\omega$ 1I; 烯二炔蒽环类抗生素, 包括烯二炔蒽环A; 双膦酸盐, 例如氯膦酸盐; 埃斯培拉霉素(esperamicin); 以及新制癌菌素发色团及相关的色蛋白烯二炔抗生素生色团、阿克拉霉素(aclacinomysins)、放线菌素、氨茴霉素(authramycin)、重氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素c、carabacin、洋红霉素(caminomycin)、嗜癌霉素(carzinophilin)、色霉素(chromomycin)、放线菌素D、柔红霉素、地托比星(detorubicin)、6-二氮杂-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星(包括吗啉代-多柔比星、氨基吗啉代-多柔比星、2-吡咯啉子基-多柔比星和脱氧多柔比星)、表柔比星、依索比星(esorubicin)、伊达比星(idarubicin)、发波霉素(marcellomycin)、丝裂霉素如丝裂霉素C、霉酚酸、诺加霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycins)、培洛霉素、泊非霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素(puromycin)、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodoxorubicin)、链黑菌素、链佐星(streptozocin)、杀结核菌素、乌苯美司(ubenime)、净司他丁、佐柔比星; 抗-代谢物如氨甲喋呤和5-氟尿苷(5-FU); 叶酸类似物如二甲叶酸(denopterin)、氨甲喋呤、蝶罗呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate); 嘧啶类似物如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫唑嘌呤胺(thiamiprime)、硫鸟嘌呤; 嘧啶类似物如环胞苷(ancitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷(6-azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、双脱氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依诺他滨、氟尿苷(floxuridine); 雄性激素如二甲睾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、环硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、睾内酯(testolactone); 抗-肾上腺药(anti-adrenals)如氨鲁米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane); 叶酸补偿剂如亚叶酸(folinic acid); 醋葡醛内酯(aceglatone); 醛磷酰胺糖苷(aldophosphamideglycoside); 氨基酮戊酸(aminolevulinic acid); 恩尿嘧啶

(eniluracil)；安吖啶(amsacrine)；贝塔布辛(bwstrabucil)、比生群(bisantrene)；依达曲沙(edatraxate)；地磷酰胺(defofamine)；地美可辛(demecolcine)；地吖醌(diaziquone)；依洛尼塞(el fornithine)；醋酸羟吡呋唑(elliptinium acetate)；埃博霉素(epothilone)；依托格鲁(etoglucid)；硝酸镓；羟基脲；香菇多糖(lentinan)；氯尼达明(lonidainine)；美登木素生物碱类(maytansinoid)如美登素和安丝菌素(ansamitocins)；米托胍腙(mitoguazone)；米托蒽醌(mitoxantrone)；mopidanmol；根瘤菌剂(nitraerine)；喷司他丁；蛋氨氮芥(phena met)；吡柔比星；洛索蒽醌(losoxantrone)；鬼臼酸(podophyllinic acid)；2-乙基酰肼；丙卡巴肼；PSK多糖复合物；丙亚胺(razoxane)；根瘤菌素(rhizoxin)；西佐喃(sizofuran)；螺锗(spirogermanium)；细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid)；三亚胺醌(triazi quone)；2,2',2''-三氯代三乙胺；单端孢霉烯族化合物(trichothecenes)（特别是T-2毒素、疣孢菌素A(veralcurin A)、杆孢菌素A(roridin A)和蛇形菌素(anguidine)）；乌拉坦(urethan)；长春地辛；达卡巴嗪(dacarbazine)；甘露莫司汀(mannomustine)；二溴甘露醇(mitobronitol)；二溴卫矛醇(mitolactol)；哌泊溴烷(pipobroman)；gacytosine；阿糖胞昔(arabinoside)（"Ara-C"）；环磷酰胺；塞替派；紫杉烷类,如紫杉醇、多西他赛；苯丁酸氮芥；吉西他滨；6-硫鸟嘌呤；巯基嘌呤；氨甲喋呤；铂配位复合物如顺铂、奥沙利铂和卡铂；长春碱；铂；依托泊苷(VP-16)；环环磷酰胺；米托蒽醌；长春新碱；长春瑞滨；盐酸米托蒽醌；替尼泊苷；依达曲沙；柔红霉素；氨基蝶呤；希罗达(xeloda)；伊班膦酸钠；伊立替康(例如,CPT-11)；拓扑异构酶抑制剂RFS 2000；二氟甲基鸟氨酸(DMFO)；维甲酸类药物如维甲酸；卡培他滨；及以上任何药物的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0105] 在另一个实施方案中,本发明的组合物可包含其它生物活性物质,包括治疗药物或前药,例如,其它化疗剂、清除剂化合物、抗生素、抗-病毒剂、抗-真菌剂、抗-炎药、血管收缩剂和抗凝血剂、用于癌症疫苗应用的抗原或相应的前药。

[0106] 示例性的清除剂化合物包括,但不限于含巯基的化合物如谷胱甘肽、硫脲,和半胱氨酸;醇如甘露醇、取代的酚类;醌类、取代的酚类、芳胺类和硝基化合物。

[0107] 可采用各种形式的化疗剂和/或其它生物活性剂。这些包括,但不限于,例如不带电荷的分子、分子复合物、盐、醚、酯、酰胺等形式,其为生物学活性的。

[0108] E. 制备环糊精/ATP抑制剂组合物的方法

[0109] 制备环糊精/ATP抑制剂组合物及其制剂的方法包括使本发明的化合物与载体和任选的一种或多种辅助成分混合的步骤。一般来说,所述制剂通过使本文所述的ATP产生的选择性抑制剂与环糊精均匀和紧密地混合来制备。一般地,这样的复合物可通过在滴加治疗剂(例如,含有ATP产生的选择性抑制剂的溶液)时搅动和混合环糊精(例如,含有环糊精的溶液)而获得,或反之亦然。许多有助于抑制剂和环糊精合并的混合方法是本领域已知的,例如,但不限于,超声处理、涡流、搅拌、加热、共沉淀、中和、制浆、捏合、研磨等。依据治疗剂的物理特性,有可能使用溶于溶剂的物质或固体物质作为治疗剂。对溶剂没有特别的限制,并且人们可使用,例如,与环糊精外相相同的物质。与环糊精混合的治疗剂的量可以是等摩尔量或不同的比例,这取决于组合所需的水平。在一些实施方案中,ATP产生的选择性抑制剂的绝对量可在相对于环糊精的量的0.001-10 mol当量,0.01-1 mol当量范围内,或包含的任何范围。同样,对加热温度没有特别的限制。例如,5°C或更高、室温或更高(例

如,20°C或更高也是优选的),都是可接受的。

[0110] 存在除去任何不需要的或未结合的复合物或组合物,例如不被环糊精包封的治疗剂或不被脂质体包封的治疗剂环糊精复合物的熟知的方法。代表性实例包括,但不限于,透析、离心分离,和凝胶过滤。透析可例如使用透析膜进行。作为透析膜,人们可引用具有分子量截止的膜如纤维素管或Spectra/Por。至于离心分离,离心加速可优选地以100,000 g或更高,且更优选以300,000 g或更高来进行。凝胶过滤可,例如,通过基于分子量使用柱如Sephadex或Sephadose进行分馏来进行。

[0111] 在一些情况下,为延长药物作用,改变(例如,减慢)从皮下或肌内注射的药物吸收是合乎需要的。这可通过使用具有差的水溶性的结晶或无定形材料的液体悬浮液来实现。药物的吸收率取决于其溶解的速率,这依次又可取决于晶体尺寸和结晶形式。作为选择,胃肠外-给予的药物形式的延缓吸收可通过溶解或悬浮药物于油性媒介中实现。在一些实施方案中,本文描述的环糊精-包封的选择性ATP抑制剂组合物可被加载到脂质体中。

[0112] 可注射的贮库形式通过使本化合物在可生物降解的聚合物如聚丙交酯-聚乙交酯中形成微囊化基质来制得。根据药物与聚合物的比例,和所用具体聚合物的性质,可控制药物释放的速率。其它可生物降解的聚合物的实例包括聚(原酸酯)和聚(酐)。贮库可注射的制剂也通过将药物截留在与身体组织相容的脂质体或微乳剂中制备。

#### [0113] F. 治疗方法

[0114] 本发明还提供预防、延迟、减轻,和/或治疗癌症,包括癌性肿瘤的新的治疗方法。在一个实施方案中,一种治疗方法包括给予受试者(例如,有需要的受试者)有效量的环糊精/选择性ATP产生抑制剂组合物。有需要的受试者可包括,例如,已诊断患有肿瘤,包括前癌性肿瘤、癌症的受试者,或已被治疗的受试者,包括对先前的治疗无反应的受试者。

[0115] 如在“治疗有效量”的治疗剂中的术语“有效量”指引起所需的生物学反应所必需的药物的量。如将为本领域普通技术人员意识到的,药物的有效量可根据例如所需的生物终点,要传递的药物,药物组合物的组成,靶组织或细胞等因素而变化。更特别地,术语“有效量”指足以产生所需的作用的量,例如,减少或缓解疾病、病症或病况,或其一个或多个症状的严重性、持续时间、进展,或发生;预防疾病、病症或病况的进展,造成疾病、病症或病况的消退;预防与疾病、病症或病况有关的症状的复发、发展、发生或进展,或提高或改进另一种疗法的预防或治疗作用。

[0116] 本发明的方法可被用来治疗任何癌性或前癌性肿瘤。在某些实施方案中,癌性肿瘤具有高度的糖酵解表型。例如,高度的糖酵解肿瘤可位于选自以下的组织:脑、结肠、泌尿生殖器、肺、肾、前列腺、胰腺、肝、食管、胃、造血组织、乳腺、胸腺、睾丸、卵巢、皮肤、骨髓和/或子宫组织。在一些实施方案中,本发明的方法和组合物可被用来治疗任何癌症。可通过本发明的方法和组合物治疗的癌症包括,但不限于,来自膀胱、血、骨、骨髓、脑、乳腺、结肠、食管、胃肠、齿龈、头、肾、肝、肺、鼻咽、颈、卵巢、前列腺、皮肤、胃、睾丸、舌头,或子宫的癌细胞。另外,癌症可特别地具有以下组织学类型,虽然它并不限于这些:肿瘤、恶性肿瘤;癌;未分化的癌;巨细胞癌和梭形细胞癌;小细胞癌;乳头状癌;鳞状细胞癌;淋巴上皮癌;基底细胞癌;毛母质癌(pilomatrix carcinoma);移行细胞癌;乳头状移行细胞癌;腺癌;恶性胃泌素瘤;胆管癌;肝细胞癌;合并性肝细胞癌和胆管癌;小梁腺癌;腺样囊性癌;腺瘤性息肉内腺癌;腺癌、家族性结肠息肉病;实体瘤;恶性类癌肿瘤;细支气管-肺泡腺癌;乳头状腺癌;

嫌色细胞癌 (chromophobe carcinoma) ;嗜酸细胞癌;嗜酸性腺癌 (oxyphilic adenocarcinoma) ;嗜碱性粒细胞癌;透明细胞癌;粒细胞癌;滤泡腺癌;乳头状和滤泡状腺癌;非囊性硬化性癌 (nonencapsulating sclerosing carcinoma) ;肾上腺皮质癌;子宫内膜样癌;皮肤附属器癌 (skin appendage carcinoma) ;大汗腺腺癌 (apocrine adenocarcinoma) ;皮脂腺癌;耵聍腺癌 (ceruminous adenocarcinoma) ;粘液表皮样癌;囊腺癌;乳头状囊腺癌;浆液性乳头状囊腺癌;黏液性囊腺癌;粘液腺癌;印戒细胞癌;浸润性导管癌;髓样癌;小叶癌;炎性癌;佩吉特病 (paget's disease) 、乳腺癌、腺泡细胞癌;腺鳞癌;腺癌w/鳞状上皮化生;恶性胸腺瘤;恶性卵巢间质肿瘤;恶性卵泡膜细胞瘤;恶性粒细胞瘤;和恶性母细胞瘤;sertoli细胞;恶性睾丸间质细胞瘤 (leydig cell tumor, malignant) ;恶性脂质细胞肿瘤;恶性副神经节瘤;恶性乳腺外副神经节瘤;嗜铬细胞瘤;血管球肉瘤 (glomangiosarcoma) ;恶性黑色素瘤;无黑色素性黑色素瘤 (amelanotic melanoma) ;浅表扩散性黑色素瘤;巨大色素痣中的恶性黑色素瘤;上皮样细胞黑色素瘤;恶性蓝痣 (blue nevus, malignant) ;肉瘤;纤维肉瘤;恶性纤维组织细胞瘤;粘液肉瘤;脂肪肉瘤;平滑肌肉瘤;横纹肌肉瘤;胚胎性横纹肌肉瘤;腺泡状横纹肌肉瘤;间质肉瘤;恶性混合瘤,米勒管混合瘤 (mullerian mixed tumor) ;肾母细胞瘤;肝癌 (hepatoblastoma) ;癌肉瘤;恶性间质瘤;恶性布伦纳瘤 (brenner tumor, malignant) ;恶性叶状肿瘤;滑膜肉瘤;恶性间皮瘤、无性细胞瘤 (dysgerminoma) ;胚胎癌;恶性畸胎瘤;恶性卵巢腺肿瘤;绒毛膜癌;恶性中肾瘤 (mesonephroma, malignant) ;血管肉瘤;恶性血管内皮瘤;卡波济氏肉瘤;恶性血管外皮细胞瘤;淋巴管肉瘤;骨肉瘤;皮质旁骨肉瘤 (juxtacortical osteosarcoma) ;软骨肉瘤;恶性软骨母细胞瘤;间叶性软骨肉瘤;骨巨细胞瘤;尤文氏肉瘤 (ewing's sarcoma) ;恶性牙源性肿瘤;成釉细胞性牙肉瘤 (ameloblastic odontosarcoma) ;恶性成釉细胞瘤;造釉细胞纤维肉瘤;恶性松果体瘤;脊索瘤;恶性胶质瘤;室管膜瘤;星形细胞瘤;原浆性星形细胞瘤;纤维型星形细胞瘤;星形母细胞瘤;胶质母细胞瘤;少突胶质细胞瘤;成少突胶质细胞瘤 (oligodendroblastoma) ;原始神经外胚叶 (primitive neuroectodermal) ;小脑肉瘤;成神经节细胞瘤;神经母细胞瘤;视网膜母细胞瘤;嗅神经源性肿瘤;恶性脑膜瘤;神经纤维肉瘤;恶性神经鞘瘤;恶性粒细胞瘤;恶性淋巴瘤;何杰金氏病;何杰金氏淋巴瘤;副肉芽肿;小淋巴细胞性恶性淋巴瘤;弥漫性大细胞恶性淋巴瘤;恶性滤泡性淋巴瘤;蕈样肉芽肿;其它的非-何杰金氏淋巴瘤;恶性组织细胞增生症;多发性骨髓瘤;肥大细胞肉瘤;免疫增生性小肠疾病;白血病;淋巴白血病;浆细胞白血病;红白血病 (erythroleukemia) ;淋巴瘤细胞白血病;髓系白血病;嗜碱性粒细胞白血病;嗜酸性粒细胞白血病;单核细胞白血病;肥大细胞白血病;成巨核细胞白血病;髓系肉瘤;和毛细胞白血病。

[0117] 本文描述的组合物可通过任何合适的给药途径传递,包括口服、经鼻、经粘膜、眼内、直肠、阴道内、胃肠外,包括肌肉、皮下、髓内注射,以及鞘内、直接心室内、静脉内、关节内、胸骨内、滑膜内、肝内、病灶内、颅内、腹膜内、鼻内,或眼内注射、脑池内、局部,作为散剂、软膏剂或滴剂(包括滴眼液),包括颊下和舌下、经皮、通过吸入喷雾剂,或本领域已知的其它传递方式。

[0118] 如本文所用的术语“系统给予”、“全身给予”、“外周给予”和“外周给药”意指给予选择性ATP产生抑制剂/环糊精复合物,以使它进入患者的系统,因而经受代谢和其它类似

过程。

[0119] 如本文所用的术语“胃肠外给予”和“胃肠外给药”意指并非肠道和局部给药的给予模式,通常通过注射,并包括,但不限于,静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、眼内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下腔、椎管内和胸骨内注射和输注。

[0120] 在某些实施方案中,药物组合物经全身传递(例如,经由口服或胃肠外给予)。在某些其它实施方案中,药物组合物通过直接注射进入肿瘤或直接注射进入肿瘤的血液供应(例如,动脉或静脉血液供应)局部传递。在一些实施方案中,药物组合物通过全身和局部给药来传递。例如,患有肿瘤的受试者可通过与口服给予本发明的药物组合物组合,直接注射含有本文描述的组合物的组合物进入肿瘤或肿瘤的血液供应来治疗。如果采用局部和全身给予,局部给予可在全身给予之前、与全身给予同时和/或在全身给予之后发生。

[0121] 在某些实施方案中,本发明的治疗方法,包括治疗癌性或前-癌性肿瘤,包括给予所述受试者与第二个药物和/或疗法组合的本文描述的组合物。所谓“与…组合”是意指或者同时,顺序,或者其组合给予选择性ATP产生抑制剂/环糊精复合物与一个或多个治疗剂。因此,给予选择性ATP产生抑制剂/环糊精复合物和/或治疗剂的组合的受试者,可在相同的时间(即,同时)或在不同的时间(即,顺序地,以在相同的天或在不同的天的任一次序)接受如本文所述的选择性ATP产生抑制剂/环糊精复合物,和一个或多个治疗剂,只要两种药物的组合作用在受试者中实现。当顺序给药时,所述药物彼此可在1、5、10、30、60、120、180、240分钟或更长时间内给予。在其它实施方案中,顺序给予的药物可彼此在1、5、10、15、20或更多天内给予。

[0122] 当组合给予时,各种药物引起特定生物学反应的有效浓度可少于每个药物在单独给予时的有效浓度,从而允许减少一个或多个药物相对于如果药物作为单一药物给予时所需剂量的剂量。多个药物的作用可以是,但不必一定是加合或协同作用。可多次给予药物。在这样的组合疗法中,第一次给予的药物的治疗作用尚未消失时,顺序、同时或分开给予随后的药物。

[0123] 在某些实施方案中,这样的方法包括给予药物组合物,其包含本文描述的与一个或多个化疗剂和/或抗氧化剂化合物,包括在此描述的化疗剂,以及本领域已知的其它药物组合的组合物。联合疗法包括以这样一种方式顺序、同时和分开,或共同给予所述组合物,即当给予随后的化合物时,所给予的第一个选择性ATP抑制剂的治疗作用尚未完全消失。在一个实施方案中,第二个药物是化疗剂。在另一个实施方案中,第二个药物是抗氧化剂化合物。在另一个实施方案中,第二个药物是放射疗法。在进一步的实施方案中,除了所述组合物外,还可以给予放射疗法。在某些实施方案中,第二个药物可以分开的药物组合物共同配制。

[0124] 在一些实施方案中,本发明的药物组合物将掺入一定量的要传递的一种或多种物质,其量足以传递给患者治疗有效量的结合的治疗剂或其它材料作为预防性或治疗性治疗的一部分。在微粒中的活性化合物的所需浓度将依赖于药物的吸收,失活和排泄率以及所述化合物的传递速率。要注意到剂量值也可随着要减轻的病症的严重性而变化。要进一步理解对于任何特定的受试者,具体的剂量方案应该依据个体需要和给予或监测给予所述组合物的人员的专业判断,随着时间的推移而调节。通常,剂量将使用本领域技术人员已知的

技术测定。

[0125] 剂量可以是基于所述组合物或其活性化合物(例如,ATP产生的选择性抑制剂)每kg患者体重的量。例如,已设计包封在其中的组合物或化合物的量的范围,包括约0.001、0.01、0.1、0.5、1、10、15、20、25、50、75、100、150、200或250 mg或更多的这样的组合物每kg患者体重。其它量将是本领域技术人员已知的并容易地确定。

[0126] 在某些实施方案中,所述组合物或其活性化合物的剂量(例如,ATP产生的选择性抑制剂)将通常在约0.001 mg-约250 mg每kg体重范围内,特别是在约50 mg-约200 mg每kg体重范围内,且更特别是在约100 mg-约200 mg每kg体重范围内。在一个实施方案中,剂量是在约150 mg-约250 mg每kg体重范围内。在另一个实施方案中,剂量是约200 mg每kg体重。

[0127] 在一些实施方案中,所述组合物或其活性化合物(例如,ATP产生的选择性抑制剂)在药物组合物中的摩尔浓度将少于或等于约2.5 M、2.4 M、2.3 M、2.2 M、2.1 M、2 M、1.9 M、1.8 M、1.7 M、1.6 M、1.5 M、1.4 M、1.3 M、1.2 M、1.1 M、1 M、0.9 M、0.8 M、0.7 M、0.6 M、0.5 M、0.4 M、0.3 M或0.2 M。在一些实施方案中,所述组合物或其活性化合物(例如,ATP产生的选择性抑制剂)的浓度将少于或等于约0.10 mg/ml、0.09 mg/ml、0.08 mg/ml、0.07 mg/ml、0.06 mg/ml、0.05 mg/ml、0.04 mg/ml、0.03 mg/ml或0.02 mg/ml。

[0128] 或者,剂量可参照所述组合物或其活性化合物(例如,ATP产生的选择性抑制剂)的血浆浓度测定。例如,可采用最大血浆浓度( $C_{max}$ )和在从时间0-无穷( $AUC (0-4)$ )的血浆浓度-时间曲线下的面积。本发明的剂量包括产生对于 $C_{max}$ 和 $AUC (0-4)$ 和其它剂量的以上值的那些剂量,其导致用于那些参数的较大或较小值。

[0129] 本发明的所述组合物的活性成分的实际剂量水平可改变,以获得有效实现对特定患者、组合物,和给药模式的所需治疗反应的活性成分,而对患者无毒的量。

[0130] 选择的剂量水平将取决于各种因素包括所用制剂中特定治疗剂,或其酯、盐或酰胺的活性,给药途径,给药时间,排泄速率或要采用的特定治疗剂的代谢,治疗的持续时间,与所用特定化合物组合使用的其它药物、化合物和/或材料,待治疗患者的年龄、性别、体重、病症、一般健康状况和先前的医疗史等医学领域熟知的因素。

[0131] 具有本领域普通技能的临床医师或兽医可容易地确定并开具所需药物组合物的有效量的处方。例如,临床医师或兽医可开具和/或给予以比所需水平更低的剂量的用于药物组合物的本发明化合物,以实现所需的治疗作用并逐渐增加剂量,直至达到所需的效果。

[0132] 一般来说,本发明化合物的合适的日剂量将是有效产生治疗效果的最低剂量的化合物的量。这样的有效剂量将一般地取决于上述因素。

[0133] 如果需要,活性化合物的有效日剂量可在一整天的适当时间间隔,任选地以单一剂量形式,作为2、3、4、5、6或更多个分开给予的亚-剂量给予。

[0134] 将在给定的患者中产生最有效治疗的任何特定化合物的给药准确时间和量将取决于特定化合物的活性、药代动力学和生物利用度,患者的生理条件(包括年龄、性别、疾病类型和阶段、一般身体状况、对给定药物的剂量和类型的反应性),给药途径等。本文提出的用药指导可被用来优化治疗,例如,确定给药的最佳时间和/或量,其将不需要超出由监测受试者和调节剂量和/或时间组成的常规实验。

[0135] 在受试者接受治疗的同时,患者的健康可通过在24-小时期间的预定时间测量一

个或多个相关指标监测。所有的治疗方面,包括给药和制剂的补充、量、次数,可依据这样的监测的结果来优化。患者可通过测量相同的参数,定期重新评估以确定改进的程度,第一次这样的重新评估通常发生在从治疗开始的第4周末,而随后的重新评估在治疗期间每4-8周发生,然后在此后每3个月进行。治疗可连续几个月或甚至数年,最少一个月是典型的用于人的疗程。调节例如给予的药物的量和给药次数可基于这些重新评估而进行。

[0136] 治疗可用低于化合物的最适剂量的较小剂量开始。之后,剂量可以小的增量增加直至达到最佳的治疗效果。

[0137] 如上所述,组合物或其活性化合物(例如,ATP产生的选择性抑制剂)可与放射疗法组合给予。放射疗法的最适剂量可作为日剂量给予受试者。放射疗法的最适日剂量可以是,例如,从约0.25-0.5 Gy、约0.5-1.0 Gy、约1.0-1.5 Gy、约1.5-2.0 Gy、约2.0-2.5 Gy,和约2.5-3.0 Gy。示例性日剂量可以是,例如,从约2.0-3.0 Gy。例如,如果肿瘤对较低剂量的辐射有抗性,则可给予较高剂量的辐射。高剂量的辐射可达到,例如,4 Gy。此外,在治疗过程中给予的放射总剂量可例如在从约50-200 Gy范围内。在一示例性实施方案中,在治疗过程中给予的放射总剂量的范围为,例如,从约50-80 Gy。在某些实施方案中,辐射的剂量可在例如,1、2、3、4或5分钟的时间间隔时给予,其中时间量取决于辐射源的给予率。

[0138] 在某些实施方案中,最适辐射的日剂量可给予,例如,每周4或5天,持续约4-8周。在备选的实施方案中,最适辐射的日剂量可1周7天,每日给予,持续约4-8周。在某些实施方案中,辐射的日剂量可以单一剂量给予。或者,辐射的日剂量可作为多个剂量给予。在进一步的实施方案中,辐射的最适剂量可以是基于每日基础的患者可耐受剂量的更高的放射剂量。因此,高剂量的辐射可给予患者,但以频率较少的剂量方案给予。

[0139] 可用于癌症治疗的放射类型是本领域熟知的并包括电子束、来自直线加速器或放射源如钴或铯的高能光子、质子,和中子。示例性离子化辐射是x-射线辐射。

[0140] 给予辐射的方法是本领域熟知的。示例性方法包括,但不限于,外光束辐射、内光束辐射,和放射性药物。在外光束辐射中,直线加速器被用来传递高-能量x-射线至被癌症影响的身体区域。由于辐射源起源于身体之外,外光束辐射可被用来用均匀的剂量辐射治疗大面积的身体。内部放射疗法,也称为近距离放射疗法,涉及传递高剂量的放射至身体的特定部位。两种主要类型的内部放射疗法包括组织内射线疗法,其中辐射源被放置在受影响的组织中,和腔内辐射疗法,其中辐射源被放置在与受影响区域的距离很短的内部体腔内。放射性材料也可通过连接到肿瘤特异性抗体被传递至肿瘤细胞。用于内部放射疗法的放射性材料通常被包含在小胶囊剂、小球、线、管,或植入物中。相反,放射性药物是可经口服、静脉内或直接进入体腔给予的启封辐射源。

[0141] 放射疗法也可包括立体定向手术或立体定向放射疗法,其中精确量的辐射可使用直线加速器或伽玛刀和三维立体定向适形放射疗法(3DCRT)(其是一种在辐射治疗之前绘制肿瘤位置的形态图的计算机辅助疗法)传递至小肿瘤区域。

[0142] 本化合物的毒性和治疗效力可通过在细胞培养或实验动物中,例如,测定LD<sub>50</sub>和ED<sub>50</sub>的标准药理学程序测定。优选显示出大治疗指标的组合物。在一些实施方案中,可测量LD<sub>50</sub>(致死剂量)而对于本文描述的环糊精-包封的选择性ATP抑制剂组合物可以是相对于无任何环糊精包封的选择性ATP抑制剂的,例如,至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%或更多的减少。类似地,可

测量ED<sub>50</sub>(即,实现症状的半数-最大抑制的浓度)并对于本文描述的环糊精-包封的选择性ATP抑制剂组合物可以是相对于无任何环糊精包封的选择性ATP抑制剂的,例如,至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%或更多的增加。同样,类似地,可测量IC<sub>50</sub>(即,实现对癌细胞的半数-最大细胞毒性或抑制细胞生长作用的浓度)并对于本文描述的环糊精-包封的选择性ATP抑制剂组合物可以是相对于无任何环糊精包封的选择性ATP抑制剂的,例如,至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%或更多的增加。虽然可使用显示出毒性副作用的化合物,应该注意到的是设计使化合物靶向所需位点,以减少副作用的传递系统。

[0143] 在一些实施方案中,本公开的方法在测定法中产生癌细胞生长的至少约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%,或甚至100%的抑制。

[0144] 在任何上述方法中,给予选择性ATP产生抑制剂/环糊精复合物与给予选择性ATP产生抑制剂/环糊精复合物之前的实体恶性肿瘤比较,可导致受试者的实体恶性肿瘤的至少约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%,或甚至100%的减少。

[0145] 在一些实施方案中,治疗有效量的选择性ATP产生抑制剂/环糊精复合物被预防性地给予,以防止受试者形成实体恶性肿瘤。

[0146] 在一些实施方案中,受试者是人。在其它实施方案中,受试者不是人,例如哺乳动物。

[0147] 从细胞培养测定和动物研究获得的数据可被用于配制用于人的剂量范围。任何补充,或作为选择的其中任何组分的剂量,优选地位于包括ED<sub>50</sub>的循环浓度的范围内,伴有极少的甚或没有毒性。剂量可依赖于所用剂型和采用的给药途径在该范围内变化。对于本发明的药物,治疗有效量可从细胞培养测定开始估算。剂量可在动物模型中配制以达到包括如在细胞培养中所测定的IC<sub>50</sub>的循环血浆浓度范围。这样的信息可被用来更精确地测定在人类中有用的剂量。血浆中的水平可,例如,通过高效液相色谱测量。

[0148] G. 药剂盒

[0149] 本文描述的选择性ATP产生抑制剂/环糊精复合物和组合物可被组装成用于治疗或预防疾病,例如癌症的药剂盒或药物系统。在一些实施方案中,3-BrPA-环糊精复合物和组合物可被用来预防或治疗由癌症引起的实体恶性肿瘤。一般来说,本公开的药剂盒含有一些或所有的组分、试剂、补充品等以实施依据本公开主题的方法。药剂盒通常包含有效量的复合物以预防、延迟、减少,或治疗有害的疾病(例如,实体恶性肿瘤)。在一个实施方案中,药剂盒包括至少一个包含本文描述的选择性ATP产生抑制剂/环糊精复合物和/或其组合物的容器(例如,硬纸盒、玻瓶、小瓶、管,或安瓿)。通常,复合物和/或组合物将在一个或多个容器中供应,每个容器含有有效量的复合物以使得实体恶性肿瘤消退、减慢,或被抑制。

[0150] 因此,在一些实施方案中,本公开的主题提供一种药剂盒,其包含包封在至少一种环糊精载体中的至少一种选择性ATP产生抑制剂。在其它实施方案中,药剂盒还包含使用包封在至少一种环糊精载体中的至少一种选择性ATP产生抑制剂的一套说明书。

[0151] 分开贮存选择性ATP产生抑制剂和环糊精,然后在使用前合并它们可能是需要的。因此,在还有的其它实施方案中,药剂盒包含在一个容器中的至少一种选择性ATP产生抑制剂和在另一个容器中的至少一种环糊精载体。

[0152] 范例

[0153] 以下实施例已被包括以提供给本领域普通技术人员实践本公开主题的代表性实施方案的指导。按照本公开内容和本领域技术人员的一般水平,技术人员可意识到,以下实施例仅意味着是示例性的,并且可采用许多改变、修饰,和变更而不背离目前公开的主题的范围。以下实施例通过举例说明的方式提供而不作为限制。

[0154] 实施例1:实施例2-3的材料和方法

[0155] A. 合成修饰的 $\beta$ -环糊精的通用方法

[0156] 琥珀酰基- $\beta$ -环糊精购自Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA; 分类号85990)。购买未修饰的 $\beta$ -环糊精和 $\alpha$ -环糊精(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)。

[0157] 然而,也可合成琥珀酰基化环糊精。例如,用在吡啶中的0.9摩尔当量的甲苯磺酰氯对 $\beta$ -环糊精(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)的6' 伯羟基进行单甲苯磺酰化(mono-tosylated),以提供相应的甲苯磺酸酯,通过用碘化钠在丙酮中处理,将其转化为碘代-衍生物。将碘代衍生物与适当的胺经于80°C加热8-12 h,转化为所需的6' 氨基化环糊精(Tang 和 Ng (2008) *Nat. Protocol* 3:691-697)。通过用0.9当量的琥珀酸酐在DMF中处理母体 $\beta$ -环糊精,合成6' -单琥珀酰基- $\beta$ -环糊精(Cucinotta等 (2005) *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 37: 1009-1014)。产物在丙酮中沉淀并在使用前经HPLC纯化。

[0158] 具有最佳稳定性的pH范围是pH 4-9。

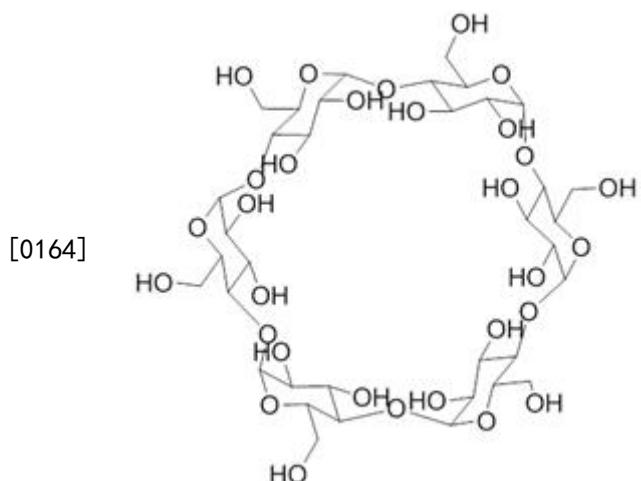
[0159] B. 制备包封的复合物的通用程序

[0160] 按1:1比例制备包封在琥珀酰基- $\beta$ -环糊精内的3-BrPA。将3-BrPA (150 mg, 1 mmol)以小份(每次10 mg)加入到琥珀酰基- $\beta$ -环糊精(1,500 mg在蒸馏水中)的搅拌溶液中。在完成加入后,于室温下超声处理溶液1小时。然后经超声处理的溶液被允许于25°C在恒温混匀仪(thermomixer)中震摇过夜,在干冰-丙酮浴中快速冷冻并冻干。

[0161] 类似地,按2:1的比例制备包封在琥珀酰基- $\beta$ -环糊精内的3-BrPA。将3-BrPA (166 mg, 1 mmol)以小份(每次10 mg)加入到琥珀酰基- $\beta$ -环糊精(918 mg在20 ml蒸馏水中)的搅拌溶液中。在完成加入后,于室温下超声处理溶液1小时。然后经超声处理的溶液被允许于25°C在恒温混匀仪(thermomixer)中震摇过夜,在干冰-丙酮浴中快速冷冻并冻干。

[0162] 此外,按1:1的比例制备包封在 $\alpha$ -环糊精(见以下结构)内的3-BrPA。将3-BrPA (166 mg, 1 mmol)以小份(每次10 mg)加入到 $\alpha$ -环糊精(972 mg, 1 mmol在10 ml蒸馏水中)的搅拌溶液中。在完成加入后,于室温下超声处理溶液1小时。然后经超声处理的溶液被允许于25°C在恒温混匀仪(thermomixer)中震摇过夜,在干冰-丙酮浴中快速冷冻并冻干。用类似的结果使用非-GRAS和GRAS版本。

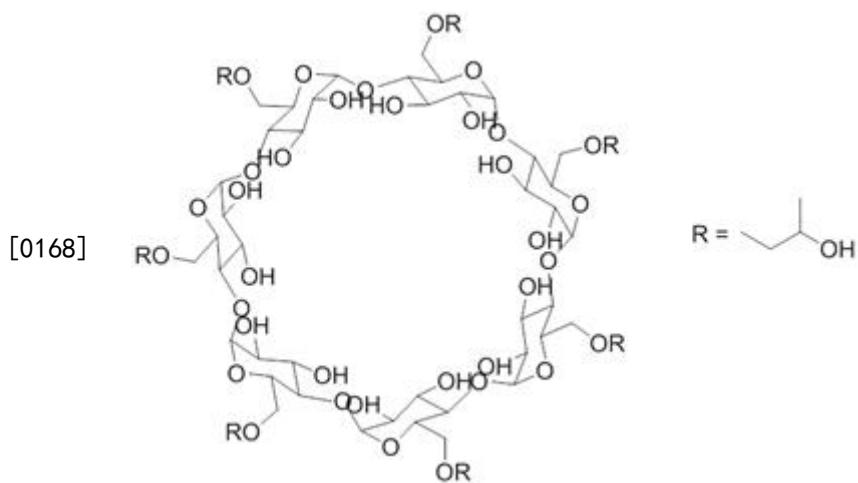
[0163]  $\alpha$ -环糊精结构



[0165] 已令人惊讶地确定,用产生负电荷(阴离子)的可电离基团替代一个或多个其 $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖单元上的一个或多个羟基的修饰环糊精,比那些具有产生正电荷(阳离子)的可电离的基团的环糊精或未修饰的环糊精,例如未修饰的 $\alpha$ -或 $\beta$ -环糊精更好地稳定3-卤代丙酮酸。也令人惊讶地确定 $\beta$ -环糊精包封呈保护和稳定3-BrPA的形式的3-BrPA,特别是在体内疗效并且也在体外疗效方面显著优于 $\alpha$ -环糊精。

[0166] 此外,准备了体外细胞培养和体内小鼠治疗并如上和如下对琥珀酰基- $\beta$ -环糊精包封3-BrPA所述进行,使用通常认为是安全的(GRAS)版本的 $\beta$ -环糊精(例如,具有如以下化学形式所示的3-5取代水平的羟基丙基- $\beta$ -环糊精)包封的3-BrPA,而结果类似于对琥珀酰基- $\beta$ -环糊精包封3-BrPA描述的那些结果。

[0167] GRAS羟基丙基- $\beta$ -环糊精结构



[0169] C. 体外细胞培养

[0170] 3-BrPA和 $\beta$ -环糊精(媒介)购自Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA)。为了成活力测定,将MiaPaCa-2和Suit-2细胞以 $5 \times 10^3$ 细胞每孔的密度,按一式三份接种于96-孔板中。12小时后,用增加浓度的3-BrPA、CD-3BrPA (0-150  $\mu$ m)和媒介处理细胞。细胞内ATP水平依据制造商的方案,使用细胞滴度-Glo发光细胞成活力(Cell Titer-Glo Luminescence Cell Viability)测定药剂盒(Promega, Durham, NC, USA)测定。测量在处理后24小时和72小时进行。

[0171] D. 小鼠体内治疗

[0172] 总共15只动物随机接受每日5 mg/kg  $\beta$ -CD-3BrPA (以1:1的比例) (N=10) 或媒介对照(N=5)的注射。基线生物发光成像证实在所有动物中的肿瘤生长(在图4和5中显示的5只代表性动物)。在腹膜内注射2周后,所有动物经受后续成像。用媒介处理的动物表明生物发光信号的强烈增加,表示肿瘤进展。

[0173] 根据批准的方案的机构准则使用雄性无胸腺裸鼠(20-25 g, 4周龄, Cr1:Nu-Nu, Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA)。小鼠被维持在恒温和恒湿下的层流室中,自由给予食物和水。在延伸因子1 $\alpha$ 启动子的控制下,使用用荧光素酶-氨基糖苷磷酸转移酶融合基因稳定转染的MiaPaCa-2细胞系。小鼠在手术和治疗之前通过异氟烷吸入麻醉法麻醉。制造一个小的左腹侧切口并将胰腺从腹内取出。通过注射1-2  $\times$  10<sup>6</sup> MiaPaCa-2细胞进入胰腺尾部,生成原位胰腺瘤。肿瘤细胞的成功的囊下胰腺内注射通过流体水泡的外观而没有腹膜内泄漏来鉴定。

[0174] 为了生物发光成像(BLI),携带原位肿瘤的麻醉小鼠用150 mg/kg的D-虫萤光素(Gold Biotechnology, St Louis, MO, USA)腹膜内注射并在5分钟后使用IVIS 100(Xenogen Corp, Alameda, CA, USA)光学成像。表示检测到的光子的空间分布的伪彩色图像被叠加在灰度摄影图像上。使用活图像软件(Living Image software) (Xenogen Corp.)曝光10秒后,用ROIs对信号强度定量(p/s/cm<sup>2</sup>/Sr)。在肿瘤植入后7、14、21、28和35天进行成像。

[0175] 在肿瘤植入后1周后,使用BLI在各动物中证实肿瘤生长后,所有的动物被随机分为3组以经由每日腹膜内注射(注射体积,500  $\mu$ l /小鼠/天;剂量,5 mg/kg)接受或者3-BrPA、CD-3BrPA或者媒介。注射溶液通过将所述化学物溶于磷酸盐缓冲盐水中,调节至pH 7.4来制备。在开始注射期间每小时观察动物1次和在每一后续注射后每4-6小时观察1次。记录所有治疗组的总体临床病症中的任何改变。

[0176] 在最后的BLI成像后24小时内,使用颈椎脱位处死动物。打开整个腹部并使用脾和胰腺的整块提取获得肿瘤。肿瘤样品使用4%多聚甲醛固定72小时,用石蜡包埋并切片。组织学切片经苏木精和伊红(H&E)染色并由病理学家咨询解释。

[0177] 实施例2:环糊精包封的3-BrPA对人胰腺癌细胞系的体外影响

[0178] 对人胰腺癌的两个细胞系,即MiaPaCa-2和Suit-2,测试了它们对3-BrPA和CD-3-BrPA的反应。MiaPaCa-2源自局部浸润性的人腺癌并在胰腺内形成典型的实体结节。它已知对几个标准护理抗癌剂,包括吉西他滨显示出显著的抗性。Suit-2源自自己从转移性肝脏肿块分离的高度侵袭性的胰腺肿瘤。它具有高度侵袭性的表型特性,例如侵袭性和迁移性。细胞反应或细胞成活力使用标准ATP活力测定法测定。每个实验重复至少两次,使用三份重复生物样品。

[0179] 图2A-2B显示3-BrPA(传统的在磷酸盐-缓冲盐水中的3-BrPA,没有任何环糊精包封或复合物形成)或 $\beta$ -CD-3-BrPA(在磷酸盐-缓冲盐水中的琥珀酰基- $\beta$ -环糊精包封的3-BrPA)对MiaPaCa-2细胞(图2A)和Suit-2细胞(图2B)在处理24小时后的影响。数据显示用 $\beta$ -CD-3-BrPA处理的细胞成活力与3-BrPA处理的细胞比较的剂量依赖性降低。另外,耐多药性MiaPaCa2细胞被发现对3-BrPA/CD-3-BrPA比对Suit2细胞更敏感。媒介( $\beta$ -环糊精在磷酸盐-缓冲盐水中,无任何3-BrPA)本身不引起任何毒性。

[0180] 图3显示3-BrPA(传统的在磷酸盐-缓冲盐水中的3-BrPA,没有任何环糊精包封或

复合物形成)或 $\beta$ -CD-3-BrPA (在磷酸盐-缓冲盐水中的琥珀酰基- $\beta$ -环糊精包封的BrPA)在处理72小时后对MiaPaCa2细胞的影响。MiaPaCa-2细胞显示,即使以~50  $\mu$ M浓度的CD-3-BrPA处理72小时,成活力也显著丧失,而以相同的浓度处理24小时(图2A),没有明显的成活力丧失。因此,采用处理的较长持续时间(48小时),相当低浓度(50  $\mu$ M)的CD-3-BrPA足以启动细胞死亡(~50%死亡)(图3)。

[0181] 实施例3:材料和环糊精包封的3-BrPA在人胰腺癌的小鼠模型中的体内作用

[0182] 在体内研究中使用人胰腺癌的无胸腺小鼠模型。人胰腺癌细胞系,MiaPaca-2,稳定表达荧光素酶基因,被原位植入胰腺中。肿瘤生长和反应通过生物发光成像监测。

[0183] 表1描述在用高-剂量的3-BrPA或CD-3-BrPA治疗的荷瘤动物中观察到的临床体征或症状。这些症状以无偏倚的和盲法-研究(unbiased and blind-study)方式记录。这些症状在剂量>5 mg/kg体重和在浓度~3.5 mM (高于推荐的治疗剂量)时被观察到。不需要的临床体征或症状在用3-BrPA治疗的小鼠中被发现,且这些体征或症状明显少于用CD-3-BrPA治疗的小鼠,表示环糊精载体保护受试者避免3-BrPA分子的副作用。

[0184] 表1

[0185]	临床体征/病况	3-BrPA治疗	琥珀酰基- $\beta$ -环糊精-3-BrPA治疗
		+++	+/-
	癫痫发作/颤抖/痉挛	+++	+/-
	流涎症	+++	+/-
	气促	+++	+/-
	异常行为(例如, 无活力/无反应)	+++	+/-
	低体温	+++	+/-

[0186] 用琥珀酰基- $\beta$ -环糊精-3-BrPA治疗的动物显示对生物发光成像的完全或几乎-完全的肿瘤反应(图4和5)。随后,处死动物以验尸证实生物发光结果(图4)。结果指示CD-3BrPA甚至在与CD形成复合物后仍保留其抗癌活性。

[0187] 进行原位MiaPaCa-2肿瘤的组织病理学分析。图6显示,苏木精和伊红(H&E)染色的肿瘤显示在对照组中没有变化,而从治疗的动物收获的肿瘤显示广泛的中央坏死以及游离肿瘤组织的区域。

[0188] 因此,已经确定环糊精复合物形成不影响3-BrPA的抗癌特性,如从体外和体内数据所证实的。同样,3-BrPA的活性可由CD保持或保护,直至它被传递或分布至靶器官或肿瘤。此外,CD-3-BrPA给予动物导致比单用3-BrPA更少的毒性或相关的-临床体征。

[0189] 实施例4:实施例5-6的材料和方法

[0190] 使用以下材料和方法扩展在实施例2-3中描述的实验,以推进从其中获得的结果。例如,胰管腺癌(PDAC)排名为世界癌症相关死亡的第四位最常见的原因(Siegel等(2014) *CA Canc. J. Clin.* 64:9-29)。由于大多数患者在晚期阶段才被诊断,治疗选项仍然是有限的,且预后令人沮丧,5-年成活力少于5% (Hidalgo (2010) *New Engl. J. Med.* 362:1605-1617)。过去二十年中在了解胰腺癌的肿瘤发生和疾病发展的过程中带来了重大进展,其现在可被视为一个不同的和多因素的肿瘤过程(Hidalgo (2010) *New Engl. J. Med.* 362:

1605-1617; Hanahan和Weinberg (2011) *Cell* 1144: 646-674)。胰腺肿瘤组织是由几个独特的, 细胞和非-细胞要素包括富含胶原、血管化差、高度缺氧、非肿瘤性基质组成的(Chu等 (2007) *J. Cell. Biochem.* 101: 887-907; Mahadevan和Von Hoff (207) *Mol. Canc. Therapeut.* 6: 1186-1197)。这些特征与最常用的系统应用的抗癌剂, 例如吉西他滨的突出的化学抗性相关(Muerkoster等 (2004) *Cancer Res.* 64: 1331-1337; Yokoi和Fidler (2004) *Clin. Canc. Res.* 10: 2299-2306)。值得注意的是, 改变的能量代谢最近已被添加到肿瘤微环境的组织原理的组织原理中并且现在可被看作是胰腺癌的“标记” (Hanahan和Weinberg (2011) *Cell* 1144: 646-674; Guillaumond等 (2014) *Arch. Biochem. Biophys.* 545: 69-73)。氧独立依赖于作为癌细胞能量供应的主轴的糖酵解长期以来一直被称为“沃伯格效应(Warburg effect)” ; 然而, 这种情形尚未被临床用于治疗目的(Warburg等 (1927) *J. Gen. Physiol.* 8: 519-530; Ganapathy-Kanniappan和Geschwind (2013) *Mol. Cancer* 12: 152)。3-溴代丙酮酸(3-BrPA), 一种高度有效的酶磷酸甘油醛-3-脱氢酶(GAPDH)的小分子抑制剂, 是唯一可获得的抗-糖酵解候选药物, 其能够选择性地通过一羧酸转运蛋白1(MCT1)进入癌细胞(Ganapathy-Kanniappan等 (2009) *AntiCancer Res.* 29: 4909-4918; Birsoy等 (2013) *Nature Genet.* 45: 104-108)。3-BrPA的抗-肿瘤作用已被广泛地研究并证实在几个鼠科动物肿瘤模型中, 在局部区域疗法的环境下, 或者通过肿瘤-供血动脉或直接肿瘤内注射来传递(0ta等 (2013) *Target. Oncol.* 8: 145-151; Geschwind等 (2002) *Canc. Res.* 62: 3909-3913)。然而, 由于3-BrPA的烷基化特性, 当以治疗剂量系统传递时, 其已显示出显著的毒性, 这反过来可能会阻碍这种药物在癌症患者中的临床发展和使用(Chang等 (2007) *Acad. Radiol.* 14: 85-92; Cao等 (2008) *Clin. Canc. Res.* 14: 1831-1839)。

[0191] A. 抗体、试剂和药剂盒

[0192] 使用以下第一抗体: 兔抗-MMP-9多克隆抗体(pAB) #3852 (Cell Signaling)、DAPI #D1306 (Invitrogen)、Alexa Fluor 568鬼笔环肽(Phalloidin) #12380 (Life Technologies)、GAPDH (14C10) 单克隆AB (mAB) Alexa Fluor 488缀合物 #3906 (Cell Signaling)、GAPDH pAB #sc-47724 (Santa Cruz)、裂解的胱天蛋白酶-3 pAB #9661 (Cell Signaling)、MCT-1 pAB #sc50324 (Santa Cruz), 和Ki-67药剂盒/抗体(Dako Inc.)。使用以下第二抗体: 山羊抗-兔IgG HRP-缀合的#7074 (Santa Cruz)、抗-兔IgG (H+L)、F(ab')<sub>2</sub>片段PE缀合物 #8885 (Cell Signaling), 和山羊抗-鼠IgG-FITC #sc2010。使用以下化学品: 3-溴代丙酮酸(3-BrPA, Sigma Aldrich)、吉西他滨盐酸盐(LC Laboratories)、琥珀酰基-β-环糊精(β-CD, Sigma Aldrich), 和D-虫萤光素钾盐(Gold Biotechnology, St Louis, MO, USA)。使用以下细胞培养试剂: RPMI-1640 (Life Technologies)、MEM (Life Technologies)、胎牛血清(FBS, Thermo Scientific)、青霉素/链霉素(SigmaAldrich)、胶原I大鼠尾(BD Biosciences, #354326), 和可控气氛室(Plas. Labs)。使用以下侵袭性测定试剂: 基质胶基底膜基质(BD Biosciences)和基质胶侵袭小室transwell聚碳酸酯膜插入物(Corning)。使用以下试剂盒: CellTiter-Glo发光细胞活力测定试剂盒(Promega)、双荧光素酶报告基因测定试剂盒(Promega)、2D定量试剂盒(GE Healthcare)、histostain加第三代(3rd gen) ICH检测试剂盒(Invitrogen), 和diff quik染色试剂盒(Polysciences Inc.)。使用以下成像设备: Zeiss 700 LSM共聚焦显微镜、Olympus IX81倒置显微镜、Eclipse TS100倒置显微镜(Nikon), 和IVIS200 (Xenogen Corp., Alameda,

CA)。

[0193] B. 复合物制剂和核磁共振(NMR)光谱法

[0194] 为制备包封在 $\beta$ -CD中的3-BrPA, 将3-BrPA (166 mg, 1 mM) 以小份(每次10 mg)加入到 $\beta$ -CD (918 mg在20 ml DI水中)的搅拌溶液中。在完成加入后, 于50°C超声处理溶液1小时。然后经超声处理的溶液被允许于25°C在恒温混匀仪(thermomixer)中震摇过夜, 在干冰-丙酮浴中快速冷冻并冻干。冻干的复合物被原样使用以供进一步的生物学和生物物理研究。 $^1\text{H}$  NMR实验以400 MHz在Bruker Avance光谱仪上进行。NMR谱以99.9%  $\text{D}_2\text{O}$ 记录并以相对于四甲基硅烷(TMS)的每百万低场份数报告。 $\beta$ -CD单独、3-BrPA单独, 或3-BrPA和 $\beta$ -CD复合物的10 mM溶液, 用1% DSS (3-(三甲基甲硅烷基)-1-丙烷磺酸, 钠盐; SigmaAldrich)作为内部标准制备。于25°C, 用32帧扫描记录谱。亚甲基质子(0.1 ppm)的高场位移在复合后被观察到(见图7)。

[0195] C. 单层细胞培养和成活力测定

[0196] 两种人胰腺腺癌细胞系, *lucMiaPaCa-2* (用荧光素酶-氨基糖苷磷酸转移酶融合基因稳定转染, 由Dr. Phuoc T. Tran友好提供) 和*Suit-2* (由Dr. Shinichi Ota, Japan 惠赠) 分别在RPMI或MEM培养基中培养, 这两种培养基补充有10% FBS和1%青霉素-链霉素。通过使用发光-基试剂盒(Cel1Titer-Glo, Promega) 和多标签96-孔板(Costar), 量化细胞内三磷酸腺苷(ATP)水平, 测定不同的药物对细胞成活力的作用。使用这种荧光-基药剂盒在*lucMiaPaCa-2*细胞中的成活力测量的准确性和可重复性使用双荧光素酶报告基因测定试剂盒(Promega)证实。简言之, 将 $5 \times 10^3$ 细胞按一式三份接种并在常氧或缺氧(1%  $\text{O}_2$ -水平, 用 $\text{CO}_2$ 和氮在可控气氛室内平衡)条件下培养72小时。使指定量的游离3-BrPA、1:1- $\beta$ -CD-3-BrPA或作为对照的 $\beta$ -CD溶于PBS并加入到培养基中处理24小时。对于使用吉西他滨的实验, 细胞在暴露于药物72小时之前培养24小时。细胞成活力按照生产商的方案测定。

[0197] D. 3D器官型细胞培养、成像和免疫荧光

[0198] 使用基于胶原I的3D器官型细胞培养, 以模拟细胞外-基质(ECM)-富集的环境并测试3-BrPA对肿瘤侵袭性的作用(Cheung等(2013) *Cel1155*:1639-1651; Nguyen-Ngoc和Ewald(2013) *J. Microscop.* 251:212-223)。特别地, 一种最初由25  $\mu\text{l}$  10x DMEM和217  $\mu\text{l}$ 胶原I (3.83 mg/ml) 组成的胶原溶液在冰上制备。通过滴加氢氧化钠(Sigma Aldrich)达到pH = 7.0来调节pH值。然后使用DMEM F12/GlutaMAX (LifeTechnologies) 将胶原I稀释至3 mg/ml的最终浓度。在无盖玻璃底24-孔板(InvitroScientific)的每个孔的底部, 使用15  $\mu\text{l}$ 胶原溶液创建底层, 然后使其于37°C聚合至少1 hr。剩余的胶原溶液保持在冰上3-5小时, 以允许初始聚合。使总共 $65 \times 10^3$  *lucMiaPaCa-2*或 $45 \times 10^3$  *Suit-2*细胞重新悬浮于150  $\mu\text{l}$ 体积的胶原溶液中。通过创建0.5 cm高度的下降, 细胞悬浮液放置在预热低层的顶部。使胶原-细胞悬浮液于37°C聚合1h, 随后用细胞培养基覆盖(Nguyen-Ngoc和Ewald (2013) *J. Microscop.* 251:212-223)。

[0199] 3D细胞器或者一次或者按顺序处理。对于单一处理, 使包埋的细胞在处理前, 在常氧的或缺氧(1%  $\text{O}_2$ -水平在可控气氛室内)条件下培养5天。在第5天, 培养基用含有1:1- $\beta$ -CD-3-BrPA/3-BrPA/ $\beta$ -CD的培养基替换, 将细胞与各个浓度的药物一起培养24小时。对于使用吉西他滨的实验, 在处理前使细胞生长48小时并与药物一起培养另外72小时。使用吉西他滨的初始实验在24小时后不表现出任何效力, 因而决定遵循最常见报道的培养时间72小

时。用3-BrPA的连续处理用各自的剂量隔天进行,持续1周并用亮场显微镜(Olympus),以40x放大倍率,用1.3 NA油目镜评价。使用Hamamatsu光电C9100-02 EMCCD相机(Hamamatsu Photonics C9100-02 EMCCD camera),用SlideBook 5.0程序获取图像。

[0200] 显微镜观察与如在体外生物发光成像(BLI)上所见细胞成活力的量化进行比较。对于后一测量,覆盖3D器官型细胞培养物的细胞培养基用在PBS中的500  $\mu$ l荧光素酶底物(D-萤光素,钾盐,Life Technologies, 20 mg/ml)替换。暴露5分钟后,板被定位并采集图像(Xenogen Ivis Imaging System 100)。由光子发射确定信号强度(计数)并在封闭整个3D细胞器的感兴趣区域(ROI)内测量(Living Image Software, PerkinElmer)。

[0201] 使用免疫荧光显微验证镜微观和BLI结果。3D细胞器使用4%甲醛固定并于-80°C用OCT化合物(Tissue Tek)冷冻固定(cryofixed)。样品于-20°C被切成100  $\mu$ m厚的切片。OCT使用PBS洗涤两次,每次10 mins。在染色前,切片用0.5 % Trizol 100在PBS中渗透30 mins并使用PBS洗涤两次,每次10 mins。在用10% FBS在PBS中封闭2小时后,使样品与第一抗体(Alexa Fluor 568鬼笔环肽, Invitrogen, 1:100; GAPDH Alexa Fluor 488缀合物, Cell Signalling, 1:800; 裂解的胱天蛋白酶-3, Cell Signalling, 1:500; HIF-1  $\alpha$  1:50)一起于室温(RT)、光保护下培养1 hr。对于非-缀合的第一抗体,也采用另外的与藻红蛋白(PE)-或荧光素异硫氰酸酯(FITC)-缀合的第二抗体一起于RT下1小时的培养。这之后用PBS洗涤两次,每次10 mins。DAPI在300ng/ml的浓度被用作复染剂(counter stain)并与缀合的抗体同时加入到样品中。样品用抗衰减的封固剂(antifading mountant)密封并用盖玻片覆盖。共聚焦荧光显微镜以40x放大倍率,用1.4 NA油目镜和63x放大倍率,用1.4 NA油目镜进行。图像用Zen2012软件(CarlZeiss)分析。激发和发射波长是由缀合物制造商推荐的那些波长。例如,555 nm被用来对鬼笔环肽(phalloidin)和PE-缀合物进行激发,488 nm被用来对Alexa Fluor 488,以及FITC-缀合物进行激发,而405 nm被用来对DAPI进行激发。在555和1000 nm之间对红色荧光检查发射,而490 nm及以上对绿色荧光检查发射。当分别用红色或绿色荧光成像时,DAPI的发射在490 nm以下或529nm以下捕获。

[0202] E. 基质胶侵袭测定、酶谱法和免疫印迹法

[0203] 3-BrPA抑制肿瘤侵袭的能力使用基质胶侵袭测定法,以及明胶酶谱法研究(Hu和Beeton (2010) *J. Visual. Exp.* 45:2445; Scott等(2011) *J. Visual. Exp.* 58:e3525)。为了基质胶侵袭测定,制备一种含有0.01 M Tris和0.7%氯化钠的包被缓冲液并用来稀释基质胶基底膜(BD Biosciences, #356234)至300  $\mu$ g/ml。随后,Boyden室(Transwell, Corning; 6.5 mm-直径, 8  $\mu$ m孔径)用100  $\mu$ l基质胶溶液包被并于37°C贮存2小时以允许胶凝化。约7.5x 10<sup>4</sup>细胞重新悬浮于500  $\mu$ l的无FBS培养基并平铺到插入物的上部腔室中,然后将其放入一个含有750  $\mu$ l含有FBS的培养基的24-孔板中。于37°C培养过夜后,将溶于PBS的不同量的3-BrPA加入到上部腔室中。48小时后,用棉拭子从基质胶除去非-侵袭性细胞。固定粘附于渗透插入物底侧的侵袭的细胞并用Diff Quik染色试剂盒(Polysciences Inc.)染色。使用彩色倒置显微镜(Eclipse TS 100),以4x、10x和20x放大倍率进行光学显微镜方法。通过以10x放大倍率测量在处理后染色细胞的面积,与未处理的样品比较,对细胞的侵袭进行量化。

[0204] 进行酶谱法测定以测定分泌的MMP-9的活性。因此,4 x 10<sup>6</sup>Suit-2细胞和2.5 x 10<sup>6</sup>lucMiaPaCa-2细胞被接种在75 cm<sup>2</sup>-烧瓶中并于37°C,在常氧的条件下培养过夜。次日,

加入含有不同浓度的3-BrPA的新鲜的无FBS培养基并将细胞培养另外24小时。随后,收集上清液、过滤,并使用2D Quant试剂盒(GE Healthcare)测定最终的蛋白质浓度。调节浓度后,将每个样品加载到两个10%明胶酶谱法凝胶剂(Invitrogen)中。电泳后,在两个凝胶剂之一中的蛋白质被复性并允许于37°C在显影缓冲液中酶促消化过夜。凝胶用4份0.1%考马斯亮蓝(Coomassie Brilliant Blue)在1份100%甲醇中染色24小时并用稀释(DI)水洗涤直至消化的区域被检测为白色带。蛋白质印迹法分析使用一式两份凝胶进行。蛋白质被印迹到PVDF-膜上并使用5%脱脂乳在1x TBS和0.1%吐温/DI (TBST)中封闭。初次抗-MMP抗体(Cell Signaling)以1:1000稀释比使用并于4°C培养过夜,接着于室温下培养HRP-缀合的第二抗体(Santa Cruz) 1 hr。HRP提供一种电化学发光信号(ECL Kit, GE Healthcare),其用ImageJ 1.46r软件(Wayne Rasband, National Institute of Health)分析并用来通过比较线积分量化信号强度。

[0205] F. 原位动物异种移植植物

[0206] 根据经批准的动物保护和使用委员会的机构指导(institutional guidelines under approved Animal Care and Use Committee)方案,使用雄性无胸腺裸鼠(体重, 20-25 g; 4周龄; Cr1:NU (NCr) -Foxn1<sup>nu</sup>; Charles River Laboratory, Germantown, MD, USA)。小鼠被维持在恒定的温度和湿度的层流室中,自由给予食物和水。通过植入悬浮于50  $\mu$ l PBS中的 $1.5 \times 10^6$  lucMiaPaCa-2至麻醉小鼠胰腺的尾部,生成原位异种移植植物肿瘤。为做到这一点,小鼠被放置在一个干净的麻醉诱导室中(氧流速,1升/分钟;异氟烷浓度3-4%)。在翻正反射失去后,动物被放置在外科手术台面,其中鼻锥被用来维持麻醉(氧流,0.8升/分钟;异氟烷浓度,1.5-2%)。制造一个小小的,左腹侧切口,且胰腺被外置以使用30G汉密尔顿注射器(Hamilton syringe)注入细胞溶液。由没有腹膜内泄漏的液体水泡的外观鉴定成功的囊下胰腺内注射。腹腔用双层的非可吸收缝合材料缝合(Kim等(2009) *nat. Protocol*. 4:1670-1680)。

[0207] G. 生物发光成像和超声成像

[0208] 肿瘤成活力在手术植入后第7天经由体内生物发光成像(BLI)证实。麻醉的荷瘤小鼠经腹膜内注射D-萤光素150 mg/kg并在5分钟后,使用IVIS 200系统(Xenogen)光学成像。表示光子的空间分布的伪彩色图像被叠加在先前获得的灰度摄影图像上。创建感兴趣区域(ROI)以包括光学肿瘤图像。经10-秒暴光后,使用活图像(Living Image)软件(Xenogen),对信号强度以光子/秒/平方厘米/球面度(p/s/cm<sup>2</sup>/Sr)在ROI内进行量化。另外地,在使用小-动物超声成像(USI)处理后,证实肿瘤的原位生长。简言之,麻醉小鼠经受通过应用具有40 MHz的MS-550D MicroScan换能器探头(具有22-55 MHz的宽带),使用VEV02100 (Visual Sonics Inc., Toronto, Canada, 由Dr. Harry C. Dietz友好提供)的检查。肿瘤定位使用左肾的尖顶和脾的尾尖作为解剖标志证实(Ota等(2013) *Target. Oncol.* 8:145-151; Tuli等(2012) *Translat. Oncol.* 5:77-84)。

[0209] H. 治疗方案和影像随访

[0210] 患有肿瘤的动物,如通过LI和USI二者证实的,被随机分成4组:组1 (N = 21只动物)接受每日腹膜内注射 $\beta$ -CD-3-BrPA复合物(以1:1摩尔比,5 mg/kg 3-BrPA在26 mg/kg  $\beta$ -CD中,溶于500  $\mu$ l盐水),组2 (N = 7只动物)接受腹膜内注射吉西他滨(150 mg/kg溶于200  $\mu$ l盐水,3次注射/周,如通常在文献中报道的,例如Liau和Whang (2008) *Clin. Canc.*

Res. 14:1470-1477; Larbouret等 (2010) *Annal. Oncol.* 21:98-103), 组3 (N = 7) 接受每日腹膜内注射 $\beta$ -CD (26 mg/kg  $\beta$ -CD, 溶于500  $\mu$ l盐水), 和组4 (N = 7只动物) 接受每日腹膜内注射单独的3-BrPA (5 mg/kg溶于500  $\mu$ l 盐水)。所有动物经为期四周的无间断治疗。在第一次注射后的第7、14、21、28天采集BLI。在最后成像期后的第28天或当垂死时处死动物。

[0211] I. 免疫组织化学

[0212] 在处死动物后, 获取肿瘤, 用4%甲醛溶液固定至少72小时的时期, 在石蜡中包埋以供免疫组织化学分析。玻片的苏木精和曙红 (H&E) 染色依据标准方案, 例如在Casadonte和Caprioli (2011) *Nat. Protocol.* 6:1695-1709中描述的那些进行。18  $\mu$ m厚的肿瘤切片被染色, 以用于以下目的: 使用Histostain加第三代Gen IHC检测试剂盒 (Invitrogen), 以及Ki-67试剂盒 (Dako Inc.) 检测GAPDH、MCT-1、裂解的胱天蛋白酶-3, 和Ki-67。特别地, 样品使用二甲苯脱蜡并使用降低的乙醇稀释度系列再水合。用去离子水洗涤后, 于95°, 使样品在含有柠檬酸 (Dako) 的沸腾的恢复溶液中渗透40分钟。使样品冷却至RT并与2滴 (总共~100  $\mu$ l) 过氧化物酶猝灭溶液一起培养5 min, 封闭20 mins。与第一抗体 (GAPDH, 1:500; MCT-1, 1:250; Ki-67和HIF-1 $\alpha$ ; 1:50, 裂解的胱天蛋白酶-3, 1:1,500; 在PBS中) 的培养在RT下, 在一个潮湿的室内发生60 mins。将生物素化第二抗体和链霉抗生物素-过氧化物酶缀合物以每次10 min的顺序加入到样品中。使26.5  $\mu$ l 3,3'-二氨基联苯 (DAB) 发色团与1 ml DAB底物缓冲液充分混合并将100  $\mu$ l经5 mins加入各样品。苏木精被用作复染剂。培养步骤后接着是用蒸馏水洗涤并用PBS洗涤两次, 每次2 mins。样品用抗衰减的封固剂 (antifading mountant) 密封并用盖玻片覆盖。对所有的玻片扫描并以20x放大倍率, 使用高分辨率Aperio®扫描系统 (Vista, California, USA) 数字化。然后使用Aperio影像仪®软件 (Aperio ImageScope®software) 评估数字化的玻片。对于Ki-67-染色的组织切片, 以10x观察总共5-10个视野, 记录Ki-67-阳性细胞的数目, 以及细胞的总数以计算Ki-67标记的指数 (公式: 指数[%] = [阳性细胞数/总细胞数]  $\times$  100)。

[0213] J. 统计学数据分析

[0214] 所有的实验都是独立进行的并重复至少3次。来自实验的数据用均值±均值的标准误差总结。数据集的统计学比较用Student's t-检验以及单向ANOVA检验进行。在动物中报告的BLI信号强度被归一化并报告为基于基线值的倍数。

[0215] 实施例5: $\beta$ -CD-3-BrPA显示在2D和3D细胞培养中的强烈抗-癌作用和靶向代谢减少癌细胞的侵袭性潜力

[0216] 在NMR-光谱证实3-BrPA和 $\beta$ -CD之间的复合 (图7) 后, 药物的微囊制剂被用于进一步的实验。为评价微囊包封的3-BrPA ( $\beta$ -CD-3-BrPA) 实现剂量-依赖性ATP耗尽和细胞死亡的效力, 使用两种人胰腺癌细胞系。MiaPaCa-2源自原发性胰腺腺癌 (PDAC) 和Suit-2源自不同患者的转移性原发性胰腺腺癌 (Kitamura等 (2000) *Clin. Exp. Metast.* 18:561-571)。 $\beta$ -CD-3-BrPA的剂量-依赖性作用与游离的3-BrPA, 以及吉西他滨比较, 而 $\beta$ -CD用作对照。由于缺氧常常与PDAC的化学抗性有关, 缺氧暴露被添加到实验设计中 (Yokoi和Fidler (2004) *Clin. Canc. Res.* 10:2299-2306; Kasuya等 (2011) *Oncol. Rep.* 26:1399-1406; Onozuka等 (2011) *Canc. Sci.* 102:975-982; Zhao等 (2014) *Canc. Res.* 74:2455-2464)。已发现 $\beta$ -CD-3-BrPA和游离3-BrPA在常氧 (50-75  $\mu$ M), 以及缺氧 (12.5-25  $\mu$ M) 条件下显示出类似的细胞毒性特征, 并且有趣的是, 当缺氧时对药物更敏感 (图8)。用 $\beta$ -CD单独处理的细胞系在整个

实验中是完全存活的,甚至当暴露于极高的浓度时。对Suit-2细胞观察到类似的结果,但在常氧和缺氧条件之间的差异不太明显(图8)。当评价吉西他滨的效力时,MiaPaCa-2和Suit-2细胞的IC<sub>50</sub>在常氧的条件(0.1 μM)下几乎不能达到,没有浓度达到完全杀死,和缺氧似乎增加了对药物的抗性。

[0217] 为检验β-CD-3-BrPA在富含ECM的环境中的效力,将1ucMiaPaCa-2细胞在3D胶原1基质中培养并用单一剂量的β-CD-3-BrPA、游离的3-BrPA或者β-CD(作为对照)处理。BLI量化显示,两种药物制剂在常氧的条件(IC<sub>50</sub>, 25-50 μM)下具有等同的效力(图8)。在缺氧条件下,MiaPaCa-2细胞对游离的3-BrPA比对β-CD-3-BrPA稍微更敏感(图8)。在3D中培养的细胞继续用药物处理,如实施例4中所述。形态学、BLI,和免疫荧光-基分析证实3-BrPA渗透富含ECM的基质和抑制细胞增殖,以及诱导细胞凋亡的能力(图9-10),如此,未处理的MiaPaCa-2细胞在胶原1基质内增殖并形成“葡萄”-样结构,而Suit-2细胞显示了一个更具侵袭性的生长模式,并在6天的生长后可见细胞突起(图10)。当用3-BrPA处理时,两种细胞系的增殖被抑制,伴有在Suit-2细胞中的显著减少的细胞突起(图10)。此外,免疫荧光成像证实了由3-BrPA剂量-依赖性诱导的细胞凋亡。

[0218] 另外,3-BrPA在亚-致死药物浓度抑制胰腺癌细胞的侵袭性的能力使用基质胶侵袭测定法检验。如在图11A-11B中所示,局部侵袭性MiaPaCa-2细胞和转移性Suit-2细胞二者均显示在药物浓度低至12.5 μM时侵袭性减少。另外,亚-致死剂量的3-BrPA对基质-金属蛋白酶9(MMP-9)(一种充分描述的用于胰腺癌细胞侵袭潜力的标志)分泌的作用,使用明胶酶谱法和免疫印迹检验(Jones等(1999) *Annal. N. Y. Acad. Sci.* 880:288-307; Merdad等(2014) *Anticanc. Res.* 34:1355-1366; Yang等(2001) *J. Surg. Res.* 98:33-39)。因此,MMP-9分泌的显著减少在两种细胞系中检测。这种作用用6.25 μM浓度的3-BrPA开始观察到,该浓度是不诱导细胞凋亡或减少细胞成活力的剂量,并在更多的转移性Suit-2细胞系中更早的发生(图11C-11D)。

[0219] 实施例6:β-CD-3-BrPA的系统传递获得强烈的体内抗-癌作用

[0220] 系统传递的β-CD-3-BrPA的抗-癌效果使用人胰腺癌的异种移植物模型在无胸腺裸鼠中检验。在选择治疗剂量用于更详细的研究之前,对β-CD-3-BrPA和游离3-BrPA二者进行非荷瘤动物的比较剂量升级研究。因此,在单次注射后,20 mg/kg β-CD-3-BrPA和10 mg/kg游离3-BrPA被确定为半数致死剂量(LD<sub>50</sub>),而当系统给药且每日1次,持续7天的疗程时,5 mg/kg β-CD-3-BrPA被确定为而不引起任何毒性的安全剂量。然后,总共42只具有原位-植入的和BLI-和USI-证实的MiaPaCa-2肿瘤的动物被随机接受腹膜内(i.p.)注射β-CD-3-BrPA(N=21)、吉西他滨(N=7),或β-CD(N=7)。具有原位植入物的另一组动物(N=7)用游离3-BrPA治疗。用每日腹膜内(i.p.)注射游离3-BrPA(5 mg/kg在500 μl盐水中)治疗的动物表现出高的治疗-相关毒性和3/7(43%)的动物在第一次随访BLI的采集之前死亡(图12C)。在实验结束时(第28天),用游离药物治疗的动物只有2/7(28%)仍然是活着的(图12C)。这样的死亡率在任何其余的组中未观察到。每日i.p.注射β-CD-3-BrPA(5 mg/kg在500 μl盐水中)表现出强烈抗-癌作用,在第一次注射后第14天可见早期的影响(图12B)。治疗4周后,进行各组之间的BLI信号强度比较。用β-CD对照处理的动物表现出与基线比较的140-倍信号增加。在吉西他滨-治疗的动物中观察到一个适度减速的肿瘤生长,随着时间的推移,信号增加60-倍。最重要的是,与吉西他滨和对照组比较,用β-CD-3-BrPA治疗的动物

显示出最小的或没有信号进展(图12)。在达到这个终点后,处死动物并收集肿瘤用于进一步的分析。所有动物经受验尸并收获器官(脑、心、肺、肠、肝和肾)用于分析潜在的组织损害。在用 $\beta$ -CD-3-BrPA治疗的动物中未观察到器官毒性或组织损伤(图12D)。在用 $\beta$ -CD-3-BrPA治疗的动物中的肿瘤病理学分析显示了非常大的肿瘤破坏,伴有中心区域的液化性坏死(图13)。具有完整细胞连接的肿瘤区域表现出裂解的胱天蛋白酶-3的高度表达,指示暴发性肿瘤细胞凋亡。用 $\beta$ -CD-3-BrPA治疗的动物表现出增殖的显著减少,如用Ki67免疫组织化学的分别为17%和51%的均数所评价的(图13)。此外,与 $\beta$ -CD或吉西他滨组比较,用 $\beta$ -CD-3-BrPA治疗的动物表现出MCT1和GAPDH在治疗的肿瘤内的较低表达水平。

[0221] 这些结果指示,系统传递的 $\beta$ -CD-3-BrPA在体内实现强烈的抗-肿瘤作用,同时当与游离药物比较时,在治疗剂量下引起更少得多的毒性。此外,微囊化的3-BrPA不改变药物在体外对抗胰腺癌细胞的效果,这被在常氧和缺氧两种条件下使用2D,以及富含ECM的3D细胞培养所证实。3-BrPA在亚致死剂量时抑制MMP-9的分泌和减少胰腺癌细胞的侵袭性的能力还指示这种药物的抗-转移潜力。

[0222] 选择性地靶向肿瘤代谢长期以来被认为是理想的治疗选项,但尚未转化为临床实践。使用3-BrPA达到系统传递能力的里程碑意义的主要限制是由于其烷基化特性所报告的毒性(Ganapathy-Kanniappan和Geschwind (2013) *Mol. Cancer* 12:152; Chang等 (2007) *Acad. Radiol.* 14:85-92; Kunjithapatham等 (2013) *BMC Res. Not.* 6:277)。结果,局部图像-引导的药物传递已被探索作为一种替代治疗选项;然而,这些方法的实际应用被限于治疗局部疾病(0ta等 (2013) *Target. Oncol.* 8:145-151; Geschwind等 (2002) *Cancer Res.* 62: 3909-3913)。本文描述的结果清楚地表明药物,当适当地配制用于系统传递时,是极其有效的,从而将这种化合物的应用扩大至事实上的任何癌症。这些结果与其中药物仅以其游离形式被系统地用来治疗实体瘤的其它研究的那些结果形成对比。在该研究中,游离3-BrPA在用于本文描述的实验的剂量时不能引起任何有意义的肿瘤反应(Cao等 (2008) *Clin. Canc. Res.* 14:1831-1839; Schaefer等 (2012) *Translat. Res.* 159:51-57)。特别地,一项研究,其探索游离3-BrPA与HSP90抑制剂组合在皮下胰腺癌异种移植物中的系统传递,在3-BrPA以剂量5 mg/kg单独使用(出于安全考虑,每周给药两次)时,未报告任何明显的效果(Cao等 (2008) *Clin. Canc. Res.* 14:1831-1839)。游离药物的这种不利疗效特性的一个可能的解释是3-BrPA通过与血清蛋白的非特异性相互作用的快速激活,这已知早在系统给予后2-3分钟在体内发生(Kunjithapatham等 (2013) *BMC Res. Not.* 6:277)。在这些剂量时观察到一些疗效,但过度的毒性,伴有在大多数动物中的与治疗-相关的死亡,是主要的结果。因此,相信系统给予游离3-BrPA可能不是有效的并可增加不需要的毒性。也相信在微囊化制剂中,3-BrPA对于吸收进入肿瘤细胞是更加可生物利用的,而对明显介导其毒性的正常细胞是较少可利用的(Birsoy等 (2013) *Nature Genet.* 45:104-108; Zhang和Ma (2013) *Advanc. Drug Deliv. Rev.* 65:1215-1233; Heidel和Schluep (2012) *J. Drug Deliv.* 2012:262731)。

[0223] 胰腺肿瘤组织的一个特征是密集的ECM的过度积聚,这限制氧的扩散并创建一个称为显著的化学抗性和增加的侵袭性的高度缺氧、灌注不良的肿瘤微环境(Yokoi和Fidler (2004) *Clin. Canc. Res.* 10:2299-2306; Yang等 (2001) *J. Surg. Res.* 98:33-39)。发表的研究证实超过30%的胰腺肿瘤细胞位于缺氧肿瘤隔室,从而规避传统的化学治疗作

用。这些细胞然后继续重新形成一种变得甚至更具侵袭性且对化学治疗抵抗的肿瘤 (Guillaumond等 (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110:3919-3924)。本文描述的结果表明3-BrPA能够有效地阻断肿瘤糖酵解,即使当它在缺氧条件下加剧时。相反,已证实吉西他滨,甚至在最高剂量下,也无力应付胰腺癌细胞中的缺氧。到目前为止,对于在癌细胞中3-BrPA的氧依赖性,相互矛盾的数据已有报道 (Cao等 (2008) *Cancer Chemother. Pharmacol.* 62:985-994; Xiao等 (2013) *Oncol. Rep.* 29:329-334)。然而,存在3-BrPA克服缺氧作为抗药性的一个关键机制的能力支持的重要证据 (Xu等 (2005) *Cancer Res.* 65:613-621)。特别地,最近的研究建立了MCT-1的缺氧和表达之间的联系,这被证明是在缺氧细胞和肿瘤区域中过度表达,因此提供了用于缺氧肿瘤组织对3-BrPA的敏感性增加的功能解释 (Matsumoto等 (2013) *Magnet. Res. Med.* 69:1443-1450)。值得注意的是,已在体外探索了结合吉西他滨和3-BrPA,以有效地实现疗效的增加;然而,未鉴定组合作用,因此,未进行各自的体内实验。

[0224] 此外,使用富含胶原1的3D器官型细胞培养作为富含ECM的肿瘤微环境的模型,已表明与单层细胞培养比较,3-BrPA成功地渗透基质而没有任何可测量的疗效的减少的能力。用于本文描述的研究的3D细胞培养模型可被看作是相对特异性的,主要是因为它是由基质组成的,这种基质模拟如在人类离体样品所见到的富含胶原1的ECM (Mollenhauer等 (1987) *Pancreas* 2:14-24)。虽然为了药物试验的目的,这样的体外模型的好处受到越来越多的认可,模拟体内的这些条件代表一个更大的挑战 (Longati等 (2013) *BMC Cancer* 13:95)。当设计这种研究时,要考虑不同的动物模型。在一方面,使用广泛认可的原位异种移植物模型带来重要的优点,例如再现性、可预测的肿瘤生长动力学,以及允许肿瘤细胞的基因组修饰,以表达特异性的和可成像的报告基因 (Kim等 (2009) *Nat. Protocol* 4: 1670-1680)。另一方面,这些模型反映了人类病变中肿瘤微环境的程度尚不清楚。虽然几个定义良好的小鼠肿瘤模型能够更逼真模拟ECM-组分和肿瘤缺氧,这些模型似乎不太适合于标准化药物试验的目的 (Guillaumond等 (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110:3919-3924)。在证实3-BrPA在体外抑制剂细胞侵袭性的能力方面,考虑了转移性Suit-2异种移植物模型的应用。然而,原位植入Suit-2异种移植物导致并发症(即,血性腹水)和大多数动物在植入后14天内的损失,这促进了选择MiaPaCa-2异种移植物作为一种可实行的备选方案。

[0225] 一个另外的意外结果在治疗的肿瘤组织的免疫组织化学分析中被观察到:紧接着预期的和先前报道的作为3-BrPA的分子靶的GAPDH耗尽,作为用于3-BrPA的特定转运蛋白的MCT-1的量在处理的样品中显著减少 (Ganapathy-Kanniappan等 (2012) *Radiotherapy and Oncology* 102:834-845)。迄今为止,对于作为3-BrPA的潜在靶的MCT-1存在,没有证据存在。然而,这种乳酸转运蛋白已被反复确定为一个合适的癌症治疗的分子靶点 (Schneiderhan等 (2009) *Gut* 58: 1391-1398; Shih等 (2012) *Oncotarget* 3:1401-1415; Sonveaux等 (2012) *PLoS One* 7: e33418)。

[0226] 因此,本文描述的结果确定微囊化的3-BrPA作为一个朝着最终实现可系统传递抗-糖酵解肿瘤疗法的目标的有前景的进展。 $\beta$ -CD-3-BrPA的强抗-癌作用和有利的毒性特征铺设了通向在患有胰腺癌症和潜在的其它恶性肿瘤的患者中的临床试验的途径。

[0227] 通过参考结合

[0228] 本申请通篇引用的所有参考文献、专利申请、专利,和公布的专利申请的内容,以

及图和序列表通过引用结合到本文中。应该理解,虽然本文引用了许多专利申请、专利,和其它参考文献,这样的参考并不构成对任何这些文件形成本领域一般常识的一部分的认可。

[0229] 等价方案

[0230] 本领域技术人员将认识到,或使用不超过常规的实验能够确定,本文描述的本发明的特定实施方案的许多等价方案。这样的等价方案意欲由以下的权利要求书涵盖。

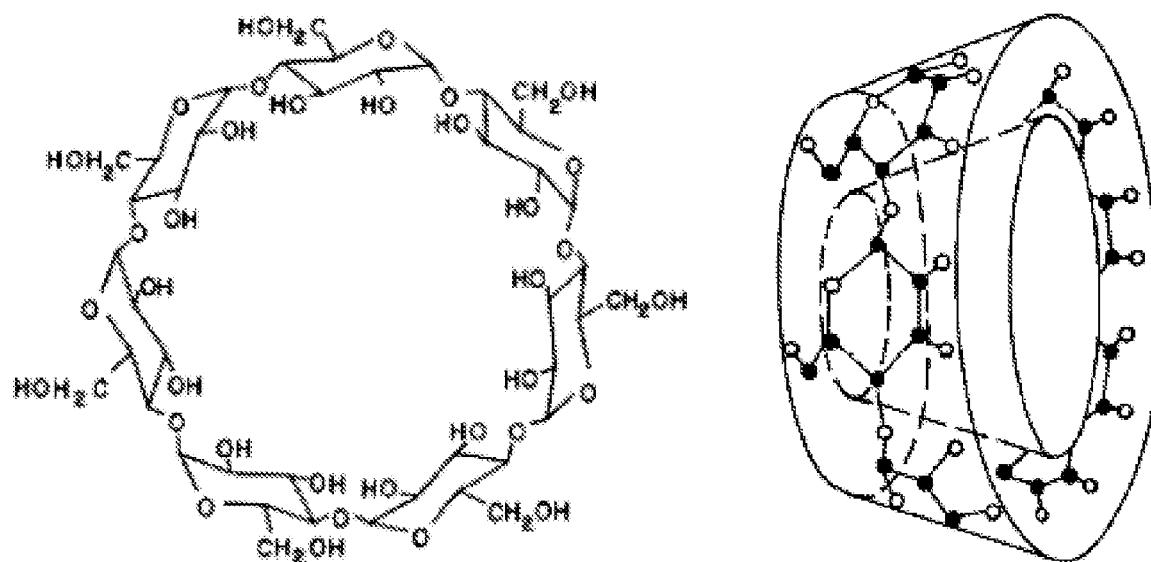


图 1

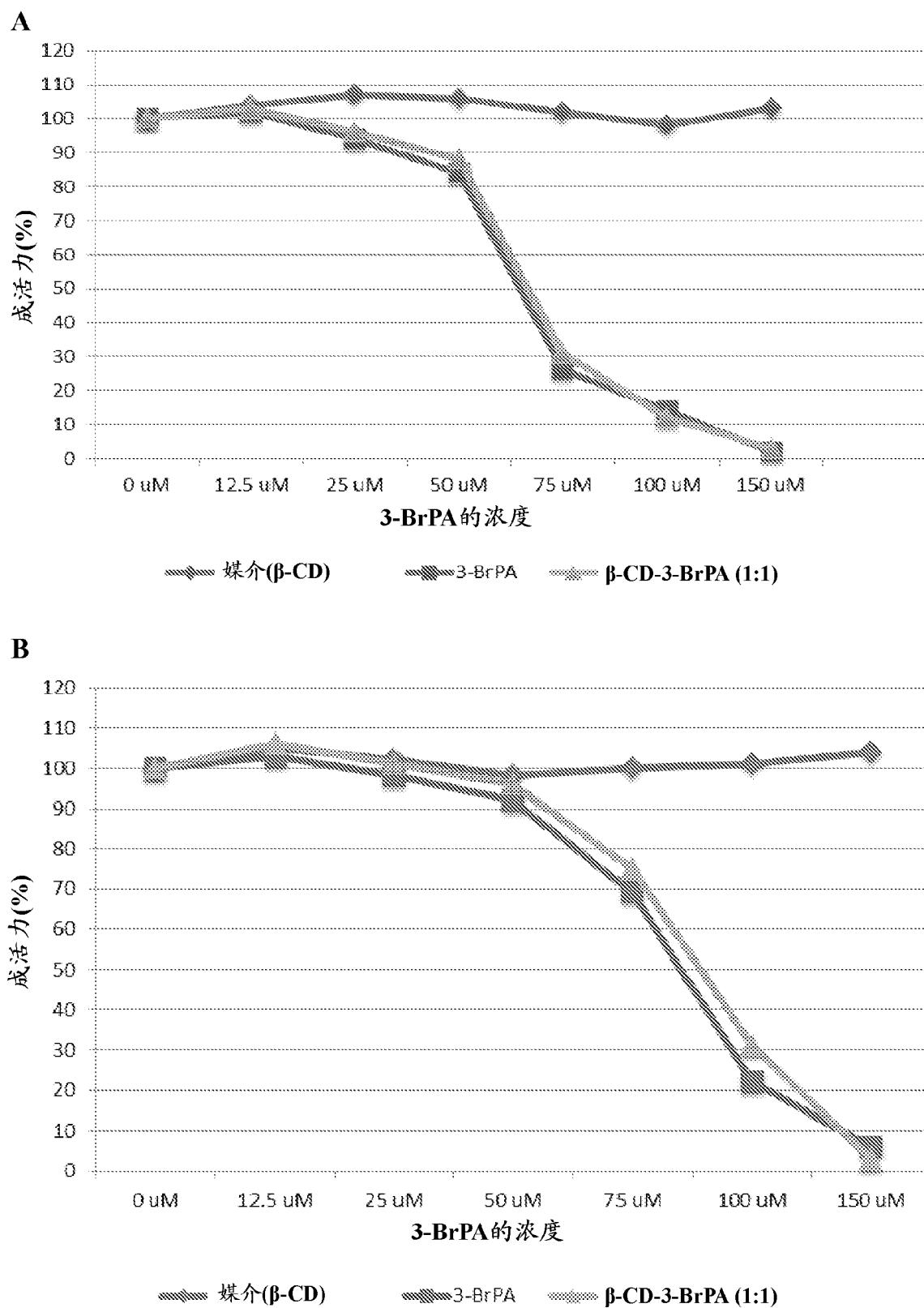


图 2

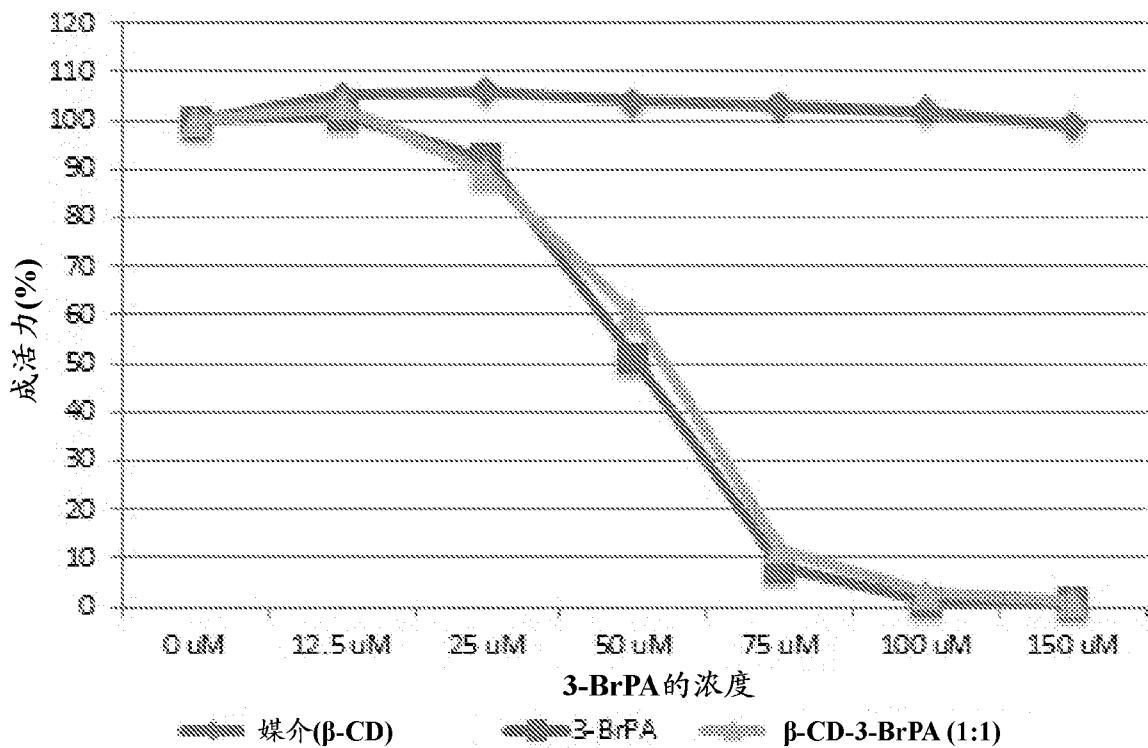


图 3

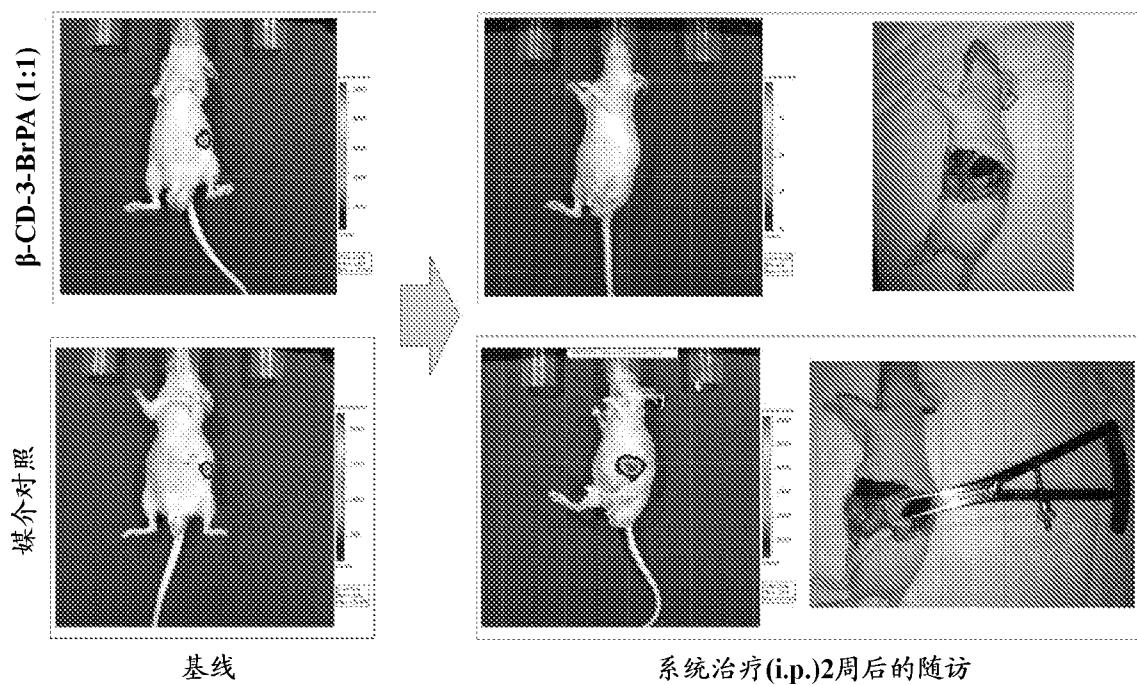


图 4

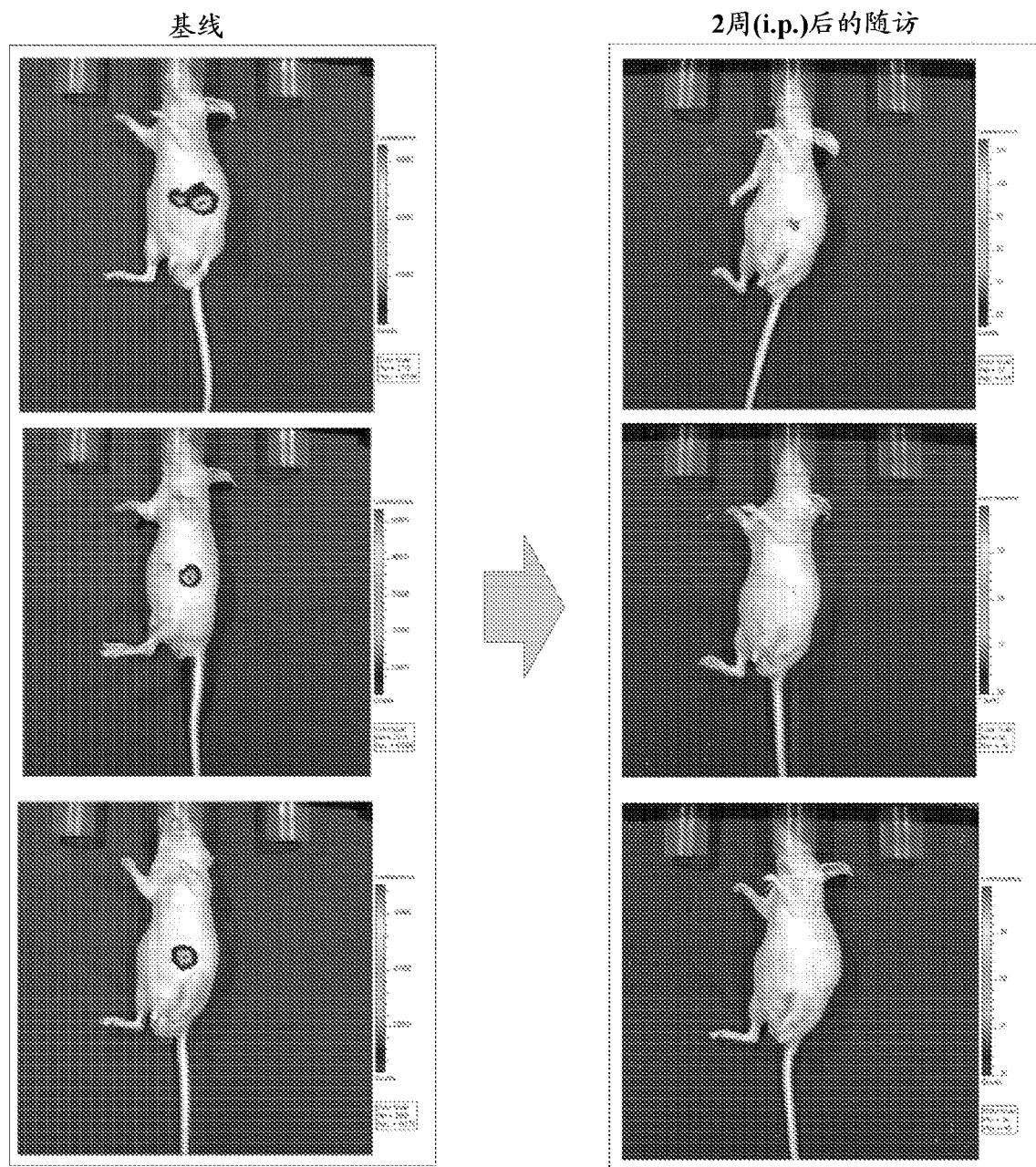


图 5

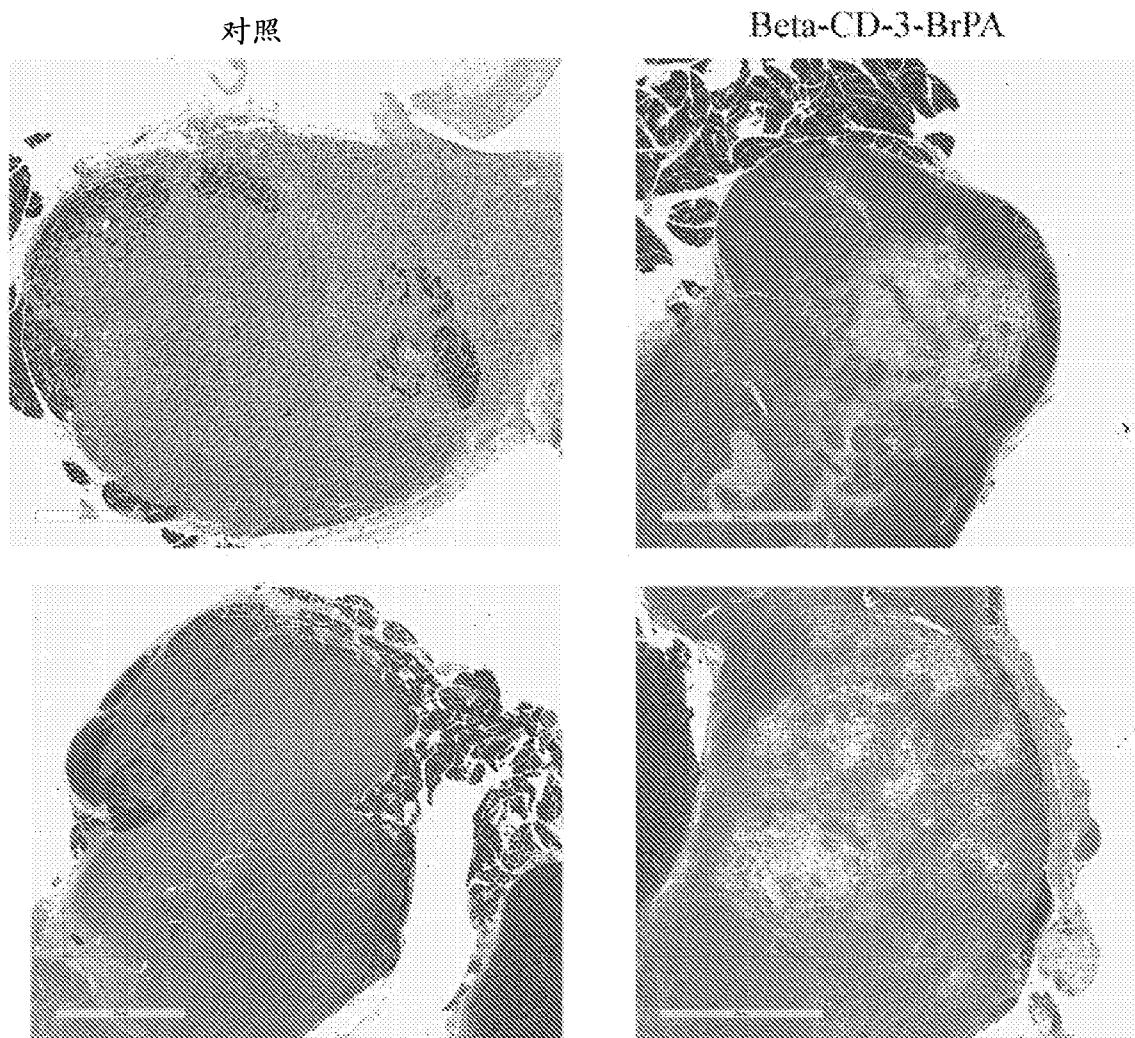


图 6

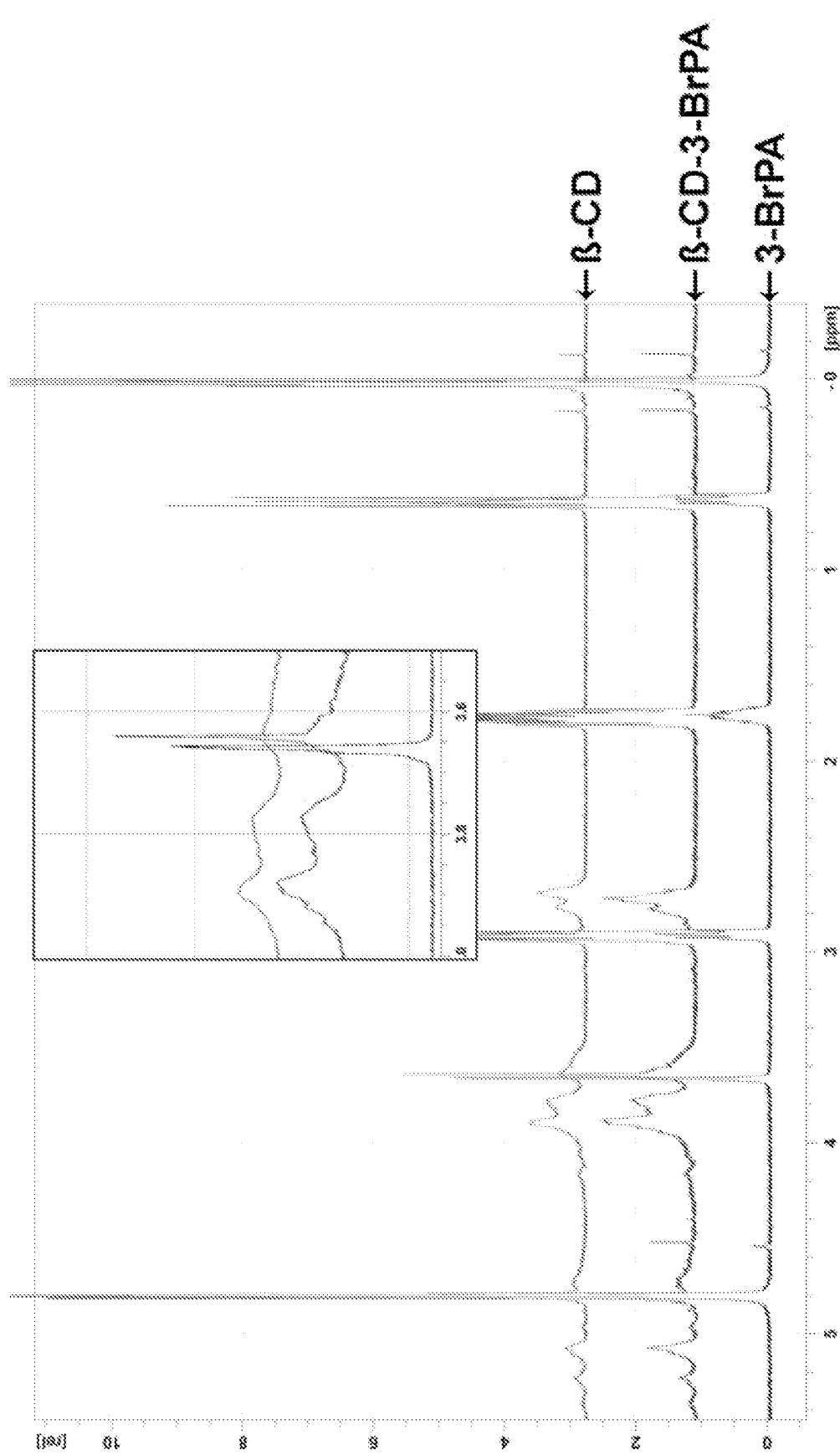
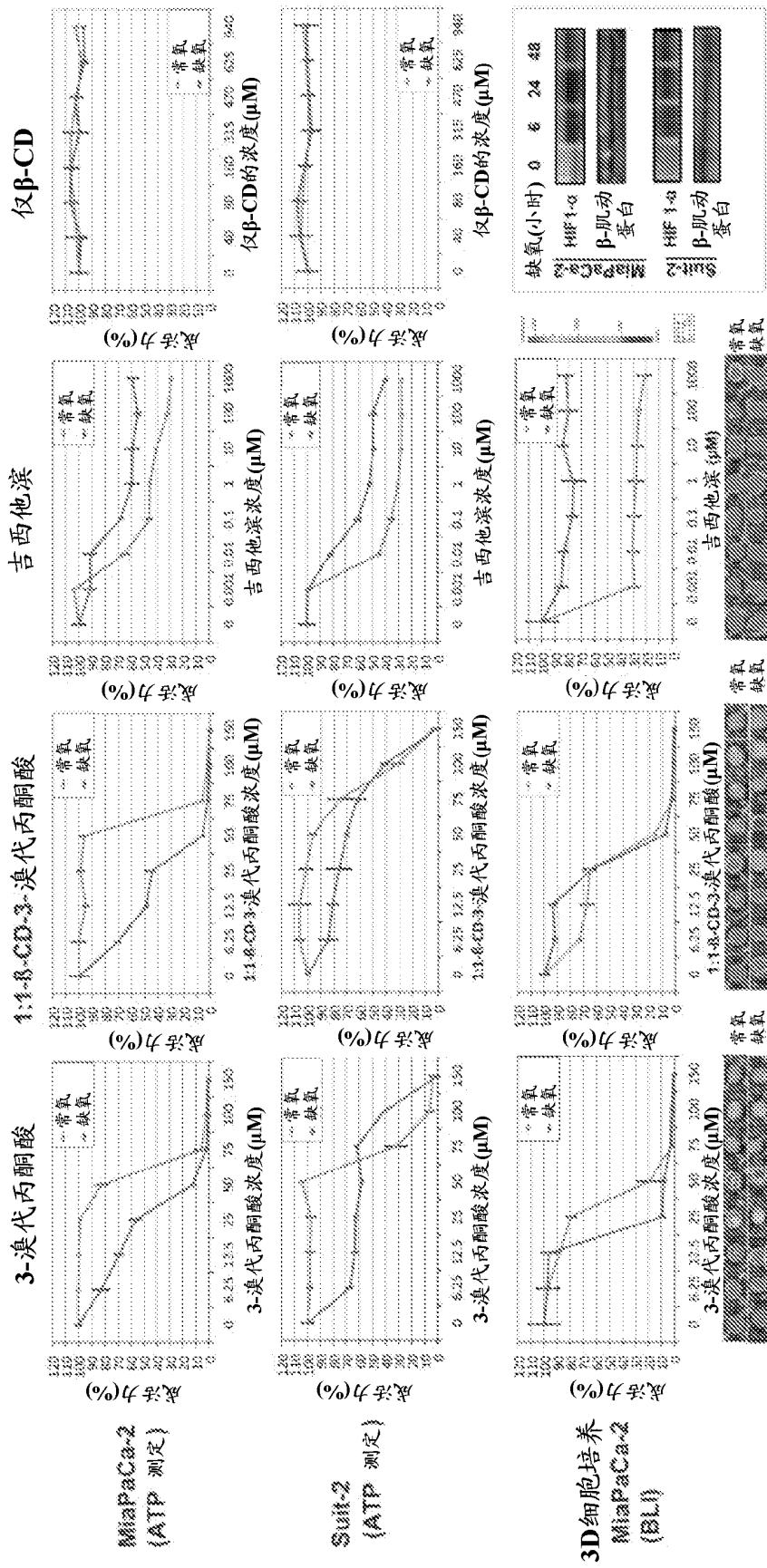


图 7



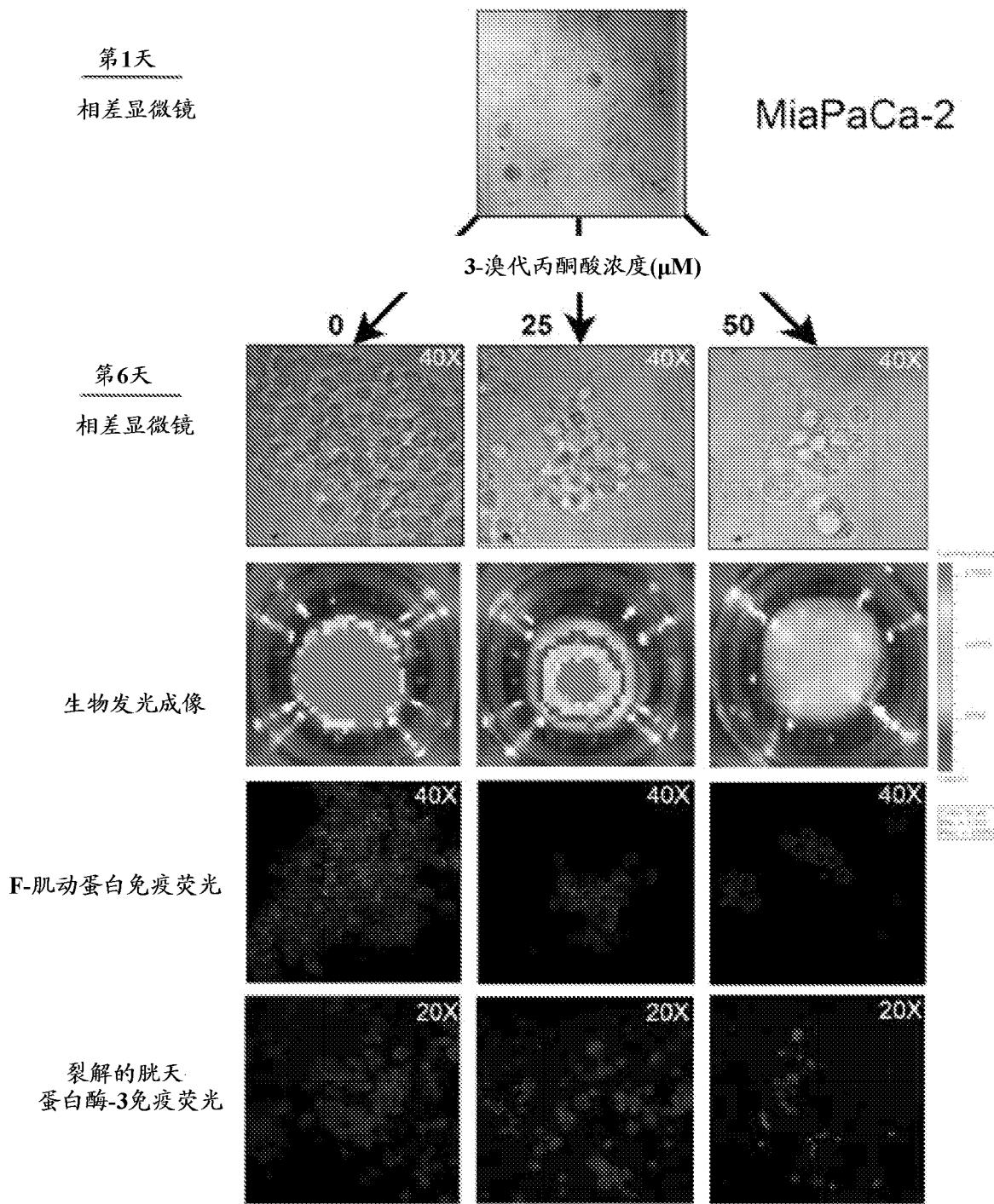


图 9

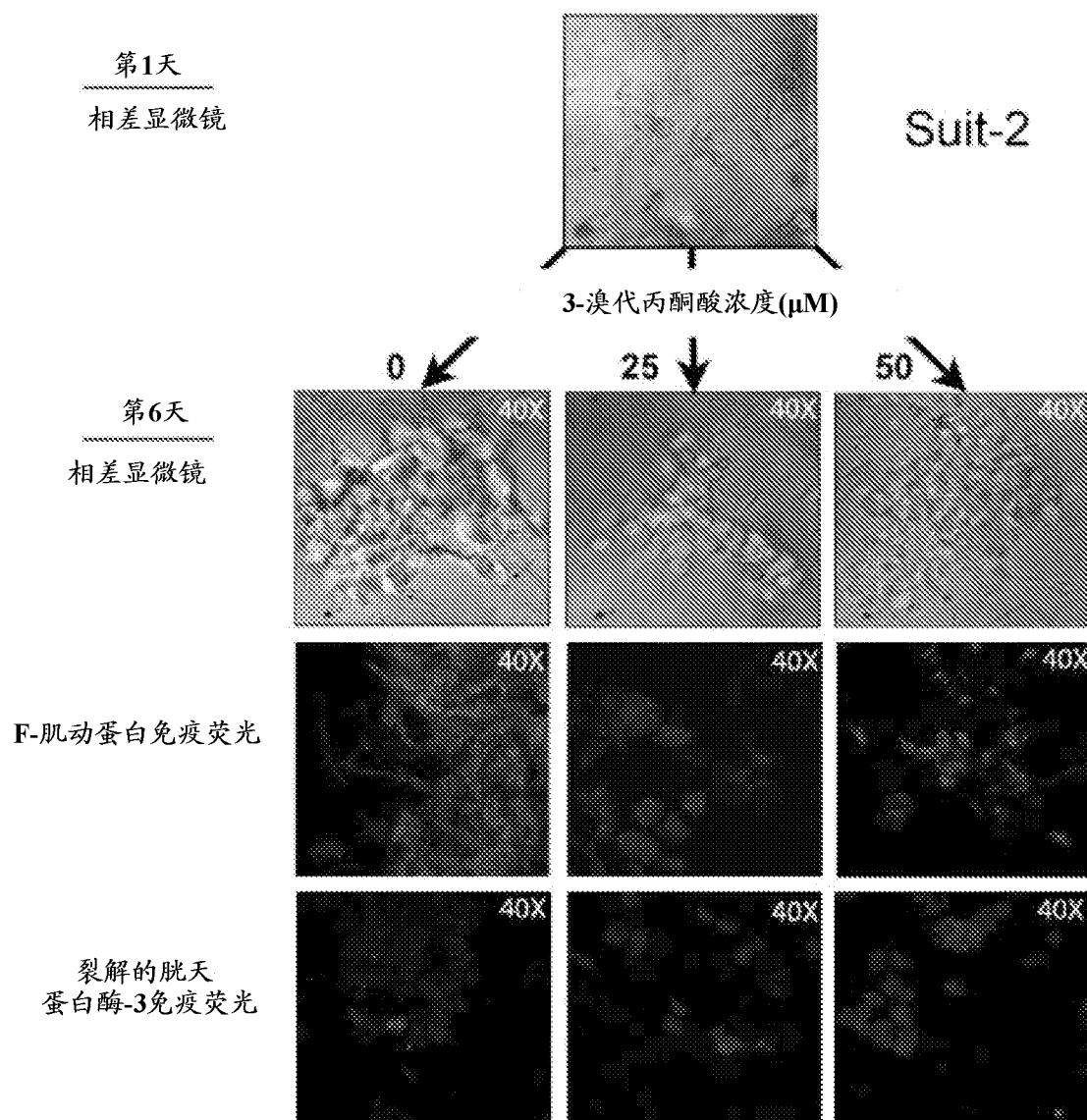


图 10

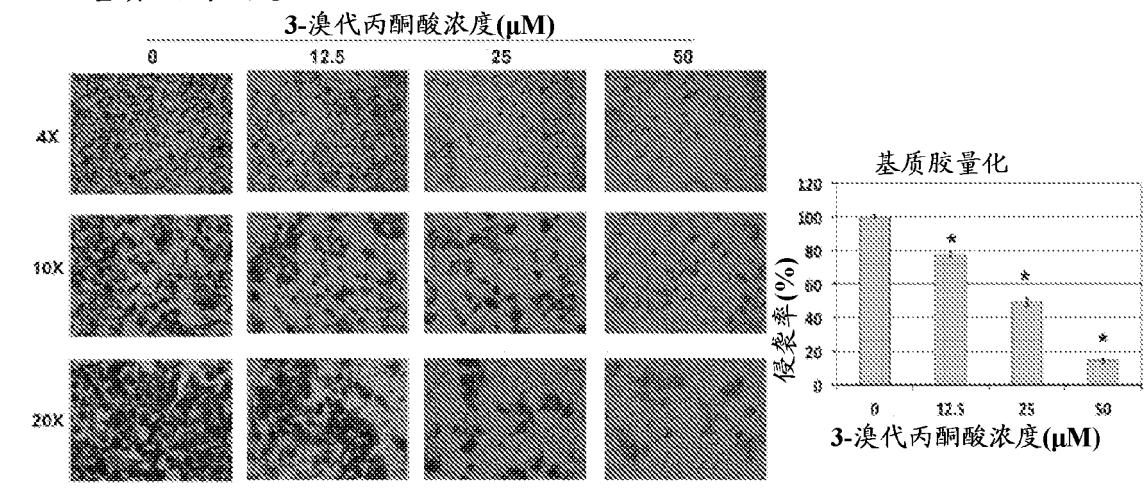
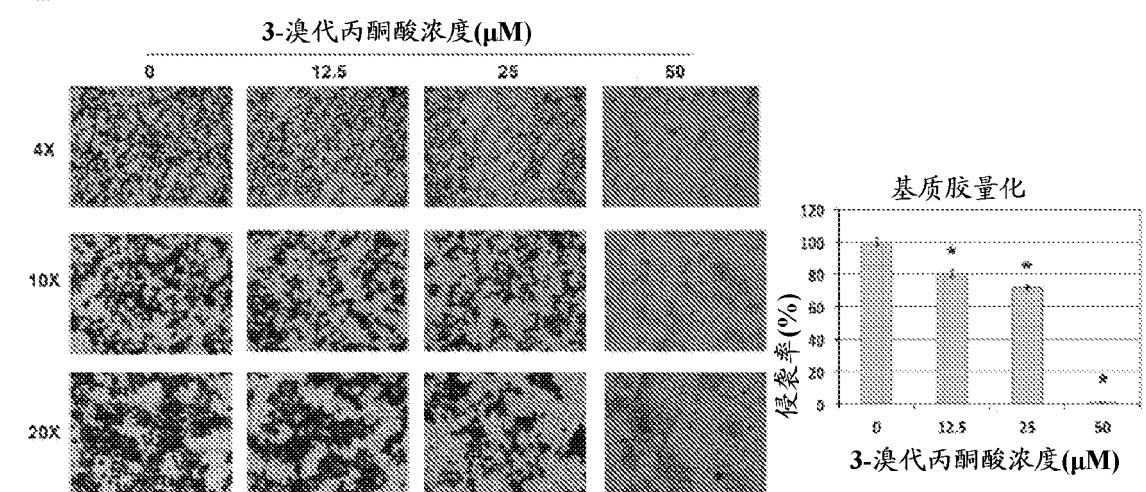
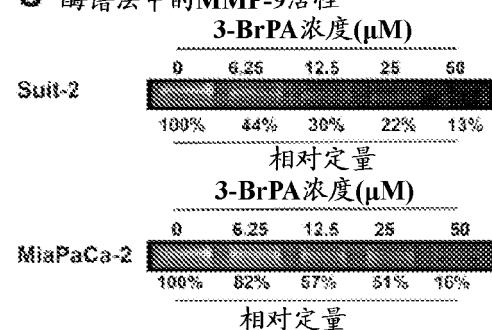
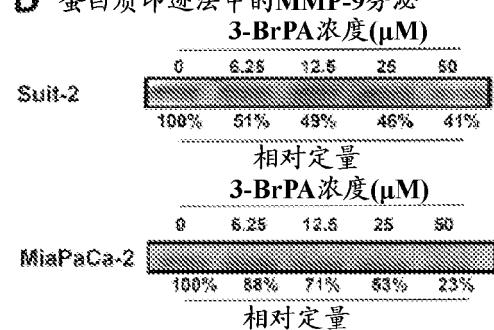
**A 基质胶侵袭测定Suit-2****B 基质胶侵袭测定MiaPaCa-2****C 酶谱法中的MMP-9活性****D 蛋白质印迹法中的MMP-9分泌**

图 11

A 原位植入 *lucMiaPaCa-2* 异种移植植物 (N=42)

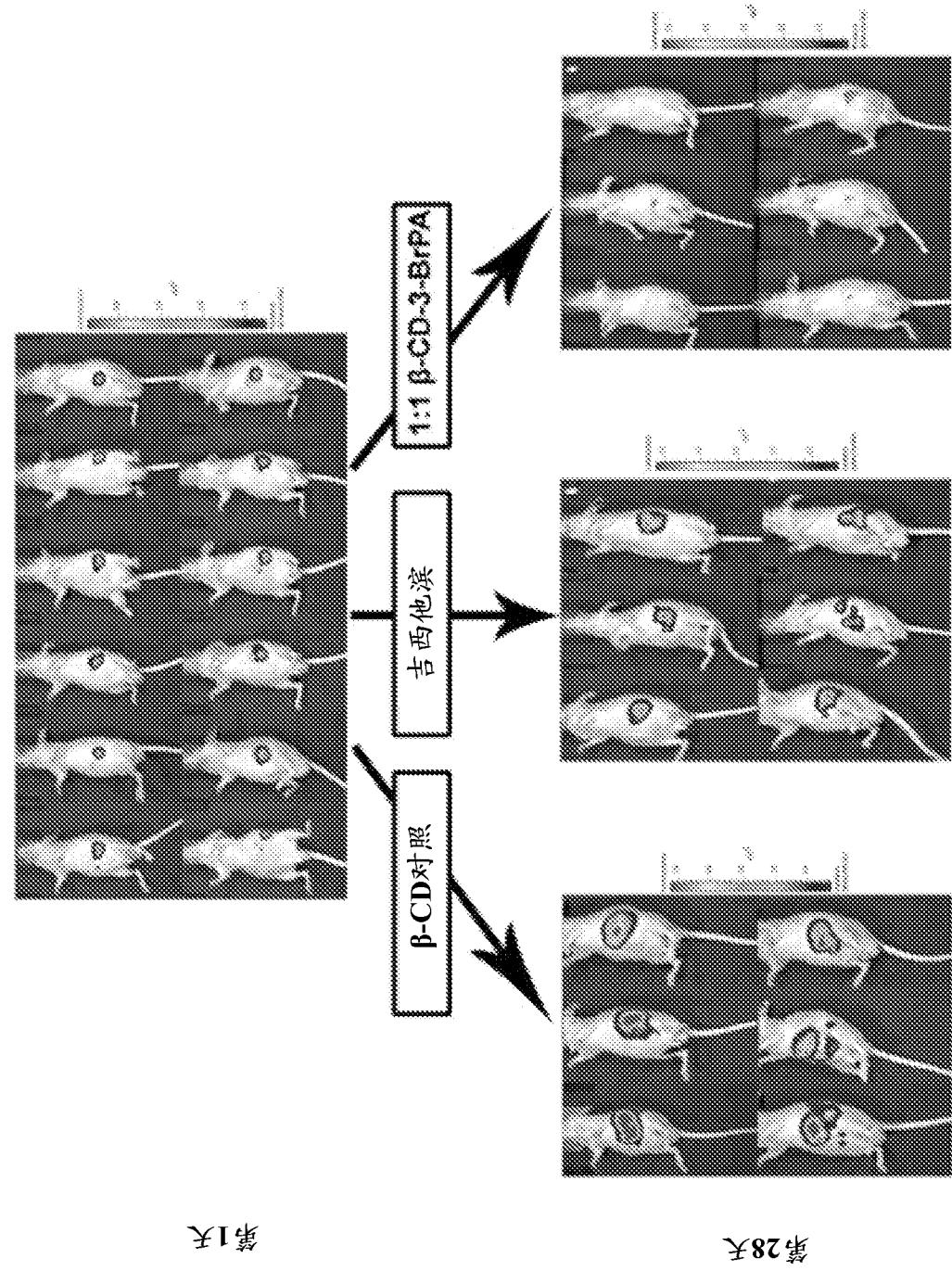


图 12

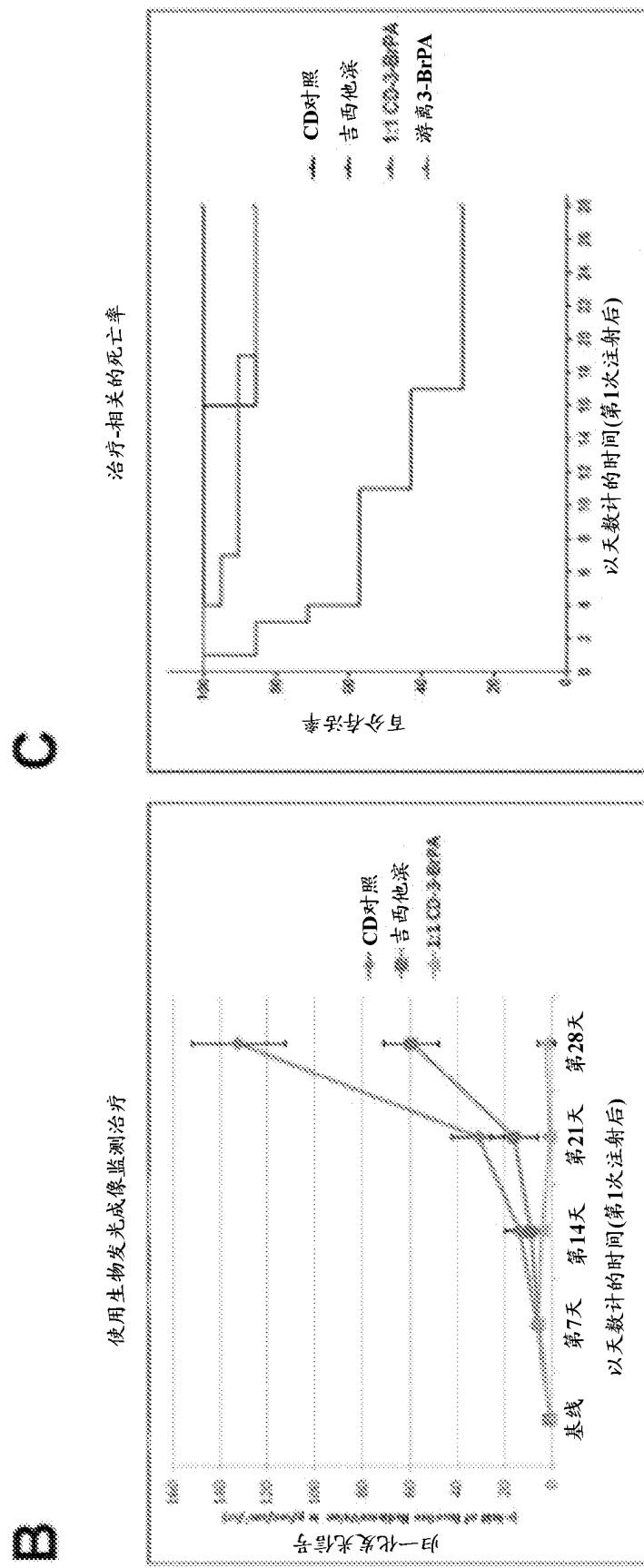


图 12(续)

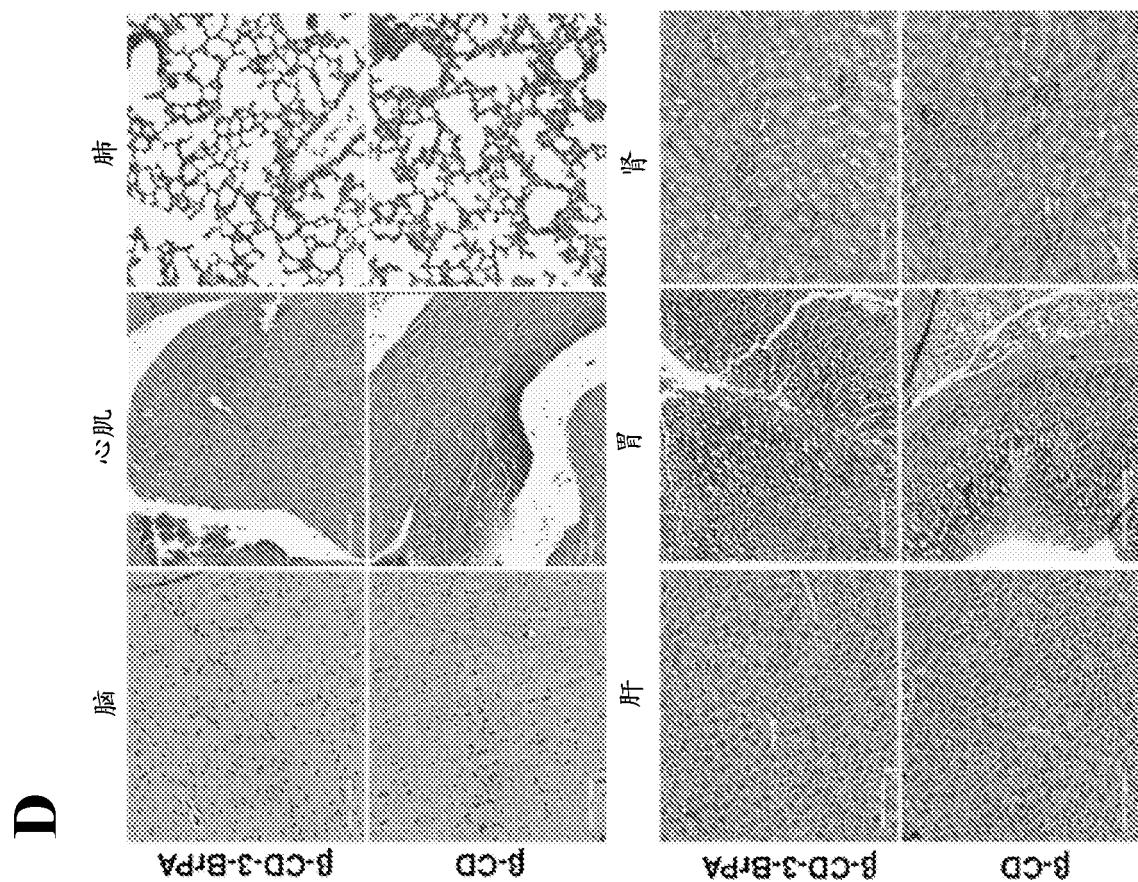


图 12(续)

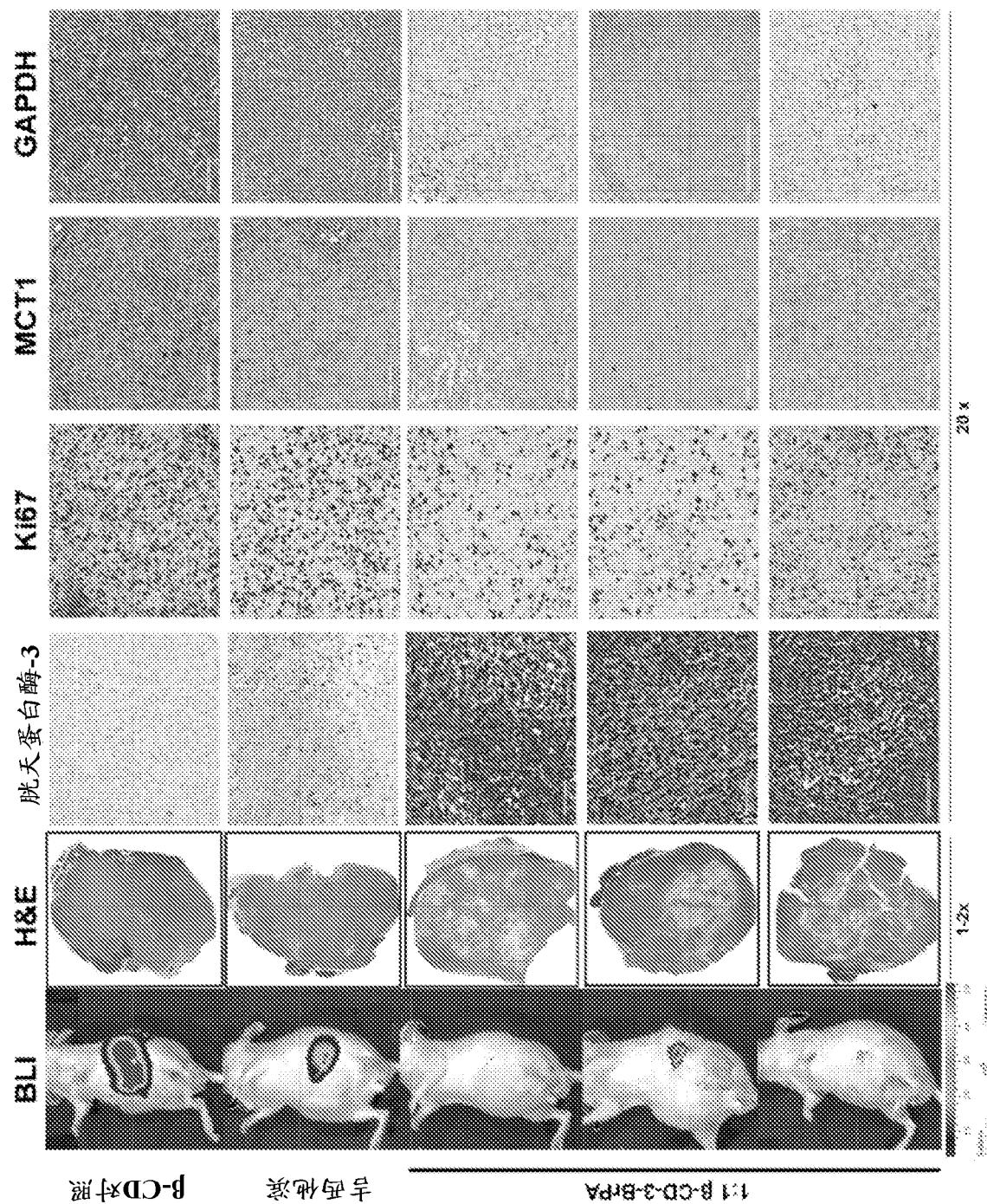


图 13