(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117083061 A
(43)申请公布日 2023.11.17

(21)申请号 202280024006.5
(22)申请日 2022.01.28
(30)优先权数据
63/144,690 2021.02.02 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.09.22
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2022/014379 2022.01.28
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/169690 EN 2022.08.11
(71)申请人 孔彦平
地址 美国新罕布什尔州
(72)发明人 孔彦平 刘锦红
(74)专利代理机构 北京市立方律师事务所 11330
专利代理师 杨剑
(51)Int.Cl.
*A61K 31/131*(2006.01)

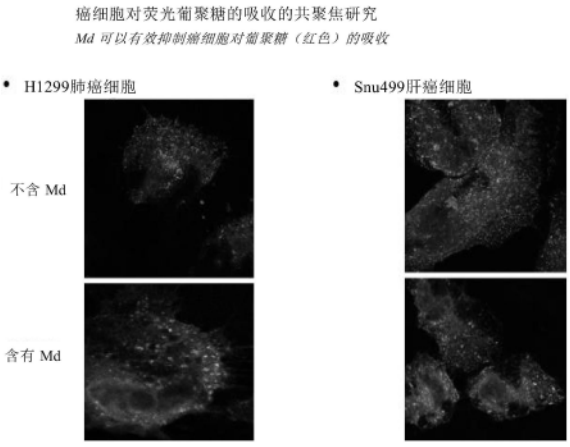
权利要求书2页 说明书13页 附图4页

(54)发明名称

用于治疗癌症的组合物和方法

(57)摘要

本发明提供了亚甲基二胺的药物组合物及其用于治疗各种类型癌症(例如肺癌、肝癌、皮肤癌、卵巢癌、前列腺癌、乳腺癌和血液癌)的方法。




CN 117083061 A

1.一种用于治疗癌症或相关疾病或病症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的包含亚甲基二胺(二氨基甲烷)或其药学上可接受的形式的药物组合物。

2.一种用于在缓解或手术后降低癌症复发的风险或延迟癌症复发的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的包含亚甲基二胺(二氨基甲烷)或其药学上可接受的形式的药物组合物。

3.一种用于在缓解或手术后预防癌症复发的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的包含亚甲基二胺(二氨基甲烷)或其药学上可接受的形式的药物组合物。

4.一种用于抑制癌细胞生长的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用包含亚甲基二胺(二氨基甲烷)或其药学上可接受的形式的药物组合物。

5.根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中亚甲基二胺为药学上可接受的盐的形式。

6.根据权利要求5所述的方法,其中亚甲基二胺为亚甲基二胺二盐酸盐的形式。

7.根据权利要求1-6中任一项所述的方法,其中癌症是实体肿瘤。

8.根据权利要求7所述的方法,其中所述实体肿瘤选自由肺癌、肝癌、皮肤癌、卵巢癌、前列腺癌和乳腺癌组成的组。

9.根据权利要求1-6中任一项所述的方法,其中癌症是血液癌。

10.根据权利要求9所述的方法,其中所述血液癌选自由白血病、淋巴瘤和骨髓瘤组成的组。

11.根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中所述施用是口服、皮下、肌肉内、肿瘤内、静脉内或吸入施用。

12.根据权利要求11所述的方法,其中施用是口服。

13.根据权利要求6-12中任一项所述的方法,其中亚甲基二胺二盐酸盐以约10mg至约1,000mg范围内的日剂量施用约7至约180天的时间段。

14.根据权利要求6-12中任一项所述的方法,其中亚甲基二胺二盐酸盐以约10mg至约1,000mg范围内的日递增剂量施用约7至约180天的时间段。

15.根据权利要求14所述的方法,其中亚甲基二胺二盐酸盐以约15mg至约500mg范围内的日递增剂量施用约7至约180天的时间段。

16.根据权利要求15所述的方法,其中亚甲基二胺二盐酸盐以约20mg至约250mg范围内的日递增剂量施用约7至约180天的时间段。

17.根据权利要求1-16中任一项所述的方法,其还包括向所述受试者施用第二疗法或第二治疗剂。

18.根据权利要求1-16中任一项所述的方法,其与化学疗法、激素疗法、放射疗法和免疫疗法中的一者或多者联合。

19.根据权利要求17或18所述的方法,其包括向所述受试者施用化学治疗剂。

20.根据权利要求17或18所述的方法,其包括向所述受试者施用激素治疗剂。

21.根据权利要求17或18所述的方法,其包括向所述受试者施用放射疗法。

22.根据权利要求17或18所述的方法,其包括向所述受试者施用免疫疗法。

23.根据权利要求17或18所述的方法,其中所述第二治疗剂是小分子剂。

24.根据权利要求17或18所述的方法,其中所述第二治疗剂是蛋白质或抗体。

25.根据权利要求17或18所述的方法,其中所述第二治疗剂是细胞疗法。

26.一种药物组合物,其包含治疗有效量的亚甲基二胺(二氨基甲烷)或其药学上可接受的形式以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。

27.根据权利要求26所述的药物组合物,其中亚甲基二胺为药学上可接受的盐的形式。

28.根据权利要求27所述的药物组合物,其中亚甲基二胺为亚甲基二胺二盐酸盐的形式。

29.一种单剂量形式,其包含根据权利要求26-28中任一项所述的药物组合物。

30.根据权利要求29所述的单剂量形式,其中所述药物组合物适用于口服施用。

31.根据权利要求29所述的单剂量形式,其为片剂或胶囊的形式。

32.根据权利要求29所述的单剂量形式,其为液体溶液或悬液的形式。

33.一种试剂盒,其包含权利要求29-32中任一项所述的单剂量形式和第二治疗剂的单剂量形式及其施用说明书。

34.根据权利要求33所述的试剂盒,其中所述第二治疗剂是用于化学疗法、激素疗法、放射疗法或免疫疗法的治疗剂。

35.亚甲基二胺(二氨基甲烷)或其药学上可接受的形式在制备用于治疗癌症或相关疾病或病症的药物中的用途。

36.亚甲基二胺(二氨基甲烷)或其药学上可接受的形式在治疗癌症或相关疾病或病症中的用途。

37.根据权利要求36所述的用途,其中所述癌症是实体肿瘤。

38.根据权利要求36或37所述的用途,其与第二疗法或第二治疗剂联合。

39.根据权利要求38所述的用途,其与化学疗法、激素疗法、放射疗法或免疫疗法联合。

# 用于治疗癌症的组合物和方法

[0001] 优先权要求和相关申请

[0002] 本申请要求2021年2月2日提交的美国临时申请号63/144,690的优先权利益,所述临时申请的全部内容为所有目的通过引用并入本文。

## 技术领域

[0003] 本发明总的来说涉及用于治疗癌症的新型治疗方法和药物组合物。更具体而言,本发明涉及亚甲基二胺的药物组合物及其用于治疗各种类型癌症(例如肺癌、肝癌、皮肤癌、卵巢癌、前列腺癌、乳腺癌和血液癌)的用途。

## 背景技术

[0004] 癌症是一组涉及细胞异常生长的疾病,可侵入或扩散到身体其他部位。截至2019年,每年新增病例约1800万例,并造成约880万人死亡。男性中最常见的癌症类型是肺癌、前列腺癌、结肠直肠癌和胃癌。在女性中,最常见的类型是乳腺癌、结肠直肠癌、肺癌和宫颈癌。尽管癌症有许多治疗方法,包括手术、化学疗法、放射疗法、激素疗法、靶向疗法和姑息治疗,但癌症仍然是最大的健康威胁。

[0005] 癌细胞含有基因突变,并表现出生长迅速和代谢异常。癌细胞中营养物质的加工与正常细胞或相应良性肿瘤中的营养物质加工明显不同。癌细胞对葡萄糖的吸收水平提高,并且可以利用来自于血液中预先形成的、来自饮食的脂肪酸来加速其生长。癌细胞中内吞作用的演变可能与基因谱变化有关。我们以前的研究表明,与正常细胞不同,肝癌和乳腺癌细胞可以通过内吞作用从其微环境中吸收大分子核酸(Kong等,2017 Biological Research 50(2):1-7)。癌细胞需要快速吸收营养物质以匹配其高增殖速率。某些癌症例如乳腺癌、肝癌和肺癌与其他类型的癌症例如生长缓慢的甲状腺癌相比,表现出更具侵略性的生长(高增殖)。快速生长的癌症需要其细胞具有高的营养物质吸收速率。

[0006] 目前可用于治疗癌症的治疗剂和方法尚不充足。仍然迫切且持续不断地需要新型和改进的治疗剂来有效治疗癌症和相关疾病和病症。

## 发明内容

[0007] 本发明部分是基于预料不到地发现了某些治疗方法和药物组合物,其正如本文中所证实的,可用于治疗多种癌症例如肺癌、肝癌、皮肤癌、卵巢癌、前列腺癌、乳腺癌和血液癌。具体而言,本文公开了一种使用亚甲基二胺(例如亚甲基二胺二盐酸盐)治疗癌症和/或预防或延迟癌症复发的方法。亚甲基二胺可以单独使用或与各种其他治疗剂联合使用。

[0008] 一方面,本发明总的来说涉及一种治疗癌症或相关疾病或病症的方法。所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的包含亚甲基二胺或其药学上可接受的形式的药物组合物。

[0009] 另一方面,本发明总的来说涉及一种在缓解或手术后降低癌症复发的风险或延迟癌症复发的方法。所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的包含亚甲基二胺或其

药学上可接受的形式的药物组合物。

[0010] 又一方面,本发明总的来说涉及一种在缓解或手术后预防癌症复发的方法。所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的包含亚甲基二胺或其药学上可接受的形式的药物组合物。

[0011] 又一方面,本发明总的来说涉及一种抑制癌细胞生长的方法。所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的包含亚甲基二胺或其药学上可接受的形式的药物组合物。

[0012] 又一方面,本发明总的来说涉及一种药物组合物,其包含治疗有效量的亚甲基二胺或其药学上可接受的形式以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。

[0013] 又一方面,本发明总的来说涉及一种单剂量形式,其包含本文公开的药物组合物。

[0014] 又一方面,本发明总的来说涉及一种试剂盒,其包含本发明的单剂量形式和第二治疗剂的单剂量形式及其施用说明书。

[0015] 又一方面,本发明总的来说涉及亚甲基二胺或其药学上可接受的形式在制备用于治疗癌症(例如实体肿瘤)或相关疾病或病症的药物中的用途。

[0016] 又一方面,本发明总的来说涉及亚甲基二胺或其药学上可接受的形式在治疗癌症(例如实体肿瘤)或相关疾病或病症中的用途。

## 附图说明

[0017] 图1示出了亚甲基二胺二盐酸盐(图中的Md)在抑制H1299细胞(左侧,肺癌)和Snu499细胞(右侧,肝癌)对葡聚糖的吸收的示例性数据。红色是癌细胞中的葡聚糖。在添加浓度为0.5mM的亚甲基二胺二盐酸盐后,癌细胞对葡聚糖的吸收显著受到抑制(与不添加亚甲基二胺二盐酸盐的细胞相比,添加了亚甲基二胺二盐酸盐的细胞中红色明显更少)。

[0018] 图2示出了使用MTT测定法(Sigma)进行增殖研究的示例性数据。从左至右是不同的癌细胞系。C8161和MUM2C是黑素瘤。SKOV3和OVACA3是卵巢癌。ScNAP和DU145是前列腺癌。H1299和A549是肺癌。MDA231是乳腺癌。SNU499是肝癌。对于每种细胞系而言,7个不同颜色的柱子表示亚甲基二胺二盐酸盐的不同浓度。从左至右:0μM、1μM、50μM、100μM、250μM、500μM和1mM。随着亚甲基二胺二盐酸盐的剂量从低到高,细胞以剂量依赖性方式被抑制,即剂量越高,抑制越强(柱越短表示抑制越强)。

[0019] 图3示出了由亚甲基二胺二盐酸盐诱导的细胞凋亡研究的示例性数据。使用浓度为500μM的亚甲基二胺二盐酸盐时,荧光峰显著右移,这意味着更多细胞具有荧光(更多荧光意味着更多细胞处于凋亡中)。左:黑素瘤;右:肺癌;顶部:对照;中间:低剂量(100μM);底部:高剂量(500μM)的亚甲基二胺二盐酸盐。所述数据显示亚甲基二胺二盐酸盐以剂量依赖性方式诱导癌细胞凋亡。

[0020] 图4示出了亚甲基二胺盐酸盐显著抑制3种血液癌细胞系(Jurkat、HL-60和MV-411)的示例性数据。四个柱子表示在不同浓度的亚甲基二胺盐酸盐下的活细胞数量,从左到右:0、50μM、100μM和500μM。当浓度增加时,观察到的活细胞减少。

[0021] 定义

[0022] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语均具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。除非根据术语所在的上下文另有说明,否则下述术语应具有下述含义。

[0023] 当本文使用商品名时,除非上下文另有说明,否则商品名包括所述商品名产品的产品制剂、仿制药和活性药物成分。

[0024] 本文提供的范围被理解为是所述范围内的所有值的简写。例如,1至14的范围被理解为包括由1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14组成的组的任何数字、数字的组合或子范围。

[0025] 在本说明书和随附的权利要求书中,除非上下文另有明确规定,单数形式包括复数指称物。

[0026] 除非具体陈述或从上下文中显而易见,否则本文所使用的术语“约”被理解为是在本领域的正常公差范围内,例如在平均值的2个标准偏差内。“约”可以被理解为在所陈述的值的10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%或0.01%之内。本文提供的所有数值均可以被术语“约”修饰,除非从上下文另有说明。

[0027] 除非具体说明或从上下文中显而易见,否则本文所使用的术语“或”被理解为是包含在内。

[0028] 当用于定义组合物和方法时,术语“包含”意味着所述组合物和方法包括所叙述的要素,但不排除其他要素。当用于定义组合物和方法时,术语“由……组成”应意味着所述组合物和方法包括所叙述的要素,并排除对所述组合物和方法具有任何重要意义的其他要素。例如,“基本上由……组成”是指对明确叙述的药理活性剂的施用,并且排除未明确叙述的药理活性剂。术语“基本上由……组成”不排除药理学上无活性或惰性的试剂,例如药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。当用于定义组合物和方法时,术语“由……组成”应意味着排除其他成分的微量元素和实质性方法步骤。由这些过渡性术语中的每一者定义的实施方式都在本发明的范围之内。

[0029] 本文所使用的术语“疾病”、“障碍”或“病症”在本文中可互换使用,是指病理状况,例如可以通过症状或其他识别因素来识别与健康或正常状态偏离的病理状况。术语“疾病”包括障碍、综合征、病症和损伤。疾病包括但不限于增殖性、炎性性、免疫性、代谢性、传染性和缺血性疾病。

[0030] 本文所使用的所公开的化合物的“药学上可接受的形式”包括但不限于所公开的化合物的药学上可接受的盐、酯、水合物、溶剂化物、异构体、前体药物和同位素标记的衍生物。在一个实施方式中,“药学上可接受的形式”包括但不限于所公开的化合物的药学上可接受的盐、酯、异构体、前体药物和同位素标记的衍生物。在一些实施方式中,“药学上可接受的形式”包括但不限于所公开的化合物的药学上可接受的盐和同位素标记的衍生物。

[0031] 在某些实施方式中,所述药学上可接受的形式是药学上可接受的盐。本文所使用的术语“药学上可接受的盐”是指在合理的医学判断范围内,适合与受试者的组织接触使用而没有过度毒性、刺激性、过敏反应等,并与合理的利益/风险比相称的那些盐。药学上可接受的盐在本领域是公知的。例如,Berge等在J.Pharmaceutical Sciences(1977)66:1-19中详细描述了药学上可接受的盐。本文提供的化合物的药学上可接受的盐包括从适合的无机和有机酸和碱衍生的那些盐。药学上可接受的无毒酸加成盐的实例是氨基与无机酸例如盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸和高氯酸或与有机酸例如乙酸、草酸、马来酸、酒石酸、柠檬酸、琥珀酸或丙二酸形成的盐,或者通过使用本领域中使用的其他方法例如离子交换形成的盐。其他药学上可接受的盐包括己二酸盐、海藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐

(benzenesulfonate)、苯磺酸盐(besylate)、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、甲酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、葡萄糖酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢碘酸盐、2-羟基-乙磺酸盐、乳糖醛酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、对甲苯磺酸盐、十一烷酸盐、戊酸盐等。在某些实施方式中,可以衍生盐的有机酸包括例如乙酸、丙酸、乙醇酸、丙酮酸、草酸、乳酸、三氟乙酸、马来酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸、水杨酸等。

[0032] 所述盐可以在所公开的化合物的分离和纯化过程中原位制备,或者单独制备,例如通过将母体化合物的游离碱或游离酸分别与适合的碱或酸反应。

[0033] 在某些实施方式中,所述药学上可接受的形式是“溶剂化物”(例如水合物)。本文所使用的术语“溶剂化物”是指进一步包括通过非共价分子间力结合的溶剂的化学计算量或非化学计算量的化合物。所述溶剂化物可以是所公开的化合物或其药学上可接受的盐。在溶剂是水的情况下,溶剂化物是“水合物”。药学上可接受的溶剂化物或水合物是例如可以包括1至约100个、或1至约10个、或1至约2个、约3个或约4个溶剂或水分子的水合物。应该理解,本文所使用的术语“化合物”涵盖了化合物和所述化合物的溶剂化物以及它们的混合物。

[0034] 在某些实施方式中,所述药学上可接受的形式的前体药物。本文所使用的术语“前体药物”(或“前药”)是指在体内转化以产生所公开的化合物或所述化合物的药学上可接受的形式的化合物。前体药物在施用到受试者时可能是无活性的,但在体内通过例如水解(例如在血液中水解)而转变成活性化合物。在某些情况下,前体药物与母体化合物相比具有改进的物理和/或递送性能。相对于母体化合物,前体药物在施用到受试者时(例如通过在口服施用后允许增强在血液中的吸收)可以提高所述化合物的生物可利用度,或增强向感兴趣的生物区室(例如脑或淋巴系统)的递送。示例性的前体药物包括相对于母体化合物具有增强的水溶性或通过肠膜的主动转运的所公开化合物的衍生物。

[0035] 前体药物化合物通常在哺乳动物生物体中提供溶解性、组织相容性或延迟释放的优点(参见例如Bundgard,H.,《前体药物的设计》“Design ofProdrugs”,(1985),pp.7-9,21-24(Elsevier,Amsterdam))。前体药物的讨论被提供在Higuchi,T.等,“作为新型递送系统的前药”(Pro-drugs as Novel Delivery Systems),A.C.S.Symposium Series,Vol.14和《药物设计中的生物可逆载体》(Bioreversible Carriers in Drug Design),Edward B.Roche主编,American Pharmaceutical Association and Pergamon Press,1987中,两者均整体通过引用并入本文。前体药物的示例性优点可以包括但不限于其物理性质,例如与母体化合物相比增强了在生理pH下用于胃肠外施用的水溶性,或者它可以增强从消化道的吸收,或者它可以增强药物长期储存的稳定性。

[0036] 本文所使用的术语“药学上可接受的”赋形剂、载体或稀释剂指参与将受试药物制剂从一个器官或身体的一部分携带或运输到另一个器官或身体的一部分的药学上可接受的材料、组合物或载体,如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂或溶剂或包封材料。每种载体

都必须是“可接受的”,即与制剂的其他成分相容并且不会对患者造成伤害。可以作为药学上可接受的载体的材料的一些实例包括:糖类,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;黄蓍胶粉;麦芽;明胶;滑石;赋形剂,例如可可脂和栓剂用蜡;油类,例如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;二醇类,例如丙二醇;多元醇,例如甘油、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇;酯类,例如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,例如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原水;等渗盐水;林格氏溶液;乙醇;磷酸盐缓冲溶液;以及用于药物制剂中的其他无毒相容性物质。润湿剂、乳化剂和润滑剂例如月桂基硫酸钠、硬脂酸镁和聚氧化乙烯-聚氧化丙烯共聚物,以及着色剂、脱模剂、涂层剂、甜味剂、调味剂和香料、防腐剂和抗氧化剂,也可以存在于组合物中。

[0037] 本文所使用的术语“预防”是指用于阻止、延迟、避免或停止疾病或病症的发作、发病率、严重程度或复发的方法。例如,在对疾病或病症易感的受试者中,如果与未接受方法的受试者相比所述疾病或病症或其一种或多种症状的发作、发病率、严重程度或复发减少或延迟,则所述方法被认为是一种预防。在对疾病或病症易感的受试者中,如果与接受治疗之前受试者的进展相比,在接受所公开的方法之后受试者中的疾病或病症的一种或多种症状的发作、发病率、严重程度或复发减少或延迟,则所述方法也被认为是一种预防。癌症的发作、发病率、严重程度或复发的减少或延迟可以是约5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100%或其间的任何量的减少。

[0038] 预防等并不意味着阻止受试者患上特定的疾病或障碍。预防可能需要多次施用。预防可以包括在所有疾病症状都已消除的受试者中预防疾病的复发,或在复发-缓解性疾病中预防复发。

[0039] 本文所使用的术语“受试者”和“患者”在本文中可互换使用,是指活的动物(人类或非人类)。受试者可以是哺乳动物。术语“哺乳动物”是指在分类学类别哺乳动物中的任何动物。哺乳动物可以是人类或非人类哺乳动物,例如狗、猫、猪、奶牛、绵羊、山羊、马、大鼠和小鼠。术语“受试者”并不排除在疾病或病症方面完全正常或在所有方面都正常的个体。

[0040] 本文所使用的术语“治疗有效量”是指一种或多种治疗剂的足以实现预期治疗效果并具有极小或没有不良副作用的剂量。治疗有效量可以由专业医生确定,例如通过首先施用低剂量的药理学治疗剂,然后逐渐增加剂量,直至实现所需治疗效果且具有极小或没有不良副作用。

[0041] 本文所使用的术语“治疗”疾病或障碍是指在疾病或病症发生之前或之后减轻、延迟或改善这种病症或这种疾病或病症的一种或多种症状的方法。治疗可以针对疾病的一种或多种效应或症状和/或其潜在病理。治疗可以是任何减轻,并且可以包括但不限于疾病或疾病症状的完全消除。当通过任何标准技术测量时,与同等未治疗对照相比,这种减轻或阻止程度至少为5%、10%、20%、40%、50%、60%、80%、90%、95%或100%。

[0042] 本文公开的任何组合物或方法可以与本文提供的任何其他组合物和方法中的一者或多者组合。

[0043] 同位素标记的化合物也在本公开的范围之内。本文所使用的“同位素标记的化合物”是指目前公开的化合物(包括本文所描述的每种药用盐),其中一个或多个原子被原子质量或质量数不同于通常在自然界中发现的原子质量或质量数的原子代替。可以掺入到目

前公开的化合物中的同位素的实例包括氢、碳、氮、氧、磷、氟和氯的同位素，例如分别为$^{2}H$、$^{3}H$、$^{13}C$、$^{14}C$、$^{15}N$、$^{18}O$、$^{17}O$、$^{31}P$、$^{32}P$、$^{35}S$、$^{18}F$和$^{36}Cl$。

[0044] 通过对目前公开的化合物进行同位素标记，所述化合物可用于药物和/或底物组织分布测定。氚化($^{3}H$)和碳-14($^{14}C$)标记的化合物因其易于制备和可检测性而特别优选。此外，用较重的同位素如氘($^{2}H$)取代可以提供由于更高的代谢稳定性而产生的某些治疗优势，例如体内半衰期增加或剂量需求减少，因此在某些情况下可能是优选的。目前公开的同位素标记的化合物，包括其药用盐、酯和前体药物，可以通过本领域中已知的任何手段制备。

[0045] 此外，用较重的同位素例如氘取代通常富含的氢($^{1}H$)可以提供例如由于吸收、分布、代谢和/或排泄(ADME)特性的改善而产生的某些治疗优势，产生具有改善的疗效、安全性和/或耐受性的药物。用$^{13}C$代替通常丰富的$^{12}C$也可以获得益处(参见WO 2007/005643、WO 2007/005644、WO 2007/016361和WO 2007/016431)。

[0046] 本发明的化合物在制备后，优选被分离和纯化以获得含有以重量计的量等于或大于95％(“基本上纯的”)的组合物，然后将其如本文所述进行使用或配制。在某些实施方式中，本发明的化合物的纯度超过99％。

[0047] 本文也设想了本发明的化合物的溶剂化物和多晶型物。本发明的化合物的溶剂化物包括例如水合物。

[0048] 可以采用任何适合的施用途径，例如胃肠外、静脉内、皮下、肌肉内、脑/心室内、体内、腹膜内、直肠或口服施用。对特定患者最适合的施用方式将取决于正在治疗的疾病或病症的性质和严重程度或正在使用的疗法的性质以及活性化合物的性质。

[0049] 用于口服施用的固体剂型包括胶囊、片剂、丸剂、粉剂和颗粒剂。在此类固体剂型中，将本文描述的化合物或其衍生物与至少一种惰性常规赋形剂(或载体)例如柠檬酸钠或磷酸二钙或下述物质混合：(i)填充剂或增量剂，例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖醇和硅酸，(ii)黏合剂，例如羧甲基纤维素、海藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶，(iii)保湿剂，例如甘油，(iv)崩解剂，例如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些复合硅酸盐和碳酸钠，(v)溶液缓凝剂，例如石蜡，(vi)吸收促进剂，例如季铵化合物，(vii)润湿剂，例如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯，(viii)吸附剂，例如高岭土和膨润土，以及(ix)润滑剂，例如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠，或其混合物。在胶囊、片剂和丸剂的情况下，剂型还可以包含缓冲剂。类似类型的固体组合物也可以在软胶囊和硬胶囊中用作填充剂，使用诸如乳糖或牛奶糖以及高分子量聚乙二醇等赋形剂。固体剂型例如片剂、糖衣丸、胶囊、丸剂和颗粒剂可以用包衣和壳、例如肠溶包衣和本领域已知的其它包衣和壳制备。

[0050] 用于口服施用的液体剂型包括药学上可接受的乳液、溶液、悬液、糖浆和酏剂。除了活性化合物之外，液体剂型还可以含有本领域中常用的惰性稀释剂例如水或其他溶剂、增溶剂和乳化剂例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苯甲酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油类特别是棉籽油、花生油、玉米胚芽油、橄榄油、蓖麻油、芝麻油、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇的脂肪酸酯，或这些物质的混合物等。除了此类惰性稀释剂之外，组合物还可以包括额外的试剂，例如润湿剂、乳化剂、悬浮剂、甜味剂、调味剂或芳香剂。

[0051] 本文公开的材料、组合物和组分可用于所公开的方法和组合物，可以与所公开的方法和组合物结合使用，可用于制备所公开的方法和组合物，或者是所公开的方法和组合物的产物。应当理解，当公开这些材料的组合、子集、相互作用、组等时，尽管可能没有明确公开这些化合物的每种不同的个体和集体组合和排列的具体指称，但本文具体设想并描述了每一者。例如，如果公开和讨论了一种方法，并且讨论了可以对包括在所述方法中的多个分子进行的多个修饰，除非特别相反指明，否则具体设想了所述方法以及可能的修饰的每一种组合和排列。同样，也具体设想和公开了它们的任何子集或组合。这个概念适用于本公开的所有方面，包括但不限于使用所公开的组合物的方法中的步骤。因此，如果存在可以执行的各种附加步骤，则应当理解，这些附加步骤中的每一者都可以用所公开的方法的任何特定方法步骤或方法步骤的组合来执行，并且每个这样的组合或组合的子集都被具体设想，并且应当被认为是公开的。

## 具体实施方式

[0052] 本发明提供了一种治疗各种类型的癌症的新型方法。本文公开的治疗方法和药物组合物可以在缓解或降低手术后的复发风险、提高生存率和改善治疗结果方面对癌症患者有益。本发明的方法和组合物可用于治疗多种癌症，例如肺癌、肝癌、皮肤癌、卵巢癌、前列腺癌和乳腺癌。

[0053] 营养物质的吸收对于癌细胞的快速生长至关重要。在不希望受到理论束缚的情况下，来自于外部细胞的大的营养物分子可以与癌细胞表面上的极性分子形成非共价键，以启动内吞作用。亚甲基二胺能够干扰这种键合，从而抑制吸收过程。

[0054] 正如本文中公开的，测试了亚甲基二胺二盐酸盐对癌细胞的营养物吸收的抑制及其对癌细胞增殖的影响。在不希望受到理论束缚的情况下，另一种作用机制是亚甲基二胺可以显著诱导癌细胞凋亡，这是治疗癌症的一种重要方式，其可能继发于或独立于癌细胞的吸收的抑制。此外，进行了体内研究以测试所述化合物对癌症模型的作用。结果证实，亚甲基二胺二盐酸盐在抑制癌细胞的营养物吸收中有效，并抑制癌细胞的增殖。此外，在小鼠癌症模型中，亚甲基二胺二盐酸盐在治疗癌症中有效。

[0055] 亚甲基二胺(二氨基甲烷)具有下述化学式：

[0056] $NH_2\text{-}CH_2\text{-}NH_2$

[0057] 亚甲基二胺可以以任何药学上可接受的形式，例如以酸加成盐的形式使用。示例性的酸加成盐包括二盐酸盐或亚甲基二胺二盐酸盐($CH_2(NH_2)_2 \cdot 2HCl$)。

[0058] $H_2N\overset{\frown}{}NH_2 \cdot 2HCl$

[0059] 一方面，本发明总的来说涉及一种治疗癌症或相关疾病或病症的方法。所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的包含亚甲基二胺或其药学上可接受的形式的药物组合物。

[0060] 另一方面，本发明总的来说涉及一种在缓解或手术后降低癌症复发的风险或延迟癌症复发的方法。所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的包含亚甲基二胺或其药学上可接受的形式的药物组合物。

[0061] 又一方面，本发明总的来说涉及一种在缓解或手术后预防癌症复发的方法。所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的包含亚甲基二胺或其药学上可接受的形式

的药物组合物。

[0062] 又一方面,本发明总的来说涉及一种抑制癌细胞生长的方法。所述方法包括向有需要的受试者施用包含亚甲基二胺或其药学上可接受的形式的药物组合物。

[0063] 在某些实施方式中,亚甲基二胺为药学上可接受的盐的形式。

[0064] 在某些实施方式中,亚甲基二胺为亚甲基二胺的酸加成盐(例如亚甲基二胺二盐酸盐)的形式。

[0065] 在某些实施方式中,所述治疗的癌症是实体肿瘤,例如选自由肺癌、肝癌、皮肤癌、卵巢癌、前列腺癌和乳腺癌组成的组。

[0066] 在某些实施方式中,所述治疗的癌症是血液癌,例如选自由白血病、淋巴瘤和骨髓瘤组成的组。

[0067] 在某些实施方式中,施用途径是口服、皮下、肌肉内、肿瘤内、静脉内或吸入施用。在某些实施方式中,施用途径是口服。

[0068] 在某些实施方式中,亚甲基二胺二盐酸盐以约10mg至约1,000mg(例如约10mg至约500mg、约10mg至约100mg、约50mg至约1,000mg、约100mg至约1,000mg、约500mg至约1,000mg)范围内的日剂量施用约7至约180天(例如约7至约60天、约7至约90天、约7至约120天)的时间段。在某些实施方式中,所述日剂量是固定的。在某些实施方式中,所述日剂量根据受试者对治疗的反应进行调整。

[0069] 在某些实施方式中,亚甲基二胺二盐酸盐以提高的(上升的)日剂量即增加的日剂量(例如约10mg至约1,000mg)施用一段时间(例如约7至约180天),每次根据受试者对治疗的反应进行调整。在某些实施方式中,上升的日剂量包括每隔一天将日剂量加倍。在某些实施方式中,上升的日剂量包括每三天将日剂量加倍。在某些实施方式中,上升的日剂量包括每周将日剂量加倍。

[0070] 在某些实施方式中,本发明的方法还包括向受试者施用第二疗法或第二治疗剂。

[0071] 在某些实施方式中,亚甲基二胺的施用与化学疗法、激素疗法、放射疗法和免疫疗法中的一者或多者联合提供。在某些实施方式中,所述受试者被施用化学治疗剂。在某些实施方式中,所述受试者被施用激素治疗剂。在某些实施方式中,所述受试者被施用放射疗法。在某些实施方式中,所述受试者被施用免疫疗法。

[0072] 在某些实施方式中,所述第二治疗剂是小分子剂。

[0073] 在某些实施方式中,所述第二治疗剂是蛋白质或抗体。

[0074] 在某些实施方式中,所述第二治疗剂是细胞疗法。

[0075] 又一方面,本发明总的来说涉及一种药物组合物,其包含治疗有效量的亚甲基二胺或其药学上可接受的形式以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。

[0076] 在某些实施方式中,亚甲基二胺采取药学上可接受的盐的形式。

[0077] 在某些实施方式中,亚甲基二胺采取酸加成盐(例如亚甲基二胺二盐酸盐)的形式。

[0078] 又一方面,本发明总的来说涉及一种包含本文公开的药物组合物的单剂量形式。

[0079] 在某些实施方式中,所述单剂量形式适用于口服施用。

[0080] 在某些实施方式中,所述单剂量形式为片剂或胶囊的形式。

[0081] 在某些实施方式中,所述单剂量形式为液体溶液或悬液的形式。

[0082] 又一方面,本发明总的来说涉及一种试剂盒,其包含本发明的单剂量形式和第二治疗剂的单剂量形式及其施用说明书。

[0083] 在某些实施方式中,所述第二治疗剂是用于化学疗法的治疗剂。在某些实施方式中,所述第二治疗剂是用于激素疗法的治疗剂。在某些实施方式中,所述第二治疗剂是用于免疫疗法的治疗剂。

[0084] 又一方面,本发明总的来说涉及亚甲基二胺或其药学上可接受的形式在用于治疗癌症(例如实体肿瘤)或相关疾病或病症的药物中的用途。

[0085] 又一方面,本发明总的来说涉及亚甲基二胺或其药学上可接受的形式在治疗(例如实体肿瘤)或相关疾病或病症中的用途。

[0086] 在某些实施方式中,亚甲基二胺与第二疗法或第二治疗剂(例如化学疗法、激素疗法、放射疗法或免疫疗法治疗剂)联合使用。

[0087] 化学治疗剂的实例包括埃罗替尼(TARCEVA®,Genentech/OSI Pharm.)、硼替佐米(VELCADE®,Millennium Pharm.)、氟维司群(FASLODEX®,AstraZeneca)、索坦(SU11248,Pfizer)、来曲唑(FEMARA®,Novartis)、甲磺酸伊马替尼(GLEEVEC®,Novartis)、PTK787/ZK 222584(Novartis)、奥沙利铂(Eloxatin®,Sanofi)、5-FU(5-氟尿嘧啶)、甲酰四氢叶酸、雷帕霉素(Sirolimus,RAPAMUNE®,Wyeth)、拉帕替尼(TYKERB®,GSK572016,Glaxo Smith Kline)、洛那法尼(SCH 66336)、索拉非尼(BAY43-9006,Bayer Labs)和吉非替尼(IRESSA®,AstraZeneca)、AG1478、AG1571(SU 5271,Sugen),烷化剂例如噻替哌和CYTOXAN®环磷酰胺,烷基磺酸酯例如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡,氮丙啶类例如苯并多巴、卡波醌、美妥替哌和乌瑞替哌,乙烯亚胺类和甲基蜜胺类包括六甲蜜胺、三亚乙基蜜胺、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺和三羟甲基蜜胺,番荔枝内酯类(特别是布拉它辛和布拉它辛酮),喜树碱类(包括合成类似物拓扑替康),苔藓抑素,callystatin,CC-1065(包括其阿多来新、卡折来新和比折来新合成类似物),念珠藻素类(特别是念珠藻素1和念珠藻素8),尾海兔素,多卡霉素(包括合成类似物,KW-2189和CB1-TM1),五加素,水鬼蕉碱,匍枝珊瑚醇,海绵抑制素,氮芥类例如苯丁酸氮芥、萘氮芥、氯磷酰胺、雌莫司汀、异环磷酰胺、氮芥、盐酸甲氧氮芥、马法兰、新恩比兴、苯芥胆甾醇、泼尼莫司汀、曲洛磷胺、乌拉莫司汀,亚硝基脲类例如卡莫司汀、氯脲霉素、福莫司汀、洛莫司丁、尼莫司汀和雷莫司汀,抗生素类例如烯二炔类抗生素(例如加利车霉素,特别是加利车霉素γII和加利车霉素ωII(Angew Chem.Intl.Ed.Engl.(1994)33:183-186),动力霉素包括动力霉素A,二膦酸盐类例如氯膦酸盐,埃斯佩拉霉素,以及新制癌菌素发色团和相关的色蛋白烯二炔抗生素发色团)、阿克拉霉素类、放线菌素、安曲霉素、重氮丝氨酸、博来霉素类、放线菌素C、卡柔比星、洋红霉素、嗜癌素、色霉素(chromomycinis)、放线菌素D、柔红霉素、地托比星、6-重氮基-5-酮基-L-正亮氨酸、ADRIAMYCIN®(多柔比星)、吗啉代-多柔比星、氰基吗啉代-多柔比星、2-吡咯啉代-多柔比星和脱氧多柔比星)、表柔比星、伊索比星(esonibicin)、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素类例如丝裂霉素C、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素类、培洛霉素、泊非霉素、嘌呤霉素、奎拉霉素、罗多比星、链黑霉素、链脲佐菌素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星,抗代谢物例如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU),叶

酸类似物例如二甲叶酸、甲氨蝶呤、蝶罗呤、三甲曲沙,嘌呤类似物例如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤,嘧啶类似物例如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮杂尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、二脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷,雄激素类例如卡鲁睾酮、丙酸屈他雄酮、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯,抗肾上腺素类例如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦,叶酸补充剂例如亚叶酸,醋葡醛内酯,醛磷酰胺糖苷,氨基乙酰丙酸,恩尿嘧啶,安吖啶,倍曲布西(bestrabucil),比生群,依达曲沙,地磷酰胺,秋水仙胺,地吖醌,依氟鸟氨酸,依利醋铵,埃博霉素,依托格鲁,硝酸镓,羟基脲,香菇多糖,氯尼达明,美登素类例如美登素和安丝菌素,米托胍腙,米托蒽醌,莫哌达醇,二胺硝吖啶,喷司他丁,蛋氨氮芥,吡柔比星,洛索蒽醌,鬼臼酸,2-乙肼,丙卡巴肼,PSK®多糖复合物(JHS Natural Products,Eugene,Oreg.),雷佐生,利索新,西佐喃,锗螺胺,细交链孢菌酮酸,三亚胺醌,2,2',2″-三氯三乙胺,单端孢霉烯类(特别是T-2毒素、疣疱菌素A、杆孢菌素A和蛇形菌素),乌拉坦,长春地辛,达卡巴嗪,甘露醇氮芥,二溴甘露醇,二溴卫矛醇,哌泊溴烷,gacytosine,阿糖胞苷("Ara-C"),环磷酰胺,噻替哌,紫杉烷类例如TAXOL®(紫杉醇,Bristol-Myers Squibb Oncology,Princeton,N.J.)、ABRAXANE®(无Cremophor)、紫杉醇的白蛋白工程化纳米粒子剂型(American Pharmaceutical Partners,Schaumberg,111.)和TAXOTERE®(多西他赛,Rhone-Poulenc Rorer,Antony,France),苯丁酸氮芥,GEMZAR®(吉西他滨),6-硫鸟嘌呤,巯基嘌呤,甲氨蝶呤,长春碱,依托泊苷(VP-16),异环磷酰胺,米托蒽醌,长春新碱,NAVELBINE®(长春瑞滨),米托蒽醌,替尼泊苷,依达曲沙,柔红霉素,氨基蝶呤,卡培他滨(XELODA®),伊班膦酸盐,CPT-11,拓扑异构酶抑制剂RFS2000,二氟甲基鸟氨酸(DMFO),视黄醇类例如视黄酸,以及任何上述物质的药学上可接受的盐、酸和衍生物。

[0088] 下面的实施例意在说明本发明的实践,并且不以任何方式限制。

[0089] 实施例

[0090] 在2种癌细胞系中测试了亚甲基二胺(二盐酸盐)对癌细胞的吸收的抑制(实施例1)。测试了这种药物对癌细胞增殖的抑制(实施例2)。亚甲基二胺二盐酸盐也在黑素瘤和肺癌中诱导细胞凋亡(细胞死亡)(实施例3)。在3种细胞系中观察到血液癌的抑制(实施例4)。此外,使用肝癌的动物模型进行了疗效研究(实施例5)。计算了在动物治疗中的剂量以预测用于人类的相关剂量。

[0091] 实施例1.亚甲基二胺二盐酸盐抑制癌细胞对荧光葡聚糖的吸收

[0092] 试剂:荧光葡聚糖、Alexa Fluor 600、目录号为AF 488(MA1065A488)的网格蛋白重链抗体、Hoechst#62249和PBS中的阻断缓冲液均来自于Thermo Fisher。葡聚糖被用作标志物以测试癌细胞的吸收。

[0093] 将癌细胞系H1299(肺癌)和SNU499(肝癌)用DMEM+10%FBS在带有14mm底部微孔板的Mat Tek 35mm培养皿中,以5x$10^4$/板培养24小时,然后用DMEM清洗。在DMEM中添加含有或不含100μM亚甲基二胺盐酸盐的荧光葡聚糖,在37℃下在$CO_2$培养箱中培养30分钟;然后用PBS清洗。将细胞用4%聚甲醛的PBS溶液在室温下固定15分钟,并用3%BSA的PBS溶液在室温下封闭30分钟。将细胞用网格蛋白重链单克隆抗体、AlexaFluor 488以5μg/mL的稀释度在封闭缓冲液中,在室温下避光染色1小时。将细胞核(蓝色)用Hoechst染料在封闭缓冲液中以1:10,000的稀释度在室温下染色5分钟。在共聚焦显微镜Leica TCS SP8上获取图像。

[0094] 如图1中所示,在添加亚甲基二胺二盐酸盐后代表葡聚糖的红色明显降低。所述研究揭示了亚甲基二胺二盐酸盐可以有效抑制两种类型的癌细胞(肺癌和肝癌)对葡聚糖的吸收。

[0095] 实施例2.亚甲基二胺二盐酸盐抑制癌细胞生长(增殖)

[0096] 将癌细胞系在添加有10%胎牛血清(FBS)和100U/mL青霉素-链霉素的DMEM中,于添加有5%$CO_2$的加湿37℃培养箱中培养。使用MTT增殖试剂盒(Sigma)分析细胞增殖。简单来说,将细胞在96孔板中铺板(每孔$5.0\times10^3$个细胞),并允许其附着过夜。然后在测定前将细胞用不同浓度(0、1μM、50μM、100μM、250μM、500μM和1mM)的亚甲基二胺二盐酸盐处理24小时。在温育期后,向每个孔添加10μL MTT标记试剂(终浓度为0.5mg/mL)。将微孔板在潮湿环境(37℃,5%$CO_2$)中温育4小时。在每个孔中添加100μL增溶溶液。允许板在培养箱中,在潮湿气氛(37℃,5%$CO_2$)中静置过夜。检查紫色甲瓒晶体的完全溶解,并使用微孔板读板器以570nm的波长测量样品的吸光度。

[0097] 如图2中所示,亚甲基二胺二盐酸盐在50μM的浓度下开始抑制大部分癌细胞的生长,并在高于100μM时以剂量依赖性方式显著抑制增殖。

[0098] 实施例3.亚甲基二胺二盐酸盐诱导黑素瘤和肺癌细胞凋亡(细胞死亡)

[0099] 细胞凋亡试剂盒购自Invitrogen,批号为2208491。该研究按照公司的方案进行。将H1299和C8161细胞在不含或含有100μM或500μM药物的DMEM/FBS培养基中培养,在24小时后收获,并用冷磷酸盐缓冲盐水(PBS)清洗。制备1X膜联蛋白结合缓冲液:向4mL去离子水添加1mL 5X膜联蛋白结合缓冲液。将清洗过的细胞再次离心。舍弃上清液,并将细胞重悬在1X膜联蛋白结合缓冲液中。测定细胞密度,并在1X膜联蛋白结合缓冲液中稀释到~$1\times10^6$个细胞/mL,并制备的体积足以使每个测定为100μL。向每个100μL细胞悬液添加5μLAlexa Fluor®488膜联蛋白V,并将细胞在室温下温育15分钟。在温育期后,添加400μL 1X膜联蛋白结合缓冲液,轻柔混合并置于冰上。使用流式细胞术分析染色的细胞,并在530nm处测量荧光发射。如图3中所示,与对照相比,亚甲基二胺二盐酸盐刺激更多的细胞发出荧光,这表明更多细胞发生细胞凋亡。在更高的500μM药物浓度下,观察到比100μM时更多的荧光。该结果显示,亚甲基二胺二盐酸盐以剂量依赖性方式显著诱导这两种癌细胞凋亡。

[0100] 实施例4.血液癌细胞的抑制

[0101] 将每种细胞系的50000个细胞铺于24孔板的每个孔中,用不同浓度的亚甲基二胺盐酸盐(作为对照的0、50μM、100μM和500μM)处理24小时,然后对活细胞进行计数。Jurkat:T细胞白血病,HL-60:急性白血病细胞;MV-411:B-粒单核细胞白血病。

[0102] 在图4中,四个柱子代表在不同浓度的亚甲基二胺盐酸盐下活细胞的数量:从左到右,当浓度提高时,对于所有三种血液癌细胞系观察到更少的活细胞。在更高浓度下,抑制以剂量依赖性方式更加显著。这显示了亚甲基二胺盐酸盐对三种血液癌细胞(Jurkat、HL-60和MV-411)的显著抑制。

[0103] 实施例5.在肝癌的小鼠模型中亚甲基二胺二盐酸盐抑制肿瘤生长

[0104] 将H22这种来自于ATCC的小鼠肝癌细胞系在含有10%BSA的1640培养基中,于37℃和5%$CO_2$下培养。48小时后收获细胞,并用培养基稀释到$1x10^6$个细胞/mL。将体重为20至23克的雄性昆明小鼠用于体内研究。在整个研究中允许动物自由取用食物和水。本文描述的所有实验方案均得到动物实验伦理审查委员会批准。将0.2mL$1\times10^6$/ml的细胞悬液接种到

昆明小鼠的腹腔中。5天后移植H22腹水。收获腹水中的H22细胞，用灭菌NS稀释到$1\times10^7$/mL的浓度，然后将0.2mL皮下注射到小鼠的右腋下区域中。5天后可以观察到移植的肿瘤。将动物随机分为3组，每组7只小鼠，并每天通过口服接受药物。第1组：生理盐水；第2组：120mg/Kg的低剂量亚甲基二胺二盐酸盐；第3组：240mg/Kg的高剂量亚甲基二胺二盐酸盐。在第3天、第6天和第9天测量每只小鼠中皮下移植肿瘤的两个垂直尺寸(长度和宽度)，以计算肿瘤体积，将其在各组之间进行比较(体积＝1/2×长度×宽度$^2$)。如表1中所示，亚甲基二胺二盐酸盐在小鼠肝癌模型中成功地抑制肿瘤生长，该抑制是剂量依赖性的。肿瘤抑制率计算方法是：生理盐水组中的肿瘤体积减去亚甲基二胺二盐酸盐治疗组中的肿瘤体积，然后除以生理盐水组的肿瘤体积。亚甲基二胺二盐酸盐在较低剂量下达到30.5%的肝癌抑制，在较高剂量下达到36.8%的肝癌抑制。

[0105] 表1.亚甲基二胺二盐酸盐在小鼠中抑制肝癌的肿瘤生长

[0106]

| | 第3天 | 第6天 | 第9天 | 第9天的肿瘤抑制率 |
|---|---|---|---|---|
| 生理盐水 | 0.47 | 1.19 | 1.74 | - |
| 亚甲基二胺二盐酸盐 120 mg/Kg | 0.43 | 0.85 | 1.21 | 30.5% |
| 亚甲基二胺二盐酸盐 240 mg/Kg | 0.41 | 0.78 | 1.10 | 36.8% |

[0107] 注射亚甲基二胺二盐酸盐后的平均肿瘤体积($cm^3$)

[0108] 申请人的公开内容在本文中参考附图的优选实施方式中进行了描述，其中相同的数字表示相同或相似的要素。在整个本说明书中，对“一个实施方式”、“实施方式”或类似语言的引用意味着与所述实施方式相结合描述的特定特点、结构或特征被包括在本发明的至少一个实施方式中。因此，在整个本说明书中短语“在一个实施方式中”、“在实施方式中”和类似语言的出现可能但不一定都指称同一实施方式。

[0109] 申请人的公开内容的描述的特点、结构或特征可以以任何适合的方式组合在一个或多个实施方式中。在本文的描述中，叙述了大量具体细节以提供对本发明的实施方式的全面理解。然而，相关领域的技术人员将会认识到，本申请人的组合物和/或方法可以在不具有一个或多个所述具体细节的情况下，或使用其他方法、组分、材料等来实践。在其他情况下，公知的结构、材料或操作没有详细示出或描述，以避免使本公开的各个方面模糊不清。

[0110] 除非另有定义，否则本文中使用的所有技术和科学术语均具有与本领域普通技术人员通常理解的相同的含义。尽管与本文中描述的相似或等效的任何方法和材料也可用于本公开的实践或试验，但现在描述了优选的方法和材料。除了所公开的特定顺序之外，本文叙述的方法可以以逻辑上可行的任何顺序进行。

[0111] 通过引用并入

[0112] 本公开中参考和引用了其他文件例如专利、专利申请、专利出版物、期刊、书籍、论

文、网页内容。出于所有目的，所有此类文件通过引用整体并入本文。任何被称为通过引用并入本文但与现有定义、陈述或本文明确阐述的其他公开材料相冲突的材料或其部分，仅在所并入的材料与本公开的材料之间不产生冲突的范围内被并入。在发生冲突的情况下，冲突将以有利于本公开作为优选公开的方式解决。

[0113] 等同性

[0114] 代表性实例旨在帮助说明本发明，不旨在并且也不应被解释为限制本发明的范围。事实上，对于本领域技术人员来说，除了本文中示出和描述的之外，本发明的各种修改及其许多进一步的实施方式从本文件的全部内容，包括本文中包含的实施例和对科学和专利文献的引用，将变得显而易见。所述实施例含有重要的附加信息、例证和指南，它们可以被改编以在其各种实施方式及其等同物中适应于本发明的实践。

癌细胞对荧光葡聚糖的吸收的共聚焦研究

*Md 可以有效抑制癌细胞对葡聚糖（红色）的吸收*

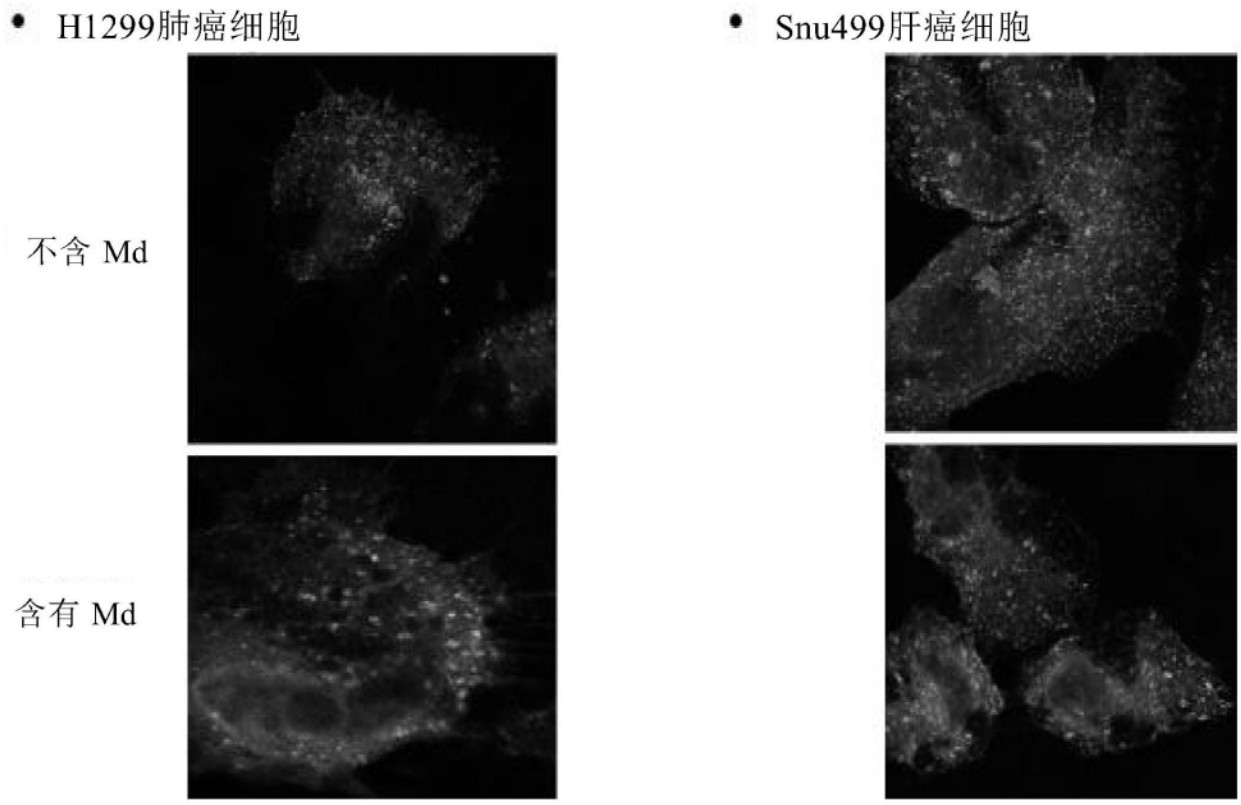



图1

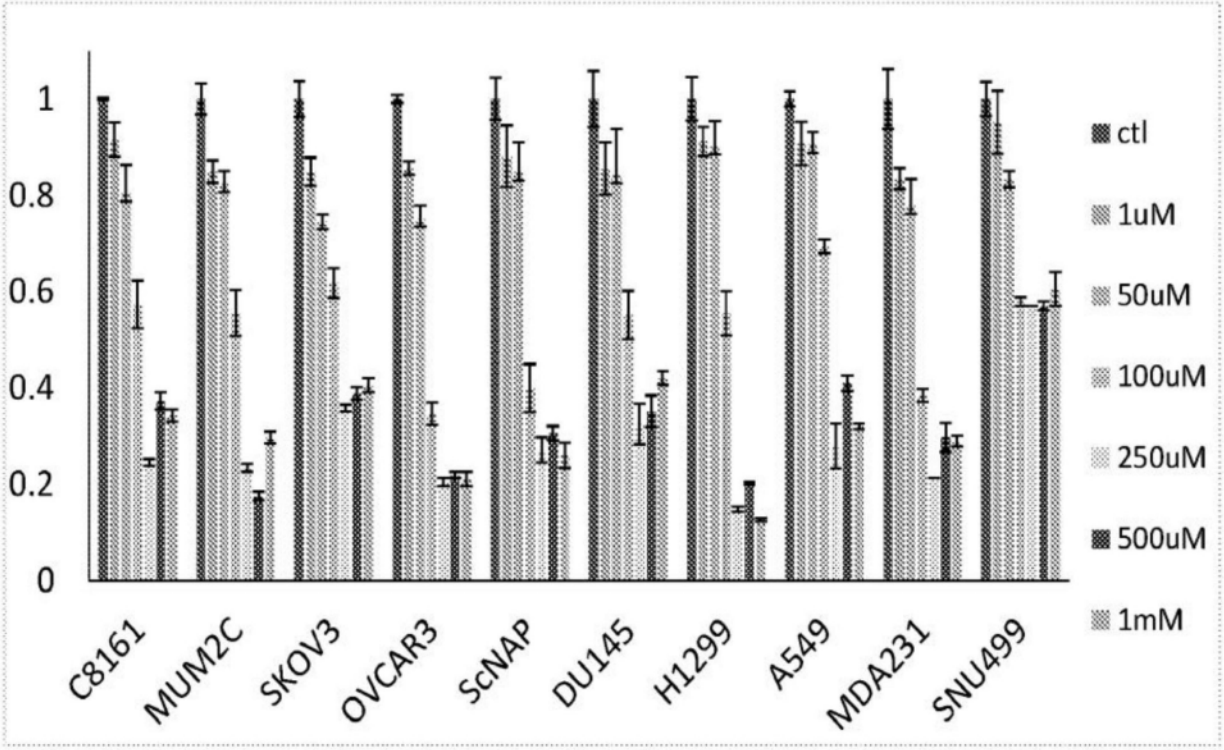

1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
ctl
1uM
50uM
100uM
250uM
500uM
1mM
C8161
MUM2C
SKOV3
OVCAR3
ScNAP
DU145
H1299
A549
MDA231
SNU499

图2

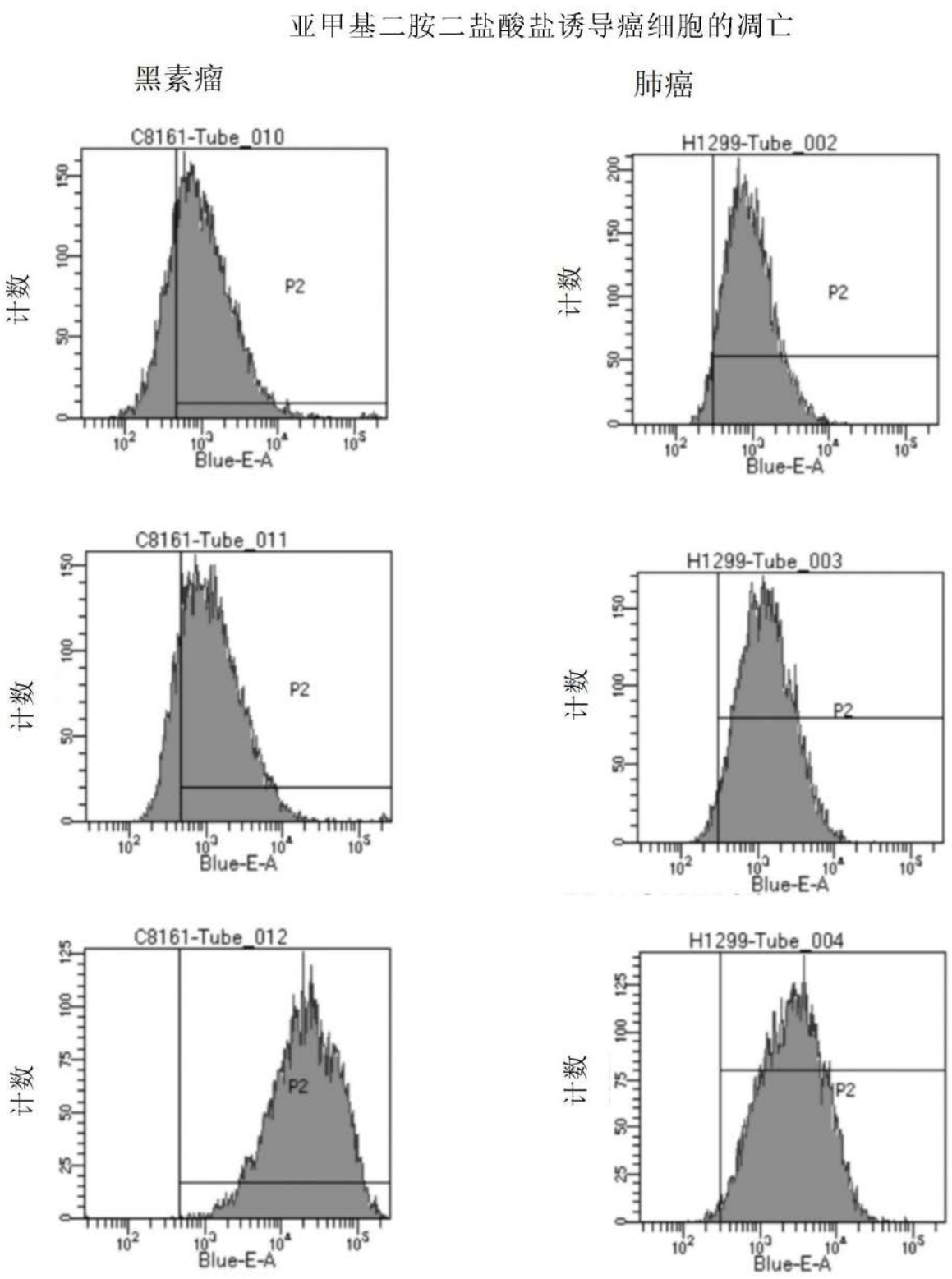

亚甲基二胺二盐酸盐诱导癌细胞的凋亡
黑素瘤
肺癌
C8161-Tube_010
H1299-Tube_002
C8161-Tube_011
H1299-Tube_003
C8161-Tube_012
H1299-Tube_004
计数
Blue-E-A
P2

图3

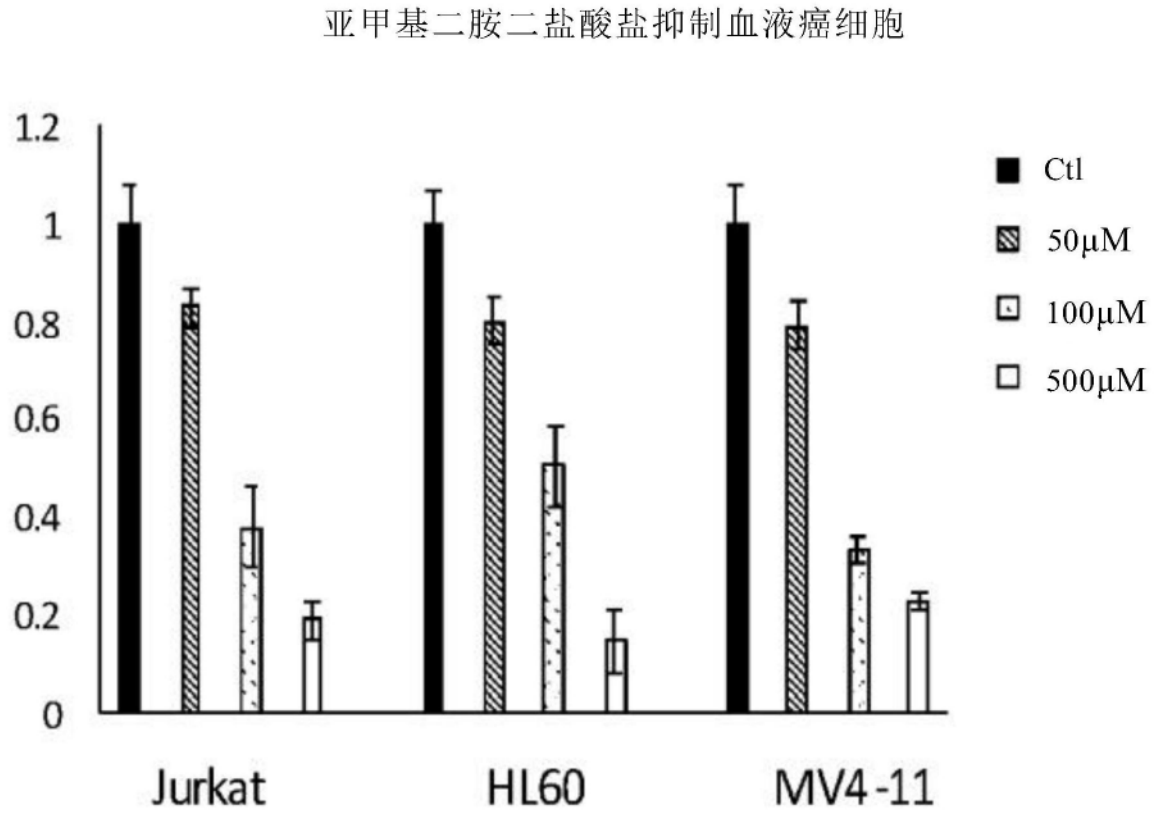

亚甲基二胺二盐酸盐抑制血液癌细胞
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Jurkat
HL60
MV4-11
Ctl
50μM
100μM
500μM

图4