



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107311969 B

(45) 授权公告日 2022.01.28

(21) 申请号 201710613672.3

(51) Int.Cl.

(22) 申请日 2011.03.21

C07D 307/92 (2006.01)

A61K 31/343 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61P 35/00 (2006.01)

申请公布号 CN 107311969 A

审查员 徐建国

(43) 申请公布日 2017.11.03

(30) 优先权数据

61/315,890 2010.03.19 US

61/315,886 2010.03.19 US

61/325,814 2010.04.19 US

(62) 分案原申请数据

201180023107.2 2011.03.21

(73) 专利权人 北京强新生物科技有限公司

地址 100083 北京市海淀区学院路30号科

大天工大厦B座8层01-15室

(72) 发明人 李嘉强 D.勒格特 李有志 李微

权利要求书2页 说明书62页 附图24页

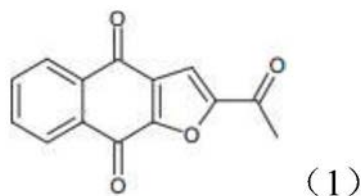
(54) 发明名称

靶向癌症干细胞的新的化合物和组合物

(57) 摘要

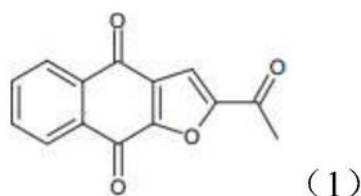
本发明提供了萘并呋喃化合物、萘并呋喃化合物的多晶型物、颗粒形式的萘并呋喃化合物、含有一或多种萘并呋喃化合物的纯组合物、含有颗粒形式的一或多种萘并呋喃化合物的纯组合物、制备这些萘并呋喃化合物、多晶型物、纯组合物和/或颗粒形式的方法和使用这些萘并呋喃化合物、多晶型物、纯组合物和/或颗粒形式来治疗需要其的患者的方法。

## 1. 一种包含化合物1



的组合物,其中该组合物中化合物1的纯度大于或等于99.5%,该组合物包含至多0.5%的杂质是一或多种选自下列的杂质:2-乙酰基-2,3-二氢萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2,6-二乙酰基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2,7-二乙酰基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,3-乙酰基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二醇和1-(4,9-二羟基-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙酮,其中纯度是采用高效液相色谱(HPLC)测定的;所述化合物1为化合物1的多晶型物,其特征为X射线衍射图包括在大约下列 $2\theta$ 角度处的峰:10.2,11.4,11.9,14.1,14.5,17.3,21.0,22.2,24.0,26.0和28.1度。

## 2. 一种包含化合物1



的组合物,其中该组合物中化合物1的纯度大于或等于99.5%,该组合物包含至多0.5%的杂质是一或多种选自下列的杂质:2-乙酰基-2,3-二氢萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2,6-二乙酰基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2,7-二乙酰基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,3-乙酰基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二醇和1-(4,9-二羟基-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙酮,其中纯度是采用高效液相色谱(HPLC)测定的;所述化合物1为化合物1的多晶型物,其特征为X射线衍射图包括在大约下列 $2\theta$ 角度处的峰:7.5,9.9,11.4,12.3,15.0,23.0,23.3,24.1,24.6,25.0,26.1,27.0和28.4度。

3. 权利要求1或2的组合物,其中该组合物的纯度大于或等于99.8%。

4. 权利要求1或2的组合物,其中该组合物的纯度大于或等于99.9%。

5. 权利要求1或2的组合物,其中该组合物包含的每个单一杂质少于或等于0.2%。

6. 权利要求1或2的组合物,其中化合物为颗粒形式。

7. 权利要求1至6任一项的组合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途,所述药物以治疗有效量向患者施用,所述癌症与STAT3的超表达相关。

8. 权利要求1至6任一项的组合物,或其可药用盐在制备用于延长癌症患者的无进展生存期(PFS)药物中的应用,所述药物以治疗有效量向患者施用,所述癌症与STAT3的超表达相关。

9. 权利要求7或8的用途,其中癌症选自结肠直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、头颈部肿瘤、黑色素瘤、胃腺癌、肺癌、前列腺癌、胰腺癌、肾细胞癌、肝细胞癌、子宫颈癌、肉瘤、脑肿瘤、眼癌、胆囊癌、垂体瘤、唾液腺癌、鼻咽癌、子宫内膜癌、多发性骨髓瘤、白血病、淋巴瘤和肾上腺类皮质激素癌。

10. 权利要求7或8的用途,其中癌症选自血管肉瘤。
11. 权利要求7或8的用途,其中癌症选自耐药性癌症、复发性癌症和转移性癌症。

## 靶向癌症干细胞的新的化合物和组合物

[0001] 本申请是申请号为“201180023107.2”，发明名称为“靶向癌症干细胞的新的化合物和组合物”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本专利申请要求美国临时专利申请61/315,886 (2010年3月19日申请)、美国临时专利申请61/315,890 (2010年3月19日申请) 和美国临时专利申请61/325,814 (2010年4月19日申请) 的优先权。将每个这些申请的内容以引证的方式全部结合到本文中。

[0004] 本发明的领域

[0005] 本发明提供了萘并呋喃化合物、萘并呋喃化合物的多晶型物、颗粒形式的萘并呋喃化合物、含有一或多种萘并呋喃化合物的纯组合物、含有颗粒形式的一或多种萘并呋喃化合物的纯组合物、制备这些萘并呋喃化合物、多晶型物、纯组合物和/或颗粒形式的方法和使用这些萘并呋喃化合物、多晶型物、纯组合物和/或颗粒形式来治疗需要其的患者的方法。

[0006] 本发明的背景

[0007] 仅仅在美国，癌症造成的死亡数量每年就有数十万 (hundreds of thousands) 人。虽然在通过手术、放疗和化疗来治疗某些形式的癌症方面取得了进展，但许多类型的癌症基本上是不能治愈的。即使当可以有效治疗特定癌症的时候，这种治疗的副作用可能是严重的，并且导致生活质量的显著降低。

[0008] 大部分常规化疗药剂具有毒性和有限效果，尤其对于晚期实质固态瘤患者。化学治疗剂损伤非癌性以及癌性细胞。这种化合物的治疗指数 (区分癌性细胞和正常细胞的治疗能力的量度) 可能非常低。通常，有效杀死癌细胞的化疗药物的剂量还杀死正常细胞，尤其是进行频繁细胞分裂的那些正常细胞 (例如上皮细胞)。当正常细胞受到治疗的影响时，可能出现副作用，例如脱发、抑制血细胞生成和恶心。根据患者的常规健康情况，这种副作用妨碍化疗，或至少对于患者来说是极其不愉快和不舒服的，并且严重地降低癌症患者剩余生命的生活质量。即使对于对化疗作出反应的癌症患者出现肿瘤衰退，这种肿瘤响应通常不会延长无疾病进展存活率 (PFS) 或不会延长整体存活率 (OS)。事实上，在对化疗产生初始响应之后，癌症通常快速发展，并且形成更多的转移病变。这种复发性的癌症对化疗药物变得高度耐受性，或用化疗药物难以治疗。人们认为，化疗之后的这种快速复发和顽固性是由癌症干细胞所引起的。

[0009] 最近的研究证明了具有自我更新能力的癌症干细胞 (CSC，还称为肿瘤起始细胞或癌症干细胞样细胞) 的存在，并且认为其基本上对恶性生长、复发和转移病变负责。重要的是，CSC对常规治疗具有内在的耐受性。因此，对于癌症患者来说，针对癌症干细胞具有活性的靶向药剂是巨大的希望 (J Clin Oncol.2008Jun 10;26 (17))。因此，常规化疗可以杀死大部分癌细胞，但留下癌症干细胞。通过化疗减少非干细胞的常规癌细胞之后，癌症干细胞可以生长更快，人们认为这是化疗之后快速复发的机理。

[0010] STAT3是在对促进增殖、存活及其它生物过程的细胞因子和/或生长因子的响应过程中被激活的癌基因。通过生长因子受体酪氨酸激酶、Janus激酶或Src家族激酶介导的关

键酪氨酸残基的磷酸化, STAT3被激活。一旦酪氨酸磷酸化, STAT3形成均二聚体, 并且移位至核中, 与靶基因启动子中的特异性DNA响应要素结合, 诱导基因表达。STAT3激活参与肿瘤生成、侵入和转移病变的基因, 包括Bcl-x1、Akt、c-Myc、细胞周期蛋白D1、VEGF和存活素。STAT3在各种人类癌症中具有异常的活性, 包括所有主要癌以及一些血液肿瘤。持续活性的STAT3出现在一半以上的乳房和肺癌、结肠直肠癌、卵巢癌、肝细胞癌和多发性骨髓瘤等中; 并且出现在95%以上的头/颈癌症中。STAT3被认为是癌细胞耐药性的主要机理之一。然而, 对于发现药物抑制剂来说, 它们难以靶向STAT3。在该行业经过十年努力之后, 迄今为止, 还没有确定具有临床相关效能的STAT3的直接抑制剂。

[0011] 相应地, 还需要发现选择性靶向癌细胞、靶向癌干细胞和抑制STAT3的化合物和药物组合物, 以及制备临床应用的这些化合物和药物组合物的方法。

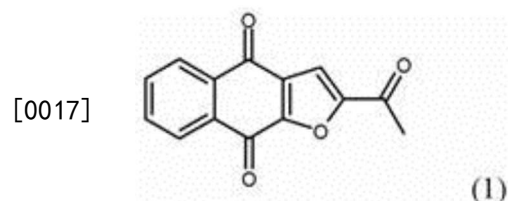
[0012] 本文所列举的参考文献不被认为是所要求保护的发明的现有技术。

[0013] 概述

[0014] 本发明提供了萘并呋喃化合物、萘并呋喃化合物的多晶型物、含有一或多种萘并呋喃化合物的纯组合物和颗粒形式的萘并呋喃化合物。这些萘并呋喃化合物(包括颗粒形式的)、多晶型物和纯组合物是癌干细胞和STAT3的选择性抑制剂。WO 2009/036099和WO 2009/036101公开了萘并呋喃化合物靶向癌干细胞。通过抑制STAT3, 它还抑制非癌干细胞的癌细胞。在某些接触条件下, 那些化合物能够杀死许多不同类型的癌细胞, 不会破坏正常细胞。因此, 该化合物可以用于治疗癌症, 尤其用于治疗 and 预防难治疗的、复发性的、转移性的癌症, 或STAT3表达的癌症。本公开还描述了制备萘并呋喃化合物、其衍生物和中间体和相关化合物的药物组合物的方法。

[0015] 本文描述的这些萘并呋喃化合物(包括颗粒形式的)、多晶型物和纯组合物可有效用于各种适应症, 包括, 例如, 治疗细胞增殖病症、延迟细胞增殖病症的进展, 防止细胞增殖病症的复发, 或减轻细胞增殖病症的症状。例如, 该萘并呋喃化合物(包括颗粒形式的)、多晶型物和纯组合物可有效用于治疗癌症、延迟癌症的进展、防止癌症的复发、减轻癌症的症状或者另一方面改善癌症。

[0016] 在一些实施方案中, 该萘并呋喃化合物是如下所示的化合物的多晶型物, 本文称为“化合物1”,



[0018] 例如, 在一些实施方案中, 多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物, 其特征为: X射线衍射图基本上与图1所列出的X射线衍射图相似。如下进行图1所示的X射线粉末衍射分析: 使用Philips PW1800衍射器, 使用Cu辐射, 40KV/30mA, 在5°至70°范围内, 步长0.03°, 统计时间3小时。使用下列条件, 从2-45°2θ进行分析: 发散狭缝: 0.6mm, 防散射狭缝: 0.6mm, 接收狭缝: 0.1mm, 探测器狭缝: 0.6mm, 步长: 0.02°, 脉冲时间(step time): 5秒钟。在一些实施方案中, 多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物, 其特征为: X射线衍射图基本上与图2所列出的X射线衍射图相似。在

一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图基本上与图3所列出的X射线衍射图相似。使用Bruker D8Advance衍射器,进行图2和3所示的X射线粉末衍射分析。使用下列条件,从2-45°2 $\theta$ 进行分析:发散狭缝:0.6mm,防散射狭缝:0.6mm,接收狭缝:0.1mm,探测器狭缝:0.6mm,步长:0.02°,脉冲时间:5秒钟。

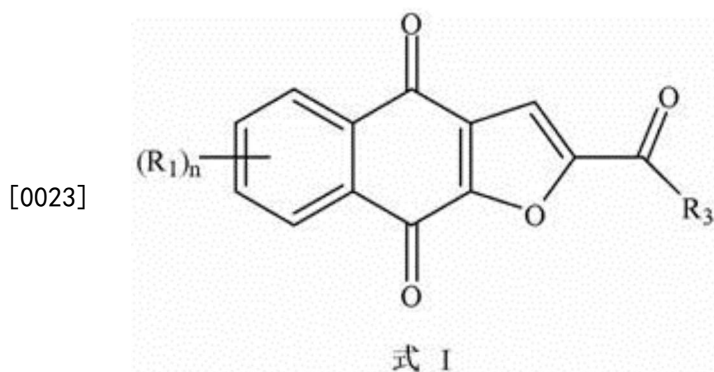
[0019] 例如,在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约下列2 $\theta$ 角度处包括一个或多个峰:10.2, 11.4, 11.9, 14.1, 14.5, 17.3, 21.0, 22.2, 24.0, 26.0和28.1度。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约下列2 $\theta$ 角度处包括一个或多个峰:10.2, 11.9, 14.1, 14.5, 17.3, 22.2和/或28.1度。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约10.2度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约11.9度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约14.1度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约14.5度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约17.3度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约22.2度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约28.1度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰:至少在大约10.2度2 $\theta$ 处的峰,至少在大约11.9度2 $\theta$ 处的峰,至少在大约14.1度2 $\theta$ 处的峰,至少在大约14.5度2 $\theta$ 处的峰,至少在大约17.3度2 $\theta$ 处的峰,至少在大约22.2度2 $\theta$ 处的峰,至少在大约28.1度2 $\theta$ 处的峰和其任何组合。

[0020] 例如,在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约下列2 $\theta$ 角度处包括一个或多个峰:7.5, 9.9, 11.4, 12.3, 15.0, 23.0, 23.3, 24.1, 24.6, 25.0, 26.1, 27.0和28.4度。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约下列2 $\theta$ 角度处包括一个或多个峰:7.5, 9.9, 12.3, 15, 23.0, 23.3, 24.6和/或28.4度。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约7.5度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约9.9度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约12.3度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约15度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大

约23度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约23.3度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约24.6度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约28.4度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰:至少在大约7.5度2 $\theta$ 处的峰,至少在大约9.9度2 $\theta$ 处的峰,至少在大约15度2 $\theta$ 处的峰,至少在大约12.3度2 $\theta$ 处的峰,至少在大约23.0度2 $\theta$ 处的峰,至少在大约23.3度2 $\theta$ 处的峰,至少在大约24.6度2 $\theta$ 处的峰和至少在大约28.4度2 $\theta$ 处的峰和其任何组合。

[0021] 本发明还提供了颗粒形式的萘并呋喃化合物。例如,颗粒形式的萘并呋喃化合物是如下所示的式I化合物的颗粒,其是活性的,即,具有体内抗肿瘤效果和/或抗肿瘤活性。有效的颗粒对粒径具有限定要求,例如,具有小于或等于大约200 $\mu\text{m}$ 、大约150 $\mu\text{m}$ 、大约100 $\mu\text{m}$ 、大约40 $\mu\text{m}$ 、或大约20 $\mu\text{m}$ 、大约10 $\mu\text{m}$ 、大约5 $\mu\text{m}$ 、大约4 $\mu\text{m}$ 、大约3 $\mu\text{m}$ 、大约2 $\mu\text{m}$ 、大约1 $\mu\text{m}$ 、大约0.5 $\mu\text{m}$ 或大约0.2 $\mu\text{m}$ 的直径。比限定粒径大的颗粒是非活性的或活性较小。

[0022] 在一些实施方案中,颗粒形式的萘并呋喃化合物是按照式I的化合物或其盐或溶剂化物的颗粒,



[0024] 其中颗粒具有小于或等于大约200 $\mu\text{m}$ 的直径;其中每个(R<sub>1</sub>)独立地选自:氢,卤素,氟,氰基,硝基,CF<sub>3</sub>,OCF<sub>3</sub>,烷基,甲基,取代的烷基,烯基,取代的烯基,炔基,取代的炔基,环烷基,取代的环烷基,环烯基,取代的环烯基,杂环,取代的杂环,芳基,取代的芳基,OR<sub>a</sub>,SR<sub>a</sub>和NH<sub>2</sub>;其中n是4;其中R<sub>3</sub>选自:氢,卤素,氟,氰基,CF<sub>3</sub>,OCF<sub>3</sub>,烷基,甲基,取代的烷基,卤素取代的烷基,羟基取代的烷基,胺取代的烷基,烯基,取代的烯基,炔基,取代的炔基,环烷基,取代的环烷基,环烯基,取代的环烯基,杂环,取代的杂环,芳基,取代的芳基,OR<sub>a</sub>,SR<sub>a</sub>和NR<sub>b</sub>R<sub>c</sub>;其中R<sub>a</sub>独立地选自:氢,烷基,取代的烷基,烯基,取代的烯基,炔基,取代的炔基,环烷基,取代的环烷基,环烯基,取代的环烯基,杂环,取代的杂环,芳基和取代的芳基;其中R<sub>b</sub>和R<sub>c</sub>独立地选自:氢,烷基,取代的烷基,环烷基,取代的环烷基,杂环,取代的杂环,芳基和取代的芳基,或R<sub>b</sub>和R<sub>c</sub>与它们键合的N一起形成杂环或取代的杂环。

[0025] 在一些实施方案中,每个(R<sub>1</sub>)独立地选自:氢,甲基,F(氟),Cl,Br,I,OH和NH<sub>2</sub>;R<sub>3</sub>选自甲基和C(R<sub>8</sub>)<sub>3</sub>,每个(R<sub>8</sub>)独立地选自氢,甲基,F(氟),Cl,Br,I,OH和NH<sub>2</sub>。在一些实施方案中,(R<sub>1</sub>)和(R<sub>8</sub>)中至多两个是F(氟),其余的是氢。在一些实施方案中,R<sub>3</sub>是甲基。在进一步实施方案中,化合物选自2-(1-羟乙基)-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙酰基-7-氯-萘并

[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙酰基-7-氟-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙酰基萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,其对映体、非对映体、互变异构体和盐或溶剂化物。

[0026] 在一些实施方案中,颗粒形式的萘并呋喃化合物是化合物1的颗粒。

[0027] 在一些实施方案中,颗粒形式的萘并呋喃化合物是化合物1的多晶型物的颗粒。例如,在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图基本上与图1所列出的X射线衍射图相似。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图基本上与图2所列出的X射线衍射图相似。例如,在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图基本上与图3所列出的X射线衍射图相似。

[0028] 例如,在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约下列 $2\theta$ 角度处包括一个或多个峰:10.2, 11.4, 11.9, 14.1, 14.5, 17.3, 21.0, 22.2, 24.0, 26.0和28.1度。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约下列 $2\theta$ 角度处包括一个或多个峰:10.2, 11.9, 14.1, 14.5, 17.3, 22.2和/或28.1度。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约10.2度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约11.9度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约14.1度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约14.5度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约17.3度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约22.2度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约28.1度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰:至少在大约10.2度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约11.9度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约14.1度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约14.5度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约17.3度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约22.2度 $2\theta$ 处的峰和至少在大约28.1度 $2\theta$ 处的峰和其任何组合。

[0029] 例如,在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约下列 $2\theta$ 角度处包括一个或多个峰:7.5, 9.9, 11.4, 12.3, 15.0, 23.0, 23.3, 24.1, 24.6, 25.0, 26.1, 27.0和28.4度。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约下列 $2\theta$ 角度处包括一个或多个峰:7.5, 9.9, 12.3, 15, 23.0, 23.3, 24.6和/或28.4度。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约7.5度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,



多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约9.9度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约12.3度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约15度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约23度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约23.3度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约24.6度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约28.4度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰:至少在大约7.5度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约9.9度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约15度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约12.3度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约23.0度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约23.3度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约24.6度 $2\theta$ 处的峰和至少在大约28.4度 $2\theta$ 处的峰和其任何组合。

[0030] 在一些实施方案中,颗粒具有小于或等于大约160 $\mu\text{m}$ 、大约150 $\mu\text{m}$ 、大约120 $\mu\text{m}$ 、大约100 $\mu\text{m}$ 、大约50 $\mu\text{m}$ 、大约40 $\mu\text{m}$ 或大约20 $\mu\text{m}$ 的直径。在进一步实施方案中,颗粒具有小于或等于大约10 $\mu\text{m}$ 、大约5 $\mu\text{m}$ 、大约4 $\mu\text{m}$ 、大约3 $\mu\text{m}$ 、大约2 $\mu\text{m}$ 、大约1 $\mu\text{m}$ 、大约0.5 $\mu\text{m}$ 、大约0.2 $\mu\text{m}$ 或大约0.1 $\mu\text{m}$ 的直径。

[0031] 本发明提供了萘并呋喃化合物(例如,式I的化合物)的颗粒,其是活性的,即,具有抗肿瘤效果和/或抗肿瘤活性。活性颗粒具有一定的规格,例如,具有小于或等于大约200 $\mu\text{m}$ 、大约150 $\mu\text{m}$ 、大约100 $\mu\text{m}$ 、大约40 $\mu\text{m}$ 、或大约20 $\mu\text{m}$ 、大约10 $\mu\text{m}$ 、大约5 $\mu\text{m}$ 、大约4 $\mu\text{m}$ 、大约3 $\mu\text{m}$ 、大约2 $\mu\text{m}$ 、大约1 $\mu\text{m}$ 、大约0.5 $\mu\text{m}$ 、大约0.2 $\mu\text{m}$ 或大约0.1 $\mu\text{m}$ 的直径。比这种一定规格大的颗粒是非活性的,或比本文所描述颗粒的活性小。

[0032] 在按照本发明的一些实施方案中,药物组合物包括化合物(例如,按照式I的萘并呋喃或其盐或溶剂化物)的颗粒。例如,在一些实施方案中,药物组合物包括化合物1的颗粒。例如,在一些实施方案中,药物组合物包括化合物1的多晶型物的颗粒。例如,在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图基本上与图1所列出的X射线衍射图相似。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图基本上与图2所列出的X射线衍射图相似。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图基本上与图3所列出的X射线衍射图相似。

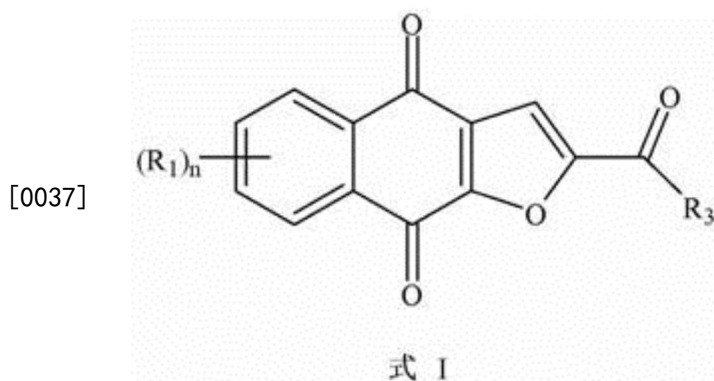
[0033] 例如,在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约下列 $2\theta$ 角度处包括一个或多个峰:10.2, 11.4, 11.9, 14.1, 14.5, 17.3, 21.0, 22.2, 24.0, 26.0和28.1度。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约下列 $2\theta$ 角度处包括一个或多个峰:10.2, 11.9, 14.1, 14.5, 17.3, 22.2和/或28.1

度。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约10.2度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约11.9度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约14.1度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约14.5度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约17.3度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约22.2度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约28.1度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰:至少在大约10.2度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约11.9度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约14.1度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约14.5度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约17.3度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约22.2度 $2\theta$ 处的峰和至少在大约28.1度 $2\theta$ 处的峰和其任何组合。

[0034] 例如,在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约下列 $2\theta$ 角度处包括一个或多个峰:7.5, 9.9, 11.4, 12.3, 15.0, 23.0, 23.3, 24.1, 24.6, 25.0, 26.1, 27.0和28.4度。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约下列 $2\theta$ 角度处包括一个或多个峰:7.5, 9.9, 12.3, 15, 23.0, 23.3, 24.6和/或28.4度。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约7.5度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约9.9度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约12.3度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约15度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约23度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约23.3度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约24.6度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约28.4度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰:至少在大约7.5度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约9.9度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约15度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约12.3度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约23.0度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约23.3度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约24.6度 $2\theta$ 处的峰和至少在大约28.4度处的峰和其任何组合。

[0035] 累积的全部颗粒的一部分可以具有小于或等于大约200 $\mu\text{m}$ 的直径。在一些实施方案中,颗粒组的一部分可以至少为这组颗粒总数的至少大约1%,至少大约5%,至少大约10%,至少大约20%,或至少大约30%。在某些实施方案中,该部分是相当大的部分。例如,颗粒组的“相当大的部分”可以为该组颗粒总数的至少大约99%,至少大约95%,至少大约90%,至少大约85%,至少大约80%,至少大约75%,至少大约70%,至少大约60%,或至少大约50%。每个( $R_1$ )独立地选自:氢,卤素,氟,氰基,硝基, $\text{CF}_3$ , $\text{OCF}_3$ ,烷基,甲基,取代的烷基,烯基,取代的烯基,炔基,取代的炔基,环烷基,取代的环烷基,环烯基,取代的环烯基,杂环,取代的杂环,芳基,取代的芳基, $\text{OR}_a$ , $\text{SR}_a$ 和 $\text{NH}_2$ 。 $n$ 可以是正整数;例如, $n$ 可以是4。 $R_3$ 可以选自:氢,卤素,氟,氰基, $\text{CF}_3$ , $\text{OCF}_3$ ,烷基,甲基,取代的烷基,卤素取代的烷基,羟基取代的烷基,胺取代的烷基,烯基,取代的烯基,炔基,取代的炔基,环烷基,取代的环烷基,环烯基,取代的环烯基,杂环,取代的杂环,芳基,取代的芳基, $\text{OR}_a$ , $\text{SR}_a$ 和 $\text{NR}_b\text{R}_c$ 。 $R_a$ 可以独立地选自:氢,烷基,取代的烷基,烯基,取代的烯基,炔基,取代的炔基,环烷基,取代的环烷基,环烯基,取代的环烯基,杂环,取代的杂环,芳基和取代的芳基。 $R_b$ 和 $R_c$ 可以独立地选自:氢,烷基,取代的烷基,环烷基,取代的环烷基,杂环,取代的杂环,芳基和取代的芳基,或 $R_b$ 和 $R_c$ 与它们键合的N一起形成杂环或取代的杂环。

[0036] 在按照本发明的某些实施方案中,每个( $R_1$ )可以独立地选自氢,甲基,F(氟),Cl,Br,I,OH,和 $\text{NH}_2$ 。 $R_3$ 可以选自甲基和 $\text{C}(\text{R}_8)_3$ 。每个( $R_8$ )可以独立地选自氢,甲基,F(氟),Cl,Br,I,OH和 $\text{NH}_2$ 。在一些实施方案中,( $R_1$ )和 $\text{R}_8$ 中至多两个可以是F(氟),其余的是氢。



[0038] 在按照本发明的某些实施方案中,按照式I的化合物选自2-(1-羟乙基)-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙酰基-7-氯-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙酰基-7-氟-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙酰基萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,和2-乙基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮。在某些实施方案中,按照式I的化合物是化合物1。在一些实施方案中,按照式I的化合物是化合物1的多晶型物。例如,在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图基本上与图1所列出的X射线衍射图相似。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图基本上与图2所列出的X射线衍射图相似。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图基本上与图3所列出的X射线衍射图相似。

[0039] 例如,在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约下列 $2\theta$ 角度处包括一个或多个峰:10.2, 11.4, 11.9, 14.1, 14.5, 17.3, 21.0, 22.2, 24.0, 26.0和28.1度。在一些实施方案中,多晶型

物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约下列2 $\theta$ 角度处包括一个或多个峰:10.2,11.9,14.1,14.5,17.3,22.2和/或28.1度。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约10.2度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约11.9度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约14.1度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约14.5度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约17.3度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约22.2度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约28.1度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰:至少在大约10.2度2 $\theta$ 处的峰,至少在大约11.9度2 $\theta$ 处的峰,至少在大约14.1度2 $\theta$ 处的峰,至少在大约14.5度2 $\theta$ 处的峰,至少在大约17.3度2 $\theta$ 处的峰,至少在大约22.2度2 $\theta$ 处的峰和至少在大约28.1度2 $\theta$ 处的峰和其任何组合。

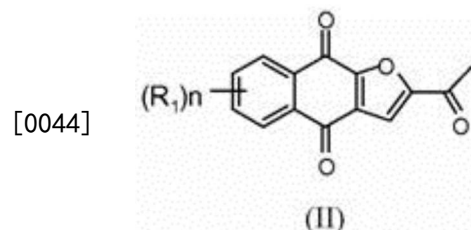
[0040] 例如,在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约下列2 $\theta$ 角度处包括一个或多个峰:7.5,9.9,11.4,12.3,15.0,23.0,23.3,24.1,24.6,25.0,26.1,27.0和28.4度。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约下列2 $\theta$ 角度处包括一个或多个峰:7.5,9.9,12.3,15,23.0,23.3,24.6和/或28.4度。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约7.5度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约9.9度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约12.3度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约15度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约23度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约23.3度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约24.6度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约28.4度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰:至少在大约7.5度2 $\theta$ 处的峰,至少在大约9.9度2 $\theta$ 处的峰,至少在大约15度2 $\theta$ 处的峰,至少在大约12.3度2 $\theta$ 处的峰,至少

在大约23.0度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约23.3度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约24.6度 $2\theta$ 处的峰和至少在大约28.4度 $2\theta$ 处的峰和其任何组合。

[0041] 例如,该药物组合物可以具有至少大约90%的累积颗粒总数量,所述颗粒具有小于或等于大约160 $\mu\text{m}$ 、100 $\mu\text{m}$ 、40 $\mu\text{m}$ 、20 $\mu\text{m}$ 、10 $\mu\text{m}$ 、5 $\mu\text{m}$ 、3 $\mu\text{m}$ 或2 $\mu\text{m}$ 的粒径。例如,该药物组合物可以具有至少大约50%的累积颗粒总数量,所述颗粒具有小于或等于160 $\mu\text{m}$ 、100 $\mu\text{m}$ 、40 $\mu\text{m}$ 、20 $\mu\text{m}$ 、10 $\mu\text{m}$ 、5 $\mu\text{m}$ 、3 $\mu\text{m}$ 、2 $\mu\text{m}$ 、1 $\mu\text{m}$ 或0.5 $\mu\text{m}$ 的粒径。例如,该药物组合物可以具有至少大约10%的累积颗粒总数量,所述颗粒具有小于或等于160 $\mu\text{m}$ 、100 $\mu\text{m}$ 、40 $\mu\text{m}$ 、20 $\mu\text{m}$ 、5 $\mu\text{m}$ 、2 $\mu\text{m}$ 、1 $\mu\text{m}$ 、0.5 $\mu\text{m}$ 或0.1 $\mu\text{m}$ 的粒径。在药物组合物中,颗粒可以具有例如小于或等于大约160 $\mu\text{m}$ 、40 $\mu\text{m}$ 、20 $\mu\text{m}$ 、10 $\mu\text{m}$ 、5 $\mu\text{m}$ 、4 $\mu\text{m}$ 、3 $\mu\text{m}$ 、2 $\mu\text{m}$ 、1 $\mu\text{m}$ 、0.5 $\mu\text{m}$ 、0.3 $\mu\text{m}$ 或0.2 $\mu\text{m}$ 的中值粒径。例如,颗粒可以具有大约0.2 $\mu\text{m}$ 至大约50 $\mu\text{m}$ 的中值粒径,或大约0.5 $\mu\text{m}$ 至大约30 $\mu\text{m}$ 的中值粒径。例如,该药物组合物可以具有累积颗粒总数,平均直径与中值粒径的比例至多为大约2。该药物发明可以具有包括结晶状态化合物的颗粒,以至少两种不同的多晶型状态存在。

[0042] 在一些实施方案中,药物组合物包括颗粒形式的式I的化合物或其多晶型物,其中颗粒小于20微米,10微米,5微米,2微米,1微米或0.5微米。

[0043] 本发明提供了基本上纯的式II化合物,



[0045] 其中每个 $R_1$ 独立地是H、Cl或F; $n$ 是0、1、2、3或4。在一些实施方案中,式II的化合物是颗粒形式的化合物。

[0046] 在一些实施方案中,基本上纯的化合物是化合物1。在一些实施方案中,化合物1是颗粒形式的化合物。

[0047] 在一些实施方案中,基本上纯的化合物选自2-(1-羟乙基)-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙酰基-7-氯-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙酰基-7-氟-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙酰基萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,磷酸单[1-(4,9-二氧化-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙烯基]酯,磷酸1-(4,9-二氧化-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙烯基酯二甲酯,其对映体、非对映体、互变异构体和盐或溶剂化物。

[0048] 在一些实施方案中,基本上纯的化合物是化合物1的多晶型物。例如,在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图基本上与图1所列出的X射线衍射图相似。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图基本上与图2所列出的X射线衍射图相似。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图基本上与图3所列出的X射线衍射图相似。

[0049] 例如,在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约下列 $2\theta$ 角度处包括一个或多个峰:10.2,

11.4, 11.9, 14.1, 14.5, 17.3, 21.0, 22.2, 24.0, 26.0 和 28.1 度。在一些实施方案中, 多晶型物是 2-乙酰基-4H, 9H- 萘并 [2, 3-b] 呋喃-4, 9-二酮的多晶型物, 其特征为: X 射线衍射图至少在大约下列 2 $\theta$  角度处包括一个或多个峰: 10.2, 11.9, 14.1, 14.5, 17.3, 22.2 和/或 28.1 度。在一些实施方案中, 多晶型物是 2-乙酰基-4H, 9H- 萘并 [2, 3-b] 呋喃-4, 9-二酮的多晶型物, 其特征为: X 射线衍射图至少在大约 10.2 度 2 $\theta$  处包括峰。在一些实施方案中, 多晶型物是 2-乙酰基-4H, 9H- 萘并 [2, 3-b] 呋喃-4, 9-二酮的多晶型物, 其特征为: X 射线衍射图至少在大约 11.9 度 2 $\theta$  处包括峰。在一些实施方案中, 多晶型物是 2-乙酰基-4H, 9H- 萘并 [2, 3-b] 呋喃-4, 9-二酮的多晶型物, 其特征为: X 射线衍射图至少在大约 14.1 度 2 $\theta$  处包括峰。在一些实施方案中, 多晶型物是 2-乙酰基-4H, 9H- 萘并 [2, 3-b] 呋喃-4, 9-二酮的多晶型物, 其特征为: X 射线衍射图至少在大约 14.5 度 2 $\theta$  处包括峰。在一些实施方案中, 多晶型物是 2-乙酰基-4H, 9H- 萘并 [2, 3-b] 呋喃-4, 9-二酮的多晶型物, 其特征为: X 射线衍射图至少在大约 17.3 度 2 $\theta$  处包括峰。在一些实施方案中, 多晶型物是 2-乙酰基-4H, 9H- 萘并 [2, 3-b] 呋喃-4, 9-二酮的多晶型物, 其特征为: X 射线衍射图至少在大约 22.2 度 2 $\theta$  处包括峰。在一些实施方案中, 多晶型物是 2-乙酰基-4H, 9H- 萘并 [2, 3-b] 呋喃-4, 9-二酮的多晶型物, 其特征为: X 射线衍射图至少在大约 28.1 度 2 $\theta$  处包括峰。在一些实施方案中, 多晶型物是 2-乙酰基-4H, 9H- 萘并 [2, 3-b] 呋喃-4, 9-二酮的多晶型物, 其特征为: X 射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰: 至少在大约 10.2 度 2 $\theta$  处的峰, 至少在大约 11.9 度 2 $\theta$  处的峰, 至少在大约 14.1 度 2 $\theta$  处的峰, 至少在大约 14.5 度 2 $\theta$  处的峰, 至少在大约 17.3 度 2 $\theta$  处的峰, 至少在大约 22.2 度 2 $\theta$  处的峰和至少在大约 28.1 度 2 $\theta$  处的峰和其任何组合。

[0050] 例如, 在一些实施方案中, 多晶型物是 2-乙酰基-4H, 9H- 萘并 [2, 3-b] 呋喃-4, 9-二酮的多晶型物, 其特征为: X 射线衍射图至少在大约下列 2 $\theta$  角度处包括一个或多个峰: 7.5, 9.9, 11.4, 12.3, 15.0, 23.0, 23.3, 24.1, 24.6, 25.0, 26.1, 27.0 和 28.4 度。在一些实施方案中, 多晶型物是 2-乙酰基-4H, 9H- 萘并 [2, 3-b] 呋喃-4, 9-二酮的多晶型物, 其特征为: X 射线衍射图至少在大约下列 2 $\theta$  角度处包括一个或多个峰: 7.5, 9.9, 12.3, 15, 23.0, 23.3, 24.6 和/或 28.4 度。在一些实施方案中, 多晶型物是 2-乙酰基-4H, 9H- 萘并 [2, 3-b] 呋喃-4, 9-二酮的多晶型物, 其特征为: X 射线衍射图至少在大约 7.5 度 2 $\theta$  处包括峰。在一些实施方案中, 多晶型物是 2-乙酰基-4H, 9H- 萘并 [2, 3-b] 呋喃-4, 9-二酮的多晶型物, 其特征为: X 射线衍射图至少在大约 9.9 度 2 $\theta$  处包括峰。在一些实施方案中, 多晶型物是 2-乙酰基-4H, 9H- 萘并 [2, 3-b] 呋喃-4, 9-二酮的多晶型物, 其特征为: X 射线衍射图至少在大约 12.3 度 2 $\theta$  处包括峰。在一些实施方案中, 多晶型物是 2-乙酰基-4H, 9H- 萘并 [2, 3-b] 呋喃-4, 9-二酮的多晶型物, 其特征为: X 射线衍射图至少在大约 15 度 2 $\theta$  处包括峰。在一些实施方案中, 多晶型物是 2-乙酰基-4H, 9H- 萘并 [2, 3-b] 呋喃-4, 9-二酮的多晶型物, 其特征为: X 射线衍射图至少在大约 23 度 2 $\theta$  处包括峰。在一些实施方案中, 多晶型物是 2-乙酰基-4H, 9H- 萘并 [2, 3-b] 呋喃-4, 9-二酮的多晶型物, 其特征为: X 射线衍射图至少在大约 23.3 度 2 $\theta$  处包括峰。在一些实施方案中, 多晶型物是 2-乙酰基-4H, 9H- 萘并 [2, 3-b] 呋喃-4, 9-二酮的多晶型物, 其特征为: X 射线衍射图至少在大约 24.6 度 2 $\theta$  处包括峰。在一些实施方案中, 多晶型物是 2-乙酰基-4H, 9H- 萘并 [2, 3-b] 呋喃-4, 9-二酮的多晶型物, 其特征为: X 射线衍射图至少在大约 28.4 度 2 $\theta$  处包括峰。在一些实施方案中, 多晶型物是 2-乙酰基-4H, 9H- 萘并 [2, 3-b] 呋喃-4, 9-二酮的多晶型物, 其特征为: X 射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰: 至少在大约 7.5 度 2 $\theta$  处的峰,

至少在大约9.9度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约15度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约12.3度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约23.0度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约23.3度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约24.6度 $2\theta$ 处的峰和至少在大约28.4度 $2\theta$ 处的峰和其任何组合。

[0051] 在一些实施方案中,化合物1的多晶型物是颗粒形式的化合物。

[0052] 在某些实施方案中,化合物、产物和/或药物组合物具有至少大约80%、大约85%、大约90%、大约95%或大约99%的纯度。在一些实施方案中,化合物、产物和/或药物组合物具有至少大约95.5%、大约96%、大约96.5%、大约97%、大约97.5%、大约98%、大约98.5%、大约99%或大约99.5%的纯度。在一些实施方案中,化合物、产物和/或药物组合物具有至少大约99.1%、大约99.2%、大约99.3%、大约99.4%、大约99.5%、大约99.6%、大约99.7%、大约99.8%或大约99.9%的纯度。

[0053] 在某些实施方案中,化合物、产物和/或药物组合物具有至多大约10%、大约5%、大约1%、大约0.15%或大约0.5%的杂质。在一些实施方案中,化合物、产物和/或药物组合物含有至多大约0.5%、大约0.2%、大约0.15%或大约0.1%的各种单一杂质。在进一步实施方案中,杂质是一或多种选自下列的杂质:2-乙酰基-2,3-二氢萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2,6-二乙酰基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2,7-二乙酰基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,3-乙酰基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二醇和1-(4,9-二羟基-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙酮。

[0054] 在一些实施方案中,杂质包括残余溶剂。在一些实施方案中,溶剂选自乙酸乙酯(EtOAc),甲苯,乙醇,甲醇,氯仿和 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /己烷。

[0055] 在一些实施方案中,纯度是用HPLC(高效液相色谱)测定的。在一些实施方案中,纯度是用NMR(核磁共振)测定的。在进一步实施方案中,纯度是用HPLC和NMR两者测定的。

[0056] 本发明还提供了颗粒形式的化合物1的多晶型物、产品和/或药物组合物,其中该化合物是高度纯化的形式。例如,在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图基本上与图1所列出的X射线衍射图相似。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图基本上与图2所列出的X射线衍射图相似。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图基本上与图3所列出的X射线衍射图相似。

[0057] 例如,在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约下列 $2\theta$ 角度处包括一个或多个峰:10.2, 11.4, 11.9, 14.1, 14.5, 17.3, 21.0, 22.2, 24.0, 26.0和28.1度。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约下列 $2\theta$ 角度处包括一个或多个峰:10.2, 11.9, 14.1, 14.5, 17.3, 22.2和/或28.1度。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约10.2度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约11.9度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约14.1度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实

施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约14.5度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约17.3度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约22.2度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约28.1度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰:至少在大约10.2度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约11.9度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约14.1度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约14.5度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约17.3度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约22.2度 $2\theta$ 处的峰和至少在大约28.1度 $2\theta$ 处的峰和其任何组合。

[0058] 例如,在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约下列 $2\theta$ 角度处包括一个或多个峰:7.5, 9.9, 11.4, 12.3, 15.0, 23.0, 23.3, 24.1, 24.6, 25.0, 26.1, 27.0和28.4度。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约下列 $2\theta$ 角度处包括一个或多个峰:7.5, 9.9, 12.3, 15, 23.0, 23.3, 24.6和/或28.4度。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约7.5度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约9.9度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约12.3度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约15度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约23度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约23.3度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约24.6度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约28.4度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰:至少在大约7.5度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约9.9度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约15度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约12.3度 $2\theta$ 处的峰,至少在大約23.0度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约23.3度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约24.6度 $2\theta$ 处的峰和至少在大约28.4度处的峰和其任何组合。

[0059] 化合物1的多晶型物是颗粒形式的多晶型物。在一些实施方案中,化合物1的多晶型物是颗粒形式的多晶型物,其中颗粒具有小于或等于大约160 $\mu\text{m}$ 、大约150 $\mu\text{m}$ 、大约120 $\mu\text{m}$ 、大约100 $\mu\text{m}$ 、大约50 $\mu\text{m}$ 、大约40 $\mu\text{m}$ 或大约20 $\mu\text{m}$ 的直径。在一些实施方案中,颗粒形式的化合物1的多晶型物是颗粒群,其中颗粒群具有小于或等于大约160 $\mu\text{m}$ 、大约150 $\mu\text{m}$ 、大约120 $\mu\text{m}$ 、大约100 $\mu\text{m}$ 、大约50 $\mu\text{m}$ 、大约40 $\mu\text{m}$ 或大约20 $\mu\text{m}$ 的 $D_{50}$ (即粒径分布中值点,其将粒径分布分为两个



相等部分)。在一些实施方案中,化合物1的多晶型物是颗粒形式的多晶型物,其中颗粒具有小于或等于大约10 $\mu$ m、大约5 $\mu$ m、大约4 $\mu$ m、大约3 $\mu$ m、大约2 $\mu$ m、大约1 $\mu$ m、大约0.5 $\mu$ m、大约0.2 $\mu$ m或大约0.1 $\mu$ m的直径。在一些实施方案中,颗粒形式的化合物1的多晶型物是颗粒群,其中该颗粒群具有小于或等于大约10 $\mu$ m、大约5 $\mu$ m、大约4 $\mu$ m、大约3 $\mu$ m、大约2 $\mu$ m、大约1 $\mu$ m、大约0.5 $\mu$ m或大约0.2 $\mu$ m的D<sub>50</sub>。

[0060] 本发明提供了化合物1的多晶型物的颗粒或颗粒群,其是活性的,即,具有抗肿瘤效果和/或抗肿瘤活性。活性颗粒具有一定的规格,例如,具有小于或等于大约200 $\mu$ m、大约150 $\mu$ m、大约100 $\mu$ m、大约40 $\mu$ m、或大约20 $\mu$ m、大约10 $\mu$ m、大约5 $\mu$ m、大约4 $\mu$ m、大约3 $\mu$ m、大约2 $\mu$ m、大约1 $\mu$ m、大约0.5 $\mu$ m或大约0.2 $\mu$ m的直径或D<sub>50</sub>。比这种一定规格大的颗粒是非活性的,或比本文所描述颗粒的活性小。

[0061] 化合物1的多晶型物的累积的全部颗粒的一部分可以具有小于或等于大约200 $\mu$ m的直径或D<sub>50</sub>。在一些实施方案中,颗粒组的一部分可以至少为这组颗粒总数的大约1%,至少大约5%,至少大约10%,至少大约20%,或至少大约30%。在某些实施方案中,该部分是相当大的部分。例如,颗粒组的“相当大的部分”可以为该组颗粒总数的至少大约99%,至少大约95%,至少大约90%,至少大约85%,至少大约80%,至少大约75%,至少大约70%,至少大约60%,或至少大约50%。

[0062] 在一些实施方案中,化合物1的多晶型物的颗粒群可以具有至少大约90%的累积颗粒总数量,其中颗粒具有小于或等于大约160 $\mu$ m、100 $\mu$ m、40 $\mu$ m、20 $\mu$ m、10 $\mu$ m、5 $\mu$ m、3 $\mu$ m或2 $\mu$ m、1 $\mu$ m或0.5 $\mu$ m的粒径。例如,化合物1的多晶型物的颗粒群可以具有至少大约50%的累积颗粒总数量,其中颗粒具有小于或等于大约160 $\mu$ m、100 $\mu$ m、40 $\mu$ m、20 $\mu$ m、10 $\mu$ m、5 $\mu$ m、3 $\mu$ m、2 $\mu$ m、1 $\mu$ m或0.5 $\mu$ m的粒径。例如,化合物1的多晶型物的颗粒群可以具有至少大约10%的累积颗粒总数量,其中颗粒具有小于或等于160 $\mu$ m、100 $\mu$ m、40 $\mu$ m、20 $\mu$ m、5 $\mu$ m、2 $\mu$ m、1 $\mu$ m、0.5 $\mu$ m或0.1 $\mu$ m的粒径。在化合物1的多晶型物的颗粒群中,颗粒可以具有例如小于或等于大约160 $\mu$ m、40 $\mu$ m、20 $\mu$ m、10 $\mu$ m、5 $\mu$ m、4 $\mu$ m、3 $\mu$ m、2 $\mu$ m、1 $\mu$ m、0.5 $\mu$ m或0.2 $\mu$ m的中值粒径。例如,颗粒可以具有大约0.002 $\mu$ m至大约50 $\mu$ m的中值粒径,或大约0.2 $\mu$ m至大约30 $\mu$ m的中值粒径。例如,化合物1的多晶型物的颗粒群可以具有累积颗粒总数,其中颗粒的平均直径(mean diameter)与中值粒径(median diameter)的比例至多为大约2。化合物1的多晶型物的颗粒群可以具有包括结晶状态的化合物的颗粒,这种结晶状态化合物以至少两种不同的多晶型状态存在。

[0063] 在一些实施方案中,化合物1的多晶型物是颗粒形式的多晶型物,其中颗粒具有小于或等于大约20微米、大约10微米、大约5微米或大约3微米、2微米、1微米、0.5微米、0.2微米或0.1微米的直径。在一些实施方案中,颗粒形式的化合物1的多晶型物是颗粒群,其中颗粒群具有小于或等于大约20微米、10微米、5微米、4微米、5微米、3微米、2微米、1微米、0.5微米或0.2微米的D<sub>50</sub>。

[0064] 本发明还提供了药物组合物,其包含治疗有效量的基本上纯的萘并呋喃化合物和可药用载体、赋形剂或稀释剂。赋形剂可以包括,例如,脂肪酸的甘油酯,饱和脂肪酸的甘油酯,具有8至18个碳的饱和脂肪酸的甘油酯,月桂酸甘油酯,聚乙二醇,纤维素,微晶纤维素,羧甲纤维素,卵磷脂(phosphatidylcholine),脂质,甾醇,胆固醇,表面活性剂,聚山梨酸酯和/或聚氧乙烯脱水山梨糖醇烷基化物。

[0065] 在按照本发明的一些实施方案中,制备的项目可以包括含有治疗有效量的药物组

合物和可药用赋形剂的容器。

[0066] 制备按照本发明的一些实施方案的化合物、产品和/或药物组合物的方法可以包括：将化合物碾磨，形成颗粒。例如，可以将化合物球磨、辊轧、喷磨、润磨、超声碾磨、研磨或用这些方法的组合方法和/或其它碾磨方法来处理。可以降低化合物的温度，例如，降低至低温，并碾磨。温度的这种降低可以使化合物变得更脆，且更可以通过碾磨来降低粒径。

[0067] 制备按照本发明的一些实施方案的化合物、产品和/或药物组合物的方法可以包括结晶。在结晶期间获得的粒径分布 (PSD) 受到结晶期间存在的各种机理的组合的影响，例如成核、生长、聚集、磨耗、破裂，等等。当在结晶期间不能始终控制粒径来满足目标规格时，可以包括额外工艺步骤，例如，干磨。

[0068] 按照本发明的治疗患有瘤的人、哺乳动物或动物患者的方法、延迟其进展的方法、防止其复发的方法、减轻其症状的方法或者使其得到改善的方法可以包括：给予治疗有效量的化合物、产品和/或药物组合物，使得出现抗肿瘤活性。例如，抗肿瘤活性可以是抗癌活性。例如，抗肿瘤活性可以包括：减缓瘤体积的生长、终止瘤体积的生长或减小瘤体积。瘤可以包括实质固态瘤、恶性肿瘤、转移性细胞、癌症干细胞。瘤可以包括癌、肉瘤、腺癌、淋巴瘤或血液恶性肿瘤。瘤可以通过化疗、放疗和/或激素治疗难以治疗的瘤。可以给予化合物、产品和/或药物组合物，以便防止瘤的复发。可以给予化合物、产品和/或药物组合物作为手术切除的辅助治疗。可以例如口服和/或静脉内给予化合物、产品和/或药物组合物。

[0069] 按照本发明的方法还包括治疗患有疾病或病症的人、哺乳动物或动物患者的疾病或病症、延迟其发展、防止其复发、减轻其症状或者使其得到改善。在一些实施方案中，疾病或病症选自自身免疫性疾病，炎性疾病，炎症性肠疾病，关节炎，自身免疫性脱髓鞘病症，阿尔海默氏疾病，中风，缺血再灌注损伤和多发性脑硬化。

[0070] 如果给予患有疾病或病症的患者化合物、产品和/或药物组合物能够达到任何一或多种实验室或临床效果，则认为这种给药是成功的。例如，如果与疾病或病症相关的症状得到减轻、减少、抑制或没有进一步发展（即，更坏的，静止的 (static)），则认为给药是成功的。如果病症（例如，自身免疫病症）进入症状缓解状态或没有进一步发展（即，更坏的，静止的），则认为给药是成功的。

[0071] 在一些实施方案中，与任何各种已知的治疗（包括，例如化学治疗及其它抗肿瘤药剂、抗炎症化合物和/或免疫抑制化合物）联合给予本文所描述的化合物、产品和/或药物组合物。在一些实施方案中，本文所描述的化合物、产品和/或药物组合物可与任何各种已知的治疗结合使用，已知的治疗包括（非限制性实例）：外科治疗和方法，放射治疗，化疗和/或激素或其它内分泌相关的治疗。

[0072] 可以顺序或同时给予这些“共同治疗”。可以在相同药物组合物中给予受试者本文所描述的化合物、产品和/或药物组合物和第二种治疗，优选受试验的人。或者，可以用独立的药物组合物同时、分开或顺序给予受试者本文所描述的化合物、产品和/或药物组合物和第二种治疗。可以通过相同或不同的给药途径给予本文所描述的化合物、产品和/或药物组合物和第二种治疗。在一些实施方案中，本发明的共同治疗包含有效量的本文所描述的化合物、产品和/或药物组合物和有效量的至少一种其它治疗（例如，预防或治疗剂），这种其它治疗与本文所描述的化合物、产品和/或药物组合物的作用机理不同。在一些实施方案中，本发明的共同治疗可以提高本文所描述的化合物、产品和/或药物组合物和第二种治疗

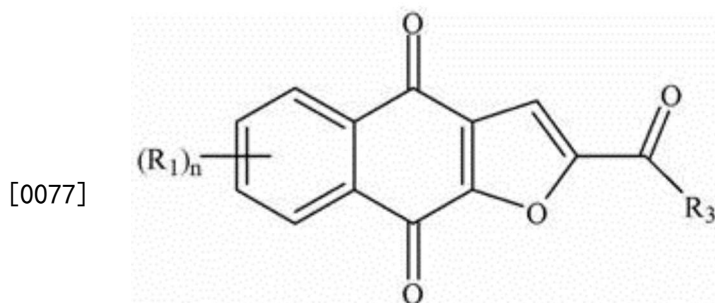
的预防或治疗效果,通过它们一起起作用,具有加和或协同效应。在某些实施方案中,本发明的共同治疗可以降低与第二种治疗(例如,预防或治疗剂)相关的副作用。

[0073] 在一些实施方案中,可以通过如下方法给予化合物、产品和/或药物组合物来治疗的疾病或病症。化合物的血液摩尔浓度可以至少为第一个连续时间周期的有效浓度,并且小于有害浓度,这种连续时间周期应该至少与有效时间周期一样长,并且短于有害时间周期。第一个连续时间周期之后,血液摩尔浓度可以小于有效浓度。例如,有效浓度可以是大约0.1 $\mu$ M,大约0.2 $\mu$ M,大约0.5 $\mu$ M,大约1 $\mu$ M,大约2 $\mu$ M,大约3 $\mu$ M,大约4 $\mu$ M,大约5 $\mu$ M,大约6 $\mu$ M,大约10 $\mu$ M,或者本领域技术人员确定的其它有效浓度。例如,有害浓度可以是大约1 $\mu$ M,大约3 $\mu$ M,大约10 $\mu$ M,大约15 $\mu$ M,大约30 $\mu$ M,大约100 $\mu$ M,或者本领域技术人员确定的其它有害浓度。例如,有效时间期间可以是大约1小时,2小时,大约4小时,大约6小时,大约8小时,大约10小时,大约12小时,大约24小时,或者是本领域技术人员确定的其它有效时间周期。例如,有害时间周期可以是大约12小时,大约24小时,大约48小时,大约72小时,大约144小时,或者本领域技术人员确定的其它有害时间周期。

[0074] 在一些实施方案中,选择化合物、产品和/或药物组合物的治疗有效量,以便产生大于肿瘤细胞的IC<sub>50</sub>值并且小于正常细胞的IC<sub>50</sub>值的血液浓度。在一些实施方案中,选择治疗有效量,以便产生足以杀死肿瘤细胞并且小于正常细胞的IC<sub>50</sub>值的血液浓度。

[0075] 在一些实施方案中,利用下列剂型口服给予化合物、产品和/或药物组合物:例如,片剂,丸剂,胶囊剂(硬或软胶囊),小胶囊(caplet),粉剂,颗粒剂,混悬剂,溶液剂,凝胶剂,扁囊剂,锭剂,糖锭,糖浆剂,酏剂,乳剂,水包油乳剂,油包水乳剂和/或吸饮剂。

[0076] 在按照本发明的一些实施方案中,降低或抑制肿瘤细胞的复制或扩散的组合物包括通过下列方法选择的颗粒组。可以提供按照式I的化合物或其盐或溶剂化物。



式 I

[0078] 在一些实施方案中,可以提供化合物1或其盐或溶剂化物。在一些实施方案中,可以提供化合物1的多晶型物。例如,在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图基本上与图1所列出的X射线衍射图相似。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图基本上与图2所列出的X射线衍射图相似。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图基本上与图3所列出的X射线衍射图相似。

[0079] 例如,在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约下列2 $\theta$ 角度处包括一个或多个峰:10.2, 11.4, 11.9, 14.1, 14.5, 17.3, 21.0, 22.2, 24.0, 26.0和28.1度。在一些实施方案中,多晶型

物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约下列2 $\theta$ 角度处包括一个或多个峰:10.2,11.9,14.1,14.5,17.3,22.2和/或28.1度。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约10.2度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约11.9度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约14.1度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约14.5度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约17.3度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约22.2度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约28.1度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰:至少在大约10.2度2 $\theta$ 处的峰,至少在大约11.9度2 $\theta$ 处的峰,至少在大约14.1度2 $\theta$ 处的峰,至少在大约14.5度2 $\theta$ 处的峰,至少在大约17.3度2 $\theta$ 处的峰,至少在大约22.2度2 $\theta$ 处的峰和至少在大约28.1度2 $\theta$ 处的峰和其任何组合。

[0080] 例如,在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约下列2 $\theta$ 角度处包括一个或多个峰:7.5,9.9,11.4,12.3,15.0,23.0,23.3,24.1,24.6,25.0,26.1,27.0和28.4度。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约下列2 $\theta$ 角度处包括一个或多个峰:7.5,9.9,12.3,15,23.0,23.3,24.6和/或28.4度。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约7.5度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约9.9度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约12.3度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约15度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约23度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约23.3度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约24.6度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约28.4度2 $\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰:至少在大约7.5度2 $\theta$ 处的峰,至少在大约9.9度2 $\theta$ 处的峰,至少在大约15度2 $\theta$ 处的峰,至少在大约12.3度2 $\theta$ 处的峰,至少

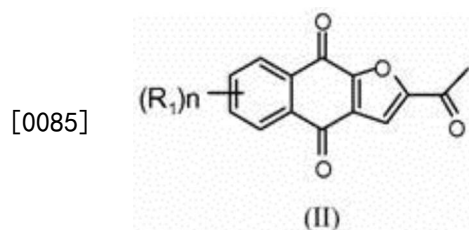
在大约23.0度2 $\theta$ 处的峰,至少在大约23.3度2 $\theta$ 处的峰,至少在大约24.6度2 $\theta$ 处的峰和至少在大约28.4度处的峰和其任何组合。

[0081] 可以制备至少一组包括化合物的颗粒。可以测定至少一组颗粒的各自的粒径分布。可以以预定浓度给予肿瘤细胞和正常细胞至少一组颗粒,并且给予预定的一段时间。可以观察颗粒对肿瘤细胞和正常细胞的代谢和/或分裂效果。基于颗粒对肿瘤细胞的效果,可以确定每组颗粒的有效性评级。基于颗粒对正常细胞的效果,可以确定每组颗粒的毒性评级。可以将具有第一个粒径分布的至少一组颗粒的有效性评级和/或毒性评级与具有不同于第一个粒径分布的粒径分布的至少其它一组颗粒的有效性评级和/或毒性评级进行比较。可以选择有效性评级大于至少一组其它颗粒的有效性评级、毒性评级小于至少其它一组颗粒的毒性评级和/或加权有效性评级和毒性评级的和大于至少其它一组颗粒的加权有效性评级和毒性评级的和的颗粒组作为最佳颗粒组。例如,可以将最佳颗粒组的粒径分布确定为最佳粒径分布。例如,最佳颗粒组可以包括在组合物中。例如,有效性评级可以与抗肿瘤活性成正比。例如,有效性评级可以基于抑制肿瘤细胞的代谢和/或分裂。例如,毒性评级可以与耐受性成反比。例如,毒性评级可以基于抑制正常细胞的代谢和/或分裂。例如,可以体外给予肿瘤细胞和正常细胞至少一组颗粒。例如,有效性评级可以是肿瘤细胞的IC<sub>50</sub>值。例如,毒性评级可以是正常细胞的IC<sub>50</sub>值。例如,可以在试验动物中体内给予肿瘤细胞和正常细胞至少一组颗粒。试验动物可以是,例如,哺乳动物,灵长类动物,小鼠,大鼠,豚鼠,兔或狗。有效性评级可以是肿瘤细胞体积减小,毒性评级可以是试验动物质量降低。

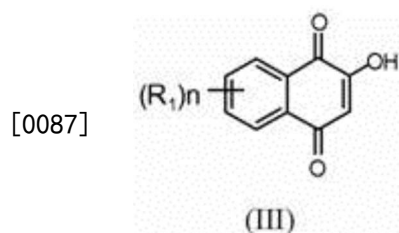
[0082] 在一些实施方案中,制备含有化合物的一组颗粒可以包括:通过溶解和分散化合物、用微流体技术溶解和分散化合物、用空穴化或喷雾方法溶解和分散化合物、碾磨化合物、球磨化合物、辊轧化合物、喷射研磨化合物、湿磨化合物、超声碾磨化合物、研磨化合物和/或筛分化合物,从而将预定粒径分布的颗粒分离。可以将颗粒悬浮在可药用赋形剂中。测定粒径分布可以包括使用选自下列的技术:筛分分析,光学显微计数,电子显微照片统计,电阻统计,沉降时间,激光衍射,声谱和组合技术。

[0083] 治疗瘤或其它细胞增殖病症的方法可以包括:给予患有瘤的人、哺乳动物或动物治疗有效量的组合物,该组合物包含具有最佳粒径和分布的最佳组合物颗粒组。

[0084] 本发明还提供了制备式II化合物的方法,



[0086] 其中R<sub>1</sub>是H、Cl或F,该方法包括:使式III的化合物

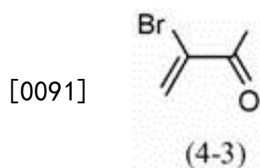


[0088] 在第一个溶剂中,同时在碱的存在下,与酮反应,将粗品从老化的反应混合物中结

晶出来,并在第二个溶剂中使该粗品与氧化剂反应。

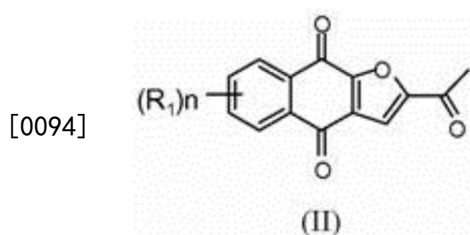
[0089] 在一些实施方案中,该反应在与外界空气联通的容器中进行。

[0090] 在一些实施方案中,酮是式IV的化合物。

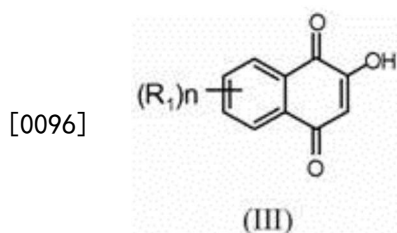


[0092] 在一些实施方案中,第一个溶剂选自四氢呋喃(THF),二噁烷和甲苯,碱选自1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一-7-烯(DBU),三乙基胺和二异丙基乙基胺。在一些实施方案中,氧化剂是二氧化锰。在一些实施方案中,第二个溶剂是甲苯。在一些实施方案中,该方法进一步包括用炭处理氧化产物。

[0093] 本发明提供了制备式II化合物的方法,



[0095] 其中R<sub>1</sub>是H、Cl或F,该方法包括:使式III的化合物



[0097] 在第一个溶剂中,同时在碱的存在下,与酮反应,将粗品从老化的反应混合物中结晶出来,在第二个溶剂中溶解该粗品,并用炭处理该粗品。

[0098] 本发明提供了制备萘并呋喃化合物的方法。该方法包括:在第一个溶剂中,使萘并二氢呋喃化合物或包括萘并二氢呋喃化合物的混合物与氧化剂反应。在一些实施方案中,该混合物进一步包括萘并呋喃化合物。在一些实施方案中,萘并呋喃化合物选自2-(1-羟乙基)-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙酰基-7-氯-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙酰基-7-氟-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙酰基萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,磷酸单[1-(4,9-二氧化-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙基]酯,磷酸1-(4,9-二氧化-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙基酯二甲酯,其对映体、非对映体、互变异构体和盐或溶剂化物。在一些实施方案中,氧化剂是二氧化锰。在一些实施方案中,第一个溶剂是甲苯。在一些实施方案中,该方法进一步包括:通过活性炭的垫过滤氧化产物。在一些实施方案中,该方法进一步包括:通过蒸发第一个溶剂,使萘并呋喃化合物结晶。在一些实施方案中,该方法进一步包括:将萘并呋喃化合物用第二个溶剂重结晶。在一些实施方案中,第二个溶剂是乙酸乙酯。在一些实施方案中,该方法进一步包括:使萘并呋喃化合物与第二个溶剂一起形成浆液,加热该浆液,并将该浆液冷却。

[0099] 本发明提供了制备基本上纯的萘并呋喃化合物的方法。该方法包括:将萘并呋喃

化合物用第一个溶剂结晶,用第二个溶剂将该萘并呋喃化合物重结晶。本发明提供了制备基本上纯的萘并呋喃化合物的另一个方法。该方法包括:将萘并呋喃化合物用第一个溶剂结晶,使晶体萘并呋喃化合物与第二个溶剂形成浆液,将该浆液加热,并冷却该浆液。在一些实施方案中,萘并呋喃化合物选自2-(1-羟乙基)-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙酰基-7-氯-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙酰基-7-氟-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙酰基萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,磷酸单[1-(4,9-二氧化-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙基]酯,磷酸1-(4,9-二氧化-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙基酯二甲酯,其对映体、非对映体、互变异构体和盐或溶剂化物。在一些实施方案中,第一个溶剂是甲苯。在一些实施方案中,第二个溶剂是乙酸乙酯。

[0100] 本发明提供了通过上述任何一个方法制备的萘并呋喃化合物。在一些实施方案中,萘并呋喃化合物选自2-(1-羟乙基)-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙酰基-7-氯-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙酰基-7-氟-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙酰基萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,磷酸单[1-(4,9-二氧化-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙基]酯,磷酸1-(4,9-二氧化-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙基酯二甲酯,其对映体、非对映体、互变异构体和盐或溶剂化物。在某些实施方案中,该萘并呋喃化合物具有至少大约80%、大约85%、大约90%、大约95%或大约99%的纯度。在一些实施方案中,该萘并呋喃化合物具有至多大约10%、大约5%、大约2%、或大约1%、大约0.5%、大约0.2%、大约0.15%或大约0.1%的杂质。

[0101] 本发明提供了制备化合物1的颗粒的方法,包括化合物1的多晶型物的颗粒、高纯度形式的化合物1的颗粒和高纯度形式的化合物1的多晶型物的颗粒。在一些实施方案中,具有目标中值粒径(例如,大约20微米)的颗粒是通过碾磨化合物1的晶体来制备的,所述晶体包括纯化形式的化合物1的晶体、化合物1的多晶型物的晶体和/或纯化形式的化合物1的多晶型物的晶体。例如,使用喷射碾磨方法碾磨晶体,其中喷射管压力为大约40,碾磨压力为大约100,进料速度是大约1304g/小时。

[0102] 附图的简要说明

[0103] 图1是描述晶体形式1的XRPD数据的图例。

[0104] 图2是描述晶体形式2的XRPD数据的图例。

[0105] 图3是描述晶体形式3的XRPD数据的图例。

[0106] 图4是描述晶体形式1和晶体形式3的XRPD数据对比的图例。

[0107] 图5A和5B是描述晶体形式2的合成过程的图例系列。

[0108] 图6A-6D是描述晶体形式3的合成过程的图例系列。

[0109] 图7A和7B是描述晶体形式1和3的形态的图片。

[0110] 图8是描述晶体形式1的有限抗肿瘤活性的曲线。

[0111] 图9是描述晶体形式2的抗肿瘤活性的曲线。

[0112] 图10是对比晶体形式1和晶体形式3的抗肿瘤活性的曲线。

[0113] 图11是描述晶体形式2在癌症患者中的临床药物动力学(PK)数据的曲线。

[0114] 图12是描述晶体形式3在癌症患者中的PK数据的曲线。

[0115] 图13是描述用大约90%纯的晶体形式2(使用图5A-5B所举例说明的合成方法制

备)所观察到的毒性的曲线。

[0116] 图14是描述大约95%纯的晶体形式2(使用图5A-5B所举例说明的合成方法制备)的安全性的曲线。

[0117] 图15是描述不同粒径范围的化合物1的抗肿瘤活性的曲线。

[0118] 图16是描述不同粒径范围的化合物1的体内PK数据的曲线。

[0119] 图17是描述化合物1的溶解和粒径之间的关系的曲线。

[0120] 图18是描述癌症干细胞特异性的和常规的癌症治疗之间差别的图例。

[0121] 图19是描述结肠癌转移病变至肾脏的完全衰退的图例。

[0122] 图20是说明对患者BID给药的药物动力学曲线,其中以500mg的剂量对患者给药,每天两次(总日剂量1000mg)。

[0123] 图21是说明对患者每天给药一次的药物动力学曲线,其中以20mg的剂量对患者给药,每天一次。

[0124] 图22是举例说明用化合物1治疗的结肠直肠癌患者的无进展生存期的对比曲线。将用化合物1治疗的、所评价的结肠直肠癌患者的无进展生存期(PFS)与结肠直肠癌患者的最佳支持治疗的历史PFS数据进行比较。

[0125] 图23是举例说明无进展生存期(PFS)与药物动力学暴露量的对比曲线。将接受化合物1的所评价患者的PFS与化合物1接触量超过或低于1.6uM(接触至少4小时)的PFS进行比较。

[0126] 图24是说明提高安全性和选择性的目标PK模式的曲线。

[0127] 图25是说明长期患有稳定疾病(>16周)的患者在BBI608治疗期间、在它们的肿瘤组织中具有高水平p-STAT3的图片(在治疗之前)。

[0128] 本发明的详细说明

[0129] 下面详细地讨论本发明的实施方案。在描述实施方案过程中,为了清楚起见,使用特定术语。然而,本发明不限于如此选择的特定术语。相关领域的技术人员能够认识到,可以使用在不背离本发明的精神和范围下形成的其它等效部分及其它方法。本文以引证的方式结合所列举的所有参考文献,好象每个参考文献被单独地结合一样。

[0130] 在本文中,“相当大部分”的颗粒组可以至少为该组颗粒总数的大约99%,至少大约95%,至少大约90%,至少大约85%,至少大约80%,至少大约75%,至少大约70%,至少大约60%或至少大约50%。

[0131] 可以体外或体内测定组合物的抗癌症干细胞活性。例如,通过给予化合物并测定癌症干细胞的自我更新和存活率,可以体外测定组合物的抗肿瘤活性。例如,将已经给予化合物的肿瘤细胞的特性与没有给予化合物(对照)的肿瘤细胞的特性进行比较,由此可以体外评价化合物的抗肿瘤活性。例如,使用转移模型和/或使用原位模型,测定已经给予化合物的动物的肿瘤体积变化,可以体内测定组合物的抗肿瘤活性。例如,通过对已经给予化合物的动物与没有给予化合物的动物(对照)进行比较,可以体内评价化合物的抗肿瘤活性。

[0132] 可以体外或体内测定组合物的耐受性。例如,通过给予正常细胞化合物并测定其分裂率、通过测定正常细胞的营养吸收、通过测定正常细胞不同于营养吸收的代谢率指标、通过测定正常细胞的生长和/或通过测定正常细胞的其它生命指标,可以体外测定组合物的耐受性。例如,将已经给予化合物的正常细胞的特性与没有给予化合物的正常细胞(对



照)的特性进行比较,可以体外评价化合物的耐受性。例如,通过测定已经给予化合物的动物的体重或食物摄入或获得临床观察结果(例如毛发保持或丧失、活力和/或对刺激的敏感性),可以体内测定组合物的耐受性。例如,通过对已经给予化合物的动物与没有给予化合物的动物(对照)进行比较,可以体内评价化合物的耐受性。

[0133] 可以确定化合物、产物和/或药物组合物的有效性评级和/或毒性评级。例如,有效性评级可以与抗肿瘤活性成正比,或可以是相对于抗肿瘤活性的单调递增函数。例如,毒性评级可以与耐受性成反比,或可以是相对于耐受性的单调递减函数。

[0134] 据报道,萘并呋喃化合物缺乏体内抗肿瘤活性。参见M.M.Rao和D.G.I.Kingston, *J.Natural Products*, 45 (5) (1982) 600-604。此外,据报道,该化合物对癌细胞和正常细胞具有同等毒性。也就是说,报道该化合物可以同等地杀死癌细胞和正常细胞,结论为该化合物没有治疗癌症的潜力。参见K.Hirai K.等人, *Cancer Detection and Prevention*, 23 (6) (1999) 539-550; Takano A.等人, *Anticancer Research* 29:455-464, 2009。

[0135] 然而,本文报道的实验研究表明,当以具有合适粒径分布的颗粒形式给予该化合物时,可以实现本公开中描述的某些药物动力学接触量,使得该化合物的确具有选择性的抗肿瘤活性。

[0136] 对于本发明的目的,药物的“生物利用率”定义为:给药剂型中进入系统循环中的药物相对数量和出现在血液中的药物的比率。生物利用率取决于至少三个因素:(i)控制生物利用率的吸收,而后(ii)它的组织再分布,和(iii)消除(代谢性降解加上肾及其它机理)。

[0137] 通过考虑组织再分布和生物转化(即,消除)(这也可以通过静脉内给予药物来评估),可以评估“绝对生物利用率”。除非另有陈述,否则,“HPLC”是指高效液相色谱;“可药用”是指生理学允许的物质,当给予哺乳动物时,其不会典型地产生过敏或其它不良反应,例如,胃紊乱、眩晕等等;“哺乳动物”是指高级脊椎动物,包括人和用乳腺分泌的乳汁抚养幼崽并且通常在不同程度上用毛发覆盖皮肤的所有其它动物;“治疗”包括解除、减轻或消除哺乳动物疾病的至少一种症状。

[0138] 本文使用的术语“治疗”包括给予按照本发明的化合物,预防性地防止或抑制不希望有的病症,并且治疗性地消除或降低该病症的程度或症状。治疗还包括防止不希望有的病症的复发、延迟不希望有的病症的发展和防止或延迟不希望有的病症的发病。将按照本发明的治疗给予患有需要这种治疗的疾病或病症的人或其它哺乳动物。治疗还包括对细胞或器官体外应用化合物。治疗可以通过系统或局部给药来进行。

[0139] 有效量是实现目标药理学效果所必需的、用单一剂量或多剂量给予的活性组分的数量。利用熟练的临床医师熟知的常规实验和滴定法(titration),熟练的医师可以确定个体患者或治疗个体病症的有效剂量并使其最佳化。实际剂量和计划可以根据下列而变化:是否与其它药物联合给予组合物,或药物动力学的个别差异,药物处置和代谢。类似地,对于体外应用,数量也可以变化。按照特定状况的需要(不用过度实验)来调节剂量,这在本领域技术人员知识范围之内。本文公开的剂量范围不妨碍使用更高或更低的、可以批准在特定应用中应用的组分剂量。

[0140] 本文提供的药物组合物的性状包括适合于给予人的药物组合物。基于本公开,熟练的技术人员可以理解,这种组合物通常适合于给予任何哺乳动物或其它动物。适合于给

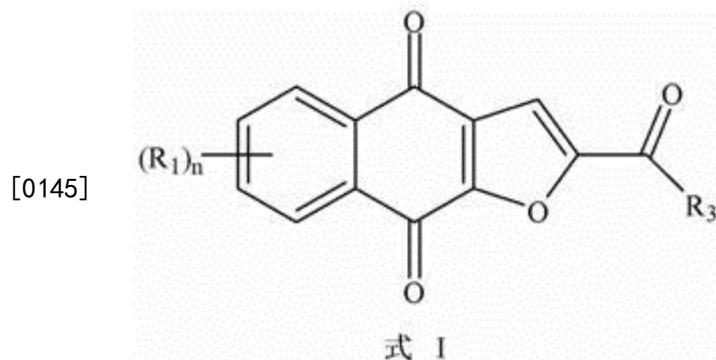
予各种动物的组合物的制备方法已经被充分了解,普通兽医药理学家基于给予人的药物组合物可以用常规实验来设计和进行这种改进。

[0141] 化合物结构和性能

[0142] 式I的萘并呋喃化合物,例如2-(1-羟乙基)-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙酰基-7-氯-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙酰基-7-氟-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙酰基萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,实际上不溶于水和宽范围的试验溶剂,包括DMSO(二甲亚砜),N-甲基吡咯烷,DMA(二甲基乙酰胺),乙醇,PEG400(聚乙二醇400),丙二醇,Cremophor EL(聚乙氧基蓖麻油),Labrasol(辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯(聚氧甘油酯)),Labrafil M(植物油PEG-6(聚乙二醇)酯)和Capryol(丙二醇辛酸酯)。该萘并呋喃化合物可溶于一定范围的极性有机溶剂中,例如某些卤代烃,例如,氯烃,例如二氯甲烷,酯,乙酸乙酯,羧酸,例如乙酸,酮,例如丙酮,和醇,例如甲醇。发现萘并呋喃化合物可溶于二氯甲烷和乙酸乙酯中。

[0143] 本文所描述的、发现选择性抗肿瘤活性的实验研究是通过给予小颗粒形式的药物组合物的活性化合物实现的,使得集中于萘并呋喃化合物上的选择性抗癌活性达到一定的药物动力学接触量。由于目前讨论的、由化合物得出的观察结果,当以小直径的颗粒形式给予时,其它萘并呋喃(例如萘并呋喃)可以类似地显示出它们达到一定药物动力学接触量(从而获得选择性的抗癌活性)的药物动力学特性的有利改变。可以实验测定以一或多种不同粒径分布形式给予的其它萘并呋喃的药物动力学特性。

[0144] 可以显示药物动力学特性和效果提高的、以给予动物、哺乳动物或人的形式的粒径减小的一些其它化合物包括以式I呈现的那些化合物、和其盐和溶剂化物(如对实施例中所试验的化合物所看到的)。



[0146] 在式I中,符号 $(R_1)_n$ 表示 $(R_1)$ 取代基在沿着苯环的每个合适位置独立地取代。例如,对于n等于4,四个 $R_1$ 取代基可以全部相同,或它们可以各自不同。例如,每个 $(R_1)$ 可以独立地选自氢,卤素,氟,氰基,硝基, $CF_3$ , $OCF_3$ ,烷基,甲基,取代的烷基,烯基,取代的烯基,炔基,取代的炔基,环烷基,取代的环烷基,环烯基,取代的环烯基,杂环,取代的杂环,芳基,取代的芳基, $OR_a$ , $SR_a$ 和 $NH_2$ 。烷基可以包括具有例如1至8个通过单键连接的碳原子的部分,烯基可以包括具有例如2至8个通过一个或多个双键连接的碳原子的部分,炔基可以包括具有例如2至8个通过一个或多个三键连接的碳原子的部分。取代基可以包括下列部分,例如氢,卤素,氰基,硝基,芳基, $OR_a$ , $SR_a$ 和 $NH_2$ 。例如,每个 $(R_1)$ 可以独立地选自氢,甲基,F(氟),Cl(氯),Br(溴),I(碘),OH(羟基)和 $NH_2$ (胺)。例如, $R_3$ 可以选自氢,卤素,氟,氰基, $CF_3$ , $OCF_3$ ,烷基,甲基,取代的烷基,卤素取代的烷基,羟基取代的烷基,胺取代的烷基,烯基,取代的烯

基,炔基,取代的炔基,环烷基,取代的环烷基,环烯基,取代的环烯基,杂环,取代的杂环,芳基,取代的芳基, $OR_a$ ,  $SR_a$  和  $NR_bR_c$ 。例如, $R_3$ 可以选自甲基和 $C(R_8)_3$ 。每个 $(R_8)$ 可以独立地选自氢,甲基,F(氟),Cl,Br,I,OH和 $NH_2$ 。例如,至多两个独立选择的 $(R_1)$ 取代基和 $(R_8)$ 取代基可以选为F(氟),其余的选为氢。

[0147] 在一些实施方案中,式I的化合物选自2-(1-羟乙基)-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙酰基-7-氯-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙酰基-7-氟-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙酰基萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,其对映体、非对映体、互变异构体和盐或溶剂化物。例如,可以选择每个 $(R_1)$ 是氢,可以选择 $R_3$ 是甲基,使得式I的化合物是2-乙酰基萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮。例如,每个 $R_a$ 可以独立地选自氢,烷基,取代的烷基,烯基,取代的烯基,炔基,取代的炔基,环烷基,取代的环烷基,环烯基,取代的环烯基,杂环,取代的杂环,芳基和取代的芳基。例如,每个 $R_b$ 和 $R_c$ 可以独立地选自氢,烷基,取代的烷基,环烷基,取代的环烷基,杂环,取代的杂环,芳基和取代的芳基。或者, $R_b$ 和 $R_c$ 与它们键合的N一起可以形成杂环或取代的杂环。

[0148] 多晶型物

[0149] 本发明的萘并呋喃化合物包括多晶型物。在一些实施方案中,多晶型物是按照式I的化合物的多晶型物。在一些实施方案中,多晶型物是化合物1的多晶型物。例如,在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图基本上与图1所列出的X射线衍射图相似。在本文中,这种多晶型物称为“晶体形式1”、“形式1”或“XRPD1”,这些术语可互换使用。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图基本上与图2所列出的X射线衍射图相似。在本文中,这种多晶型物称为“晶体形式2”、“形式2”或“XRPD2”,这些术语可互换使用。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图基本上与图3所列出的X射线衍射图相似。在本文中,这种多晶型物称为“晶体形式3”、“形式3”或“XRPD3”,这些术语可互换使用。

[0150] 例如,在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约下列 $2\theta$ 角度处包括一个或多个峰:10.2, 11.4, 11.9, 14.1, 14.5, 17.3, 21.0, 22.2, 24.0, 26.0和28.1度。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约下列 $2\theta$ 角度处包括一个或多个峰:10.2, 11.9, 14.1, 14.5, 17.3, 22.2和/或28.1度。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约10.2度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约11.9度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约14.1度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约14.5度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约17.3度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮

的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约22.2度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约28.1度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰:至少在大约10.2度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约11.9度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约14.1度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约14.5度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约17.3度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约22.2度 $2\theta$ 处的峰和至少在大约28.1度 $2\theta$ 处的峰和其任何组合。

[0151] 例如,在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约下列 $2\theta$ 角度处包括一个或多个峰:7.5, 9.9, 11.4, 12.3, 15.0, 23.0, 23.3, 24.1, 24.6, 25.0, 26.1, 27.0和28.4度。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约下列 $2\theta$ 角度处包括一个或多个峰:7.5, 9.9, 12.3, 15, 23.0, 23.3, 24.6和/或28.4度。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约7.5度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约9.9度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约12.3度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约15度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约23度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约23.3度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约24.6度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图至少在大约28.4度 $2\theta$ 处包括峰。在一些实施方案中,多晶型物是2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰:至少在大约7.5度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约9.9度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约15度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约12.3度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约23.0度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约23.3度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约24.6度 $2\theta$ 处的峰和至少在大约28.4度处的峰和其任何组合。

[0152] 已经在各种溶剂和条件下检测了晶体形式1,但已经表明它的抗肿瘤活性低(图8)。在图8所示的研究中,对形成皮下FaDu人头颈癌的免疫抑制小鼠口服(po)给予指定数量的、手工研磨的、具有晶体形式1的化合物1或赋形剂对照物。将化合物1配制在GELUCIRE™中。每天(qd)给予所有方案。在治疗期间,周期性地评估肿瘤大小。

[0153] 在杂质的存在下意外地获得晶体形式2,并且已表明这种多晶型物显示了有效的抗肿瘤活性(图9)。在图9所示的研究中,对形成皮下FaDu人头颈癌的免疫抑制小鼠口服(po)给予100mg/kg微粉化的化合物1(利用图5A和5B所描述的合成方法制备(第一批))或赋形剂对照物。将化合物1配制在GELUCIRE™中。每天(qd)给予所有方案。在治疗期间,周期性地评估肿瘤大小。已经利用现行良好的生产实践(cGMP)方法成功地制备了形式2,并且被

FDA和Health Canada批准用于临床试验。在癌症患者中,形式2显现了目标药物动力学(图11)、安全性和强的抗肿瘤活性信号。

[0154] 晶体形式3显现了与形式1类似但不同的X射线粉末衍射(XRPD)图,并且表现出与形式1非常不同的晶体习性(图7A和B)。形式3只可以使用本文所描述的特别设计的浆液方法、由形式1产生。形式3显示了有效的抗肿瘤活性(图10)。在图10所示的研究中,对形成皮下FaDu人头颈癌的免疫抑制小鼠口服(po)给予200mg/kg的、手工研磨的、具有晶体形式1或形式3的化合物1或赋形剂对照物。将化合物1配制在gelucire中。每天(qd)给予所有方案。在治疗期间,周期性地评估肿瘤大小。这种多晶型物已经成功地利用cGMP方法制备,并且被FDA和Health Canada批准用于临床试验。在癌症患者中,形式3也显现了目标药物动力学(图12)、安全性和强的抗肿瘤活性信号。

[0155] 制备晶体形式2的合成方法示于图5A-5B中。简要地说,将3-丁烯-2-酮(451.2克)加入到2升3颈圆底烧瓶中,圆底烧瓶配备有机械搅拌器、温度计和加入漏斗。向加入漏斗中加入溴(936.0克)。将烧瓶中的内含物冷却至-5℃之后,将溴滴入烧瓶中,同时强烈搅拌,并将温度在-5℃下保持30分钟。将该混合物在-5℃额外搅拌15分钟,而后分成4个等份。将每份混合物以及四氢呋喃(2133.6克)加入到22升4颈圆底烧瓶中,圆底烧瓶配备有机械搅拌器、温度计和加入漏斗。将DBU(1,3-二氮杂双环[5.4.0]十一-7-烯,222.9克)加入到加入漏斗中。将DBU滴入烧瓶中,同时强烈搅拌,并将温度在0℃-5℃保持30分钟。在0℃-5℃,将该混合物额外搅拌15分钟。然后将2-羟基-1,4-萘醌(231克)加入到烧瓶中。将额外的DBU(246.0克)加入到加入漏斗中,而后滴入到烧瓶中的混合物中,滴入速度应该使反应混合物的温度不超过40℃。完全加入DBU之后,将得到的混合物在室温下搅拌过夜,并获取反应混合物的样品进行HPLC分析。向该反应混合物中加入水(10.8升),并将得到的混合物冷却至0℃-3℃,保持至少30分钟,而后通过真空过滤器过滤。用5%碳酸氢钠水溶液(3升)、水(3升)、1%乙酸水溶液(3升)和乙醇(2X1升,两次)依次冲洗过滤的固体。将冲洗的固体保存,与其它批料收集在一起。将合并的粗品(28.73kg)以及乙酸乙酯(811.7kg)加入到配备有机械搅拌器、温度计和冷凝器的500加仑容器中。在氮气氛围中,将该混合物加热至回流(72℃),保持2小时,而后用含有活性炭层的10微米过滤筒过滤,除去不溶性物质。用新的热乙酸乙酯(10kg)冲洗容器、传输管线和过滤器。将合并的滤液冷却至0-5℃,并在此温度下保持2小时,而后用20英寸Buchner过滤器进行过滤。将过滤的固体产物用0-5℃的乙酸乙酯(5.7kg)冲洗,在40℃真空干燥至恒重。将剩余的滤液蒸发,使体积减少63%,并再次重复结晶过程,产生第二批产物,也将其在与第一批产物相同的条件下干燥。获得的两批都是晶体形式2。制备的第一批(0.5kg)具有99.5%纯度(HPLC;NMR纯度~95%)。制备的第二批(1.09kg)具有98.9%纯度(HPLC;NMR纯度~90%)。

[0156] 制备晶体形式3的合成方法示于图6A-6D中。本文简要地列出步骤。步骤1:使用溴将3-丁烯-2-酮(甲基乙烯基酮,MVK)溴化。不使用额外的溶剂。将中间体3,4-二溴丁-2-酮溶于四氢呋喃(THF)中,并使其与1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一-7-烯(DBU)反应,形成第二个中间体3-溴-3-丁烯-2-酮。一旦该反应完成,加入2-羟基-1,4-萘醌(HNQ)。加入第二份DBU,并使该混合物暴露在空气中。用水淬灭该反应,并过滤收集固体。用碳酸氢钠水溶液、乙酸水溶液、水和乙醇洗涤这些固体。通过在乙醇中形成浆液并收集固体来分离产物。步骤2:用活化的二氧化锰(在甲苯中)将伴随目标2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮

(化合物1)的剩余量的2-乙酰基-2,3-二氢萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮氧化为化合物1。通过炭和硅藻土饼过滤该混合物。浓缩滤液,使产物沉淀,将其过滤并干燥。步骤3:在75℃-80℃,使固体在乙酸乙酯(25mL/g纯化的化合物1)中成浆大约5小时,过滤收集,干燥。用这种方法制备的化合物1是晶体形式3。用这种方法但没有形成浆液过程所制备的化合物1产生晶体形式1。

[0157] 化合物粒径分布对血浆药物浓度和选择性抗肿瘤活性的效果

[0158] 在本发明之前,没有形成和/或评估化合物1的微颗粒。先前的研究已经表明,在动物模型中,化合物1对正常和癌细胞具有同样毒性,并且没有观察到抗肿瘤活性。本文提供的研究表明,减小化合物1的粒径不但提高了生物利用率、而且提高了选择性的抗肿瘤活性,没有毒性迹象。由于生物利用率提高将会同样地增加癌细胞和正常细胞与化合物1的接触,所以,这种结果是意想不到的。选择性提高抗癌活性同时没有增加对正常细胞的毒性的机理还不清楚。在这些研究中,当 $D_{50}$ (即,将分布分为两个相等部分的粒径分布的中值点)为大约20 $\mu\text{m}$ 时,化合物1的生物利用率提高似乎达到最佳。然而,对于 $D_{50}$ 值大约为2 $\mu\text{m}$ 的情况进行了进一步研究。与具有20微米的 $D_{50}$ 的颗粒相比较,具有2微米的 $D_{50}$ 的化合物1的微颗粒意外地提高了抗肿瘤活性,尽管没有提高药物动力学接触。在其它研究中,产生了具有大约100纳米的 $D_{50}$ ( $D_{50}=110.4$ 纳米)的化合物1的纳米颗粒,但意外的是,观察到该粒径的化合物1的抗肿瘤活性降低。相应地,在一个优选实施方案中,含有化合物1的颗粒(例如,微颗粒)的组合物具有等于或低于20微米的 $D_{50}$ 和等于或高于0.2微米的 $D_{50}$ ,并且意外地具有有效的抗肿瘤活性,同时对正常细胞的细胞毒性没有增加。

[0159] 在图15中说明了不同粒度范围的化合物1的颗粒的抗肿瘤活性,并且在图16-18中说明了不同粒度范围的化合物1的颗粒的药物动力学数据。在图15所示的研究中,对形成皮下FaDu人头颈癌的免疫抑制小鼠口服(po)给予指定数量的、具有指定粒径的化合物1或赋形剂对照物。每天(qd)给予所有方案。周期性地评估肿瘤大小。

[0160] 发现给予限定粒径(例如,减小粒径)的颗粒形式的萘并呋喃化合物可提高体内血浆药物浓度。除非另作说明,否则本文的术语“粒径”和“直径”可互换地用于描述颗粒。应该理解,使用术语“直径”未必意味着颗粒具有绝对或近似的球形。例如,“直径”可以用作颗粒粒径的近似值,例如,与非球形颗粒体积相等的圆球的直径。

[0161] 在意外的效果中,发现给予限定粒径分布的萘并呋喃化合物颗粒(例如,小颗粒)(在药物组合物中)产生选择性的抗肿瘤活性。例如,在小鼠异种移植模型中,以具有20 $\mu\text{m}$ (即,微米,这些术语可在本文中互换使用)中值粒径的颗粒形式给予的化合物显示了效果(选择性的抗肿瘤活性),虽然效果相对较弱。比较起来,150 $\mu\text{m}$ (微米)的颗粒没有显示效果。给予较小颗粒形式的萘并呋喃化合物可以产生选择性抗肿瘤活性的发现是意外发现,不能仅仅基于溶解性或生物利用率提高来解释。也就是说,通常,溶解性提高与药物口服生物利用率提高有关,这可以增加对正常细胞的毒性以及抗肿瘤活性。正如以上的讨论,如果不是在WO 2009/036099和WO 2009/036101中描述的限定条件下进行接触,萘并呋喃化合物可以同等地对肿瘤细胞和正常细胞产生毒性。

[0162] 在进一步的意外效果中,发现在药物组合物中给予粒径进一步减小的萘并呋喃化合物颗粒可产生显著提高的抗肿瘤活性,但几乎不会改变药物动力学特性,即,生物利用率没有改变。例如,在小鼠异种移植模型中,以具有2 $\mu\text{m}$ (微米)中值粒径的颗粒形式给予的化

合物显示了显著提高的效果。与20 $\mu\text{m}$ 的颗粒相比,2 $\mu\text{m}$ 的颗粒显示了显著提高的效果,但药物动力学特性非常类似。换句话说,这种提高的效果与药物动力学特性(即,生物利用率)无关。这种结果是非常意外的,因为对于这种溶解性差的化合物来说,效果提高通常与药物的口服生物利用率提高相关。

[0163] 因此,观察到选择性抗肿瘤活性提高是意外和意想不到的结果。本发明提供了萘并呋喃化合物(例如,式I的化合物)的颗粒,其是活性的,即,具有抗肿瘤效果和/或选择性的抗肿瘤活性。该活性颗粒具有限定粒径,例如,具有小于或等于大约200 $\mu\text{m}$ 、大约150 $\mu\text{m}$ 、大约100 $\mu\text{m}$ 、大约40 $\mu\text{m}$ 、或大约20 $\mu\text{m}$ 、大约10 $\mu\text{m}$ 、大约5 $\mu\text{m}$ 、大约4 $\mu\text{m}$ 、大约3 $\mu\text{m}$ 、大约2 $\mu\text{m}$ 、大约1 $\mu\text{m}$ 、大约0.5 $\mu\text{m}$ 、大约0.2 $\mu\text{m}$ 或大约0.1 $\mu\text{m}$ 的直径。比这种限定粒径大的颗粒是非活性的,或比本文所描述颗粒的活性小。

[0164] 由此,给予较小颗粒形式的萘并呋喃化合物或另一种按照式I的化合物可以提高它的选择性的抗肿瘤活性。在给药过程中使用具有限定粒径分布的按照式I化合物的颗粒可以建立目标选择性的抗肿瘤活性。例如,使用具有限定粒径分布的萘并呋喃化合物,例如,较小颗粒,可以在较短的时段产生更高的血液浓度,并且产生选择性的抗肿瘤活性,虽然活性相对较弱。进一步减小化合物的粒径,可以显著地提高效果,同时不改变化合物的血浆浓度。

[0165] 除非另有陈述,否则,本文的术语“血浆浓度”、“血液摩尔浓度”和“血液浓度”可互换使用。术语“瘤”可用于描述显示异常生长型的细胞。这种瘤可以包括良性和恶性肿瘤,例如实质固态瘤,以及其它细胞生长病症,例如白血病,其没有确定的形状,并且不限于人或动物体的特定区域。由此,“瘤”包括癌性和非癌性的赘生性细胞和组织。除非另作说明,否则,在本文中交代的或提及的特定研究或实验中,术语“肿瘤”和“癌症”指的是更宽范围的所有瘤种类,包括不限于人或动物体的特定区域的那些瘤。然而,更具限制性的术语“实质固态瘤”不包括细胞生长病症,例如白血病,其没有确定的形状,并且不限于人或动物体的特定区域。

[0166] 瘤可以没有下列特征或具有一个或一个以上下列特征:固态(实质固态瘤),恶性肿瘤,转移病变或Stat 3途径活性。瘤可以包括例如癌症干细胞。瘤可以是例如癌、肉瘤、腺癌、淋巴瘤或血液恶性肿瘤。

[0167] 已经将吸收定义为从给药位点获取的药物到达身体之内要测定的位点的过程。参见M.Rowland,T.N.Tozer(1995) *Clinical pharmacokinetics: Concepts and applications*. Lippincott Williams&Wilkins。口服药物吸收通常指的是药物穿过肠上皮细胞的顶膜的转运过程,因为认为顶膜是膜渗透的速率限制步骤。参见U.Fagerholm&H.Lennernäs(1995) *Experimental estimation of the effective unstirred water layer thickness in the human jejunum, and its importance in oral drug absorption*, *Eur J Pharm Sci* 3:247-253; M.B.Lande,J.M.Donovan&M.L.Zeidel(1995) *The relationship between membrane fluidity and permeabilities to water, solutes, ammonia, and protons*, *J Gen Physiol* 106:67-84。渗透性是描述药物如何容易地通过膜转运的普通术语。药物的比渗透率特征取决于它的理化性质,包括亲油性、电荷、粒径和极性表面积。参见Rowland&Tozer 1995; C.A.Lipinski,F.Lombardo,B.W.Dominy&P.J.Feeney(2001) *Experimental and computational approaches to estimate solubility and*



permeability in drug discovery and development settings, Adv Drug Deliv Rev 46:3-26. 吸收率取决于药物的渗透性、膜的表面积和经过膜的浓度梯度。浓度梯度是被动扩散的驱动力,是药物膜转运的最常见的机理。对口服给药来说,药物主要为肠管所吸收。人肠管大约为5-8米长,具有将近200平方米的总表面积,而小鼠肠管只有大约10-20cm长。因此,虽然更大粒径的药物的渗透性比较小粒径药物的渗透性低,但可以预测,作为人用药物的更大粒径的药物可以比小鼠中较小粒径药物具有更高的吸收率或与具有其相同的吸收率。

[0168] 例如,当以药物制剂形式给药时,例如,用于治疗癌症或肿瘤,可以预测中值粒径小于或等于大约200 $\mu\text{m}$ 、150 $\mu\text{m}$ 、100 $\mu\text{m}$ 、80 $\mu\text{m}$ 、60 $\mu\text{m}$ 、40 $\mu\text{m}$ 、20 $\mu\text{m}$ 、10 $\mu\text{m}$ 、5 $\mu\text{m}$ 、4 $\mu\text{m}$ 、3 $\mu\text{m}$ 、2 $\mu\text{m}$ 、1 $\mu\text{m}$ 、0.5 $\mu\text{m}$ 或0.2 $\mu\text{m}$ 的按照式I化合物的粒度分布能够产生选择性的抗肿瘤活性。例如,粒度分布应该使颗粒具有大约0.02 $\mu\text{m}$ 至大约5 $\mu\text{m}$ 或大约0.2 $\mu\text{m}$ 至大约4 $\mu\text{m}$ 的中值粒径。例如,粒度分布应该使颗粒具有小于或等于大约5 $\mu\text{m}$ 的中值粒径、平均直径与中值粒径的比例至多为大约2和众数直径(mode diameter)与中值粒径的比例至少为大约0.25。

[0169] 术语“颗粒”可以指的是式I化合物的团聚体。术语“平均”可以指的是所有颗粒大小的和除以颗粒总数。术语“中间值”可以指的是例如直径,其中一半颗粒具有更大的直径,一半颗粒具有更小的直径。术语“众数”可以表示最通常出现的粒径值。术语“累积总数”可以指的是所有颗粒。

[0170] 通过给予萘并呋喃化合物颗粒所获得的选择性抗肿瘤活性不但取决于颗粒的粒径分布,例如,颗粒的体积或代表那些体积的特征的直径,而且取决于颗粒的形状和形状分布。例如,与球形颗粒组相比,针状颗粒组可以产生不同的药物动力学特性。由此,合乎需要的是,测定所给予颗粒的形状和形状分布特征,和/或,使用一定的方法,制备具有预定形状和形状分布特征的颗粒,例如,接近均匀形状,例如,近似于圆球的颗粒。例如,颗粒的球形度 $\Psi$ 可以定义为:

$$[0171] \quad \Psi = \frac{\pi^{1/3} (6V_p)^{2/3}}{A_p},$$

[0172] 其中 $V_p$ 是颗粒的体积, $A_p$ 是颗粒的表面积。圆球具有 $\Psi = 1$ 的球形度,颗粒的球形度越接近单一(unity),颗粒的形状越接近圆球。作为对比,四面体具有大约0.671的球形度,立方体具有大约0.806的球形度,八面体具有大约0.846的球形度,十二面体具有大约0.910的球形度,二十面体具有大约0.939的球形度。因为对于给定体积来说,圆球的表面积最小,所以,可以预计,接近球形的颗粒比更不接近球形的相同体积的颗粒溶解得更慢。圆球组的平均球形度可以定义为

$$[0173] \quad \Psi_m = \frac{\pi^{1/3} (6 \sum V_p)^{2/3}}{\sum A_p},$$

[0174] 其中 $\sum V_p$ 是所有颗粒的总体积, $\sum A_p$ 是所有颗粒的总表面积。例如,所给予的按照式I化合物的颗粒可以具有至少大约0.8的平均球形度,或至少大约0.9的平均球形度。

[0175] 颗粒的粒径、粒径分布、形状、形状分布特征和其它因素例如表面粗糙度或不规则度可以影响所给予的药物制剂中的化合物1颗粒组的平均比表面积。平均比表面积可以定义为: $\sum A_p / \sum m_p$ ,其中 $\sum A_p$ 是颗粒的总表面积, $\sum m_p$ 是颗粒的总质量。颗粒的平均比表面积



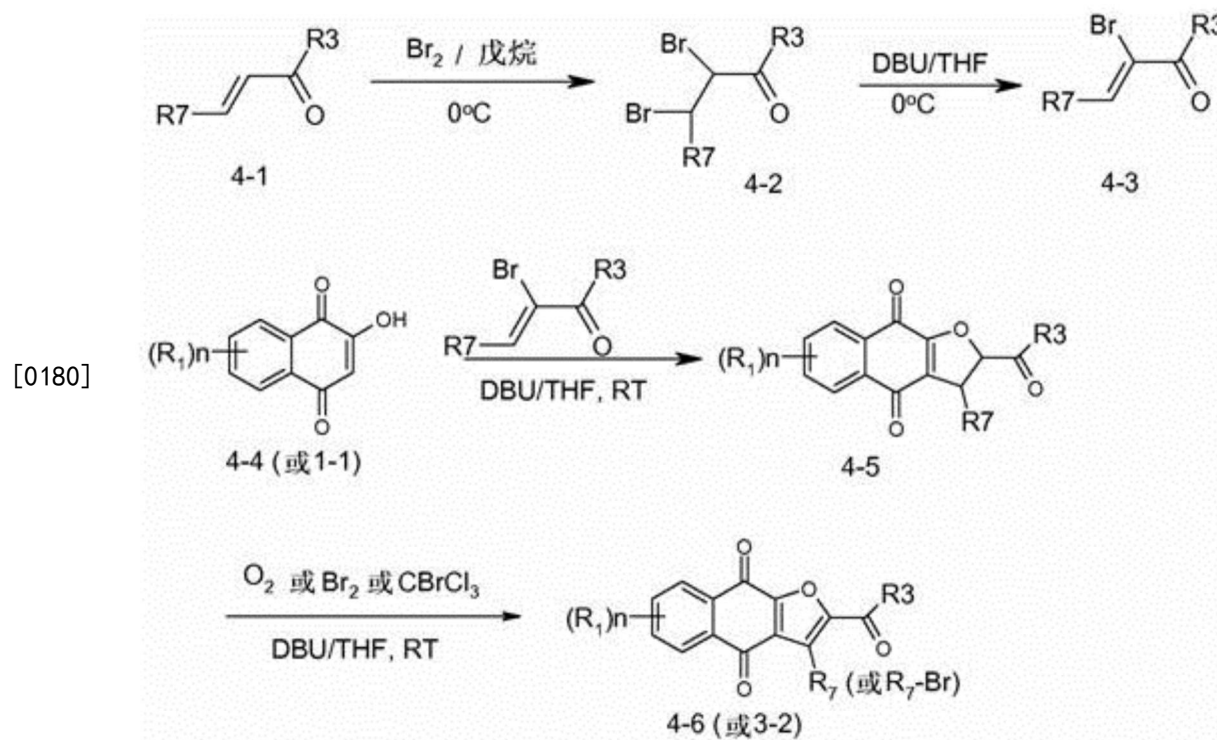
越大,预期颗粒溶解的越快。

[0176] 按照式I化合物在药物制剂中的颗粒可以包括跨越不同颗粒之间或在相同颗粒内的结晶状态的萘并呋喃化合物。结晶状态可以在跨越不同颗粒之间或在相同颗粒内包括一或多种多晶型物。正如本领域技术人员所理解的那样,预期颗粒的溶解速率受到化合物颗粒中的物质状态影响,例如,第一个多晶型物或第二个多晶型物是否是晶体。

[0177] 一或多种技术可以用于测定药物制剂中的按照式I化合物的颗粒的粒径和/或粒径分布。例如,可以使用筛分分析、光学显微计数、电子显微照片统计、电阻统计、沉降时间、激光衍射和/或声谱。一些或所有这些技术或其变体可以用于测定药物制剂中的萘并呋喃化合物颗粒的形状、形状分布特征和/或比表面积。BET等温线和/或透气性比面积技术可以用于测定药物制剂中的按照式I化合物的颗粒的比表面积。

[0178] 形成萘并呋喃化合物的方法

[0179] WO 2009/036099和WO 2009/036101公开了制备式II的萘并呋喃化合物的方法如下。



[0181] DBU:1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一-7-烯;

[0182] THF:四氢呋喃;

[0183] RT:室温。

[0184] 在该方法中,使3-溴-3-丁烯-2-酮(4-3)与2-羟基-1,4-萘醌(4-4)在一个空气开放的容器中反应,产生2,3-二氢萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮(4-5)。用外界空气中的氧气氧化2,3-二氢萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮(4-5),变成萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮(4-6)。用该方法制备萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮。然而,在进一步形成该化合物期间,测出该方法仍然产生显著的各种杂质,这种杂质妨碍这些化合物的临床应用潜力。在一些实施方案中,杂质之一是2,3-二氢萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮(4-5)。

[0185] 在一方面,本发明提供了制备萘并呋喃的改进方法。该改进方法可以使杂质最少,

并由此制备基本上纯的萘并呋喃。本文使用的术语“基本上纯”是指制备品包括至少大约80%或80%以上的本发明的化合物(以%面积(HPLC)形式测定)。在一些实施方案中,萘并呋喃是萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮和它的相关化合物(4-6)。

[0186] 在一些实施方案中,本发明的方法包括:在第一个溶剂中,用氧化剂氧化3-溴-3-丁烯-2-酮(4-3)和2-羟基-1,4-萘醌(4-4)的偶合的粗品。在进一步实施方案中,氧化剂是二氧化锰( $\text{MnO}_2$ )。在更进一步的实施方案中,分离粗品,而后将其氧化。在一些实施方案中,第一个溶剂是甲苯或氯仿。

[0187] 在一些实施方案中,本发明的方法进一步包括:用炭处理老化的氧化混合物,除去某些杂质。在进一步实施方案中,用活性炭的垫过滤老化的氧化混合物。在更进一步的实施方案中,在大约100°C过滤混合物。

[0188] 在一些实施方案中,本发明的方法进一步包括:从滤液中结晶出产物。在进一步实施方案中,蒸发浓缩滤液,并冷却,使产物结晶。

[0189] 在一些实施方案中,本发明的方法进一步包括:用第二个溶剂将产物重结晶。在进一步实施方案中,第二个溶剂是乙酸乙酯。

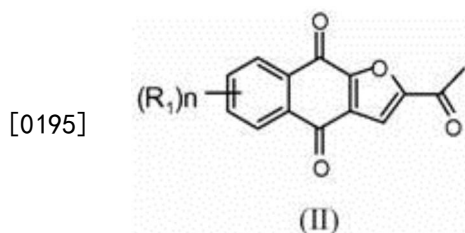
[0190] 在另一个实施方案中,本发明的方法进一步包括:使从第一个溶剂中结晶出的产物在第二个溶剂中形成浆液,将该浆液加热,并冷却该浆液。在进一步实施方案中,第二个溶剂是乙酸乙酯。在一些实施方案中,使产物形成浆液,并只加热至部分溶解。在进一步实施方案中,用于使产物形成浆液的第二个溶剂的体积为在加热条件下完全溶解产物所需体积的1/10,1/5,1/4,1/3,1/2或2/3。

[0191] 本发明还提供了通过本发明的方法制备的萘并呋喃化合物。在一些实施方案中,萘并呋喃化合物选自2-(1-羟乙基)-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙酰基-7-氯-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙酰基-7-氟-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙酰基萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,磷酸单[1-(4,9-二氧化-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙烯基]酯,磷酸1-(4,9-二氧化-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙烯基酯二甲酯,其对映体、非对映体、互变异构体和盐或溶剂化物。在进一步实施方案中,用下列方法制备萘并呋喃化合物:包括在甲苯的存在下,使2-羟基-1,4-萘醌(4-4)和3-溴-3-丁烯-2-酮(4-3)的偶合的、分离的粗品与二氧化锰反应。在更进一步的实施方案中,该方法进一步包括:用活性炭的垫过滤老化的反应混合物。

[0192] 在另一个方面,本发明提供了基本上纯的萘并呋喃化合物。

[0193] 在一些实施方案中,本发明提供了基本上纯的化合物,其选自2-(1-羟乙基)-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙酰基-7-氯-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙酰基-7-氟-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙酰基萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,磷酸单[1-(4,9-二氧化-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙烯基]酯,磷酸1-(4,9-二氧化-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙烯基酯二甲酯,其对映体、非对映体、互变异构体和盐或溶剂化物。

[0194] 在一些实施方案中,本发明提供了基本上纯的式II化合物,



[0196] 其中每个 $R_1$ 独立地是H、Cl或F； $n$ 是0、1、2、3或4。

[0197] 本文使用的“基本上纯”是指至少大约80%的纯度。在一些实施方案中，本发明化合物的纯度具有至少大约85%、大约90%、大约95%或大约99%的纯度。在进一步实施方案中，本发明化合物的纯度具有至少大约99.5%或大约99.8%的纯度。在更进一步的实施方案中，本发明化合物的纯度具有至少大约99.85%、大约99.90%、大约99.94%、大约99.95%或大约99.99%的纯度。在一些实施方案中，本发明的化合物选自2-(1-羟乙基)-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮, 2-乙酰基-7-氯-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮, 2-乙酰基-7-氟-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮, 2-乙酰基萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮, 2-乙基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮, 磷酸单[1-(4,9-二氧化-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙烯基]酯, 磷酸1-(4,9-二氧化-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙烯基酯二甲酯, 其对映体、非对映体、互变异构体和盐或溶剂化物。在一些实施方案中，本发明的化合物是多晶型物。在一些实施方案中，本发明的化合物是按照式I的化合物的多晶型物。在一些实施方案中，本发明的化合物是化合物1的多晶型物。

[0198] 可能存在于本发明化合物中的典型的杂质包括一或多种选自下列的杂质：副产物，异构体，中间体和溶剂。在一些实施方案中，相对于式II的化合物，可能存在于本发明化合物中的杂质至多为大约10%、大约8%、大约5%、大约2%或大约1%。在进一步实施方案中，相对于式II的化合物，可能存在于本发明化合物中的杂质至多为大约0.5%、大约0.2%、大约0.15%或大约0.1%。在更进一步的实施方案中，相对于式II的化合物，可能存在于本发明化合物中的杂质至多为大约0.05%、大约0.02%或大约0.01%。在一些实施方案中，相对于式II的化合物，基本上纯的式II化合物具有至多百万分之(p.p.m.) 500、200、100、50、20、10、5、2、1、0.5、0.2、0.15、0.1或0的残余的一种副产物或多种副产物。

[0199] 在一些实施方案中，杂质包括一或多种选自下列的副产物：2-乙酰基-2,3-二氢萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮, 2,6-二乙酰基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮, 2,7-二乙酰基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮, 3-乙酰基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮, 萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮, 萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮, 萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮和1-(4,9-二羟基-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙醇。

[0200] 在一些实施方案中，杂质包括锰(Mn)。

[0201] 可以用各种仪器测定本发明化合物的纯度。在一些实施方案中，纯度是用HPLC(高效液相色谱)测定的。在一些实施方案中，纯度是用NMR(核磁共振)测定的。在进一步实施方案中，纯度是用HPLC和NMR测定的。

[0202] 在动物试验中，相比于含有化合物1的纯度更小的组合物，含有化合物1的这些高纯度组合物显示出显著提高的安全特性。在小鼠中，没有观察到高纯度化合物1的任何副作用迹象。另外，含有化合物1的这些高纯度组合物已经在患者中进行了试验，并且表现了卓越的安全性。例如，图13说明了所观察到的含有大约90%纯度化合物1的组合物毒性，而

图14说明,含有大约95%或更大纯度的化合物1的高纯度组合物是安全和有效的。在图13所示的研究中,对形成皮下FaDu人头颈癌(上图)或MDA-231人乳腺癌(下图)的免疫抑制小鼠口服(po)给予指定数量的化合物1或赋形剂对照物。将化合物1配制在GELUCIRE™中。每天(qd)给予所有方案。在治疗期间,周期性地评估体重。每个点代表八个肿瘤的平均值±SEM。对于大约90%纯度的化合物,观察到显著的毒性。在第一个实验(上图)中,在治疗期间,总共有4只小鼠死亡(一个在第16天死亡,2个在第19天死亡,1个在第23天死亡),因此,它们死亡之后,它们的体重未包括在图内。在第二个实验(下图)中,在治疗期间,总共有3只小鼠死亡(1个在第14天死亡,2个在第21天死亡),因此,它们死亡之后,它们的体重未包括在图内。在图14所示的研究中,对形成皮下FaDu人头颈癌(上图)或MDA-231人乳腺癌(下图)的免疫抑制小鼠口服(po)给予指定数量的化合物1或赋形剂对照物。将化合物1配制在GELUCIRE™中。每天(qd)给予所有方案。在治疗期间,周期性地评估体重。每个点代表八个肿瘤的平均值±SEM。高纯度的化合物1耐受性很好,并且没有毒性迹象。在两个实验中,所有的小鼠在整个治疗过程中保持健康状态。在一期研究中,将化合物1的剂量从20mg/天逐步升高至2000mg/天,并且不达到最大耐受剂量(MTD)。没有观察到剂量限制性毒性。患者能够很好地耐受化合物1,没有药物诱导的副作用,这与癌症化疗药物形成鲜明对照。在历史记录肿瘤药物当中,基本上纯的化合物1的组合物的临床安全特性处于最好的水平。

#### [0203] 药物制剂

[0204] 在药物制剂中,发现某些赋形剂或增强剂提高了给定粒径分布的按照式I化合物的颗粒的口服生物利用率。例如,加入药学相容的赋形剂GELUCIRE™ 44/14(Gattefossé生产的聚乙二醇甘油基月桂酸酯),可以提高具有小于或等于大约20微米的中值粒径的化合物1的生物利用率。可用于提高或控制口服生物利用率的其它赋形剂的例子包括:表面活性剂,例如TWEEN 80™或TWEEN 20™(聚山梨酸酯,即,聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯)或某些脂质,例如卵磷脂,例如,二豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)。表面活性剂包括两亲的并含有疏水与亲水基的化合物。其它赋形剂可以包括,例如,脂肪酸的甘油酯,饱和脂肪酸的甘油酯,具有8至18个碳的饱和脂肪酸的甘油酯,月桂酸甘油酯,聚乙二醇,聚氧乙烯脱水山梨糖醇烷基化物,纤维素或纤维素衍生物,例如微晶纤维素和羧甲基纤维素(CMC),以及脂质,例如甾醇,例如,胆固醇。其它赋形剂可以包括抗氧化剂,例如维生素E。本领域技术人员可以理解,其它赋形剂和其它组分可以包括在按照本发明的药物制剂中。例如,可以包括其它活性剂,标准赋形剂,载体,液体载体,盐水,水溶液,稀释剂,表面活性剂,分散剂,惰性稀释剂,造粒和崩解剂,粘合剂,润滑剂,助流剂,脱色剂,甜味剂,调味剂,着色剂,防腐剂,生理可降解的组合物例如明胶,水赋形剂和溶剂,油性赋形剂和溶剂,悬浮剂,分散或湿润剂,悬浮剂,乳化剂,缓和剂,缓冲剂,盐,增稠剂,明胶,填料,乳化剂,抗氧化剂,抗菌剂,抗真菌剂,稳定剂,水,二醇,油剂,醇,结晶阻滞剂(例如,抑制糖结晶的阻滞剂),淀粉,糖,蔗糖,表面活性剂,提高任何其它组分的溶解性的试剂,例如多羟基醇,例如甘油或山梨糖醇,可药用聚合的或疏水性的物质,及其它组分。本领域技术人员可以理解,根据剂型(例如,注射溶液剂,胶囊剂或丸剂)加入合适的其它试剂。

[0205] 可以将本发明的按照式I的化合物配制为“药物组合物”。按照本发明的实施方案包括各种剂型,这种剂型包括可以例如用于治疗患者的化合物。例如,口服剂型可以包括片剂,丸剂,胶囊剂(硬或软胶囊剂),小胶囊,粉剂,颗粒剂,混悬剂(例如,在水或油赋形剂中

的混悬剂),溶液剂(例如,在水或油赋形剂中的溶液剂),凝胶,扁囊剂,锭剂,糖锭,糖浆剂,酞剂,乳剂,吸饮剂,水包油乳剂或油包水乳剂。因为片剂和胶囊剂容易给药,所以,它们代表优选的口服剂型。可以用标准技术将固体口服剂型包糖衣或肠溶包衣。例如,鼻部及其它粘膜喷涂制剂(例如,吸入形式)可以包括活性化合物与防腐剂和等渗药剂的纯水溶液。优选,调节这种制剂的pH值,并且达到与鼻或其它粘膜相适合的等渗压的状态。或者,它们可以是悬浮在载气中的细分的固体粉剂、吸入剂或气雾剂形式。这种制剂可以用任何合适的装置或方法递送,例如,雾化器,喷射器,定量吸入器,等等。例如,可以局部给予按照本发明的药物组合物,例如,软膏剂、乳剂或栓剂形式。例如,可以用注射剂形式给予按照本发明的药物组合物。由此,按照本发明的剂型可以具有例如固体、半固体、液体或气体形式。合适的剂型包括但不限于:口服、直肠、舌下、粘膜、鼻部、眼睛、皮下、肌肉、静脉内、肠胃外、透皮、脊椎、鞘内、关节内、动脉内、蛛网膜下、支气管、淋巴管和子宫内(intra-uterile)给药,及用于系统递送活性组分的其它剂型。活性组分,例如,按照式I的化合物,可以包含在给予受试者(患者)之后提供快速释放、持续释放、延迟释放或本领域技术人员已知的任何其它释放特性的制剂中。对于给定治疗来说,选择的给药模式和剂型与合乎给定治疗需要并且有效的化合物或组合物的治疗数量以及其它因素例如患者(病人)的精神状态和身体条件紧密相关。

[0206] 可以按散装、单一单位剂量形式、多个单一单位剂量形式或多剂量形式制备、包装或出售本发明的药物组合物。本文使用的“单位剂量”是药物组合物的离散数量,其包括预定数量的活性组分。每个单位剂量中的活性组分数量通常等于所给予的活性组分的总数量,或总剂量的适当部分,例如,这种剂量的一半或三分之一。适合于口服给药的本发明的药物组合物的制剂可以是离散固体剂量单位形式。每个固体剂量单位含有预定数量的活性组分,例如,单位剂量或其一部分。本文使用的“油性”液体是包括极性比水小的碳或硅基液体的液体。在这种药物剂型中,优选,活性剂与一或多种其可药用载体和任选的任何其它治疗组分一起使用。载体必须是可药用载体,其应该与制剂的其它组分相容,并且不会过度地危害其接受者。本发明的组合物可以提供于单位剂型中,其中每个剂量单位,例如一茶匙、片剂、胶囊剂、溶液剂或栓剂,仅仅含有预定数量的活性药物或前体药物,或与其它药学活性剂适当地联用。术语“单位剂型”是指适合作为人和动物受试者的单位剂量的物理离散单位,每个单位仅仅含有预定数量的本发明的组合物,或与其它活性剂联用,计算的该数量应该足以产生目标效果。

[0207] 可以用本领域已知的技术制备本发明药物组合物的剂型,并且该剂型含有治疗有效量的活性化合物或组分。已知的或下文公开的任何技术可以用于制备按照本发明的药物组合物或制剂。通常,制备方法包括:使活性组分与载体或一或多种其它额外的组分结合,而后如有必要或需要的话,使产物成型或包装为目标单或多剂量单位。可以使用公开的方法或要研发的方法制备按照本发明的粉剂和颗粒制剂。这种制剂可以直接给予受试者,或用以形成例如片剂形式、填充的胶囊剂形式,或向其中加入水或油性赋形剂,制备成水或油性混悬剂或溶液剂。片剂可以通过压制或模塑或用湿法造粒来制备,任选与一或多种助剂一起制备。压制片可以如下制备:在合适的机械中,挤压自由流动形式的活性组分(例如粉末或颗粒制剂)。模制片可以如下制备:在合适机械中,将活性组分、可药用载体和最低限度的足够液体(使混合物湿润)的混合物模制。片剂可以是非包衣片剂,或可以使用本领域已

知的方法或要研发的方法将它们包衣。可以配制包衣片剂,使其在受试者的胃肠道中延迟崩解,例如,使用肠溶衣,由此使活性组分持续释放和吸收。片剂可以进一步包括能够提供药学精美和适口的制剂的组分。包括活性组分的硬胶囊剂可以使用生理可降解的成分(例如明胶)来制备。这种硬胶囊剂包括活性组分。包括活性组分的软胶囊剂可以使用生理可降解的成分(例如明胶)来制备。这种软胶囊包括活性组分,活性组分可以与水或油介质混合。可以以液态或干燥产物形式制备、包装和销售适合于给药的本发明的药物组合物的液体制剂,这种干燥产物在使用之前与水或其它合适的赋形剂重组。可以使用常规方法或要研发的方法制备液体混悬剂(其中活性组分分散在水或油性赋形剂中)和液体溶液(其中活性组分溶于水或油性赋形剂中)。活性组分的液体混悬剂可以在水或油性赋形剂中。活性组分的液体溶液可以在水或油性赋形剂中。为了制备这种药物剂型,可以按照常规药物配制技术,使活性组分(例如,萘并呋喃)与药物载体密切地混合。根据希望给予的制剂形式,载体可以采用多种形式。在制备口服剂型的组合物过程中,可以使用任何常规药物介质。

[0208] 在按照本发明的一些实施方案中,制备的物品包括含有治疗有效量的药物组合物的容器,其中药物组合物包括按照式I的化合物。容器可以包括可药用赋形剂。容器可以包括印刷的标签说明书。例如,印刷的标签可以标明给予药物组合物应该采用的剂量和频率、该组合物是否应该与食品一起给予或是否在摄入食品前或后的限定时段内给予。组合物可以包含在能够容纳和分配剂型的任何合适的容器中,并且其应该不会与该组合物显著地相互作用。标签说明书可以与本文所描述的治疗方法一致。利用使标签和容器保持物理邻近的方法,可以使标签与容器结合在一起。作为非限制性实例,容器和标签两者可以都包含在包装材料中,例如盒子或塑料收缩包装,或可以与说明书结合,其中说明书与容器结合,例如,利用不会使标签说明书模糊的胶液或其它结合或固定方法。

[0209] 制备具有选择的粒径分布的药物制剂和确定最佳粒径分布的方法

[0210] 碾磨方法

[0211] 在按照本发明的方法中,碾磨或研磨方法可用于减小活性组分或按照式I的化合物的粒径。例如,碾磨或研磨方法可以适合于制备具有200 $\mu\text{m}$ 、150 $\mu\text{m}$ 、100 $\mu\text{m}$ 、40 $\mu\text{m}$ 、20 $\mu\text{m}$ 、5 $\mu\text{m}$ 、2 $\mu\text{m}$ 或更大或更小中值粒径的颗粒。这种碾磨或研磨方法可以包括,例如,球磨,辊轧,喷射研磨,湿磨,超声碾磨、研磨和组合方法。例如,该方法可以通过用硬面冲击颗粒或使颗粒处于高压状态下(例如,在两个表面之间挤压颗粒)来减小粒径。例如,在喷射研磨过程中,气流携带颗粒,并将它们加速至高速。然后,颗粒撞击其它颗粒和壁,并破碎为更小的颗粒。例如,在湿磨过程中,颗粒与液体混合,并使得到的浆液通过高剪切混合器,从而使颗粒破碎。例如,在超声碾磨过程中,例如,浆液中的颗粒暴露于超声辐射中。超声诱导的空穴化作用可以使颗粒破碎为更小粒径的颗粒。

[0212] 有利的是,在碾磨或研磨颗粒操作之前,降低颗粒的温度。例如,温度可以降低到低温,例如,使颗粒与低温流体(例如液氮)接触或将颗粒浸渍在其中。这种温度降低可以使颗粒变得更脆,并且容易使它们的粒径在碾磨或研磨操作过程中减小。在碾磨或研磨过程之后,可用选择方法,例如筛分,以缩小粒径的范围。

[0213] 结晶方法

[0214] 结晶是制备药物的主要分离和纯化步骤。结晶还可以用于控制粒径。在结晶期间获得的粒径分布(PSD)受到结晶期间存在的各种机理的组合的影响,例如成核、生长、聚集、

磨损、破裂,等等。在结晶期间,为了获得目标产物性能,控制PSD是很关键的。当在结晶期间不能始终控制粒径来满足目标规格时,可以包括额外工艺步骤,例如,干磨。(Braat等人, Crystallization: Particle Size Control, Encyclopedia of Pharmaceutical Technology: Third Edition, 2006年10月2日出版)。

#### [0215] 治疗癌症的方法

[0216] 按照本发明的治疗受瘤折磨的人、哺乳动物或动物受试者、延迟瘤的发展、防止瘤的复发、减轻瘤的症状或者使其得到改善的方法包括:给予治疗有效量的、包含预定粒径分布的颗粒的药物组合物,例如,按照式I的化合物,例如化合物1,纯化合物,纯产物和/或纯药物组合物,使得瘤体积的生长得到减缓,终止瘤体积的生长,减小瘤体积和/或杀死癌性瘤。可以用该方法治疗的瘤类型的一些例子包括:实质固态瘤,恶性肿瘤,癌瘤,转移性肿瘤,包括癌症干细胞的瘤,涉及STAT3途径的瘤,癌和肉瘤。可以通过给予按照式I化合物的颗粒来治疗的癌瘤(未详尽列出)包括下列:乳腺癌,头颈癌,肺癌,卵巢癌,胰腺癌,结肠直肠癌,前列腺癌,黑素瘤,肉瘤,肝癌,脑肿瘤,白血病,多发性骨髓瘤,胃癌和淋巴瘤。在这些癌瘤中,可能涉及STAT3途径。可以通过给予例如按照式I化合物的颗粒来治疗的癌瘤(未详尽列出)包括下列:结肠直肠癌,乳腺癌,卵巢癌,肺癌,黑素瘤和成髓细胞瘤。在这些癌瘤中,可能涉及CSC途径。可以通过给予例如按照式I化合物的颗粒来治疗的其它癌瘤(未详尽列出)包括下列:肺癌,子宫颈癌,肾细胞癌,肝细胞癌,食管癌,胶质瘤,膀胱癌,结肠直肠癌,乳腺癌,前列腺癌,胰腺癌,子宫内膜癌,甲状腺癌,胆管癌,骨癌,眼癌(成视网膜细胞瘤),胆囊癌,垂体癌,直肠癌,唾液腺癌和鼻咽癌。

#### [0217] 癌症干细胞

[0218] 近年来,肿瘤生成的新模式已经获得广泛承认,在这种模式中,假设整个肿瘤块当中只有一小部分在肿瘤内决定致瘤活性,而以前的或克隆遗传模式认为所有突变的肿瘤细胞同等地促进这种致瘤活性。按照新模式,这种小部分致瘤细胞是具有干细胞性质的被转型的细胞,并且被称作“癌症干细胞”(CSCs)。在九十年代期间,Bonnet和Dick首先证明了CSCs体内存在于急性骨髓性白血病(AML)中。他们的数据表明,当移植到免疫缺陷小鼠中时,只有少量人AML细胞的亚种群能够转运AML,而其它AML细胞不能诱导白血病。随后,这些CSCs显示出具有相同的细胞标志物(CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>)作为原始造血干细胞。(Bonnet, D., Normal and leukaemic stem cells. Br J Haematol, 2005. 130 (4): p. 469-79)。从那以后,研究人员发现,CSCs确实存在于各种型式的肿瘤中,包括脑、乳房、皮肤、前列腺、结肠直肠癌,等等。

[0219] 肿瘤生成的CSC模式可以解释为了形成肿瘤移植物而需要将几万或几十万肿瘤细胞注射到实验动物中的原因。在人AML中,这些细胞在10,000个之中的出现率小于1 (Bonnet, D. 和 J. E. Dick, Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat Med, 1997. 3 (7): p. 730-7)。尽管在给定肿瘤细胞群中非常稀少,但有证据表明,这种细胞存在于几乎所有的肿瘤类型中。然而,由于癌细胞系选自特异性适合于生长在组织培养物中的癌细胞的子群,所以,癌细胞系的生物和功能性可以进行显著的改变。因此,不是所有的癌细胞系都含有CSCs。

[0220] 癌症干细胞与正常干细胞享有许多类似的特性。例如,CSCs具有自我更新能力,也就是说,能够引起其它致瘤的癌症干细胞,与有限的分裂数量相反,它的速度典型地比其它



肿瘤细胞分裂慢。CSCs还能够分化为多种细胞类型,这可以解释下列组织学证据:不但许多肿瘤包含宿主器官固有的多种细胞类型,而且通常在肿瘤转移过程中保持异质性。已经证明,CSCs基本上负责肿瘤生成、癌症转移和癌症复发。CSCs还称为肿瘤起始细胞,癌症干细胞样细胞,干细胞样癌细胞,高度致瘤的细胞,肿瘤干细胞,实质固态瘤干细胞或超级恶性细胞。

[0221] 对于将来的癌症治疗和疗法,癌症干细胞的存在具有根本性的意义。这些意义表现在疾病鉴定、选择性的药物靶向、预防癌症转移和复发、形成新的对抗癌症的策略。

[0222] 在试验初期,现行癌症治疗的效果常常测定肿瘤皱缩的大小(即,被杀死的肿瘤块的数量)来确定。由于CSCs形成很小比例的肿瘤,并且比它们的更加分化的子代具有显著不同的生物特征,所以,对于对干细胞特异性起作用的药物来说,测定肿瘤块可能不是必然的选择。事实上,癌症干细胞似乎对放疗(XRT)有抗性,并且利用化学疗法和靶向药物难以治疗。(Hambardzumyan,D.,M.Squatrito,和E.C.Holland,Radiation resistance and stem-like cells in brain tumors.Cancer Cell,2006.10(6):p.454-6;Baumann,M.,M.Krause,和R.Hill,Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance.Nat Rev Cancer,2008.8(7):p.545-54;Ailles,L.E.和I.L.Weissman,Cancer stem cells in solid tumors.Curr Opin Biotechnol,2007.18(5):p.460-6)。正常成体(somatic)干细胞天然地对化学治疗剂有抗性,它们具有泵出药物的各种泵(例如MDR)和DNA修复蛋白。进一步的,它们还具有缓慢的细胞更新速度,而化学治疗剂靶向快速复制的细胞。癌症干细胞(其是正常干细胞的突变对应部分)也具有类似的机理,使它们幸免于药物治疗和辐射治疗。换句话说,常规化疗和放疗杀死分化的或正在分化的细胞,形成肿瘤散块,其不能产生新的高度致瘤的癌症干细胞。相反,引起分化的和正在分化的细胞癌症干细胞群可能未受影响,并且导致疾病的复发。常规抗癌症治疗的进一步危害是:化学治疗只保留化疗抗性的癌症干细胞的可能性,接下来的复发性肿瘤可能也对化疗有抗性。

[0223] 由于幸存的癌症干细胞可以恢复肿瘤并导致复发,所以,重要的是,抗癌症治疗应该包括针对CSCs的策略(参见图18)。这与为了防止蒲公英再生长而消除根源类似(即使已经割了草地表面的物质)。(Jones,R.J.,W.H.Matsui,和B.D.Smith,Cancer stem cells:are we missing the target?J Natl Cancer Inst,2004.96(8):p.583-5)。通过选择性的靶向癌症干细胞,使得治疗患有主动侵入性肿瘤、不可切除的肿瘤和难治疗的或复发性的癌症的患者以及防止肿瘤转移和复发成为可能。研发靶向癌症干细胞的特定治疗可以提高癌症患者的存活率和生活质量,尤其是对于转移性癌症患者。开启这种未开发的潜力的关键是鉴定和验证对于癌症干细胞自我更新和存活的选择性重要的途径。令人遗憾的是,虽然过去已经说明了构成癌症中肿瘤生成或胚胎和成体干细胞的自我更新基础的多种途径,但只确定和验证了癌症干细胞自我更新和存活的很少数途径。

[0224] 还有许多探究癌症干细胞的鉴定和分离的方法。主要使用的方法探讨CSCs排出药物的能力,或基于与癌症干细胞结合的表面标志物的表达。

[0225] 例如,由于CSCs对许多化学治疗剂有抗性,不令人惊讶的是,CSCs几乎普遍超表达药物外排泵,例如ABCG2(BCRP-1)(Ho,M.M.,等人,Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells.Cancer Res,2007.67(10):p.4827-33;Wang,J.,等人,Identification of cancer stem cell-



like side population cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line. *Cancer Res*, 2007. 67 (8) :p.3716-24; Haraguchi, N., 等人, Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system. *Stem Cells*, 2006. 24 (3) :p.506-13; Doyle, L.A. 和 D.D. Ross, Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene*, 2003. 22 (47) :p.7340-58; Alvi, A.J., 等人, Functional and molecular characterisation of mammary side population cells. *Breast Cancer Res*, 2003. 5 (1) :p.R1-8) 及其它 ATP 结合盒 (ABC) 超家族成员 (Frank, N.Y., 等人, ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res*, 2005. 65 (10) :p.4320-33; Schatton, T., 等人, Identification of cells initiating human melanomas. *Nature*, 2008. 451 (7176) :p.345-9)。相应地, 最初用于富集造血和白血病干细胞的侧群 (SP) 技术还用于鉴定和分离 CSCs。(Kondo, T., T. Setoguchi, 和 T. Taga, Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101 (3) :p.781-6)。首先由 Goodell 等人描述的这种技术利用了不同的 ABC 转运体依赖性荧光染料流出物, 例如 Hoechst 33342, 确定并分离了富集了 CSCs (enriched in CSCs) 的细胞群 (Doyle, L.A. 和 D.D. Ross, Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene*, 2003. 22 (47) :p.7340-58; Goodell, M.A., 等人, Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med*, 1996. 183 (4) :p.1797-806)。具体地说, 通过阻断含有维拉帕米的药物流来显示 SP, 此时染料不再能够被泵出 SP。

[0226] 研究人员还集中在发现能够从大多数肿瘤中辨别出癌症干细胞的特定标志物方面。被癌症干细胞最普遍表达的 surface 标志物包括 CD44、CD133 和 CD166。(Collins, A.T., 等人, Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*, 2005. 65 (23) :p.10946-51; Li, C., 等人, Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*, 2007. 67 (3) :p.1030-7; Ma, S., 等人, Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology*, 2007. 132 (7) :p.2542-56; Prince, M.E., 等人, Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104 (3) :p.973-8; Ricci-Vitiani, L., 等人, Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, 2007. 445 (7123) :p.111-5; Singh, S.K., 等人, Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, 2003. 63 (18) :p.5821-8; Dalerba, P., 等人, Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104 (24) :p.10158-63)。主要基于这些表面标志物的差异表达分类的肿瘤细胞占到至今所描述的高度致瘤的 CSCs 的大部分。因此, 为了从癌细胞系和从大多数肿瘤组织中鉴定和分离癌症干细胞, 对这些表面标志物很好地加以确认。

[0227] 最近的研究表明, 存在具有可使肿瘤复发的排它性能力的癌症干细胞 (CSCs)。这

些CSCs存在于几乎所有肿瘤类型中,并且与持续恶性生长、癌症转移、复发和抗癌症药物性功能上相关。CSCs和其更加分化的子代似乎具有显著不同的生物特征。常规癌症药物筛选依赖于测定肿瘤块的数量,因此,对于特异性地作用于CSCs的药物来说,它们可能不是必然的选择。事实上,已经证明CSCs对标准化疗和放疗有抗性,并且在标准抗癌症治疗之后变得富集,这导致癌症难以治疗和复发。分离这些细胞的方法包括但不限于:通过它们排出Hoechst 33342的能力进行鉴定,通过这些细胞表达的表面标志物,例如CD133、CD44、CD166等等进行鉴定,和通过它们致瘤性能进行富集。癌症干细胞与肿瘤生成有关的证据阐明了靶向癌症干细胞的巨大的治疗机会。

[0228] 本文提供的数据(与近来CSC研究中的突破相结合)使得本发明提供了旨在抑制CSCs的一系列方法、旨在抑制CSCs和异种癌细胞二者的一系列方法和治疗特定具有CSCs的癌症或一般癌症的一系列方法。本发明还提供了相关的方法(例如,制备和筛选药物候选物的方法)、物质、组合物和试剂盒。该方法可以防止CSCs自我更新,这样就可以使它不再能够通过分裂为致瘤CSC细胞来补充它的数量。或者,该方法可以诱导在CSCs中或在CSCs与异种癌细胞两者中的细胞死亡。

[0229] 这种方法可用于治疗受试者的癌症。作为这种治疗的良好候选者的癌症包括但不限于:乳腺癌,头颈癌,肺癌,卵巢癌,胰腺癌,结肠癌,前列腺癌,肾细胞癌,黑素瘤,肝细胞癌,子宫颈癌,肉瘤,脑肿瘤,胃癌,多发性骨髓瘤,白血病和淋巴瘤。在一些实施方案中,该方法用于治疗肝癌、头颈癌、胰腺癌和/或胃癌。在一些实施方案中,该方法用于治疗多发性骨髓瘤、脑肿瘤和肉瘤。

[0230] 进一步的,由于已经证明CSCs根本上对肿瘤生成、癌症转移和癌症复发负责,所以,可以实施旨在抑制CSCs或CSCs与异种癌细胞两者的本发明的任何方法,用于治疗转移性的、化疗或放疗难以治疗的癌症,或者在受试者中初始治疗之后复发的癌症。

[0231] 在一些实施方案中,按照本发明的癌症干细胞抑制剂是:式1的化合物,化合物1,化合物1的多晶型物,2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图基本上与图1所列出的X射线衍射图相似,2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图基本上与图2所列出的X射线衍射图相似,2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰:至少在大约10.2度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约11.9度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约14.1度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约14.5度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约17.3度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约22.2度 $2\theta$ 处的峰和至少在大约28.1度 $2\theta$ 处的峰和其任何组合,2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图基本上与图3所列出的X射线衍射图相似,2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物,其特征为:X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰:至少在大约7.5度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约9.9度 $2\theta$ 处的峰,至少在大約12.3度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约15度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约23度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约23.3度 $2\theta$ 处的峰,至少在大约24.6度 $2\theta$ 处的峰和至少在大约28.4度 $2\theta$ 处的峰和其任何组合,2-(1-羟乙基)-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙酰基-7-氯-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙酰基-7-氟-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙酰基萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,2-乙基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮,磷酸单[1-(4,9-二氧化-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙基]酯,磷酸1-(4,9-二氧化-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-

乙烯基酯二甲酯，其对映体、非对映体、互变异构体和盐或溶剂化物；式1化合物的多晶型物，化合物1，化合物1的多晶型物，2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图基本上与图1所列出的X射线衍射图相似，2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图基本上与图2所列出的X射线衍射图相似，2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰：至少在大约10.2度 $2\theta$ 处的峰，至少在大约11.9度 $2\theta$ 处的峰，至少在大约14.1度 $2\theta$ 处的峰，至少在大约14.5度 $2\theta$ 处的峰，至少在大约17.3度 $2\theta$ 处的峰，至少在大约22.2度 $2\theta$ 处的峰和至少在大约28.1度 $2\theta$ 处的峰和其任何组合，2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图基本上与图3所列出的X射线衍射图相似，2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰：至少在大约7.5度 $2\theta$ 处的峰，至少在大约9.9度 $2\theta$ 处的峰，至少在大约12.3度 $2\theta$ 处的峰，至少在大约15度 $2\theta$ 处的峰，至少在大约23度 $2\theta$ 处的峰，至少在大约23.3度 $2\theta$ 处的峰，至少在大约24.6度 $2\theta$ 处的峰和至少在大约28.4度 $2\theta$ 处的峰和其任何组合，2-(1-羟乙基)-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮，2-乙酰基-7-氯-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮，2-乙酰基-7-氟-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮，2-乙酰基萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮，2-乙基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮，磷酸单[1-(4,9-二氧化代-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙烷基]酯，磷酸1-(4,9-二氧化代-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙烷基酯二甲酯，其对映体、非对映体、互变异构体和盐或溶剂化物；或基本上纯形式的式1化合物，化合物1，化合物1的多晶型物，2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图基本上与图1所列出的X射线衍射图相似，2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图基本上与图2所列出的X射线衍射图相似，2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰：至少在大约10.2度 $2\theta$ 处的峰，至少在大约11.9度 $2\theta$ 处的峰，至少在大约14.1度 $2\theta$ 处的峰，至少在大约14.5度 $2\theta$ 处的峰，至少在大约17.3度 $2\theta$ 处的峰，至少在大约22.2度 $2\theta$ 处的峰和至少在大约28.1度 $2\theta$ 处的峰和其任何组合，2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图基本上与图3所列出的X射线衍射图相似，2-乙酰基-4H,9H-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮的多晶型物，其特征为：X射线衍射图包括两个或多个选自下列的峰：至少在大约7.5度 $2\theta$ 处的峰，至少在大约9.9度 $2\theta$ 处的峰，至少在大约12.3度 $2\theta$ 处的峰，至少在大约15度 $2\theta$ 处的峰，至少在大约23度 $2\theta$ 处的峰，至少在大约23.3度 $2\theta$ 处的峰，至少在大约24.6度 $2\theta$ 处的峰和至少在大约28.4度 $2\theta$ 处的峰和其任何组合，2-(1-羟乙基)-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮，2-乙酰基-7-氯-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮，2-乙酰基-7-氟-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮，2-乙酰基萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮，2-乙基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮，磷酸单[1-(4,9-二氧化代-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙烷基]酯，磷酸1-(4,9-二氧化代-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙烷基酯二甲酯，其对映体、非对映体、互变异构体和盐或溶剂化物；2-(1-羟乙基)-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮、2-乙酰基-7-氯-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮、2-乙酰基-7-氟-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮、2-乙酰基萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮、2-乙基-萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮、磷酸单[1-(4,9-二氧化代-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙烷基]酯、磷酸1-(4,9-二氧化代-3a,4,9,9a-四氢-萘并[2,3-b]呋喃-2-基)-乙烷基酯二甲酯，其对映体、非对映体、互变异构体和盐或溶剂化物。

[2,3-b]呋喃-2-基)-乙烷基酯二甲酯、其对映体、非对映体、互变异构体和盐或溶剂化物的颗粒形式(本文还称为“本发明的化合物”)。

[0232] 本发明提供了鉴定能够抑制癌症干细胞的药物候选物的方法。在一些实施方案中,药物候选物能够在CSC中诱导细胞死亡或至少抑制其自我更新。在进一步实施方案中,药物候选物能够在CSC中诱导细胞死亡或至少抑制其自我更新,并且在异种癌细胞中诱导细胞死亡。对于筛选药物候选物,可以靶向该途径的各个阶段。

[0233] 相应地,在另一个方面,本发明的化合物可用于配制治疗或预防病症或病症的药物组合物。一些病症包括但不限于:自身免疫性疾病,炎性疾病,炎症性肠疾病,关节炎,自身免疫性脱髓鞘病症,阿尔海默氏疾病,中风,缺血再灌注损伤和多发性脑硬化。一些病症是癌症,并且包括但不限于:各种型式的乳腺癌,头颈癌,肺癌,卵巢癌,胰腺癌,结肠直肠癌,前列腺癌,肾细胞癌,黑素瘤,肝细胞癌,子宫颈癌,肉瘤,脑肿瘤,胃癌,多发性骨髓瘤,白血病和淋巴瘤。

[0234] 相应地,在一个方面,本发明提供了抑制癌症干细胞的方法,在这种方法中,给予细胞有效量的本发明的化合物。已知具有CSCs的癌症是这种治疗的良好候选者,并且包括但不限于:各种型式的乳腺癌,头颈癌,肺癌,卵巢癌,胰腺癌,结肠直肠癌,前列腺癌,肝癌,黑素瘤,多发性骨髓瘤,脑肿瘤,肉瘤,成髓细胞瘤和白血病。

[0235] 进一步的,由于已经证明CSCs根本上负责肿瘤生成、癌症转移和癌症复发,所以,可以实践旨在抑制CSCs的本发明的任何方法,用于治疗转移性的、化疗或放疗难以治疗的癌症,或者初始治疗患者之后复发的癌症。

[0236] 在该方法的一些实施方案中,治疗的癌症选自下列:肝癌,结肠癌,头颈癌,胰腺癌,胃癌,肾癌,肉瘤,多发性骨髓瘤,转移性乳腺癌,转移性前列腺癌,白血病,淋巴瘤,胰腺食道癌,脑肿瘤,胶质瘤,膀胱癌,子宫内膜癌,甲状腺癌,胆管癌,骨癌,眼癌(成视网膜细胞瘤),胆囊癌,垂体癌,直肠癌,唾液腺癌和鼻咽癌。

[0237] 在一方面,本发明提供了治疗患者癌症的方法,在该方法中,给予患者治疗有效量的包含本发明化合物的药物组合物。癌症可以是转移性的癌症。患者可以是哺乳动物,例如,人。

[0238] 对于下列病症,可以通过给予患有瘤的患者(病人)例如按照式I化合物的颗粒来治疗。瘤可以通过化疗、放疗和/或激素治疗难以治疗的瘤。瘤是不能用手术切除的瘤。瘤可以在患者(病人)中已经复发。癌症干细胞与瘤的复发有关;利用按照本发明的方法来杀死癌症干细胞或抑制它们的自我更新可以防止瘤本身重新产生。通过给予羧基呋喃颗粒来进行治疗,可以减缓或终止瘤体积生长,或通过例如诱导肿瘤细胞的死亡、抑制其生长和/或分裂和/或选择性地杀死肿瘤细胞,可以减小瘤体积。例如,按照本发明的治疗可以诱导瘤细胞的细胞死亡。例如,该治疗可以起到抑制肿瘤细胞的STAT3途径的作用。

[0239] 通过给予患有瘤的患者(病人)例如本发明化合物的颗粒来进行治疗,可用以防止瘤的复发和/或作为手术切除的辅助治疗。

[0240] 可以口服给予包含例如本发明化合物的颗粒的药物组合物,因为这是方便的治疗形式。例如,可以口服给予药物组合物,每天不超过四次。或者,可以静脉内或腹膜内给予药物组合物。

[0241] 在按照本发明的方法中,包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药

物组合物的治疗有效量可以是在下列范围内的总的日剂量：大约20mg至大约2000mg，大约100mg至大约1500mg，大约160mg至大约1400mg，或大约180mg至1200mg。在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量是在下列范围内的总的日剂量：大约200mg至大约1500mg，或大约360mg至1200mg。在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量是在下列范围内的总的日剂量：大约400mg至大约1000mg。在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量是大约1000mg的总的日剂量。

[0242] 在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量是以单一日剂量形式给予的。例如，在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量是以单一日剂量形式给予的，范围从大约20mg QD至大约2000mg QD。在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量是以单一日剂量形式给予的，范围为大约20mg QD至大约1000mg QD。

[0243] 在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量是以一个以上的日剂量形式给予的。例如，在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量是以两个日剂量形式给予的，其中总日剂量在大约160mg至1400mg的范围。在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量是以两个日剂量形式给予的，其中总日剂量在大约320mg至1200mg的范围。例如，在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量是以两个日剂量形式给予的，其中总日剂量在大约400mg至1000mg的范围。在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量是以两个日剂量形式给予的，其中总的日剂量为大约1000mg。

[0244] 在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量是以两个日剂量形式给予的，其中每个剂量在大约80mg至1000mg的范围。在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量是以两个日剂量形式给予的，其中每个剂量在大约160mg至600mg的范围。在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量是以两个日剂量形式给予的，其中每个剂量在大约200mg至大约500mg的范围。在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量是以两个日剂量形式给予的，其中每个剂量为大约500mg。

[0245] 在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量是以三个日剂量形式给予的，其中总日剂量在大约240mg至大约1500mg的范围。在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量是以三个日剂量形式给予的，其中总日剂量在大约480mg至大约1500mg的范围。

[0246] 在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量是以三个日剂量形式给予的，其中每个剂量在大约80mg至500mg的范围。在一些实施方案中，包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治

疗有效量是以三个日剂量形式给予的,其中每个剂量在160mg至500mg的范围。

[0247] 本发明的化合物或其药物组合物可以通过任何一种途径或通过组合途径给药,例如,口服、静脉内或腹膜内。例如,在一些实施方案中,口服给予本发明的化合物。在一些实施方案中,可以利用包含Gelucire和Tween 80的制剂口服给予本发明的化合物。

[0248] 本发明化合物的给予剂量应该能够在患者(例如,病人)中获得至少大约0.002 $\mu$ M至大约30 $\mu$ M的化合物的血液浓度,保持时间至少2小时至不超过24小时。在一些实施方案中,本发明化合物的给予剂量应该能够在患者中获得至少大约0.2 $\mu$ M至大约1 $\mu$ M的化合物的血液浓度,保持时间至少2小时至不超过24小时。等于或高于大约0.2 $\mu$ M,0.5 $\mu$ M,1.0 $\mu$ M,1.5 $\mu$ M,2.0 $\mu$ M,2.5 $\mu$ M,3.0 $\mu$ M,4.0 $\mu$ M,5.0 $\mu$ M,6.0 $\mu$ M,7.0 $\mu$ M,8.0 $\mu$ M,9.0 $\mu$ M,10.0 $\mu$ M,15.0 $\mu$ M,保持至少2小时,并且少于24小时。在一些实施方案中,本发明化合物的给予剂量应该能够在患者中获得等于或高于大约1.0 $\mu$ M、1.5 $\mu$ M、2.0 $\mu$ M、3.0 $\mu$ M、5.0 $\mu$ M、10.0 $\mu$ M、15.0 $\mu$ M的化合物的血液浓度,保持时间至少2小时,并且少于24小时。在一些实施方案中,本发明化合物的给予剂量应该能够在患者中获得等于或高于大约2.0 $\mu$ M、3.0 $\mu$ M、5.0 $\mu$ M、10.0 $\mu$ M的化合物的血液浓度,保持时间至少2小时,并且少于24小时。在一些实施方案中,本发明化合物的给予剂量应该能够在患者中获得等于或高于大约3.0 $\mu$ M或5.0 $\mu$ M的化合物的血液浓度,保持时间至少2小时,并且少于24小时。

[0249] 本发明化合物的给予剂量应该能够在24小时中使患者(例如,病人)获得至少大约0.002 $\mu$ M.h至大约300 $\mu$ M.h的化合物的血液浓度。在一些实施方案中,本发明化合物的给予剂量应该能够在患者中、在24小时内获得等于或高于大约0.2 $\mu$ M、0.5 $\mu$ M、1.0 $\mu$ M、1.5 $\mu$ M、2.0 $\mu$ M、2.5 $\mu$ M、3.0 $\mu$ M、4.0 $\mu$ M、5.0 $\mu$ M、6.0 $\mu$ M、7.0 $\mu$ M、8.0 $\mu$ M、9.0 $\mu$ M、10.0 $\mu$ M、15.0 $\mu$ M的曲线下的面积(AUC<sub>24</sub>),保持时间至少2小时,并且少于24小时。在一些实施方案中,本发明化合物的给予剂量应该能够在患者中获得等于或高于大约1.0 $\mu$ M、1.5 $\mu$ M、2.0 $\mu$ M、3.0 $\mu$ M、5.0 $\mu$ M、10.0 $\mu$ M、15.0 $\mu$ M的化合物的血液浓度,保持时间至少2小时,并且少于24小时。在一些实施方案中,本发明化合物的给予剂量应该能够在患者中获得等于或高于大约2.0 $\mu$ M、3.0 $\mu$ M、5.0 $\mu$ M、10.0 $\mu$ M的化合物的血液浓度,保持时间至少2小时,并且少于24小时。在一些实施方案中,本发明化合物的给予剂量应该能够在患者中获得等于或高于大约3.0 $\mu$ M或5.0 $\mu$ M的化合物的血液浓度,保持时间至少2小时,并且少于24小时。在一些实施方案中,本发明化合物的给予剂量应该能够在患者中、在24小时内获得等于或高于大约2 $\mu$ M\*hr、10 $\mu$ M\*hr、20 $\mu$ M\*hr、30 $\mu$ M\*hr、40 $\mu$ M\*hr、50 $\mu$ M\*hr、60 $\mu$ M\*hr、70 $\mu$ M\*hr、80 $\mu$ M\*hr、90 $\mu$ M\*hr、100 $\mu$ M\*hr、125 $\mu$ M\*hr、150 $\mu$ M\*hr、200 $\mu$ M\*hr、250 $\mu$ M\*hr、300 $\mu$ M\*hr、400 $\mu$ M\*hr和500 $\mu$ M\*hr的曲线下的面积(AUC<sub>0-24hr</sub>)。

[0250] 如果患者(病人)的病征需要的话,可以以持续或脉动输液形式给予药物组合物的剂量。治疗时间可以是几十年、几年、几个月、几周或几天,只要益处持续即可。提供的上述范围只是作为指导原则,并使其最佳化。

[0251] 在按照本发明的方法中,通过给予药物组合物,使得化合物的血液摩尔浓度至少为有效浓度,并且小于第一个连续时间周期的有害浓度,这种连续时间周期应该至少与有效时间周期一样长,并且短于有害时间周期,由此可以选择性地杀死瘤的细胞。第一个连续时间周期之后,血液摩尔浓度可以小于有效浓度。有效浓度可以是足够高的浓度,使得肿瘤细胞(例如,癌细胞)被杀死。有效时间周期可以足够长,使得肿瘤细胞(例如,癌细胞)被杀死。有害浓度可以是正常细胞受到损伤或被杀死时的浓度。有害时间周期可以是正常细胞

受到损伤或被杀死的足够长的时间周期。例如,有效浓度可以等于高于大约0.02 $\mu$ M,大约0.05 $\mu$ M,大约0.1 $\mu$ M,大约0.2 $\mu$ M,大约0.5 $\mu$ M,大约1 $\mu$ M,大约3 $\mu$ M,大约10 $\mu$ M或大约20 $\mu$ M。例如,无害浓度可以等于或低于大约3 $\mu$ M,大约10 $\mu$ M,大约14 $\mu$ M,大约30 $\mu$ M或大约100 $\mu$ M。例如,有效时间周期可以等于或高于大约2小时,大约4小时,大约6小时,大约12小时,大约24小时或大约48小时。例如,为了达到正常细胞的无害接触,化合物1的药物浓度必须在大约12小时、大约24小时之内基本上从血液中廓清。“基本上从血液中廓清”是指血液药物浓度降低至少大约50%、至少大约60%、至少大约80%、至少大约90%。例如,当给予一段时间的化合物时,有效浓度可以是超过癌细胞的IC<sub>50</sub>值的浓度。例如,当至少以有效浓度给予化合物时,有效时间周期可以是经过这一周期癌细胞受到选择性抑制或被杀死时的时间周期。例如有害浓度可以是,当以任何时间周期给予化合物时,超过正常细胞的IC<sub>50</sub>值的浓度。例如,当以有效浓度给予化合物时,有害时间周期可以是经过这一周期正常细胞以及癌细胞受到抑制或被杀死时的时间周期。

[0252] 本领域技术人员可以通过选择剂量和频率(以便达到本文所描述的、认为选择性杀死肿瘤细胞(例如癌细胞)并且保留(sparing)正常细胞所必需的“选择性药物动力学特性”(SPP)),给予药物组合物。对SPP的这种考虑还可以指导药物组合物的设计,例如,颗粒的粒径分布和形状分布。

[0253] 在按照本发明的方法中,用下列剂型口服给予药物组合物:例如,片剂,丸剂,胶囊剂(硬或软胶囊),小胶囊,粉剂,颗粒剂,混悬剂,溶液剂,凝胶,扁囊剂,锭剂,糖锭,糖浆剂,酏剂,乳剂,水包油型乳剂,油包水型乳剂或吸饮剂。

[0254] 鉴定最佳粒径分布

[0255] 在按照本发明的方法中,可以如下测定用于治疗人、哺乳动物或动物肿瘤患者的按照式I化合物、化合物1、化合物1的多晶型物和/或基本上纯形式的化合物1的最佳粒径分布。可以制备至少一组包括化合物的颗粒。在制备该颗粒组的过程中,例如,固体化合物样品的粒径可以利用下列方法减小:例如,将化合物溶解并使溶液雾化,将化合物溶解并将溶液超声处理,将固体化合物球磨,辊轧固体化合物,研磨固体化合物和/或筛分固体化合物。可以利用本领域技术人员已知的方法或组合方法来测定至少一组颗粒的粒径分布。例如,可以使用下列技术来测定粒径分布:例如,筛分分析,光学显微计数,电子显微照片统计,电阻统计,沉降时间,激光衍射,声谱,其它技术或组合技术。可以以预定浓度给予肿瘤细胞和正常细胞至少一组颗粒,并且给予预定的一段时间。可以观察颗粒对肿瘤细胞和正常细胞的代谢、分裂和/或其它生命指标的效果。观察到的颗粒对肿瘤细胞的效果可用于确定每组颗粒的有效性评级。例如,抑制肿瘤细胞的代谢和/或分裂、损伤或杀死肿瘤细胞或者另外显示高的抗肿瘤活性的颗粒组,可以认为其有效性评级高。观察到的颗粒对正常细胞的效果可用于确定每组颗粒的毒性评级。例如,抑制正常细胞的代谢和/或分裂、损伤或杀死正常细胞或者正常细胞对颗粒组另外显示低耐受性的颗粒组,可以认为其毒性评级高。

[0256] 例如,可以将颗粒组体外给予肿瘤细胞和正常细胞。例如,有效性评级可以等于肿瘤细胞的IC<sub>50</sub>值、与其成正比或是其的单调递增函数。例如,毒性评级可以等于正常细胞的IC<sub>50</sub>值、与其成正比或是其的单调递增函数。

[0257] 例如,可以将颗粒组在试验动物中体内给予肿瘤细胞和正常细胞。例如,试验动物可以是哺乳动物,灵长类动物,小鼠,大鼠,豚鼠,兔或狗。例如,有效性评级可以等于给予颗

粒组之后的肿瘤细胞体积的减小、与其成正比或是其的单调递增函数。例如，毒性评级可以等于给予颗粒组之后的试验动物质量的降低、与其成正比或是其的单调递增函数。例如，可以在临床研究中给予人颗粒组。治疗肿瘤的方法可以包括：给予患有肿瘤的人、哺乳动物或动物治疗有效量的按照式I化合物、化合物1、化合物1的多晶型物和/或基本上纯形式的化合物1的颗粒组。在体外给予动物或人或细胞化合物、按照式I的化合物、化合物1、化合物1的多晶型物和/或基本上纯形式的化合物1的颗粒之前，可以将颗粒悬浮在可药用赋形剂中。

[0258] 可以将具有第一个粒径分布的每组颗粒的有效性评级和/或毒性评级与具有不同于第一个粒径分布的粒径分布的其它颗粒组的有效性评级和/或毒性评级进行比较。具有高有效性评级和低毒性评级的化合物的颗粒组可以有效抑制或杀死肿瘤细胞，例如癌症，但保留(sparing)正常细胞。本领域技术人员可以选择最佳颗粒组，这种最佳颗粒组的有效性评级大于、毒性评级小于和/或加权有效性评级和毒性评级的和大于至少一个其它颗粒组(例如，有效性评级可以用正系数加权，毒性评级可以用负系数加权)。本领域技术人员还可以使用其它标准来选择最佳颗粒组，例如，具有加权有效性评级之和以及具有相对于毒性评级的加权有效性评级比率的颗粒。可以认为最佳颗粒组的粒径分布为试验化合物的最佳粒径分布。一个化合物(例如，化合物1)与另一个化合物(例如，按照式I的化合物，其不是化合物1)可以具有不同的最佳粒径分布。当通过体外给予细胞、小型试验动物和大型试验动物指定化合物来测定最佳粒径分布时，指定化合物的最佳粒径分布可以不同。然而，通过体外或体内给予有机体指定化合物所测定的最佳粒径分布，可以代表另一个化合物或给予另一个有机体的最佳粒径分布的合理起点。

[0259] 按照式I的化合物、化合物1、化合物1的多晶型物和/或基本上纯形式的化合物1的最佳颗粒组可以包括在组合物中，以减少或抑制肿瘤细胞的复制或扩散。

## 实施例

[0260] 提供下列实施例，进一步说明本发明的不同特征。该实施例还说明了实践本发明所使用的方法。这些实施例不限制所要求保护的发明。

### [0261] 实施例1：制备萘并呋喃化合物

[0262] 萘并呋喃化合物(2-乙酰基萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮)的制备方法概括如下：

#### [0263] 步骤1：溴化

[0264] 向配备有机械搅拌器、温度计和加入漏斗的2升3颈圆底烧瓶中加入3-丁烯-2-酮(451.2克)。向加入漏斗中加入溴(936.0克)。将烧瓶中的内含物冷却至-5℃之后，将溴滴入烧瓶中，同时强烈搅拌，并将温度在-5℃下保持30分钟。将该混合物在-5℃额外搅拌15分钟，而后分成4个等份。

#### [0265] 步骤2：脱溴

[0266] 将每份混合物以及四氢呋喃(2133.6克)一起加入到22升4颈圆底烧瓶中，圆底烧瓶配备有机械搅拌器、温度计和加入漏斗。向加入漏斗中加入DBU(1,3-二氮杂双环[5.4.0]十一-7-烯,222.9克)。将DBU滴入烧瓶中，同时强烈搅拌，并将温度在0℃-5℃保持30分钟。在0℃-5℃，将该混合物额外搅拌15分钟。

#### [0267] 步骤3：偶合反应



[0268] 然后将2-羟基-1,4-萘并呋喃(231克)加入到烧瓶中。将额外的DBU(246.0克)加入到加入漏斗中,而后滴入到烧瓶中的混合物中,滴入速度应该使反应混合物的温度不超过40℃。完全加入DBU之后,将得到的混合物在室温下搅拌过夜,并获取反应混合物的样品进行HPLC分析。

[0269] 步骤4:结晶

[0270] 向该反应混合物中加入水(10.8升),并将得到的混合物冷却至0℃-3℃,保持至少30分钟,而后通过真空过滤器过滤。用5%碳酸氢钠水溶液(3升)、水(3升)、1%乙酸水溶液(3升)和乙醇(2X1升,两次)依次冲洗过滤的固体。

[0271] 将冲洗的固体保存,与其它批料收集在一起。将合并的粗品(28.73kg)以及乙酸乙酯(811.7kg)加入到配备有机械搅拌器、温度计和冷凝器的500加仑容器中。在氮气氛围中,将该混合物加热至回流(72℃),保持2小时,而后用含有活性炭层的10微米过滤筒过滤,除去不溶性物质。

[0272] 将新的热乙酸乙酯(10kg)用于冲洗容器、传输管线和过滤器。将合并的滤液冷却至0-5℃,并在此温度下保持2小时,而后用20英寸Buchner过滤器进行过滤。将过滤的固体产物用0-5℃的乙酸乙酯(5.7kg)冲洗,在40℃真空干燥至恒重。将剩余的滤液蒸发,使体积减少63%,并再次重复结晶过程,产生第二批产物,也将其在与第一批产物相同的条件下干燥。

[0273] 按照该方法获得一批(a lot of)萘并呋喃化合物。该批化合物的纯度是95.44%面积(HPLC)。

[0274] 实施例2:制备萘并呋喃化合物

[0275] 萘并呋喃化合物(2-乙酰基萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮)的另一个制备方法概括如下:

[0276] 步骤1:溴化

[0277] 向12升RBF(圆底烧瓶)(用紫外线滤光镜避光保护)中加入MVK(2,160ml,26.4mol),并在干冰/丙酮浴中冷却至-9.6℃。用2小时20分钟慢慢地加入溴(1,300ml,25.3mol),保持 $T < -2.6^{\circ}\text{C}$  ( $T_{\text{max}}$ )。将得到的黄色混合物额外搅拌28分钟。

[0278] 步骤2:脱溴化氢

[0279] 向含有预先冷却的THF(四氢呋喃)(20升,5ml/g HNQ(2-羟基-1,4-萘醌))的72升RBF中加入上述溴化产物,并将得到的溶液冷却至-4.8℃。用2小时20分钟慢慢地加入DBU(4,200ml,28.1mol)(溶于THF(4,200ml)中),保持 $T < 0.3^{\circ}\text{C}$  ( $T_{\text{max}}$ )。将得到的悬浮液搅拌42分钟。

[0280] 步骤3:偶合

[0281] 在-1.8℃,将一份2-羟基-1,4-萘并呋喃(4,003g,23.0mol)加入到上述反应混合物中。放到冷却浴中,同时用48分钟加入第二份DBU(3,780ml,25.3mol),将反应温度调到40℃。除去冷却浴,并将该反应混合物搅拌度过周末(对空气开放)。

[0282] 步骤4:分离粗品

[0283] 向含有预先冷却的水(100升,25ml/g HNQ)的200升反应器中加入上述反应混合物。将得到的混悬剂冷却至6.0℃,而后在 $T = 3 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 下搅拌~1小时。然后将得到的悬浮液过滤,并将收集的固体转移回到200升反应器中。

[0284] 在5%NaHCO<sub>3</sub>水溶液(26升,6.5ml/g HNQ)中搅拌1小时之后,将该悬浮液过滤。将收集的固体转移回到200升反应器中,在水(26升)中搅拌1小时,而后过滤。

[0285] 将湿润的固体转移回到200升反应器中,在1%乙酸水溶液(26升)中搅拌~1小时,过滤,而后在过滤漏斗上用水(10升)洗涤。将收集的固体转移回到200升反应器中,在乙醇(17.5升;4.3ml/g HNQ)中加热至轻微回流(77.4℃)。将得到的悬浮液冷却至4.2℃,过滤。

[0286] 将湿润的固体转入100升反应器中,在乙醇(17.5升;4.3ml/g HNQ)中加热至回流(77.6℃)。将得到的悬浮液冷却至4.5℃,过滤。将湿滤饼除去液体,过夜。获取<sup>1</sup>H NMR和HPLC样品。<sup>1</sup>H NMR:化合物1/NDHF(2-乙酰基-2,3-二氢茚并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮)42:58%;HPLC:化合物1/NDHF 74:11面积%。

[0287] 将固体在真空烘箱中、在50℃干燥4天,得到2,268g粗品化合物1。<sup>1</sup>H NMR:化合物1/NDHF 41:59%;HPLC:化合物1/NDHF 67:11面积%。

[0288] 步骤5:茚并二氢呋喃的氧化

[0289] 使粗品化合物1(2.268kg)在甲苯(77升)中形成浆液。加入MnO<sub>2</sub>(9536g),并将该混合物加热至轻微回流。1小时之后,TLC(1:1EA:己烷)显示反应完成。

[0290] 然后,将该反应混合物趁热通过硅藻土(1530g,底层)、活性炭(2230g,中间层)和硅藻土(932g,表层)的预热垫过滤。收集橙黄色滤液。

[0291] 将滤液在旋转蒸发器上浓缩至大约1/10体积。将浆液过滤,并用甲苯洗涤。然后将晶体在50℃干燥,得到952g(42%)暗黄色固体。HPLC:99.94%。<sup>1</sup>H NMR显示没有茚并二氢呋喃。

[0292] 将晶体在50℃、在真空条件下额外干燥46-65小时,从而减少该物质中的残余甲苯的数量。

[0293] 步骤6:乙酸乙酯处理

[0294] 将化合物1(5816g)加入到200升反应容器中。加入乙酸乙酯(145升,25ml/g),并将该溶液用2小时26分钟加热至回流。使回流保持5小时30分钟,然后将该混合物冷却,并过夜保持至17℃。

[0295] 将该浆液在聚乙烯釉料上过滤。将黄色晶体空气干燥,然后放入盘中,在真空烘箱中保持75小时,得到5532g(95.1%产率)黄色固体。HPLC:99.86%。<sup>1</sup>H NMR与化合物1的结构相符。

[0296] 步骤7:乙酸乙酯重结晶

[0297] 向2升RBF中加入粗品(10g)和乙酸乙酯(900ml)。将该混合物在~77℃回流,而后加入更多的乙酸乙酯(100ml),达到完全溶解。将得到的清澈的浅黄色溶液回流搅拌~30分钟,而后取消加热。将该混合物在室温下搅拌过夜。

[0298] 将得到的悬浮液过滤,并将收集的黄色固体在漏斗上用乙酸乙酯(30ml)冲洗。将湿润固体在真空烘箱中、在40-50℃干燥4小时,获得8.53g黄色晶体产物(总产率~17%)。

[0299] <sup>1</sup>H NMR:与结构一致;HPLC:99.94面积%;DSC:228.68℃,151J/g。

[0300] 除非另外具体表明,否则,按照实施例1来制备下面实施例中使用的化合物1。

[0301] 实施例3:茚并呋喃化合物的微粉化

[0302] 例如,碾磨化合物1晶体,并使其通过160微米(μm)筛(筛#100,150μm筛孔),产生大约160微米或更小的晶体。

[0303] 例如, 碾磨化合物1晶体 (Retsch超离心研磨机ZM 200; 单程, 18,000rpm, 使用0.25mm筛网), 达到大约20微米的中值粒径。表3提供了所得到的粒径分布 (Malvern2000, 带有Hydro 2000S湿润辅助设备)。纵行提供了颗粒的总累积百分数的最大粒径, 在纵行标题的角注中提供。例如, 纵行 $D_{90}$ 表示90%的颗粒等于该粒径, 或具有更小的粒径。纵行 $D_{50}$ 表示中值粒径: 一半颗粒具有更大的粒径, 一半颗粒具有相等或更小的粒径。

	粒径 (微米)		
	$D_{90}$	$D_{50}$	$D_{10}$
样品B	48.9	20.2	2.3

[0305] 表3. 碾磨的化合物1的粒径分布。

[0306] 例如, 使用喷射研磨方法 (4"喷射碾机, 喷射管压力=40, 碾磨压力=100, 进料速度=1304g/小时) 将化合物1晶体微粉化, 达到大约2微米的中值粒径, 如表4所提供的数据。使用干燥颗粒方法 (Sympatec Helos/KF粒度分析器) 进行粒径分析。

	粒径 (微米)		
	$D_{90}$	$D_{50}$	$D_{10}$
样品A	4.63	2.07	0.53

[0308] 表4. 微粉化的化合物1的粒径分布。

[0309] 得自于粒径分布的对数正态模式的累积分布函数很符合于表4所提供的数据。累积分布函数表示为

$$[0310] \quad CDF(d) = \frac{1}{2} \left( 1 + \operatorname{erf} \left( \frac{\ln(d) - \ln(d_{\text{median}})}{\sigma\sqrt{2}} \right) \right),$$

[0311] 其中erf是误差函数,  $d$ 是粒径变量,  $d_{\text{median}}$ 是中值粒径,  $\sigma$ 是与累积分布函数的宽度相关的参数。CDF ( $d$ ) 代表粒径小于或等于 $d$ 的颗粒部分。将 $d_{\text{median}}$ 设定为观察到的2.07微米的中值, 拟合该模型, 得到 $\sigma=1.06$ 的值。该模型显示了3.6微米的平均直径和0.67微米的众数直径。该模型还显示了2200m<sup>2</sup>/kg的颗粒的比面积, 不过这并不考虑某些因素, 例如表面粗糙度。

[0312] 实施例4: 2微米、20微米、150微米中值粒径制剂在小鼠中的药物动力学

[0313] 在实验中, 在20%Gelucire 44/14和1%Tween 80中, 将在实施例2的步骤6中制备的微粉化的化合物1 (具有2微米、20微米、150微米的平均粒径) 配制为悬浮液, 并口服给予小鼠100mg/kg。每个时间点代表3只小鼠的平均值 (图16)。

[0314] 如图16所示, 当都以100mg/kg的剂量给药时, 相比于2微米和20微米颗粒, 具有125-150微米之间的粒径的化合物1显示了更低水平的接触, 但它显示了相同的图形。在如将2微米粒径 ( $d_{50}$ ) 的化合物1一样给药的小鼠中, 20微米粒径 ( $d_{50}$ ) 的化合物1显示了类似的血浆接触。此外, 如果使125-150微米化合物1的接触加倍, 它与2和20微米PK曲线非常类似。

[0315] 实施例5: 粒径减小的制剂显示更强的肿瘤生长抑制

[0316] 在本研究中, 如果以粒径大于20微米的组合物形式给予小鼠化合物1, 化合物1没有效果, 或效果很弱。然而, 如果以粒径小于5微米的组合物形式给予化合物1, 则发现化合

物1具有有效的抗肿瘤活性,没有观察到毒性。

[0317] 在实验中,在形成皮下异种移植的FaDu人头颈癌的免疫抑制小鼠的模型中,对筛至160微米的化合物1颗粒的制剂进行试验。在9%Gelucire、20%维生素E TPGS中,将药物组合物配制为80mg/ml(表3)。在每天口服400mg/kg的剂量下(还给予赋形剂对照物),没有观察到效果,如图15所示。该剂量水平比图16所示的PK实验中所使用的剂量水平高4倍。因此,与显示良好效果的100mg/kg 2微米化合物1的剂量相比,这些小鼠接受4x更高的接触水平。每天(qd)给予所有方案。

[0318] 在实验中,将化合物1晶体碾磨至大约20微米的中值粒径。当将化合物1碾磨至大约20微米的中值粒径时,在具有异种移植的FaDu人头颈肿瘤的小鼠中每天口服给予200mg/kg,只观察到弱的或中等效果(图15)(还给予赋形剂对照物)。每天(qd)给予所有方案。

[0319] 还试验了实施例1中制备的化合物1晶体。使用喷射研磨方法(4"喷射碾磨机,喷射管压力=40,碾磨压力=100,进料速度=1304g/小时)将化合物1晶体微粉化,达到大约2微米的中值粒径,如表4所提供的数据。

[0320] 将FaDu人头颈癌细胞皮下接种到雌性无胸腺裸鼠中( $6 \times 10^6$ 个细胞/小鼠),并使其形成明显的肿瘤。当肿瘤达到大约100mm<sup>3</sup>时,每天口服(po)化合物1100mg/kg或赋形剂对照物来治疗动物。将化合物1在20%gelucire中配制成10mg/ml。在整个治疗过程中,测定肿瘤和体重(图15)。

[0321] 使用喷射研磨方法(8"饼状磨,文氏管压力=40,磨压力=40,进料速度=1920g/小时)将化合物1微粉化,达到大约2微米的中值粒径,如表5所提供的数据。使用干燥颗粒方法(Sympatec Helos/KF粒度分析器)进行粒径分析。观察到与表4中的2微米物质一样的类似的抗肿瘤活性。

	粒径(微米)		
	D <sub>90</sub>	D <sub>50</sub>	D <sub>10</sub>
样品A	5.5	2.21	0.51

[0322] 表5.微粉化的化合物1的粒径分布。

[0324] 因此,虽然150微米或20微米的化合物1显示了与2微米的化合物1类似的血浆接触图(图16)。它们显示了不同的效果:150微米的化合物1没有显示效果(图15);20微米的化合物1显示了弱的或中等效果;2微米的化合物1显示很强的效果。

[0325] 如图16所示,如2微米粒径(d<sub>50</sub>)的化合物1给药的一样,20微米粒径(d<sub>50</sub>)的化合物1显示了类似的血浆接触。然而,令人惊讶的是,在小鼠异种移植模型中,20微米粒径的化合物1只显示了弱的或中等效果,而2微米粒径的化合物1显示了有效的效果。这是意想不到的结果,因为常见的理解是,药物的效果基于它的药物动力学。因此,由于两种粒径显示了相同的药物动力学,所以,它们应该同等有效。

[0326] 此外,如果使125-150微米化合物1的接触加倍,它与2和20微米PK曲线非常类似。有趣的是,当以高达400mg/kg的水平给予小鼠150微米化合物1时,它在异种移植模型中也没有显示效果(图15)。

[0327] 这些结果与减小粒径可导致血浆接触增加并因此效果更好的常规观点相反。

[0328] 实施例6:HPLC试验

[0329] 这种HPLC方法用于评价萘并呋喃的纯度,例如,2-乙酰基萘并[2,3-b]呋喃-4,9-

二酮(化合物1),并通过HPLC检测反应完成情况。所有的组分用色谱图中的全部峰的面积百分比来表示。

[0330] 1.装置和物质(表6A)

[0331]	装置	带有 UV 检测器和整合系统的 HPLC 系统
	柱	Phenomenex Luna C18(2)5- $\mu$ m, 4.6-mm x 250-mm(P/N 00G-4252-E0)或同等的柱
	酸度计	使用当天进行校正
	乙腈	HPLC 级
	二甲亚砜(DMSO)	ACS 级或更好
	磷酸	ACS 试剂
	磷酸氢二钾	ACS 试剂
	化合物 1	参考物质

[0332] 2.溶液制备

[0333] 10mM磷酸盐缓冲剂

[0334] 称量1.74g磷酸氢二钾,并用1升净化水稀释(根据需要的数量调节重量和体积)。用磷酸将pH值调节至pH6.8。

[0335] 移动相A

[0336] 如下制备移动相A:将10mM磷酸盐缓冲剂和乙腈混合,缓冲剂与乙腈的比例为80:20。脱气。

[0337] 移动相B

[0338] 如下制备移动相B:将10mM磷酸盐缓冲剂和乙腈混合,缓冲剂与乙腈的比例为20:80。脱气。

[0339] 稀释剂

[0340] 移动相A用作所有样品和标准制剂的稀释剂。

[0341] 3.标准制剂

[0342] 化合物1储备溶液标准(浓度 $\approx$ 1.0mg/ml)

[0343] 如下制备:将10mg化合物1参考物质称量到20mL闪烁管中;记录重量 $\pm$ 0.01mg。加入10mL DMSO,并超声处理,直到固体溶解为止。

$$[0344] \quad \text{浓度} = \frac{(\text{参考标准重量, mg}) \times \text{标准小数纯度}}{(\text{储备溶液的体积, mL})}$$

[0345] 储备溶液试验样品(浓度 $\approx$ 1.0mg/ml)

[0346] 如下制备试验溶液:将10mg样品称量到20mL闪烁管中,并用10mL DMSO稀释。

$$[0347] \quad \text{浓度} = \frac{(\text{样品重量, mg})}{(\text{储备溶液的体积, mL})}$$

[0348] 工作试验样品(浓度 $\approx$ 0.01mg/ml)

[0349] 如下制备该溶液:将1mL转移到100mL容量瓶中,用稀释剂溶液稀释。

$$[0350] \quad \text{浓度} = \frac{\text{储备溶液试验样品浓度} \times (\text{转移的体积, mL})}{(\text{工作溶液的体积, mL})}$$

## [0351] 4. 仪器操作条件 (表6B)

[0352]

流速	0.8 mL/分
柱温	30℃
检测器波长	270 nm
注射体积	40 μL
梯度	0-5 分 – 0% B至0% B 5-19 分 – 0% B至90% B 19-24 分 – 90% B至90% B 24-29 分 – 90% B至0% B 注释：在 100% A 条件下， 在注射之间有 5 分钟平衡时间
运行时间	29 分

## [0353] 5. 操作程序

[0354] 按以下顺序注射溶液：

[0355] 1. 稀释剂空白 (1X)

[0356] 2. 化合物1工作标准 (5X)

[0357] 3. 试验溶液 (每个2X)

[0358] 4. 工作标准 (每个1X)。

## [0359] 6. 系统适用性

[0360] 如果满足下列标准, 适合使用该系统。

[0361] 1. 在顺序开始时注射稀释剂空白, 没有任何鉴定杂质的干扰峰

[0362] 2. 开始的时候, 5个重复注射的化合物1工作标准具有: (1)  $\%RSD_{\text{峰面积}} < 3.0\%$ ; (2)  $\%RSD_{\text{保留时间}} < 3.0\%$ ; 和 (3) 平均拖尾因子  $< 2.0$ 。

[0363] 3. 在同等标准 (bracketed standard) 的色谱中, (1) 保留时间是从起始的适当注射开始的平均保留时间的97.0-103.0%, 和 (2) 它的面积%是初始值的97.0-103.0%。

## [0364] 7. 计算

[0365] 所有的峰以色谱图中的全部峰的面积%形式报道, 这可以利用组合软件通过下式来计算:

$$[0366] \quad \text{面积}\% = \frac{\text{峰的面积统计}}{\text{所有峰的总面积}} \times 100$$

## [0367] NMR和TLC

## [0368] NMR (表6C)

[0369]

装置	Varian Inova 500NMR光谱仪
脉冲序列	S2pul
溶剂	CDC13
温度	25.0℃/298.1K
弛豫延迟	1.000秒
脉冲	45.0度
采集时间	2.732秒

宽度	11992.2Hz
	32次重复
OBSERVE H1	499.7029706MHz
FT大小	65536
总时间	1分,50秒

[0370] 硅胶TLC (表6D)

[0371]	洗脱液	乙酸乙酯：己烷，1：1
	显影	UV
	R <sub>f401</sub>	约 0.7
	R <sub>fNDHF</sub>	约 0.6

[0372] 实施例7：制备2-乙酰基萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮

[0373] 下面提供了化合物1的制备方法。

[0374] 步骤1：溴化

[0375] 向配备有机械搅拌器、温度计和加入漏斗的2升3颈圆底烧瓶中加入3-丁烯-2-酮(451.2克)。向加入漏斗中加入溴(936.0克)。将烧瓶中的内含物冷却至-5℃之后，将溴滴入烧瓶中，同时强烈搅拌，并将温度在-5℃下保持30分钟。将该混合物在-5℃额外搅拌15分钟，而后分成4个等份。

[0376] 步骤2：脱溴

[0377] 将每份混合物以及四氢呋喃(2133.6克)加入到22升4颈圆底烧瓶中，圆底烧瓶配备有机械搅拌器、温度计和加入漏斗。向加入漏斗中加入DBU(1,3-二氮杂双环[5.4.0]十一-7-烯,222.9克)。将DBU滴入烧瓶中，同时强烈搅拌，并将温度在0℃-5℃保持30分钟。在0℃-5℃，将该混合物额外搅拌15分钟。

[0378] 步骤3：偶合反应

[0379] 然后将2-羟基-1,4-萘醌(231克)加入到烧瓶中。将额外的DBU(246.0克)加入到加入漏斗中，而后滴入到烧瓶中的混合物中，滴入速度应该使反应混合物的温度不超过40℃。完全加入DBU之后，将得到的混合物在室温下搅拌过夜，并获取反应混合物的样品进行HPLC分析。

[0380] 向该反应混合物中加入水(10.8升)，并将得到的混合物冷却至0℃-3℃，保持至少30分钟，而后通过真空过滤器过滤。用5%碳酸氢钠水溶液(3升)、水(3升)、1%乙酸水溶液(3升)和乙醇(2X 1升，两次)依次冲洗过滤的固体。

[0381] 步骤4：结晶

[0382] 将冲洗的固体保存，与其它批料收集在一起。将合并的粗品(28.73kg)以及乙酸乙酯(811.7kg)加入到配备有机械搅拌器、温度计和冷凝器的500加仑容器中。在氮气氛围中，将该混合物加热至回流(72℃)，保持2小时，而后用含有活性炭层的10微米过滤筒过滤，除去不溶性物质。

[0383] 将新的热乙酸乙酯(10kg)用于冲洗容器、传输管线和过滤器。将合并的滤液冷却至0-5℃，并在此温度下保持2小时，而后用20英寸Buchner过滤器进行过滤。将过滤的固体产物用0-5℃的乙酸乙酯(5.7kg)冲洗，在40℃真空干燥至恒重。

[0384] 将剩余的滤液蒸发，使体积减少63%，并再次重复结晶过程，产生第二批产物，也

将其在与第一批产物相同的条件下干燥。

[0385] 按照该方法获得两个批次的化合物1。一批具有91.64面积%的纯度,另一批具有95.44面积%的纯度(用HPLC测定)。

[0386] 实施例8:制备粗品2-乙酰基萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮

[0387] 制备化合物1的另一个方法概括如下。

[0388] 步骤1:溴化

[0389] 向12升RBF(圆底烧瓶)(用紫外线滤光镜避光保护)中加入MVK(2,160ml, 26.4mol),并在干冰/丙酮浴中冷却至-9.6℃。用2小时20分钟慢慢地加入溴(1,300ml, 25.3mol),保持 $T < -2.6^{\circ}\text{C}$  ( $T_{\text{max}}$ )。将得到的黄色混合物额外搅拌28分钟。

[0390] 步骤2:脱溴化氢

[0391] 向含有预先冷却的THF(四氢呋喃)(20升,5ml/g HNQ(2-羟基-1,4-萘醌))的72升RBF中加入上述溴化产物,并将得到的溶液冷却至-4.8℃。用2小时20分钟慢慢地加入DBU(4,200ml,28.1mol)(溶于THF(4,200ml)中),保持 $T < 0.3^{\circ}\text{C}$  ( $T_{\text{max}}$ )。将得到的悬浮液搅拌42分钟。

[0392] 步骤3:偶合

[0393] 在-1.8℃,将一份2-羟基-1,4-萘醌(4,003g,23.0mol)加入到上述反应混合物中。放入冷却浴,同时用48分钟加入第二份DBU(3,780ml,25.3mol),将反应温度调到40℃。除去冷却浴,并将该反应混合物搅拌度过周末(对空气开放)。

[0394] 步骤4:分离粗品

[0395] 向含有预先冷却的水(100升,25ml/g HNQ)的200升反应器中加入上述反应混合物。将得到的混悬液冷却至6.0℃,而后在 $T = 3 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 下搅拌~1小时。然后将得到的悬浮液过滤,并将收集的固体转移回到200升反应器中。

[0396] 在5%NaHCO<sub>3</sub>水溶液(26升,6.5ml/g HNQ)中搅拌1小时之后,将该悬浮液过滤。将收集的固体转移回到200升反应器中,在水(26升)中搅拌1小时,而后过滤。

[0397] 将湿润的固体转移回到200升反应器中,在1%乙酸水溶液(26升)中搅拌~1小时,过滤,而后在过滤漏斗上用水(10升)洗涤。将收集的固体转移回到200升反应器中,在乙醇(17.5升;4.3ml/g HNQ)中加热至轻微回流(77.4℃)。将得到的悬浮液冷却至4.2℃,过滤。

[0398] 将湿润的固体转入100升反应器中,在乙醇(17.5升;4.3ml/g HNQ)中加热至回流(77.6℃)。将得到的悬浮液冷却至4.5℃,过滤。将湿滤饼除去液体,过夜。获取<sup>1</sup>H NMR和HPLC样品。<sup>1</sup>H NMR:化合物1/NDHF(2-乙酰基-2,3-二氢萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮)42:58%;HPLC:化合物1/NDHF 74:11面积%。

[0399] 将固体在真空烘箱中、在50℃干燥4天,得到2,268g粗品化合物1。<sup>1</sup>H NMR:化合物1/NDHF 41:59%;HPLC:化合物1/NDHF 67:11面积%。

[0400] 实施例9:萘并二氢呋喃的氧化

[0401] 使粗品化合物1(2.268kg)在甲苯(77升)中形成浆液。加入MnO<sub>2</sub>(9536g),并将该混合物加热至轻微回流。1小时之后,TLC(1:1EA:己烷)显示反应完成。

[0402] 然后,将该反应混合物趁热通过硅藻土(1530g,底层)、活性炭(2230g,中间层)和硅藻土(932g,顶层)的预热垫过滤。收集橙黄色滤液。

[0403] 将滤液在旋转蒸发器上浓缩至大约1/10体积。将浆液过滤,并用甲苯洗涤。然后将



晶体在50℃干燥,得到952g (42%) 暗黄色固体。HPLC:99.94%。<sup>1</sup>H NMR显示没有萘并二氢呋喃。

[0404] 将晶体在50℃、在真空条件下额外干燥46-65小时,从而减少该物质中的残余甲苯的数量。

[0405] 实施例10:乙酸乙酯处理

[0406] 将化合物1 (5816g) 加入到200升反应容器中。加入乙酸乙酯 (145升, 25ml/g), 并将该溶液用2小时26分钟加热至回流。使回流保持5小时30分钟,然后将该混合物冷却,并保持至17℃过夜。

[0407] 将该浆液在聚乙烯釉料上过滤。将黄色晶体空气干燥,然后放入盘中,在真空烘箱中保持75小时,得到5532g (95.1%产率) 黄色固体。HPLC:99.86%。<sup>1</sup>H NMR与化合物1的结构相符。

[0408] 实施例11:乙酸乙酯重结晶

[0409] 向2升RBF中加入粗品 (10g) 和乙酸乙酯 (900ml)。将该混合物在~77℃回流,而后加入更多的乙酸乙酯 (100ml),达到完全溶解。将得到的清澈的浅黄色溶液回流搅拌~30分钟,而后取消加热。将该混合物在室温下搅拌过夜。

[0410] 将得到的悬浮液过滤,并将收集的黄色固体在漏斗上用乙酸乙酯 (30ml) 冲洗。将湿润固体在真空烘箱中、在40-50℃干燥4小时,获得8.53g黄色晶体产物(总产率~17%)。

[0411] <sup>1</sup>H NMR:与结构一致;HPLC:99.94面积%;DSC:228.68℃, 151J/g。

[0412] 实施例12:鉴定靶向癌症和癌症干细胞的萘并呋喃化合物

[0413] 方法

[0414] 生活评价:每天检查每个动物的健康状况。每三天检测一次体重。按照实验室的动物饲养方法,每天提供食物和水。认为产生>20%致死率和/或>20%净体重丧失的治疗具有毒性。结果可以表示为平均肿瘤体积(mm<sup>3</sup>) ±SE。认为P值<0.05具有统计相关性。

[0415] 动物饲养:使4-5周的雄性或雌性无胸腺裸鼠(Charles River Laboratories, Wilmington,MA.) 适应畜舍装置至少1周,而后开始研究。使用的所有实验程序与American Physiology Society and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals列出的指导原则一致,并且还经过the Institutional Animal Care and Use Committee of Boston Biomedical Inc的批准。将在具有控制温度(68°F-72°F)、光(12小时照明-黑暗循环)和湿度(45-55%)的房间中,将动物分成4只一组放在铺垫木屑的笼中。在实验期间,允许动物自由接触水和食物。

[0416] 实施例13:临床试验:安全性和效果

[0417] 接到US FDA和Health Canada批准的IND之后,选择2-乙酰基萘并[2,3-b]呋喃-4,9-二酮进入一期临床试验,其是在患有晚期癌症(用标准治疗失败)的成年患者中进行的剂量递增研究。一个循环包括:每天两次口服给予化合物,给予4周。每4周(28天)重复循环,直到满足疾病的发展、无法接受的毒性或其它停止标准为止。按照开放标记和多中心试验来进行剂量递增试验。改进的Simon加速滴定方案用于剂量递增。

[0418] 试验的主要目标是测定安全性、耐受性和建议二期剂量(RP2D)。该试验的第二目标是测定化合物的药物动力学特性、化合物的药效和化合物的初期抗肿瘤活性。

[0419] 包括的标准包括:组织学或细胞学确定转移性的、不可切除的或复发性的实质固

态瘤;  $\geq 18$ 岁; RECIST确定的疾病; Karnofsky  $\geq 70\%$ 。排除标准包括: 在第一个剂量的4周内, 化疗、放疗、免疫治疗或调查研究药剂; 在第一个剂量的4周内手术; 和已知的脑转移病变。

[0420] 到2011年2月7日为止, 42个患有各种晚期实质固态瘤的化疗失败的癌症患者参加了该研究。在上述标准下选择的患者的人口统计数据 and 基本疾病特征概括在表7中。

[0421] 表7. 人口统计数据 and 基本疾病特征

[0422]

	患者 (N=42)	
年龄(岁)	平均 最小, 最大	59.6(12.7) 28, 91
性别[N(%)]	男性 女性	29(70.7%) 12(29.3%)
人种[N(%)]	高加索人 亚洲人 黑人 其它 西班牙人	33(80.5%) 3(7.3%) 1(2.4%) 2(4.9%) 0(0%)
预先治疗 <sup>1</sup>	> 3 2 1	20 2 4

[0423] 那些42个患者当中, 评价了10个同龄患者, 剂量从20mg至2000mg/天。剂量递增表现了较好的耐受性, 并且没有观察到剂量限制性毒性。不利状况通常很轻微, 最常见的是: 腹泻、恶心和疲劳。3级或大于3级的状况包括: 疲劳和腹泻。这些不利状况是这些晚期癌症患者在临床试验时的感受的记录, 可能与化合物1有关, 或可能与化合物1无关。不利状况概括在表8中。

[0424] 表8. 不利状况的概述

[0425]

状况术语	任何等级		1级		2级		3级	
	状况的#	占全部状况的%	状况的#	占全部状况的%	状况的#	占全部状况的%	状况的#	占全部状况的%
腹泻	23	28.4%	20	24.7%	2	2.5%	2	2.5%
呕吐	14	17.3%	13	16.0%	1	1.2%	0	0.0%
恶心	10	12.3%	8	9.9%	2	2.5%	0	0.0%
腹部痉挛	6	7.4%	5	6.2%	1	1.2%	0	0.0%
虚弱	5	6.2%	2	2.5%	3	3.7%	0	0.0%
疲劳	4	4.9%	1	1.2%	2	2.5%	1	1.2%
厌食	4	4.9%	3	3.7%	1	1.2%	0	0.0%
味觉异常	3	3.7%	3	3.7%	0	0.0%	0	0.0%
食欲降低	2	2.5%	1	1.2%	1	1.2%	0	0.0%
发烧	2	2.5%	1	1.2%	1	1.2%	0	0.0%
皮疹	2	2.5%	2	2.5%	0	0.0%	0	0.0%
晕眩	2	2.5%	2	2.5%	0	0.0%	0	0.0%
稀便	2	2.5%	2	2.5%	0	0.0%	0	0.0%
尿变色	2	2.5%	2	2.5%	0	0.0%	0	0.0%

[0426]

[0427] 迄今为止, 既没有达到MTD、也没有达到RP2D。剂量大约1000mg/天的化合物显示了满意的药物动力学, 具有明显的线型药物动力学, 并且在每个28天当中重复每天给药时, 没

有证据显示药物积聚。在320mg/天的剂量水平下,化合物的血浆浓度在至少1.5 $\mu$ M的浓度下持续8小时(体外化合物的IC<sub>50</sub>值:30-500nM)。不同剂量组的平均血浆浓度示于图12中。

[0428] 在42个给药患者当中,到2011年2月7日为止,评价了24个患者的肿瘤响应;16个患者(16/24个评价的患者)达到病情稳定(8至75+周)。迄今为止登记的患者概括在表9中。

[0429] 表9. 迄今为止登记的患者

[0430]

患者	总的 日剂量 (mg)	计划	诊断	最佳响应 (RECIST 1.1)	新的病变
0001	20	qd	结肠腺癌	MR (衰退27.6%)	1
0002	40	qd	胃腺癌	PD	3
0003	80	qd	头颈癌	SD	0
0004	80	bid	结肠腺癌	PD	0
0005	160	bid	黑素瘤	n.e	n.e.
0006	160	bid	肺腺癌	SD	0
0007	320	bid	肺腺癌	n.e	n.e.
0008	320	bid	结肠腺癌	SD	2
0009	320	bid	头颈癌	n.e	n.e.
0010	320	bid	结肠腺癌	SD	0
0011	320	bid	血管肉瘤	SD	0
0012	320	bid	前列腺癌	PD	0
0013	400	bid	胃腺癌	SD (衰退迹象)	0
0014	400	bid	卵巢癌	SD (CA 125 标准化)	0
0015	400	bid	结肠腺癌	SD (CEA ? >30-50%)	0

[0431]

患者	总的 日剂量 (mg)	计划	诊断	最佳响应 (RECIST 1.1)	新的病变
0016	600	bid	胰腺癌	PD	0
0017	600	bid	直肠癌	n.e	n.e.
0018	600	bid	前列腺癌	n.e	n.e.
0019	600	bid	NSC肺癌	n.e	n.e.
0020	600	bid	乳腺癌	SD (肿瘤出现凹穴)	0
0021	800	bid	软骨肉瘤	SD	0
0022	800	bid	前列腺癌	PD	0
0023	800	bid	肾上腺瘤 (Adenocorticot)	SD	0
0024	1000	bid	直肠癌	SD	0
0025	1000	bid	肉瘤	PD	-
0026	1000	bid	胰腺癌	n.e.	n.e.
0027	1400	bid	结肠腺癌	PD	2
0028	1400	bid	结肠腺癌	PD	-
0029	1400	bid	黑色素瘤	SD	-

[0432]

患者	总的 日剂量 (mg)	计划	诊断	最佳响应 (RECIST 1.1)	新的病变
0030	1000	bid	结肠腺癌	n.e	n.e.
0031	1000	bid	结肠腺癌	n.e	n.e.
0032	200	tid	结肠腺癌	SD	0
0033	500	tid	结肠腺癌	n.e	n.e.
0034	500	tid	膀胱腺癌	n.e	n.e.
0035	500	tid	结肠直肠癌	n.e	n.e.
0036	500	tid	直肠癌	n.e	n.e.
0037	500	tid	结肠腺癌	SD	0
0038	500	tid	胰腺癌	n.e	n.e.
0039	200	tid	GEJ癌症	-	-
0040	500	bid	结肠直肠癌	-	-
0041	500	bid	结肠直肠癌	-	-
0042	500	bid	结肠腺癌	-	-

[0433] 16/24个评价的患者显示了SD/MR, 12个显示了延长的SD(>12周)(通过RECIST1.1);在83%的给药患者中防止了新的转移性病变。

[0434] 在患者0001中,结肠癌转移至肾脏的病变的完全衰退示于图19中。在每天给药20mg的条件下,在患者的尿中观察到高浓度的化合物。化合物富集在尿中(表10)可以解释在相对低剂量下所观察到的完全衰退。

[0435] 在患者0001中,结肠癌转移至肾脏的病变的完全衰退示于图19中。在每天给药20mg的条件下,在患者的尿中观察到高浓度的化合物。化合物富集在尿中可以帮助解释在相对低剂量下所观察到的完全衰退。

[0436] 表10. 高浓度的化合物1存在于患者尿中

患者	总的日剂量 (mg)	给药后时间 (分)	BBI608 (uM)
7	320	120-240	4.3
		360-480	23.1
8	320	120-240	7.9
		360-480	1.8
9	320	120-240	8.9
		360-480	23.6
10	320	120-240	22.7
		360-480	26.2
11	320	120-240	1.8
		360-480	4.5
12	400	120-240	4.11
		360-480	3.86
14	400	120-240	1.42
		360-480	5
15	600	120-240	3.1
		360-480	10.65
17	600	120-240	1.66
		360-480	45.35
18	600	120-240	2.41
		360-480	6.3
20	800	120-240	6.17
		360-480	118.25
21	800	120-240	0.42
		360-480	7.42
23	800	120-240	2.51
		360-480	11.97

[0437]

[0438] 相应地,该化合物显示了出色的安全性。迄今为止,没有观察到剂量限制性毒性。

[0439] 还观察到口服bid给药的满意的PK特性。血浆浓度达到有效浓度(体外IC<sub>50</sub>值)的几倍。AUC数据示于表11中。

[0440] 表11. 不同剂量水平的AUC概述

[0441]

BID给药的 总的日剂量 (mg)	AUC <sub>0-24</sub> (uM*hr)	SD
80	7.95	
160	9.52	0.91
320	29.79	14.95
400	53.61	19.55
600	27.27	5.97
800	26.43	5.27
1000	42.61	8.94
1400	28.38	3.95
2000	39.09	18.66

[0442] 此外,观察到抗肿瘤活性的迹象。在化疗难以治疗的肿瘤范围内,包括结肠直肠腺癌、头颈癌、肺癌、乳腺癌、胃癌和卵巢癌、黑素瘤,24个患者当中的16个显示了SD/MR(通过RECIST)。其中有一个结肠癌转移至肾脏的病变出现完全衰退(图19)。用化合物1治疗的患者显示显著地缺少新的转移性肿瘤病变。患有晚期难以治疗的癌症的24个评价的患者当中,80%以上没有出现转移性肿瘤。

[0443] 在BBI608治疗期间发现,疾病长期稳定(>16周)的患者,在使用抗p-STAT3抗体进行免疫组织化学治疗之前,在他们的肿瘤组织中发现具有高水平的p-STAT3(图25)。

[0444] 实施例14:给药方案

[0445] 包含本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式的药物组合物的治疗有效量可以是在下列范围内的总的日剂量:大约20mg至大约2000mg,大约240mg至大约1500mg,或大约400mg至大约1000mg。

[0446] 合适的给药方案包括:给予单一日剂量的本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式。例如,给予单一日剂量的本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式,范围从大约20mg QD至大约1000mg QD。

[0447] 合适的给药方案包括:给予一个以上日剂量的本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式。例如,给予两个日剂量的本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式,其中总的日剂量在大约40mg至大约2000mg的范围。例如,给予两个日剂量的本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式,其中每个剂量在大约20mg至1000mg的范围。例如,给予两个日剂量的本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式,其中每个剂量在大约160mg至600mg的范围。例如,给予两个日剂量的本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式,其中每个剂量在大约200mg至500mg的范围。例如,给予两个日剂量的本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式,其中每个剂量为大约500mg。

[0448] 合适的给药方案包括:给予三个日剂量的本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式,其中总的日剂量在大约60mg至大约1500mg的范围。例如,给予三个日剂量的本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式,其中每个剂量在大约20mg至500mg的范围。例如,给予三个日剂量的本发明化合物的颗粒、多晶型物和/或纯化形式,其中每个剂量在160mg

至500mg的范围。

[0449] 人类患者接受大约500mg化合物1 (每日两次,即,总的日剂量1000mg) 的给药方案表明在几乎所有治疗的患者中达到最佳选择性的药物动力学。在人中,这种给药方案(本文指的是500mg BID)显示了化合物1的目标药物动力学性能(图20)。

[0450] 在另一个合适的给药方案中,给予人患者500mg化合物1,一天三次(TID)。与每日给药两次相比较,尽管一天给药三次没有使化合物1的接触水平得到显著提高,但TID给药提高了药物的接触时间(在人中)。这种剂量方案(本文指的是500mg TID)表明在人中出现良好的耐受性,没有观察到显著的药物相关的不利状况。

[0451] 在又一个合适的给药方案中,给予人患者大约20mg或20mg以上的化合物1,每日一次。这种给药方案(本文指的是20mg QD)在患者中出现治疗活性水平,但从人的血液中快速地廓清(图21)。这种剂量方案在人中出现良好的耐受性,由于尿中的药物浓度很高,在肾脏的结肠癌病变中显现了有效的抗肿瘤活性的迹象。

[0452] 在又一个合适的给药方案中,在空腹条件下,与乳汁一起给予化合物1,得到合乎需要的药物动力学(表12)。

[0453] 表12. 乳汁对化合物1的药物动力学的效果

PK参数	禁食	与乳一起	倍数变化
C <sub>最大</sub> (uM)	2.01	3.05	1.52
AUC <sub>0-24hrs</sub>	20.12	31.40	1.56
C <sub>最大</sub> (uM)	2.55	2.89	1.13
AUC <sub>0-24hrs</sub>	20.72	32.16	1.55

[0455] 在又一个合适的给药方案中,与食物一起给予化合物1,造成T<sub>最大</sub>延迟(表13)。

[0456] 表13. 与食物一起摄取化合物1导致T<sub>最大</sub>延迟

患者	T <sub>最大</sub> (小时)		
	禁食	与乳一起	与食物一起
20	2	2	8
21	6	6	6
22	8	8	10
24	-	6.3	10
27	-	0.5	6
28	-	6	10

[0458] 实施例15: 蔡并呋喃化合物延长无进展生存期

[0459] 在患有化疗难以治疗的晚期结肠直肠癌症的患者中,表明无进展生存期(PFS)得到延长(图22)。在患有头颈癌、胃癌、卵巢癌、三阴性乳腺癌、黑素瘤、肾上腺类皮质激素癌和肺癌的患者中,也可以看到无进展生存期的延长。

[0460] 在患有各种癌的患者中,包括结肠直肠癌、胃癌、头颈癌、黑素瘤、软组织瘤、肺癌、前列腺癌、卵巢癌、肾上腺类皮质激素癌和血管肉瘤,化合物1的血药浓度高于1μM与无进展生存期的增加有关(图23)。

[0461] 实施例16: 化合物1的药物动力学特性

[0462] 发现化合物1对癌细胞和正常细胞具有同等毒性,并且断定其没有治疗癌症的潜力(K.Hirai K.等人,Cancer Detection and Prevention,23 (6) (1999) 539-550;Takano



A.等人, *Anticancer Research* 29:455-464, 2009)。本文所描述的研究违反直觉地发现,与正常细胞相比,化合物1杀死癌细胞和癌症干细胞需要显著更短的时间接触。正常细胞对化合物1接触可以至多耐受24小时。此外,本文研究发现,短期不接触药物之后,正常细胞可以恢复,而癌细胞一旦接触某些浓度的化合物1至少2小时,它们不能恢复。基于这些研究,使用如下表14所示数据,对化合物1设计特定药物动力学接触[称为选择性的药物动力学特性(SPP),或优选的药物动力学特性(PPP),它们在本公开中可互换使用],在患者中达到选择性的抗肿瘤活性(图24)。

[0463] 表14. 使用粒径来达到优选的药物动力学(PK)接触,以提高血浆药物浓度,并降低对正常细胞的毒性

治疗时间	化合物 608 IC50 (uM)				
	正常细胞			癌细胞	
	CD34 <sup>+</sup> BM 红细胞	CD34 <sup>+</sup> BM 骨髓	PMBCs	DU145	HT29
4-12 小时				<0.2	<0.5
12-24 小时	>30	>30	14	<0.2	<0.5
72 小时			3		

[0465] 对本发明化合物(例如,化合物1)、其颗粒、多晶型物和/或纯化形式的合适SPP或PPP接触是在至少1.0μM或1.0μM以上接触至少2小时,血药浓度必须在24小时之内基本上廓清。

[0466] 例如,患者在确定时段内(优选至少2小时)保持接触至少1.5μM浓度的本发明的化合物(例如化合物1)、其颗粒、多晶型物和/或纯化形式,药物必须在24小时之内基本上廓清。更长时间接触该化合物可以导致毒性和/或丧失选择性。

[0467] 为了达到这种目标SPP或PPP,可以使本发明化合物的给予剂量在患者(例如,病人)中达到至少大约0.02μM至大约30μM范围内的化合物血液浓度。例如,可以使本发明化合物的给予剂量能够在患者中获得至少大约0.5μM以上的化合物的血液浓度,保持时间至少2小时,但少于24小时。例如,可以使本发明化合物的给予剂量能够在患者中获得至少大约2μM的化合物的血液浓度,保持时间至少2小时,但少于24小时。

[0468] 优选,为了诱导癌细胞死亡,在浓度大于0.2μM的条件下,癌细胞必须接触本发明的化合物(例如,化合物1)、其颗粒、多晶型物和/或纯化形式4小时。然而,延长接触时间不会显著地有助于本发明的化合物(例如,化合物1)、其颗粒、多晶型物和/或纯化形式杀死癌细胞的效果。当化合物1的浓度维持在大于大约0.5至大约3μM少于24小时时,化合物1具有杀死癌细胞并保留正常细胞的选择性活性。减小化合物1的粒径可以达到这种优选的药物动力学模式和选择性的活性。

[0469] 化合物1杀死癌细胞并保留正常细胞的选择性活性可以通过表14中的数据表明和通过图24的图解来描述。使癌细胞接触大约或高于0.2μM和30μM浓度的化合物1大约4小时(至多大约24小时),可选择性地杀死癌细胞,并保留正常细胞。在这些浓度下持续接触24小时以上,可导致选择性的丧失,正常细胞也受到损伤。接触血液浓度小于0.5μM的化合物1,不能杀死癌细胞,与接触时间的量无关。



[0470] 本文所描述的给药方案显示了这种优选的PK模式。例如,在接受500mg BID的患者中显示的PK是这种优选的PK接触模式(图20),其表明了持续接触高于治疗水平的化合物1,同时经过24小时药物基本上廓清。在血浆药物浓度剂量依赖性提高的患者中,从80mg BID至200mg BID,达到SPP或PPP。在300mg BID和400mg BID条件下,与200mg BID相比,血浆药物浓度的进一步提高似乎受到限制。然而,人们发现,500mg BID可以意外地帮助减小患者之间的变化,也就是说,所有治疗的患者可以达到SPP,并具有足够高的血浆药物浓度(图12)。最后,接触1.6 $\mu$ M以上的化合物1至少4小时的患者的无进展生存期提高,表明这种接触模式在人中可导致效果提高。在患有各种癌症的患者中,包括结肠直肠癌、胃癌、头颈癌、黑色素瘤、软骨肉瘤、肺癌、前列腺癌、卵巢癌、肾上腺类皮质激素癌和血管肉瘤,PK接触1 $\mu$ M以上的化合物1与无进展生存期提高有关(图23)。这些数据完全不同于临床前实验所预期的数据。在临床前研究中,表明化合物可杀死癌细胞或癌症干细胞,IC<sub>50</sub>值为大约100至200nM。然而,临床观察患者发现,那些浓度与临床活性无关。与此相反,血浆浓度必须达到1 $\mu$ M以上才具有活性迹象。当血药浓度进一步提高至大约2 $\mu$ M或3 $\mu$ M、或2 $\mu$ M或3 $\mu$ M以上时,则与提高的抗肿瘤活性迹象有关。

[0471] 在本说明书中举例和讨论的实施方案,只是告诉本领域技术人员发明人已知的制备和使用本发明的最佳方法。在本说明书中,不应该认为有限制本发明范围的内容。提供的所有实施例是代表性的实施例,而不是限制性实施例。在不背离本发明的条件下,本领域技术人员按照上面的教导,可以对本发明的上述实施方案进行改进或改变。因此可以理解,在权利要求和其等效内容的范围内,可以按照不同于具体描述的方式来实施本发明。

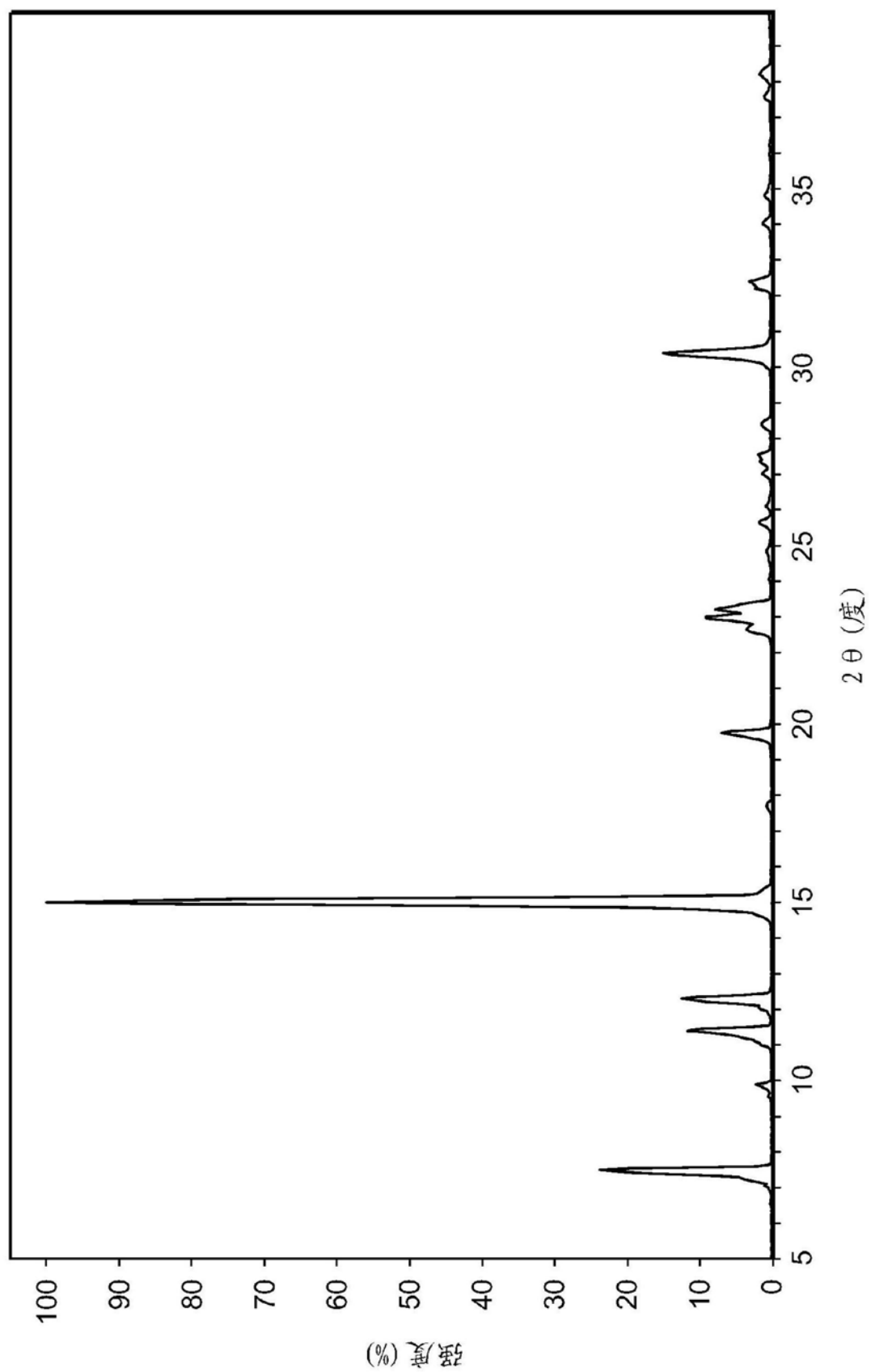


图1

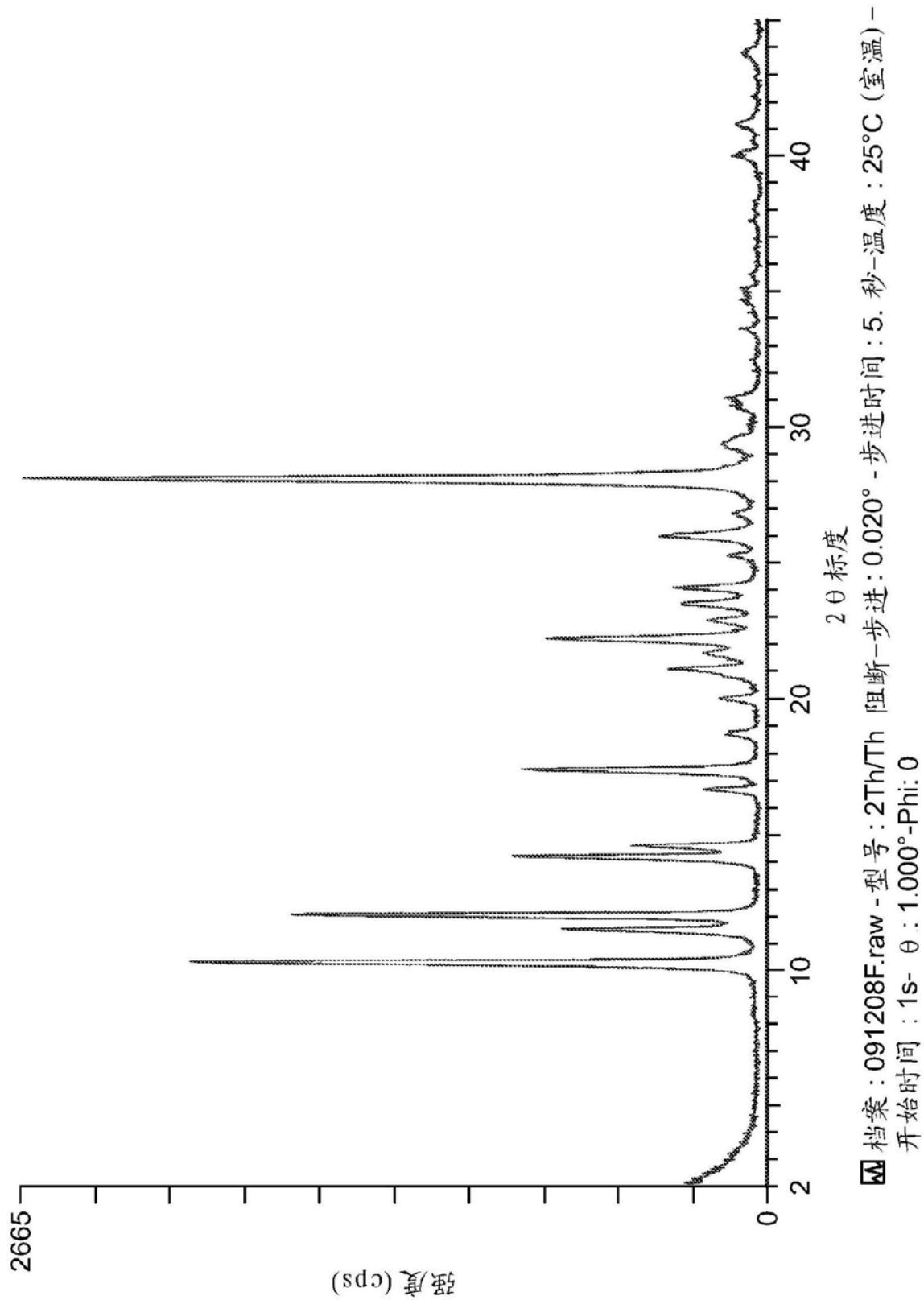


图2

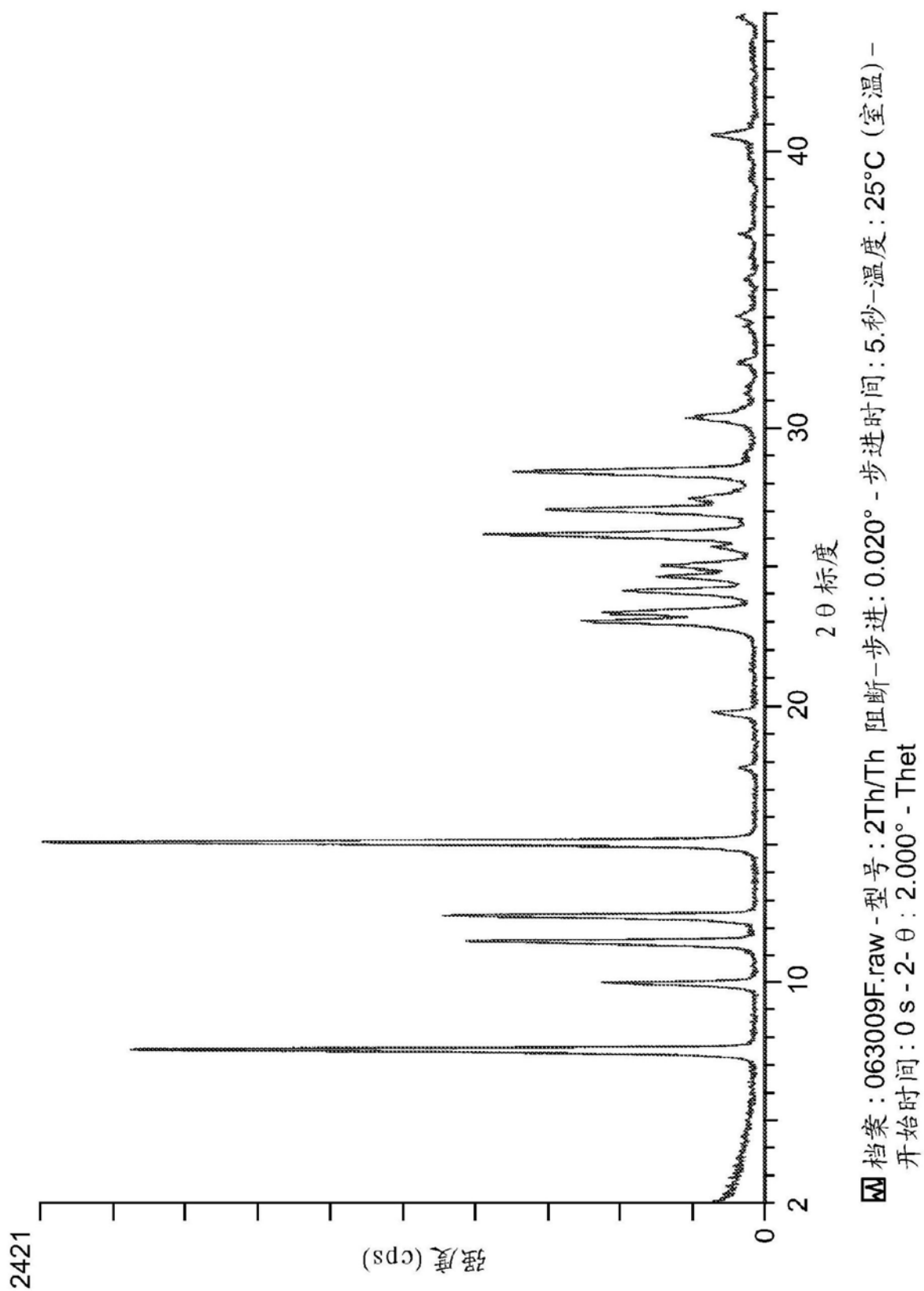


图3

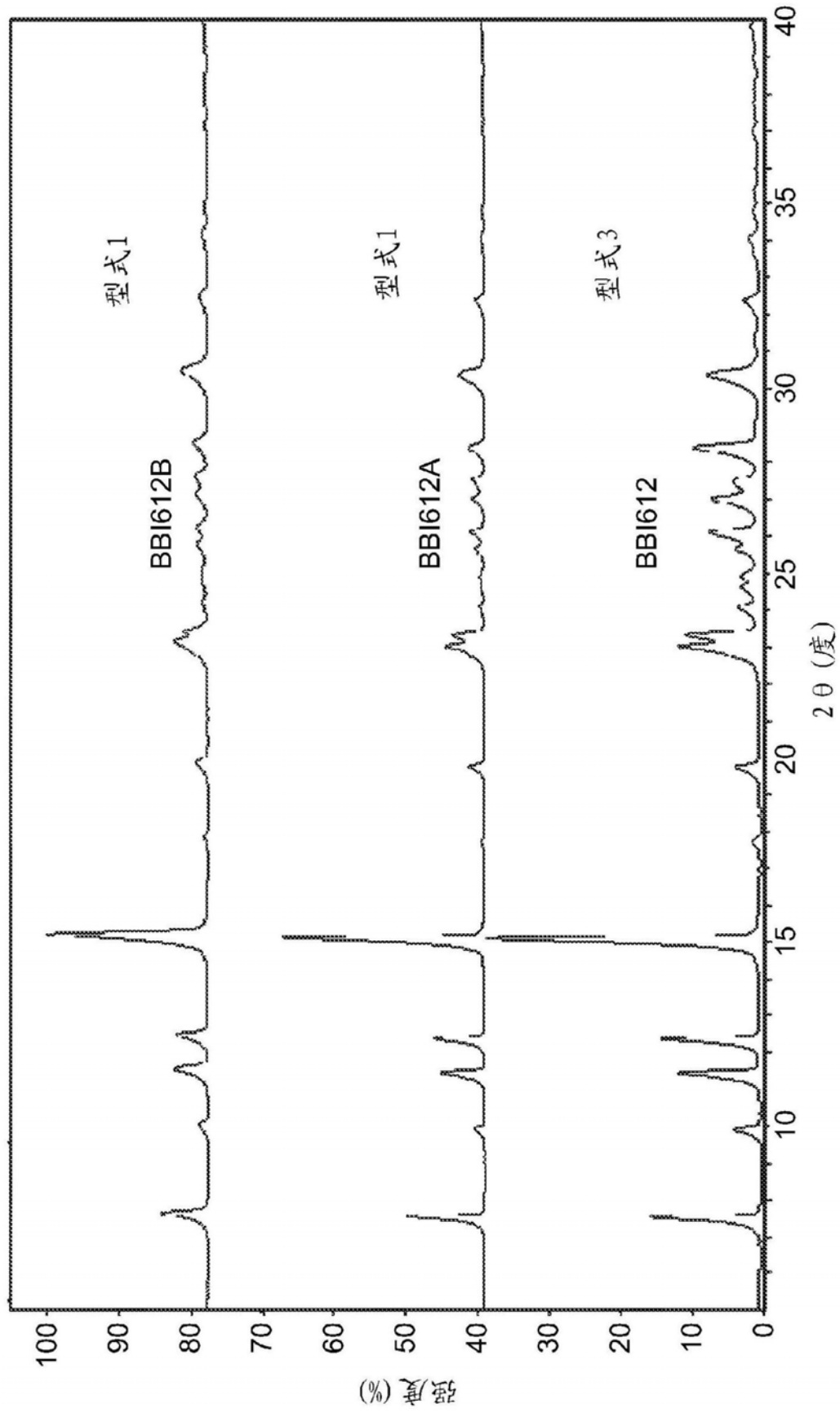
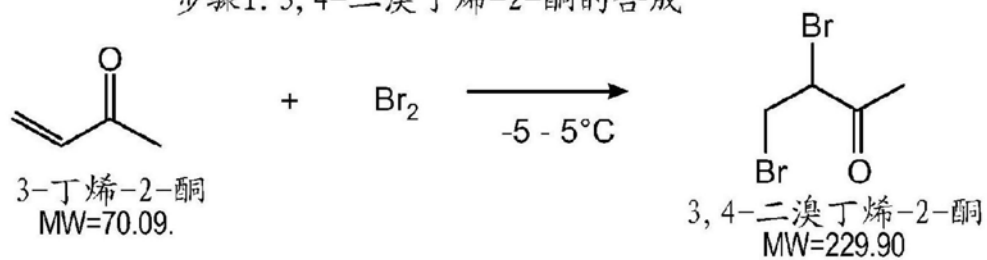


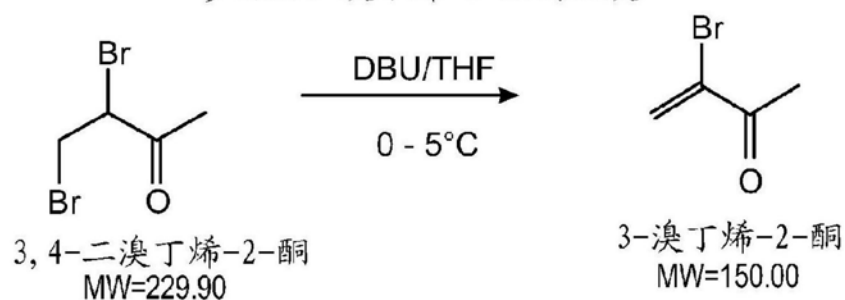
图4

## 工艺流程图

## 步骤1: 3, 4-二溴丁烯-2-酮的合成



## 步骤2: 3-溴丁烯-2-酮的脱溴



## 步骤3: 化合物1的合成

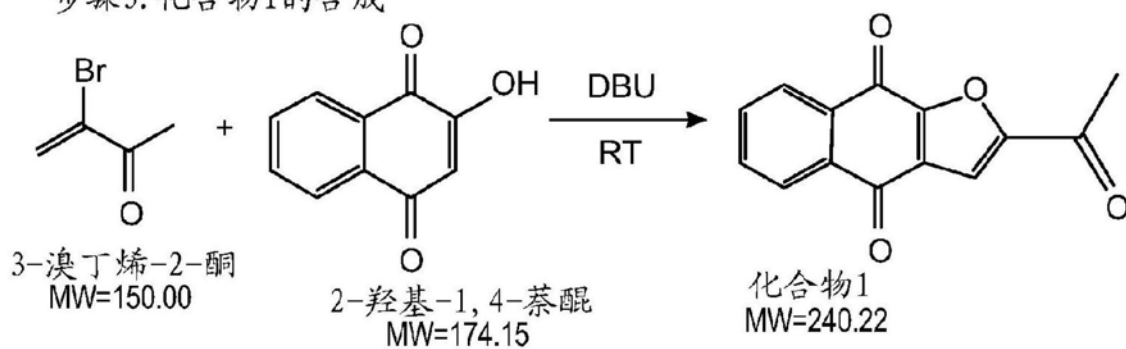


图5A

### 工艺流程图

化合物1工艺流程图: 合成/粗品分离

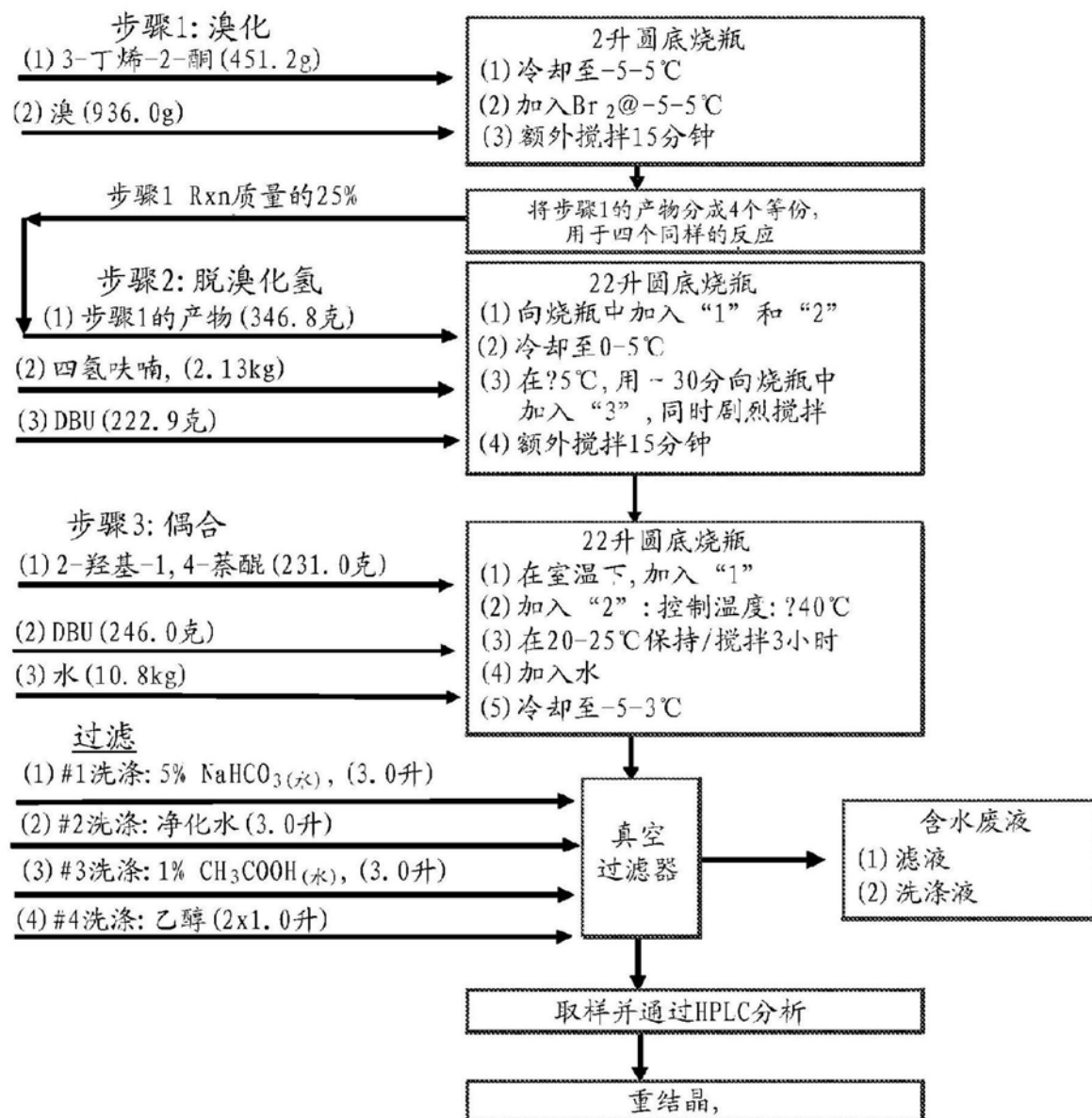


图5B

## 化合物1的合成方案

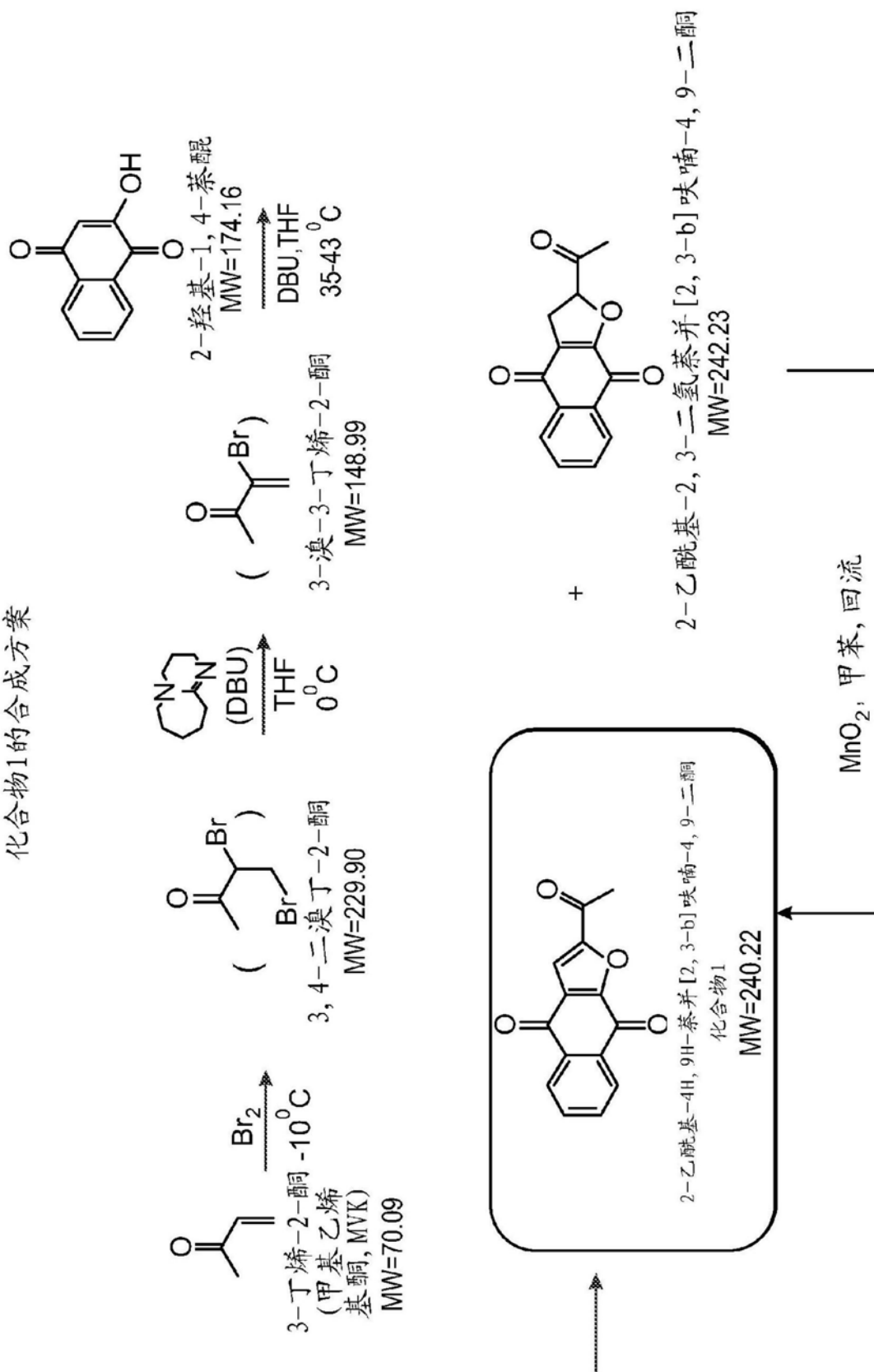


图6A



工艺流程图: 步骤1: 粗品化合物1的合成

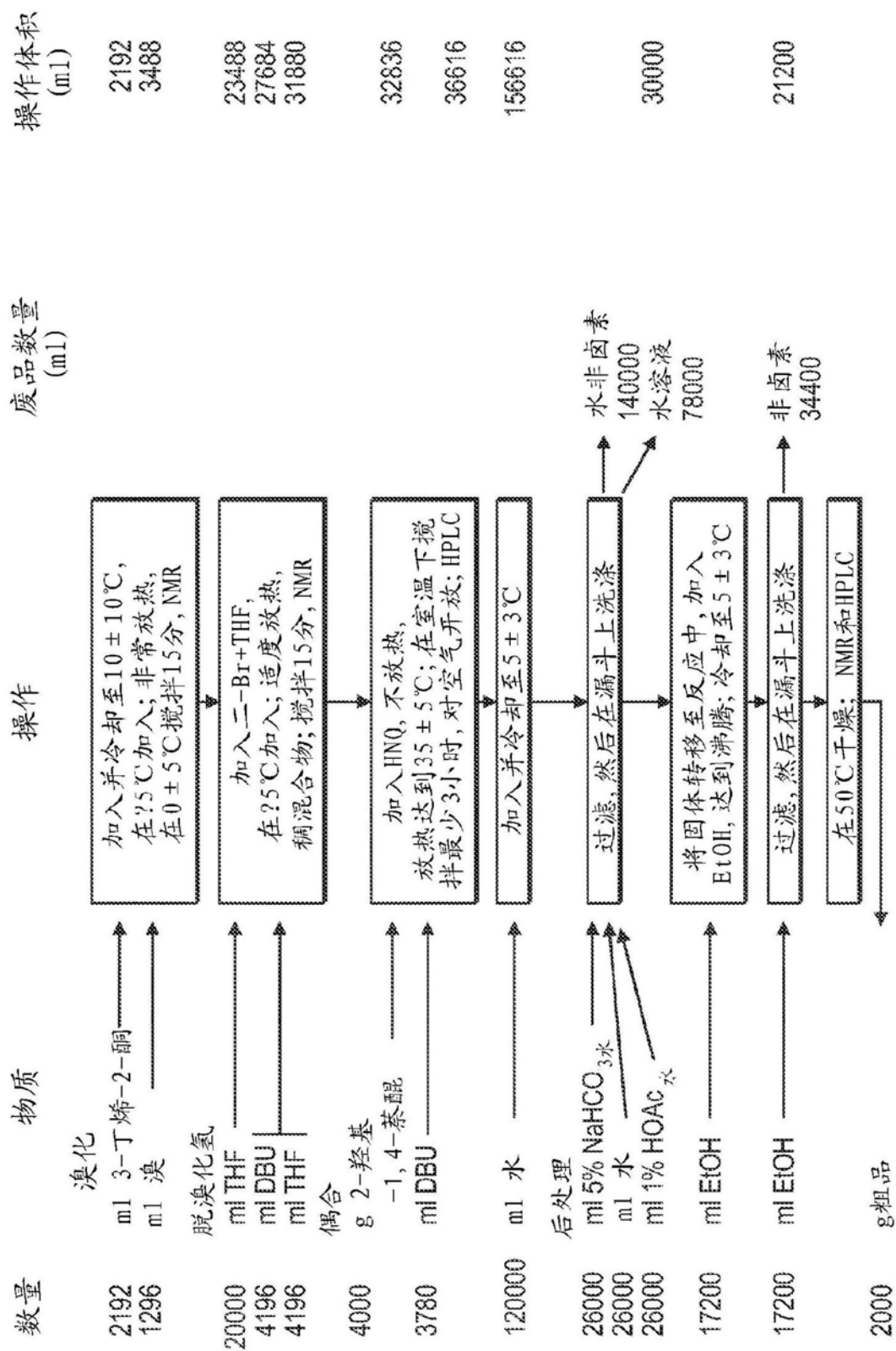


图6B

工艺流程图: 步骤2: 氧化/活性炭处理

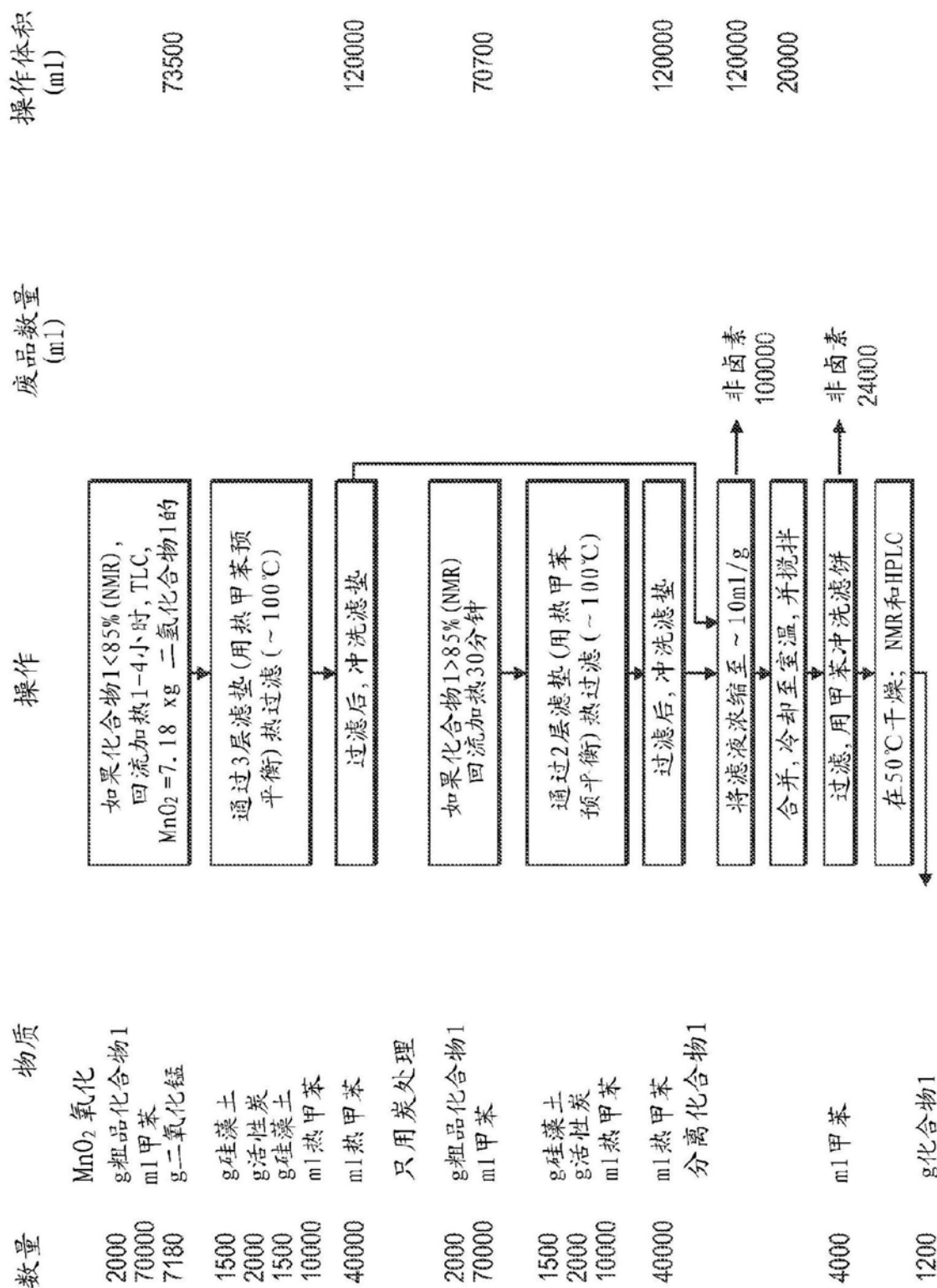


图6C

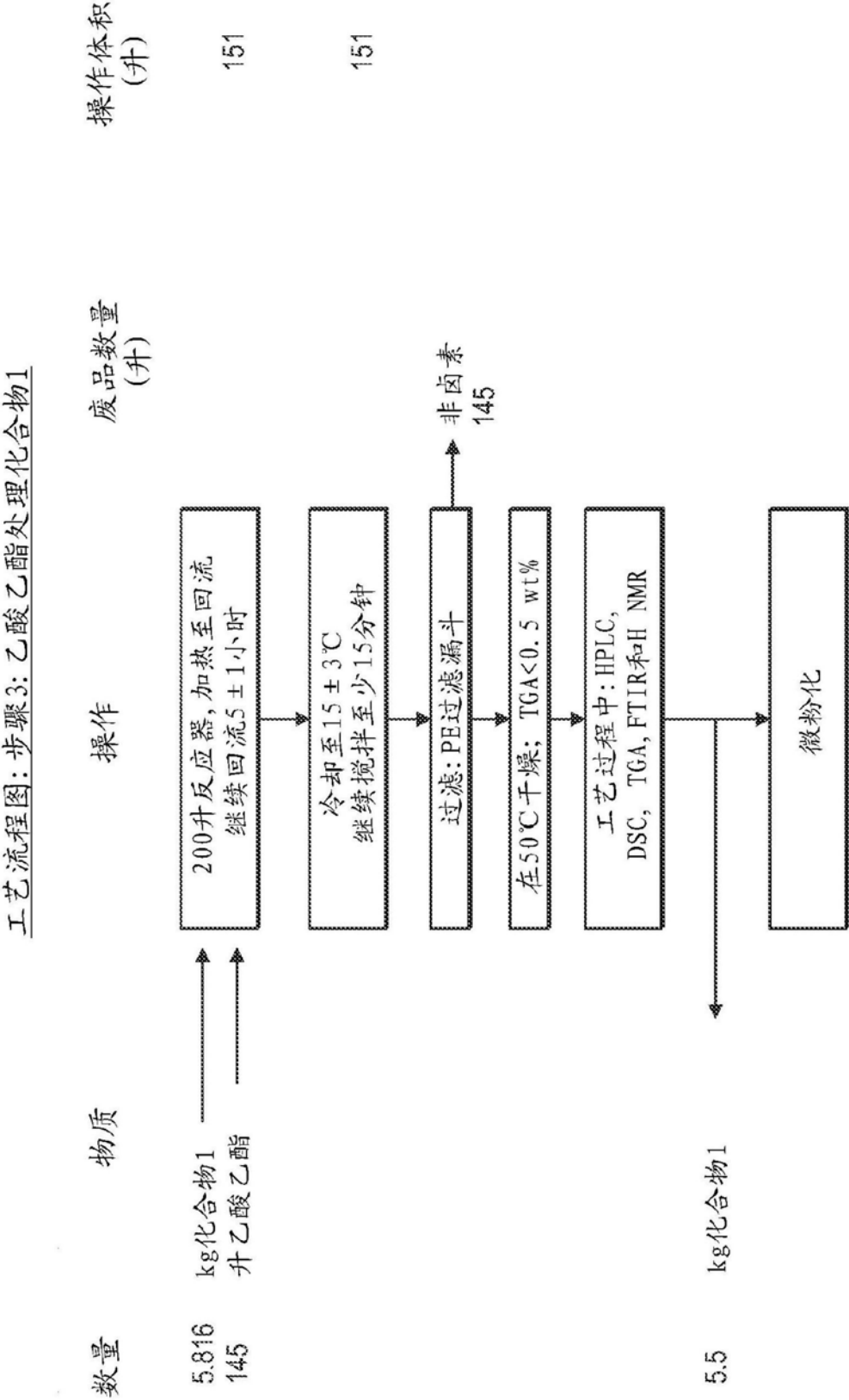


图6D

晶体形式1

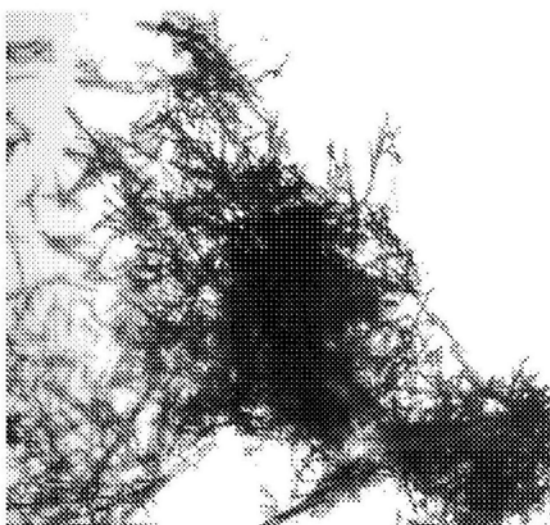


图7A

晶体形式3

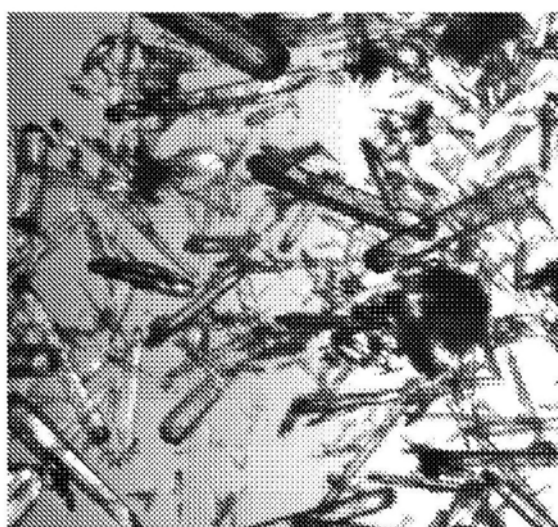


图7B

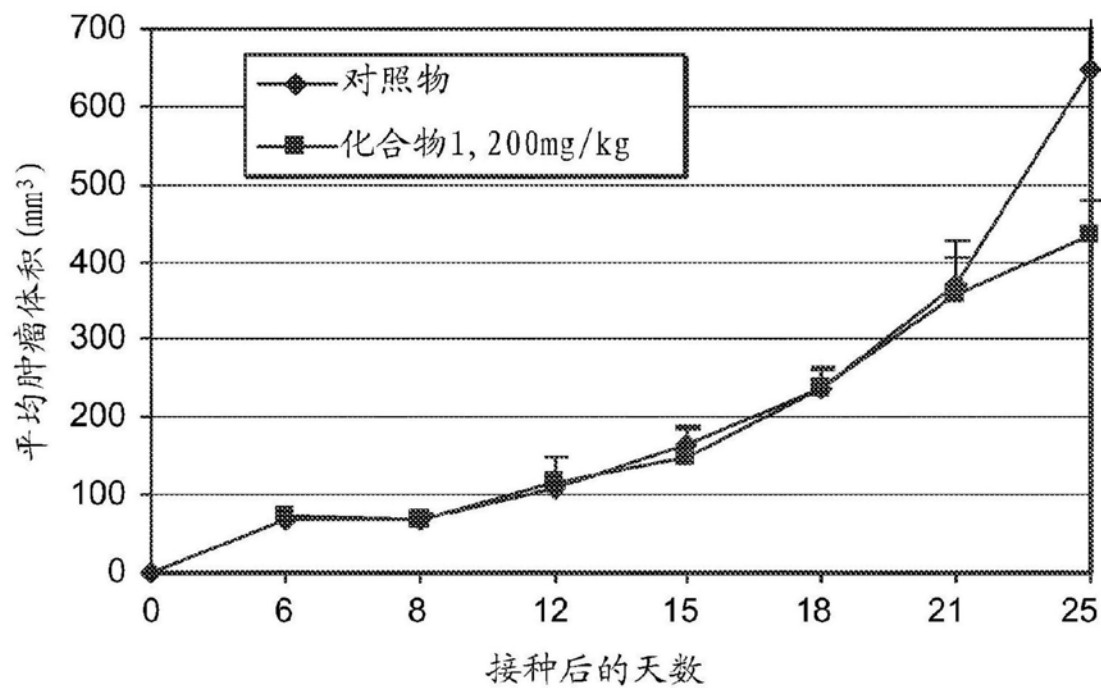


图8

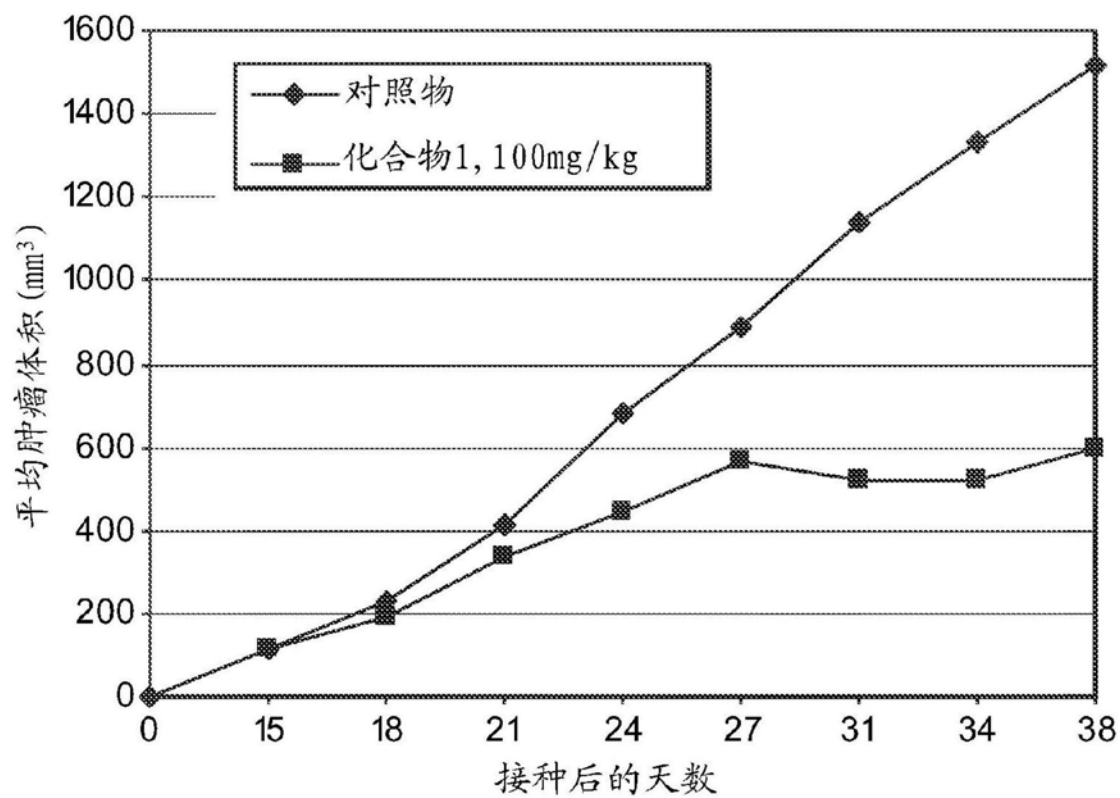


图9

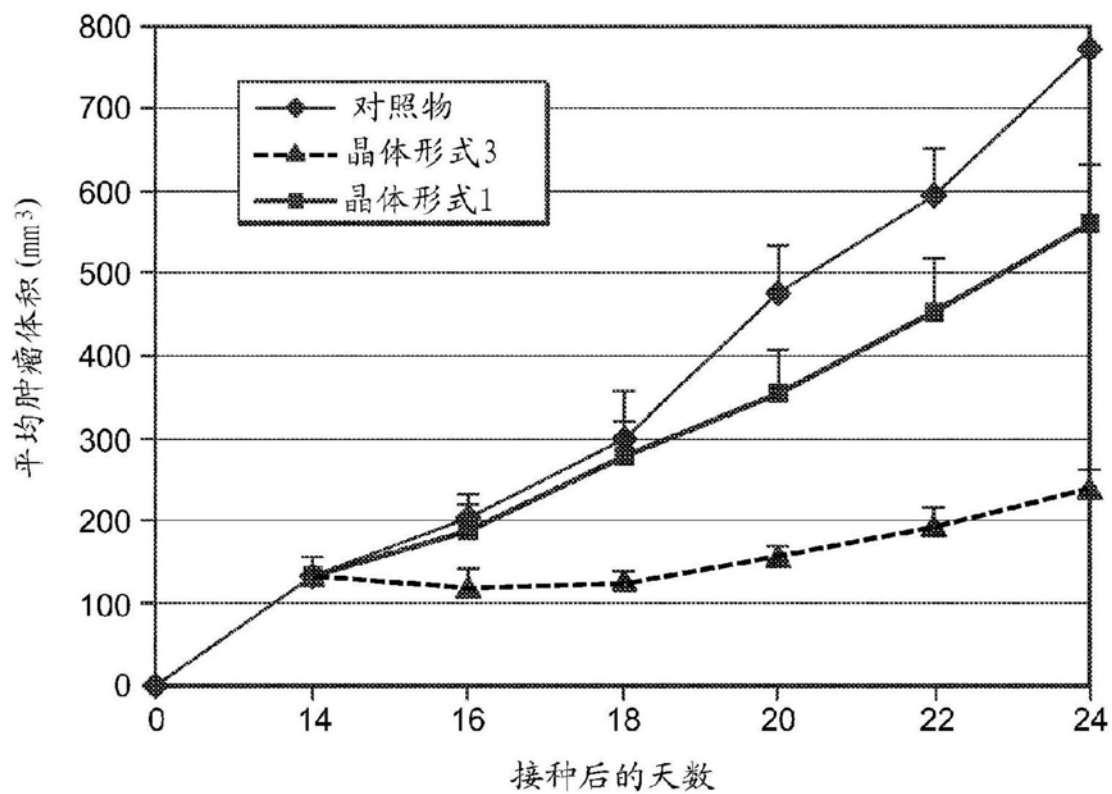


图10

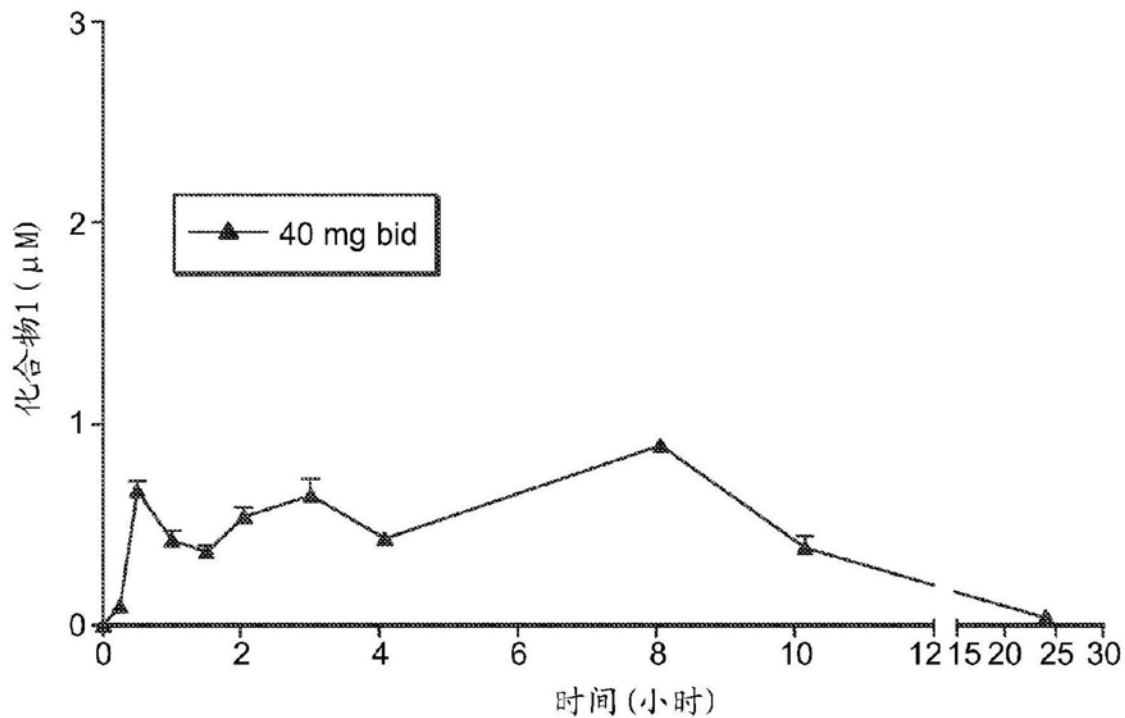


图11

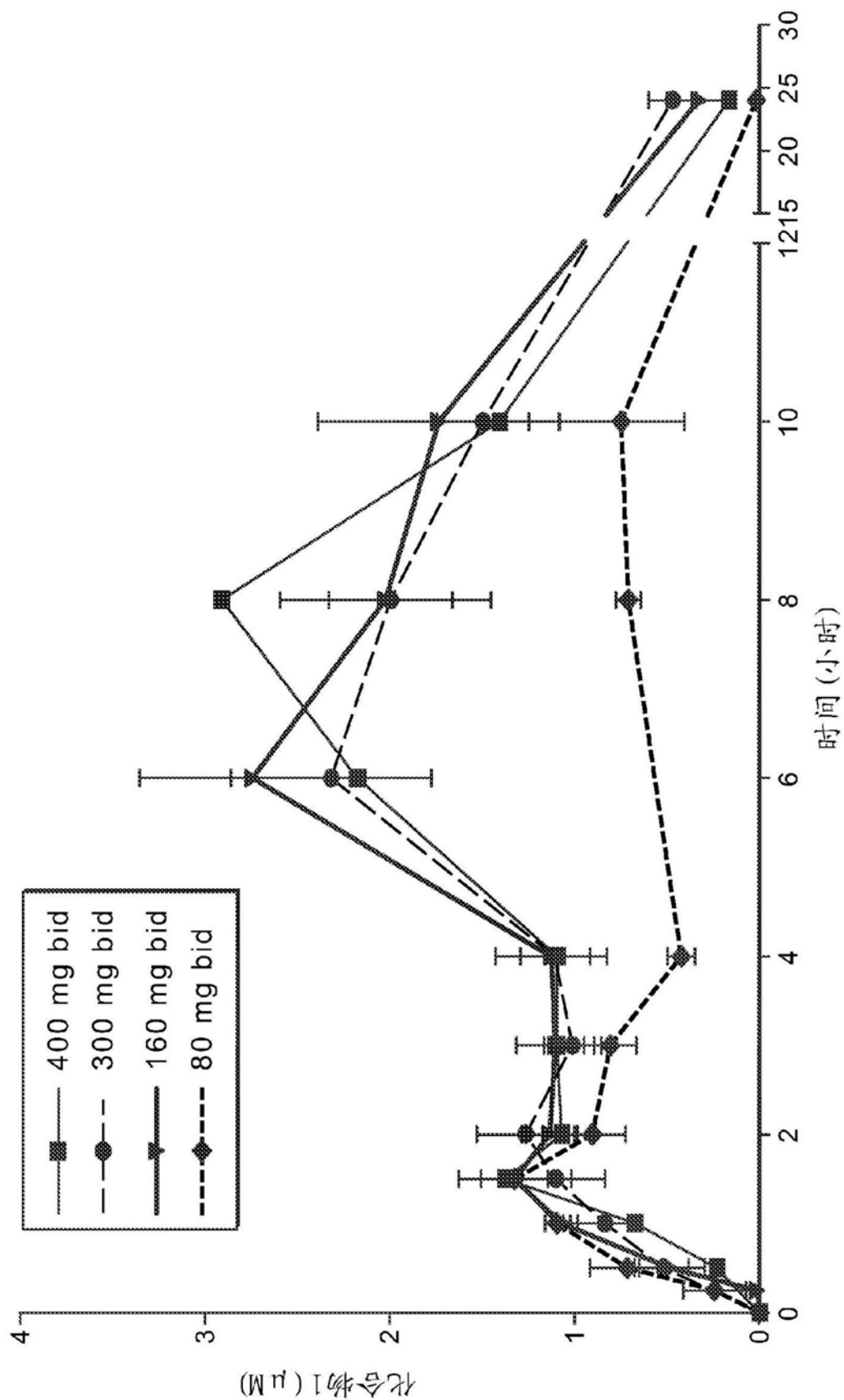


图12

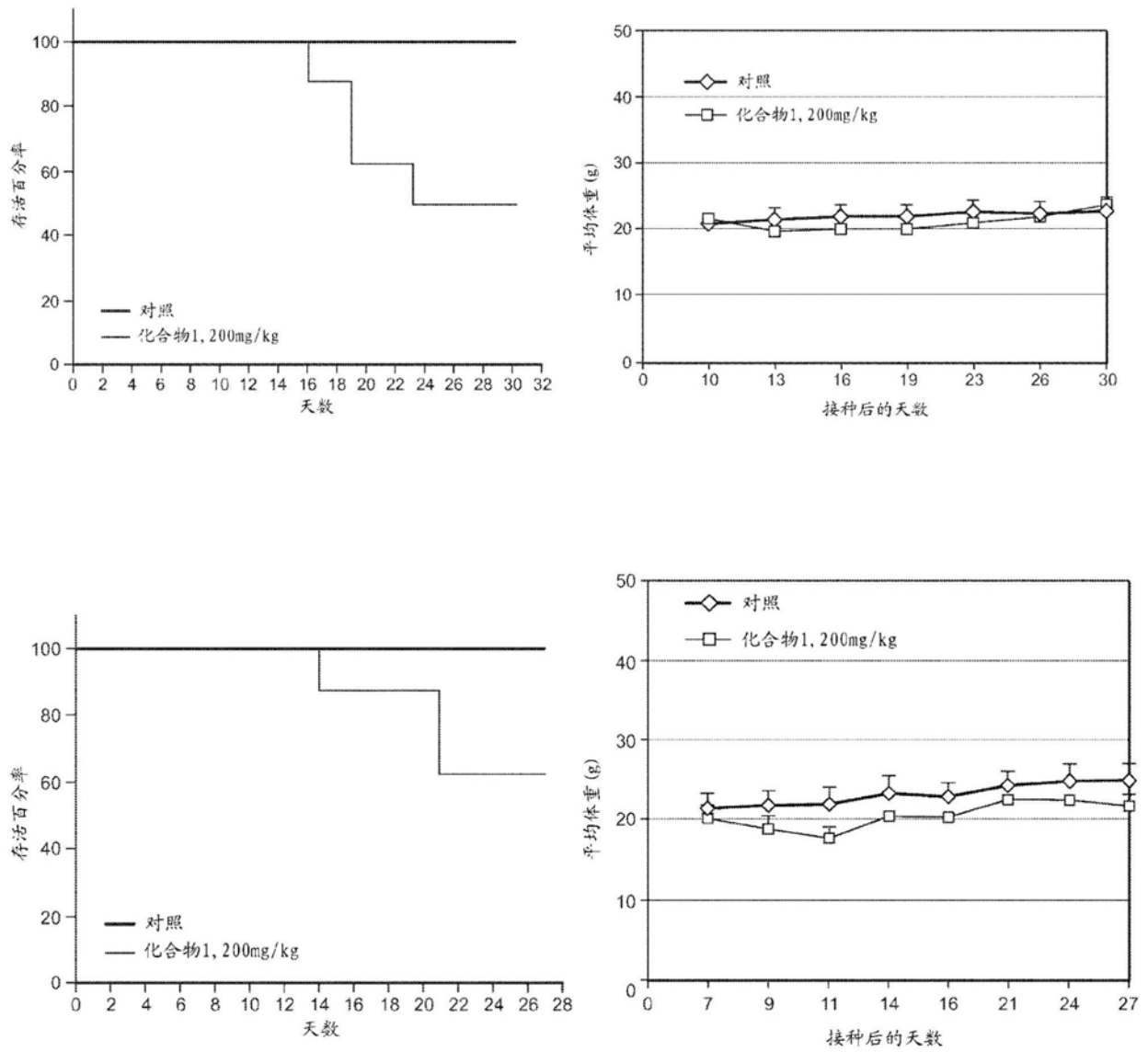


图13



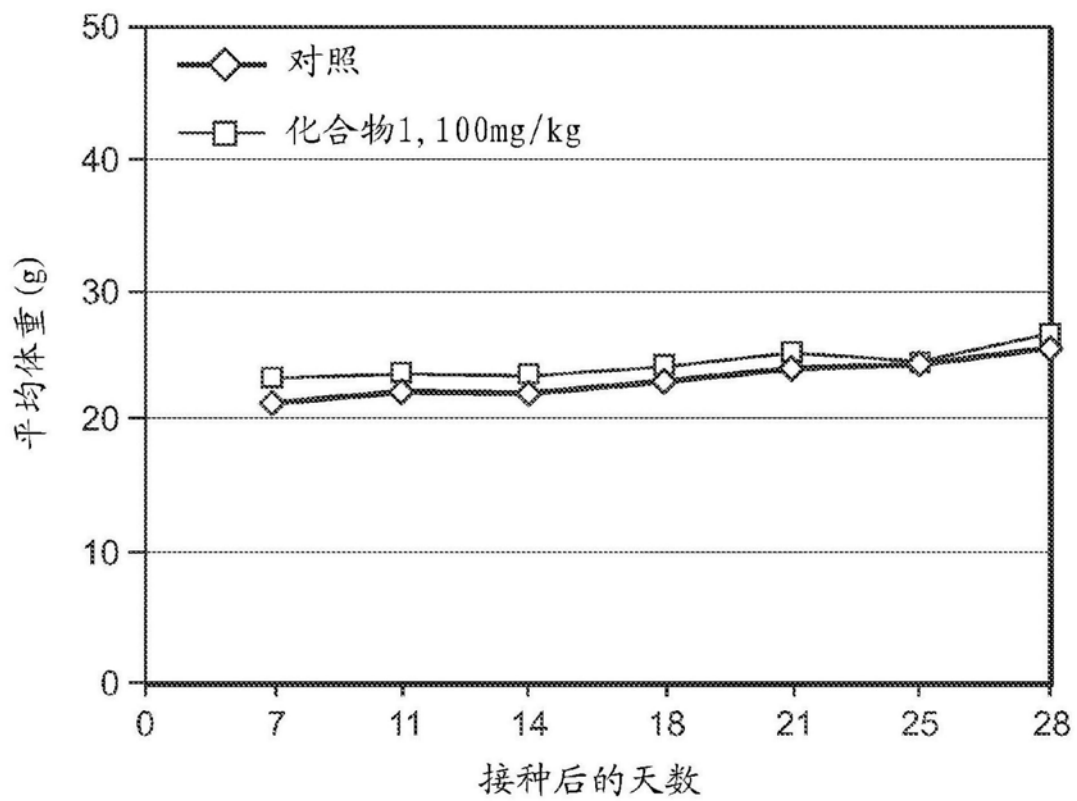
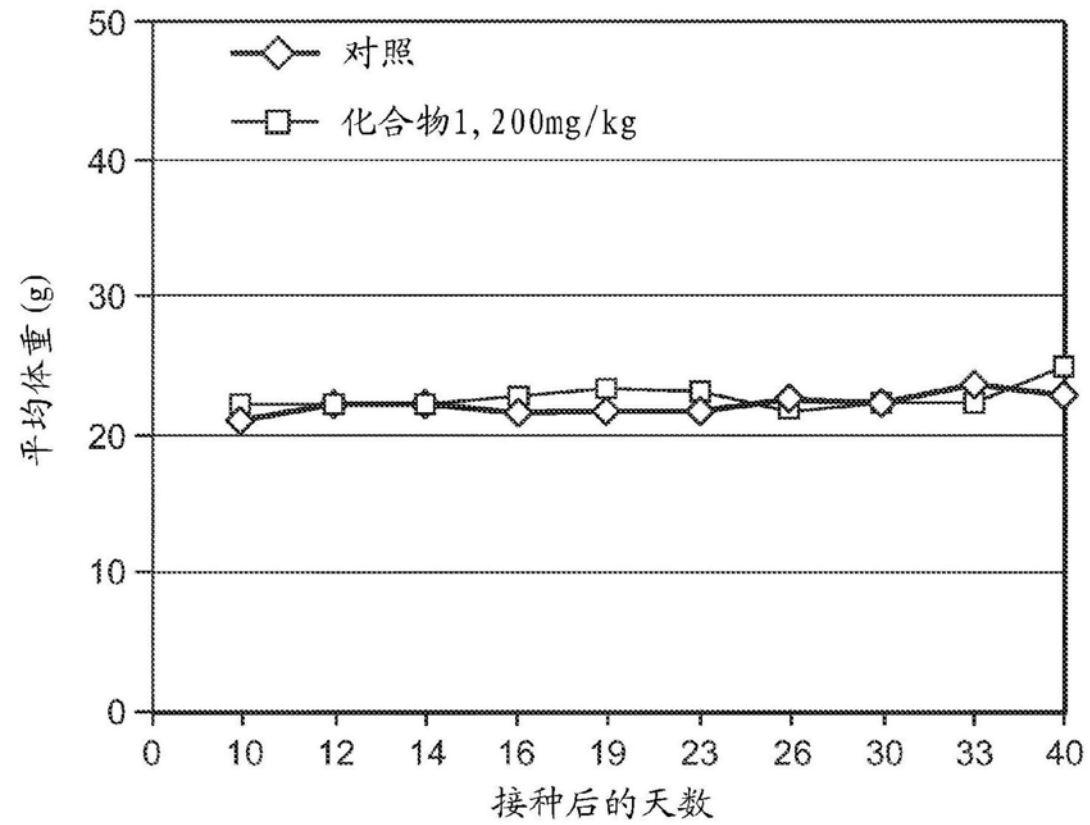


图14

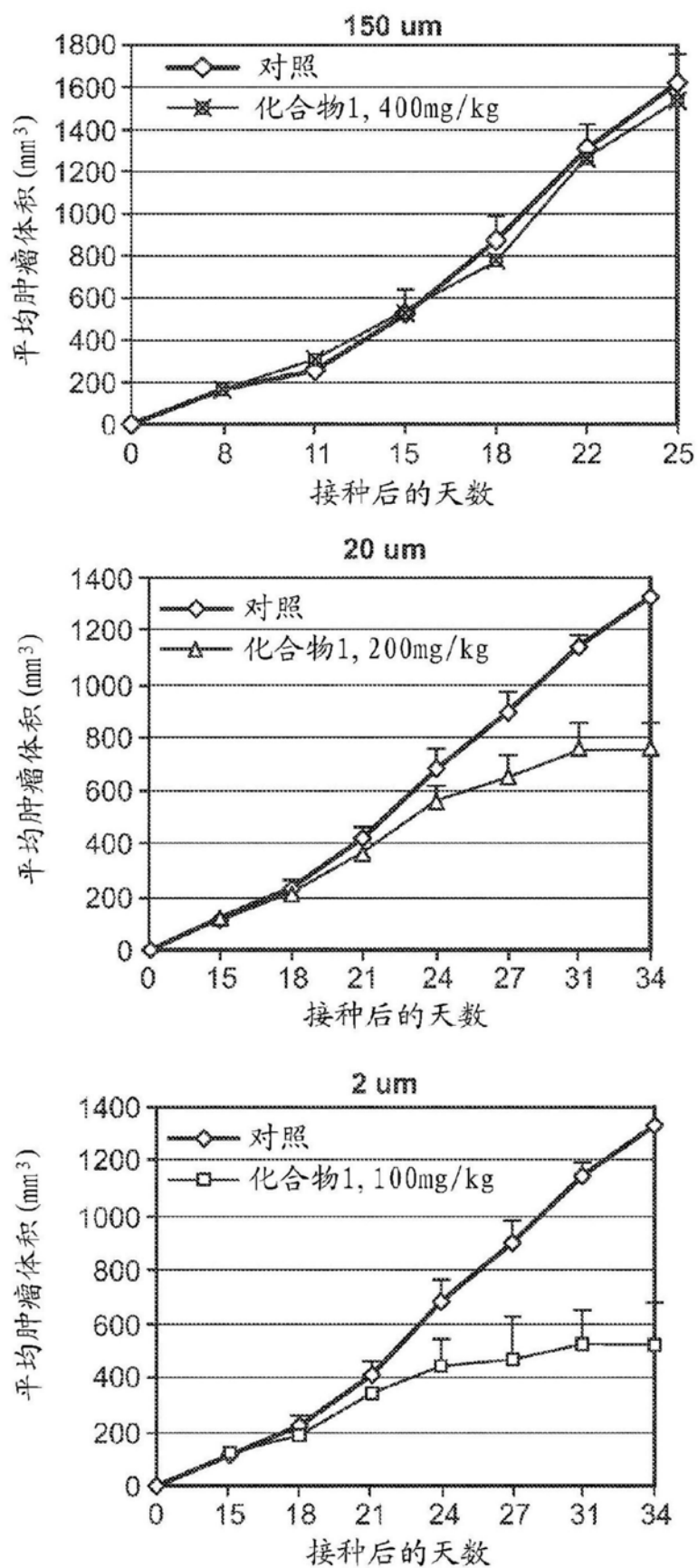


图15

单独po 100mg/kg化合物1(在20% Gelucire中)

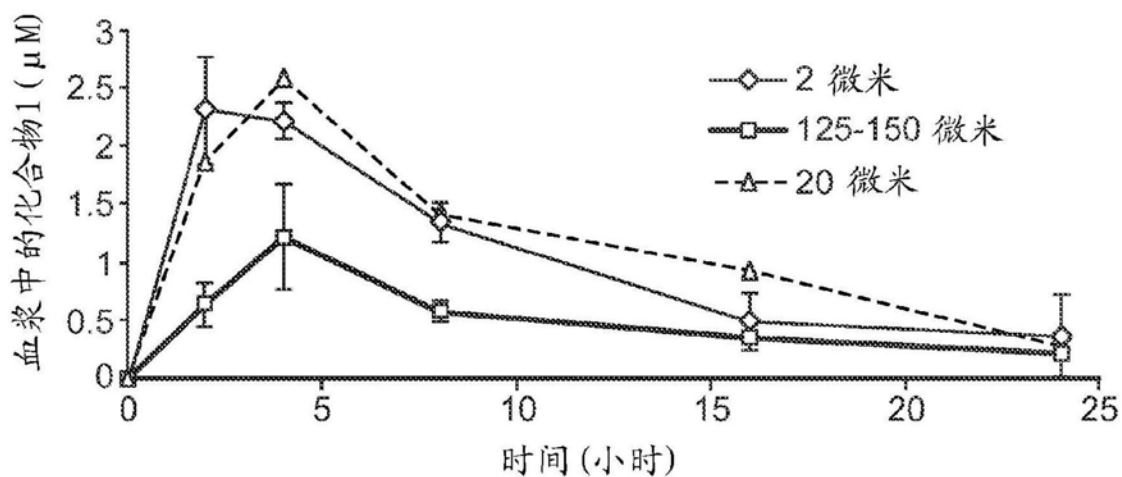


图16

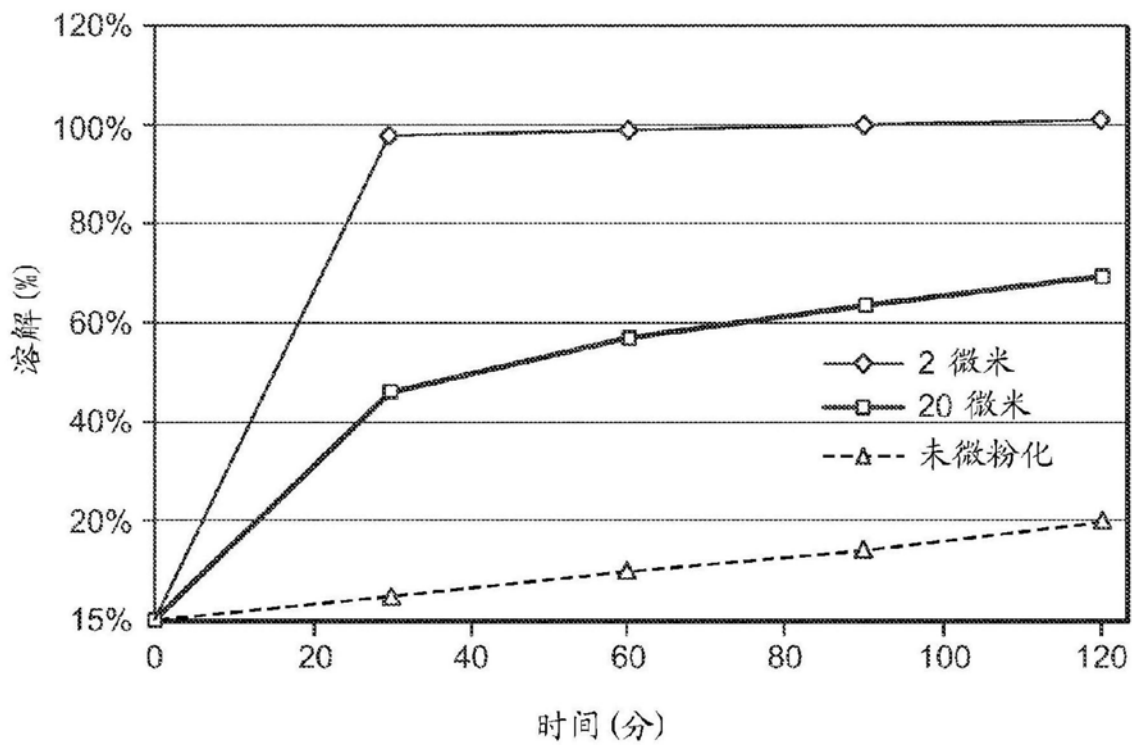


图17

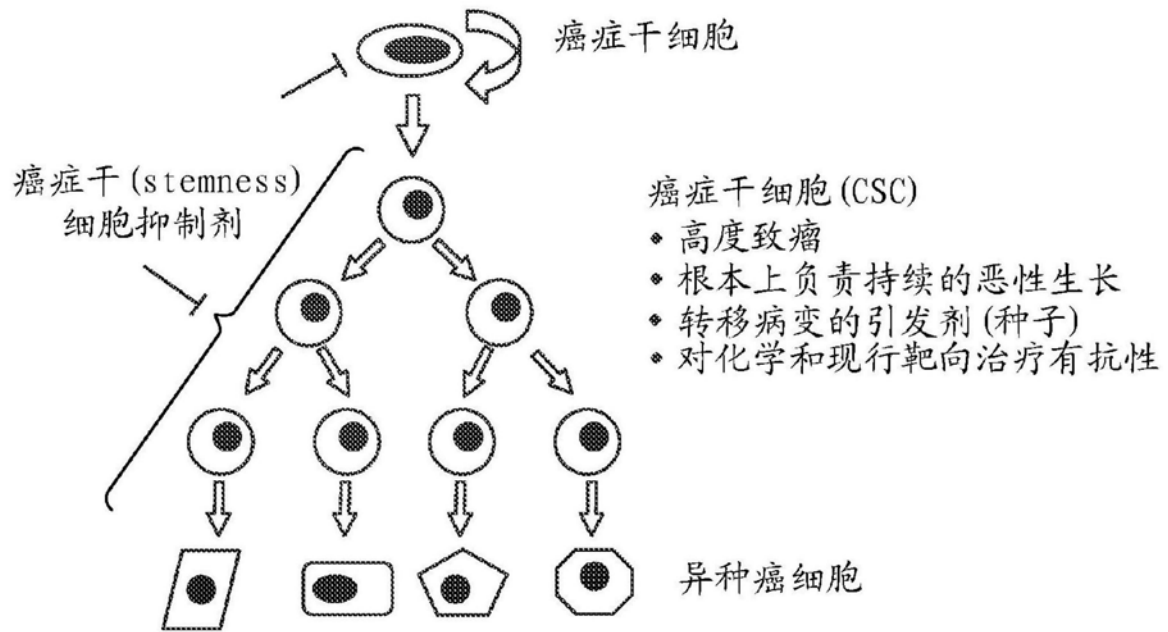


图18

4个周期之后

2个周期之后

基线



图19

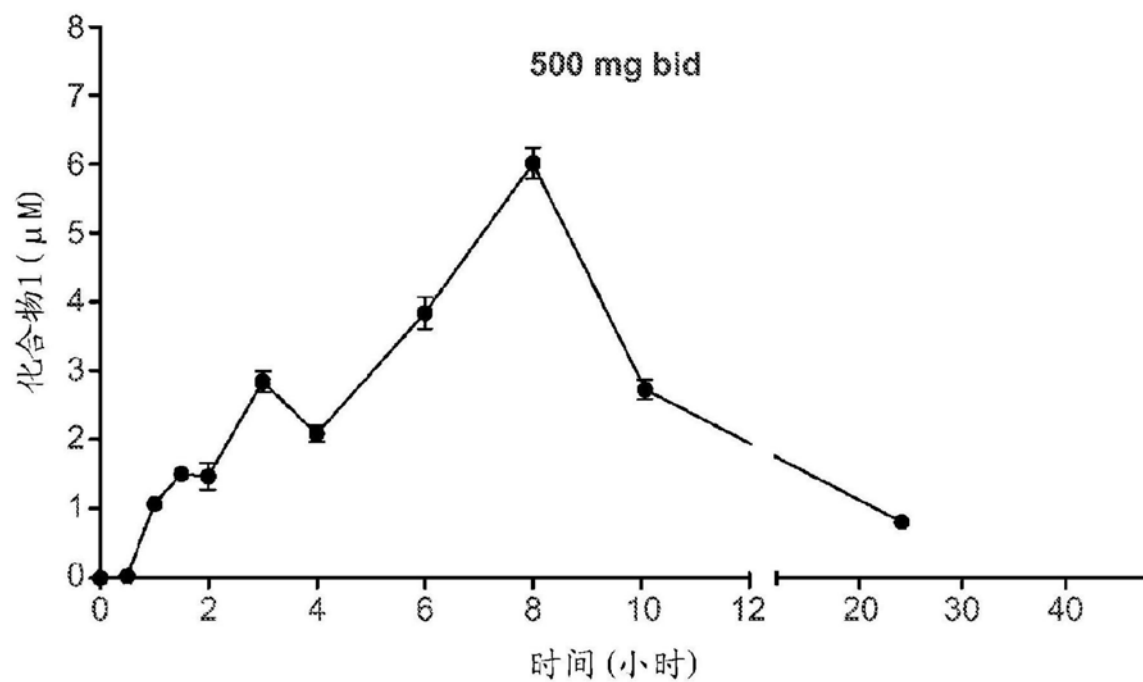


图20

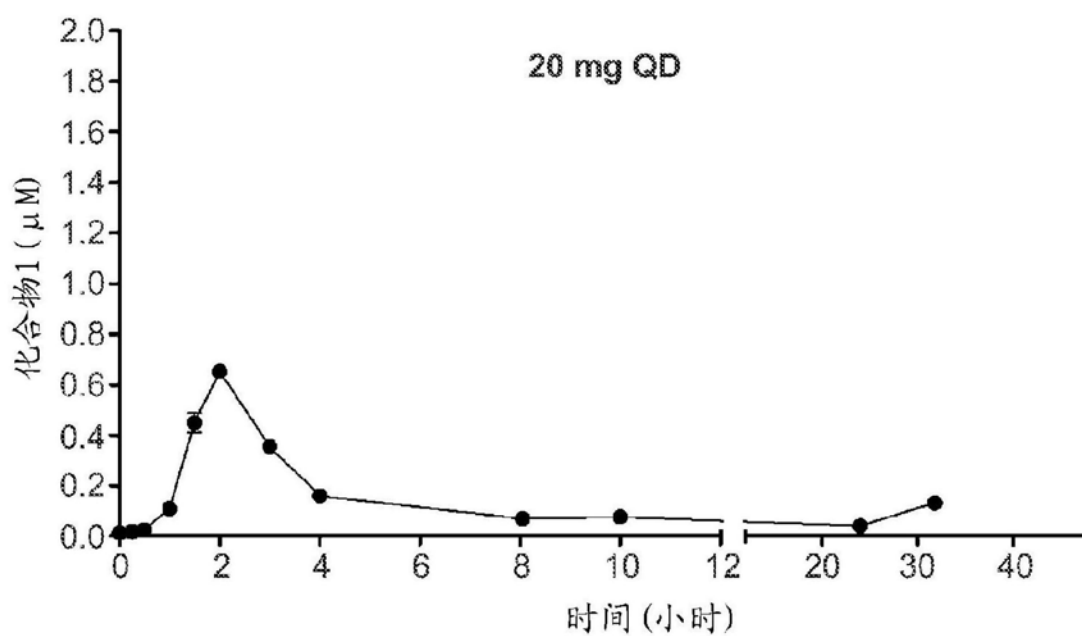


图21

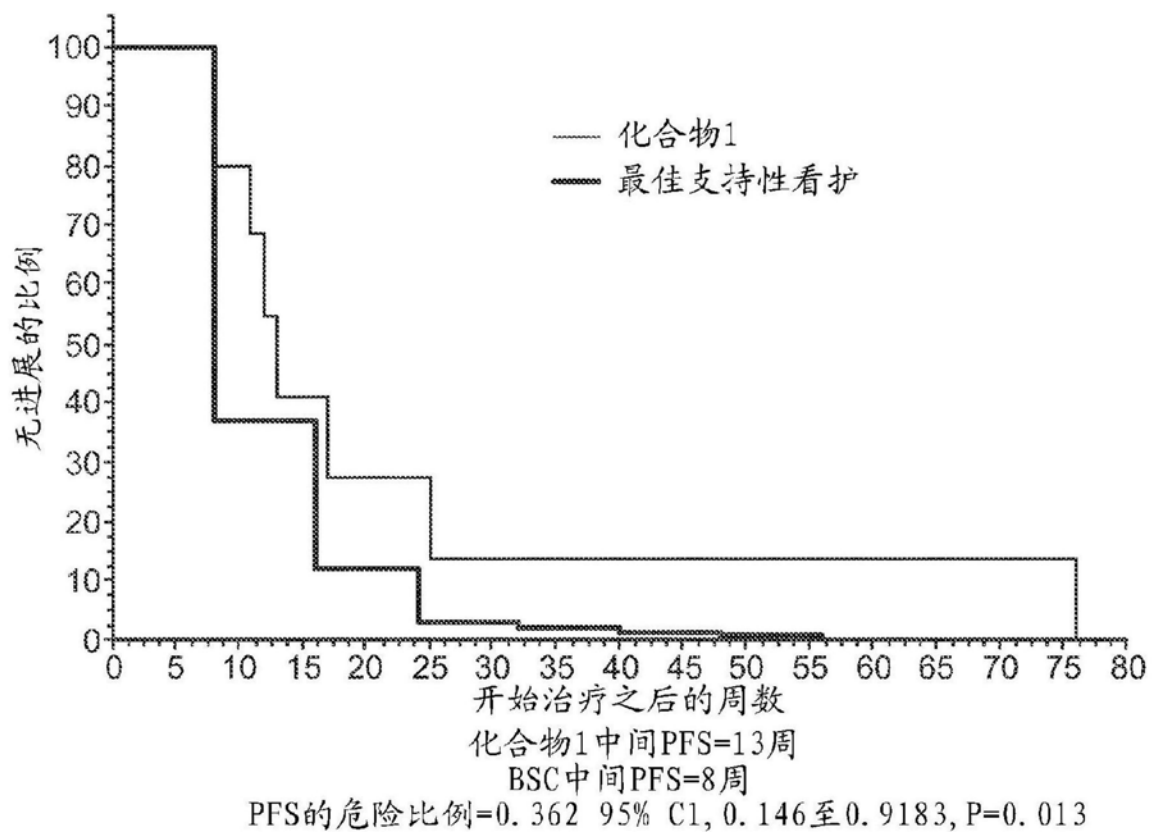


图22

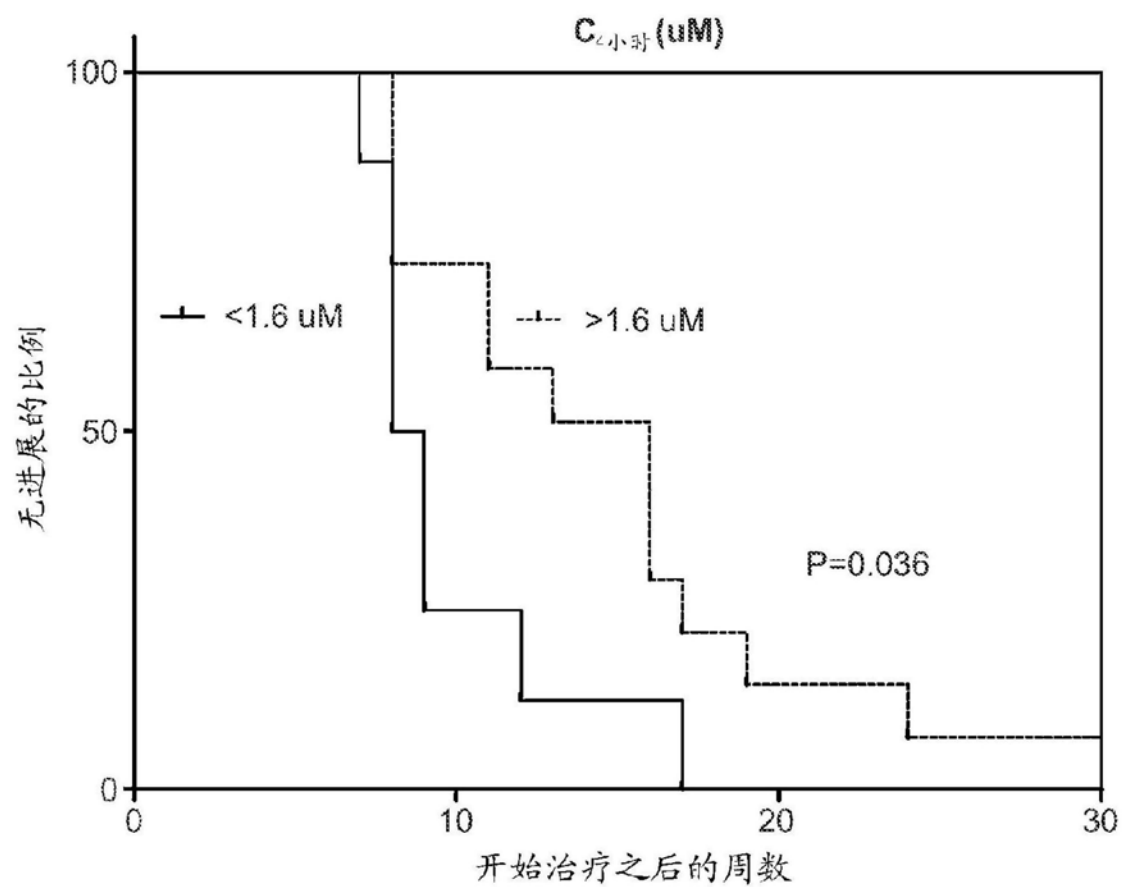


图23



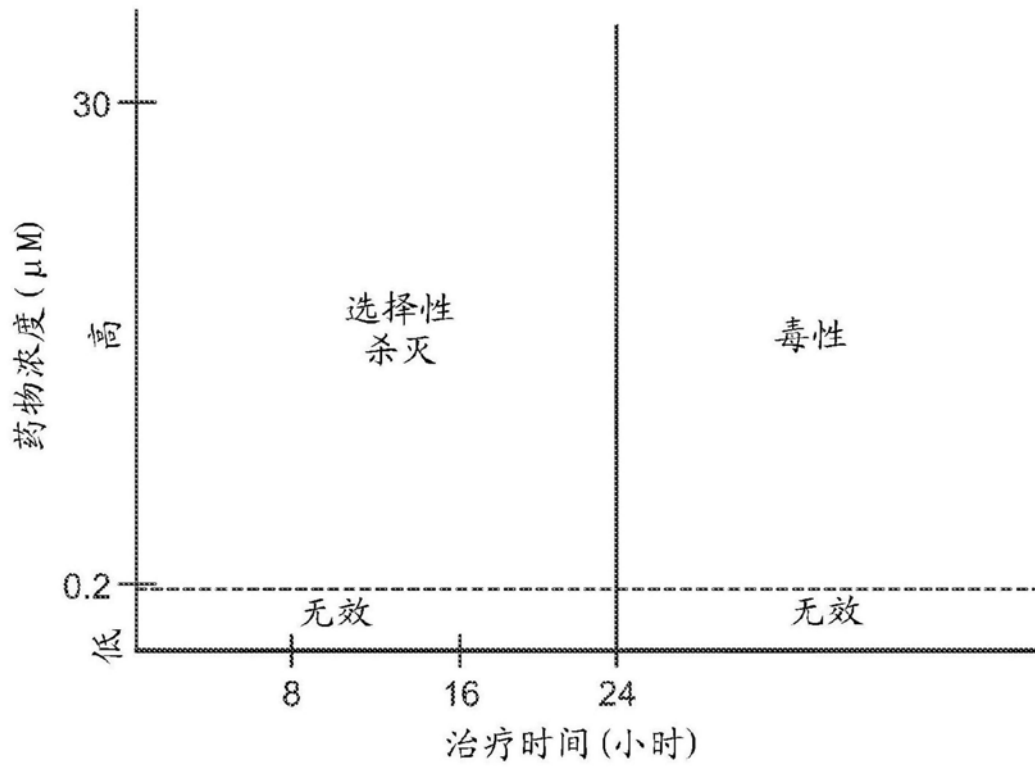


图24

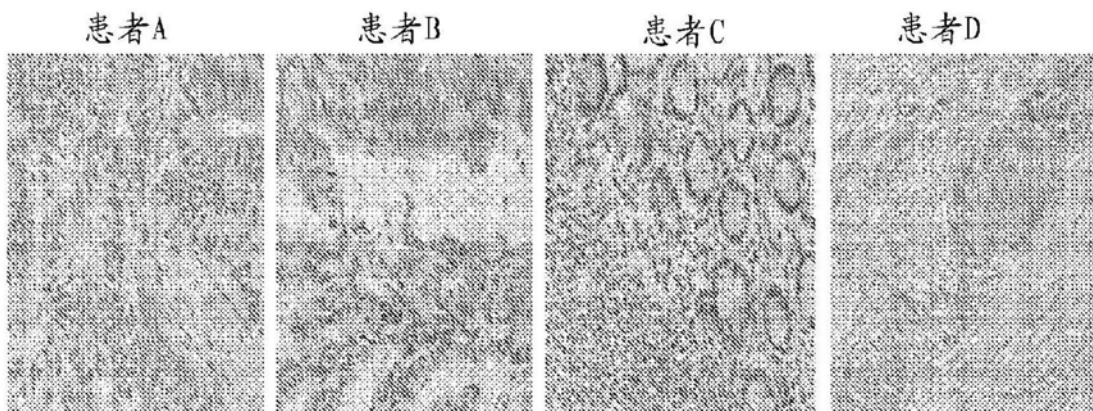


图25