



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112770755 A

(43) 申请公布日 2021.05.07

(21) 申请号 201980060580.4

(22) 申请日 2019.09.17

(30) 优先权数据

62/732,553 2018.09.17 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.03.16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/051595 2019.09.17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/061106 EN 2020.03.26

(71) 申请人 坎格特生物技术制药有限责任公司

地址 美国纽约

申请人 浙江工业大学

(72) 发明人 凌祥 李庆勇 李风知

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

代理人 袁志明

(51) Int.Cl.

A61K 31/4738 (2006.01)

A61K 31/4745 (2006.01)

C07D 491/00 (2006.01)

C07D 491/22 (2006.01)

权利要求书9页 说明书54页 附图34页
按照条约第19条修改的权利要求书9页

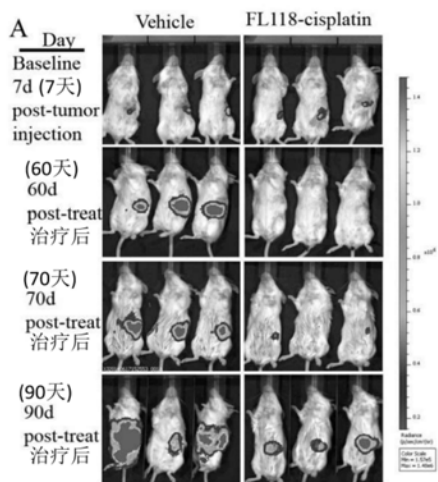
(54) 发明名称

平台药物FL118位置7和9衍生的类似物的组成,合成,制备和应用治疗人类疾病

(57) 摘要

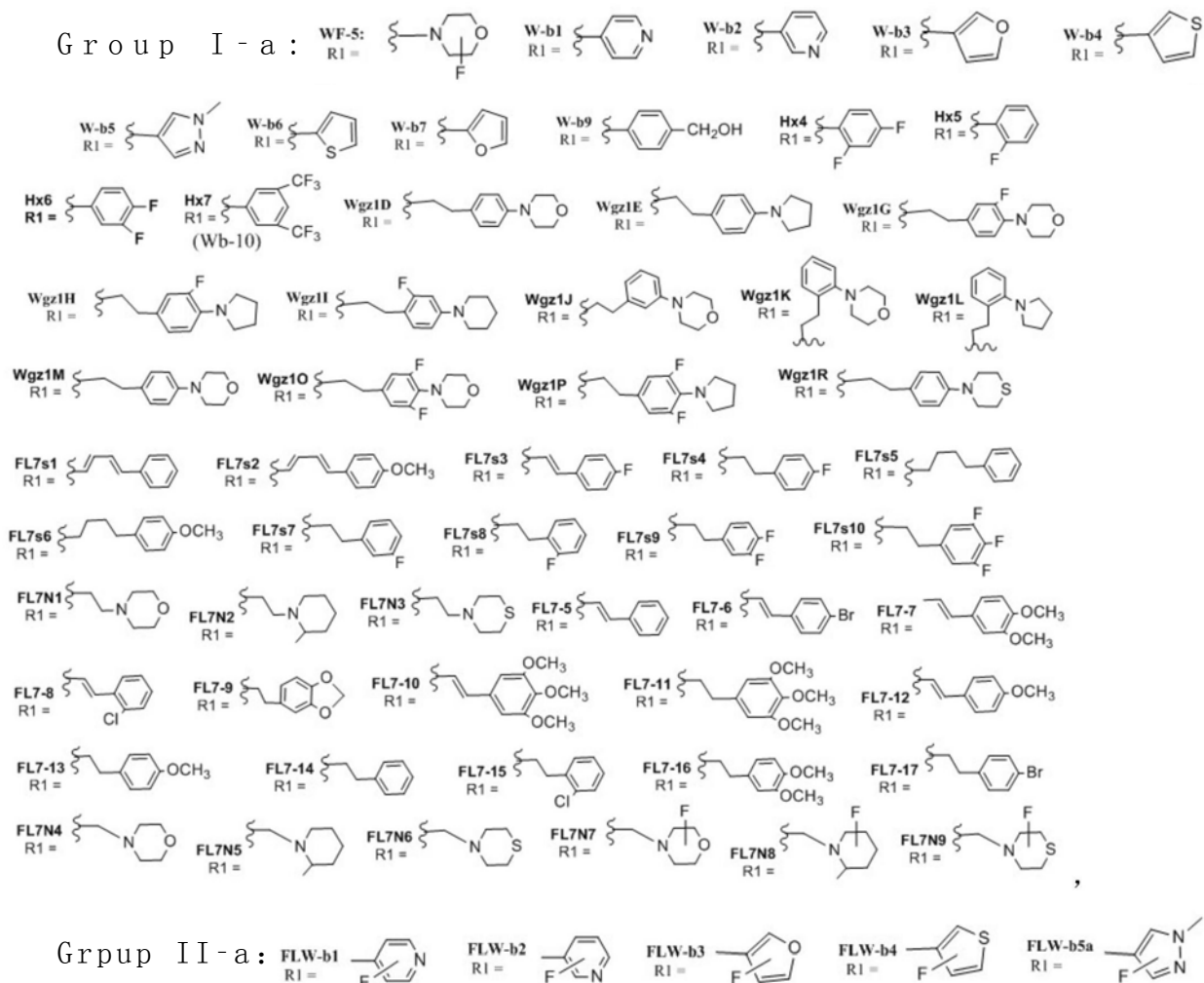
本文描述的是平台药物FL118位置7和/或位置9衍生的类似物的化学合成,组成,配方,功能,方法和用于治疗癌症或其他人类疾病用途。衍生自平台药物FL118化学修饰的化合物可单独使用,也可与其他抗癌药结合使用,以预防,消除或逆转癌症表型。本发明旨在通过应用一系列结构相关的平台药物FL118衍生的各种个体类似物来实现独特的个性化癌症治疗(个性化的精确医学)。所述平台药物FL118类似物在癌细胞中靶向多种与人类疾病相关蛋白及其信号传导途径。

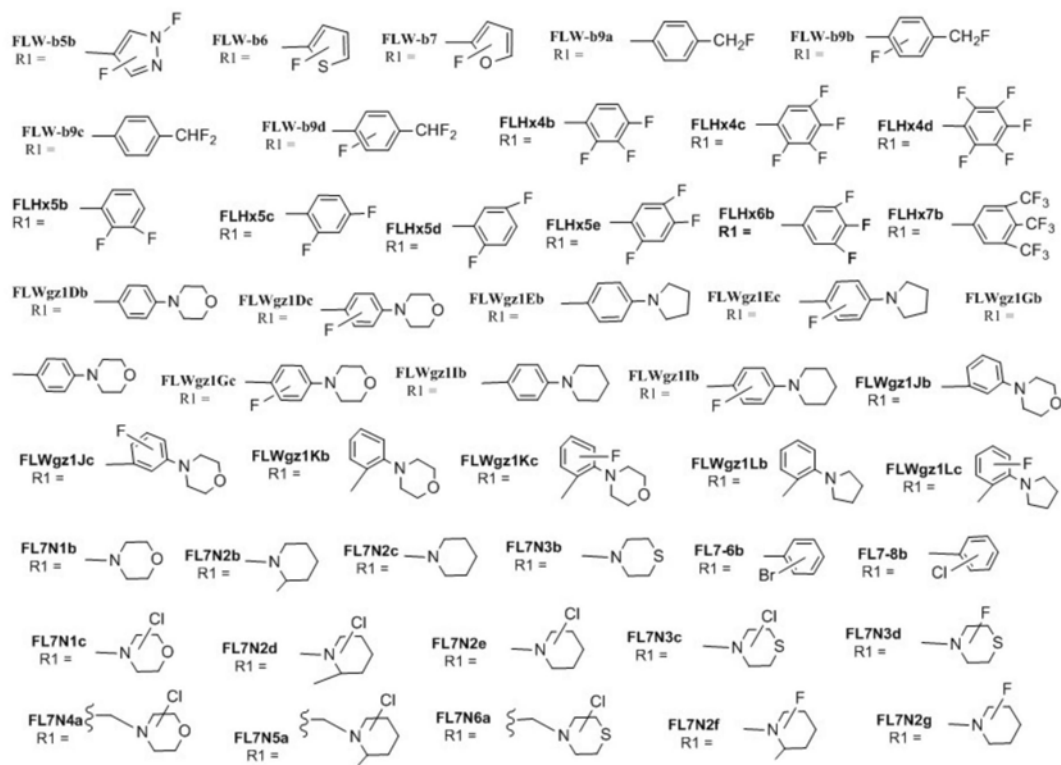
图6: FL118作为新药平台药物与顺铂组合可同时抑制胰腺癌细胞的生长和肿瘤转移



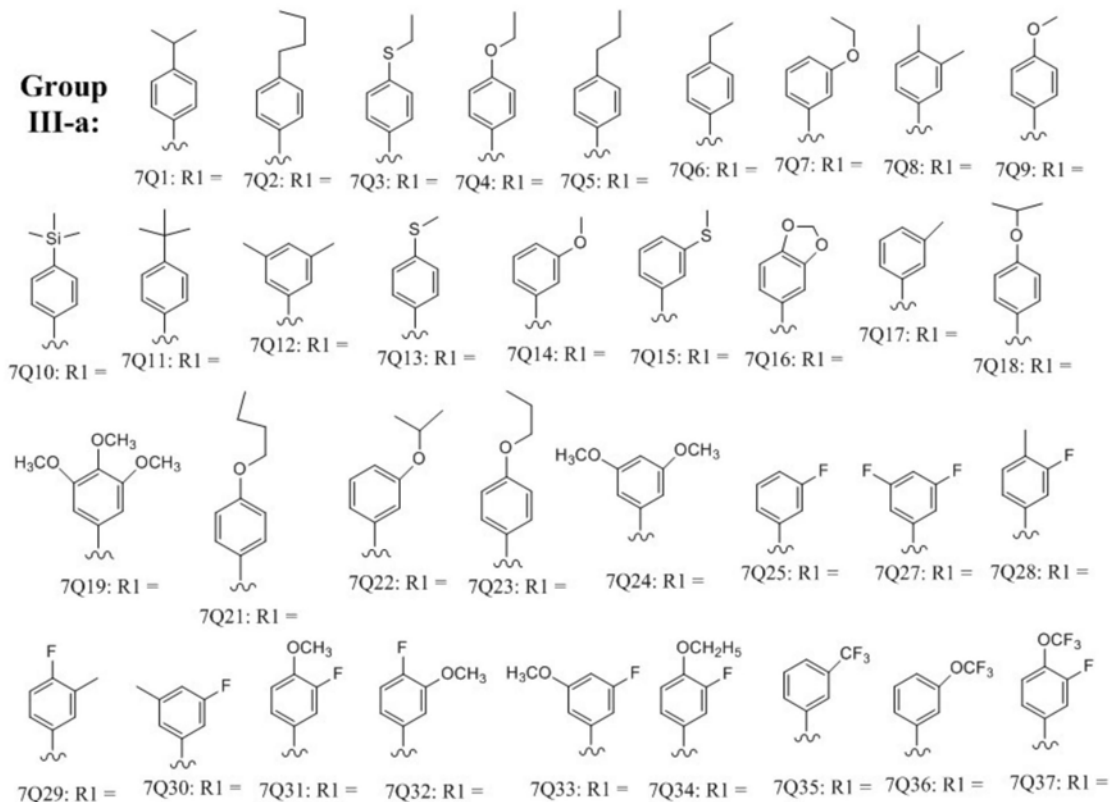
公式 1/式 1

其中当 R_2 为H时,则 R_1 独立选自以下的I-a组(Group I-a),II-a组(Group II-a),III-a组(Group III-a)和IV-a组(Group IV-a):

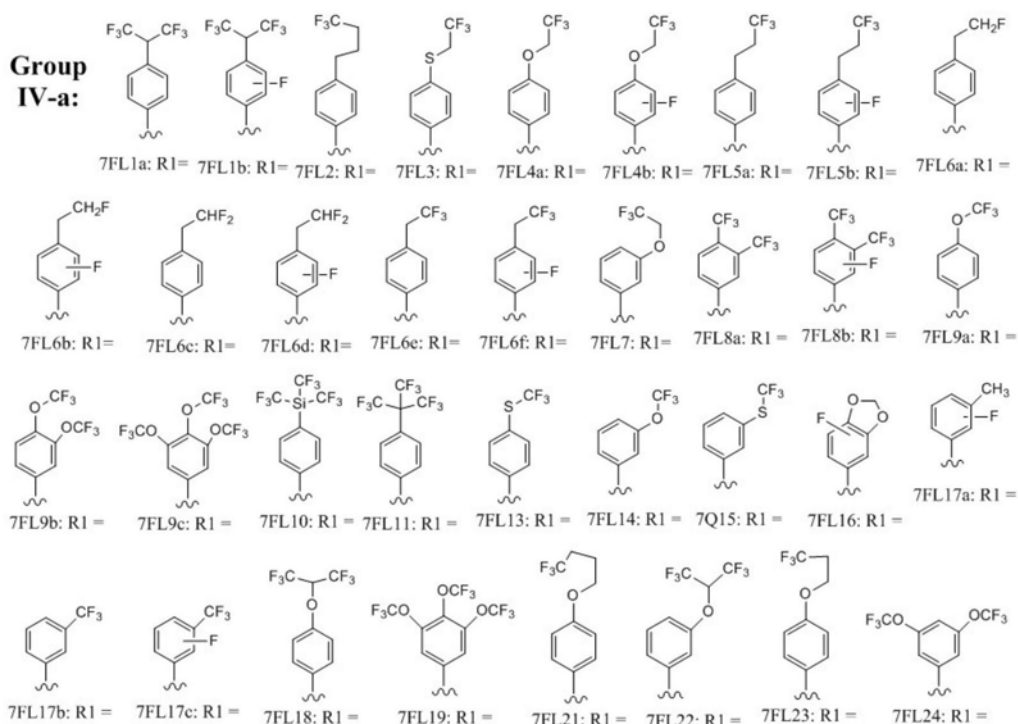




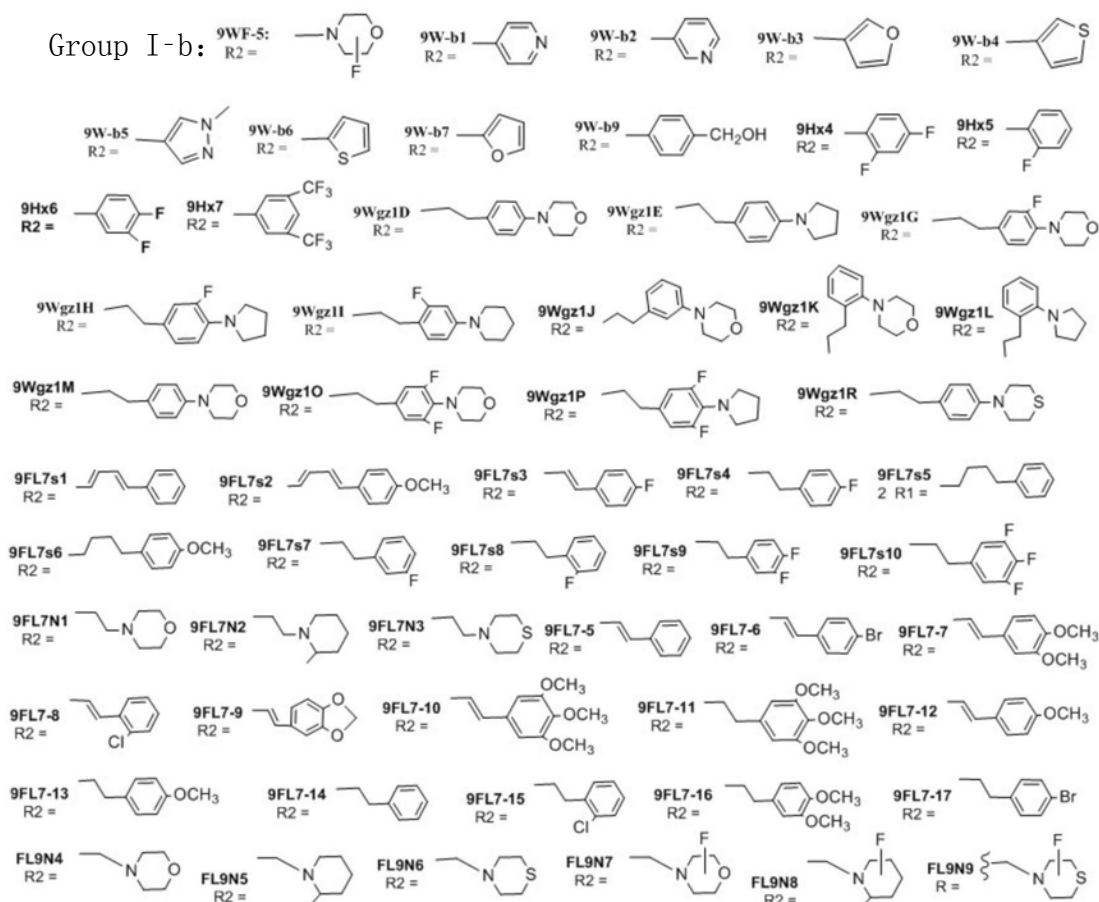
Group III-a:



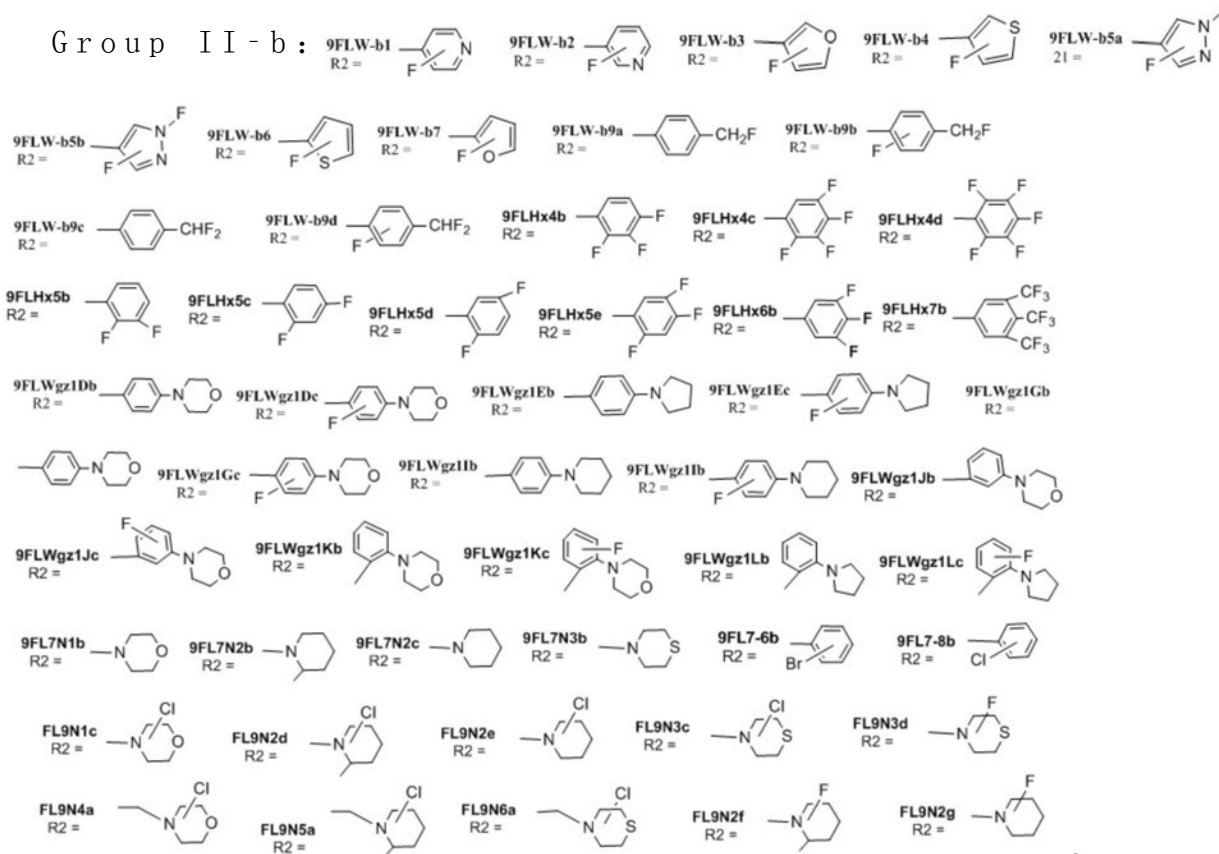
和



或其中当 R_1 为H时,则 R_2 独立地选自以下的I-b组(Group I-b),II-b组(Group II-b),III-b组(Group III-b)和IV-b组(Group IV-b):



Group II-b:





其中20位酯对应的化合物衍生自各种酯化化学基团。

4.如权利要求1所述的组成化合物(公式1化合物),其中化合物用于所述疾病是一种或多种选自实体瘤,血液癌,纤维肉瘤,粘肉瘤,脂肪肉瘤,软骨肉瘤,成骨肉瘤,脊索瘤,血管肉瘤,内皮细胞肉瘤,淋巴管腺肉瘤,假性粘膜癌的癌症,淋巴管内皮细胞瘤,滑膜瘤,间皮瘤,尤因氏肿瘤,平滑肌肉瘤,横纹肌肉瘤,结肠癌,胰腺癌,乳腺癌,卵巢癌,前列腺癌,鳞状细胞癌,基底细胞癌,腺癌,头颈癌,汗腺癌,皮脂腺癌,乳头状癌,乳头状腺癌,囊状腺癌,髓样癌,支气管癌,肾细胞癌,肝癌,胆管癌,绒毛膜癌,精原细胞瘤,胚胎癌,威尔姆斯瘤,宫颈

癌,子宫癌,睾丸肿瘤,肺癌,小细胞癌肺癌,膀胱癌,上皮癌,神经胶质瘤,神经胶质母细胞瘤,多形胶质母细胞瘤,星形细胞瘤,髓母细胞瘤,颅咽管瘤,室管膜瘤,松果体瘤,血管母细胞瘤,听神经瘤,少突胶质细胞瘤,神经鞘瘤,脑膜瘤,黑素瘤,神经母细胞瘤,视网膜母细胞瘤,白血病,急性白血病,急性白血病,白血病,急性白血病,急性淋巴细胞白血病早幼粒细胞白血病,急性骨髓单核细胞白血病,急性单核细胞白血病,急性红细胞白血病,慢性白血病,慢性粒细胞白血病,慢性淋巴细胞性白血病,淋巴瘤,霍奇金病,非霍奇金病,多发性骨髓瘤和胸腺瘤及其任何组合。

5. 根据权利要求4的组成,其中所述癌症分子表型包括一种或多种生物标志物或靶标的表达,所述生物标志物或靶标选自抗凋亡蛋白(survivin,Mcl-1,XIAP,cIAP2),ABC转运蛋白,缺氧诱导因子1 α (HIF-1 α),Hdm2/Mdm2,HdmX/MdmX (Mdm4),p53(野生型,无效或突变),突变APC,突变Kras,热休克蛋白60 (HSP60),应激70蛋白 (GRP75),ATP依赖性RNA解旋酶(DDX5/p68),核仁RNA解旋酶21 (DDX21),延伸因子2 (EF2),mRNA剪接前因子ATP依赖性RNA解旋酶(DHX15),过渡型内质网ATPase (TERA),转铁蛋白受体蛋白 (TFR1),MAP激酶活化蛋白激酶2 (MAPK2),连环蛋白beta-1 (CTNB1),早期内体抗原1 (EEA1),鸟嘌呤核苷酸结合蛋白亚基beta-2-like 1 (GBLP),电子转移黄素蛋白亚基 (ETFA),蛋白酶体激活物亚基3 (PSME3),UPF0368蛋白Cxorf26 (CX026),过氧化物毒素-2 (PRDX2),过氧化物毒素-1 (PRDX1),硫氧还蛋白依赖性过氧化物还原酶 (PRDX3),富含丝氨酸/精氨酸的剪接因子3 (SRSF3),蛋白酶体亚基beta 2型 (PSB2),谷胱甘肽S转移酶P (GSTP1),MAP/微管亲和力调节激酶3 (MARK3),DNA损伤诱导因子1 (DDI1),肿瘤蛋白D52样2 (TPD52L2),钙离子通道蛋白,电压依赖性B1亚基 (CACNB1),可能的G蛋白偶联受体1 (GPCR1),泛素特异性肽酶2a (USP2a),黑皮质素2受体 (MC2R),成纤维细胞生长因子18 (FGF18),肿瘤蛋白p53诱导蛋白3 (TP53I3),CCHC型锌指蛋白,核酸结合蛋白 (CNBP),WD重复域22 (WDR22),钾电压门控通道亚家族E成员1 (PVGCS-E-M1),泛素结合酶E2T (UBE2T),泛素样蛋白7 (ULP7),RNA结合基序结构,单链相互作用蛋白2 (RBMS2),细胞质酪氨酸蛋白激酶 (BMX) 和细胞周期蛋白B1相互作用蛋白1 (CCNB1IP1)。

6. 如权利要求1所述的组成化合物(公式1化合物),其中公式1化合物将用于克服急性和慢性获得性或固有治疗抗性肿瘤。并与药学上可接受的盐与一种或多种以下化合物按顺序或同时给予受试者:化学治疗剂,化学预防剂,天然植物衍生剂,非植物衍生的剂。这些包括姜黄素,白藜芦醇,维生素D3,维生素A,维生素E,维生素C,异硫氰酸酯 (ITC),异硫氰酸烯丙酯组成的组 (AITC),水飞蓟宾/silibinin(水飞蓟宾/silybin),舒林酸,含硒化合物,甲基硒酸,源自桃金天牛的AMR类似物,AMR-Me,AMR-MeOAc,泰美普洛尔 (terameprocol),塞来昔布,伊马替尼,槲皮素,表没食子儿茶素-3-没食子酸酯 (EGCG),德盖林,3,3'-二吡啶基甲烷 (DIM),大黄素,金雀异黄素,托芬那酸,辛伐他汀,藤黄酸,二十二碳六烯酸,熊果酸,齐墩果酸,蟾蜍灵,磺胺噻唑,去甲酚,消炎痛 (indomethacin),卢比欧尔,地精,阿维辛D,西格列酮,贝伐单抗 (Avastin),crolibulin,黄素 (Baicalein),帕克西林 (Paxilline),普萘洛尔A (Purvalanol A),NU6140,Ardisianone,NVP-BGT226,HDAC抑制剂,MS-275/恩替司他 (Entinostat),SAHA,酸二萜类化合物,蟾蜍他灵,枯萎素A (Withaferin A),羽扇豆 (Plumbagin),黄酮A (Flavokawain A),黄酮B,洋地黄毒苷 (Ponicidin),七叶素 (Escin),库瓜辛J (Kuguacin J),LQB-118,丁三醇 (Crotopoxide),苦瓜糖苷C (Kuguaglycoside C),破坏蛋白B (Destruxin B),乙二胺 (Evodiamine),芝麻素 (Sesamin),前列腺素,内皮素拮抗

剂,胞质激酶抑制剂,内皮素受体拮抗剂,安布森坦,波生坦和西他生坦,PDE5 (PDE-V) 抑制剂,西地那非,他达拉非,伐地那非,钙通道阻滞剂,氨氯地平,非洛地平,伐普米坦,地尔硫卓,薄荷醇,前列环素,曲前列环素,伊洛前列素,伊洛前列素,氧气,肝素,华法令,利尿剂,地高辛,环孢菌素,环孢菌素A,CTLA4-Ig抗体蛋白,CD154蛋白,CD40融合蛋白,gp39融合蛋白,CD40lg蛋白,CD8gp39蛋白,NF- κ B核转运抑制剂功能蛋白,脱氧精瓜林(DSG),胆固醇生物合成抑制剂,HMG CoA还原酶抑制剂,洛伐他汀,辛伐他汀,非甾体抗炎药(NSAIDs),布洛芬,阿司匹林,对乙酰氨基酚,来氟米特,脱氧精瓜林,环加氧酶抑制剂,异芹菜碱,地塞米松,金化合物, β -激动剂,沙丁胺醇,LABA,沙美特罗,白三烯拮抗剂,孟鲁司特,抗增殖剂,甲氨蝶呤,FK506,他克莫司,普罗格拉夫,霉酚酸酯,细胞毒性药物,硫唑嘌呤,VP-16蛋白,依托泊甙,氟哌啶,氨氯地林,喜树碱,阿糖胞苷,吉西他滨,氟脱氧尿苷,美法仑,环磷酰胺,抗代谢物,氨甲蝶呤,拓扑异构酶抑制剂,喜树碱,DNA烷基化剂,顺铂,激酶抑制剂,索拉非尼,微管中毒,紫杉醇,TNF- α 抑制剂,tenidap,抗TNF抗体,可溶性TNF受体,羟基尿素,雷帕霉素,西罗莫司,rapapune及其任何组合。

7. 根据权利要求1所述的组成化合物(公式1化合物),其中将公式1或FL118化合物制成含有一种环糊精的有机溶剂的母液而被配制成一种环糊精-药物复合物的悬浮液。再进一步将有机溶剂除去而形成环糊精-药物制成复合粉剂,而用于口服(per oral, po/p.o.),腹膜内(ip/IP/ip)或静脉内(iv/IV/iv)给药或制成固体药物片剂形式而用于口服,包括以下步骤:

1) 将一种环糊精溶解在乙醇中;二甲基亚砜(DMSO);二甲基乙酰胺(DMA);二甲基甲酰胺(DMF);N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP);或七氟丁酸/全氟丁酸(HFBA/PFBA),但不能溶于二氯甲烷;氯仿丙酮;四氢呋喃1、4-二恶烷;三氯乙烯;1,1,二氯-1-氟乙烷;全氟聚醚;全氟己烷;三氟乙酸;五氟丙酸酐;全氯乙烯;双(三氟甲烷)-磺酰胺;或全氟辛烷,来制备预定浓度(例如20%)的有机溶剂-环糊精母液;

2) 通过剧烈涡旋搅拌 ≥ 1 小时例如1,000rpm的高速搅拌 ≥ 1 小时,以每个药物化合物分子与1.5-2.0个环糊精分子的比例将公式1或FL118的化合物溶解在有机溶剂-环糊精溶液中。用磁棒搅拌24小时以将100%的药物负载分子到每个环糊精分子中,形成聚合物状态的悬浮液;

3) 通过选自以下的方法处理所得的聚合物状态悬浮液以除去有机溶剂:冻干,鼓式干燥器,降膜蒸发器,薄膜蒸发器和利福反应器;其中通过这些过程之一将产生一种类型的环糊精-药物复合物粉末;

4) 将制备好的环糊精-药物复合物粉末在真空下于30°C干燥过夜;

5) 使用喷射研磨系统/机器将干燥的环糊精-药物复合物粉末研磨成小于37微米的细颗粒;

6) 将研磨后的环糊精-药物复合物粉末重悬于含5%丙二醇的水溶液中,以口服,静脉注射或腹膜内给药的方式给予患者。

8. 根据权利要求7的组成,其中将研磨后的环糊精-药物(即FL118或公式1的化合物)复合物粉末制成含有2-5%羟丙基甲基纤维素(HPMC,粘度为40-60cps),1-5%丙二醇和0-4%的聚乙二醇(PEG) 300或400的生理盐水(0.85%NaCl)悬浮液。

悬浮液中FL118或公式1化合物的浓度范围为0.1mg/mL至5mg/mL用于口服给药。

9. 根据权利要求7的组成, 其中将研磨的环糊精-药物复合物粉末通过与填充剂, 粘合剂或稀释剂, 崩解剂, 助流剂, 润滑剂或抗微生物剂或防腐剂均匀混合, 然后通过压片机中进行干压将均匀的粉末压制成片剂形式。

10. 根据权利要求9所述的组成, 其中所述填充剂, 粘合剂或稀释剂选自纤维素或纤维素衍生物, 淀粉或淀粉衍生物和乳糖。崩解剂选自胶体二氧化硅, 交联羧甲基纤维素钠和交联维酮。助流剂选自磷酸氢钙和胶体二氧化硅。润滑剂选自硬脂酸镁, 硬脂酸, 聚乙二醇和滑石粉。抗菌剂或防腐剂选自丙二醇, 对羟基苯甲酸丙二醇酯, 尼泊金丙酯(propylene paraben), 对羟基苯甲酸甲酯(methyl paraben)和甘油。

11. 根据权利要求9的组合, 其中研磨的粉末成分的比例: 环糊精-药物复合物为10-50%, 微晶纤维素(MCC)为30%-80%, 玉米淀粉为0%-40%, 乳糖为10%-25%, 胶态二氧化硅为0%-3%, 磷酸氢钙(dibasic calcium phosphate)为1%-10%和硬脂酸镁为0.2%-3%。这个组合构成片剂形式。

12. 根据权利要求1所述的组成化合物(公式1化合物), 其中将公式1或FL118的化合物配制成用于口服, 静脉内或腹膜内给药的水性悬浮液制剂, 其包括以下步骤:

1) 将一种环糊精溶解在100%非水乙醇中制成乙醇-环糊精母溶液;

2) 将公式1或FL118的化合物溶于乙醇-环糊精以上溶液中, 形成乙醇-环糊精-药物复合物悬浮液;

3) 然后通过使用闭环喷雾干燥系统对乙醇-环糊精-药物(公式1或FL118的化合物)复合悬浮在惰性气体(例如氮气)气氛下进行急骤喷雾干燥进行精制。并采用溶剂回收和。该方法将产生一种环糊精-药物复合物均匀粉末;

4) 将制备好的环糊精-药物复合物粉末在真空下于30℃干燥过夜;

5) 使用喷射研磨系统/机器将干燥的环糊精-药物复合物粉末研磨成约小于37微米的细颗粒粉末;

6) 将研磨后的环糊精-药物复合物粉末重悬于含量最高为5%丙二醇的生理盐水溶液中, 以口服, 静脉注射或腹膜内给药的方式给予患者。

13. 根据权利要求7的组合, 其中环糊精的类型是羟丙基-β-环糊精(HPβCD), β-环糊精(βCD)或磺丁基醚-β-环糊精(SBβCD)。

14. 根据权利要求8的组合, 其中环糊精的类型是羟丙基-β-环糊精(HPβCD), β-环糊精(βCD)或磺丁基醚-β-环糊精(SBβCD)。

15. 根据权利要求9的组合, 其中环糊精的类型是羟丙基-β-环糊精(HPβCD), β-环糊精(βCD)或磺丁基醚-β-环糊精(SBβCD)。

16. 根据权利要求12的组合, 其中环糊精的类型是羟丙基-β-环糊精(HPβCD), β-环糊精(βCD)或磺丁基醚-β-环糊精(SBβCD)。

17. 根据权利要求12的组合, 其中制备一个典型的示例性乙醇-HPβCD主溶液的步骤包括: 将20g HPβCD溶于100%非水乙醇中至总体积为100mL, 以制备20% HPβCD-乙醇母溶液。

18. 根据权利要求17的组合, 其中制备乙醇-HPβCD-药物复合物悬浮液的步骤包括: 将2g FL118或公式1化合物溶解在100mL 20%乙醇-HPβCD主溶液中制备成乙醇-HPβCD-药物复合物悬浮液。

19. 根据权利要求17的组合, 其中制备用于口服, 腹膜内或静脉内给药的水性悬浮液的

包括以下步骤:

1) 通过使用闭环喷雾干燥系统对乙醇-HP β CD-药物(公式1或FL118的化合物)复合悬浮在惰性气体(例如氮气)气氛下进行急骤喷雾干燥进行精制。并采用溶剂回收和。该过程的方法将产生HP β CD-药物复合物均匀粉末;

2) 将制得的HP β CD-药物复合物粉末在真空下于30℃进一步干燥过夜;

3) 使用喷射研磨系统或机器将干燥的HP β CD-药物复合物粉末研磨成小于或等于37微米的细颗粒;

4) 将研磨过的HP β CD-药物复合物粉末重悬于含量最高为5%丙二醇的生理盐水溶液中,以口服,静脉注射或腹膜内给药的方式给予患者。其中如用于ip或iv途径给药,药物(公式1或FL118的化合物)的浓度为0.1-1mg/mL;如用于而口服,药物(公式1或FL118的化合物)的浓度为1-10mg/mL。

20. 根据权利要求1所述的组成化合物(公式1化合物),其中将公式1或FL118化合物制成各种形式的水悬浮液,纳米颗粒或固体片剂或胶囊,所述的这些药物制剂包含一种或多种如下盐的药物制剂:选自氯化物,磷酸盐,甲磺酸盐,二甲磺酸盐的盐,甲苯磺酸盐,甲苯磺酸盐,乳酸盐,酒石酸盐,苹果酸盐,双乙酸盐或柠檬酸盐。这些定量的药物制剂每周口服1至5次。

21. 根据权利要求1所述的组成化合物(公式1化合物),其中各种制剂形式的公式1或FL118化合物是本文所述的任何实施方案的化合物的组合,并且经口服,静脉内,皮下,经皮,腹膜内或通过吸入给药。

平台药物FL118位置7和9衍生的类似物的组成,合成,制备和应用治疗人类疾病

相关申请的交叉引用

[0001] 该PCT国际专利申请要求于2018年9月17日提交的美国临时专利申请序列号62/732,553的优先权,该美国临时专利申请的全部内容通过引用方式并入前述美国临时专利申请和PCT的主题。于2015年3月24日提交的国际专利申请号PCT/US2015/022095,其标题为“使用FL118核心化学结构平台产生FL118衍生物治疗人类疾病”。

政府资助的研究声明

[0002] 本发明是在美国政府的支持下部分完成的,该资助是由国家癌症研究所(NCI)授予Canget BioTekpharma LLC(授权号R44CA176937)。美国政府享有本发明的某些权利。

发明领域

[0003] 本公开发明涉及证明和保护FL118 7和9位衍生的类似物的组成,合成,配制的问题及其用于治疗 and/或预防与人类相关的疾病包括人类癌症和肿瘤的,以及癌症和肿瘤抗药性和生存途径,癌症靶标和癌症生物标志物。

背景

[0004] 我们有很多数据显示FL118化合物的化学结构可有效治疗包括癌症在内的不同人类疾病。

发明内容总结

[0005] 在上面提到的我们先前提交的PCT国际专利申请(PCT/US2015/022095)中,我们提供了很多证据,表明FL118化合物的化学结构是一个重要的药物平台可以化学产生一系列FL118化学结构类似的药物用于治疗不同的人类疾病包括癌症。我们的后续研究进一步表明了FL118平台的新颖性。例如,我们证明了虽然FL118的化学结构与喜树碱(CPT)和FDA批准的CPT类似物伊立替康,SN-38(伊立替康的活性代谢产物)和托泊替康相似,但这些化合物都使用拓扑异构酶I(Top1)作为其治疗靶点,而FL118的抗肿瘤活性/功效与Top1表达无关(Li F, et al. Top1: a major target of FL118 for its antitumor efficacy or mainly involved in its side effects of hematopoietic toxicity? Am J Cancer Res 2017; 7: 370-82)。具体而言,我们证明了在人类大肠癌动物模型中,FL118可以在没有或非常低的Top1表达的肿瘤中表现出很高的抗肿瘤功效,而具有很高Top1表达的肿瘤可以表现出抗药性或对FL118治疗的敏感性并不高。

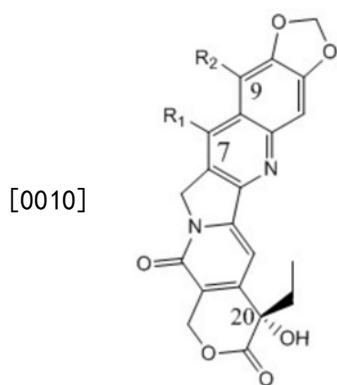
[0006] 我们已彻底总结和审查了过去六十多年中进入临床试验的所有喜树碱(CPT)类似物,我们发现整个学术和工业领域都在很大程度上使用Top1抑制强度来预测CPT类似物的抗肿瘤潜力。然而,越来越多的证据支持我们的观点,即某些CPT类似物可以发挥显着的非Top1介导的抗肿瘤活性。实际上,由于正常人体组织和细胞更新需要Top1进行DNA复制,因此某些CPT类似物象FL118在高浓度的情况下对Top1活性的抑制似乎与药物的副作用有关(例如造血毒性)。事实是,尽管临床开发中,大多数(如果不是全部)CPT类似物都比伊立替康和/或托泊替康表现出更强的Top1活性抑制能力。然而,使用这些类似物进行的广泛临床

试验并未显示出比伊立替康或拓扑替康在抗肿瘤活性和/或低副作用毒性方面具有显著优势 (Li F, Jiang T, Li Q, Ling X: CPT and its derivatives are known to target Top1 as their mechanism of action: did we miss something in CPT analogue molecular targets for treating human disease such as cancer? Am J Cancer Res 2017, 7: 2350-94)。我们预计, 如果进一步专注于发现对Top1功能/活性有强烈抑制作用的CPT类似物作为CPT类似物的临床前和临床开发的主要标准, 我们可能将继续无法找到高效低毒的下一代新型CPT类似物在人类疾病 (例如癌症) 的治疗中取得突破。

[0007] 我们提议开发CPT衍生物对其Top1功能/活性具有低抑制作用, 而同时靶向多种与疾病相关的关键基因和/或基因产物。这样的分子应具有对抗癌症和其他人类疾病的高功效和低毒性。

[0008] 在本发明中, 我们提供了在我们的研究团队中合成的各种FL118平台衍生化合物的实例, 以证明FL118平台衍生化合物是发现具有高抗癌功效和低毒性的伟大化合物的丰富资源, 可用于治疗各种类型癌症。

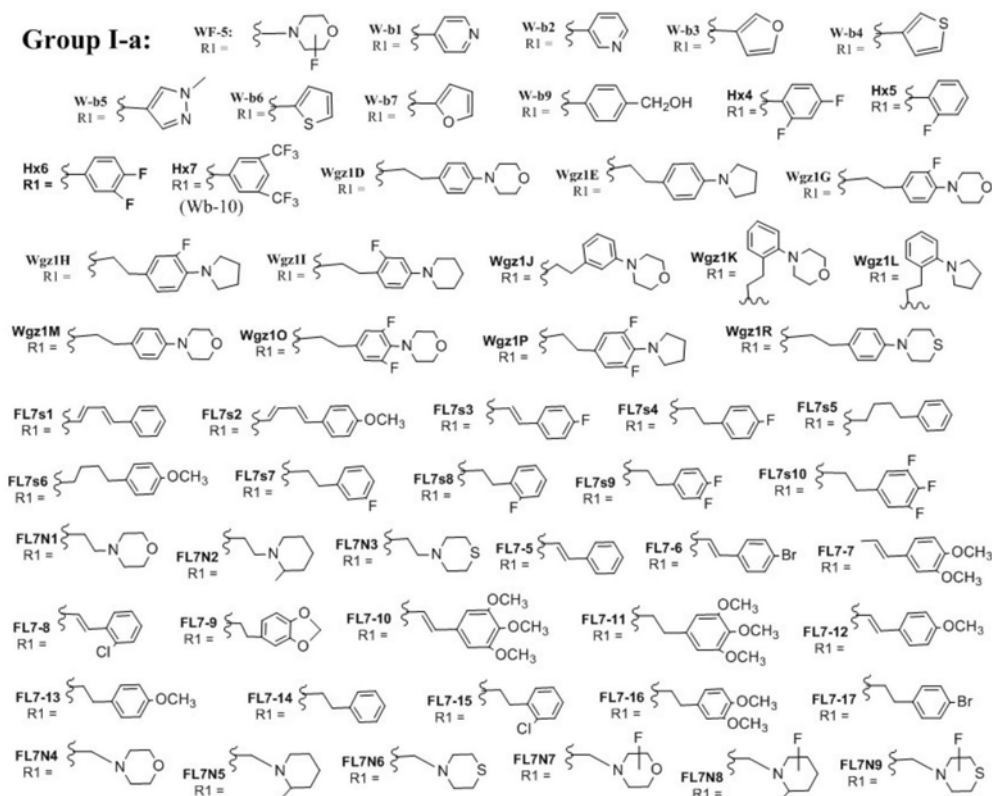
[0009] 在本公开发明中, 我们提供了包含具有以下公式1的组成化合物:



公式 1

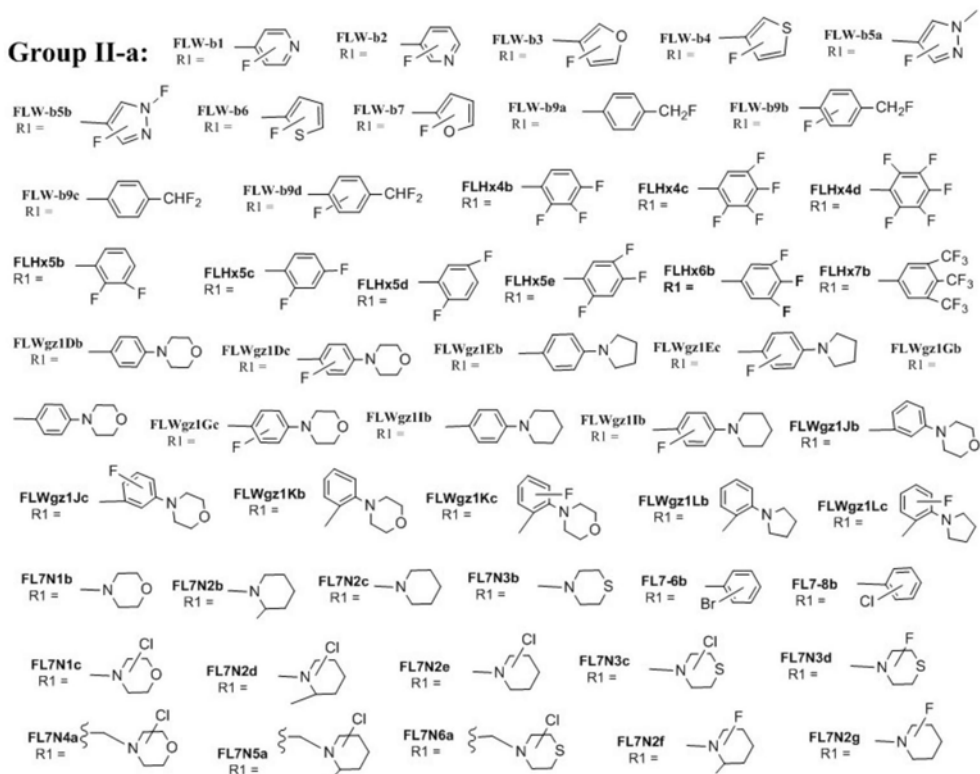
[0011] In one situation, wherein the “R2” on Position 9 of Formula 1 is “H”, and the “R1” on the Position 7 of Formula 1 is independently selected from, but is not limited to, the Group I-a, Group II-a, Group III-a and Group IV-a below: [00011] 在一种情况下, 公式1的位置9上的“R₂”是“H”, 而公式1的位置7上的“R₁”独立地选自但不限于以下的I-a组 (Group I-a), II-a组 (Group II-a), III-a组 (Group III-a) 和IV-a组 (Group IV-a):

Group I-a:



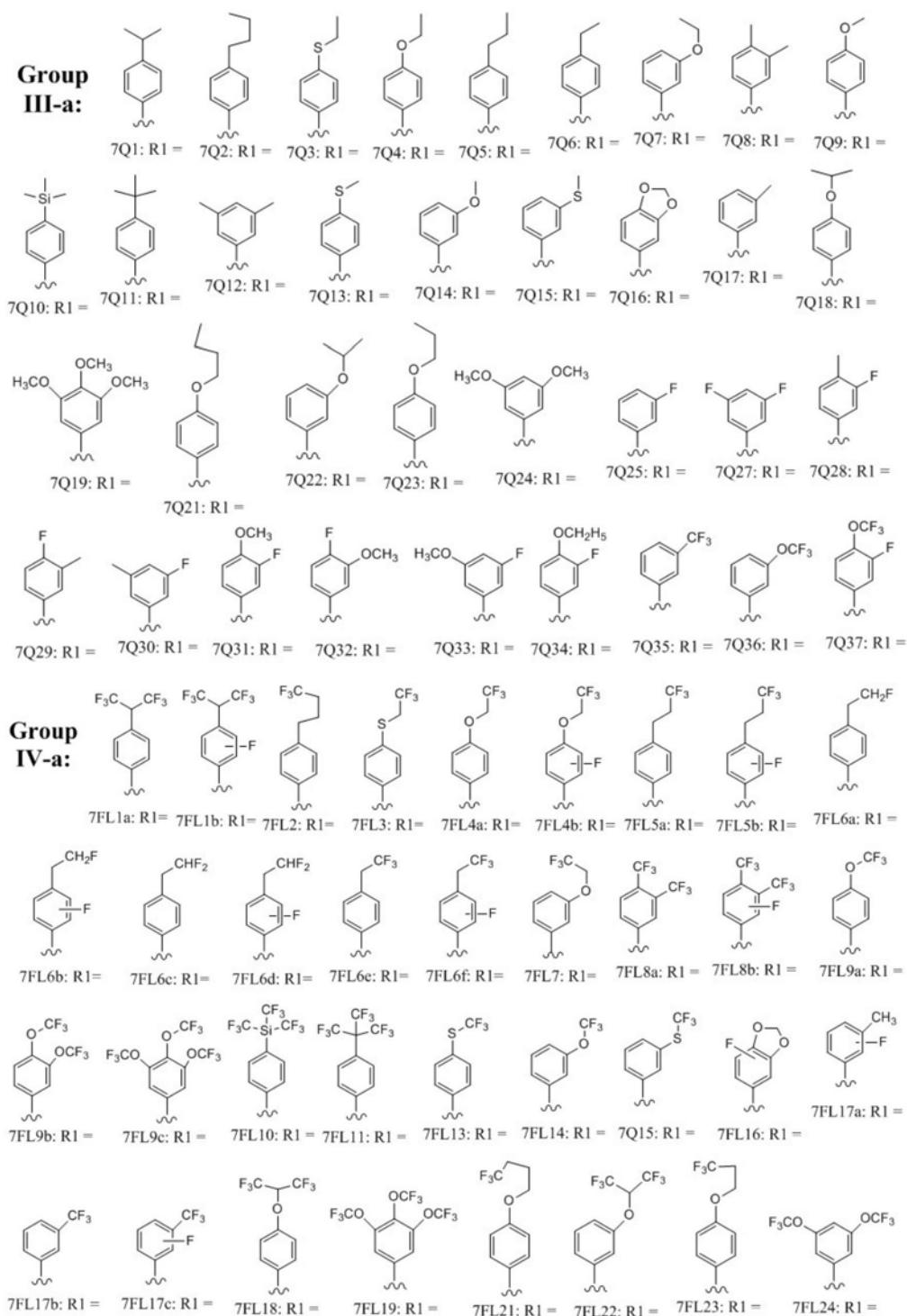
[0012]

Group II-a:



[0013]

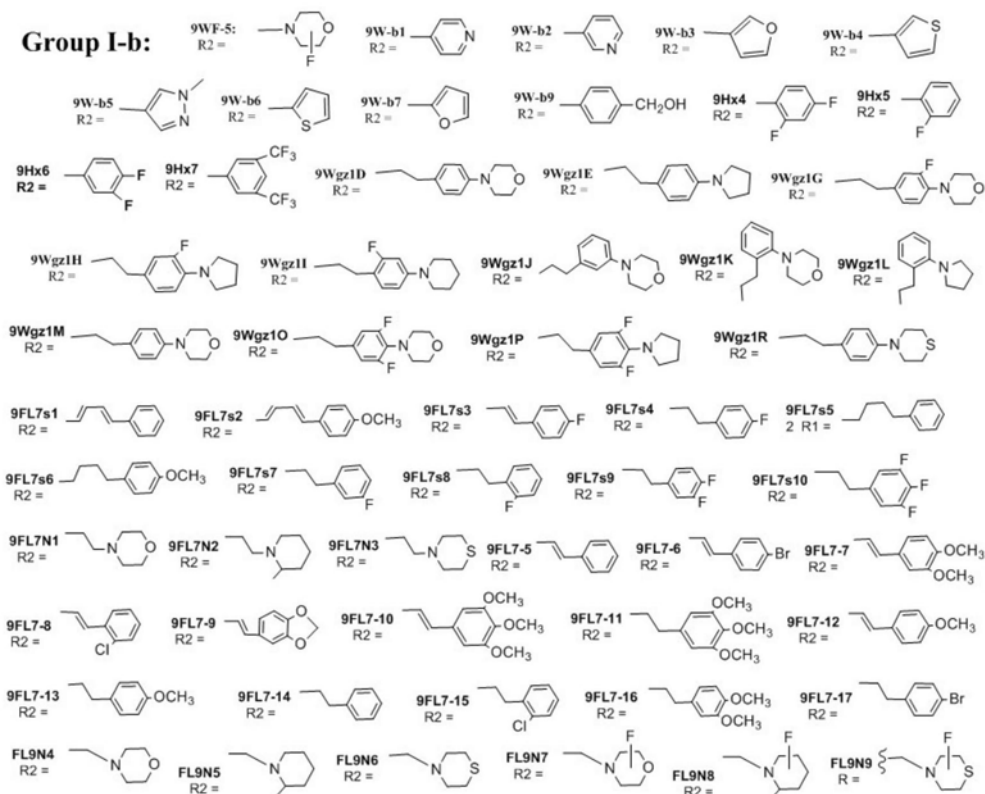
[0014]



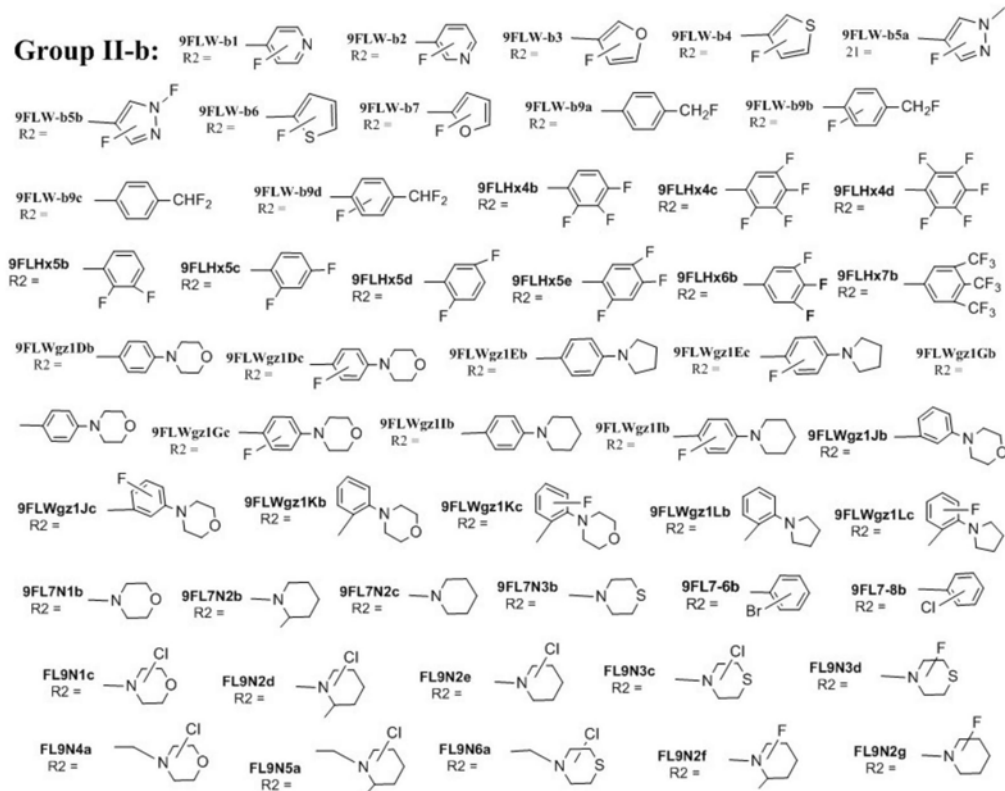
[0015]

[0016] 在另一种情况下,其中公式1的位置7上的“R₁”是“H”,而公式1的位置9上的“R₂”独立地选自但不限于以下的I-b组(Group I-b),II-b组(Group II-b),III-b组(Group III-b)和IV-b组(Group IV-b):

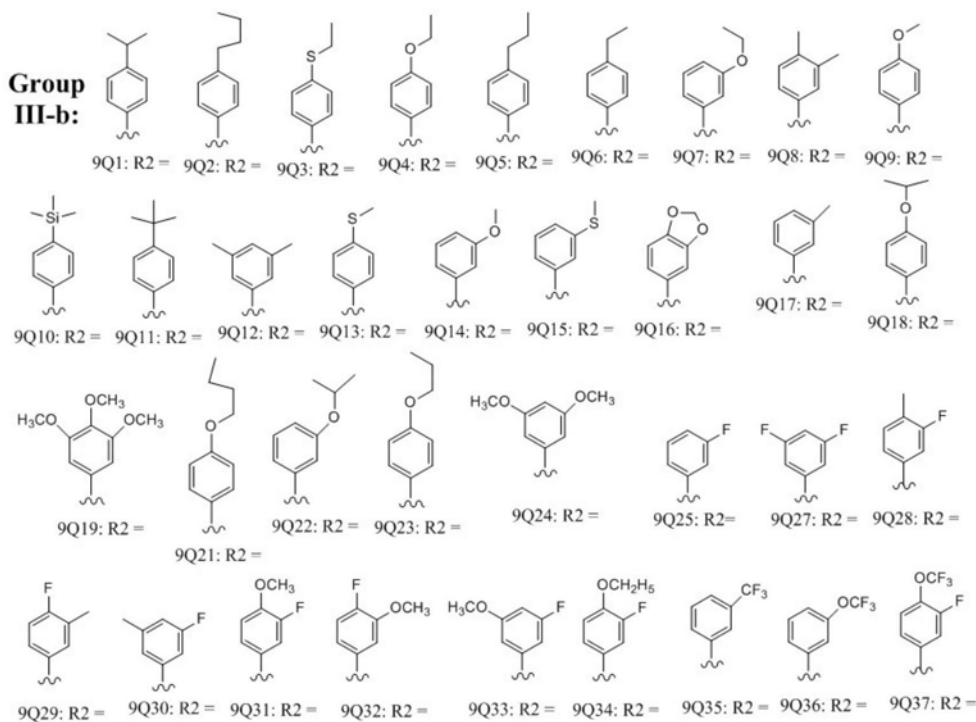
9WF-5; R2 = Br

Group I-b:

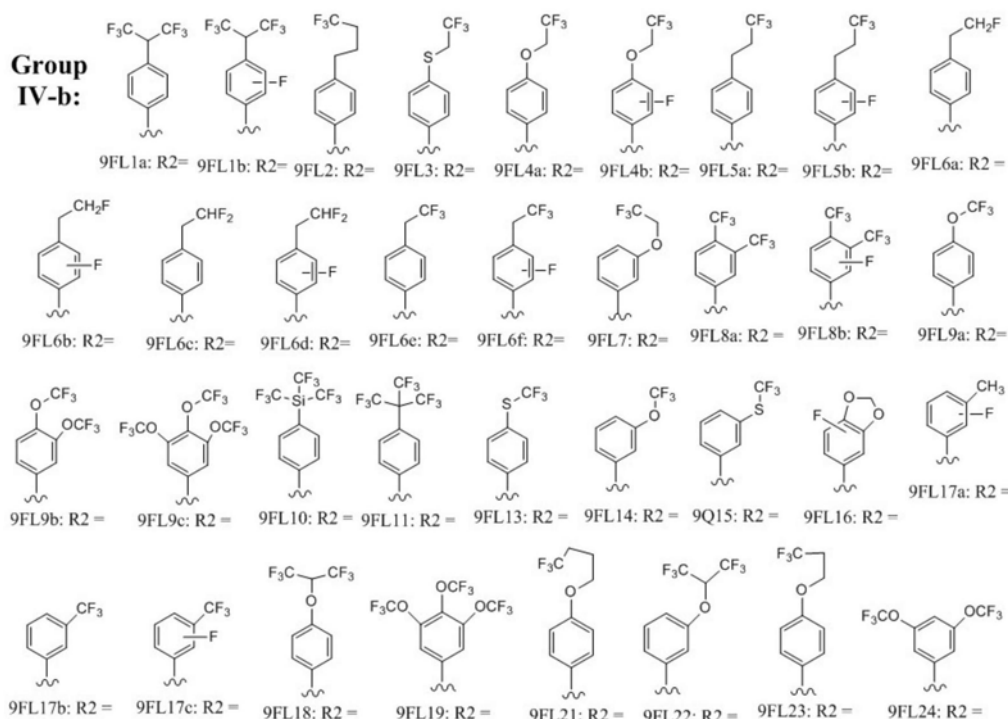
[0017]

Group II-b:

[0018]



[0019]



[0020]

[0021] 在第三种情况下,其中公式1的位置9上的“R₂”是以下化学基团之一时:F⁻,Cl⁻,Br⁻,I⁻,FCH₂⁻,F₂CH⁻,F₃C⁻,ClCH₂⁻,Cl₂CH⁻,Cl₃C⁻,BrCH₂⁻,Br₂CH⁻,Br₃C⁻,ICH₂⁻,I₂CH⁻,I₃C⁻,HO⁻,HONH⁻,CH₃O⁻,FCH₂O⁻,F₂CHO⁻,ClCH₂O⁻,Cl₂CHO⁻,NH₂⁻,NH₂CH₂⁻,NH₂CFH⁻,CH₃NH⁻,FCH₂NH⁻,F₂CHNH⁻,ClCH₂NH⁻,Cl₂CHNH⁻, (CH₃)₂N⁻, (FCH₂)₂N⁻, (F₂CH)₂N⁻, (ClCH₂)₂N⁻, (Cl₂CH)₂N⁻, -NHC(O)NH₂, -C(O)CH₃, -C(O)CH₂F, -C(O)CHF₂, -C(O)CH₂Cl, -C(O)CHCl₂, -CO₂CH₃, -CO₂CH₂F, -CO₂CHF₂, CO₂CH₂Cl, -CO₂CHCl₂, and -C(O)N(CH₂)₂, 则公式1的位置7上的“R₁”独立地选自但不限于I-a组(Group I-a), II-a组(Group II-a), III-a组(Group III-a)和IV-a组(Group IV-a)。

[0022] 在第四种情况下,其中公式1的7位上的“R₁”是以下化学基团之一时:F⁻,Cl⁻,Br⁻,I⁻,FCH₂⁻,F₂CH⁻,F₃C⁻,ClCH₂⁻,Cl₂CH⁻,Cl₃C⁻,BrCH₂⁻,Br₂CH⁻,Br₃C⁻,ICH₂⁻,I₂CH⁻,I₃C⁻,HO⁻,HONH⁻,CH₃O⁻,FCH₂O⁻,F₂CHO⁻,ClCH₂O⁻,Cl₂CHO⁻,NH₂⁻,NH₂CH₂⁻,NH₂CFH⁻,CH₃NH⁻,FCH₂NH⁻,F₂CHNH⁻,ClCH₂NH⁻,Cl₂CHNH⁻, (CH₃)₂N⁻, (FCH₂)₂N⁻, (F₂CH)₂N⁻, (ClCH₂)₂N⁻, (Cl₂CH)₂N⁻, -NHC(O)NH₂, -C(O)CH₃, -C(O)CH₂F, -C(O)CHF₂, -C(O)CH₂Cl, -C(O)CHCl₂, -CO₂CH₃, -CO₂CH₂F, -CO₂CHF₂, CO₂CH₂Cl, -CO₂CHCl₂, and -C(O)N(CH₂)₂, 则公式1的位置9上的“R₂”独立地选自但不限于I-b组(Group I-b), II-b组(Group II-b), III-b组(Group III-b)和IV-b组(Group IV-b)。

[0023] 在说明性实施方案中,公式1的化合物还包括其衍生自各种酯化化学基团的与20位酯对应的化合物。所有公式1的化合物经口服,静脉内,皮下,经皮,腹膜内或通过吸入给药。在说明性实施方案中,疾病选自肿瘤性疾病,自身免疫性疾病,血管狭窄性疾病和与异常细胞增殖有关的任何其他人类疾病,例如结节性硬化症(TSC)和癌症。

[0024] 在一些实施方案中,该疾病是一种或多种癌症选自实体瘤,血液癌,纤维肉瘤,粘肉肉瘤,脂肪肉瘤,软骨肉瘤,成骨肉瘤,脊索瘤,血管肉瘤,血管内皮肉瘤,淋巴管肉瘤,假性黏膜肉瘤,腹膜炎,淋巴管肉瘤,滑膜瘤,间皮瘤,尤因氏肿瘤,平滑肌肉瘤,横纹肌肉瘤,结肠癌,胰腺癌,乳腺癌,卵巢癌,前列腺癌,鳞状细胞癌,基底细胞癌,腺癌,头颈癌,汗腺癌,皮脂腺癌,乳头状瘤癌,乳头状腺癌,囊腺癌,髓样癌,支气管癌,肾细胞癌,肝癌,胆管癌,绒毛膜癌,精原细胞瘤,胚胎癌,威尔姆斯瘤,宫颈癌,子宫癌,睾丸癌,肺癌,小细胞肺癌,膀胱癌,上皮癌,神经胶质瘤,胶质母细胞瘤,多形胶质母细胞瘤,星形细胞瘤,髓母细胞瘤,颅咽管瘤,室管膜瘤,松果体瘤,血管母细胞瘤,听神经瘤,少突胶质细胞瘤,神经鞘瘤,脑膜瘤,黑素瘤,神经母细胞瘤,视网膜母细胞瘤,白血病,急性白血病,急性淋巴细胞性白血病,急性淋巴细胞性白血病,急性髓性白血病,急性粒细胞单核细胞白血病,急性单核细胞性白血病,急性红细胞白血病,慢性白血病,慢性粒细胞性白血病,慢性淋巴细胞性白血病,淋巴瘤,霍奇金氏病,非霍奇金氏病,多发性骨髓瘤和胸腺瘤或其任何组合。

[0025] 在合适的实施方案中,一种或多种癌症是一种或多种转移性癌症,原发性肿瘤,难治性癌症,进行性癌症,浸润性癌症,实体瘤,弥散性肿瘤或血液学癌症。在说明性实施方案中,一种或多种癌症对一种或多种治疗具有抗性难治的。在说明性实施方案中,难治性癌症表型包括一种或多种选自我们先前发明(PCT/US2015/022095)中报道的抗药性标志物或靶标蛋白的表达,其包括但不限于抗凋亡蛋白(survivin, Mcl-1, XIAP, cIAP2), ABC转运蛋白, 缺氧诱导因子1α(HIF-1α), Hdm2/Mdm2, HdmX/MdmX(Mdm4), p53, 突变APC和/或突变Kras。在说明性实施方案中, ABC转运蛋白选自ABCG2, ABCC4, MDR1, MRP1; 热休克蛋白60(HSP60), 应激70蛋白(GRP75), ATP依赖性RNA解旋酶DDX5(p68), 核仁RNA解旋酶21(DDX21), 延伸因子2(EF2), mRNA剪接前因子ATP依赖的RNA解旋酶(DHX15), 过渡型内质网ATPase(TERA), 转铁蛋白受体蛋白(TFR1), MAP激酶激活的蛋白激酶2(MAPK2), 连环蛋白beta-1(CTNB1), 早期体内抗原1(EEA1), 鸟嘌呤核苷酸结合蛋白亚基beta-2-like 1(GBLP), 电子转移黄素蛋白亚基α(ETFA), 蛋白酶体激活物亚基3(PSME3), UPF0368蛋白Cxorf26(CX026), 过氧化物毒素-2(PRDX2), 过氧化物毒素-1(PRDX1), 硫氧还蛋白依赖性过氧化物还原酶(PRDX3), 富含丝氨酸/精氨酸的剪接因子3(SRSF3), 蛋白酶体亚基beta 2型(PSB2), 谷胱甘肽S-转移酶P(GSTP1), MAP/微管亲和力调节激酶3(MARK3), DNA损伤诱导物1(DDI1), 肿瘤蛋白D52样2

(TPD52L2), 钙离子通道蛋白, 电压依赖性 β 1亚基 (CACNB1), 可能的G蛋白偶联受体1 (PGPCR1), 泛素特异性肽酶2a (USP2a), 黑皮质素2受体 (MC2R), 成纤维细胞生长因子18 (FGF18), 肿瘤蛋白p53诱导蛋白3 (TP53I3), CCHC型锌指蛋白, 核酸结合蛋白 (CNBP), WD重复域22 (WDR22), 钾电压门控通道亚家族E成员1 (PVGCS-E-M1), 泛素结合酶E2T (UBE2T), 泛素样蛋白7 (ULP7), RNA结合基序结构, 单链相互作用蛋白2 (RBMS2), 细胞质酪氨酸蛋白激酶 (BMX) 和细胞周期蛋白B1相互作用蛋白1 (CCNB1IP1)。在说明性实施方案中, p53是野生型, 无效或p53突变体, 或其中规范的p53途径中存在异常, 或其任何组合。

[0026] 在说明性的实施方案中, 公式1的化合物包括治疗急性抗性。在一些实施方案中, 公式1化合物将用于克服急性和慢性获得性或固有治疗抗性肿瘤。并与药学上可接受的盐与一种或多种以下化合物按顺序或同时给予受试者: 化学治疗剂, 化学预防剂, 天然植物衍生剂, 非植物衍生的剂。这些包括姜黄素, 白藜芦醇, 维生素D3, 维生素A, 维生素E, 维生素C, 异硫氰酸酯 (ITC), 异硫氰酸烯丙酯组成的组 (AITC), 水飞蓟宾/silibinin (水飞蓟宾/silybin), 舒林酸, 含硒化合物, 甲基硒酸, 源自桃金天牛的AMR类似物, AMR-Me, AMR-MeOAc, 泰美普洛尔 (terameprocol), 塞来昔布, 伊马替尼, 槲皮素, 表没食子儿茶素-3-没食子酸酯 (EGCG), 德盖林, 3,3'-二吡啶基甲烷 (DIM), 大黄素, 金雀异黄素, 托芬那酸, 辛伐他汀, 藤黄酸, 二十二碳六烯酸, 熊果酸, 齐墩果酸, 蟾蜍灵, 磺胺噻唑, 去甲酚, 消炎痛 (indomethacin), 卢比欧尔, 地精, 阿维辛D, 西格列酮, 贝伐单抗 (Avastin), crolibulin, 黄素 (Baicalein), 帕克西林 (Paxilline), 普萘洛尔A (Purvalanol A), NU6140, Ardisianone, NVP-BGT226, HDAC抑制剂, MS-275/恩替司他 (Entinostat), SAHA, 酸二萜类化合物, 蟾蜍他灵, 枯萎素A (Withaferin A), 羽扇豆 (Plumbagin), 黄酮A (Flavokawain A), 黄酮B, 洋地黄毒苷 (Ponicidin), 七叶素 (Escin), 库瓜辛J (Kuguacin J), LQB-118, 丁三醇 (Crotopoxide), 苦瓜糖苷C (Kuguaglycoside C), 破坏蛋白B (Destruxin B), 乙二胺 (Evodiamine), 芝麻素 (Sesamin), 前列腺素, 内皮素拮抗剂, 胞质激酶抑制剂, 内皮素受体拮抗剂, 安布森坦, 波生坦和西他生坦, PDE5 (PDE-V) 抑制剂, 西地那非, 他达拉非, 伐地那非, 钙通道阻滞剂, 氨氯地平, 非洛地平, 伐普米坦, 地尔硫卓, 薄荷醇, 前列环素, 曲前列环素, 伊洛前列素, 伊洛前列素, 氧气, 肝素, 华法令, 利尿剂, 地高辛, 环孢菌素, 环孢菌素A, CTLA4-Ig抗体蛋白, CD154蛋白, CD40融合蛋白, gp39融合蛋白, CD40lg蛋白, CD8gp39蛋白, NF- κ B核转运抑制剂功能蛋白, 脱氧精瓜林 (DSG), 胆固醇生物合成抑制剂, HMG CoA还原酶抑制剂, 洛伐他汀, 辛伐他汀, 非甾体抗炎药 (NSAIDs), 布洛芬, 阿司匹林, 对乙酰氨基酚, 来氟米特, 脱氧精瓜林, 环加氧酶抑制剂, 异芹菜碱, 地塞米松, 金化合物, β -激动剂, 沙丁胺醇, LABA, 沙美特罗, 白三烯拮抗剂, 孟鲁司特, 抗增殖剂, 甲氨蝶呤, FK506, 他克莫司, 普罗格拉夫, 霉酚酸酯, 细胞毒性药物, 硫唑嘌呤, VP-16蛋白, 依托泊甙, 氟哌啶, 氨氯地林, 喜树碱, 阿糖胞苷, 吉西他滨, 氟脱氧尿苷, 美法仑, 环磷酰胺, 抗代谢物, 氨甲蝶呤, 拓扑异构酶抑制剂, 喜树碱, DNA烷基化剂, 顺铂, 激酶抑制剂, 索拉非尼, 微管中毒, 紫杉醇, TNF- α 抑制剂, tenidap, 抗TNF抗体, 可溶性TNF受体, 羟基尿素, 雷帕霉素, 西罗莫司, rapapune及其任何组合。

[0027] 在说明性实施方案中, 将公式1的化合物配制成各种形式的水悬浮液, 纳米颗粒或固体状态, 例如片剂, 胶囊等。在说明性实施方案中, 可能用的盐是氯化物, 磷酸盐, 甲磺酸盐, 二甲磺酸盐, 甲苯磺酸盐, 乳酸盐, 酒石酸盐, 苹果酸盐, 双乙酸盐或柠檬酸盐。在说明性

实施方案中,公式1的化合物以约0.01mg/kg至约10mg/kg的每日总剂量给药。在示例性的实施方案中,公式1的化合物与药学上可接受的盐每周给药1-5次。

[0028] 在说明性的实施方案中,公式1的化合物与该化合物的药学上可接受的盐,以0.01mg/kg至10mg/kg的单位剂型给药,或公式1化合物以0.01mg/kg至20mg/kg的剂量给药。

[0029] 在说明性的实施方案中,单位剂量足以提供:(a) 在受试者血浆中的C_{max}为约10至400ng/mL的公式1化合物或在受试者血浆中的C_{max}为约10至400ng/mL的公式1化合物;和/或(b) 给药后12小时在受试者血浆中约1至50ng/mL的公式1化合物;和/或(c) 给药后24小时在受试者血浆中约0至5ng/mL的化合物;和/或(d) 公式1的活性梯度在施用于受试者后48小时内肿瘤中维持1-25ng/mL。在说明性实施方案中,所述受试者是人类受试者。

[0030] 在说明性的实施方案中,公式1化合物是本文所述的任何实施方案中的化合物。

[0031] 在说明性的实施方案中,本文提供了一种药物组合,包含公式1的化合物,该公式1化合物的药学上可接受的盐,还包含药学上可接受的载体。在说明性实施方案中,本发明提供了应用活性成分用于治疗受试者的肿瘤疾病或与受试者的肿瘤疾病相关的生物学病症,其中所述活性成分是公式1化合物。

[0032] 在说明性的实施方案中,公式1化合物是本文所述的任何实施方案的化合物。

[0033] 在一方面,本发明提供了化学合成公式1的各种化合物的合成方法。

[0034] 在一个方面,本发明提供制成前述公式1化合物的水性悬浮液制剂。该制剂在生理盐水中含0.1%至约10% (w/v) 的的环糊精,例如羟丙基-β-环糊精。在一些实施方案中,在盐水稀释之前,所述制剂最终达到含乙醇的悬浮液的状态,至多40mg/mL的公式1化合物在生理盐水中含有40% (w/v) 环糊精例如羟丙基-β-环糊精。在一些说明性的实施方案中,制剂最终达到无有机溶剂的状态。在说明性实施方案中,该制剂在生理盐水中含0.1-10%的羟丙基-β-环糊精(w/v),1-5%丙二醇(PG) (w/v或w/w),0-4% (w/v) 聚乙二醇400。其中丙二醇和聚乙二醇400的总和为1%至5% (w/v)。

[0035] 在一个方面,本发明提供制造包含公式1的化合物或公式1的化合物与药学上可接受的盐一起制造成含乙醇或无有机溶剂的制剂方法。

[0036] 在说明性的实施方案中,环糊精为羟丙基-β-环糊精(HPBCD)。在说明性的实施方案中,羟丙基-β-环糊精(HPBCD)在盐水中的最终浓度为约0.1%至约10% (w/v) 的最终浓度存在。在说明性实施方案中,其他溶剂选自丙二醇(PG),聚乙二醇(PEG) 300和PEG400中的一种或多种。在说明性实施方案中,在盐溶液中,PG,PEG300和PEG400中的一种或多种以悬浮液中总浓度为1%至5%或以0-5%的浓度存在于制剂粉末/片剂状态(w/w)。在说明性的实施方案中,乳化剂是羟丙基甲基纤维素(HPMC)。在一些实施方案中,粘度为40-60cps的HPMC以2%至5% (w/v) 的终浓度存在于制剂中。在说明性实施方案中,所述制剂以0.1-10mg/mL的公式1化合物的终浓度作为稀释后的终浓度。

[0037] 一方面,本发明涉及一种生产包含式1的化合物或式1的化合物的药学上可接受的盐的无有机溶剂的粉末/片剂制剂的方法。本发明提供制造包含公式1的化合物或公式1的化合物与药学上可接受的盐一起制造成含无有机溶剂的粉末或片剂的制方法制作方法。

[0038] 在另一方面,本发明提供了来自公式1的化合物的无有机溶剂的粉末胶囊/片剂制剂,其中所述制剂包含填充剂/粘合剂/稀释剂(纤维素/纤维素衍生物,淀粉/淀粉衍生物,乳糖),崩解剂(胶体二氧化硅,交联羧甲基纤维素钠,交联聚维酮),助流剂(磷酸氢钙,胶体

二氧化硅), 润滑剂(硬脂酸镁, 硬脂酸, 聚乙二醇, 滑石粉), 抗菌剂/防腐剂(丙二醇/PG, 尼泊金丙酯/propylene paraben, 对羟基苯甲酸甲酯/methyl paraben, 甘油)。

[0039] 在下一个方面, 本发明提供了选自公式1的化合物的无有机溶剂的粉末胶囊/片剂制剂, 其中所述制剂包含微晶纤维素(MCC, 30%-80%), 玉米淀粉(0%-40%), 乳糖(10%-25%), 胶体二氧化硅(1%-3%), 磷酸氢钙(1%-10%), 硬脂酸镁(0.2%-3%), 丙二醇(1%-5%)。

[0040] 另一方面, 本发明提供了HPBCD配制FL118化合物的无有机溶剂的粉末, 并可直接溶解在诸如含有0-5%丙二醇(PG)的生理盐溶液中, 以用于腹膜内(ip/IP/ip), 静脉内(iv/iv/IV)或口服(po/po)给药以治疗癌症。

[0041] 前述发明内容仅是说明性的, 而无意于以任何方式进行限制。除了上述说明性实施例和特征方面之外, 通过参考以下附图和详细描述, 进一步说明实施例证和其他方面将变得显而易见。

附图的简要说明

[0042] 图1显示FL118平台药物下调胰腺癌细胞中多种抗凋亡蛋白的表达并上调某些促凋亡蛋白: 如图所示, 用FL118处理过的胰腺癌细胞, 通过蛋白质印迹使用每种蛋白质的相应抗体检测了抗凋亡蛋白survivin, Mcl-1, XIAP, cIAP2以及凋亡蛋白Bad, Bim和Bax的表达。PANC1胰腺癌细胞系的结果显示在A中, MIA PaCa2(Mia2)胰腺癌细胞系的结果显示在B中。GAPDH是蛋白质上样的内部对照。nM: 纳摩尔

[0043] 图2显示了通过FL118平台药物诱导胰腺癌细胞的的凋亡和杀伤以及对细胞活力的抑制: A和B, FL118治疗导致caspase-3的活化和PARP的裂解。如图所示, 用FL118处理的胰腺癌细胞(A, PANC1, B, MIA PaCa2)通过western印迹检测caspase-3的活化和PARP的裂解。GAPDH是总蛋白质负载量的内部对照。C, FL118诱导胰腺癌细胞死亡。用载体媒介物(vehicle)或FL118分别以10、10和500nM处理PANC1和Mia2胰腺癌细胞48小时。然后通过流式细胞仪测定亚G1 DNA含量(后凋亡的死细胞)。数据来自3次独立测试, 并以直方图的形式表示为平均值 $\pm$ SD。D, FL118抑制胰腺癌细胞的活力。如图所示, 用载体媒介物(vehicle/无FL118)或一系列FL118浓度处理Mia2, PANC1和BxPC3胰腺癌细胞以及正常人皮肤成纤维细胞(HDF), 持续72h。然后使用MTT测定法测定细胞活力。数据显示为直方图, 均方根SD来源于3个独立的测试分析。nM: 纳摩尔

[0044] 图3显示了FL118平台药物对参与胰腺癌细胞DNA损伤和修复的蛋白表达的影响: 使用每种蛋白的相应抗体, 通过蛋白质印迹法检测了H2AX, ChK1, ChK2, ATM, ATR, RAD51和DNA Pol II。GAPDH是蛋白质上样的内部对照。B, 蛋白酶体抑制剂MG132可以挽救ERCC6表达的减少。如图所示, 仅用FL118和MG132或联合用FL118和MG132处理亚汇合的SKOV3细胞8h, 然后用ERCC6抗体进行蛋白质印迹分析。微管蛋白是蛋白质负载的内部对照。C, 比较FL118和拓扑替康(TOP)对ERCC6表达的作用。如图所示, 用FL118或TOP处理的SKOV3细胞8h, 然后用ERCC6抗体进行蛋白质印迹分析。微管蛋白是蛋白质负载的内部对照。nM: 纳摩尔; μ M: 微摩尔

[0045] 图4显示了FL118平台药物而不是顺铂能消除耐药的GFPcODC阳性A2780CP细胞: A和B, 用和不使用顺铂(Cis)处理细胞72h。之后是数字拍摄细胞的相差GFP成像。C和D, 分别对顺铂(C)和FL118(D)处理对耐药的GFPcODC阳性A2780CP细胞百分比变化的影响。nM: 纳摩

尔; $\mu\text{M}/\text{uM}$: 微摩尔

[0046] 图5显示FL118平台药物同时靶向增殖癌细胞和潜干细胞样癌细胞:A, FL118-顺铂组合增强对PANC1细胞的杀伤(通过台盼蓝排除法确定死细胞)。B, 用台盼蓝排除法评估, GFPcODC阳性细胞在50 μM 顺铂中存活情况(4天处理)。C, FL118-顺铂杀死GFPcODC阳性(耐药)细胞(箭头)。结果是数字拍摄细胞的相差GFP成像。D, FL118-顺铂组合可减少PANC1球状细胞数量。*, $P < 0.001$ 。FL, FL118; T, 时间。E, FL118对胰腺癌干细胞球形成的影响。请参阅方法部分中的详细信息。F, CD44干细胞标志物阳性胰腺癌细胞的集落形成。G, 来自图5F所示数据的定量数据。nM: 纳摩尔; $\mu\text{M}/\text{uM}$: 微摩尔

[0047] 图6显示了使用FL118平台药物和顺铂组合的原位LucPANC1模型的体内成像以监测胰腺肿瘤的生长和转移:模型的建立在方法中描述了。原位植入LucPANA1细胞数天后, 按qw x 4的时间表显示了用或不用FL118和顺铂治疗小鼠结果。A, 经过和未经过FL118和顺铂处理的整个小鼠身体的生物发光图像(显示在第7、60、70和90天)。B, 生物发光图像(BLI)的肿瘤生长曲线显示为总通量随时间的变化。

[0048] 图7显示了FL118平台药物单独或与吉西他滨组合抑制胰腺癌患者异种移植(PDX)肿瘤的高效性:PDX肿瘤最初是从临床上从疾病的转移部位获得的胰腺癌患者肿瘤组织中建立的。通过在免疫缺陷SCID小鼠的腹侧皮下接种30-40mg肿瘤组织来建立人胰腺癌PDX肿瘤的小鼠模型。FL118平台药物在无有机溶剂中与HPBCD(2-羟丙基-2--环糊精)配制成药物载体, 并溶于2%HPMC(羟丙基甲基纤维素)和1%PG(丙二醇)的盐水中(浓水溶液悬浮液)(可以口服)。胰腺癌PDX肿瘤维持在SCID小鼠上。将实验性SCID小鼠皮下植入小鼠侧面的单个胰腺癌PDX肿瘤长到100-300mm³(指定为第0天)后7到14天, 通过腹膜内注射(ip/IP)施用最大耐受剂量约为一半(1/2MTD, 5mg/kg)的FL118, (A, B, C)或以0.75mg/kg的剂量与吉西他滨联合以60mg/kg($\sim 1/2\text{MTD}$) (D)每周给药以次共4次(qw x 4)(箭头)。A, 胰腺癌PDX14244肿瘤的结果。B, 胰腺癌PDX17624肿瘤的结果。C和D, 来自胰腺癌PDX10978肿瘤的结果。每条曲线代表源自五只小鼠(每组5只小鼠)的平均值 $\pm$ SD。E, 图7D中所示的相同数据以肿瘤体积格式给出, 以显示实验期间肿瘤的实际大小。

[0049] 图8显示了在小鼠和犬类动物中FL118平台药物对动物体重变化的影响:模型的建立在方法中描述了。A, FL118对BALB/cj小鼠体重变化的影响。通过qw x 4(箭头)口服途径给药显示了媒介物(vehicle)和FL118 MTD(10mg/kg)剂量水平的结果。体重曲线来自6只独立的BALB/cj小鼠的平均值 $\pm$ SD。B和C, FL118对比格犬体重变化的影响。在第1天和第8天口服FL118得出的媒介物(vehicle)和FL118剂量分别为0.55mg/kg(1/4MTD), 1.1mg/kg(1/2MTD)和2.2mg/kg(MTD)的结果。权重直方图是从2只雄性或2只雌性比格犬的平均SD得出的。

[0050] 图9显示了口服FL118平台药物的药代动力学(PK)结果。SCID小鼠皮下植入人结肠SW620和HT-29肿瘤。植入的肿瘤长至600-1000mm³后, 以1.5mg/kg的剂量口服FL118。然后, 在30分钟, 1小时, 4小时, 8小时, 12小时和24小时收集血液和肿瘤组织。在每个时间点使用三只SCID小鼠。样品分析在方法中介绍了。每条曲线是使用Excel软件分析的3只小鼠的平均药物浓度 $\pm$ SD。

[0051] 图10显示了在HT-3成视网膜细胞瘤异种移植肿瘤中, FL118类似药物, FL7s-3, FL7s-4和FL7s-7的抗肿瘤功效和毒性测试。人HT-3视网膜母细胞瘤异种移植肿瘤最初是通

过在皮下注射100-200 μ L培养基中有 $2-5 \times 10^6$ HT-3细胞而建立的。通过在SCID小鼠侧面皮下接种30-40mg肿瘤组织而建立HT-3异种移植瘤的小鼠模型。在移植的肿瘤达到100-200mm³ (指定的第0天) 后7-14天开始使用单个的化合物进行治疗。如箭头所示, 治疗方案是每周一次通过口服药物给药共四次 (q7d x 4)。药物在不含有有机溶剂的HPBCD, 2%HPMC (羟丙基甲基纤维素) 和1%PG (丙二醇) 的生理盐水 (浓水悬浮液) 中用于口服。赋形剂是相同的没有药物的浓水悬浮液。A. FL7s-3处理的异种移植肿瘤曲线图 (左图) 和体重图 (右图)。B. FL7s-4-处理的异种移植肿瘤曲线图 (左图) 和体重图 (右图)。C. FL7s-7处理的异种移植肿瘤曲线图 (左图) 和体重图 (右图)。值得注意的是, 用媒介物 (vehicle) 处理的携带HT-3视网膜母细胞瘤肿瘤的SCID小鼠由于肿瘤过大在3周内被安乐死。

[0052] 图11显示了在HT-3视网膜母细胞瘤异种移植肿瘤中, FL118类似药物, FL7-5和FL7-15的抗肿瘤功效和毒性的测试。建立了人HT-3视网膜母细胞瘤肿瘤的小鼠模型如图10所示。在移植的肿瘤达到100-150mm³ (指定的第0天) 后7-14天开始使用单个的化合物进行治疗。如箭头所示, 治疗方案是每周一次通过口服药物给药共四次 (q7d x 4)。药物在不含有有机溶剂的HPBCD, 2%HPMC (羟丙基甲基纤维素) 和1%PG (丙二醇) 的生理盐水 (浓水悬浮液) 中用于口服。赋形剂是相同的没有药物的浓水悬浮液。A. FL7-5-处理的异种移植肿瘤曲线图 (左图) 和体重曲线 (右图)。B. FL7-14处理的异种移植肿瘤曲线图 (左图) 和体重图 (右图)。

[0053] 图12显示了在HT-3成视网膜细胞瘤异种移植肿瘤模型中, 源自FL118平台的类似物, FL7N-1, FL7N-2和FL7N-3的抗肿瘤功效和毒性。人HT-3视网膜母细胞瘤肿瘤的小鼠模型的建立与图10中描述的相同。在移植的肿瘤达到100-200mm³ (指定为第0天) 后7天开始使用单个的化合物进行治疗。如黑箭头所示, 通过口服给药仅给药一次后。A. 治疗32-35天 (左图) 和治疗后前20天 (中图) 的FL7N-1异种移植肿瘤曲线图。动物的体重状况显示在右侧面板中。B. 治疗32-35天 (左图) 和治疗后前15天 (中图) 的FL7N-2异种移植肿瘤曲线图。动物的体重状况显示在右侧面板中。C. FL7N-3异种移植治疗32-35天肿瘤曲线 (左图) 和治疗后的前8天 (中图)。动物的体重状况显示在右侧面板中。当肿瘤达到1500mm³时, 所有小鼠均被安乐死。因此, 由于给予治疗时的肿瘤大小不同, 因此在不同的时间在不同的肿瘤大小百分比下对每只小鼠实施安乐死。

[0054] 图13显示了动物模型中胰腺癌 (PDX 14244) 和结肠直肠癌 (PDX27454) 患者来源的异种移植 (PDX) 肿瘤中FL118平台来源的类似物FL7N-1的抗肿瘤功效和毒性 (体重变化)。PDX肿瘤最初是在严重免疫缺陷 (SCID) 小鼠上建立的, 该小鼠来自胰腺和结直肠癌患者的肿瘤组织, 该组织是从临床疾病的转移部位获得的。FL118平台药物在不含有有机溶剂的HPBCD, 2%HPMC (羟丙基甲基纤维素) 和1%PG (丙二醇) 的生理盐水 (浓水悬浮液) 中用于口服。媒介物 (vehicle) 是没有药物的水性悬浮液。在SCID小鼠的侧腹区域的左侧 (PDX14244) 和, 右侧 (PDX27454) 皮下植入30-40mg的PDX肿瘤 (从维持PDX肿瘤小鼠中分离)。在移植的肿瘤达到100-200mm³ (指定的第0天) 后7-14天开始使用媒介物 (vehicle) 或药物进行治疗。如黑色箭头所示, 每周对PDX肿瘤的动物模型进行一次口服治疗共三次。A. 用对照 (vehicle) 或FL7N1治疗后获得的胰腺癌PDX14244肿瘤曲线图。B. 用载体或FL7N1治疗后获得的结直肠癌PDX27454肿瘤曲线图。C. 在整个实验期间显示了媒介物 (vehicle) 或用FL7N-1处理后的动物体重变化曲线。

[0055] 图14显示了FL118平台药物衍生的类似物W-b1, W-b2和W-b3药物在SW620结直肠癌异种移植肿瘤模型中的抗肿瘤功效和毒性。人SW620异种移植肿瘤的小鼠模型和药物制剂的形成与图10中描述的相同。在移植的肿瘤达到100-200mm³ (约7天) 后 (指定的第0天) 开始使用单个的化合物进行治疗。每周一次共两次口服治疗人SW620异种移植肿瘤的动物模型 (如黑色箭头所示)。A. W-b1药物的异种移植肿瘤治疗曲线图 (上图) 和动物体重变化曲线图 (下图)。B. W-b2药物的异种移植肿瘤曲线图 (上图) 和动物体重变化曲线图 (下图)。C. W-b3药物的异种移植肿瘤曲线图 (上图) 和动物体重变化曲线图 (下图)。

[0056] 图15显示了FL118平台药物衍生的类似物W-b4, W-b5和W-b6药物在SW620结直肠癌异种移植肿瘤模型中的抗肿瘤功效和毒性。人SW620异种移植肿瘤的小鼠模型和药物制剂的形成与图10中描述的相同。在移植的肿瘤达到100-200mm³ (约7天) 后 (指定的第0天) 开始使用单个的化合物进行治疗。每周一次共两次口服治疗人SW620异种移植肿瘤的动物模型 (如黑色箭头所示)。A. W-b4药物的异种移植肿瘤治疗曲线图 (上图) 和动物体重变化曲线图 (下图)。B. W-b5药物的异种移植肿瘤曲线图 (上图) 和动物体重变化曲线图 (下图)。C. W-b6药物的异种移植肿瘤曲线图 (上图) 和动物体重变化曲线图 (下图)。

[0057] 图16显示了FL118平台药物衍生的类似物W-b7, W-b9和W-b10药物在SW620结直肠癌异种移植肿瘤模型中的抗肿瘤功效和毒性。人SW620异种移植肿瘤的小鼠模型和药物制剂的形成与图10中描述的相同。在移植的肿瘤达到100-200mm³ (约7天) 后 (指定的第0天) 开始使用单个的化合物进行治疗。每周一次共一次 (A, C) 或每周一次共两次 (B) 口服治疗人SW620异种移植肿瘤的动物模型 (如黑色箭头所示)。A. W-b7药物的异种移植肿瘤治疗曲线图 (上图) 和动物体重变化曲线图 (下图)。B. W-b9药物的异种移植肿瘤曲线图 (上图) 和动物体重变化曲线图 (下图)。C. W-b10药物的异种移植肿瘤曲线图 (上图) 和动物体重变化曲线图 (下图)。

[0058] 图17显示了FL118平台药物来源的衍生的类似物Hx-4药物在动物模型中的胰腺癌 (PDX14244) 和结直肠癌 (PDX27454) 患者来源的异种移植 (PDX) 肿瘤中的抗肿瘤效力和毒性 (体重变化)。PDX肿瘤的建立, 口服给药的药物制剂, 以及媒介物对照的组成和人肿瘤免疫缺陷SCID小鼠模型的建立与图7和图13中描述的相同。在移植的肿瘤达到100-200mm³ (约7-14天后) (指定为第0天) 用Hx-4或媒介物 (对照) 治疗在SCID小鼠上的PDX肿瘤。如黑色箭头所示, 每周一次共3次口服在动物模型上进行PDX肿瘤治疗。A. 媒介物对照或Hx-4药物治疗后获得的胰腺癌PDX14244肿瘤曲线图。B. 媒介物对照或Hx-4药物治疗后获得的结直肠癌PDX27454肿瘤曲线图。C. 在实验期间用媒介物对照或Hx-4药物治疗后的动物体重变化曲线。

[0059] 图18显示了FL118平台药物来源的衍生的类似物Hx-5药物在动物模型中的胰腺癌 (PDX14244) 和结直肠癌 (PDX27454) 患者来源的异种移植 (PDX) 肿瘤中的抗肿瘤效力和毒性 (体重变化)。PDX肿瘤的建立, 口服给药的药物制剂, 以及媒介物对照的组成和人肿瘤免疫缺陷SCID小鼠模型的建立与图7和图13中描述的相同。在移植的肿瘤达到100-200mm³ (约7-14天后) (指定为第0天) 用Hx-5或媒介物 (对照) 治疗在SCID小鼠上的PDX肿瘤。如黑色箭头所示, 每周一次共3次口服在动物模型上进行PDX肿瘤治疗。A. 媒介物对照或Hx-5药物治疗后获得的胰腺癌PDX14244肿瘤曲线图。B. 媒介物对照或Hx-5药物治疗后获得的结直肠癌PDX27454肿瘤曲线图。C. 在实验期间用媒介物对照或Hx-5药物治疗后的动物体重变化曲

线。

[0060] 图19显示了FL118平台药物来源的衍生的类似物Hx-6药物在动物模型中的胰腺癌(PDX14244)和结直肠癌(PDX27454)患者来源的异种移植(PDX)肿瘤中的抗肿瘤效力和毒性(体重变化)。PDX肿瘤的建立,口服给药的制剂,以及媒介物对照的组成和人肿瘤免疫缺陷SCID小鼠模型的建立与图7和图13中描述的相同。在移植的肿瘤达到100-200mm³(约7-14天后)(指定为第0天)用Hx-6或媒介物(对照)治疗在SCID小鼠上的PDX肿瘤。如黑色箭头所示,每周一次共3次口服在动物模型上进行PDX肿瘤治疗。A.媒介物对照或Hx-6药物治疗后获得的胰腺癌PDX14244肿瘤曲线图。B.媒介物对照或Hx-6药物治疗后获得的结直肠癌PDX27454肿瘤曲线图。C.在实验期间用媒介物对照或Hx-6药物治疗后的动物体重变化曲线。

[0061] 图20显示了FL118平台药物来源的衍生的类似物Hx-7药物在动物模型中的胰腺癌(PDX14244)和结直肠癌(PDX27454)患者来源的异种移植(PDX)肿瘤中的抗肿瘤效力和毒性(体重变化)。PDX肿瘤的建立,口服给药的制剂,以及媒介物对照的组成和人肿瘤免疫缺陷SCID小鼠模型的建立与图7和图13中描述的相同。在移植的肿瘤达到100-200mm³(约7-14天后)(指定为第0天)用Hx-7或媒介物(对照)治疗在SCID小鼠上的PDX肿瘤。如黑色箭头所示,每周一次共3次口服在动物模型上进行PDX肿瘤治疗。A.媒介物对照或Hx-7药物治疗后获得的胰腺癌PDX14244肿瘤曲线图。B.媒介物对照或Hx-7药物治疗后获得的结直肠癌PDX27454肿瘤曲线图。C.在实验期间用媒介物对照或Hx-7药物治疗后的动物体重变化曲线。

[0062] 图21-1显示了FL118平台药物来源的衍生的类似物7Q6药物在动物模型中的胰腺癌(PDX14244)和结直肠癌(PDX27454)患者来源的异种移植(PDX)肿瘤中的抗肿瘤效力和毒性(体重变化)。PDX肿瘤的建立,口服给药的制剂,以及媒介物对照的组成和人肿瘤免疫缺陷SCID小鼠模型的建立与图7和图13中描述的相同。在移植的肿瘤达到100-200mm³(约7-14天后)(指定为第0天)用7Q6或媒介物(对照)治疗在SCID小鼠上的PDX肿瘤。如黑色箭头所示,每周一次共4次口服在动物模型上进行PDX肿瘤治疗。A.媒介物对照或7Q6药物治疗后获得的胰腺癌PDX14244肿瘤曲线图。B.媒介物对照或7Q6药物治疗后获得的结直肠癌PDX27454肿瘤曲线图。C.在实验期间用媒介物对照或7Q6药物治疗后的动物体重变化曲线。

[0063] 图21-2显示了FL118平台药物来源的衍生的类似物7Q6药物在动物模型中的结直肠癌(PDX27454)患者来源的异种移植(PDX)肿瘤中的抗肿瘤效力和毒性(体重变化)。PDX肿瘤的建立,腹腔内给药的制剂,以及媒介物对照的组成和人肿瘤免疫缺陷SCID小鼠模型的建立与图7和图13中描述的相同。在移植的肿瘤达到100-200mm³(约7-14天后)(指定为第0天)用7Q6或媒介物(对照)治疗在SCID小鼠上的PDX肿瘤。如黑色箭头所示,每周一次共1次腹腔内在动物模型上进行PDX肿瘤治疗。A.媒介物对照或7Q6药物治疗后获得的结直肠癌PDX27454肿瘤曲线图。B.在实验期间用媒介物对照或7Q6药物治疗后的动物体重变化曲线。

[0064] 图22显示了FL118平台药物来源的衍生的类似物7Q9药物在动物模型中的胰腺癌(PDX14244)和结直肠癌(PDX27454)患者来源的异种移植(PDX)肿瘤中的抗肿瘤效力和毒性(体重变化)。PDX肿瘤的建立,口服给药的制剂,以及媒介物对照的组成和人肿瘤免疫缺陷SCID小鼠模型的建立与图7和图13中描述的相同。在移植的肿瘤达到100-200mm³(约7-14天后)(指定为第0天)用7Q9或媒介物(对照)治疗在SCID小鼠上的PDX肿瘤。如黑色箭头所示,

每周一次共4次口服在动物模型上进行PDX肿瘤治疗。A. 媒介物对照或7Q9药物治疗后获得的胰腺癌PDX14244肿瘤曲线图。B. 媒介物对照或7Q9药物治疗后获得的结直肠癌PDX27454肿瘤曲线图。C. 在实验期间用媒介物对照或7Q9药物治疗后的动物体重变化曲线。

[0065] 图23显示了FL118平台药物来源的衍生的类似物7Q24药物在动物模型中的胰腺癌(PDX14244)和结直肠癌(PDX27454)患者来源的异种移植(PDX)肿瘤中的抗肿瘤效力和毒性(体重变化)。PDX肿瘤的建立,口服给药的制剂,以及媒介物对照的组成和人肿瘤免疫缺陷SCID小鼠模型的建立与图7和图13中描述的相同。在移植的肿瘤达到100-200mm³(约7-14天后)(指定为第0天)用7Q24或媒介物(对照)治疗在SCID小鼠上的PDX肿瘤。如黑色箭头所示,每周一次共4次口服在动物模型上进行PDX肿瘤治疗。A. 媒介物对照或7Q24药物治疗后获得的胰腺癌PDX14244肿瘤曲线图。B. 媒介物对照或7Q24药物治疗后获得的结直肠癌PDX27454肿瘤曲线图。C. 在实验期间用媒介物对照或7Q24药物治疗后的动物体重变化曲线。

[0066] 图24显示了FL118平台药物来源的衍生的类似物7Q28药物在动物模型中的结直肠癌(PDX27454)患者来源的异种移植(PDX)肿瘤中的抗肿瘤效力和毒性(体重变化)。PDX肿瘤的建立,腹腔内给药的制剂,以及媒介物对照的组成和人肿瘤免疫缺陷SCID小鼠模型的建立与图7和图13中描述的相同。在移植的肿瘤达到100-200mm³(约7-14天后)(指定为第0天)用7Q28或媒介物(对照)治疗在SCID小鼠上的PDX肿瘤。如黑色箭头所示,每周一次共1次腹腔内在动物模型上进行PDX肿瘤治疗。A. 媒介物对照或7Q28药物治疗后获得的结直肠癌PDX27454肿瘤曲线图。B. 在实验期间用媒介物对照或7Q28药物治疗后的动物体重变化曲线。注意,口服7Q28会降低7Q28的抗肿瘤功效(数据未显示)。

[0067] 图25显示了FL118平台药物来源的衍生的类似物7Q31药物在动物模型中的结直肠癌(PDX27454)患者来源的异种移植(PDX)肿瘤中的抗肿瘤效力和毒性(体重变化)。PDX肿瘤的建立,腹腔内给药的制剂,以及媒介物对照的组成和人肿瘤免疫缺陷SCID小鼠模型的建立与图7和图13中描述的相同。在移植的肿瘤达到100-200mm³(约7-14天后)(指定为第0天)用7Q31或媒介物(对照)治疗在SCID小鼠上的PDX肿瘤。如黑色箭头所示,每周一次共1次腹腔内在动物模型上进行PDX肿瘤治疗。A. 媒介物对照或7Q31药物治疗后获得的结直肠癌PDX27454肿瘤曲线图。B. 在实验期间用媒介物对照或7Q31药物治疗后的动物体重变化曲线。注意,口服7Q31会降低7Q31的抗肿瘤功效(数据未显示)。

[0068] 图26显示了FL118平台药物来源的衍生的类似物7Q32药物在动物模型中的结直肠癌(PDX27454)患者来源的异种移植(PDX)肿瘤中的抗肿瘤效力和毒性(体重变化)。PDX肿瘤的建立,口服给药的制剂,以及媒介物对照的组成和人肿瘤免疫缺陷SCID小鼠模型的建立与图7和图13中描述的相同。在移植的肿瘤达到100-200mm³(约7-14天后)(指定为第0天)用7Q32或媒介物(对照)治疗在SCID小鼠上的PDX肿瘤。如黑色箭头所示,每周一次共4次口服在动物模型上进行PDX肿瘤治疗。A. 媒介物对照或7Q32药物治疗后获得的结直肠癌PDX27454肿瘤曲线图。B. 在实验期间用媒介物对照或7Q32药物治疗后的动物体重变化曲线。注意,与口服7Q32相比,腹腔内7Q32给药可增加7Q32对动物的毒性(数据未显示)。

[0069] 图27显示了FL118平台药物来源的衍生的类似物7Q35药物在动物模型中的结直肠癌(PDX27454)患者来源的异种移植(PDX)肿瘤中的抗肿瘤效力和毒性(体重变化)。PDX肿瘤的建立,腹腔内给药的制剂,以及媒介物对照的组成和人肿瘤免疫缺陷SCID小鼠模型

的建立与图7和图13中描述的相同。在移植的肿瘤达到100-200mm³ (约7-14天后) (指定为第0天) 用7Q35或媒介物(对照) 治疗在SCID小鼠上的PDX肿瘤。如黑色箭头所示, 每周一次共1次腹腔内在动物模型上进行PDX肿瘤治疗。A. 媒介物对照或7Q35药物治疗后获得的结直肠癌PDX27454肿瘤曲线图。B. 在实验期间用媒介物对照或7Q35药物治疗后的动物体重变化曲线。注意, 口服7Q35会降低7Q35的抗肿瘤功效(数据未显示)。

[0070] 图28显示了FL118平台药物来源的衍生的类似物7Q36药物在动物模型中的结直肠癌(PDX27454) 患者来源的异种移植(PDX) 肿瘤中的抗肿瘤效力和毒性(体重变化)。PDX肿瘤的建立, 腹腔内给药的制剂, 以及媒介物对照的组成和人肿瘤免疫缺陷SCID小鼠模型的建立与图7和图13中描述的相同。在移植的肿瘤达到100-200mm³ (约7-14天后) (指定为第0天) 用7Q36或媒介物(对照) 治疗在SCID小鼠上的PDX肿瘤。如黑色箭头所示, 每周一次共1次腹腔内在动物模型上进行PDX肿瘤治疗。A. 媒介物对照或7Q36药物治疗后获得的结直肠癌PDX27454肿瘤曲线图。B. 在实验期间用媒介物对照或7Q36药物治疗后的动物体重变化曲线。注意, 口服7Q36会降低80%的7Q36的抗肿瘤功效(数据未显示)。

[0071] 图29显示了FL118平台药物来源的衍生的类似物9Q10 (9-10) 药物在动物模型中的胰腺癌(PDX14244) 和结直肠癌(PDX27454) 患者来源的异种移植(PDX) 肿瘤中的抗肿瘤效力和毒性(体重变化)。PDX肿瘤的建立, 口服给药的制剂, 以及媒介物对照的组成和人肿瘤免疫缺陷SCID小鼠模型的建立与图7和图13中描述的相同。在移植的肿瘤达到100-200mm³ (约7-14天后) (指定为第0天) 用9Q10 (9-10) 或媒介物(对照) 治疗在SCID小鼠上的PDX肿瘤。如黑色箭头所示, 每周一次共3次口服在动物模型上进行PDX肿瘤治疗。A. 媒介物对照或9Q10 (9-10) 药物治疗后获得的胰腺癌PDX14244肿瘤曲线图。B. 媒介物对照或9Q10 (9-10) 药物治疗后获得的结直肠癌PDX27454肿瘤曲线图。C. 在实验期间用媒介物对照或9Q10 (9-10) 药物治疗后的动物体重变化曲线。注意, 媒介物(对照) 治疗的小鼠的体重变化在10%以内。

[0072] 图30显示了FL118平台药物来源的衍生的类似物9Q17 (9-17) 药物在动物模型中的胰腺癌(PDX14244) 和结直肠癌(PDX27454) 患者来源的异种移植(PDX) 肿瘤中的抗肿瘤效力和毒性(体重变化)。PDX肿瘤的建立, 口服给药的制剂, 以及媒介物对照的组成和人肿瘤免疫缺陷SCID小鼠模型的建立与图7和图13中描述的相同。在移植的肿瘤达到100-200mm³ (约7-14天后) (指定为第0天) 用9Q17 (9-17) 或媒介物(对照) 治疗在SCID小鼠上的PDX肿瘤。如黑色箭头所示, 每周一次共3次口服在动物模型上进行PDX肿瘤治疗。A. 媒介物对照或9Q17 (9-17) 药物治疗后获得的胰腺癌PDX14244肿瘤曲线图。B. 媒介物对照或9Q17 (9-17) 药物治疗后获得的结直肠癌PDX27454肿瘤曲线图。C. 在实验期间用媒介物对照或9Q17 (9-17) 药物治疗后的动物体重变化曲线。注意, 媒介物(对照) 治疗的小鼠的体重变化在10%以内。

[0073] 图31显示了FL118平台药物来源的衍生的类似物9Q18 (9-18) 药物在动物模型中的胰腺癌(PDX14244) 和结直肠癌(PDX27454) 患者来源的异种移植(PDX) 肿瘤中的抗肿瘤效力和毒性(体重变化)。PDX肿瘤的建立, 口服给药的制剂, 以及媒介物对照的组成和人肿瘤免疫缺陷SCID小鼠模型的建立与图7和图13中描述的相同。在移植的肿瘤达到100-200mm³ (约7-14天后) (指定为第0天) 用9Q18 (9-18) 或媒介物(对照) 治疗在SCID小鼠上的PDX肿瘤。如黑色箭头所示, 每周一次共3次口服在动物模型上进行PDX肿瘤治疗。A. 媒介物

对照或9Q18 (9-18) 药物治疗后获得的胰腺癌PDX14244肿瘤曲线图。B. 媒介物对照或9Q18 (9-18) 药物治疗后获得的结直肠癌PDX27454肿瘤曲线图。C. 在实验期间用媒介物对照或9Q18 (9-18) 药物治疗后的动物体重变化曲线。注意, 媒介物(对照) 治疗的小鼠的体重变化在10%以内。

[0074] 图32显示了FL118药物的抗肿瘤功效和毒性(体重变化) 的比较, 以两种不同的制剂配方(配方1: 无有机溶剂的水悬浮液与配方2: 乙醇-水的悬浮液) 为例。免疫缺陷的SCID小鼠模型的UMUC3膀胱癌异种移植肿瘤: UMUC3异种移植肿瘤最初是通过在100-200 μ L培养基中皮下注射 $2-5 \times 10^6$ 个UMUC3细胞而建立的。通过皮下接种30-40mg肿瘤组织在SCID小鼠腹侧而建立了UMUC3异种移植的小鼠模型。在移植的肿瘤达到100-200mm³(约7-14天) 后(指定为第0天), 开始使用无有机溶剂的FL118悬浮液(配方1) 与乙醇的FL118悬浮液(配方2) 进行治疗。如箭头所示, 治疗方案是每周四次通过口服给药(q7d x 4)。A. 不含有机溶剂的FL118水性悬浮液(配方1) 与乙醇-水性FL118悬浮液(配方2) 的抗肿瘤活性比较。B. 无有机溶剂的FL118水性悬浮液(配方1) 与乙醇水溶液的FL118悬浮液(配方2) 的毒性比较(体重变化)。

[0075] 图33显示了在动物模型的人大肠癌(27454) 患者来源的异种移植(PDX) 肿瘤中测试由喷雾干燥过程获得的, 临床上相容且方便的FL118制剂的抗肿瘤功效和毒性(体重变化)。将FL118与HPBCD(2-羟丙基- β -环糊精) 配制成乙醇溶液, 然后采用喷雾干燥法制得FL118-HPBCD配制成的复合粉末。将FL118-HPBCD复合粉末研磨成 ≤ 400 目(37微米) 的颗粒, 然后将其溶于含5%PG(丙二醇) 的盐水中制成悬浮液, 然后口服。媒介物(对照) 是含5%PG的盐水和等效的HPBCD但不含FL118。PDX肿瘤的实验免疫缺陷SCID小鼠的建立与图7和13中描述的相同。PDX肿瘤SCID小鼠经口服媒介物(对照) 和FL118制剂。移植的肿瘤在7-14天内达到100-200mm³(指定为第0天) 后, 按箭头所示, 每周一次共4次。A. 用媒介物(对照) 和FL118制剂治疗后获得的结直肠癌PDX27454肿瘤曲线图。B. 显示了用媒介物或FL118制剂治疗后的动物体重变化曲线。

[0076] 表1: FL118抗癌药对BALB/cj小鼠血液学参数的影响。

[0077] 表2: FL118抗癌药对BALB/cj小鼠血清生化参数的影响。

[0078] 表3: FL118抗癌药对比格犬血液学参数的影响。

[0079] 表4: FL118抗癌药对比格犬的血清生化参数的影响。

[0080] 表5: FL118抗癌药衍生的7Q-系列衍生物对不同肿瘤细胞的抗癌活性(以 μ M为单位的IC₅₀/EC₅₀)。

[0081] 表6: FL118抗癌药衍生的9Q-系列衍生物对不同肿瘤细胞的抗癌活性(以 μ M为单位的IC₅₀/EC₅₀)。

[0082] 表7: FL118抗癌药衍生的FL7s和FL7-系列对不同肿瘤细胞的抗癌活性(以nM为单位的IC₅₀/EC₅₀)。

[0083] 表8: FL118抗癌药衍生的FL7N-系列对不同肿瘤细胞的抗癌活性(以nM为单位的IC₅₀/EC₅₀)。

[0084] 表9: FL118抗癌药衍生的Wb-系列对不同肿瘤细胞的抗癌活性(以nM为单位的IC₅₀/EC₅₀)。

[0085] 表10: FL118抗癌药衍生的Hx-系列对不同肿瘤细胞的抗癌活性(以nM为单位的

IC50/EC50)。

[0086] 表11:用于FL118抗癌药毒性和最大耐受剂量(MTD)研究的比格犬的实验设计。

[0087] 表12:通过配体亲和纯化(使用的配体为FL118和FL118类似物)发现和FL118的氚(³H)标记的探针筛选蛋白阵列鉴定潜在的FL118生化配体标志物和靶标。

发明的具体实施描述

[0088] 本公开尤其涉及用作抗癌剂的新型化合物。同样,本文公开了用于在人类疾病状况的治疗和/或预防中合成和使用此类化合物的方法。本公开进一步涉及所述化合物的药物制剂,具有用于需要治疗的受试者和/或用于预防适应症。

[0089] 下面提供了本说明书中使用的某些术语的定义。除非另有定义,否则本文所用的所有技术和科学术语通常具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同含义。如本说明书和所附权利要求书中所使用的,单数形式“一个”,“一种”和“该”包括复数个的指示物,除非另有明确内容规定。例如,提及“化合物”包括两种或更多种化合物的组合等。

术语

[0090] 如本文所用,“约”将被本领域普通技术人员理解,并且将在一定程度上根据其使用的上下文而变化。如果存在本领域普通技术人员不清楚的术语使用,则在给定使用上下文的情况下,“约”将表示枚举值的正负10%。

[0091] 如本文所用,将一种或多种药剂或药物例如一种或多种抗凋亡蛋白和/或信号传导抑制剂化合物用至一个或多个受试者,包括将化合物引入或递送至受试者。引入或递送至受试者可以通过任何合适的途径进行,包括口服,鼻内,通过吸入,肠胃外(静脉内,肌肉内,腹膜内或皮下),直肠或局部进行。给药可以包括自我给药和他人给药。还应当理解,所描述的医学状况的各种治疗或预防方式旨在表示“实质性”,其包括总的但也少于总的治疗/预防,并且其中获得了一些生物学或医学上相关的结果。

[0092] 如本文所用,术语“评估”,“测定”,“确定”和“测量”可互换使用,并且包括定量和定性确定。这些术语指的是任何形式的测量,包括确定是否存在特征或类特征。评估可以是相对的,也可以是绝对的。“评估…的存在”包括确定某东西存在和/或不存在的量。

[0093] 如本文所用,术语“临床因素”是指执业医师在确定用于治疗或预防一种或多种疾病的诊断,预后或治疗方案时可以考虑的任何数据。这些因素包括但不限于患者的病史,患者的身体检查,全血细胞计数,血细胞或骨髓细胞的检查,细胞遗传学,肺部健康,疾病的血管指征以及细胞的免疫表型。

[0094] 如本文所用,在比较两个或更多个样品时,对治疗或药物反应的上下文中,术语“可比”或“对应”分别指用于治疗或药物的相同类型的样品,反应,治疗和药物的比较。在一些实施例中,可比较的样本可以在不同时间从同一个人获得。在其他实施方案中,可比较的样品可获自不同的个体,例如患者和健康个体。通常,出于控制目的,可将比较的样本通过公因子进行归一化。

[0095] 如本文所用,术语“组成物”是指具有指定量的指定成分的产品,以及直接或间接地由指定量的指定成分的组成产生的任何产品。

[0096] 如本文所用,术语“诊断”是指检测疾病或病症或确定疾病或病症的阶段或程度。通常,疾病或病症的诊断是基于对指示该疾病的一种或多种因素和/或症状的评估。即,可以基于指示疾病或病症的存在或不存在因素的存在,不存在或数量来进行诊断。被认为指

示特定疾病的诊断的每种因素或症状不必仅与该特定疾病相关,即,可以从诊断因素或症状中推断出不同的诊断。同样,在某些情况下,可能会出现指示特定疾病的因素或症状出现在没有该特定疾病的个体中。术语“诊断”还涵盖确定药物治疗的治疗效果或预测对药物治疗的反应模式。诊断方法可以单独使用,或与医学领域中针对特定疾病或病症的其他诊断和/或分期方法结合使用。

[0097] 如本文所用,术语“药物”,“化合物”,“活性剂”,“试剂”,“药物组成物”,“药物制剂”和“药理活性剂”可互换使用并且术语“化合物”是指适于给药并且具有有益的生物作用,适合于治疗疾病或异常生理状况的治疗作用的任何化合物,复合物或组合物,尽管该作用也可以是预防性质。该术语还涵盖本文具体提及的那些活性剂的药学上可接受的,药理活性的衍生物,包括但不限于盐,酯,酰胺,前药,活性代谢物,类似物等。当使用术语“活性剂”,“药理活性剂”和“API”(活性药物成分)时,或者当具体地识别出特定的活性剂时,应当理解为申请人打算包括该活性剂和药物本身以及药学上可接受的药理活性盐,酯,酰胺,前药,缀合物,代谢物,类似物等。

[0098] 如本文所用,术语组合物的“有效量”或“药学有效量”或“治疗有效量”是足以实现期望的治疗和/或预防作用的量,例如产生预防或减轻与所治疗疾病有关的症状的量。给予受试者的本发明组合物的量将取决于疾病的类型和严重性以及个体的特征,例如总体健康,年龄,性别,体重和对药物的耐受性。这也将取决于疾病的程度,严重程度和类型。技术人员将能够根据这些和其他因素确定合适的剂量。本发明的组合物(组成物)也可以与一种或多种其他治疗化合物组合施用。

[0099] 如本文所用,术语“肿瘤性疾病”是指任何种类和起源的癌症及其前体阶段。因此,术语“肿瘤性疾病”包括由术语“瘤形成”,“肿瘤形成”,“癌”,“癌前”或“肿瘤”标识的主题。肿瘤性疾病通常表现为细胞分裂异常,导致特定细胞群水平异常。同样,内皮细胞的单克隆扩增可以指肺小动脉内皮细胞的“肿瘤”。此外,肿瘤性疾病的潜在异常细胞分裂通常是细胞固有的,而不是对感染或炎症的正常生理反应。在一些实施方案中,用于使用本文提供的方法诊断的肿瘤性疾病包括癌。“癌”是指良性或恶性的上皮肿瘤。

[0100] 如本文所用,术语“药学上可接受的盐”包括无机碱,有机碱,无机酸,有机酸或碱性或酸性氨基酸形成的盐。作为无机碱的盐,本发明包括,例如,钠或钾碱金属;碱土金属,例如钠或钾碱土金属;碱土金属,例如钙和镁或铝和氨碱土金属。作为有机碱的盐,本发明包括例如三甲胺,三乙胺,吡啶,甲基吡啶,乙醇胺,二乙醇胺和三乙醇胺。作为无机酸的盐,本发明包括例如盐酸,氢硼酸,硝酸,硫酸和磷酸。作为有机酸的盐,本发明包括例如甲酸,乙酸,三氟乙酸,富马酸,草酸,酒石酸,马来酸,乳酸,柠檬酸,琥珀酸,苹果酸,甲磺酸,苯磺酸和对甲苯磺酸。作为碱性氨基酸的盐,本发明包括例如精氨酸,赖氨酸和鸟氨酸。酸性氨基酸包括例如天冬氨酸和谷氨酸。

[0101] 如本文所用,术语“预后”是指对临床状况或疾病的可能进程和结果的预测。通常通过评估指示疾病的有利或不利过程或结果的疾病因素或症状来进行预后。如本文所使用的短语“确定预后”是指技术人员可以通过其预测患者病情或结果的过程。术语“预后”不是指以100%的准确性预测病程或结果的能力。相反,本领域技术人员将理解,术语“预后”是指某种病程或结果发生的可能性。也就是说,与那些没有表现出这种状况的人相比,表现出某种状况的患者更容易发生病程或转归。如本文所使用的术语“有利预后”和“阳性预后”,

或“不利预后”和“阴性预后”是用于预测病症或疾病的可能进程和/或可能结果的相对术语。好的或肯定的预后比不利或否定的预后预示病症的更好结果。在一般意义上,“有利的预后”是相对优于可能与特定病症相关联的许多其他可能的预后的结果,而不利的预后则预测的结果比可能的其他许多可能的预后要差与特定条件相关联。有利或肯定的预后的典型例子包括:优于平均治愈率,较低的转移倾向,比预期的寿命长的时间,良性过程与癌性过程的区别等。例如,阳性预后是指患者在治疗后治愈特定癌症的可能性为50%,而患有相同癌症的普通患者治愈的可能性仅为25%。

[0102] 如本文所用,术语“参考水平”是指可能出于比较目的而感兴趣的物质的水平。在一些实施方案中,参考水平可以是指定的组合物的剂量,其作为来自对照受试者的样品的剂量水平的平均值。在其他实施方案中,参考水平可以是同一受试者在不同时间例如在施用组合物的时间过程中的水平,例如在2、4、6、8和10分钟(min)确定的水平,等等。

[0103] 如本文所用,术语“样品”或“测试样品”是指从受试者收集的包含任何液体或固体材料。在合适的实施方案中,测试样品获自生物学来源,即“生物样品”,例如培养物中的细胞或来自动物,最优选鼠科动物,哺乳动物或人类受试者的组织样品。

[0104] 如本文所用,术语“受试者”或“个体”是指哺乳动物,例如小鼠,大鼠或人,但也可以是另一种动物,例如家畜,例如狗,猫或类似动物,农场动物(例如牛,绵羊,猪,马等)或实验动物(例如猴子,大鼠,小鼠,兔子,豚鼠),或类似的东西。术语“患者”是指患有或怀疑患有疾病的“受试者”。

[0105] 如本文所用,术语“治疗”或“缓解”是指治疗性治疗或预防性措施,其中目的是预防或减慢(减轻)目标病理状况或病症。如果在接受根据本发明的方法的治疗剂后,受试者显示出可观察到的和/或可测量的减轻或不减轻一种或多种特定疾病或症状的体征和症状,则该受试者被成功地“治疗”了一种疾病状况。

[0106] 如本文所用,提及诸如“氢”或“H”之类的某些元素是指包括该元素的所有同位素。例如,如果将R基团定义为包括氢或H,则它也包括氘和氚。

[0107] 概述

[0108] 控制人类疾病以延长寿命和生活质量是临床实践中的目标。在人类癌症控制领域,挑战是治疗抗性(例如化学疗法和放射疗法中的治疗抗性),导致无法治愈的疾病或治疗后的高转移和/或复发率。因此,癌症的治疗抗性,转移和复发是癌症死亡的主要原因,并且继续挑战着整个领域。

[0109] 对同行评审文献的分析表明,克服治疗抗性的挑战是对治疗的固有或获得性(诱导)抗性是通过多种机制引起的,通常是由于癌细胞通常具有多种多样遗传和表观遗传学这一事实造成癌症相关蛋白的变异和异常表达。为了应对治疗耐药性的挑战,必须解决由多种机制导致的治疗耐药性这一事实。为此,现有技术缺乏有效的策略。

[0110] 先前已经采用将一种分子靶向剂与一种或两种传统的细胞毒性药物协同使用作为联合治疗方案。然而,对于某些具有特定癌症类型和/或有利遗传背景的患者,该方法仅能够减轻与毒性和功效有关的治疗抗性。治疗抗性的另一个挑战性问题是癌症是高度异质性疾病(Swanton C: Intratumor heterogeneity: evolution through space and time, Cancer research 2012, 72: 4875-4882);可以在同一肿瘤的不同区域检测到预后好和不好的基因表达特征,并且在同一肿瘤的每个肿瘤区域可能未检测到百分比显著的体细

胞突变(Gerlinger M,et al.:Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing,The New England journal of medicine 2012, 366:883-892)。这种广泛的肿瘤内异质性在个性化癌症治疗(个性化药物)和生物标记物开发方面提出了艰巨的挑战。因此,需要新的策略来解决这些挑战。

[0111] 本发明的一个方面涉及由实施例子证明的具有特定活性谱的一些特定抗癌化合物的发明,这些化合物是由本发明创建的,但是其中尽管如此,这些化合物仍具有定量和/或定性的多种靶向机制,以对抗癌细胞抗治疗性。在本文公开的新颖化合物中,尽管每种化合物都可以靶向或绕过多种抗药性因子,但是各个化合物显示出不同的选择性(定量和/或定性),并具有广谱重叠。这类化合物赋予治疗适应症,克服了因多种遗传和/或表观遗传学改变以及与癌症相关的异常基因表达而导致的治疗抗性。因此,单个化合物可以靶向具有重叠但截然不同的遗传背景的特定癌症类型或相同类型的癌症。这就赋予了在本发明公开的新颖化合物个性化精准医学的新颖策略来解决治疗耐药性的挑战。同样,从成本效益的角度来看,由于每种抗癌化合物均具有定义的特定目标组(定量或定性),为了节省某些癌症患者用于诊断和/或预后指征的生物标志物测试成本,这些在本发明公开的新颖的单独化合物药物可以通常也用于癌症治疗,而无需进行生物标志物前检测程序。对于这些患者,特定的药物选择将基于与癌症和药物相关的常识,而不是基于生物标志物或遗传测定(因为在大多数情况下,如果不是全部,则通常没有那么明确地定义这种关系),尽管这样会没有充分发挥这些药物的最大价值。这种前所未有的以个性化精准医学的方式克服治疗抗性的策略来自我们最近获得的出乎意料的结果(请参阅示例部分)。

[0112] 抗癌药喜树碱(CPT)最初是由Mansukh Wani博士和Monroe Wall博士与美国国家癌症研究所(NCI)合作从植物提取物中鉴定和分离的。虽然已经合成了多种基于喜树碱结构的化合物(喜树碱衍生物),但只有两种喜树碱类似物,伊立替康和拓扑替康(均为基于喜树碱结构的衍生物)被商业化在临床实践中用于治疗癌症。目前,伊立替康和托泊替康代表了喜树碱结构类似物中抗肿瘤活性相对于毒性而言最好的两种化合物。然而,对伊立替康或拓扑替康治疗的抗药性是临床实践中的常见问题,这严重挑战了其应用范围。在我们之前的专利(PCT/US15/22095)中,我们证明了在以前的发明中受保护的某些独特化合物可以有效克服对伊立替康和托泊替康具有抗药性的肿瘤(有关详细信息,请参见我们最近的出版物:Ling X,et al:FL118,a novel camptothecin analogue,overcomes irinotecan and topotecan resistance in human tumor xenograft models,Am J of Transl Res 2015,7:1765-1781)。

[0113] 独特的喜树碱结构类似物FL118靶向并绕过多种治疗抗性因子和功能,以消除动物模型中许多类型的人类肿瘤异种移植肿瘤。参见See Ling X,et al.:A Novel Small Molecule FL118 That Selectively Inhibits Survivin,Mcl-1,XIAP and cIAP2 in a p53-Independent Manner,Shows Superior Antitumor Activity,PLoS ONE 2012,7:e45571。研究还表明,FL118的抗肿瘤活性高度依赖于其一级结构和空间构型(Zhao J,et al.:Antitumor activity of FL118,a survivin,Mcl-1,XIAP,cIAP2 selective inhibitor,is highly dependent on its primary structure and steric configuration,Molecular Pharmaceutics 2014;11:457-467)。先前专利(PCT/US15/22095)的结果显示,FL118有效克服了伊立替康和拓扑替康诱导的治疗耐药性(Ling,et

al., Am J of Transl Res 2015, 7:1765-1781)。FL118有效地绕过了ATP结合盒(ABC)转运蛋白如ABCG2产生的难治性表型,而SN-38(伊立替康的活性代谢产物)和拓扑替康是ABCG2的底物,无法绕过ABCG2诱导的治疗耐药性。现在,先前发明(PCT/US15/22095)的这些发现发表于Westover D, et al: FL118, a novel camptothecin derivative, is insensitive to ABCG2 expression and shows improved efficacy in comparison with irinotecan in colon and lung cancer models with ABCG2-induced resistance, Molecular Cancer 2015, 14:92。此外,我们最近的研究表明,喜树碱,伊立替康/SN-38(伊立替康的活性代谢产物)和拓扑替康的已知治疗靶点是拓扑异构酶I(Top1),它们需要Top1表达才能显示出抗肿瘤活性。相反,FL118平台抗癌药的抗肿瘤功效与Top1的表达无关,没有Top1的表达的人类肿瘤对FL118的治疗可表现出高度的敏感性(Li F, et al: Topoisomerase I(Top1): a major target of FL118 for its antitumor efficacy or mainly involved in its side effects of hematopoietic toxicity? Am J Cancer Res. 2017; 7:370-82)。

[0114] 在本发明中,我们证明了衍生自FL118平台抗癌药的个体化合物在不同癌症类型之间或在具有不同个体的相同癌症类型中显示出独特的抗癌活性。本发明还以水悬浮液形式,粉剂胶囊形式或片剂形式用于口服(po/p.o.)腹膜内(ip/IP/i.p.)或静脉内(iv/IV/i.v.)给药的水不溶性FL118和/或FL118类似物的含乙醇制剂和无有机溶剂制剂的进一步开发的各种实施方案中进行了描述。

[0115] 在说明性的实施方案中,本发明提供了衍生自平台抗癌药FL118的位置7或位置9的一组化合物的组成和化学合成的方法,以及这些式1的新化合物制备用途人类疾病,例如癌症的治疗。下面描述了单个FL118核心结构平台衍生的类似物的详细合成示例。

[0116] 示例性的平台药物FL118位置7衍生的化合物的合成(FL18:10,11-亚甲基二氧基-喜树碱)

[0117] 在第7位用肉桂烯基制备平台药物FL118的衍生物(示例性):

[0118] 步骤1:制备6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基查尔酮:

[0119] 将3,4-亚甲基二氧基苯乙酮溶解在硝基甲烷(80mL)中,并向其中滴加浓硝酸(20.7mL)。混合物反应2小时,并向其中滴加饱和碳酸氢钠溶液以使pH达到约7。混合物用二氯甲烷萃取3次。合并有机层,用盐水洗涤,用无水MgSO₄干燥并浓缩。所得黄色油状物通过柱色谱法纯化(乙酸乙酯:石油醚=1:8),得到7.8g浅黄色固体(76%)。mp(melting point/熔点) 110-112°C

[0120] 将6-硝基-3,4-亚甲基二氧基苯乙酮(7.8g, 37.3mmol)溶解在乙酸乙酯(70mL)中,并加入催化量的Pd/C。混合物在氢气氛下反应12小时。滤出催化剂,并将滤液浓缩。所得物为5.5g浅黄色固体(83%)。mp 123-124°C。

[0121] 将6-氨基-3,4-亚甲基二氧基苯乙酮(0.2g, 1.1mmol)溶于无水醇(10ml)中,依次加入氢氧化钠(0.4g, 11mmol)和苯甲醛(0.14g, 1.3mmol)。混合物反应12小时,并将溶液浓缩。通过柱色谱法(乙酸乙酯:石油醚=1:4)纯化混合物,得到0.21g黄色固体(71%)。mp 130-132°C

[0122] ¹H NMR(CDCl₃, 600MHz) δ: 8.08(s, 1H, ArH), 7.81(d, J=15.2Hz, 1H, =CHAr), 7.53(d, J=15.2Hz, 1H, ArCOCH=), 6.79(d, J=7.7Hz, 2H, ArH), 6.67(d, J=7.7Hz, 2H, ArH), 6.60(t, J=7.7Hz, 1H, ArH), 6.54(s, 1H, ArH), 6.20(brs, 2H, NH₂), 6.02(s, 2H, OCH₂O)。

[0123] 6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基-4-溴查尔酮的制备方法与6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基查尔酮的制备方法相同,不同之处在于:6-氨基-3,4-亚甲基二氧基苯乙酮和4-溴-苯甲醛;6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基-3,4-二甲氧基查尔酮的制备方法与6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基查尔酮的制备方法相同,只是试剂为6-氨基-3,4-亚甲基二氧基苯乙酮和3,4-二甲氧基-苯甲醛;6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基-2-氯查尔酮的制备方法与6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基查尔酮的制备方法相同,只是试剂为6-氨基-3,4-亚甲基二氧基苯乙酮和2-氯苯甲醛;6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基-3,4-亚甲基二氧基查尔酮的制备方法与6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基查尔酮的制备方法相同,只是试剂为6-氨基-3,4-亚甲基二氧基苯乙酮和3,4-亚甲基二氧基苯甲醛;6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基-3,4,5-三甲氧基查尔酮的制备方法与6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基查尔酮的制备方法相同分别是6-氨基-3,4-亚甲基二氧基苯乙酮和3,4,5-三甲氧基-苯甲醛;6-氨基-3,4'-亚甲基二氧基-4-甲氧基查尔酮的制备方法与6-氨基-3,4-亚甲基二氧基查尔酮的制备方法相同,只是试剂为6-氨基-3,4-亚甲基二氧基苯乙酮和4-甲氧基苯甲醛;

[0124] 步骤2:在7位上用肉桂基制备FL118衍生物:

[0125] FL7-5:20 (S) -7-肉桂基-10,11-亚甲基二氧基喜树碱(4S) -4-乙基-7,8-二氢-4-羟基-1H-吡喃[3,4-f]将吡啶-3,6,10(4H) -三酮(200mg,0.76mmol)溶于无水甲苯(70mL)中。加入6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基查尔酮(0.37g,1.37mmol)和对甲苯磺酸(26.2mg,0.15mmol)。混合物在110℃下在氮气氛下反应24小时。将混合物冷却,并在减压下除去溶剂。化合物通过柱色谱法纯化(二氯甲烷:甲醇=97:3),得到270mg浅黄色固体(72%)。mp 220-222℃。

[0126] ¹H NMR (CF₃COOD,600MHz) δ:8.19 (s,1H),7.98 (s,1H),7.91 (s,1H),7.87 (d,J=4.4Hz,2H),7.81 (d,J=16.5Hz,1H),7.69 (s,1H),7.60 (s,3H),6.48 (s,2H),6.00 (d,J=16.5Hz,1H),5.95 (s,2H),5.66 (d,J=17.04Hz,1H),2.21 (m,2H),1.20 (t,J=7.2Hz,3H)。¹³C NMR (CF₃COOD,150MHz) δ:178.6,160.4,159.7,154.9,153.7,151.4,148.8,142.4,142.2,141.2,136.5,133.9,131.3,130.2,128.5,128.4,123.9,120.1,107.3,105.7,103.5,99.6,76.2,68.6,54.8,33.4,8.1。

[0127] FL7-6:20 (S) -7-(4-溴肉桂基)-10,11-亚甲二氧基喜树碱:如用于合成和纯化7-5所述,使用(4S) -4-乙基-7,8-二氢-4-羟基-1H-吡喃并[3,4-f]吡啶-3,6,10(4H) -trioneana和6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基-4-溴-查尔酮。所得物为300mg浅黄色固体(70%)。mp 238℃。

[0128] ¹H NMR (CF₃COOD,600MHz) δ:7.46 (s,1H),7.31 (s,1H),7.07 (d,J=7.4Hz,2H),6.81 (d,J=6.3Hz,1H),6.69 (s,1H),6.41 (s,3H),6.18 (s,2H),5.65 (s,2H),5.23 (d,J=7.04Hz,2H),2.11 (m,2H),0.92 (t,J=7.2Hz,3H)。¹³C NMR (CF₃COOD,150MHz) δ:177.2,161.3,159.7,153.9,152.7,151.4,148.9,142.6,142.2,141.2,136.6,132.9,131.8,130.1,129.4,128.2,126.4,124.9,123.9,120.5,107.7,105.5,103.9,99.6,76.3,68.7,54.3,33.2,8.5。

[0129] FL7-7:20 (S) -7-(3,4-二甲氧基肉桂基)-10,11-亚甲基二氧基喜树碱:如用于合成和纯化7-5所描述的使用制备的7-7(4S) -4-乙基-7,8-二氢-4-羟基-1H-吡喃并[3,4-f]吡啶-3,6,10(4H) -三酮和6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基-3,4-二甲氧基查尔酮。所得物

为230mg浅黄色固体(53%)。mp 192℃。

[0130] ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600MHz) δ : 7.50 (d, $J=7.68\text{Hz}$, 2H), 7.40 (d, $J=13.2\text{Hz}$, 2H), 7.28 (s, 1H), 7.14 (d, $J=8.22\text{Hz}$, 2H), 6.37 (s, 1H), 6.15 (s, 2H), 5.39 (s, 2H), 4.76 (s, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 2.29 (m, 2H), 1.23 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H)。 ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150MHz) δ : 175.2, 162.9, 159.3, 157.7, 152.4, 150.8, 150.2, 148.6, 145.1, 144.9, 137.5, 135.3, 134.9, 130.9, 127.8, 125.2, 122.8, 121.4, 119.6, 111.5, 110.3, 106.5, 101.7, 97.3, 77.4, 68.2, 55.4, 55.2, 54.8, 20.5, 10.6。

[0131] FL7-8:20 (S) -7- (2-氯肉桂烯基) -10,11-亚甲二氧基喜树碱:7-8的制备和纯化方法如关于合成和纯化7-5所述,使用(4S) -4-乙基-7,8-二氢-4-羟基-1H-吡喃并[3,4-f]呋啉-3,6,10 (4H) -三酮和6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基-2-氯查耳酮。所得物为250mg浅黄色固体(62%)。mp 209-212℃。

[0132] ^1H NMR (CF₃COOD, 600MHz) δ : 7.58 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.34 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 7.11 (d, $J=6.8\text{Hz}$, 1H), 7.02 (s, 1H), 6.73 (s, 3H), 6.27 (s, 2H), 5.95 (s, 2H), 5.66 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 2.01 (m, 2H), 0.90 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H)。 ^{13}C NMR (CF₃COOD, 150MHz) δ : 176.6, 161.4, 159.7, 154.3, 153.5, 151.4, 148.9, 144.4, 142.7, 141.2, 136.5, 133.1, 131.3, 130.2, 128.6, 128.4, 123.9, 120.1, 107.5, 106.7, 104.5, 99.2, 77.2, 68.1, 54.8, 33.4, 8.4。

[0133] FL7-9:20 (S) -7- (3,4-亚甲基二氧基-肉桂基) -10,11-亚甲基二氧基-喜树碱:如用于合成和纯化7-5所述的那样制备和纯化:7-9。使用(4S) -4-乙基-7,8-二氢-4-羟基-1H-吡喃并[3,4-f]呋啉-3,6,10 (4H) -三酮和6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基-3,4-亚甲基二氧基查耳酮。所得物为150mg浅黄色固体(36%)。mp 177℃。

[0134] ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600MHz) δ : 7.53 (d, $J=4.38\text{Hz}$, 2H), 7.50 (d, $J=7.68\text{Hz}$, 3H), 7.21 (d, $J=2.76\text{Hz}$, 1H), 7.13 (d, $J=7.68\text{Hz}$, 2H), 6.36 (t, $J=8.28\text{Hz}$, 2H), 6.21 (s, 2H), 5.39 (s, 2H), 4.76 (s, 2H), 2.29 (m, 2H), 1.08 (t, $J=7.38\text{Hz}$, 3H)。 ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150MHz) δ : 167.7, 154.6, 152.2, 151.1, 149.0, 148.8, 145.7, 139.0, 138.6, 128.7, 126.0, 125.8, 124.1, 115.9, 109.6, 108.6, 104.2, 103.7, 102.9, 99.1, 98.1, 76.2, 68.6, 54.8, 21.3, 8.3。

[0135] FL7-10:制备20 (S) -7- (3,4,5-三甲氧基-肉桂基) -10,11-亚甲基二氧基喜树碱:7-10,并如关于7-的合成和纯化所述进行纯化。5使用(4S) -4-乙基-7,8-二氢-4-羟基-1H-吡喃并[3,4-f]呋啉-3,6,10 (4H) -三酮和6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基-3,4,5-三甲氧基查耳酮。所得物为200mg浅黄色固体(45%)。mp 167℃。

[0136] ^1H NMR (DMSO- d_6 , 600MHz) δ : 7.44 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.15 (s, 2H), 6.64 (s, 1H), 6.37 (t, $J=8.21\text{Hz}$, 2H), 6.21 (s, 2H), 5.39 (s, 2H), 4.76 (s, 2H), 3.91 (s, 6H), 3.74 (s, 3H), 1.85 (m, 2H), 0.89 (t, $J=7.38\text{Hz}$, 3H)。 ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150MHz) δ : 172.3, 159.3, 158.9, 158.4, 156.2, 152.9, 151.5, 149.5, 145.8, 141.3, 140.6, 139.1, 135.9, 133.1, 128.8, 122.3, 121.6, 118.6, 105.9, 105.3, 104.9, 102.1, 100.1, 97.4, 77.3, 68.6, 59.9, 56.2, 56.0, 50.3, 30.4, 7.5。

[0137] FL7-12:20 (S) -7- (4-甲氧基-肉桂基) -10,11-亚甲基二氧基喜树碱:如用于合成和纯化7-5所述,使用(4S) 所述制备和纯化) -4-乙基-7,8-二氢-4-羟基-1H-吡喃并[3,4-f]呋啉-3,6,10 (4H) -三酮和6'-氨基-3',4'-亚甲二氧基-4-甲氧基查耳酮。所得物为250mg浅黄色固体(62%)。mp 203-205℃。

[0138] ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 600MHz) δ : 7.88 (d, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 7.52 (s, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.21 (d, $J=8.22\text{Hz}$, 2H), 7.12 (d, $J=6.9\text{Hz}$, 2H), 7.08 (s, 1H), 6.33 (s, 2H), 5.39 (s, 2H), 4.76 (s, 2H), 3.88 (s, 3H), 2.28 (m, 2H), 0.93 (t, $J=7.68\text{Hz}$, 3H)。 ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 150MHz) δ : 174.5, 162.7, 160.5, 159.3, 154.2, 151.9, 148.5, 139.0, 138.3, 135.8, 131.2, 130.9, 130.4, 128.7, 126.0, 124.4, 116.5, 115.4, 103.9, 103.7, 99.5, 98.1, 76.8, 67.7, 56.2, 54.3, 21.3, 7.9。

[0139] 用苯乙基在第7位上制备FL118平台衍生物(示例性):

[0140] 步骤1: 制备6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基二氢查耳酮:

[0141] 将6-氨基-3,4-亚甲基二氧基查尔酮(0.30g, 1.1mmol)溶解在乙酸乙酯(25mL)中, 并加入催化量的Pd/C。混合物在氢气氛下反应10小时。滤出催化剂, 并将滤液浓缩。所得物为0.26g浅黄色固体(87%)。mp 103-104°C。

[0142] ^1H NMR (CDCl_3 , 600MHz) δ : 7.45 (s, 1H, ArH), 6.62 (d, $J=6.4\text{Hz}$, 2H, ArH), 6.35 (d, $J=6.4\text{Hz}$, 2H, ArH), 6.31 (s, 1H, ArH), 6.28 (s, 1H, ArH), 6.20 (brs, 2H, NH_2), 6.07 (s, 2H, OCH₂O), 2.69 (t, $J=4.7\text{Hz}$, 2H, ArCOCH₂), 2.67 (t, $J=4.7\text{Hz}$, 2H, CH₂Ar)。

[0143] 6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基-4-溴二氢查耳酮的制备方法与6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基二氢查耳酮的制备方法相同。6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基-4-溴查尔酮; 6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基-3,4-二甲氧基-二氢查尔酮的制备方法与6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基二氢查尔酮的制备方法相同, 所不同的是试剂为6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基-3,4-二甲氧基查尔酮; 6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基-2-氯-二氢查尔酮的制备方法与6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基二氢查尔酮的制备方法相同, 所不同的是试剂为6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基-2-氯查耳酮; 6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基-3,4-亚甲基二氧基-二氢查尔酮的制备方法与6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基二氢查尔酮的制备方法相同。6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基-3,4-亚甲基二氧基查尔酮的制备方法; 6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基-3,4,5-三甲氧基二氢查耳酮的制备方法与6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基二氢查耳酮的制备方法相同。6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基-3,4,5-三甲氧基查尔酮; 6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基-4-甲氧基二氢查耳酮的制备方法与6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基二氢查耳酮的制备方法相同, 只是试剂为6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基-4-甲氧基查耳酮。

[0144] 步骤2: 在第7位用苯乙基制备FL118平台衍生物:

[0145] FL7-14:20 (S)-7-苯乙基-10,11-亚甲基二氧基喜树碱: (4S)-4-乙基-7,8-二氢-4-羟基-1H-吡喃并[3,4-f]吡啶3,6,10(4H)-三酮(200mg, 0.76mmol)溶于无水甲苯(70mL)中。加入6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基二氢查耳酮(0.37g, 1.37mmol)和对甲苯磺酸(26.2mg, 0.15mmol)。该混合物在110°C下在氮气氛下反应24小时。将混合物冷却, 并在减压下除去溶剂。化合物通过柱色谱法纯化(二氯甲烷: 甲醇=97:3), 得到280mg浅黄色固体(75%)。mp 220-223°C。

[0146] ^1H NMR (CF_3COOD , 600MHz) δ : 7.93 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.09 (s, 3H), 6.89 (s, 2H), 6.31 (s, 2H), 5.76 (d, $J=17.1\text{Hz}$, 1H), 5.42 (d, $J=17.04\text{Hz}$, 1H), 4.75 (dd, $J=19.2\text{Hz}$, $J=18.66\text{Hz}$, 2H), 3.58 (d, $J=20.34\text{Hz}$, 2H), 3.18 (s, 2H), 1.99 (m, 2H), 0.99 (t, $J=7.68\text{Hz}$, 3H)。 ^{13}C NMR (CF_3COOD , 150MHz) δ : 176.2, 157.8, 157.6, 154.9, 152.9, 151.3, 149.7, 139.6, 139.3, 138.6, 129.7, 128.8, 128.5, 128.1, 127.7, 127.2, 121.7, 105.1,

103.8, 100.2, 97.5, 73.8, 66.2, 51.2, 35.1, 33.7, 31.0, 5.8。

[0147] FL7-17:20 (S) -7- (4-溴-苯乙基) -10,11-亚甲二氧基喜树碱:如用于制备和纯化7-14所述的方法,使用(1)制备和纯化7-17。(4S) -4-乙基-7,8-二氢-4-羟基-1H-吡喃并[3,4-f]吡啶-3,6,10(4H) -三酮和6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基-4-溴-二氢查耳酮。所得物为300mg浅黄色固体(68%)。mp 240-243℃。

[0148] ¹H NMR (DMSO-d₆, 600MHz) δ: 7.59 (s, 1H), 7.46 (s, 2H), 7.23 (m, 3H), 7.12 (s, 1H), 6.28 (s, 2H), 5.39 (s, 2H), 4.82 (dd, J=18.66Hz, J=10.98Hz, 2H), 2.94 (s, 2H), 2.28 (s, 2H), 1.86 (m, 2H), 0.87 (t, J=7.2Hz, 3H)。¹³C NMR (DMSO-d₆, 150MHz) δ: 173.1, 157.2, 151.5, 150.6, 149.6, 147.4, 146.6, 146.1, 142.5, 141.4, 138.3, 129.2, 128.8, 128.7, 126.8, 126.1, 124.7, 118.6, 105.8, 103.2, 100.0, 96.6, 72.9, 65.7, 49.9, 35.2, 30.8, 21.4, 8.3。

[0149] FL7-16:20 (S) -7- (3,4-二甲氧基苯乙基) -10,11-亚甲基二氧基喜树碱:如用于7-14的合成和纯化的描述,制备和纯化7-16。(4S) -4-乙基-7,8-二氢-4-羟基-1H-吡喃并[3,4-f]吡啶-3,6,10(4H) -三酮和6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基-3,4-二甲氧基-二氢查耳酮。所得物为270mg浅黄色固体(64%)。mp 165-168℃。

[0150] ¹H NMR (DMSO-d₆, 600MHz) δ: 7.66 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.77 (s, 2H), 6.55 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.12 (s, 2H), 5.44 (s, 2H), 4.95 (s, 2H), 3.68 (s, 6H), 3.58 (t, J=7.14Hz, 2H), 2.93 (t, J=7.14Hz, 2H), 1.91 (m, 2H), 0.93 (t, J=7.68Hz, 3H)。¹³C NMR (DMSO-d₆, 150MHz) δ: 173.1, 157.3, 153.2, 153.1, 151.4, 150.6, 149.7, 149.4, 147.7, 146.8, 142.2, 136.9, 136.6, 128.4, 124.9, 118.5, 106.7, 105.9, 105.5, 103.1, 100.2, 96.4, 72.9, 65.7, 56.3, 56.1, 50.1, 35.6, 31.8, 30.8, 8.3。

[0151] FL7-15:20 (S) -7- (2-氯-苯乙基) -10,11-亚甲基二氧基喜树碱:如用于合成和纯化7-14所述的方法,使用(4S) -4-乙基-7,8-二氢-4-羟基-1H-吡喃并[3,4-f]吡啶-3,6,10(4H) -三酮和6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基-2-氯-二氢查耳酮。所得物为270mg浅黄色固体(67%)。mp 183-186℃。

[0152] ¹H NMR (DMSO-d₆, 600MHz) δ: 7.48 (d, J=8.28Hz, 3H), 7.28 (s, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.12 (d, J=7.68Hz, 2H), 6.39 (s, 1H), 6.29 (s, 1H), 5.40 (s, 2H), 4.98 (d, J=10.98Hz, 2H), 2.28 (s, 4H), 1.82 (m, 2H), 0.86 (t, J=7.14Hz, 3H)。¹³C NMR (DMSO-d₆, 150MHz) δ: 175.2, 157.2, 151.5, 150.3, 148.2, 147.1, 146.6, 146.4, 142.5, 140.7, 138.3, 129.3, 128.8, 128.6, 126.8, 126.2, 124.7, 118.6, 105.8, 102.5, 100.1, 97.6, 72.9, 65.7, 49.9, 35.2, 30.7, 22.4, 8.3。

[0153] FL7-11:20 (S) -7- (3,4-亚甲基二氧基-苯乙基) -10,11-亚甲基二氧基-喜树碱:如关于7-14的合成和纯化所述制备和纯化。使用(4S) -4-乙基-7,8-二氢-4-羟基-1H-吡喃并[3,4-f]吡啶-3,6,10(4H) -三酮和6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基-3,4-亚甲基二氧基-二氢查耳酮。所得物为140mg浅黄色固体(31%)。mp 155-157℃。

[0154] ¹H NMR (DMSO-d₆, 600MHz) δ: 7.66 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.55 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.32 (s, 2H), 5.44 (s, 2H), 4.95 (s, 2H), 3.68 (s, 9H), 3.58 (t, J=7.14Hz, 2H), 2.93 (t, J=7.14Hz, 2H), 1.91 (m, 2H), 0.93 (t, J=7.68Hz, 3H)。¹³C NMR (DMSO-d₆, 150MHz) δ: 173.1, 157.3, 153.2, 153.1, 151.4, 150.6, 149.7, 149.4, 147.7, 146.8, 142.2, 136.9,

136.6, 128.4, 124.9, 118.5, 106.7, 105.9, 105.5, 103.1, 100.2, 96.4, 72.9, 65.7, 60.5, 56.3, 56.1, 50.1, 35.6, 31.8, 30.8, 8.3。

[0155] FL7-13:20 (S) -7-(4-甲氧基-苯乙基)-10,11-亚甲二氧基喜树碱:7-13被制备和纯化,如关于合成和纯化7-14所述,使用(4S)-4-乙基-7,8-二氢-4-羟基-1H-吡喃并[3,4-f]吡啶-3,6,10(4H)-三酮和6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基-4-甲氧基-二氢查耳酮。所得物为160mg浅黄色固体(41%)。mp 172-175℃。

[0156] ¹H NMR (DMSO-d₆, 600MHz) δ: 7.49 (d, J=7.74Hz, 2H), 7.41 (s, 1H), 7.21 (s, 1H), 7.13 (d, J=7.14Hz, 2H), 6.81 (d, J=7.68Hz, 1H), 6.27 (s, 2H), 5.39 (s, 2H), 4.76 (s, 2H), 3.68 (s, 3H), 2.83 (s, 2H), 2.28 (s, 2H), 1.86 (m, 2H), 0.89 (t, J=6.06Hz, 3H)。¹³C NMR (DMSO-d₆, 150MHz) δ: 173.0, 158.3, 157.2, 151.6, 150.5, 149.1, 146.9, 145.8, 142.8, 138.4, 133.2, 130.1, 128.6, 128.0, 126.0, 124.6, 118.7, 114.2, 105.4, 103.3, 99.9, 96.8, 72.9, 65.8, 55.5, 49.9, 34.3, 30.8, 21.3, 8.3。

[0157] 在FL118平台第7位上制备具有杂环乙基的衍生物(示例性):

[0158] 步骤1:6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基-吗啉基乙基二苯甲酮的制备是将3,4-亚甲基二氧基苯乙酮(8.1g, 49.3mmol)溶解于硝基甲烷(80mL)和浓硝酸(20.7mL)中(滴加1小时)。使混合物反应2小时,然后滴加饱和碳酸氢钠溶液,使pH达到约7。将混合物用二氯甲烷萃取3次,合并有机层,用盐水洗涤,用无水MgSO₄干燥,浓缩,所得黄色油状物通过柱色谱法纯化(乙酸乙酯:石油醚=1:8),得到7.8g浅黄色固体(76%),熔点110-112℃;

[0159] 将6-硝基-3,4-亚甲基二氧基苯乙酮(7.8g, 37.3mmol)溶解在DMF-DMA中,混合物在110℃下反应2小时,然后冷却至室温。加入己烷,黄色固体沉淀。过滤并得到9.4g滤饼(95%)。

[0160] 将获得的固体(9.4g, 35.6mmol)溶解在二恶烷(60mL)和吗啉(3.6mL, 36mmol)中。将混合物加热至回流6小时。减压除去溶剂,得到黄色油。化合物通过柱色谱法纯化(石油醚:乙酸乙酯=1:2),得到8.7g浅黄色固体(80%)。

[0161] 将得到的化合物(8.0g, 26.1mmol)溶解在乙酸(20mL)中,并将混合物冷却至0℃。加入硼氢化钠(493.1mg, 13.1mmol)。减压除去溶剂,并通过柱色谱法(石油醚:乙酸乙酯=1:2)纯化化合物。结果为5.6g浅黄色固体(70%)。

[0162] 将得到的化合物(5.6g, 18.19mmol)溶解在乙酸乙酯(70mL)中,并加入催化量的Pd/C。混合物在氢气氛围下反应12小时。滤出催化剂,并将滤液浓缩。结果为4.3g浅黄色固体(90%)。

[0163] ¹H NMR (500MHz, DMSO) δ: 7.34 (s, 2H), 7.24 (s, 1H), 6.29 (s, 1H), 5.92 (s, 2H), 3.57-3.50 (m, 2H), 2.94 (t, J=7.4Hz, 2H), 2.57 (t, J=7.3Hz, 2H), 2.37 (s, 4H)。

[0164] 6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基-硫代吗啉基乙基二苯甲酮的制备与6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基-吗啉基乙基二苯甲酮的制备相同,所不同的是试剂是硫吗啉;6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基-(2-甲基)哌啶基乙基二苯甲酮的制备方法与6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基-吗啉基乙基二苯甲酮的制备方法相同是2-甲基哌啶。

[0165] 步骤2:在第7位制备带有杂环乙基的FL118平台衍生物:

[0166] FL7N-1:20 (S) -7-吗啉基乙基-10,11-亚甲基二氧基喜树碱:(4S)-4-乙基-7,8-二氢-4-羟基-1H-吡喃并[3,4-f]吡啶-3,6,10(4H)-三酮(200mg, 0.76mmol)溶于无水甲苯

(70mL), 6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基-吗啉基乙基二苯甲酮(0.38g, 1.37mmol)) 并加入对甲苯磺酸(26.2mg, 0.15mmol)。混合物在110℃下在氮气氛围下反应24小时。将混合物冷却, 并在减压下除去溶剂。化合物通过柱色谱法纯化(二氯甲烷: 甲醇=97:3), 得到150mg浅黄色固体(40%)。mp>250℃。

[0167] ^1H NMR (CF_3COOD , 600MHz) δ : 7.26 (s, 1H), 6.98 (s, 1H), 6.74 (s, 1H), 5.9 (s, 2H), 4.76 (d, 1H), 4.74 (d, 1H), 4.22 (s, 2H), 3.67 (m, 4H), 2.69 (d, 2H), 2.65 (d, 2H), 2.37 (d, 4H), 1.87 (m, 2H), 0.96 (t, 3H)。 ^{13}C NMR (CF_3COOD , 150MHz) δ : 178.6, 159.4, 157.7, 156.9, 151.7, 149.4, 145.8, 141.4, 139.2, 126.2, 123.5, 120.9, 108.3, 102.2, 101.5, 101.4, 73.0, 66.8, 58.1, 55.5, 53.7, 45.6, 30.2, 28.5, 28.4, 26.2, 5.6。

[0168] FL7N-3:20 (S)-7-硫代吗啉基乙基-10,11-亚甲基二氧基喜树碱: 如使用(4S)-4-乙基-7,8-二氢-4-羟基-1H-吡喃并[3,4-f]吡啶-3,6,10(4H)-三酮和6'-氨基-3',4'-亚甲基二氧基-硫代吗啉基乙基二苯甲酮来制备和纯化7-28所述来制备和纯化7N-3。得到170mg浅黄色固体(45%)。mp>250℃。

[0169] ^1H NMR (CF_3COOD , 600MHz) δ : 7.26 (s, 1H), 6.98 (s, 1H), 6.74 (s, 1H), 5.9 (s, 2H), 4.76 (d, 1H), 4.74 (d, 1H), 4.22 (s, 2H), 2.73 (m, 4H), 2.69 (d, 2H), 2.65 (d, 2H), 2.54 (d, 4H), 1.87 (m, 2H), 0.96 (t, 3H)。 ^{13}C NMR (CF_3COOD , 150MHz) δ : 172.6, 159.4, 157.7, 156.9, 151.7, 149.4, 145.8, 141.4, 139.2, 126.2, 123.5, 120.9, 108.3, 102.2, 101.5, 101.4, 73.0, 65.1, 58.3, 58.1, 55.5, 45.6, 30.2, 28.5, 28.4, 26.2, 5.6。

[0170] 在FL118平台第7位上制备具有芳基或杂芳基的衍生物(示例性):

[0171] 步骤1: 20 (S)-O-乙酰基-FL118 (10,11-亚甲基二氧基-喜树碱): 将10,11-亚甲基二氧基-喜树碱(0.23g, 0.58mmol) 加入无水乙酸(6mL) 和吡啶(4mL), 且混合物反应48小时。将该混合物倒入25mL己烷中, 并沉淀出固体。将混合物过滤并将滤饼用己烷洗涤。结果为240mg黄色固体(95%)。mp>250℃。

[0172] 步骤2: 20 (S)-O-乙酰基-7-氯-FL118 (10,11-亚甲基二氧基喜树碱):

[0173] 将30%的过氧化氢溶液(3.2mL, 28mmol) 加入到20 (S)-O-乙酰基-10,11-亚甲基二氧基喜树碱(0.24g, 0.55mmol) 和乙酸(20mL) 的混合物中。混合物在75℃下反应3小时。将混合物冷却, 并在减压下除去溶剂。得到210mg黄色固体(85%)。在0℃下, 将草酰氯(0.1mL, 1.1mmol) 加入该化合物的混合物中, 得到(0.21g, 0.47mmol) 的DMF(20mL) 溶液。混合物在15℃下反应3小时。将混合物倒入冰水(50mL) 中, 并用二氯甲烷萃取3次。合并有机层, 用无水 MgSO_4 干燥并浓缩。然后通过柱色谱法纯化(二氯甲烷: 甲醇=100:1), 得到0.16g黄色固体(75%)。mp>250℃。

[0174] ^1H NMR (CF_3COOD , 600MHz) δ : 7.42 (s, 1H), 7.36 (s, 1H), 6.74 (s, 1H), 5.9 (s, 2H), 4.76 (d, 1H), 4.74 (d, 1H), 4.22 (s, 2H), 2.01 (s, 3H), 1.96 (m, 2H), 0.96 (t, 3H)。 ^{13}C NMR (CF_3COOD , 150MHz) δ : 172.5, 170.6, 162.8, 158.1, 157.0, 150.9, 149.9, 145.5, 142.4, 136.9, 125.7, 122.7, 108.3, 102.7, 101.6, 101.2, 76.0, 65.5, 42.1, 27.0, 21.1, 21.1。

[0175] 步骤3: 20 (S)-O-乙酰基-7-(吡啶基-4-)-FL118 (10,11-亚甲基二氧基喜树碱):

[0176] 在10mL微波反应管中, 加入20 (S)-O-乙酰基-7-氯-10,11-亚甲基二氧基喜树碱(0.47g, 1mmol), 吡啶基-4-硼酸(0.18g, 1.5mmol) 依次加入氟化铯(0.30g, 2.0mmol), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.11g, 0.1mmol) 和二恶烷(5mL)。混合物在微波下于120℃反应30分钟。将混合物

冷却并减压除去溶剂。然后通过柱色谱法纯化(二氯甲烷:丙酮=30:1),得到0.43g黄色固体(85%)。mp>250℃。

[0177] W-b1:20(S)-7-(吡啶基-4-)-FL118(10,11-亚甲基二氧基喜树碱):20(S)-O-乙酰基-7-(吡啶基-4-)-将10,11-亚甲基二氧基喜树碱(0.43g,0.84mmol)溶于甲醇(20mL)中,加入甲醇钠(0.09g,1.68mmol),在室温下反应12小时,调节pH至pH=7.0,减压除去溶剂,然后用柱色谱法纯化(二氯甲烷:丙酮=30:1),得到0.39g黄色固体(83%),mp>250℃。

[0178] ^1H NMR(CF₃COOD,600MHz) δ :8.91(d,J=5.8Hz,2H),8.32(d,J=8.6Hz,1H),7.87(t,J=7.7Hz,1H),7.79-7.70(m,2H),7.63(t,J=7.7Hz,1H),7.41(d,J=5.7Hz,2H),6.11(s,2H),5.73(d,J=16.4Hz,1H),5.30(d,J=16.4Hz,1H),5.11(s,2H),3.72(s,1H),2.02-1.80(m,2H),1.06(t,J=7.4Hz,3H)。 ^{13}C NMR(CF₃COOD,150MHz) δ :172.5,159.7,157.3,157.0,151.6,149.9,149.8,149.6,145.5,144.5,142.7,141.9,123.9,121.6,121.2,120.0,108.1,106.3,101.6,101.2,73.0,65.8,44.6,30.3,5.6。

[0179] 在FL118平台第7位上用苯基制备衍生物(示例性):

[0180] 步骤1:1-(3,5-二甲基苯甲酰基)-3,4-亚甲基二氧基-6-硝基苯的制备:

[0181] 6-硝基吡啶(194.3mg,1mmol),氯化钯(8.87mg,0.05mmol),三(1-萘基)膦(20.6mg,0.05mmol), (3,5-二甲基苯基)硼酸(2.0mmol),K₂CO₃(414mg,3mmol)和THF(5ml)的混合物在65℃下将加热至回流24小时。反应后,将混合物浓缩至干,加入二氯甲烷,然后过滤。在室温下将重铬酸吡啶鎓(564.3mg,1.5mmol)加入到滤液中。(25℃)。将混合物在室温搅拌。持续24小时。过滤并将滤液浓缩至干。通过柱色谱法(乙酸乙酯:石油醚=1:9)纯化得到的黑色固体,得到278mg黄色固体(75%)。

[0182] ^1H NMR(500MHz,CDC13) δ :7.70(s,1H),7.59(m,2H),7.50(s,1H),7.05(s,1H),6.26(s,2H),2.45(s,6H)。

[0183] 1-(4-异丙基苯甲酰基)-3,4-亚甲基二氧基-6-硝基苯的制备方法与1-(3,5-二甲基苯甲酰基)-3,4-亚甲基二氧基-6-硝基苯的制备方法相同,不同的是试剂是2-溴-6-硝基吡啶和4-异丙基苯基硼酸。1-(4-丁基苯甲酰基)-3,4-亚甲基二氧基-6-硝基苯的制备方法与1-(3,5-二甲基苯甲酰基)-3,4-亚甲基二氧基-6-硝基苯的制备方法相同。试剂为2-溴-6-硝基吡啶和4-丁基苯基硼酸。1-(4-乙氧基苯甲酰基)-3,4-亚甲基二氧基-6-硝基苯的制备方法与1-(3,5-二甲基苯甲酰基)-3,4-亚甲基二氧基-6-硝基苯的制备方法相同。试剂为2-溴-6-硝基吡啶和4-乙氧基苯基硼酸。

[0184] 步骤2:1-(3,5-二甲基苯甲酰基)-3,4-亚甲基二氧基-6-氨基苯的制备:

[0185] 将1-(3,5-二甲基苯甲酰基)-3,4-亚甲基二氧基-6-硝基苯(224mg,0.75mmol)溶解在甲醇(50mL)中,并加入催化量的Pd/C。混合物在氢气氛围下反应24小时。滤出催化剂,并将滤液浓缩。结果为190mg浅黄色固体(85%)。

[0186] ^1H NMR(500MHz,CDC13) δ :7.41(m,2H),7.38(m,1H),6.94(m,1H),6.49(s,2H),6.24(s,1H),5.93(s,2H),2.44(s,6H)。

[0187] 1-(4-异丙基苯甲酰基)-3,4-亚甲基二氧基-6-氨基苯的制备方法与1-(3,5-二甲基苯甲酰基)-3,4-亚甲基二氧基-6-氨基苯的制备方法相同,不同的是试剂是1-(4-异丙基苯甲酰基)-3,4-亚甲基二氧基-6-硝基苯。1-(4-丁基苯甲酰基)-3,4-亚甲基二氧基-6-氨基苯的制备方法与1-(3,5-二甲基苯甲酰基)-3,4-亚甲基二氧基-6-氨基苯的制备方法相

同,试剂是1-(4-丁基苯甲酰基)-3,4-亚甲基二氧基-6-硝基苯。1-(4-乙氧基苯甲酰基)-3,4-亚甲基二氧基-6-氨基苯的制备方法与1-(3,5-二甲基苯甲酰基)-3,4-亚甲基二氧基-6-氨基苯的制备方法相同,试剂为1-(4-乙氧基苯甲酰基)-3,4-亚甲基二氧基-6-硝基苯。

[0188] 步骤3:制备FL118(10,11-亚甲基二氧基喜树碱)第7位为苯基的衍生物:

[0189] FL7Q-12: (20s)-7-(3,5-二甲基苯基)-10,11-亚甲基二氧基喜树碱: (4S)-4-乙基-7,8-二氢-4-羟基-1H-吡喃[将3,4-f]吲哚啉-3,6,10(4H)-三酮(100mg,0.38mmol)溶解在无水甲苯(40mL)中。加入1-(3,5-二甲基苯甲酰基)-3,4-亚甲基二氧基-6-硝基苯(135mg,0.5mmol)和对甲苯磺酸(13mg,0.075mmol)。该混合物在110℃下在氮气氛下反应24h。将混合物冷却,并在减压下除去溶剂。化合物通过柱色谱法纯化(二氯甲烷:甲醇=97:3),得到38mg浅黄色固体(25%)。

[0190] ¹H NMR(600MHz) δ: 7.65(s,1H), 7.57(s,1H), 7.20(s,1H), 7.09(s,1H), 7.04(s,1H), 7.01(s,1H), 6.17(q, J=1.2Hz, 2H), 5.73(d, J=16.1Hz, 1H), 5.30(d, J=16.1Hz, 1H), 5.03(m, 2H), 3.79(s,1H), 2.45(d, J=1.4Hz, 6H), 1.90(m, 2H), 1.06(t, J=7.4Hz, 3H)。¹³C NMR(151MHz, CDCl₃) δ: 174.01, 157.59, 151.35, 150.12, 149.51, 149.14, 148.17, 147.26, 143.35, 138.92, 134.77, 130.80, 126.37, 126.26, 124.81, 117.61, 105.83, 102.29, 101.72.79, 66.38, 50.23, 31.54, 21.45, 7.85。

[0191] FL7Q-1: (20s)-7-(4-异丙基苯基)-10,11-亚甲基二氧基喜树碱: 如7Q-12所描述的制备和纯化相同,使用(4S)-4-乙基-7,8-二氢-4-羟基-1H-吡喃并[3,4-f]吲哚并啉-3,6,10(4H)-三烯酮和1-(4-异丙基苯甲酰基)-3,4-亚甲基二氧基-6-氨基苯制备和纯化7Q-1。结果为58mg浅黄色固体(30%)。

[0192] ¹H NMR(600MHz) δ: 7.64(s,1H), 7.56(s,1H), 7.45(m, 2H), 7.40(s,1H), 7.34(d, J=7.7Hz, 1H), 7.09(s,1H), 6.16(d, J=2.2Hz, 2H), 5.72(d, J=16.1Hz, 1H), 5.29(d, J=16.1Hz, 1H), 5.04(m, 2H), 3.81(s,1H), 2.82(q, J=7.6Hz, 2H), 1.90(m, 2H), 1.39(t, J=7.6Hz, 3H), 1.05(t, J=7.3Hz, 3H)。¹³C NMR(151MHz, CDCl₃) δ: 173.91, 157.52, 151.33, 150.13, 149.49, 149.16, 148.15, 147.17, 145.50, 143.07, 132.06, 128.89, 128.75, 126.51, 124.79, 117.67, 105.83, 102.34, 101.72.76, 66.35, 50.26, 31.56, 28.78, 15.47, 7.87。

[0193] FL7Q-2: (20s)-7-(4-丁基苯基)-10,11-亚甲基二氧基喜树碱: 如7Q-12所描述的制备和纯化相同,使用(4S)-4-乙基-7,8-二氢-4-羟基-1H-吡喃并[3,4-f]吲哚啉-3,6,10(4H)-三烯酮和1-(4-丁基苯甲酰基)-3,4-亚甲基二氧基-6-氨基苯制备和纯化7Q-2。结果是70mg浅黄色固体(35%)。

[0194] ¹H NMR(600MHz) δ: 7.58(s,1H), 7.51(s,1H), 7.41(m, 3H), 7.33(d, J=7.8Hz, 1H), 7.07(s,1H), 6.15(s, 2H), 5.72(d, J=16.1Hz, 1H), 5.28(d, J=16.1Hz, 1H), 5.02(m, 2H), 3.83(s,1H), 2.77(t, J=7.8Hz, 2H), 1.88(m, 2H), 1.74(m, 2H), 1.47(m, 2H), 1.04(m, 6H)。¹³C NMR(151MHz, CDCl₃) δ: 173.91, 157.52, 151.30, 150.12, 149.49, 149.14, 148.17, 147.19, 144.24, 143.05, 132.02, 129.41, 128.60, 126.47, 124.77, 117.64, 105.83, 102.30, 101.72.76, 66.34, 50.21, 35.55, 33.52, 31.55, 22.47, 14.01, 7.86。

[0195] FL7Q-4: (20s)-7-(4-乙氧基苯基)-10,11-亚甲基二氧基喜树碱: 如7Q-12所描述的制备和纯化相同,使用(4S)-4-Ethyl-7,8-dihydro-4-hydroxy-1H-pyrano[3,4-f]indolizine-3,6,10(4H)-trioneana和1-(4-ethoxyl benzoyl)-3,4-methyldioxy-6-氨基

苯制备和纯化7Q-4。结果为67mg浅黄色固体(34%)。

[0196] ^1H NMR (600MHz) δ : 7.65 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.37 (m, 2H), 7.13 (d, $J=7.7\text{Hz}$, 3H), 6.17 (d, $J=1.6\text{Hz}$, 2H), 5.73 (d, $J=16.1\text{Hz}$, 1H), 5.30 (d, $J=16.1\text{Hz}$, 1H), 5.05 (m, 2H), 4.18 (q, $J=7.0\text{Hz}$, 2H), 3.79 (s, 1H), 2.12 (s, 2H), 1.90 (m, 2H), 1.53 (t, $J=7.0\text{Hz}$, 3H), 1.06 (t, $J=7.3\text{Hz}$, 3H)。 ^{13}C NMR (151MHz, CDCl_3) δ : 173.85, 159.66, 157.49, 151.24, 150.22, 149.36, 149.08, 148.11, 147.12, 142.74, 130.09, 126.64, 126.49, 124.83, 117.59, 115.28, 105.73, 97.31, 97.31, 72.75, 66.29, 63.75, 50.23, 31.52, 14.87, 7.83。

[0197] 合成FL118平台第9位上衍生的化合物

[0198] 在FL118平台第9位用苯基衍生的衍生物的制备(示例性):

[0199] 步骤1: 2-溴-6-硝基吡啶的制备:

[0200] 将NBS (8mmol, 1.42g) 加入到6-硝基胡椒醛 (5mmol, 1.03g) 在浓硫酸 (8mL) 中搅拌, 然后将得到的混合物在45℃加热45分钟 (min)。然后加入冰 (100g)。混合物用乙酸乙酯萃取3次。合并有机层, 用盐水洗涤, 用无水 MgSO_4 干燥并浓缩。所得黄色固体通过柱色谱法纯化(乙酸乙酯: 石油醚=1:9), 得到1.23g黄色固体 (90%)。

[0201] ^1H NMR (500MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.13 (s, 1H), 6.36 (s, 1H), 6.30 (s, 2H)。

[0202] 步骤2: 2-(4-乙基苯基)-6-硝基胡椒醛的制备:

[0203] 将2-溴-6-硝基吡啶 (1mmol, 274mg), 4-乙基苯基硼酸 (1.2mmol), $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (0.1mmol, 40mg), K_2CO_3 (2mmol, 276毫克), 甲苯 (5毫升) 在120℃加热回流8小时。然后加入水 (25ml)。将混合物用二氯甲烷萃取3次。合并有机层, 用盐水洗涤, 用无水 MgSO_4 干燥并浓缩。所得黄色固体通过柱色谱法纯化(乙酸乙酯: 石油醚=1:9), 得到195mg黄色固体 (65%)。

[0204] ^1H NMR (500MHz, 氯仿- d) δ : 10.11 (s, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.29 (m, 3H), 6.19 (s, 2H), 2.73 (m, 2H), 1.28 (m, 3H)。

[0205] 2-(4-异丙基苯基)-6-硝基胡椒醛的制备方法与2-(4-乙基苯基)-6-硝基胡椒醛的制备方法相同, 不同之处在于试剂为2-溴-6-硝基酚。2-(4-丁基苯基)-6-硝基胡椒醛的制备工艺与2-(4-乙基苯基)-6-硝基胡椒醛的制备方法相同, 所不同的是试剂为2-溴-6-硝基吡啶和2-溴-6-4-丁基苯基硼酸; 2-(4-乙氧基苯基)-6-硝基胡椒醛的制备方法与2-(4-乙基苯基)-6-硝基胡椒醛的制备方法相同, 所不同的是试剂为2-溴-6-硝基吡啶和4-乙氧基苯基硼酸; 2-(4-丙基苯基)-6-硝基胡椒醛的制备方法与2-(4-乙基苯基)-6-硝基胡椒醛的制备方法相同, 所不同的是试剂为2-溴-6-硝基吡啶和4-丙基苯基硼酸; 2-(3-乙氧基苯基)-6-硝基胡椒醛的制备方法与2-(4-乙基苯基)-6-硝基胡椒醛的制备方法相同, 所不同的是试剂为2-溴-6-硝基胡椒醛和3-乙氧基苯基硼酸;

[0206] 步骤3: 2-(4-乙基苯基)-6-氨基胡椒醛的制备:

[0207] 将2-(4-乙基苯基)-6-硝基胡椒醛 (195mg, 0.65mmol) 溶解在甲醇 (70mL) 中, 并加入催化量的 Pd/C 。混合物在氢气氛下反应24小时。滤出催化剂, 并将滤液浓缩。所得物为146mg浅黄色固体 (83%)。

[0208] ^1H NMR (500MHz, 氯仿- d) δ : 9.38 (s, 1H), 7.62 (s, 2H), 7.30 (s, 4H), 6.36 (s, 1H), 5.94 (s, 2H), 2.66 (m, 2H), 1.22 (m, 3H)。

[0209] 2-(4-异丙基苯基)-6-氨基胡椒醛的制备方法与2-(4-乙基苯基)-6-氨基胡椒醛

的制备方法相同,不同之处在于试剂为2-(4-异丙基苯基)-6-硝基胡椒醛;2-(4-丁基苯基)-6-氨基胡椒醛的制备方法与2-(4-乙基苯基)-6-氨基胡椒醛的制备方法相同,只是试剂为2-(4-丁基苯基)-6-硝基胡椒醛;2-(4-乙氧基苯基)-6-氨基胡椒醛的制备方法与2-(4-乙基苯基)-6-氨基胡椒醛的制备方法相同,不同之处在于试剂为2-(4-乙氧基苯基)-6-硝基胡椒醛;2-(4-丙基苯基)-6-氨基胡椒醛的制备方法与2-(4-乙基苯基)-6-氨基胡椒醛的制备方法相同,只是试剂为2-(4-丙基苯基)-6-硝基胡椒醛;2-(3-乙氧基苯基)-6-氨基胡椒醛的制备方法与2-(4-乙基苯基)-6-氨基胡椒醛的制备方法相同,不同之处在于试剂为2-(3-乙氧基苯基)-6-硝基胡椒醛;

[0210] 步骤4:制备FL118第9位为苯基的衍生物:

[0211] FL9Q6: (20s) -9-(4-乙基苯基)-FL118: (4S) -4-乙基-7,8-二氢-4-羟基-1H-吡喃[3,4-f]吡啶-3,6,10(4H)-三酮(100mg,0.38mmol)溶解在无水甲苯(40mL)中。加入2-(4-乙基苯基)-6-氨基胡椒醛(146mg,0.54mmol)和对甲苯磺酸(13.1mg,0.075mmol)。混合物在110℃下在氮气氛围下反应24小时。将混合物冷却,并在减压下除去溶剂。化合物通过柱色谱法纯化(二氯甲烷:甲醇=97:3),得到42mg浅黄色固体(21%)。

[0212] ¹H NMR (500MHz, 氯仿-d) δ: 8.27 (s, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.44 (d, J=2.7Hz, 4H), 6.20 (s, 2H), 5.74 (d, J=16.2Hz, 1H), 5.31 (d, J=16.3Hz, 1H), 5.17 (s, 2H), 3.76 (s, 1H), 2.80 (q, J=7.7Hz, 2H), 1.91 (m, 2H), 1.36 (t, J=7.6Hz, 3H), 1.06 (t, J=7.3Hz, 3H)。 ¹³C NMR (151MHz, CDCl₃) δ: 173.99, 157.69, 150.99, 150.17, 149.99, 147.98, 146.88, 146.31, 144.85, 130.30, 129.49, 128.52, 127.84, 127.33, 125.45, 117.78, 116.90, 105.20, 102.15, 72.81, 66.36, 50.20, 31.61, 28.75, 15.40, 7.86。

[0213] FL9Q1: (20s) -9-(4-异丙基苯基)-FL118: 如9Q6所描述的制备和纯化相同,使用(4S) -4-乙基-7,8-二氢-4-羟基-1H-吡喃并[3,4-f]吡啶-3,6,10(4H)-三烯酮和2-(4-异丙基苯基)-6-氨基胡椒醛制备和纯化9Q1。所得物为58mg浅黄色固体(30%)。

[0214] ¹H NMR (500MHz, Chloroform-d) δ: 8.24 (s, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.45 (m, 4H), 6.18 (s, 2H), 5.74 (d, J=16.1Hz, 1H), 5.30 (d, J=16.1Hz, 1H), 5.16 (s, 2H), 3.79 (s, 1H), 3.06 (p, J=7.0Hz, 1H), 1.89 (m, 2H), 1.37 (d, J=7.0Hz, 6H), 1.06 (t, J=7.4Hz, 3H)。 ¹³C NMR (151MHz, CDCl₃) δ: 173.90, 157.65, 150.93, 150.19, 149.93, 149.39, 147.93, 146.82, 146.25, 130.29, 129.58, 127.86, 127.31, 127.08, 125.42, 117.79, 116.90, 105.18, 102.72, 72.81, 66.30, 50.20, 34.03, 31.63, 23.96, 7.84。

[0215] FL9Q2: (20s) -9-(4-丁基苯基)-FL118: 如9Q6所描述的制备和纯化相同,使用(4S) -4-乙基-7,8-二氢-4-羟基-1H-吡喃并[3,4-f]吡啶-3,6,10(4H)-三烯酮和2-(4-丁基苯基)-6-氨基胡椒醛制备和纯化9Q2。所得物为40mg浅黄色固体(20%)。

[0216] ¹H NMR (500MHz, Chloroform-d) δ: 8.23 (s, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.42 (s, 4H), 6.18 (s, 2H), 5.74 (d, J=16.3Hz, 1H), 5.30 (d, J=16.2Hz, 1H), 5.16 (s, 2H), 3.79 (s, 1H), 2.75 (m, 2H), 1.91 (m, 2H), 1.71 (m, 2H), 1.46 (q, J=7.4Hz, 3H), 1.06 (t, J=7.3Hz, 3H), 1.00 (t, J=7.3Hz, 3H)。 ¹³C NMR (151MHz, CDCl₃) δ: 173.99, 157.68, 150.98, 150.16, 149.98, 147.97, 146.87, 146.29, 143.59, 130.23, 129.44, 129.04, 127.86, 127.32, 125.43, 117.78, 116.92, 105.72, 72.81, 66.36, 50.22, 35.56, 33.54, 31.61, 22.52, 14.02, 7.87。

[0217] FL9Q4: (20s) -9-(4-乙氧基苯基)-10,11-亚甲基二氧基喜树碱: 如9Q6所描述的制

备和纯化相同,使用(4S)-4-乙基-7,8-二氢-4-羟基-1H-吡喃并[3,4-f]呋喃-3,6,10(4H)-三烯酮和2-(4-乙氧基苯基)-6-硝基胡椒醛制备和纯化9Q4。所得物为49mg浅黄色固体(25%)。

[0218] ^1H NMR (500MHz, Chloroform- d) δ : 8.24 (s, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.42 (d, $J=8.2\text{Hz}$, 2H), 7.12 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 6.19 (s, 2H), 5.75 (d, $J=16.2\text{Hz}$, 1H), 5.31 (d, $J=16.1\text{Hz}$, 1H), 5.17 (s, 2H), 4.15 (m, 2H), 3.75 (s, 1H), 1.91 (m, 2H), 1.50 (t, $J=6.9\text{Hz}$, 3H), 1.06 (t, $J=7.4\text{Hz}$, 3H)。 ^{13}C NMR (151MHz, CDCl_3) δ : 173.99, 159.20, 157.68, 150.97, 150.15, 149.96, 147.99, 146.88, 146.34, 131.56, 127.80, 127.30, 125.58, 124.10, 117.78, 116.66, 114.95, 97.09, 72.81, 66.36, 63.65, 50.20, 31.61, 14.89, 7.86。

[0219] FL9Q5: 如9Q6所描述的制备和纯化相同,使用(4S)-4-乙基-7,8-二氢-4-羟基-1H-吡喃并[3,4-f]呋喃-3,6,10(4H)-三烯酮和2-(4-丙基苯基)-6-氨基胡椒醛制备和纯化9Q5。所得物为41mg浅黄色固体(21%)。

[0220] ^1H NMR (500MHz, Chloroform- d) δ : 8.22 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.42 (s, 4H), 6.18 (s, 2H), 5.74 (d, $J=16.2\text{Hz}$, 1H), 5.30 (d, $J=16.2\text{Hz}$, 1H), 5.16 (s, 2H), 3.79 (s, 1H), 2.73 (m, 2H), 1.91 (m, 2H), 1.77 (m, 2H), 1.05 (t, $J=7.4\text{Hz}$, 6H)。 ^{13}C NMR (151MHz, CDCl_3) δ : 174.01, 157.68, 151.02, 150.14, 149.99, 147.98, 146.88, 146.32, 143.37, 130.22, 129.50, 129.08, 127.87, 127.33, 125.45, 117.80, 116.93, 105.19, 102.35, 72.80, 66.38, 50.21, 37.95, 31.61, 24.46, 14.02, 7.86。

[0221] FL9Q7: (20s)-9-(3-乙氧基苯基)-10,11-亚甲基二氧基喜树碱: 如9Q6所描述的制备和纯化相同,使用(4S)-4-乙基-7,8-二氢-4-羟基-1H-吡喃并[3,4-f]呋喃-3,6,10(4H)-三烯酮和2-(3-乙氧基苯基)-6-氨基胡椒醛制备和纯化9Q7。所得物为58mg浅黄色固体(30%)。

[0222] ^1H NMR (500MHz, Chloroform- d) δ : 8.21 (s, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.51 (m, 2H), 7.05 (m, 3H), 6.18 (s, 2H), 5.75 (d, $J=16.1\text{Hz}$, 1H), 5.31 (d, $J=16.1\text{Hz}$, 1H), 5.16 (s, 2H), 4.12 (q, $J=7.0\text{Hz}$, 2H), 3.77 (s, 1H), 1.90 (m, 2H), 1.47 (t, $J=6.9\text{Hz}$, 3H), 1.06 (t, $J=7.4\text{Hz}$, 3H)。 ^{13}C NMR (151MHz, CDCl_3) δ : 174.04, 159.34, 157.70, 151.02, 150.13, 150.08, 147.92, 146.89, 146.27, 133.61, 130.03, 127.85, 127.39, 125.33, 122.53, 117.81, 116.84, 116.73, 114.37, 133.7, 97.34, 72.80, 66.40, 63.65, 50.21, 31.60, 14.85, 7.86。

药物组成成分

[0223] 药物组合物在先前的发明(PCT/US15/22095)有描述。在这里,我们添加了新的发明。一方面,本公开提供了药物组合物,其包含至少一种式1的化合物和一种或多种药学上可接受的载体。如上所述,本发明的组合物可以包含其他用于组合的治疗剂,并且可以例如通过使用常规或专门的固体或液体媒介物或稀释剂以及适合于以下方式的药物添加剂来配制:具体而言,在悬浮液药物形式中,(i)式1化合物的悬浮液在存在或不存在5%丙二醇(PG)的情况下,含有乙醇-羟丙基- β -环糊精(HP β CD)-化合物与盐水的复合物在口服之前稀释;(ii)可以将由乙醇-HP β CD溶液配制的式1化合物的化合物直接进行喷雾干燥过程,以获得式1-HP β CD粉末状的化合物。然后将此粉末喷射研磨,并在口服前可将喷射研磨的式1-HP β CD粉末直接稀释在含5%PG的盐水中;(iii)片剂形式制剂中的式1-HP β CD复合物粉末的化合物,该药物组合物包含填充剂/粘合剂/稀释剂(例如纤维素/纤维素衍生物,淀粉/淀粉衍

生物,乳糖),崩解剂(例如胶体硅酮,交联羧甲基纤维素钠,交联维酮),助流剂(例如磷酸氢钙,胶体二氧化硅),润滑剂(例如硬脂酸镁,硬脂酸,聚乙二醇,滑石粉),抗微生物剂/防腐剂(丙二醇,对羟基苯甲酸丙二醇酯,对羟基苯甲酸甲酯,甘油)等等,根据我们的技术以及药物制剂领域中其他众所周知的方法例如,参见Remington:The Science and Practice of Pharmacy,21st Ed.,Lippincott Williams&Wilkins(2005)。

[0224] 通常将药物组合物配制成为与其预期的给药途径相容。尽管在本发明中着重于在水悬浮液中口服施用FL118和合成FL118核心结构平台衍生的类似物,但这种水悬浮液制剂也可用于腹膜内和静脉内给药。

[0225] 用于口服的水性悬浮液形式包括不同的配方。在一种配方中,水性悬浮液包含乙醇-HP β CD-式1复合制剂的化合物的复合形式,用存在或不存在5%PG的生理盐水将其进一步稀释,然后口服。在另一种配方中,乙醇-HP β CD-式1配合物的化合物将直接进入喷雾干燥过程中,以得到HP β CD-式1配合物的化合物粉末制剂,然后进行喷射研磨使粉末颗粒尺寸 $\leq$ 37微米。然后,在给药前,可以将喷射研磨过的HP β CD-式1配合物粉末化合物溶解在含5%PG的生理盐水中。在第三种配方中,可以将喷射研磨过的HP β CD-式1配合物粉末化合物稀释在含有或不含有丙二醇(PG,1-5%),聚乙二醇(PEG)300(或PEG400)(0-5%)和羟丙基甲基纤维素(HPMC,2-5%)的生理盐水中来口服使用。

[0226] 用于口服的粉剂或片剂形式包括用环糊精(例如但羟丙基- β -环糊精)配制的前述式1化合物的无溶剂粉片剂制剂,其中制剂还包含微晶纤维素(MCC,30%-80%),玉米淀粉(0%-40%),乳糖(10%-25%),胶体二氧化硅(1%-3%),磷酸氢钙(1%-10%),硬脂酸镁(0.2%-3%),丙二醇(1%-10%)。

[0227] 为了使用于眼睛以治疗视网膜母细胞瘤或其他人类疾病,活性化合物可以是在低百分比(1-5%)的环糊精(例如 β -环糊精,羟丙基- β -环糊精,磺丁基醚- β -环糊精)在有或没有增稠剂(例如羟丙基甲基纤维素/HPMC)的情况下掺入溶剂配方中。也可以包括添加剂,例如缓冲剂,包括杀菌剂和杀真菌剂的防腐剂,例如丙二醇(PG),乙酸乙酸苯酯或硝酸苯汞,苯扎氯铵或氯己定,以及增稠剂例如羟丙基纤维素。

[0228] 本公开内容的药物组合物和方法可以进一步包括如本文所述和/或本领域已知的另外的治疗活性化合物(第二种试剂或药物),通常用于与一种或多种药物协同治疗一种或多种病理状况。包含本发明公开的式1的化合物的组合物与其他治疗剂的组合具有协同作用,以实现对本发明所述的各种疾病,病症和/或病状的治疗或预防。此类第二试剂包括但不限于来自植物或非植物的化学治疗剂和/或化学预防剂,例如姜黄素,白藜芦醇,维生素D3,异硫氰酸酯(ITC),例如异硫氰酸烯丙酯(AITC),类前列腺素,内皮素拮抗剂,细胞质激酶抑制剂,受体激酶抑制剂,内皮素受体拮抗剂(例如安布森坦,波生坦和西他森坦),PDE5(PDE-V)抑制剂(例如西地那非,他达拉非和伐地那非),钙通道阻滞剂,例如氨氯地平,非洛地平,伐普仑,地尔硫卓和薄荷醇,前列环素,曲前列环素,伊洛前列素,贝拉前列素,一氧化氮,氧气,肝素,华法林,利尿剂,地高辛,环孢菌素,例如环孢菌素A,CTLA4-Ig,抗体(例如ICAM-3,抗IL-2)受体(Anti-Tac),抗CD45RB,抗CD2,抗CD3(OKT-3),抗CD4,抗CD80,抗CD86,阻断CD40和gp39之间相互作用的试剂,例如特异于CD40和/或gp39,即CD 154,是由融合蛋白构建的m CD40和gp39(CD40lg和CD8gp39),NF- κ B功能抑制剂,例如核易位抑制剂,例如脱氧精银素(DSG),胆固醇生物合成抑制剂,例如HMG CoA还原酶抑制剂(洛伐他汀和辛伐他

汀),非甾体抗炎药(NSAID),例如布洛芬,阿司匹林,对乙酰氨基酚,来氟米特,脱氧精胰岛素,环加氧酶抑制剂(例如celecoxib),类固醇(如泼尼松龙或地塞米松),金化合物, β -激动剂(如沙丁胺醇),LABAs(如沙美特罗,白三烯)作为孟鲁司特,抗增殖剂如甲氨蝶呤,FK506(他克莫司,普罗格拉夫),霉酚酸酯,细胞毒药物如硫唑嘌呤,VP-16,依托泊苷,氟达拉滨,阿霉素,阿霉素,氨苯磺酸,喜树碱,阿糖胞苷,环阿糖胞苷,吉西他滨,,抗代谢物(例如甲氨蝶呤),拓扑异构酶抑制剂(例如喜树碱),DNA烷基化剂(例如顺铂),基那这些抑制剂例如索拉非尼,微管毒物例如紫杉醇,TNF- α 抑制剂例如tenidap,抗TNF抗体或可溶性TNF受体,羟基脲和雷帕霉素(西罗莫司或雷帕莫恩)或其衍生物。

[0229] 来自本发明的式1化合物也可以制备成药学上可接受的盐,但是应当理解为非药理学上可接受的盐也落入本发明的范围内,至少用作药理学上可接受的盐的中间体。药理学上可接受的盐的实例包括但不限于,硫酸盐,磷酸盐,甲磺酸盐,二甲磺酸盐,甲苯磺酸盐,乳酸盐,酒石酸盐,苹果酸盐,双乙酸盐,柠檬酸盐,双盐酸盐,药理学上可接受的阳离子的盐,例如钠,钾,锂,钙,镁,铵和烷基铵;药理学上可接受的无机酸的酸加成盐,例如盐酸,正磷酸,硫酸,磷酸,硝酸,碳酸,硼酸,氨基磺酸和氢溴酸;或药理学上可接受的有机酸的盐,例如乙酸,丙酸,丁酸,酒石酸,马来酸,羟基马来酸,富马酸,柠檬酸,乳酸,粘胶酸,葡萄糖酸,苯甲酸,琥珀酸,草酸,苯乙酸,甲磺酸,三卤甲磺酸,甲苯磺酸,苯磺酸,苯磺酸,磺胺酸,天冬氨酸,谷氨酸,乙二醛,硬脂酸,棕榈酸,油酸,月桂酸,泛酸,单宁,抗坏血酸,戊酸和乳清酸。胺基的盐还可以包含季铵盐,其中氨基氮原子带有合适的有机基团,例如烷基,烯基,炔基或芳烷基部分。可以通过常规方式形成盐,例如通过使化合物的游离碱形式与一种或多种当量的适当的酸在不溶于该盐的溶剂或介质中,或在诸如水的溶剂中反应而形成。在真空中或通过冷冻干燥或通过将现有盐的阴离子交换为合适的离子交换树脂上的另一种阴离子而除去。在一些实施方案中,该盐是氯化物,硫酸盐,磷酸盐,甲磺酸盐,二甲磺酸盐,甲苯磺酸盐,乳酸盐,酒石酸盐,苹果酸盐,双乙酸盐,柠檬酸盐或双盐酸盐。

[0230] 在一些实施方案中,本发明的式1的化合物以治疗有效量施用。这样的给药赋予了式1化合物将引起与临床医生所寻求的受试者的例如细胞,组织,体液相关的应答。在一些实施方案中,每天至每周施用约0.01至5mg/kg受试者体重。合适的剂量水平包括例如每天至每周0.01至5mg/kg,每天至每周0.05至1mg/kg或每天至每周0.1至0.5mg/kg或每两个周。在此范围内,在一些实施方案中,剂量是每天或每周或每两周0.05至0.2、0.2至1或1至5mg/kg。例如可以将剂量选择为在这些范围中的任何范围内的任何剂量,以对被治疗的受试者进行有效治疗和/或对症治疗。

[0231] 应当理解,任何特定受试者的具体剂量水平和剂量频率可以变化,并且取决于多种因素,包括所用式1的具体化合物的活性,代谢稳定性和作用时间,用该化合物受试者的年龄,体重,总体健康状况,性别,饮食,给药方式和时间,排泄率,药物组合,特定疾病的严重程度和接受治疗的宿主状况。

方法和用途

[0232] 本发明鉴定了关于治疗(化学治疗,放射治疗)抗治疗性因子的独特的治疗适应症,通过使用式1化合物去靶向或绕过两种或多种肿瘤抗性因子来控制癌症的治疗抗性因素而克服癌症抗治疗性。这些抗治疗性因子包括survivin,Mcl-1,XIAP,cIAP2,ATP结合盒(ABC)转运蛋白(例如ABCG2,ABCC4,MDR1,MRP1)的异常表达,缺氧诱导因子1 α (HIF-1 α),

Hdm2/HdmX (Mdm2/MdmX) 复合体中的HdmX (Mdm2) 和HdmX (MdmX), ERCC6, p53的野生型, 无效或突变以及p53相关途径。使用高级替代研究方法, 包括药物亲和柱纯化和氘标记式1化合物作为探针进行蛋白微阵列筛选, 从而实现对药物-蛋白质相互作用进行全局普查而揭示出可能的生物标记和靶蛋白。这生物标记和靶蛋白包括(但不限于) Survivin, Mcl-1, XIAP, cIAP2, ABC转运蛋白, 缺氧诱导因子1 α (HIF-1 α), Hdm2, HdmX, p53, 突变型APC和/或突变型Kras。在说明性实施方案中, ABC转运蛋白选自ABCG2, ABCC4, MDR1, MRP1, 热休克蛋白60 (HSP60), 应激70蛋白 (GRP75), ATP依赖性RNA解旋酶DDX5 (p68), 核仁RNA解旋酶2 (DDX21), 延伸因子2 (EF2), mRNA剪接前因子ATP依赖的RNA解旋酶 (DHX15), 过渡型内质网ATPase (TERA), 转铁蛋白受体蛋白 (TFR1), MAP激酶激活的蛋白激酶2 (MAPK2), 连环蛋白beta-1 (CTNB1), 早期内体抗原1 (EEA1), 鸟嘌呤核苷酸结合蛋白亚基beta-2-like 1 (GBLP), 电子转移黄素蛋白亚基 α (ETF α), 蛋白酶体激活物亚基3 (PSME3), UPF0368蛋白Cxor26 (CX026), 过氧化物酶-2 (PRDX2), 过氧化物酶-1 (PRDX1), 硫氧还蛋白依赖性过氧化物还原酶 (PRDX3), 富含丝氨酸/精氨酸的剪接因子3 (SRSF3), 蛋白酶体亚基 β 2型 (PSB2), 谷胱甘肽S-转移酶P (GSTP1), MAP/微管亲和力调节激酶3 (MARK3), DNA损伤诱导物1 (DDI1), 肿瘤蛋白D52-like 2 (TPD52L2), 钙通道, 电压依赖性, β 1亚基 (CACNB1), 可能的G蛋白偶联受体1 (GPCR1), 泛素特异性肽酶2 (USP2), 黑皮质素2受体 (MC2R), 成纤维细胞生长因子18 (FGF18), 肿瘤蛋白p53诱导蛋白3 (TP53I3), CCHC型锌指, 核酸结合蛋白 (CNBP), WD重复结构域22 (WDR22), 钾电压门控通道亚家族E成员1 (PVGCS-E-M1), 泛素结合酶E2T (推定) (UBE2T), 泛素样蛋白7 (ULP7), RNA结合基序, 单链相互作用蛋白2 (RBMS2), 细胞质酪氨酸蛋白激酶 (BMX) 和细胞周期蛋白B1相互作用蛋白1 (CCNB1IP1)。在说明性实施方案中, p53是野生型, 无效或p53突变体, 或其中规范的p53途径中存在异常, 或其任何组合。

[0233] 通过下面给出的许多实例进一步说明本发明, 这些实例不应以任何方式解释为限制性的。以下是在整个实例中使用的材料和方法的描述。

[0234] 细胞系, 细胞培养物和试剂。在这项研究中, 人结肠直肠癌细胞系 (SW620, HT29), 成视网膜细胞瘤细胞系HT-3, 人胰腺导管腺癌细胞系, PANC1, MIA PaCa2 (Mia2), BxPC3和卵巢癌细胞系SKOV3最初是从ATCC获得的; 亲代PANC1细胞系产生了表达萤光素酶的PANC1 (lucPANC1); 人类卵巢癌细胞系A2780及其对顺铂耐药的细胞系A2780CP是史蒂芬·豪威尔博士 (Steven Howell) 的礼物。所有这些细胞系均保存在DMEM或RPMI 1640培养基中, 该培养基中含有10%的胎牛血清 (FBS, 亚特兰大生物公司, 佐治亚州劳伦斯维尔), 青霉素 (100单位/毫升) 和链霉素 (0.1微克/毫升) (Invitrogen, 纽约州)。常规每周两次将细胞传代培养, 并在37°C下于5%CO₂的潮湿培养箱中进行维护。顺铂 (Fresenius Kabi USA, LLC), 吉西他滨 (Pfizer) 和Abraxane (Celgene) 来自罗斯韦尔公园癌症研究所医院药房。单克隆抗微管蛋白抗体, 多抗抗肌动蛋白抗体和山羊过氧化物酶偶联的抗兔IgG抗体购自Sigma (St. Louis, MO)。survivin (FL-142), ERCC1, ERCC6, α -H2AX, ChK1, ChK2, ATM, ATR, RAD51, DNA Pol和GAPDH的抗体来自圣克鲁斯 (Santa Cruz, CA)。Mcl-1, XIAP, cIAP2, Bad, Bim, Bax, 裂解/激活的caspase-3和(裂解和全长) PARP的抗体来自Cell Signaling (Beverly, MA, USA)。MTT (3-[4,5-二甲基噻唑-2-基]-2,5,-二苯基溴化四唑鎓) 和亮氨酸购自USB (俄亥俄州克利夫兰)。MG132购自Medchemexpress (新泽西州普林斯顿)。D-荧光素钾盐购自Gold Biotechnology (密苏里州圣路易斯)。FL118是在实验室内合成的, 纯度 $\geq$ 95%。与在人肿瘤

动物模型中测试的新鲜制剂相比,用于体内动物口服给药的配制悬液中的FL118高度稳定超过12个月,并且其抗肿瘤功效没有可观察到的变化。

[0235] 用于体外和体内研究的式1化合物的制剂。为了进行体外研究,首先将式1化合物以1mM的储备液形式溶于DMSO中。在将药物添加到细胞之前,将储备溶液进一步用DMSO稀释至实验最终浓度的1000倍。将1000x工作储备溶液直接稀释到与实验相关的缓冲液/溶液或与癌细胞类型相关的培养基中。对于体内研究,使用上文和下文所述的专有技术方法和独特的方法配制式1的化合物。

[0236] 蛋白质印迹/免疫印迹。使用和不使用FL118处理的癌细胞(在某些实验中,在存在MG132的情况下)在RIPA缓冲液(含有150mM NaCl,1.0% IGEPAL CA-630、0.5%脱氧胆酸钠,0.1%SDS和50mM Tris,pH 8.0的)中裂解。之后与等体积的2X SDS上样缓冲液混合后,将每个样品中的50μg总蛋白在95℃加热5分钟。加热后样品在12-15%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶上分离,并电转移至纯硝酸纤维素膜(Bio-Rad,Hercules,CA)。然后在室温下,将转移至纯硝酸纤维素膜在TBS-T缓冲液(20mM Tris/HCl pH 7.5、0.137M NaCl和0.1%Tween 20)中的5%脱脂奶中封闭2-3小时。接下来,将膜与不同的一抗在含有5%BSA的TBS-T中于4℃在1:500至1:2000的稀释范围内孵育过夜。用TBS-T洗涤后,将膜在含有5%脱脂乳和相应的二抗(1:5000)的TBS-T缓冲液中在室温下摇动孵育45-60分钟。使用Western Lightning Plus-ECL(Perkin Elmer,沃尔瑟姆,马萨诸塞州)检测目标蛋白,并通过不同的曝光时间(3-120秒)进行可视化。检测肌动蛋白作为内部对照用以标准化每个样品的总蛋白负载量。

[0237] DNA sub-G1流式细胞仪分析。使用或不使用FL118处理48小时的PANC1和MIA PaCa-2胰腺癌细胞通过胰蛋白酶消化并用PBS洗涤。将细胞($\sim 1 \times 10^6$)重悬于5ml 70%乙醇中。初始固定后,将细胞悬浮在含有25μg/mL碘化丙锭(PI),0.2%Triton X-100和40μg/ml RNase A的0.5ml PBS中在4℃孵育30分钟后,通过流式细胞仪分析细胞。使用WinList软件(Verity Software House Inc.,Topsham,ME)分析来自流式细胞术的数据,并表示为与媒介物(对照)处理的对照组相比得到的相对G1 DNA相对折叠倍数的增加。实验结果表示为平均值±SD的三次重复测定。差异的统计显著性由两组之间的学生t检验确定。

[0238] MTT测定。通过MTT细胞生存力测定法确定药物(FL118,吉西他滨,Abraxane,顺铂)分别和组合对细胞生长的细胞生长/生存力抑制作用。将活细胞(每孔2500个细胞)铺在96孔板的每个孔中。过夜孵育后,分别用和不使用不同浓度组合的相关药物以不同浓度处理细胞,并孵育72小时。向每个孔中加入比色底物MTT,使其终浓度为0.4mg/ml。将96孔板中的细胞在5%CO₂培养箱中于37℃下进一步培养4小时,然后吸出培养基。通过向每个孔中加入200ul DMSO来溶解MTT代谢产物formazan。使用Ultra Microplate Reader(Bio-Tek Instruments)在570nm下测量相关孔中的吸光度。每个实验至少重复三次。使用GraphPad Prism 6(GraphPad Software,Inc.,La Jolla,CA),从每种分析化合物的一系列药物剂量范围计算出IC₅₀/EC₅₀值。

[0239] A2780-GFPcODC,A2780CP-GFPcODC和PANC1GFPcODC细胞的产生和荧光显微镜检查以检测干样和抗药性绿色细胞。含有绿色荧光标记的逆转录病毒表达载体pQCXIN-ZsGreen-cODC(鸟氨酸脱羧酶)由Frank Pajonk博士提供(Vlashi E,et al.,In vivo imaging,tracking,and targeting of cancer stem cells.J Natl Cancer Inst.2009;

101:350-9)。从用上述载体转染的包装细胞收集的逆转录病毒颗粒分别感染A2780, A2780CP和PANC1细胞。转染的细胞用于实验。将转染的细胞单独或联合使用或不联合使用顺铂或FL118处理规定的时间。细胞图像是使用Olympus IX73倒数分数(Olympus)数字获取的。活细胞百分比是从10个显微镜视野中计数的总细胞总数的平均值中获得的。

[0240] 在基质胶中干细胞培养测定。用PANC1细胞通过在1、10和100nM的FL118或溶媒(对照)的存在下进行处理来进行球形形成分析。将球体保持在含有20ng/ml表皮生长因子,10ng/ml碱性成纤维细胞生长因子,5μg/ml胰岛素和0.4%牛血清白蛋白的改良MEM中。将PANC1细胞以1000个细胞/孔的密度接种在24孔超低附着平板(Sigma-Aldrich)中。简而言之,将1000个PANC1细胞悬浮于40μL培养基中,并与60μLBDMatrigel™(BD Bioscience,美国加利福尼亚州圣何塞)充分混合。将混合物铺在板孔中,并将板在5%CO₂培养箱中于37℃温育45分钟,以使BDMatrigel™固化。固化后,进行FL118处理。将每个孔中的球体放置在平板中以生长20天,然后在显微镜下以10X的放大倍率目测定量。

[0241] CD44阳性细胞分选和CD44阳性细胞集落形成。使用荧光激活的细胞用流式细胞仪(FACS)纯化分选CD44阳性(CD44+)细胞。FITC荧光偶联的小鼠抗人CD44被用于CD44+PANC1细胞的FACS纯化。简而言之,通过使用0.25%胰蛋白酶/0.02%EDTA收获PANC1细胞。将细胞重新悬浮在细胞培养基中后,对细胞计数并在具有2%FBS的PBS中洗涤并通过离心收集。在冰上放置30分钟,向含有1百万个细胞和2%的FBS的1ml PBS中加入10μL FITC-CD44抗体。抗体标记后,在BDFACSAria™III细胞分选仪(BD Science,美国)上进行流式细胞术分析之前,在含2%BSA的PBS中洗涤PANC1细胞。将PANC1 CD44+细胞以300个细胞/孔的密度接种在6孔板中,接种24小时后,用1、10和100nM FL118或溶媒处理细胞72小时后,用PBS洗去溶媒和FL118。将细胞在含有10%血清的完全培养基中于37℃,5%CO₂的培养箱中连续培养12天。之后固定菌落,用结晶紫溶液染色,并在第12天对菌落计数之前拍摄图像。实验结果表示为平均值±SD。差异的统计显著性由两组之间的学生t检验确定。

[0242] 动物模型研究批准。所有体内实验研究均按照机构动物护理和使用委员会(IACUC)批准的小鼠方案进行,该方案已由Roswell Park综合癌症中心的IACUC批准。使用的所有免疫缺陷SCID小鼠均为6-12周龄。

[0243] 使用的人类异种移植肿瘤。在本发明公开中,使用了人SW620(结直肠),HT29(结直肠)和HT-3(成视网膜细胞瘤)癌细胞系建立的异种移植肿瘤。最初通过将皮下注射 $2-5 \times 10^6$ 培养的癌细胞(体积为100-150μL)到免疫缺陷SCID小鼠腹侧面来建立人类肿瘤细胞系异种移植肿瘤。然后,通过套管针移植30-50mg非坏死的肿瘤块,将衍生的肿瘤在小鼠中传代以进行实验或维持。在本发明公开中,我们还使用了两种类型的源自癌症患者的异种移植肿瘤(PDX)肿瘤:人结肠直肠癌PDX(PDX27454)和人胰腺癌PDX(PDX14244)。PDX肿瘤最初是从临床上癌症患者的肿瘤在SCID小鼠上建立的。

[0244] 人胰腺导管腺癌(PDAC)原位肿瘤小鼠模型和治疗。通过胰蛋白酶消化收获在培养基中生长的PANC1细胞(LucPANC1),在冰冷的PBS中洗涤两次,并调节至 5×10^7 个活细胞/ml。将包含100万个LucPANC1细胞的20μL体积注射到SCID小鼠胰腺中。具体来说,使用由动物中心提供和维护的啮齿动物麻醉机,用异氟烷麻醉SCID小鼠。麻醉的手术平面通过踏板退缩反射进行监测。将眼药膏置于眼睛中。将腹部剃毛并使用碘磨砂膏和酒精制备。用剪刀切开一个长达1厘米的切口,拔出三分之一的脾脏,并用29号针头以20μL的体积100万个

LucPANC1细胞注射入胰腺尾部。将胰腺放回腹部,并用5.0种可吸收的外科缝合线缝合腹壁肌肉组织和腹膜。用湿粘合封闭皮肤,在手术后7天将其除去。术后q8-12小时皮下注射镇痛药为0.05mg/kg丁丙诺啡。允许小鼠在笼子中单独恢复,该笼子放置在循环的热水加热垫上。这样可以减少手术后的电击。一旦小鼠从手术过程中完全康复,并在正常进食和饮水的情况下自由地在笼子中移动,就将它们放回笼子中。如果在研究过程中有小鼠表现出垂死的迹象,则将其安乐死。健康的原位小鼠随机分为2组(每组3只小鼠):对照组和FL118-顺铂治疗组(注意,LucPANC1细胞具有耐药性)。细胞原位植入后7天开始用媒介物(对照)和FL118加顺铂进行治疗。治疗方案是在第7、14、21和第7天分别给予5mg/kg的顺铂(半最大耐受剂量,约1/2MTD)和0.75mg/kg的FL118(约1/6MTD)经腹腔内(ip)注射。每1-3周进行一次生物发光成像(BLI)(第1周为基线)。

[0245] 小鼠全身体内成像。使用Roswell Park(RPCI)的平移成像共享资源中的Xenogen体内成像系统(Caliper Life Science,Hopkinton,MA)进行SCID小鼠全身成像,以检测荧光素酶报道分子的活性。在成像之前,将荷有肿瘤的小鼠在单独的诱导室中与氧混合以2.5%的异氟烷(Patterson Logistics Services Inc.,Mount Joy,PA)麻醉。诱导麻醉后,向小鼠腹膜内注射75mg/kg剂量的溶于PBS的D-荧光素钾盐,然后转移至体内成像室。在成像室内为动物提供2.5%的维持麻醉,在D-荧光素注射后十分钟,进行BLI检测荧光素酶活性。成像后,将动物放回笼子并进行监测,以确保完全康复。报告的总通量测量值(代表BLI信号强度)是通过追踪整个肿瘤上的感兴趣区域而获得的。所有测量和显示的伪彩色BLI辐射度图像都是使用Living Image(PerkinElmer,W altham,MA)软件获得的。

[0246] 人胰腺癌(PDAC)患者来源的异种移植物(PDX)肿瘤小鼠模型和治疗。实验遵循了IACUC批准的小鼠实验方案。简而言之,将维持在SCID小鼠上的人PDAC PDX肿瘤分离,并将一片非坏死性肿瘤组织(30-40mg)皮下移植到雌性SCID小鼠的侧腹区域。在将PDAC PDX肿瘤移植后的7至14天肿瘤长至150-250mm³时(定义为第0天),将小鼠随机分为所需的组(每组5只小鼠),单独用于FL118或进行联合测试。在这项研究中,我们使用省时的腹腔内(ip)途径进行药物管理。FL118和吉西他滨的时间表是每周进行1次共4次单独或联合给药。当前研究中的FL118使用一种基本配方,该配方在盐水中包含FL118(0.1-0.25mg/ml),DMSO(5%)和羟丙基-β-环糊精(0.05-0.125%,w/v)。在我们先前的专利(PCT/US2011/058558)中详细描述了配制过程。载体溶液在不含FL118的盐水中含有DMSO(5%)和羟丙基-β-环糊精(0.05-0.125%,w/v)。每周使用数字游标卡尺测量肿瘤长度(L)和宽度(W)1-3次,直到实验研究结束。使用以下公式计算肿瘤体积(v): $v=0.5(L \times W^2)$ 。然后将肿瘤大小除以第0天肿瘤大小相对于第0天的百分率。在每个时间点的平均肿瘤体积±标准差(SD)来自每组5只小鼠。使用Sigma Plot软件制作肿瘤曲线。

[0247] 应用具有免疫能力的BALB/cj小鼠在FL118毒性和最大耐受剂量(MTD)中的研究。六周龄的雌性BALB/cj小鼠购自Jackson实验室。将小鼠随机分为4组,每组六只小鼠。然后以qw×4的时间表通过口服FL118以10mg/kg(在SCID小鼠中为FL118MTD),12.5mg/kg和15mg/kg治疗或口服媒介物(对照)。MTD被定义为不会导致药物相关的垂死状态或死亡,暂时的体重减轻不超过20%,临床病理无明显变化,包括血液学和生物化学参数的最高剂量。实验期间记录的其他毒性迹象包括小鼠行为,毛皮状态,运动和腹泻。使用ProCyteDx®血液分析仪(IDEXX BioResearch)和CatalystDx®化学分析仪(IDEXX BioResearch)在

Roswell Park动物中心的内部服务中进行了小鼠血液学和化学研究。

[0248] 将具有免疫能力的比格犬用于FL118毒性和MTD研究。合同研究组织 (CRO) Covance进行了研究。简要的实验方法如下:

[0249] 对于SCID小鼠中的两个剂量,FL118 MTD估计为12mg/kg/剂量。计算得出狗的FL118 MTD为2mg/kg。因此,剂量设定为0.55、1.1和2.2mg/kg。Covance Research Products, Inc. (Cumberland, Virginia) 用了9个雄性和9个雌性纯种小猎犬,它们的体重在5个月大,雄性为7.9-10.1kg,雌性为7.2至8.3kg。在开始之前,使动物适应测试设施(印第安纳州格林菲尔德) 15天。将动物按性别安置。使用计算机程序将动物分配到研究中,该程序旨在通过表11所示的实验设计实现组分配方面的体重平衡。

[0250] 在本研究中FL118的制剂无菌生理盐水(0.85%NaCl)中含有0.44%(2-羟丙基)- β -环糊精(HP β CD),2%羟丙基甲基纤维素(HPMC),1%的乙二醇(PG)以及分别含有0.11、0.22和0.44mg/ml的FL118。不含FL118的口服给药溶液是赋形剂对照。在给药阶段的第1天和第8天通过口服给药,剂量体积为5mL/kg。每天两次(上午和下午)检查动物的死亡率,异常情况以及疼痛或困扰的迹象。记录异常发现。在给药阶段,每天对每只动物进行一次笼侧观察,除了进行详细观察的日子。记录异常发现。在给药前阶段和给药阶段的第1、4和8天(如适用,在给药之前)对每只动物进行一次详细的观察。在计划的安乐死当天还收集了每只动物的详细观察结果。记录异常发现或正常迹象。在给药的每一天,在给药后约1、4和24小时对每只动物进行笼侧观察。记录异常发现。给药后观察的开始时间基于每个组/性别的给药完成时间。在给药前阶段和给药阶段的第1、4、8天(在给药之前,视情况而定)两次记录体重。在给药阶段的第1至4、4至8和8至9天记录定量的食物消耗。经由颈静脉从禁食的动物中收集用于血液学,凝血和临床化学的血液样品。在给药前阶段和预定的安乐死当天收集一次血样。抗凝剂是柠檬酸钠用于凝结试验,EDTA钾用于血液学试验。没有抗凝剂的情况下收集用于临床化学的样品。

[0251] 在给药阶段的第10天,将所有禁食过夜的动物用戊巴比妥钠麻醉,放血并验尸。记录处死动物的最终体重。宏观检查尸体外部特征包括外部孔口,腹腔,胸腔和颅腔,器官和组织。尸检期间有病理科医师进行咨询。在预定的处死动物时记录器官重量。成对的器官一起称重。统计分析数据包括均值和标准差(SD),其中包括绝对体重,体重变化,定量食物消耗,连续临床病理值以及最终体重和器官重量等参数。

[0252] 用于在荷瘤小鼠中进行药代动力学(PK)研究的样品制备。药物PK研究的进行方式如下:当肿瘤大小增长到大约800-在1000mm³的情况下,以六个SCID小鼠(每组3只小鼠)以1.5mg/kg的剂量单次口服施用FL118,所述SCID小鼠有人SW620和HT29异种移植肿瘤。在30分钟,1小时,4小时,12小时和24小时的一系列时间点收集肿瘤组织和血液样品。将每个肿瘤组织收集在管中,并立即用液氮冷冻。将每个血液样品收集在肝素LH/1.3离心管(SARSTEDT)中,并通过离心(1500rpm x 2分钟)回收血浆。从每个血液样本中收集的血浆被转移到新的试管中,并立即在液氮中冷冻。然后将液氮冷冻的样品转移到-80℃的冰箱中进行分析。值得注意的是,口服FL118的1.5mg/kg在此制剂配方中接近于FL118每天进行五次(q1d x 5),隔两天进行五次(q2d x5)最大耐受剂量。

[0253] 口服给药后化合物的药代动力学分析。血浆中的FL18药物用酸化的甲醇萃取。将800 μ L冰冷的酸化甲醇等分试样加到200 μ L血浆中,涡旋振荡15秒钟。同时,将小鼠组织或人

异种移植肿瘤组织中的FL118首先在1x PBS (W/V=1g组织/3ml 1x PBS) 中匀浆,然后用酸化的甲醇萃取。将800μL冰冷的酸化甲醇等分试样加到200μL匀浆的组织中,然后涡旋振荡1分钟。然后将样品以13,000rpm离心5分钟。然后将上清液转移到干净的13X100mm玻璃管中。样品在真空中干燥,并保存在-20℃下直至分析。分析时将干燥的样品在200μL流动相(80% 3% TEA和20% 乙腈pH 5.5) 中重构,并注入15μL。使用带有荧光检测和Empower软件的Acquity UPLC系统进行分析。在Acquity BEH Shield RP18 1.7μm,2.1mm X 100mm色谱柱(沃特世) 上进行分离。荧光检测器设置在以下激发(Ex) 和发射(Em) 波长下:Ex 370nm Em 510nm。通过用FL118加标血浆来制备校准标准品;校准曲线范围为5ng/mL-500ng/mL。为了确保质量,在血浆中分别以25和250ng/mL的等分试样制备质量控制样品,并在-20℃下保存。在测试开始和结束时,一式两份注入QC。分析验证包括在5天内运行12条标准曲线。使用每条曲线分析QC样品。实验校准器的总精度(%CV=6.4) 和总精度(101%) 被证明是极好的。以%CV表示的QC精度等于7.5%,总体QC精度为96%。

[0254] 使用氚(3H) 标记的FL118或FL118类似物作为探针通过筛选ProtoArray® 蛋白阵列(Invitrogen) 来搜索生物化学靶标/生物标志物。

[0255] 小分子/配体(FL118或类似物) 的氚3H标记:在50ml的圆底烧瓶中装入0.8-1mg FL-2(FL118或类似物)、120mg 5%PdBaSO₄、90Ci T₂气体,浸入有机硅中在180℃-190℃的温度下进行24小时的油浴。溶于1ml DMSO中,并与50%EtOH交换10x。直接注入CapCell Pak C-18色谱柱,流动相30%CH₃CN 0.1%TFA,流速6ml/min,U.V.=200nm,相对=40分钟。纯化后,获得了特异性为16.5mCi/mm²的探针,用于在ProtoArray®蛋白阵列上筛选>9,000种人类蛋白质。

[0256] 用氚3H标记的探针进行ProtoArray®蛋白阵列筛选:1.封闭ProtoArray:

a) 从-20℃的储存库中取出后,立即将装有人蛋白质微阵列v5.0的邮件放置在4℃下。并在使用前在4℃下平衡邮件至少15分钟。b) 将人类蛋白微阵列的条形码朝上放在4腔培养箱的底部,以使微阵列的条形码末端靠近含有缩进数字的托盘末端。c) 使用无菌移液器,向每个腔室中加入5mL分析缓冲液。避免将缓冲液直接移液到阵列表面。d) 在设定为50rpm的振荡器上,将托盘在4℃下温育1小时(循环振荡)。e) 孵育后,从分析缓冲液中去除蛋白质微阵列。要从4腔培养箱中取出阵列,请将镊子尖端插入带有锯齿的数字端,然后轻轻向上撬动阵列。用戴手套的手,仅握住微阵列的边缘来拾取微阵列。点击以清除滑动表面上多余的液体。f) 立即继续探测阵列。2.探测ProtoArray:a) 将每个ProtoArray水平放置在单独的50mL无菌锥形管中,大约1/3的阵列延伸到管外。阵列的条形码末端应从试管中突出(面朝上)。b) 对于每个ProtoArray,添加100μL包括氚3H标记的探针和位置定位试剂3H-雌二醇的探测混合物,然后将混合物轻轻吸到ProtoArray的表面上。c) 用镊子将盖玻片轻轻放在ProtoArray的表面上,以免捕获气泡。d) 将带有盖玻片的ProtoArray放置在锥形管内,并使阵列的印刷面朝上。盖上管子。将试管放在平坦的表面上,使阵列的印刷面朝上,并使试管尽可能水平。如果需要,将锥形管粘在平坦的表面上,以免造成任何意外干扰。e) 在4℃下孵育阵列90分钟,不要摇动。f) 从培养箱中取出装有ProtoArray的锥形管,并向该管中加入40mL氚SMI分析缓冲液。g) 在室温下将阵列在缓冲液中孵育30秒。玻璃盖玻片将漂浮下来。如果未从阵列中移出盖玻片,请不要用镊子将其移开。h) 用镊子小心地移开被盖住的盖玻片,不要接触阵列表面。适当丢弃盖玻片作为放射性废物。i) 倒出氚SMI分析缓冲液。确保

正确处置放射性废物。j) 向试管中加入40mL新鲜的氚SMI分析缓冲液。在室温下将阵列孵育30秒。倾析缓冲区。重复洗涤步骤一次。确保正确处置放射性废物。k) 如果使用含NaCl的氚SMI分析缓冲液, 请用缺少NaCl的氚SMI缓冲液再洗涤一遍。3. 干燥并暴露ProtoArray: a) 在探测过程结束时, 从室内取出ProtoArray阵列。在实验室抹布上轻拍阵列的一个边缘几秒钟, 以沥干所有缓冲液。b) 将每个ProtoArray阵列放在载玻片架中(或如果没有载玻片架, 则使用无菌的50mL锥形管)。确保将阵列正确放置并固定在支架中, 以防止在离心过程中损坏阵列。c) 在室温下, 用离心机(配有平板转子, 如果使用载玻片支架, 则配有平板转子)将载玻片支架或50mL锥形管中的阵列在 $200\text{ Å} \sim g$ 下离心1分钟。确认阵列完全干燥。d) 用透明胶带将玻片粘贴到8x10埃克塞特保护板上(或类似尺寸的厚滤纸)。仅用胶带粘贴幻灯片的顶部和底部边缘, 而不能覆盖任何阵列区域。附着力有助于防止长时间曝光期间发生意外移动, 也有助于防止转移到屏幕上。将ProtoArray放在X射线胶片盒中, 并直接覆盖对氚敏感的磷光屏。e) 将ProtoArray暴露在荧光屏上16天。4. 图像采集和分析: GenePix Pro v7 (分子设备公司) 和/或ScanArray。采集软件(PerkinElmer, Inc.) 用于图像采集和分析。

[0257] FL118或FL118类似物亲和柱纯化生化靶标/生物标记物。1. 配体(FL118或类似物)耦合: a) 将2根DADPA UltraLink支架(ThermoFisher)和一瓶洗涤缓冲液平衡至室温。b) 卸下顶盖并从色谱柱上拧下底部标签(使用提供的白色尖端重新封盖色谱柱底部)(注意: 在整个过程中打开色谱柱的盖子时, 请务必在卸下顶盖之前先卸下顶盖, 以防止气泡被吸入色谱柱中的树脂床。c) 将2根色谱柱放在自制的架子上, 以使存储溶液从色谱柱中排出。d) 通过加入2ml偶联缓冲液(CB)平衡色谱柱, 使其流过树脂床并从色谱柱中排出。然后, 用3ml(柱体积为2ml)的下列每种溶液逐渐平衡树脂, 然后将DMSO从10%逐渐增加到80%, 然后在80%DMSO:20%CB中添加FL118。装回底盖(附带的白色尖端)。丢弃收集试管中的流通液。e) 将5ml对照溶液(4.5ml DMSO+0.5ml CB)添加到第1列中; 将5ml FL118溶液[2.5ml FL118(在DMSO中为1mg/ml)+2ml DMSO+0.5ml CB]加到第2列中。f) 上下轻轻颠倒, 将树脂重悬于对照液或FL118溶液中。g) 将树脂浆液转移到标有1(对照柱)和2(FL18柱)的15ml锥形管中。h) 在每个15ml管中加入200 μ lPharmaLink偶联试剂(37%甲醛溶液): 每2-4ml FL118结合溶液200 μ l(FL18柱)。i) 盖上试管, 并在54℃下涡流孵育FL118浆液 $\sim$ 24小时。j) 然后将1000 μ lBC加50 μ l甲醛添加到每个在55℃旋转48小时的色谱柱中。2. 将树脂浆液转移至新色谱柱, 色谱柱清洗和保存以进行亲和纯化: a) 准备4个室温空柱。打开顶盖, 并用纯ddH₂O将底盖加到每根色谱柱上, 使其充满, 然后打开底盖使其沥干但不干燥。b) 向每根色谱柱中加入1-2ml CBD3/4($\sim$ 50-55%水溶液), 使其沥干但不干燥。c) 当溶液几乎从色谱柱中流出时(不要让色谱柱干燥), 盖上底盖。d) 旋转两个15ml反应管, 使对照浆液或FL118/树脂浆液重新悬浮。然后用1ml移液器将对照浆液转移到色谱柱1(C1:对照细胞)和2(C2:FL118细胞浆), 2) 将FL118浆液转移到3柱中(C3:control-nuc1)和4(C4:FL118-nuc1)。注意, a) DMSO/BC=4.5ml/5.5ml; b) 柱体积现在为1ml。e) 让树脂沉降, 然后打开底盖, 使溶液从立柱中流出, 以排出所有反应溶液。f) 先用2ml CBD3, 再用2ml CBD3, 再用2ml超纯水/DMSO溶液(75:25)洗涤色谱柱, 以防止缓冲液沉淀。然后用1.5ml 100%DMSO洗涤以帮助去除未反应的FL118。g) 用1ml CBD6连续洗涤各柱, 然后依次用1ml CBD5, CBD4, CBD3, CBD2和CBD1洗涤, 最后用4ml tris洗涤缓冲液(0.1M Tris, pH 8.0)洗涤; 然后通过添加9x 4ml Tris洗涤缓冲液(0.1M Tris, pH 8.0)继续用tris缓冲液洗涤色谱柱, 以淬灭未被FL118密封的活性位点。直至将

Wash9排干至2ml,重封柱子,然后将柱子在32-37℃的烤箱中放置45分钟,以淬灭未被FL118密封的活性位点。然后再用tris洗涤缓冲液(0.1M Tris,pH 8.0)洗涤3x 4ml。在最后一次用8ml含0.04%NaN₃的Tris洗涤缓冲液进行额外洗涤时,将整个湿盘合并到tris洗涤缓冲液中,然后将盘向下推至200毫升,重新盖好底部柱帽以保持Tris缓冲液以插入磁盘。使用巴斯德移液器留出1毫米的间隙。然后将溶液排放至2ml以上的树脂中,然后盖上市谱柱,并在4℃(冷室)中垂直放置色谱柱。3. 配体(FL118或类似物)结合蛋白的亲亲和柱纯化:将癌细胞裂解物平行地通过亲和柱和对照柱。大量使用洗涤缓冲液后,用8M尿素缓冲液洗脱结合在柱上的蛋白质。4. 蛋白质鉴定:洗脱的蛋白质溶液经3K OMEGA Nanosep 1.5ml试管装置脱去尿素并浓缩。通过下文描述的蛋白质组学分析所得的蛋白质混合物与对照柱平行得到的混合物进行平行分析。

[0258] 使用可靠的蛋白组学技术从蛋白质混合物中鉴定蛋白质:使用Qu Lab开发的基于IonStar/MS1的蛋白组学技术对所得的蛋白质混合物进行分析(Shen X,Shen S,Li J,Hu Q,Nie L,Tu C,Wang X,Orsburn B,Wang J,Qu J:An IonStar Experimental Strategy for MS1 Ion Current-Based Quantification Using Ultrahigh-Field Orbitrap: Reproducible,In-Depth,and Accurate Protein Measurement in Large Cohorts.J Proteome Res 2017,16:2445-56)。简而言之,通过蛋白质提取,还原,烷基化和有机溶剂沉淀以及用胰蛋白酶消化所得蛋白质沉淀的过程,将4μl中的4μg肽样品进行纳米LC/UHF-Orbitrap LUMOS MS分析。然后将采用严格的标准进行蛋白质鉴定。IonStar处理管线将用于从样品中鉴定出的蛋白的MS1定量。将使用DAVID Bioinformatics Resources v6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)的在线工具和Ingenuity Pathway Analysis(IPA, Ingenuity Systems)来分析基因本体论(Gene Ontology/GO)注释(定量蛋白质)。对于GO富集分析,所有定量的蛋白质的总合将用作背景。使用IPA进行核心分析,进行蛋白质功能,上游调节剂和途径分析。由软件分配的生物和功能注释将被手动检查,并重新分组为各自的类别。层次聚类分析(不居中的Pearson相关距离和质心链接)将使用聚类3.0进行分析,并在需要时由TreeView显示,以支持基于树关联和基于图像关联的层次浏览(<http://www.eisenlab.org>)。我们将使用GSEA分析工具分析经过Hx6处理和未经Hx6处理的UOK262细胞中蛋白质网络途径的变化。基于我们的蛋白组学技术,我们可以在每个样本中定量>7000种蛋白质而不会丢失细胞裂解液样品中的数据。

[0259] 用X射线粉末衍射仪(XRPD)分析API(活性药物成分)-HPβCD粉末复合物的衍射:将使用XRPD方法测定每个制备的式1-HPβCD复合物的化合物的晶体或无定形态。具体而言,每种制剂粉末的约5mg样品将散布到Si基板的中心(样品区域的直径为1厘米)以进行XRPD测试。样品的实验室XRPD模式将在25℃下收集。衍射数据将在 $2\theta = 3^\circ - 40^\circ$ 的角度范围内以 $2\theta = 0.02^\circ$ 的步长和0.12s/step的时间计算收集。

[0260] 用调制差示扫描量热法(mDSC)分析API(即式1的化合物)-HPβCD粉末复合物的混溶性:将使用mDSC方法确定API-HPβCD复合物粉末中API的混溶性状态。具体而言,mDSC分析将在动态氮气氛中,在室温至300℃的温度范围内,以Q2000差示扫描量热仪(TA,美国)以2℃/min的升温速率进行。将每种API-HPβCD复合粉末称重,放入装有针孔盖的Tzero铝制样品盘中;一个空锅用作测试的参考控件。另外,来自每种式1粉末的API化合物的API-HPβCD复合物的玻璃化转变温度(Tg)。

[0261] 用高效液相色谱法 (HPLC) 分析HPBCD中API (即式1的化合物) 的负载量:HPBCD中API负载量的重量百分比将通过HPLC确定。具体而言,将进行HPLC以确定HPBCD中API (式1的化合物) 负载的重量百分比。在测试中,将使用Waters XSelect CSH C18色谱柱(3.5 μ m, 4.6x150mm,Waters,爱尔兰)。流动相为0.05%三氟乙酸水溶液(流动相A)和乙腈与0.05%三氟乙酸(流动相B)的梯度程序,将以每分钟1mL的总流速泵送。梯度将如下所示:初始条件A中的B含量为10%,然后在15分钟内B在A中的含量从10%升至到60%的线性梯度,然后在10分钟内B在A中的含量从60%升至到90%的线性梯度,90%B在A中保持5分钟之后恢复到初始状态0.01分钟并保持10分钟。柱温将保持在30 $^{\circ}$ C,洗脱液将在220nm波长下进行监控。进样量为5.0 μ L。稀释剂为DMSO。

例子

[0262] 通过以下实施例子进一步说明本发明,这些实施例子不应以任何方式解释为限制性的。以下是示例的描述。

[0263] FL118平台药物抑制抗药性胰腺癌干细胞样细胞中的多种抗凋亡蛋白:由于我们的发明(PCT/US2015/022095)表明FL118是产生新药的很好平台以及胰腺癌众所周知的抗治疗(药物治疗,放射治疗)性,因此我们确定FL118是否能抑制在胰腺导管腺癌(PDAC)细胞系中表达的多种抗凋亡蛋白(survivin,Mcl-1,XIAP,cIAP2)。据报道,胰腺癌细胞系Mia-Paca2 (Mia2) 和PANC1具有很高的侵袭性,并且对所有一线药物都具有抗药性(Legoffic A et al., Identification of genomic alterations associated with the aggressiveness of pancreatic cancer using an ultra-high-resolution CGH array. *Pancreatology*.2009;9:267-72)。因此,我们选择使用这些细胞系来确定FL118对各种抗凋亡蛋白以及某些促凋亡蛋白表达的影响(采用Western印迹法)。我们的数据显示,FL118在16h(小时)至48h范围内的处理以剂量依赖性方式差异性调节PANC1和Mia2细胞中抗凋亡蛋白(XIAP,cIAP2,Mcl-1或survivin)的表达(图1A和1B),而这种处理诱导凋亡蛋白(Bad,Bim或Bax)以不同程度表达(图1A和1B)。

[0264] 接下来,我们确定图1所示的FL118介导的抗凋亡蛋白的抑制和前凋亡蛋白的诱导是否将伴随凋亡的诱导和细胞杀伤。我们的研究表明,用FL118平台药物(10-500nM)在短短24h内即可在PANC1和Mia2细胞中强烈诱导caspase-3激活和PARP裂解(凋亡标记,图2AB)。此外,这些凋亡标记物的激活伴随着PANC1和Mia2细胞中亚G1 DNA含量的显著增加,表明FL118对细胞具有杀伤作用(图2C)。与这些发现一致,我们还确定了FL118对PANC1,Mia2以及对吉西他滨敏感的BxPC-3胰腺癌细胞系细胞活力的影响。我们的数据显示,低浓度(nM水平)的FL118可有效抑制胰腺癌细胞的活力(图2D)。基于已公布的吉西他滨耐药性状况和PANC1,Mia2和BxPC-3的敏感性(Legoffic A et al., *Pancreatology*.2009;9:267-72),FL118似乎在抑制抗吉西他滨方面更有效。与FL118对吉西他滨敏感的BxPC-3细胞生存力的影响相比,该观察结果表明FL118平台药物更倾向于杀死耐药的PANC1和Mia2胰腺癌细胞(图2D)。

[0265] FL118平台药物在耐药性胰腺癌细胞中表现出对ERCC6的持续抑制和对 β -H2AX的诱导。众所周知,药物/放射治疗诱导的DNA损伤可以激活ATM信号传导,进而导致p53的积累和活化,并诱导凋亡。为了更深入地了解FL118平台药物治疗与潜在细胞DNA损伤的关系,我们确定了FL118对耐药胰腺癌细胞株PANC1中一组DNA损伤和修复基因表达的影响。我们发

现,在与DNA损伤/修复过程相关的一组蛋白质测试中(ERCC1,ERCC6, γ -H2AX,ChK1,ChK2,ATM,ATR,RAD51,DNA Pol β),FL118大大降低了ERCC6表达并诱导的 γ -H2AX表达(图3A)。ERCC6是优先修复活性基因的关键调节因子。也有文献证明,ERCC6的高表达赋予了对5-Fu治疗的抗性,并且与CRC大肠癌患者的生存期有关。我们的其他研究表明,FL118平台药物对ERCC6表达的抑制似乎是由蛋白酶体降解途径介导的,因为在蛋白酶体抑制剂MG132存在的情况下可以挽救FL118介导的ERCC6的下调。此外,FL118在抑制ERCC6表达方面具有比拓扑替康强得多的作用(图3C)。

[0266] FL118平台药物减少抗药性卵巢癌细胞和胰腺癌细胞中的干样癌细胞的数量,表明其强大的平台性质。基于FL118平台可以在许多情况下消除大肠癌而不会复发的事实,我们推测FL118应该有效减少包括癌症干细胞(CSC)在内的耐药癌细胞,因为已知抗凋亡蛋白survivin和Mcl-1可以在CSC耐药性中发挥重要作用。为了对此进行测试,我们使用了Pajonk博士实验室开发的一种新颖方法来实时追踪耐药细胞(Vlashi E, et al., *In vivo* imaging, tracking, and targeting of cancer stem cells. *J Natl Cancer Inst.* 2009; 101:350-9)。这种方法利用了耐药细胞降低26S蛋白酶体活性。在稳定表达26S活性报告基因(GFPcODC融合蛋白)的细胞系中,由于26S活性降低,仅耐药性癌细胞将保持GFP阳性。在这里,我们同时使用了多重耐药性卵巢癌细胞系A2780CP和耐药性PDAC细胞系PANC1来检验上述假设。我们发现,在已建立的表达GFPcODC的细胞中,与亲本药物敏感的A2780-GFPcODC系相比,耐药A2780CP70-GFPcODC细胞中的GFPcODC阳性细胞明显增多(图4A)。如图所示,以10 μ M的顺铂处理A2780CP70-GFPcODC细胞72小时杀死了90%的总细胞群,但GFPcODC阳性细胞存活了下来(图4B, 4C)。相比之下,在10nM和100nM的FL118平台药物处理可减少GFPcODC阳性耐药A2780CP细胞群体的50%以上(图4D)。

[0267] 接下来,我们将相同的系统应用于胰腺癌PANC1-GFPcODC细胞。我们测试了FL118-顺铂联合用药对通过台盼蓝排除法测定的耐药性癌细胞杀伤的作用。用20 μ M顺铂或10nM FL118进行为期4天的单药治疗可引起相似程度的细胞死亡($\sim$ 18%),而用FL118-顺铂联合治疗可引起62%的细胞死亡,与之单药治疗相比细胞杀伤率高3倍(图5A)。GFPcODC阳性的PANC1细胞在PANC1-GFPcODC细胞系中较低($\sim$ 0.5%),但具有极高的耐药性,这与典型癌细胞系中的CSC特征一致。GFPcODC阳性(耐药)细胞可在50 μ M的顺铂中存活4天,而相同的处理可杀死92%的GFP阴性(药物敏感)PANC1细胞(图5B)。有趣的是,在这种特殊条件下,用20 μ M的顺铂(Cis)或10nM的FL118(FL)进行单次处理似乎无法杀死GFPcODC阳性(耐药)细胞(图5C, Cis, 20 μ M, FL, 10nM),而FL118-顺铂组合杀死高度耐药的GFPcODC阳性PANC1细胞(图5C, FL+Cis, 箭头)。而切,在胰腺CSC球体形成实验中,我们发现大多数存活的抗药性干细胞样细胞无法形成球体(图5D)。具体而言,在为期10天的胰腺球体培养实验的球体形成过程中,10nM FL118、3 μ M顺铂或其组合能够显著抑制球体形成,特别是在组合情况下,与无药对照相比(100, $p < 0.001$, 图5D)。

[0268] 为了进一步证实这些发现,我们另外使用典型的基于基质胶的CSC球形成测定法,已知该测定法可以更紧密地模拟体内情况。在这种测定法中,只有抗药性干细胞样癌细胞才能形成细胞球体。FL118平台药物在抑制细胞球体形成方面显示出很高的功效(图5E)。为了进一步证明FL118对干细胞样耐药性癌细胞的作用,我们从耐药性PANC1细胞中分离了CD44干细胞标志物阳性的胰腺癌细胞群。我们使用干细胞培养条件进行了CD44干细胞标志

物阳性细胞的群落形成。与图5E的数据一致,FL118平台药物甚至在1nM时仍能显着抑制群落形成,而在10和100nM时,FL118能够完全消除CD44干细胞标记阳性PANC1细胞的群落形成(图5F-G)。这些结果(图5E-G)表明,与人工产生的GFPcODC阳性PANC1细胞相比(图5C-D),CD44干细胞标记阳性PANC1细胞中的耐药性干细胞状癌细胞对FL118治疗更为敏感。因此,在转染表达GFPcODC的载体和获得表达GFPcODC的细胞的选择过程后,GFPcODC阳性的细胞模型可能是一种高度耐药的细胞模型或不太实际的细胞模拟系统,而该过程可能无法完全模拟CD44干细胞标记阳性的耐药细胞。另一个解释是,这中差异也可能是由于在选择表达GFPcODC的细胞后高度耐药性种群的进一步富集所致。总之,我们的研究强烈表明,单独使用FL118平台药物和将FL118与细胞毒性药物联合使用是新颖的治疗选择,可以有效地减少耐药干细胞样胰腺癌细胞的数量。

[0269] FL118平台药物和顺铂(Cis)的组合同时抑制胰腺肿瘤(PDAC)的生长和转移。PDAC对治疗的耐药性为癌细胞转移铺平了道路。由于胰腺癌患者经常表现出转移性疾病,因此转移是一个具有挑战性的问题。为了测试FL118平台药物是否可以同时抑制PDAC肿瘤的生长和向其他部位的转移,我们使用了原位PANC1模型。为了使用生物发光体内成像(BLI)监视活体小鼠中的肿瘤生长和转移,我们建立了表达萤光素酶的PANC1细胞(LucPANC1),并以20微升的体积将一百万个LucPANC1细胞注射到了SCID小鼠的胰腺中。这些小鼠用媒介物对照(图6A,左图,n=3)或FL118-顺铂组合物(图6A,右图)治疗。从第7天开始,通过腹腔内注射(ip)0.75mg/kg的媒介物或FL118(1/6最大耐受剂量:1/6MTD)联合顺铂(5mg/kg,1/2MTD)对这些小鼠进行治疗4次(qw x 4)。每1-3周以7天为基线进行BLI体内成像(图6A,上图)。我们的研究表明,单个肿瘤的辐射强度在很窄的范围内下降,表明我们的手术中肿瘤植入在很小范围内(图6A)。FL118-顺铂治疗以相对较低的剂量水平显着抑制了PANC1肿瘤的生长和向LucPANC1原位模型中其他部位的转移。例如,在LucPANC1细胞植入后的第60天(60d),所有治疗小鼠中的肿瘤均退化到不可检测的水平(图6A,第二行)。值得注意的是,在第90天,在第28天完成治疗后,BLI生物发光体内成像在对照组的三只小鼠中的两只中检测到局部转移(分别为4个红色肿瘤中心和2个红色肿瘤中心),但是在BLI生物发光体内成像的FL118-顺铂治疗组中未检测到局部转移(图6,90d,第四行/底部)。研究结束时对动物进行的尸检表明,在对照组该肿瘤不仅在胰腺(原发性肿瘤)上,而且在肝脏(一只老鼠有两个位点,另一只老鼠有一个位点)和小肠上(只有前者一处),说明肿瘤转移。相比之下,FL118-顺铂治疗小鼠的原始肿瘤部位(胰腺)仅生长出明显较小的肿瘤而切没有肿瘤转移。重要的是,这仅是一个周期/疗程的治疗。这些结果表明我们的模型系统可以精确地测量转移到其他器官部位的开始时间。从每组总肿瘤随时间定量的总BLI强度显示在图6B中。这些观察结果表明,FL118平台药物是一个独特而有前途的平台,是一种核心结构药物,可用于在不同类型的人类癌症中产生具有更好的抗肿瘤功效的新药。研究还表明,FL118平台药物可杀死增殖性癌细胞和耐药性/潜伏性CSC样癌细胞,这将在所述的下一个示例性实验中得到进一步证实。

[0270] 单独的FL118平台药物或与吉西他滨组合可消除动物模型中的人PDCA PDX肿瘤。接下来,我们使用人类胰腺癌(PDCA)患者源性异种移植(PDX)肿瘤模型进行体内研究,因为PDX模型是临床上最相关的动物模型,并且可以呈现出所发现肿瘤的许多组织学特征和异质性治疗敏感性反应在患者中。最近有文献报道,胰腺癌PDX保留了活跃的旁分泌/刺猬信

号,而异形增生在PDX肿瘤小鼠模型中活跃。我们的研究表明,FL118不是ABCG2和Pgp的底物,并且表现出良好的药代动力学(PK)性质(请参阅下文)。基于FL118平台药物的这些特征,我们认为异型增生(desmoplasia)介导的耐药性可能不能成为阻止FL118达到癌细胞治疗水平的障碍。因此,我们在人PDAC PDX肿瘤模型中单独和与吉西他滨(一种典型的胰腺癌药物)联合测试了FL118的疗效。在测试的八个PDAC PDX肿瘤模型中,我们发现其中四个对FL118治疗表现出高敏感性。如图7A和7B所示,PDX14244和PDX17624对FL118表现出高敏感性,并且FL118能够在一个治疗周期(qw x 4,图7A,7B,仅一个周期/疗程治疗)后消除这些胰腺癌PDX肿瘤。然而,其他4个对FL118表现出不同程度的敏感性。例如,图7C中所示的PDX10978,FL118仅能够延迟PDX10978肿瘤的生长。接下来,我们测试了FL118与常用的胰腺癌药物如吉西他滨联用是否可以解决FL118的不敏感性问题。我们对上面使用的FL118不太敏感的PDAC PDX10978进行了FL118和吉西他滨的联合治疗。在本研究中,我们单独使用0.75mg/kg (≈1/6MTD)的FL118和60mg/kg (≈1/2MTD)的吉西他滨通过ip的qw x 4方案联合使用(一个周期/疗程)。我们发现单独使用FL118或吉西他滨只能延迟肿瘤的生长。相反,FL118与吉西他滨的组合仅用一个治疗周期就能消除所有5只治疗动物的PDX10978肿瘤(图7D,从第14-35天开始)。图7E是使用肿瘤绝对大小直方图格式显示联合治疗的协同作用。我们的研究表明,很大比例的PDAC肿瘤对FL118平台药物可能表现出较高的敏感性,而其他一些PDAC肿瘤对FL118的治疗则有可能表现出较低的敏感性。但是与使用的胰腺癌细胞毒性药物(如吉西他滨)联合治疗,FL118可以消除对FL118较不敏感的PDAC肿瘤。

[0271] FL118平台药物在鼠类和犬类动物中均表现出非常有利的毒理学特征。我们的研究表明,FL118口服制剂在每周4次(qw x 4)的有人类肿瘤的SCID小鼠中具有10mg/kg的最大耐受剂量(MTD)。由于SCID小鼠的免疫系统不足,因此以相同的路线和时间表确定FL118是否在具有免疫能力的小鼠中具有相似的MTD至关重要。我们发现使用≥12.5mg/kg的口服qw x 4会导致体重减轻20%以上,其中包括一些濒死状态的小鼠。但是,BALB/cj小鼠有很好的耐受10mg/kg的使用剂量,并且小鼠体重减轻在正常变异范围内(图8A)。一致地,从17个血液学参数的评估结果表明,只有白细胞(WBC)和淋巴细胞(LYMPH)下降到正常范围的低端边缘(表1)。经过FL118处理后,所有其他参数均与溶媒对照参数相似,并且参数均在正常范围内变化(表1)。同样,在12种临床生物化学参数中,FL118处理的结果与媒介物对照处理的结果的参数非常相似,其接近或在正常变异范围内(表2)。就狗毒理学研究结果而言,所有动物均以良好的条件存活到实验结束。没有观察到与FL118有关的临床毒性。某些观察到的粪便异常是罕见的,短暂的,并且在给药前阶段对某些动物有明显相似的异常。因此,它们与FL118不相关。对于所有经FL118处理的组,在正常动物体重变化的范围内,没有观察到或仅有最小的体重变化(图8B,C)。这些观察结果与收集样品的血液学分析结果一致,其中大多数变化在给药前变化范围内。媒介物对照和最高FL118剂量治疗犬的结果显示在表3中。如图所示,在此FL118 MTD剂量水平中,FL118仅对一些血液学参数(例如血小板和单核细胞减少)表现出很小的影响,但这些都不是很严重的(表3)。同样,在临床生物化学研究中,对照和FL118测试物品处理过的动物之间或个别犬的给药前和给药阶段测试结果之间几乎没有差异,并且所有差异均与正常变异一致并且被认为是偶然的(表4)。观察到的差异的特征在于以下大多数或全部特征:幅度小,与剂量无关,性别不一致,缺乏相关发现和/或与开始给药前存在的差异相似。因此,总体上,FL118平台药物在狗的毒理学特征是非

常有利的,这是至关重要的,因为狗的生理学特性比小鼠或大鼠更接近人类。

[0272] 用于FL118的口服给药的新开发的制剂获得了有利的药代动力学(PK)曲线。我们以前的研究表明,FL118静脉内(iv)注射在肿瘤中迅速蓄积,但很快从血液中清除,而FL118可以在肿瘤中维持较长的半衰期(Ling,et al.:FL118,a novel camptothecin analogue,overcomes irinotecan and topotecan resistance in human tumor xenograft models,American Journal of Translational Research 2015,7:1765-1781)。但是,静脉内注射不方便;药物管理需要护士的帮助。因此,对于一种抗癌药的商业化,在可能的情况下,口服给药始终是首选。在这方面,我们利用新开发的FL118平台药物口服制剂作为制剂测试产品。然后我们确定了口服后FL118的PK曲线。以这种方式进行的PK研究表明,与静脉内注射FL118比较,在无有机溶剂的HPBCD作为口服FL118药物载体的生理盐水悬浮液可获得良好的PK曲线。具体而言,口服后,FL118迅速积聚到肿瘤中,并且肿瘤中FL118的浓度比血清中高许多倍(图9)。

[0273] 对一组FL118平台药物衍生的类似物(FL7s-3,FL7s-4,FL7s-7,FL7-5,FL7-14,FL7-15,FL7-17)的几次体内测试表明FLs-3和FL7s-7是潜在继续前进研发的两个最有希望的候选分子。基于口服施用FL7s-3,FL7s-4,FL7s-7,FL7-5,FL7-14,FL7-15和FL7-17的FL118类似物的初步发现,我们重新测试了抗肿瘤活性和口服FL7s-3,FL7s-4,FL7s-7,FL7-5,FL7-14的FL118平台类似物的多剂量毒性(体重变化)的分布。我们没有包括FL7-15和FL7-17,因为其他体内数据表明,就总体抗肿瘤活性和毒性谱而言,FL7-15和FL7-17不如FL7-5和FL7-14好。通过以每周一次共4次的时间表对FL7s-3,FL7s-4,FL7s-7,FL7-5,FL7-14的各个药物进行多次口服给药(图10、11),我们的体内动物模型人视网膜母细胞瘤异种移植的研究表明,FL7s-3和FL7s-7似乎是继续研发需要考虑的两个候选对象。

[0274] 另一组衍生合成的FL118平台药物的3个类似物:尽管所有三种新化合物都有希望,但三种候选药物之一显示出优异的抗视网膜母细胞瘤肿瘤活性,而在所有三种剂量下均未显示毒性。对于这三种新化合物,我们使用HT-3视网膜母细胞瘤异种移植肿瘤模型进行了体内动物模型研究,以评估其抗肿瘤活性和毒性。在该实验中,我们仍将新开发的药物制剂用于口服。由于化合物的数量有限,因此我们只能根据所示药物的可获得性,每种药物以3-4剂量口服一次给药(如图12所示)。口服给药的体内动物模型研究表明,这三种新化合物FL7N-1,FL7N-2和FL7N-3均表现出出色的抗肿瘤活性和良好的毒性(图12)。此外,FL7N-1在所有三种剂量(5mg/kg,10mg/kg和15mg/kg)中均显示出优异的抗肿瘤活性,而在这三种剂量中的任何一种剂量下均未显示出毒性(小鼠体重减轻)(图12A),就药物作用机制(MOA)而言,具有高度针对性的特征。

[0275] 尽管FL7N-1在胰腺癌患者源性异种移植(PDX)肿瘤模型(PDX14244)和结直肠癌PDX模型(PDX27454)中表现出良好的抗肿瘤活性,但FL7N-1似乎是治疗儿童罕见的视网膜母细胞瘤疾病的好药。基于图12中通过一次给药获得的FL7N-1的抗视网膜母细胞瘤肿瘤活性,我们接下来测试了FL7N-1在胰腺癌(PDX14244)和大肠癌(PDX27454)中的抗肿瘤功效和毒性(体重变化)。PDX肿瘤最初是在SCID小鼠上建立的,胰腺癌和大肠癌患者的肿瘤组织是在临床上从该疾病的转移部位获得的。在不含有有机溶剂的溶液中,FL7N-1首先与HPBCD(2-羟丙基- β -环糊精)形成复合体再与2%HPMC(羟丙基甲基纤维素)和1%PG(丙二醇)悬浮在生理盐水液中配制口服。媒介物对照是没有FL7N-1的相同生理盐水悬浮液。在SCID小鼠的

侧腹区域 (PDX14244 的左侧, PDX27454 的右侧) 皮下植入实验性 SCID 小鼠皮下植入 30-40mg 单独的 PDX 肿瘤 (从维持肿瘤的小鼠中分离)。在移植的肿瘤 7-14 天后达到 100-200mm³ (指定为第 0 天) 时开始使用媒介物对照或 FL7N-1 进行治疗。如黑色箭头所示, 每周对 PDX 肿瘤的动物模型进行一次口服共 3 次治疗。我们的研究表明, 虽然 FL7N-1 表现出好的抗胰腺癌 PDX14244 肿瘤 (图 13A) 和抗结直肠癌 PDX27454 肿瘤 (图 13B), 但 FL7N-1 表现出了非常优异的抗视网膜母细胞瘤活性 (图 12A)。因此, FL7N-1 可能是开发用于治疗儿童罕见疾病视网膜母细胞瘤的优先候选药物。

[0276] FL118 平台药物衍生的 Wb 系列药物 (W-b1, W-b2, W-b3, W-b4, W-b5, W-b6, W-b7, W-b9, W-b10/Hx7) 在大肠癌 SW620 细胞建立的异种移植肿瘤中的抗肿瘤活性作用。使用 SW620 细胞在 SCID 小鼠中建立的异种移植肿瘤, 我们还测试了一组新的 FL118 平台衍生化合物 (W-b1, W-b2, W-b3, W-b4, W-b5, W-b6, W-b7, W-b9, W-b10/Hx7)。首先通过在 100-150μL 培养基中皮下注射 $2-5 \times 10^6$ SW620 细胞来建立人 SW620 异种移植肿瘤。通过在 SCID 小鼠侧面皮下接种 30-40mg 肿瘤组织 (从肿瘤维持的 SCID 小鼠中分离) 来建立 SW620 异种移植的小鼠模型。在移植的肿瘤 7-14 天后达到 100-200mm³ (指定的第 0 天) 时, 开始使用单个的化合物进行治疗。然后, 根据可用药物量, 以一系列剂量水平每周给药 1 次共 2 次治疗。在不含有有机溶剂的情况下, 将单个化合物与 HPBCD 溶合后与 2% HPMC (羟丙基甲基纤维素) 和 1% PG (丙二醇) 配制成生理盐水的悬浮液用于口服。赋形剂是相同的没有药物的悬浮液。我们对这些单个药物的体内测试表明, 尽管这些化合物大多数都显示出出色的抗肿瘤活性, 但 W-b2, W-b3 和 W-b6 的化合物在该 Wb- 系列中与其他化合物比较具有更高的抗肿瘤活性 (图 14-16)。

[0277] FL118 平台药物衍生的 Hx 系列药物 (Hx4, Hx5, Hx6 和 Hx7/W-b10) 在胰腺癌患者来源的异种移植 (PDX) 肿瘤模型 (PDX14244) 和结直肠癌 PDX 中的抗肿瘤活性。在胰腺癌 (PDX14244) 和结直肠癌 (PDX27454) 患者衍生的异种移植 (PDX) 肿瘤中, 我们还在动物模型中测试了另一组新的 FL118 平台衍生化合物 (Hx4, Hx5, Hx6 和 Hx7/W-b10) 的抗肿瘤作用。PDX 肿瘤最初是在 SCID 小鼠上建立的, 胰腺癌和大肠癌患者的肿瘤组织是在临床上从该疾病的转移部位获得的。在不含有有机溶剂的溶液中, 单个药为首先与 HPBCD (2-羟丙基-β-环糊精) 形成复合体再与 2% HPMC (羟丙基甲基纤维素) 和 1% PG (丙二醇) 悬浮在生理盐水液中配制口服。媒介物对照是没有药物的相同生理盐水悬浮液。在 SCID 小鼠的侧腹区域 (PDX14244 的左侧, PDX27454 的右侧) 皮下植入实验性 SCID 小鼠皮下植入 30-40mg 单独的 PDX 肿瘤 (从维持肿瘤的小鼠中分离)。在移植的肿瘤 7-14 天后达到 100-200mm³ (指定为第 0 天) 时开始使用媒介物对照或这些药物之一进行治疗。如黑色箭头所示, 每周对 PDX 肿瘤的动物模型进行一次口服共 3 次治疗。我们对这些药物的体内测试表明, 尽管每种化合物均显示出出色的抗肿瘤活性, 但 Hx6 和 Hx7/W-b10 化合物具有比其他两种化合物更高的抗肿瘤活性, 且具有良好的毒性此 (图 17-20)。

[0278] FL118 平台药物衍生的 7Q 系列药物 (7Q1-7Q24) 胰腺癌患者来源的 (PDX14244) 和/或结直肠癌患者来源的 (PDX27454) 异种移植肿瘤模型中的抗肿瘤活性。在胰腺癌 (PDX14244) 和/或结直肠癌 (PDX27454) 患者衍生的异种移植肿瘤中, 我们还在动物模型中测试了另一组新的 FL118 平台衍生 7Q 系列化合物的抗肿瘤作用。测试确定了 7Q6、7Q9 和 7Q24 在该 Q 系列化合物在这些肿瘤模型中排名前 3 位的化合物。具体来说, PDX 肿瘤最初是在 SCID 小鼠上建

立的,胰腺癌和大肠癌患者的肿瘤组织是在临床上从该疾病的转移部位获得的。在不含有有机溶剂的溶液中,单个药为首先与HP β CD (2-羟丙基- β -环糊精) 形成复合体再与2%HPMC (羟丙基甲基纤维素) 和1%PG (丙二醇) 悬浮在生理盐水液中配制口服。媒介物对照是没有药物的相同生理盐水悬浮液。在SCID小鼠的侧腹区域 (PDX14244的左侧,PDX27454的右侧) 皮下植入实验性SCID小鼠皮下植入30-40mg单独的PDX肿瘤(从维持肿瘤的小鼠中分离)。在移植的肿瘤7-14天后达到100-200mm³ (指定为第0天) 时开始使用媒介物对照或用7Q系列药物之一进行治疗。如黑色箭头所示,每周对PDX肿瘤的动物模型进行一次口服共4次治疗。对这些药物的体内测试表明,尽管每种化合物均显示出出色的抗肿瘤活性,但7Q6、7Q9和7Q24化合物的抗肿瘤活性要比该7Q系列中的其他化合物高得多(图21-23)。

[0279] FL118平台药物衍生的7Q系列药物 (7Q25-7Q48) 在结直肠癌PDX模型 (PDX27454) 中的抗肿瘤活性。在大肠癌患者源性异种移植肿瘤 (PDX27454) 中,我们在动物模型中测试了另一组7Q系列化合物 (2:7Q24-7Q48), 并确定在这个7Q系列化合物中,7Q28、7Q31、7Q32、7Q35和7Q36在该肿瘤模型中显示了很具有前途。具体来说,PDX肿瘤最初是在SCID小鼠上建立的,胰腺癌和大肠癌患者的肿瘤组织是在临床上从该疾病的转移部位获得的。在不含有有机溶剂的溶液中,单个药为首先与HP β CD (2-羟丙基- β -环糊精) 形成复合体再与2%HPMC (羟丙基甲基纤维素) 和1%PG (丙二醇) 悬浮在生理盐水液中配制口服。媒介物对照是没有药物的相同生理盐水悬浮液。在SCID小鼠的侧腹区域 (PDX14244的左侧,PDX27454的右侧) 皮下植入实验性SCID小鼠皮下植入30-40mg单独的PDX肿瘤(从维持肿瘤的小鼠中分离)。在移植的肿瘤7-14天后达到100-200mm³ (指定为第0天) 时开始使用媒介物对照或用7Q系列药物 (7Q24-7Q48) 之一进行治疗。如黑色箭头所示,每周对PDX肿瘤的动物模型进行一次口服共1次 (7Q28,7Q31,7Q35或7Q36) 或4次 (7Q32) 治疗。对这些药物的体内测试表明,与该7Q系列中的其他化合物相比,7Q28、7Q31、7Q32、7Q35和7Q36的化合物具有更高的抗肿瘤活性(图24-28)。

[0280] FL118平台药物衍生的9Q系列药物在胰腺癌患者来源的 (PDX14244) 和结直肠癌患者来源的 (PDX27454) 异种移植肿瘤模型中的抗肿瘤活性。在胰腺癌 (PDX14244) 和结直肠癌 (PDX27454) 患者衍生的异种移植肿瘤中,我们在动物模型中还测试了另一组新的FL118平台衍生9Q系列化合物的抗肿瘤作用。测试确定了9Q10、9Q17和9Q18在该9Q系列化合物在这些肿瘤模型中排名前3位的化合物。具体来说,PDX肿瘤最初是在SCID小鼠上建立的,胰腺癌和大肠癌患者的肿瘤组织是在临床上从该疾病的转移部位获得的。在不含有有机溶剂的溶液中,单个药为首先与HP β CD (2-羟丙基- β -环糊精) 形成复合体再与2%HPMC (羟丙基甲基纤维素) 和1%PG (丙二醇) 悬浮在生理盐水液中配制口服。媒介物对照是没有药物的相同生理盐水悬浮液。在SCID小鼠的侧腹区域 (PDX14244的左侧,PDX27454的右侧) 皮下植入实验性SCID小鼠皮下植入30-40mg单独的PDX肿瘤(从维持肿瘤的小鼠中分离)。在移植的肿瘤7-14天后达到100-200mm³ (指定为第0天) 时开始使用媒介物对照或用9Q系列药物之一进行治疗。如黑色箭头所示,每周对PDX肿瘤的动物模型进行一次口服共3次治疗。对这些药物的体内测试表明,尽管每种化合物均显示出抗肿瘤活性,但9Q10、9Q17和9Q18化合物比该9Q系列中的其他化合物具有更高的抗肿瘤活性(图29-31)。在此,我们要强调的是,尽管9Q系列化合物的抗肿瘤活性似乎比7Q系列化合物低,但9Q系列化合物的毒性也相对比7Q系列更好一些。

[0281] 以两种不同配方配制的FL118的口服给药的抗肿瘤活性和毒性比较:无有机溶剂的FL118水性悬浮液制剂(配方1)和乙醇-HPBCD-FL118复合悬浮液制剂(配方2)。我们以FL118药物为例,对本发明用于FL118或式1化合物的两种不同的配方制剂进行了对比测试。配方2中描述了制备乙醇-HPBCD-FL118复合悬浮液的详细过程,配方1中描述了制备无有机溶剂的药物水悬浮液的详细过程。在此测试示例中,乙醇-HPBCD-FL118复合悬浮液(配方2)包含40mg/mL药物(在这种情况下为FL118),在100%非水乙醇中的40%HPBCD。将这种储备状态的药物形式用生理盐水稀释80倍至0.5mg/mL药物(在这种情况下为FL118),然后再对小鼠口服。相比之下,不含有机溶剂的药物生理盐水悬浮液(配方1)是一种即用型悬浮液,其中包含0.5mg/mL药物(在这种情况下为FL118),0.5%HPBCD,2%HPMC和1%PG(丙二醇)。我们使用人类膀胱癌细胞系UMUC3建立的异种移植肿瘤模型进行研究。研究表明,尽管两种不同配方中的FL118均显示出具有相似毒性(体重变化),但似乎乙醇-HPBCD-FL118复合物(配方2)显示出比有机溶剂的配方有更好的抗肿瘤功效(图32)。

[0282] 在动物模型的人结肠直肠癌(PDX27454)患者来源的异种移植肿瘤中,在临床相容且方便的由喷雾干燥产生的FL118制剂进行测试抗肿瘤功效和毒性(体重变化)。将FL118配制成乙醇-HPBCD(2-羟丙基- β -环糊精)混合溶液,然后采用喷雾干燥法制得FL118-HPBCD配制的复合粉末。将FL118-HPBCD复合粉末研磨成 ≤ 400 目(37微米)的颗粒,然后将其溶于含5%PG(丙二醇)的生理盐水中制成悬浮液然后口服。媒介物对照是含5%PG的生理盐水和等效的HPBCD但不含FL118。实验SCID小鼠中PDX肿瘤的建立与图7和13中描述的相同。移植的肿瘤在7-14天后达到100-200mm³后(指定为第0天),在SCID小鼠上的PDX肿瘤经媒介物和FL118按箭头所示每周一次共4次口服给药。如图33所示,FL118在其一半的MTD时表现出很大的抗肿瘤活性而没有毒性(图33)。

[0283] 使用MTT测定法测试了在各种癌细胞类型中细胞生长和活力的抑制。表5显示了FL118平台衍生的7Q系列药物的IC₅₀/EC₅₀结果。表6显示了FL118平台衍生的9Q系列药物的IC₅₀/EC₅₀结果。FL118平台衍生的FL7s和FL7系列药物的IC₅₀/EC₅₀结果如表7所示。FL118平台衍生的FL7N系列药物的IC₅₀/EC₅₀结果如表8所示。FL118平台衍生的Wb-药物的IC₅₀/EC₅₀结果如表9所示。表10中显示了FL118平台衍生的Hx系列药物的IC₅₀/EC₅₀结果。

[0284] 用FL118或类似物制备亲和柱来纯化FL118或类似物的结合蛋白作为潜在的蛋白生物标志物和靶标以及用氘(3H)标记的FL118或类似物作为探针来发现ProtoArray蛋白阵列上的9,000多种人类蛋白中的潜在的蛋白生物标志物和靶标。通过使用这两种方法,我们发现了许多可以与FL118或类似物结合的蛋白质作为潜在的蛋白生物标志物和靶标。表12列出了排名靠前的候选蛋白生物标志物和靶标。

药物制剂过程

[0285] 新发明的制剂是对相关发明的进一步发展。参见PCT/US15/22095(使用FL118核心化学结构平台产生用于治疗人类疾病的FL118衍生物),通过引用将其全部内容合并于此。

[0286] 在两种情况下发明了用于口服的式1化合物的水性悬浮液制剂(在某些情况下,与iv或ip是相容的)。

[0287] 用于口服的式1化合物的水悬浮液制剂(配方1)的制备步骤如下:

[0288] 步骤1:在一些实施方案中,将一种类型的环糊精(例如羟丙基- β -环糊精,HPBCD)溶解在乙醇中;在另一些实施方案中,溶解在二甲亚砜(DMSO);在另一些实施方案中,溶解

在二甲基乙酰胺 (DMA) 中; 在另一些实施方案中, 溶解在二甲基甲酰胺 (DMF); 在另一些实施方案中, 溶解在N-甲基-2-吡咯烷酮 (NMP) 中; 在另一些实施方案中, 溶解在七氟丁酸/全氟丁酸 (HFBA/PFBA) 中。该浓度取决于将要溶解的式1化合物的量, 每个式1的化合物分子在经测试证明有效的有机溶剂 (例如乙醇, DMSO, DMA, DMF, NMP 或 HFBA/PFBA) 中应有1.5至2.0的环糊精 (例如HPBCD) 分子。但这些配方过程不能用以下有机试剂: 不能用二氯甲烷; 不能用氯仿; 不能用丙酮; 不能用四氢呋喃; 不能用1,4-二恶烷; 不能用三氯乙烯; 不能用1,1,二氯-1-氟乙烷; 不能用全氟聚醚; 不能用全氟己烷; 不能用三氟乙酸; 不能用五氟丙酸酐; 不能用全氯乙烯; 不能用双(三氟甲烷)磺酰胺不能用或全氟辛烷来制备适当浓度的有机溶剂-环糊精母液。

[0289] 步骤2: 通过剧烈涡旋 ≥ 1 小时或摇动 ≥ 24 小时, 将FL118或式1化合物溶解于有机溶剂-环糊精溶液中, 以确保完成药物装载制剂 (即100%药物/API加载到HPBCD中)。然后将所得的混合聚合物状态的悬浮液进行处理, 以除去这些有机溶剂。这可以通过不同的方法进行, 包括但不限于冻干, 鼓式干燥机, 降膜蒸发器, 薄膜蒸发器和利福法反应器以去除有机溶剂。对于某些此类有机溶剂悬浮液的复杂混合物, 例如在乙醇的情况下, 还可以通过喷雾干燥过程中使用惰性气氛在闭环喷雾干燥系统 (具有溶剂回收功能) 使通过喷雾干燥法来去除有机溶剂。

[0290] 步骤3: 然后将干燥状态的剩余的式1化合物-环糊精复合物粉末重悬于含有以下的生理盐水 (NaCl, pH5-6.5为0.85%) 溶液: 羟丙基甲基纤维素 (HPMC, 例如在2-5%下粘度为40-60cps的HPMC) 和丙二醇浓度 (PG, 1-5%), 聚乙二醇 (PEG) 300或PEG400 (0-4%)。对于这种悬浮液可以口服给药。式1化合物制剂的最终浓度可以在0.1至5mg/ml的范围内。

[0291] 制备粘度为40-60cps的HPMC的8%储备溶液 (用100mL作为例子):

[0292] 称重80g HPMC并将其加到1000mL厚的玻璃瓶中, 然后添加约900mL 85-95°C的热生理盐水并将其放入95°C的水浴中。在6小时中每15-30分钟摇晃一次, 然后将热生理盐水加到1000mL中形成8%HPMC。

[0293] 然后将1000mL的玻璃瓶固定在摇床上的水平位置, 并在室温以200rpm摇动过夜。应该是很厚的透明溶液出现。

[0294] 制备1000mL的含有1%PG的2%HPMC的溶液 (作为例子):

[0295] 250毫升8%HPMC+740毫升盐水+10毫升PG=1000毫升1%PG, 2%HPMC。

[0296] 本发明进一步提供了提供了口服, 腹腔内或静脉内给药的配方1改进形的式1化合物的水悬浮液制剂方法。其制备步骤如下:

[0297] 步骤1: 将一种类型的环糊精例如2-羟丙基- β -环糊精 (HPBCD) 溶解在100%无水乙醇中制得乙醇-HPBCD主溶液。但不能用DMSO; DMA; DMF; NMP或HFBA/PFBA; 而切也不能用: 二氯甲烷; 氯仿; 丙酮; 四氢呋喃; 1,4-二恶烷; 三氯乙烯; 1,1,二氯-1-氟乙烷; 全氟聚醚; 全氟己烷; 三氟乙酸; 五氟丙酸酐; 全氯乙烯; 双(三氟甲烷)磺酰胺; 或全氟辛烷。

[0298] 步骤2: 将FL118或式1化合物溶解于乙醇-HPBCD主溶液中以形成乙醇-HPBCD-药物复合物。

[0299] 步骤3: 然后通过使用闭环喷雾干燥系统进行乙醇-HPBCD-药物复合物悬浮液的喷雾干燥。在喷雾干燥过程中应该使用惰性气体 (例如氮气) 以形成惰性气氛。此过程将产生HPBCD-药物复合物粉末。

[0300] 步骤4:将制备的HPBCD-药物复合物粉末在真空下于30℃下进一步干燥过夜。使HPBCD-药物复合物粉末干燥以进行下一步喷射研磨。

[0301] 步骤5:使用喷射研磨系统/机器将HPBCD-药物复合物粉末研磨成细颗粒(≤ 37 微米)。

[0302] 步骤6:在对受试者/患者口服给药之前,将研磨的HPBCD-药物复合物粉末用含有 $\leq 5\%$ PG的生理盐水通过剧烈摇动重新悬浮之后对患者口服。

[0303] 下面提供了一个特定示例:

[0304] 1) 称重20g HPBCD,使其溶于100%非水乙醇中,使其总体积为100mL(注意,在这种情况下,需要约87mL非水乙醇)。通过摇晃 ≥ 1 小时以以确保溶解完全制成20%HPBCD-乙醇母液。

[0305] 2) 通过高速(例如1,000rpm)的磁力混合 ≥ 24 小时将2g FL118或式1化合物溶解于100mL 20%HPBCD-乙醇主溶液(即每mL 20mg药物)。

[0306] 3) 通过使用具有溶剂回收和惰性气体(例如氮气)的闭环喷雾干燥系统(以在喷雾干燥过程中形成惰性气氛),将乙醇-HPBCD-药物复合物悬浮液喷雾干燥。此过程将产生HPBCD-药物复合物粉末。注意,喷雾干燥过程中应搅拌乙醇-HPBCD-药物复合物悬浮液。

[0307] 4) 将制备的HPBCD-药物复合物粉末在真空下在30℃下干燥过夜,以使HPBCD-药物复合物粉末充分干燥以用于下一步喷射研磨。

[0308] 5) 喷射研磨的方法:将干燥的HPBCD-药物复合物粉末通过喷射磨机进行研磨,以得到细尺寸(≤ 37 微米/400目)的HPBCD-药物复合物粉末。

[0309] 6) 在患者口服之前,将研磨过的HPBCD-药物复合物粉末经剧烈摇晃悬浮在含有0-5%PG用生理盐水中形成0.1-10mg/mL的药物/API浓度。对于ip或iv途径,API药物浓度应为0.1-2mg/mL,对于po则应为1-10mg/mL。

[0310] 可以将研磨后的HPBCD-药物复合物粉末进一步配制成用于口服的片剂产品。可以按照以下步骤进行准备:

[0311] 步骤1:将研磨的HPBCD-药物复合物粉末(10-50%)与微晶纤维素(MCC,30%-80%),玉米淀粉(0%-40%),乳糖(10混合)%-25%),胶态二氧化硅(0%-3%),磷酸氢钙(1%-10%)和硬脂酸镁(0.2%-3%)混合进一步研磨以使每种成分均匀地分布在粉末中。

[0312] 步骤2:然后通过干压工艺将该光滑的粉末压制各种大小和形式的片剂。

[0313] 本公开不限于本申请中描述的特定实施例。如本领域技术人员将显而易见的,可以在不脱离其精神和范围的情况下进行许多修改和变型。除了本文列举的功能和方法之外,在本公开的范围内的功能上等效的方法和设备对于本领域技术人员从前述描述中将是显而易见的。这样的修改和变化旨在落入所附权利要求的范围内。本公开仅由所附权利要求的术语以及这些权利要求所赋予的等同物的全部范围来限制。应当理解,本公开内容不限于特定的方法,试剂,化合物组成或生物系统,它们当然可以变化。还应当理解为,本文所使用的术语仅出于描述特定实施方案的目的,而无意于进行限制。另外,在根据马库什(Markush)组描述本公开的特征或方面的情况下,本领域技术人员将认识到,由此也根据马库什组的任何单个成员或成员的子组描述本公开。

[0314] 如本领域技术人员将理解的,出于任何目的和所有目的,特别是在提供书面描述方面,本文公开的所有范围也涵盖任何和所有可能的子范围及其子范围的组合。任何列出

的范围都可以容易地识别为充分描述,并且可以将相同范围分解为至少相等的一半,三分之二,四分之一,五分之一,十分之几等。作为非限制性示例,可以容易地分解本文讨论的每个范围如本领域的技术人员将理解的,所有语言,例如“最多”,“至少”,“大于”,“小于”,以及“小于三分之一”,“中三分之一”和“上三分之一”等。包括所列举的数字,并且是指可以随后细分为上述子范围的范围。最后,如本领域技术人员将理解的,范围包括每个单独的构件。

[0315] 尽管本文已经公开了各个方面和说明性实施例,但是其他方面和实施例对于本领域技术人员将是显而易见的。本文公开的各个方面和实施例是出于说明的目的,而不是意图限制,真实的范围和精神由所附权利要求指示。

[0316] 本文引用的所有参考文献通过引用整体并入本文,以用于所有目的,其程度就好像每个单独的出版物,专利或专利申请出于所有目的通过引用整体地具体并单独地并入。

[0317] 前述概述仅是说明性的,而绝非意图是限制性的。除了上述说明性方面,实施例和特征之外,通过参考在本发明的详细描述中呈现的附图和示例,其他方面,实施例和特征将变得显而易见。

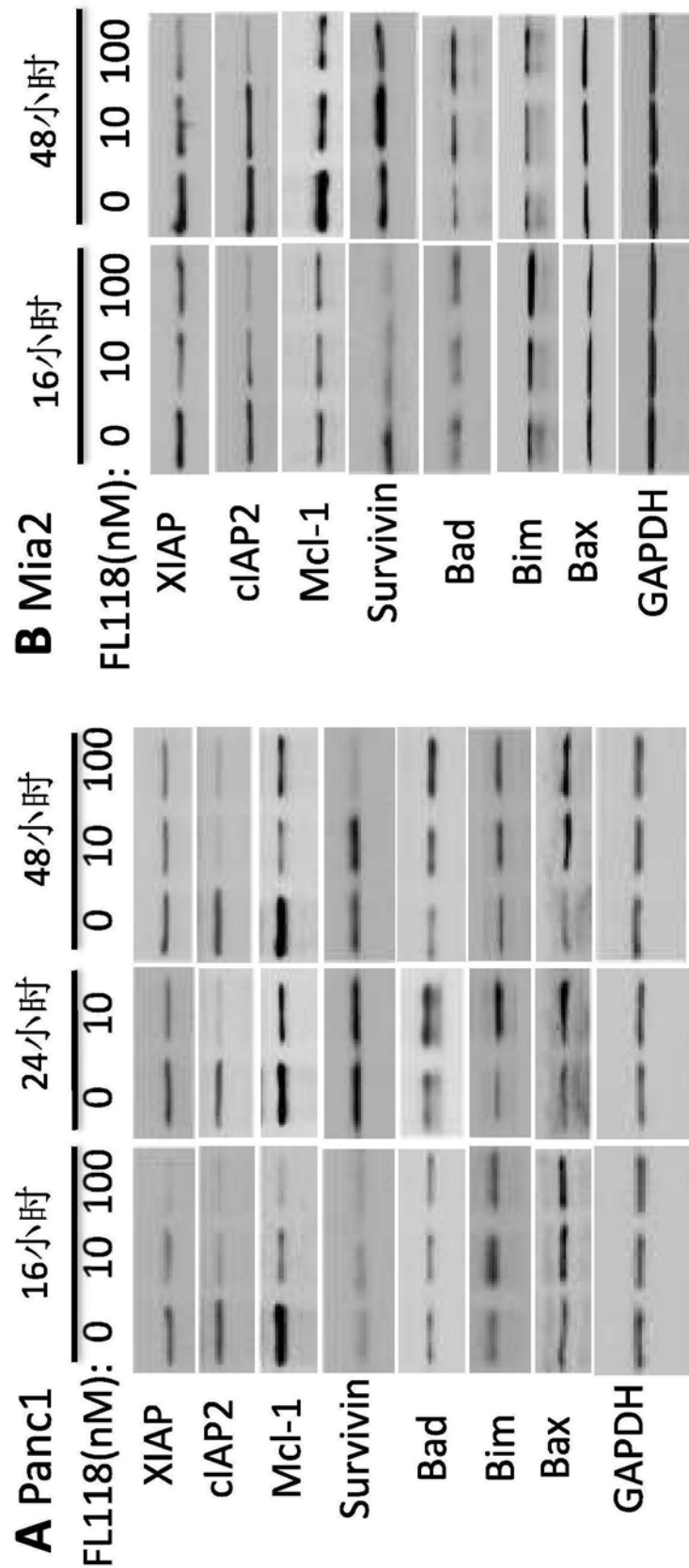


图1:FL118作为一种新药的平台药物,可有效抑制耐药胰腺癌干细胞样细胞中的多种抗凋亡蛋白

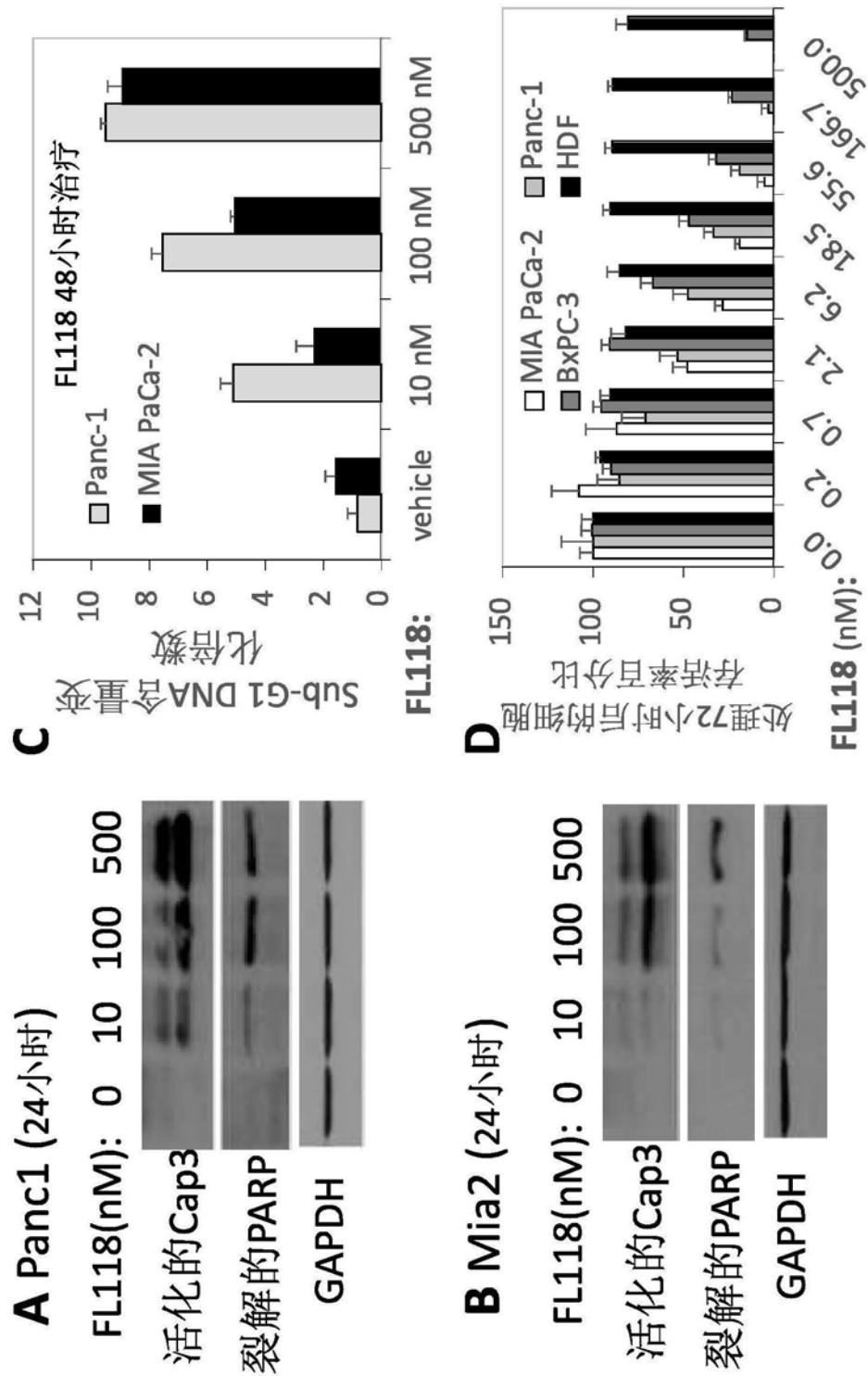


图2:FL118作为新药平台药物可有效抑制胰腺癌细胞的活力,并诱导细胞凋亡和细胞杀伤

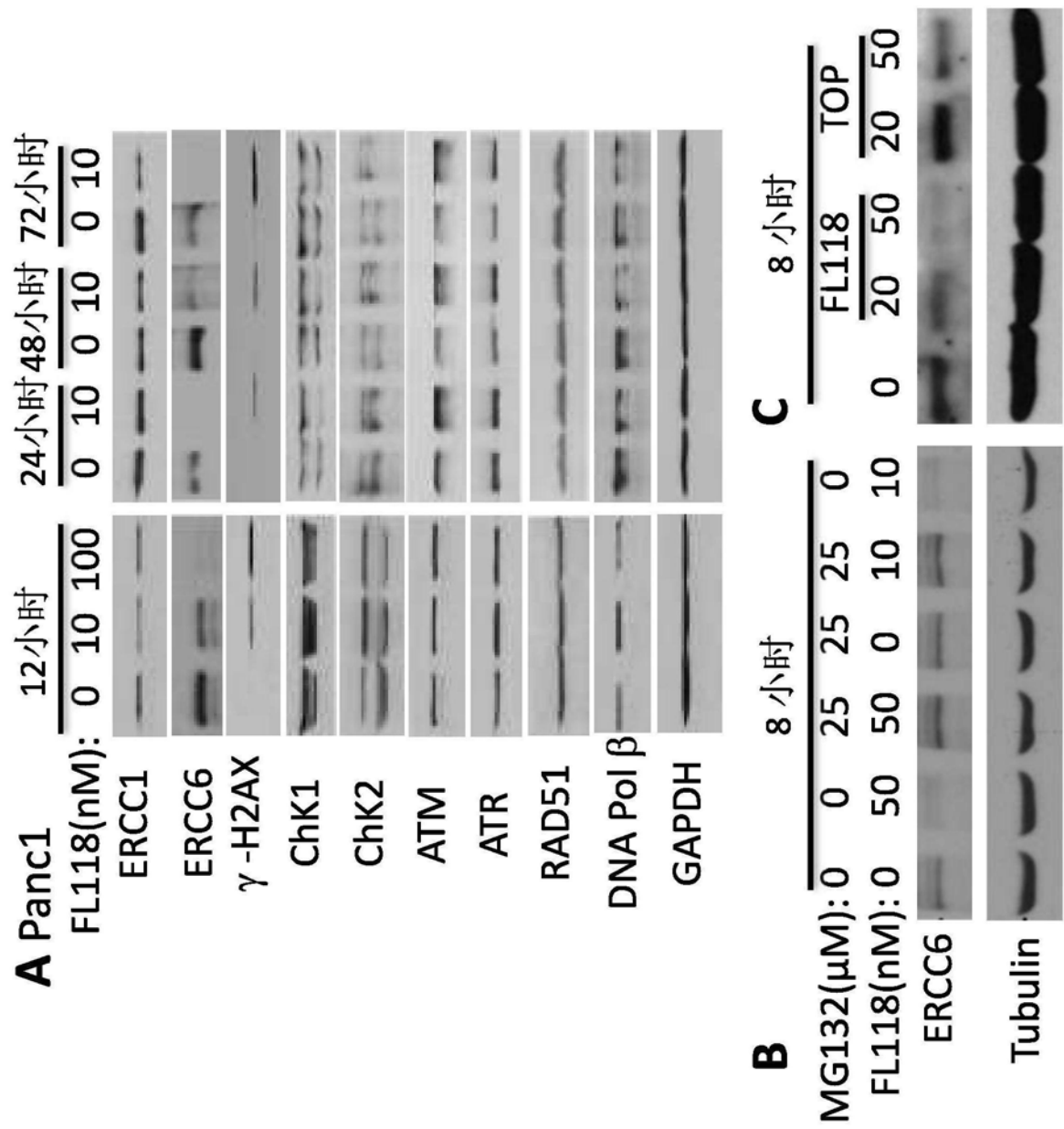


图3:FL118作为新药平台药物在耐药胰腺癌细胞中表现出对ERCC6的持续抑制和对 γ -H2AX 的诱导

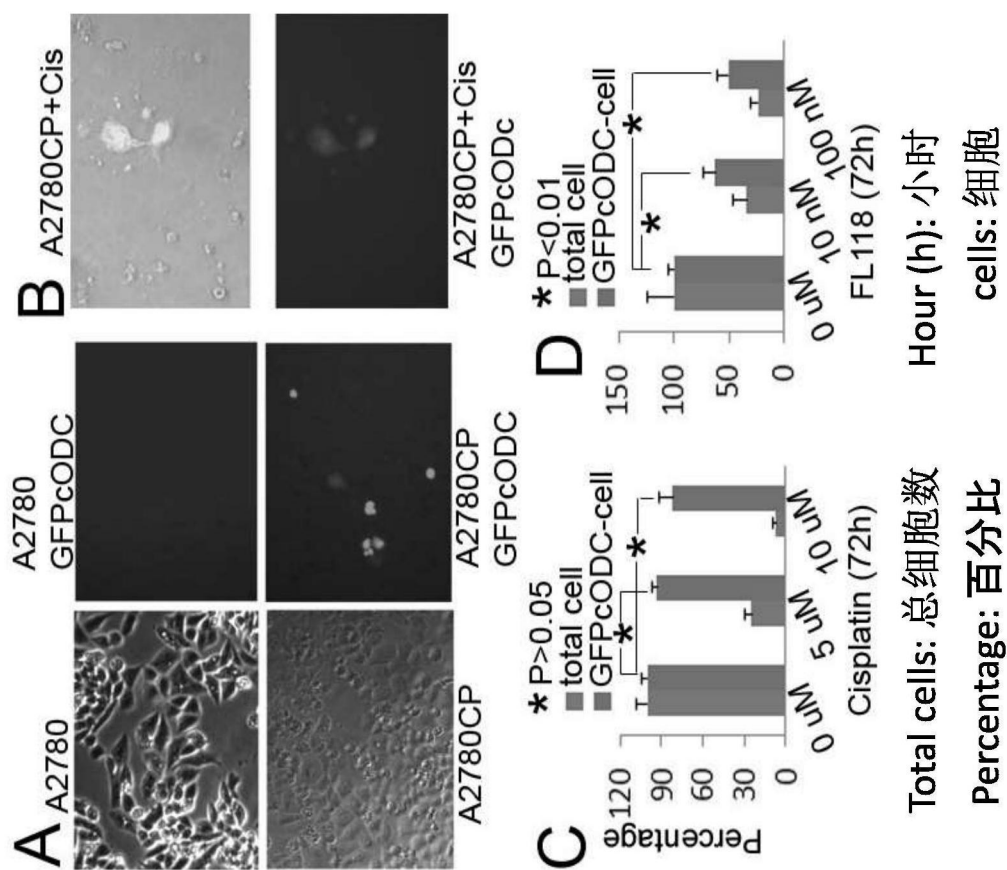
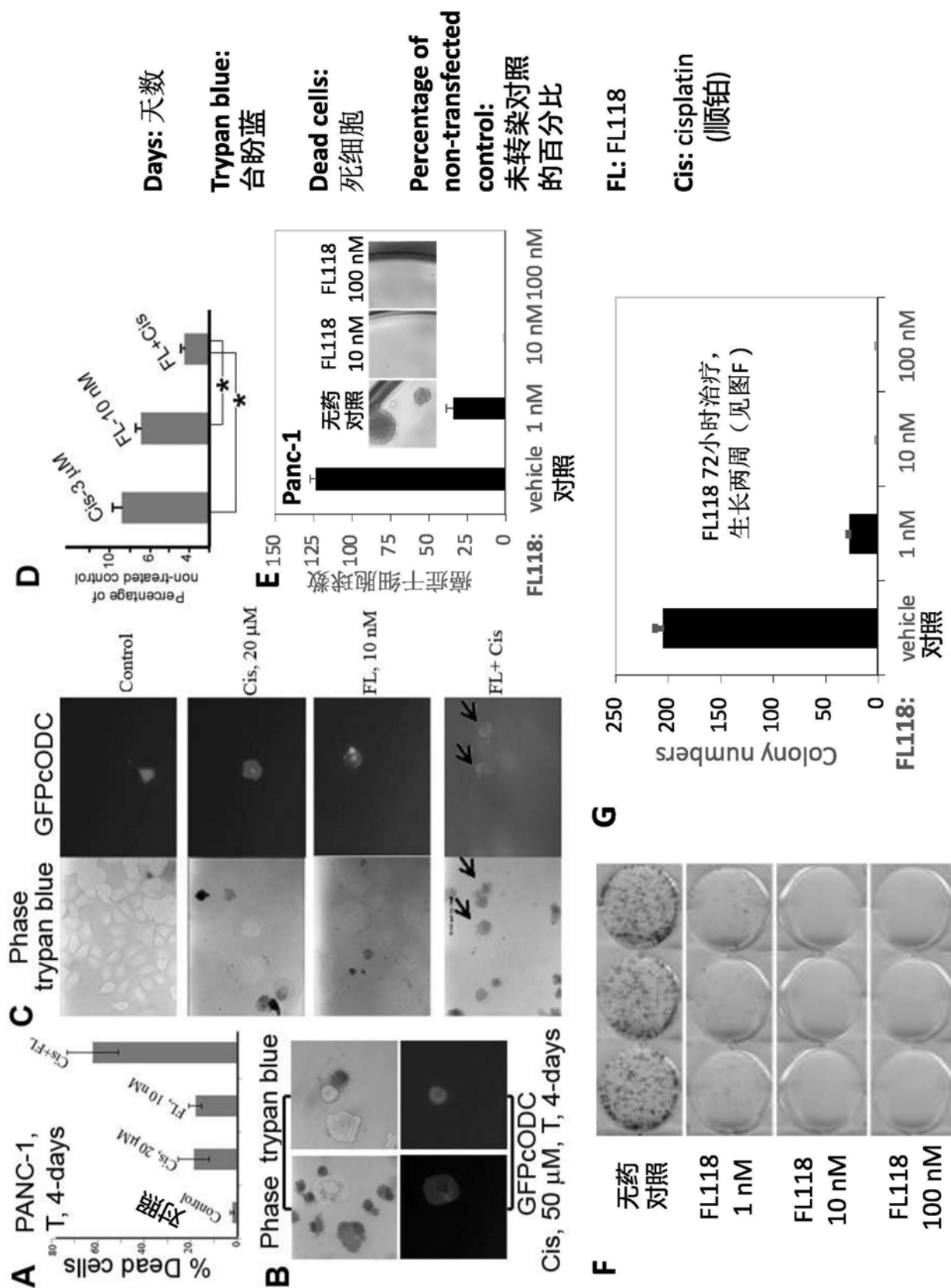


图4:FL118作为一种新的药物平台药物够消除耐药的GFPcODC阳性A2780CP细胞(而顺铂不能)



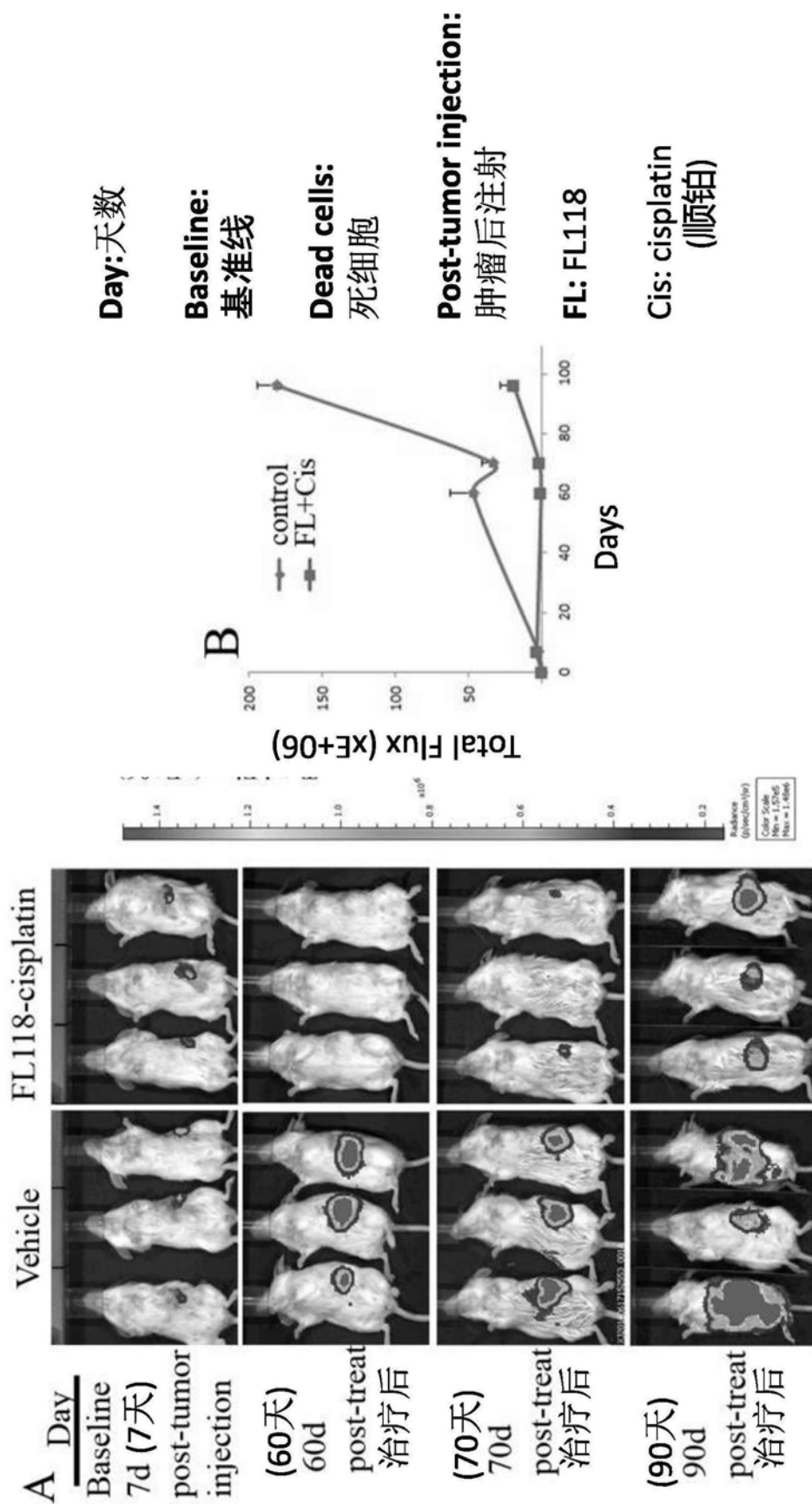


图6:FL118作为新药平台药物与顺铂组合可同时抑制胰腺癌细胞的生长和肿瘤转移

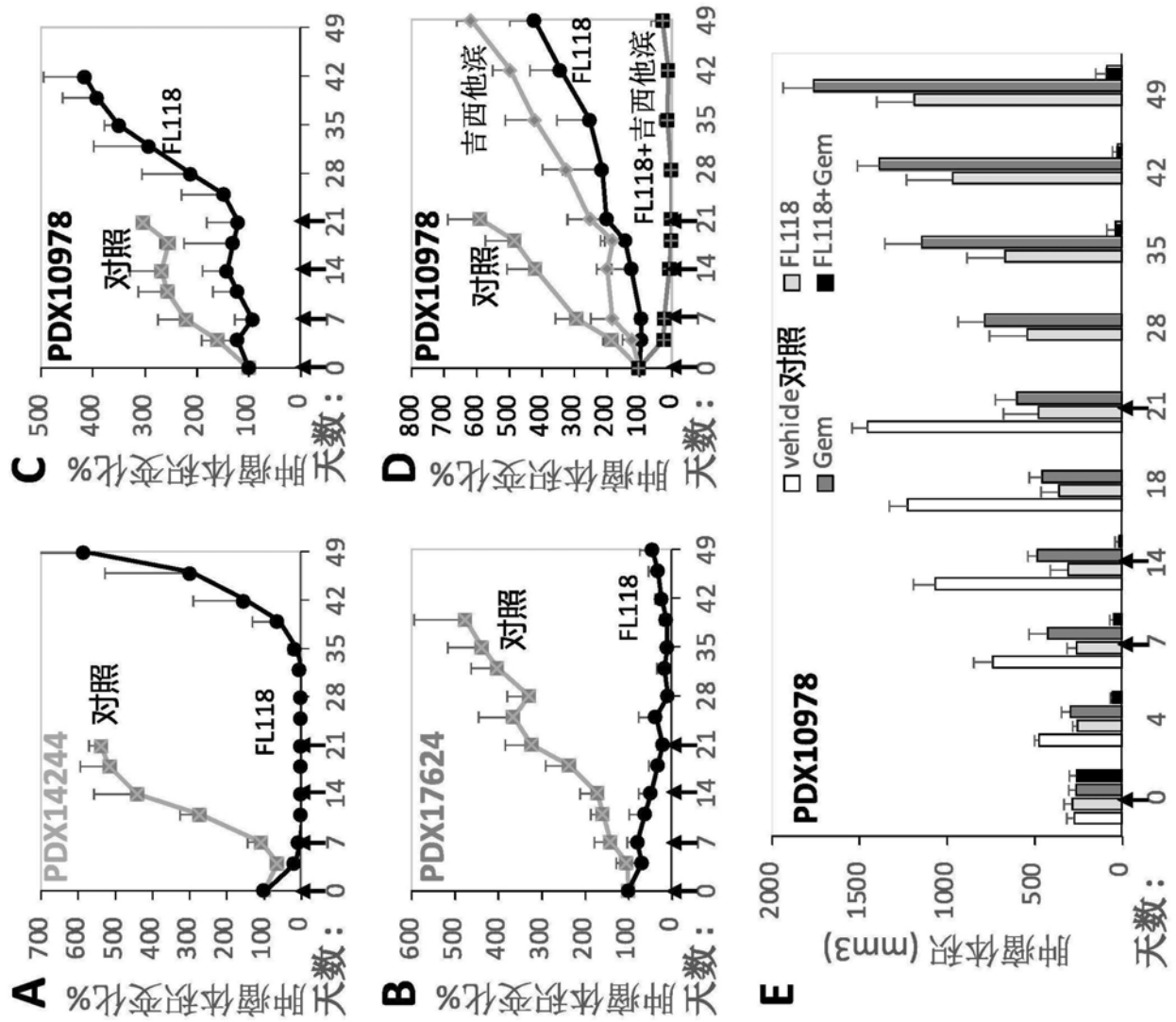


图7:FL118作为一种新的药物平台,可有效消除动物模型中单独或与吉西他滨联用的人胰腺导管腺癌(PDAC)肿瘤(口服)

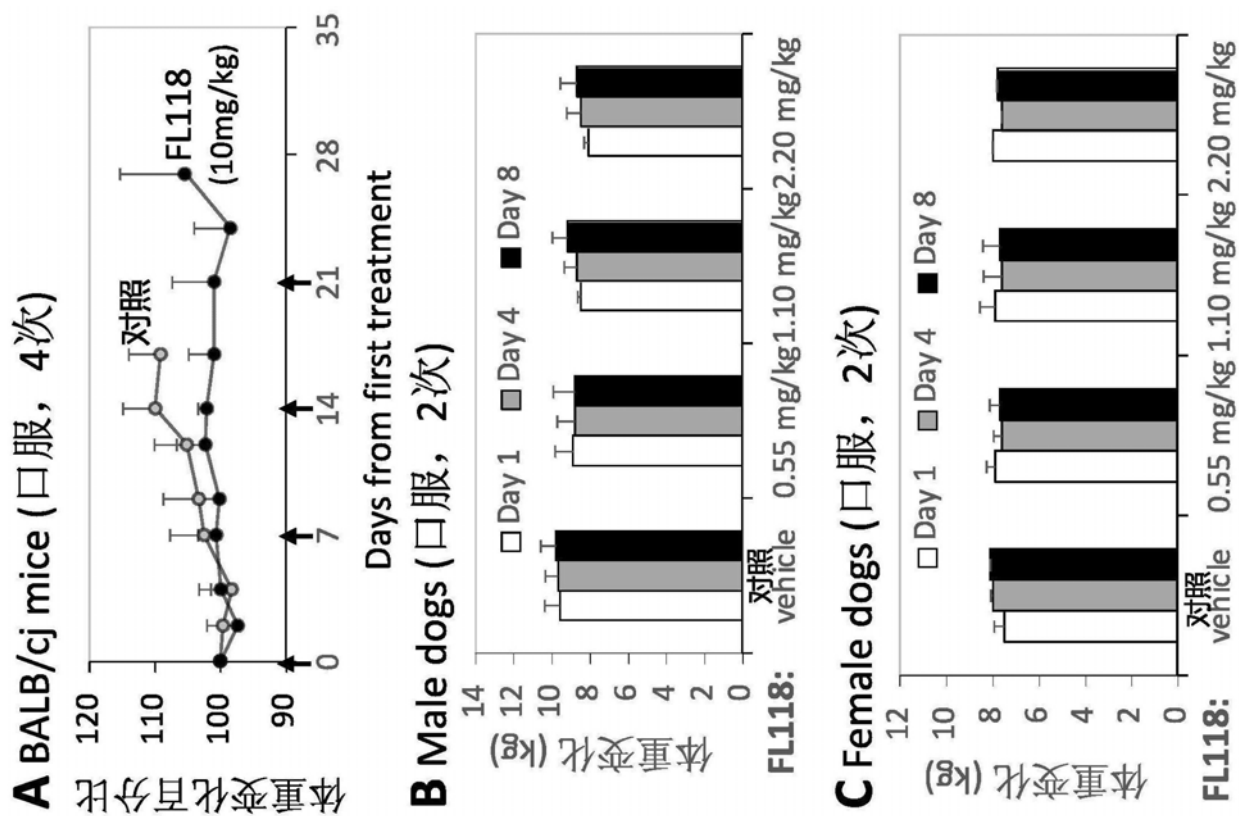


图8:新药平台FL118在鼠和犬类动物模型的治疗过程中均产生最小的毒性

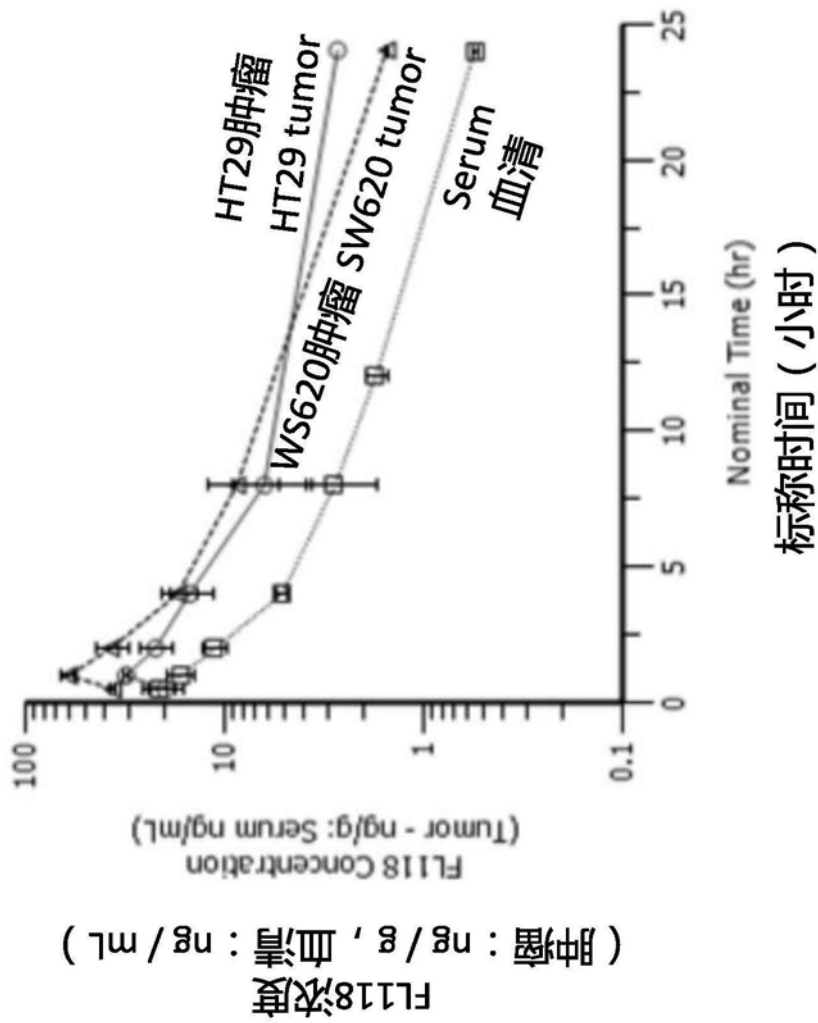


图9:FL118的口服给药也显示出良好的药代动力学

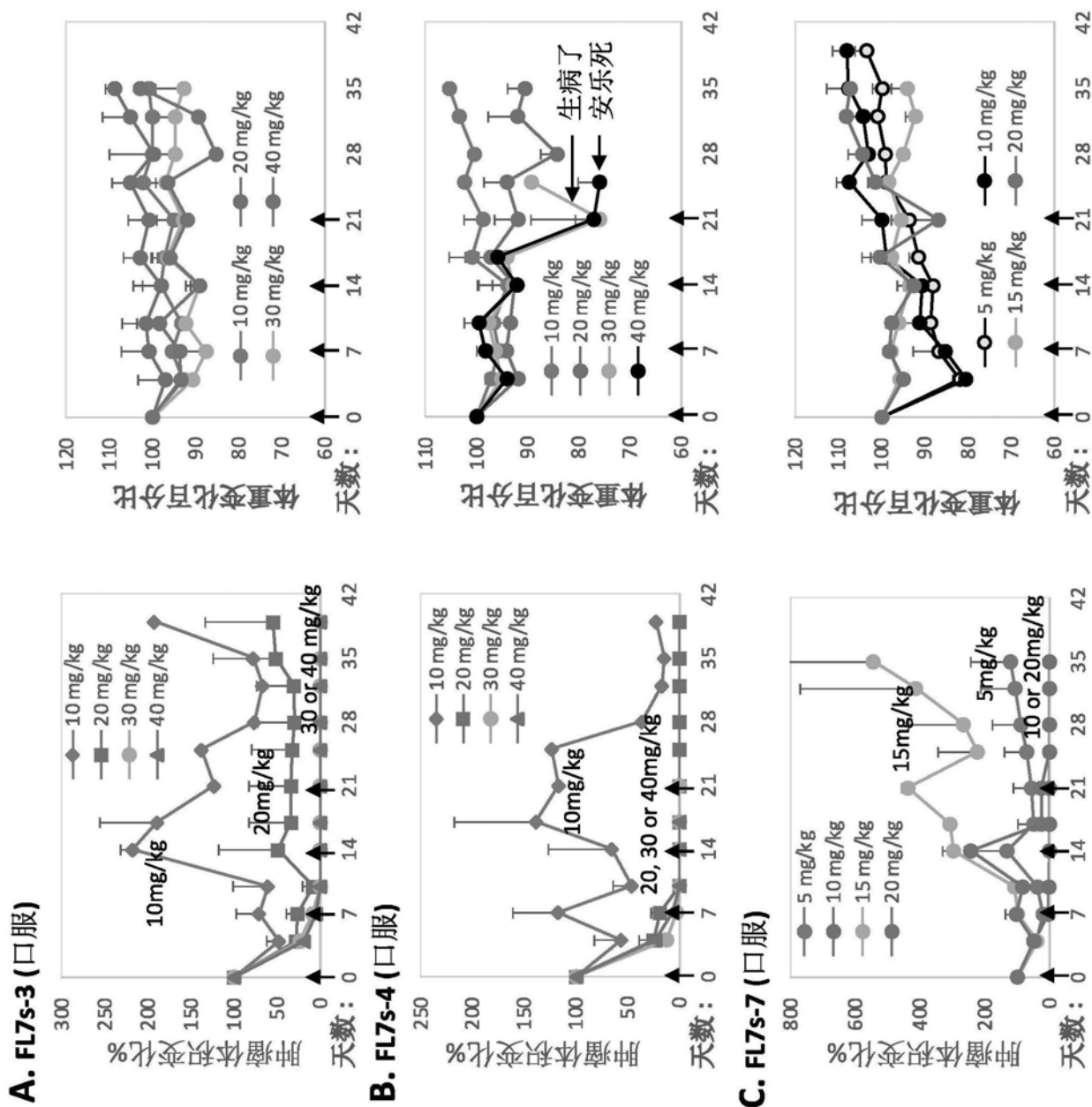


图10:FL7s-3,FL7s-4和FL7s-7抗癌药在HT-3视网膜母细胞瘤异种移植肿瘤中的抗肿瘤功效和毒性的重新测试

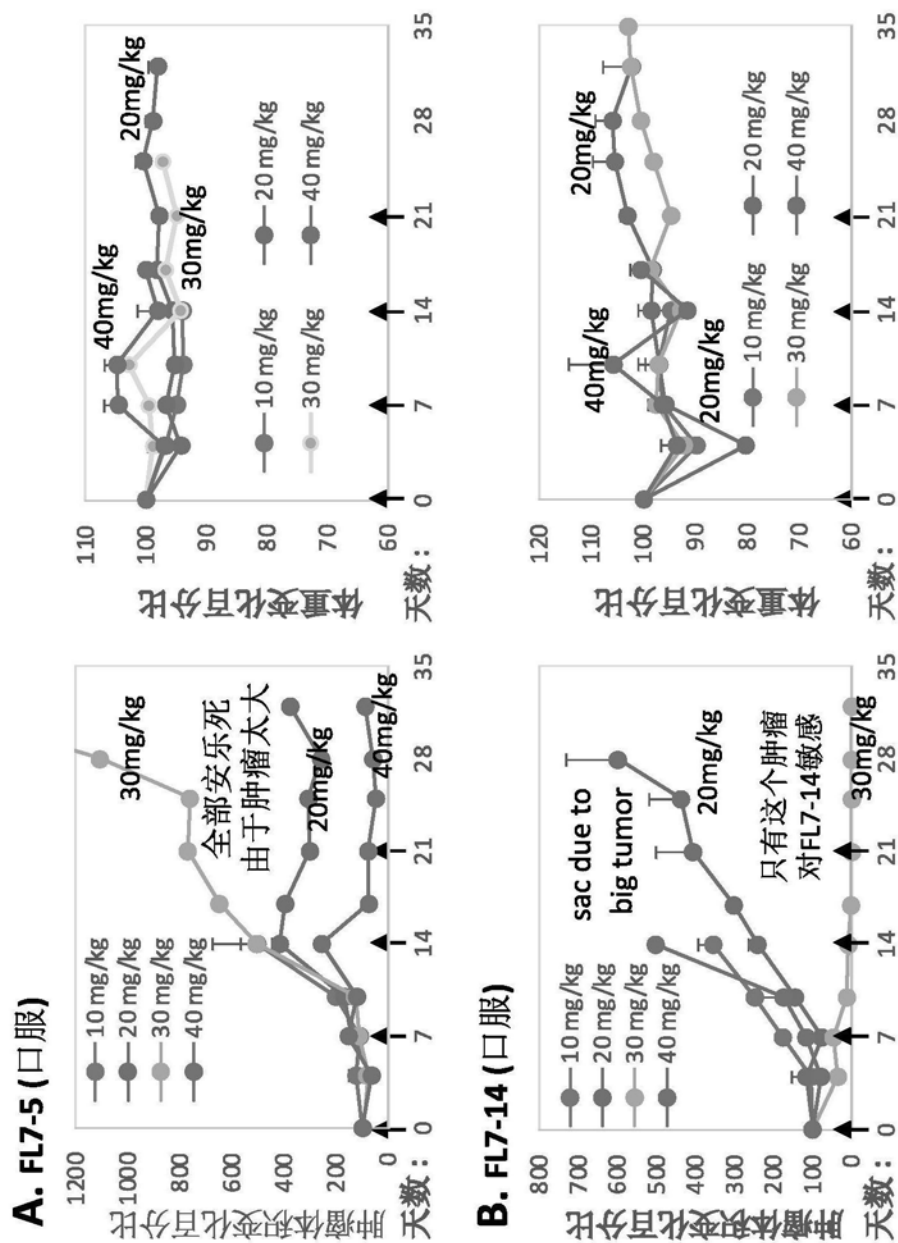


图11:FL7-5和FL7-14抗癌药在HT-3视网膜母细胞瘤异种移植肿瘤中的抗肿瘤功效和毒性的重新测试

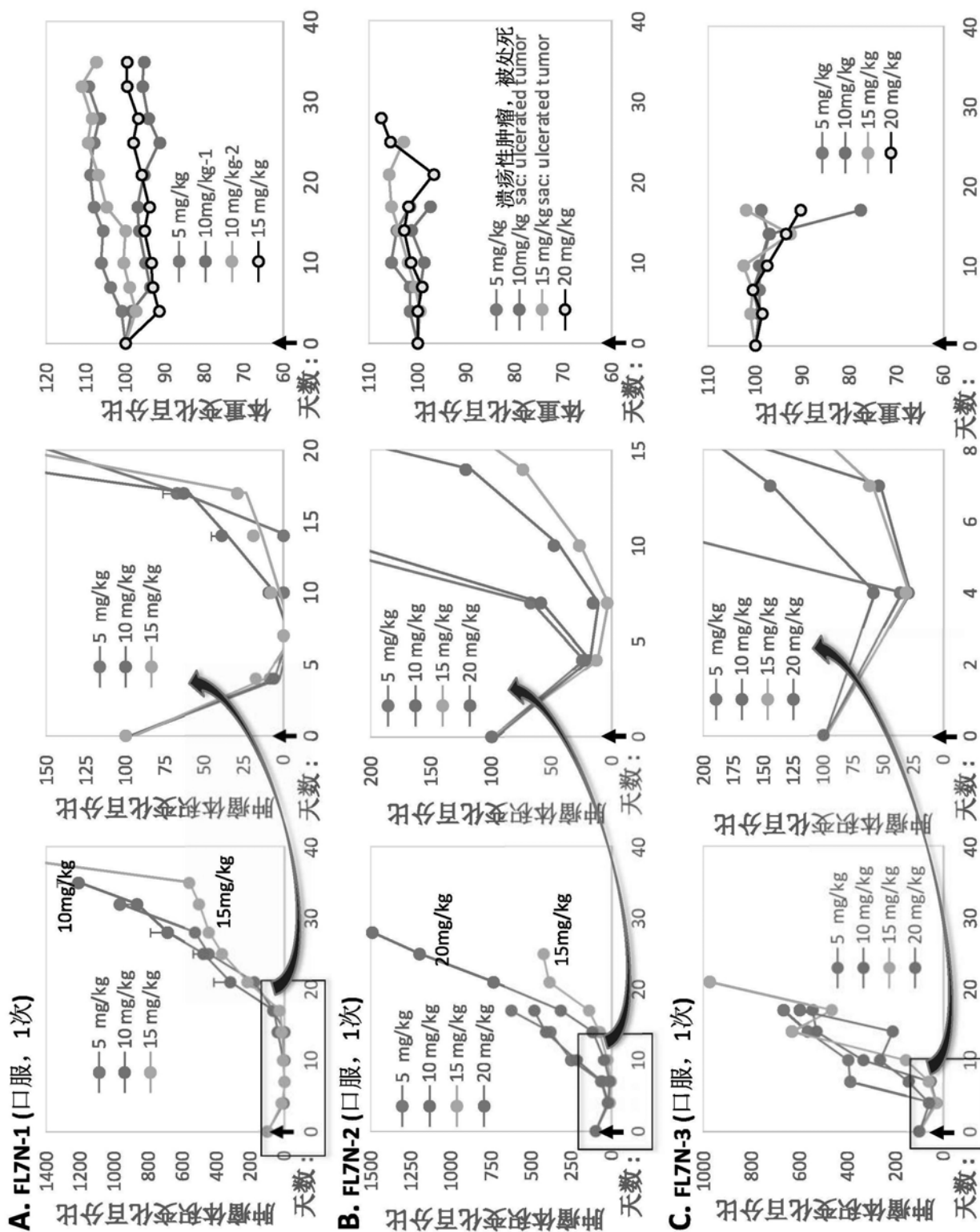


图12: FL7N-1, FL7N-2和FL7N-3抗癌药在HT-3视网膜母细胞瘤异种移植肿瘤中的抗肿瘤效力和毒性(体重变化)

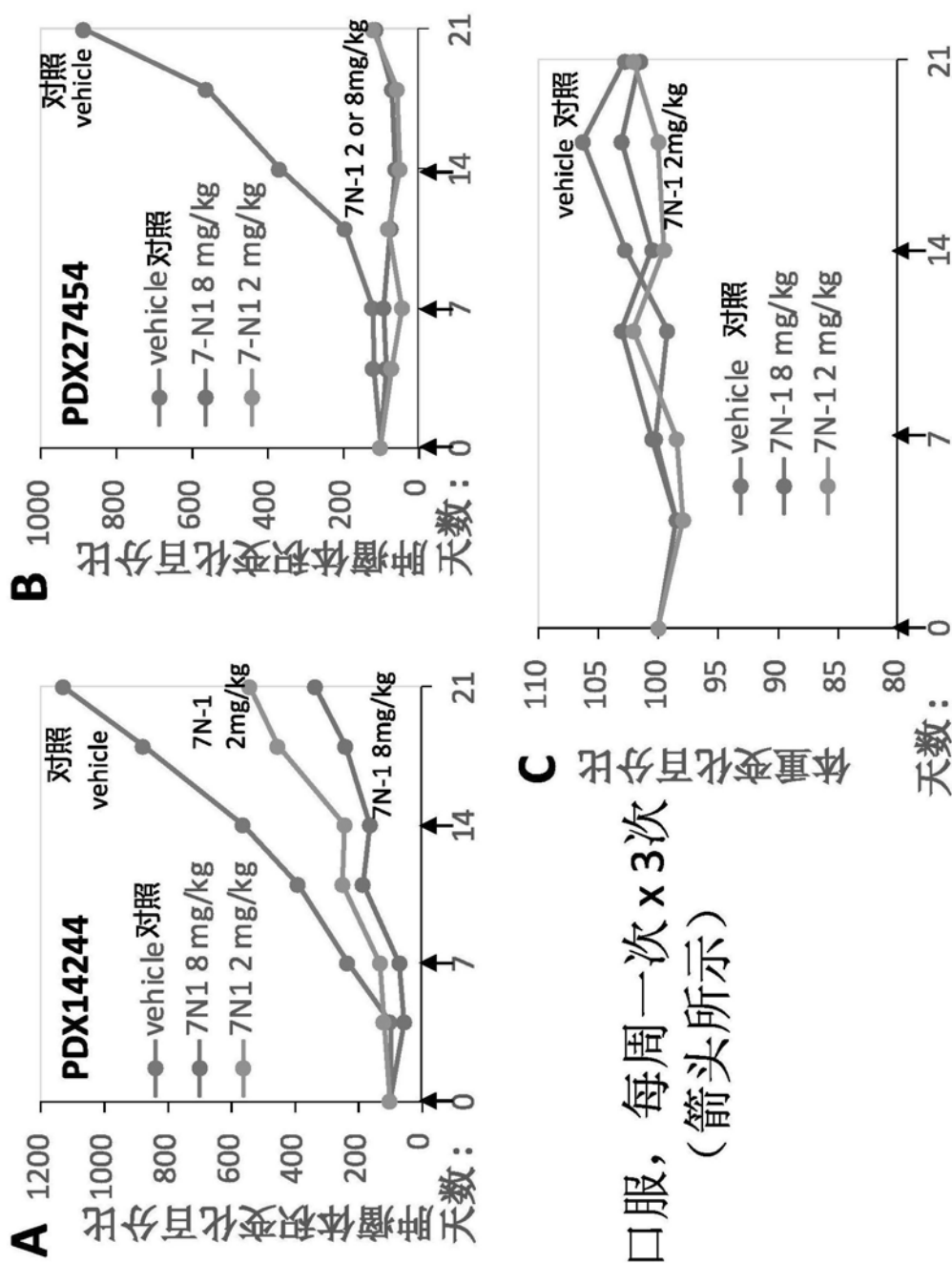


图13:FL7N1抗癌药在胰腺癌(PDX14244)和大肠癌(PDX27454)患者源性异种移植肿瘤中的抗肿瘤功效和毒性(体重变化)

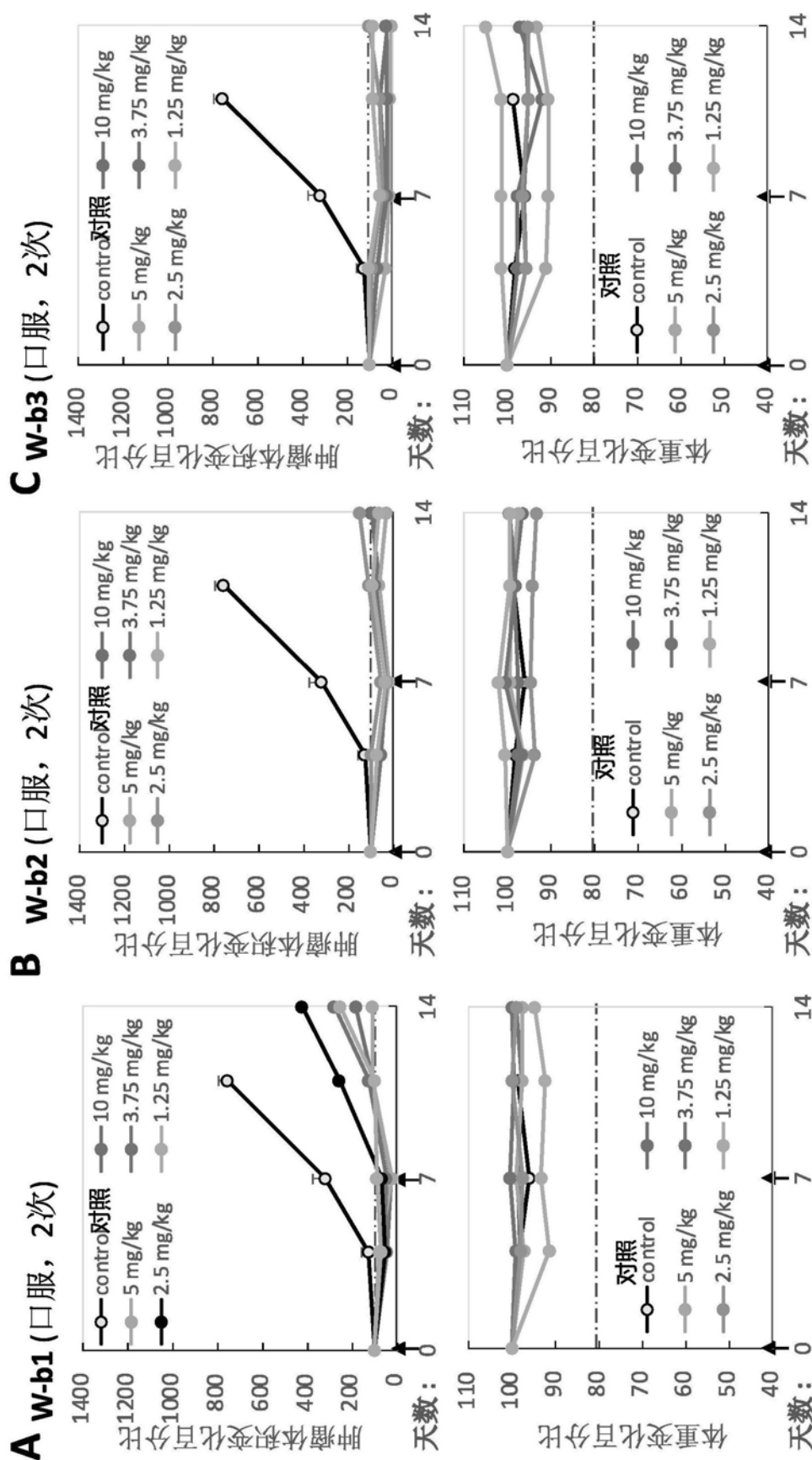


图14: W-b1, W-b2和W-b3抗癌药在SW620异种移植肿瘤中的抗肿瘤功效和毒性(体重变化)

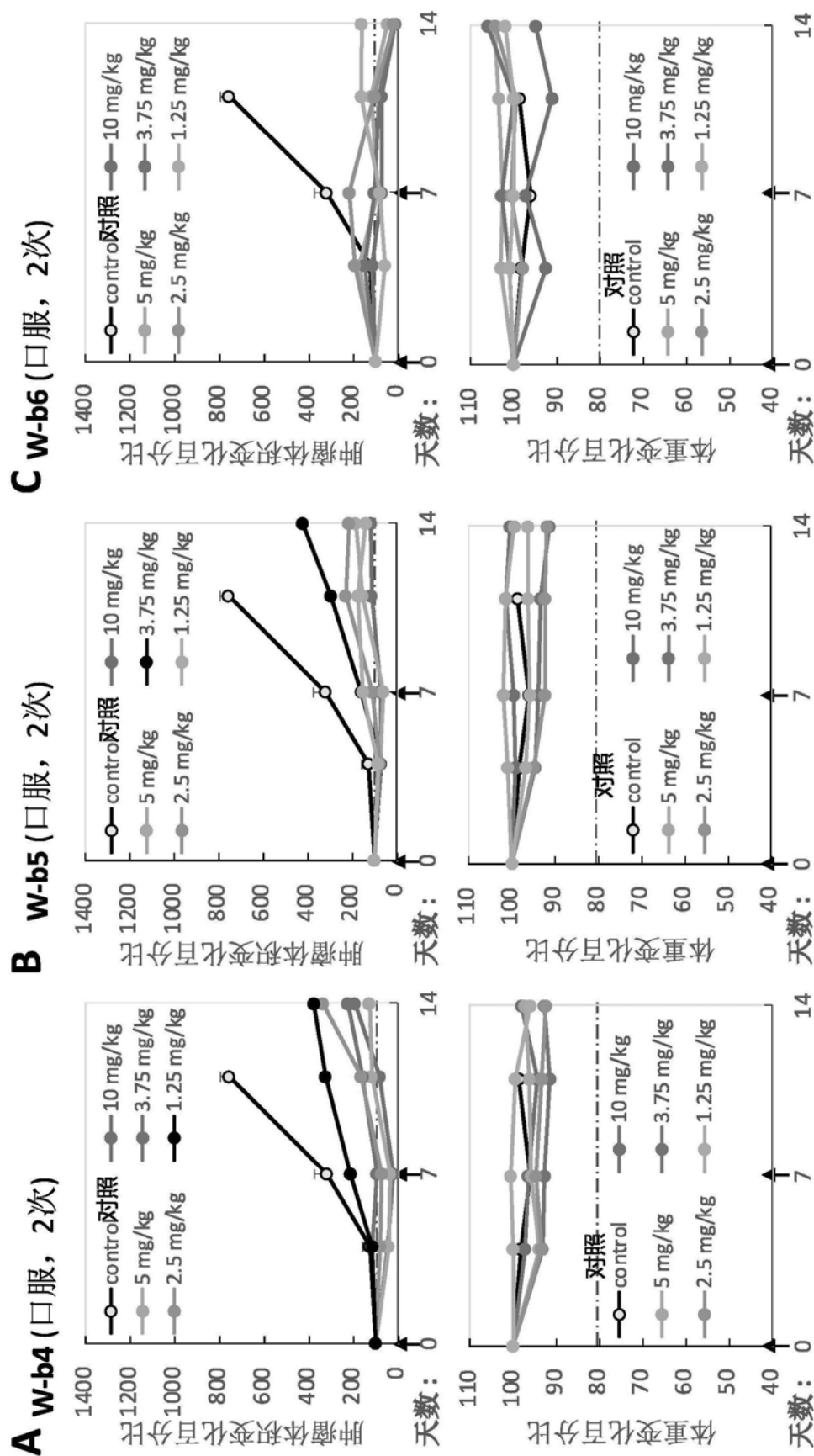


图15:W-b4,W-b5和W-b6抗癌药在SW620异种移植肿瘤中的抗肿瘤功效和毒性(体重变化)

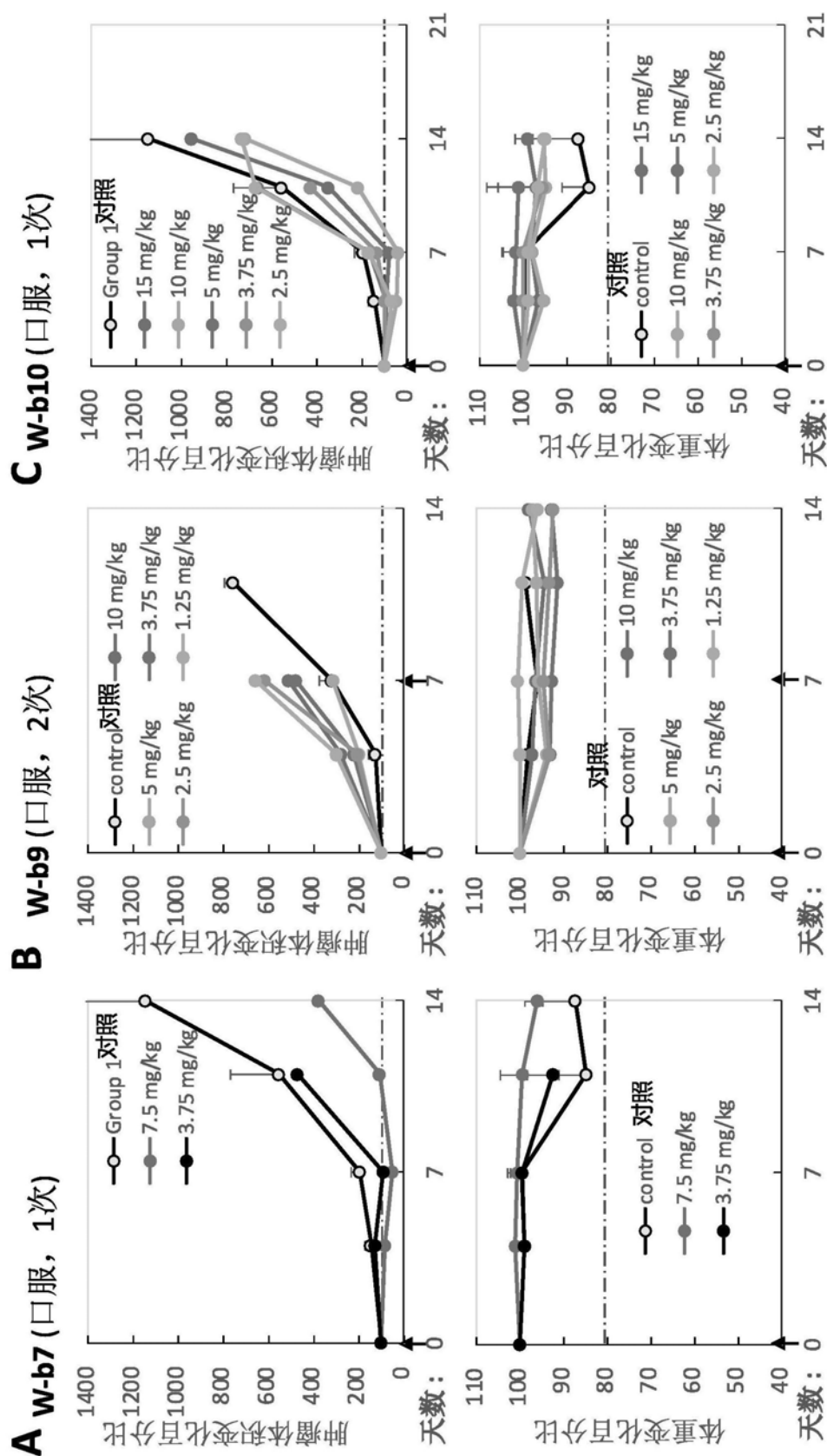


图16:W-b7,W-b9和W-b10(Hx7)抗癌药在SW620异种移植肿瘤中的抗肿瘤功效和毒性(体重变化)

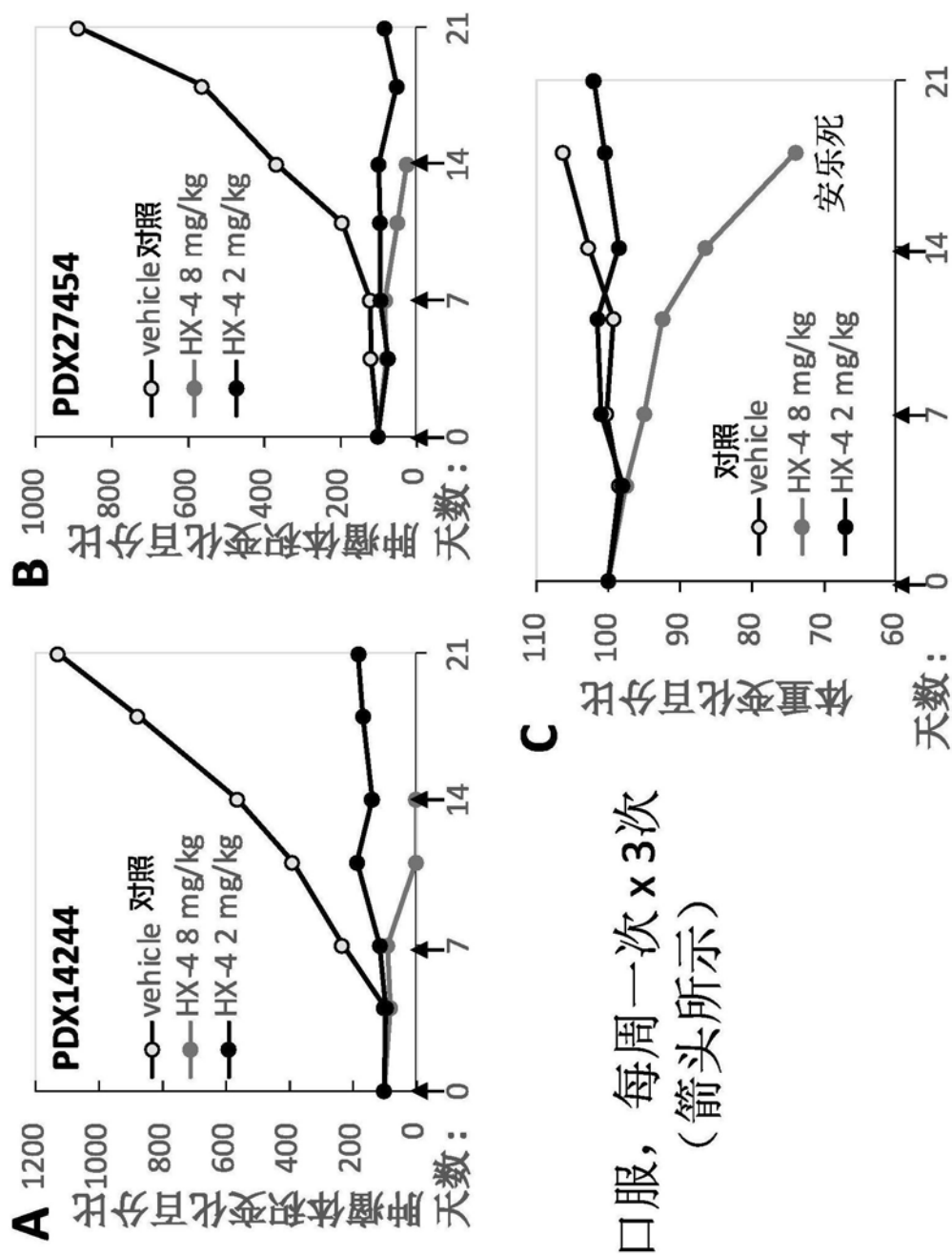


图17:Hx4抗癌药在胰腺癌 (PDX14244) 和结肠癌 (PDX27454) 患者源性异种移植肿瘤中的抗肿瘤功效和毒性 (体重变化)

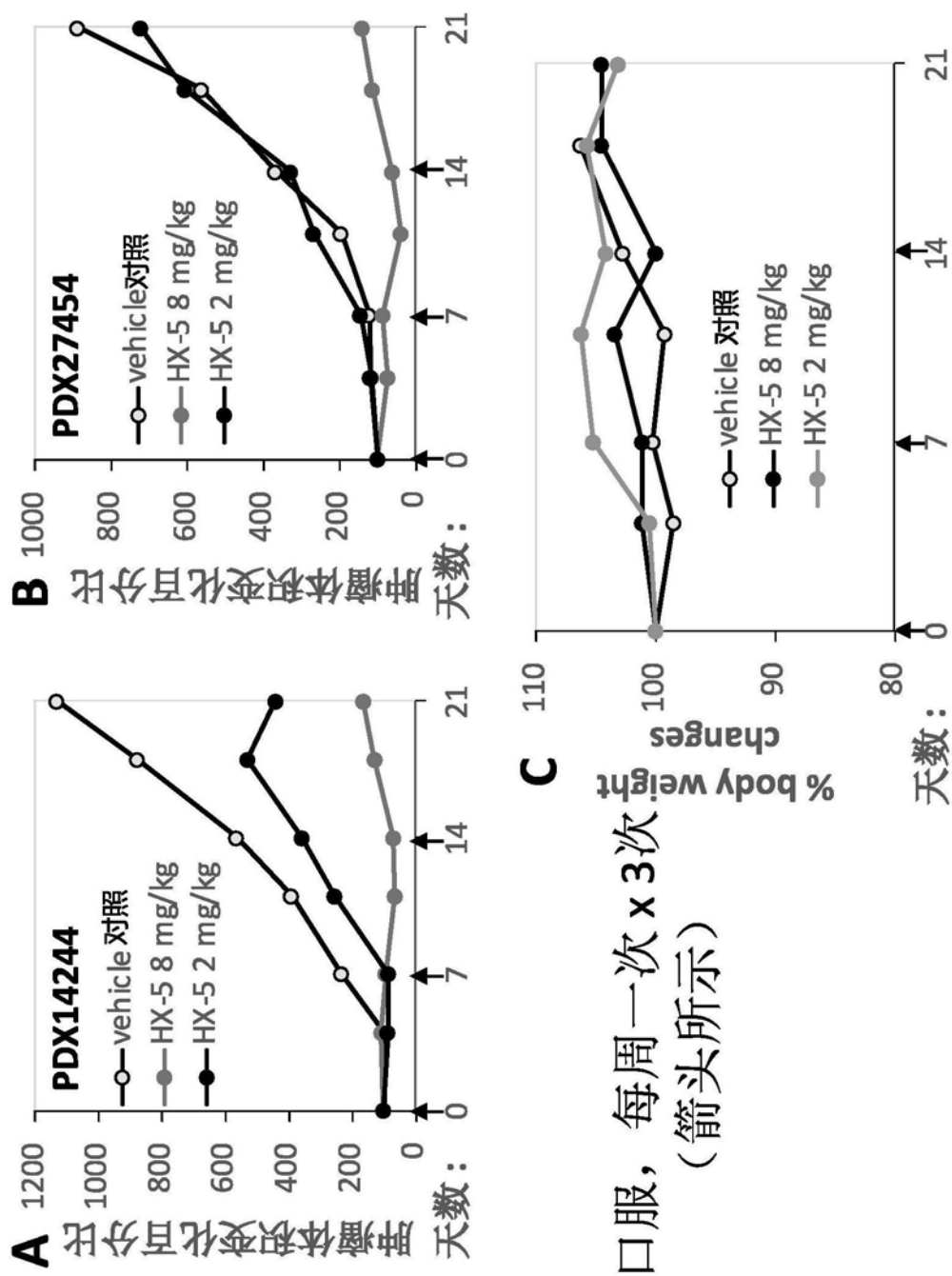


图18:Hx5抗癌药在胰腺癌 (PDX14244) 和结肠癌 (PDX27454) 患者源性异种移植 (PDX) 肿瘤中的抗肿瘤功效和毒性 (体重变化)

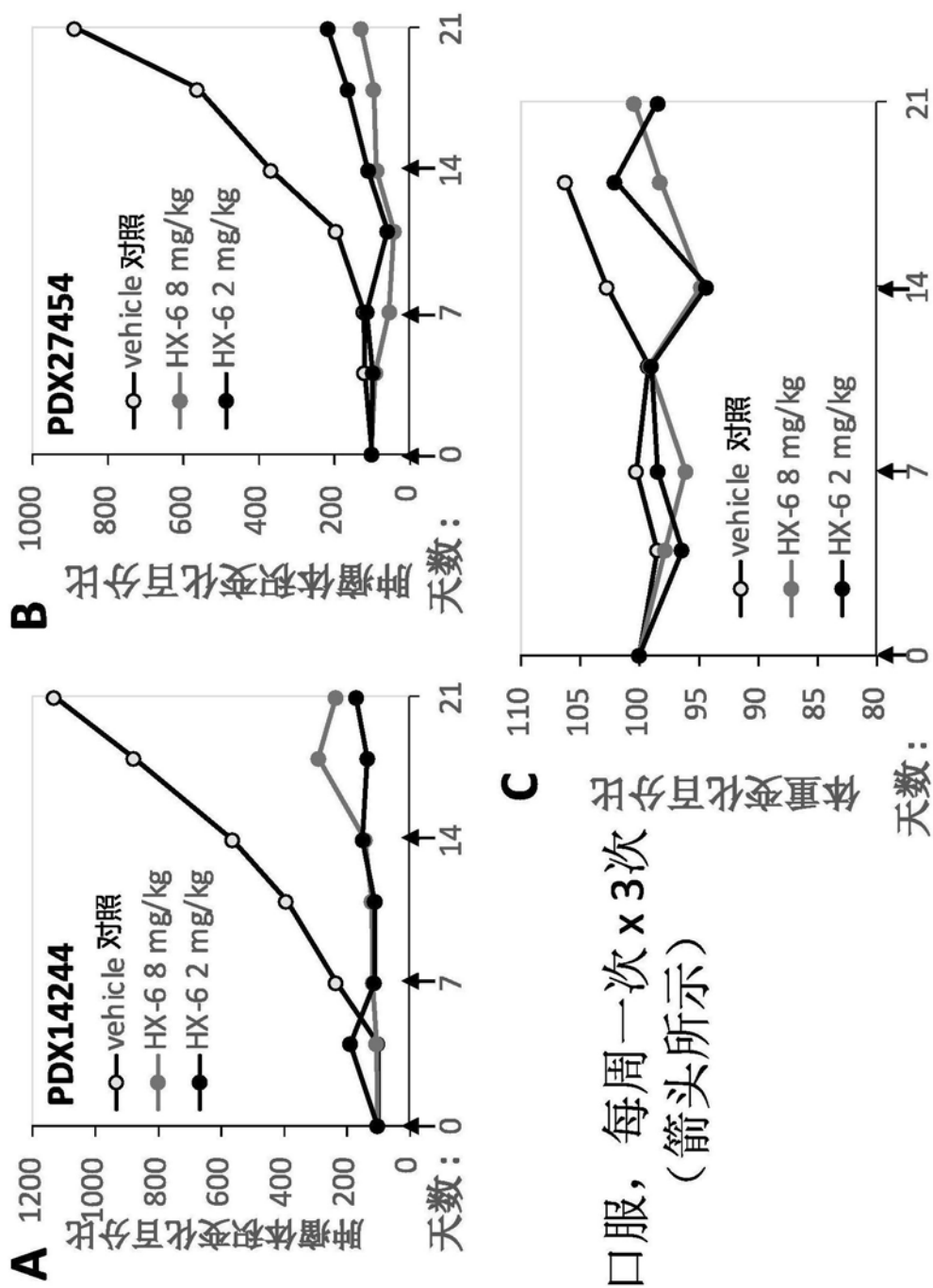


图19:Hx6抗癌药在胰腺癌(PDX14244)和大肠癌(PDX27454)患者源性异种移植肿瘤中的抗肿瘤功效和毒性(体重变化)

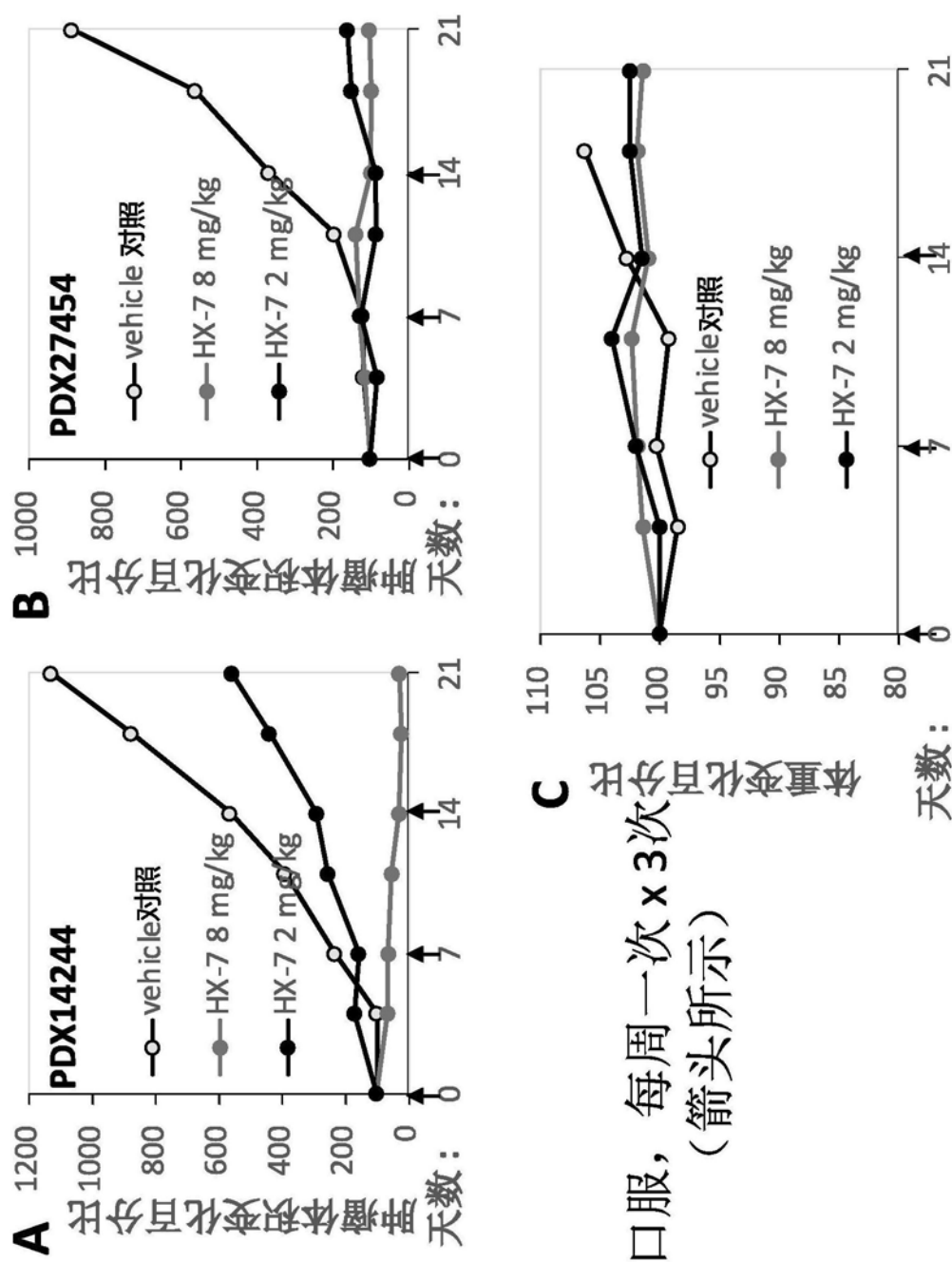


图20:Hx7 (W-b10) 抗癌药在胰腺癌 (PDX14244) 和结肠癌 (PDX27454) 患者源性异种移植肿瘤中的抗肿瘤功效和毒性(体重变化)

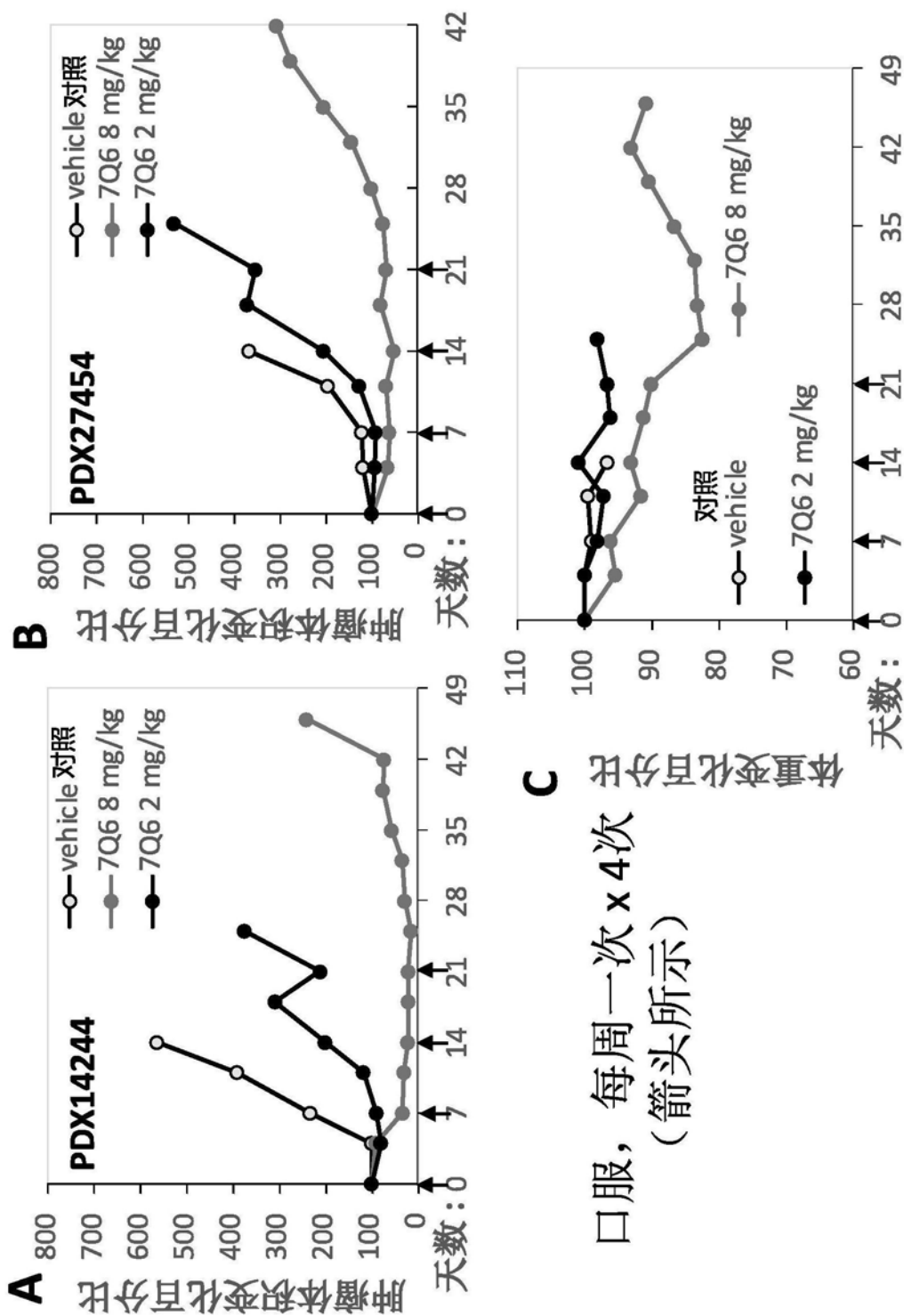


图21-1:7Q6抗癌药在胰腺癌 (PDX14244) 和大肠癌 (PDX27454) 患者源性异种移植肿瘤中的抗肿瘤功效和毒性(体重变化)

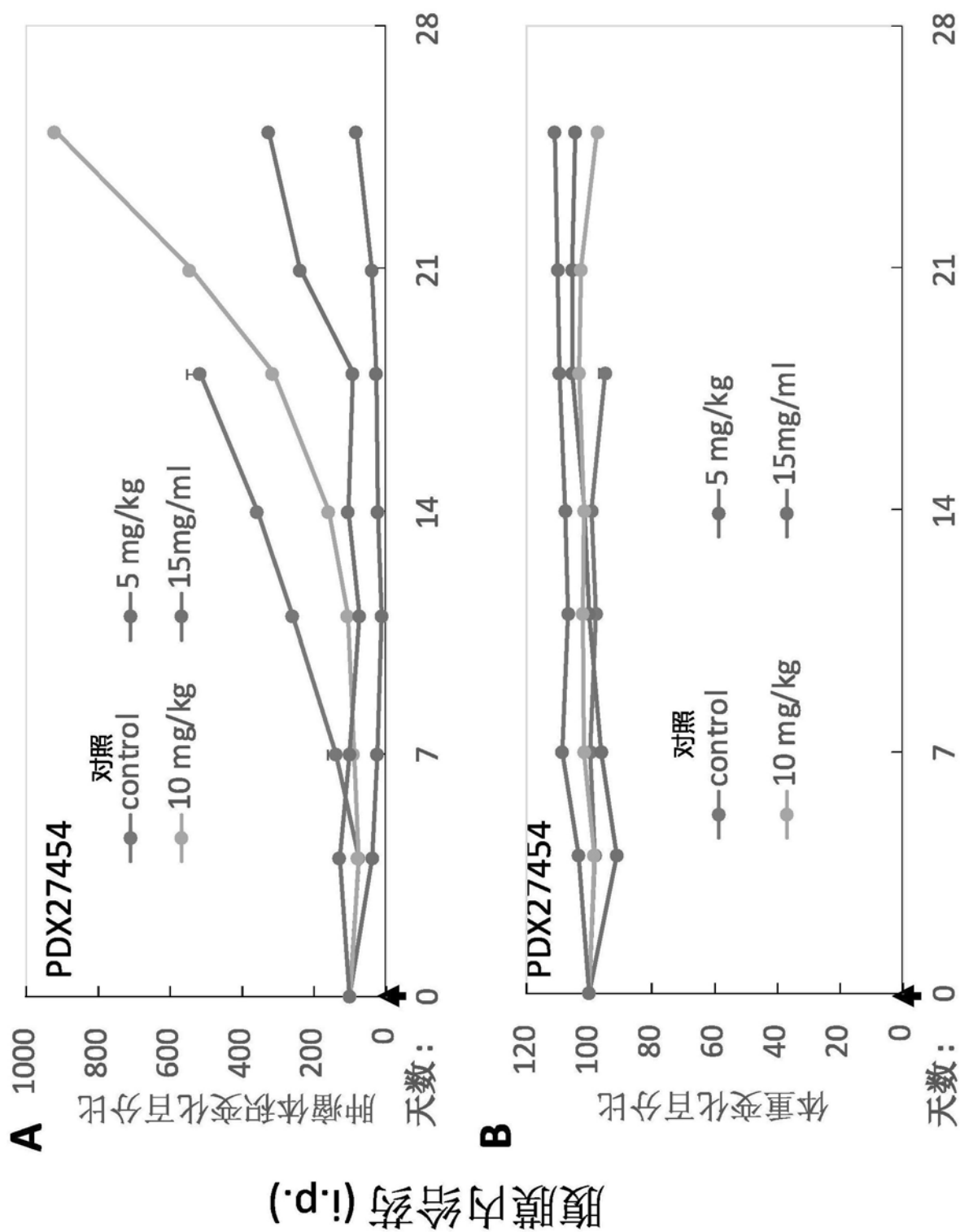


图21-2: 7Q6抗癌药在大肠癌患者源性异种移植肿瘤 (PDX27454) 中的抗肿瘤功效和毒性 (腹腔内注射一次)

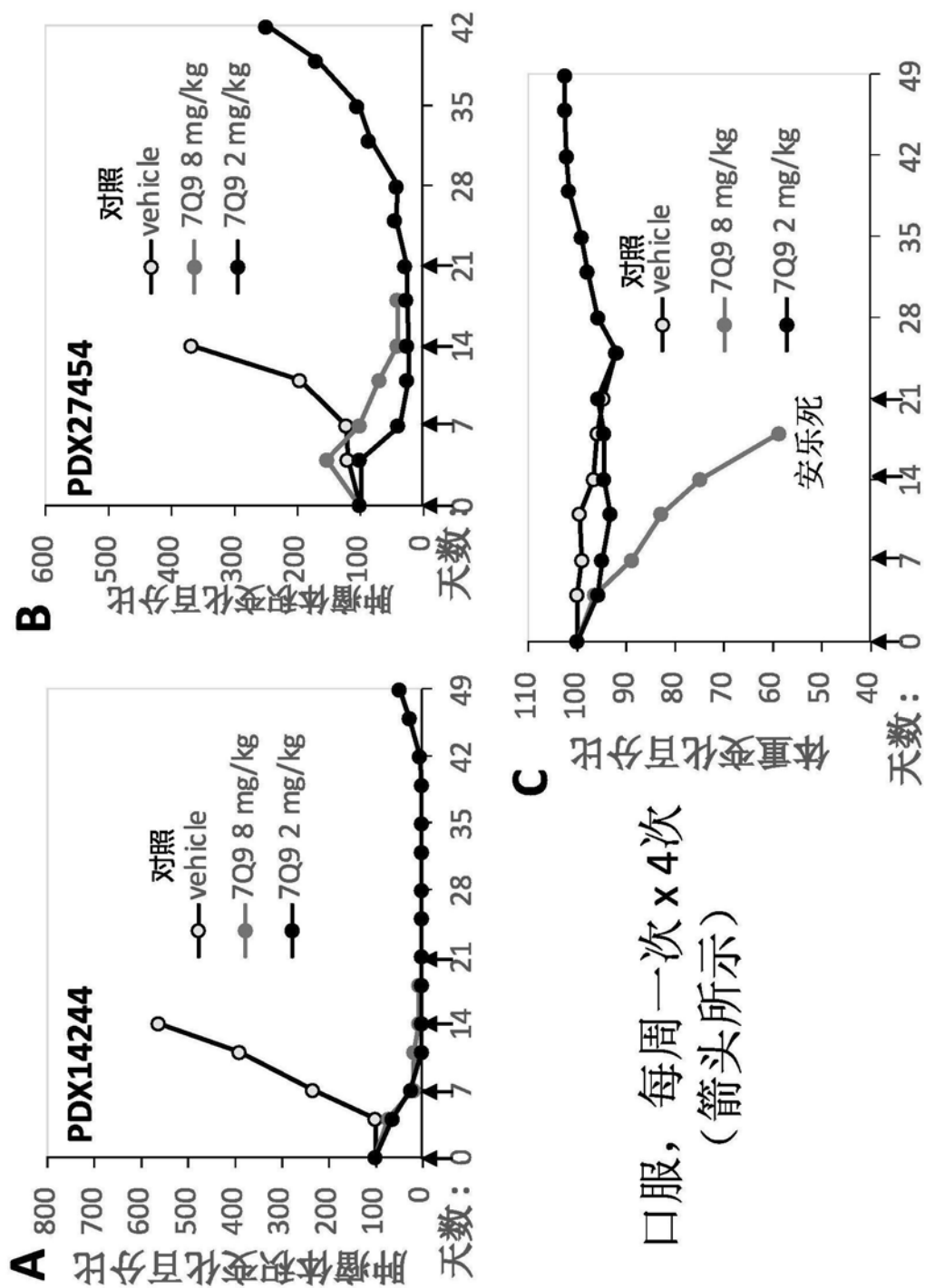


图22:7Q9抗癌药在胰腺癌(PDX14244)和大肠癌(PDX27454)患者源性异种移植肿瘤中的抗肿瘤功效和毒性(体重变化)

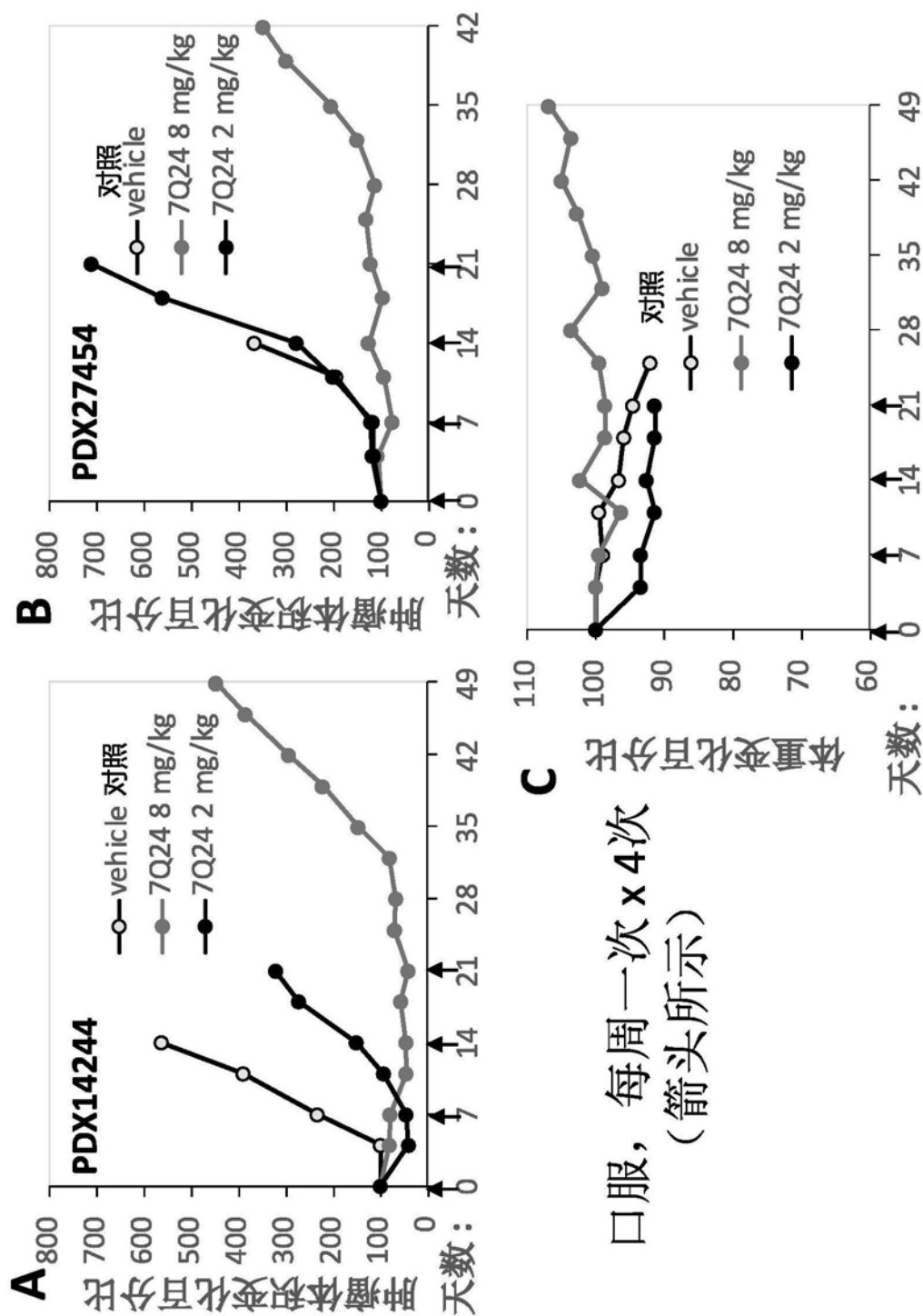


图23: 7Q24抗癌药在胰腺癌 (PDX14244) 和结肠癌 (PDX27454) 患者源性异种移植肿瘤中的抗肿瘤功效和毒性 (体重变化)

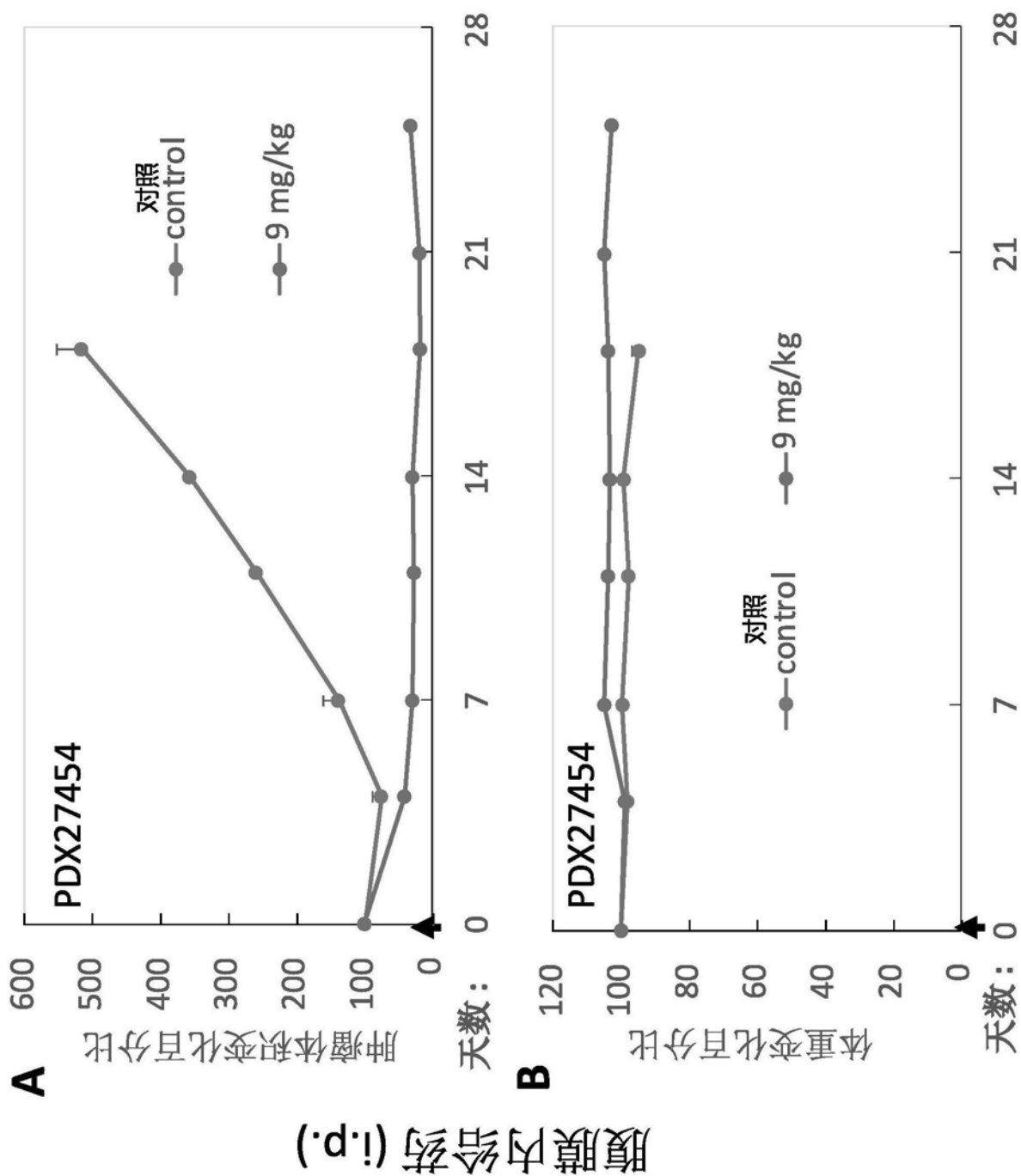


图24:7Q28抗癌药在大肠癌患者来源的异种移植肿瘤(PDX27454)中的抗肿瘤功效和毒性(腹腔内注射一次)

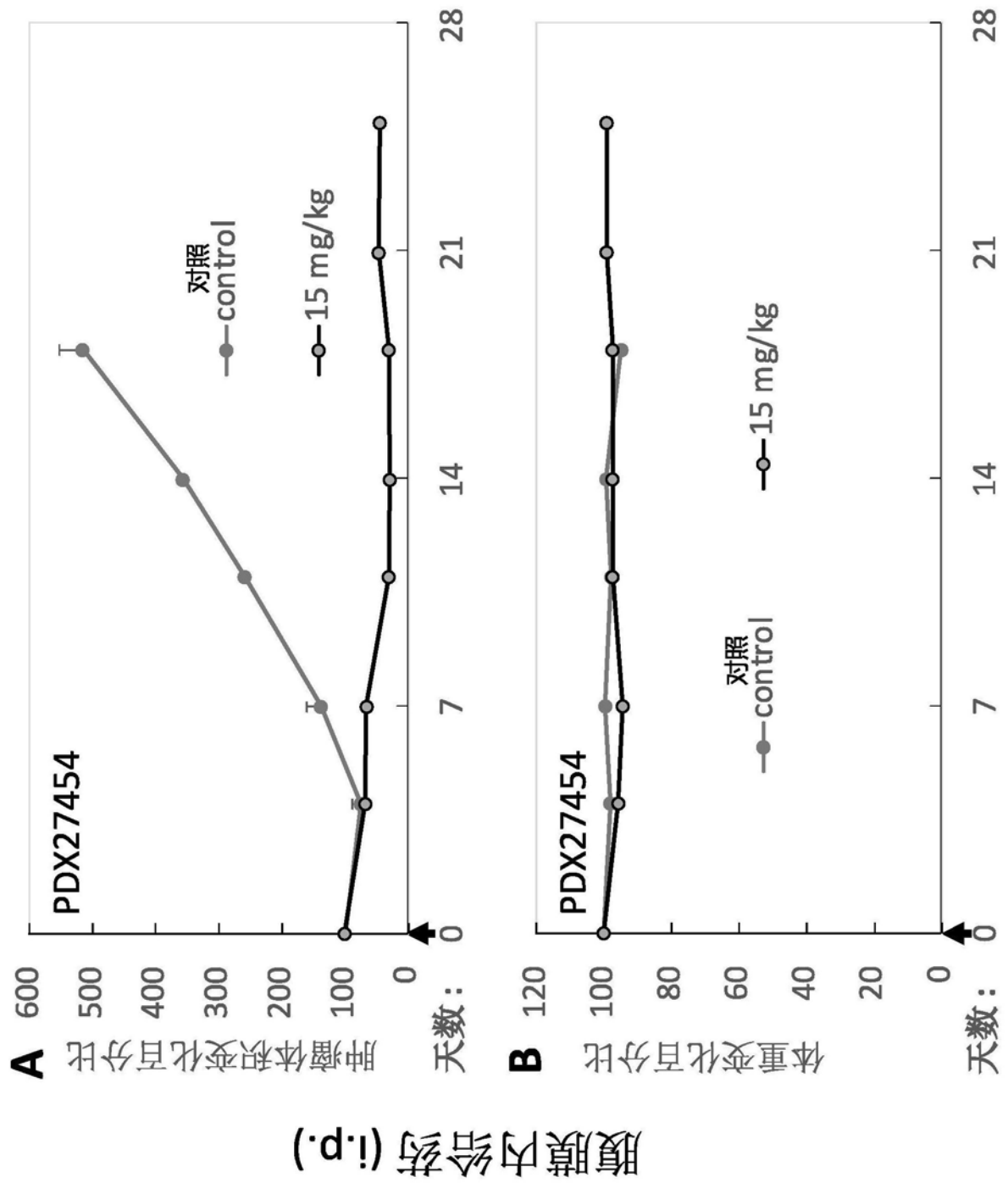


图25:7Q31抗癌药在大肠癌患者来源的异种移植肿瘤 (PDX27454) 中的抗肿瘤功效和毒性 (腹腔内注射一次)

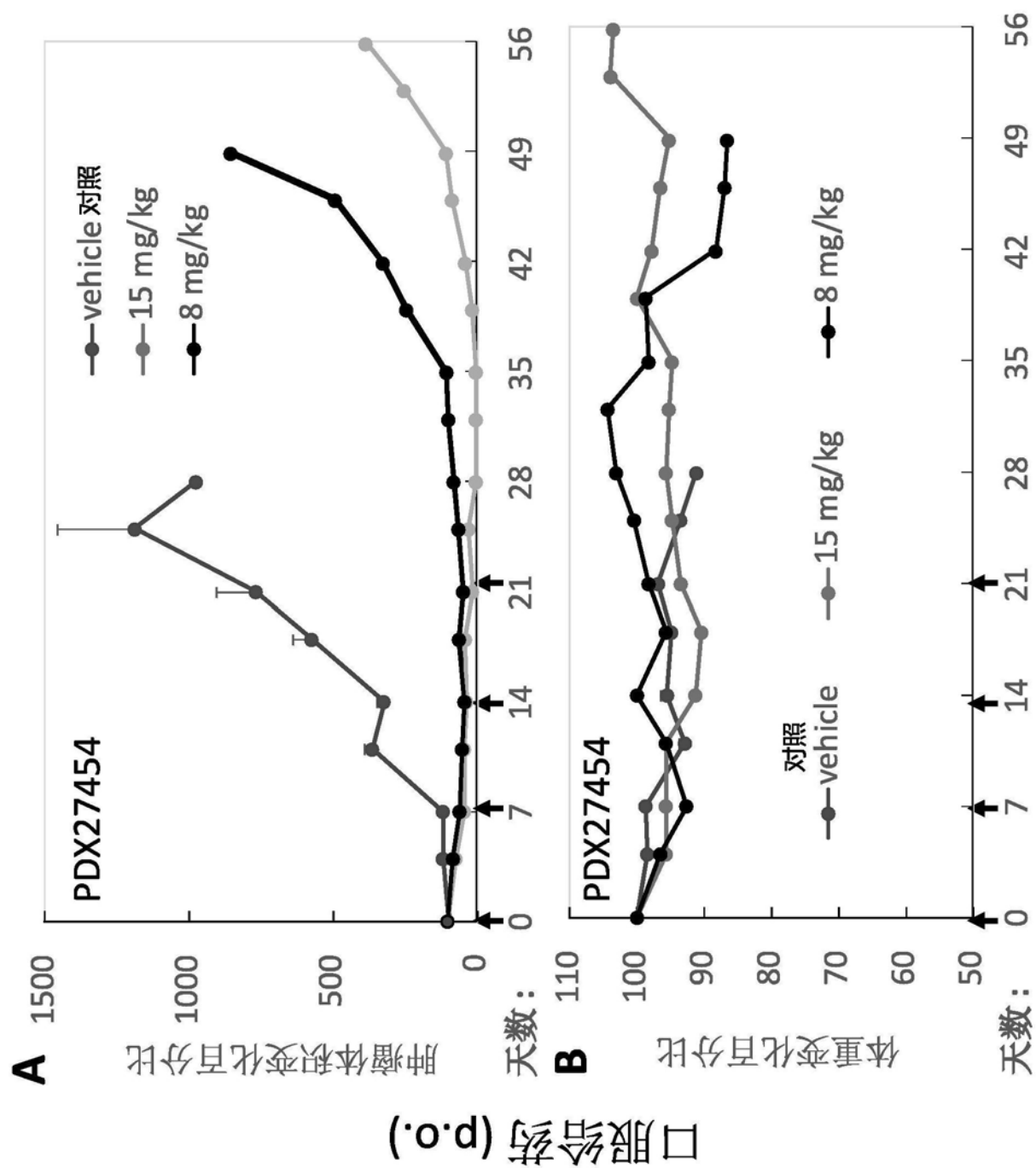


图26:7Q32抗癌药在大肠癌患者来源的异种移植肿瘤(PDX27454)中的抗肿瘤功效和毒性(体重变化)

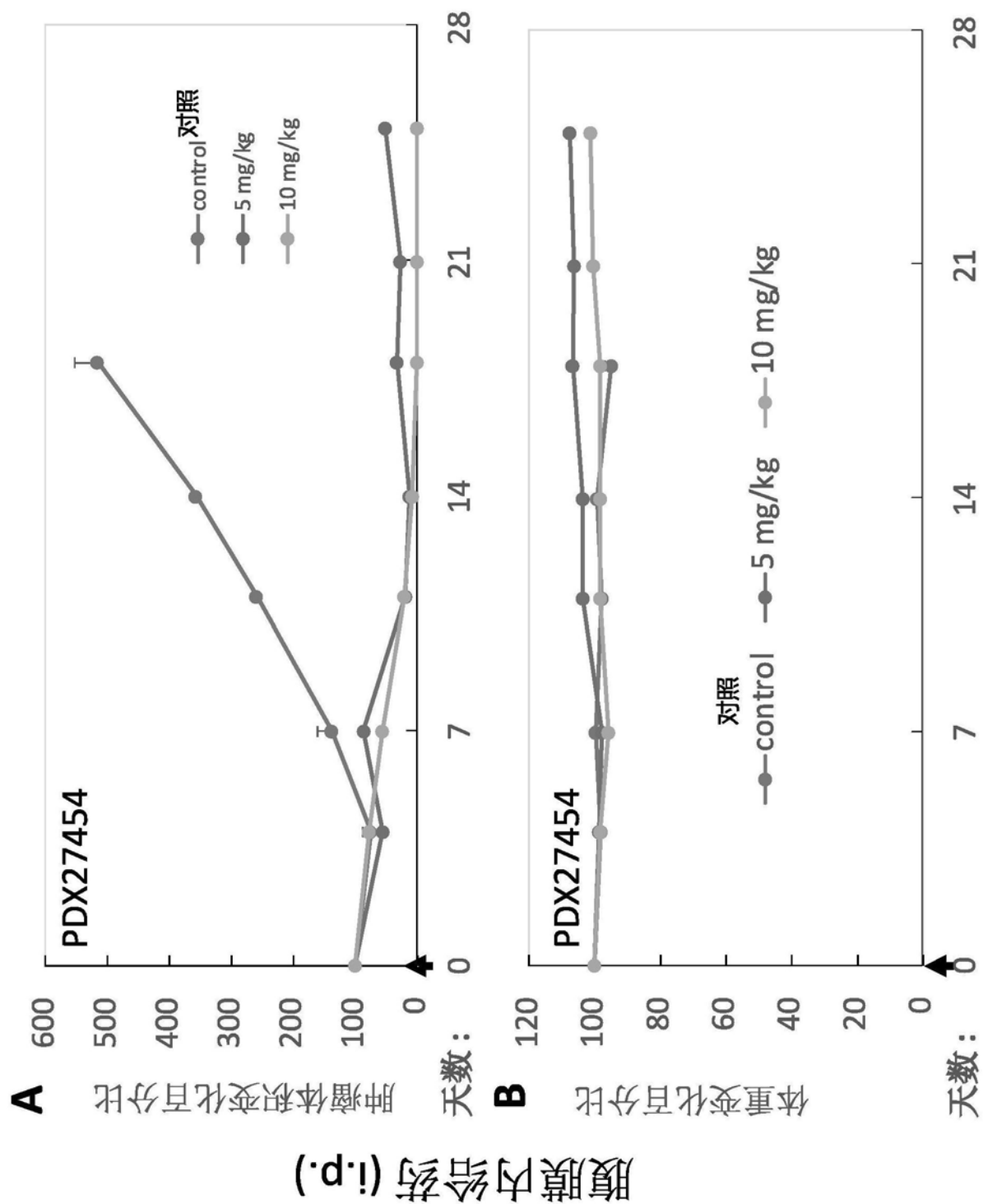


图27:7Q35抗癌药在大肠癌患者来源的异种移植肿瘤(PDX27454)中的抗肿瘤功效和毒性(腹腔内注射一次)

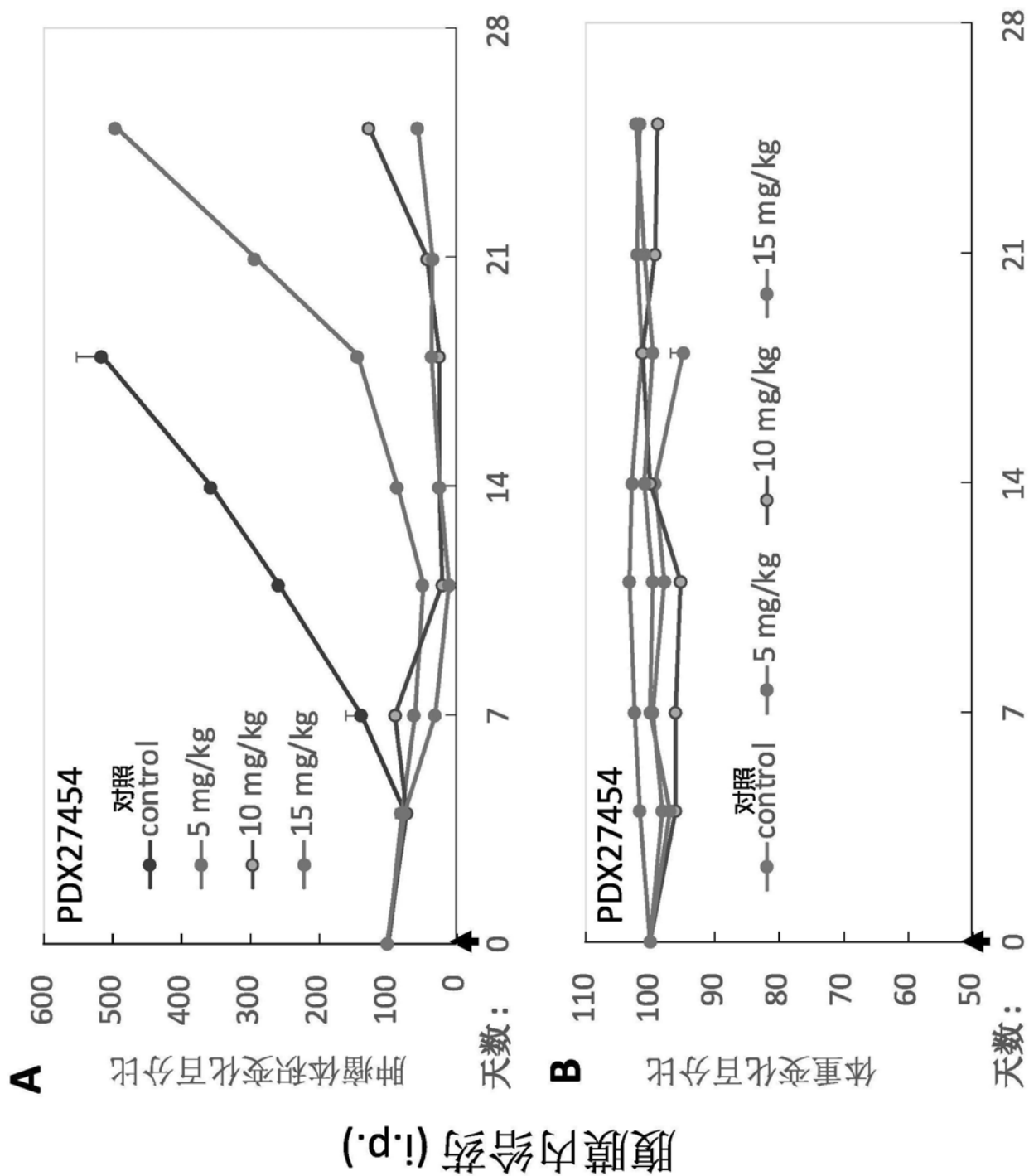


图28:7Q36抗癌药在大肠癌患者来源的异种移植肿瘤 (PDX27454) 中的抗肿瘤功效和毒性 (腹腔内注射一次)

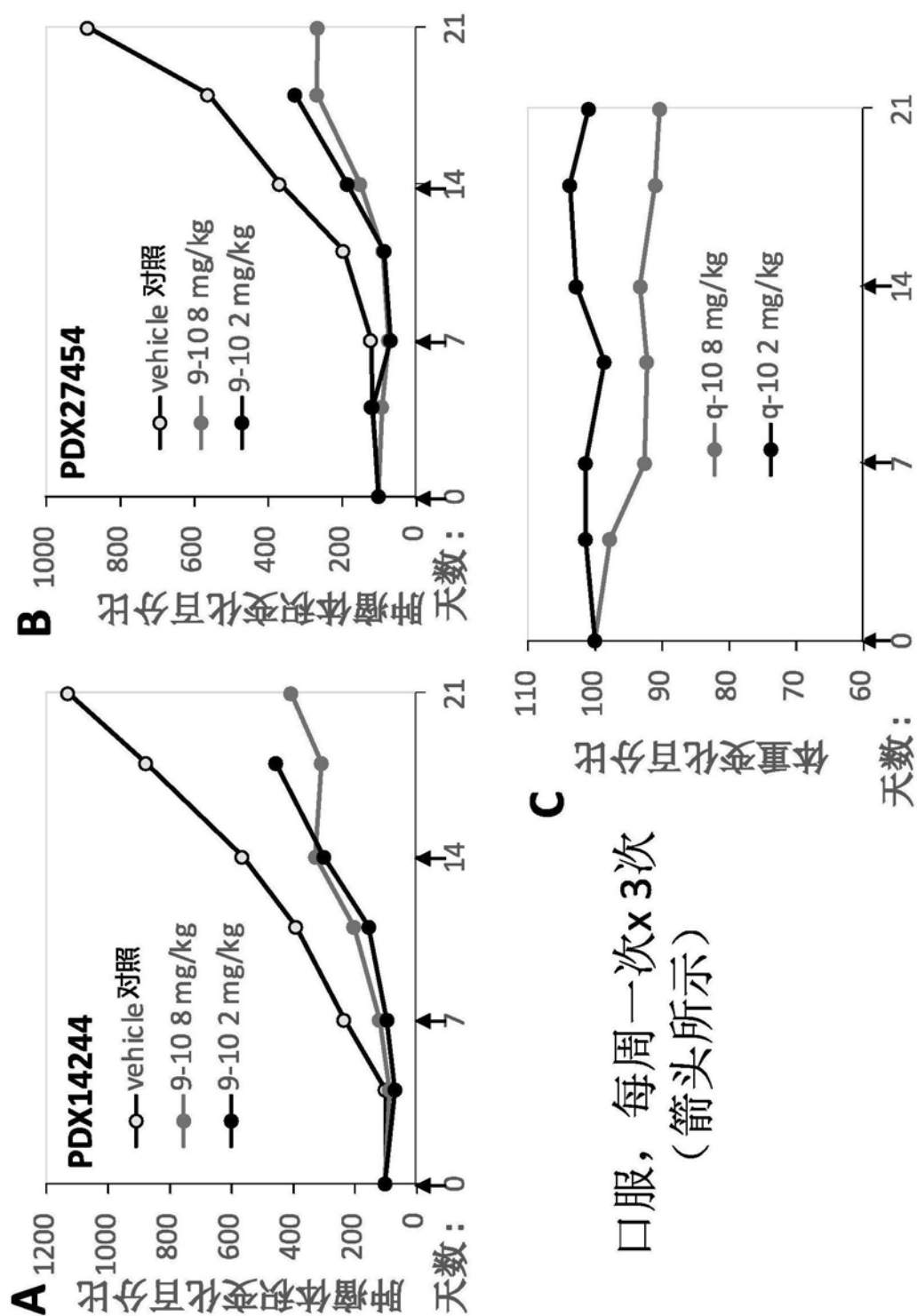


图29: 9Q10 (9-10) 抗癌药在人胰腺癌 (PDX14244) 和结肠癌 (PDX27454) 患者源性异种移植的肿瘤 (PDX) 中的抗肿瘤功效和毒性 (体重变化)

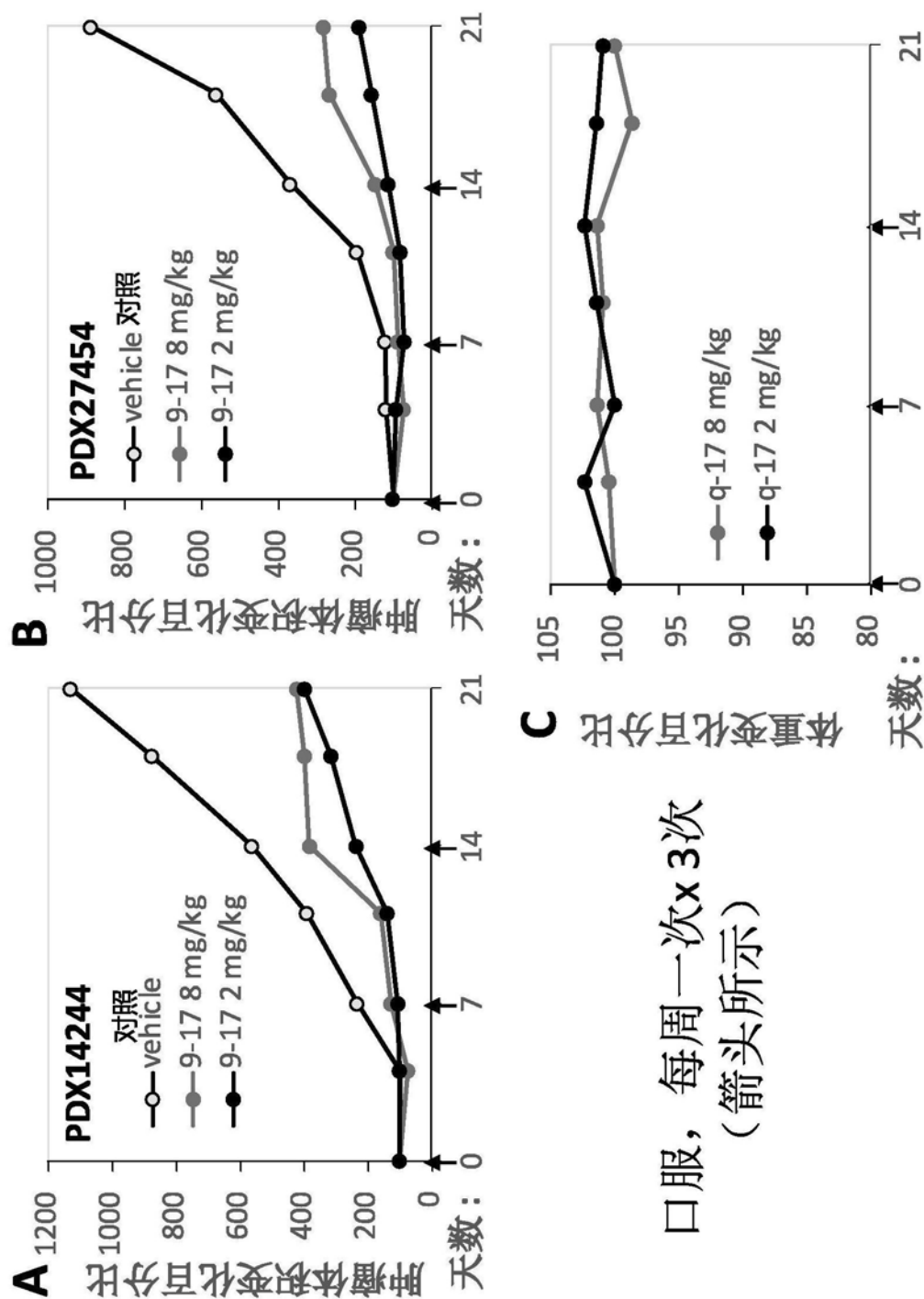


图30:9Q17 (9-17) 抗癌药在人胰腺癌 (PDX14244) 和结肠癌 (PDX27454) 患者源性异种移植的肿瘤 (PDX) 中的抗肿瘤功效和毒性 (体重变化)

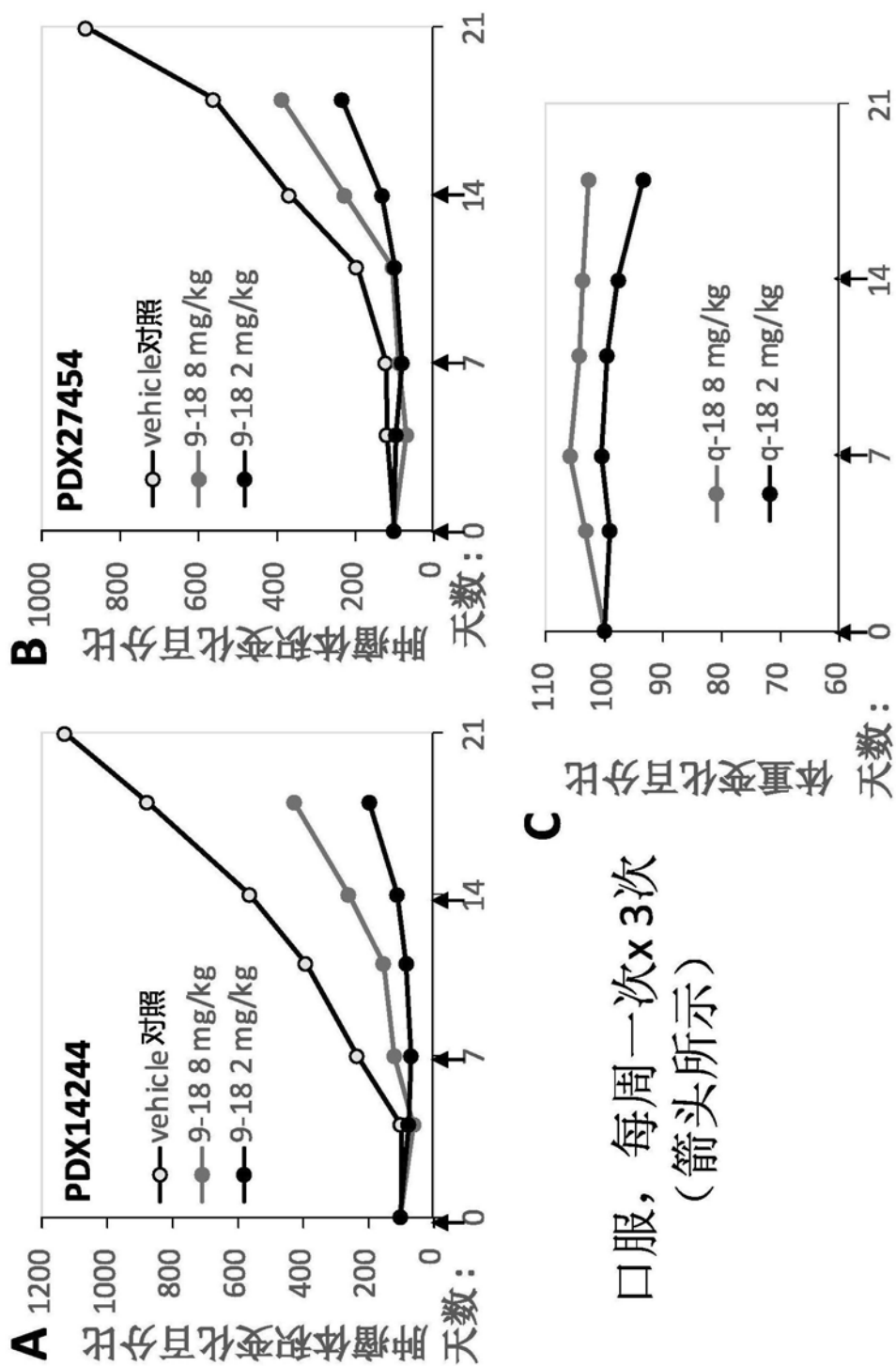


图31:9Q18 (9-18) 抗癌药在人胰腺癌 (PDX14244) 和结肠癌 (PDX27454) 患者源性异种移植的肿瘤 (PDX) 中的抗肿瘤功效和毒性 (体重变化)

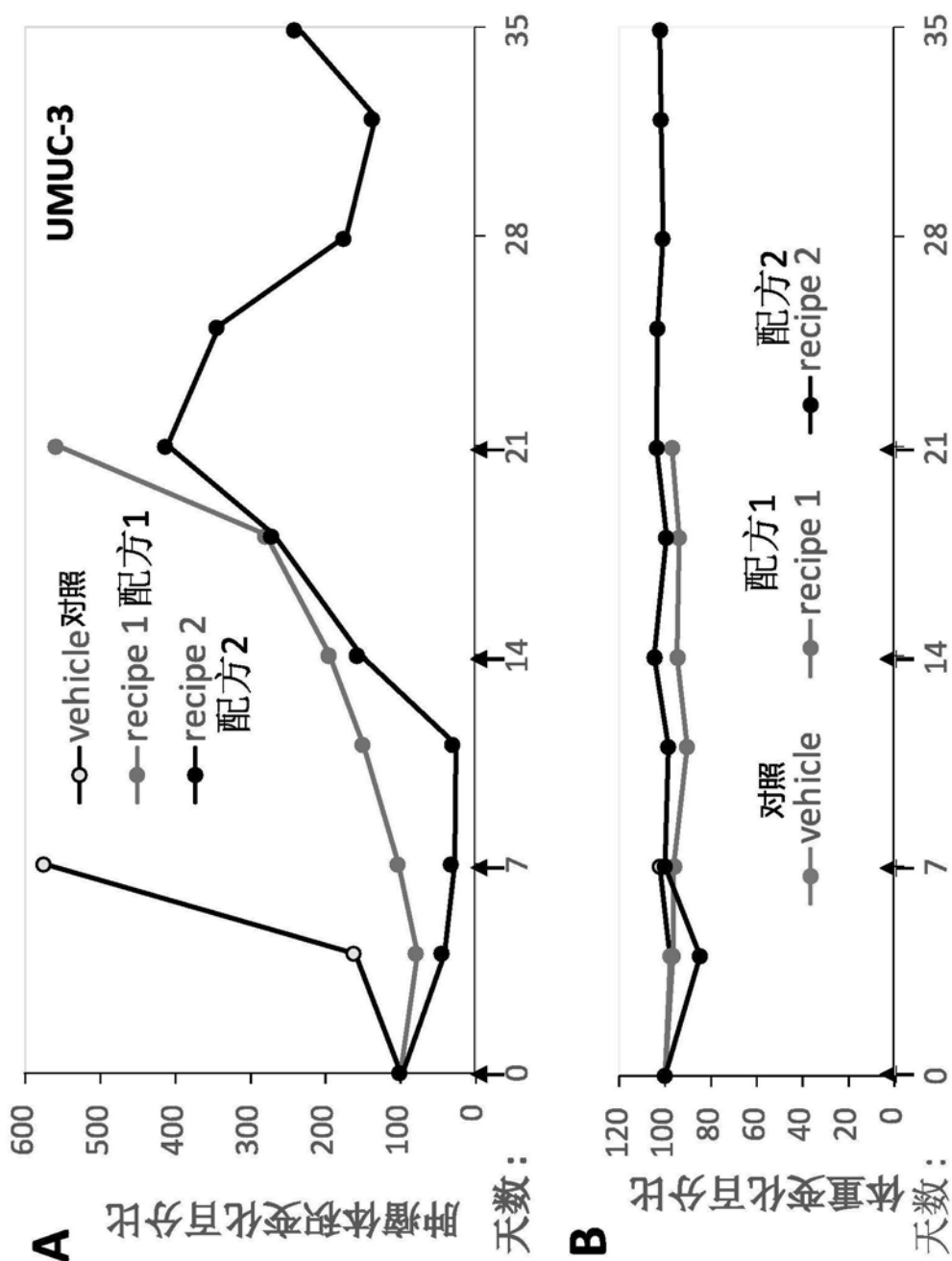


图32: 人UMUC3膀胱癌在免疫缺陷的SCID小鼠模型中, 两种不同配方的FL118的制剂的抗肿瘤功效和毒性比较 (配方1: 无有机溶剂的水悬浮液; 配方2: 乙醇-水悬浮液)

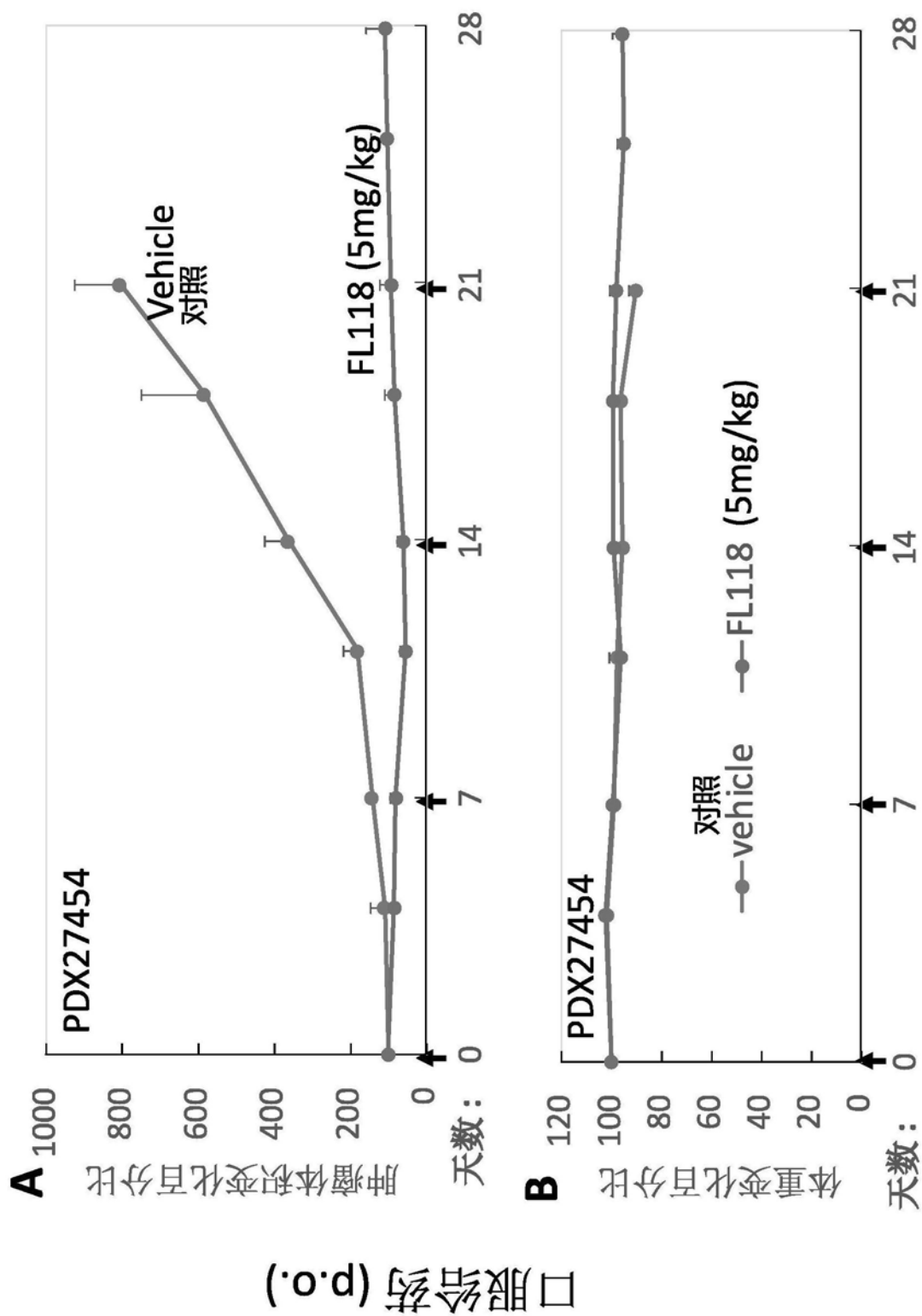
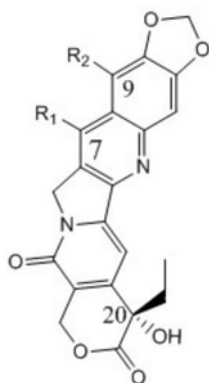


图33:用人类结直肠癌患者源性异种移植肿瘤 (PDX27454) 动物模型测试临床方便且兼容的喷雾干燥制得的FL118制剂抗肿瘤功效和毒性

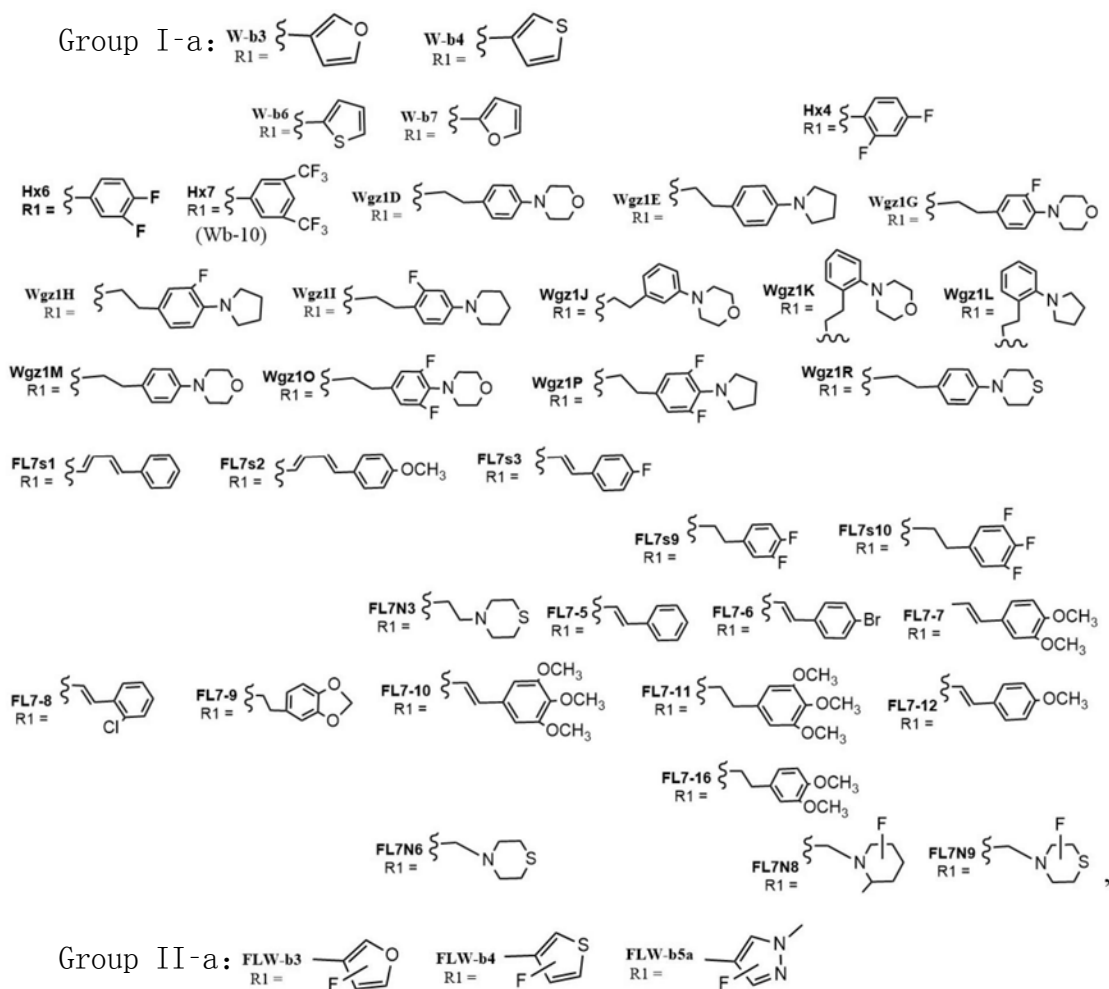
1. 一种组成化合物包含：

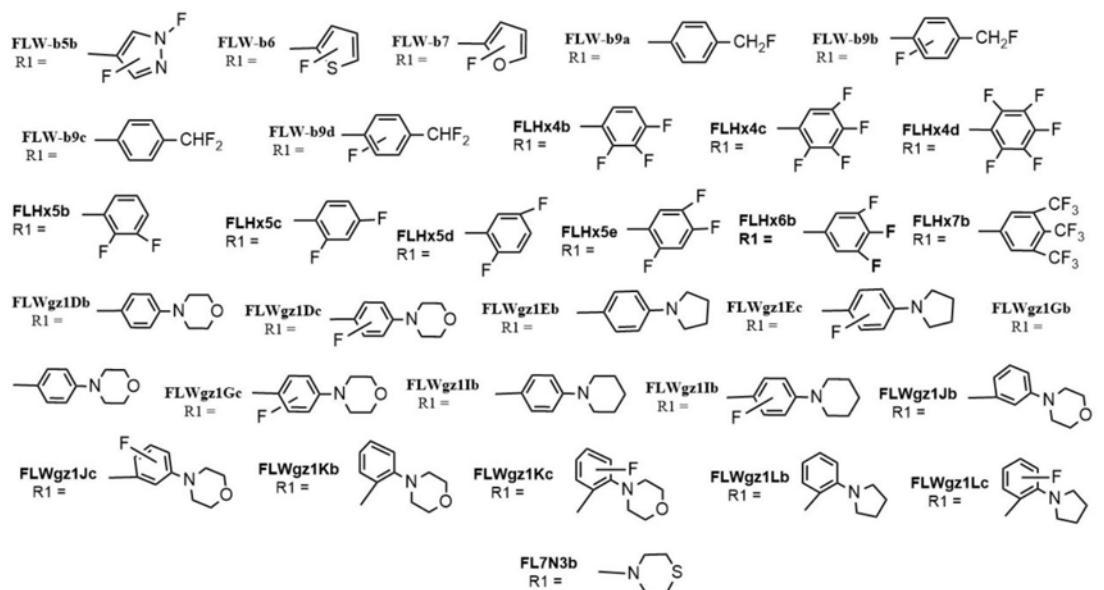


公式 1/式 1

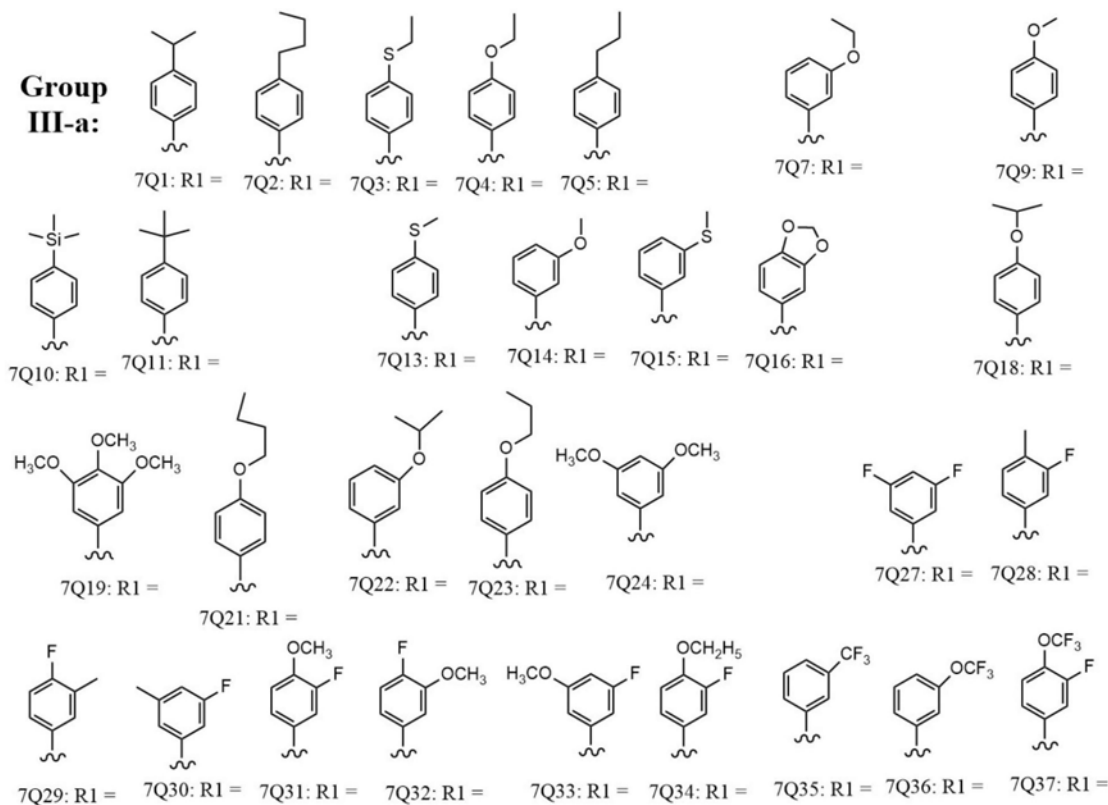
其中取代基选自：

其中当 R_2 为H时，则 R_1 独立选自以下的I-a组(Group I-a)，II-a组(Group II-a)，III-a组(Group III-a)和IV-a组(Group IV-a)：

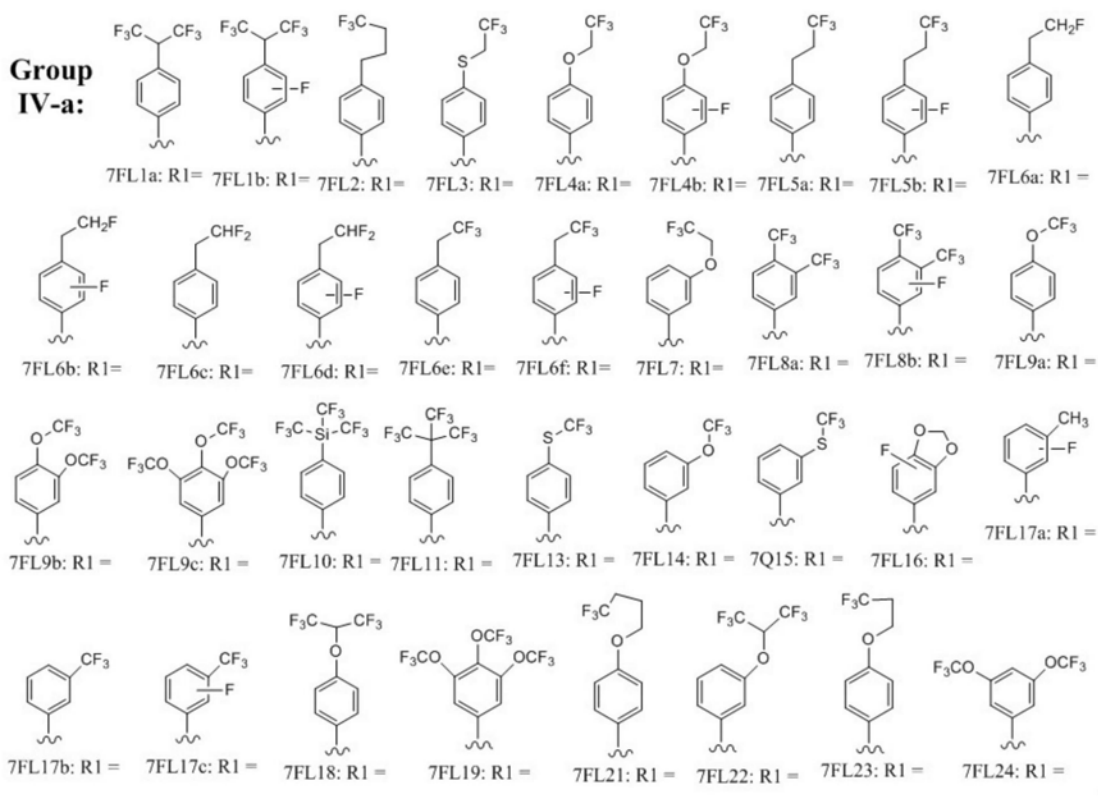




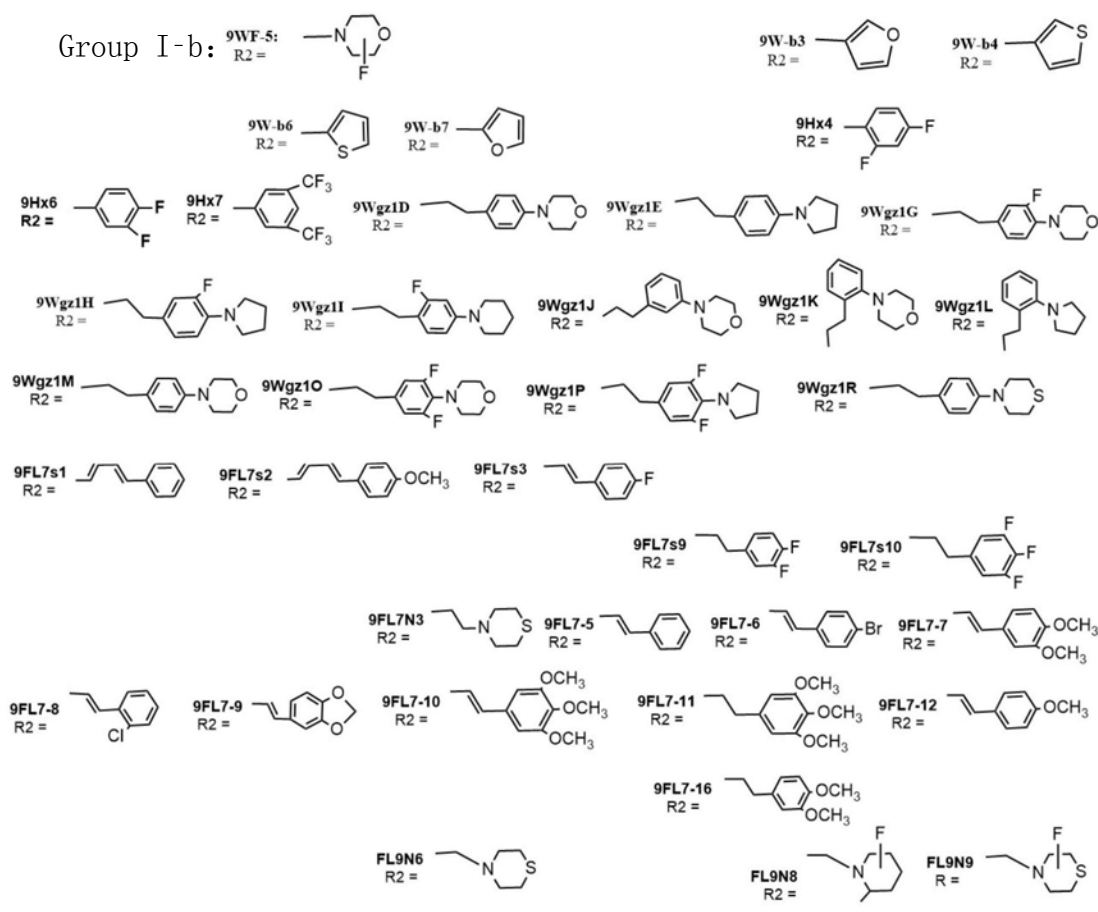
Group III-a:



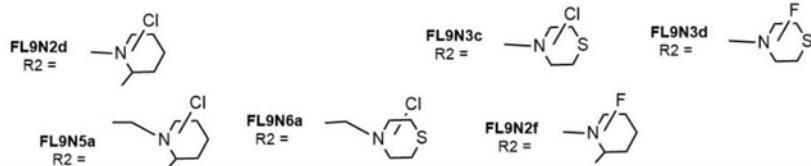
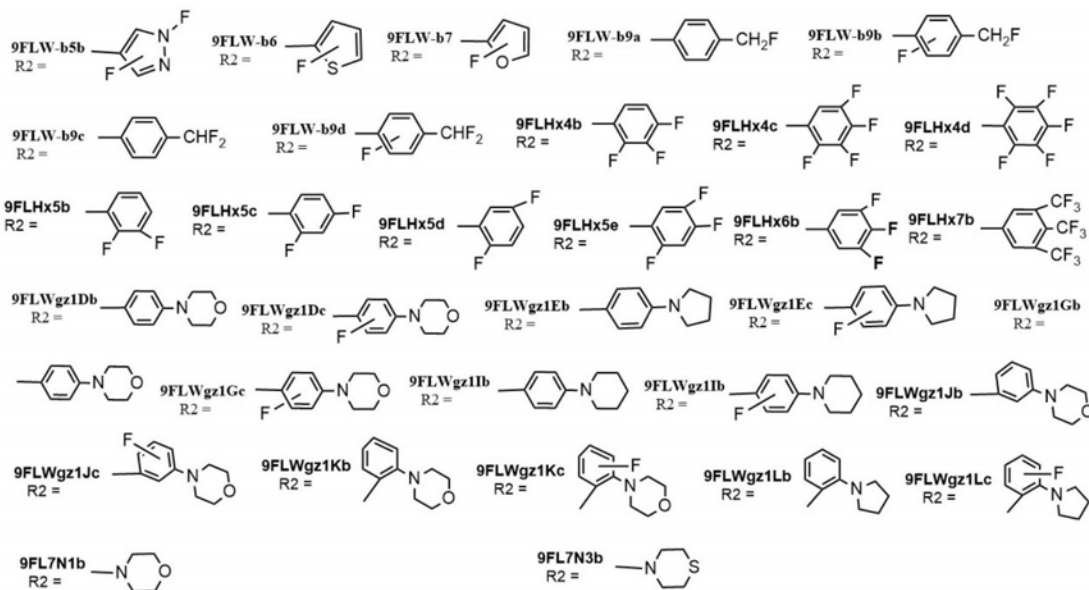
和



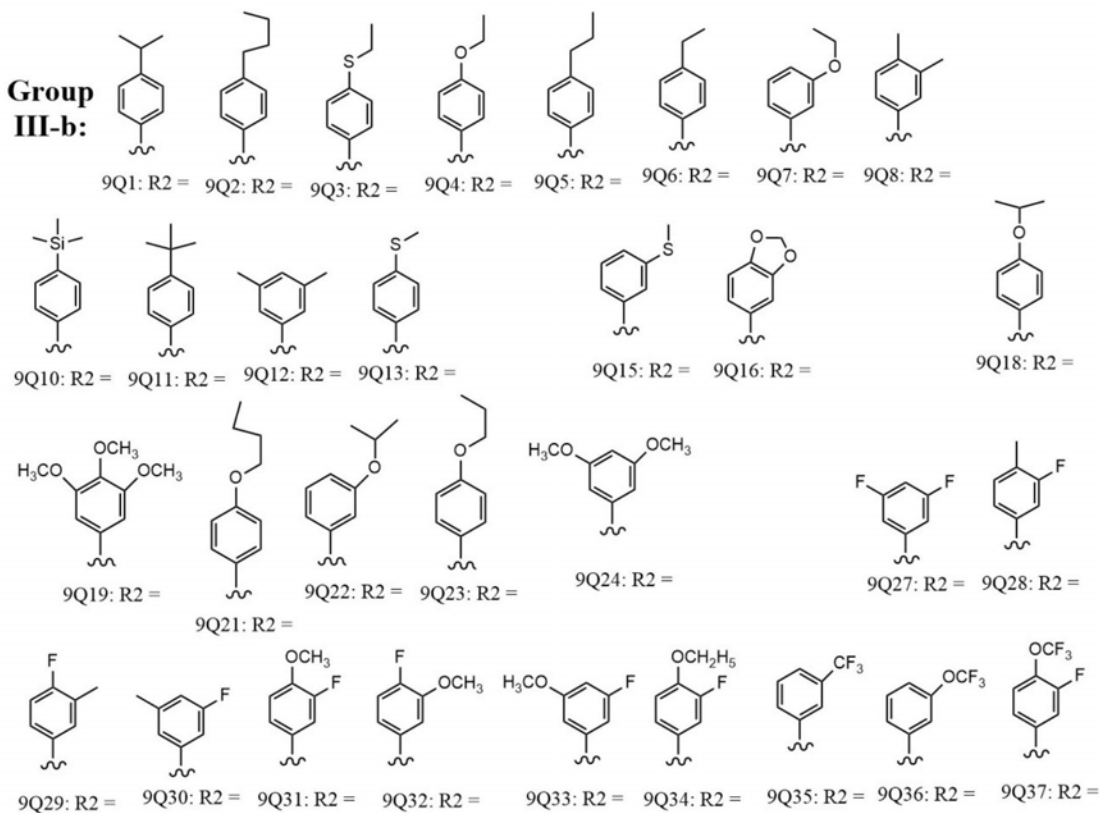
或其中当R₁为H时,则R₂独立地选自以下的I-b组(Group I-b),II-b组(Group II-b),III-b组(Group III-b)和IV-b组(Group IV-b):



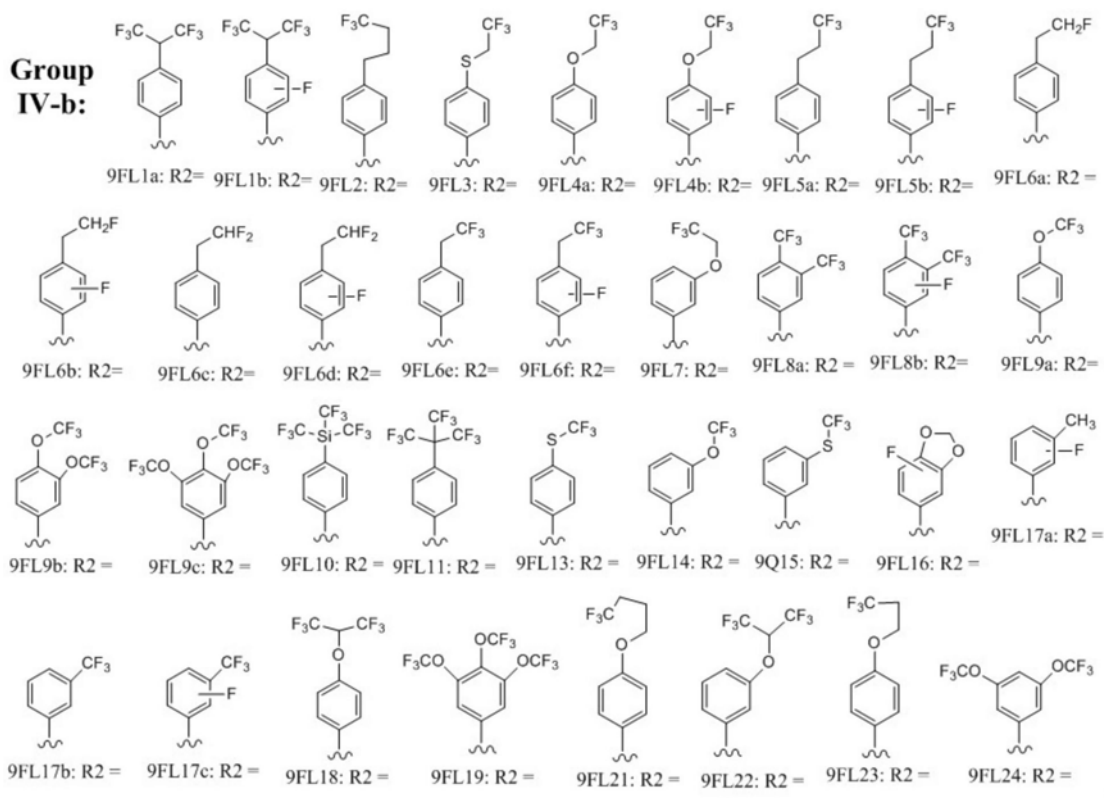
Group II-b: 9FLW-b3  9FLW-b4  9FLW-b5a 



Group III-b:



和



或其中当R₂为以下化学基团之一时: F-, F₂CH-, F₃C-, Cl₂CH-, Cl₃C-, Br₂CH-, Br₃C-, I₂CH-, I₃C-, FCH₂O-, F₂CHO-, ClCH₂O-, Cl₂CHO-, NH₂-, FCH₂NH-, F₂CHNH-, ClCH₂NH-, Cl₂CHNH-, (FCH₂)₂N-, (F₂CH)₂N-, (ClCH₂)₂N-, (Cl₂CH)₂N-, -C(O)CH₂F, -C(O)CHF₂, -C(O)CH₂Cl, -C(O)CHCl₂, -CO₂CH₃, -CO₂CH₂F, -CO₂CHF₂, CO₂CH₂Cl或-CO₂CHCl₂, 则R₁独立地选自以上的I-a组(Group I-a), II-a组(Group II-a), III-a组(Group III-a)和IV-a组(Group IV-a),

或其中R₁为以下化学基团之一时: F-, F₂CH-, F₃C-, Cl₂CH-, Cl₃C-, Br₂CH-, Br₃C-, I₂CH-, I₃C-, FCH₂O-, F₂CHO-, ClCH₂O-, Cl₂CHO-, NH₂-, FCH₂NH-, F₂CHNH-, ClCH₂NH-, Cl₂CHNH-, (FCH₂)₂N-, (F₂CH)₂N-, (ClCH₂)₂N-, (Cl₂CH)₂N-, -C(O)CH₂F, -C(O)CHF₂, -C(O)CH₂Cl, -C(O)CHCl₂, -CO₂CH₃, -CO₂CH₂F, -CO₂CHF₂, CO₂CH₂Cl, or -CO₂CHCl₂或-CO₂CHCl₂, 则R₂独立选自I-b组(Group I-b), II-b组(Group II-b), III-b组(Group III-b)和IV-b组(Group IV-b), 以及

其中20位酯对应的化合物衍生自各种酯化化学基团。

2. 如权利要求1所述的组成化合物(公式1化合物), 化合物以口服, 静脉内, 皮下, 透皮, 腹膜内或通过吸入给药。

3. 如权利要求1所述的组成化合物(公式1化合物), 其中化合物用于所述疾病选自肿瘤性的疾病, 自身免疫性疾病, 血管狭窄, 结节性硬化症(TSC)和任何其他与细胞增殖有关的人类疾病。

4. 如权利要求1所述的组成化合物(公式1化合物), 其中化合物用于所述疾病是一种或多种选自实体瘤, 血液癌, 纤维肉瘤, 粘肉瘤, 脂肪肉瘤, 软骨肉瘤, 成骨肉瘤, 脊索瘤, 血管肉瘤, 内皮细胞肉瘤, 淋巴管腺肉瘤, 假性粘膜癌的癌症, 淋巴管内皮细胞瘤, 滑膜瘤, 间皮瘤, 尤因氏肿瘤, 平滑肌肉瘤, 横纹肌肉瘤, 结肠癌, 胰腺癌, 乳腺癌, 卵巢癌, 前列腺癌, 鳞状细胞癌, 基底细胞癌, 腺癌, 头颈癌, 汗腺癌, 皮脂腺癌, 乳头状癌, 乳头状腺癌, 囊状腺癌, 髓样癌, 支气管癌, 肾细胞癌, 肝癌, 胆管癌, 绒毛膜癌, 精原细胞瘤, 胚胎癌, 威尔姆斯瘤, 宫颈

癌,子宫癌,睾丸肿瘤,肺癌,小细胞癌肺癌,膀胱癌,上皮癌,神经胶质瘤,神经胶质母细胞瘤,多形胶质母细胞瘤,星形细胞瘤,髓母细胞瘤,颅咽管瘤,室管膜瘤,松果体瘤,血管母细胞瘤,听神经瘤,少突胶质细胞瘤,神经鞘瘤,脑膜瘤,黑素瘤,神经母细胞瘤,视网膜母细胞瘤,白血病,急性白血病,急性白血病,白血病,急性白血病,急性淋巴细胞白血病早幼粒细胞白血病,急性骨髓单核细胞白血病,急性单核细胞白血病,急性红细胞白血病,慢性白血病,慢性粒细胞白血病,慢性淋巴细胞性白血病,淋巴瘤,霍奇金病,非霍奇金病,多发性骨髓瘤和胸腺瘤及其任何组合。

5. 根据权利要求4的组成,其中所述癌症分子表型包括一种或多种生物标志物或靶标的表达,所述生物标志物或靶标选自抗凋亡蛋白(survivin,Mcl-1,XIAP,cIAP2),ABC转运蛋白,缺氧诱导因子1 α (HIF-1 α),Hdm2/Mdm2,HdmX/MdmX(Mdm4),p53(野生型,无效或突变),突变APC,突变Kras,热休克蛋白60(HSP60),应激70蛋白(GRP75),ATP依赖性RNA解旋酶(DDX5/p68),核仁RNA解旋酶21(DDX21),延伸因子2(EF2),mRNA剪接前因子ATP依赖性RNA解旋酶(DHX15),过渡型内质网ATPase(TERA),转铁蛋白受体蛋白(TFR1),MAP激酶活化蛋白激酶2(MAPK2),连环蛋白beta-1(CTNB1),早期内体抗原1(EEA1),鸟嘌呤核苷酸结合蛋白亚基beta-2-like 1(GBLP),电子转移黄素蛋白亚基(ETFA),蛋白酶体激活物亚基3(PSME3),UPF0368蛋白Cxor26(CX026),过氧化物毒素-2(PRD2),过氧化物毒素-1(PRD1),硫氧还蛋白依赖性过氧化物还原酶(PRD3),富含丝氨酸/精氨酸的剪接因子3(SRSF3),蛋白酶体亚基beta 2型(PSB2),谷胱甘肽S转移酶P(GSTP1),MAP/微管亲和力调节激酶3(MARK3),DNA损伤诱导因子1(DDI1),肿瘤蛋白D52样2(TPD52L2),钙离子通道蛋白,电压依赖性B1亚基(CACNB1),可能的G蛋白偶联受体1(PGPCR1),泛素特异性肽酶2a(USP2a),黑皮质素2受体(MC2R),成纤维细胞生长因子18(FGF18),肿瘤蛋白p53诱导蛋白3(TP53I3),CCHC型锌指蛋白,核酸结合蛋白(CNBP),WD重复域22(WDR22),钾电压门控通道亚家族E成员1(PVGCSE-M1),泛素结合酶E2T(UBE2T),泛素样蛋白7(ULP7),RNA结合基序结构,单链相互作用蛋白2(RBMS2),细胞质酪氨酸蛋白激酶(BMX)和细胞周期蛋白B1相互作用蛋白1(CCNB1IP1)。

6. 如权利要求1所述的组成化合物(公式1化合物),其中公式1化合物将用于克服急性和慢性获得性或固有治疗抗性肿瘤。并与药学上可接受的盐与一种或多种以下化合物按顺序或同时给予受试者:化学治疗剂,化学预防剂,天然植物衍生剂,非植物衍生的剂。这些包括姜黄素,白藜芦醇,维生素D3,维生素A,维生素E,维生素C,异硫氰酸酯(ITC),异硫氰酸烯丙酯组成的组(AITC),水飞蓟宾/silibinin(水飞蓟宾/silybin),舒林酸,含硒化合物,甲基硒酸,源自桃金天牛的AMR类似物,AMR-Me,AMR-MeOAc,泰美普洛尔(terameprocol),塞来昔布,伊马替尼,槲皮素,表没食子儿茶素-3-没食子酸酯(EGCG),德盖林,3,3'-二吡啶基甲烷(DIM),大黄素,金雀异黄素,托芬那酸,辛伐他汀,藤黄酸,二十二碳六烯酸,熊果酸,齐墩果酸,蟾蜍灵,磺胺噻唑,去甲酚,消炎痛(indomethacin),卢比欧尔,地精,阿维辛D,西格列酮,贝伐单抗(Avastin),crolibulin,黄酮(Baicalein),帕克西林(Paxilline),普萘洛尔A(Purvalanol A),NU6140,Ardisianone,NVP-BGT226,HDAC抑制剂,MS-275/恩替司他(Entinostat),SAHA,酸二萜类化合物,蟾蜍他灵,枯萎素A(Withaferin A),羽扇豆(Plumbagin),黄酮A(Flavokawain A),黄酮B,洋地黄毒苷(Ponicidin),七叶素(Escin),库瓜辛J(Kuguacin J),LQB-118,丁三醇(Crotepoxide),苦瓜糖苷C(Kuguaglycoside C),破坏蛋白B(Destruxin B),乙二胺(Evodiamine),芝麻素(Sesamin),前列腺素,内皮素拮抗

剂,胞质激酶抑制剂,内皮素受体拮抗剂,安布森坦,波生坦和西他生坦,PDE5 (PDE-V) 抑制剂,西地那非,他达拉非,伐地那非,钙通道阻滞剂,氨氯地平,非洛地平,伐普米坦,地尔硫卓,薄荷醇,前列环素,曲前列环素,伊洛前列素,伊洛前列素,氧气,肝素,华法令,利尿剂,地高辛,环孢菌素,环孢菌素A,CTLA4-Ig抗体蛋白,CD154蛋白,CD40融合蛋白,gp39融合蛋白,CD40lg蛋白,CD8gp39蛋白,NF- κ B核转运抑制剂功能蛋白,脱氧精瓜林 (DSG),胆固醇生物合成抑制剂,HMG CoA还原酶抑制剂,洛伐他汀,辛伐他汀,非甾体抗炎药 (NSAIDs),布洛芬,阿司匹林,对乙酰氨基酚,来氟米特,脱氧精瓜林,环加氧酶抑制剂,异芹菜碱,地塞米松,金化合物, β -激动剂,沙丁胺醇,LABA,沙美特罗,白三烯拮抗剂,孟鲁司特,抗增殖剂,甲氨蝶呤,FK506,他克莫司,普罗格拉夫,霉酚酸酯,细胞毒性药物,硫唑嘌呤,VP-16蛋白,依托泊甙,氟哌啶,氨氯地林,喜树碱,阿糖胞苷,吉西他滨,氟脱氧尿苷,美法仑,环磷酰胺,抗代谢物,氨甲蝶呤,拓扑异构酶抑制剂,喜树碱,DNA烷基化剂,顺铂,激酶抑制剂,索拉非尼,微管中毒,紫杉醇,TNF- α 抑制剂,tenidap,抗TNF抗体,可溶性TNF受体,羟基尿素,雷帕霉素,西罗莫司,rapapune及其任何组合。

7. 根据权利要求1所述的组成化合物(公式1化合物),其中将公式1或FL118化合物制成含有一种环糊精的有机溶剂的母液而被配制成一种环糊精-药物复合物的悬浮液。再进一步将有机溶剂除去而形成环糊精-药物制成复合粉剂,而用于口服(per oral, po/p.o.),腹膜内(ip/IP/ip)或静脉内(iv/IV/iv)给药或制成固体药物片剂形式而用于口服,包括以下步骤:

1) 将一种环糊精溶解在乙醇中;二甲基亚砜(DMSO);二甲基乙酰胺(DMA);二甲基甲酰胺(DMF);N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP);或七氟丁酸/全氟丁酸(HFBA/PFBA),但不能溶于二氯甲烷;氯仿丙酮;四氢呋喃1、4-二恶烷;三氯乙烯;1,1,二氯-1-氟乙烷;全氟聚醚;全氟己烷;三氟乙酸;五氟丙酸酐;全氯乙烯;双(三氟甲烷)-磺酰胺;或全氟辛烷,来制备预定浓度(例如20%)的有机溶剂-环糊精母液;

2) 通过剧烈涡旋搅拌 ≥ 1 小时例如1,000rpm的高速搅拌 ≥ 1 小时,以每个药物化合物分子与1.5-2.0个环糊精分子的比例将公式1或FL118的化合物溶解在有机溶剂-环糊精溶液中。用磁棒搅拌24小时以将100%的药物负载分子到每个环糊精分子中,形成聚合物状态的悬浮液;

3) 通过选自以下的方法处理所得的聚合物状态悬浮液以除去有机溶剂:冻干,鼓式干燥器,降膜蒸发器,薄膜蒸发器和利福反应器;其中通过这些过程之一将产生一种类型的环糊精-药物复合物粉末;

4) 将制备好的环糊精-药物复合物粉末在真空下于30°C干燥过夜;

5) 使用喷射研磨系统/机器将干燥的环糊精-药物复合物粉末研磨成小于37微米的细颗粒;

6) 将研磨后的环糊精-药物复合物粉末重悬于含5%丙二醇的水溶液中,以口服,静脉注射或腹膜内给药的方式给予患者。

8. 根据权利要求7的组成,其中将研磨后的环糊精-药物(即FL118或公式1的化合物)复合物粉末制成含有2-5%羟丙基甲基纤维素(HPMC,粘度为40-60cps),1-5%丙二醇和0-4%的聚乙二醇(PEG) 300或400的生理盐水(0.85%NaCl)悬浮液。悬浮液中FL118或公式1化合物的浓度范围为0.1mg/mL至5mg/mL用于口服给药。

9. 根据权利要求7的组成, 其中将研磨的环糊精-药物复合物粉末通过与填充剂, 粘合剂或稀释剂, 崩解剂, 助流剂, 润滑剂或抗微生物剂或防腐剂均匀混合, 然后通过压片机中进行干压将均匀的粉末压制成片剂形式。

10. 根据权利要求9所述的组成, 其中所述填充剂, 粘合剂或稀释剂选自纤维素或纤维素衍生物, 淀粉或淀粉衍生物和乳糖。崩解剂选自胶体二氧化硅, 交联羧甲基纤维素钠和交联维酮。助流剂选自磷酸氢钙和胶体二氧化硅。润滑剂选自硬脂酸镁, 硬脂酸, 聚乙二醇和滑石粉。抗菌剂或防腐剂选自丙二醇, 对羟基苯甲酸丙二醇酯, 尼泊金丙酯(propylene paraben), 对羟基苯甲酸甲酯(methyl paraben)和甘油。

11. 根据权利要求9的组合, 其中研磨的粉末成分的比例: 环糊精-药物复合物为10-50%, 微晶纤维素(MCC)为30%-80%, 玉米淀粉为0%-40%, 乳糖为10%-25%, 胶态二氧化硅为0%-3%, 磷酸氢钙(dibasic calcium phosphate)为1%-10%和硬脂酸镁为0.2%-3%。这个组合构成片剂形式。

12. 根据权利要求1所述的组成化合物(公式1化合物), 其中将公式1或FL118的化合物配制成用于口服, 静脉内或腹膜内给药的水性悬浮液制剂, 其包括以下步骤:

1) 将一种环糊精溶解在100%非水乙醇中制成乙醇-环糊精母溶液;

2) 将公式1或FL118的化合物溶于乙醇-环糊精以上溶液中, 形成乙醇-环糊精-药物复合物悬浮液;

3) 然后通过使用闭环喷雾干燥系统对乙醇-环糊精-药物(公式1或FL118的化合物)复合悬浮在惰性气体(例如氮气)气氛下进行急骤喷雾干燥进行精制。并采用溶剂回收和。该方法将产生一种环糊精-药物复合物均匀粉末;

4) 将制备好的环糊精-药物复合物粉末在真空下于30℃干燥过夜;

5) 使用喷射研磨系统/机器将干燥的环糊精-药物复合物粉末研磨成约小于37微米的细颗粒粉末;

6) 将研磨后的环糊精-药物复合物粉末重悬于含量最高为5%丙二醇的生理盐水溶液中, 以口服, 静脉注射或腹膜内给药的方式给予患者。

13. 根据权利要求7的组合, 其中环糊精的类型是羟丙基-β-环糊精(HPβCD), β-环糊精(βCD)或磺丁基醚-β-环糊精(SBβCD)。

14. 根据权利要求8的组合, 其中环糊精的类型是羟丙基-β-环糊精(HPβCD), β-环糊精(βCD)或磺丁基醚-β-环糊精(SBβCD)。

15. 根据权利要求9的组合, 其中环糊精的类型是羟丙基-β-环糊精(HPβCD), β-环糊精(βCD)或磺丁基醚-β-环糊精(SBβCD)。

16. 根据权利要求12的组合, 其中环糊精的类型是羟丙基-β-环糊精(HPβCD), β-环糊精(βCD)或磺丁基醚-β-环糊精(SBβCD)。

17. 根据权利要求12的组合, 其中制备一个典型的示例性乙醇-HPβCD主溶液的步骤包括: 将20g HPβCD溶于100%非水乙醇中至总体积为100mL, 以制备20% HPβCD-乙醇母溶液。

18. 根据权利要求17的组合, 其中制备乙醇-HPβCD-药物复合物悬浮液的步骤包括: 将2g FL118或公式1化合物溶解在100mL 20%乙醇-HPβCD主溶液中制备成乙醇-HPβCD-药物复合物悬浮液。

19. 根据权利要求17的组合, 其中制备用于口服, 腹膜内或静脉内给药的水性悬浮液的

包括以下步骤:

1) 通过使用闭环喷雾干燥系统对乙醇-HP β CD-药物(公式1或FL118的化合物)复合悬浮在惰性气体(例如氮气)气氛下进行急骤喷雾干燥进行精制。并采用溶剂回收和。该过程的方法将产生HP β CD-药物复合物均匀粉末;

2) 将制得的HP β CD-药物复合物粉末在真空下于30℃进一步干燥过夜;

3) 使用喷射研磨系统或机器将干燥的HP β CD-药物复合物粉末研磨成小于或等于37微米的细颗粒;

4) 将研磨过的HP β CD-药物复合物粉末重悬于含量最高为5%丙二醇的生理盐水溶液中,以口服,静脉注射或腹膜内给药的方式给予患者。其中如用于ip或iv途径给药,药物(公式1或FL118的化合物)的浓度为0.1-1mg/mL;如用于而口服,药物(公式1或FL118的化合物)的浓度为1-10mg/mL。

20. 根据权利要求1所述的组成化合物(公式1化合物),其中将公式1或FL118化合物制成各种形式的水悬浮液,纳米颗粒或固体片剂或胶囊,所述的这些药物制剂包含一种或多种如下盐的药物制剂:选自氯化物,磷酸盐,甲磺酸盐,二甲磺酸盐的盐,甲苯磺酸盐,甲苯磺酸盐,乳酸盐,酒石酸盐,苹果酸盐,双乙酸盐或柠檬酸盐。这些定量的药物制剂每周口服1至5次。

21. 根据权利要求1所述的组成化合物(公式1化合物),其中各种制剂形式的公式1或FL118化合物是本文所述的任何实施方案的化合物的组合,并且经口服,静脉内,皮下,经皮,腹膜内或通过吸入给药。