



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102596197 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 18

(21) 申请号 201080044059. 0

A61K 31/343(2006. 01)

(22) 申请日 2010. 08. 25

A61K 31/436(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 31/09(2006. 01)

2009904098 2009. 08. 27 AU

A61K 31/407(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 03. 30

(86) PCT申请的申请数据

PCT/AU2010/001097 2010. 08. 25

(87) PCT申请的公布数据

W02011/022772 EN 2011. 03. 03

(71) 申请人 生物学特性有限公司

地址 澳大利亚南澳大利亚州

(72) 发明人 加布里埃尔·克雷米迪奥蒂斯

戴维·毕比 安娜贝尔·莱斯克

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

代理人 李丙林 吴胜周

(51) Int. Cl.

A61K 31/404(2006. 01)

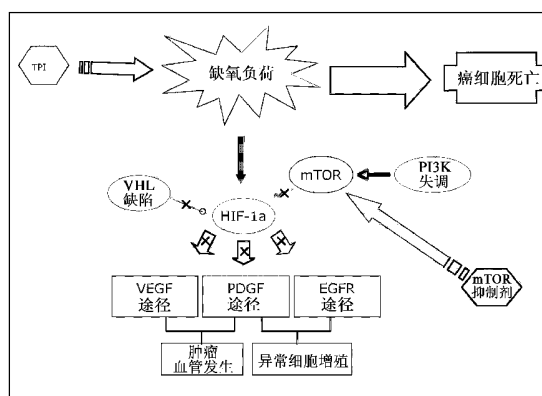
权利要求书 3 页 说明书 36 页 附图 4 页

(54) 发明名称

用于治疗增生性疾病的联合疗法

(57) 摘要

一种微管蛋白聚合抑制剂和 mTOR 抑制剂的药物组合物以及一种利用微管蛋白聚合抑制剂和 mTOR 抑制剂的组合来治疗增生性疾病的方法。



1. 一种用于治疗增生性疾病的药物组合,包括:(a) 微管蛋白聚合抑制剂,以及(b) mTOR 抑制剂。

2. 一种用于治疗增生性疾病的方法,包括向需要其的患者给予(a) 微管蛋白聚合抑制剂、以及(b)mTOR 抑制剂的步骤。

3. (a) 微管蛋白聚合抑制剂、以及(b)mTOR 抑制剂在制备用于治疗增生性疾病的药剂中的应用。

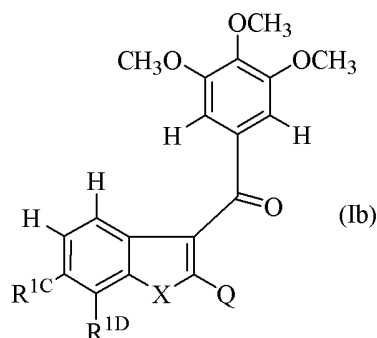
4. 联合(b)mTOR 抑制剂使用的(a) 微管蛋白聚合抑制剂在制备用于治疗增生性疾病的药剂中的应用。

5. 联合(a) 微管蛋白聚合抑制剂使用的(b)mTOR 抑制剂在制备用于治疗增生性疾病的药剂中的应用。

6. 一种药物组合物,包括(a) 微管蛋白聚合抑制剂,以及(b)mTOR 抑制剂。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的组合、方法、应用或组合物,其中,所述微管蛋白聚合抑制剂是下式(Ib)的化合物,或其盐、

溶剂化物或前药:



其中:

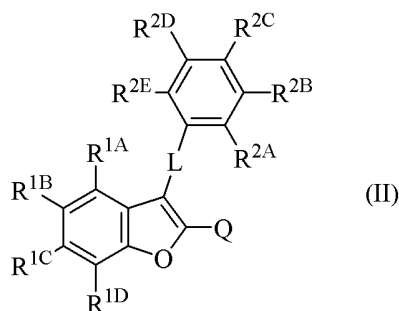
X 表示 O、S、SO、SO₂、Se、SeO、SeO₂ 或 NR, 其中 R 选自 H、O、可选取代的酰基、可选取代的烯基、可选取代的烷基、可选取代的芳基、可选取代的环烯基、可选取代的环烷基、可选取代的杂芳基、可选取代的杂环基、和可选取代的磺酰基;

R^{1C} 表示 C₁₋₃ 烷氧基;

R^{1D} 表示羟基或氨基;

Q 表示 H、CN、卤素、三烷基硅烷基、可选取代的烷基、可选取代的烯基、可选取代的炔基、可选取代的酰基、可选取代的氧酰基、可选取代的酰氨基、可选取代的氨酰氨基、OR''、SR'' 或 NR'' R''、或者 NR'' ' NR'' ', 其中各个 R'' 独立地表示 H、可选取代的烷基、可选取代的烯基、可选取代的炔基、可选取代的芳基、可选取代的杂芳基、可选取代的酰基和可选取代的氧酰基, 其中各个 R'' ' 独立地表示 H、可选取代的烷基、可选取代的烯基、可选取代的炔基、可选取代的芳基和可选取代的杂芳基。

8. 根据权利要求1至6中任一项所述的组合、方法、应用或组合物,其中,所述微管蛋白聚合抑制剂是下式(II)的化合物,或其盐、溶剂化物或前药:



其中：

R^{1A} 和 R^{1B} 各自独立地表示 H、羧基、氰基、二卤代甲氧基、卤素、羟基、硝基、五卤代乙基、磷酸氨基、磷酸基、氧磷基、磺基、三卤代乙烯基、三卤代甲硫基、三卤代甲氧基、三卤代甲基、可选取代的酰基、可选取代的酰氨基、可选取代的酰亚氨基、可选取代的酰亚氨基基、可选取代的酰氧基、可选取代的芳烷基、可选取代的芳烷氧基、可选取代的烯基、可选取代的烯氧基、可选取代的烷氧基、可选取代的烷基、可选取代的炔基、可选取代的炔氧基、可选取代的氨基、可选取代的氨酰基、可选取代的氨酰氧基、可选取代的氨磺酰基、可选取代的氨磺酰基、可选取代的芳基、可选取代的芳氧基、可选取代的环烯基、可选取代的环烷基、可选取代的杂芳基、可选取代的杂环基、可选取代的氧酰基、可选取代的氧酰氨基、可选取代的氧酰氧基、可选取代的氧酰亚氨基、可选取代的氧亚磺酰氨基、可选取代的氧磺酰氨基、可选取代的氧磺酰基、可选取代的氧磺酰氧基、可选取代的亚磺酰基、可选取代的亚磺酰氨基、可选取代的磺酰基、可选取代的磺酰氨基、可选取代的硫基、可选取代的硫酰基、可选取代的硫酰氨基，或者 R^{1A} 和 R^{1B} 一起形成可选取代的芳基、可选取代的杂环基、可选取代的杂芳基、可选取代的环烷基、或可选取代的环烯基；

R^{1C} 表示 C_{1-3} 烷氧基、 C_{1-3} 烷硫基、 C_{1-3} 烷基氨基、或 C_{1-3} 二烷基氨基；

R^{1D} 表示羟基或氨基；

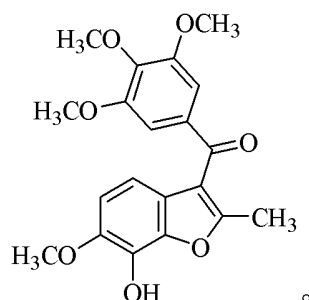
L 表示 $C=O$ 、 O 、 S 、 SO 、 SO_2 、 Se 、 SeO 、 SeO_2 、 $C=NZ'$ 、或 NR' ，其中 Z' 是 H、可选取代的烷基、可选取代的芳基或可选取代的氨基；并且其中 R' 选自 H、 O 、可选取代的酰基、可选取代的烯基、可选取代的烷基、可选取代的芳基、可选取代的环烯基、可选取代的环烷基、可选取代的杂芳基、可选取代的杂环基、或可选取代的磺酰基；

R^{2A} – R^{2E} 各自独立地表示 H、羧基、氰基、二卤代甲氧基、卤素、羟基、硝基、五卤代乙基、磷酸氨基、磷酸基、氧磷基、磺基、三卤代乙烯基、三卤代甲硫基、三卤代甲氧基、三卤代甲基、可选取代的酰基、可选取代的酰氨基、可选取代的酰亚氨基、可选取代的酰亚氨基基、可选取代的酰氧基、可选取代的芳烷基、可选取代的芳烷氧基、可选取代的烯基、可选取代的烯氧基、可选取代的烷氧基、可选取代的烷基、可选取代的炔基、可选取代的炔氧基、可选取代的氨基、可选取代的氨酰基、可选取代的氨酰氧基、可选取代的氨磺酰基、可选取代的氨磺酰基、可选取代的芳基、可选取代的芳氧基、可选取代的环烯基、可选取代的环烷基、可选取代的杂芳基、可选取代的杂环基、可选取代的氧酰基、可选取代的氧酰氨基、可选取代的氧酰氧基、可选取代的氧酰亚氨基、可选取代的氧酰氧基、可选取代的氧亚磺酰氨基、可选取代的氧磺酰氨基、可选取代的氧磺酰基、可选取代的氧磺酰氧基、可选取代的亚磺酰基、可选取代的亚磺酰氨基、可选取代的磺酰基、可选取代的磺酰氨基、可选取代的硫基、可选取代的硫酰基、可选取代的硫酰氨基、或可选取代的硫酰氧基；或者 R^{2A} 和 R^{2B} 、 R^{2B} 和 R^{2C} 、 R^{2C} 和 R^{2D} 、以及 R^{2D} 和 R^{2E} 中

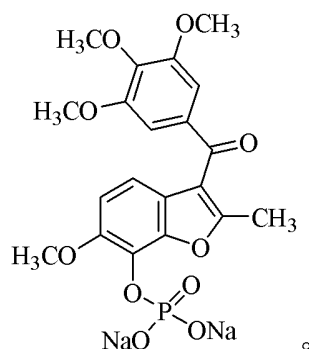
的任一个一起形成可选取代的芳基、可选取代的杂环基、可选取代的杂芳基、可选取代的环烷基、或可选取代的环烯基；以及

Q 表示 H、CN、卤素、三烷基硅烷基、可选取代的烷基、可选取代的烯基、可选取代的炔基、可选取代的酰基、可选取代的氧酰基、可选取代的酰氨基、可选取代的氨酰氨基、OR''、SR'' 或 NR'' R''、或者 NR'' ' NR'' '，其中各个 R'' 独立地表示 H、可选取代的烷基、可选取代的烯基、可选取代的炔基、可选取代的杂环基、可选取代的芳基、可选取代的杂芳基、可选取代的酰基和可选取代的氧酰基，其中各个 R'' ' 独立地表示 H、可选取代的烷基、可选取代的烯基、可选取代的炔基、可选取代的芳基和可选取代的杂芳基。

9. 根据权利要求 1 至 6 中任一项所述的组合、方法、应用或组合物，其中，所述微管蛋白聚合抑制剂是下式 (III) 的化合物，或其盐、溶剂化物或前药：



10. 根据权利要求 9 所述的组合、方法、应用或组合物，其中，所述式 (III) 的化合物是下式的化合物：



11. 根据权利要求 1 至 10 中任一项所述的组合、方法、应用或组合物，其中，所述 mTOR 抑制剂选自 BEZ235 (NVP-BEZ235)、地磷莫司 (AP 23573, MK-8669)、PI-103、雷帕霉素 (西罗莫司, 雷帕鸣)、替西罗莫司 (Torice1, CCI-779)、依维莫司 (Afinitor, RAD001, Certican)、ABT 578、SAR 543 和 AP 23841。

12. 根据权利要求 11 所述的组合、方法、应用或组合物，其中，所述 mTOR 抑制剂是依维莫司或替西罗莫司。

13. 根据权利要求 11 所述的组合、方法、应用或组合物，其中，所述 mTOR 抑制剂是依维莫司。

14. 根据权利要求 11 所述的组合、方法、应用或组合物，其中，所述 mTOR 抑制剂是雷帕霉素。

15. 根据权利要求 1 至 14 中任一项所述的组合、方法、应用或组合物，其中，所述增生性疾病选自肾癌、卵巢癌和肺癌。

16. 根据权利要求 15 所述的组合、方法、应用或组合物，其中，所述增生性疾病是肾癌。

用于治疗增生性疾病的联合疗法

技术领域

[0001] 本发明总体上涉及用于治疗增生性疾病 (proliferative disease) 尤其是癌症的新型化学组合和方法。

背景技术

[0002] 癌症通常用化学疗法和 / 或放射疗法进行治疗。尽管经常有效用于破坏大量的肿瘤细胞,但是这样的疗法经常遗留对治疗有抗性的大量肿瘤细胞。这些抗性细胞能够增殖而形成对治疗也有抗性的新肿瘤。使用化疗药物的已知组合已导致多药抗性 (“MDR”) 肿瘤细胞。

[0003] 增生性疾病如癌症的模式是多因子的。例如,对过去四十年的研究已导致认识到,细胞毒性剂 (或抗增生剂) 包括干扰微管组成 (microtubule formulation) 的抗代谢剂、能够交联 DNA 的烷基化剂、通过阻断 DNA 复制而能够干扰 DNA 烷基化的基于铂的试剂、抗肿瘤抗生素剂、拓扑异构酶抑制剂 (topoisomerase inhibitor) 等。在这样的疾病的治疗中,具有不同机制的药物可以进行组合 (即,联合疗法),具有有益的效果,包括有效治疗 MDR 肿瘤细胞以及最小化副作用如不期望的细胞毒性。然而,这里的困难在于,不是所有已知的抗增生剂的组合提供有用或有益的效果,并且相应地在许多实验室的研究目前集中在开发新的且有用的抗增生组合伴侣 (联合配体, combination partner)。

发明内容

[0004] 本发明提供一种用于治疗增生性疾病的药物组合 (药物组合物或药物联用, pharmaceutical combination), 包括: (a) 微管蛋白聚合抑制剂, 和 (b) mTOR (雷帕霉素的哺乳动物靶标) 抑制剂。

[0005] 本发明还提供一种用于治疗增生性疾病的方法, 包括向需要其的患者给予 (a) 微管蛋白聚合抑制剂、和 (b) mTOR 抑制剂的步骤。

[0006] 本发明还提供 (a) 微管蛋白聚合抑制剂、和 (b) mTOR 抑制剂在制备用于治疗增生性疾病的药剂中的应用。

[0007] 本发明还提供联合 (b) mTOR 抑制剂使用的 (a) 微管蛋白聚合抑制剂在制备用于治疗增生性疾病的药剂中的应用。

[0008] 本发明还提供联合 (a) 微管蛋白聚合抑制剂使用的 (b) mTOR 抑制剂在制备用于治疗增生性疾病的药剂中的应用。

[0009] 本发明进一步提供一种药物组合物, 包含 (a) 微管蛋白聚合抑制剂、和 (b) mTOR 抑制剂。

[0010] 令人惊讶地, 已发现在利用包含 (a) 微管蛋白聚合抑制剂、和 (b) mTOR 抑制剂的组合来治疗增生性疾病中的效果大于单独利用 (a) 或 (b) 能够实现的效果。即, 已发现本发明的组合具有加合或协同效应。

附图说明

[0011] 图 1 是示出了本发明的组合的提出效果的示意图。

[0012] 图 2 是示出了对于实例 2 化合物 (Example 2 compound) 与替西罗莫司 (temsirolimus) 的组合对于各种癌细胞系的联合指数值 (combination index value) 的图表。

[0013] 图 3 是示出了利用实例 2 (化合物) 处理的人肾异种移植物的免疫化学分析的照片。

[0014] 图 4 示出了与 CA4P 和本发明的化合物实例 2 (化合物) 之间的血管性衰竭 (肿瘤灌注减少) 的比较水平有关的 % 灌注对照相对于化合物的量 (mg/kg) 的曲线图。

[0015] 图 5 示出了与化合物实例 2 (化合物) 在带有 MDA-MB-231 原位乳腺实性肿瘤的 Balb/c nu/nu 小鼠中的肿瘤生长抑制有关的肿瘤体积比 (天 * / 第 1 天) 相对于时间 (天) 的曲线图。

[0016] 图 6 示出了用实例 2 (化合物) 和 mTOR 抑制剂雷帕霉素 (rapamycin) (+/-SEM) 处理的 Caki-1 异种移植物的肿瘤体积 (mm³) 相对于时间 (天) 的曲线图。

[0017] 图 7 示出了对于用实例 2 (化合物) 和 mTOR 抑制剂雷帕霉素处理的具有 Caki-1 异种移植物的小鼠的存活的百分比存活相对于时间 (天) 的曲线图。

具体实施方式

[0018] 在整个本说明书及所附权利要求书中,除非上下文有其他要求,术语“包括”及变形如“包含”和“含有”应被理解为,暗示包括所述的整数或步骤、或整数或步骤的组,但不排除任何其他的整数或步骤、或整数或步骤的组。

[0019] 本说明书中对任何现有公开 (或来源其的信息)、或对已知的任何事情提及,不是并且不应被视为承认或表示或任何形式的启示,该现有公开 (或来源于其的信息) 或已知的事情形成本说明书所涉及的研究领域中的公知常识的一部分。

[0020] 组合伴侣 (a): 微管蛋白聚合抑制剂 (TPI)

[0021] 如本文中使用的,术语“微管蛋白聚合抑制剂”是指这样的任何和所有化合物,其直接与微管蛋白相互作用并抑制微管蛋白聚合,并由此干扰微管的生理功能。微管蛋白抑制剂 (TPI) 经常被称为微管“不稳定 (destabilising)”剂。这样的化合物应与微管蛋白相互作用化合物如紫杉烷类和爱博霉素类 (epothilones) (其使微管蛋白聚合物稳定并抑制微管蛋白解聚 (即微管稳定剂)) 形成对照。

[0022] 合适 TPI 的实例包括:

[0023] (i) 合成化合物

[0024] • ABT-751 (E7010, Abbott)

[0025] • MPC-6827 (AzixaTM, Myriad Pharmaceuticals)

[0026] • AEZS-112 (ZEN-012, Eterna Zentaris)

[0027] • CYT997 (Cytopia)

[0028] • MN-029 (Denibulin, MediciNova/Angiogene)

[0029] • EPC2407 (EpiCept)

[0030] • ZIO-301 (Indibulin, Ziopharm Oncology)

[0031] (ii) 天然产物衍生物

[0032] • 长春氟宁 (vinflunine) (Javlor, Pierre Fabre Medicament) 以及其他长春花生物碱类 (vinca alkaloids) (例如长春灭瘟碱 (vinblastin)、长春新碱 (vincristine) 和长春瑞滨 (vinorelbine))

[0033] • 考布他汀 (combretastatin)

[0034] • CA4 (ZybrestatTM, OXiGENE)

[0035] • Oxi4503 (OXiGENE)

[0036] • AVE8062 (AC7700, Sanofi Aventis)

[0037] • 甲磺酸艾日布林 (Eribulin Mesylate) (E7389, Eisai)

[0038] • 多拉司他汀 10 (Dolastatin 10) (NCI)

[0039] • 他西多丁 (Tasidotin) (synthadotin, Genzyme)

[0040] • 2- 甲氧雌甾二醇 (2-methoxyestradiol) (2ME2 或 **Panzem®**, EntreMed)

[0041] • E7974 (Eisai)

[0042] • NPI-2358 (Nereus Pharmaceuticals)

[0043] 微管是丝状聚合物,其是细胞骨架的关键成分。它们是在聚合和解聚的状态之间波动的动态结构。这种性能使得微管能够调节细胞形状、粘附、迁移和增殖。TPI 直接中断 (破坏, disrupt) 微管聚合过程并相应地具有实现 (招致或达到, effect) 细胞形状改变和抑制细胞增殖的能力。这些性能对于 TPI 作为用于治疗癌症的治疗剂以及在本发明的组合中的应用是很重要的。

[0044] 主要由于它们的选择性地关闭 (停止或衰竭, shut down) 通过肿瘤的血流的能力, TPI 化合物在癌症治疗中很重要。通过化疗用 TPI 剂的开发和新的广泛临床使用, 靶向微管蛋白聚合抑制已经成为一种非常良好有效的抗癌途径。

[0045] TPI 可以基于它们的特定微管蛋白结合位点进行分类。

[0046] 长春花生物碱类与微管蛋白的结合定义 (限定, define) 利用这些化合物观察到的介导微管蛋白不稳定化活性的位点。该“长春花”位点已被证实直接结合实现微管蛋白不稳定的大量化合物。

[0047] 秋水仙碱 (秋水仙素, colchicine) 与微管蛋白的结合限定与“长春花”位点情形一样的引起微管蛋白不稳定的独立结合位点。尽管 TPI 与“长春花”位点的结合作为抗癌化疗剂已成功, 但是“秋水仙碱”位点结合剂相对被忽视, 可能是由于缺少由秋水仙碱提供的治疗空白。然而, 最近, 已经描述了大量“秋水仙碱”位点结合剂, 其具有引起实性肿瘤内的血管阻断的能力。这些 TPI 被称为血管阻断剂 (VDA)。表现出 VDA 能力的“秋水仙碱”位点结合剂中的许多是基于天然产物如考布他汀 (CA4P, OXi-4503, AVE-8062)、秋水仙碱 (ZD6126) 和脱氢苯基阿夕斯丁 (phenylahistin) (NPI-2358), 尽管其他的是合成化合物 (MN-029 和 EPC2407)。

[0048] TPI 由于干扰微管完整性而充当 VDA, 导致内衬 (line) 肿瘤的血管的内皮细胞的细胞骨架改变。作为结果, 这些通常是扁平的细胞变为更圆形的, 并失去它们的细胞之间的接触。这些事件导致肿瘤血管变窄并最终堵塞通过这些血管的血流。与这些试剂相关的肿瘤选择性起因于这样的事实, 即肿瘤血管系统比正常血管系统更弱并且更趋于瓦解。然而, 大量与 VDA 相关的剂量受限毒性是由于健康组织中血流的减少。

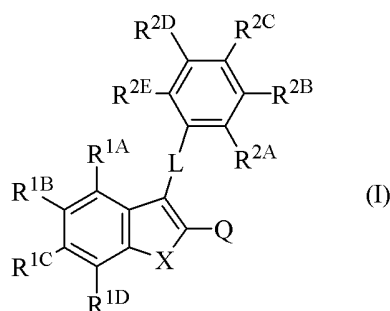
[0049] 在一个优选实施方式中, TPI 是通过结合于微管蛋白的秋水仙碱位点而起作用的 TPI。能够用来确定 TPI 是否在微管蛋白的秋水仙碱位点处起作用的测定在本领域是已知的, 如在 Ma, R et al, Cancer Chemother. Pharmacol., 2008, Sept 62(4) 559-68 中。

[0050] 在另一实施方式中, TPI 是在秋水仙碱结合位点处起作用且是基于有环呋喃类 (annulated furans) (例如苯并呋喃, 呋喃并 [2,3-d] 嘧啶-2(1H)-酮等)、苯并噻吩和吲哚结构骨架的 TPI, 如在 US 7,456,214、US 7,429,681、US 7,071,190、US 6,849,656、US 5,886,025、US 6,162,930、US 6,350,777、US 5,340,062、WO 06/084338、WO 02/060872、WO 07/087684 和 WO08/070908 中公开的那些。

[0051] 在一个实施方式中, TPI 选自在 WO 06/084338、WO 07/087684 或 WO 08/070908 中公开的 TPI。

[0052] 在一个实施方式中, TPI 选自下式 (I) 的化合物及其盐:

[0053]



[0054] 其中:

[0055] X 表示 O、S、SO、SO₂、Se、SeO、SeO₂ 或 NR, 其中 R 选自 H、O、可选取代的酰基、可选取代的烯基、可选取代的烷基、可选取代的芳基、可选取代的环烯基、可选取代的环烷基、可选取代的杂芳基、可选取代的杂环基、以及可选取代的磺酰基;

[0056] R^{1A} 和 R^{1B} 各自独立地表示 H、羧基、氰基、二卤代甲氧基、卤素、羟基、硝基、五卤代乙基、磷酰氨基 (phosphorylamino)、膦酰基 (phosphono)、氧膦基 (phosphinyl)、磺基 (硫代, sulfo)、三卤代乙烯基、三卤代甲硫基 (trihalomethanethio)、三卤代甲氧基、三卤代甲基、可选取代的酰基、可选取代的酰氨基 (acylamino)、可选取代的酰亚氨基 (acylimino)、可选取代的酰亚氨基氧基 (acyliminoxy)、可选取代的酰氧基、可选取代的芳烷基、可选取代的芳烷氧基、可选取代的烯基、可选取代的烯氧基、可选取代的烷氧基、可选取代的烷基、可选取代的炔基、可选取代的炔氧基、可选取代的氨基、可选取代的氨酰基、可选取代的氨酰氧基、可选取代的氨磺酰基、可选取代的氨硫酰基 (aminothioacyl)、可选取代的芳基、可选取代的芳氧基、可选取代的环烯基、可选取代的环烷基、可选取代的杂芳基、可选取代的杂环基、可选取代的氧酰基、可选取代的氧酰氨基、可选取代的氧酰氧基、可选取代的氧酰亚氨基、可选取代的氧亚磺酰氨基 (oxysulfinylamino)、可选取代的氧磺酰氨基、可选取代的氧硫酰基 (oxythioacyl)、可选取代的氧硫酰氧基、可选取代的亚磺酰基 (sulfinyl)、可选取代的亚磺酰氨基、可选取代的磺酰基、可选取代的磺酰氨基、可选取代的硫基 (巯基, thio)、可选取代的硫酰基 (thioacyl)、可选取代的硫酰氨基 (thioacylamino), 或者 R^{1A} 和 R^{1B} 一起形成可选取代的芳基、可选取代的杂环基、可选取代的杂芳基、可选取代的环烷基、或可选取代的环烯基;

[0057] R^{1C} 表示 C_{1-3} 烷氧基、 C_{1-3} 烷硫基 (alkylthio)、 C_{1-3} 烷基氨基、或 C_{1-3} 二烷基氨基；

[0058] R^{1D} 表示羟基或氨基；

[0059] L 表示 C = O、O、S、SO、SO₂、Se、SeO、SeO₂、C = NZ'、或 NR'，其中 Z' 是 H、可选取代的烷基、可选取代的芳基或可选取代的氨基；并且其中 R' 选自 H、O、可选取代的酰基、可选取代的烯基、可选取代的烷基、可选取代的芳基、可选取代的环烯基、可选取代的环烷基、可选取代的杂芳基、可选取代的杂环基、或可选取代的磺酰基；

[0060] R^{2A} - R^{2E} 各自独立地表示 H、羧基、氰基、二卤代甲氧基、卤素、羟基、硝基、五卤代乙基、磷酰氨基、膦酰基、氧膦基、磺基、三卤代乙烯基、三卤代甲硫基、三卤代甲氧基、三卤代甲基、可选取代的酰基、可选取代的酰氨基、可选取代的酰亚氨基、可选取代的酰亚氨基氧基、可选取代的酰氧基、可选取代的芳烷基、可选取代的芳烷氧基、可选取代的烯基、可选取代的烯氧基、可选取代的烷氧基、可选取代的烷基、可选取代的炔基、可选取代的炔氧基、可选取代的氨基、可选取代的氨酰基、可选取代的氨酰氧基、可选取代的氨磺酰基、可选取代的氨磺酰基、可选取代的芳基、可选取代的芳氧基、可选取代的环烯基、可选取代的环烷基、可选取代的杂芳基、可选取代的杂环基、可选取代的氧酰基、可选取代的氧酰氨基、可选取代的氧酰亚氨基、可选取代的氧酰氧基、可选取代的氧亚磺酰氨基、可选取代的氧磺酰氨基、可选取代的氧磺酰基、可选取代的氧磺酰氧基、可选取代的亚磺酰基、可选取代的亚磺酰氨基、可选取代的磺酰基、可选取代的磺酰氨基、可选取代的硫基、可选取代的硫酰基、可选取代的硫酰氨基、或可选取代的硫酰氧基；或者 R^{2A} 和 R^{2B} 、 R^{2B} 和 R^{2C} 、 R^{2C} 和 R^{2D} 、以及 R^{2D} 和 R^{2E} 中的任一个（任何）一起形成可选取代的芳基、可选取代的杂环基、可选取代的杂芳基、可选取代的环烷基、或可选取代的环烯基；以及

[0061] Q 表示 H、CN、卤素、三烷基硅烷基、可选取代的烷基、可选取代的烯基、可选取代的炔基、可选取代的酰基、可选取代的氧酰基、可选取代的酰氨基、可选取代的氨酰氨基、OR''、SR'' 或 NR'' R''，其中各个 R'' 独立地表示 H、可选取代的烷基、可选取代的烯基、可选取代的炔基、可选取代的芳基、可选取代的杂芳基、可选取代的杂环基、可选取代的酰基和可选取代的氧酰基，或者 NR'' ' NR'' '，其中各个 R'' ' 独立地表示 H、可选取代的烷基、可选取代的烯基、可选取代的炔基、可选取代的芳基和可选取代的杂芳基。

[0062] 在一些实施方式中， R^{1A} - R^{1B} 和 R^{2A} - R^{2E} 独立地选自以下基团：

[0063] 烷基，优选甲基和乙基；

[0064] 取代烷基，优选 1- 羟乙基，1- 巯乙基，甲氧基亚氨基甲基，乙氧基亚氨基甲基，1-(羟基亚氨基) 乙基，1-(羟基亚氨基) 丙基，1- 胍基乙基 (1-hydrazinoethyl)，1- 胍基丙基，羟基亚氨基甲基，2- 氧丙基，2- 氧丁基，3- 氧戊基，硝基甲基，1- 硝基甲基和 2- 硝基甲基；

[0065] 酰基，优选甲酰基，乙酰基，丙酰基，苯甲酰基（可选地被甲基、甲氧基、卤素、硝基、三氟甲基或氰基取代）；

[0066] 烷氧基，优选甲氧基和乙氧基；

[0067] 氧酰基，优选甲氧基羰基，乙氧基羰基，丙氧基羰基，丁氧基羰基，异丁氧基羰基；

[0068] 酰氧基，优选乙酰氧基和丙酰氧基；

[0069] 取代的芳烷基，优选 1- 羟基苄基，和 1- 巯苄基；

[0070] 亚磺酰基，优选甲基亚磺酰基，乙基亚磺酰基，苯亚磺酰基（可选地被甲基、甲氧

基、卤素、硝基、三氟甲烷或氰基取代), 甲氧基亚磺酰基, 乙氧基亚磺酰基;

[0071] 磺酰基, 优选甲磺酰基, 乙磺酰基, 苯磺酰基 (可选地被甲基、甲氧基、卤素、硝基、三氟甲烷或氰基取代), 甲氧基碳 (methoxycarbo), 三氟甲烷;

[0072] 氧酰氨基, 优选甲氧羰基氨基 (甲氧酰胺基, methoxycarbonylamido) 和乙氧羰基氨基;

[0073] 氧硫酰基, 优选甲氧硫羰基和乙氧硫羰基;

[0074] 硫酰氧基, 优选硫乙酰氧基 (thionoacetoxy) 和硫丙酰氧基 (thionopropionoxy);

[0075] 亚磺酰氨基, 优选甲亚磺酰氨基, 乙亚磺酰氨基和苯亚磺酰氨基 (可选地被甲基、甲氧基、卤素、硝基、三氟甲烷或氰基取代);

[0076] 氨基;

[0077] 取代氨基, 优选 L- 缬氨酸、D- 缬氨酸、L- 丙氨酸、D- 丙氨酸、天冬氨酸和丙氨酰丝氨酸的残基, N- 甲氨基, 以及 N, N' - 二甲氨基;

[0078] 磺酰氨基, 优选甲磺酰氨基, 乙磺酰氨基和苯磺酰氨基 (可选地被甲基、甲氧基、卤素、硝基、三氟甲烷或氰基取代);

[0079] 氧亚磺酰氨基, 优选甲氧基亚磺酰氨基和乙氧基亚磺酰氨基;

[0080] 氧磺酰氨基, 优选甲氧基磺酰氨基和乙氧基磺酰氨基;

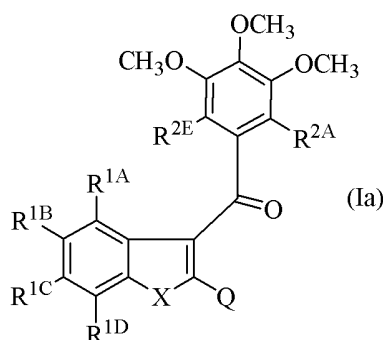
[0081] 可选取代的烯基, 优选 1- 丙烯基, 乙烯基, 硝基乙烯基, 氰基乙烯基, 或三氟乙烯基和苯乙烯基 (可选地被甲基、甲氧基、卤素、硝基、三氟甲烷或氰基取代);

[0082] 炔基, 优选 1- 丙炔基, 乙炔基或三甲基硅烷基乙炔基。

[0083] 在一个实施方式中, R^{2D} 、 R^{2C} 和 R^{2B} 是甲氧基并且 L 是羰基 ($C=O$)。

[0084] 相应地, 在这个实施方式中, 本发明的 TPI 由下式 (Ia) 表示:

[0085]



[0086] 其中:

[0087] X 表示 O、S、SO、SO₂、Se、SeO、SeO₂ 或 NR, 其中 R 选自 H、O、可选取代的酰基、可选取代的烯基、可选取代的烷基、可选取代的芳基、可选取代的环烯基、可选取代的环烷基、可选取代的杂芳基、可选取代的杂环基、和可选取代的磺酰基;

[0088] R^{1A} 和 R^{1B} 各自独立地表示 H、羧基、氰基、二卤代甲氧基、卤素、羟基、硝基、五卤代乙基、磷酰氨基、膦酰基、氧膦基、磺基、三卤代乙烯基、三卤代甲硫基、三卤代甲氧基、三卤代甲基、可选取代的酰基、可选取代的酰氨基、可选取代的酰亚氨基、可选取代的酰亚氨基基、可选取代的酰氧基、可选取代的芳烷基、可选取代的芳烷氧基、可选取代的烯基、可选取代的烯氧基、可选取代的烷氧基、可选取代的烷基、可选取代的炔基、可选取代的炔氧基、可选

取代的氨基、可选取代的氨酰基、可选取代的氨酰氧基、可选取代的氨磺酰基、可选取代的氨磺酰基、可选取代的芳基、可选取代的芳氧基、可选取代的环烯基、可选取代的环烷基、可选取代的杂芳基、可选取代的杂环基、可选取代的氧酰基、可选取代的氧酰氨基、可选取代的氧酰氧基、可选取代的氧酰亚氨基、可选取代的氧亚磺酰氨基、可选取代的氧磺酰氨基、可选取代的氧磺酰基、可选取代的氧磺酰氧基、可选取代的亚磺酰基、可选取代的亚磺酰氨基、可选取代的磺酰基、可选取代的磺酰氨基、可选取代的硫基、可选取代的硫酰基、可选取代的硫酰氨基,或者 R^{1A} 和 R^{1B} 一起形成可选取代的芳基、可选取代的杂环基、可选取代的杂芳基、可选取代的环烷基、或可选取代的环烯基;

[0089] R^{1C} 表示 C_{1-3} 烷氧基、 C_{1-3} 烷硫基、 C_{1-3} 烷基、或 C_{1-3} 二烷基;

[0090] R^{1D} 表示羟基或氨基;

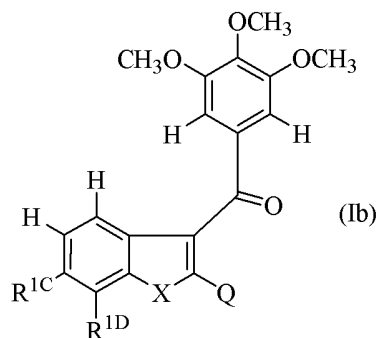
[0091] R^{2A} 和 R^{2E} 独立地表示 H、羧基、氰基、二卤代甲氧基、卤素、羟基、硝基、五卤代乙基、磷酰氨基、磷酰基、氧磷基、磺基、三卤代乙烯基、三卤代甲硫基、三卤代甲氧基、三卤代甲基、可选取代的酰基、可选取代的酰氨基、可选取代的酰亚氨基、可选取代的酰亚氨基氧基、可选取代的酰氧基、可选取代的芳烷基、可选取代的芳烷氧基、可选取代的烯基、可选取代的烯氧基、可选取代的烷氧基、可选取代的烷基、可选取代的炔基、可选取代的炔氧基、可选取代的氨基、可选取代的氨酰基、可选取代的氨酰氧基、可选取代的氨磺酰基、可选取代的氨磺酰基、可选取代的芳基、可选取代的芳氧基、可选取代的环烯基、可选取代的环烷基、可选取代的杂芳基、可选取代的杂环基、可选取代的氧酰基、可选取代的氧酰氨基、可选取代的氧酰氧基、可选取代的氧酰亚氨基、可选取代的氧亚磺酰氨基、可选取代的氧磺酰氨基、可选取代的氧磺酰基、可选取代的氧磺酰氧基、可选取代的亚磺酰基、可选取代的亚磺酰氨基、可选取代的磺酰基、可选取代的磺酰氨基、可选取代的硫基、可选取代的硫酰基、可选取代的硫酰氨基、或可选取代的硫酰氧基;以及

[0092] Q 表示 H、CN、卤素、三烷基硅烷基、可选取代的烷基、可选取代的烯基、可选取代的炔基、可选取代的酰基、可选取代的氧酰基、可选取代的酰氨基、可选取代的氨酰氨基、可选取代的氨酰氨基、OR''、SR'' 或 NR'' R'' , 其中各个 R'' 独立地表示 H、可选取代的烷基、可选取代的烯基、可选取代的炔基、可选取代的芳基、可选取代的杂芳基、可选取代的杂环基、可选取代的酰基和可选取代的氧酰基,或者 NR'' ' NR'' ', 其中各个 R'' ' 独立地表示 H、可选取代的烷基、可选取代的烯基、可选取代的炔基、可选取代的芳基和可选取代的杂芳基。

[0093] 在另一实施方式中, R^{1A} 、 R^{1B} 、 R^{2A} 和 R^{2E} 表示 H, 并且 R^{1C} 表示 C_{1-3} 烷氧基。

[0094] 相应地,在这个实施方式中,本发明的 TPI 由下式 (Ib) 表示:

[0095]



[0096] 其中:

[0097] X 表示 O、S、SO、SO₂、Se、SeO、SeO₂ 或 NR，其中 R 选自 H、O、可选取代的酰基、可选取代的烯基、可选取代的烷基、可选取代的芳基、可选取代的环烯基、可选取代的环烷基、可选取代的杂芳基、可选取代的杂环基、和可选取代的磺酰基；

[0098] R^{1C} 表示 C₁₋₃ 烷氧基；

[0099] R^{1D} 表示羟基或氨基；

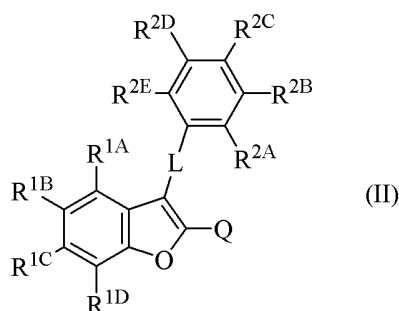
[0100] Q 表示 H、CN、卤素、三烷基硅烷基、可选取代的烷基、可选取代的烯基、可选取代的炔基、可选取代的酰基、可选取代的氧酰基、可选取代的酰氨基、可选取代的氨酰氨基、OR''、SR'' 或 NR'' R''，其中各个 R'' 独立地表示 H、可选取代的烷基、可选取代的烯基、可选取代的炔基、可选取代的芳基、可选取代的杂芳基、可选取代的酰基和可选取代的氧酰基，或者 NR'' ' NR'' '，其中各个 R'' ' 独立地表示 H、可选取代的烷基、可选取代的烯基、可选取代的炔基、可选取代的芳基和可选取代的杂芳基。

[0101] 在一个优选实施方式中，R^{1C} 表示甲氧基。

[0102] 对于由式 I、Ia 和 Ib 表示的化合物，X 优选选自 O、S 和 NR。更优选地，X 是 O 或 NR，并最优选地 X 是 O。

[0103] 相应地，在另一实施方式中，该 TPI 由下式 II 表示：

[0104]



[0105] 其中：

[0106] R^{1A} 和 R^{1B} 各自独立地表示 H、羧基、氰基、二卤代甲氧基、卤素、羟基、硝基、五卤代乙基、磷酸氨基、膦酰基、氧膦基、磺基、三卤代乙烯基、三卤代甲硫基、三卤代甲氧基、三卤代甲基、可选取代的酰基、可选取代的酰氨基、可选取代的酰亚氨基、可选取代的酰亚氨氧基、可选取代的酰氧基、可选取代的芳烷基、可选取代的芳烷氧基、可选取代的烯基、可选取代的烯氧基、可选取代的烷氧基、可选取代的烷基、可选取代的炔基、可选取代的炔氧基、可选取代的氨基、可选取代的氨酰基、可选取代的氨酰氧基、可选取代的氨磺酰基、可选取代的氨硫酰基、可选取代的芳基、可选取代的芳氧基、可选取代的环烯基、可选取代的环烷基、可选取代的杂芳基、可选取代的杂环基、可选取代的氧酰基、可选取代的氧酰氨基、可选取代的氧酰氧基、可选取代的氧酰亚氨基、可选取代的氧亚磺酰氨基、可选取代的氧磺酰氨基、可选取代的氧硫酰基、可选取代的氧硫酰氧基、可选取代的亚磺酰基、可选取代的亚磺酰氨基、可选取代的磺酰基、可选取代的磺酰氨基、可选取代的硫基、可选取代的硫酰基、可选取代的硫酰氨基，或者 R^{1A} 和 R^{1B} 一起形成可选取代的芳基、可选取代的杂环基、可选取代的杂芳基、可选取代的环烷基、或可选取代的环烯基；

[0107] R^{1C} 表示 C₁₋₃ 烷氧基、C₁₋₃ 烷硫基、C₁₋₃ 烷基氨基、或 C₁₋₃ 二烷基氨基；

[0108] R^{1D} 表示羟基或氨基；

[0109] L 表示 $C = O$ 、 O 、 S 、 SO 、 SO_2 、 Se 、 SeO 、 SeO_2 、 $C = NZ'$ 、或 NR' ，其中 Z' 是 H、可选取代的烷基、可选取代的芳基或可选取代的氨基；并且其中 R' 选自 H、O、可选取代的酰基、可选取代的烯基、可选取代的烷基、可选取代的芳基、可选取代的环烯基、可选取代的环烷基、可选取代的杂芳基、可选取代的杂环基、或可选取代的磺酰基；

[0110] R^{2A} – R^{2E} 各自独立地表示 H、羧基、氰基、二卤代甲氧基、卤素、羟基、硝基、五卤代乙基、磷酰氨基、膦酰基、氧膦基、磺基、三卤代乙烯基、三卤代甲硫基、三卤代甲氧基、三卤代甲基、可选取代的酰基、可选取代的酰氨基、可选取代的酰亚氨基、可选取代的酰亚氨基氧基、可选取代的酰氧基、可选取代的芳烷基、可选取代的芳烷氧基、可选取代的烯基、可选取代的烯氧基、可选取代的烷氧基、可选取代的烷基、可选取代的炔基、可选取代的炔氧基、可选取代的氨基、可选取代的氨酰基、可选取代的氨酰氧基、可选取代的氨磺酰基、可选取代的氨硫酰基、可选取代的芳基、可选取代的芳氧基、可选取代的环烯基、可选取代的环烷基、可选取代的杂芳基、可选取代的杂环基、可选取代的氧酰基、可选取代的氧酰氨基、可选取代的氧酰亚氨基、可选取代的氧酰氧基、可选取代的氧亚磺酰氨基、可选取代的氧磺酰氨基、可选取代的氧硫酰基、可选取代的氧硫酰氧基、可选取代的亚磺酰基、可选取代的亚磺酰氨基、可选取代的磺酰基、可选取代的磺酰氨基、可选取代的硫基、可选取代的硫酰基、可选取代的硫酰氨基、或可选取代的硫酰氧基；或者 R^{2A} 和 R^{2B} 、 R^{2B} 和 R^{2C} 、 R^{2C} 和 R^{2D} 以及 R^{2D} 和 R^{2E} 中的任一个一起形成可选取代的芳基、可选取代的杂环基、可选取代的杂芳基、可选取代的环烷基、或可选取代的环烯基；以及

[0111] Q 表示 H、CN、卤素、三烷基硅烷基、可选取代的烷基、可选取代的烯基、可选取代的炔基、可选取代的酰基、可选取代的氧酰基、可选取代的酰氨基、可选取代的氨酰氨基、 OR'' 、 SR'' 或 NR'' R'' ，其中各个 R'' 独立地表示 H、可选取代的烷基、可选取代的烯基、可选取代的炔基、可选取代的杂环基、可选取代的芳基、可选取代的杂芳基、可选取代的酰基和可选取代的氧酰基，或者 NR''' NR''' ，其中各个 R''' 独立地表示 H、可选取代的烷基、可选取代的烯基、可选取代的炔基、可选取代的芳基和可选取代的杂芳基。

[0112] 在该实施方式中，优选 L 是羰基 ($C = O$)。而且，优选 R^{2D} 、 R^{2C} 或 R^{2B} 中的至少一个表示羟基或 C_{1-3} 烷氧基。更优选地，当 $X = O$ 时，L 是羰基并且 R^{2D} 、 R^{2C} 和 R^{2B} 表示甲氧基。甚至更优选地，当 $X = O$ 时，L 是羰基， R^{2D} 、 R^{2C} 和 R^{2B} 表示甲氧基，并且 R^{1A} 、 R^{1B} 、 R^{2A} 、 R^{2E} 是 H。

[0113] 此外，对于式 (I)、(Ia)、(Ib) 和 (II) 的化合物，优选 Q 表示 H、CN、可选取代的 C_{2-4} 炔基、可选取代的 C_{2-6} 烯基、可选取代的 C_{1-4} 烷基、羟基、可选取代的氧酰基、 NR'' R'' 、 SR'' （其中各个 R'' 独立地是 H、可选取代的 C_{1-4} 烷基、可选取代的杂环基、可选取代的杂芳基）、 NR''' NR''' （其中各个 R''' 独立地是 H、 C_{1-3} 烷基）、可选取代的酰氨基、或卤素。

[0114] 在一些实施方式中，Q 独立地选自以下基团：

[0115] H；

[0116] CN；

[0117] 卤素，优选 Br 或 Cl；

[0118] 烷基，优选甲基、乙基、丙基、丁基；

[0119] 取代烷基，优选氨基、氧酰氨基烷基和氧磺酰氨基烷基；

[0120] 可选取代的烯基，优选乙烯基，2- 烷基乙烯基、2- 氧酰基乙烯基、2- 氨酰基乙烯基；

- [0121] 可选取代的炔基, 优选乙炔基、2- 烷基乙炔基;
- [0122] 可选取代的氧酰基;
- [0123] OR'' , 优选羟基、甲氧基、乙氧基;
- [0124] $NR''R''$, 优选 NH_2 、烷基氨基、二烷基氨基、杂芳氨基、氨烷基氨基、羟基烷基氨基、烷氧基烷基氨基、氧酰基烷基氨基、氧酰氨基烷基氨基、胍基烷基氨基;
- [0125] SR'' , 优选烷硫基、氨基烷硫基、杂芳硫基、氨烷基硫基、羟基烷硫基、烷氧基烷硫基、氧酰基烷硫基、氧酰氨基烷硫基、胍基烷硫基;
- [0126] 肼。
- [0127] 化学定义
- [0128] “烷基”是指一价烷基, 其可以是直链的或支链的, 并且优选具有 1 至 10 个碳原子或更优选 1 至 6 个碳原子, 并且甚至更优选 1 至 3 个碳原子。这样的烷基的实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、正己基等。
- [0129] “亚烷基”是指二价烷基, 优选具有 1 至 10 个碳原子并且更优选 1 至 6 个碳原子, 并且甚至更优选 1 至 3 个碳原子。这样的亚烷基的实例包括亚甲基 ($-CH_2-$)、亚乙基 ($-CH_2CH_2-$)、以及亚丙基异构体 (例如, $-CH_2CH_2CH_2-$ 和 $-CH(CH_3)CH_2-$) 等。
- [0130] “芳基”是指具有单个环的不饱和芳族碳环基 (例如苯基) 或多个稠合环的不饱和芳族碳环基 (例如萘基或蒽基), 优选具有 6 至 14 个碳原子。芳基的实例包括苯基、萘基等。
- [0131] “亚芳基”是指二价芳基, 其中的芳基是如上所述的。
- [0132] “芳氧基”是指基团芳基 $-O-$, 其中的芳基是如上所述的。
- [0133] “芳烷基”是指 $-$ 亚烷基 $-$ 芳基, 优选在亚烷基部分具有 1 至 10 个碳原子而在芳基部分具有 6 至 10 个碳原子。这样的芳烷基例如是苄基、苄乙基等。
- [0134] “芳烷氧基”是指基团芳烷基 $-O-$, 其中的芳烷基是如上所述的。这样的芳烷氧基例如是苄氧基等。
- [0135] “烷氧基”是指基团烷基 $-O-$, 其中的烷基是如上所述的。实例包括甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、叔丁氧基、仲丁氧基、正戊氧基、正己氧基、1,2- 二甲基丁氧基等。
- [0136] “烯基”是指一价烯基, 其可以是直链的或支链的, 并且优选具有 2 至 10 个碳原子并且更优选 2 至 6 个碳原子, 并且具有至少一个并且优选 1-2 个碳碳双键。实例包括乙烯基 ($-CH=CH_2$)、正丙烯基 ($-CH_2CH=CH_2$)、异丙烯基 ($-C(CH_3)=CH_2$)、丁-2- 烯基 ($-CH_2CH=CHCH_3$) 等。
- [0137] “烯氧基”是指基团烯基 $-O-$, 其中的烯基是如上所述的。
- [0138] “亚烯基”是指二价烯基, 优选具有 2 至 8 个碳原子并且更优选 2 至 6 个碳原子。实例包括亚乙烯基 ($-CH=CH-$) 和亚丙烯基异构体 (例如 $-CH_2CH=CH-$ 和 $-C(CH_3)=CH-$) 等。
- [0139] “炔基”是指这样的炔基, 优选具有 2 至 10 个碳原子并且更优选 2 至 6 个碳原子, 并且具有至少一个并且优选 1-2 个碳碳三键。炔基的实例包括乙炔基 ($-C\equiv CH$)、炔丙基 ($-CH_2C\equiv CH$)、戊-2- 炔基 ($-CH_2C\equiv CCH_2CH_3$) 等。
- [0140] “炔氧基”是指基团炔基 $-O-$, 其中的炔基是如上所述的。
- [0141] “亚炔基”是指二价炔基, 优选具有 2 至 8 个碳原子并且更优选 2 至 6 个碳原子。

实例包括亚乙炔基 ($-\text{C} \equiv \text{C}-$)、亚丙炔基 ($-\text{CH}_2-\text{C} \equiv \text{C}-$) 等。

[0142] “酰基”是指基团 $\text{H}-\text{C}(\text{O})-$ 、烷基 $-\text{C}(\text{O})-$ 、环烷基 $-\text{C}(\text{O})-$ 、芳基 $-\text{C}(\text{O})-$ 、杂芳基 $-\text{C}(\text{O})-$ 和杂环基 $-\text{C}(\text{O})-$ ，其中的烷基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环基是如本文中所描述的。

[0143] “氧酰基”是指基团 $\text{HOC}(\text{O})-$ 、烷基 $-\text{OC}(\text{O})-$ 、环烷基 $-\text{OC}(\text{O})-$ 、芳基 $-\text{OC}(\text{O})-$ 、杂芳基 $-\text{OC}(\text{O})-$ 和杂环基 $-\text{OC}(\text{O})-$ ，其中的烷基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环基是如本文中所描述的。

[0144] “氨基”是指基团 $-\text{NR}^*\text{R}^*$ ，其中各个 R^* 独立地是氢、烷基、环烷基、芳基、杂芳基、和杂环基，并且其中烷基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环基中的每一个是如本文中所描述的。

[0145] “氨酰基”是指基团 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^*\text{R}^*$ ，其中各个 R^* 独立地是氢、烷基、环烷基、芳基、杂芳基、和杂环基，并且其中烷基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环基中的每一个是如本文中所描述的。

[0146] “氨酰基氨基”是指基团 $-\text{NR}^*\text{C}(\text{O})\text{NR}^*\text{R}^*$ ，其中各个 R^* 独立地是氢、烷基、环烷基、芳基、杂芳基、和杂环基，并且其中烷基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环基中的每一个是如本文中所描述的。

[0147] “酰氨基”是指基团 $-\text{NR}^*\text{C}(\text{O})\text{R}^*$ ，其中各个 R^* 独立地是氢、烷基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环基，并且其中烷基、环烷基、芳基、杂芳基、和杂环基中的每一个是如本文中所描述的。

[0148] “酰氧基”是指基团 $-\text{OC}(\text{O})-$ 烷基、 $-\text{OC}(\text{O})-$ 芳基、 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 杂芳基、和 $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 杂环基，其中烷基、芳基、杂芳基和杂环基是如本文中所描述的。

[0149] “氨酰氧基”是指基团 $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}^*-$ 烷基、 $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}^*-$ 芳基、 $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}^*-$ 杂芳基、和 $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}^*-$ 杂环基，其中 R^* 独立地是氢、烷基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环基，并且其中烷基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环基中的每一个是如本文中所描述的。

[0150] “氧酰氨基”是指基团 $-\text{NR}^*\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 烷基、 $-\text{NR}^*\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 芳基、 $-\text{NR}^*\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 杂芳基、和 $\text{NR}^*\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 杂环基，其中 R^* 独立地是氢、烷基、环烷基、芳基、杂芳基、和杂环基，其中烷基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环基中的每一个是如本文中所描述的。

[0151] “氧酰氧基”是指基团 $-\text{OC}(\text{O})\text{O}-$ 烷基、 $-\text{O}-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 芳基、 $-\text{OC}(\text{O})\text{O}-$ 杂芳基、和 $-\text{OC}(\text{O})\text{O}-$ 杂环基，其中烷基、环烷基、芳基、杂芳基、和杂环基是如本文中所描述的。

[0152] “酰亚氨基”是指基团 $-\text{C}(\text{NR}^*)-\text{R}^*$ ，其中各个 R^* 独立地是氢、烷基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环基，并且其中烷基、环烷基、芳基、杂芳基、和杂环基中的每一个是如本文中所描述的。

[0153] “酰亚氨氧基”是指基团 $-\text{O}-\text{C}(\text{NR}^*)-\text{R}^*$ ，其中各个 R^* 独立地是氢、烷基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环基，并且其中烷基、环烷基、芳基、杂芳基、和杂环基中的每一个是如本文中所描述的。

[0154] “氧酰亚氨基”是指基团 $-\text{C}(\text{NR}^*)-\text{OR}^*$ ，其中各个 R^* 独立地是氢、烷基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环基，并且其中烷基、环烷基、芳基、杂芳基、和杂环基中的每一个是如本文中所描述的。

[0155] “环烷基”是指具有单个环状环或多个稠合环的环状烷基，优选整合（具有）3 至 8 个碳原子。这样的环烷基的实例包括单环结构如环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环辛基

如本文中所描述的。

[0170] “磺酰基 (sulfonyl)”是指基团 H-S(O)_2- 、 alkyl-S(O)_2- 、环烷基 $-\text{S(O)}_2-$ 、芳基 $-\text{S(O)}_2-$ 、杂芳基 $-\text{S(O)}_2-$ 、和杂环基 $-\text{S(O)}_2-$ ，其中的烷基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环基是如本文中所描述的。

[0171] “亚磺酰氨基 (sulfinylamino)”是指基团 H-S(O)-NR^*- 、烷基 $-\text{S(O)-NR}^*-$ 、环烷基 $-\text{S(O)-NR}^*-$ 、芳基 $-\text{S(O)-NR}^*-$ 、杂芳基 $-\text{S(O)-NR}^*-$ 、和杂环基 $-\text{S(O)-NR}^*-$ ，其中 R^* 独立地是氢、烷基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环基，并且其中的烷基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环基中的每一个是如本文中所描述的。

[0172] “磺酰氨基 (sulfonfylamino)”是指基团 $\text{H-S(O)}_2-\text{NR}^*-$ 、烷基 $-\text{S(O)}_2-\text{NR}^*-$ 、环烷基 $-\text{S(O)}_2-\text{NR}^*-$ 、芳基 $-\text{S(O)}_2-\text{NR}^*-$ 、杂芳基 $-\text{S(O)}_2-\text{NR}^*-$ 、和杂环基 $-\text{S(O)}_2-\text{NR}^*-$ ，其中 R^* 独立地是氢、烷基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环基，并且其中的烷基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环基中的每一个是如本文中所描述的。

[0173] “氧亚磺酰氨基 (oxysulfinylamino)”是指基团 HO-S(O)-NR^*- 、烷基 O-S(O)-NR^*- 、环烷基 O-S(O)-NR^*- 、芳基 O-S(O)-NR^*- 、杂芳基 O-S(O)-NR^*- 、和杂环基 O-S(O)-NR^*- ，其中 R^* 独立地是氢、烷基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环基，并且其中的烷基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环基中的每一个是如本文中所描述的。

[0174] “氧磺酰氨基 (oxysulfonylamino)”是指基团 $\text{HO-S(O)}_2-\text{NR}^*-$ 、烷基 $\text{O-S(O)}_2-\text{NR}^*-$ 、环烷基 $\text{O-S(O)}_2-\text{NR}^*-$ 、芳基 $\text{O-S(O)}_2-\text{NR}^*-$ 、杂芳基 $\text{O-S(O)}_2-\text{NR}^*-$ 、和杂环基 $\text{O-S(O)}_2-\text{NR}^*-$ ，其中 R^* 独立地是氢、烷基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环基，并且其中的烷基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环基中的每一个是如本文中所描述的。

[0175] “氨硫酰基 (aminothioacyl)”是指基团 $\text{R}^*\text{R}^*\text{N-C(S)-}$ ，其中各个 R^* 独立地是氢、烷基、环烷基、芳基、杂芳基、和杂环，并且其中的烷基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环基中每一个是如本文中所描述的。

[0176] “硫酰氨基 (thioacylamino)”是指基团 H-C(S)-NR^*- 、烷基 $-\text{C(S)-NR}^*-$ 、环烷基 $-\text{C(S)-NR}^*-$ 、芳基 $-\text{C(S)-NR}^*-$ 、杂芳基 $-\text{C(S)-NR}^*-$ 、和杂环基 $-\text{C(S)-NR}^*-$ ，其中 R^* 独立地是氢、烷基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环基，并且其中的烷基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环基中的每一个是如本文中所描述的。

[0177] “氨亚磺酰基 (aminosulfinyl)”是指基团 $\text{R}^*\text{R}^*\text{N-S(O)-}$ ，其中各个 R^* 独立地是氢、烷基、环烷基、芳基、杂芳基、和杂环，并且其中的烷基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环基中的每一个是如本文中所描述的。

[0178] “氨磺酰基 (aminosulfonyl)”是指基团 $\text{R}^*\text{R}^*\text{N-S(O)}_2-$ ，其中各个 R^* 独立地是氢、烷基、环烷基、芳基、杂芳基、和杂环，并且其中的烷基、环烷基、芳基、杂芳基和杂环基中的每一个是如本文中所描述的。

[0179] 在本说明书中，“可选取代的”用来表示，一个基团可以被或可以不被一个或多个选自以下的基团进一步取代或稠合（以形成稠合多环基团）：羟基，酰基，烷基，烷氧基，烯基，烯氧基，炔基，炔氧基，氨基，氨酰基，硫基，芳烷基，芳烷氧基，芳基，芳氧基，酰氨基，氰基，卤素，硝基，磺基，膦酰基，膦酰氨基，氧膦基，杂芳基，杂芳氧基，杂环基，杂环氧基，氧酰基，肟，肟醚 (oxime ether)，脞， $-\text{NHC(NH)NH}_2$ ，氧酰氨基，氧磺酰氨基，氨酰氧基，三卤代甲基，三烷基硅烷基，五氟乙基，三氟甲氧基，二氟甲氧基，三氟甲硫基，三氟乙烯基，一 - 和

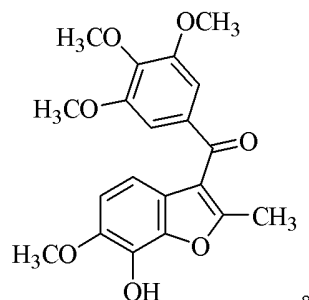
二-烷基氨基,一-和二-(取代烷基)氨基,一-和二-芳氨基,一-和二-杂芳氨基,一-和二-杂环氨基,以及具有选自烷基、芳基、杂芳基和杂环基的不同取代基的不对称二-取代胺等。

[0180] 可选取代的氨基也可以包括氨基酸和肽残基。

[0181] 式 I、Ia、Ib 或 II 的 TPI 化合物可以通过已知的方法制备,包括在 WO 02/060872 和 WO 07/087684 中披露的那些方法,将它们通过引用结合于本文中。

[0182] 在一个进一步的实施方式中,本发明的联合疗法中使用的 TPI 是下式 (III) 的化合物或其盐、溶剂化物或前药:

[0183]



[0184] 式 (III) 的化合物 (2-甲基-7-羟基-3-(3,4,5-三甲氧基苯甲酰基)-6-甲氧基苯并呋喃) 可以通过在 PCT/AU2007/000101 (WO 07/087684) 中描述的合成方法制备。

[0185] 已经观察到式 I、Ia、Ib、II 或 III 的化合物是有效的微管蛋白聚合抑制剂 (TPI)。式 I、Ia、Ib、II 或 III 的化合物的一个重要方面是特定 C-6 连同 C-7 取代基连同 C-2Q-基团 (尤其是 C-2 甲基) 的组合,当相比于其他结构相关的 TPI 化合物时,这似乎赋予更大的效力和选择性。在这些化合物中,当用 VDA 进攻时,选择性不是简单地依赖于肿瘤血管系统朝向瓦解的趋向,而且依赖于 VDA 在肿瘤内皮细胞和正常内皮细胞之间进行区分的能力。在健康组织中存在的正常内皮细胞处于“静止 (quiescent)”状态,而肿瘤内皮细胞处于“活化 (activated)”状态。大多数 VDA 在这两种状态之间不进行区分,例如考布他汀 A4 (CA4) 对于静止和活化的内皮细胞是等效的。然而,式 I、Ia、Ib、II 并且尤其是 III 的化合物相对于正常内皮细胞 (静止的) 对肿瘤内皮细胞 (活化的) 表现出选择性。

[0186] 应理解,本发明的 TPI 和式 I、Ia、Ib、II 或 III 的化合物可以作为它们的药用盐给予主体。合适的药用盐包括但不限于药学上可接受的无机酸如盐酸、硫酸、磷酸、硝酸、碳酸、硼酸、氨基磺酸 (sulfamic acid) 和氢溴酸的盐,或药学上可接受的有机酸如乙酸、丙酸、丁酸、酒石酸、马来酸、羟基马来酸、富马酸、马来酸、柠檬酸、乳酸、粘酸、葡萄糖酸、苯甲酸、琥珀酸、草酸、苯基乙酸、甲磺酸、甲苯磺酸、苯磺酸、水杨酸、氨基苯磺酸、天冬氨酸、谷氨酸、依他酸、硬脂酸、棕榈酸、油酸、月桂酸、泛酸、单宁酸、抗坏血酸和戊酸的盐。

[0187] 碱盐包括但不限于与药学上可接受的阳离子如钠、钾、锂、钙、镁、铵和烷基铵形成的盐。尤其是,本发明在其范围内包括阳离子盐例如磷酸根的钠或钾盐、或烷基酯 (例如甲基,乙基)。

[0188] 还应理解,作为本发明的 TPI 或式 I、Ia、Ib、II 或 III 的化合物的前药的任何化合物也属于本发明的范围和精神。术语“前药”以其最宽泛含义使用并且涵盖体内转化为本发明的化合物 (例如式 I、Ia、Ib、II 或 III 的化合物) 的那些衍生物。这样的衍生物对于本领域技术人员容易发生,并且包括例如,其中游离羟基 (例如在 C-7 位置或 R^{1D} 处) 转

化成酯如乙酸酯或磷酸酯的化合物,或其中游离氨基(例如在 C-7 位置或 R^{1D} 处)转化成酰胺(例如 α -氨基酸酰胺)的化合物。用于酯化例如乙酰化这些化合物的程序步骤在本领域是熟知的并且可以包括在合适催化剂或碱存在下用适当羧酸、酸酐或氯化物处理该化合物。特别优选的前药是磷酸二钠酯。本发明的化合物的磷酸二钠酯(尤其是式 III 的化合物的 C-7 磷酸二钠酯)可以用于增大这些化合物的溶解性。这例如将可以允许该化合物在良性赋形剂如盐水中递送。该磷酸二钠酯可以依据在 Pettit, G. R., et al, *Anticancer Drug Des.*, 1995, 10, 299 中描述的方法进行制备。总体上描述前药(及其制备)的其他文章包括: *Design of Prodrugs*, 1985, H. Bundgaard (Elsevier); *The Practice of Medicinal Chemistry*, 1996, Camille G. Wermuth et al., Chapter 31 (Academic Press); 以及 *A Textbook of Drug Design and Development*, 1991, Bundgaard et al., Chapter 5, (Harwood Academic Publishers)。

[0189] 式 I、Ia、Ib、II 和 III (或其盐或前药) 可以是作为游离化合物或作为溶剂化物(例如水化物)的结晶形式,并且预计这两种形式都在本发明的范围内。溶剂化的方法在本领域中通常是已知的。

[0190] 组合伴侣 (b): mTOR 抑制剂

[0191] mTOR 是一种细胞内丝氨酸/苏氨酸激酶,主要涉及翻译起始的控制。PI3K/Akt- 依赖性磷酸化通过薯蓣蛋白 (tuberin) (TSC1/TSC2 复合物的蛋白产物) 信号转导,导致 mTOR 活化。mTOR 随后磷酸化下游靶标,引起蛋白翻译的起始。

[0192] 因此,抑制 mTOR 的活化(引起其下游靶标的下调)的任何试剂被本文中所使用的“mTOR 抑制剂”的含义所涵盖。

[0193] 合适 mTOR 抑制剂包括:

[0194] BEZ235 (NVP-BEZ235), 地磷莫司 (deforolimus) (AP 23573, MK-8669), PI-103, 雷帕霉素 (rapamycin) (西罗莫司 (Sirolimus), 雷帕鸣 (Rapamune)), 替西罗莫司 (temsirolimus) (Torisel, CCI-779), 依维莫司 (everolimus) (Afinitor, RAD001, Certican), ABT 578, SAR 543 和 AP 23841。

[0195] 任何 mTOR 组合伴侣的适合性经常取决于递送模式。相比于雷帕霉素,替西罗莫司和依维莫司(其都是雷帕霉素的类似物)已被开发具有优异的溶解性能,使得它们适用于静脉内给药(替西罗莫司)和口服给药(依维莫司)。

[0196] 增生性疾病

[0197] 如在本文中使用的,术语“增生性疾病”广泛地涵盖任何肿瘤病,包括潜在恶性(癌前)或恶性(癌性)的那些。因此该术语涵盖肿瘤的治疗。

[0198] 相应地,术语“肿瘤”通常用来定义任何恶性癌性的或癌前的细胞生长,并且可以包括白血病和恶性肿瘤如黑素瘤、结肠癌、肺癌、卵巢癌、皮肤癌、乳腺癌、胰腺癌、咽喉癌、脑癌、前列腺癌、CNS 癌和肾癌,以及其他癌症。

[0199] 在一个优选实施方式中,所述组合可以用于治疗肿瘤并且尤其是用于以下肿瘤: 乳腺癌、脑胶质母细胞瘤 (brain glioblastoma)、结直肠腺癌、肺癌、卵巢腺癌、胰腺癌、前列腺癌、肾细胞腺癌、以及咽喉鳞状细胞癌。

[0200] 在一个优选的方面,本发明提供一种 (a) 和 (b) 的组合,用于治疗肾癌,并且尤其用于治疗转移性肾细胞癌。

[0201] (a) 和 (b) 的组合

[0202] 不希望受限于任何特定理论,认为,伴侣 (a) 和 (b) 联合起作用以更好地实现癌细胞死亡。如图 1 中所示的,假定 TPI 在高度血管分布肿瘤中诱导缺氧 / 细胞毒性负荷,同时 mTOR 抑制伴随地抑制 HIF1a 驱动的血管形成 / 存活响应,从而产生有益的加合或协同效应。

[0203] 因此,本发明提供一种治疗肿瘤的方法,包括联合有效量的 (b) mTOR 抑制剂给予有效量的 (a) 微管蛋白靶向剂 (tubulin targeting agent)。

[0204] 在实施方式中,以下组合是特别优选的:

[0205]

组合伴侣 (a)	+	组合伴侣 (b)	=	治疗
式 III 的化合物 (或其前药)	+	替西罗莫司		肾癌
式 III 的化合物 (或其前药)	+	雷帕霉素		肾癌
式 III 的化合物 (或其前药)	+	依维莫司		肾癌
式 III 的化合物 (或其前药)	+	西罗莫司		肾癌
式 III 的化合物 (或其前药)	+	地磷莫司		肾癌
式 III 的化合物 (或其前药)	+	替西罗莫司		卵巢癌
式 III 的化合物 (或其前药)	+	雷帕霉素		卵巢癌
式 III 的化合物 (或其前药)	+	依维莫司		卵巢癌
式 III 的化合物 (或其前药)	+	西罗莫司		卵巢癌
式 III 的化合物 (或其前药)	+	地磷莫司		卵巢癌
式 III 的化合物 (或其前药)	+	替西罗莫司		肺癌
式 III 的化合物 (或其前药)	+	雷帕霉素		肺癌
式 III 的化合物 (或其前药)	+	依维莫司		肺癌
式 III 的化合物 (或其前药)	+	西罗莫司		肺癌
式 III 的化合物 (或其前药)	+	地磷莫司		肺癌

[0206] 在以上实施方式中,优选地,前药形式是式 III 的化合物的 C-7 磷酸二钠酯。

[0207] “有效量”用来表示,当给予需要这样的治疗的哺乳动物 (尤其是人) 时,各个组合伴侣足以实现对于具体增生性疾病的治疗的量。因此,例如,组合伴侣 (a) 的化合物 (或其药用盐、溶剂化物或前药) 的治疗有效量是足以协同增强或加强 mTOR 抑制剂的活性 (反之亦然) 以使靶向的疾病被减少或减轻的量。

[0208] 这可以包括至少部分地达到期望的效果,或延迟所治疗的具体疾病(例如肿瘤)的发作、或抑制其进展、或完全地拦截或反转其发作或进展。

[0209] 患有增生性疾病的患者的临床研究如开放标签(open-label)、剂量递增(dose escalation)研究可以包括提高组合的活性成分的协同效应的研究。有益和/或协同效应可以通过这些研究的结果直接确定,这同样是本领域技术人员已知的。这些研究也能够比较利用该活性成分的单一疗法与本发明的组合的效果。优选地,组合伴侣(a)的剂量可以逐步升高直至达到最大耐受量(MTD),而试剂(b)作为固定剂量给予。可替换地,组合伴侣(a)以固定剂量给予而试剂(b)的剂量逐步升高。每个患者可以每天或间歇地接受试剂(a)的剂量。治疗的效力可以每9周通过评价症状评分例如在6、12、18或24周之后在这样的研究中确定。

[0210] 本发明的药物组合的给予可以不仅导致有益效果,例如加合或协同治疗效应,例如对于症状的减轻、延迟进展或抑制,而且导致进一步的令人惊讶的有益效果。这样的其他效果可以包括,相比于仅施用在本发明的组合中使用的药学活性成分之一的单一疗法,较少的副作用、改善的生活质量或降低的发病率。

[0211] 本发明的一个进一步的益处在于,能够使用所述组合的活性成分的更低剂量。剂量不仅需要更小而且也可以更低频率施用,这可以减少副作用的发生率或严重性。

[0212] 术语“给予(给药)”涉及将组合伴侣共给予(co-administration)单个患者,并且计划包括治疗方案,其中这些试剂不必需通过相同给药途径或同时进行给予。相应地,组合伴侣(a)和(b)可以在一个组合的单位剂型或在两个单独的单位剂型中一起、依次或单独地进行给予。单位剂型也可以是固定的组合如药物组合物,其包含伴侣(a)(或其盐、溶剂化物或前药)和伴侣(b)二者。

[0213] 尤其是,本发明的组合的组合伴侣中的每一个的治疗有效量可以同时或依次以及以任何顺序进行给予,并且这些成分可以单独地或作为固定组合进行给予。例如,根据本发明的预防或治疗增生性疾病的方法可以包括:(i)给予游离形式或药用盐形式的伴侣(a);以及(ii)同时或以任何顺序依次地给予游离形式或药用盐形式的伴侣(b),其中以联合治疗有效量,优选以协同有效量,例如以对应于本文中所描述的量的每天或间歇剂量。本发明的组合的单个组合伴侣,可以以分开或单个组合形式,在治疗过程期间的不同时间点单独地或同时地进行给予。此外,术语给予还涵盖使用在体内同样转化成所述组合伴侣的组合伴侣的前药。因此,本发明应理解为包括所有这样的同时或交替治疗方案,并且术语“给予”应被相应地进行解释。

[0214] 同样,应当理解,组合伴侣可以作为用于治疗增生性疾病(例如肿瘤治疗)中的“多部分的试剂盒(kit of parts)”提供。该试剂盒可以包括其中组合伴侣单独地提供用于共给予的包装与具体治疗使用的说明书。

[0215] 在本发明的组合中采用的组合伴侣的每一个的有效剂量可以根据所采用的具体化合物或药物组合物、给予模式、待治疗的病症、待治疗的病症的严重度而变化。因此,本发明的组合的剂量方案依据各种各样的因素进行选择,包括给予途径以及患者的肾和肝功能。普通技能的医生能够容易地确定和开处方对于减轻、对抗或停止该病症进展所需的单个活性成分的有效量。

[0216] 当然,组合伴侣(a)和(b)的日剂量将依据各种各样的因素而变化,例如所选的化

合物、待治疗的具体病症以及期望的效果。然而，一般地，作为单个剂量或分开的剂量，在以约 0.05 至 20mg/kg/天，特别是 1 至 20mg/kg/天，例如 0.4 至 16mg/kg/天的日剂量率给予试剂 (a) 后获得满意的结果。组合伴侣 (a) 和伴侣 (b) 可以通过任何常规途径，尤其是肠内地，例如口服地，例如以片剂、胶囊、口服液，或非肠道地，例如以注射液或悬液形式进行给予。合适的用于口服给予的单位剂型包括例如约 0.02 至 50mg 活性成分，通常 0.1 至 30mg 以及 2 至 25mg、4 至 20mg 的组合伴侣 (a) 或 (b)，连同用于其的一种或多种药用稀释剂或载体。

[0217] 组合伴侣 (b) 可以以 0.5 至 1000mg 的日剂量范围给予人。用于口服给予的合适单位剂型包括约 0.1 至 500mg 活性成分，优选 5-50mg/天，更优选 5-20mg/天，并且更优选约 7-12mg/天，连同用于其的一种或多种药用稀释剂或载体。用于递送已知的 mTOR 抑制剂的方法和给予方案对于医师是已知的。

[0218] 例如，给予方案可以包括在 mTOR 抑制剂作为口服日剂量（例如约 100mg/天）给予的情况下，在（21 天周期的）第 1 天和第 8 天通过静脉内（I.V.）以指定剂量水平添加 TPI（例如式 III 的化合物）。在这个实施方式中，式 (III) 的化合物可以以 4 至 16mg/m² 的水平给药。

[0219] 本发明的药物组合的给予不仅导致有益效果，例如加合或协同治疗效应，例如对于抑制肿瘤的生长，而且导致进一步令人惊讶的有益效果，例如更少的副作用、改善的生活质量或降低的发病率（相比于仅施用在本发明的组合中使用的药学活性成分中的一种的单一疗法）。

[0220] 一个进一步的益处在于，可以使用低剂量的本发明的组合的活性成分，例如，剂量不仅经常需要更小而且也以更频率施用，或者可以使用以便消除副作用发生率。这依据待治疗患者的期望和要求。

[0221] 伴侣 (a) 和 (b) 的组合可以独立地或一起地与一种或多种药用载体和可选地一种或多种其他常规药学佐剂进行组合，并肠内地，例如口服地以片剂、胶囊、囊片等形式给予，或者非肠道地，例如腹膜内或静脉内地以无菌注射液或悬液形式给予。肠内和非肠道组合物可以通过常规方式制备。

[0222] 根据本发明，用于组合伴侣 (a) 和伴侣 (b) 的分开给予或用于以固定组合（即组合物）给予的药物组合物可以以本领域已知的方式制备，并且是适于肠内，如口服或直肠以及非肠道给予哺乳动物（温血动物），尤其是人的那些，包括单独的（例如如上所指出的）或联合一种或多种药用载体或稀释剂，尤其是适于肠内或非肠道施用的治疗有效量的至少一种药理学活性组合伴侣。

[0223] 合适药物组合物包含，例如约 0.1% 至约 99.9%，优选约 1% 至约 60% 的活性成分。

[0224] 组合物可以包含任何合适载体、稀释剂或赋形剂。这些包括所有常规的溶剂、分散介质、填料、固体载体、包衣、抗真菌剂和抗菌剂、透皮剂、表面活性剂、等渗剂和吸附剂等。应当了解，本发明的组合物也可以包括其他补充性生理活性试剂。

[0225] 载体必须与组合物的其他成分相容且对于主体不是有害的意义上是药学上“可接受的”。组合物包括适于口服、直肠、鼻道、局部（包括含服和舌下）、阴道或非肠道（包括皮下、肌内、静脉内和皮内）给予的那些。组合物可以方便地以单位剂型提供并且可以通过

制药领域熟知的任何方法制备。这样的方法包括使活性成分与载体（其构成一种或多种助剂）联合的步骤。一般地，组合物通过均匀地并且紧密地使活性成分与液体载体或细分的固体载体或这二者联合，然后如果需要使该产物成型，而制备。

[0226] 适用于口服给予的本发明的组合物可以作为离散单位如胶囊、香囊或片剂（各自包含预定量的活性成分）、作为粉末或颗粒、作为在水性或非水性液体中的溶液或悬液、或作为水包油液体乳液或油包水液体乳液提供。活性成分也可以作为大药丸、药糖剂（electuary）或糊剂提供。

[0227] 片剂可以通过压制或模制（可选地与一种或多种助剂）来制备。压制的片剂可以通过在合适机器中将活性成分压制成自由流动形式如粉末或颗粒进行制备，可选地混合粘结剂（例如，惰性稀释剂）、防腐崩解剂（例如羟基乙酸淀粉钠，交联聚乙烷基吡咯烷酮，交联羧甲基纤维素钠）表面活性剂或分散剂。模制的片剂可以通过在合适机器中模制用惰性液体稀释剂增湿的粉状化合物的混合物而制备。片剂可以可选地被涂覆或划纹（scored），并且可以利用例如各种比例的羟丙基甲基纤维素（以提供期望的释放分布）进行配制，以提供其内的活性成分的缓慢或受控释放。片剂可以可选地提供有肠溶衣，以提供在不同于胃的内脏部位中的释放。

[0228] 适用于在嘴中局部给予的组合物包括包含在增味基质（通常为蔗糖和阿拉伯树胶或黄蓍胶）中的活性剂的锭剂；包含在惰性基质如明胶和甘油、或蔗糖和阿拉伯树胶中的活性成分的软锭剂；以及包含在合适液体载体中的活性成分的漱口水。

[0229] 适用于局部给予至皮肤的组合物可以包含溶解或悬浮在任何合适载体或基质中的化合物并且可以为洗剂、凝胶、霜剂、糊剂、软膏等形式。合适载体包括矿物油、丙二醇、聚氧乙烯、聚氧丙烯、乳化蜡、山梨醇酐单硬脂酸酯 60、鲸蜡酯蜡、鲸蜡硬脂醇、2-辛基十二烷醇、苯甲醇和水。皮肤贴也可以用来给予本发明的化合物。

[0230] 用于直肠给予的组合物可以作为栓剂提供，具有合适基质，包括例如可可油、甘油、明胶或聚乙二醇。

[0231] 适用于阴道给予的组合物可以作为阴道栓剂、棉球、霜剂、凝胶、糊剂、泡沫剂或喷雾制剂（除了活性成分外，还包含如本领域已知为合适的那些载体）提供。

[0232] 适用于非肠道给予的组合物包括水性和非水等渗无菌注射液，其可以包含抗氧化剂、缓冲剂、杀菌剂和溶质（其使该组合物与预计受体的血液等渗）；以及水性和非水无菌悬液，其可以包括悬浮剂和增稠剂。组合物可以提供在单位剂量或多剂量密封容器例如安剖瓶和小瓶中，并且可以储存在冷冻干燥（冻干）条件下，仅要求在即将使用之前添加无菌液体载体例如水以进行注射。即时注射液和悬液可以由之前描述的各种无菌粉末、颗粒和片剂制备。

[0233] 优选的单位剂量组合物是包含活性成分的日剂量或单位、日子剂量（如本文中上述的）、或其合适部分的那些。

[0234] 应当理解，除了以上特别提及的活性成分外，本发明的组合物可以包括对于所讨论的组合物类型的本领域中常规的其他试剂，例如适用于口服给予的那些可以包括这样的进一步试剂，如粘结剂、增甜剂、增稠剂、增味剂、崩解剂、涂覆剂、防腐剂、润滑剂和 / 或延时剂。合适增甜剂包括蔗糖、乳糖、葡萄糖、阿斯巴特（aspartame）或糖精。合适崩解剂包括玉米淀粉、甲基纤维素、聚乙烷基吡咯烷酮、黄原胶（xanthan gum）、膨润土（bentonite）、

褐藻酸或琼脂。合适增味剂包括薄荷油 (peppermint oil)、冬青 (wintergreen) 的油、草莓、桔子或木莓 (raspberry) 增味剂。合适涂覆剂包括丙烯酸和 / 或甲基丙烯酸和 / 或它们的酯的聚合物或共聚物、石蜡、脂肪醇、玉米朊 (zein)、虫胶 (shellac) 或谷朊 (gluten)。合适防腐剂包括苯甲酸钠、维生素 E、 α -生育酚、抗坏血酸、羟苯甲酸甲酯、羟苯甲酸丙酯或亚硫酸氢钠。合适润滑剂包括硬脂酸镁、硬脂酸、油酸钠、氯化钠或滑石。合适延时剂包括单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。

[0235] 本领域技术人员将理解,本文中描述的发明可以进行不同于具体描述的那些的变形和改变。应当理解,本发明包括落入所述精神和范围内的所有这样的变形和改变。本发明还包括单个地或集中地在本说明书中提及或指出的所有步骤、特征、组合物或化合物,以及所述步骤或特征中的任何两个或更多个的任意和所有组合。

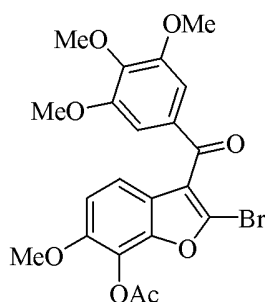
[0236] 现在将参考以下实例来描述本发明的某些实施方式,这些实例仅用于举例说明的目的而并不用于限制上文描述的一般性的范围。

[0237] 实例

[0238] 合成方案

[0239] 2- 溴 -7- 乙酰氧基 -3-(3,4,5- 三甲氧基苯甲酰基)-6- 甲氧基苯并呋喃的制备。

[0240]



[0241] 步骤 1: 2-叔丁基二甲基硅烷基-3-(叔丁基二甲基硅烷基氧亚甲基)-6-甲氧基-7-异丙氧基苯并呋喃 (Larock 偶联)。

[0242] 在 100℃ 下,将 2-异丙氧基-3-甲氧基-5-碘苯酚 (4.41mmol)、1-(叔丁基二甲基硅烷基)-3-(叔丁基二甲基硅烷基氧)丙炔 (1.5g, 5.28mmol)、氯化锂 (189mg, 4.45mmol) 和碳酸钠 (2.34g, 22.08mmol) 在干燥二甲基甲酰胺 (5mL) 中的悬液通过抽真空,然后回填氮气而除去氧。加入醋酸钯 (135mg, 0.60mmol) 并用氮气使反应器脱气两次。然后将反应混合物在这个温度下搅拌 4 小时 (tlc (薄层色谱)) 并通过在真空蒸馏而除去溶剂。将残留物溶解在乙酸乙酯 (75mL) 中,良好搅拌,过滤并用三乙胺 (5mL) 处理。在硅胶 (10g) 上浓缩该溶液并通过快速层析 (硅胶,洗脱剂=己烷/二乙醚/三乙胺;95:5:1%) 纯化而获得黄色油状物的标题化合物 (1.45g, 96%) ; ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 7.24 (d, 1H, J = 8.45Hz), 6.88 (d, 1H, J = 8.47Hz), 4.80 (s, 2H, CH_2), 4.73 (m, 1H), 3.88 (s, 3H, OMe), 1.36 (d, 6H, J = 6.17Hz), 0.94 (s, 9H), 0.92 (s, 9H), 0.35 (s, 6H), 0.12 (s, 6H)。

[0243] 步骤 2: 2-叔丁基二甲基硅烷基-3-甲酰基-6-甲氧基-7-异丙氧基苯并呋喃

[0244] 向 2-叔丁基二甲基硅烷基-3-(叔丁基二甲基硅烷基氧亚甲基)-6-甲氧基-7-异丙氧基苯并呋喃 (2.69mmol) 在甲醇 (100mL) 中的溶液中加入浓盐酸 (200 μL) 并搅拌反应 30 分钟 (通过 TLC 监控),用三乙胺 (2mL) 淬灭并且溶剂通过在真空下蒸馏而除去。将残留物溶解在二氯甲烷 (20mL) 中,用水 (10mL) 洗涤,在硫酸镁上干燥,在真空下浓缩并用甲

苯 (20mL) 共蒸馏。将粗产物溶解在干燥二氯甲烷 (4mL) 中并加入到科林试剂 (Collin' s reagent) (三氧化铬 (1.01g), 吡啶 (1.65mL), 在干燥二氯甲烷 (30mL) 中) 的搅拌溶液中。搅拌该悬液 10 分钟, 过滤并用二乙醚 (20mL) 洗涤残留物。滤液在二氧化硅 (10g) 上浓缩并通过快速层析 (硅胶, 洗脱剂 = 己烷 / 二乙醚 / 三乙胺 (90 : 9 : 1)) 纯化而获得浅黄色油状物的标题化合物 (503mg, 48%) ; ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 10.25 (s, 1H, CHO), 7.79 (d, 1H, $J = 8.45\text{Hz}$), 6.98 (d, 1H, $J = 8.46\text{Hz}$), 4.65 (m, 1H), 3.89 (s, 3H, OMe), 1.35 (d, 6H, $J = 6.17\text{Hz}$), 0.97 (s, 9H), 0.45 (s, 6H)。

[0245] 步骤 3: 2-叔丁基二甲基硅烷基-3-(3,4,5-三甲氧基苯甲酰基)-6-甲氧基-7-异丙氧基苯并呋喃

[0246] 在氮气下, 在 -78°C 向 3,4,5-三甲氧基碘苯 (377mg, 1.27mmol) 在干燥四氢呋喃 (1mL) 中的搅拌溶液中加入正丁基锂 (795 μL , 1.59mmol, 在环己烷中的 2M 溶液), 并将反应混合物在该温度下搅拌 40 分钟。在这个时间之后, 经由注射器吸液管逐滴地向反应中加入 2-叔丁基二甲基硅烷基-3-甲酰基-6-甲氧基-7-异丙氧基苯并呋喃 (1.07mmol) 在干燥四氢呋喃 (1mL) 中的溶液。反应混合物在 -60°C 下搅拌 20 分钟, 然后允许升温至 0°C , 搅拌 10 分钟, 用饱和氯化铵溶液 (2mL) 淬灭并用乙酸乙酯 (20mL) 稀释。有机层用水 (10mL) 洗涤, 在硫酸镁上干燥并在真空下除去溶剂而获得与甲苯共蒸馏的残留物。粗产物 (908mg) 溶解在干燥四氢呋喃 (10mL) 中并加入 2,3-二氯-5,6-二氧基-1,4-苯醌 (900mg, 1.59mmol) 进行处理。反应混合物在室温下搅拌 16 小时 (通过 tlc 监控), 然后加载到二氧化硅 (10g) 上并通过快速层析 (硅胶, 洗脱剂 = 己烷 / 二乙醚 / 三乙胺, 90 : 9 : 1) 纯化而获得浅黄色油状物的标题化合物 (498mg, 69%) ; ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 7.14 (s, 2H, 苯甲酰基 Hs), 6.81 (d, 1H, $J = 8.64\text{Hz}$), 6.77 (d, 1H, $J = 8.64\text{Hz}$), 4.74 (m, 1H), 3.93 (s, 3H, OMe), 3.86 (s, 3H, OMe), 3.78 (s, 6H, 2x OMe), 1.39 (d, 6H, $J = 6.14\text{Hz}$), 1.01 (s, 9H), 0.26 (s, 6H)。

[0247] 步骤 4: 2-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)-7-乙酰氧基-3-(3,4,5-三甲氧基苯甲酰基)-6-甲氧基苯并呋喃

[0248] 在氮气下, 在室温下, 向 2-(叔丁基二甲基硅烷基氧基)-7-异丙氧基-3-(3,4,5-三甲氧基苯甲酰基)-6-甲氧基-苯并呋喃 (160mg, 0.31mmol) 在干燥 DCM (2mL) 中的溶液中加入固体三氯化铝 (83mg, 0.62mmol) 并将反应混合物搅拌 15 分钟 (通过 tlc 监控)。反应用氯化铵的饱和溶液淬灭, 用二氯甲烷萃取并在硫酸镁上干燥。通过蒸馏除去溶剂并且通过水与甲苯的共沸除去而干燥残留物。粗产物溶解在吡啶 (2mL) 中, 加入乙酸酐 (1mL) 并在室温下搅拌反应混合物 2 小时。溶剂在真空下蒸馏并将残留物加载到硅胶 (1g) 上并通过柱层析 (硅胶, 洗脱剂, 己烷 : 二乙醚 ; 80 : 20) 纯化 (134mg, 84%) ; ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 7.14 (s, 2H, 苯甲酰基 Hs), 6.98 (d, 1H, $J = 8.72\text{Hz}$), 6.85 (d, 1H, $J = 8.72\text{Hz}$), 3.93 (s, 3H, OMe), 3.86 (s, 3H, OMe), 3.80 (s, 6H, 2x OMe), 2.41 (s, 3H), 0.99 (s, 9H), 0.25 (s, 6H)。

[0249] 步骤 5: 2-溴-7-乙酰氧基-3-(3,4,5-三甲氧基苯甲酰基)-6-甲氧基苯并呋喃

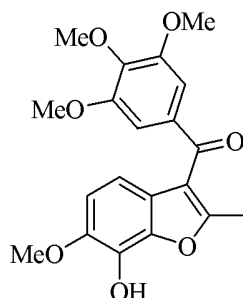
[0250] 在氮气下, 在室温下, 向 2-叔丁基二甲基硅烷基-7-乙酰氧基-3-(3,4,5-三甲氧基苯甲酰基)-6-甲氧基苯并呋喃 (120mg, 0.44mmol) 在 1,2-二氯乙烷 (1mL) 中的溶液中逐滴加入溴 (12 μL , 0.44mmol) 并将反应混合物在这个温度下搅拌 10 分钟。在这个时间之后, 用饱和硫代硫酸钠溶液淬灭反应, 用乙酸乙酯 (20mL) 萃取, 在硫酸镁上干燥, 并通过在

真空下蒸馏而除去溶剂。粗产物通过硅胶柱层析(洗脱剂=己烷:二乙醚;8:2-7:3)纯化而获得无色结晶固体的标题化合物(91mg,81%);¹H NMR(300MHz, CDCl₃) δ 7.40(d, 1H, J = 8.70Hz), 7.14(s, 2H, 苯甲酰基-Hs), 6.98(d, 1H, J = 8.75Hz), 3.94(s, 3H, OMe), 3.89(s, 3H, OMe), 3.86(s, 6H, 2x OMe), 2.43(s, 3H); ¹³C NMR(75MHz, CDCl₃) δ 187.95(CO), 167.71, 152.75, 149.54, 147.49, 142.59, 131.92, 131.80, 123.91, 121.84, 119.89, 117.72, 109.89, 106.92, 60.69, 56.61, 56.00, 20.09。

[0251] 实例 1

[0252] 2-甲基-7-羟基-3-(3,4,5-三甲氧基苯甲酰基)-6-甲氧基苯并呋喃的制备

[0253]



[0254] 制备 A

[0255] 在 90℃ 下,向 2-溴-7-乙酰氧基-3-(3,4,5-三甲氧基苯甲酰基)-6-甲氧基苯并呋喃(20mg,0.042mmol)、甲基-硼酸(40mg,0.67mmol)在 1,4-二噁烷(2mL)中的搅拌溶液中加入四-三苯基磷钯(11mg,0.01mmol),随后加入在蒸馏水(0.5mL)中的碳酸氢钠溶液。反应混合物在 5 分钟之后变红。在 2 小时(tlc)之后,使反应混合物达到室温并加入饱和氯化铵(2mL)并用二氯甲烷(20mL)稀释。分离有机层并用水洗涤,在硫酸镁上干燥并通过在真空下蒸馏除去溶剂。残留物通过 PTLC(洗脱剂=二氯甲烷/甲醇,1:1)纯化而获得绒毛状白色固体(fluffy white solid)的标题化合物(反应期间分解的乙酸酯);(3mg,19%)。

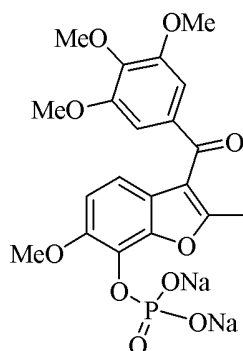
[0256] 制备 B(Negishi 偶联)

[0257] 在 0℃ 下,向在干燥 THF(1.5mL)中的溴化锌(592mg,2.63mmol)的搅拌溶液中加入甲基锂(在二乙醚中的 1.6M 溶液,2.6mL,4.15mmol)的溶液,并将反应混合物搅拌 2 小时。加入固体 2-溴-7-乙酰氧基-3-(3,4,5-三甲氧基苯甲酰基)-6-甲氧基-苯并呋喃(300mg,0.63mmol)并在真空下除去醚,并向剩余悬液中加入二氯二(三苯基磷)钯催化剂(21mg)和催化量的碘化铜(I)。反应混合物在室温下搅拌 36 小时(通过 TLC 监控),用饱和氯化铵溶液淬灭并用二氯甲烷(10mL)萃取,在硫酸镁上干燥并在真空下蒸馏溶剂,并且产物通过硅胶柱(洗脱剂=己烷/乙酸乙酯;8:2)纯化。产物在甲醇(106mg,46%)中结晶;¹H NMR(300MHz, CDCl₃) δ 7.09(s, 2H, 苯甲酰基 Hs), 6.93(d, 1H, J = 8.54Hz), 6.83(d, 1H, J = 8.56Hz), 5.70(bs, 1H, OH), 3.93(s, 3H, OMe), 3.92(s, 3H, OMe), 3.83(s, 6H, 2x OMe), 2.54(s, 3H, 2-Me)。

[0258] 实例 2

[0259] 6-甲氧基-2-甲基-3-(3,4,5-三甲氧基苯甲酰基)苯并呋喃-7-基磷酸二钠的制备

[0260]



[0261] 步骤1: 6-甲氧基-2-甲基-3-(3,4,5-三甲氧基苯甲酰基)苯并呋喃-7-基磷酸二苄基酯:

[0262] 在氮气氛围下,在0℃,向0.081g(0.22mmol)的(7-羟基-6-甲氧基-2-甲基苯并呋喃-3-基)(3,4,5-三甲氧基苯基)甲酮、0.086g(0.261mmol)的四溴化碳和0.063ml(0.283mmol)的亚磷酸二苄酯在2.5ml无水乙腈中的混合物中,逐滴加入0.046ml的无水三乙胺。所得混合物在室温下搅拌2h,然后用乙酸乙酯稀释至20ml,用盐水洗涤,在无水硫酸镁上干燥,过滤并在减压下蒸发至干。残留物通过快速柱层析(二氯甲烷/乙酸乙酯,9:1)纯化而获得无色泡沫状的标题化合物(0.13g,94%);¹H NMR(CDCl₃) δ 2.42(s,3H, Me-2);3.83(s,1H, OMe);3.93(s,3H, OMe);5.33(m,4H, CH₂Ph);6.89(d, CH 芳香, J = 8.7Hz);7.21(dd,1H, CH 芳香, J = 8.72Hz; J = 1.2Hz);7.08(s,2H, CH 芳香);7.29-7.43(m,10H, CH 芳香)。

[0263] 步骤2: 6-甲氧基-2-甲基-3-(3,4,5-三甲氧基苯甲酰基)苯并呋喃-7-基磷酸二钠:

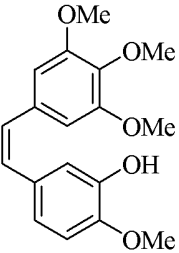
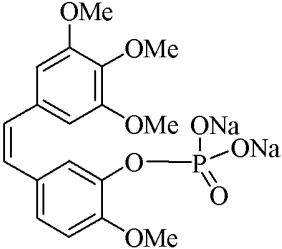
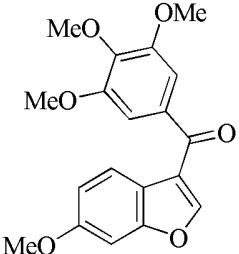
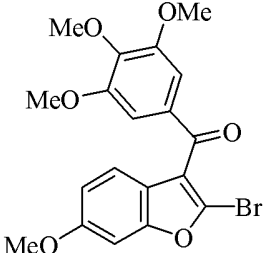
[0264] 在氮气氛围下,在-5℃,向0.122g(0.193mmol)来自步骤1的产物在1ml无水乙腈中的搅拌溶液中加入0.075ml(0.58mmol)的溴三甲基硅烷。所得混合物在0℃下搅拌1h,然后真空下蒸发至干。残留物用无水甲醇稀释至5ml并通过加入甲醇钠使该溶液的pH达到约10。在减压下蒸发所得混合物之后,固体残留物用无水异丙醇(4x 1.5ml)和无水乙醇(3x 1.5ml)洗涤,并在真空下干燥而获得0.062g(65%收率)的无色固体的标题化合物;¹H NMR(D₂O) δ 2.37(s,3H, Me-2);3.76(s,6H, OMe);3.79(s,3H, OMe);3.82(s,3H, OMe);4.66(s, H₂O);6.93(d,1H, CH 芳香, J = 8.6Hz);7.04(d,1H, CH 芳香, J = 8.6Hz);7.10(s,2H, CH 芳香)。

[0265] 生物学数据

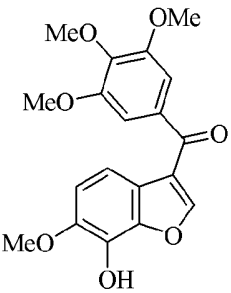
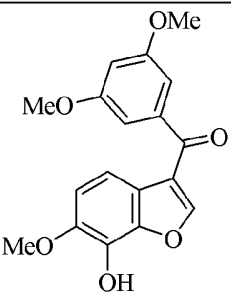
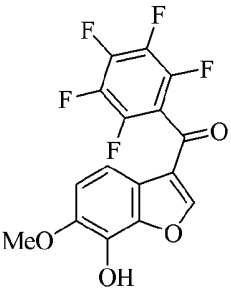
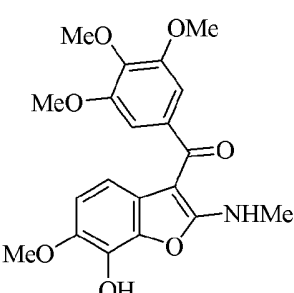
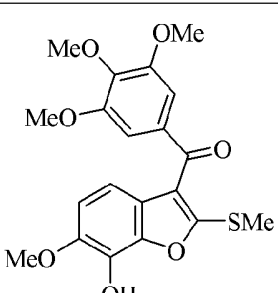
[0266] (A) (i) 对于组合伴侣(a)的体外研究

[0267] 表1:对于化合物的体外数据:这些是利用磺基罗丹明B(Sulforhodamine B)(SRB)或Systmex细胞计数(CC)测定对化合物的生长抑制研究的结果。IC₅₀是抑制50%的净细胞生长所需的浓度。

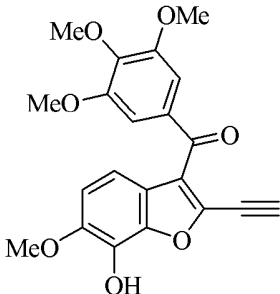
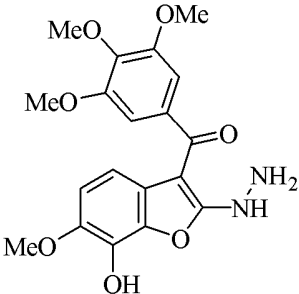
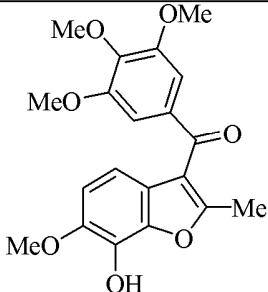
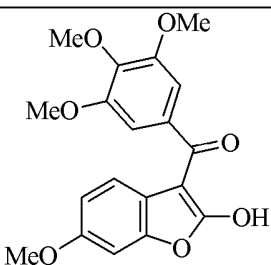
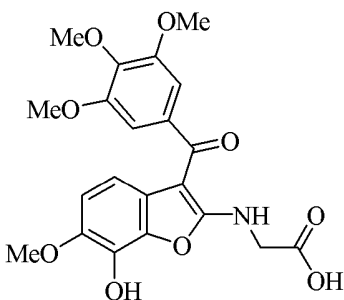
[0268]

实例	结构	癌细胞系 ^a : IC ₅₀ , nM	HUVECs ^c Tum: IC ₅₀ , nM Norm: IC ₅₀ , nM
3		5	Tum: 1-10 Norm: 1-10
4		5	Tum: 1-10 Norm: 1-10
5		55	Tum: 10-100 Norm: 10-100
6		500	Tum: 100-1000 Norm: 100-1000

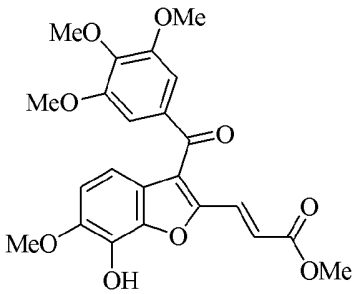
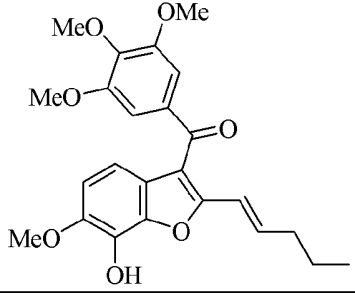
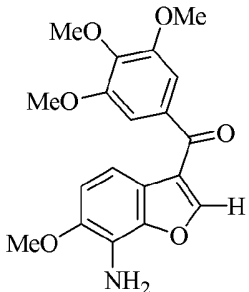
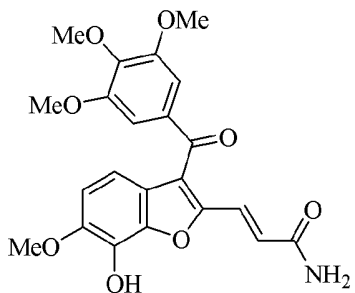
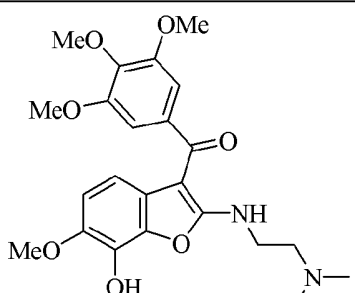
[0269]

实例	结构	癌细胞系 ^a : IC ₅₀ , nM	HUVECs ^c Tum: IC ₅₀ , nM Norm: IC ₅₀ , nM
7		45	Tum: 10-100 Norm: 10-100
8		35	Tum: 100-1000 Norm: 100-1000
9		800	Tum: >1000 Norm: >1000
10		3.5	Tum: 1-10 Norm: 0.1-1
11		1.2	Tum: 0.1-1 Norm: 1-10

[0270]

实例	结构	癌细胞系 ^a : IC ₅₀ , nM	HUVECs ^c Tum: IC ₅₀ , nM Norm: IC ₅₀ , nM
12		3.3	Tum: 1-10 Norm: 1-10
13		35	Tum: 1-10 Norm: 10-100
14		2.0	Tum: 0.1-1 Norm: 10-100
15		575	Tum: 100-1000 Norm: 100-1000
16		260	Tum: 100-1000 Norm: 100-1000

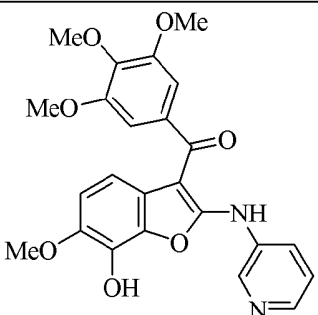
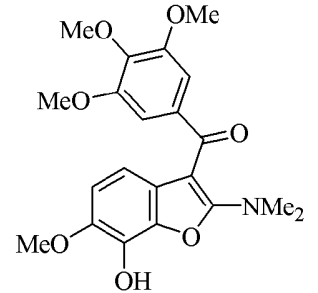
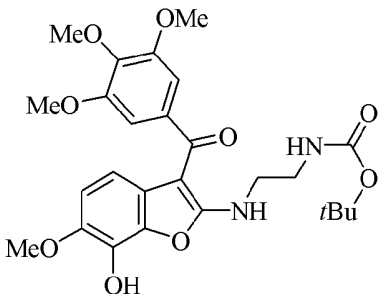
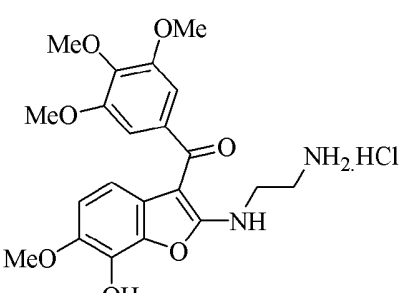
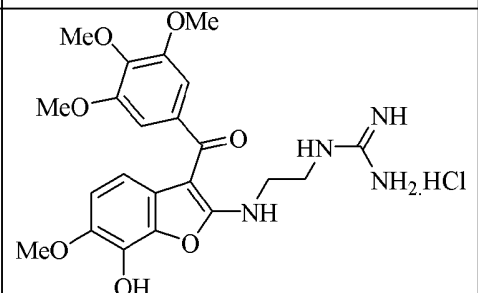
[0271]

实例	结构	癌细胞系 ^a : IC ₅₀ , nM	HUVECs ^c Tum: IC ₅₀ , nM Norm: IC ₅₀ , nM
17		2.0	Tum: 0.1-1 Norm: 1-10
18		8.0	Tum: 1-10 Norm: 1-10
19		1-10 ^b	Tum: 1-10 Norm: 1-10
20		1-10 ^b	Tum: 1-10 Norm: 1-10
21		10-100 ^b	Tum: 10-100 Norm: 10-100

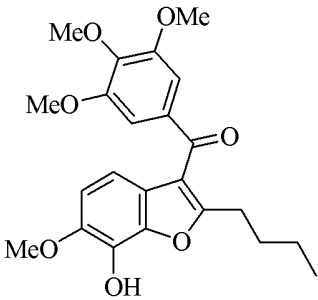
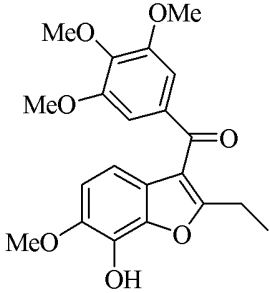
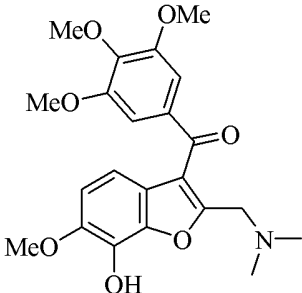
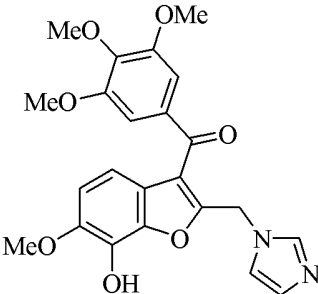
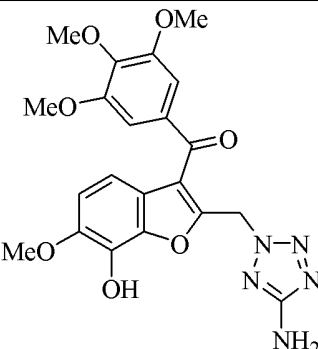
[0272]

实例	结构	癌细胞系 ^a : IC ₅₀ , nM	HUVECs ^c Tum: IC ₅₀ , nM Norm: IC ₅₀ , nM
22		1-10 ^b	Tum: 1-10 Norm: 1-10
23		0.1-1 ^b	Tum: 1-10 Norm: 1-10
24		1-10 ^b	Tum: 1-10 Norm: 1-10
25		0.1-1 ^b	Tum: 1-10 Norm: 1-10
26		1-10 ^b	Tum: 1-10 Norm: 1-10

[0273]

实例	结构	癌细胞系 ^a : IC ₅₀ , nM	HUVECs ^c Tum: IC ₅₀ , nM Norm: IC ₅₀ , nM
27		1-10 ^b	Tum: 1-10 Norm: 1-10
28		1-10 ^b	Tum: 1-10 Norm: 1-10
29			Tum: 1-10 Norm: 1-10
30			Tum: 100-1000 Norm: 100-1000
31			Tum: 100-1000 Norm: 10-100

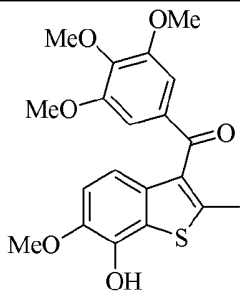
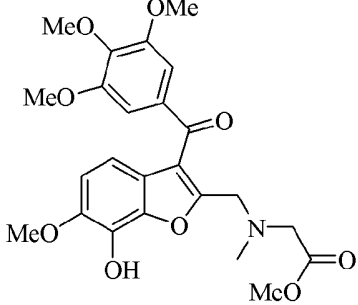
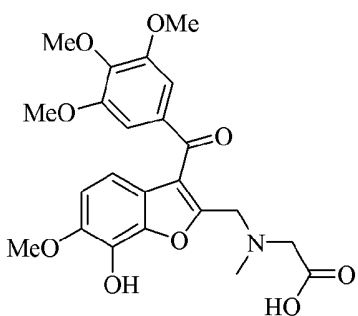
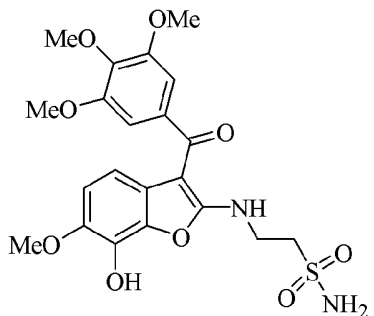
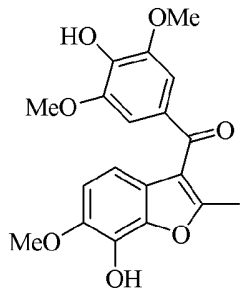
[0274]

实例	结构	癌细胞系 ^a : IC ₅₀ , nM	HUVECs ^c Tum: IC ₅₀ , nM Norm: IC ₅₀ , nM
32			Tum: 1-10 Norm: 1-10
33			Tum: 0.1-1.0 Norm: 0.1-1.0
34			Tum: 1-10 Norm: 1-10
35			Tum: 1-10 Norm: 1-10
36			Tum: 1-10 Norm: 1-10

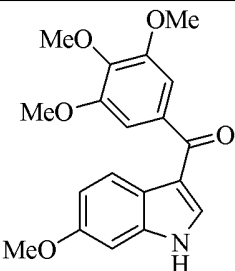
[0275]

实例	结构	癌细胞系 ^a : IC ₅₀ , nM	HUVECs ^c Tum: IC ₅₀ , nM Norm: IC ₅₀ , nM
37			Tum: 10-100 Norm: 10-100
38			Tum: 0.1-1 Norm: 0.1-1
39			Tum: 0.01-0.1 Norm: 0.1-1
40			Tum: 1-10 Norm: 10-100
41			Tum: 1-10 Norm: 1-10

[0276]

实例	结构	癌细胞系 ^a : IC ₅₀ , nM	HUVECs ^c Tum: IC ₅₀ , nM Norm: IC ₅₀ , nM
42			Tum: 0.1-1 Norm: 1-10
43			Tum: 1-10 Norm: 1-10
44			Tum: 10-100 Norm: 10-100
45			Tum: 1-10 Norm: 1-10
46			Tum: 10-100 Norm: 100-1000

[0277]

实例	结构	癌细胞系 ^a : IC ₅₀ , nM	HUVECs ^c Tum: IC ₅₀ , nM Norm: IC ₅₀ , nM
47			Tum: 1-10 Norm: 1-10

[0278] ^a 除非另有指明,癌细胞系是 MCF-7。

[0279] ^b 癌细胞系是 MDA-MB-231。

[0280] ^c 人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 肿瘤型活化的内皮细胞 (Tum) 和正常静止型内皮细胞 (Norm)。

[0281] 生物学实验的概述:

[0282] 微管蛋白聚合测定:微管蛋白聚合抑制测定利用基于荧光的检测试剂盒 (#BK011, Cytoskeleton(细胞骨架)) 根据生产商的说明书进行。试验化合物加入到含有 20% 甘油在 1x 缓冲液 1 中的 1mM GTP 的 2mg/ml 微管蛋白溶液中 (缓冲液 1:80mM 哌嗪-N, N'-二[2-乙磺酸]倍半钠盐;2mM 氯化镁;0.5mM 乙二醇-二(b-氨基-乙基醚)N,N,N', N'-四乙酸,pH 6.9,10uM 荧光报道分子 (fluorescent reporter))。以 1 分钟的间隔在 42 分钟期间测量荧光。增加的荧光表明微管蛋白聚合增加。相比于单体微管蛋白亚单位,荧光报道分子对于聚合的微管蛋白的亲合力增加十倍。该结果是在紧接微管蛋白聚合后的荧光信号。

[0283] 增生测定-静止内皮 (quiescent endothelium):将人脐静脉内皮细胞 (CC-2519, Clonetics) 一式三份地在 96 孔板中以 15000 个细胞/孔铺放在 EBM2(CC-3156, Clonetics)+0.5% FBS(CC-4101A, Clonetics)+GA-1000(CC-4381A, Clonetics) 中。细胞在 37°C 5% CO₂ 下培养过夜。介质随后用包括所述化合物或阴性对照的新鲜介质置换。细胞培养达 48h 时间。进行 MTT 测定以测量细胞数量的变化。简而言之,将 20 μl 的 MTT 试剂加入到含有 100 μl 的 EBM2+0.5% FBS 的细胞中并在 37°C 孵育 2 小时。测量在 492nm 的吸光度。

[0284] 增生测定-活化的内皮:将人脐静脉内皮细胞 (CC-2519, Clonetics) 一式三份地在 96 孔板中以 2500 个细胞/孔铺放在 EGM2(CC-3162, Clonetics) 中。细胞在 37°C 5% CO₂ 下培养过夜。介质随后用包括所述化合物或阴性对照的新鲜介质置换。细胞培养 48h 的时间。进行 MTT 测定以测量细胞数量的变化。简而言之,将 20 μl 的 MTT 试剂加入到含有 100 μl 的 EBM2 的细胞中并在 37°C 孵育 2 小时。测量在 492nm 的吸光度。

[0285] (ii) 对于组合伴侣 (a) 的体内研究

[0286] 血管阻断测定 (Vascular Disruption Assay):将雌性无胸腺 BALB/c-nu/nu 小鼠 (裸小鼠) 用于这个研究。小鼠为 6-8 周龄并且购自澳大利亚西部佩思的动物资源中心 (Animal Resource Centre) 并允许进行驯化多天。所有动物在无病原体条件下圈养并

依据南澳大利亚费林德斯大学 (Flinders University of South Australia) 和 NH&MRC 指南以及对于用于科学目的的动物的照料和使用的澳大利亚实践法典 (Australian Code of Practice) 进行照料。将人乳腺癌 MDA MB 231 作为原位异种移植物在裸小鼠的乳房脂肪垫中生长。每只小鼠在右前肢下方, 所述乳房脂肪垫正上方皮下地注射在 50 μ l 达尔贝科 PBS (Dulbecco's PBS) 中的 2×10^6 个细胞。当肿瘤达到 100–150 mm³ 的直径 (植入后 3 周) 时, 选取肿瘤进行处理。将试验化合物 (实例 2) 溶解在盐水中并在总体积 400 μ l 中以范围为 150 mg/kg–1 mg/kg 的浓度静脉内注射。肿瘤携带动物在注入该试验化合物之后 24 小时, 静脉内地注入 10 mg/kg Hoechst 33342。在 Hoechst 33342 注射之后 1 分钟使动物安乐死。回收肿瘤以进行组织化学分析。通过评估沿整个肿瘤横截面染色的 Hoechst 33342 的量进行肿瘤灌注分析。在紫外光过滤器下观察 10 微米的冷冻肿瘤活组织的切片。使用 4x 物镜, 成功获取 8- 位单色照片, 表示肿瘤切片的总面积。总体肿瘤切片的复合照片通过叠加单色照片的共有面积而生成。进行同一肿瘤切片的苏木素 (Hematoxylin) 和曙红 -Y (Eosin-Y) 染色以确定非肿瘤区域。在 Hoechst 33342 复合照片上使非肿瘤区域成图并从定量分析中排除。通过测量 Hoechst 33342 染色的像素面积和肿瘤区域的总像素面积进行定量。灌注表示为 Hoechst 33342 染色面积对总肿瘤面积的百分比 (参见图 4)。

[0287] **肿瘤生长抑制**: 将带有 MDA-MB-231 实性原位肿瘤的 Balb/c nu/nu 小鼠用化合物实例 2 以 40 mg/kg 进行处理。动物用总共两个循环的实例 2 处理静脉内给药。每个循环在第 1 天和第 8 天给药, 接着是三周无药期。表示为相对于初始肿瘤体积的比值的肿瘤生长在总共 72 天上显示。

[0288] 肿瘤生长以及动物健康在治疗后第 1 天检测直至 72 天。在这个实验中观察到的结果 (参见图 5) 清楚地显示在用两个周期的实例 2 治疗的动物中的肿瘤生长抑制。在实例 2 治疗的 ($n = 64$) 和赋形剂治疗的 ($n = 20$) 动物之间的肿瘤生长的显著差异在第 4 天 ($p < 0.001$; 不成对的 t - 试验 (unpaired t -test); Prism® analysis) 直至第 70 天被清晰地观察到。

[0289] (B) (i) 对于 (a) 和 (b) 的组合的体外研究

[0290] 微管蛋白靶向 VDA 试剂的临床前评价已经证实, 这些化合物能够阻断 (破坏) 肿瘤血流, 增加肿瘤缺氧和坏死。这些作用导致动物模型中肿瘤生长的一定减少。从通过 VDA 作用引起的血管损伤的肿瘤恢复在治疗后 48 小时内发生。此外, 血管阻断使肿瘤块的外部细胞外缘多余, 其看起来由围绕肿瘤被膜并且通过 VDA 作用保持未受影响的正常血管所支持。可以合理地假设, 其存活的外缘随后支持肿瘤血管重建并从 VDA 试剂的作用恢复。我们假设肿瘤从 VDA 作用的影响的恢复受支持癌症细胞存活和诱导血管发生的分子途径驱动。我们进行了大量组织学分析以评估由实例 2 对肿瘤微环境的成分的完整性所引起的损伤并获得可能涉及肿瘤恢复的蛋白质上调的信息。我们的分析包括 VEGF、磷酸化 mTOR、缺氧诱导因子 -1 α (Hif-1 α) 和缺氧诱导因子 -2 α (Hif-2 α) 的表达的评价, 细胞凋亡的水平、内皮细胞和基膜蛋白层粘连蛋白的完整性的评价。我们的观察结果表明, 在用实例 2 治疗后 24–30h, 存在利用内皮细胞标记物、和 CD31 的染色的减少, 证实肿瘤内皮细胞的破坏, 以及层粘连蛋白染色的显著减少, 这是基膜完整性降解的证据。此外, 我们的分析显示, 肿瘤内的坏死细胞的数量显著增大。最重要地, 利用抗 - 人类 VEGF 抗体的染色的显著增加是明显的。在存活边缘区域周围 (如由箭头指示的) 增加的磷酸化 mTOR (ser 2448)、Hif-1 α

和 Hif-2 α 的表达以及坏死区（如图 3 中箭头指示的）中内皮细胞的丧失在实例 2 治疗的肿瘤中观察到。

[0291] 在围绕实例 2 诱导的坏死肿瘤区域的存活边缘 (viable rim) 中磷酸化 mTOR 上调的新发现导致目前的假设, 即实例 2 (以及类似的, TPI 试剂) 与 mTOR 蛋白的抑制剂的联合治疗在递送延长的血管关闭效应 (将肿瘤暴露于更长缺氧期并导致增加的肿瘤生长的抑制) 中是协同作用的。

[0292] 此外, 微管蛋白靶向试剂抑制癌细胞增生的固有性能提供对于这类试剂的第二抗癌机制。我们已经证实, 用实例 2 和 mTOR 抑制剂替西罗莫司对大量细胞系的联合治疗在体外抑制癌细胞系增生中产生加合效应。除了其在诱导血管发生中已证实的作用外, mTOR 也是一种癌细胞代谢和存活的关键驱动物。mTOR 的抑制剂诱导白细胞郁积 (cytostasis) 并且大量已被批准用于大量癌症情形下的临床使用。因此, 微管蛋白和 mTOR 的协作靶向可能产生改善的治疗益处。

[0293] 通过破坏肿瘤血管支持以及直接地通过抑制癌细胞增生, mTOR 与 TPI 试剂的潜在治疗相容性的双重模式对于 TPI 类的微管蛋白靶向化合物是独特的。相反, 具有 VDA 活性的非-TPI 试剂例如 DMXAA 或 ASA404 (5,6-二甲基占吨酮-4-乙酸) 对于癌细胞不施加直接的抗增生性作用。

[0294] 免疫组织学分析 - 方法 (图 3)

[0295] 将 6 至 8 周的雌性 BALB/c nu/nu 小鼠皮下 (s.c) 注射人癌细胞系 Caki-1 (代表肾癌)。细胞再悬浮在达尔贝科 PBS (Sigma-Aldrich) 中并且皮下注射 5×10^6 个细胞。在治疗之前, 肿瘤生长至 700mm^3 的平均尺寸。实例 2 治疗由以 32mg/kg 的剂量水平的单个静脉内 (i.v) 注射构成。包括盐水治疗作为赋形剂对照。在给药后 24 小时, 使动物安乐死并切除肿瘤以用于组织学检查。制备肿瘤的冰冻切片并用磷酸化 mTOR (ser 2448)、Hif-1 α 、Hif-2 α 和 CD31 特异性抗体进行探测。利用 3,3'-二氨基联苯胺 (褐色染色) 使抗体染色可视化并且切片用 Myers 苏木素反染色。

[0296] 利用体外增生测定来评估联合实例 2 与 mTOR 抑制剂

[0297] 使用人类癌细胞系来评价对于与实例 2 的联合合适的试剂。

[0298] 分析是基于在待评价的化合物存在下体外细胞增生的测量结果。将细胞以平均 500-2000 个细胞 / 孔接种在 96 孔板中, 在添加试验化合物之前允许粘附整夜。在试验物质存在下在培养 48-72h 之后评估细胞增生。细胞用实例 2 和待评价的化合物的组合进行处理、或者单独用这些试剂的每一个进行处理。增生测量通过基于四唑的比色测定 (MTS) 进行。代谢活性细胞利用 CellTiter 96® Aqueous One Solution (一种水溶液) (Promega Corp. Madison WI, USA) 根据生产商说明书进行测量并获取 492nm 处的吸光度值。将对于各个化合物浓度的吸光度值标准化成对应的赋形剂对照培养物。S 形剂量响应曲线拟合于这些数据, 并且增生降低 50% 的浓度利用 Graph Pad Prism 4 软件 (San Diego, USA) 进行计算。

[0299] 联合指数值 (Combination Index Value)

[0300] 使用人类癌细胞系 (列举细胞系: Caki-1, A498, Calu-6, SKOV-3, A4549) 来评价在体外的联合治疗。细胞用实例 2 与替西罗莫司协同治疗 72 小时并利用定量软件 CalcuSyn 分析来自单个试剂和所述组合二者的 ED50 和 ED75 数据以确定联合指数 (CI)

和效果（分为协同作用的、加合的或无加合益处的组合）(Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. Pharmacol Rev. 2006 Sep ;58(3) :621-81)。结果在图 2 中以表格显示。

[0301] 细胞培养和细胞系

[0302] 癌细胞系包括 Calu-6、A549、A498、Caki-1 和 Sk-OV-3 (ATCC, Manassas, VA, USA)。Calu-6 细胞在 MEM 培养基(Gibco®)中培养, 该培养基具有 10% FCS、2mM 青霉素 - 链霉素 - 谷氨酰胺(Gibco®)、10mM Hepes (乙基哌嗪乙磺酸) 缓冲液(Gibco®)、1mM 丙酮酸钠溶液 (sodium pyruvate solution) (Gibco®) 和 0.1mM 非必需氨基酸溶液(Gibco®)。SK-OV-3 细胞在 DMEM/F12 (Gibco®) 培养基中培养, 该培养基具有 10% FCS、2mM 青霉素 - 链霉素 - 谷氨酰胺和 10mM Hepes 缓冲液。A549 细胞在 F12K (Gibco®) 培养基中培养, 该培养基具有 10% FCS 和 2mM 青霉素 - 链霉素 - 谷氨酰胺。A498 细胞在 MEM 培养基 (Gibco®) 中培养, 该培养基具有 10% FCS 和 2mM 青霉素 - 链霉素 - 谷氨酰胺。Caki-1 细胞在 McCoys5a (Gibco®) 培养基中培养, 该培养基具有 0% FCS 和 2mM 青霉素 - 链霉素 - 谷氨酰胺。

[0303] 利用体内（小鼠）测定评估联合实例 2 与 mTOR

[0304] 6-8 周的雌性 BALB/c nu/nu 小鼠用来源于肾癌的人类细胞系 caki-1 皮下接种以建立实性肿瘤。肿瘤在接受治疗之前生长至 150mm³ 的平均尺寸。每周对肿瘤体积（立方厘米）测量 2 至 3 次。动物在 28 天循环的第 1 天和第 8 天以 32mg/kg 的静脉内给药和 / 或在每周循环的第 2 天和第 5 天以 1mg/kg 腹膜内 (ip) 给予雷帕霉素。在研究期间监控肿瘤生长和动物健康。

[0305] 肿瘤生长表示为平均肿瘤体积 (mm³) 并且做成曲线直至其中 90% 的赋形剂治疗的动物仍然活着的时间点。存活显示为仍然活着的动物的百分比并且数据显示为直到研究结束。

[0306] 在这种试剂时间安排下, 相比于单独的单一疗法（实例 2 或雷帕霉素）或赋形剂对照, 朝向减小的肿瘤体积（图 6）和增大的存活（图 7）的趋势在联合疗法组（实例 2+ 雷帕霉素）中观察到。

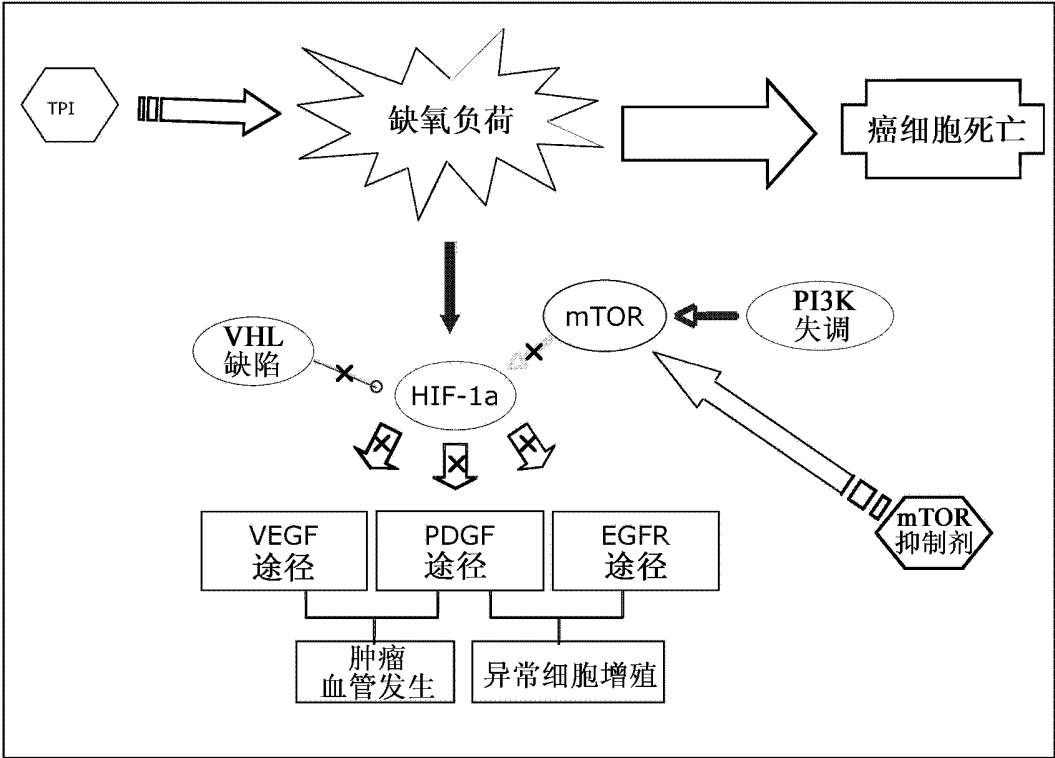


图 1

细胞系	指征	替西罗莫司	
		ED ₅₀	ED ₇₅
Caki-1	肾，透明细胞癌	0.719	1.059
A498	肾，癌	0.845	0.442
Calu-6	肺，退形性癌	0.782	0.765
A4549	肺癌	0.785	0.887
SK-OV-3	卵巢腺癌	0.965	0.986

CI=0.1-0.9协同作用的
CI=0.9-1.1加合的
CI=>1.1无加合益处

图 2

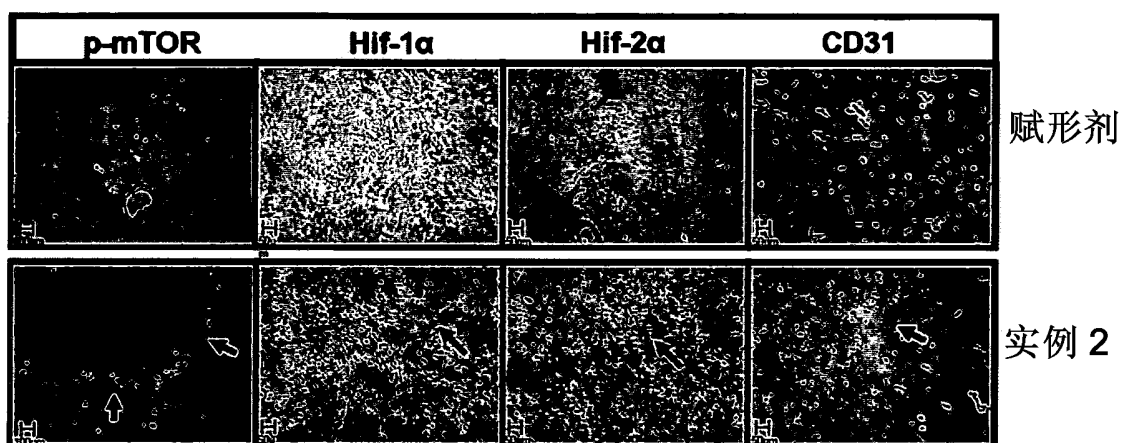


图 3

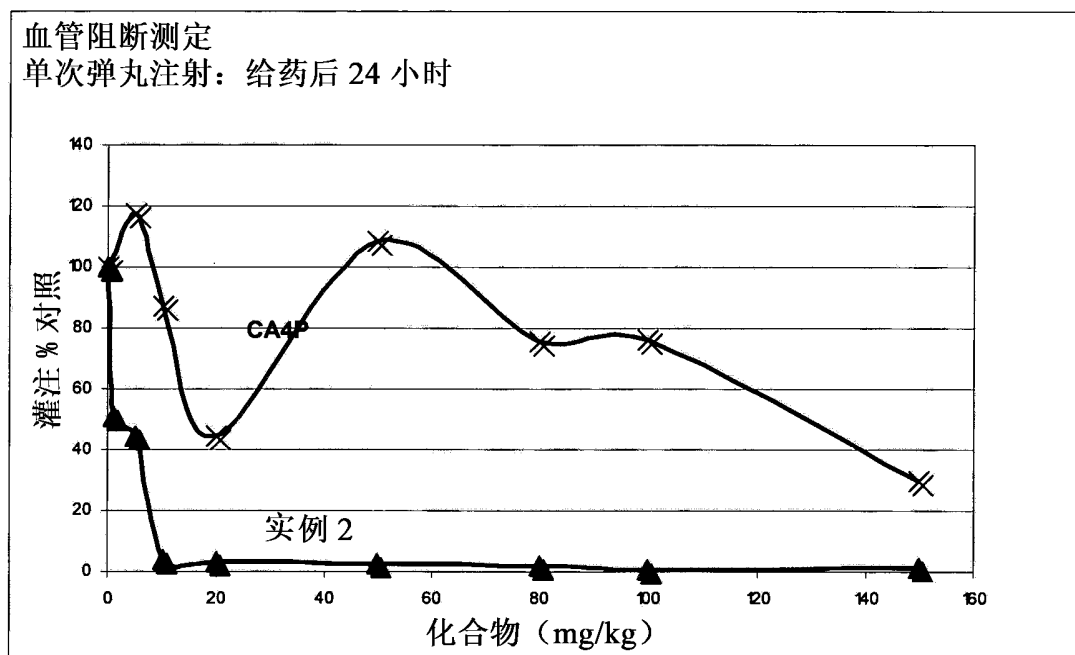


图 4

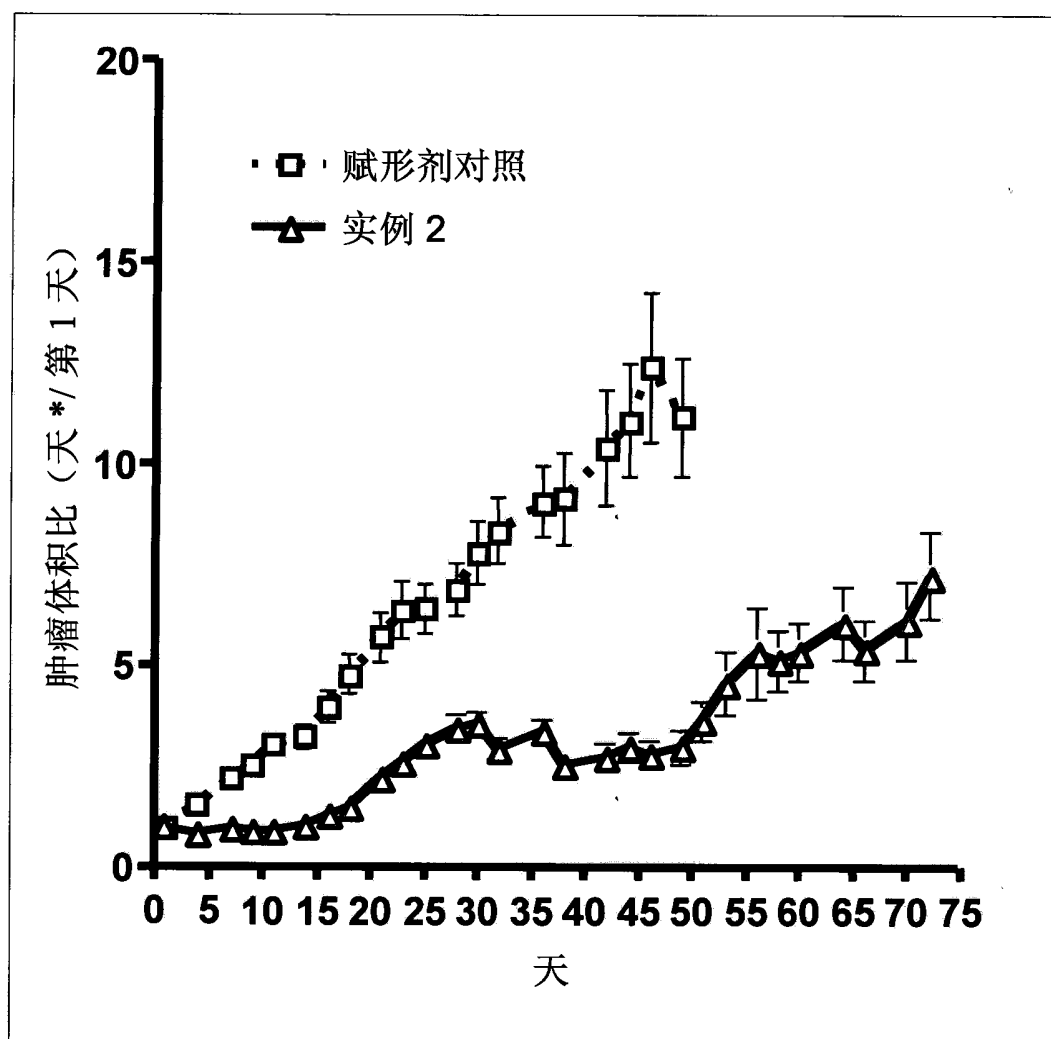


图 5

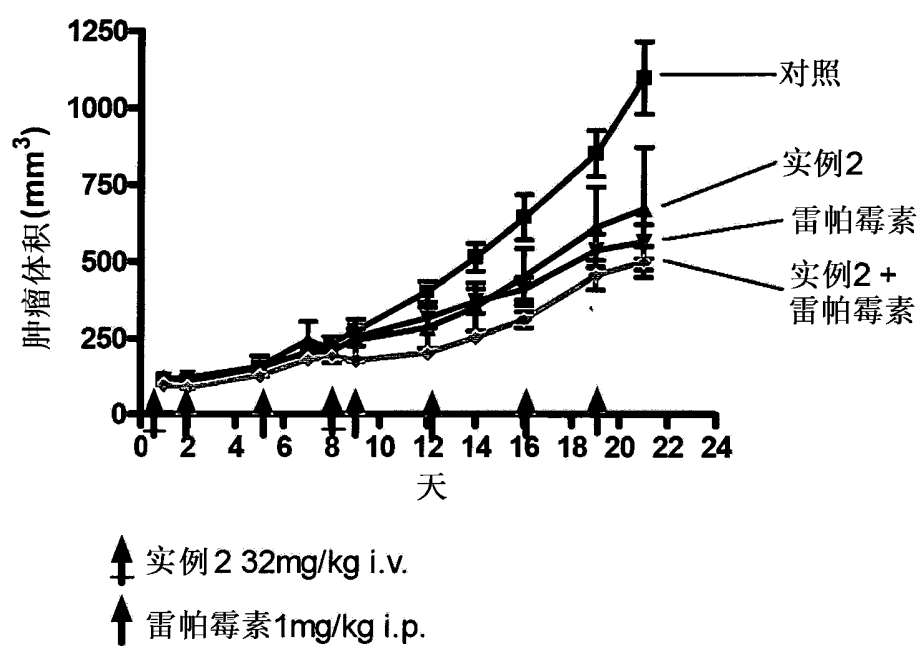


图 6

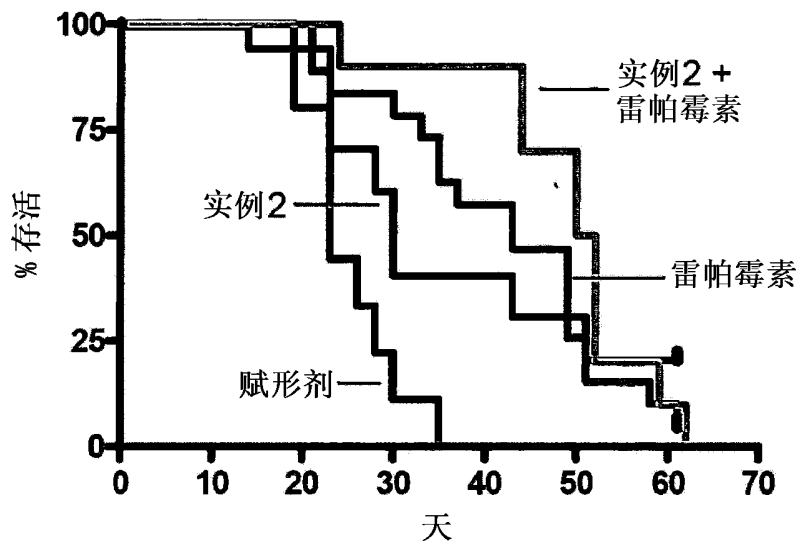


图 7