



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107848970 A

(43)申请公布日 2018.03.27

(21)申请号 201680044370.2

(22)申请日 2016.07.29

(30)优先权数据

62/199194 2015.07.30 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.01.29

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/044607 2016.07.29

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/019925 EN 2017.02.02

(71)申请人 地平线孤儿病有限责任公司

地址 美国伊利诺伊州

(72)发明人 T.C.赞克尔 S.L.伊斯贝尔

A.A.高

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 彭昶 鲁炜

(51)Int.Cl.

G07D 211/46(2006.01)

G07D 211/74(2006.01)

A61K 31/445(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书4页 说明书27页 附图2页

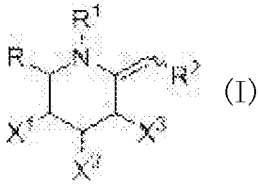
(54)发明名称

岩藻糖苷酶抑制剂

(57)摘要

本公开内容一般涉及可用作岩藻糖苷酶酶类的抑制剂的化合物,且涉及用如本文公开的化合物来治疗肿瘤或癌症,例如肝病及肝肿瘤(例如,肝细胞癌)的方法及组合物。

1. 一种式I化合物:



其中:

X^1 、 X^2 和 X^3 独立地选自OH、卤代和O(C)OCH₃;

R选自C₁₋₃烷基和C₁₋₃卤代烷基;

R¹选自H、C₁₋₃烷基、OH、-CO₂C₁₋₃烷基;

R²选自以下-NR^bC(O)R^a、-NR^bC(O)OR^a、-NR^bC(O)NR^cR^a、-NR^bC(O)SR^a、-C(O)R^a和-C(O)NR^bR^a;

R^a为-C₀₋₃亚烷基-G;

G选自芳基、杂芳基、环烷基和杂环烷基;和

R^b和R^c独立地选自H和C₁₋₃烷基。

2. 权利要求1的化合物,其中 X^1 、 X^2 和 X^3 为OH。

3. 权利要求1或2的化合物,其中R为甲基。

4. 前述权利要求的任一项的化合物,其中R¹为H。

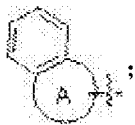
5. 前述权利要求的任一项的化合物,其中R²为-NR^bC(O)R^a。

6. 前述权利要求的任一项的化合物,其中R²为-C(O)NR^bR^a。

7. 前述权利要求的任一项的化合物,其中R^b为H。

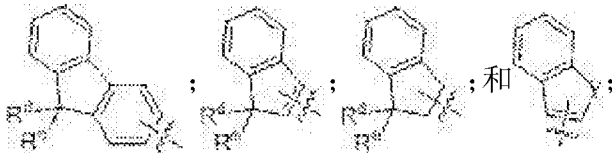
8. 前述权利要求的任一项的化合物,其中G选自任选取代的吡啶基、苯并噻吩基、茚基、茛基、二氢茛基和苯基。

9. 前述权利要求的任一项的化合物,其中G选自任选取代的苯基和



其中A为5-、6-、7-、8-、9-或10员碳环或杂环系统。

10. 前述权利要求的任一项的化合物,其中G选自



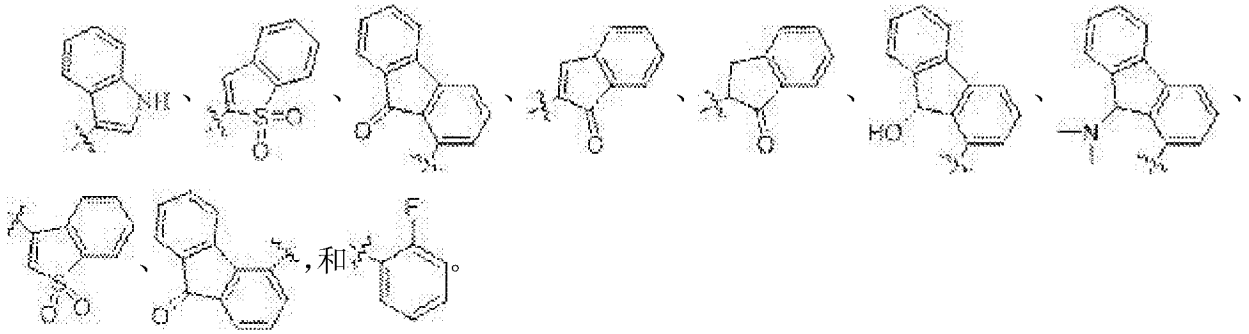
R^d和R^e独立地选自H、OR^f、NR^fR^g、C₁₋₃烷基和C₁₋₅环烷基;或

R^d和R^e与其所连接的碳原子结合在一起形成C=O;

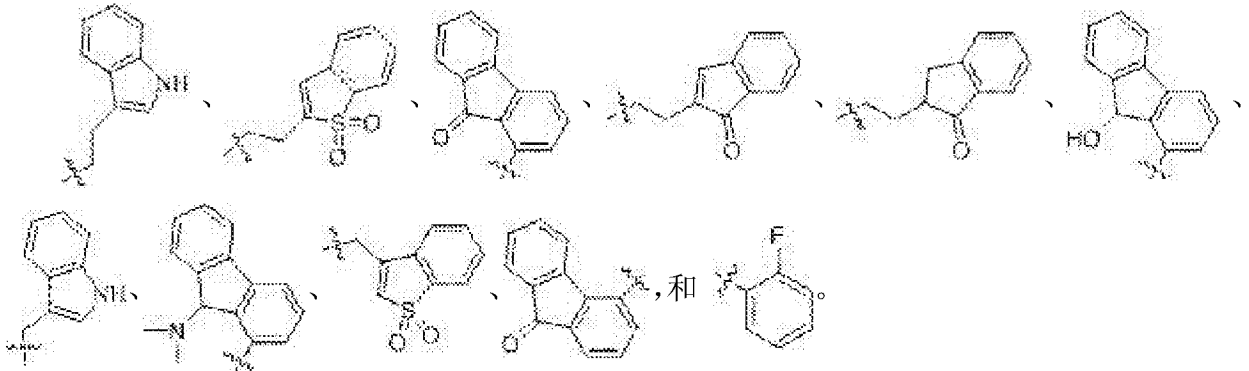
R^f和R^g独立地选自H和C₁₋₃烷基;和

Y选自NH、N-C₁₋₃烷基、S、SO、SO₂和O。

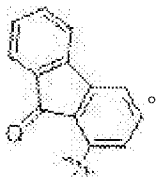
11. 前述权利要求的任一项的化合物,其中G选自



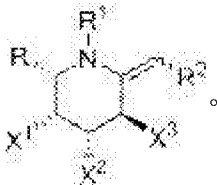
12. 前述权利要求的任一项的化合物,其中R^a选自



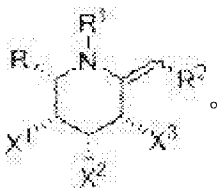
13. 前述权利要求的任一项的化合物,其中R^a为



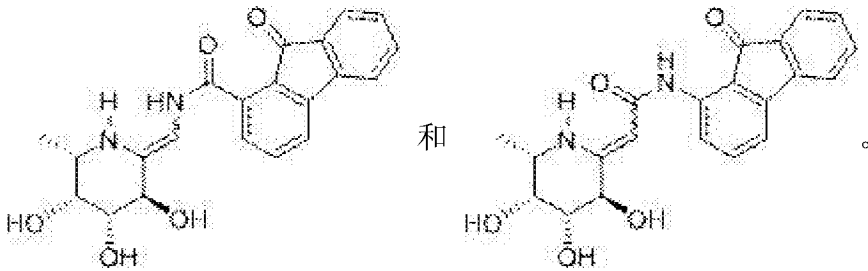
14. 前述权利要求的任一项的化合物,其中式I化合物具有以下结构:



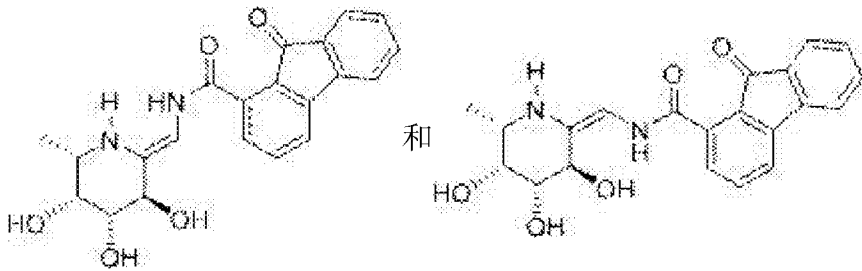
15. 权利要求1-13的任一项化合物,其中式I化合物具有以下结构:



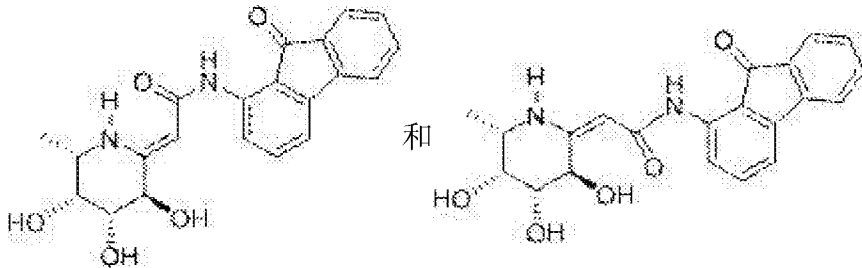
16. 权利要求1-14的任一项化合物,其中所述化合物选自:



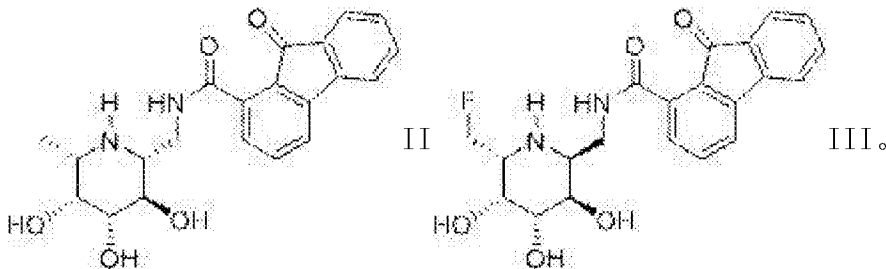
17. 权利要求1-14的任一项化合物,其中所述化合物选自:



18. 权利要求1-14的任一项化合物,其中所述化合物选自:



19. 一种用于在有需要的受试者中治疗肿瘤或癌症的方法,其包括给予治疗有效量的如权利要求1-18的任一项的化合物、化合物II或化合物III:



20. 权利要求19的方法,其中所述肿瘤或癌症为肝癌、乳癌、黑素瘤、肺癌、白血病、胰腺癌、胃癌、结肠直肠癌和头颈癌。

21. 权利要求19-22的任一项的方法,其中所述化合物减少受试者中的肿瘤转移。

22. 权利要求19的方法,其中所述肿瘤为肝细胞癌、肝炎病毒感染、肝硬化、中毒性肝损伤和遗传性血色素沉着症的结果。

23. 权利要求22的方法,其中所述肿瘤为肝细胞癌的结果。

24. 权利要求19-23的任一项的方法,其中所述治疗导致所述受试者中肿瘤尺寸减小。

25. 权利要求19-24的任一项的方法,其中所述治疗导致所述受试者的血液中的 α -胎蛋白水平比治疗前的水平降低。

26. 权利要求19-25的任一项的方法,其中所述化合物经静脉内给予。

27. 权利要求26的方法,其中所述化合物经肝动脉给予。

28. 权利要求19-25的任一项的方法,其中所述化合物与第二种药物组合给予。

29. 权利要求28的方法,其中第二种药物选自化学治疗剂、细胞毒性剂、放射性同位素、抗病毒剂、抗真菌剂、消炎剂和抗体。

30. 权利要求29的方法,其中化学治疗剂选自多柔比星和5-氟尿嘧啶。

31. 权利要求29的方法,其中第二种药物为细胞毒性剂。

32. 权利要求31的方法,其中细胞毒性剂选自盐酸氮芥、环磷酰胺、异环磷酰胺、苯丁酸氮芥、美法仑、白消安、塞替派、卡莫司汀、洛莫司汀、达卡巴嗪和链佐星。

33. 权利要求29的方法,其中第二种药物为放射性同位素。

34. 权利要求33的方法,其中所述放射性同位素选自以下: ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{111}In 、 ^{90}Y 、 ^{67}Cu 、 ^{127}Lu 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{255}Fm 、 ^{149}Tb 、 ^{223}Rd 、 ^{213}Pb 、 ^{212}Pb 、 ^{211}At 、 ^{89}Sr 、 ^{153}Sm 、 ^{166}Ho 、 ^{225}Ac 、 ^{186}Re 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 和 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 。

35. 权利要求29的方法,其中所述肿瘤与肝炎病毒感染相关,且第二种药物为抗病毒剂。

岩藻糖苷酶抑制剂

[0001] 相关申请案的交叉引用

本申请要求2015年7月30日提交的美国临时申请号62/199,194的权益,其通过引用以其整体结合到本文中。

[0002] 本公开内容的领域

本公开内容一般涉及可用作岩藻糖苷酶(fucosidase)酶类的抑制剂的化合物,且涉及用如本文所公开的化合物来治疗肿瘤或癌症,例如肝病和肝肿瘤(例如,肝细胞癌)的方法和组合物。

[0003] 背景

已经注意到蛋白质糖基化在正常细胞与肿瘤细胞之间的差异且其已成为研发肿瘤选择性抗体的基础(Hakomori, S., *Adv Exp. Med. Biol.*, 491:369-402, 2001)。相对于正常肝细胞,已观测到肝细胞癌(HCC)细胞显著地和不适当地使其糖蛋白岩藻糖基化(fucosylate) (Block, T.M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 102:779-84, 2005; Comunale, M.A. et al., *J. Proteome Res.* 8:595-602, 2009; Mehta, A. et al., *Dis. Markers*, 25:259-65, 2008; Noda, K. et al., *Cancer Res.* 63:6282-9, 2003; Norton, P.A. et al., *J. Cell. Biochem.* 104:136-49, 2008)。这些糖蛋白的大部分在肿瘤溶酶体中死亡,在那里它们被降解。一份报告已提出升高的溶酶体 α -L-岩藻糖苷酶的血清水平对HCC具有预测性,其指示癌变前肝细胞为在生物合成路径中适应增加水平的糖蛋白岩藻糖基化而导致此酶可能上调(Giardina, M.G. et al., *Cancer* 83:2468-74, 1998)。已对人类肝 α -L-岩藻糖苷酶的催化机制进行过研究(White, W.J. et al., *Biochim. Biophys. Acta.* 912: 132-8 (1987))。

[0004] 例如由于基因中的遗传突变,溶酶体 α -L-岩藻糖苷酶(FUCA1)的失活导致称为岩藻糖苷储积病(fucosidosis)的溶酶体储积病(LSD) (Willems, P.J. et al., *Eur. J. Hum. Genet.* 7:60-7, 1999; Intra, J. et al., *Gene* 392:34-46, 2007)。表现有岩藻糖苷储积病的患者显示出未降解物质的溶酶体体积聚,因为他们无法以溶酶体方式降解末端和核心岩藻糖基化的寡糖,且其存活期很少超过6年(Willems, P.J. et al., *Am. J. Med. Genet.* 38:111-31, 1991)。

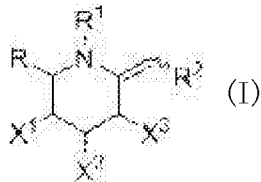
[0005] 美国专利5,240,707公开 α -甘露糖苷酶和岩藻糖苷酶抑制剂,其被推测可用作免疫调节剂和用作抗转移剂。其它已知的岩藻糖苷酶抑制剂包含L-脱氧岩藻野尻霉素(L-deoxyfuconojirimycin; DFJ) (Winchester, B. et al., *Biochem. J.* 265:277-82, 1990),其基于经典野尻霉素亚胺基糖结构且对溶酶体岩藻糖苷酶具有10 nM的抑制常数。也参见美国专利5,100,797,其公开了基于脱氧岩藻野尻霉素(DFJ或DNJ),例如 β -L-同型岩藻野尻霉素,和1- β -C取代的脱氧甘露野尻霉素的额外抑制剂。另一个强效岩藻糖苷酶抑制剂为7员氮杂环庚烷类的一员((3R,4R,5S,6S)-1-丁基-4,5,6-三羟基氮杂环庚烷-3-羧酸,“Faz”)。尽管具有艾杜糖醛糖(iduronate sugar)的羟基构型(configuration)和羧基官能基,这个新分子在低纳摩尔范围内也以一定效能抑制岩藻糖苷酶(Li, H. et al., *Chembiochem* 9:253-60, 2008)。也已研究具有胺的烷基修饰的亚胺基糖抑制剂

(McCormack, P.L.. et al., Drugs 63:2427-34; discussion 2435-6, 2003; Bause, E.. et al., FEBS Lett. 278:167-70, 1991)。岩藻糖苷酶抑制剂进一步描述于美国专利号5,382,709、5,240,707、5,153,325、5,100,797、5,096,909和5,017,704、美国专利公布号2011/0189084和Wu. et al., Angew. Chem. Int. Ed. 49:337-40 (2010)中。

[0006] 简述

本公开内容一般涉及用于治疗肿瘤或癌症,包含肝病,例如肝细胞癌的化合物、组合物和方法。所涵盖的组合物包含如本文所公开的化合物。

[0007] 在一个方面,本公开内容提供一种式I化合物:



其中:

X¹、X²和X³独立地选自OH、卤代和O(C)OCH₃;

R选自C₁₋₃烷基和C₁₋₃卤代烷基;

R¹选自H、C₁₋₃烷基、OH、-CO₂C₁₋₃烷基;

R²选自-NR^bC(O)R^a、-NR^bC(O)OR^a、-NR^bC(O)NR^cR^a、-NR^bC(O)SR^a、-C(O)R^a和-C(O)NR^bR^a;

R^a为-C₀₋₃亚烷基-G;

G选自芳基、杂芳基、环烷基和杂环烷基;和

R^b和R^c独立地选自H和C₁₋₃烷基。

[0008] 在一些实施方案中,X¹、X²和X³为OH。

[0009] 在一些实施方案中,R为甲基。

[0010] 在一些实施方案中,R¹为H。

[0011] 在一些实施方案中,R²为-NR^bC(O)R^a。

[0012] 在一些实施方案中,R²为-C(O)NR^bR^a。

[0013] 在一些实施方案中,R^b为H。

[0014] 在一些实施方案中,G选自任选取代的吡啶基、苯并噻吩基、苄基、茛基、二氢茛基和苯基。

[0015] 在一些实施方案中,G选自任选取代的苯基和



其中A为5-、6-、7-、8-、9-或10员碳环或杂环系统。

[0016] 在一些实施方案中,G选自

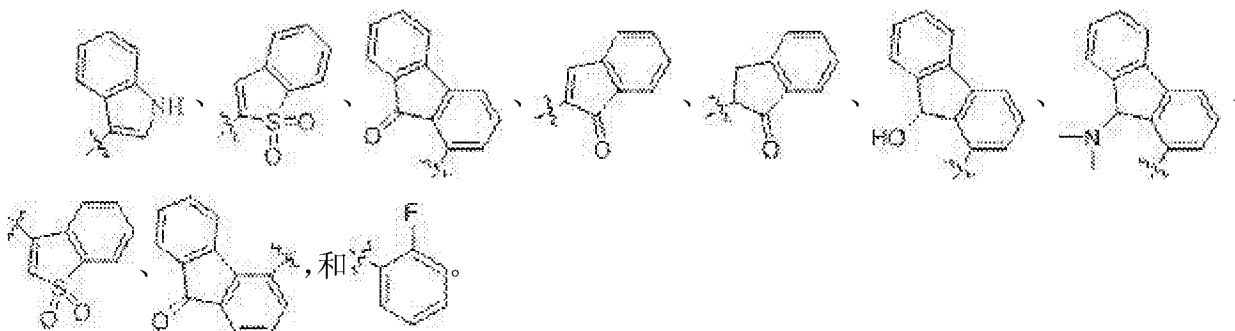


R^d和R^e独立地选自H、OR^f、NR^fR^g、C₁₋₃烷基和C₁₋₅环烷基;或

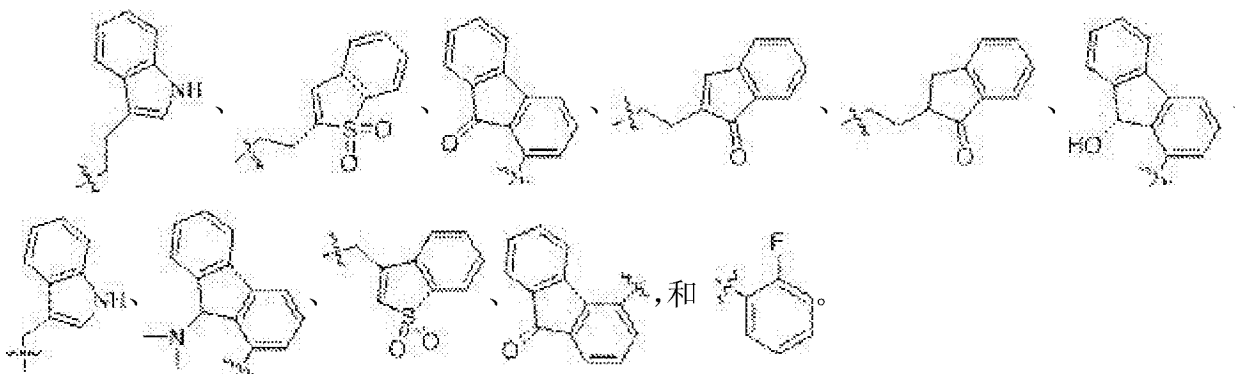
R^d和R^e与其所连接的碳原子结合在一起形成C=O;

R^f和R^g独立地选自H和C₁₋₃烷基;和
Y选自NH、N-C₁₋₃烷基、S、SO、SO₂和O。

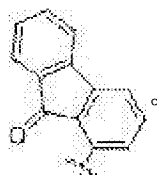
[0017] 在一些实施方案中,G选自



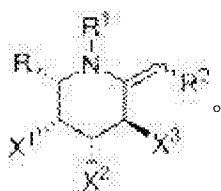
[0018] 在一些实施方案中,R^a选自



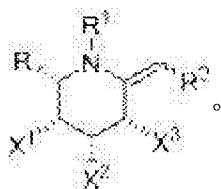
[0019] 在一些实施方案中,R^a为



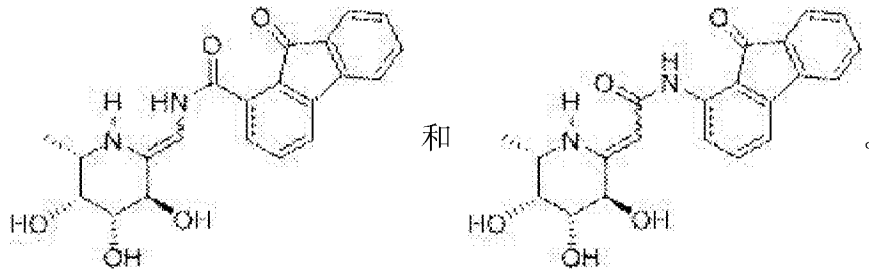
[0020] 在一些实施方案中,式I化合物具有以下结构:



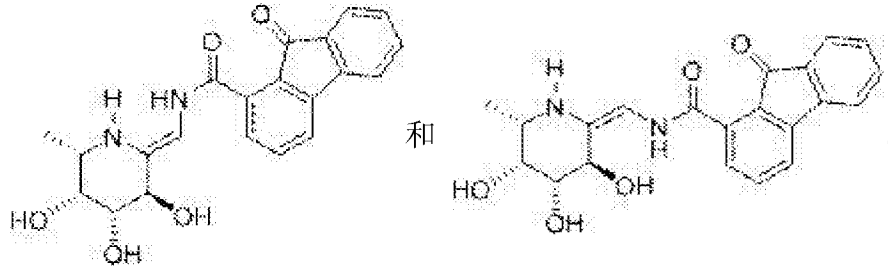
[0021] 在一些实施方案中,式I化合物具有以下结构:



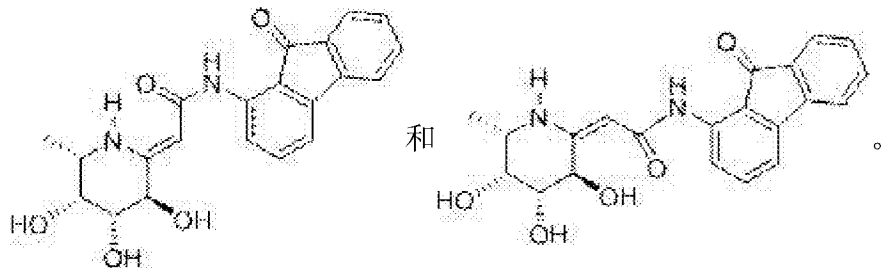
[0022] 在一些实施方案中,化合物选自:



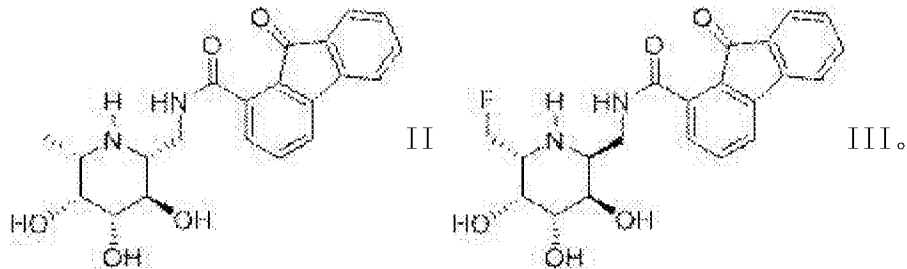
[0023] 在一些实施方案中,化合物选自:



[0024] 在一些实施方案中,化合物选自:



[0025] 在另一方面,本公开内容提供一种用于在有需要的受试者中治疗肿瘤或癌症的方法,其包括给予治疗有效量的如本文所述的化合物。在各个实施方案中,化合物为化合物II或化合物III:



[0026] 在各个实施方案中,肿瘤或癌症为肝癌、乳癌、黑素瘤、肺癌、白血病、胰腺癌、胃癌、结肠直肠癌和头颈癌。

[0027] 在各个实施方案中,化合物会减少受试者中的肿瘤转移。在进一步的实施方案中,治疗使得受试者中的肿瘤尺寸减小。

[0028] 在一些实施方案中,肿瘤为肝肿瘤且为肝细胞癌、肝炎病毒感染、肝硬化、中毒性肝损伤和遗传性血色素沉着症的结果。

[0029] 在一相关的实施方案中,肝肿瘤为肝细胞癌的结果。

[0030] 在另一实施方案中,治疗使得受试者的血液中的 α -胎蛋白水平比治疗前的水平降低。

[0031] 在一些实施方案中,化合物经静脉内给予。在一相关的实施方案中,化合物经由肝动脉给予。在一些实施方案中,化合物以在0.02至2000 mg/kg或0.1至100 mg/kg范围内的

剂量给予,例如1至1500 mg/kg、10至1000 mg/kg、25至500 mg/kg、50至250 mg/kg、75至200 mg/kg、50至150 mg/kg、60至130 mg/kg、70至110 mg/kg、75至100 mg/kg、80至95 mg/kg、85至90 mg/kg、100至250 mg/kg、120至230 mg/kg、130至220 mg/kg、140至210 mg/kg、150至200 mg/kg、160至190 mg/kg、170至180 mg/kg、约87.5 mg/kg或约175 mg/kg。

[0032] 在一些实施方案中,化合物与第二种药物组合给予。在某些实施方案中,第二种药物选自化学治疗剂、细胞毒性剂、放射性同位素、抗病毒剂、抗真菌剂、消炎剂和抗体。在一相关的实施方案中,化学治疗剂选自多柔比星和5-氟尿嘧啶。

[0033] 在进一步的实施方案中,第二种药物为细胞毒性剂。在一些实施方案中,细胞毒性剂选自盐酸氮芥、环磷酰胺、异环磷酰胺、苯丁酸氮芥、美法仑(melphalan)、白消安(busulfan)、塞替派(thiotepa)、卡莫司汀(carmustine)、洛莫司汀(lomustine)、达卡巴嗪(dacarbazine)和链佐星。

[0034] 在另一实施方案中,第二种药物为放射性同位素。在一些实施方案中,放射性同位素选自¹³¹I、¹²⁵I、¹¹¹In、⁹⁰Y、⁶⁷Cu、¹²⁷Lu、²¹²Bi、²¹³Bi、²⁵⁵Fm、¹⁴⁹Tb、²²³Rd、²¹³Pb、²¹²Pb、²¹¹At、⁸⁹Sr、¹⁵³Sm、¹⁶⁶Ho、²²⁵Ac、¹⁸⁶Re、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga和^{99m}Tc。

[0035] 在一个实施方案中,肿瘤与肝炎病毒感染相关联,且第二种药物为抗病毒剂。

[0036] 也涵盖本文所公开的任一前述化合物在制备用于治疗本文所述的肿瘤或癌症中的任一者的药物中的用途。也涵盖供用于治疗肿瘤或癌症的包含如本文所述的化合物的组合物。也涵盖注射器,例如单次使用或预填充注射器;包含任一前述化合物的无菌密封容器,例如,小瓶、瓶、容器和/或药剂盒或包装,任选伴有适合的使用说明书。

[0037] 本文中所述的任一前述化合物可与本领域中已知的或本文所述的可用作辅助疗法以治疗肿瘤或癌症的任何药物同时给予。也涵盖包含任一前述化合物与其它治疗剂(例如,肝治疗剂)在一起的组合物。

[0038] 应理解本文所述的各特征或实施方案或组合为本发明任何方面的非限制性、例示性实例,且同样意谓可与本文所述的任何其它特征或实施方案或组合进行组合。例如,在用例如“一个实施方案”、“一些实施方案”、“进一步的实施方案”、“具体例示性实施方案”和/或“另一实施方案”的措辞描述特征时,这些类型的实施方案中的每一个为特征的非限制性实例,其意欲与本文所述的任何其它特征或特征组合进行组合而不必列举出每一个可能的组合。这样的特征或特征组合适用于本发明的任一方面。当公开落入范围内的数值的实例时,涵盖这些实例中的任一个作为可能的范围端点,在这样的端点之间的任何和所有数值均包括在内,且预想上端点和下端点的任何和所有组合。

[0039] 附图简述

图1为显示与化合物II、III和IV一起孵育的HepG2细胞的糖蛋白代谢中的扰动(perturbations)的图。

[0040] 图2为显示24小时处理后HepG2细胞中化合物II和IV的细胞毒性的图。

[0041] 图3为显示48小时处理后HepG2细胞中化合物II和IV的细胞毒性的图。

[0042] 详细描述

本发明涉及化合物和这样的化合物作为岩藻糖苷酶抑制剂(例如,作为抑制 α -L-岩藻糖苷酶的活性以自糖蛋白分解岩藻糖残基的化合物)的用途。本发明也涉及这样的化合物治疗肿瘤或癌症,例如肝肿瘤,尤其是肝细胞癌的用途。不受本发明的理论的约束,岩藻糖

苷酶抑制剂诱导糖蛋白衍生的寡糖在溶酶体中积聚,类似于溶酶体储积病在肝细胞中的影响,由此在细胞中诱发细胞毒性事件。

[0043] 定义

除非上下文另外明确指示,否则如本文中和所附权利要求书中所用的,单数形式“一”、“一个”和“该”包含复数指代。因此,例如提及“一种衍生物”时,其包括多个这样的衍生物,且提及“一个患者”时,其包含可提及一或多个患者等。

[0044] 此外,除非另外说明,否则使用“或”意指“和/或”。类似地,“包含(comprise/comprises/comprising)”和“包括(include/includes/including)”为可互换的且并不意欲为限制性的。

[0045] 更应理解在各个实施方案的描述中使用术语“包含”时,本领域技术人员应理解在一些特定情况中,可使用措辞“主要由……组成”或“由……组成”来替代地描述实施方案。

[0046] 除非另外定义,否则本文中所用的所有技术和科学术语具有与本公开内容所属领域中普通技术人员通常理解相同含义。尽管类似或等效于本文所述的方法和材料的那些方法和材料可用于实践所公开的方法和材料,但例示性方法、装置和材料描述于本文中。

[0047] 提供上文所讨论且贯穿全文的文献仅仅因为其公开于本申请的申请日之前。不应将本文中的任何内容解释为承认本发明人由于先前的公开内容而无权先于此类公开内容。须特别注意,本公开内容引用的各文献以其全文引用的方式结合到本文中。

[0048] 以下参考文献为技术人员提供本公开内容中所用的多个术语的一般定义: Singleton. et al., 微生物学和分子生物学辞典(DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY) (第2版 1994);剑桥科学和技术辞典(THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) (Walker编辑, 1988);遗传学词汇表(THE GLOSSARY OF GENETICS), 第5版, R. Rieger. et al. (编辑), Springer Verlag (1991);和Hale与Marham, 哈珀柯林斯生物学辞典(THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY) (1991)。

[0049] 如本文所用的,“治疗有效量”或“有效量”指化合物的足以引起症状改善,例如相关医学病症得以治疗、愈合、预防或改善,或此类病症的治疗、愈合、预防或改善的比率提高,通常在经治疗的患者群体中获得统计学显著意义改进的量。当提及单独给予的个别活性成分时,治疗有效剂量仅指该成分。当提及组合时,治疗有效剂量指不论组合(包含连续或同时)给予的产生治疗效果的活性成分的组合量。在一些实施方案中,例如对于脂肪肝病,治疗有效量的化合物改善一或多种症状,包含(但不限于)肝纤维化、肝脏脂肪含量、肝硬化的发生率或进展、肝细胞癌的发生率、例如ALT和AST的肝脏转氨酶水平增加、血清铁蛋白增加、 γ -谷氨酰转移酶(γ -GT)的水平升高和血浆胰岛素、胆固醇和三酸甘油酯的水平升高。

[0050] 如本文所用的“肝肿瘤”包括产生在肝脏中或其上的或与肝脏物理相关的原发性肿瘤和/或赘瘤(neoplasia)和/或转移。其也包括转移至体内其它处,但仍对本文所公开的化合物有反应的肝肿瘤的转移。这样的肿瘤和赘瘤的许多类型为已知的。原发性肝肿瘤包括肝细胞癌和本领域中已知的其它肿瘤。这样的肿瘤通常为实体肿瘤,或它们为积聚定位于肝脏的扩散肿瘤。根据本发明的用于治疗肿瘤或赘瘤可为恶性或良性的,且先前用化学疗法、放射和/或其它治疗进行治疗。

[0051] 如本文所用的“肿瘤”或“赘瘤”或“癌症”包括原发性肿瘤和/或转移二者。肿瘤包括例如卵巢癌、子宫颈癌、前列腺癌、乳癌、肺癌、结肠癌或胃癌及其转移至肝脏的瘤。

[0052] “治疗”指预防性治疗或疗效性治疗。在某些实施方案中，“治疗”指为了治疗或预防目的，向受试者给予化合物或组合物。

[0053] “治疗性”治疗为出于减轻或消除病理学体征或症状的目的，向表现出病理学体征或症状的受试者给予的治疗。体征或症状可为生物化学、细胞、组织学、功能或生理、主观或客观的。

[0054] “预防性”治疗为出于降低发生病变的风险的目的，向未表现出疾病的病征或仅表现出疾病的早期体征的受试者给予治疗。本公开内容的化合物或组合物可作为预防性治疗提供，以减少发生病变的可能性或使病变(如果发生)的严重性降至最低。

[0055] “诊断”意指鉴定病理学病症的存在、程度和/或性质。诊断方法在其特异性和选择性方面有所不同。虽然特定诊断方法可能无法提供病症的确定诊断，但如果所述方法提供有助于诊断的阳性指示，则其为足够的。

[0056] “药用组合物”指适合于受试者动物(包含人类和哺乳动物)的医药用途的组合物。药用组合物包含治疗有效量的本公开内容的化合物，任选的另一种生物学活性剂，以及任选的药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。在一实施方案中，药用组合物涵盖包含活性成分和构成载体的惰性成分的组合物，以及直接或间接由任何两种或两种以上成分的组合、复合或聚集，或由一种或多种成分的解离或由一种或多种成分的其它类型的反应或相互作用而产生的任何产物。因此，本公开内容的药用组合物涵盖通过将本公开内容的化合物与药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂掺和而制得的任何组合物。

[0057] “药学上可接受的载体”指标准药用载体、缓冲剂等任何一种，例如磷酸盐缓冲盐水溶液、5%右旋糖水溶液和乳液(例如，油/水或水/油乳液)。赋形剂的非限制性实例包含佐剂、粘合剂、填充剂、稀释剂、崩解剂、乳化剂、润湿剂、润滑剂、助流剂、甜味剂、调味剂和着色剂。适合的药用载体、赋形剂和稀释剂描述于Remington's 药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences) (第19版, Mack Publishing Co., Easton, 1995)中。优选的药用载体取决于给予活性剂的预期模式而定。典型给予模式包括经肠(例如，经口)或胃肠外(例如，皮下、肌肉内、静脉内或腹膜内注射；或局部、经皮或经粘膜给予)。

[0058] “药学上可接受的盐”为可调配成用于医药用途的化合物的盐，其包括(但不限于)金属盐(例如，钠、钾、镁、钙等)和氨或有机胺的盐。

[0059] 如本文所使用“药学上可接受的”或“药理学上可接受的”意为不为生物学上或其它方面不期望的物质，即，可在不导致任何不需要的生物影响或在不以有害方式与含有其的组合物的任何组分或与存在于个体身体上或体内的任何组分相互作用的情况下向个体给予的物质。

[0060] 如本文所用的术语“单位剂型”指适合作为用于人类和动物受试者的单一剂量的物理离散单位，各单位含有以足以(任选与药学上可接受的赋形剂、稀释剂、载体或溶媒混合)产生所需作用的量计算的预定量的本公开内容的化合物。本公开内容的新的单位剂型的说明取决于所用特定化合物和要达到的效果，以及与宿主中的各化合物相关的药效学。

[0061] 如本文所用的术语“受试者”涵盖哺乳动物。哺乳动物的实例包含(但不限于)哺乳动物类的任何成员：人类、非人类灵长类(例如黑猩猩和其它猿类和猴类物种)；农畜，例如

牛、马、绵羊、山羊、猪；家畜，例如兔、狗和猫；实验室动物，包含啮齿动物，例如大鼠、小鼠和豚鼠等。该术语并不指示特定年龄或性别。在各个实施方案中，受试者为人类。在各个实施方案中，受试者为儿童或青年。

[0062] α -L-岩藻糖苷酶

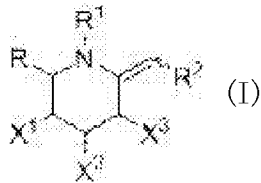
α -L-岩藻糖苷酶 (Genbank 索取号 NP_000138) (通过引用结合到本文中) 通常在溶酶体中参与长糖链(寡糖)的裂解。当缺乏该酶时，糖链会积聚且最终会导致岩藻糖苷储积病的临床特征。岩藻糖苷储积病为一种由缺乏 α -L-岩藻糖苷酶且糖岩藻糖在组织中积聚所导致的常染色体隐性溶酶体储积病。参见，例如 Johnson. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 133:90-7, 1986。不同表型包括例如以下的临床特征：呈严重早期形式的神经退化、生长迟缓、内脏肥大 (visceromegaly) 和癫痫；呈较长存活形式的粗糙面部特征、弥漫性体血管角皮瘤 (angiokeratoma corporis diffusum)、痉挛和精神运动发育延缓。

[0063] 可使用基因测试鉴定岩藻糖苷酶基因中的突变来检测岩藻糖苷储积病。也通过岩藻糖苷储积病患者的尿液中存在升高水平的岩藻糖基化蛋白质来诊断岩藻糖苷酶 (Michalski. et al., Eur J Biochem. 201: 439-58, 1991)。

[0064] 在肝细胞癌中已检测到 α -L-岩藻糖苷酶的水平升高且已被提出为 HCC 的标志物 (Giardina. et al., Cancer 70:1044-48, 1992)。

[0065] 岩藻糖苷酶抑制剂

本公开内容提供干扰糖键的岩藻糖苷酶水解的酶促活性的化合物。化合物具有如式 I 中提供的结构：



其中：

X¹、X²和X³独立地选自OH、卤代和O(C)OCH₃；

R选自C₁₋₃烷基和C₁₋₃卤代烷基；

R¹选自H、C₁₋₃烷基、OH、-CO₂C₁₋₃烷基；

R²选自-NR^bC(O)R^a、-NR^bC(O)OR^a、-NR^bC(O)NR^cR^a、-NR^bC(O)SR^a、-C(O)R^a、和-C(O)NR^bR^a；

R^a为-C₀₋₃亚烷基-G；

G选自芳基、杂芳基、环烷基和杂环烷基；和

R^b和R^c独立地选自H和C₁₋₃烷基。

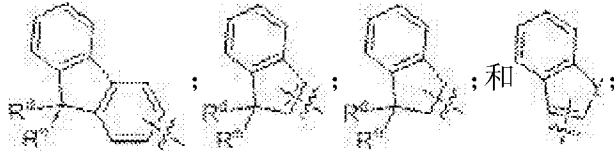
[0066] 在一些情况下，X¹、X²和X³为OH，R为甲基，和/或R¹为H。在一些情况下，R²为-NR^bC(O)R^a或-C(O)NR^bR^a。在一些情况下，R^b为H。

[0067] 适合的G基团包括(但不限于)任选取代的吡啶基、苯并噻吩基、茛基、茛基、二氢茛基和苯基。例如，G基团包括任选取代的苯基和



其中A为5-、6-、7-、8-、9-或10员碳环或杂环系统。

[0068] G基团也包括(但不限于):



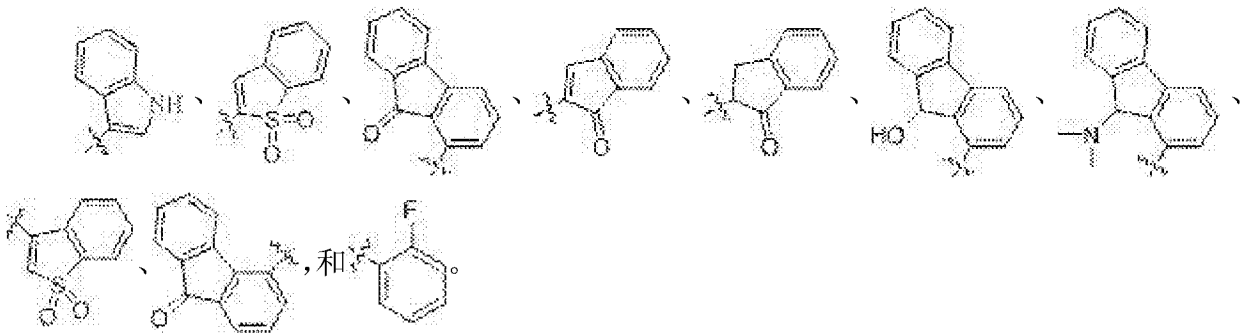
其中R^d和R^e独立地选自H、OR^f、NR^fR^g、C₁₋₃烷基和C₁₋₅环烷基;或

R^d和R^e与其所连接的碳原子结合在一起形成C=O;

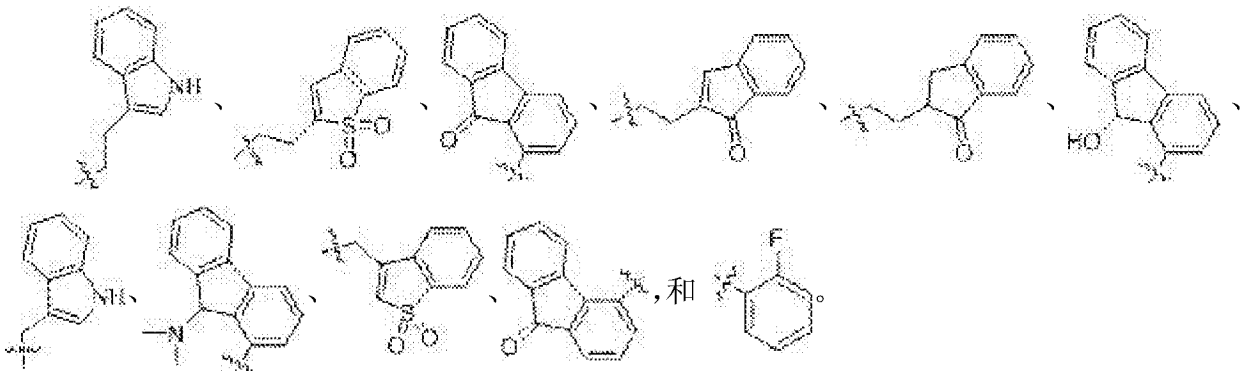
R^f和R^g独立地选自H和C₁₋₃烷基;和

Y选自NH、N-C₁₋₃烷基、S、SO、SO₂和O。

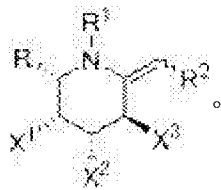
[0069] G基团的实例包括(但不限于)以下:



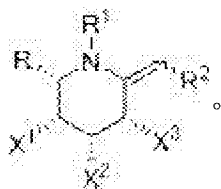
[0070] R^a基团的实例包括(但不限于)以下:



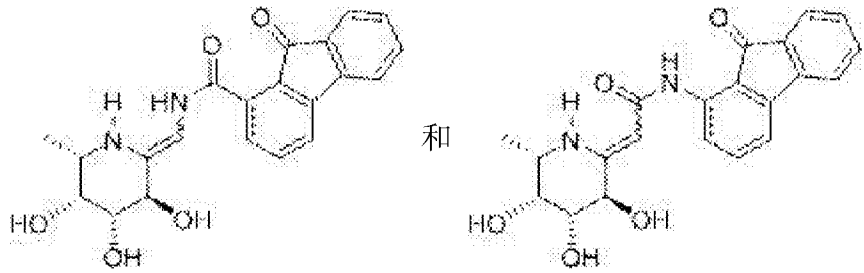
[0071] 在一些情况下,式I化合物具有以下结构:



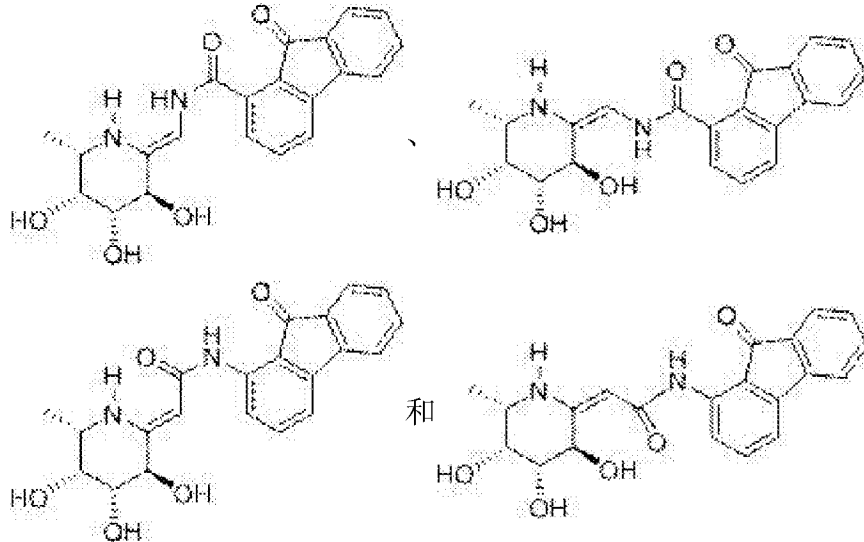
[0072] 在一些情况下,式I化合物具有以下结构:



[0073] 适合的化合物包括(但不限于):



[0074] 化合物的实例也包括(但不限于):



[0075] 使用方法、药用组合物和给药

可通过将化合物溶解、悬浮或乳化于含水或无水溶剂,例如植物油或其它类似油、合成脂肪酸甘油酯、高级脂肪酸的酯或丙二醇中;且如果需要,伴以常规添加剂,例如增溶剂、等渗剂、助悬剂、乳化剂、稳定剂和防腐剂来将所述化合物调配成供注射用的制剂。

[0076] 化合物可在经由吸入给药的气溶胶制剂中使用。本发明的化合物可调配成可接受的加压推进剂,例如二氯二氟甲烷、丙烷、氮气等。

[0077] 用于注射或静脉内给予的单位剂型可包含组合物中的化合物,所述组合物为在无菌水、无菌生理盐水或另一种药学上可接受的无菌载体中的溶液。

[0078] 在实际使用中,本文所述的化合物可作为活性成分根据常规医药混配技术与药用载体组合成紧密混合物。载体可取决于给药例如口服或胃肠外(包含静脉内)所需的制剂形式而采取多种形式。

[0079] 关于经皮给药途径,药物经皮给药的方法公开于Remington医药科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)(第17版, Gennaro. et al. 编辑, Mack Publishing Co., 1985)中。经皮或皮肤贴剂为一种可用于本发明方法的经皮递送化合物的手段。贴剂优选地提供例如DMSO的吸收增强剂以增加化合物的吸收率。用于经皮药物递送的其它方法公开于美国专利号5,962,012、6,261,595和6,261,595中。所述专利中的每一篇以全文引用的方式并入本文中。

[0080] 药学上可接受的赋形剂,例如溶媒、辅料、载体或稀释剂均可在市场上购得。此外,药学上可接受的辅助物质,例如pH调节剂和缓冲剂、张力调节剂、稳定剂、润湿剂等均可在市场上购得。

[0081] 技术人员应易于了解,剂量水平可随特定化合物的功能、症状的严重程度和受试者对副作用的易感性而变化。给定化合物的优选的剂量可易于由本领域技术人员通过多种方法确定,包括(但不限于)在患者、测试动物中和体外进行的剂量反应和药代动力学评估。

[0082] 在这些方面的每一个中,但在任何给定情况下的最适合的途径将部分取决于要治疗的病症的性质和严重程度和活性成分的性质,虽然组合物包括(但不限于)适合于口服、经直肠、局部、胃肠外(包括皮下、肌肉内和静脉内)、经肺(经鼻或经颊吸入)或经鼻给药的组合物。例示性给药途径为口服和静脉内途径。组合物可适宜地以单位剂型存在且通过药剂学领域中熟知的任何方法制备。

[0083] 可将本发明的组合物包囊于或附着至病毒包膜或囊泡或并入至细胞中来给予。囊泡是通常为球形且常呈脂质的胶束颗粒。脂质体为由双层膜形成的囊泡。适合的囊泡包括(但不限于)单层囊泡和多层脂质囊泡或脂质体。可使用标准技术(例如描述于例如美国专利号4,394,448中的那些)由广泛范围的脂质或磷脂化合物,例如卵磷脂、磷脂酸、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、鞘磷脂、糖脂、神经节苷脂等来制得这样的囊泡和脂质体。这样的囊泡或脂质体可用于以胞内方式给予化合物且将化合物递送至靶器官。也可使用包囊来达成目标组合物的控制释放(参见例如美国专利号5,186,941)。

[0084] 可使用将化合物递送至血流中的任何给药途径。优选地,以胃肠外形式给予组合物,最优选静脉内给予。在一些实施方案中,经由门静脉给予组合物。颈静脉内和颈动脉内注射也是有用的。可局部或区域性地给予组合物,例如腹膜内或皮下或肌肉内。在一个方面,与适合的医药稀释剂或载体给予组合物。

[0085] 待给予的剂量将取决于个体的需要、所需效果、所用活性剂和所选的给药途径。化合物的优选的剂量在约0.2 pmol/kg-约25 nmol/kg范围内,且特别优选的剂量在2-250 pmol/kg范围内;或者,化合物的优选的剂量可在0.02-2000 mg/kg或0.1-100 mg/kg范围内,例如1-1500 mg/kg、10-1000 mg/kg、25-500 mg/kg、50-250 mg/kg、75-200 mg/kg、50-150 mg/kg、60-130 mg/kg、70-110 mg/kg、75-100 mg/kg、80-95 mg/kg、85-90 mg/kg、100-250 mg/kg、120-230 mg/kg、130-220 mg/kg、140-210 mg/kg、150-200 mg/kg、160-190 mg/kg、170-180 mg/kg、约87.5 mg/kg或约175 mg/kg。

[0086] 本发明的化合物可用于对动物,例如哺乳动物中,且特别是对人类的治疗性、预防性和诊断性干预。

[0087] 发现本发明的方法可用于治疗多种不同疾病病症。可用本发明的化合物治疗的特定疾病病症会有所变化。因此,影响肝脏且可通过本发明的方法治疗的疾病病症包含细胞增殖性疾病,例如肿瘤疾病、自体免疫疾病、激素异常疾病、退行性疾病、老年疾病和可引起肝脏肿瘤生长的类似疾病。

[0088] 治疗意谓涵盖与化合物的给药相关的对受试者的任何有益结果,其包括降低获得疾病的可能性;预防疾病;减缓、遏止或逆转疾病的进展或改善与宿主罹患疾病病症的相关症状,其中改善或受益在广义上用于指至少降低参数(例如伴随经治疗的病理性病症的症状,例如炎症和与之伴随的疼痛)的量值。因此,治疗也包含以下情况:其中病理性病症或至少与其相关的症状得到完全抑制,例如防止发生或停止,例如终止,使得宿主不再患有病理性病症,或至少表征所述病理性病症的症状。

[0089] 癌症

本文预期岩藻糖苷酶的抑制剂可用于治疗经测定对用岩藻糖苷酶抑制剂治疗具有敏感性的癌症。预期本文的方法可用于鉴定对用岩藻糖苷酶抑制剂治疗具有抗性的癌症。例示性癌症包括(但不限于)肾上腺皮质癌、AIDS相关癌症、AIDS相关淋巴瘤、肛门癌、肛门直肠癌、肛管癌、附件癌、儿童小脑星形细胞瘤、儿童大脑星形细胞瘤、基底细胞癌、皮肤癌(非黑素瘤)、胆道癌、肝外胆管癌、肝内胆管癌、膀胱癌、泌尿膀胱癌、骨与关节癌、骨肉瘤和恶性纤维组织细胞瘤、脑癌、脑肿瘤、脑干神经胶质瘤、小脑星形细胞瘤、大脑星形细胞瘤/恶性神经胶质瘤、室管膜瘤、神经管胚细胞瘤、小脑幕上原始神经外胚层瘤、视觉路径和下丘脑神经胶质瘤(visual pathway and hypothalamic glioma)、乳腺癌(包含三阴性乳腺癌)、支气管腺瘤/类癌、类癌瘤、胃肠癌、神经系统癌、神经系统淋巴瘤、中枢神经系统癌、中枢神经系统淋巴瘤、宫颈癌、儿童癌症、慢性淋巴细胞白血病、慢性骨髓白血病、慢性骨髓增生性疾病、结肠癌、结肠直肠癌、皮肤T细胞淋巴瘤、淋巴赘瘤、蕈样真菌病、Seziary综合征(Seziary Syndrome)、子宫内膜癌、食道癌、颅外生殖细胞瘤、性腺外生殖细胞瘤、肝外胆管癌、眼癌、眼内黑素瘤、视网膜母细胞瘤、胆囊癌、胃癌(gastric/stomach cancer)、胃肠类癌瘤、胃肠道基质瘤(GIST)、生殖细胞瘤、卵巢生殖细胞瘤、妊娠期滋养细胞瘤神经胶质瘤、头颈癌、肝细胞(肝)癌、霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin lymphoma)、下咽癌、眼内黑素瘤、眼癌、胰岛细胞瘤(内分泌胰脏)、卡波济氏肉瘤(Kaposi Sarcoma)、肾脏癌、肾癌、喉癌、急性淋巴细胞白血病、急性骨髓性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、慢性骨髓性白血病、毛细胞白血病、唇癌和口腔癌、肝癌、肺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、AIDS相关淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(Waldenstram macroglobulinemia)、神经管胚细胞瘤、黑素瘤、眼内(眼)黑素瘤、默克尔细胞癌(merkel cell carcinoma)、恶性间皮瘤、间皮瘤、转移性鳞状颈癌、口癌、舌癌、多发性内分泌瘤综合征、蕈样真菌病、骨髓发育不良综合征、骨髓发育不良/骨髓增生性疾病、慢性骨髓性白血病、急性骨髓性白血病、多发性骨髓瘤、慢性骨髓增生性疾病、鼻咽癌、神经母细胞瘤、口部癌、口腔癌、口咽癌症、卵巢癌、卵巢上皮癌、低恶性潜能卵巢瘤、胰腺癌、胰岛细胞胰腺癌、鼻窦和鼻腔癌、副甲状腺癌、阴茎癌、咽部癌、嗜铬细胞瘤、松果体母细胞瘤和小脑幕上原始神经外胚层瘤、垂体瘤、浆细胞赘瘤/多发性骨髓瘤、胸膜肺母细胞瘤、前列腺癌、直肠癌、肾盂和输尿管癌、移行细胞癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、尤文氏家族肉瘤肿瘤(ewing family of sarcoma tumor)、软组织肉瘤、子宫癌、子宫肉瘤、皮肤癌(非黑素瘤)、皮肤癌(黑素瘤)、默克尔细胞皮肤癌、小肠癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃(stomach/gastric)癌、小脑幕上原始神经外胚层肿瘤、睪丸癌、咽喉癌、胸腺瘤、胸腺瘤和胸腺癌、甲状腺癌、肾盂与输尿管和其它泌尿器官的移行细胞癌、妊娠期滋养细胞瘤、尿道癌、子宫内膜子宫癌、子宫肉瘤、子宫体癌、阴道癌、外阴癌和威尔姆氏肿瘤(Wilm's Tumor)。在一些实施方案中,癌症选自黑素瘤、结肠直肠癌、胰腺癌、膀胱癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、卵巢癌和肺癌。

[0090] 在各个实施方案中,肿瘤或癌症为肝癌、乳癌、黑素瘤、肺癌、白血病、胰腺癌、胃癌、结肠直肠癌或头颈癌。

[0091] 肝病症

本发明所涵盖的肝疾病或肝病症包括(但不限于)下文所讨论的那些病症。肝细胞癌或肝细胞瘤为世界第五大最常见癌症且发病率一直在不断攀升。致癌肝细胞保留高水平的

LRP1表达。肝细胞癌对化学疗法反应不佳,因为肿瘤细胞显示高抗药性且因为所用化学疗法因全身性(静脉内)给药所致尤其在心脏和肾脏中具有严重毒性。

[0092] 肝炎为针对肝脏炎症的通用术语。肝炎可为急性或慢性的且包括急性或慢性肝衰竭,例如起因于病毒(例如,甲、乙、丙、丁或戊型肝炎或非甲乙丙丁戊型肝炎、CMV、厄泼斯坦-巴尔病毒(Epstein-Barr))、真菌、立克次体或寄生虫感染、酒精、化学毒素、药物(例如乙酰氨基苯酚、胺碘酮(aminodrone)、异烟肼、氟烷、氯丙嗪、红霉素)、代谢型肝病(例如,威尔逊氏病(Wilson's disease)、 α 1-抗胰蛋白酶缺乏)、癌症、特发性自体免疫肝病、肝硬化(例如原发性胆汁性肝硬化)、胆道阻塞。由甲、乙和/或丙型肝炎病毒导致的肝脏感染可引起缓慢进行性肝病,进而导致肝衰竭。急性肝炎感染最常由甲型肝炎所致。乙型肝炎和丙型肝炎感染可在体内持续且变成长期存在的感染(慢性)。丙型肝炎可导致包括肝硬化和癌症的重大病症。

[0093] 所涵盖的可使用本文所公开的化合物治疗的额外肝病或病况包括与肝脂织炎、胆汁郁积、肝硬化、中毒性肝损伤(例如,因药物毒性或环境毒性所致,例如黄霉素B1相关癌症)和遗传性血色素沉着症相关或由其引起的肿瘤。

[0094] 预期使本文所公开的化合物与第二种药物组合来进行对患有肝肿瘤的受试者的给药,所述第二种药物包括(但不限于)化学治疗剂、细胞毒性剂、放射性同位素、抗病毒剂、抗真菌剂、消炎剂、抗体和其它可用于治疗肝肿瘤或其它与肝肿瘤发展相关的肝病的疗法。

[0095] 用于与本文所公开的治疗肝癌的化合物组合向HCC患者给予的候选药物包括(但不限于):5-氟尿嘧啶、多柔比星(阿霉素)、丝裂霉素C、顺铂、表柔比星、道诺霉素、依托泊苷(etoposide)和表1中所列出的其它化学治疗剂、阿德福韦(adefovair)、拉米夫定(lamivudine)、恩替卡韦(entecavir)、利巴韦林(ribavirin)、干扰素 α 、聚乙二醇化干扰素 α -2a、干扰素 α -2b和其它抗病毒剂、维生素E、熊脱氧胆酸和其它用于治疗肝病药物的药物。其它药物显示于下表1中。

表 1

烷基化剂	天然产物
氮芥类	抗有丝分裂药物
氮芥	
环磷酰胺	
异环磷酰胺	紫杉烷
美法仑	紫杉醇
苯丁酸氮芥	长春花生物碱类(Vinca alkaloid)
	长春花碱(VLB)

亚硝基脲类	长春新碱
卡莫司汀(BCNU)	长春瑞滨(vinorelbine)
洛莫司汀(CCNU)	Taxotere® (多西他赛(docetaxel))
司莫司汀(semustine)(甲基-CCNU)	雌莫司汀(estramustine)
	磷酸雌莫司汀
乙烯亚胺/甲基-三聚氰胺	
三亚乙基三聚氰胺(TEM)	表鬼臼毒素(Epipodophylotoxin)
三亚乙基噻代磷酸胺	依托泊苷
(塞替派)	替尼泊苷(teniposide)
六甲三聚氰胺	
(HMM, 六甲蜜胺)	抗生素类
	放线菌素 D
磺酸烷基酯类	柔红霉素(红比霉素(rubido-mycin))
白消安	多柔比星(阿霉素(adria-mycin))
	米托蒽醌(mitoxantrone)/依达比星(idarubicin)
三嗪类	博来霉素
达卡巴嗪(DTIC)	普卡霉素(光辉霉素)
	丝裂霉素 C
抗代谢物	放线菌素
叶酸类似物	阿非迪霉素(aphidicolin)
氨甲喋呤	
曲美沙特(Trimetrexate)	酶
培美曲塞(Pemetrexed)	L-天冬酰胺酶
(多靶向抗叶酸物)	L-精氨酸酶
嘧啶类似物	放射增敏剂
5-氟尿嘧啶	甲硝哒唑
氟脱氧尿苷	米索硝唑(misonidazole)
吉西他滨	脱甲基米索硝唑
胞嘧啶阿拉伯糖苷	嘧莫硝唑(pimonidazole)
(AraC, 阿糖胞苷)	依他硝唑(etanidazole)
5-氮胞苷(azacytidine)	尼莫唑(nimodazole)
2,2'-二氟脱氧-胞苷	RSU 1069

嘌呤类似物	EO9
6-巯嘌呤	RB 6145
6-巯鸟嘌呤	SR4233
硫唑嘌呤(azathioprine)	烟酰胺
2'-脱氧助间型霉素	5-溴脱氧尿苷
(2'-deoxycoformycin)(喷司他汀)	5-碘脱氧尿苷
赤霉素-腺嘌呤(EHNA)	溴脱氧胞苷
磷酸氟达拉滨	
2-氟脱氧腺苷	
(克拉屈滨(cladribine), 2-CdA)	
I 型拓扑异构酶抑制剂	其它药物
喜树碱(camptothecin)	铂配位复合物
托泊替康(topotecan)	顺铂
伊立替康(irinotecan)	卡铂
	奥沙利铂
生物反应调节剂	葱醌
G-CSF	米托葱醌
GM-CSF	
	取代的脲
分化剂	羟基脲
视黄酸衍生物	
	甲基胍衍生物
激素和拮抗剂	N-甲基胍(MIH)
肾上腺皮质激素/拮抗剂	丙卡巴胍(procarbazine)
泼尼松(prednisone)和等效物	
地塞米松	肾上腺皮质激素抑制剂
氨鲁米特(ainoglutethimide)	米托坦(α, p' -DDD)
	氨鲁米特(ainoglutethimide)
孕酮类	
己酸羟基孕酮	细胞因子
醋酸甲羟孕酮	干扰素(α 、 β 、 γ)
醋酸甲地孕酮	介白素-2

雌激素	光敏剂
己烯雌酚(diethylstilbestrol)	血叶啉衍生物
炔雌醇/等效物	Photofrin®
	苯并叶啉衍生物
抗雌激素	Npe6
他莫昔芬(tamoxifen)	锡卟啉(tin etioporphyrin) (SnET2)
	苯博瑞德-a (pheoboride-a)
雄激素	细菌叶绿素-a
丙酸睾酮	酞菁(naphthalocyanines)
氟甲睾酮/等效物	酞菁
	酞菁锌
抗雄激素	
氟他胺(flutamide)	辐射
促性腺激素释放激素	X 射线
激素类似物	紫外光
亮丙立德(leuprolide)	γ 辐射
	可见光
非类固醇抗雄激素	红外辐射
氟他胺	微波辐射

[0096] 可用于治疗肿瘤的细胞毒性剂包括(但不限于)盐酸氮芥、环磷酰胺、异环磷酰胺、苯丁酸氮芥、美法仑、白消安、塞替派、卡莫司汀、洛莫司汀、达卡巴嗪和链佐星。

[0097] 可用于治疗肿瘤的放射性同位素包括(但不限于)¹³¹I、¹²⁵I、¹¹¹In、⁹⁰Y、⁶⁷Cu、¹²⁷Lu、²¹²Bi、²¹³Bi、²⁵⁵Fm、¹⁴⁹Tb、²²³Rd、²¹³Pb、²¹²Pb、²¹¹At、⁸⁹Sr、¹⁵³Sm、¹⁶⁶Ho、²²⁵Ac、¹⁸⁶Re、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga和^{99m}Tc。

[0098] 预期供用于方法中的抗体包含用于治疗癌症和其它病症的抗体,包括(但不限于)抗表皮生长因子受体(EGFR)(西妥昔单抗(cituximab)、帕尼单抗(panitumamab))、抗血小板衍生生长因子受体α(PDGFRα)、抗磷脂酰肌醇聚糖3(GPC3)和其它可用于治疗癌症或已转移至肝脏和身体其它部位的癌症的抗体。

[0099] 药剂盒

作为另外的方面,本发明包括药剂盒,所述药剂盒包含一或多种本文所述的化合物或组合物,以有助于其实践本发明方法的应用的方式封装。在一个实施方案中,这样一种药剂盒包含本文所述的化合物或组合物(例如,包含单独化合物或与第二种药物的组合的组合物),其封装在容器例如密封瓶或器皿中(容器上贴有标签),或包含于描述化合物或组合物在实践方法中的用途的包装中。优选地,以单位剂型包装化合物或组合物。药剂盒可进一步包含适合于根据特定给药途径给予组合物的装置。优选地,药剂盒含有描述组合物用途的标签。

[0100] 虽然已结合本公开内容的特定实施方案描述本发明,但先前的描述以及在其之后

的实施例意欲说明而非限制本公开内容的范围。在本公开内容的范围内的其它方面、优点以及修改对于本领域技术人员而言将是显而易见的。

实施例

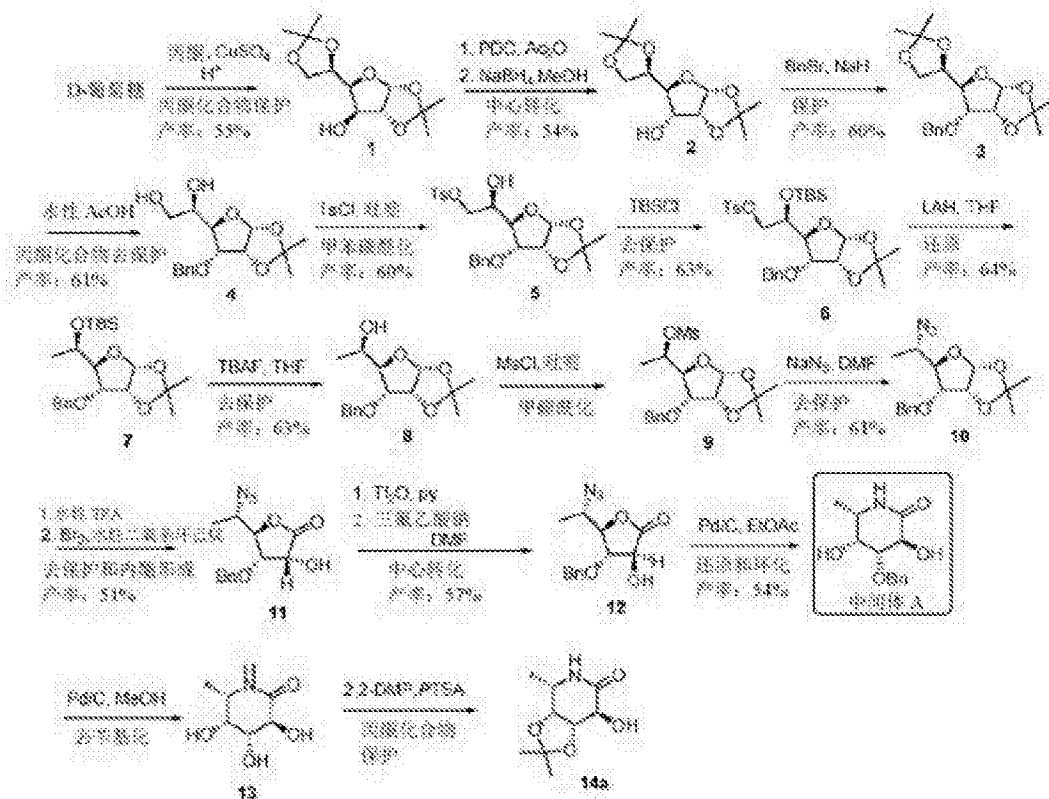
[0101] 实施例1

化合物的合成

可根据以下方法,使用对起始试剂的合适的修饰来制备本文所公开的化合物。鉴于以下讲述且使用典型的有机化学技术,本领域技术人员可合成如本文中公开的化合物。

[0102] 中间体A的合成:如流程1中所示由D-葡萄糖制备中间体A。

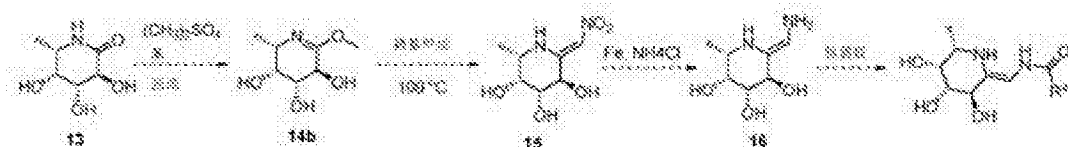
[0103] 流程1



中间体A的去苄化作用产生化合物13,其可转化为经保护的化合物14a。

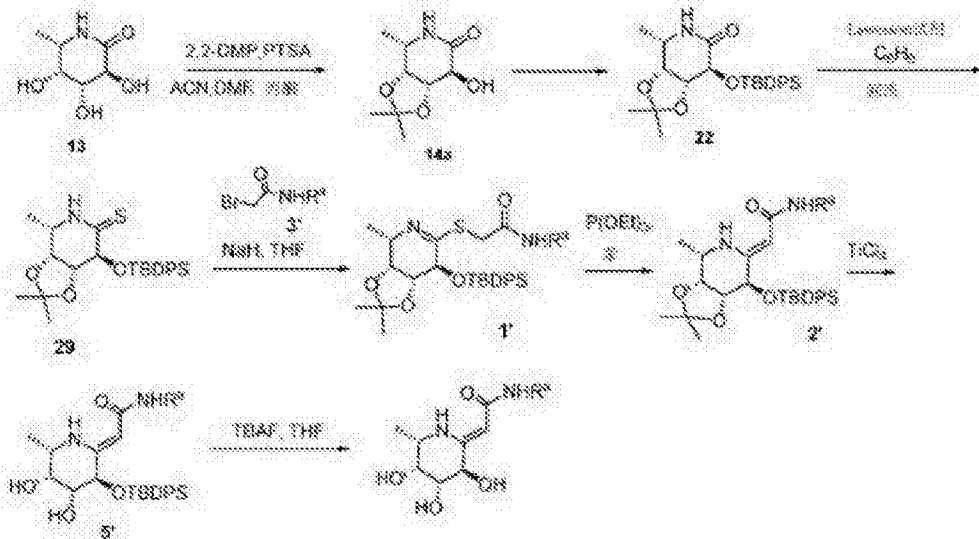
[0104] 式I化合物的合成:如流程2中所示,由化合物13通过转化成烯胺(化合物16),接着与合适的活性羧酸偶联来制备式I化合物。

[0105] 流程2



如流程3中所示,也由化合物13通过转化成硫代内酰胺(化合物29),接着与合适的 α -溴酰胺(化合物3')偶联且转化成式I化合物来制备式I化合物。

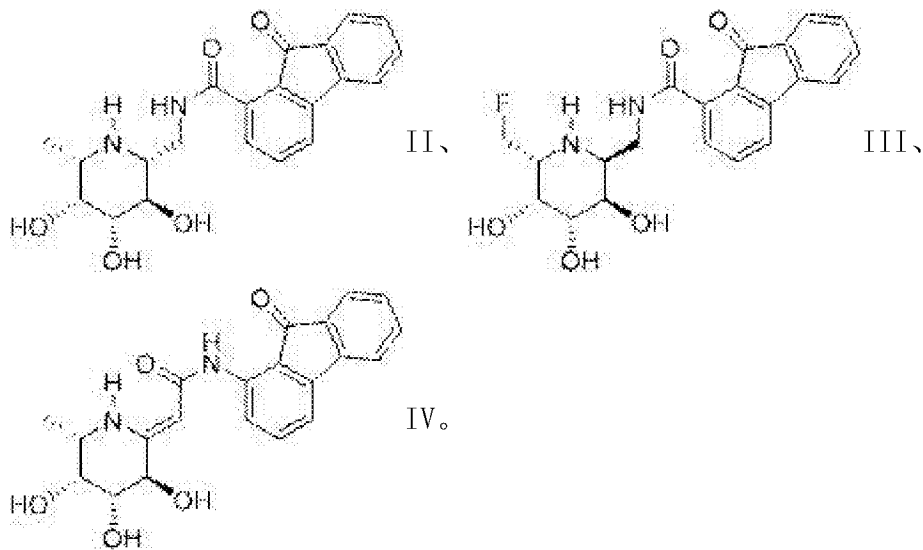
[0106] 流程3



实施例2

体外岩藻糖苷酶抑制

通过制备50 mM磷酸-柠檬酸(pH 4.5)、5 mM MgCl₂、640 nM 4-甲基伞形酮基(methylumbelliferyl)- α -L-岩藻吡喃糖苷(4MU-FUC)、1 ng/mL rhFUCAL (R&D Systems)和化合物II、III或IV的反应混合物来评价岩藻糖苷酶抑制作用:



[0107] 将反应(100 μ L)在37 $^{\circ}$ C下孵育30分钟,随后用600 mM的相同体积的柠檬酸-碳酸缓冲液(pH 9)猝灭。通过360 nm下的激发和450 nm下的发射来测量荧光。结果提供于表2中。

[0108] 表2

化合物	体外 IC ₅₀ (μ M)
II	0.016
III	0.059
IV	1.5

结果表明化合物II、III和IV有效抑制岩藻糖苷酶活性。

[0109] 实施例3

用经标记的岩藻糖进行代谢标记

通过使HepG2细胞在无岩藻糖苷酶抑制剂的情况下或在有化合物II、III或IV的情况下(参见实施例2)生长24小时,随后添加四乙酸(3S,4R,5R,6S)-6-乙炔基四氢-2H-吡喃-2,3,4,5-四酯、一种含有代替5'-甲基的炔烃部分的预乙酰化岩藻糖类似物(Click-iT™岩藻糖炔烃(Click-iT™岩藻糖 炔烃(Fucose Alkyne), Molecular Probes, Eugene, Oregon)生长另外48小时来测定糖蛋白代谢中的扰动。固定、渗透、洗涤细胞且用Alexa Fluor 488叠氮化物(Alexa Fluor 488 Azide)染色以正交标记结合岩藻糖类似物的糖蛋白。随后使用Guava 6HT-2L流式细胞仪(ThermoFisher)分析细胞的荧光。结果提供于图1和表3中,且表明用化合物II和IV处理后细胞中的岩藻糖基化物质的水平升高,其与岩藻糖苷酶抑制作用一致。结果也表明在用化合物III处理的细胞中岩藻糖基化物质的水平降低,表明岩藻糖基化可能受到抑制。此外,在使用健康纤维母细胞代替HepG2细胞的类似测定中,证明用化合物II处理对岩藻糖基化物质的水平的影响极小。

[0110] 表3

样本	绿色荧光均值(GRN-HLog)	相对于溶媒的倍数
溶媒((-)炔烃+叠氮化物)	2831	---
化合物 II	8433	2.98
化合物 IV	12900	4.56
化合物 III	1220	0.43

实施例4

HepG2细胞中的细胞毒性

为评价化合物在细胞中的细胞毒性,将HepG2细胞以 1.5×10^4 细胞/孔,按一式三份接种于最小必需培养基(Minimum Essential Media)、10% FBS和2 mM L-谷氨酰胺的96孔培养板中。使涂铺的细胞恢复48小时。随后用含有化合物II或IV的稀释液(参见实施例2)的相同培养基替换培养基,孵育24或48小时,且进行XTT测定以测量存活率(ATCC)。结果提供于图2和图3中且显示,相比于化合物II,化合物IV在较高抑制剂浓度下显示降低的细胞毒性。

[0111] 实施例5

化合物II的细胞毒性

多路复用细胞毒性测定:为评价化合物II(参见实施例2)在癌症和正常细胞中的细胞毒性,使细胞在RPMI1640、10% FBS、2 mM L-丙氨酸-L-谷氨酰胺、1 mM丙酮酸钠或在37°C下5% CO₂的潮湿氛围中的特定培养基中生长。在384孔培养板中接种细胞且在37°C下5% CO₂的潮湿氛围中孵育。在细胞接种之后24小时添加化合物II。同时,生成0时间未处理的细胞培养板。

[0112] 72小时培养期后,固定细胞且用经荧光标记的抗体和核染料染色,使得可对细胞核、凋亡细胞和有丝分裂细胞进行观测。使用抗活性半胱天冬酶-3抗体检测凋亡细胞。使用抗磷酸-组蛋白-3抗体检测有丝分裂细胞。

[0113] 使化合物II连续稀释3.16倍且测定超过9种浓度。使用GE Healthcare IN细胞分析仪1000 (GE Healthcare IN Cell Analyzer 1000)进行自动荧光显微术,且用4×物镜

收集影像。

[0114] 资料分析:使用InCell分析器1000 3.2获得十二位tiff影像且用Developer Toolbox 1.6软件加以分析。使用非线性回归将数据拟合至S形4点、4参数一个位点剂量反应模型(One-Site dose response model)来计算EC₅₀和IC₅₀值,其中:y (拟合) = A + [(B - A) / (1 + ((C/x) ^ D))].使用基于软件(AIM)的自定义数据简化引擎(custom data reduction engine) MathIQ进行曲线拟合、EC₅₀/IC₅₀计算且生成报告。

[0115] 多路复用细胞毒性测定使用基于细胞影像的分析技术,其中固定细胞且用经荧光标记的抗体和核染料染色,以观测细胞核和凋亡细胞和有丝分裂细胞。使用抗活性半胱天冬酶-3抗体检测凋亡细胞。使用抗磷酸-组蛋白-3抗体检测有丝分裂细胞。通过结合的核染料的信号强度来测量细胞增殖。细胞增殖测定结果称为相对细胞计数。为测定细胞增殖终点,使用下式将细胞增殖数据结果转变成对照百分比(POC):

$$POC = \text{相对细胞数(化合物孔)} / \text{相对细胞数(溶媒孔)} \times 100.$$

[0116] 相对细胞数IC₅₀为最大可能性反应的50%时的测试化合物浓度。相对细胞数EC₅₀为曲线拐点处或有效反应的一半时的测试化合物浓度(拟合曲线解(fitted curve solution)的参数C)。GI₅₀为降低一半所观测到的增长而所需的浓度。此为抑制在未处理细胞与接种于孔中的数量的细胞之间的生长中间位置的浓度(0时间值)。

[0117] 0时间未处理的培养板用于测定72小时测定时段内的加倍数量:72小时内的加倍数量 = LN[细胞数(72小时结束点) * 细胞数(0时间)] / LN(2)

各生物标记物的结果相对于标准化为各孔中的相对细胞数的溶媒背景成倍增加。

[0118] 激活的半胱天冬酶-3标记物标记早期至晚期凋亡的细胞。结果显示为凋亡细胞相对于标准化为各孔中的相对细胞数的溶媒背景成倍增加。引起半胱天冬酶-3信号的5倍诱导的测试化合物的浓度指示显著的凋亡诱导。浓度高于相对细胞数IC₉₅的孔自半胱天冬酶-3诱导分析消除。

[0119] 磷酸-组蛋白-3标记物标记有丝分裂细胞。结果显示为有丝分裂细胞相对于标准化为各孔中的相对细胞数的溶媒背景成倍诱导。当有丝分裂细胞信号相对于背景的诱导倍数为约1时,对于细胞周期“无影响”。磷酸-组蛋白-3信号相对于溶媒背景增加两倍或两倍以上指示显著测试化合物诱导的有丝分裂阻断。

[0120] 当细胞毒性水平低于所测量的相对细胞数IC₉₅时,磷酸-组蛋白-3信号减少一半或一半以上可仅表明G1/S阻断。当在高于相对细胞数IC₉₅的浓度下观测到磷酸-组蛋白-3信号减少一半或一半以上时,有丝分裂细胞数的减少最可能是由于较一般细胞毒性作用而非真正的G1/S期阻断所致。具有浓度高于相对细胞数IC₉₅的孔自磷酸-组蛋白-3分析消除。

[0121] 这些研究的结果提供于下表4中且显示抑制细胞中的溶酶体岩藻糖苷酶的化合物II对多种肿瘤细胞系,包括结肠和前列腺细胞系具有毒性。结果也表明化合物II诱导一些正常(非肿瘤)原始细胞系的生长停滞但并不会杀死它们。

[0122]

表4

组织	类型	细胞系	细胞毒性 EC ₅₀ (μM)	G1/S 停滞 (μM)	主要作用
结缔组织	肉瘤	HT-1080	21	78	细胞凋亡
肺	癌	A549	29	21	细胞凋亡
结肠	癌	HT-29	31	无	细胞凋亡
脑	母细胞瘤	U-87 MG	34	26	生长停滞
胰腺	癌	BxPC-3	43	55	生长停滞
肝	癌	HepG2	44	36	细胞凋亡
乳腺	癌	MDA-MB-231	44	无	
子宫颈	癌	HeLa	47	70	
前列腺	癌	LNCaP	54	无	细胞凋亡
血液	白血病	K562	98	93	生长停滞
肝	癌	SNU-423	>100	无	生长停滞
卵巢	癌	SKOV3	>100	98	生长停滞
间质干细胞	正常	HUMSC	9	10	生长停滞
内皮	正常	HUVEC	14	14	生长停滞
皮肤	正常	NHDF	22	14	生长停滞
肾脏	正常	HRPTEpiC	72	10	生长停滞
初级肝细胞	正常	HPH	>100	-	无作用

实施例6

化合物II的药代动力学和生物分布

为评价化合物II（参见实施例2）在小鼠血浆中的药代动力学，以1 mg/kg的剂量静脉内给予化合物II。在给药后不同时间点至24小时时测量化合物II浓度，且结果提供于表5中。

[0123] 表5

组 ID	动物 ID	治疗	溶液	途径	疗程	时间(h)	化合物 II 浓度(ng/ml)	均值(ng/ml)
1	1	化合物 II	PBS	IV	1mg/kg qd×1	给药前	BQL	---
1	2						BQL	
1	3						BQL	
1	1	化合物 II	PBS	IV	1mg/kg qd×1	0.0833	259	273
1	2						247	
1	3						313	
1	1	化合物 II	PBS	IV	1mg/kg qd×1	1	28.7	31.6
1	2						31.8	
1	3						34.3	
1	4	化合物 II	PBS	IV	1mg/kg qd×1	2	8.58	7.84
1	5						5.83	
1	6						9.10	
1	4	化合物 II	PBS	IV	1mg/kg qd×1	4	2.76	2.66
1	5						1.86	
1	6						3.36	
1	4	化合物 II	PBS	IV	1mg/kg qd×1	8	1.56	1.43
1	5						1.17	
1	6						1.57	
2	7	化合物 II	PBS	IV	1mg/kg qd×1	12	1.04	1.38
2	8						1.06	
2	9						2.04	
2	10	化合物 II	PBS	IV	1mg/kg qd×1	24	BQL	---
2	11						BQL	
2	12						BQL	

BQL = 低于定量限 < 1.0 ng/ml

--- = 不适用

为评价化合物II (参见实施例2) 在小鼠肝脏和结肠中的生物分布, 以1 mg/kg的剂量静脉内给予化合物II。在给药后1小时和8小时时测量化合物II浓度, 且结果提供于表6和表7中。

[0124] 表6

化合物II在肝脏中的浓度

组 ID	动物 ID	治疗	溶液	途径	疗程	时间(h)	化合物 II 浓度(ng/g)	均值(ng/g)
1	1	化合物 II	PBS	IV	1mg/kg qd×1	1	188	262
1	2						298	
1	3						301	
1	4	化合物 II	PBS	IV	1mg/kg qd×1	8	9.03	9.86
1	5						7.64	
1	6						12.9	

表7

化合物II在结肠中的浓度

组 ID	动物 ID	治疗	溶媒	途径	疗程	时间 (h)	化合物 II 浓度 (ng/g)	均值 (ng/g)
1	1	化合物 II	PBS	IV	1mg/kg qd×1	1	1930	1780
1	2						1770	
1	3						1640	
1	4	化合物 II	PBS	IV	1mg/kg qd×1	8	638	600
1	5						289	
1	6						872	

这些结果表明岩藻糖苷酶抑制剂自小鼠血浆的快速清除,但反映化合物在组织,尤其在结肠中的分布。

[0125] 实施例7

人类肝细胞癌的原位模型中的体内功效

为评价体内的化合物,使用人类肝细胞癌的原位模型。原位肿瘤模型由将人类肝癌细胞系HepG2植入裸鼠中产生且使肿瘤细胞在体内生长来生成。

[0126] 使用10只小鼠/组和两个剂量疗程进行功效研究。以175 mg/kg的剂量每日一次持续3周(QD×21),或以87.5 mg/kg的剂量每日两次持续3周(BID×21)通过口服管饲(po)给予化合物II(参见实施例2)。向对照动物给予溶媒(100 μL)。

[0127] 随后评价动物的体重和肿瘤体积的变化,且结果提供于表8和表9中。

[0128] 表8

肿瘤体积 (mm³)

剂量 (mg/kg)	0天	第2天	第5天	第9天	第12天	第16天	第20天
0	212	245	276	333	377	443	483
87.5	212	224	227	247	270	326	320
175	211	238	277	320	348	364	416

表9

体重 (g)

剂量 (mg/kg)	0天	第2天	第5天	第9天	第12天	第16天	第20天
0	22.23	22.35	21.97	21.74	22.2	20.63	20.4
87.5	22.45	22.05	21.93	21.58	21.51	20.39	20.86
175	22.93	22.94	22.28	22.1	22.26	20.58	19.98

化合物II在两种给药疗程的动物模型中均显示出肿瘤体积有效减小,其中87.5 mg/kg每日两次剂量观测到较多的减小。这些数据支持岩藻糖苷酶抑制剂对于靶向患有肝癌或其它肝脏病症的病人中的肿瘤细胞的适用性。

[0129] 实施例8

化合物的表征

除了上述实施例以外,也可通过本领域内已知的其它测定,包括(但不限于)下文所述的测定来测量本文中化合物的活性。

[0130] HepG2细胞中的生物化学功效:最初衍生自HCC肿瘤的HepG2细胞会产生超岩藻糖基化的糖蛋白。为评价化合物在肝细胞中的生物化学功效,使用标准条件培养HepG2细胞且在多孔板中仅用缓冲液、一或多种已知的岩藻糖苷酶抑制剂或测试化合物进行孵育。隔夜孵育后,用冷PBS冲洗细胞且通过在50 mM柠檬酸钠(pH 4.8)中冻融来使其裂解。通过离心澄清细胞裂解物且根据制造商协议,使用4-甲基伞形酮基- α -L-岩藻糖测定(可购自Sigma-Aldrich,参照PMID 2137330)测定岩藻糖苷酶活性。也使用标准程序测定 β -葡糖醛酸酶水平以对细胞数目和溶酶体功能进行标准化。

[0131] HepG2细胞中的功能性功效研究:在12孔板中以 1×10^5 细胞/孔接种HepG2细胞且使其恢复24小时。随后将细胞与测试化合物一起培养72小时。随后通过MTT增殖测定来评价细胞状态。

[0132] 预期抑制HepG2细胞中的岩藻糖苷酶活性将引起岩藻糖基化蛋白质在细胞中的积聚,导致细胞死亡或至少减缓或终止细胞增殖。

[0133] 原位肿瘤异种移植物模型中的功能性功效:在如先前所述(Ong, L.C. et al., Mol. Imaging Biol. 11:334-42 (2009); Aihara, A. et al., J. Hepatol. 52:63-71 (2010))的原位肝内异种移植物模型中测定化合物的功效。简言之,用合适麻醉剂,例如氯胺酮(ketamine)、安定或其组合来麻醉6-8周的重度联合免疫缺乏(SCID)小鼠,且通过中线切开腹部进行上中线剖腹术来暴露小鼠的门静脉。随后使用规格为30的针头在一分钟过程中将 10^6 HepG2细胞的悬浮液注射至门静脉中。随后缝合切口且使动物保持温暖直至完全苏醒。

[0134] 为测量化合物治疗的功效,使用合适的放射性标记的药物,例如2-脱氧-2-(F-18)-氟-D-葡萄糖(^{18}F -FDG)进行正电子发射断层摄影术(PET)(Ong, L.C. et al., Mol. Imaging Biol. 11:334-42 (2009))以经由无创法追踪HepG2诱发的肿瘤在经治疗和对照小鼠中的进展。也在体内通过在治疗和对照动物中肿瘤区域的组织学分析来测量化合物治疗的功效。

[0135] 也在原位肿瘤模型中测定溶酶体储积病指标,包含溶酶体、尿液和血液中的粘多糖(GAG)水平的测量。

[0136] 预期相比于未接受化合物的受试者,给予化合物将减小肿瘤尺寸或减缓肿瘤生长的进展。也预期如通过GAG测定所测量的,给予化合物将增加摄取化合物的细胞的溶酶体中岩藻糖基化蛋白质的水平。

[0137] 实施例9

化合物的表征

除了上述实施例以外,也可通过本领域内已知的其它动物模型,包括(但不限于)下文所述的动物模型来测量本文的化合物的体内活性。

[0138] 皮下肿瘤异种移植物模型中的功能性功效:在皮下异种移植物模型中测定化合物的功效。可使用6-8周的重度联合免疫缺乏(SCID)小鼠,通过用合适麻醉剂,例如氯胺酮、安定或其组合麻醉,且随后用合适的以下细胞的悬浮液注射来获得适合的皮下异种移植物模型:例如针对肝细胞癌的Huh-7、SK-Hep1、HA22T/VGH或PLC/PRF/5细胞;针对乳癌的BT-474、MDA-MB-453、MCF-7或MDA-MB-231细胞;针对肺癌的NCI-H460、A549、NCI-1703或NCI-H226细胞;针对胃癌的SNU-1、NCI-N87、TMC-1、TSGH或TSGH-S3细胞;针对急性骨髓白血病的

MV4-11、RS4-11或MOLM-13细胞;针对结肠癌的COLO 205或HT-29细胞;针对鼻癌的RPMI2650细胞;针对胰腺癌的PANC1或MIA-PaCa 2细胞;针对头颈癌的RPMI-2650、Detroit 562、FaDu或HSC -3细胞;和针对甲状腺癌的TT细胞。随后缝合切口且使动物保持温暖直至完全苏醒。

[0139] 为测量化合物治疗的功效,使用合适的放射性标记的药物,例如2-脱氧-2- (F-18)-氟-D-葡萄糖 (^{18}F -FDG) 进行正电子发射断层摄影术(PET) (Ong, L.C.. et al., Mol. Imaging Biol. 11:334-42 (2009)),以经由无创法追踪经诱发的肿瘤在治疗和对照小鼠中的进展。也在体内通过治疗和对照动物中肿瘤区域的组织学分析来测量化合物治疗的功效。

[0140] 也在皮下肿瘤模型中测定溶酶体储积病指标,包含溶酶体、尿液和血液中的粘多糖(GAG)水平的测量。

[0141] 预期相比于未接受化合物的受试者,给予化合物将减小肿瘤尺寸或减缓肿瘤生长的进展。也预期如通过GAG测定所测量的,给予化合物将增加摄取化合物的细胞的溶酶体中岩藻糖基化蛋白质的水平。

[0142] 原位肿瘤异种移植模型中的功能性功效:在原位异种移植模型中测定化合物的功效。可使用6-8周的重度联合免疫缺乏(SCID)小鼠,通过用合适麻醉剂,例如氯胺酮、安定或其组合麻醉,且随后用合适的以下细胞的悬浮液注射来获得适合的原位异种移植模型:例如针对肝细胞癌的Huh-7、PLC/PRF/5或BNL 1ME A.7R.1-luc细胞;源自患者(例如,针对源自患者的异种移植(PDX)模型的肝细胞癌患者)的细胞;针对头颈癌的Detroit 562或HSC-3细胞;和针对黑素瘤的B16-F10细胞。随后缝合切口且使动物保持温暖直至完全苏醒。

[0143] 此外,可通过在有免疫能力的同基因型C57BL/6小鼠后脚掌中接种B16-F10-luc2鼠黑素瘤细胞来获得黑素瘤的自发性淋巴型癌转移模型。

[0144] 为测量化合物治疗的功效,使用合适的放射性标记的药物,例如2-脱氧-2- (F-18)-氟-D-葡萄糖 (^{18}F -FDG) 进行正电子发射断层摄影术(PET) (Ong, L.C.. et al., Mol. Imaging Biol. 11:334-42 (2009)),以经由无创法追踪诱发的肿瘤在治疗和对照小鼠中的进展。也在体内通过治疗和对照动物中肿瘤区域的组织学分析来测量化合物治疗的功效。

[0145] 也在皮下肿瘤模型中测定溶酶体储积病指标,包含溶酶体、尿液和血液中的粘多糖(GAG)水平的测量。

[0146] 预期相比于未接受化合物的受试者,给予化合物将减小肿瘤尺寸或减缓肿瘤生长的进展。也预期如通过GAG测定所测量的,给予化合物将增加摄取化合物的细胞的溶酶体中岩藻糖基化蛋白质的水平。

[0147] 实施例10

化合物的体内给予

HCC为经诊断的第5大最常见恶性肿瘤,且全世界每年造成接近500,000人死亡。手术移除、移植和物理破坏肿瘤组织为治疗的第一选择,但仅5%至10%的表现患有肿瘤的患者适用于这些方法(Ribero, D.. et al., Expert Rev. Anticancer Ther. 6:567-579 (2006); Lau, W. Y.. et al., J. Am. Coll. Surg. 202:155-168 (2006); Lin, X. D. . et al., Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int. 5:16-21 (2006))。此外,全身性化学疗法得

到15%至20%的低反应率,二者均因为化学治疗剂的毒性和肿瘤细胞抗性(Chan, J. Y.. et al., *Life Sci.* 67:2117-2124 (2000); Plosker, G. L.. et al., *Drugs* 45:788-856 (1993))。

[0148] 例如,多柔比星为高效对抗多种肿瘤的癌症化学治疗剂,且尤其对经历快速生长的细胞,包括肿瘤细胞具有毒性。然而,显著的肝脏和心脏毒性和血液细胞生成的遏制会限制多柔比星在治疗肝细胞癌中的应用(Danesi, R.. et al., *Clin. Pharmacokinet.* 41: 431-444 (2002))。此外,肝细胞癌细胞显示出转化为抗药型的高比率(Hu, Y.. et al., *Int. J. Oncol.* 25:1357-1364 (2004))。

[0149] 一种对疗法的替代方法利用放射。例如,当前正处于测试中的新型肝癌治疗涉及将已用放射性物质(⁹⁰Y)标记的微观玻璃珠注射至肝脏主动脉中,所述放射性物质自主动脉传送到灌注肿瘤组织的小血管中。放射随后破坏肿瘤组织。然而,血液自肝动脉至肺部的显著分流会妨碍玻璃珠在许多患者中的使用。玻璃珠的显著回流进入喂给胃肠道的动脉中也可引起严重副作用。因此,对肿瘤组织的疗法的有效递送需要一种较具指向性的方法,所述方法不会依赖于将在血管中受到截留的大物质。

[0150] 为评价体内的化合物,使用人类肝细胞癌的原位模型。

[0151] 为在动物中生成原位肿瘤,将人类肝癌细胞系植入裸鼠、大鼠或其它合适动物中且使肿瘤细胞在体内生长。可用于原位模型的HCC细胞系包括(但不限于)上述那些细胞系,例如Hep3B、HepG2、SK-Hep1、HA22T/VGH、PLC/PRF/5和Huh-7。HCC的原位肿瘤模型为本领域中已知的且描述于例如Okubo. et al. (*J Gastroenterol Hepatol.* 2007 22:423-8); Armengol. et al. (*Clin Cancer Res.* 2004 10:2150-7);和Yao. et al. (*Clin Cancer Res.* 2003 9:2719-26)中。

[0152] 为首先确立体内给予化合物和对照品的剂量范围,使用接受化合物(例如,至多200毫克/公斤/天)的5只小鼠/组进行小剂量范围研究。每日或者静脉内或者腹膜内给予测试药剂,持续两周(QD×14)且在研究终点测试受试动物的体重、任何临床观测和临床病理学和组织病理组织学的变化。

[0153] 为进行功效研究,使用8至10只小鼠/组,且向接受人类HCC细胞的动物和对照动物给予3个测试剂量范围的上述化合物。或者静脉内或者腹膜内给予测试药物且以合适频率,例如每日一次持续4周(QD×28)、每日一次持续3周(QD×21)或每日一次持续2周(QD×14)给予。随后使用本领域中已知的技术来评价受试动物的体重、临床观测和体内功效测量(例如肿瘤体积)、肝脏病理组织学和一般临床病理学的任何变化。

[0154] 化合物在体内降低肝细胞癌细胞的生长的能力表明,化合物有效递送至肝脏细胞中而导致可测量的生物学作用。动物模型中的有效肿瘤死亡的论证表明化合物有效靶向患有肝癌或其它肝脏病症的病人中的肿瘤细胞。

[0155] 针对测试治疗剂的生物分布和疗法功效的另一肝细胞癌(HCC)相关动物模型为土拨鼠肝炎病毒(WHV)感染的东部土拨鼠(Tennant, B. C.. et al., *Gastroenterology* 127:S283-293 (2004))。几乎所有在新生时就已感染病毒的土拨鼠在24个月的中值时间间隔内便患上HCC。中值预期寿命为30个月,然而经WHV感染的土拨鼠并未患有肝硬化(一种存在于大部分HCC患者中的病症)。土拨鼠肝炎病毒与人类B型肝炎病毒在结构、遗传学、传送方法、感染过程和发展至肝细胞癌方面是相似的。在强调此模型的重要性方面存在明显的

相似性。与人类相似,暴露于肝炎病毒的所有土拨鼠的一半以上在出生不久后便患上慢性感染,且几乎所有慢性感染的土拨鼠在暴露后大约20至28个月便患上肝细胞癌。其余经接种的新生土拨鼠通常患有急性肝炎,但将产生对于病毒的抗体且恢复。17%与25%之间的这些“恢复”的动物在暴露后29至56个月之间患上HCC。自肝炎感染明显恢复后患上HCC也发现于人类中。

[0156] 为测定化合物对肝肿瘤细胞的有效性,在土拨鼠HCC模型中研究对照和测试化合物的摄取和毒性。在一个实施方案中,使用大约1.5至2岁的六只经慢性感染的土拨鼠和四只未感染的土拨鼠。

[0157] 有用的化合物将通常显示出以下特征:1) 不会对已受损的肝脏功能造成不利影响,2) 肝脏和恶性肝脏组织进行可测量的摄取,3) 且当摄取时,对肿瘤细胞具有毒性且引起肿瘤消退。

[0158] 也在肿瘤模型中测定溶酶体储积病指标,包含溶酶体、尿液和血液中的寡糖水平的测量。

[0159] 如上述例示性实施例中所阐述的本发明中的许多修饰和变化预期为本领域技术人员所想到的。因此,本发明应仅受如所附权利要求书中所呈现的此类限制的限定。

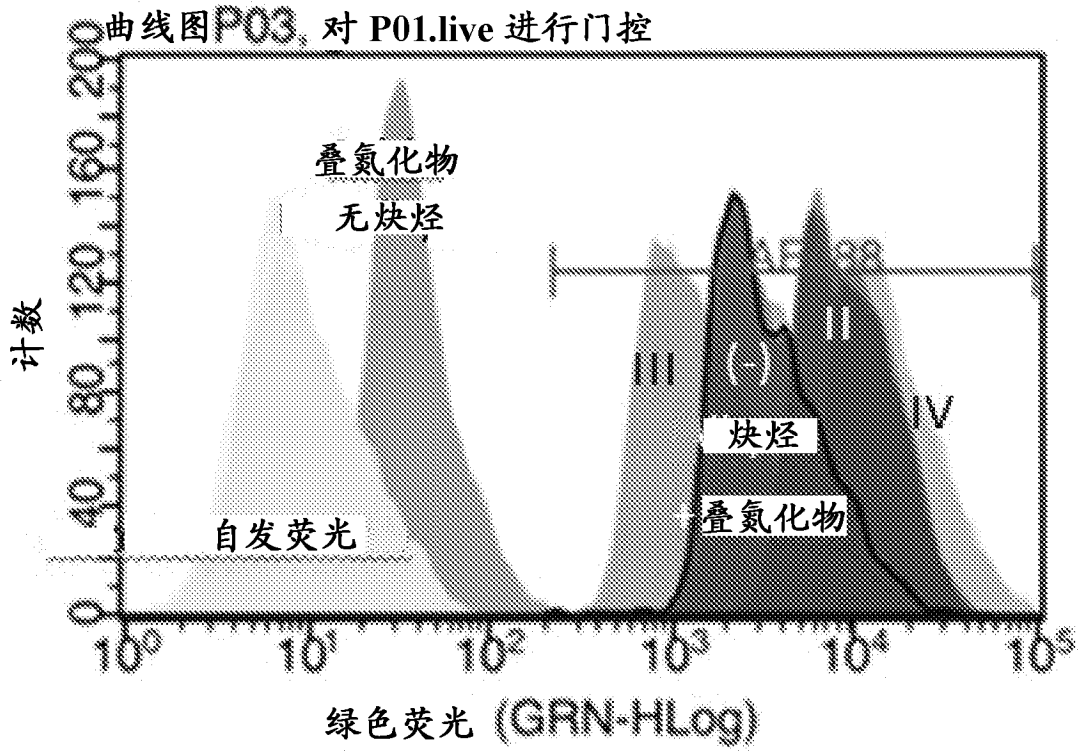


图 1

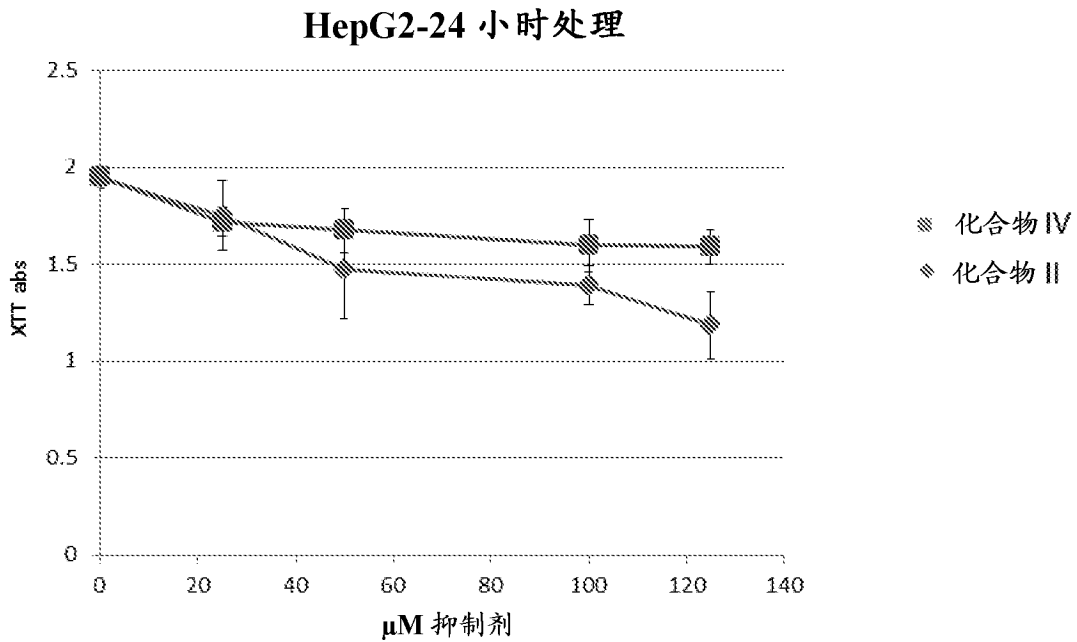


图 2

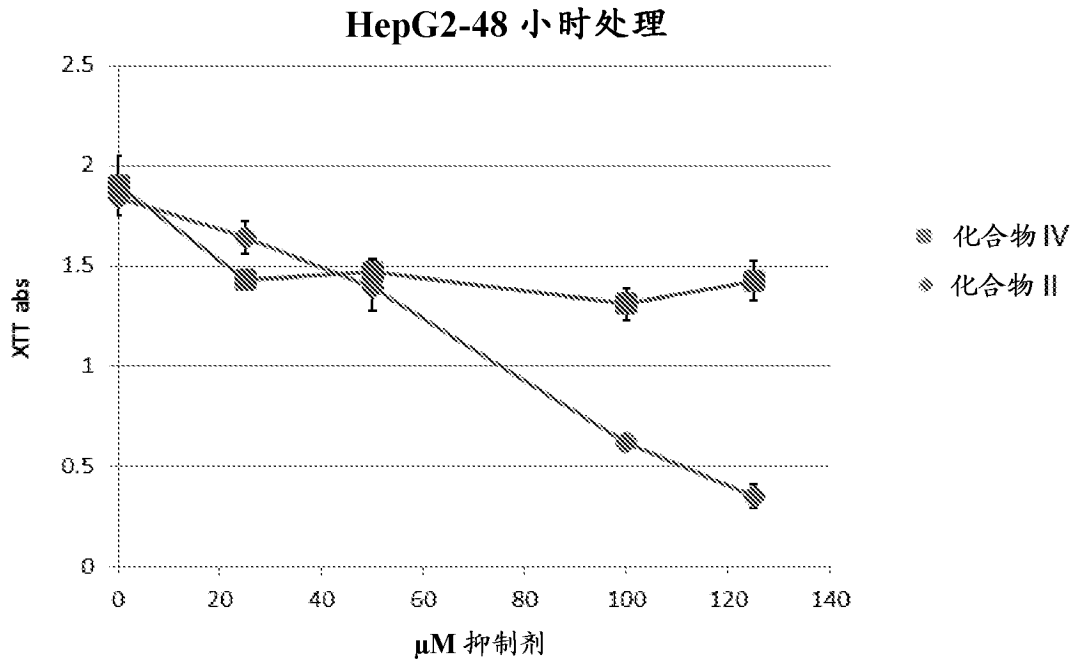


图 3