



(21) 申請案號：107138334

(22) 申請日：中華民國 107 (2018) 年 10 月 30 日

(51) Int. Cl. :

*A61K31/4745 (2006.01)**A61K31/517 (2006.01)**A61K31/555 (2006.01)**A61K45/06 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)**C07D471/14 (2006.01)**C07F15/02 (2006.01)*

(30) 優先權：2017/10/30

美國

62/578,938

(71) 申請人：加拿大商艾普托斯生物科學公司 (加拿大) APTOSE BIOSCIENCES INC. (CA)
加拿大(72) 發明人：萊斯 威廉 G RICE, WILLIAM G. (US) ; 荷威爾 史蒂芬 HOWELL, STEPHEN
(US) ; 蔡 正昱 TSAI, CHENG-YU (US)

(74) 代理人：陳長文

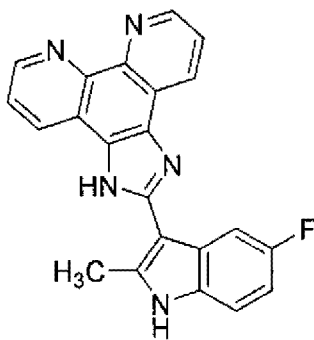
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：35 項 圖式數：22 共 117 頁

(54) 名稱

用於治療癌症之芳基咪唑

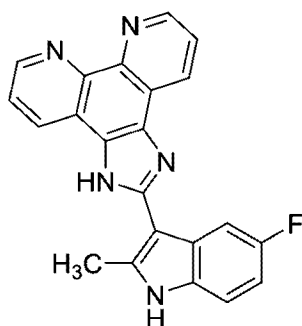
(57) 摘要

本發明係關於一種預防、減小或治療個體之癌症的方法，其包含向該個體投與治療有效量之



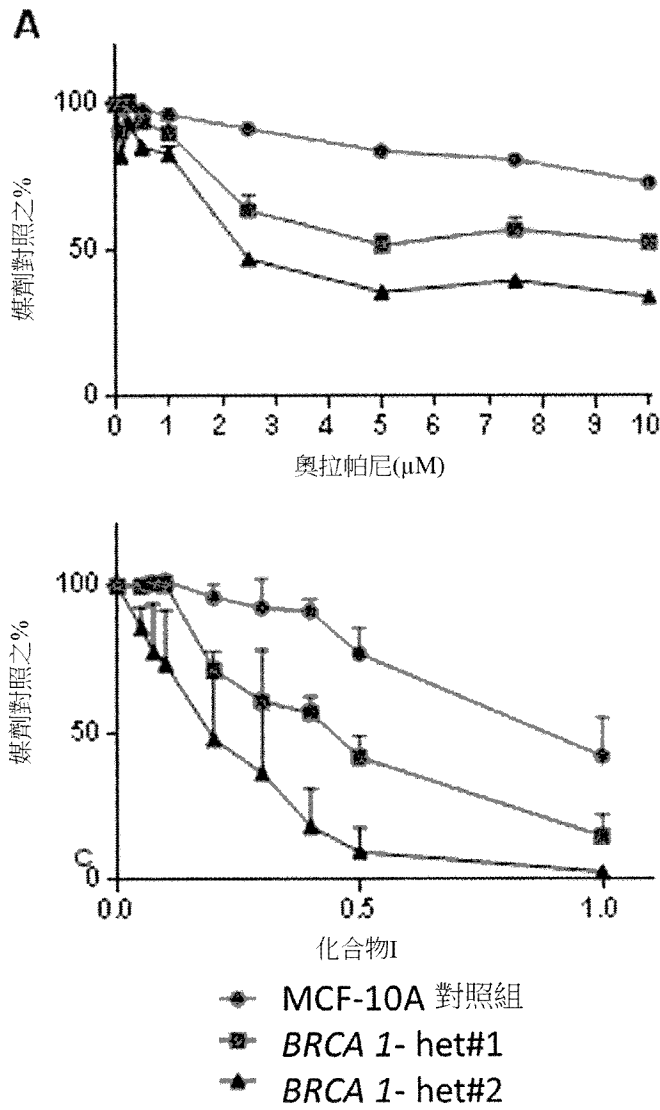
或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、錯合物或螯合物(包括金屬螯合物，諸如鐵、鋅及其他金屬)，其中該個體 DNA 修復基因具有突變。

The present invention relates to a method of preventing, reducing, or treating cancer in a subject, comprising administering a therapeutically effective amount of

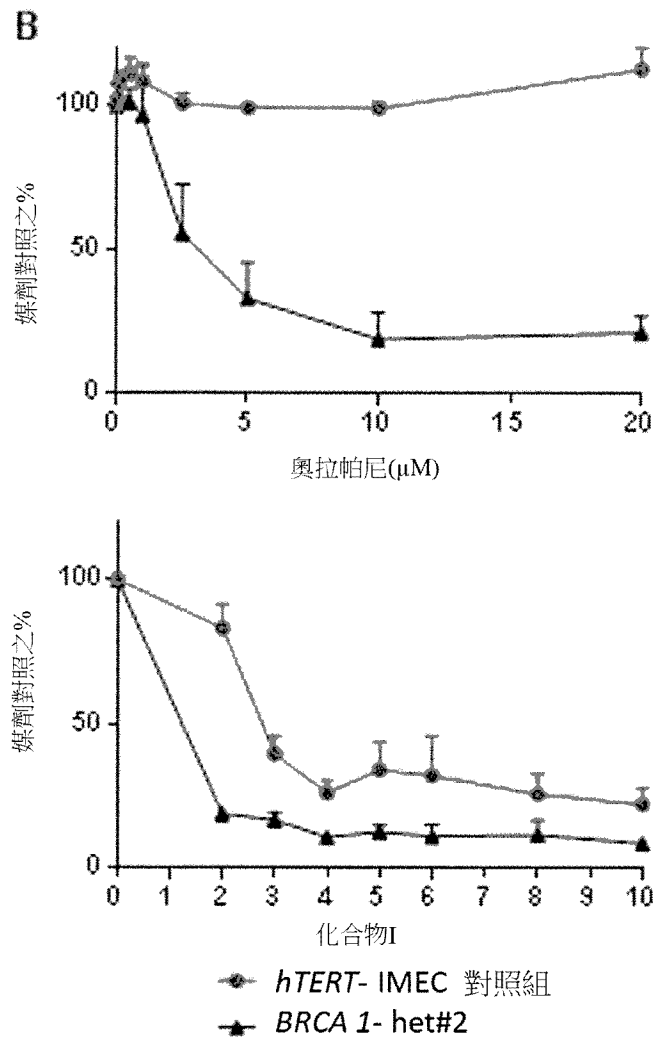


or a pharmaceutically acceptable salt, free base, hydrate, complex, or chelate (including metal chelates, such as iron, zinc and others) thereof to the subject, wherein the subject has a mutation in a DNA repair gene.

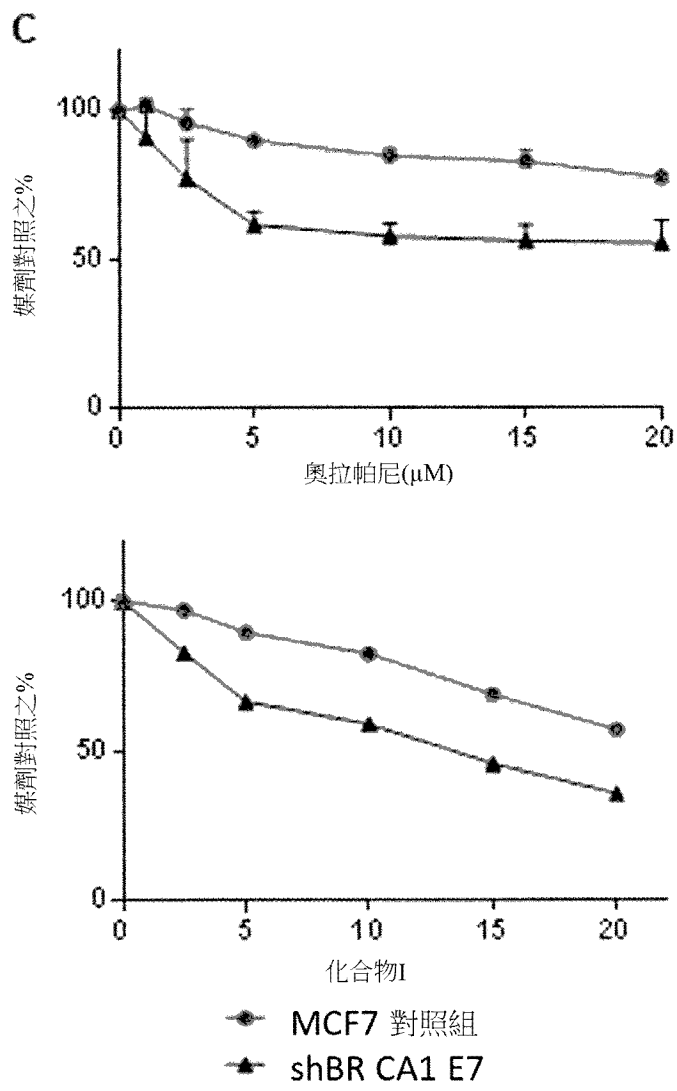
指定代表圖：



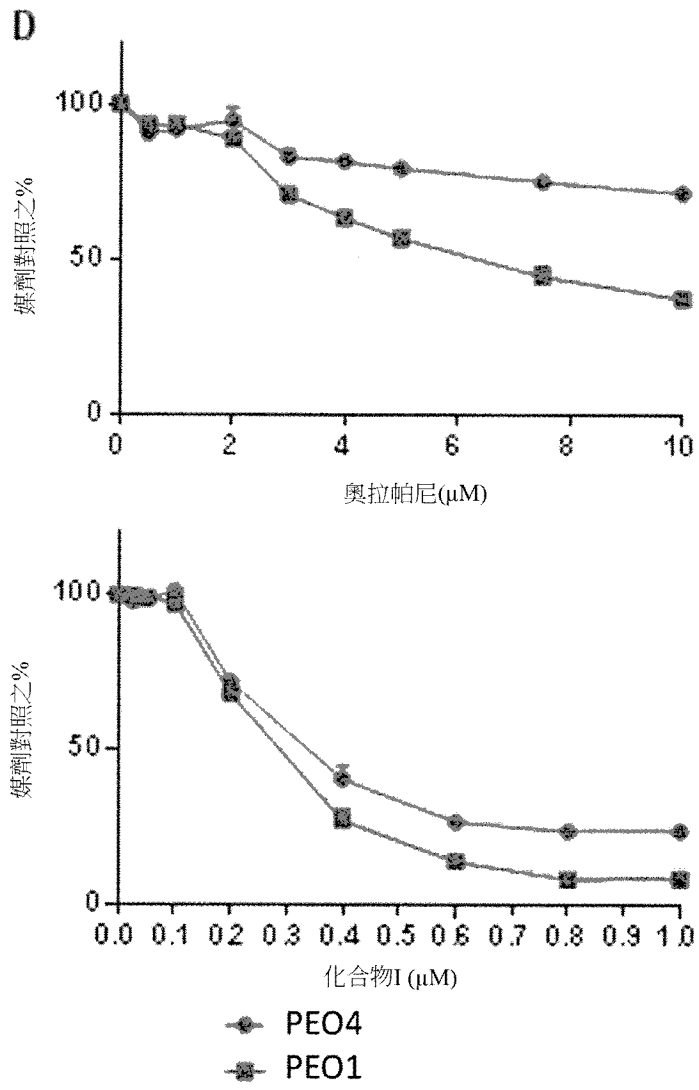
【圖3】



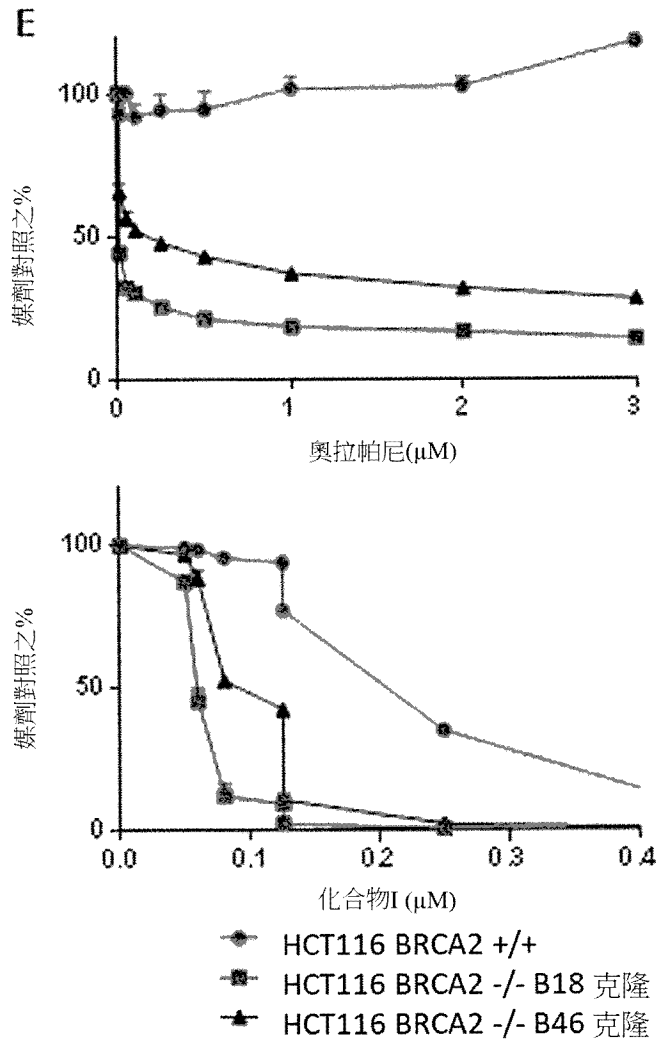
【圖3】(續)



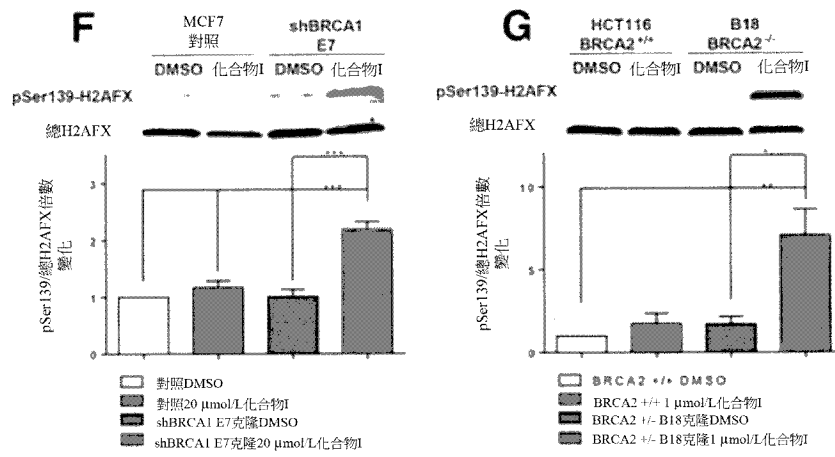
【圖3】(續)



【圖3】(續)

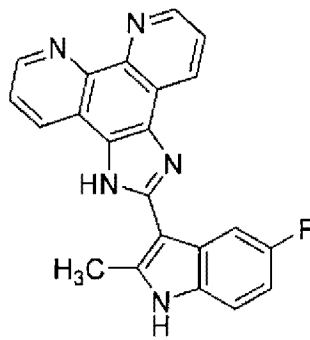


【圖3】(續)



【圖3】(續)

特徵化學式：



I

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於治療癌症之芳基咪唑

【英文發明名稱】

ARYL IMIDAZOLES FOR THE TREATMENT OF CANCER

【技術領域】

【0001】 本發明大體上係關於一種預防、減小或治療個體中癌症之方法。

【先前技術】

【0002】 由乳癌易感性基因編碼的蛋白質(BRCA蛋白質)係與乳癌、卵巢癌及其他癌症之傾向性有關。由於此等蛋白質廣泛性地表現，由此意指該等蛋白質參與許多對所有細胞是基本的過程，包括DNA修復及重組、細胞週期之檢查點控制及轉錄作用。

【0003】 特定言之，乳癌之遺傳易感性係與某些基因(例如*BRCA-1*及*BRCA-2*)之突變相關。咸信由此等基因編碼之蛋白質會有保護染色體結構之作用，但由於其參與多種過程，因此其確切作用尚不明確。假設突變導致蛋白質破壞，這導致BRCA缺陷細胞之染色體不穩定性，由此使其易於發生贅生性轉型。

【0004】 約10%之乳癌病例聚集在家族中，一些係由於BRCA-1及BRCA-2基因之突變，引起較高的癌症風險。與腫瘤抑制相關之其他基因突變可解釋癌症傾向性。此等突變包括p53腫瘤抑制、STK11/LKB、蛋白激酶或PTEN磷酸酶之突變。

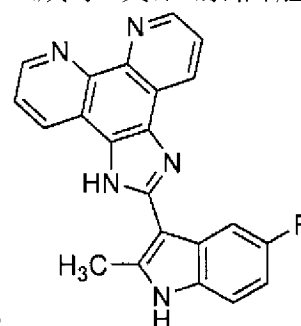
【0005】 腫瘤中同源重組缺陷為選擇性殺死腫瘤細胞提供機會；然

而，目前用於利用此機會之藥物會產生嚴重的骨髓抑制(myelosuppression)，這限制了劑量。因此，在此項技術中仍然存在未滿足的高度優先需要，以鑑定BRCA1或BRCA2功能喪失引起超敏性但不導致骨髓抑制之藥物。

【發明內容】

【0006】 本發明係關於一種預防、減小或治療個體中癌症之方法。

【0007】 在一實施例中，本發明係關於一種預防、減小或治療個體



中癌症之方法，其包含向個體投與治療有效量之化合物I，

或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、錯合物或螯合物(包括金屬螯合物，諸如鐵、鋅及其他金屬)，其中該個體DNA修復基因具有突變。在某些實施例中，DNA修復基因係同源重組基因。例如，DNA修復基因係同源重組(homologous recombination, HR)依賴性去氧核糖核酸(DNA)雙股裂縫(double strand break, DSB)修復路徑中之基因。在一些實施例中，DNA修復基因係一或多個選自由以下組成之群的基因：*BRCA-1*、*BRCA-2*、*ATM*、*ATR*、*CHK1*、*CHK2*、*Rad51*、*RPA*及*XRCC3*。例如，DNA修復基因係*BRCA-1*及/或*BRCA-2*。在一實施例中，個體係人類。

【0008】 在一實施例中，個體在DNA修復基因中之突變係雜合的。在某些實施例中，個體在同源重組(HR)依賴性去氧核糖核酸(DNA)雙股裂縫(DSB)修復路徑中之基因突變係雜合的。在一個實施例中，個體在BRCA1或BRCA2中之突變係雜合的。在另一實施例中，個體在BRCA1或BRCA2

中之突變係純合的。

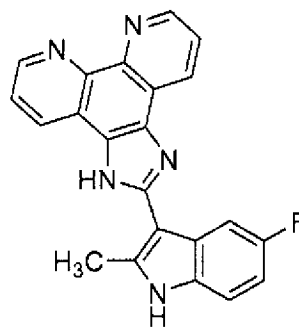
【0009】 在一實施例中，癌症選自由以下組成之群：血液癌、結腸直腸癌、卵巢癌、乳癌、子宮頸癌、肺癌、肝癌、胰腺癌、淋巴結癌、白血病、腎癌、結腸癌、前列腺癌、腦癌、頭頸癌、骨癌、喉癌及口腔癌、尤文氏肉瘤、皮膚癌、腎癌及心臟癌。在某些實施例中，癌症選自由以下組成之群：乳癌、肺癌、卵巢癌、淋巴結癌、結腸癌、白血病、腎癌及前列腺癌。在一個實施例中，癌症為乳癌。

【0010】 在一些實施例中，癌症為血液科惡性疾病。血液科惡性疾病之實例包括但不限於白血病、淋巴瘤、霍奇金氏病及骨髓瘤。此外，急性淋巴球性白血病(acute lymphocytic leukemia, ALL)、急性類骨髓球性白血病(acute myeloid leukemia, AML)、急性前髓細胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)、慢性淋巴球性白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)、慢性類骨髓球性白血病(chronic myeloid leukemia, CML)、慢性嗜中性球白血病(chronic neutrophilic leukemia, CNL)、急性未分化性白血病(acute undifferentiated leukemia, AUL)、多形性大細胞淋巴瘤(anaplastic large-cell lymphoma, ALCL)、前淋巴球性白血病(prolymphocytic leukemia, PML)、幼年骨髓單核球性白血病(juvenile myelomonocytic leukemia, JMML)、成人T細胞ALL、AML伴三系骨髓發育不良(AMLITMDS)、混合系白血病(mixed lineage leukemia, MLL)、嗜伊紅性白血病、套膜細胞淋巴瘤、骨髓發育不良症候群(myelodysplastic syndromes, MDS) (例如高風險MDS)、骨髓增生病(myeloproliferative disorders, MPD)及多發性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)。在一些實施例中，癌症為急性類骨髓球性白血病。在一些實施例中，癌症為慢性類骨

髓球性白血病。在一些實施例中，癌症為淋巴瘤。在一些實施例中，癌症為高風險骨髓發育不良症候群。

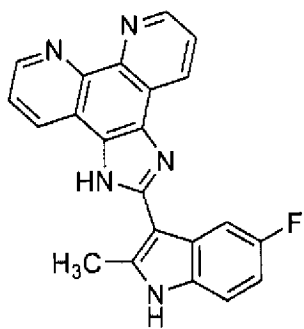
【0011】 在一實施例中，癌症為BRCA相關之癌症。在某些實施例中，BRCA相關之癌症具有一或多個BRCA-1及/或BRCA-2基因突變。

【0012】 在一實施例中，本發明之方法進一步包含投與治療有效量



之第二治療活性劑。在已向個體投與 之前、期間或之後投與第二治療活性劑。第二治療活性劑選自由免疫治療劑、抗癌劑及血管生成劑組成之群中之一或多者。在一個實施例中，第二治療活性劑為PARP抑制劑。例如，PARP抑制劑為奧拉帕尼(olaparib)。

【0013】 在一實施例中，相對於未投與治療有效量之

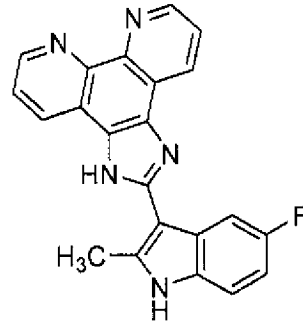


或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、錯合物或螯合物(包括金屬螯合物，諸如鐵、鋅及其他金屬)個體，該個體經歷小於90%之骨髓活性降低。例如，該個體可經歷小於10%之骨髓活性降低或骨髓活性未降低。

【0014】 在一實施例中，個體已患有癌症。在某些實施例中，已患有癌症之個體經歷與癌症有關的腫瘤之尺寸之縮小或減小。例如，個體經歷與癌症有關之腫瘤之完全消除。在某些實施例中，已患有癌症之個體經

歷與癌症有關之腫瘤中新血管形成或血管生成的抑制、降低或減少。

【0015】 在另一實施例中，本發明係關於一種殺死癌細胞之方法，



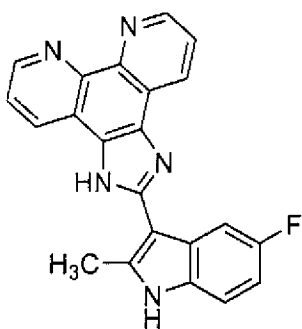
其包含使該等細胞與治療有效量之

或其醫藥學上可接受

之鹽、游離鹼、水合物、錯合物或螯合物(包括金屬螯合物，諸如鐵、鋅及其他金屬)接觸。在一個實施例中，癌細胞在一或多個選自由以下組成之群的基因中具有缺陷：*BRCA-1*、*BRCA-2*、*ATM*、*ATR*、*CHK1*、*CHK2*、*Rad51*、*RPA*及*XRCC3*。

【0016】 在另一實施例中，本發明係關於一種誘導癌細胞中細胞週期停滯之方法，其包含使該等細胞與治療有效量之細胞接觸，由此使其易於發生贅生性轉型。

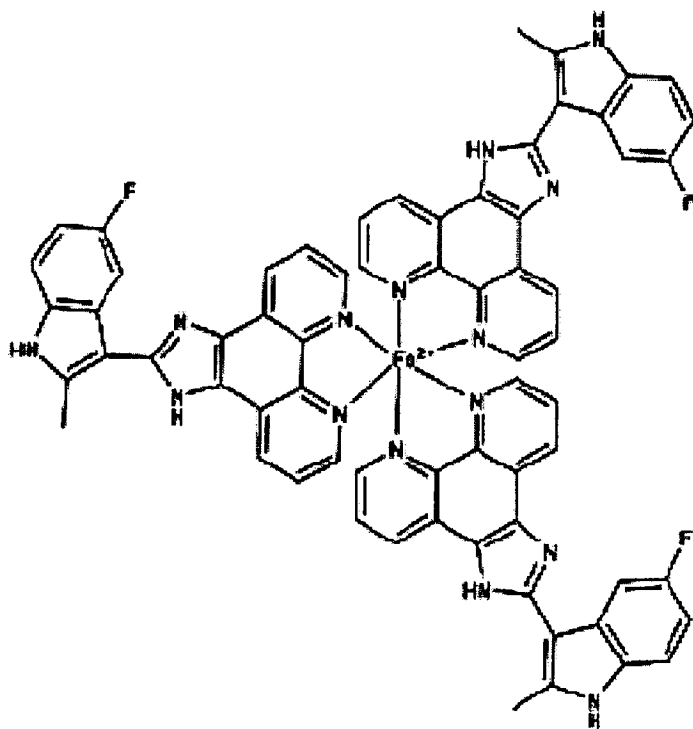
【0017】 在另一實施例中，本發明係關於一種預防、減少或治療個體之癌症的方法，其包含以具有一或多個金屬原子之錯合物形式投與治療



有效量之

之一或多個分子，其中該個體具有DNA修復基

因突變。在一個實施例中，一或多個金屬原子選自由以下組成之群：鐵、鋅、鋁、鎂、鉑、銀、金、鉻、鎳、鈦、銅、鈳、銨、銻、釩、鉬、錳、鎢及鈷。在一個實施例中，一或多個金屬原子為鐵。在某些實施例中，錯合物



具有以下結構：

【0018】 應瞭解，涵蓋前述概念及下文更詳細論述之額外概念的所有組合（限制條件為該等概念並非彼此不相容）作為本文中所揭示之發明主題的部分。詳言之，預期在本發明結尾處出現之所主張主題的全部組合為本文中所揭示之發明性主題的部分。亦應瞭解，本文中明確採用的亦可出現在以引用之方式併入之任何揭示案中的術語應符合與本文中所揭示之特定概念最為一致的含義。

【圖式簡單說明】

【0019】 圖1顯示 $\text{Fe}(\text{化合物I})_3$ 為化合物I之活性胞內形式。(A)化合物I之結構。(B) $\text{Fe}(\text{化合物I})_3$ 之結構。(C)化合物I (■)及 $\text{Fe}(\text{化合物I})_3$ (●)在Raji氏細胞中之相對細胞毒性。(D)曝露於 $0.5 \mu\text{M}$ 化合物I或 $\text{Fe}(\text{化合物I})_3$ 達6小時之Raji氏細胞中化合物I(■)及 $\text{Fe}(\text{化合物I})_3$ (■)之胞內積聚。垂直條， \pm SEM；其中缺失SEM小於符號之尺寸；***， $P < 0.001$ ；****， $p < 0.0001$ 。

【0020】 圖2顯示化合物I導致DNA損傷。(A) Raji氏細胞中

phospho-ATM、 γ -H2AX及分裂PARP之積聚隨曝露於0.5 μ M化合物I之持續時間而變。所顯示之免疫印跡為三項獨立實驗之代表。(B)核灶形成之代表性免疫螢光影像，比較DMSO-及經化合物I治療之CAOV3細胞。(C)每細胞 γ H2AX病灶之平均 \pm SEM數；N = 100。(D)顯示用DMSO或0.5 μ M化合物I治療6小時之CAOV3細胞中中性評測量化的尾DNA百分比之盒須圖，N = 檢測細胞之數量。垂直條， \pm SEM；*， $p < 0.05$ ，****， $p < 0.0001$ 。

【0021】 圖3顯示BRCA1及BRCA2功能喪失引起對化合物I之超敏感性。BRCA1精通及缺陷同基因型MCF10A克隆(clone)(A)、*hTERT*-IMEC克隆(B)及MCF7 (C)對奧拉帕尼(右邊)及化合物I (左邊)之敏感度。BRCA2精通及缺陷同基因型PEO4及PEO1 (D)及HCT116 BRCA2缺陷克隆(E)對奧拉帕尼及化合物I之敏感度。用DMSO或所指示濃度之化合物I治療24小時的MCF7對照及shBRCA1克隆E7細胞中H2AFX之積聚g (F)，及BRCA2精通HCT116及缺陷克隆B18細胞中H2AFX之積聚g (G)。垂直條， \pm SEM。*， $P < 0.05$ ；**， $P < 0.01$ ；***， $P < 0.001$ 。

【0022】 圖4顯示對化合物I (稱作化合物IR)具有抗性之細胞之特徵。(A) Raji氏(●)、Raji氏/化合物IR (■) Raji氏/化合物IR及在無藥物培養基中培養3個月後Raji氏/化合物IR細胞(▲)之濃度-存活曲線。(B)涉及用DMSO或化合物I 0.5 μ M治療24小時之Raji氏及Raji氏/化合物IR中之細胞凋亡的蛋白質的西方墨點分析(Western blot analysis)。(C)在曝露於0.5 μ M化合物I 6小時之後，Raji氏及Raji氏/化合物IR細胞中化合物I (■)及Fe(化合物I)₃ (■)之胞內積聚。(D)在6小時時，隨化合物I濃度而變的Raji氏及Raji氏/化合物IR細胞中Fe(化合物I)₃之胞內積聚。垂直，條， \pm SEM；** $p < 0.01$ ；***， $p < 0.001$ ；****， $p < 0.0001$ 。

【0023】 圖5顯示ABCG2在對抗化合物I中之作用。(A) Raji氏及Raji氏/化合物IR中ABCG2 mRNA之相對位準。(B)用抗ABCG2抗體探測生物素化蛋白質之西方墨點法。Na/K ATP酶充當內參考物。(C) Ko143在Raji氏(●)及Raji氏/化合物IR (■)中之細胞毒性。(D)用單獨的化合物I或化合物I與5 nM (▲)或50 nM Ko143 (▼)組合治療之Raji氏(●)及Raji氏/化合物IR (■)的濃度-存活曲線。(E)拓朴替康(topotecan)在Raji氏(●)及Raji氏/化合物IR (■)中及拓朴替康與50 nM Ko143之組合在Raji氏/化合物IR (▲)中之細胞毒性。(F)卡鉑(carboplatin)在Raji氏(●)及Raji氏/化合物IR (■)中及卡鉑與50 nM Ko143之組合在Raji氏/化合物IR (▲)中之細胞毒性。(G)用化合物I治療的經pcDNA (●)及ABCG2 克隆R5 (■)轉染之HEK-293的濃度-存活曲線。垂直，條，± SEM；**， $p < 0.01$ 。

【0024】 圖6顯示化合物I及Fe(化合物I)₃之流入及流出。(A)化合物I及Fe(化合物I)₃積聚於與0.5 μM化合物I一起培育的Raji氏及Raji氏/化合物IR細胞中之時程。(B) Fe(化合物I)₃積聚於與0.5 μM Fe(化合物I)₃一起培育的Raji氏及Raji氏/化合物IR細胞中之時程。(C)歷經2小時，化合物I及Fe(化合物I)₃自藉由曝露於0.5 μM 化合物I 6小時而負載的Raji氏及Raji氏/化合物IR細胞之流出。

【0025】 圖7顯示與Raji氏/化合物IR細胞相比，Raji氏中phospho-ATM、γ-H2AX及分裂PARP之積聚。

【0026】 圖8顯示化合物I對抗白血病及淋巴瘤細胞株之抗增生活性。A)用化合物I治療5天之AML細胞株的濃度-反應曲線。細胞生長表現為經媒劑治療之細胞的生長百分比。B)其他白血病及淋巴瘤細胞株之濃度-反應曲線。誤差條，至少三次重複檢測之± SD。

【0027】 圖9顯示AML細胞株中，化合物I以劑量依賴性及時間依賴性方式誘導G0-G1細胞週期停滯。A)頂部，用化合物I以所指示之濃度治療24小時的MV4-11細胞。如物質及方法部分中所描述測定之細胞週期分佈。底部，在曝露於化合物I 24小時之後MV4-11細胞中的CDK4及CCND3蛋白質位準。自三次獨立西方墨點法定量之蛋白質位準，圖示為隨媒劑之倍數變化。B)及C)化合物I對KG-1及EOL-1細胞中細胞週期分佈之效應。D)-F)，隨曝露(MV4-11細胞，500 nmol/L；KG-1細胞，600 nmol/L化合物I；且EOL-1細胞，300 nmol/L化合物I)持續時間而變之化合物I對細胞週期分佈之效應。誤差條，兩次重複的流式細胞量測術檢測及三次重複的西方墨點法之 \pm SD。

【0028】 圖10顯示化合物I治療以時間依賴性及濃度依賴性方式誘導細胞凋亡。A，在曝露於化合物I 24小時之後，MV4-11、KG-1及EOL-1細胞之細胞凋亡百分比(早期及晚期)。如物質及方法部分中所描述量測細胞凋亡。B，用V-媒劑或A-化合物I治療24小時之AML細胞的PARP1-特異性抗體的西方墨點分析。PARP1抗體識別全長(較高帶)及分裂PARP1(較低帶)兩者。C，用500 nmol/L化合物I治療1至24小時之MV4-11、KG-1及EOL-1細胞中PARP1分裂之西方墨點分析。GAPDH被包括為內參考物。D，化合物I誘導MV4-11 (500 nmol/L)、KG-1 (600 nmol/L)及EOL-1 (300 nmol/L)細胞中細胞凋亡之時程。誤差條，兩次重複檢測之 \pm SD。

【0029】 圖11顯示MYC RNA及蛋白質表現受到化合物I之負性調節。A，治療AML細胞株24小時及藉由qRT-PCR用MYC-特異性引子/探針對所量測之MYC mRNA位準。使用GraphPad Prism圖示為媒劑百分比。b，以所列濃度治療24小時的MV4-11、KG-1及EOL-1細胞中MYC蛋白質位準

之西方墨點分析。GAPDH充當內參考物。C，圖示為用500 nmol/L化合物I治療所列次數之MV4-11、KG-1及EOL-1細胞中隨媒劑之倍數變化的MYC mRNA表現的直方圖。D，與來自健康供體之PBMC相比，AML細胞株中MYC mRNA之基本表現位準。相對於藉由qRT-PCR測定之GAPDH的表現。誤差條，來自至少三次重複實驗之 \pm SD。

【0030】 圖12顯示化合物I誘導DDR路徑。A，用(v)媒劑或500 nmol/L (A)化合物I治療延長時段之MV4-11細胞中之總TP53蛋白質位準。B，在如A中那樣進行治療的MV4-11細胞中，藉由西方墨點分析偵測之TP53的轉譯後修飾。C，曝露於500 nmol/L化合物I之MV4-11細胞的西方墨點分析。D，用化合物I以指定濃度治療24小時之MV4-11、KG-1及EOL-1細胞中 γ -H2AX (H2AX phos-S139)位準的西方墨點分析。

【0031】 圖13顯示Fe(化合物I)₃錯合物之活體外及細胞活性。A，用親代化合物I或Fe(化合物I)₃治療5天之AML細胞株的濃度-反應曲線。細胞生長表現為經媒劑治療之細胞的生長百分比。誤差條，來自3-5次重複檢測之平均SD。B，左邊，在用Fe(化合物I)₃以所列濃度治療24小時之後，KLF4、CDKN1A及MYC mRNA表現。誤差條，平均 \pm SD。右邊，在曝露於媒劑(v)或濃度增加之Fe(化合物I)₃達24小時之後，MV4-11細胞中c-PARP1、MYC及 γ H2AX蛋白質位準之西方墨點分析。C，自圖22及23中所示之代表性實例FRET曲線所計算的 $\Delta T_{1/2}$ 值，其中對各曲線重複至少三次。相對於各所測試之化合物的log[藥物] mol/L標繪各寡核苷酸之 $\Delta T_{1/2}$ 。

【0032】 圖14顯示ABCG2在對抗Fe(化合物I)₃中之作用。(A)用單獨的Fe(化合物I)₃或與50 nmol Kol43組合(▼)治療的Raji氏(●)及Raji氏/化合物IR (■)之濃度-存活曲線。(B)用Fe(化合物I)₃治療的經空載體(●)或表現

ABCG2之載體(■)轉染之HEK-293克隆R5的濃度-存活曲線。

【0033】 圖15顯示AML細胞株中KLF4及CDKN1A (p21)由化合物I之誘導。A)用化合物I以所列濃度治療24小時後的KLF4 mRNA誘導。B) AML細胞株中CDKN1A mRNA表現之濃度依賴性增加。C)在曝露於媒劑(v)或濃度增加之化合物I 24小時之後，MV4-11細胞中CDKN1A蛋白質位準之西方墨點分析。D) p21 mRNA之時間依賴性增加。E)與媒劑(V)相比，隨曝露於500 nM化合物I (A)之持續時間而變之MV4-11細胞中CDKN1A蛋白質位準的西方墨點分析。所有mRNA量測均藉由qRT-PCR及相對於GAPDH內參考物進行圖示來進行。誤差條，來自3次重複實驗之 \pm SD。

【0034】 圖16顯示AML細胞株中，化合物I以劑量依賴性及時間依賴性方式誘導G₀/G₁細胞週期停滯。A)在圖16 A-C之下圖中定量的MV4-11、KG -1及EOL-1細胞中CDK4及CCND3蛋白質位準之代表性西方墨點。B)在曝露於IC₅₀濃度之化合物I指定次數之後，CDK4及CCND3蛋白質位準。自3次獨立西方墨點法定量之蛋白質位準，圖示為隨媒劑之倍數變化。誤差條， \pm SD。C)隨化合物I曝露(MV4-11細胞500 nM，KG -1細胞600 nM，且EOL-1細胞300 nM)持續時間而變之CDK4及CCND3蛋白質位準的代表性西方墨點。V-媒劑，A-化合物I。

【0035】 圖17顯示化合物I治療以時間依賴性及濃度依賴性方式誘導細胞凋亡。A)顯示早期相對於晚期凋亡細胞之分佈的直方圖。B)經化合物I治療相對於經媒劑治療之MV4-11、KG -1及EOL-1細胞中之總凋亡細胞隨時間之變化。誤差條，來自2次重複實驗之 \pm SD。

【0036】 圖18顯示MV4-11細胞中由化合物I調控之路徑。A)藉由用媒劑或500 nM化合物I治療6小時之MV4-11細胞的RNA-seq分析所偵測的

差異表現基因之基因本體分析(Gene Ontology, GO)。使用廣泛分子標籤數據庫(MSigDB)演算GO項及p值。B) 6小時後，經媒劑及化合物I (500 nM) 治療之MV4-11細胞中之標準化蛋白質位準。蛋白質位準藉由反相蛋白質陣列來偵測。GraphPad Prism中所產生之熱圖，3個重複樣品之平均。C)利用MSigDB之差異表現蛋白質之GO分析。

【0037】 圖19顯示AML細胞中化合物I對MYC表現之調控。A)用500 nM化合物I治療指定次數之MV4-11、KG-1及EOL-1細胞中之總MYC蛋白質位準。蛋白質位準自3次獨立西方墨點法定量、標準化至GAPDH且圖示為隨媒劑之倍數變化。誤差條， \pm SD。B)在A)中定量之代表性西方墨點。C)相對於來自健康供體之PBMC，AML細胞株中MYC之基本蛋白質表現。D)在ChIP-qPCR分析中所使用之MYC特異性引子對之位置。E)用500 nM化合物I治療2、6及24小時之MV4-11細胞中，MYC啟動子處H3K27ac之ChIP-qPCR分析，圖示為在標準化至輸入之後隨媒劑治療之倍數變化。F)用化合物I (500 nM)或媒劑預治療3小時之MV4-11細胞中，藉由RT-qPCR測定之MYC mRNA位準。在添加1 μ M放線菌素D之後，在所列時間點採用之樣品。誤差條，來自3次生物重複實驗之 \pm SD。藉由TTEST使用excel所計算的*P值 < 0.05 ，** < 0.005 。

【0038】 圖20顯示化合物I之細胞藥理學。A)化合物I吸收於KG-1細胞中之時程。B)藉由使KG-1細胞曝露於1 μ M化合物I，化合物I自所負載之細胞流出1或6小時。C)親代單體化合物I之結構。D) Fe(化合物I)₃之結構。E)吸收於MV4-11細胞中之化合物I及Fe(化合物I)₃。

【0039】 圖21顯示G-四鏈體結構之FRET測定分析。A)淬滅FRET測定之示意圖。在低溫下，G-四鏈體結構形成並且螢光FAM信號由BHQ1淬

滅；隨著溫度上升，G4結構外展並且FAM信號增強。針對各藥物濃度，計算螢光信號為 $\max(T_{1/2})$ 之50%時之溫度，然後相對於藥物濃度標繪 $\Delta T_{1/2}$ (藥物 $T_{1/2}$ - 媒劑 $T_{1/2}$)。B) ds-DNA對照寡核苷酸之熔化曲線。C)與化合物I一起培育6小時後G4寡核苷酸之熔化曲線。誤差條，來自3次生物重複實驗之 \pm SD。

【0040】 圖22顯示Fe(化合物I)₃使G-四鏈體寡核苷酸之 T_m 穩定。A-D)含有A)人類端粒、B) MYC基因啟動子、C) rRNA基因座及D) KIT基因啟動子的G-四鏈體序列之5' FAM - 3' BHQ1雙標記寡核苷酸之熔化曲線。誤差條，來自3次生物重複實驗之 \pm SD。

【實施方式】

相關申請案之交叉參考

【0041】 本申請案主張2017年10月30日申請之臨時申請案序第62/578,938號之權益，該臨時申請案之內容特此以全文引用之方式併入。

【0042】 鑒於前述與鑑定BRCA1或BRCA2功能喪失引起細胞超敏性但不導致個體骨髓抑制之藥物有關之挑戰，已鑑定化合物I。出乎意料地發現化合物I導致DNA損傷，並且存在同源重組缺陷之細胞對此藥物之超敏性與其對奧拉帕尼之超敏性一樣，該奧拉帕尼係經FDA批准之PARP抑制劑。化合物I加入有限的藥物庫，其可以利用同源重組之缺陷而不引起骨髓抑制。

【0043】 亦進行作用機制及對化合物I之抗性的機理研究，以便鑑定可以引導組合藥物研究之合成致死相互作用。如本文中所描述，化合物I胞內轉化成Fe錯合物(Fe(化合物I)₃)，其為藥物之活性形式。化合物I在如由 γ H2AX積聚及病灶形成所記錄之早期時間點下產生DNA損傷。發現

BRCA1-及BRCA2-缺陷細胞對化合物I之超敏性與對奧拉帕尼之超敏性程度相當。Raji氏細胞中對化合物I之抗性與流出轉運子ABCG2之上調相關並且抗性部分由ABCG2抑制逆轉。特別關注化合物I利用同源重組缺陷之能力，因為與喪失此修復功能而引起超敏性之所有其他藥物不同，化合物I即使在最大耐受劑量下亦不會產生骨髓抑制。

【0044】 關注化合物I係因為其為表現出對廣泛範圍的實性瘤及血液科惡性疾病兩者的強細胞毒性且不會導致骨髓抑制之新穎類型化合物之成員。本文中所報告之關鍵發現為化合物I單體可以胞內轉化成含有亞鐵Fe原子及化合物I之三個分子的活性錯合物，其胞內濃度可超過原來藥物之胞內濃度。化合物I及/或其具有鐵之錯合物導致DNA損傷，其中DNA修復需要BRCA1及BRCA2兩者之功能，如由化合物I之合成致死所證明。在Raji氏淋巴瘤細胞情況下，後天抗性與減少的藥物吸收及標記的ABCG2藥物流出泵之過表現相關，該藥物流出泵之抑制部分逆轉抗性。

【0045】 與許多其他用於治療淋巴瘤之化學治療劑相比，化合物I之細胞積聚相對緩慢，但其表現為快速轉化成Fe(化合物I)₃，因為一在細胞中偵測到原來形式之藥物，此錯合物就出現。按6小時計，Fe(化合物I)₃之細胞含量超出原來形式之細胞含量的~18倍。Fe(化合物I)₃錯合物之效力僅比原來藥物之效力小2倍，這可以藉由以下事實來解釋：雖然化合物I為中性的，但Fe(化合物I)₃大得多並且含有2⁺電荷，預期這將削弱透膜流入。在與Fe(化合物I)₃錯合物一起培育的細胞中未偵測到原來藥物之事實表明Fe(化合物I)₃為藥物之活性胞內形式。已知含有2,10吡啶環結構之藥物可螯合Fe及Zn。在化合物I的情況下，雖然Fe螯合物在細胞中充足，但Zn螯合物不可偵測。實際上，Fe螯合物位準充足高使得曝露於化合物I之細胞變成粉紅

色。高位準之Fe(化合物I)₃引發其形成是否消耗Fe細胞至細胞代謝削弱的點之問題，並且此問題仍然為進一步研究之令人感興趣的點。不受任何特別理論之束縛，螯合可由胞內環境促進，因為當化合物I與完全組織培養基一起培育時，未偵測到胞外Fe(化合物I)₃。

【0046】已採用由BRCA1/2功能喪失所產生之同源重組缺陷引起對某些類型之DNA損害藥物的超敏性的觀測結果，以提高含鉑藥物順鉑(cisplatin)及卡鉑及特別係在卵巢癌的情況下的PARP抑制劑奧拉帕尼及尼拉帕尼(niraparib)之效用。Ledermann等人，「Olaparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive Relapsed Ovarian Cancer」, *N. Engl. J. Med.*, 2012;366(15):1382-92；Mirza等人，「Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer」, *N. Engl. J. Med.*, 2016;375(22):2154-64，這兩者均以引用之方式併入。已在多種其他腫瘤中以較低頻率鑑定了各種程度之同源重組缺陷。Davies等人，「HRDetect is a Predictor of BRCA1 and BRCA2 Deficiency Based on Mutational Signatures」, *Nat. Med.* 2017;23(4):517-525，其特此以引用之方式併入。特別關注化合物I利用同源重組缺陷之能力，因為與喪失此修復功能而引起超敏性之所有其他藥物不同，化合物I即使在最大耐受劑量下亦不會產生骨髓抑制。Cercek等人，「Phase 1 study of COMPOUND I HCl, an Inducer of KLF4, in Patients with Advanced or Metastatic Solid Tumors」, *Invest. New Drugs*, 2015;33(5):1086-92，其特此以引用之方式併入。因此，化合物I加入有限的藥物庫，其可以利用此重要的治療窗。本文中所報告之觀測結果將γ-H2AX鑑定為臨床藥物效應之潛在生物標誌物，並且指出朝向更詳細的化合物I如何導致DNA損傷的研究之方式。Ivashkevich等人，「Use

of the Gamma-H2AX Assay to Monitor DNA Damage and Repair in Translational cancer Research」, *Cancer Lett*, 2012;327(1-2):123-33, 其特此以引用之方式併入。

【0047】 Raji氏淋巴瘤細胞中對化合物I之後天抗性之發展與減少的化合物I及Fe(化合物I)₃錯合物積聚有關。Raji氏敏感細胞比抗性細胞中之胞內Fe(化合物I)₃多 16.5 ± 1.94 倍, 這極佳地對應於Raji氏/化合物IR對敏感細胞之相對抗性(16.7 ± 3.9 倍)。Raji氏/化合物IR細胞之RNA-seq分析大多直接指出ABCG2之過表現為一種可能的抗性機制。西方墨點分析證實蛋白質位準上調, 並且ABCG2具有功能性, 並且藉由其抑制劑部分逆轉對化合物I以及拓朴替康之抗性之能力建立直接參與化合物I抗性。在與預先形成之錯合物一起培育的抗性細胞中Fe(化合物I)₃積聚減少之事實表明Fe(化合物I)₃以及原來的藥物可為用於ABCG2轉運子之基質。增加的ABCG2賦予抗性之已知類別之藥物中無一者具有明顯的與化合物I或Fe(化合物I)₃之結構類似性。因此, ABCG2可以調節對化合物I之抗性的發現擴展用於重要轉運子的已知基質之範圍。將需要在大面積細胞株中探索ABCG2是否可以用作對化合物I之敏感性的生物標誌物。在大面積細胞株中探索關聯圖譜(Connectivity Map) (<https://portals.broadinstitute.org/cmap/>)未揭示任何顯著的化合物I與迄今為止所測試的其他藥物中之任一者的毒性圖案之間的類似性, 進一步突出此化合物之獨特性。

【0048】 考慮到ABCG2、Ko143之特異性抑制劑不會完全逆轉後天化合物I抗性, 其他機制似乎很可能亦有助於表現型。就此而言, 特別關注對卡鉑之交叉抗性。卡鉑並非已知的ABCG2基質, 但其亦會導致DNA損傷, 並且已廣泛報告轉錄合併修復之上調有助於對卡鉑及順鉑兩者之抗

性，這兩者均在DNA中產生相同類型之加合物。Enoiu等人，「Repair of Cisplatin-induced DNA Interstrand Crosslinks by a Replication-independent Pathway Involving Transcription-coupled Repair and Translesion Synthesis」, *Nucleic Acids Res.* 2012;40(18):8953-64，其特此以引用之方式併入。尚待確定DNA修復能力之上調是否有助於卡鉑及化合物I兩者抗性。

【0049】 本文中亦描述，發現AML細胞中化合物I與CDKN1A上調及MYC下調、繼之以G₀-G₁細胞週期停滯及細胞凋亡相關。此外，AML中公認的關鍵致癌基因MYC之抑制與化合物I之細胞毒性相關。差異表現分析表明涉及DNA損傷，包括誘導 γ -H2AX積聚，及在化合物I治療後之細胞應激路徑。先前的細胞藥物動力學研究證明細胞中化合物I自單體形式轉換為亞鐵錯合物[Fe(化合物I)₃]，並且此錯合物為該藥物之主要胞內形式。在此研究中，我們證明親代化合物I及Fe(化合物I)₃錯合物結合於G-四鏈體(G4)模體且使其穩定。在關鍵致癌基因(例如MYC、KIT)以及rRNA基因及端粒之啟動子中發現經Fe(化合物I)₃錯合物穩定之G4模體。二級DNA結構之穩定化對G4模體而言係特異性的，因為親代化合物I及Fe(化合物I)₃不與dsDNA相互作用。用預先形成之Fe(化合物I)₃治療MV4-11 AML細胞亦抑制MYC表現並誘導CDKN1A表現以及誘導細胞凋亡及DNA損傷路徑。總之，該等結果支持化合物I對MYC及其下游靶基因之表現、細胞週期停滯及DNA損傷及應激反應的效應可與化合物I及Fe(化合物I)₃對G-四鏈體DNA模體之作用相關的結論。

定義

【0050】 除非另外定義，否則本文中所用之所有技術及科學術語具

有與一般熟習本申請案所屬技術者通常所理解的相同的含義。雖然可以在本申請案之實踐或測試中使用與本文中所描述之方法及物質類似或等效的任何方法及物質，但代表性方法及物質在本文中進行描述。

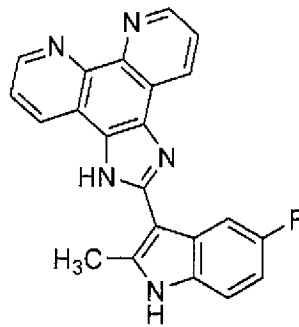
【0051】 貫穿本說明書之參考「一個實施例(one embodiment)」或「一實施例(an embodiment)」意謂結合實施例所描述的特定特徵、結構或特性包括於至少一個實施例中。因此，片語「在一個實施例中」或「在一實施例中」在本說明書通篇中各處之出現未必皆指同一實施例。此外，可在一或多個實施例中以任何適合的方式組合特定特徵、結構或特性。此外，除非內容另外明確指定，否則如本說明書及所附申請專利範圍中所使用，單數形式「一(a/an)」及「該(the)」包括複數個指示物。亦應注意，除非內容明確指定，否則術語「或」通常以其包括「及/或」之含義而採用。

【0052】 除非另外指示，否則本說明書及申請專利範圍中所使用之表現成分數量、反應條件等之所有數字應理解為在所有情況下皆由術語「約」修飾。因此，除非相反指示，否則本說明書及所附申請專利範圍中所闡述之數值參數為近似值，其可取決於本申請案設法獲得之所需性質而變化。

【0053】 貫穿本說明書，提供某些量之數值範圍。應理解，此等範圍包含其中所有子範圍。因此，範圍「50至80」包括其中所有可能範圍(例如51-79、52-78、53-77、54-76、55-75、60-70等)。此外，既定範圍內之所有值可為藉此涵蓋之範圍的端點(例如範圍50-80包括具有諸如55-80、50-75等之端點的範圍)。

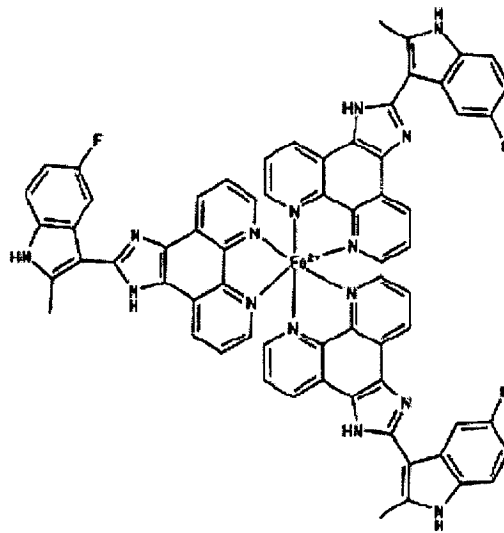
【0054】 化合物I係指2-(5-氟-2-甲基-1*H*-吡啶-3-基)-1*H*-咪唑并[4,5-*f*][1,10]啡啉、其醫藥學上可接受之鹽、酯、前驅藥、水合物、溶合物

及異構物，其結構如下。



化合物I

【0055】 Fe(化合物I)₃係指以下結構：



Fe(化合物I)₃

【0056】 「醫藥學上可接受之鹽」包括酸加成鹽及鹼加成鹽兩者。

【0057】 化合物I之醫藥學上可接受之鹽可為衍生自無機酸或有機酸之「醫藥學上可接受之酸加成鹽」，並且該鹽可為含有陰離子之醫藥學上可接受之無毒性酸加成鹽。例如，該鹽可包括由以下所形成之酸加成鹽：無機酸，諸如鹽酸、硫酸、硝酸、磷酸、氫溴酸、氫碘酸及其類似無機酸；有機碳酸，諸如酒石酸、甲酸、檸檬酸、乙酸、三氯乙酸、三氟乙酸、葡萄糖酸、苯甲酸、乳酸、反丁烯二酸、順丁烯二酸及其類似有機碳酸；及磺酸，諸如甲磺酸、苯磺酸、對甲苯磺酸、萘磺酸及其類似磺酸。

【0058】 化合物I之醫藥學上可接受之鹽可藉由此項技術中熟知的習知方法來製備。特定言之，根據本發明之「醫藥學上可接受之鹽」可藉由以下來製備：例如將化合物I溶解於可與水混溶的有機溶劑諸如丙酮、甲醇、乙醇或乙腈及其類似有機溶劑中；向其中添加過量有機酸或無機酸之水溶液；使由此獲得之混合物沈澱或結晶。此外，其可藉由進一步使來自其之溶劑或過量酸汽化；且然後藉由使用例如吸濾器乾燥該混合物或過濾該萃取物來製備。

【0059】 如本文中所用，術語「螯合物」意謂由與至少一個雙牙配位子相關聯且視情況與一或多個單牙或多牙配位子相關聯之中心金屬構成之分子實體。例如，如所使用之「螯合物」意謂由與至少一個化合物I之雙牙配位子相關聯的中心金屬構成之分子實體。在中心金屬與配位子中之任一者之間的相互作用中，配位子與中心金屬之間的鍵可包括共價鍵、離子鍵及/或配位共價鍵。

【0060】 如本文中所用，術語「錯合物」或「金屬錯合物」意謂金屬及配位子之配位錯合物。例如，如本文中所用，「錯合物」或「金屬錯合物」意謂金屬及化合物I之配位錯合物。

【0061】 如本文中所用，術語「金屬」意謂任何可與配位子配位之鹼金屬、鹼土金屬、過渡金屬、稀土金屬、鹼性金屬及半金屬。代表性金屬包括過渡金屬、鑰系金屬及銅系金屬。在一些實施例中，金屬具有能夠與配位子相互作用之d-軌域。例如，金屬可為鐵、鋅、鋁、鎂、鉑、銀、金、鉻、鎳、鈦、銅、鈦、鋳、鈳、鈳、鈳、鈳及鈳。在一個實施例中，金屬為鐵。

【0062】 除非另外指示，否則如本文中所用，術語「酯」係指具有

化學結構-(R)_n-COOR'之化學部分，其中R及R'各自獨立地選自由以下組成之群：烷基、環烷基、芳基、雜芳基(藉由芳族環連接至氧原子)及雜脂環(藉由芳族環連接)，並且n為0或1。

【0063】 如本文中所用，術語「前驅藥」係指將經受活體內代謝活化而產生原藥(parent drug)之前驅體化合物。前驅藥常常係有用的，因為在一些情況下與其原藥相比其可容易地投與。舉例而言，與前驅藥之原藥常常顯示出不良的生物可用性不同，一些前驅藥經由經口投與而生物可用。此外，前驅藥與其原藥相比可顯示出改進的在醫藥組合物中之溶解度。舉例而言，由於藥物之溶解度會不利地影響整個細胞膜中之滲透性，因此可以酯前驅藥形式投與化合物I，以便提高藥物遞送功效。然後，一旦呈酯前驅藥形式之化合物進入靶細胞中，則其可代謝水解至羧酸及活性實體中。

【0064】 化合物I之水合物或溶合物包括於本發明之範疇內。如本文中所用，「溶合物」意謂由溶劑合作用(本發明之溶劑分子與活性劑之分子或離子的組合)形成之錯合物，或由溶質離子或分子(本發明之活性劑)與一或多個溶劑分子組成之聚集物。溶劑可為水，在此情況下溶合物可為水合物。水合物之實例包括但不限於半水合物、單水合物、二水合物、三水合物、六水合物等。一般熟習此項技術者應理解本發明化合物之醫藥學上可接受之鹽亦可以溶合物形式存在。溶合物通常經由水合或由本發明之無水化合物自然吸收水分形成，該水合為製備本發明化合物之任一部分。包括水合物之溶合物可在化學計量比率中一致，例如，每個溶合物分子或每個水合物分子具有兩個、三個、四個鹽分子。另一種可能性，例如，兩個鹽分子在化學計量上與三個、五個、七個溶劑分子或水合物分子相關。用於結晶之溶劑，諸如醇，尤其係甲醇及乙醇；醛；酮，尤其係丙酮；酯，例

如乙酸乙酯；可以嵌入晶柵特別係醫藥學上可接受之溶劑中。

【0065】 本發明之化合物或其醫藥學上可接受之鹽可以含有一或多個對掌性軸，使得構型異構化(atropisomerization)成為可能。構型異構為由於圍繞單鍵之位阻旋轉而產生之立體異構體，其中因立體應變或其他促成因素所致之能量差異產生高至足以允許個別構象異構體分離之旋轉阻障。本發明意在包括所有該等可能的異構物，以及其外消旋及光學純形式，無論其是否在本文中具體描繪。光活性異構物可使用對掌性合成子或對掌性試劑來製備，或使用習知技術例如層析法及分段結晶來解析。用於製備/分離個別構型異構之習知技術包括自適合的光學純前驅物進行對掌性合成或使用例如對掌性高壓液相層析法 (high pressure liquid chromatography, HPLC) 對外消旋體(或鹽或衍生物之外消旋體)進行解析。

【0066】 「立體異構體」係指由相同鍵所鍵結之相同原子構成但具有不可互換的不同三維結構之化合物。本發明考慮各種立體異構體及其混合物，因為其係關於構型異構。

【0067】 關於特定疾病或病症之術語「治療(treat、treating或treatment)」包括預防該疾病或病症，及/或減輕、改善、減緩或消除該疾病或病症之症狀及/或病變。一般而言，如本文中所用之術語係指減緩、緩解、減輕及移除疾病或病況之症狀。本文中之化合物I可以治療有效量在調配物或藥劑中，該治療有效量為可引起生物效應諸如DNA損傷、某些細胞(例如癌細胞)之細胞凋亡、某些細胞之增殖減少，或引起例如減緩、緩解、減輕或移除疾病或病況之症狀的量。該等術語亦可以指降低或遏止細胞增殖速率(例如減緩或阻止腫瘤生長)或減少增殖癌細胞之數目(例如移除部分或所有腫瘤)。

【0068】 當如上所述之治療係指預防疾病、病症或病況時，該治療被稱為預防性治療。投與該預防劑可在增生性病徵之特徵性症狀表現之前進行，使得疾病或病症被預防或替代地延遲其進展。

【0069】 如本文中所用，術語「抑制」或「降低」細胞增殖意謂當與不經受本申請案之方法、組合物及組合的增殖性細胞相比時，如使用一般熟習此項技術者已知的方法所量測之細胞增殖量減緩、減少或例如遏止例如10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%。

【0070】 如本文中所用，「細胞週期停滯」係指阻止在細胞中發生的導致其分裂及複製的一系列事件，其可由許多因素引起，包括但不限於DNA損傷、X-輻射、電離輻射及化學治療劑。在某些實施例中，「DNA損傷」及「細胞週期停滯」可互換使用。

【0071】 如本文中所用，術語「細胞凋亡」係指固有的細胞自毀或自殺程序。回應於觸發刺激，細胞經受一連串的事件，包括細胞收縮、細胞膜出泡及彩色凝結及碎片化。此等事件以細胞轉化為膜結合之粒子團簇(凋亡體)告終，該等團簇其後由巨噬細胞吞噬。

【0072】 如本文中所用，「骨髓抑制」係指造血中之一或多種組分之抑制，其表現在細胞型中之一或多者的異常位準中，該細胞型為此過程之產物。對於造血綜述及造血細胞之特性，參見*Clinical Immunology: Principles and Practice*, 第1卷, 第2章, 第15頁-第24頁(Lewis及Harriman編, Mosby-Year Book公司1996)，其頁面特此以引用之方式併入。在一般位準上，其係指減少白血球及/或血小板計數。在更特定之位準上，其亦係指相對於正常位準抑制以下由造血產生之細胞中之一或多者：B細胞、T細胞、自然殺手細胞、樹突狀細胞、巨噬細胞、嗜鹼性球、嗜酸性球、嗜鹼

性球、肥大細胞及血小板。其他術語可與骨髓抑制互換使用並且對熟習此項技術者而言將顯而易見。該等術語之非限制性實例包括「骨髓抑制(bone marrow suppression)」、「骨髓毒性」及「骨髓清除」。另一方面，因此，「骨髓恢復(myelorecovery)」與骨髓抑制相反。因此，在一個實施例中，術語「骨髓活性」係指以下由造血產生之細胞的位準：B細胞、T細胞、自然殺手細胞、樹突狀細胞、巨噬細胞、嗜鹼性球、嗜酸性球、嗜鹼性球、肥大細胞血小板、紅血球、血小板、骨髓及淋巴白血球及其他對熟習此項技術者而言顯而易見的細胞。

【0073】 如本文中所用，術語「個體」係指動物，諸如哺乳動物或非哺乳動物。例如，個體可為哺乳動物，諸如人類，其需要癌症之治療或預防。在本發明之上下文中，術語個體可與術語患者互換使用。

【0074】 「哺乳動物」包括人類，及馴養動物(諸如實驗動物及家養寵物(例如貓、犬、豬、牛、綿羊、山羊、馬、兔))與非馴養動物(諸如野生動物及其類似動物)兩者。如本文中所用，術語「患者」或「個體」包括人類及動物。

【0075】 「非哺乳動物」包括非哺乳無脊椎動物及非哺乳脊椎動物，諸如鳥(例如雞或鴨)或魚。

【0076】 「醫藥組合物」係指本發明化合物與此項技術中普遍接受用於將生物活性化合物遞送至哺乳動物(例如人類)之介質的調配物。該介質包括所有醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑。

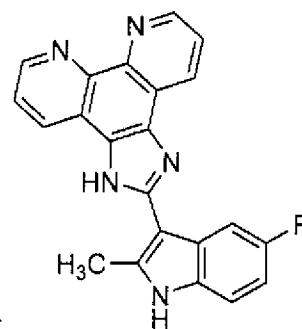
【0077】 「有效量」係指治療有效量或預防有效量。「治療有效量」係指在必要的劑量及時段下，有效地獲得所需治療結果諸如癌細胞死亡、腫瘤尺寸減小、生命期延長或預期壽命延長之量。化合物之治療有效量可

以根據諸如疾病狀態、年齡、性別及個體體重及化合物在個體中引發所需反應之能力的因素而變。可調節給藥方案以提供最佳治療反應。治療有效量亦為其中化合物之治療有益效應超過其任何毒性或有害效應的量。「預防有效量」係指在必要的劑量及時段下，有效地獲得所需預防結果諸如腫瘤變小或細胞增殖變慢之量。通常，預防劑量在疾病之前或在疾病早期階段用於個體，使得預防有效量可以少於治療有效量。

方法

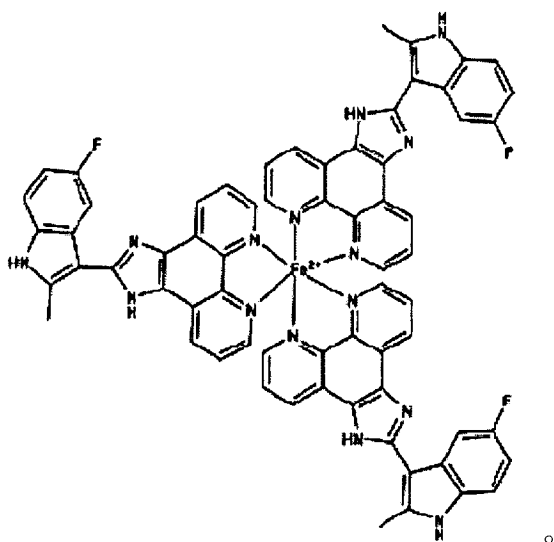
【0078】 本發明提供預防、減少或治療個體之癌症的方法。

【0079】 在本發明之一個實施例中，提供一種方法以預防、減少或



治療個體之癌症，包含向個體投與治療有效量之 (化合物 I)或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、錯合物或螯合物（包括金屬螯合物，諸如鐵、鋅及其他金屬），其中該個體具有DNA修復基因突變。在一實施例中，個體為人類。在另一實施例中，個體已患有癌症。

【0080】 在另一實施例中，本發明係關於一種預防、減少或治療個體之癌症的方法，其包含以具有一或多個金屬原子之錯合物形式投與治療有效量之化合物I之一或多個分子，其中該個體具有DNA修復基因突變。在一個實施例中，一或多個金屬原子選自由以下組成之群：鐵、鋅、鋁、鎂、鉑、銀、金、鉻、鎳、鈦、銅、鈦、鋳、鈳、鉬、錳、鎢及鈷。在一個實施例中，一或多個金屬原子為鐵。在某些實施例中，錯合物具有以下結構：



【0081】 在一實施例中，DNA修復基因係同源重組基因。在某些實施例中，DNA修復基因係同源重組(HR)依賴性去氧核糖核酸(DNA)雙股裂縫(DSB)修復路徑中之基因。熟習此項技術者應瞭解HR依賴性DNA DSB修復路徑經由同源機制修復DNA中之雙股裂縫(DSB)以重新形成連續的DNA螺旋。K. K. Khanna及S. P. Jackson, Nat. Genet. 27(3): 247-254 (2001)，其特此以全文引用之方式併入。HR依賴性DNA DSB修復路徑之組分包括但不限於ATM、ATR、CHK1、CHK2、RPA、RAD51、RAD51L1、RAD51C、RAD51L3、DMC1、XRCC2、XRCC3、RAD52、RAD54L、RAD54B、BRCA1、BRCA2、RAD50、MRE11A及NBS1。其他涉及HR依賴性DNA DSB修復路徑之蛋白質包括調節因子諸如EMSY。Hughes-Davies等人, Cell, 第115卷, 第523頁-第535頁，其特此以全文引用之方式併入。因此，在某些實施例中，DNA修復基因係一或多個選自由以下組成之群的基因：*BRCA-1*、*BRCA-2*、*ATM*、*ATR*、*CHK1*、*CHK2*、*Rad51*、*RPA*及*XRCC3*。在某些實施例中，DNA修復基因係*BRCA-1*及/或*BRCA-2*。

【0082】 在本發明之一實施例中，個體在DNA修復基因中之突變係雜合的。在某些實施例中，個體在同源重組(HR)依賴性去氧核糖核酸

(DNA)雙股裂縫(DSB)修復路徑中之基因突變係雜合的。因此，在某些實施例中，同源重組(HR)依賴性去氧核醣核酸(DNA)雙股裂縫(DSB)修復路徑中之基因係一或多個選自由以下組成之群的基因：*BRCA-1*、*BRCA-2*、*ATM*、*ATR*、*CHK1*、*CHK2*、*Rad51*、*RPA*及*XRCC3*。在某些實施例中，DNA修復基因係*BRCA-1*及/或*BRCA-2*。

【0083】 在本發明之一實施例中，個體在DNA修復基因中之突變係純合的。在某些實施例中，個體在同源重組(HR)依賴性去氧核醣核酸(DNA)雙股裂縫(DSB)修復路徑中之基因突變係純合的。因此，在某些實施例中，同源重組(HR)依賴性去氧核醣核酸(DNA)雙股裂縫(DSB)修復路徑中之基因係一或多個選自由以下組成之群的基因：*BRCA-1*、*BRCA-2*、*ATM*、*ATR*、*CHK1*、*CHK2*、*Rad51*、*RPA*及*XRCC3*。在某些實施例中，DNA修復基因係*BRCA-1*及/或*BRCA-2*。

【0084】 在一實施例中，向個體投與治療有效量之化合物I，或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、錯合物或螯合物(包括金屬螯合物，諸如鐵、鋅及其他金屬)，以治療或預防癌症。熟習此項技術者應瞭解在本發明之上下文內，可治療或預防多種癌症。因此，在一實施例中，癌症選自由以下組成之群：血基質癌、結腸直腸癌、卵巢癌、乳癌、子宮頸癌、肺癌、肝癌、胰腺癌、淋巴結癌、白血病、腎癌、結腸癌、前列腺癌、腦癌、頭頸癌、骨癌、喉癌及口腔癌、尤文氏肉瘤、皮膚癌、腎癌及心臟癌。在某些實施例中，癌症選自由以下組成之群：乳癌、肺癌、淋巴結癌、結腸癌、白血病、腎癌及前列腺癌。在一個實施例中，癌症為乳癌。在一些實施例中，癌症為血液科惡性疾病。血液科惡性疾病之實例包括但不限於白血病、淋巴瘤、霍奇金氏病及骨髓瘤。此外，急性淋巴球性白血病(ALL)、

急性類骨髓球性白血病(AML)、急性前髓細胞白血病(APL)、慢性淋巴球性白血病(CLL)、慢性類骨髓球性白血病(CML)、慢性嗜中性球白血病(CNL)、急性未分化性白血病(AUL)、多形性大細胞淋巴瘤(ALCL)、前淋巴球性白血病(PML)、幼年骨髓單核球性白血病(JMML)、成人T細胞ALL、AML伴三系骨髓發育不良(AMLITMDS)、混合系白血病(MLL)、嗜伊紅性白血病、套膜細胞淋巴瘤、骨髓發育不良症候群(MDS) (例如高風險MDS)、骨髓增生病(MPD)及多發性骨髓瘤(MM)。在一些實施例中，癌症為急性類骨髓球性白血病。在一些實施例中，癌症為慢性類骨髓球性白血病。在一些實施例中，癌症為淋巴瘤。在一些實施例中，癌症為高風險骨髓發育不良症候群。

【0085】 在一實施例中，向個體投與治療有效量之化合物I，或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、錯合物或螯合物(包括金屬螯合物，諸如鐵、鋅及其他金屬)，以治療或預防BRCA相關聯之癌症。熟習此項技術者應瞭解多種癌症與BRCA有關。在一實施例中，BRCA相關之癌症具有一或多個BRCA-1及/或BRCA-2基因突變。

【0086】 癌細胞可具有一種表現型，其特徵在於HR依賴性DNA DSB修復路徑之組分缺陷，亦即癌細胞中該路徑之組分之活性降低或消除。具有該表現型之癌細胞之路徑組分例如上文所列之組分可能存在缺陷，亦即癌細胞中該組分之表現及/或活性可能降低或消除，例如藉助於編碼核酸或編碼調節因子之基因中之突變、多型性或表觀遺傳修飾，諸如高甲基化。

【0087】 在一些較佳實施例中，癌細胞具有BRCA1及/或BRCA2缺陷表現型，亦即癌細胞中BRCA1及/或BRCA2活性降低或消除。具有此表現型之癌細胞之BRCA1及/或BRCA2可能存在缺陷，亦即癌細胞中BRCA1

及/或BRCA2之表現及/或活性可能降低或消除，例如藉助於編碼核酸或編碼調節因子之基因(例如編碼BRCA2調節因子的EMSY基因)(Hughes-Davies等人, Cell, 第115卷, 第523頁-第535頁，其特此以引用之方式併入)中之突變、多型性或表觀遺傳修飾，諸如高甲基化。

【0088】 BRCA1及BRCA2為已知的腫瘤抑制因子，其野生型等位基因經常在雜合載體之腫瘤中丟失(Jasin M. Oncogene. 2002 十二月16; 21(58):8981-93；Tutt等人Trends Mol Med. (2002)8(12):571-6)。BRCA1及/或BRCA2突變與乳癌之關聯在此項技術中充分表徵(Radice P J Exp Clin Cancer Res. 2002九月21(3 Suppl):9-12，其特此以引用之方式併入)。亦已知編碼BRCA2結合因子之EMSY基因之擴增與乳癌及卵巢癌有關。

【0089】 BRCA1及/或BRCA2突變之載體亦具有較高的卵巢癌、前列腺癌及胰腺癌風險。

【0090】 在其他較佳實施例中，癌細胞可具有ATM、ATR、CHK1、CHK2、Rad51、DSS1、RPA及/或XRCC3缺陷表現型，亦即癌細胞中此等組分中之一或多者之活性降低或消除。例如，癌細胞之ATM、ATR、CHK1、CHK2、Rad51、DSS1、RPA及/或XRCC3可能存在缺陷，亦即癌細胞中ATM、ATR、CHK1、CHK2、Rad51、DSS1、RPA及/或XRCC3之表現及/或活性可能降低或消除，例如藉助於編碼核酸或編碼調節因子之基因中之突變、多型性或表觀遺傳修飾，諸如高甲基化。

【0091】 在一實施例中，具有突變型DNA修復基因、被投與治療有效量之化合物I或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、錯合物或螯合物(包括金屬螯合物，諸如鐵、鋅及其他金屬)之個體為動物。在某些實施例中，個體為哺乳動物。因此，在本發明之上下文內的個體可為人類、馴

養動物(例如實驗動物)、家養寵物(例如貓、犬、豬、牛、綿羊、山羊、馬、兔)及非馴養動物諸如野生動物及其類似動物。在一個實施例中，個體為人類。

骨髓抑制

【0092】 在一實施例中，本發明之方法係關於向個體投與治療有效量之化合物I，或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、錯合物或螯合物，其中相對於未投與治療有效量之化合物I之個體，該個體中骨髓抑制之發病率被預防或降低。在某些實施例中，已向未投與治療有效量之化合物I之個體投與用於治療或預防癌症的非化合物I的化學治療劑。因此，在一個實施例中，本發明之方法係關於向個體投與治療有效量之化合物I，或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、錯合物或螯合物(包括金屬螯合物，諸如鐵、鋅及其他金屬)，其中相對於尚未投與非化合物I之化學治療劑之個體，該個體中骨髓抑制之發病率被預防或降低。如本文中所用，骨髓抑制一般係指造血中之一或多種組分(例如骨髓活性)之抑制，其表現在細胞型中之一或多者的異常位準中，該細胞型為此過程之產物。造血中之一或多種組分(例如骨髓活性)之抑制可指代例如白血球計數及/或血小板計數的抑制。因此，在一實施例中，提供一種本發明之預防、減輕或治療個體之癌症的方法，其包含向個體投與治療有效量之化合物I或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、錯合物或螯合物(包括金屬螯合物，諸如鐵、鋅及其他金屬)，其中該個體具有DNA修復基因突變，並且其中相對於未投與治療有效量之化合物I之個體，該個體經歷小於90%的骨髓活性降低。舉例而言，相對於未投與治療有效量之化合物I之個體，該個體經歷小於90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、

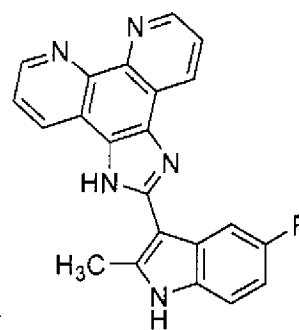
25%、24%、23%、22%、21%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.75%、0.5%、0.25%之骨髓活性降低。在一實施例中，相對於未投與治療有效量之化合物I之個體，投與治療有效量之化合物I之個體經歷小於10%的骨髓活性降低。在一實施例中，相對於未投與治療有效量之化合物I之個體，投與治療有效量之化合物I之個體未經歷骨髓活性降低。

【0093】 在一實施例中，提供一種治療個體之癌症的方法，其包含向個體投與治療有效量之化合物I，或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、錯合物或螯合物(包括金屬螯合物，諸如鐵、鋅及其他金屬)，其中該個體具有DNA修復基因突變。在某些實施例中，可在患有癌症之個體中藉由投與治療有效量之化合物I或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、錯合物或螯合物(包括金屬螯合物，諸如鐵、鋅及其他金屬)來治療各種與癌症有關且對熟習此項技術者而言顯而易見的病理狀態。因此，在一個實施例中，個體經歷與癌症有關的腫瘤之尺寸縮小或減小。腫瘤尺寸縮小或減小可為約1%腫瘤尺寸之縮小或減小至約100%腫瘤尺寸之縮小或減小不等，包括其間之所有整數及範圍。舉例而言，腫瘤尺寸之縮小或減小可為約1%、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%或約100%。在一個實施例中，個體經歷與癌症有關之腫瘤之完全消除(亦即100%腫瘤尺寸之縮小或減小)。在另一實施例中，個體經歷與癌症有關之腫瘤中新血管形成或血管生成的抑制、降低或減少。與癌症有關之腫瘤中新血管形成或血管生成的降低或減少可為約1%新血管形成或血管生成的減少或降低至約100%新血管形成或血管生

成的減少或降低不等，包括其間之所有整數及範圍。舉例而言，新血管形成或血管生成的減少或降低可為約1%、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%或約100%。在一個實施例中，個體經歷與癌症有關之新血管形成或血管生成的完全減少或降低(亦即100%新血管形成或血管生成的減少或降低)。

【0094】 在一個實施例中，本發明係關於一種殺死癌細胞之方法，其包含使該等細胞與治療有效量之化合物I或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、錯合物或螯合物(包括金屬螯合物，諸如鐵、鋅及其他金屬)接觸。在某些實施例中，癌細胞在一或多個選自由以下組成之群的基因中具有缺陷：*BRCA-1*、*BRCA-2*、*ATM*、*ATR*、*CHK1*、*CHK2*、*Rad51*、*RPA*及*XRCC3*。

【0095】 在一個實施例中，本發明係關於一種誘導癌細胞中細胞週



期停滯之方法，其包含使該等細胞與治療有效量之或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、錯合物或螯合物(包括金屬螯合物，諸如鐵、鋅及其他金屬)接觸。在某些實施例中，癌細胞在一或多個選自由以下組成之群的基因中具有缺陷：*BRCA-1*、*BRCA-2*、*ATM*、*ATR*、*CHK1*、*CHK2*、*Rad51*、*RPA*及*XRCC3*。

【0096】 在一個實施例中，提供一種使個體中之G-四鏈體(G4)穩定之方法，其中該方法包含向個體投與治療有效量之化合物I，或其醫藥學上

可接受之鹽、游離鹼、水合物、錯合物或螯合物(包括金屬螯合物，諸如鐵、鋅及其他金屬)。在另一實施例中，提供一種使個體中之G-四鏈體(G4)穩定之方法，其中該方法包含向個體投與治療有效量之包含化合物I或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、錯合物或螯合物(包括金屬螯合物，諸如鐵、鋅及其他金屬)及至少一種額外的如本文中所述的治療活性劑之醫藥組合。在一些實施例中，提供一種使個體中之G-四鏈體(G4)穩定之方法，其中該方法包含向個體投與治療有效量之包含化合物I或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、錯合物或螯合物(包括金屬螯合物，諸如鐵、鋅及其他金屬)之醫藥組合，並且在已向個體投與前述化合物之前、期間或之後投與放射治療或至少一種額外的治療活性劑。

【0097】 在一個實施例中，以約1毫克/天至約3公克/天之劑量投與化合物I，或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、錯合物或螯合物(包括金屬螯合物，諸如鐵、鋅及其他金屬)。在某些實施例中，以約1毫克/天至約200毫克/天之劑量投與化合物I，或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、錯合物或螯合物(包括金屬螯合物，諸如鐵、鋅及其他金屬)。在某些實施例中，以約50毫克/天至約200毫克/天之劑量投與化合物I，或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、錯合物或螯合物(包括金屬螯合物，諸如鐵、鋅及其他金屬)。

組合療法

【0098】 在一個實施例中，本發明提供一種包含化合物I與至少一種額外的治療活性劑之組合療法。

【0099】 在一個實施例中，本發明提供一種治療有需要的患者中與細胞增殖有關的病況之方法。在一個實施例中，本發明提供一種治療癌症

或腫瘤之方法。該方法包含向有需要之患者共同投與治療有效量之化合物I或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、酯、溶合物及/或前驅藥及至少一種額外的治療活性劑。在一個實施例中至少一種額外的治療活性劑係奧拉帕尼。

【0100】 術語「共同投與(co-administration或coadministration)」係指以協同方式一起投與(a)化合物I或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、錯合物或螯合物(包括金屬螯合物，諸如鐵、鋅及其他金屬)及(b)至少一種額外的治療活性劑。例如，共同投與可為同時投與、依序投與、重疊投與、間隔投與、連續投與或其組合。在一個實施例中，將化合物I或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、錯合物或螯合物(包括金屬螯合物，諸如鐵、鋅及其他金屬)及至少一種額外的治療活性劑調配成單劑型。在另一實施例中，化合物I或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、錯合物或螯合物(包括金屬螯合物，諸如鐵、鋅及其他金屬)及至少一種額外的治療活性劑以各別劑型提供。

【0101】 醫藥調配物

【0102】 在另一實施例中，本發明提供一種包含與醫藥學上可接受的賦形劑或載劑組合的作為活性成分的如本文中所揭示的治療有效量之化合物I或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、錯合物或螯合物(包括金屬螯合物，諸如鐵、鋅及其他金屬)的醫藥組合物及/或組合。出於多種目的將賦形劑加入調配物中。

【0103】 在一些實施例中，可將化合物I或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、錯合物或螯合物(包括金屬螯合物，諸如鐵、鋅及其他金屬)及至少一種治療活性劑調配成單一醫藥組合物及/或組合。在一些實施

例中，可將化合物I或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、錯合物或螯合物(包括金屬螯合物，諸如鐵、鋅及其他金屬)及至少一種治療活性劑調配成包含醫藥學上可接受的賦形劑或載劑的各別醫藥組合物及/或組合。

【0104】 在特定實施例中，可將化合物I或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、錯合物或螯合物(包括金屬螯合物，諸如鐵、鋅及其他金屬)及至少一種治療活性劑調配成單一醫藥組合物及/或組合組合物。在另一實施例中，組合物可以約1 mg至約1 g之量包含如本文中所揭示的化合物I或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、錯合物或螯合物(包括金屬螯合物，諸如鐵、鋅及其他金屬)。在另一實施例中，該量為約5 mg至約500 mg。在另一實施例中，該量為約20 mg至約400 mg。在另一實施例中，該量為約50 mg至約300 mg。在另一實施例中，該量為約100 mg至約200 mg。在另一實施例中，化合物為化合物I之鹽、酯、溶合物或前驅藥。

【0105】 在另一實施例中，醫藥組合物可包含濃度為約0.1 mg/ml至約10 mg/ml之化合物I或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、錯合物或螯合物(包括金屬螯合物，諸如鐵、鋅及其他金屬)。在另一實施例中，該濃度為約0.5 mg/mL至約5 mg/ml。在另一實施例中，該濃度為約0.75 mg/mL至約4.5 mg/ml。在另一實施例中，該濃度為約3 mg/ml至約5 mg/ml。

【0106】 在另一實施例中，化合物為化合物I之鹽、酯、溶合物或前驅藥。在另一實施例中，組合物可包含化合物I或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、酯、溶合物及/或前驅藥，及PARP抑制劑。在另一實施例中，PARP抑制劑為奧拉帕尼。

【0107】 在另一實施例中，組合物可包含化合物I或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、酯、溶合物及/或前驅藥及奧拉帕尼，其中組合

物中奧拉帕尼之量為約10 mg至約800 mg。在另一實施例中，奧拉帕尼之量為約20 mg至約600 mg。在另一實施例中，奧拉帕尼之量為約100 mg至約500 mg。在另一實施例中，奧拉帕尼之量為約300 mg至約400 mg。

【0108】 可將醫藥學上可接受之賦形劑加入組合物/調配物中。例如，可將稀釋劑加入本發明之調配物中。稀釋劑提高固體醫藥組合物及/或組合之容積，並且可使含有組合物及/或組合之醫藥劑型更易於患者及護理者處理。用於固體組合物及/或組合之稀釋劑包括例如微晶纖維素(例如AVICEL)、微細纖維素、乳糖、澱粉、預膠凝化澱粉、碳酸鈣、硫酸鈣、糖、葡萄糖結合劑(dextrate)、糊精、右旋糖、二水合磷酸氫鈣、磷酸三鈣、高嶺土、碳酸鎂、氧化鎂、麥芽糊精、甘露醇、聚甲基丙烯酸酯(例如EUDRAGIT(r))、氯化鉀、粉末狀纖維素、氯化鈉、山梨糖醇及滑石。

【0109】 經壓緊成諸如片劑之劑型的固體醫藥組合物及/或組合可以包括賦形劑，其功能包括幫助在壓縮之後使活性成分及其他賦形劑結合在一起。用於固體醫藥組合物及/或組合之黏合劑包括阿拉伯膠、褐藻酸、卡波姆(例如卡波莫)、羧甲基纖維素鈉、糊精、乙基纖維素、明膠、瓜爾豆膠、黃蓍膠、氫化植物油、羥乙基纖維素、羥丙基纖維素(例如KLUCEL)、羥丙基甲基纖維素(例如METHOCEL)、液體葡萄糖、矽酸鎂鋁、麥芽糊精、甲基纖維素、聚甲基丙烯酸酯、聚維酮(例如KOLLIDON、PLASDONE)、預膠凝化澱粉、海藻酸鈉及澱粉。

【0110】 經壓緊之固體醫藥組合物及/或組合在患者的胃中之溶解速率可藉由向該組合物及/或組合中添加崩解劑來提高。崩解劑包括褐藻酸、羧甲基纖維素鈣、羧甲基纖維素鈉(例如AC-DI-SOL及PRIMELLOSE)、膠質氧化矽、交聯羧甲纖維素鈉、交聯聚維酮(例如KOLLIDON及

POLYPLASDONE)、瓜爾豆膠、矽酸鎂鋁、甲基纖維素、微晶纖維素、波拉克林鉀、粉末狀纖維素、預膠凝化澱粉、海藻酸鈉、羥基乙酸澱粉鈉(例如EXPLOTAB)、馬鈴薯澱粉及澱粉。

【0111】 可以添加助滑劑以改善未經壓緊之固體組合物及/或組合之流動性並且改善用劑之精確性。可充當助滑劑之賦形劑包括膠質氧化矽、三矽酸鎂、粉末狀纖維素、澱粉、滑石及磷酸三鈣。

【0112】 當諸如片劑之劑型藉由壓緊粉末狀組合物及/或組合而製備時，該組合物及/或組合經受來自衝頭及染料之壓力。一些賦形劑及活性成分具有黏附於衝頭及染料之表面的趨勢，這會導致產物具有凹痕及其他表面不規則性。可向組合物及/或組合中加入潤滑劑以減少黏著並減輕自染料釋放產物。潤滑劑包括硬脂酸鎂、硬脂酸鈣、單硬脂酸甘油酯、棕櫚基硬脂酸甘油酯、氫化蓖麻油、氫化植物油、礦物油、聚乙二醇、苯甲酸鈉、月桂基硫酸鈉、硬脂醯反丁烯二酸鈉、硬脂酸、滑石及硬脂酸鋅。

【0113】 調味劑及風味增強劑使劑型對患者而言更適口。用於可包括在本發明之組合物及/或組合中的醫藥產品的常見調味劑及風味增強劑包括麥芽醇、香草精、乙香草醛、薄荷醇、檸檬酸、反丁烯二酸、乙麥芽醇及酒石酸。

【0114】 亦可使用任何醫藥學上可接受的著色劑來使固體及液體組合物及/或組合染色以改善其外觀及/或便於患者鑑定產物及單位劑量位準。

【0115】 可使用本發明之化合物I或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、酯、溶合物及/或前驅藥及任何其它固體賦形劑來製備成呈液體醫藥組合物及/或組合形式，在改賦形劑中之組分溶解於或懸浮於液體載

劑諸如水、植物油、醇、聚乙二醇、丙二醇、丙三醇或聚乙二醇 15 羥硬脂酸酯(Solutol)中。

【0116】 液體醫藥組合物及/或組合可含有乳化劑以使不可溶於液體載劑之活性成分或其他賦形劑均勻地分散在整個組合物及/或組合中。可適用於本發明之液體組合物及/或組合之乳化劑包括例如明膠、蛋黃、酪蛋白、膽固醇、阿拉伯膠、西黃蓍膠、鹿角菜膠、果膠、甲基纖維素、卡波姆、鯨蠟硬脂醇及鯨蠟醇。

【0117】 液體醫藥組合物及/或組合亦可含有黏度增強劑以改善產品之口感及/或塗佈胃腸道之內層。該等藥劑包括阿拉伯膠、褐藻酸膨潤土、卡波姆、羧甲基纖維素鈣或羧甲基纖維素鈉、鯨蠟硬脂醇、甲基纖維素、乙基纖維素、明膠瓜爾豆膠、羥乙基纖維素、羥丙基纖維素、羥丙基甲基纖維素、麥芽糊精、聚乙烯醇、聚維酮、碳酸丙烯酯、海藻酸丙二醇酯、海藻酸鈉、羥基乙酸澱粉鈉、澱粉西黃蓍膠及三仙膠。

【0118】 可添加甜味劑諸如阿斯巴甜、乳糖、山梨糖醇、糖精、糖精鈉、蔗糖、阿斯巴甜、果糖、甘露醇及轉化糖以改善味道。

【0119】 可以攝取安全之位準添加防腐劑及螯合劑諸如醇、苯甲酸鈉、丁基化羥基甲苯、丁基化羥基甲氧苯及乙二胺四乙酸以改善儲存穩定性。

【0120】 液體組合物及/或組合亦可含有緩衝劑諸如葡萄糖酸、乳酸、檸檬酸或乙酸、葡萄糖酸鈉、乳酸鈉、檸檬酸鈉或醋酸鈉。賦形劑及所用量之選擇可藉由調配科學家基於標準程序之經驗及考量並參考該領域中之著作來容易地確定。

【0121】 本發明之固體組合物及/或組合包括粉末、顆粒、聚集體及

經壓緊之組合物及/或組合。劑量包括適合於經口、經頰、經直腸、非經腸(包括皮下、肌內及靜脈內)、吸入及經眼投與之劑量。儘管在任何既定情況下最適合的投與將取決於所治療之病況的性質及嚴重程度，但本發明之最佳途徑為口服。劑量可方便地以單位劑型存在且藉由醫藥學技術中熟知的任何方法來製備。

【0122】 劑型包括固體劑型如片劑、粉劑、膠囊、栓劑、藥囊、糖衣錠及口含錠，以及液體糖漿劑、懸浮液、噴霧劑及酏劑。

【0123】 本發明之劑型可為含有在硬殼或軟殼內的本發明之組合物及/或組合較佳為粉末體或顆粒狀固體組合物及/或組合之膠囊。殼可由明膠來製備並且視情況含有塑化劑(諸如丙三醇及山梨糖醇)，及乳白劑或著色劑。

【0124】 用於壓片或膠囊填充之組合物及/或組合可藉由濕式造粒法來製備。在濕式造粒中，將呈粉末形式之活性成分及賦形劑中之一些或所有摻合且然後在導致粉劑凝集成顆粒劑之液體(通常為水)存在下進一步混合。對顆粒進行篩選及/或研磨、乾燥且然後篩選及/或研磨至所需粒度。可顆粒壓片，或可壓片之前添加其他賦形劑，諸如助滑劑及/或潤滑劑。

【0125】 壓片組合物及/或組合可藉由乾式摻合來習知地製備。例如，可將活性劑及賦形劑的經摻合之組合物及/或組合壓成塊或片且然後搗碎成經壓緊之顆粒劑。可隨後將經壓緊之顆粒劑壓縮成片劑。

【0126】 作為乾式造粒之替代方案，可使用直接壓縮技術將經摻合之組合物及/或組合直接壓縮成壓緊劑型。直接壓縮產生更多的均勻片劑而非顆粒劑。特別良好地適合於直接壓縮壓片之賦形劑包括微晶纖維素、噴幹乳糖、磷酸二鈣、二水合物及膠質氧化矽。此等及其他賦形劑在直接壓

縮壓片中之適當用途對此項技術中具有特別係直接壓縮壓片的調配挑戰的經驗及技能之彼等而言為已知的。

【0127】 本發明之膠囊填充可包含關於壓片所描述的前述摻合物及顆粒中之任一者；然而，其不經受最終壓片步驟。

【0128】 可根據此項技術中已知之方法將活性成分及賦形劑調配成組合物及/或組合及劑型。

【0129】 在一個實施例中，劑型可作為試劑盒提供，該試劑盒包含化合物I或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、酯、溶合物及/或前驅藥及醫藥學上可接受之賦形劑及載劑作為各別組分。在一個實施例中，劑型可作為試劑盒提供，該試劑盒包含化合物I或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、酯、溶合物及/或前驅藥、至少一種額外的治療活性劑及醫藥學上可接受之賦形劑及載劑作為各別組分。在一些實施例中，劑型試劑盒允許醫師及患者在使用之前藉由溶解、懸浮或混合化合物I或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、酯、溶合物及/或前驅藥與醫藥學上可接受之賦形劑及載劑來調配口服溶液或注射溶液。在一個實施例中，與經預調配之化合物I或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、酯、溶合物及/或前驅藥之調配物相比，提供化合物I或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、酯、溶合物及/或前驅藥之劑型試劑盒具有改善的穩定性。

【0130】 在一個實施例中，在調配物或組合物及/或組合中，本發明之醫藥調配物或組合物及/或組合含有25-100重量%或50-100重量%之如本文中所述之化合物I或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、酯、溶合物及/或前驅藥。

【0131】 在另一實施例中，本發明之方法包括以上述醫藥調配物或

組合物及/或組合形式投與治療有效量之化合物I或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、錯合物或螯合物(包括金屬螯合物，諸如鐵、鋅及其他金屬)。在特定實施例中，該等方法用於預防、減少或治療個體之癌症。在另一實施例中，該等方法用於殺死癌細胞。在另一實施例中，該等方法用於誘導癌細胞中細胞週期停滯。

【0132】 以下實例進一步說明本發明但不應解釋為以任何方式限制其範疇。

實例

【0133】 實例1：實例2-7之物質及方法

【0134】 藥物及試劑

【0135】 化合物I及氘化化合物I(化合物I-d6)由APTOSE Biosciences(San Diego, CA)提供。清潔劑相容性蛋白質檢測試劑盒，DC™蛋白質檢測購自BioRad Laboratories, Inc.(Hercules, CA)。CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)購自Promega (Madison, WI)。PARP、MCL-1、BAD、BIK、Na⁺/K⁺ ATP酶抗體來自Cell Signaling Technology公司(Danvers, MA)。pSer139 H2AX及ATM抗體購自Abcam (Cambridge, UK)。ABCG2抗體獲自KAMIYA Biomedical (Tukwila, WA)。Ko143及pSer1981-ATM抗體獲自Millipore Sigma (St. Louis, MO)。奧拉帕尼購自Selleckchem (Houston, TX)。卡鉑及拓朴替康獲自UCSD Moores Cancer Center Pharmacy。

【0136】 細胞型及培養

【0137】 人類伯基特氏淋巴瘤(Burkitt lymphoma)細胞株Raji氏獲自美國典型培養物保藏中心(American Type Tissue Culture Collection)並在

37°C、5% CO₂下在補充有10%胎牛血清(ATCC)之RPMI 1640培養基(ATCC)中培養。藉由在6個月時段內曝露於濃度漸進升高之化合物I來產生化合物I抗性Raji氏(Raji氏/化合物IR)細胞株。CAOV3細胞獲自ATCC並在補充有10%胎牛血清之完全DMEM中培養。MCF7載體受控及BRCA1 shRNA亞克隆獲自Dr. Simon Powell (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center)並在具有10%胎牛血清之EMBM中培養。MCF10A及*hTERT*-IMEC克隆獲自Dr. Ben Ho Park (Johns Hopkins University)。HCT116 BRCA2^{+/+}細胞及BRCA2^{-/-}細胞獲自Dr. Samuel Aparicio (British Columbia Cancer Research Centre)。PEO1及PEO4細胞獲自Dr. Sharon Cantor (University of Massachusetts)且此等細胞株在如先前發表之相同條件下培養。Sakai等人, Functional restoration of BRCA2 protein by secondary BRCA2 mutations in BRCA2-mutated ovarian carcinoma, *Cancer Res.* 2009;69(16):6381-6 ; Konishi等人, Mutation of a single allele of the cancer susceptibility gene BRCA1 leads to genomic instability in human breast epithelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2011;108(43):17773-8 ; Xu等人, CX-5461 is a DNA G-quadruplex stabilizer with selective lethality in BRCA1/2 deficient tumours, *Nature Communications* 2017;8:14432, 其皆特此以引用之方式併入。

【0138】 細胞毒性研究

【0139】 將細胞種植在96孔板中，並用所指示之藥物處理細胞5天。使用購自Promega之CellTiter 96 AQueous單溶液(MTS)細胞增殖檢測儀來量測細胞存活率，並且使用GraphPad Prism 6軟件計算IC₅₀值。

【0140】 生物素標記及免疫墨點程序

【0141】 為了量化ABCG2表現，用EZ-LINK sulfo-NHS-SS-biotin (Thermo Scientific, Pittsburg, PA)使細胞表面生物素化並使其經受如先前所報告之西方墨點分析並經受西方墨點分析。Tsai CY, Liebig JK, Tsigelny IF, Howell SB, The copper transporter 1 (CTR1) is required to maintain the stability of copper transporter 2 (CTR2). *Metallomics* 2015;7:1477-87，其特此以引用之方式併入。

【0142】 RNA-seq及qRT-PCR

【0143】 使用RNeasy微型試劑盒(QIAGEN, Valencia, CA)自三個獨立樣品中分離總細胞RNA用於各實驗。將RNA-seq樣品提供給IGM Genomics Center, University of California, San Diego, La Jolla, CA (<http://igm.ucsd.edu/genomics/>)，以便使用Agilent Bioanalyzer進行庫生成及驗證，在Illumina定序器HiSeq4000上進行定序。由OHSU進行生物信息學分析。用於證實ABCG2過表現之正向及反向引子分別為：5'-TTA-GGA-TTG-AAG-CCA-AAG-G-3'及5'-TAG-GCA-ATT-GTG-AGG-AAA-ATA-3'。

【0144】 化合物I之細胞藥理學

【0145】 將曝露於化合物I或Fe(化合物I)₃之細胞在含有5 ng氘化化合物I標準物之乙腈中均質化。採用與使用正離子模式電灑游離(ESI)作為離子源的Thermo LCQdeca質譜儀連接之Agilent 1260液相層析儀(LC)系統，在UCSD分子質譜儀上分析樣品。分別地，ESI離子源電壓設定為5 kV，及鞘氣體流量率為80單元，輔助氣體流量率為20單元，及毛細管溫度為250℃。使用具有0.1%甲酸之水作為移動相A及具有0.1%甲酸之乙腈作為移動相B，利用Phenomenex Kinetex Biphenyl柱(ID 2.1 mm×長50 mm，粒度

2.6 μm)進行LC分離。將LC流量率設定為0.30毫升/分鐘。LC梯度在10分鐘內自5%流動相B上升至95%流動相B，在95% B下保持2分鐘，在1分鐘內恢復至5% B，且然後在5% B下保持6分鐘。在正離子模式ESI-MS/MS分析下，自位於 m/z 368 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)處之化合物I的分子態離子峰，在 m/z 353處觀察到其主要碎片峰，其中標準化碰撞能量為45%，並且自位於 m/z 374 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)處之化合物I-d6的分子態離子峰，在 m/z 359處觀察到其主要碎片峰，其中標準化碰撞能量為45%。選擇反應監測(Selected reaction monitoring, SRM)模式用於獲取 m/z 353及 m/z 359碎片峰。與外加化合物I-d6之量相關的SRM峰面積比(化合物I/化合物I-d6)用於量化樣品中之化合物I及 $\text{Fe}(\text{化合物I})_3$ 。相同的柱、梯度及流量率用於偵測 $\text{Fe}(\text{化合物I})_3$ ，其使用Agilent 1100 HPLC及Orbitrap XL (Thermo)質譜儀採用Thermo IonMax ESI界面來偵測。在此等情況下， $\text{Fe}(\text{化合物I})_3$ 溶離約11.5分鐘。10:1分散流用於0.3毫升/分鐘之溶離劑流量率，使得分散後將約0.030毫升/分鐘引入ESI中。離子源MS參數如下：毛細管溫度 250°C 、鞘氣體流量20單元、正極性、源電壓5.0 kV、毛細管電壓22 V及鏡筒透鏡80 V。傅立葉變換(Fourier transform) MS (Orbitrap)參數為：FTMS AGC $1\text{e}6$ 、FTMS微掃描平均為2及FTMS完整掃描最大離子時間為500 ms。使用15,000 (在400 m/z 處，峰 m/z 除以峰寬，以半高寬形式給出)之解析度參數。對於MS-MS CID譜，使用45%之標準化碰撞能量。

【0146】 $\text{Fe}(\text{化合物I})_3$ 之合成及特徵

【0147】 將濃縮水原料中的五莫耳當量之亞鐵離子(如 FeSO_4)加入乙醇中的化合物I中，這產生深紅色沈澱物，其隨後溶解於DMSO中並由HPLC及質譜表徵。 $\text{Fe}(\text{化合物I})_3$ 之純度 $>95\%$ 並且在完全RPMI-1640培養

基中穩定至少5天。

【0148】 彗星檢測

【0149】 彗星檢測試劑盒購自Trevigen (Gaithersburg, MD)並且根據製造商的說明書進行中性彗星檢測。用Keyence螢光顯微鏡(Keyence America, Itasca, IL)採集影像並用OpenComet軟件定量。

【0150】 免疫螢光染色

【0151】 細胞被收集並用PBS洗滌兩次，固定在Z-fix溶液(緩衝鋅福馬林固定劑，Anatech公司, Creek, MI)中，並用在含有5%牛血清白蛋白的PBS中之0.3% Triton X-100滲透及封閉。然後將細胞與 γ -H2AX抗體(1:250稀釋於在含有1%牛血清白蛋白的PBS中之0.3% Triton X-100中)一起培育過夜，繼之以三次洗滌。將細胞與螢光結合二級抗體(1:1000稀釋)一起培育1小時，繼之以三次洗滌。用具有4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)之ProLong Gold抗螢光衰減試劑安置載玻片以對細胞核進行染色(Molecular Probes)。螢光用Keyence螢光顯微鏡使用100 \times 物鏡來查看並用Image J軟件(the National Institutes of Health)來定量。

【0152】 統計分析

【0153】 所有兩組比較均利用假設不等差異之司圖頓t檢驗(Student's *t*-test)。數據呈現為最少三項獨立實驗之平均 \pm SEM。

【0154】 實例2：化合物I之細胞藥理學。

【0155】 在化合物I表現出強細胞毒性之細胞型中，淋巴瘤得到關注，因為大多數用於治療此疾病之標準化學治療劑導致骨髓抑制，這限制了劑量。出於此原因，選擇Raji伯基特氏淋巴瘤細胞用於化合物I之細胞藥理學之研究。Raji氏細胞中化合物I之胞內積聚藉由液相層析串聯式質譜

(LC-MS/MS)來定量。化合物I及其內標化合物I-d6在~6.9分鐘時自LC柱溶離，具有尖峰輪廓。Raji氏細胞相對緩慢地積聚化合物I，其中6小時後含量接近穩態(圖6A)。

【0156】 在選擇用於化合物I之偵測的相同反應監測模式下，LC-MS/MS追蹤之仔細檢查鑑定出在~8.7分鐘時自LC柱溶離之次峰。使用LC-HR-ESI-TOFMS (液相層析高解析度電灑游離飛行時間質譜)，鑑定出峰具有 m/z 578.65，其亦在~8.7分鐘時溶離。利用Obritrapp-MS之高解析度MS/MS分析證明其為化合物I與亞鐵以3比1比率之錯合物(圖1B)。Fe(化合物I)₃三元錯合物之結構由LC-MS-ESI表徵。前驅物離子質譜之兩個主要特徵約束該結構之鑑定。第一為藉由高解析度MS對其兩個帶正電離子之質荷比(m/z)進行的精確質量量測。第二特徵為所量測之峰的顯示該結構含有至少一個鐵原子的同位素分佈。另外，錯合物之MS-MS譜顯示兩個碎片離子，一個在與游離化合物I相同之368 m/z 處，並且一個離子在與鐵及兩個剩餘的化合物I配位子一致之789 m/z 處。三元錯合物之質量計算值578.6520 m/z 非常接近於對若干不同天數中之各者所觀察到的平均 m/z 結果578.6519 m/z 。量測值與計算值之差值比為-0.2 ppm。異日間標準差為0.0003 m/z ， $n = 3$ ，並且同日內質量差值比一致小於1.0 ppm。此一致性量測值在3 ppm標準內，該標準通常應用於合成有機產物之結構證明。鐵之存在藉由該元素之同位素圖案來證實。鐵具有4個穩定的同位素，⁵⁴Fe、⁵⁶Fe、⁵⁷Fe及⁵⁸Fe，其天然豐度分別為5.85%、91.75%、2.12%及0.28%。由於⁵⁴Fe同位素而出現之MS峰係獨特的，因為其與化合物I配位子之碳、氫及氮之天然同位素不一致。在該錯合物之譜中，其質量計算值為577.6542 m/z (比大多數豐富的同位素峰小~1 m/z ，因為離子為正二電荷)。對此峰

所觀察到的平均質量為577.6545 m/z，其標準差為0.0003 m/z。在n = 3之情況下異日間差值比為0.5 ppm。⁵⁴Fe峰之強度亦一致地量測為⁵⁶Fe主峰之離子豐度強度之約6%，如根據天然豐度比所預期。對於上文給出的峰值位置之量測，相對於391.2843 m/z之內標（由於環境背景而普遍存在的鄰苯二甲酸二異辛酯離子）重新校準結果。

【0157】 發現Fe(化合物I)₃錯合物可以藉由向在乙醇中之化合物I中添加FeSO₄來簡單地合成。Fe(化合物I)₃之純度藉由HPLC來記錄並且發現該錯合物在儲存時穩定。Fe(化合物I)₃之IC₅₀為145.7 ± 0.5 nM，大概比化合物I之效力小1.5倍，歸因於用其正雙重帶電的Fe離子難以進入細胞(圖1C)。藉由用0.5 μM之各化合物治療Raji氏細胞6小時並基於各分子之游離效率校正胞內濃度來檢測化合物I及Fe(化合物I)₃之相對吸收率(圖1D)。經化合物I治療之細胞比經Fe(化合物I)₃治療之細胞積聚更多的胞內Fe(化合物I)₃，與此等兩個分子之IC₅₀之差值一致。雖然大部分化合物I在經化合物I治療之細胞中胞內轉化成Fe(化合物I)₃，但在經Fe(化合物I)₃治療之細胞中Fe(化合物I)₃並不會胞內分解產生可偵測的游離化合物I。因此，相信Fe(化合物I)₃為化合物I之主要活性胞內形式。

【0158】 實例3：化合物I導致DNA損傷。

【0159】 化合物I之結構與結合於DNA中的四鏈體結構的藥物之結構類似，該結合引起股裂縫；這引向化合物I是否對DNA造成損傷之研究。用0.5 μM 化合物I治療親代Raji氏細胞以延長時段並且藉由磷酸化形式之ATM及γH2AX的藉由西方墨點分析所量測的積聚來評定DNA損傷之誘導。圖2A顯示在Raji氏細胞中從6小時開始化合物I產生磷酸化ATM及γH2AX的明顯增加，並且其隨著藥物曝露持續時間長達24小時而增加。在

8小時處開始偵測到PARP之分裂，指示誘導細胞凋亡。Raji氏細胞具有極小核，使得難以定量 γ H2AX病灶之形成，因此將人類卵巢癌細胞株CAOV3用於此目的。圖2B顯示在曝露於DMSO或1 μ M 化合物I 24小時之CAOV3細胞中 γ H2AX病灶形成之代表性影像。圖2C顯示在1小時時偵測到病灶數目增加並且在8小時後病灶數目更加明顯地增加。DNA損傷之證據由主要偵測DNA雙股裂縫的中性彗星檢測之結果(圖2D)進一步強化。儘管與DMSO治療相比，當細胞用0.5 μ M 化合物I治療6小時時尾DNA沒有增加，但當細胞用化合物I治療6小時且然後在無藥物之培養基中培育18小時時，彗星尾部中之DNA顯著更多。此等結果提供有力的證據，亦即化合物I產生DNA損傷並且產生能夠觸發細胞凋亡之DNA股裂縫之積聚。

【0160】 實例4：BRCA1/2缺陷細胞對化合物I超敏。

【0161】 化合物I產生DNA損傷之發現引向同源重組中之細胞缺陷是否對此藥物超敏的研究。使用BRCA1精通及缺陷人類細胞株之同基因型對，測試化合物I與BRCA1缺陷之間存在合成致死的假定。發現各含有產生過早終止密碼子(BRCA1-het #1及#2)之BRCA1中之2-bp缺失的雜合基因敲入的兩個獨立的MCF10A亞克隆，比在克隆的基因組(對照)內經歷靶向載體之隨機結合的克隆對奧拉帕尼更敏感，證實在該等兩個基因敲入克隆中BRCA1功能之喪失(圖3A，左邊)。這兩個基因敲入克隆甚至對化合物I更加超敏(圖3A，右邊)。在含有衍生自hTERT-IMEC細胞株的相同2-bp基因嵌入之克隆中證實了BRCA1功能受損之效應，同時亦發現其對奧拉帕尼及化合物I兩者皆超敏(圖3B)。BRCA1缺陷細胞對化合物I超敏之結論進一步由在其中BRCA1表現被shRNAi之表現穩定地阻斷的MCF7 E7細胞中獲得之結果支持。如圖3C中所示，E7克隆對奧拉帕尼及化合物I具有類似

的超敏性程度。在BRCA1勝任細胞及BRCA1非勝任細胞之三個獨立的同基因對中之此等結果指示：由化合物I產生的DNA損傷的修復部分取決於BRCA1在其中起作用同源重組及/或其他DNA修復路徑。分別使用BRCA2精通及BRCA2缺陷卵巢癌細胞株PEO4及PEO1測試BRCA2缺陷細胞是否對化合物I較敏感。PEO1為BRCA2缺陷並且對順鉑及聚(ADP-核糖)聚合酶抑制劑AG14361敏感。PEO4衍生自順鉑抗性復發時之腹水並且含有使BRCA2功能復原之二級突變。BRCA2功能之復原增強對奧拉帕尼(圖3D，左邊)及化合物I(圖3D，右邊)兩者之抗性。使用BRCA2精通HCT116細胞及兩個BRCA2^{-/-}亞克隆B18及B46獲得類似結果(圖3E)。因此，BRCA1亦或BRCA2功能之喪失使得惡性細胞對化合物I超敏。

【0162】 實例5：後天抗藥性之選擇

【0163】 為了劃定化合物I之哪些效應與對此藥物之敏感性最為密切相關，研發出Raji伯基特氏淋巴瘤細胞株的子株，其由於在6個月時段內反覆曝露於濃度逐漸升高之化合物I而具有後天抗性(Raji氏/化合物IR)。在選擇過程中，抗性緩慢且逐漸地演變，在任何點處均沒有突變。當使用在曝露於藥物120小時期間定量生長率之檢測進行測試時，對於親代Raji氏細胞化合物I之IC₅₀為91.9±22.3 nM。這與針對新鮮分離之AML胚細胞及CLL細胞已報告之範圍相同。Zhang等人，「Inhibition of c-Myc by ATPO-COMPOUND I as an Innovative Therapeutic Approach to Induce Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Acute Myeloid Leukemia [abstract]」, *Blood* 2016;128:1716；Kurtz等人，「Broad Activity of COMPOUND I in AML and other Hematologic Malignancies Correlates with KFL4 Expression Level [abstract]」, *Blood* 2015;126:1358，此等兩者特此以引

用之方式併入。Raji氏/化合物IR細胞對化合物I具有 16.7 ± 3.9 倍抗性 ($IC_{50} : 1387.7 \pm 98.5$ nM)。在於無藥物培養基中培養期間，抗性之位準保持穩定達至少3個月(圖4A)。Raji氏/化合物IR細胞比親代細胞生長地略快，但差值在統計學上並不顯著。在誘導Raji氏敏感細胞中細胞凋亡之濃度下，化合物I未能觸發Raji氏/化合物IR細胞中之細胞凋亡。當用 $0.5 \mu\text{M}$ 化合物I治療敏感細胞24小時時，與DMSO對照相比，促凋亡蛋白質BIK及BAD分別增加 $47.5 \pm 16.8\%$ 及 2.1 ± 0.25 倍($p < 0.05$, $n = 3$)並且抗凋亡蛋白質MCL-1減少 $38.1 \pm 2.3\%$ ($p < 0.001$, $n = 3$)。在經受相同曝露之Raji氏/化合物IR細胞中未偵測到此等改變中之一者(圖4B)。

【0164】 實例6：抗藥性機制

【0165】 Raji氏/化合物IR細胞中之抗性可歸因於流入或流出、胞內解毒之變化或藥物的主要靶標之變化。監測與原來的化合物I或Fe(化合物I)₃錯合物一起培育之Raji氏及Raji氏/化合物IR細胞中原來的化合物I及Fe(化合物I)₃兩者之胞內積聚。在曝露於化合物I之Raji氏/化合物IR細胞中，兩種形式的藥物的積聚率均嚴重降低(圖6A及表1)。

表1.在前2小時內化合物I及Fe(化合物I)₃自Raji氏及Raji氏/化合物IR細胞中之流出率(log fmole/ 10^7 細胞/小時)。

	細胞株	
	Raji氏	Raji氏/化合物IR
化合物I	$-0.19 \pm 0.025^*$ ($-0.24 \sim -0.13$) [¥]	$-0.26 \pm 0.025^*$ ($-0.32 \sim -0.21$) [¥]
Fe(化合物I) ₃	$-0.22 \pm 0.044^*$ ($-0.32 \sim -0.13$) [¥]	$-0.17 \pm 0.063^*$ ($-0.32 \text{ to } -0.014$) [¥]

*平均 \pm SEM, $n = 6$

[¥]95%信賴區間

當細胞與鐵(化合物I)₃錯合物一起培育時，在較小程度上亦為如此(圖6B)。相比之下，在細胞加載任一形式之藥物後的前2小時內ATPO-化合物I亦或Fe(化合物I)₃之流出沒有明顯差異。此等結果指示Raji氏細胞中對化合

物I之抗性與該藥物之兩種形式之積聚減弱相關。當Raji氏/化合物IR細胞與化合物I一起培育時，在6小時時藥物積聚之更詳細的量測證實該藥物的兩種形式之積聚明顯減少；然而，Fe(化合物I)₃錯合物之位準仍超過原來藥物之位準(圖4C)。僅當用至少3倍之化合物I治療Raji氏/化合物IR細胞時，Fe(化合物I)₃之胞內含量最終達到與敏感細胞中之位準類似的位準(圖4D)。用0.5 μM 化合物I治療Raji氏/化合物IR細胞24小時不會產生增加的phospho-ATM或phospho-γH2AX，並且在抗性細胞中沒有偵測到與較少的胞內化合物I及Fe(化合物I)₃大致上一致的PARP分裂(圖7)。

【0166】 為獲得對抗性機制之進一步洞察，對敏感Raji氏及抗性Raji氏/化合物IR細胞兩者之三個獨立樣品實施RNA-seq分析。藉由移除所有6個樣品中之所有具有少於50個讀段之基因來進行基因位準差異表現分析，因為僅具有低位準表現之基因會導致差異表現分析之不規則性。若經調整之p值小於0.05位準並且其在任一方向上的倍數變化> 2，則認為基因差異表現。在13,791個可評估基因中，有1,012個在Raji氏/化合物IR細胞中顯著上調及704個顯著下調之基因。ATP結合匣亞家族成員ABCG2為轉錄位準增加千倍以上之上調最多的基因(表2)。

表2. Raji氏/化合物IR細胞中基因上調之排序。

基因ID	基因名稱	增加倍數	經調整之p值
ENSG00000118777	ABCG2	1127.3	2.24E-05
ENSG00000114200	BCHE	173.8	3.24E-05
ENSG00000142149	HUNK	52.9	8.59E-04
ENSG00000060709	RIMBP2	46.6	3.99E-04
ENSG00000165695	AK8	42.5	5.74E-04
ENSG00000234323	RP11-308N19.1	41.4	3.16E-04
ENSG00000261690	AC009133.12	39.3	1.60E-03
ENSG00000161570	CCL5	37.3	5.74E-05
ENSG00000168824	NSG1	33.0	9.84E-04
ENSG00000154864	PIEZO2	31.6	3.88E-04

儘管Raji氏/化合物IR中若干其他的多藥抗性ABC轉運子亦上調，但ABCG2轉錄本之增加最為突出(表3)。藉由qRT-PCR及西方墨點分析證實Raji氏/化合物IR細胞中ABCG2之顯著上調(圖5A及B)。

表3. 在Raji/化合物IR細胞中上調之ABC轉運子家族成員基因。

基因ID	基因名稱	增加倍數	經調整之p值
ENSG00000118777	ABCG2	1127.3	2.24E-05
ENSG00000160179	ABCG1	0.9	8.56E-01
ENSG00000085563	ABCB1 (MDR1)	4.8	8.24E-04
ENSG00000103222	ABCC1 (MRP1)	1.5	1.25E-02
ENSG00000023839	ABCC2 (MRP2)	3.2	6.09E-03

【0167】 Ko143為一種特異性ABCG2抑制劑，相對於其抑制P-gp或MRP-1轉運子之能力，其選擇性超過200倍。在至多300 nM之濃度下，Ko143自身對Raji氏或Raji氏/化合物IR細胞而言無毒(圖5C)。為了測試化合物I為ABCG2之基質的假定，評估Ko143逆轉Raji氏/化合物IR細胞之抗性之能力。表4及圖5D中之數據顯示在Raji氏/化合物IR細胞中用Ko143同步治療顯著逆轉化合物I抗性。

表4. ABCG2抑制劑對化合物I之抗性之效應

細胞株	單獨的化合物I		COMPOUND I + 5 nM Ko143		COMPOUND I + 50 nM Ko143	
	IC ₅₀ (nM) [#]	RR [§]	IC ₅₀ (nM)	RR [§]	IC ₅₀ (nM)	RR [§]
Raji氏/化合物IR	1387 ± 94	16.7 ± 3.9 ^b	853 ± 44	10.9 ± 1.9 ^c	200.6 ± 20.7	2.5 ± 0.7 ^a
Raji氏	105 ± 2.4	-	98.3 ± 0.8	-	103.1 ± 2.9	-

[#]平均± SEM

[§]相對抗性

^ap < 0.05 ; ^bp < 0.01 ; ^cp < 0.001

【0168】 為提供ABCG2功能增強之進一步證據，對抗性細胞進行拓朴替康(一種證據充分的ABCG2基質)交叉抗性測試。發現Raji氏/化合物IR

細胞對拓朴替康具有3倍交叉抗性並且用Ko143治療完全逆轉此抗性(圖5E)。有趣地，儘管卡鉑不被認為係ABCG2基質，但Raji氏/化合物IR對卡鉑亦具有顯著的交叉抗性；用Ko143治療不會減小Raji氏/化合物IR細胞中之卡鉑IC₅₀ (圖5F)。出人意料地，發現Raji氏/化合物IR細胞對依託泊苷(etoposide) (ABCG2基質)及強效雙股裂縫誘導劑超敏。根據RNA-seq數據之GO及路徑揭示：Raji氏/化合物IR中DNA修復路徑下調，這部分解釋了對依託泊苷之超敏性。

【0169】 實例7：化合物I與G-四鏈體DNA之相互作用與c-MYC之抑制相關。

【0170】 當前機理研究證明化合物I在轉錄位準下藉由降低其啟動子處之乙醯化H3K27且另外藉由使c-MYC mRNA失穩來調變c-MYC。另外，RNA-seq及反相蛋白質陣列(RPPA)數據之差異基因表現分析突出c-MYC在化合物I之機制中的作用(GO項-由c-MYC下調(p值6E-26)，基因啟動子受c-MYC束縛(p值4.2 E-10)，c-MYC之ChIP靶標(p值3.3E-8))。此外，自RPPA數據觀察到p-Chk1、p-Chk2、 γ H2Ax及總p53及E2F1增加，其皆為DNA損傷反應路徑活化之指示。這伴隨著XBP1、GRP78及p-p38位準升高，這指向細胞應激反應信號(GO項-細胞應激之調節，p值1.89E-8)。

【0171】 儘管化合物I可參與多種機理性事件，但化合物I對c-MYC表現、細胞週期停滯及DNA損傷以及具有受損DNA修復機制之細胞中的合成致死之效應可以藉由Fe(化合物I)₃錯合物對G-四鏈體DNA模體之作用來解釋。

【0172】 實例8：實例9-16之材料及方法

【0173】 細胞及化合物

【0174】 EOL-1、GRANTA-519、Jeko-1、Jurkat、Molm-13、NOMO-1、SKM-1及SU-DHL-6獲自Leibniz-Institut DSMZ。HL-60、KG-1、Mino、MV4-11、Raji氏及THP-1獲自ATCC。HEL92.1.7獲自European Collection of Authenticated Cell Cultures並且Ramos細胞為Dr. M. Andreeff (MD Anderson Cancer Center, Houston, TX)之贈品。所有細胞均按照製造商之說明書在完全培養基中培養。自製造商收到後1個月內收集並冷凍早期繼代細胞。所有實驗均係在早期繼代細胞解凍後6周內進行。每6個月使用MycoScope黴漿菌偵測試劑盒(Genlantis目錄號MY01050)來篩檢潛在污染。使用Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, 目錄號17-1440-02)自新鮮健康供體血液分離外周血液單核細胞(Peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。為合成化合物I游離鹼，將10-啡啉-5,6-二酮(1.2當量)、乙酸(22體積)、2-甲基-5-氟吡啶-3-甲醛(1.0當量)及乙酸銨(15當量)在中等攪拌下反應，同時在 $95 \pm 5^\circ\text{C}$ 下加熱3至7小時。將反應冷卻至 20°C 與 25°C 之間，過濾，用乙酸及乙醇沖洗，並用 N_2 吹掃乾燥，繼之以在 65°C 下用2:1乙醇:水洗滌4小時，冷卻至 20°C 至 25°C ，過濾，用2:1乙醇:水及EtOAc沖洗，且隨後用 N_2 吹掃乾燥。藉由HPLC之純度為99.5%，並且藉由FT-IR、 ^1H NMR、 ^{13}C NMR及LC/MS證實結構特性。為了 $\text{Fe}(\text{化合物I})_3$ 合成，將五莫耳當量之含於水中之亞鐵離子 FeSO_4 加入溶解於乙醇中的化合物I中。收集所產生之深紅色沈澱物($\text{Fe}(\text{化合物I})_3$)並將其溶解於DMSO中並藉由HPLC及質譜表徵，其純度 $> 95\%$ 。CX-5461 (7)購自MedChem Express (目錄號HY-13323)。

【0175】 細胞毒性研究

【0176】 將細胞種植在96孔板中，並以媒劑DMSO或化合物I (10濃

度)在37°C及5% CO₂下處理細胞達5天。使用CellTiter 96 AQueous單溶液(MTS)細胞增殖檢測儀(Promega, 目錄號G3581)來量測細胞存活率, 並且使用GraphPad Prism 7軟件計算IC₅₀值。

【0177】 吸收及流出檢測

【0178】 將曝露於化合物I之細胞在含有5 ng氘化化合物I標準物之乙腈中均質化。採用與使用正離子模式電灑游離作為離子源的Thermo LCQdeca質譜儀連接之Agilent 1260液相層析儀(LC)系統, 在UCSD分子質譜儀上分析樣品。

【0179】 qRT-PCR

【0180】 細胞在收集前用媒劑或化合物I以不同濃度治療24小時或以單一濃度治療1、3、6、12及24小時。藉由QiaShredder柱(QIAGEN, 目錄號79656)溶解細胞, 使用QIAGEN RNeasy Plus Mini Kit (目錄號74134)分離總RNA, 並且利用Transcriptor Universal cDNA主混合物(Roche, 目錄號05893151001)合成cDNA, 並且然後用於使用FastStart基本DNA探針主混合物(Roche, 目錄號06402682001)及Roche LightCycler96之qRT-PCR分析。引子探針對購自IDT (表5)。按標準化至GAPDH後在經媒劑治療之樣品內的倍數變化計算表現($2^{\Delta\Delta C_t}$)。

表5：IDT引子探針對

基因	IDT檢測名稱
GAPDH	Hs.PT.58.40035104
CDKN1A (p21)	Hs.PT.58.40874346
MYC	Hs.PT.58.26770695

【0181】 西方墨點法

【0182】 如上所述治療細胞。製備全細胞溶解產物, 其由SDS-PAGE分離, 並被轉移至硝化纖維膜。所使用之偵測抗體列於表6中。密度測定法

使用ImageJ或Image Studio Lite第5.2版軟件進行並標準化至GAPDH之密度。

表6：抗體

抗體	目錄號	公司
CCND3 / Cyclin D3	2936	Cell Signaling
CDK4	12790	Cell Signaling
PARP1	9532	Cell Signaling
總TP53	sc-126	Santa Cruz
TP53 Phos-Ser15	2528	Cell Signaling
TP53乙醯基K382	2525	Cell Signaling
γ H2AX	9718	Cell Signaling
CHEK1 phos-Ser345	2348	Cell Signaling
CHEK1	2360	Cell Signaling
MAPK14 / p38 phos-Thr180/Tyr182	4511	Cell Signaling
MAPK14 / p38	8690	Cell Signaling
MAPK8 / JNK phos-Thr183/Tyr185	4668	Cell Signaling
CDKN1A / p21	sc-397	Santa Cruz
GAPDH	sc-365062	Santa Cruz
MYC	sc-40	Santa Cruz
RIgG	sc-2025	Santa Cruz
20 Rabbit HRP	170-8515	Biorad
20 Mouse HRP	170-6516	Biorad

【0183】 用於細胞凋亡及細胞週期分析之流式細胞量測術

【0184】 如上所述治療細胞。為了確定細胞凋亡，細胞用FITC-Annexin V及碘化丙錠(PI；BD Pharmingen，目錄號556570)染色且然後在BD Accuri C6流式細胞計數器上分析。為了量測DNA合成及細胞週期之階段，經治療之細胞用5-乙炔基-2'-去氧尿苷(Edu) Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific，目錄號C10425)及PI (PI/RNase A染色溶液，BD Biosciences，目錄號550825)染色。藉由使用Live/Dead Fixable Far Red Dead Cell Stain Kit (Thermo Fisher Scientific，目錄號L34973)自分析中排除死亡細胞。按照製造商的說明書進行染色。

【0185】 RNA定序分析

【0186】 使經治療之MV4-11細胞經受總RNA萃取(對於qRT-PCR分析)並在UCSD基因組學核心設施處定序。RNA使用Illumina TruSeq來處理並且對Illumina HiSeq4000上之50-bp讀段而經單端定序。數據由位於Oregon Health and Science University (Portland, OR)之McWeeny實驗室分析。使用FASTQC <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>評定FASTQ文件之讀段基礎分佈及序列表示。使用SubRead v1.5.0-pl使讀段與HG37對準，保持獨特的映射讀段。丟棄具有小於50個讀段之差異表現基因(在所有4個樣品中)。原始數據及經處理之文件可在GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE111949>) 上獲得，登錄號GSE111949。

【0187】 反相蛋白質陣列分析

【0188】 對MV4-11細胞進行RNA定序(RNA-seq)分析並且製備全細胞萃取物用於西方墨點法。樣品在MD Anderson Cancer Center反相蛋白質陣列(RPPA)核心設施(詳見 <https://www.mdanderson.org/research/research-resources/core-facilities/functional-proteomics-rppa-core/rppa-process.html>)處進行處理。對蛋白質表現位準求3次平均值，並使用GraphPad Prism 7繪製熱圖。

【0189】 與qPCR結合之染色質免疫沈澱

【0190】 用媒劑DMSO或500 nmol/L 化合物I治療MV4-11細胞2、6或24小時且然後用1%之甲醛交聯。染色質藉由音波處理來萃取且然後與H3K27ac (活性模體#39133)抗體一起培育過夜。抗體：DNA錯合物與

Protein G珠粒(Invitrogen Dynabeads目錄號10004D)分離且藉由具有對MYC啟動子具有特異性之引子(表7)之qPCR來分析。按在輸入DNA對照內之倍數計算H3K27ac富集。

表7：ChIP引子

位置	正向引子	反向引子
MYC Prom1	GAGCAGCAGCGAAAGGGAGA	CAGCCGAGCACTCTAGCTCT
MYC Prom 2	CCGCATCCACGAAACTTTG	GGGTGTTGTAAGTTCCAGTGCAA

【0191】 RNA分解檢測

【0192】 細胞用媒劑DMSO或500 nmol/L 化合物I繼之以1 μ mol/L 放線菌素D治療3小時。對於qRT-PCR分析，在放線菌素D添加前及添加後每10分鐘取細胞等分試樣，用於RNA萃取及cDNA合成。使用特異性引子(表8)分析MYC及28s rRNA之位準並將MYC RNA表現標準化至28s rRNA [$2^{(28s C_t值-MYC C_t值)}$]。

表8：表現引子

基因	正向引子	反向引子
28s RNA	AGTAGCAAATATTCAAACGAGAACTTT	ACCCATGTTCAACTGCTGTTC
MYC	CAGTAGAAATACGGCTGCAC	TTCGGGTAGTGGAAAACCAG

【0193】 FRET檢測

【0194】 FRET檢測及數據分析如先前所描述來進行並且藉由使用雙標記(5'FAM-3'BHQ1)單股寡核苷酸來修改。使用Roche LightCycler 96 [在37°C下持續300秒，繼之以溫度以3°C間隔升高至91°C (25步)，其中在各溫度下之總培育時間為300秒]，在媒劑DMSO或濃度遞增的化合物I、Fe(化合物I)₃、CX-5461或TMPyP4存在下評定各寡核苷酸之融化溫度。即刻分析藥物及寡核苷酸反應混合物或將其在室溫下培育6小時且然後進行

分析。引子信息提供於表9中。較長的培育時間並不影響Fe(化合物I)₃、TMPyP4或CX-5461活性反而增強化合物I G4結合能力。化合物I數據呈現6小時時間點。

表9：G-四鏈體寡核苷酸

G4位置	G4寡核苷酸序列
端粒	5'(FAM)-GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-(BHQ1)3'
MYC	5'(FAM)-CCATGGGGAGGGTGGAGGGTGGGGAAGGT-(BHQ1)3'
KIT	5'(FAM)-TTATAGGGAGGGCGCTGGGAGGAGGGAGGAGAC-(BHQ1)3'
rRNA	5'(FAM)-AATAAGGGTGGCGGGGGGTAGAGGGGGGTAATA-(BHQ1)3'
ds_DNA	5'(FAM)-TATAGCTATA[Sp~C18]TATAGCTATA-(BHQ1)3'

【0195】 實例9：AML細胞中化合物I誘導細胞毒性、上調p21並且誘導G₀-G₁細胞週期停滯

【0196】 化合物I抑制AML細胞株及各種形式之淋巴瘤細胞株的增殖，其中IC₅₀值在57 nmol/L至1.75 μmol/L範圍內(圖8；表10)。在MV4-11細胞中作為曝露持續時間之函數，該藥物之效力僅顯示出適度變化，其中曝露48、72及120小時之IC₅₀值分別為0.47、0.40及0.24 μmol/L。先前研究將KLF4及CDKN1A表現之上調報告為腫瘤中APT0-化合物I活性之潛在機制。儘管在6個所測試的AML細胞株中之4個中化合物I上調KLF4表現(圖15A)，但在所有AML細胞株中均以濃度依賴性方式誘導CDKN1A (*p21*)表現(圖15B及15C)。在所有所測試之AML細胞株中CDKN1A mRNA之上調隨曝露持續時間而增加(圖15D及15E)。在稍後的時間點處，CDKN1A表現開始下降，可能係由於細胞死亡增加。CDKN1A表現之誘導通常與隨後的G₀-G₁細胞週期停滯有關，該細胞週期停滯係在化合物I治療實性瘤細胞株後觀察到的。與此一致，觀察到G₀-G₁中劑量依賴性之細胞增加，其伴隨所測試之所有AML細胞株的S-及G₂-M期中細胞分數降低(圖9A -C，頂部)。

在MV4-11之情況下，在曝露於1 $\mu\text{mol/L}$ APT0 化合物I 24小時之後，所有活細胞均已在G₀-G₁中停滯。已知CCND3 (Cyclin D3)及CDK4可促進G₁細胞週期進展，而CDKN1A可負性調節此過程。經化合物I治療之AML細胞之西方墨點分析揭示CDK4及CCND3兩者之劑量依賴性地抑制，儘管3個AML細胞株中之各者中的程度不同(圖9A-C，底部；圖16A)。

表10：白血病及淋巴瘤細胞株中之化合物I IC₅₀值

疾病類型	細胞株	IC ₅₀ (μM) 平均值
MCL	Jeko-1	0.057
MCL	GRANTA-519	0.082
伯基特氏	Raji氏	0.1
AML	MOLM-13	0.14
MCL	Mino	0.23
AML	MV4-11	0.24
AML	EOL-1	0.3
AML	THP1	0.34
伯基特氏	Ramos	0.35
AML	HL-60	0.46
AML	SKM-1	0.48
AML	KG-1	0.51
DLBCL	SUDHL-6	0.51
T-ALL	Jurkat	0.52
AML	Nomo-1	1.45
AML	HEL92.1.7	1.75

為了使細胞週期停滯與各種路徑擾動相關，並且為了劃定機理事件之序列，在用媒劑或化合物I (IC₅₀濃度)多次治療細胞長達24小時後進行細胞週期分析。在用單獨的媒劑所治療之細胞中沒有細胞週期相位分佈擾動。早在2小時時就偵測到G₀-G₁中細胞分數增加，並且在整個24小時之藥物曝露時段中，此分數以時間依賴性地方式持續增加(圖9D-F)。西方墨點分析顯示與G₀-G₁停滯類似的CDK4及CCND3蛋白質位準之時間依賴性地下降(圖16B及16C)。此等數據確立在AML細胞中化合物I產生時間依賴性及濃

度依賴性G₀-G₁停滯，並表明這由所建立之p21及週期蛋白質依賴性激酶路徑介導。

【0197】 實例10：在AML細胞株中化合物I誘導細胞凋亡

【0198】 為了研究由化合物I導致細胞死亡之機制，用或不用化合物I治療MV4-11、EOL-1及KG-1 AML細胞，並藉由流式細胞量測術及西方墨點法使其經受細胞凋亡標誌物偵測。用PI及Annexin V對細胞進行染色，以區分活(Annexin V及PI陰性)、早期細胞凋亡(Annexin V陽性及PI陰性)、晚期細胞凋亡(Annexin V及PI陽性)及死(Annexin V陰性及PI陽性)細胞。在所有細胞株中在24小時時觀察到凋亡細胞之濃度依賴性增加(圖10A；圖17A)。基於Annexin V及PI染色之IC₅₀值與抗增殖IC₅₀值類似。PARP分裂(c-PARP1)為內源性及外源性路徑兩者之下游細胞凋亡之典型信號。化合物I以濃度依賴性及時間依賴性方式誘導c-PARP1積聚，這與如藉由Annexin V/PI染色所量測之細胞凋亡誘導類似(圖10B-C；圖17B)。對於所有3個AML細胞株，在曝露於化合物I之後3與6小時之間出現凋亡細胞增加(圖10D)，這跟隨在曝露2小時時所觀察到的G₀-G₁細胞週期停滯之後。

【0199】 實例11：化合物I藥力學

【0200】 為了進一步洞察由化合物I所採用之導致細胞週期停滯及細胞凋亡的路徑，對mRNA及蛋白質位準兩者進行差異表現分析。用媒劑或500 nmol/L 化合物I治療MV4-11細胞6小時，且然後藉由RNA-seq分析基因表現。發現總共1,643個基因在化合物I治療後經差異調節(> 2倍變化且 $P < 0.05$)，其中416個基因上調並且1,227個基因下調(表11)。RNA-seq分析偵測到KLF4之2倍增加及CDKN1A表現之4.5倍增加，這由MV4-11細胞之qRT-PCR數據證實。利用廣泛分子標籤數據庫

(<http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/index.jsp>)分析差異調節基因之豐富路徑或GO (基因本體)項(圖18A)。如所預期，差異表現之基因集中富含細胞凋亡及細胞週期路徑。出乎意料地，化合物I治療後，DNA損傷反應(DNA damage response, DDR)及內質網(endoplasmic reticulum, ER)應激/未摺疊蛋白回應路徑中亦富含基因表現輪廓。另外，TP53路徑中富含經上調之基因並且基因由MYC下調。在MV4-11細胞中偵測到的基因表現變化提高了化合物I可藉由誘導DNA損傷及激活細胞應激路徑及/或藉由抑制MYC致癌基因之表現來導致細胞凋亡的可能性。

表11：來自RNA-seq及RPPA之差異表現基因

抗體/蛋白質	倍數變化	p值
Histone-H3	5.08312399	5.45E-05
H2AX_pS140	4.19597407	0.000522
PAR	2.70749443	0.001439
凋亡蛋白酶-3	2.38247687	0.00075
p38_pT180_Y182	2.02214932	0.000782
DM-Histone-H3	2.00835777	0.000457
DM-K9-Histone-H3	2.00341212	0.002556
凋亡蛋白酶-7-分裂的	1.67071017	3.46E-05
Bad_pS112	1.55036509	0.002505
Hif-1- α	1.4823094	0.012889
Syk	1.43304918	0.031588
Chk1	1.43276703	0.034112
E2F1	1.42334521	0.021131
N-Ras	1.39693163	0.004314
Ubq-Histone-H2B	1.37487462	0.037092
XBP-1	1.36926109	0.011104
Cyclin-E1	1.36142448	0.0002
Chk2_pT68	1.31238742	0.000457
ADAR1	1.3084933	0.007035
ACC_pS79	1.3015573	0.000181

抗體/蛋白質	倍數變化	p值
CD29	1.29122101	0.032909
BiP-GRP78	1.28988582	0.008195
p53	1.28815199	0.035039
Pdcd-1L1	1.26162272	0.039318
PAI-1	1.25745484	0.025156
Rb_pS807_S811	0.64862926	0.005124
S6_pS240_S244	0.64668982	0.002977
Ets-1	0.60342423	0.014415
Cyclin-B1	0.59444823	0.001083
PLK1	0.49462682	0.009377
NDRG1_pT346	0.4566332	5.11E-05

【0201】為了檢驗化合物I對蛋白質表現之效應，MV4-11細胞如上進行治療並且藉由RPPA微陣列進行分析以定量>300總經修飾之蛋白質及轉譯後經修飾之蛋白質。在總經修飾之蛋白質及轉譯後經修飾之蛋白質兩者的位準上觀察到效應(>1.25倍且 $P < 0.05$)，其中上調蛋白質多於下調蛋白質(圖18B；表11)。值得重視地，分裂的凋亡蛋白酶-7增加，這指示細胞凋亡。利用廣泛分子標籤數據庫進行差異表現蛋白質之GO分析。顯著的GO項包括細胞死亡及G₁-S細胞週期停滯路徑，即G₀-G₁停滯之正式描述，並且與藉由流式細胞量測術及RNA-seq分析所偵測到的細胞週期效應一致(圖18C)。E2F1、TP53、 γ H2AX、CHEK1 phos-S296及CHEK2 phos-T68之增加支持DNA損傷路徑由化合物I治療觸發之觀念。另外，觀察到XBP1、HSPA5及MAPK14 (p38) phos-T180/182增加，指示ER或細胞應激($P = 1.89E^{-08}$ ；參考文獻15)。DDR路徑亦可以經由激活MAPK14及MAPK8 (JNK)之MAPK路徑傳信，並且儘管不清楚哪一條路徑代表起始事件，但DDR路徑與ER應激之間的串擾為公認的現象。差異表現蛋白質及mRNA之顯著部分為MYC致癌蛋白之靶基因，已知該MYC致癌蛋白為細胞週期及

細胞凋亡路徑調節之組成部分。總之，此等數據表明MYC致癌基因之調節可能在化合物I之機制中起到早期及關鍵作用。

【0202】 實例12：在AML細胞中化合物I濃度依賴性及時間依賴性地下調MYC mRNA及蛋白質位準

【0203】 MYC表現牽涉到廣泛範圍的癌症包括白血病及淋巴瘤之病原性。最新的研究證明抑制MYC轉錄導致血液科起源之癌細胞凋亡，使MYC成為具有吸引力的治療靶點。對吾等RNA-seq數據集之回顧揭示，在MV4-11細胞中，在6小時時MYC由化合物I下調。在經化合物I治療之MV4-11細胞中，亦觀察到基因轉錄增加由MYC負性調節。在所有所測試之AML細胞株中化合物I均產生MYC mRNA及蛋白質位準兩者之濃度依賴性降低，並且MYC抑制之IC₅₀值與抗增殖性IC₅₀值類似(圖11A及B)。在MV4-11、EOL-1及KG-1 AML細胞中，此等變化隨曝露時間直至24小時而增加(圖11C；圖19A及19B)。MV4-11細胞中之MYC蛋白質壓製的時程與由RNA-seq偵測到的MYC基因表現水平之抑制的時程類似。與來自健康供體之PBMC相比，所有所測試之AML細胞株的MYC的基礎表現均顯著更高(圖11D；圖19C)。因此，在所有經檢測之AML細胞株中化合物I均下調mRNA處之MYC及蛋白質位準。

【0204】 調節MYC表現為涉及MYC轉錄、mRNA穩定性及蛋白質轉換之複雜過程。對公認的活性染色質標誌物H3K27ac進行ChIP-qPCR分析，以評估用化合物I治療後MYC基因啟動子之轉錄能力(圖19D)。MV4-11細胞中MYC啟動子處H3K27ac降低早在2小時時就已觀察到並隨時間推移而發展，指示MYC啟動子之修飾及隨後的MYC基因轉錄壓製為化合物I作用機制之早期介體(圖19E)。為了確定化合物I是否影響MYC mRNA穩定

性，對EOL-1細胞進行RNA分解檢測。相對於媒劑，經化合物I預治療之細胞中之MYC mRNA位準明顯降低(圖19F)，指示化合物I可降低MYC mRNA之穩定性。此等數據表明化合物I藉由影響轉錄及mRNA穩定性兩者而調節MYC。

【0205】 實例13：化合物I觸發DNA損傷及細胞應激路徑

【0206】 除了MYC之外，RNA及蛋白質差異表現分析亦指出TP53、DNA損傷及ER應激參與化合物I之作用機制。尋求驗證在MV4-11細胞中化合物I治療後顯示TP53蛋白質位準增加之RPPA數據。在早期時間點(1、3及6小時)下MV4-11細胞曝露於500 nmol/L化合物I產生顯著增加的TP53位準，接著在12小時時恢復至基線並且在24小時時進一步減少，大概歸因於此時大量的細胞死亡(圖12A)。總蛋白質增加伴隨著phospho-Ser15及乙酰基-K382增加(圖12B)。回應於DNA損傷TP53在Ser15及Ser20處磷酸化，這減少MDM2結合及p53之蛋白酶體降解。此外，回應於細胞應激p53被乙酰化，並且此修飾可以進一步穩定TP53蛋白質位準並調變結合活性。TP53之活化可經由上調諸如BBC3 (PUMA)、PMAIP1 (NOXA)及BAX之促凋亡因子來觸發細胞凋亡。RNA-seq數據集顯示在經化合物I治療之MV4-11細胞中，BBC3增加3.95倍且PMAIP1增加1.38倍。在用500 nmol/L化合物I治療後的早期時間點下，進一步詢問MV4-11細胞中DNA損傷及細胞應激路徑之參與。在添加化合物I後1小時時偵測到phos-CHEK1增加，其中峰位於約4小時處，表明DNA損傷為早期事件(圖12C)。在CHEK1磷酸化後，DDR標誌物 γ H2AX在6小時內穩定增加。在所有所測試之AML細胞株中均偵測到濃度依賴性的 γ H2AX增加，由此進一步為化合物I觸發DDR路徑之概念增加憑證(圖12D)。另外，在4至6小時治療時，MAPK14 phos-T180

及MAPK8 phos-Thr183/pTyr185兩者均增加，這指示經由DDR或ER應激路徑傳信(圖12C)。總體而言，數據表明由化合物I誘導之DNA損傷為化合物I機制中的早期事件。

【0207】 實例14：化合物I之胞內藥物動力學

【0208】 藉由質譜法確定的KG-1 AML細胞中化合物I之吸收及流出動力學之量測指示逐漸接近穩定狀態及快速初始流出，但末端流出非常長(圖20A及20B)。當使KG-1細胞曝露於化合物I 1或6小時且然後置於無藥物培養基中時，流出模式由在前30分鐘期間發生的快速期、接著為延長的末期組成，使得大量化合物I保留在KG-1細胞中持續超過24小時。與此等數據一致，細胞藥物動力學研究揭示化合物I胞內轉換成含有1個鐵原子及3個化合物I [Fe(化合物I)₃]分子之錯合物(圖20C及20D)。實際上，在細胞毒性檢測中，預錯合之Fe(化合物I)₃藥物與親代化合物I單體一樣強效(圖13A)。此外，如分別藉由c-PARP及 γ H2AX所量測，在MV-4-11細胞中，Fe(化合物I)₃錯合物觸發細胞凋亡及DNA損傷路徑。Fe(化合物I)₃亦以劑量依賴性方式誘導KLF4及CDKN1A表現並抑制MYC (圖13B)。然而，在24小時檢測中需要較高濃度之Fe(化合物I)₃來引發對親代化合物I之相同回應(與細胞毒性檢測中的5天治療相比)，可能歸因於觀察到的預錯合之Fe(化合物I)₃的流入速率較慢(圖20E)。

【0209】 實例15：化合物I使G-四鏈體序列穩定

【0210】 親代化合物I及其胞內Fe(化合物I)₃形式含有某些特徵，諸如金屬配位啡啉環及平面結構，這可以允許藥劑充當G-四鏈體(G4) DNA配位子。G4為由富含鳥嘌呤之區域摺疊形成相互疊加之平面鳥嘌呤四分體所產生的動態二級DNA結構。在端粒處及許多重要致癌基因之啟動子中發

現G4特異性序列。G4序列充當基因表現之調節子，並且已採用使G4四鏈體穩定之小分子配位子來下調重要的致癌基因，諸如KIT及MYC。端粒DNA中G4模體之穩定化會導致端粒酶之抑制、端粒不穩定及去保護，其皆可以觸發DDR路徑。此外，DNA複製之起始位點與DNA G4序列重疊，並且在該等位點處G-四鏈體結構之穩定化導致複製叉停頓及細胞週期停滯。

【0211】 評估化合物I (藥物之親代單體形式)及Fe(化合物I)₃使用經改良之FRET檢測來結合及穩定G4序列的能力(圖21及22)。將熟知的G4配位子TMPyP4及最近報告具有G4結合性質之臨床階段分子CX-5461用作對照，以評估化合物I及Fe(化合物I)₃對G4穩定活性之特異性。如所預期，CX-5461為所有所測試之G4序列的強效穩定劑，並且TMPyP4使除KIT基因啟動子之G4外的所有G4模體穩定(圖13C)。有趣地，Fe(化合物I)₃濃度的增加使與MYC及KIT基因啟動子、rRNA及端粒相對應的G4結構穩定，其效力與TMPyP4之效力類似(圖13C；圖22)。親代單體化合物I亦顯示G4模體之時間依賴性穩定化，但其顯示穩定MYC G4序列之最大傾向(圖13C)。

【0212】 為了評估G4結構對與ds-DNA非特異性相互作用之選擇性，用在溶液中形成ds-DNA髮夾結構之自互補寡核苷酸重複FRET檢測。值得注意地，Fe(化合物I)₃證明G4結構對ds-DNA之選擇性比CX-5461及TMPyP4兩者之選擇性的程度高得多，突出化合物I為一種更具辨別力之G4配位子之事實(圖13C；圖21B)。基因表現分析顯示，回應於化合物I治療在AML細胞中MYC及KIT表現下降(RNA-seq數據，MV4-11細胞6小時治療)，但45s rRNA之位準沒有下降。缺乏對45s rRNA之效應可能反映了化合物I及/或Fe(化合物I)₃進入胞核的富含rRNA之核仁區的可用性的差異。儘管如此，化合物I顯然能使G4結構穩定，這為MYC及其他基因表現之抑

制提供闡釋。在不受任何特定理論束縛之情況下，假設由化合物I穩定G4模體引起複製叉及端粒處的單股及雙股裂縫；化合物I之此G4結合力鑑定了藥物觸發DDR路徑、細胞週期停滯及細胞凋亡之機制。

【0213】 實例16：論述

【0214】 化合物I因其在非臨床模型中之療效及其在動物中或在實性瘤患者中其初始第I期試驗中不產生骨髓抑制之事實，目前在臨床開發中用於治療AML。此處所報告之數據為此新型藥劑之作用機制提供新見解，其為更精確的臨床應用及生物標誌物開發指明道路。此等研究證實化合物I為AML細胞中G₀-G₁細胞週期停滯及細胞凋亡之強效誘導劑。額外的新發現包括化合物I經由對MYC之啟動子及mRNA穩定性兩者的效應產生時間依賴性及濃度依賴性之MYC下調，在許多AML細胞株中其誘導主轉錄因子及腫瘤抑制因子KLF4，並且其誘導DNA損傷。另外，化合物I、Fe(化合物I)₃之預錯合鐵形式導致類似的細胞毒性效應，包括細胞凋亡、DNA損傷及MYC表現下調。

【0215】 無論化合物I呈其親代單體形式或Fe(化合物I)₃鐵錯合物形式，其均使DNA中之G4模體穩定的發現為許多此藥物之藥效學效應提供闡釋。已知G4之穩定化會破壞端粒穩定性並阻滯複製叉，引起單股及雙股DNA裂縫。認為MYC啟動子中如此穩定化之G4充當基因靜止子。藉由化合物I與KIT及端粒G4結構之靶標結合之其提供一種機制，經由該機制，化合物I激活協調AML細胞中之細胞週期停滯且促進細胞凋亡之DDR路徑。

【0216】 另外，含有BRCA1/2突變之細胞對化合物I超敏，進一步支持化合物I作用機制中DNA損傷之作用。化合物I持續產生CDKN1A之上調，這介導G₀-G₁之停滯。另外，在DNA雙股裂縫後可以誘導CDKN1A阻

斷細胞週期進程，以允許有足夠的時間來修復DNA。與CDKN1A誘導組合，在許多AML細胞株中化合物I增加*KLF4*基因表現，已知其作為G₁細胞週期檢查點之部分調節CDKN1A。亦已知*KLF4*回應於DNA損傷而上調，並且在G₀-G₁停滯及細胞凋亡兩者中起作用。對未來研究而言*KLF4*在化合物I作用機制中之作用值得關注。儘管化合物I之結構表明其可能能夠產生反應性氧物質，但在MV4-11、EOL1或KG-1細胞中，使用分子感測器或GSH之變化未偵測到該等物質。

【0217】 CHEK1/2之活化、TP53之穩定化及E2F1之誘導亦指示化合物I治療後的早期事件對細胞週期停滯及DNA修復起傳信作用。化合物I治療2小時後偵測到細胞週期停滯，而6小時後觀察到RNA及蛋白質位準兩者處之若干促凋亡因子之上調。除了激活DNA修復過程外，pCHEK1/2及TP53亦可以在觸發細胞凋亡中起作用。若DNA修復失敗，則p53可以經由BAX、BAD、BBC3或PMAIP1之上調來激活細胞凋亡。藉由經化合物I治療之MV4-11細胞之RNA-seq分析偵測到此等促凋亡因子的表現增加。眾所周知，為了進行細胞凋亡需要凋亡蛋白酶依賴性的PARP1分裂。化合物I產生穩定及早期的PARP1分裂，進一步為化合物I藉由觸發DDR路徑而起作用的假定增加憑證。這表明DNA損傷之位準對細胞而言為災難性的，並且轉錄程式之改變使細胞向細胞凋亡方向傾斜。MYC失調為多種惡性疾病中常見的致癌驅動子，這使其成為一種有吸引力的潛在治療靶點。然而，由於MYC調節及傳信之複雜性，靶向MYC具有挑戰性。最近，已證實由BET-溴域(bromodomain)抑制劑壓製MYC表現能有效觸發白血病細胞中之細胞凋亡。然而，溴域蛋白存在於所有活性基因上，並且溴域蛋白之抑制會導致嚴重的毒性及骨髓抑制。在所有所測試之AML細胞株中，化合物I在RNA

及蛋白質位準兩者下均產生降低的MYC表現，並且在不同AML細胞中MYC之下調與其細胞毒性效力類似。偵測到AML細胞株中之MYC位準高於來自健康供體之PBMC中之MYC位準，這可能與化合物I對此等類型之細胞的差異效應相關。最近的研究表明，協同的TP53上調及MYC下調導致有效清除CML中之白血病幹細胞群。MV4-11之化合物I治療產生相同的效應，這為其發展提供額外的理論依據。已報告，較高的MYC表現與上皮性卵巢癌及神經母細胞瘤之不良臨床結果相關，表明化合物I可能對此等惡性疾病具有有益效應。總體而言，此數據顯示化合物I主要經由G-四鏈體結構之參與之多層面作用機制，其唯一適合於靶向造血性惡性病。此外，化合物I代表一種不導致骨髓抑制之首創MYC抑制劑，使其特別適合於管理骨髓功能受損之AML患者。

【0218】 前述實例及某些實施例之描述應視為說明而非限制如由申請專利範圍所定義之本發明。如將容易瞭解的，可以在不脫離如由申請專利範圍中所闡述之本發明的情況下利用上述特徵之眾多變體及組合。所有該等變體皆意欲包括在本發明之範疇內。所引用之所有參考文獻均以全文引用之方式併入本文中。

【0219】 應理解，若在本文中提及任何先前技術出版物，則在任何國家中，該參考文獻並不構成承認該出版物形成此項技術中公共常識之部分。

【0220】 藉由鑑定引用而在本文中提及之所有公開案、專利、專利申請案及公開專利申請案之揭示內容特此以全文引用之方式併入本文中。

【補充序列表】

- <110> 加拿大商艾普托斯生物科學公司
 <120> 用於治療癌症之芳基咪唑
 <130> LCTH-057/01TW 320913-2380
 <140> TW 107138334
 <141> 2018-10-30
 <150> US 62/578,938
 <151> 2017-10-30
 <160> 15
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> ABCG2寡核苷酸引子
 <400> 1
 ttaggattga agccaaagg 19
- <210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> ABCG2寡核苷酸引子
 <400> 2
 taggcaattg tgaggaaat a 21
- <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> MYC寡核苷酸引子
 <400> 3
 gagcagcagc gaaagggaga 20
- <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> MYC寡核苷酸引子
 <400> 4
 cagccgagca ctctagctet 20
- <210> 5

<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> MYC寡核苷酸引子	
<400> 5	
ccgcatccac gaaactttg	19
<210> 6	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> MYC寡核苷酸引子	
<400> 6	
gggtgttgta agttccagtg caa	23
<210> 7	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 28s RNA寡核苷酸引子	
<400> 7	
agtagcaaat attcaaacga gaacttt	27
<210> 8	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 28s RNA寡核苷酸引子	
<400> 8	
acccatgttc aactgctggt c	21
<210> 9	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> MYC寡核苷酸引子	
<400> 9	
cagtagaaat acggetgcac	20
<210> 10	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> MYC寡核苷酸引子	

<400> 10 ttcgggtagt ggaaaaccag	20
<210> 11 <211> 33 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> G-四鏈體端粒寡核苷酸	
<220> <221> misc_feature <222> (1)..(1) <223> 共價連接之FAM (螢光素)螢光染料	
<220> <221> misc_feature <222> (33)..(33) <223> 共價連接之BHQ1 (Black Hole Quencher 1)非螢光發色團	
<400> 11 gggttagggt tagggttagg gttagggtta ggg	33
<210> 12 <211> 29 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> G-四鏈體MYC寡核苷酸	
<220> <221> misc_feature <222> (1)..(1) <223> 共價連接之FAM (螢光素)螢光染料	
<220> <221> misc_feature <222> (29)..(29) <223> 共價連接之BHQ1 (Black Hole Quencher 1)非螢光發色團	
<400> 12 ccatggggag ggtggagggt ggggaaggt	29
<210> 13 <211> 33 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> G-四鏈體KIT寡核苷酸	
<220> <221> misc_feature <222> (1)..(1) <223>	
<220> 共價連接之FAM (螢光素)螢光染料	

<221> misc_feature
 <222> (33)..(33)
 <223> 共價連接之BHQ1 (Black Hole Quencher 1)非螢光發色團

<400> 13
 ttatagggag ggcgctggga ggagggagga gac 33

<210> 14
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> G-四鏈體rRNA寡核苷酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 共價連接之FAM (螢光素)螢光染料

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (33)..(33)
 <223> 共價連接之BHQ1 (Black Hole Quencher 1)非螢光發色團

<400> 14
 aataaggggtg gcggggggta gaggggggta ata 33

<210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> G-四鏈體ds_DNA寡核苷酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> 共價連接之FAM (螢光素)螢光染料

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(11)
 <223> 藉由Spacer 18、亦即18個原子長之六乙二醇鏈連接

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> 共價連接之BHQ1 (Black Hole Quencher 1)非螢光發色團

<400> 15
 tatagctata tatagctata 20



【發明摘要】

【中文發明名稱】

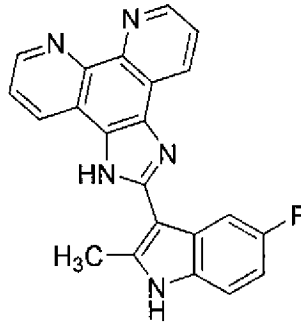
用於治療癌症之芳基咪唑

【英文發明名稱】

ARYL IMIDAZOLES FOR THE TREATMENT OF CANCER

【中文】

本發明係關於一種預防、減小或治療個體之癌症的方法，其包含向該



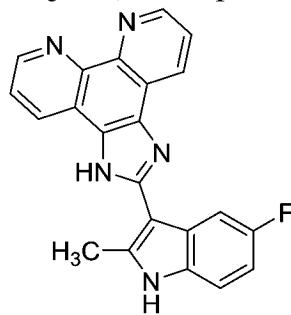
個體投與治療有效量之

或其醫藥學上可接受之鹽、游離

鹼、水合物、錯合物或螯合物(包括金屬螯合物，諸如鐵、鋅及其他金屬)，其中該個體DNA修復基因具有突變。

【英文】

The present invention relates to a method of preventing, reducing, or treating cancer in a subject, comprising administering a therapeutically



effective amount of

or a pharmaceutically acceptable

salt, free base, hydrate, complex, or chelate (including metal chelates, such as iron, zinc and others) thereof to the subject, wherein the subject has a mutation in a DNA repair gene.

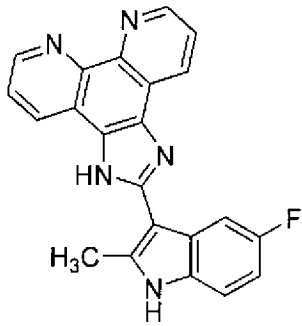
【指定代表圖】

圖3

【代表圖之符號簡單說明】

無

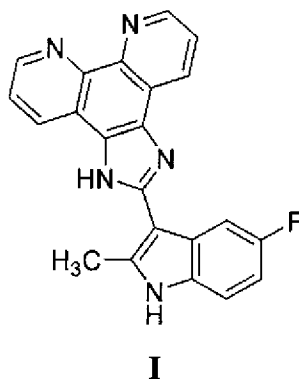
【特徵化學式】



I

【發明申請專利範圍】**【第1項】**

一種預防、減小或治療個體中癌症之方法，其包含向該個體投與治療有效量之化合物I：



或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、錯合物或螯合物；其中該個體DNA修復基因具有突變。

【第2項】

如請求項1之方法，其中該DNA修復基因為同源重組基因。

【第3項】

如請求項1之方法，其中該DNA修復基因係同源重組(HR)依賴性去氧核糖核酸(DNA)雙股裂縫(DSB)修復路徑中之基因。

【第4項】

如請求項1之方法，其中該DNA修復基因係一或多個選自由以下組成之群的基因：*BRCA-1*、*BRCA-2*、*ATM*、*ATR*、*CHK1*、*CHK2*、*Rad51*、*RPA*及*XRCC3*。

【第5項】

如請求項2之方法，其中該DNA修復基因為*BRCA-1*及/或*BRCA-2*。

【第6項】

如請求項1之方法，其中該個體在DNA修復基因中之突變係雜合的。

【第7項】

如請求項6之方法，其中該個體在該同源重組(HR)依賴性去氧核糖核酸(DNA)雙股裂縫(DSB)修復路徑中之基因突變係雜合的。

【第8項】

如請求項6之方法，其中該個體在BRCA1或BRCA2中之突變係雜合的。

【第9項】

如請求項6之方法，其中該個體在BRCA1或BRCA2中之突變係純合的。

【第10項】

如請求項1之方法，其中該癌症選自由以下組成之群：血基質癌、結腸直腸癌、卵巢癌、乳癌、子宮頸癌、肺癌、肝癌、胰腺癌、淋巴結癌、白血病、腎癌、結腸癌、前列腺癌、腦癌、頭頸癌、骨癌、喉癌及口腔癌、尤文氏肉瘤(Ewing's sarcoma)、皮膚癌、腎癌及心臟癌。

【第11項】

如請求項10之方法，其中該癌症選自由以下組成之群：乳癌、肺癌、淋巴結癌、結腸癌、白血病、腎癌及前列腺癌。

【第12項】

如請求項11之方法，其中該癌症為乳癌。

【第13項】

如請求項1之方法，其中該癌症為BRCA相關之癌症。

【第14項】

如請求項13之方法，其中該BRCA相關之癌症具有BRCA-1及/或BRCA-2基因之一或多個突變。

【第15項】

如請求項1之方法，其中該個體為人類。

【第16項】

如請求項1之方法，其進一步包含投與治療有效量之第二治療活性劑。

【第17項】

如請求項16之方法，其中該第二治療活性劑係在該個體投與化合物I之前、期間或之後投與。

【第18項】

如請求項16之方法，其中該第二治療活性劑選自由免疫治療劑、抗癌劑及血管生成劑組成之群中之一或多者。

【第19項】

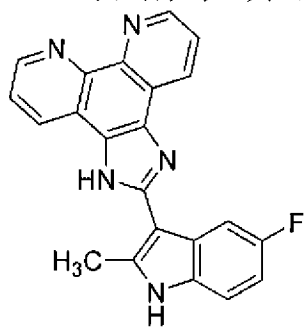
如請求項18之方法，其中該第二治療活性劑為PARP抑制劑。

【第20項】

如請求項19之方法，其中該PARP抑制劑為奧拉帕尼(olaparib)。

【第21項】

如請求項1之方法，其中相對於未投與治療有效量之化合物I



或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、錯合物或螯

合物之個體，該個體經歷小於90%之骨髓活性降低。

【第22項】

如請求項21之方法，其中該個體經歷小於10%之骨髓活性降低。

【第23項】

如請求項21之方法，其中該個體未經歷骨髓活性降低。

【第24項】

如請求項1之方法，其中該個體已患有癌症。

【第25項】

如請求項24之方法，其中該個體經歷與癌症有關的腫瘤之尺寸縮小或減小。

【第26項】

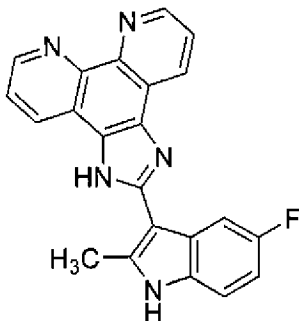
如請求項25之方法，其中該個體經歷該與癌症有關之腫瘤之完全消除。

【第27項】

如請求項24之方法，其中該個體經歷與癌症有關的腫瘤中之新血管形成或血管生成的抑制、減輕或減少。

【第28項】

一種殺死癌細胞之方法，其包含使該等細胞與治療有效量之化合物I



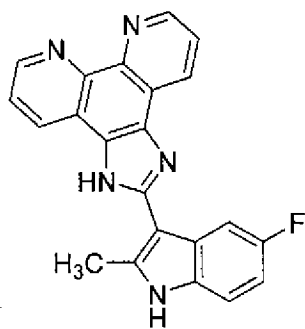
或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合物、錯合物或螯合物接觸。

【第29項】

如請求項28之方法，其中該等癌細胞在一或多個選自由以下組成之群的基因中具有缺陷：*BRCA-1*、*BRCA-2*、*ATM*、*ATR*、*CHK1*、*CHK2*、*Rad51*、*RPA*及*XRCC3*。

【第30項】

一種誘導癌細胞中細胞週期停滯之方法，其包含使該等細胞與治療有



效量之化合物I

或其醫藥學上可接受之鹽、游離鹼、水合

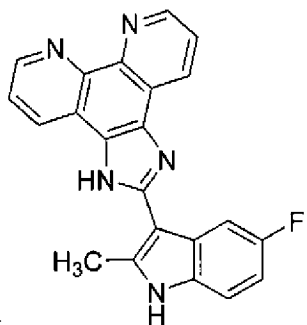
物、錯合物或螯合物接觸。

【第31項】

如請求項30之方法，其中該等癌細胞在一或多個選自由以下組成之群的基因中具有缺陷：*BRCA-1*、*BRCA-2*、*ATM*、*ATR*、*CHK1*、*CHK2*、*Rad51*、*RPA*及*XRCC3*。

【第32項】

一種預防、減輕或治療個體之癌症的方法，其包含投與治療有效量之



一或多個分子

與一或多個金屬原子之錯合物，其中該個

體DNA修復基因具有突變。

【第33項】

如請求項32之方法，其中該等一或多個金屬原子選自由以下組成之

群：鐵、鋅、鋁、鎂、鉑、銀、金、鉻、鎳、鈦、銅、鈦、鋯、鈦、鈦、鋁、錳、鎢及鈷。

【第34項】

如請求項33之方法，其中該一或多個金屬原子為鐵。

【第35項】

如請求項34之方法，其中該錯合物具有以下結構：

