



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111132672 A

(43)申请公布日 2020.05.08

(21)申请号 201880061330.8

(22)申请日 2018.09.10

(30)优先权数据

62/561,002 2017.09.20 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.03.20

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/050162 2018.09.10

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/060152 EN 2019.03.28

(71)申请人 俄克拉荷马医学研究基金会

地址 美国俄克拉荷马州

(72)发明人 瑞欧·A·汤纳

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 郑斌 刘振佳

(51)Int.Cl.

A61K 31/13(2006.01)

A61K 31/185(2006.01)

A61K 31/4188(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书4页 说明书39页 附图16页

(54)发明名称

抗药性胶质瘤的治疗

(57)摘要

本公开描述2,4-二磺酰基苯基叔丁基硝酮(2,4-ds-PBN)在治疗替莫唑胺药物抗性胶质瘤中的用途。所述2,4-ds-PBN可以与包括替莫唑胺在内的其他化疗和放疗和手术组合,以减少胶质瘤发生、复发、扩散、生长、转移和血管化,并且抑制替莫唑胺抗性的发展。

1. 一种治疗受试者中的替莫唑胺抗性胶质瘤的方法,其包括向所述受试者施用有效抑制所述胶质瘤的血管化、生长或扩散的剂量的2,4-二磺酰基苯基叔丁基硝酮(2,4-ds-PBN)。

2. 如权利要求1所述的方法,其中施用是通过需要2,4-ds-PBN随后穿过血脑屏障的途径进行的。

3. 如权利要求2所述的方法,其中所述途径是肠内、静脉内或动脉内途径。

4. 如权利要求1所述的方法,其中所述受试者患有复发性或转移性胶质瘤。

5. 如权利要求1所述的方法,其中所述受试者先前用一种或多种抗胶质瘤疗法治疗失败。

6. 如权利要求1所述的方法,其中2,4-ds-PBN的有效剂量是约5至约150mg/kg体重/天。

7. 如权利要求2所述的方法,其中肠内施用是通过食物组分的饮食补充进行的。

8. 如权利要求2所述的方法,其中所述肠内施用呈丸剂或液体的形式。

9. 如权利要求1所述的方法,其还包括第二抗胶质瘤疗法。

10. 如权利要求9所述的方法,其中所述第二抗胶质瘤疗法是放射、手术或化疗,诸如替莫唑胺、洛莫司汀、长春新碱、甲基苄肼、PCV、BCNU、CCNU和/或DFMO。

11. 如权利要求10所述的方法,其中所述第二抗胶质瘤剂是替莫唑胺。

12. 如权利要求11所述的方法,其中替莫唑胺的有效剂量低于替莫唑胺的标准单一疗法剂量。

13. 如权利要求7所述的方法,其中所述有效量是正在施用的饮食的约0.005w/w%至约0.1w/w%。

14. 如权利要求1所述的方法,其中所述胶质瘤是星形细胞瘤、少枝胶质细胞瘤或多形性胶质母细胞瘤或者前述中的任一种的表达TGF- $\beta$ 1、MGMT和/或APGN的形式。

15. 如权利要求1所述的方法,其还包括通过在用2,4-ds-PBN治疗之前和之后测量脂多糖结合蛋白的表达来评定治疗功效。

16. 一种用于抑制受试者中的胶质瘤替莫唑胺抗性的发展的方法,其包括(a) 鉴定患有胶质瘤的受试者,和(b) 向所述受试者施用有效抑制所述胶质瘤中的替莫唑胺抗性的发展的剂量的以下物质:

(i) 2,4-二磺酰基苯基叔丁基硝酮(2,4-ds-PBN), 和

(ii) 替莫唑胺。

17. 如权利要求16所述的方法,其中施用是通过需要2,4-ds-PBN随后穿过血脑屏障的途径进行的。

18. 如权利要求17所述的方法,其中所述途径是肠内、静脉内或动脉内途径。

19. 如权利要求16所述的方法,其中所述有效剂量是约5至约150mg/kg体重/天。

20. 如权利要求18所述的方法,其中肠内施用是通过食物组分的饮食补充进行的。

21. 如权利要求18所述的方法,其中所述肠内施用呈丸剂或液体的形式。

22. 如权利要求20所述的方法,其中2,4-ds-PBN的有效量是正在施用的饮食的约0.005w/w%至约0.1w/w%。

23. 如权利要求16所述的方法,其中所述胶质瘤是星形细胞瘤、少枝胶质细胞瘤、多形性胶质母细胞瘤或者前述中的任一种的表达TGF- $\beta$ 1或MGMT的形式。

24. 如权利要求16所述的方法,其还包括第二抗胶质瘤疗法。
25. 如权利要求24所述的方法,其中所述第二抗胶质瘤疗法是放射、手术或化疗,诸如替莫唑胺、洛莫司汀、长春新碱、甲基苄肼、PCV、BCNU、CCNU和/或DFMO。
26. 如权利要求25所述的方法,其中所述第二抗胶质瘤剂是替莫唑胺。
27. 如权利要求26所述的方法,其中替莫唑胺的有效剂量低于替莫唑胺的标准单一疗法剂量。
28. 如权利要求16所述的方法,其还包括通过在用2,4-ds-PBN治疗之前和之后测量脂多糖结合蛋白的表达来评定功效。
29. 一种用于抑制胶质瘤复发的方法,其包括(a) 鉴定患有胶质瘤的受试者,和(b) 向所述受试者施用有效抑制所述胶质瘤的复发的剂量的以下物质:
- (i) 2,4-二磺酰基苯基叔丁基硝酮(2,4-ds-PBN), 和
  - (ii) 替莫唑胺。
30. 如权利要求29所述的方法,其中施用是通过需要2,4-ds-PBN随后穿过血脑屏障的途径进行的。
31. 如权利要求30所述的方法,其中所述途径是肠内、静脉内或动脉内途径。
32. 如权利要求29所述的方法,其中所述胶质瘤是星形细胞瘤、少枝胶质细胞瘤、多形性胶质母细胞瘤或者前述中的任一种的表达TGF- $\beta$ 1或MGMT的形式。
33. 如权利要求29所述的方法,其中2,4-ds-PBN的有效剂量是约5至约150mg/kg体重/天。
34. 如权利要求29所述的方法,其还包括施用抑制胶质瘤复发的第二药剂。
35. 如权利要求34所述的方法,其中所述第二抗胶质瘤疗法是放射、手术或化疗,诸如替莫唑胺、洛莫司汀、长春新碱、甲基苄肼、PCV、BCNU、CCNU和/或DFMO。
36. 如权利要求35所述的方法,其中所述第二抗胶质瘤剂是替莫唑胺。
37. 如权利要求36所述的方法,其中替莫唑胺的有效剂量低于替莫唑胺的标准单一疗法剂量。
38. 如权利要求29所述的方法,其还包括对所述受试者中的胶质瘤形成进行筛选。
39. 如权利要求1、16或29所述的方法,其还包括评定LBP的表达,其中与未治疗对照相比LBP水平降低指示预后改善。
40. 如权利要求29所述的方法,其还包括通过在用2,4-ds-PBN治疗之前和之后测量脂多糖结合蛋白的表达来评定功效。
41. 一种检测胶质母细胞瘤的方法,其包括:
- (a) 从受试者获得样品; 和
  - (b) 评定所述样品中的脂多糖结合蛋白(LBP)水平,
- 其中LBP水平高于来自可比较的正常对照样品的LBP水平指示所述受试者中存在胶质母细胞瘤。
42. 如权利要求41所述的方法,其中评定LBP水平包括免疫学评定或核酸评定。
43. 如权利要求42所述的方法,其中免疫学评定包括ELISA、RIA、免疫印迹或免疫组织化学。
44. 如权利要求42所述的方法,其中核酸评定包括RT-PCR、RNA印迹、RNA-Seq或微阵列。

45. 如权利要求41所述的方法,其中所述样品是全血、血清、血浆或尿液。
46. 一种监测胶质母细胞瘤进展的方法,其包括:
- (a) 从受试者获得样品;
  - (b) 评定所述样品中的脂多糖结合蛋白(LBP)水平;以及
  - (c) 在第二时间点重复步骤(a)和(b),
- 其中与步骤(b)相比步骤(c)中的LBP水平更高指示所述受试者中胶质母细胞瘤的进展。
47. 如权利要求46所述的方法,其中评定LBP水平包括免疫学评定或核酸评定。
48. 如权利要求47所述的方法,其中免疫学评定包括ELISA、RIA、免疫印迹或免疫组织化学。
49. 如权利要求47所述的方法,其中核酸评定包括RT-PCR、RNA印迹、RNA-Seq或微阵列。
50. 如权利要求46所述的方法,其中所述样品是全血、血清、血浆或尿液。
51. 一种对胶质母细胞瘤分级的方法,其包括:
- (a) 从受试者获得样品;
  - (b) 评定所述样品中的脂多糖结合蛋白(LBP)水平;
  - (c) 将步骤(b)的所述LBP水平与低等级、中等级和/或高等级胶质母细胞瘤的对照样品进行比较,以及
  - (d) 对所述受试者中的所述胶质母细胞瘤分配等级。
52. 如权利要求46所述的方法,其中评定LBP水平包括免疫学评定或核酸评定。
53. 如权利要求47所述的方法,其中免疫学评定包括ELISA、RIA、免疫印迹或免疫组织化学。
54. 如权利要求47所述的方法,其中核酸评定包括RT-PCR、RNA印迹、RNA-Seq或微阵列。
55. 如权利要求46所述的方法,其中所述样品是肿瘤样品、全血、血清、血浆或尿液。
56. 一种治疗患有胶质母细胞瘤的受试者的方法,其包括向所述受试者施用连接到脂多糖结合蛋白(LBP)靶向剂的治疗剂。
57. 如权利要求56所述的方法,其中所述LBP靶向剂是抗体、ScFv、Fab或F(ab')<sub>2</sub>或肽。
58. 如权利要求56所述的方法,其中所述治疗剂是化疗剂、放疗剂、免疫治疗剂或生物制剂。
59. 如权利要求56所述的方法,其中所述化疗剂是替莫唑胺或2,4-二磺酰基苯基叔丁基硝酮(2,4-ds-PBN)。
60. 如权利要求56所述的方法,其中所述胶质母细胞瘤具有抗药性。
61. 如权利要求60所述的方法,其中所述胶质母细胞瘤具有替莫唑胺抗性。
62. 如权利要求56或60所述的方法,其中所述胶质母细胞瘤先前已经用替莫唑胺和/或2,4-二磺酰基苯基叔丁基硝酮(2,4-ds-PBN)进行治疗。
63. 如权利要求56所述的方法,其中所述胶质母细胞瘤是复发性的和/或转移性的。
64. 如权利要求56所述的方法,其中所述治疗剂与LBP的连接键是可切割的。
65. 如权利要求56所述的方法,其还包括评定所述患者或所述胶质母细胞瘤中的LBP表达。
66. 一种鉴定受试者中的胶质母细胞瘤边界的方法,其包括:

- (a) 向所述受试者施用连接到脂多糖结合蛋白的成像剂;和
- (b) 对所述受试者中的胶质母细胞瘤部位进行成像。

67. 如权利要求66所述的方法,其还包括向所述受试者施用连接到ELTD1、Slit-3或Spondin-1的成像剂。

68. 如权利要求66所述的方法,其中所述成像剂是染料、放射性标记、荧光标记、化学发光标记、MRI标记或近红外标记。

69. 如权利要求66所述的方法,其还包括在成像之后切除所述胶质母细胞瘤。

70. 如权利要求69所述的方法,其还包括在切除之后对所述胶质母细胞瘤部位进行再成像。

71. 一种鉴定来自受试者的组织样品中的胶质母细胞瘤细胞的方法,其包括:

- (a) 从所述受试者获得组织样品
- (b) 将所述组织样品与连接到脂多糖结合蛋白的标记接触;以及
- (c) 检测与所述组织样品结合的所述标记-LBP缀合物。

72. 如权利要求71所述的方法,其还包括将所述组织样品与连接到所述受试者的标记接触,所述标记是连接到ELTD1、Slit-3或Spondin-1的成像剂。

73. 如权利要求71所述的方法,其中所述标记是染料、放射性标记、荧光标记、化学发光标记、MRI标记或近红外标记。

74. 如权利要求71所述的方法,其中所述组织样品是未固定的新鲜活检样品。

75. 如权利要求71所述的方法,其中所述组织样品是固定的活检样品。

## 抗药性胶质瘤的治疗

[0001] 本申请要求2017年9月20日提交的美国临时申请序列号62/561,002的优先权益,所述临时申请的全部内容特此以引用的方式并入。

### 背景技术

[0002] 1. 技术领域

[0003] 本公开总体上涉及肿瘤学和化疗领域。更具体地,本公开涉及2,4-二磺酰基苯基叔丁基硝酮(2,4-ds-PBN)用于治疗抗药性胶质瘤的用途。

[0004] 2. 相关技术描述

[0005] 胶质瘤是由大脑的正常“胶质”细胞和/或其前体细胞引起的脑肿瘤的广泛组。胶质瘤存活的最重要决定因素是胶质瘤的“等级”。存活的第二决定因素是诊断年龄、一般状况和手术范围。具有低等级胶质瘤的患者具有持久的自然历史,通常存活时间较长,而具有高等级胶质瘤的那些患者更难以成功治疗并且具有更短的存活时间。所有的胶质瘤都具有特定体征和症状,其主要与胶质瘤的位置和大小相关。

[0006] 例如,颞叶胶质瘤可能导致癫痫发作、言语困难和/或记忆丧失。额叶胶质瘤可能导致癫痫发作、行为变化、身体相对侧上手臂或腿部无力和/或言语困难。枕部胶质瘤可能导致视力丧失。顶叶胶质瘤可能导致空间定向丧失、身体相对侧上感官减弱和/或无法识别曾经熟悉的物体或人。

[0007] 星形细胞瘤是由称为星形胶质细胞的脑细胞或其前体引起的胶质瘤肿瘤。星形胶质细胞是中枢神经系统中支持神经元功能的细胞。星形细胞瘤可以通过指示恶性增加的组织学特征而分级为星形细胞瘤、间变性星形细胞瘤或多形性胶质母细胞瘤。间变性星形细胞瘤和多形性胶质母细胞瘤被认为是高等级胶质瘤,而星形细胞瘤被认为是低等级胶质瘤。高等级肿瘤快速生长并且可能容易浸润并在整个大脑中扩散。低等级星形细胞瘤也可能浸润大脑,但是通常更局部化,并且在长时间内生长缓慢。高等级肿瘤更具侵略性并且需要非常强烈的治疗。儿童中的大部分星形细胞肿瘤是低等级的,而成人中的大部分是高等级的。星形细胞瘤可能在大脑和脊髓中的任何地方发生,然而,大部分位于大脑半球中。

[0008] 少枝胶质细胞瘤也是胶质瘤。它们由少突胶质细胞和/或其细胞前体引起。正常的少突胶质细胞提供髓鞘,这是一种覆盖大脑和脊髓中的神经轴突的脂肪物质,并且允许神经更有效地传导电脉冲。少枝胶质细胞瘤分为低等级少枝胶质细胞瘤(侵略性较小)和间变性少枝胶质细胞瘤(更具侵略性)。比纯少枝胶质细胞瘤更常见的是低等级和间变性肿瘤,它们是星形细胞瘤和少枝胶质细胞瘤(“少突星形细胞瘤”)的混合物。

[0009] 间变性少枝胶质细胞瘤和混合型少突星形细胞瘤比星形细胞瘤对于细胞毒性化疗更具敏感性。对于PCV(丙卡巴肼(甲基苄肼)、CCNU(洛莫司汀)、长春新碱)化疗的高应答率使得此方案的使用成为至少非常常见的治疗(如果不是对于这些肿瘤的标准护理的话)。低等级少枝胶质细胞瘤对于化疗也具有敏感性,并且当低等级肿瘤开始生长时,即使先前进行了手术/放射疗法,也可以使用PCV。

[0010] 苯基-叔丁基-硝酮(PBN)作为潜在的抗胶质瘤药物的效率已在大鼠C6胶质瘤植入

模型的预处理中显示 (Doblas等人, 2008)。来自未处理的大鼠的MRI结果显示C6胶质瘤的扩散性侵袭, 具有一些相关联的血管形成。发现作为预处理进行的PBN施用清楚地诱导生长速率降低和肿瘤消退以及预防血管形成。然而, 与预处理 (>80%的肿瘤具有减少的生长) 相比, PBN的后处理对于肿瘤消退具有减小的作用 (~50%的肿瘤具有减少的肿瘤生长)。MRI发现与来自组织学和血管形成标记物免疫染色评估的那些相对。

[0011] 在最近的研究中, 发明人显示PBN的一种结构类似物2,4-ds-PBN, 降低肿瘤体积并延迟肿瘤生长速率。2,4-ds-PBN后处理也显著有效地增加存活率。此结果是意料之外且令人惊讶的, 因为已知PBN的磺化衍生物不能够易于穿过血脑屏障 (BBB)。先前已发现PBN (亲本硝酮) 易于渗透BBB (Wang和Shuaib, 2007)。2,4-二磺酰基PBN (2,4-ds-PBN) 在结构上与亲本化合物PBN相关, 但是含有两个使其更具水溶性的磺酰基基团。由于水溶性增加, 2,4-二磺酰基PBN初始地被认为与PBN相比, 不易于穿过BBB (Wang和Shuaib, 2007)。然而, 发明人证明了2,4-二磺酰基PBN可以容易地穿过BBB (Coutinho de Souza等人, 2015)。理想地, 用作抗胶质瘤疗法的药物需要穿过BBB的内皮连接以到达大部分肿瘤细胞 (Cao等人, 2005), 但是可能的是, 恶性胶质瘤已获得通过分泌可溶性因子来有效降解紧密连接的能力, 从而最终导致被侵袭的脑组织内BBB的破坏 (Schneider等人, 2004)。具体地, 2,4-二磺酰基PBN已显示作为对于胶质瘤组织的单一疗法的显著功效。

## 发明内容

[0012] 因此, 根据本公开, 提供了一种治疗受试者中的替莫唑胺抗性胶质瘤的方法, 其包括向所述受试者施用有效抑制所述胶质瘤的血管化、生长或扩散的剂量的2,4-二磺酰基苯基叔丁基硝酮 (2,4-ds-PBN)。施用可以通过需要2,4-ds-PBN随后穿过血脑屏障的途径, 诸如肠内、静脉内或动脉内途径进行。

[0013] 所述受试者可能患有复发性或转移性胶质瘤, 并且/或者可能先前用一种或多种抗胶质瘤疗法治疗失败。2,4-ds-PBN的有效剂量可以是约5至约150mg/kg体重/天。所述肠内施用可以通过食品组分的饮食补充进行, 或者所述肠内施用可以呈丸剂或液体的形式。所述受试者可以是人。

[0014] 所述方法还可以包括第二抗胶质瘤疗法, 诸如放射、手术或化疗, 诸如替莫唑胺、洛莫司汀、长春新碱、甲基苄肼、PCV、BCNU、CCNU和/或DFMO。所述第二抗胶质瘤剂可以是替莫唑胺, 所述替莫唑胺的有效剂量可以低于替莫唑胺的标准单一疗法剂量。

[0015] 2,4-ds-PBN的有效量可以是正在施用的饮食的约0.005w/w%至约0.1w/w%。所述胶质瘤可以是星形细胞瘤、少枝胶质细胞瘤或多形性胶质母细胞瘤或者前述中的任一种的表达TGF- $\beta$ 1、MGMT和/或APGN的形式。

[0016] 所述方法还可以包括通过在用2,4-ds-PBN治疗之前和之后测量脂多糖结合蛋白的表达来评定治疗功效。所述方法还可以包括评定LBP的表达, 其中与未治疗对照相比LBP水平降低指示预后改善。

[0017] 在另一个实施方案中, 提供了一种用于抑制受试者中胶质瘤替莫唑胺抗性的发展的方法, 其包括 (a) 鉴定患有胶质瘤的受试者, 以及 (b) 向所述受试者施用有效抑制所述胶质瘤中替莫唑胺抗性的发展的剂量的 (i) 2,4-二磺酰基苯基叔丁基硝酮 (2,4-ds-PBN) 和 (ii) 替莫唑胺。施用可以通过需要2,4-ds-PBN随后穿过血脑屏障的途径, 诸如肠内、静脉内

或动脉内途径进行。

[0018] 所述受试者可能患有复发性或转移性胶质瘤,并且/或者可能先前用一种或多种抗胶质瘤疗法治疗失败。2,4-ds-PBN的有效剂量可以是约5至约150mg/kg体重/天。所述肠内施用可以通过食品组分的饮食补充进行,或者所述肠内施用可以呈丸剂或液体的形式。所述受试者可以是人。

[0019] 所述方法还可以包括第二抗胶质瘤疗法,诸如放射、手术或化疗,诸如替莫唑胺、洛莫司汀、长春新碱、甲基苄肼、PCV、BCNU、CCNU和/或DFMO。所述第二抗胶质瘤剂可以是替莫唑胺,所述替莫唑胺的有效剂量可以低于替莫唑胺的标准单一疗法剂量。

[0020] 2,4-ds-PBN的有效量可以是正在施用的饮食的约0.005w/w%至约0.1w/w%。所述胶质瘤可以是星形细胞瘤、少枝胶质细胞瘤或多形性胶质母细胞瘤或者前述中的任一种的表达TGF- $\beta$ 1、MGMT和/或APGN的形式。所述方法还可以包括评定LBP的表达,其中与未治疗对照相比LBP水平降低指示预后改善。

[0021] 在又一个实施方案中,提供了一种用于抑制胶质瘤复发的方法,其包括(a)鉴定患有胶质瘤的受试者,以及(b)向所述受试者施用有效抑制所述胶质瘤的复发的剂量的(i) 2,4-二磺酰基苯基叔丁基硝酮(2,4-ds-PBN)和(ii)替莫唑胺。施用可以通过需要2,4-ds-PBN随后穿过血脑屏障的途径,诸如肠内、静脉内或动脉内途径进行。

[0022] 所述受试者可能患有复发性或转移性胶质瘤,并且/或者可能先前用一种或多种抗胶质瘤疗法治疗失败。2,4-ds-PBN的有效剂量可以是约5至约150mg/kg体重/天。所述肠内施用可以通过食品组分的饮食补充进行,或者所述肠内施用可以呈丸剂或液体的形式。所述受试者可以是人。

[0023] 所述方法还可以包括第二抗胶质瘤疗法,诸如放射、手术或化疗,诸如替莫唑胺、洛莫司汀、长春新碱、甲基苄肼、PCV、BCNU、CCNU和/或DFMO。所述第二抗胶质瘤剂可以是替莫唑胺,所述替莫唑胺的有效剂量可以低于替莫唑胺的标准单一疗法剂量。

[0024] 2,4-ds-PBN的有效量可以是正在施用的饮食的约0.005w/w%至约0.1w/w%。所述胶质瘤可以是星形细胞瘤、少枝胶质细胞瘤或多形性胶质母细胞瘤或者前述中的任一种的表达TGF- $\beta$ 1、MGMT和/或APGN的形式。所述方法还可以包括对所述受试者中的胶质瘤形成进行筛选。所述方法还可以包括通过在用2,4-ds-PBN治疗之前和之后测量脂多糖结合蛋白的表达来评定功效。所述方法还可以包括评定LBP的表达,其中与未治疗对照相比LBP水平降低指示预后改善。

[0025] 在再一个实施方案中,提供了检测胶质母细胞瘤的方法,其包括(a)从受试者获得样品;以及(b)评定所述样品中的脂多糖结合蛋白(LBP)水平,其中LBP水平高于来自可比较的正常对照样品的LBP水平指示所述受试者中存在胶质母细胞瘤。评定LBP水平可以包括免疫学评定或核酸评定,诸如选自ELISA、RIA、免疫印迹或免疫组织化学的免疫学评定,或者选自RT-PCR、RNA印迹、RNA-Seq或微阵列的核酸评定。样品可以是全血、血清、血浆或尿液。

[0026] 进一步的实施方案包括监测胶质母细胞瘤进展的方法,其包括(a)从受试者获得样品;(b)评定所述样品中的脂多糖结合蛋白(LBP)水平;以及(c)在第二时间点处重复步骤(a)和(b),其中与步骤(b)相比步骤(c)中的LBP水平更高指示所述受试者中胶质母细胞瘤的进展。评定LBP水平可以包括免疫学评定或核酸评定,诸如选自ELISA、RIA、免疫印迹或免疫组织化学的免疫学评定,或者选自RT-PCR、RNA印迹、RNA-Seq或微阵列的核酸评定。样品



可以是全血、血清、血浆或尿液。

[0027] 又一进一步的实施方案包括对胶质母细胞瘤分级的方法,其包括(a)从受试者获得样品;(b)评定所述样品中的脂多糖结合蛋白(LBP)水平;(c)将步骤(b)的所述LBP水平与低等级、中等级和/或高等级胶质母细胞瘤的对照样品进行比较,以及(d)对所述受试者中的所述胶质母细胞瘤分配等级。评定LBP水平可以包括免疫学评定或核酸评定,诸如选自ELISA、RIA、免疫印迹或免疫组织化学的免疫学评定,或者选自RT-PCR、RNA印迹、RNA-Seq或微阵列的核酸评定。样品可以是全血、血清、血浆或尿液。

[0028] 另外的实施方案包括治疗患有胶质母细胞瘤的受试者的方法,其包括向所述受试者施用连接到脂多糖结合蛋白(LBP)靶向剂的治疗剂。所述LBP靶向剂可以是抗体、ScFv、Fab或F(ab')<sub>2</sub>或肽。所述治疗剂可以是化疗剂、放疗剂、免疫治疗剂或生物制剂。所述化疗剂可以是替莫唑胺或2,4-二磺酰基苯基叔丁基硝酮(2,4-ds-PBN)。所述胶质母细胞瘤可以具有抗药性,诸如替莫唑胺抗性。所述胶质母细胞瘤可能先前已经用替莫唑胺和/或2,4-二磺酰基苯基叔丁基硝酮(2,4-ds-PBN)进行治疗。所述胶质母细胞瘤可以是复发性的和/或转移性的。所述治疗剂与LBP的连接键可能是可切割的。所述方法还可以包括评定所述患者或所述胶质母细胞瘤中的LBP表达。

[0029] 再一个实施方案包括一种鉴定受试者中的胶质母细胞瘤边界的方法,其包括(a)向所述受试者施用连接到脂多糖结合蛋白的成像剂;和(b)对所述受试者中的胶质母细胞瘤部位进行成像。所述方法还可以包括向所述受试者施用连接到ELTD1、Slit-3或Spondin-1的成像剂。所述成像剂可以是染料、放射性标记、荧光标记、化学发光标记、MRI标记或近红外标记。所述方法还可以包括在成像之后切除所述胶质母细胞瘤,任选地还包括在切除之后对所述胶质母细胞瘤部位进行再成像。

[0030] 再又一个实施方案包括一种鉴定来自受试者的组织样品中的胶质母细胞瘤细胞的方法,其包括(a)从所述受试者获得组织样品;(b)将所述组织样品与连接到脂多糖结合蛋白的标记接触;以及(c)检测与所述组织样品结合的所述标记-LBP缀合物。所述方法还可以包括将所述组织样品与连接到所述受试者的标记接触,所述标记是连接到ELTD1、Slit-3或Spondin-1的成像剂。所述标记可以是染料、放射性标记、荧光标记、化学发光标记、MRI标记或近红外标记。所述组织样品可以是未固定的新鲜活检样品。所述组织样品可以是固定的活检样品。

[0031] 预期本文所述的任何方法或组合物可以针对本文所述的任何其他方法或组合物实施。

[0032] 当在权利要求书和/或说明书中连同术语“包含”一起使用时,使用的措辞“一个(a)”或“一种(an)”可意味“一个”,但它也符合“一个或多个”、“至少一个”及“一个或多个”的含义。

[0033] 预期此说明书中讨论的任何实施方案可以针对本发明的任何方法或组合物实施,并且反之亦然。此外,本发明的组合物和试剂盒可以用于实现本发明的方法。

[0034] 在整个本申请中,术语“约”用于指示值包括装置、用于测定所述值的方法的误差的固有变化,或研究受试者中存在的变化。

[0035] 术语“包含(comprise)”(和任何形式的包含,诸如“comprises”和“comprising”)、“具有(have)”(和任何形式的具有,诸如“has”和“having”)、“含有(contain)”(和任何形式

的含有,诸如“contains”和“containing”)和“包括(include)”(和任何形式的包括,诸如“includes”和“including”)是开放式连接动词。因此,“包含(comprises)”、“具有(has)”、“含有(contains)”或“包括(includes)”一个或多个元件的系统或方法拥有这一个或多个元件,但不限于仅拥有这一个或多个元件或步骤。类似地,“包含”、“具有”、“含有”或“包括”一个或多个特征的装置或方法的元件拥有这一个或多个特征,但不限于仅拥有这一个或多个特征。

## 附图说明

[0036] 以下附图组成本说明书的一部分,并且被包括以进一步说明本发明的某些方面。本发明可以通过参考与本文提出的特定实施方案的详细描述结合的这些附图中的一个或多个来更好地理解。

[0037] 图1:未处理的以及用TMZ、OKN-007和组合的OKN-007和TMZ处理的携带G55胶质瘤的小鼠的动物存活百分比卡普兰-迈耶曲线(Kaplan-Meier curve)。

[0038] 图2:在MRI检测肿瘤( $>5\text{mm}^3$ )之后在第19-22天获得的体内肿瘤体积( $\text{mm}^3$ )。

[0039] 图3:描绘每个处理组(TMZ,OKN-007(OKN),组合的OKN-007和TMZ(Comb)和未处理(UT))的中间肿瘤区域中的肿瘤(最大肿瘤)的MR图像。

[0040] 图4:每个处理组(UT,TMZ,OKN或组合处理)在最后MRI时间点处获得的肿瘤体积。

[0041] 图5A:每个处理组在多个时间点处获得的肿瘤体积(平均值 $\pm$ S.D.) (UT:具有虚线-点线的黑色开口圆圈;TMZ:具有虚线的蓝色开口方形;OKN:具有点线的绿色开口向上三角形;组合:具有实线的红色封闭向下三角形)。当肿瘤 $\geq 10\text{mm}^3$ ,持续多达 $\geq 50$ 天时,处理窗口开始。

[0042] 图5B:UT、TMZ、OKN或组合处理的携带G55胶质瘤的小鼠中归一化的(归一化到对侧或正常脑组织)rCBF值的变化(肿瘤检测之后在第21-22天的肿瘤的rCBF减去初始肿瘤检测时的rCBF)。

[0043] 图6:从UT、TMZ、OKN或组合处理的携带G55胶质瘤的小鼠获得的肿瘤组织裂解液中由ELISA测量的离体LBP水平。

[0044] 图7:从UT、TMZ、OKN或组合处理的携带G55胶质瘤的小鼠获得的血清中由ELISA测量的离体LBP水平。

[0045] 图8:与OKN-007组合的TMZ抗性(T98G,G55)和TMZ敏感性(U251)GBM细胞系的体外 $\text{IC}_{50}$ 评定。

[0046] 图9:OKN-007对于携带胶质瘤的大鼠肿瘤中的LBP的影响。对来自携带F98胶质瘤的动物的组织裂解液进行的LBP的ELISA评定显示在用OKN-007进行的疗法期间的表达差异。与无肿瘤对照组相比,携带肿瘤的动物中的LBP水平显著升高,并且OKN-007处理使LBP的水平接近无肿瘤对照。

[0047] 图10:OKN-007对于携带胶质瘤的大鼠血清中的LBP的影响。使用来自图9的相同动物的血清进行的LBP的ELISA评定确认,LBP可以充当可以预测OKN-007在胶质瘤中的疗法结果的血清标记物。

[0048] 图11A至图11C:根据肿瘤等级的LBP水平。与分为低等级胶质瘤的肿瘤相比,LBP水平在高等级人患者胶质瘤中升高。高等级胶质瘤:多形性胶质母细胞瘤(图11A)中和低等级

星形细胞瘤(图11B)中的LBP的代表性免疫组织化学染色。(图11C)高等级(GBM-胶质母细胞瘤,AA-间变性星形细胞瘤,A0-间变性少枝胶质细胞瘤;94个患者组织样品)和低等级(LGA-低等级星形细胞瘤,oligo-良性少枝胶质细胞瘤;45个患者组织样品)人胶质瘤中LBP表达的免疫组织化学(IHC)分数平均值。分级准则:0:0%;1:0至<25%;2:25至<50%;3:50至<75%;4:75-100% IHC染色的检测。

[0049] 图12:作为OKN功效的标记物的LBP。对于每个处理组,在研究结束时由血液和肿瘤组织样品通过ELISA评定LBP水平。发现与具有G55胶质瘤的UT小鼠相比,所有的处理均显著降低血液中的LBP。发现与具有G55胶质瘤的UT小鼠相比,OKN和组合处理显著降低肿瘤组织中的LBP在肿瘤组织或血液中,OKN或组合疗法之间LBP水平似乎没有差异。

[0050] 图13A至图13B:(图13A)未处理(UT)的以及用TMZ、OKN-007和组合的OKN-007和TMZ处理的携带G55胶质瘤的小鼠的动物存活百分比卡普兰-迈耶曲线。发现与UT携带G55胶质瘤的小鼠相比,所有的处理组均具有显著更高的存活率( $p < 0.05$ 或更大)。发现组合处理组具有比TMZ处理组显著更高的存活百分比( $p < 0.01$ )。(图13B)在MRI检测肿瘤( $> 5\text{mm}^3$ )之后在第19-22天获得的体内肿瘤体积( $\text{mm}^3$ )。发现与UT组相比,所有的处理组均具有显著更低的肿瘤体积( $p < 0.01$ 或更大)。

[0051] 图14Ai-Diii:描绘在肿瘤检测之后在第19-22天,(图14A)未处理(UT),或每个处理组(图14B) TMZ,(图14C) OKN-007(OKN),或(图14D)组合的OKN-007和TMZ(Comb)的中间肿瘤区域中的肿瘤(最大肿瘤)的代表性MR图像。对于标记“i”的图像,肿瘤用模糊的线突出显示以描绘肿瘤边界。图“ii”或“iii”中的图像是处理组A-D中的其他实例,描绘UT组中的一致性或处理组中的变化性。在此时间点范围内,在处理之后,对于OKN-007或组合疗法组,图14Ciii或图14Diii中没有可检测的肿瘤。

[0052] 图15Ai-E:(图15A) UT、(图15B) TMZ、(图15C) OKN或(图15D)组合处理的携带G55胶质瘤的小鼠中归一化的(归一化到对侧或正常脑组织) rCBF值如通过灌注MRI描绘的血管变化[肿瘤检测之后在第21-22天的肿瘤的rCBF(相对脑血流量)减去初始肿瘤检测时的rCBF]。标记“i”的图像的上部图是每个处理组的代表性T2加权形态学MR图像,而标记“ii”的图像是每个处理组的代表性灌注图。(图15E) UT和TMZ、OKN或组合疗法处理的携带G55胶质瘤的小鼠中归一化rCBF的变化的定量评定。与UT组相比,所有的处理组均具有显著更低的( $p < 0.05$ 或更大)归一化rCBF变化。

[0053] 图16:比较LN18 GBM细胞中TMZ+OKN与单独的TMZ处理组时的基因倍数变化。

[0054] 图17:比较LN229 GBM细胞中TMZ+OKN与单独的TMZ处理组时的基因倍数变化。

[0055] 图18:在处理第22、28和46小时,涂覆有层粘连蛋白的PDMS(聚二甲基硅氧烷)微通道中未处理的(UT)或用OKN-007(OKN)、TMZ或OKN+TMZ两者处理的G55 GBM细胞的迁移速度。在第22和28小时UT细胞(\*)和用OKN或OKN+TMZ处理的那些之间以及与在第46小时所有的处理组之间存在显著差异。在第22和28小时TMZ与OKN+TMZ组之间存在显著差异(†)。\*(†)  $p < 0.05$ ,\*\*(††)  $p < 0.01$ ,\*\*\* $p < 0.001$ 。

[0056] 图19:来自OKN-007处理的和未处理的携带大鼠F98胶质瘤的肿瘤的mRNA样品的微阵列分析,其指示在网络路径示意图中与未处理组( $n = 4$ )相比,处理组( $n = 4$ )中基因下调(绿色; $> 2$ 倍变化)。受影响的主要下调基因途径包括TGF $\beta$ 1、PDGFBB、P38 MAPK、NF $\kappa$ B、一些MMP(具体地MMP12)、DCN(核心蛋白聚糖)、SERPINB2、LUM、LBP(脂多糖结合蛋白)和若干胶原

蛋白。

[0057] 图20:作为大鼠F98处理胶质瘤相对于未处理肿瘤中通过OKN-007下调的57个基因的主要调节因子的TGFβ1。(上游调节因子分析,IPA)。OKN-007使57个基因下调,包括胶原蛋白、MMP12(组织重塑)、SERPINB2(丝氨酸蛋白酶抑制蛋白肽酶抑制剂)、IGFBP5(胰岛素样生长因子结合蛋白)。

[0058] 图21A至图21C:(图21A)未处理或(图21B)用OKN-007处理的大鼠F98原位肿瘤(中间肿瘤区域)的TGFβ1 IHC。未处理(UT)或OKN-007(OKN)处理中来自F98肿瘤组织裂解液的(图21C)ELISA TGFβ1蛋白水平(pg/mL)。

## 具体实施方式

[0059] 由于难以较早且准确诊断和缺乏当前有效的治疗化合物,被诊断为患有多形性胶质母细胞瘤的患者的预后非常差。此外,初始对药物具有敏感性的胶质瘤可能随时间变得具有抗性,从而为治疗这种高度致命形式的癌症提出了额外的挑战。

[0060] 如上所指出,PBN的结构类似物2,4-ds-PBN能够降低肿瘤体积并延迟患有胶质瘤的动物的肿瘤生长速率,并且还显著增加存活率。然而,并不清楚2,4-ds-PBN是否可以积极地影响基于替莫唑胺(TMZ)的疗法的结果,包括预防并克服胶质瘤细胞中的TMZ抗性。考虑到TMZ治疗的标准护理状态和TMZ抗性的流行,这种益处将对于正在用TMZ进行治疗的患者具有相当大的意义。

[0061] 因此,本发明人试图在TMZ抗性和共疗法的背景下观察2,4-ds-PBN的作用。体外细胞数据清楚地表明,2,4-ds-PBN显著地降低用TMZ处理的TMZ抗性GBM细胞的细胞活力。体内数据清楚地显示,组合的2,4-ds-PBN和TMZ处理明显增加动物存活率并且降低TMZ抗性胶质瘤异种移植裸小鼠模型中的肿瘤体积。这些意料之外的结果表明,2,4-ds-PBN和TMZ的联合使用是针对胶质瘤的有强效的新治疗方案。

[0062] 以下详细地描述本公开的这些和其他方面。

### [0063] 2. 间变性胶质瘤层

#### [0064] A. 临床特征

[0065] 间变性胶质瘤是中间等级浸润性胶质瘤-分类在低等级(局部化,缓慢生长)与多形性胶质母细胞瘤(快速生长且高度侵袭)之间。间变性星形细胞瘤(AA)是由称为星形胶质细胞的脑细胞和/或其前体引起的肿瘤。星形胶质细胞是中枢神经系统的支持细胞。儿童中的大部分星形细胞肿瘤是低等级的,而成人中的大部分是高等级的。这些肿瘤可能在大脑和脊髓中的任何地方发生。

[0066] 少枝胶质细胞瘤是来源于少突胶质细胞和/或其前体的胶质瘤。少突胶质细胞在大脑中的有髓鞘神经元的结构和功能中发挥作用。间变性少枝胶质细胞瘤(AO)比少枝胶质细胞瘤更具侵略性,但是也比间变性星形细胞瘤对化疗更具敏感性。对于PCV(丙卡巴胍,CCNU,长春新碱)化疗使用的高应答率使得在放射疗法之前、在辐射之前和/或在肿瘤复发和进展时常用PCV化疗。另一种胶质瘤作为少枝胶质细胞瘤和星形细胞瘤肿瘤形式两者的组织学混合物出现,并且被称为少突星形细胞瘤。虽然少突星形细胞瘤可能是低等级的,但是大部分混合型少突星形细胞瘤是间变性少突星形细胞瘤(AOA)。

[0067] 最后的胶质瘤亚组是室管膜瘤。恶性室管膜瘤的一种亚型是间变性室管膜瘤

(AE);这些肿瘤由沿被称为脑室的脑脊液通道排列的室管膜细胞和/或其前体引起。这些肿瘤分为幕上(在脑部的上部分中)或幕下(在脑部的后部中)。

[0068] 由胶质瘤产生的临床特征和症状取决于肿瘤的位置和患者的年龄。胶质瘤的最常见位置在成人中是在大脑半球中,并且在儿童中是在小脑、脑干、下丘脑和丘脑中。脊髓胶质瘤比大脑胶质瘤更不常见。具有这些肿瘤的患者所具有的症状根据在大脑或脊髓中的位置而变化。它们可以产生头痛、癫痫发作、恶心和呕吐、四肢无力、单侧感官变化、性格变化和走路不稳。

[0069] B.分类

[0070] 间变性星形细胞瘤。间变性星形细胞瘤的组织学特征与低等级星形细胞瘤的那些相似,但是这些特征更明显且夸张。这些肿瘤是WHO等级III(Kleihues等人,1993;Kleihues和Cavenee,2000)。细胞数增加,核多形性和细胞多形性也增加。这些特征可能是极端的,具有连式细胞(back-to-back cells)和奇异的浓染细胞核。可能缺乏细胞质,核分裂和扩大指示间变。有丝分裂活动在大部分间变性星形细胞瘤中容易识别,但是令人难以理解的是可能在具有瓜子形细胞的区域中不存在。

[0071] 在此等级中间变的范围是广泛的,一些实例显示低细胞数和多形性,有丝分裂像很少,并且其他具有高度细胞性和多形性,有丝分裂频繁,仅缺乏胶质母细胞瘤的组织学诊断所需的坏死。出于这个原因,具有更客观的行为指示物是有用的,并且细胞增殖的一些标记物已试图用于更准确地预测预后。此区域中使用最多的标记物是溴脱氧尿苷(BrdU)和Ki-67的抗体(Davis等人,1995)。BrdU的细胞并入是细胞周期的DNA合成期的特异性标记物,而Ki-67抗体标记细胞周期的除G<sub>0</sub>以外所有时期中存在的抗原。两种抗体可以通过石蜡包埋的组织切片中的免疫组织化学染色来鉴定。作为归纳,间变性星形细胞瘤的较高标记率与较差预后相关联(Hoshino等人,1993;Davis等人,1995;Lambom等人,1999)。

[0072] 多形性胶质母细胞瘤。还被称为多形性胶质母细胞瘤的胶质母细胞瘤是具有最高等级的恶性,WHO等级IV的胶质瘤(Kleihues和Cavenee,2000)。它占颅内肿瘤的15%至23%和星形细胞瘤的约50%-60%。大部分实例通常被认为由星形胶质细胞引起,因为胶质纤维酸性蛋白可以在细胞质中鉴定到。然而,一些实例明显由其他胶质细胞谱系,诸如少突胶质细胞引起。胶质母细胞瘤是最常发生的星形细胞瘤。尸检和系列活检研究显示一些星形细胞瘤进展通过各个恶性等级,从低等级转化为间变性星形细胞瘤再转化为胶质母细胞瘤(Muller等人,1977)。但是,因为胶质母细胞瘤的一些实例似乎在其他方面正常的患者中快速发生并且当其较小时被识别到,因此认为这各种各样的胶质母细胞瘤也可以直接由星形胶质细胞前体细胞的恶性转化引起而不经较低恶性等级(Kleihues和Ohgaki,1997;1999)。

[0073] 肿瘤坏死是将胶质母细胞瘤与间变性星形细胞瘤区分开的特征性总体特征(Nelson等人,1983;Burger等人,1985;1991)。另一种独特的且诊断性的微观特征是肿瘤内增殖性血管变化的存在。这些变化可能在内皮细胞(血管内皮增生或增殖)或在血管壁本身的细胞(血管壁细胞增殖)中发生。这两种类型的变化有时一起被认为是微血管增殖。胶质母细胞瘤细胞数通常是非常高的。单个细胞可能很小,具有较高的核:细胞质比率,或非常大且奇异,具有丰富的嗜酸性细胞质。这些较小的细胞可能似乎在肿瘤坏死区域周围成排密集,从而形成特征性假栅栏。胶质母细胞瘤肿瘤倾向于广泛地浸润大脑,均匀地分散到不

同的部位并且产生多灶性胶质瘤。一些实例确实是多灶性的(即,同时在多个原发性部位中发生),而这些多灶性肿瘤中的许多在尸检检查整个大脑时显示组织学联系。

[0074] 少枝胶质细胞瘤。与星形细胞瘤一样,少枝胶质细胞瘤模拟其假定的起源细胞的组织学。它们还主要在白质中产生,但也往往比相似恶性等级的星形细胞瘤更多地浸润大脑皮层。与星形细胞瘤一样,组织学恶性的分级方案已用于少枝胶质细胞瘤,但是这些与用于星形细胞瘤的分级方案相比与预后的相关性较差(Burger等人,1987;Bigner等人,1998;Daumas-Duport等人,1997)。用于对少枝胶质细胞瘤进行分级的许多组织学特征与用于星形细胞瘤的那些相似:细胞数、多形性、有丝分裂活动、血管变化和坏死。低等级少枝胶质细胞瘤可能具有小囊肿。所有组织学等级的少枝胶质细胞瘤往往易于浸润皮层并且在膜下区域中、神经元周围和血管周围形成肿瘤细胞簇。通常,少枝胶质细胞瘤的细胞具有圆形的规则细胞核和明显的细胞质边界,细胞质被清除。另一个相当独特且诊断上有用的特征是少枝胶质细胞瘤的血管模式,其被称为“鸡网状(chicken-wire)”血管,可以将肿瘤分到离散小叶中。随着间变性增加,少枝胶质细胞瘤可以变得具有高度细胞性和多形性,接近多形性胶质母细胞瘤的外观,存在坏死。虽然将这些分类为间变性少枝胶质细胞瘤是正确的,但是一旦在任何高等级胶质瘤中鉴定到坏死,一些人就使用术语胶质母细胞瘤。用于将间变性少枝胶质细胞瘤与星形胶质母细胞瘤分开的一个正当理由是比前者稍微更好的预后,即使在此最高恶性等级中也是如此。一些著者报告了>3%-5%的MIB-1标记指数预测少枝胶质细胞瘤中的恶化预后(Heegard等人,1995;Kros等人,1996;Dehghani等人,1998)。

[0075] 少突星形细胞瘤。许多(如果不是大部分的话)少枝胶质细胞瘤在星形细胞瘤的区域或紧密细胞混合物的情况下发生。对于混合型胶质瘤的诊断,各部分应是大量的,但是著者对于准确数字具有不同的观点;通常具有10%至25%范围的微少元素的混合物用于诊断混合型胶质瘤。少突星形细胞瘤和间变性少突星形细胞瘤分别对应于WHO等级II或等级III(Kleihues和Cavenee,2000)。间变性的组织学特征可能存在于任一组分中,并且将不利地影响预后。此类特征包括标记的细胞多形性、高细胞数和高有丝分裂率。还可能看到微血管增殖和坏死。未显示预后和对疗法的应答取决于少枝胶质组分相对于星形细胞组分的比例(Shaw等人,1994),但是自相矛盾的是,少枝胶质组分的BrdU LI比星形细胞组分对于存活率更具预测性(Wacker等人,1994),并且晚期肿瘤进展受星形细胞组分的影响。

[0076] 3. 苯基正叔丁基硝酮(PBN)和替莫唑胺(TMZ)

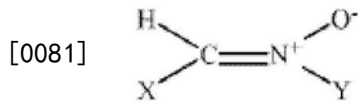
[0077] A. PBN

[0078] 化合物苯基正叔丁基硝酮(PBN)在20世纪50年代首次合成,但是在1968年发现其非常有助于在化学反应中捕获并稳定化游离基团,并且因此它被称为自旋捕获剂(Janzen,1971)。虽然PBN是原型自旋捕获剂,但是已合成若干其他硝酮并且发现可用于在化学反应中捕获并表征游离基团。这些自旋捕获剂首先用于化学反应,但是在20世纪70年代中期,它们开始被用于在生物化学和生物系统中捕获游离基团(Poyer等人,1978)。药代动力学研究显示PBN易于且快速地几乎等量分布到所有组织,在大鼠中具有约132分钟的半衰期并且在尿液中大部分被消除。已进行了相对较少的代谢研究,但是已知化合物的一些环羟基化(主要在对位)在肝脏中发生。

[0079] Novelli首先显示PBN可以用于保护试验动物免受感染性休克(Novelli等人,1986),并且这确实随后由其他小组确认(Pogrebniak等人,1992)。使用PBN和衍生物作为药

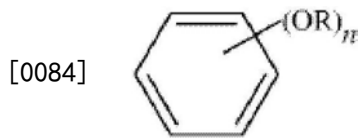
理学药剂开始于1988年的以下发现之后,所述发现显示PBN在实验脑中风模型中具有神经保护活性(Floyd,1990;Floyd等人,1996;Carney等人,1991)。这些结果被重复并延伸(参见Clough-Helfman等人,1991;Cao等人,1994;Folbergrova等人,1995;Pahlmark等人,1996)。其他人总结了关于PBN和衍生物的深入神经保护药理学研究努力(Floyd,1997;Hensley等人,1996)。除神经退行性疾病之外,PBN已显示在涉及ROS介导的过程的其他病理病状(包括糖尿病和许多其他病状)中进行保护。PBN及其一些衍生物为何在实验中风和若然其他神经退行性模型中如此具有神经保护性的机制基础还未被完全阐明。然而,清楚的是,其作用不能简单地通过其捕获游离基团的能力来解释。

[0080] PBN的通式为:

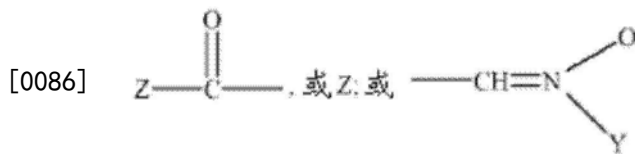


[0082] 其中:

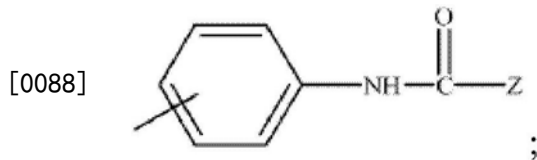
[0083] X是苯基或



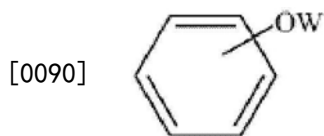
[0085] R是H,



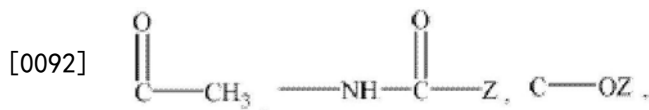
[0087] 并且n是1至5的整数;或



[0089] Y是可以在一个或多个位置上羟基化或乙酰化的叔丁基;苯基;或



[0091] 其中W是



[0093] 或Z;并且Z是C<sub>1</sub>至C<sub>5</sub>直链或支链烷基。

[0094] B. 癌症中的PBN

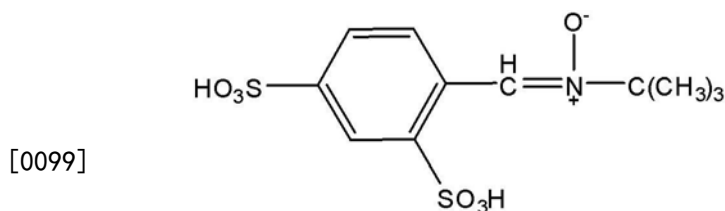
[0095] 美国专利5,569,902(以引用的方式并入本文)描述了硝酮游离基团捕获剂用于治疗癌症的用途。具体地,PBN和相关化合物被描述为可用于制备抗癌饮食和制备此类补充饮食。最有可能有益地接受硝酮的受试者包括:(1)癌前测试指示肿瘤存在的高概率的那些,(2)暴露于非常强烈的致癌环境的那些,并且其肿瘤进展概率较高,以及(3)其遗传倾向使

其肿瘤发展可能性较高的那些。

[0096] 美国专利公布2007/0032453 (以引用的方式并入本文) 使用MRI技术描述了抗炎性苯基正丁基硝酮 (PBN) 对于胶质瘤的作用。PBN本身能够在肿瘤植入之前、肿瘤植入时或之后,在被提供给受试者时控制肿瘤发展。因此,提出了使用PBN和相关的硝酮游离基团捕获剂作为胶质瘤的治疗剂。

[0097] C. 2,4-二磺酰基苯基正叔丁基硝酮 (2,4-ds-PBN)

[0098] 美国专利5,488,145 (以引用的方式并入本文) 描述了2,4-二磺酰基苯基叔丁基硝酮及其药学上可接受的盐。这些材料被描述为有用的药物制剂,其用于口服或静脉内施用给遭受如在中风中发生的急性中枢神经系统氧化或遭受本身可以表现为进行性中枢神经系统功能损失的逐步中枢神经系统氧化的患者。



### 2,4-二磺酰基 PBN (还被称为 OKN-0007)

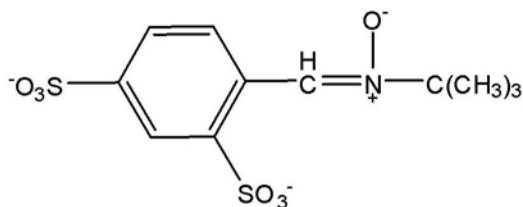
[0100] 预期2,4-二磺酰基PBN的两个磺酸基团表现出改善的水溶性,但是还预期其由于疏油特征而表现出运输穿过血/脑屏障较差。然而,当制备了当前的化合物并在体内测试时,其显示与PBN相比意料之外的功效增加。此功效增加随着与PBN相比效力增加而发生。与此效力和功效的明显增加直接相反的是,与PBN相比毒性明显且高度显著地降低。

[0101] 这些结果是意料之外的,因为在关于化合物的特定定义家族内的结构/活性关系的一般文献中,治疗效力通常与毒性共变。因此,大部分相关化合物维持其治疗效力与毒性的比率。相比之下,本发明的化合物偏离此预期关系,因为相对于紧密相关的类似物,其效力增加并且其毒性降低。

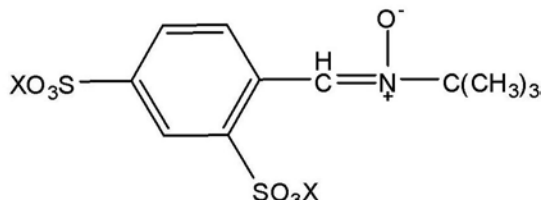
[0102] 因此,在一方面,本发明提供了PBN-二磺酰基化合物及其药学上可接受的盐。在第二方面,本发明提供了具有此化合物或其盐作为活性成分的可静脉内和口服施用的药物组合物。

[0103] 2,4-ds PBN可以在更高pH下以离子化盐形式存在:





[0104] 或



[0105] 其中X是药学上可接受的阳离子。最常见地，此阳离子是单价物质，诸如钠、钾或铵，但是它也可以是单独多价的或与药学上可接受的单价阴离子组合的阳离子，例如钙与氯、溴、碘、羟基、硝酸根、磺酸根、乙酸根、酒石酸根、草酸根、琥珀酸根、棕榈酸根或类似的阴离子；镁与此类阴离子；锌与此类阴离子等。当多价阳离子和单价阴离子的这些组合以结构式示出时，在本文中，单价阴离子识别为“Y”。

[0106] 在这些材料中，游离酸和简单的钠、钾或铵盐是最优选的，钙和镁盐也是优选的，但并不如此优选。

[0107] 2,4-ds PBN可以通过两步反应顺序制备。在第一步骤中，使用合适的催化剂，诸如活化的锌/乙酸催化剂或铝/汞齐催化剂，将可商购获得的叔丁基硝酮(2-甲基-2-硝基丙烷)转化为对应的正羟胺。此反应可以在约15-100℃下在液体反应介质，诸如在锌催化剂的情况下醇/水混合物，或在铝汞齐催化剂的情况下醚/水混合物中进行0.5至12小时，并且尤其约2至6小时左右。

[0108] 在第二步骤中，将新形成的羟胺与4-甲酰基-1,3-苯二磺酸反应，通常所使用的胺稍微过量。此反应可以在相似的温度条件下进行。此反应通常在10至24小时内完成。

[0109] 如此形成的产物是游离酸，并且特征在于89g/mole的分子量。它是白色粉状材料，其在加热时分解。它的特征在于在水中大于1g/ml的溶解度和在D<sub>2</sub>O中8.048ppm(dd, 8.4, 1.7Hz) ; 8.836ppm(d, 8.4Hz) ; 8.839ppm(d, 1.7Hz) ; 8.774ppm的<sup>1</sup>H NMR光谱。

[0110] 各种盐可以容易地通过将游离酸在水性介质中与两个当量的适当碱(例如钾盐的KOH等)混合来形成。

[0111] 一种合成是基于R.H.Hinton和E.G.Janzen(J.Org.Chem.57:2646-2651,1992)的著作。它涉及醛与羟胺的缩合。羟胺是不稳定的，并且使用活化的锌活化剂在使用当天新鲜制备。合成如下。

[0112] 表1-必备化学品

[0113] 1. 95%乙醇

[0114] 2. 2-甲基-2-硝基丙烷

[0115] 3. 锌粉

[0116] 4. 冰醋酸

- [0117] 5. 二乙醚
- [0118] 6. 饱和氯化钠
- [0119] 7. 硫酸镁, 无水固体
- [0120] 8. 4-甲酰基-1,3-苯磺酸 (MW 310.21g/mole), 二钠盐水合物
- [0121] 9. 甲醇
- [0122] 10. 二氯甲烷
- [0123] 表2-正叔丁基羟胺的制备
- [0124] 1. 500mL三颈圆底烧瓶配备有磁搅拌棒、温度计转接座、温度计和加料漏斗。
- [0125] 2. 将95%乙醇(350mL)添加到烧瓶中并在冰浴中冷却至10℃。
- [0126] 3. 一次性添加2-甲基-2-硝基丙烷(6.18g, 0,060mole)和锌粉(5.89g, 0,090mole)。
- [0127] 4. 将冰醋酸(10.8g, 0,180mole)置于加液漏斗中,并且在剧烈搅拌下以将温度维持在低于15℃下的速率逐滴添加。
- [0128] 5. 去除冰浴并且将混合物在室温下搅拌3小时。
- [0129] 6. 将溶剂从混合物中脱除,留下叔丁基羟胺、乙酸锌和水。
- [0130] 7. 添加二氯甲烷(50mL),并且将混合物通过布氏漏斗过滤。
- [0131] 8. 将留在滤纸上的乙酸锌滤饼用2X 25mL二氯甲烷洗涤。
- [0132] 9. 将水在分液漏斗中从滤液中分离,并且将有机层经硫酸镁干燥。
- [0133] 10. 将硫酸镁通过槽形滤纸过滤来去除,然后将二氯甲烷通过旋转蒸发脱除。
- [0134] 11. 将粘性液体的产物(100%产率=5.34g)溶解在甲醇(50mL)中用于以下使用。
- [0135] 表3-2,4-二磺酰基苯基-正叔丁基硝酮的制备
- [0136] 1. 3颈250ml圆底烧瓶配备有搅拌棒、气体分散管、加液漏斗和用循环冰水冷却的Friedrichs冷却器。
- [0137] 2. 向烧瓶添加200mL甲醇、4-甲酰基-1,3-苯二磺酸(9.31g, 30mmole)和正叔丁基羟胺(来自A部分的25mL甲醇溶液,理论上30mmole)。
- [0138] 3. 将反应物用加热罩加热至回流,同时在搅拌下用氮气使反应物鼓泡。
- [0139] 4. 将混合物回流2小时。
- [0140] 5. 添加来自以上的剩余羟胺。
- [0141] 6. 用氮气鼓泡继续回流至少18小时,但是不超过24小时。
- [0142] 7. 将热反应混合物在布氏漏斗上过滤,并且将固体用热甲醇洗涤。
- [0143] 8. 将甲醇通过旋转蒸发脱除至黄色粘性油状物。
- [0144] 9. 添加热1:1乙醇:丙酮(200mL),并且将混合物加热以溶解油状物。
- [0145] 10. 将溶液冷却以使产物结晶。
- [0146] 11. 将产物采集在布氏漏斗上并且在真空下干燥过夜。
- [0147] 12. 反应通常得到75%产率的白色粉末。
- [0148] 其他合成方法也在现有技术中公开。
- [0149] D. 替莫唑胺
- [0150] 替莫唑胺(TMZ; 品牌名称Temodar®和Temodal®和Temcad®)是口服化疗药物。它是烷基化剂,用作一些脑癌的治疗物;用作星形细胞瘤的二线治疗物和多形性胶质母

细胞瘤的一线治疗物。TMZ是烷基化剂达卡巴嗪的前药和咪唑四嗪衍生物。其经核准的适应症包括亚硝基脲和丙卡巴肼难治性间变性星形细胞瘤和新诊断的多形性胶质母细胞瘤。TMZ在美国自从1999年8月开始可获得,并且在其他国家自从2000年早期开始可获得。

[0151] TMZ的最常见副作用是骨髓抑制。与替莫唑胺相关联的最常见非血液学不良作用是恶心和呕吐,其是自我限制的或者易于用标准止吐疗法控制。这些后面的作用通常是轻度至中度(等级1至2)。严重恶心和呕吐的发病率各自大约是4%。具有预先存在的严重呕吐或严重呕吐史的患者可能在开始替莫唑胺治疗之前需要止吐疗法。替莫唑胺应在空腹状态下,至少在进餐前一小时施用。止吐疗法可以在施用替莫唑胺之前或之后施用。替莫唑胺禁止用于对于其组分或对于达卡巴嗪具有过敏性的患者。不建议在具有严重骨髓抑制的患者中使用替莫唑胺。替莫唑胺的标准口服剂量是每天150mg/m<sup>2</sup>,增加至维持在每天200mg/m<sup>2</sup>。较低水平是低于标准剂量的任何值,包括例如125mg/m<sup>2</sup>、100mg/m<sup>2</sup>、75mg/m<sup>2</sup>或50mg/m<sup>2</sup>。

[0152] 替莫唑胺是遗传毒性的、致畸的且对胎儿有毒性的,并且不应在怀孕期间使用。由于存在分泌到母乳中的风险,哺乳期女性应在接受药物期间停止哺乳。一项研究指示服用替莫唑胺而没有同时采取保育措施的女性后期在生活中怀孕率较低,但是所述研究太小而没有显示替莫唑胺造成女性不育的风险的假设的统计学显著性。在男性患者中,替莫唑胺可能具有遗传毒性作用。建议男性在治疗期间或治疗之后多达6个月不要成为孩子的父亲并且在治疗之前寻求关于精子冷冻保存的建议,这是因为由于替莫唑胺疗法可能引起不可逆的不孕。替莫唑胺很少可以导致急性呼吸衰竭或肝损伤。

[0153] 替莫唑胺的治疗益处取决于其使DNA烷基化/甲基化的能力,这最常发生在鸟嘌呤残基的N-7或O-6位置处。此甲基化损害DNA并且触发肿瘤细胞的死亡。然而,一些肿瘤细胞能够通过人体中表达由O-6-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶(MGMT)基因编码的蛋白质O<sup>6</sup>-烷基鸟嘌呤DNA烷基转移酶(AGT)而修复这种类型的DNA损伤,并且因此减弱替莫唑胺的治疗功效。在一些肿瘤中,MGMT基因的表现遗传沉默阻止这种酶的合成,并且因此此类肿瘤对于由替莫唑胺引起的杀伤更具敏感性。相反,脑肿瘤中AGT蛋白的存在预测对于替莫唑胺的较差应答,并且这些患者从用替莫唑胺进行的化疗收到很少益处。

[0154] 实验室研究和临床试验研究了通过将其与其他药理剂组合来增加替莫唑胺的抗癌效力的可能性。例如,临床试验指示添加氯喹可能有益于治疗胶质瘤患者。实验室研究发现当添加表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)(绿茶的一种组分)时,替莫唑胺更有效地杀伤脑肿瘤细胞;然而,这种作用的功效还未在脑肿瘤患者中确认。临床前研究在2010年报告了对于当与替莫唑胺和放射疗法组合时使用新型扩散增强化合物反式藏红花酸钠(TSC)的研究,并且临床试验在2015年8月进行。

[0155] 虽然以上提及的方法研究了替莫唑胺与其他药剂的组合是否可以改善治疗结果,还开始努力研究改变替莫唑胺分子本身是否可以增加其活性。一个这种方法将紫苏醇(一种被证明在脑癌患者中具有治疗活性的天然化合物)与替莫唑胺分子永久性地融合。所得的新型化合物被称为NEO212或TMZ-POH,其显示了比两种亲本分子替莫唑胺和紫苏醇显著更大的抗癌活性。虽然截至2016年NEO212还未在人体中进行测试,但是它已在胶质瘤、黑色素瘤、三阴性乳腺癌的脑转移的动物模型中显示优异的癌症治疗活性。

[0156] 因为表达MGMT基因的肿瘤细胞对于替莫唑胺的作用更具抗性,所以研究人员研究了包含O<sup>6</sup>-苄基鸟嘌呤(O<sup>6</sup>-BG)(AGT抑制剂)是否可以克服这种抗性并且改善药物的治疗有

效性。在实验室中,这种组合确实在体外肿瘤细胞培养物和体内动物模型中显示增加的替莫唑胺活性。然而,最近完成的脑肿瘤患者的II期临床试验产生了混合结果;虽然向患有替莫唑胺抗性间变性胶质瘤的患者给予 $O^6$ -BG和替莫唑胺时,似乎存在一定的改善治疗活性,但是在患有替莫唑胺抗性多形性胶质母细胞瘤的患者中似乎没有替莫唑胺敏感性的显著恢复。

#### [0157] 4. 组合治疗

[0158] 在一个实施方案中,2,4-ds-PBN疗法(任选地包括TMZ)可以与另一种胶质瘤疗法,诸如放射、PCV、DFMO、CCNU或BCNU结合使用。这些组合物将以有效杀伤细胞或抑制细胞增殖的组合量提供。此过程可以涉及将细胞同时与药剂接触。这可以通过以下方式实现:将细胞与包含两种药剂的单一组合物或药理学制剂接触,或通过将细胞同时与两种不同组合物或制剂接触,其中一种组合物包括2,4-ds-PBN并且另一种包括第二药剂。

[0159] 替代性地,2,4-ds-PBN疗法可以在其他药剂治疗之前或之后,时间间隔介于数分钟至数周范围内。在向细胞、组织或生物体单独施加其他药剂和2,4-ds-PBN的实施方案中,通常将确保在每次递送时间之间,有相当长的时间段不会到期,使得所述药剂仍能够对细胞发挥有利的组合作用。在此类情况下,预期可以在彼此的约12-24h内,并且更优选地,彼此的约6-12h内将细胞与形式接触。在一些情况下,可能需要显著地延长治疗的时间段,然而,其中相应施用之间相隔数天(2、3、4、5、6或7)至数周(1、2、3、4、5、6、7或8)。

[0160] 预期每种药剂施用多次。例如,其中2,4-ds-PBN疗法(任选地包括TMZ或其他AGT抑制剂)是“A”,并且第二药剂或疗法是“B”,预期以下情况:

[0161] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

[0162] B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

[0163] B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[0164] 将对患者评估被认为与肿瘤无关的神经系统变化并且使用NCI通用毒性准则(神经毒性)进行分级。除了基线听力测试以外,由医师决定对患者进行耳毒性的重复听力测试,所述患者通过神经系统检查被证明具有听力损失或听力损失的进展。此外,两周一次进行血细胞计数,并且在每个周期之前进行血清肌酐、碱性磷酸酶、胆红素和丙氨酸氨基转移酶测试。主要基于嗜中性粒细胞和血小板计数(长春新碱、洛莫司汀和甲基苄肼)或耳毒性(DFMO),可以在治疗过程中改变剂量。偶尔需要针对腹泻降低DFMO剂量。

#### [0165] A. PCV

[0166] PCV是一种药物组合疗法,其采用三种不同的药剂-肼衍生物、甲基苄肼、亚硝基脲、洛莫司汀和微管蛋白相互作用剂、长春新碱。它已在多种临床试验中使用,最引人注目的是由发明人用于评定其对于高等级胶质瘤和髓母细胞瘤肿瘤的作用。在PCV的情况下观察到的主要副作用是剂量限制性骨髓毒性。以下描述PCV的每种组分。

[0167] 应注意,本发明可以包括使用BCNU而非CCNU(洛莫司汀),因为两者均是亚硝基脲。还预期可以使用CCNU和丙卡巴肼或者BCNU和丙卡巴肼而没有长春新碱,因为长春新碱通常被认为在PCV组合中的药物中是活性最低的。

[0168] 肼和亚硝基脲两者均是烷基化剂。作为一个基团,烷基化剂与细胞DNA、RNA和蛋白质分子并且与较小的氨基酸、谷胱甘肽和相似的化学品形成共价化学加成物。通常,这些烷基化剂与细胞成分中的亲核原子,诸如核酸、蛋白质、氨基酸或谷胱甘肽中的氨基、羧基、磷

酸酯、巯基基团反应。还未很好地了解这些烷基化剂在癌症疗法中的机制和作用。除胍和亚硝基胍之外，烷基化剂包括：三氮烯，诸如达卡巴嗪和替莫唑胺；氮芥，诸如氯胺丁、环磷酰胺、异环磷酰胺、盐酸氮芥、美法仑、尿嘧啶氮芥；氮丙啶，诸如噻替派；甲磺酸酯，诸如白消安；铂络合物，诸如顺铂、卡铂；生物还原性烷基化剂，诸如丝裂霉素和六甲蜜胺。这些化合物中的任一种可以一起使用或单独使用，与本发明的化合物组合使用。

[0169] i. 胍和三氮烯衍生物

[0170] 胍和三氮烯衍生物与亚硝基胍相似，因为它们自发分解或代谢以产生烷基碳正离子，其使DNA烷基化。此类化合物包括甲基苄胍、达卡巴嗪和替莫唑胺。

[0171] 甲基苄胍中的活性成分是丙卡巴胍盐酸盐(N-异丙- $\alpha$ -(2-甲基胍基)-对甲苯甲酰胺单盐酸盐)。其从Roche Laboratories公司可获得。它在1969年被批准用于治疗霍奇金氏病。典型形式是含有50mg丙卡巴胍作为盐酸盐的口服胶囊。剂量根据丙卡巴胍被用作与其他抗癌药物组合的药物或用作单一治疗剂而变化。针对单一药剂使用，根据PDR的建议指南是每天两次100mg，持续14天。

[0172] 甲基苄胍的准确作用模式尚未清楚。一些证据显示药物通过抑制蛋白质、RNA和DNA合成来起作用。其主要在肝和肾中代谢，并且似乎自动氧化为偶氮衍生物，释放了过氧化氢。偶氮衍生物异构化为脘，并且在水解之后分为苯甲醛衍生物和甲基胍。甲基胍进一步降解为CO<sub>2</sub>和CH<sub>4</sub>，并可能降解为胍，而醛氧化为酸，其在尿液中排泄出。

[0173] 甲基苄胍表现出单胺氧化酶抑制活性(MAOI)，所以应遵循限制含有高酪胺含量的食物的饮食。在疗法期间应避免的药物包括抗组胺药、拟交感神经药、巴比妥酸盐、麻醉药、降压药或吩噻嗪和乙醇。还应在丙卡巴胍期间避免一些食物，诸如自然老化奶酪、巧克力、坚果和香蕉，因为它们在理论上可能在一些患者中导致高血压并发症。另外，如果在具有肾和/或肝功能障碍的患者中使用甲基苄胍，则可能发生不可接受的毒性。在诸如以下的中枢神经系统体征或症状的情况下，治疗可能缩短：感觉异常、神经病或局促不安；嗜中性粒细胞减少症(绝对嗜中性粒细胞计数低于1500/ $\mu$ l)、血小板减少症(血小板低于100,000/p1)、过敏反应、口腔周围的溃疡或位点持续疼痛、腹泻或便溏、大出血或出血倾向。

[0174] 不良但预期的反应包括白细胞减少症、嗜中性粒细胞减少症、贫血和血小板减少症。通常报告的急性副作用是在剂量施用期间或之后立即产生的恶心和呕吐。

[0175] ii. 亚硝基胍

[0176] 亚硝基胍代表一组治疗性烷基化剂。这类化合物包括洛莫司汀、卡莫司汀、司莫司汀、链霉素和尼莫司汀。

[0177] (a) 洛莫司汀

[0178] 洛莫司汀是合成的烷基化剂，其还被称为CCNU，具有1-(2-氯乙基)-3-环己基-1-亚硝基胍的化学名称。其在1977年被批准用于治疗脑肿瘤和霍奇金氏病。它作为口服胶囊从Bristol Myers Squibb可获得，以10mg、40mg和100mg形式存在。剂量可以根据洛莫司汀用作单一药剂或其他化疗剂组合使用而变化。作为在先前未治疗的患者中的单一药剂，根据PDR的建议剂量是130mg，作为单一口服剂量，每6周一剂。洛莫司汀穿过血脑屏障。

[0179] 据信，CCNU使DNA和RNA烷基化。它与其他亚硝基胍和一些但并非所有的烷基化剂是交叉抗性的。它还可以通过蛋白质中氨基酸的氨甲酰化抑制若干关键酶促过程。

[0180] 最常见且严重的毒性副作用是骨髓抑制，其导致血小板减少症和白细胞减少症，

这可能引发出血和感染。骨髓毒性是累积性的,并且因此必须基于来自先前剂量的最低血细胞计数来考虑剂量调整。

[0181] (b) 卡莫司汀

[0182] 卡莫司汀还被称为BCNU,具有N,N'-双(2-氯乙基)-N-硝基脲的化学名称,是1977年FDA批准的硝基脲烷基化剂。卡莫司汀许多年来已被用于治疗原发性脑肿瘤并且用于治疗胶质瘤。卡莫司汀从Bristol Meyers Squibb可获得,呈含有10mg卡莫司汀和3ml无菌稀释剂的小瓶的包装形式,以用于通过i.v.注射递送。作为单一药剂,卡莫司汀在约150-200mg/m<sup>2</sup>下每6周一次施用。在组合方案中,卡莫司汀可以与洛莫司汀相似的剂量给与。替代性递送方式是通过直接植入到肿瘤部位中的薄片(Gliadel®薄片)进行。

[0183] 潜在的副作用包括骨髓抑制、贫血、腹泻、低白细胞和血小板计数、肺毒性和吞咽困难。

[0184] iii. 微管蛋白相互作用剂

[0185] 微管蛋白相互作用剂通过结合到微管蛋白(一种聚合形成细胞微管的蛋白质)上的特异性位点来干扰细胞分裂。微管是重要的细胞结构单元。当相互作用剂结合在蛋白质上时,细胞不能适当地形成微管。微管蛋白相互作用剂包括长春新碱和长春碱,生物碱和紫杉烷两者,诸如紫杉醇和多西他赛。

[0186] 长春新碱作为Oncovin™从Eli Lilly&Company可获得,并且作为硫酸长春新碱从Faulding可获得。还被称为长春花碱、22-氧代-、硫酸盐(1:1)(盐),生物碱的盐从普通开花草本植物,长春花植物获得。其通过静脉内注射递送。它在1963年被标注批准用于Ewing肉瘤、横纹肌肉瘤、Wilm肿瘤、神经母细胞瘤、霍奇金氏病和白血病。

[0187] 作用机制仍在研究中;然而,存在以下指示:涉及了有丝分裂纺锤体中微管形成的抑制,从而导致中期状态处分裂细胞的停止。肝是主要排泄器官。长春新碱的大部分静脉内剂量在快速组织结合之后被排泄到胆汁中。长春新碱似乎不穿过血脑屏障。

[0188] 已报告长春新碱降低抗癫痫发作药物的血液水平并增加癫痫发作活动。最常见的不利反应是脱发。发生白细胞减少症、神经炎痛和便秘,但是通常持续少于7天。

[0189] B. DFMO

[0190] 多种高度增殖性类型的癌症与具有癌症的哺乳动物的肿瘤组织和血液和尿液中增加水平的多胺,腐胺、精胺和亚精胺相关联。研究显示,这可能与通过速率限制酶鸟氨酸脱羧酶(ODC)进行的多胺合成增加相关。多胺合成的途径开始于L-鸟氨酸。这种天然氨基酸虽然通常不并入到蛋白质中,但是也是将精氨酸代谢为鸟氨酸和尿液的尿液循环的一部分。鸟氨酸通过鸟氨酸脱羧酶(ODC)转化为腐胺和CO<sub>2</sub>,并且被认为是多胺产生中的速率限制步骤。随着添加由S-腺苷甲硫氨酸提供的多胺,腐胺被转化为精胺。精胺然后通过亚精胺合成酶转化为亚精胺,再次与S-腺苷甲硫氨酸的脱羧反应相关联。腐胺、精胺和亚精胺代表哺乳动物组织中的三种主要多胺。多胺存在于动物组织和微生物中,并且已知在细胞生长和增殖中发挥重要作用。虽然多胺在细胞生长和增殖中的准确作用机制还未知,但是似乎多胺可以促进大分子过程,诸如DNA、RNA或蛋白质合成。已知多胺水平在睾丸、腹侧前列腺和胸腺中,在银屑病皮损中以及其他经历快速生长过程的细胞中是高的。

[0191] 还熟知的是,肿瘤组织的快速增殖的特点是多胺水平的异常升高。因此,多胺还可以在维持肿瘤生长中发挥重要作用。因此,ODC抑制剂(诸如DFMO)可以通过阻断多胺的形成

并且因此减慢、中断或停止肿瘤组织的增殖和转移来发挥其治疗作用。

[0192] DFMO ( $\alpha$ -二氟甲基鸟氨酸、依氟鸟氨酸、Ornidyl®) 是氨基酸L-鸟氨酸的结构类似物,并且具有化学式 $C_6H_{12}N_2O_2F_2$ 。DFMO可以在本发明的方法中用作D-和L-对映异构体的外消旋(50/50)混合物,或用作D-和L-异构体的混合物,其中D-异构体相对于L-异构体更丰富,例如相对于L-异构体70%重量、80重量%、90重量%或更多的D-异构体。所用的DFMO还可以基本上不含L-对映异构体。

[0193] DFMO的剂量限制性毒性作用是血小板减少症(血液中血小板异常地少,其在约50%的患者中发生)、白细胞减少症(白细胞异常地少)或贫血。此毒性作用是相对无害且可逆的,并且在停药之后停止。

[0194] 已在标准动物肿瘤模型中评定了ODC抑制剂对于控制快速增殖的肿瘤组织的生长速率的作用。例如,已在以下动物肿瘤模型中证明了DFMO的抗肿瘤作用:小鼠中的L1210白血病,Balb/C小鼠中的EMT6肿瘤,大鼠中7,12-二甲基苯并蒽诱导的(DMBA诱导的)乳腺肿瘤,以及Buffalo大鼠中的DFMO Morris 7288C或5123肝癌。此外,已如下证明了DFMO与各种细胞毒性剂组合的抗肿瘤作用:(a) 在小鼠中的L1210白血病中,在Buffalo大鼠中的Morris 7288C肝癌中以及在小鼠中的EMT6肿瘤中与长春地辛或阿霉素组合,(b) 在小鼠中的L1210白血病中与阿糖胞苷组合,(c) 在小鼠中的L1210白血病中与甲氨蝶呤组合,(d) 在小鼠中的EMT6肿瘤中和在小鼠中的DMBA诱导的肿瘤中与环磷酰胺组合,(e) 在小鼠胶质瘤26脑肿瘤中与BCNU组合,以及(f) 在小鼠中的L1210白血病中,在Buffalo大鼠中的Morris 7288C肝癌中,在小鼠中的P388淋巴细胞白血病中以及在小鼠中的S-180肉瘤中与MGBG组合。

[0195] 虽然DFMO可以有效地阻断肿瘤腐胺生物合成,但是所得的抗肿瘤作用是白细胞郁滞,不是细胞毒性。例如,DFMO降低MCA肉瘤的生长速率,但是不产生肿瘤消退。此发现与显示DFMO是细胞抑制剂的其他研究的报告一致。然而,研究指示,DFMO药剂可能存在显著的作用,从而允许并入DFMO的组合化疗方案的未来发展。

[0196] DFMO作为用于治疗各种肿瘤的治疗性ODC抑制剂的初始愿望在一定程度上变得渺茫,因为虽然DFMO事实上确实不可逆地抑制ODC活性,但是用DFMO体内处理的细胞显著地增加其外源腐胺的摄入,如美国专利4,925,835中所述。所述细胞的细胞间运输机制通过从细胞外环境引入腐胺来在DFMO损害的ODC活性周围进行“结束运行”。因此,DFMO体内作用比体外作用差得多。所以,虽然DFMO有效地抑制细胞内腐胺新生,但是它也导致细胞外腐胺的摄入增加,从而抵消其ODC抑制作用。

[0197] 这个问题被以下事实加重:腐胺存在于许多常见的食物中,诸如葡萄柚汁,其含有大约400ppm腐胺。这使得其几乎不可能为患者提供不含腐胺的营养足够的饮食。因此,DFMO处理的细胞能够引入足够量的细胞外腐胺来支持细胞分裂。

[0198] 使得DFMO对于人患者更可接受的策略描述于美国专利4,859,452(以引用的方式并入)中。描述了DFMO的配制品,其包含与精氨酸或鸟氨酸组合的必需氨基酸来帮助降低DFMO诱导的毒性。

[0199] C.06-烷基鸟嘌呤-DNA烷基转移酶抑制剂

[0200] 06-烷基鸟嘌呤-DNA烷基转移酶(AGT)是抑制性药物诸如替莫唑胺的靶。其他AGT抑制剂也可以根据所公开的方法被证明是有用的。

[0201] D.放射

[0202] 造成DNA损伤且已广泛用于癌症疗法的因素包括通常所说的 $\gamma$ 射线、X射线和/或放射性同位素向肿瘤细胞的定向递送。还预期其他形式的DNA损伤因素,诸如微波和UV辐射。所有这些因素最有可能对DNA、DNA的前体、DNA的复制和修复以及染色体的组装和维持造成大范围的损伤。X射线的剂量范围在从延长时间段(3至4周)内50至200伦琴的每日剂量至2000至6000伦琴的单剂量的范围内。放射性同位素的剂量范围广泛变化,并且取决于同位素的半衰期、所发射的放射的强度和类型以及赘生性细胞的摄取。当应用于细胞时,术语“接触的”和“暴露的”在本文中用于描述其中治疗性构建体和化疗剂或放疗剂被递送到靶细胞或者被放置成与靶细胞直接并置的过程。为了实现细胞杀伤或停滞,两种药剂以有效杀伤细胞或防止其分裂的组合量被递送到细胞。

[0203] E. 手术

[0204] 大约60%的具有癌症的人将经历一些类型的手术,包括预防性、诊断性或分级、治愈性和缓和性手术。作为癌症治疗的治愈性手术可以与其他疗法,诸如本发明的治疗、化疗、放疗、激素疗法、基因疗法、免疫疗法和/或替代性疗法结合使用。治愈性手术包括其中所有或一部分癌性组织以物理方式去除、切除和/或破坏的切除术。肿瘤切除术是指肿瘤的至少一部分的物理去除。除肿瘤切除术之外,通过手术进行的治疗还包括激光手术、冷冻手术、电手术以及用显微镜控制的手术(莫氏手术)。还预期本发明可以与去除表面癌、初癌或偶发量的正常组织结合使用。

[0205] 5. 脂多糖结合蛋白

[0206] A. LBP

[0207] 脂多糖结合蛋白是人体中由LBP基因编码的蛋白质。LBP是可溶性急性期蛋白,其结合细菌脂多糖(或LPS)以通过将LPS呈递到重要的细胞表面模式识别受体(被称为CD14和TLR4)来引发免疫应答。由此基因编码的蛋白质参与对于革兰氏阴性细菌感染的急性期免疫应答。革兰氏阴性细菌在其外细胞壁上含有糖脂、脂多糖(LPS)。与细菌渗透性增强蛋白(BPI)一起,所编码的蛋白质结合LPS并与CD14受体相互作用,从而可能发挥调节LPS依赖性单核细胞应答的作用。在小鼠中的研究表明,所编码的蛋白质是对于LPS的快速急性期应答所需要的,但是并非对于从循环清除LPS所需的。此蛋白质是结构上和功能上相关蛋白的家族的一部分,包括BPI、血浆胆固醇酯转移蛋白(CETP)和磷脂转移蛋白(PLTP)。此基因存在于染色体20上,紧靠BPI基因的下游。脂多糖结合蛋白显示与CD14、TLR2、TLR4和共受体MD-2相互作用。

[0208] B. LBP缀合物和成像

[0209] 由发明人首先在此报告,与分为低等级胶质瘤的肿瘤相比,LBP水平在高等级人患者胶质瘤中升高。因此,根据本文公开的诊断方法使用的LBP缀合物包括连接到荧光标记、放射性标记和造影剂的LBP的诊断性缀合物。这些缀合物可以施用给受试者,并且其在体内,并且具体地在胶质瘤部位处的存在可以使用手持式荧光扫描器、近红外扫描器、MRI装置和PET扫描器确定。这种方法还可以用于监测治疗的功效,其中LBP水平降低指示治疗性益处。

[0210] 6. 药物制剂

[0211] 本发明公开了多种组合物,在本发明的某些方面,其被施用到动物。例如,将配制2,4-ds-PBN以及各种第二化疗剂以用于施用。在预期临床应用的情况下,应有必要制备呈



适用于预期应用的形式的一些化合物和组合物的药物组合物。一般来说,这将使得需要制备基本上无热原以及可能对人或动物有害的其他杂质的组合物。

[0212] 一般将需要采用适当盐和缓冲液来使药剂适于引入到患者中。本发明的水性组合物包含有效量的药剂,其溶解或分散于药学上可接受的载体或水性介质中。短语“药学上或药理学上可接受的”是指当施用于动物或人时不产生不利、过敏或其他不良反应的分子实体和组合物。如本文所用,“药学上可接受的载体”包括任何和所有溶剂、分散介质、包衣剂、抗菌剂和抗真菌剂、等张剂和吸收延迟剂等。此类介质和药剂用于药物活性物质的用途是本领域众所周知的。除非任何常规介质或药剂与本发明的载体或细胞不相容,否则预期其在治疗组合物中的用途。还可以将补充性活性成分(诸如其他抗癌剂)并入组合物中。

[0213] 呈游离碱或药理学上可接受的盐形式的活性成分的溶液可以在合适地与表面活性剂(诸如羟丙基纤维素)混合的水中制备。分散液也可以在甘油、液体聚乙二醇、其混合物中以及油中制备。在普通的储存和使用条件下,这些制剂含有防腐剂以防止微生物的生长。静脉内媒介物包括流体和营养补充剂。防腐剂包括抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体。根据众所周知的参数调节药物中各种组分的pH和精确浓度。

[0214] 基于预期目标确定药剂的有效量。术语“单位剂量”是指适用于受试者的物理上离散的单位,每个单位含有预定量的治疗组合物,所述量经计算产生与其施用(即适当的途径和治疗方案)相关的期望应答。待施用的量(均根据处理的数量和单位剂量)取决于待处理的受试者、受试者的状态和所需的保护。治疗组合物的精确量还取决于医师的判断并且为各个体所特有的。

[0215] A. 肠内施用

[0216] 本发明的活性化合物可以有利地被配制为用于肠内施用,例如被配制为口服施用。药物形式可以包括芝麻油、花生油或水性丙二醇;以及用于可摄取组合物的即时制备的无菌粉末,包括片剂、丸剂和胶囊。另外,预期本发明的药剂可以食物添加剂的形式提供并且并入到每日饮食计划中。所有这些形式通常被选择为在制造和储存条件下是无菌且稳定的。

[0217] 活性化合物可以被配制为呈中性或盐形式的组合物。药学上可接受的盐包括酸加成盐(由蛋白质的游离氨基形成),并且所述酸加成盐由例如像盐酸或磷酸的无机酸,或诸如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等的有机酸形成。由游离羧基形成的盐也可以衍生自例如像钠、钾、铵、钙或铁氢氧化物的无机碱和诸如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等的有机碱。

[0218] 载体也可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其合适的混合物以及植物油的溶剂或分散介质。可以例如通过使用诸如卵磷脂的包衣、通过在分散液的情况下维持所需粒径以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。对微生物作用的防止可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞(thimerosal)等来实现。在许多情况下,优选将包括等张剂,例如糖或氯化钠。可注射组合物的延长吸收可以通过在组合物中使用延迟吸收的剂例如单硬脂酸铝和明胶来实现。

[0219] 无菌可注射溶液是通过将在适当溶剂中的所需量的活性化合物与以上列举的各种其他成分(根据需要)合并,随后进行过滤灭菌来制备。通常,分散液是通过将各种灭菌的活性成分并入含有基础分散介质和来自以上列举的那些的所需其他成分的无菌媒介物中

来制备。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,具体的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,其产生活性成分加来自其前述无菌过滤溶液的任何额外所需成分的粉末。

#### [0220] B. 其他施用途径

[0221] 除被配制用于肠内施用的化合物之外,还设想肠外制剂,诸如静脉内或肌肉内注射。施用还可以是鼻内、颊、直肠、阴道或局部施用。替代性地,施用可以通过内、皮下或腹腔注射进行。还预期通过导管进行连续灌注。此类组合物通常将呈上文所述的药学上可接受的组合物形式施用。

#### [0222] 7. 实施例

[0223] 包括以下实施例以示范本发明的具体实施方案。本领域技术人员应理解以下实施例中公开的技术表示由本发明人发现的,在本发明实践中发挥良好作用的技术,并且因此可以被认为构成本发明实践的特定预期模式。然而,根据本公开,本领域技术人员应理解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下可以在已公开并仍获得类似或相似结果的特定实施方案中做出许多改变。

#### [0224] 实施例1-引入和研究设计

[0225] 裸小鼠中的原位G55人GBM异种移植物是发明人已在先前的公布中使用并且继续在他的小组中使用的建立的GBM模型。此模型模仿非常具有侵略性的GBM。对于此模型,发明人具有动物存活率的先前数据、未处理动物以及TMZ处理的动物的肿瘤体积和血管灌注数据。他还具有指示G55细胞具有TMZ抗性的初步数据,并且因此这一发现进一步支持了这些细胞作为TMZ抗性的理想异种移植物模型的用途。

[0226] 发明人用四个处理组进行了研究。对于两个组,发明人需要最少5只动物/组。这些是单独的OKN和OKN+TMZ组。对于另外两个组(未处理和单独的TMZ),发明人包括了预先存在的数据来组成每个5只的组,并且在所进行的研究中包括了2个未处理组和2个TMZ组。

[0227] 发明人使用MRI来获得用于评定处理应答的肿瘤体积。他还获得了血管灌注数据来评定处理对于肿瘤血管的作用。根据灌注图像来计算肿瘤血管灌注率(测量为相对脑血流量)。由于血管形成导致的血管系统紊乱,未处理的肿瘤中肿瘤血管灌注率降低。根据rCBF的归一化差异,这将导致明显的rcBF变化。通过抗癌处理致使肿瘤血管灌注率恢复可以指示抗血管形成作用。根据rCBF的归一化变化,如果处理作用影响了肿瘤血管,这将导致相对较小的rCBF差值。发明人还评定了动物存活百分比。对于MRI研究,他初始指示了未处理组需要最少3个时间点,并且处理动物需要至少5个时间点来用MRI评定肿瘤生长和血管变化,而实际上,由于积极治疗应答,对于未处理小鼠,发明人获得了至少5个时间点,并且对于处理小鼠获得了远超过10个时间点。

[0228] 发明人还发现了潜在的生物标记物LBP(脂多糖结合蛋白),其在携带大鼠F98胶质瘤的大鼠(通过ELISA评定)的肿瘤中并且在GBM人组织样品(通过免疫组织化学评定)中升高。从来自大鼠F98胶质瘤模型的微阵列数据发现了此生物标记物,其中未处理的肿瘤具有高水平的LBP,并且OKN-007处理具有LBP的基因表达的>2倍降低。另外,在大鼠F98胶质瘤模型中,发现与未处理的携带肿瘤的动物相比,OKN-007在肿瘤组织( $p < 0.0001$ )和血清( $p < 0.001$ )两者中均显著降低LBP蛋白水平(通过ELISA评定)。发明人针对LBP使用ELISA试剂盒来在携带G55肿瘤的小鼠中在未处理或用TMZ、OKN-007或TMZ+OKN-007处理的肿瘤组织和血清两者中评定作为功效标记物的此生物标记物。

### [0229] 实施例2-方法

[0230] 细胞培养。从Michael E. Sughrue博士(俄克拉荷马州健康科学中心大学)获得G55细胞。将G55细胞在增补10%加强型小牛血清(CCS;HyClone, Logan, Ut)和1%青霉素/链霉素的DMEM(LifeTechnologies, Waltham, MA)中培养。

[0231] 小鼠和处理。根据OMRF IACUC(机构动物护理和使用委员会)政策(其遵循NIH指导)实施动物研究。向两个月大的雄性裸小鼠(Hsd:Athymic Nude-Foxnlnu小鼠;Harlan Inc., Indianapolis, IN)脑内植入人G55异种移植细胞( $1 \times 10^7$ )/mL 1%琼脂糖溶液,悬浮在4 $\mu$ L细胞培养介质中。一旦肿瘤达到10-15mm<sup>3</sup>(通过MRI确定),将就小鼠用OKN-007(150mg/kg;通过连续喝水)或TMZ(30mg/kg,通过每3天一次灌胃)每3天处理一次。将TMZ溶解在无茵盐水中的5%DMSO和5% soluto1-15中。对小鼠进行处理,直至肿瘤达到100-150mm<sup>3</sup>,或者在通过MRI检测肿瘤(>5mm<sup>3</sup>)之后总计达到60天。

[0232] MRI。在Bruker Bio-spec 7.0Tesla/30-cm水平-孔磁体成像系统上进行MRI实验。通过使用1.5-2.5%异氟烷和0.8L/min O<sub>2</sub>将动物固定,并且置于用于信号传输的72-mm正交体积线圈中,并且使用表面小鼠-头部线圈以用于信号接收。获得T2加权的成像,并且根据MRI数据集计算肿瘤体积。

[0233] 灌注成像。为了评定与肿瘤毛细血管相关联的微血管变化,使用灌注成像方法,动脉自旋标记(ASL)。在位于头尾轴的点上的大脑的肿瘤具有最大横截面的单一轴向切片上获得灌注图。在肿瘤周围手动画出五个感兴趣的区域(ROI)的轮廓,并且还从大脑的对侧取适当的ROI以用于比较的目的。为了计算rCBF值的差值,在晚期(对于未处理小鼠,在脑内植入细胞之后第18-26天)和早期(在细胞植入之后第10-13天)肿瘤阶段获得肿瘤rCBF值,并且归一化到对应动物的对侧大脑区域中的rCBF值。

[0234] 脂多糖结合蛋白(LBP)ELISA测定。LBP ELISA试剂盒(Antibodies-Online.com; ABIN370808)对于血清、血浆和组织样品中的小鼠LBP水平是特异性的。这是比色测定,其在微板读取器上读取以用于测量450/620nm处的吸光度。根据标准曲线计算LBP浓度并且乘以适当的稀释因子。

[0235] 统计分析。使用卡普兰-迈耶曲线分析存活曲线。使用多重比较,通过双向ANOVA比较肿瘤体积、归一化的rCBF的变化和LBP水平。数据表示为平均值 $\pm$ SD,并且\*0.05、\*\*0.01、\*\*\*0.001和\*\*\*\*0.0001的P值被认为是统计上显著的。

### [0236] 实施例3-结果

[0237] 动物存活率(参见图1)。动物存活百分比数据指示,在肿瘤检测并处理超过50天之后,60%的组合疗法(OKN-007+TMZ)处理的小鼠保持存活60天。在肿瘤检测之后,OKN-007处理的小鼠中的一个(处理小鼠的20%)也存活60天。统计分析指示,发现与未处理(UT)的携带G55胶质瘤的小鼠相比,所有的处理小鼠(单独的OKN-007,单独的TMZ或组合疗法)具有显著的存活百分比增加。还发现组合疗法小鼠比TMZ处理的小鼠具有显著更长的存活。OKN-007处理的小鼠与组合疗法小鼠之间没有显著性。如果动物组数量较大,则可能在OKN-007处理的小鼠与组合疗法小鼠之间获得显著差异,因为在这两个组之间p值为0.07。

[0238] 肿瘤体积(参见图2至图4)。在对UT小鼠进行安乐死,即肿瘤体积达到150mm<sup>3</sup>或更大(在肿瘤检测之后第19-22天)以及在每个处理组的最后时间点时,在同一时间段比较肿瘤体积。在肿瘤检测之后第19-22天,发现与UT小鼠相比,TMZ、OKN-007或组合疗法处理的小

鼠全部具有显著降低的肿瘤体积(图2)。发现所有处理的小鼠在肿瘤体积方面彼此均没有显著差别,然而,与TMZ或OKN-007处理的小鼠相比,组合疗法具有最低的肿瘤体积平均值。因为样品大小较小( $n=5$ ),所以如果动物数量增加,处理组之间可能存在显著差异。TMZ组具有较大方差,发明人还在他所实施的另外两个研究中观察到这一点。针对每个所研究的处理组还示出了描绘肿瘤的代表性MR图像(中间肿瘤区域)(图3)。在每个处理组的最后时间点,发现与UT小鼠相比,TMZ和组合疗法组的肿瘤体积显著更小(图4)。由于OKN-007处理组的较大方差,与UT小鼠或其他处理组中的任一个(单独的TMZ或组合疗法)相比,肿瘤体积没有显著差异。以下图中描绘了在多个时间点处获得的肿瘤体积(图5A)。描绘了处理窗口,其中当肿瘤达到 $\geq 10\text{mm}^3$ 时,对肿瘤进行处理。

[0239] 肿瘤血管灌注率(rCBF的归一化差值)(参见图5B)。发现与UT小鼠相比,肿瘤rCBF的归一化差值在所有的处理小鼠中显著降低。由于每个组的动物数量较小,所以处理组之间没有显著差异,然而与TMZ处理相比,组合疗法和OKN-007处理的组两者似乎在其肿瘤中具有更正常化的灌注率。针对每个处理组示出代表性的形态学MR图像及其对应的灌注图。

[0240] LBP ELISA测定(参见图6和图7)。与UT小鼠相比,OKN-007处理的小鼠或组合疗法小鼠中的LBP水平在肿瘤组织中显著更小(图6)。在肿瘤组织中,发现TMZ处理组LBP水平与UT小鼠肿瘤没有显著不同。OKN-007处理组与组合疗法之间的肿瘤LBP水平没有显著差异。所述作用可能主要由OKN-007的作用产生。发现与UT小鼠样品相比,所有处理组中的血清LBP水平显著更小,从而指示一般处理应答(图7)。

[0241] 与OKN-007组合的TMZ抗性和TMZ敏感性GBM细胞系的体外 $\text{IC}_{50}$ 评定(图8)。发明人先前已证明OKN-007在胶质母细胞瘤(GBM)临床前模型中具有抗肿瘤活性。体外数据证明当被组合在一起时,OKN-007可以减少TMZ(替莫唑胺)抗性GBM细胞系(T98G和G55)。

[0242] 脂多糖结合蛋白(LBP)。在评定OKN-007作用机制的详细研究期间,使用转录微阵列来阐明大鼠F98胶质瘤模型中与OKN-007处理相关联的特异性遗传变化。LBP在OKN处理的大鼠F98胶质瘤中下调(与未处理相比),并且与 $\text{TGF-}\beta 1$ 相关联。需要LPB(脂多糖结合蛋白,其在27年前被发现并且以结合LPS的能力命名)来防止感染,并且参与先天免疫和适应性免疫。LBP的主要作用机制仍未清楚。

[0243] OKN-007对于LPB的作用(图9和图10)。在图9中示出未处理的(肿瘤)和OKN-007处理的(OKN处理的肿瘤)携带F98胶质瘤的大鼠的肿瘤组织中的蛋白质LBP的水平。从未处理的(对照)和OKN-007处理的(对照+OKN)大鼠获得正常脑组织。与未处理相比,OKN-007处理的胶质瘤中的LBP水平显著降低( $p < 0.0001$ )。对照组织(未处理或处理)也显著更低( $p < 0.0001$ )

[0244] 在图10中示出未处理的(肿瘤)和OKN-007处理的(OKN处理的)F98胶质瘤大鼠的血清中的蛋白质LBP的水平。还获得来自正常大鼠的血清(对照)。与未处理的携带肿瘤的大鼠( $p < 0.001$ )相比,在OKN处理的携带F98胶质瘤的大鼠中,在正常大鼠相对于未处理的携带肿瘤的大鼠( $p < 0.0001$ )中或者正常大鼠相对于OKN-007处理的携带胶质瘤的大鼠( $p < 0.05$ )中,LBP的血清水平显著更低。

[0245] 与低等级胶质瘤(图11B)相比,高等级胶质瘤(图11A)中LBP的免疫组织化学水平指示高等级胶质瘤中LBP的显著增加(图11C)。发现与未处理肿瘤相比,在裸小鼠中的G55人GBM异种移植物中,LBP通过OKN-007或通过组合的OKN-007+TMZ处理在肿瘤组织(左图)和

血清(右图)两者中均显著降低。图12。

[0246] 结论。组合疗法(OKN-007+TMZ)似乎在肿瘤组织和血清两者中在增加的动物存活率、降低的肿瘤体积、降低的rCBF变化和降低的LBP水平方面具有总体有利应答。可能的是,动物数量增加将显示在比较3个处理组(单独的TMZ、单独的OKN-007和组合疗法)时动物存活率、肿瘤体积和rCBF变化的显著差异。还将有利的是,在另一种TMZ抗性模型(另一种TMZ抗性GBM细胞系的异种移植模型,或使用来自TMZ治疗失败的患者GBM细胞的患者衍生的异种移植模型)中实施研究。总而言之,数据支持与TMZ或OKN-007单独治疗相比,组合的OKN-007和TMZ处理指示总体改善,并且应被考虑用于临床研究。然而,为了方便关于公布的其他癌症研究,动物数量增加并且可能使用另一种异种移植模型将加强总体结果。

[0247] 实施例4-材料和方法

[0248] 体内研究

[0249] 小鼠和处理。根据OMRF IACUC(机构动物护理和使用委员会)政策(其遵循NIH指导)实施动物研究。对于F98大鼠胶质瘤细胞植入模型,用立体定向装置(前侧边2mm和前面2mm,并且在3mm深度下)将F98细胞( $10^5$ 个,在 $10\text{-}\mu\text{l}$ 体积中)脑内植入在总计15只Fischer 344大鼠(雄性200-250克)中。一旦肿瘤达到 $10\text{-}20\text{mm}^3$ 体积(如通过MRI确定),就将动物分为两个组:OKN-007处理组( $n=8$ )和未处理组(UT)( $n=7$ )。对大鼠进行处理,直至肿瘤达到 $200\text{-}250\text{mm}^3$ 体积或者总计4-6周。对于G55 GBM细胞植入模型,向两个月大的雄性裸小鼠(Hsd:Athymic Nude-Foxnlnu小鼠;Harlan Inc., Indianapolis, IN)脑内植入人G55异种移植细胞( $1 \times 10^6$ )/mL 1%琼脂糖溶液,悬浮在 $4\mu\text{L}$ 细胞培养介质中。一旦肿瘤达到 $10\text{-}15\text{mm}^3$ (通过MRI确定),就将小鼠用在饮用水中的OKN-007( $150\text{mg}/\text{kg}$ ;  $0.20\% \text{w/v}$ , 针对20g小鼠)每天处理一次,或用TMZ( $30\text{mg}/\text{kg}$ )每3天处理一次。将OKN-007溶解在水中并且每2天更新一次。对水瓶进行称重,并且确定每只小鼠消耗的OKN-007的量。在这些小鼠中没有观察到OKN-007的液体摄入体积的显著变化。OKN-007的平均摄取量是大约 $140\text{-}150\text{mg}/\text{kg}/\text{天}/\text{小鼠}$ 。将TMZ溶解在无菌盐水中的5%DMSO和5% solutol-15中并通过灌胃施用。对小鼠进行处理,直至肿瘤达到 $100\text{-}150\text{mm}^3$ 或者总计4-6周。对所有组进行分层以确保在开始处理之前肿瘤大小相似。

[0250] 磁共振成像(MRI)。在Bruker Bio-spec 7.0Tesla/30-cm水平-孔磁体成像系统上进行MRI实验。通过使用1.5-2.5%异氟烷和 $0.8\text{L}/\text{min}\text{O}_2$ 将动物固定,并且置于用于信号传输的72-mm正交体积线圈中,并且使用表面大鼠-头部或小鼠-头部线圈以用于信号接收。用以下获得T2加权形态学成像: $0.5\text{mm}$ 的切片厚度,针对大鼠 $4 \times 5\text{cm}^2$ 或针对小鼠 $2 \times 2\text{cm}^2$ 的FOV,针对大鼠接近 $150\mu\text{m}$ 并且针对小鼠 $80\mu\text{m}$ 的平面内分辨率,3000ms的重复时间(TR)和63ms的回波时间(TE),总计13min的采集时间。使用Amira v5.6.0(FEI),根据3D MRI切片绘制的MRI数据集计算肿瘤体积(Zhao等人,2018;Tang等人,2011;Tang等人,2016)。

[0251] 灌注成像。为了评定与肿瘤毛细血管相关联的微血管变化,使用灌注成像方法,动脉自旋标记(ASL),如先前所述(Ziegler等人,2017)。在位于头尾轴的点上的大脑的肿瘤具有最大横截面的单一轴向切片上获得灌注图。在肿瘤周围手动画出五个感兴趣的区域(ROI)的轮廓,并且还从大脑的对侧取适当的ROI以用于比较的目的。为了计算rCBF值的差值,在晚期(对于未处理小鼠,在脑内植入细胞之后第18-26天)和早期(在细胞植入之后第10-13天)肿瘤阶段获得肿瘤rCBF值,并且归一化到对应动物的对侧大脑区域中的rCBF值。

根据形态学图像数据集,肿瘤体积变形。

[0252] RNA的分离和制备。对于大鼠F98胶质瘤研究,在最后一次MRI检查之后对所有大鼠进行安乐死。取出每只动物的大脑,并且快速冷冻在液氮中,之后储存在-80℃的冷冻器中。将来自所有处理组的所有肿瘤组织的总RNA用RNeasy Mini试剂盒(Qiagen)纯化,并且通过分光光度法(Nanodrop)量化。使用SuperScript IV逆转录酶试剂盒(Invitrogen)合成cDNA。

[0253] 微阵列分析。使用Illumina TotalPrep™ RNA扩增试剂盒用于标记cRNA(Ambion, Austin, TX),如先前所述(Griffitts等人,2009)。使用Affymetrix RaGene-1\_0-st-v1微阵列对4x 4个处理的/未处理的样品进行分析。对外显子水平总结的测量值进行分数归一化并且使用微阵列的显著性分析(SAM, [PMID:11309499])在<40%的假发现率(FDR)和<1.5的倍数变化下测试差异表达。使用创新通路分析(IPA) (Ingenuity® 系统, world-wide-web@ingenuity.com)进行功能富集分析。

[0254] 组织学和免疫组织化学(IHC)。在最后一次MRI检查之后对所有小鼠进行安乐死。对安乐死(异氟烷)小鼠进行灌注固定(通过尾静脉注射施用10%中性缓冲福尔马林),并且取出每只动物的整个大脑,另外保存在10%中性缓冲福尔马林中,并且进行常规处理。将石蜡包埋的组织切成5μm切片,安装在super frost plus®玻璃载玻片上,用苏木精和曙红(H&E)染色,并且通过光学显微镜检查。进行免疫组织化学(IHC)以通过用抗TGFβ1抗体(兔抗TGFβ1,目录号250876,1mg/mL,ABBIOTEC, San Diego, CA)染色组织样品来建立TGFβ1水平。对于TGFβ1 IHC,将切片在抗原提取溶液(柠檬酸缓冲液,pH 6, Vector Laboratories, Burlingame CA)中在蒸饭器中温育20min,接着在去离子水中冷却20min。

[0255] 统计分析。使用卡普兰-迈耶曲线分析存活曲线。分析肿瘤体积、归一化的rCBF的变化和肿瘤血液体积,并且使用多重比较通过双向ANOVA比较。数据表示为平均值±SD,并且\*0.05、\*\*0.01、\*\*\*0.001和\*\*\*\*0.0001的P值被认为是统计上显著的。对于微阵列数据,使用每个基因的随机方差t-统计学(Wright和Simon,2003)。

[0256] 体外研究

[0257] 细胞和培养基。从美国组织培养物保藏中心(ATCC; Manassas, VA, USA) (U-138-ATCC (CRL-HTB-16) 胶质母细胞瘤; LN-18-ATCC (CRL-2610) 胶质母细胞瘤; LN-229-ATCC (CRL-2611) 胶质母细胞瘤; 和T-98G-ATCC- (CRL-1690) 获得大部分GBM细胞。从Sigma-Aldrich获得U-251GBM细胞(N#09063001, 以前还被称为U-373MG (ATCC® HTB-17))。从Michael Sughrue博士(其为加州大学旧金山分校的住校医生)获得G55细胞(最初从C. David James (神经外科, UCSF, CA, USA) 获得, 其对细胞进行表征)。

[0258] 将细胞在37℃下,在5%CO<sub>2</sub>下,在标准加湿温育器中,在增补10%胎牛血清(Gibco)的Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM, Gibco BRL, Crand Island, NY, USA)中培养。

[0259] IC<sub>50</sub>浓度-TMZ敏感性确定的方案。根据与未处理对照相比50%生长抑制所需的浓度(IC<sub>50</sub>; 还被称为GI<sub>50</sub>)评估六个胶质瘤细胞系对于TMZ的敏感性(Wang等人,2017)。简而言之,将细胞以1x 10<sup>4</sup>个细胞/孔接种在24孔平底板中,并且用培养基温育24小时。随后用培养基将细胞洗涤两次,并且用新鲜培养基(对照)或含有0.1-1,000μM TMZ的培养基进一步温育。根据每个板含有具有+/-TMZ的生长培养基,存在一个具有含有1mM OKN的培养基的

板。在暴露于各种浓度的TMZ 72小时之后,通过胰蛋白酶化将细胞剥离并且计数。在每个浓度下重复实验至少4次。

[0260] RNA制备。为了在实验测量的实验模式中避免来自人为来源的贡献,将每个细胞系在四个独立的培养物中生长,并且对从每个培养物提取的mRNA独立地实施整个过程。

[0261] 对于4个组,将细胞系LN-18和LN-229经受其基因表达图谱的评定:细胞,具有TMZ的细胞,具有TMZ-OKN组合处理的细胞,具有OKN的细胞。将提取的总RNA用RNeasy Mini试剂盒(Qiagen)纯化,通过分光光度法(Nanodrop)定量。

[0262] 通过实时定量RT-PCR对HIF-1 $\alpha$ 、MPG和MGMT进行mRNA定量。将来自具有所有处理的所有细胞系的总RNA用RNeasy Mini试剂盒(Qiagen)纯化,并且通过分光光度法(Nanodrop)量化。使用SuperScript IV逆转录酶试剂盒(Invitrogen)合成cDNA。

[0263] 将靶基因mRNA扩增并且通过Bio-Rad CFX96<sup>TM</sup>实时系统测量。使用SYBR选择主混合物(Applied Biosystems)确定基因表达。在每个循环结束时测量与PCR产物的浓度成比例的荧光信号,并且立即展示在计算机屏幕上,从而允许实时监测PCR。反应通过在首先检测到PCR产物的扩增时循环期间的点来表征,而不是通过固定数量的循环之后累积的PCR产物的量来表征模板的起始量越高,所观察到的荧光的显著增加越早。阈值循环被定义为荧光通过高于基线的固定阈值所经历的分数的循环数。将荧光数据转化为循环阈值测量值,输出到Microsoft Excel。使用甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)mRNA表达水平作为定量内部对照。对于精确定量,使用GAPDH基因的表达将每个样品的mRNA表达水平归一化。

[0264] 通过整合DNA技术合成所有的引物。使用的引物是:

[0265] HIF-1 $\alpha$ :F 5'-GTCGGACAGCCTCACCAAACAGAGC-3'

[0266] R 5'-GTAACTTGATCCAAAGCTCTGAG-3'。

[0267] 对于MGMT:

[0268] F 5'-GGGTCTGCACGAAATAAAGC-3',

[0269] R 5'-CTCCGGACCTCCGAGAAC-3'[6],

[0270] 5'-GTC CTA GTC CGG CGA CTT CC-3',和

[0271] 5'-CTT GTC TGG GCA GGC CCT TTG C-3'

[0272] 用于扩增603-bp MPG的转录物[9]。

[0273] 用于HIF-1 $\alpha$ 、MPG和MGMT的ELISA。在所有四个处理组(单独的细胞,具有TMZ的细胞,具有OKN的细胞,具有组合的OKN和TMZ的细胞)的所有六个胶质瘤细胞系中评定蛋白质表达。在测定之前将细胞裂解。简而言之,将细胞通过冷PBS轻轻地洗涤,并且然后用胰蛋白酶脱离,并且通过在1,000 $\times$ g下离心5分钟来采集。然后,将细胞在冷PBS中洗涤三次,然后悬浮在新鲜的裂解缓冲液中。将裂解液在2-8 $^{\circ}$ C下在1,500 $\times$ g下离心10分钟以去除细胞碎片。

[0274] 测定是基于夹心式ELISA原理。提供的微滴定板的每个孔预涂覆有靶特异性捕获抗体。向孔添加标准物或样品,并且靶抗原结合捕获抗体。洗掉未结合的标准物或样品。然后添加生物素缀合的检测抗体,其结合捕获的抗原。洗掉未结合的检测抗体。然后添加亲和素-辣根过氧化物酶(HRP)缀合物,其结合生物素。洗掉未结合的亲和素-HRP。然后添加TMB底物,其与HRP酶反应,导致显色。将硫酸停止溶液添加到终止显色反应,并且然后在450nm $\pm$ 2nm的波长下测量孔的光学密度(OD)。然后将未知样品的OD与使用已知的抗原浓度

生成的OD标准曲线进行比较以便确定其抗原浓度。

[0275] 然后将由ELISA确定的抗原浓度归一化至每个细胞裂解液的总蛋白质浓度以便在各组之间进行比较。N-甲基化嘌呤DNA糖基化酶 (MPG) 和缺氧诱导因子1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) 的ELISA试剂盒购自CLOUD-CLONE CORP. (CCC) 并且人MGMT的ELISA试剂盒购自LifeSpan Biosciences公司。

[0276] RNA-seq。在RNA-seq分析之前,实施量控制措施。在Thermo Fisher Qubit荧光计上通过荧光分析确定RNA的浓度。使用Agilent TapeStation仪器确认RNA的总量。在初始QC步骤之后,根据制造商的方案,使用Lexogen Quantseq FWD文库制备试剂盒生成测序文库。简而言之,使用5' -标记的poly-T寡聚物引物生成cDNA的第一链。在RNase消化之后,使用5' -标记的随机引物生成cDNA的第二链。随后的具有额外引物的PCR步骤将完整适配体序列添加到初始5' 标签,添加唯一的索引以用于样品的去多重用,并且扩增文库。针对适当的大小和量,在Agilent TapeStation上测定每个样品的最终文库。然后将这些文库以如通过荧光分析确定的等摩尔量汇集。在Roche LightCycler 480仪器上,用Kapa Biosystems Illumina文库量化试剂,使用qPCR绝对定量最终汇集物。用高通量化学和75bp单端读取,在Illumina Nextseq 500仪器上进行测序。

[0277] 用bbduk (使用Kmer进行去污染) (Bushnell,2014) 处理原始测序文件,剪切poly A尾部和适配体序列。使用Fastqc (Andrews,2010) 和multiQC (Ewels等人,2016) 检查所得的fastq文件的质量。33-36的高质量分数 (phred分数) 存在于所有样品中,每个具有9.3+/-1.3百万个读取。然后将用Tophat2 (Trapnell等人,2009) 与GRCh38基因组对齐的排序的bam文件提供到两个并行的单独管线,以便由每个软件包分析稳健应答。使用‘基因组比对’功能‘summarizeOverlaps’和负二项式广义线性建模软件包DESeq2 (Love等人,2014),用R获得计数和差异基因表达。

[0278] 细胞迁移。针对迁移研究,将具有内部PDMS (聚二甲基硅氧烷) 微通道的6孔腔室在每个孔中用10 $\mu$ g/ml的层粘连蛋白 (Sigma-Aldrich) 涂覆。在100 $\mu$ l中接种G55细胞 (50x 10<sup>3</sup>个),并且在每个孔中补充2ml培养基。将腔室在37 $^{\circ}$ C下,在5%CO<sub>2</sub>下在温育器中温育,直至计划时间点。将一些腔室用OKN-007、TMZ或与TMZ组合的OKN-007 (对于OKN-007和TMZ两者以及当两者组合时,1 $\mu$ L/mL培养基) 处理,并且对于每个处理组,一个孔不进行处理以用作对照。使用Olympus CK40倒置显微镜 (日本) 在10x下拍摄微通道内部的孔的图像,并且在接种后在22h、28h和46h处测量相同细胞行进的距离,计算细胞迁移速率 ( $\mu$ m/h)。每个处理重复至少3次,并且数据示为平均值 $\pm$ S.D.。

[0279] 统计分析。分析RT-PCR基因和ELISA蛋白质水平以及细胞迁移,并且使用多重比较通过双向ANOVA比较。使用来自DESeq2提供的Benjamini-Hochberg FDR值的FDR<0.05分析RNA-seq数据 (Love等人,2014;Benjamini和Hochberg,1995;Robinson等人,2010)。数据表示为平均值 $\pm$ SD,并且\*0.05、\*\*0.01、\*\*\*0.001和\*\*\*\*0.0001的P值被认为是统计上显著的。

[0280] 实施例5-结果

[0281] 体内G55原位异种移植物GBM模型。动物存活百分比数据指示,在肿瘤检测并处理超过50天之后,60%的组合疗法 (OKN-007+TMZ) 处理的小鼠保持存活60天 (图13A)。在肿瘤检测之后,OKN-007处理的小鼠中的一个 (处理小鼠的20%) 也存活60天。统计分析指示,发



现与未处理 (UT) 的携带G55胶质瘤的小鼠相比,所有的处理小鼠 (单独的OKN-007,单独的TMZ或组合疗法) 具有显著的存活百分比降低。还发现组合疗法小鼠比TMZ处理的小鼠具有显著更长的存活。OKN-007处理的小鼠与组合疗法小鼠之间没有显著性。

[0282] 在对UT小鼠进行安乐死,即肿瘤体积达到150mm<sup>3</sup>或更大 (在肿瘤检测之后第19-22天) 以及在每个处理组的最后时间点时,在同一时间段比较肿瘤体积。在肿瘤检测之后第19-22天,发现与UT小鼠相比,TMZ、OKN-007或组合疗法处理的小鼠全部具有显著降低的肿瘤体积 (图13B)。发现所有处理的小鼠在肿瘤体积方面彼此均没有显著差别,然而,与TMZ或OKN-007处理的小鼠相比,组合疗法具有最低的肿瘤体积平均值。针对每个所研究的处理组还示出了描绘肿瘤的代表性MR图像 (中间肿瘤区域) (图14)。

[0283] 发现与UT小鼠相比,肿瘤rCBF的归一化差值在所有的处理小鼠中显著降低 (图15E)。由于每个组的动物数量较小,所以处理组之间没有显著差异,然而与TMZ处理相比,组合疗法和OKN-007处理的组两者似乎在其肿瘤中具有更正常化的灌注率。针对每个处理组示出代表性的形态学MR图像 (图15-Di) 及其对应的灌注图 (图15A-Dii)。

[0284] 体外GBM细胞研究,根据体外GBM细胞生长曲线,由TMZ敏感性细胞 (U251, LN229) 证实了在100μM或更小的TMZ浓度下,大部分细胞被杀伤超过50% (表4)。对于TMZ抗性GBM细胞 (T98、LN18、U138、G55), 在小于100μM的TMZ浓度下组合疗法的作用是明显的。组合疗法的功效是显著的。

[0285] 表4-用单独的TMZ (0, 0.1, 1, 10, 100或1000μM) 或与OKN组合的TMZ (1mM) 处理的人GBM细胞的IC<sub>50</sub>值。

细胞系	TMZ, μM	TMZ, μM + OKN-007
G55 (低)	567.4	63.4
G55 (高)	94.3	37.9
[0286] U138	448.1	195.5
U251	176.5	8.0
LN229	107.5	小于 1 (<1)
	~100	小于 1 (<1)
LN18	773.7	31.9
T98	438.3	295.4
	447.2	138.9

[0287] 发现与对于一些细胞 (LN229、U138、G55), 与2mM浓度相比, 1mM浓度的OKN在降低细胞活力方面效率是一样的。在其他细胞 (U251、T98、LN18) 中, 发现与1mM浓度相比, 2mM OKN在降低细胞活力方面稍微更有效。

[0288] HIF-1α、MGMT和MPG。RT-PCR (表5) 指示, 在所有的TMZ处理的和OKN-007+TMZ处理的细胞中, HIF-1α基因倍数变化增加。在所有细胞中, OKN-007增加HIF-1α基因倍数变化, 除T98细胞以外, 其具有降低的基因倍数变化。在用TMZ或OKN-007处理的LN18细胞中, MGMT基因倍数变化降低。在T98细胞中, OKN-007降低MGMT基因倍数变化。在TMZ、OKN-007或组合处

理之后,在U251细胞中,MGMT基因倍数变化增加。在LN18组合处理中,MGMT基因倍数变化稍微增加。在TMZ处理之后的大部分细胞中,在OKN-007处理的G55和U138细胞中,并且对于用与TMZ组合的OKN-007处理的G55、LN18和U138细胞,MPG基因倍数变化增加。对于用OKN-007处理的LN18、T98、U251和LN229细胞,并且也对于用OKN-007+TMZ处理的T98和LN229细胞,MPG基因倍数变化降低。

[0289] 表5-在用TMZ、OKN或组合的OKN+TMZ处理的或未处理的 (UT) TMZ抗性和TMZ敏感性人GBM细胞中HIF-1 $\alpha$ 、MGMT和MPG的RT-PCR基因倍数变化

细胞	HIF-1 $\alpha$				MGMT				MPG			
	UT	TMZ	OKN	Comb	UT	TMZ	OKN	Comb	UT	TMZ	OKN	Comb
<b>TMZ 抗性</b>												
G55	1.00	1.85	1.20	2.10	-	-	-	-	1.06	2.53	4.52	3.58
LN18	1.03	2.11	1.35	2.76	1.06	0.77	0.42	1.26	1.00	2.95	0.60	5.40
U138	1.00	2.05	2.93	3.17	-	-	-	-	1.13	7.14	11.10	12.70
T98	1.00	1.72	0.58	1.56	1.00	1.07	0.54	1.15	1.10	1.22	0.62	0.73
<b>TMZ 敏感性</b>												
U251	1.00	1.48	1.59	1.56	1.00	1.32	1.22	1.24	1.10	1.11	0.81	1.16
LN229	1.00	1.41	1.09	2.03	-	-	-	-	1.10	1.22	0.62	0.73

[0291] 对于每个细胞处理组,N=2。

[0292] ELISA证实了,蛋白质水平(表6)指示在用TMZ或组合处理处理的大部分细胞中HIF-1 $\alpha$ 升高。在U138细胞中OKN-007稍微降低HIF-1 $\alpha$ 水平,而在所有的其他细胞中,此蛋白质在此处理组中稍微升高。在用TMZ或组合处理处理的G55、T98和U251细胞中MGMT升高。在G55和LN18细胞中,OKN-007稍微降低MGMT。MPG主要仅在用TMZ或与TMZ组合的OKN-007处理的U251细胞中升高。在LN229细胞中,OKN-007降低MPG水平。

[0293] 表6-在用TMZ、OKN或组合的OKN+TMZ处理的或未处理的 (UT) TMZ抗性和TMZ敏感性人GBM细胞中HIF-1 $\alpha$ 、MGMT和MPG的ELISA蛋白质水平 (ng/mg细胞裂解液) 变化。

细胞	HIF-1 $\alpha$				MGMT				MPG			
	UT	TM Z	OK N	Com b	UT	TM Z	OK N	Com b	UT	TM Z	OK N	Com b
<b>TMZ 抗性</b>												
<b>G55</b>	0.1 4	1.08	0.19	1.13	0.3 7	1.19	0.31	1.11	1.1 5	1.50	1.41	1.77
<b>LN18</b>	0.7 6	0.83	0.92	1.07	1.2 3	1.28	0.98	1.31	2.1 8	2.27	2.38	2.20
<b>U138</b>	0.4 0	0.84	0.33	0.44	0.7 7	0.98	0.75	0.93	1.3 0	1.50	1.22	1.30
<b>T98</b>	0.4 2	0.77	0.58	0.59	0.6 2	1.76	0.84	1.57	3.0 4	3.82	3.61	3.27
<b>TMZ 敏感性</b>												
<b>U251</b>	0.3 0	1.41	0.61	0.91	0.9 2	1.48	0.91	1.44	2.7 0	4.99	2.77	4.09
<b>LN229</b>	0.6 8	0.74	0.66	1.14	0.6 7	0.75	0.69	0.89	2.3 4	1.93	1.88	2.23

[0295] 对于每个细胞处理组, N=4。

[0296] RNA-seq数据。图17示出了与单独的TMZ组相比,在TMZ+OKN组中, LN18细胞具有37种上调基因和3种下调基因。对于样品25,基因似乎在此列中全部上调。这似乎与其他组合的OKN+TMZ LN18样品相比固定在不同的阈值下。如果阈值降低,则模式与列26或28(其他组合的OKN-007+TMZ处理的LN18细胞)中的那些相似。

[0297] 图16示出了与单独的TMZ组相比,在TMZ+OKN组中, LN18细胞具有37种上调基因和3种下调基因。对于样品25,基因似乎在此列中全部上调。这似乎与其他组合的OKN+TMZ LN18样品相比固定在不同的阈值下。如果阈值降低,则模式与列26或28(其他组合的OKN-007+TMZ处理的LN18细胞)中的那些相似。图17示出了与单独的TMZ组相比,在TMZ+OKN组中, LN229细胞具有21种上调基因和19种下调基因。

[0298] 体外细胞迁移研究。G55 GBM细胞迁移研究指示,与未处理的(UT)细胞相比,在处理之后,OKN处理的细胞的细胞迁移速率在22h和46h处显著降低。发现与UT细胞相比,在处理之后,用TMZ处理的细胞在28h和46h处显著降低。还发现与单独的TMZ相比,组合的OKN+TMZ处理在处理之后22h和28h处显著降低细胞迁移。

[0299] 来自UT或用OKN-007处理的大鼠F98胶质瘤的微阵列数据。

[0300] 微阵列分析鉴定OKN处理之后基因的明显下调。384个基因具有至少一个显著下调的外显子,而仅3个上调(数据未示出)。途径分析指示,OKN处理的F98肿瘤下调与细胞外基质(ECM)相关联的若干基因(例如,胶原蛋白和MMP基因),全部与TGF $\beta$ 1连接。

[0301] RT-PCR能够确认与UT F98肿瘤相比,在OKN处理的情况下,若干ECM基因下调(表7)。

[0302] 表7-从具有2、5或10倍基因表达变化的F98未处理的和OKN-007处理的肿瘤分离的RNA的RT-PCR。

[0303]

上调				下调			
基因	>2 倍	>5 倍	>10 倍	基因	>2 倍	>5 倍	>10 倍
CDH4	4.06			ADAMTS1	3.57		
CNTN1			15.03	CD44	3.03		
HAPLN1	3.1			CDH3	3.70		
MMP16	4.72			COL1A1	2.27		
NCAM2			11.63	COL2A1	2.33		
SGCE		8.06		COL3A1	3.13		
SPOC1			11.08	COL4A1	2.94		
SYT1			19.03	COL4A2	2.63		

[0304]	VTN	3.03			COL5A1	3.33		
					COL6A1	2.94		
					COL8A1	2.33		
					CTGF	2.63		
					ECM1	2.86		
					EMILIN1	2.27		
					FN1	2.63		
					ITGA2	3.7		
					ITAD	2.38		
					ITGB3	2.13		
					ITGB3	2.13		
					ITGB4	3.70		
					LAMC1	2.33		
					MMP12			16.67
					MMP13			50.00
					MMP14	2.86		
					MMP1 A	4.17		
					MMP2	2.86		
					MMP3	3.85		
					MMP7	2.86		
					MMP8	3.85		
					MMP9		7.14	
					POSTN			33.33
					SELE	2.86		
					SELL	2.13		
					SELP	2.13		
					SPP1		8.33	
					TGFBI	2.22		
					THBS2	3.7		
					TIMP1	3.45		
				RGDC	3.45			

[0305] 上游调节因子分析将TGFβ1鉴定为最显著抑制的上游调节因子,其控制57个下调基因(图20)。TGFβ1本身下调接近2倍。

[0306] 免疫组织化学显示,与UT肿瘤相比,在OKN处理的F98胶质瘤中,TGFβ1蛋白质水平明显降低(图21A至图21B)。还使用ELISA确认了TGFβ1蛋白质水平的降低,从而指示与UT肿瘤相比,在OKN处理的F98胶质瘤中,TGFβ1蛋白质表达的水平显著降低( $p < 0.001$ ) (图21C)。

[0307] 实施例6-讨论

[0308] 发明人能够证实,与TMZ组合的OKN-007可以加强TMZ在TMZ敏感性GBM细胞中的作用,并且使TMZ抗性GBM细胞对于TMZ更具敏感性和/或加强OKN-007对于肿瘤细胞生长的作用。他们能够证实,OKN-007本身可以通过TGF-β1下调与细胞外基质相关联的若干基因,并

且针对细胞迁移也是有效的。他们先前发现,OKN-007可以有效地抑制细胞增殖,降低均与血管形成相关联的HIF-1 $\alpha$ 和VEGFR2,并且增加细胞凋亡。

[0309] 当OKN-007与TMZ组合时,它针对体外TMZ敏感性和TMZ抗性GBM细胞两者可以是有效的,并且协同降低肿瘤体积,并且增加G55原位异种移植植物GBM模型中的动物存活率和体内正常血管化。

[0310] 最近研究的其他TMZ组合疗法包括:使GLI1沉默,GLI1与Hedgehog信号传导相关联并且特异性地影响胶质瘤样干细胞(U87-MG,T98G)(Melamed等人,2018);抑制Wnt/ $\beta$ -连环蛋白信号传导,其下调醛脱氢酶亚型3A1(ALDH3A1)的表达(Suwala等人,2018);使用miR-519a模拟物,其中miR-519a通过靶向信号转导及转录活化因子3(STAT3)介导的自体吞噬并且促进TMZ诱导的自体吞噬(U87-MG/TMZ)来充当肿瘤抑制剂(Li等人,2018);抑制PI3K来使GBM细胞对于TMZ具有敏感性(Haas等人,2018);抑制SOX9/CA9(碳酸酐酶9)介导的致瘤途径来增强TMZ敏感性(Xu等人,2018);以及使用聚( $\epsilon$ -己内酯)(PCL)、聚(乙烯亚胺)(PEI)和聚(乙二醇)(PEG)纳米载体构建体的叶酸酯缀合的三嵌段共聚物(Fa-PEG-PEI-PCL,Fa-PEC)共递送靶向BCL-2基因的TMZ和siRNA(Peng等人,2018)。与TMZ组合的所有疗法均用于加强TMZ的作用和/或影响TMZ抗性GBM细胞。

[0311] 对于研究的IC<sub>50</sub>部分,对于所有细胞,OKN-007在降低TMZ IC<sub>50</sub>浓度方面具有明显的作用,使得GBM细胞全部变得具有TMZ敏感性(或更具TMZ敏感性,如果它们已具TMZ敏感性的话)。关于用G55细胞评定TMZ抗性应具有警示。发明人证实了,低代G55细胞系实际是TMZ抗性的,而高代G55(>30代)可以变得具有TMZ敏感性。对于体内G55异种移植植物数据,发明人使用低代G55细胞系(<10代),其是与用于发明人的体外研究的那些相似的代。

[0312] 根据变化浓度的OKN-007,得出以下结论:对于一些细胞系(例如,LN229、U138、G55),与2mM浓度相比,1mM浓度的OKN在降低细胞活力方面效率是一样的,而对于其他细胞系(例如,U251、T98、LN18),与1mM浓度相比,2mM OKN在降低细胞活力方面是稍微更有效的。

[0313] 蛋白质水平似乎指示,TMZ在所有细胞中升高HIF-1 $\alpha$ ,在大部分细胞(除LN229以外)中升高MGMT,并且仅在T98和U251细胞中升高MPG。对于大部分细胞,OKN-007似乎不影响HIF-1 $\alpha$ 蛋白质(与在未处理细胞中相比),OKN-007本身似乎不影响MGMT的蛋白质水平(与未处理细胞相比;除LN18以外),并且在单独的OKN处理的情况下,MPG在T98细胞中仍然升高。有趣的是,HIF-1 $\alpha$ 在U251、U138和T98细胞中通过TMZ诱导,并且然后通过OKN-007降低。组合的TMZ+OKN似乎保持HIF-1 $\alpha$ 升高(除U138细胞以外),MGMT蛋白质水平在组合的TMZ+OKN处理的情况下不明显变化,并且在组合的TMZ+OKN处理的情况下MPG在U251细胞中仍然升高,而其他细胞不被明显地影响(不被TMZ、OKN或组合的TMZ+OKN处理影响)。具体地,在U251、T98和G55细胞中,MGMT的水平由于TMZ而增加,但是OKN-007的处理不抑制MGMT的表达。

[0314] 在基因水平下,对于TMZ处理的细胞,HIF-1 $\alpha$ 基因倍数变化在所有细胞中增加(与未处理细胞相比)。组合的TMZ+OKN处理在一些细胞中引起比单独的TMZ更多的HIF-1 $\alpha$ 基因倍数变化增加(例如,LN229、LN18、U138和G55),但是总体上,组合处理似乎对于HIF-1 $\alpha$ 没有任何明显的降低影响。在T98中,由于组合处理,存在明显降低的HIF-1 $\alpha$ 基因表达,但是它不是显著的。与未处理细胞相比,单独的OKN似乎仅在T98 GBM细胞中降低HIF-1 $\alpha$ 基因倍数变化。对于U138和U251,OKN处理中的HIF-1 $\alpha$ 基因倍数变化似乎仍然增加(与未处理细胞相比)。与蛋白质水平不同,在基因水平下HIF-1 $\alpha$ 未被OKN-007降低。仅在T98细胞中OKN-007的

作用降低。与细胞中的常氧条件相比，HIF-1 $\alpha$ 基因倍数变化可以在更低氧的环境中不同，诸如在肿瘤中(体内)。

[0315] 在具有可检测水平的仅3个细胞系(U251、T98、LN18)中，对于单独的TMZ或组合的TMZ+OKN，MGMT基因倍数变化仅适度增加。在U251细胞中，单独的OKN处理稍微增加MGMT基因倍数变化，但是相反地，在LN18和T98细胞中降低MGMT基因倍数变化(与未处理细胞相比)。关于OKN，这些结果可能指示，单独的OKN可以降低MGMT基因表达，其可以降低GBM细胞的抗性。

[0316] 在3个细胞系(G55、LN18和U138)中，TMZ处理的细胞中MPG基因倍数变化(与蛋白质水平不同)升高超过2倍。在组合疗法的情况下，4个细胞系(G55、LN229、LN18和U138)具有升高的MPG基因倍数变化(与未处理细胞相比)。有趣的是，单独的OKN处理具有2个细胞系(G55和U138)的持续升高的MPG基因倍数变化，以及另外2个细胞系(LN18、T98)的一定降低(与未处理细胞相比)。没有观察到MGT被OKN-007降低。

[0317] 根据LN18GBM细胞的RNA-seq数据，有趣的上调基因是RNF149(扩增p53应答来停止细胞周期的应力感应器基因)、IDO-1(涉及人胶质瘤)和SLC14a2(mTORC2上游内源性跨膜蛋白(UT2)负调节STAT3的活化)。有趣的下调基因包括SUMO2(诸如脑缺血和缺氧的条件中SUMO的过表达可以增加细胞存活率，而SUMO表达的敲低被证明对于细胞是有毒性的；并且与抗性胶质瘤细胞中的TGF $\beta$ 1相关联(Yoshino等人,2010))、HIST1H1C/H1.2(组蛋白HIST1H1C的敲低抑制高葡萄糖诱导的炎症和细胞毒性)以及PFN1(前纤维蛋白-1磷酸化与人胶质瘤中的肿瘤侵略性相关联)(Liu等人,2012)。

[0318] 对于LN229细胞的RNA-seq数据，有趣的下调基因是EGR1(与其肿瘤是ER阳性的和HER2阳性的患者中的较短无疾病存活；IGF1R信号传导途径在药物抗性中非常相关的)、XIST(增加的水平与较短的存活和较差的预后相关联)以及PRKDC(乳腺癌患者中耐药性的预后性生物标记物)。有趣的上调基因包括ZC3H12A(关键的炎症负调节因子)、RN7SK(潜在的抗增殖性和肿瘤抑制性功能)、SUN-2和KLHL21。

[0319] 根据进一步的生物信息学分析，FOS具有最稳健的下调，其可以作为跨所有细胞系和所有处理条件TMZ、OKN和TMZ+OKN以及当数据单独分到每个处理条件或细胞系中时的OKN作用来观察到。还观察到FOS足以降低细胞活力并通过放射使胶质母细胞瘤对于DNA损伤敏感，所以这可能也帮助TMZ导致DNA损伤(Liu等人,2016)。

[0320] MGMT在许多条件中具有不显著的变化；然而，对于LN229，log<sub>2</sub>倍数变化为~3，其中p值为~0.057。

[0321] 可能与TMZ抗性相关联并且组合的OKN+TMZ疗法可能具有影响的其他MOA包括TGF- $\beta$ 1(Yoshino等人,2010;Wang等人,2017)，并且还可能包括Akt(Fan等人,2014)和巨噬细胞(Zeng等人,2017)。在发明人的用OKN处理的F98大鼠胶质瘤的微阵列评定中，TGF- $\beta$ 1通过下调通常与TGF- $\beta$ 1连接的57个基因来在MOA中对于OKN功效发挥主要作用。可能在组合的OKN+TMZ疗法中，OKN影响TGF- $\beta$ 1并消除对于TMZ抗性细胞的应答。

[0322] 根据OKN-007处理的相对于未处理的大鼠F98胶质瘤RNA的微阵列分析，证实了下调的基因主要包括整联蛋白和胶原蛋白家族的成员，其富含细胞外基质1和细胞粘附分子。用OKN-007处理的肿瘤组织的细胞活力下降，而细胞死亡通过ANGPT2、DLL4、HPX、IGF1和TGF $\beta$ 1基因的下调增加。“血管形成”也在OKN-007处理的样品中下降。若干免疫应答基因明

显下调,其中LBP(脂多糖结合蛋白)下调最多。

[0323] TGF $\beta$ 1(其最后一个外显子下调)是57个基因的主要下调因子。它参与以上提及的几乎所有的过程,并且也被认为是通过OKN-007下调的主要上游调节因子。

[0324] 除整联蛋白和胶原蛋白之外,还有值得注意的细胞外基质糖蛋白的组,诸如光蛋白聚糖(LUM)、原纤维蛋白1和5(FBN1)、层粘连蛋白(LAMA2)。它们全部下调,然而,基质金属肽酶3(MMP3)(一种降解所有前述蛋白质的酶)、ADAMTS9和PRSS2、其他肽酶也下调。在恶性肿瘤的血管内皮细胞中但不在正常血管中表达的CD248下调。这表明细胞外基质维护和重塑在未处理的胶质瘤样品中是活跃的,并且通过OKN-007处理正常化。

[0325] TGF $\beta$ 1和除其他功能外调节细胞粘附和迁移的TGF- $\beta$ 蛋白LTBP2(潜在的转化生长因子 $\beta$ 结合蛋白)也下调。相似地,其他细胞粘附相关分子(诸如POSTN(骨膜素)和LUM(光蛋白聚糖))下调。F11r(F11受体,一种免疫球蛋白超家族基因成员)是细胞粘附、细胞-细胞相互作用和紧密连接形成的重要调节因子,也下调。总之,表明细胞粘附下调。

[0326] LBP(脂多糖结合蛋白)是下调最强的免疫相关基因,并且其外显子大部分下调。此基因参与对于革兰氏阴性的8种细菌感染的急性期免疫应答。DMBT1(恶性脑肿瘤缺失蛋白1)在肿瘤细胞和免疫系统的相互作用中发挥作用。细胞因子受体IL1R1、与IL6和IL31AR同源二聚的抑瘤素M受体(OSMR)、干扰素( $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\omega$ )受体1(IFNAR1)和F11受体全部下调。

[0327] 总体上,通过下调基因过表达的过程似乎返回至正常状态,与之形成对比的是未处理的胶质瘤样品,其中它们被异常调节。例如,单外显子CD248基因在恶性肿瘤中(并且在来自此研究的未处理的胶质瘤样品中)高度表达。CD248在OKN-007处理的样品中下调,从而表明肿瘤细胞返回至正常状态。

[0328] 因为胶质瘤是高度侵袭性肿瘤,发明人还使用微流体腔室来观察OKN-007是否不仅在抑制细胞增殖、血管形成和增加细胞凋亡方面发挥作用(Towner等人,2013),还在抑制胶质瘤细胞迁移/侵袭方面发挥作用(Szopa等人,2017)。发明人显示OKN-007显著降低迁移速度。胶质瘤细胞侵袭依赖于胶质瘤细胞与细胞外基质组分,诸如刺激不同的下游迁移途径的纤连蛋白、胶原蛋白IV、肌腱蛋白-C和纤连蛋白之间的相互作用(Demuth和Berens,2004)。

[0329] 因为TGF- $\beta$ 1在TMZ抗性中发挥主要作用(Yoshino等人,2010;Wang等人,2017),并且OKN-007可能实际上通过靶向TGF- $\beta$ 1来影响TMZ抗性。LN18RNA-seq数据中的额外支持性数据显示,当OKN与TMZ组合时(与单独的TMZ相比),与TGF- $\beta$ 1 TMZ抗性相关联的SUMO2也被敲低。

[0330] 基于体外组合的OKN-007+TMZ处理研究,针对未来研究,以下生物标记物,HIF-1 $\alpha$ 、TGF $\beta$ 1、c-FOS、PFN-1、SUMO2全部需要作为可能涉及在与TMZ组合时OKN-007可能在协同影响TMZ抗性中所发挥的作用的潜在关键分子组分来进一步探讨。

[0331] 应注意,在针对U251和U87细胞系的先前研究中,由组织培养物生成的基因表达图谱与由皮下(s.c.)植入的肿瘤生成的那些显著不同,其与脑内(i.c.)生长的那些显著不同。i.c.基因表达图谱与由s.c.异种移植物生成的那些之间的差异表明,虽然体内生长环境调节基因表达,但是原位生长条件诱导不同的改变集合(Camphausen等人,2005)。这可能暗示使用适当的模型来正确地代表肿瘤微环境(TME)的重要性。

[0332] 总而言之,OKN-007是有趣的抗胶质瘤剂,其不仅可以通过下调与细胞外基质和细



胞分裂相关联的关键基因来靶向致瘤性TGFβ1途径来自身发挥作用,而且还可以消除对于TMZ抗性GBM细胞/组织的作用。与组合的OKN-007+TMZ疗法相关联的MOA似乎不通过HIF-1α、MGMT或MPG来发生。OKN-007本身可以减少一些GBM细胞的这些基因和蛋白质中的一些,但是在OKN-007或组合处理组的情况下,大部分GBM细胞不受影响或具有升高的水平。RNA-seq分析提供针对其他可能的MOA的关于OKN-007在与TMZ组合时如何可以对TMZ抗性发挥作用的见解,并且这些需要进一步探讨。将OKN-007与TMZ组合似乎是一个有希望的治疗性策略,其可以防止TMZ抗性GBM细胞增殖并且可能延长TMZ的作用。

[0333] \*\*\*\*\*

[0334] 按照本公开内容不需要过度的实验可以制得和实行本文公开和要求权利的所有组合物和方法。尽管本发明的组合物和方法已经根据优选实施方案加以描述,但对本领域技术人员显而易见的是在不偏离本发明的概念、精神和范围的情况下,可以使本文所述的组合物和方法以及本文所述方法的步骤或步骤的顺序发生变化。更具体说来,显而易见的是在化学上和生理学上相关的某些剂可以取代本文所述的剂,同时将达到相同或相似结果。对于本领域技术人员显而易见的所有这种类似的替代和修改被认为在由所附权利要求书限定的本发明的精神、范围和概念内。

[0335] 参考文献

[0336] 以下参考文献以引用方式特别并入本文,在某种程度上,它们提供示例性程序或对本文所阐述的那些进行补充的其他细节。

[0337] 美国专利公布2007/0032453

[0338] 美国专利5,569,902

[0339] 美国专利5,488,145

[0340] Bigner et al., In: Pathology of Tumors of the Nervous System, Russell and Rubinstein (Eds.), 6th Edition, London: Edward Arnold, 757, 1998.

[0341] Burger et al., In: Surgical Pathology of the Nervous System and Its Coverings, 3<sup>rd</sup> ed., New York, Churchill Livingstone, Inc, 737, 1991.

[0342] Burger et al., Cancer, 56:1106-1111, 1985.

[0343] Burger et al., Cancer, 59:1345-1352, 1987.

[0344] Cao et al., Brain Res., 644:267-272, 1994.

[0345] Cao et al., J. Clin. Oncol. 23:4127-36, 2005.

[0346] Carney et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:3633-3636, 1991.

[0347] Clough-Helfman et al., Free Radic. Res. Commun., 15:177-186, 1991.

[0348] Coutinho de Souza et al., Free Radic. Biol. Med., 87:157-168, 2015.

[0349] Daumas-Duport et al., J. Neurooncol., 34:61-78, 1997.

[0350] Davis et al., J. Neurooncol., 24:9-12, 1995.

[0351] Dehghani et al., Acta Neuropathol., 95:493-504, 1998.

[0352] Doblbas et al., Free Radic. Biol. Med. 44:63-72, 2008.

[0353] Floyd et al., FASEB J., 4:2587-2597, 1990.

[0354] Floyd et al., In: Neuroproiective Approaches to the Treatment of Parkinson's Disease and other Neurodegenerative Disorders, Chapman et al.

- (Eds.), Academic Press Limited, London, 69–90, 1996.
- [0355] Floyd, *Adv. Pharmacol.*, 38:361–378, 1997.
- [0356] Folbergrova et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92:5057–5061, 1995.
- [0357] Fosmark et al., *PLoS ONE* 12 (6) :1–17, 2017.
- [0358] Heegard et al., *Cancer*, 76:1809–1813, 1995.
- [0359] Hensley et al., In: *Neuroprotective Agents and Cerebral Ischaemia*, Green and Cross (Eds.), Academic press Ltd., London, 299–317, 1996.
- [0360] Hoshino et al., *Int. J. Cancer*, 53:550–555, 1993.
- [0361] Kleihues and Cavenee, In: *Pathology and Genetics of Tumors of the Nervous System*, IARC Press, Lyon, 227–228, 2000.
- [0362] Kleihues and Ohgaki, *Brain Pathol*, 7:1131–1136, 1997.
- [0363] Kleihues and Ohgaki, *Neuro-Oncology*, 1:44–51, 1999.
- [0364] Kleihues et al., In: *Histological Typing of Tumours of the Central Nervous System*. 2<sup>nd</sup> Ed., Berlin: Springer-Verlag, 112, 1993.
- [0365] Kros et al., *Cancer*, 78:1107–1113, 1996.
- [0366] Lamborn et al., *Cancer*, 85:925–935, 1999.
- [0367] Muller et al., *Acta Neurochtr (Wien)*, 37:75–91, 1977.
- [0368] Pahlmark et al., *Acta Physiol. Scand.*, 157:41–51, 1996.
- [0369] Pogrebniak et al., *Surgery*. 112:130–139, 1992.
- [0370] Poyer et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 539:402–409, 1978.
- [0371] Schneider et al., *Acta Neuropathol* 107:272–6, 2004.
- [0372] Shaw et al., *Neurosurgery*, 34:577–582, 1994.
- [0373] Wacker et al., *J. Neuro-Oncology*, 19:113–122, 1994.
- [0374] Wang and Shuaib, *Drugs Aging* 24:537–46, 2007.
- [0375] Ostrom QT, Gittleman H, Liao P et al., *CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010–2014. Neuro Oncol* 2017;19;v1–v88.
- [0376] Lai SW, Huang BR, Liu YS, Lin HY, Chen CC, Tsai CF, Lu DY, Lin C, *Int J Mol Sci* 2018;19(1).
- [0377] Shi J et al., *Oncotarget* 2017;8(50):87554–567.
- [0378] Fisher T et al., *Cancer J* 2007, 13:335–344.
- [0379] Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM et al., *Genes Dey* 2007;21:2683–2710.
- [0380] Liu Z-G et al., *cOncotarget* 2016;7(40):65946.
- [0381] Happold C, Stojcheva N, Silginer M, Weiss T, Roth P, Reifenberger G, Weller M. *J Neurochem* 2018;144(6):780–790.
- [0382] Wang Z, Xu X, Liu N, Cheng Y, Jin W, Zhang P, Wang X, Yang H, Liu H, Tu Y. *Oncotarget* 2017;9(1):192–204.
- [0383] Zhao YH et al., *Front Neurol* 2018;9:127.
- [0384] Tang JB et al., *Neuro Oncol* 2011 13(5):471–86.

- [0385] Tang JH et al., *Exp Cell Res* 2016;343(2):148-158.
- [0386] Melamed JR, Morgan JT, loele SA, Gleghorn JP, Sims-Mourtada J, Day ES. *Oncotarget* 2018;9(43):27000-27015.
- [0387] Grek CL, Sheng Z, Naus CC, Sin WC, Gourdie RG, Ghatnekar GG. *Curr Opin Pharmacol* 2018;41:79-88.
- [0388] Haas B, Klinger V, Keksel C, Bonigut V, Kiefer D, Caspers J, Walther J, Wos-Maganga M, Weickhardt S, Rohn G, Timmer M, Frotschl R, Eckstein N. *Cancer Cell Int* 2018;18:69.
- [0389] Xu X, Wang Z, Liu N, Cheng Y, Jin W, Zhang P, Wang X, Yang H, Liu H, Zhang Y, Tu Y. *Int J Oncol* 2018;53(1):189-202.
- [0390] Dai S, Yan Y, Xu Z, Zeng S, Qian L, Hou L, Li X, Sun L, Gong Z. *Front Pharmacol* 2018;8:960.
- [0391] Roos WP, Frohnapfel L, Quiros S, Ringel F, Kaina B. *Cancer Lett* 2018;424:119-126.
- [0392] Shang C, Tang W, Pan C, Hu X, Hong Y. *Cancer Chemother Pharmacol* 2018;81(4):671-678.
- [0393] Sun Q, Pei C, Li Q, Dong T, Xing W, Zhou P, Gong Y, Zhen Z, Gao Y, Xiao Y, Su J, Ren H. *Biochem Biophys Res Commun* 2018;496(4):1040-1046.
- [0394] Yi GZ, Xiang W, Feng WY, Chen ZY, Li YM, Deng SZ, Guo ML, Zhao L, Sun XG, He MY, Qi ST, Liu YW. *Biomed Res Int* 2018;2018:5238760.
- [0395] Jia L, Tian Y, Chen Y, Zhang G. *Onco Targets Ther* 2018;11:313-321.
- [0396] Towner RA, Gillespie DL, Schwager A, Saunders DG, Smith N, Njoku CE, Krysiak RS III, Larabee C, Iqbal H, Floyd RA, Bourne DWA, Abdullah O, Hsu EW, Jensen RL. *Neuro Oncology* 15:330-40(2013).
- [0397] Coutinho de Souza P, Balasubramanian K, Njoku C, Smith N, Gillespie DL, Schwager A, Abdullah O, Ritchey JW, Fung K-M, Saunders D, Jensen RL, Towner RA. *J Magn Reson Imaging*, 2015;42:1582-91.
- [0398] Coutinho de Souza P, Smith N, Pody R, He T, Njoku C, Silasi-Mansat R, Lupu F, Meek B, Chen H, Dong Y, saunders D, Orock A, Hodges E, Colijn S, Mamedova N, Towner RA. *Am J Nuclear Med Mol Imaging* 2015;5(4):363-78.
- [0399] Coutinho de Souza P, Smith N, Atolagbe O, Ziegler J, Nijoku C, Lerner M, Ehrenshaft M, Mason RP, Meek B, Plafker SM, Saunders D, Mamedova N, Towner RA. *Free Radical Biol Med* 2015;87:157-168.
- [0400] Ziegler J, Pody R, Coutinho de Souza P, Evans B, Saunders D, Smith N, Mallory S, Njoku C, Dong Y, Chen H, Dong J, Lerner M, Mian O, Tummala S, Battiste J, Fung K-M, Wren JD, Towner RA. *Neuro-Oncology* 2017;19(2):175-185.
- [0401] Griffitts J, Tesiram Y, Reid GE, Saunders D, Floyd RA, Towner RA. *J Lipid Res* 2009;50:611-622.
- [0402] Wright GW, Simon R. *Bioinformatics* 2003;19:2448-55.

- [0403] Bushnell B.//sourceforge.net/projects/bbmap.2014.
- [0404] Andrews S.FastQC:a quality control tool for high throughput sequence data.2010.
- [0405] Ewels P,Magnusson M,Lundin S,Kaller M.Bioinformatics 2016;32(19):3047-3048.
- [0406] Trapnell C,Pachter L,Salzberg SL.Bioinformatics2009;25(9):1105-1111.
- [0407] Love MI,Huber W,Anders S.Genome Biology 2014;15:550.doit 10.1186/s13059-014-0550-8.
- [0408] Benjamini Y,Hochberg Y.J Royal Stat Soc Ser B 1995;57(1):289-300.
- [0409] Robinson MD.McCarthy DJ,Smyth GK.Bioinformatics 2010;26(1):139-140.
- [0410] Suwala AK,Koch K,Rios DH,Aretz P,Uhlmann C,Ogorek I,Felsberg J,Reifenberger G,Kohrer K,Deenen R,Steiger HJ,Kahlert UD,Maciaczyk J,Oncotarget 2018;9(32):22703-22716.
- [0411] Li H,Chen L,Li JJ,Zhou Q,Huang A,Liu WW,Wang K,Gao L,Qi ST,Lu YT.J Hematol Oncol 2018;11(1):70.
- [0412] Peng Y,Huang J,Xiao H,Wu T,Shuai X Int J Nanomedicine 2018;13:3467-3480.
- [0413] Yoshino A et al,Int J Oncol 2010;36(6):1367-77.
- [0414] Liu C et al.,J Biomed Biotechnol 2012;2012:760679.
- [0415] Wang Z et al.,Anticancer Drugs 2017;29:136-144.
- [0416] Fan Y et al.,Nat Cell Biol 2014;16(5):445-56.
- [0417] Zeng H et al.,Cell Death Dis 2017;8(6):e2885.
- [0418] Szopa W,Burley TA,Kramer-Marek G,Kaspera W.Biomed Res Int 2017;2017:8013575.
- [0419] Demuth T,Berens ME.J Neuro-Oncology 2004;70(2):217-228.
- [0420] Camphausen K et al.,PNAS 2005;102(23)8287-8292.

肿瘤检测之后小鼠的存活百分比

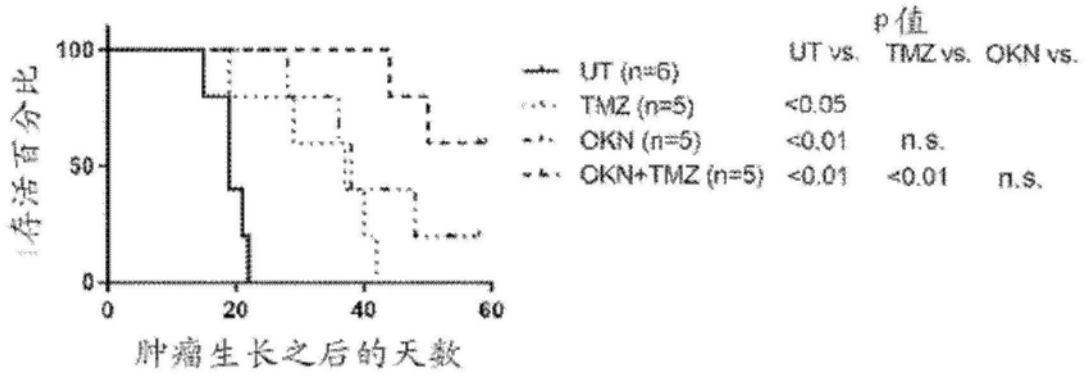


图1

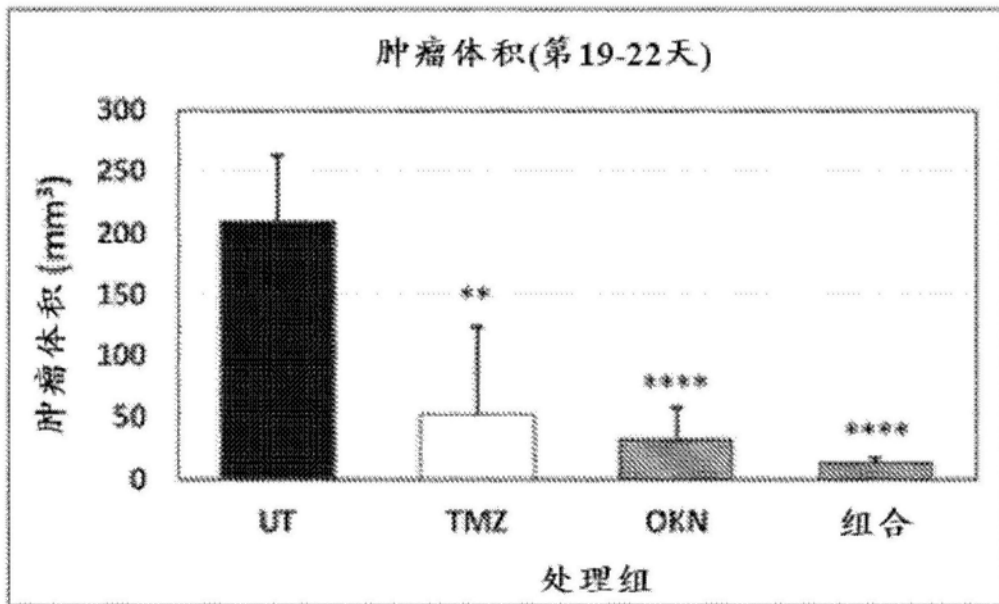


图2

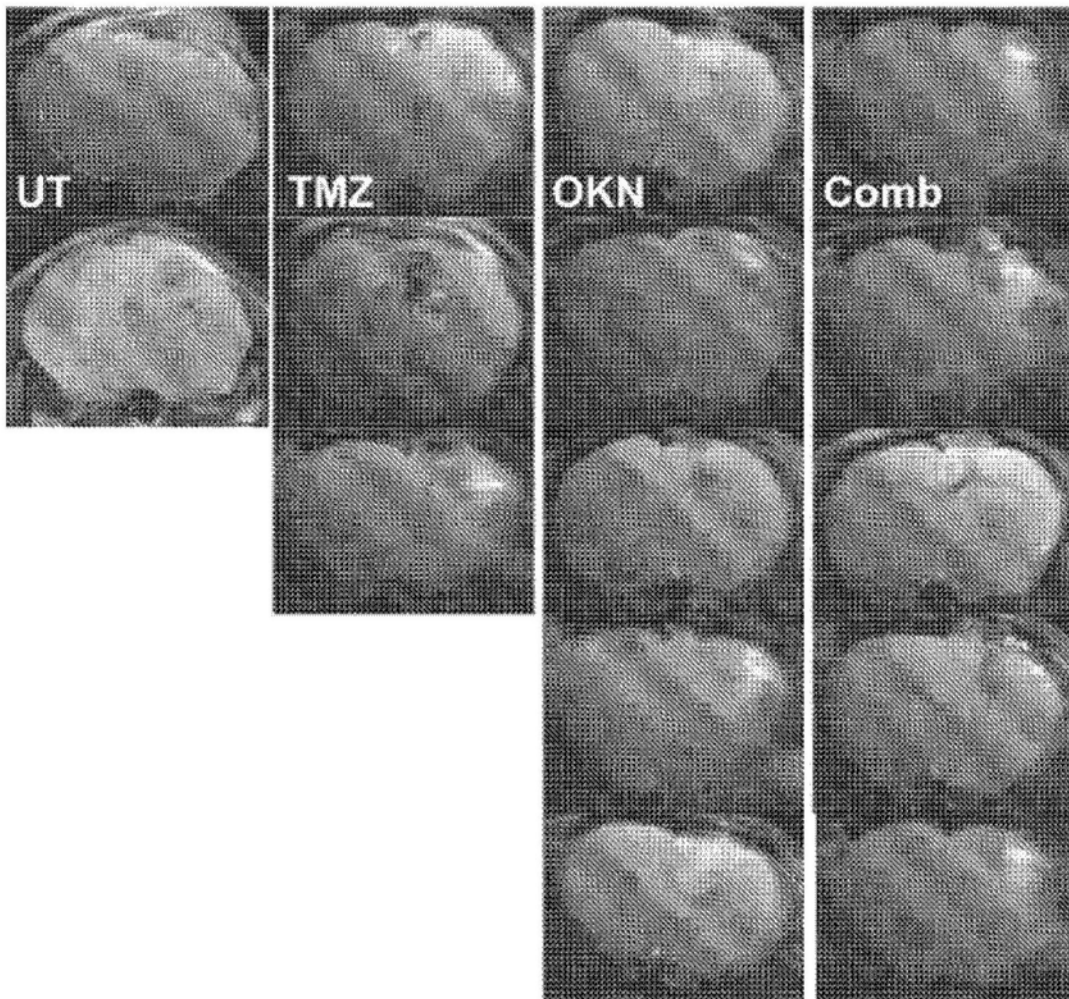


图3

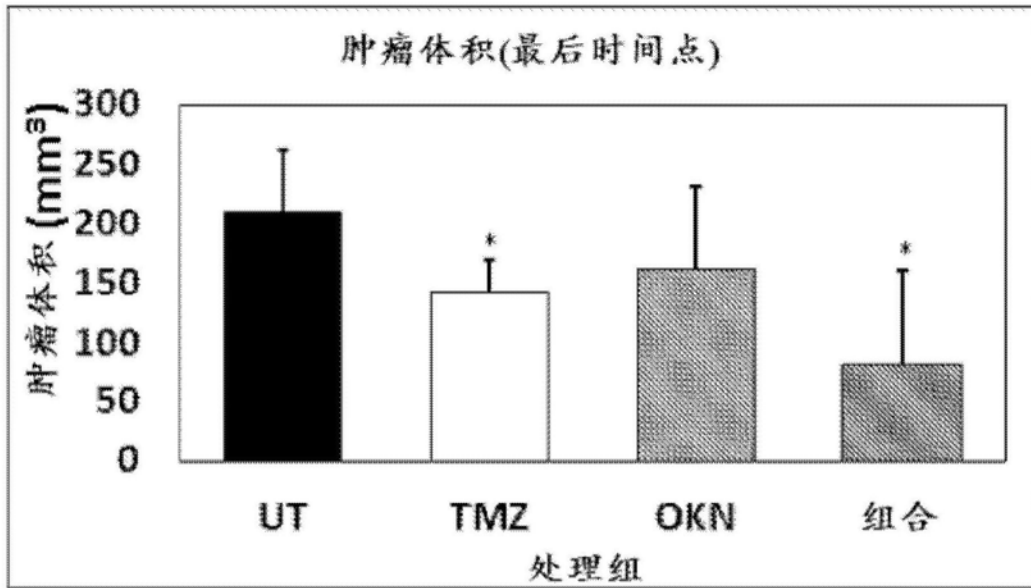


图4

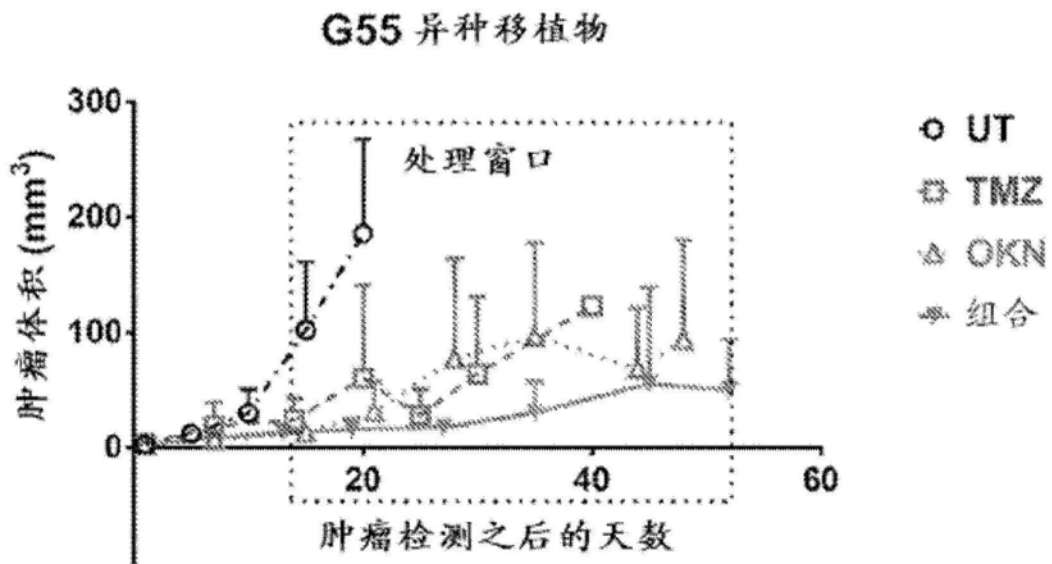


图5A

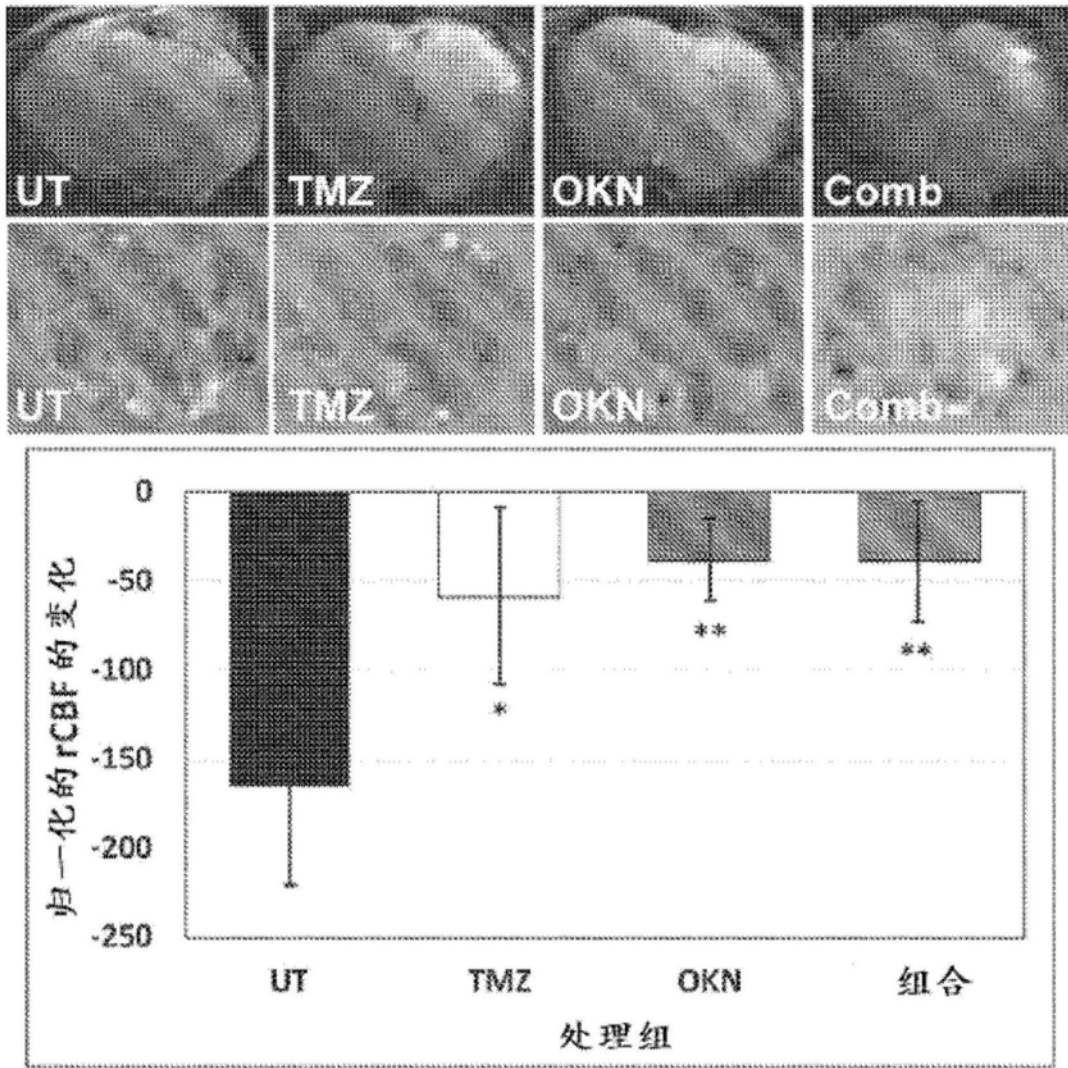


图5B



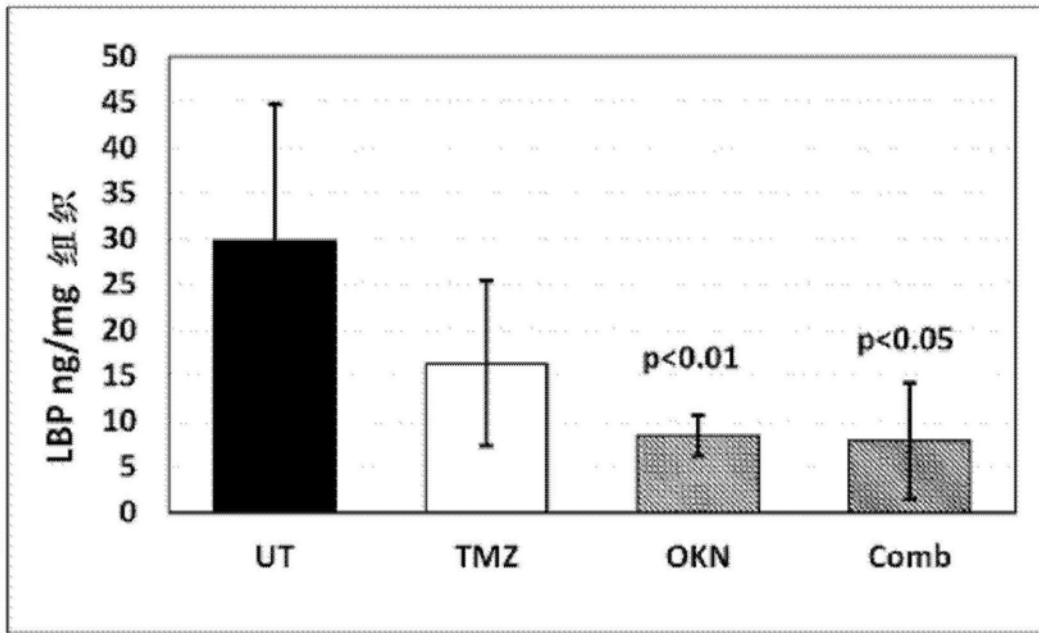


图6

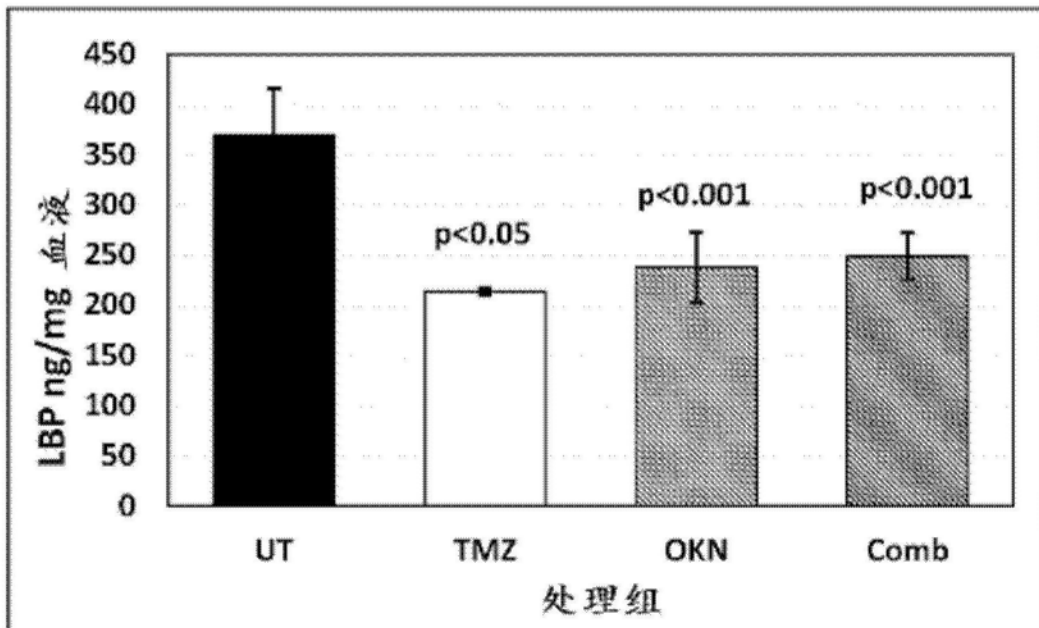
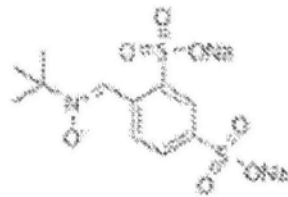
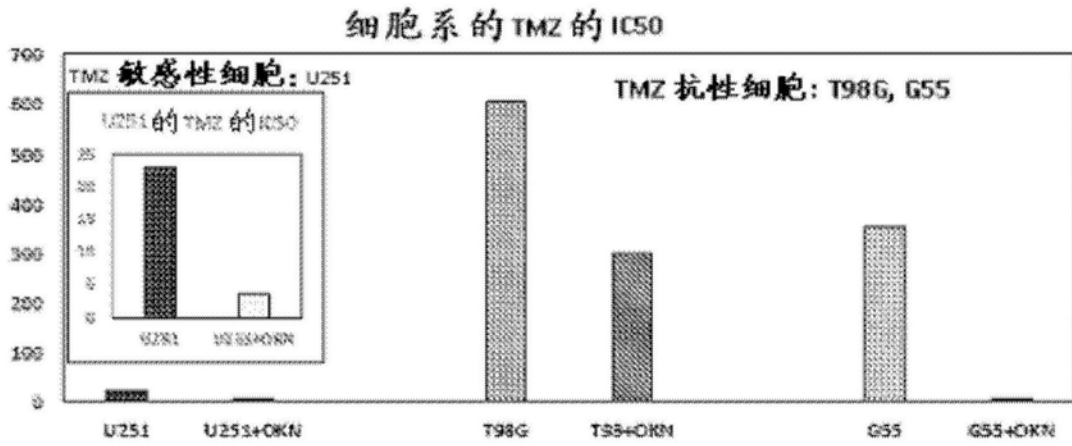
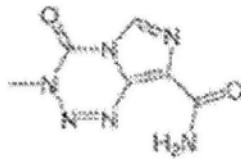


图7



OKN-007: MW 381.33



TMZ: MW 194.151

图8

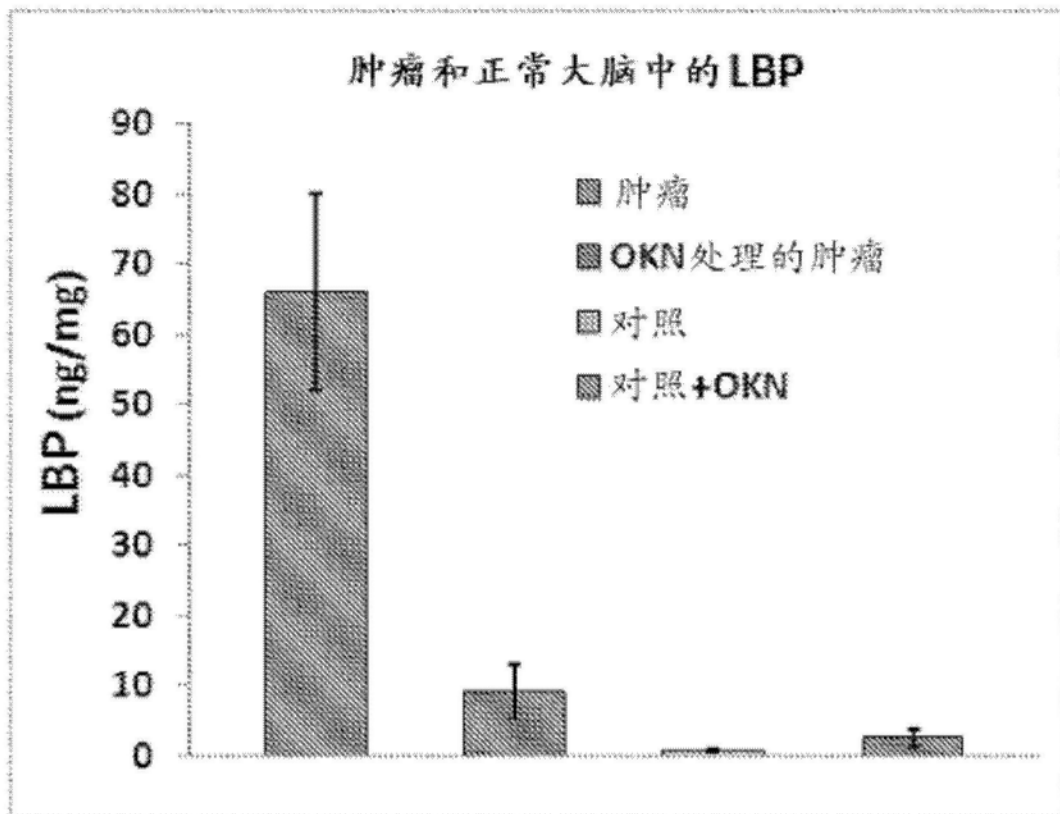


图9

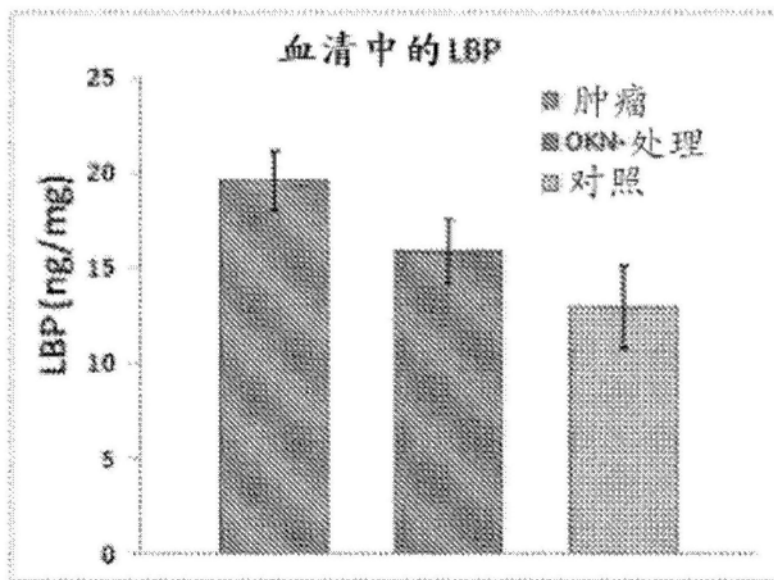


图10

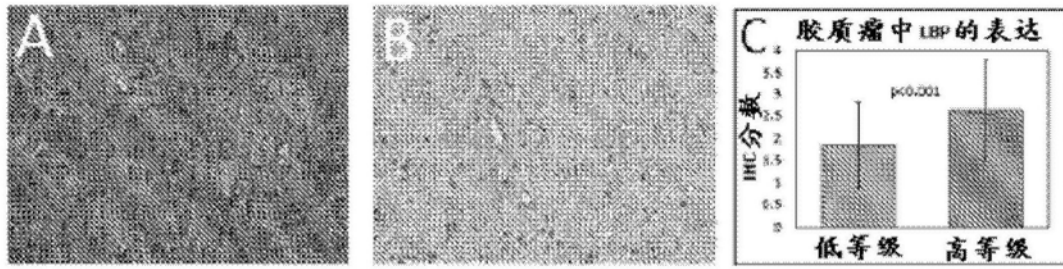


图11A-C

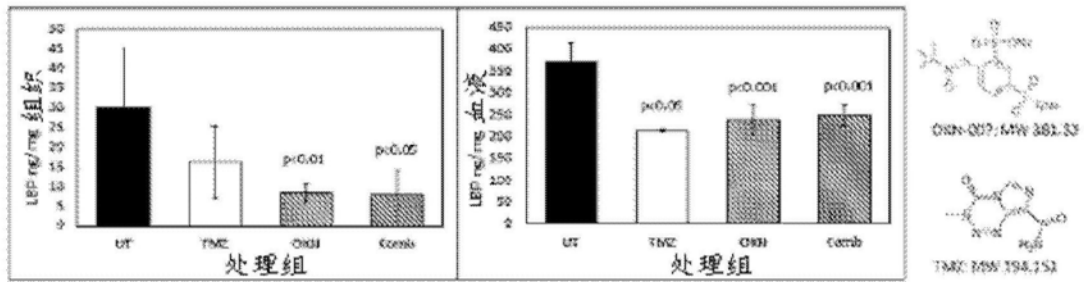


图12

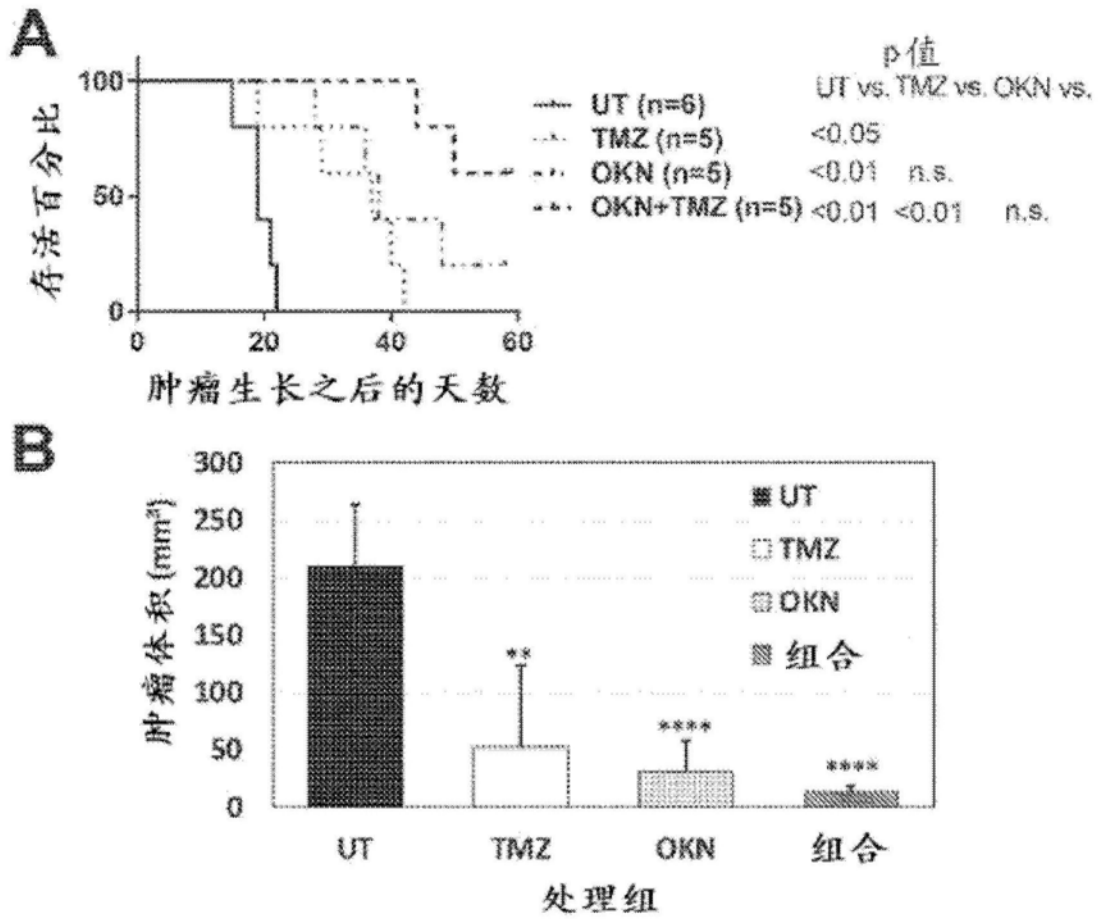


图13A-B

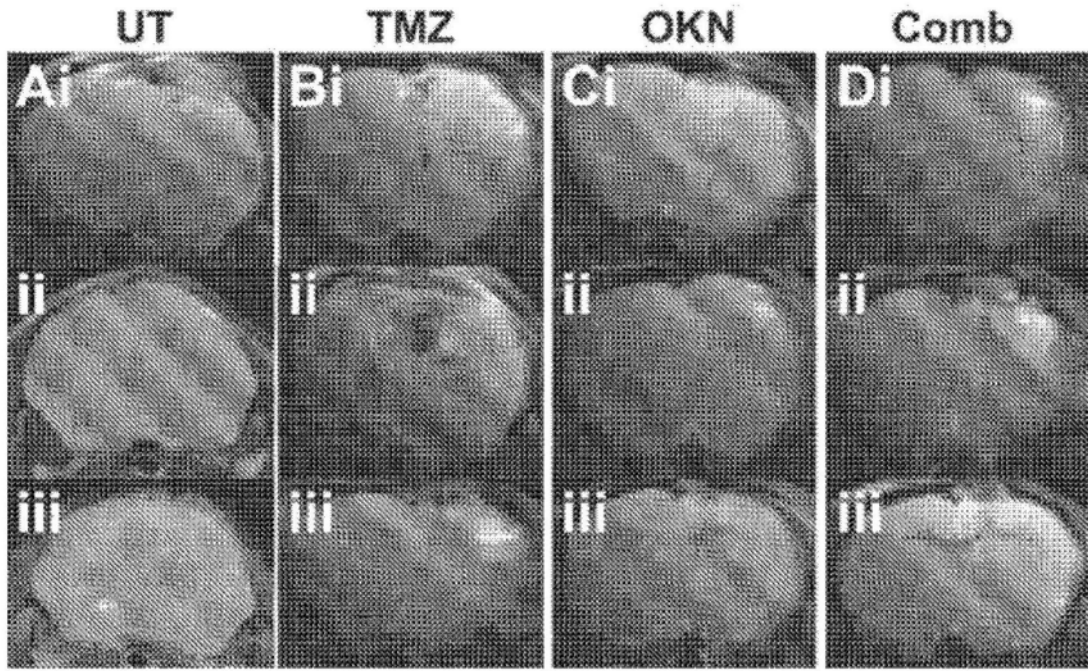


图14Ai-Diii

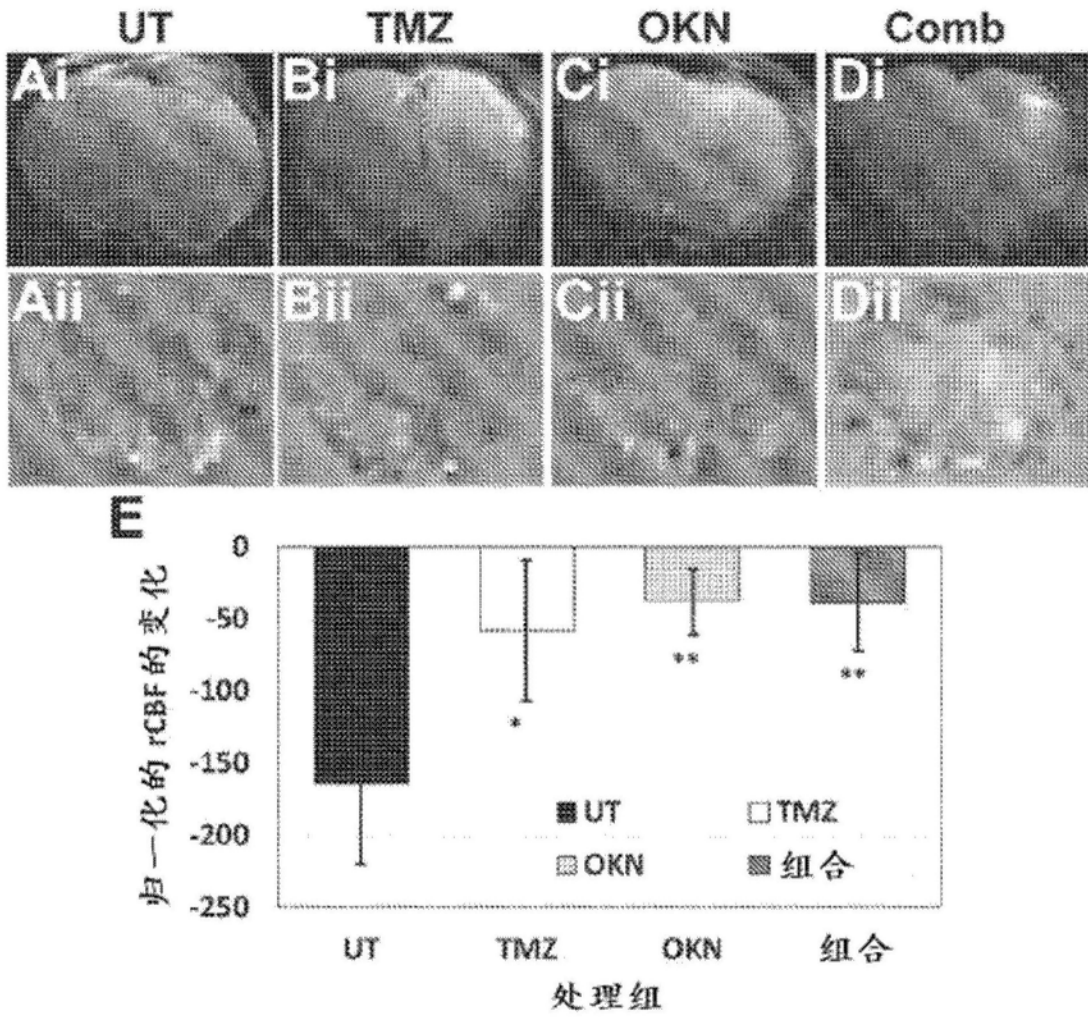


图15Ai-E

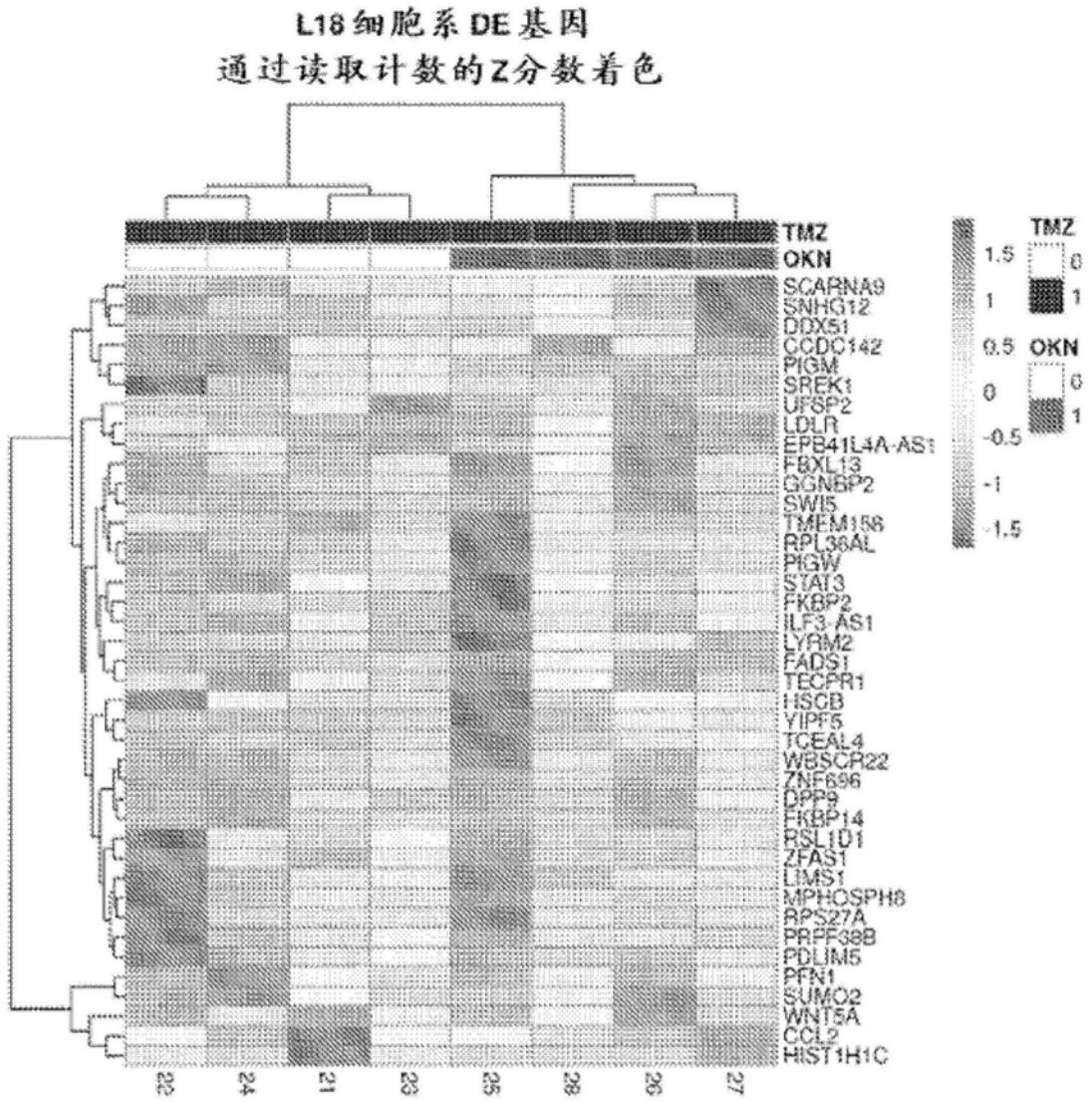


图16



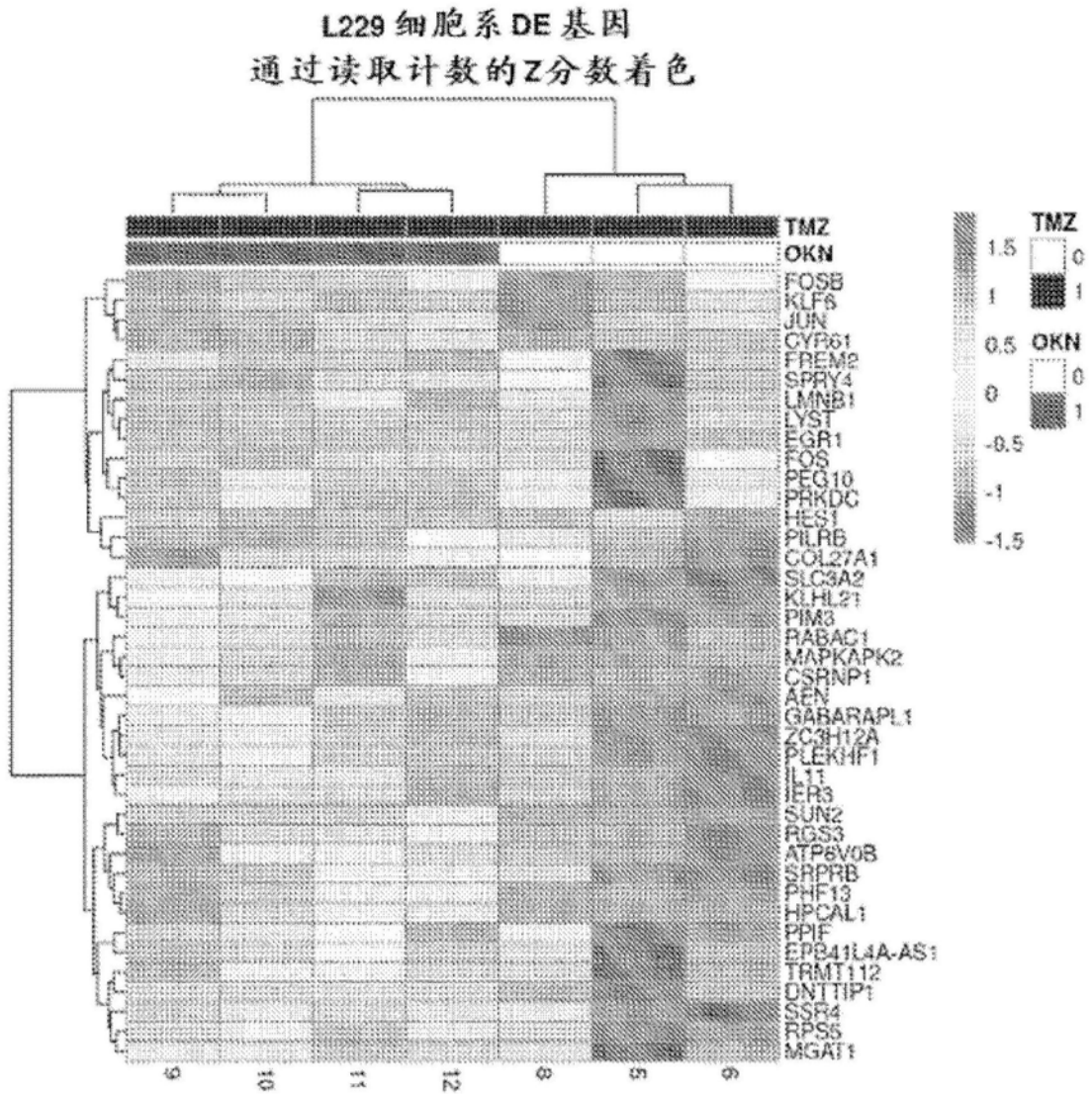


图17

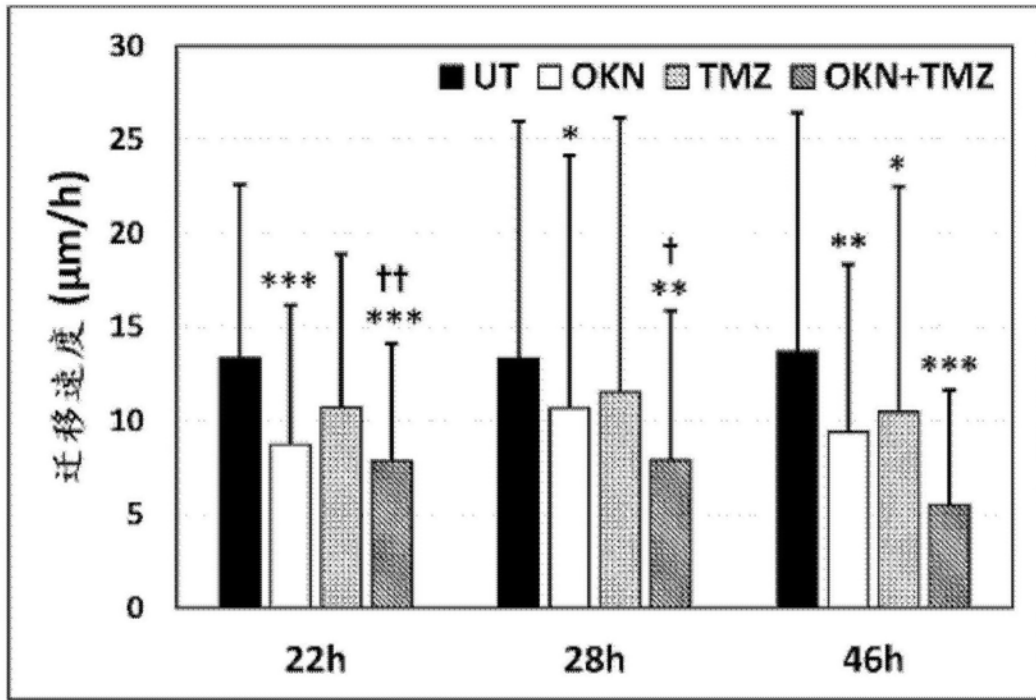


图18

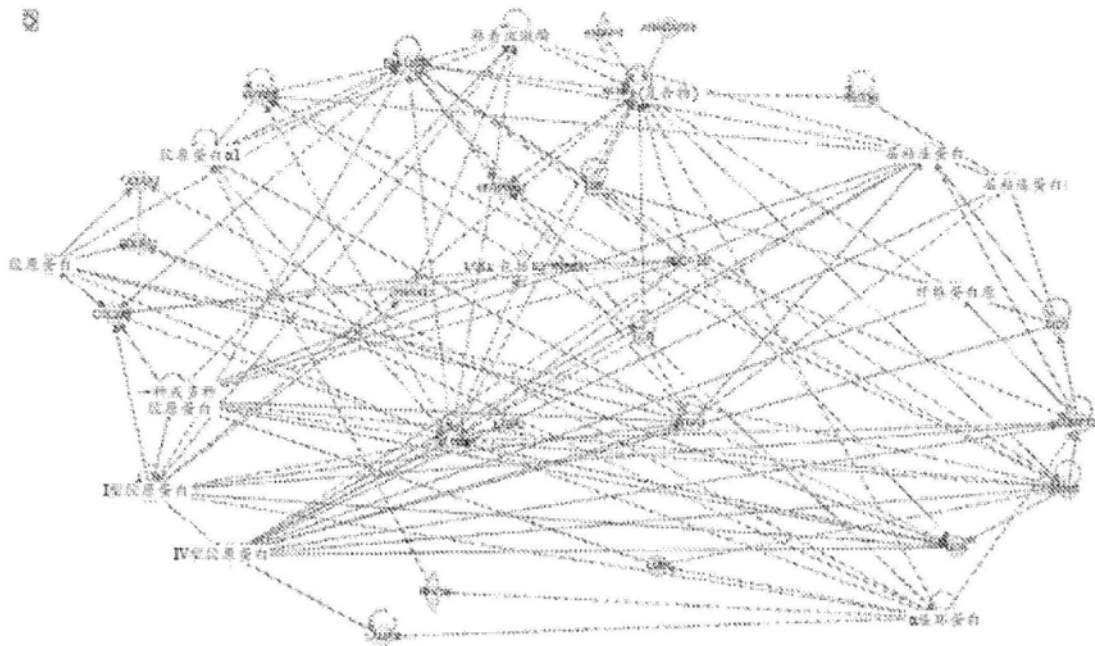
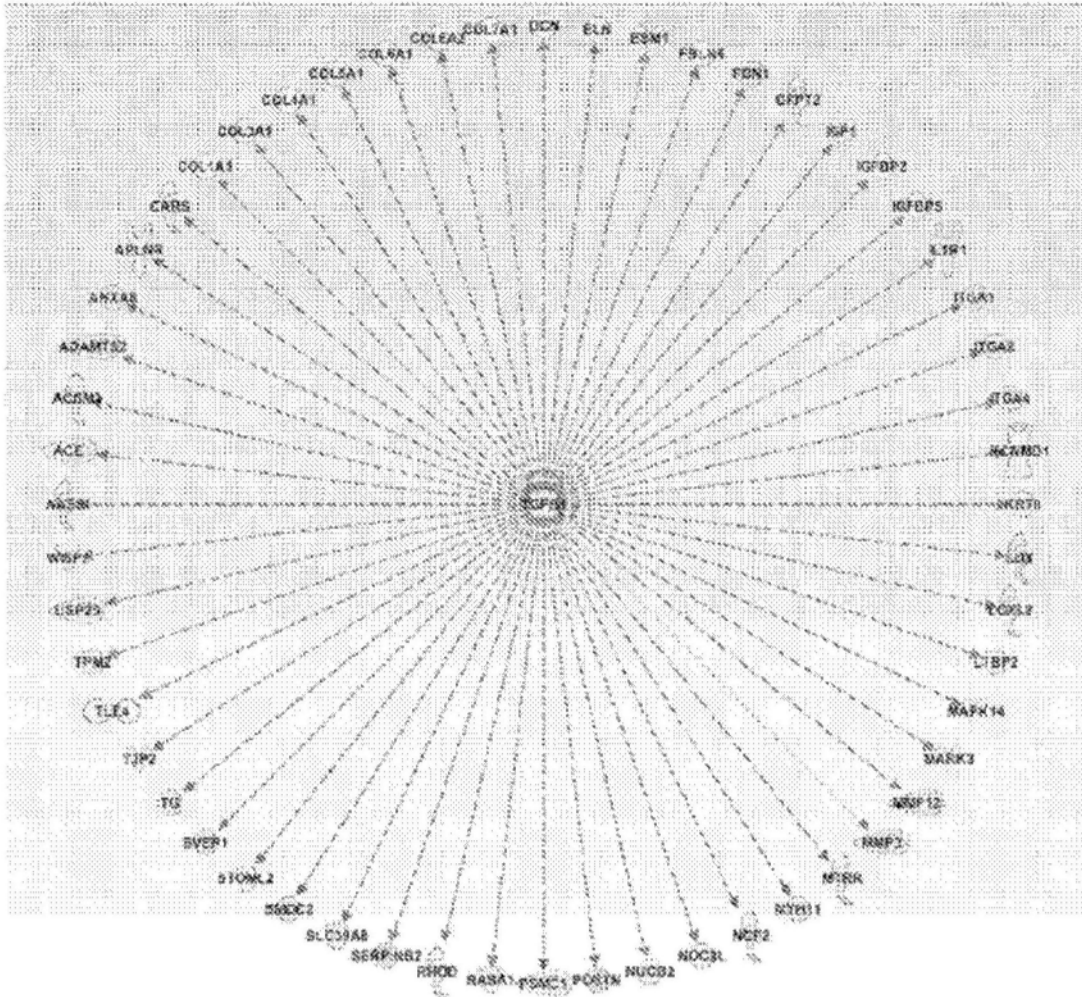


图19

tgfb1网络



©2000-2012 Ingenuity Systems公司版权所有。

图20

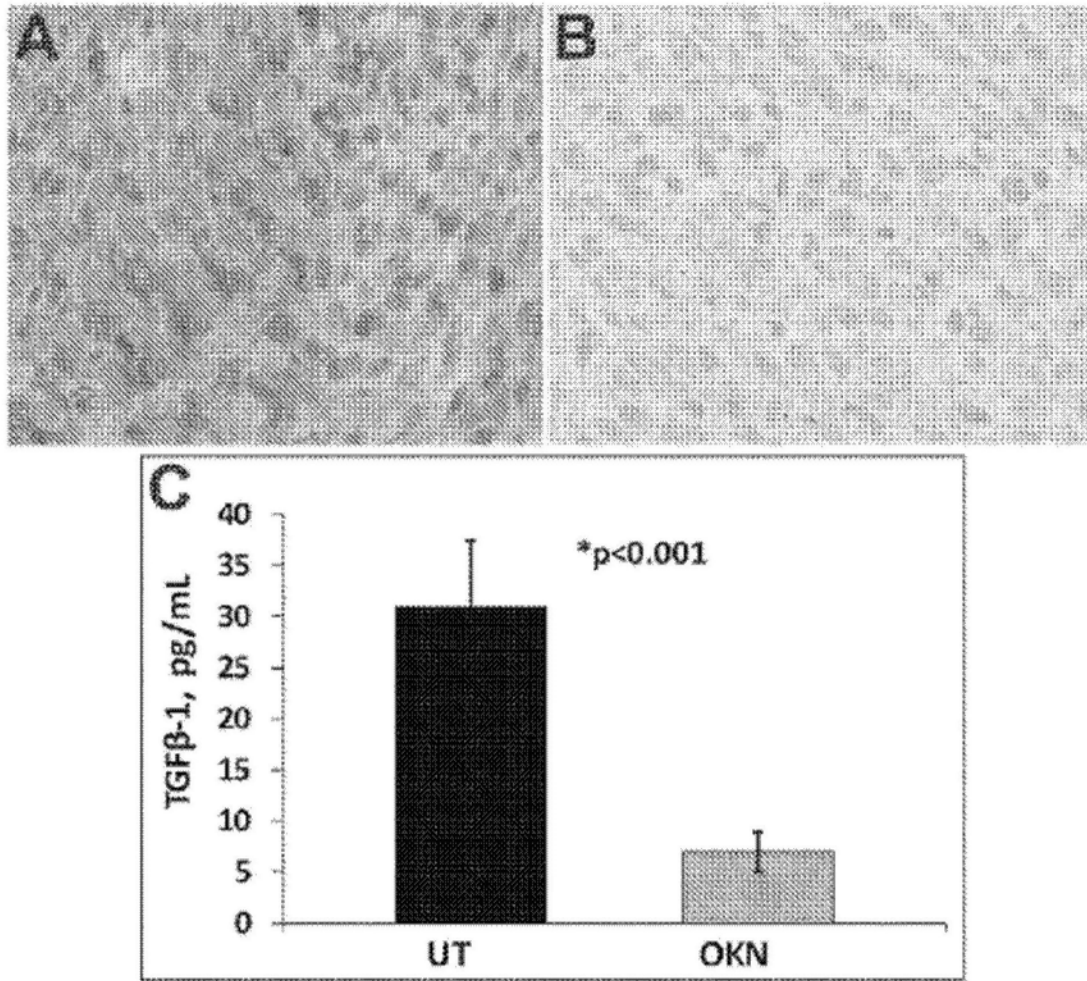


图21A-C