



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103154246 B

(45) 授权公告日 2015.11.25

(21) 申请号 201180033581.3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011.05.16

C12N 15/13(2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 31/7088(2006.01)

61/334, 991 2010. 05. 14 US

A61K 31/55(2006.01)

61/370,745 2010.08.04 US

(56) 对比文件

61/375, 863 2010. 08. 22 US

WO 2008083056 A2, 2008.07.10, 全文.

61/467, 376 2011. 03. 24 US

W0 2010015387 A1 , 2010.02.11, 全文.

61/467,342 2011.03.24 US

李焕. PP2B 和 PP1 α 协同作用激活正性转录延伸因子 P-TEFb 的机制. 《中国优秀硕士学位论文全文数据库(基础科学辑)》. 2009. A006-13.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

赵午莉 等. 靶向白血病特异性转录调节因子融合蛋白 siRNA 的研究进展. 《中国科技论文》, 2010, 第 1-6 页.

2013. 01. 06

(86) PCT国际申请的申请数据

审查员 彭海航

PCT/US2011/036672 2011.05.16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/143660 EN 2011. 11. 17

(73) 专利权人 达那-法伯癌症研究所

地址 美国马萨诸塞州

专利权人 冷泉港实验室

(72)发明人 J·E·布拉德纳 J·祖伯 史俊炜

C · R · 瓦科克

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平

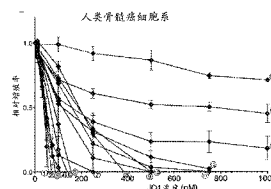
权利要求书2页 说明书89页 附图38页

(54) 发明名称

用于治疗白血病的组合物和方法

(57) 摘要

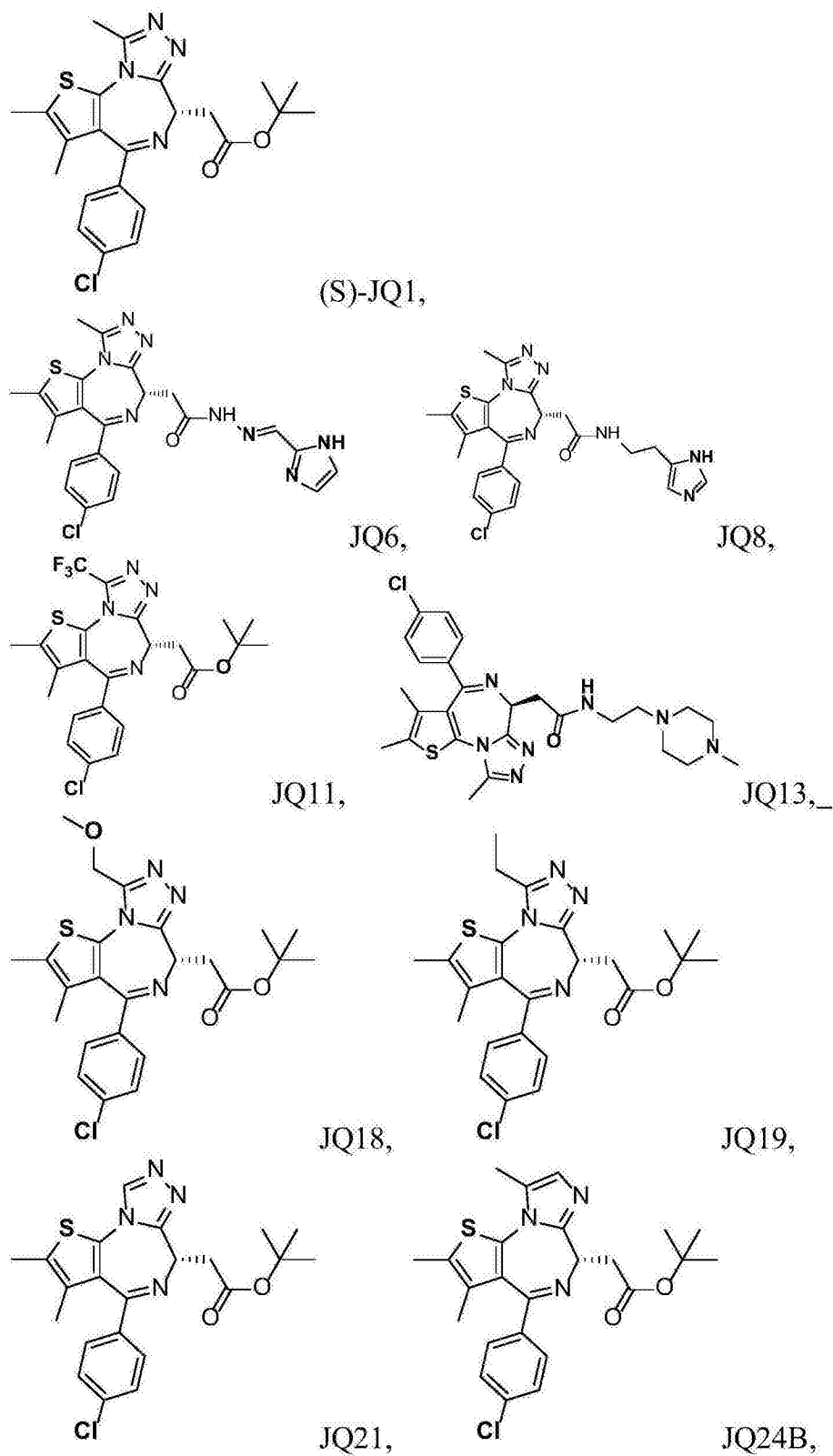
本发明提供了用于治疗受试者中的急性髓性白血病的组合物、方法和试剂盒。

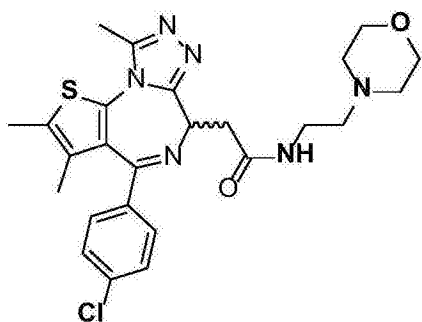


细胞系	已知的遗传学特征/或 感染谱
① C2C12-MLL-APL-Fly ^{1/2}	遗传学交叉的 C2C12-APL 和 C2C12-MLL
② CMK	遗传学交叉的 FGF-6 ^{1/2} 、E-cadherin ^{1/2}
③ MV1-F1	MLL-APL 感染谱
④ C2C12-MLL-APL-Nfs ²⁰⁰	遗传学交叉的 C2C12-APL 和 FGF-11/FGF18、MLL-1/2 感染谱 (感染谱相似)
⑤ EOL-1	MLL-NRAS 感染谱
⑥ KASUMI-1	AML1/MLL-APL 感染谱
⑦ THP-1	AML1/MLL-APL 感染谱
⑧ HL-60	MLL-APL 感染谱
⑨ MOLM-13	MLL-APL 感染谱
⑩ NOMO-1	MLL-APL 感染谱
⑪ NBT-34	BCR-ABL1、AML1/MLL-APL 感染谱
⑫ KG-1	MLL-APL 感染谱
⑬ K-562	MLL-APL1、CMK 感染谱

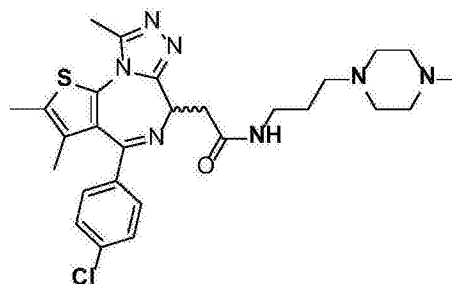
*“真白”白血病-淋巴细胞型, Hen G. Deesler, 国内作者与
魏治泰教授译, W. J. van der Grinten, 第二版, 2001

1. 一种试剂在制备用于治疗受试者中的白血病的药物中的用途,其中所述试剂是由下述结构式中的任一项所表示的化合物:





JQ33,



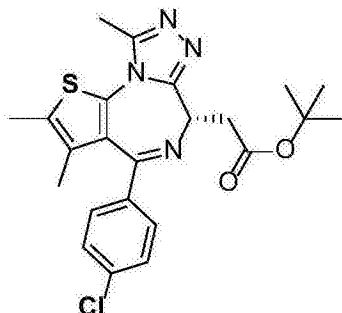
JQ35,

或其一种盐、溶剂合物或水合物。

2. 权利要求 1 所述的用途, 其中该白血病是急性髓性白血病 (AML)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、急性淋巴细胞白血病 (ALL)、慢性髓性白血病 (CML)、慢性粒单核细胞白血病 (CMML)、嗜酸细胞性白血病、毛细胞性白血病、何杰金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、非何杰金氏淋巴瘤、骨髓增生障碍或骨髓增生异常综合征。

3. 如权利要求 1 所述的用途, 其中所述白血病是急性髓性白血病。

4. 如权利要求 3 所述的用途, 其中所述试剂是以下结构式表示化合物 JQ1,



或其一种盐、溶剂合物或水合物。

5. 如权利要求 1 所述的用途, 其中该受试者是哺乳动物。

6. 如权利要求 5 所述的用途, 其中该受试者是人类病人。

7. 如权利要求 6 所述的用途, 其中该人类病人是成人。

8. 如权利要求 6 所述的用途, 其中该人类病人是儿童。

9. 如权利要求 3 所述的用途, 其中该药物减少了受试者中的白血病细胞的生长、增殖或存活。

用于治疗白血病的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2010 年 5 月 14 日提交的美国临时申请号 61/334,991 ;2010 年 8 月 4 日提交的美国临时申请号 61/370,745 ;2010 年 8 月 22 日提交的美国临时申请号 61/375,863 ;2011 年 3 月 24 日提交的美国临时申请号 61/467,376 以及 2011 年 3 月 24 日提交的美国临时申请号 61/467,342 的权益。通过引用以其全文将这些申请的内容结合在此。

[0003] 在联邦资助研究下做出本发明的权利陈述

[0004] 本工作由来自美国国立卫生研究院的以下拨款支持,拨款号 :K08CA128972。在本发明中政府具有一定的权利。

[0005] 发明背景

[0006] 急性髓性白血病 (AML) 代表一个范例,用于理解协作的遗传和表观遗传变化的复杂模式如何导致肿瘤发生。虽然这种复杂性对靶标疗法的发展提出了挑战,但是不同的 AML 基因突变普遍功能上地集中于解除对类似的核心细胞过程的调节。在 AML 起始中的一个关键事件是细胞命运程序的恶化,从而产生白血病干细胞 (LSC),白血病干细胞异常地自我更新并且由此维持疾病的蔓延。虽然不完全了解,已经将这个过程与调节性染色质修饰的改变联系起来,其对基因表达的影响得以良好表征。因此,在 AML 中常见的癌基因,如 AML1-ETO 以及 MLL 融合蛋白,至少部分地通过表观遗传通路的重编程诱导自我更新程序。一些表观遗传调节子是体细胞突变的靶标。由于通过致癌刺激诱导的表观遗传的改变是有可能可逆的,因此正在探索作为候选药物靶标的染色质调节子。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明提供了用于检测并治疗白血病以及相关的失调(例如,急性髓性白血病 (AML)、慢性淋巴细胞白血病 (Chronic Lymphocytic Leukemia) (CLL)、急性淋巴细胞白血病 (ALL)、慢性髓性白血病 (CML)、慢性粒单核细胞白血病 (CMML)、嗜酸细胞性白血病、毛细胞性白血病、何杰金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、非何杰金氏淋巴瘤、骨髓增生障碍或骨髓增生异常综合征)的组合物、方法和试剂盒。

[0009] 在一个方面中,本发明总体上提供了一种用于治疗受试者中的白血病或相关的失调(例如,急性髓性白血病 (AML)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、急性淋巴细胞白血病 (ALL)、慢性髓性白血病 (CML)、慢性粒单核细胞白血病 (CMML)、嗜酸细胞性白血病、毛细胞性白血病、何杰金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、非何杰金氏淋巴瘤、骨髓增生障碍或骨髓增生异常综合征)的方法,该方法包括向该受试者给予一种有效量的抑制 Brd4 的试剂(例如,一种靶向 Brd4 的限制性核酸 JQ1)或其衍生物。

[0010] 在另一个方面中,本发明提供了一种减少白血病细胞的生长、增殖或存活的方法,该方法包括使该细胞接触一种有效量的抑制 Brd4 的试剂或其衍生物,由此减少白血病细胞的生长、增殖或存活。

[0011] 在又一个方面中,本发明提供了一种诱导白血病细胞的细胞死亡或终末分化的方法,该方法包括使该细胞接触一种有效量的抑制 Brd4 的试剂或其衍生物,由此诱导白血

病细胞的细胞死亡或终末分化。

[0012] 在又一个方面中,本发明提供了一种治疗受试者中的急性髓性白血病的方法,该方法包括给予需要它的受试者一种有效量的抑制 Brd4 的试剂,由此治疗受试者的急性髓性白血病。

[0013] 在又一个方面中,本发明提供了一种药用组合物,该药用组合物在一种药用有效的赋形剂中包含治疗有效量的抑制 Brd4 的试剂或其衍生物。

[0014] 在又一个方面中,本发明提供了一种用于治疗白血病的试剂盒,该试剂盒包含一种治疗有效量的抑制 Brd4 的试剂,以及用于在权利要求 8 中的方法中使用的化合物的给药的书面说明书。

[0015] 在又一个方面中,本发明提供了一种用于检测白血病细胞的临床反应性的方法,该方法包括使白血病细胞接触一种 Brd4 抑制剂或其衍生物,并且检测该细胞中的巨噬细胞特异性分化标记的表达,其中该巨噬细胞特异性分化标记表达的提高表明该细胞响应于该试剂。

[0016] 在又一个方面中,本发明提供了一种用于选择针对经鉴别患有白血病的受试者的治疗方案的方法,该方法包括使该受试者的白血病细胞接触一种 Brd4 抑制剂或其衍生物,并且检测该细胞中的巨噬细胞特异性分化标记的表达,其中该巨噬细胞特异性分化标记表达的提高表明包含该试剂的治疗方案应该被选择用于该受试者。

[0017] 在又一个方面中,本发明提供了一种用于检测白血病细胞的临床反应性的方法,该方法包括使白血病细胞接触一种 Brd4 抑制剂或其衍生物,并且检测该细胞中的 myc 的表达,其中 myc 表达的减少表明该细胞响应于该试剂。

[0018] 在又一个方面中,本发明提供了一种用于选择针对受试者的治疗方案的方法,该方法包括使白血病细胞接触一种 Brd4 抑制剂或其衍生物,并且检测 myc 的表达,其中 myc 表达的减少表明包含该试剂的治疗方案应该被选择用于该受试者。

[0019] 在此描绘的本发明的任何上述方面或任何其他方面的不同实施方案中,该试剂是小化合物(例如,JQ1 或其衍生物)或抑制性核酸分子(例如,siRNA、shRNA 或反义核酸分子)。在上述方面的其他实施方案中,该受试者是哺乳动物(例如,人类病人)。在其他实施方案中,该受试者是成年哺乳动物(例如,成年人类病人)。在其他实施方案中,该受试者是幼年哺乳动物(例如,儿童人类病人)。在上述方面的其他实施方案中,该方法减少了受试者中的白血病细胞的生长、增殖或存活。在任何上述方面的不同实施方案中,该试剂是具有化学式 I-XXII 中任一的或具有在此所述的任何其他化学式的化合物。在上述方面的具体实施方案中,该细胞是在受试者中。在上述方面的其他实施方案中,该白血病是急性髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性髓性白血病(CML)、慢性粒单核细胞白血病(CMML)、嗜酸细胞性白血病、毛细胞性白血病、何杰金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、非何杰金氏淋巴瘤、骨髓增生异常或骨髓增生障碍。在上述方面的其他实施方案中,该白血病细胞衍生自急性髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性髓性白血病(CML)、慢性粒单核细胞白血病(CMML)、嗜酸细胞性白血病、毛细胞性白血病、何杰金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、非何杰金氏淋巴瘤、骨髓增生异常或骨髓增生障碍。在另一个方面中,本发明总体上提供了一种用于治疗受试者中的白血病或相关的失调(例如,急性髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、急性淋巴

细胞白血病 (ALL)、慢性髓性白血病 (CML)、慢性粒单核细胞白血病 (CMML)、嗜酸细胞性白血病、毛细胞性白血病、何杰金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、非何杰金氏淋巴瘤、骨髓增生障碍或骨髓增生异常综合征) 的方法, 该方法包括向该受试者给予一种有效量的抑制 Brd4 的试剂 (例如, 一种靶向 Brd4 的限制性核酸 JQ1) 或其衍生物。

[0020] 在另一个方面中, 本发明提供了一种减少白血病细胞的生长、增殖或存活的方法, 该方法包括使该细胞接触一种有效量的抑制 Brd4 的试剂或其衍生物, 由此减少白血病细胞的生长、增殖或存活。

[0021] 在又另一个方面中, 本发明提供了一种诱导白血病细胞的细胞死亡或终末分化的方法, 该方法包括使该细胞接触一种有效量的抑制 Brd4 的试剂或其衍生物, 由此诱导该白血病细胞的细胞死亡或终末分化。

[0022] 在又另一个方面中, 本发明提供了一种治疗受试者的急性髓性白血病的方法, 该方法包括给予需要它的受试者一种有效量的抑制 Brd4 的试剂, 由此治疗受试者的急性髓性白血病。

[0023] 在又另一个方面中, 本发明提供了一种药用组合物, 该药用组合物在一种药用有效的赋形剂中包含治疗有效量的抑制 Brd4 的试剂或其衍生物。

[0024] 在又另一个方面中, 本发明提供了一种用于治疗白血病的试剂盒, 该试剂盒包含一种治疗有效量的抑制 Brd4 的试剂以及用于在权利要求 8 中的方法中使用的化合物的给药的书面说明书。

[0025] 在又另一个方面中, 本发明提供了一种用于检测白血病细胞的临床反应性的方法, 该方法包括使白血病细胞接触一种 Brd4 抑制剂或其衍生物, 并且检测该细胞中的巨噬细胞特异性分化标记的表达, 其中该巨噬细胞特异性分化标记表达的提高表明该细胞响应于该试剂。

[0026] 在又另一个方面中, 本发明提供了一种用于选择针对经鉴别患有白血病的受试者的治疗方案的方法, 该方法包括使该受试者的白血病细胞接触一种 Brd4 抑制剂或其衍生物, 并且检测该细胞中的巨噬细胞特异性分化标记的表达, 其中该巨噬细胞特异性分化标记表达的提高表明包含该试剂的治疗方案应该被选择用于该受试者。

[0027] 在又另一个方面中, 本发明提供了一种用于检测白血病细胞的临床反应性的方法, 该方法包括使白血病细胞接触一种 Brd4 抑制剂或其衍生物, 并且检测该细胞中的 myc 的表达, 其中 myc 表达的减少表明该细胞响应于该试剂。

[0028] 在又另一个方面中, 本发明提供了一种用于选择针对受试者的治疗方案的方法, 该方法包括使白血病细胞接触一种 Brd4 抑制剂或其衍生物, 并且检测 myc 的表达, 其中 myc 表达的减少表明包含该试剂的治疗方案应该被选择用于该受试者。

[0029] 在此描绘的本发明的任何上述方面或任何其他方面的不同实施方案中, 该试剂是小化合物 (例如, JQ1 或其衍生物) 或抑制性核酸分子 (例如, siRNA、shRNA 或反义核酸分子)。在上述方面的其他实施方案中, 该受试者是哺乳动物 (例如, 人类病人)。在上述方面的其他实施方案中, 该方法减少了受试者中的白血病细胞的生长、增殖或存活。在任何上述方面的不同实施方案中, 该试剂是具有化学式 I-XXII 中任一的或具有在此所述的任何其他化学式的化合物。在上述方面的具体实施方案中, 该细胞是在受试者中。在上述方面的其他实施方案中, 该白血病是急性髓性白血病 (AML)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、急性

淋巴细胞白血病 (ALL)、慢性髓性白血病 (CML)、慢性粒单核细胞白血病 (CMML)、嗜酸细胞性白血病、毛细胞性白血病、何杰金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、非何杰金氏淋巴瘤、骨髓增生异常或骨髓增生障碍。在上述方面的其他实施方案中,该白血病细胞衍生自急性髓性白血病 (AML)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、急性淋巴细胞白血病 (ALL)、慢性髓性白血病 (CML)、慢性粒单核细胞白血病 (CMML)、嗜酸细胞性白血病、毛细胞性白血病、何杰金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、非何杰金氏淋巴瘤、骨髓增生异常或骨髓增生障碍。

[0030] 在结合附图考虑时,从下面的本发明的各种非限制性实施方案的详细描述中,本发明的其他优点和新颖特征将变得显而易见。在本说明书以及通过引用结合的文献包括冲突和 / 或不一致的披露的情况下,本说明书将控制。

[0031] 联系下面提供的实例来分离或制造本发明定义的组合物和物品。从详细的说明中,以及从权利要求中,本发明的其它特征和优点将是显而易见的。

[0032] 附图简要说明

[0033] 附图 1A 和 1B 显示染色质调节子对 Brd4 抑制敏感。附图 1A 包含一个显示参与染色质修饰的基因的分布的饼图以及一个显示 MLL-AF9/Nras^{G12D}白血病中池化的负选择筛选的图表,该图表描绘了在十四天的培养期间,1072 种信息性的 shRNA 的表现度 (representation) 的变化 (附图 1B)。数字表明在每个分类中的基因的数目。针对每一基因,使用 BIOPREDSi 算法 (Huesken 等人, (Huesken),《自然生物技术》(Nat Biotech), 2005 ; 23 :995-1001) 设计六种 shRNA,并使其适于 miR30 情况。使用大型芯片上的寡核苷酸合成,随后通过池化 PCR 克隆和单个克隆的序列验证来构建该文库,得出总共 1095 种 shRNA (每个基因三至六种)。附图 1B 包含一个图,显示了在 14 天的培养期间,1072 种信息性的 shRNA 表现度的变化。在 MLL-AF9/Nras^{G12D}白血病细胞上进行池化的负选择筛选,shRNA 的丰度比如下计算:给予强力霉素十四天之后的读数数目 (T_{14}) 除以给予强力霉素之前的读数 (T_0)。将这些结果作为两次重复的平均值以升序排列绘图。将完全消耗的 shRNA (在 T_{14} 处读数为零, $n = 71$) 按 10^{-5} 的比例绘制;在这个组中突出显示的 shRNA 按字母顺序用相等的间隔表明。将正评分的 shRNA (在两个重复中都具有高于二十倍的消耗, $n = 177$) 标记为深灰色。阳性对照包括靶向 Rpa1、Rpa3、Pcna 或 Polr2b 的 shRNA。阴性对照 shRNA 靶向海肾荧光素酶 (Ren) 或 Braf。

[0034] 附图 2A-2D 显示在 Tet-On 感受态 AML 模型中的 RNAi 筛选。附图 2A 是一个示意图,描述了 RNAi 筛选策略。在一个 Tet-On 感受态急性髓性白血病 (AML) 模型中进行该筛选,该模型是通过将编码 rtTA3-IRES-MLL-AF9 和荧光素酶 -IRES-Nras^{G12D}的载体经逆转录病毒共转导入造血干细胞以及祖细胞 (HSPC) 产生。将从晚期病鼠上重获的白血病细胞放置在培养基中并且用于筛选。将靶向染色质调节基因的自定义 shRNA 文库使用芯片上寡核苷酸合成来进行合成,并且以池化形式 (pooled format) 进行克隆。将 1095 种序列验证的 shRNA 的文库池亚克隆到 TRMPV-Neo (Zuber 等人,《自然生物技术》(Nat Biotechnol), 2011 ; 29 :79-83) 中,并且转导到白血病细胞中,随后进行 G418 选择。然后将细胞用强力霉素处理十四天 (相当于十二次细胞传代),随后进行荧光激活细胞分选 (FACS),从而分离 dsRed- 阳性 / shRNA- 表达的细胞。基因组 DNA 从分选的 (T_{14}) 以及预处理的 (T_0) 白血病细胞制备,并且被用作 shRNA 引导链的 PCR 扩增的模板,使该模版经受深度测序从而量化该文库中的每种 shRNA 的相对丰度。将该筛选中的靠前符合定义为这样的基因,对其而言

至少两种 shRNA 显示出高于二十倍消耗。三十八种基因满足这些标准并且经受了使用不同的 MLL-AF9/Nras^{G12D} 诱导的 AML 细胞系和组成型 shRNA 表达载体 (LMN) 的逐一验证。附图 2B 是一个散点图,说明了质粒池与药物选择之后经文库转导的白血病细胞 (T₀) 的两个重复之间的每一 shRNA 的归一化读数的相互关系。该相互关系证实该文库表现度 (library representation) 在很大程度上未受逆转录病毒和药物选择影响。附图 2C 是在一个试验中与 T₁₄ 相比较的 T₀ 中的每一 shRNA 的归一化读数的散点图。低相互关系表明 shRNA 表现度 (shRNA representation) 的实质性地改变。附图 2D 是一个散点图,说明了在两个独立重复中的 T₁₄ 处的每一 shRNA 的归一化读数的相互关系。高相互关系表明 shRNA 丰度的改变是由于特异性影响。r, 皮尔逊相关系数。

[0035] 附图 3A 和 3B 验证了该筛选策略。附图 3A 是一个示意图,描述了 RNAi 筛选验证策略。将在初始池化筛选 (标准:在两独立重复中,至少两种 shRNA 消耗高于二十倍) 中正评分的每一基因经受逐一验证。将设计为靶向那一基因的 shRNA 亚克隆到该 LMN 载体中,该载体在组成型 LTR 启动子的控制下表达 miR30-shRNA,并且其特征是 GFP 和 NeoR 的报告子。将 LMN-shRNA 转导入一个独立衍生的 MLL-AF9/Nras^{G12D} 白血病细胞系中,该转导具有 20% 的平均感染效率。通过流式细胞计数法经十天监控 GFP% 的相对变化并且用作细胞生长抑制的示值读数,将其绘制为消耗倍数 [GFP% (d2) 除以 GFP% (d12)]。附图 3B 是一个直方图,显示了所有靶向这三十八种经鉴别的符合对象的 LMN-shRNA 在初始筛选中的消耗倍数。所有靶向这三十八种经鉴别的符合对象的 LMN-shRNA 在初始筛选中的消耗倍数。一些基因未能验证,这可能是由于 (i) 在初始筛选中的真实的假阳性, (ii) 在独立的白血病系中的变量影响,或 (iii) shRNA 表达系统之间的差别。基于经鉴别的显示出最高消耗 (二十五倍) 的 shRNA 的总数目,Brd4 被鉴别为该筛选中的最前符合。

[0036] 附图 4A-4E 展示了在白血病、MEF 以及 G1E 细胞中的 Brd4-shRNA 效果的比较。在每一个所示的实验中,将 TtTMPV 载体中的强力霉素可诱导的 shRNA 转导进入 Tet-On 感受态细胞,随后进行 G418 选择。附图 4A 包含多个图,显示了 48 小时的强力霉素 (dox) 处理后的 Brd4mRNA 水平的 RT-qPCR 的结果。(n = 4)。附图 4B 包含多个图,显示了竞争性增殖测定的结果。将选择的细胞与未经转导的细胞以 8 : 1 比率进行混合,并且随后用强力霉素进行培养。在标明的时间点确定 Venus- 阳性 /TurboRFP- 阳性 (即, shRNA 表达) 细胞的相对百分数并且将变化用于读出生长抑制效果 (n = 3)。误差棒表示平均数标准误差 (s. e. m.)。附图 4C 包含给予强力霉素五天之后的流式细胞计量术图,这些图来自在附图 4B 中测定的细胞的细胞周期分析 (BrdU/7-AAD 双重染色)。附图 4D 包含的图显示了给予强力霉素五天之后,使用在附图 4A 中测定的细胞的膜联蛋白 V (Annexin V) /DAPI 双重染色而进行的凋亡测量。首先对活细胞 (FSC/SSC) 应用设门,随后是 RFP+/shRNA+ 细胞设门。这解释了累积的死亡 (膜联蛋白 V+/DAPI+) 细胞的缺乏。附图 4E 包含多个表,显示了如在附图 3A 中描述的、在 G1E 中进行的 LMN-shRNA 的 GFP 消耗的程度 (n = 3)。误差棒表示 s. e. m.。

[0037] 附图 5A-5D 显示了 BRD4 的 shRNA 敲低足以抑制人类 AML 细胞系 THP-1 和 MOLM-13 的生长。靶向人类 BRD4 的 shRNA 被克隆到 TRMPV-Neo 载体中,随后是 Eco- 受体 +/Tet-On 感受态人类 AML 细胞系 THP-1 和 MOLM-13 的逆转录病毒转导。用 G418 选择细胞,持续一周。附图 5A 包含一个图,显示了条件性 RNAi 抑制时的 BRD4 敲低效率。48 小时的强力霉素 (dox) 处理后,对 TRMPV-MOLM-13 系进行 RT-qPCR (n = 3)。误差棒表示 s. e. m.。附图 5B

和 5C 包含多个图表,显示了 MOLM-13 和 THP-1 的竞争性增殖测定的结果。将经选择的细胞与未经转导的细胞混合并且随后在强力霉素 (dox) 上培养。在标明的时间点确定 dsRed+/shRNA+ 细胞的相对百分数并且将变化用于测量生长抑制效果。结果是两独立实验的平均值。将所有的结果归一化为对照 shRNA (shRen. 713)。误差棒表示 s. e. m.。附图 5D 包括流式细胞计量术,该流式细胞计量术来自 5 天的强力霉素 (dox) 处理之后对附图 5B 和 5C 的细胞的细胞周期分析 (BrdU/DAPI 双重染色)。在 dsRed+/shRNA+ 细胞上对各事件进行设门。

[0038] 附图 6A-6E 显示了 AML 生长对 Brd4 抑制敏感。附图 6A (上组) 包含一个代表性的全细胞裂解物的蛋白质印迹,该细胞裂解物制备自鼠类胚胎纤维母细胞 (MEF) 培养系,该培养系经过用标明的 TtTMPV-shRNA 进行转导并且用强力霉素诱导五天。附图 6A (下组) 展示了用 LMN-shRNA 转导 MLL-AF9/Nras^{G12D} 白血病培养系之后, GFP % 的相对改变。附图 6B-6E 展示了在用 JQ1 进行处理时鼠类 (附图 6B 和 6D) 和人类 (附图 6C 和 6E) 的细胞增殖的抑制。附图 6B 和 6C 包含多个图表,显示了经 JQ1 处理的细胞的增殖率。曲线是通过测量培养三周之后有活力的细胞数目的增加并且将数据拟合成指数生长曲线来产生的。相对于对照细胞的增殖率 (设定为 1 (n = 3)) 来对结果进行绘图。将结果归一化为经载体 / DMSO 处理的细胞的增殖率,设定为 1 (n = 3)。术语 CML-BC 是指慢性髓性白血病急变期。术语 T-ALL 是指 T 细胞急性成淋巴细胞白血病。附图 6D 和 6E 包含的图显示了在标明的浓度,经 JQ1 处理持续四十八小时之后,定量化的 S-相 (BrdU- 阳性) 百分数 (n = 3)。在所示的所有实验中,将 BrdU 脉冲三十分钟。所有的误差棒表示 s. e. m.。附图 7A 和 7B 显示, JQ1 在不同的人类白血病细胞系中展示出广谱抗白血病活性。附图 7A 和 7B 包括显示 JQ1 处理的细胞系的增殖率的图。曲线是这样产生的:进行培养 3 天后测量有活力细胞数目的增加并且将数据拟合成指数生长曲线。相对于对照细胞 (经 DMSO 处理) 的增殖率 (设置为 1) 对结果进行绘图。(n = 3)。误差棒表示 s. e. m.。大部分人类髓细胞性白血病细胞系显示出 IC50 < 500nM。

[0039] 附图 8A-8D 显示了病人衍生的成人 AML 样品的 JQ1 敏感性。附图 8A 包括一张表,显示有关所分析的 AML 样本的临床与病理学信息。附图 8B 包括一张表,总结了 JQ1 对增殖 (3H- 胸苷 - 吸收)、凋亡 (吉姆萨染色 (Giemsa stain)) 以及细胞成熟 (莱特 - 吉姆萨染色 (Wright-Giemsa staining)) 的影响。由于该增殖测定与附图 7 中利用的那些不同,所以 HL-60 以及 MOLM-13 被包括以保证 IC50 测量与其他研究结果相一致。附图 8C 包含的图显示了在细胞因子存在下,经 JQ1 处理的 AML 样本的增殖曲线。(n = 3)。误差棒表示 s. e. m.。附图 8D 包括 AML 样品 #4 的莱特 - 吉姆萨染色细胞离心涂片的图像,显示了巨噬细胞分化的形态学特征。

[0040] 附图 9A-9C 显示了病人衍生的小儿白血病样品的 JQ1 敏感性。附图 9A 包括一张表,总结了来自这些 JQ1 实验的病人白血病样品信息以及敏感性数据。该 MV4-11 细胞系被包括作为一种对照以确保使用 WST1 测定进行的增殖测量与附图 7 中显示的结果是可比较的。用 JQ1 处理样品持续 72 小时,接着用 WST-1 试剂进行分析或用膜联蛋白 V 染色进行分析。对使用 250nM JQ1 处理了 48 小时的样本进行细胞离心涂片的莱特 - 吉姆萨染色。附图 9B 包括一个显示增殖曲线的图。结果被归一化为经 DMSO 处理的对照细胞。(n = 3)。误差棒表示 s. e. m.。附图 9C 包括样品 PED025 的莱特 - 吉姆萨染色细胞离心涂片的图像,显

示了淋巴分化的特征。

[0041] 附图 10A-10C 显示 JQ1 处理导致白血病细胞的凋亡。附图 10A 和 10B 包括显示鼠细胞 (附图 10A) 以及人细胞 (附图 10B) 的细胞死亡定量的图。细胞用 250nM JQ1 处理四十八小时,接着用碘化丙啶 (PI) 进行染色。通过 FACS 对 PI 染色呈阳性的细胞进行定量; $n = 3$ 。所有误差棒表示 s. e. m.。附图 10C 包括的图显示了对用 JQ1 处理了四十八小时的 MLL-AF9/Nras^{G12D}白血病细胞的凋亡测量。(n = 3)。显示了代表性实验的结果。

[0042] 附图 11A-11F 显示无性繁殖的 TRMPV-Neo 白血病系在强力霉素诱导 shRNA 表达时显示出强健的疾病抑制。通过进行限制性连续稀释来产生 TRMPV-Neo 克隆。附图 11A 包括一个图示,描述了这些体内 RNAi 以及 JQ1 实验。将 Tet-On 感受态白血病细胞用 TRMPV-Neo-shRNA 进行转导,接着进行 G418 选择,并且随后移植进入经亚致死剂量照射的受体小鼠中。疾病起始时 (典型的是在五或六天后通过生物发光成像来确定),通过在饮水与食物中补充强力霉素来诱导 shRNA 表达。利用生物发光成像、总存活数以及 dsRed 阳性细胞定量来对动物疾病负荷进行评估。附图 11B 包括经强力霉素处理的白血病克隆的 FACS 图。这些结果证实了这些细胞群体中高百分数的 Venus+/dsRed+ 细胞。经鉴别的克隆是 > 99.9% 阳性,尽管 TRMPV-Neo 池典型地是 ~ 85% Venus+/dsRed+ (参见附图 12)。附图 11C 包括白血病负荷的生物发光图像。在疾病起始后 (移植后第 5-6 天) 给予强力霉素。附图 11D 包括一个图,显示了强力霉素处理之后的生物发光成像响应的定量。标明了每一处理方式中的小鼠的数目并且误差棒表示 s. e. m.。附图 11E 包括一个图,显示了用标明的 TRMPV-shRNA 白血病克隆进行了移植的受体小鼠的卡普兰 - 迈耶存活曲

[0043] (Kaplan-Meier survival curve)。强力霉素处理的间隔通过箭头标明。克隆的 shBrd4 疾病的总存活得益是 9-10 天,而非克隆的池的存活中值是 4 天。附图 11F 包括晚期病变的经强力霉素处理的小鼠中的供体衍生 (CD45. 2+) 骨髓细胞的流式细胞计量术图。显示的门 (gate) 包括 dsRed+/shRNA+ 细胞。

[0044] 附图 12A-12I 显示 Brd4 对于体内白血病进展是需要的。附图 12A 包括在疾病起始 (即,移植后六天) 时给予强力霉素的小鼠的生物发光图像。第零天是给予强力霉素的第一天。附图 12B 包括一个图,显示了强力霉素给予之后的生物发光成像响应的定量。所显示的是四个重复小鼠的平均值。附图 12C 包括一个图,显示了用标明的 TRMPV-shRNA 白血病细胞系进行了移植的受体小鼠的卡普兰 - 迈耶存活曲线。强力霉素给予的周期通过箭头标明。利用时序检验 () 计算相对于靶向海肾荧光素酶的 shRNA (shRen) 的统计显著性; * $p = 0.0001$, ** $p < 0.0001$ 。附图 12D 包括晚期病变的给予强力霉素的小鼠中供体衍生的 (CD45. 2 阳性) 骨髓细胞的流式细胞计量术。显示的门 (gate) 包括 dsRed 阳性 /shRNA 阳性细胞。附图 12E 包括一个图,显示了 CD45. 2 阳性晚期白血病负荷中的 dsRed 阳性 /shRNA 阳性百分数的定量。附图 12F 包括用 JQ1 (50mg/kg/d) 或 DMSO 载体处理的 MLL-AF9/Nras^{G12D} 白血病受体小鼠的生物发光图像。附图 12G 包括一个图,显示了对 JQ1 处理响应的生物发光成像的定量。所显示的是 6 只经 DMSO 处理的以及 7 只经 JQ1 处理的小鼠的平均值。利用双尾学生氏配对 t 检验 (two-tailed Student's paired t-test) 计算 p 值。附图 12H 包括一个图,显示了对照以及 JQ1 处理小鼠的卡普兰 - 迈耶存活曲线。利用时序检验计算统计显著性。在 12F、12G 以及 12H 中,JQ1 处理在移植 50,000 白血病细胞之后的第 1 天开始。附图 12I 包括一个图,显示了在已建立疾病中对 JQ1 处理响应的生物发光成像的定量。

用 500,000 白血病细胞对小鼠进行移植,接着在移植后 6 天开始处理,此时可 以对疾病进行首次成像。所显示的是 6 只经 DMSO 处理的以及 7 只经 JQ1 处理的小鼠的平均值。利用双尾学生氏配对 t 检验计算 p 值。显示的所有误差棒表示 s. e. m. 。

[0045] 附图 13A-13E 显示,在已建立的 MLL-AF9/NrasG12D 白血病中 100mg/kg/d 以及 50mg/kg/d 的 JQ1 处理展现单药 (single agent) 活性。附图 13A 包括用 100mg/kg/d JQ1 处理的白血病小鼠的生物发光图像。用 1 百万白血病细胞对小鼠进行移植,接着在第 4 天开始处理 (此时通过成像疾病变得可见)。附图 13B 包括的图显示了生物发光图像的定量。(每一组中 $n = 8$)。误差棒表示 s. e. m. 。附图 13C 包括一个图,显示了对照以及 JQ1 处理小鼠的卡普兰 - 迈耶存活曲线。在移植后第 4 天开始处理 (由水平线标明)。利用时序检验计算统计显著性。附图 13D 包括用 50mg/kg/d JQ1 处理的白血病小鼠的生物发光图像。用 500,000 白血病细胞对小鼠进行移植,接着在第 6 天开始处理 (此时通过成像疾病变得可见)。定量显示于附图 12I 中。附图 13E 包括一个图,显示了对照以及附图 13D 中所示的 JQ1 处理小鼠的卡普兰 - 迈耶存活曲线。在移植后第 6 天开始处理 (由水平线标明)。利用时序检验计算统计显著性。

[0046] 附图 14A-14C 显示, JQ1 在 AML1-ET09a/Nras^{G12D}/p53^{-/-} AML 小鼠模型中展示出单药抗白血病活性。附图 14A 是一个显示了实验策略的图示。将 p53^{-/-} HSPC 与 AML1-ET09a 以及萤光素酶 IRES-NrasG12D 构建体进行共转导,接着将细胞移植进入经亚致死剂量辐射的受体小鼠中。如已经在前所述,小鼠高外显率地死于 AML (Dick, J. E., 《血液》(Blood) 2008 ; 112 :4793-807)。将从垂死小鼠得来的脾脏白血病材料移植进入次级受体动物中。在 5 天的发病 (通过生物发光成像来确定) 后,开始 50mg/kg/d JQ1 处理。附图 14B 包括在标明的时间点处的白血病小鼠的生物发光图像。附图 14C 包括一个图,显示了对 JQ1 处理响应的生物发光成像的定量。所显示的是每一处理组中 8 只小鼠的平均值,误差棒表示利用双尾学生氏配对 t 检验计算 p 值。

[0047] 附图 15 包括的图显示了 JQ1 处理对外周造血细胞计数的影响。用 JQ1 (50 或 100mg/kg/d) 或 DMSO 载体 (400ul/d) 对健康 C57BL/6 小鼠进行处理,两者都是通过腹 膜内注射进行给予持续 20 天。通过下颌下出血来收集外周血液并且利用 Hemavet 950 分析器 (Drew Scientific 公司) 进行分析。各值表示 3 只重复小鼠的平均值 ;误差棒表示 s. e. m. 。

[0048] 附图 16 包括细胞染色,显示了 20 天的 JQ1 给予对正常骨髓造血作用具有最小影响。在骨髓分析之前,对健康 C57BL/6 小鼠进行处理,每天腹腔内注射 50mg/kg 或 100mg/kg JQ1,持续 20 天。经载体或 JQ1 处理的小鼠的胸骨髓的 H&E 染色组织病理学显示出正常的细胞性以及正常的混合造血作用。每个处理组 $n = 3-5$ 只小鼠。显示了代表性图像。

[0049] 附图 17A 以及 17B 显示每日的 JQ1 给予对正常造血作用具有最小影响。在骨髓 FACS 分析之前,对健康 C57BL/6 小鼠进行处理,每天注射 50mg/kg 或 100mg/kg JQ1,持续 20 天。附图 17A 包括骨髓细胞的代表性 FACS 图,显示了用于区分 Lin⁻、ckit⁺ 细胞 (LK 祖细胞) 以及 Lin⁻Scal⁺ckit⁺ (LSK 干细胞) 并且对它们的百分数进行定量的设门。附图 17B 包括的图显示了总共的针对标明的抗体进行了染色的骨髓细胞的百分数。($n = 3$)。误差棒表示 s. e. m. 。

[0050] 附图 18A-18I 显示 Brd4 抑制导致骨髓分化以及白血病干细胞消耗。附图 18A 以及 18B 包括光学显微镜图像,显示了 2 天的强力霉素诱导的 shRNA 表达或 2 天的 100nM JQ1 处

理之后的梅格二氏 (May-Grunwald) / 吉姆萨染色的 MLL-AF9/Nras^{G12D} 白血病细胞。shRNA 表达是在经 TRMPV 转导的白血病细胞里进行诱导。利用 40X 物镜进行成像。附图 18C 以及 18D 包括 4 天的 shRNA 表达或 2 天的 100nM JQ1 处理之后, Mac-1 以及 c-kit 表面表达的 FACS 图。附图 18E-18H 包括基因集合富集分析 (GSEA) 图, 评估了 Brd4 抑制时巨噬细胞以及 LSC 基因标志的变化。在附图 18E 以及 18G 中, 在 2 天的强力霉素诱导之后, 从分选的 dsRed+/shRNA+ 细胞 (Ren vs 三种不同的 Brd4shRNA) 获得用于表达阵列的 RNA。在附图 18F 以及 18H 中, 从用 DMSO 或 100nM JQ1 处理 2 天的白血病细胞获得微阵列数据。NES = 归一化的富集分数。FDR $q\text{-val}$ = 假发现率 q 值, 它是具有给定 NES 的基因集合表示假阳性结果的概率。附图 18I 包括显示 RT-qPCR 结果的图。进行 RT-qPCR 来分析在 2 天的强力霉素诱导的 shRNA 表达或 2 天的 100nM JQ1 处理之后参与巨噬细胞功能的基因。shRNA 表达是利用 TRMPV 载体来进行诱导。对于 shRNA 实验而言, 将 dsRed+/shRNA+ 进行了 FACS 分选以制备 RNA。显示的 Brd4shRNA 数据是 Brd4.552、1448 以及 2097shRNA 样品的平均值。将信号归一化为 GAPDH, 对照样品设置为 1。(n = 3)。误差棒表示 s. e. m.。

[0051] 附图 19 包括 GSEA 图, 显示了 JQ1 在 THP-1 人类 AML 细胞中引发与在鼠 MLL-AF9/Nras^{G12D} AML 模型中类似的基因表达变化模式。在收集 RNA 之前, 用 250nM JQ1 处理 THP-1 细胞持续 48 小时。利用 Affymetrix 人类基因 ST 1.0 阵列进行表达阵列。进行 GSEA 以评估 Brd4 抑制时巨噬细胞、LSC 以及 Myc 基因标志的变化, 如所示。

[0052] 附图 20A-20H 显示 JQ1 在白血病细胞中抑制 Myc 通路。附图 20A 和 20B 包括的图显示在利用 JQ1 处理 48 小时之后, 小鼠 (附图 20A) 或人 (附图 20B) 中的相对 Myc RNA 水平的 RT-qPCR 结果。将结果归一化为 GAPDH, 将未处理细胞中的 RNA 水平设置为 1 (n = 3)。附图 20C 包括全细胞裂解物的蛋白质印迹, 该全细胞裂解物是从用 DMSO 或 250nM JQ1 处理了 48 小时的 MLL-AF9/Nras^{G12D} 白血病细胞而制备。附图 20D 包括显示 RT-qPCR 结果的图。在用 250nM JQ1 处理 MLL-AF9/Nras^{G12D} 白血病细胞之后, 在标明的时间点进行 RT-qPCR。将结果归一化为 GAPDH, 将未处理细胞中的 mRNA 水平设置在 1 (n = 3)。附图 20E 包括显示 ChIP-qPCR 结果的图。用标明的抗体以及引物位置在 MLL-AF9/Nras^{G12D} 白血病细胞中进行 ChIP-qPCR (就 DMSO 而言, n = 6; 就 JQ1 处理而言, n = 4)。TSS = 转录起始位点。附图 20F 包括全细胞裂解物的蛋白质印迹, 该全细胞裂解物是从用空载体或包含 Myc cDNA 的 MSCV 逆转录病毒进行了转导的 MLL-AF9/Nras^{G12D} 白血病细胞而制备。将细胞用 DMSO 或 250nM JQ1 处理 48 小时。附图 20G 包括一个图, 显示了在用空载体或 Myc-cDNA 进行了转导的 MLL-AF9/Nras^{G12D} 白血病细胞中, 在 30 分钟脉冲之后 BrdU 掺入的定量。以标明的浓度将细胞用 JQ1 处理 5 天。(n = 3)。附图 20H 包括梅格二氏 / 吉姆萨染色 的 MLL-AF9/Nras^{G12D} 白血病细胞的光学显微镜图像, 这些细胞用空载体或包含 MyccDNA 的载体进行了转导。将细胞用 50nM JQ1 处理 5 天。显示了在 40X 物镜获取的代表性图像。显示的所有误差棒表示 s. e. m.。

[0053] 附图 21A-21D 显示经由 shRNA 的 Brd4 敲低导致 Myc 水平的下调以及 Myc 靶标基因表达的下调。附图 21A 和 21B 包括的图显示了 Brd4 (附图 21A) 以及 Myc (附图 21B) mRNA 水平的 RT-qPCR 分析结果, 这些 mRNA 从经分选的用标明的 TtTMPV-shRNA 构建体进行了转导的 TurboRFP+ (shRNA 表达) 白血病细胞制备而来。将细胞用强力霉素处理 3 天。结果归一化至 GAPDH。附图 21C 包括从 Brd4-shRNA 表达细胞制备的提取物的蛋白质印迹。使用经 TRMPV 转导的 MLL-AF9/Nras 白血病克隆。将细胞用强力霉素处理 3 天。附图 21D 包括

GSEA 图,评估了 Myc 下游靶标基因表达的变化。微阵列数据获自在附图 21A 中描述的 RNA 样品。Myc 靶标基因集合已经在先前得以描述 (Kim 等人,《细胞》(Cell) 2010 ;143 :313-24 ;以及 Schuhmacher 等人,《核酸研究》(Nucleic Acids Res) 2001 ;29 :397-406)。

[0054] 附图 22 显示 JQ1 引发 Myc 靶标基因表达的下调。附图 22 包括 GSEA 图,评估了 JQ1 诱导的 Myc 下游基因标志的变化。从用 DMSO 或 100nM JQ1 处理 48 小时的 MLL-AF9/Nras^{G12D} 白血病细胞获得微阵列数据。

[0055] 附图 23A 和 23B 显示,48 小时的 JQ1 处理在白血病细胞中选择性地抑制 Myc 表达。附图 23A 和 23B 包括显示 RT-qPCR 结果的图。进行 RT-qPCR 以确定小鼠 (附图 23A) 或人类 (附图 23B) 细胞系中的 Myc RNA 水平。将结果归一化为 GAPDH,将未处理细胞中的 RNA 水平设置在 1 (n = 3)。误差棒表示 s. e. m.。

[0056] 附图 24A-24D 显示了逆转录病毒的 Myc 过表达对白血病细胞 JQ1 敏感性的影响。附图 24A 包括用于 Myc 过表达的逆转录病毒载体的图示。附图 24B 包括显示 RT-qPCR 结果的图。进行 RT-qPCR 以对用 JQ1 处理白血病细胞 5 天时的巨噬细胞相关基因进行评估,这些白血病细胞过表达 Myc 或空载体对照。n = 3。误差棒表示 s. e. m.。附图 24C 包括一个图,显示了在 50nM JQ1 或 DMSO 载体对照的存在下,对照以及 Myc 转导的 MLL-AF9/Nras^{G12D} 白血病细胞中的累积细胞数目。附图 24D 包括一个图,显示了在第 4 天的经 JQ1 处理的细胞的细胞死亡定量。通过 FACS 对 PI+ 细胞进行定量 (n = 3)。误差棒表示 s. e. m.。

[0057] 附图 25A-25D 显示 Myc 过表达阻止 Brd4shRNA 诱导的细胞周期停滞以及巨噬细胞分化。附图 25A 包括代表性流式细胞计量术图,显示了 MLL-AF9/Nras^{G12D} 白血病培养细胞的细胞周期 (BrdU/DAPI 双染色) 分析,这些培养细胞是用 MSCV-Myc 或空载体连同 TtTMPV 条件型 shRNA 载体一起进行了共转导并且随后用嘌呤霉素以及 G418 进行了选择。将细胞用强力霉素处理 3 天以诱导 shRNA 表达。在 dsRed+/shRNA+ 细胞上对各事件设门。附图 25B 包括的图显示了 shRNA+/dsRed+ 群体中 BrdU 掺入的定量。n = 3。误差棒表示 s. e. m.。附图 25C 包括梅格二氏 / 吉姆萨染色的 MLL-AF9/Nras^{G12D} 白血病细胞的光学显微镜图像。给予强力霉素处理持续 2 天。用 40X 物镜获取图像。附图 24D 包括显示 RT-qPCR 结果的图。进行 RT-qPCR 以评估用 MSCV-Myc 或空 MSCV 载体转导的 Tet-On 感受态白血病细胞中在 2.5 天的强力霉素诱导的 Brd4-shRNA 表达之后与巨噬细胞相关的基因。使用 TtTMPV 载体来表达 shRNA。n = 3。误差棒表示 s. e. m.。

[0058] 附图 26A-26C 显示大部分的经 JQ1 诱导的基因表达变化是 Myc 抑制的次级效应。将经 MSCV-Myc 或空载体对照转导的 MLL-AF9/Nras^{G12D} 白血病细胞用 100nM JQ1 处理 48 小时,接着收集 RNA 用于表达微阵列分析。附图 26A 包括 mRNA 的相对丰度的行归一化 (row-normalized) 的热量图 (heat map) 表示,这些 mRNA 对根据其在 JQ1 处理后的空载体对照白血病细胞中是上调 (左) 还是下调 (右) 2 倍而选择的基因进行编码。在此利用的适度水平的 Myc 过表达在 JQ1 处理之前影响基因表达。附图 26B 包括热量图表示,显示了 Myc 过表达对标明的基因集合的基因表达变化的影响。附图 26A 以及 26B 中的色度指示行归一化的表达值。附图 26C 包括的图显示了 JQ1 诱导的基于与 Myc 表达关系的基因表达变化的分类。如果在对照细胞的 JQ1 处理之后表达改变 2 倍的基因仍能够在用 MSCV-Myc 转导的白血病细胞中表达改变 2 倍,则将它们归类为 Myc 独立性的。如果基因在 JQ1 处理的 MSCV-Myc 细胞中未能表达改变 2 倍,则将它们分类为 Myc 依赖性的。

[0059] 附图 27A-27D 显示, Myc 的 shRNA 敲低抑制 MLL-AF9/Nras^{G12D} 白血病发展并且引发终末骨髓分化。附图 27A 包括一个图, 显示了当将 LMN-shRNA 转导进入 MLL-AF9/Nras^{G12D} 白血病细胞系时的细胞生长抑制。将 GFP% 的相对改变通过流式细胞计量术经 6 天进行监测并且用作对细胞生长抑制的测量。附图 27B 包括 FACS 图, 显示了在转染后第 4 天, 经 LMN 转导的白血病细胞的 c-kit 以及 Mac-1 的表面表达。在 dsRed+/shRNA+ 细胞上对所有事件设门。附图 27C 包括 2 天的强力霉素诱导的 TRMPV-shRNA 表达之后, 梅格二氏 / 吉姆萨染色的克隆的 MLL-AF9/Nras^{G12D} 白血病细胞的光学显微镜图像。附图 28D 包括显示 RT-qPCR 结果的图。进行 RT-qPCR 来分析在 2 天的强力霉素诱导的 shRNA 表达之后参与巨噬细胞功能的基因。shRNA 表达是利用 TRMPV 载体来进行诱导。将信号归一化为 GAPDH, 对照样品设置为 1。(n = 3)。误差棒表示 s. e. m.。

[0060] 附图 28A 以及 28B 显示相对于其他细胞类型, Brd4 并没有在 AML 中一致性地过表达。附图 28A 和 28B 包括显示 RT-qPCR 结果的图。对标明的小鼠 (附图 28A) 或人类 (附图 28B) 细胞系进行 RT-qPCR。结果归一化至 GAPDH。n = 3。误差棒表示 s. e. m.。

[0061] 附图 29A 和 29B 显示在 小鼠中 (+)-JQ1 的药物代谢动力学研究结果。附图 29A 包括药物代谢动力学数据以及测量参数的表。在单次腹膜内注射 (+)-JQ1 (50mg/kg) 进入成年 C1 雄性小鼠中以后, 在预先规定的时间点, 如所示, 通过三重的四极 LCMS-MS (API-2000) 来测量血浆药物浓度。以这一剂量给予 (+)-JQ1 产生极好的峰血浆浓度 (C_{max} > 20uM) 以及总药物接触 (AUC > 20,000h*ng/mL)。BQL 表示其中 (+)-JQ1 超出该药物代谢动力学检测测定的可定量极限 (1.00ng/mL) 的样品。附图 29B 包括一个图, 显示了使用附图 29A 中列出的数据得到的 (+)-JQ1 的血浆浓度 - 时间曲线。数据表示平均测量并且误差棒表示标准差, 两者都来自一式三份的独立测量。体外观察到的生物活性浓度 (100nM; 水平红线) 以上的药物血浆浓度通过外推法观察了 10 小时以上。

[0062] 附图 30A-30C 显示抑制 Brd4、Myb 以及 MLL-AF9 (伴随这三个因子抑制时 Myc 的下调) 时引起的广泛重叠的转录效应。附图 30A 包括 GSEA 图, 评估了 MLL-AF9 以及 Myb 下游的转录标志。基于 Tet-Off 介导的 MLL-AF9 下调或 Myb shRNA 敲低时的倍数变化, 利用 RMA 分别将 MLL-AF9_500 以及 Myb 500 定义为前 500 下调的基因。该 500 基因截取相应于 Log₂ 倍数变化, 对 Myb 而言是 -1.17 并且对 MLL-AF9 而言是 -1.77。附图 30B 包括标明的微阵列重复中 Myc 表达的热度图表示。利用 Limma 算法, 补充地利用 Bioconductor, 来计算 Log₂ 倍数变化以及 adj. P. Val。附图 30C 包括显示 RT-qPCR 结果的图。进行 RT-qPCR 来验证 JQ1 处理不影响 Hoxa7、Hoxa9 以及 Meis1 的表达, 它们是经良好确立的 MLL-AF9 的直接靶标。这表示 Brd4 抑制不抵消 MLL-AF9 的总体功能, 但是却抑制一大子集的其他下游靶标, 例如 Myc。n = 3。误差棒表示 s. e. m.。

[0063] 定义

[0064] 所谓“试剂 (agent)”意味着任何小分子的化学化合物、抗体、核酸分子、或多肽、或其片段。

[0065] 如在此所使用的, 术语“烷基 (alkyl)”意味着饱和的直链或支链非环烃, 该烃典型地具有 1-10 个碳原子。代表性的饱和的直链烷基包括甲基、乙基、正丙基、正丁基、正戊基、正己基、正庚基、正辛基、正壬基以及正癸基; 而饱和的支链烷基包括异丙基、仲 - 丁基、异丁基、叔 - 丁基、异戊基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、

2-甲基己基、3-甲基己基、4-甲基己基、5-甲基己基、2,3-二甲基丁基、2,3-二甲基戊基、2,4-二甲基戊基、2,3-二甲基己基、2,4-二甲基己基、2,5-二甲基己基、2,2-二甲基戊基、2,2-二甲基己基、3,3-二甲基戊基、3,3-二甲基己基、4,4-二甲基己基、2-乙基戊基、3-乙基戊基、2-乙基己基、3-乙基己基、4-乙基己基、2-甲基-2-乙基戊基、2-甲基-3-乙基戊基、2-甲基-4-乙基戊基、2-甲基-2-乙基己基、2-甲基-3-乙基己基、2-甲基-4-乙基己基、2,2-二乙基戊基、3,3-二乙基己基、2,2-二乙基己基、3,3-二乙基己基等。包括在本发明的化合物中的烷基基团可以是未经取代的、或可任选地经一个或多个取代基取代,诸如氨基、烷氨基、芳氨基、杂芳氨基、烷氧基、烷硫基、氧基、卤素、酰基、硝基、羟基、氰基、芳基、杂芳基、烷芳基、烷基杂芳基、芳氧基、杂芳氧基、芳硫基、杂芳硫基、芳氨基、杂芳氨基、碳环基、碳环氧基、碳环硫基、碳环氨基、杂环基、杂环氧基、杂环氨基、杂环硫基等。对于本发明的化合物而言典型地优选低级烷基。

[0066] 所谓“改变(alteration)”意味着通过标准技术已知的方法(如在此描述的方法)检测的基因或多肽的表达水平或活性的变化(增加或减少)。如在此所使用的,改变包括表达水平的10%变化,优选是表达水平的25%的变化、更优选是40%的变化、以及最优选是50%或更大的变化。

[0067] 所谓“改善(ameliorate)”是指减少、抑制、减弱、减小、阻滞、或稳定疾病的发展或进展。

[0068] 所述的“类似物(analog)”意味着不是相同的但是具有类似的功能或者结构特征的分子。例如,多肽类似物保留了对应的天然存在的多肽的至少一些生物活性,同时相对于天然存在的多肽具有增强其功能的某些生物化学修饰。这样的生物化学修饰可以增加其蛋白酶抗性、膜通透性或半衰期,而不改变,例如,配体结合。类似物可以包括非天然氨基酸。

[0069] 如在此所使用的,术语“芳族环(aromatic ring)”或“芳基(aryl)”意味着单环或多环的芳族环或者包括碳和氢原子的环基团。适合的芳基基团的实例包括,但并不局限于,苯基、甲苯基、蒽基、茆基、茛基、萘基、萘基、和萘基、以及苯稠合的碳环部分,如5,6,7,8-四氢萘基。芳基基团可以是未经取代的或可任选地经一个或多个取代基取代,例如,在此所描述的用于芳基基团的取代基(包括但并不局限于烷基(优选是低级烷基或者经一个或多个卤素取代的烷基)、羟基、烷氧基(优选是低级烷氧基)、烷硫基、氰基、卤素、氨基、硼酸($-B(OH)_2$)、以及硝基)。在某些实施方案中,芳基基团是单环,其中该环包括6个碳原子。

[0070] 所谓“溴基结构域(bromodomain)”意味着识别乙酰化的赖氨酸残基的多肽的一部分。在一个实施方案中,BET家族成员多肽的溴基结构域包括大约110个氨基酸并且共享一种保守的折叠,该折叠包括被不同的环区连接的四个 α 螺旋的一种左旋束,这些环区与染色质相互作用。

[0071] 所谓“BET家族多肽(BET family polypeptide)”意味着包括两个溴基结构域和一种额外末端(ET)结构域的多肽或其片段,其具有转录调控活性或乙酰化的赖氨酸结合活性。示例性的BET家族成员包括BRD2、BRD3、BRD4以及BRDT。

[0072] 所谓“BRD2多肽(BRD2 polypeptide)”意味着与能够结合染色质或者调控转录的NP_005095具有至少85%同一性的蛋白质或其片段。

[0073] 一个示例性的BRD2多肽的序列如下:

[0074] MLQNVTPHNKLPGEAGNAGLLGLGPEAAAPGKRIRKPSLLYEGFESPTMASVPALQLTPANPPPPEVSN

PK

[0075] KPGRVTNQLQYLHKVVMKALWKHQFAWPFRQPVDVAVKLGLPDYHKI IKQPMDMGT IKRRLENNYYWAA
SE

[0076] CMQDFNTMFTNCYIYNKPTDDIVLMAQTLEKIFLQKVASMPQEEQELVVTIPKNSHKKGAKLAALQGS
VT

[0077] SAHQVPAVSSVSHTALYTPPPEIPTTVLNIPHPSVISSPLLKSLHSAGPPLLAVTAAPPAQPLAKKKG
VK

[0078] RKADTTTPTPTAILAPGSPASPPGSLEPKAARLPPMRRESGRPIKPPRKDLPSQQQHQSCKGKLSE
QL

[0079] KHCNGILKELLSKKHAAYAWPFYKPVDAALGLHDYHDI IKHPMDLSTVKKRMENRDYRDAQEFAADV
RL

[0080] MFSNCYKYNPPDHDVVAMARKLQDVFEFVRYAKMPDEPLEPGPLPVSTAMPPGLAKSSSESSESSESSSE
SS

[0081] SEEEEEDEEDEEEEESESSDSEEEERHRLAELQEQLRAVHEQLAALSQGPISKPKRKREKKEKKKKR
KA

[0082] EKHRGRAGADEDDKGPRAPRPPQPKSKKASGSGGSAALGPSGFGPSGGSGTKLPKKATKTAPPALP
TG

[0083] YDSEEEEESRPMSYDEKRQLSLDINKLPGEKLGRVVHIIQAREPSLRDSNPEEIEIDFETLKPSTLRE
LE

[0084] RYVLSCLRKPKRPYTIKKPVGKTKEELALEKKRELEKRLQDVSGQLNSTKKPPKKANEKTESSSAQQ
VA

[0085] VSRLSASSSSSDSSSSSSSSSSSDTSDSDSG

[0086] 所谓“BRD2 核酸分子 (BRD2 nucleic acid molecule)”意味着对 BRD2 多肽或其
片段进行编码的多核苷酸。

[0087] 所谓“BRD3 多肽 (BRD3 polypeptide)”意味着与能够结合染色质或者调控转录的
NP_031397.1 具有至少 85% 同一性的蛋白质或其片段。

[0088] 一个示例性的 BRD3 多肽的序列如下：

[0089] 1 mstattvapa gipatpgpvn ppppevsnp kprgrktnqlq ymqnvvvktl wkhqfawpfy

[0090] 61 qpvdaiaklnl pdyhkiiknp mdmgtikkrl ennywsase cmqdfntmft ncyiynkptd

[0091] 121 divlmaqale kiflqkvaqm pquevellpp apkgkgrkpa agaqsagtqq vaavssvspa

[0092] 181 tpfqsvpptv sqtpviaatp vptitanvts vpvppaaapp ppatpivpvv pptppvvkkk

[0093] 241 gvkrkadttt pttsaitasr sesppplsdp kqakvvarre sggrpikppk kdledgevpq

[0094] 301 hagkkkgklse hlrycdsilr emlskkhaay awpfykpvda ealelhdyhd iikhpmdlst

[0095] 361 vkrkmdgrey pdaqgfaadv rlmfsncyky nppdhevvam arklqdvfem rfakmpdepv

[0096] 421 eapalpapaa pmvskgaess rsseessds gssdseeera trlaelqeql kavheqlaal

[0097] 481 sqapvnkppk kkekkekek kkdkekek hkvaeeek akvappakqa qqkkaakka

[0098] 541 nstttagrql kkgkqasas ydseeeeegl pmsydekrql sldinrlpge klgrvvhiiq

[0099] 601 srepslrdsn pdeieidfet lkpttlrele ryvksclqkk qrkpfsasgk kqaakskeel

[0100] 661 aqekkkerek rlqdvsgqls sskkparkek pgsapsggps rlsssssses gsssssgsss

[0101] 721 dssdse

[0102] 所谓“Brd3 核酸分子 (Brd3 nucleic acid molecule)”意味着对 BRD3 多肽进行编码的多核苷酸。

[0103] 所谓“BRD4 多肽 (BRD4 polypeptide)”意味着与能够结合染色质或者调控转录的 NP_055114 具有至少 85% 同一性的蛋白质或其片段。

[0104] 1 msaesgpgtr lrnlpvmgdg letsqmsttq aqaqpqpana astnppppet snpnkpkqrt

[0105] 61 nqlqyllrvv lktlwkhqfa wpfqqpvдав klnlpdyki iktpmdmgti kkrlennyyw

[0106] 121 naqeciqlfn tmftncyiyn kpgddivlma ealeklflqk inelpteete imivqakgrg

[0107] 181 rgrketgtak pgvstvpntt qastppqtqt pqnpppvqa tphpfpavtp dliqvtpvmt

[0108] 241 vvppqplqtp ppvppqpqp papapqvqs hppiiaatpq pvkttkkgvkr kadtttptti

[0109] 301 dpiheppslp pepkttklgq rressrpvkp pkkdvpdsq hpapeksskv seqlkccsgi

[0110] 361 lkemfakkha ayawpfykpv dvealglhdy cdiikhpm dm stiksklear eyrdaqefga

[0111] 421 dvrlmfsncy kynppdhev amarklqdvf emrfakmpde peepvvavss pavppptkvv

[0112] 481 appsssdsss dssdsdsst ddseeeraqr laelqeqlka vheqlaalsq pqqnkpkkke

[0113] 541 kdkkekkkek hkrkeeven kksakeppp kktkknssn snvskkepap mkskppptye

[0114] 601 seedckckpm syeekrqlsl dinklpgekl grvvhiqsr epslksnpd eieidfetlk

[0115] 661 pstlrelery vtsclrkrk pqaekvdvia gsskmkgfss sesesssess ssdsedsetg

[0116] 721 pa

[0117] 所谓“Brd4 核酸分子 (Brd4 nucleic acid molecule)”意味着对 BRD4 多肽进行编码的多核苷酸。

[0118] 所谓“BRDT 多肽 (BRDT polypeptide)”意味着与能够结合染色质或者调控转录的 NP_001717 具有至少 85% 同一性的蛋白质或其片段。

[0119] 1 mslpsrqtai ivnppppeyi ntkkngrltn qlqylqkvvl kdlwkhsfsw pfqrpvdavk

[0120] 61 lqlpdytiii knpmdlntik krlenkyyak ascedfnt mfsncylynk pgddivlmaq

[0121] 121 aleklfmqkl sqmpqeeqv gvkerikkgt qqniavssak eksspsatek vfkqqeipsv

[0122] 181 fpktsispln vvqgasvnss sqtaaavtkg vkrkadttt atsavkasse fsptfteksv

[0123] 241 alppikenmp knvlpdsqqq ynvvktvkvt eqlrhcseil kemlakkhfs yawpfynpvd

[0124] 301 vnalglhnyy dvvknpmldg tikekmdnqe ykdaykfaad vrlmfmncyk ynppdhevvt

[0125] 361 marmlqdvfe thfskipiep vesmplcyik tditettgre ntneassegn ssddsederv

[0126] 421 krlaklqeql kavhqqqlvl sqvpfrklk kkekskkek kekvnnsnen prkmceqmrl

[0127] 481 kekskrnqpk krkqqfiglk sedednakpm nydekrqlsl ninklpgdkl grvvhiqsr

[0128] 541 epslsnsnpd eieidfetlk astlreleky vsaclrkrpl kppakkimms keelhsqkkq

[0129] 601 elekrllldvn nqlnsrkrqt ksdktqpska venvsrlses sssssssses essssdlsss

[0130] 661 dssdsesemf pkftevkpnd spskenvkkm knecilpegr tgvvtqigycv qdtttsanttl

[0131] 721 vhttpshvm ppnhhqlafn yqelehlqtv knisplqilp psgdseqsln gitvmhpsgd

[0132] 781 sdttmlseec qapvqkdiki knadswkslg kpvkpsgvmk ssdelfnqfr kaaiekevka

[0133] 841 rtqelirkhl eqntkelkas qenqrldng ltvesfsnki qnkcsgeeqk ehqqsseaqd

[0134] 901 ksklwlldkr dlarqkeqer rrreamvgti dmtlqsdimt mfennfd

[0135] 所谓“BRDT 核酸分子 (BRDT nucleic acid molecule)”意味着对 BRDT 多肽进行

编码的多核苷酸。

[0136] 关于手性中心的命名,术语“d”以及“l”构型正如国际理论与应用化学联合会(IUPAC)所定义的。关于术语非对映异构体、消旋体、差向异构体以及对映异构体,这些将在它们通常的语境中使用以便描述制品的立体化学。

[0137] 所谓“化合物(compound)”意味着任何小分子的化学化合物、抗体、核酸分子、或多肽、或其片段。

[0138] 在本公开中,“包括(comprises、comprising)”、“包含(containing)”以及“具有(having)”等具有美国专利法指定的意义并且意味着“包括(includes、including)”等;“基本上由...组成(consisting essentially of 或 consists essentially)”同样具有美国专利法指定的意义并且该术语是开放性的,允许超出所叙述的存在,只要所叙述的基本或新特征不被超过叙述的存在改变,但是排除现有技术实施方案。

[0139] 所谓“计算机建模(computer modeling)”意味着应用计算程序确定以下一项或多项:配体对于结合部分的定位和结合邻近,被结合配体占用的空间,结合部分与配体之间的互补接触表面的量,给定配体对结合部分进行结合的变形能,以及配体与结合部分之间的氢键能、范德华相互作用、疏水性相互作用、和/或静电相互作用能的一些估算。计算机建模还可以提供模型系统与候选化合物的特征比较。例如,计算机建模实验可以比较本发明的一个药效团模型与一个候选化合物,以便评估该候选化合物与该模型的适宜性。

[0140] 所谓“计算机可读媒介(computer readable media)”意味着可以被计算机直接读取并且存取例如从而使得该媒质适合于在以上提到的计算机系统中使用的任何媒质。该媒质包括,但并不局限于,磁存储媒质如软磁盘、硬磁盘存储媒质以及 磁带;光存储媒质如光盘或只读光盘(CD-ROM);电存储媒质如RAM和只读存储器(ROM);以及这些分类的混合体如磁/光存储媒质。

[0141] 所谓“计算机系统(computer system)”意味着用于分析原子坐标数据的硬件装置、软件装置以及数据存储装置。本发明的基于计算机的最小硬件装置包括中央处理器(CPU)、输入装置、输出装置以及数据存储装置。理想的是,提供一个监视器对结构数据进行可视化。该数据存储装置可以是随机存取存储器(RAM)或者对本发明的计算机可读媒质进行存取的装置。这样的系统的实例是从Silicon Graphics Incorporated公司以及Sun Microsystems公司可得到的运行基于Unix的,Windows NT或IBM OS/2的操作系统的微型计算机工作站。

[0142] “检测(detect)”指的是识别有待检测的分析物的存在、缺乏或者量。

[0143] 所谓“可检测的标记物(detectable label)”意味着一种组合物,当把该组合物连接到一个感兴趣的分子时,使后者变成通过光谱、光化学、生物化学、免疫化学、或化学的手段可检测的。例如,有用的标记物包括放射性同位素、磁珠、金属珠、胶粒、荧光染料、高电子密度试剂、酶(例如,如通常在酶联免疫吸附试验(ELISA)中所使用的)、生物素、异羟基洋地黄毒甙元、或半抗原。

[0144] 术语“非对映异构体(diastereomers)”指的是具有两个或更多个不对称中心并且其分子不是彼此镜像的立体异构体。

[0145] 所谓“疾病(disease)”意味着损害或妨碍细胞、组织、或器官正常功能的任何违和或失调。易于用在此描述的化合物进行治疗的疾病的实例包括白血病以及相关的失调

(例如,急性髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性髓性白血病(CML)、慢性粒单核细胞白血病(CMML)、嗜酸细胞性白血病、毛细胞性白血病、何杰金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、非何杰金氏淋巴瘤、骨髓增生障碍或骨髓增生异常综合征)。

[0146] 所谓“有效量(effective amount)”意味着相对于未治疗的病人,改善疾病的症状所需的药剂的量。用于实施本发明以治疗性地处理疾病的一种或多种活性化合物的有效量随给药方式,受试者的年龄、体重以及总体健康状况而变化。最终地,主治医生或者兽医会决定适当的量以及给药方案。这样的量被指为“有效(effective)”量。

[0147] 术语“对映异构体(enantiomers)”是指一种化合物的两种互为不能重叠的镜像的立体异构体。两种对映异构体的等摩尔混合物称为“消旋混合物”或者“消旋体”。

[0148] 所谓“适宜性(fitting)”意味着通过自动、或半自动的手段确定试剂分子的一个或多个原子与 BET 家族成员的一个或多个原子或结合位点(例如, BRD2、BRD3、BRD4 以及 BRDT 的溴基结构域)的相互作用,并且确定这种相互作用稳定的程度。用于适宜性的不同的基于计算机的方法在此进一步地描述。

[0149] 所谓“片段(fragment)”意味着多肽或者核酸分子的一部分。这一部分包含,优选地,参考核酸分子或多肽的整个长度的至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、或 90%。一个片段可以包含 10、20、30、40、50、60、70、80、90,或 100、200、300、400、500、600、700、800、900,或 1000 个核苷酸或氨基酸。

[0150] 术语“卤烷基(haloalkyl)”旨在包括以上定义的,经卤素单、双或多取代的烷基基团,例如氟甲基以及三氟甲基。

[0151] 术语“卤素(halogen)”是指 -F、-Cl、-Br 或 -I。

[0152] 术语“杂芳基(heteroaryl)”指的是芳族的 5-8 元单环、8-12 元双环、或 11-14 元三环环系统,如果是单环则具有 1-4 个环杂原子,如果是双环则具有 1-6 个杂原子,或如果是三环则具有 1-9 个杂原子,所述杂原子选自 O、N、或 S,并且剩余环原子是碳。杂芳基基团可以可任选地经一个或多个如在此描述的用于芳基基团的取代基取代。杂芳基基团的实例包括,但并不局限于,吡啶基、呋喃基、苯并二氧杂环戊烯基、噻吩基、吡咯基、噁唑基、噁二唑基、咪唑基、噻唑基、异噁唑基、喹啉基、吡唑基、异噻唑基、哒嗪基、嘧啶基、吡嗪基、三嗪基、三唑基、噻二唑基、异喹啉基、吡啶基、苯丙噁唑基、苯并呋喃基、吡啶并吡啶基、四唑基、苯并咪唑基、苯并噻唑基、苯并噻二唑基、苯并噁二唑基、以及吡啶基。

[0153] 如在此所使用的术语“杂原子(heteroatom)”是指除了碳或氢之外的任何元素的原子。优选杂原子是氮、氧、硫以及磷。术语“同分异构体(isomers)”或者“立体异构体(stereoisomers)”指的是具有相同的化学构成,但是原子或基团的空间安排不同的化合物。

[0154] 如在此所使用的术语“杂环的(heterocyclic)”指的是在一个环状结构内包含除了碳之外的至少一个原子(例如,S、O、N)的有机化合物。这些有机化合物中的该环状结构可以是芳族的或者,在某些实施方案中,是非芳族的。杂环部分的一些实例包括,但并不局限于,吡啶、嘧啶、吡咯烷、呋喃、四氢呋喃、四氢噻吩、以及二噁烷。

[0155] “杂交(hybridization)”意味着互补核碱基之间的氢键合,该氢键合可以为沃森-克里克(Watson-Crick)、霍氏(Hoogsteen)或反霍氏(reversed Hoogsteen)氢键合。

例如,腺嘌呤和胸腺嘧啶是通过氢键的形成进行配对的互补核碱基。

[0156] 术语“羟基 (hydroxyl)”意味着 -OH。

[0157] 所谓“抑制性核酸”意味着一种双链 RNA、siRNA、shRNA、或反义 RNA、或其部分、或其模拟物,当将其给予哺乳动物细胞时,导致靶基因表达的下降(例如,下降 10%、25%、50%、75%、或者甚至 90-100%)。典型地,核酸抑制剂包含靶标核酸分子的至少一部分或其直向同源物,或者包含靶标核酸分子的互补链的至少一部分。例如,一条抑制性核酸分子包括在此描绘的任何或所有核酸的至少一部分。

[0158] 所谓“分离的多核苷酸 (isolated polynucleotide)”意味着脱离了基因的核酸(例如, DNA),该基因在衍生出本发明的核酸分子的有机体的天然存在的基因组中。因此该术语包括,例如,重组 DNA,该重组 DNA 合并进入载体、自主复制质粒或病毒、或原核生物或真核生物的基因组 DNA,或者该重组 DNA 作为不依赖于其他序列的分离的分子存在(例如,通过聚合酶链反应 (PCR) 或限制性内切核酸酶消化产生的 cDNA 或者基因组的或 cDNA 的片段。此外,该术语包括从 DNA 分子转录的 RNA 分子,以及对另外的多肽序列进行编码的杂合基因的一部分的重组 DNA。

[0159] 所谓“分离的多肽 (isolated polypeptide)”意味着本发明的从天然伴随它的组分中分离的多肽。典型地,当该多肽以重量计为至少 60%时,将它从它天然关联的蛋白质和天然存在的有机分子中分离。优选地,制品是以重量计至少 75%、更优选是至少 90%、并且最优选是至少 99%的本发明的多肽。本发明的分离的多肽可以,例如,通过从天然源提取、对这样的多肽进行编码的重组核酸的表达、或化学合成蛋白质而得到。可以通过任何适当的方法测量纯度,例如,柱色谱法、聚丙烯酰胺凝胶电泳、或高效液相色谱 (HPLC) 分析。

[0160] 术语“同分异构体 (isomers)”或者“立体异构体 (stereoisomers)”指的是具有相同的化学构成,但是原子或基团的空间安排不同的化合物。

[0161] 术语“同位素衍生物 (isotopic derivatives)”包括化合物的衍生物,其中这些化合物中的一个或多个原子被这些原子的相应的同位素替换。例如,含有碳原子 (C^{12}) 的化合物的同位素衍生物可以是其中该化合物的该碳原子被 C^{13} 同位素替换的同位素衍生物。

[0162] 所谓“白血病细胞”意味着衍生自白血病的细胞。

[0163] 所谓“标记 (marker)”意味着在与疾病或失调相关联的表达水平或活性方面具有改变的任何蛋白质或多核苷酸。

[0164] 措辞“抑制癌细胞生长 (inhibiting the growth of a cancer cell)”包括放慢、中断、阻滞或停止其生长和转移并且不是必须地表明该生长的完全消除。

[0165] 在本发明的方法中有用的核酸分子包括对本发明的多肽或其片段进行编码的任何核酸分子。这样的核酸分子不需要与内源性核酸序列具有 100% 的同一性,但是将典型地表现出基本的同一性。与内源性序列具有“基本同一性 (substantial identity)”的多核苷酸典型地能够与双链核酸分子的至少一条链杂交。在本发明的方法中有用的核酸分子包括对本发明的多肽或其片段进行编码的任何核酸分子。这样的核酸分子不需要与内源性核酸序列具有 100% 的同一性,但是将典型地表现出基本的同一性。与内源性序列具有“基本同一性 (substantial identity)”的多核苷酸典型地能够与双链核酸分子的至少一条链杂交。所谓“杂交 (hybridize)”意味着在不同的严格条件下进行配对以便在互补的多核苷酸序列(例如,在此描述的基因)、或其部分之间形成双链分子。(例如,参见 Wahl, G. M. 和

S. L. Berger(1987)《酶学方法》(Methods Enzymol.)152 :399), Kimmel, A. R. (1987)《酶学方法》(Methods Enzymol.)152 :507)。

[0166] 如在此所使用的术语“光学异构体 (optical isomers)”包括互为不能重叠的镜像的分子,也被称为手性分子。

[0167] 在此使用的短语“肠胃外给药 (parenteral administration 和 administered parenterally)”意味着除了肠内以及局部给药之外的给药方式,通常是通过注射,并且包括但并不局限于,静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眼眶内、心内、真皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊髓内以及胸骨内注射以及输注。

[0168] 术语“多环基 (polycyclyl)”或者“多环的基团 (polycyclic radical)”指的是两个或更多个环的环基团 (例如,环烷基、环烯基、环炔基、芳基和 / 或杂环基),其中两个或更多个碳被两个邻接的环共用,例如,这些环是“稠环”。通过非相邻的原子连接的环称为“桥”环。多环的每个环可以经以上描述的取代基取代,例如,卤素、羟基、烷基羰基氧基、芳基羰基氧基、烷氧基羰基氧基、芳氧基羰基氧基、羧基、烷基羰基、烷氧基羰基、氨羰基、烷基硫羰基、烷氧基、磷酸根、膦酸基、亚膦酸基、氰基、氨基 (包括烷基氨基、二烷基氨基、芳氨基、二芳氨基、以及烷基芳氨基)、酰胺基 (包括烷基羰基氨基、芳基羰基氨基、氨基甲酰基以及脲基)、脒基、亚胺基、硫氢基、烷硫基、芳硫基、硫代羧酸根、硫酸根、磺酸基、氨磺酰基、亚磺酰氨基、硝基、三氟甲基、氰基、叠氮基、杂环基、烷基、烷基芳基、或芳族的或杂芳族的部分。

[0169] 如在此所使用的术语“多晶型 (polymorph)”指的是本发明的化合物或其络合物的固体晶型。相同化合物的不同多晶型表现出不同的物理、化学和 / 或光谱特性。不同的物理特性包括,但并不局限于,稳定性 (例如,对热或光)、可压缩性以及密度 (在配制和产品制造方面重要)、以及溶解速率 (能够影响生物可利用率)。稳定性的不同可由化学反应性 (例如,差分氧化,一种剂型当包括一种多晶型时比包括另一种多晶型褪色更快) 或力学特征 (例如,存储时破碎为动力学上有利的多晶型的片剂转化成热力学上更稳定的多晶型) 或两者 (例如,具有一种多晶型的片剂在高湿度时更容易断裂) 的变化引起。多晶型的不同的物理特性可以影响它们的加工。

[0170] 术语“药物前体 (prodrug)”包括具有可在体内代谢的部分的化合物。通常,药物前体在体内通过酯酶或者其他机制代谢为活性药物。药物前体的实例以及它们的应用在本领域是众所周知的 (参见,例如, Berge 等人 (1977) “药物盐 (Pharmaceutical Salts)”《药物科学杂志》(J. Pharm. Sci) 66 :1-19) 可以在化合物的最终分离和纯化时原位制备这些药物前体,或通过将经纯化的化合物以自由酸形式或羟基分开地与适合的酯化剂进行反应。通过用羧酸进行处理,可以将羟基基团转化成酯类。药物前体部分的实例包括经取代的和未经取代的、支链或无支链的低级烷基酯部分 (例如,丙酸酯类),低级烯基酯类,二 - 低级烷基 - 氨基低级烷基酯类 (例如,二甲基氨基乙基酯),酰氨基低级烷基酯类 (例如,乙酰氧基甲基酯),酰氧基低级烷基酯类 (例如,新戊酰氧基甲基酯),芳基酯类 (苯基酯),芳基 - 低级烷基酯类 (例如,苯甲基酯),经取代的 (例如,用甲基、卤素、或甲氧基取代基) 芳基和芳基 - 低级烷基酯类,酰胺类,低级烷基酰胺类,二 - 低级烷基酰胺类,以及羟基酰胺类。优选的药物前体部分是丙酸酯类和酰基酯类。也包括在体内通过其他机制转化成活性形式的药物前体。

[0171] 此外,横跨碳 - 碳双键的立体化学的表示也与通常的化学领域相反:“Z”指的是经

常被称为“顺式 (cis)” (相同侧) 的构象而“E”指的是经常被称为“反式 (trans)” (相反侧) 的构象。本发明的化合物包括这两种构型, 顺式 / 反式和 / 或 Z/E。

[0172] 所谓“减少 (reduces)”或“增加 (increases)”意味着相对于参考, 分别地至少大约 10%、25%、50%、75%、或 100% 的负的或正的改变。

[0173] 所谓“减少细胞存活 (reducing cell survival)”意味着相对于参考细胞, 抑制细胞的生存力或诱导细胞死亡。

[0174] 所谓“参考 (reference)”意味着标准或对照状况。

[0175] “参考序列 (reference sequence)”是定义的作为序列比较的基础的序列。参考序列可以是规定序列的子集或者整体, 例如全长 cDNA 或基因序列的区段、或者该完整的 cDNA 或基因序列。对多肽而言, 参考多肽序列的长度将通常是至少大约 16 个氨基酸, 优选地是至少大约 20 个氨基酸, 更优选地是至少大约 25 个氨基酸, 并且甚至更优选地是大约 35 个氨基酸、大约 50 个氨基酸、或大约 100 个氨基酸。对核酸而言, 参考核酸序列的长度将通常是至少大约 50 个核苷酸、优选地是至少大约 60 个核苷酸、更优选地是至少大约 75 个核苷酸、并且甚至更优选地是大约 100 个核苷酸或大约 300 个核苷酸或它们附近的或者它们之间的任一整数。

[0176] 所谓“均方根偏差 (root mean square deviation)”是指离均差的平方的算术平均数的平方根。

[0177] 使用序列分析软件 (例如, 威斯康星大学生物技术中心 (麦迪逊大学道 1710, 威斯康星州 53705 (1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705)) 遗传计算组的序列分析软件包, BLAST、BESTFIT、GAP、或 PILEUP/PRETTYBOX 程序) 典型地测量序列同一性。这种软件通过将同源性程度分配给不同的取代、缺失、和 / 或其他修饰进行相同或相似序列的匹配。保守取代典型地包括以下组内的取代: 甘氨酸、丙氨酸; 缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸; 天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺; 丝氨酸、苏氨酸; 赖氨酸、精氨酸; 以及苯丙氨酸、酪氨酸。在确定同一性程度的示例性方法中, 可以使用 BLAST 程序, 其中在 e^3 到 e^{-100} 之间的概率分数表示密切相关的序列。

[0178] 所谓“siRNA”意味着一种双链 RNA。最佳的, 一条 siRNA 是在长度上 18、19、20、21、22、23 或 24 个核苷酸并且在它的 3' 末端具有 2 个碱基突出。这些 dsRNA 可以被引入单个细胞或整个动物中; 例如, 它们可以经由血流被全身性地引入。此类 siRNA 用于下调 mRNA 水平或者启动子活性。

[0179] 所谓“特异性结合 (specifically binds)”意味着一种化合物或抗体识别并且结合本发明的多肽, 但是基本上并不识别并且结合天然地包括本发明的多肽的试样 (例如, 生物试样) 中的其他分子。

[0180] 所谓“受试者 (subject)”意味着哺乳动物, 包括但并不局限于, 人或非人类的哺乳动物, 如牛、马、犬、绵羊、或猫。

[0181] 所谓“基本上同一的 (substantially identical)”意味着相对于参考氨基酸序列 (例如, 在此描述的任一氨基酸序列) 或核酸序列 (例如, 在此描述的任一核酸序列), 一种多肽或核酸分子表现出至少 85% 的同一性。优选地, 相对于用于比较的序列, 这样的序列在氨基酸水平或核酸上为至少 85%、90%、95%、99% 或甚至 100% 的同一。

[0182] 术语“巯基 (sulfhydryl 或 thiol)”意味着 -SH。

[0183] 如在此所使用的,术语“互变异构体 (tautomers)”指的是通过互变异构化容易地进行相互转化的有机分子的同分异构体,其中氢原子或质子在该反应中迁移,在一些场合伴随着单键与相邻双键的转换。

[0184] 本发明提供了多个对于开发高特异性药物是有用的靶标以便治疗以在此描述的方法为特征的失调。此外,本发明的方法提供了一种容易的手段以便识别安全用于受试者的疗法。此外,本发明的方法提供了以高体积通量、高灵敏度以及低复杂度实际上地分析任何数量的用于作用于在此描述的疾病的化合物的通路。

[0185] 如在此所使用的术语,“预防 (prevent、preventing、prevention)”、“预防性治疗 (prophylactic treatment)”等指的是减少失调或违和在受试者中的发展的可能性,该受试者没有失调或违和,但是有发展失调或违和的风险或者容易发展失调或违和。

[0186] “有效量 (effective amount)”指的是对经治疗的受试者产生治疗作用的化合物的量。这种治疗效果可以是客观的 (即通过一些测试或标记是可测量的) 或主观的 (即受试者给出了作用的指征或感觉到了作用)。在此描述的化合物的有效量可以在每千克体重大约 1mg 到大约 5000mg 的范围内。有效剂量还会根据给药通路,以及与其他药剂共同使用的可能性而改变。

[0187] 将在此提供的范围理解为该范围内的所有值的简略表达。例如,将 1 至 50 的范围理解为包括下组的任一数、数的组合、或者下组的子范围,该组由以下各项组成: 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、或 50。

[0188] 如在此所使用的术语“治疗 (treat、treating、treatment 等)”指的是减少或改善失调和 / 或与其相关联的症状。所谓“改善 (ameliorate)”是指减少、抑制、减弱、减小、阻滞、或稳定疾病的发展或进展。将被理解的是,尽管不能排除,治疗失调或违和并不要求完全地消除该失调、违和或与其相关联的症状。

[0189] 除非明确声明或从上下文显而易见,如在此所使用的,术语“或 (or)”被理解为包括在内。除非明确声明或从上下文显而易见,如在此所使用的,术语“一个、一种 (a、an)”、“和”和“该 (the)”被理解为单一的或复数的。

[0190] 除非明确声明或从上下文显而易见,如在此所使用的,术语“大约 (about)”被理解为在本领域的正常容差范围内,例如,在平均数的 2 标准差之内。大约可以被理解为在声明值的 10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、或 0.01% 之内。除非从上下文显而易见,在此提供的所有数值被该术语大约修饰。

[0191] 在此的变量的任何定义中的一系列化学基团的陈述包括该变量作为任何单个基团或所列出基团的组合的定义。在此针对变量或方面的实施方案的陈述包括该实施方案作为任何单个的实施方案或与任何其他实施方案或其部分的组合。

[0192] 在此提供的任何组合物或方法可以与在此提供的一个或多个任何其他组合物和方法进行组合。

[0193] 发明的详细说明

[0194] 本发明特征是有用于治疗白血病以及相关的失调 (例如,急性髓性白血病 (AML)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、急性淋巴细胞白血病 (ALL)、慢性髓性白血病 (CML)、慢性粒单核细胞白血病 (CMML)、嗜酸细胞性白血病、毛细胞性白血病、何杰金氏淋巴瘤、多发性骨髓

瘤、非何杰金氏淋巴瘤、骨髓增生障碍或骨髓增生异常综合征)的组合物和方法。

[0195] 本发明至少部分基于抑制 Brd4 的试剂的发现,这些试剂有用于抑制急性髓性白血病的发展或进展。该抑制可以包括抑制 Myc 的活性。这些发现还突出了 RNAi 筛选作为发现平台用于揭示癌症中用于直接药理学介入的表观遗传缺陷的功用。

[0196] 如在下文详细报告的,使用无偏性的方法对急性髓性白血病 (AML) (一种与异常染色质相关联的、攻击性的造血系统恶性肿瘤) 中的表观遗传缺陷进行探测,从而得到了 Brd4 的抑制对治疗白血病有用的发现。通过筛选专门的靶向在遗传上定义的白血病中已知的染色质调节子的 shRNA 文库,包含溴基结构域的蛋白 Brd4 被鉴别为一种对 AML 疾病维持而言的关键性需求。使用 shRNA 或小分子抑制剂 JQ1 对 Brd4 的抑制导致体外和体内的强健的抗 - 白血病效应,伴随着终末髓细胞样分化和白血病干细胞 (LSC) 的消除。这些效应归因于在维持 Myc 基因表达和促进异常自我更新中需要 Brd4。

[0197] 含有溴基结构域的蛋白质

[0198] 基因调控基本上被可逆的、非共价的大分子组装控制。至 RNA 聚合酶的信号转导要求更高级的蛋白质复合体,该复合体被能够解释染色质的翻译后修饰状态的组装因子在空间上调控。表观遗传读出物是结构上不同的蛋白质,各自具有一个或多个进化上保守的效应物模块,该效应物模块识别组蛋白或 DNA 的共价修饰。组蛋白尾上的赖氨酸残基的 ϵ -N-乙酰化 (Kac) 与开放的染色质构造以及转录激活相关联 (Marushige 等人,《美国科学院院刊》(Proc Natl Acad Sci U S A),73,3937-3941, (1976))。乙酰基 - 赖氨酸的背景特异的分子识别主要由溴基结构域介导。

[0199] 作为转录因子复合体 (TAF1、PCAF、Gcn5 以及 CBP) 的组分以及表观遗传记忆的决定子,含有溴基结构域的蛋白质有重要的生物学意义 (Dey 等人,《分子生物细胞学》(Mol Biol Cell),20,4899-4909, (2009))。有含有总共 57 种不同的溴基结构域的 41 种人类蛋白质。尽管大量序列不同,但所有的溴基结构域共享一种保守的折叠,该折叠包括由确定底物特异性的不同环区 (ZA 与 BC 环) 连接的四个 α 螺旋 (α_Z 、 α_A 、 α_B 、 α_C) 的一种左旋束。具有肽底物的共晶体结构表明乙酰基 - 赖氨酸被一种中心疏水腔识别并且通过与存在于大多数溴基结构域中的天冬酰胺残基的氢键得以锚定 (Owen, D. J. 等人,通过组蛋白乙酰转移酶 gcn5p 的溴基结构域识别乙酰化的组蛋白 H4 的结构基础,《欧洲分子生物学组织杂志》(Embo J),19,6141-6149, (2000))。溴基结构域和额外末端 (BET) 家族 (BRD2、BRD3、BRD4 以及 BRDT) 共享一种共同结构域构造以及一种更趋异的 C 端募集结构域,该共同结构域构造包括表现高水平的序列保守性的两个 N 端溴基结构域 (Zeng 等人,《欧洲生物化学学会联盟通讯》(FEBS Lett),513,124-128, (2002))。

[0200] 本发明特征在于用于抑制人类溴基结构域蛋白质的组合物和方法。

[0201] 本发明的化合物

[0202] 本发明提供了多种化合物 (例如, JQ1 和具有在此描述的化学式的化合物),这些化合物结合在 BET 家族成员 (例如 BRD2、BRD3、BRD4) 的第一溴基结构域的 apo 晶体结构的结合袋中。不希望受理论的约束,这些化合物可以特别有效地抑制白血病,包括但不限于急性髓性白血病 (AML)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、急性淋巴细胞白血病 (ALL)、慢性髓性白血病 (CML)、慢性粒单核细胞白血病 (CMML)、嗜酸细胞性白血病、毛细胞性白血病、何杰金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、非何杰金氏淋巴瘤、骨髓增生障碍或骨髓增生异常综合征。在

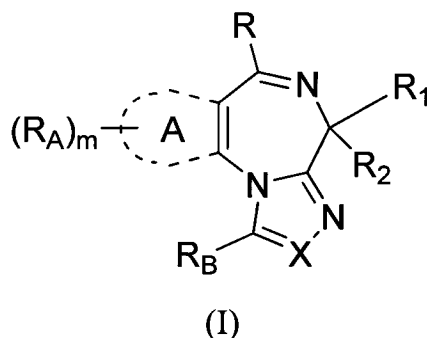
一种方法中,使用分子对接程序对有利于治疗白血病以及相关的失调的化合物进行选择,以鉴别预期结合到溴基结构域结构结合袋的化合物。在某些实施方案中,本发明的化合物可以阻止、抑制、或破坏、或减少 BET 家族成员(例如,BRD2、BRD3、BRD4、BRDT)的至少 10%、25%、50%、75%、或 100%的生物活性,和/或例如通过结合到溴基结构域 apo 结合袋内的结合位点破坏这类蛋白质的亚细胞定位。

[0203] 在某些实施方案中,本发明的化合物是小分子,其分子量小于大约 1000 道尔顿、小于 800、小于 600、小于 500、小于 400、或小于大约 300 道尔顿。本发明的化合物的实例包括 JQ1 和其他化合物,这些化合物结合到 BET 家族成员(例如,BRD4(下文指 BRD4(1);PDB ID 20SS))的第一溴基结构域的 apo 晶体结构的结合袋。JQ1 是一种新型的噻吩并-三唑并-1,4-二氮杂环庚烷。本发明进一步提供了这些化合物的药学上可接受的盐。

[0204] 在某些实施方案中,本发明的化合物是小分子,其分子量小于大约 1000 道尔顿、小于 800、小于 600、小于 500、小于 400、或小于大约 300 道尔顿。本发明的化合物的实例包括 JQ1 和其他化合物,这些化合物结合到 BET 家族成员(例如,BRD4(下文指 BRD4(1);PDB ID 20SS))的第一溴基结构域的 apo 晶体结构的结合袋。JQ1 是一种新型的噻吩并-三唑并-1,4-二氮杂环庚烷。本发明进一步提供了这些化合物的药学上可接受的盐。

[0205] 在一个方面,该化合物是具有化学式 I 的化合物:

[0206]



[0207] 其中

[0208] X 是 N 或 CR₅;

[0209] R₅ 是 H、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基,其中的每一个可任选地经取代;

[0210] R_B 是 H、烷基、羟烷基、氨基烷基、烷氧基烷基、卤烷基、羟基、烷氧基、或 -COO-R₃, 其中的每一个可任选地经取代;

[0211] 环 A 是芳基或杂芳基;

[0212] 每一个 R_A 独立地是烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基,其中的每一个可任选地经取代;或者任何两个 R_A 与各自附接的多个原子一起可以形成一个融合的芳基或杂芳基基团;

[0213] R 是烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基;其中的每一个可任选地经取代;

[0214] R₁ 是 -(CH₂)_n-L, 其中 n 是 0-3 并且并且 L 是 H、-COO-R₃、-CO-R₃、-CO-N(R₃R₄)、-S(O)₂-R₃、-S(O)₂-N(R₃R₄)、N(R₃R₄)、N(R₄)C(O)R₃、可任选地经取代的芳基、或可任选地经取代的杂芳基;

[0215] R₂ 是 H、D、卤素、或可任选地经取代的烷基;

[0216] 每一个 R₃ 独立地选自下组,该组由以下各项组成:

[0217] (i)H、芳基、经取代的芳基、杂芳基、或经取代的杂芳基；

[0218] (ii) 杂环烷基或经取代的杂环烷基；

[0219] (iii) $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 链烯基或 $-C_2-C_8$ 炔基，每一个包含 0、1、2、或 3 个选自 O、S、或 N 的杂原子； $-C_3-C_{12}$ 环烷基、经取代的 $-C_3-C_{12}$ 环烷基、 $-C_3-C_{12}$ 环烯基、或经取代的 $-C_3-C_{12}$ 环烯基，其中的每一个可以可任选地经取代；以及

[0220] (iv) NH_2 ， $N = CR_4R_6$ ；

[0221] 每一个 R_4 独立地是 H、烷基、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基，其中的每一个可任选地经取代；

[0222] 或将 R_3 和 R_4 与它们附接的氮原子一起以形成一个 4-10 元环；

[0223] R_6 是烷基、链烯基、环烷基、环烯基、杂环烷基、芳基、或杂芳基，其中的每一个可任选地经取代；或将 R_4 和 R_6 与它们附接的碳原子一起以形成一个 4-10 元环；

[0224] m 是 0、1、2、或 3；

[0225] 假设

[0226] (a) 如果环 A 是噻吩基，X 是 N，R 是苯基或经取代的苯基， R_2 是 H， R_B 是甲基，并且 R_1 是 $-(CH_2)_n-L$ ，其中 n 是 1 并且 L 是 $-CO-N(R_3R_4)$ ，那么不将 R_3 和 R_4 与它们附接的氮原子一起形成一个吗啉代环；

[0227] (b) 如果环 A 是噻吩基，X 是 N，R 是经取代的苯基， R_2 是 H， R_B 是甲基，并且 R_1 是 $-(CH_2)_n-L$ ，其中 n 是 1 并且 L 是 $-CO-N(R_3R_4)$ ，并且 R_3 和 R_4 之一是 H，那么 R_3 和 R_4 中的另一个不是甲基、羟乙基、烷氧基、苯基、经取代的苯基、吡啶基或经取代的吡啶基；并且

[0228] (c) 如果环 A 是噻吩基，X 是 N，R 是经取代的苯基， R_2 是 H， R_B 是甲基，并且 R_1 是 $-(CH_2)_n-L$ ，其中 n 是 1 并且 L 是 $-COO-R_3$ ，那么 R_3 不是甲基或乙基；

[0229] 或其一种盐、溶解物或水合物。

[0230] 在某些实施方案中，R 是芳基或杂芳基，其中的每一个可任选地经取代。

[0231] 在某些实施方案中，L 是 H、 $-COO-R_3$ 、 $-CO-N(R_3R_4)$ 、 $-S(O)_2-R_3$ 、 $-S(O)_2-N(R_3R_4)$ 、 $N(R_3R_4)$ 、 $N(R_4)C(O)R_3$ 或可任选地经取代的芳基。在某些实施方案中，每一个 R_3 独立地选自下组，该组由以下各项组成：H，包含选自 O、S、或 N 的 0、1、2 或 3 个杂原子的 $-C_1-C_8$ 烷基；或 NH_2 ， $N = CR_4R_6$ 。

[0232] 在某些实施方案中， R_2 是 H、D、卤素或甲基。

[0233] 在某些实施方案中， R_B 是烷基、羟烷基、卤烷基、或烷氧基；其中的每一个可任选地经取代

[0234] 在某些实施方案中， R_B 是甲基、乙基、羟甲基、甲氧基甲基、三氟甲基、 $COOH$ 、 $COOMe$ 、 $COOEt$ 、或 $COOCH_2OC(O)CH_3$ 。

[0235] 在某些实施方案中，环 A 是 5 或 6 元芳基或杂芳基。在某些实施方案中，环 A 是硫代呋喃基、苯基、萘基、联苯基、四氢萘基、茚满基、吡啶基、呋喃基、吡咯基、嘧啶基、哒嗪基、吡嗪基、咪唑基、噁唑基、噻吩基、噻唑基、三唑基、异噻唑基、喹啉基、吡咯基、吡嗪基、或 5, 6, 7, 8- 四氢异喹啉基。

[0236] 在某些实施方案中，环 A 是苯基或噻吩基。

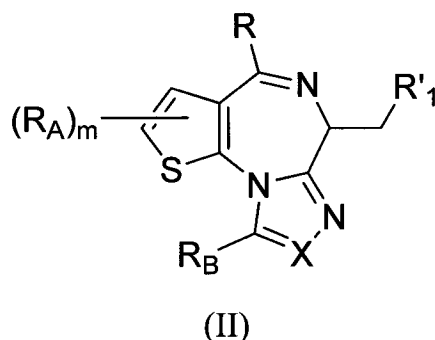
[0237] 在某些实施方案中，m 是 1 或 2，并且至少一次出现的 R_A 是甲基

[0238] 在某些实施方案中，每一个 R_A 独立地是 H、一个可任选地经取代的烷基，或任何两

个 R_A 与各自附接的多个原子一起可以形成一个芳基。

[0239] 在另一个方面,该化合物是具有化学式 II 的化合物:

[0240]



[0241] 其中

[0242] X 是 N 或 CR_5 ;

[0243] R_5 是 H、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基,其中的每一个可任选地经取代;

[0244] R_B 是 H、烷基、羟烷基、氨基烷基、烷氧基烷基、卤烷基、羟基、烷氧基、或 $-COO-R_3$, 其中的每一个可任选地经取代;

[0245] 每一个 R_A 独立地是烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基,其中的每一个可任选地经取代;或者任何两个 R_A 与各自附接的多个原子一起可以形成一个融合的芳基或杂芳基基团;

[0246] R 是烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基,其中的每一个可任选地经取代;

[0247] R'_1 是 H、 $-COO-R_3$ 、 $-CO-R_3$ 、可任选地经取代的芳基、或可任选地经取代的杂芳基;

[0248] 每一个 R_3 独立地选自下组,该组由以下各项组成:

[0249] (i) H、芳基、经取代的芳基、杂芳基、经取代的杂芳基;

[0250] (ii) 杂环烷基或经取代的杂环烷基;

[0251] (iii) $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 链烯基或 $-C_2-C_8$ 炔基,每一个包含 0、1、2、或 3 个选自 O、S、或 N 的杂原子; $-C_3-C_{12}$ 环烷基、经取代的 $-C_3-C_{12}$ 环烷基; $-C_3-C_{12}$ 环烯基、或经取代的 $-C_3-C_{12}$ 环烯基;其中的每一个可以可任选地经取代;

[0252] m 是 0、1、2、或 3;

[0253] 其条件是如果 R'_1 是 $-COO-R_3$, X 是 N, R 是经取代的苯基,并且 R_B 是甲基,那么 R_3 不是甲基或乙基;

[0254] 或其一种盐、溶解物或水合物。

[0255] 在某些实施方案中, R 是芳基或杂芳基,其中的每一个可任选地经取代。在某些实施方案中, R 是苯基或吡啶基,其中的每一个可任选地经取代。在某些实施方案中, R 是对 -Cl- 苯基、邻 -Cl- 苯基、间 -Cl- 苯基、对 -F- 苯基、邻 -F- 苯基、间 -F- 苯基或吡啶基。

[0256] 在某些实施方案中, R'_1 是 $-COO-R_3$ 、可任选地经取代的芳基、或可任选地经取代的杂芳基;并且 R_3 是 $-C_1-C_8$ 烷基,它包含 0、1、2、或 3 个选自 O、S、或 N 的杂原子,并且它可以可任选地经取代。在某些实施方案中, R'_1 是 $-COO-R_3$, 并且 R_3 是甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、仲丁基、或叔丁基;或 R'_1 是 H 或可任选地经取代的苯基。

[0257] 在某些实施方案中, R_B 是甲基、乙基、羟甲基、甲氧基甲基、三氟甲基、 $COOH$ 、 $COOMe$ 、 $COOEt$ 、 $COOCH_2OC(O)CH_3$ 。

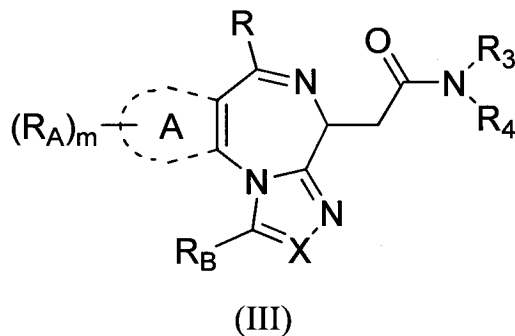
[0258] 在某些实施方案中, R_B 是甲基、乙基、羟甲基、甲氧基甲基、三氟甲基、 COOH 、 COOMe 、 COOEt 、或 $\text{COOCH}_2\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$ 。

[0259] 在某些实施方案中, 每一个 R_A 独立地是一个可任选地经取代的烷基, 或任何两个 R_A 与各自附接的多个原子一起可以形成一个融合的芳基。

[0260] 在某些实施方案中, 每一个 R_A 是甲基。

[0261] 在另一个方面, 该化合物是具有化学式 III 的化合物:

[0262]



[0263] 其中

[0264] X 是 N 或 CR_5 ;

[0265] R_5 是 H 、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基, 其中的每一个可任选地经取代;

[0266] R_B 是 H 、烷基、羟烷基、氨基烷基、烷氧基烷基、卤烷基、羟基、烷氧基、或 $-\text{COO}-R_3$, 其中的每一个可任选地经取代;

[0267] 环 A 是芳基或杂芳基;

[0268] 每一个 R_A 独立地是烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基, 其中的每一个可任选地经取代; 或者任何两个 R_A 与各自附接的多个原子一起可以形成一个融合的芳基或杂芳基基团;

[0269] R 是烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基, 其中的每一个可任选地经取代;

[0270] 每一个 R_3 独立地选自下组, 该组由以下各项组成:

[0271] (i) H 、芳基、经取代的芳基、杂芳基、或经取代的杂芳基;

[0272] (ii) 杂环烷基或经取代的杂环烷基;

[0273] (iii) $-\text{C}_1-\text{C}_8$ 烷基、 $-\text{C}_2-\text{C}_8$ 链烯基或 $-\text{C}_2-\text{C}_8$ 炔基, 每一个包含 0、1、2、或 3 个选自 O 、 S 、或 N 的杂原子; $-\text{C}_3-\text{C}_{12}$ 环烷基、经取代的 $-\text{C}_3-\text{C}_{12}$ 环烷基、 $-\text{C}_3-\text{C}_{12}$ 环烯基、或经取代的 $-\text{C}_3-\text{C}_{12}$ 环烯基, 其中的每一个可以可任选地经取代; 以及

[0274] (iv) NH_2 , $N = \text{CR}_4R_6$;

[0275] 每一个 R_4 独立地是 H 、烷基、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基, 其中的每一个可任选地经取代;

[0276] 或将 R_3 和 R_4 与它们附接的氮原子一起以形成一个 4-10 元环;

[0277] R_6 是烷基、链烯基、环烷基、环烯基、杂环烷基、芳基、或杂芳基, 其中的每一个可任选地经取代; 或将 R_4 和 R_6 与它们附接的碳原子一起以形成一个 4-10 元环;

[0278] m 是 0、1、2、或 3;

[0279] 假设:

[0280] (a) 如果环 A 是噻吩基, X 是 N , R 是苯基或经取代的苯基, R_B 是甲基, 那么不将 R_3

和 R_4 与它们附接的氮原子一起形成一个吗啉代环 ; 并且

[0281] (b) 如果 A 是噻吩基, X 是 N, R 是经取代的苯基, R_2 是 H, R_6 是甲基, 并且 R_3 和 R_4 之一是 H, 那么 R_3 和 R_4 中的另一个不是甲基、羟乙基、烷氧基、苯基、经取代的苯基、吡啶基或经取代的吡啶基 ; 以及

[0282] 或其一种盐、溶解物或水合物。

[0283] 在某些实施方案中, R 是芳基或杂芳基, 其中的每一个可任选地经取代。在某些实施方案中, R 是苯基或吡啶基, 其中的每一个可任选地经取代。

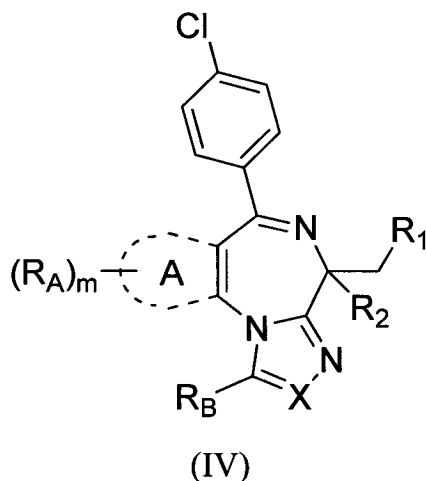
[0284] 在某些实施方案中, R 是对 -Cl- 苯基、邻 -Cl- 苯基、间 -Cl- 苯基、对 -F- 苯基、邻 -F- 苯基、间 -F- 苯基或吡啶基。在某些实施方案中, R_3 是 H、 NH_2 、或 $N = CR_6$ 。

[0285] 在某些实施方案中, 每一个 R_4 独立地是 H、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基 ; 其中的每一个可任选地经取代。

[0286] 在某些实施方案中, R_6 是烷基、链烯基、环烷基、环烯基、杂环烷基、芳基、或杂芳基, 其中的每一个可任选地经取代。

[0287] 在另一个方面, 该化合物是具有化学式 IV 的化合物 :

[0288]



[0289] 其中

[0290] X 是 N 或 CR_5 ;

[0291] R_5 是 H、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基, 其中的每一个可任选地经取代 ;

[0292] R_6 是 H、烷基、羟烷基、氨基烷基、烷氧基烷基、卤烷基、羟基、烷氧基、或 $-COO-R_3$, 其中的每一个可任选地经取代 ;

[0293] 环 A 是芳基或杂芳基 ;

[0294] 每一个 R_A 独立地是烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基, 其中的每一个可任选地经取代 ; 或者任何两个 R_A 与各自附接的多个原子一起可以形成一个融合的芳基或杂芳基基团 ;

[0295] R_1 是 $-(CH_2)_n-L$, 其中 n 是 0-3 并且 L 是 H、 $-COO-R_3$ 、 $-CO-R_3$ 、 $-CO-N(R_3R_4)$ 、 $-S(O)_2-R_3$ 、 $-S(O)_2-N(R_3R_4)$ 、 $N(R_3R_4)$ 、 $N(R_4)C(O)R_3$ 、可任选地经取代的芳基、或可任选地经取代的杂芳基 ;

[0296] R_2 是 H、D、卤素、或可任选地经取代的烷基 ;

[0297] 每一个 R_3 独立地选自下组, 该组由以下各项组成 :

[0298] (i)H、芳基、经取代的芳基、杂芳基、或经取代的杂芳基；

[0299] (ii) 杂环烷基或经取代的杂环烷基；

[0300] (iii) $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 链烯基或 $-C_2-C_8$ 炔基，每一个包含 0、1、2、或 3 个选自 O、S、或 N 的杂原子； $-C_3-C_{12}$ 环烷基、经取代的 $-C_3-C_{12}$ 环烷基、 $-C_3-C_{12}$ 环烯基、或经取代的 $-C_3-C_{12}$ 环烯基，其中的每一个可以可任选地经取代；以及

[0301] (iv) NH_2 ， $N = CR_4R_6$ ；

[0302] 每一个 R_4 独立地是 H、烷基、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基，其中的每一个可任选地经取代；

[0303] 或将 R_3 和 R_4 与它们附接的氮原子一起以形成一个 4-10 元环；

[0304] R_6 是烷基、链烯基、环烷基、环烯基、杂环烷基、芳基、或杂芳基，其中的每一个可任选地经取代；或将 R_4 和 R_6 与它们附接的碳原子一起以形成一个 4-10 元环；

[0305] m 是 0、1、2、或 3；

[0306] 假设

[0307] (a) 如果环 A 是噻吩基，X 是 N， R_2 是 H， R_B 是甲基，并且 R_1 是 $-(CH_2)_n-L$ ，其中 n 是 0 并且 L 是 $-CO-N(R_3R_4)$ ，那么不将 R_3 和 R_4 与它们附接的氮原子一起形成一个吗啉代环；

[0308] (b) 如果环 A 是噻吩基，X 是 N， R_2 是 H， R_B 是甲基，并且 R_1 是 $-(CH_2)_n-L$ ，其中 n 是 0 并且 L 是 $-CO-N(R_3R_4)$ ，并且 R_3 和 R_4 之一是 H，那么 R_3 和 R_4 中的另一个不是甲基、羟乙基、烷氧基、苯基、经取代的苯基、吡啶基或经取代的吡啶基；并且

[0309] (c) 如果环 A 是噻吩基，X 是 N， R_2 是 H， R_B 是甲基，并且 R_1 是 $-(CH_2)_n-L$ ，其中 n 是 0 并且 L 是 $-COO-R_3$ ，那么 R_3 不是甲基或乙基；或者

[0310] 其一种盐、溶解物或水合物。

[0311] 在某些实施方案中， R_1 是 $-(CH_2)_n-L$ ，其中 n 是 0-3 并且 L 是 $-COO-R_3$ 、可任选地经取代的芳基、或可任选地经取代的杂芳基；并且 R_3 是 $-C_1-C_8$ 烷基，它包含 0、1、2、或 3 个选自 O、S、或 N 的杂原子，并且它可以可任选地经取代。在某些实施方案中，n 是 1 或 2 并且 L 是烷基或 $-COO-R_3$ ，并且 R_3 是甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、仲丁基、或叔丁基；或 n 是 1 或 2 并且 L 是 H 或可任选地经取代的苯基。

[0312] 在某些实施方案中， R_2 是 H 或甲基。

[0313] 在某些实施方案中， R_B 是甲基、乙基、羟甲基、甲氧基甲基、三氟甲基、 $COOH$ 、 $COOMe$ 、 $COOEt$ 、 $COOCH_2OC(O)CH_3$ 。

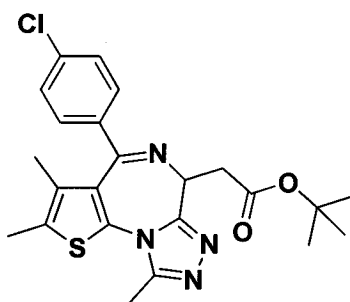
[0314] 在某些实施方案中，环 A 是苯基、萘基、联苯基、四氢萘基、茚满基、吡啶基、呋喃基、吡咯基、嘧啶基、哒嗪基、吡嗪基、咪唑基、噁唑基、噻吩基、噻唑基、三唑基、异噻唑基、喹啉基、吡咯基、吡唑基、或 5,6,7,8-四氢异喹啉基。

[0315] 在某些实施方案中，每一个 R_A 独立地是一个可任选地经取代的烷基，或任何两个 R_A 与各自附接的多个原子一起可以形成一个芳基。

[0316] 本发明的方法还涉及具有化学式 V-XXII 的化合物，并且涉及在此所述的任何化合物。

[0317] 在另一个方面，该化合物是由以下化学式表示的化合物：

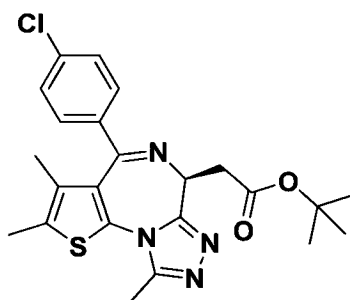
[0318]



[0319] 或其一种盐、溶解物或水合物。

[0320] 在某些实施方案中,该化合物是 (+)-JQ1 :

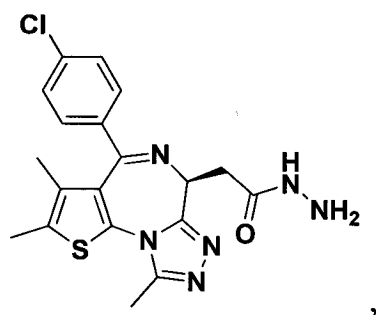
[0321]



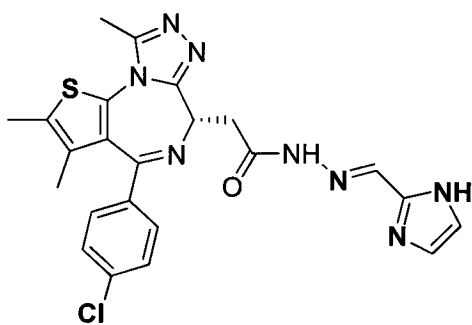
[0322] 或其一种盐、溶解物或水合物。

[0323] 在另一个方面,该化合物是由以下化学式表示的化合物 :

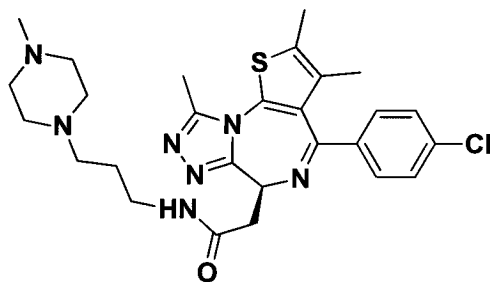
[0324]



[0325]

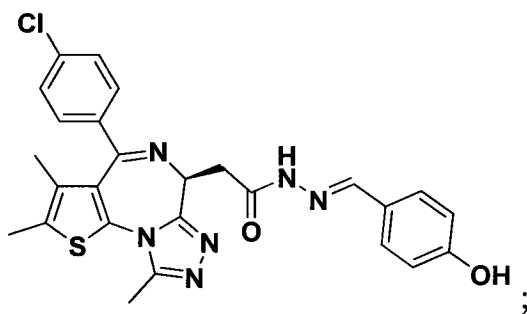


,



,

或

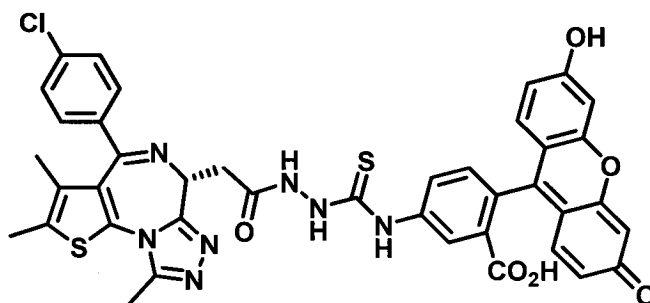


;

[0326] 或其一种盐、溶解物或水合物。

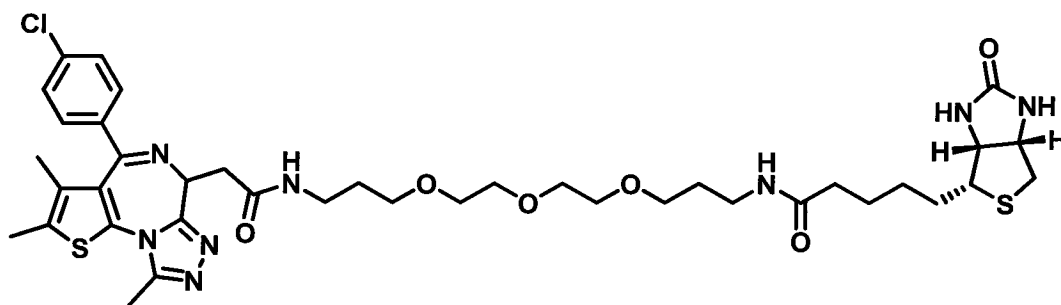
[0327] 在另一个方面,该化合物是由以下化学式表示的化合物:

[0328]



[0329]

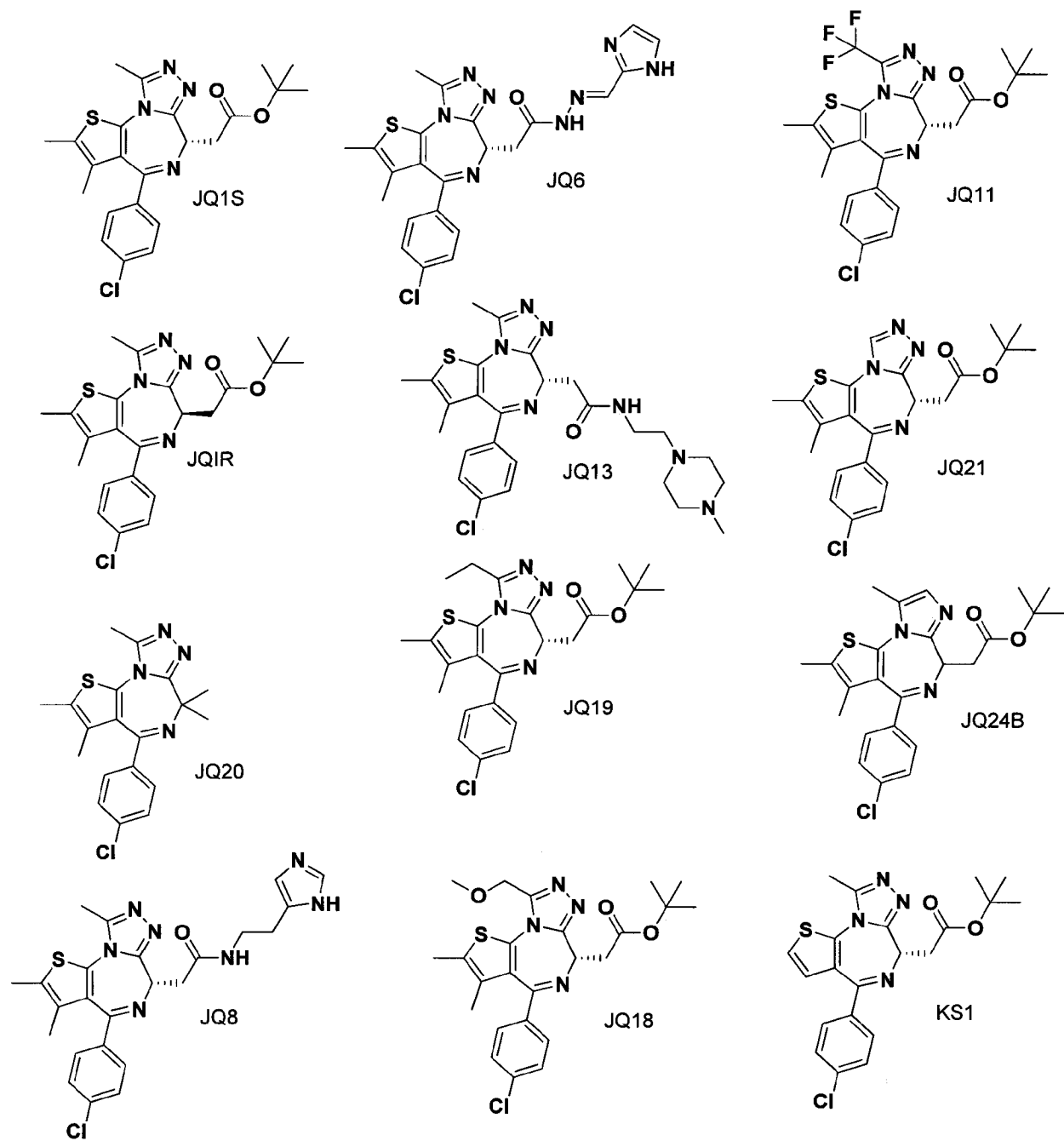
或



[0330] 或其一种盐、溶解物或水合物。

[0331] 在另一个方面中,该化合物是由以下化学式中任一个表示的化合物:

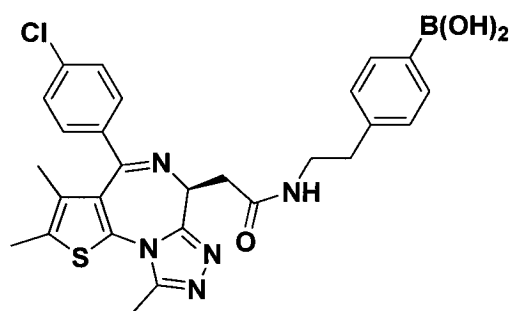
[0332]



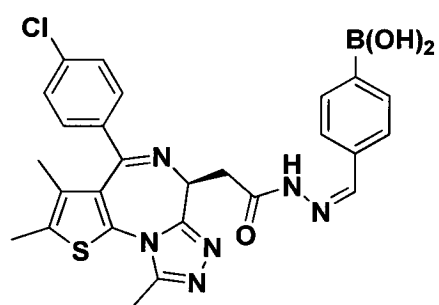
[0333] 或其一种盐、溶解物或水合物。

[0334] 在另一个方面中,该化合物是由以下化学式中任一个表示的化合物:

[0335]



或

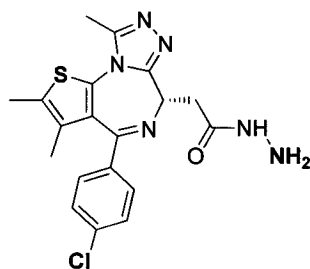
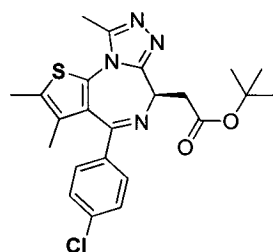
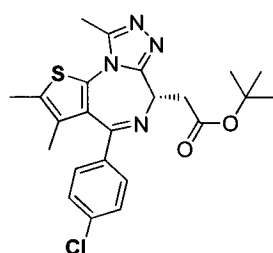


;

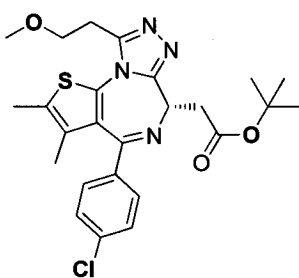
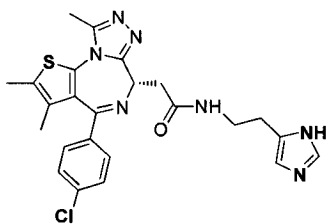
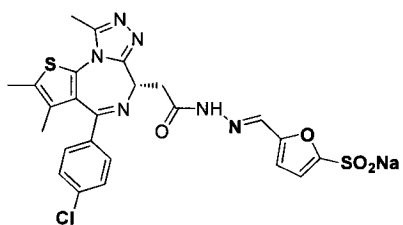
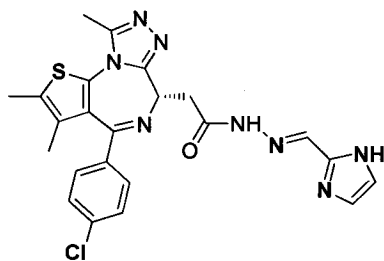
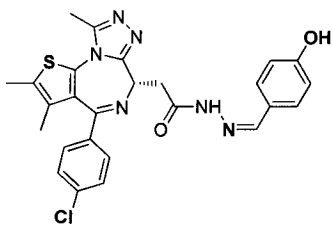
[0336] 或其一种盐、溶解物或水合物。

[0337] 在另一个方面中,该化合物是由以下结构中任一个表示的化合物:

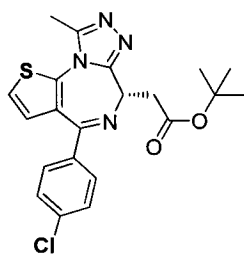
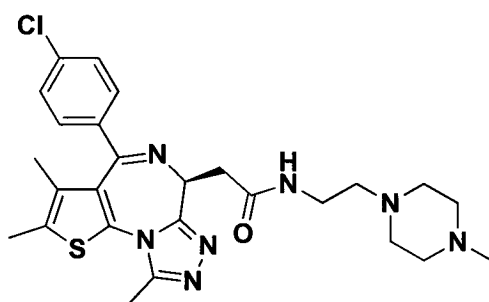
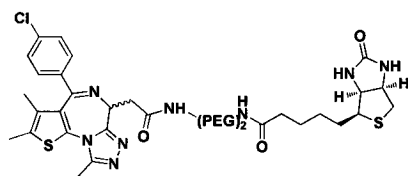
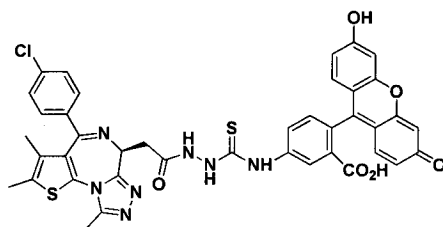
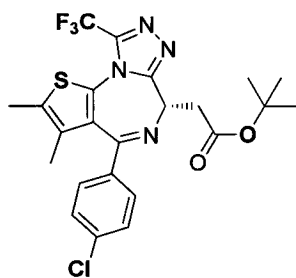
[0338]



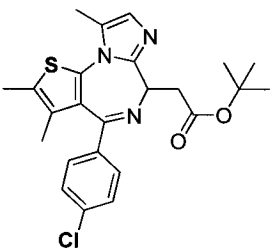
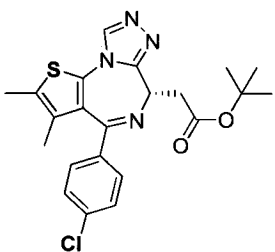
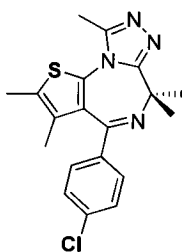
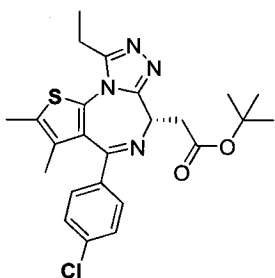
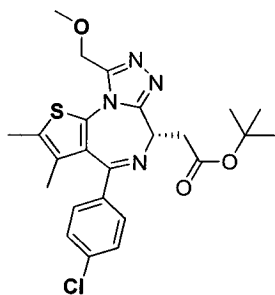
[0339]



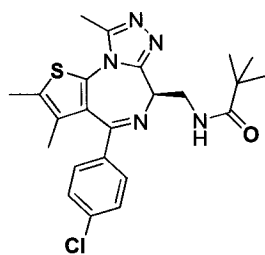
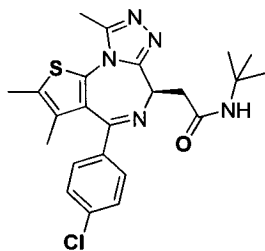
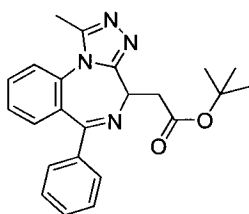
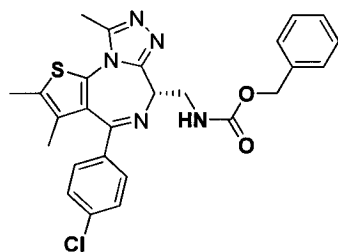
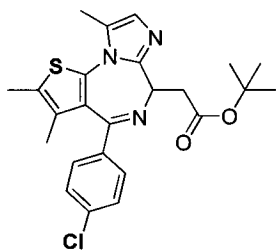
[0340]



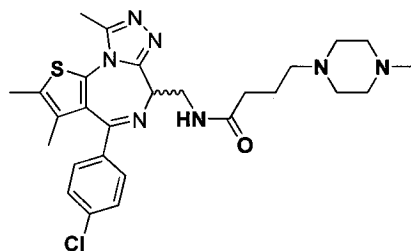
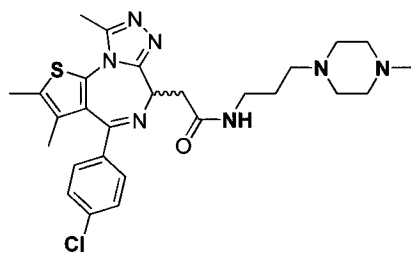
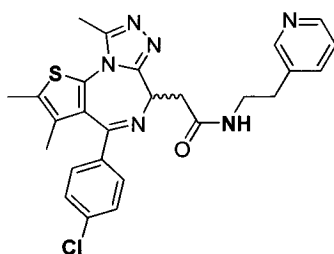
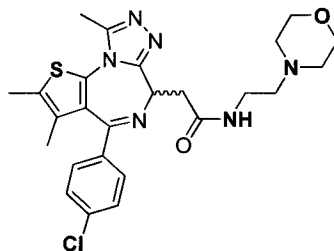
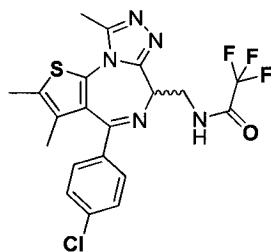
[0341]



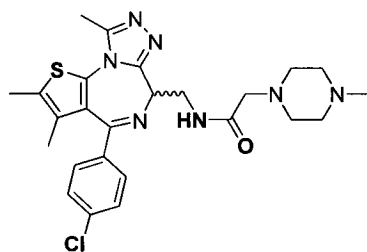
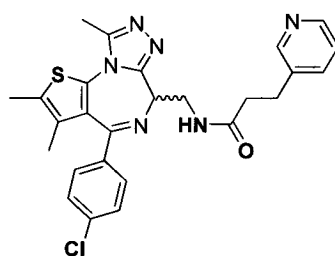
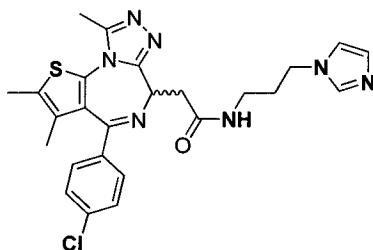
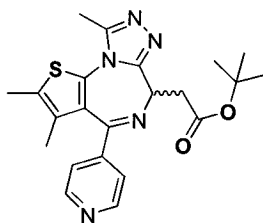
[0342]



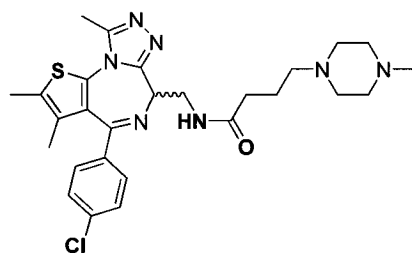
[0343]



[0344]



或

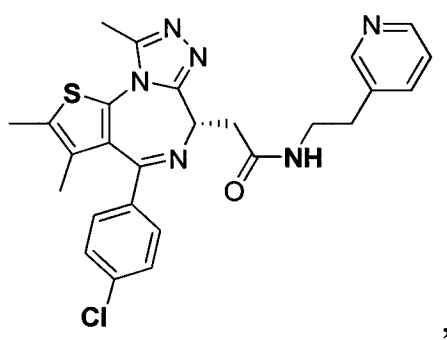
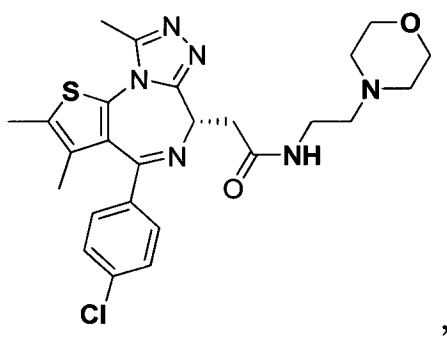
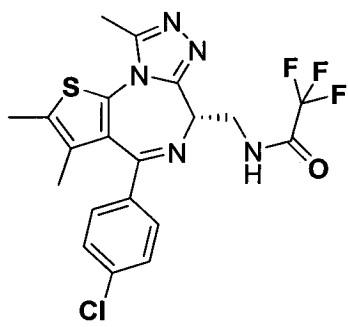
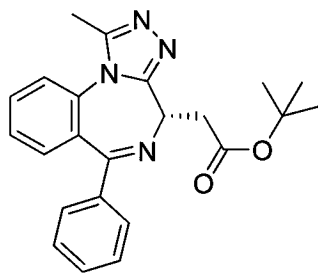


;

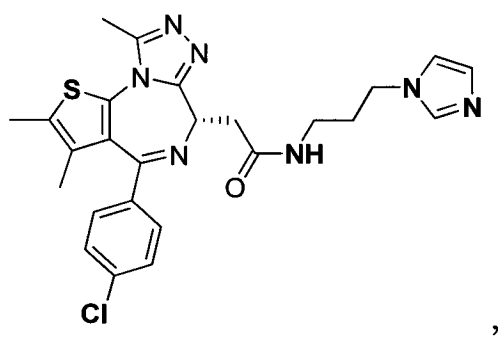
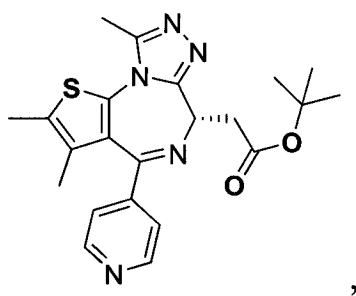
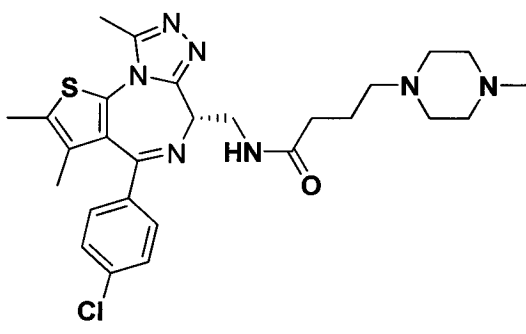
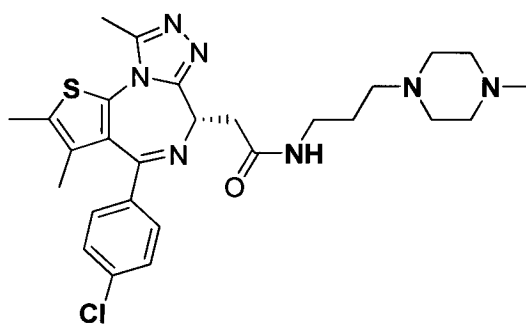
[0345] 或其一种盐、溶解物或水合物。

[0346] 在某些实施方案中,本发明的一种化合物可由以下结构之一表示:

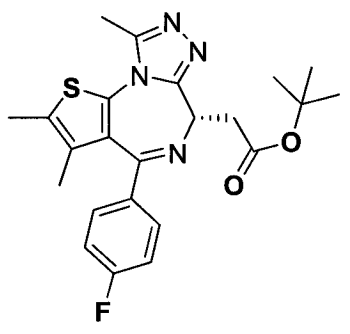
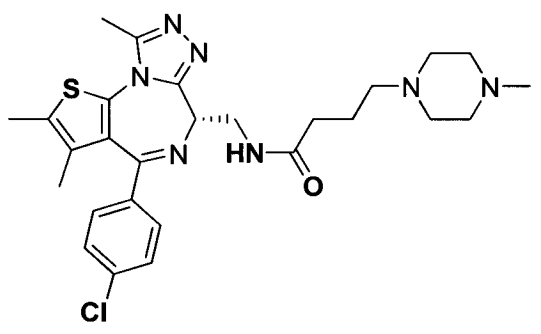
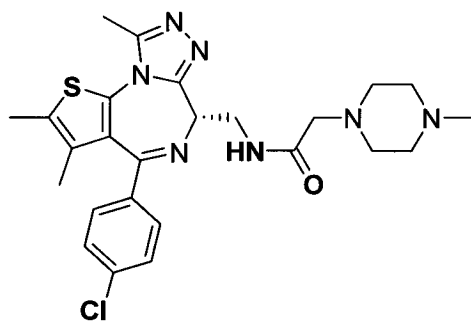
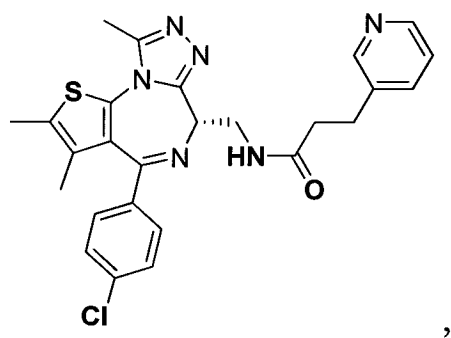
[0347]



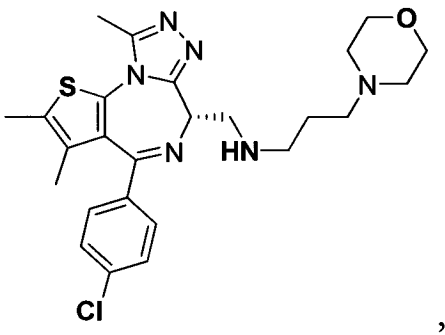
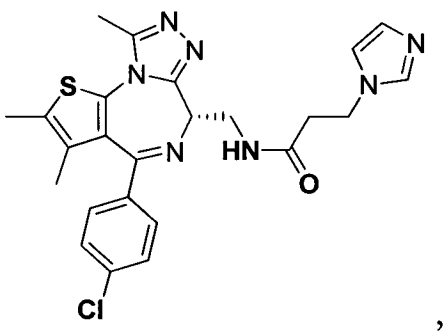
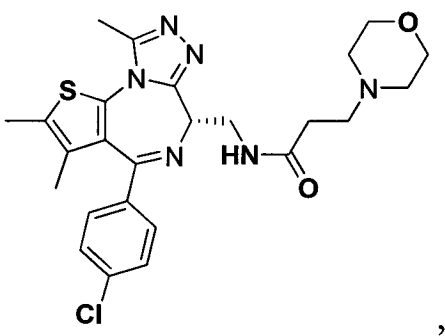
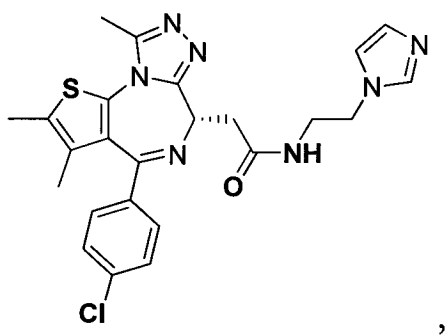
[0348]



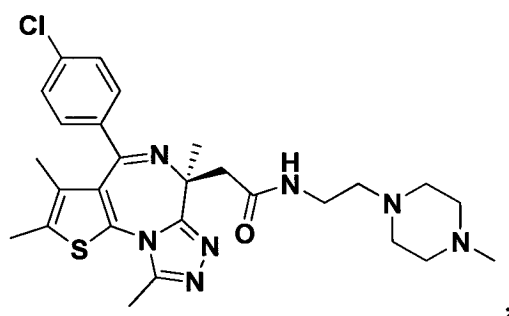
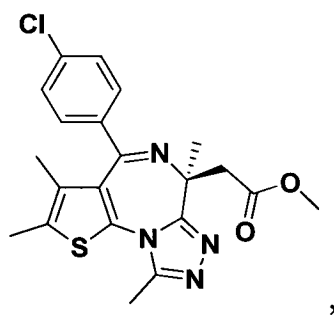
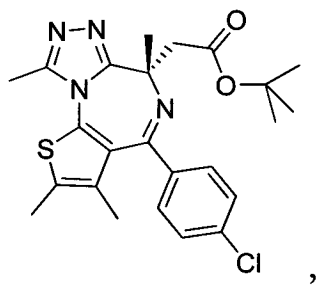
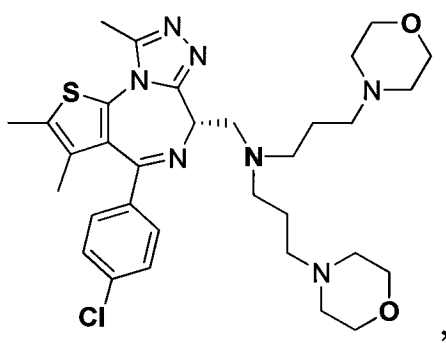
[0349]



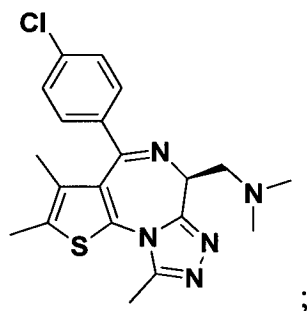
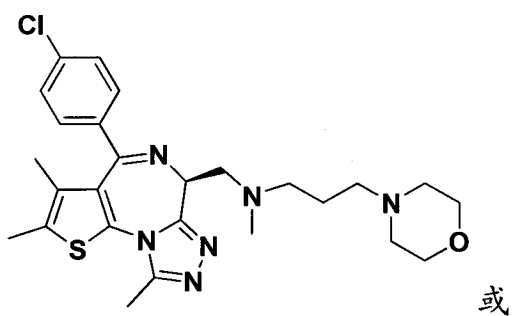
[0350]



[0351]



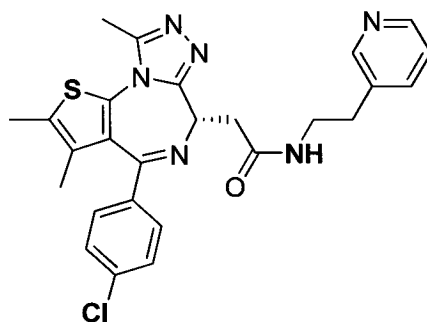
[0352]



[0353] 或其一种盐、溶解物或水合物。

[0354] 在一个实施方案中,该化合物由以下结构表示:

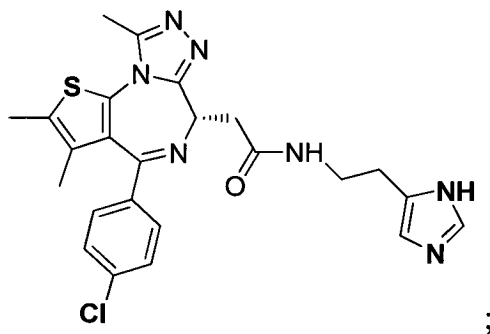
[0355]



[0356] 或其一种盐、溶解物或水合物。

[0357] 在另一个实施方案中,该化合物由以下结构表示:

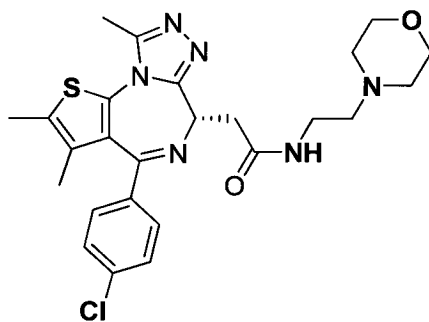
[0358]



[0359] 或其一种盐、溶解物或水合物。

[0360] 在另一个实施方案中,该化合物由以下结构表示:

[0361]

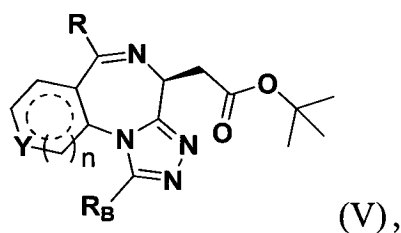


[0362] 或其一种盐、溶解物或水合物。

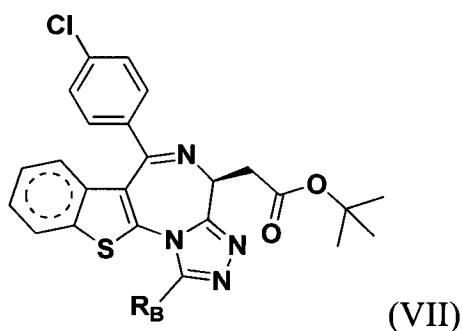
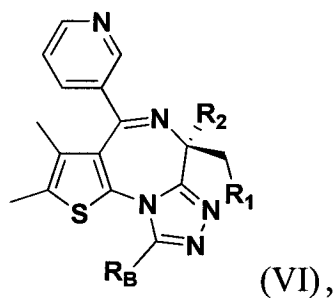
[0363] 在某些实施方案中,本发明的化合物可以具有与在此列出的任何化合物相反的手性。

[0364] 在某些实施方案中,该化合物是由化学式 (V)、(VI)、或 (VII) 表示的化合物:

[0365]



[0366]



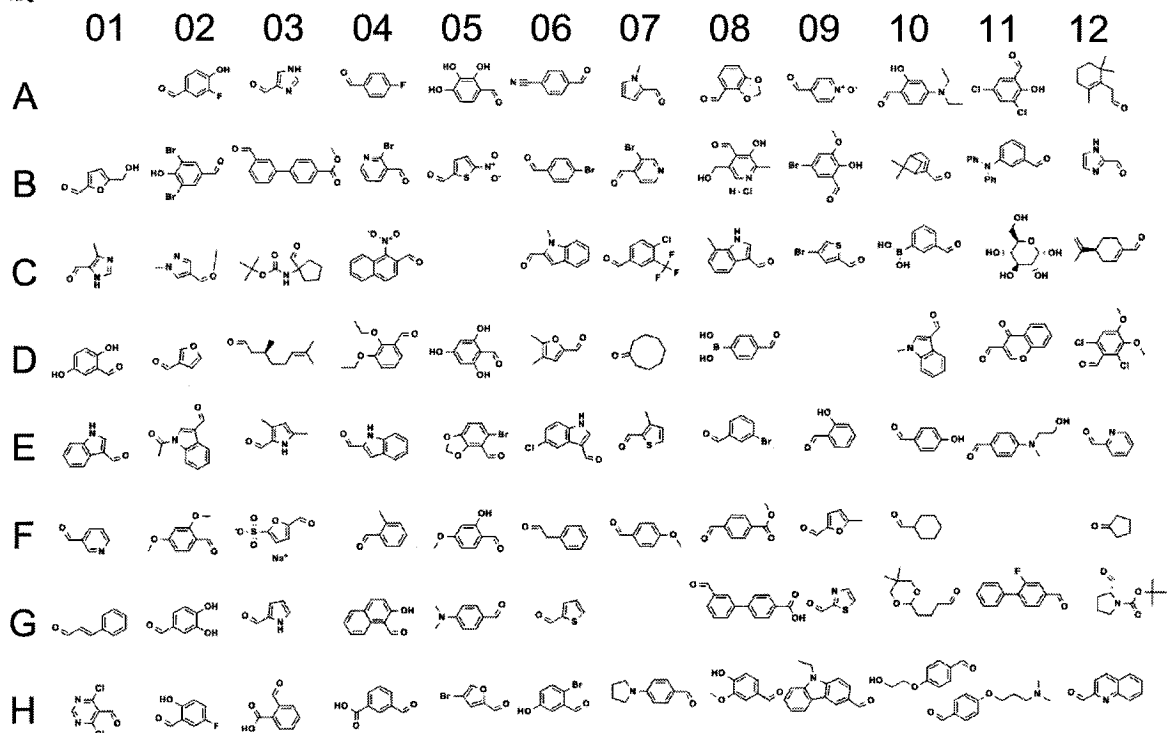
[0367] 其中, R 、 R_1 、以及 R_2 和 R_B 具有如在化学式 (I) 中相同的意义; Y 是 O、N、S、或 CR_5 , 其中 R_5 具有如在化学式 (I) 中相同的意义; n 是 0 或 1; 并且化学式 (VII) 中的虚线圈表示芳族的或者非芳族的环; 或其一种盐、溶解物或水合物。

[0368] 在化学式 I-IV 和 VI (或在此的任何化学式) 中任一的某些实施方案中, R_6 表示下面表 A 中列出的醛的非羰基部分 (即, 对具有化学式 R_6CHO 的醛而言, R_6 是该醛的非羰基部分) 在某些实施方案中, R_4 和 R_6 一起表示表 A 中列出的酮的非羰基部分 (即, 对化学式 $R_6C(O)R_4$ 的酮而言, R_4 和 R_6 是该酮的非羰基部分)

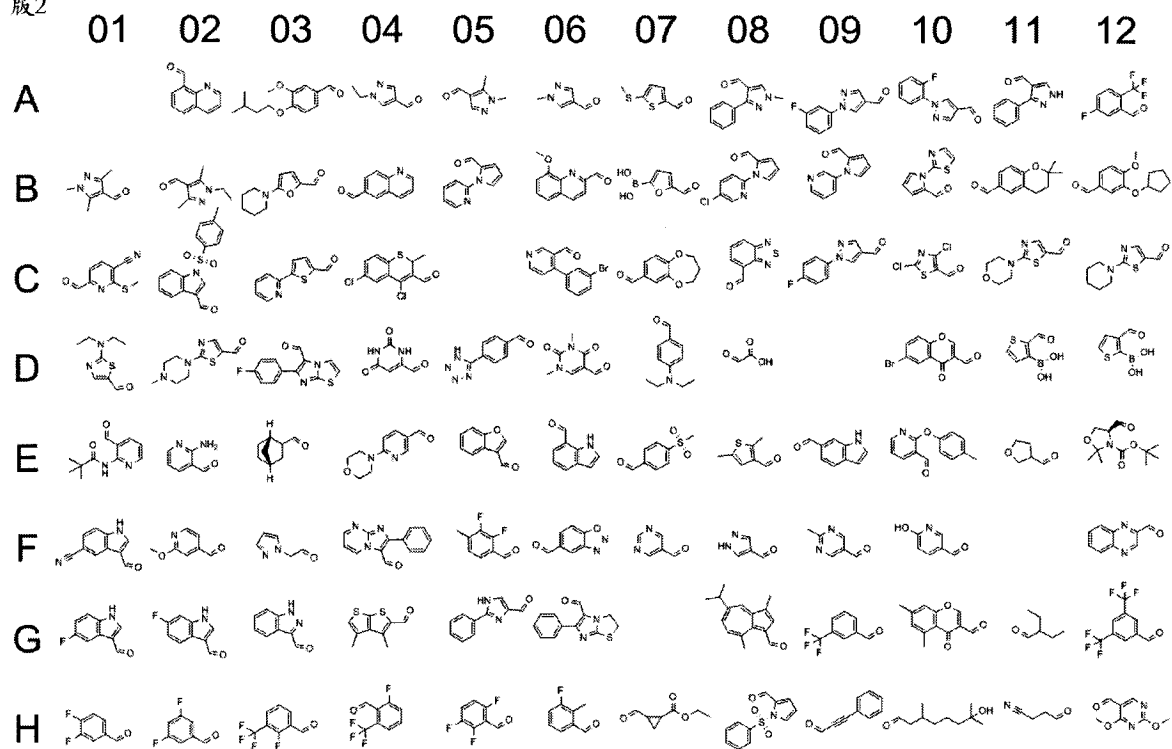
[0369] 表 A:

[0370]

版1

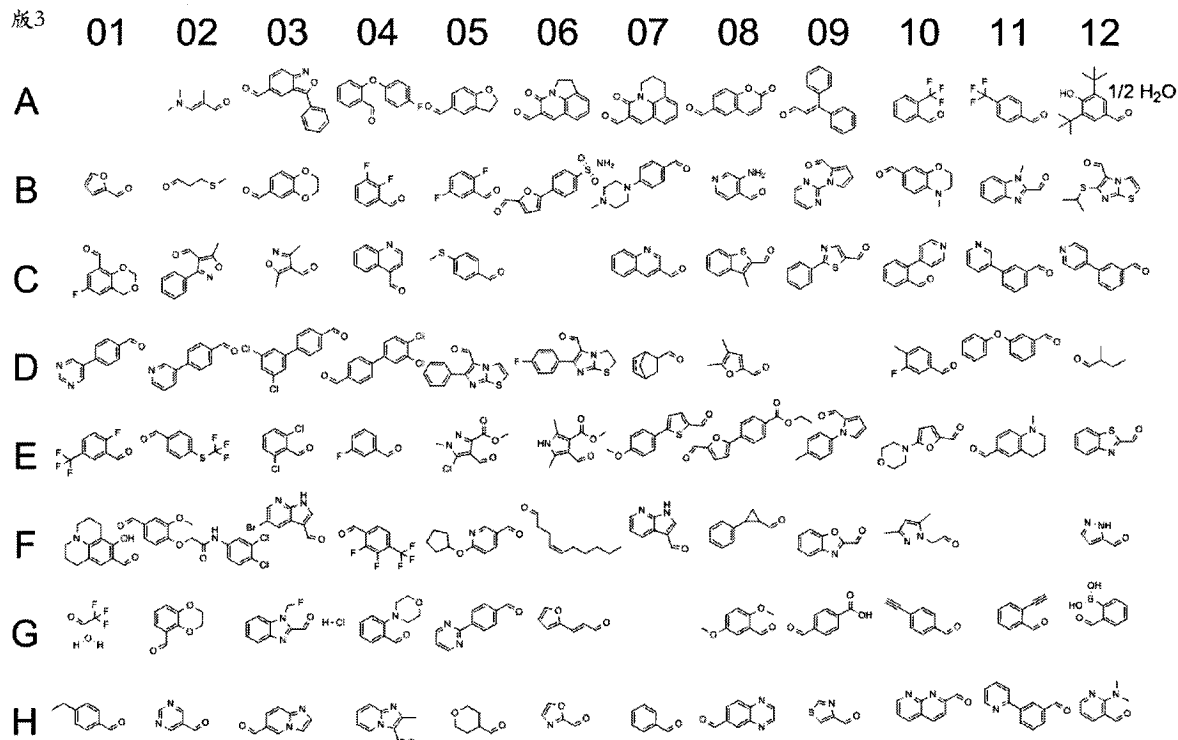


版2

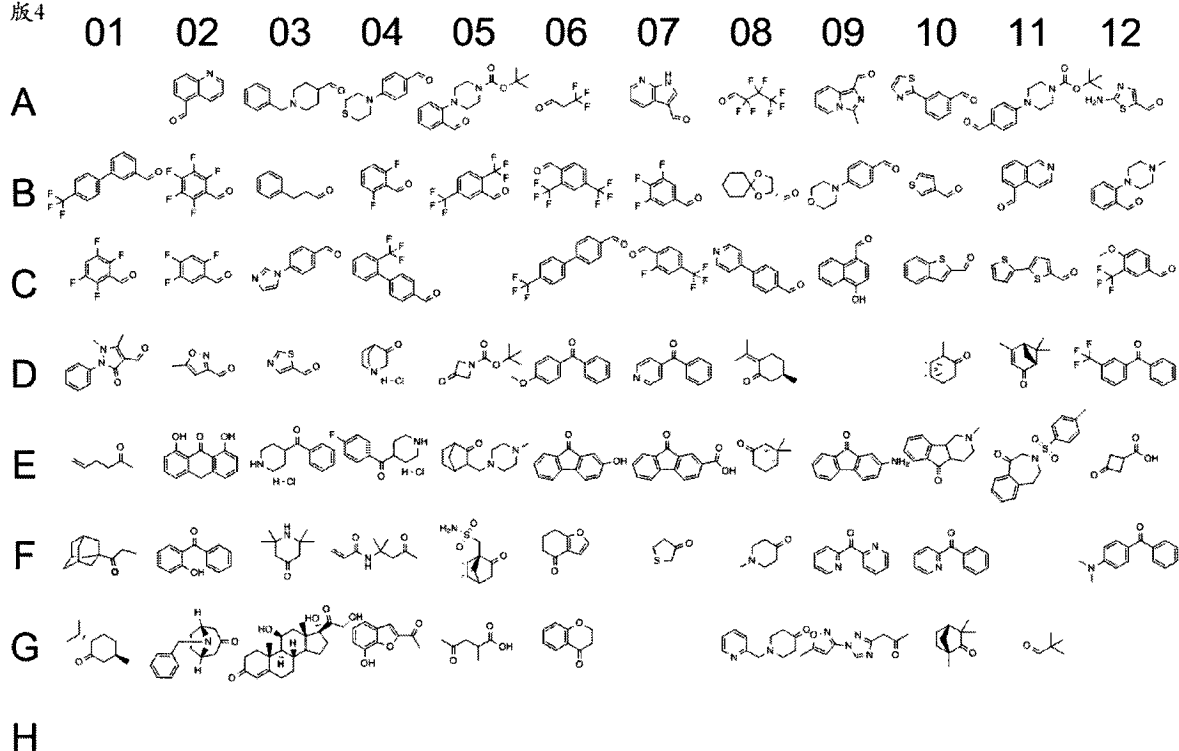


[0371]

版3

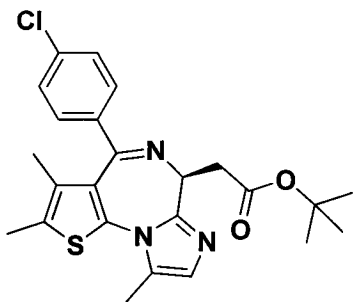


版4



[0372] 在一个实施方案中,该化合物是由以下化学式表示的化合物:

[0373]

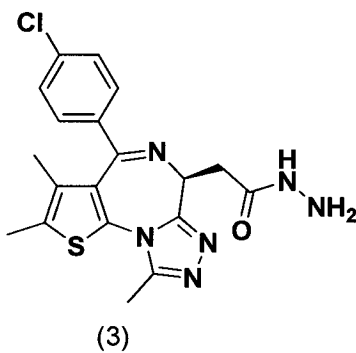


或其一种盐、溶解物或水合物。

(VIII),

[0374] 在某些实施方案中,该化合物是(消旋的)JQ1;在某些实施方案中,这种化合物是(+)-JQ1。在某些实施方案中,该化合物是选自下组,该组由以下各项组成:

[0375]

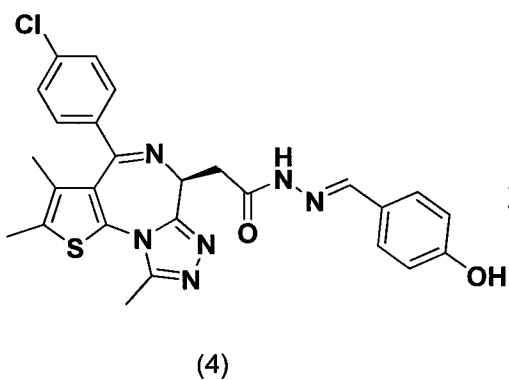


(3)

[0376]

和

[0377]

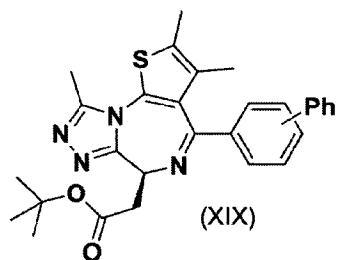
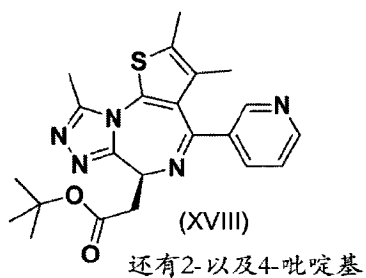
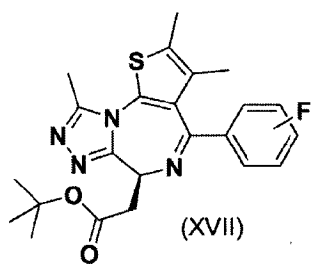
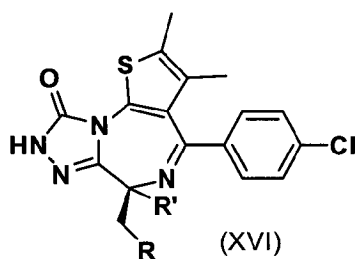
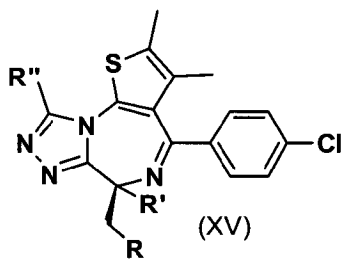
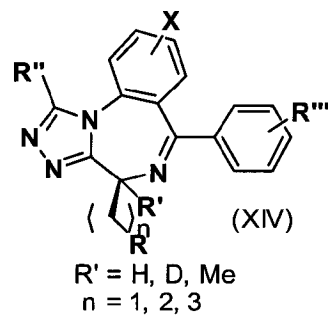
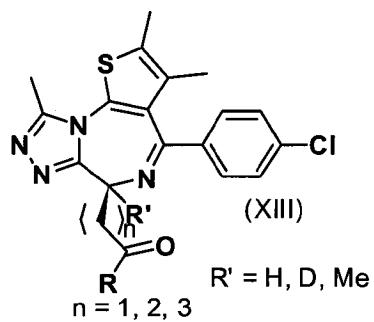
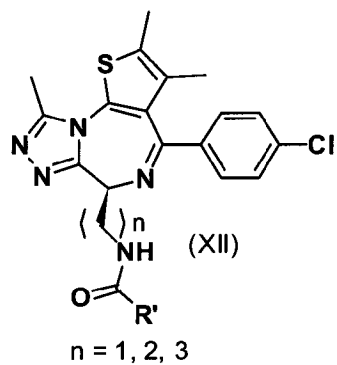
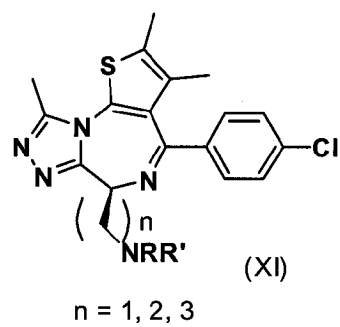
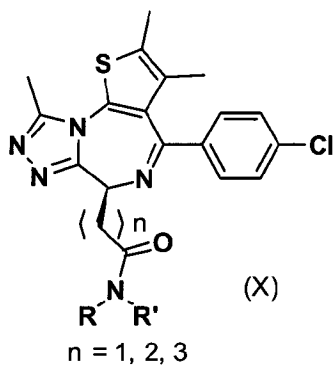
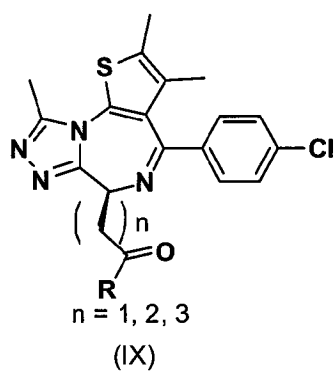


(4)

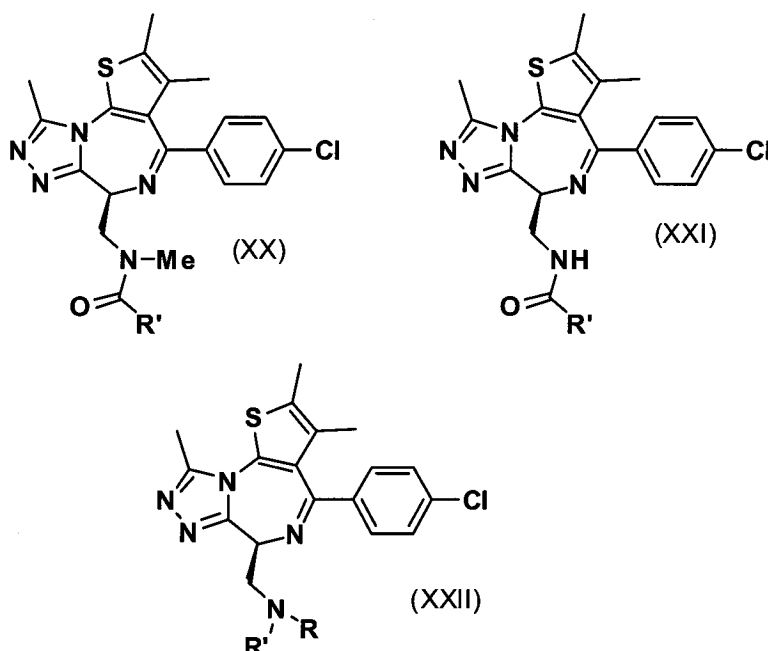
或其一种盐、溶解物或水合物。

[0378] 化合物的另外的实例包括根据以下化学式中任一所述的化合物:

[0379]



[0380]

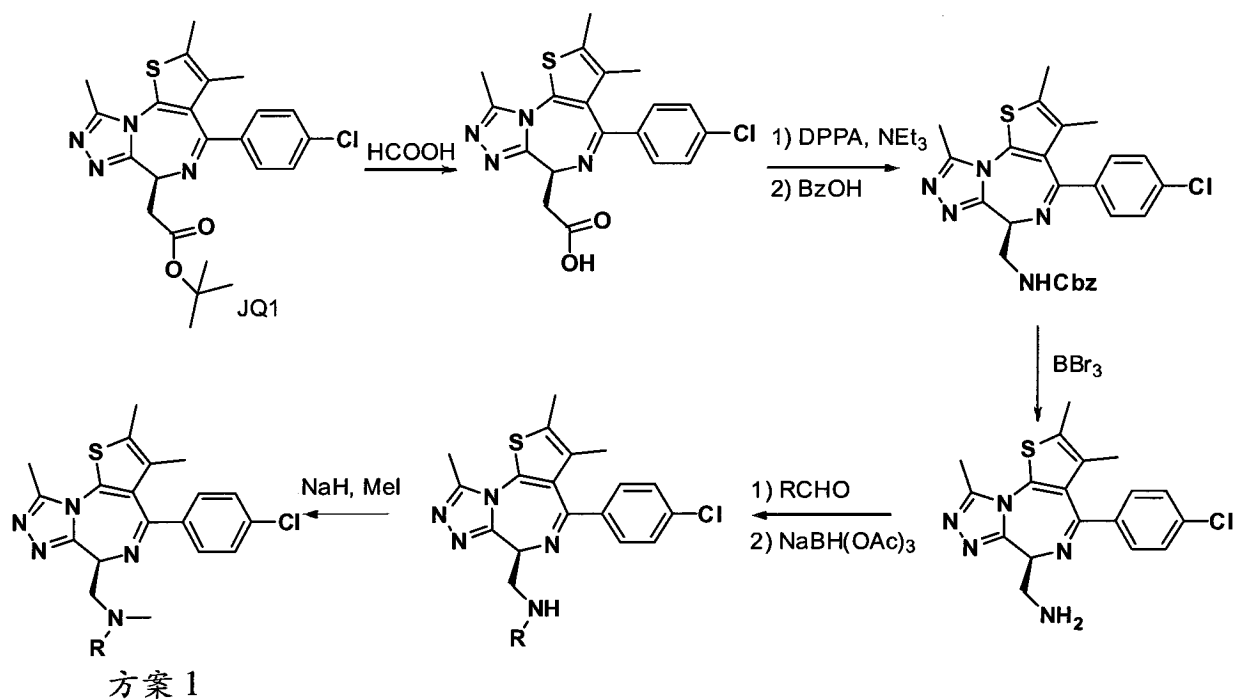


[0381] 在化学式 IX-XXII 中, R 和 R' 可以是,例如, H、芳基、经取代的芳基、杂芳基、杂芳基、杂环烷基、-C₁-C₈烷基、-C₂-C₈链烯基、-C₂-C₈炔基、-C₃-C₁₂环烷基、经取代的 -C₃-C₁₂环烷基、-C₃-C₁₂环烯基、或经取代的 -C₃-C₁₂环烯基,其中的每一个可以可任选地经取代。在化学式 XIV 中, X 可以是用于如在此所描述的芳基基团的任何取代基。

[0382] 可以通过多种方法制备本发明的化合物,其中一些方法在本领域是已知的。例如,下文提供的化学实例提供了用于制备化合物 JQ1 (作为消旋体) 以及对映异构体 (+)-JQ1 和 (-)-JQ1 的合成方案 (见方案 S1 和 S2)。可以替换适当的起始材料通过类似的方法制备具有化学式 (I)-(VIII) 的化合物。

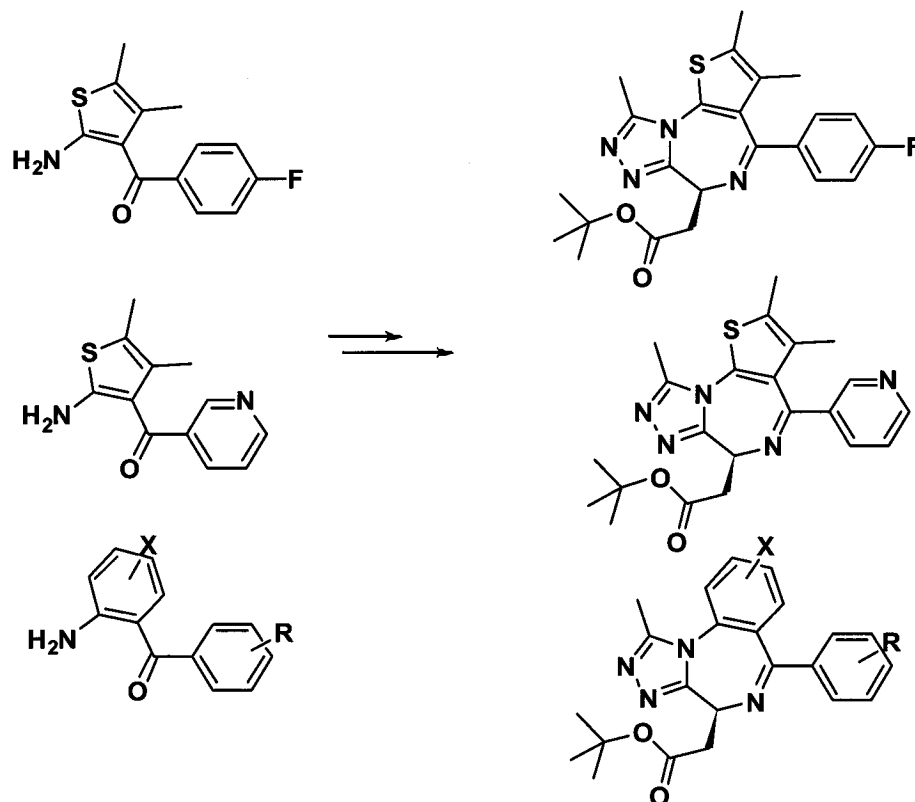
[0383] 例如,从 JQ1 起始,类似的胺可以按照下面所示的方案 1 制备。

[0384]



[0385] 如方案 1 中所示, JQ1 的叔丁基酯的水解提供羧酸, 用二苯基磷酰基叠氮化物 (DPPA) 处理该羧酸并使其经历克尔蒂斯 (Curtius) 重排条件以提供苄氧羰基 (Cbz) 保护的胺, 然后脱保护产生该胺。该胺基团的后续加工, 例如通过还原氨化, 产生仲胺, 这种仲胺可以被进一步地烷基化以提供叔胺。

[0386]

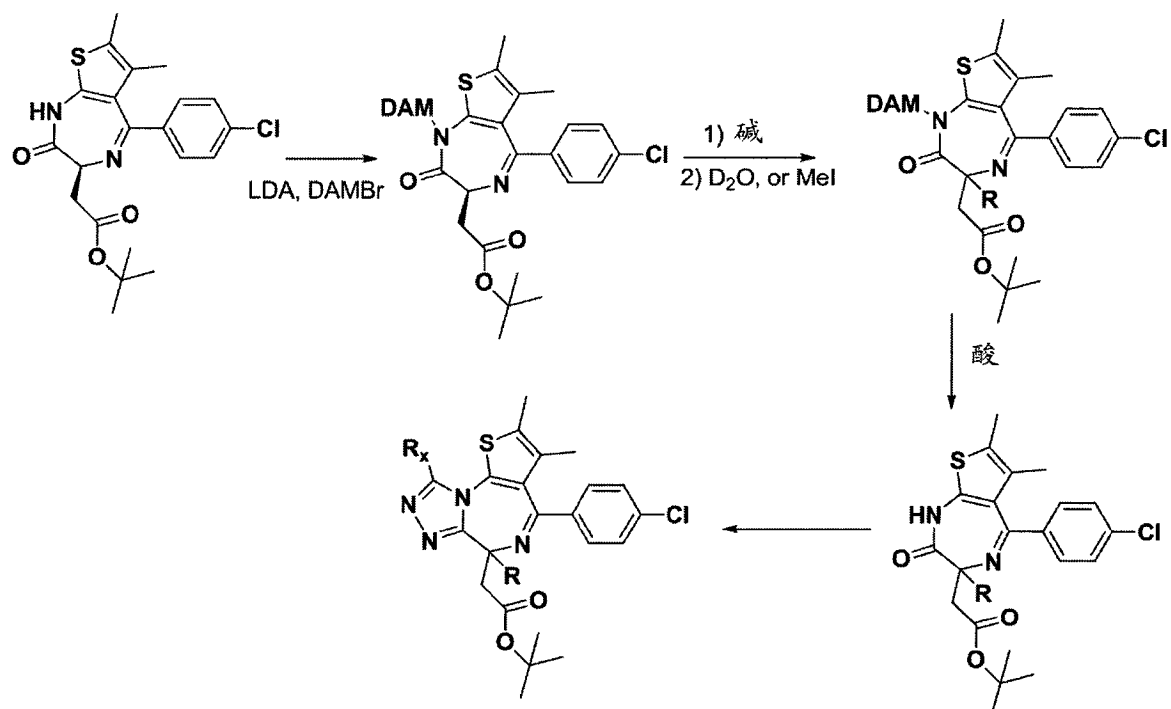


方案 2

[0387] 方案 2 列出了本发明的化合物的另外的实例的合成, 例如具有化学式 I 的化合物, 其中稠环核心被修饰 (例如, 通过如化学式 I 中环 A 的不同的芳基环的取代)。使用具有适当官能度的氨基二芳基酮 (例如, 替换以下方案 S1 中的氨基二芳基酮 S2) 提供了具有多种稠环核心和 / 或芳基基团附属物 (相应于化学式 I 中的基团 R) 的新颖化合物。这样的氨基二芳基酮是可商购的或者可以通过多种方法制备, 其中一些方法在本领域是已知的。

[0388] 方案 3 提供了用于制备本发明的另外的化合物的其他示例性合成方案。

[0389]



案 3

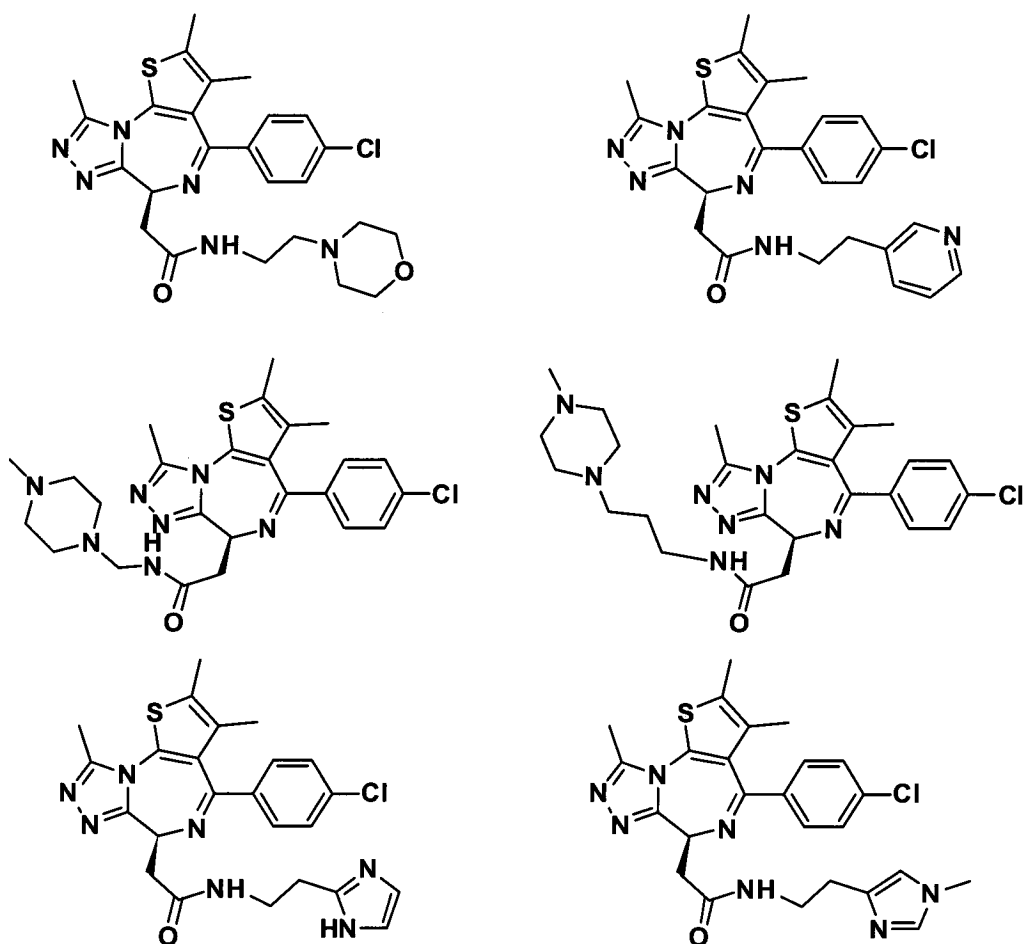
[0390] 如方案 3 所示,用 R 部分 (DAM = 二甲氨基亚甲基保护基团) 对稠合的二环前体 (参见以下用于合成这种化合物的方案 S1) 进行官能化,并且然后通过和酰肼进行反应对其进行加工以形成三环的稠合核心。通过选择合适的酰肼可以改变取代基 R_x 。

[0391] 本发明的化合物的其他实例 (可以通过在此描述的方法制备) 包括:

[0392] 酰胺类:

[0393] 可以通过例如以下的步骤制备酰胺类:制备相应的羧酸或酯,随后用适当的胺在标准条件下对其进行酰胺化。在某些实施方案中,酰胺提供了具有含有末端氮的环 (例如,吡啶基、哌啶基、哌嗪基、咪唑基 (包括 N-甲基-咪唑基)、吗啉基等) 的二碳“连接子”。示例性的酰胺结构包含:

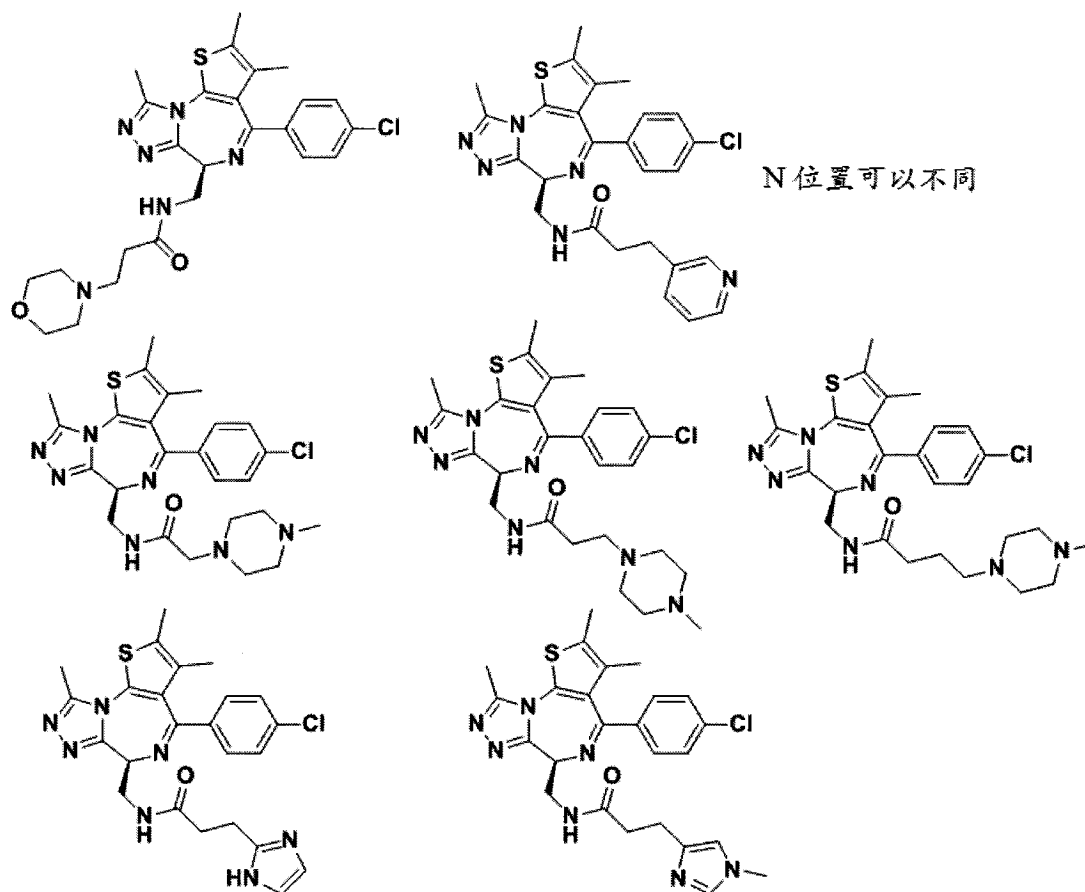
[0394]



[0395] 优选使用酰胺部分与含有末端氮的环之间的二碳链接子。

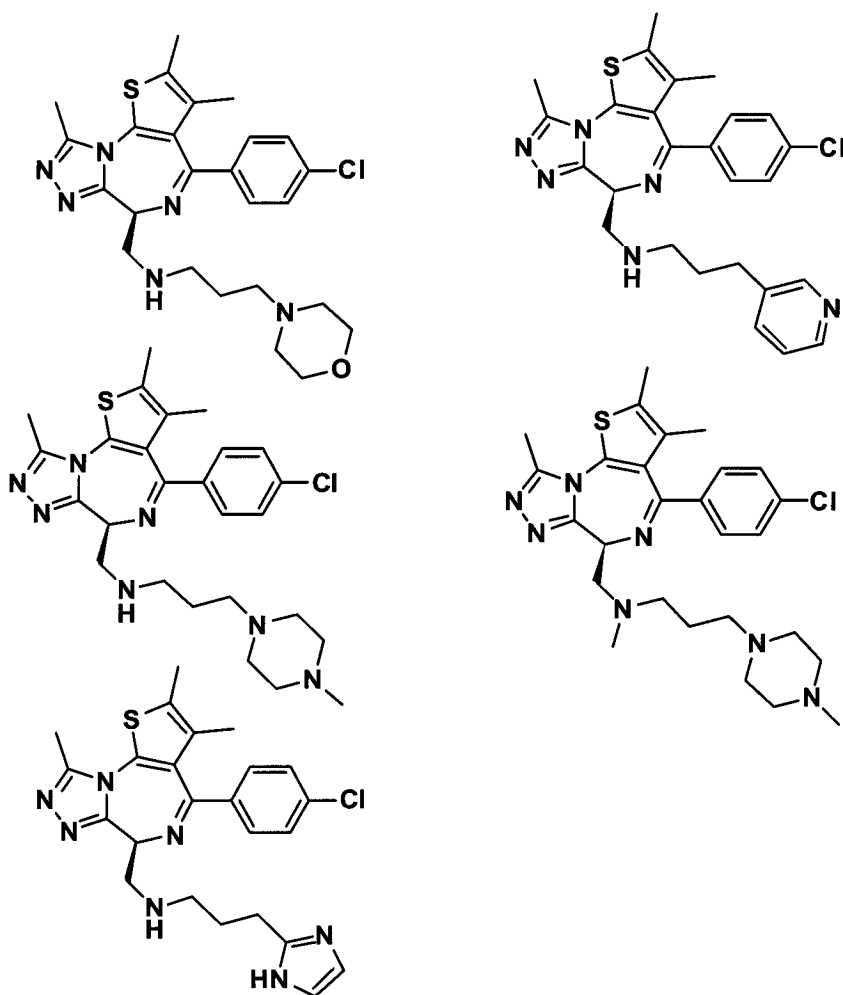
[0396] “反向酰胺类”：

[0397]



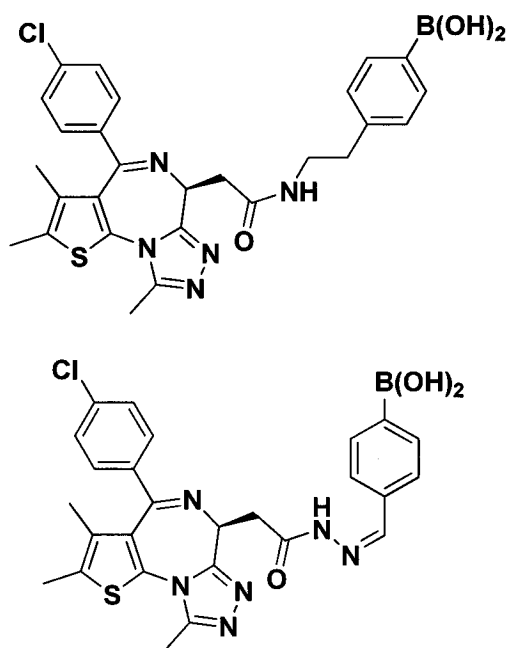
[0398] 仲胺类：

[0399]



[0400] 硼酸类：

[0401]

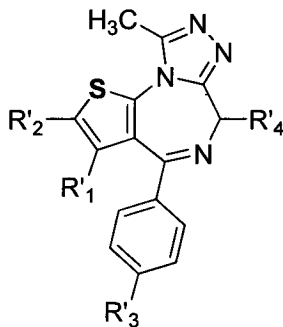


[0402] 在某些实施方案中，具有至少一个手性中心的化合物以消旋形式存在。在某些实施方案中，具有至少一个手性中心的化合物是在对映异构体意义上富集的，即，

具有至少大约 10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、85 %、90 %、95 %、99 % 或 100 % 的对映异构体过量 (e. e.)。在某些实施方案中,化合物与在此描述的化合物 (+)-JQ1 ((S)-2-(4-(4-氯苯基)-2,3,9-三甲基-6H-噻吩并[3,2-f][1,2,4]三唑并[4,3-a][1,4]二氮杂环庚-6-基)乙酸叔丁酯)具有相同的绝对构型。

[0403] 在于此披露的任一化学式的某些实施方案中,该化合物不由以下结构表示:

[0404]



[0405] 其中:

[0406] R'_1 是 C_1 - C_4 烷基;

[0407] R'_2 是氢、卤素、或可任选地经卤素原子或羟基基团取代的 C_1 - C_4 烷基;

[0408] R'_3 是卤素原子、可任选地经卤素原子取代的苯基、 C_1 - C_4 烷基、 C_1 - C_4 烷氧基、或氰基; $-NR_5-(CH_2)_m-R_6$, 其中 R_5 是卤素原子或 C_1 - C_4 烷基, m 是 0-4 的整数, 并且 R_6 是可任选地经卤素原子取代的苯基或吡啶基; 或 $-NR_7-CO-(CH_2)_n-R_8$, 其中 R_7 是卤素原子或 C_1 - C_4 烷基, n 是 0-2 的整数, 并且 R_8 是可任选地经卤素原子取代的苯基或吡啶基; 并且

[0409] R'_4 是 $-(CH_2)_a-CO-NH-R_9$, 其中 a 是 1-4 的整数, 并且 R_9 是 C_1 - C_4 烷基; C_1 - C_4 羟烷基; C_1 - C_4 烷氧基; 或可任选地经 C_1 - C_4 烷基、 C_1 - C_4 烷氧基、氨基或羟基基团取代的苯基或吡啶基, 或 $-(CH_2)_b-COOR_{10}$, 其中 b 是 1-4 的整数, 并且 R_{10} 是 C_1 - C_4 烷基。

[0410] 术语“药学上可接受的盐 (pharmaceutically acceptable salt)”还指的是由在此披露的化合物 (例如, JQ1, 具有化学式 I-XXII 的化合物) 或在此描述的任何其他化合物制备的盐, 这种盐具有酸性官能团, 如羧酸官能团, 以及药学上可接受的无机或有机碱。适合的碱包括, 但并不局限于, 碱金属, 如钠、钾、以及锂, 的氢氧化物; 碱土金属, 如钙和镁, 的氢氧化物; 其他金属, 如铝和锌, 的氢氧化物; 氨、和有机胺类, 如未经取代的或经羟基取代的单-、二-、或三烷基胺; 二环己胺; 三丁基胺; 吡啶; N-甲基-N-乙基胺; 二乙胺; 三乙胺; 单-、双-或三-(2-羟基-低级烷基胺类), 如单-、双-、或三-(2-羟基乙基)胺、2-羟基-叔丁胺、或三-(羟基甲基)甲胺, N,N-二-低级烷基-N-(羟基低级烷基)-胺, 如 N,N-二甲基-N-(2-羟基乙基)胺, 或三-(2-羟基乙基)胺; N-甲基-D-葡萄糖胺; 以及氨基酸类, 如精氨酸、赖氨酸等。术语“药学上可接受的盐 (pharmaceutically acceptable salt)”还指的是由在此披露的化合物, 或在此描述的任何其他化合物制备的盐, 这种盐具有碱性官能团, 如氨基官能团, 以及药学上可接受的无机或有机酸。适合的酸包括, 但并不局限于, 硫酸氢盐、柠檬酸、乙酸、草酸、盐酸、溴化氢、碘化氢、硝酸、磷酸、异烟酸、乳酸、水杨酸、酒石酸、抗坏血酸、琥珀酸、马来酸、苯磺酸 (besylic acid)、富马酸、葡萄糖酸、glucaronic acid、糖二酸、甲酸、苯甲酸、谷氨酸、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸 (benzenesulfonic acid)、以及对甲苯磺酸。

[0411] 除抑制 Brd4 的小化合物以外,本发明进一步提供了抑制 Brd4 表达或生物活性的其他试剂。

[0412] 抑制性核酸

[0413] 本发明进一步提供了抑制 Brd4 的表达或活性的抑制性核酸分子,以及这些试剂用于治疗白血病(例如,急性髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性髓性白血病(CML)、慢性粒单核细胞白血病(CMML)、嗜酸细胞性白血病、毛细胞性白血病、何杰金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、非何杰金氏淋巴瘤、骨髓增生障碍或骨髓增生异常)的用途。此类寡核苷酸包括结合编码 Brd4 的核酸分子(例如,反义分子、siRNA、shRNA)的单链以及双链的核酸分子(例如,DNA、RNA 及其类似物)以及直接结合到 Brd4 上从而调节其生物活性的核酸分子(例如,适体)。

[0414] 核糖核酸酶

[0415] 可以使用包含本发明的反义 Brd4 序列的催化性 RNA 分子或核糖核酸酶来抑制体内 Brd4 核酸分子的表达。核糖核酸酶序列包含在反义 RNA 中赋予对它们 RNA-切割活性,由此增加这些构建体的活性。靶向 RNA 特异性核酶的设计和用途描述于 Haseloff 等人,《自然》(Nature)1988 ;334 :585-591,以及美国专利申请公开号 2003/0003469 A1 中,将它们各自通过引用结合在此。

[0416] 因此,本发明的特点还有在结合臂包括具有八至十九个之间的连续核碱基的反义 RNA 的催化性 RNA 分子。在本发明的一个优选实施方案中,该催化性核酸分子在锤头(hammerhead)或发夹基序中形成。此类锤头基序的实例由 Rossi 等人,《艾滋病研究和人体逆转录酶病毒》(Aids Research and Human Retroviruses)1992 ;8 :183 所描述。发卡基序的实例由 Hampel 等人,1989 年 9 月 20 日提交的“用于切割特定的 RNA 序列的 RNA 催化剂”(RNA Catalyst for Cleaving Specific RNA Sequences)(1988 年 9 月 20 日提交的美国序列号 07/247,100 的部分继续);Hampel 和 Tritz,《生物化学》(Biochemistry)1989 ;28 :4929 以及 Hampel 等人,《核酸研究》(Nucleic Acids Research)1990 ;18 :299 描述。这些特定的基序不局限在本发明中,并且本领域的普通技术人员将认识到在本发明的酶性核酸分子中有重要作用的全部都如以下:它具有特异性底物结合部位,该部位与一个或多个靶基因 RNA 区互补,并且它在该底物结合部位内或周围具有核苷酸序列,这些序列赋予该分子 RNA 切割活性。

[0417] 小发卡 RNA 由具有可任选的 3' UU-突出的茎-环结构组成。同时可以有变化,茎的范围可以从 21 至 31bp(理想地是 25 至 29bp),并且环的范围可以从 4 至 30bp(理想地是 4 至 23bp)。就 shRNA 在细胞中的表达而言,可以使用包含聚合酶 III H1-RNA 或 U6 启动子,一种用于茎-环的 RNA 插入的克隆位点以及 4-5-胸苷转录终止信号的质粒载体。该聚合酶 III 启动子通常具有明确定义的起始与终止位点并且它们的转录本无聚腺苷酸尾巴。用于这些启动子的终止信号由聚胸苷段(polythymidine tract)确定并且在第二个尿苷之后,该转录本典型地被切割。在表达的 shRNA 中,这个位置处的切割产生一种与合成的 siRNA 的 3' 突出类似的 3' UU 突出。用于在哺乳动物细胞中表达 shRNA 的此外的方法描述于上文引用的参考文献中。

[0418] siRNA

[0419] 短的二十一至二十五个核苷酸双链 RNA 在下调基因表达上是有效的(Zamore 等

人,《细胞》(Cell)101:25-33;Elbashir 等人,《自然》(Nature)2001;411:494-498,通过引用结合在此)。McCaffrey 等人(《自然》(Nature)2002;418:38-39)已经体内证实了 siRNA 方法在哺乳动物中的疗效。

[0420] 给出靶基因的序列,可以设计出 siRNA 来使该基因失活。例如,可以将此类 siRNA 直接给药于受影响组织,或全身性地给药。可以使用 Brd4 基因的核酸序列来设计小干扰 RNA(siRNA)。这些 21 至 25 个核苷酸的 siRNA 可以用作,例如,治疗剂以治疗血管疾病或失调。

[0421] 可以采用本发明的抑制性核酸分子作为用于 RNA 干扰(RNAi)介导的 BET 表达敲低的双链 RNA。在一个实施方案中,造血细胞或白血病细胞中 Brd4 表达被降低。RNAi 是一种用于减少感兴趣的特异性蛋白的细胞内表达的方法(综述于 Tuschl,《化学生物化学》(ChemBiochem)2001;2:239-245;Sharp,《基因 & 发育》(Genes & Devel.)2000;15:485-490;Hutvagner 和 Zamore,《遗传发育新见》(Curr. Opin. Genet. Devel.)2002;12:225-232;以及 Hannon,《自然》(Nature)2002;418:244-251)。越来越多地使用 siRNAs 引入细胞(通过 dsRNA 的转染或使用基于质粒的表达系统的 siRNA 表达)来在哺乳动物细胞中创造功能缺失的表型。

[0422] 在本发明的一个实施方案中,双链 RNA(dsRNA)分子被制成包含本发明的核碱基低聚物的八至十九个之间的连续核碱基。该 dsRNA 可以是两种不同的 RNA 链,它们具有双链的 RNA 链或单一的自身双链化的 RNA 链(短发卡(sh)RNA)。典型地,dsRNA 有大约 21 或 22 个碱基对,但是如果希望的话,可以更短或更长(多达大约 29 个核碱基)。可以使用标准技术(例如,化学合成或体外转录)制备 dsRNA。例如,可向 Ambion 公司(德克萨斯州,奥斯丁(Austin, Tex))以及 Epicentre 公司(威斯康辛州,麦迪逊(Madison, Wis))购买试剂盒。用于在哺乳动物细胞中表达 dsRNA 的方法描述于 Brummelkamp 等人,《科学》(Science)2002;296:550-553;Paddison 等人,《基因 & 发育》(Genes & Devel.)2002;16:948-958;Paul 等人,《自然生物技术》(Nature Biotechnol.)2002;20:505-508;Sui 等人,《美国科学院院刊》(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)2002;99:5515-5520;Yu 等人,《美国科学院院刊》(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)2002;99:6047-6052;Miyagishi 等人,《自然生物技术》(Nature Biotechnol.)2002;20:497-500;以及 Lee 等人,《自然生物技术》(Nature Biotechnol.)2002;20:500-505,将它们各自通过引用结合在此。

[0423] 小发夹 RNA(shRNA)包含一种具有茎-环结构的 RNA 序列。“茎-环结构”是指具有二级结构的核酸,该二级结构包含一个核苷酸区,该核苷酸区是已知的或预测为可形成双链或双链体(茎部分),该双链体的一端通过主要是单链核苷酸(环部分)的区域连接。术语“发卡”在此还用来指茎-环结构。此类结构在本领域中是已知的并且该术语的使用与它在本领域中的含义一致。如在本领域中已知的,该二级结构不需要额外的配对碱基。因此,该茎可以包含一个或多个碱基错配或膨胀部。可替代地,该配对碱基可以是精确的,即,不包含任何错配。多重的茎-环结构可以通过一种接头彼此连接,例如,像一种核酸接头、miRNA 侧翼序列、其他分子或其组合。

[0424] 在此使用的,术语“小发卡 RNA”包括常规的形成 miRNA 前体(前-miRNA)的茎-环 shRNA。尽管在范围上可能有一些变化,一个常规的茎-环 shRNA 可包含范围从 19 至 29bp 的茎以及范围从 4 至 30bp 的环。“shRNA”还包括微小 RNA 嵌入的 shRNA(基于 miRNA 的

shRNA), 其中该 miRNA 双链体的引导链和过客链是合并到一个现存的 (或天然的) miRNA 中或者是合并到一个经修饰的或合成的 (设计的) miRNA 中。在一些情况下, 该前体 miRNA 分子可以包含不止一个茎-环结构。微小 RNA 内源地编码大约 22 个核苷酸长的 RNA 分子, 并且通常以高等组织特异或发育阶段特异的方式来表达, 并且这些微小 RNA 转录后地调节靶基因。已经在植物和动物中鉴别了超过 200 个的不同的 miRNA。这些小的调节性 RNA 被认为通过以下两种主要的作用方式来起重要的生物学功能: (1) 通过阻抑靶 mRNA 的翻译, 以及 (2) 通过 RNA 干扰 (RNAi), 即, mRNA 的酶切与降解。在后者的案例中, miRNA 功能类似于小干扰 RNA (siRNA)。因此, 可以基于现存的 miRNA 基因的特点设计并表达人工 miRNA。

[0425] 在此方面, 可以将短发卡 RNA 设计为模仿内源性的 miRNA。许多 miRNA 中间体可以被用作 shRNA 或 shRNA_{mir} 的模型, 包括但不限于包含 miR-15a、-16、-19b、-20、-23a、-27b、-29a、-30b、-30c、-104、-132s、-181、-191、-223 的主链设计的 miRNA (见, 美国公开号 2005/0075492)。在一些实施方案中, shRNA 分子是基于人 miR-30 序列而设计, 通过用不相关的配对碱基序列取代 pri-miR-30 的茎序列来进行重新设计以允许人工 shRNA 的表达 (Siolas 等人, 2005, 《自然生物技术》(Nat. Biotech.) 23:227-231; Silva 等人, 2005, 《自然遗传学》(Nat. Genet.) 37:1281-1288; Zeng 等人 (2002), 《分子细胞》(Molec. Cell) 9:1327-1333)。该 miR-30 的自然茎序列可以由长度上从大约 16 至大约 29 个核苷酸, 特别是长度上从大约 19 至 29 个核苷酸的茎序列代替。可以改变环序列使得长度从大约 4 至大约 23 个核苷酸。在一个实施方案中, 该 shRNA 分子的茎是长度上大约 22 个核苷酸。在另一个实施方案中, 该茎是长度上大约 29 个核苷酸。因此, 使用合成生产的 shRNA, 以及在自然界中发现的并且可以将其改型以作为合成的沉默短发卡 RNA 起功能的微小 RNA (miRNA) 分子来实施本发明。

[0426] shRNA 可以从 DNA 载体中表达以提供持续的沉默并且高产率递送进入几乎任何细胞类型。在一些实施方案中, 该载体是一种病毒载体。示例性的病毒载体包括逆转录病毒载体, 其包括慢病毒的、腺病毒的、杆状病毒的以及鸟类病毒的载体, 并且包括允许稳定的、单拷贝基因组整合的此类载体。逆转录病毒质粒载体可以从其衍生的逆转录病毒包括但不局限于, 莫洛尼鼠白血病病毒、脾坏死病毒、劳氏肉瘤病毒、哈维肉瘤病毒、禽类白细胞增生病毒、长臂猿白血病病毒、人免疫缺陷病毒、骨髓增生肉瘤病毒和乳腺癌病毒。逆转录病毒质粒载体可以用于转导包装细胞系 (packaging cell line), 从而形成生产者细胞系 (producer cell line)。可以被转染的包装细胞的实例包括但不局限于, PE501、PA317、R-2、R-AM、PA12、T19-14x、VT-19-17-H2、RCRE、RCRIP、GP+E-86、GP+envAm12 以及 DAN 细胞系, 如在 Miller, 《人类基因治疗》(Human Gene Therapy) 1:5-14 (1990) 中所述的, 通过引用以其全文结合于此。载体可以经由本领域中已知的任何方法转导这些包装细胞。生产者细胞系产生有传染性的逆转录病毒载体颗粒, 这些逆转录病毒载体颗粒诱导对 DNA 复制蛋白进行编码的多核苷酸。然后可以采用此类逆转录病毒载体颗粒来体外或体内地转导真核细胞。这些经转导的真核细胞将表达 DNA 复制蛋白。

[0427] 本质上可以使用任何用于将核酸构建体引入细胞内的方法。引入核酸的物理方法包括注射含有该构建体的溶液, 用被该构建体覆盖的粒子轰击, 将细胞、组织样品或有机体浸泡在该核酸的溶液中, 或者在该构建体存在下电穿孔细胞膜。可以使用包装进入病毒颗粒中病毒构建体来完成表达型构建体有效地引入细胞中以及被编码的 shRNA 的有效转录。

可以使用其他本领域中已知的、用于将核酸引入细胞的方法,如,脂类介导的载体转运,化学品介导的转运如磷酸钙,等等。因此,可以将编码 shRNA 的核酸构建体与执行一种或多种以下活动的组分一起引入:增强细胞摄入 RNA,促进双链体链的退火,使退火链稳定或者否则增加靶基因的抑制。

[0428] 对于细胞内表达而言,可以使用 DNA 载体,例如包含 RNA 聚合酶 II 或 RNA 聚合酶 III 启动子的质粒载体。内源性 miRNA 的表达由 RNA 聚合酶 II (PolII) 启动子控制,并且在一些情况下,与 RNA 聚合酶 III 启动子相比较,shRNA 由 PolII 启动子驱动最有效 (Dickins 等人,2005,《自然遗传学》(Nat. Genet.) 39:914-921)。在一些实施方案中,可以通过可诱导型启动子或条件型表达系统(包括但不限于, RNA 聚合酶类型 II 启动子)来控制 shRNA 的表达。在本发明的上下文中有用的启动子的实例是四环素诱导型启动子(包括 TRE-紧 (TRE-tight))、IPTG-诱导型启动子、四环素反式激活蛋白系统以及反向的四环素反式激活蛋白 (rtTA) 系统。还可以使用组成型启动子,以及细胞或组织特异性的启动子。许多启动子是普遍存在的,这样使得它们在所有的细胞和组织类型中表达。某一实施方案使用四环素应答性启动子 (tetracycline-responsive promoter),它是体外和体内研究中最有效的条件型基因表达系统之一。针对可诱导型 shRNA 的描述见国际专利申请 PCT/US2003/030901(公开号 WO 2004-029219 A2) 以及 Fewell 等人,2006,《今日药物发现》(Drug Discovery Today) 11:975-982。

[0429] 小发夹 RNA (shRNA) 包含一种具有茎-环结构的 RNA 序列。“茎-环结构”是指具有二级结构的核酸,该二级结构包含一个核苷酸区,该核苷酸区是已知的或预测为可形成双链或双链体(茎部分),该双链体的一端通过主要是单链核苷酸(环部分)的区域连接。术语“发卡”在此还用来指茎-环结构。此类结构在本领域中是已知的并且该术语的使用与它在本领域中的含义一致。如在本领域中已知的,该二级结构不需要额外的配对碱基。因此,该茎可以包含一个或多个碱基错配或膨胀部。可替代地,该配对碱基可以是精确的,即,不包含任何错配。多重的茎-环结构可以通过一种接头彼此连接,例如,像一种核酸接头、miRNA 侧翼序列、其他分子或其组合。

[0430] 在此使用的,术语“小发卡 RNA”包括常规的形成 miRNA 前体(前-miRNA)的茎-环 shRNA。尽管在范围上可能有一些变化,一个常规的茎-环 shRNA 可包含范围从 19 至 29bp 的茎以及范围从 4 至 30bp 的环。“shRNA”还包括微小 RNA 嵌入的 shRNAs(基于 miRNA 的 shRNAs),其中该 miRNA 双链体的引导链和过客链是合并到一个现存的(或天然的)miRNA 中或者是合并到一个经修饰的或合成的(设计的)miRNA 中。在一些情况下,该前体 miRNA 分子可以包含不止一个茎-环结构。微小 RNA 内源地编码大约 22 个核苷酸长的 RNA 分子,并且通常以高等组织特异或发育阶段特异的方式来表达,并且这些微小 RNA 转录后地调节靶基因。已经在植物和动物中鉴别了超过 200 个的不同的 miRNA。这些小的调节性 RNA 被认为通过以下两种主要的作用方式来起重要的生物学功能:(1) 通过阻抑靶 mRNA 的翻译,以及(2) 通过 RNA 干扰 (RNAi),即,mRNA 的酶切与降解。在后者的案例中,miRNA 功能类似于小干扰 RNA (siRNA)。因此,可以基于现存的 miRNA 基因的特点设计并表达人工 miRNA。

[0431] 在此方面,可以将短发卡 RNA 设计为模仿内源性的 miRNA。许多 miRNA 中间体可以被用作 shRNA 或 shRNAmir 的模型,包括但不限于包含 miR-15a、-16、-19b、-20、-23a、-27b、-29a、-30b、-30c、-104、-132s、-181、-191、-223 的主链设计的 miRNA(见,美国公开号

2005/0075492)。在一些实施方案中, shRNA 分子是基于人 miR-30 序列而设计, 通过用不相关的配对碱基序列取代 pri-miR-30 的茎序列来进行重新设计以允许人工 shRNA 的表达 (Siolas 等人, 2005, 《自然生物技术》(Nat. Biotech.) 23 :227-231 ;Silva 等人, 2005, 《自然遗传学》(Nat. Genet.) 37 :1281-1288 ;Zeng 等人 (2002), 《分子细胞》(Molec. Cell) 9 :1327-1333)。该 miR-30 的自然茎序列可以由长度上从大约 16 至大约 29 个核苷酸, 特别是长度上从大约 19 至 29 个核苷酸的茎序列代替。可以改变环序列使得长度从大约 4 至大约 23 个核苷酸。在一个实施方案中, 该 shRNA 分子的茎是长度上大约 22 个核苷酸。在另一个实施方案中, 该茎是长度上大约 29 个核苷酸。因此, 使用合成生产的 shRNA, 以及在自然界中发现的并且可以将其改型以作为合成的沉默短发卡 RNA 起功能的微小 RNA(miRNA) 分子来实施本发明。

[0432] shRNA 可以从 DNA 载体中表达以提供持续的沉默并且高产率递送进入几乎任何细胞类型。在一些实施方案中, 该载体是一种病毒载体。示例性的病毒载体包括逆转录病毒载体, 其包括慢病毒的、腺病毒的、杆状病毒的以及鸟类病毒的载体, 并且包括允许稳定的、单拷贝基因组整合的此类载体。逆转录病毒质粒载体可以从其衍生的逆转录病毒包括但不局限于, 莫洛尼鼠白血病毒、脾坏死病毒、劳氏肉瘤病毒、哈维肉瘤病毒、禽类白细胞增生病毒、长臂猿白血病毒、人免疫缺陷病毒、骨髓增生肉瘤病毒和乳腺癌病毒。逆转录病毒质粒载体可以用于转导包装细胞系, 从而形成生产者细胞系。可以被转染的包装细胞的实例包括但不局限于, PE501、PA317、R-2、R-AM、PA12、T19-14x、VT-19-17-H2、RCRE、RCRIP、GP+E-86、GP+envAm12 以及 DAN 细胞系, 如在 Miller, 《人类基因治疗》(Human Gene Therapy) 1 :5-14(1990) 中所述的, 通过引用以其全文结合于此。载体可以经由本领域中已知的任何方法转导这些包装细胞。生产者细胞系产生有传染性的逆转录病毒载体颗粒, 这些逆转录病毒载体颗粒诱导对 DNA 复制蛋白进行编码的多核苷酸。然后可以采用此类逆转录病毒载体颗粒来体外或体内地转导真核细胞。这些经转导的真核细胞将表达 DNA 复制蛋白。

[0433] 本质上可以使用任何用于诱导细胞内核酸构建体的方法。引入核酸的物理方法包括注射含有该构建体的溶液, 用被该构建体覆盖的粒子轰击, 将细胞、组织样品或有机体浸泡在该核酸的溶液中, 或者在该构建体存在下电穿孔细胞膜。可以使用包装进入病毒颗粒中病毒构建体来完成表达型构建体有效地引入细胞中以及被编码的 shRNA 的有效转录。可以使用其他本领域中已知的、用于将核酸引入细胞的方法, 如, 脂类介导的载体转运, 化学介导的转运如磷酸钙, 等等。因此, 可以将编码 shRNA 的核酸构建体与执行一种或多种以下活动的组分一起引入: 增强细胞摄入 RNA, 促进双链体链的退火, 使退火链稳定或者否则增加靶基因的抑制。

[0434] 对于细胞内表达而言, 可以使用 DNA 载体, 例如包含 RNA 聚合酶 II 或 RNA 聚合酶 III 启动子的质粒载体。内源性 miRNA 的表达由 RNA 聚合酶 II (PolII) 启动子控制, 并且在一些情况下, 与 RNA 聚合酶 III 启动子相比较, shRNA 由 PolII 启动子驱动最有效 (Dickins 等人, 2005, 《自然遗传学》(Nat. Genet.) 39 :914-921)。在一些实施方案中, 可以通过可诱导型启动子或条件型表达系统 (包括但不限于, RNA 聚合酶类型 II 启动子) 来控制 shRNA 的表达。在本发明的上下文中有用的启动子的实例是四环素诱导型启动子 (包括 TRE-紧 (TRE-tight))、IPTG-诱导型启动子、四环素反式激活蛋白系统以及反向的四环

素反式激活蛋白 (rtTA) 系统。还可以使用组成型启动子, 以及细胞或组织特异性的启动子。许多启动子是普遍存在的, 这样使得它们在所有的细胞和组织类型中表达。某一实施方案使用四环素应答性启动子 (tetracycline-responsive promoter), 它是体外和体内研究中最有效的条件型基因表达系统之一。针对可诱导型 shRNA 的描述见国际专利申请 PCT/US2003/030901 (公开号 W0 2004-029219 A2) 以及 Fewell 等人, 2006, 《今日药物发现》(Drug Discovery Today) 11:975-982。

[0435] 核碱基低聚物的递送

[0436] 裸露的抑制性核酸分子或其类似物能够进入哺乳动物细胞并且抑制感兴趣的基因 (例如, Brd4) 的表达。尽管如此, 可能希望的是利用一种辅助寡核苷酸或其他核碱基低聚物递送进入细胞的配制品 (参见, 例如, 美国专利号 5, 656, 611、5, 753, 613、5, 785, 992、6, 120, 798、6, 221, 959、6, 346, 613 以及 6, 353, 055, 将它们各自通过引用结合在此。

[0437] 药物治疗

[0438] 在其它实施方案中, 使用此处描述的方法发现的有药用价值的试剂 (例如 JQ1 或具有此处描绘的化学式的化合物), 例如, 通过合理的药物设计, 可作用于现有化合物的结构修饰的一种药物或信息。对于治疗用途而言, 用此处披露的方法得以鉴别的这些组合物或试剂可以全身性地给药, 例如配制在药学上可接受的缓冲液 如生理盐水中。优选的给药途径包括, 例如, 在病人体内提供连续的、持续的药物水平的皮下注射、静脉注射、腹腔注射、肌肉注射或皮内注射。使用一种在生理上可接受的载体中的、在此处得以鉴别的治疗有效量的治疗剂来对人类病人或其它动物进行治疗。对合适的载体以及它们的配制进行了描述, 例如, 在 E. W. Martin 著作的《雷明顿氏药学全书》(Remington's Pharmaceutical Sciences) 中进行了描述。待被给药的制剂的剂量的变化取决于给药方式、该病人的年龄和体重, 以及白血病 (例如, 急性髓性白血病 (AML)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、急性淋巴细胞白血病 (ALL)、慢性髓性白血病 (CML)、慢性粒单核细胞白血病 (CMML)、嗜酸细胞性白血病、毛细胞性白血病、何杰金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、非何杰金氏淋巴瘤、骨髓增生异常和骨髓增生障碍) 的临床症状。总体上, 尽管在某些情况下, 由于该化合物特异性增加会需要较低的用量, 但是用量会处于在其他与白血病相关联的疾病的的治疗中使用的其他试剂所用的那些量的范围内。以减少癌症细胞的增殖、生长或存活的剂量将一种化合物进行给药, 这个剂量通过使用本领域的技术人员已知的方法或使用任何测量细胞增殖或活力的测定来确定。

[0439] 药用组合物的配制

[0440] 用于治疗白血病的化合物的给予可以通过任何合适的手段, 这些手段产生有效减少白血病细胞增殖或存活的与其他组分组合的治疗剂的浓度。该化合物可以任何合适地包含于任何合适的载体物质中, 并且总体上以该组合物总重的 1-95% (按重量计) 存在。该组合物可以是以一种适合于肠胃外 (例如, 皮下、静脉内、肌肉内、或腹膜内) 给药通路的剂型来提供。这些药用组合物可以按常规药物实践 (见, 例如, 雷明顿:《试剂的科学与实践》(第 20 版)(Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20th ed.), ed.), A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000, 以及《制药技术百科全书》(Encyclopedia of Pharmaceutical Technology), 编辑, J. Swarbrick 与 J. C. Boylan, 1988-1999 年, Marcel Dekker 公司, 纽约) 进行配制。在一个具体的实施方案中, 将本发

明的试剂直接全身性地给予受试者。

[0441] 人类剂量最初可以通过从小鼠中使用的化合物的量进行推断来确定,正如本领域技术人员认识到的,与动物模型相比来修改对人类的剂量是本领域中的惯例。在一个实施方案中,以 50mg/kg 经口地或全身性地给予本发明的试剂。在某些其他实施方案中,可以想象到的是,剂量变化可以从大约 1 μ g 化合物 /Kg 体重之间至大约 5000mg 化合物 /Kg 体重;或从大约 5mg/Kg 体重至大约 4000mg/Kg 体重;或大约 10mg/Kg 体重至大约 3000mg/Kg 体重,或从大约 50mg/Kg 体重到大约 2000mg/Kg 体重;或从大约 100mg/Kg 体重到大约 1000mg/Kg 体重;或从大约 150mg/Kg 体重至大约 500mg/Kg 体重。在其他实施方案中,这个剂量可以是大约 1、5、10、25、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2500、3000、3500、4000、4500、或 5000mg/Kg 体重。在其他实施方案中,可以想到的是,剂量可以在大约 5mg 化合物 /Kg 体重至大约 100mg 化合物 /Kg 体重的范围内。在其他实施方案中,这些剂量可以是大约 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100mg/Kg 体重。当然,同在此类的治疗方案中常规做的一样,这个剂量可以往上或往下调节,这个调节取决于最初的临床试验和具体病人的需要。

[0442] 根据本发明的这些药用组合物可以配制在给药时基本上立刻释放出该活性化合物或者在给药后任何一个预定的时刻或时间段释放出该活性化合物。后一种类型的组合物一般被称为控制释放配制品,它包括 (i) 在身体内在较长的时间内产生一个基本上恒定的药物浓度的配制品;(ii) 预定的滞后时间后,在身体内在较长的时间内产生一个基本上恒定的药物浓度的配制品;(iii) 在一段预定的时间期间,通过维持身体内相对恒定有效的水平,同时相伴的与该活性物质的血浆水平波动(锯齿动力学模式)相关联的不希望的副作用最小化,来维持作用的配制品;(iv) 通过,例如,控释组合物与胸腺相邻或接触的空间放置来定位作用的配制品;(v) 允许方便给药,使得,例如,每一个或两个星期给药一次的配制品;以及 (vi) 靶向白血病的配制品,该白血病包括但不限于急性髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性髓性白血病(CML)、慢性粒单核细胞白血病(CMML)、嗜酸细胞性白血病、毛细胞性白血病、何杰金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、非何杰金氏淋巴瘤、骨髓增生异常、以及骨髓增生障碍。对于某些应用而言,控释配制品排除了对在白天频繁给药以维持血浆水平于治疗水平的需要。

[0443] 可以遵循许多策略中的任何一个,以便获得其中释放速率大于所谈论的化合物的代谢速率的控释。在一个实例中,控释是通过对各种配方参数和成分的合适选择来获得,包括,例如,不同的控释组合物和包衣类型。因此,将该治疗剂与合适的赋形剂配入一种给药时以受控方式释放该治疗剂的药用组合物中。实例包括单或多单位片剂或胶囊组合物、油溶液、悬浮液、乳剂、微胶囊、微球、分子复合物、纳米颗粒、贴剂、以及脂质体

[0444] 多种肠胃外组合物

[0445] 该药用组合物可以剂型、配制品通过注射、输注或植入(皮下、静脉内、肌内、腹膜内、等等)或经由合适的含有常规的、无毒的药学上可接受的载体和佐剂的递送装置或植入物进行肠胃外给药。此类组合物的配制和制备对药物配制领域的普通技术人员而言是众所周知的。配制可以在雷明顿:《药学科学与实践》(Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 同上)中找到。

[0446] 可以用单位剂型（例如，在单剂量的安瓿中），或者用包括若干剂量的小瓶来提供多种肠胃外使用组合物，并且其中可以加入合适的防腐剂（见下文）。该组合物的形式可以是一种溶液、悬浮液、乳液、输注装置、或用于植入的递送装置，或者它可以是一种在使用前用水或其它合适的载体复原的干粉剂。除减少白血病细胞的生长、增殖或存活的活性剂外，该组合物可以包含合适的肠胃外可接受的载体和 / 或赋形剂。该（这些）活性治疗剂可以掺入到用于控释的微球、微胶囊、纳米颗粒、脂质体等中。此外，该组合物可以包含悬浮、增溶、稳定、pH 调节剂，张度调节剂，和 / 或分散剂。

[0447] 如上文所述，根据本发明的这些药用组合物可以是适合于无菌注射的形式。为了制备这样的一种组合物，将该（这些）合适的活性治疗剂溶解于或悬浮于一种肠胃外可接受的液体载体中。可以采用的可接受的载体和溶剂是水，通过加入适量的盐酸、氢氧化钠或合适的缓冲液调整到合适的 pH 值的水，1,3- 丁二醇，林格氏溶液 (Ringer' s solution)、以及等渗氯化钠溶液和葡萄糖溶液。该水性配制品还可以包含一种或多种防腐剂（例如甲基、乙基或对羟基苯甲酸正丙酯）。在其中这些化合物之一仅少量或微溶于水的情况下，可以添加一种溶解增强剂或增溶剂，或该溶剂可包括 10% -60% (w/w) 的丙二醇等。

[0448] 控释的肠胃外组合物

[0449] 多种控释的肠胃外组合物可以是水悬浮液，微球，微胶囊，磁性微球，油溶液，油悬浮液，或乳液形式。可替代地，该活性药可以掺入到生物相容的载体、脂质体、纳米颗粒、埋植剂、或输注设备中。

[0450] 用于制备微球和 / 或微胶囊的材料是，例如可生物降解的 / 可生物蚀解的聚合物如：聚泌乳激素、聚氰基丙烯酸异丁酯、聚 (2- 羟基乙基 -L- 左旋谷氨酸)、以及聚 (乳酸)。当配制一种控释的肠胃外配制品时，可以使用的生物相容载体是碳水化合物（例如葡聚糖）、蛋白质（例如清蛋白）、脂蛋白或抗体。在埋植剂中使用的材料可以是非可生物降解的（例如聚二甲基硅氧烷）或可生物降解的（例如聚己内酯、聚乳酸、聚乙醇酸或聚邻醚或其组合物）。

[0451] 用于口服的固体制剂形式

[0452] 用于口服的配制品包括含有与无毒的药学上可接受的赋形剂混合的该（这些）活性成分的片剂。此类配制品对熟练的业内人士而言是已知的。赋形剂可以是，例如，惰性稀释剂或填充剂（例如，蔗糖、山梨醇、糖、甘露醇、微晶纤维素、淀粉（包括马铃薯淀粉）、碳酸钙、氯化钠、乳糖、磷酸钙、硫酸钙、或磷酸钠）；造粒剂和崩解剂（例如，纤维素衍生物（包括微晶纤维素）、淀粉（包括马铃薯淀粉）、交联羧甲基纤维素钠、藻酸盐、或藻酸）；结合剂（例如，蔗糖、葡萄糖、山梨糖醇、阿拉伯胶、藻酸、藻酸钠、明胶、淀粉、预胶化淀粉、微晶纤维素、硅酸铝镁、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乙基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、或聚乙二醇）；以及润滑剂，助流剂，和抗结合剂（例如，硬脂酸镁、硬脂酸锌、硬脂酸、硅酸盐、氢化植物油、或滑石）。其他药学上可接受的赋形剂可以是着色剂、调味剂、增塑剂、湿润剂、缓冲剂，等。

[0453] 这些片剂可以是无包衣的或它们可以通过已知技术包衣，来可任选地延迟在胃肠道中的崩解和吸收并且从而提供在较长的时间内的持续作用该包衣可以调适于以一种预定的模式释放该活性药物（例如，为了获得一种控释配制品），或者它可以调适于不释放该活性药物，直到通过胃后（肠溶包衣）。该包衣可以是一种糖包衣、一种膜包衣（例如，基

于羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素、甲基羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羧甲基纤维素、丙烯酸酯共聚物、聚乙二醇和 / 或聚乙烯吡咯烷酮), 或一种肠溶包衣 (例如, 基于甲基丙烯酸共聚物、乙酸邻苯二甲酸纤维素、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、醋酸羟丙基甲基纤维素琥珀酸酯、聚醋酸乙烯酯邻苯二甲酸酯、虫胶、和 / 或乙基纤维素)。此外, 可以使用一种延时材料, 例如, 单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。

[0454] 这些固体片剂组合物可以包含调适于使该组合物避免不需要的化学变化 (例如, 该活性治疗物质的释放前的化学降解) 的一种包衣。该包衣可以是以与在《制药技术百科全书》(Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, 同上) 中表述的一种相似方式应用于该固体制剂形式。

[0455] 可以将至少两种治疗剂一起混合在该片剂中, 或者可以分开。在一个实例中, 该第一活性治疗剂包含在该片剂的内部, 并且该第二活性治疗剂包含在该片剂的外部, 使得该第二治疗剂的实质部分在该第一治疗剂释放前得以释放。

[0456] 口服用配制品还可以呈现为咀嚼片、或硬明胶胶囊, 其中该活性成分与惰性固体稀释剂 (例如, 马铃薯淀粉、乳糖、微晶纤维素、碳酸钙、磷酸钙或高岭土) 混合, 或呈现为软明胶胶囊, 其中该活性成分与水或一种油介质混合, 例如, 花生油, 液体石蜡或橄榄油。可以用上述的按照片剂和胶囊剂的这些成分, 以一种常规的使用例如混合器、流化床装置或喷雾干燥设备的方式来制备粉剂和颗粒剂。

[0457] 控释的口服制剂形式

[0458] 可以将多种用于口服的控释组合物, 例如, 构建成通过控制该活性物质的溶解和 / 或扩散来释放该活性治疗剂。通过化合物的片剂、胶囊、丸、或颗粒配制品的适当包衣, 或通过将该化合物掺入到一种合适的基质中, 从而可以够获得溶解或扩散的控释。一种控释包衣可以包含以上提到的这些包衣物质中的一种或多种和 / 或例如虫胶、蜂蜡、糖蜡、蓖麻蜡、巴西棕榈蜡、硬脂醇、单硬脂酸甘油酯、二硬脂酸甘油酯、棕榈酰硬脂酰甘油酯、乙基纤维素、丙烯酸树脂、dl- 聚乳酸、醋酸丁酸纤维素、聚氯乙烯、聚乙酸乙烯酯、乙烯吡咯烷酮、聚乙烯、聚甲基丙烯酸酯、甲基丙烯酸甲酯、2- 羟甲基丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯水凝胶、1, 3- 丁二醇、乙二醇甲基丙烯酸酯, 和 / 或聚乙烯醇。在一个控释基质配制品中, 该基质材料还可以包括, 例如, 水合甲基纤维素、巴西棕榈蜡和硬脂醇, 卡波姆 934 (carbopol 934)、硅酮、甘油三硬脂酸酯、丙烯酸甲酯 - 甲基丙烯酸甲酯、聚氯乙烯、聚乙烯、和 / 或卤化氟烷。

[0459] 含有一种或多种治疗化合物的控释组合物还可以是一种胃漂浮片剂或胶囊形式 (例如, 在口服给药时, 漂浮在胃内容物之上一定时间段的一种片剂或胶囊)。该 (这些) 化合物的胃漂浮片剂配制品可以通过将该 (这些) 化合物与赋形剂以及 20-75% (w/w) 的水状胶质 (例如羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、或羟丙基纤维素) 的混合物进行粒化来制备。然后将所得颗粒压制成片剂。在与胃液接触时, 该片剂在它的表面周围形成了一个基本上不透水的凝胶屏障。这个凝胶屏障参与保持小于一的密度, 从而使该片剂仍然漂浮在胃液中。

[0460] 联合治疗

[0461] 可任选地, 用于治疗白血病的治疗剂, 这些白血病包括但不限于急性髓性白血病 (AML)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、急性淋巴细胞白血病 (ALL)、慢性髓性白血病 (CML)、慢性粒单核细胞白血病 (CMML)、嗜酸细胞性白血病、毛细胞性白血病、何杰金氏淋巴瘤、

多发性骨髓瘤、非何杰金氏淋巴瘤、骨髓增生异常、以及骨髓增生障碍,是单独给予或与其他用于治疗癌症的标准疗法联合给予;这类方法对于技术人员而言是已知的,并且描述于 E. W. Martin 的雷明顿的药物科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences) 中。如果希望,本发明的试剂(例如 JQ1,在此描绘的化学式的化合物,及其衍生物)是与对于治疗癌症而言有用的任何常规化疗剂联合给予。

[0462] 试剂盒或药物系统

[0463] 这些组合物可以被组装进用于在白血病的治疗中使用的试剂盒或药物系统(这些白血病例如,急性髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性髓性白血病(CML)、慢性粒单核细胞白血病(CMML)、嗜酸细胞性白血病、毛细胞性白血病、何杰金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、非何杰金氏淋巴瘤、骨髓增生异常、以及骨髓增生障碍)。根据本发明的这个方面的试剂盒或药物系统包括一个载体工具,如一个盒、纸盒、管等,该载体工具中严格限定地具有一个或多个容器工具,如:小瓶、管、安瓿、瓶子等。本发明的试剂盒或药物系统还可以包括用于使用本发明的这些试剂的相关使用说明书。

[0464] 疗法

[0465] 疗法可以在任何进行癌症治疗的地方进行提供在家、医生的办公室、诊所、医院门诊部、或医院。一般在医院开始治疗,这样使得医生可以接近地观察疗法的效果并且做出任何需要的调整。疗法的持续时间取决于要治疗的癌症种类、病人的年龄和病况、病人的疾病的阶段和类型、以及病人的身体对治疗的响应。可以按不同的间隔(例如每天、每周、或每月)进行给药。可以按包括休息期的续-断周期(on-and-off cycles)给予疗法,这样使得病人的身体具有构建健康新细胞并且重新获得其力量的机会。

[0466] 如上所述,如果希望,用本发明的化合物(例如 JQ1)进行治疗,靶向 Brd4 的抑制性核酸分子可以与用于治疗增生性疾病的疗法(例如放射疗法、外科手术、或化学疗法)相组合。除非另外指明,本发明的实施采用很好地处在熟练业内人士的见识范围之内的分子生物学(包含重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术。此类技术在文献中进行充分地说明,例如:“分子克隆:实验指南”(“Molecular Cloning:A Laboratory Manual”),第二版,(Sambrook,1989);“寡核苷酸合成”(“Oligonucleotide Synthesis”)(Gait,1984);“动物细胞培养”(“Animal Cell Culture”)(Freshney(弗雷谢尼),1987);“酶学方法”(“Methods in Enzymology”)“实验免疫学手册”(“Handbook of Experimental Immunology”(Weir,1996);“哺乳动物细胞的基因转移载体”(“Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells”)(Miller 和 Calos,1987);“分子生物学现行规范”(“Current Protocols in Molecular Biology”)(Ausubel,1987);“PCR:聚合酶链式反应”(“PCR:The Polymerase Chain Reaction”),(Mullis,1994);“免疫学现行规范”(“Current Protocols in Immunology”)(Coligan,1991)。这些技术适用于本发明的多核苷酸和多肽的生产,并且按照这样,可以被考虑用于制备和实施本发明。对具体实施方案特别有用的技术将在下面的部分进行讨论。

[0467] 给出以下的实例是为了给本领域普通技术人员提供如何进行和使用测试、筛选和本发明的治疗方法的一个完整的公开和说明,而不是旨在限定诸位发明人认为是自己的发明的范围。

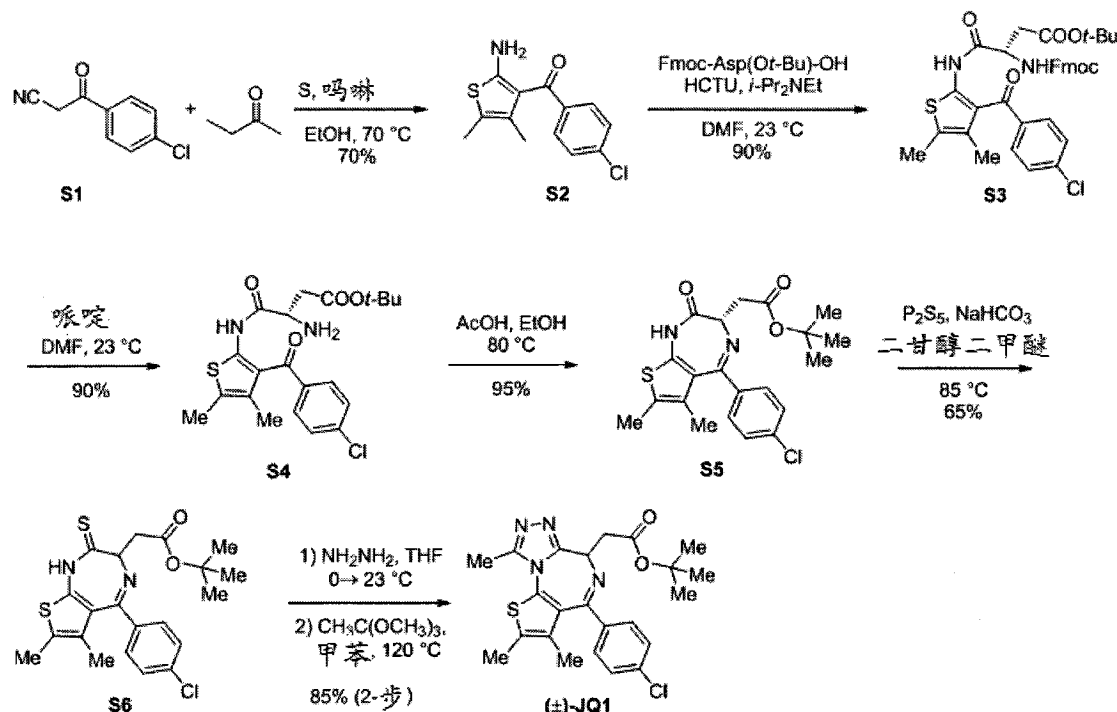
[0468] 实例

[0469] I. 化学实例 - 制剂的合成和方法

[0470] 本发明的化合物可以用此处描述的方法, 和 / 或根据由此处描述的本领域的普通技术人员已知的方法进行合成。

[0471] 方案 S1. 消旋溴基结构域抑制剂 (±)-JQ1 的合成

[0472]



[0473] (2-氨基-4,5-二甲基噻吩-3-基)(4-氯苯基)甲酮 (S2)

[0474] 根据以上所示的方案制备该化合物 JQ1。

[0475] 将固体硫磺 (220mg, 6.9mmol, 1.00 当量) 在 23²¹C 加入到 4-氯苯甲酰基乙腈 S1 (1.24g, 6.9mmol, 1.00 当量), 2-丁酮 (0.62ml, 6.9mmol, 1 当量), 以及吗啉 (0.60ml, 6.9mmol, 1.00 当量) 的乙醇 (20ml, 0.35M) 溶液中。该然后将该混合物加热至 70 °C。12 小时后, 将该反应混合物冷却至 23 °C 并且倒入盐水 (100ml) 中。该将该水层用乙酸乙酯 (3×50ml) 进行萃取。将这些合并的有机层用盐水 (50ml) 洗涤, 用无水硫酸钠干燥, 过滤并且在减压下进行浓缩。将残余物用快速柱色谱法 (Combiflash RF 系统, 40 克硅凝胶, 梯度 0 至 100% 的乙酸乙酯 - 己烷) 纯化以获得黄色固体状的 S2 (1.28g, 70%)。

[0476] (S)-叔丁基-3-([[(9H-芴-9-基)甲氧基]羰基]氨基)-4-[[3-(4-氯苯甲酰基)-4,5-二甲基噻吩-2-基]氨基]-4-氧丁酸酯 (S3)

[0477] 将 (2-(6-氯-1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲铵六氟磷酸酯 (HCTU) (827mg, 2.0mmol, 2.00 当量), 和 N,N-二异丙基乙胺 (0.72ml, 4.0mmol, 4.00 当量) 依次加入到 9-芴甲氧羰基-天冬氨酸 β-叔丁基酯 [Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH] (864mg, 2.1mmol, 2.10 当量) 的 N,N-二甲基甲酰胺溶液中 (1.5ml, 1.0M)。然后将该混合物在 23 °C 搅拌 5 分钟。再添加固体 S2 (266mg, 1.0mmol, 1 当量)。将该反应混合物在 23 °C 搅拌。16 小时后, 添加乙酸乙酯 (20ml) 和盐水 (20ml)。将这两个层分离, 并且将该水层用乙酸乙酯 (2×20ml) 萃取。将这些合并的有机层用盐水 (30ml) 洗涤, 用无水硫酸钠干燥, 过滤而且在减压下进行浓缩。将残余物用快速柱色谱法 (Combiflash RF 系统, 40 克硅凝胶, 梯度 0 至 100% 的乙

酸乙酯-己烷)纯化以获得棕色油状的 S3(625mg,90%)。

[0478] (S)-3-氨基-4-((3-(4-氯苯甲酰基)-4,5-二甲基噻吩-2-基)氨基)-4-氧丁酸叔丁酯 (S4)

[0479] 将化合物 S3(560mg,0.85mmol,1 当量)在 23℃溶解于 20%哌啶的 DMF 溶液中(4.0ml,0.22M)。30 分钟后,将乙酸乙酯(20ml)和盐水(20ml)加入到该反应混合物中。将这两个层分离,并且将该水层用乙酸乙酯(2×20ml)萃取。将这些合并的有机层用盐水(3×25ml)洗涤,用无水硫酸钠干燥,过滤并且在减压下进行浓缩。将残余物用快速柱色谱法(Combiflash RF 系统,24 克硅凝胶,梯度 0 至 100%的乙酸乙酯-己烷)纯化以获得黄色固体状的游离胺 S4(370mg,90%)。该对映异构体的纯度降至 75%(用采用 AS-H 柱的 Berger 超临界流体色谱法(SFC)确定)。

[0480] (S)-2-(5-(4-氯苯基)-6,7-二甲基-2-氧-2,3-二氢-1H-噻吩并[2,3-e][1,4]二氮杂环庚-3-基)乙酸叔丁酯 (S5)

[0481] 将氨基酮 (S4)(280mg,0.63mmol)溶解于 10%乙酸乙醇溶液中(21ml,0.03M)。该反应混合物被加热至 85℃。30 分钟后,将所有的溶剂在减压下去除。将残余物用快速柱色谱法(Combiflash RF 系统,12 克硅凝胶,梯度 0 至 100%的乙酸乙酯-己烷)纯化以获得白色固体状的化合物 S5(241mg,95%)。S5 的对映异构体纯度为 67%(用采用 AS-H 柱的 Berger 超临界流体色谱法(SFC)确定)。

[0482] 2-(5-(4-氯苯基)-6,7-二甲基-2-硫代-2,3-二氢-1H-噻吩并[2,3-e][1,4]二氮杂环庚-3-基)乙酸叔丁酯 (S6)

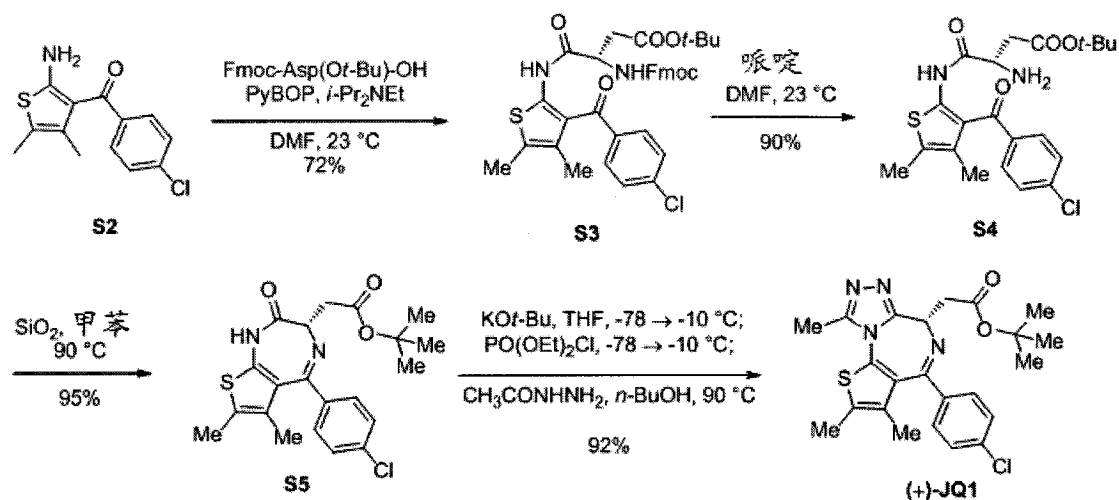
[0483] 将五硫化二磷(222mg,1.0mmol,2.00 当量)、碳酸氢钠(168mg,2.0mmol,4.00 当量)依次加到 S5(210mg,0.5mmol,1 当量)的二甘醇二甲醚溶液(1.25ml,0.4M)中。将该反应混合物加热至 90℃。16h 后,添加盐水(20ml)和乙酸乙酯(35ml)。将这两个层分离,并且将该水层用乙酸乙酯(3×30ml)萃取。将这些合并的有机层用盐水(2×15ml)洗涤,用无水硫酸钠干燥,过滤并且在减压下进行浓缩。将残余物用快速柱色谱法(Combiflash RF 系统,24 克硅凝胶,梯度 0 至 100%的乙酸乙酯-己烷)纯化以获得棕色固体状的含有回收的 S5(73mg,34%)的 S6(141mg,65%)。

[0484] 2-(4-(4-氯苯基)-2,3,9-三甲基-6H-噻吩并[3,2-f][1,2,4]三唑并[4,3-a][1,4]二氮杂环庚-6-基)乙酸叔丁酯 [(±)JQ1]

[0485] 在 0℃,将肼(0.015ml,0.45mmol,1.25 当量)加到 S6(158mg,0.36mmol,1 当量)的 THF(2.6ml,0.14M)溶液中。将该反应混合物加温至 23℃,并且在 23℃搅拌 1h。将所有的溶剂在减压下去除。该得到的肼直接使用,无需纯化。然后将该肼溶解于原乙酸三甲酯和甲苯(6ml,0.06M)的 2:3 混合物中。将该反应混合物加热至 120℃。2h 后,将所有的溶剂在减压下去除。将残余物用快速柱色谱法(Combiflash 系统,4 克硅凝胶,梯度 0 至 100%的乙酸乙酯-己烷)纯化以获得白色固体状的 JQ1(在两步中,140mg,85%)。这些反应条件进一步使该手性中心差向异构化,产生消旋体, JQ1(用采用 AS-H 柱的 Berger 超临界流体色谱法(SFC)确定)。

[0486] 方案 S2. 富含对映异构体的 (+)-JQ1 的合成

[0487]



[0488] (S)-叔丁基-3-([[(9H-芴-9-基)甲氧基]羰基]氨基)-4-{[3-(4-氯苯甲酰基)-4,5-二甲基噻吩-2-基]氨基}-4-氧丁酸酯 (S3)

[0489] 将(苯并三唑-1-基氧基)三吡咯烷基磷(PyBOP)(494mg, 0.95mmol, 0.95当量)、N,N-二异丙基乙胺(0.50ml, 2.8mmol, 2.75当量)依次加入到9-芴甲氧羰基-天冬氨酸β-叔丁基酯[Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH](411mg, 1.00mmol, 1.0当量)的N,N-二甲基甲酰胺溶液中(1.0ml, 1.0M)中。然后在23℃将该混合物搅拌5分钟。然后添加固体状S2(266mg, 1.0mmol, 1当量)。将该反应混合物在23℃搅拌。4h后,添加乙酸乙酯(20ml)和盐水(20ml)。将这两个层分离,并且将该水层用乙酸乙酯(2×20ml)萃取。将这些合并的有机层用盐水(30ml)洗涤,用无水硫酸钠干燥,过滤并且在减压下进行浓缩。将残余物用快速柱色谱法(Combiflash RF系统,40克硅胶,梯度0至100%的乙酸乙酯-己烷)纯化以获得棕色油状的S3(452mg, 72%)。

[0490] (S)-3-氨基-4-((3-(4-氯苯甲酰基)-4,5-二甲基噻吩-2-基)氨基)-4-氧丁酸叔丁酯 (S4)

[0491] 将化合物S3(310mg, 0.47mmol, 1当量)在23℃下溶解于20%吡啶的DMF溶液中(2.2ml, 0.22M)。30分钟后,将乙酸乙酯(20ml)和盐水(20ml)加入到该反应混合物中。将这两个层分离,并且将该水层用乙酸乙酯(2×20ml)萃取。将这些合并的有机层用盐水(3×25ml)洗涤,用无水硫酸钠干燥,过滤并且在减压下进行浓缩。将残余物用快速柱色谱法(Combiflash RF系统,24克硅胶,梯度0至100%的乙酸乙酯-己烷)纯化以获得黄色固体状的游离胺S4(184mg, 90%)。该对映异构体的纯度是91%(用采用AS-H柱的Berger超临界流体色谱法(SFC)确定)。

[0492] (S)-2-(5-(4-氯苯基)-6,7-二甲基-2-氧-2,3-二氢-1H-噻吩并[2,3-e][1,4]二氮杂环庚-3-基)乙酸叔丁酯 (S5)

[0493] 将氨基酮(S4)(184mg, 0.42mmol)溶解于甲苯(10ml, 0.04M)中。添加硅胶(300mg),并且将该反应混合物加热至90℃。3h后,将该混合物冷却至23℃。将该硅胶进行过滤并且用乙酸乙酯进行洗涤。将这些合并的滤液浓缩。将残余物用快速柱色谱法(Combiflash RF系统,12克硅胶,梯度0至100%的乙酸乙酯-己烷)纯化以获得白色固体状的化合物S5(168mg, 95%)。S5的对映异构体纯度为90%(用采用AS-H柱的Berger超临界流体色谱法(SFC)确定)。

[0494] (S)-2-(4-(4-氯苯基)-2,3,9-三甲基-6H-噻吩并[3,2-f][1,2,4]三唑并[4,

3-a][1,4] 二氮杂环庚-6-基) 乙酸叔丁酯 [(+)-JQ1]

[0495] 在 -78 °C 将叔丁醇钾 (1.0M THF 溶液, 0.3ml, 0.30mmol, 1.10 当量) 加到 S5 (114mg, 0.27mmol, 1 当量) 的 THF (1.8ml, 0.15M) 溶液中。将该反应混合物加温至 -10 °C, 并且在 23 °C 搅拌 30min。将该反应混合物冷却至 -78 °C。将氯磷酸二乙酯 (0.047ml, 0.32mmol, 1.20 当量) 加入反应混合物中 22。将该获得的混合物经 45min 加温至 -10 °C。将乙酰肼 (30mg, 0.40mmol, 1.50 当量) 加入反应混合物中。将该反应混合物在 23 °C 搅拌。1h 后, 将 1-丁醇 (2.25ml) 加到反应混合物中, 将其加热至 90 °C。1h 后, 将所有溶剂在减压下去除。将残余物用快速柱色谱法 (Combiflash RF 系统, 4 克硅胶, 梯度 0 至 100% 的乙酸乙酯-己烷) 纯化以获得对映异构体纯度 (用采用 AS-H 柱的 Berger 超临界流体色谱法确定, 85% 己烷-甲醇, 210nm, t_R (R-对映异构体) = 1.59min, t_R (S-对映异构体) = 3.67min) 为 90% 的白色固体状的 (+)-JQ1 (114mg, 92%)。用制备型 HPLC (采用 OD-H 柱的 Agilent 高压液相色谱) 将该产物进一步纯化以获得大于 99% ee 的 S-对映异构体。

[0496] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3 , 25 °C) δ 7.39 (d, J = 8.4Hz, 2H), 7.31 (d, J = 8.4Hz, 2H), 4.54 (t, J = 6.6MHz, 1H), 3.54-3.52 (m, 2H), 2.66 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 1.67 (s, 3H), 1.48 (s, 9H)。

[0497] ^{13}C NMR (150MHz, CDCl_3 , 25 °C) δ 171.0, 163.8, 155.7, 150.0, 136.9, 131.1, 130.9, 130.6, 130.3, 128.9, 81.2, 54.1, 38.1, 28.4, 14.6, 13.5, 12.1。

[0498] 对 $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{ClN}_2\text{O}_3\text{S}[\text{M}+\text{H}]^+$ 的 HRMS (ESI) 计算值 (calc'd): 457.1460, 实验值 (found) 457.1451m/z。

[0499] TLC (EtOAc), R_f : 0.32 (UV)

[0500] $[\alpha]_D^{22} = +75$ (c 0.5, CHCl_3)

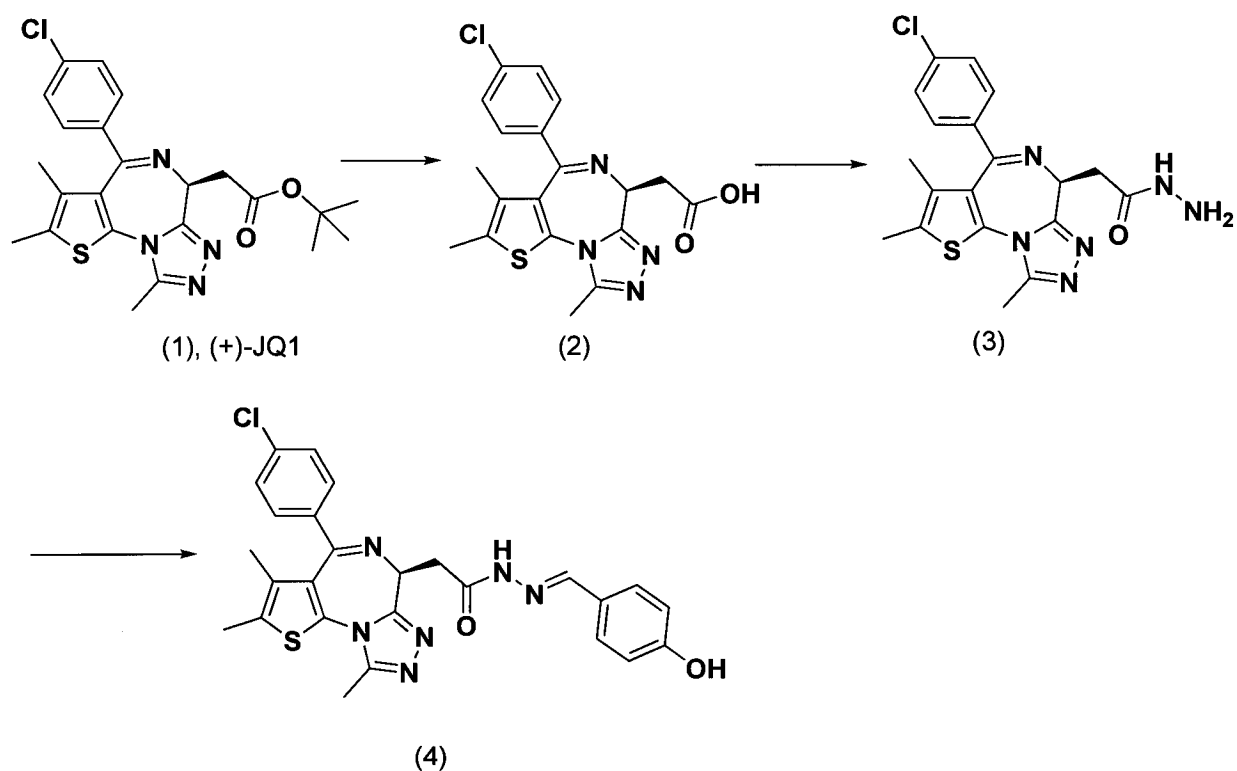
[0501] 采用 Fmoc-D-Asp (Ot-Bu)-OH 作为起始材料, 以相似的方式合成 (-)-JQ1, 并且用制备型 HPLC (采用 OD-H 柱的 Agilent 高压液相色谱) 将该产品进一步纯化以获得大于 99% ee 的 R-对映异构体。 $[\alpha]_D^{22} = -72$ (c 0.5, CHCl_3)

[0502] 另外的化合物的合成

[0503] 如方案 S3 图示制备本发明的另外的化合物。

[0504] 方案 S3. 肼衍生物的合成

[0505]



[0506] 如方案 S3 所示,将 (+)-JQ1 (1) 的叔丁基酯进行切割以生成自由酸 (2),这种自由酸与肼偶联生成酰肼 (3)。与 4- 羟基苯甲醛的反应生成腙 (4)。

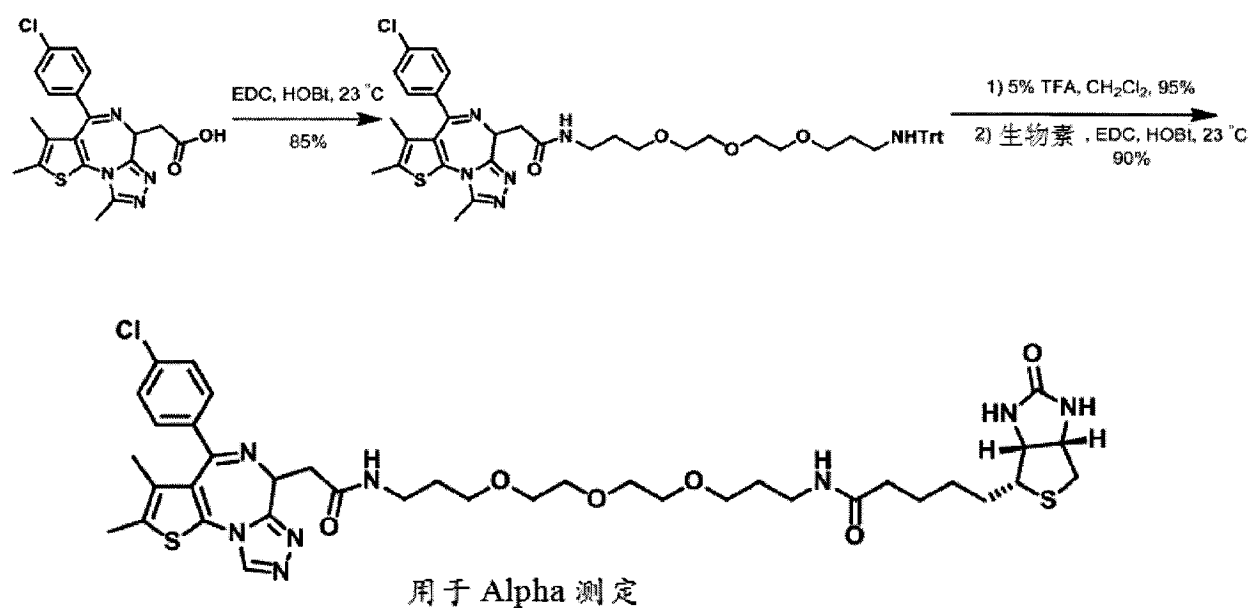
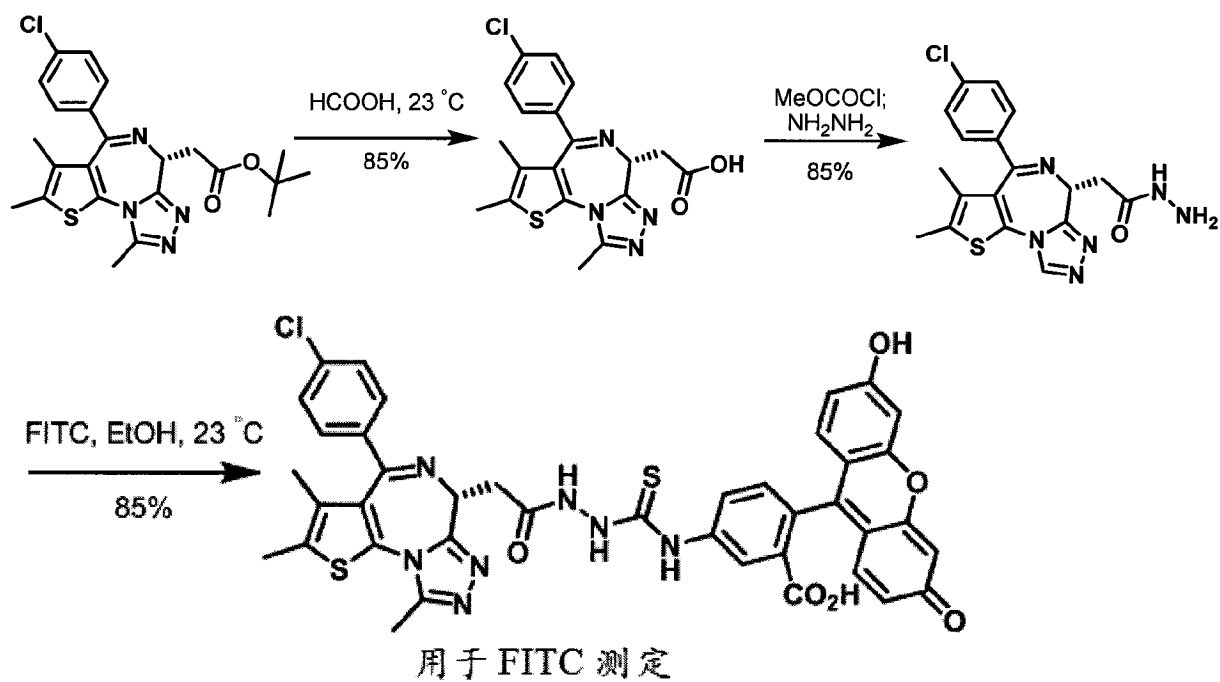
[0507] 酰肼 (3) 和腙 (4) 二者均在至少一个生物测定中显示出活性。

[0508] 通过酰肼 (3) 与多种含有羰基的化合物 (见上表 A) 的反应制备一种化合物库。

[0509] 制备另外化合物用作,如,测试开发的探针。在下面的方案 S4 中示出一个示例性的合成。

[0510] 方案 S4. 可用作探针的衍生物的合成。

[0511]

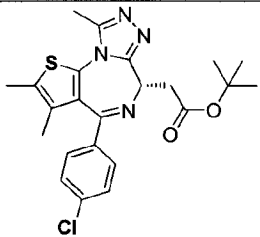
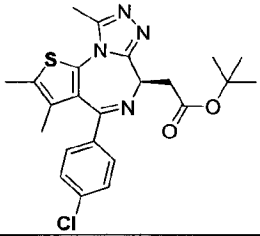
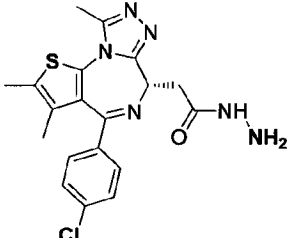
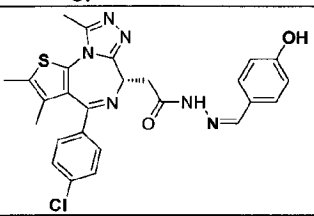
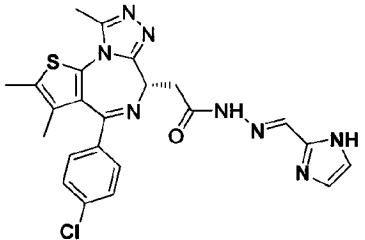
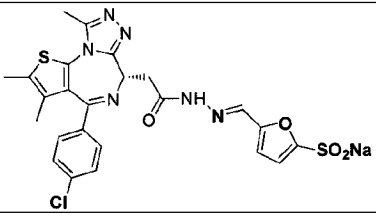
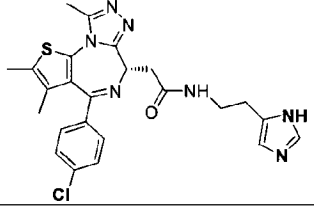


[0512] 制备如下表中所示的额外的化合物：

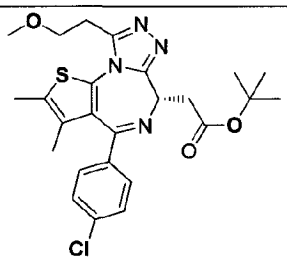
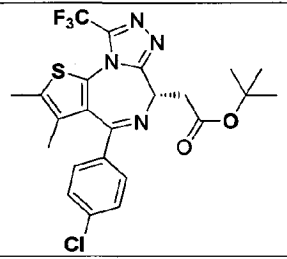
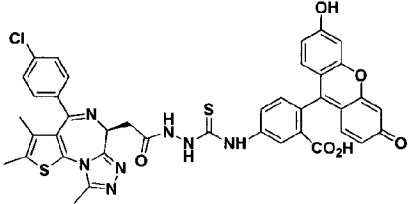
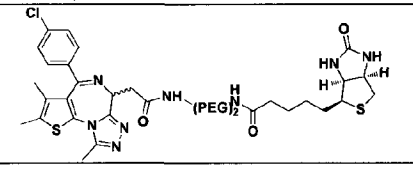
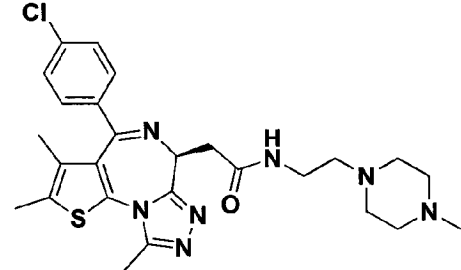
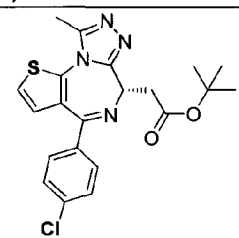
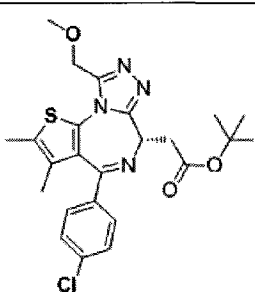
[0513]

化合物名称	结构	MS [M+H] ⁺ m/z (观察到的)
-------	----	----------------------------------

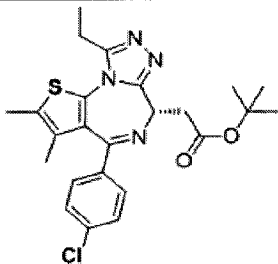
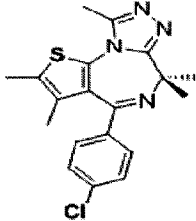
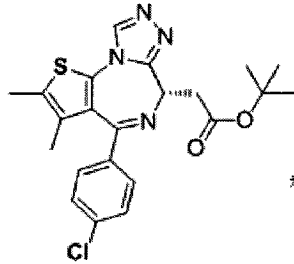
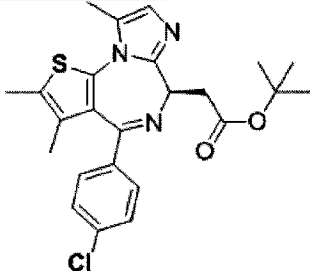
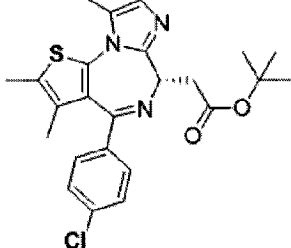
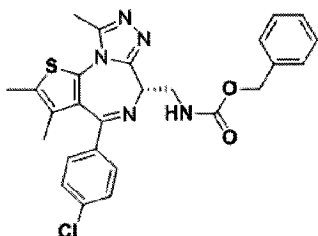
[0514]

(S)-JQ1		457.1
(R)-JQ1		457.1
JQ3		415.1
JQ4		519.1
JQ6		493.1
JQ7		579.0
JQ8		494.1

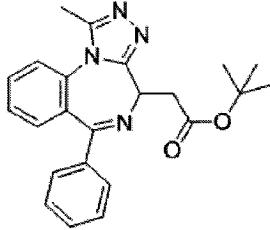
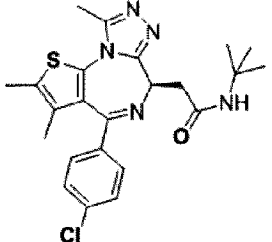
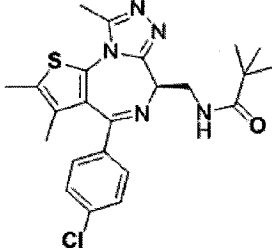
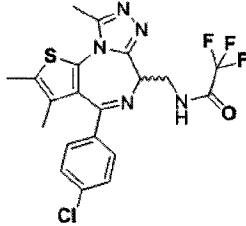
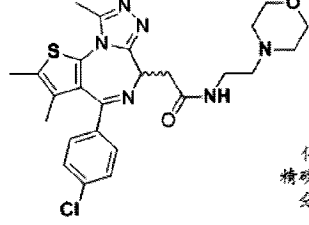
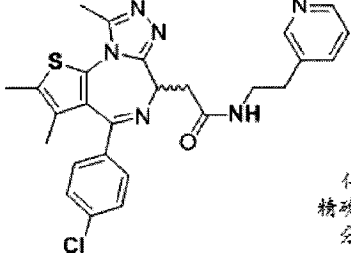
[0515]

JQ10		501.1
JQ11		511.1
JQ1-FITC		804.1
JQ1-生物素		829.3
JQ13		526.2
KS1		429.1
JQ18	 化学式: C₂₄H₂₇ClN₄O₃S 精确质量: 486.14924 分子量: 487.01418	487.1

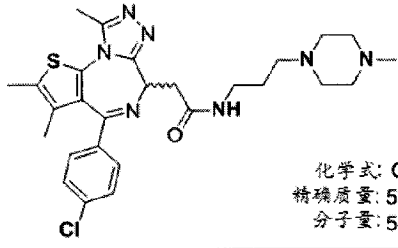
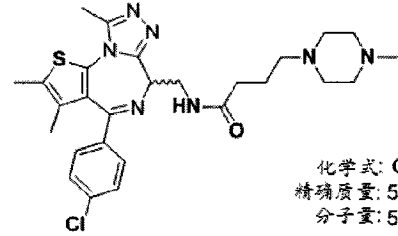
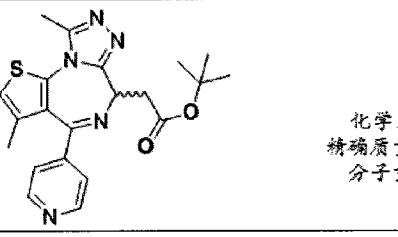
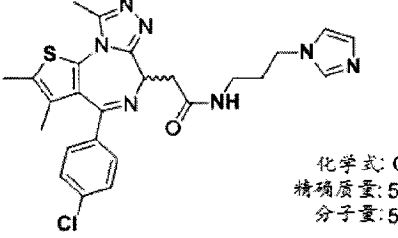
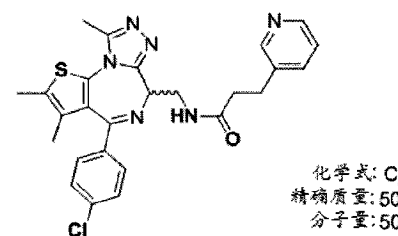
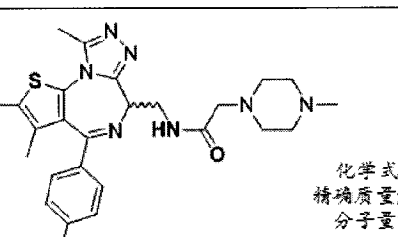
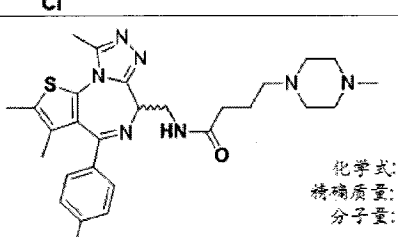
[0516]

JQ19	 化学式: $C_{24}H_{27}ClN_4O_2S$ 精确质量: 470.15432 分子量: 471.01478	471.1
JQ20	 化学式: $C_{19}H_{19}ClN_4S$ 精确质量: 370.10190 分子量: 370.89896 JQI-II-023	370.1
JQ21	 JQI-II-024 化学式: $C_{22}H_{23}ClN_4O_2S$ 精确质量: 442.12302 分子量: 442.96162	443.1
JQ24A	 化学式: $C_{24}H_{26}ClN_3O_2S$ 精确质量: 455.1434 分子量: 456.0001	456.1
JQ24B	 化学式: $C_{24}H_{26}ClN_3O_2S$ 精确质量: 455.1434 分子量: 456.0001	456.1
JQ25	 化学式: $C_{26}H_{24}ClN_5O_2S$ 精确质量: 505.1339 分子量: 506.0191	506.1

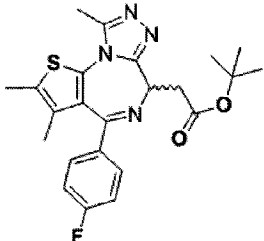
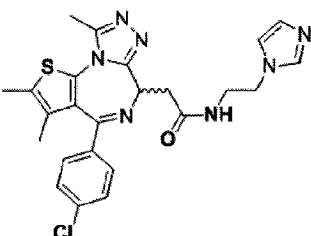
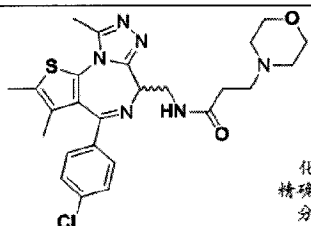
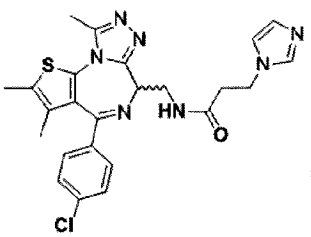
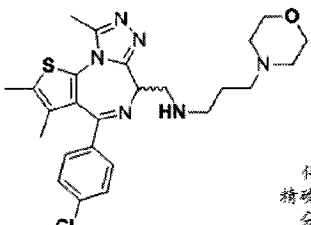
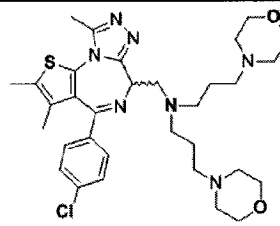
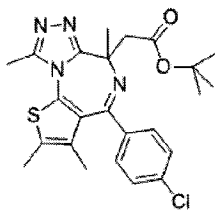
[0517]

JQB	 化学式: $C_{23}H_{24}N_4O_2$ 精确质量: 388.1899 分子量: 388.4623	389.2
JQ30	 化学式: $C_{23}H_{26}ClN_5OS$ 精确质量: 455.1547 分子量: 456.0034	456.2
JQ31	 化学式: $C_{23}H_{26}ClN_5OS$ 精确质量: 455.1547 分子量: 456.0034	456.2
JQ32	 化学式: $C_{20}H_{17}ClF_3N_5OS$ 精确质量: 467.0794 分子量: 467.8951	468.1
JQ33	 化学式: $C_{25}H_{29}ClN_6O_2S$ 精确质量: 512.1761 分子量: 513.0548	512.2
JQ34	 化学式: $C_{26}H_{25}ClN_6OS$ 精确质量: 504.1499 分子量: 505.0343	505.1

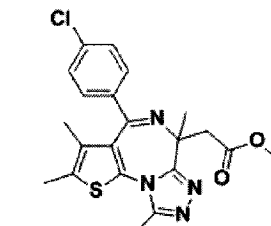
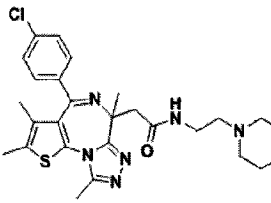
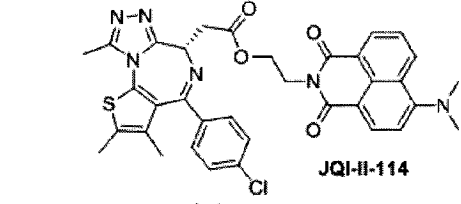
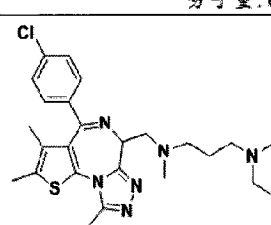
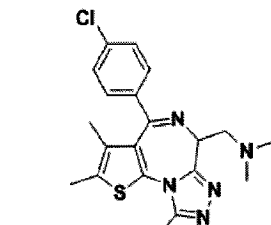
[0518]

JQ35	 化学式: $C_{27}H_{34}ClN_7OS$ 精确质量: 539.2234 分子量: 540.1232	540.2
JQ36	 化学式: $C_{27}H_{34}ClN_7OS$ 精确质量: 539.2234 分子量: 540.1232	540.2
JQ37	 化学式: $C_{22}H_{25}N_5O_2S$ 精确质量: 423.1729 分子量: 423.5312	424.2
JQ38	 化学式: $C_{25}H_{26}ClN_7OS$ 精确质量: 507.1608 分子量: 508.0382	508.2
JQ39	 化学式: $C_{26}H_{25}ClN_6OS$ 精确质量: 504.1499 分子量: 505.0343	505.1
JQ40	 化学式: $C_{25}H_{30}ClN_7OS$ 精确质量: 511.1921 分子量: 512.0700	512.2
JQ41	 化学式: $C_{27}H_{34}ClN_7OS$ 精确质量: 539.2234 分子量: 540.1232	540.2

[0519]

JQ42	 化学式: $C_{23}H_{25}FN_4O_2S$ 精确质量: 440.1682 分子量: 440.5336	441.2
JQ43	 化学式: $C_{24}H_{24}ClN_7OS$ 精确质量: 493.1452 分子量: 494.0117	494.1
JQ44	 化学式: $C_{25}H_{29}ClN_6O_2S$ 精确质量: 512.1761 分子量: 513.0548	513.2
JQ45	 化学式: $C_{24}H_{24}ClN_7OS$ 精确质量: 493.1452 分子量: 494.0117	494.1
JQ46	 化学式: $C_{25}H_{31}ClN_6OS$ 精确质量: 498.1969 分子量: 499.0712	499.2
JQ47	 化学式: $C_{32}H_{44}ClN_7O_2S$ 精确质量: 625.2966 分子量: 626.2555	626.3
JQ48	 精确质量: 470.1543 分子量: 471.0148	471.2

[0520]

JQ49	 精确质量: 428.1074 分子量: 428.9350	429.1
JQ50	 精确质量: 539.2234 分子量: 540.1232	540.2
JQ51	 JQI-II-114 精确质量: 666.1816 分子量: 667.1764	667.2
JQ52	 精确质量: 512.2125 分子量: 513.0978	513.2
JQ53	 精确质量: 399.1284 分子量: 399.9402	400.1

[0521] 每个化合物的色谱数据与该指定结构相一致。

[0522] II. 生物学活性和治疗方法

[0523] 实例 1 :对于急性髓性白血病细胞的增殖而言, Brd4 是关键并且特异性地需要的

[0524] 为了系统地探查急性髓性白血病细胞 (AML) 所需的表观遗传通路,进行了 shRNA 筛选。为此,构建了靶向 243 个已知染色质调节子的定制 hRNA 文库。该文库包括表观遗传标记的多数“写入器 ()”、“阅读器 ()”、和“消除器 ()”(附图 1A)。将 1,095 个 shRNAs (每个基因三至六个) 的文库构建到 TRMPV 中, TRMPV 是一种优化用于阴性选择 RNAi 筛选的载体。在初步筛选中,该文库作为一个池被转导进入一个已建立的 Tet-On 感受态 AML 小鼠模型细胞系中,该细胞系包括 MLL-AF9 和 Nras^{G12D} 融合基因 (Zuber 等人,《自然生物技术》(Nat Biotechnol) 2011 ;29 :79-83)。在药物选择后,通过添加强力霉素 (dox) 诱导 shRNA 表达。使用从基因组 DNA 扩增的 shRNA 引导链的深度测序,监控培养十四天以后文库表示中的变化。(附图 1B 和 2A-2D)。在两个独立重复的每一个中,177 个 shRNA 表现出大于二十倍的消耗,这被用作评分标准。对于靶向必需基因 (Rpa1、Rpa3、Pcna、Polr2b) 的所有八个阳性

对照 shRNA 连同靶向两个已知 MLL-AF9 辅因子 (Men1 和 Psip1) 的若干 shRNA 而言,达到了正评分。具有在初步筛选中达到评分标准的至少两个独立 shRNA 的基因经历一个广泛的逐一验证,其中使用独立的 MLL-AF9/Nras^{G12D} AML 系和载体系统 (附图 3A) (对于另外的细节,参见 PCT 公开号 WO/2010/111712)。在初步筛选和验证阶段这二者中,靶向转录因子 Brd4 的 shRNA 是在最强烈消耗的 shRNA 中。总体来说,Brd4 被鉴别为对该 shRNA 筛选的实验条件最具响应性的基因 (附图 1B 和 3B)。

[0525] Brd4 是含溴基结构域的蛋白的 BET 家族的一个成员,这些蛋白结合乙酰化的组蛋白来影响转录。BRD4 还是一个以鳞状细胞癌的罕见形式经由染色体易位而突变的原癌基因。尚未描述 Brd4 在白血病中的作用。小分子 BET 溴基结构域抑制剂的最新进展 (Filippakopoulos 等人,《自然》(Nature) 2010 ;468 :1067-73),连同 Brd4 被鉴别为上述 shRNA 筛选中最具响应性的基因,这提示 Brd4 是用于 AML 治疗的一个新颖的药物靶标。五个独立的 Brd4shRNA 显示出了在敲低效率和生长抑制之间的近似相符性,这表明了中靶效应 (on-target effects) (附图 6A 和 6B)。Brd4 抑制导致白血病细胞的细胞周期停滞以及凋亡,而在永生的鼠胚胎成纤维细胞 () 中的等价敲低只导致适度的细胞周期抑制而没有细胞毒性 (附图 4A-4D)。Brd4 敲低还未能影响非转化的成红细胞的生长 (附图 4E)。此外,靶向 BRD4 的 shRNA 还足以在两个 MLL-AF9+ 人 AML 系中诱导细胞周期停滞 (附图 5A-5D)。总之,这些结果表明在 MLL-AF9+AML 中,Brd4 是关键的需要。

[0526] 实例 2 :溴基结构域蛋白抑制剂 JQ1 特异性地阻断急性髓性白血病 (AML) 细胞增殖

[0527] 在多种白血病细胞类型中,测试了 JQ1 (BET 溴基结构域的顶级小分子抑制剂,具有对 Brd4 的第一溴基结构域的最高亲和力 (等人) 的效果。与成纤维细胞和 G1E 相比,小鼠 MLL- 融合白血病细胞的增殖对亚微摩尔的 JQ1 浓度显著敏感 (附图 6B),这与 Brd4-shRNA 对这些不同细胞类型的增殖的相对影响一致。还在一系列已建立的人类白血病细胞系中 (如在成年的和小儿的原代白血病样品中) 检验了的 JQ1 的生长抑制效果。在 13/14 个 AML 细胞系 (附图 6C 和 7A) 以及跨不同基因亚型的 12/15 个原代 AML (附图 8 和 9) 中,观察到了 JQ1 (IC₅₀ < 500nM) 的广泛生长抑制活性。此外 3/3 个测试的原代 MLL- 重排小儿白血病对 JQ1 高度敏感 (附图 9A 和 9B),同时其他测试的非 AML 白血病和实体瘤细胞系显示出对该化合物的最小敏感性 (附图 6C 和 7B)。在所有测试的 AML 系中,JQ1 处理普遍引发细胞周期停滞和凋亡。类似于 shRNA- 介导的 Brd4 敲低后所见的效果 (附图 6D、6E、8A-8D、9A-9C、10A-10C)。总之,这些数据表明在体外,Brd4 对于 AML 生长是重要的,可以使用溴基结构域抑制剂 JQ1 对其进行有效靶向。

[0528] 实例 3 :通过抑制 Brd4,在体内抑制白血病进展

[0529] 研究了 Brd4 对 AML 进展的体内相关性。为了在小鼠中建立的 AML 中抑制 Brd4,用含抗 Brd4shRNA 的或含对照 shRNA 的 TRMPV 构建体转导 Tet-On 感受态 MLL-AF9/Nras^{G12D} 白血病细胞。然后将这些细胞移植到事先经亚致死剂量照射的第二受体小鼠中。在发病以后,通过生物发光成像对其进行确认,通过给予强力霉素 (dox) 诱导 shRNA 表达 (附图 11A-11F)。随后的监控揭示,Brd4 抑制导致白血病进展的显著延迟,并且提供了显著的存活益处 (附图 12A-12C)。利用 TRMPV 载体中与 shRNA 表达相联系的 dsRed 报告子 (Zuber 等人,《自然生物技术》2011 ;29 :79-83),流式细胞术分析证实,如与对照相比,在终末白

血病载荷内, Brd4-shRNA- 阳性细胞被消耗。该数据表明, 研究的小鼠中的致死性是由于 Brd4-shRNA- 阴性细胞的发展 (附图 12D 和 12E)。总之, 这些数据表明, RNAi 介导的 Brd4 抑制在体内抑制了白血病扩张。

[0530] 实例 4 :在体内, JQ1 处理抑制已建立的 AML

[0531] 为了检验在 AML 中 JQ1 是否具有单药活性, 对用 MLL-AF9/Nras^{G12D} 白血病细胞移植的小鼠每天注射 JQ1 (50mg/kg) 亦或载体进行处理。JQ1 给药导致疾病进展的显著延迟并且显著延长了存活 (附图 12F-12H)。在已建立的疾病的环境中, JQ1 也展示了单药活性, 如在 MLL-AF9/Nras^{G12D} 和在 AML1-ETO9a/Nras^{G12D}/p53^{-/-} AML 模型中所见 (附图 12I、13A-13E、以及 14A-14C), 其中这两者都已知对常规化学疗法不敏感 (Zuber 等人,《基因与发育》(), 2009 ; 23 :877-89)。与以前的发现一致 (Filippakopoulos 等人,《自然》2010 ;468 :1067-73), 在小鼠中 JQ1 处理是很好地耐受的, 如果有的话, 也是对正常血细胞生成具有很小影响 (附图 15、16、17A 和 17B)。这些发现证明, JQ1 作为单药在体内具有有效的并且白血病特异性的作用。

[0532] 实例 5 :通过 shRNA 或 JQ1 的 Brd4 抑制降低白血病细胞的干细胞潜能并且诱导它们的分化

[0533] AML 特征在于与无能力完成终末骨髓分化相联系的扩展的自我更新能力。因此, 接下来考虑 Brd4 的存在是否影响白血病细胞的分化状态。Brd4shRNA 表达和 JQ1 处理二者将 MLL-AF9/Nras^{G12D} 白血病细胞的形态学从骨髓单核细胞胚细胞 (myelomonocytic blast) 改变为具有巨噬细胞样外观的细胞 (附图 18A 和 18B)。在通过 shRNA 亦或 JQ1 处理的 Brd4 抑制时, 上调的基因涉及巨噬细胞功能和 Mac-1 (一种髓样分化标志物)。Brd4 抑制下调了 c-kit, 它的水平与 MLL 重排白血病中的白血病干细胞的频率相关 (附图 18C 和 18D)。此外, JQ1 处理在多数的测试原代白血病样品中诱导了的成熟表型的形态学征象, 尽管程度变化 (附图 8 和 9)。

[0534] 为了进一步验证 Brd4 的抑制是否消除了 LSC 腔, 对从 Brd4-shRNA 和 JQ1 处理的白血病细胞获得的表达微阵列进行了基因集合富集分析 (GSEA) (Subramanian 等人,《美国国家科学院院刊》2005 ;102 :15545-50)。GSEA 揭示了在 Brd4 抑制后的巨噬细胞特异性基因显著上调 (附图 18E 和 18F), 连同先前示出的基因表达信号的总体损失, 从而从非自我更新的白血病细胞子集区别 LSC (附图 18G 和 18H) (Somervaille 等人,《细胞干细胞》(Cell Stem Cell), 2009 ;4 :129-40)。附图 18I 包括示出 RT-qPCR 结果的图。在 JQ1 处理的人 AML 细胞系 THP-1 中可见基因表达改变的类似曲线 (附图 19)。重要地, 在这些测定中, 经由 shRNA 的 Brd4 敲低和药理学的 BET 溴基结构域抑制之间的强表型相似确立了 Brd4 是 JQ1 的靶标。因此, 这些结果揭示, Brd4 对于维持白血病干细胞群以及对于防止它们的终末分化是必要的。

[0535] 实例 6 :在鼠和人白血病细胞中, JQ1 抑制 Myc 通路 (一条与白血病干细胞自我更新相关联的通路)

[0536] 因为 Myc 通路与白血病干细胞自我更新相关联, 并且 Myc 似乎是 Brd4 的下游靶标, 因此研究了 Brd4 抑制对 Myc 水平的影响。在小鼠 MLL-AF9/Nras^{G12D} 白血病细胞中, 经由 shRNA 或 JQ1 处理的 Brd4 抑制导致 Myc mRNA 水平和 Myc 蛋白水平的大幅减少 ;与此对比, Brd4 在 MEF 或 G1E 细胞中具有最小作用 (附图 20A-20C、21A、和 21B)。在 JQ1 暴露 60

分钟内发生 Myc mRNA 水平的下调,定性地先于涉及巨噬细胞分化的基因的增加表达,例如 Cd74(附图 20D)。进一步支持直接转录调节,免疫沉淀反应实验鉴别了 Myc 启动子的~2 千碱基上游的聚焦性 Brd4 占有区域,该区域在暴露于 JQ1 后消除(附图 20E)。如预期那样,对用 shRNA 或用 JQ1 的 Brd4 抑制的 RNAi 或 JQ1 诱导的抑制还导致 Myc 靶基因表达的总体减少(附图 21C 和 22)(还参见 Kim 等人,《细胞》2010;143:313-24;以及 Schuhmacher 等人,《核酸研究》,2001;29:397-406)。明显地,在检验的一系列广泛的小鼠和人白血病细胞系中,JQ1 处理引发了 Myc 下调(附图 20A-20C,附图 23A 和 23B),表明 JQ1 提供了一种在一系列白血病亚型中抑制 Myc 通路的工具。附图 21D 包括评估 Myc 下游靶基因表达变化的 GSEA 图。

[0537] 实例 7: Brd4 通过独立于 Myc 的通路调节细胞存活

[0538] 接下来,进行实验以进一步评估 JQ1 处理的抗增殖效果是否是经由抑制 Myc 活性发生。在此,产生 MLL-AF9/Nras^{G12D} 白细胞培养,使得从逆转录病毒启动子异位表达 Myc cDNA,这导致完全抗 JQ1 诱导的转录抑制的轻微的但是组成性的 Myc 过表达(附图 20F, 24A 和 24B)。显著地,异位的 Myc 赋予对 JQ1、Brd4shRNA 诱导的细胞周期停滞、以及巨噬细胞分化的几乎完全的抗性(附图)。此外,总体表达曲线揭示,绝大部分 JQ1 诱导的转录变化实际是 Myc 下调的次级效应(附图 26A-26C)。Myc 自身的 shRNA 敲低也引发类似 Brd4 抑制的生长停滞和髓样分化的模式(附图 27A-D),这进一步支持 Myc 作为 JQ1 诱导的效应的重要中介物。重要地,异位 Myc 表达不能防止 JQ1 诱导的细胞死亡,这提示在调节细胞存活中 Brd4 的另外的独立于 Myc 的作用。这些发现表明,在维持 Myc 活性以保持白血病中的未分化细胞状态方面,Brd4 具有重要作用。

[0539] 通过采用靶向表观遗传调节子的无偏筛选方法(non-biased screening approach),Brd4 被鉴别为对 AML 疾病维持所需的关键因子。因为在 AML 中 Brd4 并不明显突变或过表达(附图 28A 和 28B),单通过该疾病的遗传的或转录的表征,尚未揭示白血病细胞对 Brd4 抑制的精细敏感性。此外,在此描述的结果证明,溴基结构域抑制剂在不同 AML 背景下具有广泛活性,并且通过比较它的效果与 Brd4-shRNA 诱导的那些,提供了以下证据: Brd4 是 JQ1 抗白血病活性的相关靶标。JQ1 是强健(robust)的抗白血病分子,在啮齿动物中具有约一小时的半寿期(附图 29)。在体内,用 Brd4shRNA 也观察到这样的效果,明白地凸显了 RNAi 筛选在揭示癌症中新颖的药物靶标中的效用。

[0540] 作为乙酰基-赖氨酸结合域的竞争性抑制剂,JQ1 干扰 Brd4“阅读”促进转录激活的组蛋白乙酰化标识的能力(Filippakopoulos 等人,2010)。当应用于白血病细胞,JQ1 干扰支持自我更新的转录回路;因此,JQ1 诱导了白血病干细胞(LSC)的终末分化。Myb 是 MLL-AF9 诱导的转录程序中的中心中介物,并且对于异常自我更新状态而言是重要的,这样使得 Myb 抑制足以消除疾病(Zuber,已提交)。有趣地,Brd4 的遗传的或药理学的抑制之后产生的基因表达变化显著类似于在抑制 MLL-AF9 或 Myb 时所观察到的那些(附图)。然而,JQ1 处理并不影响 Hoxa7、Hoxa9、或 Meis1 的表达,它们是 MLL-AF9 的良好确立的直接靶标。这表明,Brd4 抑制并不抵消 MLL-AF9 的总体功能,而是抑制了靶集的其他下游靶标,例如经由 Myc 的抑制。总之,似乎 MLL-AF9、Myb、和 Brd4 在恶性自我更新所必要的普通转录回路中功能性地交叉。该程序的关键效应因子是癌蛋白 Myc(Zuber 等人,已提交),它已经被验证为一个有吸引力的治疗靶标,但不适合传统药理学抑制。

[0541] 以上提到的实例明确证明,靶向 Brd4 对白血病背景具有选择性地压制了 Myc 表达并且限制了自我更新,因此避免了与系统的 Myc 抑制潜在相关联的造血毒性。因此,经由 RNAi 敲低或 JQ1 处理抑制 Brd4 通过直接调制表观遗传机器,定义了一种用于破解涉及鼠和人白血病相关联的难懂的致癌通路的特定并有效的策略。

[0542] 使用以下材料和方法,获得了在以上实例中的在此报告的结果。

[0543] 质粒

[0544] 对于有条件性的 RNAi 实验,从 TRMPV-Neo 载体亦或 TtTMPV-Neo 载体表达 shRNA,这先前已经进行过描述 (Zuber 等人,《自然-生物技术》2011;29:79-83)。为了筛选验证,将 shRNA 克隆到 LMN(MSCV-miR30-PGK-NeoR-IRES-GFP) 中,LMN 是基于 LMP3 通过用 NeoR 盒替代 PuroR 转基因而产生的。对于 Myc 拯救实验,将野生型小鼠 Myc cDNA 亚克隆到 MSCV-PGK-Puro-IRES-GFP(MSCV-PIG) 中 (Hemann 等人,《自然遗传学》(Nat Genet) 2003;33:396-400)。

[0545] 池化的阴性选择 RNAi 筛选

[0546] 使用 miR30 适配的 BIOPREDSi 预测,设计靶向到调节小鼠基因的 243 染色质的定制 shRNA 文库 (Huesken 等人,《自然-生物技术》2005;23:995-1001) (6shRNA/基因),并且通过 PCR 克隆一个在 55k 定制的阵列上合成的寡核苷酸池来构建该文库 (安捷伦科技有限公司 (Agilent Technologies),列克星敦,马萨诸塞州 (Lexington, MA),如以前所述 (Zuber 等人,2011)。在序列验证后,以相等的浓度在一个池中将 1095 个 shRNA (3-6 个/基因) 与若干阳性和阴性对照 shRNA 组合在一起。将该池亚克隆到 TRMPV-Neo 中,并且使用主要导致单逆转录病毒整合的条件将其转导到 Tet-On MLL-AF9/Nras^{G12D} 白血病细胞中,并且以 > 500 个细胞的计算数目表示每个 shRNA (总计感染 3 千万个细胞,2% 的转导效率)。使用 mg/ml G418 (Invitrogen 公司, (卡尔斯巴德,加利福尼亚州 (Carlsbad, CA)) 选择转导的细胞,持续 5 天;贯穿该实验,在每一传代 > 2 千万个细胞被维持以保存文库表现度 (library representation)。在药物选择后,获得 T0 样品 (每个重复 ~ 2 千万个细胞),并且随后在添加 0.5mg/ml G418 和 1 μg/ml 强力霉素下培养细胞以诱导 shRNA 表达。14 天以后 (= 12 次传代, T14),对于每个重复,使用一台 FACSAriaII™ 仪器 (BD Biosciences 公司, (斯帕克斯,马里兰州 (Sparks,MD)) 对 ~ 1500 万个表达 shRNA (dsRed+/Venus+) 的细胞进行分选。通过使用 PhaseLock™ 管 (5prime 公司,盖瑟斯堡,马里兰州 (Gaithersburg,MD)) 进行两轮苯酚萃取随后进行异丙醇沉淀而分离来自 T0 和 T14 样品的基因组 DNA。通过 shRNA 引导链的 PCR 扩增产生深度测序模板文库,如以前所述 (Zuber 等人,2011)。在一台 Illumina® 基因组分析器 (圣迭戈,加利福尼亚州 (San Diego, CA) 上,在 8pM 的最终浓度分析文库;将 18nt 用反向读译引导链的引物进行测序 (miR30EcoRISeq, TAGCCCTTGAATTCCGAGGCAGTAGGCA)。为了提供对于检测实验样品中的 shRNA 消耗而言足够的基线,希望的是在 T0 样品中获得每一 shRNA > 500 个读数,这需要每个样品 > 1000 万个读数来补偿池化的质粒制备中固有的或由 PCR 偏差引入的 shRNA 表现 (shRNA representation) 中的差异。在这些条件下,获得对于 1072 个 (全部的 97%) shRNA 的 > 500 个读数的 T0 基线。使用定制的银河系平台 (Galaxy platform) (Taylor 等人,《生物信息学实验指南》(Curr Protoc Bioinformatics),第 10 章,105 单元 (2007)) 进行序列加工。对于每一 shRNA 和条件,将匹配读数的数目归一化到每一道的文库特定读数的总数,并

且被输入数据库用于进一步分析。

[0547] 细胞培养

[0548] 所有小鼠 MLL- 白血病细胞系衍生自从患晚期疾病的受体小鼠获得的骨髓, 并培养于补充了 10% 胎牛血清 (FBS) 和青霉素 / 链霉素的 RPMI1640 培养基中。MLL-AF9 (单独)、MLL-AF9/Nras^{G12D}、Tet-On MLL-AF9/Nras^{G12D}、和 MLL-ENL/FLT3^{ITD} 的细胞培养物是如先前所述而得到 (Zuber 等人,《基因和发育》(Genes Dev) 2009 ;23 :877-89 和 Zuber 等人, 2011)。永生化 MEF 培养物在先前得以描述 (Zuber 等人, 2011)。G1E 细胞是由 Mitchell Weiss (宾夕法尼亚大学) 惠赠的。MEF 细胞在含有 10% FBS 与 1% 谷氨酰胺 (GIBCO® 公司, 卡尔斯巴德, 加利福尼亚州 ()) 的 DMEM 中培养。G1E 细胞在含有 15% FBS、2U/ml 红细胞生成素 (Sigma-Aldrich 公司) 以及 10% kit 配体条件化培养介质的 IMDM 中培养。除了 KASUMI-1 在含有 20% FBS 的 RPMI1640 中培养外, 所有的人白血病细胞系在含有 10% FBS 的 RPMI1640 中培养。NOMO-1 和 MOLM-13 购自 DSMZ 公司。KASUMI-1、HL-60 以及 IMR-90 从 ATCC 公司得到。K-562 和 THP-1 是由 Martin Carroll (宾夕法尼亚大学) 惠赠的。U2OS、HeLa 和 Jurkat 是由 CSHL 组织培养服务部门提供的。

[0549] 蛋白质印迹

[0550] 对于 Brd4 蛋白质印迹, 将 30g 全细胞裂解 RIPA 提取物 (25mM Tris pH7.6, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% 脱氧胆酸钠, 0.1% SDS) 上样至每个泳道。对于 Myc 蛋白印迹, 直接在 Laemmli 缓冲液中裂解细胞。每个泳道上样约为 50,000 细胞当量。蛋白提取物用 SDS-PAGE 电泳进行分辨, 并转移到硝酸纤维素膜用于印迹。

[0551] 增殖测定

[0552] 通过经 72 小时对活细胞数目的增长计数来进行增殖测定。通过与碘化丙啶 (PI) 孵育来排除死细胞。在 Guava EasyCyte (Millipore 公司, 比尔利卡, 马萨诸塞州 Billerica) 上进行细胞浓度测量, 利用前向 / 侧向散射 / PI- 细胞来仅对活细胞设门。使用以下公式计算增值率: $\ln(\text{细胞浓度}_{72h} / \text{细胞浓度}_{0h}) / 72$ 。通过归一化至经 DMSO 处理的细胞的增殖率来计算相对增殖率。

[0553] 梅 - 格 - 吉姆萨离心涂片染色

[0554] 可用 1 μ g/ml 强力霉素处理 MLL-AF9/Nras^{G12D} 白血病细胞来诱导 TRMPVshRNA 或用 100nM JQ1 处理两天。将 50,000 细胞重悬浮在 100 μ l FACS 缓冲液 (5% FBS, 含有 0.05% NaN₃ 的 PBS) 中, 使用 Shandon Cytospin 2 涂片离心机以 500rpm 离心 5min 甩片 (cytospun) 在玻璃玻片上。根据制造商的方案进行梅 - 格 (Sigma-Aldrich 公司, #019K4368) 以及吉姆萨 (Sigma-Aldrich 公司, #010M4338) 染色。用 40 倍物镜的 Zeiss Observer 显微镜采集图像。

[0555] BraU 细胞周期分析和膜联蛋白 V 流式细胞计量术

[0556] 根据制造商的方案 (BD 公司, APC BrdU 流式试剂盒, #552598) 进行 BrdU 掺入测定, 其中将细胞用 BrdU 脉冲 30 分钟。将细胞用 7-AAD 或 DAPI 进行共染色用于 DNA 含量测量。对于所有条件性的 shRNA 实验, 在 shRNA+/dsRed+ 细胞群上对该分析进行设门。根据制造商 (BD 公司, APC 膜联蛋白 V, #550475) 的方案进行针对凋亡的膜联蛋白 V 染色。在附图 4e 中, 在活细胞 (FSC/SCC) 和 dsRed+/shRNA+ 群上进行膜联蛋白 V 设门, 以确保 shRNA 效果的清晰读出。这种设门方法选择性地将早期凋亡细胞 (膜联蛋白 V+, DAPI-) 可视化,

由此在这些图中明显缺乏积累的死细胞（膜联蛋白 V⁺, DAPI⁺）。使用 Flowjo 软件来进行所有分析。

[0557] 人 AML 细胞系中的 shRNA 实验

[0558] 人 shRNA 克隆进入 TRMPV-Neo 载体,接着是 THP-1 和 MOLM-13 细胞的逆转录病毒转导,这些细胞经过修饰以使用 MSCV-RIEP 质粒 (rtTA-ires-EcoR-PGK-Puro) 来表达同向性受体 () 和 rtTA3。将细胞用 400 μ g/ml 的 G418 进行选择 1 周。用 1 μ g/ml 的强力霉素处理细胞来诱导 shRNA 表达。将使用 FACS 的 dsRed⁺/shRNA⁺ 细胞的相对改变用来检测生长抑制。如上所述进行 BrdU 细胞周期分析。

[0559] 成人原代白血病样品分析 (附图 8)

[0560] 原代白血病细胞是从 12 位诊断患有 AML () 或 AML 复发 () 的未受处理的病人的外周血 (PB) 或骨髓 (BM) 吸出样品中获得的。根据法美英 (FAB) 合作研究小组 (Delhommeau 等人,《新英格兰医学杂志》(N Engl J Med) 2009 ;360 :2289-301 ;和 Ley 等人,《新英格兰医学杂志》2010 ;363 :2424-33) 以及世界卫生组织 () 提供的标准来建立诊断。用 Ficol1 提取单核细胞 (MNC) 并且被保存在液氮中直到使用。每一情况下,血液捐献或骨髓穿刺之前获得同意书。这项研究由维也纳大学医学院的机构审查委员会 (伦理委员会) 批准。HL60 和 MOLM13 细胞系被包括用作对照 (微生物与细胞培养德国汇总 (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures), DSMZ, 不伦瑞克, 德国)。解冻后,如通过台盼蓝排除法估算,AML 细胞的生存力范围是从 70% 至 99%。

[0561] 在存在或不存在 JQ1 (10⁻⁵, 000nM) 的情况下,原代细胞 (解冻的 MNC, 5-10x 10⁴ 细胞 / 孔) 和细胞系 (1-5x 10⁴ 细胞 / 孔) 在 96 孔微量滴定板 (TPP 公司, Trasadingen, 瑞士) 中用添加 10% 的胎牛血清 (FCS, Pasching 公司) 的 RPMI 1640 (PAA 实验室, Pasching 公司, 奥地利) 培养基在 37°C (5% CO₂) 培养 48 小时。在选择实验中,在存在或不存在增殖诱导细胞因子的混合物的情况下,将原代 AML 细胞与 JQ1 孵育。重组人 (rh)G-CSF, 100ng/ml (Amgen 公司, 千橡, 加利福尼亚 州 ()) ;rhSCF, 100ng/ml (Peprotech 公司, 落基山, 新泽西州 ()) ;和 rhIL-3, 100ng/ml (, 维也纳, 奥地利 ())。48 小时后,加入 0.5 μ Ci ³H- 胸苷 (16 小时)。在 Filtermate 196 收获器中,在滤膜上收获细胞。过滤器是空气干燥的,并且用 β - 计数器 (Top-Count NXT, Packard Bioscience 公司) 测量结合放射活性。所有的实验都是一式三份进行的。增殖是作为对照 (培养在对照培养基中的细胞) 的百分数计算的,并且 JQ1 的抑制效果是用 IC₅₀ 值表示。在细胞离心涂片器载玻片上通过莱特 - 吉姆萨染色分析药物暴露细胞的分化的形态学征象。

[0562] 小儿原代白血病样品分析 (附图 9)

[0563] 依据机构审查委员会批准的方案收集新诊断的患有急性白血病的儿童的诊断骨髓样品。依照赫尔辛基协议获得同意书。收集时,将原代白血病细胞用 Ficol1-Paque PLUS (GE, Piscataway, 新泽西州) 通过密度离心进行富集,并且随后保存在液氮中。解冻冻存细胞的瓶,重悬在培养基中,并且通过密度离心来富集活的白血病细胞。细胞被保持在含有 20% 胎牛血清的补加培养基中。所有白血病细胞培养物在 37°C、5% CO₂ 下孵育。

[0564] 将原代白血病样品在 96 孔板中用各剂量范围的 JQ1 和载体对照处理 72 小时。对于膜联蛋白结合实验,收获细胞并用膜联蛋白 V-PE 和 7-AAD (BD Pharmingen 公司, 圣地亚哥, 加利福尼亚州 ()) 染色,用 FACSCalibur 读取,并用 FlowJo 软件分析 (Tree Star 公司, 阿

什兰,俄勒冈州)。对于 WST-1 测定,将 WST-1 试剂(曼海姆,德国)加入培养基(1 : 10 稀释)并用 Bio-Rad model 680 型酶标仪(Bio Rad Laboratories 公司,赫拉克勒斯,加利福尼亚州)在 450nm 测量吸光度。WST-1 测定是一式三份地进行的。

[0565] 将原代白血病样品在 96 孔板中用 250nM JQ1 和载体对照处理 48 小时。在基线、24 小时和 48 小时制备细胞离心涂片,并且用莱特-吉姆萨(Sigma-Aldrich 公司,圣路易斯,蒙大拿州)溶液染色。用尼康 Eclipse E600 显微镜系统获取图像。

[0566] 骨髓组织学分析

[0567] 将石蜡包埋切片用苏木精伊红(HE)染色。在具有尼康 Digital Sight 摄像机的尼康 80i 显微镜上,用 NIS-Elements F2.30 软件以 2560×1920 的分辨率拍摄图片。用 Adobe Photoshop CS2 重新调整图像大小并且设定分辨率为 300 像素/英尺,应用自动对比并使用非锐化滤镜来改进图像清晰度。

[0568] 正常造血功能的 FACS 评估(附图 17)

[0569] 人 shRNA 克隆进入 TRMPV-Neo 载体,接着是 THP-1 和 MOLM-13 细胞的逆转录病毒转导,这些细胞经过修饰以使用 MSCV-RIEP 质粒(rtTA-ires-EcoR-PGK-Puro)来表达同向性受体()和 rtTA3。将细胞用 400 μ g/ml 的 G418 进行选择 1 周。用 1 μ g/ml 的强力霉素处理细胞来诱导 shRNA 表达。使用 FACS 的 dsRed+/shRNA+ 细胞的相对改变用来检测生长抑制。如上所述进行 BrdU 细胞周期分析。

[0570] 微阵列表达

[0571] 通过 CSHL 微阵列共享资源来进行微阵列。使用 RNeasy®迷你试剂盒(QIAGEN 公司,日耳曼镇,马里兰州, #74104)从 107 个细胞中提取 RNA。在安捷伦 2100 生物分析仪()、RNA 6000 Pico Series II 芯片(安捷伦,派罗阿尔托,加利福尼亚州,美国)评估 RNA 质量。用 RIN score(2.0 或更高版本)评估样品。用改良的 Eberwine 技术()扩增 RNA,然后使用 Ambion 公司®WT 表达试剂盒(Ambion 公司,奥斯汀,德克萨斯州)将 aRNA 转换。用安捷伦 2100 生物分析仪 RNA 6000 Nano 系列 II 芯片(安捷伦,派罗阿尔托,加利福尼亚州,美国)针对 3' 偏好(3' bias)对所有样品进行了 aRNA 和 cDNA 的大小分布的评估。然后将 cDNA 片段化,并利用 Affymetrix 基因芯片 WT 末端标签化试剂盒(Affymetrix 公司,圣克拉拉,加利福尼亚州)来用生物素进行末端标签化。针对杂交准备样品,依据制造商对小鼠基因 ST 1.0 基因芯片(Affymetrix 公司,圣克拉拉,加利福尼亚州)的说明进行杂交、清洗和扫描。使用 Affymetrix 表达控制台质量度量(Affymetrix Expression Console QC metrics)传送图像数据。通过基于 R 的 Bioconductor 中的

[0572] 附图 25 中展示的热量图是使用 GenePattern 软件制作的()。简言之,RMA 处理的微阵列数据被转换成 log2 标度。然后将选定的基因列表进行行归一化并且在 GenePattern 的 Heat mapImage 模块上运行。

[0573] 基因集合富集分析()分析

[0574] 使用具有 1000 表型排列(phenotype permutation)的 GSEA v2.07 软件(Broad 研究院(),剑桥,马萨诸塞州)进行基因集合富集分析(Subramanian 等人美国科学院院刊 2005 ;102 :15545-50)。白血病干细胞和 Myc 基因集合是从指定的出版物获得的(Kim 等人,《cell》2010 ;143 :313-24, Schuhmacher 等人,《核酸研究》2001 ;29 :397-406, 和 Somervaille 等人,《细胞干细胞》2009 ;4 :129-40)。巨噬细胞发育基因集合是从

Ingenuity®Pathway Analysis (IPA) 软件 (Ingenuity 公司, 红木城, 加利福尼亚州) 获得的。Myb 标志基因集合 (shMyb MLL-AF9/Nras^{G12D}白血病细胞中前 500 个下调基因) 以及 MLL-AF9 标志基因集合 (MLL-AF9 Tet-OFF MLL-AF9/Nras^{G12D}白血病细胞中前 500 个下调的基因) 是从 Lowe/Vakoc 实验室未公开研究中的微阵列数据中得到的 (Zuber 等人, 已提交)。

[0575] 附图 19 中, 为了在人微阵列数据上运行 GSEA, 首先用 bioDBNet dbWalk 模块 (<http://biodbnet.abcc.ncifcrf.gov/db/dbWalk.php>) 或人工地用 NCBI 数据库将小鼠的基因集合转换为人基因名。GSEA 方法的详细描述和解释被提供在网站 (<http://www.broadinstitute.org/gsea/doc/GSEAUserGuideFrame.html>) 上。简言之, 归一化的富集分数 (NES) 提供了“一个基因集合在基因排级列表的顶部或底部被过度表现的程度”假发现率 q 值 (FDR q-val) “是具有给定 NES 的基因集表示假阳性结果的估算概率”“一般地, 考虑到在多数表达数据集合中缺少一致性并且分析的基因集合的数目相对较少, 25% 的 FDR 截取是合适的。

[0576] 染色质免疫沉淀

[0577] ChIP 测定是精确按照所述来进行 (Filippakopoulos 等人)。用连续 EGS (Pierce 公司)/ 甲醛进行交联。所有的结果通过 qPCR 进行量化, 该 qPCR 是使用 SYBR green (ABI) 在 ABI 7900HT 上进行的。将每一 IP 信号参考为一种输入标准曲线稀释系列 () 以针对起始细胞数目方面的不同以及针对引物扩增效率进行归一化。

[0578] RT-qPCR

[0579] 用 Trizol® 试剂 (Invitrogen 公司, 卡尔巴斯德, 加利福尼亚州 ()) 制备 RNA。用 qScript™ cDNA SuperMix (, 盖瑟斯堡, 马里兰州 (, #101414-106) 来进行 cDNA 的合成。在 ABI™ 7900HT 上用 Sybr green (ABI 公司, 卡斯巴尔德, 加利福尼亚州, #4364344) 进行定量 PCR (qPCR) 分析。用 delta-Ct 方法对所有信号进行定量。将所有的信号归一化到 GAPDH 水平。

[0580] 引物

[0581] 小鼠 RT-qPCR 引物 (从 5' 至 3' 端书写)

[0582] Bim : CCTGCTTTGCTCTCTCCATTTT 和 CCCCACCCAGACACAAGTA

[0583] Brd4 : CCATGGACATGAGCACAATC 和 TGGAGAACATCAATCGGACA

[0584] Cc14 : CCCGAGCAACACCATGAAG 和 CCACGAGCAAGAGGAGAGAGA

[0585] Cd74 : CCAACGCGACCTCATCTCTAA 和 AGGGCGGTTGCCAGTA

[0586] Gapdh : TTCACCACCATGGAGAAGGC 和 CCCTTTTGGCTCCACCCT

[0587] Hoxa7 : AGTTCAGGACCCGACAGGAA 和 CAGGTAGCGGTTGAAATGGAA

[0588] Hoxa9 : CCGAAAAAATGCCGAGAA 和 CCGGGTTATTGGGATCGAT

[0589] Itgax : CCAGGTTGCCAGTGAGAA 和 CTCAGATGGGCGGGTTCA

[0590] Mmp9 : CATTCGCGTGGATAAGGAGT 和 TCACACGCCAGAAGAATTTG

[0591] Myc : GCCGATCAGCTGGAGATGA 和 GTCGTCAGGATCGCAGATGAAG

[0592] 人 RT-qPCR 引物 (从 5' 至 3' 端书写)

[0593] BIM : CACCGTGTCCATTACAGCAG 和 CTAATAATGCAGGAGGCCAAG

[0594] BRD4 : CCCCTCGTGGTGGTGAAG 和 GCTCGCTGCGGATGATG

- [0595] GAPDH :CCTGACCTGCCGTCTAGAAA 和 CTCCGACGCCTGCTTCAC
- [0596] MYC :AGGGATCGCGCTGAGTATAA 和 TGCCTCTCGCTGGAATTACT
- [0597] 小鼠 Myc ChIP 引物 (从 5' 至 3' 端书写)
- [0598] Myc-3.8kb :TGTGGCTTTCTGTCTTTT 和 AGGGGACATCCCCATTTTAC
- [0599] Myc-2.2kb :ATTCATTTTCCCCATCCACA 和 TTGCAAAGAGGGGGAGTAGA
- [0600] Myc-1.9kb :ACAAATCCGAGAGCCACAAC 和 AACACCAAGAGCCACCAATC
- [0601] Myc-1.8kb :GGTGGCTCTTGGTGTGTTGAG 和 TCGAGCTCATTGCACAATTC
- [0602] Myc-1.7kb :CAACTTTGAACAATGAGCACCT 和 CTCTCACTGCTACCCGGTTT
- [0603] Myc-1.5kb :CGAGGAGTCCGGAATAAGAA 和 TCTTTTGCTCTGTGCATTGG
- [0604] Myc-1kb :GCCTCTTGTGAAAACCGACT 和 CCGGTCTACACCCCATACAC
- [0605] Myc+1kb :TGGAATCCTGAGGTCTTTGG 和 CAGAAATGCACCAAGCTGAA
- [0606] Myc+1.5kb :CCCTCCCCTTTTATTTTCGAG 和 GCTTTTCTTTCCGATTGCTG
- [0607] Myc+3.7kb :TGCTTTGGGTGTGTCTGAAG 和 CTCCCAGAAAGGCAGAACAG
- [0608] 抗体

[0609] 用于蛋白印迹的抗 Brd4 抗体是 Gerd Blobel 的惠赠,用于的抗 Brd4 抗体购自 Sigma 公司 (#HPA015055)。抗 Myc 抗体购自 Epitomics 公司 (#1472-1)。在 FACS 中使用的抗体:APC 抗小鼠 CD117/ckit (Biolegend 公司, #105811)、APC 抗小鼠 CD11b (Biolegend 公司, #101211)、Pacific Blue 抗小鼠 CD45.2 (Biolegend 公司, #109820)、小鼠造血谱系 eFluor®450 混合物 (ebioscience 公司, #88-7772-72)、APC 抗小鼠 CD45R/B220 (Biolegend 公司, #103212)、APC 抗小鼠 TER-119/红系细胞 (Erythroid Cells) (Biolegend 公司, #116212)、APC 抗小鼠 Ly-6G/Gr-1 (ebioscience 公司, #17-5931)、PE-Cy7 抗小鼠 CD117/ckit (ebioscience 公司, #25-1171-82) 和 APC 抗小鼠 Sca-1 (ebioscience 公司, #17-5981-81)。抗 β -肌动蛋白 HRP 抗体购自 Sigma 公司 (#A3854)。

[0610] 抗 Brd4 抗体是来自 Gerd Blobel 的惠赠。Myc 抗体 (Epitomics 公司加利福尼亚州, #1472-1)。用于 FACS 的抗体购自 Biolegend 公司 (圣地亚哥, 加利福尼亚州,), APC 抗小鼠 CD117/ckit (#105811)、APC 抗小鼠 CD11b (#101211) 和 Pacific Blue 抗小鼠 CD45.2 (#109820)。抗 β -肌动蛋白 HRP 抗体购自 Sigma 公司 (#A3854)。

[0611] 动物研究

[0612] 对于条件性的体内 RNAi 实验,用 TRMPV-shRNA 构建体对 Tet-On MLL-AF9/Nras^{G12D} 白血病细胞进行转导。通过尾静脉注射 1×10^6 个细胞进入经亚致死剂量 (5.5Gy) 辐射的 B6/SJL (CD45.1) 受体小鼠中进行白血病细胞移植。

[0613] 针对整个身体生物发光成像,用 50mg/kg 的 D-荧光素 (Goldbio 公司, 圣路易斯, 蒙大拿州,) 对小鼠进行腹膜内注射,并在 10 分钟后使用 IVIS®Spectrum 系统 (, 沃尔瑟姆, 马萨诸塞州,) 进行分析。使用活体成像软件 (Living Image software) () 以及标准化的覆盖小鼠躯干和四肢的感兴趣矩形区域来进行定量

[0614] 对于 shRNA 诱导,用含有强力霉素的饮用水 (2mg/ml 具有 2% 蔗糖; Sigma-Aldrich 公司, 圣路易斯, 蒙大拿州) 和食物 (625mg/kg, Harlan 实验室, 印第安纳波利斯, 印第安纳州) 来处理动物。对于 JQ1 治疗实验,通过在涡旋下滴加 2-羟丙基- β -环糊精 (Sigma-Aldrich 公司) 载体来将 JQ1 在 DMSO 中的 100mg/ml 储液稀释 20 倍,产生 5mg/

ml 的最终浓度。将移植 MLL-AF9/Nras^{G12D}白血病细胞的小鼠每日腹膜内地 (IP) 注射新鲜制备的经载体稀释的 JQ1 (100mg/kg) 或 400 μ l 载体 (含有 5% DMSO)。

[0615] 微阵列分析

[0616] 利用 Affymetrix ST 1.0 GeneChips 进行表达微阵列。利用具有 1000 表型排列的 GSEA v2.07 软件 (Subramanian 等人) 进行通路分析。

[0617] 其他实施方案

[0618] 从上述的描述中看出,很明显可以对在此描述的本发明进行变体和修改以使其适合于不同的用途和情况。这样的实施方案也在下述权利要求的范围内。

[0619] 在此的变量的任何定义中的一系列要素的详述包括作为所列出要素的任何单个要素或组合 (或子组合) 的那个变量的定义。在此的实施方案的详述包括作为任何单个实施方案或与任何其他实施方案或其部分结合的实施方案。

[0620] 通过引用将在这个说明书中提到的所有专利和出版物结合在此,其程度如同将每一个单独的专利和出版物具体并且个别地指明通过引用结合在此。

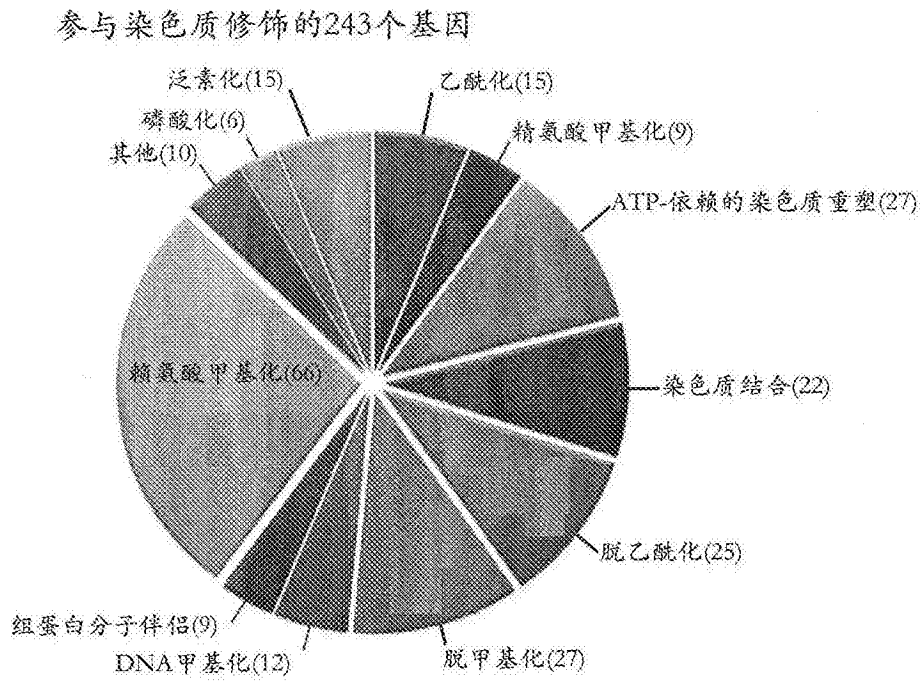


图 1A

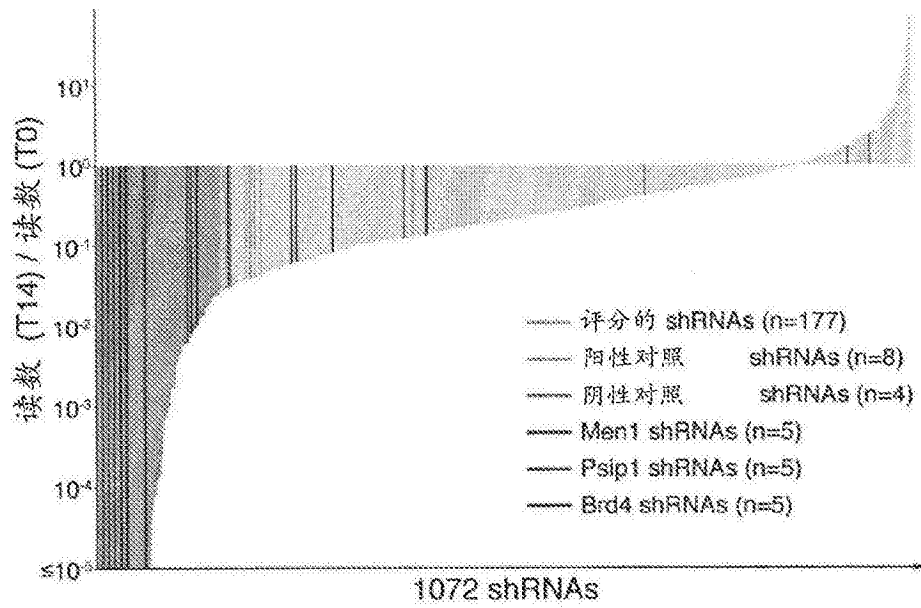


图 1B

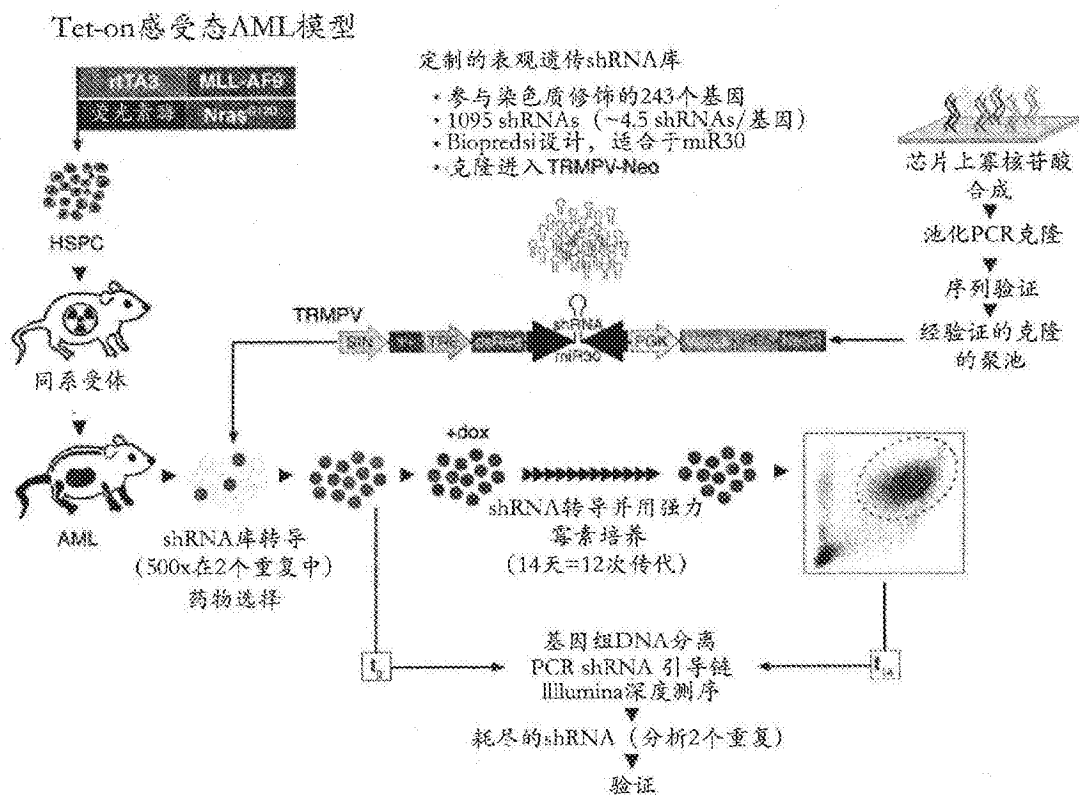


图 2A

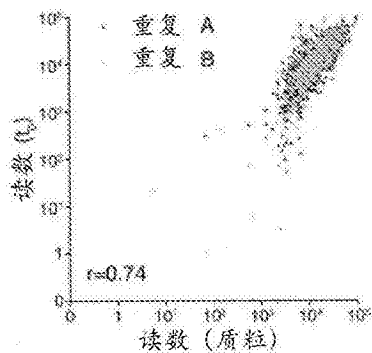


图 2B

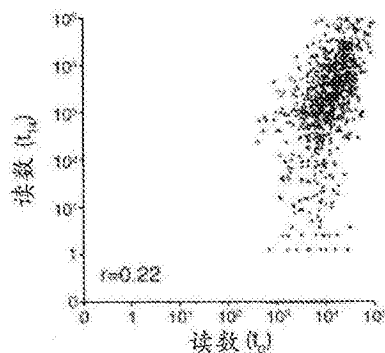


图 2C

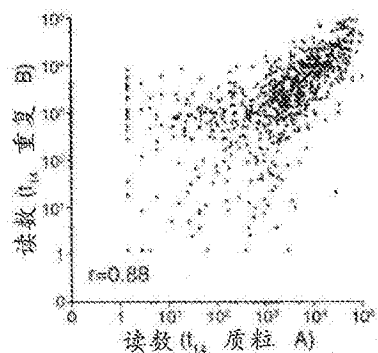


图 2D

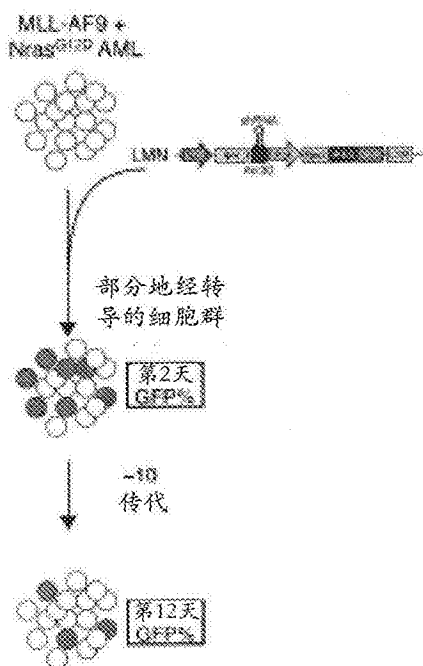


图 3A

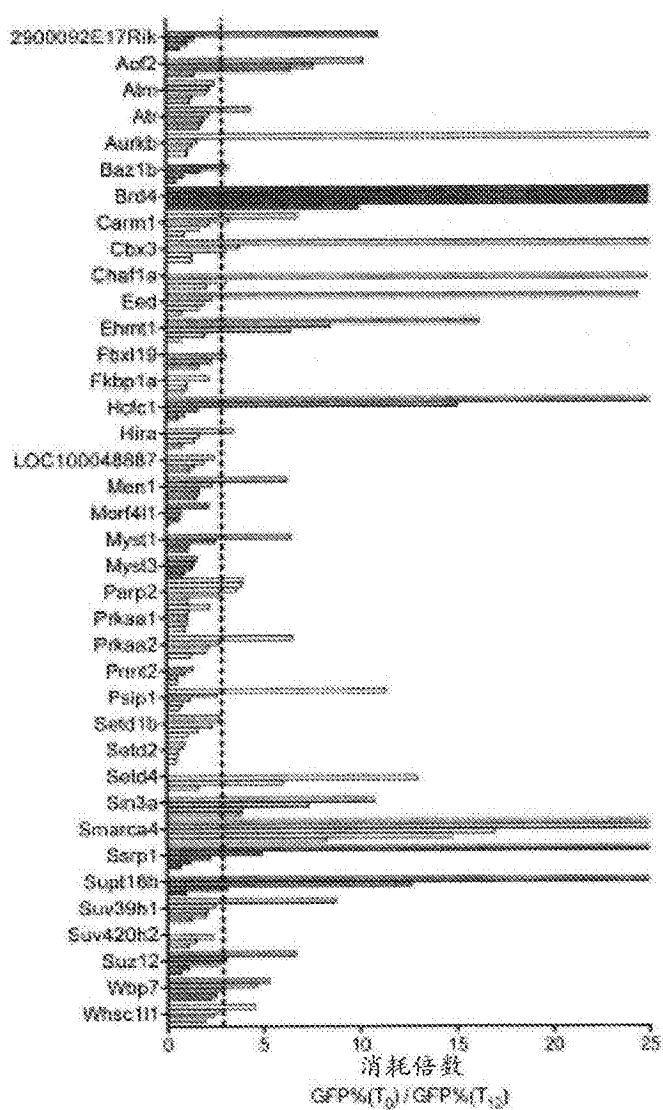


图 3B

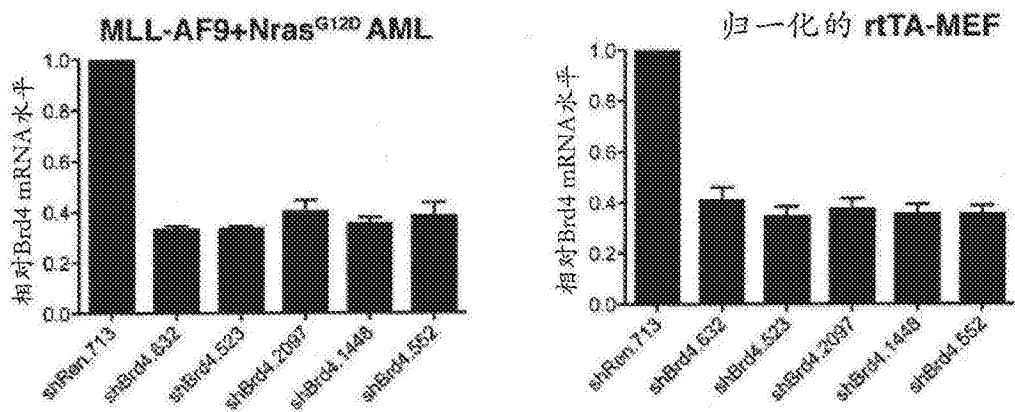


图 4A

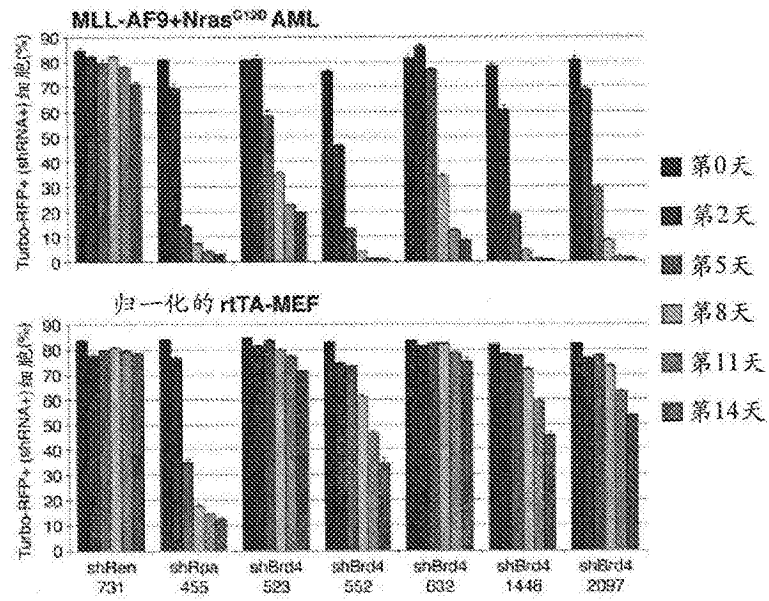


图 4B

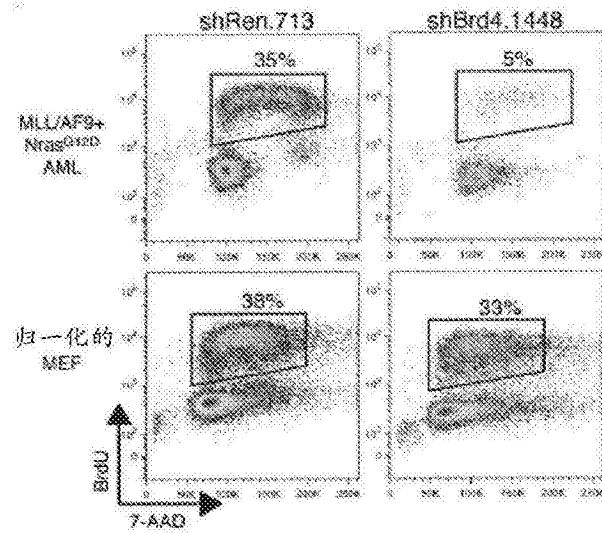


图 4C

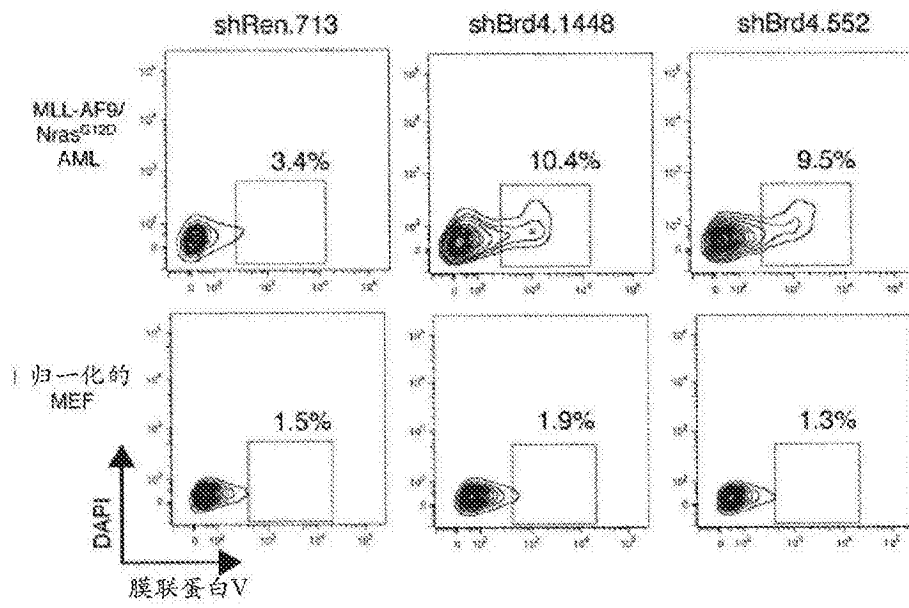


图 4D

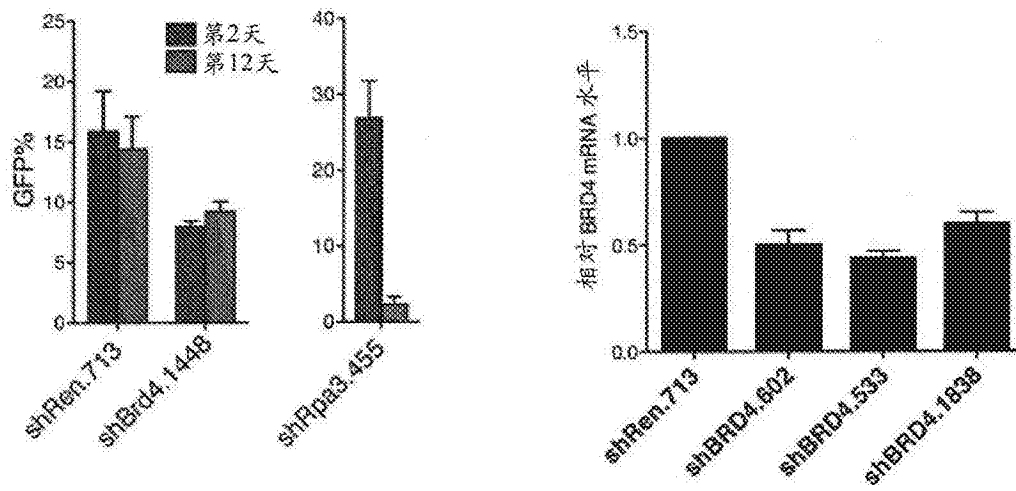


图 4E

图 5A

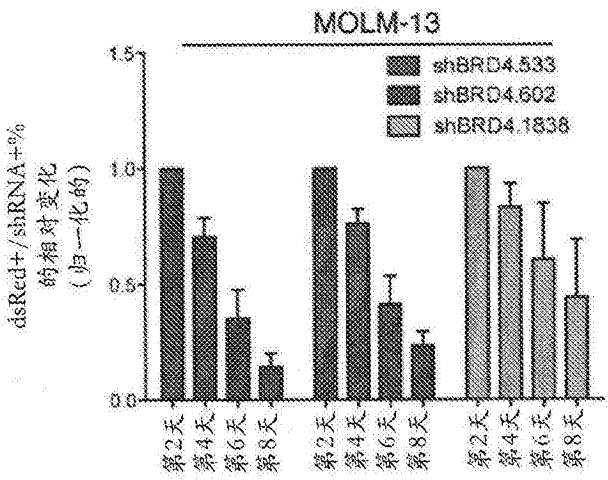


图 5B

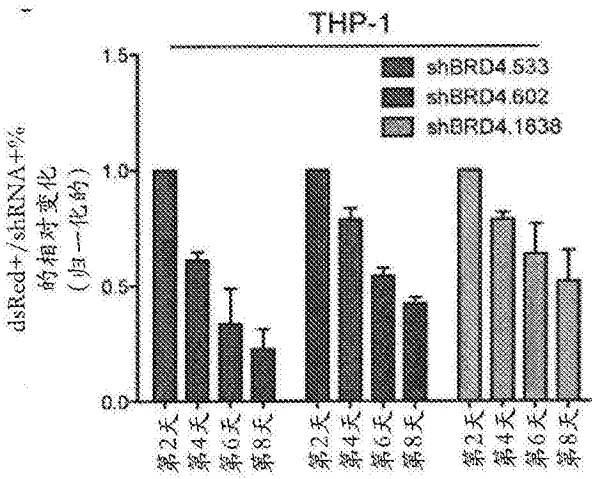


图 5C

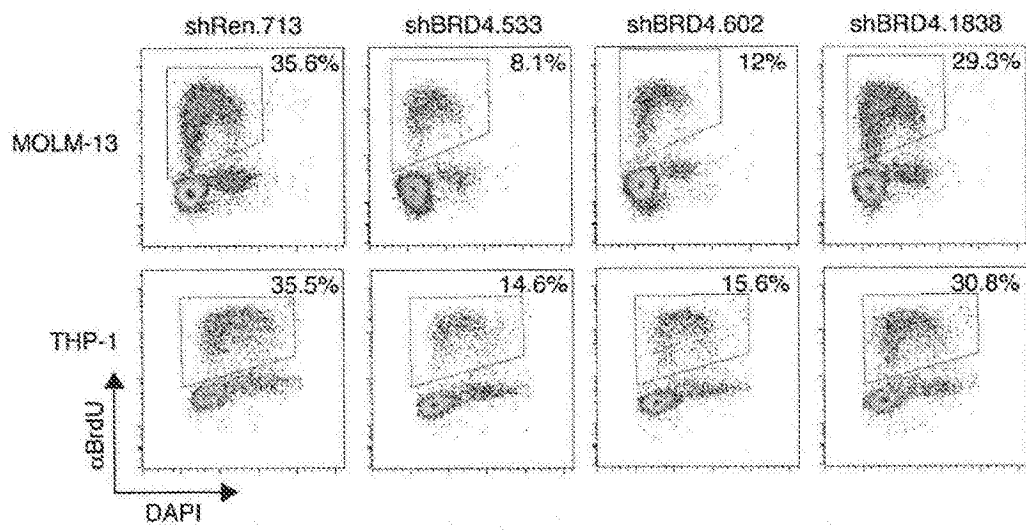


图 5D

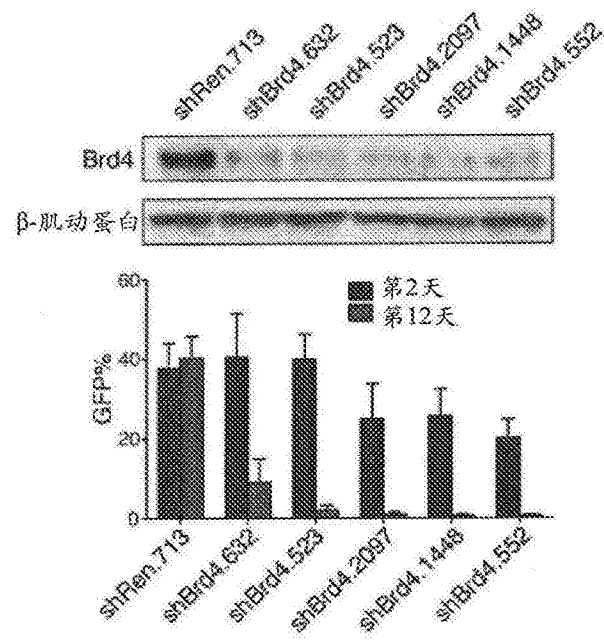


图 6A

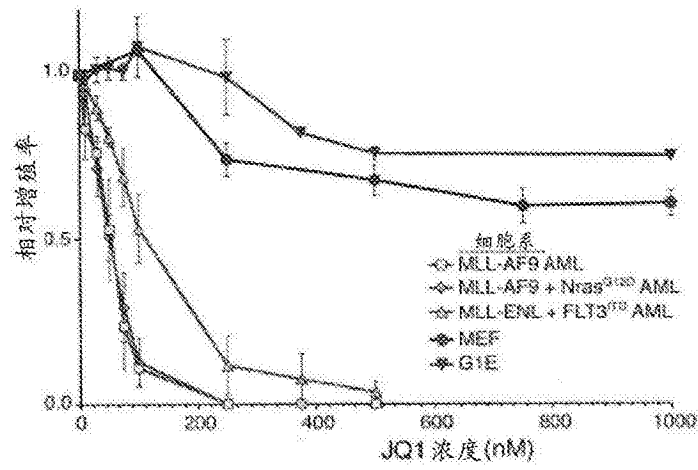


图 6B

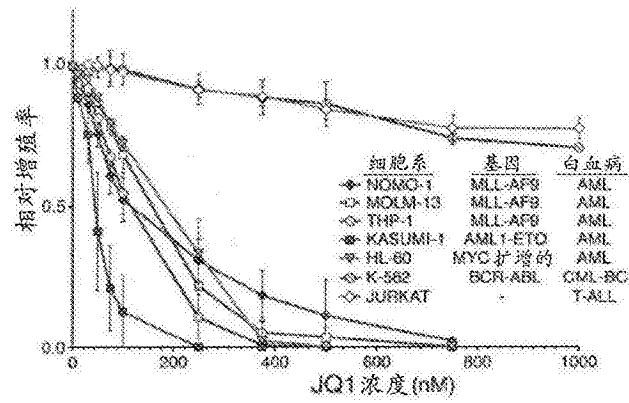


图 6C

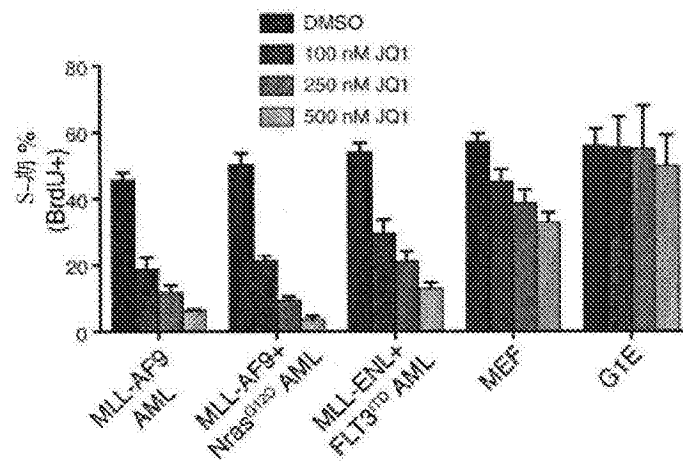


图 6D

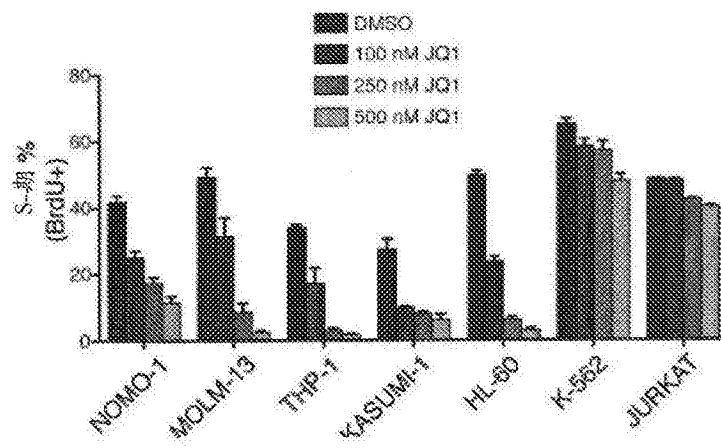
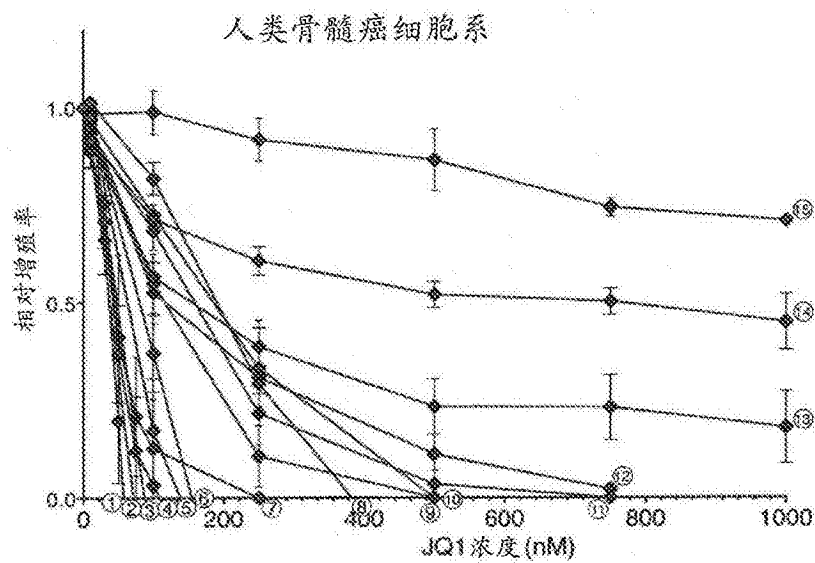


图 6E



细胞系	已知的遗传学和/或疾病描述*
① CD34.MLL-AF9.FLT3 ^{ITD}	遗传上定义的hCD34+细胞
② CMK	JAK3A57Y; AML M7 + 唐氏综合征
③ MV4-11	MLL-AF4; AML M5
④ CD34.MLL-AF9.Nras ^{Q12R}	遗传上定义的hCD34+细胞
⑤ EoL-1	FIP1L1-PDGFRα; MLL-ITD; 嗜酸性粒细胞AML
⑥ NB4	PML-RARA; AML M3
⑦ KASUMI-1	AML1-ETO; AML M2
⑧ HEL	AML M6
⑨ THP-1	MLL-AF9.NRAS ^{Q12R} ; AML M5
⑩ HL-60	MYC 扩增; AML M2
⑪ MOLM-13	MLL-AF9.FLT3 ^{ITD} ; AML M5a
⑫ NOMO-1	MLL-AF9; AML M5a
⑬ HNT-34	BCR-ABL1; AML M4
⑭ KG-1	NRAS ^{Q61R} ; AML
⑮ K-562	BCR-ABL1; CML 急变期

AML = 急性髓性白血病; CML = 慢性髓性白血病

* 摘自“白血病-淋巴瘤指南”, Han G. Drexler, 微生物与细胞培养德国汇总, Wraunschweig Germany, 第二版, 2010

图 7A

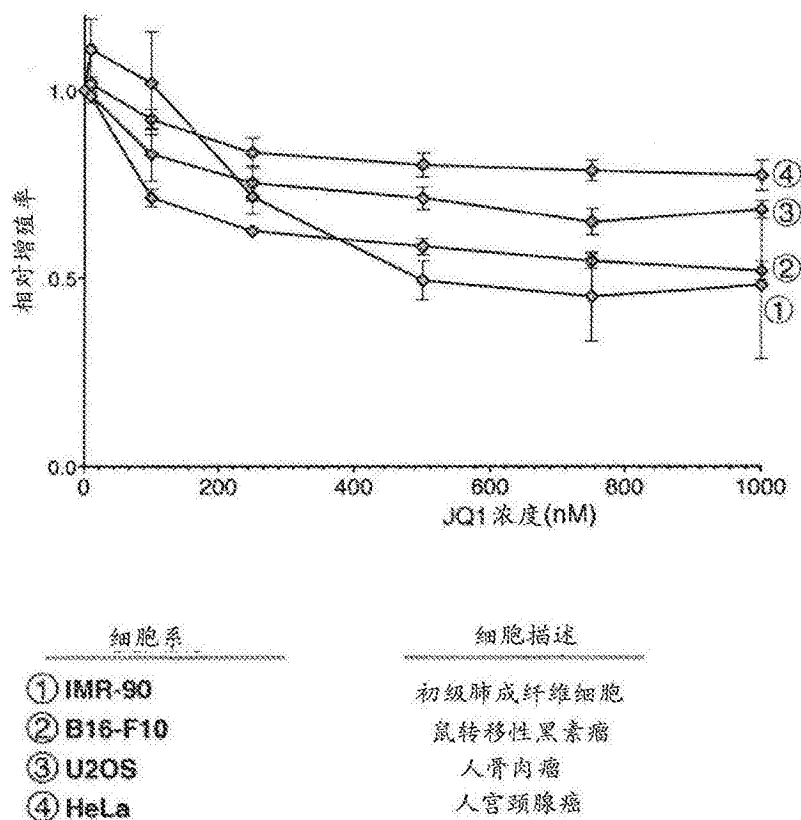


图 7B

AML: F/M	Age	FAB	WHO	WBC 10 ⁹ /L	% Blast cells PB	BM	核型	突变	
1*	F	32	M1	具有t(9;11)的AML	0.4*	80%	73%	46,XX,t(9;11)	MLL1-AF9
2	M	61	M5	单核细胞性AML	35.1	33%	72%	46,XY,t(11;17)	MLL1-MSF
3	M	65	M5	具有t(9;11)/NPM1m的AML	94.8	6%	90%	47,XY,t(9;11),+8	MLL1-AF9, FLT3-D835, NPM1m
4	M	80	M4	具有NPM1m的AML	198.5	25%	52%	46,XY	FLT3 ITD, KIT D816V, NPM1m
5	M	54	M1	具有NPM1m的AML	361.5	95%	92%	46,XY	FLT3 ITD, NPM1m
6	F	49	M4	髓单核细胞AML	15.4	16%	63%	46,XX	FLT3 ITD
7	M	67	M1	骨髓发育不良AML	74.6	95%	84%	complex	-
8*	F	61	M5	骨髓发育不良AML	82.1*	77%	74%	46,XX,del12p,del20q	-
9	F	39	M5	单核细胞性AML	37.7	65%	94%	47,XX,t(3;11),+8	-
10	F	49	M4	具有inv16的AML	94.2	47%	57%	46,XX,inv16	FLT3 ITD
11	M	58	M2	具有t(8;21)的AML	100	60%	58%	46,XY,t(8;21)	-
12	M	23	M2	具有t(8;21)的AML	13.7	52%	58%	45,X,-Y,t(8;21)	-

*在复发期对这些病人进行了分析：缩写：WBC，白细胞计数；F，女性；M，男性；FAB，法国-美国-英国合作研究组；WHO，世界卫生组织；PB，外周血；BM，骨髓；NPM1m，突变的NPM1；

图 8A

AML:	来源	3H-胸苷-吸收		凋亡诱导**		成熟
		+细胞因子* IC50 (nM)	-细胞因子 IC50 (nM)	% 凋亡细胞 (吉姆萨)	500 nM JQ1 1,000 nM JQ1	
1	PB	280	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
2	BM	90	70	14	22	+(巨噬细胞)
3	BM	160	240	n.t.	n.t.	n.t.
4	PB	1030	420	14	18	++(巨噬细胞)
5	BM	420	n.t.	30	50	+(骨髓)
6	BM	1420	140	14	37	++(骨髓)
7	BM	40	n.t.	23	28	+(骨髓)
8	PB	40	50	33	27	-
9	BM	50	50	n.t.	n.t.	n.t.
10	BM	150	60	36	55	++(巨噬细胞)
11	BM	40	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
12	BM	60	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
HL60	+ cti		200			
MOLM13	+ cti		135			

*在G-CSF (100 ng/ml)、SCF (100 ng/ml) 以及IL-3 (100 ng/ml) 存在下, 用JQ1对细胞进行解育

**在细胞离心涂片器上通过莱特-吉姆萨染色来确定凋亡细胞百分数; 在每一情况下将在对照培养基中测得的凋亡细胞百分数 (通常<10%细胞) 减去。

图 8B

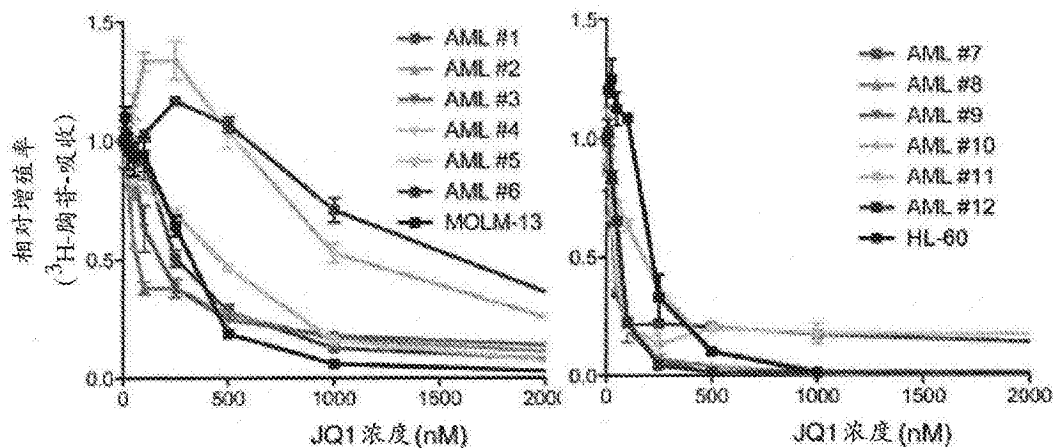


图 8C

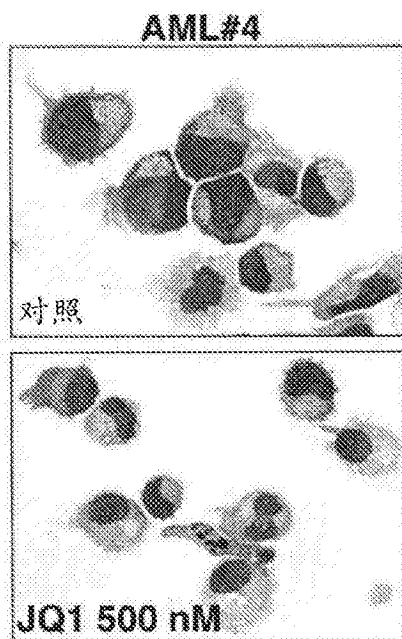


图 8D

样品ID	年龄组	表型	分子的/细胞遗传的	WST1 IC50 (nM)	凋亡的诱导**		成熟
					% 凋亡细胞 (AVB)		
				500 nM JQ1	1,000 nM JQ1		
PED025	婴儿	MPAL (B/骨髓的)	MLL-ENL	153	32	33	++ (淋巴的)
PED095	婴儿	MPAL (B/骨髓的)	MLL-AF4	174	32	18	++ (骨髓的)
PED051	儿童	AML	FLT3/ITD	596	21	24	-
PED004	儿童	AML	单倍性7, BCR-ABL	451	19	34	+ (骨髓的)
801343	婴儿	pre-B ALL	MLL-ENL	345	13	20	++ (淋巴的)
PED063	儿童	AML	CBFB-MYH11	136	21	24	-
MV4-11	+ ctrl	AML	MLL-AF4, FLT3/ITD	165	80	86	n.t.

缩写: MPAL: 急性白血病的混合表型。n.t. 未经测试

*膜联蛋白V结合流式细胞计量术 (AVB) 确定凋亡细胞百分数; 每一情况下将在对照培养基中测得的凋亡细胞百分数减去。

图 9A

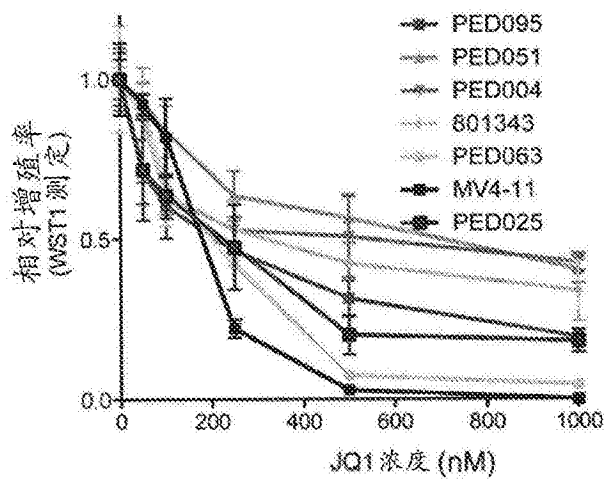


图 9B

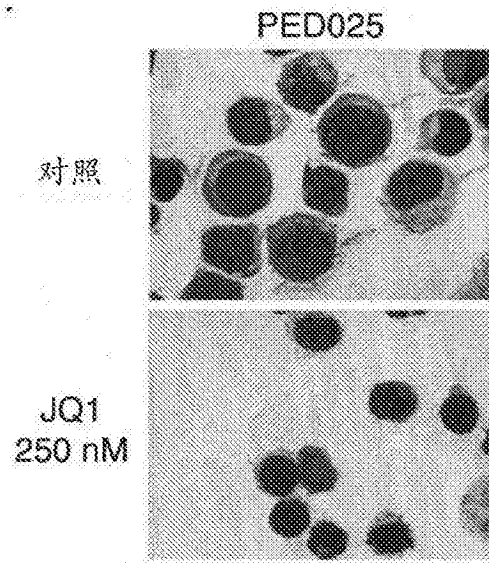


图 9C

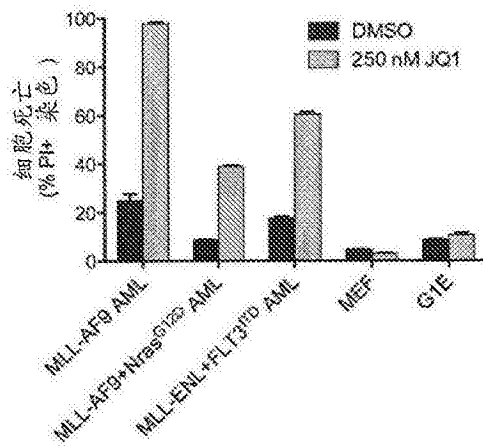


图 10A

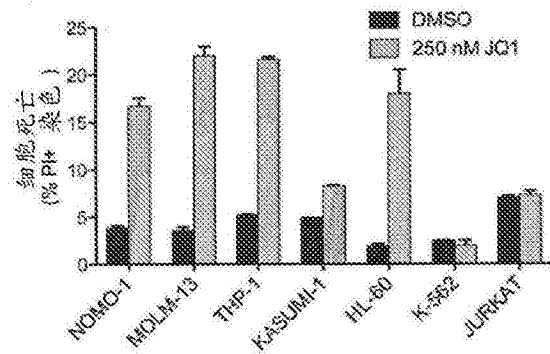


图 10B

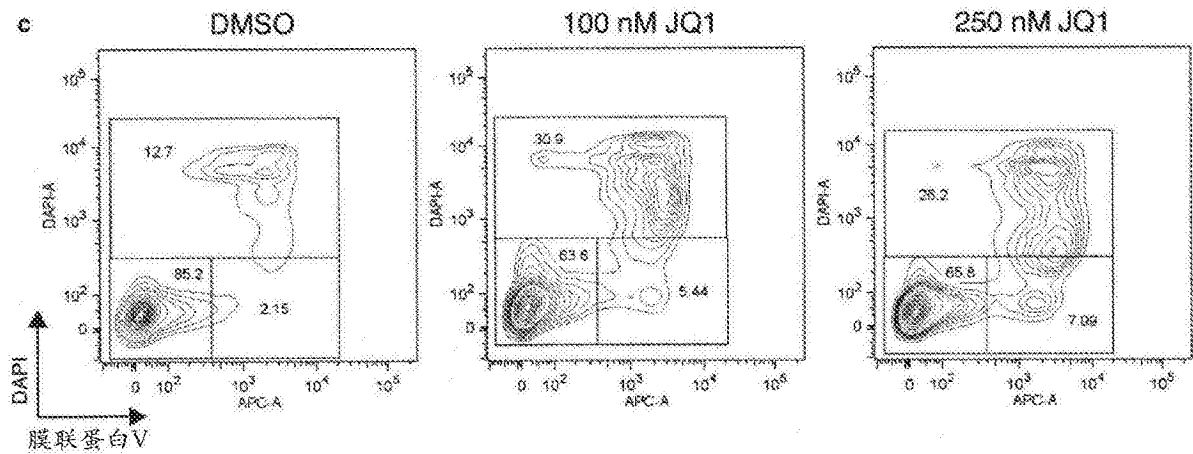


图 10C

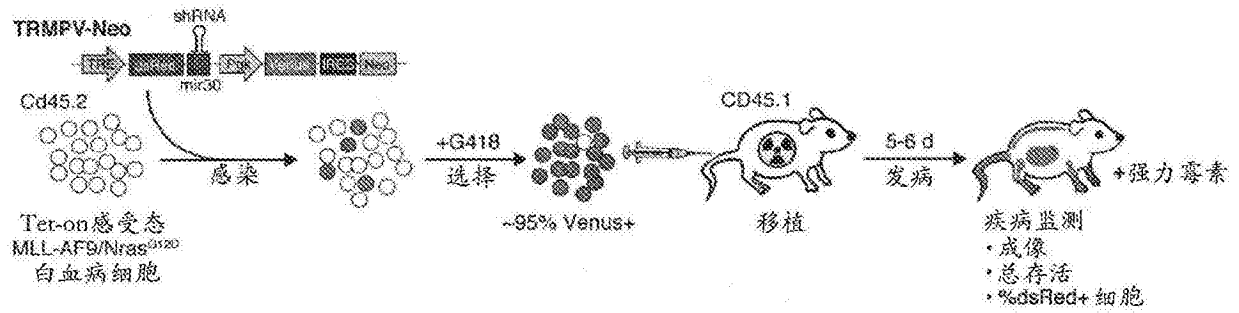


图 11A

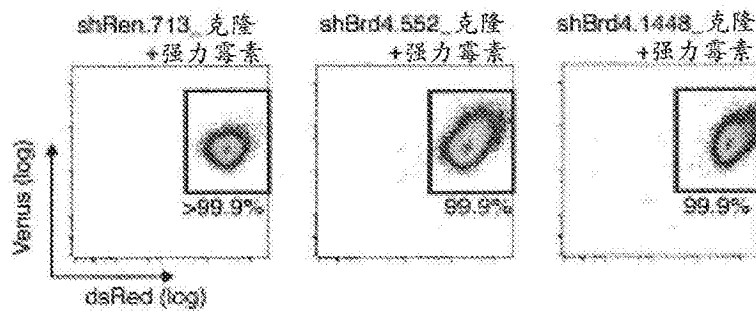


图 11B

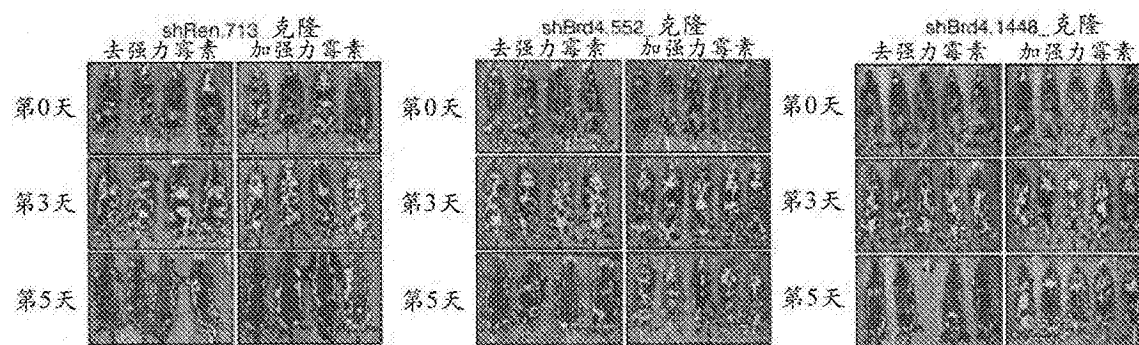


图 11C

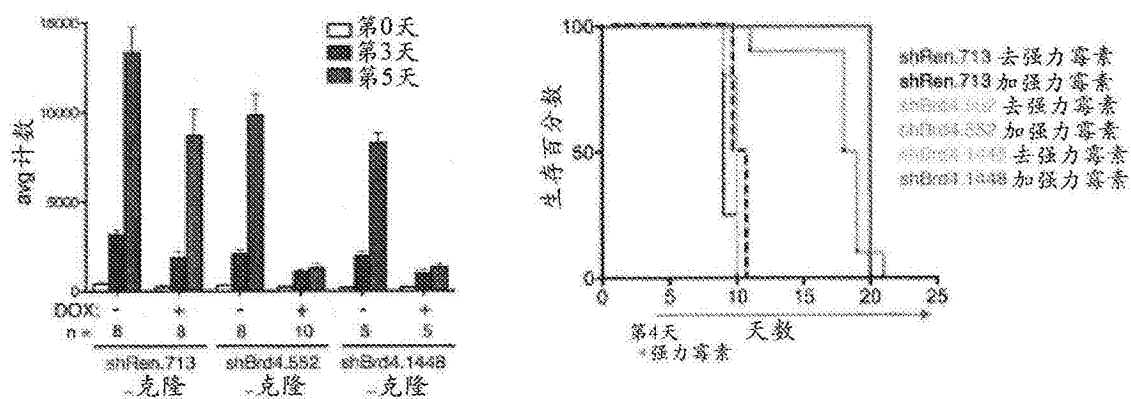


图 11E

图 11D

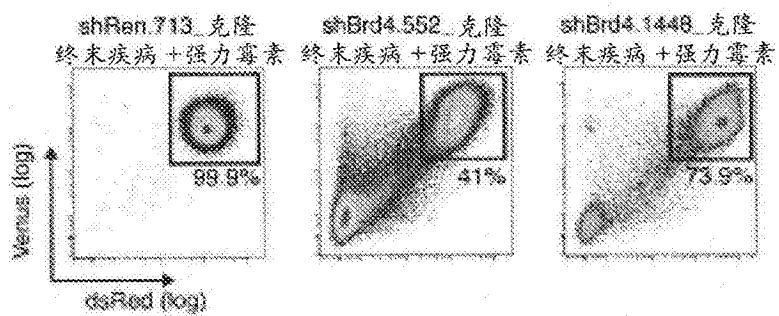


图 11F

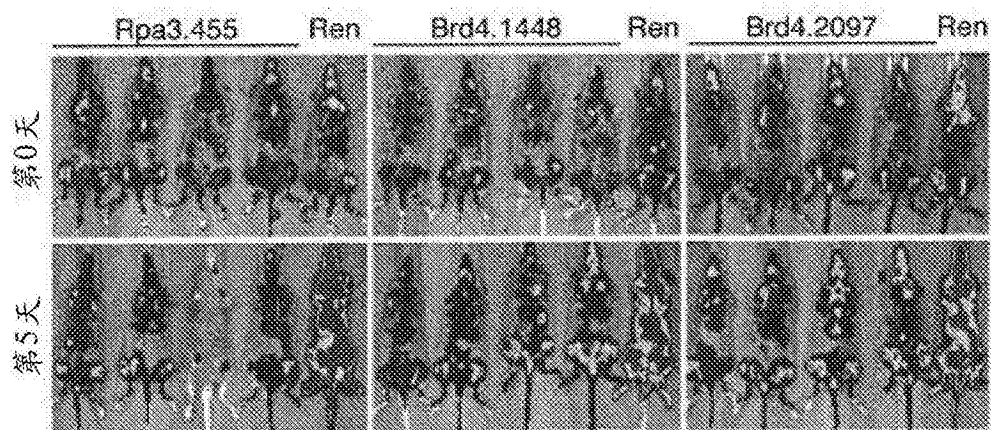


图 12A

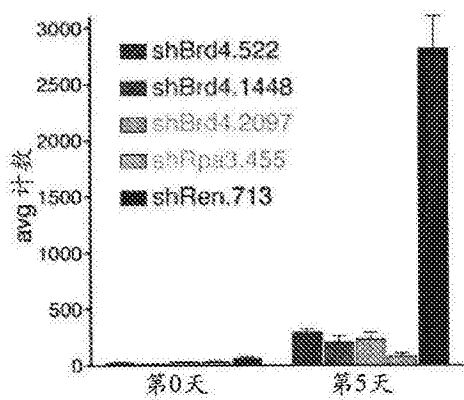


图 12B

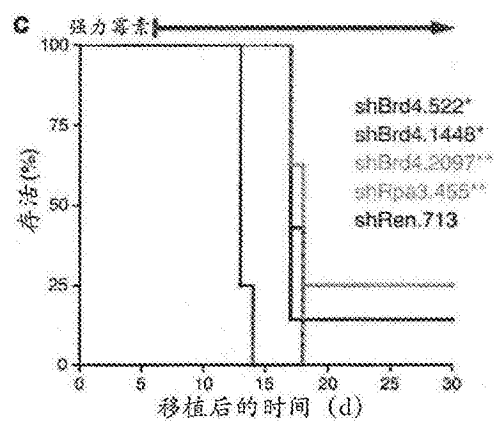


图 12C

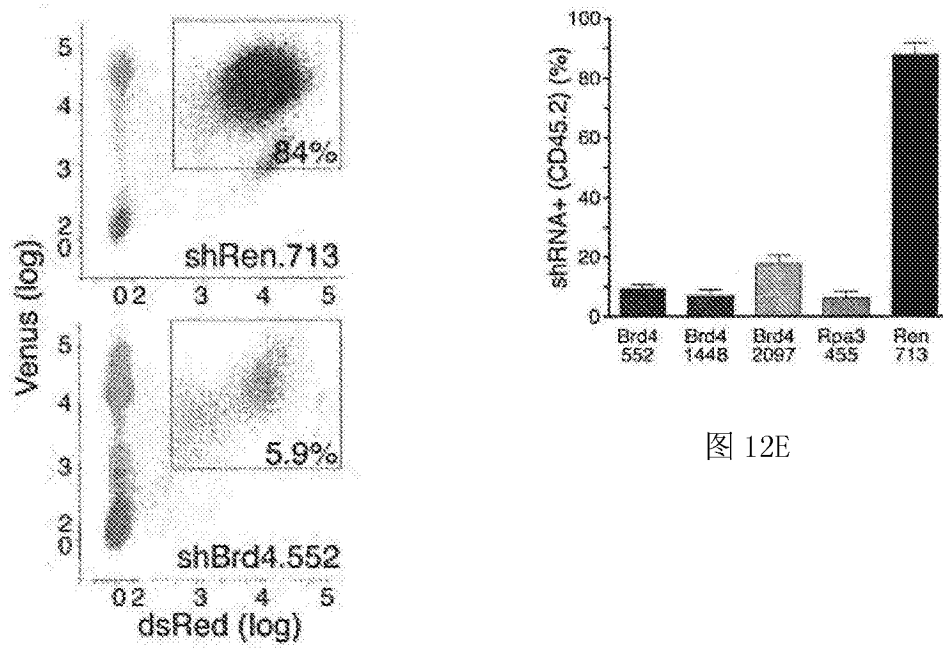


图 12E

图 12D

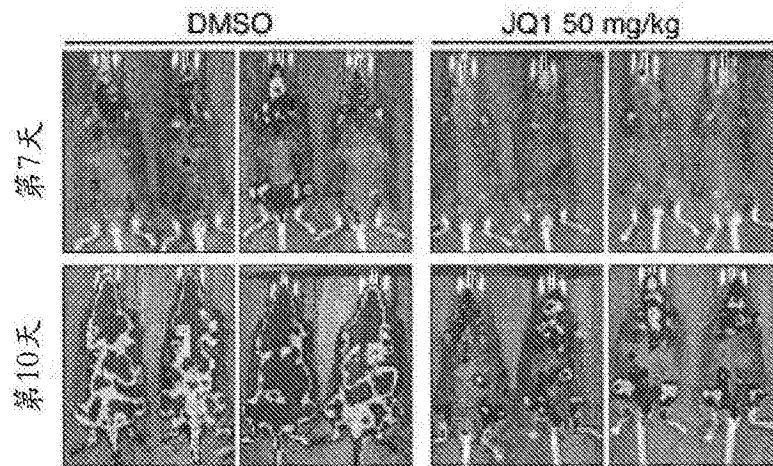


图 12F

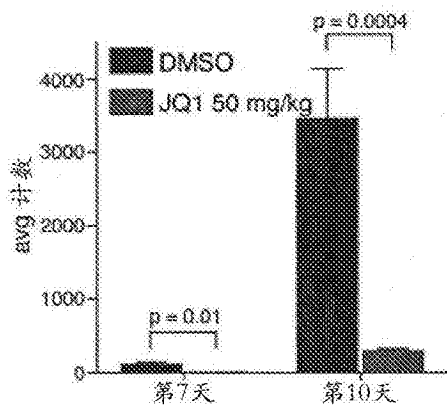


图 12G

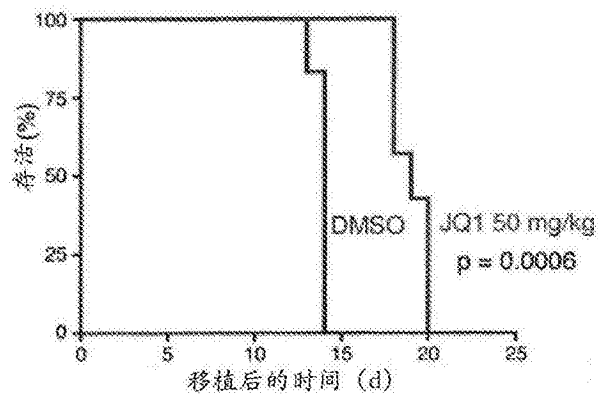


图 12H

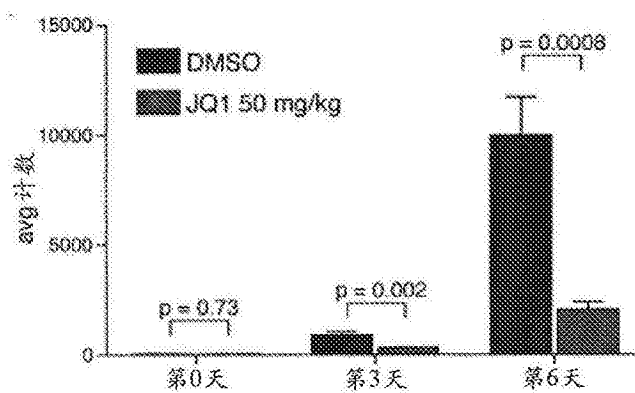


图 12I

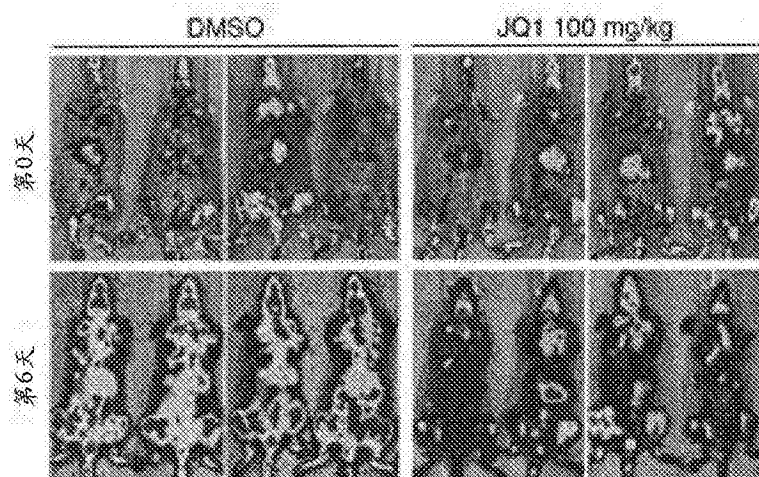


图 13A

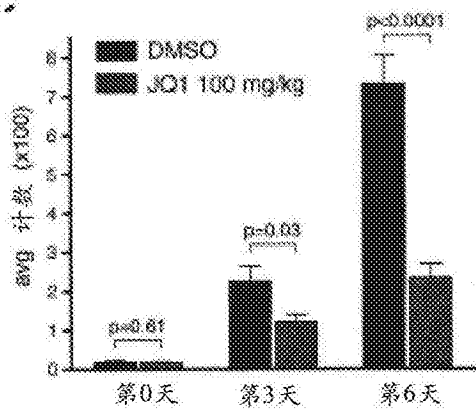


图 13B

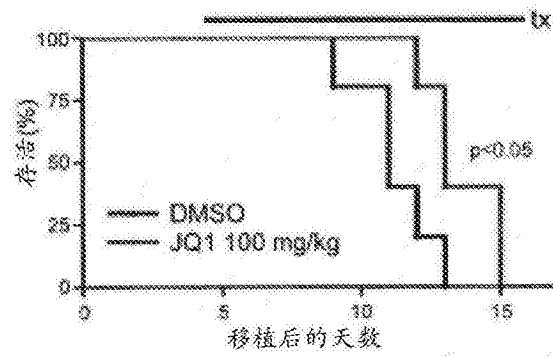


图 13C

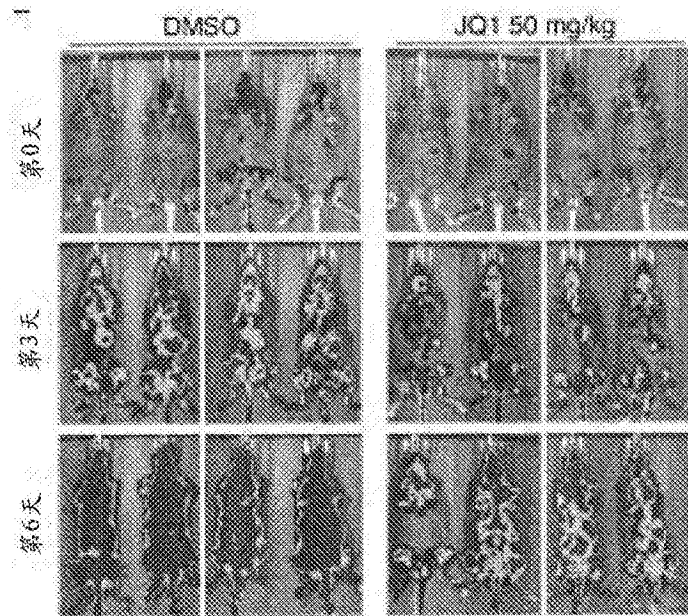


图 13D

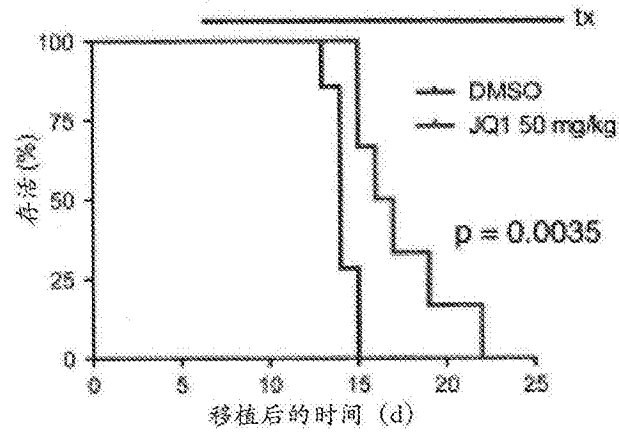


图 13E

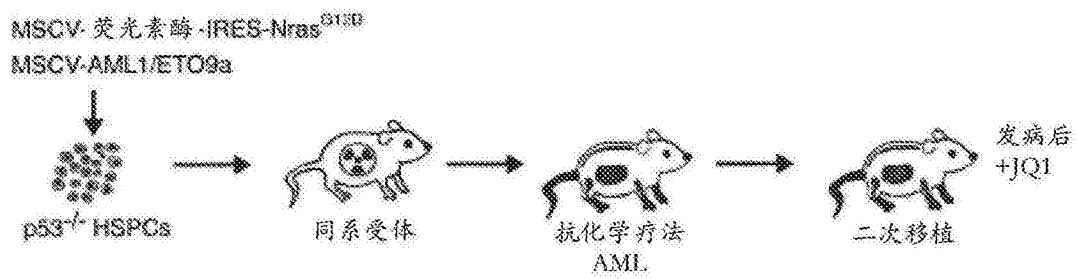


图 14A

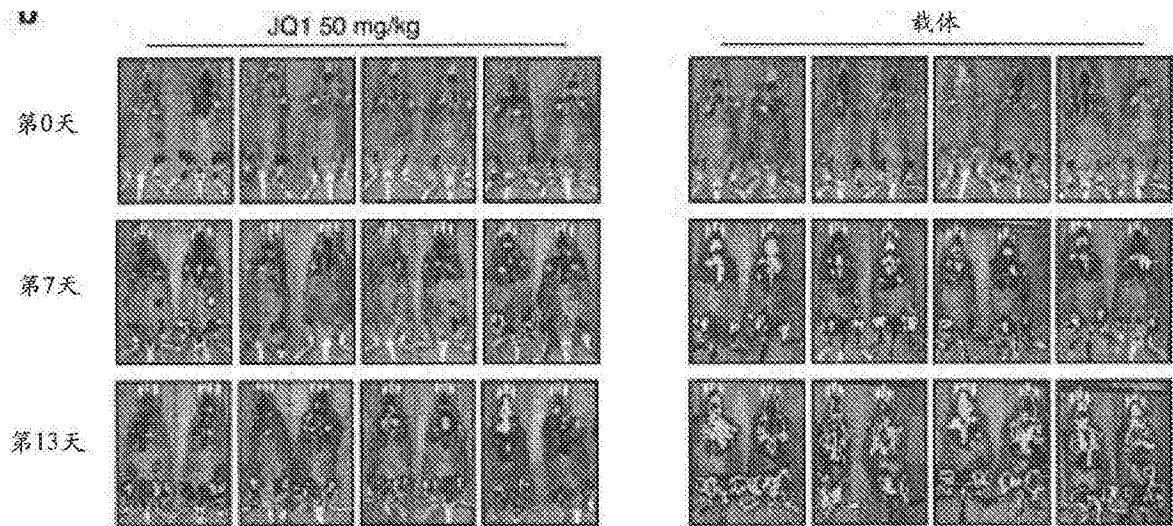


图 14B

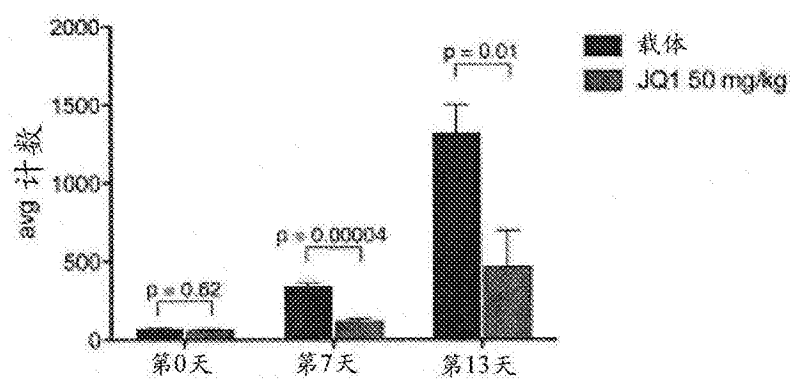


图 14C

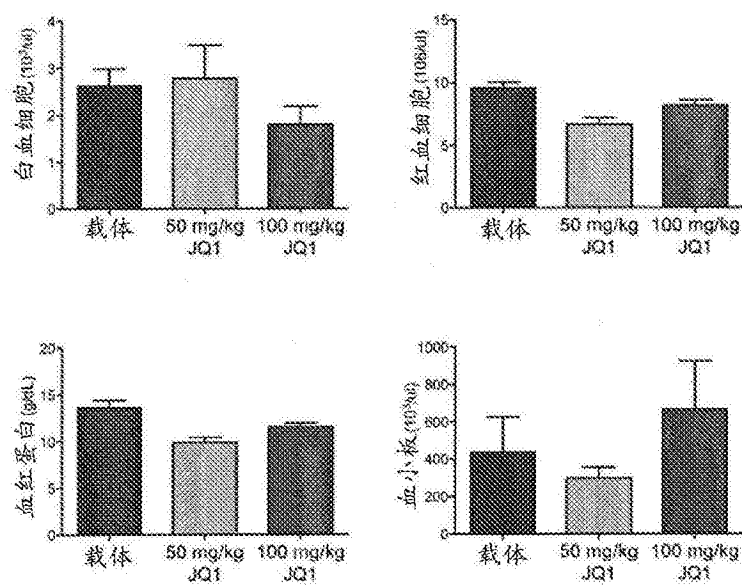


图 15

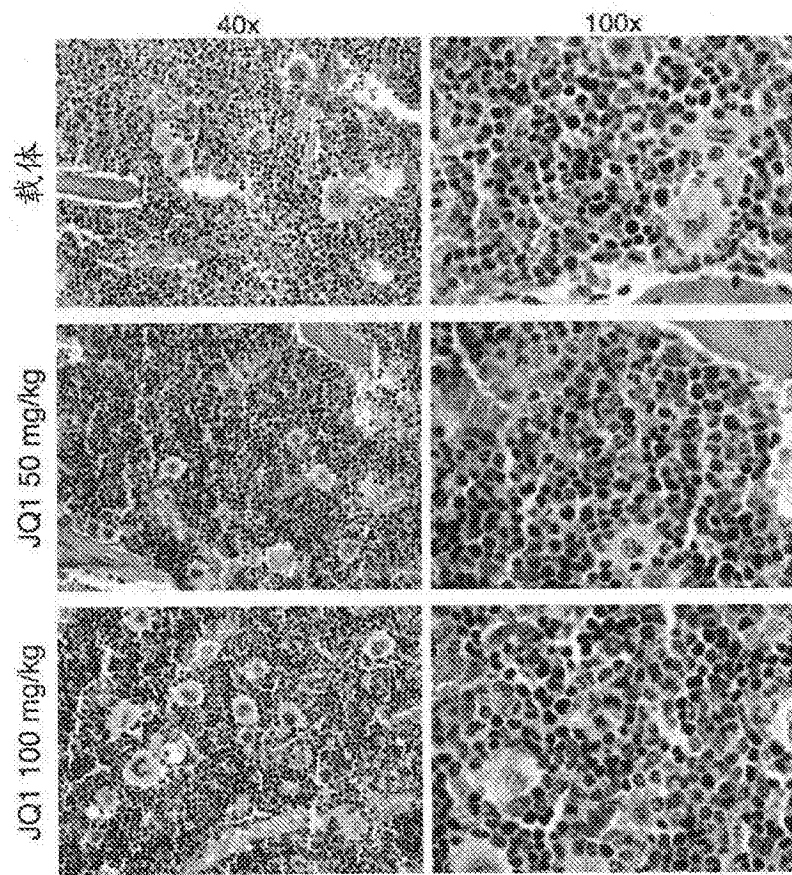


图 16

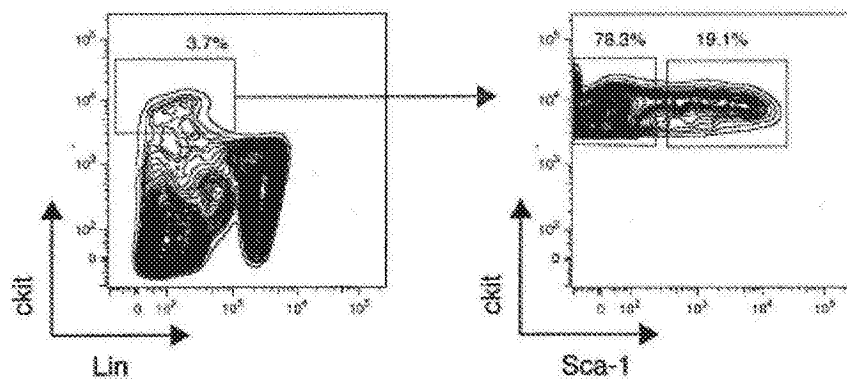


图 17A

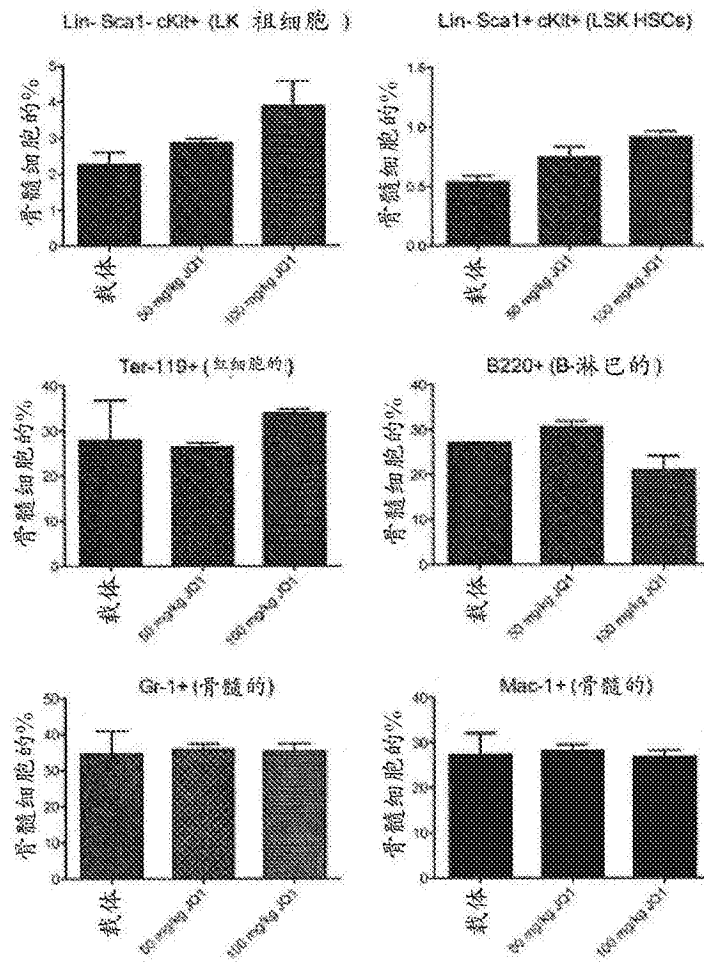


图 17B

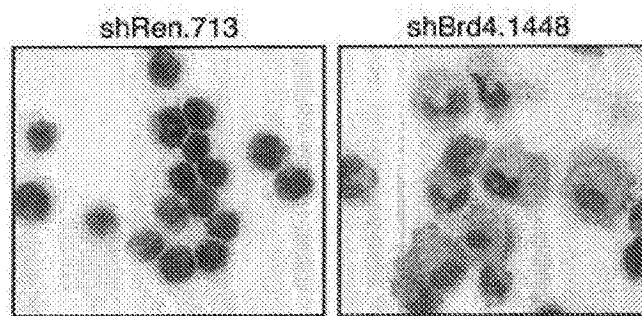


图 18A

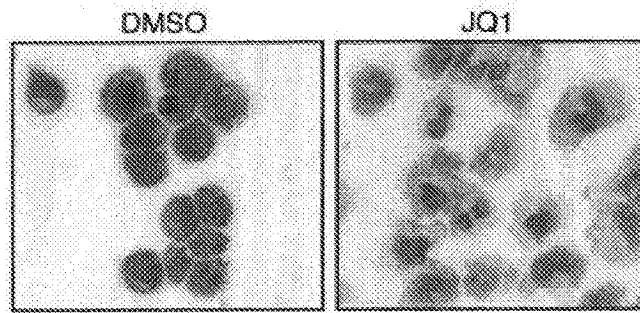


图 18B

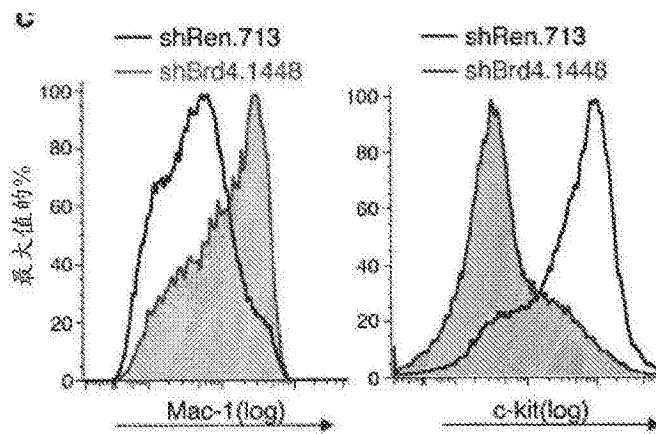


图 18C

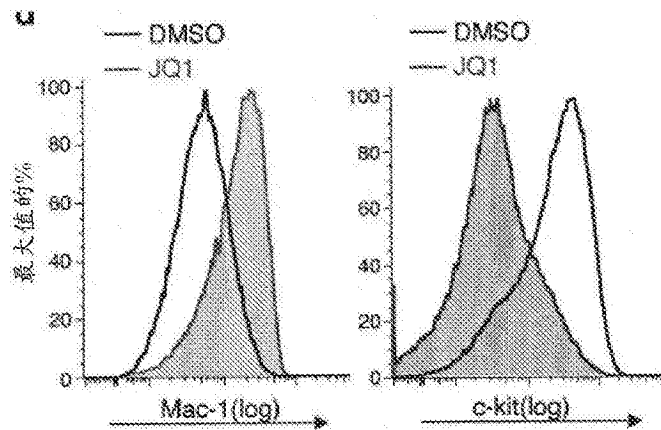


图 18D

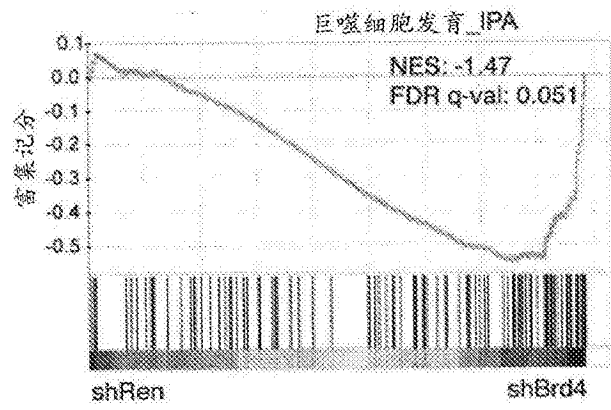


图 18E

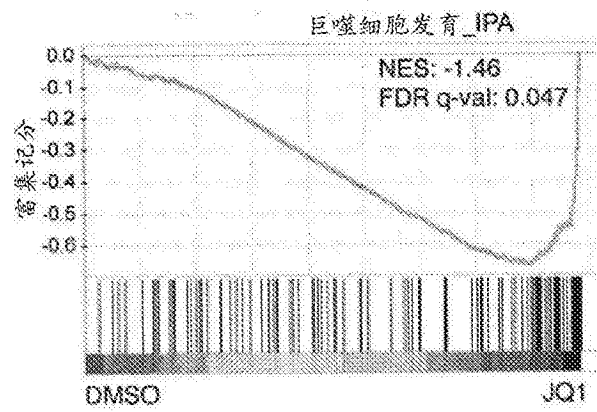


图 18F

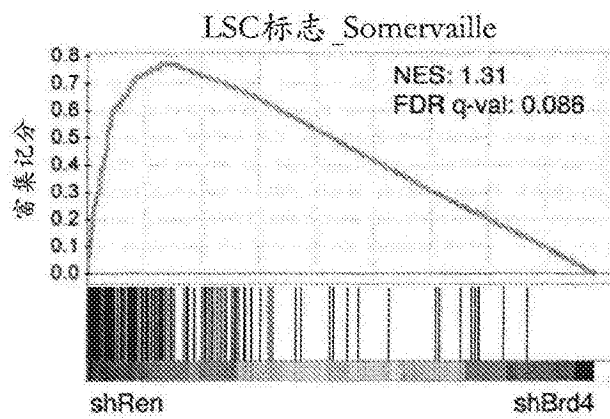


图 18G

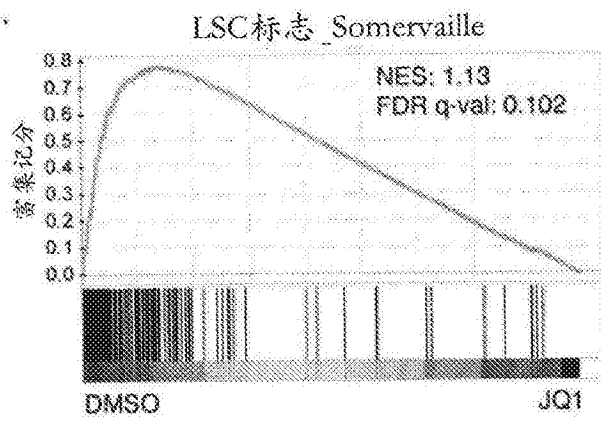


图 18H

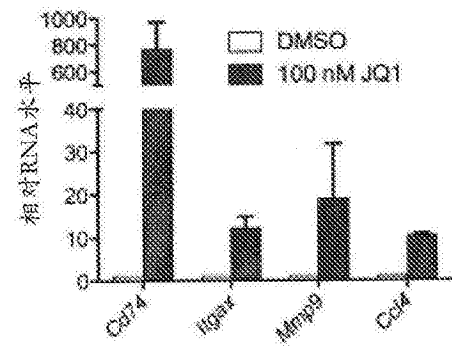
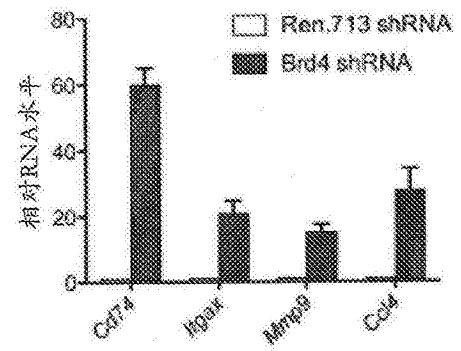


图 18I

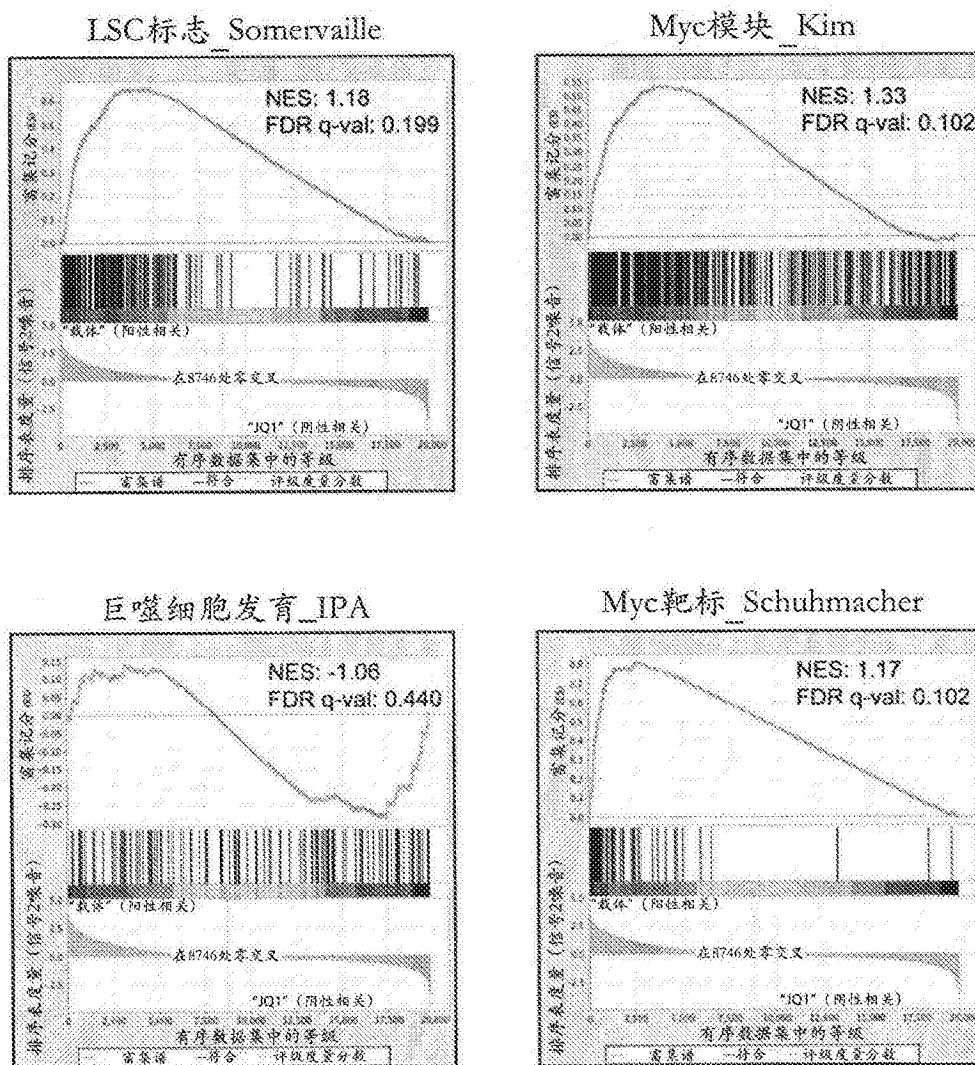


图 19

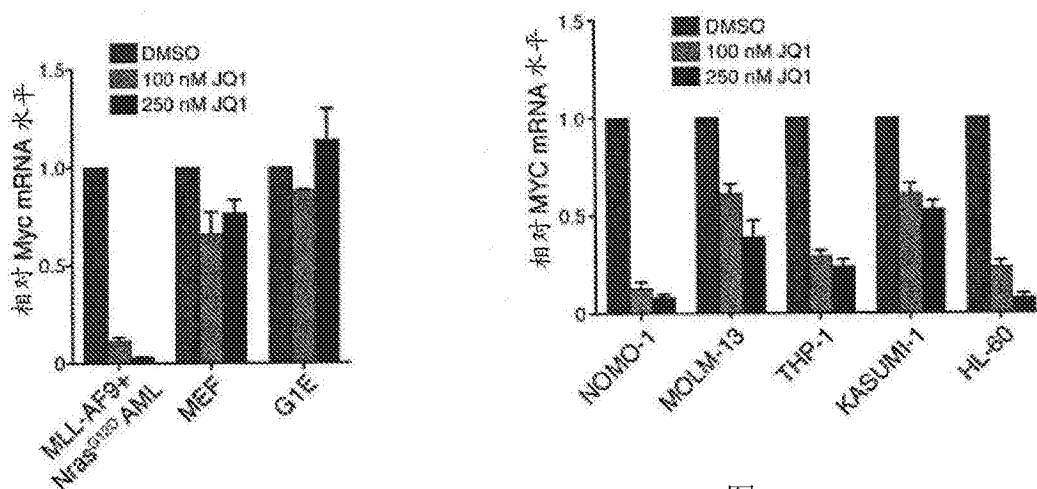


图 20B

图 20A

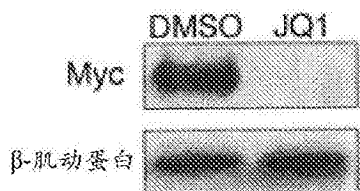


图 20C

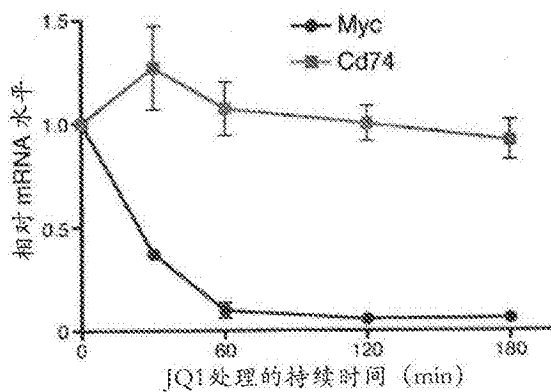


图 20D

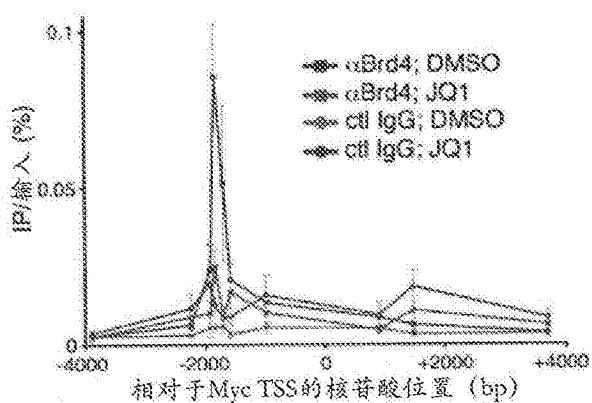


图 20E

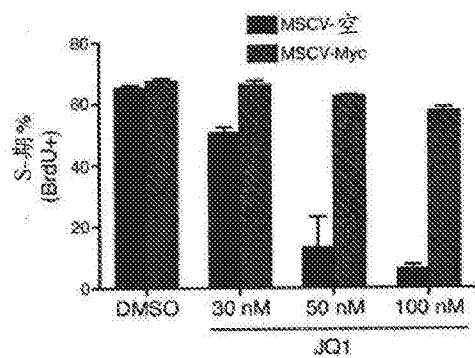


图 20G

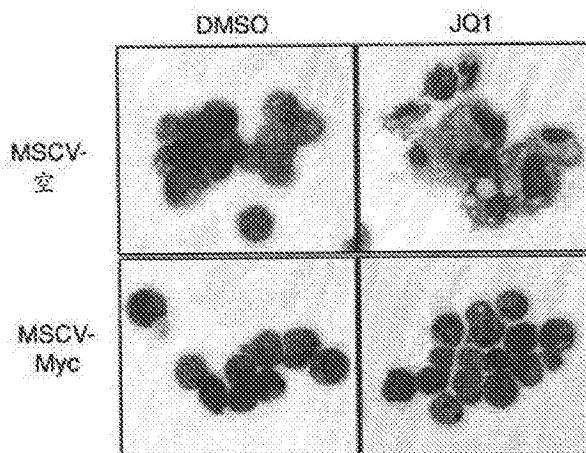


图 20H

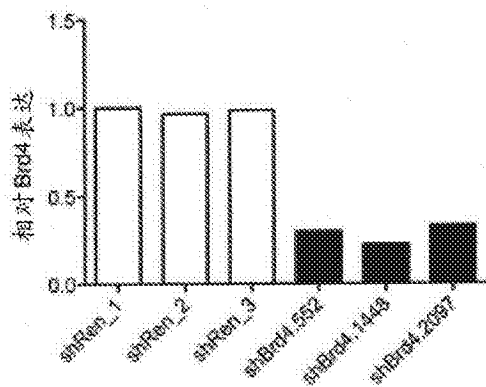


图 21A

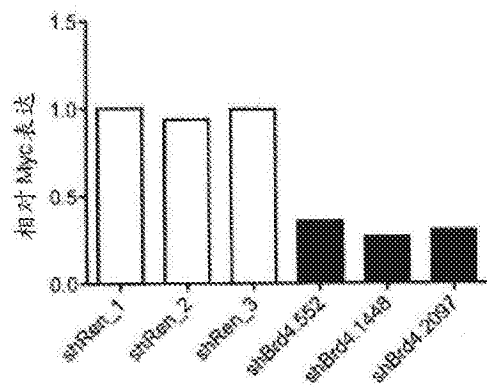


图 21B

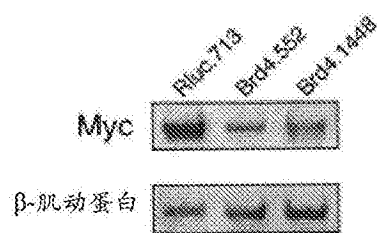


图 21C

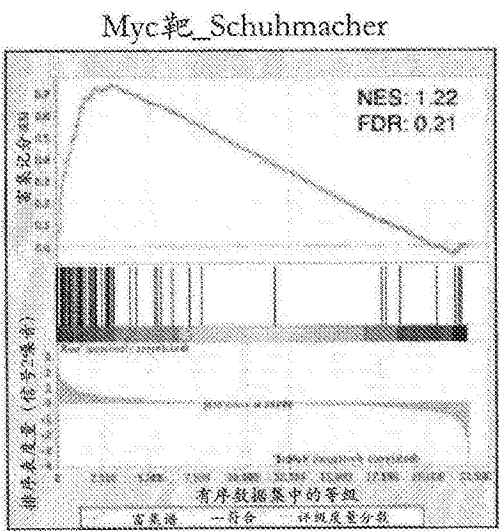
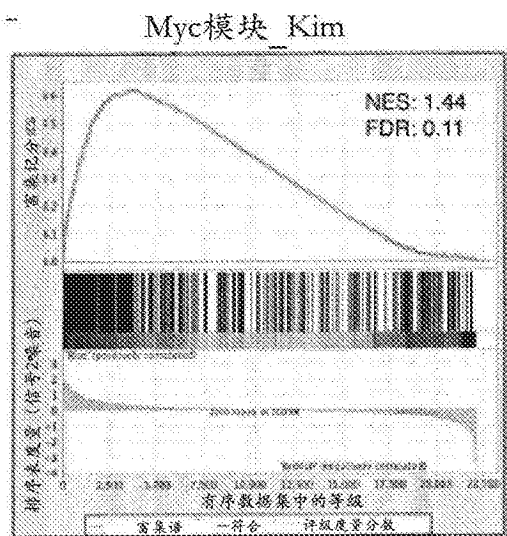


图 21D

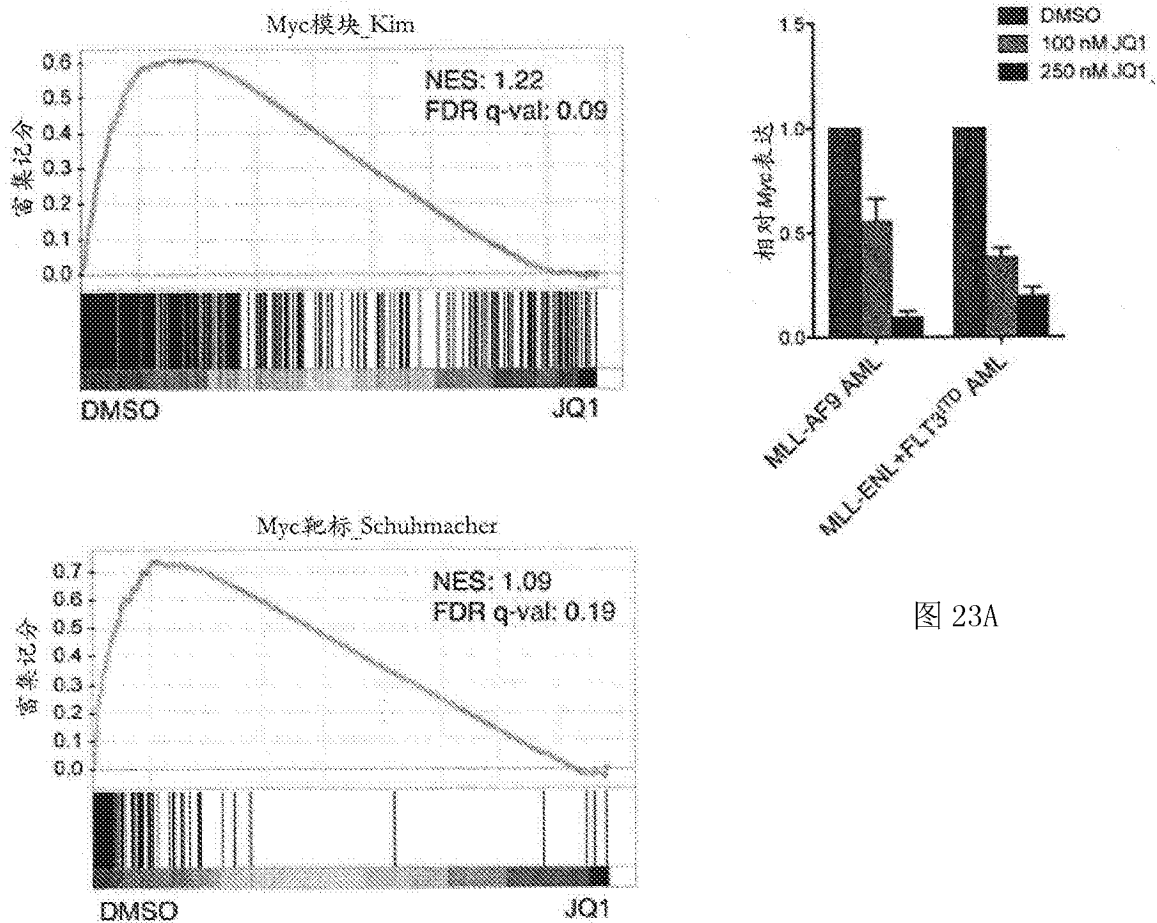


图 23A

图 22

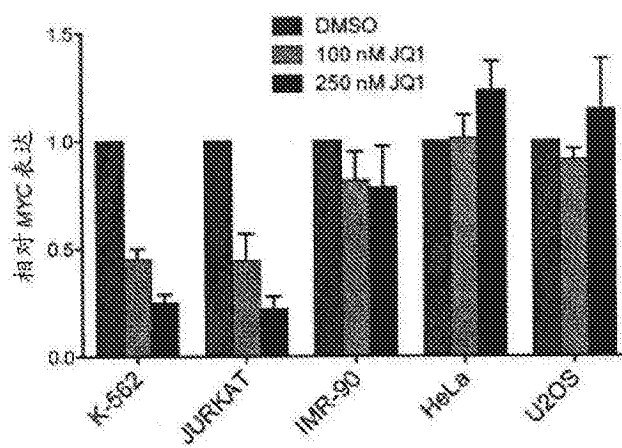


图 23B

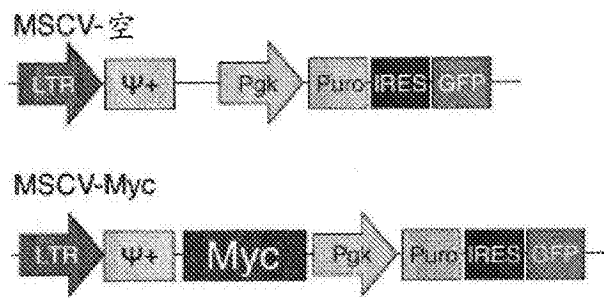


图 24A

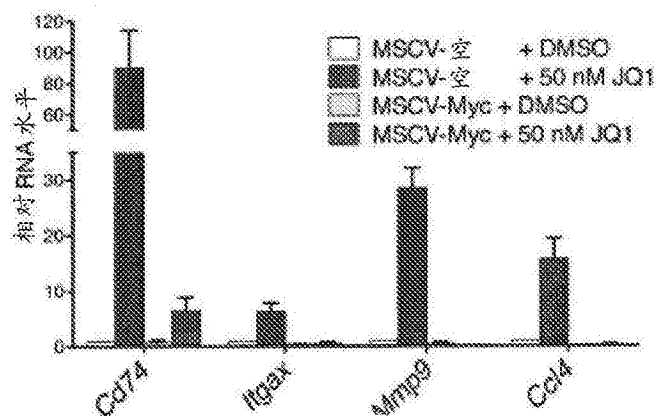


图 24B

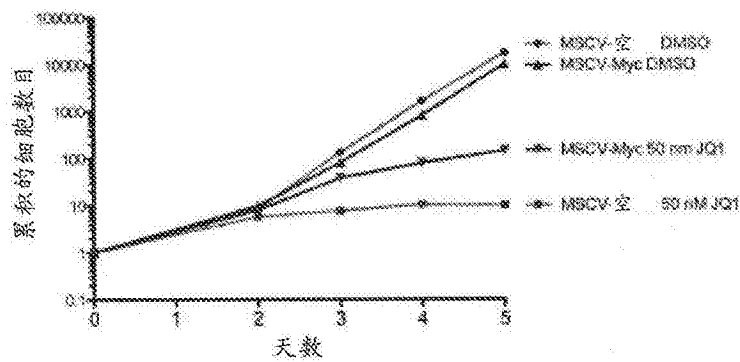


图 24C

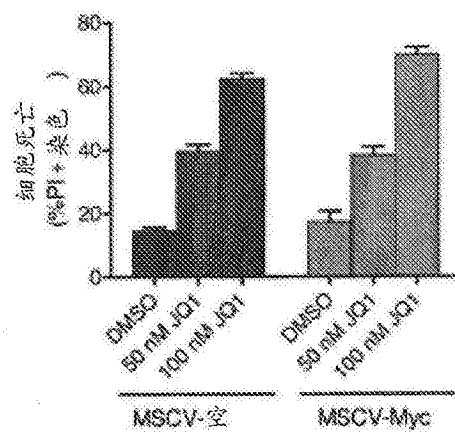


图 24D

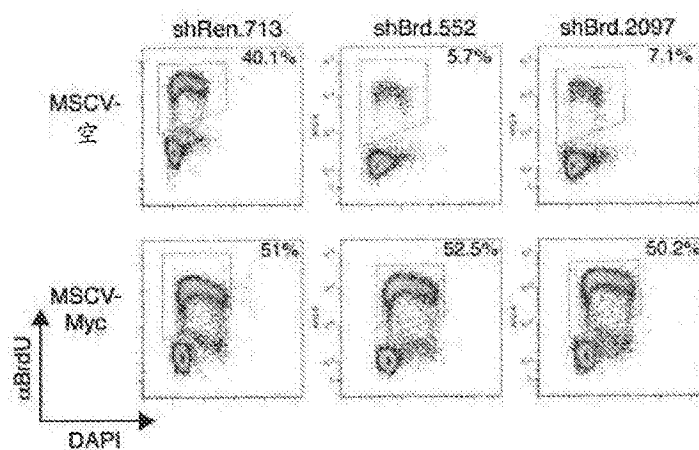


图 25A

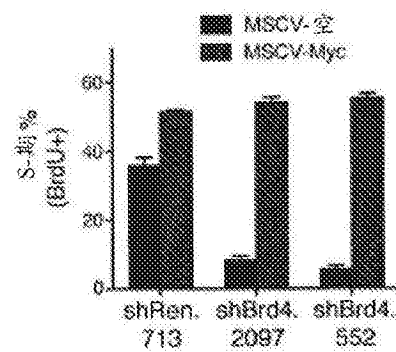


图 25B

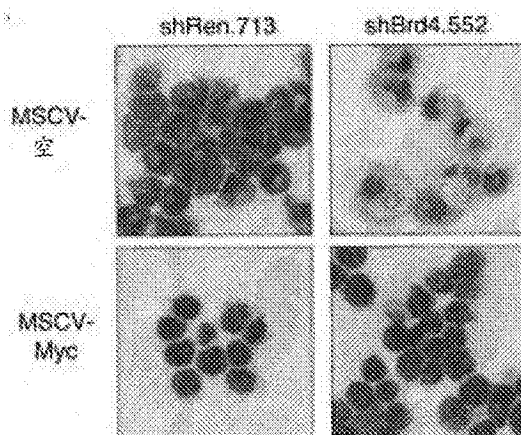


图 25C

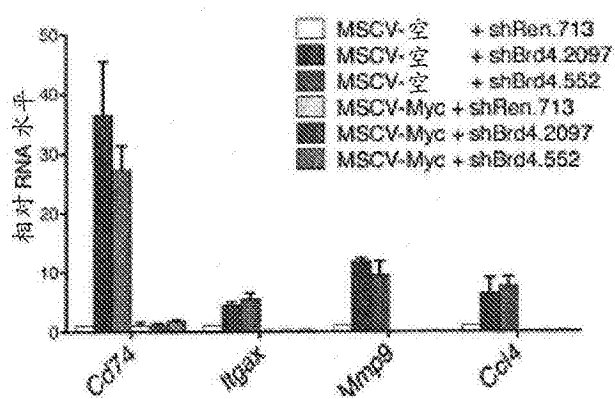


图 25D

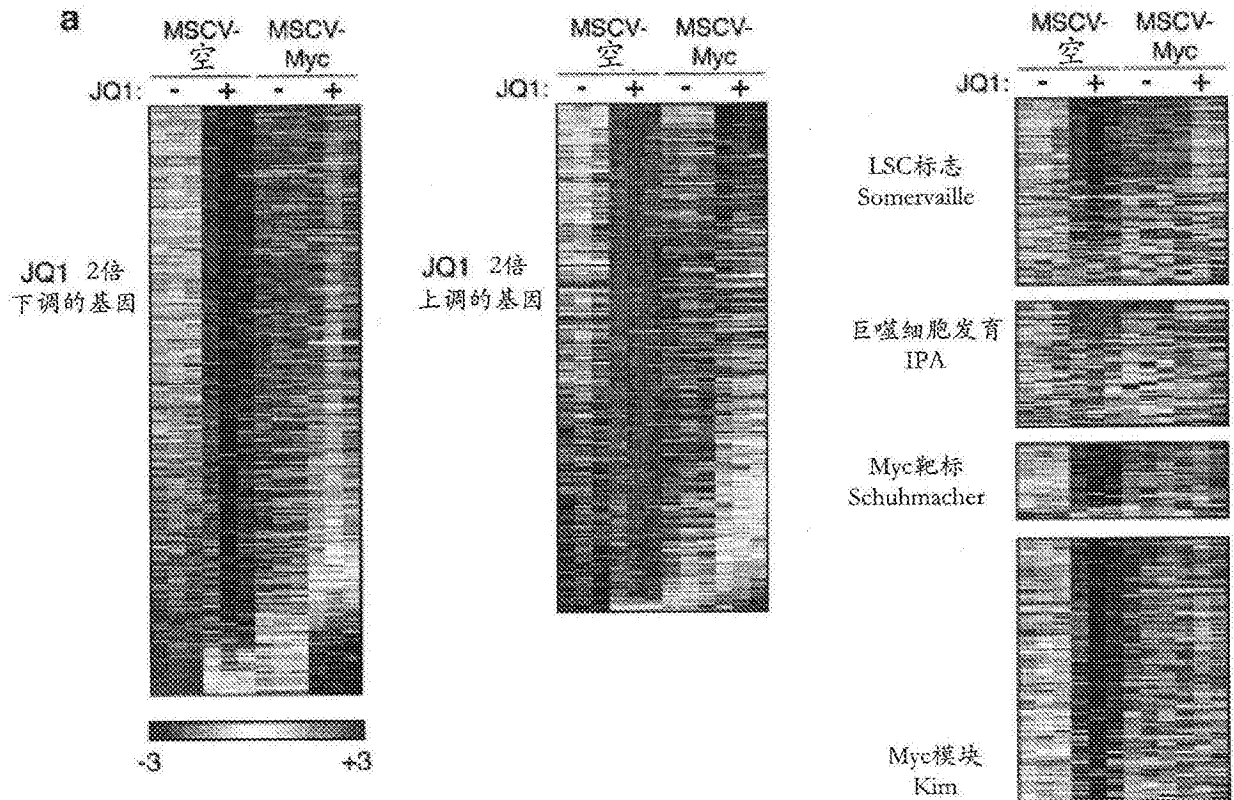


图 26A

图 26B

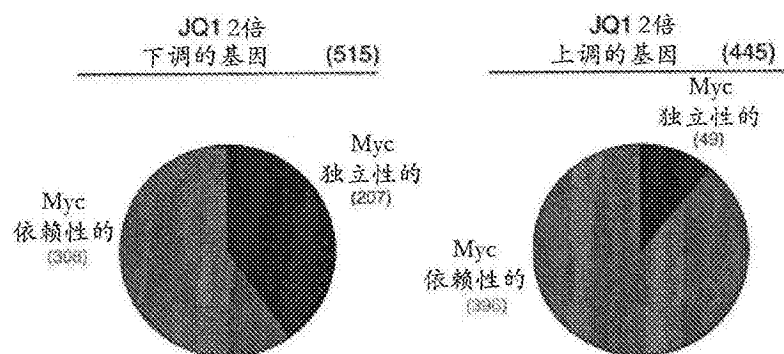


图 26C

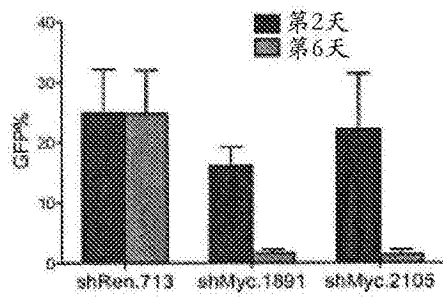


图 27A

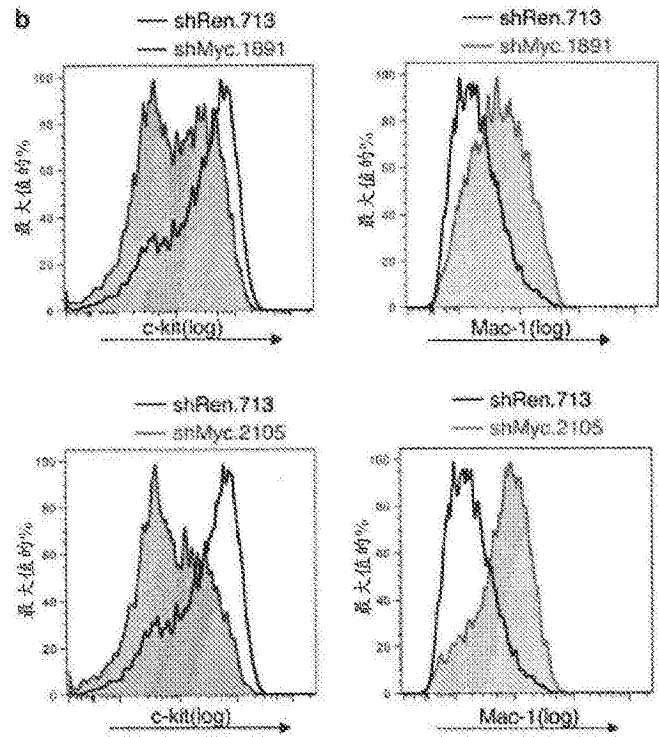


图 27B

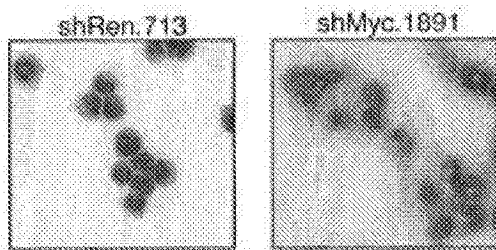


图 27C

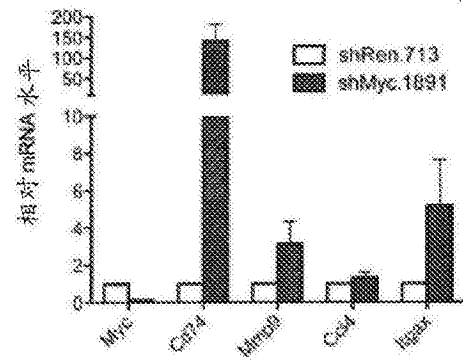


图 27D

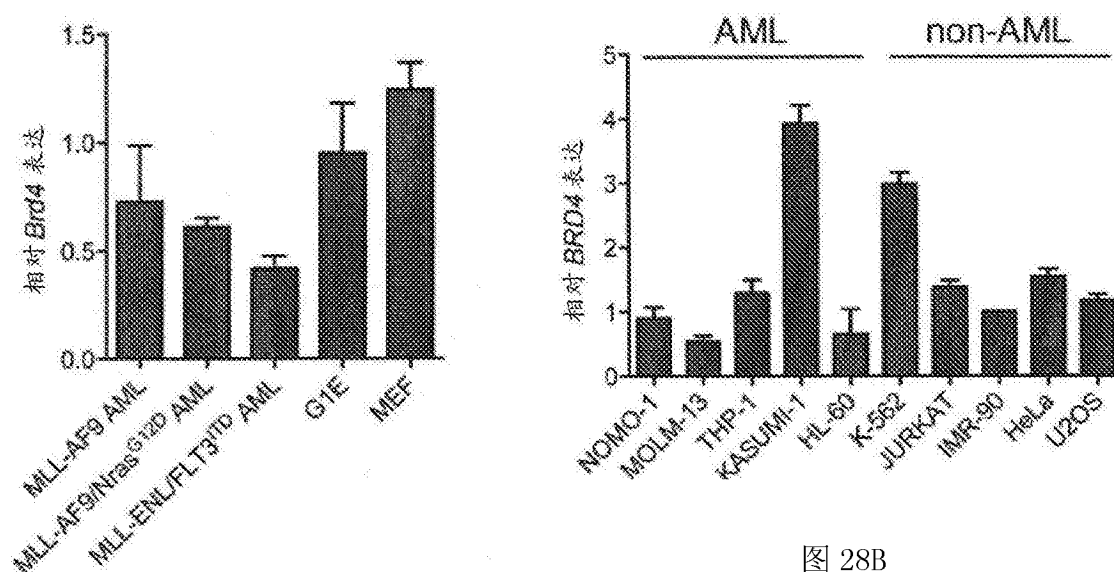


图 28B

图 28A

雄性CD1小鼠中50 mg/kg的IP给药后(S)-JQ1的个体和平均血浆浓度-时间数据								
剂量 (mg/kg)	给药 途径	取样 时间 (hr)	浓度 (ng/mL) 个体			平均 (ng/mL)	SD	CV(%)
50	IP	0	BQL	BQL	BQL	BQL	NA	NA
		0.033	7270	9480	5470	7407	2009	27.1
		0.083	11000	12600	9610	11037	1545	14.0
		0.25	8660	8930	11400	9663	1510	15.6
		0.5	8540	6950	9920	8470	1486	17.5
		1	5690	4270	4680	4880	731	15.0
		2	3590	4370	4450	4137	475	11.6
		4	2620	1280	2060	1987	673	33.9
		6	65.7	523	801	463	371	80.1
		8	151	595	446	397	226	56.9
		12	4.54	5.02	10.9	6.82	3.54	51.9
		24	BQL	BQL	BQL	BQL	NA	NA
PK 参数		单位	估计值					
T _{max}		hr	0.0830					
C _{max}		ng/mL	11000					
终末 t _{1/2}		hr	1.24					
AUC _{0-∞}		hr*ng/mL	22700					
AUC ₀₋₂₄		hr*ng/mL	22700					

图 29A

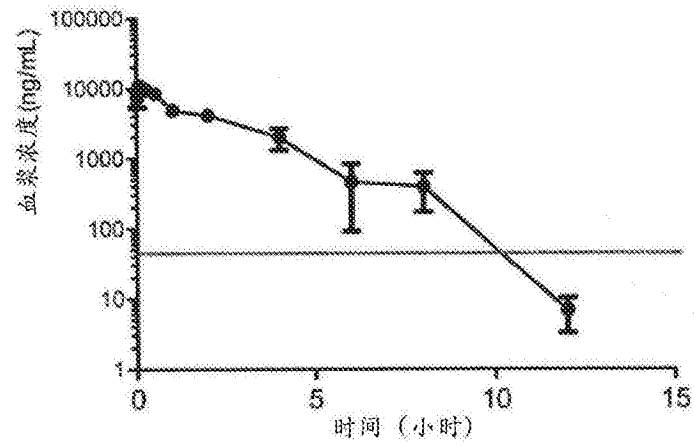


图 29B

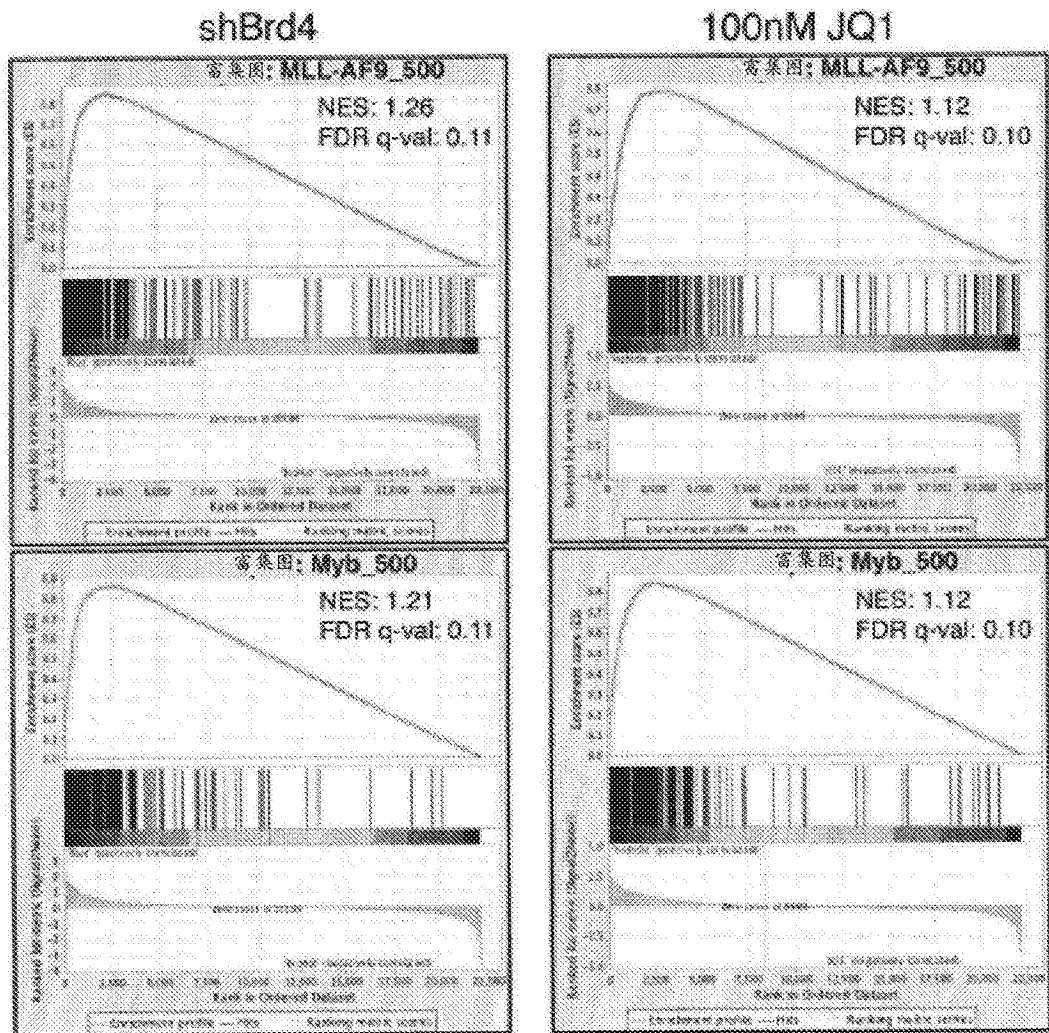


图 30A

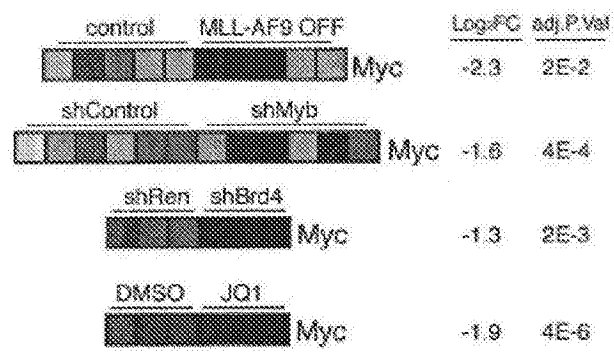


图 30B

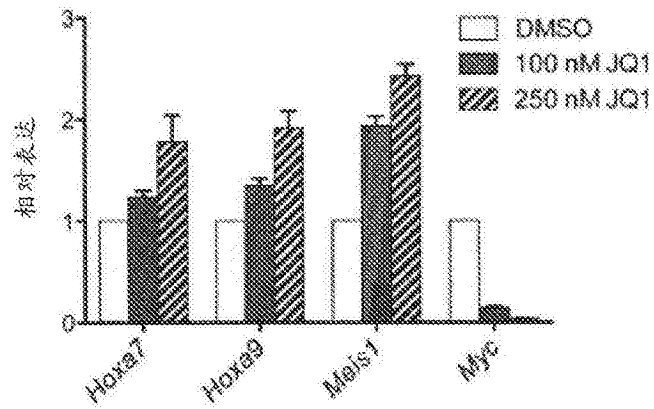


图 30C