



(10) 授权公告号 CN 114269345 B

(45) 授权公告日 2025.06.27

(21) 申请号 201980086179.8

(22) 申请日 2019.10.25

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114269345 A

(43) 申请公布日 2022.04.01

(30) 优先权数据
62/751255 2018.10.26 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.06.25

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/058062 2019.10.25

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/086963 EN 2020.04.30

(73) 专利权人 科乐斯疗法公司
地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 S·贝图恩 K·迪亚斯
C·A·埃文斯

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

专利代理师 王琳 彭昶

(51) Int.Cl.
A61K 31/519 (2006.01)
C07D 487/04 (2006.01)
C07D 401/14 (2006.01)
A61K 31/4162 (2006.01)
A61P 19/08 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

(56) 对比文件
W0 2018200855 A1, 2018.11.01

审查员 蔡放

权利要求书2页 说明书58页 附图23页

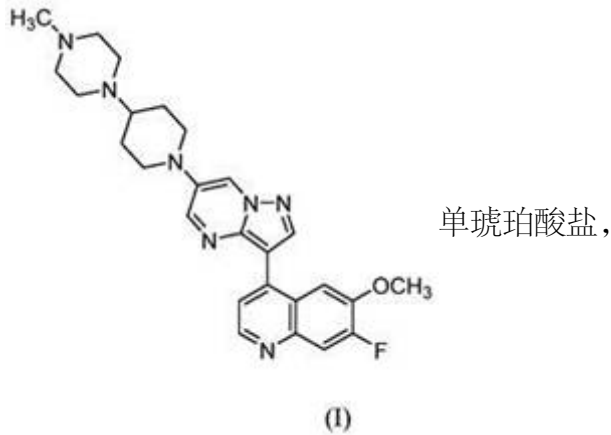
(54) 发明名称

ALK2抑制剂的晶体形式

(57) 摘要

本发明涉及ALK2抑制剂的结晶形式、其制备方法及其相关药物制剂。本发明还涉及所述结晶形式的药物用途。

1. 一种具有式 (I) 结构的结晶化合物,



其中所述结晶化合物具有 3.58 ± 0.2 、 7.05 ± 0.2 、 10.59 ± 0.2 、 10.75 ± 0.2 、 13.80 ± 0.2 、 14.16 ± 0.2 、 15.16 ± 0.2 、 15.68 ± 0.2 、 16.18 ± 0.2 、 16.80 ± 0.2 、 17.15 ± 0.2 、 17.69 ± 0.2 、 17.97 ± 0.2 、 18.29 ± 0.2 、 18.59 ± 0.2 、 18.84 ± 0.2 、 19.27 ± 0.2 、 20.29 ± 0.2 、 24.47 ± 0.2 、 24.84 ± 0.2 和 28.47 ± 0.2 的 2θ 值。

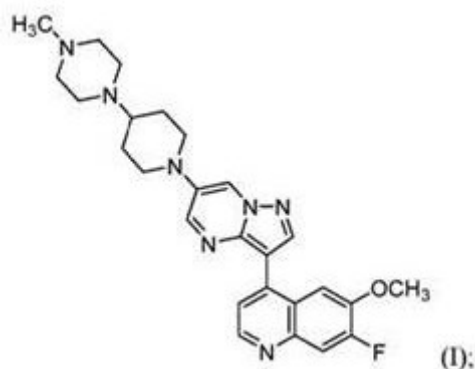
2. 权利要求1的结晶化合物,其中所述化合物是无水的。

3. 权利要求1的结晶化合物,其具有 3.58 ± 0.2 、 7.05 ± 0.2 、 10.59 ± 0.2 、 10.75 ± 0.2 、 13.80 ± 0.2 、 14.16 ± 0.2 、 15.16 ± 0.2 、 15.68 ± 0.2 、 16.18 ± 0.2 、 16.80 ± 0.2 、 17.15 ± 0.2 、 17.69 ± 0.2 、 17.97 ± 0.2 、 18.29 ± 0.2 、 18.59 ± 0.2 、 18.84 ± 0.2 、 19.27 ± 0.2 、 20.29 ± 0.2 、 21.05 ± 0.2 、 21.26 ± 0.2 、 21.56 ± 0.2 、 21.78 ± 0.2 、 22.68 ± 0.2 、 23.84 ± 0.2 、 24.47 ± 0.2 、 24.84 ± 0.2 、 25.15 ± 0.2 、 26.10 ± 0.2 、 27.12 ± 0.2 、 27.78 ± 0.2 、 28.47 ± 0.2 和 29.06 ± 0.2 的 2θ 值。

4. 权利要求1的结晶化合物,其具有基本上如图1所示的XRPD图,标记为形式A。

5. 一种药物组合物,其包含权利要求1-4中任一项的结晶化合物和一种或多种药学上可接受的赋形剂。

6. 一种制备具有式 (I) 结构的结晶化合物的方法:



包括:

- a) 提供式 (I) 化合物;
 - b) 加入琥珀酸以形成混合物;和
 - c) 从包含式 (I) 化合物的混合物中结晶式 (I) 化合物,
- 其中所述结晶化合物是单琥珀酸盐,和其中所述结晶化合物具有 3.58 ± 0.2 、 7.05

± 0.2 、10.59 ± 0.2 、10.75 ± 0.2 、13.80 ± 0.2 、14.16 ± 0.2 、15.16 ± 0.2 、15.68
 ± 0.2 、16.18 ± 0.2 、16.80 ± 0.2 、17.15 ± 0.2 、17.69 ± 0.2 、17.97 ± 0.2 、18.29
 ± 0.2 、18.59 ± 0.2 、18.84 ± 0.2 、19.27 ± 0.2 、20.29 ± 0.2 、24.47 ± 0.2 、24.84
 ± 0.2 和28.47 ± 0.2 的 2θ 值。

7. 权利要求1-4任一项的结晶化合物在制备药物中的用途,所述药物用于治疗患有贫血的受试者。

ALK2抑制剂的晶体形式

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35 USC 119要求2018年10月26日提交的临时申请号62/751,255的优先权权益,其全部内容并入本文作为参考。

背景技术

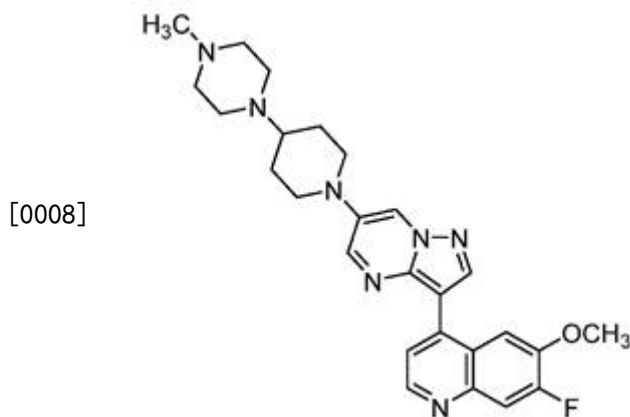
[0003] BMP信号传导家族是TGF- β 超家族的各种子集。通过三种不同的II型受体(BMPRII、ActRIIa和ActRIIb)和至少四种I型受体(ALK1、ALK2、ALK3和ALK6)识别超过二十种已知的BMP配体。二聚体配体便利受体异聚体的组装,允许组成型激活的II型受体丝氨酸/苏氨酸激酶使I型受体丝氨酸/苏氨酸激酶磷酸化。激活的I型受体使BMP应答(BR-) SMAD效应子(SMAD 1、SMAD 5和SMAD 8)磷酸化,以便利与SMAD4(一种也便利TGF信号传导的共SMAD)的复合物中的核转位。此外,BMP信号可以以SMAD非依赖性方式激活细胞内效应子(如MAPKp38)。可溶性BMP抑制剂(如头蛋白(noggin)、脊索蛋白(chordin)、格里莫林蛋白(gremlin)和卵泡抑素(follistatin))通过配体整合来限制BMP信号传导。

[0004] 也已经提出了BMP信号在调节铁调素(一种系统铁平衡的肽激素和中心调控子)的表达中的作用。铁调素结合膜铁转运蛋白(脊椎动物中唯一的铁输出者)并促进铁转运蛋白的降解。铁转运蛋白活性的丧失防止铁从肠上皮细胞、巨噬细胞和肝细胞中的细胞内储存转移到血流中。BMP信号传导与铁代谢之间的联系代表了治疗学的潜在靶标。

[0005] 考虑到BMP和TGF- β 超家族在配体(目前>25种不同的配体)和受体(识别BMP的四种I型受体和三种II型受体)水平上的巨大结构多样性和受体结合的异源四聚体方式,用于经由可溶性受体、内源性抑制剂或中和抗体抑制BMP信号的传统方法是不实际的或无效的。内源性抑制剂(如头蛋白和卵泡抑素)对于配体亚类具有有限的特异性。单个受体对于配体具有有限的亲和力,然而受体异源四聚体对于特定配体展现出更高的特异性。对于特定配体或受体特异性的中和抗体先前已经被描述,并且也被该信号传导系统的结构多样性限制。因此,本领域中需要特异性拮抗BMP信号通路并且可以用于在治疗性应用或实验应用中操纵这些通路的药剂(如上文列出的那些)。

[0006] 发明概述

[0007] 本发明的一个方面涉及具有式(I)结构的结晶化合物,



[0009] 本发明的另一方面涉及制备式(I)的结晶化合物的方法。

[0010] 在某些实施方案中,本发明提供了适用于受试者的药物制剂,其包含式(I)的结晶化合物和一种或多种药学上可接受的赋形剂。在某些实施方案中,药物制剂可以用于治疗或预防本文所述的病况或疾病。

[0011] 附图的详细说明

[0012] 图1显示了式(I)化合物单琥珀酸盐形式A的XRPD图。

[0013] 图2显示了式(I)化合物单琥珀酸盐形式B的XRPD图。

[0014] 图3显示了式(I)化合物游离碱的XRPD图。

[0015] 图4显示了式(I)化合物游离碱的差示扫描量热法(DSC)和热重分析(TGA)图。

[0016] 图5显示了式(I)化合物游离碱的动态蒸气吸附谱(DVS)。

[0017] 图6显示了式(I)化合物单琥珀酸盐形式A参考样品和在THF中制备的形式A的XRPD图。

[0018] 图7显示了式(I)化合物单琥珀酸盐形式A的¹H-NMR谱。

[0019] 图8显示了式(I)化合物单琥珀酸盐形式A参考样品和在EtOH中制备的形式A的XRPD图。

[0020] 图9显示了在EtOH中制备的式(I)化合物单琥珀酸盐形式A的DVS。

[0021] 图10显示了在DVS分析之前和之后的式(I)化合物单琥珀酸盐形式A,以及式(I)化合物单琥珀酸盐形式C的XRPD谱的叠加。

[0022] 图11显示了在EtOH中制备的式(I)化合物单琥珀酸盐形式A、式(I)化合物单琥珀酸盐形式A参考样品以及式(I)化合物单琥珀酸盐形式B的XRPD谱的叠加。

[0023] 图12显示了式(I)化合物单琥珀酸盐形式A和琥珀酸的XRPD谱。

[0024] 图13显示了式(I)化合物单琥珀酸盐形式A的差示扫描量热法(DSC)和热重分析(TGA)图。

[0025] 图14显示了式(I)化合物单琥珀酸盐形式A和形式B的XRPD谱。

[0026] 图15显示了式(I)化合物单琥珀酸盐形式B的差示扫描量热法(DSC)和热重分析(TGA)图。

[0027] 图16显示了式(I)化合物单琥珀酸盐形式B的DVS。

[0028] 图17显示了式(I)化合物单琥珀酸盐形式B在DVS分析之前和之后的XRPD谱的叠加。

[0029] 图18显示了式(I)化合物单琥珀酸盐形式B的¹H-NMR谱。

[0030] 图19显示了式(I)化合物单琥珀酸盐形式A、形式B和形式C的XRPD谱的叠加。

[0031] 图20显示了式(I)化合物单琥珀酸盐形式C的差示扫描量热法(DSC)和热重分析(TGA)图。

[0032] 图21显示了式(I)化合物单琥珀酸盐形式C的¹H-NMR谱。

[0033] 图22显示了式(I)化合物单琥珀酸盐形式A、形式B和形式D的XRPD谱的叠加。

[0034] 图23显示了式(I)化合物单琥珀酸盐的形式A和形式D的混合物的差示扫描量热法(DSC)。

[0035] 图24显示了式(I)化合物单琥珀酸盐形式D的¹H-NMR谱。

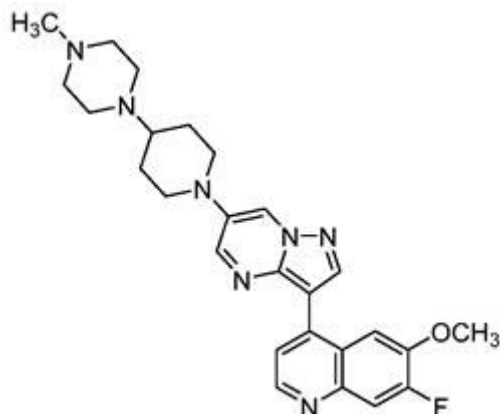
[0036] 图25显示了由形式A给药引起的血清铁浓度。

[0037] 图26显示了由形式A给药引起的转铁蛋白饱和度百分比。

[0038] 发明详述

[0039] 在某些实施方案中,本发明提供具有式(I)结构的结晶化合物,

[0040]



(I) 及其盐。

[0041] 在某些实施方案中,式(I)的结晶化合物不是溶剂化的(例如,晶格不包含溶剂分子)。在某些此类实施方案中,式(I)的结晶化合物是无水的或基本上无水的。

[0042] 在某些实施方案中,式(I)化合物呈与选自氯化物、溴化物、琥珀酸盐、昔萘酸盐、柠檬酸盐、苹果酸盐、半苹果酸盐、酒石酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、磷酸盐、甲苯磺酸盐、硫酸盐和硫酸氢盐的阴离子形成的盐的形式。在优选的实施方案中,式(I)化合物呈琥珀酸盐的形式,例如单琥珀酸盐。

[0043] 本文所述的任何结晶化合物可用于制备用于治疗本文公开的任何疾病或病况的药物。

[0044] 式(I)化合物的单琥珀酸盐至少以“形式A”、“形式B”、“形式C”和“形式D”的形式存在,如下详述。这些不同的形式在本文中被理解为“多晶型物”。

[0045] 结晶化合物的多晶型物可以通过粉末X射线衍射(XRPD)表征。 θ 表示衍射角,以度为单位。在某些实施方案中,XRPD中使用的衍射仪测量衍射角为衍射角 θ 的两倍。因此,在某些实施方案中,本文所述的衍射图是指相对于角度 2θ 测量的X射线强度。

[0046] 在某些实施方案中,式(I)化合物单琥珀酸盐的第一无水结晶形式具有约 7.05 ± 0.2 , 15.16 ± 0.2 , 21.05 ± 0.2 , 21.26 ± 0.2 和 24.47 ± 0.2 的 2θ 值。在进一步的实施方案中,式(I)化合物单琥珀酸盐的无水结晶具有约 3.58 ± 0.2 , 7.05 ± 0.2 , 13.8 ± 0.2 , 14.16 ± 0.2 , 15.16 ± 0.2 , 16.18 ± 0.2 , 16.80 ± 0.2 , 17.15 ± 0.2 , 17.69 ± 0.2 , 18.29 ± 0.2 , 18.84 ± 0.2 , 20.29 ± 0.2 , 21.05 ± 0.2 , 21.26 ± 0.2 , 22.68 ± 0.2 , 23.84 ± 0.2 , 24.47 ± 0.2 , 24.84 ± 0.2 和 28.47 ± 0.2 的 2θ 值。在更进一步的实施方案中,式(I)化合物单琥珀酸盐的无水结晶具有约 3.58 ± 0.2 , 7.05 ± 0.2 , 10.59 ± 0.2 , 10.75 ± 0.2 , 13.80 ± 0.2 , 14.16 ± 0.2 , 15.16 ± 0.2 , 15.68 ± 0.2 , 16.18 ± 0.2 , 16.80 ± 0.2 , 17.15 ± 0.2 , 17.69 ± 0.2 , 17.97 ± 0.2 , 18.29 ± 0.2 , 18.59 ± 0.2 , 18.84 ± 0.2 , 19.27 ± 0.2 , 20.29 ± 0.2 , 21.05 ± 0.2 , 21.26 ± 0.2 , 21.56 ± 0.2 , 21.78 ± 0.2 , 22.68 ± 0.2 , 23.84 ± 0.2 , 24.47 ± 0.2 , 24.84 ± 0.2 , 25.15 ± 0.2 , 26.10 ± 0.2 , 27.12 ± 0.2 , 27.78 ± 0.2 , 28.47 ± 0.2 和 29.06 ± 0.2 的 2θ 值。

[0047] 在某些实施方案中,式(I)化合物单琥珀酸盐的无水结晶形式具有基本上如图1所

示的XRPD图,标记为形式A。

[0048] 在某些实施方案中,式(I)化合物单琥珀酸盐的第二无水结晶形式具有约 9.79 ± 0.2 、 13.05 ± 0.2 、 22.91 ± 0.2 、 23.60 ± 0.2 和 26.25 ± 0.2 的 2θ 值。在进一步的实施方案中,式(I)化合物单琥珀酸盐的无水结晶具有约 3.25 ± 0.2 、 9.79 ± 0.2 、 13.05 ± 0.2 、 16.75 ± 0.2 、 19.50 ± 0.2 、 22.91 ± 0.2 、 23.60 ± 0.2 和 26.25 ± 0.2 的 2θ 值。在另外的实施方案中,式(I)化合物单琥珀酸盐的无水结晶具有约 3.25 ± 0.2 、 9.79 ± 0.2 、 13.05 ± 0.2 、 13.61 ± 0.2 、 14.39 ± 0.2 、 16.75 ± 0.2 、 18.50 ± 0.2 、 19.50 ± 0.2 、 22.91 ± 0.2 、 23.60 ± 0.2 和 26.25 ± 0.2 的 2θ 值。

[0049] 在某些实施方案中,式(I)化合物单琥珀酸盐的无水结晶形式具有基本上如图2所示的XRPD图,标记为形式B。

[0050] 在某些实施方案中,式(I)化合物游离碱的第三无水结晶形式具有约 6.00 ± 0.2 、 12.00 ± 0.2 、 16.14 ± 0.2 、 17.72 ± 0.2 、 18.00 ± 0.2 、 18.64 ± 0.2 和 23.50 ± 0.2 的 2θ 值。在某些实施方案中,式(I)化合物单琥珀酸盐的无水结晶形式具有基本上如图3所示的XRPD图,标记为游离碱。

[0051] 在某些实施方案中,本发明涉及包含式(I)单琥珀酸盐的结晶化合物和一种或多种药学上可接受的赋形剂的药物组合物。在某些实施方案中,药物组合物选自片剂、胶囊剂和混悬剂。

[0052] 如本文所用,术语“基本纯”是指纯度大于90%的结晶多晶型物,意思是含有小于10%的任何其他化合物,包括相应的无定形化合物或结晶盐的替代多晶型物。优选地,结晶多晶型物大于95%纯,或甚至大于98%纯。

[0053] 制备式(I)化合物的晶体形式的方法

[0054] 在某些实施方案中,本发明涉及一种制备具有式(I)结构的结晶化合物的方法,包括

[0055] a) 提供式(I)化合物;

[0056] b) 加入酸以形成混合物;和

[0057] c) 从包含式(I)化合物的混合物中结晶式(I)化合物。

[0058] 在某些实施方案中,通过本发明的方法制备的结晶化合物是无水的。在其他实施方案中,通过本发明的方法制备的结晶化合物是水合物。

[0059] 在某些实施方案中,式(I)化合物存在于至少一种溶剂中。在某些实施方案中,酸存在于至少一种溶剂中。

[0060] 在某些实施方案中,式(I)化合物和至少一种溶剂形成溶液。在某些实施方案中,式(I)化合物和至少一种溶剂形成浆液或悬浮液。在某些实施方案中,酸和至少一种溶剂形成溶液。在某些实施方案中,酸和至少一种溶剂形成浆液或悬浮液。

[0061] 在某些实施方案中,酸选自HCl、HBr、琥珀酸、1-OH-2-萘甲酸、柠檬酸、苹果酸、酒石酸、丙二酸、甲磺酸、磷酸、甲苯磺酸和硫酸。在优选的实施方案中,酸是琥珀酸。

[0062] 在某些实施方案中,溶剂包含丙酮、乙腈、N,N-二甲基乙酰胺(DMA)、二甲基甲酰胺(DMF)、二甲亚砜(DMSO)、二噁烷、乙醇、乙酸乙酯、庚烷、己烷、乙酸异丙酯、甲醇、甲乙酮、N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)、四氢呋喃(THF)、甲苯、2-丙醇、1-丁醇、水或其任意组合。在某些优选的实施方案中,例如为了获得形式A,溶剂是THF、乙醇或其混合物。在其他优选的实施方案中,

案中,例如为了获得形式B,溶剂是乙醇。

[0063] 在某些实施方案中,酸存在于至少一种溶剂中并且加入到式(I)化合物中以形成浆液,并且从浆液中结晶化合物的步骤包括从浆液中沉淀化合物。

[0064] 在某些实施方案中,式(I)化合物、酸和至少一种溶剂形成溶液,并且从混合物中结晶化合物的步骤包括使溶液达到过饱和状态以导致式(I)化合物从溶液中沉淀出来。

[0065] 在某些实施方案中,使包含式(I)化合物的混合物过饱和包括缓慢加入反溶剂,例如庚烷、己烷、乙醇或可与有机溶剂混溶的另一种极性或非极性液体,允许溶液冷却(有或没有播种溶液),减少溶液的体积或其任何组合。在某些实施方案中,使包含式(I)化合物的混合物过饱和包括加入反溶剂,将溶液冷却至环境温度或更低,和减少溶液的体积,例如通过从溶液中蒸发溶剂。在某些实施方案中,使溶液冷却可以是被动的(例如,使溶液在环境温度下静置)或主动的(例如,在冰浴或冷冻机中冷却溶液)。

[0066] 在某些实施方案中,制备方法进一步包括分离晶体,例如通过过滤晶体、通过从晶体滗析(decanting)流体或通过任何其他合适的分离技术。在进一步的实施方案中,制备方法进一步包括洗涤晶体。

[0067] 在某些实施方案中,包含式(I)化合物的混合物是浆液,并且从混合物中结晶化合物的步骤包括从浆液中沉淀化合物。在一些实施方案中,结晶化合物通过离心分离。

[0068] 在某些实施方案中,制备方法进一步包括诱导结晶。该方法还可包括干燥晶体,例如在减压下。在某些实施方案中,诱导沉淀或结晶包括二次成核,其中在晶种存在或与环境(结晶器壁、搅拌叶轮、超声仪器等)的相互作用下发生成核。

[0069] 在某些实施方案中,洗涤晶体包括用选自反溶剂、乙腈、乙醇、庚烷、己烷、甲醇、四氢呋喃、甲苯、水或其组合的液体洗涤。如本文所用,“反溶剂”是指其中盐晶体不溶、微溶或部分可溶的溶剂。实际上,向溶解有盐晶体的溶液中加入反溶剂会降低盐晶体在溶液中的溶解度,从而促进盐的沉淀。在某些实施方案中,用反溶剂和有机溶剂的组合洗涤晶体。在某些实施方案中,反溶剂是水,而在其他实施方案中它是烷烃溶剂,例如己烷或戊烷,或芳烃溶剂,例如苯、甲苯或二甲苯。在某些实施方案中,反溶剂是甲醇。

[0070] 在某些实施方案中,洗涤晶体包括用上述的溶剂或一种或多种溶剂的混合物洗涤式(I)的结晶化合物。在某些实施方案中,在洗涤之前冷却溶剂或溶剂混合物。

[0071] 式(I)化合物的晶体形式的用途

[0072] 在各种实施方案中,本发明提供抑制BMP信号通路的化合物,以及在得益于BMP信号传导的抑制的受试者中治疗或预防疾病或病况的方法。在各种实施方案中,本发明的化合物包含如本文所公开的式(I)的化合物及其盐(包含药学上可接受的盐)。

[0073] 本文引用的全部参考文献都如同充分阐明整体并入本文作为参考。除非另外定义,否则本文中使用的技术术语和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。可以在下列中找到分子生物学中常用术语的定义: Benjamin Lewin, *Genes V*, 牛津大学出版社出版, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew等人(著), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, 由Blackwell Science Ltd.出版, 1994 (ISBN 0-632-02182-9); 和Robert A. Meyers(著), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, 由VCH Publishers, Inc.出版, 1995 (ISBN 1-56081-569-8)。下列向本领域技术人员提供了本申请中使用的许多术语的一般性指导:

Allen等人, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* 第22版, Pharmaceutical Press (2012年9月15日); Hornyak等人, *Introduction to Nanoscience and Nanotechnology*, CRC Press (2008); Singleton和Sainsbury, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology* 第3版, 修订, J. Wiley & Sons (New York, NY 2006); Smith, *March's Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure* 第7版, J. Wiley & Sons (New York, NY 2013); Singleton, *Dictionary of DNA and Genome Technology* 第3版, Wiley-Blackwell (2012年11月28日); 和Green和Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 第4版, Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2012)。关于如何制备抗体的参考,参见Greenfield, *Antibodies A Laboratory Manual* 第2版, Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor NY, 2013); Köhler和Milstein, *Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion*, Eur. J. Immunol. 1976年7月, 6(7):511-9; Queen和Selick, *Humanized immunoglobulins*, 美国专利No. 5,585,089 (1996年12月); 和Riechmann等人, *Reshaping human antibodies for therapy*, Nature 1988年3月24日, 332(6162):323-7。

[0074] 本领域技术人员将认识到许多与本文所描述相似或等同的方法或材料,可以用于实施本发明。根据下列详细说明,结合图示说明(举例来说)本发明的实施方案的各种特征的附图,本发明的其他特征和优势将变得显而易见。事实上,本发明决不限于所描述的方法和材料。为了方便起见,此处收集了本文中说明书、实施例和所附权利要求中采用的某些术语。

[0075] 除非另有说明或者从上下文中隐含,否则下列术语和短语包含下文提供的含义。除非另有明确说明或者从上下文显而易见,否则下文术语和短语不排除术语或短语在其所属领域中已经获得的含义。除非另外定义,否则本文中使用的全部技术术语和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。应当理解的是,本发明不限于本文所描述的特定方法、方案和试剂等,并且因此可以变化。本文中使用的定义和术语被提供以帮助描述特定实施方案,而不旨在限制所要求保护的发明,因为本发明的范围仅由权利要求书限制。

[0076] 除非另有说明,否则在描述本申请的一个或更多个实施方案的上下文中(尤其是在权利要求书的上下文中)使用的术语“(a)”和“(an)”以及“所述(the)”和相似的提及可以被解释为涵盖单数和复数两者。本文中数值范围的列举仅旨在用作分别对落入范围内的每个单独的数值进行提及的简化方法。除非本文另外指出,否则每个单独的数值都被并入说明书中,如同其在本文中被单独列举。除非本文另外指出或者以其他方式与上下文明显矛盾,否则本文所描述的全部方法可以以任何适合的顺序进行。针对本文中某些实施方案提供的任何实例或示例性语言和全部实例或示例性语言(例如,“如”)的使用仅旨在更好地说明本申请,并且不对以其他方式要求保护的本申请的范围构成限制。缩写“例如(e.g.)”来源于拉丁文例如(exempli gratia),并且在本文中用于表示非限制性实例。因此,缩写“例如(e.g.)”与术语“例如(for example)”同义。说明书中的任何语言都不应当被解释为表示对于实施本申请必要的任何未要求保护的要素。

[0077] 如本文所使用的,术语“软组织”用于指连接、支撑或围绕身体的其他结构和器官的组织。术语“软组织”可以指肌肉、韧带、腱、筋膜、皮肤、纤维组织、脂肪、滑膜、神经和/或血管。

[0078] 如本文所使用的,术语“异常骨形成”指在通常不存在骨的区域(如软组织)中骨的生成。

[0079] 术语“患者”、“受试者”和“个体”在本文中被可互换地使用,并且指向其提供治疗(包含预防疾病治疗)的动物(特别是人)。如本文所使用的,术语“受试者”指人和非人动物。术语“非人动物”和“非人哺乳动物”在本文中被可互换地使用,并且包含全部脊椎动物(例如,哺乳动物(如非人灵长类动物(特别是高等灵长类动物)、绵羊、狗、啮齿动物(例如,小鼠或大鼠)、豚鼠、山羊、猪、猫、兔、牛)和非哺乳动物(如鸡、两栖动物、爬行动物)等)。在一些实施方案中,受试者是人。在另一个实施方案中,受试者是实验动物或作为疾病模型的动物替代物。在另一个实施方案中,受试者是包含伴生动物(例如,狗、猫、大鼠、豚鼠、仓鼠等)的家养动物。

[0080] 如本文所使用的,术语“处于患有异常骨形成的风险”指已经暴露于已知引起受试者群体中异常骨形成的病况的受试者。虽然并非每个暴露于这样的病况的受试者都将发展到患有异常骨形成,但可以将暴露于这些病况的全部受试者视为“处于风险”。这样的病况通常包含创伤(例如,肌肉骨骼创伤、中枢神经系统损伤或脊髓损伤)。

[0081] 如在本文使用的,“预防”病症或病况的治疗剂指化合物,在统计样品中,相对于未经治疗的对照样品,化合物降低经治疗的样品中的病症或病况的发生,或相对于未经治疗的对照样品,化合物延迟病症或病况的一种或多种症状的发作或降低病症或病况的一种或多种症状的严重性。

[0082] 术语“治疗”包含预防性治疗和/或治疗性的治疗。术语“预防性或治疗性的”治疗是本领域公认的,并且包含向宿主施用主题组合物中的一种或多种。如果在有害的病况(例如,宿主动物的疾病或其他有害的状态)的临床表现之前施用,则治疗是预防疾病的(即,其保护宿主免于发展有害的病况),而如果其在有害的病况的表现之后被施用,则治疗是治疗性的(即,其旨在减低、减轻或稳定现有的有害病况或其副作用)。

[0083] 术语“减少(decrease)”、“降低的(reduced)”、“降低(reduction)”或“抑制(inhibit)”在本文中使用,都意指性质、水平或其他参数的统计学上显著的量的减少或减小。在一些实施方案中,“降低(reduce)”、“降低(reduction)”或“减少(decrease)”或“抑制(inhibit)”通常意为与参照水平(例如,不存在给定治疗)相比至少10%的减少,并且可以包含(例如)至少约10%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%或更多的减少。如本文所使用的,与参照水平相比,“降低(reduction)”或“抑制(inhibition)”不包含完全抑制(inhibition)或降低(reduction)。“完全抑制(inhibition)”是与参照水平相比100%的抑制(inhibition)。减少可以优选降低至对于不患有特定病症的个体的正常范围内所接受的水平。

[0084] 术语“增加的(increased)”、“增加(increase)”、“增强”或“激活”在本文中使用,都通常意指性质、水平或其他参数的统计学上显著的量的增加;为了避免任何疑问,术语

“增加的”、“增加”、“增强”或“激活”意为与参照水平相比至少10%的增加(例如,与参照水平相比,至少约20%或至少约30%或至少约40%或至少约50%或至少约60%或至少约70%或至少约80%或至少约90%的增加或直至并包含100%的增加或10-100%之间的任何增加)或者与参照水平相比,至少约2倍或至少约3倍或至少约4倍或至少约5倍或至少约10倍的增加、至少约20倍的增加、至少约50倍的增加、至少约100倍的增加、至少约1000倍的增加或更多。

[0085] 术语“药学上可接受的”可以指可以向受试者(例如,哺乳动物或人)施用而没有过度毒性的化合物和组合物。

[0086] 如本文所使用的,术语“药学上可接受的载体”可以包含当与活性成分组合时允许成分保留生物学活性并且与受试者的免疫系统无反应性的任何材料或物质。实例包括但不限于标准药物载体(如磷酸盐缓冲盐溶液、水、乳剂(如油/水乳剂)和各种类型的润湿剂)中的任何一种。术语“药学上可接受的载体”排除组织培养基。

[0087] 短语“ALK2的活性”意为ALK-2酶活性(例如,如激酶活性;ALK-2使BMP应答SMAD蛋白磷酸化的能力)和/或ALK-2介导的信号传导(例如,如ALK-2通过结合BMP配体在ALK-2的激活后介导下游信号转导和转录活性的能力)。在一些实施方案中,“ALK2的活性”意为ALK2介导的BMP信号传导。在一些实施方案中,“ALK2的活性”意为ALK2介导的BMP应答基因转录(例如,由BMP/ALK2信号转导介导的转录活性)。

[0088] 短语“ALK5的活性”意为ALK-5酶活性(例如,如激酶活性;ALK-5使TGF- β 应答SMAD蛋白磷酸化的能力;ALK-5使SMAD2或SMAD3磷酸化的能力)和/或ALK-5介导的信号传导(例如,如ALK-5通过结合TGF- β 配体在ALK-5的激活后介导下游信号转导和转录活性的能力)。在一些实施方案中,“ALK5的活性”意为ALK5介导的TGF- β 信号传导。在一些实施方案中,“ALK5的活性”意为ALK5介导的TGF- β 应答基因转录(例如,由TGF β /ALK5信号转导介导的转录活性)。

[0089] 短语“ALK1的活性”意为ALK-1酶活性(例如,如激酶活性;ALK-1使BMP应答SMAD蛋白磷酸化的能力)和/或ALK-1介导的信号传导(例如,如ALK-1通过结合BMP配体在ALK-1的激活后介导下游信号转导和转录活性的能力)。在一些实施方案中,“ALK1的活性”意为ALK1介导的BMP信号传导。在一些实施方案中,“ALK1的活性”意为ALK1介导的BMP应答基因转录(例如,由BMP/ALK1信号转导介导的转录活性)。

[0090] 短语“ALK4的活性”意为ALK-4酶活性(例如,如激酶活性;ALK-4使激活素应答SMAD蛋白磷酸化的能力;ALK-4使SMAD 2或SMAD 3磷酸化的能力)和/或ALK-4介导的信号传导(例如,如ALK-4通过结合激活素配体在ALK-4的激活后介导下游信号转导和转录活性的能力)。在一些实施方案中,“ALK4的活性”意为ALK4介导的激活素信号传导。在一些实施方案中,“ALK4的活性”意为ALK4介导的激活素应答基因转录(例如,由激活素/ALK4信号转导介导的转录活性)。

[0091] 短语“ALK6的活性”意为ALK-6酶活性(例如,如激酶活性;ALK-6使BMP应答SMAD蛋白磷酸化的能力)和/或ALK-6介导的信号传导(例如,如ALK-6通过结合BMP配体在ALK-6的激活后介导下游信号转导和转录活性的能力)。在一些实施方案中,“ALK6的活性”意为ALK6介导的BMP信号传导。在一些实施方案中,“ALK6的活性”意为ALK6介导的GDF5信号传导。在一些实施方案中,“ALK6的活性”意为ALK6介导的BMP应答基因转录(例如,由BMP/ALK6信号

转导介导的转录活性)。

[0092] 人ALK2是509个氨基酸的蛋白质。蛋白质序列公布为例如GenBank登录号NP_001104537.1(具有NM_001111067.2的对应的核苷酸序列),UniProt条目Q04771。

[0093] 人ALK5具有至少两种同种型:503个氨基酸的蛋白质(同种型1)和426个氨基酸的蛋白质。人ALK5同种型1的蛋白质序列公布为例如GenBank登录号NP_004603.1(具有NM_004612.2的对应的核苷酸序列)。426个氨基酸的同种型的蛋白质序列公布为例如GenBank登录号NP_001124388.1(具有NM_001130916.1的对应的核苷酸序列)。关于两种同种型的信息还公布为UniProt条目P36897。

[0094] 人ALK1是503个氨基酸的蛋白质。蛋白质序列公布为例如GenBank登录号NP_001070869.1(具有NM_001077401.1的对应的核苷酸序列;转录本变体2)和NP_000011.2(具有NM_000020.2的对应的核苷酸序列;转录本变体1),UniProt条目P37023。

[0095] 人ALK3是532个氨基酸的蛋白质。蛋白质序列公布为例如GenBank登录号NP_004320(具有NM_004329.2的对应的核苷酸序列),UniProt条目P36894。

[0096] 人ALK4具有至少三种同种型。同种型a是505个氨基酸的蛋白质。蛋白质序列公布为例如GenBank登录号NP_004293(具有NM_004302的对应的核苷酸序列),UniProt条目P36896。

[0097] 人ALK6的同种型a是532个氨基酸的蛋白质,而同种型b是502个氨基酸的蛋白质。人ALK6同种型a的蛋白质序列公布为例如GenBank登录号NP_001243722(具有NM_001256793.1的对应的核苷酸序列)。人ALK6同种型b的蛋白质序列公布为例如GenBank登录号NP_001194(具有NM_01203.2的对应的核苷酸序列)。

[0098] 注意,上述蛋白质中的每种在体内被进一步加工(如通过信号序列的裂解)以产生成熟形式。

[0099] 如本文所使用的,术语“包括”意为除了所呈现的经定义的要素之外还可以存在其他要素。“包括”的使用表示包含而非限制。

[0100] 如本文所使用的,术语“基本上由……组成”指给定实施方案所需的那些要素。该术语容许实质上不影响本发明的该方面的一个或多个基本特性和新颖特性或功能特性的附加要素存在。

[0101] 术语“由……组成”指如本文所描述的组合物、方法、及其各自的组成部分,其不包括在实施方案的描述中未列举的任何要素。

[0102] “可选的”或“可选地”意为随后描述的情况可能发生或可能不发生,使得描述包含情况发生的情形和情况不发生的情形。

[0103] 表达的改变:表达的改变指相对于对照(如健康的受试者)在生物样品(如来自患有斯耶格伦综合征的患者的样品,例如,在唾液腺活组织检查中)中可检测到的基因转录本(例如,mRNA)或基因产物(例如,蛋白质)水平的变化。表达的“改变”包含表达的增加(上调)或表达的减少(下调)。

[0104] 骨形态发生蛋白6(BMP6):生长因子的TGF- β 超家族的成员。已在几种不同的哺乳动物组织和细胞类型(包含平滑肌细胞、生长板软骨细胞、细支气管上皮细胞、角膜、表皮、唾液腺和神经系统的细胞)中检测到BMP6的表达(Blessing等人,*J Cell Biol* 135(1):227-239,1996)。在体外,BMP6已示出抑制细胞分裂,促进终末上皮分化,并且诱导软骨内

骨形成、成骨细胞分化和神经元成熟 (Heikinheimo等人, *Cancer Res* 59:5815-5821, 1999)。BMP6也被称为植物相关生长因子 (TGFB相关)、VGR、VGR1和VG-1相关蛋白。来自许多不同物种的BMP6的基因组序列、mRNA序列和蛋白质序列是可公开获得的 (如从国家生物技术信息中心的GenBank数据库中)。

[0105] 对照:“对照”指用于与实验样品进行比较的样品或标准物 (如从患有斯耶格伦综合征的患者获得的唾液腺样品)。在一些实施方案中,对照是从健康的志愿者获得的样品 (本文中也称为“正常”对照)。在一些实施方案中,对照是历史对照或标准值 (即,表示基线或正常值的先前测试的对照样品或样品组)。

[0106] 诊断:通过疾病的病征、症状和/或各种测试结果来鉴别疾病的过程。通过该过程得到的结论也称为“诊断”。通常进行的测试的形式包含体格检查、血液测试、医学成像、遗传分析、尿液分析和活组织检查。

[0107] 诊断上显著的量:在一些实施方案中,“诊断上显著的量”指生物样品中BMP6 (或任何其他基因或蛋白质) 的水平增加或减少,增加或减少足以允许将一个患者群体与另一个患者群体 (如斯耶格伦综合征患者群体与一组健康的个体) 区分开。在一些实施例中,诊断上显著的增加或减少是至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少8倍、至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少30倍或至少40倍。本文提供RT-PCR作为如何可以检测BMP6表达的一个实例。免疫测定 (如ELISA) 是用于检测BMP6的表达的方法的另一个实例。然而,本领域技术人员将认识到,存在其他方法以测量基因表达,并且根据所使用的方法,可以出现检测到的表达水平的变化。因此,如果使用另一种检测方法,则诊断上显著的量可能变化。在其他实施方案中,“诊断上显著的量”指唾液腺的电势的增加或减少,增加或减少足以允许将一个患者群体与另一个患者群体 (如斯耶格伦综合征患者群体与一组健康的对照) 区分开。在一些实施例中,诊断上显著的增加或减少为约10%、约20%、约30%、约40%或约50%。

[0108] 免疫抑制药物:包含具有减少身体的免疫系统应答的能力的任何药剂或化合物。在一些实施方案中,免疫抑制药物是皮质类固醇。在其他实施方案中,免疫抑制药物是小分子 (如环孢霉素) 或单克隆抗体 (如细胞因子阻滞剂)。

[0109] 抑制剂:可以降低基因产物的活性或干扰基因表达的任何化学化合物、核酸分子、小分子、肽或多肽 (如抗体)。在一些实施例中,抑制剂可以直接地或间接地降低或抑制由基因编码的蛋白质的活性。可以例如通过与蛋白质结合并且从而防止蛋白质结合预期靶标 (如受体) 来实现直接抑制。可以例如通过与蛋白质的预期靶标 (如受体或结合配偶体) 结合从而阻断或降低蛋白质的活性来实现间接抑制。在一些实施例中,本公开的抑制剂可以通过降低或抑制基因的表达 (尤其是通过干扰基因表达 (转录、加工、翻译、翻译后修饰) (例如,通过干扰基因的mRNA并且阻断基因产物的翻译或通过基因产物的翻译后修饰或通过引起细胞内定位的变化)) 来抑制基因。在本发明的各种实施方案中,抑制剂是一种或多种式 (I) 的化合物。

[0110] 抑制表达或活性:如本文所使用的,抑制基因 (如BMP6) 的表达或活性的药剂是降低细胞或组织中由基因 (如BMP6) 表达的mRNA或蛋白质的水平或者降低 (包含消除) 基因或经编码的蛋白质 (如BMP6) 的一种或多种活性的药剂。类似地,抑制BMP信号传导的药剂是抑制、阻断或防止BMP信号通路中的信号传导事件 (如下游靶标的磷酸化,例如SMAD1/5/8的磷

酸化)的任何化合物。

[0111] 测量表达水平:对存在于样品中的基因产物的量进行定量。定量可以是数值的或相对的。可以使用本领域已知或本文所描述的任何方法(如通过RT-PCR、抗体结合(例如,ELISA)或免疫组织化学方法)来实现检测基因产物(如BMP6 mRNA或蛋白质)的表达。在一些实施方案中,检测到的变化是与对照相比表达的增加或减少。在一些实施例中,检测到的增加或减少是与对照相比至少两倍、至少三倍或至少四倍的增加或减少。在方法的其他实施方案中,增加或减少是诊断上显著的量,诊断上显著的量指足够大的变化以提供诊断的统计概率。

[0112] 甲基CpG结合蛋白2 (MECP2):DNA甲基化是真核生物基因组的主要修饰,并且在哺乳动物发育中起重要作用。人蛋白MECP2、MBD1、MBD2、MBD3和MBD4包括与甲基-CpG结合域(MBD)中每个中的存在有关的核蛋白家族。除MBD3外,这些蛋白质中的每个都能够与甲基化的DNA特异性结合。MECP2、MBD1和MBD2还可以阻抑甲基化的基因启动子的转录。与其他MBD家族成员相比,MECP2是X连锁的,并且经受X失活。MECP2在干细胞中是非必要的,但对于胚胎发育是必要的。MECP2基因突变是雷特综合征(一种进行性神经发育病症)的大多数病例的病因和女性精神发育迟缓的最常见的病因之一。MECP2也称为RS;RTS;RTT;PPMX;MRX16;MRX79;MRXSL;AUTSX3;MRXS13;和DKFZp686A24160。MECP2的基因组序列、mRNA序列和蛋白质序列是可公开获得的(如从国家生物技术信息中心的GenBank数据库中)。

[0113] 头蛋白(NOG):结合转化生长因子- β (TGF- β)超家族信号传导蛋白成员(如BMP4和BMP6)并且使转化生长因子- β (TGF- β)超家族信号传导蛋白成员(如BMP4和BMP6)失活的分泌蛋白。通过比TGF- β 超家族的成员更有效地扩散通过细胞外基质,该蛋白质可以在创建形态发生梯度(morphogenic gradient)中起主要作用。该蛋白质似乎在发育的早期以及后期中都具有多效性作用。头蛋白的核苷酸序列和氨基酸序列是可公开获得的(如在GenBank数据库中(对于人头蛋白,参见NCBI基因ID 9241))。

[0114] 非甾体类抗炎药(NSAID):抗炎药剂的一种类型,通过抑制前列腺素的产生起作用。NSAIDs发挥抗炎作用、止痛作用和退热作用。NSAID的实例包含布洛芬、酮洛芬、吡罗昔康、萘普生、舒林酸、阿司匹林、碱式水杨酸胆碱、二氟尼柳、非诺洛芬、吲哚美辛、甲氯芬那酸、双水杨酯、托美丁和水杨酸镁。

[0115] 恢复唾液流量(或增加唾液流量):在具有减低的唾液流量(如可能由斯耶格伦综合征和/或BMP6表达的增加造成)的受试者中增加唾液产生的过程。可以通过例如唾液流速的增加和/或唾液流量体积的增加来表示唾液流量的增加。在一些实施方案中,可以通过施用治疗剂来实现恢复唾液流量。在一些实施例中,治疗剂是药物(如匹鲁卡品(SalagenTM)或西维美林(EvoxacTM)。在其他实施例中,治疗剂是BMP6表达或活性的抑制剂。

[0116] 恢复泪液产生:在具有减低的流泪(如可能由斯耶格伦综合征造成)的受试者中增加泪液产生的过程。在一些实施方案中,可以通过施用治疗剂来实现恢复泪液产生。在特定实施例中,治疗剂是BMP6表达或活性的抑制剂。

[0117] 唾液腺:产生唾液的外分泌腺。如本文所使用的,“唾液腺”包含人受试者中的任何唾液腺(包含例如腮腺、小唾液腺、下颌下腺、舌下腺和冯埃布纳腺)。存在遍布口腔的超过600个小唾液腺。

[0118] 斯耶格伦综合征(SS):一种自身免疫性病症,特征在于攻击并且破坏产生泪液和

唾液的腺体的免疫细胞。斯耶格伦综合征不会危及生命或缩短生命,但可以显著降低生活质量。该病症的标志性症状是口干和眼干。斯耶格伦综合征也可以引起皮肤干燥、鼻干燥和阴道干燥,并且可以影响身体的其他器官(包含肾、血管、肺、肝、胰和脑)。斯耶格伦综合征在美国影响1-4百万人,其中妇女发展该疾病的可能性高出9倍。在诊断时,斯耶格伦的患病者中的大多数为至少40岁。

[0119] 许多不同的标准可以用于鉴别患有斯耶格伦综合征的受试者,并且包含下列中的一种或更多种:(i)眼部症状(例如,持续眼干和/或眼中沙或砂砾的复发性感觉);(ii)口腔症状(例如,每天口干的感觉、持续肿胀的唾液腺和/或饮用液体以吞咽干燥食物);(iii)眼部受累的客观证据,客观证据被定义为在无麻醉的情况下进行的席默测试(Schirmer's test)的阳性结果(5分钟内 $\leq 5\text{mm}$)和/或孟加拉玫瑰红评分(Rose bengal score)或其他眼表染色评分(根据范比斯特福德评分系统(van Bijsterveld's scoring system) ≥ 4);(iv)小唾液腺的组织病理学(测量病灶评分或塔普利评分(Tarpley score));(v)以下列唾液腺受累的客观证据证明的唾液腺受累:依据非刺激性全唾液流量的阳性结果(15分钟内 $\leq 1.5\text{ml}$),示出弥漫性涎管扩张(点状、腔状或破坏状)的存在,而在主要管中没有阻塞的迹象的腮腺造影,和/或示出示踪剂的延迟的摄取、降低的浓度和/或延迟的排泄的唾液闪烁显像;或(vi)自身抗体(在血清中存在Ro(SSA)抗原或La(SSB)抗原或两者的抗体)。因此,在一些实施方案中,展现出上述病征或症状中的一种或更多种的受试者被选择用于根据本文公开的方法的治疗。

[0120] 在不存在另一种结缔组织病的情况下,干燥(sicca)(干燥(dryness))症状(干燥病症学(sicca symptomology))的存在被命名为“原发性斯耶格伦综合征”。原发斯耶格伦综合征的特征还可以在于:受试者具有上文列出的六个标准中任何四个的阳性结果(只要组织病理学(第iv项)或血清学(第vi项)呈阳性)或者上文列出的四个客观标准(即,第iii项、第iv项、第v项、第vi项)中任何三个的存在。在存在上文列出的第i项或第ii项、外加第iii项、第iv项和第v项中任何两个标准的情况下,患有自身免疫过程(如类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、进行性系统性硬化症、硬皮病或多发性肌炎)的患者被称为患有“继发性斯耶格伦综合征”。

[0121] 治疗有效的量:足以在正在用药剂治疗的受试者中或细胞中实现期望的作用的指定药物或治疗剂的量。药剂的有效量将取决于几个因素(包括但不限于正在被治疗的受试者或细胞、以及治疗组合物的施用方式)。

[0122] X失活特异性转录本(非蛋白质编码)(XIST):X失活是雌性哺乳动物中的一种早期发育过程,该早期发育过程通过转录使一对X染色体中的一个沉默,从而使雄性与雌性之间的剂量相等。该过程由几种因素(包含被称作X失活中心(XIC)的X染色体的区)调控。XIST基因仅由失活的X染色体的XIC表达。转录本被剪接但不编码蛋白质。转录本保留在核中,在核中其包覆失活X染色体。XIST也称为XCE、XIC和SXII。XIST的基因组序列和RNA序列是可公开获得的(如从国家生物技术信息中心的GenBank数据库中)。

[0123] 缩写

[0124] AAV 腺相关病毒

[0125] ATP 三磷酸腺苷

[0126] BMP6 骨形态发生蛋白6

[0127]	BSA	牛血清白蛋白
[0128]	BW	体重
[0129]	CGH	比较基因组杂交法
[0130]	ELISA	酶联免疫吸附测定
[0131]	EP	电势
[0132]	FS	病灶评分
[0133]	HIF-1 alpha	缺氧诱导因子1- α
[0134]	HO	异位骨化
[0135]	HTS	低渗溶液
[0136]	HV	健康志愿者
[0137]	IFN	干扰素
[0138]	IL	白细胞介素
[0139]	IM	肌内
[0140]	IPA	Ingenuity Pathway Analysis
[0141]	MECP2	甲基CpG结合蛋白2
[0142]	MyD88	髓样分化初级应答基因88
[0143]	NOD	非肥胖糖尿病
[0144]	OD	光密度
[0145]	O/N	过夜
[0146]	PDGF	血小板衍生生长因子
[0147]	pSS	原发性斯耶格伦综合征
[0148]	qPCR	定量聚合酶链式反应
[0149]	RIN	RNA完整性计数
[0150]	RT	室温
[0151]	RT-PCR	逆转录酶聚合酶链式反应
[0152]	Runx2	runt相关转录因子2
[0153]	RVD	调节性体积减少
[0154]	SFR	唾液流速
[0155]	SG	唾液腺
[0156]	SMG	下颌下腺
[0157]	SS	斯耶格伦综合征
[0158]	TEER	跨上皮电阻
[0159]	TGF	转化生长因子
[0160]	TRIF	β 干扰素TIR结构域衔接蛋白
[0161]	WT	野生型
[0162]	XIST	X失活特异性转录本(非蛋白质编码)

[0163] 此外,除非上下文另有要求,单数术语应包括复数,而复数术语应包括单数。

[0164] 应当理解,本发明不限于本文所述的特定方法、方案和试剂等,并且因此可以与其不同。本文使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,并不旨在限制本发明的范围,本发

明的范围仅由权利要求限定。

[0165] 本文提供的方法和组合物部分基于以下发现:本文描述的一种或多种结晶化合物或组合物通过抑制通过BMP I型受体ALK2的信号传导而起到BMP抑制剂的作用。此外,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物在本文中显示可有效治疗和/或预防软组织中的异常骨形成。因此,本文提供用于治疗软组织中异常骨形成的方法和组合物,包括用本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物进行治疗。

[0166] 在各种实施方案中,本发明提供用于治疗受试者的软组织中的异常骨形成的方法,方法包括:施用治疗有效量的一种或多种本文所述的结晶化合物或组合物。在一些实施方案中,受试者在治疗之前被确定患有异常骨形成或者处于患有异常骨形成的风险。在一些实施方案中,受试者已经经受肌肉骨骼创伤、脊髓损伤或中枢神经系统损伤。在一些实施方案中,异常骨形成与异位骨化病相关。在一些实施方案中,异位骨化病选自自由下列组成的组:获得性异位骨化、进行性骨化性纤维发育不良、强直性椎关节僵硬、创伤性异位骨化、烧伤相关性异位骨化或冲击损伤相关性异位骨化和关节置换术相关性异位骨化。在一些实施方案中,软组织包括肌肉、腱、韧带和/或筋膜。在一些实施方案中,向受试者施用至少一种附加的药剂。在一些实施方案中,至少一种附加的药剂包括皮质类固醇、非甾体类抗炎药(NSAID)、脂氧合酶抑制剂、白三烯抑制剂、肥大细胞稳定剂、抗组胺药物、TNF抑制剂、IL-23阻滞剂或IL-1信号传导抑制剂。在一些实施方案中,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物的治疗有效量包括在5mg/kg至250mg/kg范围内的剂量。在一些实施方案中,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物的治疗有效量不引起大于20%的总身体质量的重量损失。

[0167] 在各种实施方案中,本发明提供用于治疗受试者的软组织中的异常骨形成的方法,方法包括:向受试者施用治疗有效量的BMP I型丝氨酸-苏氨酸激酶受体的抑制剂,其中BMP I型丝氨酸-苏氨酸激酶受体的抑制剂是本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物。在一些实施方案中,BMP I型丝氨酸-苏氨酸受体是ALK2、ALK3或ALK6。在一些实施方案中,BMP I型丝氨酸-苏氨酸受体是ALK2或ALK3。

[0168] 在各种实施方案中,本发明提供用于治疗受试者的软组织中的异常骨形成的方法,方法包括:向受试者施用治疗有效量的BMP II型丝氨酸-苏氨酸激酶受体的抑制剂,其中BMP II型丝氨酸-苏氨酸激酶受体的抑制剂是本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物。在一些实施方案中,BMP II型丝氨酸-苏氨酸受体是ACVR2A、ACVR2B、BMP2或TGF β 2。

[0169] 在各种实施方案中,本发明提供用于在受试者中抑制丝氨酸-苏氨酸激酶受体的方法,方法包括:在有效抑制丝氨酸-苏氨酸激酶受体的条件下,向受试者施用丝氨酸-苏氨酸激酶受体的抑制剂,其中丝氨酸-苏氨酸激酶受体的抑制剂是本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物。在一些实施方案中,丝氨酸-苏氨酸激酶受体是BMP I型受体、BMP II型受体或TGF- β I型受体。在一些实施方案中,丝氨酸-苏氨酸激酶受体是BMP I型受体。在一些实施方案中,BMP I型受体是ALK2、ALK3或ALK6。在一些实施方案中,BMP I型受体是ALK2或ALK3。在一些实施方案中,丝氨酸-苏氨酸激酶受体是BMP II型受体。在一些实施方案中,BMP II型受体是ACVR2A、ACVR2B、BMP2或TGF β 2。在一些实施方案中,丝氨酸-苏氨酸激酶受体是TGF- β I型受体。在一些实施方案中,TGF- β I型受体是ALK5。

[0170] 在各种实施方案中,本发明提供用于鉴别一种或多种用于抑制丝氨酸-苏氨酸激

酶受体的化合物的方法,方法包括:a)提供包括丝氨酸-苏氨酸激酶受体的样品;b)使样品与本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物接触;以及c)进行测定以鉴别抑制丝氨酸-苏氨酸激酶受体的一种或多种化合物,其中测定是体外测定、体内测定或离体测定。在一些实施方案中,丝氨酸-苏氨酸激酶受体是BMP I型受体、BMP II型受体或TGF- β I型受体。在一些实施方案中,测定是体外测定。

[0171] 在各种实施方案中,本发明提供治疗患有斯耶格伦综合症的受试者的方法,方法包括:a)选择相对于对照在受试者的唾液腺中具有增加的BMP6表达的受试者;以及b)向受试者施用治疗有效量的抑制BMP6的表达或活性的药剂,从而治疗患有斯耶格伦综合症的受试者,其中抑制BMP6的表达或活性的药剂是本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物。在一些实施方案中,唾液腺是小唇唾液腺(minor labial salivary gland)、腮腺或下颌下腺。

[0172] 在各种实施方案中,本发明提供用于治疗患有弥漫性内生型脑桥胶质瘤(DIPG)的受试者的方法,方法包括选择患有弥漫性内生型脑桥胶质瘤(DIPG)的受试者,以及向受试者施用治疗有效量的本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物,从而治疗患有弥漫性内生型脑桥胶质瘤(DIPG)的受试者。

[0173] 在各种实施方案中,本发明提供用于治疗受试者的软组织中的异常骨形成的方法,方法包括:向受试者施用治疗有效量的TGF- β I型受体丝氨酸-苏氨酸激酶受体的抑制剂,其中TGF- β I型丝氨酸-苏氨酸激酶受体的抑制剂是本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物。在一些实施方案中,TGF- β I型受体是ALK5。

[0174] 在各种实施方案中,本发明提供用于在受试者中抑制丝氨酸-苏氨酸激酶受体的方法,方法包括:在有效抑制丝氨酸-苏氨酸激酶受体的条件下,向受试者施用丝氨酸-苏氨酸激酶受体的抑制剂,其中丝氨酸-苏氨酸激酶受体的抑制剂是本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物。在一些实施方案中,丝氨酸-苏氨酸激酶受体是BMP I型受体、BMP II型受体或TGF- β I型受体。在一些实施方案中,丝氨酸-苏氨酸激酶受体是BMP I型受体。在一些实施方案中,BMP I型受体是ALK2、ALK3或ALK6。在一些实施方案中,BMP I型受体是ALK2或ALK3。在一些实施方案中,丝氨酸-苏氨酸激酶受体是BMP II型受体。在一些实施方案中,BMP II型受体是ACVR2A、ACVR2B、BMP2或TGF β 2。在一些实施方案中,丝氨酸-苏氨酸激酶受体是TGF- β I型受体。在一些实施方案中,TGF- β I型受体是ALK5。

[0175] 在各种实施方案中,本发明提供增加受试者中的唾液流量的方法,方法包括:a)选择相对于对照在受试者的唾液腺中具有增加的BMP6表达的受试者;以及b)向受试者施用治疗有效量的抑制BMP6的表达或活性的药剂,从而增加受试者中的唾液流量,其中抑制BMP6的表达或活性的药剂是本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物或下颌下腺。

[0176] 在各种实施方案中,本发明提供增加受试者中的唾液流量的方法,方法包括:a)选择相对于对照在受试者的唾液腺中具有增加的BMP6表达的受试者;以及b)向受试者施用治疗有效量的抑制BMP信号传导的药剂,从而增加受试者中的唾液流量,其中抑制BMP信号传导的药剂是本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物。在一些实施方案中,唾液腺是小唇唾液腺、腮腺或下颌下腺。

[0177] 异位骨化病

[0178] 术语“异位骨化”指其中通常不存在骨的软组织中的异常骨形成。获得性异位骨化

基本上可以与下列中的任何一起发生:肌肉骨骼创伤、脊髓损伤、中枢神经系统损伤、头部损伤、脑血管意外、镰状细胞性贫血、血友病、破伤风、脊髓灰质炎、多发性硬化、毒性表皮坏死松解和烧伤。肌肉骨骼创伤的实例包括但不限于髌、膝、肩或肘关节成形术;骨折;关节脱位;或软组织创伤(包括股四头肌和肱肌)。获得性异位骨化也可以与发烧、肿胀和红斑(例如,皮肤的局部片状变红)相关。在一个实施方案中,神经源性异位骨化与局部创伤不相关。

[0179] 遗传疾病进行性骨化性纤维发育不良(FOP)和进行性骨发育异常(progressive osseous heteroplasia)(POH)是异位骨形成的最严重的表现。FOP很少发生,并且是编码骨形态发生蛋白I型受体的ACVR1中的突变的结果。患有POH的患者具有GNAS基因的失活性突变,当突变遗传自母亲时,突变也可以引起奥尔布赖特氏遗传性骨营养不良(Albright's hereditary osteodystrophy)(AHO)。

[0180] 局限性骨化性肌炎的特征在于成纤维细胞、新骨和/或软骨的肌内增殖。

[0181] 通常在损伤后3周与12周之间出现HO。可以通过计算机断层摄影、骨闪烁显像和超声检查可靠地诊断异位骨化。在两周至六周之后,异常骨形成已经进展到通过放射摄影可检测到的程度。通常在六个月内出现骨成熟。

[0182] 异位骨化的常规治疗:常规治疗通常涉及非甾体类抗炎药(吲哚美辛、罗非昔布(rofecoxib))或二膦酸盐(依替膦酸盐(etidronate)、帕米膦酸盐(pamidronate))、华法林钠(Coumadin)/华法林(warfarin)、水杨酸盐,和/或也可以施用局部辐射。手术往往是治疗的唯一选择。

[0183] 可以通过用于HO的标准放射学分级系统来测量治疗结果,治疗结果包含与下列有关的测量:通过测角术测量的受影响的关节中活动范围的变化、与HO有关的临床症状或临床病征的客观改善的平均时长、标准化功能测量或关节特异性测量的变化。

[0184] 应用

[0185] BMP信号通路和TGF- β 信号通路对于正常器官发生和模式形成、以及成熟组织的正常重构和病理性重构而言必不可少。BMP信号通路中的缺陷与许多先天性疾病过程和后天性疾病过程(包含遗传性出血性毛细血管扩张综合征、原发性肺高血压、幼年性家族性息肉病以及散发性肾细胞癌和前列腺癌)有关。已经表明,在某些与缺陷性信号传导组分相关的疾病状态中,减弱的BMP信号传导可能是原因,而其他发现已经表明,在一些情况下,过度的BMP信号传导可能是致病的(Waite等人 *Nat. Rev. Genet.* 4:763-773, 2005; Yu等人. *J. Biol. Chem.* 280:24443-24450, 2003)。用实验方法调控BMP信号传导的能力将为研究疗法和确定这些病况的根本原因提供手段。本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物是ALK2(一种BMP1型受体)的抑制剂,并且可以用于破坏通过BMP通路的信号传导。

[0186] 贫血(包含铁缺乏症和慢性病贫血)的治疗

[0187] 为了回顾,参见Weiss等人 *N. Engl. J. Med.* 352:1011-1023, 2005。在患有慢性感染、自身免疫性疾病(如系统性红斑狼疮和类风湿性关节炎和卡斯尔曼病(Castleman's disease))、炎性肠病、癌症(包含多发性骨髓瘤)和肾衰竭的患者中,可以看到炎症性贫血(也称为慢性病贫血)。炎症性贫血往往由肽激素铁调素的适应不良表达引起。铁调素引起铁转运蛋白(一种使铁从巨噬细胞的细胞内存储和从肠上皮细胞的转运成为可能的关键蛋白)的降解。许多患有肾衰竭的患者患有红细胞生成素缺乏症和过度铁调素表达的组合物。BMP信号传导诱导铁调素的表达,并且用BMP拮抗剂抑制铁调素表达会增加铁水平。如本文

所描述的化合物可以用于治疗归因于慢性病或炎症以及相关高铁调素状态 (hyperhepcidinemic state) 的贫血。

[0188] 根据各种病因学的炎症性贫血中IL-6的升高、体内慢性IL-6施用的效果和针对缺乏IL-6的啮齿动物中贫血的保护,炎症细胞因子IL-6被认为是炎症状态中升高的铁调素表达的主要原因(Weiss等人 *N. Engl. J. Med.* 352:1011-1023, 2005)。已经表明,用IL-6刺激肝癌细胞系诱导铁调素表达,而用BMP拮抗剂治疗撤销IL-6诱导的铁调素表达(Yu等人 *Nat. Chem. Biol.* 4:33-41, 2008)。此外,BMP拮抗剂可以抑制体内由病原菌的注射诱导的铁调素表达。还已经表明,小鼠和斑马鱼中的系统性铁施用快速地激活肝脏中的BMP应答SMAD和铁调素表达,并且BMP拮抗作用有效地阻断这些应答(Yu等人 *Nat. Chem. Biol.* 4:33-41, 2008)。先前的发现(BMP拮抗剂可以抑制铁调素表达,并且提高体内血清铁水平(数据未示出))支持BMP信号传导在铁调节中的功能重要性。这些数据合起来表明,铁介导的和炎症介导的铁调素的调节和循环铁水平需要BMP信号传导。因此,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物(其通过ALK2破坏BMP信号传导)可以用于在各种情况下改变铁可用性以获取治疗益处。

[0189] 如本文所描述的化合物和/或药物组合物可以用于贫血状态,以(i)增进膳食铁补充或口服铁补充(其比铁的静脉内施用更安全)的功效以增加血清铁浓度;(ii)增进预期的手术中血液中血红蛋白的积累,或者能够在预期的手术中自我供血;以及(iii)增强红细胞生成素及其相关物的功效,从而能够对于贫血施用较低剂量的红细胞生成素,同时最小化红细胞生成素的已知毒性和副作用(即,高血压、心血管事件和肿瘤生长)。

[0190] B. 进行性骨化性纤维发育不良(FOP)的治疗

[0191] 在各种实施方案中,本公开涉及受试者的软组织中的疾病或病症(包括异常骨生长)的治疗和/或预防。异位骨化(HO)涉及不需要的骨生长,其特征在于细胞不适当地分化成骨细胞。这种病况导致骨形成(通常在关节附近),其中骨形成往往限制关节的活动性。HO可以在神经损伤和对关节周围的软组织(如肌肉或结缔组织)的直接损伤(其中,HO随后发展)后发生。

[0192] 存在三种公认的HO的病因:创伤性、神经源性和遗传性。创伤性HO通常在骨折、脱位、手术程序和严重烧伤后发生。最常见的是,在骨折和开放复位内固定术(ORIF)程序或全髌置换术(THA)之后,在髌周围看到HO。同样,HO往往与病理学(如创伤性脑损伤(TBI)、脊髓损伤(SCI)、中枢神经系统(CNS)感染、肿瘤、中风、破伤风、脊髓灰质炎、脊髓痨、多发性硬化和选择性脊神经后根切断术)有关。特发性肌痉挛的存在也与HO的发展相关。

[0193] 骨形态发生蛋白(BMP)在各种组织(包含骨、软骨、血管、心脏、肾、神经元、肝和肺)中表现出宽谱生物学活性。BMP是转化生长因子- β (TGF- β) 家族的成员,其与II型丝氨酸-苏氨酸激酶受体和I型丝氨酸-苏氨酸激酶受体结合,并且通过Smad信号通路和非Smad信号通路转导信号。进行性骨化性纤维发育不良(FOP)(异位骨化病的一种类型)是常染色体显性罕见疾病,其影响每1-2百万人中的一个人。其特征在于胚胎发育过程中拇趾(大脚趾)的畸形和出生后的进行性异位软骨内骨化(HEO),其导致异位骨的第二骨骼的形成。具有FOP经典特征的个体在编码ACRV1(也称为ALK2)(一种BMP 1型受体)的基因中具有相同的杂合激活突变(R206H)。目前不存在针对这种罕见且毁灭性疾病的有效治疗。因此,依然存在对于用于治疗异位骨化和异位骨化疾病和异位骨化病症的组合物和方法的需要。

[0194] FOP由受影响的个体中组成性激活突变体形式的ALK2的存在引起(Shore等人*Nat. Genet.* 38:525-527, 2006)。BMP信号传导的特异性抑制剂(如本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物)可以用于预防响应于创伤、肌肉骨骼应力(musculoskeletal stress)或炎症的过度骨形成。这样的化合物也可以用于帮助病理性骨的消退。可以全身性或局部地施用本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物,以集中或限制对创伤或炎症区域的效果。

[0195] 本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物(ALK2抑制剂)可以用作慢性疗法,以阻抑高度易感个体中的自发性骨形成。本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物可以用作慢性疗法,以阻抑高度易感个体中的自发性骨形成。瞬态疗法(transient therapy)可以用于预防FOP个体中的异常骨形成,在创伤性事件之前、在创伤性事件期间或者甚至在创伤性事件之后通过施用,FOP个体发展最常与创伤相关的骨瘤或病理性骨。可以在患有FOP的个体中在必需的或紧急的内科程序或外科程序(甚至重要的免疫和拔牙)之前、在必需的或紧急的内科程序或外科程序(甚至重要的免疫和拔牙)期间或者在必需的或紧急的内科程序或外科程序(甚至重要的免疫和拔牙)之后立即使用用如本文所描述的BMP抑制剂(例如,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物)的瞬态治疗,以防止病理性钙化。与其他骨抑制剂、免疫调控药或抗炎药(如NSAID、类固醇、环孢霉素、环磷酰胺、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、利妥昔单抗(rituxumab)、依那西普(etanercept)或相似药物)的组合疗法可以增加BMP拮抗剂在抑制这种病症中的异位骨形成中的有效性。

[0196] 本文提供用于软组织中异常骨形成的治疗和/或预防的方法和组合物。在某些实施方案中,方法和组合物治疗和/或预防疾病或病症(包括软组织中的异常骨形成)。可以用本文所描述的方法和组合物治疗的示例性疾病或病症包括但不限于异位骨化病(如进行性骨化性纤维发育不良、强直性椎关节僵硬、创伤性异位骨化、烧伤相关性异位骨化或冲击损伤相关性异位骨化和关节置换术相关性异位骨化)。

[0197] 因此,在一方面,本文提供用于治疗和/或预防受试者的软组织中的异常骨形成的方法,方法包括:施用治疗有效量的包括本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物的药物组合物。

[0198] C. 癌症的治疗

[0199] 过度BMP信号传导(可能由于BMP的过度表达或者反常地由于BMP II型受体表达的损失而出现)可能有助于某些实体肿瘤(包含乳腺癌、前列腺癌、骨癌、肺癌和肾细胞癌)的肿瘤发生、生长或转移(Yu等人.*J. Biol. Chem.* 280:24443-24450, 2008; Waite等人.*Nat. Rev. Genet.* 4:763-773, 2003; Alarmo等人.*Genes, Chromosomes Cancer* 45:411-419, 2006; Kim等人.*Cancer Res.* 60:2840-2844, 2000; Kim等人.*Clin. Cancer Res.* 9:6046-6051, 2003; Kim等人.*Oncogene* 23:7651-7659, 2004)。如果与BMP过度表达或BMP II型受体缺乏相关的增加的BMP活性有助于疾病的发病机制,则以BMP I型受体(配体和II型受体两者的下游)的水平使用如本文所描述的化合物抑制BMP信号传导活性可能是使BMP信号传导活性正常化和可能抑制肿瘤生长或肿瘤转移的有效手段。

[0200] 本文中预期将本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物作为辅助化学疗法或主要化学疗法用于治疗癌症(例如,它们可以用于减缓或阻止这样的肿瘤细胞(以及其他肿瘤组成细胞类型)的生长或转移)以获取临床益处。另外,如本文所描述的BMP抑制剂可以用

于干扰某些类型的癌症(例如,腺癌(如前列腺癌和乳腺癌))的骨转移性质。此外,如本文所描述的本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物可以用于抑制形成骨或者为骨源性的肿瘤(如骨肉瘤)中的成骨细胞活性(作为辅助化学疗法或主要化学疗法)。此外,如本文所描述的本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物可以用于抑制破骨细胞活性(也由BMP通过其靶标基因RANKL的作用来调控),破骨细胞活性在病况(如多发性骨髓瘤和其他骨靶向肿瘤)中病理性地增加。BMP抑制剂在这些病况中的应用可以降低归因于肿瘤受累的溶骨性病变和骨折的存在。在一些实施方案中,癌症是弥漫性内生型脑桥胶质瘤(DIPG)。

[0201] D. 病理性骨形成的治疗

[0202] 如本文所描述的包括本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物的组合物可以用于治疗或减轻炎症病症中的病理性骨形成/骨融合(如关节强硬性脊椎炎或其他“血清阴性”脊椎关节病),其中这样的病症中的自身免疫和炎症似乎会刺激骨形成。化合物的一种应用将是预防关节手术之后的过度骨形成(特别是在患有关节强硬性脊椎炎或类风湿性关节炎患者中)。如本文所描述的包括本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物的组合物也可以用于预防疾病(如系统性红斑狼疮、硬皮病或皮炎)中的钙质沉着(营养不良性软组织钙化)。

[0203] 对肌肉的钝性创伤性损伤可以在某些个体中的肌肉内引起异常骨形成,造成称为创伤性骨化性肌炎的病症(Cushner等人. *Orthop. Rev.* 21:1319-1326, 1992.)。头部创伤和烧伤也可以诱导异位骨形成,显著地损害患者康复和恢复。可选地除了通常针对这样的病况开出的抗炎药(例如,非甾体类抗炎药(如吲哚美辛或布洛芬))之外,用如本文所描述的本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物进行治疗可以有助于预防易患病个体中的病理性骨形成,或者有助于减轻或消退最近受影响的或受久远影响的个体中的病变。很少有其他肌肉已经被描述为在存在包括心肌在内的损伤或创伤的情况下发展骨化,并且在那些情况下用如本文所描述的BMP抑制剂进行相似治疗可能是有帮助的。

[0204] E. 异位骨形成或适应不良性骨形成的治疗

[0205] BMP信号传导及其转录靶标与门克伯格血管钙化疾病(Monckeberg's vascular calcification disease)中和动脉粥样硬化血管疾病中的内膜性和中膜性血管重构和钙化有关(Bostrom等人. *J. Clin. Invest.* 91:1800-1809, 1993; Tyson等人. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23:489-494, 2003)。BMP和BMP诱导的骨分化也与心脏瓣膜钙化有关。天然心脏瓣膜可以钙化(特别是当其已经异常时)。典型实例是二尖瓣主动脉瓣,这些瓣膜通常变成钙化的,导致狭窄。患有钙化性主动脉瓣狭窄的患者往往需要进行瓣膜置换的心脏手术。异常钙化可以不利地影响假体血管移植物或心脏瓣膜的功能。例如,假体心脏瓣膜变成钙化的,导致变窄和经常的渗漏。

[0206] 如本文所描述的本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物可以用于抑制单独的血管钙化疾病或瓣膜钙化疾病,或者血管钙化疾病或瓣膜钙化疾病与动脉粥样硬化疾病、肾病、肾性骨营养不良或甲状旁腺疾病的组合。

[0207] 如本文所描述的包括一种或多种式I化合物的药物组合物可以用于抑制单独的血管钙化疾病或瓣膜钙化疾病,或者血管钙化疾病或瓣膜钙化疾病与动脉粥样硬化疾病、肾病、肾性骨营养不良或甲状旁腺疾病的组合。

[0208] 如本文所描述的本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物可以用于通过全身

性施用或局部施用或直接并入假体材料或其他植入物中(例如,与涂覆或构成植入物或假体的全部或一部分的聚合物的混合物中)来抑制假体血管材料或假体瓣膜材料的钙化。

[0209] 如本文所描述的包括本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物的药物组合物可以用于通过全身性施用或局部施用或直接并入假体材料或其他植入物中(例如,与涂覆或构成植入物或假体的全部或一部分的聚合物的混合物中)来抑制假体血管材料或假体瓣膜材料的钙化。

[0210] 在一些情况下,期望的是延迟骨折后的骨折愈合,或者有意地抑制某些位置中的骨折愈合,以防止由于适应不良性骨形成的功能损伤。例如,如果发生骨折并且由于医学原因或实际原因不能立即进行手术,则可以通过使用如本文所描述的本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物使骨折愈合暂时“暂停”,直至可以进行明确的手术或操作。例如,这可以防止对于随后有意再骨折以确保骨碎片的正确并置的需要。预期的是,如果治疗时期相对短,则在停止本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物的施用,将随即发生正常骨折愈合过程。在其他情况下,任何量的新骨生长都可能损害功能(如当骨折直接影响关节时)。在这些情况下,BMP活性的总体抑制或局部抑制(通过经由从局部植入物或基质扩散来全身性递送或局部递送如本文所描述的BMP拮抗剂)可以用于抑制骨折愈合或者防止关键区域处的骨折骨痂。

[0211] F. 经由BMP拮抗剂的免疫调控

[0212] BMP已经被报道减弱炎症应答或免疫应答(Choi等人. Nat. Immunol. 7:1057-1065, 2006; Kersten等人. BMC Immunol. 6:9, 2005),其可以损害个体抵抗感染(即,病毒性、细菌性、真菌性、寄生虫性或结核病)的能力。本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物(通过ALK2的BMP信号传导的抑制剂)可以用于增进炎症应答或免疫应答,使个体能够更快速地清除感染。本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物可以用于增进炎症应答或免疫应答,使个体能够更快速地清除感染。

[0213] 淋巴细胞和其他免疫细胞在其细胞表面上表达BMP受体,并且越来越多的证据表明BMP调控各种体液免疫区室和细胞免疫区室的发育和成熟,并且调控成熟有机体中的体液免疫应答和细胞免疫应答。BMP信号对免疫细胞的影响可能是环境特异性的(众所周知许多具有免疫重要性的细胞因子的影响),并且因此必须以经验为主地确定它们是否增进或减低特定淋巴细胞群体的发育或功能。使用如本文所描述的化合物的BMP拮抗作用可以是用于有意地使细胞免疫区室、先天免疫区室或体液免疫区室的发育发生偏差以用于疗法的有效方案,或者是用于成熟免疫系统中免疫应答的治疗偏差的方案。这些方案可以靶向细胞免疫、先天免疫或体液免疫的先天性病症,或者靶向其中免疫应答不适当弱化的病症(例如,当通过其他方式进行免疫困难或无效时,作为促进成功抗原敏化的佐剂),或者靶向其中免疫应答过度或不适当的病症(例如,自身免疫和自身敏化)。在一些情况下,如本文所描述的BMP拮抗剂对于免疫耐受的有意诱导(即,在同种异体移植或自身免疫中)也可以是有效的。

[0214] G. 皮肤疾病的治疗

[0215] 经培养的角化细胞的扩增——在体外,BMP抑制角化细胞增殖并且促进分化(在Botchkarev等人. Differentiation 72:512-526, 2004中进行了综述)。在需要皮肤移植的患者(例如,在烧伤之后)中,皮肤移植物由经培养的角化细胞制成。角化细胞可以来源于

其他动物(异种移植物),但这些只是暂时性的,因为其通常被免疫系统排斥。角化细胞可以来源于患者本身,并且可以在实验室中生长成细胞层(经培养的上皮自体移植物)。患者不大可能会排斥来源于他/她自己身体的角化细胞。向角化细胞培养物中添加如本文所描述的BMP拮抗剂可以用于促进角化细胞增殖,使患者能够更快地接受移植物。

[0216] 改善的上皮形成——BMP6在皮肤损伤中被高度表达,并且在不同病因的慢性人伤口中检测到高水平的BMP6(Kaiser等人. J. Invest. Dermatol. 111:1145-1152, 1998)。在皮肤中过度表达BMP6的小鼠中,显著延迟上皮再形成和使皮肤伤口愈合(Kaiser等人. J. Invest. Dermatol. 111:1145-1152, 1998)。改善的上皮形成可以减少瘢痕形成。本文中预期本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物的局部施用或全身性施用,以增进例如在压疮(褥疮)或者不愈合性或愈合不良性皮肤溃疡(例如,在患有外周血管疾病、糖尿病、静脉功能不全的患者中)的治疗中皮肤伤口的上皮形成。化合物也将被预期减少瘢痕形成。

[0217] 毛发生长的促进——头皮上毛囊的生长是周期性的,具有三个阶段:毛发生长初期(生长阶段)、毛发生长中期(退化阶段)和毛发生长终期(休止阶段)。近期证据表明,BMP信号延迟从毛发生长终期向毛发生长初期的转换(Plikus等人. Nature 451:340-344, 2008)。使用如本文所描述的本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物抑制BMP信号传导可以缩短毛发生长终期阶段,并且增加毛发生长初期阶段中的毛囊的数量。本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物可以用于治疗其中毛囊不足或者毛发脱落比其生长更频繁的情况。这些情况包括雄激素性脱发(男性型秃发)、斑秃(alopecia areata)和静止期脱发。

[0218] 牛皮癣的治疗——牛皮癣是炎性皮肤病症,其可以在皮肤创伤以及随后的修复和炎症(凯布内现象(Koebner phenomenon))后发生。BMP可以参与引起牛皮癣的修复和炎症机制,因为小鼠皮肤中BMP6的过度表达导致与患有牛皮癣的患者中观察到的皮肤病变类似的皮肤病变(Blessing等人. J. Cell. Biol. 135:227-239, 1996)。可以局部地或全身性施用本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物,以治疗已确立的牛皮癣或者防止其在皮肤损伤之后的发展。

[0219] 角膜瘢痕形成的治疗——BMP6表达与结膜瘢痕形成相关(Andreev等人. Exp. Eye Res. 83:1162-1170, 2006)。本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物可以用于预防或治疗角膜瘢痕形成和导致的失明。

[0220] H. 系统性高血压的治疗

[0221] BMP4的输注诱导小鼠中的系统性高血压(Miriyala等人. Circulation 113: 2818-2825, 2006)。血管平滑肌细胞表达多种BMP配体。BMP增加电压门控性钾通道的表达,并且从而增加血管平滑肌的收缩(Fantozzi等人. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 291:L993-1004, 2006)。因此,本文中预期本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物抑制BMP信号传导,其可以用于降低血压。患有高血压的患者中血压的持续性降低被预期预防心肌梗死、充血性心力衰竭、脑血管意外和肾衰竭。如本文所描述的治疗可以用于经由局部递送(例如,经由气雾剂)靶向特异性血管床中的高血压(如肺高血压中)。

[0222] 肺高血压的治疗

[0223] BMP信号传导有助于肺高血压的发病机制。例如,具有减少的BMP4水平的小鼠被保护免受由长时期呼吸低氧浓度诱导的肺高血压和肺血管重构(Frank等人. Circ. Res.

97:496-504, 2005)。此外,在患有散发性肺动脉高血压和家族性肺动脉高血压的患者中经常发现编码II型BMP受体(BMPRII)的基因中的突变。可以预期的是,减少的BMP信号传导可能引起肺高血压。然而,Yu和同事(Yu等人. J. Biol. Chem. 280:24443-24450, 2008)报道了BMPRII缺乏症反常地增加通过BMP配体的亚型的BMP信号传导,并且因此增加的BMP信号传导实际上可以有助于肺高血压的发展。

[0224] 一种或多种本文所述的晶体化合物或组合物可以用于预防处于患病风险的患者(例如,具有BMPRII突变的患者)中的肺动脉高血压的发展,或者用于治疗患有特发性肺动脉高血压或获得性肺动脉高压的患者。如本文所描述治疗的个体中减少的肺高血压被预期具有呼吸浅短、右心室肥大和右心室衰竭的减少。

[0225] 包括本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物的药物组合物可以用于预防处于患病风险的患者(例如,具有BMPRII突变的患者)中的肺动脉高血压的发展,或者用于治疗患有特发性肺动脉高血压或获得性肺动脉高压的患者。如本文所描述治疗的个体中减少的肺高血压被预期具有呼吸浅短、右心室肥大和右心室衰竭的减少。

[0226] 心室肥大的治疗

[0227] BMP-10水平在患有高血压的大鼠的肥大心室中增加,并且该BMP配体诱导经培养的新生大鼠心室肌细胞中的肥大(Nakano等人. Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 293:H3396-3403, 2007)。BMP-10信号传导的抑制可以用于预防/治疗心室肥大。心室肥大可以由于舒张功能障碍而导致充血性心力衰竭。包括本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物的药物组合物可以预防/治疗充血性心力衰竭。

[0228] 神经系统病症的治疗

[0229] 脊髓损伤和神经病的治疗——BMP是脊髓损伤之后成体脊髓中轴突再生的有效抑制剂(Matsuura等人. J. Neurochem. 2008)。据报道,在脊髓挫伤后,损伤部位周围的少突神经胶质细胞和星形胶质细胞中的BMP表达升高。头蛋白(一种BMP抑制剂)的鞘内施用导致脊髓挫伤之后增强的运动活动和皮质脊髓束的显著再生长。

[0230] RGMa抑制脊髓损伤之后的轴突生长和轴突恢复以及突触再形成(被针对RGMa的抗体阻断的作用)(Hata等人. J. Cell. Biol. 173:47-58, 2006; Kyoto等人. Brain Res. 1186:74-86, 2007)。RGMa增强BMP信号传导(Babitt等人. J. Biol. Chem. 280:29820-29827, 2005),表明BMP信号传导可能是防止轴突生长和轴突恢复的原因。

[0231] 基于这些考虑,将预期如本文所描述的用本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物治疗增加脊髓损伤之后的轴突生长和轴突恢复。将预期如本文所描述的治疗预防/治疗与宽谱病症(包含糖尿病)相关的神经病。此外,如本文所描述的用本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物的治疗可以用于治疗与神经病相关的疼痛和运动功能障碍。

[0232] 与中枢神经系统炎症相关的神经系统病症的治疗——已经在多发性硬化和克罗伊茨费尔特-雅各布病(Creutzfeldt-Jakob disease)病变中检测到BMP4和BMP5(Deininger等人. Acta Neuropathol. 90:76-79, 1995)。也已经在患有实验性自身免疫性脑脊髓炎的小鼠(一种多发性硬化的动物模型)中检测到BMP(Ara等人. J. Neurosci. Res. 86:125-135, 2008)。如本文所描述的治疗可以用于预防或治疗多发性硬化、以及与中枢神经系统炎症或由BMP信号介导的适应不良损伤修复过程相关的其他神经系统病症。

[0233] 痴呆的治疗——BMP信号传导的抑制剂可以促进小鼠神经前体细胞中的神经发生

(Koike等人. *J. Biol. Chem.* 282: 15843-15850, 2007)。如本文所描述的用本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物治疗可以用于增进与神经元的加速损失相关的多种神经系统病症(包含脑血管意外和阿尔茨海默病、以及其他痴呆)中的神经发生。

[0234] 改变记忆和学习——BMP信号传导在参与记忆和认知行为的神经元的发育和保持中具有重要作用。例如,在新环境中,缺乏BMP拮抗剂脊索蛋白的小鼠具有增强的空间学习,但具有较少的探索性活动(Sun等人. *J. Neurosci.* 27:7740-7750, 2007)。如本文所描述的用本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物的治疗可以用于改变或预防记忆或学习(例如,诱导由于麻醉的记忆缺失)或者在其他可能引起痛苦的情况下用于预防创伤后应激障碍病症。

[0235] 动脉粥样硬化的治疗

[0236] 大量证据表明,BMP配体在血管壁中是促炎的和促动脉粥样硬化的(Chang等人. *Circulation* 116:1258-1266, 2007)。敲低BMP4的表达会减少炎性信号,而敲低BMP拮抗剂(例如,卵泡抑素或头蛋白)会增加炎性信号。如本文所描述的用本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物的治疗可以用于降低与动脉粥样硬化、自身免疫性疾病和其他血管炎相关的血管炎症。通过减少动脉粥样硬化,如本文所描述的治疗将减少急性冠状动脉综合征(心绞痛和心脏病发作)、短暂性缺血发作、中风、外周血管疾病和其他血管缺血事件。此外,就动脉粥样硬化有助于动脉瘤形成的发病机理而言,如本文所描述的化合物可以用于减缓动脉瘤形成的进行,减少动脉瘤结构的频率和对于血管手术的需求。

[0237] 由于BMP和影响基质重构的BMP诱导的基因产物中的许多在早期动脉粥样硬化病变中都是过度表达的,因此BMP信号可以促进斑块形成和斑块进行(Bostrom等人. *J Clin Invest.* 91: 1800-1809. 1993; Dhore等人. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21: 1998-2003. 2001)。因此,动脉粥样硬化斑块中的BMP信号传导活性可以代表一种适应不良损伤-修复的形式,或者可以有损于炎症。随着时间的过去,BMP信号也可以诱导居留血管细胞群体或新生血管细胞群体分化成成骨样细胞,导致血管的内膜性钙化和中膜性钙化(Hruska等人. *Circ Res.* 97: 105-112. 2005)。钙化血管疾病或动脉硬化与减少的血管扩张性、以及增加的心血管事件风险和死亡率相关,并且当与潜在的动脉粥样硬化疾病相关时尤其成问题(Bostrom等人. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 10: 151-158. 2000)。然而,如果可以截获有助于动脉粥样硬化病变和钙化病变两者的进行的信号,则两者都可以消退(Sano等人. *Circulation.* 103: 2955-2960. 2001)。在某些方面,如本文所描述的用本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物的治疗可以用于限制体内动脉粥样硬化斑块和血管钙化的进行。

[0238] 斯耶格伦综合征的治疗

[0239] 斯耶格伦综合征是一种自身免疫性病症,其中免疫细胞攻击并且破坏产生泪液和唾液的腺体。斯耶格伦综合征被认为是风湿性病症,意味着其引起关节、肌肉、皮肤和/或其他器官中的炎症。该病症的标志性症状是口干和眼干。斯耶格伦综合征也可以引起皮肤干燥、鼻干燥和阴道干燥,并且可以影响身体的其他器官(包含肾、血管、肺、肝、胰和脑)。斯耶格伦综合征在美国影响1-4百万人,并且目前是美国第二常见的自身免疫性风湿性疾病。在诊断时,斯耶格伦的患者中的大多数为至少40岁,并且妇女发展该疾病的可能性多出9倍。斯耶格伦综合征可以以原发性风湿性病况或者以与其他风湿性疾病(如系统性红斑狼

疮(“狼疮”)、硬皮病性胆汁性肝硬变或类风湿性关节炎)相关的继发性病症的形式出现。

[0240] 斯耶格伦综合征可以损害身体的重要器官,伴随着可以保持稳定、恶化或变得缓解的症状。一些患者仅经历眼干和口干的轻度症状,而其他患者经历身体健康周期,随后经历严重疾病。虽然许多患者能够根据症状处理问题,但其他患者患有视力模糊、持续性眼部不适、复发性口腔感染、腮腺肿胀、嘶哑、以及吞咽和进食困难。衰弱性疲劳和关节疼痛可以严重损害生活质量。

[0241] 目前不存在用于斯耶格伦综合征的已知治愈方法,也不存在恢复腺体分泌的特异性治疗。治疗通常是根据症状的和支持性的(包含水分替代疗法以减轻眼干和口干的状况)。非甾体类抗炎药可以用于治疗肌肉骨骼症状。对于患有严重并发症的个体,往往开出皮质类固醇或免疫抑制药物。这些药物可以具有严重的副作用。此外,该疾病的诊断目前基于适应症(如他觉干燥和主观干燥、自身抗体和单核浸润)的组合,并且主要是消除其他已知疾病以实现斯耶格伦综合征的诊断的过程。因此,不仅需要准确地诊断患有斯耶格伦综合征的患者,还需要鉴别用于该疾病的治疗的可行治疗靶标。

[0242] 骨形态发生蛋白6(BMP6)是生长因子的TGF- β 超家族的成员。已在几种不同的哺乳动物组织和细胞类型(包含平滑肌细胞、生长板软骨细胞、细支气管上皮细胞、角膜、表皮、唾液腺和神经系统细胞)中检测到BMP6的表达(Blessing等人, *J Cell Biol* 135(1):227-239, 1996)。在体外,BMP6已示出抑制细胞分裂,促进终末上皮分化,并且诱导软骨内骨形成、成骨细胞分化和神经元成熟(Heikinheimo等人, *Cancer Res* 59:5815-5821, 1999)。

[0243] DNA甲基化是真核生物基因组的主要修饰,并且在哺乳动物发育中起重要作用。人蛋白质MECP2、MBD1、MBD2、MBD3和MBD4包括与甲基-CpG结合域(MBD)中每个中的存在有关的核蛋白家族。除MBD3外,这些蛋白质中的每个都能够与甲基化的DNA特异性结合。MECP2、MBD1和MBD2还可以阻抑甲基化的基因启动子的转录。与其他MBD家族成员相比,MECP2是X连锁的,并且经受X失活。

[0244] X失活是雌性哺乳动物的一种早期发育过程,该早期发育过程通过转录使一对X染色体中的一个沉默,从而使雄性与雌性之间的剂量相等。该过程由几种因素(包含被称作X失活中心(XIC)的X染色体的区)调控。XIST基因(X失活特异性转录本(非蛋白质编码))仅由失活X染色体的XIC表达。转录本被剪接但不编码蛋白质。转录本保留在细胞核中,在核中转录本包覆失活X染色体。

[0245] 本文还提供通过选择具有增加的BMP6表达的受试者并且向受试者施用治疗有效量的抑制BMP6的表达或活性的药剂来治疗患有斯耶格伦综合征的受试者的方法,其中药剂是本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物。本文还提供治疗患有斯耶格伦综合征的受试者的方法,方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物,从而治疗受试者。

[0246] 男性斯耶格伦综合征患者表达XIST(一种通常在男性中不表达的非编码RNA)。还描述了男性斯耶格伦综合征患者下调MECP2以及参与DNA甲基化的其他蛋白质的发现。在一些实施方案中,生物样品是唾液腺(如小唾液腺)。

[0247] 在男性斯耶格伦综合征患者的子集中,Y染色体基因表达下调,调控RNA加工和病毒复制的核糖体蛋白以及调控DNA甲基化的蛋白质的表达也下调。这些发现提供了可以用于斯耶格伦综合征的诊断和治疗的附加标志物。

[0248] 还提供通过选择具有增加的XIST表达的男性受试者并且向受试者施用治疗有效量的抑制XIST表达的药剂来治疗患有斯耶格伦综合症的男性受试者的方法。还提供通过选择具有增加的XIST表达的男性受试者并且向受试者施用治疗有效量的本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物来治疗患有斯耶格伦综合症的男性受试者的方法。还提供通过选择具有减少的MECP2表达的男性受试者并且向受试者施用治疗有效量的本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物来治疗患有斯耶格伦综合症的男性受试者的方法。本文还提供治疗患有斯耶格伦综合症的男性受试者的方法,方法包括向男性受试者施用治疗有效量的本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物,从而治疗男性受试者。

[0249] 与健康的对照受试者相比,斯耶格伦综合症患者展现出唾液腺中BMP6表达的统计上显著的增加。唾液腺中BMP6的过度表达增加唾液腺中的电势。本文公开了发现:BMP6信号传导的抑制剂的施用增加唾液腺中的唾液流量,其中抑制剂是本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物。

[0250] 本文提供增加受试者中的唾液流量的方法。在一些实施方案中,方法包括向受试者施用BMP6信号转导的抑制剂,其中抑制剂是本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物。在其他实施方案中,方法包含选择相对于对照在受试者的唾液腺中具有增加的BMP6表达的受试者,并且向受试者施用BMP6信号传导的抑制剂,其中抑制剂是本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物。在一些情况下,受试者患有斯耶格伦综合症。

[0251] 在一些实施方案中,展现出增加的BMP6表达的唾液腺是小唇唾液腺、腮腺或下颌下腺。

[0252] 在一些实施方案中,向唾液腺局部施用BMP6的抑制剂,其中抑制剂是本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物。

[0253] 在一些实施方案中,BMP6信号传导的抑制剂抑制BMP I型受体ALK2和/或BMP I型受体ALK3,其中抑制剂是本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物。

[0254] 在一些实施方案中,生物样品是组织样品(如唾液腺组织(例如,通过唾液腺的活组织检查获得的组织))。在一些实施例中,唾液腺是小唇唾液腺、腮腺或下颌下腺。在其他实施方案中,生物样品是体液样品(如唾液、泪液、血液或血清样品)。

[0255] 在一些实施方案中,所公开的方法还包含向被诊断患有斯耶格伦综合症的受试者提供适当的疗法。在一些实施例中,适当的疗法包括施用促进唾液产生的药剂(例如,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物)、施用皮质类固醇、施用免疫抑制药物、施用非甾体类抗炎药、施用抑制BMP6的表达或活性的药剂、施用抑制BMP信号传导的药剂(例如,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物)或其任何组合。

[0256] 还提供通过选择在唾液腺中具有增加的BMP6表达的受试者并且向受试者施用治疗有效量的抑制BMP6的表达或活性的药剂来增加受试者中的唾液流量的方法。在一些实施例中,药剂是本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物。在一些实施方案中,唾液腺是小唇唾液腺、腮腺或下颌下腺。

[0257] 在一些实施方案中,抑制BMP信号传导的药剂是本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物。

[0258] 在一些实施方案中,向唾液腺局部施用抑制BMP6的表达或活性的药剂或者抑制BMP信号传导的药剂,其中药剂是本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物。在其他实施

方案中,全身性施用抑制BMP6的表达或活性的药剂或者抑制BMP信号传导的药剂,其中药剂是本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物。

[0259] 在一些实施方案中,方法还包含向被诊断患有斯耶格伦综合症的受试者提供适当的疗法。在一些实施例中,适当的疗法包括施用促进唾液产生的药剂(例如,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物)、施用皮质类固醇、施用免疫抑制药物、施用非甾体类抗炎药、施用抑制BMP6的表达或活性的药剂、施用抑制BMP信号传导的药剂(例如,一种或多种式I化合物)或其任何组合。

[0260] 在一些实施方案中,所公开的方法还包含向被诊断患有斯耶格伦综合症的男性受试者提供适当的疗法。在一些实施例中,适当的疗法包括施用促进唾液产生的药剂(例如,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物)、施用皮质类固醇、施用免疫抑制药物、施用非甾体类抗炎药、施用抑制BMP6的表达或活性的药剂、施用抑制BMP信号传导的药剂(例如,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物)、施用抑制XIST表达的药剂、施用编码MECP2的核酸分子或其任何组合。

[0261] 还提供通过选择具有增加的XIST表达和/或减少的MECP2表达的男性受试者,并且(i)向受试者施用治疗有效量的抑制XIST表达的药剂或者(ii)向受试者施用治疗有效量的编码MECP2的核酸分子或者(i)和(ii)两者,来治疗患有斯耶格伦综合症的男性受试者的方法。

[0262] 还提供通过选择具有增加的XIST表达和/或减少的MECP2表达的受试者,并且向受试者施用(i)治疗有效量的抑制XIST表达的药剂或者(ii)治疗有效量的编码MECP2的核酸分子(如编码MECP2的运载体)或者(i)和(ii)两者,来增加男性受试者中的唾液流量的方法。

[0263] 示例性的XIST抑制剂包含例如与XIST核酸分子特异性杂交的反义寡核苷酸或siRNA分子。XIST核酸序列是可公开获得的(如以GenBank™登录号NR-001564存放的(deposited)人XISTRNA序列)。可以由本领域技术人员使用可公开获得的XIST序列设计靶向XIST的适当的反义寡核苷酸或siRNA。XIST反义转录本Tsix是可以与所公开的方法一起使用的已知的XIST的抑制剂(Senner和Brockdorff, *Curr Opin Genet Dev* 19(2):122-126, 2009; Stavropoulos等人, *Proc Natl Acad Sci USA* 98(18):10232-10237, 2001)。

[0264] 如本文所描述的,在男性SS患者中鉴别到性染色体基因表达的显著改变(包含XIST表达、减少的MECP2表达和Y染色体基因表达的明显沉默)。在来自被诊断患有与pSS相关的自身免疫性疾病(包含类风湿性关节炎、II型糖尿病、系统性硬化和淋巴瘤)的男性的受影响组织中也鉴别到这种基因表达模式(被称为自身免疫Xist Y染色体失活综合征(AXYIS))。

[0265] 特别地,本文中描述了下列发现:在男性斯耶格伦综合症患者的子集中,Y染色体基因表达下调(例如,基因RPS4Y1、基因RPS4Y2、基因JAR1D1D、基因CYORF15B和基因CYORF14的表达下调),调控RNA加工和病毒复制的核糖体蛋白质(例如,RPS4Y1、RPS4Y2和RPS4X)以及调控DNA甲基化的蛋白质(如MDB6和NASP)的表达也下调。此外,在患有斯耶格伦综合症的男性患者的X染色体的视蛋白(OPN1LW、OPN1MW和OPN1MW2)以及tex28区中鉴别到大量重复和/或缺失。这些发现提供了可以用于男性中斯耶格伦综合症的诊断和治疗的附加标志物。

[0266] 本文提供通过向受试者施用抑制BMP6的药剂(如抑制BMP6的表达(mRNA表达或蛋白质表达)或至少一种生物学活性的化合物)来在需要治疗的受试者(如在唾液腺中具有增加的BMP6表达的受试者)中治疗斯耶格伦综合征的方法,其中药剂或化合物是本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物。药剂或化合物还可以是抑制BMP信号传导的药剂或化合物(如本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物)。

[0267] 在各种实施方案中,本发明提供治疗患有斯耶格伦综合征的受试者的方法,或者增加受试者中的唾液流量的方法,方法包括选择相对于对照在受试者的唾液腺中具有增加的BMP6表达的受试者,以及向受试者施用治疗有效量的抑制BMP6的表达或活性的药剂或抑制BMP信号传导的药剂,从而治疗患有斯耶格伦综合征的受试者或者增加受试者中的唾液流量,其中药剂是本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物。在一些实施方案中,唾液腺是小唇唾液腺、腮腺或下颌下腺。在一些实施方案中,抑制BMP6的表达或活性的药剂是本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物。

[0268] 弥漫性内生型脑桥胶质瘤(DIPG)的治疗

[0269] 弥漫性内生型脑桥胶质瘤(DIPG)(也称为弥漫性内生型脑桥胶质瘤)是位于脑干桥(中部)的肿瘤。脑干是脑的最低部分,连接大脑与脊髓。弥漫性内生型脑桥胶质瘤已经与和进行性骨化性纤维发育不良相同的ACVR1中的功能突变获得相关。

[0270] 在各种实施方案中,本发明提供用于治疗患有弥漫性内生型脑桥胶质瘤(DIPG)的受试者的方法,方法包括:选择患有弥漫性内生型脑桥胶质瘤(DIPG)的受试者,以及向受试者施用治疗有效量的本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物,从而治疗患有弥漫性内生型脑桥胶质瘤(DIPG)的受试者。

[0271] 祖细胞(包含胚胎干细胞和成体干细胞)在体外和在体内的繁殖、移植和分化

[0272] 对于调节前体细胞群体和干细胞群体的分化和再生,以及在一些情况下防止(虽然在其他情况中指引)组织朝向谱系的分化而言,BMP信号是重要的。如本文所描述的用本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物的治疗可以用于(i)在体内或在体外保持干细胞群体或多能细胞群体中的多能状态;(ii)在体内或在体外扩增干细胞群体或多能细胞群体;(iii)在体内或在体外直接分化干细胞群体或多能细胞群体;(iv)单独地或与其他治疗组合或与其他治疗依次在体内或在体外操纵或指引干细胞群体或多能细胞群体的分化;以及(v)调控经分化的细胞群体去分化成多能群体或祖细胞群体。

[0273] 许多干细胞谱系和前体谱系需要BMP信号,以便确定其是否将扩增、朝向特定组织谱系分化、归入特定组织类型并且与特定组织类型整合或经历程序性细胞死亡。BMP信号经常与由生长因子(bFGF、PDGF、VEGF、HBEGF、PIGF等)、音猬因子(SHH)、Notch信号通路和Wnt信号通路提供的信号相互作用,以实现这些变化(Okita等人. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 1:103-111, 2006)。如本文所描述的用本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物的治疗可以用于指引干细胞(例如,胚胎干细胞)或组织祖细胞朝向特定谱系的分化以用于治疗应用(Park等人. *Development* 131:2749-2762, 2004; Pashmforoush等人. *Cell* 117:373-386, 2004)。可替代地,对于某些细胞群体,如本文所描述的BMP抑制剂在防止分化并且促进扩增中可以是有效的,以便产生对于临床应用有效的足够数量的细胞。本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物和其他BMP拮抗剂或一个或多个生长因子或一个或多个信号传导分子的确切剂量和/或组合可以对每种细胞类型和组织类型高度特异性。

[0274] 例如,某些胚胎干细胞系需要与白血病抑制因子(LIF)共培养,以抑制分化并且保持某些经培养的胚胎干细胞系的多能性(Okita等人. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 1: 103-111, 2006)。如本文所描述的本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物的使用可以用于在不存在LIF的情况下保持多能性。其他ES细胞系需要与特定饲养细胞层共培养,以便保持多能性。当担忧饲养细胞层或其DNA组分或蛋白质组分的污染将使细胞用于人疗法的应用复杂化或者阻碍细胞用于人疗法的应用时,如本文所描述的本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物的使用(单独地或与其他药剂组合)在保持多能性中可以是有效的。

[0275] 在另一个实施例中,在一些情况下,在停止培养中的LIF之前不久用蛋白质(如头蛋白)拮抗BMP信号能够诱导分化成心肌细胞谱系(Yuasa et al. *Nat. Biotechnol.* 23:607-611, 2005)。药理BMP拮抗剂(如本文所描述的本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物)的使用即使不可以实现更有效的效果,也可以实现相似的效果。可以将这样的分化细胞治疗性地引入患病心肌中。可替代地,这样的治疗实际上对于已经归入患病心肌中的经移植的前体细胞可能更有效。用BMP的蛋白质拮抗剂(如头蛋白)的全身性疗法将极其昂贵,并且需要复杂的给药。如本文所描述的BMP拮抗剂的全身性递送或局部递送可以使这样的前体细胞偏向原位分化成功能性心肌细胞。

[0276] 化合物在哺乳动物中的应用

[0277] 通过使用由本领域技术人员确定为适当的剂量和施用方案,可以将如本文所描述的包括本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物的药物组合物用于治疗受试者(例如,人、家养宠物、家畜或其他动物),并且这些参数可以根据例如所治疗的病症的类型和程度、受试者的整体健康状况、化合物的治疗指数和施用途径而变化。标准临床试验可以用于优化如本文所描述的包括本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物的任何特定药物组合物的剂量和给药频率。可以使用的示例性施用途径包含口服、肠胃外、静脉内、动脉内、皮下、肌内、局部、颅内、眶内、眼、心室内、囊内、脊柱内、脑池内、腹膜内、鼻内、气雾剂或通过栓剂施用。用于制造可以与本文所描述的方法和组合物一起使用的制剂的方法是本领域公知的,并且可以在例如Remington: *The Science and Practice of Pharmacy* (第20版, A. R. Gennaro), Lippincott Williams & Wilkins, 2000中找到。

[0278] 昆虫中的BMP信号传导的抑制

[0279] 与脊索动物的BMP受体相比,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物可以对节肢动物的BMP受体具有活性,甚至可能具有选择性。抑制节肢动物幼虫或卵中的BMP信号传导可能引起严重的发育异常,并且当抑制该通路时,可能例如经由在斑马鱼和果蝇中观察到的相同背部化来损害其繁殖能力。与人BMP受体相比,对节肢动物BMP受体具有非常强选择性的BMP拮抗剂可以用作杀虫剂或害虫防治剂,其比目前的策略显然具有更小的毒性并且更环保。

[0280] 离体应用

[0281] 除了以治疗方法向患者施用之外,如本文所描述的本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物也可以用于离体处理细胞和组织,以及待植入患者中的结构材料(参见上文)。例如,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物可以用于处理可以例如在移植中使用的外植组织。

[0282] 高胆固醇血症或高脂蛋白血症的治疗

[0283] 用小分子或重组BMP抑制剂治疗降低缺乏低密度脂蛋白受体 (LDLR^{-/-}) 的小鼠中的血管炎症(经由巨噬细胞累积和组织蛋白酶活性)、动脉粥样化形成和血管钙化。不希望受理论束缚,作为对血管炎症的影响的潜在解释,已经发现氧化型LDL (oxLDL) 增加BMP2表达并且诱导人主动脉内皮细胞中的活性氧物质 (ROS) 的产生。基于通过小分子或重组BMP抑制剂的抑制,由oxLDL诱导的ROS产生似乎需要BMP信号传导。用小分子BMP抑制剂治疗降低血浆低密度脂蛋白水平,而不抑制HMG-CoA还原酶活性,表明BMP信号传导在LDL胆固醇生物合成的调控中的作用。还已经发现小分子BMP抑制剂抑制高脂饮食喂养的LDLR缺陷小鼠中观察到的肝脂肪变性 (hepatosteatosis)。小分子或重组BMP抑制剂在体外抑制肝癌细胞中ApoB-100的合成。这些发现暗示了血管钙化和动脉粥样化形成中的BMP信号传导,并且提供了至少两种新型机制,通过所述至少两种新型机制,BMP信号传导可以有助于动脉粥样硬化的发病机制。这些研究突出了BMP信号通路作为动脉粥样硬化的治疗中的治疗靶标,同时鉴别了BMP信号传导在血管氧化应激、炎症和脂质代谢的调控中的几种新型功能。

[0284] 在各种实施方案中,如本文所描述的本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物可以用于降低患者中ApoB-100的循环水平。在各种实施方案中,如本文所描述的本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物可以用于降低患者中LDL的循环水平。在各种实施方案中,如本文所描述的本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物可以用于治疗高胆固醇血症、高脂血症或高脂蛋白血症(包含先天性或获得性高胆固醇血症、高脂血症或高脂蛋白血症)。在一些实施方案中,先天性高胆固醇血症、高脂血症或高脂蛋白血症是常染色体显性高胆固醇血症 (ADH)、家族性高胆固醇血症 (FH)、多基因性高胆固醇血症、家族性混合型高脂血症 (FCHL)、高载脂蛋白β脂蛋白血症或小而密LDL综合征 (LDL表型B)。

[0285] 在一些实施方案中,获得性高胆固醇血症、获得性高脂血症或获得性高脂蛋白血症与下列相关:糖尿病、高脂血饮食和/或久坐生活方式、肥胖症、代谢综合征、内源性肝病或继发性肝病、原发性胆汁性肝硬化或其他胆汁淤积病症、酒精中毒、胰腺炎、肾病综合征、终末期肾病、甲状腺功能减退、归因于施用噻嗪类、β-受体阻滞剂、类维生素A、高活性抗逆转录病毒药剂、雌激素、孕激素或糖皮质激素的医源病发生。在各种实施方案中,如本文所描述的本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物可以用于治疗与脂质吸收或脂质代谢中的缺陷相关的疾病、病症或综合征(如胆固醇血症、脑腱性黄瘤病或家族性低β-脂蛋白血症)。

[0286] 在各种实施方案中,如本文所描述的本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物可以用于治疗由高脂血症引起的疾病、病症或综合征(如冠状动脉疾病及其表现(例如,心肌梗死;心绞痛;急性冠状动脉综合征(如不稳定型心绞痛);心功能障碍(如,由心肌梗死引起的充血性心力衰竭);或与心肌缺血/心肌梗死相关的心律失常)、归因于脑动脉供应部分的闭塞的中风、脑出血、外周动脉疾病(例如,肠系膜缺血);肾动脉狭窄;肢体缺血和跛行;锁骨下动脉窃血综合征;腹主动脉瘤;胸主动脉瘤、假动脉瘤、壁内血肿;或穿透性动脉溃疡、分割性动脉瘤、主动脉狭窄、血管钙化、黄瘤(如影响腱或巩膜和皮肤黄瘤的黄瘤)、黄斑瘤或肝脂肪变性)。

[0287] 在各种实施方案中,如本文所描述的本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物或其组合可以用于如在展现出正常循环脂质水平或代谢的个体中治疗上述疾病、病症或综合征,而不管循环脂质水平。

[0288] 在各种实施方案中,如本文所描述的本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物可以用于降低由冠状动脉血管疾病、脑血管疾病或外周血管疾病引起的继发性心血管事件。在各种实施方案中,如本文所描述的本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物可以用于治疗个体而不管脂质水平,例如用于治疗展现出正常循环胆固醇水平和循环脂质水平的个体。在各种实施方案中,如本文所描述的本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物可以与HMG-CoA还原酶抑制剂联合施用。

[0289] 在各种实施方案中,如本文所描述的本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物可以用于如具有升高的心血管风险标志物(例如,C反应蛋白)或例如升高的弗雷明汉风险评分(Framingham Risk Score)的个体中的心血管疾病的预防。在各种实施方案中,如本文所描述的,如本文所描述的本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物可以用于预防展现出正常循环胆固醇水平和循环脂质水平的个体中的心血管疾病。

[0290] 在各种实施方案中,如本文所描述的本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物用于治疗或预防前述疾病、病症或综合征,正在治疗的患者未被诊断患有和/或未患有下列病况中的一种或多种:与动脉粥样硬化、自身免疫性疾病和其他血管炎相关的血管炎症;动脉粥样硬化疾病、动脉粥样化斑块和/或血管钙化;动脉瘤和/或动脉瘤形成;急性冠状动脉综合征(心绞痛和心脏病发作)、短暂性缺血发作、中风、外周血管疾病或其他血管缺血事件。

[0291] 在各种实施方案中,如本文所描述的本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物用于治疗或预防前述疾病、病症或综合征(例如,用于降低患者中ApoB-100和/或LDL的循环水平;用于治疗高胆固醇血症、高脂血症或高脂蛋白血症(包含先天性或获得性高胆固醇血症、高脂血症或高脂蛋白血症);用于治疗与脂质吸收或脂质代谢中的缺陷相关的疾病、病症或综合征;用于治疗由高脂血症引起的疾病、病症或综合征;用于降低由冠状动脉血管疾病、脑血管疾病或外周血管疾病引起的继发性心血管事件;或者用于降低由冠状动脉血管疾病、脑血管疾病或外周血管疾病引起的继发性心血管事件),正在治疗的患者还被诊断患有和/或还患有下列病况中的一种或多种:与动脉粥样硬化、自身免疫性疾病和其他血管炎相关的血管炎症;动脉粥样硬化疾病、动脉粥样化斑块和/或血管钙化;动脉瘤和/或动脉瘤形成;急性冠状动脉综合征(心绞痛和心脏病发作)、短暂性缺血发作、中风、外周血管疾病或其他血管缺血事件。

[0292] T. 软骨缺损的治疗

[0293] 通过防止间充质干细胞产生的支架的钙化和矿化,特异性BMP受体的选择性抑制实现软骨形成(Hellingman等人. Tissue Eng Part A. 2011 Apr;17(7-8):1157-67. Epub 2011年1月17日)。因此,在一些实施方案中,如本文所描述的本发明的化合物对于促进患有软骨损伤或软骨缺损的患者中的软骨修复/再生、以及由适当的细胞(如间充质干细胞)离体或体外产生软骨组织(例如,用于植入)可以是有用的。

[0294] U. 具有不同程度的选择性的化合物的应用:经由特定BMP I型受体抑制BMP信号传导的化合物,或者也经由TGF- β 、激活素、AMP激酶或VEGF受体影响信号传导的化合物。

[0295] 在各种实施方案中,本文所描述的本发明的化合物中的几种将对特定BMP I型受体具有相对较大的选择性。某些疾病的发病机理可能归因于一种特定受体的不正常的信号传导。例如,进行性骨化性纤维发育不良是由异常的(组成性激活的)ALK2功能引起的疾病

(Yu等人. Nat. Chem. Biol. 4:33-41, 2008)。在这样的情况下,在各种实施方案中,特异性拮抗BMP I型受体亚型的功能的如本文所描述的本发明的化合物可以具有降低的毒性或副作用或较大的有效性或两者的优势。

[0296] 在一些实施方案中,与TGF- β 信号传导、激活素信号传导、AMP激酶信号传导和VEGF受体信号传导相比,如本文所描述的本发明的化合物对BMP信号传导可以具有高度选择性。其他化合物可以具有较小的特异性,并且除了BMP信号传导之外可以靶向其他途径。例如,在肿瘤的治疗中,当特定患者的肿瘤的分子表型揭示多种通路的调控异常时,抑制BMP信号传导以及上述通路中的一种或多种的药剂可以具有有益效果(例如,减小肿瘤尺寸)。

[0297] 在一些实施方案中,与ALK1或ALK3或ALK4或ALK5或ALK6相比,如本文所描述的本发明的化合物(例如,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物)对于ALK2具有高度选择性。与ALK1或ALK3或ALK4或ALK5或ALK6相比,对ALK2的选择性抑制可以最小化有害影响或毒性。由于肠隐窝干细胞再循环的已知的重要性和ALK3功能在幼年性家族性息肉病中的意义,慢性ALK3抑制可能损害正常的粘膜上皮细胞更新。ALK1抑制可能损害正常的血管重构,并且导致与人遗传性毛细血管扩张综合征2型(HHT2)类似的并发症(如毛细血管渗漏、动静脉畸形和出血)。因此,相对于ALK3和ALK1选择性抑制ALK2的化合物可以帮助避免通过使用非选择性抑制剂可能遇到的这种类型的毒性。

[0298] 在某些实施方案中,本发明提供在人中抑制ALK2活性的方法,方法包括向人施用本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物,相对于人ALK1的活性,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物选择性地抑制人ALK2的活性。在一些这样的实施方案中,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物抑制人ALK2的活性,其 IC_{50} 是其抑制人ALK1活性的 IC_{50} 的约1/2。在一些这样的实施方案中,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物抑制人ALK2的活性,其 IC_{50} 是其抑制人ALK1活性的 IC_{50} 的1/5。在一些这样的实施方案中,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物抑制人ALK2的活性,其 IC_{50} 是其抑制人ALK1活性的 IC_{50} 的1/10。在一些这样的实施方案中,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物抑制人ALK2的活性,其 IC_{50} 是其抑制人ALK1活性的 IC_{50} 的1/15或1/20或1/30或1/40或1/50或1/100或1/200或1/300或1/400或1/500或1/600或1/800或1/1000或1/1500或1/2000或1/5000或1/10000或1/15000或1/20000或1/40000或1/50000或1/60000或1/70000或1/80000或1/90000或1/100000。

[0299] 在某些实施方案中,本发明提供在人中抑制ALK2活性的方法,方法包括向人施用本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物,相对于人ALK3的活性,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物选择性地抑制人ALK2的活性。在一些这样的实施方案中,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物抑制人ALK2的活性,其 IC_{50} 是其抑制人ALK3活性的 IC_{50} 的1/15。在一些这样的实施方案中,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物抑制人ALK2的活性,其 IC_{50} 是其抑制人ALK3活性的 IC_{50} 的1/20。在一些这样的实施方案中,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物抑制人ALK2的活性,其 IC_{50} 是其抑制人ALK3活性的 IC_{50} 的1/30。在一些这样的实施方案中,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物抑制人ALK2的活性,其 IC_{50} 是其抑制人ALK3活性的 IC_{50} 的1/50或1/100或1/200或1/300或1/400或1/500或1/600或1/800或1/1000或1/1500或1/2000或1/5000或1/10000或1/15000或1/20000或1/40000或1/60000或1/70000或1/80000或1/90000或1/100000。

[0300] 在某些实施方案中,本发明提供在人中抑制ALK2活性的方法,方法包括向人施用本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物,相对于人ALK4的活性,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物选择性地抑制人ALK2的活性。在一些这样的实施方案中,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物抑制人ALK2的活性,其 IC_{50} 是其抑制人ALK4活性的 IC_{50} 的1/1000。在一些这样的实施方案中,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物抑制人ALK2的活性,其 IC_{50} 是其抑制人ALK4活性的 IC_{50} 的1/2000。在一些这样的实施方案中,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物抑制人ALK2的活性,其 IC_{50} 是其抑制人ALK4活性的 IC_{50} 的1/3000。在一些这样的实施方案中,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物抑制人ALK2的活性,其 IC_{50} 是其抑制人ALK4活性的 IC_{50} 的1/4000或1/5000或1/6000或1/7000或1/8000或1/9000或1/10000或1/12000或1/14000或1/16000或1/18000或1/20000或1/25000或1/30000或1/40000或1/50000或1/60000或1/70000或1/80000或1/90000或100000。

[0301] 在某些实施方案中,本发明提供在人中抑制ALK2活性的方法,方法包括向人施用本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物,相对于人ALK6的活性,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物选择性地抑制人ALK2的活性。在一些这样的实施方案中,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物抑制人ALK2的活性,其 IC_{50} 是其抑制人ALK6活性的 IC_{50} 的1/2。在一些这样的实施方案中,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物抑制人ALK2的活性,其 IC_{50} 是其抑制人ALK6活性的 IC_{50} 的1/5。在一些这样的实施方案中,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物抑制人ALK2的活性,其 IC_{50} 是其抑制人ALK6活性的 IC_{50} 的1/10。在一些这样的实施方案中,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物抑制人ALK2的活性,其 IC_{50} 是其抑制人ALK6活性的 IC_{50} 的1/15或1/20或1/30或1/40或1/50或1/100或1/200或1/300或1/400或1/500或1/600或1/800或1/1000或1/1500或1/2000或1/5000或1/10000或1/15000或1/20000或1/40000或1/50000或1/60000或1/70000或1/80000或1/90000或1/100000。

[0302] 在一方面,本发明提供在人中抑制ALK2活性的方法,方法包括向人施用本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物,相对于人ALK5的活性,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物选择性地抑制人ALK2的活性。在一些这样的实施方案中,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物抑制人ALK2的活性,其 IC_{50} 是其抑制人ALK5活性的 IC_{50} 的1/1000。在一些这样的实施方案中,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物抑制人ALK2的活性,其 IC_{50} 是其抑制人ALK5活性的 IC_{50} 的1/2000。在一些这样的实施方案中,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物抑制人ALK2的活性,其 IC_{50} 是其抑制人ALK5活性的 IC_{50} 的1/3000。在一些这样的实施方案中,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物抑制人ALK2的活性,其 IC_{50} 是其抑制人ALK5活性的 IC_{50} 的1/4000或1/5000或1/6000或1/7000或1/8000或1/9000或1/10000或1/12000或1/14000或1/16000或1/18000或1/20000或1/25000或1/30000或1/40000或1/50000或1/60000或1/70000或1/80000或1/90000或1/100000。

[0303] 如本文所用,“预防”病症或病况的治疗剂是指在统计样品中相对于未治疗的对照样品降低经治疗的样品中病症或病况的发生或频率,或相对于未治疗的对照样品延迟病症或病况的一种或多种症状的发作或降低严重性的化合物。因此,癌症的预防包括,例如,相对于未治疗的对照人群,减少接受预防性治疗的患者人群中可检测到的癌性生长的数量,和/或延迟在已治疗人群中相对于未治疗的对照人群中可检测到的癌性生长的出现,例如

统计学和/或临床上显著的量。感染的预防包括,例如,相对于未治疗的对照人群,在已治疗的人群中减少感染的诊断次数,和/或与未治疗的对照人群相比在已治疗的人群中延迟感染症状的发作。疼痛的预防包括,例如,相对于未治疗的对照人群,治疗人群中的受试者所经历的疼痛感觉的程度降低或延迟。

[0304] 术语“治疗”包括预防性和/或治疗性治疗。术语“预防性或治疗性”治疗是本领域公认的并且包括向宿主施用一种或多种主题组合物。如果在不希望的病况(例如宿主动物的疾病或其他不希望的状态)的临床表现之前给药,那么治疗是预防性的(即,它保护宿主免于发展不想要的病况),而如果在不希望的病况的表现之后给药,治疗是治疗性的(即,旨在减少、改善或稳定现有的不希望的病况或其副作用)。

[0305] 组合疗法

[0306] 在某些情况下,如本文所描述的本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物可以与其他目前的药物疗法或将来的药物疗法组合使用,因为单独抑制BMP的效果可能本身不是最佳的,和/或与作用于和BMP信号传导在功能上相互作用的不同途径的疗法或作用于BMP途径本身的疗法结合,可以具有协同作用或者更有效。在某些情况下,如本文所描述的BMP抑制剂(例如,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物)与附加药物疗法的联合施用降低附加药物疗法的剂量,使得其小于当以单一疗法使用时(例如,在不存在如本文所描述的BMP抑制剂的情况下)实现治疗效果的量。

[0307] 组合疗法的一些非限制性实例可以包含下列。

[0308] 红细胞生成素(阿法依伯汀(Epogen))和如本文所描述的BMP拮抗剂的共同施用对于如上文所描述的某些类型的炎症性贫血(特别是在其中慢性炎症和红细胞生成素不足两者都起作用促进贫血的疾病(如终末期肾病)中)可以特别有效。

[0309] 在某些实施方案中,如本文所描述的BMP抑制剂(例如,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物)可以与其他抗高血脂剂或抗脂血剂联合施用,抗高血脂剂或抗脂血剂包括但不限于HMG-CoA还原酶抑制剂(例如,阿托伐他汀、西立伐他汀(cerivastatin)、氟伐他汀、洛伐他汀、美伐他汀、匹伐他汀(pitavastatin)、普伐他汀、罗苏伐他汀或辛伐他汀)、贝特类药物(fibrates)(例如,苯扎贝特(bezafibrate)、环丙贝特、氯贝特、吉非贝齐或非诺贝特(fenofibrate))、依折麦布(ezetimibe)、烟酸、胆固醇酯转移蛋白(CETP)抑制剂(例如,托塞匹布(torcetrapib)、安塞曲匹(anacetrapib)或达塞曲匹(dalcetrapib))、消胆胺、考来替泊、普罗布考、右旋甲状腺素、胆汁酸螯合剂或上述的组合。

[0310] 在某些实施方案中,如本文所描述的BMP抑制剂(例如,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物)可以与用于糖尿病的治疗联合施用,用于糖尿病的治疗包括但不限于磺酰脲类药物(例如,氯磺丙脲、甲苯磺丁脲、格列本脲、格列吡嗪或格列美脲)、减少肝产生的葡萄糖量的药物(例如,二甲双胍)、氯茴苯酸类药物(meglitinides)(例如,瑞格列奈(repaglinide)或那格列奈(nateglinide))、减少从肠吸收碳水化合物的药物(例如, α 葡萄糖苷酶抑制剂(如阿卡波糖(acarbose)))、影响血糖控制的药物(例如,普兰林肽或艾塞那肽)、DPP-IV抑制剂(例如,西格列汀(sitagliptin))、胰岛素治疗、噻唑烷酮类药物(thiazolidinones)(例如,曲格列酮、环格列酮(ciglitazone)、吡格列酮或罗格列酮)、噁二唑烷二酮类药物、 α -葡萄糖苷酶抑制剂(例如,米格列醇或阿卡波糖)、作用于 β 细胞的ATP依赖性钾通道的药剂(例如,甲苯磺丁脲、格列本脲、格列吡嗪、格列齐特(glicazide)或瑞格

列奈)、那格列奈、胰高血糖素抑制剂、参与葡萄糖异生和/或糖原分解的刺激的肝酶的抑制剂,或上述的组合。

[0311] 在某些实施方案中,如本文所描述的BMP抑制剂(例如,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合)可以与用于肥胖症的治疗联合施用,用于肥胖症的治疗包括但不限于奥利司他、西布曲明(sibutramine)、苯甲曲秦、苯丁胺、二乙胺苯丙酮、苄非他明、氯苯咪唑啉、右旋苯丙胺、利莫那班(rimonabant)、西替司他(cetilistat)、GT 389-255、APD356、普兰林肽/AC137、PYY3-36、AC 162352/PYY3-36、胃酸调节素、TM 30338、AOD 9604、油酰基-雌酮、溴隐亭、麻黄碱、瘦素、假麻黄碱或其药学上可接受的盐或上述的组合。

[0312] 在某些实施方案中,如本文所描述的BMP抑制剂(例如,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合)可以与抗高血压剂联合施用,抗高血压剂包括但不限于 β -受体阻滞剂(例如,阿普洛尔、阿替洛尔、噻吗洛尔、吲哚洛尔、普萘洛尔和美托洛尔)、ACE(血管紧张素转化酶)抑制剂(例如,贝那普利、卡托普利、依那普利、福辛普利(fosinopril)、赖诺普利、喹那普利和雷米普利)、钙通道阻滞剂(例如,硝苯地平、非洛地平、尼卡地平、伊拉地平、尼莫地平、地尔硫卓和维拉帕米)和 α -受体阻滞剂(例如,多沙唑啉、乌拉地尔(urapidil)、哌唑啉和特拉唑啉)或上述的组合。在某些实施方案中,如本文所描述的BMP抑制剂可以与用于贫血(例如,与肾衰竭和血液透析相关的炎症性贫血)的治疗联合施用,用于贫血的治疗包含但不限于红细胞生成刺激剂(例如,红细胞生成素)。

[0313] 酪氨酸激酶受体抑制剂(如SU-5416)和如本文所描述的BMP抑制剂(例如,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合)可以在抑制血管生成方面具有协同效应,特别是对于针对肿瘤的抗血管生成疗法。BMP信号(BMP-4)被认为对于干细胞或前体细胞向造血/内皮共同的祖细胞的定向(commitment)是关键性的,并且可以促进血管生成所必需的成熟内皮细胞的增殖、存活和迁移(Park等人. *Development* 131:2749-2762, 2004)。因此,使用如本文所描述的化合物对BMP信号的拮抗作用可以在内皮前体和细胞水平上提供对血管生成的附加的抑制。类似地,与如本文所描述的BMP抑制剂(例如,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合)以及其他酪氨酸激酶受体抑制剂(如伊马替尼(imatinib)(Gleevec))的共同治疗可以用于抑制某些肿瘤的血管重构和血管生成。

[0314] 音猬因子激动剂和如本文所描述的BMP抑制剂(例如,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合)的组合对于促进毛发生长可以是特别有用的,因为已知SHH活性刺激毛囊从毛发生长终期(休止)阶段的转换(Paladini等人. *J. Invest. Dermatol.* 125:638-646, 2005),同时抑制BMP途径缩短毛发生长终期阶段(Plikus等人. *Nature* 451:340-344, 2008)。将预期两者的使用引起毛发生长初期或生长阶段的相对增加的时间。

[0315] 在旨在抑制骨分化的应用中,Notch调控子(例如, γ -分泌酶抑制剂)和如本文所描述的BMP拮抗剂(例如,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合)的组合使用可能比单独的任何一种药剂更有效,因为越来越多的证据表明两种通路联合起作用以影响细胞分化(Kluppel等人. *Bioessays* 27:115-118, 2005)。这些疗法可以在其中一种或两种通路都被扰乱的肿瘤的治疗中具有协同作用(Katoh, *Stem Cell Rev.* 3:30-38, 2007)。

[0316] 印度刺猬因子(IHH)拮抗剂和BMP拮抗剂(例如,如本文所描述的本文所述的一种或多种结晶化合物或组合)的组合使用可以抑制病理性骨形成。IHH是骨前体向软骨细胞或软骨形成细胞的定向的原因。软骨内骨形成涉及软骨形成(由BMP信号和IHH信号促进)及

其随后的由于BMP信号引发的矿化程序的钙化两者的协调活性(Seki等人. *J. Biol. Chem.* 279:18544-18549, 2004; Minina等人. *Development* 128:4523-4534, 2001)。因此,IHH拮抗剂与如本文所描述的本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物的共同施用可以更有效地抑制归因于活动过强的BMP信号传导的病理性骨生长(如FOP)或者上文描述的病理性骨形成的炎症病症或创伤性病症中的任何一种。

[0317] 存在针对Smo拮抗作用和BMP拮抗作用两者用于治疗成胶质细胞瘤的效果的强有力的实验证据。如本文所描述的化合物(例如,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物)可以与Smo拮抗剂组合使用以治疗成胶质细胞瘤。

[0318] 在一些实施方案中,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物与选自下列组成的组的药剂组合施用:皮质类固醇、非甾体类抗炎药(NSAID)、脂氧合酶抑制剂、白三烯抑制剂、肥大细胞稳定剂、抗组胺药物、肿瘤坏死因子(TNF)抑制剂、IL-23阻滞剂、IL1-RA疗法、细胞毒性疗法、二膦酸盐、抗风湿药、CTA4-Ig疗法、抗生长因子疗法和白细胞介素-1信号传导的抑制剂。

[0319] 用于与本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物组合使用的示例性皮质类固醇包括但不限于泼尼松、皮质醇和氢化可的松。在一个实施方案中,皮质类固醇是泼尼松。

[0320] 用于与本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物组合使用的示例性NSAID包括但不限于萘普生、布洛芬、美洛昔康(meloxicam)、双氯芬酸、阿司匹林、吡罗昔康、舒林酸、甲氯芬那酸和吲哚美辛。

[0321] 在一些实施方案中,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物与脂氧合酶抑制剂(如甲氯芬那酸钠或齐留通(zileuton))组合施用。

[0322] 用于与本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物组合使用的示例性白三烯抑制剂包含例如孟鲁司特(montelukast)、扎鲁司特(zafirlukast)和普鲁司特(pranlukast)。

[0323] 用于与本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物组合使用的肥大细胞稳定剂的非限制性实例包括但不限于色甘酸钠、色甘酸、酮替芬、奥洛他定(olopatadine)、奥马珠单抗(omalizumab)、吡嘞司特(pemrolast)、槲皮素、茶碱、咖啡因、副黄嘌呤(paraxanthine)、氨茶碱和可可碱。

[0324] 在一些实施方案中,将本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物与抗组胺药物(例如,苯海拉明、西替利嗪、雷尼替丁、法莫替丁、氯苯那敏、氯苯海拉明(chlorodiphenhydramine)和非索非那定(fexofenidine)等)组合施用。

[0325] 预期用于与本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物一起使用的示例性抗肿瘤坏死因子(抗TNF)药物包括但不限于英夫利昔单抗(infliximab)、依那西普、阿达木单抗、赛妥珠单抗(certolizumab)、安非他酮和戈利木单抗(golimumab)。

[0326] 预期用于与本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物一起使用的白细胞介素-23(IL-23)信号传导的示例性抑制剂包括但不限于优特克单抗(ustekinumab)和BI-855066。

[0327] 预期用于与本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物一起使用的白细胞介素-1(IL-1)信号传导或IL-1RA疗法的示例性抑制剂包括但不限于阿那白滞素(anakinra)、康纳单抗(canakinumab)和利洛西普(rilonacept)。

[0328] 用于与本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物组合使用的示例性细胞毒性疗法包括但不限于甲氨蝶呤、环磷酰胺、5-氟尿嘧啶、阿霉素、长春新碱、博来霉素、丙卡巴肼、泼尼松龙(prednisilone)、达卡巴嗪、依托泊苷、顺铂、奥沙利铂等。

[0329] 用于与本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物组合使用的示例性二膦酸盐包括但不限于阿仑膦酸盐(alendronate) (FOSAMAXTM)、伊班膦酸盐(ibandronate) (BONIVATM)、利塞膦酸盐(risedronate) (ACTONELTM、ATELVIATM)和唑来膦酸(zoledronic acid) (RECLASTTM)。

[0330] 用于与本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物组合使用的示例性抗生长因子疗法包括但不限于抗PDGF疗法、抗FGF疗法和抗VEGF疗法。

[0331] 用于与本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物组合使用的示例性改善病情抗风湿药(disease modifying anti-rheumatic drug)包括但不限于硫唑嘌呤(IMURANTM)、环磷酰胺(CYTOXANTM)、环孢霉素(NEORALTM)、羟氯喹(PLAQUENILTM)、来氟米特(ARAVATM)、甲氨蝶呤(RHEUMATREXTM、TREXALLTM)、柳氮磺胺吡啶(AZULFIDINETM)和托法替尼(tofacitinib) (XELJANZTM)等。

[0332] 在进一步的实施方案中,可以将本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物与环孢霉素、麦考酚酸酯(mycophenylate mofetil)等组合施用。

[0333] 在一些实施方案中,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物与至少一种附加的药剂组合施用,其中至少一种附加的药剂包括抗炎药剂。示例性的抗炎药剂包括但不限于P物质的活性的抑制剂;P物质的分泌的抑制剂;P物质的效应的抑制剂;组胺的活性的抑制剂;组胺的分泌的抑制剂;组胺的效应的抑制剂;肥大细胞功能的抑制剂;Toll样受体信号传导的抑制剂;MyD88的抑制剂;TRIF的抑制剂;腺苷三磷酸双磷酸酶;和催化ATP的水解的药剂。

[0334] 在一些实施方案中,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物与至少一种附加的药剂组合施用,其中至少一种附加的药剂包括抗生长因子药剂。示例性的抗生长因子药剂包括但不限于PDGF配体的抑制剂;PDGF-AA的抑制剂;PDGF-BB的抑制剂;PDGFR- α 受体功能的抑制剂;PDGFR- β 受体功能的抑制剂;针对激活素A的中和抗体;针对激活素B的中和抗体;针对激活素A配体的中和抗体;针对激活素B配体的中和抗体;针对含有由INHBA编码的抑制素bA亚单位的异源二聚体配体的中和抗体;针对含有由INHBB基因编码的抑制素bB亚单位的异源二聚体配体的中和抗体;BMP配体的配体陷阱;激活素配体的配体陷阱;II型激活素受体ActRIIA的可溶性胞外域的配体陷阱;II型激活素受体ActRIIB的可溶性胞外域的配体陷阱;BMP I型受体ALK2的可溶性胞外域的配体陷阱;BMP I型受体ALK3的可溶性胞外域的配体陷阱;和BMP I型受体ALK6的可溶性胞外域的配体陷阱。

[0335] 在一些实施方案中,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物与至少一种附加的药剂组合施用,其中至少一种附加的药剂包括抗成骨信号传导剂或抗软骨形成信号传导剂。示例性抗成骨信号传导剂或抗软骨形成信号传导剂包括但不限于RAR- γ 激动剂;非选择性RAR激动剂;抑制成骨转录因子Runx2的活性的药剂;抑制成骨转录因子Runx2的表达的药剂;促进成骨转录因子Runx2的降解的药剂;抑制软骨形成转录因子Sox9的活性的药剂;抑制软骨形成转录因子Sox9的表达的药剂;促进软骨形成转录因子Sox9的降解的药剂;HIF-1 α 活性的抑制剂;和HIF-1 α 表达的抑制剂。

[0336] 在某些实施方案中,本发明的化合物可以单独使用或与另一种类型的治疗剂联合施用。如在本文使用的,短语“联合施用”指两种或更多种不同治疗化合物的任何形式的施用,使得当先前施用的治疗化合物在体内仍然有效时,第二化合物被施用(例如,两种化合物在受试者中是同时有效的,其可以包含两种化合物的协同效应)。例如,不同的治疗化合物可以以相同剂型或以单独的剂型附随地或顺序地被施用。在某些实施方案中,不同的治疗化合物可以在1小时、12小时、24小时、36小时、48小时、72小时或一周内相互施用。在一些实施方案中,在施用式(I)的化合物、式(II)的化合物或式(III)的化合物之前或者之后,在约5分钟内至约168小时内施用附加的治疗化合物。因此,接受这样的治疗的受试者可以得益于不同的治疗化合物的组合效果。

[0337] 在某些实施方案中,相对于本发明的化合物或一种或多种附加的治疗剂的每次单独施用,本发明的化合物与一种或多种附加的治疗剂(例如,一种或多种附加的化学治疗剂)的联合施用提供了改进的功效。在某些这样的实施方案中,联合施用提供累加效应,其中累加效应指本发明的化合物与一种或多种附加的治疗剂的单独施用的效应中的每个的和。

[0338] 当组合使用时,本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物可以单独地施用或以与如本文所描述的至少一种附加药剂不同的制剂的方式施用,或者可以以包括本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物和附加药剂的单一制剂的方式施用。本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物可以与至少一种附加药剂同时施用或并行施用。可以使用相同的或不同的施用方式(例如,口服、静脉内、注射等)进行本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物的施用。本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物和至少一种附加药剂的施用可以在15min内、在30min内同时发生,或者可以间隔至少1个小时(例如,至少2个小时、至少3个小时、至少4个小时、至少5个小时、至少6个小时、至少7个小时、至少8个小时、至少9个小时、至少10个小时、至少11个小时、至少12个小时或更多个小时)。本领域技术人员可以容易地确定包括本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物和至少一种附加药剂的用于组合治疗的适当的给药方案,例如,以降低副作用,以防止来自药剂中的一种的代谢干扰,以增强本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物的活性,或者以其他方式改善药效学因子或药代动力学因子。

[0339] 本文中预期的是,如上文所描述的至少一种附加的药剂与本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物的组合可以产生协同效应,协同效应大于单独施用的每种药剂的效应之和。在这样的实施方案中,预期的是,相比于单独施用本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物时的治疗效果所需的剂量,将较低剂量的本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物与第二药剂组合施用。

[0340] 剂量和施用

[0341] 在一方面,本文所描述的方法提供用于治疗受试者中的疾病或病症(包括异常骨形成)(例如,异位骨化病)的方法。在一个实施方案中,受试者可以是哺乳动物。在另一个实施方案中,哺乳动物可以是人,虽然方法对于全部哺乳动物都是有效的。方法包括向受试者施用有效量的包括本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物的药物组合物。

[0342] 药剂的剂量范围取决于效力,并且包含足够大以产生期望的效果(例如,异常骨形成的至少一种症状的降低)的量。剂量不应当太大,以致引起不可接受的不良副作用。通常,

剂量将随抑制剂的类型(例如,抗体或片段、小分子、siRNA等)和患者的年龄、病况和性别而变化。剂量可以由本领域技术人员确定,并且在发生任何并发症的情况下也可以由个人医师调整。通常,剂量从0.1mg/kg体重至1g/kg体重变动。在一些实施方案中,剂量范围是从0.1mg/kg体重至1g/kg体重、从0.1mg/kg体重至500mg/kg体重、从0.1mg/kg体重至250mg/kg体重、从0.1mg/kg体重至100mg/kg体重、从0.1mg/kg体重至50mg/kg体重、从0.1mg/kg体重至10mg/kg体重、从10mg/kg至100mg/kg、从15mg/kg至100mg/kg、从20mg/kg至100mg/kg、从25mg/kg至100mg/kg、从30mg/kg至100mg/kg、从40mg/kg至100mg/kg、从50mg/kg至100mg/kg、从60mg/kg至100mg/kg、从70mg/kg至100mg/kg、从75mg/kg至100mg/kg、从25mg/kg至50mg/kg、从50mg/kg至200mg/kg、从75mg/kg至250mg/kg、从100mg/kg至300mg/kg、从100mg/kg至200mg/kg、从100mg/kg至400mg/kg、从100mg/kg至500mg/kg、从100mg/kg至750mg/kg从200mg/kg至1000mg/kg、从300mg/kg至1000mg/kg、从400mg/kg至1000mg/kg、从500mg/kg至1000mg/kg、从600mg/kg至1000mg/kg、从700mg/kg至1000mg/kg、从800mg/kg至1000mg/kg、从900mg/kg至1000mg/kg、从250mg/kg至750mg/kg、从300mg/kg至600mg/kg,或者其间的任何范围。

[0343] 某些实施方案中,药剂的剂量是至少10mg/kg/天;在其他实施方案中,药剂的剂量是至少20mg/kg/天、至少25mg/kg/天、至少30mg/kg/天、至少40mg/kg/天、至少50mg/kg/天、至少60mg/kg/天、至少70mg/kg/天、至少80mg/kg/天、至少90mg/kg/天、至少100mg/kg/天、至少125mg/kg/天、至少150mg/kg/天、至少175mg/kg/天、至少200mg/kg/天、至少250mg/kg/天、至少300mg/kg/天、至少400mg/kg/天、至少500mg/kg/天或者更多。

[0344] 在一些实施方案中,用于在人受试者中使用的药剂的剂量范围是从10mg/天至250mg/天、从15mg/天至200mg/天、从20mg/天至200mg/天、从25mg/天至200mg/天、从25mg/天至175mg/天、从25mg/天至150mg/天、从25mg/天至125mg/天、从25mg/天至100mg/天、从25mg/天至75mg/天、从25mg/天至50mg/天、从50mg/天至200mg/天、从75mg/天至200mg/天、从100mg/天至200mg/天、从125mg/天至200mg/天、从150mg/天至200mg/天、从175mg/天至200mg/天、从50mg/天至200mg/天、从50mg/天至175mg/天、从50mg/天至150mg/天、从50mg/天至100mg/天、从50mg/天至75mg/天、从75mg/天至200mg/天、从75mg/天至175mg/天、从75mg/天至150mg/天、从75mg/天至125mg/天、从75mg/天至100mg/天、从100mg/天至200mg/天、从100mg/天至175mg/天、从100mg/天至125mg/天、从125mg/天至200mg/天、从125mg/天至175mg/天、从125mg/天至150mg/天、从150mg/天至200mg/天、从150mg/天至175mg/天、从175mg/天至200mg/天,或者其间的任何范围。

[0345] 在一个实施方案中,在人中使用的用于软组织中异常骨形成的治疗的本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物的剂量小于通常在肿瘤疾病和癌症的治疗中使用的本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物的剂量。

[0346] 可以在有限的时间段内重复上述剂量的施用。在一些实施方案中,每天一次或每天多次(例如,但不限于,每天三次)给予剂量。在另一个实施方案中,每天施用上述剂量,持续几周或几个月。治疗的持续时间取决于受试者的临床进展和对治疗的响应性。在初始较高治疗剂量之后,考虑连续的相对低的维持剂量。

[0347] 治疗有效的量是足以产生癌症的至少一种症状的统计学上显著的可测量的变化的药剂的量(参见下文“功效测量(Efficacy Measurement)”)。可以在临床试验以及给定药

剂的动物研究中测量这样的有效量。

[0348] 可以全身性施用或者可以口服施用在本文所描述的方法和组合物中有用的药剂。本文中预期的,药剂还可以静脉内(通过静脉推注(bolus infusion)或持续输注(continuous infusion))、通过吸入、鼻内、腹膜内、肌内、皮下、腔内递送,并且可以通过蠕动工具(如果需要的话)或者通过本领域技术人员已知的其他方式递送。

[0349] 在一些实施方案中,用于施用活性化合物的药学上可接受的制剂向受试者提供持续递送(如活性化合物的“缓慢释放”)。例如,在向受试者施用药学上可接受的制剂之后,制剂可以递送药剂或组合物至少一周、两周、三周或四周。优选地,用活性组合物治疗待根据本文所描述的方法治疗的受试者至少30天(通过重复施用或通过使用持续递送系统或两者)。

[0350] 如本文所使用的,术语“持续递送”旨在包含在施用后的一段时间内(优选地至少几天、一周、几周、一个月或更长时间)在体内组合物的持续递送。可以通过例如组合物随时间的持续治疗效果来证明活性化合物的持续递送(如可以通过受试者中癌症症状的持续改善或保持的改善来证明药剂的持续递送)。

[0351] 可以以单位剂量常规施用含有至少一种药剂的治疗组合物。当在对治疗组合物的提及中使用时,术语“单位剂量”指适合作为用于受试者的单位剂量的物理上独立的单元,每个单元含有经计算产生期望的治疗效果的预定量的活性材料、联同所需的生理学上可接受的稀释剂(即,载体(carrier)或媒介物(vehicle))。

[0352] 以与剂量配方相容的方式并且以治疗有效的量施用组合物。待施用的量和时机取决于待治疗的受试者、受试者的系统利用活性成分的能力和期望的治疗效果的程度。可以借助于靶向部分(如例如,抗体)或靶向脂质体技术靶向药剂。在一些实施方案中,通过使用例如由抗配体抗体(Ab)与针对特异性靶标的Ab的化学联接产生的双特异性抗体,可以使药剂靶向组织。为了避免化学缀合物的限制,抗体的分子缀合物可以用于在细胞表面分子处产生针对配体和/或嵌合抑制剂的重组双特异性单链Ab。向药剂中添加抗体容许药剂在期望的靶标位点(例如,肿瘤位点)处累加地积聚。可以采用基于抗体的靶向部分或基于非抗体的靶向部分,以将配体或抑制剂递送至靶标位点。优选地,将用于不受调控的抗原或疾病相关性抗原的天然结合剂用于该目的。

[0353] 需要施用的活性成分的精确定量取决于执业医师的判断,并且对于每个个体是特定的。然而,适合于全身应用的剂量范围在本文中公开,并且取决于施用途径。适合于施用的方案也是可变的,但特点在于初始施用、然后通过随后注射或其他施用方式以一个或多个间隔重复给药。可替代地,预期足以将血液或骨骼肌组织中的浓度保持在体内疗法规定的范围内的连续静脉内输注。

[0354] 功效测量

[0355] 可以由熟练的临床医生确定给定治疗对如本文所描述的包括异常骨生长的病症的功效。然而,如果在用包括本文所述的一种或多种结晶化合物或组合物的药剂治疗后,疾病或病症的病征或症状中的任何一种或全部以有益方式发生改变(例如,降低的骨化、异常骨生长的消退、降低的疼痛、增加活动范围等),疾病的其他临床上可接受的症状或标志物被改善或甚至减轻例如至少10%,则治疗被认为是“有效治疗”(如该术语在本文所使用的)。还可以通过个体无法恶化(如通过疾病或病症的稳定、住院或对于医学干预的需要所

评估的) (即,疾病的进展停止或至少减缓) 来测量功效。测量这些指标的方法对于本领域技术人员是已知的和/或在本文中被描述。治疗包含个体或动物(一些非限制性实例包含人或哺乳动物)中的疾病的任何治疗,并且包含:(1) 抑制疾病(例如,阻止或减缓异常骨生长的进行);或(2) 减轻疾病(例如,引起症状消退);以及(3) 预防或降低疾病发展(例如,创伤后骨化)的可能性。

[0356] 用于治疗疾病的有效量意为当向有需要的哺乳动物施用足量时足以产生对该疾病的有效治疗(如该术语在本文所定义的)的量。可以通过评估异常骨生长的物理指标(如,例如,降低的异常骨生长的尺寸、减缓的异常骨沉积、骨生长的消退、活动性改善等)来确定药剂的功效。

[0357] 药物组合物

[0358] 在某些实施方案中,本发明涉及包含式(I)的结晶化合物和一种或多种药学上可接受的赋形剂的药物组合物,以及使用这种结晶化合物和一种或多种药学上可接受的赋形剂制备的制剂。在某些实施方案中,药物制剂可用于治疗或预防本文所述的病况或疾病。在某些实施方案中,药物制剂具有足够低的热原活性以适合在人类患者中静脉内使用。在某些实施方案中,本发明还涉及适用于营养品、兽医和农业相关用途的制剂。

[0359] 在此提供了示例性的药学上可接受的赋形剂,包括例如粘合剂、崩解剂、润滑剂、矫味剂、增溶剂、悬浮助剂、乳化剂、包衣剂、环糊精和/或缓冲剂。尽管剂量可以根据患者的症状、年龄和体重、待治疗或预防的病症的性质和严重程度、给药途径和药物的形式而变化,通常对于成年人类患者推荐使用0.01至3000mg化合物的每日剂量,并且这可以以单剂量或分剂量给药。可以与载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量通常是产生治疗效果的化合物的量。

[0360] 在给定患者中治疗功效方面产生最有效结果的精确给药时间和/或组合物的量将取决于特定化合物的活性、药代动力学和生物利用度、患者的生理状况(包括年龄、性别、疾病类型和阶段、一般身体状况、对给定剂量的应答和药物类型)、给药途径等。然而,上述指南可用作微调治疗,例如,确定给药的最佳时间和/或量的基础,这仅需要由监测受试者和调整剂量和/或时机组成的常规实验。

[0361] 在某些实施方案中,给予组合物的个体是哺乳动物,例如人或非人哺乳动物。当给予动物如人时,该组合物或化合物优选作为药物组合物给药,所述药物组合物包含例如本发明化合物和药学上可接受的载体。药学上可接受的载体是本领域公知的,包括,例如,水溶液,例如水或生理缓冲盐水或其他溶剂或媒介物,例如二醇、甘油,油例如橄榄油,或可注射的有机酯。在优选的实施方案中,当这样的药物组合物用于人类给药时,特别是对于侵入性给药途径(即,避免通过上皮屏障的转运或扩散的途径,例如注射或植入),水溶液是无热原的或基本上无热原的。可以选择赋形剂,例如,以实现药剂的延迟释放或选择性地靶向一种或多种细胞、组织或器官。药物组合物可以是剂量单位形式,例如片剂、胶囊(包括分散型胶囊和明胶胶囊)、颗粒、用于重构的冻干物、粉末、溶液、糖浆、栓剂、注射剂等。该组合物还可以存在于透皮递送系统中,例如皮肤贴剂。该组合物还可以存在于适于通过眼粘膜给药局部给药的溶液中,例如滴眼剂。

[0362] 药学上可接受的载体可含有生理学上可接受的试剂,其用于例如稳定化合物,增加化合物溶解度或增加化合物的吸收,所述化合物例如本发明化合物。这些生理学上可接

受的试剂包括,例如,碳水化合物,如葡萄糖、蔗糖或右旋糖酐,抗氧化剂,如抗坏血酸或谷胱甘肽,螯合剂,低分子量蛋白质或其它稳定剂或赋形剂。药学上可接受的载体(包括生理学上可接受的试剂)的选择取决于例如组合物的给药途径。制剂或药物组合物可以是自乳化药物递送系统或自微乳化药物递送系统。药物组合物(制剂)也可以是脂质体或其他聚合物基质,其可以在其中包含例如本发明的化合物。例如,包含磷脂或其他脂质的脂质体是制备和给予相对简单的无毒的,生理学上可接受的和可代谢的载体。

[0363] 短语“药学上可接受的”在本文中用于指在合理的医学判断范围内适合用于与人类和动物的组织接触而没有过度毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症,与合理的利益/风险比相称的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0364] 本文所用的短语“药学上可接受的载体”是指药学上可接受的材料、组合物或媒介物,例如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或包封材料。在与制剂的其他成分相容并且对患者无害的意义上,每种载体必须是“可接受的”。可用作药学上可接受的载体的材料的一些实例包括:(1)糖,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;(2)淀粉,如玉米淀粉和马铃薯淀粉;(3)纤维素及其衍生物,如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;(4)粉末黄蓍胶;(5)麦芽;(6)明胶;(7)滑石;(8)赋形剂,如可可脂和栓剂蜡;(9)油,如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和豆油;(10)二醇,如丙二醇;(11)多元醇,如甘油、山梨糖醇、甘露醇和聚乙二醇;(12)酯,如油酸乙酯和月桂酸乙酯;(13)琼脂;(14)缓冲剂,如氢氧化镁和氢氧化铝;(15)海藻酸;(16)无热原水;(17)等渗盐水;(18)林格氏溶液;(19)乙醇;(20)磷酸盐缓冲溶液;和(21)药物制剂中使用的其他无毒相容性物质。在某些实施方案中,本发明的药物组合物是无热原的,即当给予患者时不引起显著的温度升高。

[0365] 术语“药学上可接受的盐”是指化合物的相对无毒的无机和有机酸加成盐。这些盐可以在化合物的最终分离和纯化过程中原位制备,或者单独通过使游离碱形式的纯化化合物与合适的有机或无机酸反应,并分离由此形成的盐来制备。代表性的盐包括氢溴酸盐、盐酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、硝酸盐、乙酸盐、戊酸盐、油酸盐、棕榈酸盐、硬脂酸盐、月桂酸盐、苯甲酸盐、乳酸盐、磷酸盐、甲磺酸盐、柠檬酸盐、马来酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、萘甲酸盐(naphthylate)、甲磺酸盐、葡庚糖酸盐、乳糖酸盐(lactobionate)、十二烷基磺酸盐和氨基酸盐等。结晶盐的制备详述于下面的实例中(参见,例如Berge等人,(1977)“Pharmaceutical Salts”, J. Pharm. Sci. 66: 1-19)。

[0366] 在其他情况下,可用于本发明方法的化合物可含有一个或多个酸性官能团,因此能够与药学上可接受的碱形成药学上可接受的盐。在这些情况下,术语“药学上可接受的盐”是指化合物的相对无毒的无机和有机碱加成盐。这些盐同样可以在化合物的最终分离和纯化过程中原位制备,或者单独通过使游离酸形式的纯化化合物与合适的碱(例如药学上可接受的金属阳离子的氢氧化物,碳酸盐或碳酸氢盐),与氨,或与药学上可接受的有机伯、仲或叔胺反应来制备。代表性的碱金属或碱土金属盐包括锂盐、钠盐、钾盐、钙盐、镁盐和铝盐等。可用于形成碱加成盐的代表性有机胺包括乙胺、二乙胺、乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、哌嗪等(参见,例如Berge等人,同上)。

[0367] 药物组合物(制剂)可以通过多种给药途径的任一种给予受试者,包括例如口服(例如,在水性或非水性溶液或悬浮液中的浸液、片剂、胶囊(包括分散型胶囊和明胶胶囊)、大丸剂、粉末、颗粒、施用于舌头的糊剂);通过口腔粘膜吸收(例如,舌下);肛门、直肠或阴

道(例如,作为栓剂、乳膏或泡沫);肠胃外(包括肌肉内、静脉内、皮下或鞘内,例如,作为无菌溶液或悬浮液);鼻;腹膜内;皮下;透皮(例如作为施用在皮肤上的贴剂);和局部的(例如,作为施用在皮肤上的乳膏、软膏或喷雾剂,或作为滴眼剂)。该化合物也可配制用于吸入。在某些实施方案中,化合物可以简单地溶解或悬浮在无菌水中。合适的给药途径和适合于该给药途径的组合物的细节可以在例如美国专利号6,110,973,5,763,493,5,731,000,5,541,231,5,427,798,5,358,970和4,172,896以及其中引用的专利中找到。

[0368] 制剂可以方便地以单位剂型提供,并且可以通过药学领域熟知的任何方法制备。可以与载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量将根据所治疗的宿主,特定的给药方式而变化。可以与载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量通常是产生治疗效果的化合物的量。通常,基于百分之百中,该量为约1%至约99%的活性成分,优选约5%至约70%,最优选约10%至约30%。

[0369] 制备这些制剂或组合物的方法包括使活性化合物(例如本发明化合物)与载体和任选的一种或多种辅助成分结合的步骤。通常,通过将本发明化合物与液体载体或细碎固体载体或两者均匀且紧密地结合,然后如果需要,使产物成形,制备制剂。

[0370] 适用于口服给药的本发明制剂可以是胶囊(包括分散型胶囊和明胶胶囊)、扁囊剂、丸剂、片剂、锭剂(lozenges)(使用调味的基质,通常是蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶)、冻干物、粉末、颗粒的形式,或作为水性或非水性液体中的溶液或悬浮液,或作为水包油或油包水液体乳液,或作为酞剂或糖浆,或作为锭剂(pastilles)(使用惰性基质,例如明胶和甘油,或蔗糖和阿拉伯胶),和/或作为漱口剂等,各自含有预定量的本发明化合物作为活性成分。组合物或化合物也可以以大丸剂、药糖剂或糊剂形式给药。

[0371] 为了制备用于口服给药胶囊(包括分散型胶囊和明胶胶囊)、片剂、丸剂、糖衣丸、粉末、颗粒等的固体剂型,将活性成分与一种或多种药学上可接受的载体如柠檬酸钠或磷酸二钙,和/或下列任何一种混合:(1)填充剂或增量剂,如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和/或硅酸;(2)粘合剂,例如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯胶;(3)保湿剂,如甘油;(4)崩解剂,如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉,海藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠;(5)溶液缓凝剂,如石蜡;(6)吸收促进剂,如季铵化合物;(7)润湿剂,例如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯;(8)吸收剂,如高岭土和膨润土;(9)润滑剂,例如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠及其混合物;(10)络合剂,如改性和未改性的环糊精;和(11)着色剂。在胶囊(包括分散型胶囊和明胶胶囊)、片剂和丸剂的情况下,药物组合物还可包含缓冲剂。类似类型的固体组合物也可用作软和硬填充的明胶胶囊中的填充剂,使用诸如乳糖(lactose)或乳糖(milk sugar)等赋形剂,以及高分子量聚乙二醇等。

[0372] 片剂可以通过压缩或模塑制成,任选地含有一种或多种辅助成分。可以使用粘合剂(例如,明胶或羟丙基甲基纤维素)、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂(例如,羧基乙酸淀粉钠或交联羧甲基纤维素钠)、表面活性剂或分散剂制备压缩片剂。模塑片剂可以通过在合适的机器中模塑用惰性液体稀释剂润湿的粉末化合物的混合物来制备。

[0373] 药物组合物的片剂和其它固体剂型,例如糖衣丸、胶囊(包括分散型胶囊和明胶胶囊)、丸剂和颗粒,可以任选地刻痕(scored)或制备成具有涂层和外壳(例如肠溶衣和在药物配方领域中熟知的其他涂层)。它们也可以配制成使其中的活性成分缓慢或受控释放,例如,使用不同比例的羟丙基甲基纤维素以提供所需的释放曲线,其它聚合物基质、脂质体

和/或微球。它们可以通过例如通过细菌截留过滤器过滤,或通过包含可以在即将使用前溶解于无菌水或一些其他无菌可注射介质中的无菌固体组合物形式的灭菌剂来灭菌。这些组合物还可以任选地含有遮光剂,并且可以是仅在或优先在胃肠道的某部分任选以延迟的方式释放活性成分的组合物。可以使用的包埋组合物的实例包括聚合物物质和蜡。如果合适,活性成分也可以是具有一种或多种上述赋形剂的微胶囊形式。

[0374] 可用于口服给药的液体剂型包括药学上可接受的乳液、用于重构的冻干物、微乳液、溶液、悬浮液、糖浆和酞剂。除活性成分外,液体剂型还可含有本领域常用的惰性稀释剂,例如水或其它溶剂、环糊精及其衍生物、增溶剂和乳化剂,如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油(特别是棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢呋喃甲醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇的脂肪酸酯,及其混合物。

[0375] 除惰性稀释剂外,本发明的组合物还可包括佐剂,如润湿剂、润滑剂、乳化剂和悬浮剂,如十二烷基硫酸钠和硬脂酸镁,或甜味剂、调味剂、着色剂、芳香剂、防腐剂或抗氧化剂。

[0376] 除活性化合物外,悬浮液可含有悬浮剂,例如乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨糖醇和脱水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂和黄蓍胶,以及它们的混合物。

[0377] 用于直肠,阴道或尿道给药的药物组合物的制剂可以栓剂形式提供,其可以通过将一种或多种活性化合物与一种或多种合适的无刺激性赋形剂或载体混合来制备,所述赋形剂或载体包括例如可可脂、聚乙二醇、栓剂蜡或水杨酸盐,在室温下为固体,但在体温下为液体,因此在直肠或阴道腔内融化并释放活性化合物。

[0378] 用于口腔给药的药物组合物的制剂可以以漱口水,口腔喷雾剂或口服软膏的形式提供。

[0379] 可选地或另外地,可以配制组合物用于经由导管、支架、线或其他腔内装置递送。通过这种装置递送可能对于递送至膀胱、尿道、输尿管、直肠或肠尤其有用。

[0380] 适用于阴道给药的制剂还包括阴道栓剂、棉塞、乳膏、凝胶、糊剂、泡沫或喷雾剂,含有本领域已知的适当载体。

[0381] 用于局部或透皮给药的剂型包括粉末、喷雾剂、软膏、糊剂、乳膏、洗剂、凝胶、溶液、贴剂和吸入剂。活性化合物可以在无菌条件下与药学上可接受的载体混合,并与可能需要的任何防腐剂,缓冲剂或推进剂混合。

[0382] 除活性化合物外,软膏、糊剂、乳膏和凝胶还可含有赋形剂,例如动物和植物脂肪、油、蜡、石蜡、淀粉、黄蓍胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅酮、膨润土、硅酸、滑石和氧化锌,或其混合物。

[0383] 除活性化合物外,粉末和喷雾剂可含有赋形剂,例如乳糖、滑石、硅酸、氢氧化铝、硅酸钙和聚酰胺粉末,或这些物质的混合物。喷雾剂可另外含有常规推进剂,例如氯氟烃和挥发性未取代的烃,例如丁烷和丙烷。

[0384] 或者,本文所述的化合物还可通过气溶胶给药。这通过制备水性气溶胶、脂质体制剂或含有该组合物的固体颗粒来实现。可以使用非水(例如碳氟化合物推进剂)悬浮液。声波喷雾器是优选的,因为它们使药剂对可导致化合物降解的剪切的暴露最小化。

[0385] 通常,通过将药剂的水溶液或悬浮液与常规的药学上可接受的载体和稳定剂一起配制来制备水性气溶胶。载体和稳定剂随特定组合物的要求而变化,但通常包括非离子表面活性剂(吐温、Pluronic、脱水山梨糖醇酯、卵磷脂、Cremophors)、药学上可接受的共溶剂如聚乙二醇、无害蛋白质如血清白蛋白、油酸、氨基酸、如甘氨酸、缓冲剂、盐、糖或糖醇。气溶胶通常由等渗溶液制备。

[0386] 透皮贴剂具有提供本发明化合物控制递送至身体的附加优点。这些剂型可以通过将活性化合物溶解或分散在适当的介质中来制备。吸收促进剂也可用于增加化合物经皮肤的通量。可以通过提供速率控制膜或将化合物分散在聚合物基质或凝胶中来控制这种通量的速率。

[0387] 眼科制剂、眼用软膏、粉末、溶液等也包括在本发明的范围内。示例性的眼科制剂描述于美国公开号2005/0080056、2005/0059744、2005/0031697和2005/004074以及美国专利号6,583,124,其内容并入本文作为参考。如果需要,液体眼科制剂具有与泪液,房水或玻璃体液相似的性质或与这些液体相容。优选的给药途径为局部给药(local administration)(例如,局部给药(topical administration),例如滴眼剂,或通过植入物给药)。

[0388] 本文所用的短语“肠胃外给药”和“胃肠外给药”是指除肠内和局部给药以外的给药方式,通常通过注射给药,包括但不限于静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、包膜下、蛛网膜下、脊柱内和胸骨内注射和输注。适于肠胃外给药的药物组合物包含一种或多种活性化合物与一种或多种药学上可接受的无菌等渗的水或非水溶液、分散液、悬浮液或乳液,或无菌粉末,其可在即将使用前重构成无菌可注射溶液或分散液,其可含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂,使制剂与预期接受者的血液等渗的溶质,或悬浮剂或增稠剂。

[0389] 本文所用的短语“全身给药”,“全身地给药”,“外周给药”和“外周地给药”是指配体、药物或其他物质除直接进入中枢神经系统的给药,使其进入患者的系统并因此经历代谢和其他类似过程,例如皮下给药。

[0390] 可用于本发明药物组合物中的合适的水性和非水性载体的实例包括水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物、植物油,如橄榄油,和可注射的有机酯,如油酸乙酯。例如,通过使用包衣材料如卵磷脂,通过在分散体的情况下保持所需的粒度,以及通过使用表面活性剂,可以保持适当的流动性。

[0391] 这些组合物还可含有佐剂,如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。通过包含各种抗菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚山梨酸等,可以确保防止微生物的作用。还可能需要在组合物中包含等渗剂,例如糖、氯化钠等。此外,可以通过包含延迟吸收的试剂如单硬脂酸铝和明胶来延长可注射药物形式的吸收。

[0392] 在某些情况下,为了延长药物的作用,希望减慢药物从皮下或肌肉注射的吸收。这可以通过使用水溶性差的结晶或无定形材料的液体悬浮液来实现。则药物的吸收速率取决于其溶解速率,而溶解速率又可能取决于晶体尺寸和结晶形式。或者,通过将药物溶解或悬浮在油媒介物中来实现胃肠外给药的药物形式的延迟吸收。

[0393] 通过在可生物降解的聚合物如聚丙交酯-聚乙交酯中形成本发明化合物的微囊化基质来制备可注射的药性持久的形式。取决于药物与聚合物的比例和所用的特定聚合物的

性质,可以控制药物释放速率。其他可生物降解的聚合物的实例包括聚(原酸酯)和聚(酸酐)。还通过将药物陷入在与身体组织相容的脂质体或微乳液中来制备药性持久的可注射制剂。

[0394] 药物的制剂可以口服、胃肠外、局部或直肠给药。当然,它们是由适合每种给药途径的形式提供的。例如,它们以片剂或胶囊形式,通过注射、吸入、眼用洗剂、软膏、栓剂、输注给药;用洗剂或软膏局部给药;和通过栓剂直肠给药。口服给药是优选的。

[0395] 为了用于本发明的方法,活性化合物可以本身或作为药物组合物给药,该药物组合物含有例如0.1-99.5% (更优选0.5-90%) 活性成分和药学上可接受的载体。

[0396] 引入方法也可由可再填装或可生物降解的装置提供。近年来,已开发出各种缓释聚合物装置并在体内测试药物的控制递送,包括蛋白质生物药物。多种生物相容性聚合物(包括水凝胶),包括可生物降解和不可降解的聚合物,可用于形成用于在特定靶位点持续释放化合物的植入物。

[0397] 这些化合物可以通过任何合适的给药途径给予人和其他动物用于治疗,包括口服、经鼻(例如通过喷雾)、直肠、阴道内、肠胃外、脑内和局部,如通过粉末、软膏或滴剂,包括口腔和舌下。

[0398] 无论选择何种给药途径,通过本领域技术人员已知的常规方法将本发明的化合物(可以合适的水合形式使用)和/或药物组合物配制成药学上可接受的剂型。

[0399] 药物组合物中活性成分的实际剂量水平可以变化,以便获得有效实现对于特定患者,组合物和给药方式的所需治疗应答而不会对患者具有毒性的活性成分的量。

[0400] 选择的剂量水平取决于多种因素,包括所用特定化合物或化合物的组合或其酯、盐或酰胺的活性、给药途径、给药时间、使用的特定化合物的排泄速率、治疗的持续时间、与所用特定化合物组合使用的其他药物、化合物和/或材料、被治疗的患者的年龄、性别、体重、病症、一般健康状况和既往医疗史,以及医学领域众所周知的类似因素。一般而言,本发明的组合物可以被提供在包含约0.1-30% w/v本文中公开的化合物的水溶液中,此外,用于肠胃外给药。典型的剂量范围为约0.01至约50 mg/kg体重每天,提供在1个单剂量或2-4个分剂量中。各分剂量可以含有相同的或不同的本发明化合物。

[0401] 具有本领域普通技能的医生或兽医可以容易地确定和开出治疗有效量的所需药物组合物。例如,医生或兽医可以以低于为了达到所需的治疗效果所需剂量的水平开始药物组合物或化合物的给药,并逐渐增加剂量直至达到所需效果。关于本发明治疗方法,化合物的“治疗有效量”是指当作为所需剂量方案的一部分给药时(给予哺乳动物,优选人),根据待治疗病症或病况或美容目的的临床上可接受的标准,例如以适用于任何医学治疗的合理的益处/风险比,缓解症状,改善病况或减缓疾病病况发作的制剂中化合物的量。通常理解的是,化合物的有效量将根据受试者的体重,性别,年龄和医疗史而变化。影响有效量的其他因素可包括但不限于患者病况的严重程度,所治疗的病症,化合物的稳定性,以及如果需要,与本发明化合物一起给予的另一类治疗剂。通过多次给予药剂可以递送更大的总剂量。确定功效和剂量的方法是本领域技术人员已知的(Isselbacher等人.(1996) Harrison's Principles of Internal Medicine 第13版, 1814-1882,并入本文作为参考)。

[0402] 通常,在本发明的组合物和方法中使用的活性化合物的合适日剂量将是有效产生

治疗效果的最低剂量的化合物的量。这种有效剂量通常取决于上述因素。

[0403] 如果需要,活性化合物的有效日剂量可以作为一个、两个、三个、四个、五个、六个或更多个亚剂量给药,在一天中以适当的间隔分开给药,任选地,以单位剂型给药。在本发明的某些实施方案中,活性化合物可以每天给药两次或三次。在优选的实施方案中,活性化合物每天给药一次。

[0404] 接受该治疗的患者是任何需要的动物,包括灵长类动物,特别是人类,以及其他哺乳动物,如马、牛、猪和绵羊;和一般的家禽和宠物。

[0405] 在某些实施方案中,本发明化合物可以单独使用或与另一种类型的治疗剂共同给予。如本文所用,短语“共同给予”是指两种或更多种不同治疗化合物的任何形式的给予,使得给予第二种化合物同时,先前给予的治疗化合物在体内仍然有效(例如,两种化合物同时在患者中有效,其可包括两种化合物的协同作用)。例如,不同的治疗化合物可以在相同的制剂中给药或在单独的制剂中同时或相继给药。在某些实施方案中,不同的治疗化合物可以在彼此相差1小时、12小时、24小时、36小时、48小时、72小时或一周内给予。因此,接受这种治疗的个体可受益于不同治疗化合物的组合效果。

[0406] 本发明包括本发明化合物的药学上可接受的盐在本发明组合物和方法中的用途。在某些实施方案中,本发明的预期的盐包括但不限于烷基、二烷基、三烷基或四烷基铵盐。在某些实施方案中,本发明的预期的盐包括但不限于L-精氨酸、benenthamine、苜星青霉素、甜菜碱、氢氧化钙、胆碱、二甲基乙醇胺、二乙醇胺、二乙胺、2-(二乙基氨基)乙醇、乙醇胺、乙二胺、N-甲基葡萄糖胺、海巴青霉素、1H-咪唑、锂、L-赖氨酸、镁、4-(2-羟乙基)吗啉、哌嗪、钾、1-(2-羟乙基)吡咯烷、钠、三乙醇胺、氨丁三醇和锌盐。在某些实施方案中,本发明的预期的盐包括但不限于Na、Ca、K、Mg、Zn或其他金属盐。

[0407] 药学上可接受的酸加成盐也可以各种溶剂合物存在,例如与水、甲醇、乙醇、二甲基甲酰胺、二甲亚砜等的溶剂合物。也可以制备这些溶剂合物的混合物。这种溶剂合物的来源可以是来自结晶溶剂,在制备或结晶的溶剂中固有的,或者是对于这种溶剂而言外来的。在一些实施方案中,所公开化合物的溶剂合物可以是二甲亚砜溶剂合物。

[0408] 润湿剂、乳化剂和润滑剂,例如十二烷基硫酸钠和硬脂酸镁,以及着色剂、脱模剂、包衣剂、甜味剂、调味剂和芳香剂、防腐剂和抗氧化剂也可以存在于组合物中。

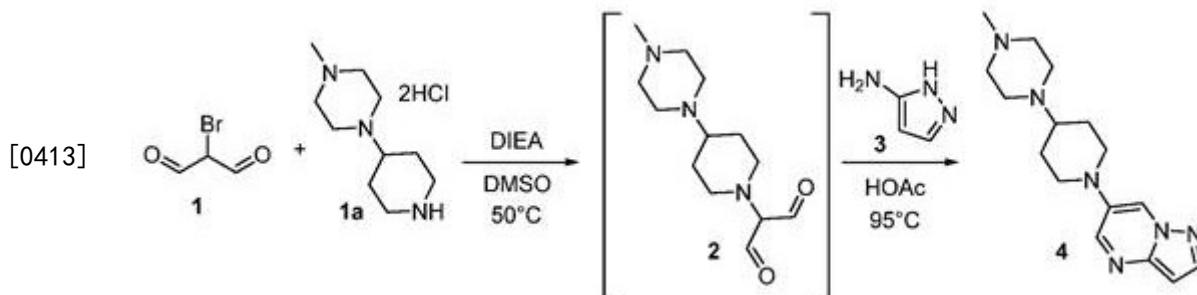
[0409] 药学上可接受的抗氧化剂的实例包括:(1)水溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸、半胱氨酸盐酸盐、硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠、亚硫酸钠等;(2)油溶性抗氧化剂,如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基化羟基苯甲醚(BHA)、丁基化羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等;和(3)金属螯合剂,如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸等。

[0410] 现在一般性地描述了本发明,通过参考以下实施例将更容易理解本发明,所述实施例仅用于说明本发明的某些方面和实施方案的目的,并不意图限制本发明。

实施例

[0411] 实施例1:式I化合物游离碱的合成

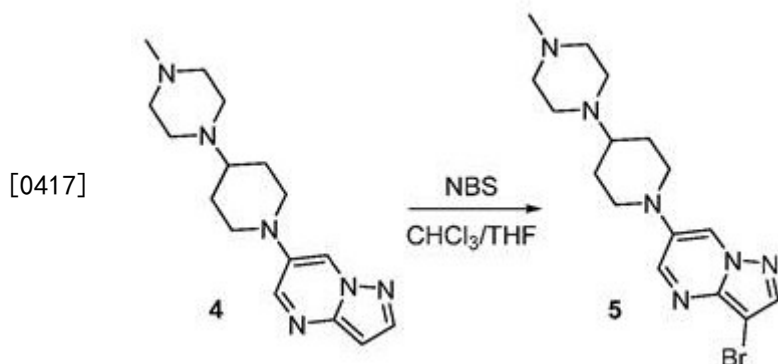
[0412] 步骤 1:化合物4的合成



[0414] 向2-溴丙二醛(700 g, 4.64 mol)在DMSO(2100 mL, 3 vol)和DIEA(889 mL, 5.1 mol)中的溶液中加入1-甲基-4-(哌啶-4-基)哌嗪(1020 g, 5.56 mol)在DMSO(1050 mL, 1.5 vol)中的溶液。将反应加热至50°C并搅拌过夜。向所得溶液中加入3-氨基吡啶(385.2 g, 4.64 mol)在DMSO(350 mL, 0.5 vol)中的40°C溶液。通过加料漏斗加入冰醋酸(1.30 L, 22.4 mol)。添加时观察到从50.8°C到63.6°C的放热。将反应加热至95°C持续6小时,冷却至室温并搅拌过夜。通过过滤除去所得固体,用DMSO(2 x 350 mL)洗涤,并转移至3L 4-颈RBF。加入MTBE(3000 mL)并将浆液搅拌3小时。过滤固体,用MTBE(2 x 700 mL)洗涤,并在55°C下真空干燥2小时。分离出505.0 g的化合物4。产率 = 36.3%

[0415] $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, 氯仿-d) δ = 8.43 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 8.09 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.94 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.57 (s, 1H), 3.55 (br d, J = 12.3 Hz, 2H), 2.73 - 2.53 (m, 7H), 2.47 (br s, 3H), 2.40 - 2.25 (m, 5H), 1.99 (br d, J = 12.7 Hz, 2H), 1.73 (dq, J = 4.0, 12.0 Hz, 3H)。

[0416] 步骤 2: 化合物5的合成

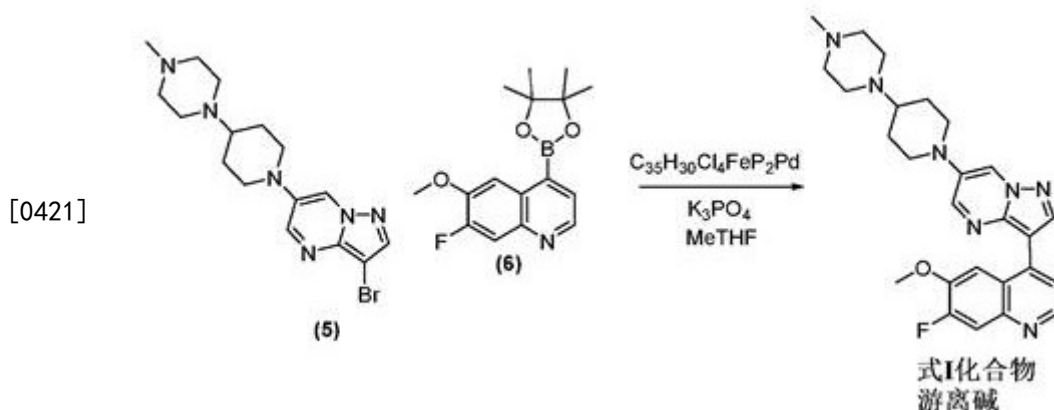


[0418] 向6-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)哌啶-1-基)吡啶并[1,5-a]嘧啶(800 g, 2.66 mol)、氯仿(9600 mL)和THF(2400 mL)的0-5°C溶液中在3小时内逐份加入固体NBS(477 g, 2.66 mol),同时保持内部温度<5°C。使所得浆液温热至室温,同时搅拌过夜。过滤反应并用氯仿(2 x 800 mL)冲洗不需要的固体。将滤液转移至分液漏斗并用饱和 NaHCO_3 (6000 mL, 7.5 vol)洗涤。分离各层,并将水层用氯仿(1600 mL, 2 vol)反萃取。合并底部有机层并用盐水(5000 mL)洗涤。顶部水层用氯仿(1600 mL, 2 vol)反萃取。浓缩底部有机层直至剩余~4 vol。浓缩的浆液用庚烷(3 x 2400 mL)进行溶剂交换,每次浓缩回4体积并将所得浆液在环境温度下搅拌过夜。过滤浆液,用MTBE(2 x 1600 mL)洗涤,并在40°C真空干燥过夜,得到889 g 棕褐色固体化合物5。产率 = 85.6%

[0419] $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, 氯仿-d) δ = 8.48 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 8.03 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.92 (s, 1H), 3.55 (br d, J = 12.3 Hz, 2H), 3.07 - 2.81 (m, 1H),

2.76 - 2.65 (m, 4H), 2.62 (br s, 4H), 2.50 - 2.27 (m, 8H), 1.98 (br d, J = 12.7 Hz, 2H), 1.73 (dq, J = 3.8, 12.0 Hz, 3H)。

[0420] 步骤3:式I化合物游离碱的合成

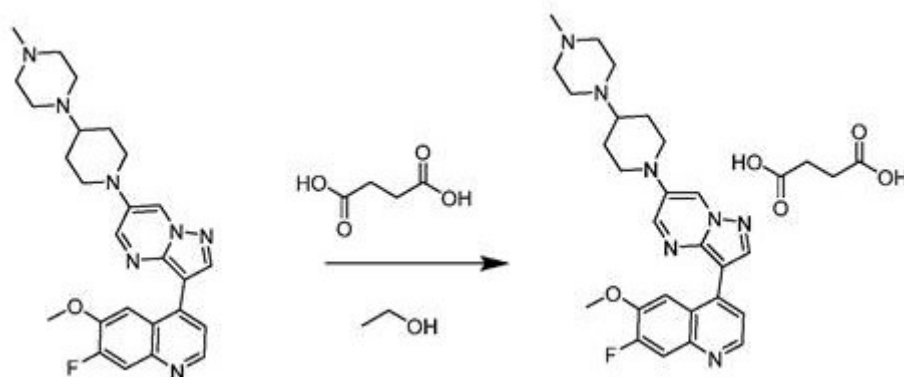


[0422] 3-溴-6-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)哌啶-1-基)吡唑并[1,5-a]嘧啶(化合物5, 500g, 1.32 mol)、7-氟-6-甲氧基-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼杂环戊-2-基)喹啉(420 g, 1.05 eq)、2-MeTHF (7.5升, 1体积)和3 M K_3PO_4 (1.32升, 2.64体积, 3eq)在烧瓶中的浆液在室温下用氮气流脱气30min。向脱气的浆液中加入 $PdCl_2(dppf)DCM$ (75.4 g),并将所得混合物用氮气脱气另外30分钟。将反应加热至60℃并在60℃下搅拌过夜。将所得混合物冷却并浓缩至最小体积。向浓缩物中加入 $CHCl_3$ (7升, 14体积)和水(3.5升, 7体积),搅拌30min后分离各层。水层(上层)用2 X 5升(2 X 10体积)的 $CHCl_3$ 萃取。将合并的有机层浓缩至最小体积并吸收至8.5升(17体积)的1:1 MeOH: $CHCl_3$ 中。向所得溶液中加入250g的Nexagen硫丙基硅胶和250g的Norit CA1碳。将所得浆液加热至50℃过夜。在室温下过滤浆液以除去固体并将所得滤液浓缩至最小体积。将稠浆吸收至8.5升(17体积)的DCM中,并向所得溶液中加入250g的Nexagen硫丙基硅胶(Thiopropyl silical gel)和250g的Norit CA1碳,并将所得浆液加热至35℃过夜。在室温下过滤浆液以除去固体。将滤液置于分液漏斗中并除去水层。所得溶液用EtOAc进行溶剂交换,其中形成固体。所得浆液用EtOAc稀释至总体积为5升(10体积)。加入MTBE(2.5升)并将所得浆液在室温下搅拌过夜。过滤固体并用2 X 2.5升(2 X 5体积)的MTBE洗涤,得到430g标题化合物。(总产率68.5%)

[0423] 1H NMR (400 MHz, 氯仿-d) δ = 8.83 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 8.57 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.22 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 7.60-7.53 (m, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.75-3.55 (m, 3H), 2.89 - 2.73 (m, 2H), 2.68 (br s, 4H), 2.60-2.39 (m, 5H) 2.33 (s, 3H), 2.16 - 1.98 (m, 2H), 1.79 (dq, J = 3.7, 11.9 Hz, 2H)。

[0424] 实施例2A:式I单琥珀酸盐的无定形化合物的合成

[0425]

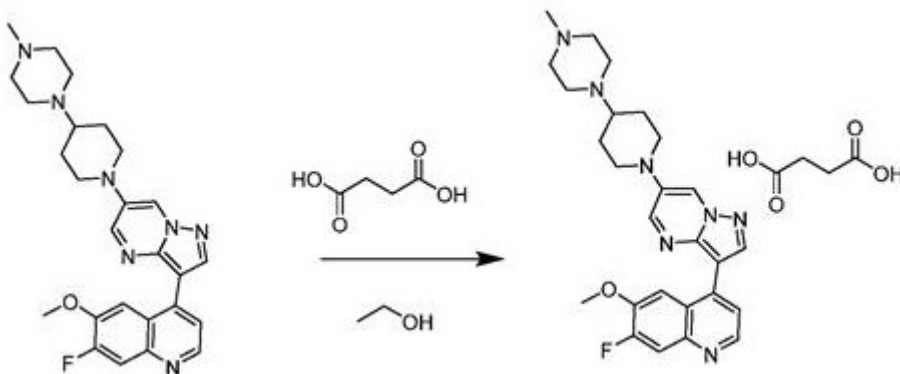


[0426] 将7-氟-6-甲氧基-4-(6-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)哌啶-1-基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)喹啉 (701.93 g, 1.48 mol) 和乙醇 (14升, 200 Proof) 在70℃下搅拌2小时。缓慢加入琥珀酸 (176 g, 1.49 mol) 和乙醇 (5升, 200 Proof) 的溶液, 并在75℃下搅拌内容物8小时以完全形成盐。将所得浆液真空浓缩至5升, 同时在浓缩过程中始终保持内部温度高于20℃。加入庚烷至14升的总体积, 并在保持内部温度高于20℃的情况下再次浓缩浆液。进行上述浓缩/重构6次以实现乙醇在庚烷中的溶剂比小于5 Wt.%, 如质子NMR (CDCl₃) 所测定。将最终的浆液冷却至20℃, 过滤固体而不洗涤。将固体放入45℃真空烘箱至恒重, 得到呈黄色固体状的标题化合物 (864.1 g, 98.6%产率)

[0427] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.83 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 8.79 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 8.66 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 8.61 (s, 1H), 7.83 (d, J = 12.3 Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.68 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.74 (br d, J = 12.6 Hz, 2H), 2.78 - 2.62 (m, 3H), 2.61 - 2.52 (m, 3H), 2.47 - 2.33 (m, 9H), 2.23 (s, 3H), 1.90 (br d, J = 11.7 Hz, 2H), 1.65 - 1.55 (m, 2H)。

[0428] 实施例2B: 式I单琥珀酸盐的无定形化合物的合成

[0429]



[0430] 将7-氟-6-甲氧基-4-(6-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)哌啶-1-基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-基)喹啉 (16 g, 0.336 mol) 和乙醇 (360 mL, 200 Proof) 在 70℃下搅拌2小时。缓慢加入琥珀酸溶液 (4.0 g, 0.339 mol和乙醇, 160 mL, 200 Proof), 并在75℃下搅拌内容物8小时以完全形成盐。将所得浆液真空浓缩至160 mL, 同时保持内部温度高于20℃ (对于正确的多晶型物很重要)。加入庚烷至总体积为160 mL, 并将浆液在20℃以上搅拌8小时。将最终浆液冷却至20℃, 过滤固体并用2 x 23 mL的1:1乙醇:庚烷洗涤。将固体置于45℃真空烘箱中并干燥至恒重以提供呈固体形式的标题化合物。(18.26 g, 产率91%)

[0431] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.83 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 8.79 (d, J =

4.6 Hz, 1H), 8.66 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 8.61 (s, 1H), 7.83 (d, J = 12.3 Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.68 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.74 (br d, J = 12.6 Hz, 2H), 2.78 - 2.62 (m, 3H), 2.61 - 2.52 (m, 3H), 2.47 - 2.33 (m, 9H), 2.23 (s, 3H), 1.90 (br d, J = 11.7 Hz, 2H), 1.65 - 1.55 (m, 2H)。

[0432] 实施例3-7的分析方法

[0433] X射线粉末衍射

[0434] X射线粉末衍射(XRPD)图在Bruker D8衍射仪上使用Cu K α 辐射(40 kV, 40 mA)、 θ -2 θ 测角仪和0.6 mm的发散度和接收狭缝以及Lynxeye检测器收集。该仪器使用经认证的刚玉(Corundum)标准(NIST 1976)进行性能检查。用于数据收集的软件是DiffraC Plus XRD Commander v2.6.1,并使用Materials Data Jade Software v 9.7.0分析和呈现数据。通过将2至50 mg样品转移到涂有薄薄一层凡士林并用玻璃板平整的零背景支架来制备样品并在环境温度下分析。在分析过程中,样品在其自身的平面内旋转。仪器参数在下表1中提供。

扫描模式	连续 PSD 快速
每步时间	1 秒(192 秒有效)
扫描范围	2° - 40° (2 θ)
步长	0.05°
样品旋转	每分钟 15 转
CuK α 辐射	40kV:40mA
主光束光学	
发散狭缝	0.6 mm
主索勒狭缝	2.5°
次光束光学	
次索勒狭缝	2.5°
检测器狭缝开口	无
防散射狭缝	3 mm
刀口	存在
检测器	2.940°

[0435]

[0436] 差示扫描量热法

[0437] 差示扫描量热法(DSC)分析使用TA Instruments Q1000 DSC,s/n 1000-0189进行。将样品称重放入铝密封盘和带有手动针孔的盖子中。使用Tzero压机将盘卷曲。从25到350°C,以10°C/分钟分析样品。使用Universal Analysis 2000, v 4.5A处理数据。

[0438] 热重分析

[0439] 热重分析(TGA)使用 TA Instruments Q50 TGA,s/n 50-0180进行。将样品装入去皮重的铂TGA盘中,并在25至350°C的温度下以10°C/分钟进行分析。使用 Universal Analysis 2000, v 4.5A处理数据。

[0440] 动态蒸气吸附/解吸

[0441] 使用Hiden Isochema, IGAsorp, s/n IGSA 126进行动态蒸气吸附/解吸(DVS)分析。将样品装入仪器上的去皮重的篮中,并在40°C下干燥1小时。然后在25°C下按以下百分

比相对湿度(%RH)步骤分析样品:吸附(%RH):0.0、10.0、20.0、30.0、40.0、50.0、60.0、70.0、80.0、90.0、95.0,解吸(%RH):90.0、80.0、70.0、60.0、50.0、40.0、30.0、20.0、10.0、0.0。

[0442] 实施例3A:式I化合物游离碱表征

[0443] 使用上面详述的XRPD技术,式I化合物游离碱是结晶的并且表现出以下峰:第4页图3。此外,热数据显示游离碱是无水和非溶剂化的(图4)。DSC显示出急剧吸热,起始温度为238.6°C,表明发生了熔化。在TGA中观察到最小的重量损失(0.4%),直到在266.3°C分解。DVS数据表明该材料不吸湿,重量增加和损失为0.5%,解吸时有轻微滞后(图5)。在DVS分析后,XRPD没有观察到变化。

[0444] 实施例4A:式I单琥珀酸盐形式A的结晶化合物的合成

[0445] 将2g式I化合物游离碱加入到60mL容器中。将0.5g琥珀酸溶解在30mL THF中,然后将酸溶液加入到游离碱固体中并在环境温度下搅拌过夜。通过使用0.45 μm尼龙滤管离心分离固体并在XRPD(图6)和NMR(图7)分析之前在真空下干燥约2小时。两种分析都表明形式A是从scale-up中分离出来的。2.6 ppm处的峰归因于一摩尔琥珀酸。scale-up的产率为88%。

[0446] 实施例4B:式I单琥珀酸盐形式A和C的结晶化合物的合成

[0447] 将2g式I化合物游离碱加入到20mL闪烁瓶中。将0.5g琥珀酸溶解在20mL EtOH中,然后将酸溶液加入到游离碱固体中并在环境温度下搅拌过夜。通过使用0.45 μm尼龙滤管离心分离固体并在XRPD分析(图8)之前在环境条件下干燥,这表明形式A是从scale-up中分离出来的。scale-up的产率为79%。该材料还通过DVS进行分析(图9)。DVS表明该材料具有吸湿性,重量增加和损失为38%,解吸时有明显的滞后现象。这类似于实施例3A的产品。该材料在80% RH以下不吸湿。DVS后XRPD分析(图10)表明材料变得高度无序并转化为水合物形式C。

[0448] 实施例4C:式I单琥珀酸盐形式A和B的结晶化合物的合成

[0449] 将100mg式I化合物游离碱加入到1打兰瓶中。将25mg琥珀酸溶解在1mL EtOH中,然后将酸溶液加入到游离碱固体中并浆化1天。通过使用0.45 μm尼龙滤管离心分离固体并在XRPD分析之前在环境条件下干燥,这表明该材料是形式A和形式B的混合物(图11)。

[0450] 实施例5:多晶型物溶剂筛选研究

[0451] 最初进行了30个实验作为式I化合物单琥珀酸盐的稳定多晶型物筛选的一部分,并在表2中详述,表3给出了从式I化合物单琥珀酸盐开始并使用促进形成更稳定的多晶型物的结晶技术进行的十九个实验,如在长时间内的缓慢冷却、缓慢蒸发、蒸气扩散和浆化。表4.3给出了从游离碱和不同比例的琥珀酸开始研究式I化合物琥珀酸盐形成的十一个实验,以确定是否存在任何其他化学计量。

[0452] 稳定的多晶型物和盐形成实验产生了形式A、形式B、形式C或形式的混合物。形式C可以是水合物,因为它是由含有水或已知含有水的溶剂(即乙醇或THF)的系统产生的。形式B被表征为一种无水多晶型物,它来自筛选过程中的各种条件和溶剂系统。所有多晶型物均被证实为具有式I化合物游离碱和琥珀酸的1:1化学计量盐。没有鉴定出琥珀酸盐的其他化学计量。

[0453] 表2:式(I)化合物单琥珀酸盐的多晶型物筛选研究

[0454]	溶剂	实验条件	观察结果	XRPD结果
--------	----	------	------	--------

CHCl ₃	尝试从55℃缓慢冷却至室温	稀浆液	形式B
二噁烷	从65℃缓慢冷却至室温	澄清溶液然后沉淀	形式A + 形式B
EtOAc	尝试从65℃缓慢冷却至室温	稀浆液	形式A + 形式B
EtOH	浆化, RT, 6 d	黄色浆液	形式A
EtOH	使用庚烷进行蒸气扩散	黄色浆液	形式A
IPA	尝试从65℃缓慢冷却至室温	稀浆液	形式A
MeOH	浆化, RT, 6 d	黄色浆液	形式A
MeOH	使用MTBE进行蒸气扩散	黄色浆液	形式A
THF	浆化, RT, 6 d	黄色浆液	形式A
水	从55℃缓慢冷却至冻结, 然后快速蒸发	浓稠的粘性凝胶, 不含固体	-
水	RT浆化	浓稠的粘性凝胶, 不含固体	-
-	97% RH Stress, RT	深黄色固体	形式C, 无序
20:80 THF/H ₂ O (a _w =0.96)	浆化, RT, 6 d	粘性固体, 无法分离	-
50:50 EtOH/H ₂ O (a _w =0.84)	从55℃缓慢冷却至冻结	澄清溶液然后粘性固体, 无法分离	-
90:10 丙酮/H ₂ O (a _w =0.71)	浆化, RT, 6 d	黄色浆液	形式B + 形式C
90:10 丙酮/H ₂ O (a _w =0.71)	从55℃缓慢冷却至 RT	澄清溶液然后沉淀	形式C, 无序
90:10 EtOH/H ₂ O (a _w =0.53)	浆化, RT, 6 d	黄色浆液	形式B + 形式C
90:10 EtOH/H ₂ O (a _w =0.53)	从55℃缓慢冷却至冻结	澄清溶液然后沉淀	形式B
98:2 IPA/H ₂ O (a _w =0.28)	浆化, RT, 6 d	黄色浆液	形式A

[0455] 表 3: 式 (I) 化合物游离碱和琥珀酸的成盐实验

[0456] 溶剂	实验条件	观察结果	XRPD结果
-----------	------	------	--------

丙酮	1:1 KER-047/琥珀酸,加热至 55°C,冷却至室温,分离固体,在室温真空下干燥	稀浆液	形式A
ACN	1:1 KER-047/琥珀酸,加热至 55°C,冷却至室温,分离固体,在室温真空下干燥	稀浆液	形式A
EtOH	1:1 KER-047/琥珀酸,加热至 55°C,冷却至室温,分离固体,在室温真空下干燥	澄清溶液然后沉淀	形式A + 少量的形式C
EtOH	1:2 KER-047/琥珀酸,加热至 65°C,冷却至室温,分离固体	澄清溶液然后沉淀	形式A
EtOH	2:1 KER-047/琥珀酸,加热至65°C,冷却至室温,分离固体	澄清溶液然后沉淀	形式A + 少量的形式C
EtOH	1:6 KER-047/琥珀酸,加热至65°C,冷却至室温,分离固体	稀浆液	形式B
EtOH	1:1 KER-047/琥珀酸,将 100 mg API 在 5 mL EtOH 中加热至 65°C,在 65°C下加入 5 mL EtOH 中的 25 mg 酸,加入形式 A的晶种,SC至 RT	澄清溶液然后沉淀	形式A

EtOH	1:1 KER-047/琥珀酸,将100 mg API在5 mL EtOH中加热至 65°C,在65°C下加入5 mL EtOH中的25 mg 酸,加入形式B的晶种,SC至 RT	澄清溶液然后沉淀	形式A
THF	1:2 KER-047/琥珀酸,加热至 65°C,冷却至室温,分离固体,在室温真空下干燥	浓稠浆液	形式B
THF	2:1 KER-047/琥珀酸,加热至 65°C,冷却至室温,分离固体,在室温真空下干燥	稀浆液	形式A + 少量的形式C
EtOH	500 mg游离碱在10 mL EtOH中,在70°C下搅拌3.5小时,125 mg琥珀酸在4 mL EtOH中,在75°C下加热6小时,急冷至冷冻	黄色浆液然后在加入酸后,溶液澄清,然后开始形成黄色沉淀,分离后为黄色固体	形式A

[0457] 实施例6:稳定的多晶型物溶剂筛选研究

[0458] 使用式 (I) 化合物形式A作为起始材料,下表4中的实验确定了形式A和形式B之间的差异,因为两者都是无水的。探索了改变乙醇和庚烷的比例以及这些溶剂的温度条件,因为这些被选为最终结晶条件。使用促进更稳定的多晶型物形成的结晶技术进行了额外的实验,如在长时间内缓慢冷却和浆化。还进行了其他针对亚稳态形式的实验,如碰撞沉淀 (crash precipitation)、碰撞冷却 (crash cool) 和快速蒸发技术。

[0459] 除了形式A、B和C外,混合物中的一种新多晶型物被鉴定为形式D。根据表征数据,该物质可能是一种水合物。形式C的无序XRPD图与结晶度更高的形式D不同。

[0460] 表4:从式 (I) 化合物单琥珀酸盐形式A开始的多晶型物筛选研究

[0461]

溶剂	实验条件	观察结果	XRPD结果
CHCl ₃	55°C浆化,冷却至冻结	黄色浆液	形式B

CH Cl ₃	将浆液加热至55℃,隔离热	黄色浆液	形式B
CH Cl ₃	RT浆化,3天	黄色浆液	形式B
Et OA c	从70℃急冷至干冰/IPA温度,分离固体	澄清溶液,黄色固体破碎,然后是粘性黄色固体	停止
Et OA c	从75℃急冷至冷冻,然后快速蒸发,循环1X	澄清溶液然后黄色固体	形式A
Et OH	低于环境温度浆化,3天	黄色浆液	形式A
Et OH	尝试使用庚烷进行快速沉淀,然后冷冻	澄清溶液然后黄色沉淀	形式A + 形式D
Et OH	环境温度浆化,3 d	黄色浆液	形式A
Et OH	40℃浆化,3 d	黄色浆液	形式A
Et OH	加热至70℃,过滤,以1:1的比例加入庚烷,冷冻,然后快速蒸发	澄清溶液然后黄色沉淀	形式A + 形式B
Et OH	加热至70℃,过滤,以1:5的比例加入庚烷,冷冻,然后快速蒸发	澄清溶液然后黄色沉淀	形式A + 形式B
Et OH	加热至70℃,过滤,以1:10的比例加入庚烷,冷冻,然后快速蒸发	澄清溶液然后黄色沉淀	形式B + 形式D
Et OH	加热至70℃,过滤,以1:20的比例加入庚烷,冷冻,分离固体	澄清溶液然后黄色沉淀,分离时呈粘性黄色固体	停止
Et OH	加热至70℃,过滤,以1:5的比例加入庚烷,冻结	澄清溶液然后黄色沉淀	形式A
Et OH	加热至70℃,过滤,以1:5的比例加入庚烷,室温	澄清溶液然后黄色沉淀	形式A
Me OH	低于环境温度浆化,3天	黄色浆液	形式A + 形式B
Me OH	环境温度浆化,3 d	黄色浆液	形式A + 形式B
Me OH	40℃浆化,3 d	黄色浆液	形式A + 形式B
TH F	从60℃急冷至冷冻,然后快速蒸发,循环1X	澄清溶液然后黄色固体	形式A + 少量的形式B

[0462] 形式A是无水和非溶剂化的结晶固体(图12)。DSC显示出急剧吸热,起始温度为

184.3°C (图13)。在TGA中观察到最小的重量损失 (0.5%),直到在201.1°C分解。

[0463] 形式B是结晶性差的固体,无水且未溶剂化(图14)。DSC在138.6°C显示出一个小的吸热,随后是急剧吸热,起始温度为169.6°C。需要热台显微镜来确定第一个小吸热事件的性质。在TGA中观察到最小的重量损失 (0.9%),直到在178.0°C分解(图15)。DVS数据表明该材料轻微吸湿,重量增加和减少12%,解吸时有轻微滞后(图16)。尽管形式B整体吸收的水分较少,但即使在较低的相对湿度下,形式B的水分增加也会立即开始。DVS后XRPD分析也与形式B一致(图17)。质子NMR中的化学位移表明该材料与化学结构一致,不存在残留溶剂(图18)。2.6 ppm处的峰归因于一摩尔琥珀酸。

[0464] 形式C是水合或溶剂化的无序材料(图19)。DSC显示出初始宽吸热峰,最大值在83.7°C,随后是另一个吸热峰,最大值在120.8°C,紧随其后的是最大值在134.8°C的放热峰。观察到最终的急剧吸热,起始温度为181.8°C。这表明形式C可能会去溶剂化并重结晶为形式A,其熔化温度为184°C(图20)。质子NMR中的化学位移与化学结构一致,不存在残留溶剂,表明形式C确实是水合物(图21)。2.6 ppm处的峰归因于一摩尔琥珀酸。

[0465] 如上所述获得形式D作为与形式A或形式B的混合物,如图22中所示的比较XRPD谱中的箭头所示。使用乙醇或庚烷获得形式D。热数据显示形式D是水合或溶剂化的(图23)。DSC显示出初始宽吸热峰,最大值在49.8°C,随后是一个小幅放热峰,最大值在132.3°C,紧随其后的是一个最大值在134.8°C的放热峰。观察到最终的急剧吸热,起始温度为182.7°C。因此,形式D可能会去溶剂化并重结晶为形式A,其熔化温度为184°C。由于该样品还包含形式A的混合物,因此存在可能促进重结晶的形式A晶种。质子NMR中的化学位移与化学结构一致,几乎不存在残留溶剂(按重量计1.5% EtOH),表明形式D可能是水合物(图24)。2.6 ppm处的峰归因于一摩尔琥珀酸。

[0466] 实施例7:式I化合物形式A和形式B竞争性浆化

[0467] 为了确定无水形式A和形式B之间热力学稳定的多晶型物,在三种不同的溶剂系统中进行竞争性浆化制备:乙醇、四氢呋喃和2-丁酮(MEK)/水(95:5)。每个溶剂系统都在三种不同的温度下进行评估:5°C、环境温度(RT)和40°C,如表5所示。乙醇和四氢呋喃的选择基于材料的溶解度。MEK被选为潜在的工艺溶剂,并加入水以提高溶解度。

[0468] 表5:形式A和形式B竞争性浆化第1部分

[0469]

溶剂	实验条件	观察结果	XRPD结果
EtOH	5°C,浆化5天	黄色浆液	形式A + 形式B
THF	5°C,浆化5天	黄色浆液	形式A + 形式B
MEK/H2O 95:5	5°C,浆化5天	黄色浆液	形式C + 形式B, 高度无序
EtOH	RT,浆化5天	黄色浆液	形式A + 形式B
THF	RT,浆化5天	黄色浆液	形式A + 形式B
MEK/H2O 95:5	RT,浆化5天	黄色浆液	形式C + 形式B, 高度无序
EtOH	40°C,浆化5天	黄色浆液	形式A
THF	40°C,浆化5天	黄色浆液	形式A + 形式B + 少量的形式C
MEK/H2O 95:5	40°C,浆化5天	黄色浆液	形式C + 形式B, 高度无序

[0470] 添加5%的水导致部分转化为水合物形式C。使用已知含水的溶剂,如THF,也导致部分转化为形式C。因此,额外的竞争性浆化在三个额外的溶剂系统中进行:乙醇/庚烷(1:

5)、乙酸乙酯/水 (97:3) 和异丙醇/水 (99:1)。乙醇/庚烷系统在-15℃、5℃、环境温度 (RT) 和40℃下进行评估。含水系统仅在环境温度下进行评估。结果如下表6所示。浆化进行7天而不是5天,如在上述浆化中所做的。形式D也包含在含水的竞争性浆化中。

[0471] 表6:形式A和形式B竞争性浆化第2部分

溶剂	实验条件	观察结果	XRPD 结果
EtOH/庚烷 1:5	形式 A + 形式 B 浆化, 40℃, 7天	黄色浆液	形式 A + 少量的形式 B
	形式 A + 形式 B 浆化, RT, 7天	黄色浆液	形式 A + 少量的形式 B
	形式 A + 形式 B, 5℃, 7天	黄色浆液	形式 A + 少量的形式 B
	形式 A + 形式 B 浆化, -15℃, 7天	黄色浆液	形式 A + 少量的形式 B
EtOAc/水 97:3 (a _w =0.93)	形式 A + 形式 B + 形式 D 浆化, RT, 7天	深黄色浆液	形式 C
IPA/水 99:1 (a _w =0.13)	形式 A + 形式 B + 形式 D 浆化, RT, 7天	黄色浆液	形式 A

[0473] 上述结果表明,随着时间的推移,由于与经5天进行的浆化相比,在形式B的存在下减少,因此形式A是最稳定的多晶型物。设计研究的宽温度范围 (~40℃至-15℃) 来确定形式A和形式B之间是否存在临界转变温度。尽管形式A具有较高的熔化吸热事件,但形式B的熔化热更高,因此热力学稳定性可能取决于形式A。

[0474] 97:3 EtOAc/水浆化导致完全转化为形式C,然而99:1 IPA/水浆化导致形式A。这些数据表明,在低水活度下,无水形式A在热力学上最稳定。在高水活度下,水合物形式C更占优势。

[0475] 实施例8:血清铁水平

[0476] 该研究评估了施用形式A后的血铁参数。8周大的健康雄性Sprague Dawley大鼠每天通过口服管饲法,以1和2.5 mg的剂量使用媒介物或形式A给药。给药90天后,终止研究并采集血清样品用于分析铁参数。使采集的血液在室温下凝结,然后在离心机中离心并等分血清。使用Cobas 6000 (Roche) 血液化学分析仪测定血清铁和不饱和铁结合能力 (UIBC)。转铁蛋白饱和度计算为总铁结合能力与总血清铁水平的百分比。

[0477] 实施例9:形式A对铁剂难治性缺铁性贫血的影响

[0478] 形式A对铁剂难治性缺铁性贫血 (IRIDA) 的影响使用IRIDA小鼠模型测定。简而言之,每3天向8周大的C57BL/6小鼠静脉注射一次靶向荧光素酶 (对照) 或TMPRSS6 (0.75 mg/kg) 的脂质封装siRNA。小鼠接受siRNA治疗,直到接受TMPRSS6 siRNA的同生群 (cohort) 增加了铁调素并降低了血清血红蛋白和血清铁时。此时,小鼠被进一步随机化以接受媒介物或形式A。小鼠在第一次siRNA给药后12天被安乐死。收集全血并测定血液学参数。此外,收集血清并通过ELISA测定铁调素浓度,通过比色测定法测定总铁含量。

[0479] 并入作为参考

[0480] 本文提及的所有出版物和专利均整体并入本文作为参考,就好像每个单独的出版物或专利被具体地和单独地指示为并入作为参考一样。在发生冲突的情况下,以本申请 (包括本文的任何定义) 为准。

[0481] 等价物

[0482] 虽然已经讨论了本发明的特定实施方案,但上述说明书是说明性的而非限制性的。在阅读本说明书和下面的权利要求书后,本发明的许多变化对于本领域技术人员来说将变得显而易见。本发明的全部范围应通过参考权利要求书及其等价物的全部范围和说明书以及这些变化来确定。

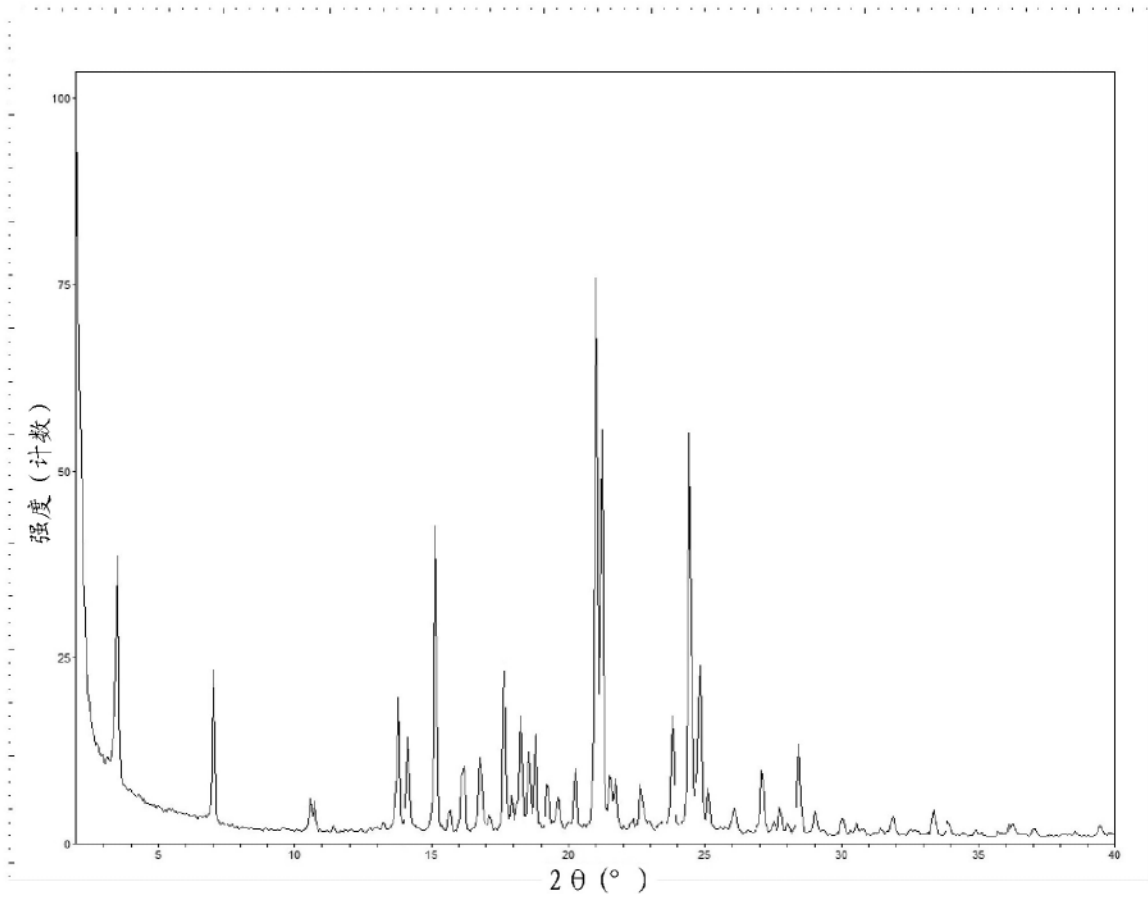


图 1

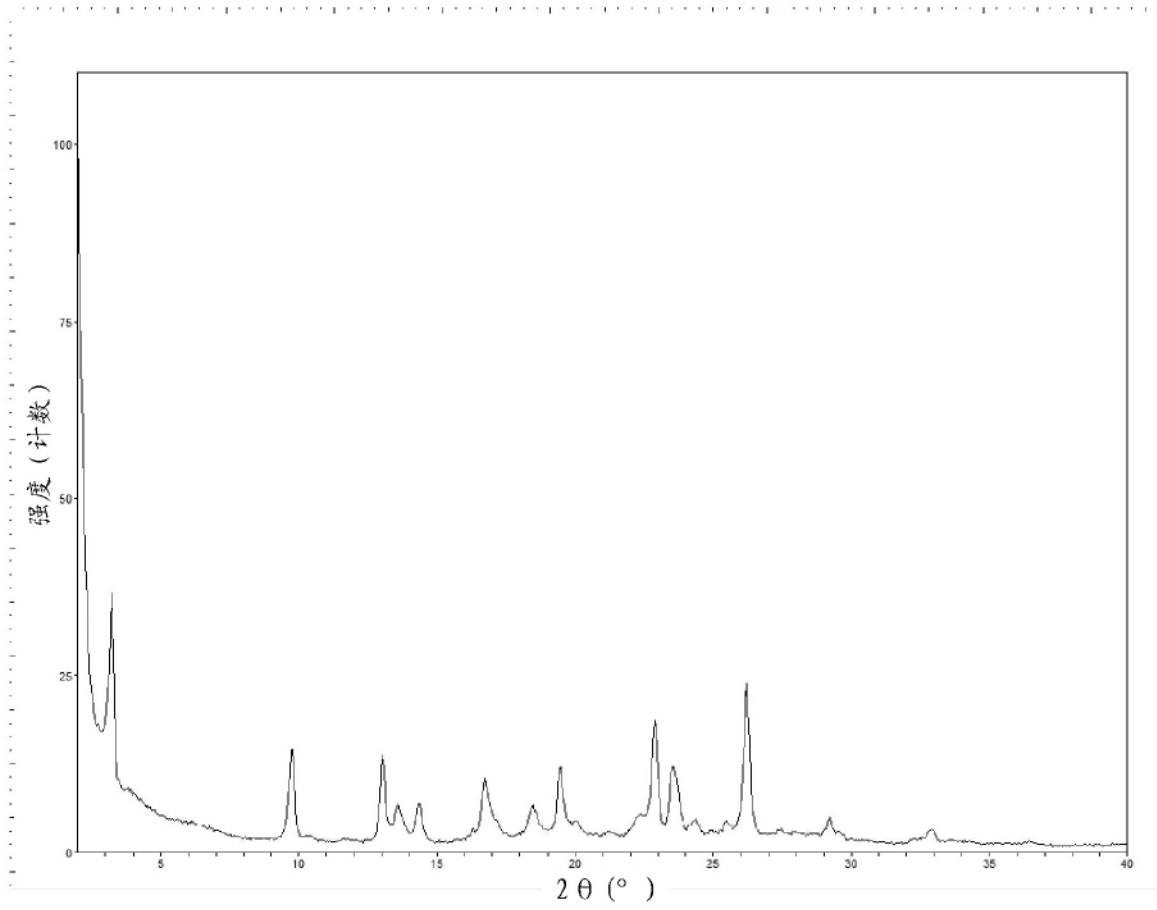


图 2

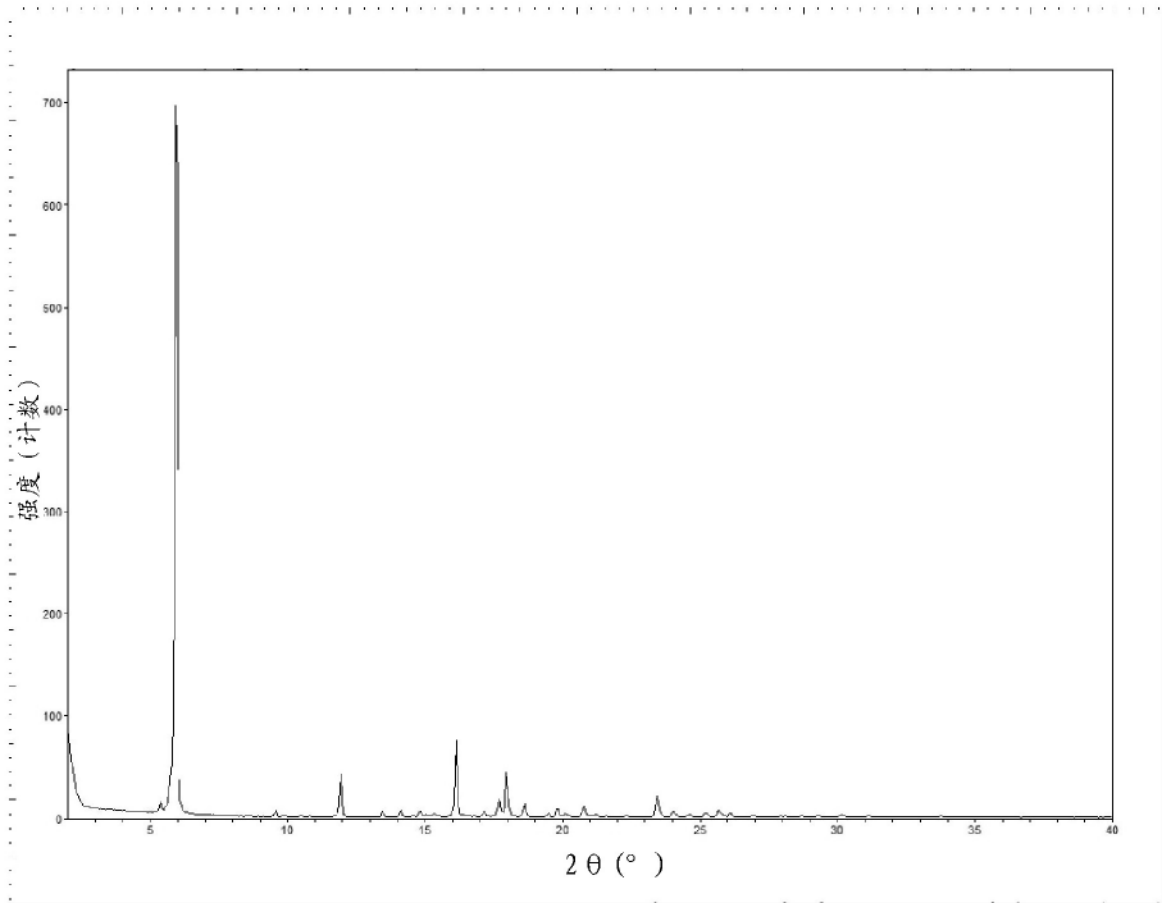


图 3

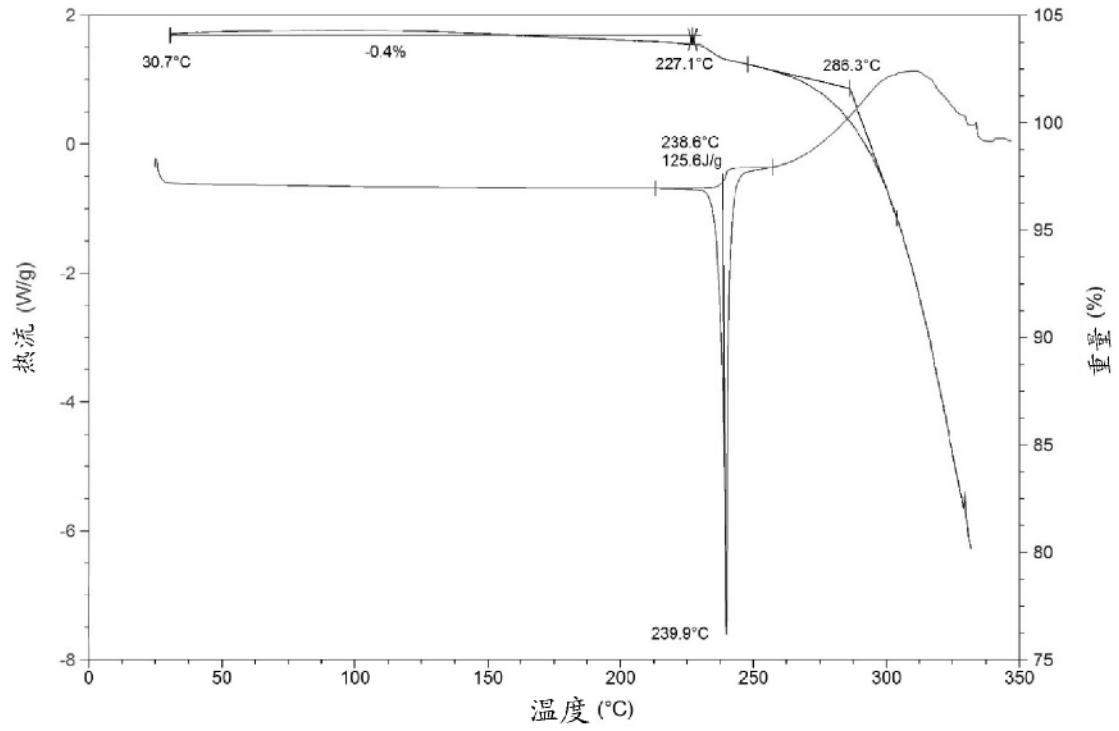


图 4

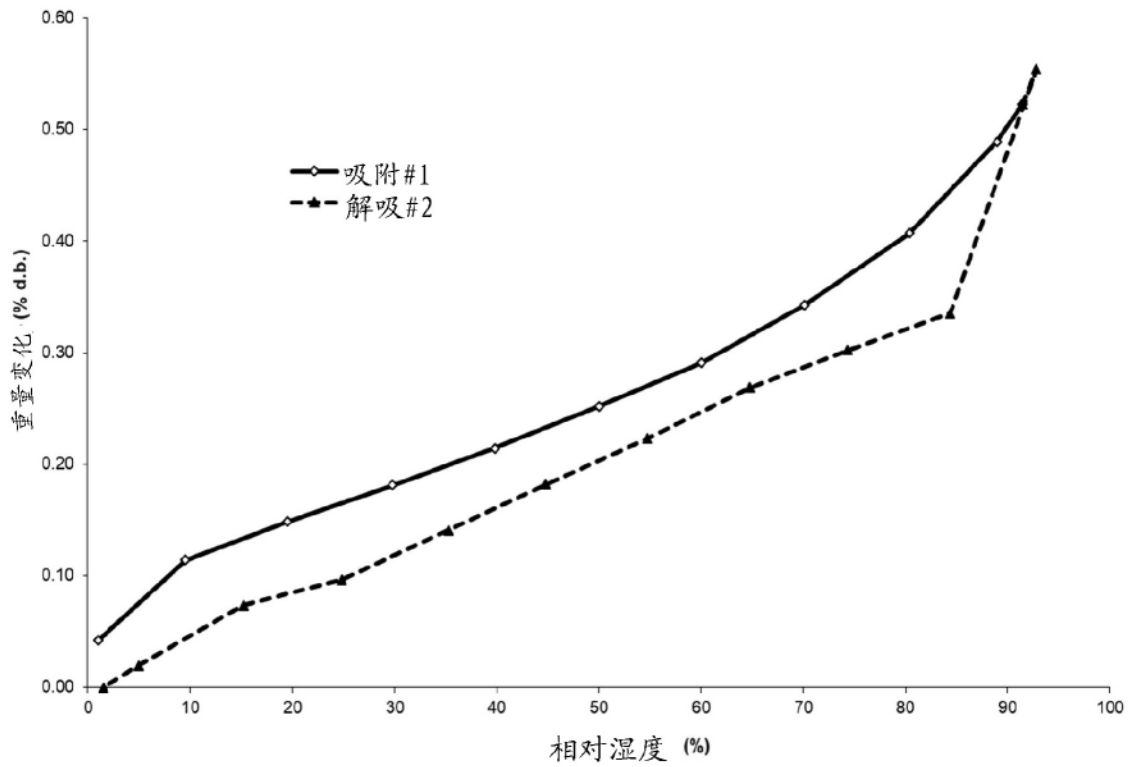


图 5

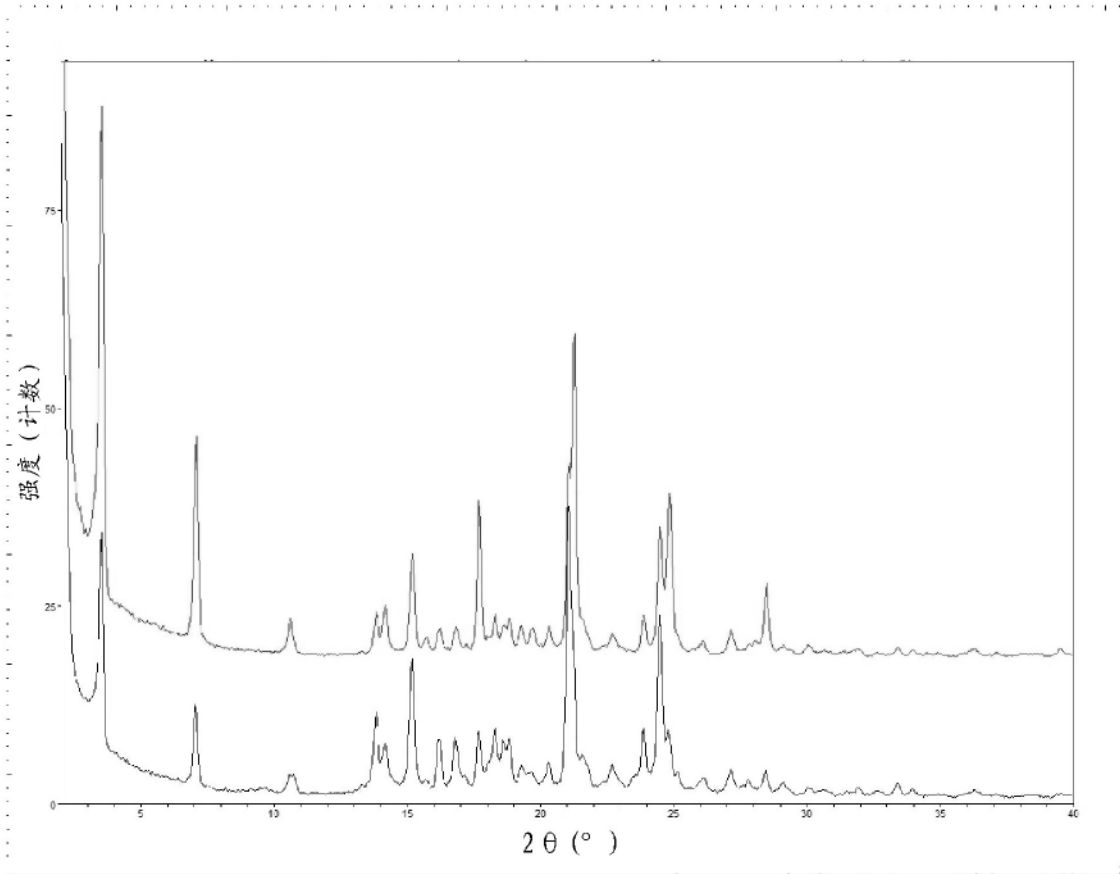


图 6

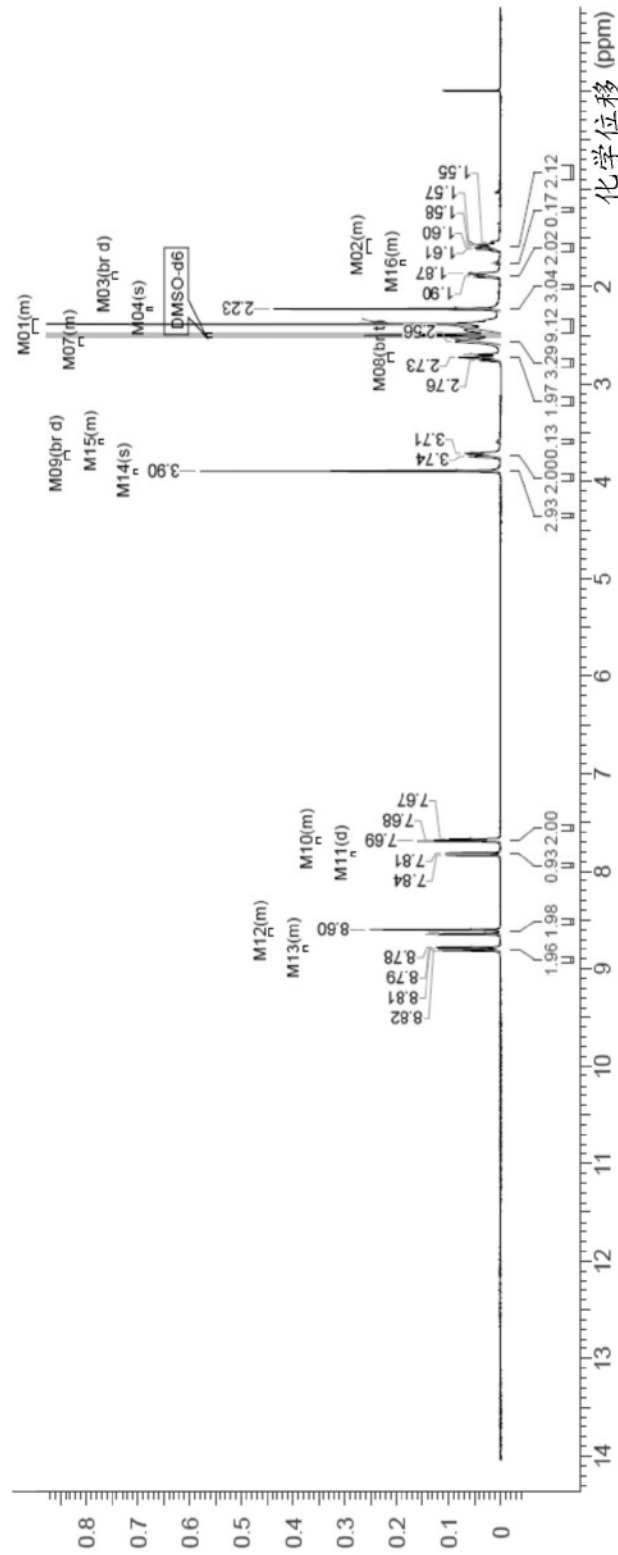


图 7

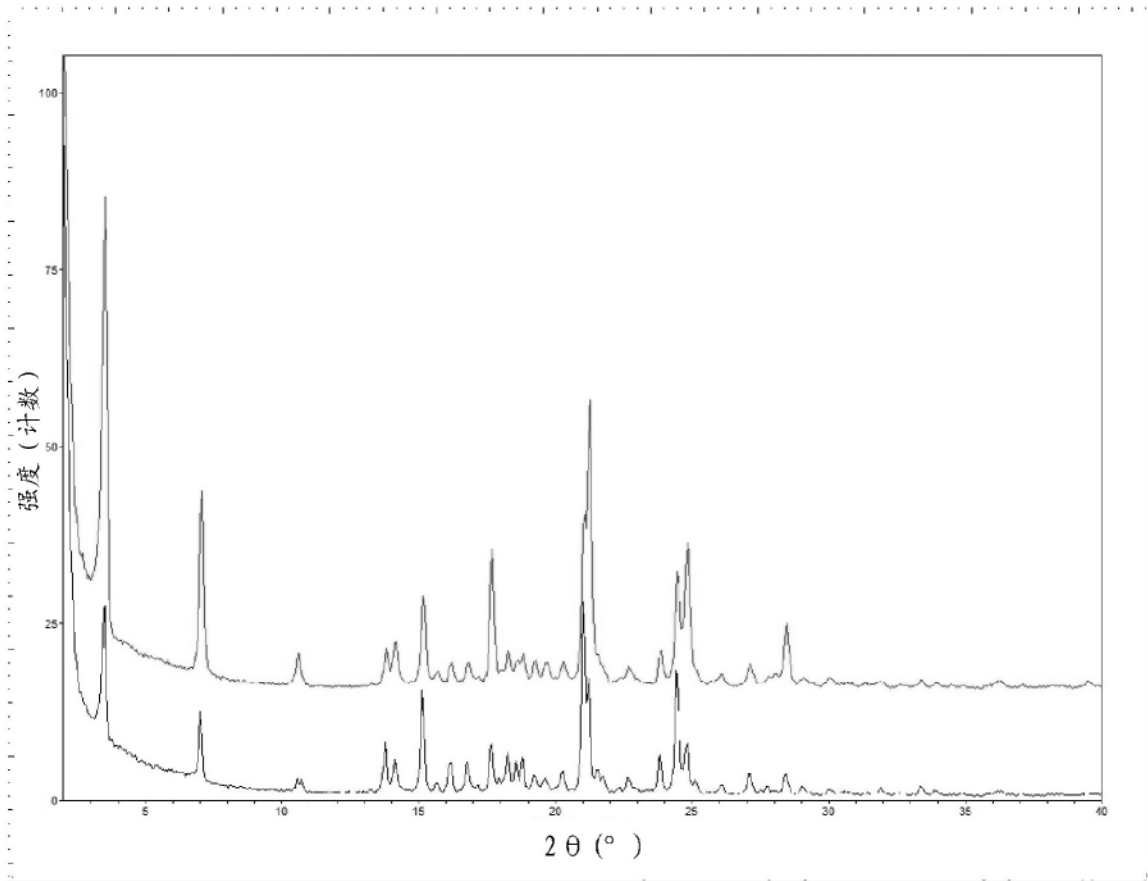


图 8

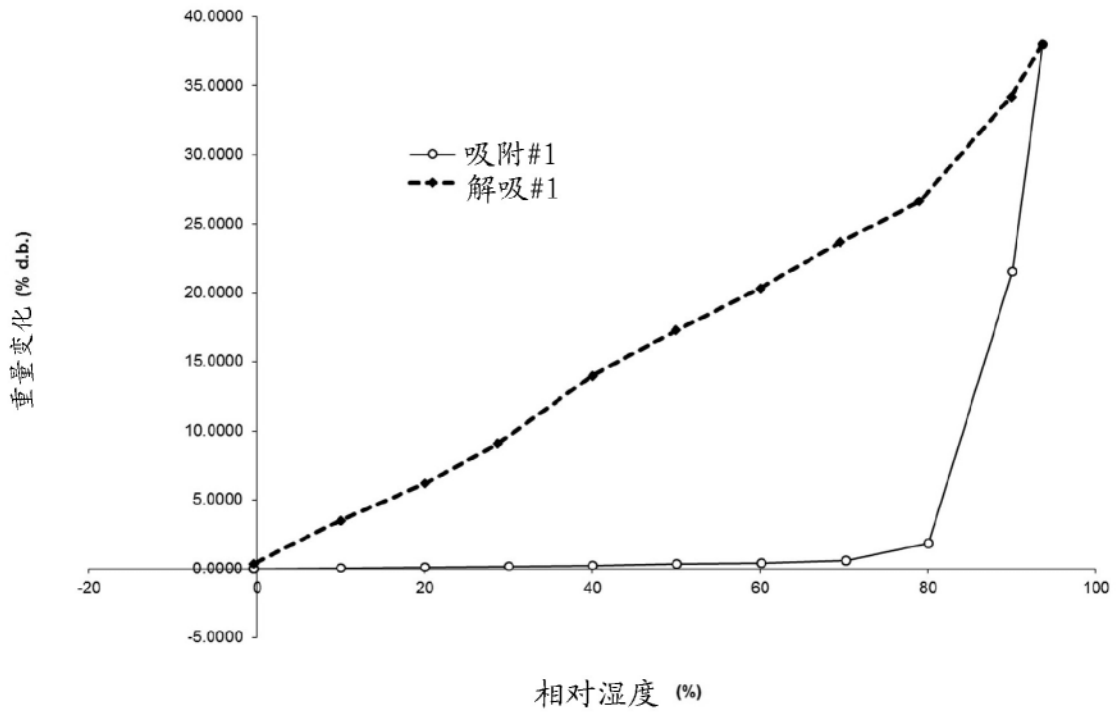


图 9

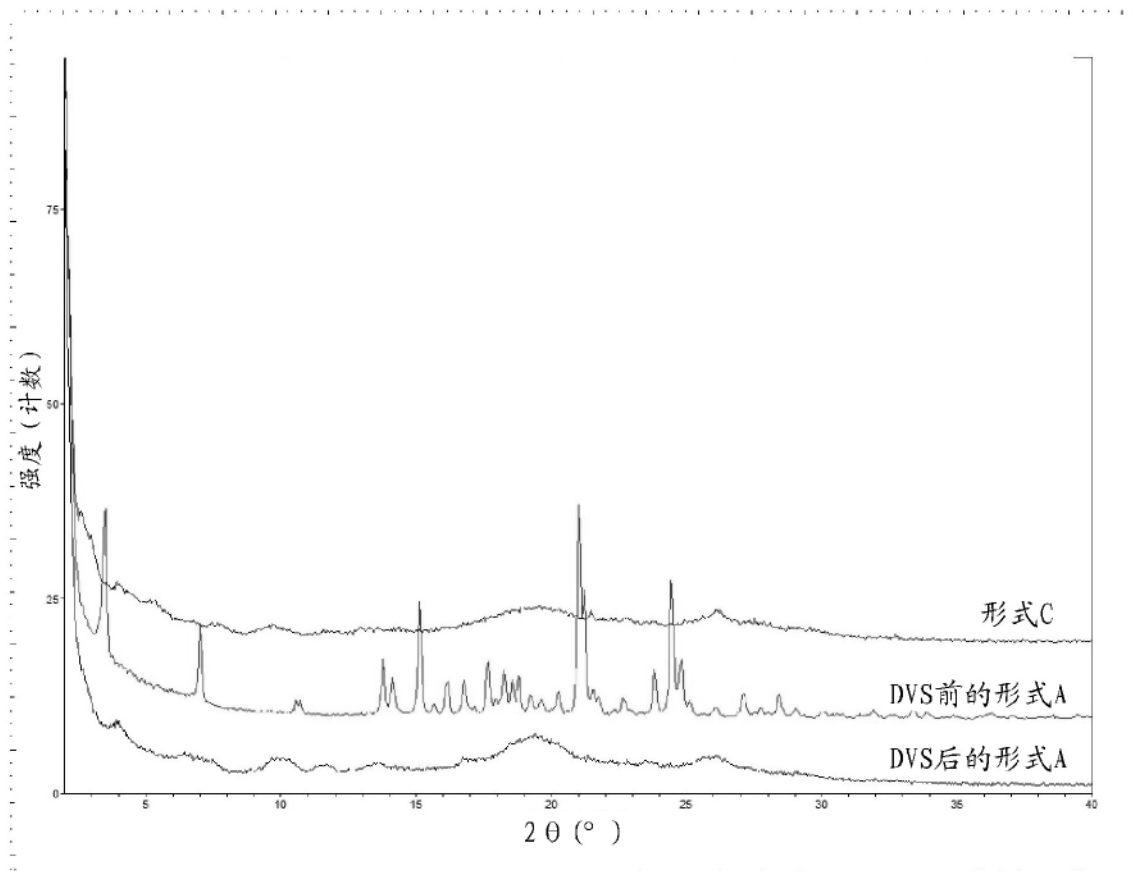


图 10

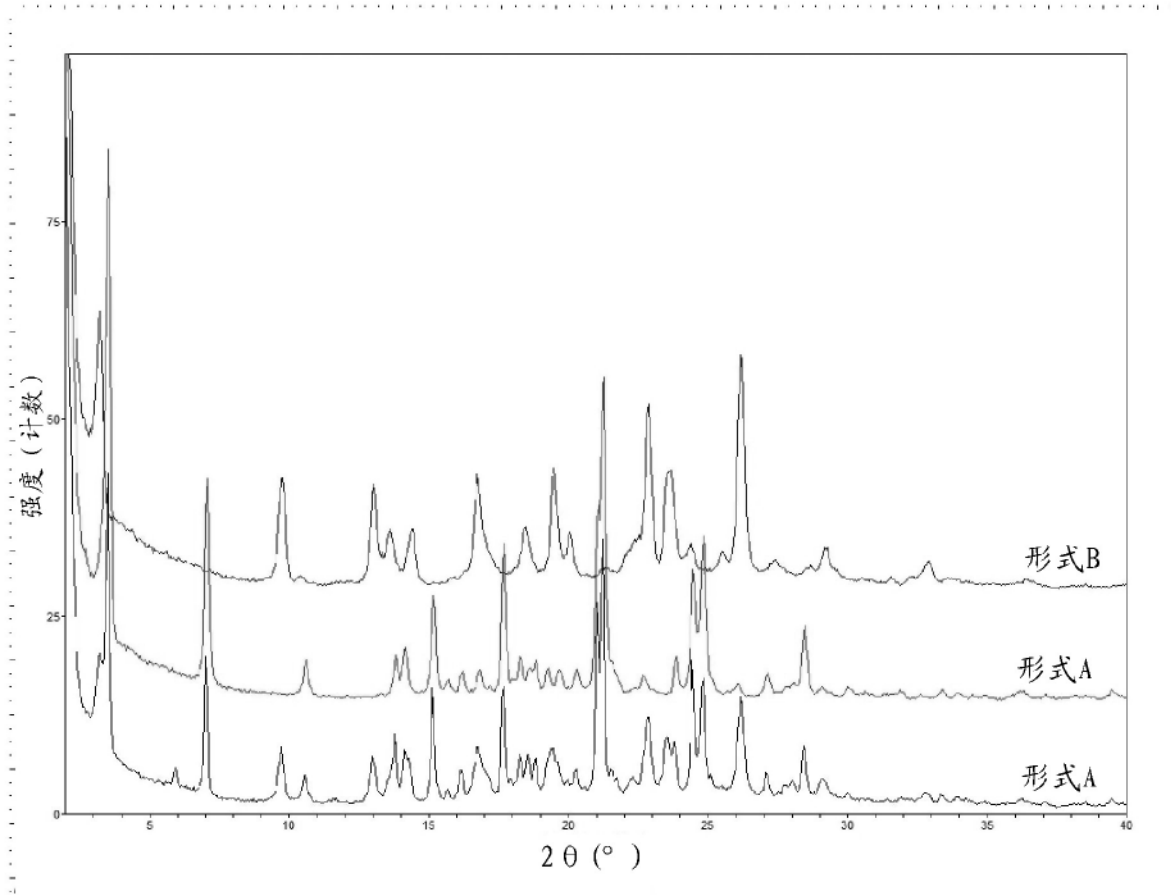


图 11

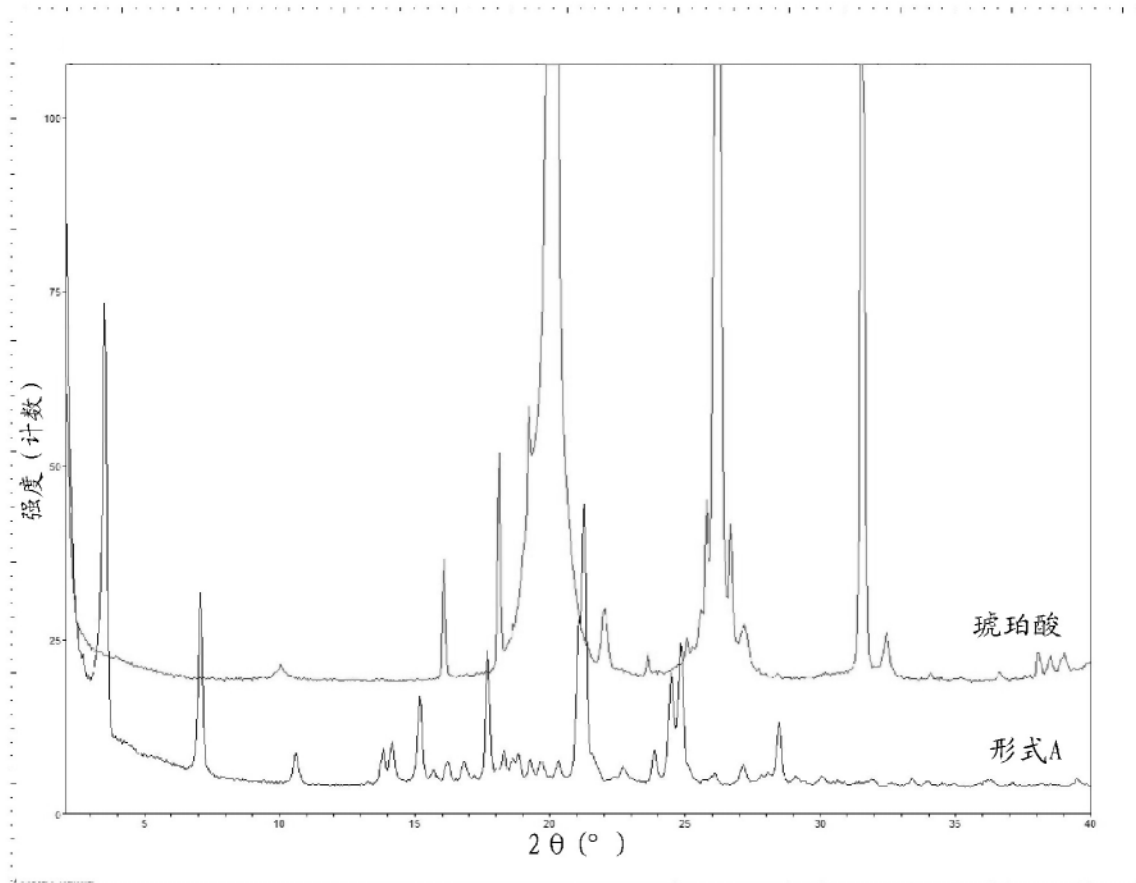


图 12

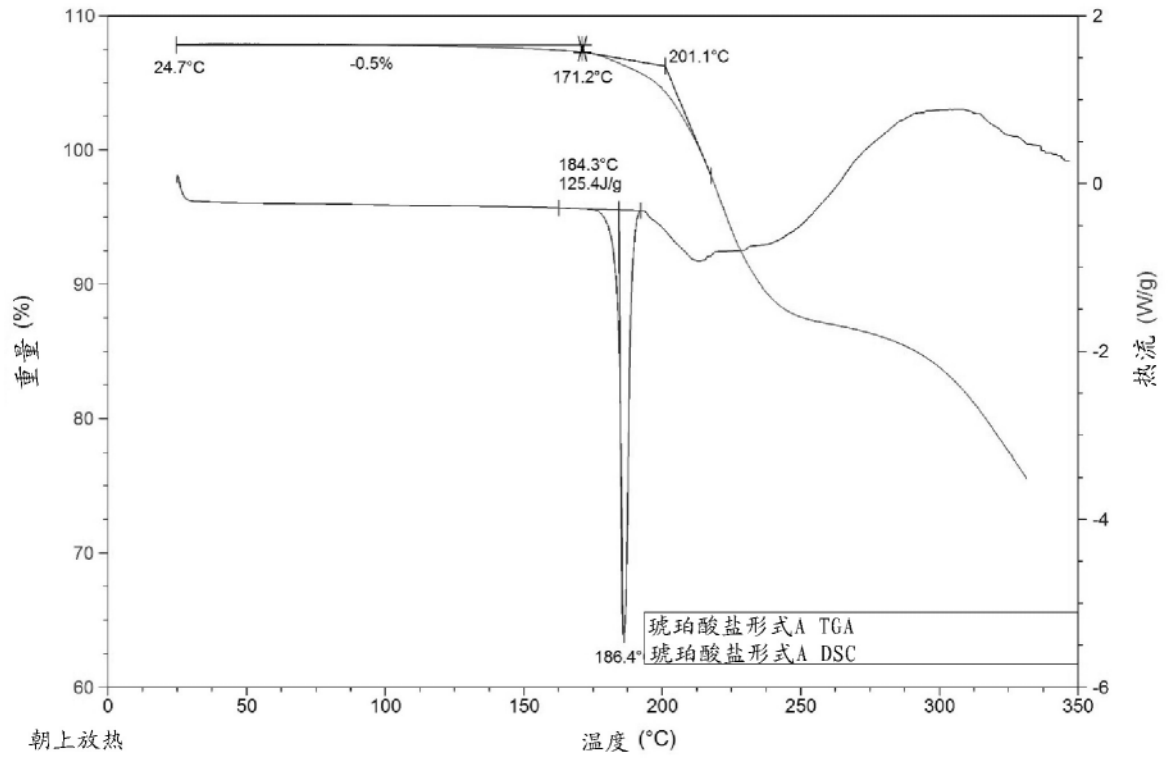


图 13

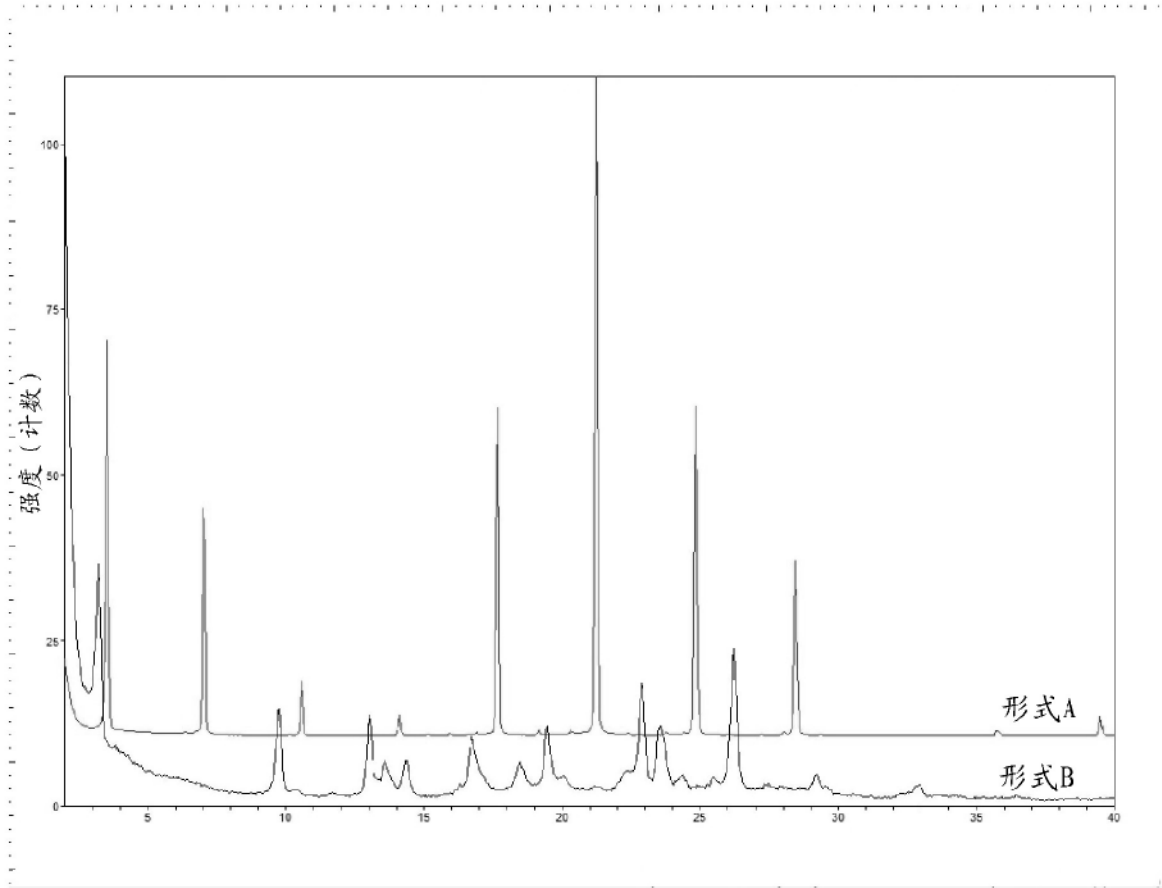


图 14

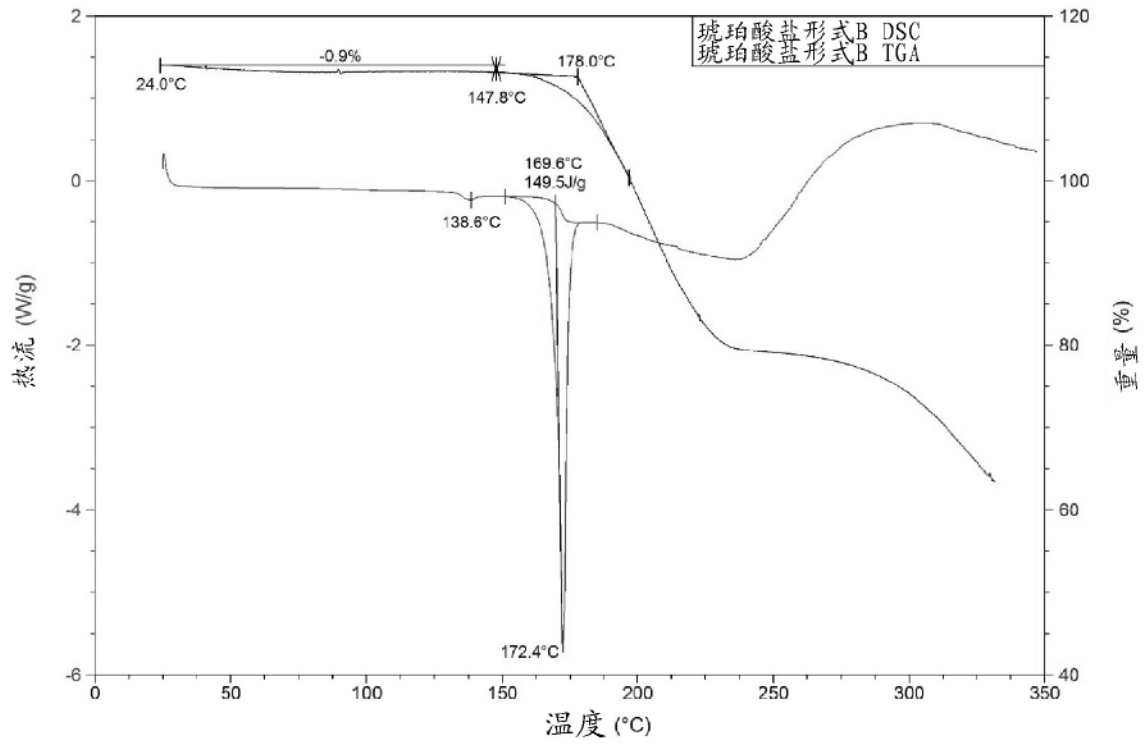


图 15

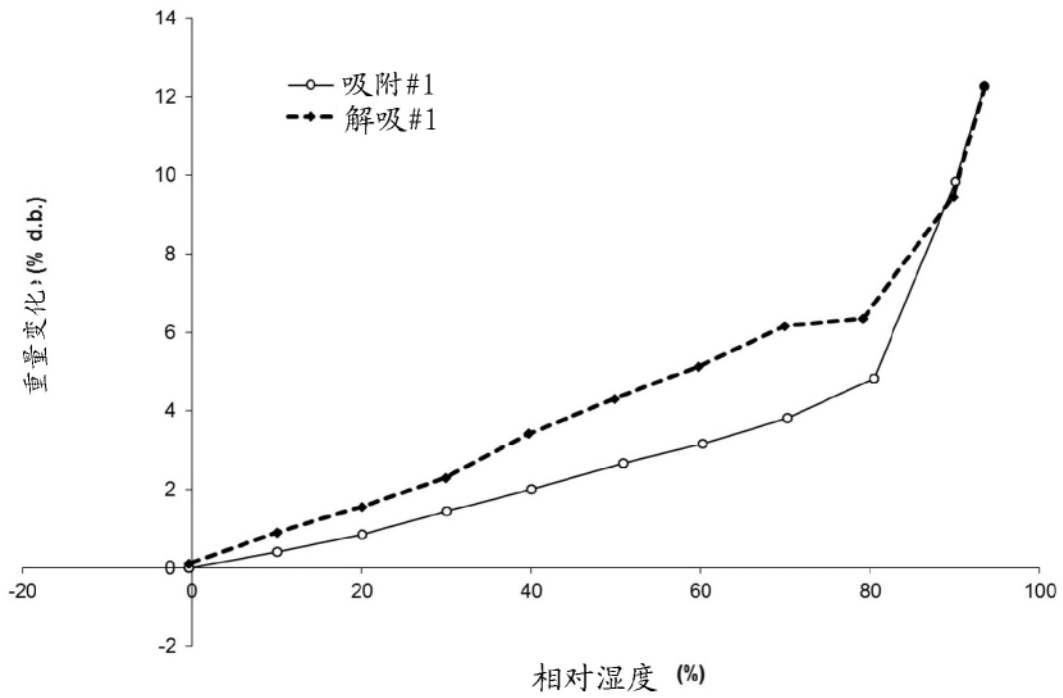


图 16

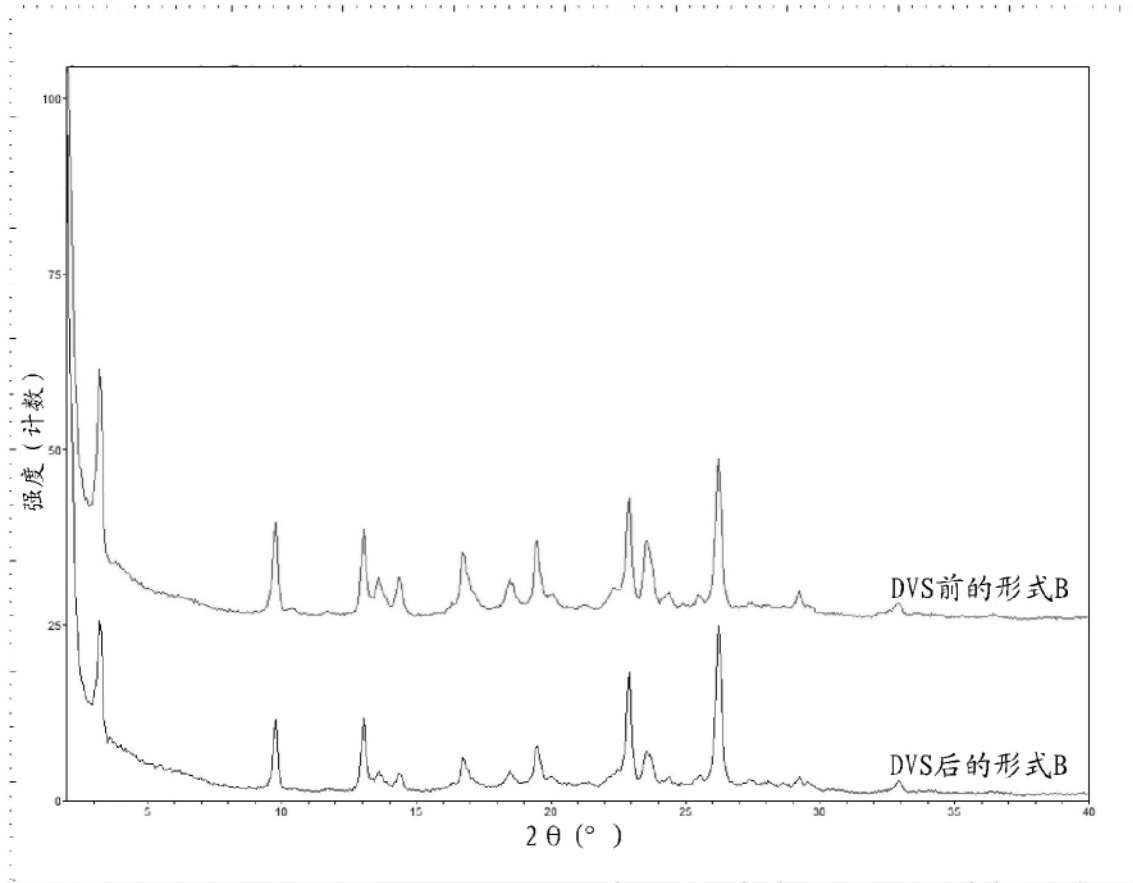


图 17

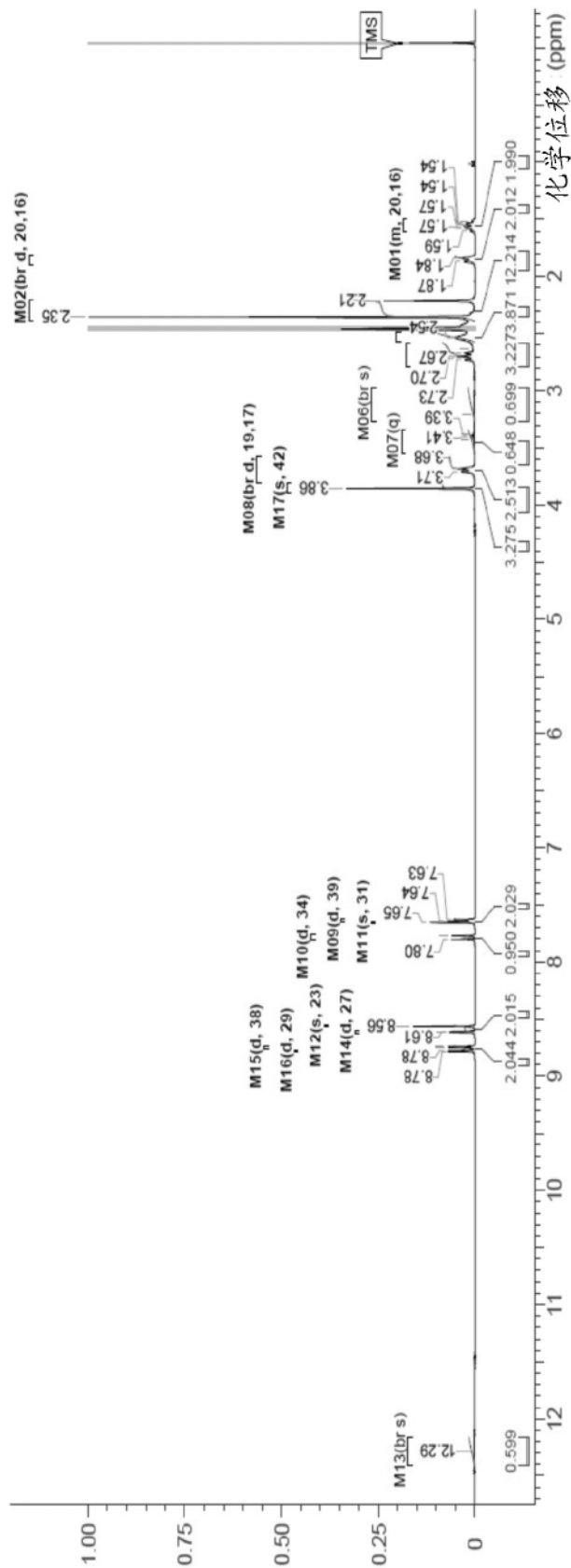


图 18

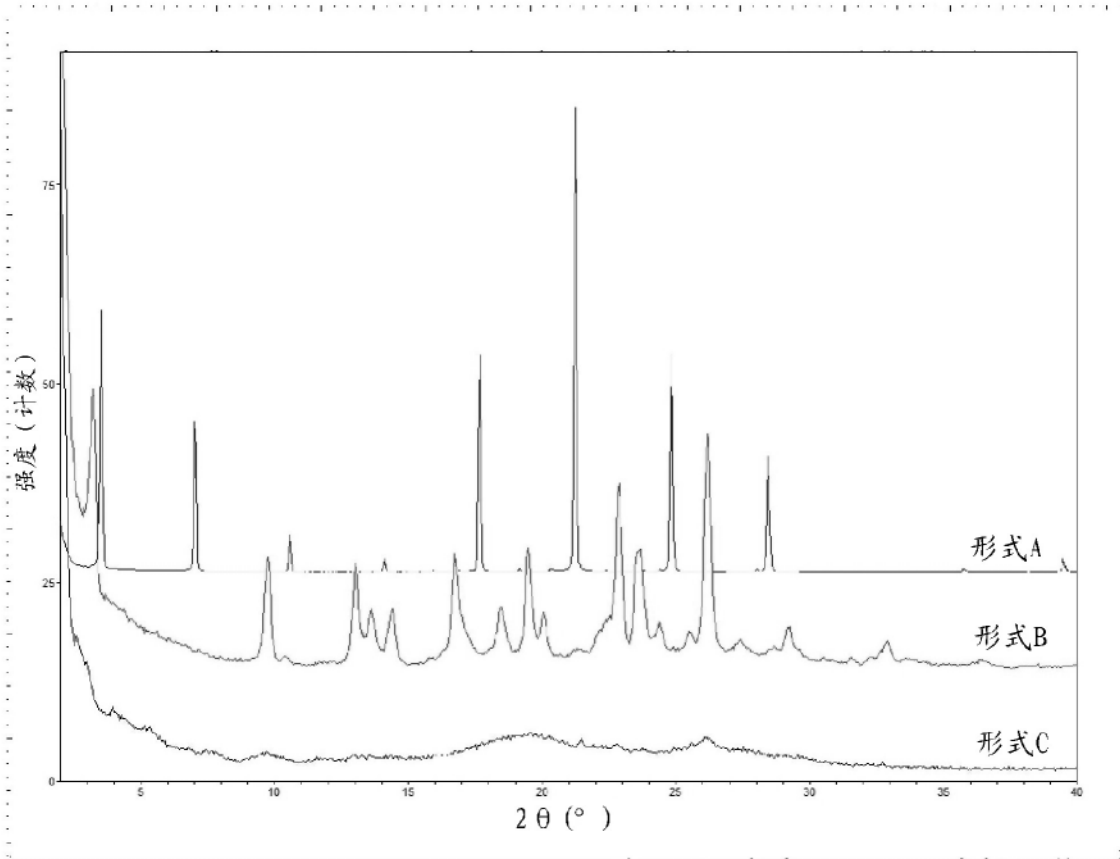


图 19

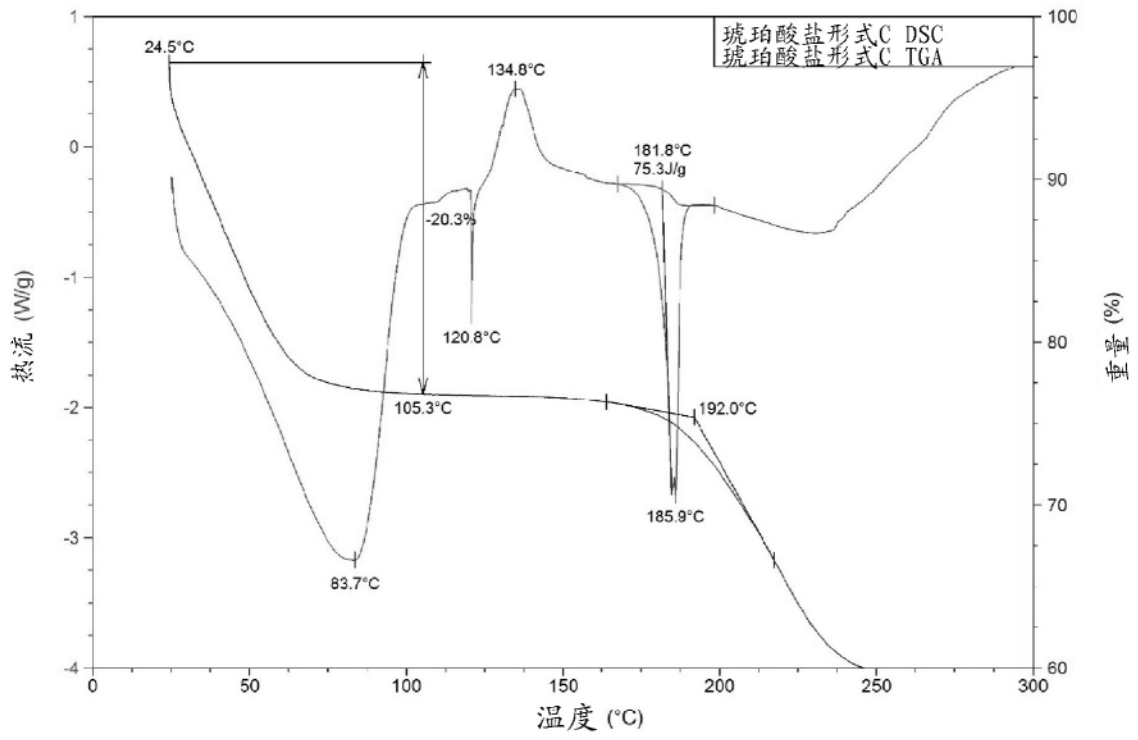


图 20

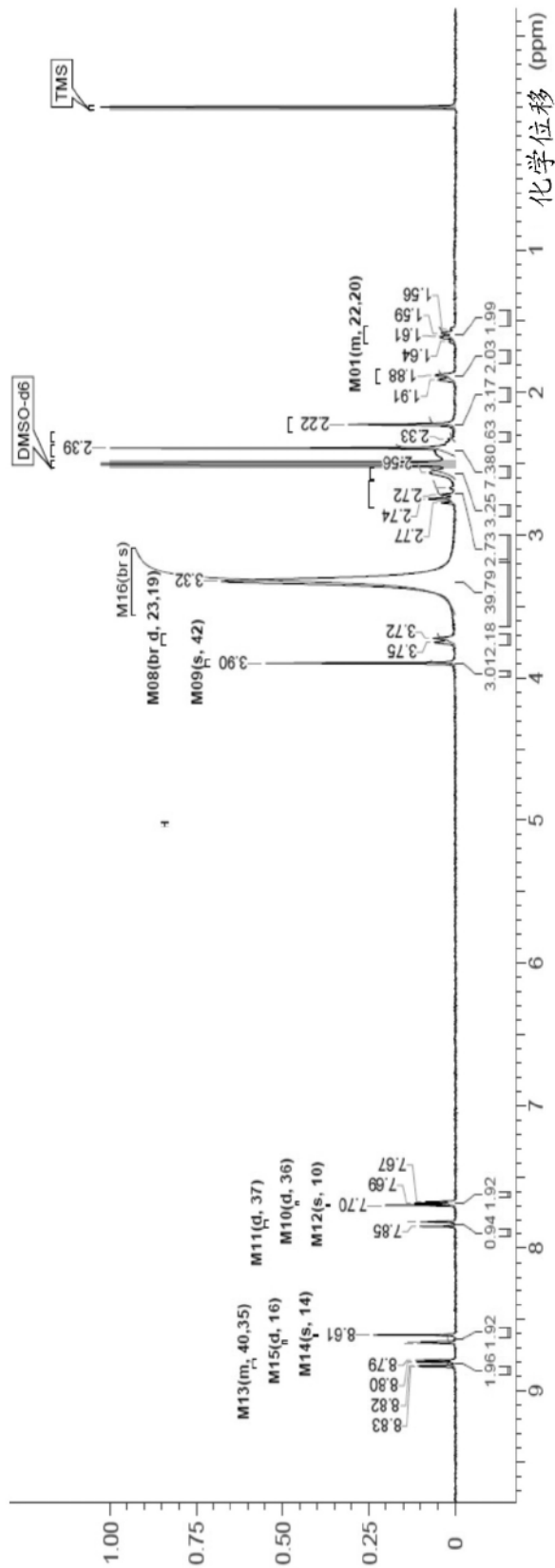


图 21

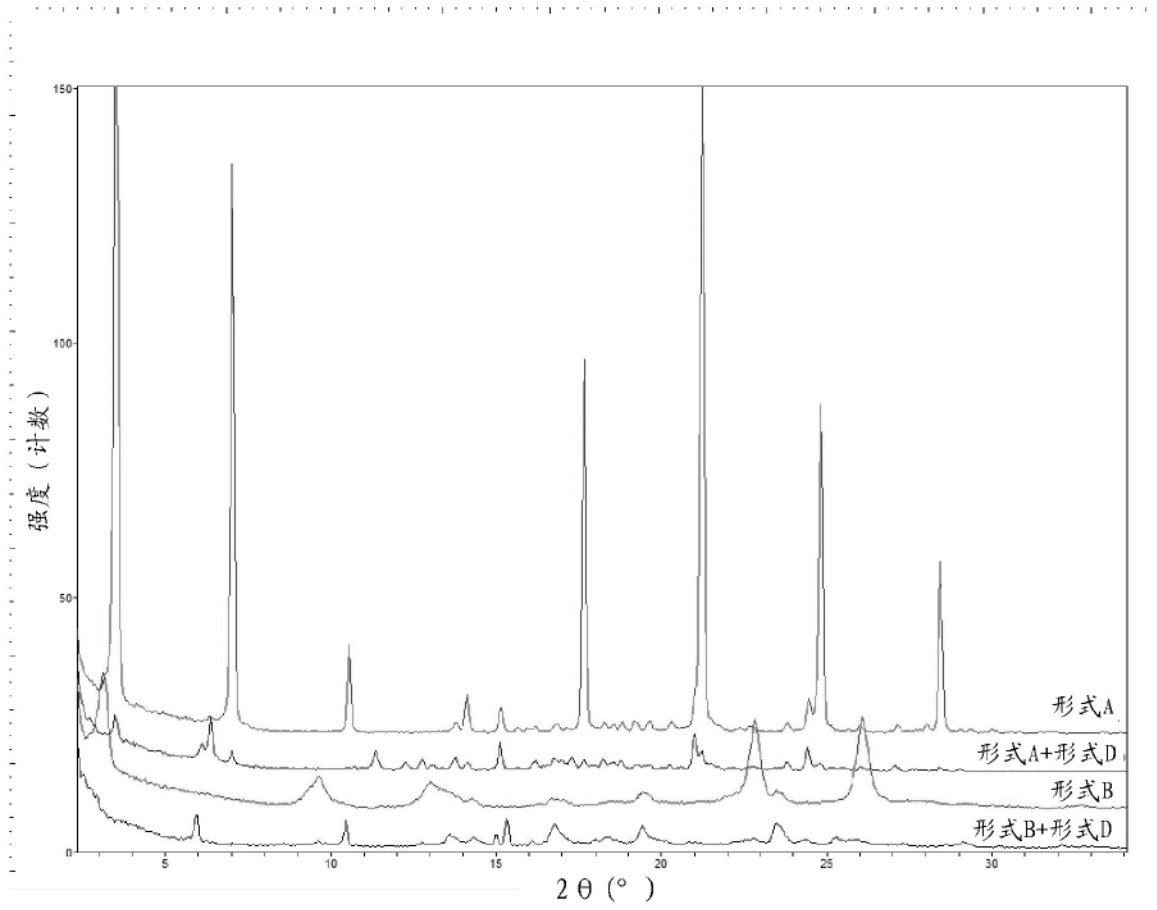


图 22

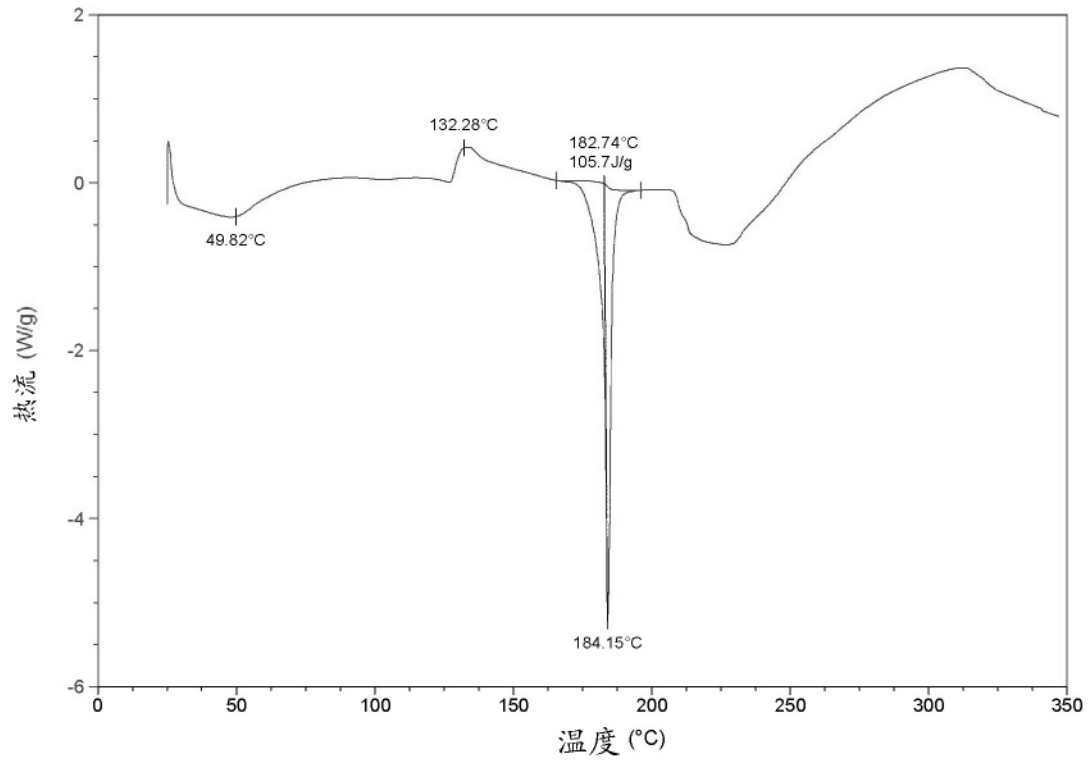


图 23

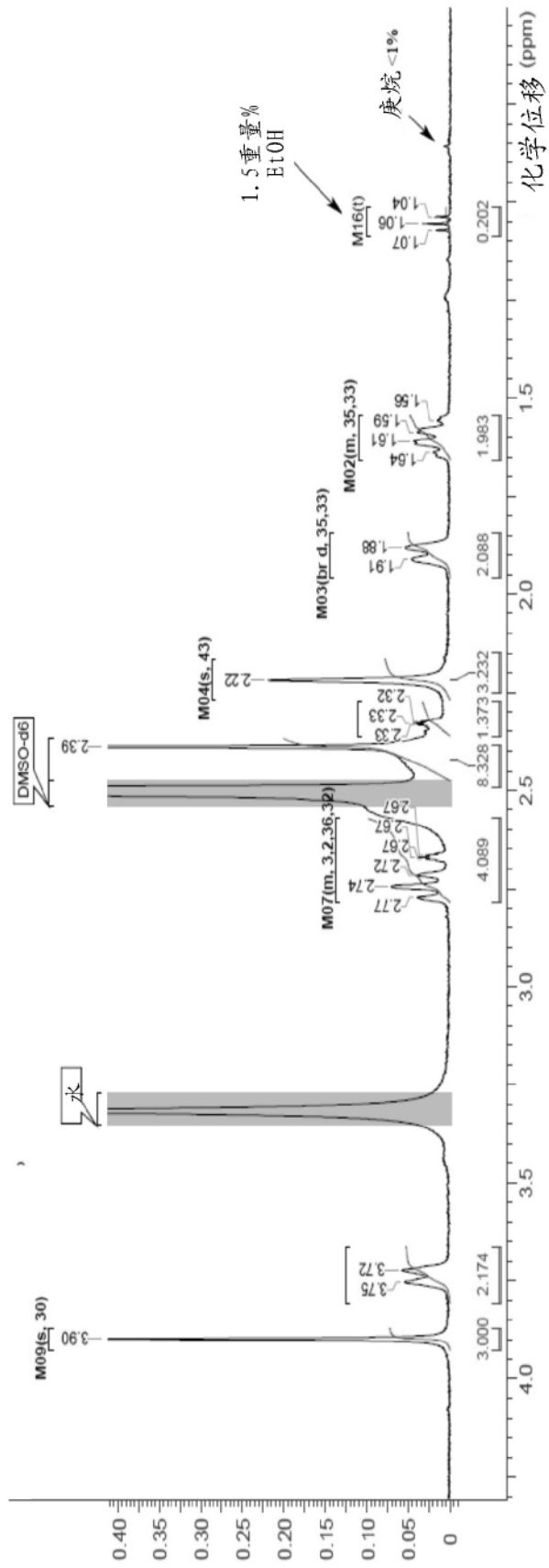


图 24

A.

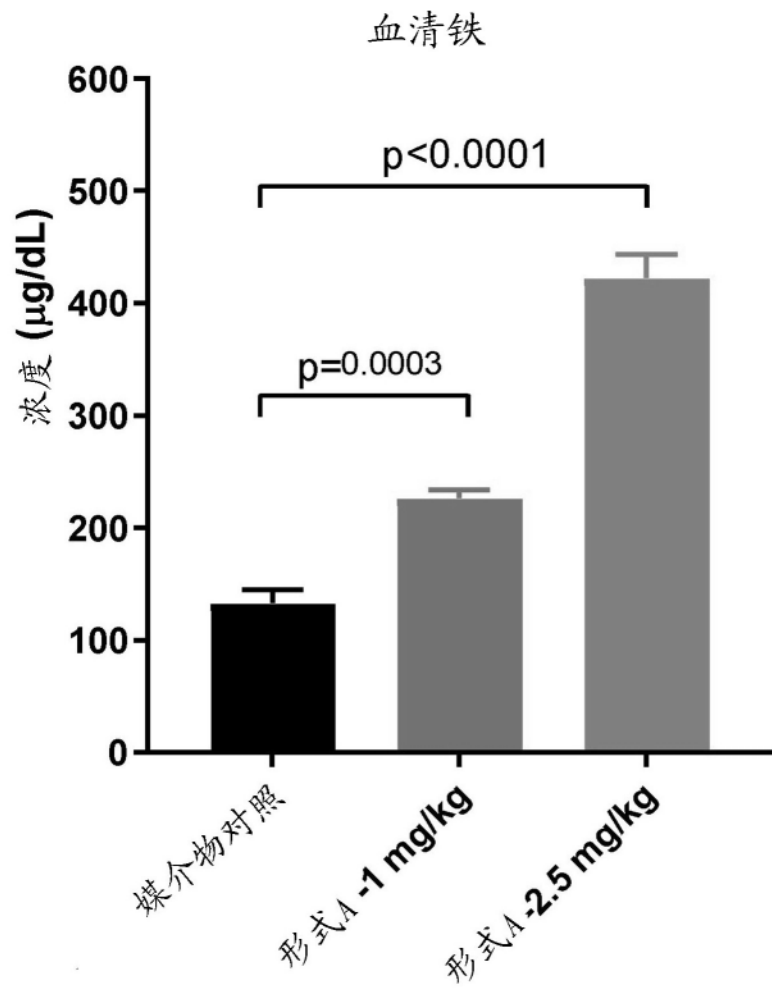


图 25

B.

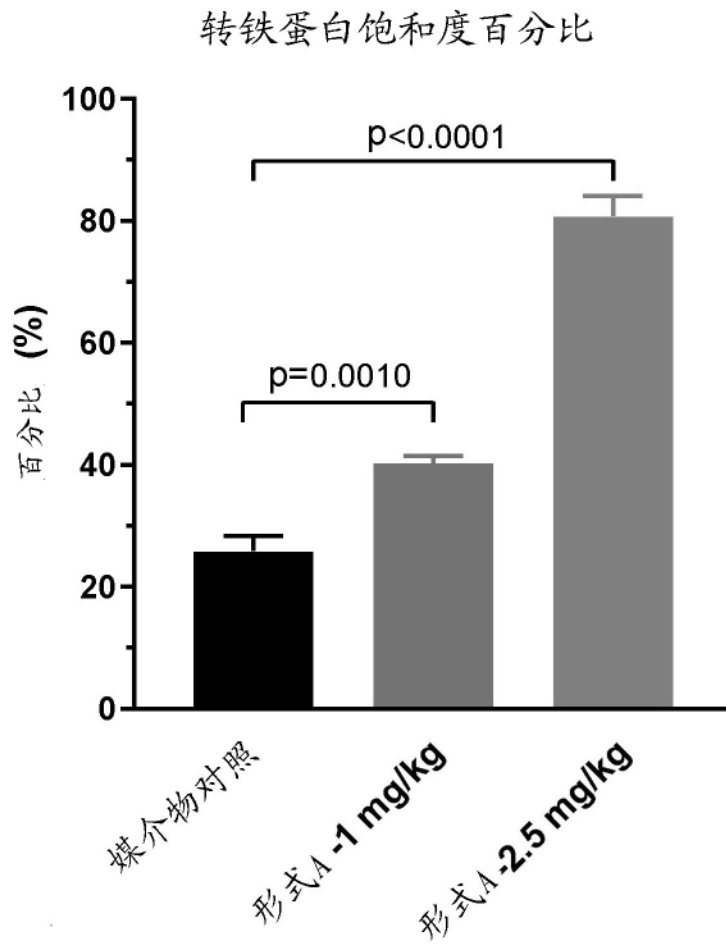


图 26