



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 108697811 B

(45) 授权公告日 2023. 04. 07

(21) 申请号 201780011422.0

(22) 申请日 2017.01.11

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108697811 A

(43) 申请公布日 2018.10.23

(30) 优先权数据
62/277,262 2016.01.11 US
62/420,258 2016.11.10 US
62/444,172 2017.01.09 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.08.15

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2017/012939 2017.01.11

(87) PCT国际申请的公布数据
W02017/123588 EN 2017.07.20

(73) 专利权人 梅里麦克制药股份有限公司
地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 D·C·德拉蒙德 B·耿
D·B·科波汀 S·K·蒂普帕拉朱
A·克什卡耶弗 O·阿尔坎

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256
专利代理师 陈文平 黄海波

(51) Int.Cl.
A61K 48/00 (2006.01)

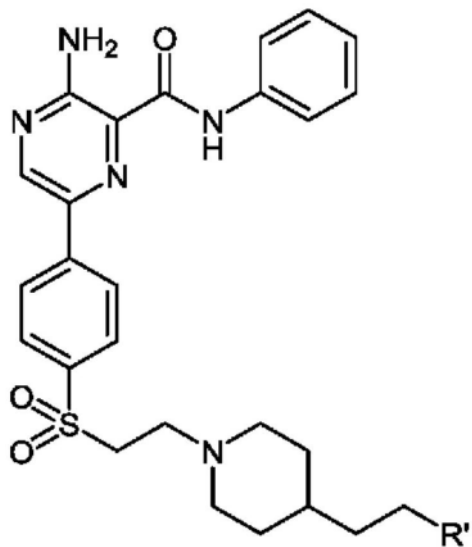
(56) 对比文件
郑里翔. 脂质体药物.《生物化学》.2015,
审查员 李非儿

权利要求书3页 说明书34页 附图86页

(54) 发明名称
抑制共济失调毛细血管扩张和Rad3相关蛋白(ATR)

(57) 摘要
抑制ATR蛋白激酶的新颖化合物包括本文公开的式(I)化合物,以及包含ATR蛋白激酶抑制剂化合物的脂质体制剂。所述组合物可用于治疗癌症。

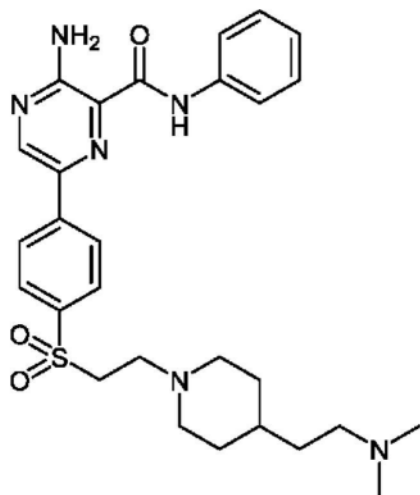
1. 一种式 (Ia) 的化合物, 或其药学上可接受的盐:



(Ia),

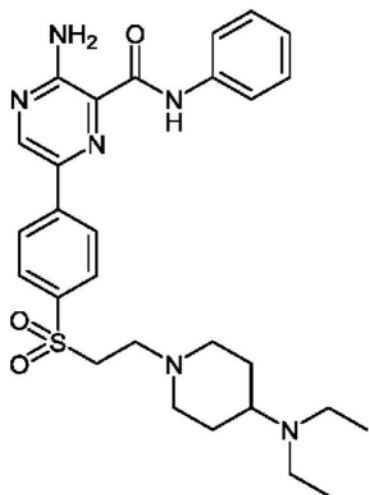
其中R' 是NR^aR^b, 其中R^a和R^b各自独立地是C₁-C₄烷基。

2. 一种化合物5的式的化合物, 或其药学上可接受的盐:



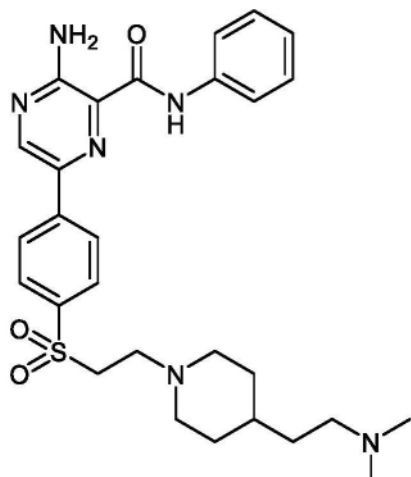
(化合物 5)。

3. 一种化合物6的式的化合物, 或其药学上可接受的盐:



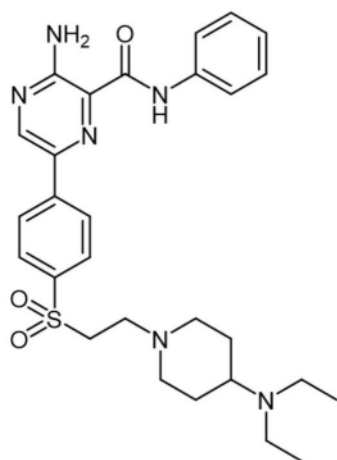
(化合物 6)。

4. 一种脂质体组合物,其包含化合物5或其药学上可接受的盐:



化合物 5。

5. 一种脂质体组合物,其包含化合物6或其药学上可接受的盐:



化合物 6。

6. 如权利要求4或5所述的脂质体组合物,其中所述脂质体包含一种或多种磷脂。
7. 如权利要求6所述的脂质体组合物,其中所述磷脂是1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)。
8. 如权利要求6所述的脂质体组合物,其中所述磷脂是氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)。
9. 如权利要求6所述的脂质体组合物,其中所述脂质体包含胆固醇。
10. 如权利要求9所述的脂质体组合物,其中所述脂质体还包含PEG(2000)-二硬脂酰甘油(PEG-DSG)。
11. 如权利要求10所述的脂质体组合物,其中所述脂质体包含摩尔比为约2:0.15的胆固醇和PEG-DSG。

抑制共济失调毛细血管扩张和Rad3相关蛋白(ATR)

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2016年1月11日提交的美国临时专利申请No.62/277,262、2016年11月10日提交的美国临时专利申请No.62/420,258以及2017年1月9日提交的美国临时专利申请No.62/444,172的优先权,其各自通过引用整体并入本申请并用于所有目的。

技术领域

[0003] 本公开涉及抑制共济失调毛细血管扩张和Rad3相关蛋白(ATR)的化合物和相关方法,包括可用于治疗癌症的方法和化合物。

[0004] 发明背景

[0005] 共济失调-毛细血管扩张和Rad3相关(ataxia-telangiectasia and Rad3-related, ATR)激酶是被认为参与细胞DNA损伤修复过程和细胞周期信号传导的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。ATR激酶与ATM(“共济失调毛细血管扩张突变(ataxia telangiectasia mutated)”)激酶和其它蛋白质一起调节细胞对DNA损伤的响应,通常称为DNA损伤响应(“DNA Damage Response, DDR”)。据信DDR通过激活细胞周期检查点(这提供了修复的时间)来刺激DNA修复,促进存活并阻止细胞周期进展。没有DDR,细胞对DNA损伤更敏感,并且容易死于由内源细胞过程如DNA复制或癌症治疗中常用的外源DNA损伤剂诱导的DNA损伤。

[0006] 已经显示在存在和不存在DNA损伤剂两种情况下,ATR功能的破坏(例如通过基因缺失)促进癌细胞死亡。ATR的突变与胃和子宫内膜的癌症有关,并导致对电离辐射的敏感性提高和细胞周期检查点的废除。ATR对于体细胞的存活是必需的,并且已经显示ATR的缺失导致损伤检查点响应的丧失和细胞死亡。参见Cortez等, *Science* 294:1713-1716 (2001)。ATR对于脆性位点的稳定性也是必需的,并且Seckel综合征患者中的低ATR表达导致复制应激后染色体断裂增加。参见Casper等, *Am. J. Hum. Genet* 75:654-660 (2004)。复制蛋白A(replication protein A, RPA)复合物将ATR及其相互作用蛋白ATRIP募集到DNA损伤位点,并且ATR本身介导CHK1信号级联的激活。参见Zou等, *Science* 300:1542-1548 (2003)。与其相关检查点激酶ATM一样,ATR在级联中早期使RAD17磷酸化,这对DNA受损细胞中的检查点信号传导是重要的。参见Bao等, *Nature* 411:969-974 (2001)。据信ATR在早期哺乳动物胚胎中特别重要,以感知不完整的DNA复制并防止有丝分裂灾难。

[0007] 然而,尽管DNA损伤化学治疗剂和电离辐射(IR)疗法已经为癌症患者提供了初始治疗益处,但是现有疗法已经失去临床效力(例如,由于肿瘤细胞DNA修复响应)。与正常细胞相比,ATR抑制剂和DNA损伤剂的体内效应在癌症的选择性治疗中显示出一定的希望,特别是在治疗G1检查点控制缺陷的肿瘤细胞中(其可能更多地依赖于ATR来存活)。

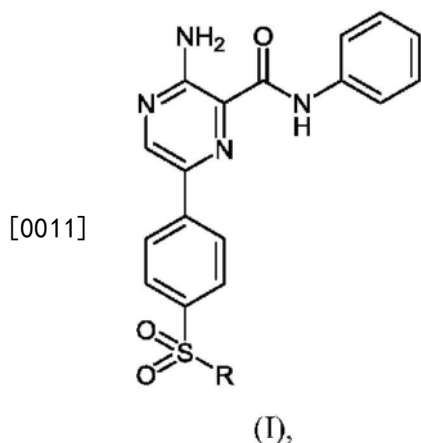
[0008] 仍然需要开发作为单一药剂或作为组合疗法的一部分(例如,与化学疗法和/或放射疗法组合)的有效的和选择性的疗法,以递送ATR抑制剂用于治疗癌症。

发明内容

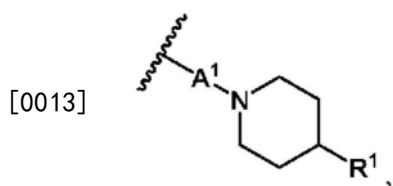
[0009] 申请人已经发现可用于抑制共济失调-毛细血管扩张和Rad3相关(ATR)激酶以及

治疗癌症的新颖化学化合物,以及具有期望的性质(例如,在血液循环中延长的半衰期和治疗肿瘤的效力)的某些ATR蛋白激酶抑制剂的脂质体制剂。本发明部分基于用于抑制ATR蛋白激酶的某些新颖化合物以及某些ATR蛋白激酶抑制剂化合物的脂质体制剂的延长的血浆半衰期和增强的抗肿瘤效力的发现。

[0010] 在第一个实施方案中,式(I)的新颖化合物或其药学上可接受的盐可用于抑制共济失调毛细血管扩张和Rad3相关(ATR)激酶以及治疗癌症:



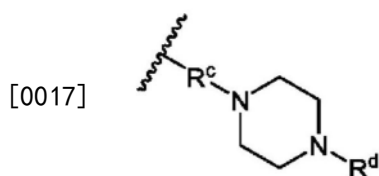
[0012] 其中R是包含 pK_a 大于7.0(优选大于8.0,最优选至少约9.5)的胺的部分。式(I)化合物优选在选择的R处包含一个或多个叔胺部分,以提供期望的ATR抑制和/或脂质体形成和稳定性特征。在一些实例中,R为包含第一叔取代氮的杂环部分,优选被包含第二叔取代氮的烷基氨基部分取代。特别地,式(I)化合物包括其中R可以是下式的部分的那些:



[0014] 其中 A^1 不存在或者是烷基(例如, C_1 - C_4 烷基(优选 $-(CH_2)_2-$),并且 R^1 是低级(例如, C_1 - C_4 烷基氨基。在一个实施方案中, R^1 是 $(C_1$ - C_4 烷基)- NR^aR^b ,其中 R^a 和 R^b 各自独立地是 C_1 - C_4 烷基,例如 R^1 是 $-(CH_2)_2-N(CH_3)(CH_3)$ 。在另一个实施方案中, R^1 是 NR^aR^b ,其中 R^a 和 R^b 各自独立地是 C_1 - C_4 烷基,例如, R^1 是 $-N(CH_2CH_3)(CH_2CH_3)$ 。

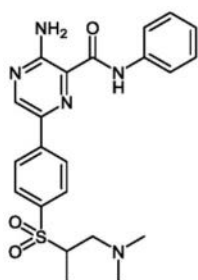
[0015] 在式(I)的另一个实施方案中,R是 $-N(H)(C_1-C_4$ 烷基)- NR^aR^b ,其中 R^a 和 R^b 各自独立地是 C_1 - C_4 烷基,或者R是 $-(G)-NR^aR^b$,其中 R^a 和 R^b 各自独立地是 C_1 - C_4 烷基,其中G是 C_1 - C_4 烷基,并且其中G可以进一步被 C_1 - C_4 烷基取代。

[0016] 在式(I)的另一个实施方案中,R可以是下式的部分:



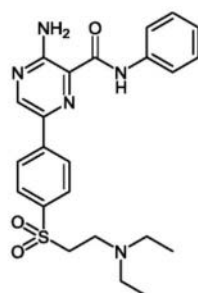
[0018] 其中 R^c 和 R^d 各自独立地是 C_1 - C_4 烷基。

[0019] 优选的实例包括含有选自化合物1、2、3、4、5或6的化合物的脂质体:



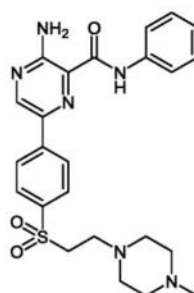
化合物 1

MW: 439.53



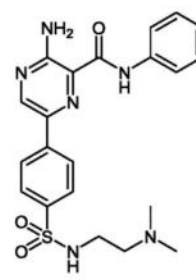
化合物 2

MW: 453.56



化合物 3

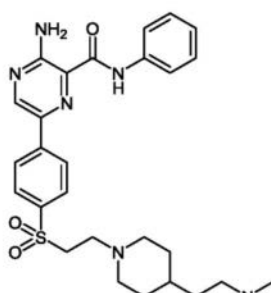
MW: 480.59



化合物 4

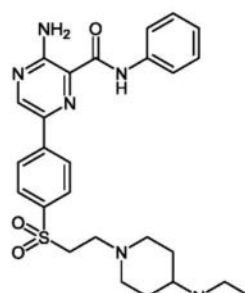
MW: 440.52

[0020]



化合物 5

MW: 536.70



化合物 6

MW: 536.70

[0021] 在第二个实施方案中,ATR抑制剂化合物的脂质体制剂可以包含与聚阴离子(例如聚阴离子化糖,如蔗糖八硫酸酯(sucrose octasulfate),或合适的聚阴离子化多元醇)一起包封在由一种或多种脂质体形成脂质(例如氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC))、胆固醇和聚合物缀合脂质(例如,甲氧基-聚(乙二醇)-1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基(PEG2000-DSG)形成的单层囊泡中的式(I)化合物或其它ATR抑制剂化合物(例如比较化合物A)。脂质体形成脂质优选包含一种或多种磷脂,选择磷脂和胆固醇的比例以提供期望量的脂质体膜刚性,同时保持式(I)化合物从脂质体的渗漏量充分减少。可以选择聚合物-缀合的脂质的类型和量以提供期望水平的蛋白质结合、脂质体稳定性和在血流中的循环时间。在一些实例中,脂质体囊泡包含3:2摩尔比的HSPC和胆固醇。特别地,脂质体可以包含由3:2:0.15摩尔比的HSPC、胆固醇和PEG2000-DSG组成的囊泡。式(I)化合物可以与合适的聚阴离子如蔗糖八硫酸酯一起包载在脂质体内。在一些实例中,脂质体以等于或接近式(I)化合物和蔗糖八硫酸酯的化学计量比的比率包封式(I)化合物和八硫酸蔗糖酯。

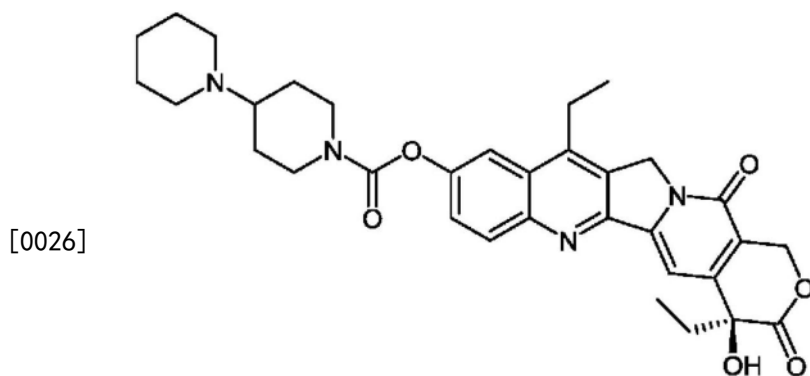
[0022] 一个具体实例提供了包封有蔗糖八硫酸酯和化合物5的具有由3:2:0.15摩尔比的HSPC、胆固醇和PEG2000-DSG形成的囊泡的脂质体。另一实例提供了包封有蔗糖八硫酸酯和化合物5的具有由3:2:0.15的摩尔比的HSPC、胆固醇和PEG2000-DSG形成的囊泡的脂质体。

[0023] 另一具体实例提供了包封有蔗糖八硫酸酯和化合物6的具有由3:2:0.15摩尔比的HSPC、胆固醇和PEG2000-DSG形成的囊泡的脂质体。

[0024] 另一具体实例提供了包封有蔗糖八硫酸酯和化合物A的具有由3:2:0.15摩尔比的HSPC、胆固醇和PEG2000-DSG形成的囊泡的脂质体。

[0025] 本文公开的ATR抑制剂化合物和/或其脂质体制剂可用于疗法和治疗方法。在一些实施方案中,疗法是治疗癌症。当用作疗法时,脂质体组合物可以与一种或多种其它化合物

或组合物一起用于治疗方案中(例如与伊立替康



伊立替康

[0027] 脂质体制剂如MM-398组合)。脂质体组合物与一种或多种其它化合物或组合物的施用可以是同时的、单独的或顺序的。一种或多种其它化合物或组合物可以是其它治疗剂,例如,其它抗癌剂,或可以是被设计用于改善治疗剂的负面副作用的化合物。

[0028] 附图描述

[0029] 图1是可用于制备本文公开的某些化合物的第一化学反应方案。

[0030] 图2是可用于制备本文公开的某些化合物的第二化学反应方案。

[0031] 图3是可用于制备本文公开的某些化合物的第三化学反应方案。

[0032] 图4是可用于制备本文公开的某些化合物的第四化学反应方案。

[0033] 图5是显示如实施例8中讨论的脂质体ATR抑制剂的血液药代动力学的图。

[0034] 图6是显示如实施例9A中所述的在宫颈MS751异种移植物模型中与MM-398组合的脂质体化合物A的抗肿瘤效力的图。

[0035] 图7是显示如实施例9A中所述的在宫颈C33A异种移植物模型中与MM-398组合的脂质体化合物A的抗肿瘤效力的图。

[0036] 图8是显示根据实施例9A的在宫颈C33A异种移植物模型中与MM-398组合的脂质体化合物A的抗肿瘤效力的图。

[0037] 图9是显示根据实施例9A的在宫颈MS751中与MM-398组合的脂质体化合物A的耐受性的图。

[0038] 图10A和图10B各自是显示如实施例10中所讨论的在NCI-H2170(图10A)或DMS-114(图10B)小鼠异种移植物模型中与MM-398组合的脂质体化合物5的效力的图。

[0039] 图11A和图11B各自是显示代表如实施例10中所讨论的在NCI-H2170(图11A)和DMS-114(图11B)小鼠异种移植物模型中与MM-398组合的脂质体化合物5的效力的Kaplan-Meyer存活曲线的图。

[0040] 图12A和图12B各自是显示在NCI-H2170(图12A)或DMS-114(图12B)小鼠异种移植物模型中与MM-398组合的脂质体化合物5的耐受性的图。

[0041] 图13A和图13B是显示如实施例11中所述的在Calu-6(图13A)或COLO-699(图13B)小鼠异种移植物模型中与MM-398组合的脂质体化合物5的效力的图。

[0042] 图14A是说明在一组肺癌细胞系中化合物6和化合物5的体外单一疗法细胞杀伤的图。

[0043] 图14B是说明与三种化学治疗剂(卡铂、吉西他滨、化合物B)组合的化合物5和化合物6的效果的图。

[0044] 图15是显示在具有和不具有多种浓度的化合物B的情况下,在Sum190PT细胞系(三阴性乳腺癌,TNBC)中测量的实施例2的ATR蛋白激酶抑制剂化合物6的 IC_{50} 位移值的图。

[0045] 图16A是显示在MDA-MB-453TNBC癌细胞系中测量的实施例2的ATR蛋白激酶抑制剂化合物6的组合的 IC_{50} 位移值的图。

[0046] 图16B是显示在MDA-MB-453TNBC癌细胞系中测量的ATR蛋白激酶抑制剂化合物A的组合的 IC_{50} 位移值的图。

[0047] 图17是从体外暴露于单独或组合的吉西他滨[16nM]或ATR抑制剂(化合物A或化合物5[1 μ M])的肺癌细胞DMS-114获得的蛋白质印迹分析。

[0048] 图18A-B是在U2OS细胞中以多种浓度组合化合物A和吉西他滨进行的细胞死亡和生长测定。将结果返回与利用两种化合物的组合的细胞生长和死亡的预测进行比较(图18A)。还在US02细胞中设定浓度的化合物A(1 μ M)和吉西他滨(0.04 μ M)下测定活细胞和凋亡细胞的数量(图18B)。

[0049] 图19显示在多种肺癌细胞系(NCI-H520和NCI-H596)和U2OS细胞中以设定浓度(分别为1 μ M和0.2 μ M)测试的单独的以及和SN38组合的化合物A,监测随时间的细胞数量。

[0050] 图20是说明在宫颈癌细胞系MS751中组合的或单独的化合物A和SN38的效果的图。

[0051] 图21A-C展示了化合物A或化合物5与吉西他滨组合的效果。图21A是展示在U2OS、H358和A549细胞系中多种浓度的化合物A或化合物5与吉西他滨组合的效果的热图。示出了在细胞中用设定浓度的化合物5和吉西他滨或化合物A和吉西他滨处理的细胞的显微镜图像(图21B)。还示出了利用设定浓度的US02和H358细胞的增殖测定(图21C)。

[0052] 图22A-B说明了利用与SN38组合(图22A)或单独(图22B)的化合物A或化合物5的A549细胞的生长曲线。

[0053] 图23显示了使用设定浓度的吉西他滨和多种浓度的化合物A或化合物5的多种细胞系中的 IC_{50} 值(μ M)。

[0054] 图24显示了对与吉西他滨或SN38组合的化合物A或化合物5响应的肺癌细胞系的概述。

[0055] 图25A-B显示了测试其抑制ATR(在靶)和ATM(脱靶)的能力的多种ATR抑制剂。抑制报道为以nM为单位的 IC_{50} (图25A)。还用化合物A或化合物5测试了另外的“脱靶”激酶(图25B)。

[0056] 图26A-F显示了在A549肺癌细胞(图26A-B)、H23肺癌细胞(图26C-D)和DMS-114细胞(图26E-F)中化合物A或化合物5的在靶结果。通过蛋白质印迹测量CHK1S345磷酸化,这是ATR抑制的读出。每种化合物还与固定浓度的吉西他滨一起使用。

[0057] 图27A-B显示对HCC-70TNBC、MDA-MB-468TNBC和DMS-114细胞系的进一步在靶分析。设定浓度的SN38与一系列化合物A或化合物5浓度一起使用。通过蛋白质印迹测试和测量多种在靶活性参数(图27A-B)

[0058] 图28显示了添加SN38和化合物A或化合物5后24小时,SUM149细胞的细胞周期阶段概况。

[0059] 图29显示用于测量与MM398组合的Ls-化合物A或Ls-化合物5的效果的DMS-114肺

异种移植模型。使用设定剂量的MM398 (5mpk) 和两种不同剂量的化合物A或化合物5 (20mpk或80mpk)。通过测量CHK1S345磷酸化水平来测定治疗效果。

[0060] 图30A-C说明了在SUM-149细胞系中Ls-化合物A和MM398的效果。通过测量RPA2 (图30A)、DNAPK、CHK1和 γ H2AX图30B)的磷酸化水平来测定治疗效果。还在没有与MM398的组合的情况下测试Ls-化合物5 (图30C)。

[0061] 图31是显示在SUM-149小鼠异种移植模型中与MM-398组合的脂质体化合物5的效力的图。

[0062] 图32是显示在SUM-149小鼠异种移植模型中与MM-398组合的脂质体化合物5的耐受性的图。

[0063] 图33在一组细胞系上通过蛋白质印迹定量的与DNA损伤响应途径相关的多种PD标志物的基础水平。

[0064] 图34是说明如何在动态细胞活力测定中计算每个孔的积分的示意图。

[0065] 图35暴露于ATR抑制剂化合物5和/或SN38的肺癌细胞系上,基础MRE11蛋白质表达(通过蛋白质印迹定量)与作为动态细胞活力的量度的积分的相关性。

[0066] 图36暴露于ATR抑制剂化合物5和/或SN38的肺癌细胞系上,基础ATM蛋白质表达(通过蛋白质印迹定量)与作为动态细胞活力的量度的积分的相关性。

[0067] 图37暴露于ATR抑制剂化合物5和/或SN38的肺癌细胞系上,基础NBS蛋白质表达(通过蛋白质印迹定量)与作为动态细胞活力的量度的积分的相关性。

[0068] 图38暴露于ATR抑制剂化合物5和/或SN38的p53功能受损的肺癌细胞系上,基础NBS蛋白质表达(通过蛋白质印迹定量)与作为动态细胞活力的量度的积分的相关性。

[0069] 图39暴露于ATR抑制剂化合物5和/或SN38的p53功能受损的肺癌细胞系上,基础NBS蛋白质表达(通过蛋白质印迹定量)与作为动态细胞活力的量度的积分的相关性。

[0070] 图40A-F暴露于ATR抑制和/或SN38后癌细胞系NCIH1299中药效学标志物的倍数变化。

[0071] 图41A-F暴露于ATR抑制和/或SN38后癌细胞系NCIH460中药效学标志物的倍数变化。

[0072] 图42A-F暴露于ATR抑制和/或SN38后癌细胞系DMS114中药效学标志物的倍数变化。

[0073] 图43A-F暴露于ATR抑制和/或SN38后癌细胞系HCC70中药效学标志物的倍数变化。

[0074] 图44A-F暴露于ATR抑制和/或SN38后癌细胞系MDAMB468中药效学标志物的倍数变化。

[0075] 图45暴露于ATR抑制和/或吉西他滨6或18小时后癌细胞系A549中药效学标志物的蛋白质印迹。

[0076] 图46暴露于ATR抑制和/或吉西他滨6或18小时后癌细胞系NCIH23中药效学标志物的蛋白质印迹。

[0077] 图47暴露于ATR抑制和/或吉西他滨6或18小时后癌细胞系DMS114中药效学标志物的蛋白质印迹。

[0078] 图48暴露于ATR抑制和/或吉西他滨6或18小时后癌细胞系U20S中药效学标志物的蛋白质印迹。

[0079] 图49暴露于ATR抑制和/或吉西他滨6或18小时后癌细胞系NCIH460中药效学标志物的蛋白质印迹。

[0080] 图50暴露于ATR抑制和/或吉西他滨6或18小时后癌细胞系HCC827中药效学标志物的蛋白质印迹。

[0081] 图51暴露于化合物5和/或SN38 18小时后一组结直肠癌细胞系中药效学标志物的蛋白质印迹。

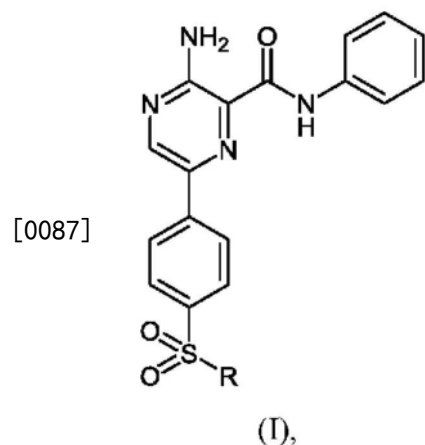
[0082] 图52暴露于化合物5和/或SN38 18小时后一组结直肠癌细胞系中磷酸化的Chk1水平的归一化定量(每种细胞系中的信号相对于存在单独SN38时的信号归一化)。

[0083] 图53暴露于化合物5和/或SN38 18小时后一组结直肠癌细胞系中磷酸化的RPA2水平的归一化定量(每种细胞系中的信号相对于存在单独SN38时的信号归一化)。

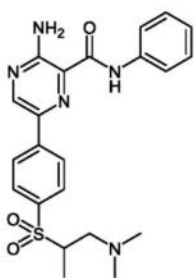
[0084] 图54暴露于化合物5和/或SN38 18小时后一组结直肠癌细胞系中 γ H2AX水平的归一化定量(每种细胞系中的信号相对于存在单独SN38时的信号归一化)。

[0085] 详述

[0086] 用于抑制ATR蛋白激酶的新颖化合物由式(I)：

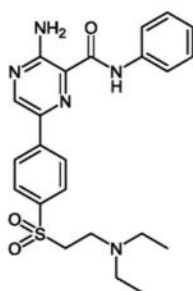


[0088] 或其药学上可接受的盐描述,其中R是包含 pK_a 大于7.0(优选大于8.0,最优选至少约9.5)的胺的部分,其被选择以提供在小鼠中至少约5小时的血浆半衰期(根据实施例7获得)。优选地,R包含具有4-12个碳的胺取代的烷基部分。可以选择R以仅包含叔取代胺和氢化烷基的组合。R优选进一步包含 pK_a 为至少7,但最优选至少约9.5(例如 pK_a 为约9.5-10.5)的叔烷基取代的胺。式(I)化合物或其药学上可接受的盐的实例包括化合物1-6(参见实施例1-6)：



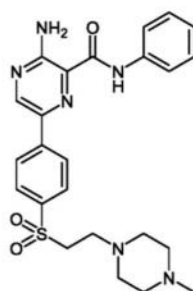
化合物 1

MW: 439.53



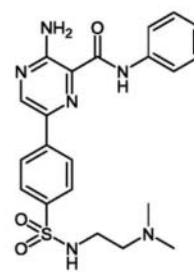
化合物 2

MW: 453.56



化合物 3

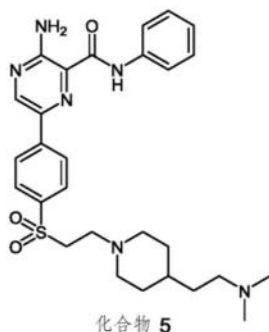
MW: 480.59



化合物 4

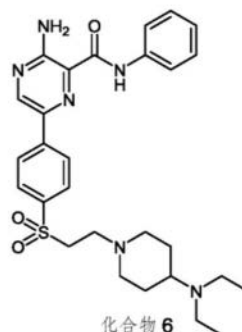
MW: 440.52

[0089]



化合物 5

MW: 536.70

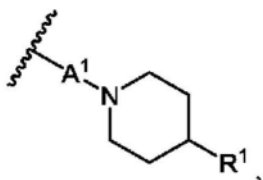


化合物 6

MW: 536.70

[0090] 式(I)化合物优选在选择的R处包含一个或多个叔胺部分,以提供期望的ATR抑制和/或脂质体形成和稳定性特征。在一些实例中,R为包含第一叔取代氮的杂环部分,优选被包含第二叔取代氮的烷基氨基部分取代。特别地,式(I)化合物包括其中R可以是下式的部分的那些:

[0091]

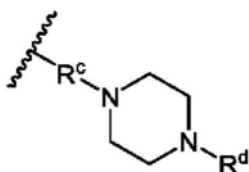


[0092] 其中A¹不存在或者是烷基(例如,C₁-C₄烷基(优选-(CH₂)₂-),并且R¹是低级(例如,C₁-C₄烷基氨基。在一个实施方案中,R¹是(C₁-C₄烷基)-NR^aR^b,其中R^a和R^b各自独立地是C₁-C₄烷基,例如R¹是-(CH₂)₂-N(CH₃)(CH₃)。在另一个实施方案中,R¹是NR^aR^b,其中R^a和R^b各自独立地是C₁-C₄烷基,例如,R¹是-N(CH₂CH₃)(CH₂CH₃)。

[0093] 在式(I)的另一个实施方案中,R是-N(H)(C₁-C₄烷基)-NR^aR^b,其中R^a和R^b各自独立地是C₁-C₄烷基,或者R是-(G)-NR^aR^b,其中R^a和R^b各自独立地是C₁-C₄烷基,其中G是C₁-C₄烷基,并且其中G可以进一步被C₁-C₄烷基取代。

[0094] 在式(I)的另一个实施方案中,R可以是下式的部分:

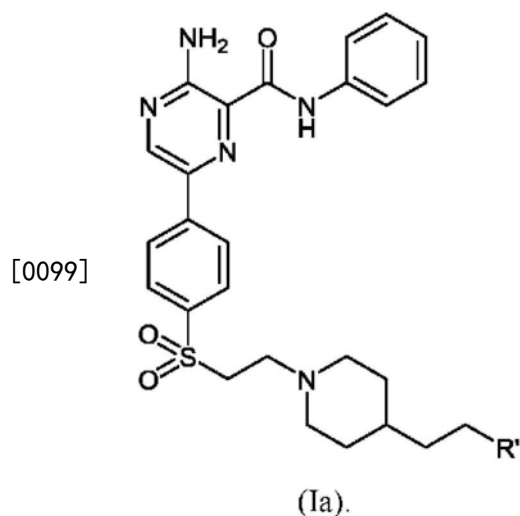
[0095]



[0096] 其中R^c和R^d各自独立地是C₁-C₄烷基。

[0097] 优选的实例包括含有选自化合物1、2、3、4、5或6的化合物的脂质体。在一些实例中,化合物是化合物5或化合物6。

[0098] 式(I)化合物可具有式(Ia)的化学结构或其药学上可接受的盐,其中R'是pK_a为约9.5或更大的叔烷基取代的胺:



[0100] 式(Ia)化合物的实例包括本文公开的化合物5(例如实施例1)。在式(Ia)的一个实施方案中,R'是NR^aR^b,其中R^a和R^b各自独立地是C₁-C₄烷基。

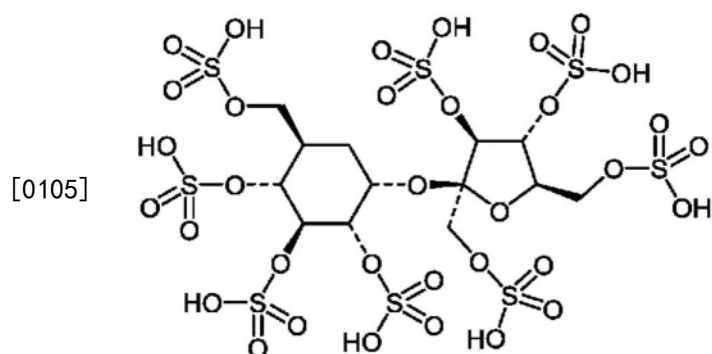
[0101] ATR蛋白激酶抑制剂化合物的脂质体制剂(例如,如实施例7中所述)可以提供期望的药代动力学性质,例如在实施例8中描述的小鼠模型中5小时或更长的增强的血浆半衰期。脂质体通常包含含有一个或多个封闭水性内部的脂质双分子层的囊泡。脂质体组合物通常包含脂质体,所述脂质体在脂质体外部的介质(例如水性流体)中。脂质体脂质可以包含在与水性介质接触时自发形成双层膜的两亲性脂质组分,例如磷脂,例如磷脂酰胆碱。脂质体还可以包含膜硬化组分,例如固醇,例如胆固醇。在一些情况下,脂质体还包含与亲水性聚合物如聚乙二醇(PEG)脂质衍生物缀合的脂质,其可以降低脂质体聚集的趋势并且还具有其它有益效果。

[0102] 脂质体制剂可以包含与聚阴离子(例如聚阴离子化糖如蔗糖八硫酸酯,或合适的聚阴离子化多元醇)一起包封在由一种或多种脂质体形成脂质(例如氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC))、胆固醇和聚合物缀合脂质(例如,甲氧基-聚(乙二醇)-1,2-二硬脂酰基-sn-甘油基(PEG2000-DSG)形成的单层囊泡中的式(I)化合物。脂质体形成脂质优选包含一种或多种磷脂,选择磷脂和胆固醇的比例以提供期望量的脂质体膜刚性,同时保持式(I)化合物从脂质体的渗漏量充分减少。

[0103] 脂质体通常具有微米或亚微米范围的大小,并且因其携带药物物质(包括抗癌药物,例如伊立替康)以及以多种有益方式改变它们的药物性质的能力而被公认。制备和表征药物脂质体组合物的方法在本领域是已知的(参见例如Lasic D.Liposomes:From physics to applications,Elsevier,Amsterdam 1993;G.Greroriadis(编),Liposome Technology,第3版,第1-3卷,CRC Press,Boca Raton,2006;Hong等,美国专利8,147,867,通过引用整体并入本文用于所有目的)。

[0104] 在一些实施例中(例如实施例7),ATR蛋白激酶抑制剂组合物可以包含脂质体,所述脂质体含有与聚阴离子如多硫酸化糖(例如蔗糖八硫酸酯)一起包封在脂质体中的ATR蛋

白激酶抑制剂化合物。蔗糖的完全取代的硫酸酯——硫糖酯(Sucrosofate)在其完全质子化形式下具有以下结构:



[0106] 硫糖酯也被称为蔗糖八硫酸酯(sucrose octasulfate或sucrooctasulfate)(SOS)。制备各种盐(例如铵盐、钠盐或钾盐)形式的硫糖酯的方法是本领域熟知的(例如,美国专利4,990,610,其全部内容通过引用并入本文)。

[0107] ATR蛋白激酶抑制剂脂质体可以通过多个步骤制备,包括形成含有TEA的脂质体,然后随着TEA离开脂质体将ATR蛋白激酶抑制剂化合物(例如,化合物A或式(I)化合物)负载到脂质体中。例如,可以通过包括以下步骤的方法制备ATR蛋白激酶抑制剂脂质体:(a)制备含有作为硫糖酯的三乙基铵盐(TEA-SOS)的三乙胺(TEA)的脂质体,以及(b)随后在有效使伊立替康进入脂质体并允许相应量的TEA离开脂质体(从而耗尽或降低跨所得脂质体的TEA的浓度梯度)的条件下使TEA-SOS脂质体与伊立替康接触。

[0108] 第一步骤可以包括通过使脂质体脂质水合并分散在TEA硫糖酯的溶液中来形成含有TEA-硫糖酯的脂质体。这可以通过例如将脂质(包含HSPC和胆固醇)溶解在加热的乙醇中,并在高于脂质体的转变温度(T_m)的温度(例如60°C或更高)下将溶解和加热的脂质溶液分散在TEA-硫糖酯水溶液中进行。通过从具有限定孔径(例如100nm)的径迹蚀刻聚碳酸酯膜(track-etched polycarbonate membrane)挤出,可以使脂质分散体形成平均尺寸为75-125nm(例如80-120nm,或者在一些实施方案中,90-115nm)的脂质体。对于每摩尔当量的硫糖酯,TEA-硫糖酯可包含至少8摩尔当量的TEA,以获得可以具有约0.40-0.50N的浓度和选择为防止分散和挤出步骤期间脂质体磷脂的不可接受的降解的pH(例如,约6.5)(例如,选择为使这些步骤期间脂质体磷脂的降解最小化的pH)的溶液。然后,在药物包封之前,可以例如通过透析、凝胶色谱、离子交换或超滤从脂质体分散体中除去未包载的TEA-SOS。得到的脂质体可以包含ATR蛋白激酶抑制剂硫糖酯。可以如下使这些ATR抑制剂脂质体稳定:将足够的药物负载到脂质体中,以将所得脂质体组合中TEA的量减少至一定水平,导致在4°C下180天后小于给定的最大水平的lyso-PC形成,或者在约4°C,或更常见在约5±3°C的冰箱中储存期间小于给定的最大水平的脂质体组合中lyso-PC积累速率,例如以mg/mL/月测量,或者单位时间内%PC转化成lyso-PC,例如mol% lyso-PC/月测量。接下来,通常通过任何合适的已知方法(例如,通过凝胶色谱法、透析、渗滤、离子交换或超滤)从脂质体中除去负载过程期间从脂质体交换到外部介质中的TEA以及任何未包载的ATR抑制剂。可以将脂质体外部介质替换成在期望的pH下缓冲的可注射的等渗流体(例如氯化钠的等渗溶液)。

[0109] 在人宫颈癌细胞系(例如MS751、C33A和SiHa细胞系,如实施例9中所示),以及多种肺癌细胞系,包括肺鳞状细胞癌细胞系(例如,实施例10中的NCI-H2170细胞系)、小细胞肺

癌细胞系(例如,实施例10中的DMS-114细胞系)和人Calu-6和COLO-699细胞系(实施例11)中,测试包含脂质体制剂的ATR蛋白激酶抑制剂化合物的多种脂质体制剂的抗肿瘤效力。

[0110] 参见图6-9和实施例9,在小鼠异种移植模型中的三种人宫颈癌细胞系中(实施例9A),测试了单独的以及伊立替康脂质体制剂MM398(实施例9B)组合的ATR抑制剂化合物A的脂质体制剂(实施例7)。对于3种宫颈癌细胞系中的2种(MS571和C33A),与对照实验相比,对于实施例7的脂质体化合物A制剂观察到随时间更大的肿瘤体积。然而,与施用单独MM398或单独脂质体化合物A相比,施用伊立替康脂质体MM398(实施例9B)与化合物A脂质体制剂(实施例7)的组合导致所有三种宫颈癌细胞系中肿瘤体积的更大抑制。

[0111] 参见图10A-10B和图11A-11B,在小鼠异种移植模型中的两种肺癌细胞系中(实施例10),测试了单独的以及伊立替康脂质体制剂MM398(实施例9B)组合的式(I)和式(Ia)的ATR抑制剂化合物5的脂质体制剂(实施例1的化合物如实施例7所述配制为脂质体)。参见图10A和图10B,与实施例10中的对照实验相比,施用化合物5的脂质体制剂减小了所测试的每种细胞系中的肿瘤体积,MM398和实施例7的化合物5脂质体组合物的组合降低了小鼠模型中的肿瘤体积,其比任何一种化合物与另一种化合物独立施用的程度更大。类似地,实施例10(图11A和图11B)中呈现的Kaplan-Meier存活曲线表明,使用两种不同细胞系,当实施例9B的伊立替康脂质体MM398与实施例7的化合物5脂质体制剂组合施用,小鼠肺癌异种移植模型测试中的存活率增加。

[0112] 参见图12A和图12B,在实施例10中评估了ATR蛋白激酶抑制剂化合物的多种脂质体制剂的耐受性。参见图12A,与伊立替康脂质体MM398(实施例9B)、对照或化合物5的脂质体制剂与MM398组合的组合相比,对于化合物5的脂质体制剂(实施例7)来说,在NCI-H2170小鼠异种移植模型中测试的小鼠体重下降随时间最低。参见图12B,与独立施用的化合物5的脂质体制剂(实施例7)或伊立替康脂质体MM398(实施例9B)相比,对于化合物5的脂质体制剂与MM398组合的组合,DMS-114小鼠异种移植模型中测试的小鼠体重的下降随时间最低。

[0113] 参见图13A和图13B,与对照、施用单独MM398伊立替康脂质体,施用化合物A脂质体制剂(实施例7)或MM398伊立替康脂质体(实施例9B)与化合物A脂质体制剂(实施例7)的组合相比,施用伊立替康脂质体MM398(实施例9B)与ATR蛋白激酶抑制剂化合物5的脂质体制剂的组合导致小鼠异种移植模型中Calu-6和COLO699细胞系两者中肿瘤体积的最大减小。

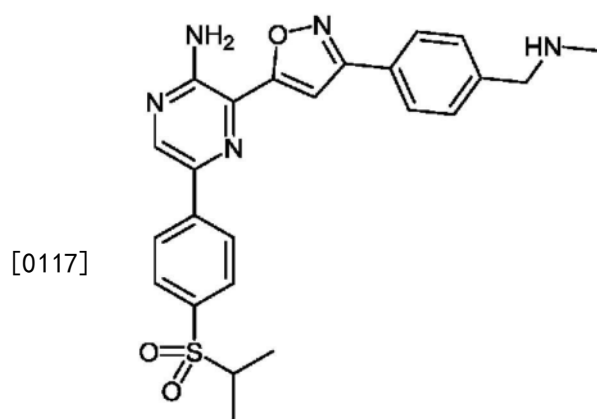
实施例

[0114] 以下实例说明了本发明的一些实施方案。提供下面的实施例和制备以使本领域技术人员能够更清楚地理解和实践本发明的这些和其它实施方案。它们不应被视为限制本发明的范围,而仅仅是其说明和代表。

[0115] 可以使用文献中已知的多种方法表达和分离ATR肽(参见例如,Ünsal-Kaçmaz等,PNAS 99:10,第6673-6678页,2002年5月14日;还参见Kumagai等.Cell 124,第943-955页,2006年3月10日;Unsal-Kacmaz等.Molecular and Cellular Biology,2004年2月,第1292-1300页;以及Hall-Jackson等.Oncogene 1999,18,6707-6713)。

[0116] 化合物A可以通过(例如)公开W02010/071827A1(2010年6月24日公开)中公开的方

法获得,其涉及化合物II-A-7的合成和用途的部分通过引用并入本文。化合物A的结构如下:

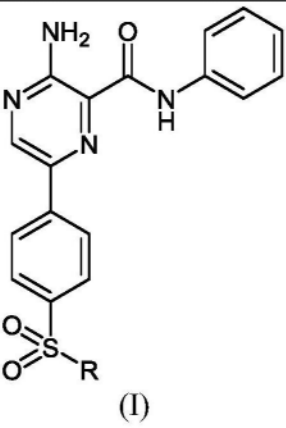
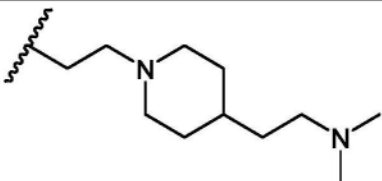
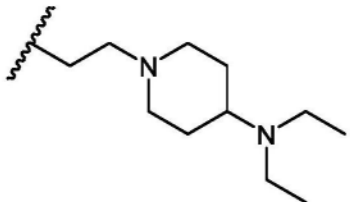
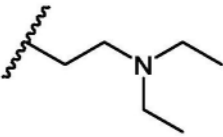
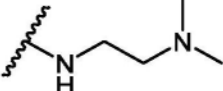


化合物 A。

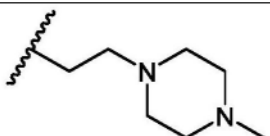
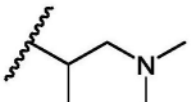
[0118] 式(I)的多种化合物可如本文所述制备,并总结于下表中。

[0119] 表1:式(I)的所选化合物

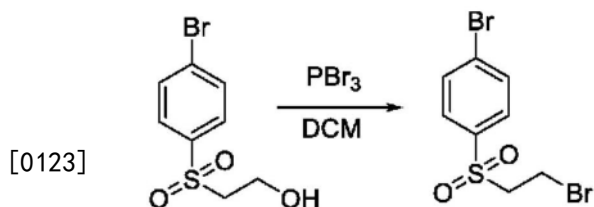
[0120]

 (I)		
化合物	R	实施例
化合物 5		1
化合物 6		2
化合物 2		3
化合物 4		4

[0121]

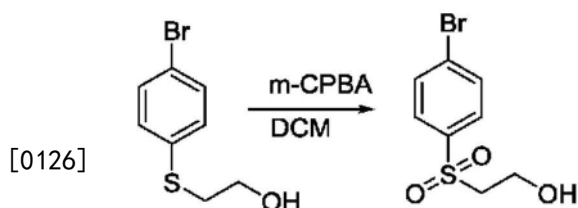
化合物 3		5
化合物 1		6

[0122] 使用图1中方案1中所示原位产生的硼酸酯在一锅式Suzuki交叉偶联中制备实例1、2、3和6。参见图1，中间体3：1-溴-4-(2-溴乙基磺酰基)苯的合成可如下所述获得。

**中间体 2****中间体 3**

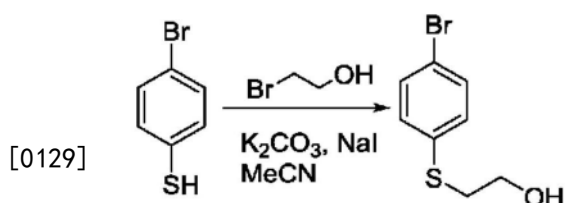
[0124] 在0℃下向中间体2 (35g, 133mmol) 在DCM (400mL) 中的溶液中滴加PBr₃ (40g, 146mmol)。然后将混合物在室温下搅拌过夜。加入水 (15mL) 以淬灭反应。然后将所得物用水 (120mL) 和盐水 (120mL) 洗涤。浓缩有机相, 得到作为黄色油状物的20g粗品3, 其不经进一步纯化用于下一步骤。

[0125] 参见图1, 中间体2的合成可以如下所述进行:

**中间体 1****中间体 2**

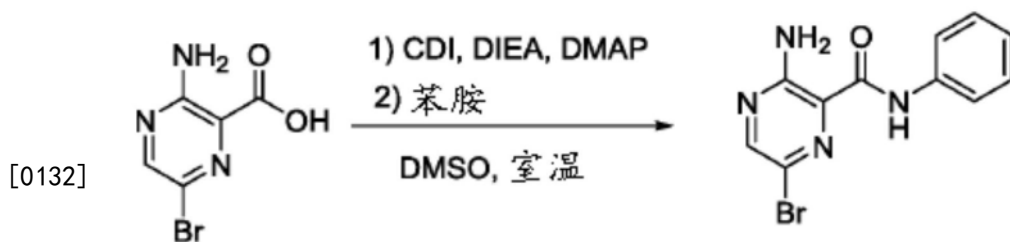
[0127] 在室温下向中间体1 (45g, 194mmol) 在DCM (500mL) 中的溶液中分批加入m-CPBA (134g, 776mmol)。然后将混合物在室温下搅拌过夜。过滤反应混合物, 加入DCM (500mL) 洗涤固体。将滤液用NaOH (1M, 300mL × 3) 和盐水 (300mL) 洗涤。将有机层浓缩至干燥, 得到作为白色固体的36g 2 (70%)。

[0128] 参见图1, 中间体1的合成可以如下所述进行。

**中间体 1**

[0130] 向4-溴苯硫酚 (45g, 238mmol) 在MeCN (600mL) 中的溶液中加入K₂CO₃ (60g, 476mmol) 和NaI (36g, 238mmol)。将混合物在室温下搅拌10分钟。然后滴加2-溴乙醇。加入后, 将混合物在室温下搅拌过夜。过滤反应混合物并将滤液浓缩至干燥。将残余物通过硅胶柱纯化, 得到作为浅黄色油状的45g 1 (81%)。

[0131] 块B可以根据图2中的方案2来制备。参见图2, 可以如下所述进行块B的合成。



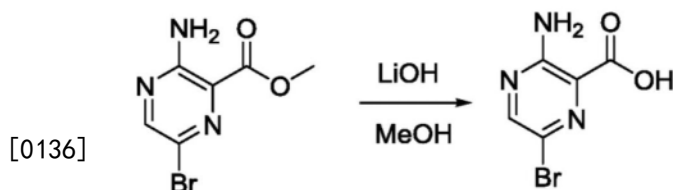
中间体 6

块 B

[0133] 向中间体6 (6.0g, 27.4mmol) 在DMSO (30mL) 中的溶液中加入CDI (8.9g, 54.8mmol)、DIPEA (3.8g, 30.1mmol) 和DMAP (0.17g, 1.37mmol)。将溶液在室温下搅拌4小时。加入苯胺 (2.5g, 27.4mmol) 并将混合物在室温下搅拌过夜。加入水并过滤收集形成的固体。通过硅胶柱纯化粗产物, 得到作为黄色固体的2.5g块B (31%)。

[0134] LC-MS (M+1): 293.2; ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 10.28 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 7.78 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 2H), 7.74 (s, 2H), 7.36 (t, $J=8.0\text{Hz}$, 2H), 7.13 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 1H)。

[0135] 再次参见图2, 中间体6的合成可以如下所述进行。

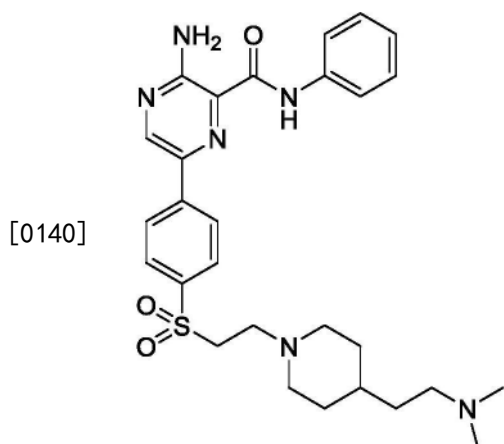


中间体 6

[0137] 向3-氨基-6-溴吡啶-2-甲酸甲酯 (10.0g 43.1mmol) 在MeOH (70mL) 中的溶液中加入LiOH (9.0g, 215mmol) 在水 (70mL) 中的溶液。将混合物在90℃下搅拌3小时。将反应混合物冷却至室温并用HCl (2M) 酸化至PH=4~5。过滤混合物, 得到作为黄色固体的7.4g 6 (79%)。

[0138] LC-MS (M+1): 218.0; ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 8.39 (s, 1H), 7.59 (br, 2H)。

[0139] 实施例1: 合成化合物5 (3-氨基-6-((4-((2-(4-(2-(二甲基氨基)乙基)哌啶-1-基)乙基)磺酰基)苯基)-N-苯基吡啶-2-甲酰胺)



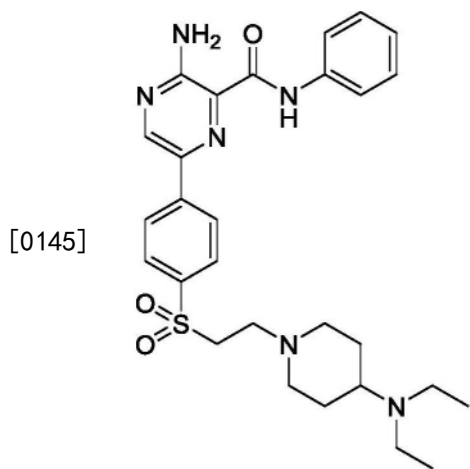
[0141] 精确质量: 536.26; 分子量: 536.70; 化合物5; 更高碱性; 143mg; 产率8.2%; pK_a

10.00。

[0142] 向2-(1-(2-((4-溴苯基)磺酰基)乙基)哌啶-4-基)-N,N-二甲基乙-1-胺(块A1)(261mg,0.648mmol)在无水二噁烷(3ml)中的溶液中加入乙酸钾(191mg,1.944mmol)和双(频哪醇合)乙硼烷(246mg,0.971mmol),通过重复真空/氮气循环使反应容器脱气,然后加入Pd(dppf)₂Cl₂·CH₂Cl₂(53mg,0.0648mmol)再次脱气,并将反应在氮气下在90℃加热2小时。然后将反应冷却至室温并加入3-氨基-6-溴-N-苯基吡嗪-2-甲酰胺(块B)、2M K₂CO₃(1ml),脱气并用氮气吹扫。加入Pd(PPh₃)₄(75mg,0.0648mmol)。反应在100℃加热4小时。将反应冷却至室温并用乙酸乙酯稀释,用盐水洗涤三次,并将有机层用Na₂SO₄干燥。在旋转蒸发器上除去溶剂后,得到深色油状残余粗产物,将其在硅胶柱色谱(Reveleris Flash Chromatography System)上纯化,使用二氯甲烷中的0-15%甲醇作为洗脱剂。获得作为黄色固体的期望产物(149mg,产率43%)。MS (M+H)⁺ 537; ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ 10.45 (s, 1H), 9.03 (s, 1H), 8.49 (d, 2H, 6.8Hz), 7.95 (d, 2H, 6.8Hz), 7.88 (s, br, 2H), 7.81 (d, 2H, 8.8Hz), 7.40 (t, 2H, 7.2Hz), 7.18 (t, 1H, 7.2Hz), 3.53 (t, 2H, 7.2Hz), 2.64 (d, 2H, 11.6Hz), 2.55 (t, 2H, 7.2Hz), 2.05 (m, 2H), 1.98 (s, 6H), 1.17 (m, 2H), 1.42 (d, 2H, 12.0Hz), 1.18 (m, 3H), 0.78 (m, 2H)。

[0143] 高分辨率质谱(Thermo Scientific™ Q Exactive™混合型四级杆-Orbitrap质谱仪): C₂₈H₃₆N₆O₃S⁺质子(1.00728)计算值=537.2642;单电荷离子的理论m/z:537.2642;实测:537.2636。

[0144] 实施例2:合成化合物6(3-氨基-6-(4-((2-(4-(二乙基氨基)哌啶-1-基)乙基)磺酰基)苯基)-N-苯基吡嗪-2-甲酰胺)



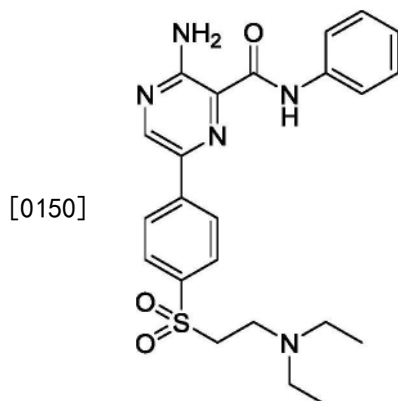
[0146] 精确质量:536.26;分子量:536.70;化合物6;更高碱性;53mg;产率11.1%;pK_a 9.81。

[0147] 使用块A2(1-(2-((4-溴苯基)磺酰基)乙基)-N,N-二乙基哌啶-4-胺)以类似方式制备实施例2,获得黄色固体(52mg,产率24%)。MS (M+H)⁺ 537; ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ 10.45 (s, 1H), 9.05 (s, 1H), 8.51 (d, 2H, 8.4Hz), 7.94 (d, 2H, 8.8Hz), 7.87 (s, br, 2H), 7.79 (d, 2H, 8.8Hz), 7.42 (t, 2H, 8.4Hz), 7.18 (t, 1H, 7.2Hz), 3.54 (t, 2H, 6.4Hz), 2.65 (d, 2H, 11.2Hz), 2.56 (t, 2H, 6.4Hz), 2.20 (q, 4H, 6.8Hz), 1.71 (t, 2, 10.4Hz), 1.33 (d, 2H, 12.4Hz), 0.85 (qd, 2H, 12.4Hz), 0.74 (t, 6H, 7.2Hz)。

[0148] 使用相应的4-二乙基氨基哌啶以类似的方式制备1-(2-((4-溴苯基)磺酰基)乙

基)-N,N-二乙基哌啶-4-胺(块A2)。得到无色油状物(661mg,产率47%),MS (M+H)⁺403,405。

[0149] 实施例3:合成化合物2(3-氨基-6-(4-((2-(二乙基氨基)乙基)磺酰基)苯基)-N-苯基吡嗪-2-甲酰胺)

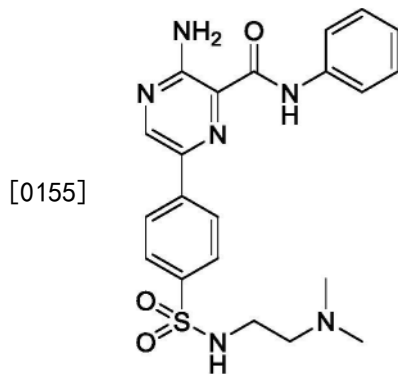


[0151] 精确质量:453.18;分子量:453.56;化合物2;较小碱性;98mg;产率7.7%;pK_a 7.46。

[0152] 使用中间体块A3,2-((4-溴苯基)磺酰基)-N,N-二乙基乙-1-胺以类似方式制备实施例3的化合物,获得黄色固体(98mg,产率11%)。MS (M+H)⁺454;¹H NMR (400MHz,DMSO-d₆):δ 10.46 (s,1H),9.05 (s,1H),8.51 (d,2H,6.8Hz),7.98 (d,2H,6.8Hz),7.88 (s,br,2H),7.81 (d,2H,8.8Hz),7.41 (t,2H,7.2Hz),7.17 (t,1H,7.2Hz),3.48 (dd,2H,6.8Hz),2.73 (m,2H),2.33 (q,4H,6.8Hz),0.81 (t,6H,6.8Hz)。

[0153] 使用相应的4-二乙胺以类似的方式制备块A3(2-((4-溴苯基)磺酰基)-N,N-二乙基乙-1-胺)。得到无色油状物(1.42g,产率73%),MS (M+H)⁺320,322

[0154] 实施例4:合成化合物4(3-氨基-6-(4-((2-(二甲基氨基)乙基)-λ²-氮烷基)磺酰基)苯基)-N-苯基吡嗪-2-甲酰胺)



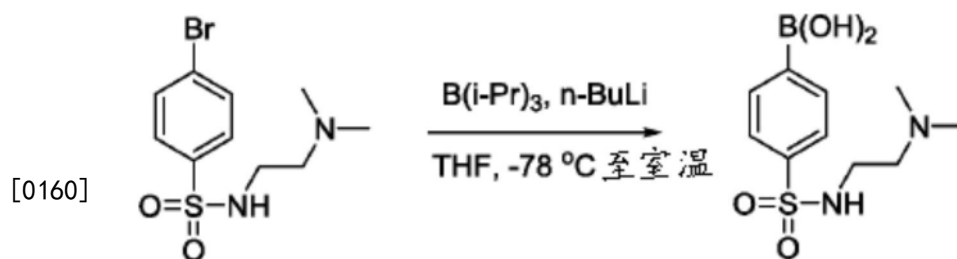
[0156] 精确质量:439.16;分子量:439.51;化合物4;pK_a 8.36。

[0157] 化合物4可以如图3中的方案3所示制备。向块B(150mg,0.51mmol)、块F(153mg,0.56mmol)和Na₂CO₃(216mg,2.0mmol)在甲苯/乙醇/水(2mL/2mL/2mL)中的混合物加入Pd(dppf)Cl₂(30mg)。将混合物在75℃的氩气氛下搅拌4小时。将反应混合物浓缩至干。通过制备型HPLC纯化残余物,得到100mg作为白色固体的TM4(45%)。

[0158] LC-MS (M+1):441.4;¹H NMR (400MHz,CD₃OD) δ8.88 (s,1H),8.33 (dd,J=6.8Hz,1.6Hz,2H),8.00 (dd,J=6.8Hz,1.6Hz,2H),7.80 (dd,J=8.4Hz,1.2Hz,2H),7.41 (t,J=7.6Hz,2H),7.19 (t,J=7.6Hz,1H),3.10 (t,J=6.4Hz,2H),2.73 (t,J=6.4Hz,2H),2.46 (s,

6H)。

[0159] 再次参见图3中的方案3,可以如下所述进行块F的合成。



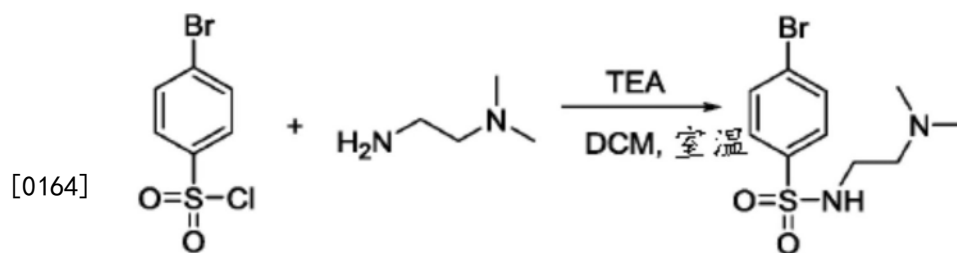
中间体 7

块 F

[0161] 在 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的氩气氛下,向中间体7 (10.0g, 32.6mmol) 在THF (200mL) 中的溶液中加入 $B(i-Pr)_3$ (30.6g, 163mmol)。然后滴加 $n-BuLi$ (2.5M, 65mL)。将混合物在 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下搅拌2小时,然后在室温下再搅拌16小时。加入水以淬灭反应。将混合物浓缩至干燥。通过制备型HPLC纯化残余物,得到5.2g作为白色固体的块F (59%)。

[0162] LC-MS (M+1): 273.4; ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.90-7.45 (m, 4H), 2.91 (s, 2H), 2.69 (t, $J=6.4\text{Hz}$, 2H), 2.18 (t, $J=6.8\text{Hz}$, 2H), 2.03 (s, 6H)。

[0163] 再次参见图3中的方案3,中间体7的合成可以如下所述进行。

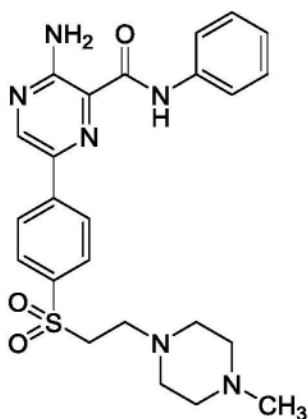


中间体 7

[0165] 在 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下,向4-溴苯-1-磺酰氯 (20, 78.3mmol) 在DCM (300mL) 中的溶液中加入TEA (22mL, 158mmol), 然后加入N,N'-二甲基乙烷-1,2-二胺 (8.3g, 94.0mmol)。将所得溶液在室温下搅拌1小时,然后用DCM (300mL) 稀释。该溶液用水 (200mL) 和盐水 (200mL) 洗涤。将有机层浓缩至干燥。通过硅胶柱纯化残余物,得到17.0g作为灰白色固体的7 (71%)。

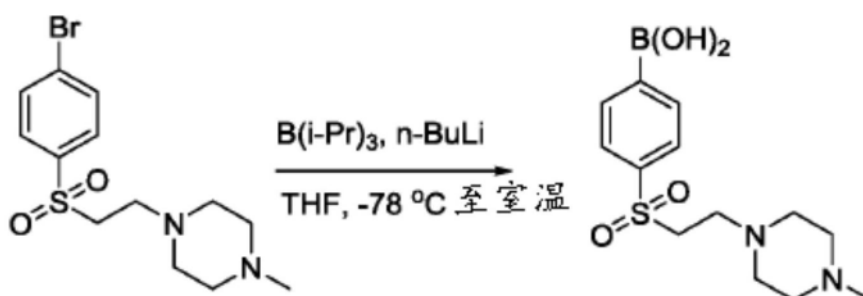
[0166] 实施例5:合成化合物3 (3-氨基-6-(4-((2-(4-甲基哌嗪-1-基)乙基)磺酰基)苯基)-N-苯基吡嗪-2-甲酰胺)

[0167]

[0168] 精确质量:480.19;分子量:480.59;化合物3; pK_a 7.73。

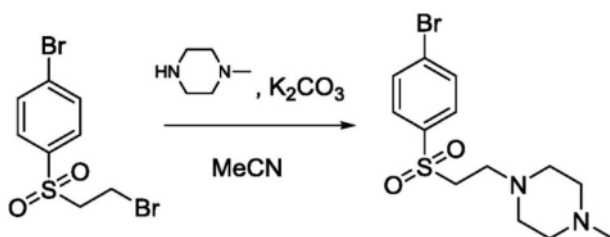
[0169] 实施例5的化合物可以通过图4所示的方案4获得。方案4中的中间体5可以如下所述获得。

[0170]

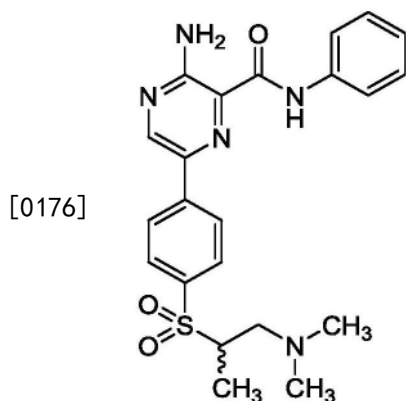
**中间体 4****中间体 5**[0171] 在-78℃的氩气氛下,向中间体4(1.7g,5.0mmol)在THF(30mL)中的溶液中加入B(i-Pr)₃(4.7g,25mmol)。然后滴加n-BuLi(2.5M,10mL)。将混合物在-78℃下搅拌2小时,然后在室温下再搅拌16小时。加入水以淬灭反应。将混合物浓缩至干燥。通过制备型HPLC纯化残余物,得到300mg作为白色固体的5(19%)。

[0172] 再次参见图4,方案4中的中间体4可以如下所述获得。

[0173]

**中间体 3****中间体 4**[0174] 向中间体3(20g,60mmol)在MeCN(300mL)中的溶液中加入1-甲基哌嗪(9.0g,90mmol)和K₂CO₃(16.6g,120mmol)。将混合物在室温下搅拌过夜。将反应混合物过滤并将滤液浓缩至干燥。通过硅胶柱纯化残余物,得到15g作为浅色固体的4(71%)。

[0175] 实施例6:合成化合物1(3-氨基-6-(4-((1-(二甲基氨基)丙-2-基)磺酰基)苯基)-N-苯基吡嗪-2-甲酰胺)



[0177] 精确质量:439.17;分子量:439.53;化合物1;较小碱性;427mg;产率12.9%; pK_a 7.04。

[0178] 根据J.Med.Chem.2011,54,2320(补充材料)中给出的用于制备化合物1的程序制备实施例6的化合物,只是使用1-溴-4-(2-溴乙基磺酰基)苯。得到黄色固体(427g,产率11%)。MS (M+H)⁺440;¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆): δ 10.46(s,1H),9.05(s,1H),8.52(d,2H,6.8Hz),7.93(d,2H,6.8Hz),7.89(s,br,2H),7.82(d,2H,8.0Hz),7.40(t,2H,7.2Hz),7.18(t,1H,7.2Hz),3.53(t,2H,7.2Hz),2.64(d,2H,11.6Hz),2.55(t,2H,7.2Hz),2.05(m,2H),1.98(s,6H),1.17(m,2H),1.42(d,2H,12.0Hz),1.18(m,3H),0.78(m,2H)。

[0179] 实施例7:制备包载有三乙基铵SOS盐的脂质体并将ATRi负载到脂质体中。

[0180] 蔗糖八硫酸钠(当量144.8)是蔗糖衍生物的钠盐,其中所有羟基都形成硫酸酯。将60克蔗糖八硫酸酯(SOS)钠盐溶于150ml去离子水中,在50℃水浴振荡(涡旋)下加热。使溶液通过填充有磺化聚苯乙烯二乙烯基苯共聚物阳离子交换树脂珠(Dowex 50Wx8-100-200目,Dow Chemical Co.)的柱。将柱用3-3.6M HCl水溶液预平衡,使树脂成为氢型,并用去离子水洗涤,直到外层显示出<1 μ S/cm的电导率。使用电导率检测器监测洗脱剂。收集对应于电导率峰的SOS级分,并立即用纯三乙胺(TEA)溶液滴定至pH6-6.5。使用钠敏感电极通过电位法分析溶液的残留钠,并使用折射计分析SOS浓度。将具有小于0.25%的残留钠的溶液用去离子水稀释至最终SOS浓度为1.1M,然后使用Millipore 0.22 μ m Steri-Top过滤器进行无菌过滤。

[0181] 胆固醇(Chol)购自Avanti Polar Lipids,Alabaster,Ala,USA,氢化大豆磷酸胆碱(HSPC)和甲氧基-聚(乙二醇)-1,2-二硬脂酰-sn-甘油基(PEG2000-DSG)获自Lipoid GmbH,Ludwigshafen,Germany。

[0182] 在65℃下将Chol、HSPC和PEG2000-DSG以3:2:0.15的摩尔比共溶于100%乙醇(200-proof,Sigma目录号:459828)中。在60-65℃下将TEA-SOS(10倍体积的所添加乙醇)溶液与脂质溶液混合并在此温度下搅拌直至形成多层囊泡的均匀的乳状悬浮液。使用氩气压力挤出机(Lipex Biomembranes)在60-65℃下将该悬浮液通过5个堆叠的孔径为100nm的碳酸酯径迹蚀刻过滤器(Corning Nuclepore)挤出3次,并将得到的单层脂质体在冰中快速冷却。然后在使用前储存在4-6℃。通过磷酸盐测定法测量磷脂浓度,并在Malvern Nanosizer上记录粒径。

[0183] 在载药之前,通过使用凝胶色谱(Sephacrose CL-4B,Pharmacia)去除过量未包载的TEA-SOS来产生TEA-SOS梯度。使用50%右旋糖溶液平衡脂质体的渗透压。最终右旋糖浓

度为15%。

[0184] 通过用1M HCl滴定并在45℃加热将ATR抑制剂溶于15%右旋糖水溶液中,然后用0.2微米NALGENE 13mm注射器过滤器过滤。通过HPLC检测溶液中的药物浓度。将含有9-10g/mL药物的ATR抑制剂的储备溶液以800g/mmol磷脂的药物/脂质比率添加到脂质体中并且用1M Hepes缓冲液和0.1N NaOH将pH调节至pH 6.5。

[0185] 在65℃偶尔搅拌下将脂质体-药物混合物孵育30分钟。快速冷却孵育混合物并在0℃下孵育10分钟,然后使其达到环境温度。用HBS-6.5缓冲液(5mM 2-(4-(2-羟基乙基)-哌嗪子基)-乙基磺酸(HEPES)、144mM NaCl, pH 6.5)洗脱在Sephadex G-25 (Amersham Pharmacia)上通过凝胶色谱法除去未包封的药物。合并在空隙体积中洗脱的脂质体级分,通过0.2微米过滤灭菌,并在使用前保存在4-6℃。通过脂质浓度、药物浓度和粒度来表征脂质体(表2)。所有ATR抑制剂均表现出良好的负载效果,除了化合物1,后者在高于400g/mol的药物脂质比下形成聚集体并沉淀。

[0186] 表2. 负载有ATR抑制剂的脂质体的表征

[0187] 实施例8. 脂质体ATRi的PK研究的一般描述

[0188]	ATR 抑制剂	负载前的药物/脂质比	负载后的药物/脂质比	负载效率(%)	脂质体大小(平均值 ± SD) nm
	化合物 6	743 ± 89	550 ± 64	74 ± 0.3	119 ± 28
	化合物 2	642 ± 10	639 ± 22	100 ± 5	130 ± 34
	化合物 5	732 ± 58	619 ± 110	84 ± 8	120 ± 29
	化合物 3	646 ± 28	628 ± 6	97 ± 5	120 ± 27
	化合物 A	736 ± 57	716 ± 41	97 ± 2	121 ± 26
	化合物 1	600-800	未负载。形成聚集体并沉淀		
		379	369	98	122 ± 24

[0189] 图5是显示脂质体ATR抑制剂的血液药代动力学的图。如实施例7中所述制备ATR抑制剂的脂质体制剂。将脂质体以20mg药物/kg的剂量静脉内施用给三只7-9周龄的雌性CD-1小鼠(Charles River)(体重约25g)。在0.08、1.5、4、8和24小时的时间点,通过隐静脉出血将血样收集到肝素锂管中。通过以10000rpm离心5分钟使血浆与细胞级分分离。通过将血浆样品与200μl 1%乙酸的甲醇溶液(1%Ac/MeOH)在-80℃孵育至少2小时来提取药物。通过以15000rpm离心20分钟使血浆蛋白沉淀。然后将75μl上清液转移到HPLC小瓶(Thermo Scientific,目录号C4011-LV1)中并加入另外的75μl 1%Ac/MeOH。通过HPLC分析药物含量,每个样品一式两份测量。数据表示为针对注射后时间绘制的%注射剂量。如图5所示,化合物1、化合物3和化合物2的脂质体制剂在循环中不稳定,脂质体化合物1和化合物3在24小时时间点通过HPLC分析不可检测,并且脂质体化合物2在8小时时间点已经不可检测。两种脂质体制剂化合物6和化合物5具有良好的循环寿命,在24小时后高于初始注射剂量的16%。下面的表2总结了血液PK曲线。与其它脂质体实例相比,脂质体化合物6和化合物5显示出最

高的血浆半衰期。

[0190] 表3. 脂质体ATR抑制剂的药代动力学参数

	药物	C _{max} (mg/ml)	AUC (mg/ml*h)	Vd (ml)	Cl (ml/h)	T _{1/2} (h)	24 小时后 ID 的%
[0191]	Ls-化合物 3	0.271	1.659	2.020	0.330	4.24	0.0
	Ls-化合物 6	0.303	3.021	1.655	0.166	6.91	16.4
[0192]	Ls-化合物 2	0.080	0.160	5.806	2.890	1.39	0.0
	Ls-化合物 5	0.227	2.504	2.012	0.182	7.65	17.2
	Ls-化合物 A	0.237	1.902	0.712	0.089	5.56	9.0
	Ls-化合物 1	0.053	0.043	6.358	7.841	0.56	0.0

[0193] 实施例9A: 使用TEA.SOS制备的LS-化合物A对小鼠宫颈癌异种移植物的体内抗肿瘤效力和耐受性

[0194] 图6是显示如实施例9A中所述的在宫颈MS751异种移植模型中与MM-398组合的脂质体化合物A的抗肿瘤效力的图。

[0195] 图7是显示如实施例9A中所述的在宫颈C33A异种移植模型中与MM-398组合的脂质体化合物A的抗肿瘤效力的图。

[0196] 图8是显示根据实施例9A的在宫颈C33A异种移植模型中与MM-398组合的脂质体化合物A的抗肿瘤效力的图。

[0197] 图9是显示根据实施例9A的在宫颈MS751中与MM-398组合的脂质体化合物A的耐受性的图。

[0198] 在人宫颈MS751、C33A和SiHa细胞系的模型中研究了与MM-398 (脂质体伊立替康) 组合的负载有ATR抑制剂化合物A的脂质体 (Ls-化合物A) 的抗肿瘤效力。细胞获自American Type Culture Collection (Rockville, MD), 并在补充有10%胎牛血清、50U/mL青霉素G和50μg/mL硫酸链霉素的RPMI培养基中于37℃、5%CO₂下根据供应商的建议繁殖。NCR nu/nu 纯合无胸腺雄性裸鼠 (4-5周龄, 体重至少16g) 获自Charles River。在小鼠右肋腹皮下接种0.1mL含有悬浮于补充有30%Matrigel的PBS中的5×10⁶个细胞的悬浮液。当肿瘤达到150mm³至350mm³的大小时, 根据以下方法将动物分配到治疗组中。根据肿瘤大小对动物进行分级, 并分到肿瘤大小减小的6个类别中。通过从每个大小类别中随机选择一只动物来形成10只动物/组的四个治疗组, 使得在每个治疗组中所有肿瘤大小均匀地代表。

[0199] 以7天的间隔, 动物接受以下制剂的四次尾静脉注射: 1) 对照 (HEPES-缓冲盐水pH 6.5); 2) 每次注射剂量为2或5mg/kg的MM-398; 3) 每次注射20或60mg/kg的脂质体化合物A; 4) MM-398, 然后以24小时的间隔注射脂质体化合物A。如实施例7所述制备用于注射的脂质体。每周两次监测动物体重和肿瘤大小。通过每周两次沿最大 (长度) 和最小 (宽度) 轴的肿瘤的触诊和卡尺测量来监测肿瘤进展。每周两次使用以下公式 (Geran, R. I., 等,

1972Cancer Chemother.Rep.3:1-88)从卡尺测量值确定肿瘤大小:

[0200] 肿瘤体积=[(长度)×(宽度)²]/2

[0201] 为了评估治疗相关毒性,还每周两次对动物称重。在肿瘤接种后观察动物60天。当组中的肿瘤达到小鼠体重的10%时,使组中的动物安乐死。将各组的平均肿瘤体积一起绘制并随时间进行比较。如图6、7和8所示,在所有三个异种移植物模型中,与单独的MM-398和脂质体化合物A相比,脂质体ATR抑制剂化合物A与MM-398的组合具有显著更强的抗肿瘤作用。通过动物体重的动态评估治疗相关毒性(图9)。没有组显示任何显著的毒性。所有治疗组动物的体重与对照组相当,并持续增加。因此,ATR抑制剂化合物A的脂质体制剂在所研究的肿瘤模型中显示增加的抗肿瘤活性,而毒性没有明显的增加。

[0202] 实施例9B:MM-398伊立替康脂质体制备

[0203] 实施例9A中和本文其它地方使用的MM398是伊立替康脂质体,其可以以多步方法制备。首先,将脂质溶解在加热的乙醇中。脂质可包含以3:2:0.015摩尔比组合的DSPC、胆固醇和MPEG-2000-DSPE。优选地,脂质体可以包封包封在由3:2:0.015摩尔比的DSPC、胆固醇和MPEG-2000-DSPE组成的泡囊中的伊立替康蔗糖八硫酸酯(SOS)。将得到的乙醇-脂质溶液分散在含有取代的胺和聚阴离子的含水介质中,条件为有效形成含有包封在由溶解的脂质形成的囊泡中的取代的胺(为铵的形式)和聚阴离子的适当大小(例如80-120nm)的基本上单层脂质体。例如,可以如下进行分散:在高于脂质转变温度(例如60-70℃)的温度下将乙醇脂质溶液与含有取代的胺和聚阴离子的水溶液混合,并使得到的水合脂质悬浮液(多层脂质体)在压力下通过一个或多个具有限定孔径例如,50nm、80nm、100nm或200nm的径迹蚀刻的例如聚碳酸酯膜过滤器。取代的胺可以是三乙胺(TEA),并且聚阴离子可以是在约0.4-0.5N的浓度下以化学计量比(例如,TEA₈SOS)组合的蔗糖八硫酸酯(SOS)。除去全部或基本上全部未包封的TEA或SOS(例如通过凝胶过滤、透析或超滤),然后在有效地允许伊立替康进入脂质体与离开脂质体的TEA交换的条件下使脂质体与伊立替康接触。条件可以包括选自以下的一种或多种条件:向脂质体外部介质中加入渗透剂(例如5%右旋糖)以平衡包载的TEA-SOS溶液的渗透压和/或防止负载期间脂质体的渗透性破裂,调节和/或选择pH(例如至6.5)以减少负载步骤期间的药物和/或脂质降解,并且提高温度以高于脂质体脂质转变温度(例如至60-70℃)以加速TEA和伊立替康的跨膜交换。通过与穿过脂质体的TEA交换负载伊立替康优选地继续直到全部或基本上全部的TEA从脂质体去除,从而耗尽跨脂质体的浓度梯度。优选地,伊立替康脂质体负载过程持续进行,直到伊立替康与蔗糖八硫酸酯的克当量比为至少0.9,至少0.95、0.98、0.99或1.0(或约0.9-1.0、0.95-1.0、0.98-1.0或0.99-1.0)。优选地,伊立替康脂质体负载过程继续进行,直到从脂质体内部移除至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或更多的TEA。伊立替康可以在脂质体内形成伊立替康蔗糖酯,例如伊立替康与蔗糖八硫酸酯的摩尔比为约8:1。接下来,使用例如凝胶(尺寸排阻)色谱、透析、离子交换或超滤除去任何剩余的脂质体外伊立替康和TEA,以获得伊立替康脂质体。脂质体外部介质替换成可注射的药理学可接受的流体,例如缓冲等渗盐水。最后,将脂质体组合物例如通过0.2微米过滤灭菌,分配到剂量小瓶中,贴标签并例如在2-8℃冷冻储存直至使用。可以在除去剩余的脂质体外伊立替康和TEA的同时将脂质体外部介质替换成药理学上可接受的流体。可调节或以其它方式选择组合物的脂质体外pH值,以提供期望的储存稳定性(例如,减少在4℃储存180天期间脂质体内lyso-PC的形成),例如通过制备pH为约6.5-

8.0或其间的任何合适的pH值(包括例如7.0-8.0和7.25)的组合物。

[0204] 称出分别对应于3:2:0.015摩尔比的量的DSPC、胆固醇(Chol)和PEG-DSPE(例如, 1264mg/412.5mg/22.44mg)。将脂质溶于氯仿/甲醇(4/1v/v)中,充分混合,分成4等份(A-D)。每个样品在60℃使用旋转蒸发器蒸发至干燥。通过在室温下在真空(180微托)下放置12小时从脂质中除去残留的氯仿。将干燥的脂质溶解于60℃的乙醇中,加入适当浓度的预热TEA₈SOS,使得最终醇含量为10%(v/v)。脂质浓度为75mM。使用Lipex thermobarrel挤出机(Northern Lipids, Canada)在约65℃下通过2个堆叠的0.1μm聚碳酸酯膜(Nucleopore)将脂质分散体挤出10次以产生典型平均直径为95-115nm(通过准弹性光散射测定)的脂质体。必要时,用1N NaOH将挤出的脂质体的pH调节至pH 6.5。通过离子交换色谱和尺寸排阻色谱的组合纯化脂质体。首先,用1N NaOH处理DOWEX IRA 910树脂,接着用去离子水洗涤3次,然后用3N HCl洗涤3次,然后用水多次洗涤。使脂质体通过准备的树脂,并通过使用流动池电导率仪(Pharmacia, Upsalla, Sweden)测量洗脱级分的电导率。如果电导率小于15μS/cm,则认为该级分可接受用于进一步纯化。然后将脂质体洗出物应用于用去离子水平衡的Sephadex G-75(Pharmacia)柱,并且测量收集的脂质体级分的电导率(通常小于1μS/cm)。通过添加40%右旋糖溶液至5%(w/w)的终浓度并从储备溶液(0.5M, pH 6.5)添加缓冲液(Hepes)至10mM的终浓度来实现跨膜等渗性。

[0205] 考虑从每批次的分析证书获得的水含量和杂质水平,通过将伊立替康·HCl三水合物粉末在去离子水中溶解至15mg/mL无水伊立替康-HCl来制备依立替康储备溶液。通过以500g/mol脂质体磷脂添加伊立替康并在热水浴中加热至60±0.1℃30分钟来启动药物负载。在从水浴中取出后立即浸入冰冷的水中来使溶液迅速冷却。使用Hepes缓冲盐水(10mM Hepes, 145mM NaCl, pH6.5)平衡和洗脱的Sephadex G75柱,通过尺寸排阻色谱除去脂质体外药物。通过HPLC分析样品的伊立替康以及通过Bartlett的方法分析磷酸盐(参见磷酸盐测定)。

[0206] 本文所述的储存稳定的伊立替康脂质体的一个优选实例是作为ONIVYDE(伊立替康脂质体注射剂)销售的产品。ONIVYDE是用于静脉内使用的用伊立替康盐酸盐三水合物配制成脂质体分散体的拓扑异构酶抑制剂。ONIVYDE适用于基于吉西他滨治疗后疾病进展后胰腺的转移性腺癌的治疗。

[0207] ONIVYDE是具有约7.25的pH的储存稳定的脂质体。ONIVYDE产品包含由伊立替康盐酸盐三水合物起始材料获得的包封在脂质体中的伊立替康硫糖酯。伊立替康的化学名称是(S)-4,11-二乙基-3,4,12,14-四氢-4-羟基-3,14-二氧化代1H-吡喃并[3',4':6,7]-吲哚并[1,2-b]喹啉-9-基-[1,4'联吡啶]-1'-羧酸酯。ONIVYDE的剂量可以基于用于制备伊立替康脂质体的伊立替康三水合物盐酸盐起始材料的当量或基于脂质体中伊立替康的量计算。每克伊立替康三水合物盐酸盐含约866mg伊立替康。例如,基于伊立替康盐酸盐三水合物起始材料的量,80mg的ONIVYDE剂量在最终产品中实际上包含约 $0.866 \times (80\text{mg})$ 的伊立替康(即,基于伊立替康盐酸盐起始材料的重量,ONIVYDE的80mg/m²的剂量相当于最终产品中伊立替康为约70mg/m²)。ONIVYDE是一种无菌的白色至微黄色不透明的等渗脂质体分散体。每10mL单剂量小瓶含有浓度为4.3mg/mL的43mg伊立替康游离碱。脂质体是直径约110nm的单层脂质双层囊泡,其包封含有作为蔗糖八硫酸酯的凝胶化或沉淀状态的伊立替康的水性空间。囊泡由1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)6.81mg/mL、胆固醇2.22mg/mL和甲氧基

封端的聚乙二醇(MW2000)-二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺(MPEG-2000-DSPE) 0.12mg/mL构成。每mL还含有作为缓冲剂的2-[4-(2-羟乙基)哌嗪-1-基]乙磺酸(HEPES) 4.05mg/mL和作为等渗试剂的氯化钠8.42mg/mL。每瓶ONIVYDE含有43mg/10mL伊立替康游离碱,在单剂量小瓶中的作为白色至微黄色不透明脂质体分散体。

[0208] 在本发明的一个实例中,ONIVYDE单位剂型是药物组合物,其包含一定量的包封在脂质体中的伊立替康,提供总量约70mg/m²的伊立替康(提供相当于80mg/m²伊立替康盐酸盐三水合物的量的伊立替康),以及小于约20%lyso-PC。单位剂型可以是总体积为约500mL的静脉内制剂。通过如下稀释来自小瓶的等渗脂质体分散体来制备ONIVYDE:从小瓶中抽出计算量的ONIVYDE。将ONIVYDE用500mL 5%葡萄糖注射液(USP)或0.9%氯化钠注射液(USP)稀释并将稀释的溶液通过轻轻倒转混合;将稀释的溶液避光保存并且在室温储存时制备的4小时内或者在冷冻条件[2℃至8℃(36°F至46°F)]储存时制备的24小时内施用。

[0209] 表明ONIVYDE(伊立替康脂质体注射剂)与5-氟尿嘧啶和甲酰四氢叶酸组合用于治疗已经在基于吉西他滨的治疗后发展胰腺的转移性腺癌的患者。在甲酰四氢叶酸和氟尿嘧啶之前施用ONIVYDE。ONIVYDE的推荐剂量是每2周通过静脉内输注经过90分钟施用70mg/m²伊立替康。在已知为UGT1A1*28等位基因的纯合体的患者中,ONIVYDE的推荐起始剂量是通过静脉内输注经过90分钟施用50mg/m²伊立替康。在随后周期中,由于耐受性,ONIVYDE的剂量可以增加至70mg/m²。对于血清胆红素高于正常值上限的患者,不推荐使用ONIVYDE。ONIVYDE作为稀释溶液经90分钟静脉内输注。

[0210] 合适的治疗方案包括每2周经过46小时ONIVYDE 70mg/m²以及(1+d外消旋形式)甲酰四氢叶酸400mg/m²(或200mg/m²活性1形式的甲酰四氢叶酸)和氟尿嘧啶2,400mg/m²(ONIVYDE/5-FU/LV;n=117),每3周ONIVYDE 100mg/m²(n=147),或每周经过24小时甲酰四氢叶酸200mg/m²和氟尿嘧啶2000mg/m²,持续4周,然后休息2周(5-FU/LV;n=134)。

[0211] 实施例10:使用TEA.SOS制备的Ls-化合物5对小鼠肺癌异种移植物的体内抗肿瘤效力和耐受性

[0212] 图10A和图10B各自是显示如实施例10中所讨论的在NCI-H2170(图10A)或DMS-114(图10B)小鼠异种移植物模型中与MM-398组合的脂质体化合物5的效力的图。

[0213] 图11A和图11B各自是显示代表如实施例10中所讨论的在NCI-H2170(图11A)和DMS-114(图11B)小鼠异种移植物模型中与MM-398组合的脂质体化合物5的效力的Kaplan-Meyer存活曲线的图。

[0214] 图12A和图12B各自是显示在NCI-H2170(图12A)或DMS-114(图12B)小鼠异种移植物模型中与MM-398组合的脂质体化合物5的耐受性的图。

[0215] 在人NCI-H2170(肺鳞状细胞癌)和DMS-114(小细胞肺癌)肺细胞系的模型中研究了与MM-398(脂质体伊立替康)组合的负载有ATR抑制剂化合物5的脂质体的抗肿瘤效力。

[0216] 细胞获自American Type Culture Collection(Rockville,MD),并在补充有10%胎牛血清、50U/mL青霉素G和50μg/mL硫酸链霉素的RPMI培养基中于37℃、5%CO₂下根据供应商的建议繁殖。NCR nu/nu纯合无胸腺雄性裸鼠(4-5周龄,体重至少16g)获自Charles River。在小鼠右肋腹皮下接种0.1mL含有悬浮于补充有30%Matrigel的PBS中的5×10⁶个细胞的悬浮液。当肿瘤达到150mm³至350mm³的大小时,根据以下方法将动物分配到治疗组中。根据肿瘤大小对动物进行分级,并分到肿瘤大小减小的6个类别中。通过从每个大小类

别中随机选择一只动物来形成10只动物/组的四个治疗组,使得在每个治疗组中所有肿瘤大小均匀地代表。以7天的间隔,动物接受以下制剂的四次尾静脉注射:1)对照(HEPES-缓冲盐水pH 6.5);2)每次注射剂量为5mg/kg的MM-398;3)每次注射80mg/kg的脂质体化合物5;4)MM-398,然后以24小时的间隔注射脂质体化合物5。如实施例7所述制备用于注射的脂质体。实施例9B中描述了MM-398。

[0217] 每周两次监测动物体重和肿瘤大小。通过每周两次沿最大(长度)和最小(宽度)轴的肿瘤的触诊和卡尺测量来监测肿瘤进展。每周两次使用以下公式从卡尺测量值确定肿瘤大小:

[0218] 肿瘤体积 = $[(\text{长度}) \times (\text{宽度})^2] / 2$

[0219] 为了评估治疗相关毒性,还每周两次对动物称重。当组中的肿瘤达到小鼠体重的10%时,使组中的动物安乐死。将各组的平均肿瘤体积一起绘制并随时间进行比较。

[0220] 如图10A和10B以及图11A和11B所示,在两种肺异种移植物模型中,脂质体ATR抑制剂化合物5显著改善了MM-398的抗肿瘤效力。脂质体ATR抑制剂和MM-398的组合处理不影响动物的体重(图12A和12B)。

[0221] 实施例11:与MM-398组合的脂质体抑制剂Ls-化合物5和LS-化合物A针对小鼠肺癌异种移植物的体内抗肿瘤效力的比较

[0222] 图13A和图13B是显示在Calu-6(图13A)或COLO-699(图13B)小鼠异种移植物模型中与MM-398组合的脂质体化合物5的效力的图。例如,图13A和13B中的数据表明,显示虽然脂质体ATR抑制剂化合物5显著改善了MM-398在两种模型中的抗肿瘤效力,但在脂质体中配制的化合物A仅在COLO-699异种移植物模型中有活性。

[0223] 在人Calu-6和COLO-699肺细胞系的异种移植物模型中,将与MM-398(脂质体伊立替康)组合的负载有ATR抑制剂化合物5的脂质体的抗肿瘤效力与化合物A的脂质体制剂的进行比较。

[0224] 细胞获自American Type Culture Collection(Rockville,MD),并在补充有10%胎牛血清、50U/mL青霉素G和50μg/mL硫酸链霉素的RPMI培养基中于37℃、5%CO₂下根据供应商的建议繁殖。NCR nu/nu纯合无胸腺雄性裸鼠(4-5周龄,体重至少16g)获自Charles River。在小鼠右肋腹皮下接种0.1mL含有悬浮于补充有30%Matrigel的PBS中的5×10⁶个细胞的悬浮液。当肿瘤达到150mm³至350mm³的大小时,根据以下方法将动物分配到治疗组中。根据肿瘤大小对动物进行分级,并分到肿瘤大小减小的6个类别中。通过从每个大小类别中随机选择一只动物来形成10只动物/组的四个治疗组,使得在每个治疗组中所有肿瘤大小均匀地代表。以7天的间隔,动物接受以下制剂的四次尾静脉注射:1)对照(HEPES-缓冲盐水pH 6.5);2)每次注射剂量为10或20mg/kg的MM-398;3)每次注射80mg/kg的脂质体化合物5;4)每次注射80mg/kg的脂质体化合物A;5)MM-398,然后以24小时的间隔注射脂质体化合物5;6)MM-398,然后以24小时的间隔注射脂质体化合物A。如实施例7所述制备用于注射的脂质体。

[0225] 每周两次监测动物体重和肿瘤大小。通过每周两次沿最大(长度)和最小(宽度)轴的肿瘤的触诊和卡尺测量来监测肿瘤进展。每周两次使用以下公式从卡尺测量值确定肿瘤大小:

[0226] 肿瘤体积 = $[(\text{长度}) \times (\text{宽度})^2] / 2$

[0227] 为了评估治疗相关毒性,还每周两次对动物称重。当组中的肿瘤达到小鼠体重的10%时,使组中的动物安乐死。将各组的平均肿瘤体积一起绘制并随时间进行比较。

[0228] 实施例12:游离药物组合筛选研究

[0229] 图14A是说明在一组肺癌细胞系中化合物6和化合物5的体外单一疗法细胞杀伤的图。与化合物6相比,化合物5更有效,IC₅₀低约3(=100.5)倍。图14B是说明与三种化学治疗剂(卡铂、吉西他滨、化合物B)组合的化合物5和化合物6的效果的图。该图比较了化学治疗剂与1μg/ml化合物6或化合物5组合的以log(μM)为单位的IC₅₀。在所有测试细胞毒性剂和除一种以外的所有细胞系中,向化学治疗剂中添加化合物5比化合物6更有效(更低的IC₅₀)。

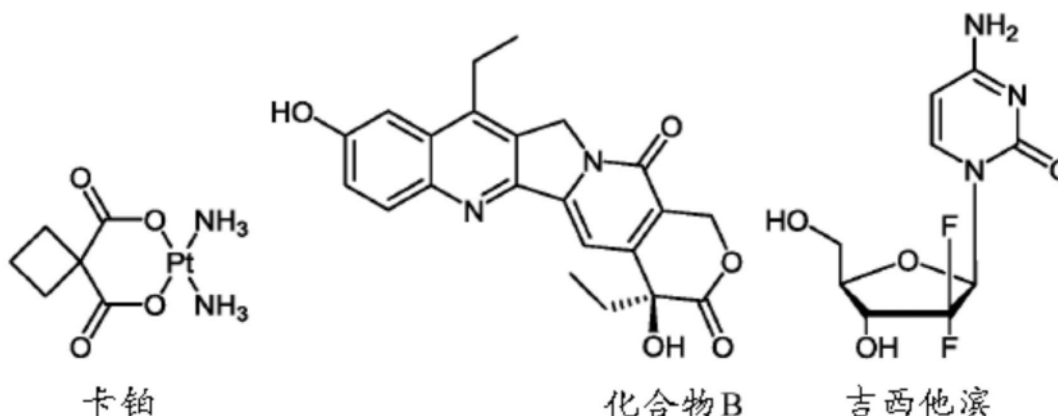
[0230] 图15是显示在Sum190PT细胞系(TNBC)中的组合(实施例2+化合物B) IC₅₀位移的图。

[0231] 图16A和图16B是显示在MDA-MB-453细胞系(TNBC)中实施例2的化合物与化合物B对比于化合物A与化合物B的组合的IC₅₀位移的比较的图。

[0232] 培养/处理条件

[0233] 使用CELLTITER-GLO发光细胞存活力测定(Promega)和Corning目录号3707 384孔白色澄清底板进行体外效力研究。将细胞铺在384孔格式中(1000个细胞/孔),并使其在37℃下孵育24小时。在24小时的时间点添加单一疗法药物,然后在37℃孵育24小时。在48小时时间点,移除培养基中的药物,用PBS洗涤,并添加新鲜培养基。然后使细胞在37℃孵育72小时。对于组合研究,使细胞暴露于卡铂或化合物B或吉西他滨24小时,然后除去化学治疗剂并使细胞暴露于第二化合物(ATR抑制剂)24小时。将细胞在新鲜培养基中再培养48小时。

[0234]



[0235] 在120小时时间点,移除培养基并添加CELLTITER-GLO (CTG) 试剂(与PBS的比例为1:1)。使用光度计(Envision Multilabel reader)读取板。

[0236] 数据分析:

[0237] 用使用Matlab开发的内部算法(Mathworks,Natick MA)分析数据。总之,计算4个重复孔的平均CTG平均发光值。通过计算变异系数(CV>20%)进行异常值检测,并从平均值中去除异常值。基于对照未处理孔对CTG值进行归一化。在拟合到4参数逻辑曲线之前,对微摩尔(μM)的药物浓度进行对数转换。

[0238]
$$y = b + \frac{(a-b)}{(1+10^{(IC_{50}-C) \cdot slope})}$$
 其中C:药物浓度,y:归一化CTG值,a:顶部渐近线(代表最大细胞杀伤),b:底部渐近线(限制于0.8-1.2),IC₅₀,slope:逻辑曲线斜率。

[0239] 根据这些规则进行数据质量控制以确保浓度范围是最佳的:(1)如果最低浓度杀死超过70%的细胞,则认为浓度范围太强(2)如果最高浓度杀死低于30%的细胞,则认为浓

度范围低的或细胞系抗性太强。另外,使用 R^2 评估拟合优度,并且 $R^2 < 0.9$ 被标记为差的拟合。

[0240] 使用JMP (SAS Institute Inc.,NC) 进行统计学分析,认为 $p < 0.05$ 是显著的。

[0241] 实施例13:ATR活性测定

[0242] 使用GST标记的全长p53作为底物,在Eurofins ATR/ATRIP HTRF测定中使用线性酶浓度对提供的化合物组针对激酶ATR/ATRIP (h) 进行 EC_{50} 测定。

[0243] 在从10 μ M半对数稀释的化合物的9个浓度下,测定 K_m 的15 μ M内的ATP浓度下的ATR/ATRIP (h) 活性。通过形成由铈标记的抗磷酸Ser15p53抗体和抗GST-d2抗体组成的能量转移复合物来测量Ser15上p53的ATR/ATRIP磷酸化。所有数据点用DMSO对照和EDTA空白一式两份进行。

[0244] 将ATR/ATRIP (h) 在25mM HEPES pH 8.0、0.01%Brij-35、1%甘油、5mM DTT、1mg/mL BSA中预稀释,并使用30nM GST,cMyc p53- (hu,FL) 作为底物在25mM HEPES pH 8.0、0.01%Brij-35、1%甘油、10mM $MnCl_2$ 中测定。通过添加ATP至终浓度为10 μ M来开始反应。

[0245] 单个重复以DMSO阳性对照活性的百分比表示。将每个抑制剂浓度的平均活性(%对照)相对于抑制剂浓度作图,并使用GRAPHPAD PRISM测定 EC_{50} 值。

[0246] 将表示为%对照活性的数据针对抑制剂浓度作图,并使用GRAPHPAD PRISM拟合到四参数逻辑中。每个化合物的图表显示在附带的Excel报告中的数据旁边。下面显示了化合物效力的总结。

[0247] 表4

化合物 ID	激酶	ATP μ M	EC_{50} * nM	顶部	底部	Hill	r^2
化合物 6	ATR ATRIP(h)	10	470.8	101	-2	-0.768	0.998
化合物 2	ATR ATRIP(h)	10	139.8	94	1	-0.911	0.998
化合物 5	ATR ATRIP(h)	10	233.9	95	1	-0.819	0.996
化合物 1	ATR ATRIP(h)	10	49.6	95	-1	-0.772	0.994
化合物 4	ATR ATRIP(h)	10	353.4	97	1	-0.860	0.997
化合物 3	ATR ATRIP(h)	10	196.1	98	-3	-0.776	0.999
化合物 A	ATR ATRIP(h)	10	<1	ND	ND	ND	ND

[0249] 实施例14:ATM活性测定

[0250] 估计的 IC_{50} 值如下(使用STANDARD KINASEPROFILER获得):

化合物	激酶	IC_{50} (nM)
化合物6	ATM (h)	>10,000
化合物2	ATM (h)	4817
化合物5	ATM (h)	>10,000
化合物1	ATM (h)	3864

化合物4	ATM (h)	6869
化合物3	ATM (h)	>10,000
化合物A	ATM (h)	42

[0252] 实施例15:用蛋白质印迹分析检测总ATR和磷酸-ATR

[0253] 参见图17:在体外使肺癌细胞DMS-114暴露于单独的或组合的吉西他滨[16nM]或ATR抑制剂(化合物A或化合物5[1 μ M])。在1、3、6和24小时后使用含有2%SDS的细胞裂解缓冲液产生全细胞蛋白裂解物,并储存在-80℃下直至收集了所有样品并同时一起进行蛋白质印迹分析。通过购自Cell Signaling Technology的抗体检测以下感兴趣的蛋白质和磷酸蛋白(参见下文的方法和材料部分):总的和磷酸-ATR(S428)、磷酸-CHK1(S317和S345)、 γ H2AX、 β -肌动蛋白。

[0254] 结果在图17中:随着添加两种ATR抑制剂(化合物A和化合物5)中的任一种,总ATR和磷酸-ATR信号随时间强烈降低,但在对照和单独吉西他滨处理中未降低(比较例如24小时1、2与3、4或5、6的)。在对吉西他滨的响应种,磷酸-CHK1(S317和S345)信号在24小时内显著增加。添加任何使用的ATR抑制剂(化合物A或化合物5)消除CHK1的磷酸化信号。两种抑制剂对ATR蛋白质和下游CHK1信号传导的降低证实了两种分子的特异性在靶作用。更重要的是,我们的猜想导致细胞周期停滞和DNA损伤修复的由CHK1磷酸化信号传导驱动细胞周期检查点的丧失通过DNA损伤的累积诱导细胞死亡。增加的 γ H2AX信号可以被看作衡量增加的毒性和DNA损伤累积的替代指标。

[0255] 细胞培养

[0256] 使U2OS和所有其它细胞在补充有10%胎牛血清(FBS)和抗生素的(RPMI)中生长。使用慢病毒颗粒,感染和嘌呤霉素筛选方案,按照Essen Bioscience Inc.的推荐产生成像和时间推移兼容的NucLight红细胞系。

[0257] 抗体和蛋白质印迹

[0258] 所有靶标和磷酸特异性抗体购自Cell Signaling和/或Epitomics,并以1:1000稀释度使用。表6中提供了所有抗体的列表。使用标准的基于抗体的蛋白质印迹和免疫组织化学方案。简单地说,使用基于2%SDS的细胞裂解缓冲液收集全细胞裂解物用于蛋白质印迹。购买第二抗体和染色方案并遵循LiCor Biosciences和/或BD Bioscience。

[0259] 表6

	靶标	公司	目录号
[0260]	ATR	Cell Signaling Technology	2790
	ATR 磷酸(S428)	Cell Signaling Technology	2853
	CHK1 磷酸 (S317)	Cell Signaling Technology	12302
[0261]	CHK1 磷酸 (S345)	Cell Signaling Technology	2348
	H2AX 磷酸(S139)	Cell Signaling Technology	9718
	β -激动蛋白	Cell Signaling Technology	4970

[0262] 全细胞裂解方案

[0263] 细胞在6cm规格中生长和处理。为了收获细胞,除去培养基并迅速替换成冰冷的PBS。然后将PBS替换成250 μ L的2%SDS裂解缓冲液。孵育5分钟后,刮下裂解的细胞并加载到

细胞裂解物匀浆器微量离心机旋转柱 (QIAshredder, Qiagen, Cat.-Nr.79656) 上。然后将滤液加载到0.2 μ m离心过滤器柱 (Nanosep MF 0.2_m, Pall, Cat.-Nr.ODM02C34) 上。然后将裂解物储存在-80℃。

[0264] 根据Steven等,“Protein microarrays for multiplex analysis of signal transduction pathways,”Nat Med 10,no.12 (2004年12月):1390-1396来修改含有2%SDS的裂解缓冲液(表7)。

[0265] 表7

[0266]	滴定的 pH=6.8 最终浓度	
	Trizma-碱	50mM
	SDS	2%
	Glycerol	5%
	EDTA	5mM
	NaF	1mM

[0267] 实施例16:广泛激酶组筛选 (359)

[0268] 359中的主要命中是:ALK、ARK、c-MER、CLK1、DYRK、GSK3a、GSK3b、FLT2、FLT3、MLK1、SIK2、TNIK和YSK4。

[0269] 表8

[0270]	激酶:	化合物 5 (M)	Log IC ₅₀	激酶:	nM
	ALK1/ACVRL1	3.57E-08	-7.45	ALK1/ACVRL1	35.7
	ALK2/ACVR1	1.66E-08	-7.78	ALK2/ACVR1	16.6

[0271]

ARK5/NUAK1	1.68E-08	-7.78	ARK5/NUAK1	16.8
CLK1	1.34E-07	-6.87	CLK1	134
CLK4	8.86E-08	-7.05	CLK4	88.6
DDR1	1.91E-07	-6.72	DDR1	191
DYRK2	7.18E-08	-7.14	DYRK2	71.8
FLT4/VEGFR3	6.34E-08	-7.20	FLT4/VEGFR3	63.4
GSK3a	5.73E-09	-8.24	GSK3a	5.73
GSK3b	6.30E-08	-7.20	GSK3b	63
MLK1/MAP3K9	1.13E-08	-7.95	MLK1/MAP3K9	11.3
MLK2/MAP3K10	9.58E-09	-8.02	MLK2/MAP3K10	9.58
MLK3/MAP3K11	5.90E-09	-8.23	MLK3/MAP3K11	5.9
PIM1	7.26E-08	-7.14	PIM1	72.6
PKCmu/PRKD1	1.34E-07	-6.87	PKCmu/PRKD1	134
PKD2/PRKD2	1.57E-07	-6.80	PKD2/PRKD2	157
RET	7.74E-08	-7.11	RET	77.4
SIK2	1.49E-07	-6.83	SIK2	149
TNIK	1.10E-07	-6.96	TNIK	110
YSK4/MAP3K19	2.92E-08	-7.53	YSK4/MAP3K19	29.2

[0272] 虽然已经结合本发明的特定实施方案描述了本发明,但是应该理解,本发明能够进行进一步的修改,并且本申请旨在覆盖本发明的任何变型、用途或改编,它们通常遵循本发明的原理并包括相对于本发明的以下偏离:这些偏离属于本发明所属领域内的已知或惯常实践,并且可以应用于本文所述的基本特征。

[0273] 实施例17:使用化合物A作为比较物的数据。

[0274] 在U2OS细胞中以多种浓度组合化合物A和吉西他滨进行细胞死亡和生长测定。将结果返回与利用两种化合物的组合的细胞生长和死亡的预测进行比较(图18A)。还在US02细胞中设定浓度的化合物A (1 μ M) 和吉西他滨 (0.04 μ M) 下测定活细胞和凋亡细胞的数量(图18B)。结果表明,与任一单独的化合物相比,化合物A和吉西他滨的组合在促进细胞死亡方面更好。

[0275] 还在多种肺癌细胞系 (NCI-H520和NCI-H596) 和U2OS细胞中以设定浓度 (分别为1 μ M和0.2 μ M) 测试单独的以及和SN38组合的化合物A,监测随时间的细胞数量。结果表明,与单独的化合物A或SN38相比,组合在维持或减少细胞数量方面更有效(图19)。

[0276] 还在宫颈癌细胞系MS-751中用组合的或单独的化合物A和SN38进行体外生长测定。体外测定表明,与单独的任一化合物相比,利用组合随时间减少了细胞数量(图20)。

[0277] 实施例18:化合物A和化合物5与吉西他滨或SN38组合的比较。

[0278] 在U2OS、H358和A549细胞系中,将化合物A或化合物5与多种浓度的吉西他滨组合进行体外细胞死亡和生长测定。结果示出了触发细胞死亡所需的每种化合物和吉西他滨的浓度(图21A)。还在US02和H358细胞中测试了化合物5和吉西他滨或化合物A和吉西他滨的设定浓度。在所有情况下,与单独的药物相比,组合减少了相对细胞增殖(图21B-C)。

[0279] 在A549细胞中化合物A或化合物5与SN38组合使用。随时间和一系列浓度测量细胞生长。突出显示了最佳化合物/SN38浓度下的生长曲线(图22A)。用一系列浓度的单独的化合物A或化合物5测量A549细胞的相对增殖(图22B)。

[0280] 使用设定浓度的吉西他滨和多种浓度的化合物A或化合物5的多种细胞系中的IC₅₀值(图23)。

[0281] 图24中提供了对与吉西他滨或SN38组合的化合物A或化合物5响应的肺癌细胞系的概述。

[0282] 实施例19:化合物A和化合物5的在靶和脱靶比较。

[0283] 测试了多种ATR抑制剂抑制ATR(在靶)和ATM(脱靶)的能力。抑制报道为以nM为单位的IC₅₀(图25A)。还用化合物A或化合物5测试了另外的“脱靶”激酶(图25B)。

[0284] 在A549肺癌细胞(图26A-B)、H23肺癌细胞(图26C-D)和DMS-114细胞(图26E-F)中用化合物A或化合物5进行在靶测试。通过蛋白质印迹测量CHK1S345磷酸化,这是ATR抑制的读出。每种化合物还与固定浓度的吉西他滨一起使用。

[0285] 对HCC-70TNBC、MDA-MB-468TNBC和DMS-114细胞系进行进一步在靶研究。设定浓度的SN38与一系列化合物A或化合物5浓度一起使用。通过蛋白质印迹测试和测量多种在靶活性参数(图27A-B)。

[0286] 添加SN38和化合物A或化合物5后24小时,测定SUM149细胞的细胞周期阶段概况(图28)。与对照组相比,当接受药物的组合时,更大百分比的细胞停滞在G2期。

[0287] 实施例20:化合物A和化合物5与MM398组合的脂质体制剂的比较。

[0288] DMS-114肺异种移植模型用于测量Ls-化合物A或Ls-化合物5与MM398组合的效果。使用设定剂量的MM398(5mpk)和两种不同剂量的化合物A或化合物5(20mpk或80mpk)。通过测量CHK1S345磷酸化水平来测定治疗效果(图29)。

[0289] 还在SUM-149细胞系中测试了Ls-化合物A与MM398的效果。通过测量RPA2、DNAPK、CHK1和 γ H2AX的磷酸化水平来测定治疗效果。还在没有与MM398的组合的情况下测试Ls-化合物5(图30A-C)。

[0290] 实施例21:使用TEA.SOS制备的Ls-化合物5对小鼠三阴性乳腺癌异种移植物的体内抗肿瘤效力和耐受性

[0291] 在人SUM-149(三阴性乳腺癌)细胞系模型中研究与MM-398(脂质体伊立替康)组合的负载有ATR抑制剂化合物5的脂质体的抗肿瘤效力。

[0292] 细胞获自American Type Culture Collection(Rockville,MD),并在补充有10%胎牛血清、50U/mL青霉素G和50 μ g/mL硫酸链霉素的RPMI培养基中于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下根据供应商的建议繁殖。NCR nu/nu纯合无胸腺雄性裸鼠(4-5周龄,体重至少16g)获自Charles

River。在小鼠右肋腹皮下接种0.1mL含有悬浮于补充有30%Matrigel的PBS中的107个细胞的悬浮液。当肿瘤达到150mm³至350mm³的大小时,根据以下方法将动物分配到治疗组中。根据肿瘤大小对动物进行分级,并分到肿瘤大小减小的6个类别中。通过从每个大小类别中随机选择一只动物来形成10只动物/组的四个治疗组,使得在每个治疗组中所有肿瘤大小均匀地代表。以7天的间隔,动物接受以下制剂的五次尾静脉注射:1)对照(HEPES-缓冲盐水pH 6.5);2)每次注射剂量为5mg/kg的MM-398;3)每次注射80mg/kg的脂质体化合物5;4)MM-398,然后以24小时的间隔注射脂质体化合物5;5)MM-398,然后注射游离的未包封的ATR抑制剂化合物A。如实施例10中所述制备用于注射的脂质体。

[0293] 每周两次监测动物体重和肿瘤大小。通过每周两次沿最大(长度)和最小(宽度)轴的肿瘤的触诊和卡尺测量来监测肿瘤进展。每周两次使用以下公式从卡尺测量值确定肿瘤大小:

[0294] 肿瘤体积=[(长度)×(宽度)²]/2

[0295] 为了评估治疗相关毒性,还每周两次对动物称重。当组中的肿瘤达到小鼠体重的10%时,使组中的动物安乐死。将各组的平均肿瘤体积一起绘制并随时间进行比较。

[0296] 如图31所示,在异种移植物模型中,脂质体ATR抑制剂化合物5显著改善了MM-398的抗肿瘤效力。脂质体ATR抑制剂和MM-398的组合处理不影响动物的体重(图32)。

[0297] 实施例22:细胞系特性分析和与Incucyte数据的比较

[0298] 对于一组荧光标记的细胞系的参与DNA损伤途径的多种蛋白质进行特性分析。用NucLight Red慢病毒转导亲本癌细胞系并用嘌呤霉素选择。通过蛋白质印迹分析测量和定量基础蛋白质水平。当进行定量时,将PD标志物信号相对于β肌动蛋白信号进行归一化。蛋白质水平与细胞系的“积分”相关,积分是对化合物5和化学治疗组合疗法的响应的。积分可以计算如下:

[0299] 参见图33和34,将细胞系接种在96孔板中,并将每个孔暴露于化合物5和化学治疗的剂量基质4天。使用Incucyte测定法测量动态细胞存活率。对于剂量矩阵中的每种药物组合,通过将归一化细胞增殖曲线下的面积相加来计算剂量组合特异性积分。通过剂量矩阵上的四个最大分数的平均来计算细胞系特异性积分。

[0300] 参见图35和36,观察到在暴露于化合物5和SN38的肺癌细胞系中,基础MRE11蛋白水平和基础ATM水平都与细胞系积分显著相关。在具有p53劣化背景并且暴露于化合物5和SN38的肺癌细胞中,积分评分与NBS、MRE11和RAD50蛋白质水平相关。“劣化的p53”细胞是具有非零基础p53蛋白水平的细胞(在大多数细胞中,p53水平仅在治疗后的蛋白质印迹中可见)。(见图37、图38和图39)。

[0301] 实施例23:信号传导实验:与SN38组合的化合物5和化合物A:6种不同的PD标志物

[0302] 参见图40-44:在癌细胞系暴露于多种剂量的与SN38组合的化合物5或化合物A后,通过蛋白质印迹定量药效动力学标志物pChk1、pRPA2、pATR、pDNAPK、pChk2和γH2AX。将HCC70、DMS114、MDAMB468、NCIH1299和NCIH460细胞接种在12孔板中,孵育过夜,然后暴露于SN38和/或ATR抑制剂。药物暴露24小时后,裂解细胞用于蛋白质印迹。当进行定量时,将PD标志物信号相对于β肌动蛋白信号进行归一化。

[0303] 实施例24:信号传导实验:与吉西他滨组合的化合物5和化合物A:3种不同的PD标志物

[0304] 参见图45-50:在暴露于ATR抑制剂和/或吉西他滨后,对六种荧光标记的细胞系的参与DNA损伤途径的多种蛋白质进行特性分析。用NucLight Red慢病毒转导亲本癌细胞系并用嘌呤霉素选择。在癌细胞系暴露于与16nM吉西他滨的组合的多种剂量的化合物5或化合物A后,通过蛋白质印迹定量药效学标志物pChk1、pATR和 γ H2AX。将A549、NCIH23、DMS114、U2OS、HCC827和NCIH460细胞接种于12孔板中,使其孵育过夜,然后暴露于SN38和/或ATR抑制剂。在药物暴露6或18小时后,裂解细胞用于蛋白质印迹。当进行定量时,将PD标志物信号相对于 β 肌动蛋白信号进行归一化。

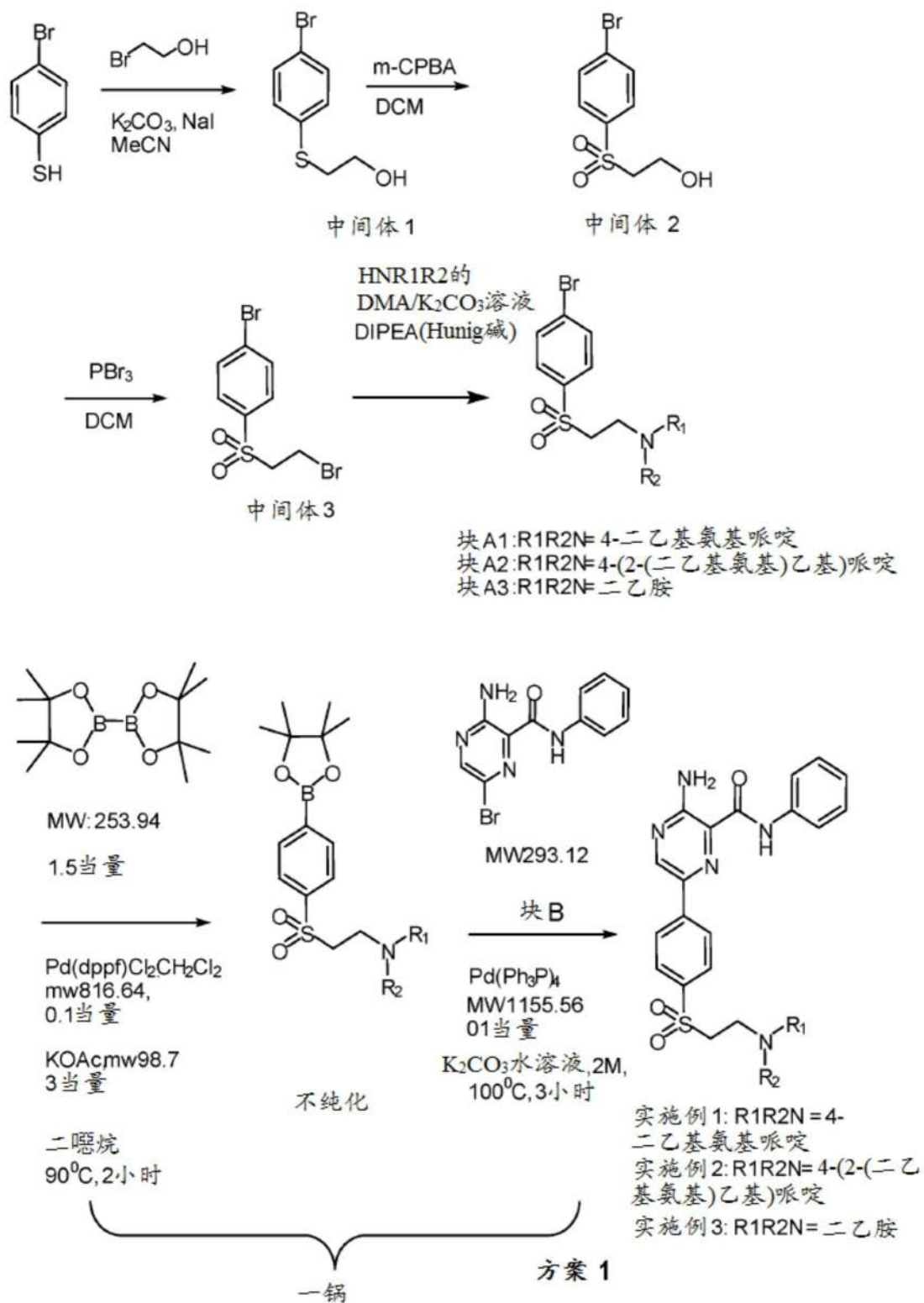


图1

方案 2

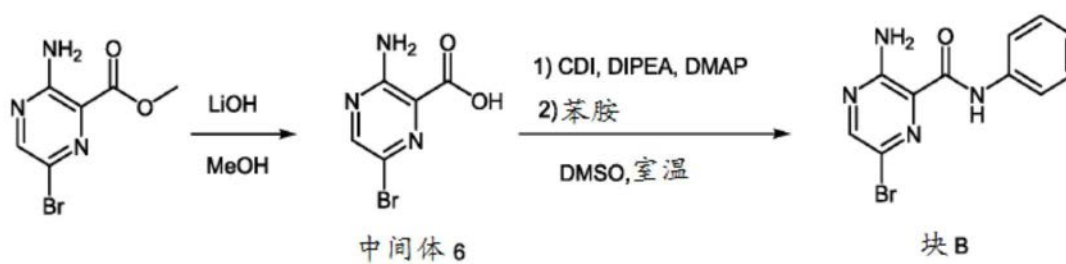


图2

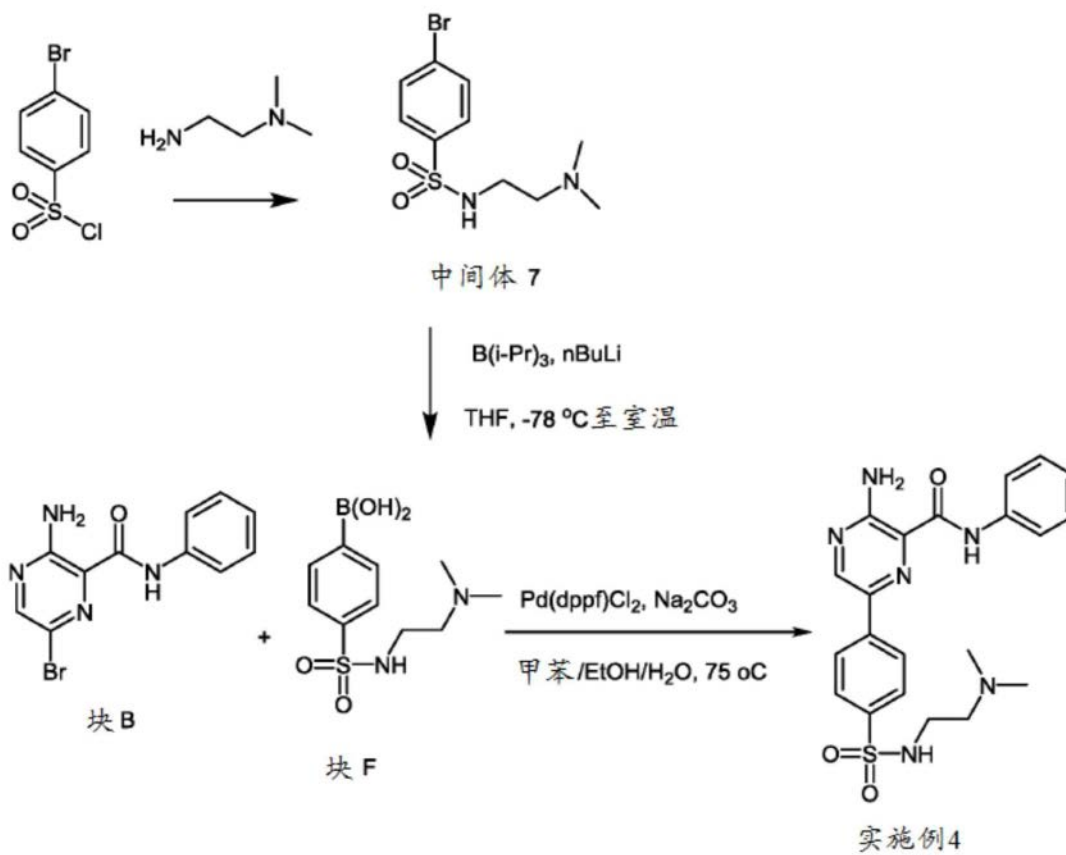


图3

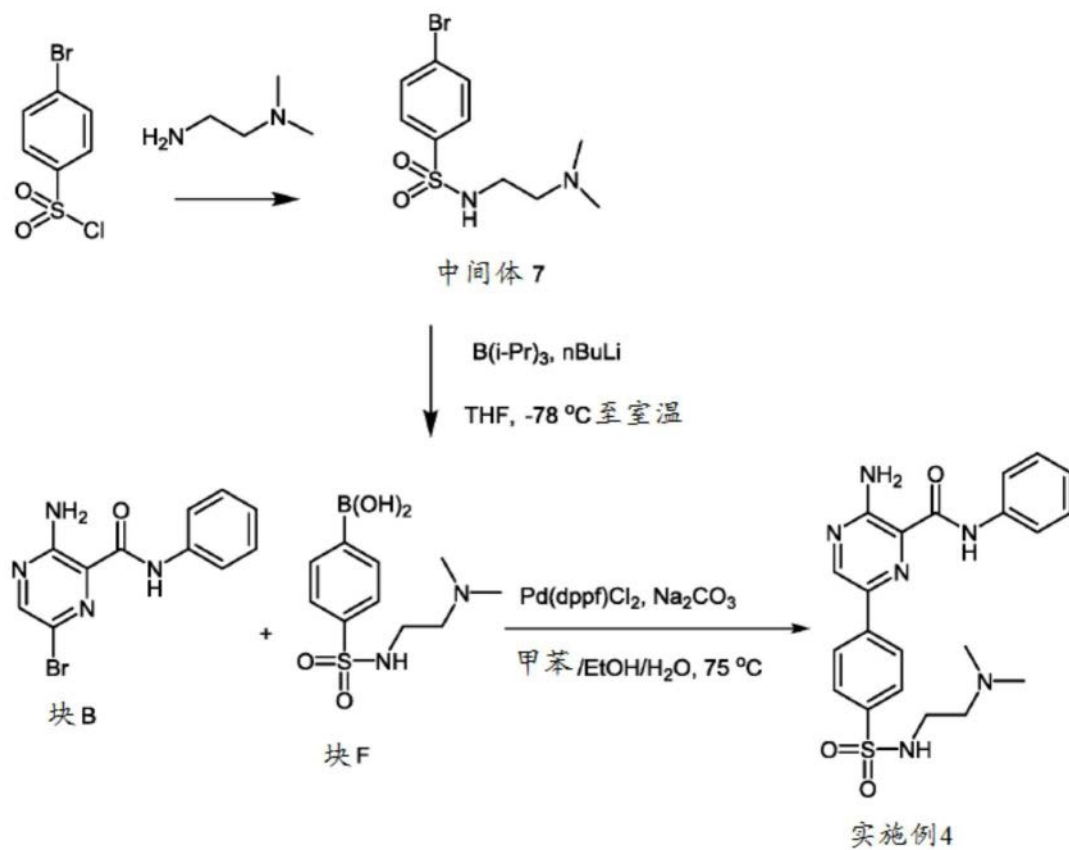


图4

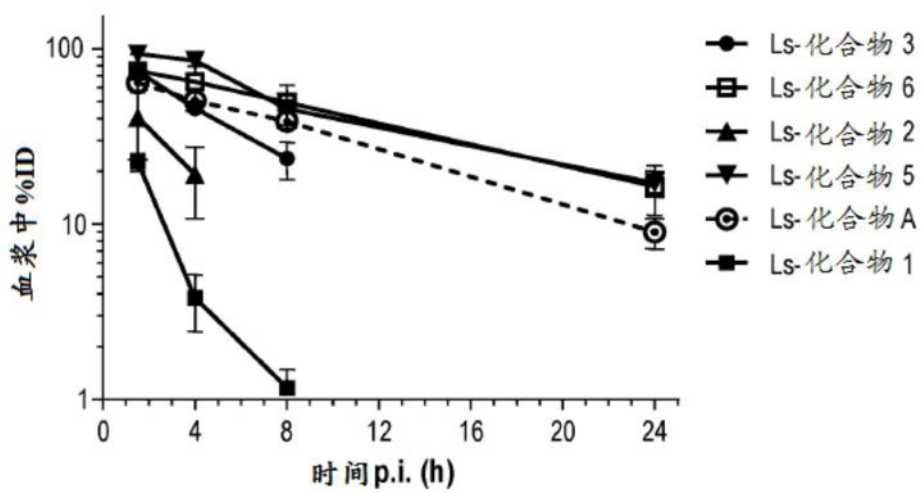


图5

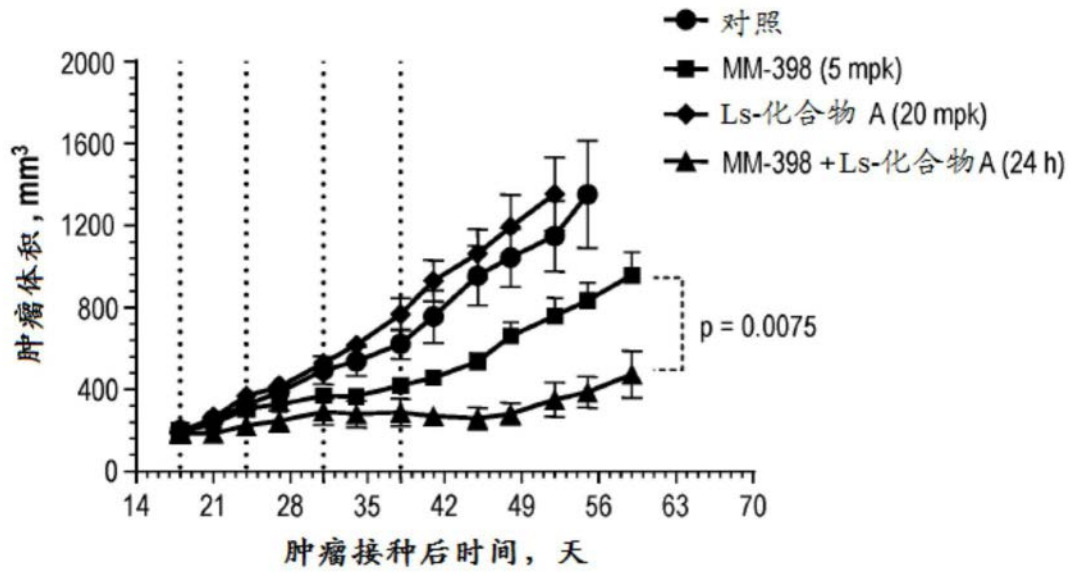


图6

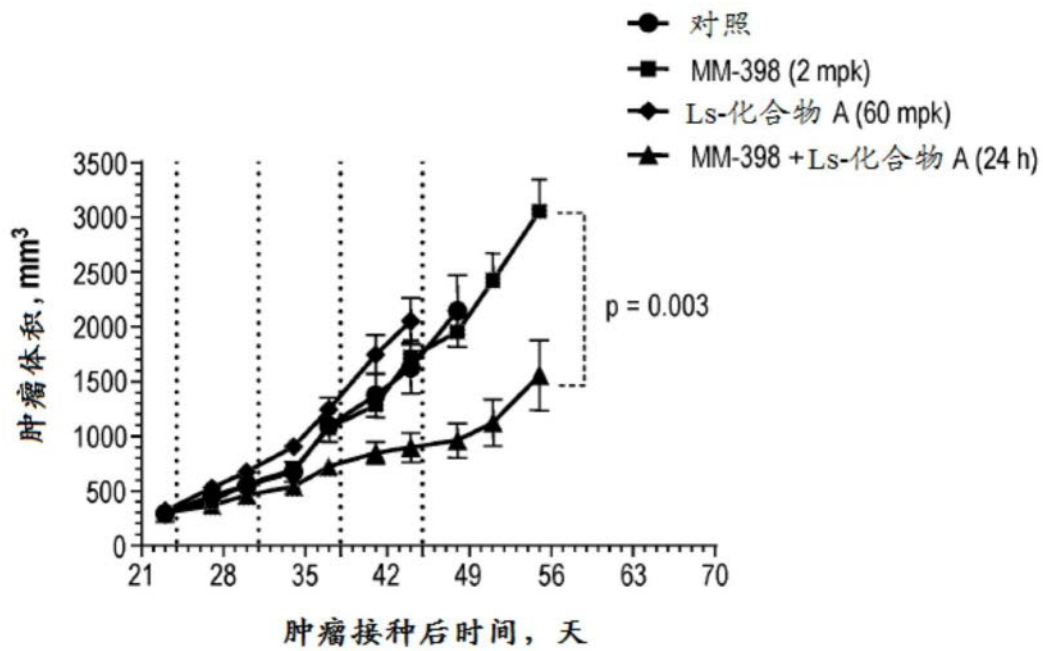


图7

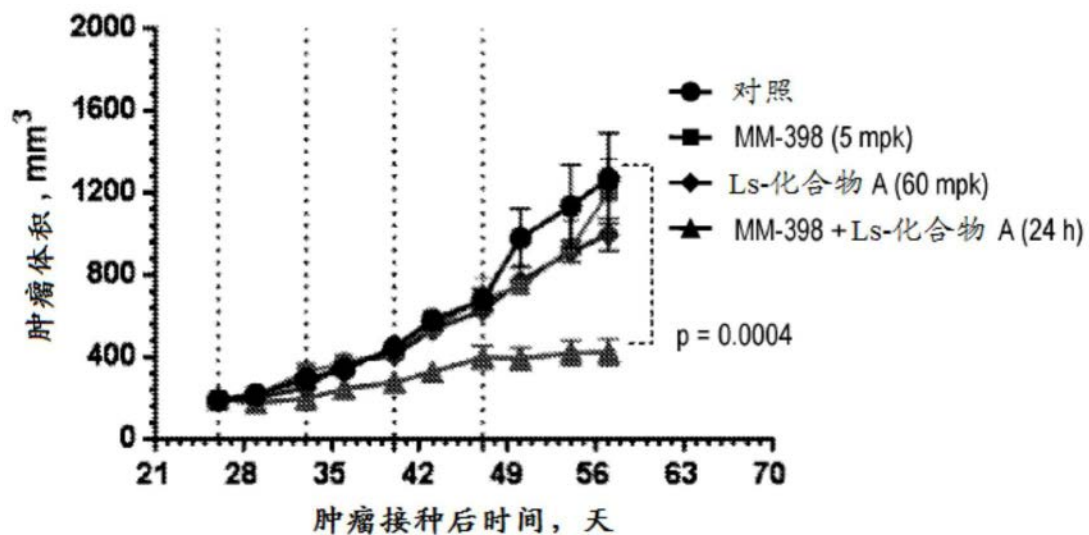


图8

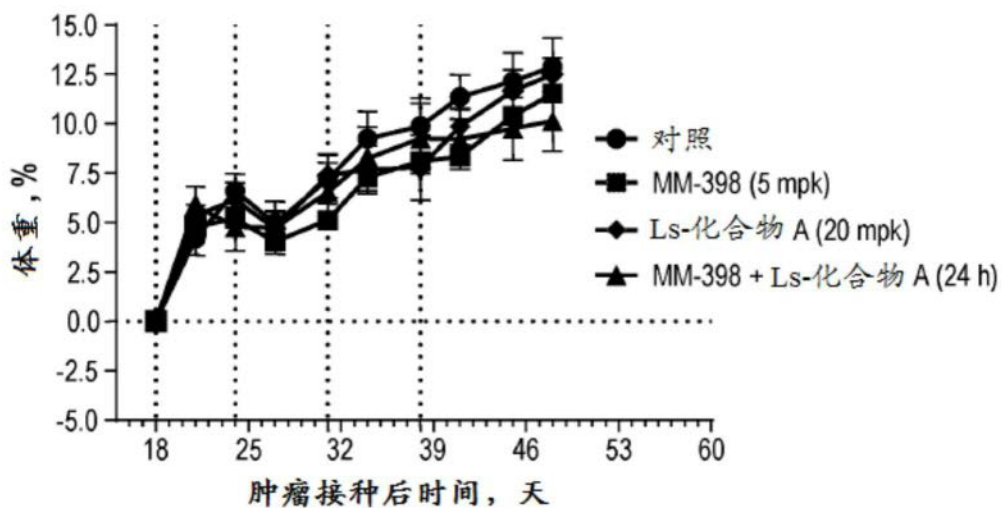


图9

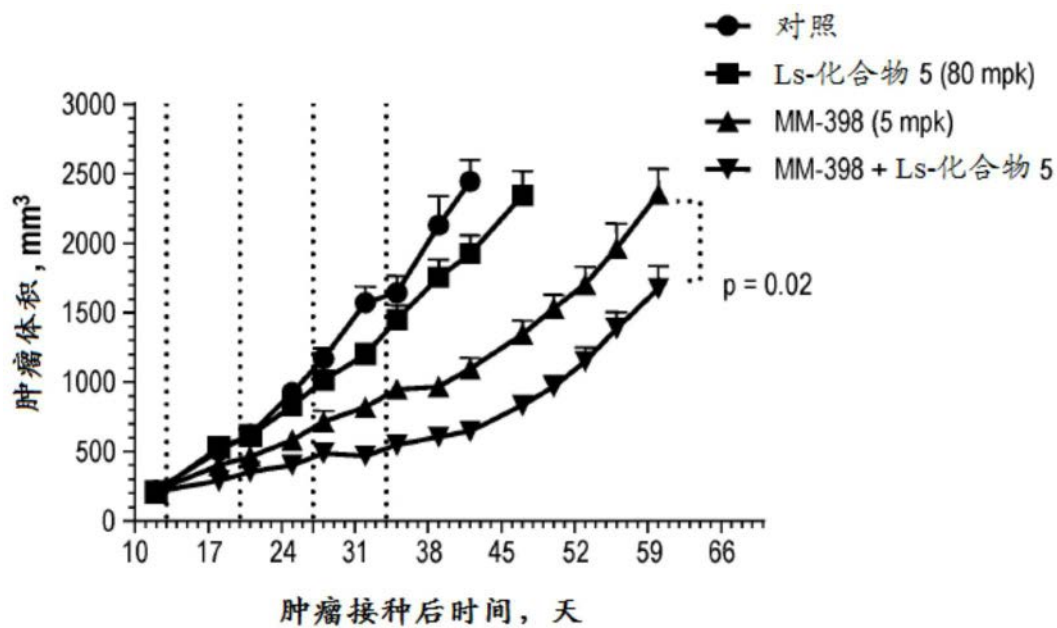


图10A

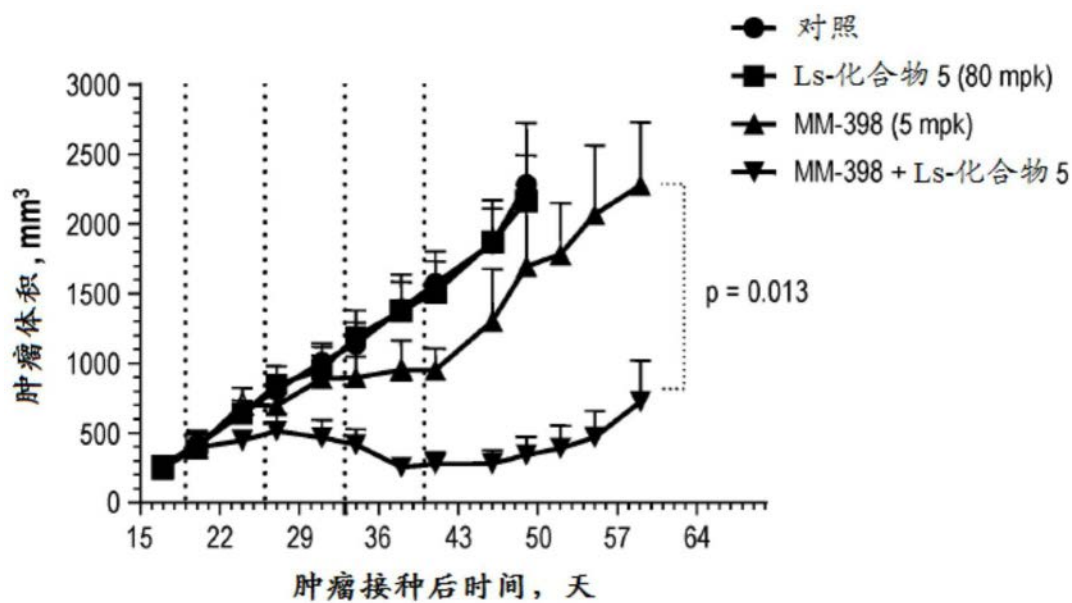


图10B

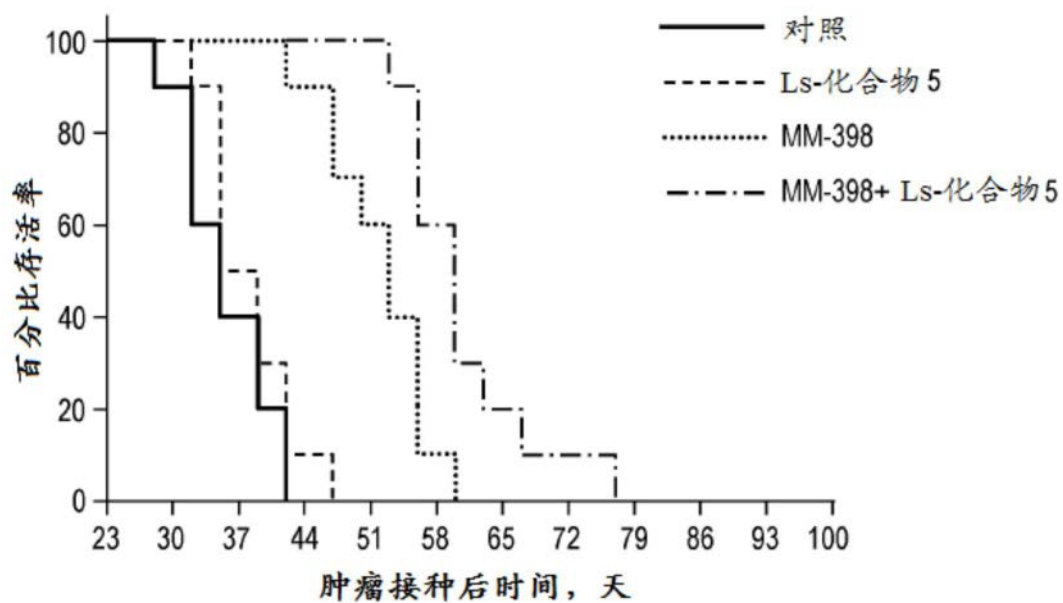


图11A

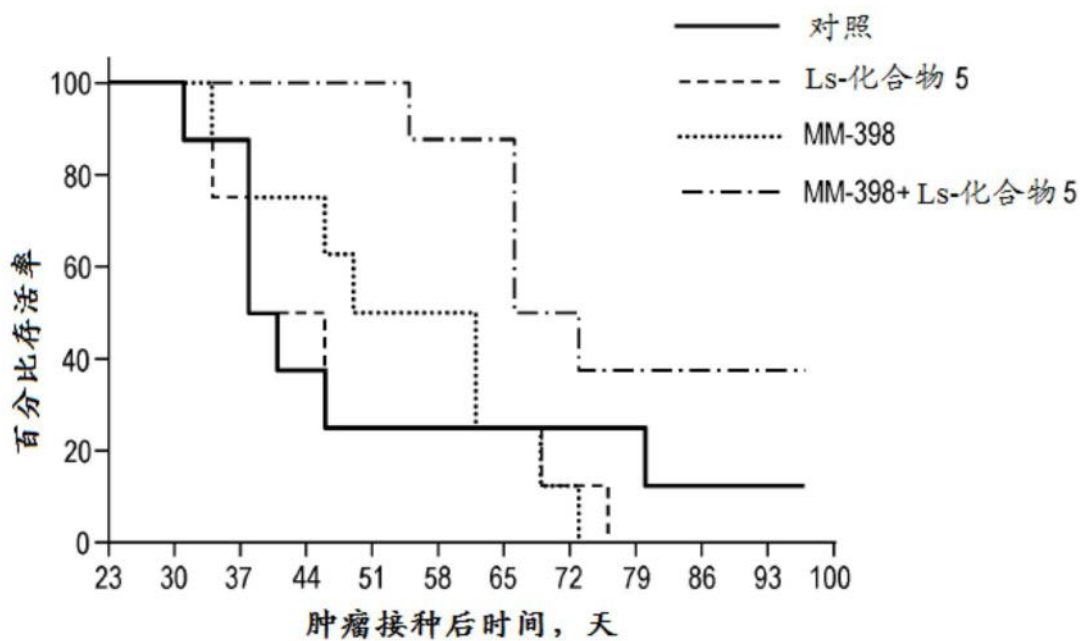


图11B

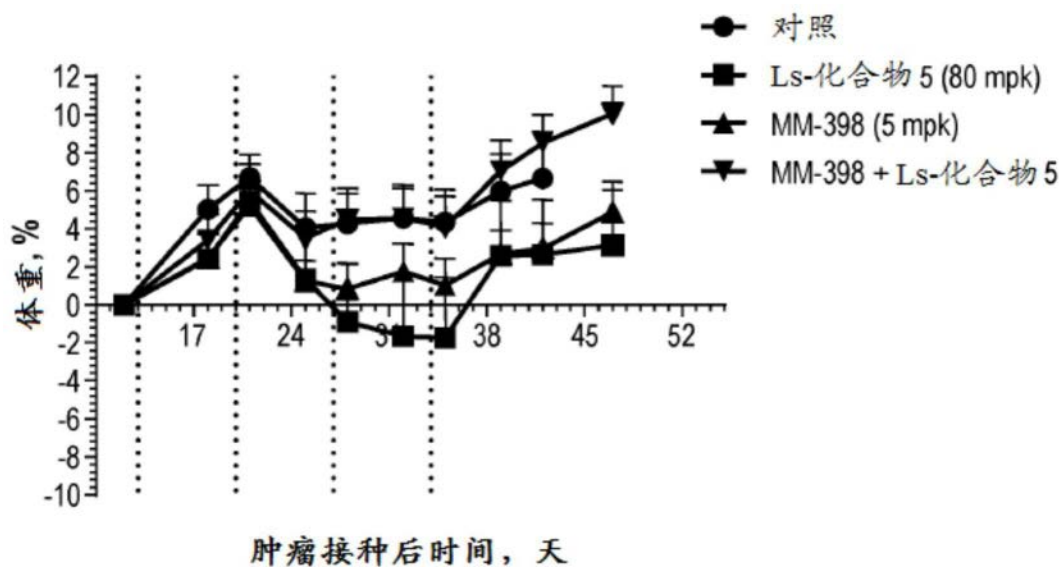


图12A

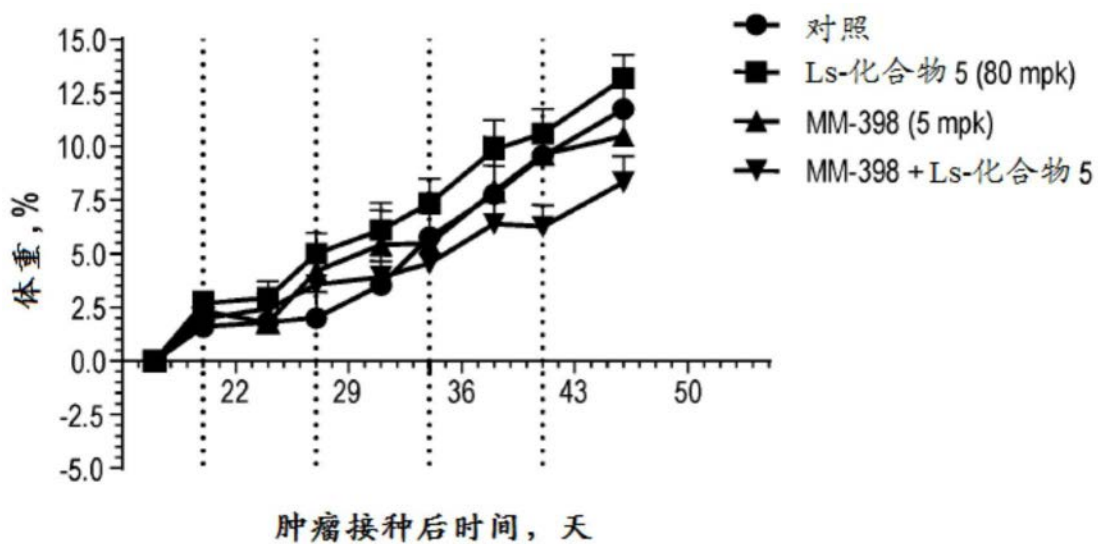


图12B

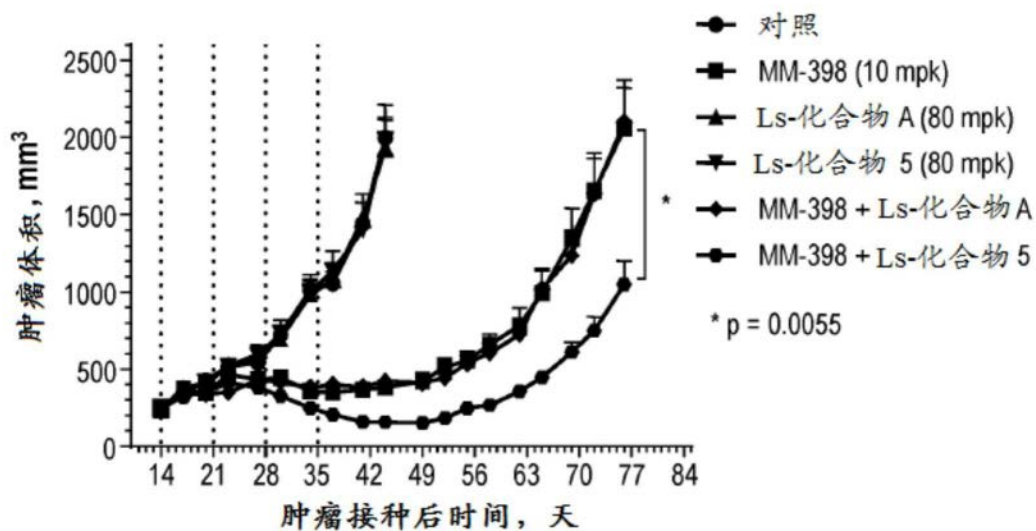


图13A

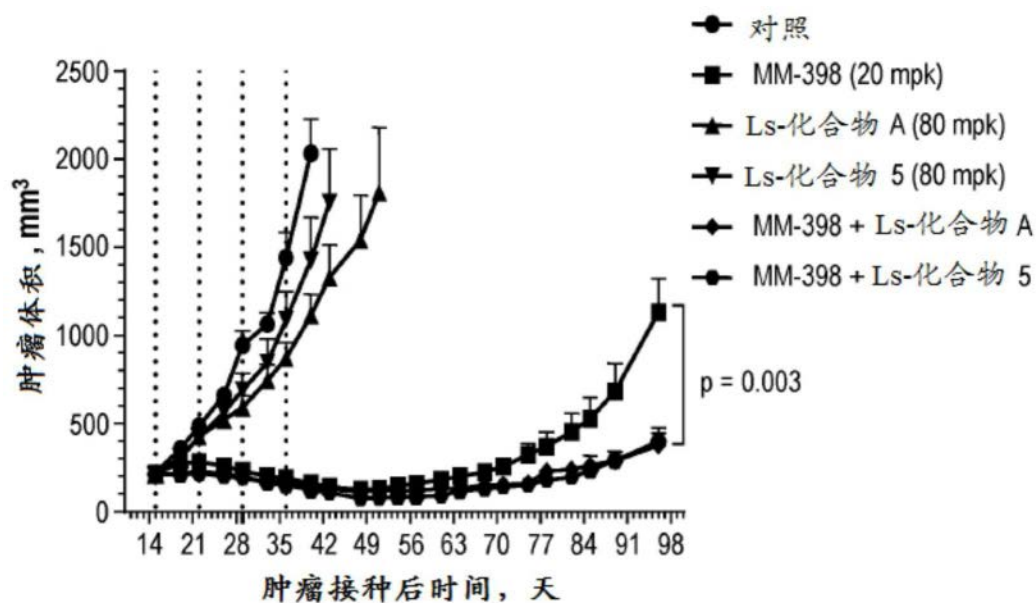


图13B

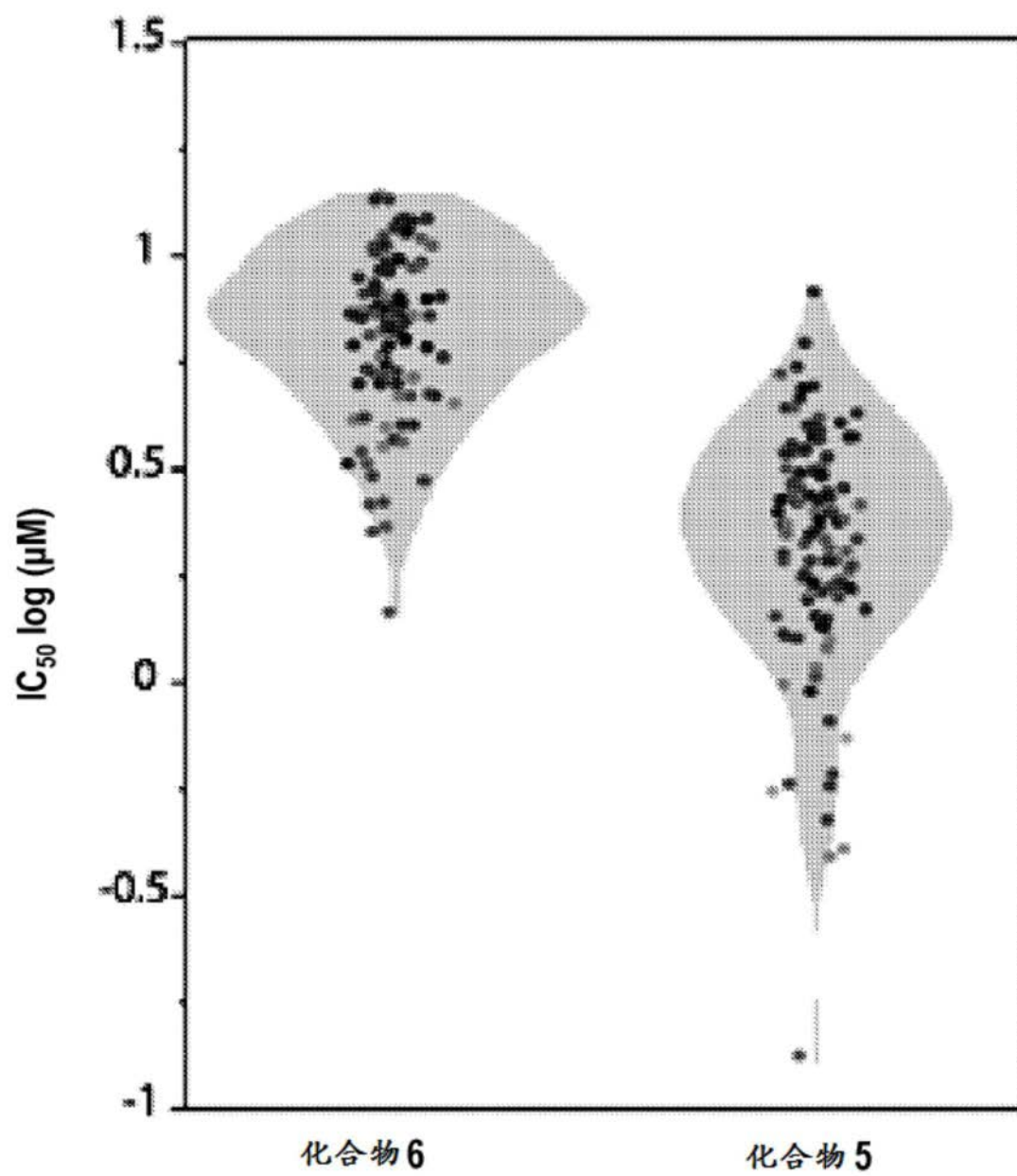


图14A

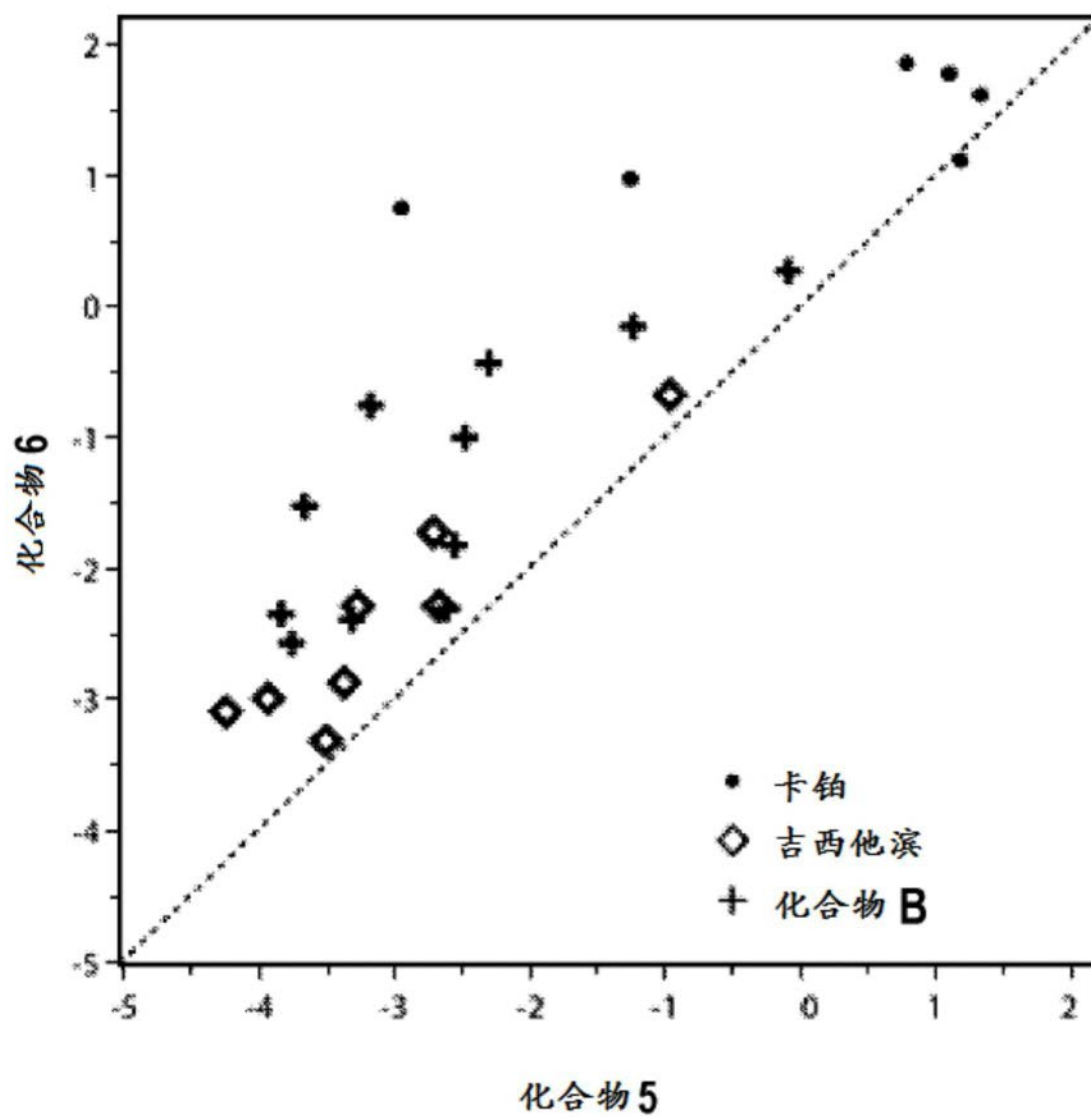


图14B

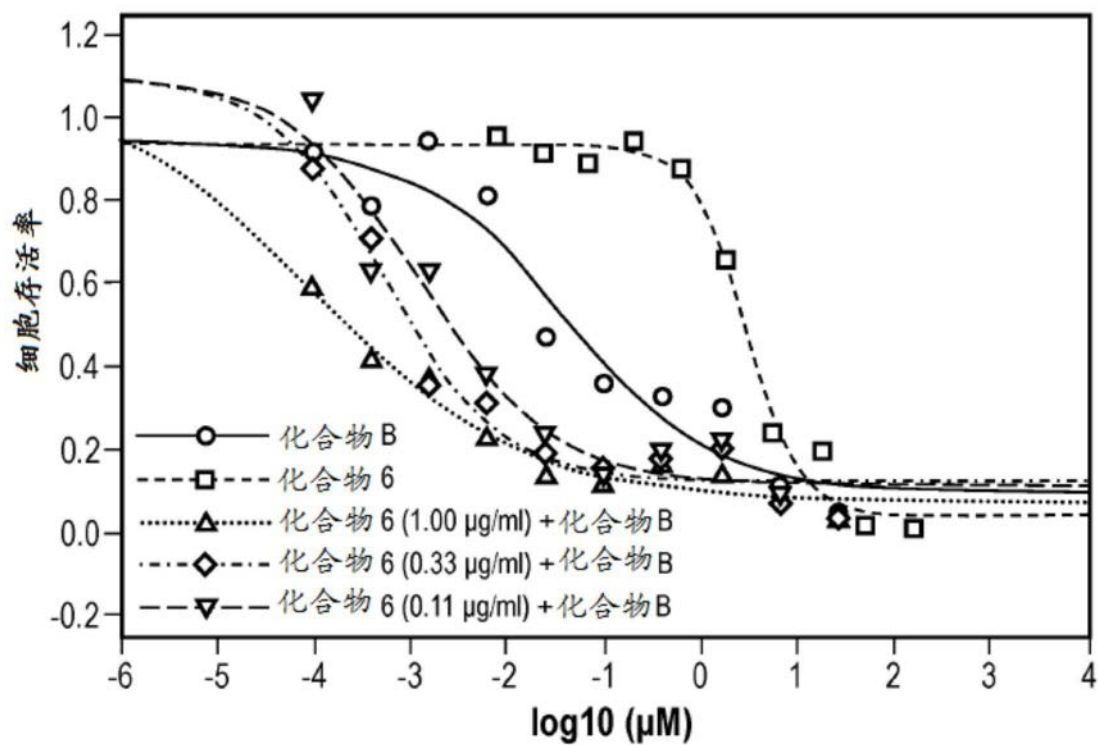


图15

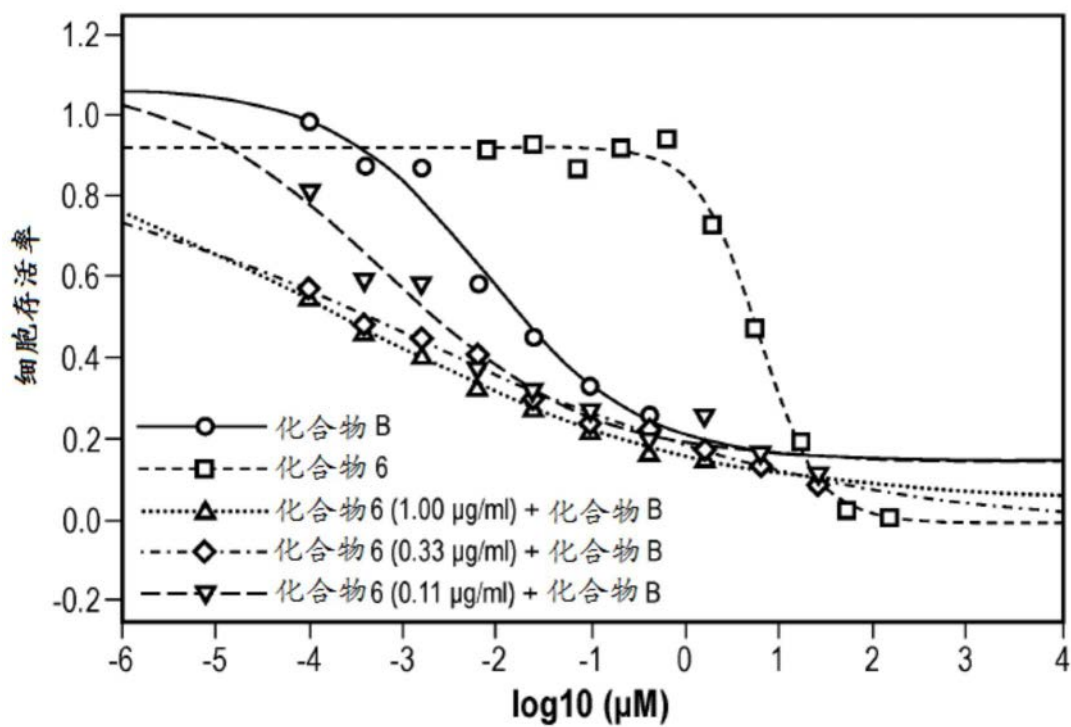


图16A

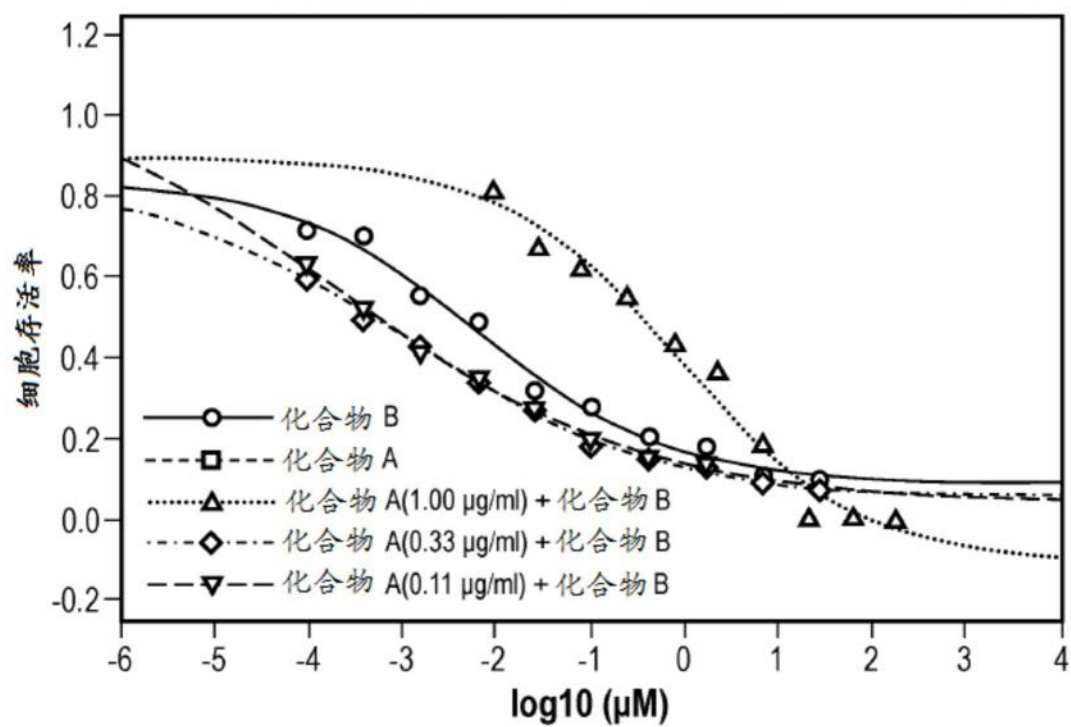


图16B

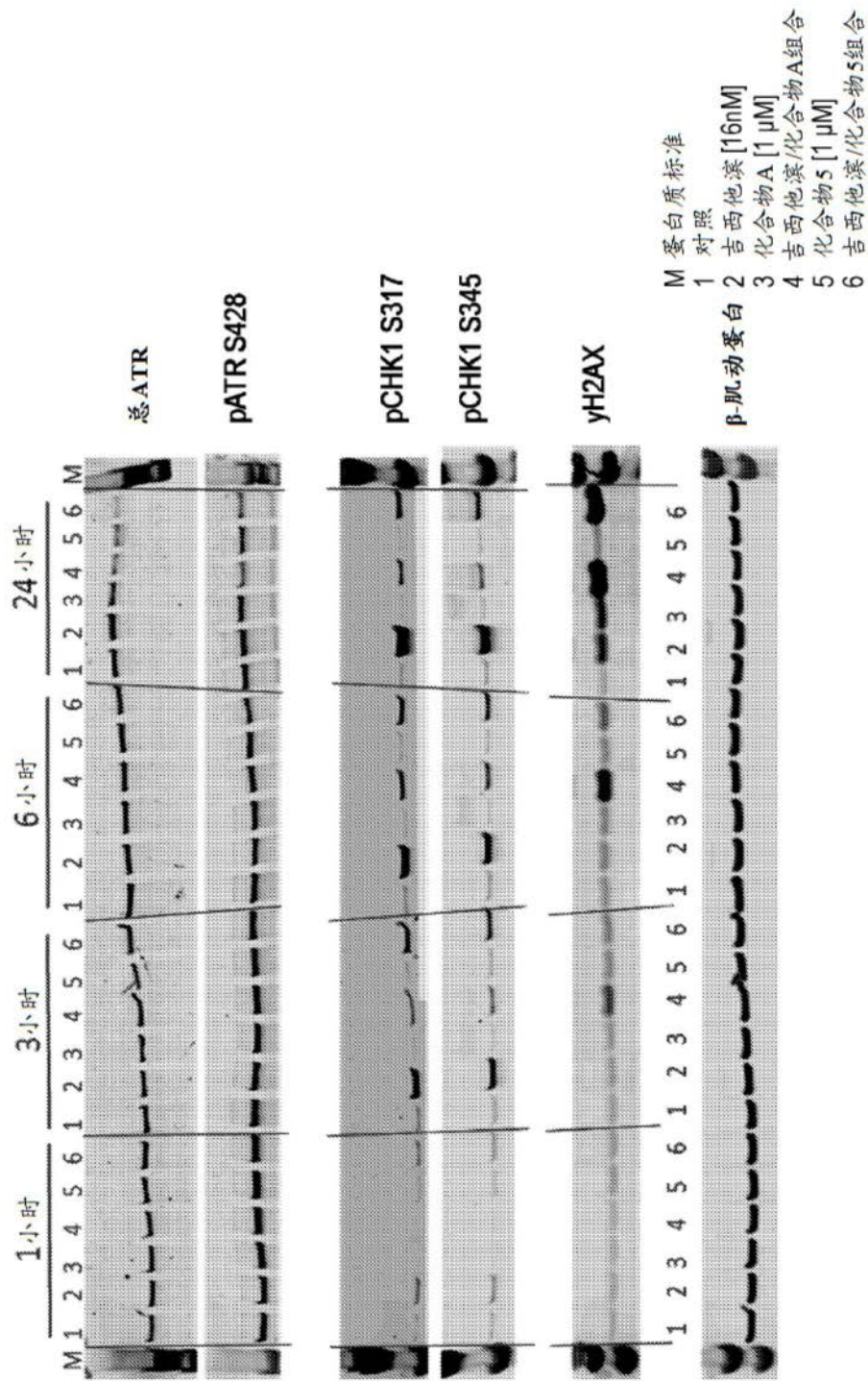


图17

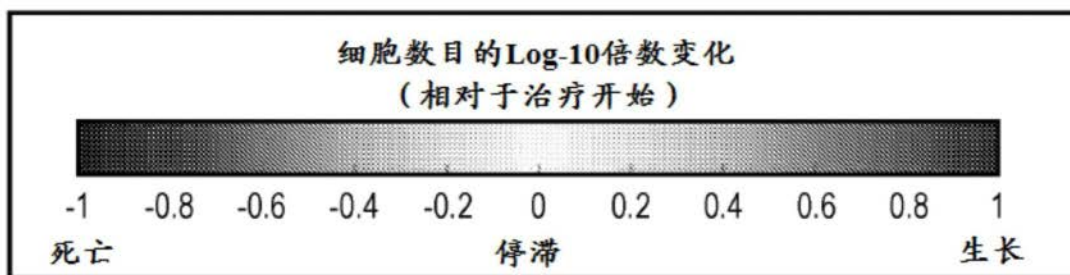
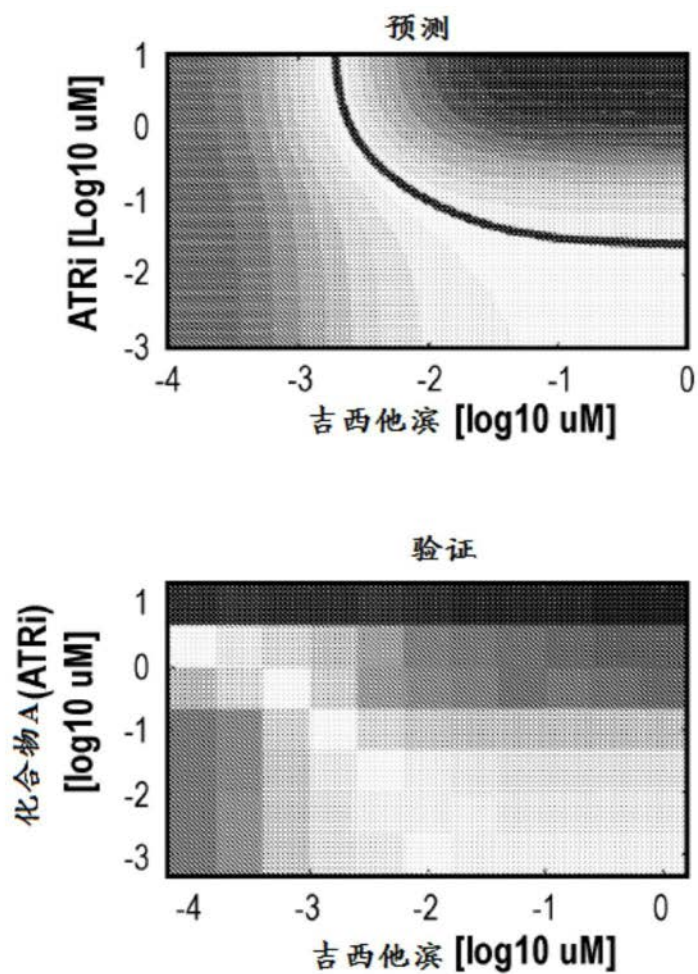


图18A

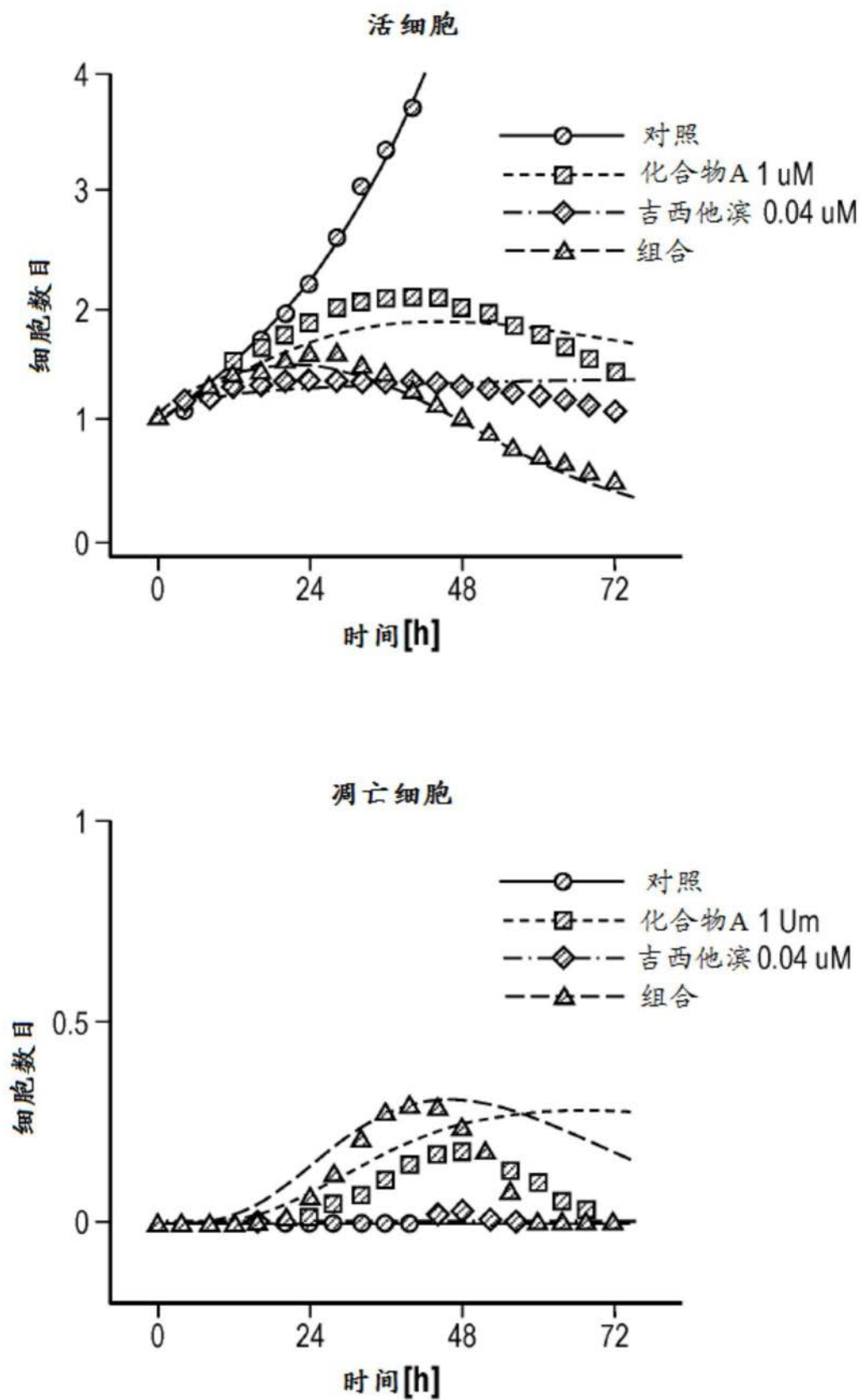


图18B

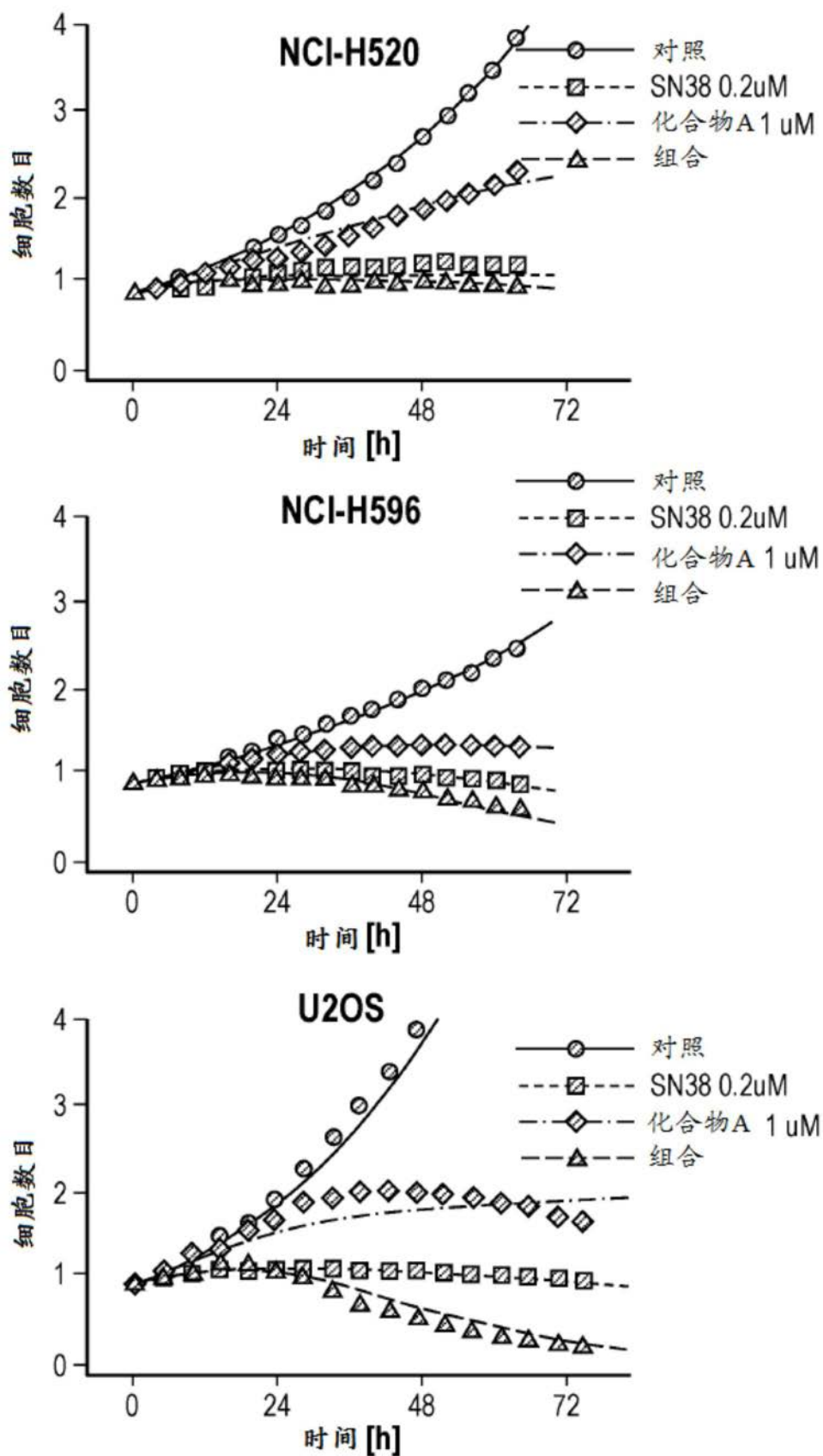


图19

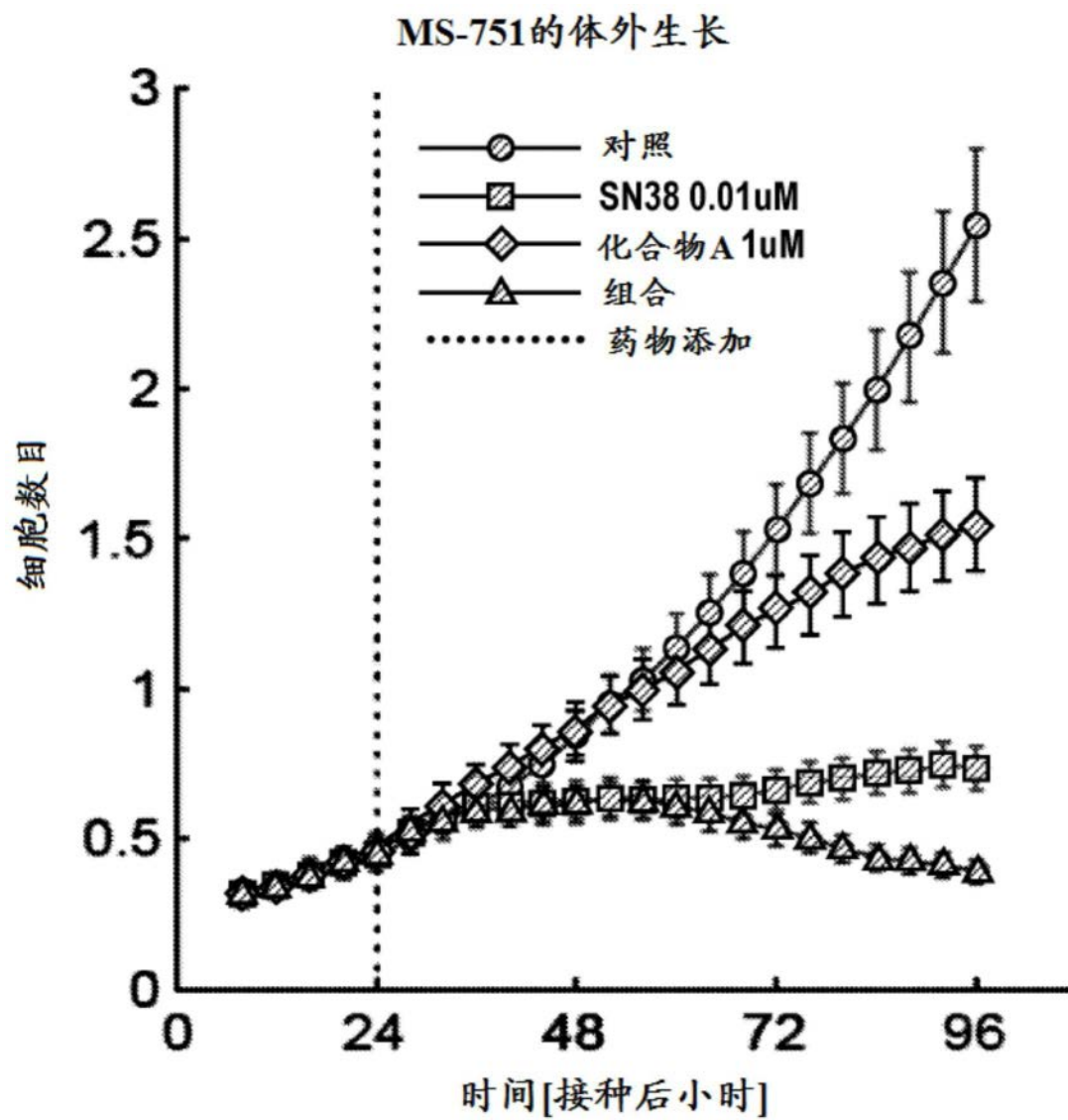


图20

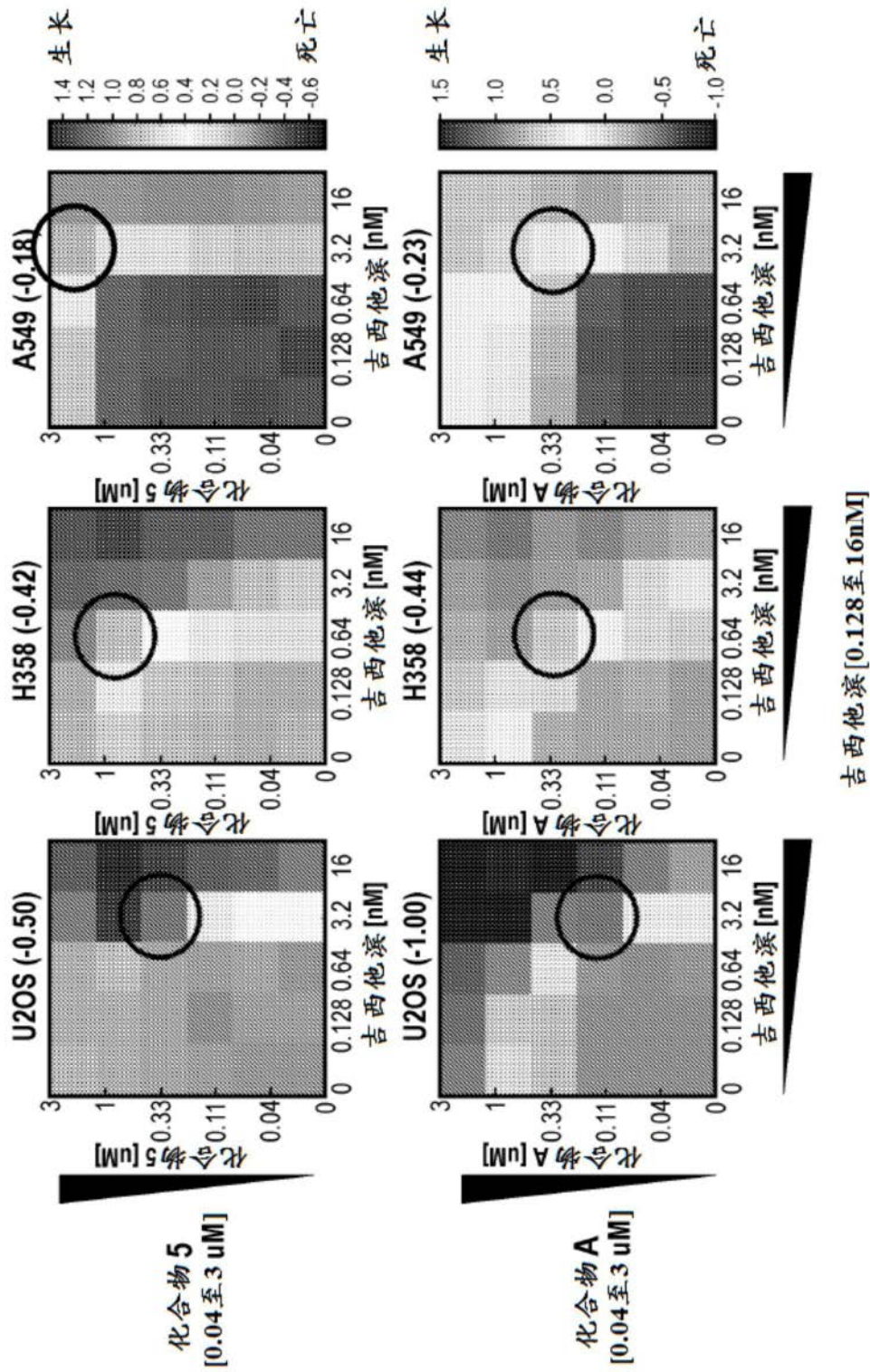


图21A

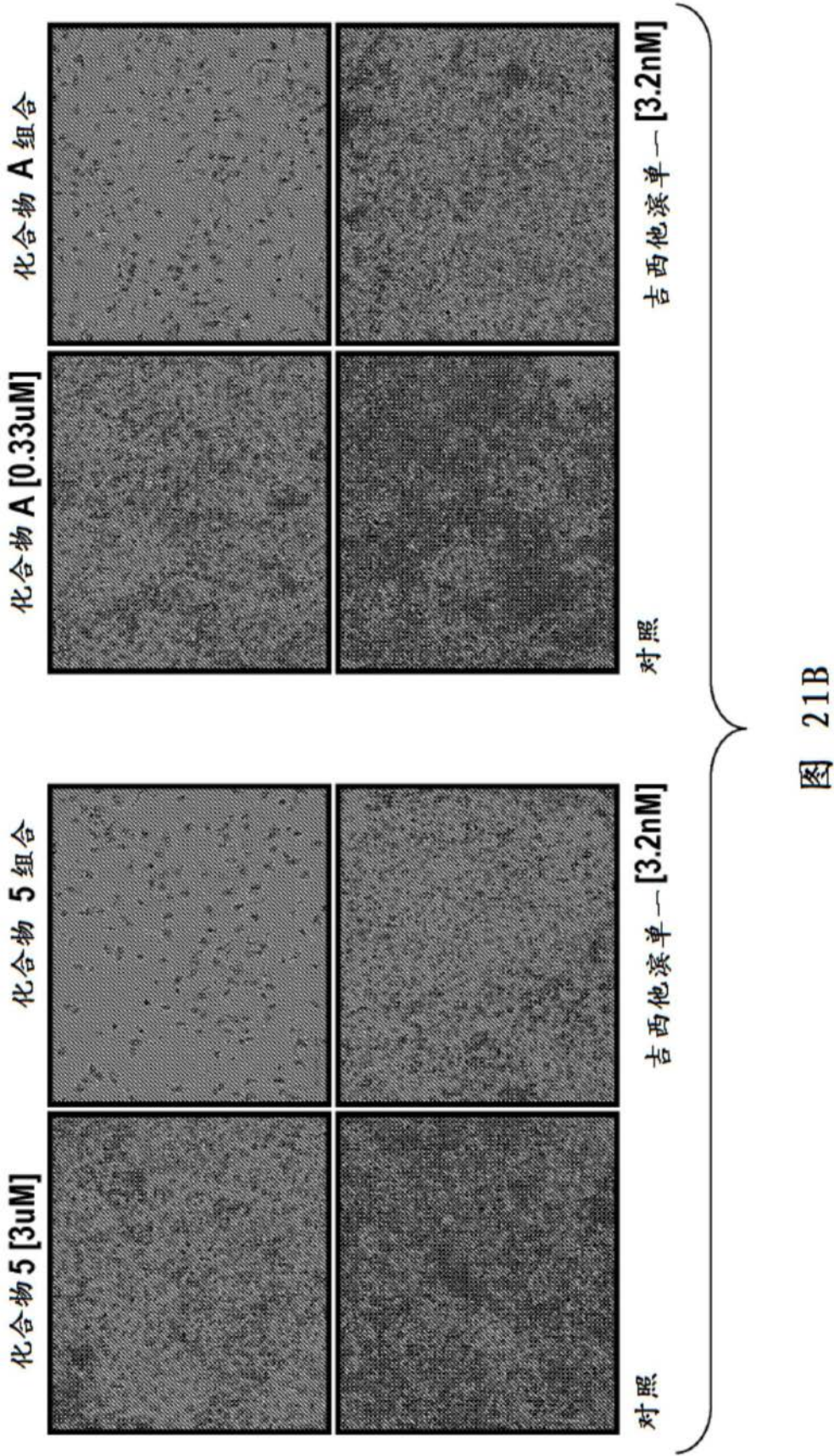


图21B

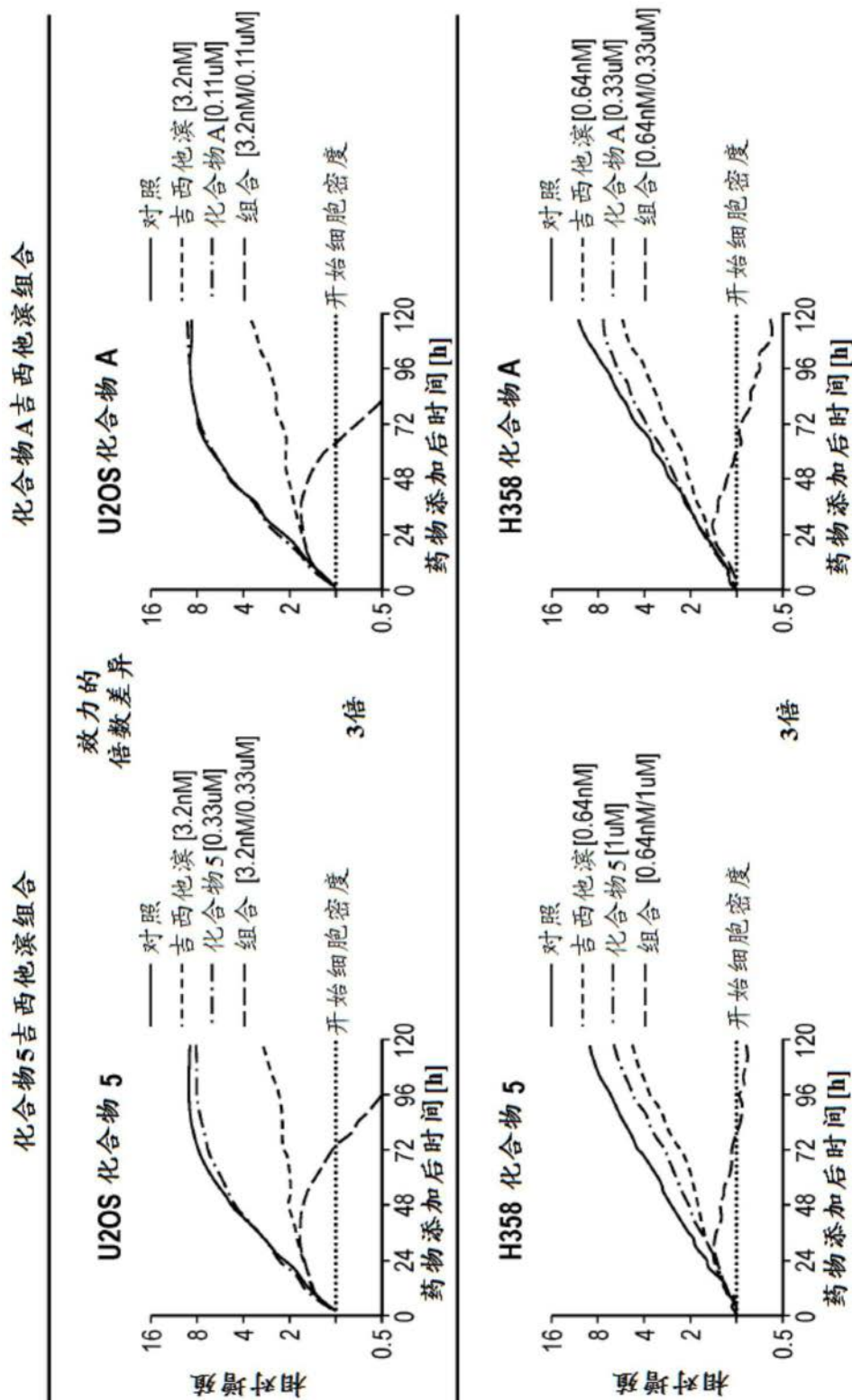


图21C

A549

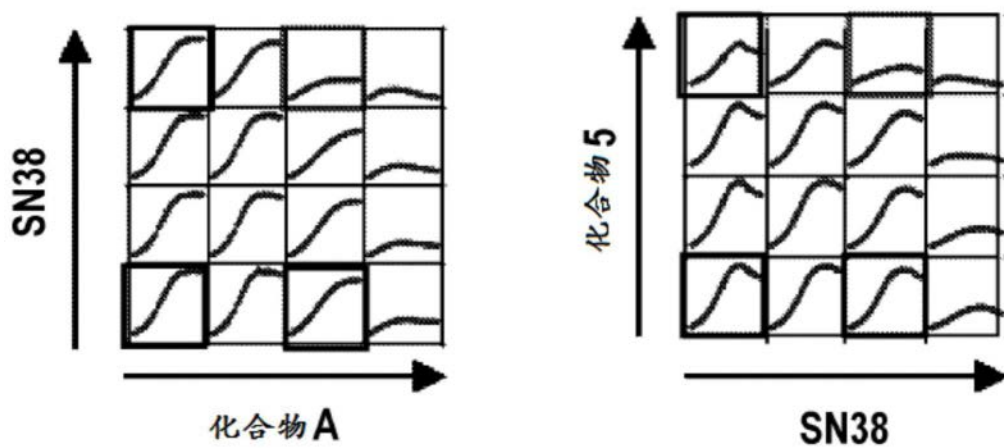


图22A

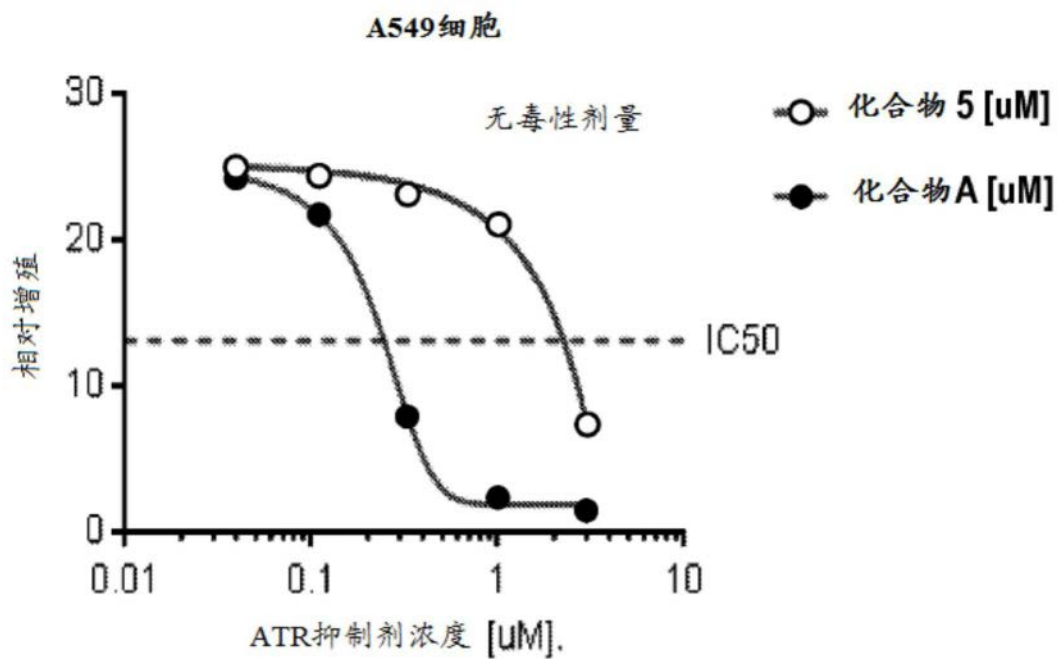


图22B

固定的吉西他滨浓度[3.2nM]

ATRI浓度系列稀释: 3, 1, 0.11, 0.33, 0.004uM

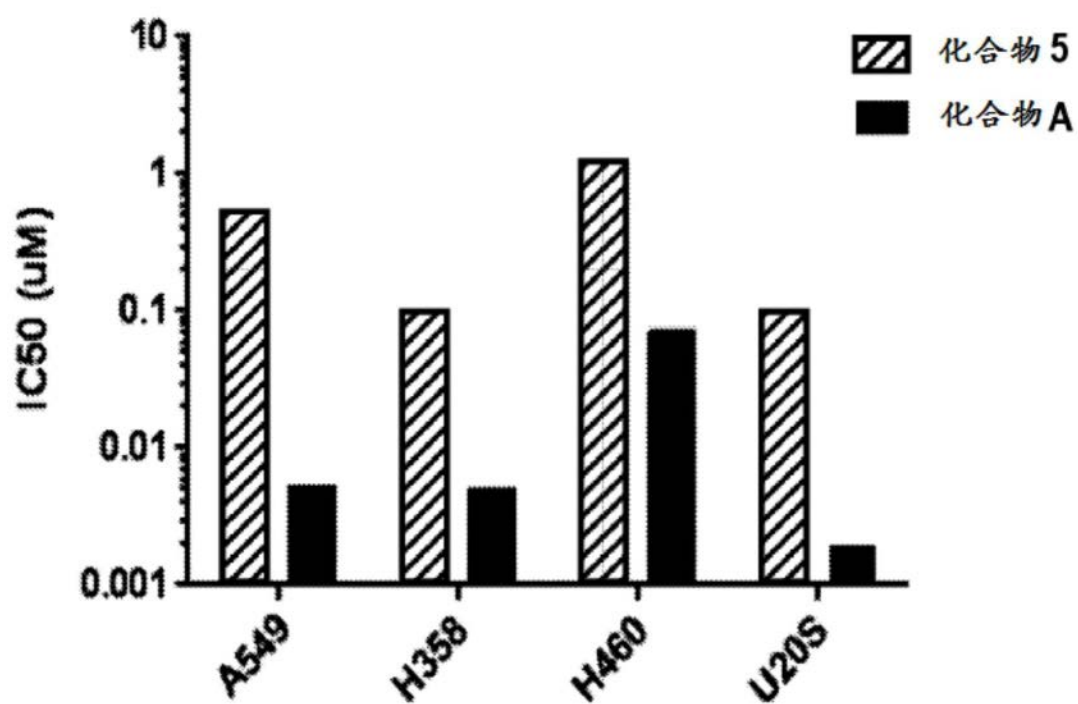


图23

吉西他滨	化合物 A	化合物 5
响应者	A549、HCC827、H2170、H358、H460	A549、HCC827、H2170、H358、H460
非响应者	H2170、H358、H596	H2170、H358、H596

SN38	化合物 A	化合物 5
响应者	A549、DMS-114、H1299、H23、H460、Calu-6	A549、DMS-114、H1299、H23、H460、Calu-6
非响应者	Calu-6、H1993、H23、H596	Calu-6、H1993、H23、H596

图24

激酶	ATR IC ₅₀ (nM)	ATM IC ₅₀ (nM)
化合物 6	470.8	> 10,000
化合物 2	139.8	4817
化合物 5	233.9	> 10,000
化合物 4	353.4	6869
化合物 3	196.1	> 10,000
化合物 A	< 1 *	42
化合物 1 ***	49.6 **	3864

Lit. ref.

* KI < 0.2nM

** KI = 6 nM

IC₅₀ = 120nM

*** 不连续

EuroFin, UK, 无细胞体系

图25A

激酶	化合物 5 IC ₅₀ (nM)	化合物 A IC ₅₀ (nM)
GSK3 α	206	126
GSK3 β	876	210
MLK1	74	59
MLK2	91	76

EuroFin, UK, 无细胞体系

图25B

A549细胞
ATR对CHK1 S345磷酸化的抑制的
基于蛋白质印迹的分析(剂量和时程)

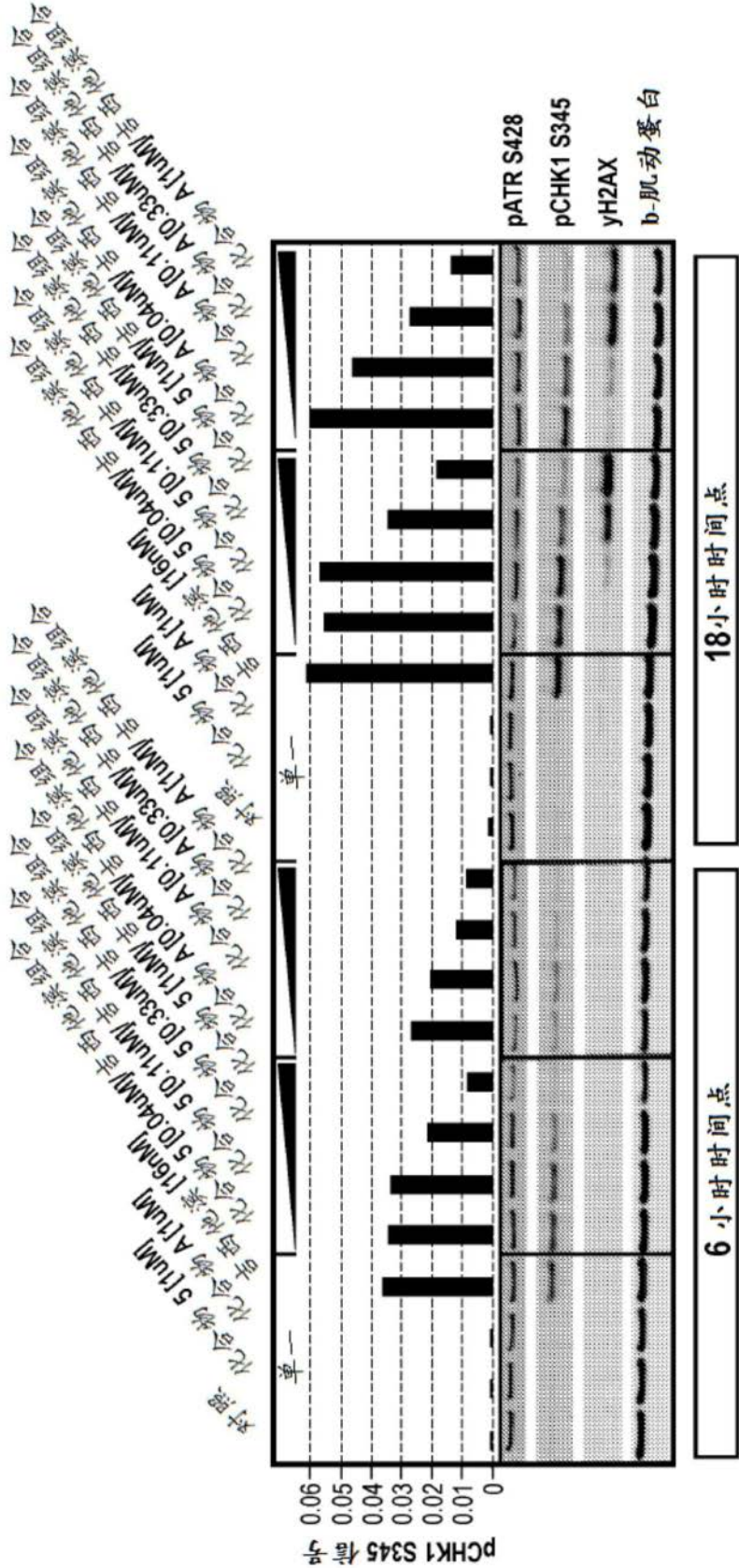


图26A

抑制CHK1 S345磷酸化的IC50

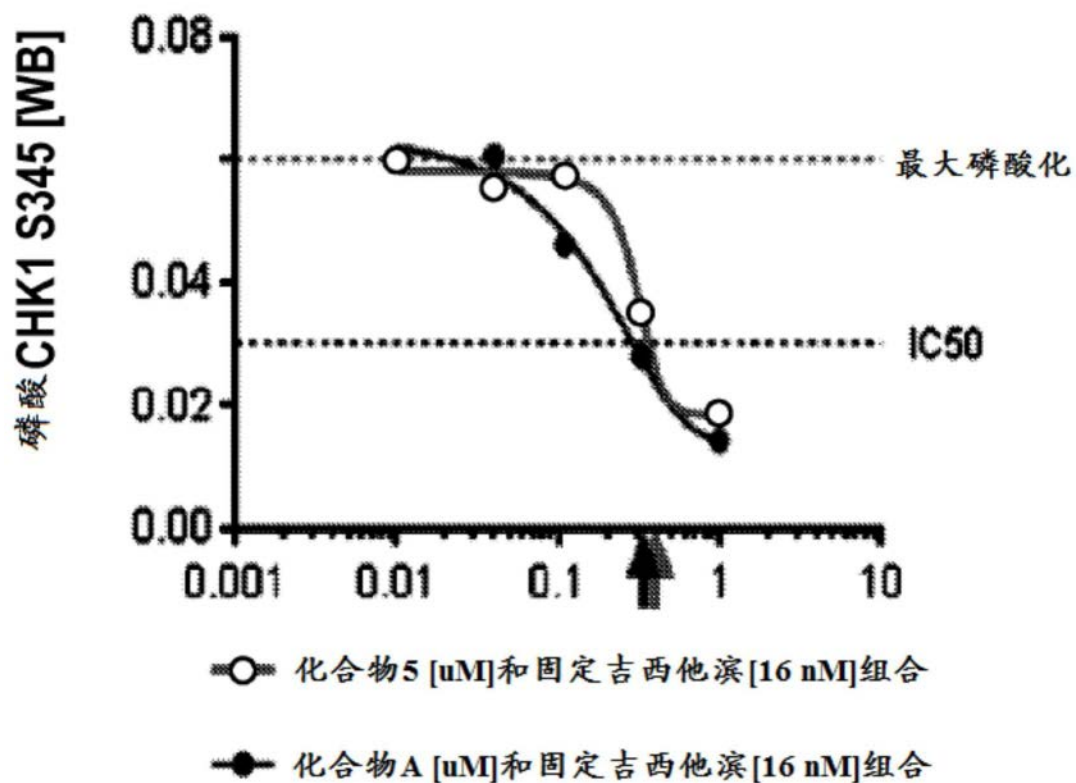


图26B

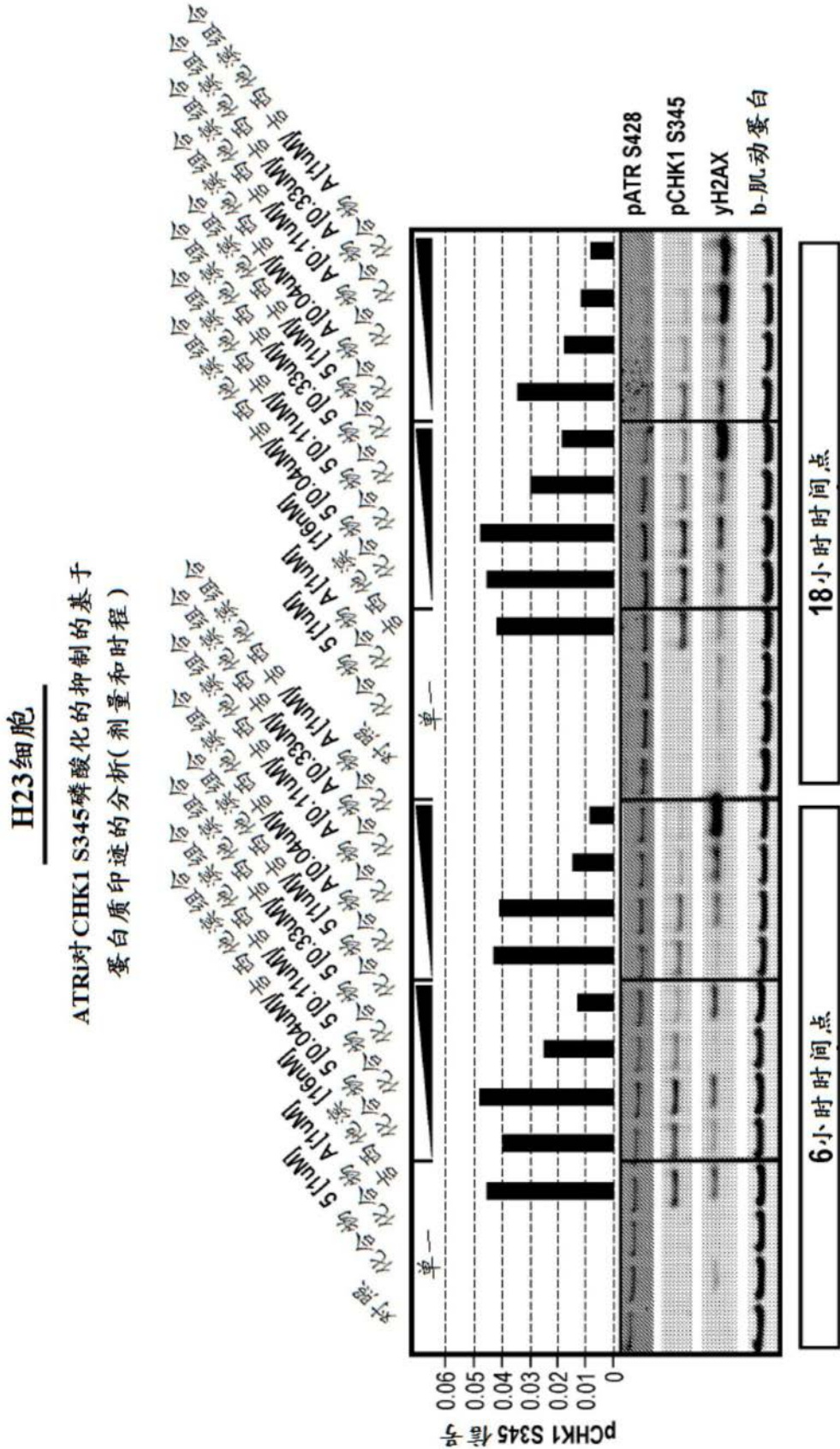


图26C

抑制CHK1 S345磷酸化的IC50

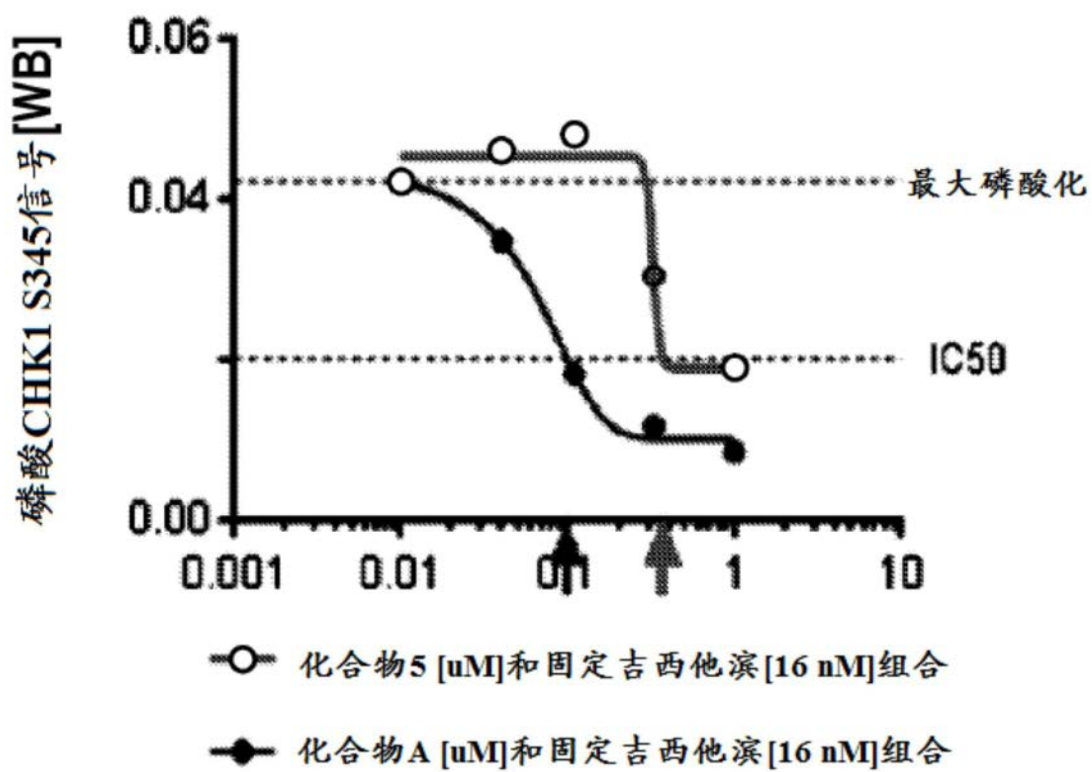


图26D

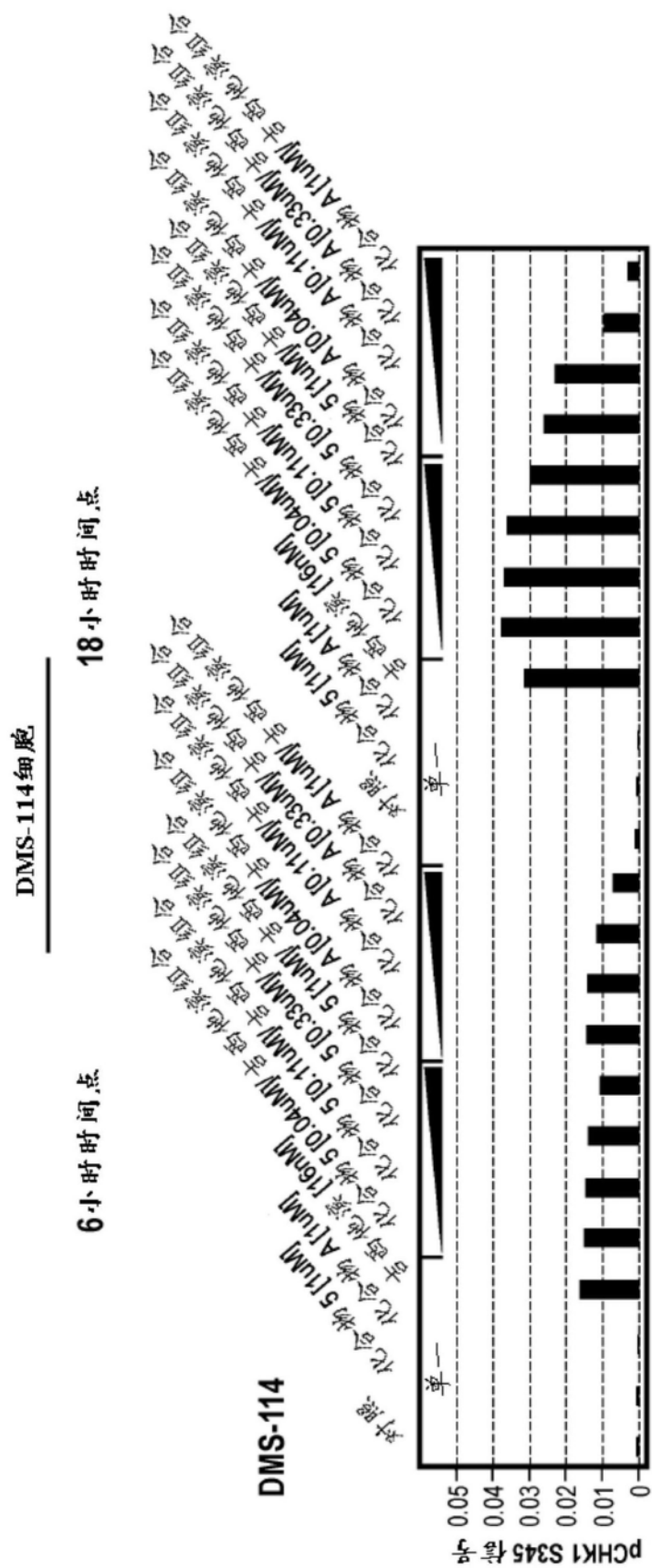


图26E

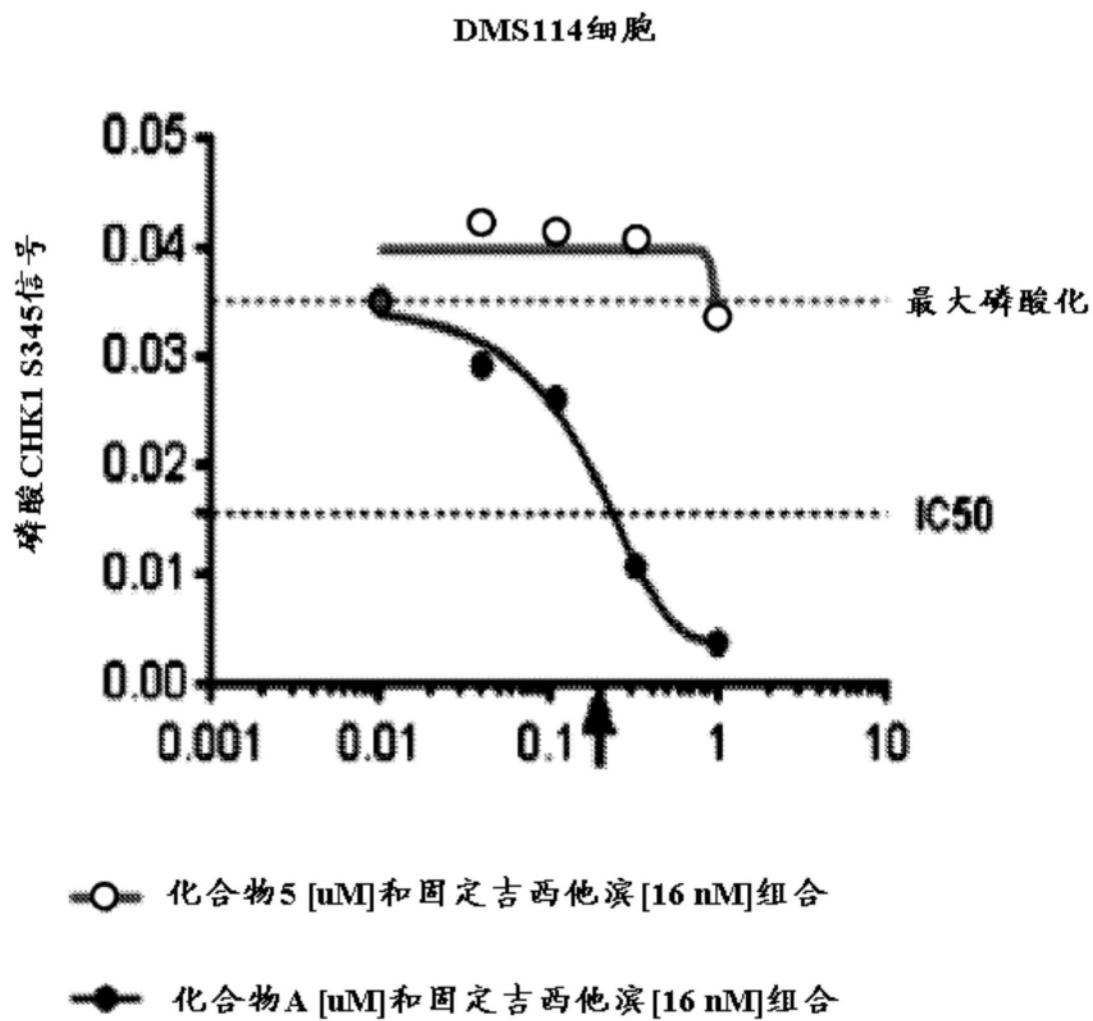


图26F

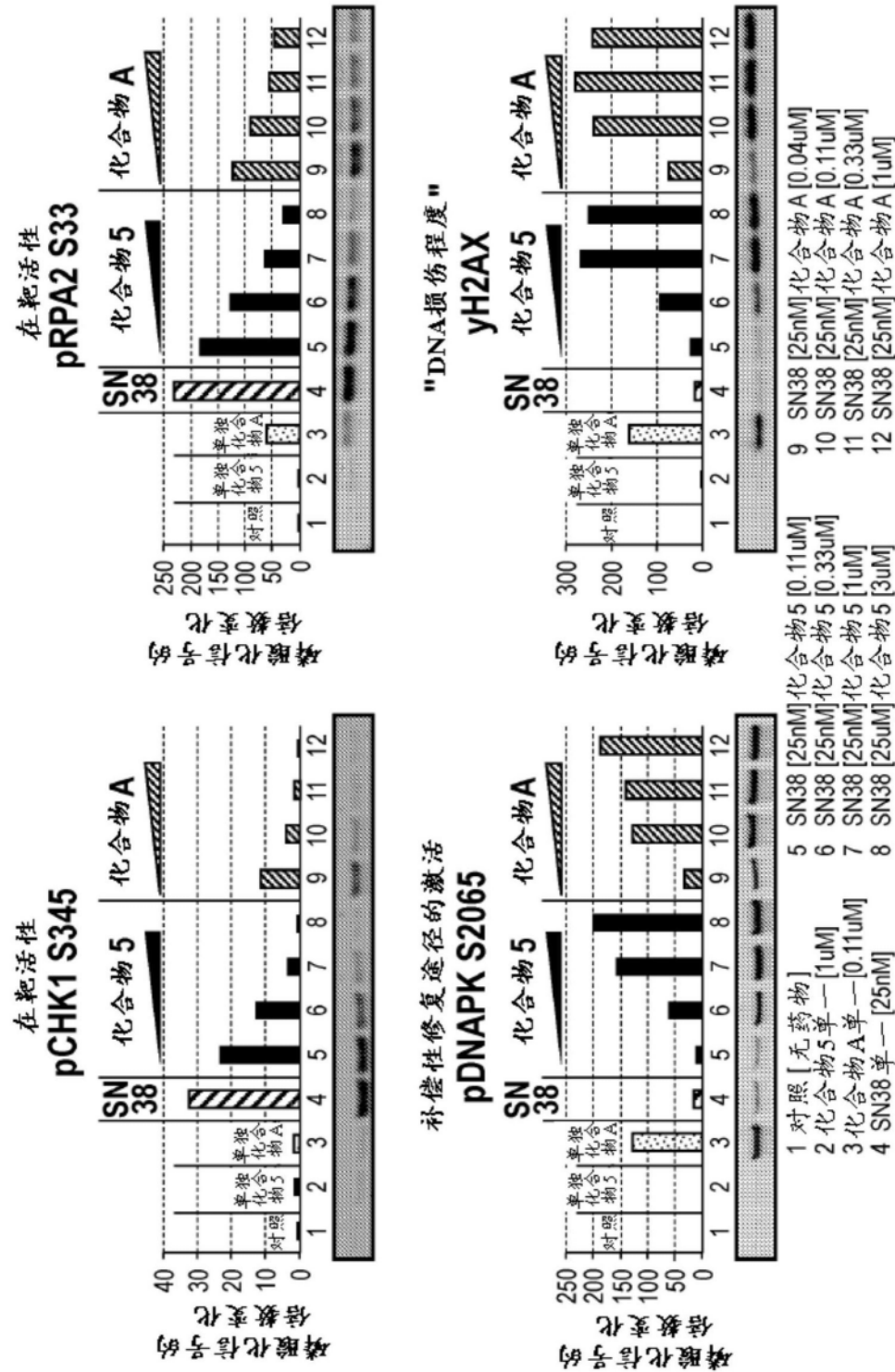


图27A

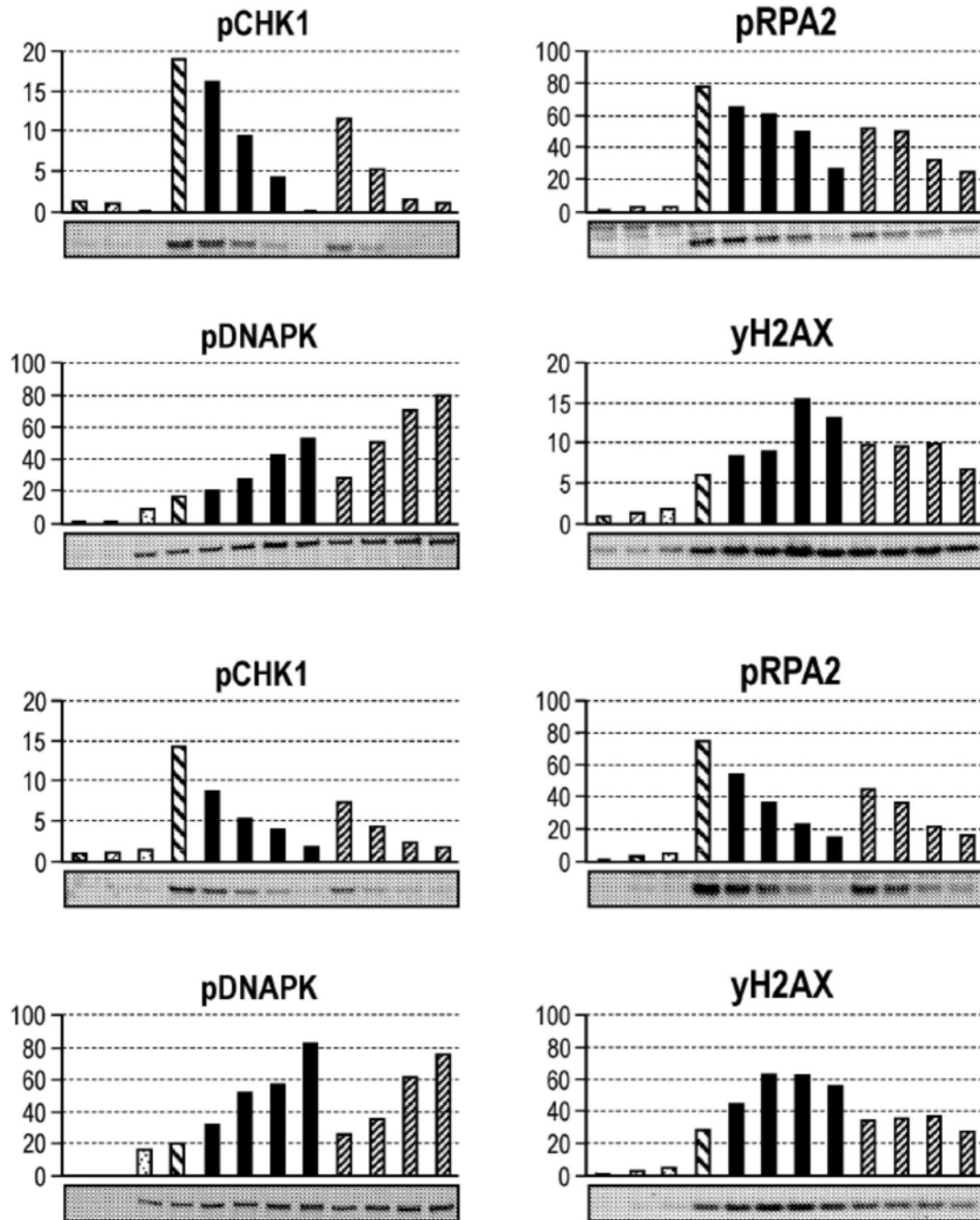


图27B

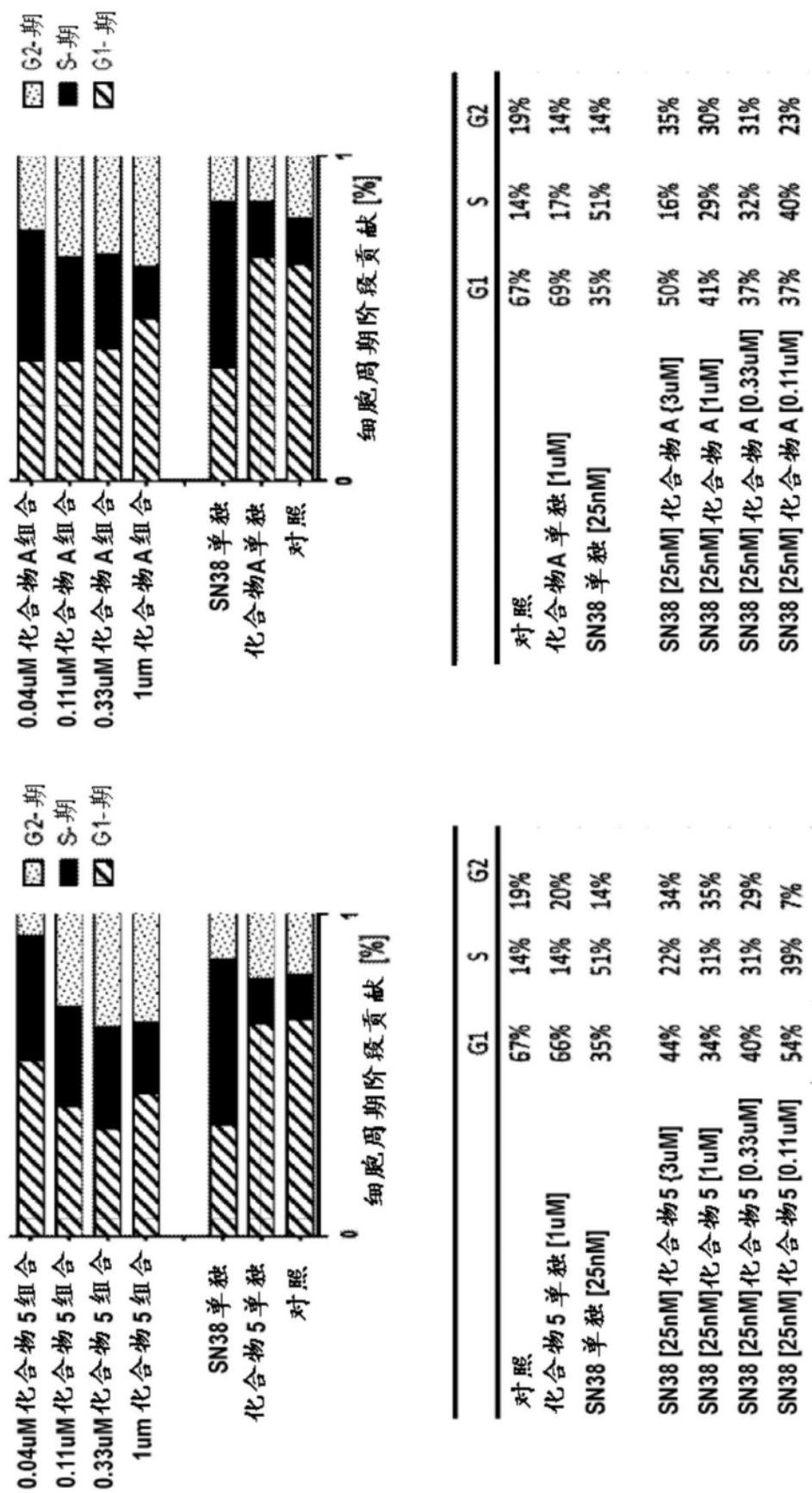


图28

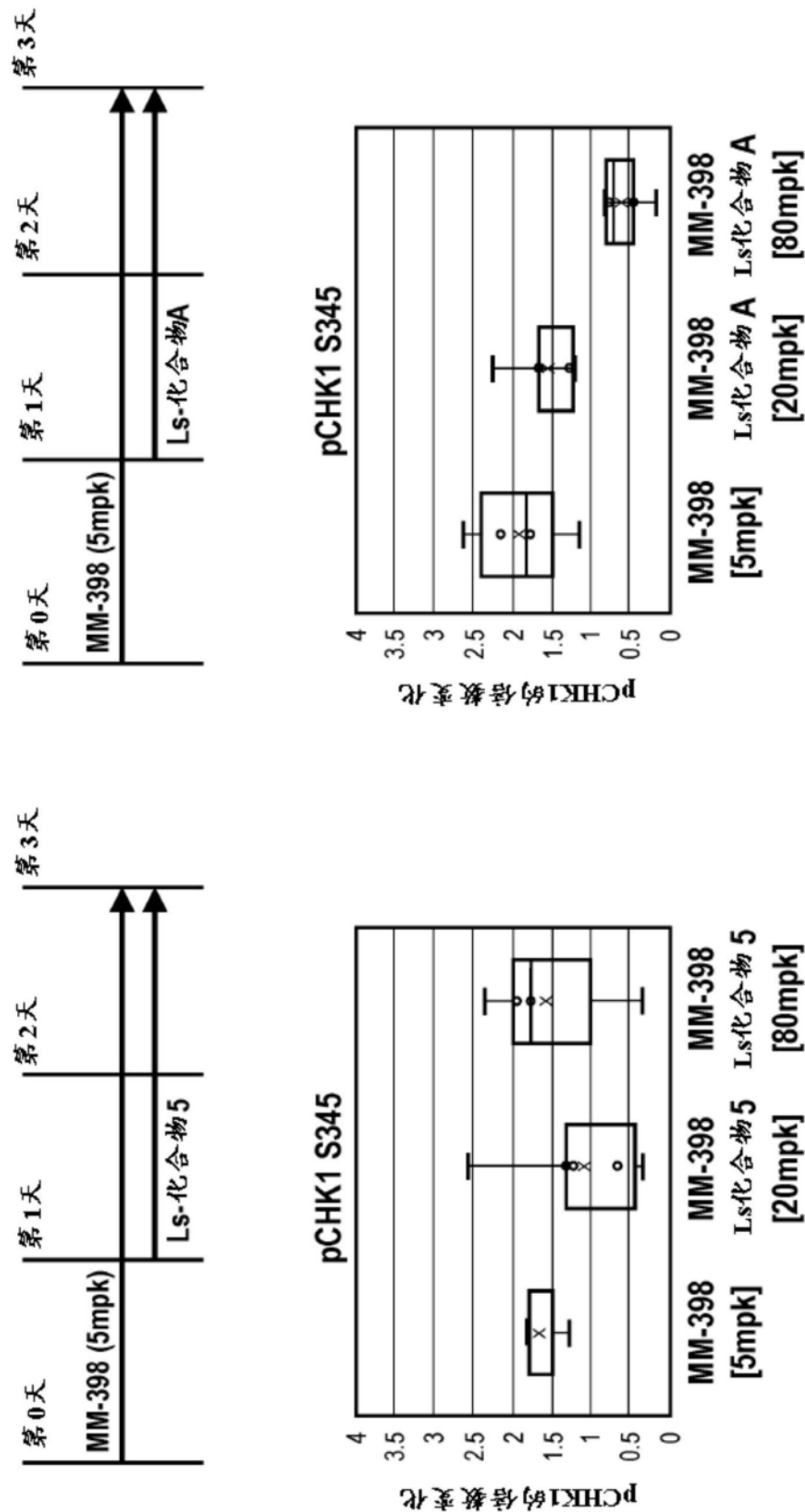


图29

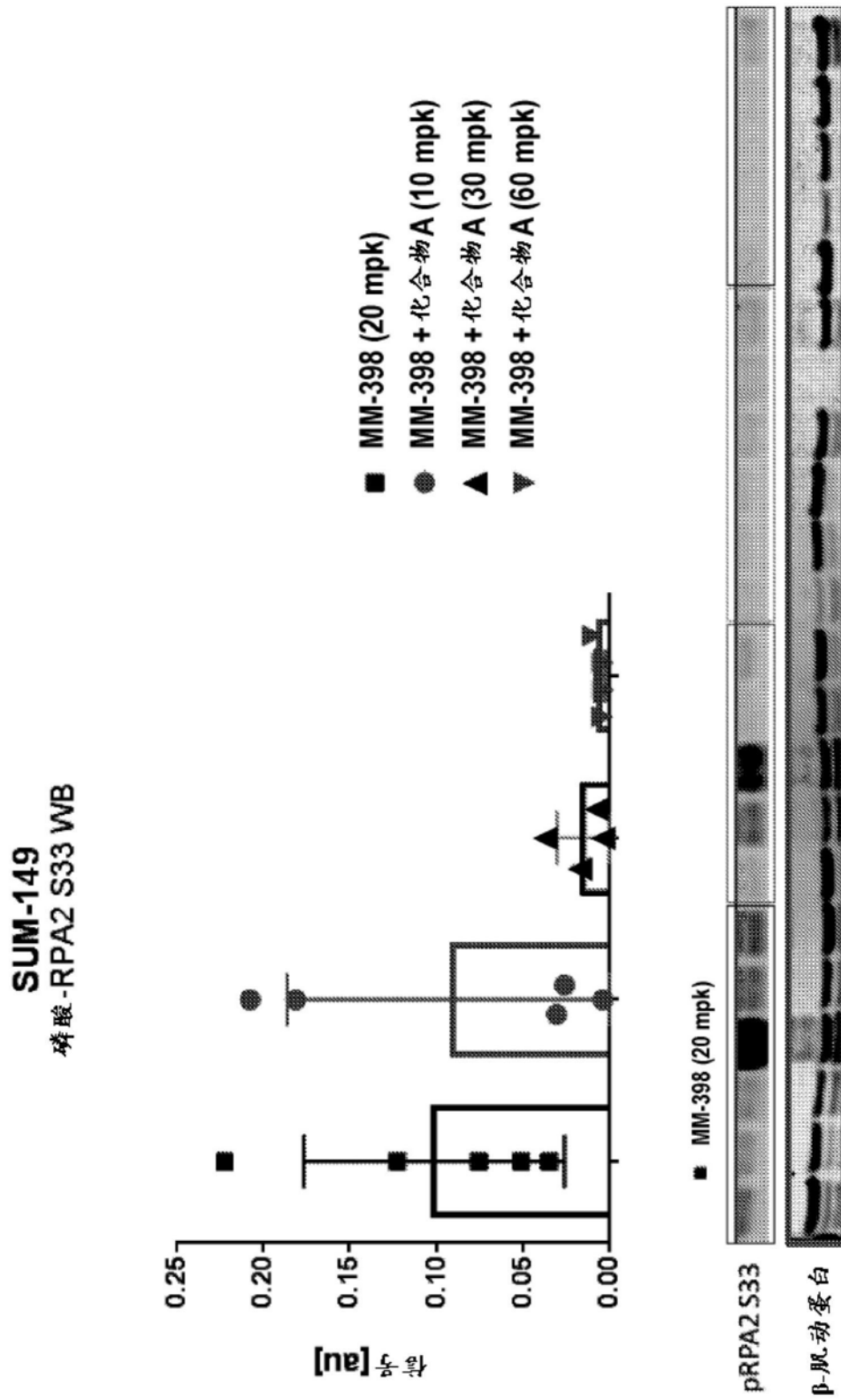


图30A

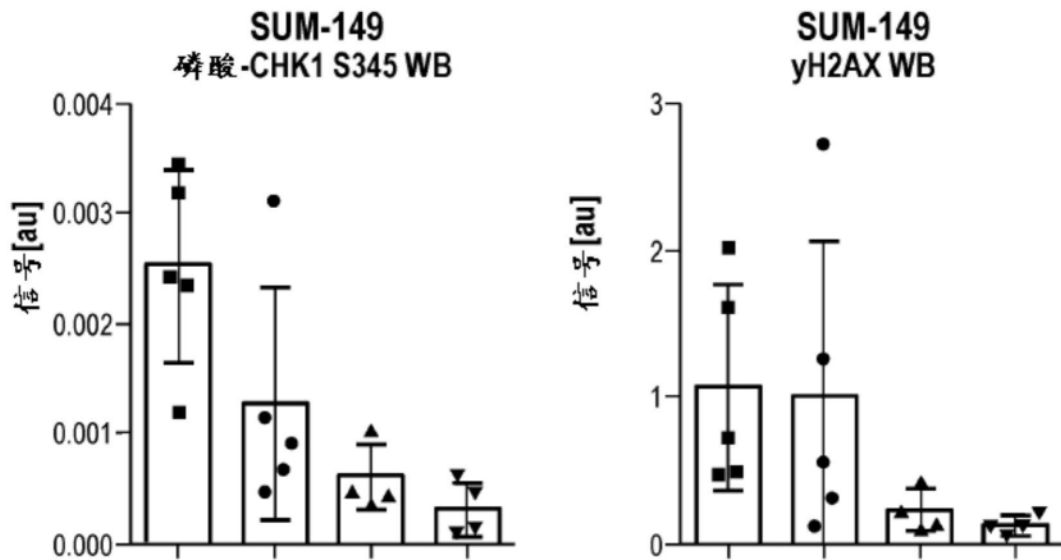
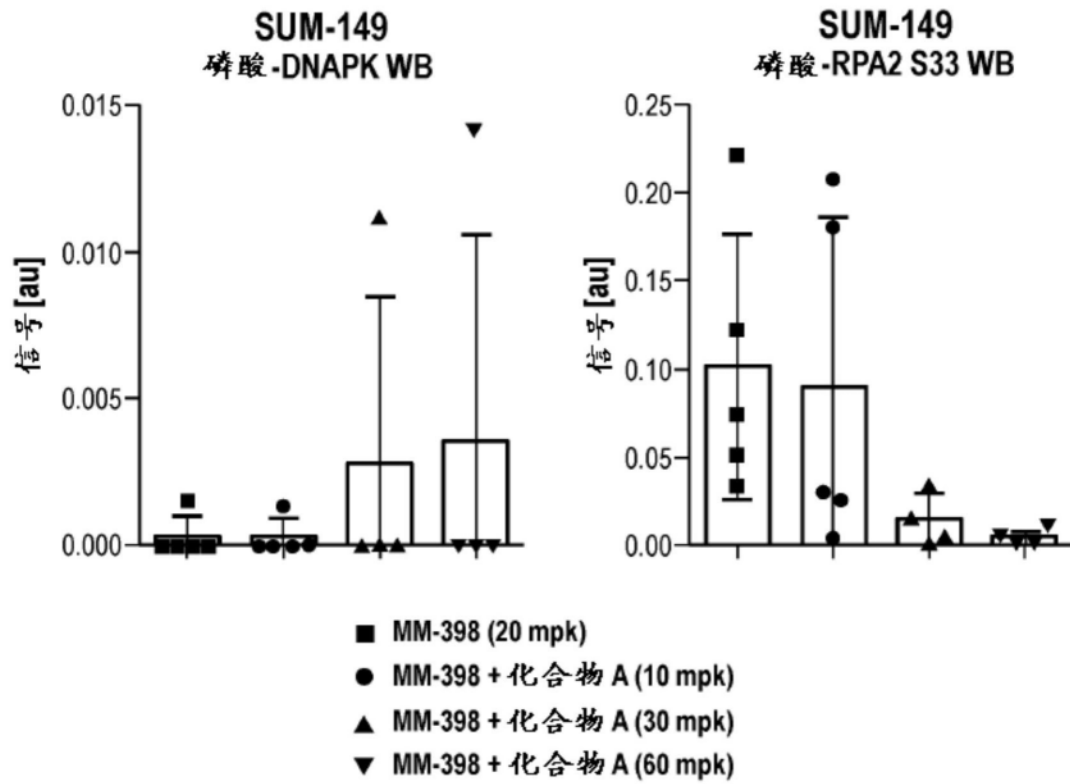


图30B

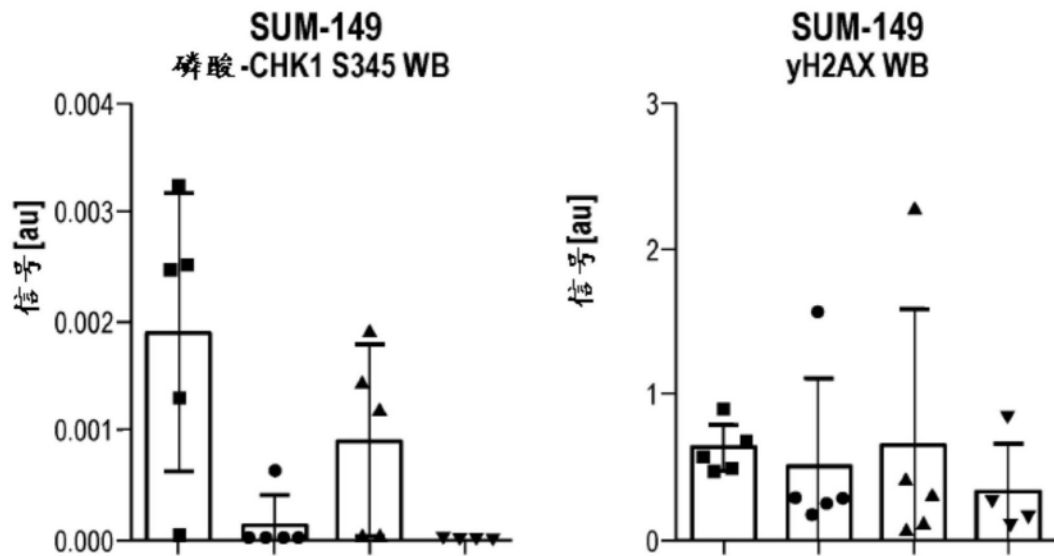
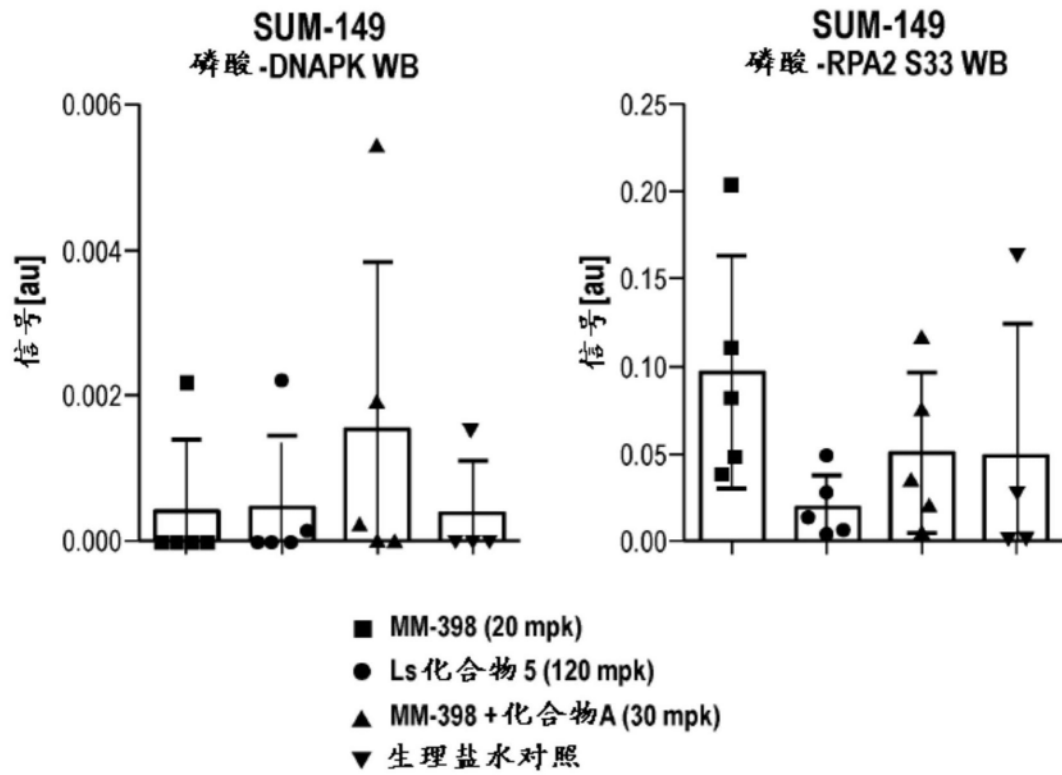


图30C

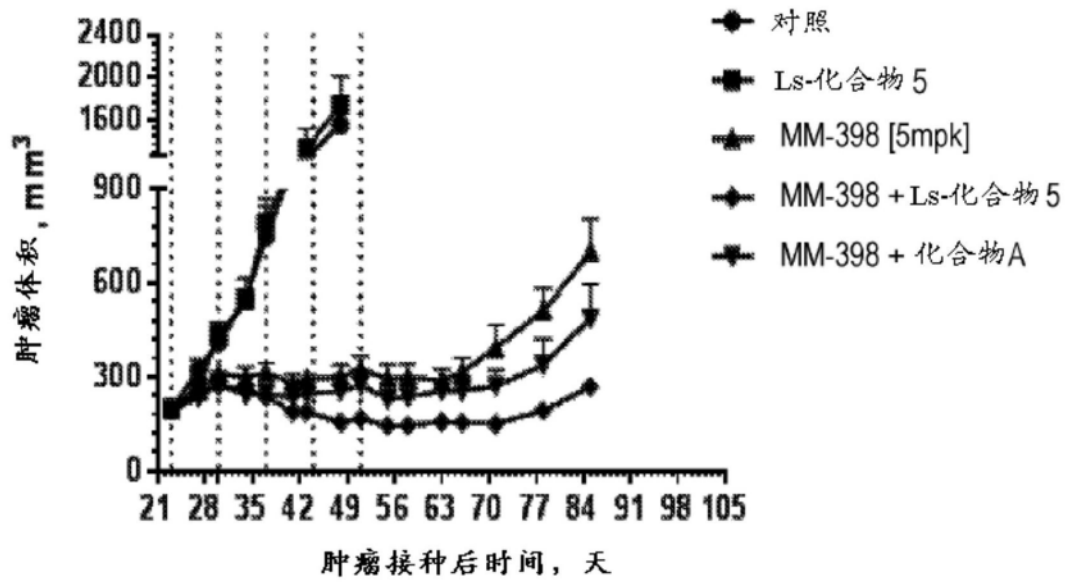


图31

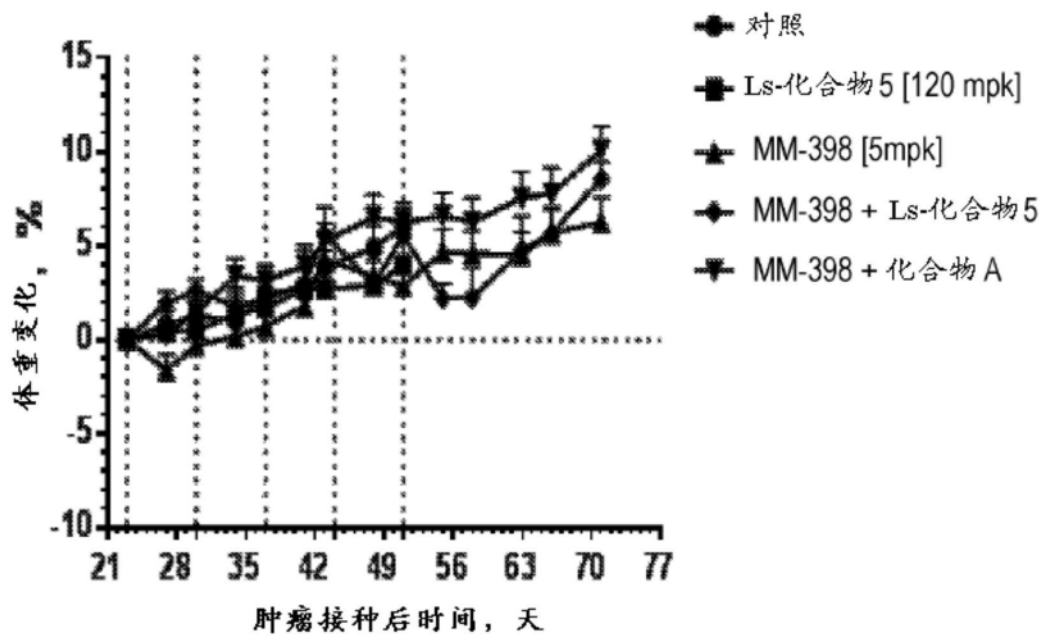


图32

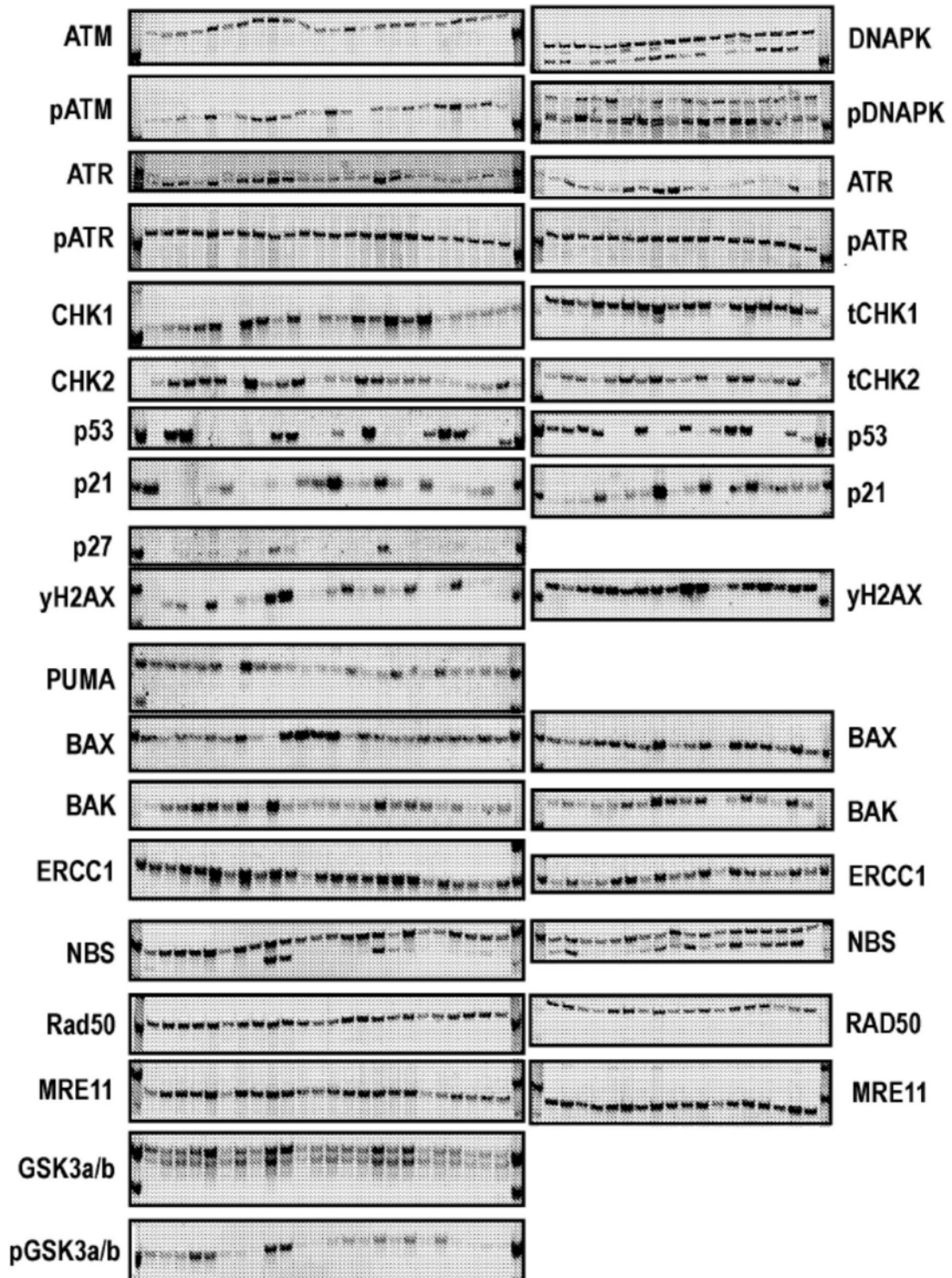


图33

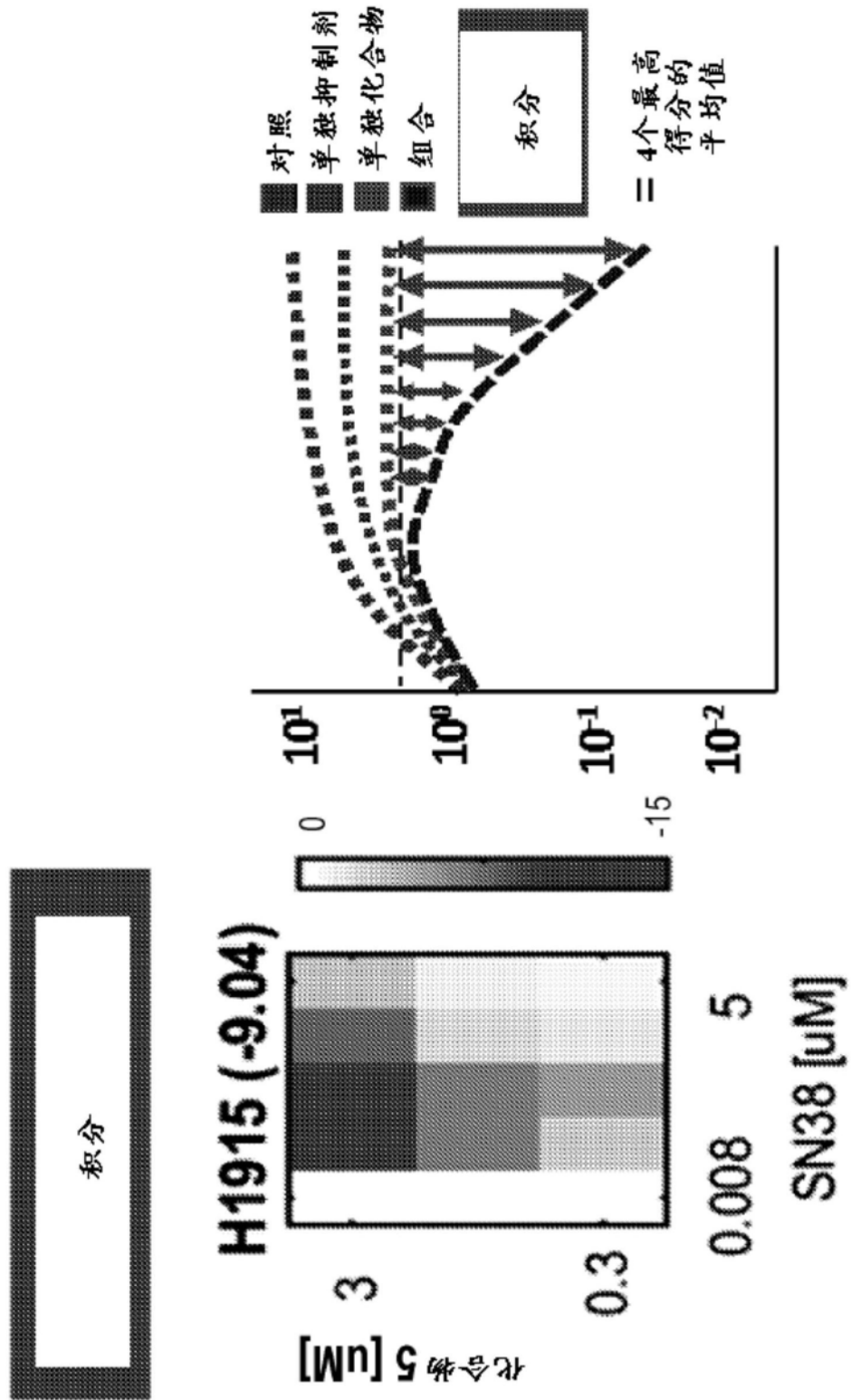


图34

MRE11蛋白表达和SN38积分相关性
(ATRI/SN38组合; 仅肺)

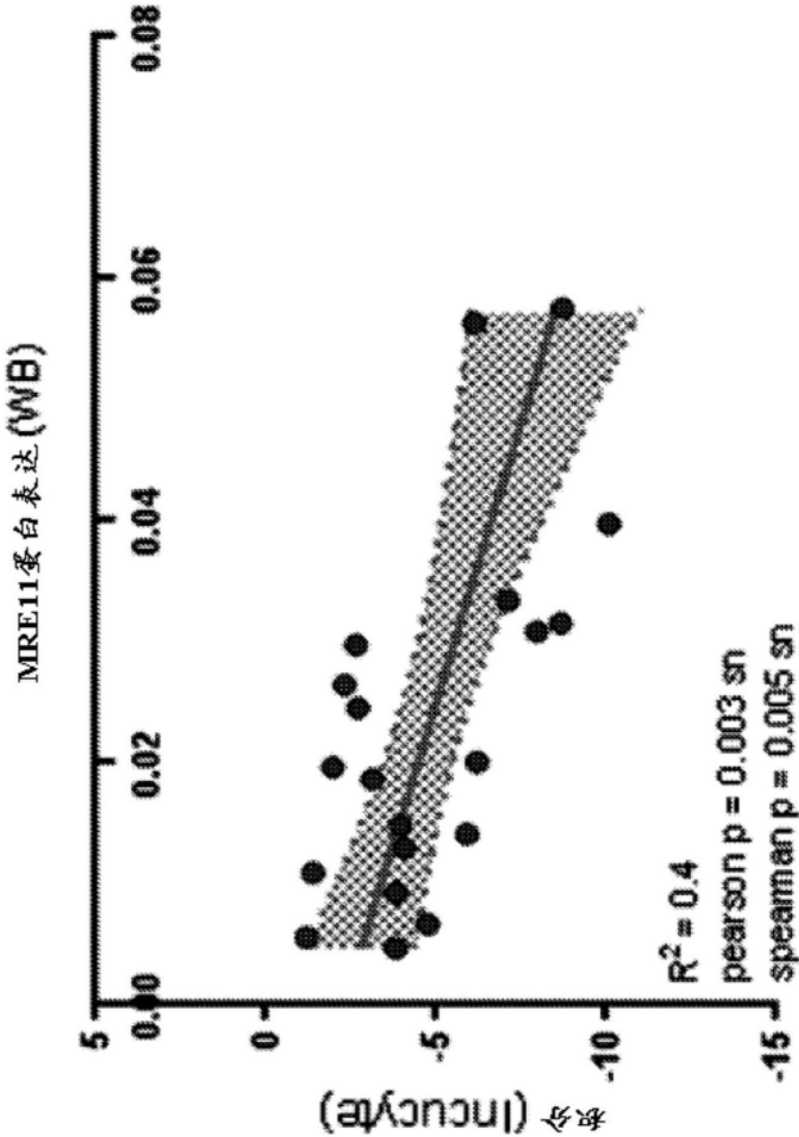


图35

ATM蛋白表达和SN38积分相关性
(ATRi/SN38组合; 仅肺)

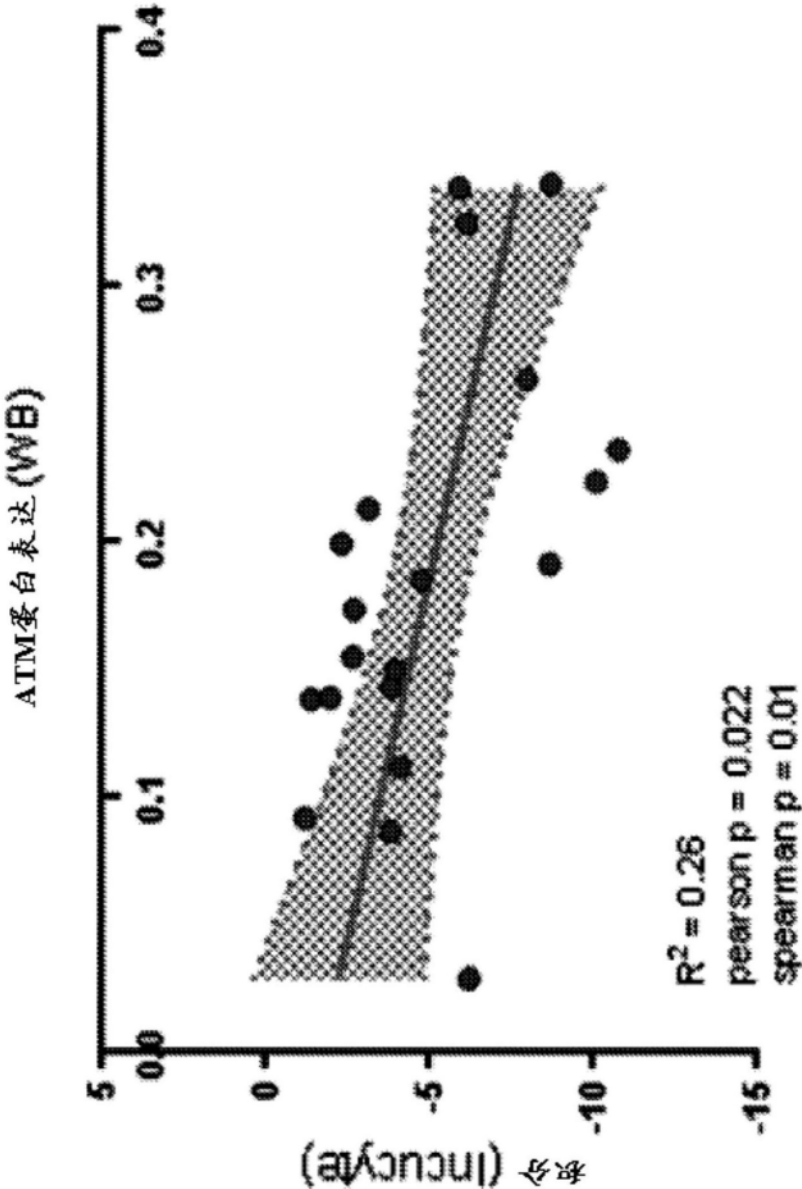


图36

NBS蛋白表达和SN38积分相关性
(ATRi/SN38组合; p53降低; 仅肺)

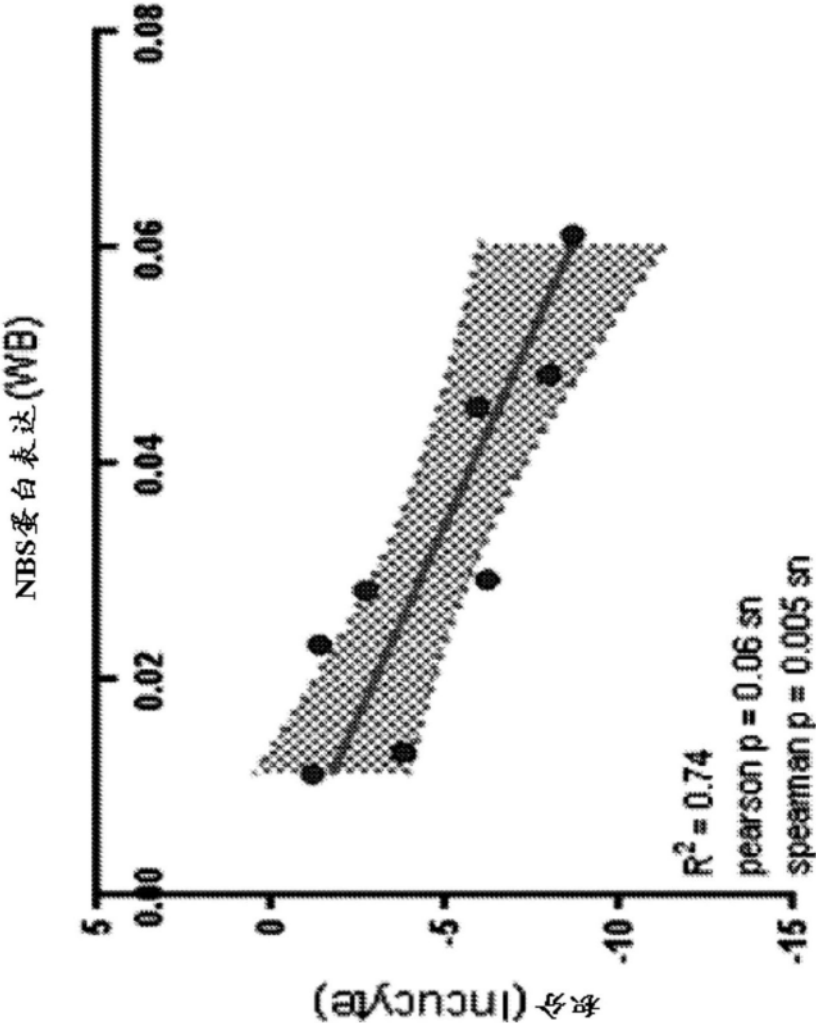


图37

MRE11蛋白表达和SN38积分相关性
(ATRi/SN38组合; p53降低; 仅肺)

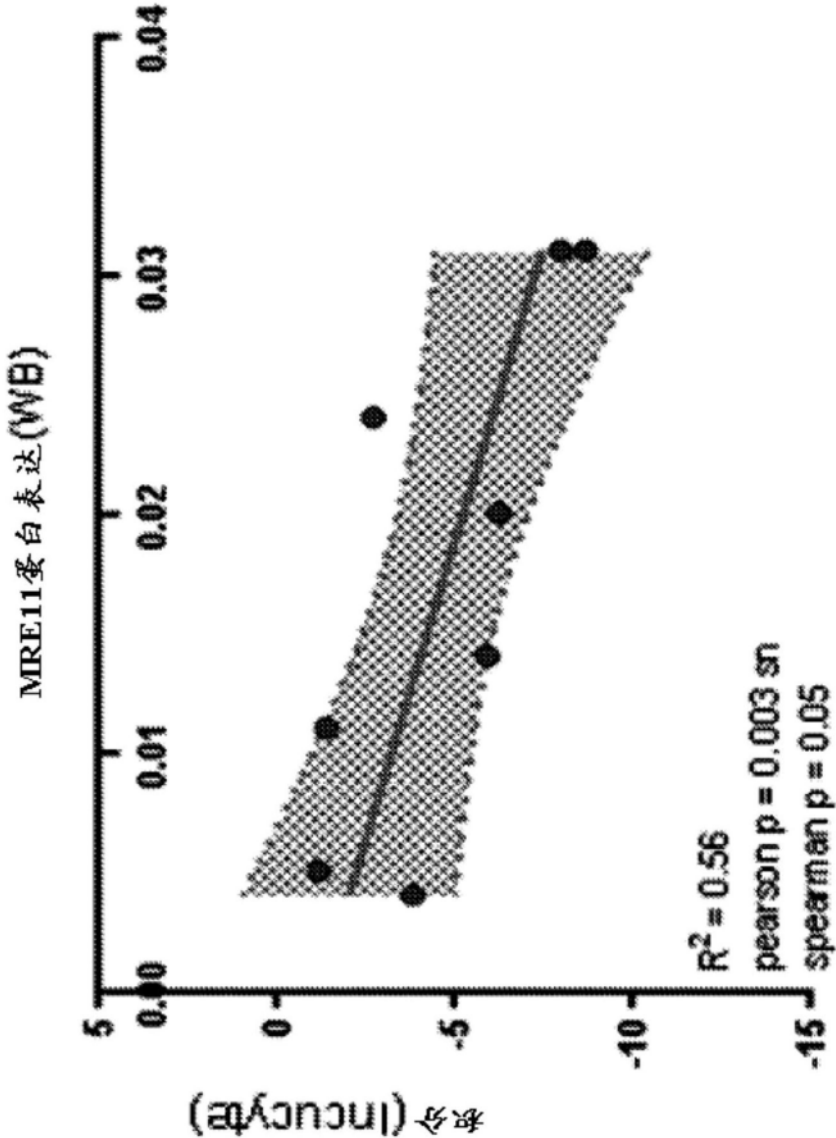


图38

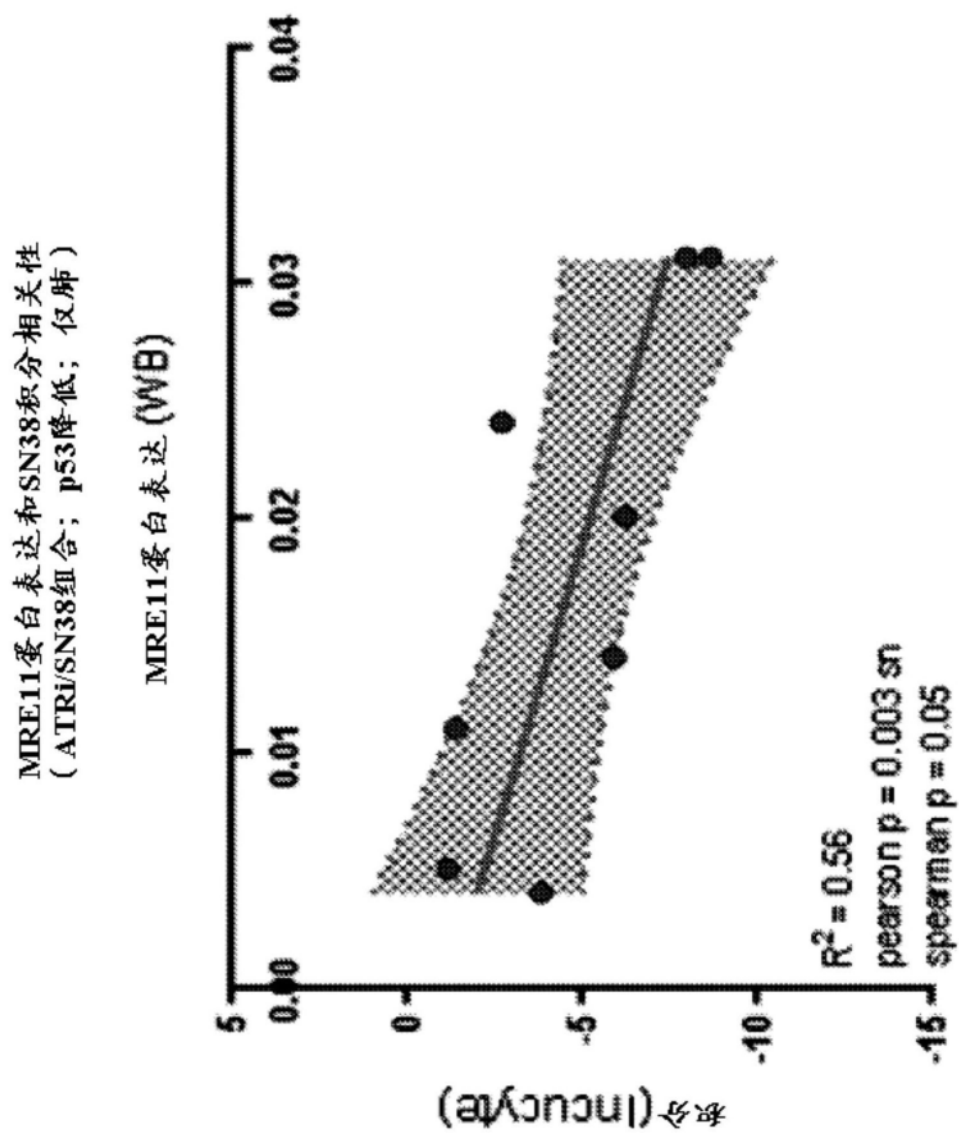


图39

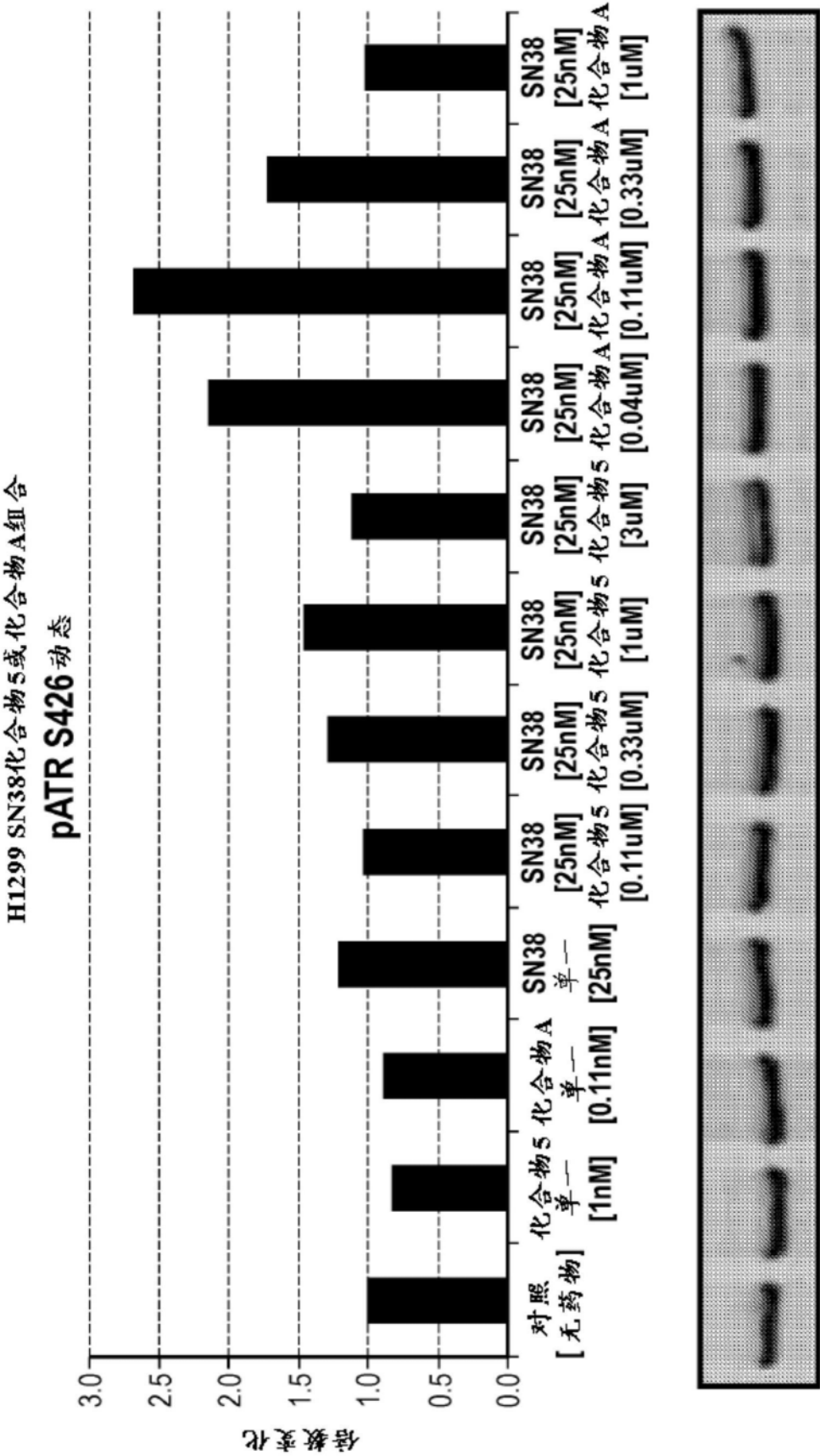


图40A

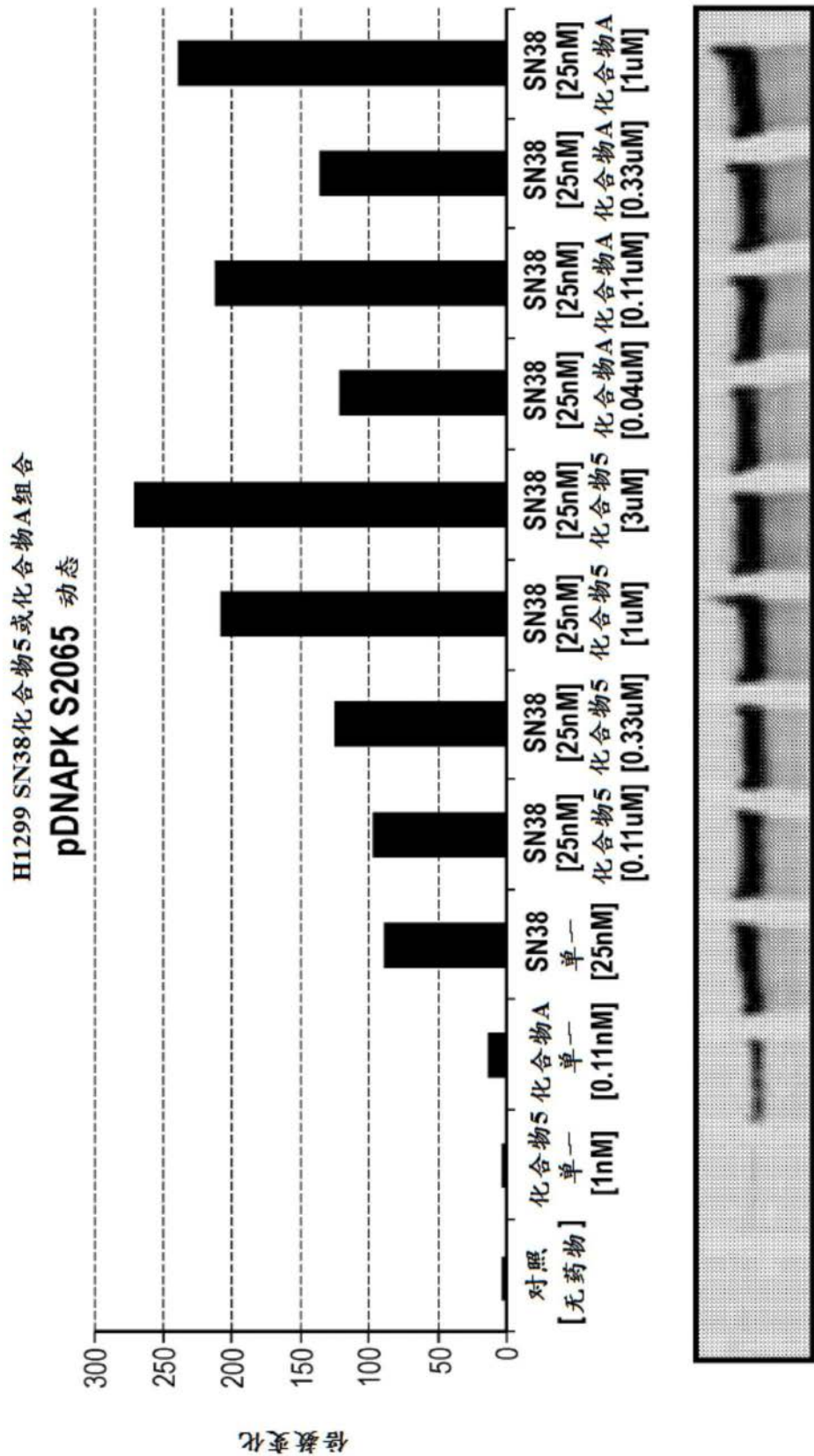


图40B

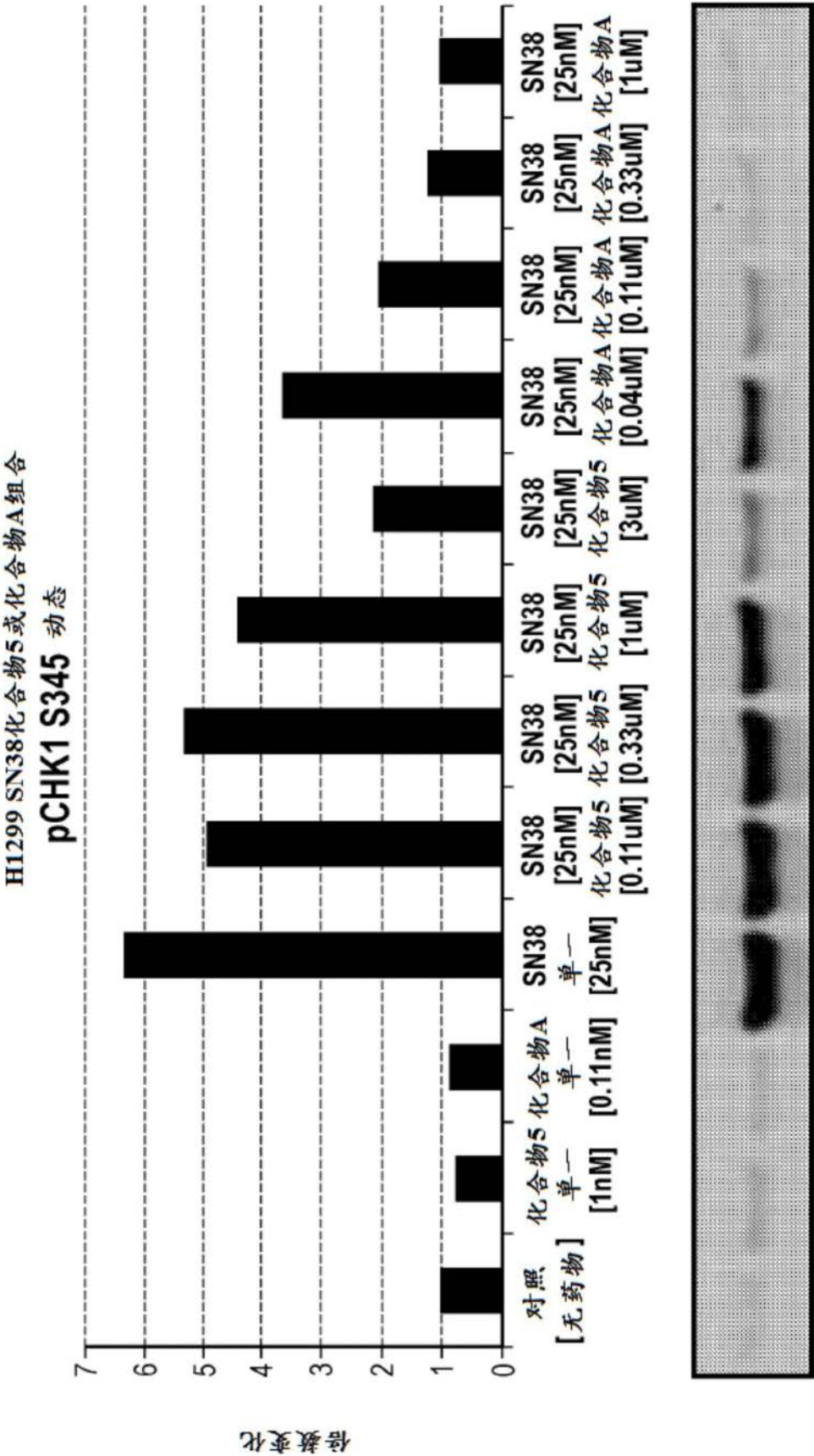


图40C

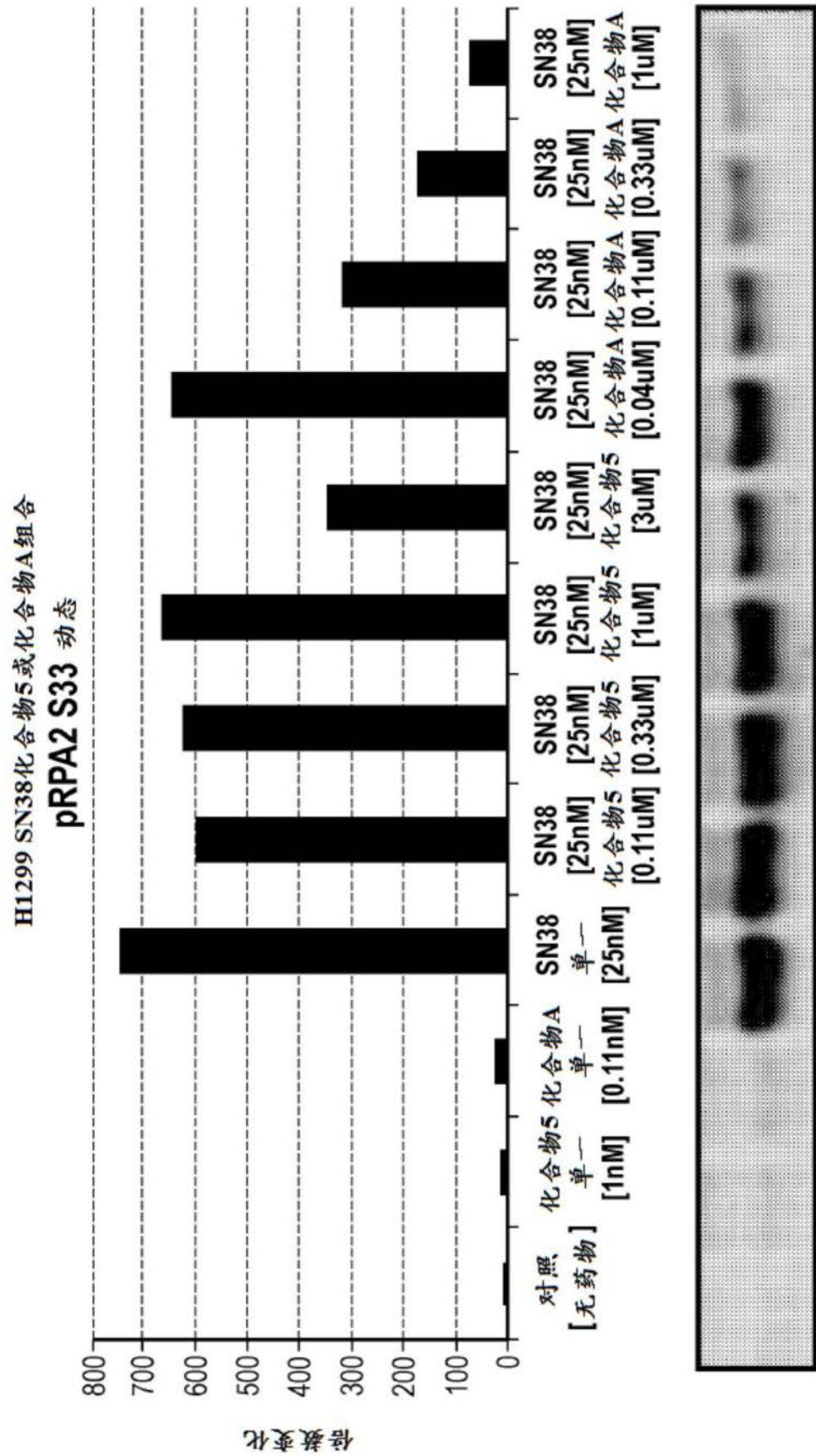


图40D

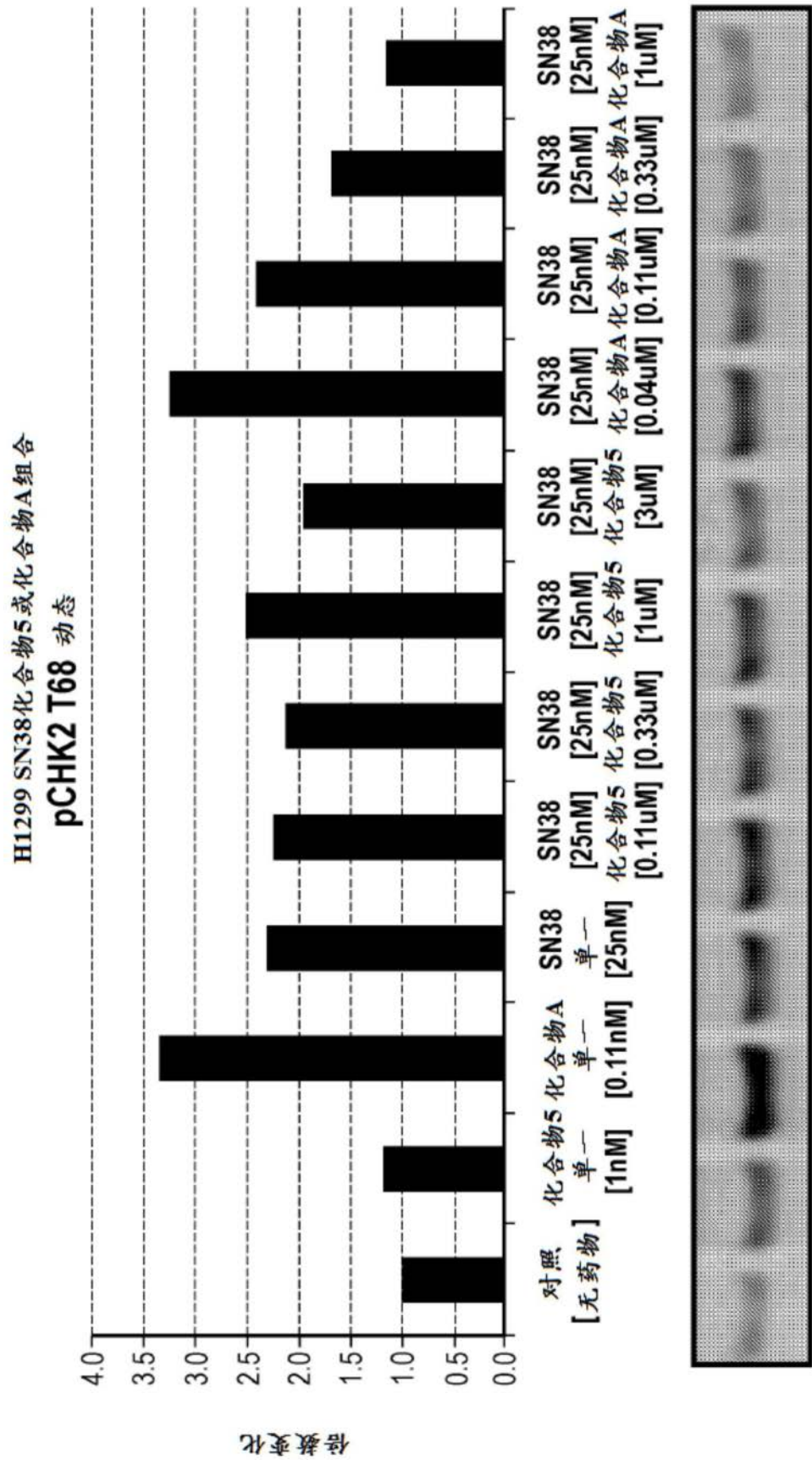


图40E

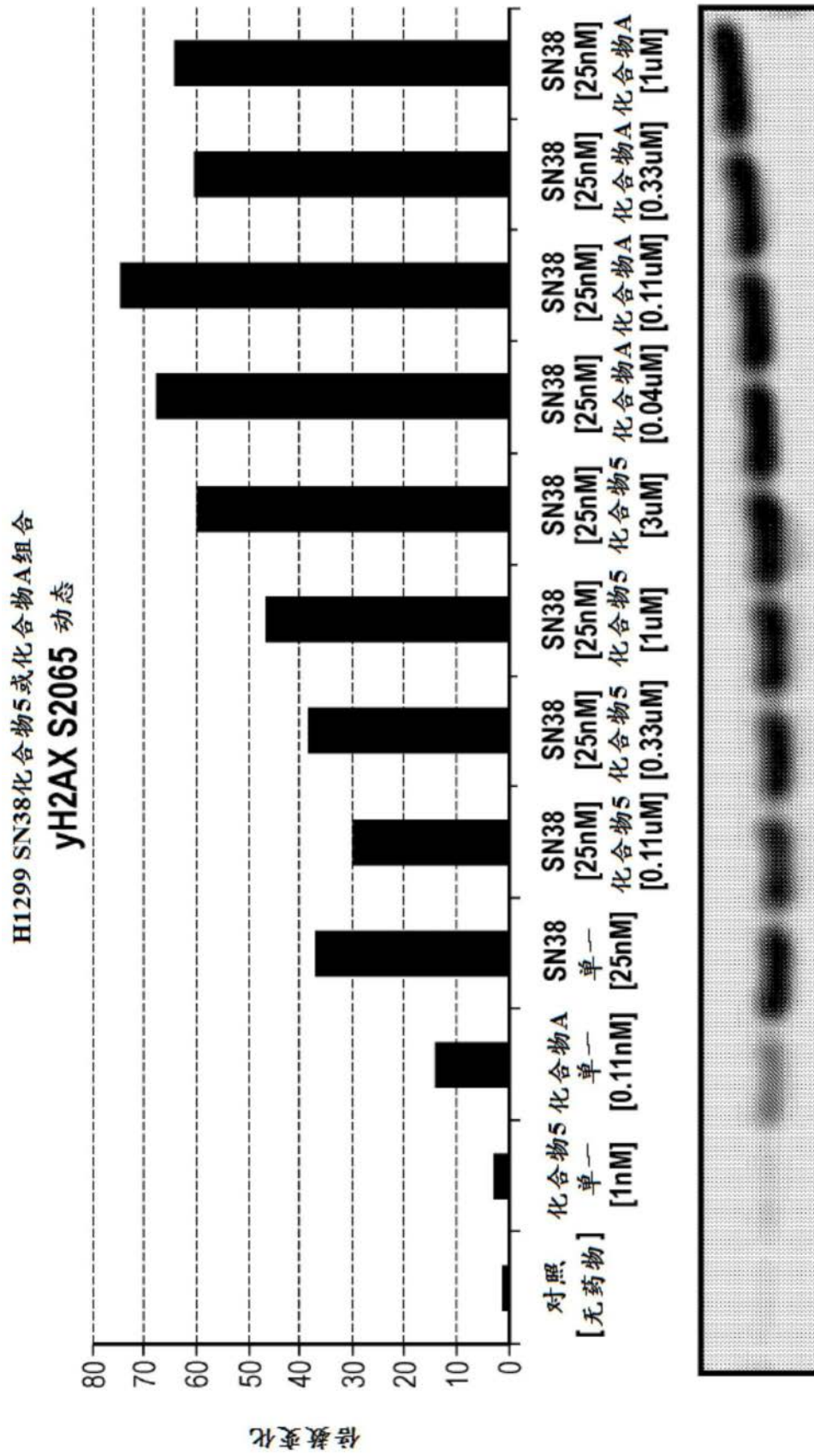


图40F

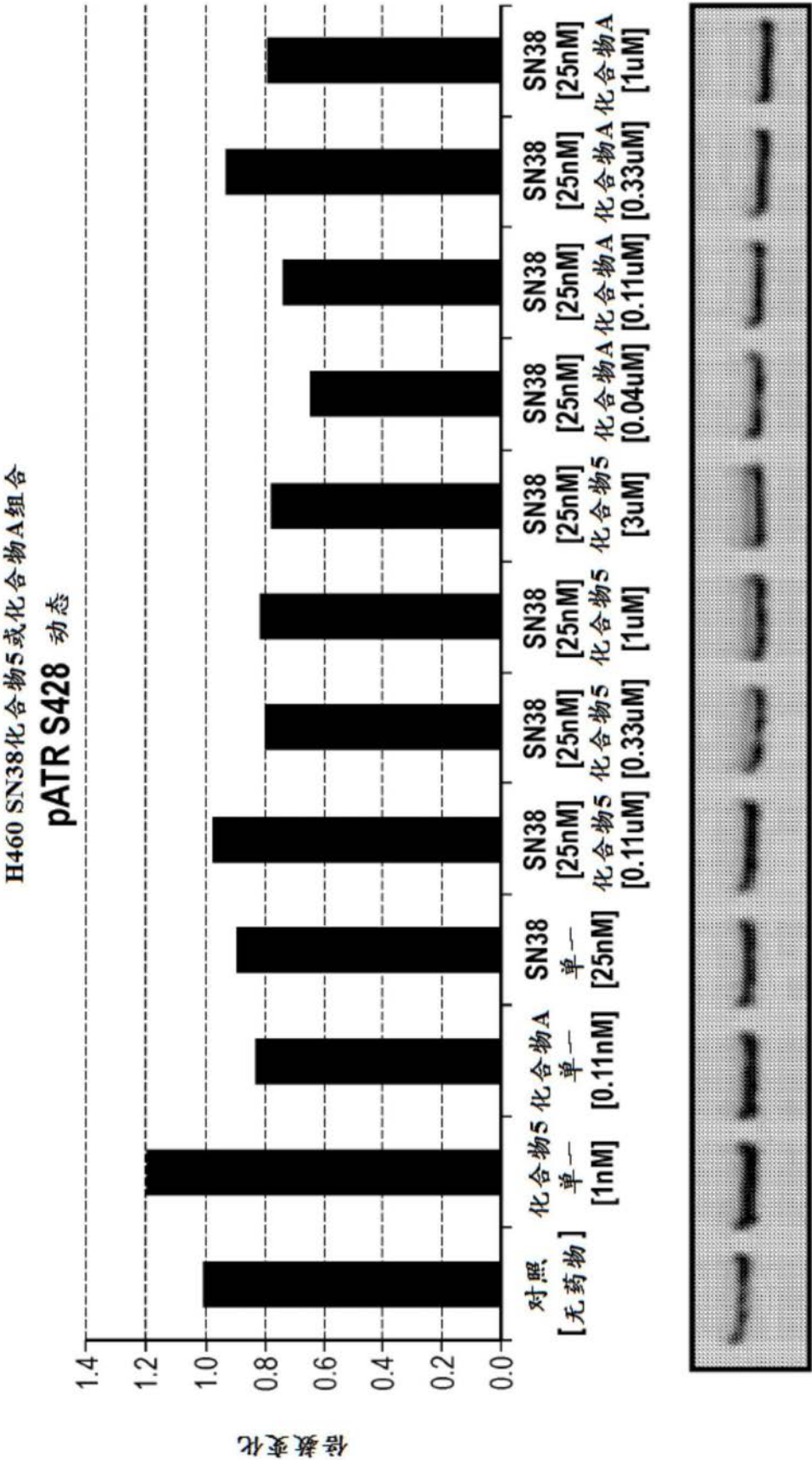


图41A

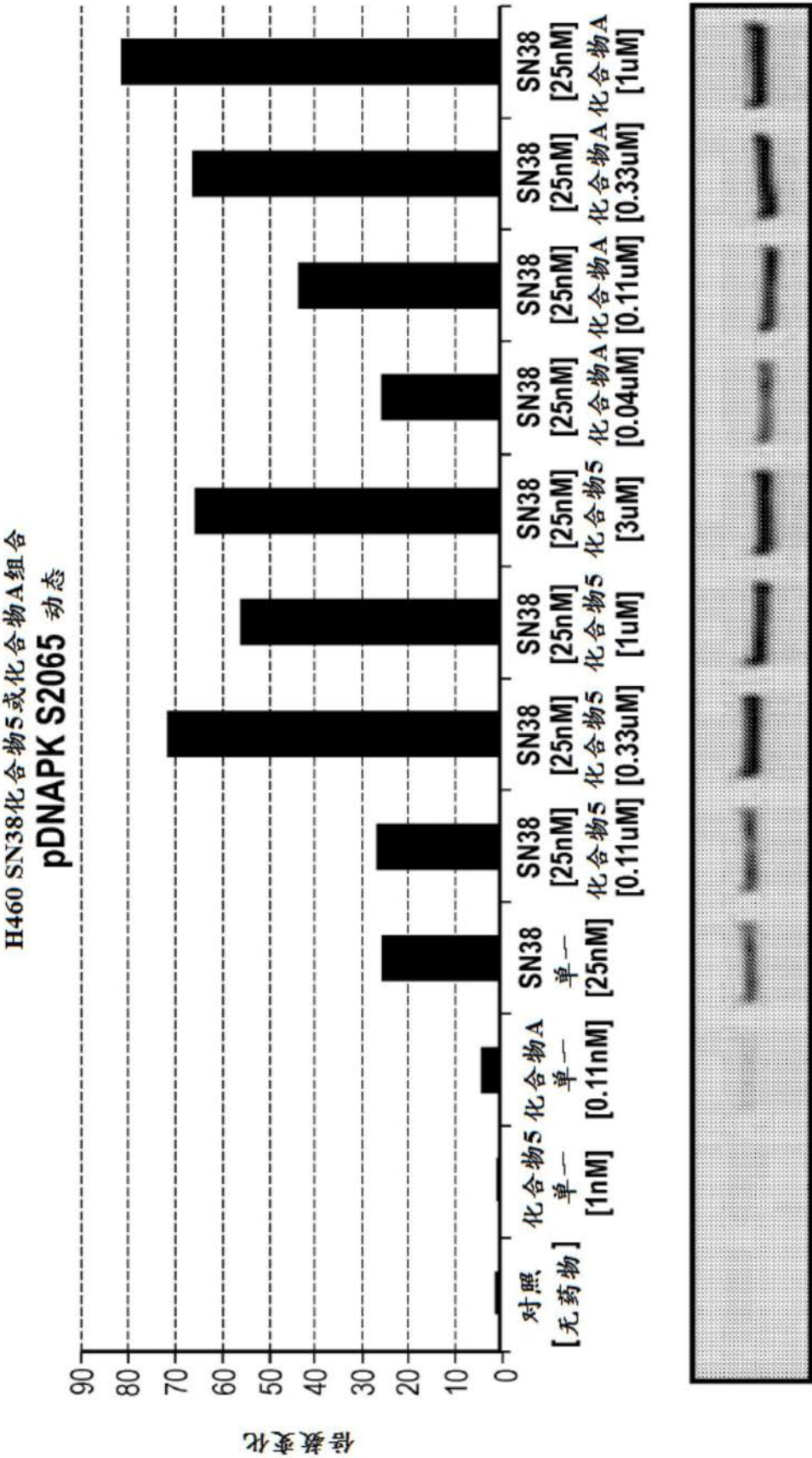


图41B

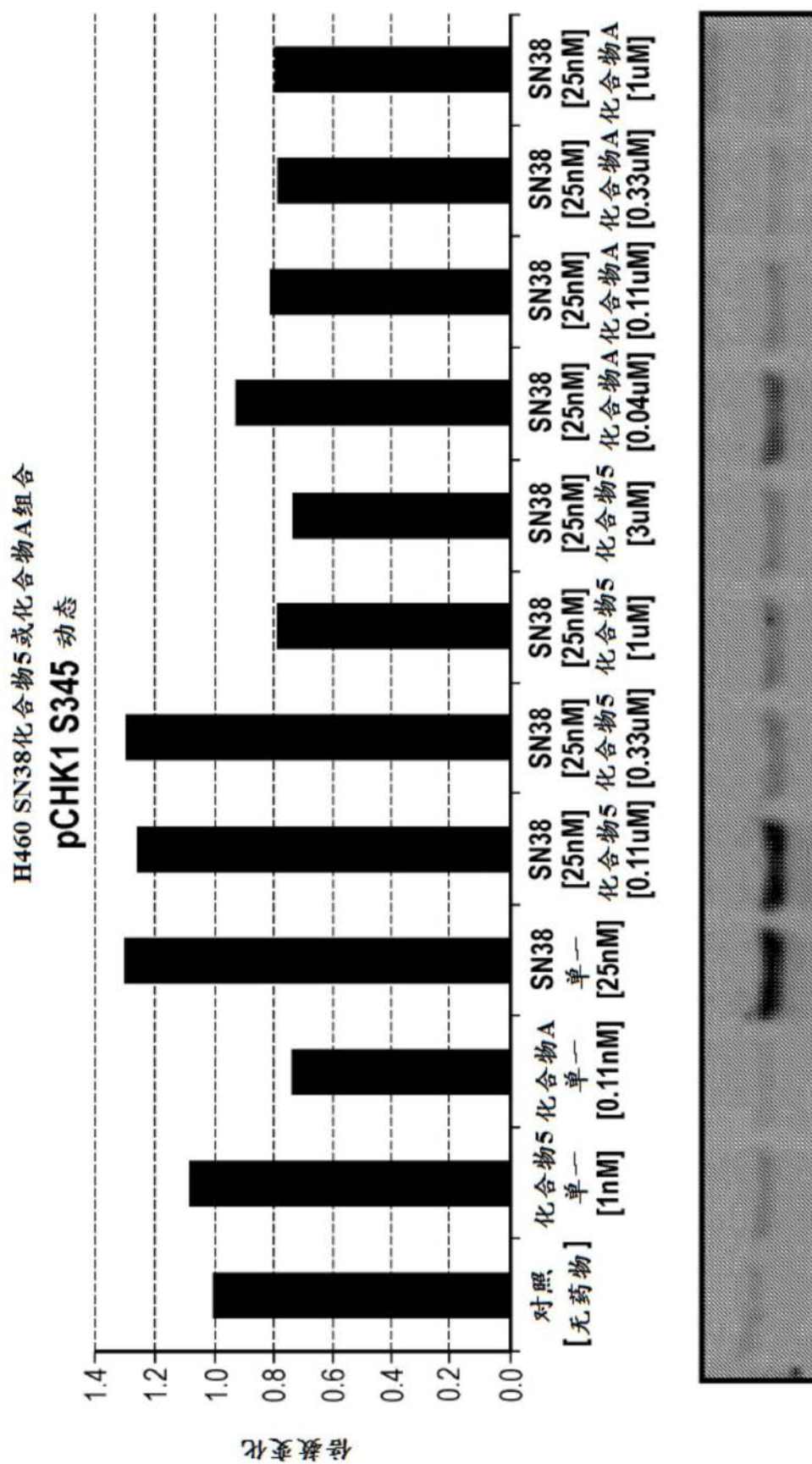


图41C

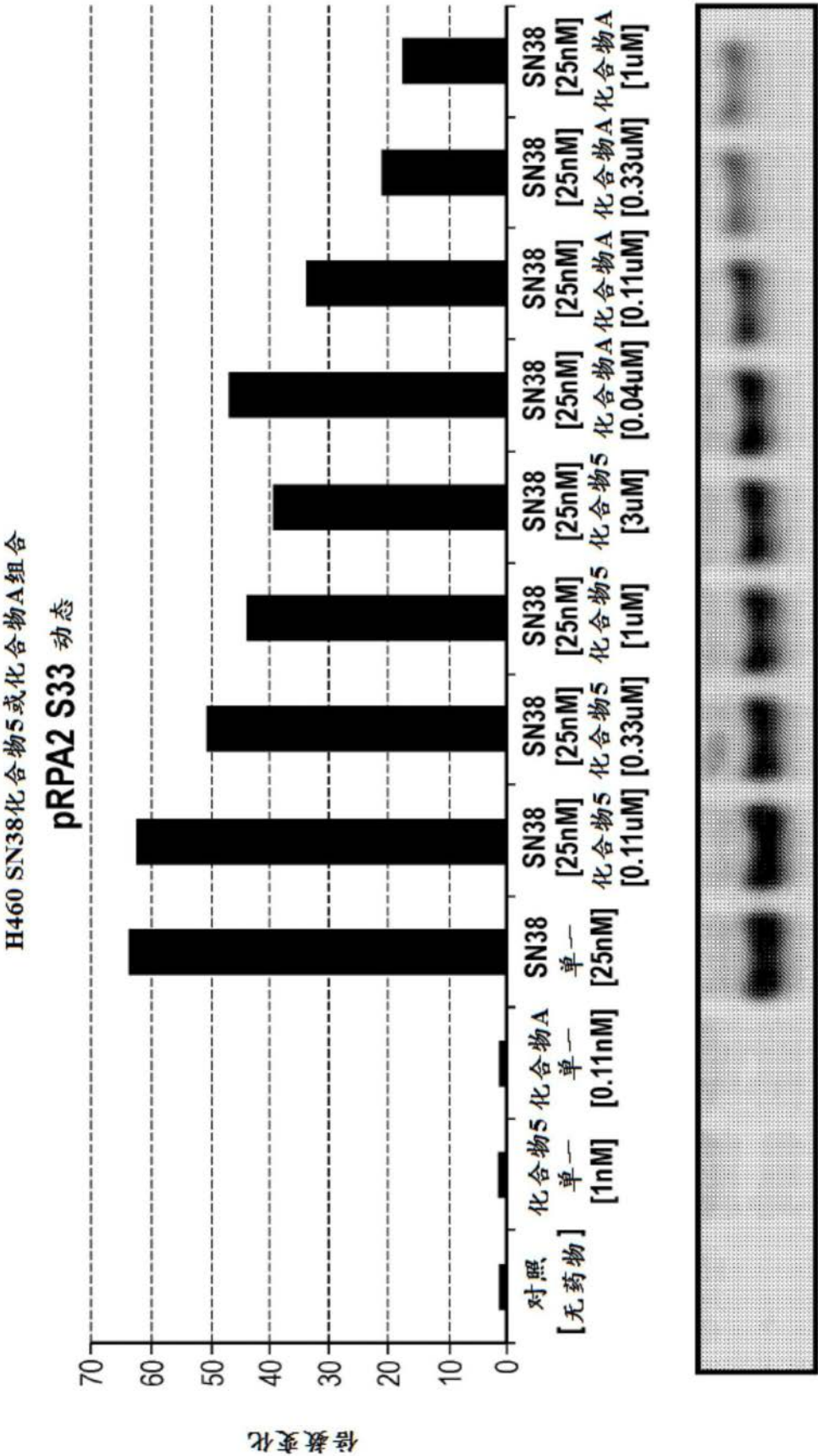


图41D

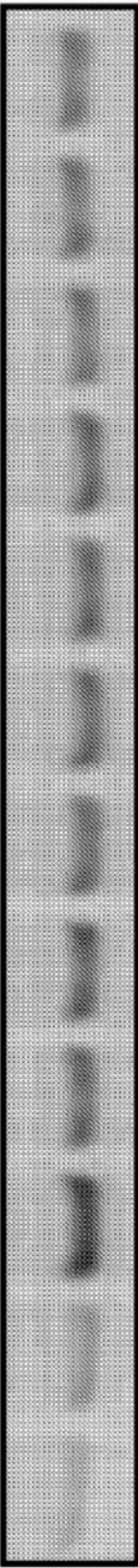
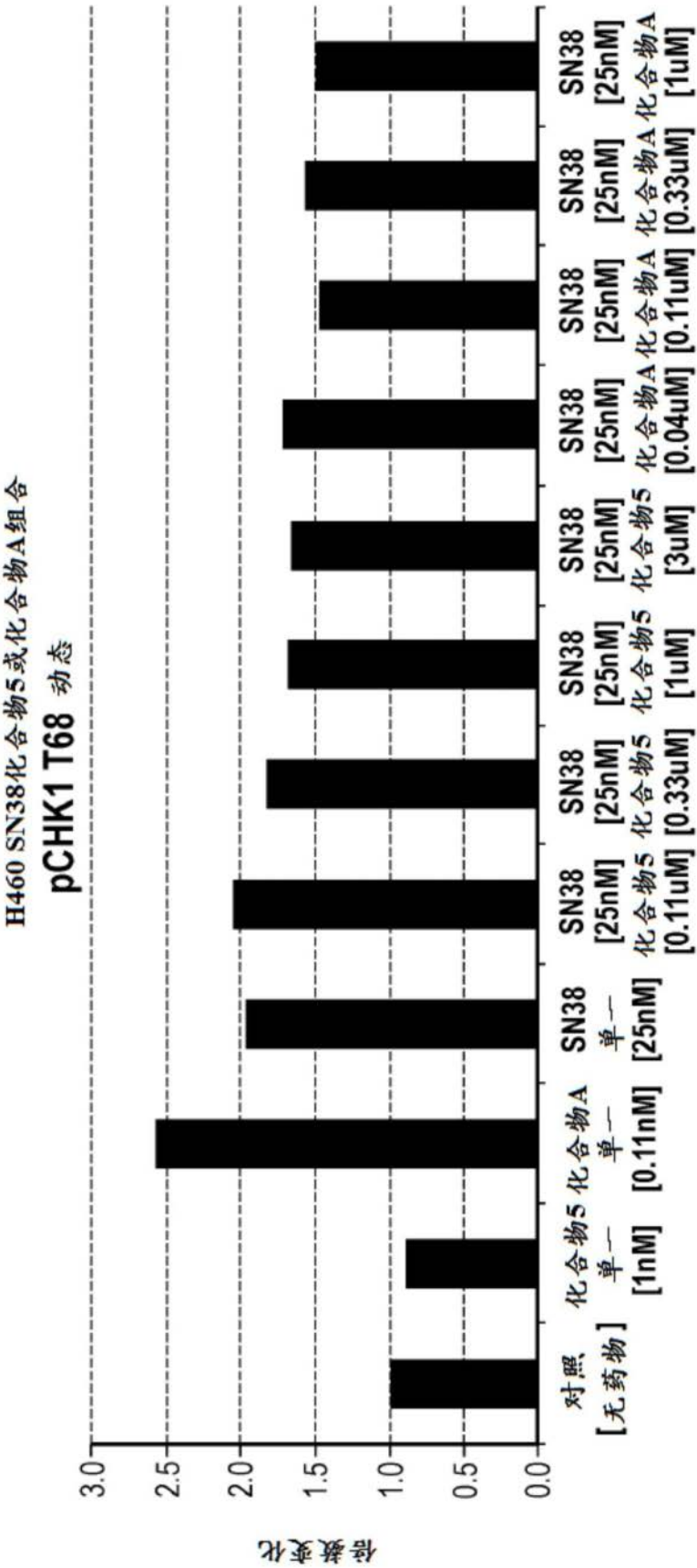


图41E

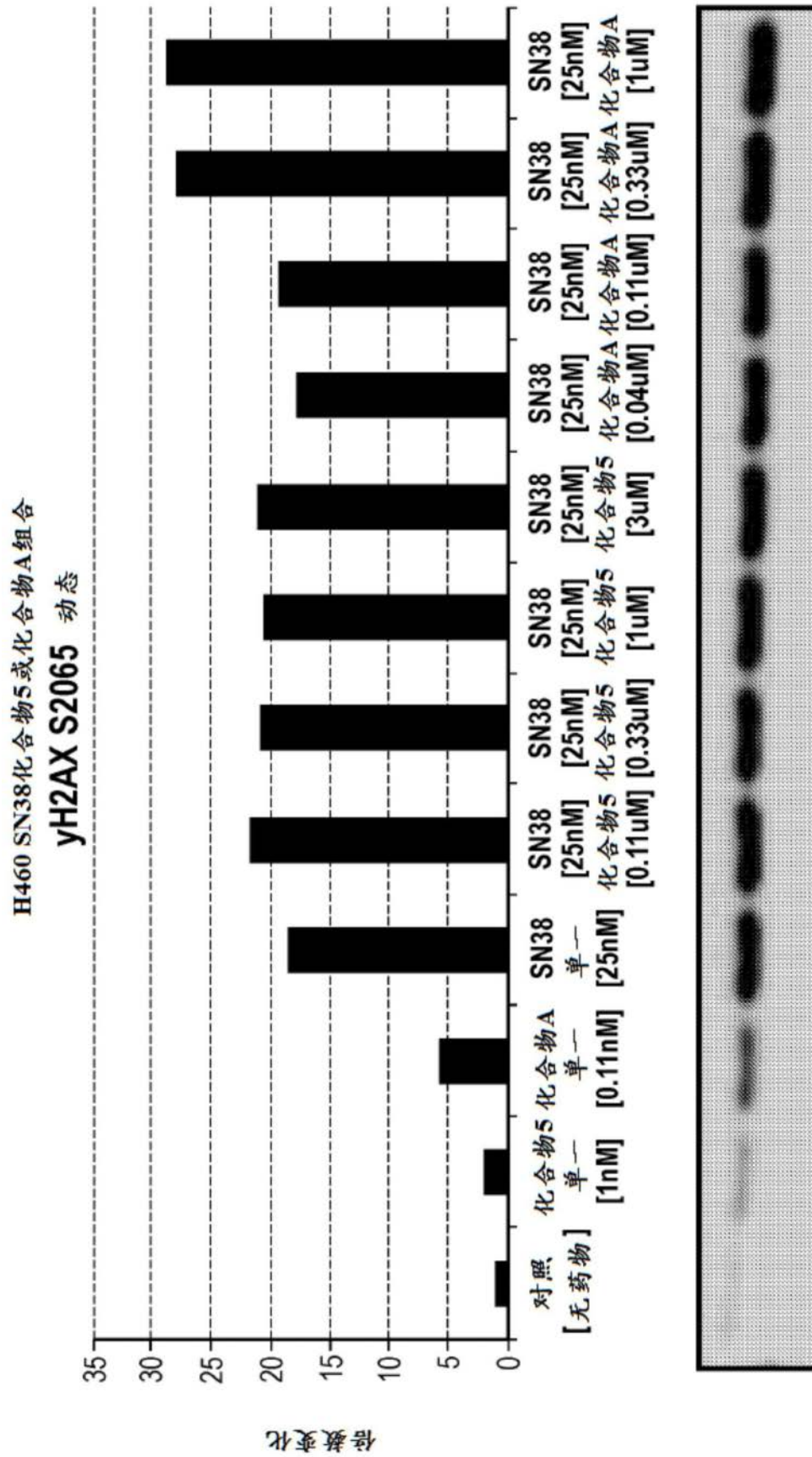


图41F

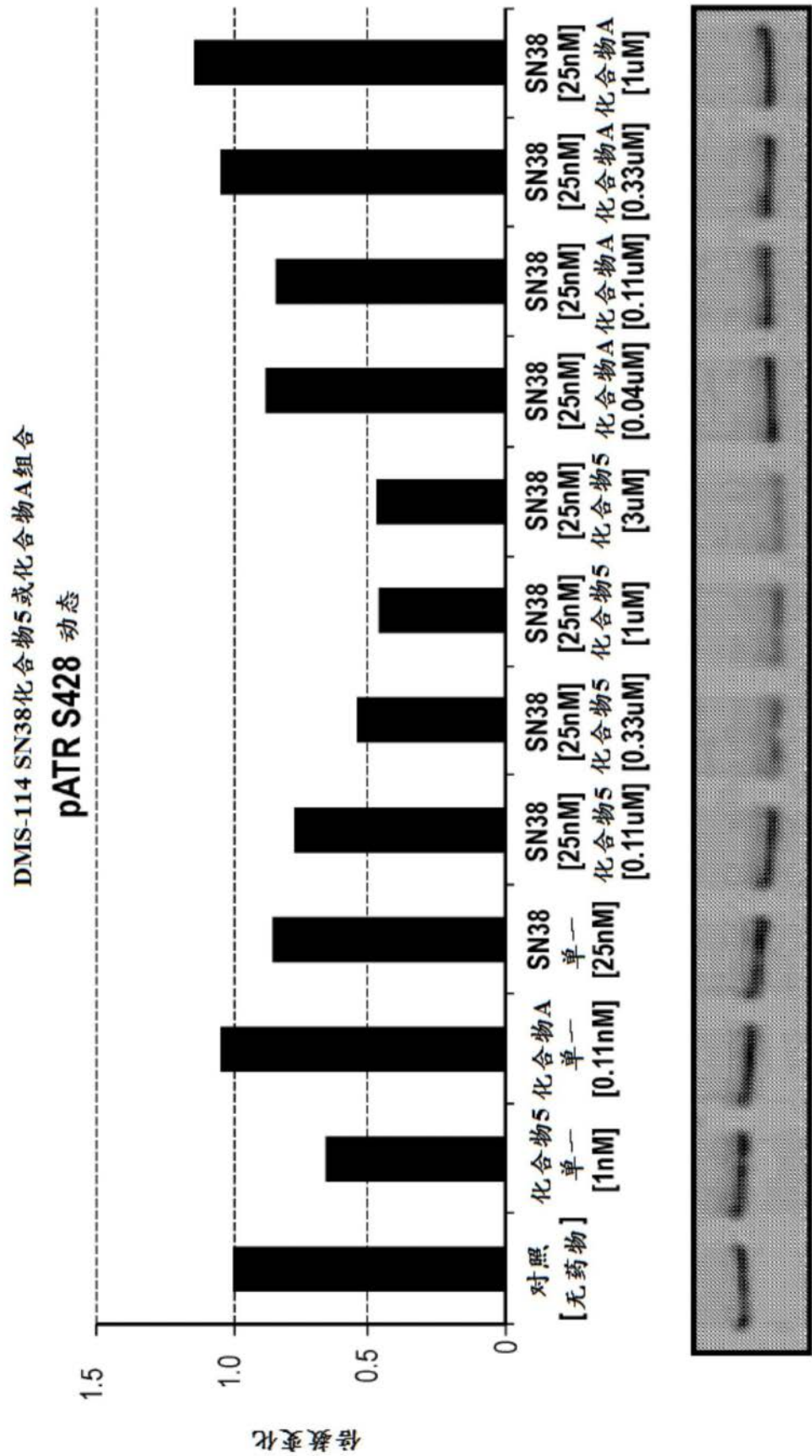


图42A

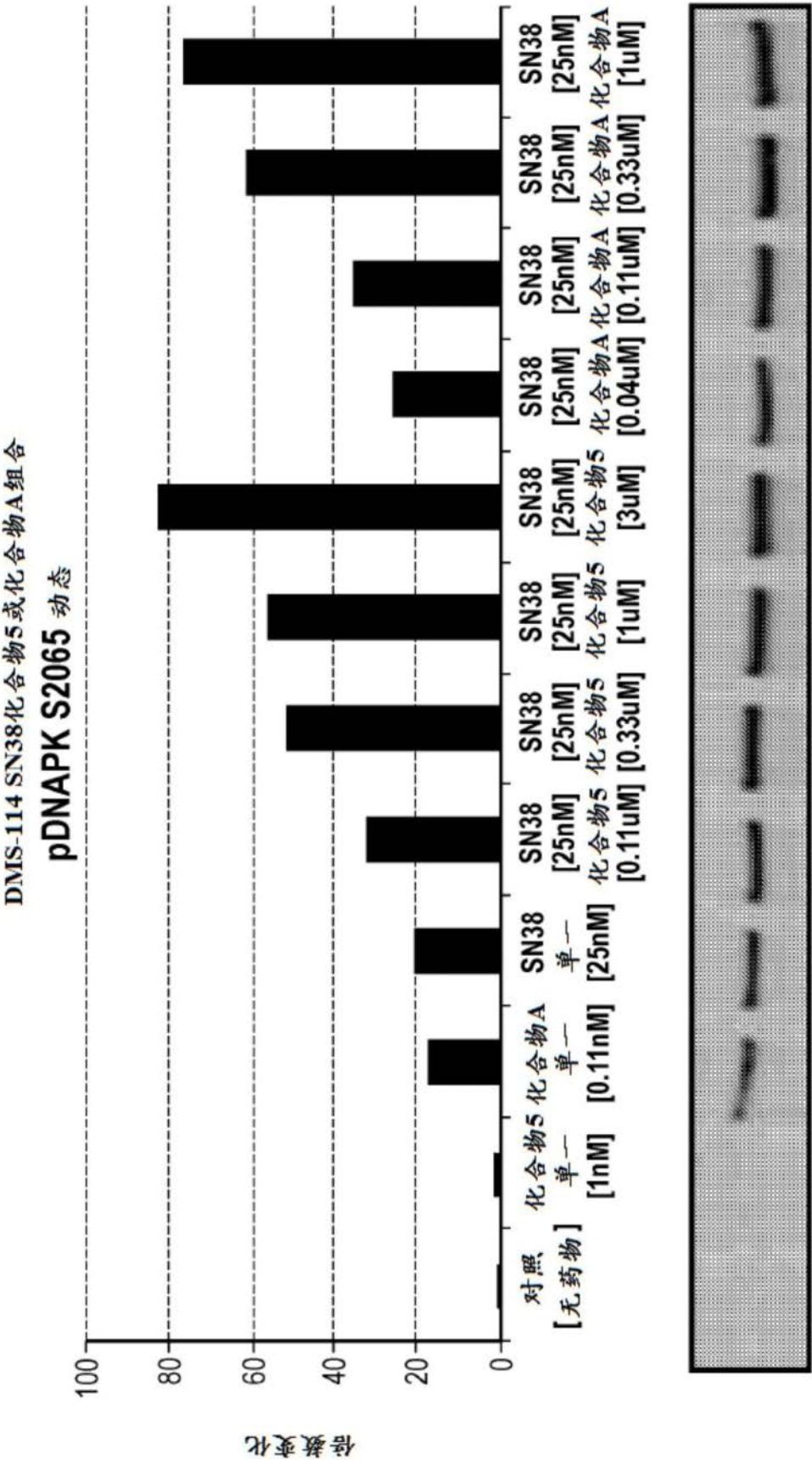


图42B

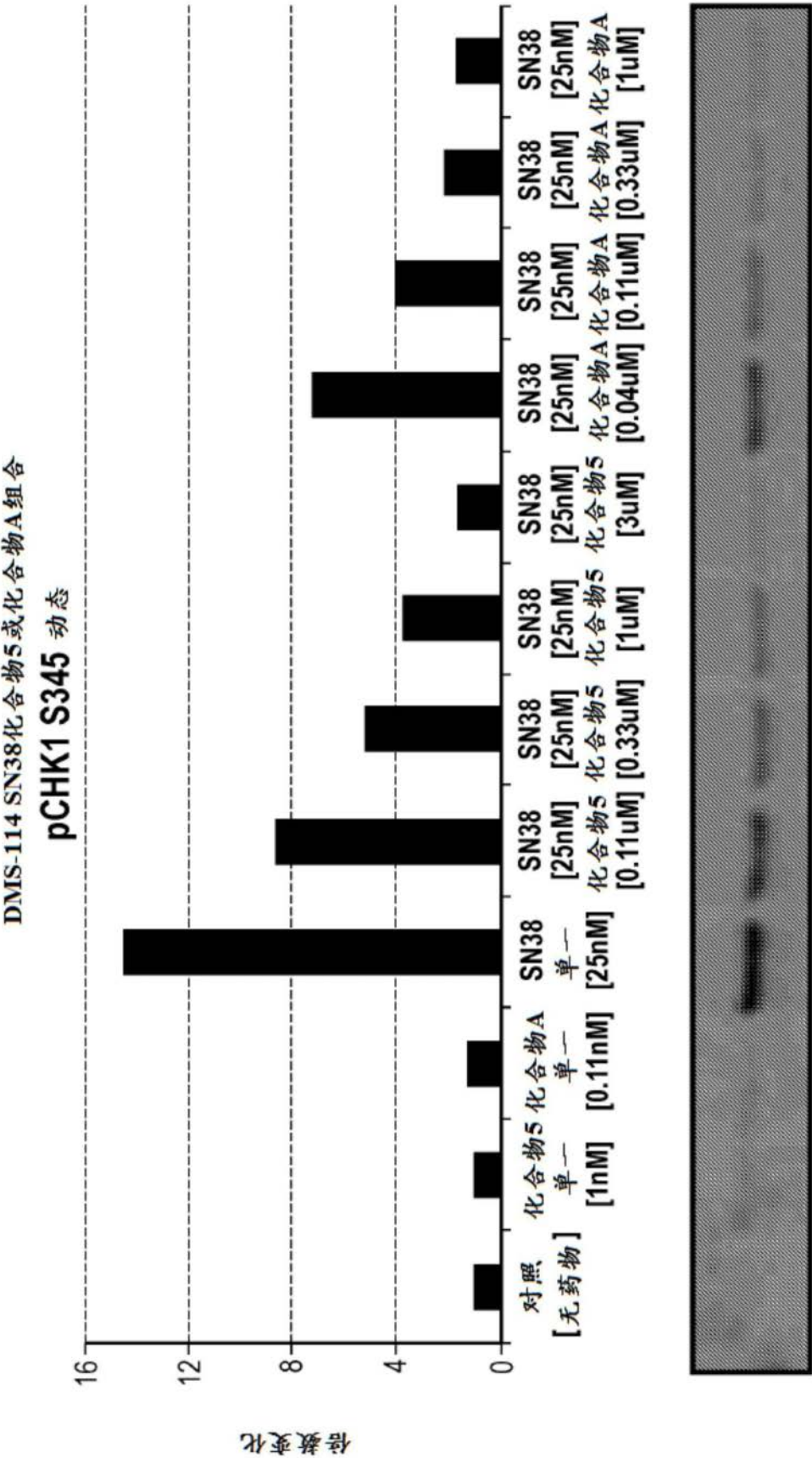


图42C

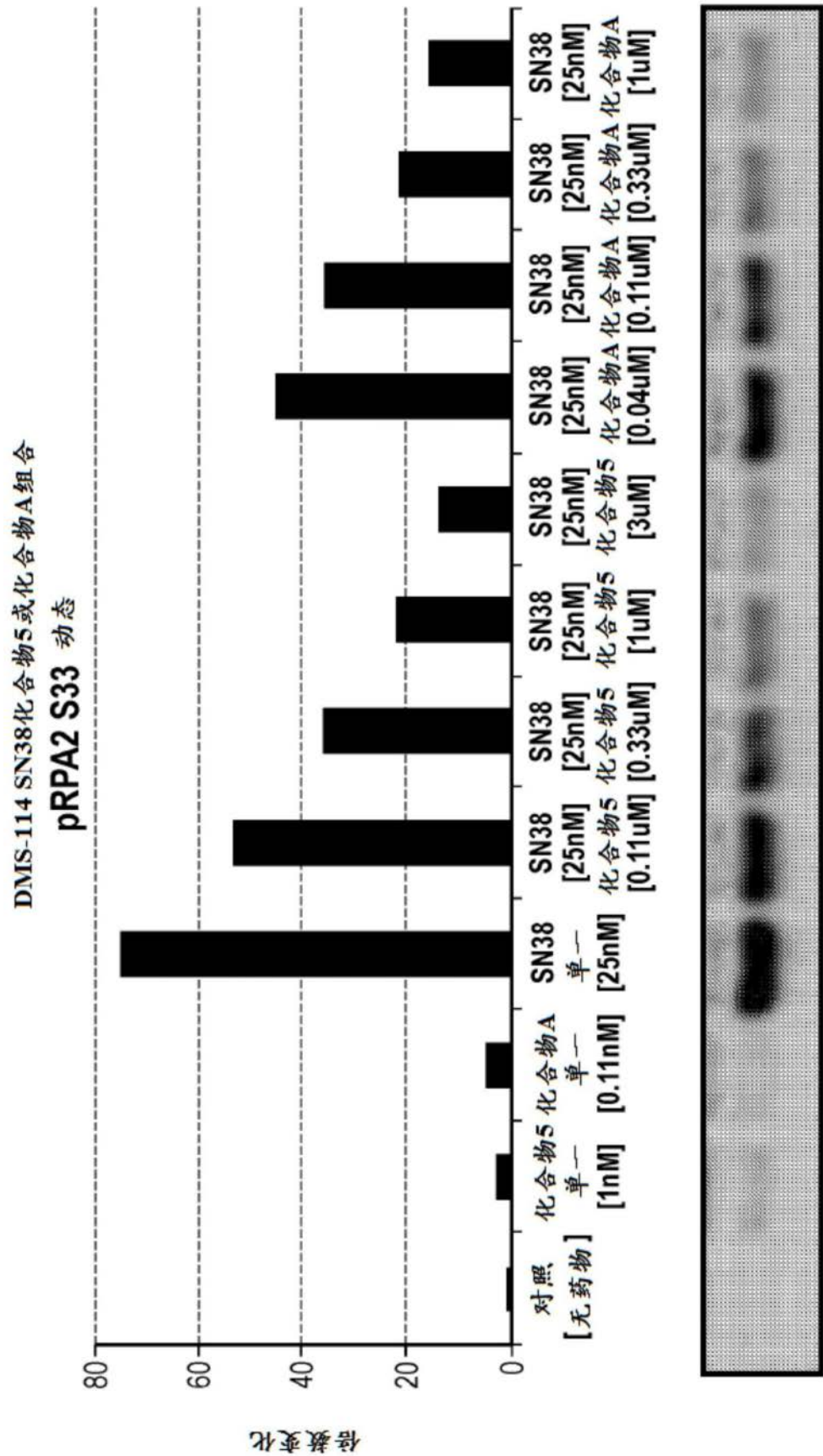


图42D

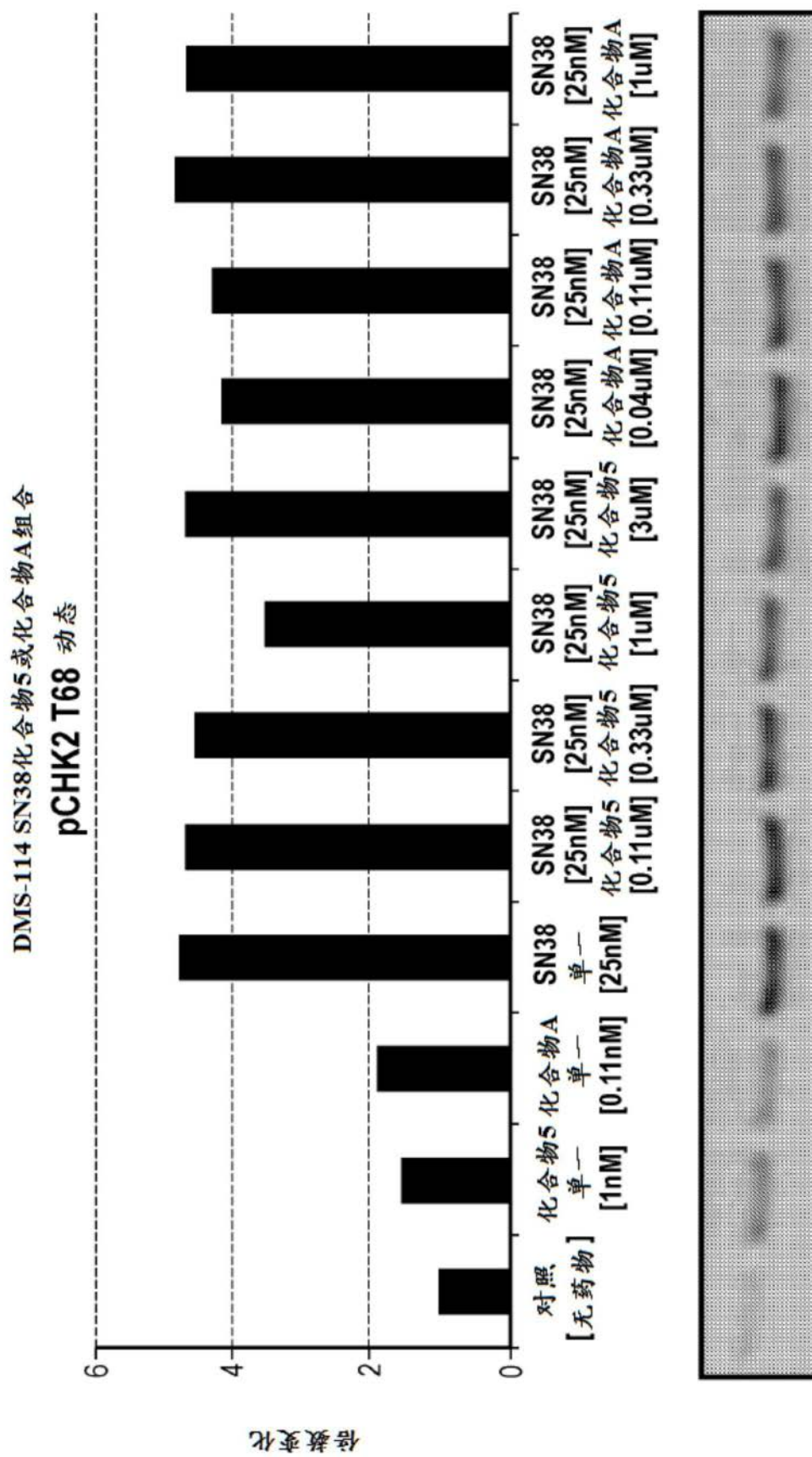


图42E

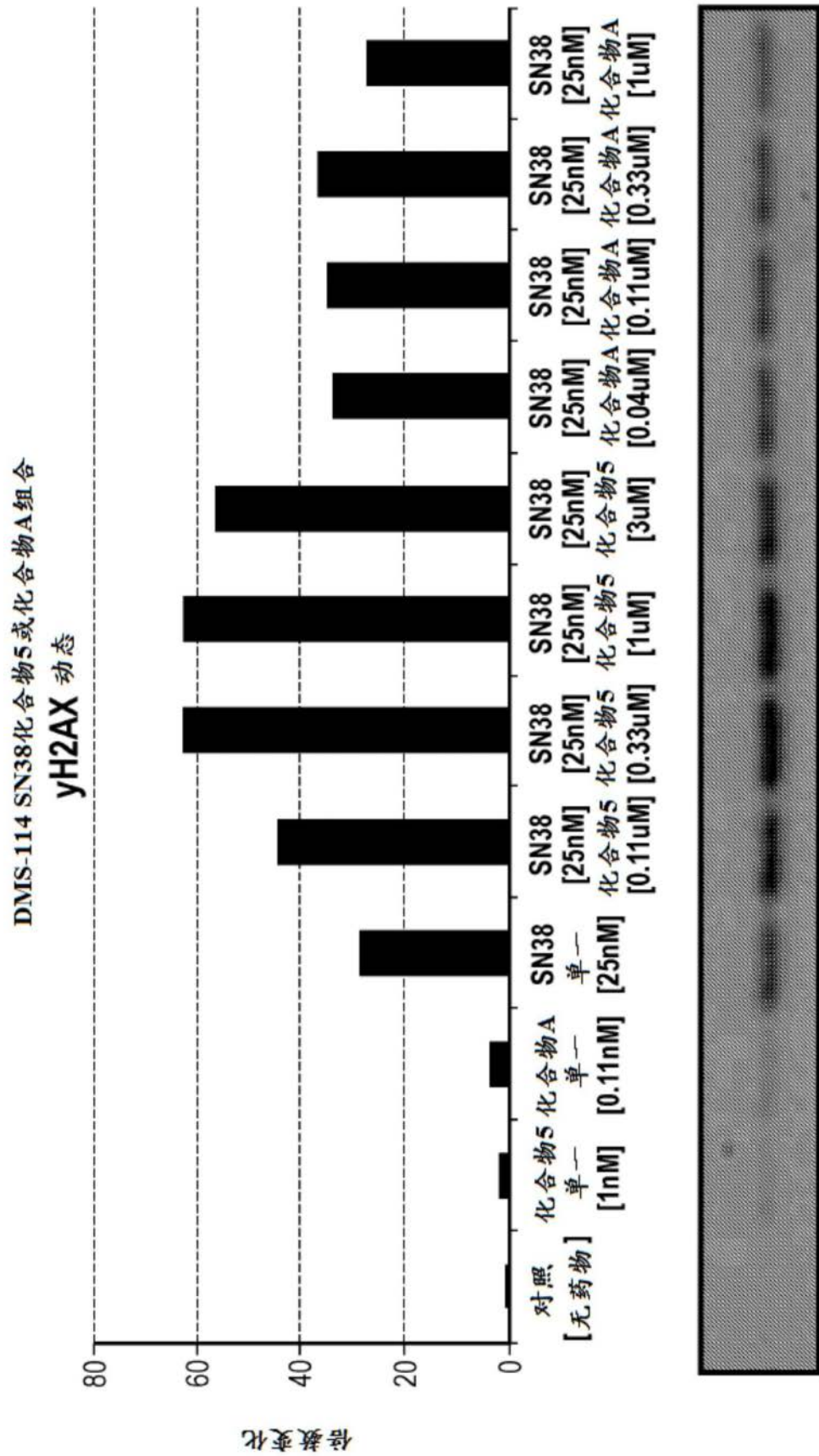


图42F

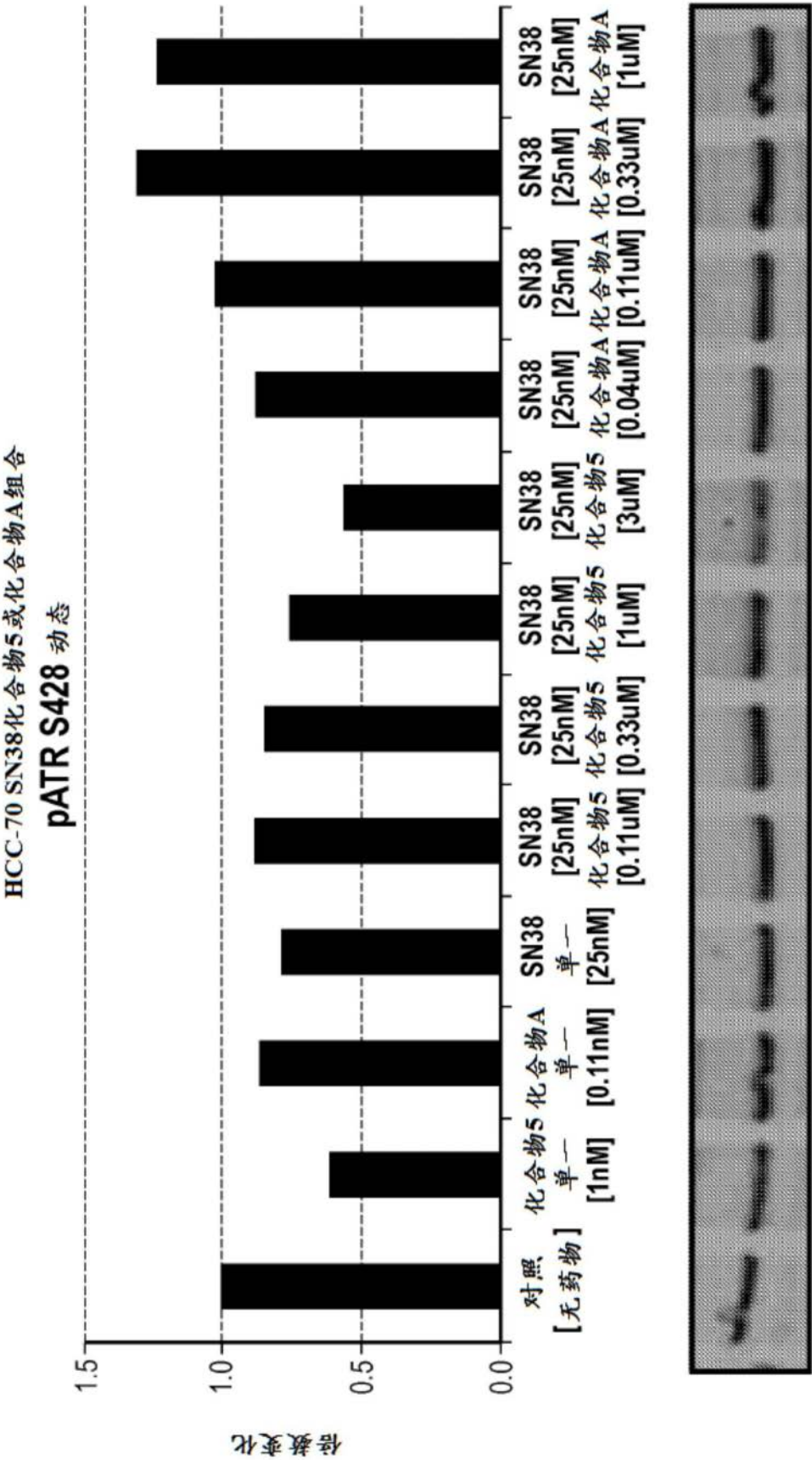


图43A

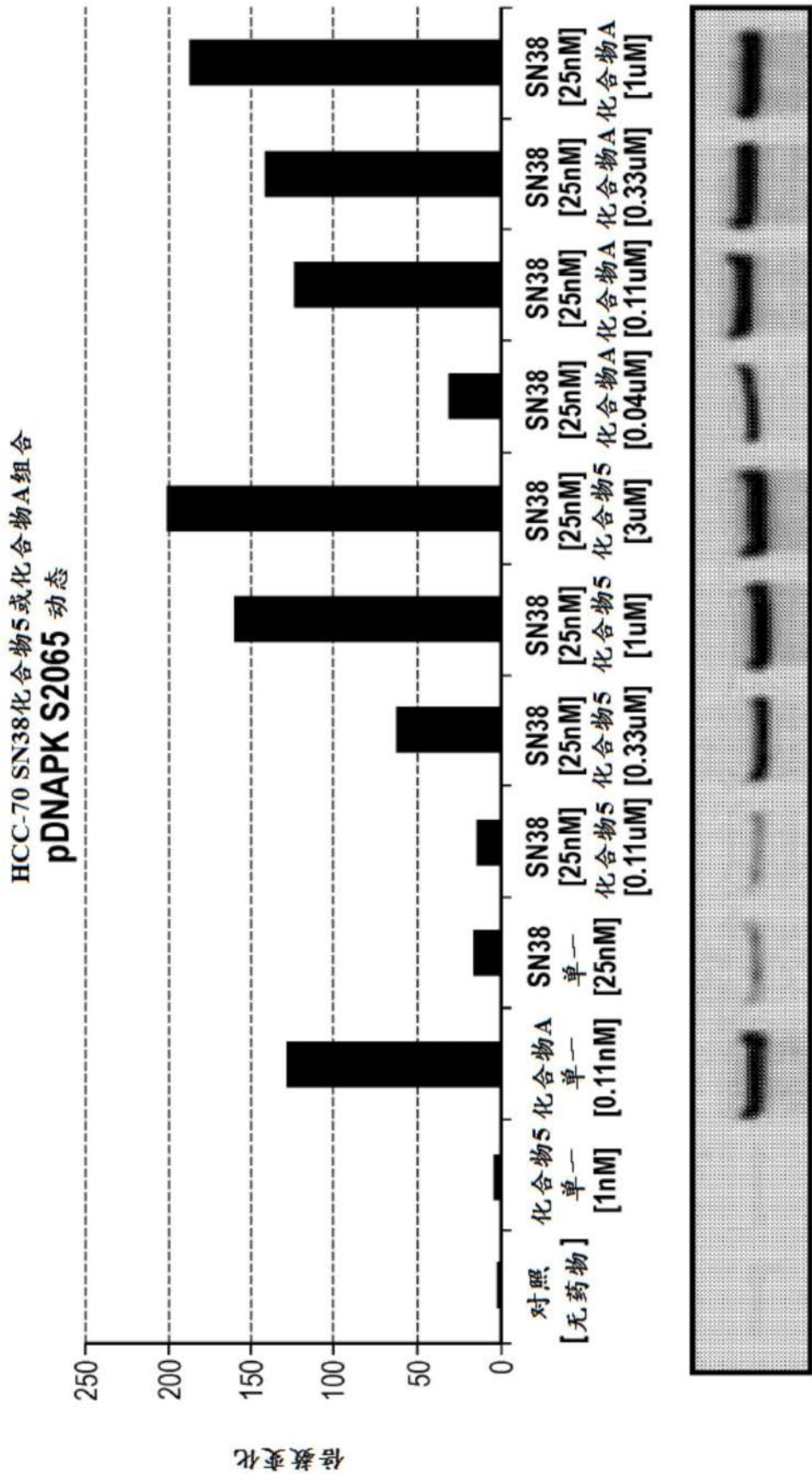


图43B

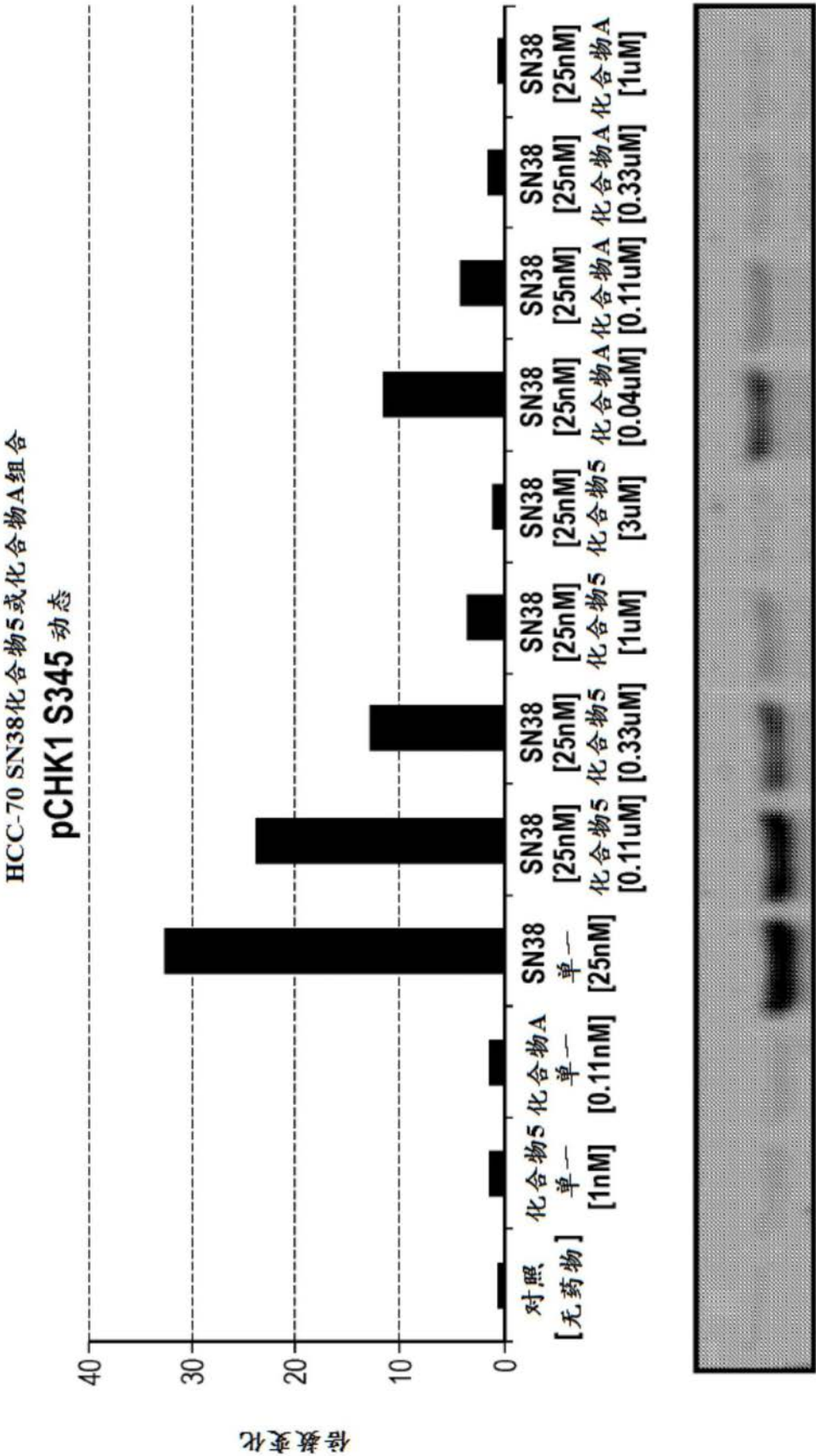


图43C

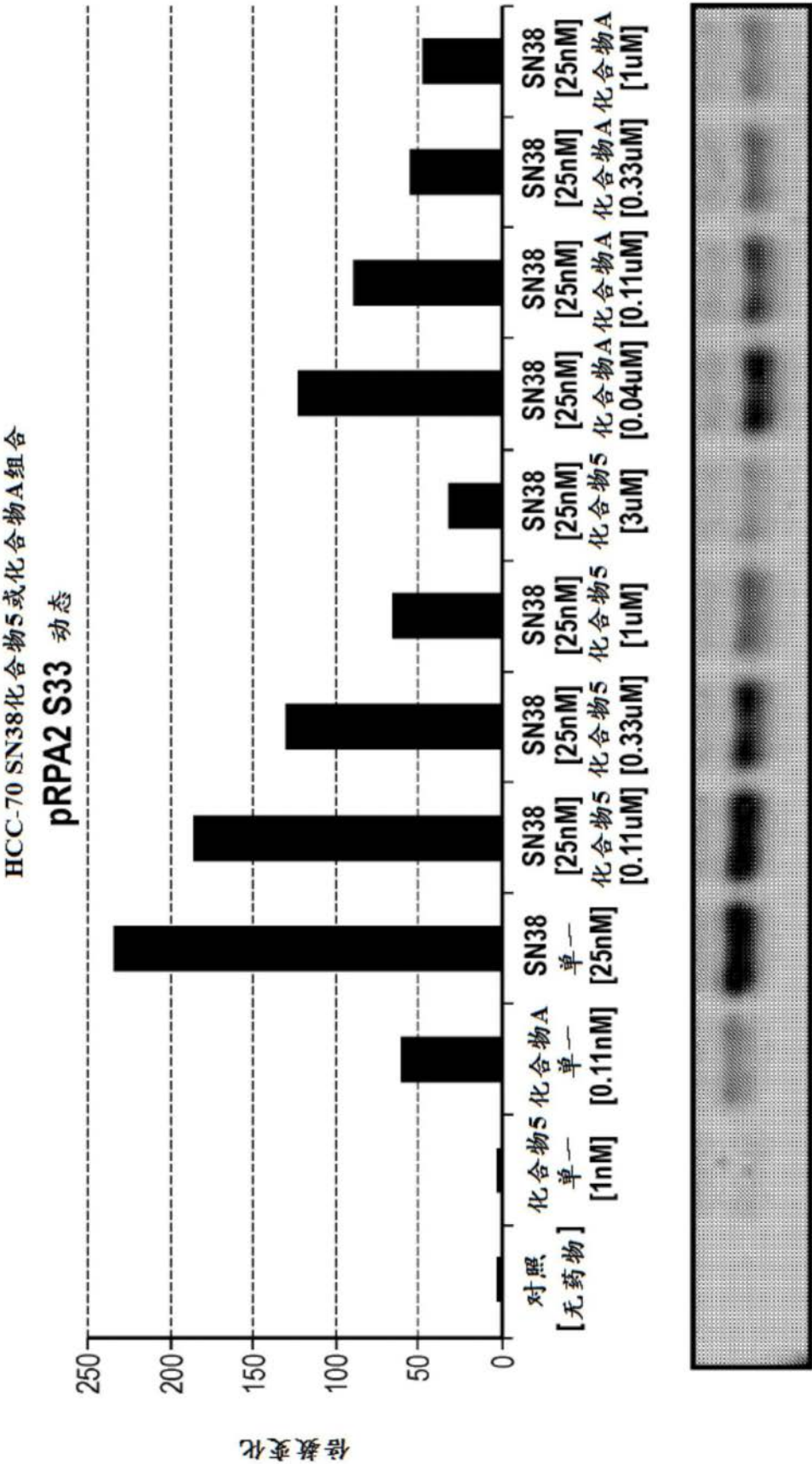


图43D

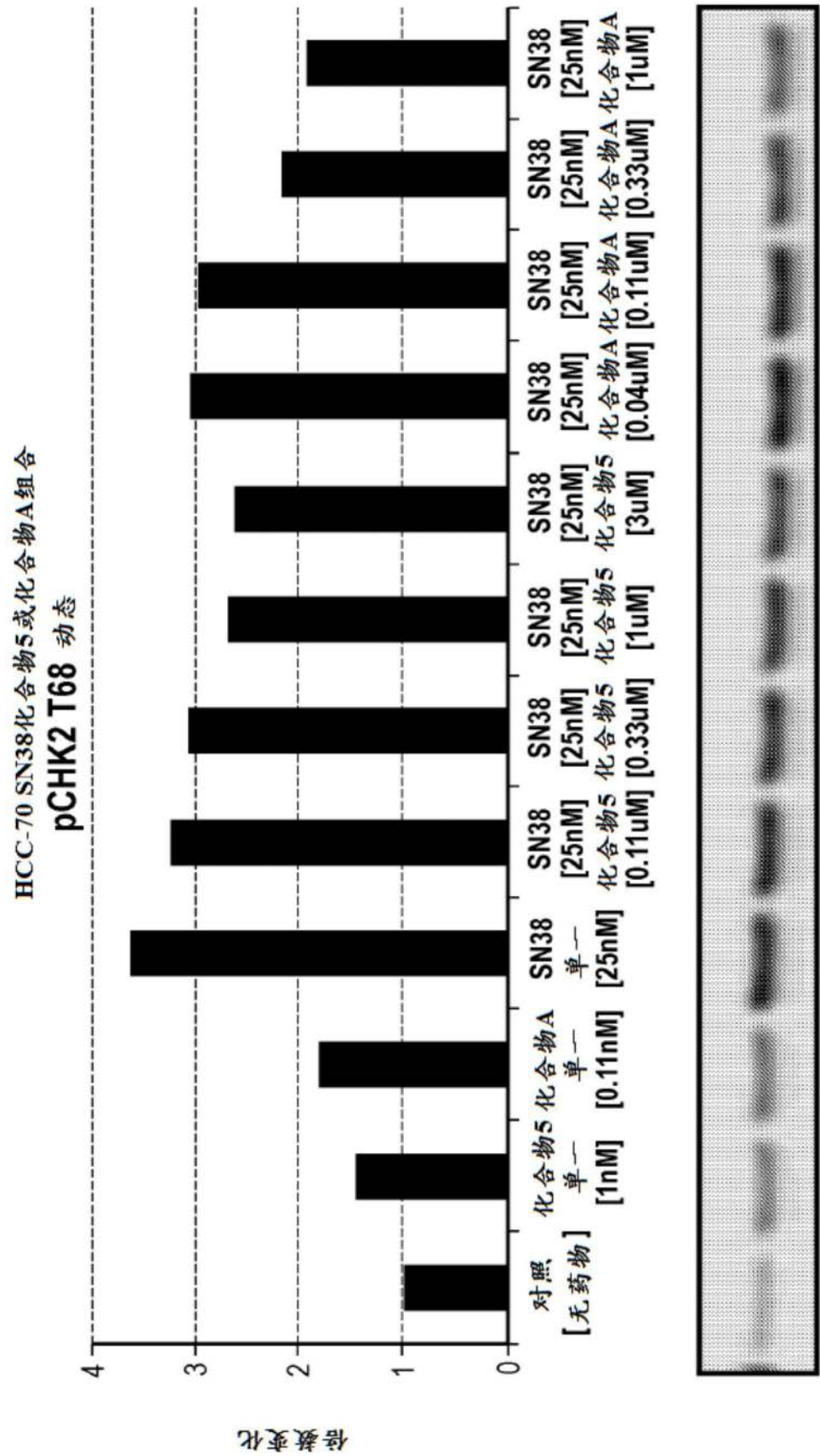


图43E

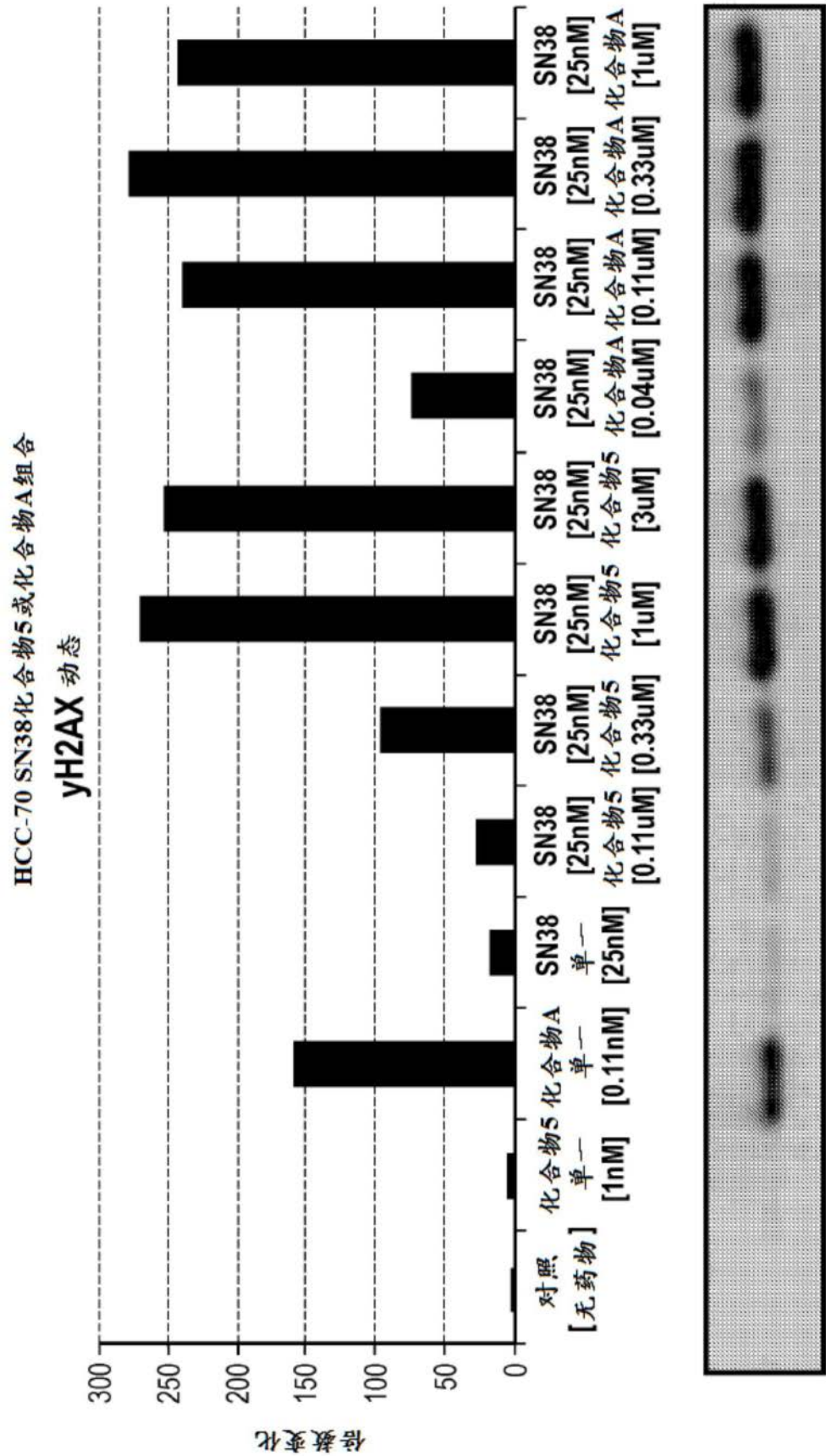


图43F

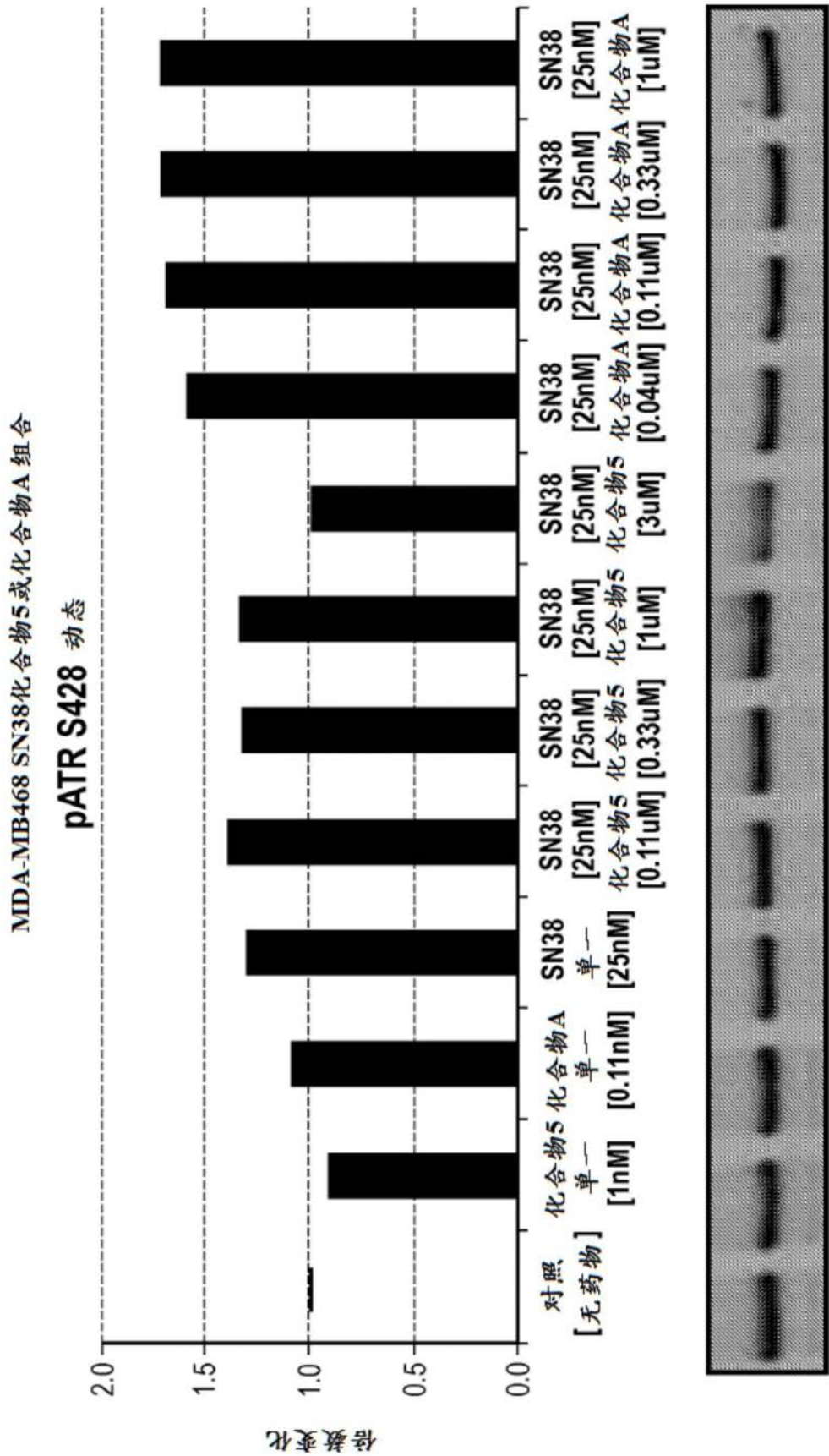


图44A

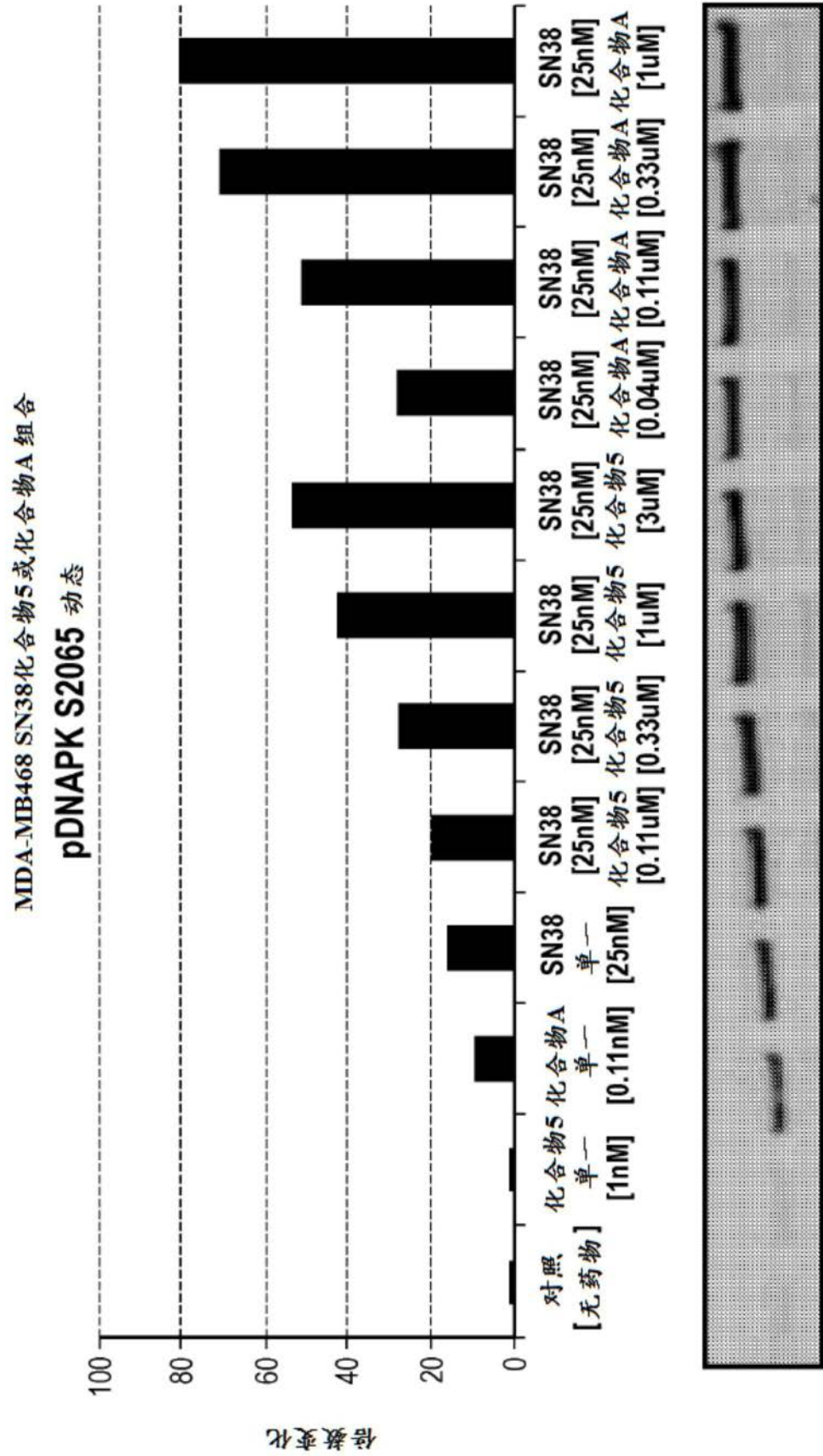


图44B

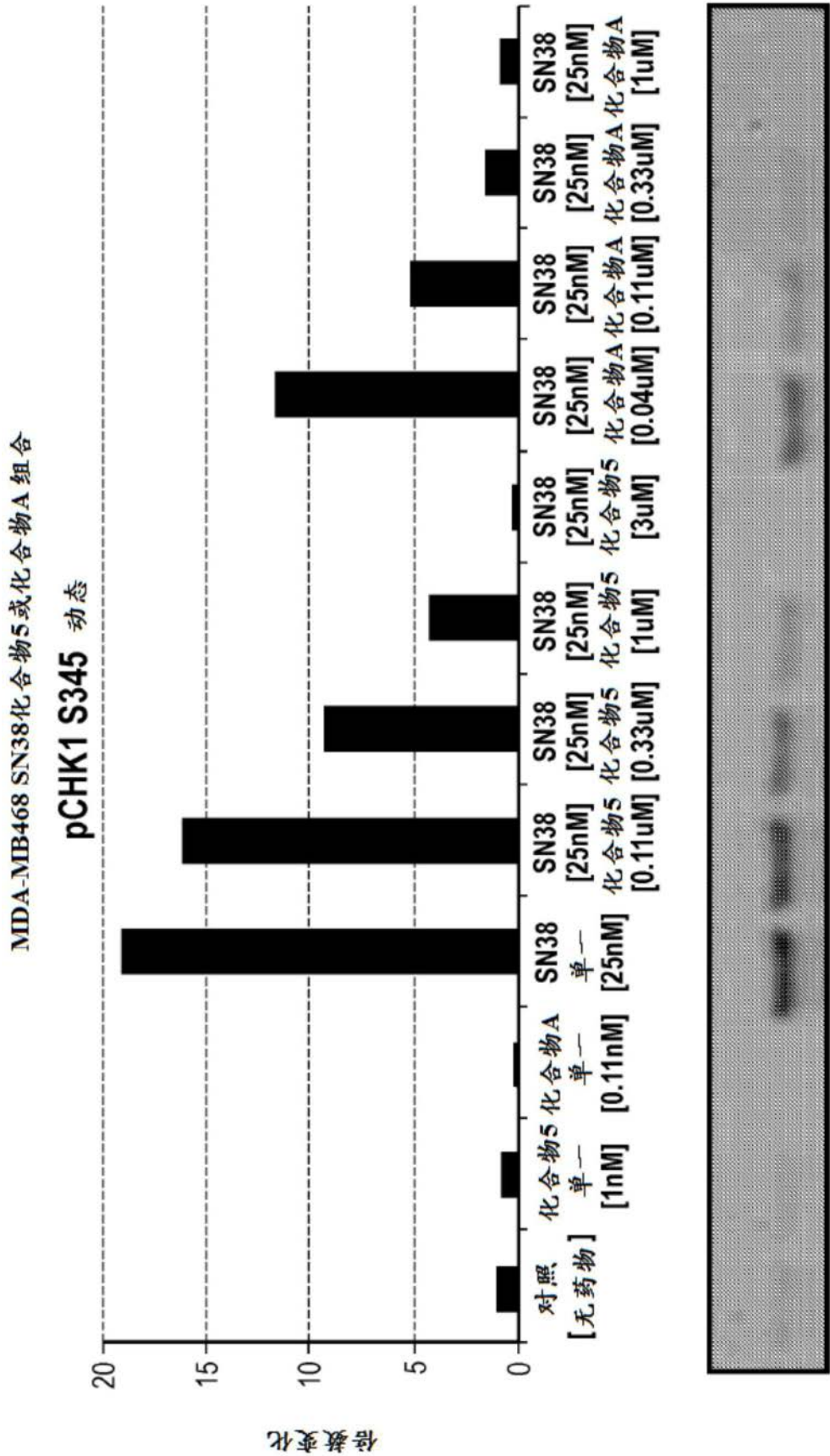


图44C

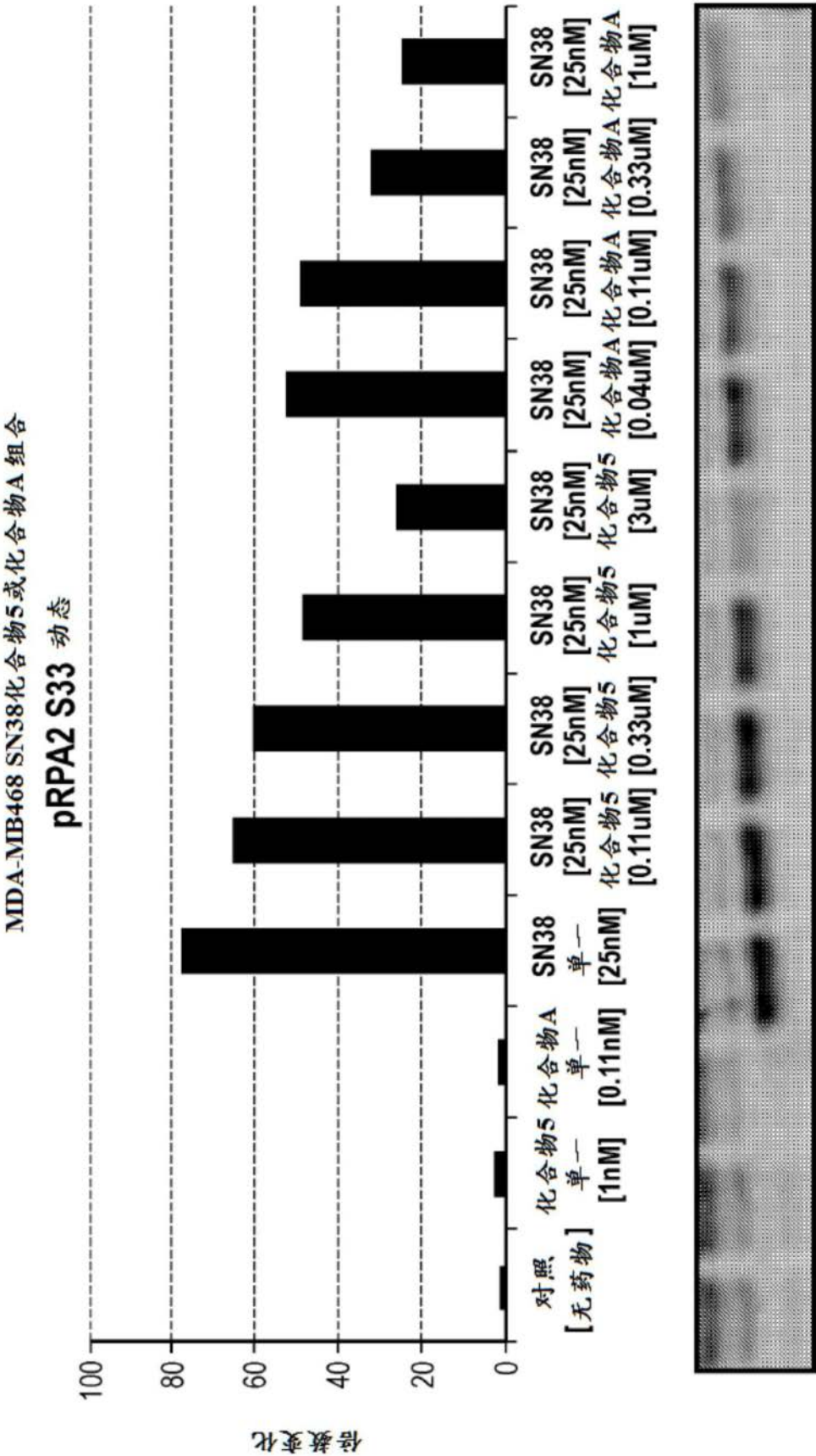


图44D

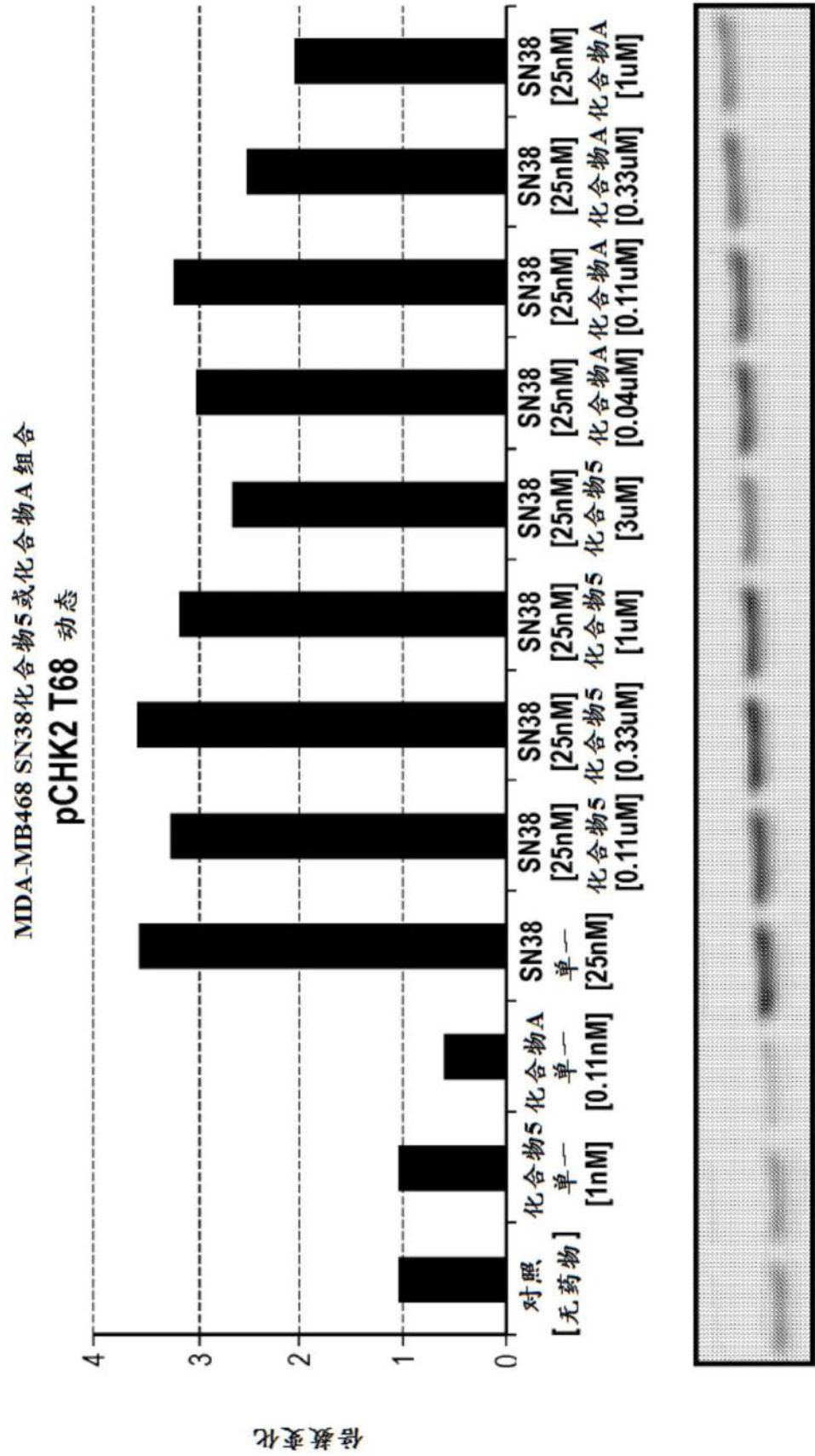


图44E

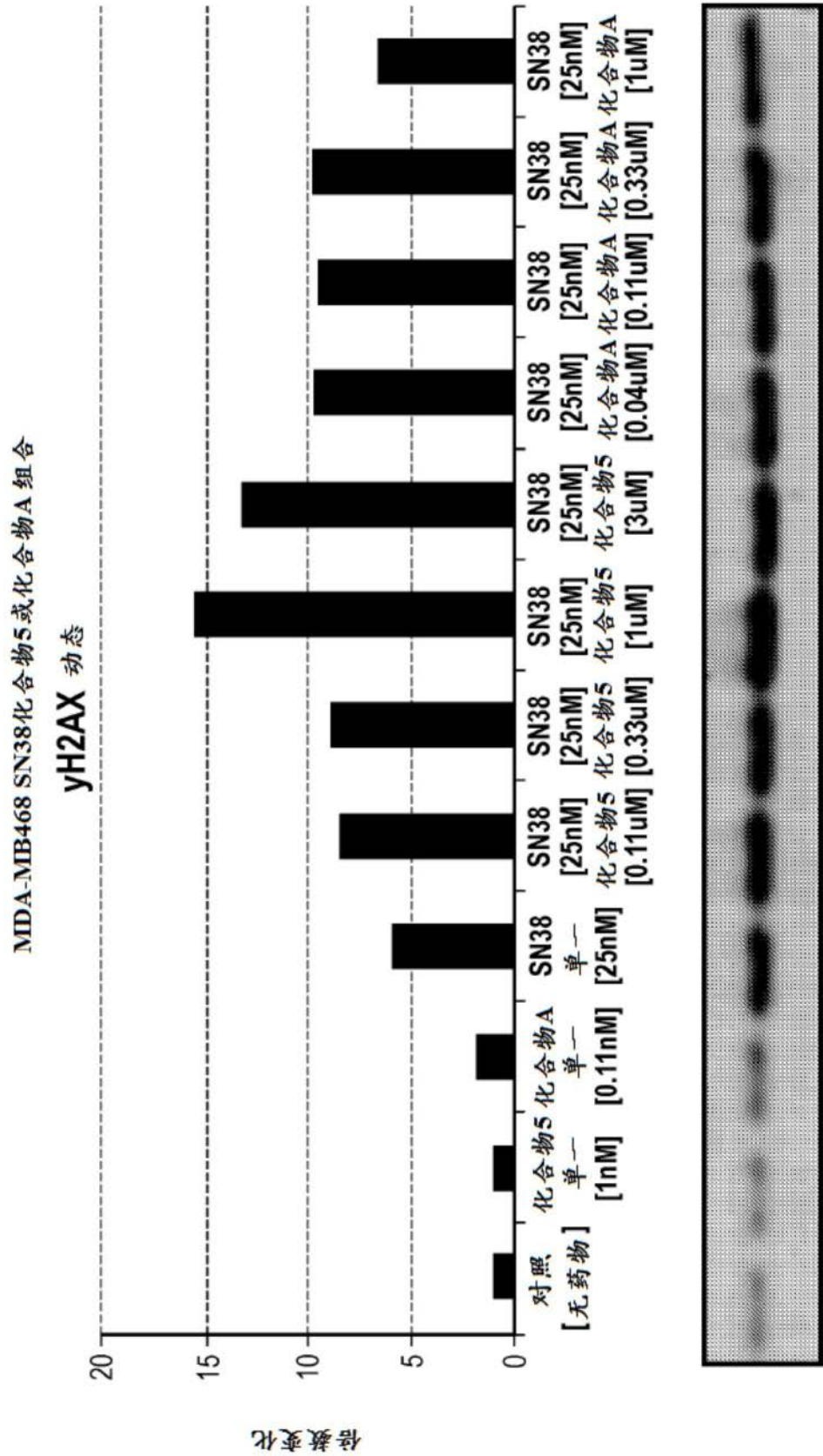


图44F

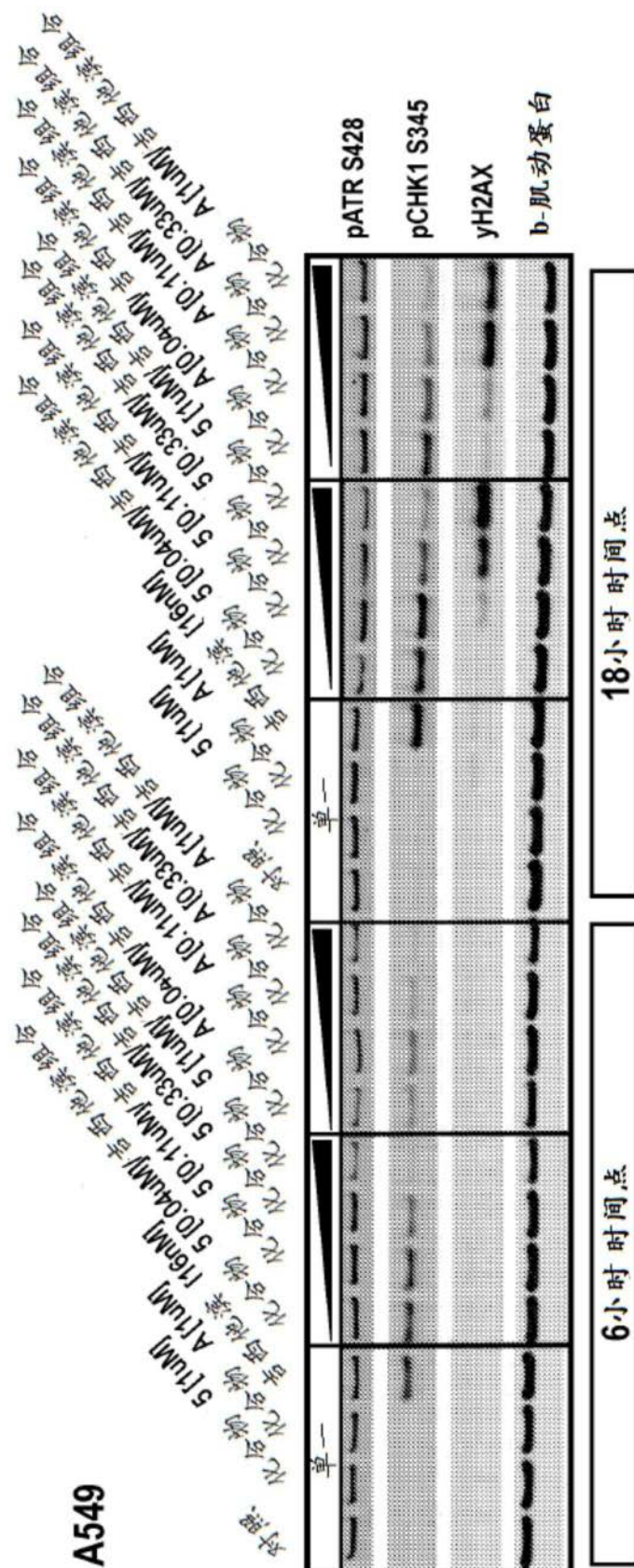


图45

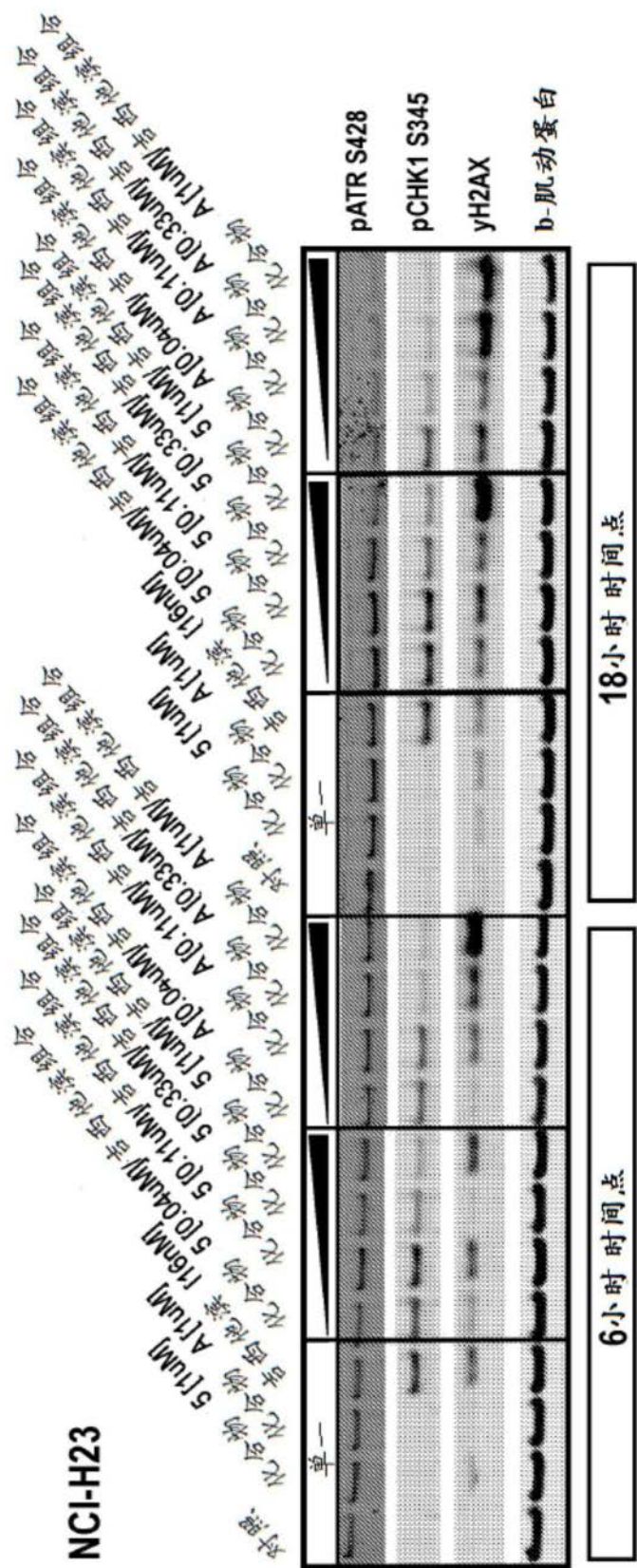


图46

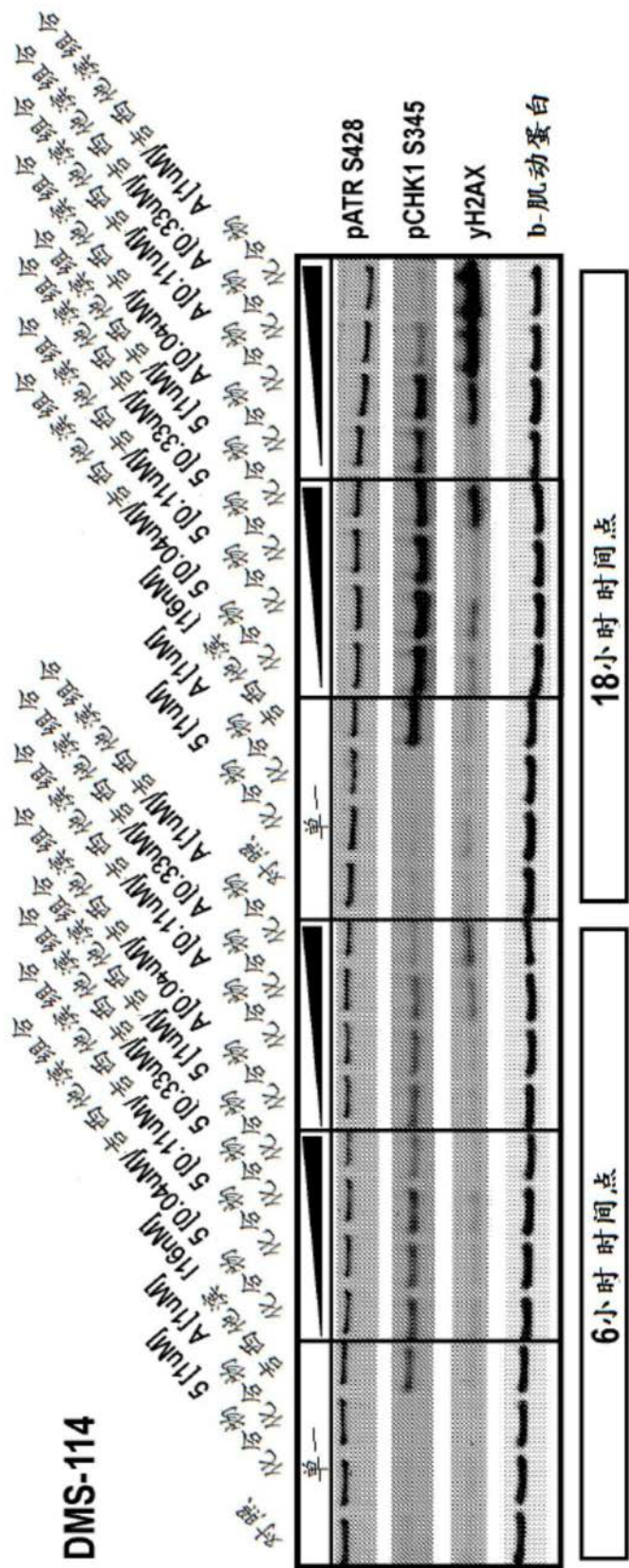


图47

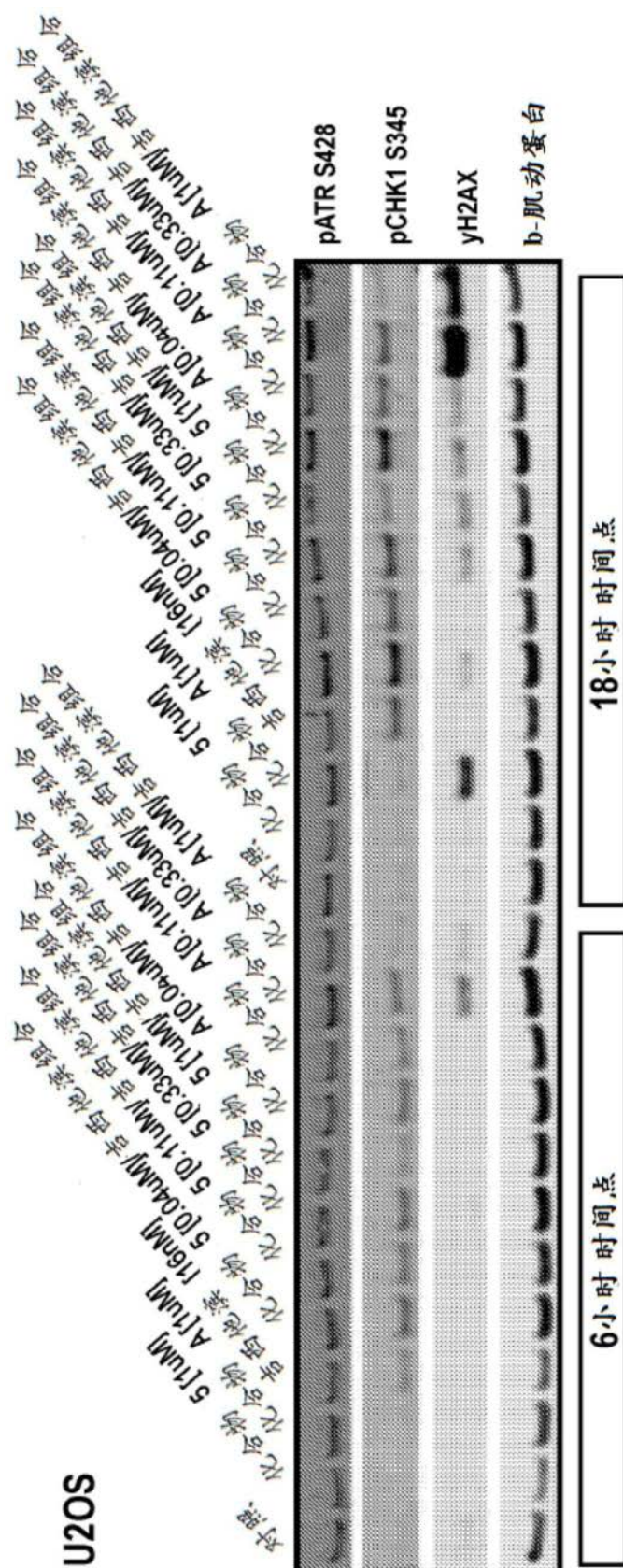


图48

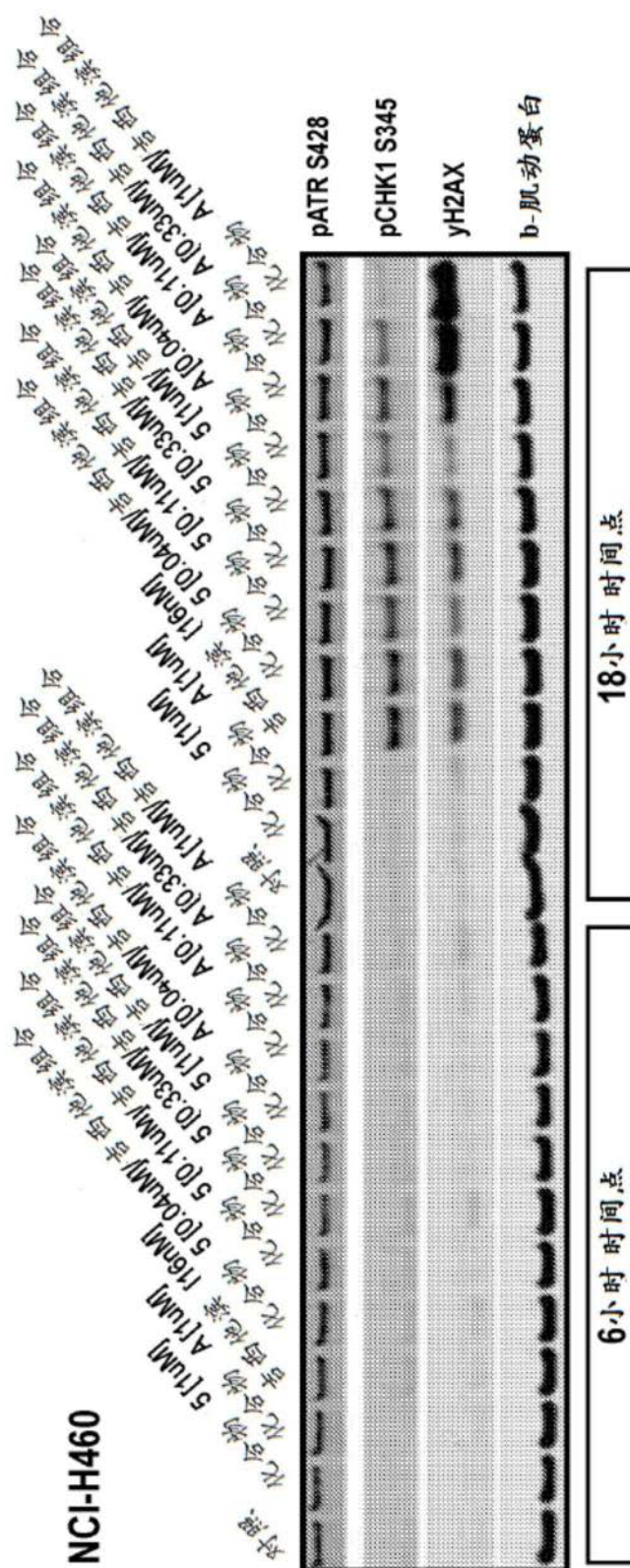


图49

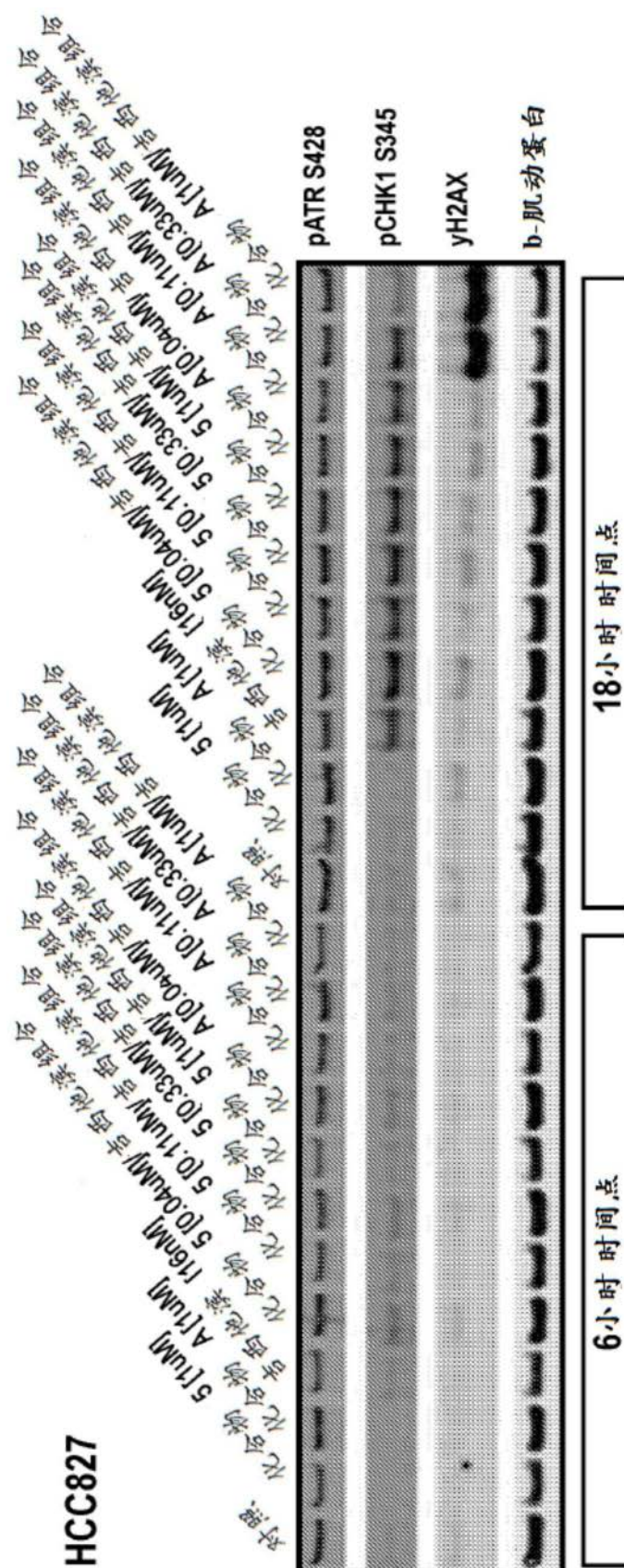


图50

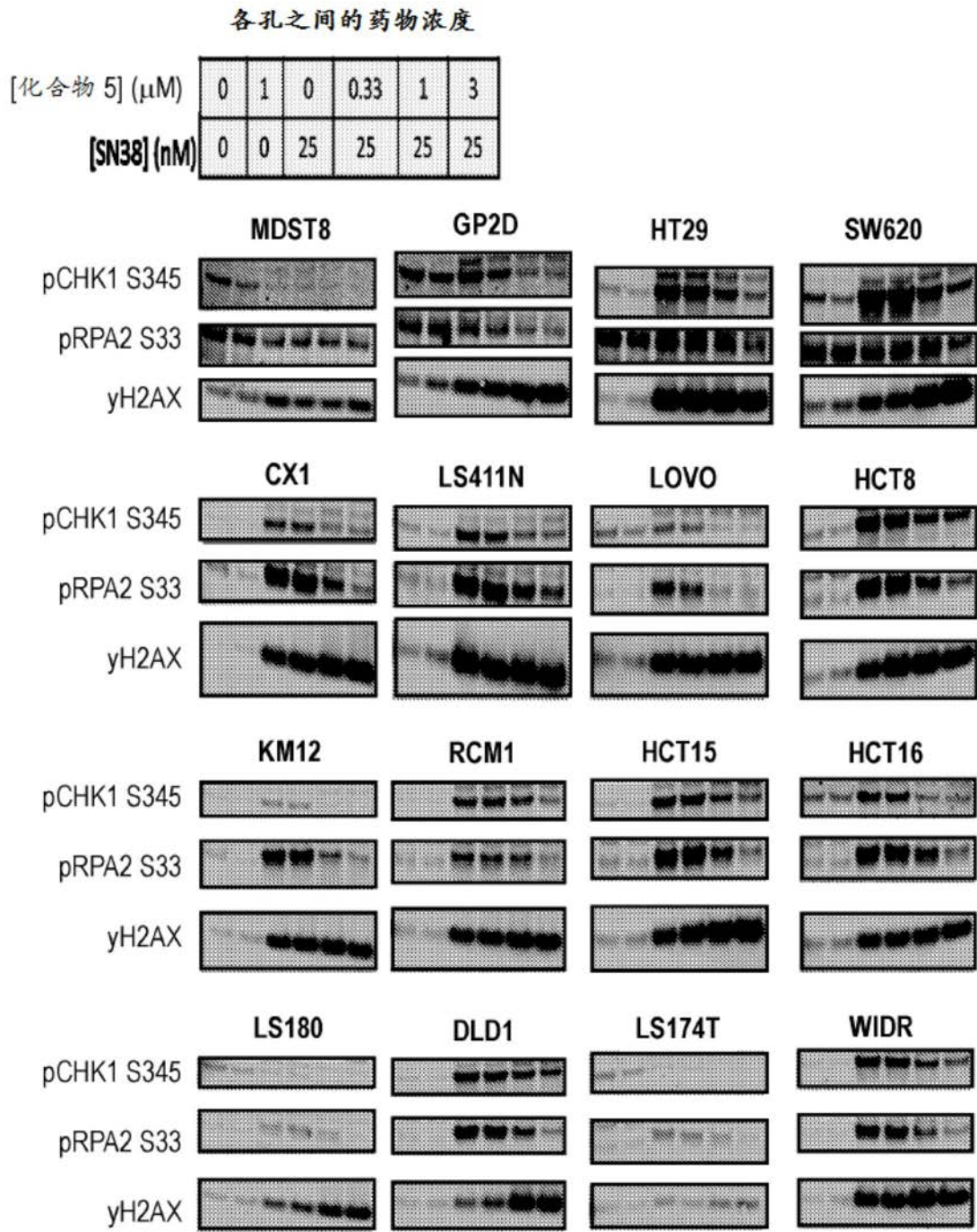


图51

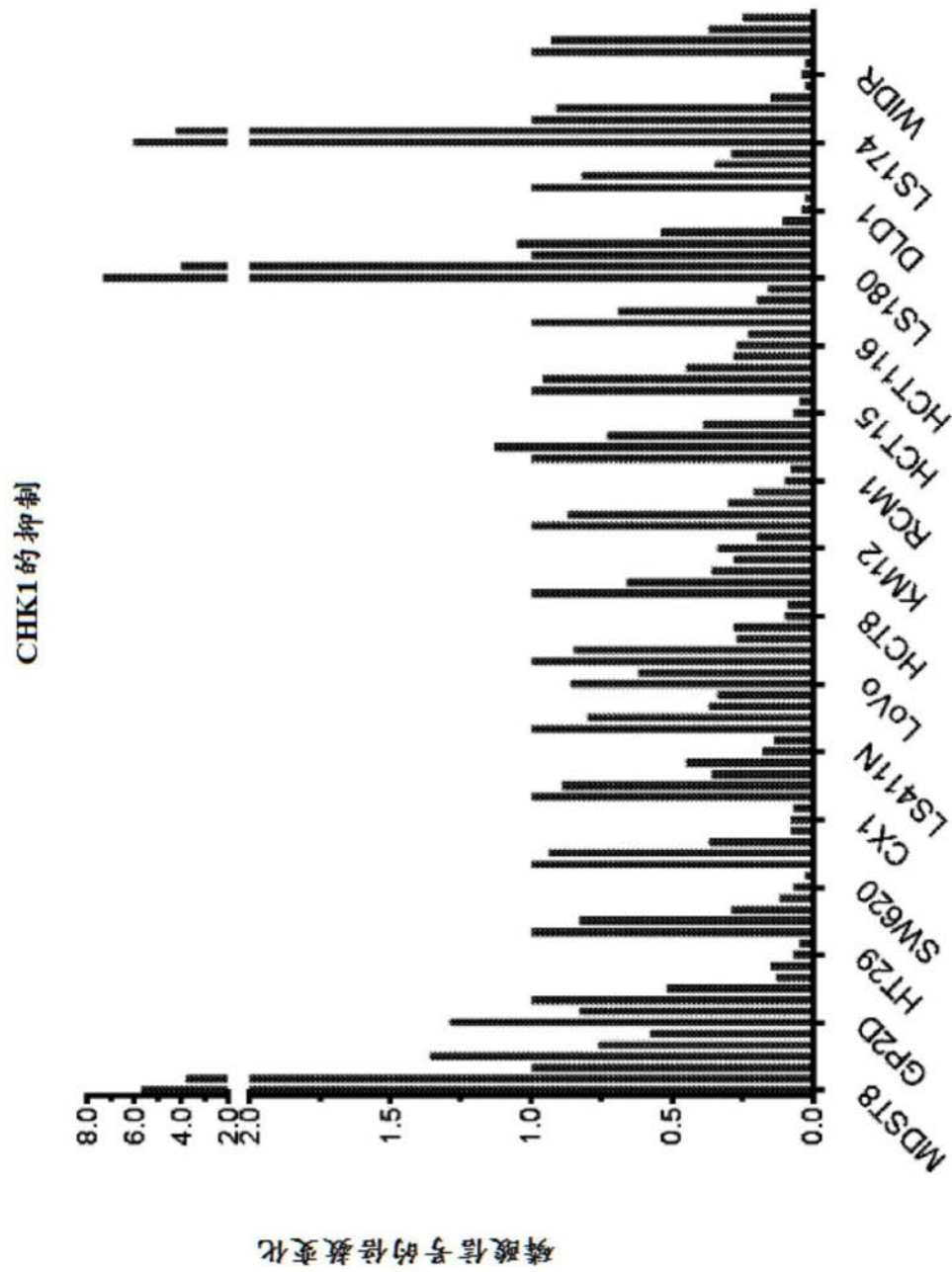


图52

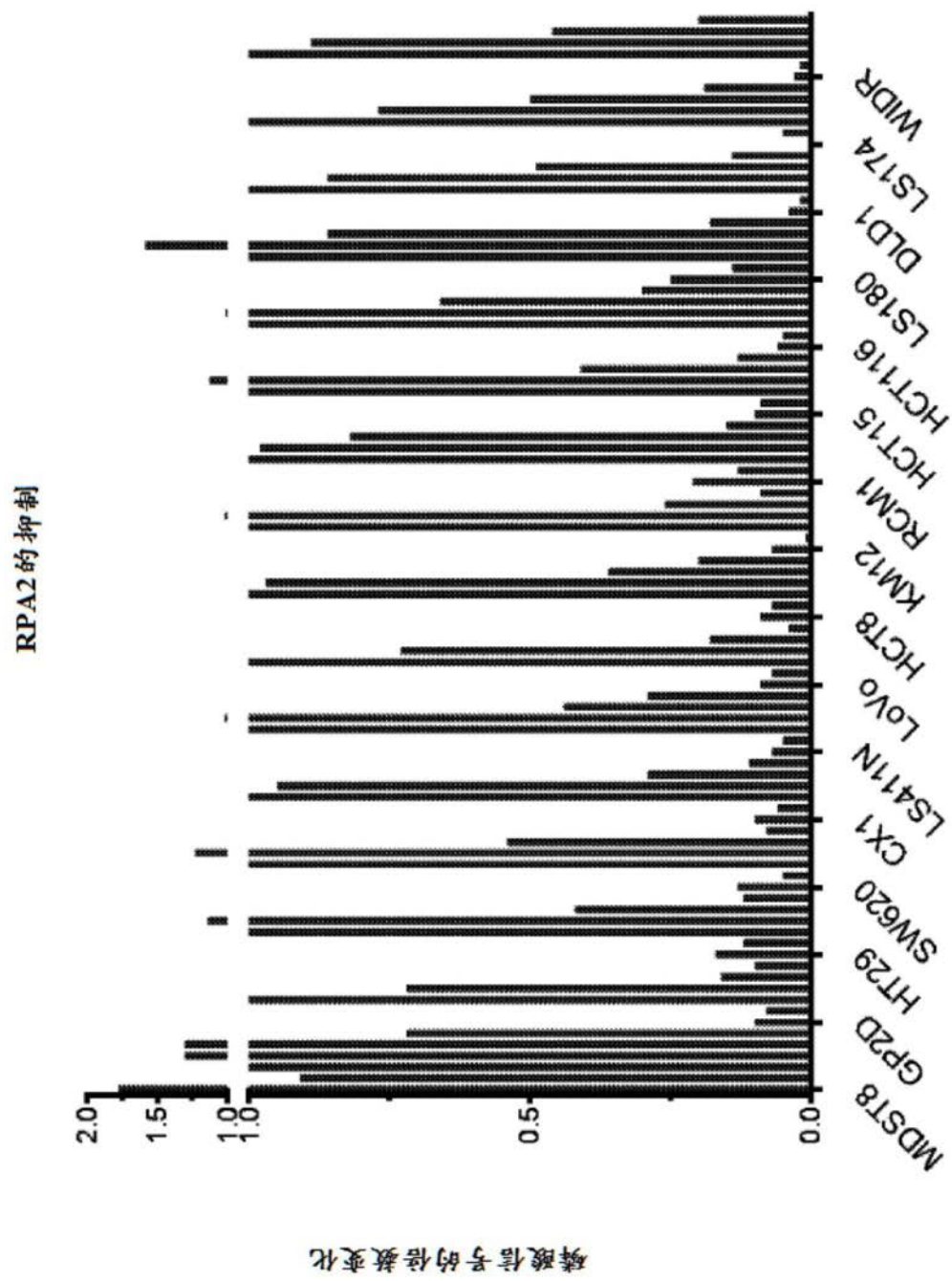


图53

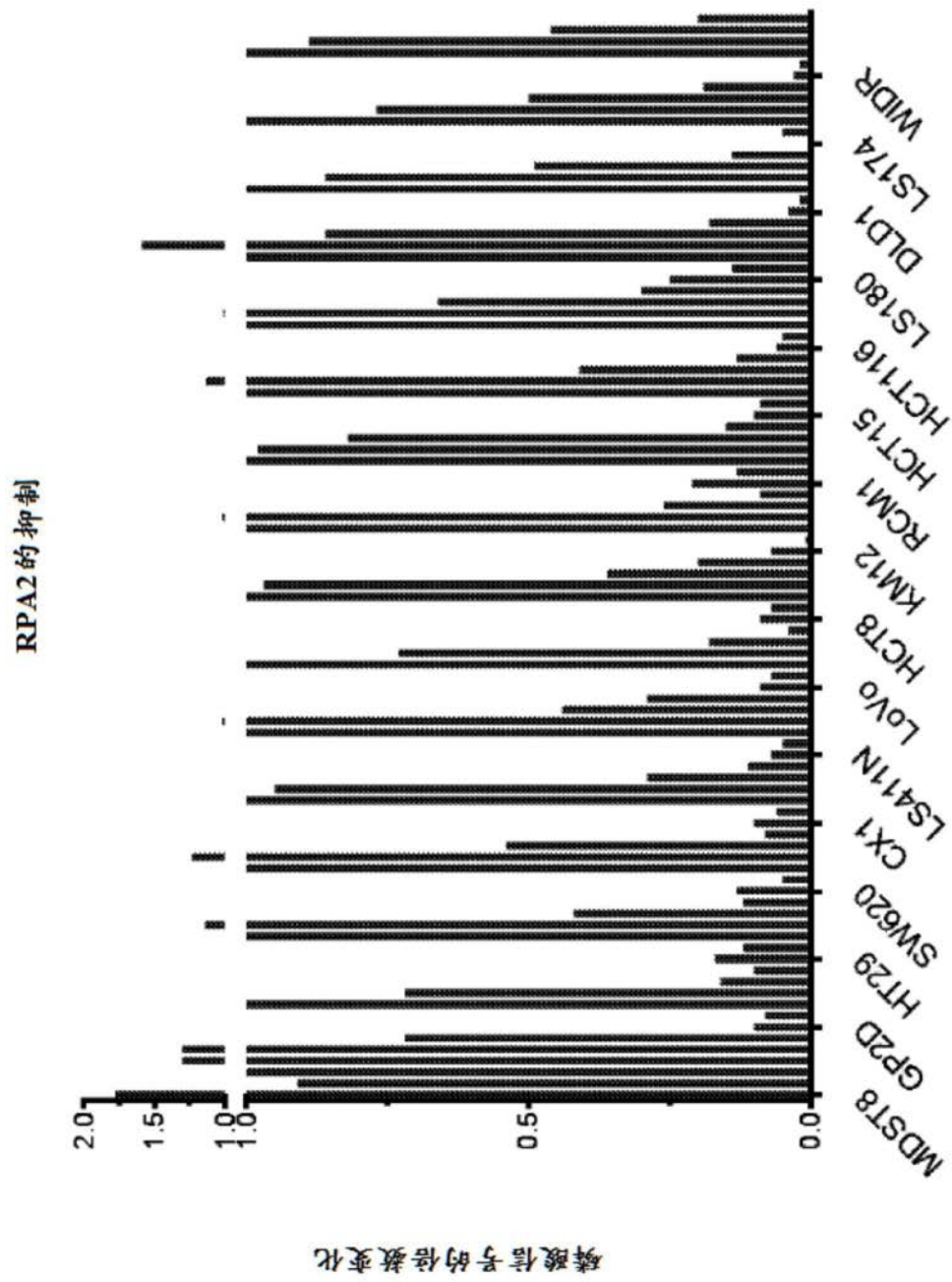


图54