



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109475542 A

(43)申请公布日 2019.03.15

(21)申请号 201780045352.0

(22)申请日 2017.07.27

(30)优先权数据

62/367,263 2016.07.27 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.01.18

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/044124 2017.07.27

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/022855 EN 2018.02.01

(71)申请人 弗吉尼亚大学专利基金会

地址 美国维吉尼亚州

(72)发明人 约翰·H·布什韦勒

阿努拉德哈·伊伦杜拉

(74)专利代理机构 深圳永慧知识产权代理事务所(普通合伙) 44378

代理人 黄鑫

(51)Int.Cl.

A61K 31/4439(2006.01)

C07D 403/14(2006.01)

A61K 31/44(2006.01)

A61P 35/02(2006.01)

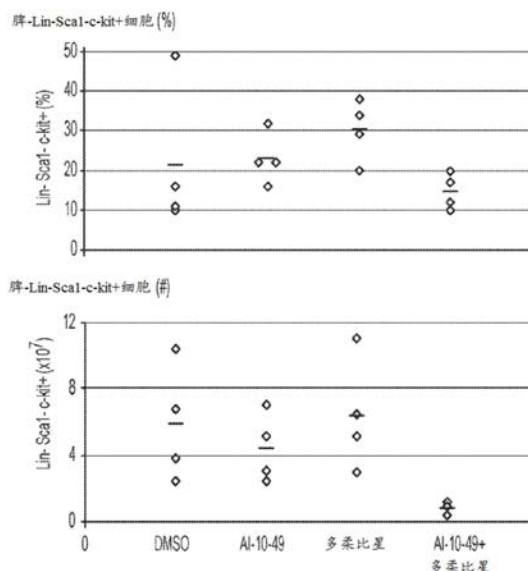
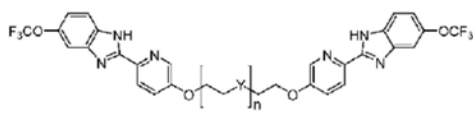
权利要求书3页 说明书12页 附图5页

(54)发明名称

用于治疗癌症的组合法

(57)摘要

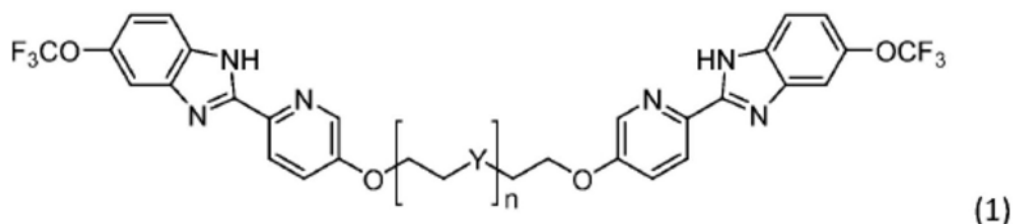
本发明涉及用于治疗inv(16)白血病的方法和组合物且特别涉及急性髓样白血病的治疗。本发明公开了治疗inv(16)白血病的方法,其包括向有此需要的受试者施用a)式(1)的化合物和b)化学治疗剂的治疗有效组合的步骤,所述化学治疗剂选自自由以下组成的组:吡柔比星、阿柔比星、米托蒽醌、多柔比星、道诺霉素、伊达比星、表柔比星、阿糖胞苷、其药学上可接受的盐和混合物。所述治疗有效组合协同抑制inv(16)白血病细胞的增殖。本发明还涉及药物组合物,其包含所述式(1)的化合物和所述化学治疗剂的治疗有效组合和药学上可接受的赋形剂。



1. 一种治疗inv (16) 白血病的方法,其包括以下步骤:

向有此需要的受试者施用以下物质的治疗有效组合

a) 式 (1) 的化合物



其中Y是O、NH或NR,其中R是甲基或乙基,

其中n是1至10的整数,

或其药学上可接受的盐;和

b) 化学治疗剂,其选自由以下组成的组:吡柔比星、阿柔比星、米托蒽醌、多柔比星、道诺霉素、伊达比星、表柔比星、阿糖胞苷、其药学上可接受的盐和混合物;

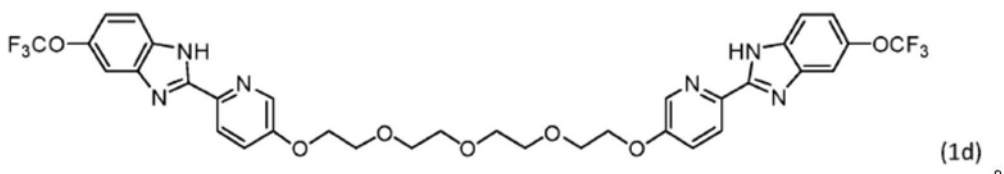
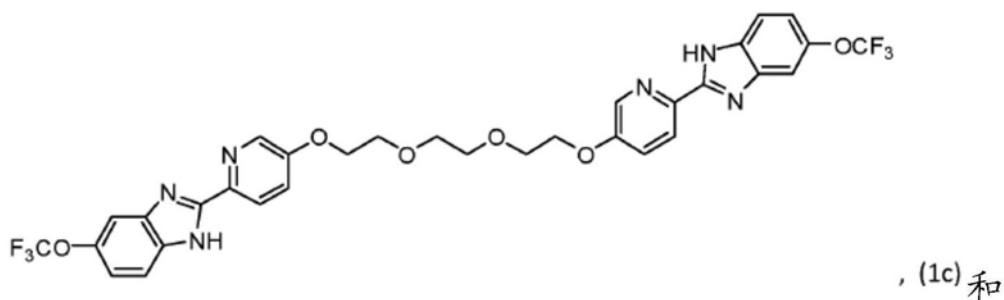
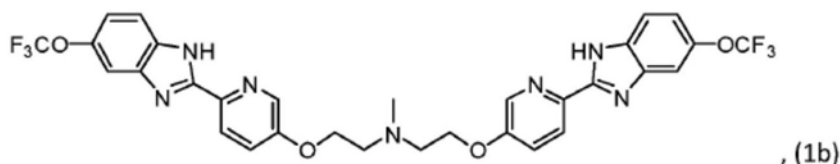
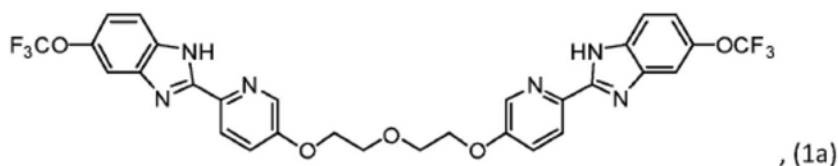
其中所述式 (1) 的化合物和所述化学治疗剂的所述治疗有效组合协同抑制inv (16) 白血病细胞的增殖。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中Y是O。

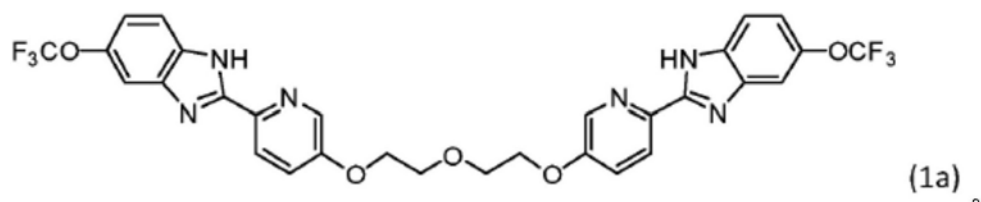
3. 根据权利要求1所述的方法,其中Y是N-CH₃。

4. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中n是1至5的整数。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述式 (1) 的化合物选自:



6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述式 (1) 的化合物是:



7. 根据权利要求1-6中任一项所述的方法, 其中将所述式(1)的化合物和所述化学治疗剂以药物组合物的形式施用, 所述药物组合物包含所述式(1)的化合物、所述化学治疗剂和药学上可接受的载体。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的方法, 其中所述化学治疗剂是多柔比星或道诺霉素。

9. 根据权利要求8所述的方法, 其中所述化学治疗剂是多柔比星。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的方法, 其中所述inv(16)白血病是急性髓样白血病。

11. 根据权利要求1-6和8-10中任一项所述的方法, 其中将所述式(1)的化合物和所述化学治疗剂同时施用, 或者通过首先施用所述式(1)的化合物, 之后施用所述化学治疗剂来依次施用。

12. 根据权利要求1-11中任一项所述的方法, 其中同时施用所述式(1)的化合物和所述化学治疗剂。

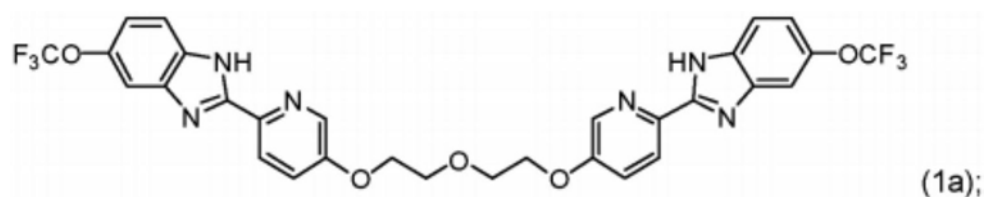
13. 根据权利要求1-12中任一项所述的方法, 其进一步包括在施用所述化学治疗剂之后, 每日施用另外的治疗有效量的所述式(1)的化合物持续1日或多日的步骤。

14. 根据权利要求1-12中任一项所述的方法, 其进一步包括在同时施用所述式(1)的化合物和所述化学治疗剂之后, 每日施用另外的治疗有效量的所述式(1)的化合物持续1日或多日的步骤。

15. 一种治疗inv(16)白血病的方法, 其包括以下步骤:

向有此需要的受试者施用以下物质的治疗有效组合

a) 式(1a)化合物或其药学上可接受的盐,



和

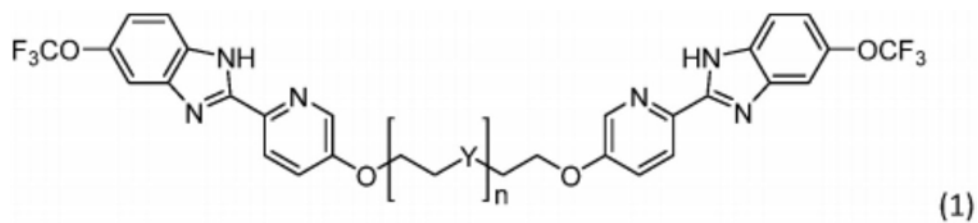
b) 多柔比星或其药学上可接受的盐;

其中所述式(1a)化合物和所述多柔比星的所述治疗有效组合协同抑制inv(16)白血病细胞的增殖。

16. 一种药物组合物, 其包含:

药学上可接受的载体和以下物质的治疗有效组合:

a) 式(1)的化合物



其中Y是O、NH或NR，其中R是甲基或乙基，

其中n是1至10的整数，

或其药学上可接受的盐；和

b) 化学治疗剂，其选自由以下组成的组：吡柔比星、阿柔比星、米托蒽醌、多柔比星、道诺霉素、伊达比星、表柔比星、阿糖胞苷或其药学上可接受的盐；

及药学上可接受的赋形剂；

其中所述式(1)的化合物和所述化学治疗剂以协同有效抑制inv(16)白血病细胞增殖的组合量存在。

用于治疗癌症的组合疗法

[0001] 关于联邦赞助的研究和开发的声明

[0002] 本发明是在由国立卫生研究院 (National Institutes of Health) 拨款的基金号 CA108056 和 CA140398 的政府支持下完成的。政府拥有本发明中的某些权利。

[0003] 相关申请的交叉引用

[0004] 本申请要求2016年7月27日提交的美国申请号62/367,263的优先权,该美国申请通过引用并入本文。

技术领域

[0005] 本发明大体上涉及治疗白血病的组合物和方法。更具体地,本发明涉及使用化学治疗剂和特异性转录因子抑制剂的协同组合治疗的组合物和方法。

背景技术

[0006] 急性髓样白血病 (AML) 是成人白血病的最常见形式。在具有染色体倒位 inv (16) (p13q22) 的 AML 中表达的转录因子融合 CBF β -SMMHC (核心结合因子 β 和平滑肌肌球蛋白重链) 在与转录因子 RUNX1 的结合方面胜过野生型 CBF β , 解调造血中的 RUNX1 活性并诱导 AML。目前利用非选择性细胞毒性化疗进行的 inv (16) AML 治疗产生良好的初始反应, 但长期存活有限。

[0007] CBF 是异二聚体转录因子, 由结合 DNA 的 RUNX 亚基 (由三种基因之一编码: RUNX1、RUNX2 或 RUNX3) 和非结合 DNA 的 CBF β 亚基构成, 这增加了 RUNX 蛋白质对 DNA 的亲合力。所有三种 RUNX 蛋白质以及 CBF β 均已被证明是特定发育途径的关键调节因子。RUNX1 和 CBF β 对于永久造血 (definitive hematopoiesis) 来说是必不可少的, 其中它们调控与干细胞和祖细胞的增殖、分化和存活相关的基因的表达。RUNX2 通过对骨骼发育关键的基因的转录调控, 对于正常骨骼形成来说是必不可少的。RUNX1 和 RUNX3 两者在神经元发育中都起着关键作用。

[0008] 基于 RUNX 蛋白质和 CBF β 在正常发育中的关键作用, 它们在许多癌症中的改变靶标。RUNX1 和 CBF β 两者都在急性髓样白血病 (AML) 和急性淋巴细胞白血病 (ALL) 患者亚组中经历染色体易位, 其中相应的融合蛋白已被清楚地证明是疾病的驱动因素。对于融合蛋白 AML1-ETO 和 TEL-AML1, 所述融合蛋白与 CBF β 的结合已被证明对于转化是必不可少的。RUNX1 在 AML 和骨髓增生异常综合征 (MDS) 患者亚组中突变。

[0009] 蛋白质-蛋白质相互作用的小分子抑制剂, 特别是在转录因子的背景下, 仍然是一个相对新生的领域, 部分原因是长期以来人们普遍认为这类相互作用是“无药可及的 (undruggable)”, 即靶向此类相互作用成功的可能性非常低。随着影响蛋白质-蛋白质相互作用 (包括转录因子) 的小分子抑制剂的成功案例越来越多, 这种范式正在明显发生变化。另外, 表观遗传信号传导蛋白的小分子抑制剂如 BRD4 或 EZH2 抑制剂的最近发展清楚地表明, 特别是转录的小分子调节是癌症治疗的潜在有力方法。

[0010] 通过引用并入本文的美国专利号 8,748,618 和 9,221,764 报道了 CBF β -SMMHC 和 RUNX1 的 Runt 结构域之间的蛋白质-蛋白质相互作用的小分子抑制剂, 所述小分子抑制剂结

合至CBFβ-SMMHC的CBFβ部分。美国专利号8,748,618和9,221,764中公开的二聚体抑制剂显示出对inv(16)细胞系的增强效力和对非inv(16)细胞系的最小作用。

[0011] 患有inv(16) AML的患者通常经历涉及细胞毒性药物如Ara-C和蒽环类药物的侵袭性化疗方案。年轻患者对这种治疗的耐受性更好,显示45%至65%的5年总体存活率(Ravandi等,2007;Pulsoni等,2008)。然而,大多数患者年龄较大且60岁以上患者的5年总体存活率为约20%(Farag等,2006)。这些数据表明,期望可改善inv(16) AML患者的治疗反应的靶向疗法。

[0012] 新出现的文献表明,包括细胞毒性化疗、激酶抑制剂或单克隆抗体在内的当前疗法不能治愈癌症可能归因于一群所谓的癌症干细胞或癌症起始细胞,它们抵抗治疗,是静息的,具有长期自我更新的潜力并且在复发时能够完全再现肿瘤表型。Inv(16) AML是这种失败的良好实例,因为inv(16)患者在复发时始终显示inv(16)重排,尽管在诊断时检测到的其它突变(RAS、FLT3ITD或KIT)可能会或者可能不会在复发时被检测到(Nakano等,1999;Kottaridis等,2002;Shih等,2008)。

[0013] 目前,将标准细胞毒性化疗用于治疗inv(16)白血病。虽然较年轻的患者对此有相当好的耐受性,但受该疾病折磨的以老年患者为主的群体对此没有很好的耐受性。更重要的是,大约60%的inv(16)患者在5年内复发并死亡,表明复发率相当高。这可能是在用标准化疗治疗时没有根除白血病干细胞群体从而使疾病复发的结果。众所周知,CBFβ-SMMHC将细胞的基因表达谱改变为更像干细胞的基因表达谱,很明显CBFβ-SMMHC是白血病干细胞表型的驱动因素。因此,很可能直接抑制CBFβ-SMMHC会改变该表达谱,因此其单独或与细胞毒性化疗组合可能是更有效的治疗方法。

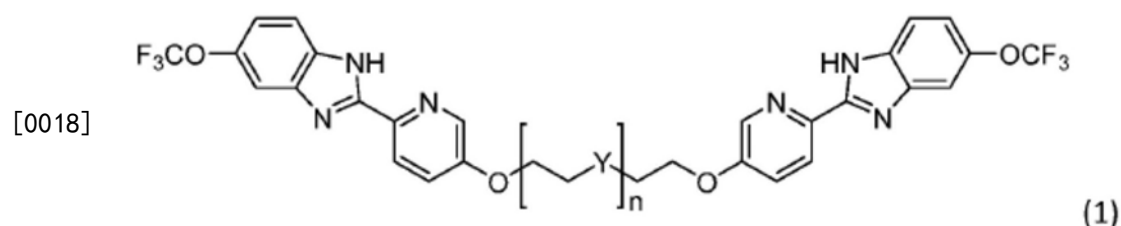
[0014] 本领域长期以来一直需要用于预防和用于治疗特别是涉及inv(16)融合的急性髓样白血病的组合物和方法。本发明满足了这些需求。

发明内容

[0015] 本发明大体上涉及用于治疗inv(16)白血病的方法和组合物。

[0016] 本发明涉及治疗inv(16)白血病的方法,其包括以下步骤:向有此需要的受试者施用以下物质的治疗有效组合

[0017] a) 式(1)的化合物



[0019] 其中Y是O、NH或NR,其中R是甲基或乙基,

[0020] 其中n是1至10的整数,

[0021] 或其药学上可接受的盐;和

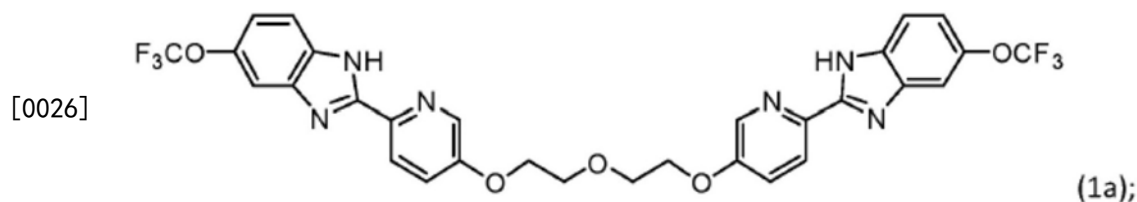
[0022] b) 化学治疗剂,其选自由以下组成的组:吡柔比星(pirarubicin)、阿柔比星(acclarubicin)、米托蒽醌(mitoxantrone)、多柔比星(doxorubicin)、道诺霉素(daunorubicin)、伊达比星(idarubicin)、表柔比星(epirubicin)、阿糖胞苷

(cytarabine)、其药学上可接受的盐和混合物。式(1)的化合物和化学治疗剂的治疗有效组合协同抑制inv(16)白血病细胞的增殖。

[0023] 在根据本发明的方法中,将式(1)的化合物和化学治疗剂同时施用,或者通过首先施用所述式(1)的化合物,之后施用所述化学治疗剂来依次施用。

[0024] 本发明还涉及药物组合物,其包含所述式(1)的化合物和所述化学治疗剂的治疗有效组合以及药学上可接受的赋形剂。式(1)的化合物和化学治疗剂的治疗有效组合是协同有效抑制inv(16)白血病细胞增殖的组合物。

[0025] 在本发明的方法和药物组合物中,式(1)的化合物是式(1a)的化合物或其药学上可接受的盐,



[0027] 并且化学治疗剂是多柔比星或其药学上可接受的盐。

[0028] 附图简述

[0029] 图1. 来自移植白血病并用DMSO(对照)、多柔比星、AI-10-49和多柔比星+AI-10-49治疗的小鼠的白细胞计数的测量。

[0030] 图2. 来自移植白血病并用DMSO(对照)、多柔比星、AI-10-49和多柔比星+AI-10-49治疗的小鼠的c-Kit⁺细胞群体的测量。

[0031] 图3. 来自移植白血病并用DMSO(对照)、多柔比星、AI-10-49和多柔比星+AI-10-49治疗的小鼠的脾重量和细胞数目的测量。

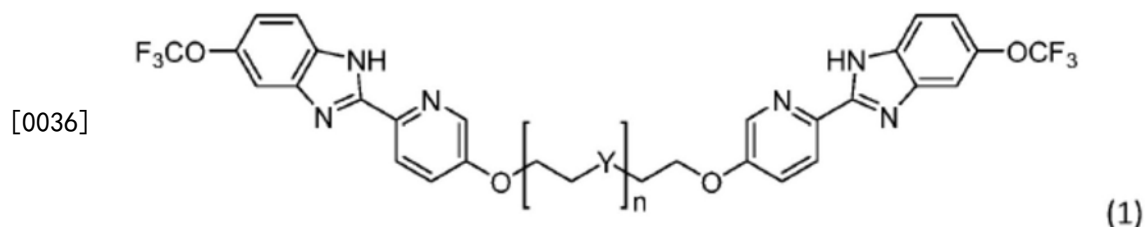
[0032] 图4. 来自移植白血病并用DMSO(对照)、多柔比星、AI-10-49和多柔比星+AI-10-49治疗的小鼠的Lin-Sca1-C-Kit⁺细胞群体的测量。

[0033] 图5. AI-10-49和多柔比星及其组合对表达CBFβ-SMMHC融合蛋白的ME-1白血病细胞系的作用的测量。

具体实施方式

[0034] 本发明涉及治疗inv(16)白血病的方法,其包括向有此需要的受试者施用以下物质的治疗有效组合:

[0035] a) 式(1)的化合物



[0037] 其中Y是O、NH或NR,其中R是甲基或乙基,

[0038] 其中n是1至10的整数,

[0039] 或其药学上可接受的盐;和

[0040] b) 化学治疗剂,其选自以下组成的组:吡柔比星、阿柔比星、米托蒽醌、多柔比

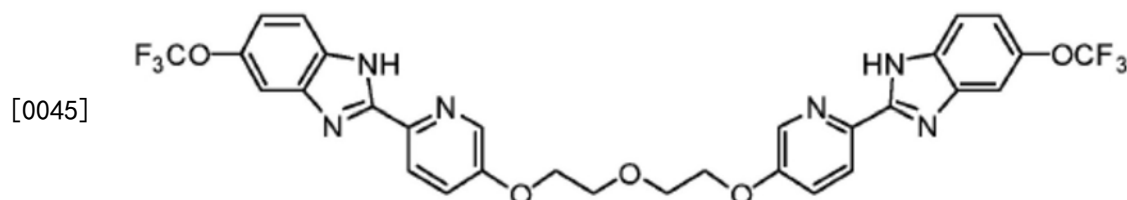
星、道诺霉素、伊达比星、表柔比星和阿糖胞苷及其混合物或其药学上可接受的盐。

[0041] 式(1)的化合物和化学治疗剂的治疗有效组合协同抑制inv(16)白血病细胞的增殖。本发明的方法特别可用于治疗急性髓样白血病,即一种类型的inv(16)白血病。“治疗(Treatment/treating)”包括预防特定病症或病况,或减轻与特定病症或病况相关的症状和/或预防或消除这些症状。

[0042] 令人惊讶地,当某些组合量的式(1)的化合物和化学治疗剂被用于抑制inv(16)白血病细胞的增殖时,可看到协同作用。用于本发明中的协同组合的每日施用的化学治疗剂剂量与每日施用的式(1)的化合物剂量的重量与重量比在约0.0001:1至约1000:1范围内。该比率可以是约0.001:1至约100:1,例如约0.01:1至约10:1,例如约0.1:1至约1:1。

[0043] 直接抑制致癌CBFβ-SMMHC融合蛋白已被证明是治疗inv(16)AML的潜在有效治疗方法(Illendula等,2015)。据报道,5-甲氧基-2-(吡啶-2-基)-1H-苯并[d]咪唑(AI-4-57)是与CBFβ-SMMHC融合蛋白的CBFβ部分结合并抑制其与RUNX蛋白质的Runt结构域结合的化合物(Illendula等,2015)。三氟甲氧基(CF₃O)衍生物(2-(吡啶-2-基)-5-(三氟甲氧基)-1H-苯并[d]咪唑,AI-10-47)相对于甲氧基化合物展示出增强的代谢稳定性(Illendula等,2015)。基于聚乙二醇的连接基被用于产生具有5、7、10和16个原子连接基长度的二价衍生物(Illendula等,2015)。五原子连接基化合物具有较低的活性,但更长的连接基化合物显示出强力的抑制作用。具有七原子连接基的化合物AI-4-83比单价化合物展示出63倍的增强。另外,AI-4-83在饱和浓度下实现了CBFβ-SMMHC和RUNX1Runt结构域的>10倍解离(Illendula等,2015)。

[0044] 具有七原子连接基的三氟甲氧基衍生物AI-10-49(在本文中还被称为化合物(1a),



[0046] 被证明是在ME-1细胞系(具有inv(16)的白血病细胞系)中诱导细胞死亡的有效且CBFβ-SMMHC特异性的化合物(Illendula等,2015)。CBFβ-SMMHC是低聚的,而CBFβ是单体的。AI-10-49抑制CBFβ-SMMHC活性,同时对CBFβ功能具有最小影响(Illendula等,2015)。

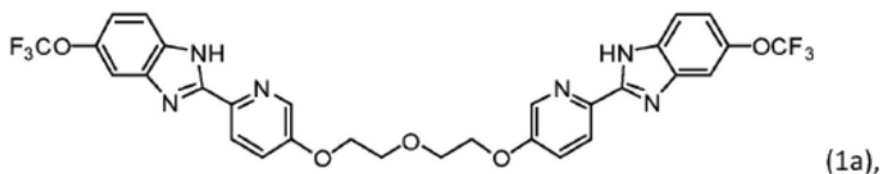
[0047] 在根据本发明的方法中,式(1)的化合物含有通过连接基-O-[CH₂CH₂Y]_n-O-连接的两个2-(吡啶-2-基)-5-(三氟甲氧基)-1H-苯并[d]咪唑基团。在式(1)的化合物中,连接基通过苯并咪唑环连接分子的两个结合部分。二聚或二价抑制剂利用CBFβ-SMMHC的低聚性质并应用多价原理(Mammen等,1998;Kiessling等,2006)来实现期望的选择性。已显示缺少极端C-末端的CBFβ-SMMHC的截短形式在溶液中形成二聚体(Lukasik等,2002)。对于全长蛋白质,这些二聚体然后低聚以形成高级低聚体(Shigesada等,2004)。相反,CBFβ在溶液中是单体的。该低聚差异提供了实现相对于CBFβ选择性抑制CBFβ-SMMHC的手段。

[0048] 根据本发明的方法,在式(1)的化合物中,Y是O、NH或S。在本发明的方法中,Y是O。在本发明的另一方法中,Y是N-CH₃。当n大于1时,Y可相同或不同。

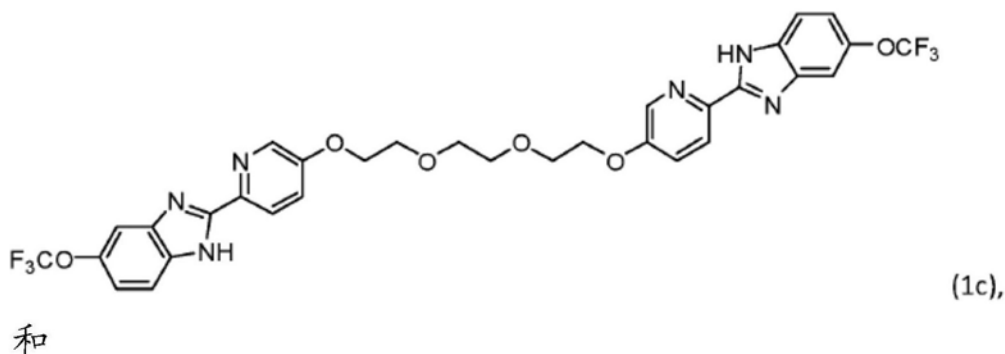
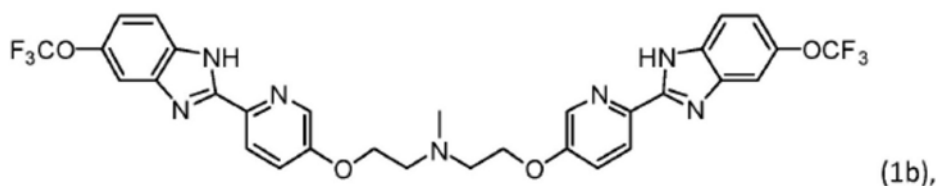
[0049] 根据本发明的方法,在式(1)的化合物中,n是1至10的整数。在根据本发明的方法和组合物中,n是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。优选地,n是1至5。在式(1)的化合物中,连接基应

足够长,以允许式(1)的二价化合物相对于单价CBF β -配体相互作用借助于CBF β -SMMHC-配体相互作用实现结合增强。参见美国专利号9,221,764,图5。结合单体CBF β 的单价化合物的解离常数等于 K_d (单体)。该化合物的同型二聚体将以等于 K_d (单体)/2的解离常数结合单体CBF β 蛋白质。然而,该同一同型二聚体将与二聚体CBF β -SMMHC蛋白质上的两个位点相互作用,并且具有等于 $(K_d(\text{单体}))^2/C_{\text{eff}}$ 的 K_d (二聚体),其中 C_{eff} 是由CBF β -SMMHC上的两个结合位点相互系连(tethering)产生的有效浓度(Mulder等,2004)。

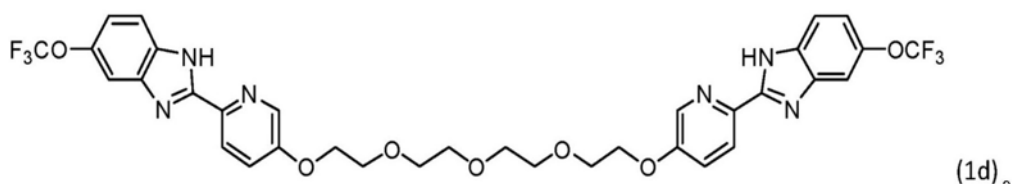
[0050] 式(1)内的非限制性示例化合物包括:



[0051]

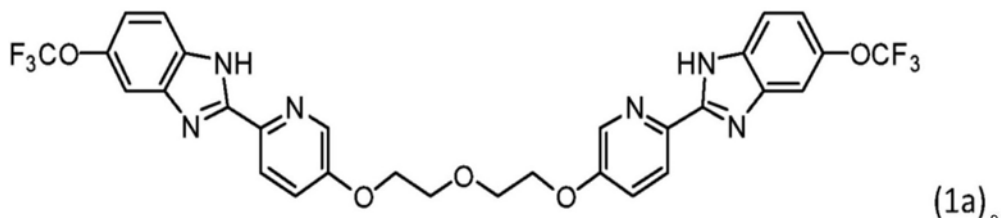


[0052]



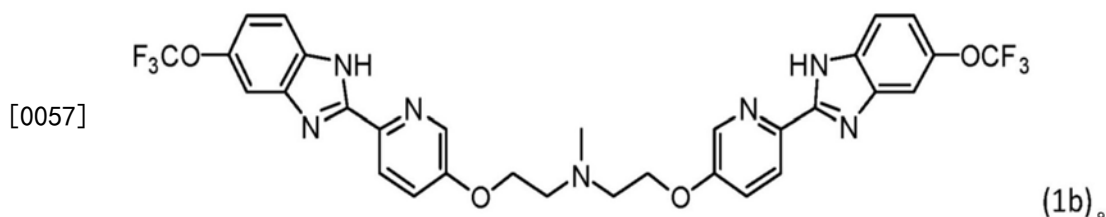
[0053] 在根据本发明的优选方法中,式(1)的化合物是

[0054]

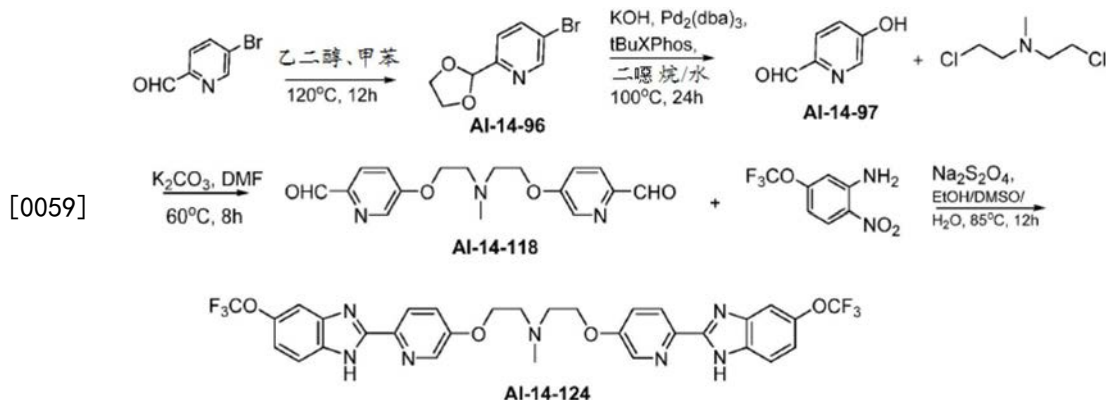


[0055] 美国专利号9,221,764(通过引用并入本文)公开了具有基于聚乙二醇的连接基的特定二价抑制剂的结构和合成途径。

[0056] 在根据本发明的方法中,式(1)的化合物是



[0058] 化合物 (1b) (也称为AI-14-124) 的示例性合成如下所示:



[0060] 根据本发明的方法,化学治疗剂选自由以下组成的组:吡柔比星、阿柔比星、米托蒽醌、多柔比星、道诺霉素、伊达比星、表柔比星和阿糖胞苷及其混合物或其药学上可接受的盐。

[0061] 如所提到的,用于本发明中的式 (1) 的化合物或化学治疗剂可采取“药学上可接受的盐”的形式,其指的是保持本发明化合物的生物有效性和性质并且在生物学上或其它方面不是不期望的盐。在许多情况下,以本发明方法施用的化合物能够由于氨基和/或羧基或类似基团的存在而形成酸盐和/或碱盐。药学上可接受的酸加成盐可由无机酸和有机酸制备。衍生自无机酸的盐包括但不限于盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等。药学上可接受的碱加成盐可由无机碱和有机碱制备。仅举例来说,衍生自无机碱的盐包括钠盐、钾盐、锂盐、铵盐、钙盐和镁盐。衍生自有机碱的盐包括但不限于伯胺、仲胺和叔胺的盐。

[0062] 患有 inv (16) AML 的患者通常经历涉及细胞毒性药物如 Ara-C (阿糖胞苷) 和蒽环类药物的侵袭性化疗方案。阿糖胞苷主要用于治疗急性髓样白血病、急性淋巴细胞白血病和淋巴瘤,其中它是诱导化疗的主要成分 (Pigneux 等, 2007)。阿糖胞苷干扰 DNA 的合成,影响需要 DNA 复制进行有丝分裂的快速分裂细胞。四种最常见的蒽环类药物是多柔比星、道诺霉素、表柔比星和伊达比星 (McGowan 等, 2017)。多柔比星和道诺霉素是第一批用于临床实践的药物。表柔比星是多柔比星的立体异构体,比多柔比星具有增大的分布体积和更长的半衰期。伊达比星是道诺霉素的衍生物,比道诺霉素亲脂性更高并且具有更高的细胞摄取。只有另外几种蒽环类药物已获得临床批准;这些包括吡柔比星、阿克拉霉素 A (aclacinomycin A) (阿柔比星) 和米托蒽醌 (取代的非糖苷蒽醌 (aglyconic anthraquinone)) (Minotti 等, 2004)。

[0063] 尽管临床应用广泛,但蒽环类药物在癌细胞中的作用机制仍然是有争议的问题。在一篇开创性的评论中,考虑了以下机制:1) 嵌入 DNA 中,导致大分子的受抑制合成;2) 产生自由基,导致 DNA 损伤或脂质过氧化;3) DNA 结合和烷基化;4) DNA 交联;5) 干扰 DNA 解旋或 DNA 链分离和解旋酶活性;6) 直接膜效应;7) 通过抑制拓扑异构酶 II 引发 DNA 损伤;和 8) 响应拓

扑异构酶II抑制而诱导细胞凋亡 (Gewirtz D.A., 1999)。

[0064] 根据本发明的方法,化学治疗剂是多柔比星或道诺霉素。例如,化学治疗剂是多柔比星。在根据本发明的方法中,化学治疗剂是盐酸多柔比星。

[0065] 在根据本发明的方法中,施用一定量的式(1)的化合物如化合物(1a)和化学治疗剂如多柔比星的治疗有效组合,以协同抑制inv(16)白血病细胞的增殖。术语“抑制”是指本发明化合物降低或阻碍所述功能如细胞增殖的能力。优选地,抑制至少10%,更优选至少25%,甚至更优选至少50%,且最优选地,该功能被抑制至少75%。

[0066] 在根据本发明的方法中,用于本发明中的协同组合的每日施用的化学治疗剂剂量与每日施用的式(1)的化合物剂量的重量与重量比在约0.0001:1至1000:1范围内。该比率可以是约0.001:1至约100:1,例如约0.01:1至约10:1,例如约0.1:1至约1:1。每日施用可以是同时、连续或不连续的。

[0067] 尽管已证明化学治疗剂和式(1)的化合物分别有效抑制inv(16)白血病细胞的增殖,但当组合时,结果不仅仅是加和的,而是协同的。供根据本发明的治疗方法中使用所需的式(1)的化合物和化学治疗剂或其盐的协同组合的量可随着施用途径、所治疗病况的性质以及患者的年龄和病况而变化,且最终将由主治医师或临床医生决定。标准操作规程是用道诺霉素以每平方米体表面积45至50mg的剂量将急性髓样白血病患者治疗3日,加上用阿糖胞苷以每平方米100至200mg的剂量治疗7至10日 (Lowenberg, 2009)。在根据本发明的治疗方法中,化学治疗剂的每日施用剂量为约10mg/m²至约10,000mg/m²。例如,一种治疗方法包括以约20至约1000mg/m²的每日剂量施用化学治疗剂。治疗方法包括以约25、30、45、50、100、150、250、450、750或900mg/m²的每日剂量施用化学治疗剂。化学治疗剂的施用可通过静脉内输注、静脉内推注、快速浓注或皮下注射来进行。在根据本发明的治疗方法中,式(1)的化合物的每日施用剂量为约10mg/m²至约10,000mg/m²。例如,一种治疗方法包括以约20至约1000mg/m²的每日剂量施用式(1)的化合物。一种治疗方法包括以约25、30、45、50、100、150、250、450、750或900mg/m²的每日剂量施用式(1)的化合物。在一种治疗方法中,化学治疗剂的施用在第1日、第2日和第3日每日一次,而式(1)的化合物的施用每日一次发生,持续一周、两周、三周、四周、五周或更长时间。式(1)的化合物的施用持续时间可由本领域技术人员确定,并根据需要进行。在一种治疗方法中,化学治疗剂的施用在第1日和第2日每日一次,而式(1)的化合物的施用每日一次发生,持续一周、两周、三周、四周、五周或更长时间。在一种治疗方法中,化学治疗剂的施用在第1日每日一次,而式(1)的化合物的施用每日一次发生,持续一周、两周、三周、四周、五周或更长时间。

[0068] 在根据本发明的治疗方法中,将式(1)的化合物和化学治疗剂同时施用,或者通过首先施用式(1)的化合物,之后施用化学治疗剂来依次施用。在根据本发明的治疗方法中,还可同时施用式(1)的化合物和化学治疗剂。在根据本发明的替代方法中,式(1)的化合物和化学治疗剂可通过首先施用式(1)的化合物,之后施用化学治疗剂来依次施用。根据本发明的其它治疗方法,在施用化学治疗剂后,还可每日施用另外的治疗有效量的式(1)的化合物,持续1日或多日。例如,在根据本发明的治疗方法中,施用式(1)的化合物,之后施用化学治疗剂,之后每日施用式(1)的化合物,持续1日或多日。作为本发明治疗方法的另一实例,将式(1)的化合物和化学治疗剂同时施用,之后每日施用式(1)的化合物,持续1日或多日。

[0069] 期望的剂量可以方便地以单次剂量呈现,或作为以适当间隔施用的分次剂量呈

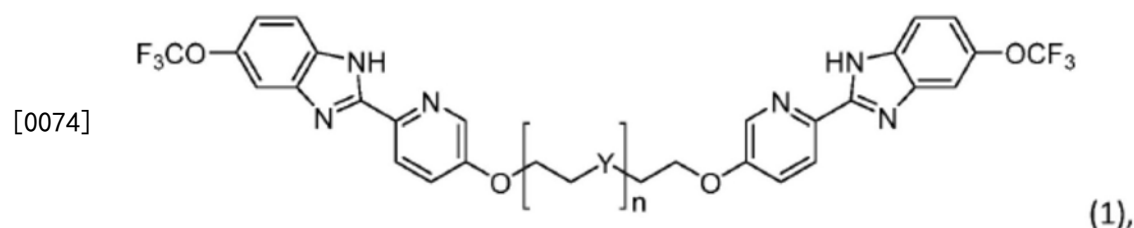
现,例如作为每日两次、三次、四次或更多次亚剂量(sub-dose)呈现。可将亚剂量本身例如进一步划分成多次离散的松散间隔的施用;例如多次注射。

[0070] 在根据本发明的方法中,使用本领域技术人员已知的技术测量来自罹患inv (16) 白血病的受试者的细胞增殖程度。使用inv (16) 白血病小鼠模型被称为白血病起始细胞的特定细胞群体已被鉴别并被接受为适当的动物模型(Kuo,Y.H.等,2006)。这种细胞群体保留了inv (16),但不具有与疾病相关的次级突变。在获得此类次级突变后,这些细胞可发展为显性白血病。这些细胞通常也对传统的细胞毒性化疗更具抗性,因此代表可发生复发的细胞库。可从血液、脾、骨髓和/或脊髓液中提取细胞用于测量。例如,使用流式细胞术测量从患有inv (16) 白血病的受试者中提取的Lin-Sca-Kit⁺细胞群体。Lin-Sca1-c-Kit⁺细胞群体富集白血病起始细胞(LIC)和白血病干细胞(LSC)群体。

[0071] 在根据本发明的治疗方法中,将式(1)的化合物和化学治疗剂以包含式(1)的化合物、化学治疗剂和药学上可接受的载体的药物组合物的形式施用。在根据本发明的其它治疗方法中,将式(1)的化合物以包含式(1)的化合物和药学上可接受的载体的药物组合物的形式施用,随后将化学治疗剂以包含化学治疗剂和药学上可接受的载体的药物组合物的形式施用。在根据本发明的方法中,药物的剂量制剂可相同或不同。例如,将化学治疗剂和式(1)的化合物配制成用于胃肠外递送的溶液。或者,将化学治疗剂配制成溶液,并将式(1)的化合物配制成片剂。

[0072] 本发明的单独实施方案是药物组合物,其包含药学上可接受的载体和以下物质的治疗有效组合

[0073] a) 式(1)的化合物



[0075] 其中Y是O、NH或NR,其中R是甲基或乙基,

[0076] n是1至10的整数,

[0077] 或其药学上可接受的盐;和

[0078] b) 化学治疗剂,其选自由以下组成的组:吡柔比星、阿柔比星、米托蒽醌、多柔比星、道诺霉素、伊达比星、表柔比星、阿糖胞苷或其药学上可接受的盐;

[0079] 其中所述式(1)的化合物和所述化学治疗剂以协同有效抑制inv (16) 白血病细胞生长的组合量存在。

[0080] 根据本发明的药物组合物可以呈含有式(1)的化合物和化学治疗剂的协同组合的任何药物形式。药物组合物可以是例如片剂、胶囊、液体悬浮液、可注射组合物、局部组合物、可吸入组合物或透皮组合物。还可制备液体药物组合物。药物组合物通常含有例如约0.1重量%至约99.9重量%组合量的式(1)的化合物和化学治疗剂,例如约0.5重量%至约99重量%组合量的式(1)的化合物和化学治疗剂,以及例如99.5重量%至0.5重量%的至少一种适合的药物赋形剂。在一个实施方案中,所述组合物可以是约5重量%与约75重量%之间的组合量的式(1)的化合物和化学治疗剂,其余为至少一种适合的药物赋形剂或至少一

种其它佐剂,如下文所述。

[0081] 取决于药物组合物的类型,药学上可接受的载体可选自本领域已知的任一种载体或载体组合。药学上可接受的载体的选择取决于待使用的药物形式和期望的施用方法。

[0082] 适合的液体药物组合物含有改善药物水溶性的增溶剂,如例如环糊精。环糊精的一个非限制性实例是 β -环糊精(β -CD) (Captisol[®])的聚阴离子可变取代的磺丁基醚。

[0083] 对于本发明的固体药物组合物,固体药物组合物中的载体不应显著改变式(1)的化合物或化学治疗剂。载体也不应与式(1)的化合物或所用化学治疗剂在其它方面不相容,如通过产生任何不期望的生物效应或不然以有害方式与药物组合物的任何其它组分相互作用。

[0084] 本发明的药物组合物可通过药物制剂领域中已知的方法制备,例如参见 Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版(Mack Publishing Company,Easton, Pa.,1990),该文献通过引用并入本文。本发明药物组合物的适合固体剂型包含至少一种药学上可接受的赋形剂,如例如柠檬酸钠或磷酸二钙,或(a) (a) 填料或增量剂,如例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅酸,(b) 粘合剂,如例如纤维素衍生物、淀粉、海藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶(gum acacia),(c) 湿润剂,如例如甘油,(d) 崩解剂,如例如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、交联羧甲基纤维素钠、复合硅酸盐和碳酸钠,(e) 溶液缓凝剂,如例如石蜡,(f) 吸收促进剂,如例如季铵化合物,(g) 润湿剂,如例如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯、硬脂酸镁等,(h) 吸附剂,如例如高岭土和膨润土,以及(i) 润滑剂,如例如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠或其混合物。在胶囊、片剂和丸剂的情况下,剂型还可包含缓冲剂。

[0085] 药物制剂领域中已知的药学上可接受的佐剂也可用于本发明的药物组合物中。这些包括但不限于防腐剂、润湿剂、悬浮剂、甜味剂、调味剂、芳香剂、乳化剂和分配剂。可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)来确保防止微生物的作用。还可能期望包括等渗剂,例如糖、氯化钠等,如果期望,本发明的药物组合物还可含有少量辅助物质,如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂、抗氧化剂等,如例如柠檬酸、山梨糖醇酐单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯、丁基化羟基甲苯等。

[0086] 如上所述的固体剂型可用包衣和外壳如肠溶包衣等制备,如制药领域中已知的。它们可含有镇静剂(pacifying agent),并且也可以是这样的组合物,即它们在肠道的某一部分以延迟的方式释放一种或多种活性化合物。可使用的包埋组合物的非限制性实例是聚合物和蜡。如果适当的话,活性化合物还可以是与一种或多种上述赋形剂的微囊化形式。

[0087] 适合的悬浮液可含有悬浮剂,如例如乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨糖醇和山梨糖醇酐酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂和黄蓍胶,或这些物质的混合物等。液体剂型可以是水性的,可含有药学上可接受的溶剂以及本领域已知的传统液体剂型赋形剂,其包括但不限于缓冲剂、调味剂、甜味剂、防腐剂和稳定剂。

[0088] 可使用供口服施用的剂型,其包括胶囊、片剂、丸剂、粉末、颗粒和悬浮液。还可将根据本发明的适合的药物组合物配制成液体或可注射的药物组合物。可通过任何公认的施用模式或用于提供类似效用的媒介(agent)进行施用。因此,施用可以是例如口服、颊部或胃肠外(静脉内、肌内、腹膜内或皮下),呈固体、半固体、冻干粉末或液体剂型,例如片剂、丸剂、软弹性和硬质明胶胶囊、粉末、溶液、悬浮液或气溶胶等形式,如例如呈适于简单施用精

确剂量的单位剂型。一种施用途可以是使用方便的每日剂量方案的口服施用,该方案可根据待治疗病况的严重程度进行调整。

[0089] 通常,在根据本发明的药物组合中,本发明的式(1)的化合物和化学治疗剂在液体组合如注射溶液中的组合浓度将为约0.1-25重量%,优选约0.5-10重量%。半固体或固体组合如凝胶或粉末中的浓度将为约0.1-5重量%,优选约0.5-2.5重量%。

[0090] 实施例

[0091] 实施例1:小鼠中的白血病移植研究

[0092] 根据马萨诸塞大学公共机构动物护理和使用委员会(University of Massachusetts Institutional Animal Care and Use Committee)审查并批准的方案进行动物实验。使用了inv(16) AML的有效小鼠模型(L.Xue等,2014)。如先前所述(Illendula等,2015),在CD45.2C57BL/6小鼠中产生携带Cbf $\beta^{+/MYH11}$ 和Nras $^{+/G12D}$ 致癌等位基因的白血病细胞。简单地说,将 2×10^3 个Cbf $\beta^{+/MYH11}$;Nras $^{+/G12D}$ 白血病细胞移植至16只亚致死辐照的六至八周龄CD45.1C57BL/6雌性小鼠中的每一只中。在移植后5日,将小鼠分成4组,每组4只小鼠:DMSO(对照,50 μ L)、Dox、AI-10-49和Dox+AI-10-49。两个Dox组在移植后5日均接受单剂量多柔比星(2mg/kg)。两个AI-10-49组均接受腹膜内注射的每日剂量的于DMSO中的AI-10-49(200mg/kg)持续10日。在这10日时期之后,处死所有小鼠并通过几种测量分析白血病负荷(leukemia burden)。使小鼠保持在多于一人的观察之下,以确定中值白血病潜伏期,一旦检测到疾病迹象,包括运动和梳理活动减少、驼背、苍白爪(贫血)和体温过低,就使小鼠无痛致死。在无痛致死时,如前所述提取并分析外周血和脾细胞(Y.H.Kuo等,2006.)。通过测量总白细胞计数、c-kit(+)-门控群体中的细胞数目、脾重量和细胞数目以及脾Lin-Sca1-c-kit+群体,分析外周血中的白血病负荷。对于Kit+和Lin-Sca-Kit+结果,使用流式细胞术来测量作用。

[0093] 如图1中所示测量白细胞计数。这在AI-10-49组和Dox组两者中均降低。Dox和AI-10-49的组合在减少WBC方面显示出加性作用。

[0094] 如图2中所示评估c-Kit+细胞群体。c-Kit+细胞群体是含有白血病细胞的富集级分。这里,单个药剂具有作用,并且所述组合显示加性作用。

[0095] 如图3中所示评价脾重量和细胞数目。这些在白血病患者中升高。脾细胞显示出类似于针对WBC和c-Kit+细胞所见的加性作用,且脾重量显示出组合相对于任一单一药剂的协同作用。

[0096] 最后,将对Lin-Sca1-c-Kit+细胞群体的作用示于图4中。该细胞群体富集白血病起始细胞(LIC)或白血病干细胞(LSC)。这里,用Dox+AI-10-49观察到对这些细胞数目的明显协同作用,而单独用AI-10-49仅见到不大的作用,单独用Dox见不到作用。

[0097] 由于多柔比星是用于inv(16) AML患者的当前护理标准的组成部分,因此我们已通过将靶向CBF β -SMMHC抑制剂(AI-10-49)与多柔比星组合而证明功效的增加。总之,这些结果强烈地表明在患者中组合AI-10-49与多柔比星以改善结局的效用。具体地说,最后的结果表明,所述组合可有效地靶向LIC群体,该群体是驱动复发的白血病细胞的储库。这强烈地表明该组合将改善inv(16) AML患者的结果。

[0098] 实施例2:对Inv(16)+细胞系ME-1的增殖的作用

[0099] 在具有20%胎牛血清和25mM HEPES的RPMI 1640中培养ME-1细胞(Inv(16)+)

(DSMZ,德国)。使用96孔板,将 5×10^5 个ME-1细胞在DMSO或如所示的不同添加顺序的不同组合中培养24小时。将细胞孵育总共4日,并使用MTT试剂盒(CellTiter96® Aqueous One Solution) (Promega,PA) 测量增殖。将化合物单独在第1日添加,单独第2日添加,或者两者都在第1日添加,以评估所述组合的时序(timing)的任何作用。将所述实验重复至少2次。

[0100] 如图5中所示,观察到同时添加AI-10-49+多柔比星的组合以及添加AI-10-49、之后在第二日添加多柔比星的协同作用。而添加多柔比星,之后添加AI-10-49,显示出与单独添加的各组分相当的抑制。

[0101] 实施例3:合成N-甲基-2-((6-(5-(三氟甲氧基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)吡啶-3-基)氧基)-N-(2-((6-(5-(三氟甲氧基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)吡啶-3-基)氧基)乙基)乙-1-胺(AI-14-124)

[0102] 通过先前所述的方法在两个步骤中实现合成(Illendula等,2015)。在步骤1中,由市售中间体5-羟基吡啶甲醛和2-氯-N-(2-氯乙基)-N-甲基乙-1-胺合成二醛5,5'-(((甲基氮烷二基)双(乙烷-2,1-二基))双(氧基))二吡啶甲醛(AI-14-118)。将由此合成的醛带入下一步。在步骤2中,由硝基苯胺(0.22g,1mmol)和二醛AI-14-118(0.16g,0.5mmol)以良好产率(0.13g,40%)合成AI-14-124。mp 139-142°C; ^1H NMR(800MHz, $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$): δ 2.54(3H, s), 3.03-3.04(2H, t), 4.30-4.31(2H, t), 7.11(1H, s), 7.40-7.60(3H, m), 8.13-8.14(1H, d, $J=8.64\text{Hz}$), 8.36(1H, d, $J=3.3\text{Hz}$); ^{13}C NMR(800MHz, $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$): δ 44.00, 57.40, 68.05, 105.91, 112.15, 118.11, 121.67, 122.75, 123.72, 134.48, 135.71, 139.64, 141.56, 146.49, 154.61, 157.67。HRMS: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{31}\text{H}_{25}\text{F}_6\text{N}_7\text{O}_4$ 计算值:674.1945;实测值:674.1947。

[0103] 参考文献

[0104] 1.Illendula,A.,Pulikkan,J.A.,Zong,H.,Grembecka,J.,Xue,L.,Sen,S.,Zhou,Y.,Boulton,A.,Kuntimaddi,A.,Gao,Y.,Rajewski,R.A.,Guzman,M.L.,Castilla,L.H.,Bushweller,J.H.,(2015).Science 347,779-784.

[0105] 2.F.Ravandi,A.K.Burnett,E.D.Agura,H.M.Kantarjian,Cancer 110,1900-1910 (2007) .

[0106] 3.Pulsoni,A.,S.Iacobelli,et al.,(2008).Haematologica 93(7):1025-32.

[0107] 4.Farag,S.S.,K.J.Archer,et al.,(2006).Blood 108(1):63-73.

[0108] 5.Nakano,Y.,H.Kiyoi,et al.,(1999).Br J Haematol 104(4):659-64.

[0109] 6.Kottaridis,P.D.,R.E.Gale,et al.,(2002).Blood 100(7):2393-8.

[0110] 7.Shih et al.,(2008).Leukemia 22(2):303-7.

[0111] 8.Mammen,M.,S.K.Choi,et al.,(1998).Angewandte Chemie-International Edition 37(20):2755-2794.

[0112] 9.Kiessling,L.L.,J.E.Gestwicki,et al.,(2006).Angewandte Chemie-International Edition 45(15):2348-2368.

[0113] 10.Lukasik,S.M.,L.Zhang,et al.,(2002).Nat Struct Biol 9(9):674-9.

[0114] 11.Shigesada,K.,B.van de Sluis,et al.,(2004).Oncogene 23(24):4297-307.

[0115] 12.Mulder,A.,T.Auletta,et al.,(2004).Journal of the American Chemical Society 126(21):6627-6636.

- [0116] 13.Pigneux,A.,et al.,Haematologica 2007,92:1327-1334.
- [0117] 14.McGowan et al.,Cardiovasc Drugs Ther.(2017) 31:63-75.
- [0118] 15.Minotti et al.,(2004) Pharmacol.Rev.56 (2) :185-229.
- [0119] 16.Gewirtz D.A.,(1999) Biochem Pharmacol 57:727-741.
- [0120] 17.Lowenberg,B.et al.,(2009) ,NEJM 361:1235-48.
- [0121] 18.Kuo,Y.H.,et al.,Cancer Cell,(2006) 9 (1) :p.57-68.
- [0122] 19.L.Xue,J.A.Pulikkan,P.J.Valk,L.H.Castilla,Blood 124,426-436 (2014) .

外周血-白细胞计数

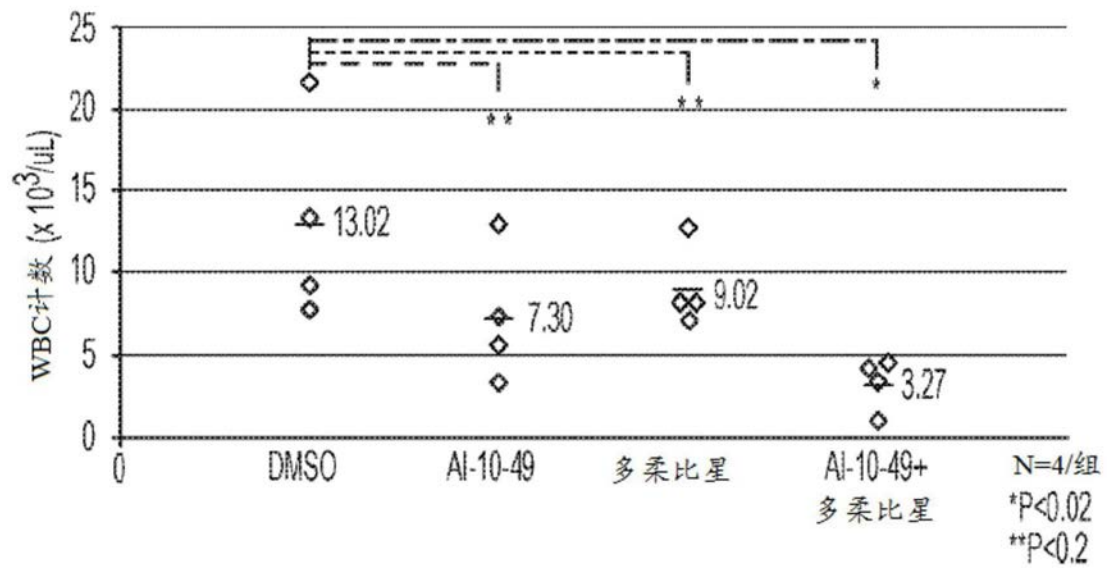


图1

外周血-c-kit+细胞

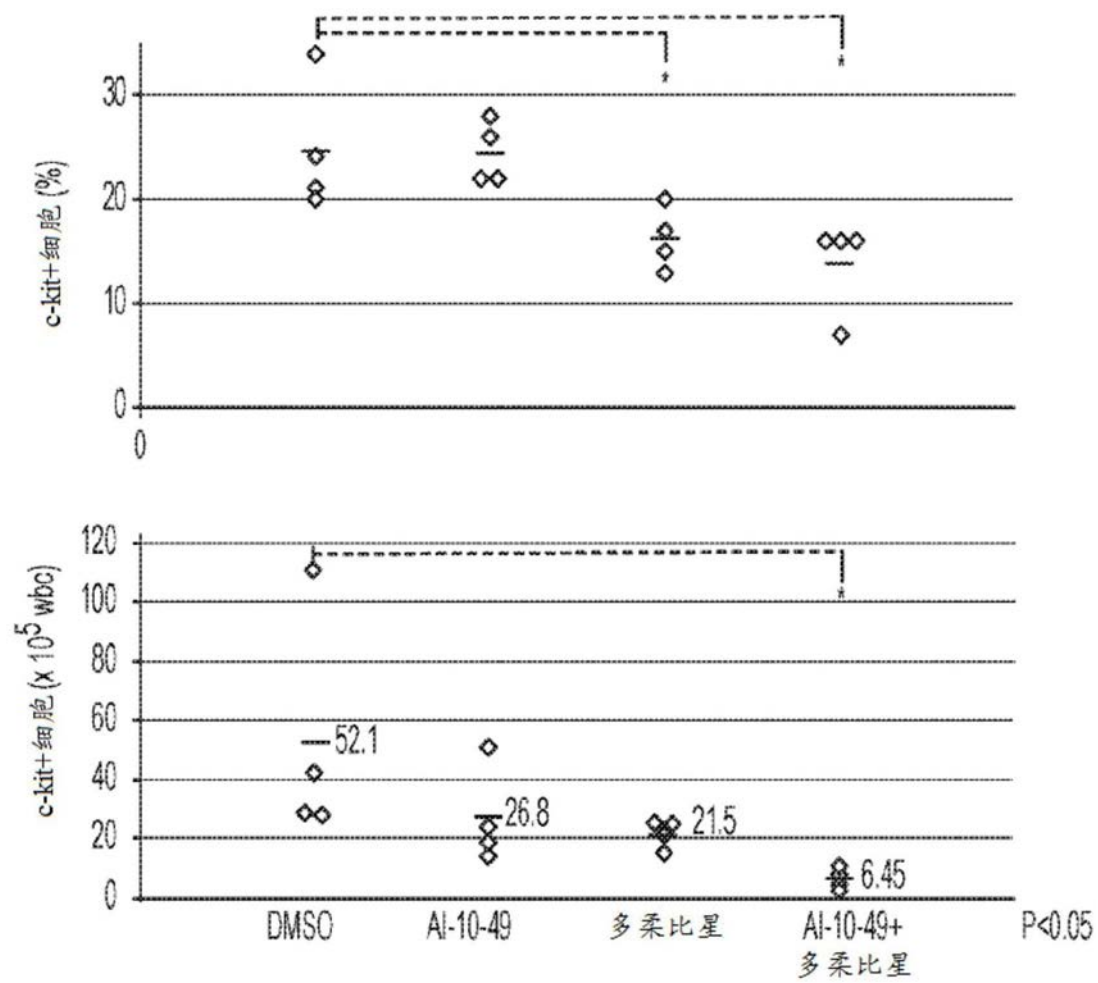


图2

脾细胞数目

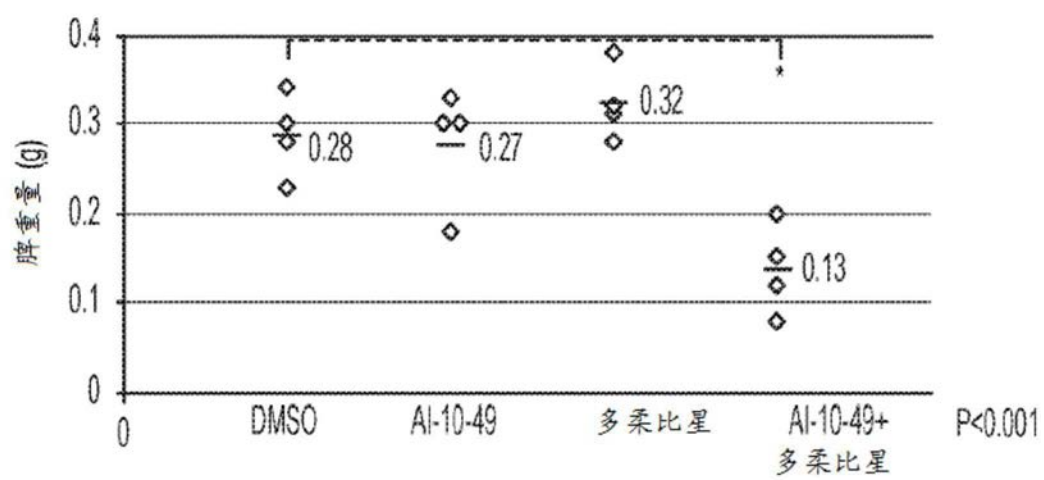
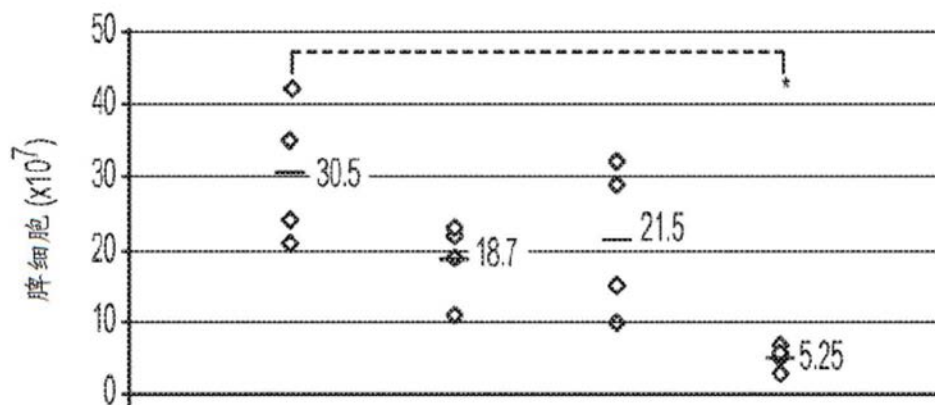


图3

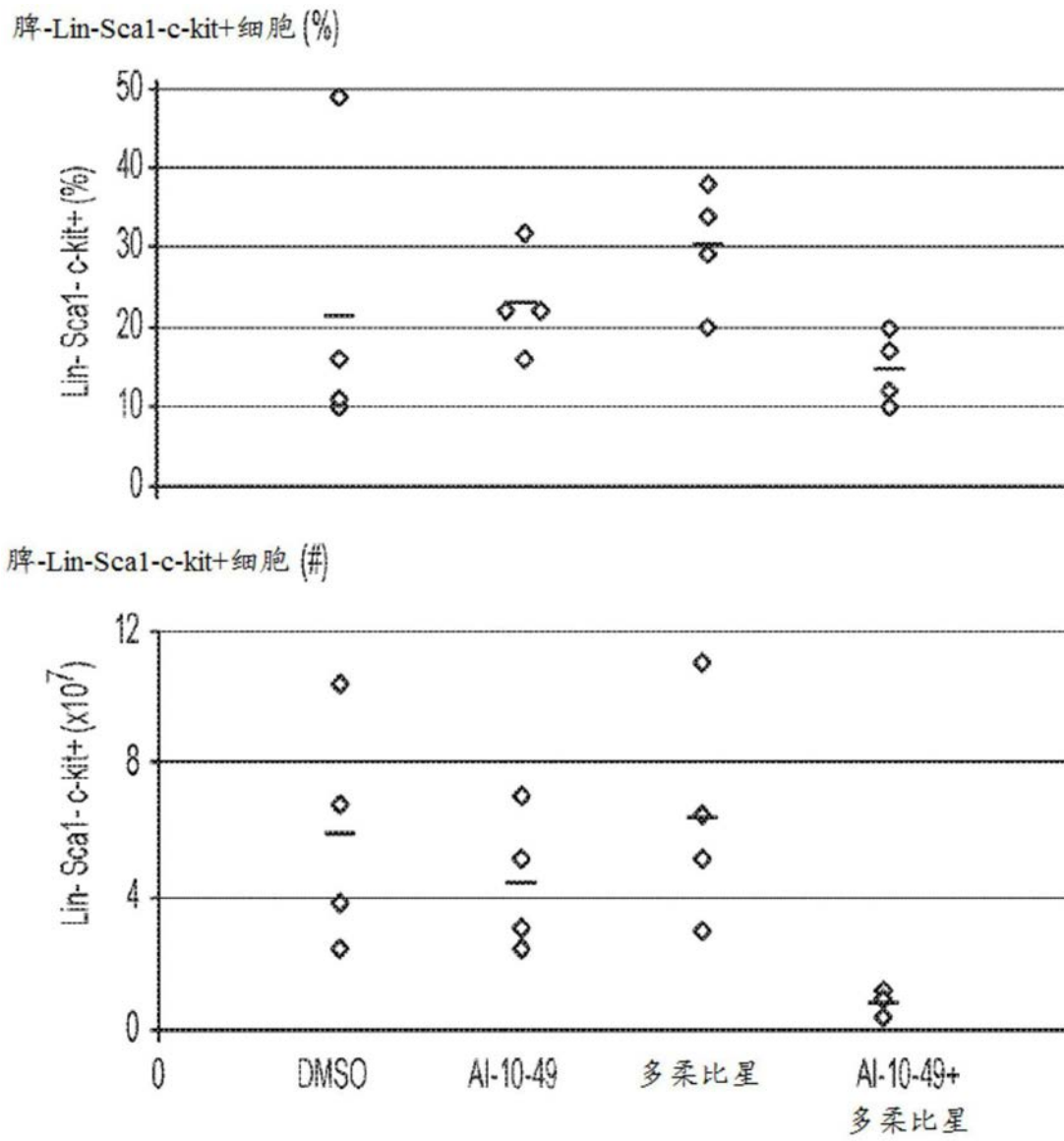


图4

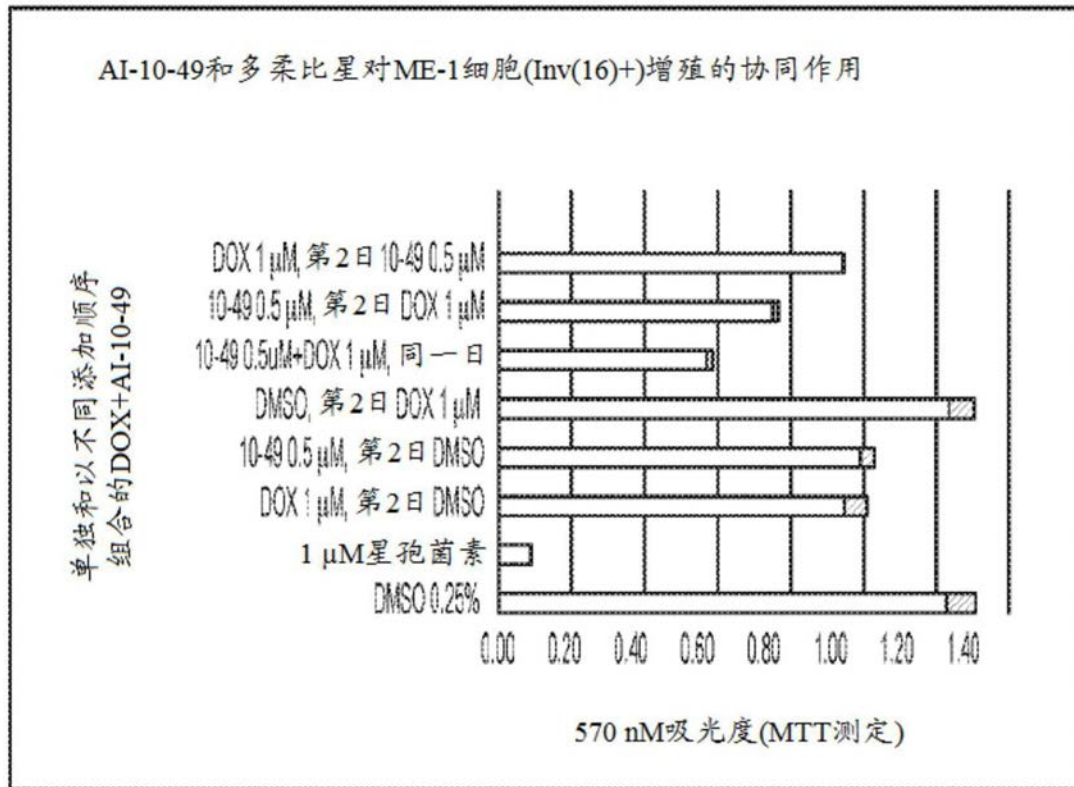


图5