



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 110143953 B

(45) 授权公告日 2022. 08. 26

(21) 申请号 201910535271.X

(22) 申请日 2014.01.22

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110143953 A

(43) 申请公布日 2019.08.20

(30) 优先权数据
61/755,878 2013.01.23 US

(62) 分案原申请数据
201480012588.0 2014.01.22

(73) 专利权人 加利福尼亚大学董事会
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 何飏 M·曼 D·M·贾伯朗斯

(74) 专利代理机构 北京龙双利达知识产权代理
有限公司 11329

专利代理师 肖鹏 王君

(51) Int. Cl.
C07D 409/04 (2006.01)
C07D 231/06 (2006.01)
A61K 31/415 (2006.01)
A61K 31/4155 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件
US 7714014 B2,2010.05.11
CN 101370498 A,2009.02.18
Martin,等.Recent patents for Hedgehog pathway inhibitors for the treatment of malignancy..《Expert Opinion on Therapeutic Patents》.2009,第19卷(第8期),
William,等.A widely useful chiral stationary phase for the high-performance liquid chromatography separation of enantiomers.《Journal of the American Chemical Society》.1980,第103卷(第13期),
Neeraj,等.Structure-Activity Relationships and Cancer-Cell Selective Toxicity of Novel Inhibitors of Glioma-Associated Oncogene Homologue 1 (Gli1) Mediated Transcription..《Journal of Medicinal Chemistry》.2009,第52卷(第14期),

审查员 刘冬

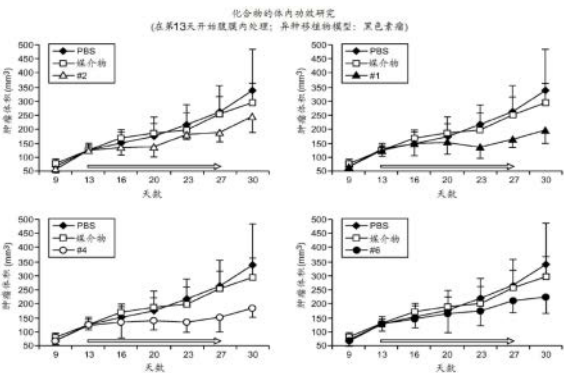
权利要求书1页 说明书43页 附图25页

(54) 发明名称

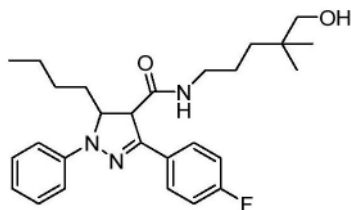
由小分子靶向人癌症中的GLI蛋白

(57) 摘要

本公开涉及由小分子靶向人癌症中的GLI蛋白。本公开提供用于诊断和治疗表达GLI多肽的癌症的组合物、药物制剂和方法。所公开的组合物和药物制剂可包含一种或多种含有吡唑基的化合物、或其类似物或衍生物。



1. 一种化合物4的分离的对映体以及其盐：



(化合物 4)

其中在 $\text{CDCl}_3\text{-d}_1/\text{D}_2\text{O-d}_2$, 所述分离的对映体的 ^1H NMR的光谱在4.34ppm具有双峰, 所述双峰的J值为4.4Hz, 且

其中通过使用直链淀粉三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)手性静止相, 二氧化碳: 甲醇85:15, v/v流动相, 2.55ml/分钟的 CO_2 流速, 0.45ml/分钟的共溶剂流速, 39.7°C的柱温度, 186巴的前压力, 150巴的背压力的手性HPLC, 所述分离的对映体与所述分离的对映体的对映体相比洗脱较慢。

2. 一种药物组合物, 其包含:

- (i) 如权利要求1所述的化合物4的分离的对映体以及其盐; 以及
- (ii) 药学上可接受的载体。

3. 一种药物组合物, 其包含:

- (i) 如权利要求1所述的化合物4的分离的对映体以及其盐; 以及
- (ii) 化学治疗剂。

4. 一种药物组合物, 其包含:

- (i) 如权利要求1所述的化合物4的分离的对映体以及其盐; 以及
- (ii) 选自埃罗替尼、培美曲塞、LY294002、SB431542以及顺铂的治疗剂。

5. 如权利要求1所述的化合物4的分离的对映体以及其盐或如权利要求2-4中任一项所述的药物组合物用于制造用以治疗癌症的药剂的用途。

6. 如权利要求5所述的用途, 其中所述癌症特征在于表达GLI蛋白。

由小分子靶向人癌症中的GLI蛋白

[0001] 本申请是申请日为2014年1月22日、中国申请号为201480012588.0、发明名称为“由小分子靶向人癌症中的GLI蛋白”的发明申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 按照美国法典第35篇第119条(e)款,本申请要求2013年1月23日提交的美国临时专利申请序列号61/755,878的申请日的优先权;所述申请的公开内容以引用的方式并入本文。

[0004] 引言

[0005] Hedgehog (Shh或Hh)、WNT、FGF和BMP信号传导途径在胚胎发生、组织再生和癌发生期间相互连接在一起。Hh信号传导途径的异常活化在多种人肿瘤中导致病理学后果。Hedgehog是通过结合包含PATCHED1 (ptch1) 和SMOOTHENED (smo) 的跨膜蛋白质复合物且引发胞质信号转导事件级联(包括导致GLI锌指转录因子的转录的蛋白激酶A的抑制)来起始Hh信号转导的分泌的糖蛋白。锌指转录因子的GLI家族然后将细胞外Hh刺激物以背景依赖性和细胞类型特异性方式翻译成所定义的转录程序(Ruiz I Altaba等,2002, Nat.Rev.Cancer2:361-72)。

[0006] 几种蛋白质(包括GLI蛋白)参与介导Hh信号传导(Katoh和Katoh,2005,Cancer Biol.Ther.4:1050-4)。脊椎动物具有至少三种不同的GLI蛋白,GLI(还被称为GLI1)、GLI2和GLI3。这些蛋白质是锌指转录因子的GLI家族的成员,并且与果蝇(*Drosophila*)翅脉中断(*Cubitus interruptus*) (Ci)和秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)性别决定基因 *tra-1* 共有高度保守的C₂-H₂锌指结构域(具有五个锌指DNA结合基序)(Hui等,1994, Dev.Biol.162:402-13)。

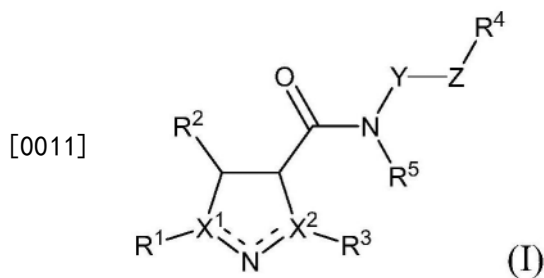
[0007] 虽然关于果蝇和鼠发育中的Hh信号传导已有许多了解,但是对于在人癌症中响应于Hh信号传导和GLI活性而活化的分子机制和肿瘤发生程序的了解仍然十分有限。Hh相关癌症的共同特性是一种或多种GLI蛋白的升高的表达水平。

发明内容

[0008] 本公开总体上涉及抑制肿瘤发生、肿瘤生长和肿瘤存活组合物和方法。所述组合物包含抑制Hedgehog和GLI信号传导途径的小分子化合物。所述组合物适用于治疗其中过量表达GLI蛋白的癌症。

[0009] 所述实施方案提供适用于检测和治疗其中过量表达GLI蛋白的多种癌症的化合物、药物组合物、试剂盒和方法。所述癌症包括肺癌、NSCLC、乳癌、结肠癌、间皮瘤、黑色素瘤、肉瘤、前列腺癌、卵巢癌、肾癌、食道癌、胃癌、肝细胞癌、鼻咽癌、胰腺癌、神经胶质瘤以及其他。

[0010] 本公开的方面包括一种式(I)的化合物以及其盐、水合物、溶剂化物、立体异构体和前药:



[0012] 其中

[0013] X^1 和 X^2 各自独立地是N或C,其中 X^1 和 X^2 中的一个为N并且 X^1 和 X^2 中的一个为C,以使环N在 X^1 和 X^2 中的任何一个为C的情况下形成双键;

[0014] R^1 是芳基或取代的芳基;

[0015] R^2 选自芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基以及烷基;

[0016] R^3 是芳基或取代的芳基;

[0017] Y是直接键或 C_1-C_4 烷基;

[0018] Z是 C_1-C_4 烷基或芳基;

[0019] R^4 是-OH;以及

[0020] R^5 是氢或 C_1-C_6 烷基。

[0021] 在所述化合物的一些实施方案中, X^1 是N并且 X^2 是C。

[0022] 在所述化合物的一些实施方案中, X^1 是C并且 X^2 是N。

[0023] 在所述化合物的一些实施方案中, R^1 是芳基。

[0024] 在所述化合物的一些实施方案中, R^2 选自芳基、取代的芳基、杂芳基以及烷基。

[0025] 在所述化合物的一些实施方案中, R^2 选自杂芳基和烷基。

[0026] 在所述化合物的一些实施方案中, R^3 是芳基。

[0027] 在所述化合物的一些实施方案中, R^3 是取代的芳基。

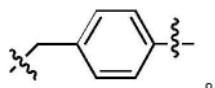
[0028] 在所述化合物的一些实施方案中, R^5 是氢。

[0029] 在所述化合物的一些实施方案中,Y是 C_1-C_4 烷基并且Z是 C_1-C_4 烷基。

[0030] 在所述化合物的一些实施方案中,Y是 C_1-C_4 烷基并且Z是 C_1-C_4 烷基,以使得Y和Z形成 $-(CH_2)_3-C(CH_3)_2-CH_2-$ 。

[0031] 在所述化合物的一些实施方案中,Y是 C_1-C_4 烷基并且Z是芳基。

[0032] 在所述化合物的一些实施方案中,Y是 C_1-C_4 烷基并且Z是芳基,以使得Y和Z形成



[0033] 在所述化合物的一些实施方案中, R^1 是芳基, R^2 是杂芳基,并且 R^3 是芳基。

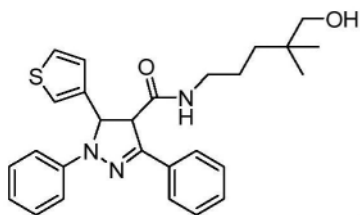
[0034] 在所述化合物的一些实施方案中, R^1 是芳基, R^2 是烷基,并且 R^3 是取代的芳基。

[0035] 在所述化合物的一些实施方案中, R^1 是芳基, R^2 是芳基,并且 R^3 是芳基。

[0036] 在所述化合物的一些实施方案中, R^1 是芳基, R^2 是取代的芳基,并且 R^3 是取代的芳基。

[0037] 在所述化合物的一些实施方案中,所述化合物是1,3-二苯基-5-噻吩-3-基-4,5-二氢-1H-吡唑-4-甲酸(5-羟基-4,4-二甲基-戊基)-酰胺,其具有结构:

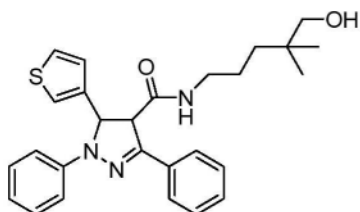
[0038]



(化合物 1)。

[0039] 在所述化合物的一些实施方案中,所述化合物是1,3-二苯基-5-噻吩-3-基-4,5-二氢-1H-吡唑-4-甲酸(5-羟基-4,4-二甲基-戊基)-酰胺,其具有结构:

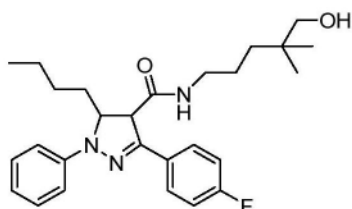
[0040]



(化合物 1)。

[0041] 在所述化合物的一些实施方案中,所述化合物是3-(4-氟-苯基)-1-苯基-5-丁基-4,5-二氢-1H-吡唑-4-甲酸(5-羟基-4,4-二甲基-戊基)-酰胺,其具有结构:

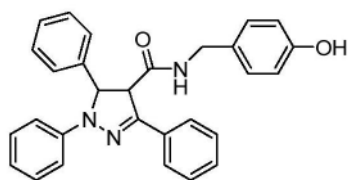
[0042]



(化合物 4)。

[0043] 在所述化合物的一些实施方案中,所述化合物是1,3,5-三苯基-4,5-二氢-1H-吡唑-4-甲酸4-羟基-苄基酰胺,其具有结构:

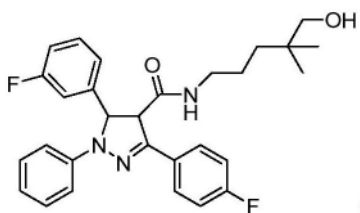
[0044]



(化合物 2)。

[0045] 在所述化合物的一些实施方案中,所述化合物是3-(4-氟-苯基)-5-(3-氟-苯基)-1-苯基-4,5-二氢-1H-吡唑-4-甲酸(5-羟基-4,4-二甲基-戊基)-酰胺,其具有结构:

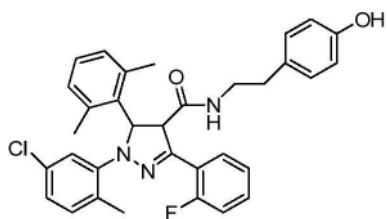
[0046]



(化合物 6)。

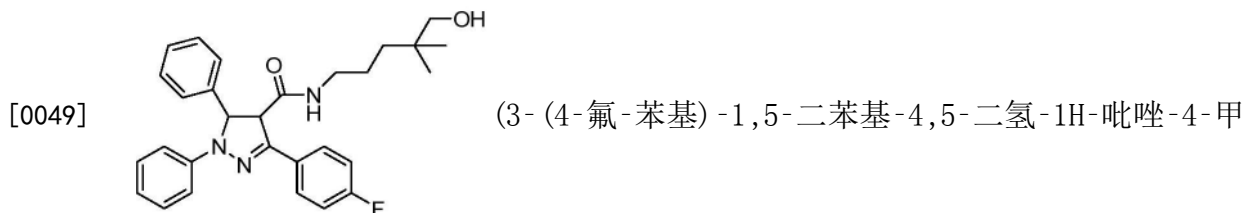
[0047] 在所述化合物的一些实施方案中,所述化合物选自:

[0048]



(1-(5-氯-2-甲基-苯基)-5-(2,6-二甲基-苯基)-3-

(2-氟-苯基)-4,5-二氢-1H-吡唑-4-甲酸[2-(4-羟基-苯基)-乙基]-酰胺,化合物3),以及



酸(5-羟基-4,4-二甲基-戊基)-酰胺,化合物5)。

[0050] 本公开的方面包括一种药物组合物,其包含如上所述的式(I)的化合物和药学上可接受的载体。

[0051] 本公开的方面包括一种药物组合物,其包含如上所述的式(I)的化合物和化学治疗剂。

[0052] 本公开的方面包括一种药物组合物,其包含如上所述的式(I)的化合物以及选自埃罗替尼、培美曲塞、LY294002、SB431542和顺铂的化学治疗剂。

[0053] 所述实施方案还提供用于使用式(I)的化合物的方法。在某一实施方案中,提供一种用于治疗患有癌性病状的受试者的方法。所述方法包括以下步骤:向所述受试者施用治疗有效量的式(I)的化合物或包含式(I)的化合物的药物组合物,其中所述癌性病状特征在于表达GLI多肽并且其中所述施用步骤产生所述受试者的治疗。

[0054] 此外,所述实施方案提供式(I)的化合物或包含式(I)的化合物的药物组合物用于在医学疗法中使用。此外,所述实施方案提供式(I)的化合物或包含式(I)的化合物的药物组合物用于在癌症的治疗中使用。此外,所述实施方案提供式(I)的化合物或包含式(I)的化合物的药物组合物在制造用于治疗癌症的药剂中的用途。

[0055] 附图简述

[0056] 图1示出根据本公开的实施方案,使用小鼠异种移植物模型(黑色素瘤MelJuso),化合物1、2、4和6的体内功效研究。在用所施用的化合物治疗之后,肿瘤重量显著降低。结果是平均值±SD(误差线)。箭头指示注射周期。

[0057] 图2示出根据本公开的实施方案,使用小鼠异种移植物模型(间皮瘤MS-1),化合物1和4的体内功效研究。在用所施用的化合物治疗之后,肿瘤重量显著降低。结果是平均值±SD(误差线)。箭头指示注射周期。

[0058] 图3示出根据本公开的实施方案,使用小鼠异种移植物模型(肺癌A549),化合物1和4的体内功效研究。在用所施用的化合物治疗之后,肿瘤重量显著降低。结果是平均值±SD(误差线)。箭头指示注射周期。

[0059] 图4示出根据本公开的实施方案,通过化合物1、2、4和6调控hGli1、hGli2、hGli3、hHHIP、hWnt2、hAxin2、hEGFR和hCyclin D1活性。

[0060] 图5示出根据本公开的实施方案,在体内治疗之后化合物1、2、4和6对小鼠的白细胞群体的作用。在完成体内研究之后,收集来自所有治疗组的每个动物的白细胞(WBC:白细胞,NE:中性粒细胞,LY:淋巴细胞,MO:单核细胞,E0:嗜酸性粒细胞,BA:嗜碱性粒细胞),并且通过血细胞计数器对白细胞群体进行计数。结果是平均值±SD(误差线)。

[0061] 图6示出根据本公开的实施方案,在体内研究的药物施用周期期间,化合物1、2、4和6对小鼠的体重的作用。

[0062] 图7示出根据本公开的实施方案,在毒性研究中不同剂量的化合物4和6对小鼠的体重的作用。将所述化合物以3种不同剂量:25、50和100mg/kg体重在腹部中腹膜内注射至动物,进行连续6天。每个给药组包含3只小鼠。使用天平测量小鼠的体重。结果是平均值±SD(误差线)。

[0063] 图8示出根据本公开的实施方案,使用细胞毒性测定和来自小鼠的肝细胞、脾细胞、肾细胞和心脏细胞筛选化合物2。

[0064] 图9示出根据本公开的实施方案,使用细胞毒性测定和来自小鼠的肝细胞、脾细胞、肾细胞和心脏细胞筛选化合物1。

[0065] 图10示出根据本公开的实施方案,使用细胞毒性测定和来自小鼠的肝细胞、脾细胞、肾细胞和心脏细胞筛选化合物4。

[0066] 图11示出根据本公开的实施方案,使用细胞毒性测定和来自小鼠的肝细胞、脾细胞、肾细胞和心脏细胞筛选化合物6。

[0067] 图12示出根据本公开的实施方案,埃罗替尼(特罗凯)和化合物4在肺癌细胞中的协同作用。

[0068] 图13示出根据本公开的实施方案,埃罗替尼(特罗凯)和化合物4在间皮瘤细胞中的协同作用。

[0069] 图14示出根据本公开的实施方案,PI3K抑制剂LY294002和化合物6在肺癌细胞中的协同作用。

[0070] 图15示出根据本公开的实施方案,PI3K抑制剂LY294002和化合物6在间皮瘤细胞中的协同作用。

[0071] 图16示出根据本公开的实施方案,TGFβ抑制剂SB431542和化合物6在肺癌细胞中的协同作用。

[0072] 图17示出根据本公开的实施方案,培美曲塞(爱宁达)和化合物6在间皮瘤细胞中的协同作用。

[0073] 图18示出根据本公开的实施方案,对于不同癌细胞系,Gli抑制剂化合物4以及其两种纯化对映体(P1和P2)中的每一种的细胞毒性IC₅₀值(μM)。

[0074] 图19示出根据本公开的实施方案,Gli抑制剂化合物4的功效与非小细胞肺癌(NSCLC)细胞中的Gli表达的相关性的图。

[0075] 图20示出根据本公开的实施方案,Gli抑制剂化合物4-对映体P2的功效与癌细胞中的Gli表达的相关性的图。

[0076] 图21示出根据本公开的实施方案,荧光素酶活性(%)的图,其示出Gli抑制剂化合物4-对映体P2在体外抑制NSCLC细胞系A549中的Gli/TAF依赖性转录活性。

[0077] 图22示出根据本公开的实施方案,Gli下游靶标的表达水平的图,其示出Gli抑制剂化合物4-对映体P2在体外抑制NSCLC细胞中的Gli下游靶标。

[0078] 图23示出根据本公开的实施方案,基因表达的图,其示出Gli抑制剂化合物4-对映体P2在体外抑制间皮瘤细胞中的Gli下游靶标。

[0079] 图24示出根据本公开的实施方案,示出Gli抑制剂化合物4-对映体P2在体外(小鼠异种移植模型:间皮瘤MS-1)抑制肿瘤中的间皮瘤细胞中的Gli下游靶标的免疫组织化学图像。

[0080] 图25示出根据本公开的实施方案,示出GDC0449 (Smo抑制剂) 与Gli抑制剂化合物4-对映体P2在体外抑制间皮瘤细胞的生长中的协同作用。

[0081] 详述

[0082] 本公开的方面包括适用于检测和治疗其中过量表达GLI蛋白的多种癌症的化合物、药物组合物、试剂盒和方法。所述组合物包含抑制Hedgehog和GLI信号传导途径的小分子化合物。

[0083] 在描述本发明和本发明的具体示例性实施方案之前,应当理解本发明不限于所述的具体实施方案,因而,当然也可有所变化。还应了解本文所用的术语仅出于描述具体实施方案的目的,并且不意图具有限制性,因为本发明的范围将仅受限于随附权利要求。

[0084] 如果提供一定范围的值,那么应理解除非上下文另外清楚地规定,否则所述实施方案内涵盖所述范围的上限与下限之间的各插入值(至下限单位的十分之一)和在所陈述的范围中的任何其他陈述值或插入值。所述实施方案内还涵盖可独立地包括于较小范围中的这些较小范围的上限和下限,从属于所陈述的范围中的任何具体排除的限值。当所述范围包括一个或两个限值时,排除那些所包括的限值之一或两者的范围也包括在所述实施方案中。

[0085] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语都具有与本发明所属领域中的普通技术人员通常所理解的相同含义。尽管在实践或测试本发明中还可使用与本文所述的那些方法和材料类似或等效的任何方法和材料,但是现在描述示例性方法和材料。

[0086] 在本说明书中引用的所有公布和专利都以引用的方式并入本文,所述引用的程度就如同已具体地和个别地指示将各个别公布或专利以引用的方式并入一般,并且以引用的方式并入本文来公开和描述与所公布引用的内容相关的方法和/或材料。引用任何公布都是因为它的公开内容在提交日期之前,而不应解释为认可本发明由于先前发明而无权先于所述公布。此外,所提供的公布日期可不同于可能需要独立确认的实际公布日期。

[0087] 应注意,除非上下文另有明确规定,否则本文中和所附权利要求中使用的单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数个指示物。因此,例如,提及一种“化合物”包括本领域的技术人员已知的多种这类化合物及其等效物等。

[0088] 术语

[0089] 除非另外定义,否则本文所使用的所有技术性和科学性术语具有本发明所属领域中的普通技术人员通常所理解的含义。以下参考文献向技术人员提供在本发明中使用的许多术语的一般定义:Singleton等,Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (第2版1994);The Cambridge Dictionary of Science and Technology(Walker编辑,1988);The Glossary of Genetics,第5版,R.Rieger等(编辑),Springer Verlag(1991);以及Hale和Marham,The Harper Collins Dictionary of Biology(1991)。如本文所用,除非另外指明,以下术语具有赋予其的含义。

[0090] 如本文所用,术语“烷基”是指直链或支链烃基,并且可包括具有指定数目的碳原子的二价和多价基团(即, C_1-C_{10} 意指一至十个碳)。饱和烃基的实例包括如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基、其同系物和异构体(例如正戊基、正己基、正庚基、正辛基等)的基团。

[0091] 如本文所用,术语“烯基”是指具有一个或多个双键的不饱和烷基。烯基的实例包

括乙烯基、2-丙烯基、巴豆基、2-异戊烯基、2-(丁二烯基)、2,4-戊二烯基以及3-(1,4-戊二烯基),以及高级同系物和异构体。

[0092] 如本文所用,术语“炔基”是指具有一个或多个三键的不饱和烷基。炔基的实例包括乙炔基(ethynyl/acetylenyl)、1-丙炔基、1-和2-丁炔基,以及高级同系物和异构体。

[0093] 如本文所用,术语“芳基”是指具有5-12个环成员的多不饱和的芳香族烃取代基,其可以是单个环或稠合在一起或共价连接的多个环(最多三个环)。芳基的非限制性实例包括苯基、1-萘基、2-萘基、4-联苯基和苄基。其他芳基也适用于所述实施方案中。

[0094] 如本文所用,术语“环烷基”是指具有3至15个碳和可稠合或共价连接的1至3个环的饱和环烃。适用于所述实施方案中的环烷基包括但不限于环戊基、环己基、环庚基和环辛基。适用于所述实施方案中的双环烷基包括但不限于[3.3.0]双环辛烷基、[2.2.2]双环辛烷基、[4.3.0]双环壬烷、[4.4.0]双环癸烷(蔡烷)、螺[3.4]辛烷基、螺[2.5]辛烷基等。

[0095] 如本文所用,术语“环烯基”是指具有3至15个碳和可稠合或共价连接的1至3个环的不饱和环烃。适用于所述实施方案中的环烯基包括但不限于环戊烯基、环己烯基、环庚烯基和环辛烯基。双环烯基也适用于所述实施方案中。

[0096] 如本文所用,术语“卤素”是指包括氟(F)、氯(Cl)、溴(Br)和碘(I)的元素。

[0097] 如本文所用,术语“杂芳基”是指具有5-12个环成员的多不饱和的芳香族烃取代基,其可以是单个环或稠合在一起或共价连接的多个环(最多三个环),并且其在环中具有至少一个杂原子,如N、O或S。杂芳基可通过杂原子连接至分子的其余部分。杂芳基的非限制性实例包括1-吡咯基、2-吡咯基、3-吡咯基、3-吡唑基、2-咪唑基、4-咪唑基、吡嗪基、2-噁唑基、4-噁唑基、2-苯基-4-噁唑基、5-噁唑基、3-异噁唑基、4-异噁唑基、5-异噁唑基、2-噻唑基、4-噻唑基、5-噻唑基、2-呋喃基、3-呋喃基、2-噻吩基、3-噻吩基、2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、2-嘧啶基、4-嘧啶基、5-苯并噻唑基、嘌呤基、2-苯并咪唑基、5-吡咯基、1-异喹啉基、5-异喹啉基、2-喹啉基、5-喹啉基、3-喹啉基和6-喹啉基。适用于所述实施方案中的另外杂芳基包括吡啶基N-氧化物、四唑基、苯并呋喃基、苯并噻吩基、吡唑基或取代的任何基团,尤其是单-或二-取代的。

[0098] 如本文所用,术语“杂环基”是指饱和环烃,其具有3至15个环成员和可稠合或共价连接的1至3个环,并且其在环中具有至少一个杂原子,如N、O或S。另外,杂原子可占据杂环连接至分子的其余部分所处的位置处。杂环基的实例包括1-(1,2,5,6-四氢吡啶基)、1-哌啶基、2-哌啶基、3-哌啶基、4-吗啉基、3-吗啉基、四氢呋喃-2-基、四氢呋喃-3-基、四氢噻吩-2-基、四氢噻吩-3-基、1-哌嗪基、2-哌嗪基等。

[0099] 如本文所用,术语“立体异构体”是指所述实施方案的具有不对称碳原子(光学中心)或双键的化合物。外消旋体、非对映体、对映体、几何异构体(即,顺式/反式异构体)和各个立体异构体全部意图涵盖在所述实施方案的范围内。

[0100] “标记”或“可检测部分”是可通过光谱、光化学、生物化学、免疫化学、化学或其他物理方式检测的组合物。例如,有用的标记包括 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{32}P 、荧光染料、电子致密试剂、酶(例如,如在ELISA中常用的)、生物素、地高辛或半抗原和蛋白质或可例如通过将放射性标记并入至小分子化合物而可检测的其他实体。标记可在任何位置处并入化合物中。

[0101] 术语“药学上可接受的”是指当向受试者(如人受试者)施用是生理上可耐受的并且通常不会产生过敏或类似不良反应的组合物。例如,术语“药学上可接受的”还可意指

由联邦或州政府的监管机构批准或在美国药典或其他通常认可的药典中列出以用于动物(如人)的。

[0102] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,以指代氨基酸残基的聚合物。所述术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人工化学模拟物的氨基酸聚合物,并且适用于天然存在的氨基酸聚合物、含有修饰的残基的那些和非天然存在的氨基酸聚合物。

[0103] 如本文所用,术语“前药”是指容易在生理条件下发生化学变化以提供所述实施方案的化合物的化合物。另外,前药可在离体环境中通过化学或生物化学方法转化成所述实施方案的化合物。例如,当放置在具有适合的酶或化学试剂的经皮贴剂贮库中时,前药可缓慢地转化为所述实施方案的化合物。

[0104] 如本文所用,术语“盐”是指取决于在本文所述的化合物上发现的取代基用相对无毒的酸或碱制备的化合物的盐。当所述实施方案的化合物含有相对酸性的官能度时,可通过纯净地或在适合的惰性溶剂中使中性形式的所述化合物与足量的所需碱相接触来获得碱加成盐。药学上可接受的碱加成盐的实例包括钠、钾、钙、铵、有机氨基或镁盐,或类似盐。当所述实施方案的化合物含有相对碱性的官能度时,可通过纯净地或在适合的惰性溶剂中使中性形式的所述化合物与足量的所需酸相接触来获得酸加成盐。药学上可接受的酸加成盐的实例包括衍生自无机酸如盐酸、氢溴酸、硝酸、碳酸、一氢碳酸、磷酸、一氢磷酸、二氢磷酸、硫酸、一氢硫酸、氢碘酸或亚磷酸等的那些,以及衍生自相对无毒的有机酸如乙酸、丙酸、异丁酸、马来酸、丙二酸、苯甲酸、琥珀酸、辛二酸、富马酸、扁桃酸、邻苯二甲酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、柠檬酸、酒石酸、甲磺酸等的盐。还包括氨基酸如精氨酸等的盐等,以及有机酸如葡萄糖醛酸或半乳糖醛酸等的盐(参见,例如,Berge, S.M.等,“Pharmaceutical Salts”, Journal of Pharmaceutical Science, 1977, 66, 1-19)。所述实施方案的某些特定化合物含有允许化合物转化成碱或酸加成盐的碱性和酸性官能度两者。

[0105] 化合物的中性形式可通过使盐与碱或酸相接触并且以常规方式分离母体化合物而再生。化合物的母体形式在某些物理特性(如在极性溶剂中的溶解度)方面不同于各种盐形式,但在其他方面,盐出于所述实施方案的目的等效于化合物的母体形式。

[0106] 如本文所用,术语“溶剂化物”是指所述实施方案的与溶剂复合的化合物。可与所述实施方案的化合物形成溶剂化物的溶剂包括常见有机溶剂如醇(甲醇、乙醇等)、醚、丙酮、乙酸乙酯、卤化溶剂(二氯甲烷、氯仿等)、己烷和戊烷。另外的溶剂包括水。当水是络合溶剂时,复合物被称为“水合物”。

[0107] “取代的”是指其中一个或多个氢原子各自独立地被相同或不同取代基替代的基团。典型的取代基包括但不限于, $-X$ 、 $-R^{14}$ 、 $-O-$ 、 $=O$ 、 $-OR^{14}$ 、 $-SR^{14}$ 、 $-S^-$ 、 $=S$ 、 $-NR^{14}R^{15}$ 、 $=NR^{14}$ 、 $-CX_3$ 、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 、 $-OCN$ 、 $-SCN$ 、 $-NO$ 、 $-NO_2$ 、 $=N_2$ 、 $-N_3$ 、 $-S(O)_2O^-$ 、 $-S(O)_2OH$ 、 $-S(O)_2R^{14}$ 、 $-OS(O)_2O^-$ 、 $-OS(O)_2R^{14}$ 、 $-P(O)(O^-)_2$ 、 $-P(O)(OR^{14})(O^-)$ 、 $-OP(O)(OR^{14})(OR^{15})$ 、 $-C(O)R^{14}$ 、 $-C(S)R^{14}$ 、 $-C(O)OR^{14}$ 、 $-C(O)NR^{14}R^{15}$ 、 $-C(O)O^-$ 、 $-C(S)OR^{14}$ 、 $-NR^{16}C(O)NR^{14}R^{15}$ 、 $-NR^{16}C(S)NR^{14}R^{15}$ 、 $-NR^{17}C(NR^{16})NR^{14}R^{15}$ 以及 $-C(NR^{16})NR^{14}R^{15}$, 其中每个X独立地是卤素,并且其中“ R^{14} ”、“ R^{15} ”、“ R^{16} ”以及“ R^{17} ”独立地是氢、烷基、取代的烷基、芳基、芳烷基、环烷基、环杂烷基、取代的环杂烷基、杂烷基、取代的杂烷基、杂芳基、取代的杂芳基、杂芳基烷基、取代的杂芳基烷基、 $-NR^{18}R^{19}$ 、 $-C(O)R^{18}$ 或 $-S(O)_2R^{18}$, 或任选地 R^{18} 和 R^{19} 与它们两者所连接的原子一起形成环杂烷基或取代的环杂

烷基环,并且其中“R¹⁸”、“R¹⁹”以及“R²²”各自独立地选自由以下组成的组:氢、取代的或未取代的烷基、取代的或未取代的芳基、取代的或未取代的芳烷基、取代的或未取代的环烷基、取代的或未取代的环杂烷基、取代的或未取代的杂烷基、取代的或未取代的杂芳基以及取代的或未取代的杂芳基烷基。

[0108] 据了解,在以上定义的所有取代的基团中,通过定义具有针对本身的其他取代基的取代基(例如,具有本身被取代的芳基取代的取代的芳基作为取代基的取代的芳基,其进一步被取代的芳基取代等)得到的聚合物不意图包括在本文中。在这类情况下,这类取代的最大数目是三。例如,取代的芳基的连续取代限于取代的芳基- (取代的芳基) -取代的芳基。

[0109] 如本文所用的“生物样品”是包含核酸或多肽的生物组织或流体的样品。这类样品通常来自人,但包括从非人灵长类动物或啮齿类动物(例如小鼠和大鼠)分离的组织。生物样品还可包括组织如活检和尸检样品的切片、出于组织学目的取得的冷冻切片、血液、血浆、血清、痰、粪便、眼泪、粘液、毛发、皮肤等。生物样品还包括源自患者组织的外植体与原代和/或转化的细胞培养物。“生物样品”还指来自动物的细胞或细胞群体或大量组织或流体。大多数情况下,生物样品已经从动物除去,但术语“生物样品”也可指在体内分析的细胞或组织,即不从动物除去。通常,“生物样品”将含有来自动物的细胞,但所述术语还可指可用于测量与癌症相关的多核苷酸或多肽水平的非细胞生物材料,如血液、唾液或尿液的非细胞级分。许多类型的生物样品可用于所述实施方案中,包括但不限于,组织活检、血液样品、颊刮擦物、唾液样品或乳头溢液。如本文所用,“组织活检”是指从动物(如人)除去以用于诊断分析的组织的量。在患有癌症的患者中,可从肿瘤除去组织,从而允许对肿瘤内的细胞的分析。“组织活检”可指任何类型的活检,如针吸活检、细针活检、手术活检等。

[0110] “提供生物样品”意指获得生物样品以用于在实施方案中描述的方法中使用。大多数情况下,这将通过去除来自患者的细胞的样品来进行,但也可通过使用先前分离的细胞(例如,由另一人在另一时间和/或出于其他目的分离的细胞)或通过体内进行实施方案的方法来完成。具有治疗或结果历史的存档组织将是特别有用的。

[0111] “癌细胞”、“转化的”细胞或在组织培养中的“转化”是指自发或诱导的不一定涉及新遗传物质的摄取的表型变化。虽然转化可由感染转化病毒和并入新基因组DNA或摄取外源DNA产生,但它也可自发产生或在暴露于致癌物之后产生,从而使内源基因突变。转化与表型变化如细胞的无限增殖化、异常生长控制、非形态学变化和/或恶性肿瘤相关(参见, Freshney, Culture of Animal Cells a Manual of Basic Technique (第3版1994))。

[0112] 短语“细胞生长的改变”是指体外或体内细胞生长和增殖特征中的任何变化,如形成病灶、固着独立性、半固体或软琼脂生长、接触抑制的变化和生长的密度限制、生长因子或血清需求的损失、细胞形态的变化、获得或失去无限增殖化、获得或失去肿瘤特异性标志物、当注射至适合的动物宿主中时形成或抑制肿瘤的能力和/或细胞的无限增殖化。参见,例如 Freshney, Culture of Animal Cells a Manual of Basic Technique 第231-241页(第3版1994)。

[0113] “关联该量”意指将已经在一种样品中测定的物质、分子或标记物(如Gli或GLI)的量与在另一样品中测定的相同物质、分子或标记物的量进行比较。在另一样品中测定的相同物质、分子或标记物的量可以对于给定癌症具有特异性的。

[0114] 术语“测定该量”的同义词涵盖在实施方案的范围内,并且包括但不限于检测、测

量、测试或测定分子(如Gli或GLI)的存在、不存在、量或浓度。

[0115] 术语“测定”的同义词涵盖在实施方案的范围内,并且包括但不限于检测、测量、分析、测试或测定实施方案的分子(如GLI多肽)、标记、化合物的存在、不存在、量或浓度。所述术语是指定性测定和定量测定两者。

[0116] 在Shh信号传导、GLI信号传导或Wnt2信号传导的背景下“下调”或“抑制”是指部分或完全阻断Shh信号传导、GLI信号传导或Wnt2信号传导,如通过针对Shh信号传导、GLI信号传导或Wnt2信号传导的已知测定所测量。抑制剂例如是实施方案的化合物。

[0117] 用于治疗的实施方案的化合物的“有效量”、“有效剂量”、“足够量”或其语法等效物是足以改善或以某种方式减少病状的症状或阻止或逆转病状的进展的量。通过施用特定药物组合物改善具体病状(例如,癌症)的症状是指可与药物组合物的施用相关的任何减轻,无论是永久的还是暂时的、持久的还是过渡性的。“有效量”可在体内和体外施用。

[0118] 术语“GLI”是指GLI蛋白的家族。GLI蛋白包括GLI(还被称为GLI1)、GLI2和GLI3。GLI蛋白的实例包括GLI1、GLI2和GLI3。

[0119] “GLI”多肽包括天然存在的或重组形式两者。因此,在一些实施方案中,如本文所述的GLI多肽和GLI亚结构域多肽可包含对应于人GLI序列的序列。因此,示例性GLI在本文提供并且是本领域中已知的。例如,已经表征了几种脊椎动物GLI1、GLI2和GLI3蛋白,例如,人GLI1(GenBank登录号NM_005269、P08151)、小鼠GLI1(GenBank登录号NM_010296、AB025922、AAC09169、P47806)、斑马鱼GLI1(GenBank登录号NM_178296)、人GLI2(GenBank登录号NM_030381;NM_030380;NM_030379、DQ086814)、小鼠GLI2(GenBank登录号XM_922107)、人GLI3(GenBank登录号NM_000168、AJ250408、M57609、P10071、AAY87165)、黑猩猩GLI3(GenBank登录号NM_001034190、AY665272、Q5IS56)、小鼠GLI3(GenBank登录号X95255、NM_008130、NP_032156、Q61602)、大鼠GLI3(GenBank登录号XM_225411)、斑马鱼GLI3(GenBank登录号NM_205728、AY377429)。

[0120] GLI蛋白可以是全长GLI蛋白或它可以是部分GLI蛋白,如GLI蛋白的亚结构域。例如,“GLI3”多肽是指人GLI3的多肽和多态变体、等位基因、突变体,其:(i)具有在至少约100、150、200、250、300、500或更多个氨基酸的区域上与选自GenBank登录号NM_000168、AJ250408、M57609、P10071和AAY87165)的人GLI3具有大于约60%氨基酸序列同一性、65%、70%、75%、80%、85%、90%或91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或更大氨基酸序列同一性的氨基酸序列,(ii)包含氨基酸基序FXXΦΦ(F=苯丙氨酸;X=任何残基;Φ=任何疏水性残基),如氨基酸序列FDAII,(iii)包含转录活化结构域,(iv)结合GLI DNA结合位点和/或(v)结合TAF。

[0121] 术语“GLI蛋白活性”是指GLI信号传导,并且包括例如通过GLI转录活化下游基因、GLI蛋白与GLI DNA结合位点的结合以及GLI蛋白与其他蛋白质例如TAF或共活化剂,如CBP(Creb蛋白结合蛋白)的结合。

[0122] 术语“Gli”是指编码GLI蛋白的基因。因此,Gli1、Gli2和Gli3是分别编码GLI1、GLI2和GLI3蛋白的基因。

[0123] “Gli核酸”或“gli多核苷酸”是指编码GLI、GLI2或GLI3蛋白的脊椎动物基因。“Gli核酸”包括天然存在的或重组形式两者。Gli多核苷酸或GLI多肽编码序列通常来自人,但也可来自其他哺乳动物,但不限于非人灵长类动物、啮齿类动物,例如大鼠、小鼠或仓鼠;牛、

猪、马、羊或其他哺乳动物。已经克隆且表征了适用于实践实施方案的Gli核酸,例如人Gli1 (GenBank登录号NM_005269)、小鼠Gli1 (GenBank登录号NM_010296、AB025922)、斑马鱼Gli1 (GenBank登录号NM_178296)、人Gli2 (GenBank登录号NM_030381;NM_030380;NM-030379、DQ086814)、小鼠Gli2 (GenBank登录号XM_922107)、人Gli3 (GenBank登录号NM_000168、AJ250408、M57609)、黑猩猩Gli3 (GenBank登录号NM_001034190、AY665272)、小鼠Gli3 (GenBank登录号X95255、NM_008130)、大鼠Gli3 (GenBank登录号XM_225411)、斑马鱼Gli3 (GenBank登录号NM_205728、AY377429)。Gli多核苷酸可以是全长Gli多核苷酸(即,编码完整GLI蛋白)或它可以是编码GLI蛋白的亚结构域的部分Gli多核苷酸。

[0124] 术语“GLI途径”、“GLI信号传导”或“GLI信号传导途径”可互换使用并且是指通过结合其受体的hedgehog蛋白启动、从而导致GLI蛋白的表达和/或活性的信号传导途径。

[0125] 术语“hedgehog”可与术语“Hh”互换使用,并且是结合Hh受体、从而启动Hh信号传导途径、从而导致GLI蛋白的表达或活化的细胞因子。在哺乳动物中存在三种Hh家族基因,音猬(Shh)、印度刺猬(Ihh)和沙漠刺猬(Dhh)。几种脊椎动物刺猬蛋白是本领域中已知的,例如,人SHH、鼠SHH、大鼠SHH、人IHH和鼠DHH。

[0126] 生物样品中术语“Gli mRNA的水平”或“Wnt2 mRNA的水平”是指分别从存在于细胞或生物样品中的Gli或Wnt基因转录的mRNA的量。mRNA通常编码功能性GLI或WNT蛋白,但是可存在改变或消除所编码的蛋白质的功能的突变。“Gli mRNA的水平”或“Wnt2mRNA的水平”不需要进行量化,但可简单地检测,例如在有或没有与来自对照样品的水平或对照样品的预期水平相比较的情况下由人主观、视觉检测。

[0127] 生物样品中“GLI多肽的水平”或“Wnt2多肽的水平”是指分别从存在于细胞或生物样品中的Gli或Wnt2 mRNA翻译的多肽的量。所述多肽可以或不具有GLI或WNT2蛋白活性。“GLI多肽的水平”或“WNT2多肽的水平”不需要进行量化,但可简单地检测,例如在有或没有与来自对照样品的水平或对照样品的预期水平相比较的情况下由人主观、视觉检测。

[0128] 如本文所用,多肽(如GLI)的水平或活性的“调节剂”包括所述多肽的活化剂和/或抑制剂并且用于指活化或抑制多肽的表达水平或多肽的活性的化合物。在某些实施方案中,多肽是GLI1、GLI2或GLI3。活化剂是例如诱导或活化实施方案的多肽的表达,或结合、刺激、增加、开放、活化、促进或增强活化,敏化或上调实施方案的多肽的活性的化合物。活化剂包括天然存在的和合成的化合物、小化学分子等。用于活化剂的测定包括例如,将候选化合物施加至表达GLI多肽的细胞并且然后测定所述功能作用。将包含用潜在活化剂处理的GLI多肽的样品或测定与无活化剂的对照样品进行比较以检查作用的程度。对照样品(未用候选化合物处理)被指定100%的相对活性值。当相对于对照的多肽活性值是110%、任选地130%、150%、任选地200%、300%、400%、500%或1000%-3000%或更高时实现多肽的活化。抑制剂是例如抑制或灭活实施方案的多肽的表达或结合、降低、封闭、灭活、阻碍或减少实施方案的多肽的活化,脱敏或下调实施方案的多肽的活性的化合物。抑制剂包括干扰GLI蛋白以及天然存在的和合成化合物、小化学分子等的表达的核酸如siRNA和反义RNA。在本文描述用于抑制剂的测定。将包含用潜在抑制剂处理的GLI多肽的样品或测定与无抑制剂的对照样品进行比较以检查作用的程度。对照样品(未用候选化合物处理)被指定100%的相对活性值。当相对于对照的多肽活性值被降低10%、任选地20%、任选地30%、任选地40%、任选地50%、60%、70%、80%或90%-100%时实现多肽的抑制。

[0129] “启动子”被定义为指导核酸转录的一系列核酸控制序列。如本文所用,启动子包括转录起始位点附近的必需核酸序列,在II型聚合酶启动子的情况下如TATA元件。启动子还任选地包括远端增强子或抑制子元件,其可位于离转录起始位点远至数千碱基对的位置。

[0130] “组成型”启动子是在大多数环境和发育条件下呈活性的启动子。“诱导型”启动子是在环境或发育调节情况下呈活性的启动子。术语“可操作地连接”是指在核酸表达控制序列(如启动子或一系列转录因子结合位点)与第二核酸序列之间的功能性连接,其中表达控制序列指导对应于第二序列的核酸的转录。

[0131] 在参考例如细胞或核酸、蛋白质或载体来一起使用时,术语“重组”指示细胞或核酸、蛋白质或载体已通过引入异源核酸或蛋白质或改变天然核酸或蛋白质来进行修饰,或者指示细胞源自如此修饰的细胞。因此,例如,重组细胞表达在细胞的天然(非重组)形式中未发现的基因或者表达以其他形式异常表达、表达不充分或完全未表达的天然基因。本文中的术语“重组核酸”是指总体上通过例如使用聚合酶和核酸内切酶操作核酸而最初在体外形成的核酸,其呈通常在自然界中不存在的形式。以此方式,实现不同序列的可操作的连接。因此,呈线性形式的分离的核酸或通过连接通常不连接的DNA分子在体外形成的表达载体两者均被认为是重组的。应了解一旦重组核酸制成并且重新引入至宿主细胞或生物体中,它将非重组地复制,即使用宿主细胞的体内细胞机制而非体外操作;然而,这类核酸,一旦重组产生,虽然随后非重组地复制,仍然被认为是重组的。类似地,“重组蛋白”是使用重组技术制备的蛋白质,即通过如上所述的重组核酸的表达。

[0132] “对化学治疗剂具有抗性”在本文中意指不响应于用化学治疗剂治疗,即不被所述治疗杀死或生长抑制的肿瘤。

[0133] 术语“受试者”或“患者”是指需要针对病状如癌症、病症或疾病的治疗的哺乳动物,如人。

[0134] 术语“TAF”是指TBP-相关因子。在某些实施方案中,TAF是TAF_{II},即参与介导由RNA聚合酶II转录的真核基因的转录活化的TAF蛋白。TAF蛋白与其他转录活化子或抑制子相互作用(Goodrich和Tjian,Curr Opin Cell Biol6(3):403-9(1994);Albright和Tjian,Genes242(1-2):1-13(2000))。TAF可来自人、小鼠、果蝇或酵母。与GLI相互作用的TAF蛋白的实例是TAF_{II}31蛋白。Klemm等克隆了人TFIID亚基,他们将所述亚基称为hTAF_{II}32(Klemm等1995,Proc Natl Acad Sci USA,92(13):5788-92)。32-kD蛋白分离自海拉细胞核提取物并且部分地测序。所鉴别的cDNA具有264个残基的推导的氨基酸序列并且与果蝇TAF_{II}40有关。Klemm等表明TAF_{II}32与GTF2B且与病毒转录反式激活因子VP16相互作用(Klemm等1995,Proc Natl Acad Sci USA,92(13):5788-92)。作者表明重组表达的TAF_{II}32在部分重组的TFIID复合物中是功能性的并且重组复合物通过GAL4-VP16融合蛋白介导活化。TAF_{II}32和TAF_{II}31是用于同一蛋白质的两种名称,其现在还被称为TAF9。Lu等克隆了TAF9,他们将其称为TAF_{II}31。TAF9编码264-氨基酸蛋白。免疫沉淀和结合分析表明TAF9与在与由MDM2(p53活性的主要细胞负调节因子)结合的那些相同的位点处的p53的N末端结构域相互作用。(Lu等,1995,Proc Natl Acad Sci USA,92(11):5154-8)。人TAF_{II}31核苷酸和蛋白质序列可例如在GenBank登录号U25112、U21858和NM_016283处找到。

[0135] 如本文所用,术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”以及“治疗(treatment)”包

括：(1) 预防疾病，如癌症，即，使疾病的临床症状不在可能易患疾病但尚未经历疾病的任何症状的受试者中发展；(2) 抑制疾病，即，阻止或减少疾病或其临床症状的发展；或(3) 减轻疾病，即，使疾病和/或其临床症状消退。治疗意指其中病状、病症或疾病的症状或病理学被改善或以其他方式有益地改变的任何方式。在某些实施方案中，需要所述治疗的受试者是哺乳动物，如人。

[0136] “肿瘤细胞”是指肿瘤中的癌前、癌性和正常细胞。

[0137] 术语“Wnt”是指与果蝇体节极性基因wingless有关的哺乳动物基因和编码的蛋白质的家族。在人中，Wnt基因家族通常编码38至43kDa富含半胱氨酸的糖蛋白，所述糖蛋白具有疏水信号序列以及保守性天冬酰胺连接的寡糖共有序列(Shimizu等, Cell Growth Differ 8(12):1349-58(1997))。Wnt家族含有至少19个哺乳动物成员。示例性Wnt蛋白包括Wnt1、Wnt2、Wnt3、Wnt3A、Wnt4、Wnt5A、Wnt5B、Wnt6、Wnt7A、Wnt7B、Wnt8A、Wnt8B、Wnt10A、Wnt10B、Wnt11、Wnt12、Wnt13、Wnt14、Wnt15以及Wnt16。在某些实施方案中，Wnt蛋白是Wnt2，如人Wnt2蛋白。

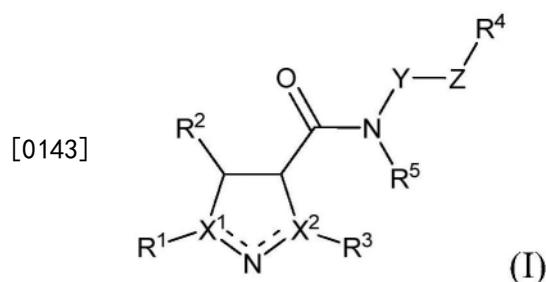
[0138] 在描述实施方案中，将讨论化合物的结构。然后，将讨论含有所述化合物的药物制剂，接着描述其使用方法和试剂盒。

[0139] 小分子化合物

[0140] 本公开的组合物包括以下所示的式I-III的化合物。本公开的药物组合物和方法也包括式I-III的化合物。

[0141] 式I

[0142] 本公开提供式(I)的化合物以及其盐、水合物、溶剂化物、立体异构体和前药：



[0144] 其中

[0145] X^1 和 X^2 各自独立地是N或C，其中 X^1 和 X^2 中的一个为N并且 X^1 和 X^2 中的一个为C，以使环N在 X^1 和 X^2 中的任何一个为C的情况下形成双键；

[0146] R^1 是芳基或取代的芳基；

[0147] R^2 选自芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基以及烷基；

[0148] R^3 是芳基或取代的芳基；

[0149] Y是直接键或 C_1 - C_4 烷基；

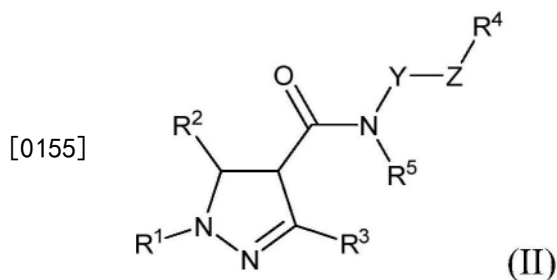
[0150] Z是 C_1 - C_4 烷基或芳基；

[0151] R^4 是-OH；以及

[0152] R^5 是氢或 C_1 - C_6 烷基。

[0153] 式II

[0154] 本公开提供式(II)的化合物以及其盐、水合物、溶剂化物、立体异构体和前药：



[0156] 其中

[0157] R^1 是芳基或取代的芳基；

[0158] R^2 选自芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基以及烷基；

[0159] R^3 是芳基或取代的芳基；

[0160] Y是直接键或 C_1-C_4 烷基；

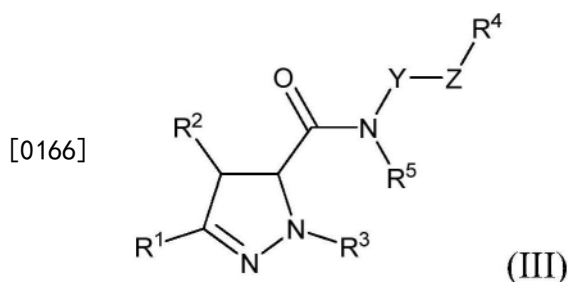
[0161] Z是 C_1-C_4 烷基或芳基；

[0162] R^4 是-OH；以及

[0163] R^5 是氢或 C_1-C_6 烷基。

[0164] 式III

[0165] 本公开提供式(III)的化合物以及其盐、水合物、溶剂化物、立体异构体和前药：



[0167] 其中

[0168] R^1 是芳基或取代的芳基；

[0169] R^2 选自芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基以及烷基；

[0170] R^3 是芳基或取代的芳基；

[0171] Y是直接键或 C_1-C_4 烷基；

[0172] Z是 C_1-C_4 烷基或芳基；

[0173] R^4 是-OH；以及

[0174] R^5 是氢或 C_1-C_6 烷基。

[0175] 在式(I)中, X^1 和 X^2 各自独立地是N或C,其中 X^1 和 X^2 中的一个为N并且 X^1 和 X^2 中的一个为C,以使得环N在 X^1 和 X^2 中的任何一个为C的情况下形成双键。在某些实施方案中, X^1 是N并且 X^2 是C。在某些实施方案中, X^1 是C并且 X^2 是N。

[0176] 在式(I)-(III)中, R^1 是芳基或取代的芳基。在某些实施方案中, R^1 是芳基。在某些实施方案中, R^1 是取代的芳基。在某些实施方案中, R^1 是取代的芳基,其中取代基是烷基或卤素。

[0177] 在式(I)-(III)中, R^2 选自芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基以及烷基。在某些实施方案中, R^2 是芳基或取代的芳基。在某些实施方案中, R^2 是芳基。在某些实施方案

中, R^2 是取代的芳基。在某些实施方案中, R^2 是杂芳基或取代的杂芳基。在某些实施方案中, R^2 是杂芳基。在某些实施方案中, R^2 是取代的杂芳基。在某些实施方案中, R^2 是烷基。

[0178] 在某些实施方案中, R^2 选自芳基、取代的芳基、杂芳基以及烷基。在某些实施方案中, R^2 选自杂芳基和烷基。在某些实施方案中, R^2 是取代的芳基, 其中取代基是烷基或卤素。

[0179] 在式 (I) - (III) 中, R^3 是芳基或取代的芳基。在某些实施方案中, R^3 是芳基。在某些实施方案中, R^3 是取代的芳基。在某些实施方案中, R^3 是取代的芳基, 其中取代基是烷基或卤素。

[0180] 在式 (I) - (III) 中, R^5 是氢或 C_1 - C_6 烷基。在某些实施方案中, R^5 是氢。在某些实施方案中, R^5 是 C_1 - C_6 烷基。

[0181] 在式 (I) - (III) 中, Y 是直接键或 C_1 - C_4 烷基。在某些实施方案中, Y 是直接键。在某些实施方案中, Y 是 C_1 - C_4 烷基。

[0182] 在式 (I) - (III) 中, Z 是 C_1 - C_4 烷基或芳基。在某些实施方案中, Z 是 C_1 - C_4 烷基。在某些实施方案中, Z 是芳基。

[0183] 在某些实施方案中, Y 是直接键并且 Z 是 C_1 - C_4 烷基。在某些实施方案中, Y 是直接键并且 Z 是芳基。在某些实施方案中, Y 是 C_1 - C_4 烷基并且 Z 是 C_1 - C_4 烷基。在某些实施方案中, Y 是 C_1 - C_4 烷基并且 Z 是芳基。

[0184] 在某些实施方案中, Y 是直接键且 Z 是 C_1 - C_4 烷基, 并且 R^5 是氢。在某些实施方案中, Y 是直接键且 Z 是芳基, 并且 R^5 是氢。在某些实施方案中, Y 是 C_1 - C_4 烷基且 Z 是 C_1 - C_4 烷基, 并且 R^5 是氢。在某些实施方案中, Y 是 C_1 - C_4 烷基且 Z 是芳基, 并且 R^5 是氢。

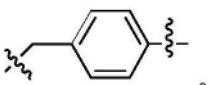
[0185] 在某些实施方案中, R^1 是芳基, R^2 是杂芳基, 并且 R^3 是芳基。

[0186] 在某些实施方案中, R^1 是芳基, R^2 是烷基, 并且 R^3 是取代的芳基。

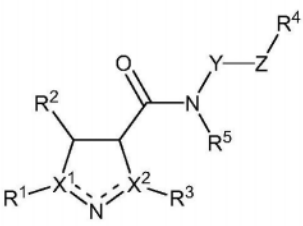
[0187] 在某些实施方案中, R^1 是芳基, R^2 是芳基, 并且 R^3 是芳基。

[0188] 在某些实施方案中, R^1 是芳基, R^2 是取代的芳基, 并且 R^3 是取代的芳基。

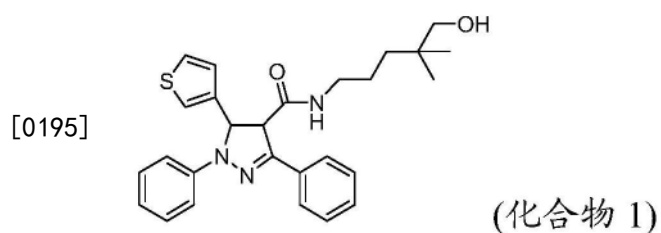
[0189] 在某些实施方案中, Y 是 C_1 - C_4 烷基并且 Z 是 C_1 - C_4 烷基, 以使得 Y 和 Z 形成 $-(CH_2)_3-C(CH_3)_2-CH_2-$ 。

[0190] 在某些实施方案中, Y 是 C_1 - C_4 烷基并且 Z 是芳基, 以使得 Y 和 Z 形成 。

[0191] 所述化合物的某些实施方案在以下表中示出。

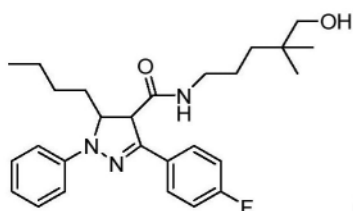
							
[0192]	化合物	X ¹	X ²	R ¹	R ²	R ³	R ⁵ -Y-Z-R ⁴
	1	N	C				H
	2	C	N				H
[0193]	3	N	C				H
	4	N	C				H
	5	N	C				H
	6	N	C				H

[0194] 所述化合物及其盐或溶剂化物或立体异构体的实施方案包括以下所示的1,3-二苯基-5-噻吩-3-基-4,5-二氢-1H-吡唑-4-甲酸(5-羟基-4,4-二甲基-戊基)-酰胺(化合物1)。



[0196] 所述化合物及其盐或溶剂化物或立体异构体的实施方案包括以下所示的3-(4-氟-苯基)-1-苯基-5-丁基-4,5-二氢-1H-吡唑-4-甲酸(5-羟基-4,4-二甲基-戊基)-酰胺(化合物4)。

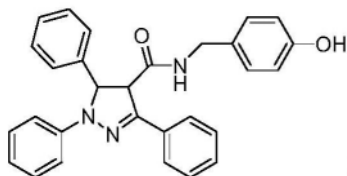
[0197]



(化合物 4)

[0198] 所述化合物及其盐或溶剂化物或立体异构体的实施方案包括以下所示的1,3,5-三苯基-4,5-二氢-1H-吡唑-4-甲酸4-羟基-苄基酰胺(化合物2)。

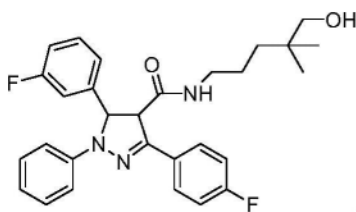
[0199]



(化合物 2)

[0200] 所述化合物及其盐或溶剂化物或立体异构体的实施方案包括以下所示的3-(4-氟-苯基)-5-(3-氟-苯基)-1-苯基-4,5-二氢-1H-吡唑-4-甲酸(5-羟基-4,4-二甲基-戊基)-酰胺(化合物6)。

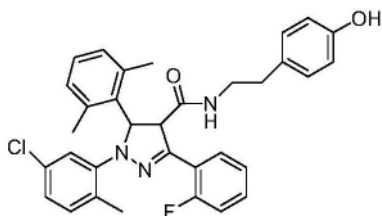
[0201]



(化合物 6)

[0202] 所述化合物及其盐或溶剂化物或立体异构体的实施方案包括以下所示的(1-(5-氯-2-甲基-苯基)-5-(2,6-二甲基-苯基)-3-(2-氟-苯基)-4,5-二氢-1H-吡唑-4-甲酸[2-(4-羟基-苯基)-乙基]-酰胺(化合物3)。

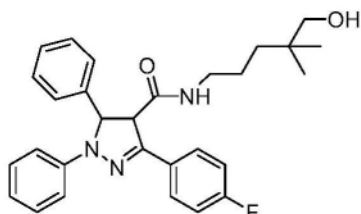
[0203]



(化合物 3)

[0204] 所述化合物及其盐或溶剂化物或立体异构体的实施方案包括以下所示的(3-(4-氟-苯基)-1,5-二苯基-4,5-二氢-1H-吡唑-4-甲酸(5-羟基-4,4-二甲基-戊基)-酰胺(化合物5)。

[0205]



(化合物 5)

[0206] 小分子化合物的制备

[0207] 提供适用于合成所公开的化合物的通常已知的化学合成方案和条件的许多通用参考文献是可获得的(参见,例如Smith和March, March's Advanced Organic Chemistry:

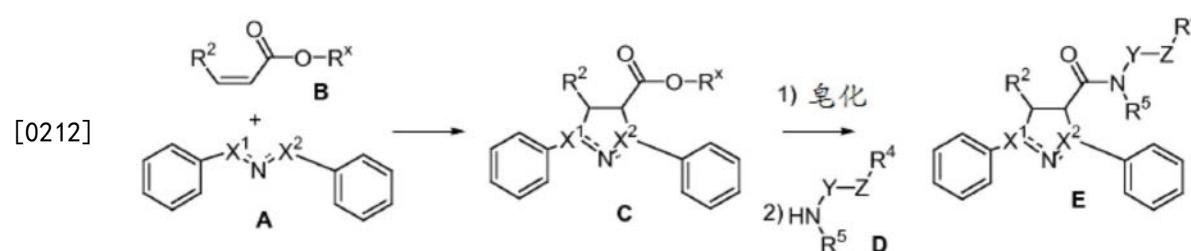
Reactions, Mechanisms, and Structure, 第五版, Wiley-Interscience, 2001; 或 Vogel, A Textbook of Practical Organic Chemistry, Including Qualitative Organic Analysis, 第四版, New York: Longman, 1978)。

[0208] 如本文所述的化合物可通过本领域中已知的任何方式来纯化, 包括色谱方法, 如高效液相色谱法 (HPLC)、制备型薄层色谱法、快速柱色谱法和离子交换色谱法。可使用任何适合的固定相, 包括正相和反相以及离子树脂。参见, 例如 Introduction to Modern Liquid Chromatography, 第2版, 编辑 L.R. Snyder 和 J.J. Kirkland, John Wiley and Sons, 1979; 以及 Thin Layer Chromatography, E. Stahl 编辑, Springer-Verlag, New York, 1969。

[0209] 在用于制备本公开的化合物的任何方法期间, 保护所涉及的任何分子上的敏感性或反应性基团可能是必要的和/或合乎需要的。这可通过如在标准文献中描述的常规保护基团来实现, 如 T.W. Greene 和 P.G.M. Wuts, “Protective Groups in Organic Synthesis”, 第四版, Wiley, New York 2006。所述保护基团可使用本领域已知的方法在方便的随后阶段除去。

[0210] 所述实施方案的化合物可根据以下的合成方案来制备。在合成方案1中, 出于说明性目的, R^1 和 R^3 是苯基; R^x 是离去基团; 并且 X^1 、 X^2 、 R^2 、 R^5 、Y、Z 和 R^4 是如先前所定义。

[0211] 合成方案1



[0213] 吡唑衍生物可使用脒与不饱和化合物之间的反应形成。在合成方案1中, 化合物A与化合物B缩合以形成化合物C。反应可纯净地或与适合溶剂一起进行。反应可在不同温度下进行, 包括在冷却下、在室温下或在加热下。在某些实施方案中, 化合物A与化合物B在适合的溶剂中回流。适合的溶剂例如是甲醇、二氯甲烷、DMF或THF。本领域的技术人员将能够根据具体反应物确定适合的反应条件。

[0214] 进一步参照合成方案1, 化合物C被皂化。在某些实施方案中, 化合物C包含酯, 其中 R^x 是烷基。用于皂化化合物C的条件包括在适合的溶剂中与碱反应。用于皂化的适合溶剂包括但不限于水、醇如甲醇和乙醇、THF以及其混合物。适合的碱包括但不限于氢氧化锂、氢氧化钠以及氢氧化钾。

[0215] 然后, 使皂化的化合物C与胺D反应以在肽偶联反应中形成化合物E。肽偶联反应通常采用常规肽偶联试剂并且在常规偶联反应条件下进行。用于使用的适合偶联试剂包括例如碳二亚胺, 如乙基-3-(3-二甲基氨基)丙基碳二亚胺 (EDC或EDCI)、二环己基碳二亚胺 (DCC)、二异丙基碳二亚胺 (DIC) 等, 以及其他熟知的偶联试剂, 如N,N'-羰基二咪唑、2-乙氧基-1-乙氧基羰基-1,2-二氢喹啉 (EEDQ)、苯并三唑-1-基氧基-三(二甲基氨基)六氟磷酸盐 (BOP)、0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸盐 (HATU) 等。任选地, 熟知的偶联促进剂如N-羟基琥珀酰亚胺、1-羟基苯并三唑 (HOBT)、1-羟基-7-氮杂苯并三唑 (HOAT)、N,N-二甲基氨基吡啶 (DMAP) 等可用于此反应中。通常, 此偶联反应在惰性稀

剂(如二氯甲烷、THF或DMF)中在约0℃至约60℃范围的温度下进行约1至约72小时。

[0216] 在示例性实例中,所述实施方案的化合物可通过肉桂酸乙酯或不饱和酯与苯甲醛苯腙的缩合来制备,接着皂化乙酯并且与胺反应以得到所需的酰胺最终产物,如在实施例中所示。或者,所述实施方案的化合物可通过第一反应肉桂酸或不饱和酯与胺来制备,以制备酰胺,然后与苯甲醛苯腙缩合。本领域的技术人员将认识到另外方法存在用于制备所述实施方案的化合物。

[0217] 在某一实施方案中,式(I)的化合物包括标记。这适用于在体内施用之后检测并测试化合物的分布。例如,氚(^3H)可在常规药物代谢动力学/动态研究中用作标记。包含标记的化合物可通过例如光谱、光化学、生物化学、免疫化学、化学或其他物理方式检测。

[0218] 所述实施方案的化合物还可可在一个或多个构成所述化合物的原子处含有非天然比例的原子同位素。例如,所述化合物可用放射性同位素(例如像氚(^3H)或碳-14(^{14}C))放射性标记。所述实施方案的化合物的所有同位素变体(无论是否具有放射性)均意图涵盖在所述实施方案的范围内。

[0219] 对映体特异性活性

[0220] 在某些实施方案中,本文所述的化合物可包括两个或多个立体异构体。如本文所用,术语“立体异构体”是指所述实施方案的具有不对称碳原子(光学中心)或双键的化合物。例如,本文所述的化合物可包括两个对映体。如本文所用,“对映体”是彼此为不能重叠的镜像的两个立体异构体中的一个。在一些实例中,化合物的对映体的外消旋混合物可分离成单独的对映体。例如,可使用分离技术,如但不限于高效液相色谱法(HPLC)(例如,手性HPLC)、结晶等来分离对映体。在其他实施方案中,单独对映体可分开地合成,例如通过使用手性起始材料和不对称合成技术。

[0221] 在某些实施方案中,单独对映体可使用手性分离技术(例如,手性HPLC)来分离,如上所述。在一些情况下,手性分离技术被配置成提供大致上纯的单独对映体。例如,单独对映体可具有90%或更高的纯度,如95%或更高、或96%或更高、或97%或更高、或98%或更高、或99%或更高、或99.5%或更高、或99.9%或更高或甚至100%纯度。在某些实例中,单独的对映体具有98%或99%或99.9%的纯度。在一些情况下,分离的对映体具有90%或更高的对映体过量,如95%或更高、或96%或更高、或97%或更高、或98%或更高、或99%或更高、或99.5%或更高、或99.9%或更高。

[0222] 在其中使用手性分离技术(例如,手性HPLC)来分离单独对映体的实施方案中,不同对映体可在所使用的分离条件下具有显著不同的保留时间(参见例如,以下实施例16)。例如,第一对映体可具有比第二对映体显著更短的保留时间。在这些情况下,第一对映体可被描述为“较快洗脱的”对映体,并且第二对映体可被描述为“较慢洗脱的”对映体。在一些实例中,第一对映体和第二对映体可具有0.1分钟或更长的洗脱时间差异,包括0.2分钟或更长,如0.3分钟或更长、或0.4分钟或更长、或0.5分钟或更长、或0.6分钟或更长、或0.7分钟或更长、或0.8分钟或更长、或0.9分钟或更长、或1分钟或更长、或1.1分钟或更长、或1.2分钟或更长、或1.3分钟或更长、或1.4分钟或更长、或1.5分钟或更长、或1.6分钟或更长、或1.7分钟或更长、或1.8分钟或更长、或1.9分钟或更长、或2分钟或更长、或2.5分钟或更长、或3分钟或更长、或3.5分钟或更长、或4分钟或更长、或4.5分钟或更长、或5分钟或更长。在一些实施方案中,第一对映体和第二对映体具有0.5分钟至2分钟,如0.5分钟至1.5分钟或

0.7分钟至1.2分钟范围内的洗脱时间差异。例如,第一对映体和第二对映体可具有1分钟的洗脱时间差异。

[0223] 在某些实施方案中,一个对映体可具有的活性大于另一个对映体的活性。例如,第一对映体可具有的活性大于第二对映体的活性。或者,第二对映体可具有的活性大于第一对映体的活性。在一些情况下,如上所述,对映体可基于其在手性分离技术(例如,手性HPLC)中的保留时间彼此区分。在这些实例中,第一对映体(例如,较快洗脱的对映体)可具有显著不同于第二对映体(例如,较慢洗脱的对映体)的活性。例如,较快洗脱的对映体可具有大于较慢洗脱的对映体的活性。在其他实施方案中,较慢洗脱的对映体具有大于较快洗脱的对映体的活性。

[0224] 在一些情况下,化合物的活性可通过其半最大抑制剂浓度(IC_{50})来测量。 IC_{50} 是化合物在抑制生物过程(或过程的组成部分,例如,酶、细胞、细胞受体、微生物等)中的有效性的度量。此定量度量指示用于半抑制生物过程所需的化合物的量。在某些实施方案中,如上所述,化合物的对映体可具有显著不同的活性。例如,第二对映体(例如,较慢洗脱的对映体)可具有小于第一对映体(例如,较快洗脱的对映体)的 IC_{50} ;即,第二对映体比第一对映体活性更高。在一些情况下,第二对映体的 IC_{50} 是第一对映体的 IC_{50} 的75%或更低,如70%或更低,包括65%或更低、或60%或更低、或55%或更低、或50%或更低、或45%或更低、或40%或更低、或35%或更低、或30%或更低、或25%或更低、或20%或更低、或15%或更低、或10%或更低、或5%或更低、或3%或更低,或第二对映体的 IC_{50} 是第一对映体的 IC_{50} 的1%或更低。

[0225] 在其他实施方案中,第一对映体(例如,较快洗脱的对映体)具有小于第二对映体(例如,较慢洗脱的对映体)的 IC_{50} ;即,第一对映体比第二对映体活性更高。在某些情况下,第一对映体的 IC_{50} 是第二对映体的 IC_{50} 的75%或更低,如70%或更低,包括65%或更低、或60%或更低、或55%或更低、或50%或更低、或45%或更低、或40%或更低、或35%或更低、或30%或更低、或25%或更低、或20%或更低、或15%或更低、或10%或更低、或5%或更低、或3%或更低,或第一对映体的 IC_{50} 是第二对映体的 IC_{50} 的1%或更低。

[0226] 在基于细胞的测定中测试小分子化合物

[0227] 所述实施方案的化合物可在体外和体内针对活性进行筛选。对于体外测定,本公开提供基于细胞的细胞毒性测定法,如本文所述。对于体内测定,本公开提供小鼠异种移植测定,如本文所述。

[0228] 药物组合物

[0229] 本公开提供一种药物组合物或一种药剂,所述药物组合物或药剂包含至少一种式(I)化合物和任选地药学上可接受的载体。可将药物组合物或药剂施用至患者以用于治疗例如例如病状如癌症。

[0230] 制剂和施用

[0231] 所述实施方案的化合物适用于制造药物组合物或药剂,所述药物组合物或药剂包含有效量的化合物与适合用于肠内或胃肠外施加的赋形剂或载体的组合或混合物。

[0232] 用于在实施方案中使用的药物组合物或药剂可通过标准技术使用一种或多种生理学上可接受的载体或赋形剂来配制。适合的药物载体在本文和E.W.Martin的“Remington's Pharmaceutical Sciences”中进行描述。实施方案的化合物以及其生理学

上可接受的盐和溶剂化物可被配制用于通过任何适合的途径,包括通过吸入、局部、鼻、口服、胃肠外或直肠施用。因此,药物组合物的施用可通过用注射器或其他装置皮内、皮下、静脉内、肌肉内、鼻内、脑内、气管内、动脉内、腹膜内、膀胱内、胸膜内、冠状动脉内或瘤内注射来进行。还考虑经皮施用,以及吸入或气雾剂施用。片剂和胶囊可口服、直肠或阴道施用。

[0233] 对于口服施用,药物组合物或药剂可采取例如通过常规方式与药学上可接受的赋形剂一起制备的片剂或胶囊的形式。在某些实施方案中,片剂和明胶胶囊包含活性组分,即,实施方案的化合物连同 (a) 稀释剂或填充剂,例如,乳糖、葡萄糖、蔗糖、甘露醇、山梨醇、纤维素(例如,乙基纤维素、微晶纤维素)、甘氨酸、果胶、聚丙烯酸酯和/或磷酸氢钙、硫酸钙;(b) 润滑剂,例如,二氧化硅、滑石、硬脂酸、其镁或钙盐、硬脂酸金属盐、胶体二氧化硅、氢化植物油、玉米淀粉、苯甲酸钠、乙酸钠和/或聚乙二醇;对于片剂还有 (c) 粘合剂,例如,硅酸铝镁、淀粉糊、明胶、黄耆胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、聚乙烯吡咯烷酮和/或羟丙基甲基纤维素;如果需要 (d) 崩解剂,例如,淀粉(例如,马铃薯淀粉或淀粉钠)、乙醇酸酯、琼脂、海藻酸或其钠盐或泡腾混合物;(e) 润湿剂,例如,月桂基硫酸钠;和/或 (f) 吸收剂、着色剂、调味剂和甜味剂。

[0234] 片剂可以是根据本领域中已知的方法薄膜包衣或肠溶包衣的。用于口服施用的液体制剂可采取例如溶液、糖浆或悬浮液的形式,或它们可呈现为用于在使用之前用水或其他适合的媒介物复原的干燥产品。所述液体制剂可通过常规方式用药学上可接受的添加剂制备,所述添加剂是例如悬浮剂(例如,山梨糖醇糖浆、纤维素衍生物或氢化食用脂肪;乳化剂(例如,卵磷脂或阿拉伯胶);非水媒介物(例如,扁桃仁油、油酯、乙醇或分馏植物油);以及防腐剂(例如,对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯或山梨酸)。所述制剂还可包含适当的缓冲盐、调味剂、着色剂和/或甜味剂。如果需要,用于口服施用的制剂可适当地配制以给予活性化合物的控制释放。

[0235] 对于通过吸入施用,所述化合物可在使用适合的推进剂(例如,二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他适合的气体)的情况下通过加压包装或喷雾器以气溶胶喷雾的形式方便地递送。在加压气雾剂的情况下,剂量单位可通过提供阀以递送计量的量来确定。可配制含有化合物与适合的粉末基质(例如乳糖或淀粉)的粉末混合物的用于在吸入器或吹入器中使用的(例如)明胶的胶囊和药筒。

[0236] 所述实施方案的化合物可被配制用于通过注射,例如,通过快速浓注或连续输注来胃肠外施用。注射制剂可单位剂型来呈现,例如,在安瓿或多剂量容器中,其中添加防腐剂。在某些实施方案中,可注射组合物是水性等渗溶液或悬浮液,并且栓剂由脂肪乳液或悬浮液制备。所述组合物可以是无菌的和/或含有佐剂,如防腐剂、稳定剂、润湿剂或乳化剂、溶液促进剂、用于调节渗透压的盐和/或缓冲剂。或者,活性成分可呈在使用前用适合的媒介物(例如无菌无热原水)复原的粉末形式。此外,它们还可含有其他治疗上有价值的物质。所述组合物分别根据常规混合、制粒或涂覆方法来制备,并且含有约0.1%至75%或约1%至50%的活性组分。

[0237] 用于经皮施加的适合制剂包含实施方案的有效量的化合物与载体。在某些实施方案中,载体包括可吸收的药理学上可接受的溶剂以帮助穿过宿主的皮肤。例如,经皮装置呈绷带的形式,所述绷带包括背部构件、任选地具有载体的含有所述化合物的储库、任选地速率控制屏障(将化合物以控制的和预定的速率在延长的一段时间内递送至宿主的皮肤),以

及任选地用于将所述装置固定至皮肤的粘合剂层。也可使用基质经皮制剂。

[0238] 在某些实施方案中,用于局部施加例如至皮肤和眼睛的适合制剂是本领域中熟知的水溶液、软膏、乳膏或凝胶。这些可包括增溶剂、稳定剂、紧张性增强剂、缓冲剂以及防腐剂。

[0239] 化合物还可被配制在直肠组合物中,如(例如)含有常规栓剂基质(例如可可脂或其他甘油酯)的栓剂或保留灌肠剂。

[0240] 此外,所述化合物可被配制为贮库型制剂。这类长效制剂可通过植入(例如皮下或肌肉内)或通过肌肉内注射来施用。因此,例如,化合物可与适合的聚合物材料或疏水性材料(例如配制为在可接受的油中的乳液)或离子交换树脂一起配制,或配制为略微可溶的衍生物,例如,为微溶盐。

[0241] 组合物可在需要时存在于包装或分配器装置中,所述包装或分配器装置可包括含有活性成分的一个或多个单位剂型。所述包装可例如包括金属或塑料箔,例如泡罩包装。包装或分配器装置可随附有施用说明书。

[0242] 组合制剂

[0243] 在某些实施方案中,药物组合物或药剂包含有效量的如本文定义的实施方案的化合物,以及另一种治疗剂,如化学治疗剂。

[0244] 化学治疗剂可包括但不限于柔红霉素(daunorubicin)、道诺霉素(daunomycin)、更生霉素(dactinomycin)、阿霉素(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、伊达比星(idarubicin)、依索比星(esorubicin)、博来霉素(bleomycin)、马磷酰胺(mafosfamide)、异环磷酰胺(ifosfamide)、阿糖胞苷(cytosine arabinoside)、双氯乙基亚硝基脲、白消安(busulfan)、丝裂霉素C(mitomycin C)、放线菌素D(actinomycin D)、光神霉素(mithramycin)、泼尼松(prednisone)、羟孕酮(hydroxyprogesterone)、睾酮、他莫昔芬(tamoxifen)、达卡巴嗪(dacarbazine)、丙卡巴肼(procarbazine)、六甲嘧胺(hexamethylmelamine)、五甲嘧胺、米托蒽醌(mitoxantrone)、安吡啶(amsacrine)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、甲基环己基亚硝基脲、氮芥(nitrogen mustard)、美法仑(melphalan)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、阿糖胞苷(cytarabine,CA)、5-氮杂胞苷、羟基脲、脱氧柯福霉素(deoxycoformycin)、4-羟基过氧环磷酰胺、5-氟尿嘧啶(5-FU)、5-氟脱氧尿苷(5-FUdR)、甲氨蝶呤(MTX)、秋水仙碱(colchicine)、紫杉醇(taxol)、长春新碱(vincristine)、长春花碱(vinblastine)、依托泊苷(etoposide)、三甲曲沙(trimetrexate)、替尼泊苷(teniposide)、顺铂己烯雌酚(DES)、维莫德吉(vismodegib)(GDC-0449)、埃罗替尼(**Tarceva®**)、培美曲塞(**Alimta®**)、PI3K抑制剂LY294002、TGFβ抑制剂SB431542以及顺铂。通常参见,The Merck Manual of Diagnosis and Therapy,第15版1987,第1206-1228页,Berkow等,编辑,Rahway,N.J.。

[0245] 在某些实施方案中,药物组合物或药剂包含实施方案的化合物和另一种选自维莫德吉(GDC-0449)、埃罗替尼(**Tarceva®**)、培美曲塞(**Alimta®**)、LY294002、SB431542以及顺铂的治疗剂。在某些实施方案中,药物组合物或药剂包含实施方案的化合物和维莫德吉(GDC-0449)。在某些实施方案中,药物组合物或药剂包含实施方案的化合物和埃罗替尼(**Tarceva®**)。在某些实施方案中,药物组合物或药剂包含实施方案的化合物和培美曲塞

(Alimta®)。在某些实施方案中,药物组合物或药剂包含实施方案的化合物和LY294002。在某些实施方案中,药物组合物或药剂包含实施方案的化合物和SB431542。在某些实施方案中,药物组合物或药剂包含实施方案的化合物和顺铂。

[0246] 某些实施方案提供化合物1-6中的一种或多种与另一种治疗剂的组合,例如如下表中所示。

[0247]

化合物 1-6 与另一种治疗剂的组合的实例					
化合物 1 和 维莫德吉 (GDC-0449)	化合物 1 和埃罗替 尼 (Tarceva®)	化合物 1 和培美曲 塞 (Alimta®)	化合物 1 和 LY294002	化合物 1 和 SB431542	化合物 1 和顺铂
化合物 2 和维 莫 德 吉 (GDC-0449)	化合物 2 和 埃 罗 替 尼 (Tarceva®)	化合物 2 和 培 美 曲 塞 (Alimta®)	化合物 2 和 LY294002	化合物 2 和 SB431542	化合物 2 和 顺铂
化合物 3 和维 莫 德 吉 (GDC-0449)	化合物 3 和 埃 罗 替 尼 (Tarceva®)	化合物 3 和 培 美 曲 塞 (Alimta®)	化合物 3 和 LY294002	化合物 3 和 SB431542	化合物 3 和 顺铂
化合物 4 和维 莫 德 吉 (GDC-0449)	化合物 4 和 埃 罗 替 尼 (Tarceva®)	化合物 4 和 培 美 曲 塞 (Alimta®)	化合物 4 和 LY294002	化合物 4 和 SB431542	化合物 4 和 顺铂
化合物 5 和维 莫 德 吉 (GDC-0449)	化合物 5 和 埃 罗 替 尼 (Tarceva®)	化合物 5 和 培 美 曲 塞 (Alimta®)	化合物 5 和 LY294002	化合物 5 和 SB431542	化合物 5 和 顺铂
化合物 6 和维 莫 德 吉 (GDC-0449)	化合物 6 和 埃 罗 替 尼 (Tarceva®)	化合物 6 和 培 美 曲 塞 (Alimta®)	化合物 6 和 LY294002	化合物 6 和 SB431542	化合物 6 和 顺铂

[0248] 当与实施方案的化合物一起使用时,这种化学治疗剂可单独地(例如,5-FU和实施方案的化合物)、顺序地(例如,5-FU和实施方案的化合物持续一段时间,接着例如,MTX和实施方案的化合物)或与一种或多种其他这类化学治疗剂组合(例如,5-FU、MTX和实施方案的化合物,或5-FU、放射疗法和实施方案的化合物)使用。施用可通过相同或不同的施用途径或一起在同一药物制剂中。

[0249] 在某些实施方案中,治疗有效量的实施方案的化合物与外科手术以及任选地施用另一种化学治疗剂组合施用。

[0250] 治疗有效量和给药

[0251] 在某些实施方案中,将药物组合物或药剂以治疗有效剂量施用至患者以预防、治疗或控制癌症。将药物组合物或药剂以足以引发患者中的有效治疗反应的量施用至患者。有效治疗反应是至少部分地阻止或减缓疾病的症状或并发症的反应。将足够实现此目标的量定义为“治疗有效剂量”。

[0252] 所施用的化合物的剂量取决于热血动物(哺乳动物)的物种、体重、年龄、个体病状、待治疗的区域的表面积以及施用形式。剂量的大小也将通过伴随具体化合物的施用在特定受试者中的任何不良作用的存在、性质和程度来确定。用于口服施用至约50至70kg的哺乳动物的单位剂量可包含约5与500mg之间的活性成分。通常,实施方案的化合物的剂量是足以实现所需作用的剂量。

[0253] 最佳给药方案可从受试者体内化合物积累的测量值进行计算。一般来说,剂量从

每kg体重1ng至1,000mg,并且可每天、每周、每月或每年给予一次或多次。本领域的普通技术人员可确定最佳剂量、给药方法和重复率。

[0254] 在某些实施方案中,包含实施方案的化合物的药物组合物或药剂以每kg受试者体重约1mg化合物(1mg/kg)至约1g/kg范围内的每日剂量施用持续多天。在某些实施方案中,每日剂量是在约5mg/kg至约500mg/kg范围内的剂量。在某些实施方案中,每日剂量是约10mg/kg至约250mg/kg。在某些实施方案中,每日剂量是约25mg/kg至约150mg/kg。每日剂量可每天施用一次或分成亚剂量并且以多次剂量施用,例如,每天两次、三次或四次。

[0255] 为了实现所需的治疗作用,可以治疗有效的每日剂量施用化合物持续多天。因此,在受试者中治疗上有效施用化合物以治疗癌症要求周期性地(例如,每日)施用,所述施用持续三天至两周或更长范围内的一段时间。通常,将施用化合物持续至少连续三天,经常持续至少连续五天,更经常持续至少十天,并且有时持续20、30、40或更多连续天。当连续每日剂量是实现治疗有效剂量的一种途径时,可实现治疗上有益的作用,即使不每日施用化合物,只要施用足够频繁地重复以维持受试者中的化合物的治疗有效浓度。例如,可每隔一天、每隔两天或(如果使用更高剂量范围并由受试者耐受)一周一次施用所述化合物。

[0256] 所述化合物的最佳剂量、毒性和治疗功效可取决于单独化合物的相对效力变化并且可通过细胞培养物或实验动物中的标准制药工序测定,例如通过测定LD₅₀(对所述群体的50%的致命剂量)以及ED₅₀(在所述群体的50%中的治疗有效剂量)。毒性作用与治疗作用之间的剂量比是治疗指数并且可表示为比例LD₅₀/ED₅₀。在某些实施方案中,本公开提供表现出较大治疗指数的化合物。虽然可使用表现出毒性副作用的化合物,但是应采取谨慎以设计将所述化合物靶向受影响的组织的部位的递送系统,从而将对正常细胞的潜在损害降至最低并且由此降低副作用。

[0257] 可用于配制用于人的剂量范围中使用从例如细胞培养测定和动物研究获得的数据。在某些实施方案中,所述化合物的剂量在包括ED₅₀的具有极小毒性或没有毒性的循环浓度范围内。所述剂量可根据所采用的剂型和施用途径而在所述范围内变化。对于在实施方案的方法中使用的任何化合物,治疗有效剂量最初可由细胞培养测定来估计。可在动物模型中配制剂量来实现包括如在细胞培养中测定的IC₅₀(实现症状的半最大抑制的测试化合物的浓度)的循环血浆浓度范围。所述信息可用于更准确地测定人中的有用剂量。可例如通过高效液相色谱法(HPLC)测量血浆中的水平。一般来说,对于典型受试者,小分子化合物的剂量当量是约1ng/kg至100mg/kg。

[0258] 在成功治疗之后,可能合乎需要的是使受试者经历维持疗法以预防所治疗的病状(例如癌症)的复发。

[0259] 使用小分子化合物治疗癌症

[0260] 所述实施方案提供用于使用式(I)的化合物例如治疗表达GLI多肽的病状(如癌症)的方法。表达GLI多肽的任何细胞或肿瘤细胞可用于实践所述实施方案的方法。

[0261] 在某些实施方案中,提供一种用于治疗患有癌性病状的受试者的方法。所述方法包括以下步骤:向所述受试者施用治疗有效量的所述实施方案的化合物,其中所述癌性病状特征在于表达GLI多肽并且其中所述施用步骤产生所述受试者的治疗。

[0262] 此外,所述实施方案提供一种用于在医学疗法中使用的式(I)的化合物。此外,所述实施方案提供一种用于在癌症的治疗中使用的式(I)的化合物。此外,所述实施方案提供

式(I)的化合物在制造用于治疗癌症的药剂中的用途。

[0263] 某些癌症表达GLI多肽。因此,受试者中的大多数癌性病状或癌症可使用所述实施方案的化合物进行治疗。在某些实施方案中,癌性病状或癌症选自结肠癌、黑色素瘤、间皮瘤、肺癌、肾细胞癌、乳癌、前列腺癌、肉瘤、卵巢癌、食道癌、胃癌、肝细胞癌、鼻咽癌、胰腺癌以及神经胶质瘤。

[0264] 在某些实施方案中,化合物用于治疗患有表达GLI多肽如GLI1、GLI2或GLI3多肽的结肠癌的受试者。

[0265] 在某些实施方案中,化合物用于治疗患有表达GLI多肽如GLI1、GLI2或GLI3多肽的乳癌的受试者。

[0266] 在某些实施方案中,化合物用于治疗患有表达GLI多肽如GLI1、GLI2或GLI3多肽的鼻咽癌的受试者。

[0267] 在某些实施方案中,化合物用于治疗患有表达GLI多肽如GLI1、GLI2或GLI3多肽的肺癌的受试者。肺癌包括但不限于,支气管癌[鳞状细胞、未分化小细胞、未分化大细胞、腺癌]、肺泡[细支气管]癌、支气管腺瘤、肉瘤、淋巴瘤、软骨瘤性错构瘤、间皮瘤、SCLC以及NSCLC。

[0268] 在某些实施方案中,化合物用于治疗患有表达GLI多肽如GLI1、GLI2或GLI3多肽的肉瘤的受试者。肉瘤包括但不限于,癌症如血管肉瘤、纤维肉瘤、横纹肌肉瘤、脂肪肉瘤、粘液瘤、横纹肌瘤、纤维瘤、脂肪瘤和畸胎瘤。

[0269] 在某些实施方案中,化合物用于治疗患有表达GLI多肽如GLI1、GLI2或GLI3多肽的胃肠癌的受试者。胃肠癌包括但不限于食道癌[鳞状细胞癌、腺癌、平滑肌肉瘤、淋巴瘤]、胃癌[癌、淋巴瘤、平滑肌肉瘤]、胰腺癌[导管腺癌、胰岛瘤、胰高血糖素瘤、促胃液素瘤、类癌瘤、血管活性肠肽瘤]、小肠癌[腺癌、淋巴瘤、类癌瘤、卡波济氏肉瘤、平滑肌瘤、血管瘤、脂肪瘤、神经纤维瘤、纤维瘤]以及大肠癌[腺癌、管状腺瘤、绒毛状腺瘤、错构瘤、平滑肌瘤]。

[0270] 在某些实施方案中,化合物用于治疗患有表达GLI多肽如GLI1、GLI2或GLI3多肽的泌尿生殖道癌的受试者。泌尿生殖道癌包括但不限于肾癌[腺癌、维尔姆斯氏(Wilms)肿瘤(肾母细胞瘤)、淋巴瘤、白血病、肾细胞癌]、膀胱和尿道癌[鳞状细胞癌、移行细胞癌、腺癌]、前列腺癌[腺癌,肉瘤]以及睾丸癌[精原细胞瘤、畸胎瘤、胚胎癌、畸胎瘤、绒毛膜癌、肉瘤、莱迪希细胞瘤、纤维瘤、纤维腺瘤、腺瘤状肿瘤、脂肪瘤]。

[0271] 在某些实施方案中,化合物用于治疗患有表达GLI多肽如GLI1、GLI2或GLI3多肽的肝癌的受试者。肝癌包括但不限于,肝细胞癌、胆管癌、肝母细胞瘤、血管肉瘤、肝细胞腺瘤以及血管瘤。

[0272] 在某些实施方案中,化合物用于治疗患有表达GLI多肽如GLI1、GLI2或GLI3多肽的皮肤癌的受试者。皮肤癌包括但不限于,恶性黑色素瘤、基底细胞癌、鳞状细胞癌、卡波济氏肉瘤、痣、发育不良性痣、脂肪瘤、血管瘤、皮肤纤维瘤、疤痕疙瘩以及银屑病。

[0273] 在某些实施方案中,化合物用于治疗患有表达GLI多肽如GLI1、GLI2或GLI3多肽的妇科癌症的受试者。妇科癌症包括但不限于子宫癌[子宫内膜癌]、宫颈癌[宫颈癌、侵袭前宫颈发育异常]、卵巢癌[卵巢癌(浆液性囊腺瘤、粘液性囊腺瘤、子宫内膜样癌、透明细胞腺瘤、未分类癌)、粒层-卵泡膜细胞瘤、塞莱二氏(Sertoli-Leydig)细胞瘤、无性细胞瘤、恶性畸胎瘤和其他生殖细胞瘤]、外阴癌[鳞状细胞癌、上皮内癌、腺癌、纤维肉瘤、黑色素瘤]、阴

道癌[透明细胞癌、鳞状细胞癌、葡萄样肉瘤(胚胎性横纹肌肉瘤)以及输卵管癌[癌]。

[0274] 在某些实施方案中,化合物用于治疗患有表达GLI多肽如GLI1、GLI2或GLI3多肽的骨癌的受试者。骨癌包括但不限于,成骨肉瘤[骨肉瘤]、纤维肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、软骨肉瘤、尤因氏肉瘤、恶性淋巴瘤[网织细胞肉瘤]、多发性骨髓瘤、恶性巨细胞瘤、脊索癌、骨软骨瘤[骨软骨性外生骨疣]、良性软骨瘤、软骨母细胞瘤、软骨粘液纤维瘤、骨样骨瘤以及巨细胞瘤。

[0275] 在某些实施方案中,化合物用于治疗患有表达GLI多肽如GLI1、GLI2或GLI3多肽的神经系统癌症的受试者。神经系统的癌症包括但不限于颅骨癌[骨瘤、血管瘤、肉芽瘤、黄瘤、骨佩吉特氏病]、脑膜癌[脑膜瘤、脑膜肉瘤(meningiosarcoma)、神经胶质瘤]、脑癌[星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、神经胶质瘤、室管膜瘤、生殖细胞瘤(松果体瘤)、多形性成胶质细胞瘤、少突神经胶质瘤、神经鞘瘤、成视网膜细胞瘤、先天性肿瘤]以及脊髓癌[神经纤维瘤、脑膜瘤、神经胶质瘤、肉瘤]。

[0276] 在某些实施方案中,化合物用于治疗患有表达GLI多肽如GLI1、GLI2或GLI3多肽的血液癌症的受试者。血液癌症包括但不限于血癌[骨髓性白血病(急性和慢性)、急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、骨髓增生性疾病、多发性骨髓瘤、脊髓发育不良综合征]、霍奇金氏病以及非霍奇金氏淋巴瘤(恶性淋巴瘤)。

[0277] 在某些实施方案中,化合物用于治疗患有表达GLI多肽如GLI1、GLI2或GLI3多肽的肾上腺癌症的受试者。肾上腺癌症包括但不限于,成神经细胞瘤。

[0278] 本公开提供一种用于治疗或预防其中表达GLI多肽如GLI1、GLI2或GLI3多肽的癌症的方法。在某些实施方案中,此方法包括向患者施用药物组合物的步骤。这种药物组合物包含例如式(I)的化合物。在某些实施方案中,所述化合物是化合物1。在某些实施方案中,所述化合物是化合物4。在某些实施方案中,所述化合物是化合物2。在某些实施方案中,所述化合物是化合物6。在某些实施方案中,所述化合物是化合物3。在某些实施方案中,所述化合物是化合物5。

[0279] 所述实施方案的药物组合物单独或与一种或多种另外的治疗性化合物或治疗组合施用。这类治疗性化合物或治疗的实例包括但不限于紫杉醇、环磷酰胺、它莫昔芬、氟尿嘧啶和阿霉素。在某些实施方案中,药物组合物或药剂包含实施方案的化合物和另一种选自埃罗替尼(Tarceva®)、培美曲塞(Alimta®)、LY294002、SB431542以及顺铂的治疗剂。此外,本文描述了其他化学治疗剂。

[0280] 用于治疗癌症的方法可任选地包括一个或多个以下步骤:从个体获得组织或流体的生物样品;针对GLI多肽如GLI1、GLI2或GLI3多肽的表达筛选所述生物样品,例如通过使生物样品与针对GLI1、GLI2或GLI3的抗体相接触;或针对Gli1、Gli2或Gli3多核苷酸的表达筛选所述生物样品,例如通过检测Gli1、Gli2或Gli3 mRNA。

[0281] 使用如本文所述的化学治疗剂初始治疗许多癌症。然而,经常,癌症发展针对这类化学治疗剂的抗性,所述化学治疗剂然后不再有效。因此,在一个实施方案中,癌症是多药耐药性癌症或以其他方式难以治疗的癌症。因此,在某些实施方案中,所述实施方案的化合物用于在肿瘤细胞中克服对化学治疗剂的抗性。此方法包括以下步骤:向对至少一种化学治疗剂具有抗性的肿瘤细胞施用所述实施方案的化合物,其中所述施用导致随后肿瘤细胞死亡。在某些实施方案中,所述化合物是化合物1。在某些实施方案中,所述化合物是化合物

4.在某些实施方案中,所述化合物是化合物2。在某些实施方案中,所述化合物是化合物6。在某些实施方案中,所述化合物是化合物3。在某些实施方案中,所述化合物是化合物5。

[0282] 在某一实施方案中,提供用于在癌症的治疗中使用的所述实施方案的化合物。在某些实施方案中,本公开提供所述实施方案的化合物在制造用于治疗性和/或预防性治疗病状(例如其中表达GLI多肽的癌症)的药物组合物或药剂中的用途。

[0283] 在某些实施方案中,本公开提供化合物在制造用于与治疗表达GLI多肽的癌症的另一种化学治疗抗癌剂组合使用的药物组合物或药剂中的用途。本文描述由本公开提供的药物组合物和药剂。

[0284] 试剂盒

[0285] 为了在以上所建议的诊断、研究以及治疗性应用中使用,本公开还提供试剂盒。在诊断和研究应用中,所述试剂盒可包括以下中的任一种或全部:测定试剂、缓冲剂、实施方案的化合物、GLI多肽、Gli核酸、抗GLI抗体、杂交探针和/或引物、Gli表达构建体等。治疗性产品可包括无菌盐水或另一种药学上可接受的乳液和悬浮液基质。

[0286] 此外,试剂盒可包括含有用于实践实施方案的方法的指导(即,方案)的说明性材料。所述说明书可以多种形式存在于本发明试剂盒中,所述形式中的一种或多种可存在于所述试剂盒中。虽然所述说明性材料通常包含书面或打印材料,但它们并不限于这些。涵盖能够存储这类说明书并且将其传达至终端用户的任何媒介。这类媒介包括但不限于,电子存储介质(如,磁盘、磁带、盒式磁带、芯片、闪存)、光学介质(例如,CD-ROM、DVD、蓝光光碟)等等。这类媒介可包括提供这类说明性资料的互联网站的网址。

[0287] 各种各样的试剂盒和组分可取决于试剂盒的意图用户和用户的具体需求根据实施方案来制备。

[0288] 在某些实施方案中,试剂盒是药物试剂盒并且包括药物组合物,所述药物组合物包含(i)实施方案的小分子化合物以及(ii)药学上可接受的载体。药物试剂盒任选地包括指出药物组合物可以或应当用于处理表达GLI多肽或Gli核酸的癌症的说明书。

[0289] 另外的试剂盒实施方案包括将允许本领域的普通技术人员进行本文所述的任何方法变化的任选的功能性部件。

[0290] 本发明组合物、药物制剂和方法的实施方案的另外方面在2012年7月20日提交的PCT/US12/47689中找到,其要求2011年7月21日提交的美国临时专利申请号61/510,176的优先权,其各自的公开内容以引用的方式整体并入本文。

[0291] 提出以下实施例以便为本领域普通技术人员提供如何进行并使用本发明实施方案的完整公开和描述,并且不意图限制发明者所认为的范围,也不意图代表以下实验为所进行的所有或仅有的实验。已经努力确保关于所使用的数值(例如用量、温度等)的准确性,但也应考虑一些实验误差和偏差。除非另外指出,否则份数是重量份,分子量是重均分子量,温度是摄氏度并且压力是大气压或接近大气压。

实施例

[0292] 实施例1:一般方法

[0293] A.细胞系

[0294] 大多数人细胞系获得自美国典型培养物保藏所(A.T.C.C.;Manassas,Virginia)。

这些细胞系包括：非小细胞肺癌 (NSCLC) 细胞A549、H1703、H460、H358、H322、H838、H1299、H1650、H1975、H522、H441、H1666、H2170、H820、HCC2935、HCC4006以及A427；间皮瘤细胞211H、H513、H2052、H28以及H2452；结肠癌细胞SW480、HCT116、HT29、Lovo、DLD-1、COLO-205、COLO-201以及CaCO2；乳腺癌细胞MCF7、HuL100、HCC1569、SKBR-3以及BT474；胰腺癌细胞Panc-1、Panc02.13、HPAF-II、SW1990、Ypac、8902-1以及8988-1；黑色素瘤细胞LOX、A375、A2058、Calu、Calv6、HA-A、AS2504、Mel202、MaMel144、SK-Mel-2、SK-Mel-5、SK-Mel-28、SK-Mel-3、SK-Mel-24、SK-Mel-30以及MelJuso；多发性骨髓瘤PRMI-8226、H929、MM1.R以及U266；前列腺癌细胞系LnCAP和DU145；正常肺成纤维细胞MRC5。其他人间皮瘤癌细胞系H290和MS-1获得自美国国立卫生研究院 (NIH, Frederick, Maryland)，并且REN由美国宾夕法尼亚大学 (费城, 宾夕法尼亚州) 的Albelda实验室的Steven教授友好提供。人胰腺癌细胞系BxPC3、Panc4.21和CFPAC-1由旧金山的加利福尼亚大学 (旧金山, 加利福尼亚州) Hebrok实验室的Matthias教授友好提供。人胃癌细胞系MNK28和AGS由旧金山的加利福尼亚大学 (旧金山, 加利福尼亚州) 的Xin Chen教授友好提供；食道癌细胞系OE19、TE-7、OE31和OE21由旧金山的加利福尼亚大学 (旧金山, 加利福尼亚州) 的Michael Korn教授友好提供。

[0295] B. 组织样品

[0296] 在外科手术时收集来自经历其肿瘤的治愈性原发性切除的患者的新鲜癌症组织和相邻的正常组织 (IRB批准H8714-15319-040)，并且立即在液氮中快速冷冻。将这些组织样品在-170℃下保持在液氮冷冻器中直到进一步使用。如下制备原代组织培养物：征得患者同意从经历切除的患者获得新鲜癌症组织，将其切割成小片 (1-2mm直径)，并且然后根据制造商的方案在室温下用胶原酶A (Roche Applied Science, Indianapolis, Indiana) 消化2小时。将来自消化的单个细胞离心沉淀，并且将细胞沉淀使用补充有10%胎牛血清、青霉素 (100 IU/ml) 和链霉素 (100µg/ml) 的RPMI 1640洗涤两次。然后，将细胞再悬浮于相同培养基中并且在6孔板中在37℃下在湿润孵育箱中用5%CO₂培养直到它们准备用于进一步处理。

[0297] C. 细胞存活测定 (基于细胞的细胞毒性测定)

[0298] 通常，将实施方案的化合物以30mM的浓度溶解在DMSO中。然后在细胞培养条件下在0、10、30、50至100µM范围的不同浓度下对化合物进行测试。为了测定处理之后的细胞存活，将细胞与化合物在6孔板中孵育约3天。在除去细胞培养基之后，添加1-ml的0.5%结晶紫溶液 (在20%乙醇和20%甲醇中制备) 以使细胞染色5分钟。然后用自来水将结晶紫溶液冲洗干净。基于结晶染色板的密度估计细胞存活。

[0299] 用于在增殖或细胞毒性测定中测定存活细胞数的另一种测定是MTS测定，一种比色方法。MTS测定试剂是可商购的 (Promega Corp., Madison, Wisconsin)。试剂含有四氮唑化合物 [3- (4,5-二甲基噻唑-2-基) -5- (3-羧基甲氧基苯基) -2- (4-磺基苯基) -2H-四氮唑，内盐；MTS] 和电子耦合试剂 (吩嗪硫酸乙酯；PES)。PES具有增强的化学稳定性，这允许它与MTS组合以形成稳定溶液。MTS四氮唑化合物 (Owen试剂) 是通过进入于组织培养基中可溶的有色甲臌产品中的细胞生物还原。此转化可通过由代谢活跃细胞中的脱氢酶产生的NADPH或NADH完成。如通过在490nm下的吸光度所测量的甲臌产品的量与培养物中的活细胞的数量成正比。因为MTS甲臌产品在组织培养基中可溶，所以此测定要求比使用四氮唑化合物如MTT的工序更少的步骤。MTT还原的甲臌产物是结晶沉淀，在于570nm下记录吸收度读数

之前在工序中需要另外步骤以溶解结晶。

[0300] D. 定量RT-PCR

[0301] 使用Qiagen RNeasy微型试剂盒 (Valencia, California) 分离总RNA。杂交探针和引物(表1)购自Applied Biosystems (ABI, Foster City, California)。根据制造商的方案进行cDNA合成和Taqman®PCR。在ABI 7300实时PCR系统中一式三份地测定基因表达。将样品标准化至其管家基因GAPDH并且然后通过使用 2^{-dCt} 方法进行计算。

[0302] 表1. 用于定量RT-PCR的杂交探针和引物

基因	杂交探针和引物 (来自 Applied Biosystems 的产品编号, 参考用于所列举的基因的 Taqman® PCR 测定混合物)
Gli1	Hs01110776_g1
Gli2	Hs01119974_m1
Gli3	Hs00609233_m1
Axin2	Hs00610344_m1
EGFR	Hs01076078_m1
Wnt-2	Hs00608224_m1
HHIP	Hs01011015_m1
细胞周期蛋白 D1	Hs99999004_m1

[0304] E. 体内抗肿瘤发生性研究

[0305] 在携带人癌细胞的小鼠异种移植物模型中体内测试所施用的化合物。简言之, 将雌性无胸腺裸鼠菌株NCRNU-M (5-10周龄, 20-25克重量; Taconic, Germantown, New York) 维持在不含病原体的条件下。使用三种人癌细胞系: NSCLC A549、黑色素瘤MelJuso以及间皮瘤MS-1。五或十只小鼠用于每个组中并且在背侧区域中以100μl的体积皮下注射 3×10^6 个癌细胞。在接种之后, 使人癌症细胞在小鼠中生长10-13天以变得可见肿瘤结节。然后将动物以50mg/kg体重 (1mg/小鼠/天) 的剂量注射实施方案的化合物。单独媒介物用作对照。将所述化合物和对照在40μl体积中进行调节以用于腹膜内注射在小鼠的腹部。在大约14天的相同时间内每日进行注射。在化合物处理完成之后允许肿瘤生长另外1-2周。每三至四天测量肿瘤大小, 并且使用宽度(x)和长度(y)计算肿瘤体积($x^2y/2$, 其中 $x < y$)。在此周期期间, 还通过测量小鼠的体重来检测处理的一般毒性。数据呈现为平均值(+S.D.)。

[0306] F. 小鼠中化合物的药物代谢动力学(PK)研究

[0307] 将小鼠(每组三只)以10mg/kg体重的剂量静脉内注射或口服施用每种化合物。然后在注射或口服施用(P0)之后20分钟、1小时、3小时、10小时和24小时从每只小鼠的尾静脉收集血浆。通过质谱法测定每一血浆样品中的化合物浓度以确认进入小鼠的血流中的化合物吸收。

[0308] G. 用于毒性评价的组织学检查

[0309] 在体内研究完成之后, 从小鼠切除不同器官。这些器官包括肝、肺、心脏、肾、肠、卵巢、脑、脾、皮肤以及肌肉。将标本固定在4%缓冲甲醛中, 包埋在石蜡中, 切片, 并且通过苏木精和伊红(HE)染色进行组织学分析。由小鼠病理学家针对如与媒介物对照相比的来自所有器官的毒性证据对HE染色的载玻片进行检查。此外, 收集来自所有处理组的每个动物的白细胞(WBC: 白细胞, NE: 中性粒细胞, LY: 淋巴细胞, MO: 单核细胞, EO: 嗜酸性粒细胞, BA: 嗜碱性粒细胞), 并且通过血细胞计数器对白细胞群体进行计数。

[0310] H. 统计学分析

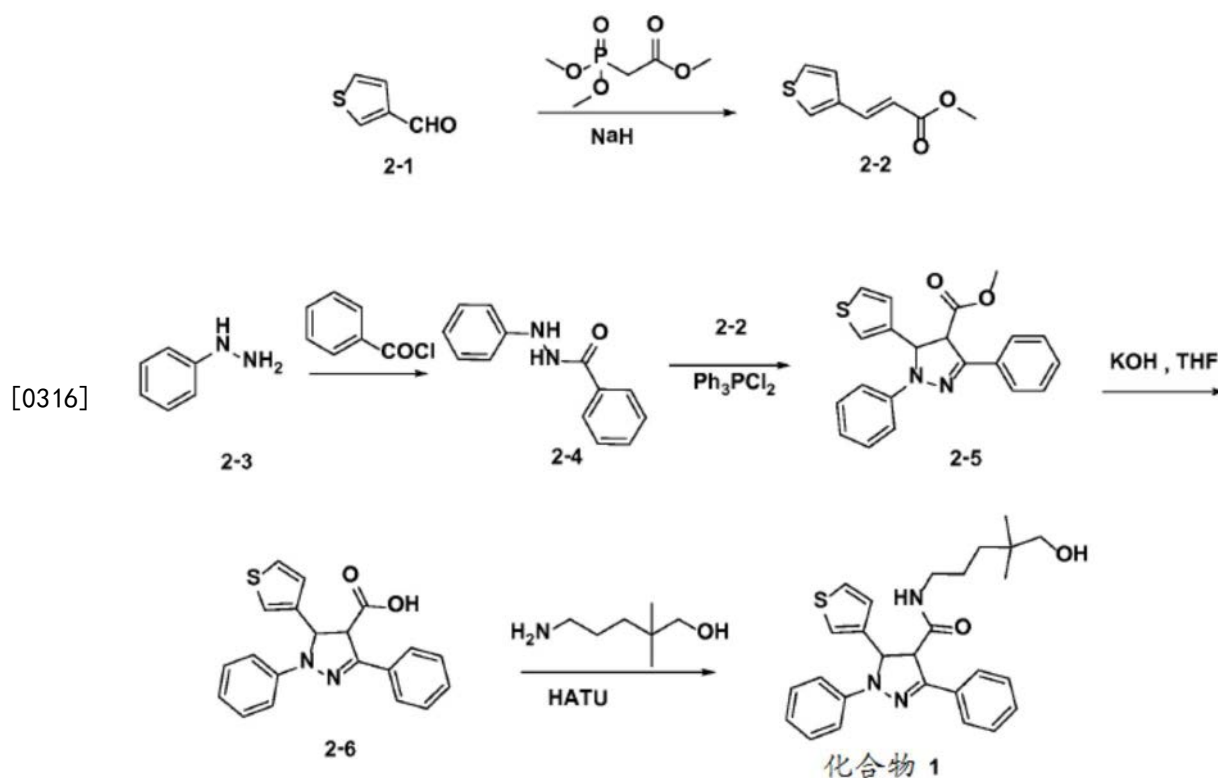
[0311] 所示的数据表示平均值(+S.D.)。Excel中的未配对T检验用于比较不同处理和细胞系。

[0312] I. 小分子化合物的制备

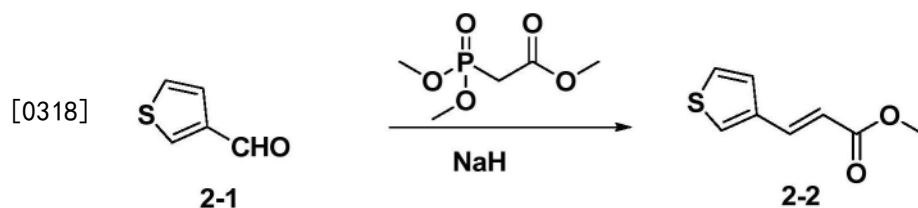
[0313] 除非另有说明,否则试剂和溶剂按来自商业供应商原样使用。在用于质子的400 MHz Bruker AVANCE光谱仪上获得质子和碳核磁共振光谱。光谱以ppm(δ)给出并且偶联常数J以赫兹报道。溶剂峰值用作质子光谱的参考峰。在Agilent 1100 HPLC LC-MS离子阱电喷雾电离(ESI)质谱仪上获得LC-MS光谱。

[0314] 实施例2:化合物1的合成

[0315] 合成方案2

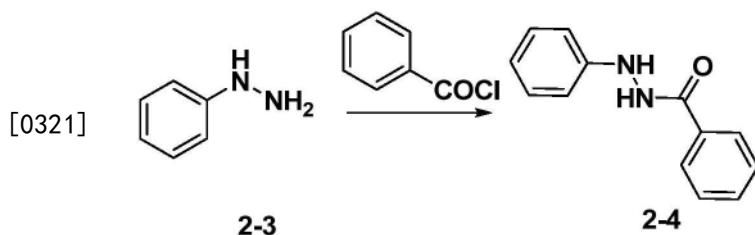


[0317] A. 化合物2-2的制备



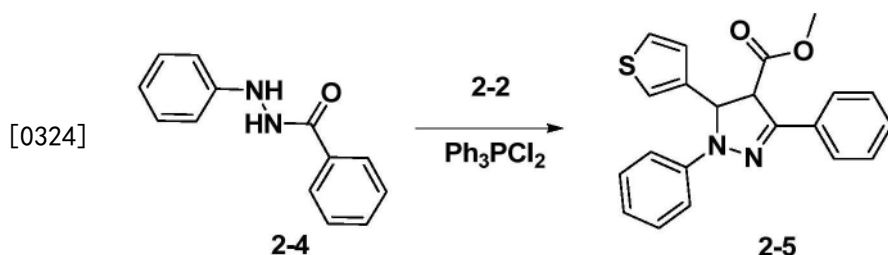
[0319] 向60%NaH(37g,0.93mol)于500mL干燥THF中的混合物添加2-(二甲氧基磷酰基)乙酸甲酯(102g,0.56mol)。然后将化合物2-1(41g,0.37mol)于100mL干燥THF中的溶液添加至此混合物。在室温下搅拌反应混合物12小时。向反应混合物中添加饱和NH₄Cl水溶液。浓缩所得到的混合物并且用乙酸乙酯萃取(3x50 mL)。将有机相用水(3x25 mL)、盐水(3x25 mL)洗涤,用无水Na₂SO₄干燥并且在真空中干燥以得到粗产物。将残余物用柱色谱法(于石油醚中的乙酸乙酯10%v/v)纯化以得到呈透明液体的化合物2-2(30g,产率:48%)。m/z:169 [M+H]⁺。

[0320] B. 化合物2-4的制备



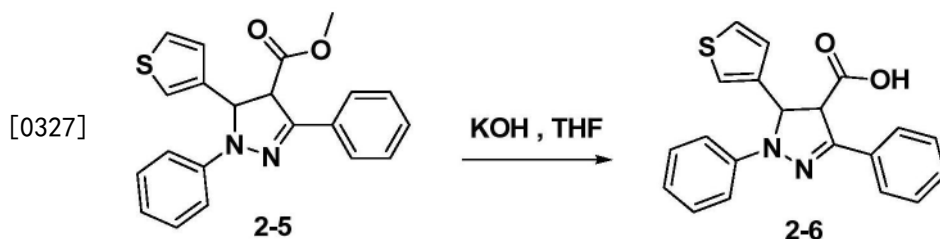
[0322] 在室温下向化合物2-3 (121g, 0.64mol)、吡啶 (101g, 1.28mol) 于400mL CH_2Cl_2 中的混合物添加苯甲酰氯 (90g, 0.64mol) 于100mL CH_2Cl_2 中的溶液。将反应混合物搅拌12小时。将反应混合物用水 (4x50mL) 洗涤, 用无水 Na_2SO_4 干燥并且在真空中干燥。将残余物用乙酸乙酯再结晶以得到呈白色固体的化合物2-4 (72g, 产率52%)。m/z: 213 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0323] C. 化合物2-5的制备



[0325] 在室温下向化合物2-4 (15g, 72mmol) 和化合物2-2 (13g, 79mmol) 以及 Ph_3PCl_2 (48g, 144mmol) 于 CH_2Cl_2 (250mL) 中的溶液添加 Et_3N (36g, 360mmol)。在室温下搅拌反应混合物12小时。将反应混合物用水 (3x30 mL)、盐水 (3x30 mL) 洗涤, 用无水 Na_2SO_4 干燥并且在真空中干燥。将残余物用柱色谱法 (于石油醚中的乙酸乙酯1% v/v) 纯化以得到呈黄色固体的化合物2-5 (10g, 产率: 38%)。m/z: 363 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

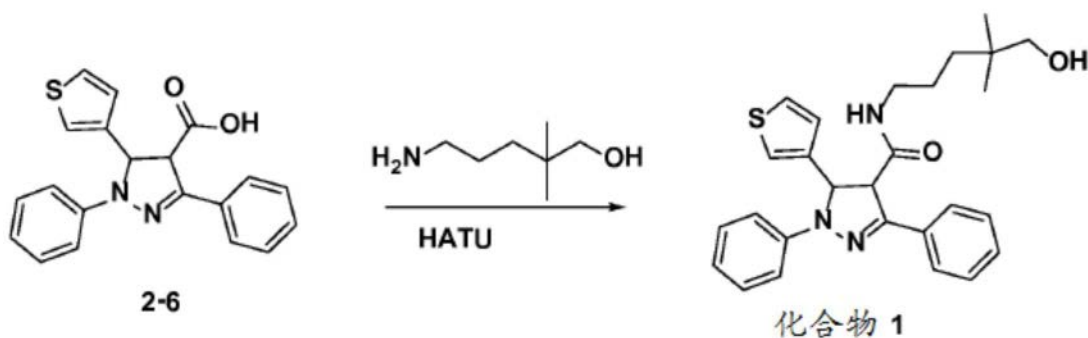
[0326] D. 化合物2-6的制备



[0328] 向化合物2-5 (10g, 28mmol) 于THF (150mL) 中的溶液添加于水 (80mL) 中的KOH (4.7g, 84mmol) 并且在室温下搅拌反应混合物12小时。用1N HCl将反应混合物pH值调节至6且浓缩, 用乙酸乙酯 (4x30 mL) 萃取。将有机相用水 (2x20 mL)、盐水 (2x20 mL) 洗涤, 用无水 Na_2SO_4 干燥并且在真空中干燥以得到呈黄色固体的粗化合物2-6 (9.0g, 产率: 92%)。m/z: 349 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0329] E. 化合物1的制备

[0330]



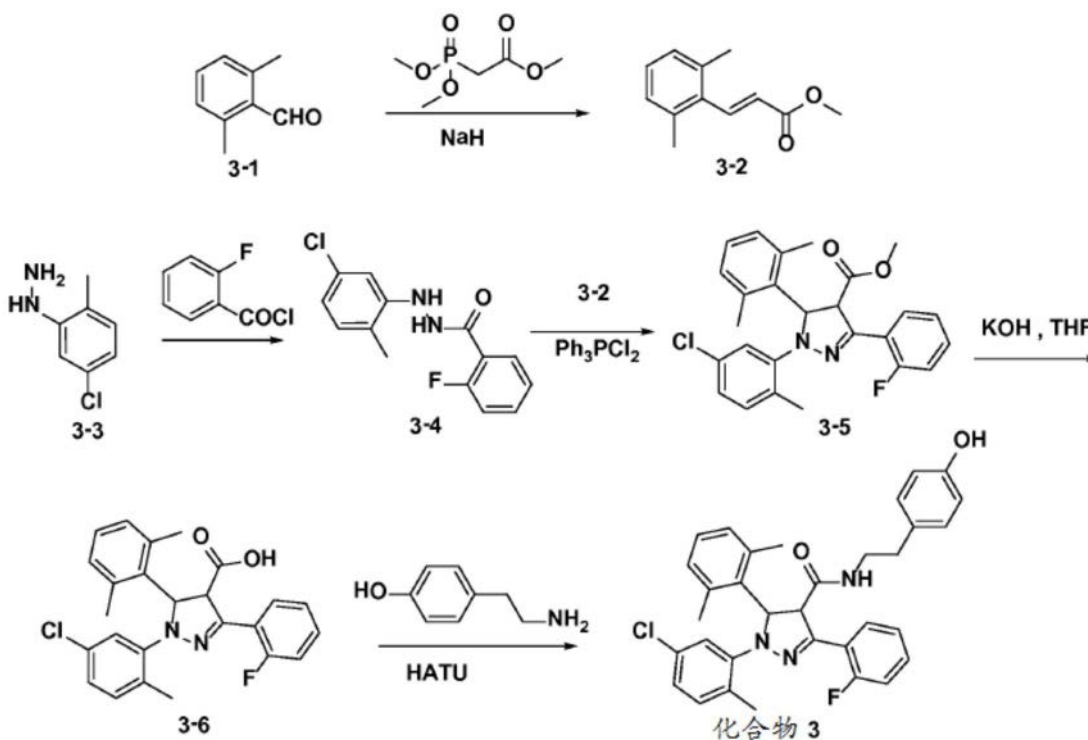
[0331] 将化合物2-6 (9.0g, 26mmol)、5-氨基-2,2-二甲基戊-1-醇 (5.1g, 39mmol)、Et₃N (5.2g, 52mmol) 以及O-(7-氮杂-1H-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓六氟磷酸盐 (HATU, 14.8g, 39mmol) 于CH₂Cl₂中的混合物在室温下搅拌12小时。将反应混合物用水 (3x20mL)、盐水 (2x20 mL) 洗涤, 用无水Na₂SO₄干燥并且在真空中干燥。将残余物通过柱色谱法 (于石油醚中的乙酸乙酯25%v/v) 纯化以得到呈白色固体的化合物1 (6.0g, 产率: 50%)。

[0332] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ 7.71 (m, 2H), 7.35~7.30 (m, 5H), 7.23 (q, J=3.2, 1H), 7.14 (d, J=8.0, 2H), 7.09 (dd, J₁=2.8 J₂=0.8, 1H), 6.94 (m, 2H), 6.38 (t, J=5.6, 1H), 4.96 (d, J=4.8, 1H), 4.49 (d, J=4.4, 1H), 3.33 (m, 1H), 3.10 (s, 2H), 3.15 (m, 1H), 1.42~1.35 (m, 2H), 1.11~1.06 (m, 2H), 0.74 (d, J=2.4, 6H)。m/z: 462 [M+H]⁺

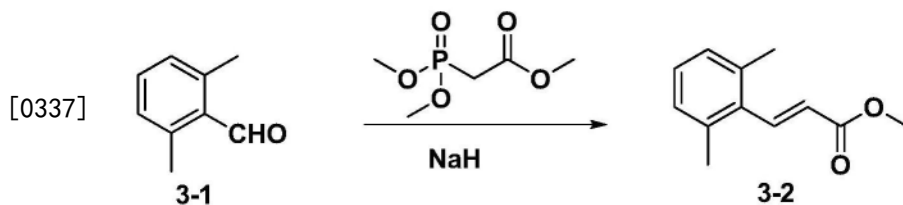
[0333] 实施例3: 化合物3的合成

[0334] 合成方案3

[0335]

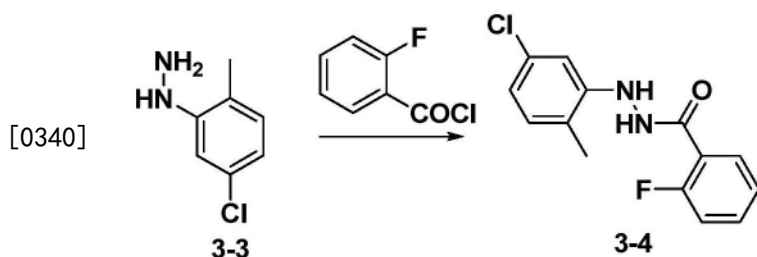


[0336] A. 化合物3-2的制备



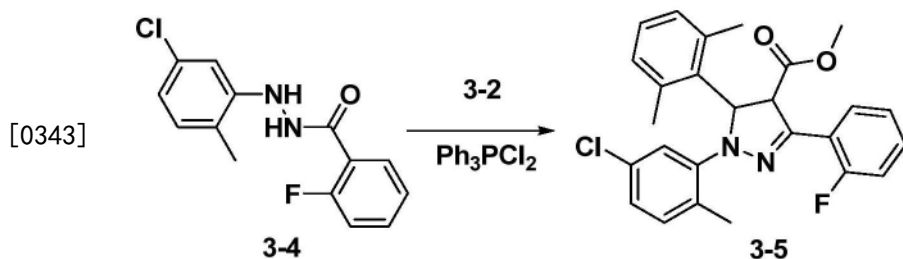
[0338] 向60%NaH (37g, 0.93mol) 于500mL干燥THF中的溶液添加2-(二甲氧基磷酰基)乙酸甲酯(102g, 0.56mol)。然后将化合物3-1 (50g, 0.37mol) 于100mL干燥THF中的溶液添加至所述溶液。在室温下搅拌反应混合物12小时。向反应混合物中添加饱和NH₄Cl水溶液。浓缩反应混合物并且用乙酸乙酯(3x50 mL)萃取。将有机相用水(3x25mL)、盐水(3x25 mL)洗涤, 用无水Na₂SO₄干燥并且在真空中浓缩以得到粗产物。将残余物用柱色谱法(于石油醚中的乙酸乙酯10%v/v)纯化以得到呈黄色液体的化合物3-2 (30g, 产率43%)。m/z: 191 [M+H]⁺

[0339] B. 化合物3-4的制备



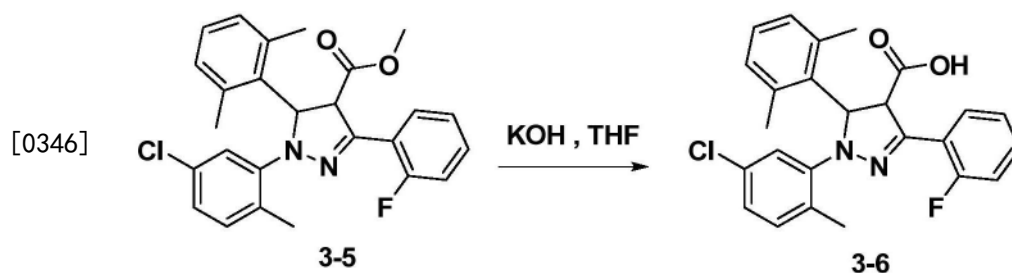
[0341] 在室温下向化合物3-3 (100g, 0.64mol) 和吡啶 (101g, 1.28mol) 于400mL CH₂Cl₂中的混合物添加4-氟苯甲酰氯(101g, 0.64mol) 于100mL CH₂Cl₂中的溶液。将反应混合物搅拌12小时。将反应混合物用水(4x50 mL)洗涤, 用无水Na₂SO₄干燥并且在真空中浓缩。将残余物用乙酸乙酯再结晶以得到呈白色固体的化合物3-4 (70g, 产率39%)。m/z: 279 [M+H]⁺

[0342] C. 化合物3-5的制备



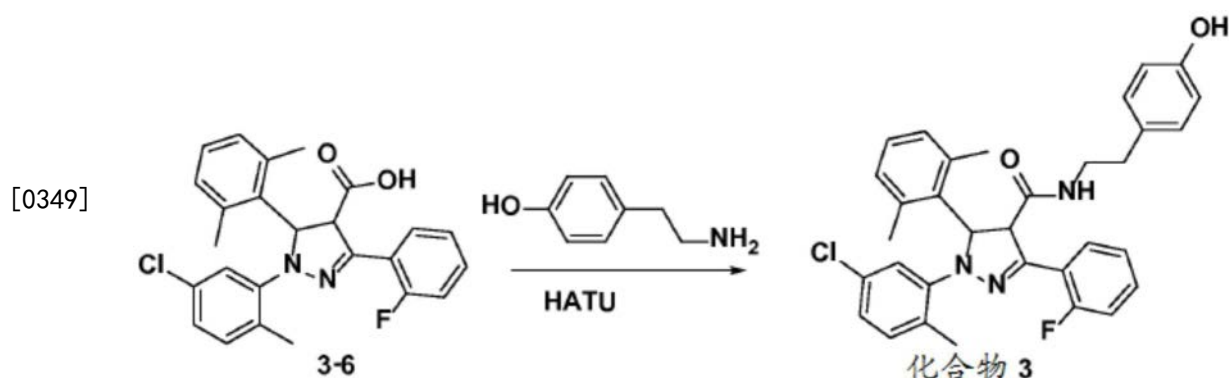
[0344] 在室温下向化合物3-4 (20g, 72mmol) 和化合物3-2 (15g, 79mmol) 以及Ph₃PCl₂ (48g, 144mmol) 于CH₂Cl₂ (250mL) 中的溶液添加Et₃N (36g, 360mmol)。在室温下搅拌此反应混合物12小时。将反应混合物用水(3x30 mL)、盐水(3x30mL)洗涤, 用无水Na₂SO₄干燥并且在真空中浓缩。将残余物用柱色谱法(乙酸乙酯于石油醚中1%v/v)纯化以得到呈黄色固体的化合物3-5 (10g, 产率31%)。m/z: 451 [M+H]⁺

[0345] D. 化合物3-6的制备



[0347] 向化合物3-5 (10.0g, 22mmol) 于THF (150mL) 中的溶液添加于水 (60mL) 中的KOH (3.7g, 67mmol)。在室温下搅拌反应混合物12小时。用1N HCl将反应混合物pH值调节至6且浓缩, 并且用乙酸乙酯 (4x30 mL) 萃取。将有机相用水 (2x20 mL)、盐水 (2x20 mL) 洗涤, 用无水Na₂SO₄干燥并且在真空中浓缩以得到呈黄色固体的粗化合物3-6 (8.0g, 产率: 83%)。m/z: 437 [M+H]⁺

[0348] E. 化合物3的制备

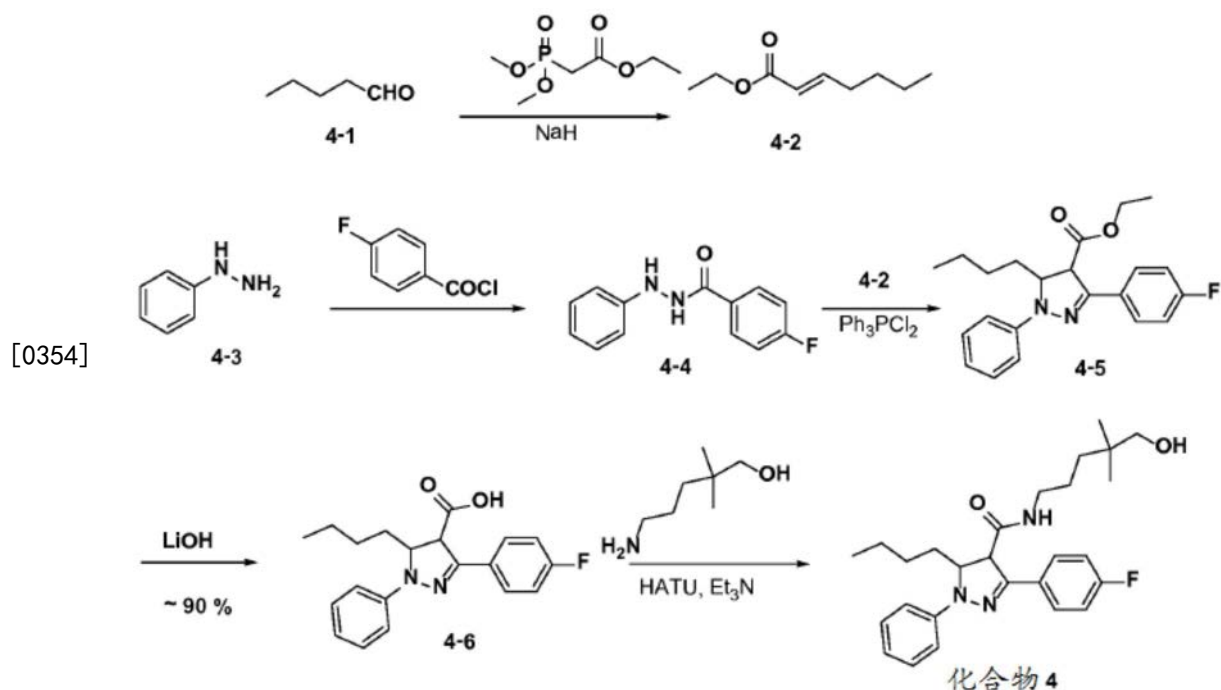


[0350] 将化合物3-6 (8.0g, 18mmol)、4-(2-氨基乙基)苯酚 (3.7g, 27mmol)、Et₃N (3.6g, 36mmol)、0-(7-氮杂-1H-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓六氟磷酸盐 (10.3g, 27mmol) 于CH₂Cl₂中的混合物在室温下搅拌12小时。将反应混合物用水 (3x20 mL)、盐水 (2x20mL) 洗涤, 用无水Na₂SO₄干燥并且在真空中浓缩。将残余物通过柱色谱法 (于石油醚中的乙酸乙酯25%v/v) 纯化以得到呈白色固体的化合物3 (5.0g, 产率: 50%)。

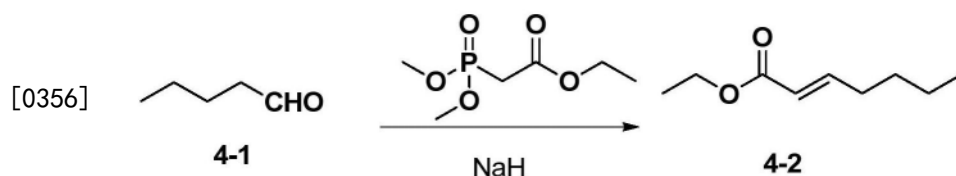
[0351] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ 7.56 (td, J₁=7.6, J₂=2.0, 1H), 7.26~7.20 (m, 1H), 7.14 (d, J=7.6, 1H), 7.07~6.90 (m, 6H), 6.83 (d, J=6.8, 1H), 6.79 (d, J=8.8, 2H), 6.12 (t, J=5.6, 1H), 5.34 (dd, J₁=10.4, J₂=1.6, 1H), 4.98 (s, 1H), 4.77 (d, J=10.4, 1H), 3.55 (m, 1H), 3.43 (m, 1H), 2.70~2.54 (m, 2H), 2.43 (s, 3H), 2.40 (s, 3H), 2.10 (s, 3H)。m/z: 556 [M+H]⁺

[0352] 实施例4: 化合物4的合成

[0353] 合成方案4

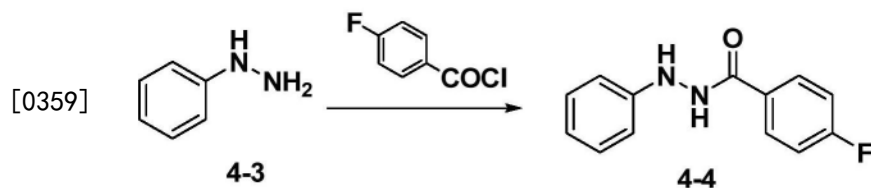


[0355] A. 化合物4-2的制备



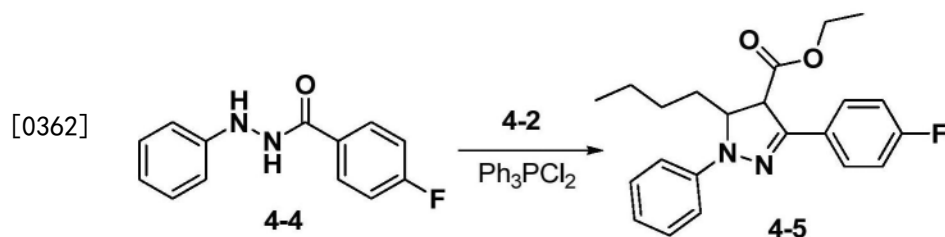
[0357] 向60%NaH(34.8g,870mmol)于500mL干燥THF中的溶液添加2-(二甲氧基磷酰基)乙酸乙酯(102g,522mmol)。然后将化合物4-1(30g,348mmol)于100mL干燥THF中的溶液添加至所述混合物。在室温下搅拌反应混合物12小时。向反应混合物中添加饱和 NH_4Cl 水溶液。浓缩反应混合物并且用乙酸乙酯(3x50 mL)萃取。将有机相用水(3x25 mL)、盐水(3x25 mL)洗涤,用无水 Na_2SO_4 干燥并且在真空中浓缩以得到粗产物。将残余物用柱色谱法(于石油醚中的乙酸乙酯10%v/v)纯化以得到呈黄色液体的化合物4-2(20g,产率37%)。 m/z :157 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0358] B. 化合物4-4的制备



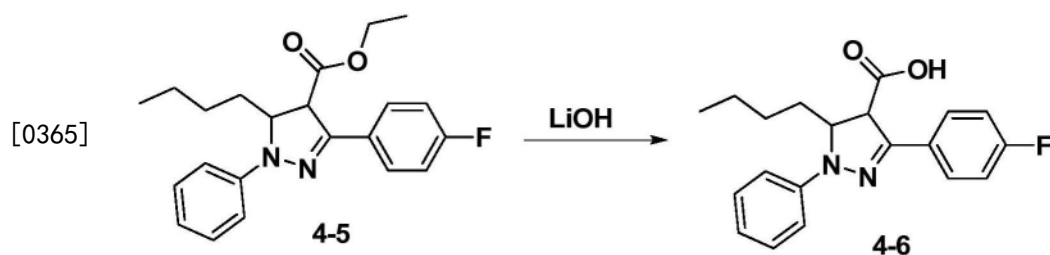
[0360] 在室温下向化合物4-3(100g,0.9mol)和吡啶(146g,1.9mol)于400mL CH_2Cl_2 中的混合物添加4-氟苯甲酰氯(147g,0.9mol)于100mL CH_2Cl_2 中的溶液。将反应混合物搅拌12小时。将反应混合物用水(4x50 mL)洗涤,用无水 Na_2SO_4 干燥并且在真空中浓缩。将残余物用乙酸乙酯再结晶以得到呈白色固体的化合物4-4(200g,产率94%)。 m/z :231 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0361] C. 化合物4-5的制备



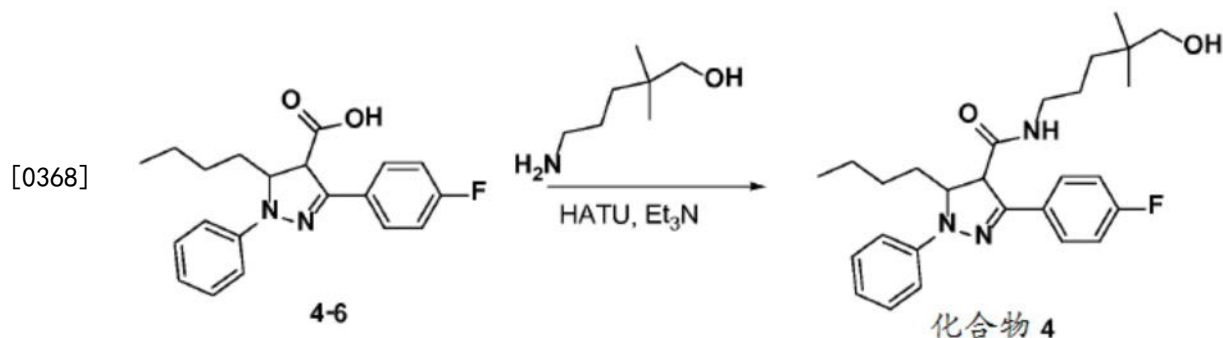
[0363] 在室温下向化合物4-4 (20g, 87mmol) 和化合物4-2 (15g, 96mmol) 和Et₃N (44g, 435mmol) 于CH₂Cl₂ (250mL) 中的溶液添加Ph₃PCl₂ (58g, 174mmol)。在室温下搅拌反应混合物12小时。将反应混合物用水 (3x30 mL)、盐水 (3x30mL) 洗涤, 用无水Na₂SO₄干燥并且在真空中浓缩。将残余物用柱色谱法 (于石油醚中的乙酸乙酯1% v/v) 纯化以得到呈黄色固体的化合物4-5 (9g, 产率28%)。m/z: 369 [M+H]⁺

[0364] D. 化合物4-6的制备



[0366] 向化合物4-5 (9.0g, 24mmol) 于THF (150mL) 中的溶液添加于水 (60mL) 中的LiOH (4.1g, 72mmol)。在室温下搅拌反应混合物12小时。用1N HCl将反应混合物pH值调节至6且浓缩, 并且用乙酸乙酯 (4x30 mL) 萃取。将有机相用水 (2x20 mL)、盐水 (2x20 mL) 洗涤, 用无水Na₂SO₄干燥并且在真空中浓缩以得到呈黄色固体的粗化合物4-6 (8.0g, 产率: 98%)。m/z: 341 [M+H]⁺

[0367] E. 化合物4的制备

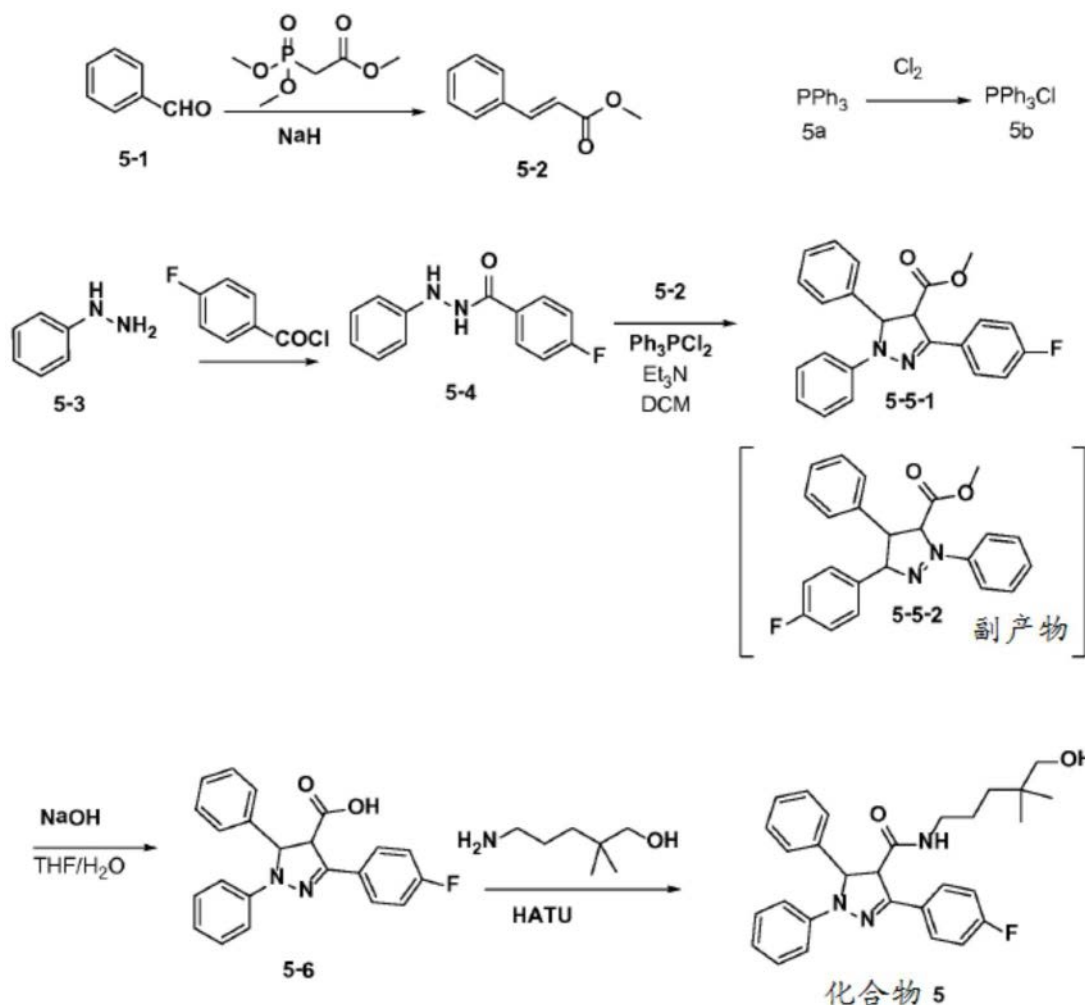


[0369] 将化合物4-6 (8.0g, 24mmol)、5-氨基-2,2-二甲基戊-1-醇 (5.3g, 41mmol)、Et₃N (5.4g, 54mmol)、O-(7-氮杂-1H-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓六氟磷酸盐 (15.4g, 40.5mmol) 于CH₂Cl₂中的混合物在室温下搅拌12小时。将反应混合物用水 (3x20 mL)、盐水 (2x20mL) 洗涤, 用无水Na₂SO₄干燥并且在真空中浓缩。将残余物通过柱色谱法 (于石油醚中的乙酸乙酯25% v/v) 纯化以得到呈白色固体的化合物4 (6.0g, 产率: 55%)。

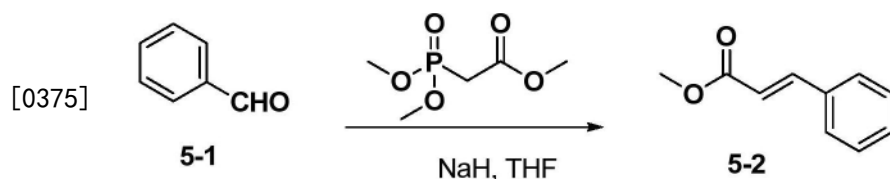
[0370] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-d₁/D₂O-d₂) δ 7.73 (td, J₁=5.6, J₂=2.4, 2H), 7.32 (t, J=7.6, 2H), 7.11 (t, J=7.8, 4H), 6.93 (t, J=7.2, 1H), 6.35 (m, 1H), 4.34 (d, J=4.4, 1H), 3.70 (m, 1H), 3.30 (m, 1H), 3.17 (s, 2H), 3.08 (m, 1H), 1.81 (m, 1H), 1.54 (m, 1H), 1.39~1.25 (m, 6H), 1.06 (m, 2H), 0.84 (t, J=6.8, 3H), 1.05 (s, 6H)。m/z: 454 [M+H]⁺

[0371] 实施例5:化合物5的合成

[0372] 合成方案5

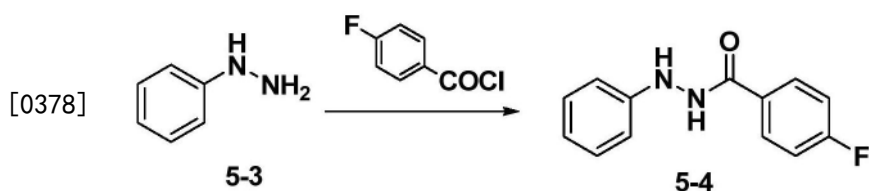


[0374] A. 化合物5-2的制备



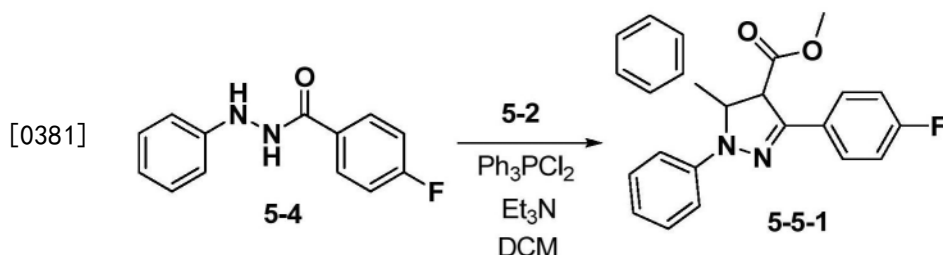
[0376] 在冰浴下向NaH (60%) (19.83g, 0.496mol, 1.5当量) 于THF (500ml) 中的悬浮液逐滴添加2-(二甲氧基磷酰基) 乙酸甲酯 (66g, 0.363mol, 1.1当量)。在添加完成之后, 将混合物搅拌30分钟。然后添加于THF (100ml) 中的化合物5-1 (40g, 0.33mol, 1.0当量)。使反应混合物升温至室温, 且搅拌过夜。在0℃-10℃下逐滴添加水 (100ml)。将反应混合物分离成多层并且通过乙酸乙酯 (2x 100mL) 萃取水层。将合并的有机层用盐水 (2x 100ml) 洗涤并且通过无水Na₂SO₄干燥。在真空中浓缩合并的有机层以得到粗产物。将粗产物用乙酸乙酯再结晶以得到呈白色固体的化合物5-2 (45g, 产率73%)。MS (ESI) m/z 163.1 (M+H)⁺。

[0377] B. 化合物5-4的制备



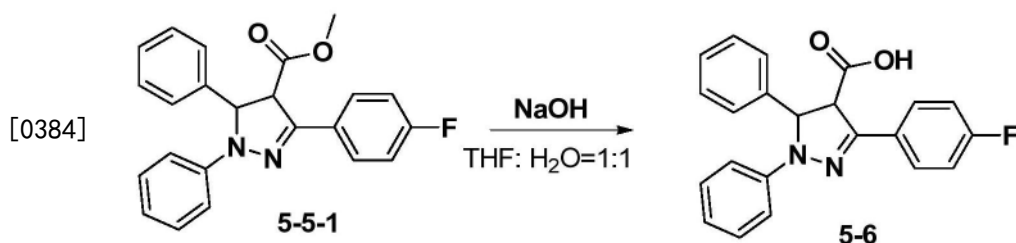
[0379] 将于 CH_2Cl_2 (500ml) 中的化合物5-3 (100g, 0.926mol, 1.0当量) 和吡啶 (110g, 1.39mol, 1.5当量) 添加至于 CH_2Cl_2 (100mL) 中的4-氟苯甲酰氯 (146.3g, 0.926mol, 1.0当量)。将反应混合物搅拌12小时。将反应混合物用水 (4x100 mL) 洗涤并且在真空中浓缩。将残余物用乙酸乙酯再结晶以得到呈白色固体的化合物5-4 (150g, 产率70%)。MS (ESI) m/z 231 ($\text{M}+\text{H}$)⁺。

[0380] C. 化合物5-5-1的制备



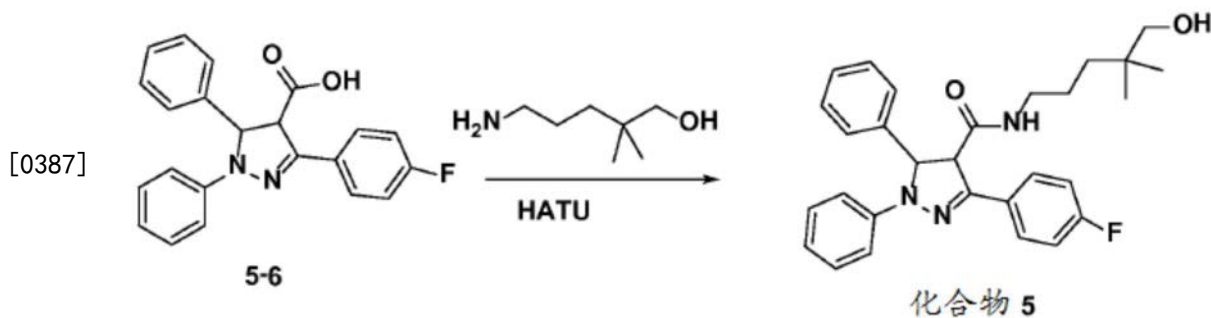
[0382] 在室温下向化合物5-4 (20.82g, 0.091mol, 1.0当量) 和化合物5-2 (16.2g, 0.10mol, 1.1当量) 和 Et_3N (46.0g, 0.455mol, 5.0当量) 于 CH_2Cl_2 中的溶液添加 Ph_3PCl_2 (60.4g, 0.182mol, 2.0当量)。在室温下搅拌反应混合物12小时。将反应混合物用水 (3x50 mL)、盐水 (2x50mL) 洗涤, 用无水 Na_2SO_4 干燥并且在真空中浓缩。将残余物用柱色谱法 (MeOH: DCM=1:100) 纯化以得到呈白色固体的化合物5-5-1 (9g, 产率26%)。MS (ESI) m/z 375 ($\text{M}+\text{H}$)⁺。

[0383] D. 化合物5-6的制备



[0385] 将化合物5-5-1 (9g, 0.024mmol, 1.0当量) 和NaOH (1.93g, 0.048mmol, 2.0当量) 于THF (50ml) 和 H_2O (50ml) 中的混合物在室温下搅拌4小时。将反应混合物在真空中浓缩且pH调节至1-2。过滤反应混合物以分离白色固体。将固体溶解至 CH_2Cl_2 中。将溶液用盐水 (2x100ml) 洗涤并且用无水 Na_2SO_4 干燥。在真空中浓缩溶液以得到呈白色固体的化合物5-6 (7.65g, 产率88%)。MS (ESI) m/z 361 ($\text{M}+\text{H}$)⁺。

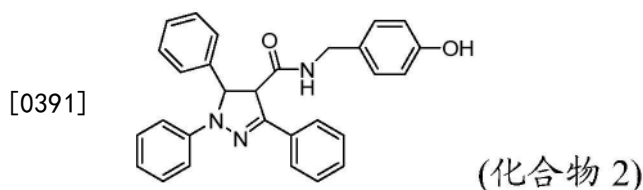
[0386] E. 化合物5的制备



[0388] 将化合物5-6 (9g, 0.025mol, 1.0当量)、o-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N'-四甲基脲鎓六氟磷酸盐 (HATU) (14.25g, 0.038mol, 1.5当量)、Et₃N (5.06g, 0.050mol, 2.0当量) 于CH₂Cl₂中的溶液在室温下搅拌2小时。向反应混合物, 添加水 (100ml) 并且分离有机相。用盐水 (2x50mL) 洗涤有机层并且用无水硫酸钠干燥。将溶液在真空中浓缩且将残余物用硅胶色谱法纯化以得到呈白色固体的化合物5 (5.6g, 产率47%)。

[0389] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.63-7.67 (m, 2H), 7.33 (m, 2H), 7.28 (m, 1H), 7.20 (m, 3H), 7.15 (m, 2H), 6.95-6.99 (m, 3H), 6.40 (m, 1H), 4.78 (d, J=4.4, 1H), 4.47 (d, J=5.2, 1H), 3.40 (m, 1H), 3.20 (s, 2H), 3.19 (m, 1H), 1.44 (m, 2H), 1.12 (m, 2H), 0.76 (s, 6H)。MS (ESI) m/z 474.2 (M+H)⁺。

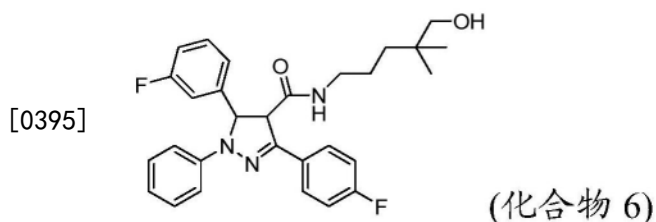
[0390] 实施例6: 化合物2的合成



[0392] 使用与实施例2-5中类似的合成工序合成化合物2。

[0393] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.31 (s, 1H), 8.92 (t, J=5.6, 1H), 7.72 (m, 2H), 7.37 (m, 5H), 7.30 (m, 3H), 7.16 (m, 2H), 7.00 (m, 4H), 6.74 (m, 1H), 6.73 (m, 2H), 5.47 (d, J=6.4, 1H), 4.31 (d, J=6.4, 1H), 4.20 (m, 2H)。MS (ESI) m/z 448.2 (M+H)⁺。

[0394] 实施例7: 化合物6的合成



[0396] 使用与实施例2-5中类似的合成工序合成化合物6。

[0397] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.62-7.64 (m, 2H), 7.33 (m, 2H), 7.26 (m, 1H), 7.12-7.15 (m, 2H), 6.97-7.01 (m, 5H), 6.40 (m, 1H), 4.78 (d, J=5.2, 1H), 4.46 (d, J=5.2, 1H), 3.38 (m, 1H), 3.20 (s, 2H), 3.19 (m, 1H), 1.38 (m, 2H), 1.13 (m, 2H), 0.76 (d, J=3.2, 1H)。MS (ESI) m/z 492.2 (M+H)⁺。

[0398] 实施例8: 实施方案的化合物在体内抑制肿瘤生长 (小鼠异种移植物模型: 黑色素瘤MelJuso)

[0399] 使用小鼠异种移植物模型 (黑色素瘤MelJuso) 进行化合物1、2、4和6的体内功效研

究。将小鼠在背侧区域中以100 μ l的体积皮下注射 3×10^6 个细胞。在接种后13天,小鼠开始接受用50mg/kg体重的剂量的施用的化合物每日处理持续14天($n=10$)。单独媒介物用作对照($n=10$)。将施用的化合物和媒介物在40 μ l体积中进行调节以用于腹膜内注射在小鼠的腹部中。如上所述计算肿瘤大小和肿瘤体积。如可在图1中观察到,在用所施用的化合物处理之后肿瘤生长被显著抑制。

[0400] 实施例9:实施方案的化合物在体内抑制肿瘤生长(小鼠异种移植物模型:间皮瘤MS-1)

[0401] 使用小鼠异种移植物模型(间皮瘤MS-1)进行化合物1和4的体内功效研究。将每组五只雌性无胸腺裸小鼠在背侧区域中以100 μ l的体积皮下注射 3×10^6 个细胞。在接种之后十天,开始以50mg/kg体重每日腹膜内注射所述化合物持续14天($n=5$)。单独媒介物用作对照($n=5$)。在处理完成之后允许肿瘤生长另外两周。每周两次测量肿瘤大小直到实验完成。与对照组相比,肿瘤重量在用所施用的化合物处理之后降低(图2)。

[0402] 实施例10:实施方案的化合物在体内抑制肿瘤生长(小鼠异种移植物模型:肺癌A549)

[0403] 对化合物1和4在小鼠异种移植物模型(NSCLC A549)中的体内功效研究进行检查。将小鼠在背侧区域中以100 μ l的体积皮下注射 3×10^6 个细胞。在接种之后10天,小鼠开始接受用50mg/kg体重剂量的化合物1或4每日处理持续14天($n=5$),然后每日另一轮50mg/kg体重的处理持续1 \times 7天。单独媒介物用作对照($n=5$)。将施用的化合物和DMSO在50 μ l体积中进行调节以用于腹膜内注射在小鼠的腹部中。在初始肿瘤接种后43天,将肿瘤从每组的小鼠切下并且使用天平测量其重量。与对照组相比,肿瘤重量在用所施用的化合物处理之后降低(图3)。这种低剂量体内结果与本文呈现的体外数据一致。

[0404] 实施例11:实施方案的化合物在体内对肿瘤中的Hedgehog途径的作用

[0405] 为了检查化合物1、2、4和6是否通过体内抑制Hedgehog信号传导途径来遏制肿瘤生长,使用从异种移植物肿瘤分离的总RNA通过定量实时RT-PCR对Hh途径的关键组分和直接靶基因(例如Gli1、Gli2、Gli3、HHIP和细胞周期蛋白D1)的表达进行分析。GAPDH用作对照。使用来自每组的具有合理大小肿瘤的两只随机选择的小鼠的“汇集”的肿瘤进行此RT-PCR分析。据发现在黑色素肿瘤(MelJuso)中Hh信号传导被化合物1、2、4和6抑制(图4)。结果在图4中示出,其中C是对照并且V是媒介物。

[0406] 实施例12:实施方案的化合物在体内对肿瘤中的规范Wnt途径的作用

[0407] 为了检查化合物1、2、4和6是否通过体内抑制Wnt信号传导途径来遏制肿瘤生长,使用从异种移植物肿瘤分离的总RNA通过定量实时RT-PCR对Wnt途径的关键组分和直接靶基因(例如Wnt2、Axin2、EGFR和细胞周期蛋白D1)的表达进行分析。GAPDH用作对照。使用来自每组的具有合理大小肿瘤的两只随机选择的小鼠的“汇集”的肿瘤进行此RT-PCR分析。据发现与对照相比,规范Wnt活化的关键指示符的表达在化合物1、2和4处理的黑色素瘤肿瘤中显著下调(图4)。结果在图4中示出,其中C是对照并且V是媒介物。

[0408] 实施例13:在体内处理之后小鼠中实施方案的化合物的毒性分析

[0409] 作为化合物1、2、4和6的初步体内毒性研究,检查在处理之后小鼠中是否存在白细胞群体的变化和体重的损失。在完成如本文所述的体内研究之后,收集来自所有处理组的每个动物的白细胞(WBC:白细胞,NE:中性粒细胞,LY:淋巴细胞,MO:单核细胞,E0:嗜酸性粒

细胞,BA:嗜碱性粒细胞),并且通过血细胞计数器对白细胞群体进行计数。在药物施用过程期间使用天平测量对照组(n=10)和处理组(n=10)的体重。在用所施用的化合物处理之后未观察到白细胞群体的明显变化或体重的损失(图5和6)。在另外的毒性研究中,检查不同剂量的化合物4和6对小鼠的体重的作用。将所述化合物以3种不同剂量:25、50和100mg/kg体重在腹部中腹膜内注射至小鼠(每给药组3只小鼠)持续连续6天。一致地,在用所施用的化合物处理之后未观察到体重的明显损失(图7)。

[0410] 实施例14:实施方案的化合物对小鼠中的不同细胞的作用

[0411] 为了在体内分析化合物1、2、4和6的毒性,将每组(三只小鼠)用两种剂量的每种化合物每日腹膜内注射持续6天,并且然后从所述小鼠切除主要小鼠器官,如肝、脾、肾和心脏。标本将被固定在4%缓冲甲醛中,包埋在石蜡中,切片并且通过苏木精和伊红(H&E)染色进行组织学分析。未观察到来自化合物处理的小鼠的器官中的明显毒性。结果在图8-11中示出。

[0412] 实施例15:实施方案的化合物和化学疗法在治疗癌细胞中的协同作用

[0413] 在人NSCLC和MM细胞系(图12-17)中进行所述化合物与几种化学疗法:埃罗替尼(Tarceva®)、PI3K抑制剂LY294002、TGFβ抑制剂SB431542以及培美曲塞(Alimta®)的組合治疗。在所有实验中,将NSCLC和MM细胞系用不同剂量的每种化合物或組合处理72小时,并且进行MTS测定以测定细胞增殖。应用通过CalcuSyn软件(Biosoft,Cambridge,UK)计算的組合指数(CI)来描述两种化合物的組合作用的作用,其中CI<1指示协同作用,CI=1指示累加作用并且CI>1指示拮抗作用。学生t检验应用于统计分析。据发现組合治疗可协同抑制NSCLC和MM细胞的增殖。

[0414] 实施例16:化合物4的对映体P1和P2的手性HPLC柱分离

[0415] 进行实验以分离化合物4的两种对映体(P1和P2)。使用Chiralpak AD-H柱(Chiral Technologies,Exton,PA)。柱大小是25cm x4.6mm内径,其中CSP颗粒大小是5微米。HPLC-等级甲醇用作在15%(v/v)下夹带在二氧化碳中的共溶剂。柱温度时39.7℃。CO₂流速是2.55ml/分钟并且共溶剂流速是0.45ml/分钟,从而产生3ml/分钟的总流速。前压力和背压力分别是186和150巴,从而产生36巴的压降。光电二极管阵列开始和终止波长分别是214和359nm。

[0416] 在所描述的条件,化合物4的对映体P1据发现具有3.27分钟的保留时间,而化合物4的对映体P2具有4.14分钟的保留时间。对于每种对映体曲线下面积百分比分别是49.1%(对映体P1)和47.7%(对映体P2)。对映体P1和对映体P2分开的随后重复色谱法(其中HPLC条件与以上所述的相同,除了对于对映体P1为39.1℃的温度和45巴的压降且对于对映体P2为41.1℃的温度和33巴的压降)分别指示99.9%(对映体P1)和98.8%(对映体P2)的纯度,其中对于对映体P1保留时间是3.53分钟且对于对映体P2保留时间是4.47分钟。

[0417] 实施例17:手性化合物4展示在多种癌细胞系中的对映体特异性活性

[0418] 进行实验以测定不同癌细胞系(包括肺癌、黑色素瘤、间皮瘤、结肠直肠癌、胰腺癌和前列腺癌)中的对映体特异性活性。将癌细胞系用媒介物或0.1μM至20μM剂量范围的化合物4和化合物4的两种纯化的对映体(P1和P2)在含有0.5%FBS的培养基中处理4天并且测定细胞毒性IC₅₀值。数据表明对映体P2在抑制癌细胞生长方面比对映体P1活性更高。结果还表明化合物4和对映体P2的活性是特异性的,因为P2对映体的IC₅₀值是化合物4(即,P1和P2对

映体的相等混合物)的 IC_{50} 值的大约50%。图18示出对于不同癌细胞系,Gli抑制剂化合物4以及其两种纯化对映体(P1和P2)中的每一种的细胞毒性 IC_{50} 值(μM)。

[0419] 实施例18:Gli抑制剂化合物4-对映体P2的功效与肺癌细胞系中的Gli表达的相关性

[0420] 进行实验以检查化合物4-对映体P2(IC_{50} 值如在图18中所示)的功效与肺癌细胞系中Gli1和Gli2的表达水平之间的相关性。化合物4-对映体P2的 IC_{50} 值(μM)与那些细胞系中的Gli1和Gli2的mRNA表达水平(通过实时RT-PCR测量)负相关,从而支持化合物4-对映体P2在抑制人肺癌细胞系中的Gli功能方面是特异性的。图19示出Gli抑制剂化合物4的功效与非小细胞肺癌(NSCLC)细胞中的Gli表达的相关性的图。

[0421] 实施例19:Gli抑制剂化合物4-对映体P2的功效与其他癌细胞中的Gli表达的相关性

[0422] 进行实验以检查化合物4-对映体P2(IC_{50} 值如在图18中所示)的功效与几种其他类型的癌细胞系(包括间皮瘤、黑色素瘤和结肠直肠癌)中Gli1和Gli2的表达水平之间的相关性。化合物4-对映体P2的 IC_{50} 值(μM)与那些细胞系中的Gli1和Gli2的mRNA表达水平(通过实时RT-PCR测量)负相关,从而支持化合物4-对映体P2在抑制癌细胞系中的Gli功能方面是特异性的。图20示出Gli抑制剂化合物4-对映体P2的功效与这些其他类型的癌细胞系(包括间皮瘤、黑色素瘤和结肠直肠癌细胞)中的Gli表达的相关性的图。

[0423] 实施例20:在NSCLC细胞系A549中通过小Gli抑制剂化合物4-对映体P2抑制Gli/TAF9依赖性转录活性

[0424] 为了检查化合物4-对映体P2在抑制Gli功能中的特异性并且为了验证它是否阻断Gli与TAF9之间的相互作用,使用连接至荧光素酶报告基因的Gli结合位点的8个重复序列(8xGli BS)作为Gli-依赖性转录的替代测量进行实验以检查在NSCLC A549细胞中化合物4-对映体P2处理之后的荧光素酶活性。所述结果指示单独Gli1或Gli2的过量表达显著增加8xGli BS-荧光素酶活性和TAF9的共表达,其中Gli1或Gli2使8xGli BS-荧光素酶活性进一步增加至比单独Gli显著更高的水平,从而证实Gli1和Gli2特异性结合Gli-结合位点并且是在转录中功能活性的,且TAF9可作为共活化剂与Gli蛋白相互作用。在5 μM 下处理16-20小时之后,据发现化合物4-对映体P2在A549细胞中显著下调单独Gli和Gli/TAF9两者诱导的8xGli BS荧光素酶活性。此结果指示化合物4-对映体P2可以是在抑制Gli蛋白与TAF9之间的相互作用方面特异性的。图21示出荧光素酶活性(%)的图,其示出Gli抑制剂化合物4-对映体P2在体外抑制NSCLC细胞系A549中的Gli/TAF依赖性转录活性。

[0425] 实施例21:Gli抑制剂化合物4-对映体P2在体外抑制NSCLC细胞中的Gli下游靶标

[0426] 使用实时RT-PCR进行实验以分析化合物4-对映体P2是否通过抑制Gli功能来遏制肺癌细胞生长。总RNA分离自用化合物4-对映体P2处理的肺癌细胞(A549和H1299)。所述结果指示Gli下游靶标如Gli1、Gli2、HHIP和Ptch1的表达水平在那些肺癌细胞系中全部被化合物4-对映体P2显著下调。这些结果表明化合物4-对映体P2化合物可通过抑制Gli功能特异性地遏制肺癌细胞生长。图22示出Gli下游靶标的表达水平的图,其示出Gli抑制剂化合物4-对映体P2在体外抑制NSCLC细胞中的Gli下游靶标。

[0427] 实施例22:Gli抑制剂化合物4-对映体P2在体外抑制间皮瘤细胞中的Gli下游靶标

[0428] 还使用实时RT-PCR进行实验以分析化合物4-对映体P2是否通过抑制Gli功能来遏

制间皮瘤细胞生长。总RNA分离自用化合物4-对映体P2 (5uM) 处理的间皮瘤细胞MS-1。所述结果指示Gli下游靶标如Gli1、Gli2、HHIP和Ptch1等的表达水平在那些MS-1细胞中全部被化合物4-对映体P2显著下调。这些结果表明化合物4-对映体P2化合物可通过抑制Gli功能特异性地遏制间皮瘤细胞生长。图23示出基因表达的图,其示出Gli抑制剂化合物4-对映体P2在体外抑制间皮瘤细胞中的Gli下游靶标。

[0429] 实施例23:Gli抑制剂化合物4-对映体P2在体内抑制肿瘤中的间皮瘤细胞中的Gli下游靶标(小鼠异种移植物模型:间皮瘤MS-1)

[0430] 使用免疫组织化学(IHC)进行实验以分析化合物4-对映体P2是否通过体内抑制Gli功能来遏制间皮瘤肿瘤生长。所述结果指示Gli1和Gli2的蛋白质表达水平在那些MS-1肿瘤中均被化合物4-对映体P2显著下调,与在那些体内肿瘤中增殖标记物Ki-67的下调一致。这些结果表明化合物4-对映体P2化合物可通过体内抑制Gli功能特异性地遏制间皮瘤肿瘤生长。图24示出显示Gli抑制剂化合物4-对映体P2在体内(小鼠异种移植物模型:间皮瘤MS-1)抑制肿瘤中的间皮瘤细胞中的Gli下游靶标的免疫组织化学图像。

[0431] 实施例24:GDC0449 (Smo抑制剂) 和Gli抑制剂化合物4-对映体P2在体外遏制间皮瘤细胞的生长中的协同作用

[0432] 进行实验以测试GDC0449 (Smo抑制剂) 与Gli抑制剂化合物4-对映体P2的组合作用。通过组合Gli抑制剂化合物4-对映体P2与Smo抑制剂GDC0449来处理间皮瘤细胞系H28。所述结果指示组合作用协同地或累加地遏制这些间皮瘤细胞得增殖。CalcuSyn软件(Biosoft)用于使用中值效应方程基于Chou-Talalay方法用组合指数(CI)针对癌细胞系中的每种组合作用治疗进行计算以鉴别协同、累加和拮抗药物相互作用。CI值描述两种化合物的组合作用的作用,其中 $CI < 1$ 指示协同作用, $CI = 1$ 指示累加作用并且 $CI > 1$ 指示拮抗作用。协同作用被进一步定义为中等协同作用($CI = 0.7-0.9$)、协同作用($CI = 0.3-0.7$)和强协同作用($CI = 0.1-0.3$)。图25示出显示GDC0449 (Smo抑制剂) 与Gli抑制剂化合物4-对映体P2在体外抑制间皮瘤细胞的生长中的协同作用。

[0433] 虽然出于清楚和理解目的,已经通过举例说明和实施例相当详细地描述了前述实施方案,但鉴于本公开的教导本领域的普通技术人员将显而易见的是,在不必背离本发明的精神和范围的情况下可对本发明进行某些变化、改变、修改和等效物替代。因此,本文描述的实施方案经受各种修改、变化等,其中本发明的范围仅通过参考随附的权利要求书来确定。本领域的技术人员将容易地识别多种非关键性参数,所述参数可被改变、变化或修改以产生基本上类似的结果。

[0434] 虽然本发明的要素各自在本文描述为包括多个实施方案,但应理解,除非另外指明,本发明的给定要素的每个实施方案能够与本发明的其他要素的每个实施方案一起使用,并且每种所述使用意图形成本发明的不同实施方案。

[0435] 如可由以上公开内容了解,本发明具有多种应用。本发明通过以上实施例进一步说明,所述实施例仅是说明性的并且不意图以任何方式限制本发明的定义和范围。

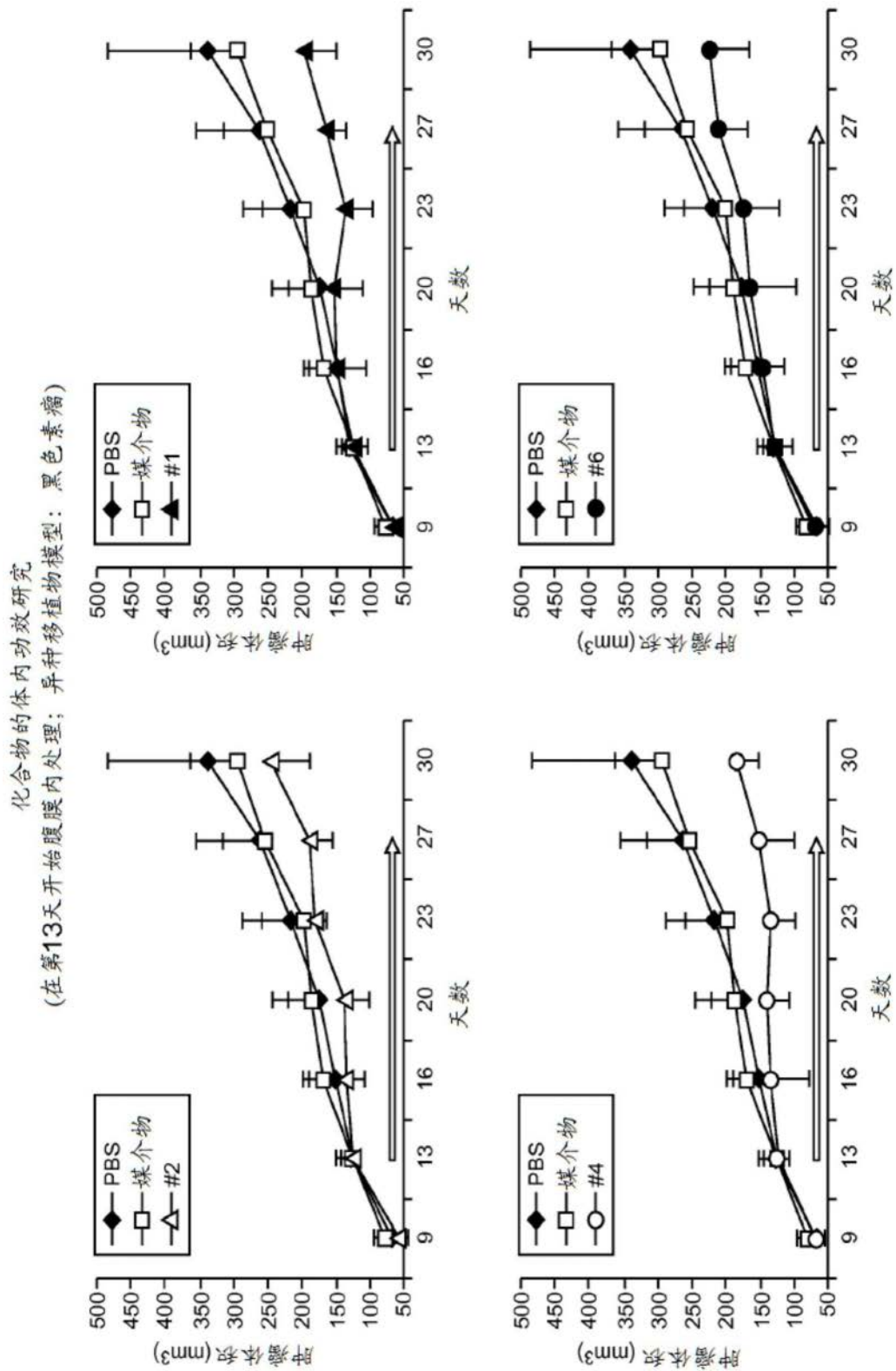


图1

化合物的体内功效研究
(在第10天开始腹膜内处理;
异种移植瘤模型: 间皮瘤MS-1)

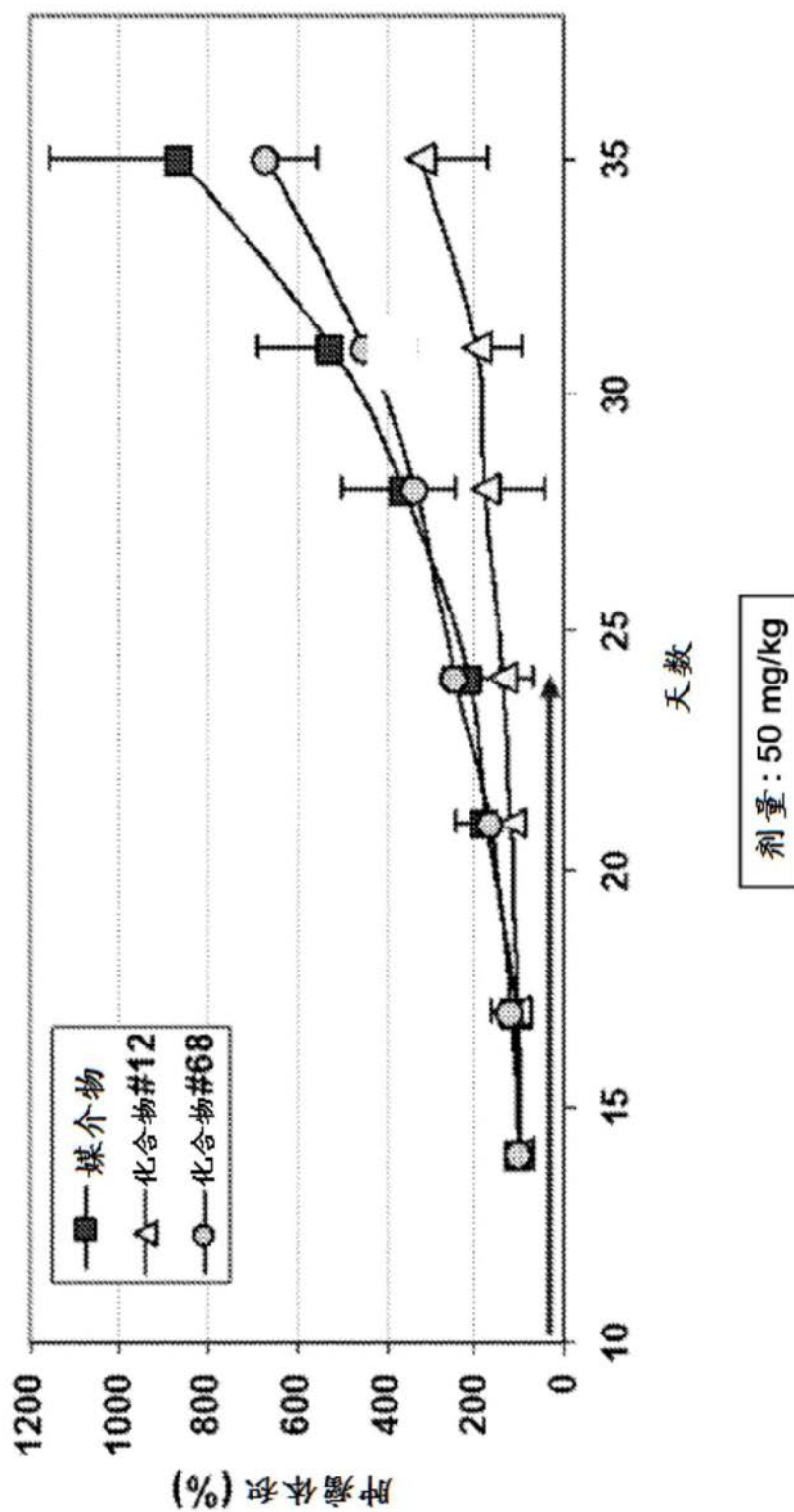


图2

化合物的体内功效研究
(在第10天开始第1轮腹膜内处理并且
在第35天开始第2轮处理;异种移植模型:肺癌A549)

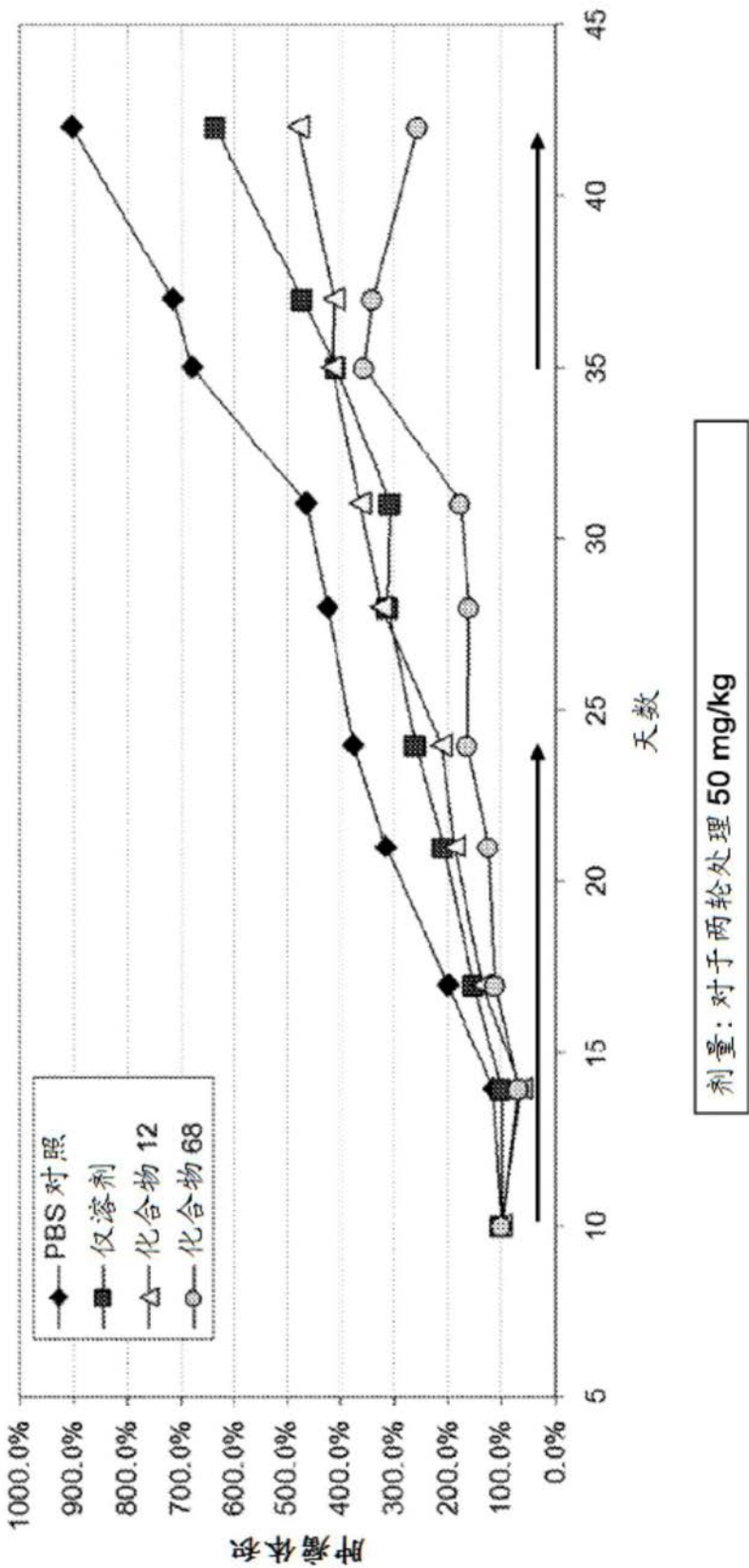


图3

化合物对体内黑色素瘤中的Hh和Wnt途径的作用

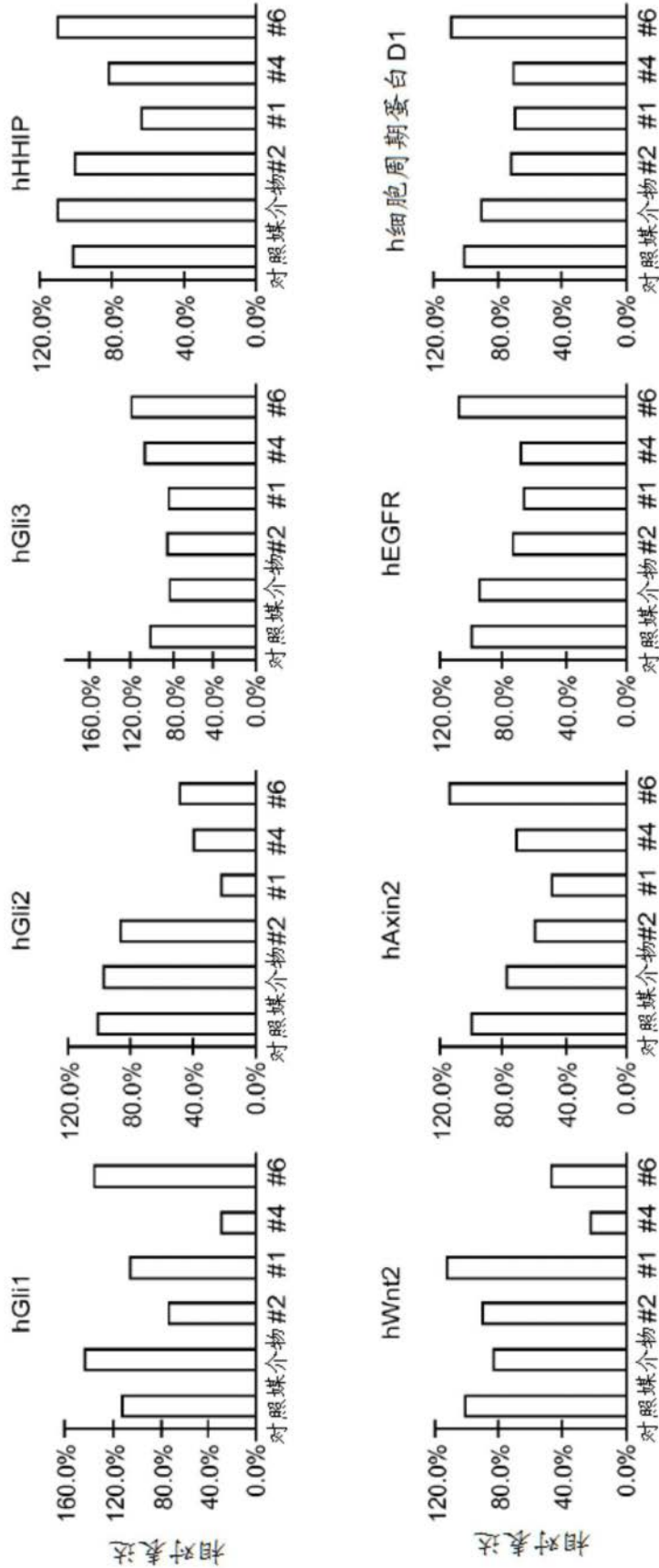


图4

小鼠中化合物的毒性分析

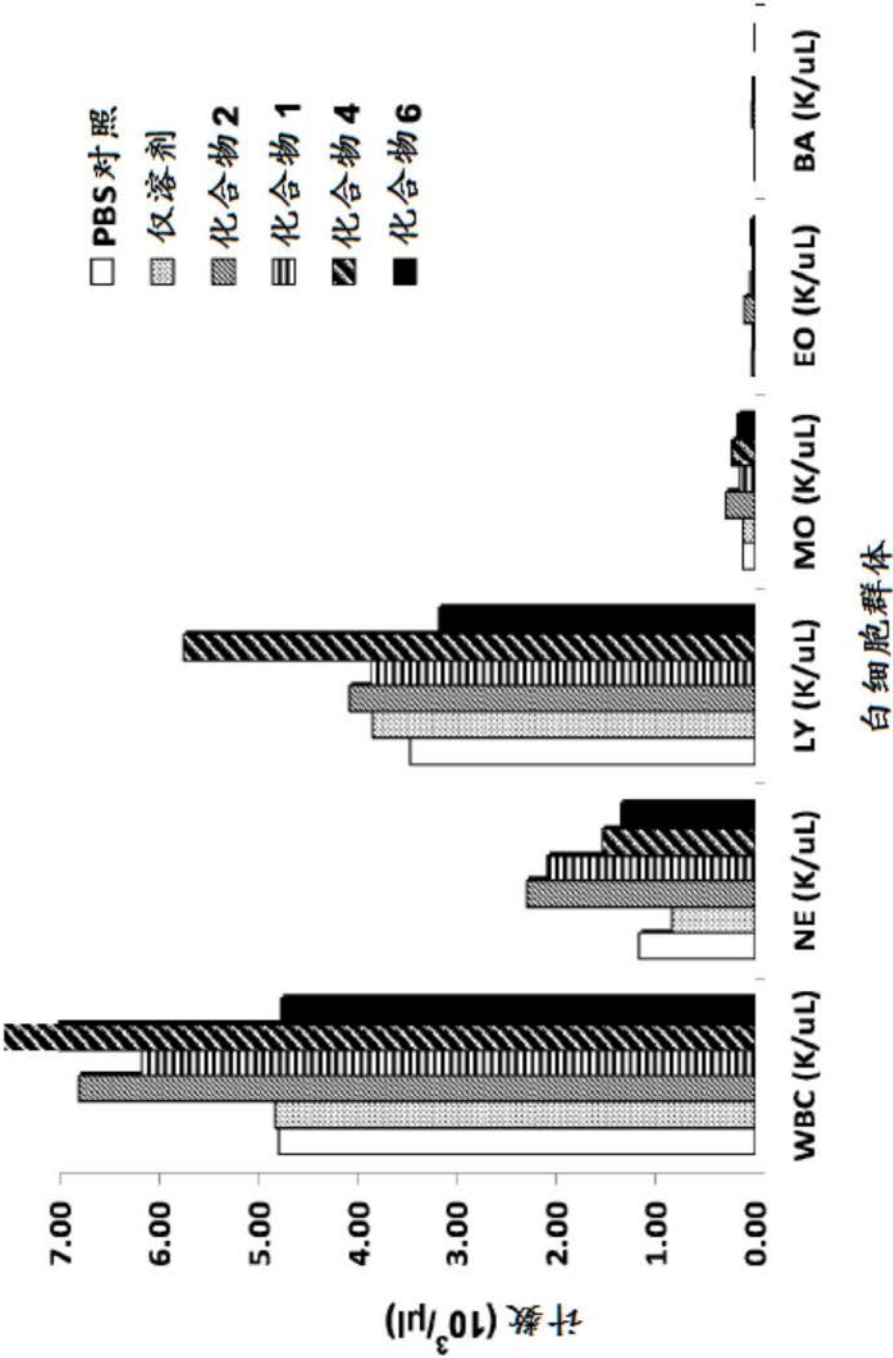


图5

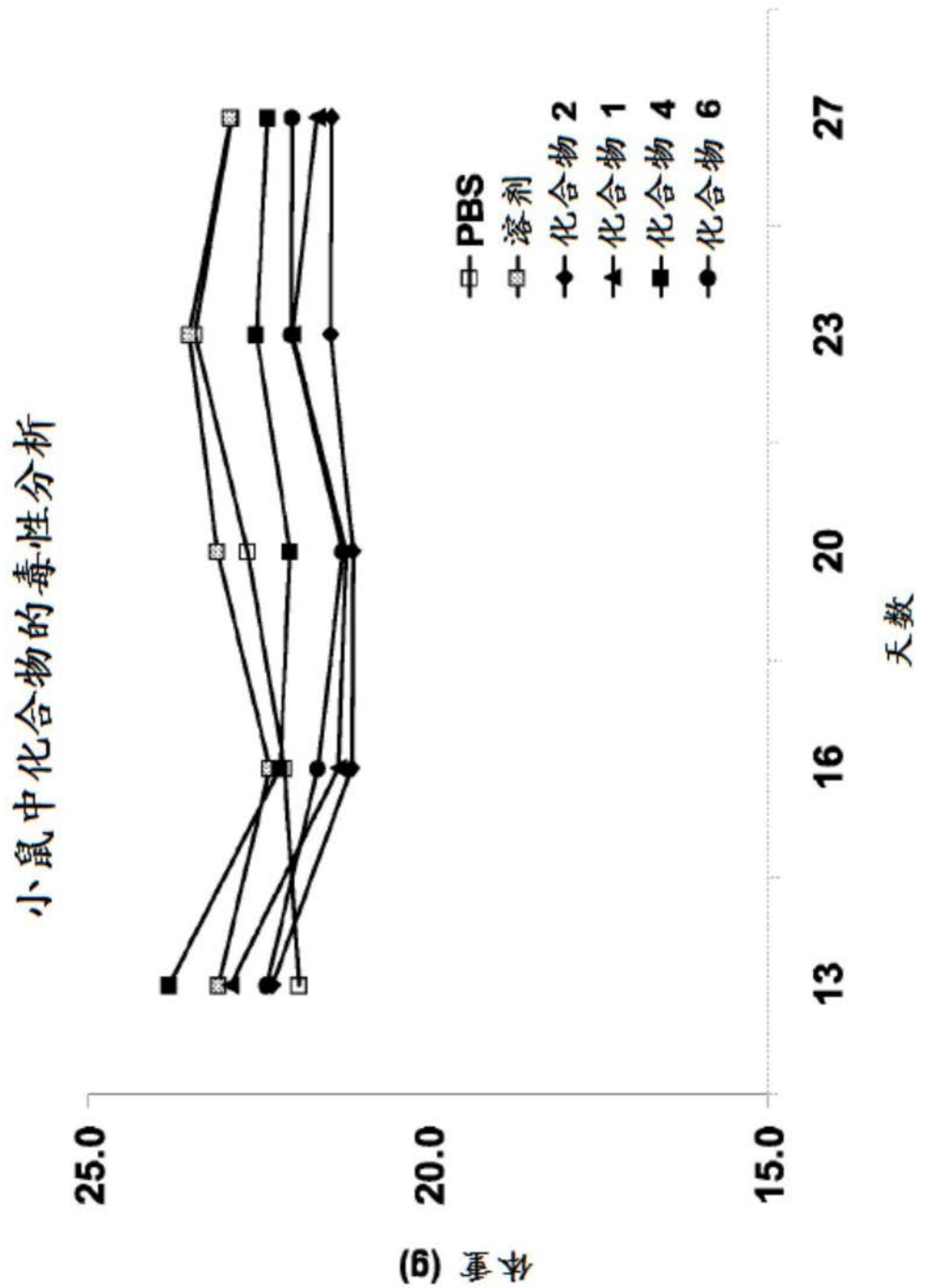


图6

小鼠中化合物的毒性分析

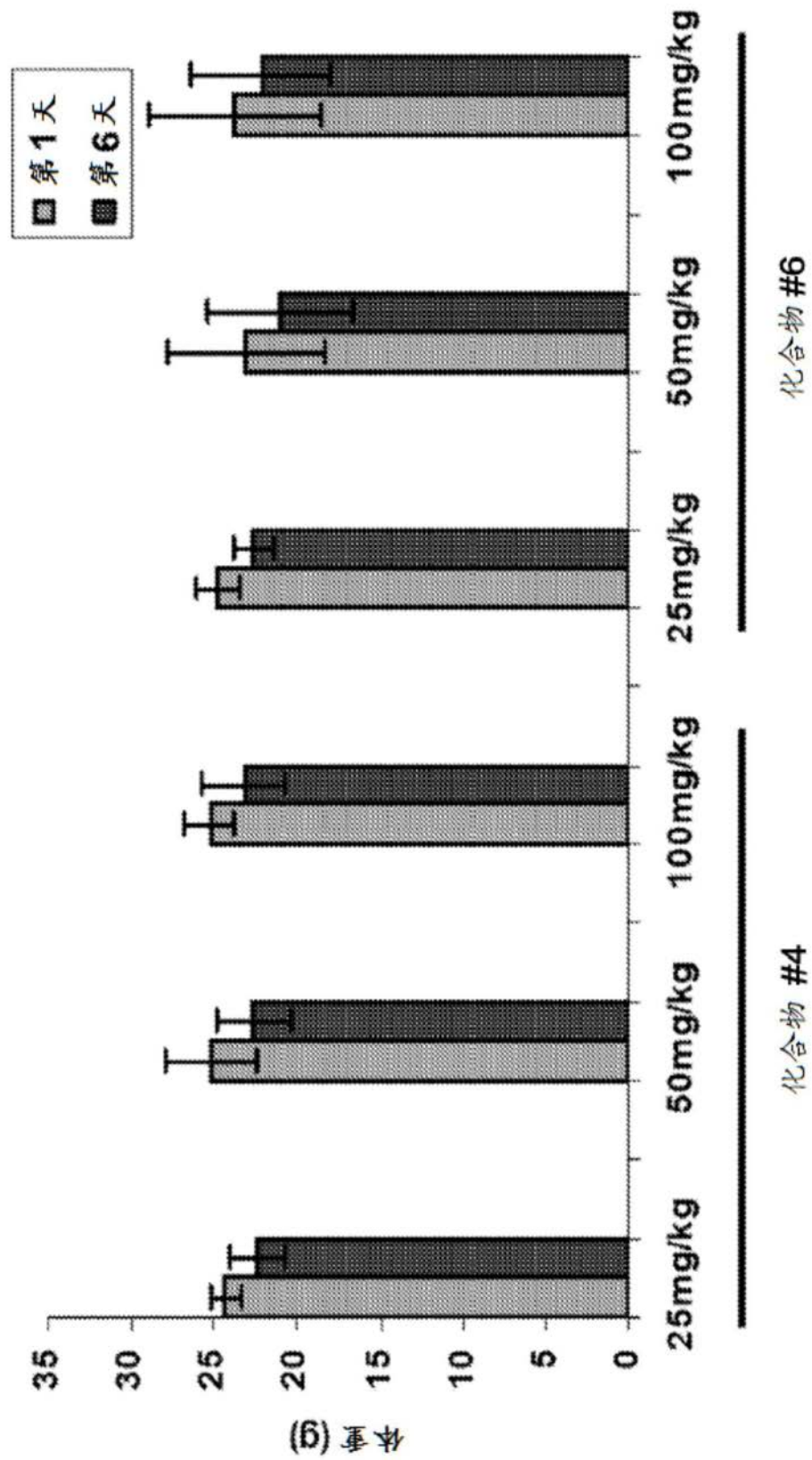


图7

小鼠中化合物#2的毒性分析

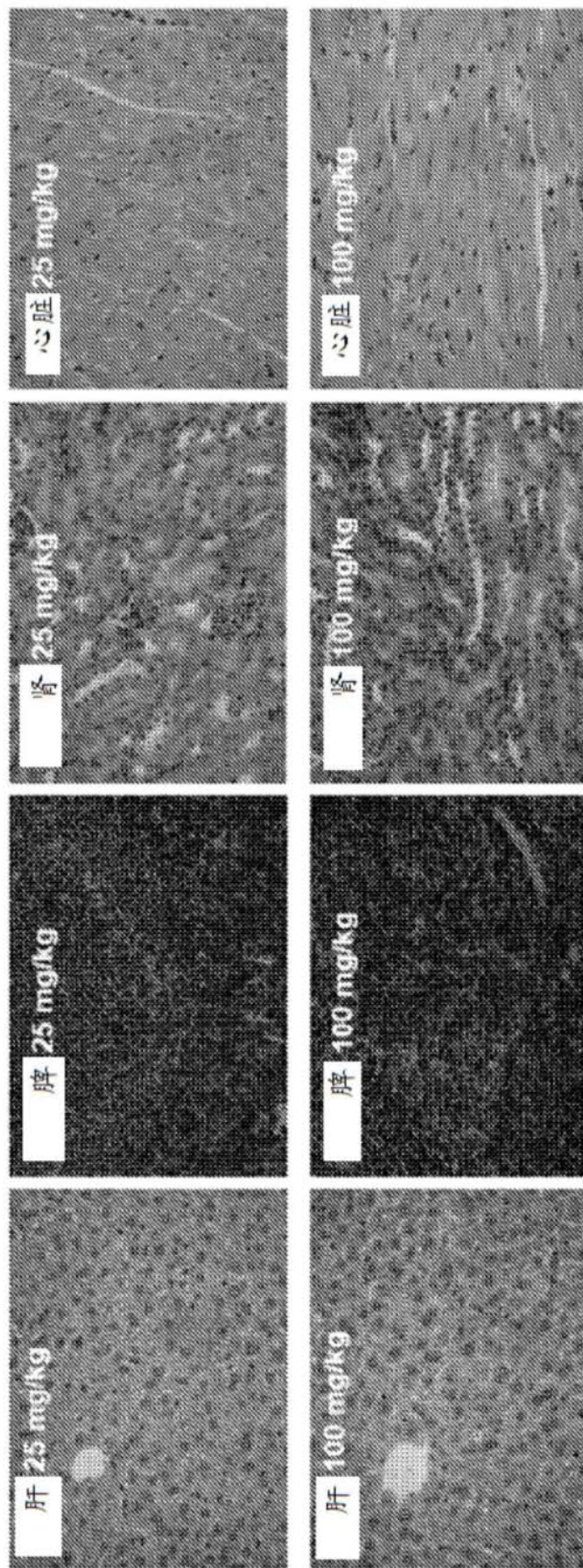


图8

小鼠中化合物 #1 的毒性分析

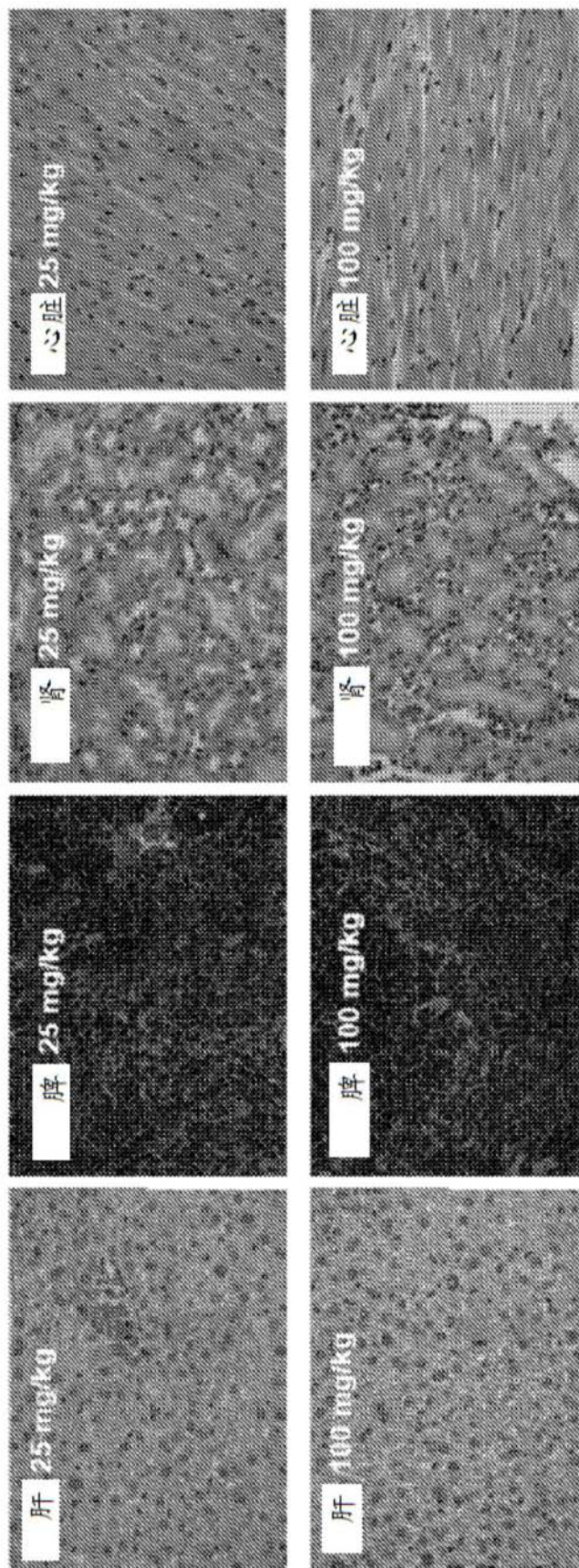


图9

小鼠中化合物#4的毒性分析

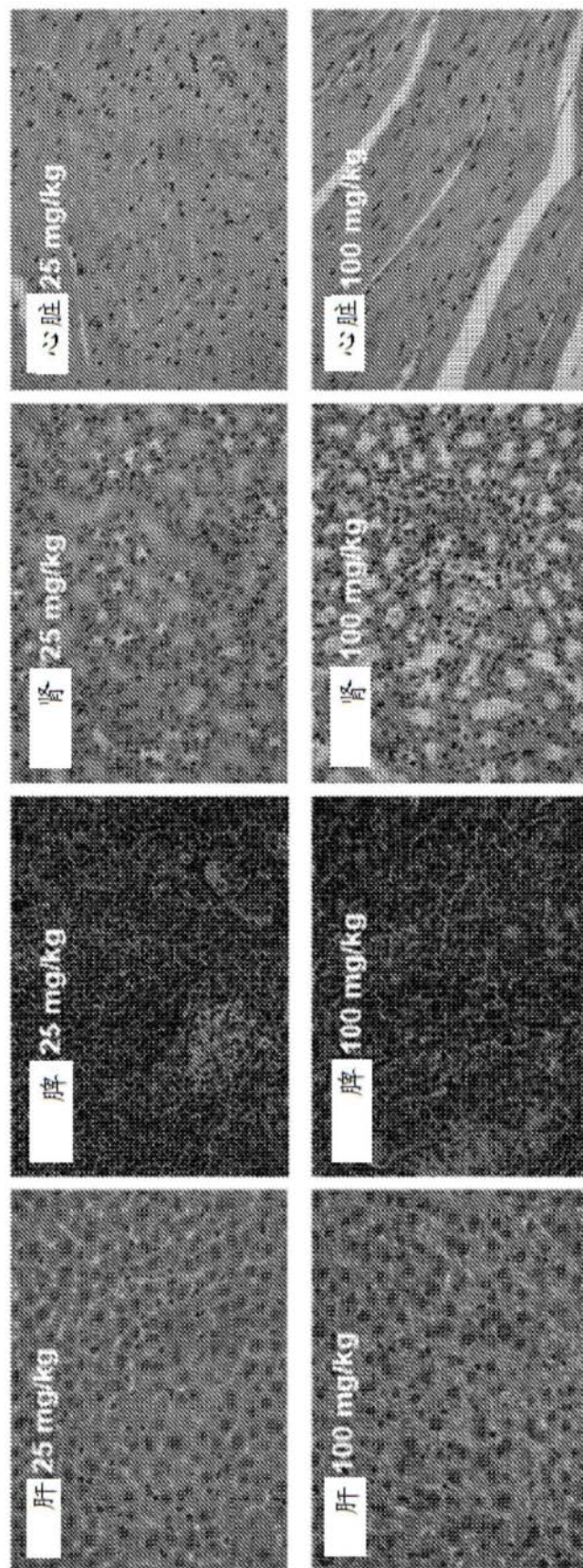


图10

小鼠中化合物#6的毒性分析

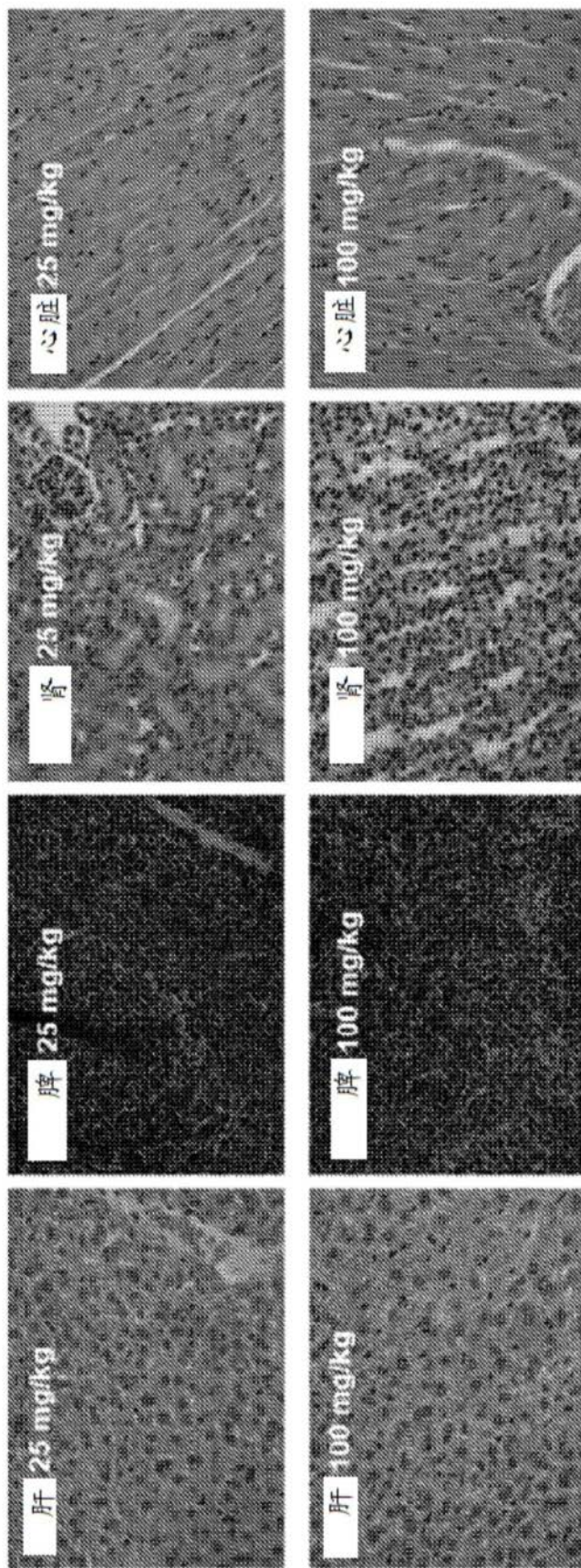


图11

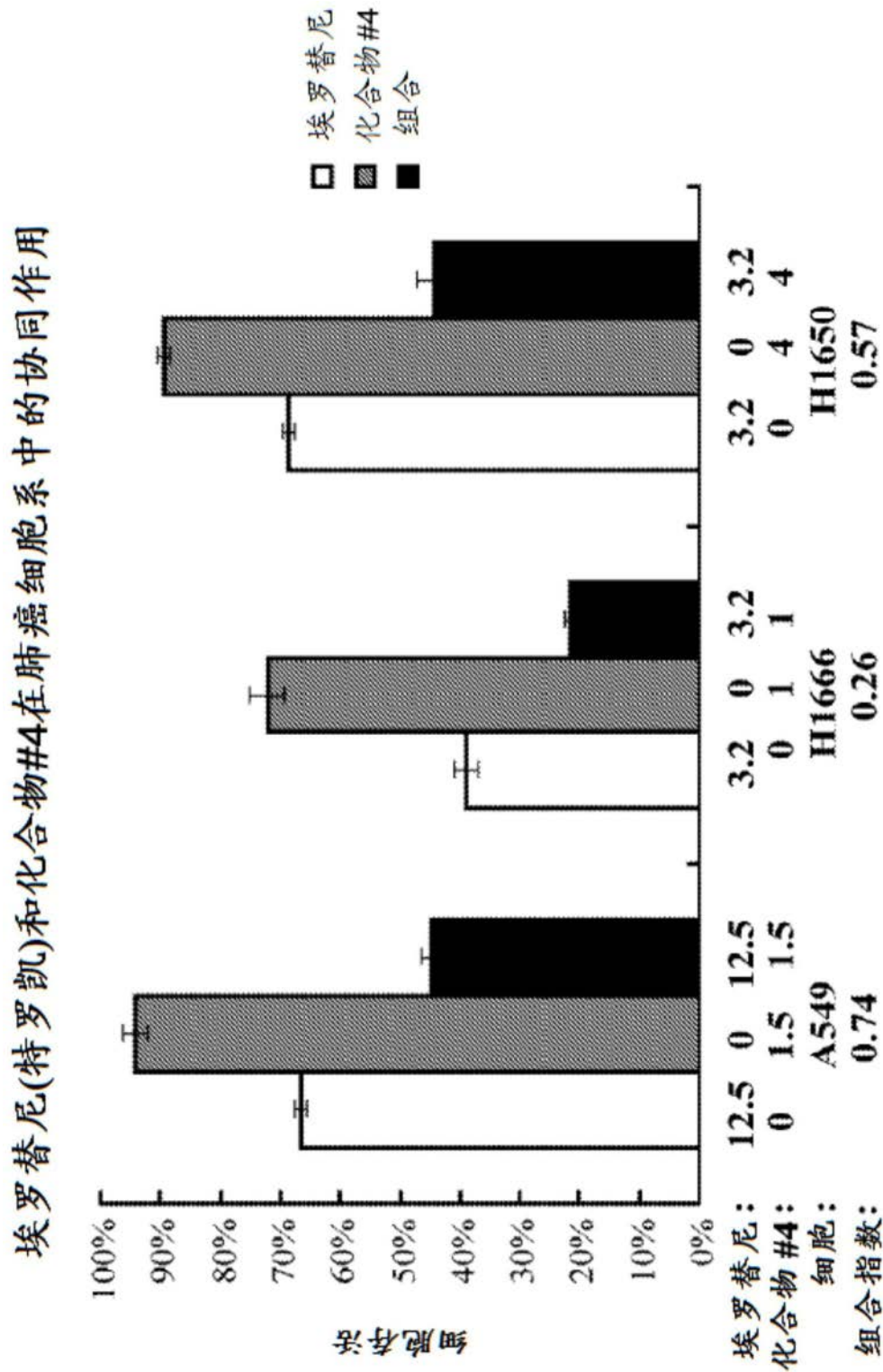


图12

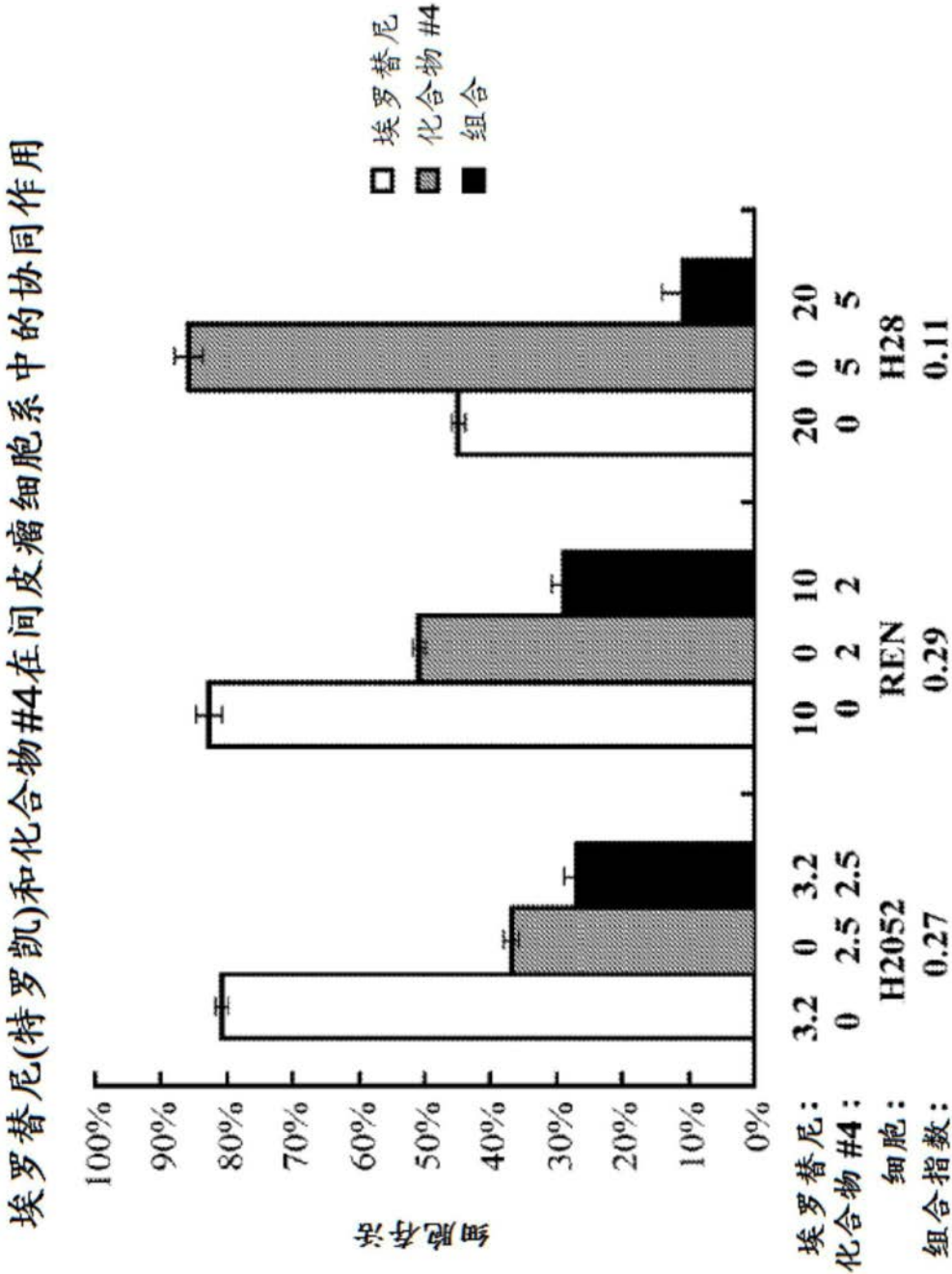


图13

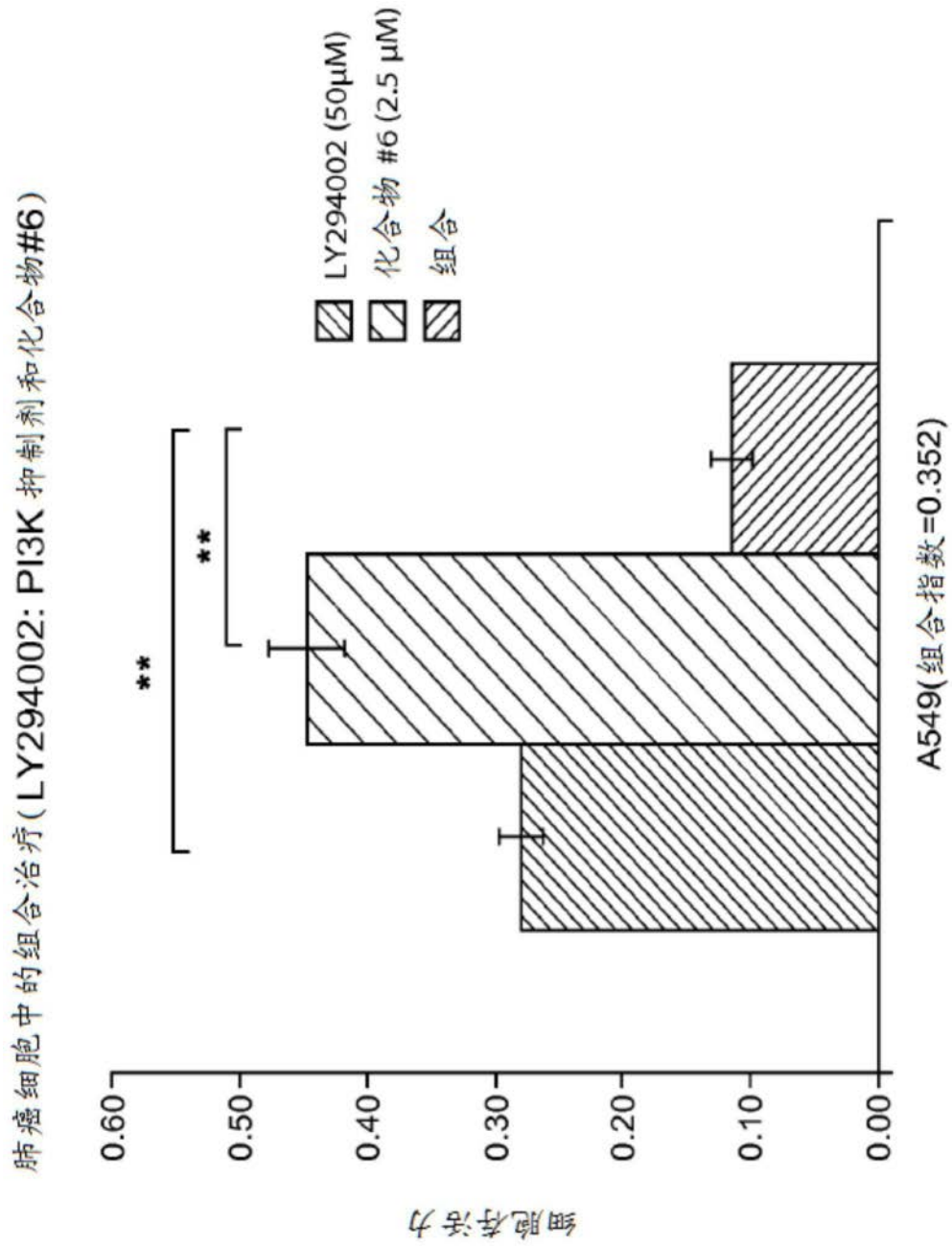


图14

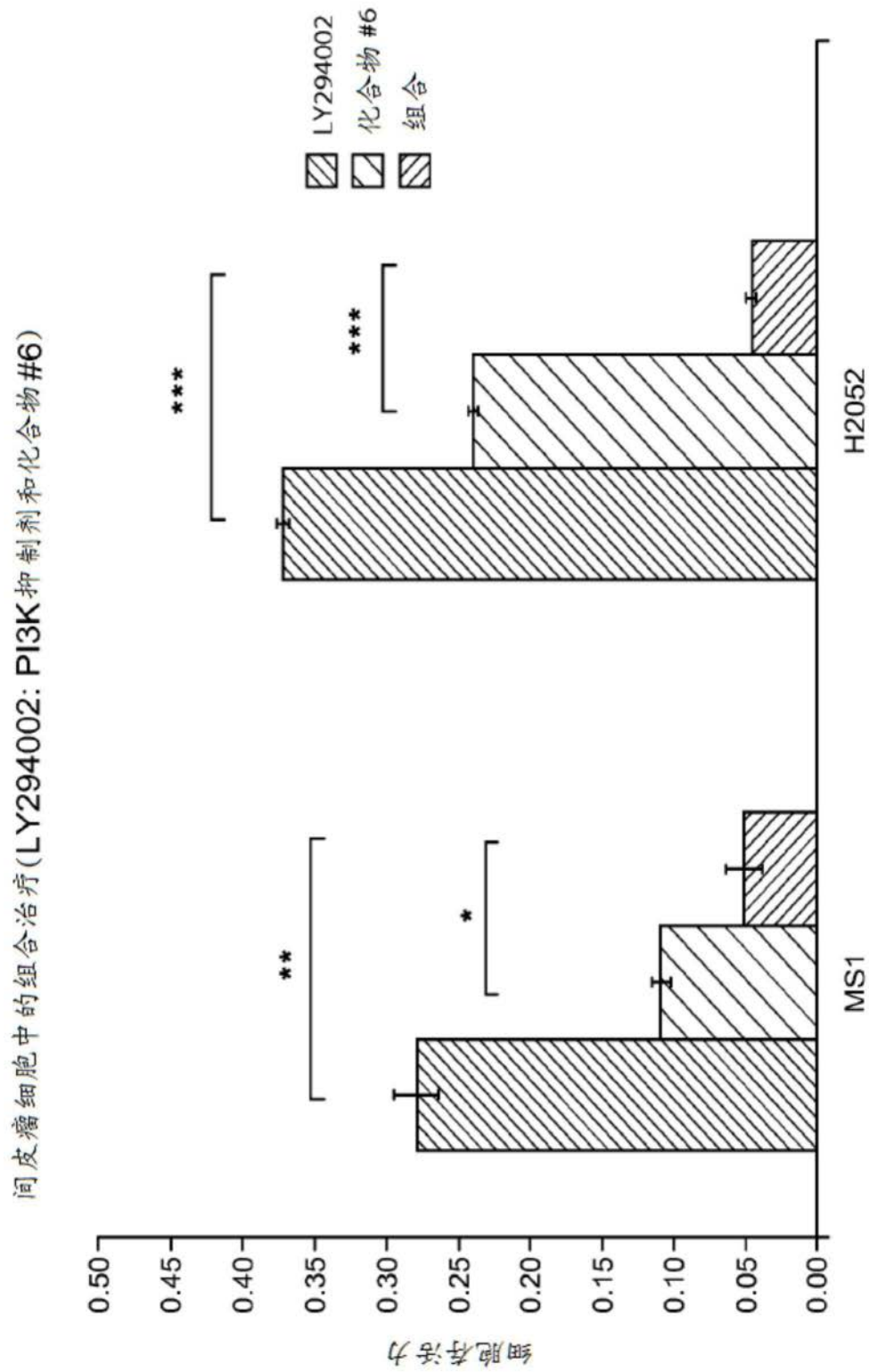


图15

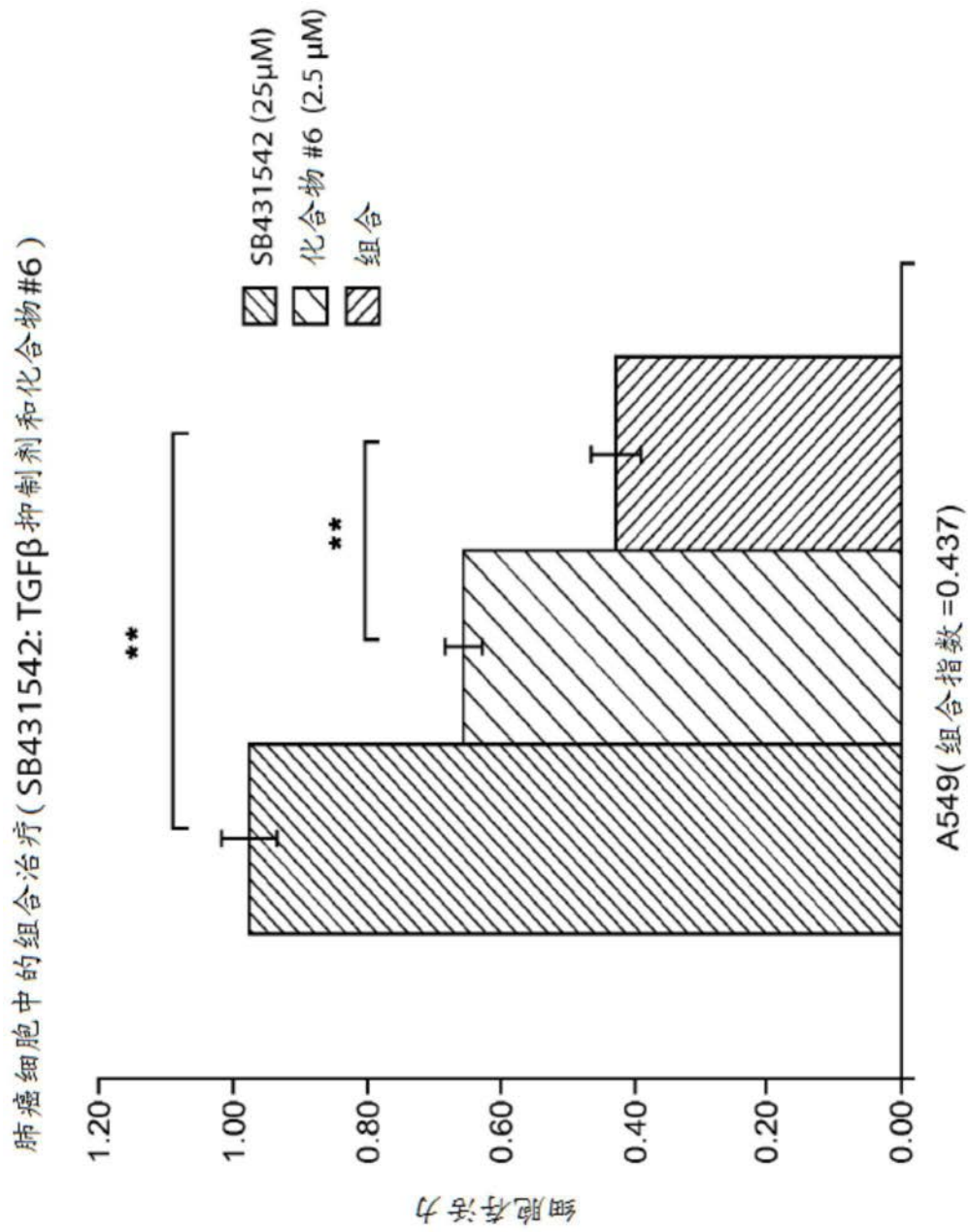


图16

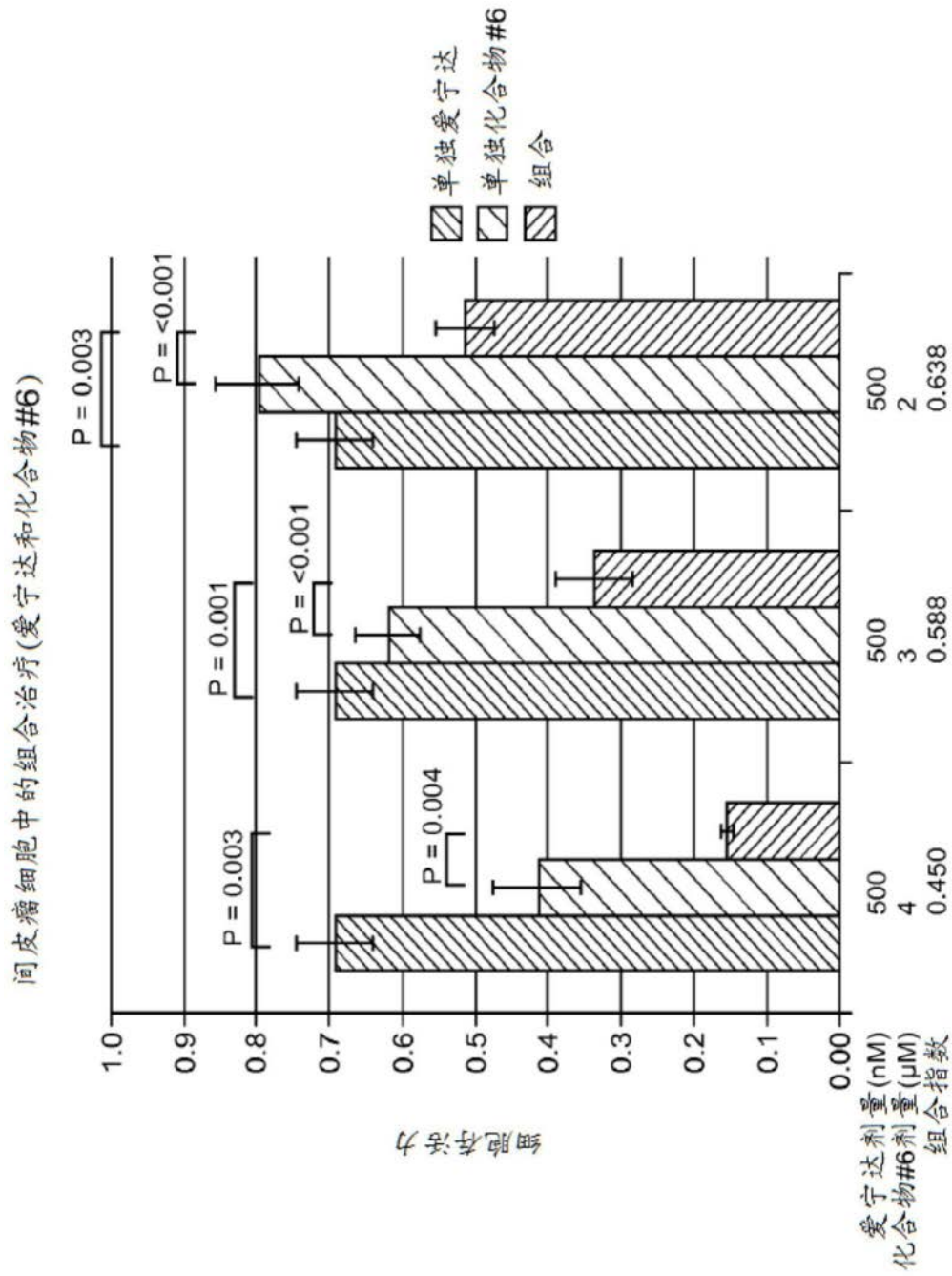


图17

癌症	细胞系	#4	P1	P2	癌症	细胞系	#4	P1	P2
黑色素瘤	Clau6	2.27	8.67	1.58	间皮瘤	H2052	1.59	12.81	0.87
	SK-Mel30	4.27	8.19	2.93		REN	1.37	5.33	0.75
	LOX	1.52	11.03	0.81		H2452	4.09	8.21	2.50
	MelJuso	0.96	8.12	0.49		211H	4.78	13.31	2.59
	Mel144	1.15	6.27	0.69		H290	1.11	4.93	0.65
	Mel202	3.54	6.08	1.94		MS1	2.09	8.11	0.88
肺	H322	2.55	9	1.34	结肠	COLO-201	6.79	8.25	5.20
	H460	2.2	6.55	1.36		Caco-2	1.55	6.72	1.20
	A549	2.87	8.14	1.33		DLD-1	1.9	0.80	0.80
	H1703	5.79	9.01	3.96		HCT116	13.50	6.50	6.50
	H1299	5.03	10.78	3.3	胰腺	CFPAC1	1.22	9.41	0.69
	H1975	4.93	13.99	2.93		ASPC-1		2.80	2.80
前列腺	H441	6.6	10.67	5.29		Panc 02.13		6.10	6.10
	H522	0.95	7.59	0.54		PANC-1		6.80	6.80
	H2170	16.27	17.97	13.17		DU145	3.17	6.02	2.54
	H838	2.89	12.04	1.38					
	A427	1.1	7.08	0.59					

图18

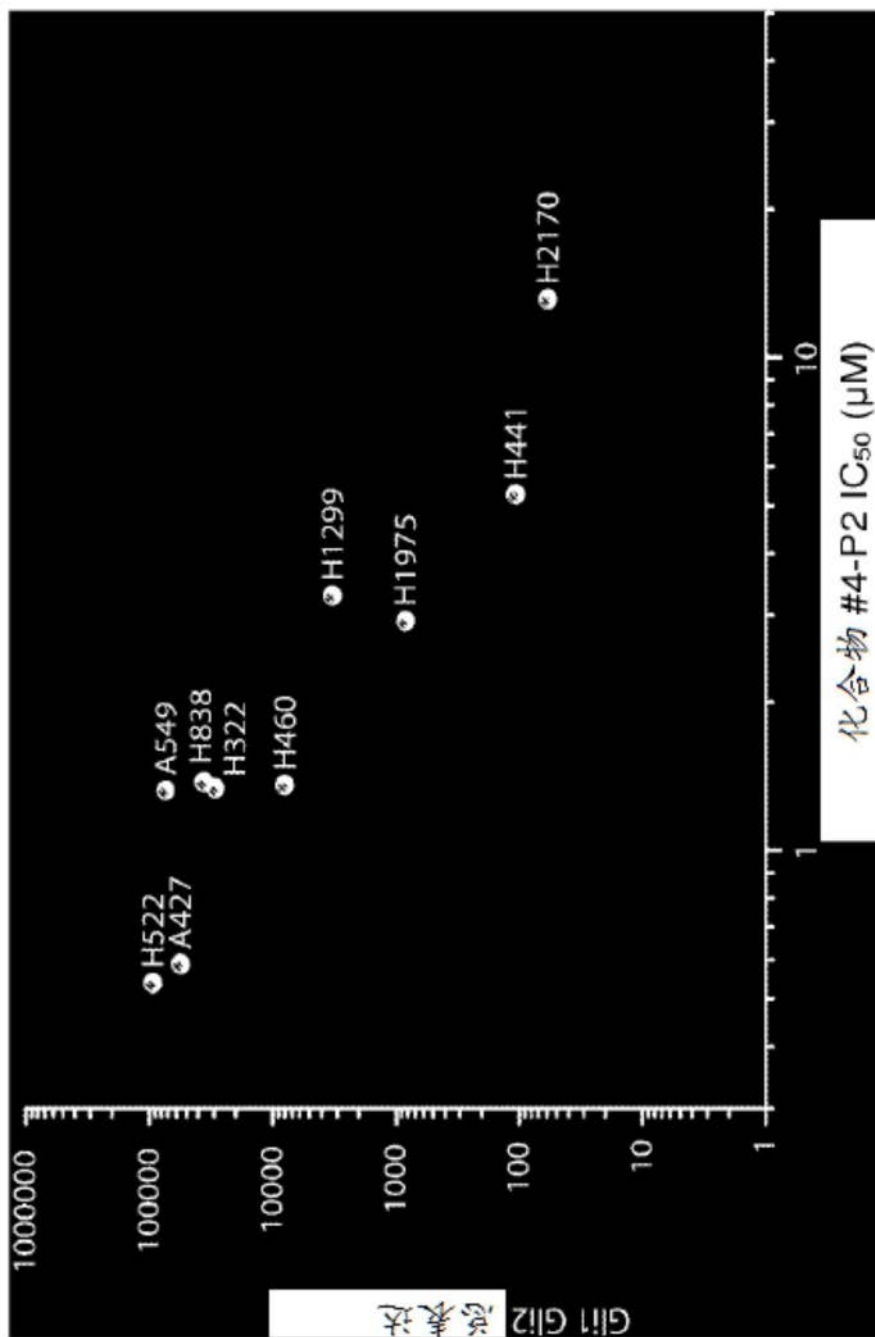


图19

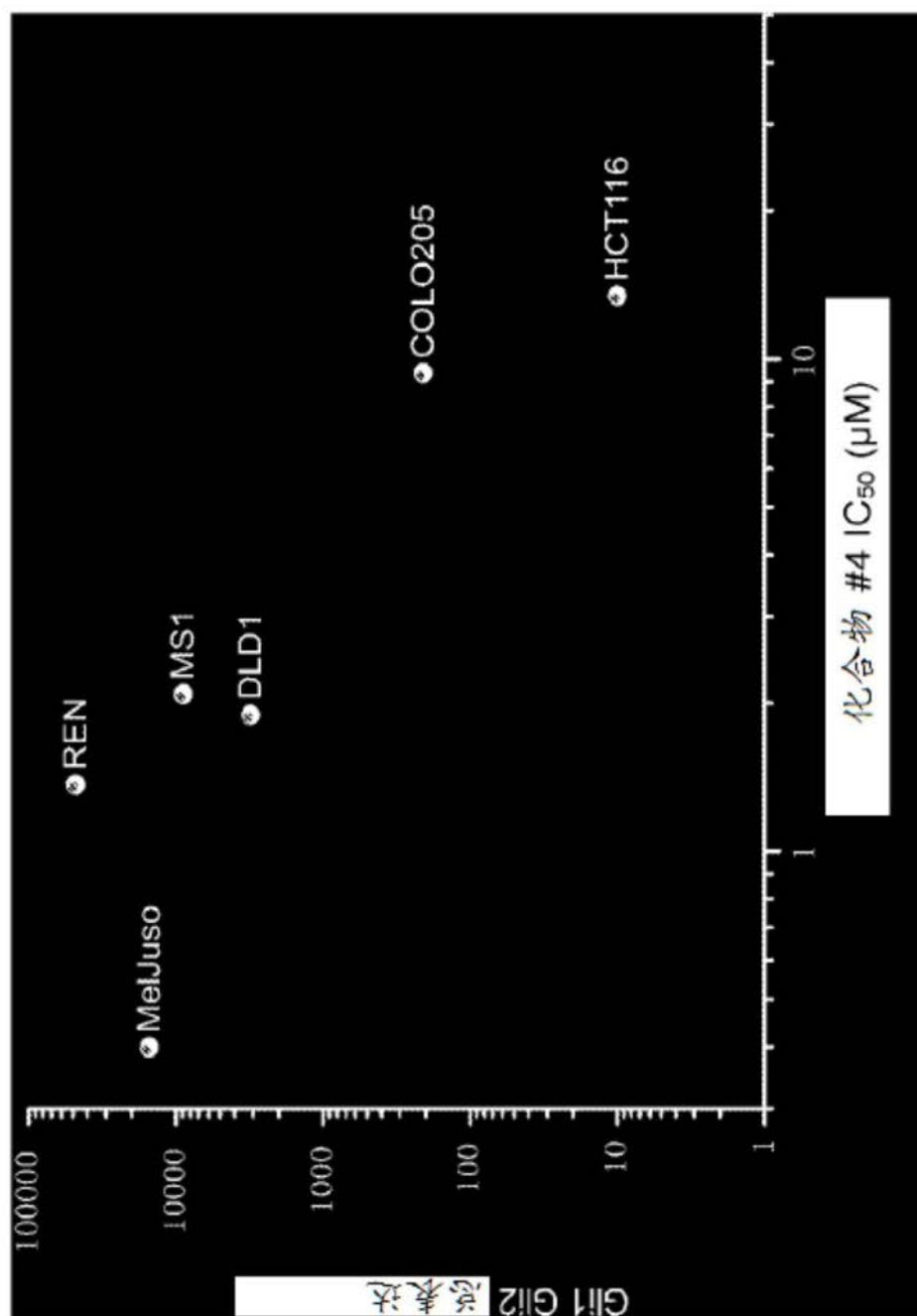


图20

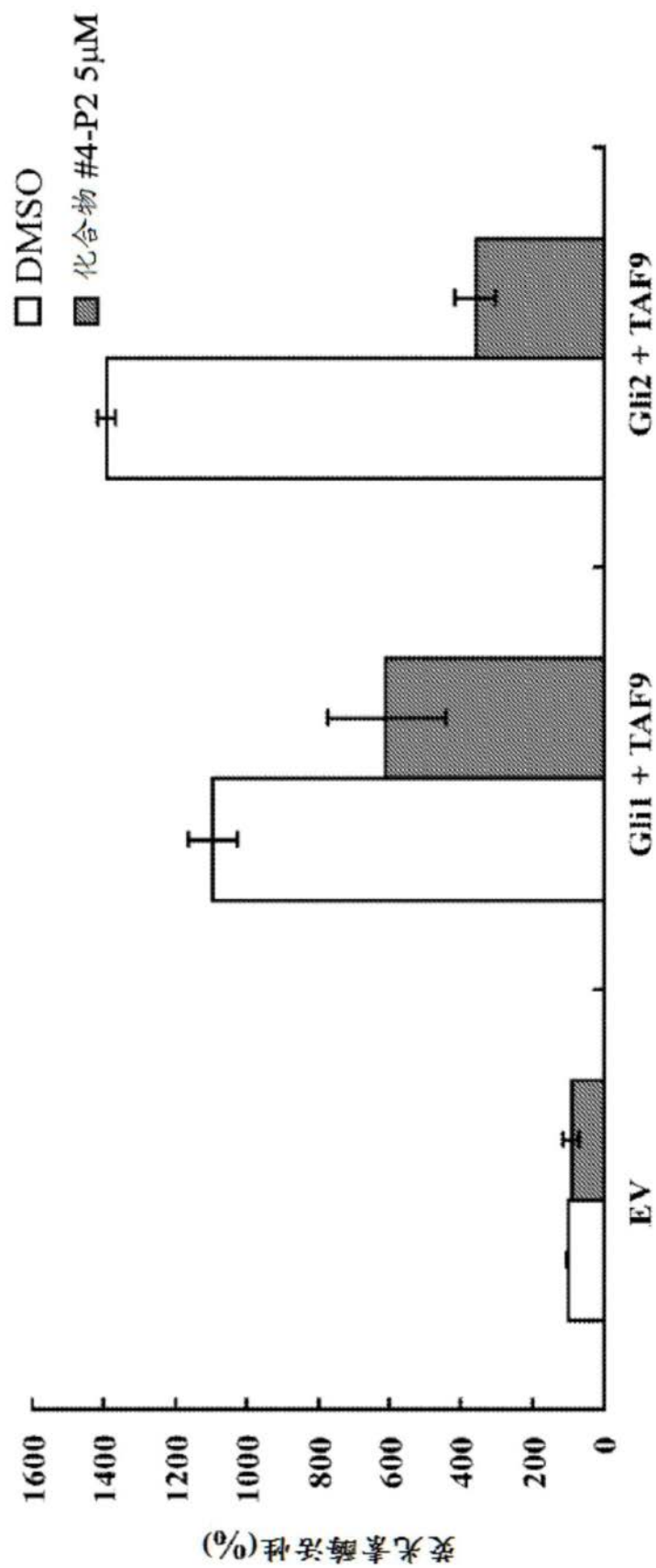


图21

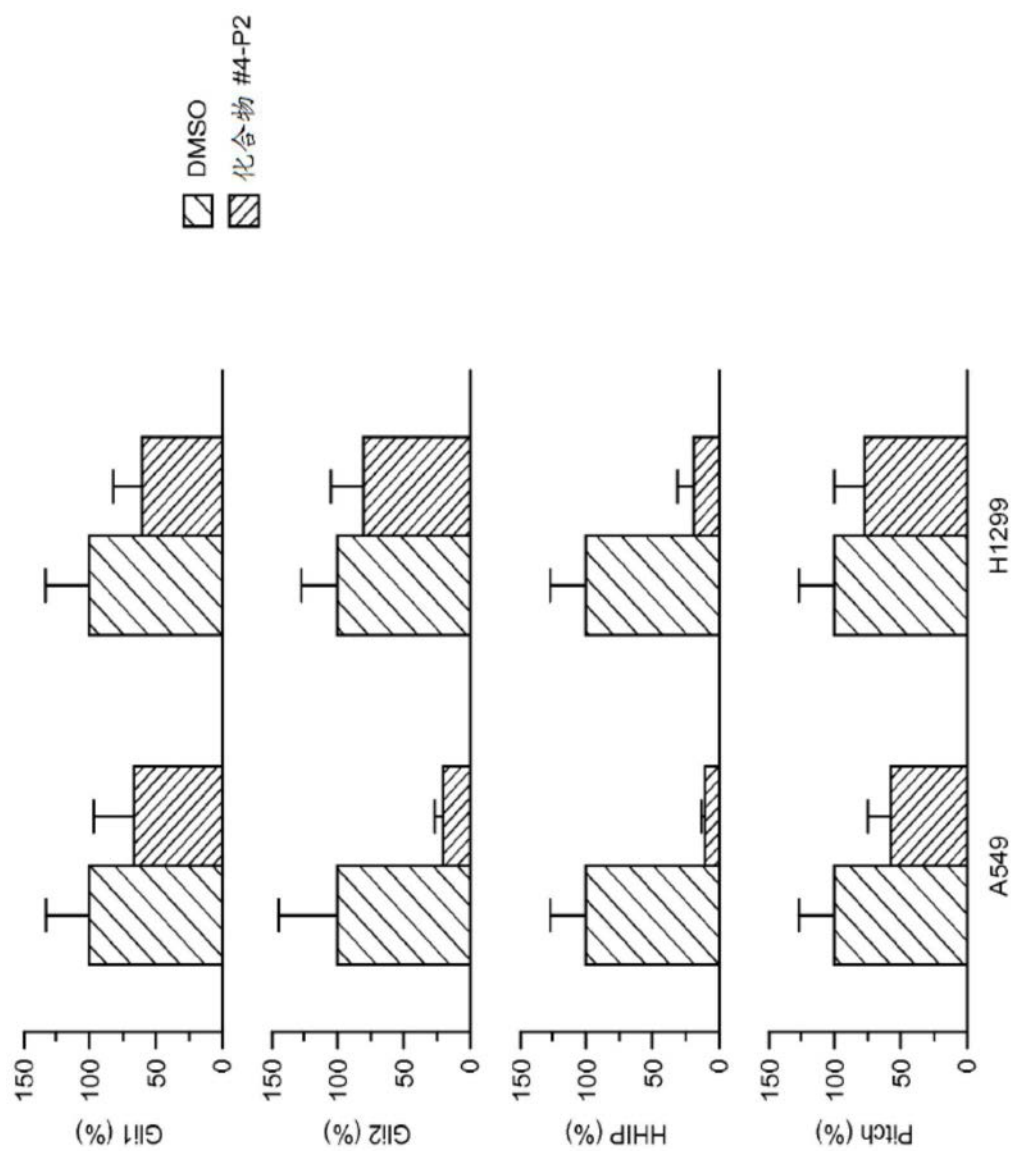


图22

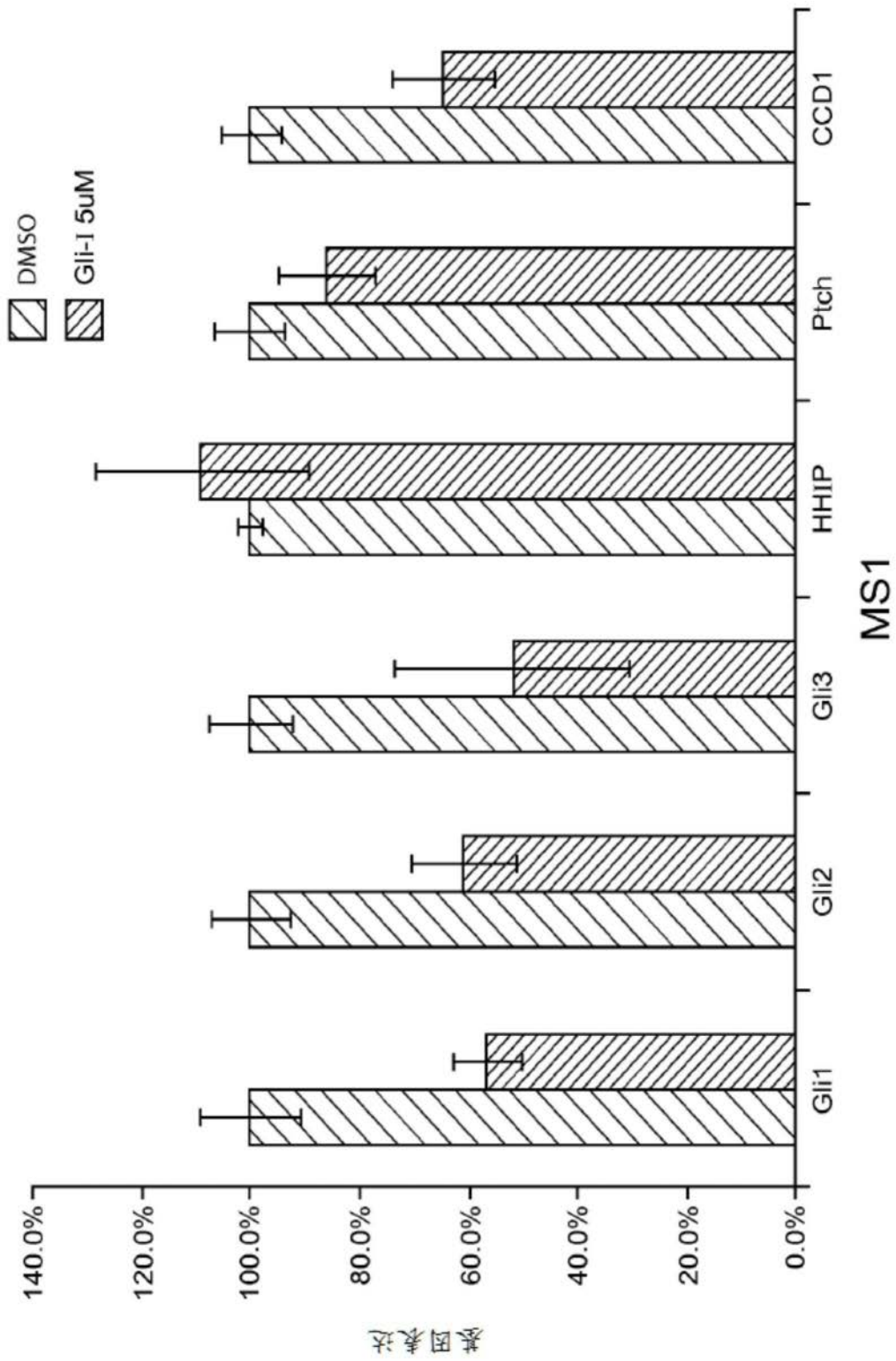


图23

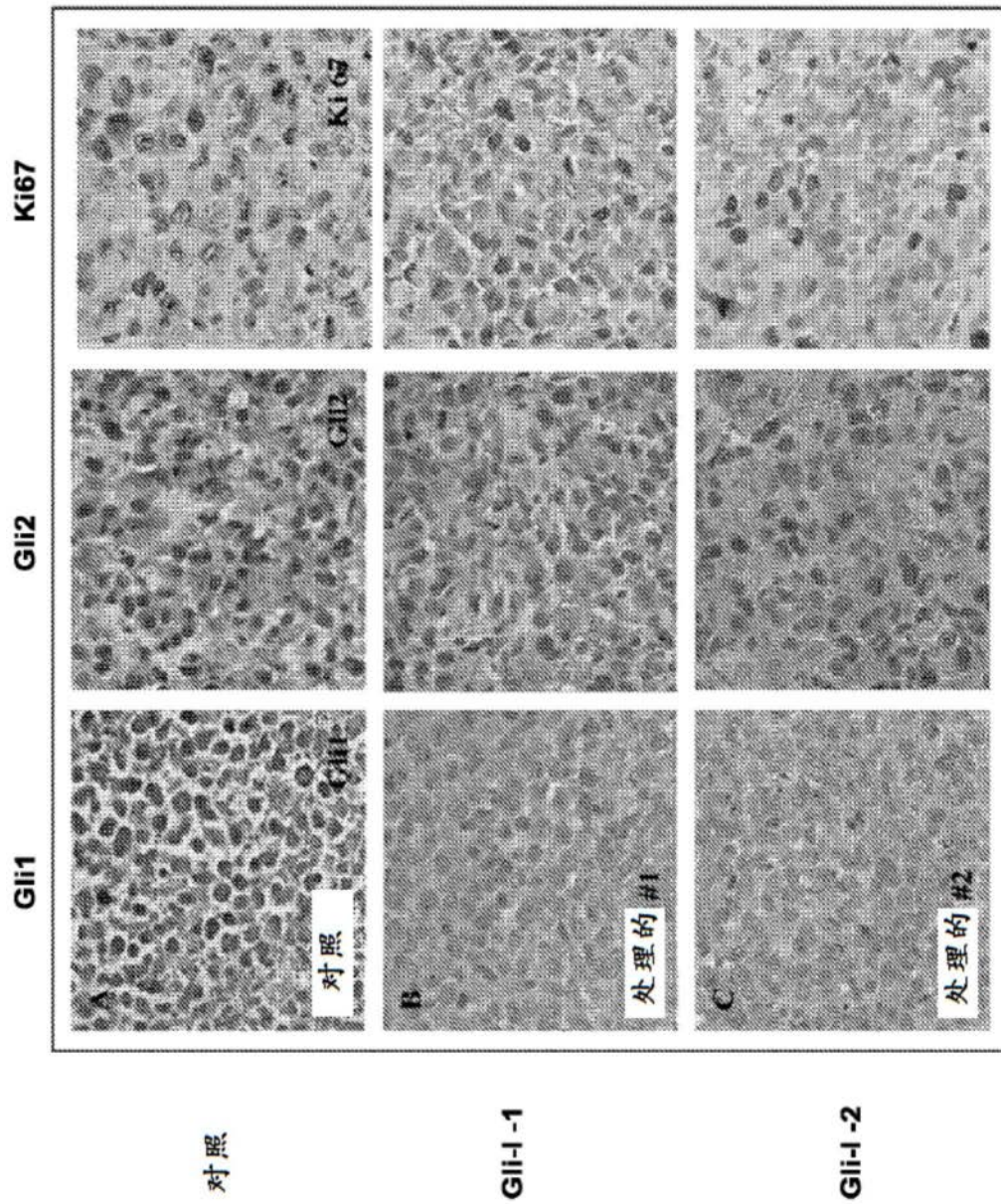


图24

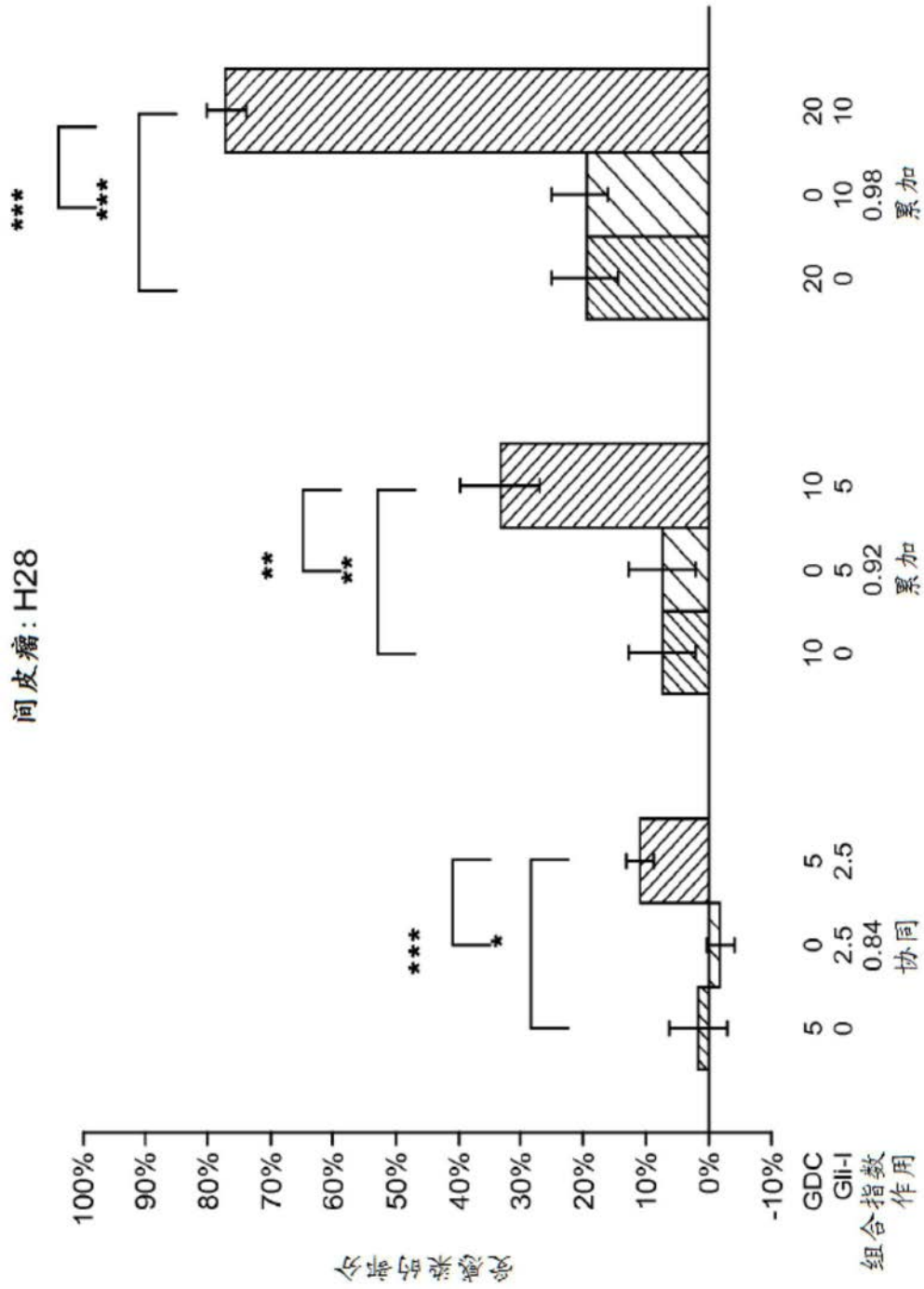


图25