



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102368905 B

(45) 授权公告日 2015. 04. 01

(21) 申请号 200980154007. 6

代理人 张晓威

(22) 申请日 2009. 11. 06

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C07D 233/06(2006. 01)

61/111, 852 2008. 11. 06 US

C07D 295/02(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2011. 07. 06

CN 101027069 A, 2007. 08. 29, 说明书第 10-34 页.

(86) PCT国际申请的申请数据

US 20080045470 A1, 2008. 02. 21, 参见说明书第 2 页第 [0020]、[0025] 段、第 6 页第 [0077]、[0094] 段、说明书附图第 4 页 FIG. 2D、第 5 页 FIG. 2E.

PCT/US2009/063586 2009. 11. 06

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/054223 EN 2010. 05. 14

(73) 专利权人 南卡罗来纳医科大学研究发展基金会

Zdzislaw M. Szulc 等. Novel analogs of d-e-MAPP and B13. Part 1: Synthesis and evaluation as potential anticancer agents. 《Bioorganic & Medicinal Chemistry》. 2008, 第 16 卷 (第 2 期), 第 1015-1031 页.

地址 美国南卡罗来纳

审查员 梁艳辉

(72) 发明人 A·别拉夫斯基 柏爱萍

Z·M·肖尔茨 Y·A·哈努恩

J·诺里斯 柳湘

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

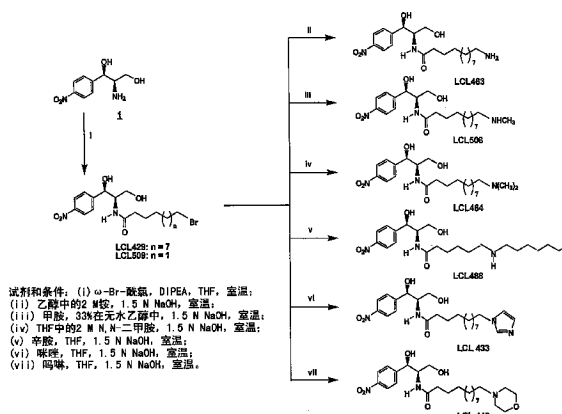
权利要求书3页 说明书47页 附图21页

(54) 发明名称

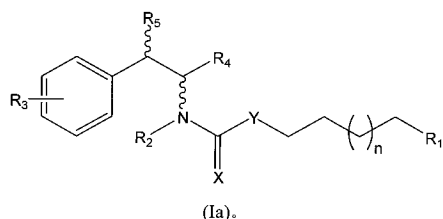
酸性神经酰胺酶的向溶酶体抑制剂

(57) 摘要

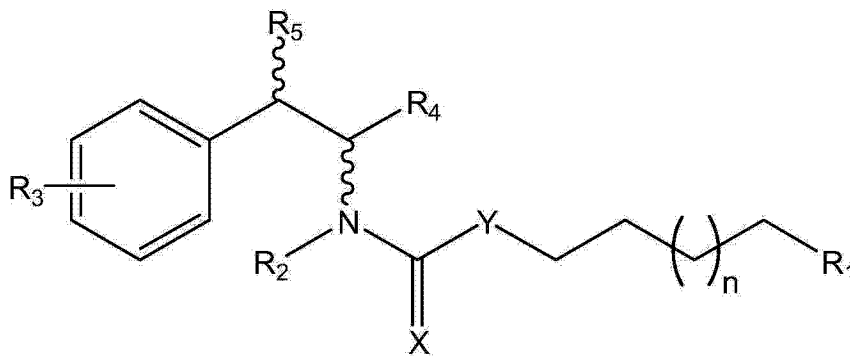
本发明提供式 (Ia) 的化合物及其药学可接受的盐, 其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、X、Y 和 n 如本文所定义。本发明还公开了制备上述式的化合物的方法、所述化合物在抑制酸性神经酰胺酶和与神经酰胺酶相关的活性中的用途, 以及所述化合物作为药物和前药在治疗和 / 或预防与不期望的神经酰胺酶或鞘氨醇激酶活性相关的疾病中的用途, 所述疾病包括但不限于癌症、癌症转移、动脉粥样硬化、狭窄、炎症、哮喘和特应性皮炎。



CN 102368905 B



1. 式 (Ib) 的化合物或其药学可接受的盐：



其中：

n 是 0 至 13 的整数；

R_1 选自 H 和正丁基；

R_2 是 H；

R_3 是 NO_2 ；

R_4 选自 CH_2OH 和 $\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}(\text{R}_8)\text{NR}_6\text{R}_7$ ；

R_5 选自 OH 和 $\text{OC}(=\text{O})\text{CH}(\text{R}_8)\text{NR}_6\text{R}_7$ ；

R_6 、 R_7 和 R_8 各自独立地选自 H 和 C_{1-8} 烷基；

X 是 O；

Y 是 CH_2 ；并且

其中 R_4 和 R_5 中的至少一个包含酯基团。

2. 如权利要求 1 所述的化合物，其中 R_4 是 $\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}(\text{R}_8)\text{NR}_6\text{R}_7$ 。

3. 如权利要求 2 所述的化合物，其中 R_8 是 H，并且 R_6 和 R_7 各自为 C_{1-8} 烷基。

4. 如权利要求 1 所述的化合物，其中 R_5 是 $\text{OC}(=\text{O})\text{CH}(\text{R}_8)\text{NR}_6\text{R}_7$ 。

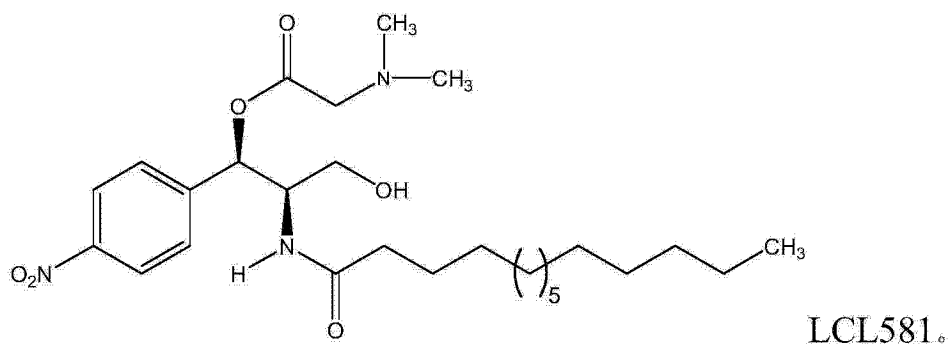
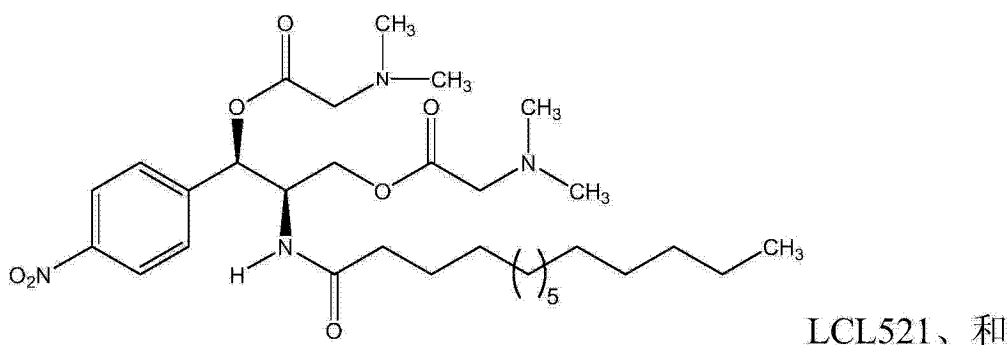
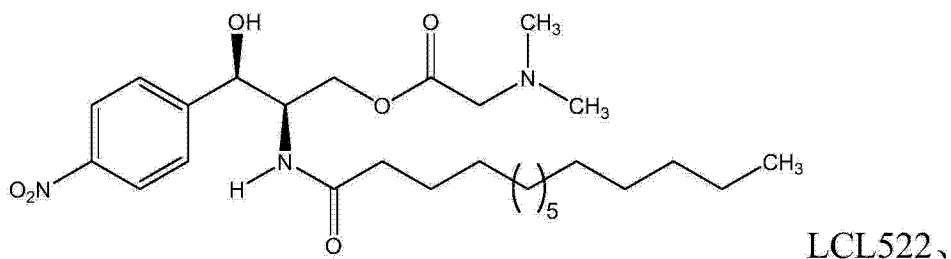
5. 如权利要求 4 所述的化合物，其中 R_8 是 H，并且 R_6 和 R_7 各自为 C_{1-8} 烷基。

6. 如权利要求 1 所述的化合物，其中 R_4 是 $\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}(\text{R}_8)\text{NR}_6\text{R}_7$ ，并且 R_5 是 $\text{OC}(=\text{O})-\text{CH}(\text{R}_8)\text{NR}_6\text{R}_7$ 。

7. 如权利要求 1 所述的化合物，其中 n 是 5。

8. 如权利要求 1 所述的化合物，其中 R_1 是正丁基。

9. 如权利要求 1 所述的化合物，其中所述化合物选自以下结构的 LCL522、LCL521 和 LCL581：



10. 药物组合物,其包含:

- (a) 如权利要求 1 所述的化合物;和
- (b) 药学可接受的载体。

11. 抑制酸性神经酰胺酶的方法,所述方法包括在其中酸性神经酰胺酶抑制剂的酯前药水解以提供所述抑制剂的条件下,使包含酸性神经酰胺酶的体外细胞样品接触有效量的所述前药,所述前药是权利要求 1 的化合物,条件是所述方法用于非诊断和非治疗目的。

12. 权利要求 1 的化合物在制备用于抑制酸性神经酰胺酶的药物中的用途。

13. 权利要求 1 的化合物在制备用于在个体中治疗或预防与不期望的神经酰胺酶或鞘氨醇激酶活性相关的疾病或病症的药物中的用途。

14. 如权利要求 13 所述的用途,其中所述疾病或病症选自癌症、癌症转移、动脉粥样硬化、狭窄、炎症、哮喘、特应性皮炎和其它增殖性疾病。

15. 如权利要求 13 所述的用途,其中所述个体是哺乳动物个体。

16. 如权利要求 13 所述的用途,其中所述药物包含权利要求 1 的化合物和药学可接受的载体。

17. 权利要求 1 的化合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

18. 如权利要求 17 所述的用途,其中所述个体是哺乳动物个体。

19. 如权利要求 17 所述的用途,其中所述药物包含权利要求 1 的化合物和药学可接受的载体。

20. 如权利要求 17 所述的用途,其中 R_4 是 $\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}(\text{R}_8)\text{NR}_6\text{R}_7$ 。

21. 如权利要求 20 所述的用途,其中 R_8 是 H, 并且 R_6 和 R_7 各自为 C_{1-8} 烷基。

22. 如权利要求 17 所述的用途,其中 R_5 是 $\text{OC}(=\text{O})\text{CH}(\text{R}_8)\text{NR}_6\text{R}_7$ 。

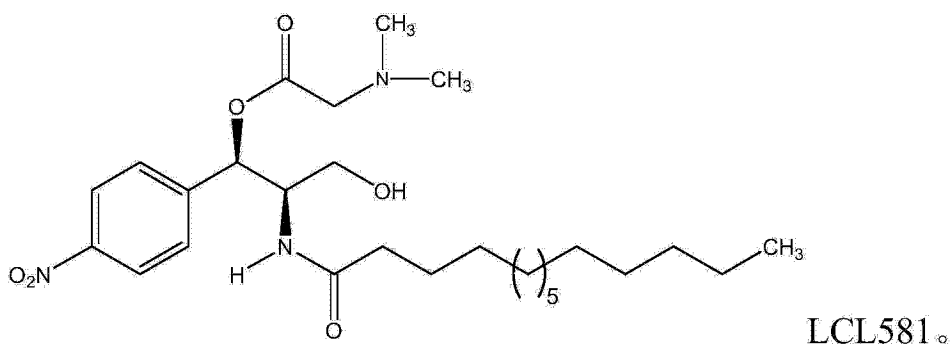
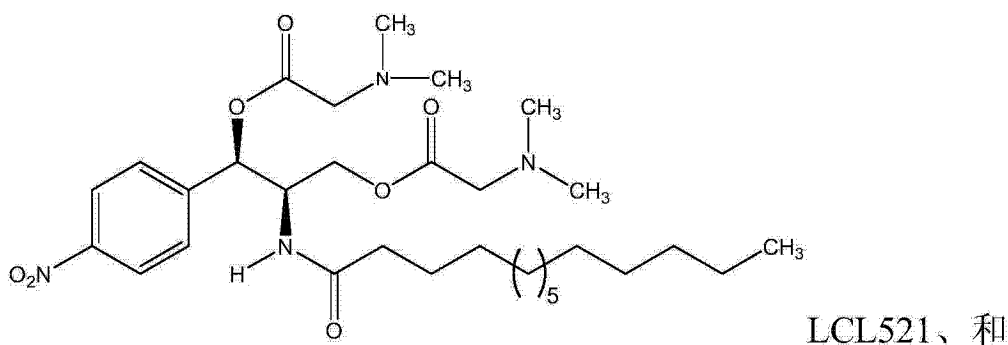
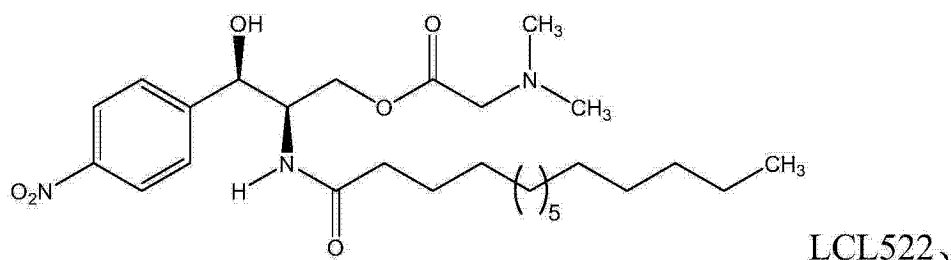
23. 如权利要求 22 所述的用途,其中 R_8 是 H, 并且 R_6 和 R_7 各自为 C_{1-8} 烷基。

24. 如权利要求 17 所述的用途,其中 R_4 是 $\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}(\text{R}_8)\text{NR}_6\text{R}_7$, 并且 R_5 是 $\text{OC}(=\text{O})-\text{CH}(\text{R}_8)\text{NR}_6\text{R}_7$ 。

25. 如权利要求 17 所述的用途,其中 n 是 5。

26. 如权利要求 17 所述的用途,其中 R_1 是正丁基。

27. 如权利要求 17 所述的用途,其中所述化合物选自以下结构的 LCL522、LCL521 和 LCL581 :



酸性神经酰胺酶的向溶酶体抑制剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2008 年 11 月 6 日提交的美国临时专利申请 61/111,852 的优先权,其公开内容整体援引加入本文。

[0003] 政府经费资助

[0004] 本发明是在美国政府的支持下,在由美国国立卫生研究院 (the National Institutes of Health) 和美国国家癌症研究所 (the National Cancer Institute) 所资助的第 P01 CA097132 项基金的帮助下完成的。因此,美国政府对于本发明享有某些权利。

技术领域

[0005] 本发明涉及两亲向溶酶体酸性神经酰胺酶抑制剂。在一些实施方案中,所述抑制剂不引发永久的溶酶体失稳 (lysosomal destabilization) 或酸性神经酰胺酶的蛋白水解降解 (proteolytic degradation)。所述抑制剂包括 N-(ω -氨基酰基) 氨基苯基醇以及 N-酰氨基苯基醇的氨基酯前药。所述抑制剂可用于治疗和/或预防与不期望的神经酰胺酶和与神经酰胺酶相关的活性相关的疾病,包括癌症和其它增殖性疾病。

[0006] 发明背景

[0007] 鞘脂代谢的刺激控制途径提供生物活性分子的丰富网络,其在各种细胞功能的调节中起到关键作用。人们越来越多地认识到鞘脂代谢物,即神经酰胺 (Cer) 和 1-磷酸-鞘氨醇 (S1P) 作为参与生存、增殖和细胞死亡的调节的信号分子的作用。具体而言, Cer 和 S1P 之间的细胞平衡 (cellular balance) 似乎在细胞决定经受凋亡或增殖中起作用,所述凋亡和增殖是肿瘤发展和生长中涉及的两种事件。Cer 在许多细胞类型中具有促凋亡 (pro-apoptotic) 能力,而相反地, S1P 能够诱发细胞增殖并保护细胞免受凋亡。因此,打翻促进 Cer 生成的平衡,即抑制神经酰胺酶 (CDase) 或鞘氨醇激酶 (SK) 活性可能促进其促凋亡作用并代表实现有效癌症疗法的有希望的合理途径。参见 Ogretmen 和 Hannun, Nat. Rev. Cancer, 4, 604-616 (2004); 和 Huwiler 和 Zangemeister-Wittke, Oncology Hematol., 63, 150-159 (2007)。

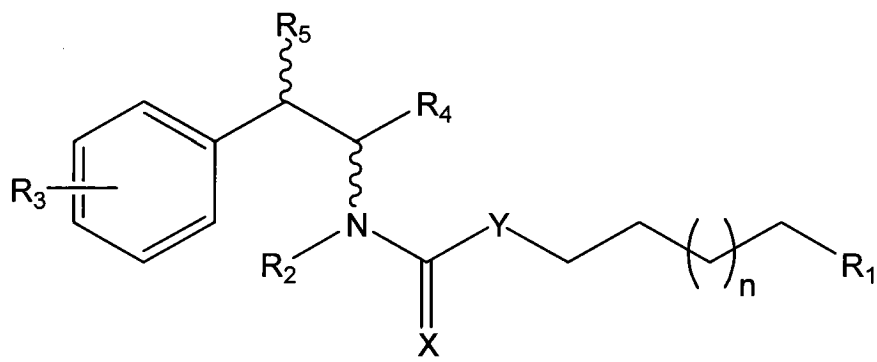
[0008] 酸性神经酰胺酶 (ACDase 或 AC) 是一种溶酶体酶,其在约 4.5 的最佳 pH 下将 Cer 分解代谢为鞘氨醇 (Sph) (SK 的底物) 和游离脂肪酸,这使其不同于其它 CDase。通过 ACDase 的作用释放的 Sph 可以作为 SK 的底物以形成 S1P 或作为神经酰胺合成酶的底物以再合成新的 Cer。参见 Bielawska 等人, Bioorg. Med. Chem., 16, 1032-1045 (2008)。由于 ACDase 在调节 Cer-Sph-S1P 相互代谢中的作用,其代表癌症疗法的新的靶标。已证明 ACDase 的水平在许多肿瘤细胞系中升高。参见 Elojeimy 等人, Mol. Ther., 15, 1259-1263 (2007)。抑制 ACDase 活性导致细胞内 C₁₆-、C₁₄- 和 C₁₈-Cer 的升高, Sph 和 S1P 的降低以及凋亡细胞死亡的刺激。参见 Bielawska 等人, Bioorg. Med. Chem., 16, 1032-1045 (2008)。因此 ACDase 已成为癌症疗法中的靶标,并且其抑制剂作为化疗剂用于数种类型的癌症。参见 Liu 等人, Front. Biosci., 13, 2293-2298 (2008); 和 Szulc 等人, Bioorg. Med. Chem., 16, 1015-1031 (2008)。

[0009] 相应地,不断地需要新的 ACDase 抑制剂,其理想地具有一种或多种以下性质:容易递送至细胞、优先地在存在 ACDase 的溶酶体区室中聚集、并且不引起对溶酶体区室的永久损伤。

[0010] 发明概述

[0011] 在一些实施方案中,本发明提供抑制酸性神经酰胺酶的化合物或其药学可接受的盐,其中所述抑制不具有永久的溶酶体失稳和/或所述酸性神经酰胺酶的蛋白水解降解,其中所述化合物具有式 (Ia) 的结构:

[0012]



[0013] 其中:

[0014] n 是 0 至 13 的整数;

[0015] R_1 选自 NH_2 、 NHR_6 、 NR_6R_7 和 N-杂环;

[0016] R_2 选自 H 和烷基;

[0017] R_3 选自 H、OH、 NO_2 、 NH_2 和 NHR_9 ;

[0018] R_4 选自 H、 CH_3 、 CH_2OH 和 $CH_2O-C(=O)-CH(R_8)NR_6R_7$;

[0019] R_5 选自 H、OH、 $=O$ 和 $OC(=O)CH(R_8)NR_6R_7$;

[0020] R_6 、 R_7 和 R_8 各自独立地选自 H、烷基、芳烷基和芳基;

[0021] R_9 是 $C(=O)-(CH_2)_mR_{10}$, 其中 m 是 5 至 10 的整数;

[0022] R_{10} 是 H、烷基、环烷基或杂环;

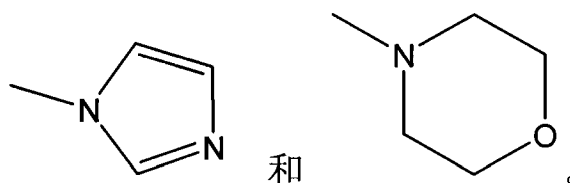
[0023] X 选自 O、NH 和 S; 并且

[0024] Y 是 CH_2 或 NH。

[0025] 在一些实施方案中, X 是 O。在一些实施方案中, Y 是 CH_2 。在一些实施方案中, R_2 是 H。在一些实施方案中, R_3 是 NO_2 。在一些实施方案中, R_4 是 CH_2OH 。在一些实施方案中, R_5 是 OH。在一些实施方案中, n 是 7。

[0026] 在一些实施方案中, R_1 是 NHR_6 , 其中 R_6 是烷基。在一些实施方案中, R_1 是 NR_6R_7 , 其中 R_6 和 R_7 各自为烷基。在一些实施方案中, R_1 是选自下组的 N-杂环:

[0027]



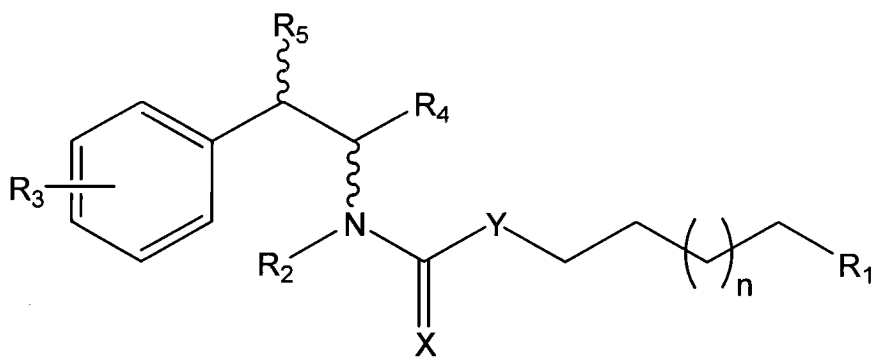
[0028] 在一些实施方案中,所述化合物选自:(1R,2R)-2-[N-(12'-{1''-咪唑}-十二烷基)-氨基]-1-(4''-硝基苯基)-1,3-丙二醇 (LCL433); (1R,2R)-2-[N-(12'-{1''-吗

啉}-十二烷酰基)-氨基]-1-(4''-硝基苯基)-1,3-丙二醇 (LCL449); (1R, 2R)-2-[N-(12'-氨基-十二烷酰基)-氨基]-1-(4''-硝基苯基)-1,3-丙二醇 (LCL463); (1R, 2R)-2-[N-(12'-N, N-二甲基氨基-十二烷酰基)-氨基]-1-(4''-硝基苯基)-1,3-丙二醇 (LCL464); (1R, 2R)-2-[N-(6'-{N-辛基氨基}-己酰基)-氨基]-1-(4''-硝基苯基)-1,3-丙二醇 (LCL488); 和 (1R, 2R)-2-[N-{12'-N-甲基-氨基}-十二烷酰基)-氨基]-1-(4''-硝基苯基)-1,3-丙二醇 (LCL506)。在一些实施方案中,所述化合物是 (1R, 2R)-2-[N-(12'-N, N-二甲基氨基-十二烷酰基)-氨基]-1-(4''-硝基苯基)-1,3-丙二醇 (LCL464)。

[0029] 在一些实施方案中,本发明提供药物组合物,其包含:(a) 式 (Ia) 的化合物和 (b) 药学可接受的载体。

[0030] 在一些实施方案中,本发明提供式 (Ib) 的化合物或其药学可接受的盐:

[0031]



[0032] 其中:

[0033] n 是 0 至 13 的整数;

[0034] R₁ 选自 H、OH、SH、NH₂、Cl、Br、I、C(=O)OH、C(=O)NH₂、NH(C(=NH))NH₂、NHR₆、NR₆R₇、⁺N(R₆)₃ 和 N-杂环;

[0035] R₂ 选自 H 和烷基;

[0036] R₃ 选自 H、OH、NO₂、NH₂ 和 NHR₉;

[0037] R₄ 选自 H、CH₃、CH₂OH 和 CH₂O-C(=O)-CH(R₈)NR₆R₇;

[0038] R₅ 选自 H、OH、=O 和 OC(=O)CH(R₈)NR₆R₇;

[0039] R₆、R₇ 和 R₈ 各自独立地选自 H、烷基、芳烷基和芳基;

[0040] R₉ 是 C(=O)-(CH₂)_mR₁₀, 其中 m 是 5 至 10 的整数;

[0041] R₁₀ 是 H、烷基、环烷基或杂环;

[0042] X 选自 O、NH 和 S;

[0043] Y 是 CH₂ 或 NH; 并且

[0044] 其中 R₄ 和 R₅ 中的至少一个包含酯基团。

[0045] 在一些实施方案中, R₄ 是 CH₂O-C(=O)-CH(R₈)NR₆R₇。在一些实施方案中, R₈ 是 H, 并且 R₆ 和 R₇ 各自为烷基。

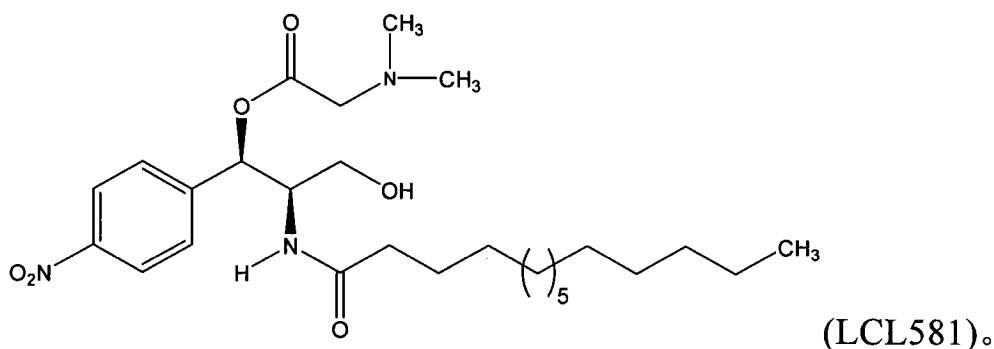
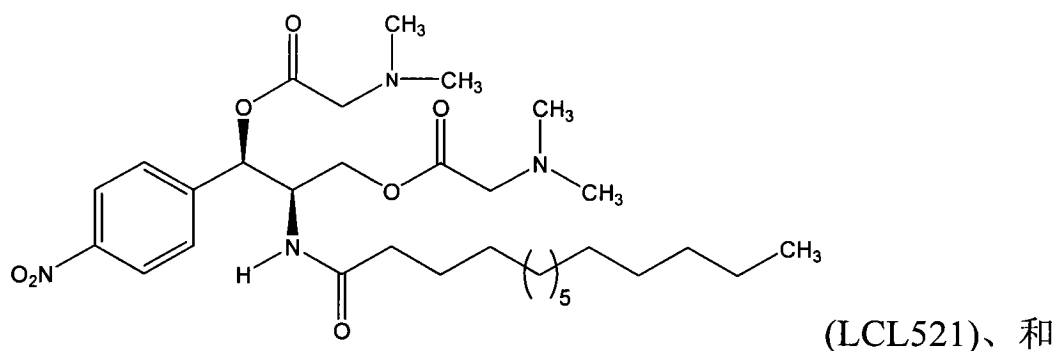
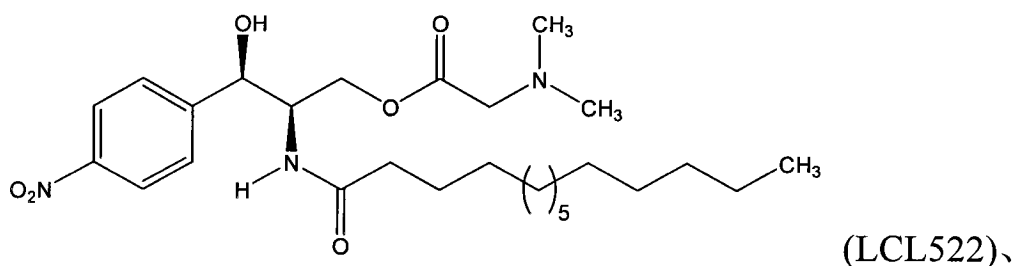
[0046] 在一些实施方案中, R₅ 是 OC(=O)CH(R₈)NR₆R₇。在一些实施方案中, R₈ 是 H, 并且 R₆ 和 R₇ 各自为烷基。

[0047] 在一些实施方案中, R₄ 是 CH₂O-C(=O)-CH(R₈)NR₆R₇, 并且 R₅ 是 OC(=O)-CH(R₈)

NR₆R₇。在一些实施方案中, n 是 5。在一些实施方案中, R₁ 是正丁基。在一些实施方案中, R₃ 是 NO₂。

[0048] 在一些实施方案中,所述化合物选自

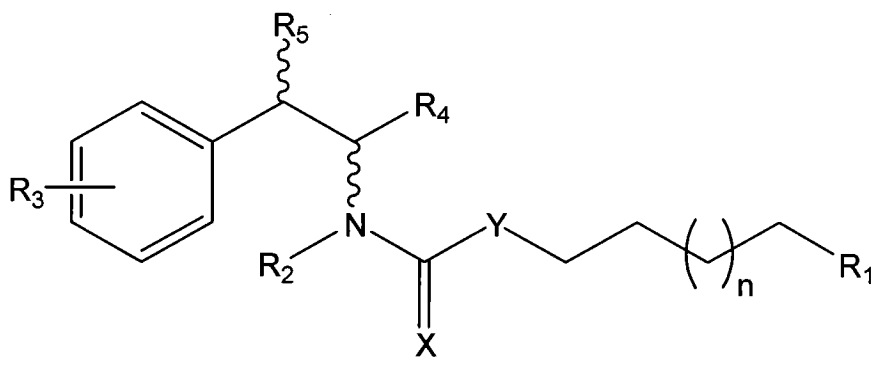
[0049]



[0050] 在一些实施方案中,本发明提供药物组合物,其包含:(a) 式 (Ib) 的化合物和 (b) 药学可接受的载体。

[0051] 在一些实施方案中,本发明提供抑制酸性神经酰胺酶的方法,所述方法包括使包含酸性神经酰胺酶的样品接触有效量的式 (Ia) 的化合物或其药学可接受的盐:

[0052]



[0053] 其中:

[0054] n 是 0 至 13 的整数；

[0055] R_1 选自 NH_2 、 NHR_6 、 NR_6R_7 和 N- 杂环；

[0056] R_2 选自 H 和烷基；

[0057] R_3 选自 H、OH、 NO_2 、 NH_2 和 NHR_9 ；

[0058] R_4 选自 H、 CH_3 、 CH_2OH 和 $CH_2O-C(=O)-CH(R_8)NR_6R_7$ ；

[0059] R_5 选自 H、OH、 $=O$ 和 $OC(=O)CH(R_8)NR_6R_7$ ；

[0060] R_6 、 R_7 和 R_8 各自独立地选自 H、烷基、芳烷基和芳基；

[0061] R_9 是 $C(=O)-(CH_2)_mR_{10}$ ，其中 m 是 5 至 10 的整数；

[0062] R_{10} 是 H、烷基、环烷基或杂环；

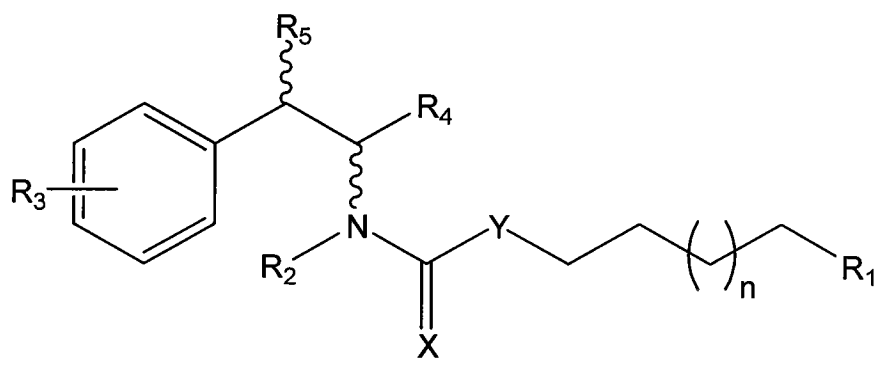
[0063] X 选自 O、NH 和 S；并且

[0064] Y 是 CH_2 或 NH；

[0065] 其中所述抑制不具有永久的溶酶体失稳和 / 或所述酸性神经酰胺酶的蛋白水解降解。在一些实施方案中，所述样品是体外细胞样品或体内细胞样品。

[0066] 在一些实施方案中，本发明提供在个体中治疗或预防与不期望的神经酰胺酶或鞘氨醇激酶活性相关的疾病或病症的方法，所述方法包括向所述个体给药有效量的式 (Ia) 的化合物或其药学可接受的盐：

[0067]



[0068] 其中：

[0069] n 是 0 至 13 的整数；

[0070] R_1 选自 NH_2 、 NHR_6 、 NR_6R_7 和 N- 杂环；

[0071] R_2 选自 H 和烷基；

[0072] R_3 选自 H、OH、 NO_2 、 NH_2 和 NHR_9 ；

[0073] R_4 选自 H、 CH_3 、 CH_2OH 和 $CH_2O-C(=O)-CH(R_8)NR_6R_7$ ；

[0074] R_5 选自 H、OH、 $=O$ 和 $OC(=O)CH(R_8)NR_6R_7$ ；

[0075] R_6 、 R_7 和 R_8 各自独立地选自 H、烷基、芳烷基和芳基；

[0076] R_9 是 $C(=O)-(CH_2)_mR_{10}$ ，其中 m 是 5 至 10 的整数；

[0077] R_{10} 是 H、烷基、环烷基或杂环；

[0078] X 选自 O、NH 和 S；并且

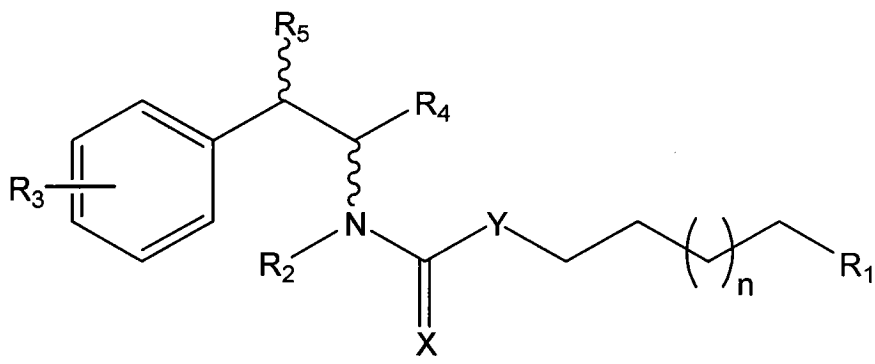
[0079] Y 是 CH_2 或 NH；

[0080] 其中所述化合物抑制酸性神经酰胺酶而不具有或基本上不具有永久的溶酶体失稳和 / 或所述酸性神经酰胺酶的蛋白水解降解。

[0081] 在一些实施方案中,所述疾病或病症选自癌症、癌症转移、动脉粥样硬化、狭窄、炎症、哮喘、特应性皮炎和其它增殖性疾病。在一些实施方案中,所述个体是哺乳动物个体。在一些实施方案中,以药物制剂的形式向所述个体给药所述式 (Ia) 的化合物,所述药物制剂包含所述式 (Ia) 的化合物和药学可接受的载体。

[0082] 在一些实施方案中,本发明提供治疗癌症的方法,所述方法包括向有此治疗需要的个体给药有效量的式 (Ia) 的化合物或其药学可接受的盐:

[0083]



[0084] 其中:

[0085] n 是 0 至 13 的整数;

[0086] R₁ 选自 NH₂、NHR₆、NR₆R₇ 和 N- 杂环;

[0087] R₂ 选自 H 和烷基;

[0088] R₃ 选自 H、OH、NO₂、NH₂ 和 NHR₉;

[0089] R₄ 选自 H、CH₃、CH₂OH 和 CH₂O-C(=O)-CH(R₈)NR₆R₇;

[0090] R₅ 选自 H、OH、=O 和 OC(=O)CH(R₈)NR₆R₇;

[0091] R₆、R₇ 和 R₈ 各自独立地选自 H、烷基、芳烷基和芳基;

[0092] R₉ 是 C(=O)-(CH₂)_mR₁₀, 其中 m 是 5 至 10 的整数;

[0093] R₁₀ 是 H、烷基、环烷基或杂环;

[0094] X 选自 O、NH 和 S; 并且

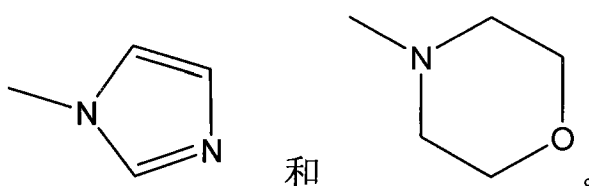
[0095] Y 是 CH₂ 或 NH。

[0096] 在一些实施方案中,所述癌症选自乳腺癌、前列腺癌、黑色素瘤、蜂窝状癌和头颈癌。在一些实施方案中,所述个体是哺乳动物个体。在一些实施方案中,以药物制剂的形式给药所述式 (Ia) 的化合物,所述药物制剂包含所述式 (Ia) 的化合物和药学可接受的载体。

[0097] 在一些实施方案中, X 是 O。在一些实施方案中, Y 是 CH₂。在一些实施方案中, R₂ 是 H。在一些实施方案中, R₃ 是 NO₂。在一些实施方案中, R₄ 是 CH₂OH。在一些实施方案中, R₅ 是 OH。在一些实施方案中, n 是 7。

[0098] 在一些实施方案中, R₁ 是 NHR₆, 其中 R₆ 是烷基。在一些实施方案中, R₁ 是 NR₆R₇, 其中 R₆ 和 R₇ 各自为烷基。在一些实施方案中, R₁ 是选自下组的 N- 杂环:

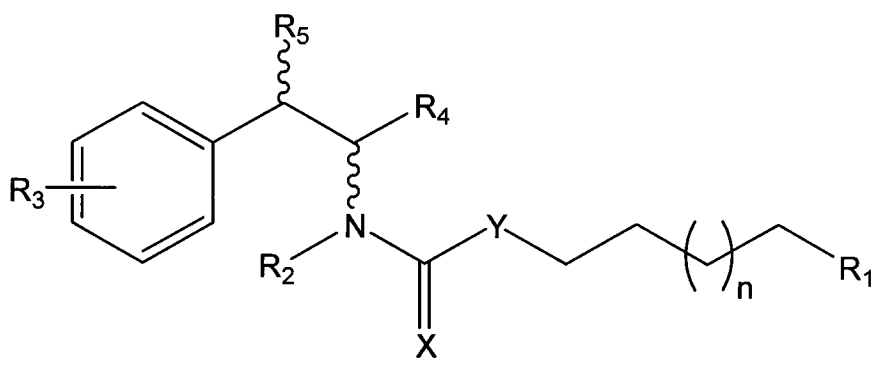
[0099]



[0100] 在一些实施方案中,所述化合物选自:(1R,2R)-2-[N-(12'-{1"-咪唑}-十二烷酰基)-氨基]-1-(4"-硝基苯基)-1,3-丙二醇(LCL433);(1R,2R)-2-[N-(12'-{1"-吗啉}-十二烷酰基)-氨基]-1-(4"-硝基苯基)-1,3-丙二醇(LCL449);(1R,2R)-2-[N-(12'-氨基-十二烷酰基)-氨基]-1-(4"-硝基苯基)-1,3-丙二醇(LCL463);(1R,2R)-2-[N-(12'-N,N-二甲基氨基-十二烷酰基)-氨基]-1-(4"-硝基苯基)-1,3-丙二醇(LCL464);(1R,2R)-2-[N-(6'-{N-辛基氨基}-己酰基)-氨基]-1-(4"-硝基苯基)-1,3-丙二醇(LCL488);和(1R,2R)-2-[N-{12'-N-甲基-氨基}-十二烷酰基)-氨基]-1-(4"-硝基苯基)-1,3-丙二醇(LCL506)。在一些实施方案中,所述化合物是(1R,2R)-2-[N-(12'-N,N-二甲基氨基-十二烷酰基)-氨基]-1-(4"-硝基苯基)-1,3-丙二醇(LCL464)。

[0101] 在一些实施方案中,本发明提供抑制酸性神经酰胺酶的方法,所述方法包括在其中酸性神经酰胺酶抑制剂的酯前药水解以提供所述抑制剂的条件下,使包含酸性神经酰胺酶的样品接触有效量的所述前药或其药学可接受的盐,所述前药具有式(Ib)的结构:

[0102]



[0103] 其中:

[0104] n 是 0 至 13 的整数;

[0105] R_1 选自 H、OH、SH、 NH_2 、Cl、Br、I、 $C(=O)OH$ 、 $C(=O)NH_2$ 、 $NH(C=NH)NH_2$ 、 NHR_6 、 NR_6R_7 、 $^+N(R_6)_3$ 和 N-杂环;

[0106] R_2 选自 H 和烷基;

[0107] R_3 选自 H、OH、 NO_2 、 NH_2 和 NHR_9 ;

[0108] R_4 选自 H、 CH_3 、 CH_2OH 和 $CH_2O-C(=O)-CH(R_8)NR_6R_7$;

[0109] R_5 选自 H、OH、=O 和 $OC(=O)CH(R_8)NR_6R_7$;

[0110] R_6 、 R_7 和 R_8 各自独立地选自 H、烷基、芳烷基和芳基;

[0111] R_9 是 $C(=O)-(CH_2)_mR_{10}$, 其中 m 是 5 至 10 的整数;

[0112] R_{10} 是 H、烷基、环烷基或杂环;

[0113] X 选自 O、NH 和 S;

[0114] Y 是 CH_2 或 NH; 并且

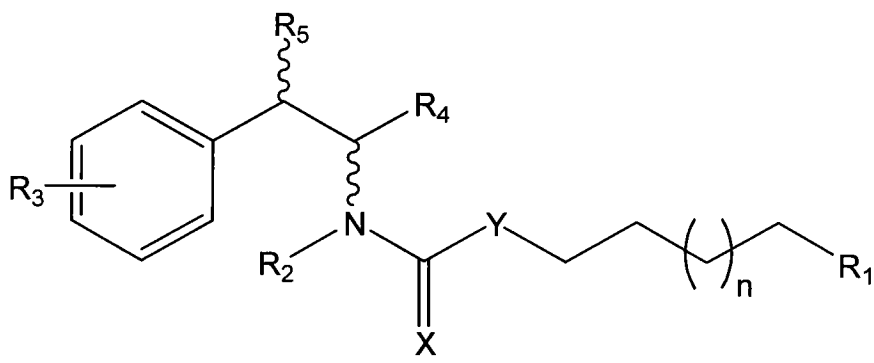
[0115] 其中 R_4 和 R_5 中的至少一个包含酯基团。

[0116] 在一些实施方案中,所述样品是体外细胞样品或体内细胞样品。

[0117] 在一些实施方案中,本发明提供在个体中治疗或预防与不期望的神经酰胺酶或鞘氨醇激酶活性相关的疾病或病症的方法,所述方法包括向所述个体给药有效量的式(Ib)

的化合物或其药学可接受的盐：

[0118]



[0119] 其中：

[0120] n 是 0 至 13 的整数；

[0121] R_1 选自 H、OH、SH、 NH_2 、Cl、Br、I、 $C(=O)OH$ 、 $C(=O)NH_2$ 、 $NH(C=NH)NH_2$ 、 NHR_6 、 NR_6R_7 、 $^+N(R_6)_3$ 和 N-杂环；

[0122] R_2 选自 H 和烷基；

[0123] R_3 选自 H、OH、 NO_2 、 NH_2 和 NHR_9 ；

[0124] R_4 选自 H、 CH_3 、 CH_2OH 和 $CH_2O-C(=O)-CH(R_8)NR_6R_7$ ；

[0125] R_5 选自 H、OH、 $=O$ 和 $OC(=O)CH(R_8)NR_6R_7$ ；

[0126] R_6 、 R_7 和 R_8 各自独立地选自 H、烷基、芳烷基和芳基；

[0127] R_9 是 $C(=O)-(CH_2)_mR_{10}$ ，其中 m 是 5 至 10 的整数；

[0128] R_{10} 是 H、烷基、环烷基或杂环；

[0129] X 选自 O、NH 和 S；

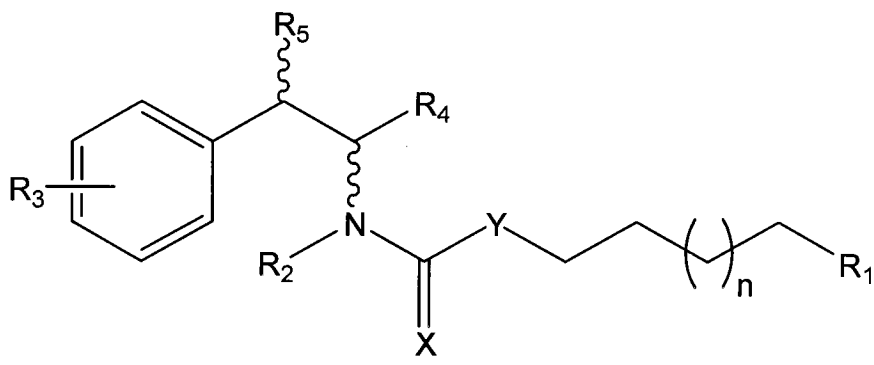
[0130] Y 是 CH_2 或 NH；并且

[0131] 其中 R_4 和 R_5 中的至少一个包含酯基团。

[0132] 在一些实施方案中，所述疾病或病症选自癌症、癌症转移、动脉粥样硬化、狭窄、炎症、哮喘、特应性皮炎和其它增殖性疾病。在一些实施方案中，所述个体是哺乳动物个体。在一些实施方案中，以药物制剂的形式向所述个体给药所述式 (Ib) 的化合物，所述药物制剂包含所述式 (Ib) 的化合物和药学可接受的载体。

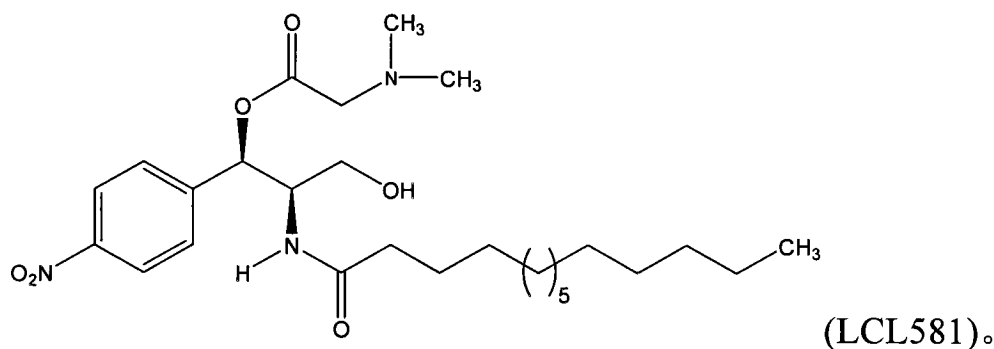
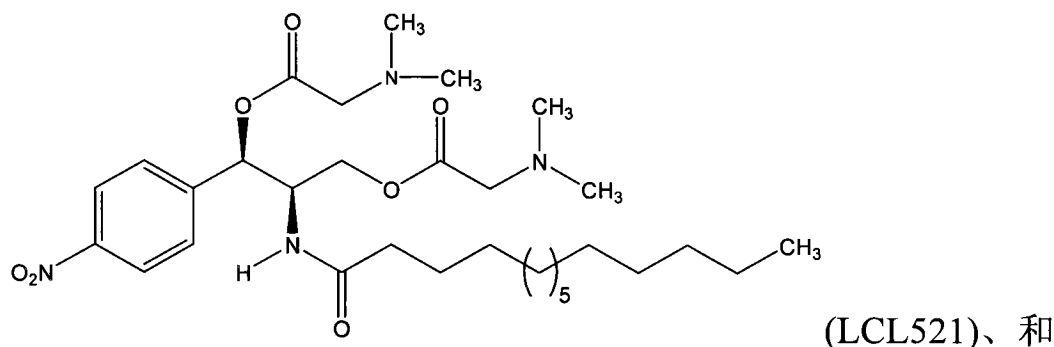
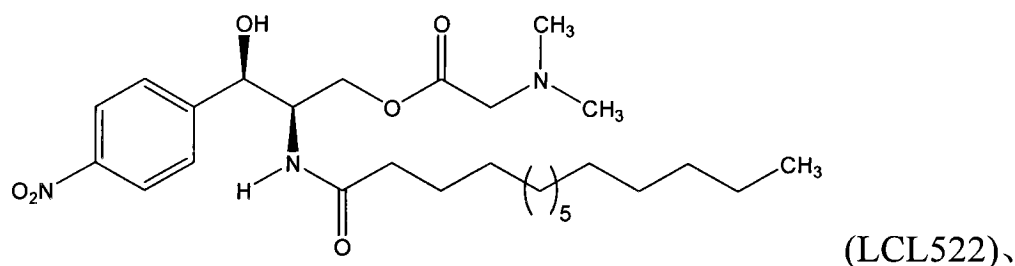
[0133] 在一些实施方案中，本发明提供治疗癌症的方法，所述方法包括向有此治疗需要的个体给药有效量的式 (Ib) 的化合物或其药学可接受的盐：

[0134]



[0135] 其中：

- [0136] n 是 0 至 13 的整数；
- [0137] R_1 选自 H、OH、SH、 NH_2 、Cl、Br、I、 $C(=O)OH$ 、 $C(=O)NH_2$ 、 $NH(C=NH)NH_2$ 、 NHR_6 、 NR_6R_7 、 $N(R_6)_3$ 和 N- 杂环；
- [0138] R_2 选自 H 和烷基；
- [0139] R_3 选自 H、OH、 NO_2 、 NH_2 和 NHR_9 ；
- [0140] R_4 选自 H、 CH_3 、 CH_2OH 和 $CH_2O-C(=O)-CH(R_8)NR_6R_7$ ；
- [0141] R_5 选自 H、OH、 $=O$ 和 $OC(=O)CH(R_8)NR_6R_7$ ；
- [0142] R_6 、 R_7 和 R_8 各自独立地选自 H、烷基、芳烷基和芳基；
- [0143] R_9 是 $C(=O)-(CH_2)_mR_{10}$ ，其中 m 是 5 至 10 的整数；
- [0144] R_{10} 是 H、烷基、环烷基或杂环；
- [0145] X 选自 O、NH 和 S；
- [0146] Y 是 CH_2 或 NH；并且
- [0147] 其中 R_4 和 R_5 中的至少一个包含酯基团。
- [0148] 在一些实施方案中，所述个体是哺乳动物个体。在一些实施方案中，以药物制剂的形式给药所述式 (Ib) 的化合物，所述药物制剂包含所述式 (Ib) 的化合物和药学可接受的载体。
- [0149] 在一些实施方案中， R_4 是 $CH_2O-C(=O)-CH(R_8)NR_6R_7$ 。在一些实施方案中， R_8 是 H，并且 R_6 和 R_7 各自为烷基。
- [0150] 在一些实施方案中， R_5 是 $OC(=O)CH(R_8)NR_6R_7$ 。在一些实施方案中， R_8 是 H，并且 R_6 和 R_7 各自为烷基。
- [0151] 在一些实施方案中， R_4 是 $CH_2O-C(=O)-CH(R_8)NR_6R_7$ ，并且 R_5 是 $OC(=O)-CH(R_8)NR_6R_7$ 。
- [0152] 在一些实施方案中， n 是 5。在一些实施方案中， R_1 是正丁基。在一些实施方案中， R_3 是 NO_2 。
- [0153] 在一些实施方案中，所述化合物选自：
- [0154]



[0155] 本发明的一个目的在于提供向溶酶体 ACDase 抑制剂以及相关的前药,其用于治疗或预防与不期望的神经酰胺酶、与神经酰胺酶相关的活性(如神经酰胺酶逆向活性(reverse activity)、神经酰胺/二氢神经酰胺合成酶(ceramide/dhceramide synthase)以及酰基转移酶)和/或鞘氨醇激酶活性相关的疾病和病症,包括癌症和其它增殖性疾病。

[0156] 上文中已表明了本发明的一个目的,并且本发明完全或部分地实现了该目的,随着说明书的进展,同时结合下文最佳描述的附图,会明确其它目的。

[0157] 附图简述

[0158] 图 1 是显示包含 ω -氨基酰基的 E 类化合物(LCL463、LCL506、LCL464、LCL488、LCL433 和 LCL449) 的合成的示意图。

[0159] 图 2 是显示 E 类化合物的合成的示意图,所述 E 类化合物是 (1R,2R)-2-N-(十四烷酰基氨基)-1-(4'-硝基苯基)-1,3-丙二醇(B13) 的前药。

[0160] 图 3 是显示 50 μ M 的 E 类抑制剂(LCL433、LCL449、LCL463、LCL464、LCL488 或 LCL506) 在体外(在 MCF-7 细胞裂解液中)对酸性神经酰胺酶(ACDase) 的抑制效应的柱状图。基于放射性棕榈酸从 [3 H]C16-Cer 中的释放测定 ACDase 活性,并表示为对照(仅为媒介物)样品中释放的放射性棕榈酸的百分比。显示 (1R,2R)-2-N-(十四烷酰基氨基)-1-(4'-硝基苯基)-1,3-丙二醇(B13) 的结果以供比较。

[0161] 图 4 是显示 10 μ M 的 E 类抑制剂(LCL433、LCL449、LCL463、LCL464、LCL488 或 LCL506) 对酸性神经酰胺酶(ACDase) 的细胞活性的抑制效应的柱状图。将 MCF-7 细胞

用 E 类抑制剂温育 2 小时,匀浆,并测定释放的放射性棕榈酸的量。结果表示为对照细胞(仅用媒介物温育)中释放的放射性棕榈酸的百分比。显示 (1R,2R)-2-N-(十四烷酰基氨基)-1-(4'-硝基苯基)-1,3-丙二醇 (B13) 的结果以供比较。

[0162] 图 5A 是显示 E 类抑制剂 (LCL433、LCL449、LCL463、LCL464、LCL488 或 LCL506; 10 μ M) 在 MCF-7 细胞处理 2 小时后对细胞鞘氨醇 (Sph) 水平的效应的柱状图。显示 (1R,2R)-2-N-(十四烷酰基氨基)-1-(4'-硝基苯基)-1,3-丙二醇 (B13) 的结果以供比较。

[0163] 图 5B 是显示 10 μ M 的 LCL464 在 MCF-7 细胞处理 2 小时后对细胞鞘脂 (SPL) 水平的效应的柱状图,所述细胞鞘脂包括神经酰胺 (C14-Cer、C16-Cer、C18-Cer、C24-Cer 和 C24:1-Cer) 和鞘氨醇 (Sph)。结果表示为在对照细胞(仅用媒介物处理)中观察到的神经酰胺和鞘氨醇的量的百分比。

[0164] 图 5C 是显示 50 μ M 的 LCL464 对细胞神经酰胺 (C14-Cer,深阴影的菱形;C16-Cer,深阴影的正方形;C18-Cer,深阴影的三角形;C24-Cer,“×”;C24:1-Cer,“*”) 和鞘氨醇 (Sph,深阴影的圆形) 的水平的时间依赖性的图。结果表示为在对照细胞(仅用媒介物处理)中观察到的神经酰胺和鞘氨醇的量的百分比。

[0165] 图 5D 是显示 LCL 464 在 24 小时后对细胞神经酰胺 (C14-Cer,深阴影的菱形;C16-Cer,深阴影的正方形;C18-Cer,深阴影的三角形;C24-Cer,“×”;C24:1-Cer,“*”) 和鞘氨醇 (Sph,深阴影的圆形) 的水平剂量依赖性效应 (0-50 μ M) 的图。结果表示为在对照细胞(仅用媒介物处理)中观察到的神经酰胺和鞘氨醇的量的百分比。

[0166] 图 6 是一组显示 10 μ M (上图印迹对的上线) 和 50 μ M (下图印迹对的上线) 的 E 类抑制剂 (LCL433、LCL449、LCL463 或 LCL464) 对酸性神经酰胺酶 (AC) 的稳定性的效应的蛋白质印迹分析的显微照片,所述稳定性是通过使用抗 AC 抗体在细胞裂解液中染色 AC 而测定的。也显示了肌动蛋白的染色结果(每一印迹对的下线)。显示 (1R,2R)-2-N-(十四烷酰基氨基)-1-(4'-硝基苯基)-1,3-丙二醇 (B13) 的结果以供比较。每一组印迹对的对照线表示仅加入媒介物(不加入 E 类抑制剂)的效应。

[0167] 图 7 是显示 10 μ M 的 LCL464 或 (1R,2R)-2-N-(十四烷酰基氨基)-1-(4'-硝基苯基)-1,3-丙二醇 (B13) 在处理一小时后(阴影柱)或五小时后(空白柱)对溶酶体稳定性的效应的柱状图。使用 LYSOTRACKER™ 红色染料 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, United States of America) 荧光测量溶酶体稳定性。结果表示为在仅用媒介物处理的对照细胞中观察到的荧光的百分比。

[0168] 图 8 是显示 E 类抑制剂 (LCL433,深阴影的三角形;LCL449,“×”;LCL463,“*”;LCL464,深阴影的圆形;LCL488,垂直单线;或 LCL506,水平线) 对 MCF-7 乳腺癌细胞生长的浓度依赖性抑制效应。也提供 (1R,2R)-2-N-(十四烷酰基氨基)-1-(4'-硝基苯基)-1,3-丙二醇 (B13;深阴影的菱形) 的浓度依赖性抑制效应以供比较。测定细胞数量,并表示为对照细胞(仅使用媒介物处理)的细胞数量的百分比。

[0169] 图 9 是显示 E 类抑制剂 (LCL433、LCL449、LCL463、LCL464、LCL488 或 LCL506) 对 MCF-7 乳腺癌细胞生长的 50% 抑制浓度 (IC_{50}) 曲线的柱状图。为了比较,也提供了 (1R,2R)-2-N-(十四烷酰基氨基)-1-(4'-硝基苯基)-1,3-丙二醇 (B13) 的 IC_{50} 。

[0170] 图 10 是显示在 48 小时(阴影柱)或 72 小时(空白柱)后,与 LCL464 在 MCF-7 乳腺癌细胞中的效应相比,其在人头颈鳞状细胞癌细胞 (SCC14a)、人前列腺癌上皮样细胞

(Du145)、人黑色素瘤细胞 (J3DR4)、人肺泡上皮细胞 (A549) 和二型人前列腺癌细胞 (PPC1) 中的 50% 抑制浓度 (IC_{50}) 的柱状图。

[0171] 图 11 是显示浓度为 $10\ \mu\text{M}$ 和 $20\ \mu\text{M}$ 的 LCL464 在 8 小时 (阴影柱) 或 24 小时 (空白柱) 后在 MCF-7 细胞中对半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (Caspase) 3/7 的效应的柱状图。结果表示为对照细胞 (仅用媒介物处理) 中的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3/7 的百分比。

[0172] 图 12 是显示 E 类前药 LCL521 对 MCF-7 乳腺癌细胞生长的浓度依赖性抑制效应的图。

[0173] 图 13 是显示 E 类前药 LCL521 在体外 (在 MCF-7 细胞裂解液中) 对酸性神经酰胺酶 (ACDase) 活性的浓度依赖性效应的柱状图。基于放射性棕榈酸从 $[^3\text{H}]\text{C16-Cer}$ 中的释放测定 ACDase 活性, 并表示为对照 (仅为媒介物) 样品中释放的棕榈酸的百分比。

[0174] 图 14A 是一对显示用 E 类前药 LCL521 和 LCL522 处理 1 小时和 5 小时对酸性神经酰胺酶 (AC) 稳定性的效应的蛋白质印迹分析的显微照片, 所述稳定性是通过在细胞裂解液中染色 AC 而测定的。还显示了 (1R, 2R)-2-N-(十四烷酰基氨基)-1-(4'-硝基苯基)-1,3-丙二醇 (B13) 和 (1R, 2R)-2-N-(十四烷基氨基)-1-(4'-硝基苯基)-1,3-丙二醇 (LCL204) 的结果以供比较。还显示了肌动蛋白的染色结果 (底部显微照片)。对照线表示仅加入媒介物的效应。

[0175] 图 14B 是显示图 14A 所述的蛋白质印迹的量化结果的柱状图。结果表示为相对于对照的荧光强度。空白柱表示 1 小时处理的数据, 而阴影柱表示 5 小时处理的数据。

[0176] 图 15 是显示 $5\ \mu\text{M}$ (空白柱) 或 $10\ \mu\text{M}$ (阴影柱) 的 E 类前药 (LCL521 或 LCL522) 在 1 小时后对溶酶体的效应的柱状图。使用 LYSOTRACKER™ 红色染料 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, United States of America) 荧光测量溶酶体稳定性。还显示了 (1R, 2R)-2-N-(十四烷酰基氨基)-1-(4'-硝基苯基)-1,3-丙二醇 (B13) 和 (1R, 2R)-2-N-(十四烷基氨基)-1-(4'-硝基苯基)-1,3-丙二醇 (LCL204) 的结果以供比较。对于 B 13, 空白柱表示用 $10\ \mu\text{M}$ 的化合物处理的结果, 而阴影柱表示用 $20\ \mu\text{M}$ 的化合物处理的结果。

[0177] 图 16 是显示 $10\ \mu\text{M}$ 的 LCL521 (深阴影柱)、LCL522 (中等阴影柱) 或 (1R, 2R)-2-N-(十四烷酰基氨基)-1-(4'-硝基苯基)-1,3-丙二醇 (B13; 浅阴影柱) 在 5 小时后在 MCF-7 细胞中对细胞鞘脂 (C14-、C16-、C18-、C24-、C24:1-神经酰胺 (Cn-Cer))、鞘氨醇 (Sph)、鞘氨醇-1-磷酸酯 (S1P) 和总神经酰胺 (Cer tot) 水平的效应的柱状图。

[0178] 图 17 是显示 LCL521 对细胞鞘氨醇 (Sph; 深阴影的圆形) 和鞘氨醇-1-磷酸酯 (S1P, 空白的圆形) 的早期抑制效应的图。还显示了神经酰胺 (C14-Cer, 深阴影的菱形; C16-Cer, 深阴影的正方形; C18-Cer, 深阴影的三角形; C24-Cer, 浅阴影的正方形; C24:1-Cer, “*”; 和总神经酰胺 (Cer tot), 空白的正方形) 的时间依赖性水平。用 LCL521 处理提供促凋亡的 C18-Cer 和 C16-Cer 时间依赖性增加。

[0179] 发明详述

[0180] 现在会在下文中参考所附实施例更为充分地描述本发明, 所述实施例中显示了代表性实施方案。然而, 本发明能够以不同的形式加以实施, 而不应解释为受限于本文所述的实施方案。相反, 提供这些实施方案使得本发明全面和完整, 并向本领域技术人员充分地表述这些实施方案的范围。

[0181] 本文中引用的所有参考文献, 包括所有的专利、专利申请、数据库信息和期刊文章

均整体援引加入本文,并且为了所有目的达到与每一单独的专利、专利申请、数据库信息或期刊文章均特别且单独地整体援引加入相同的程度。

[0182] I. 向溶酶体酸性神经酰胺酶抑制剂

[0183] 已知神经酰胺调节抗增殖反应,例如在各种人癌症细胞系中的凋亡、生长停滞、分化和衰老。已识别了细胞中的与神经酰胺作用相关的多种重要的生物靶和事件,即磷酸酶、激酶和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶的活化;端粒末端转移酶复合物的抑制;跨膜信号通路的诱导和细胞色素 c 从线粒体中的释放。使用神经酰胺作为潜在抗癌剂的缺点是非常低的水溶性、低细胞摄取、不受控的递送、释放和细胞内靶向。神经酰胺酶是在细胞中水解神经酰胺并降低其水平的酶。神经酰胺酶的抑制升高内源性神经酰胺的水平,并且开发该酶的抑制剂作为药物研发的候选。

[0184] 神经酰胺酶的家族包括酸性、中性和碱性种类。参见 Koch 等人, J. Bio. Chem., 271, 33110-33115 (1996); El Bawab 等人, J. Bio. Chem., 274, 27948-27955 (1999); 和 Mao 等人, J. Bio. Chem., 276, 26577-26588 (2001)。人酸性神经酰胺酶定位 (map) 于 8p22, 其通常在前列腺癌 (PCa) 中改变。该酶催化神经酰胺水解得到鞘氨醇和游离脂肪酸, 其总体效应是神经酰胺信号传导的下调 (即降低的凋亡) 和增加的鞘氨醇库, 所述鞘氨醇可以被鞘氨醇激酶磷酸化以产生 S1P。S1P 与内皮分化基因家族 (Edg/S1P 受体) 相互作用以促进内皮细胞迁移和血管发生。因此, 过表达神经酰胺酶的细胞 (如肿瘤细胞) 能够在其微环境中产生抗凋亡表型和血管发生的潜在增加。

[0185] 通过 RNA 印迹法, PCa 细胞系 DU145、PC3 和 LNCaP 均表现出升高的神经酰胺酶 mRNA 水平。当通过竞争性 PCR 方法分析酸性神经酰胺酶的表达时, 由根治性前列腺切除术得到的前列腺肿瘤证明 41.6% 的酸性神经酰胺酶 mRNA 水平升高, 55.5% 没有改变, 而 2.7% 的酸性神经酰胺酶 mRNA 降低。因此, 在前列腺癌中的大部分肿瘤具有呈抗凋亡表型的潜力。

[0186] 在包括 PCa 细胞在内的大部分癌细胞中, 神经酰胺引起半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶的活化、DNA 碎裂以及凋亡的其它特征和标志、应激激活蛋白激酶 (SAPK/JNK) 的诱导、磷酸酶 D 的抑制、蛋白激酶 C (PKC) 的去磷酸化和失活、增强的线粒体活性氧的释放、细胞色素 c 的释放和 PP1 的活化, 其使产生更加促凋亡表型的 SR 蛋白质去磷酸化。

[0187] 从机理上说, 正在形成涉及神经酰胺和细胞周期进程和凋亡的其它关键调节剂的细胞生长调节的协调描绘。因此, 形成对 TNF 和其它 (但不是所有) 诱导剂有反应的神经酰胺需要激活上游半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (如半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 8), 所述上游半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶的激活受到 YVAD 和 CrmA 的抑制。然而, 下游半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶的抑制剂无法防止神经酰胺的形成, 而神经酰胺激活下游半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (如半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 13) 而不激活上游半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶。此外, 执行半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (executioner caspase) 而非效应半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (effector caspase) 的抑制剂阻碍神经酰胺诱导凋亡的能力, 使神经酰胺的形成位于这两组酶之间。同样, 使用 Bcl-2 的研究表明 Bcl-2 是相同路径上的神经酰胺的下游。因此, 神经酰胺调节 Bcl-2 的磷酸化, 并且神经酰胺对细胞死亡的作用受到 Bcl-2 过表达的抑制。

[0188] 在所有这些作用中, 短链神经酰胺 (C_2 - C_8) 可以表现出与内源性神经酰胺 (即长链神经酰胺, C_{16} - C_{24}) 水平一致的效能水平。神经酰胺类似物的作用可以表现出显著的特异性。例如, 密切相关的中性脂质二酰甘油 (DAG) 不仅不模拟神经酰胺的作用, 还更常对

其拮抗作用。二氢神经酰胺（其为神经酰胺的代谢前体，并且与神经酰胺的区别仅在于其缺少 4-5 反式双键）在细胞研究中不表现出活性，但其显示相似的摄取水平。参见 Bielawska 等人, J. Bio. Chem., 268, 26226-26232 (1993) ;和 Bielawska 等人, J. Bio. Chem., 267, 18493-18497 (1992)。

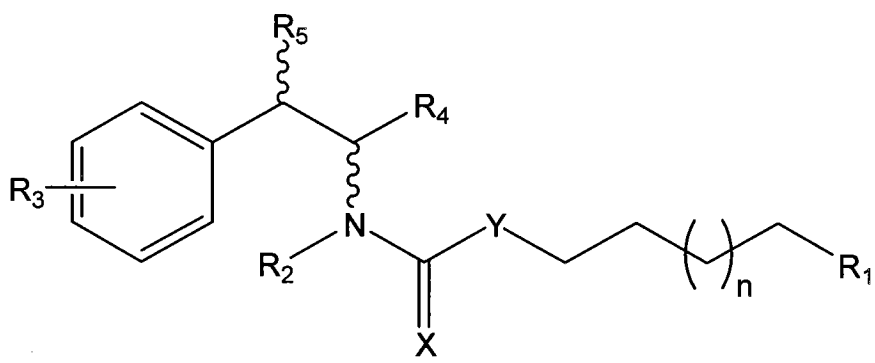
[0189] 相反，短链神经酰胺可以是与 TNF 和神经酰胺形成的其它诱导剂相关的其它关键作用的不良效应物。显然，神经酰胺不具备诱导 NF- κ B 的活性，所述 NF- κ B 是在 TNF 的炎性和抗凋亡功能中起作用的转录因子。同样，特别是与鞘氨醇和鞘氨醇-1-磷酸酯相比时，神经酰胺还是 MAP 激酶家族的 erk 成员的不良激活剂。短链神经酰胺对生化靶的子集在细胞因子应答上的受限作用进一步推动关于神经酰胺在癌症的凋亡调节中的更为特异性的作用的新兴假说。

[0190] 多条证据表明神经酰胺在介导 Fas 诱导的凋亡中的作用。首先，已证实神经酰胺的形成是 Fas 诱导的凋亡的一个完整的一部分。参见 Cremesti 等人, J. Bio. Chem., 276, 23954-23961 (2001)。第二，已证实 Fas 的活化激活酸性鞘磷脂酶 (ASmase)，所述 ASmase 已被证实参与 Fas 产生的凋亡信号的传播。参见 Raisova 等人, FEBS Lett., 473, 27-32 (2000)。第三，Fas 诱导的神经酰胺的形成与半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶的激活共同作用，并且不是凋亡的结果。参见 Tepper 等人, J. Bio. Chem., 272, 24308-24312 (1997)。第四，抗 Fas 细胞在神经酰胺水平上表现出不明显的改变，而具有正常的受体表达和完整的下游信号传导。参见 Tepper 等人, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 92, 8443-8447 (1995)。第五，已确定了神经酰胺的从头合成在 Fas 诱导的凋亡中的作用（参见 Chalfant 等人, J. Bio. Chem., 276, 44848-44855 (2001)），表明两种可能的神经酰胺“库 (pool)”能够影响 Fas 信号传导。第六，无酸性鞘磷脂酶的肝细胞对 J02 诱导的帽化不敏感，而被 25nM 剂量的 C₁₆-神经酰胺敏化。

[0191] 尽管酸性神经酰胺升高不是前列腺癌产生的必要直接原因，但 41% 的人肿瘤（60% 的 Gleason 7 级肿瘤和仅 38% 的 6 级肿瘤）中的酸性神经酰胺升高表明其表达对肿瘤生长提供选择性的益处。可能以两种方式表示该机理。首先，降低的神经酰胺水平具有抗凋亡效应，而凋亡的下调显然是一些癌症（包括前列腺）的标志。第二，通过增加的鞘氨醇激酶，S1P 的产生具有血管生成和生长效应，并在前列腺中促进内皮细胞迁移。

[0192] 本发明在一些实施方案中涉及针对细胞 ACDase 的两亲向溶酶体 ACDase 抑制剂及相关前药。在一些实施方案中，本发明涉及式 (I) 的化合物：

[0193]



[0194] 其中：

[0195] n 是 0 至 13 的整数；

[0196] R_1 选自 H、OH、SH、NH₂、Cl、Br、I、C(=O)OH、C(=O)NH₂、NH(C=NH)NH₂、NHR₆、NR₆R₇、⁺N(R₆)₃ 和 N-杂环；

[0197] R_2 选自 H 和烷基；

[0198] R_3 选自 H、OH、NO₂、NH₂ 和 NHR₉；

[0199] R_4 选自 H、CH₃、CH₂OH 和 CH₂O-C(=O)-CH(R₈)NR₆R₇；

[0200] R_5 选自 H、OH、=O 和 OC(=O)CH(R₈)NR₆R₇；

[0201] R_6 、 R_7 和 R_8 各自独立地选自 H、烷基、芳烷基和芳基；

[0202] R_9 是 C(=O)-(CH₂)_mR₁₀，其中 m 是 5 至 10 的整数；

[0203] R_{10} 是 H、烷基、环烷基或杂环；

[0204] X 选自 O、NH 和 S；

[0205] Y 是 CH₂ 或 NH；并且

[0206] 其中 R_4 和 R_5 中的至少一个包含酯基团，或其中 R_1 选自 NH₂、NHR₆、NR₆R₇ 和 N-杂环。

[0207] 因此，本发明涉及包括 2-N-(ω -氨基-酰基)-氨基-苯基醇在内的化合物（本文中还被称为 E 类化合物）以及作为 B13（及其类似物）的前药的化合物。以下在示意图 1 中显示了 B13 的结构。

[0208]

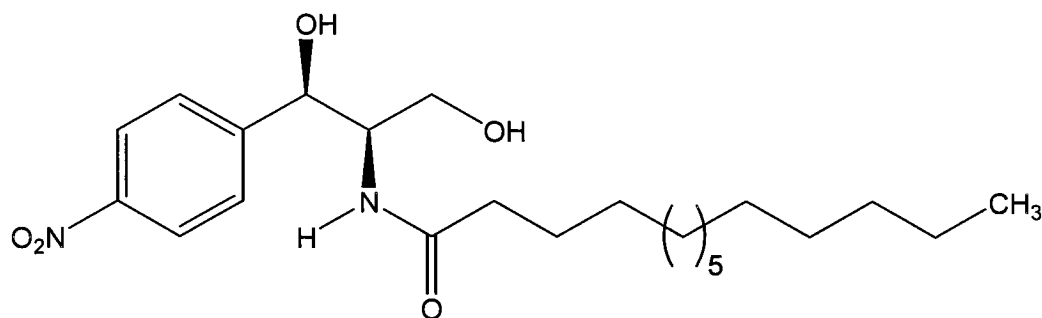


示意图 1. B13 的结构。

[0209] 在一些实施方案中，所述式 (I) 的化合物可以与酰氨基或其它 N-酰基基团结合，以使得所述化合物被 ACDase 分子识别，并提供氨基功能，以供溶酶体区室的选择性靶向。所述化合物可以在其 N-酰基或修饰的 N-酰基（如脲、硫脲、硫代酰胺等）链中包含各种烃链，将不同官能度的氨基基团（如伯胺、仲胺、叔胺或 N-杂环）引入那些 N-酰基部分、与羟基的氧原子相连的不同氨基酸基团、以及与所述氨基基团（包括苯环的氨基和 / 或羟基取代基）相连的亚甲基磷酸酯 (methylene phosphate) 基团。所述化合物可以包括任意立体化学。

[0210] 在一些实施方案中，所述化合物还可以包括氨基酸酯前药，所述氨基酸酯前药可以作为能够容易地递送至细胞以优先在溶酶体中聚积，并预期向溶酶体中释放游离抑制剂的向溶酶体前药。参见 Vig 等人, Pharm. Res., 20, 1381-1388 (2003) ; Rautio 等人, Nat. Rev. Drug Discov., 7, 255-270 (2008) ; Song 等人, J. Med. Chem., 49, 4344-4355 (2006) ; Black 和 Percival, Chembiochem, 7, 1525-1535 (2006) ; Jones-Bolin 等人, Mol. Cancer Ther., 5, 1744-1753 (2006) ; 以及 Kaufmann 和 Krise, J. Pharmaceutical. Sci., 96, 729-746 (2007) 。

例如,所述 B13 的前药可以包含一个或多个通过酯化 B13 的游离羟基而形成的氨基酯基团。

[0211] 本发明的化合物可用于诱导细胞分化、诱导凋亡以及改变细胞生长和细胞表现型。这些化合物还可用于治疗以细胞的过度增殖或迁移为特征的疾病,包括治疗癌症和其它增殖性疾病。本发明在一些实施方案中提供 B13 的结构元素与用于靶向溶酶体的氨基功能的结合,以在不引起任何显著的溶酶体功能障碍或 ACDase 的降解的情况下提供 ACDase 的强效溶酶体抑制剂。

[0212] 图 1 中显示了包含 ω -氨基酰基的示例性 E 类化合物及其合成。E 类化合物(例如 LCL464,即 (1R,2R)-2-(12'-N, N-二甲基-十二烷酰基氨基)-1-(4'-硝基苯基)-1,3-丙二醇)似乎影响内源性 Cer、Sph 和 S1P 间的通量(flux),引起与 ACDase 抑制一致的内源性 C_{14} -Cer 的早期(如在两小时内)和特异性的增加以及 Sph 的降低。特别是在更高浓度下的延长治疗(extended treatment)引起 C_{18} -Cer 的特异性增加。之前已证明这两种 Cer(C_{14} -Cer 和 C_{18} -Cer)作为促凋亡剂的作用。参见 Bielawska 等人, Bioorg. Med. Chem., 16, 1032-1045 (2008); 和 Karahatay 等人, Cancer Lett., 256, 101-111 (2007)。因此,本发明化合物的活性表明 LCL464 或其密切相关物可以用作影响 ACDase 的化疗剂。

[0213] 此外,所述前药(例如 LCL521,即 1,3-O-双-二甲基甘氨酸-B13 盐酸盐;和 LCL522,即 1-O-二甲基甘氨酸-B13 盐酸盐)的结果(参见图 2)显示对 MCF-7 细胞的增加的抑制效应。与 B13 的 $IC_{50/24h}$ 值(即 24 小时后的 50%抑制浓度)为 $60.0 \mu M$ 相比,LCL521 和 LCL522 的 $IC_{50/24h}$ 值分别为 $8.9 \mu M$ 和 $6.5 \mu M$ 。参见以下实施例 7。同样参见图 12。LCL521 在体外(参见图 13)和细胞中抑制 ACDase,引起所述酶的活性形式的 α -亚基的降低。参见图 14A 和 14B。LCL521 还可以递送至溶酶体。参见图 15。LCL521 有效地降低 Sph 和 S1P 的细胞水平,并增加细胞的促凋亡 C_{16} -和 C_{18} -神经酰胺。参见图 16 和 17。LCL522 在调节细胞鞘脂上不如 LCL521 有效,其表现更像 B13。参见图 16。不受任何一种理论的束缚,初步结果表明 LCL522 较快地水解形成 B13,而 LCL521 则缓慢地代谢为 LCL581 (B13 的单酯类似物)和 B13。这些结果表明本发明的前药途径能够增加 ACDase 抑制剂的体内治疗指数。

[0214] II. 定义

[0215] 除非在下文中另有定义,本文中所用的所有技术术语和科学术语的含义意图与本领域技术人员通常所理解的相同。提及本文中使用的技术意图指在本领域中通常所理解的技术,包括那些对本领域技术人员显而易见的技术的变化或等效技术的替换。虽然相信以下术语对于本领域技术人员很好理解,但仍然阐述以下定义以更好地解释本发明。

[0216] 除非另有说明,在整个说明书和权利要求书中所给定的化学式或化学名应包括所有的旋光异构体和立体异构体,以及存在这样的异构体和混合物的外消旋混合物。

[0217] 遵从专利法的长期惯例,当用于本申请(包括在权利要求书中)时,术语“a”、“an”和“the”指“一个或多个”。因此,短语“化合物”指一个或多个化合物。

[0218] 术语“包含”与“包括”、“含有”或“特征在于”同义,为包含性的(inclusive)或开放式的,且不排除其它未列举的元素或方法步骤。“包含”是在权利要求语言中使用的术语,其意味着所指定的元素是必需的,但是可以加入其它元素且仍形成在所述权利要求的范围内的组成。

[0219] 如本文所用,术语“由...组成”排除任何未在所述权利要求中指定的元素、步骤

或成分。当短语“由... 组成”出现在权利要求主体的分句中而非直接跟在前序部分之后时,其仅限定在该分句中所述的元素;而不从作为整体的权利要求中排除其它元素。

[0220] 如本文所用,短语“基本上由... 组成”将权利要求的范围限定到特定的材料或步骤,再加上那些实质上不影响所要求保护的主题的基本特征和新的特征的材料或步骤。

[0221] 关于术语“包含”、“由... 组成”和“基本上由... 组成”,当在本文中使用这三个术语之一时,本发明和所要求保护的主题可以包括其它两个术语的用法。

[0222] 术语“神经酰胺”可以指由鞘氨醇形成的含有酰胺的化合物,所述鞘氨醇具有在鞘氨醇的氨基上连接的脂肪酸。在一些实施方案中,所述神经酰胺是天然存在的分子。神经酰胺可以被称为“C_n-Cer”,其中 n 是由所述脂肪酸形成的酰基中的碳原子数。在一些情况下,所述神经酰胺可以在所述脂肪酸酰基中包含一个或多个双键(例如 C24:1-Cer,其为具有 24 碳脂肪酸链和一个双键的神经酰胺)。

[0223] 术语“与神经酰胺酶相关的”可以指逆神经酰胺酶(reverse ceramidase)的活性以及神经酰胺/二氢神经酰胺合成酶和酰基转移酶的活性。

[0224] 当本文中所用的术语“约”涉及可测量值(如重量、时间、剂量等的量)时,其意味着包括所给定量的一定变化,所述变化在一些实施方案中为 ±20%或 ±10%,在一些实施方案中为 ±5%,在一些实施方案中为 ±1%,而在一些实施方案中为 ±0.1%,这样的变化对于实施所公开的方法是适当的。

[0225] 当术语“不具有”涉及状况(condition)时,其意味着所涉及的状况不存在或不发生,或者基本上不存在或不发生。因此,“不具有”可以指特定状况不存在或不发生的实施方案,以及特定状况基本上不存在或不发生的实施方案(例如在特定群体(如细胞、细胞器或个体人群)中以低于 20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%或 1%发生)。

[0226] 当术语“和/或”用于描述两种或更多种活性、状况或结果时,其指包括全部所列状况的情况或仅包括所列两种状况中的一种的情况。因此,当提及不具有永久的溶酶体破坏和/或酸性神经酰胺酶的降解的情况时,所述情况可以不具有永久的溶酶体破坏、不具有酸性神经酰胺酶的降解、或不具有永久的溶酶体破坏和酸性神经酰胺酶的降解二者。

[0227] 本文所用的术语“烷基”指包括线性(即“直链”)、支链或环状的饱和或至少部分不饱和以及在一些情况下完全不饱和(即烯基和炔基)的 C₁₋₂₀ 烃链,包括例如甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、戊基、己基、辛基、乙炔基、丙炔基、丁炔基、戊炔基、己炔基、庚炔基和丙二烯基。“支链的”指其中低级烷基(如甲基、乙基或丙基)与线性烷基链相连的烷基。“低级烷基”指具有 1 至约 8 个碳原子(如 1、2、3、4、5、6、7 或 8 个碳原子)的烷基(即 C₁₋₈ 烷基)。“高级烷基”指具有约 10 至约 20 个碳原子(如 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 个碳原子)的烷基。在某些实施方案中,“烷基”特别指 C₁₋₈ 直链烷基。在其它实施方案中,“烷基”特别指 C₁₋₈ 支链烷基。

[0228] 烷基可以任选地被一个或多个烷基取代基取代(“取代烷基”),所述烷基取代基可以相同或不同。术语“烷基取代基”包括但不限于烷基、取代烷基、卤素、芳基氨基、酰基、羧基、芳氧基、烷氧基、烷硫基、芳硫基、芳烷氧基、芳烷硫基、羧基、烷氧羰基、氧代和环烷基。可以沿烷基链任选地插入一个或多个氧、硫或者取代或未取代的氮原子,其中氮取代基是氢、低级烷基(本文中也称为“烷基氨基烷基”)或芳基。

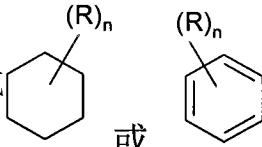
[0229] 因此,本文所用的术语“取代烷基”包括如本文所定义的烷基,其中所述烷基的一个或多个原子或官能团被另一个原子或官能团替代,所述另一个原子或官能团包括例如烷基、取代烷基、卤素、芳基、取代芳基、烷氧基、羟基、硝基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、硫酸基(sulfate)和巯基。

[0230] 本文所用的术语“芳基”指芳族取代基,其可以是单芳环或者稠合在一起的、共价连接的或与共有基团连接的多个芳环,所述共有基团例如但不限于亚甲基或亚乙基基团。所述共有连接基团还可以是羰基(如在二苯甲酮中)或氧(如在二苯醚中)或氮(如在二苯胺中)。术语“芳基”特别包括杂环芳族化合物。所述(一个或多个)芳环可以特别包括苯基、萘基、联苯基、二苯醚、二苯胺和二苯甲酮。在一些具体实施方案中,术语“芳基”指包含约5至约10个碳原子(如5、6、7、8、9或10个碳原子),并包括5元和6元烃及杂环芳环的环状芳族基团。

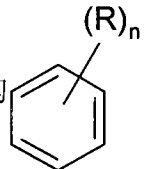
[0231] 所述芳基可以任选地被一个或多个芳基取代基取代(取代芳基),所述芳基取代基可以相同或不同,其中“芳基取代基”包括烷基、取代烷基、芳基、取代芳基、芳烷基、羟基、烷氧基、芳氧基、芳烷氧基、羧基、酰基、卤素、硝基、烷氧羰基、芳氧羰基、芳烷氧羰基、酰氧基、酰氨基、芳酰氨基、氨基甲酰基、烷基氨基甲酰基、二烷基氨基甲酰基、芳巯基、烷巯基、亚烷基和 $-NR'R''$,其中 R' 和 R'' 可以各自独立地为氢、烷基、取代烷基、芳基、取代芳基和芳烷基。

[0232] 因此,本文所用的术语“取代芳基”包括如本文所定义的芳基,其中所述芳基的一个或多个原子或官能团被另一个原子或官能团替代,所述另一个原子或官能团包括例如烷基、取代烷基、卤素、芳基、取代芳基、烷氧基、羟基、硝基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、硫酸基和巯基。

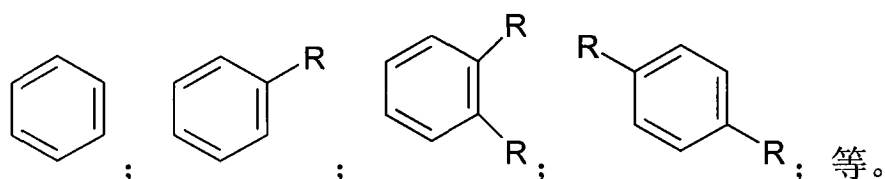
[0233] 芳基的具体实例包括但不限于环戊二烯基、苯基、呋喃、噻吩、吡咯、吡喃、吡啶、咪唑、苯并咪唑、异噻唑、异噁唑、吡唑、吡嗪、三嗪、嘧啶、喹啉、异喹啉、吲哚、呋唑等。

[0234] 本文所用的通常用例如式表示的结构是指环结构,例如但不限

于3-碳、4-碳、5-碳、6-碳等脂环和/或芳环化合物,其包含取代基R基,其中所述R基可以存在或不存在,并且当其存在时,一个或多个R基可以各自取代在所述环结构的一个或多个可用的碳原子上。所述R基的存在与否以及R基的数量由整数n的值确定。如果多于一个,则每个R基取代在所述环结构的可用的碳原子上而非取代在另一个R基上。例如,结

构 (其中n为0至2的整数)包括但不限于以下化合物基团:

[0235]



[0236] “环状的”和“环烷基”是指约 3 至约 10 个碳原子（例如 3、4、5、6、7、8、9 或 10 个碳原子）的非芳族单环或多环体系。所述环烷基可以任选地为部分不饱和的。所述环烷基还可以任选地被如本文所定义的烷基取代基、氧代和 / 或烯基取代。可以沿环状烷基链任选地插入一个或多个氧、硫或者取代或未取代的氮原子，由此提供杂环基，其中氮取代基是氢、烷基、取代烷基、芳基或取代芳基。代表性的单环环烷基环包括环戊基、环己基和环庚基。多环环烷基环包括金刚烷基、八氢萘基、十氢化萘、樟脑、蒎烷和正金刚烷基（noradamantyl）。

[0237] 术语“杂环”是指约 3 至约 14 个原子的非芳族或芳族的单环或多环体系，其中至少一个原子是杂原子（例如氧、氮或硫）。术语“N- 杂环”是指其中至少一个杂原子是氮原子的杂环。N- 杂环的实例包括但不限于氮杂环丁烷、吡咯烷、吡咯、吡咯啉、吡唑、吡唑啉、吡唑烷、哌啶、吡啶、哌嗪、吡嗪、嘧啶、哒嗪、吗啉、咪唑、苯并咪唑、咪唑啉、咪唑烷、吡啶、喹啉、异喹啉、噁唑、噻唑、异噻唑和噻嗪。在一些实施方案中，术语 N- 杂环指除吡啶外的 N- 杂环。

[0238] “芳烷基”是指芳基 - 烷基基团（其中芳基和烷基如前所述），并包括取代芳基和取代烷基。示例性的芳烷基包括苄基、苯乙基和萘甲基。

[0239] 本文所用的术语“酰基”是指有机羧酸基团，其中所述羧基的 -OH 已被另一取代基替代。因此，可以用结构 $\text{RC}(=\text{O})-$ 基团表示“酰基”基团，其中 R 是如本文所定义的烷基、取代烷基、芳烷基、芳基或取代芳基。就这点而论，术语“酰基”特别包括芳酰基，例如乙酰基呋喃和苯甲酰甲基。酰基的具体实例包括乙酰基和苯甲酰基。

[0240] “N- 酰基”是指具有 $-\text{N}-\text{C}(=\text{O})-\text{R}$ 结构的基团，其中 R 如对酰基所定义。这些基团还可以被称为酰胺。修饰的 N- 酰基包括其中所述 N- 酰基的氧已被 S 或 NH 替代的化合物，以及其中羰基（即 $-\text{C}(=\text{O})-$ ）与除氮之外的第二杂原子相连的化合物。例如，所述羰基可以与第二氮原子相连以形成脲键（即 $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{R}$ ）。

[0241] 术语“氨基”是指 $-\text{NH}_2$ 、 NHR 和 NR_2 基团，其中 R 是烷基、取代烷基、芳基、取代芳基或芳烷基，并且指在 N- 杂环（如吗啉等）中的氨基官能团。

[0242] 术语“酯”是指包含 $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{R}$ 基团的基团，其中 R 可以是烷基、取代烷基、芳烷基、芳基或取代芳基。在一些实施方案中，所述 R 基可以包含氨基取代基，且所述酯是氨基酯。

[0243] 本文所用的术语“卤代”、“卤化物”或“卤素”是指氟代、氯代、溴代和碘代基团。

[0244] 术语“羟基”是指 $-\text{OH}$ 基团。

[0245] 术语“硝基”是指 $-\text{NO}_2$ 基团。

[0246] 当使用术语“独立地选自”时，所涉及的取代基（例如 R 基，如 R_1 和 R_2 基团、或 X 和 Y 基团）可以相同或不同。例如 R_1 和 R_2 二者可以均为取代烷基，或者 R_1 可以是氢且 R_2 可以是取代烷基，等等。

[0247] 术语“癌症转移”是指原发性肿瘤扩散到另一器官。

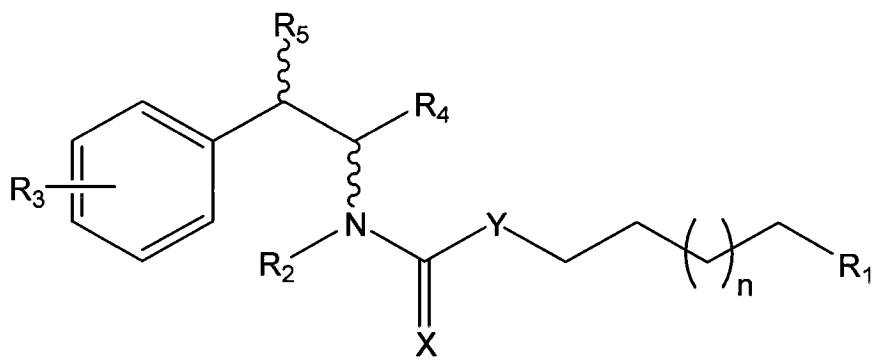
[0248] 术语“凋亡”是指程序性细胞死亡，其可以是细胞对自杀的遗传控制应答。凋亡的症状是伴有细胞毒性沸腾（cytotoxic boiling）、染色质凝聚和 DNA 碎裂的活力丧失（viability loss）。参见例如 Wyllie 等人，Int. Rev. Cytol.，68，251-306 (1980)。凋亡过程在调节组织的发育、器官的尺寸和形状和细胞的生命期中起重要作用。

[0249] III. 式 (I) 的化合物

[0250] III.A. B13 的 ω -氨基酰基类似物

[0251] 在一些实施方案中,本发明提供式 (Ia) 的化合物:

[0252]



[0253] 其中:

[0254] n 是 0 至 13 的整数;

[0255] R_1 选自 NH_2 、 NHR_6 、 NR_6R_7 和 N-杂环;

[0256] R_2 选自 H 和烷基;

[0257] R_3 选自 H、OH、 NO_2 、 NH_2 和 NHR_9 ;

[0258] R_4 选自 H、 CH_3 、 CH_2OH 和 $CH_2O-C(=O)-CH(R_8)NR_6R_7$;

[0259] R_5 选自 H、OH、 $=O$ 和 $OC(=O)CH(R_8)NR_6R_7$;

[0260] R_6 、 R_7 和 R_8 各自独立地选自 H、烷基、芳烷基和芳基;

[0261] R_9 是 $C(=O)-(CH_2)_mR_{10}$, 其中 m 是 5 至 10 的整数;

[0262] R_{10} 是 H、烷基、环烷基或杂环;

[0263] X 选自 O、NH 和 S; 并且

[0264] Y 是 CH_2 或 NH。

[0265] 在一些实施方案中,所述式 (Ia) 的化合物是酰胺或脲。因此,在一些实施方案中, X 是 O。在一些实施方案中,所述化合物是酰胺,并且 X 是 O 且 Y 是 CH_2 。

[0266] 在一些实施方案中, R_2 是 H 或低级烷基 (即 C1-C6 烷基),例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、正戊基或正己基。在一些实施方案中, R_2 是 H。

[0267] 在一些实施方案中,式 (Ia) 的苯环被一个或多个硝基取代。因此,在一些实施方案中, R_3 是 NO_2 。在一些实施方案中, R_3 取代在包含含氮基团的取代烷基的间位或对位。在一些实施方案中, R_3 是对位的。

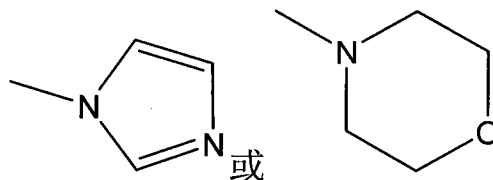
[0268] 在一些实施方案中, R_4 和 R_5 中的一个或二者均包含含氧取代基。在一些实施方案中, R_4 和 R_5 中的一个或二者均为羟基或包含酯。在一些实施方案中, R_4 是 CH_2OH 。在一些实施方案中, R_5 是 OH。

[0269] 变量 n 可以是 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 或 13。在一些实施方案中,n 是 1 至 7 的整数。在一些实施方案中,n 是 7。在一些实施方案中,n 是 1。

[0270] R_1 基团可以是任意适合的氨基基团。所述氨基基团可以是未取代的 (即 NH_2) 或包含一个或多个烷基、芳烷基或芳基氮取代基。在一些实施方案中, R_1 是烷基氨基,并具有 NHR_6 的结构,其中 R_6 是烷基。在一些实施方案中, R_1 是二烷基氨基,并具有 NR_6R_7 的结构,其

中 R_6 和 R_7 各自为烷基。在一些实施方案中, R_1 是 N-杂环。适合的 N-杂环包括芳族和非芳族的 N-杂环。所述 N-杂环可以包含除 N 原子之外的杂原子(如 O 或 S)。N-杂环还可以包含多于一个氮原子。适合的 N-杂环包括但不限于氮杂环丁烷、吡咯烷、吡咯、吡咯啉、吡唑、吡唑啉、吡唑烷、哌啶、吡啶、哌嗪、吡嗪、噻啶、哒嗪、吗啉、咪唑、苯并咪唑、咪唑啉、咪唑烷、吡啶、咪唑、喹啉、异喹啉、噁唑、噻唑、异噻唑和噻嗪。在一些实施方案中,所述 N-杂环不是吡啶。在一些实施方案中, R_1 是咪唑或吗啉,即

[0271]



[0272] 与 R_5 基团相连的碳以及与 N 原子和 R_4 基团相连的碳的立体化学可以独立地为 R 或 S。在一些实施方案中,这两个碳的立体化学均为 R。

[0273] 在一些实施方案中,所述化合物选自但不限于 (1R,2R)-2-[N-(12'-{1"-咪唑}-十二烷酰基)-氨基]-1-(4"-硝基苯基)-1,3-丙二醇 (LCL433); (1R,2R)-2-[N-(12'-{1"-吗啉}-十二烷酰基)-氨基]-1-(4"-硝基苯基)-1,3-丙二醇 (LCL449); (1R,2R)-2-[N-(12'-氨基-十二烷酰基)-氨基]-1-(4"-硝基苯基)-1,3-丙二醇 (LCL463); (1R,2R)-2-[N-(12'-N,N-二甲基氨基-十二烷酰基)-氨基]-1-(4"-硝基苯基)-1,3-丙二醇 (LCL464); (1R,2R)-2-[N-(6'-{N-辛基氨基}-己酰基)-氨基]-1-(4"-硝基苯基)-1,3-丙二醇 (LCL488); 和 (1R,2R)-2-[N-{12'-N-甲基-氨基}-十二烷酰基)-氨基]-1-(4"-硝基苯基)-1,3-丙二醇 (LCL506)。在一些实施方案中,所述化合物是 (1R,2R)-2-[-(12'-N,N-二甲基氨基-十二烷酰基)-氨基]-1-(4"-硝基苯基)-1,3-丙二醇 (LCL464)。

[0274] 可以通过任何适合的方法合成 B13 的 ω -氨基酰基类似物,例如在下文的实施例 2 中所述以及在图 1 中所示的方法。例如,可以使适合的 2-氨基乙基取代的芳族化合物(如 2-氨基-1-(4-硝基苯基)丙烷-1,3-二醇(即图 1 中的化合物 1))与 ω -卤代-酰卤(如 ω -溴代-酰氯)反应以形成酰胺。卤化物在酰基链的端部与胺(即氨、烷基胺、二烷基胺或 N-杂环)发生亲核取代得到期望的式 (Ia) 化合物。所述亲核取代反应可以在适合的有机溶剂(例如醇,如甲醇、乙醇或丙醇,或者醚,如四氢呋喃(THF))中,在碱(如 NaOH、 NaHCO_3 等)的存在下进行,以中和任何在反应中形成的酸(如 HBr)。可以使用其它适合的离去基团来代替所述卤化物,所述离去基团包括甲磺酸基(即 $-\text{O}_3\text{SCH}$)和甲苯磺酸基(即 $-\text{O}_3\text{SC}_6\text{H}_4\text{CH}_3$)。可以通过以下方式制备式 (Ia) 的脲:首先(例如通过与光气的反应)将胺原料(如化合物 1)或其受保护形式转化为异氰酸酯,然后使所述异氰酸酯与适合的胺反应。本领域技术人员会理解,所述适合的胺可以是包含烷基和第二取代基(即除伯氨基外的取代基)的伯胺,所述第二取代基是被保护的和/或可以通过进一步的化学转化被转化为卤素或氨基。

[0275] III. B. B13 的前药

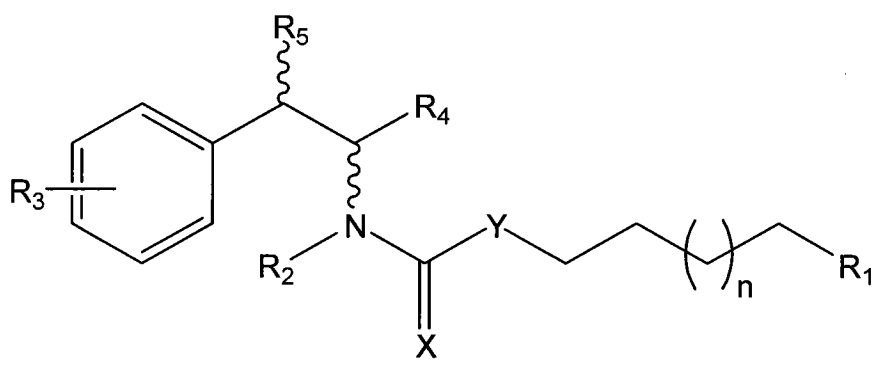
[0276] 在代表性实施方案中,本文所公开的化合物是前药,例如 B13 的前药或其类似物。前药指这样的化合物,当向个体或样品给药时,其能够(直接或间接地)提供具有期望活性

(如 ACDase 的抑制) 的另一化合物 (即“母体化合物”)。在一些但并非所有的实施方案中, 所述前药化合物的抑制活性低于母体化合物。在一些实施方案中, 所述前药化合物在转化为母体化合物之前不具有可测量的抑制活性。在一些实施方案中, 所述前药本身具有期望的活性。

[0277] 所述前药向母体化合物的转化可以在特定的酶 (如酯酶) 的存在下或在特定的生物条件下 (如在生理相关的 pH 下) 发生。在一些实施方案中, 所述前药首先转化成另一种前药, 然后该另一种前药 (有时慢得多地) 转化成母体化合物。例如与代谢产物相比, 在将这样的化合物向个体给药时, 前药能够 (例如通过使口服给药的化合物更容易吸收进入血液内) 提高本发明化合物的生物利用度, 和 / 或能够增强母体化合物向生物区室 (例如溶酶体、脑或淋巴系统等) 的递送。

[0278] 相应地, 在一些实施方案中, 本发明提供式 (Ib) 的化合物:

[0279]



[0280] 其中:

[0281] n 是 0 至 13 的整数;

[0282] R_1 选自 H、OH、SH、 NH_2 、Cl、Br、I、 $C(=O)OH$ 、 $C(=O)NH_2$ 、 $NH(C(=NH)NH_2)$ 、 NHR_6 、 NR_6R_7 、 $N(R_6)_3$ 和 N-杂环;

[0283] R_2 选自 H 和烷基;

[0284] R_3 选自 H、OH、 NO_2 、 NH_2 和 NHR_9 ;

[0285] R_4 选自 H、 CH_3 、 CH_2OH 和 $CH_2O-C(=O)-CH(R_8)NR_6R_7$;

[0286] R_5 选自 H、OH、 $=O$ 和 $OC(=O)CH(R_8)NR_6R_7$;

[0287] R_6 、 R_7 和 R_8 各自独立地选自 H、烷基、芳烷基和芳基;

[0288] R_9 是 $C(=O)-(CH_2)_mR_{10}$, 其中 m 是 5 至 10 的整数;

[0289] R_{10} 是 H、烷基、环烷基或杂环;

[0290] X 选自 O、NH 和 S;

[0291] Y 是 CH_2 或 NH; 并且

[0292] 其中 R_4 和 R_5 中的至少一个包含酯基团。

[0293] 在一些实施方案中, R_4 包含酯。例如, R_4 可以具有式 $-CH_2O-C(=O)-CH(R_8)NR_6R_7$ 。在一些实施方案中, R_8 是 H, 并且 R_6 和 R_7 各自为烷基。

[0294] 在一些实施方案中, R_5 包含酯基团。在一些实施方案中, R_5 是 $-OC(=O)CH(R_8)NR_6R_7$ 。在一些实施方案中, R_8 是 H, 并且 R_6 和 R_7 各自为烷基。

[0295] 在一些实施方案中, R_5 和 R_4 均包含酯基团。因此, 在一些实施方案中, R_4 是

$\text{CH}_2\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}(\text{R}_8)\text{NR}_6\text{R}_7$ 且 R_5 是 $\text{OC}(=\text{O})-\text{CH}(\text{R}_8)\text{NR}_6\text{R}_7$ 。

[0296] 在一些实施方案中, n 是 5, 且 R_1 是正丁基。

[0297] 在一些实施方案中, 所述式 (Ib) 的化合物是酰胺或脲。因此, 在一些实施方案中, X 是 O 。在一些实施方案中, 所述化合物是酰胺, 并且 X 是 O 且 Y 是 CH_2 。

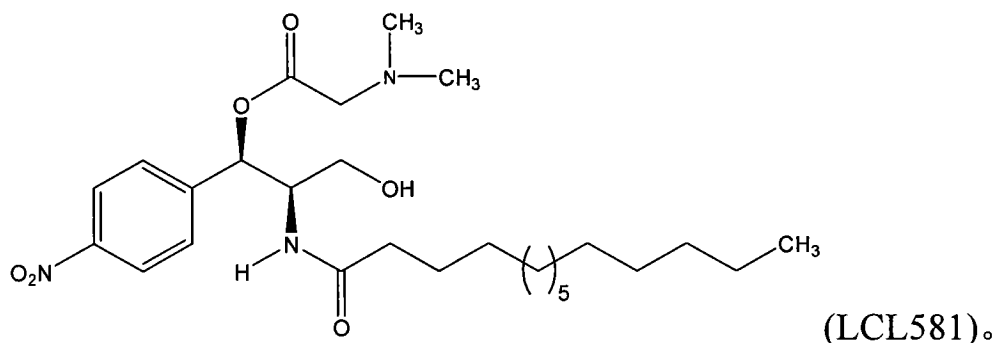
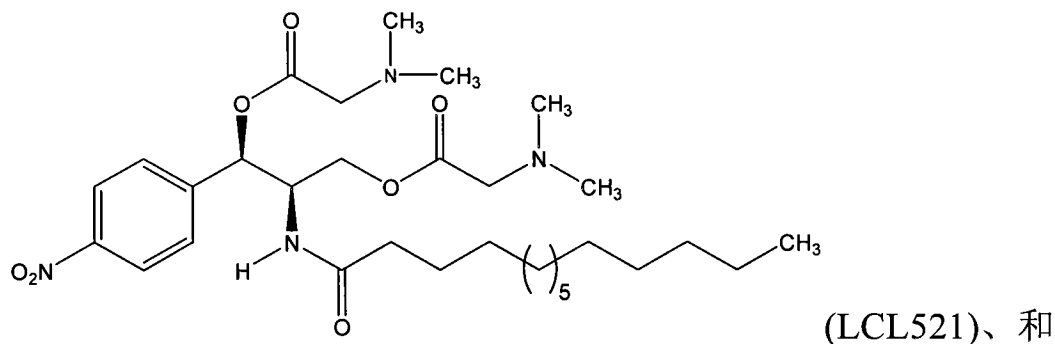
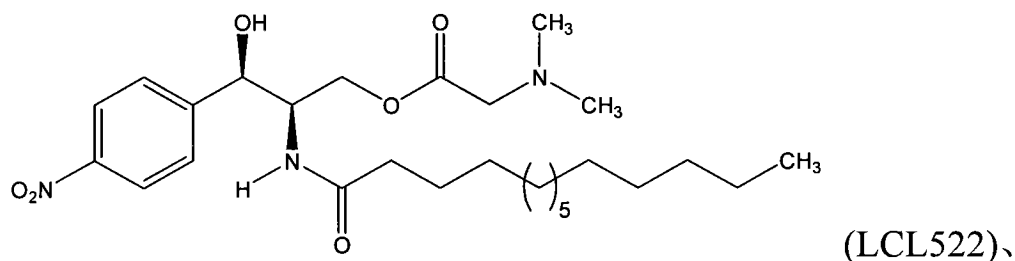
[0298] 在一些实施方案中, R_2 是 H 或低级烷基 (即 C_1 - C_6 烷基), 例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、正戊基或正己基。在一些实施方案中, R_2 是 H 。

[0299] 在一些实施方案中, 式 (Ib) 的苯环被一个或多个硝基取代。因此, 在一些实施方案中, R_3 是 NO_2 。在一些实施方案中, R_3 取代在包含含氮基团的取代烷基的间位或对位。在一些实施方案中, R_3 是对位的。

[0300] 与 R_5 基团相连的碳以及与 N 原子和 R_4 基团相连的碳的立体化学可以独立地为 R 或 S 。在一些实施方案中, 这两个碳的立体化学均为 R 。

[0301] 在一些实施方案中, 所述式 (Ib) 的化合物选自但不限于:

[0302]



[0303] 可以例如利用在肽合成中已知的试剂和 / 或条件, 通过 B13 或含羟基的 B13 类似物的完全酯化或选择性酯化来制备所述前药。在一些实施方案中, 当需要酯化反应活性更低的仲醇时, 选择性酯化包括使用适合的保护基策略以保护存在的反应活性更高的伯醇。

[0304] III. C. 药学可接受的盐

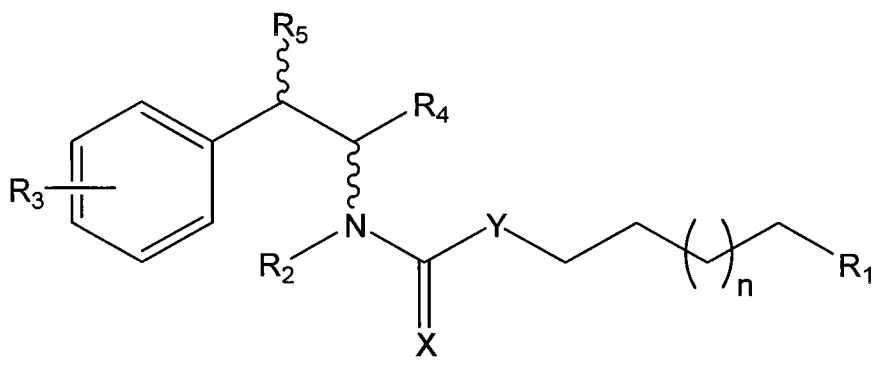
[0305] 在一些实施方案中, 本发明的化合物可以以药学可接受的盐的形式给药。因此, 在

一些实施方案中,本发明提供式 (Ia) 和 (Ib) 的化合物的药学可接受的盐。这样的药学可接受的盐包括葡萄糖酸盐、乳酸盐、乙酸盐、酒石酸盐、柠檬酸盐、磷酸盐、马来酸盐、硼酸盐、硝酸盐、硫酸盐和盐酸盐。在一些实施方案中,所述盐是盐酸盐。可以通过例如使碱性(如含胺基的)化合物与期望的酸在溶液中反应来制备本文所述的化合物的盐。

[0306] IV. 式 (I) 的化合物的用途

[0307] 在一些实施方案中,本发明提供通过使样品接触式(I)的化合物来抑制ACDase或与神经酰胺酶相关的活性的方法:

[0308]



[0309] 其中：

[0310] n 是 0 至 13 的整数；

[0311] R_1 选自 H、OH、SH、 NH_2 、Cl、Br、I、 $C(=O)OH$ 、 $C(=O)NH_2$ 、 $NH(C=NH)NH_2$ 、 NHR_6 、 NR_6R_7 、 $^+N(R_6)_3$ 和 N-杂环；

[0312] R₉ 选自 H 和烷基；

[0313] R_3 选自 H、OH、NO₂、NH₂ 和 NHR₉;

[0314] R_4 选自 H、 CH_3 、 CH_2OH 和 $CH_2O-C(=O)-CH(R_8)NR_6R_7$;

[0315] R_5 选自 H、OH、=O 和 $OC(=O)CH(R_8)NR_6R_7$;

[0316] R₆、R₇ 和 R₈ 各自独立地选自 H、烷基、芳烷基和芳基；

[0317] R_9 是 $C(=O)-(CH_2)_mR_{10}$, 其中 m 是 5 至 10 的整数;

[0318] R₁₀ 是 H、烷基、环烷基或杂环；

[0319] X 选自 O、NH 和 S：

[0320] Y 是 CH₂ 或 NH ;并且

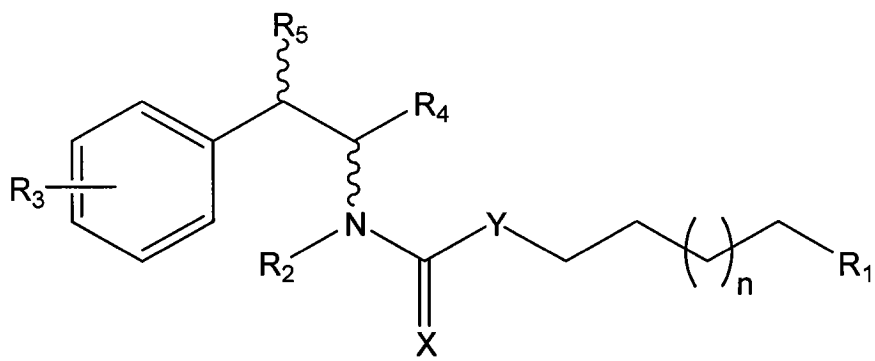
[0321] 其中 R_4 和 R_5 中的至少一个包含酯基团, 或其中 R_1 选自 NH_2 、 NHR_6 、 NR_6R_7 和 N-杂环。因此式 (I) 的化合物包括在上文第 III 部分中所述的式 (Ia) 和 (Ib) 的化合物。在一些实施方案中, 可以实现所述式 (I) 的化合物的抑制作用而不具有或基本上不具有 (即低于 20%、15%、10%、5%、4%、3%、2% 或 1%) 永久的溶酶体失稳和 / 或酸性神经酰胺酶的蛋白水解降解。

[0322] 在一些实施方案中,所述样品是体外细胞样品或体内细胞样品。因此,所述样品可以包括培养基中的全细胞或含有 ACDase 的溶解细胞。所述样品还可以包括存在于组织、血浆或器官样品中或存在于个体中的细胞。因此,本发明的方法可以用于关于 ACDase 和与神经酰胺酶相关的活性的科学研究和 / 或医学研究中。

[0323] 本发明还提供涉及本发明的化合物在治疗、预防、管理或改善与多种疾病和病症

相关的一种或多种症状中的用途的方法。相应地,在一些实施方案中,本发明提供在个体中治疗或预防与不期望的神经酰胺酶、与神经酰胺酶相关的活性和 / 或鞘氨醇激酶活性相关的疾病或病症的方法,其中所述方法包括向所述个体给药有效量的式 (I) 的化合物:

[0324]



[0325] 其中:

[0326] n 是 0 至 13 的整数;

[0327] R₁ 选自 H、OH、SH、NH₂、Cl、Br、I、C(=O)OH、C(=O)NH₂、NH(C(=NH))NH₂、NHR₆、NR₆R₇、⁺N(R₆)₃ 和 N- 杂环;

[0328] R₂ 选自 H 和烷基;

[0329] R₃ 选自 H、OH、NO₂、NH₂ 和 NHR₉;

[0330] R₄ 选自 H、CH₃、CH₂OH 和 CH₂O-C(=O)-CH(R₈)NR₆R₇;

[0331] R₅ 选自 H、OH、=O 和 OC(=O)CH(R₈)NR₆R₇;

[0332] R₆、R₇ 和 R₈ 各自独立地选自 H、烷基、芳烷基和芳基;

[0333] R₉ 是 C(=O)-(CH₂)_mR₁₀, 其中 m 是 5 至 10 的整数;

[0334] R₁₀ 是 H、烷基、环烷基或杂环;

[0335] X 选自 O、NH 和 S;

[0336] Y 是 CH₂ 或 NH; 并且

[0337] 其中 R₄ 和 R₅ 中的至少一个包含酯基团, 或其中 R₁ 选自 NH₂、NHR₆、NR₆R₇ 和 N- 杂环。在一些实施方案中, 可以给药所述式 (I) 的化合物而不具有或基本上不具有 (即低于 20%、15%、10%、5%、4%、3%、2% 或 1%) 永久的溶酶体失稳和 / 或酸性神经酰胺酶的蛋白水解降解。

[0338] 如上所述, 神经酰胺调节对应激的多种生化应答和细胞应答, 包括凋亡、细胞周期停滞和细胞衰老。参见 Hannun 等人, Trends in Cell Biol., 10, 73-80 (2000); 和 Mathias 等人, Biochem. J., 335, 465-480 (1998) 以供参考。已知几种细胞外药剂和应激原 (stress stimuli) (例如肿瘤坏死因子 α (TNF-α))、化疗剂和热引起神经酰胺聚积。一种引起神经酰胺聚积的途径是通过调节参与神经酰胺代谢的酶 (如神经酰胺酶) 的活性而实现的。神经酰胺浓度的改变足以再现与神经酰胺聚积相关的细胞因子和应激诱导物的多种生物效应。神经酰胺的聚积还再现细胞衰老的多种特征。在多种细胞类型中, 神经酰胺引起细胞分化, 不论是形态上的分化还是通过激活细胞分化的生化进程。神经酰胺还在大多数癌细胞中诱导凋亡, 其可以伴有细胞周期停滞。因此, 根据本发明, 通过本发明的方法和组合物调节神经酰胺或鞘氨醇的水平可以引起与应激反应和凋亡相关的疾病的治疗和预防。以下

公开了一些可以通过本发明的方法治疗或预防的示例性疾病和病症。

[0339] 不受任何一种或多种具体理论的束缚,本发明的化合物可以用作存在于细胞中或细胞的细胞器中的一种或多种神经酰胺酶(如ACDase)或与神经酰胺酶相关的活性的调节剂。在一些实施方案中,所述细胞器是带正电荷的细胞器,例如但不限于溶酶体。无论基本机理如何,本发明的化合物能够诱导细胞死亡。

[0340] 在一些实施方案中,本发明提供在细胞中升高神经酰胺水平的方法,其包括使所述细胞接触抑制神经酰胺酶活性的化合物。

[0341] 在一些实施方案中,本发明提供在细胞中抑制鞘氨醇形成的方法,其包括使所述细胞接触抑制神经酰胺酶活性的化合物,使得从神经酰胺转化形成的鞘氨醇的量降低。

[0342] 在一些实施方案中,本发明提供在个体中升高神经酰胺的细胞内水平的方法,其包括向所述个体给药有效量的在所述个体的细胞中抑制神经酰胺酶蛋白质的神经酰胺酶活性的化合物。

[0343] 在一些实施方案中,本发明提供在个体中抑制鞘氨醇的细胞内形成的方法,其包括向所述个体给药有效量的在所述个体的细胞中抑制神经酰胺酶蛋白质的神经酰胺酶活性的化合物。

[0344] 在一些实施方案中,治疗性和/或预防性地向个体给药抑制神经酰胺酶功能的组合物,所述个体:(1)患有涉及神经酰胺酶蛋白质或功能的水平升高(相对于正常水平或期望水平)的疾病或病症,例如神经酰胺酶蛋白质生物活性过高或过表达的个体;或(2)患有其中体外(或体内)检测表明给药神经酰胺酶抑制剂的效用的疾病或病症。可以容易地检测神经酰胺酶蛋白质或功能的升高水平,例如通过以下方式进行检测:从个体中(例如从活组织检查的组织中)获得组织样品,并在体外检测RNA或蛋白质水平、所表达的神经酰胺酶RNA或蛋白质的结构和/或活性。因此可以使用本领域中的许多标准方法,包括但不限于神经酰胺酶测定、用于检测和/或显像(vitalize)神经酰胺酶蛋白质的免疫测定(例如蛋白质印迹法、免疫沉淀法及随后的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳、免疫细胞化学等)和/或用于通过检测和/或显像神经酰胺酶mRNA来检测神经酰胺酶表达的杂交分析(hybridization assay)(例如Northern检测(Northern assay)、斑点印迹法、原位杂交等)等。

[0345] 根据本发明,通过向个体给药抑制神经酰胺酶功能的组合物来治疗和/或预防涉及细胞过度增殖和/或鞘脂信号转导功能障碍的病症。这些疾病和病症包括但不限于与细胞增殖、细胞附着、细胞迁移、肉芽组织产生(granulation tissue development)、原发性和转移性肿瘤病、炎症、心血管疾病、中风、缺血和/或动脉粥样硬化相关的疾病和病症。可以治疗和/或预防的涉及细胞过度增殖的疾病和病症包括但不限于癌症、癌前病况(pre-malignant condition)(例如增生、化生、发育异常)、良性肿瘤、过增生病症和良性增生异常病症(benign dysproliferative disorder)。癌症的特征主要在于源自特定的正常组织的异常细胞的数量增加、这些异常细胞对临近组织的入侵和这些异常细胞在个体中向远距离部位的淋巴播散或血液播散。以下讨论了可以通过给药本发明的抑制神经酰胺酶功能的组合物治疗、预防、管理和/或改善的恶性肿瘤及相关病症,特别是转移癌(对于这样的病症,参见Fishman等人, Medicine, 第二版, J. B. Lippincott Co., Philadelphia, 1985以供参考)。

[0346] 在一些实施方案中,可以通过向个体给药本发明的促进神经酰胺酶功能的组合物来治疗或预防细胞增殖不足或需要细胞增殖的病症。

[0347] 本发明包括治疗和 / 或预防疾病和病症的方法,其中所述治疗或预防可通过给药本发明的化合物而得以改进。

[0348] 在一些实施方案中,“治疗”是指疾病或病症或者其至少一种可识别症状的改善。“治疗”还指与疾病或病症相关的至少一个可测量物理参数的改善,所述疾病或病症不是必然地被个体识别。“治疗”还可以指以物理方式(如可识别症状的稳定化)或以生理方式(如物理参数的稳定化)或以这两种方式二者抑制疾病或病症的发展。“治疗”还可以指延迟疾病或病症的发作。

[0349] 在一些实施方案中,本发明的方法和组合物用作对疾病或病症的预防性措施。如本文所用,“预防”是指降低获得特定疾病或病症的风险。

[0350] 在一些实施方案中,本发明的组合物用于治疗癌症、癌症转移、动脉粥样硬化、狭窄、炎症、哮喘和特应性皮炎。在一些实施方案中,本发明提供治疗癌症的方法,其包括向有此治疗需要的个体给药有效量的式(I)化合物。

[0351] 在一些实施方案中,本发明提供治疗或预防疾病或病症的方法,其包括与其它治疗联合给药本发明的化合物。

[0352] 可以通过本发明的方法和组合物治疗和 / 或预防的癌症和相关病症包括但不限于以下病症:白血病,例如但不限于急性白血病、急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病(如成髓细胞白血病、前髓细胞性白血病、髓单核细胞白血病、单核细胞性白血病、红白血病和骨髓增生异常综合征)、慢性白血病(例如但不限于慢性髓细胞(粒细胞)白血病、慢性淋巴细胞白血病、多毛细胞白血病);真性红细胞增多症;淋巴瘤,例如但不限于霍奇金氏病、非霍奇金氏病;多发性骨髓瘤,例如但不限于郁积型多发性骨髓瘤、非分泌型骨髓瘤、骨硬化性骨髓瘤、浆细胞白血病、孤立性浆细胞瘤和髓外浆细胞瘤;**Waldenström**氏巨球蛋白血症(**Waldenström's** acroglobulinemia);未定性的单克隆丙种球蛋白病;良性单克隆丙种球蛋白病;重链病;骨骼及结缔组织肉瘤,例如但不限于骨肉瘤(bone sarcoma)、骨肉瘤(osteosarcoma)、软骨肉瘤、Ewing肉瘤、恶性巨细胞瘤、骨纤维肉瘤、脊索瘤、骨膜肉瘤、软组织肉瘤、恶性血管皮内细胞瘤(血管肉瘤)、纤维肉瘤、卡波西肉瘤、平滑肌肉瘤、脂肪肉瘤、淋巴管肉瘤、神经鞘瘤、横纹肌肉瘤、滑膜肉瘤;脑瘤,例如但不限于神经胶质瘤、星形细胞瘤、脑干胶质瘤、室管膜瘤、少突神经胶质瘤、非胶质瘤(non-gliaI tumor)、听神经瘤、颅咽管瘤、髓母细胞瘤、脑膜瘤、松果体细胞瘤、松果体母细胞瘤、原发性脑淋巴瘤;乳腺癌,包括但不限于腺癌、小叶(小细胞)癌、导管内癌、乳腺髓样癌、乳腺粘液样癌、乳腺管癌(tubular breast cancer)、乳腺乳头状癌、佩吉特氏病和炎性乳腺癌;肾上腺癌,例如但不限于嗜铬细胞瘤和肾上腺皮质癌;甲状腺癌,例如但不限于乳头状或滤泡状甲状腺癌、甲状腺髓样癌和甲状腺未分化癌;胰腺癌,例如但不限于胰岛素瘤、胃泌素瘤、胰高血糖素瘤、胰腺瘤、促生长素抑制素分泌型肿瘤和类癌或胰岛细胞瘤;垂体肿瘤,例如但不限于库兴氏病、催乳素分泌型肿瘤、肢端肥大症和尿崩症;眼癌,例如但不限于眼黑素瘤(如虹膜黑素瘤、脉络膜黑素瘤和睫状体黑素瘤)和视网膜母细胞瘤;阴道癌,例如鳞状细胞癌、腺癌和黑色素瘤;外阴癌,例如鳞状细胞癌、黑色素瘤、腺癌、基底细胞癌、肉瘤和佩吉特氏病;宫颈癌,例如但不限于鳞状细胞癌和腺癌;子宫癌,例如但不限于子宫内膜癌和子宫肉瘤;

卵巢癌,例如但不限于卵巢上皮癌、交界瘤、胚细胞瘤和间质瘤;头颈鳞状细胞癌(HNSCC);食管癌,例如但不限于鳞癌、腺癌、腺样囊性癌、粘液表皮样癌、腺鳞状癌、肉瘤、黑色素瘤、浆细胞瘤、疣状癌和燕麦细胞(小细胞)癌;胃癌,例如但不限于腺癌、蕈样胃癌(息肉样癌)、溃疡胃癌、浅表扩散型胃癌、弥散扩散型胃癌、恶性淋巴瘤、脂肪肉瘤、纤维肉瘤和癌肉瘤;结肠癌;直肠癌;肝癌,例如但不限于肝细胞癌和肝胚细胞瘤;胆囊癌,例如腺癌;胆管癌,例如但不限于乳头状胆管癌、结节性胆管癌和弥散性胆管癌;肺癌,例如非小细胞肺癌、鳞状细胞癌(表皮样癌)、腺癌、大细胞癌和小细胞肺癌;睾丸癌,例如但不限于生殖细胞瘤、精原细胞瘤、退行性(anaplastic)睾丸癌、典型(代表性)睾丸癌、精母细胞睾丸癌、非精原细胞瘤、胚胎性癌、畸胎瘤、绒毛膜癌(卵黄素瘤);前列腺癌,例如但不限于腺癌、平滑肌肉瘤和横纹肌肉瘤;阴茎癌(penal cancers);口腔癌,例如但不限于鳞状细胞癌;基底癌(basal cancer);涎腺癌,例如但不限于腺癌、粘液表皮样癌和腺样囊性癌;咽癌,例如但不限于鳞状细胞癌和疣状癌;皮肤癌,例如但不限于基底细胞癌、鳞状细胞癌和黑色素瘤、浅表扩散型黑素瘤、结节型黑素瘤、恶性雀斑样黑素瘤、肢端黑素瘤;肾癌,例如但不限于肾细胞癌、腺癌、肾上腺样瘤、纤维肉瘤、移行细胞癌(肾盂和/或输尿管(uterer));肾母细胞瘤;膀胱癌,例如但不限于移行细胞癌、鳞状细胞癌、腺癌、癌肉瘤。此外,癌症还包括粘液肉瘤、成骨性肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、间皮瘤、滑膜瘤、血管母细胞瘤、上皮癌、囊腺癌、支气管原癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌和乳头状腺癌。对于这样的病症,参见 Fishman 等人, *Medicine*, 第二版, J. B. Lippincott Co., Philadelphia, 1985; 和 Murphy 等人, *Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery*, Viking Penguin, Penguin Books, U. S. A., Inc., New York, 1997 以供参考)。

[0353] 在一些实施方案中,本发明的方法和组合物用于治疗 and / 或预防乳腺癌、前列腺癌、黑色素瘤、蜂窝状癌或头颈癌。

[0354] 还可以将本发明的抑制神经酰胺酶活性的组合物给药以治疗癌前病况和 / 或预防癌前病况向肿瘤状态或恶性状态的发展。这样的预防或治疗用途适用于已知或疑似为恶性肿瘤或癌症的前期发展的病况中,特别是其中已发生包括增生、化生或最特别的发育异常的非肿瘤的细胞生长的病况。对于这样的异常生长病况,参见 Robbins 和 Angell, *Basic Pathology*, 第二版, W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1976, 第 68-79 页以供参考)。

[0355] 可选地或者除了存在以增生、化生或发育异常为特征的异常细胞生长之外,体内表现的或在个体的细胞样品中体外表现的转化表型或恶性表型的一个或多个特征的存在可以表明抑制神经酰胺酶功能的组合物的预防性和 / 或治疗性给药的需求。转化表型的特征可以包括形态改变、不牢固的基质附着(looser substratum attachment)、接触抑制的丧失、支持物依赖性的丧失、蛋白酶释放、增加的糖转运、降低的血清需要量、胚胎抗原的表达等。

[0356] 在一些实施方案中,黏膜白斑病(一种上皮的良性增生性或发育不良性损伤)或 Bowen 病(一种原位癌)是标志着需要预防性干预的癌前病变。

[0357] 在一些实施方案中,纤维囊性疾病(囊性增生、乳房发育不良,特别是腺病(良性上皮增生))标志着对预防性干预的需求。本发明的人酸性神经酰胺酶的基因位于染色体 8(8p22) 处。基于此位置,除以上讨论的疾病和病症外,酸性神经酰胺酶可以参与与此区域相关的疾病,包括腺癌(甲状腺)、急性髓样白血病和鳞状细胞癌,尤其是那些与鼻咽区域

相关的疾病。

[0358] 在其它实施方案中,通过给药有效量的本发明化合物来治疗表现出一种或多种以下恶性肿瘤的患病因素的个体:与恶性肿瘤相关的染色体易位(如慢性髓性白血病的费城染色体、滤泡淋巴瘤的 t(14;18) 等)、家族性息肉病或 Gardner 综合症(结肠癌的可能的征兆)、良性单克隆丙球蛋白病(多发性骨髓瘤的可能的征兆)、以及与患有表现 Mendelian(基因)遗传模式的癌症或癌前疾病(例如家族性结肠息肉病、Gardner 综合症、遗传外生骨疣、多发性内分泌腺瘤病、具有淀粉样生成的甲状腺髓样癌和嗜铬细胞瘤、Peutz-Jeghers 综合症、Von Recklinghausen 神经纤维瘤病、视网膜母细胞瘤、颈动脉体瘤、皮肤黑素瘤、眼内黑素瘤、着色性干皮病、共济失调性毛细血管扩张症、Chediak-Higashi 综合症、白化病、Fanconi 再生障碍性贫血和 Bloom 综合征)的人的第一级血缘关系;参见 Robbins 和 Angell, Basic Pathology, 第二版, W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1976, 第 112-113 页。

[0359] 本发明还包括在个体中治疗和/或预防癌症或转移的方法,其包括以任意步骤次序向所述个体给药式(I)的化合物。在一些实施方案中,本发明的组合物和方法可用于预防、抑制和/或减少癌细胞的生长和/或转移。在一些实施方案中,相对于不存在所述化合物的给药时的癌细胞的生长或转移,给药所述化合物抑制或减少癌细胞的生长和/或转移,所述抑制或减少的量在一些实施方案中为至少 99%,在一些实施方案中为至少 95%,在一些实施方案中为至少 90%,在一些实施方案中为至少 85%,在一些实施方案中为至少 80%,在一些实施方案中为至少 75%,在一些实施方案中为至少 70%,在一些实施方案中为至少 65%,在一些实施方案中为至少 60%,在一些实施方案中为至少 55%,在一些实施方案中为至少 50%,在一些实施方案中为至少 45%,在一些实施方案中为至少 40%,在一些实施方案中为至少 35%,在一些实施方案中为至少 30%,在一些实施方案中为至少 25%,在一些实施方案中为至少 20%,在一些实施方案中为至少 15%,在一些实施方案中为至少 10%,并且在一些实施方案中为至少 5%。

[0360] 本发明还包括疾病的治疗和/或预防方法,其比现有的单一药物治疗法或甚至现有的联合疗法提供更好的疗效。本发明包括具有附加效能或附加疗效同时降低或避免不利作用或副作用的联合疗法。

[0361] 可以与给药本发明化合物联合使用的其它癌症疗法包括使用一种或多种组合物(包括但不限于化疗剂、免疫治疗剂、癌症疫苗、血管生成抑制剂、细胞因子)、激素疗法、基因疗法、生物疗法和放射疗法。在保持和/或增强疗效的同时,本发明的方法还可以提高个体顺应性、改善疗法和/或降低不利作用或副作用。

[0362] 在一些实施方案中,向接受用于癌症治疗的疗法(treatment modality)的个体给药本发明的化合物,其中所述个体在只用所述疗法的情况下可能经受治疗的不利作用或副作用(例如在单独给药时,所述疗法可能在其有效剂量下是有毒或有害的)。考虑到本发明,所述化合物可以改进所述疗法的治疗益处,使得当与所述化合物联合给药时,可以降低所述疗法的给药剂量和/或频率。在一些实施方案中,给药本发明的化合物以使得能够降低和/或减少化疗和/或放疗的频繁的剂量。

[0363] 在一些实施方案中,本发明的方法包括给药一种或多种血管生成抑制剂,例如但不限于血管抑制素(纤溶酶原片段);抗血管生成抗凝血酶 III;ANGIOZYME™;ABT-627;Bay

12-9566 ; 氟草胺 ; 贝伐单抗 ; BMS-275291 ; 软骨衍生的抑制因子 (CDI) ; CAI ; CD59 补体片段 ; CEP-7055 ; Col 3 ; 考布他汀 A-4 ; ENDOSTATIN™ (胶原蛋白 XVIII 片段) ; 纤连蛋白片段 ; Gro- β ; 卤夫酮 ; 肝素酶 ; 肝素六糖片段 (Heparin hexasaccharide fragment) ; HMV833 ; 人绒毛促性腺激素 (hCG) ; IM-862 ; 干扰素 $\alpha / \beta / \gamma$; 干扰素诱生蛋白 (IP-10) ; 白细胞介素 -12 ; Kringle 5 (纤溶酶原片段) ; 马立马司他 ; 金属蛋白酶抑制剂 (TIMP) ; 2- 甲氧基雌二醇 ; MMI 270 (CGS 27023A) ; MoAb IMC-1C11 ; 新伐司他 ; NM-3 ; Panzem ; PI-88 ; 胎盘核糖核酸酶抑制剂 ; 纤溶酶原激活物抑制剂 ; 血小板因子 -4 (PF4) ; 普琳司他 ; 催乳素 16kDa 片段 ; 多育曲菌素相关蛋白质 (PRP) ; PTK 787/ZK 222594 ; 维 A 酸 ; 索利司他 ; 角鲨胺 ; SS 3304 ; SU 5416 ; SU6668 ; SU11248 ; 四氢皮质甾醇 -S ; 四硫钼酸盐 ; 沙立度胺 ; 凝血酶敏感蛋白 -1 (TSP-1) ; TNP-470 ; β - 转化生长因子 (TGF- β) ; 血管抑制素 (Vasculostatin) ; 血管生成抑制素 (Vasostatin) (钙网蛋白片段) ; ZD6126 ; ZD 6474 ; 法尼基转移酶抑制剂 (FTI) ; 和二膦酸盐。

[0364] 可以与本发明,包括本发明的药物组合物和剂型及药盒联合使用的抗癌剂(如化疗剂)的其它实例包括但不限于:阿西维辛;阿柔比星;盐酸阿考达唑;阿克罗宁;阿多来新;阿地白介素;六甲蜜胺;安波霉素;醋酸阿美苄醌; ; 氨鲁米特;安吡啶;阿那曲唑;安曲霉素;天门冬酰胺酶;曲林菌素;阿扎胞苷;阿扎替派;阿佐霉素;巴马司他;苯佐替派;比卡鲁胺;盐酸比生群;二甲磺酸双奈法德;比折来新;硫酸博来霉素;布喹那钠;溴匹立明;白消安;放线菌素 C;卡鲁唑酮;卡醋酸;卡贝替姆;卡铂;卡莫司汀;盐酸卡柔比星;卡折来新;西地芬戈;苯丁酸氮芥;西罗霉素;顺铂;克拉屈滨;甲磺酸克立那托;环磷酰胺;阿糖胞苷;达卡巴嗪;放线菌素 D;盐酸柔红霉素;地西他滨;右奥马铂;地扎瓜宁;甲磺酸地扎瓜宁;地吡酮;多西紫杉醇;多柔比星;盐酸多柔比星;屈洛昔芬;柠檬酸屈洛昔芬;丙酸屈他雄酮;达佐霉素;依达曲沙;盐酸依氟鸟氨酸;依沙芦星;恩洛铂;恩普氨酯;依匹哌啶;盐酸表柔比星;厄布洛唑;盐酸依索比星;雌莫司汀;雌莫司汀磷酸钠;依他硝唑;依托泊苷;磷酸依托泊苷;氯苯乙嘧啶;盐酸法倔唑;法扎拉滨;芬维 A 胺;氟尿苷;磷酸氟达拉滨;氟尿嘧啶;氟西他滨;磷喹酮;福司曲星钠;吉西他滨;盐酸吉西他滨;羟基脲;盐酸依达比星;异环磷酰胺;伊莫福新;白细胞介素 II (包括重组白细胞介素 -2 或 rIL-2), 干扰素 α -2a ; 干扰素 α -2b ; 干扰素 α -n1 ; 干扰素 α -n3 ; 干扰素 β -I a ; 干扰素 γ -I b ; 异丙铂 ; 盐酸伊立替康 ; 醋酸兰瑞肽 ; 来曲唑 ; 醋酸亮丙瑞林 ; 盐酸利阿唑 ; 洛美曲索钠 ; 洛莫司汀 ; 盐酸洛索苄醌 ; 马索罗酚 ; 美坦辛 ; 盐酸氮芥 ; 醋酸甲地孕酮 ; 醋酸美仑孕酮 ; 美法仑 ; 美诺立尔 ; 巯嘌呤 ; 甲氨蝶呤 ; 甲氨蝶呤钠 ; 氯苯氨啶 ; 美妥替派 ; 米丁度胺 ; 米托克星 ; 丝裂红素 ; 米托洁林 ; 米托马星 ; 丝裂霉素 ; 米托司培 ; 米托坦 ; 盐酸米托恩醌 ; 霉酚酸 ; 诺考达唑 ; 诺加霉素 ; 奥马铂 ; 奥昔舒仑 ; 培门冬酶 ; 培利霉素 ; 奈莫司汀 ; 硫酸培洛霉素 ; 培磷酰胺 ; 哌泊溴烷 ; 哌泊舒凡 ; 盐酸吡罗苄醌 ; 普卡霉素 ; 普洛美坦 ; 吡吩姆钠 ; 泊非霉素 ; 泼尼氮芥 ; 盐酸丙卡巴肼 ; 嘌呤霉素 ; 盐酸嘌呤霉素 ; 吡唑呋喃菌素 ; 利波腺苷 ; 罗谷亚胺 ; 沙芬戈 ; 盐酸沙芬戈 ; 司莫司汀 ; 辛曲秦 ; 磷乙酰天冬氨酸钠 ; 司帕霉素 ; 盐酸螺旋锗 ; 螺莫司汀 ; 螺铂 ; 链黑霉素 ; 链佐星 ; 磺氯苯脲 ; 他利霉素 ; 替可加兰钠 ; 替加氟 ; 盐酸替洛苄醌 ; 替莫泊芬 ; 替尼泊苷 ; 替罗昔隆 ; 睾内酯 ; 硫咪嘌呤 ; 硫鸟嘌呤 ; 噻替派 ; 噻唑羧胺核苷 ; 替拉扎明 ; 柠檬酸托瑞米芬 ; 醋酸曲托龙 ; 磷酸曲西立滨 ; 三甲曲沙 ; 葡萄糖醛酸三甲曲沙 ; 曲普瑞林 ; 盐酸妥布氯唑 ; 乌拉莫司汀 ; 乌瑞替派 ; 伐普肽 ; 维替泊芬 ; 硫酸长春碱 ; 硫酸长春

新碱;长春地辛;硫酸长春地辛;硫酸长春匹定;硫酸长春甘酯;硫酸长春罗辛;酒石酸长春瑞滨;硫酸异长春碱;硫酸长春利定;伏氯唑;折尼铂;净司他丁;盐酸佐柔比星。其它抗癌药物包括但不限于:20-表-1,25-二羟维生素D₃;5-乙炔尿嘧啶;阿比特龙;阿柔比星;酰基富烯;腺环戊醇(adecypenol);阿多来新;阿地白介素;ALL-TK拮抗剂;六甲蜜胺;氨莫司汀;2,4-二氯苯氧乙酸(amidox);氨磷汀;氨基酮戊酸;氨柔比星;安吡啶;阿那格雷;阿那曲唑;穿心莲内酯;血管生成抑制剂;拮抗剂D;拮抗剂G;安雷利克斯;抗背部化形态发生蛋白-1(anti-dorsalizing morphogenetic protein-1);抗雄激素,前列腺癌;抗雌激素;抗癌酮;反义寡核苷酸;甘氨酸阿菲科林;细胞凋亡基因调节剂;细胞凋亡调节剂;脱嘌呤核酸;ara-CDP-DL-PTBA;精氨酸脱氨酶;asulacrine;阿他美坦;阿莫司汀;axinastatin 1;axinastatin 2;axinastatin 3;阿扎司琼;阿扎毒素;重氮酪氨酸;浆果赤霉素III衍生物;balanol;巴马司他;BCR/ABL拮抗剂;苯并二氢卟吩(benzochlorin);苯甲酰基星状孢子素(benzoylstauroporine); β -内酰胺衍生物; β -alethine;亚阿克拉霉素B(betaclamycin B);白桦脂酸;bFGF抑制剂;比卡鲁胺;比生群;双氮丙啶基精胺(bisaziridinylspermine);双奈法德;bistratene A;比折来新;breflate;溴匹立明;布度钛;丁硫氨酸硫酸亚胺(buthionine sulfoximine);卡泊三醇;钙感光蛋白C;喜树碱衍生物;金丝雀痘IL-2;卡培他滨;甲酰胺氨基三唑(carboxamide amino triazole);羧胺三唑(carboxyamidotriazole);CaRest M3;CARN 700;软骨衍生的抑制剂;卡折来新;酪蛋白激酶抑制剂(ICOS);栗精胺;天蚕抗菌肽B;西曲瑞克;二氢卟吩(chlorins);氯代喹噁啉磺酰胺(chloroquinoxaline sulfonamide);西卡前列素;顺卟啉(cis porphyrin);克拉屈滨;氯米芬类似物;克霉唑;collismycin A;collismycin B;考布他汀A4;考布他汀类似物;conagenin;crambescidin 816;克立那托;cryptophycin 8;cryptophycin A衍生物;curacin A;环戊蒽醌(cyclopentantraquinone);cycloplatam;cypemycin;阿糖胞苷酯(cytarabine ocfosfate);溶细胞因子;磷酸己烷雌酚;达昔单抗;地西他滨;脱氢膜海鞘素B;地洛瑞林;地塞米松;右异环磷酰胺(dexifosfamide);右雷佐生;右维拉帕米;地吡酮;膜海鞘素B;didox;二乙基去甲精胺(diethylnorspermine);二氢-5-氮杂胞苷;二氢紫杉醇(dihydrataxol),9-;dioxamycin;二苯基螺莫司汀;多西紫杉醇;二十二烷醇;多拉司琼;去氧氟尿苷;屈洛昔芬;屈大麻酚;多卡米星SA;依布硒;依考莫司汀;依地福新;依决洛单抗;依氟鸟氨酸;榄香烯;乙噻替氟;表柔比星;爱普列特;雌莫司汀类似物;雌激素激动剂;雌激素拮抗剂;依他硝唑;磷酸依托泊苷;依西美坦;法倔唑;法扎拉滨;芬维A胺;非格司亭;非那雄胺;夫拉平度(flavopiridol);氟卓斯汀;fluasterone;氟达拉滨;fluorodaunorubicin 盐酸盐;福酚美克;福美坦;福司曲星;福莫司汀;莫特沙芬钆(gadolinium texaphyrin);硝酸镓;加洛他滨;加尼瑞克;明胶酶抑制剂;吉西他滨;谷胱甘肽抑制剂;hepsulfam;神经生长因子(heregulin);六亚甲基二乙酰胺;金丝桃素;伊班膦酸;伊达比星;艾多昔芬;伊决孟酮;依莫福新;伊洛马司他;咪唑并吡啶酮;咪唑莫特;免疫刺激肽;胰岛素样生长因子1受体抑制剂;干扰素激动剂;干扰素;白细胞介素;碘苄胍;碘阿霉素;甘薯苦醇,4-;伊罗普拉;伊索拉定;isobengazole;异高软海绵素B(isohomohalicondrin B);伊他司琼;j asplakinolide;kahalalide F;三乙酸层状素-N(lamellarin-N triacetate);兰瑞肽;雷拉霉素(leinamycin);来格司亭;硫酸香菇多糖;leptolstatin;来曲唑;白血病抑制因子;白细胞 α 干扰素;亮丙瑞林+雌

激素 + 孕酮;亮丙瑞林;左旋咪唑;利阿唑;线性多胺 (linear polyamine) 类似物;亲脂性二糖肽;亲脂性铂化合物;lissoclinamide 7;洛铂;蚯蚓磷脂;洛美曲索;氯尼达明;洛索蒽醌;洛伐他汀;洛索立宾;勒托替康;莫特沙芬钆 (lutetium texaphyrin);利索茶碱 (lysofylline);裂解肽 (lytic peptide);美坦辛;mannostatinA;马立马司他;马索罗酚;乳腺丝氨酸蛋白酶抑制物 (maspin);基质溶解因子抑制剂;基质金属蛋白酶抑制剂;美诺立尔;麦尔巴隆 (merbarone);美替瑞林;蛋氨酸酶;甲氧氯普胺;MIF 抑制剂;米非司酮;米替福新;米立司亭;错配双链 RNA (mismatched double stranded RNA);米托胍脲;二溴卫矛醇;丝裂霉素类似物;米托蒽胺;成纤维细胞生长因子皂草毒素 (mitotoxin fibroblast growth factor saporin);米托蒽醌;莫法罗汀;莫拉司亭;单克隆抗体,人绒毛促性腺激素;单磷酸脂质 A+ 分支杆菌 (myobacterium) 细胞壁 sk;莫哌达醇;多药耐药性基因抑制剂;基于多肿瘤抑制因子 1 疗法;芥子抗癌剂;印度洋海绵 B (mycaperoxide B);分枝杆菌细胞壁提取物 myriaporone;N- 乙酰基地那林;N- 取代的苯甲酰胺;那法瑞林;nagrestip;纳洛酮 + 喷他佐辛;napavin;萘萜二醇 (naphterpin);那托司亭;奈达铂;奈莫柔比星;奈立膦酸;中性肽链内切酶;尼鲁米特;nisamycin;一氧化氮调节剂;硝基氧抗氧化剂;nitrullyn;06- 苄基鸟嘌呤;奥曲肽;okicenone;寡核苷酸;奥那司酮;昂丹司琼;昂丹司琼;oracin;口服细胞因子诱导剂;奥马铂;奥沙特隆;奥沙利铂;oxaunomycin;紫杉醇;紫杉醇类似物;紫杉醇衍生物;palauamine;棕榈酰基根霉素;帕米膦酸;人参三醇;帕诺米芬;副球菌素 (parabactin);帕折普汀;培门冬酶;培得星;木聚硫钠;喷司他丁;pentrozole;全氟溴烷;培磷酰胺;紫苏子醇;苯连氮霉素 (phenazinomycin);乙酸苯酯;磷酸酶抑制剂;毕西巴尼 (picibanil);毛果芸香碱盐酸盐;吡柔比星;吡曲克辛;placetin A;placetin B;纤维蛋白溶酶原激活剂抑制剂;铂配合物;铂化合物;铂 - 三胺配合物;吡吩姆钠;泊非霉素;泼尼松;丙基双吡啶酮;前列腺素 J2;蛋白酶体抑制剂;蛋白质 A 系免疫调节剂;蛋白激酶 C 抑制剂;蛋白激酶 C 抑制剂,微藻 (microalgal);蛋白酪氨酸磷酸酶抑制剂;嘌呤核苷磷酸化酶抑制剂;红紫素;吡唑啉吡啶;吡醇羟乙酯化血红蛋白聚氧乙烯共轭物 (pyridoxylated hemoglobin polyoxyethylene conjugate);raf 拮抗剂;雷替曲塞;雷莫司琼;ras 法尼基蛋白转移酶抑制剂 (ras farnesyl protein transferase inhibitor);ras 抑制剂;ras GAP 抑制剂;去甲基化瑞替普汀;依替膦酸铈 Re 186;根霉素;核酶;RII 维胺 (RII retinamide);罗谷亚胺;罗希吐碱 (rohitukine);罗莫肽;罗喹美克;rubiginone B1;ruboxyl;沙芬戈;saintopin;SarCNU;肌肉叶绿醇 A (sarcophytol A);沙格司亭;Sdi 1 模拟物;司莫司汀;衰老源抑制剂 1 (senescence derived inhibitor 1);正义寡核苷酸 (sense oligonucleotide);信号转导抑制剂;信号转导调节剂;单链抗原结合蛋白;西佐喃;索布佐生;硼卡钠;苯乙酸钠;solverol;生长调节素结合蛋白;索纳明;N- 磷酸乙酰 -L- 天冬氨酸;spicamycin D;螺莫司汀;脾脏五肽 (splenopentin);海绵抑制素 1 (spongistatin 1);角鲨胺;干细胞抑制剂;干细胞分裂抑制剂;stipiamide;基质降解酶抑制剂;sulfinosine;强效血管活性肠肽拮抗剂;suradista;舒拉明;苦马豆素;合成葡糖氨基聚糖;他莫司汀;他莫昔芬甲碘化物 (tamoxifen methiodide);牛磺莫司汀;他扎罗汀;替可加兰钠;替加氟;tellurapyrylium;端粒末端转移酶抑制剂;替莫泊芬;替莫唑胺;替尼泊忒;四氯十氧化物 (tetrachlorodecaoxide);tetrazomine;thaliblastine;噻可拉林;血小板生成素;血小板生成素模拟物;胸腺法新;促胸腺生成素受体激动剂;胸腺

曲南 ; 促甲状腺激素 ; 乙基锡初红紫素 (tin ethyl etiopurpurin) ; 替拉扎明 ; 二氯环戊二烯钛 ; topsentin ; 托瑞米芬 ; 全能干细胞因子 ; 翻译抑制剂 ; 维甲酸 ; 三乙酰尿苷 ; 曲西立滨 ; 三甲曲沙 ; 曲普瑞林 ; 托烷司琼 ; 妥罗雄脲 ; 酪氨酸激酶抑制剂 ; 酪氨酸磷酸化抑制剂 ; UBC 抑制剂 ; 乌苯美司 ; 尿殖窦源的生长抑制因子 ; 尿激酶受体拮抗剂 ; 伐普肽 ; variolin B ; 载体系统 (vector system) ; 红细胞基因疗法 ; 维拉雷琐 ; 藜芦胺 ; verdins ; 维替泊芬 ; 长春瑞滨 ; vinxaltine ; vitaxin ; 伏氯唑 ; 扎诺特隆 ; 折尼铂 ; 亚苄维 C (zilascorb) ; 和净司他丁斯酯。代表性的其它抗癌药物是 5- 氟尿嘧啶和甲酰四氢叶酸。当在使用沙利度胺和局部异构酶抑制剂的方法中使用, 这两种药剂特别有用。

[0365] 在一些实施方案中, 本发明的治疗进一步包括给药一种或多种免疫治疗剂, 例如抗体和免疫调节剂, 包括但不限于 HERCEPTIN®、RITUXAN®、OVAREX™、PANOREX®、BEC2、IMC-C225、VITAXIN™、CAMPATH® I/H、Smart MI95、LYMPHOCIDE™、Smart I D10 和 ONCOLYM™、利妥昔单抗、吉妥珠单抗或曲妥珠单抗。

[0366] 在一些实施方案中, 本发明的治疗进一步包括给药一种或多种血管生成抑制剂, 其包括但不限于血管抑制素 (angiostatin)、沙利度胺、kringle 5、内皮他丁、其它丝氨酸蛋白酶抑制剂、抗凝血酶、纤连蛋白的 29kDa N- 端和 40kDa C- 端蛋白水解片段、催乳素的 16kDa 蛋白水解片段、血小板因子-4 的 7.8kDa 蛋白水解片段、对应血小板因子-4 片段的 13- 氨基酸肽 (参见 Maione 等人, Cancer Res., 51, 2077-2083 (1991))、对应 I 型胶原片段的 14- 氨基酸肽 (参见 Tolsma 等人, J. Cell Biol., 122, 497-511 (1993))、对应凝血酶敏感蛋白 I 片段的 19 氨基酸肽 (参见 Tolsma 等人, J. Cell Biol., 122, 497-511 (1993))、对应 SPARC 片段的 20- 氨基酸肽 (参见 Sage 等人, J. Cell Biochem., 57, 127-140 (1995)) 或者其任意片段、家族成员或衍生物, 包括其药学可接受的盐。

[0367] 在一些实施方案中, 所述治疗方法进一步包括使用放射。

[0368] 在一些实施方案中, 所述治疗方法进一步包括给药一种或多种细胞因子, 其包括但不限于淋巴因子、肿瘤坏死因子、肿瘤坏死因子样细胞因子、 α - 淋巴毒素、 β - 淋巴毒素、 α - 干扰素、 β - 干扰素、巨噬细胞炎性蛋白、粒细胞单核细胞集落刺激因子、白细胞介素 (包括但不限于白细胞介素-1、白细胞介素-2、白细胞介素-6、白细胞介素-12、白细胞介素-15、白细胞介素-18)、OX40、CD27、CD30、CD40 或 CD137 配体、Fas/Fas 配体、4-1BBL、内皮单核细胞激活蛋白或其任意片段、家族成员或衍生物, 包括其药学可接受的盐。

[0369] 在一些实施方案中, 所述治疗方法进一步包括激素治疗。激素治疗性治疗包括激素激动剂、激素拮抗剂 (如氟他胺、他莫昔芬、醋酸亮丙瑞林 (LUPRON™)、LH-RH 拮抗剂)、激素生物合成和处理的抑制剂、甾体 (如地塞米松、维 A 酸、倍他米松、皮质醇、可的松、泼尼松、去氧睾酮、糖皮质激素、盐皮质激素、雌激素、睾酮、孕激素)、抗孕激素 (如米非司酮、奥那司酮) 和抗雄激素 (如醋酸环丙孕酮)。

[0370] 其它可以得益于神经酰胺酶抑制的增殖病症包括心血管疾病。

[0371] 用于治疗心血管疾病的血管介入 (包括血管成形术、支架、斑块切除术和移植术) 通常并发有不期望的作用。血管介入的副反应之一包括内皮增殖和平滑肌细胞增殖, 其可以导致增生, 或者更具体地, 导致再狭窄 (即动脉的再堵塞)、血管闭塞、再灌注损伤、血小板聚集和钙化。在此模式下, 损伤刺激 (injurious stimulus) 诱导生长刺激细胞因子 (如白细胞介素 1) 和肿瘤坏死因子的表达。参见 Libby 等人, Circulation, 86,

III47-III52(1992)。有证据显示神经酰胺抑制冠状动脉的内皮细胞和平滑肌细胞的生长。

[0372] 已尝试多种疗法用于治疗或预防狭窄或再狭窄。然而仍然亟需用于预防和治疗由内皮细胞和平滑肌细胞增生引起的心血管疾病的疗法。由于已证明神经酰胺抑制冠状动脉的内皮细胞和平滑肌细胞的生长,因此可以期望升高神经酰胺水平用于治疗 and 预防心血管疾病。近年来,Kester 及合作者们证明用于血管成形术的神经酰胺预防再狭窄。参见 Kester 等人, *Circ. Res.*, 87, 282-288 (2000)。可选地且更有效地,本发明的一方面通过给药本发明的化合物调节神经酰胺水平来治疗和预防再狭窄。

[0373] 相应地,因此可以期望升高神经酰胺水平用于治疗 and 预防心血管疾病。这可以通过使用本发明的组合物和方法调节神经酰胺的细胞内水平而得以实现。治疗的结果为在接受治疗的个体中至少产生健康益处,所述健康益处是在心血管疾病的情况下包括但不限于在血管介入操作后降低动脉再堵塞的风险及改善循环。

[0374] 在一些实施方案中,本发明提供预防、治疗、管理和 / 或改善自身免疫病症或炎症病症或者其一种或多种症状的方法,所述方法包括向有此需要的个体给药预防有效量和 / 或治疗有效量的本发明化合物以及预防有效量和 / 或治疗有效量的一种或多种免疫调节剂。

[0375] 白细胞介素 -1 是炎症的主要诱导物,并且 TNF 是该反应的重要调节剂。这两种细胞因子均能够激活神经酰胺酶,并因此抑制神经酰胺酶的活性,并且能够导致抗炎效应。这可以参与对具有促炎效应的鞘氨醇和鞘氨醇磷酸酯的形成的预防。同样,抑制神经酰胺酶可以预防对炎症重要的免疫细胞的过度增殖。有证据表明神经酰胺的升高和鞘氨醇的降低导致鞘氨醇磷酸酯的降低。初步数据显示在小鼠成纤维细胞 L929 中, TNF- α 升高神经酰胺水平并导致前列腺素 E2 (PGE2) 从这些细胞的释放。还证明一种神经酰胺酶抑制剂 D-赤式 -2-(N-肉豆蔻酰氨基)-1-苯基-1-丙醇 (D-MAPP) 抑制 PGE2 的释放。这一观察可能对于抑制炎症反应是重要的,所述炎症反应发生在例如但不限于风湿性关节炎的情况下。因此,可以通过使用本发明的方法调节细胞神经酰胺的水平来治疗和 / 或预防炎症。如上所述,可以通过给药本发明的可以抑制线粒体神经酰胺酶的化合物来升高神经酰胺的水平。

[0376] 自身免疫病症的实例包括但不限于斑秃、强直性脊椎炎、抗磷脂综合征、自身免疫致 Addison 病、肾上腺的自身免疫性疾病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、自身免疫性卵巢炎和睾丸炎、自身免疫性血小板减少症、白塞氏病、大疱性类天疱疮、心脏病、乳糜泻 - 皮炎、慢性疲劳免疫功能障碍综合征 (CFIDS)、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、Churg-Strauss 综合征、疤痕性类天疱疮、CREST 综合征、冷凝集素疾病、克罗恩氏病、盘状狼疮、特发性混合性冷球蛋白血症、纤维肌痛 - 纤维肌炎、肾小球性肾炎、格雷夫斯病、Guillain-Barre 综合征、桥本甲状腺炎、特发性肺纤维化、特发性血小板减少性紫癜 (ITP)、IgA 肾病 (IgA neuropathy)、青少年关节炎、扁平苔藓、红斑狼疮、美尼尔氏综合征、混合性结缔组织病、多发性硬化症、1 型或免疫介导糖尿病、重症肌无力、寻常型天疱疮、恶性贫血、结节性多动脉炎、多软骨炎、多腺性综合征、风湿性多肌痛、多肌炎和皮炎、原发性无丙种球蛋白血症、原发性胆汁性肝硬化、银屑病、银屑病关节炎、Raynaud 现象、Reiter 综合征、风湿性关节炎、结节病、硬皮病、干燥综合征、僵体综合征、全身性红斑狼疮、红斑狼疮、大动脉炎、颞动脉炎 / 巨细胞动脉炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、血管炎 (例如疱疹样皮炎血管炎)、白癜风和韦格纳肉芽肿。炎症病症的实例包括但不限于哮喘、脑炎

(encephalitis)、炎性肠病、慢性阻塞性肺病 (COPD)、变态反应性病症、脓毒性休克、肺纤维化、未分化脊椎关节病、未分化关节病、关节炎、炎性骨质溶解和由慢性病毒性或细菌性感染导致的慢性炎症。一些自身免疫病症与炎性病况相关。因此在被认为是自身免疫病症与炎性疾病之间存在重叠。所以一些自身免疫病症也可以被称为炎性疾病。

[0377] 本发明提供预防、治疗、管理和 / 或改善自身免疫病症或炎性疾病和 / 或其一种或多种症状的方法,所述方法包括向有此需要的个体给药本发明的化合物以及一种或多种免疫调节剂。向患有自身免疫病症和 / 或炎性病症的个体给药所述免疫调节剂,所述个体的平均绝对淋巴细胞计数在一些实施方案中为少于 500 个细胞 /mm³,在一些实施方案中为少于 550 个细胞 /mm³,在一些实施方案中为少于 600 个细胞 /mm³,在一些实施方案中为少于 650 个细胞 /mm³,在一些实施方案中为少于 700 个细胞 /mm³,在一些实施方案中为少于 750 个细胞 /mm³,在一些实施方案中为少于 800 个细胞 /mm³,在一些实施方案中为少于 850 个细胞 /mm³,并且在一些实施方案中为少于 900 个细胞 /mm³。因此,在一些实施方案中,在向患有自身免疫病症或炎性病症的个体给药一个或多个剂量的一种或多种免疫调节剂之前或之后,通过本领域技术人员熟知的技术(包括例如流式细胞仪或台盼蓝计数)测定所述个体的绝对淋巴细胞计数。

[0378] 免疫调节剂的实例包括但不限于甲氨蝶呤、来氟米特、环磷酰胺、环孢霉素 A 和大环内酯类抗生素(如 FK506(他克莫司))、甲泼尼龙(MP)、皮质类固醇、甾体、吗替麦考酚酯、雷帕霉素(西罗莫司)、咪唑立宾、脱氧精胍菌素、布喹那、丙二腈酰胺(malononitriloamidine)(如来氟米特(leflunamide))、T 细胞受体调节剂和细胞因子受体调节剂。T 细胞受体调节剂的实例包括但不限于抗 T 细胞受体抗体(如抗 CD4 单克隆抗体、抗 CD3 单克隆抗体、抗 CD8 单克隆抗体、抗 CD40 配体单克隆抗体、抗 CD2 单克隆抗体)和 CTLA4- 免疫球蛋白。细胞因子受体调节剂的实例包括但不限于可溶性细胞因子受体(如 TNF- α 受体的胞外域或其片段、IL-1 β 受体的胞外域或其片段以及 IL-6 受体的胞外域或其片段)、细胞因子或其片段(如白细胞介素(IL)-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-15、TNF- α 、TNF- β 、干扰素 (IFN)- α 、IFN- β 、IFN- γ 和 GM-CSF)、抗细胞因子受体抗体(如抗 IL-2 受体抗体、抗 IL-4 受体抗体、抗 IL-6 受体抗体、抗 IL-10 受体抗体和抗 IL-12 受体抗体)、抗细胞因子抗体(如抗 IFN 受体抗体、抗 TNF- α 抗体、抗 IL-1 β 抗体、抗 IL-6 抗体和抗 -IL-12 抗体)。

[0379] 抗炎剂已在炎性疾病和自身免疫病症的治疗中表现成功,并且现在是用于这样的病症的常用及标准疗法。本领域技术人员熟知的任意抗炎剂可用于本发明的组合物和方法中。抗炎剂的非限定性实例包括非甾体抗炎药物(NSAID)、甾体抗炎药、 β -激动剂、抗胆碱能药物(anticholinergic agent)和甲基黄嘌呤。NSAID 的实例包括但不限于阿司匹林、布洛芬、塞来昔布(CELEBREXTM)、双氯芬酸(VOLTARENTM)、依托度酸(LODINETM)、非诺洛芬(NALFONTM)、吲哚美辛(INDOCINTM)、酮咯酸(ketoralac)(TORADOLTM)、奥沙普秦(DAYPROTM)、萘丁美酮(nabumentone)(RELAFENTM)、舒林酸(CLINORILTM)、托美汀(tolmentin)(TOLECTINTM)、罗非昔布(VIOXXTM)、萘普生(ALEVETM、NAPROSYNTM)、酮洛芬(ACTRONTM)和萘丁美酮(RELAFENTM)。这样的 NSAID 通过抑制环加氧酶(如 COX-1 和 / 或 COX-2)起作用。甾体抗炎药的实例包括但不限于糖皮质激素、地塞米松(DECADRONTM)、可的松、氢化可的松、泼尼松(DELTAONETM)、泼尼松龙、曲安西龙、柳氮磺胺吡啶和类花生酸(例如前列腺素、血栓

素和白三烯)。

[0380] 本发明还涉及对包括细胞增殖(生长)不足和/或另外需要细胞增殖的病症(如退行性病症、生长缺陷、损伤、物理创伤)的治疗,其是通过给药激动(促进)神经酰胺酶功能(如神经酰胺-1-磷酸酯和鞘氨醇-1-磷酸酯)的化合物而实现的。其它可以得益于神经酰胺酶活化的病症是神经变性病症(如阿尔茨海默病症)和衰老病症(如免疫功能障碍)。

[0381] 如上所述,可以通过起到降低神经酰胺酶活性的作用的技术而带来如肿瘤病况的治疗,心血管疾病、炎症或以上提及的疾病的成功治疗。

[0382] 可用于测定这样的化合物的有效剂量和给药的一般技术是本领域技术人员已知的。可以使用任何起到向关注的细胞群选择性给药化学药品的作用的技术,例如使用递送复合物。这样的递送复合物可以包含适合的化学药品和靶向剂。这样的靶向剂可以包括例如甾醇、脂类、病毒或靶细胞特异性结合剂。

[0383] V. 药物制剂和给药方法

[0384] 可以向个体给药治疗有效剂量的本文所述的化合物,以治疗或预防以上讨论的疾病和病症。治疗有效剂量是指在所治疗的个体中足以引起健康益处的化合物的量。参见 Physicians' Desk Reference® (第 53 版,1999)。

[0385] 本文中所用的术语“个体”是指任何无脊椎动物或脊椎动物物种的成员。本发明的方法特别用于温血脊椎动物。因此本发明涉及哺乳动物和鸟类。更特别地提供了对于诸如人类的哺乳动物以及那些由于濒危而对人类具有重要性的哺乳动物(例如西伯利亚虎)、对人类具有经济重要性的哺乳动物(在农场中养殖以供人类食用)和/或对人类具有社会重要性的哺乳动物(作为宠物或在动物园中饲养的动物)的哺乳动物的治疗,所述哺乳动物例如除人类之外的食肉动物(如猫和狗)、猪(小猪(pig)、肉猪(hog)和野猪)、反刍动物(如牛、公牛、绵羊、长颈鹿、鹿、山羊、野牛和骆驼)以及马。还提供了本发明的方法和组合物对鸟类的用途,所述鸟类包括那些濒危鸟类、在动物园中或作为宠物饲养的鸟类以及飞禽(更特别地为驯养的禽,例如家禽,如火鸡、鸡、鸭、鹅、珍珠鸡等,因为它们也是对人类有经济重要性的)。

[0386] 因此在一些实施方案中,本发明化合物所给药的个体是动物,包括但不限于哺乳动物,例如非灵长类动物(如牛、猪、马、鸡、猫、狗、大鼠等)或灵长类动物(例如猴,如食蟹猴(acynomolgous monkey)或人类)。在一些实施方案中,所述个体是人类。本发明的组合物可用于例如在由于家族史而易感癌症的个体中或在由于环境因素而具有增加的患癌风险的个体中预防多种癌症。

[0387] 本发明的方法和组合物可以用在未接受过治疗的个体中和/或之前已接受过和/或正在接受其它药物治疗或联合治疗(包括但不限于抗癌剂)的个体中。其它个体可包括患有转移或未患有转移的个体。

[0388] 本发明的方法和组合物不仅用在未治疗的个体中,还用于治疗对其它治疗部分无应答或完全无应答的个体。在一些实施方案中,本发明提供用于在个体中治疗疾病或病症的方法和组合物,已证明所述个体对包括给药其它药剂的疗法难以治疗或无应答或有此可能。

[0389] 例如,可以通过(例如从活组织检查组织中)获得个体组织样品并体外检测其神

经酰胺来容易地检测神经酰胺水平或功能的缺失或水平降低。

[0390] V. A. 有效剂量

[0391] 可以通过在细胞培养物或实验动物中的标准药理学操作来测定组合物的毒性和疗效（例如测定 LD_{50} （对 50% 群体的致死剂量）和 ED_{50} （在 50% 群体中治疗有效的剂量））。毒性和疗效的剂量比是治疗指数，并且其可以表示为 LD_{50}/ED_{50} 比。在一些实施方案中，使用表现出大的治疗指数的化合物。当可以使用表现毒性副作用的化合物时，应当小心地设计递送体系，所述递送体系将这样的化合物靶向递送到受感染组织，以使得对未感染细胞的潜在伤害降至最低并因此降低副作用。

[0392] 从细胞培养检测和动物研究中获得的数据可用于制定用于人类的剂量范围。在一些实施方案中，这样的化合物的剂量在循环浓度的范围内，所述循环浓度包括几乎没有毒性或没有毒性的 ED_{50} 。例如，所述剂量在一些实施方案中可以为 10nM 至 100 μ M，并且在一些实施方案中为 1 μ M 至 10 μ M 或更高。所述剂量可以取决于所用的剂型和所用的给药途径而在此范围内变化。对于任何用于本发明方法中的组合物，可以从细胞培养检测初步评估治疗有效剂量。可以在动物模型中制定剂量以达到循环血浆浓度范围，其包括在细胞培养物中测定的 IC_{50} （即测试化合物达到症状的半数最大抑制的浓度）。可以使用这样的信息以更精确地测定在人类中的有用剂量。可以通过例如高效液相色谱法测量血浆中的水平。

[0393] 本领域技术人员可以容易地确定用于治疗或预防本文所述的病症的适合的日剂量。本发明组合物的推荐剂量为每天约 0.1mg 至约 100mg，作为每天上午一次的单次剂量或作为全天分份剂量提供。在一些实施方案中，日剂量为每天约 2mg 至约 25mg，并且在一些实施方案中，日剂量为每天约 5mg 至约 10mg。

[0394] 还可以通过使用各种实验动物模型（例如癌症动物模型）测定用于本发明的方法和组合物的抗癌活性，所述癌症动物模型例如具有本领域已知的以及如 Yamanaka 等人，(Microbiol. Immunol., 45, 507-514 (2001)) 所述的人肿瘤移植物的 scid 小鼠模型或裸鼠。

[0395] 在一些实施方案中，在用于个体（如人类）之前，在体外测试本发明的方法和组合物的期望的治疗活性或预防活性，然后进行体内测试。例如，可用于确定给药特定治疗方案是否适用的体外检测包括体外细胞培养物检测，在所述体外细胞培养物检测中，个体组织样品在培养物中生长，并暴露于治疗方案或以其它方式给药治疗方案，并观察这样的方案对该组织样品的效应。所接触细胞的更低水平的增殖或存活表明所述组合物对在所述个体中治疗所述病况有效。或者，可以不培养来自个体的细胞，而使用肿瘤或恶性细胞系的细胞筛选组合物。许多本领域的标准检测可用于评价这样的存活和 / 或生长；例如，可以通过测量 3H - 胸苷掺入、通过直接细胞计数、通过检测已知基因（例如原癌基因（如 *fos*、*myc*））或细胞周期标记物的转录活性的改变来检测细胞增殖；可以通过台盼蓝染色来评价细胞生存，可以基于形态改变来直观评价分化等。

[0396] 在人类中测试之前，可以在适合的动物模型体系中测试用于本发明方法的组合物，所述动物模型体系包括但不限于大鼠、小鼠、鸡、牛、猴、兔等。本领域已知且广泛用于癌症的主要动物模型包括小鼠，如 Hann 等人 (Curr. Opin. Cell Biol., 13, 778-784 (2001)) 中所述，其整体援引加入本文。

[0397] 此外，本领域技术人员已知的任意检测可用于评价本文公开的方法和组合物用于治疗、预防、管理和 / 或改善与本文所述的疾病或病症相关的一种或多种症状的预防性和 /

或治疗性用途。

[0398] 可以通过检测本发明的化合物或本发明的组合物在动物中减轻或抑制炎症和 / 或改善或缓解与炎症病症相关的一种或多种症状的能力来证明治疗炎症病症的效能。例如,如果在给药本发明的化合物或组合物后炎症得以减轻和 / 或一种或多种症状得以改善,则认为该治疗是治疗性的。

[0399] V.B. 制剂和用途

[0400] 可以使用各种方法给药本发明的化合物。引入的方法包括但不限于皮内、肌肉、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外、吸入、吹入 (insufflation) (通过嘴或鼻子)、口服、舌下或直肠途径。所述组合物可以通过任意常规途径 (例如通过注入或单次快速静脉注射 (bolus injection)、通过经上皮或皮肤粘膜层 (如口腔粘膜、直肠粘膜和肠粘膜等) 吸收) 给药,并且可以与其它生物活性剂共同给药。给药可以是全身给药或局部给药。此外,可以通过任意适合的途径 (包括脑室内注射和鞘内注射) 将本发明的药物组合物引入中枢神经系统;可以通过例如与贮器 (如奥马耶贮器) 相连的脑室内导管使脑室内注射便利化。也可以采用肺部给药,例如通过使用吸入器或喷雾器以及含雾化剂的制剂。

[0401] 在一些实施方案中,可以向有治疗需要的区域局部给药本发明的组合物。这可以通过例如但不限于手术过程中的局部注入、导管、栓剂或移植物得以实现。所述移植物可以是例如但不限于多孔材料、无孔材料或凝胶状材料,包括膜 (如硅橡胶膜 (silastic membrane)) 或纤维。

[0402] 在一些实施方案中,可以在囊泡 (vesicle), 特别是溶酶体中递送本发明的化合物。参见 Langer, Science, 249, 1527-1533 (1990); 和 Treat 等人, Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (主编), Liss, New York, 1989, 第 317-327 页和第 353-365 页。

[0403] 在一些实施方案中,可以在控释体系中递送本发明的化合物。在一些实施方案中,使用泵。参见 Langer, Science, 249, 1527-1533 (1990); Sefton, CRC Crit. Ref., Biomed. Eng., 14, 201 (1987); Buchwald 等人, Surgery, 88, 507 (1980); 和 Saudek 等人, N. Engl. J. Med., 321, 574 (1989)。在一些实施方案中,可以使用聚合材料。参见 Langer 和 Wise (主编), Medical Applications of Controlled Release, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1974; Smolen and Ball (主编), Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Wiley, New York, 1984; Ranger 和 Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem., 23, 61 (1983); 还参见 Levy 等人, Science, 228, 190 (1985); During 等人, Ann. Neurol., 25, 351 (1989); 和 Howard 等人, J. Neurosurg., 71, 105 (1989)。在一些实施方案中,可以将控释体系置于治疗靶附近,因此仅需全身剂量的一部分。参见 Goodson, Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (主编), CRC Press, Boca Raton, Florida, 1974。在 Langer (Science, 249, 1527-1533 (1990)) 中讨论了其它控释体系。

[0404] 可以使用其它递送本发明治疗剂的方法,例如如美国专利第 5,679,350 号所述的方法,其整体援引加入。

[0405] 本发明还提供药物组合物。这样的组合物包含治疗有效量的一种或多种本发明的式 (I) 化合物以及药学可接受的载体。“药学可接受的”指那些在合理的医学判断的范围内

适于接触人类和 / 或其它动物的组织而没有过度的毒性、刺激、过敏反应或与合理的益处 / 风险比相应的其它问题或并发症的载体、组合物和 / 或剂型。因此, 在一些实施方案中, 可以以制剂的形式提供本发明的化合物, 所述制剂包含所述化合物以及对于人类使用是药学可接受的载体。在一些实施方案中, 术语“药学可接受的”指由联邦政府或州政府的管理机构批准的或美国药典或其它公认的药典中所列的用于在动物中 (更特别地在人类中) 使用。

[0406] 术语“载体”指与治疗剂一同给药的稀释剂、辅剂、赋形剂或媒介物。这样的药学载体可以是无菌液体, 例如水和油, 包括那些石油、动物、植物或合成来源的油, 例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当所述药物组合物通过静脉内给药时, 水是示例性载体。还可以使用生理盐水和葡萄糖及甘油水溶液作为液体载体, 特别是用于注射液。适合的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙二醇、水、乙醇等。所述组合物还可以视需要包含少量的湿润剂或乳化剂、或 pH 缓冲剂。这些组合物可以采取溶液剂、混悬剂、乳剂、片剂、丸剂、胶囊剂、散剂、缓释制剂等形式。可以使用常规粘合剂和载体 (如甘油三酯) 将这些组合物配制为栓剂。口服制剂可以包含标准载体, 如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。适合的药学载体的实例如在 Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) 中所述。在一些实施方案中, 这样的组合物会包含治疗有效量的纯品形式的 ACDase 抑制剂或相关前药以及适量的载体, 以提供适用于向个体给药的形式。所述制剂应适于给药模式。

[0407] 在一些实施方案中, 将所述组合物按照常规操作配制为适于向人类静脉给药的药物组合物。通常, 用于静脉给药的组合物是在无菌等渗水缓冲液中的溶液。所述组合物还可以视需要包含增溶剂和局部麻醉剂 (如利多卡因) 减轻注射部位的疼痛。一般而言, 分别提供或以单位剂型混合提供这些成分, 所述单位剂型例如在密封容器 (如标示活性剂的量的安瓿或小袋 (sachette)) 中的冻干粉末或不含水的浓缩物。当欲通过注入给药所述组合物时, 可以使用含有无菌药物级水或盐水的输液瓶配药。当通过注射给药所述组合物时, 可以提供含注射用无菌水或盐水的安瓿, 使得可以在给药前混合所述组分。

[0408] 可以以中性形式或盐形式配制本发明的化合物。药学可接受的盐包括那些与游离氨基形成的盐 (例如那些衍生自盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的盐) 以及那些与游离羧基形成的盐 (例如那些衍生自氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2- 乙基氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等的盐)。

[0409] 本发明的化合物在治疗特定的病症或病况中的有效量可以取决于所述病症或病况的性质, 并且可以通过标准临床技术加以测定。此外, 可以任选地使用体外检测和动物模型以有助于确定最佳剂量范围。在所述制剂中使用的精确剂量还可以取决于给药途径和疾病或病症的严重性, 并且应当基于医师的判断和每个个体的情况而确定。

[0410] 在一些实施方案中, 通过肌肉给药本发明的化合物。用于肌肉给药的适合的剂量范围在一些实施方案中通常为每剂约 $10 \mu\text{g}$ 至 1mg , 而在一些实施方案中为每剂约 $10 \mu\text{g}$ 至 $100 \mu\text{g}$ 。在一些实施方案中, 以两剂给药所述组合物, 其中在第一剂后 24 小时给药第二剂。在一些实施方案中, 以三剂给药本发明的组合物, 在 7 天治疗方案的第 1、4 和 7 天每天给药一剂。

[0411] 以重量计,栓剂通常包含在 0.5%至 10%范围内的活性成分,口服制剂通常包含 10%至 95%的活性成分。

[0412] 本发明还提供用于治疗用途的包装(pack)或药盒,所述包装或药盒包含填充一个或多个容器,所述容器中装有本发明药物组合物的一种或多种成分。可以任选地包含与这样的容器配合的通知,所述通知为规定药物和/或诊断产品的生产、使用或销售的政府机构指定的形式,该通知反映对于人类给药的生产、使用或销售的机构的批准。

[0413] 可以使用一种或多种生理学可接受的载体或赋形剂,以常规方式配制用于本发明的药物组合物。

[0414] 对于口服给药,所述药物组合物可以采取例如片剂或胶囊剂的形式,所述片剂或胶囊剂的形式是使用药学可接受的赋形剂,通过常规手段制备的,所述药学可接受的赋形剂例如结合剂(如预胶化玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素);填充剂(如乳糖、微晶纤维素或磷酸氢钙);润滑剂(如硬脂酸镁、滑石或二氧化硅);崩解剂(如马铃薯淀粉或淀粉羟乙酸钠);或湿润剂(如十二烷基硫酸钠)。可以通过本领域熟知的方法将所述片剂包衣。用于口服给药的液体制剂可以采取例如溶液剂、糖浆剂或混悬剂的形式,或者它们可以提供为干燥产品,在使用前用水或其它适合的媒介物复原。可以使用药学可接受的添加剂,通过常规方法制备这样的液体制剂,所述药学可接受的添加剂例如助悬剂(如山梨醇糖浆、纤维素衍生物或氢化食用脂肪);乳化剂(如卵磷脂或阿拉伯树胶);非水媒介物(如杏仁油、油醇酯(oily ester)、乙醇或分馏植物油);和防腐剂(如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯或山梨酸)。所述制剂还可以在适当情况下包含缓冲盐、矫味剂、着色剂和甜味剂。

[0415] 可以适当地配制用于口服给药的制剂以提供所述活性剂在所述组合物中的控释。

[0416] 对于舌下给药,所述组合物可以采取以常规方式配制的片剂或锭剂的形式。

[0417] 对于吸入给药,可以使用适合的抛射剂(如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它适合的气体),以气雾喷雾剂(aerosol spray)的形式递送用于本发明的组合物,所述气雾喷雾剂由压缩包装或喷雾器提供。在压缩气雾剂的情况下,可以通过提供递送定量的阀来确定计量单位。可以配制包含所述组合物和适合的粉末基质(如乳糖或淀粉)的粉末混合物的用于吸入器或吹入器的(例如明胶的)胶囊或小筒(cartridge)。

[0418] 可以配制所述组合物以供肠胃外(即静脉内或肌内)给药,所述肠胃外给药是通过注射(例如通过单次快速静脉注射或连续输注)实现的。可以以含有添加的防腐剂的单位剂型(例如在安瓿或多剂量容器中)提供用于注射的制剂。所述组合物可以采取在油性或水性媒介物中的混悬剂、溶液剂或乳剂的形式,并且可以包含诸如助悬剂、稳定剂和/或分散剂的配方剂(formulatory agent)。或者,所述活性成分可以是散剂形式,在使用前用适合的媒介物(例如无菌无热原水)复原。

[0419] 所述组合物还可以配制为直肠组合物,例如含有例如常规栓剂基质(如可可脂或其它甘油酯)的栓剂或保留灌肠剂(retention enema)。

[0420] 除上述剂型外,所述组合物还可以配制为缓释剂(depot preparation)。可以通过植入(例如皮下植入或肌内植入)或通过肌内注射来给药这样的长效制剂。因此,例如可以使用适合的聚合材料或疏水材料(例如作为在可接受的油中的乳液)或离子交换树脂,或者作为略溶的衍生物(作为如略溶的盐)来配制所述组合物。

实施例

[0421] 以下实施例提供示例性实施方案。鉴于本公开内容和本领域一般技术水平,本领域技术人员可以理解,以下实施例意图仅为示例性的,并且可以在不背离本发明范围的情况下采用多种变化、更改和改变。

[0422] 材料和方法

[0423] 化学 除非另外说明,所有的溶剂和一般试剂购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, United States of America) 和 Fluka (Buchs, Switzerland)。如以前所描述地合成 B13 和 LCL204。参见 Szulc 等人, Bioorg. Med. Chem. 16, 1015-1031 (2008)。通过分析正相和 / 或反相薄层色谱法 (NP TLC 或 RP TLC) 监测反应进程,在 170°C 下加热 TLC 板后使用 PMA 试剂 (在 125mL 10% H₂SO₄ 中的七钼酸铵四水合物和硫酸铈, 5 : 2, g/g) 和 Dragendorff 试剂 (Fluka) 进行检测或通过 UV (254nm) 检测。

[0424] 细胞培养 MCF-7 细胞 (乳腺癌, 胸腔积液) 购自 American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, Maryland, United States of America), 并在补充有 10% 胎牛血清 (FCS; Summit Biotechnology, Colorado, United States of America) 的 RPMI 1640 培养基 (Life Technologies, Inc., Carlsbad, California, United States of America) 中生长, 并在标准培养箱条件 (潮湿气氛 95% 空气, 5% CO₂, 37°C) 下保存。从培养物中收集指数生长期的细胞并用于实验中。

[0425] 实施例 1

[0426] ω-Br- 类似物 LCL429 和 LCL509 的制备

[0427] 如图 1 所示, 通过 E 类类似物的 ω-Br- 类似物 LCL429 和 LCL509 进行 E 类类似物的合成, LCL429 和 LCL509 是由化合物 1 (即 (1R, 2R)-2-氨基-1-(4'-硝基苯基)-1,3-丙二醇) 和相应的溴代酰氯如以前所描述地得到。参见 Szulc 等人, Bioorg. Med. Chem., 16, 1015-1031 (2008)。化合物 1 是可以从例如 Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, United States of America) 商购获得的。

[0428] (1R, 2R)-2-[N-(12'-溴-十二烷酰基)-氨基]-1-(4''-硝基苯基)-1,3-丙二醇 (LCL429)。由 12-溴代十二烷酰氯和 (1R, 2R)-2-氨基-1-(4'-硝基苯基)-1,3-丙二醇 (化合物 1) 制得。通过快速柱色谱 (CHCl₃/MeOH, 10 : 1, v/v) 纯化粗产物, 以 78% 的收率得到作为白色微晶粉末的纯产物, mp 53.8-55.0°C; TLC (CHCl₃/MeOH, 15 : 1, v/v), R_f = 0.2; ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8.21 (d, 2H, J = 8.4), 7.57 (d, 2H, J = 8.4), 6.13 (d, 1H, J = 8.0), 5.24 (s, 1H), 4.17 (h, 1H, J = 4.0), 3.91 (s, 2H), 3.42 (t, 2H, J = 7.2), 2.12 (m, 2H), 1.86 (q, 2H, J = 7.2), 1.46 (m, 4H), 1.10-1.30 (m, 12H)。

[0429] (1R, 2R)-2-[N-(6'-溴代己酰基)-氨基]-1-(4''-硝基苯基)-1,3-丙二醇 (LCL509) 由 6-溴代己酰氯和 (1R, 2R)-2-氨基-1-(4'-硝基苯基)-1,3-丙二醇 (化合物 1) 制得。通过快速柱色谱 (CHCl₃/MeOH = 7 : 1) 纯化粗产物, 以 84% 的收率得到作为白色微晶粉末的纯产物, mp 87.1-87.5°C。TLC (CHCl₃/MeOH, 7 : 1, v/v), R_f = 0.17, ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8.17 (d, 2H, J = 8.8), 7.54 (d, 2H, J = 8.8), 6.31 (d, 1H, J = 8.8), 5.20 (s, 1H), 4.16 (h, 1H, J = 4.8, J = 3.2), 3.80 (d, 2H, J = 4.0), 3.35 (t, 2H, J = 6.8), 2.12 (q, 2H, J = 7.2, 6.8), 1.77 (q, 2H, J = 7.2, 7.2), 1.48 (q, 2H, J = 7.6, 7.6), 1.29 (q, 2H, J = 7.6)。

[0430] 实施例 2**[0431] E 类抑制剂的制备**

[0432] 制备 E 类类似物的一般操作：由 LCL429 或 LCL509 和相应的胺（氨、甲胺、二甲胺、咪唑、吗啉或辛胺）制备 E 类抑制剂，并通过快速柱色谱纯化。参见图 1。简言之，在室温下（r. t.）向均匀搅拌的 LCL429 或 LCL509（0.156mmol）在 1.5N NaOH（4mL）和 THF（8mL）混合物中的溶液中加入相应的胺。将反应混合物保持在室温或回流下直至通过薄层色谱（TLC；用 CHCl₃/MeOH, 10 : 1, v/v 洗脱）观察到反应完成。分离有机相，并用 THF（2×5mL）将水相萃取两次。用无水 NaSO₄ 干燥合并的有机相，并减压蒸发至干燥以得到粗产物。使用适合的溶剂体系通过柱色谱纯化该材料得到作为浅黄色油状物的纯目标化合物。

[0433] (1R,2R)-2-[N-(12'-{1"-咪唑}-十二烷酰基)-氨基]-1-(4"-硝基苯基)-1,3-丙二醇 (LCL433)。以 33% 的收率由 LCL429 和咪唑制得作为浅黄色油状物的目标化合物。TLC(CHCl₃/MeOH/浓 NH₄OH, 10 : 1 : 0.01, v/v/v), R_f = 0.15; ¹H-NMR(400MHz, CDCl₃) δ 8.18(d, 2H, J = 8.4), 7.78(s, 1H, 咪唑 -H), 7.59(d, 2H, J = 8.4), 7.10(s, 1H, 咪唑 -H), 6.99(s, 1H, 咪唑 -H), 6.50(d, 1H, J = 10), 5.26(d, 1H, J = 3.2), 4.22(m, 2H), 4.02(t, 2H, J = 6.8), 3.88(d, 2H, J = 4.4), 2.08(t, 2H, J = 7.6), 1.81(q, 2H, J = 6.8), 1.46(q, 2H, J = 7.6), 1.08-1.40(m, 14H)。分子式：C₂₄H₃₆N₄O₅, MS 461.3[M⁺]。

[0434] (1R,2R)-2-[N-(12'-{1"-吗啉}-十二烷酰基)-氨基]-1-(4"-硝基苯基)-1,3-丙二醇 (LCL449)。以 60% 的收率由 LCL429 和吗啉制得作为浅黄色油状物的目标化合物。TLC(CHCl₃/MeOH/浓 NH₄OH, 10 : 1 : 0.01, v/v/v). R_f = 0.12, ¹H-NMR(CDCl₃, 400MHz) δ 8.20(d, 2H, 苯基 -H, J = 8.4), 7.56(d, 2H, 苯基 -H, J = 8.4), 6.21(d, 1H, J = 8.4), 5.22(d, 1H, J = 3.2), 4.18(m, 1H), 3.85(t, 2H, J = 4.8), 3.72(t, 4H, J = 4.8), 2.46(宽峰, 6H), 2.32(t, 2H, J = 8.0), 2.10(dt, 2H, J = 7.2, 4.0), 0.92-1.50(m, 16H)。分子式：C₂₅H₄₁N₃O₆, MS 480.3[M⁺]。

[0435] (1R,2R)-2-[N-(12'-氨基-十二烷酰基)-氨基]-1-(4"-硝基苯基)-1,3-丙二醇 (LCL463)。以 40% 的收率由 LCL429 和氨制得作为白色微晶粉末的目标化合物，mp 46-48 °C。TLC(CHCl₃/MeOH/浓 NH₄OH, 1 : 1 : 0.01, v/v/v), R_f = 0.12; ¹H-NMR(CD₃OD, 400MHz) δ 8.13(d, 2H, 苯基 -H, J = 8.8), 7.61(d, 2H, 苯基 -H, J = 8.8), 5.10(d, 1H, J = 2.8), 4.15(m, 1H), 3.73(dd, 1H, J = 7.6, 7.6), 3.53(dd, 1H, J = 6.0, 6.0), 3.27(m, 2H), 2.79(t, 2H, J = 7.2), 2.04(dt, 2H, J = 7.6, 2.8), 1.56(m, 2H), 1.00-1.40(m, 14H)。分子式：C₂₁H₃₅N₃O₅, MS 410.03[M⁺]。

[0436] (1R,2R)-2-[N-(12'-N,N-二甲基氨基-十二烷酰基)-氨基]-1-(4"-硝基苯基)-1,3-丙二醇 (LCL464)。以 95% 的收率由 LCL429 和 2M 二甲胺的 THF 溶液制得。TLC(CHCl₃/MeOH/NH₄OH, 10 : 1 : 0.01, v/v/v), R_f = 0.12; ¹H-NMR(CDCl₃, 400MHz) δ 8.20(d, 2H, 苯基 -H, J = 8.8), 7.58(d, 2H, 苯基 -H, J = 8.8), 6.34(d, 1H, J = 8.4), 5.21(d, 1H, J = 3.2), 4.19(H, 1H, J = 4.0, 4.0), 3.86(m, 2H), 2.40(t, 2H, J = 7.6), 2.31(s, 6H), 2.12(t, 2H, J = 7.2), 1.20-1.50(m, 18H)。分子式：C₂₃H₃₉N₃O₅, MS 438.40[M⁺]。

[0437] (1R,2R)-2-[N-(6'-{N-辛基氨基}-己酰基)-氨基]-1-(4"-硝基-苯基)-1,3-丙二醇 (LCL488)。以 32% 的收率由 LCL509 和辛胺制得作为浅黄色油状物的目标化合物。TLC(CHCl₃/MeOH/NH₄OH, 4 : 1 : 0.01, v/v/v), R_f = 0.23; ¹H-NMR(CDCl₃, 400MHz) δ 8.12(d,

2H, 苯基 -H, $J = 8.4$), 7.60(d, 2H, 苯基 -H, $J = 8.8$), 7.32(d, 1H, $J = 7.8$), 5.17(d, 1H, $J = 3.2$), 3.79-3.68(qq, 1H, $J = 4.0, 4.0$), 2.84(m, 4H), 2.15(t, 2H, $J = 7.6$), 2.31(s, 6H), 2.12(t, 2H, $J = 7.2$), 1.20-1.80(m, 20H), 0.87(t, 3H, $J = 7.2$)。分子式: $C_{23}H_{39}N_3O_5$, MS 438.28[M⁺]。

[0438] (1R,2R)-2-[N-{12'-N-甲基-氨基}-十二烷酰基]-氨基]-1-(4"-硝基苯基)-1,3-丙二醇 (LCL506)。以 90% 的收率由 LCL429 和 2M 甲胺的 THF 溶液制得作为浅黄色油状物的目标化合物。TLC($CHCl_3/MeOH/NH_4OH, 4:1:0.01, v/v/v$), $R_f = 0.12$; $^1H-NMR(CD_3OD, 400MHz)$ δ 8.18(d, 2H, 苯基 -H, $J = 8.8$), 7.63(d, 2H, 苯基 -H, $J = 8.8$), 5.17(d, 1H, $J = 3.2$), 4.19(m, 1H), 3.76(dd, 1H, $J = 7.6, 7.6$), 3.62(dd, 1H, $J = 5.6, 5.6$), 2.91(t, 2H, $J = 8.0$), 2.65(s, 3H), 2.31(s, 6H), 2.09(t, 2H, $J = 7.2$), 1.68(m, 2H), 1.00-1.42(m, 16H)。分子式: $C_{22}H_{37}N_3O_5$, MS 424.15[M⁺]。

[0439] 实施例 3

[0440] 前药的制备

[0441] 如图 2 所示,可以由 B13(或其含有伯醇或仲醇的类似物)和 N,N-二甲基甘氨酸(或另一适合的羧酸)制备本发明的前药化合物。例如,当在适合的酯化条件(例如使用羰基二咪唑或二环己基碳二亚胺(DCC)和 N,N-二甲基氨基吡啶(DMAP))下以 1:1 的比例混合 B13 和 N,N-二甲基甘氨酸时,可以制备含有单酯(在伯醇处形成)的前药。当在摩尔过量(例如高于 2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更高)的羧酸的存在下混合 B13 和 N,N-二甲基甘氨酸时,可以形成二酯(即在伯醇和仲醇处形成的酯)。使用对于 B13 的伯醇的适合的保护策略,可以得到仲醇被酯化的单酯前药。例如,可以通过在酸的存在下使 B13 与二氢吡喃反应来将 B13 的伯醇保护成为四氢吡喃基(THP)醚。然后可以通过与 N,N-二甲基甘氨酸反应来酯化 B13 的仲醇。最后可以用对甲苯磺酸吡啶鎓(PPTS)处理该分子来除去该 THP 醚。对于其它适合的保护基以及对醇进行保护和脱保护的方法,参见 Greene 和 Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 第三版, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1999。

[0442] (1R,2R)-2-[N-十四烷酰基]-氨基]-1-(4"-硝基苯基)-1,3-丙二醇-1,3-0-双-二甲基甘氨酸盐酸盐(LCL521)。在 10mL 二氯甲烷中混合 N,N-二甲基甘氨酸(103mg, 1mmol)和 1,1'-羰基二咪唑(162mg, 1mmol),并搅拌 2 小时,然后加入 B13(42.3mg, 0.1mmol)。在室温下搅拌反应混合物直至检测不到痕量的原料。通过 TLC(氯仿-甲醇-浓氨水, 10:1:0.025, v/v)监测反应进程。将粗产物蒸发至干燥,通过柱色谱纯化残余物,并使用氯仿:甲醇:浓氨水(15:1:0.025(v/v))洗脱以得到作为蜡样固体的纯产物。将此物质在 4℃ 下溶解于乙酸乙酯中,并用乙醚溶液中的 HCl 处理。在添加 HCl 期间混合反应混合物,在低温下再保持 30 分钟,蒸发至干燥,并进一步在高真空下干燥得到作为盐酸盐的纯白色固体目标化合物。以 60% 的收率得到 LCL521。 $^1H-NMR(400MHz, CD_3OD)$ δ 8.238(d, $J = 8.8Hz, 2H$), 7.669(d, $J = 8.8Hz, 2H$), 6.243(d, $J = 4.0Hz, 1H$), 4.75(m, 1H), 4.581(dd, $J = 5.2, 7.2Hz, 1H$), 4.423(s, 2H), 4.198(s, 2H), 4.189(dd, $J = 5.2, 4.0Hz$), 2.968(s, 12H), 2.175(m, 2H), 1.421(m, 2H), 1.0-1.2(m, 20H), 0.886(t, $J = 6.4Hz$);ESI-MS(CH_3OH , 相对强度, %) m/z 593.404(M-2HCl, 60)。理论值 $[C_{31}H_{54}Cl_2N_4O_7]^+m/z$ 665.69。

[0443] (1R,2R)-2-[N-十四烷酰基]-氨基]-1-(4"-硝基苯基)-1,3-丙二醇-1-0-二甲基甘氨酸盐酸盐(LCL522)。在 3mL 二氯甲烷中混合 N,N-二甲基甘氨酸(9.3mg, 0.09mmol)

和 1,1'-羰基二咪唑 (14.6mg, 0.09mmol), 并搅拌 2 小时, 然后加入 B 13 (42.3mg, 0.1mmol)。在室温下搅拌反应混合物直至检测不到痕量的原料。通过 TLC (氯仿-甲醇-浓氨水, 10 : 1 : 0.025, v/v) 监测反应进程。将粗产物蒸发至干燥, 通过柱色谱纯化残余物, 并使用氯仿: 甲醇: 浓氨水 (15 : 1 : 0.025 (v/v)) 洗脱以得到作为蜡样固体的纯产物。将此物质在 4℃ 下溶解于乙酸乙酯中, 并用乙醚溶液中的 HCl 处理。在添加 HCl 期间混合反应混合物, 在低温下再保持 30 分钟, 蒸发至干燥, 并进一步在高真空下干燥得到作为盐酸盐的纯白色固体目标化合物。以 45% 的收率得到 LCL522。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.180 (d, J = 8.8Hz, 2H), 7.640 (d, J = 8.8Hz, 2H), 5.067 (d, J = 2.4Hz, 1H), 4.620 (dd, J = 5.2, 5.2Hz, 1H), 4.504 (m, 1H), 4.288 (dd, J = 8.4, 8.4Hz, 1H), 4.124 (dd, J = 17.2, 17.2Hz, 2H), 2.961 (s, 6H), 2.068 (m, 2H), 1.358 (m, 2H), 1.1-1.3 (m, 20H), 0.887 (t, J = 7.2Hz, 3H); ESI-MS (CH₃OH, 相对强度, %) m/z 508.347 (M-HCl, 70)。理论值 [C₂₇H₄₆ClN₃O₆]⁺m/z 544.12。

[0444] 实施例 4

[0445] E 类抑制剂的体外效应和细胞效应

[0446] 在体外和细胞水平上评价作为 ACDase 抑制剂的 E 类化合物, 包括它们调节 Cer 和 Sph (ACDase 水解活性的底物和产物) 的细胞水平的能力。还研究了这些化合物对 ACDase 降解和对溶酶体稳定性的效应。

[0447] 根据以前描述的操作 (参见 Zeidan 等人, J. Biol. Chem., 281, 24695-24703 (2006)) 使用 [³H]C₁₆-Cer 作为底物和 MCF-7 细胞裂解液作为酶源进行体外检测。简言之, 在酸性条件 (即 pH 4.5, 50mM 乙酸钠, 5mM 氯化镁, 1mM EDTA 和 0.5% Triton X-100) 下制备细胞裂解液, 并使用 BCA 蛋白质检测药盒 (Pierce, Rockford, Illinois, United States of America) 测定蛋白质水平。基于释放的放射性棕榈酸的量测定 ACDase 活性, 所述释放的放射性棕榈酸的量由 LS 6500 多功能闪烁计数器 (LS 6500 multi-purpose scintillation counter, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, California, United States of America) 计数。该结果以对照的百分比表示。

[0448] 使用之前用渐增浓度的药物处理过的培养细胞的细胞裂解液来测定所述抑制剂对 ACDase 的细胞活性的效应。对于此类检测, 使所述药物进入细胞, 持续特定的时间, 然后通过匀浆制备细胞裂解液, 并如上所述地进行检测。如以前所描述地使用 LC-MS/MS 分析来测定对内源性 Cer 和 Sph 的效应。参见 Bielawska 等人, Bioorg. Med. Chem., 16, 1032-1045 (2008); 和 Bielawska 等人, Methods, 39, 82-91 (2006)。以由 Bligh 和 Dyer 脂质提取物测定的特定鞘脂 (SPL)/ 磷脂 (Pi) 水平和 SPL/Pi (pmol/nmol) 表示最终结果。

[0449] 如以前所描述地通过蛋白质印迹法测定 E 类抑制剂对 ACDase 蛋白质降解的效应。参见 Bielawska 等人, Bioorg. Med. Chem., 16, 1032-1045 (2008); Liu 等人, Front. Biosci., 13, 2293-2298 (2008); 和 Holman 等人, Cancer Chemother. Pharmacol., 61, 231-242 (2008)。如以前所描述地使用 LYSOTRACKER™ 红 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, United States of America) 或 JC-1 线粒体染料 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, United States of America) 通过 FACS 分析来测定溶酶体稳定性和线粒体稳定性。参见 Holman 等人, Cancer Chemother. Pharmacol., 61, 231-242 (2008)。

[0450] 与 B13 的作用相比的 E 类化合物的抑制效应如图 3 所示。在 50 μM 的抑制剂浓度下的结果显示了未修饰的 B13 的最高抑制效应 (约 90% 抑制)。在相同的条件下, 大多数

E 类化合物起到 ACDase 的强效抑制剂的作用, LCL464 表现出最高效应, 即 55% 抑制。

[0451] 如图 4 所示, 在细胞水平 (2h 处理) 上, 与细胞外的体外数据相比, 所有的测试化合物表现出更强效的 ACDase 抑制。对 LCL464 检测到最高抑制 (65%)。之前研究的非 E 类化合物 LCL204 (即 (1R, 2R)-D- 苏式 -2-N- 十四烷基氨基 -1-(4'- 硝基苯基) -1, 3- 丙二醇) 引起约 35% 的抑制。令人感兴趣的是, 体外最强效的抑制剂 B13 在细胞水平上不表现出任何 ACDase 抑制。基于 ACDase 抑制的体外和细胞水平结果, LCL464 似乎是所测试的 E 类类似物中的最强效的 ACDase 抑制剂。

[0452] 为了将观察到的所述抑制剂对 ACDase 的细胞活性的效应与鞘脂的细胞水平相联系, 进一步研究了对内源性 Cer 种类 (C_n -Cer) 和 Sph 的水平的影响。结果显示 10 μ M 浓度的 E 类化合物在处理 2h 后有效地降低了 (50% -70%) 细胞 Sph 的水平。参见图 5A。所述化合物并未有效地改变整体 Cer 的水平 (98% -104%), 而特异性地升高了 C_{14} -Cer 的水平至 233% -400% 以及 C_{16} -Cer 的水平至 155%。参见图 5B。对 50 μ M 的 LCL464, 也观察到了该对 C_{14} -Cer-Sph 平衡的特征行早期效应。参见图 5C。与 10 μ M 的处理相比, 该对 C_{16} -Cer 的效应更高 (约 240%)。LCL464 还引起时间依赖性的和非常有效率的 C_{18} -Cer 水平的升高, 在 24 小时达到对照的约 900%。对浓度高于 20 μ M 的 LCL464, 观察到了该对 C_{18} -Cer 的效应。参见图 5D。令人感兴趣的是, Sph 和 C_{18} -Cer 水平的改变是相关的, 然而在 SD 方面具有大的变化 (更高的 C_{18} -Cer 增加对应于更低水平的 Sph, 反之亦然)。不受到任何一种理论的束缚, 这些结果似乎表明 LCL464 对神经酰胺合成酶 1 (CerS1) 的额外的活化效应。所观察到的对 C_{14} / C_{16} -Cer 的特异性的 ACDase 的早期抑制和随后的神经酰胺合成酶 1 (CerS1) 的活化的活性二者均可引起促凋亡的 C_{14} -Cer、 C_{16} -Cer 和 C_{18} -Cer 的升高。

[0453] 通过蛋白质印迹法测定 E 类抑制剂对 ACDase 表达的效应。参见图 6。如 5 小时处理所示, 10 μ M 浓度的 E 类化合物不降解 ACDase。这与之前研究的 ACDase 抑制剂 (如 LCL204) 相反。参见 Bielawska 等人, Bioorg. Med. Chem., 16, 1032-1045 (2008)。此外, 即使当 E 类化合物的浓度增加至 50 μ M 时, 它们仍不表现出任何对 ACDase 降解的效应。

[0454] 如图 7 所示, 10 μ M 的 LCL464 不引起溶酶体功能障碍。对 B13 也观察到了该结果。尽管如此, 对更高的浓度注意到, 30 μ M 的 LCL464 具有使溶酶体失稳的潜力 (40% /1h), 这一功能障碍通过延长的温育时间 (61% /5h, > 100% /24h) 得以恢复。仅在之前研究的非 E 类抑制剂 (如 LCL204) 中观察到永久的溶酶体失稳 (与对照相比降低溶酶体稳定性至约 90%)。参见 Bielawska 等人, Bioorg. Med. Chem., 16, 1032-1045 (2008)。

[0455] 实施例 5

[0456] E 类前药的体外效应和细胞效应

[0457] 如本文之前在实施例 4 中所述, 在体外和细胞水平上评价作为 ACDase 抑制剂的 E 类前药。如图 13 所示, LCL521 在体外抑制酸性神经酰胺酶。在细胞水平上, LCL521 似乎引起 ACDase 的 α - 亚基的细胞水平的降低 (在某种程度上类似于 LCL204), 而 LCL522 和 B13 则没有。参见图 14A 和 14B。LCL521 似乎还被递送至溶酶体, 而 LCL522 则没有。参见图 15。LCL521 降低了 Sph 和 S1P 的细胞水平, 并升高了促凋亡 C_{16} -Cer 和 C_{18} -Cer 以及总神经酰胺的水平。参见图 16 和 17。与此相反, 在细胞鞘脂的调节方面, LCL522 的表现类似于 B13。参见图 16。不受到任何一种理论的束缚, 这些数据表明 LCL522 在各种检测条件下分解形成 B13, 而 LCL521 则缓慢代谢为单酯 LCL581 和 B13。

[0458] 实施例 6**[0459] E 类抑制剂在癌细胞中的效应**

[0460] 以诱导几种癌细胞系 MCF-7、PPC1、SCC14a、A549 和 J3DR4 的分化的有效量向能够经受分化的细胞给药 E 类化合物。通过溴化 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑鎓 (MTT) 检测进行细胞活力检测。将细胞接种于 96 孔板中过夜,然后如以前所描述地用渐增浓度 (0-100 μ M) 的药物处理。参见 Hansen 等人, J. Immunol. Methods, 119, 203-210 (1989)。处理后,将该板再温育一段时间 (24-72h)。测定细胞数量的改变,并以未处理对照的百分比表示。

[0461] 结果表明本发明的化合物在低微摩尔范围下显著地降低活癌细胞的数量。用 E 类抑制剂处理 48 小时后在 MCF-7 乳腺癌细胞中的浓度依赖性抑制效应如图 8 所示。所述 E 类化合物的 IC₅₀ 曲线 (与对照相比 50% 的存活细胞) 如图 9 所示。除 LCL449 之外的几乎所有 E 类化合物与 B13 相比表现出增加的抑制效应。E 类中最有活性的类似物是 LCL463, 接下来是 LCL464。除 LCL449 (49.9 μ M) 之外,这些类似物的 IC₅₀ 值为约 6.0-15.5 μ M。B13 的结果显示 IC₅₀ 值为 20.0 μ M。

[0462] 还在几种其它类型的肿瘤细胞系中研究了 LCL464 的抗增殖效应,所述其它类型的肿瘤细胞系为: SCC14a (人头颈鳞状细胞癌)、Du145 (人前列腺癌,上皮样细胞系)、J3DR4 (人黑色素瘤)、A549 (人肺泡上皮细胞) 和 PPC 1 (人前列腺癌)。图 10 显示了在 48 小时和 72 小时处理后,与 LCL464 在 MCF-7 细胞中的效应相比,其在这些其它癌细胞系中的抑制效应。LCL464 对 MCF-7 细胞生长表现出最高效应,对于 48 小时和 72 小时处理的 IC₅₀ 值分别为 10.2 μ M 和 7.2 μ M。恰恰,这些效应对应于 ACDase 水平,相对于相同量的总蛋白质 (数据未显示) 进行评价, MCF-7 细胞具有最高的 ACDase 蛋白质表达。

[0463] 还通过 LCL464 对半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3/7 (介导执行的一组半胱氨酸蛋白酶) 的效应研究了其在 MCF-7 细胞中的凋亡效应。可以通过来自死亡受体和细胞内 / 线粒体通道二者的凋亡信号对其进行活化。简言之,将 MCF-7 细胞以 5×10^3 / 50 μ L / 孔的密度接种于 96 孔板中过夜。然后用媒介物或稀释的 LCL464 处理细胞。在 8 小时和 24 小时温育后,使用 Apo-ONE Homogeneous Caspase 3/7 Assay Kit 根据生产商的说明书 (Promega, Madison, Wisconsin, United States of America) 测量半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3/7 的活性。在 24 小时的温育后, LCL464 引起剂量依赖性的凋亡诱导, 10 μ M 和 20 μ M 的 LCL464 分别使半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3/7 的活性增加至 140% 和 200%。参见图 11。

[0464] 实施例 7**[0465] E 类前药在癌细胞中的效应**

[0466] 以诱导分化的有效量向能够经受分化的 MCF-7 细胞给药 E 类前药。通过 MTT 检测进行细胞活力检测。将细胞接种于 96 孔板中过夜,然后如以前所描述地用渐增浓度 (0-100 μ M) 的药物处理。参见 Hansen 等人, J. Immunol. Methods, 119, 203-210 (1989)。处理后,将该板再温育一段时间 (24-72h)。测定细胞数量的改变,并以未处理对照的百分比表示。通过将在用前药处理的样品和对照样品中细胞数量的改变进行比较来测定 50% 抑制浓度。

[0467] LCL521 的剂量依赖性细胞活力结果如图 12 所示。下表 1 显示了通过在 MCF-7 乳腺癌细胞中的 MTT 细胞活力检测而测量的 LCL521 的时间依赖性 IC₅₀ (24 小时、48 小时或 72

小时)。表 1 中还显示了 LCL522 的 24 小时的 IC_{50} 。为了对比,提供了 B13 的时间依赖性 IC_{50} 。与 B13 相比, LCL521 和 LCL522 二者都在 24 小时后表现出对 MCF-7 细胞的增加的抑制效应。因此,基于这些初步结果,似乎本发明的前药途径能够增加 ACDase 抑制剂的治疗指数。具体而言,似乎 LCL522 的前药途径导致增加的 B13 递送和效力。

[0468] 表 1. E 类前药的时间依赖性 IC_{50} 。

[0469]

化合物	$IC_{50/24h}$ (μM)	$IC_{50/48h}$ (μM)	$IC_{50/72h}$ (μM)
B13	60.8	25.8	23.9
LCL521	8.9	8.67	7.45
LCL522	6.5		

[0470] 应当理解,可以在不背离本发明范围的情况下改变本发明的各种细节。此外,本说明书仅为说明的目的,而非为限制的目的。

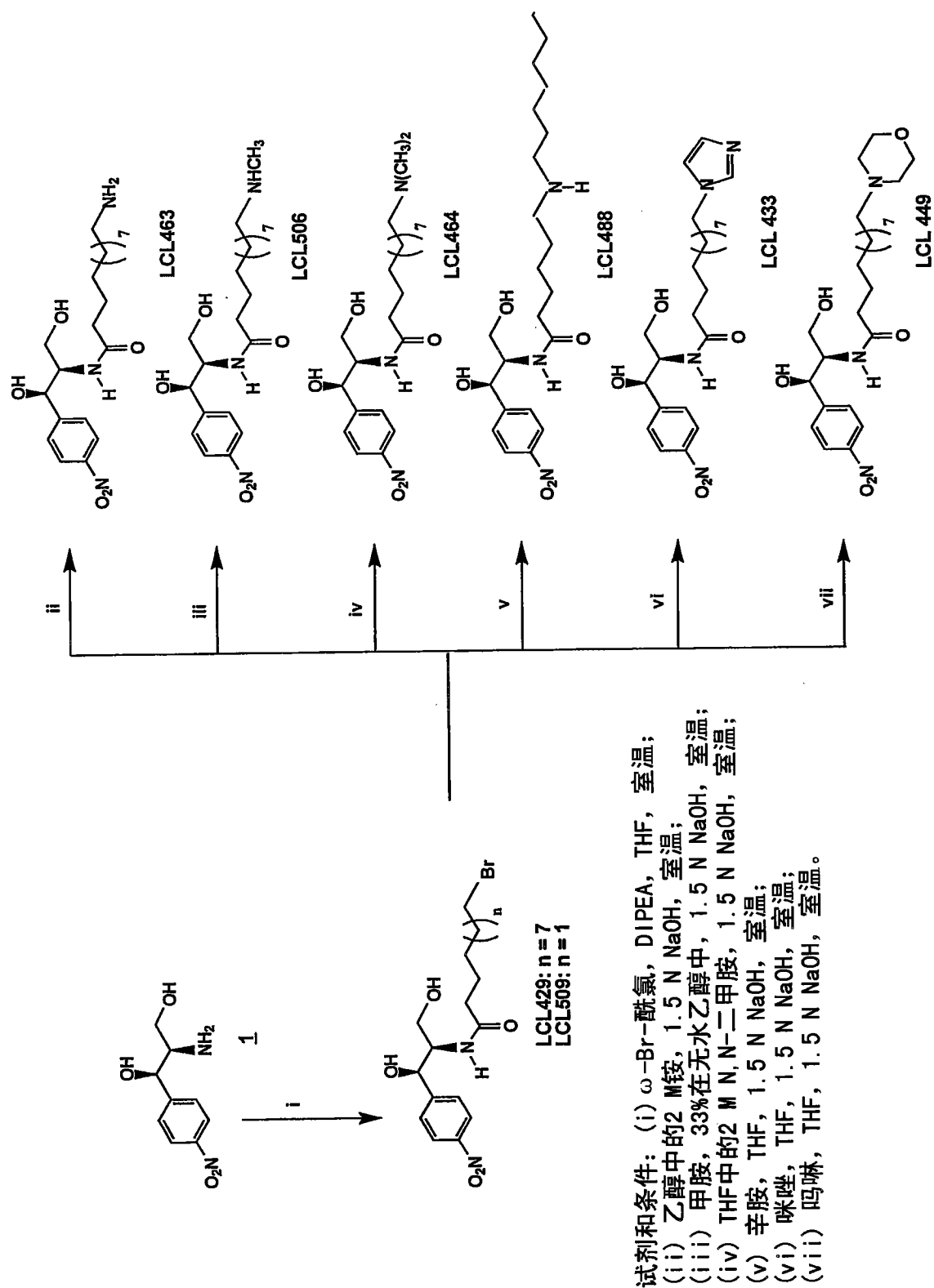
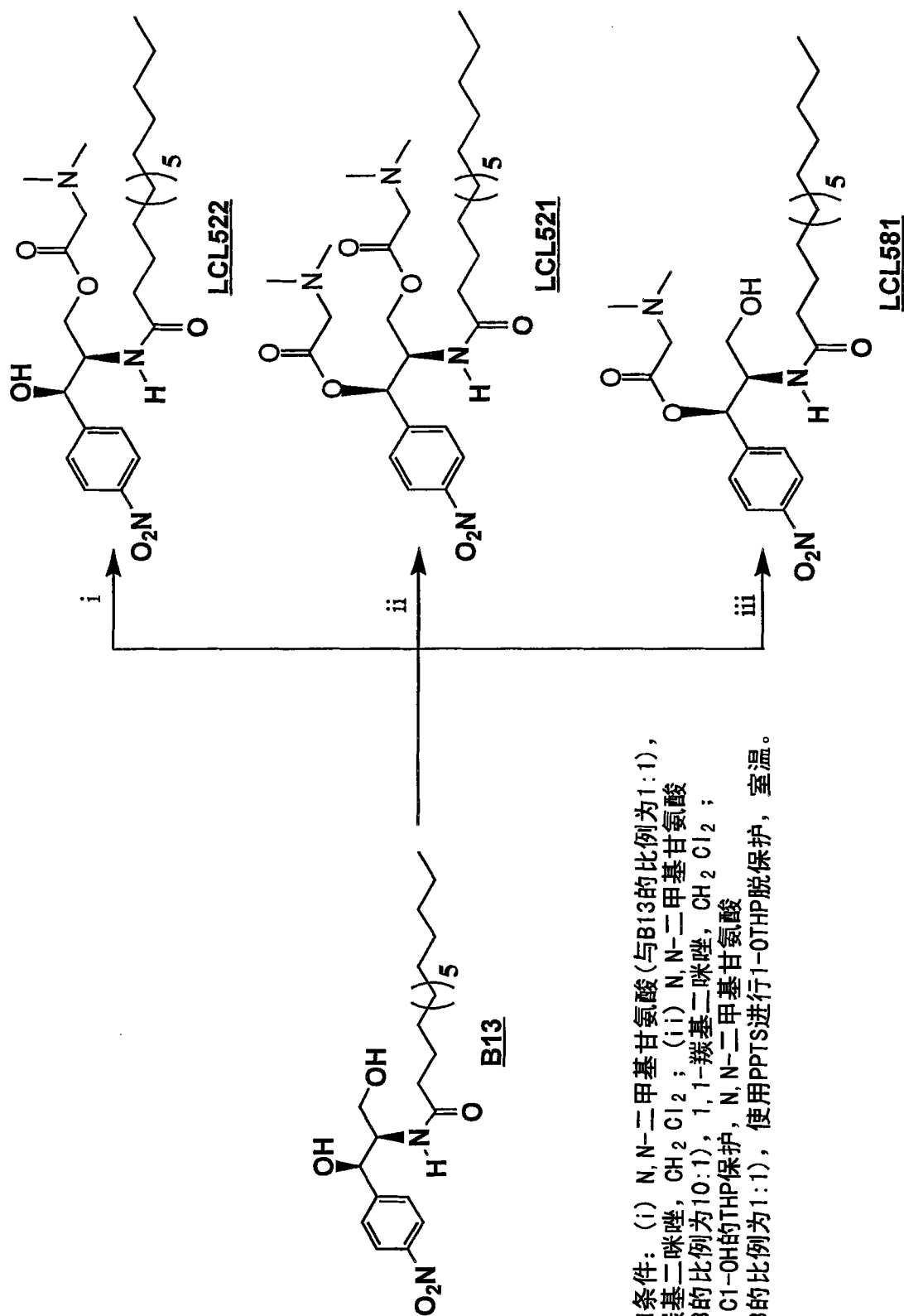


图 1



试剂和条件: (i) N, N-二甲基甘氨酸(与B13的比例为1:1), 1,1-羰基二咪唑, CH_2Cl_2 ; (ii) N, N-二甲基甘氨酸(与B13的比例为10:1), 1,1-羰基二咪唑, CH_2Cl_2 ; (iii) C1-OH的THP保护, N, N-二甲基甘氨酸(与B13的比例为1:1), 使用PPTS进行1-OTHP脱保护, 室温。

图 2

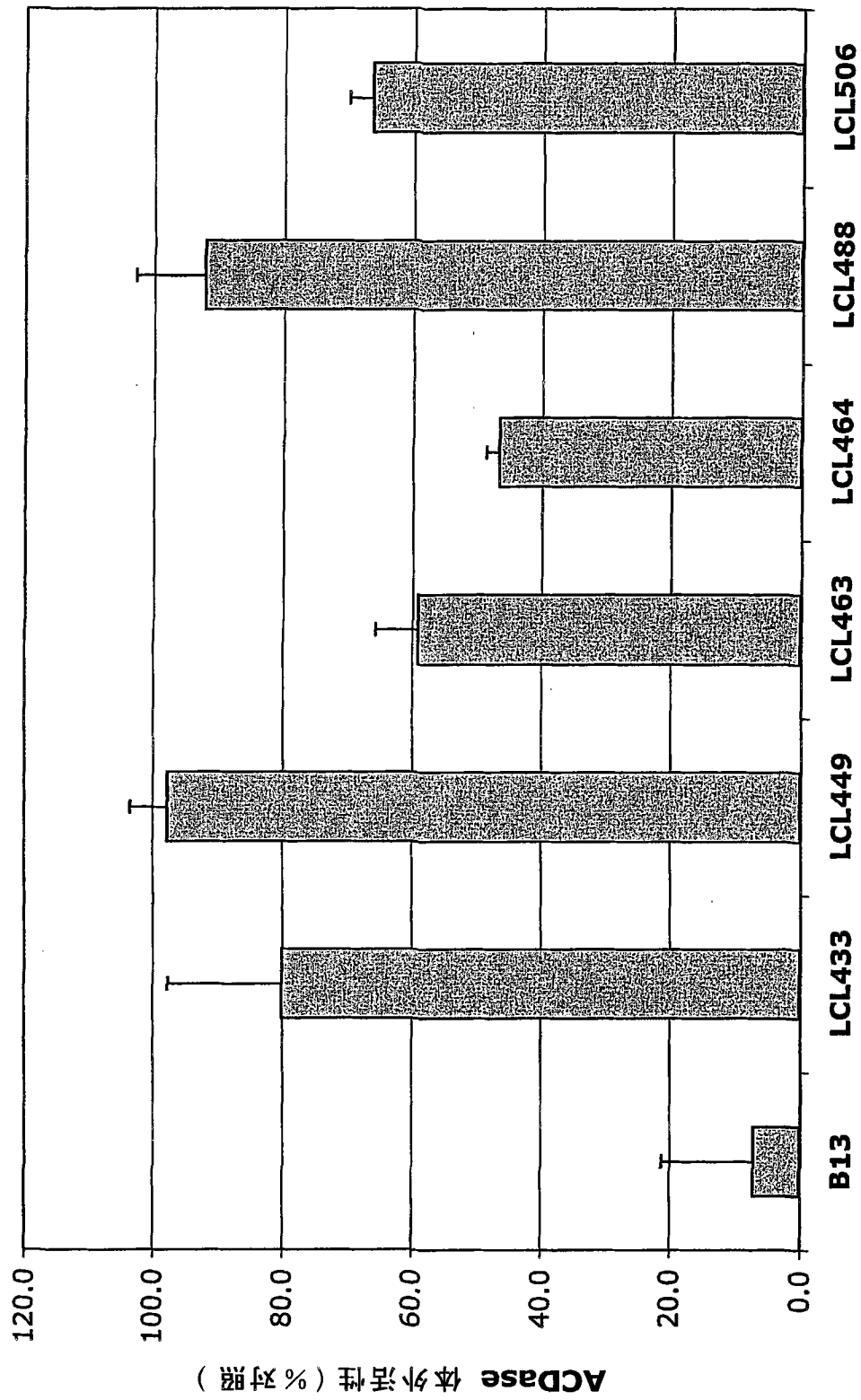


图 3

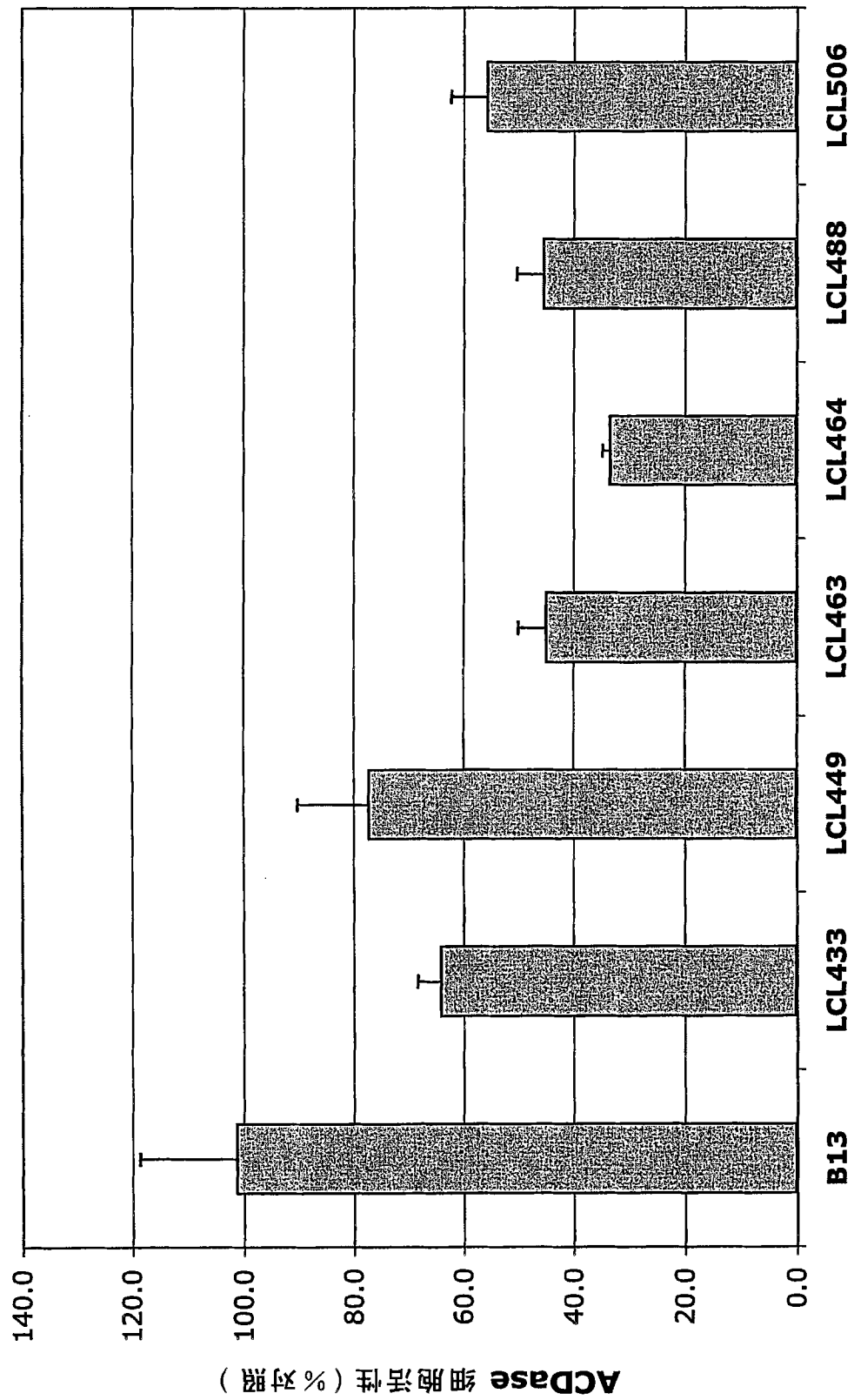


图 4

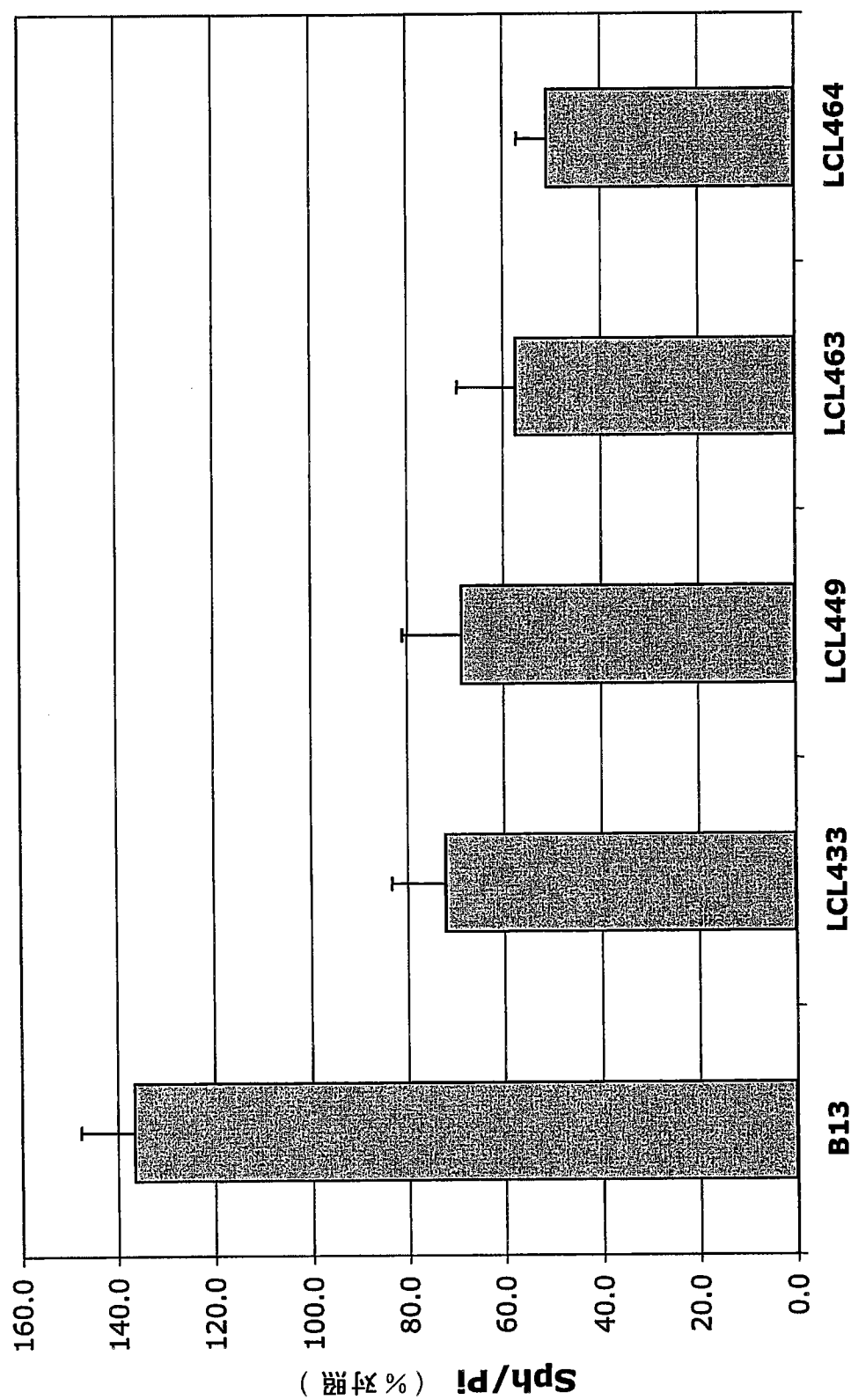


图 5A

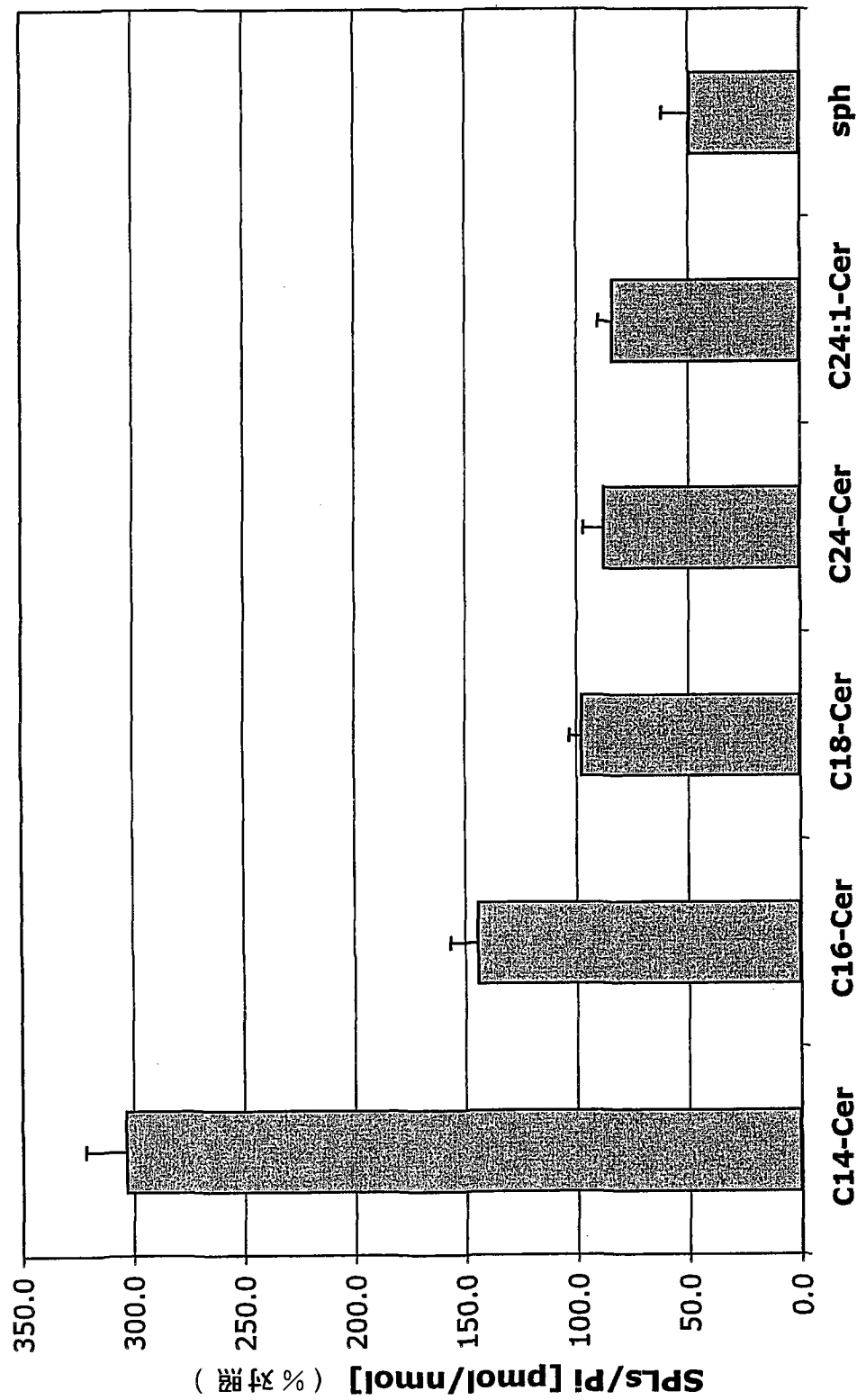


图 5B

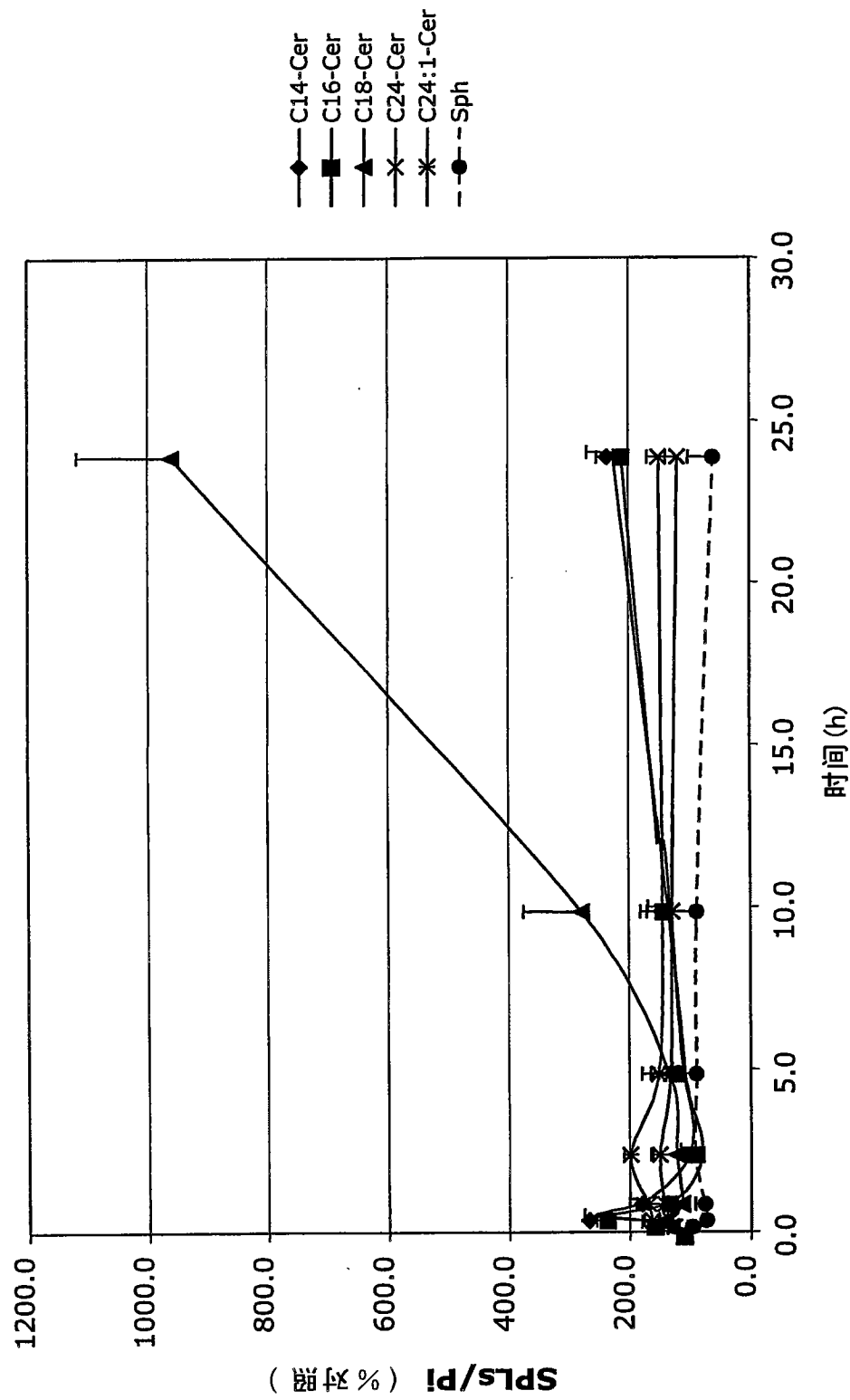


图 5C

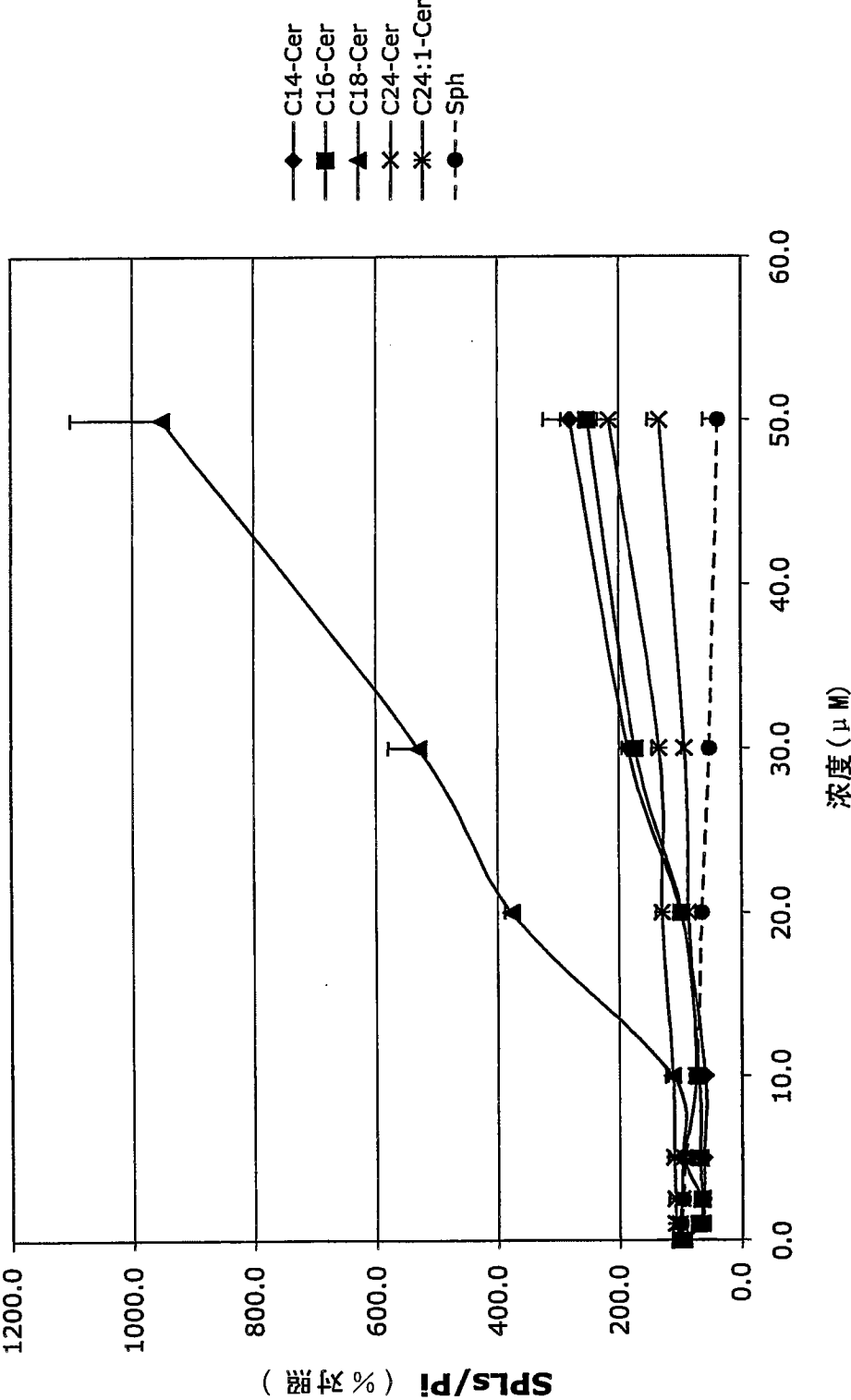


图 5D

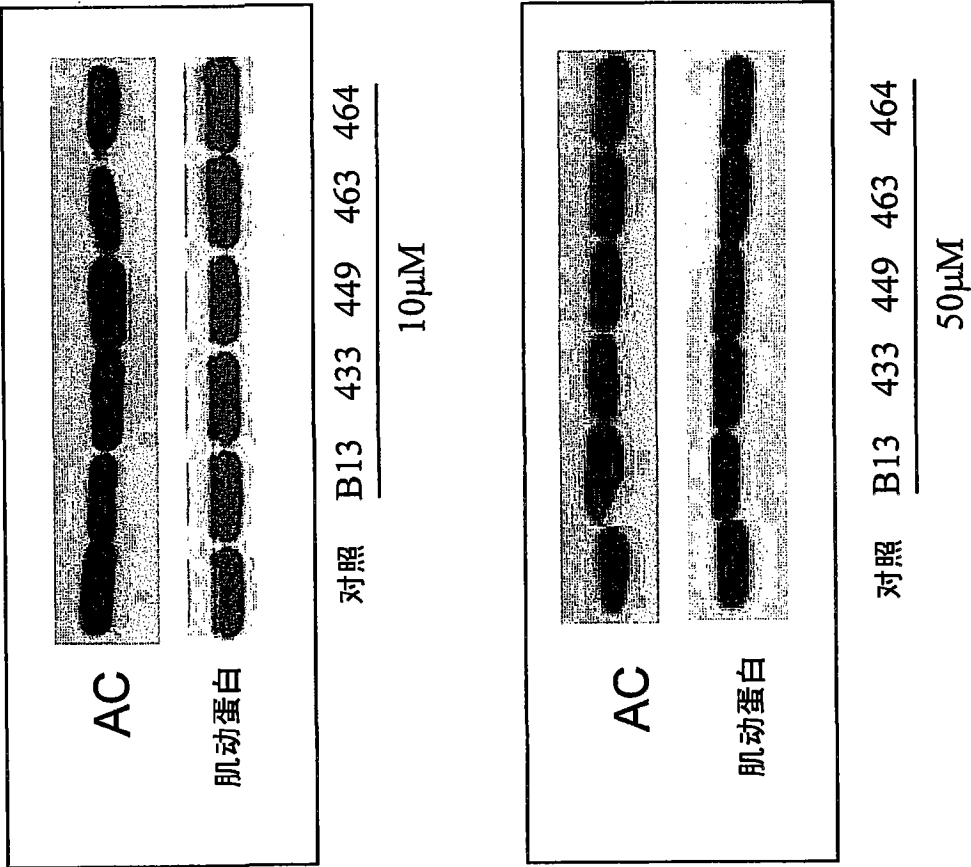


图 6

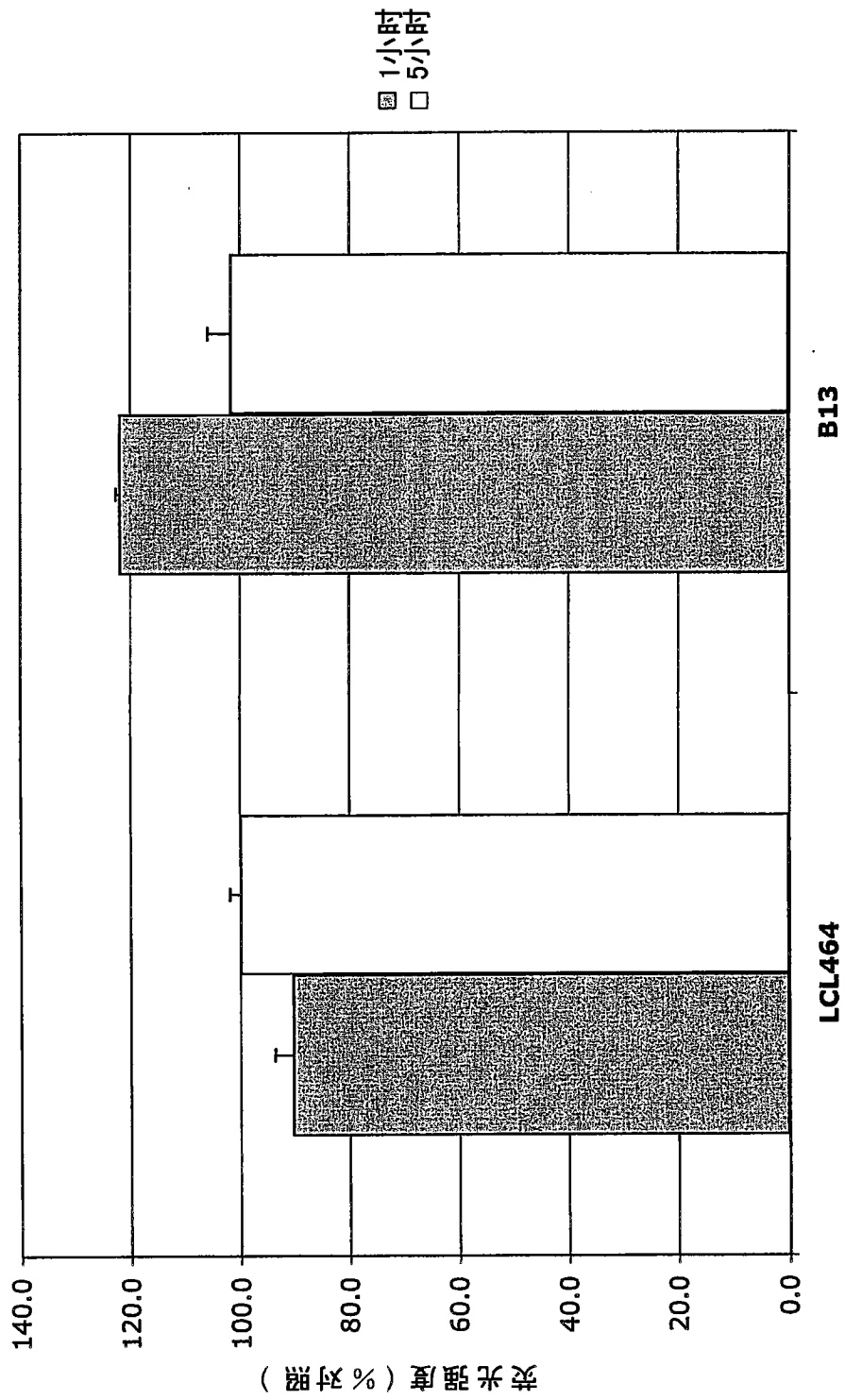


图 7

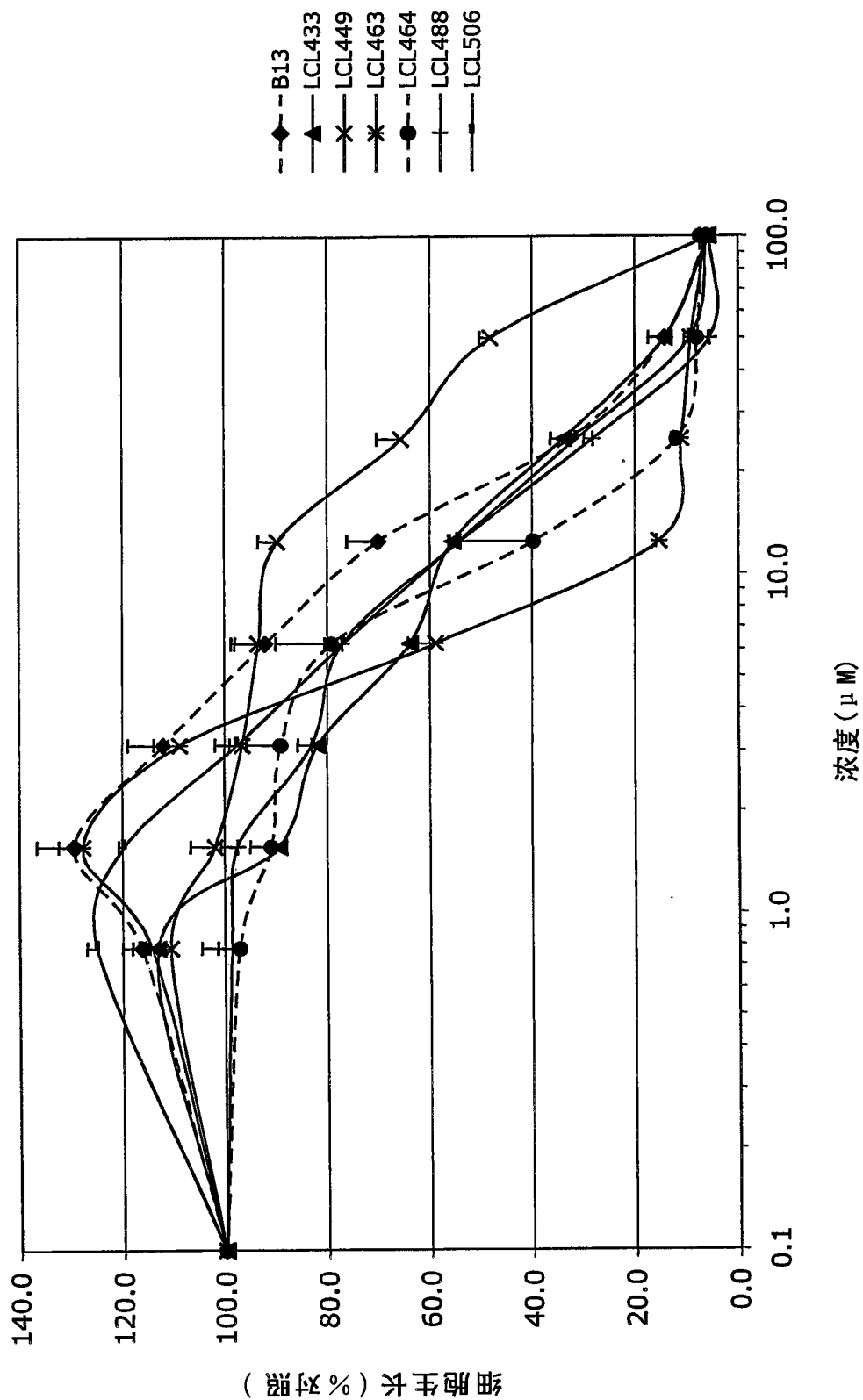


图 8

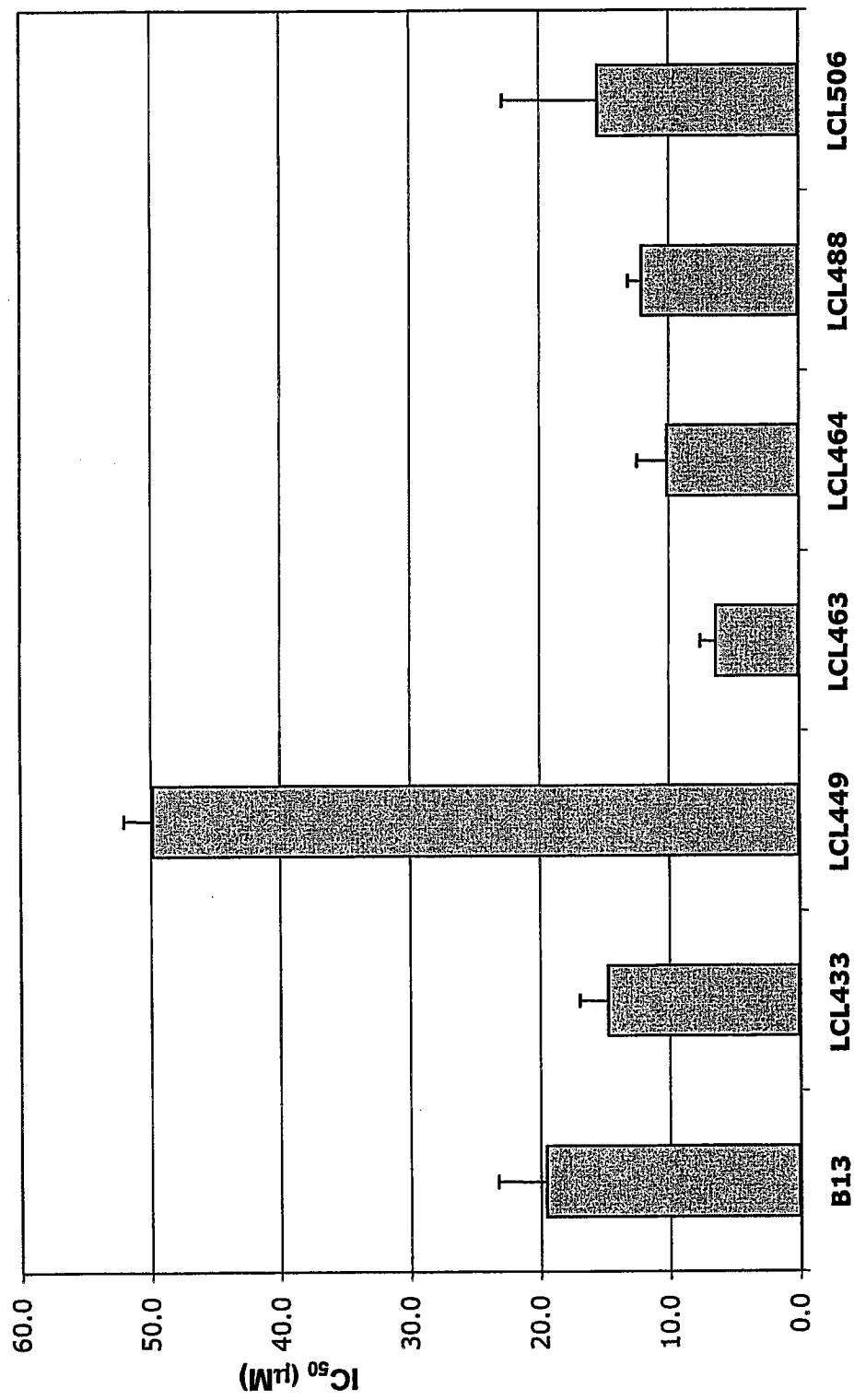


图 9

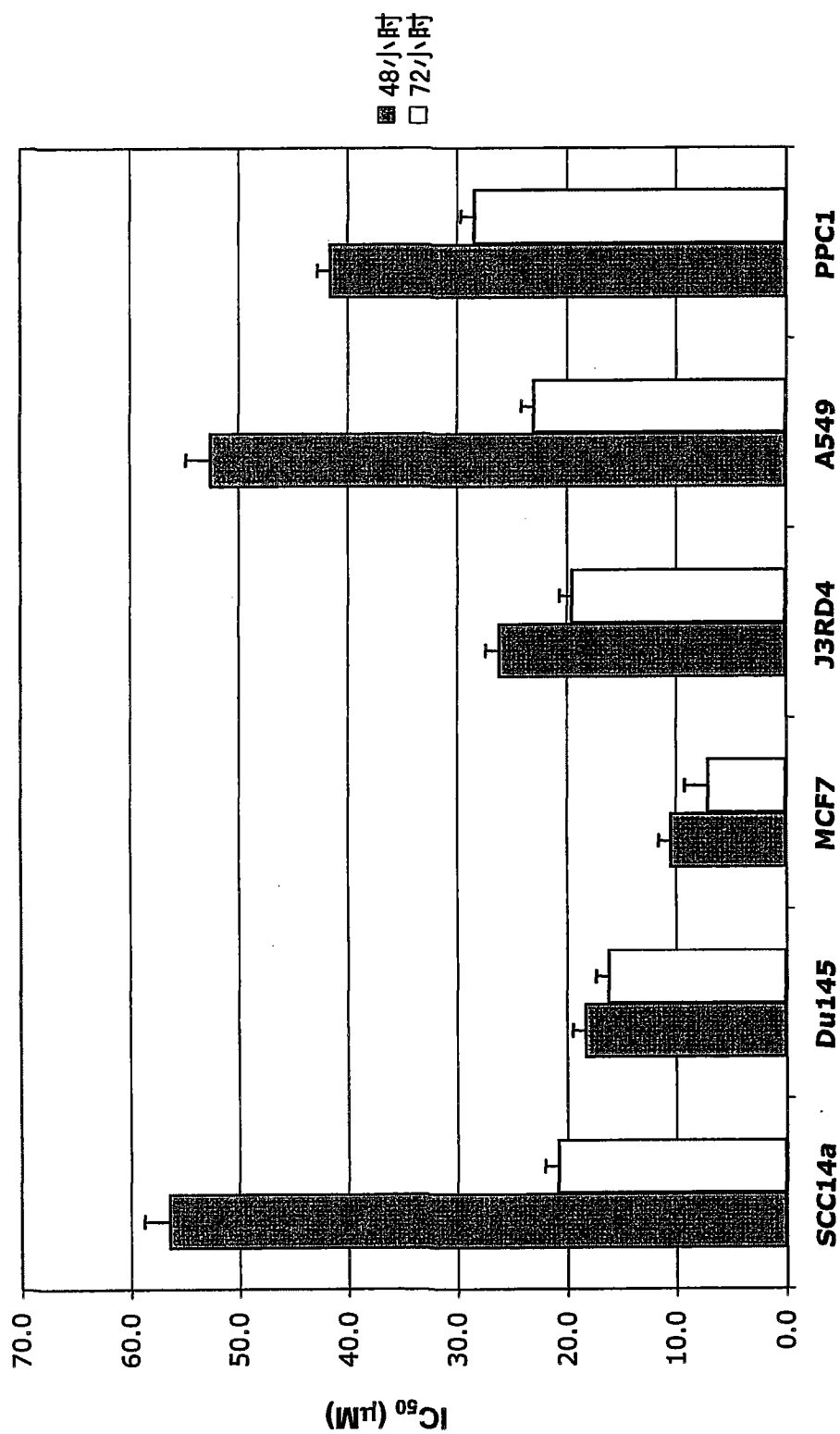


图 10

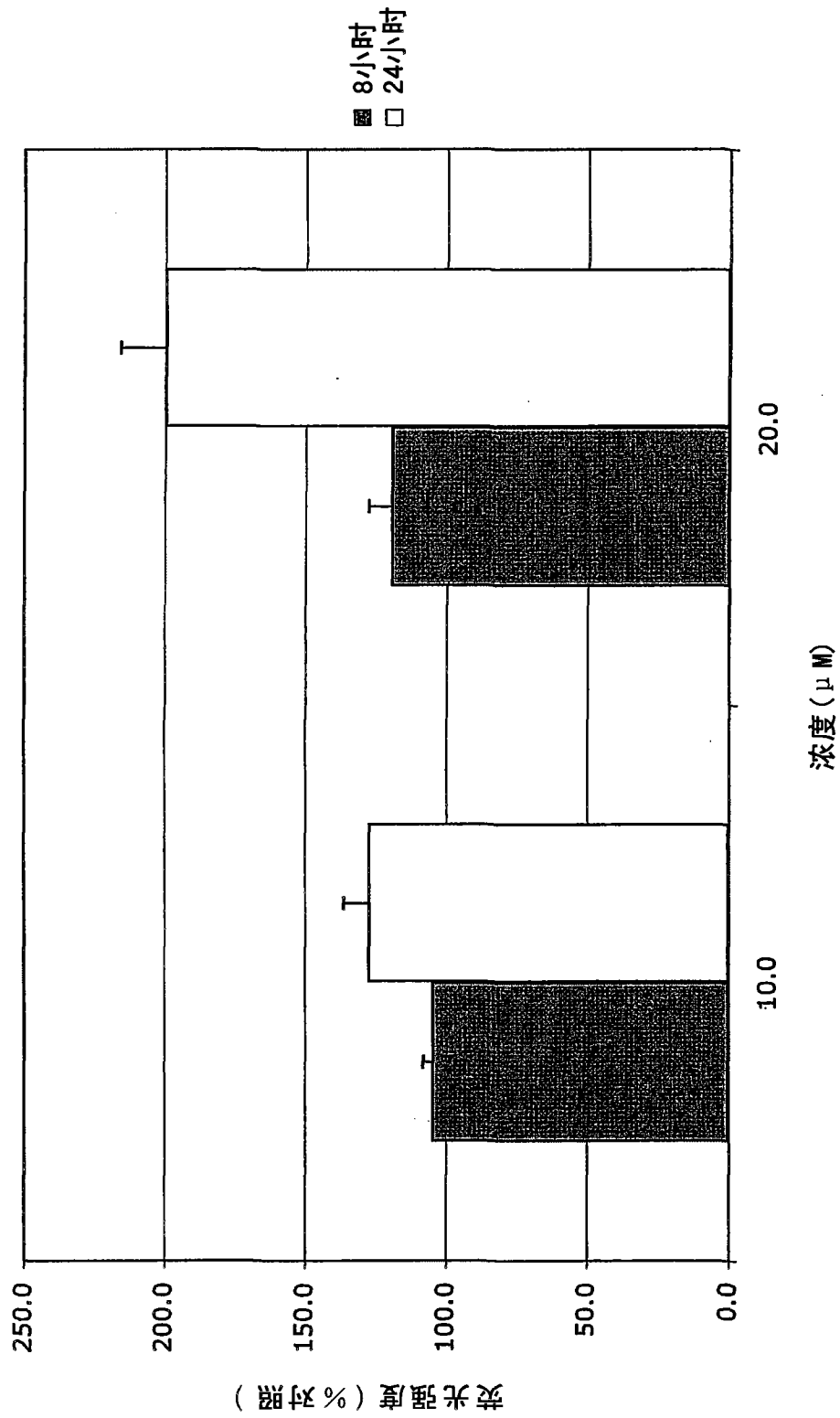


图 11

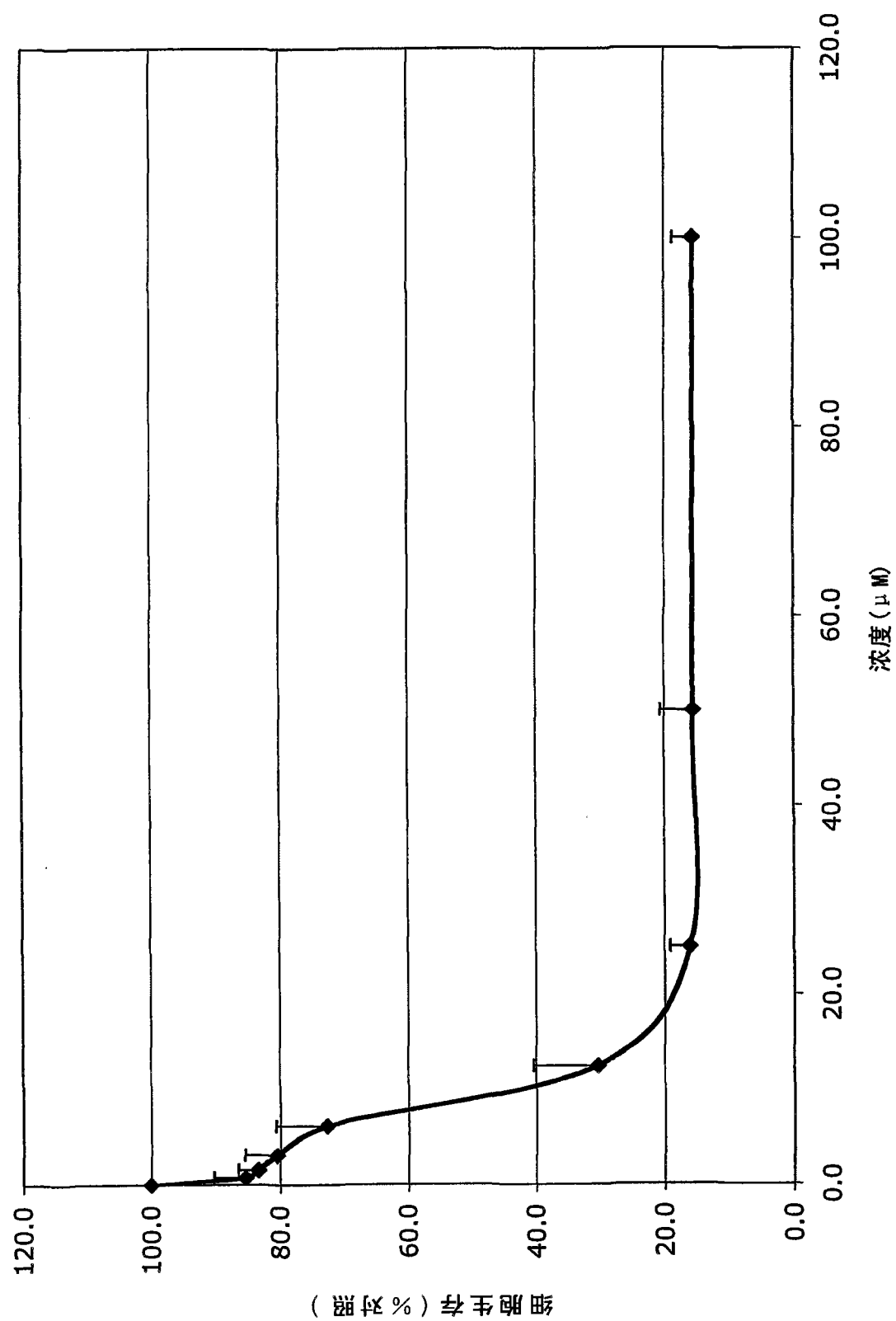


图 12

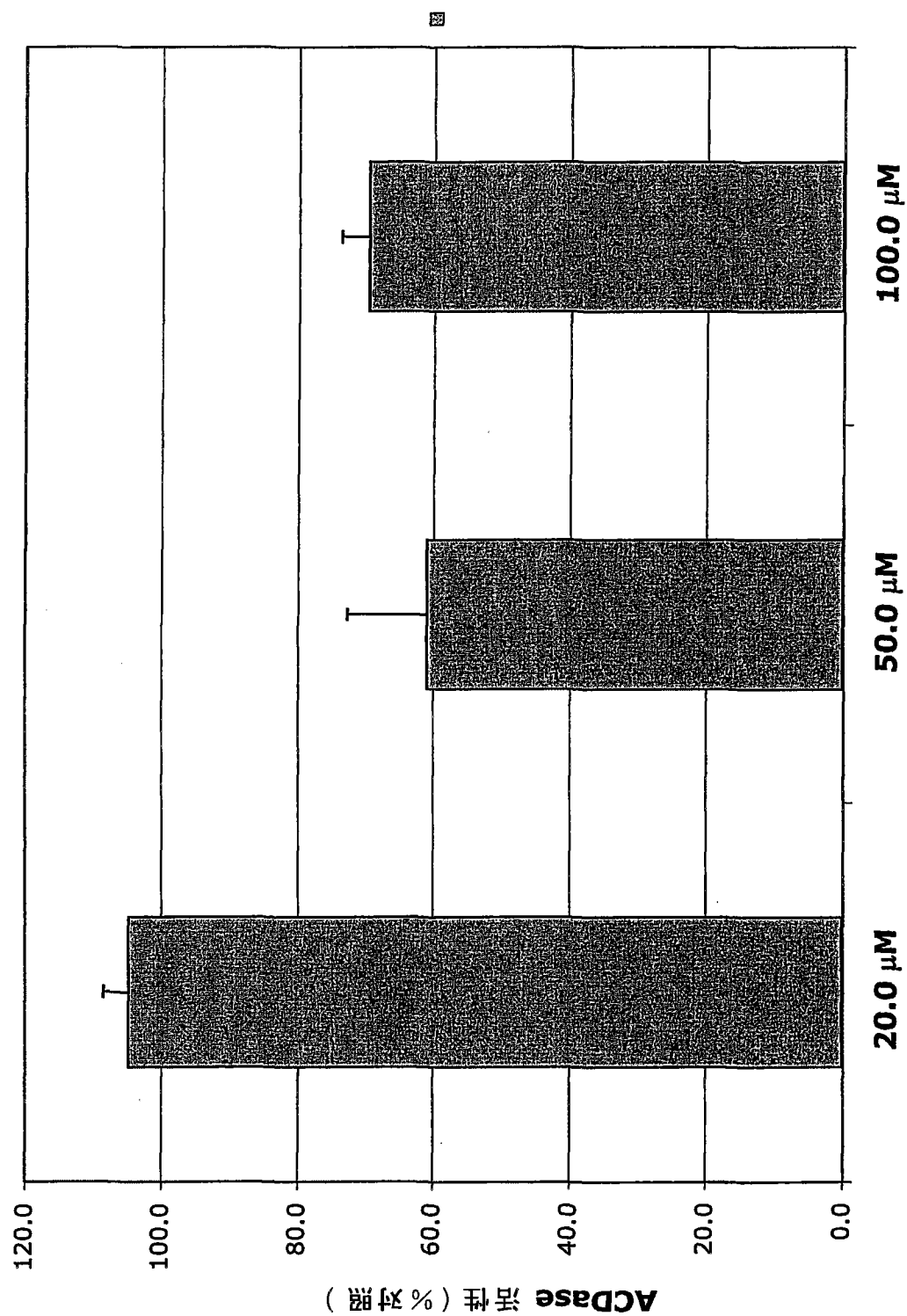


图 13

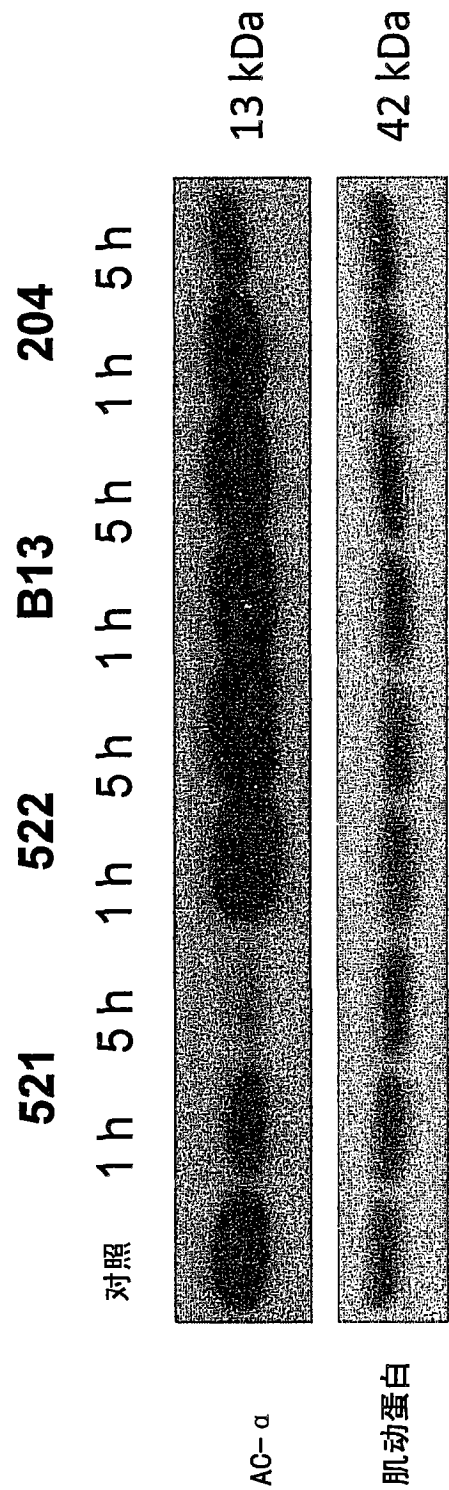


图 14A

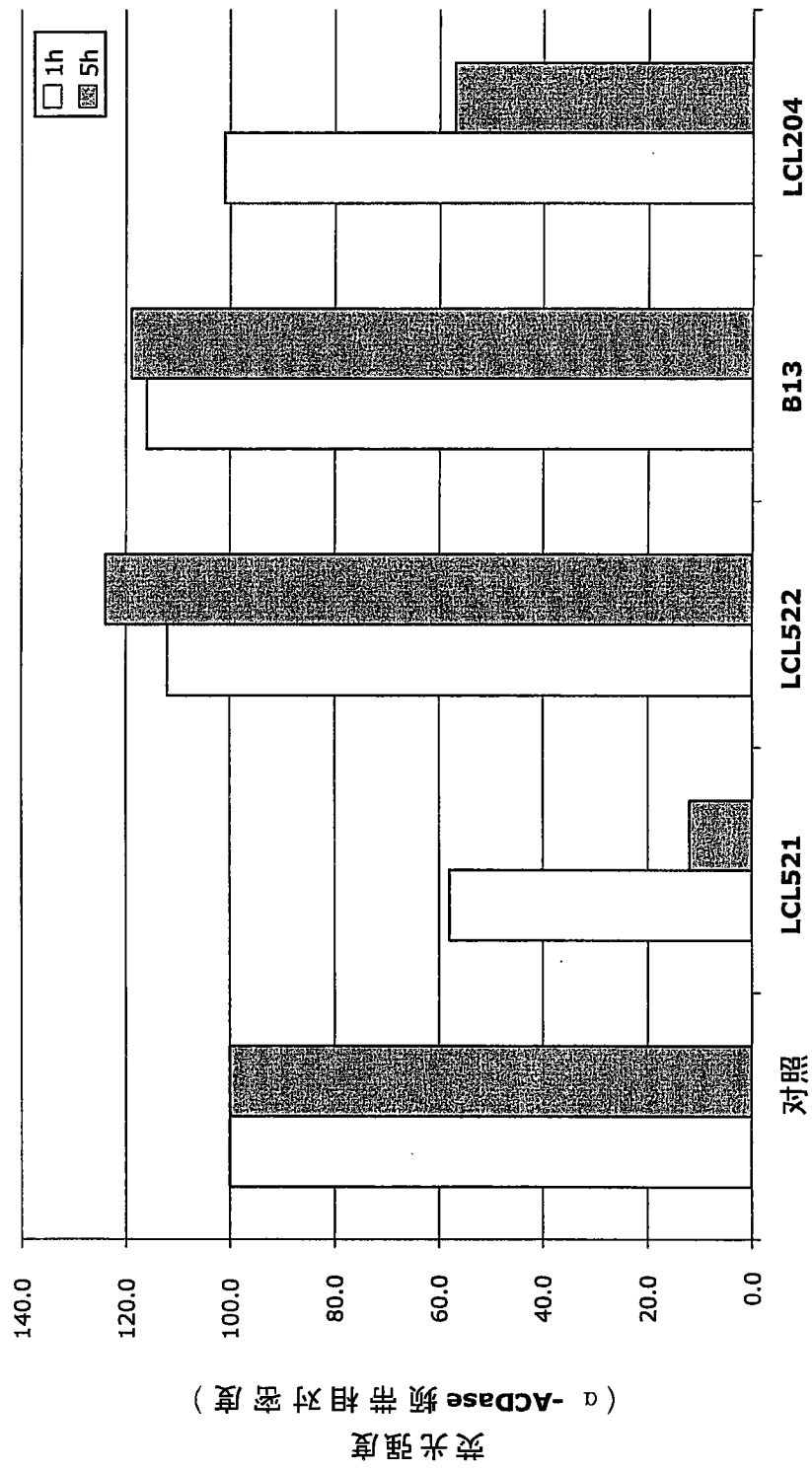


图 14B

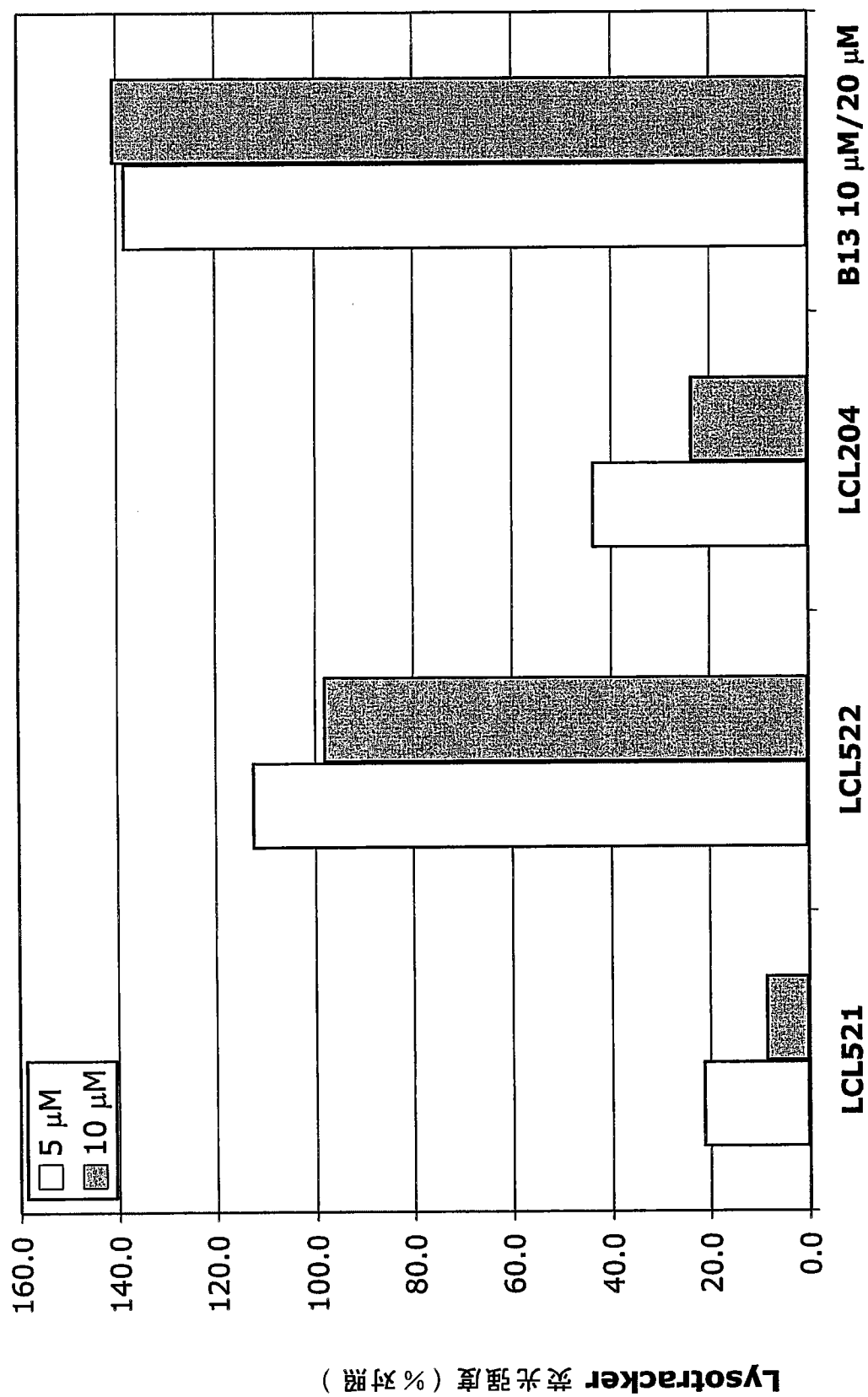


图 15

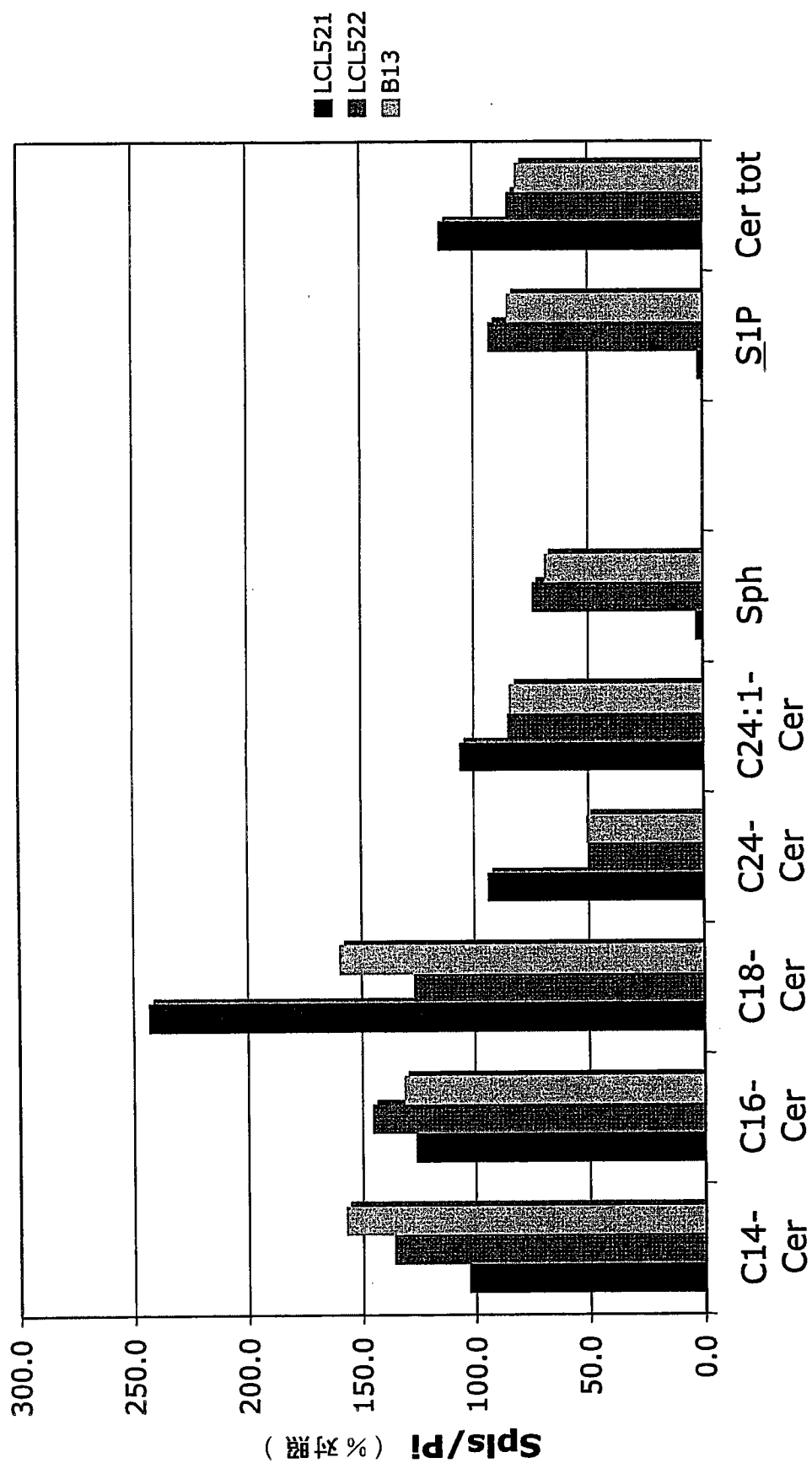


图 16

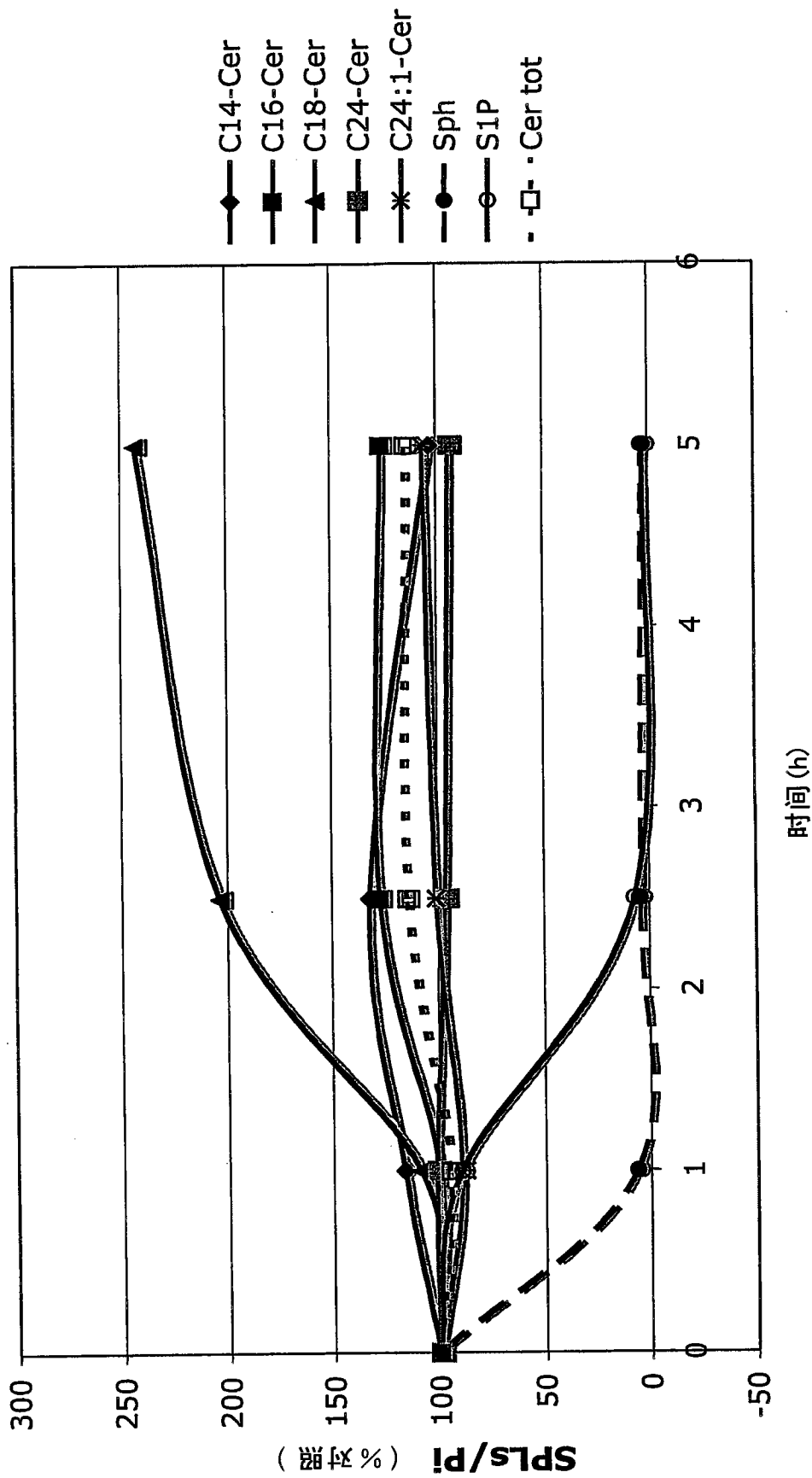


图 17