



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110785172 A

(43)申请公布日 2020.02.11

(21)申请号 201880042082.2

D·艾布拉姆森

(22)申请日 2018.07.13

(74)专利代理机构 北京市联德律师事务所

11361

(30)优先权数据

代理人 黄大正 张来光

62/535,376 2017.07.21 US

62/574,449 2017.10.19 US

62/589,734 2017.11.22 US

(51)Int.Cl.

A61K 31/4965(2006.01)

C07D 295/00(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.12.23

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2018/000881 2018.07.13

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/016595 EN 2019.01.24

(71)申请人 红山生物医药有限公司

地址 以色列特拉维夫

(72)发明人 R·法西 M·勒维蒂 T·普拉赛

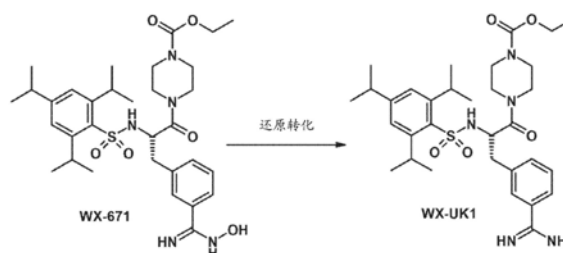
权利要求书2页 说明书16页 附图12页

(54)发明名称

WX-UK1及其产品WX-671用于治疗非癌性医学病症的用途

(57)摘要

本发明涉及治疗患有非癌性医学病症的动物的方法,所述非癌性医学病症通过用胰蛋白酶抑制剂治疗而得到改善,所述方法包括从所述动物获得生物样品;对所述样品进行测试以获得胰蛋白酶浓度,其中如果所述胰蛋白酶浓度高于正常上限,则通过向所述动物施用治疗有效量的药物组合物来对所述动物进行治疗达合适的时间段,所述药物组合物包含药学上可接受的载体和化合物N- α -(2,4,6-三异丙基苯基磺酰基)-3-羟基脒基-苯丙氨酸-4-乙氧基羰基哌嗪、其立体异构体、外消旋混合物、代谢物、药学上可接受的盐、晶体或任何组合。在一个实施方案中,所述非癌性医学病症是选自胰腺炎、胃炎、肠易激综合征和炎性肠病的炎性消化疾病。在一个实施方案中,所述药物组合物为口服施用形式。



1. 一种方法, 包括:

从患有非癌性医学病症的动物获得生物样品;

对所述样品进行测试以获得胰蛋白酶浓度, 其中如果所述胰蛋白酶浓度高于正常上限, 则通过向所述动物施用治疗有效量的药物组合物来对所述动物进行治疗达合适的时间段, 所述药物组合物包含药学上可接受的载体和化合物N- α -(2,4,6-三异丙基苯基磺酰基)-3-羟基脒基-苯丙氨酸-4-乙氧基羰基哌嗪、其立体异构体、外消旋混合物、代谢物、药学上可接受的盐、晶体或任何组合。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述生物样品选自血液、血清、尿液、唾液、十二指肠液和肠粘膜活检物。

3. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述非癌性医学病症选自胰腺炎、胃炎、肠易激综合征和炎性肠病。

4. 根据权利要求3所述的方法, 其中所述非癌性医学病症是肠易激综合征。

5. 根据权利要求4所述的方法, 其中所述肠易激综合征是以便秘为主的肠易激综合征。

6. 根据权利要求4所述的方法, 其中所述肠易激综合征是以腹泻为主的肠易激综合征。

7. 根据权利要求3所述的方法, 其中所述非癌性医学病症是炎性肠病。

8. 根据权利要求7所述的方法, 其中所述炎性肠病是克罗恩病。

9. 根据权利要求7所述的方法, 其中所述炎性肠病是溃疡性结肠炎。

10. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述非癌性医学病症是急性胰腺炎。

11. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述药物组合物为口服施用形式。

12. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述化合物以硫酸盐或硫酸氢盐的形式存在。

13. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述化合物选自:

N- α -(2,4,6-三异丙基苯基磺酰基)-3-羟基脒基-(L) 苯丙氨酸-4-乙氧基羰基哌嗪, N- α -(2,4,6-三异丙基苯基磺酰基)-3-羟基脒基-(D) 苯丙氨酸-4-乙氧基羰基哌嗪, 和 N- α -(2,4,6-三异丙基苯基磺酰基)-3-羟基脒基-(D,L) 苯丙氨酸-4-乙氧基羰基哌嗪, 或它们生理上相容的盐。

14. 根据权利要求13所述的方法, 其中所述化合物是N- α -(2,4,6-三异丙基苯基磺酰基)-3-羟基脒基-(L) 苯丙氨酸-4-乙氧基羰基哌嗪硫酸氢盐。

15. 根据权利要求13所述的方法, 其中所述化合物是N- α -(2,4,6-三异丙基苯基磺酰基)-3-羟基脒基-(L) 苯丙氨酸-4-乙氧基羰基哌嗪的结晶形式或其生理上相容的盐。

16. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述动物是人。

17. 根据权利要求1所述的方法, 其中对所述生物样品进行测试以获得胰蛋白酶-3的水平。

18. 根据权利要求1所述的方法, 其中对所述生物样品进行测试以获得胰蛋白酶-2的水平。

19. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述药物组合物与被批准用于治疗所述非癌性医学病症的另一种药物共同施用。

20. 一种方法, 包括:

从患有肠易激综合征的人获得十二指肠液的生物样品;

对所述样品进行测试以获得胰蛋白酶-3浓度, 其中如果所述胰蛋白酶-3浓度高于正常

上限,则通过向所述人施用治疗有效量的药物组合物来对所述人进行治疗达合适的时间段,所述药物组合物包含药学上可接受的载体和化合物N- α -(2,4,6-三异丙基苯基磺酰基)-3-羟基脒基-(L) 苯丙氨酸-4-乙氧基羰基哌嗪硫酸氢盐。

WX-UK1及其产品WX-671用于治疗非癌性医学病症的用途

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2017年7月21日提交的美国临时专利申请62/535,376、2017年10月19日提交的美国临时专利申请62/574,449和2017年11月22日提交的美国临时专利申请62/589,734的权益和优先权,这些申请的全部内容据此以引用方式并入本文。

背景技术

[0003] 蛋白酶是重要的信号分子,参与导致病理的许多重要过程,因此寻找针对这些蛋白酶的新型治疗策略是医学的圣杯。对于小分子药物来说,关键的挑战仍然是识别和发现具有潜在的药物治疗效果的分子靶标。

发明内容

[0004] 根据本文所示的方面,已经确定化合物N- α -(2,4,6-三异丙基苯基磺酰基)-3-脒基-(L)-苯丙氨酸4-乙氧基羰基哌嗪(WX-UK1)的高亲和力靶标对健康和疾病具有重要影响,并且指示了WX-UK1在治疗非癌性医学病症中的重要用途。在一个实施方案中,非癌性医学病症是不包括消化道癌症的炎性消化疾病,该炎性消化疾病通过用胰蛋白酶抑制剂治疗而得到改善。

[0005] 根据本文所示的方面,一种方法包括从患有非癌性医学病症的动物获得生物样品;对该样品进行测试以获得胰蛋白酶浓度,其中如果胰蛋白酶浓度高于正常上限,则通过向动物施用治疗有效量的药物组合物来对动物进行治疗达合适的时间段,该药物组合物包含药学上可接受的载体和化合物N- α -(2,4,6-三异丙基苯基磺酰基)-3-羟基脒基-苯丙氨酸-4-乙氧基羰基哌嗪、其立体异构体、外消旋混合物、代谢物、药学上可接受的盐、晶体或任何组合。在一个实施方案中,生物样品选自血液、血清、尿液、唾液、十二指肠液和肠粘膜活检物。在一个实施方案中,非癌性医学病症选自胰腺炎、胃炎、肠易激综合征和炎性肠病。在一个实施方案中,非癌性医学病症是肠易激综合征。在一个实施方案中,肠易激综合征是以便秘为主的肠易激综合征。在一个实施方案中,肠易激综合征是以腹泻为主的肠易激综合征。在一个实施方案中,非癌性医学病症是炎性肠病。在一个实施方案中,炎性肠病是克罗恩病。在一个实施方案中,炎性肠病是溃疡性结肠炎。在一个实施方案中,非癌性医学病症是急性胰腺炎。在一个实施方案中,药物组合物为口服施用形式。在一个实施方案中,化合物以硫酸盐或硫酸氢盐的形式存在。在一个实施方案中,化合物选自N- α -(2,4,6-三异丙基苯基磺酰基)-3-羟基脒基-(L)苯丙氨酸-4-乙氧基羰基哌嗪、N- α -(2,4,6-三异丙基苯基磺酰基)-3-羟基脒基-(D)苯丙氨酸-4-乙氧基羰基哌嗪和N- α -(2,4,6-三异丙基苯基磺酰基)-3-羟基脒基-(D,L)苯丙氨酸-4-乙氧基羰基哌嗪或它们生理上相容的盐。在一个实施方案中,化合物是N- α -(2,4,6-三异丙基苯基磺酰基)-3-羟基脒基-(L)苯丙氨酸-4-乙氧基羰基哌嗪硫酸氢盐。在一个实施方案中,化合物是N- α -(2,4,6-三异丙基苯基磺酰基)-3-羟基脒基-(L)苯丙氨酸-4-乙氧基羰基哌嗪的结晶形式或其生理上相容的盐。在一个实施方案中,动物是人。在一个实施方案中,对生物样品进行测试以获得胰蛋白酶-3的水平。在一

个实施方案中,对生物样品进行测试以获得胰蛋白酶-2的水平。在一个实施方案中,该药物组合物与另一种被批准用于治疗非癌性医学病症的药物共同施用。

[0006] 根据本文所示的方面,一种方法包括从患有肠易激综合征的人获得十二指肠液的生物样品;对该样品进行测试以获得胰蛋白酶-3浓度,其中如果胰蛋白酶-3浓度高于正常上限,则通过向人施用治疗有效量的药物组合物来对人进行治疗达合适的时间段,该药物组合物包含药学上可接受的载体和化合物N- α -(2,4,6-三异丙基苯基磺酰基)-3-羟基脒基-(L)-苯丙氨酸-4-乙氧基羰基哌嗪硫酸氢盐。

[0007] 在本发明之前,还不知道WX-UK1是人胰蛋白酶-3抑制剂,以及WX-UK1可用于治疗不包括消化道癌症的炎性消化疾病。在本申请的提交日期之前,公开了施用WX-UK1以治疗(尤其是)癌症。然而,WX-UK1尚不用于治疗炎性非癌性消化疾病,包括但不限于胰腺炎、胃炎、肠易激综合征和炎性肠病。在一个实施方案中,如下文详述的WX-UK1及其前药WX-671可用于治疗急性胰腺炎,但目前尚无批准的疗法。在一个实施方案中,如下文详述的WX-UK1及其前药WX-671可用于治疗肠易激综合征。在一个实施方案中,如下文详述的WX-UK1及其前药WX-671可用于治疗炎性肠病。在一个实施方案中,炎性肠病是克罗恩病。在一个实施方案中,炎性肠病是溃疡性结肠炎。

[0008] 根据本文所示的方面,公开了一种治疗动物的胰腺炎的方法,该方法包括向需要此类治疗的动物施用有效量的化合物,该化合物选自式(I)、式(II)和式(III)或含有该化合物的药学上可接受的组合物。在一个实施方案中,该方法还包括从动物获得生物样品以及对该样品进行测试以获得胰蛋白酶的活性。在一个实施方案中,生物样品选自血液、血清、尿液、唾液、十二指肠液和肠粘膜活检物。在一个实施方案中,如果平均血清胰蛋白酶浓度高于正常上限,则对动物进行治疗。在一个实施方案中,使用放射性免疫测定对样品进行测试以获得胰蛋白酶的活性,该放射性免疫测定测量胰蛋白酶及其前酶胰蛋白酶原的免疫学浓度,而不是其酶促生物活性。

[0009] 根据本文所示的方面,公开了选自式(I)、式(II)和式(III)的化合物在制造适于并旨在治疗胰腺炎的药物中的用途。

[0010] 根据本文所示的方面,公开了一种治疗动物的肠易激综合征的方法,该方法包括向需要此类治疗的哺乳动物施用有效量的化合物,该化合物选自式(I)、式(II)和式(III)或含有该化合物的药学上可接受的组合物。在一个实施方案中,肠易激综合征是具有腹泻的肠易激综合征。在一个实施方案中,肠易激综合征是具有便秘的肠易激综合征。在一个实施方案中,该方法还包括确定动物是否需要此类治疗,包括从该动物获得肠粘膜活检样品以及对该样品进行测试以获得PRSS3(胰蛋白酶-3前体)的基因表达的水平,其中如果与来自健康样品的对照值相比PRSS3 mRNA显著上调,则通过施用有效量的式(I)或式(II)的化合物来使动物经治疗。在一个实施方案中,对样品进行测试以获得PRSS3的基因表达的水平包括检测PRSS3转录物的存在。在一个实施方案中,对样品进行测试包括原位酶谱法。

[0011] 根据本文所示的方面,公开了选自式(I)、式(II)和式(III)的化合物在制造适于并旨在治疗肠易激综合征的药物中的用途。在一个实施方案中,肠易激综合征是具有腹泻的肠易激综合征。在一个实施方案中,肠易激综合征是具有便秘的肠易激综合征。

[0012] 根据本文所示的方面,已经确定化合物N- α -(2,4,6-三异丙基苯基磺酰基)-3-脒基-(L)-苯丙氨酸-4-乙氧基羰基哌嗪("WX-UK1")的高亲和力靶标对健康和疾病具有重要影

响,并且指示了WX-UK1在治疗人炎性肺疾病(不包括肺癌)中的重要用途。

[0013] 在本发明之前,还不知道WX-UK1是人胰蛋白酶-2抑制剂,以及WX-UK1可用于治疗不包括肺癌的炎性肺疾病。在本申请的提交日期之前,公开了施用WX-UK1以治疗(尤其是)癌症。然而,WX-UK1尚不用于治疗炎性肺疾病,包括但不限于急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、肺气肿和非结核分枝杆菌(NTM)。在一个实施方案中,如下文详述的WX-UK1及其前药WX-671可用于治疗未满足医疗需求的COPD。

[0014] 根据本文所示的方面,公开了一种治疗动物的肺疾病的方法,该方法包括向需要此类治疗的动物施用有效量的化合物,该化合物选自式(I)、式(II)和式(III)或含有该化合物的药学上可接受的组合物

[0015] 在一个实施方案中,该方法还包括确定动物是否需要此类治疗,包括从该动物获得肺组织样品以及对该组织样品进行测试以获得PRSS2(胰蛋白酶-2前体)的基因表达的水平,其中如果与来自健康肺组织的对照值相比PRSS2 mRNA显著上调,则通过施用有效量的式(I)、式(II)或式(III)的化合物来使动物经受治疗。在一个实施方案中,对组织样品进行测试以获得PRSS2的基因表达的水平包括检测PRSS2转录物的存在。在一个实施方案中,对组织样品进行测试包括原位酶谱法。

[0016] 根据本文所示的方面,公开了选自式(I)、式(II)和式(III)的化合物在制造适于并旨在用于治疗肺损伤的药物中的用途。

[0017] 根据本文所示的方面,公开了一种治疗动物的 α -1抗胰蛋白酶缺乏症的方法,该方法包括向需要此类治疗的动物施用有效量的化合物,该化合物选自式(I)、式(II)和式(III)或含有该化合物的药学上可接受的组合物。在一个实施方案中,该方法还包括确定动物是否需要此类治疗,包括从该动物获得生物样品以及对该样品进行测试以获得 α -1抗胰蛋白酶的浓度。在一个实施方案中,生物样品选自血液、血清、尿液、唾液、十二指肠液和肠粘膜活检物。在一个实施方案中,如果平均血清 α -1抗胰蛋白酶浓度低于正常下限,则通过施用有效量的式(I)、式(II)或式(III)的化合物来使动物经受治疗。在一个实施方案中,使用放射性免疫测定对样品进行测试以获得 α -1抗胰蛋白酶的浓度,该放射性免疫测定测量 α -1抗胰蛋白酶的免疫学浓度而不是酶促生物活性。

[0018] 根据本文所示的方面,公开了选自式(I)、式(II)和式(III)的化合物在制造适于并旨在治疗 α -1抗胰蛋白酶缺乏症的药物中的用途。

[0019] 一种治疗动物的炎性肠病的方法包括向需要此类治疗的动物口服施用有效量的式(III)的化合物或含有任一实体的药学上可接受的组合物。

[0020] 一种治疗动物的易激肠综合征的方法向需要此类治疗的动物口服施用有效量的式(III)的化合物或含有任一实体的药学上可接受的组合物。在一个实施方案中,口服施用该化合物。

[0021] 一种治疗动物的胰腺炎的方法包括向需要此类治疗的动物施用有效量的式(III)的化合物或含有任一实体的药学上可接受的组合物。在一个实施方案中,口服施用该化合物。

[0022] 一种治疗动物的肺疾病的方法包括向需要此类治疗的动物施用有效量的式(III)的化合物或含有任一实体的药学上可接受的组合物。在一个实施方案中,口服施用该化合物。

[0023] 本文还提供了试剂盒,该试剂盒在由执业医师使用时可简化向患者施用适当量的本发明剂型的过程。在某些实施方案中,本文提供的试剂盒包括至少一个容器,该容器具有本文提供的WX-671的剂型和指示如何使用该剂型治疗给定的非癌性医学病症的标签。在一个实施方案中,剂型是制备用于口服施用的固体剂型。在一个实施方案中,剂型是制备用于吸入施用的剂型。

[0024] 在本部分或本申请的任何其他部分中对任何参考文献的引用或标识均不应解释为承认此类参考文献可用作本申请的现有技术。

附图说明

[0025] 图1示出了前药WX-671向药理活性WX-UK1的还原转化。

[0026] 图2是用于识别WX-UK1靶标的过程的示意图。

[0027] 图3示出牛胰蛋白酶上WX-UK1的活性位点内及其周围的结构片段是WX-UK1结合的主要预测决定因素。

[0028] 图4是UK1活性相对于人胰蛋白酶-1抑制剂浓度的图。

[0029] 图5是UK1活性相对于人胰蛋白酶-2抑制剂浓度的图。

[0030] 图6是UK1活性相对于人胰蛋白酶-3抑制剂浓度的图。

[0031] 图7是UK1活性相对于人蛋白裂解酶(催化结构域)抑制剂浓度的图。

[0032] 图8是示出表面等离子体共振 (SPR) 实验的实验设置的示意图,其中感兴趣的配体(人uPA)被固定在传感器芯片的表面上,并且具有不同浓度的WX-UK1的溶液流过该表面并表征了这些溶液与人uPA的相互作用。

[0033] 图9示出了WX-UK1与人uPA结合的结合动力学。

[0034] 图10是示出SPR实验的实验设置的示意图,其中感兴趣的配体被固定在传感器芯片的表面上,并且具有不同浓度的WX-UK1的溶液流过该表面并表征了这些溶液与人uPA的相互作用。在一个实施方案中,感兴趣的配体选自人胰蛋白酶-1、人胰蛋白酶-3或人MT-SP1/蛋白裂解酶中的一者。

[0035] 图11示出了WX-UK1与胰蛋白酶-1结合的结合动力学。

[0036] 图12示出了WX-UK1与人胰蛋白酶-3结合的结合动力学。

[0037] 图13示出了WX-UK1与人MT-SP1/蛋白裂解酶结合的结合动力学。

具体实施方式

[0038] 定义

[0039] “患者”是指任何动物,诸如灵长类,诸如人。任何动物均可使用本发明的方法和组合物进行治疗。被确定有效地预防或治疗动物(例如啮齿类、狗和猴)的疾病或障碍的WX-UK1和WX-671也可用于治疗人体中的疾病。基于在动物研究中获得的数据,治疗人的疾病领域的技术人员将知道向人施用的化合物的剂量和途径。对于兽医用途,本发明的化合物或其无毒盐根据正常的兽医实践以适当可接受的制剂形式施用,并且兽医将决定最适合于特殊动物的给药方案和施用途径。

[0040] 如本文所用,术语“合适的时间段”是指这样的时间段:在整个治疗中,起始于受治疗者使用本公开的方法开始治疗疾病时,并且直至受治疗者停止治疗时。在一个实施方案

中,合适的时间段是一(1)周。在一个实施方案中,合适的时间段介于一(1)周和两(2)周之间。在一个实施方案中,合适的时间段是两(2)周。在一个实施方案中,合适的时间段介于两(2)周和三(3)周之间。在一个实施方案中,合适的时间段是三(3)周。在一个实施方案中,合适的时间段介于三(3)周和四(4)周之间。在一个实施方案中,合适的时间段是四(4)周。在一个实施方案中,合适的时间段介于四(4)周和五(5)周之间。在一个实施方案中,合适的时间段是五(5)周。在一个实施方案中,合适的时间段介于五(5)周和六(6)周之间。在一个实施方案中,合适的时间段是六(6)周。在一个实施方案中,合适的时间段介于六(6)周和七(7)周之间。在一个实施方案中,合适的时间段是七(7)周。在一个实施方案中,合适的时间段介于七(7)周和八(8)周之间。在一个实施方案中,合适的时间段是八(8)周。在一个实施方案中,合适的时间段介于1(1)周和两(2)年之间。在一个实施方案中,合适的时间段超过两(2)年。最终,处方医师将决定适当的合适的时间段。

[0041] 术语“治疗学上可接受的”是指适于与患者的组织接触而无不适当的毒性、发炎和变应性反应,与合理的效/险比相一致,并且对其预期用途有效的那些化合物(或盐、前药、互变异构体、两性离子形式等)。

[0042] “有效量”或“有效的量”或“治疗有效量”或“治疗有效剂量”是指完全或部分地抑制非癌性医学病症的发展或者至少部分地缓解非癌性医学病症的一种或多种症状的WX-UK1或WX-671的量。治疗有效量也可以是预防有效的量。治疗有效的量将取决于患者的大小和性别、待治疗的非癌性医学病症、疾病的严重程度以及所寻求的结果。在一个实施方案中,治疗有效剂量是指导致患者的症状改善的WX-UK1或WX-671的量。对于给定的患者,治疗有效量可通过本领域的技术人员已知的方法来确定。用于实施本发明以治疗性处理由疾病引起的病症的WX-UK1或WX-671的足够有效量根据患者的施用方式、年龄、体重和总体健康状况而变化。最终,处方医师将决定适当的量和剂量方案。

[0043] 借助于本发明,通过施用有效量的根据本发明的化合物,提供了一种抑制生物(具体地人体)中胰蛋白酶的可能性。待施用的剂量取决于待治疗疾病的性质和严重程度。在一个实施方案中,每日剂量在每体重0.01mg/kg-100mg/kg活性物质的范围内。在一个实施方案中,每日剂量在每体重0.1mg/kg-50mg/kg活性物质的范围内。在一个实施方案中,每日剂量在每体重0.5mg/kg-40mg/kg活性物质的范围内。在一个实施方案中,每日剂量在每体重1mg/kg-30mg/kg活性物质的范围内。在一个实施方案中,每日剂量在每体重5mg/kg-25mg/kg活性物质的范围内。

[0044] 如本文所用,“剂型”是旨在用于口服、皮下、静脉内或吸入施用的形式。“固体口服剂型”包括但不限于片剂、胶囊、颗粒和粉末。“吸入剂型”包括但不限于吸入剂和喷雾剂。

[0045] 如本文所用,术语“抑制剂”是指影响酶的活性的分子。本发明的抑制剂是可逆的,这意味着它们与它们的靶酶形成弱相互作用并且易于除去。可逆抑制剂与酶形成瞬时相互作用。酶与可逆抑制剂之间的结合强度由解离常数(K_d)定义。 K_d 值越小,酶与抑制剂之间的相互作用越强,并且抑制作用越大。当谈论酶抑制时, K_d 被称为 K_i 。

[0046] 如本文所用,术语“消化疾病”是指涉及胃肠道或辅助消化器官(肝脏、胰腺和胆囊)的任何疾病。本公开的消化疾病的示例包括但不限于肠易激综合征(IBS)、炎症肠病(IBD)、胃炎和胰腺炎。在一个实施方案中,患有炎症消化疾病的患者具有升高/上调的胰蛋白酶样活性,如通过胰蛋白酶的血清水平所确定的。在一个实施方案中,增加的胰蛋白酶样

活性是胰蛋白酶-2的上调。在一个实施方案中,增加的胰蛋白酶样活性是胰蛋白酶-3的上调。

[0047] 如本文所用,术语“原位酶谱法”是指一种技术,该技术使用对所测定的蛋白酶具有特异性的底物来测量蛋白酶的蛋白水解活性,该底物被修饰,使得在消化时易于看见。将底物放置在组织切片上,然后将样品在最佳温度下在湿度室中温育,这允许通过激活的酶在其天然位置消化底物。对于组织固定,可使用未固定的冷冻组织(冷冻切片)或者基于乙醇或锌的固定剂。可使用几种不同的方法来进行可视化。例如,WX-UK1温育对人结肠组织样品的作用可通过原位酶谱法来测量。人结肠组织的示例包括从患有IBS(例如使用罗马III或罗马IV标准定义)的患者获得的那些以及从健康对照获得的那些。

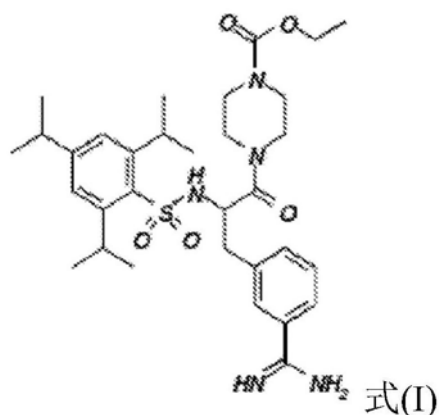
[0048] 如本文所用,术语“增加/上调的胰蛋白酶样活性”是指显著升高超过正常上限的平均胰蛋白酶水平。在一个实施方案中,患有消化疾病的患者中的平均胰蛋白酶显著高于正常上限(P小于0.001)。在一个实施方案中,在血清中检测平均胰蛋白酶水平。

[0049] 借助于本发明,通过施用有效量的根据本发明的化合物,提供了一种抑制生物(具体地人)中胰蛋白酶的可能性。待施用的剂量取决于待治疗疾病的性质和严重程度。在一个实施方案中,每日剂量在每体重0.01mg/kg-100mg/kg活性物质,更高度优选地0.1mg/kg-50mg/kg,更高度优选地0.5mg/kg-40mg/kg,更高度优选地1mg/kg-30mg/kg,更高度优选地5mg/kg-25mg/kg的范围内。

[0050] WX-UK1和WX-671

[0051] 如本文所用,术语WX-UK1是指下式I所示的丝氨酸蛋白酶的合成小分子抑制剂,包括其立体异构体、外消旋混合物、代谢物、药学上可接受的盐、晶体或任何组合。

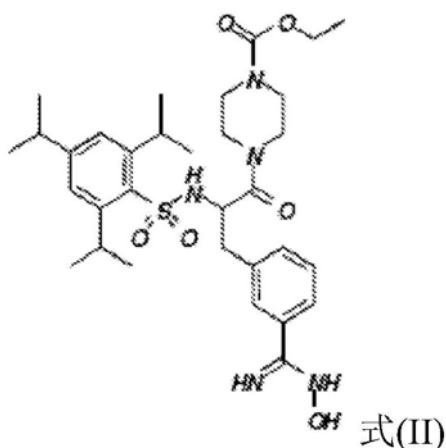
[0052]



[0053] WX-UK1可以外消旋体形式以及L-形式或D-形式的化合物存在。在一个实施方案中,在本发明的方法中使用的WX-UK1仅为L-形式的化合物。在一个实施方案中,WX-UK1以无机酸的盐(优选地盐酸盐)或以适当的有机酸的盐的形式存在。在一个实施方案中,WX-UK1可与至少一种适当的药物添加剂一起用于制备口服、皮下或静脉内施用的药物。

[0054] 如本文所用,术语WX-671是指下式II所示的WX-UK1的口服前药,包括其立体异构体、外消旋混合物、代谢物、药学上可接受的盐、晶体或任何组合。WX-671的化学名称为N-α-(2,4,6-三异丙基苯基磺酰基)-3-羟基脒基-(L)-苯丙氨酸-4-乙氧基羰基哌嗪。

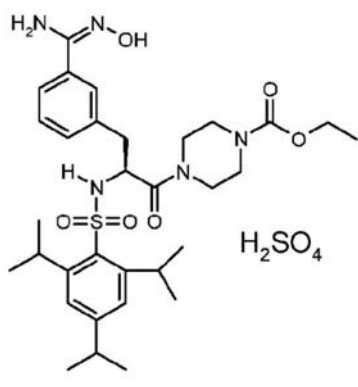
[0055]



[0056] WX-671可以其粉末、盐和晶体形式存在。根据本发明的化合物可任选地与合适的药物赋形剂和/或媒介物一起用于药物生产,并且可以合适的药物制剂(例如片剂、包衣片剂、胶囊、锭剂、粉末、糖浆、悬浮液、溶液等)的形式制备。图1示出了前药WX-671向药理活性WX-UK1的还原转化。

[0057] 在一个实施方案中,WX-671可以硫酸氢盐的形式获得,在本文中被命名为“WX-671.1”或“最高硫酸氢盐”或“式(III)”:

[0058]



[0059] WX-671.1的分子式为 $C_{32}H_{47}N_5O_6S \times H_2SO_4$,并且它是不吸湿的白色至微黄色粉末,易溶于二甲基亚砜,并可溶于乙醇,具有727.91g/mol的相对分子质量(MW游离碱:629.83g/mol)。该药物物质非常轻微地溶于水或0.1M HCl,并且可以填充在硬明胶胶囊(《欧洲药典》(Ph.Eur))中。

[0060] 先前,在临床前动物肿瘤模型中,已示出肠胃外施用的WX-UK1可降低植入肿瘤的生长速率,抑制其侵入附近的淋巴结并扩散到远处转移的靶器官。在相同的动物肿瘤模型中,口服施用的前药WX-671在减少肿瘤相关终点方面与胃肠外WX-UK1同样有效。作为前药,WX-671作为丝氨酸蛋白酶抑制剂在体外失活,并且在肠道吸收后被激活为WX-UK1。先前,已示出活性代谢物WX-UK1抑制尿激酶型纤溶酶原激活因子(uPA)和纤溶酶,其 K_i 值分别为0.65 μ M-0.9 μ M和1.46 μ M-2.4 μ M。此外,WX-UK1抑制牛胰蛋白酶,其 K_i 值为0.037 μ M。如下所述,仅因为WX-UK1具有0.037 μ M的 K_i 值,并不意味着对于其他哺乳动物(诸如人胰蛋白酶)的特异性(K_i 值)将是相同的。

[0061] 根据本文所示的方面,人丝氨酸蛋白酶与WX-UK1之间的抑制常数(K_i 值)小于或等于0.25 μ M、小于或等于0.20 μ M、小于或等于0.15 μ M并且小于或等于0.10 μ M。在一个实施方案中,人胰蛋白酶-1与WX-UK1之间的 K_i 值介于0.50 μ M和0.10 μ M之间、介于0.30 μ M和0.2 μ M之

间,为约 $0.19\mu\text{M}\pm 0.01\mu\text{M}$ 。在一个实施方案中,人胰蛋白酶-2与WX-UK1之间的 K_i 值介于 $0.050\mu\text{M}$ 和 $0.010\mu\text{M}$ 之间、介于 $0.60\mu\text{M}$ 和 $0.090\mu\text{M}$ 之间、介于 $0.070\mu\text{M}$ 和 $0.080\mu\text{M}$ 之间,为约 $0.075\mu\text{M}\pm 0.003\mu\text{M}$ 。在一个实施方案中,人胰蛋白酶-3与WX-UK1之间的 K_i 值介于 $0.005\mu\text{M}$ 和 $0.030\mu\text{M}$ 之间、介于 $0.010\mu\text{M}$ 和 $0.025\mu\text{M}$ 之间、介于 $0.015\mu\text{M}$ 和 $0.020\mu\text{M}$ 之间,为约 $0.019\mu\text{M}\pm 0.004\mu\text{M}$ 。在一个实施方案中,人MT-SP1/蛋白裂解酶与WX-UK1之间的 K_i 值介于 $0.50\mu\text{M}$ 和 $0.10\mu\text{M}$ 之间、介于 $0.40\mu\text{M}$ 和 $0.3\mu\text{M}$ 之间,为约 $0.20\mu\text{M}\pm 0.01\mu\text{M}$ 。

[0062] 丝氨酸蛋白酶

[0063] 丝氨酸蛋白酶几乎存在于所有有机体中,并且在细胞的内部和外部两者起作用;它们以两个家族存在,即“胰蛋白酶样”和“枯草杆菌蛋白酶样”。哺乳动物的丝氨酸蛋白酶具有共同的3D结构,但在表面的一些区域存在相当显著的差异,从而反映出不同的生理功能并导致与不同分子的不同相互作用。

[0064] 胰蛋白酶在哺乳动物之间差异很大,并且因此,牛胰蛋白酶是人胰蛋白酶1的丝氨酸蛋白酶同系物(SPH),但并非相同。不同哺乳动物之间的胰蛋白酶并不相同。例如,小鼠具有8种胰蛋白酶,与6种人胰蛋白酶中的任一种都不一样。

[0065] 出乎意料的是,现已发现,虽然到目前为止WX-UK1被认为是用于治疗实体肿瘤的潜在抗肿瘤、抗转移剂,但其在治疗胰蛋白酶驱动的炎性疾病方面具有潜在用途,包括但不限于胰腺炎、胃炎、炎性肠病、肠易激综合征、炎性肺病和炎性血管病,均是非癌性适应症。

[0066] 现已发现,WX-UK1与胰蛋白酶-2之间的缔合速率比WX-UK1与uPA(先前已知的WX-UK1的靶标)之间的缔合速率快。此外,现已通过药物结合动力学研究发现,WX-UK1与胰蛋白酶-2之间的解离速率比WX-UK1与uPA之间的缔合速率慢。

[0067] 现已发现,WX-UK1与胰蛋白酶-3之间的缔合速率比WX-UK1与uPA(先前已知的WX-UK1的靶标)之间的缔合速率快。此外,现已通过药物结合动力学研究发现,WX-UK1与胰蛋白酶-3之间的解离速率比WX-UK1与uPA之间的缔合速率慢。

[0068] 在一个实施方案中,此类解离特征可能提供对选择性和毒性问题的更大控制,因为缓慢的解离通常与高结合亲和力相关,并且WX-UK1可能显示出明显的靶标选择性和广泛的治疗窗口。相反,由于WX-UK1与附带靶标的潜在亲和力较低,因此它也可能更快地与不期望的不良事件介导的靶标解离。在此类情况下,药物主要靶标复合物的持续时间将比不期望复合物的持续时间长,使得药物的有益作用可能持续超过不良事件。

[0069] 通过发现胰蛋白酶-2和胰蛋白酶-3是WX-UK1的高亲和力靶标,据信与已被教导用于治疗癌症的WX-UK1(或其前药WX-671)的剂量相比,可能需要更低剂量的WX-UK1或其前药WX-671来治疗胰蛋白酶驱动的炎性疾病。

[0070] 在一个实施方案中,当治疗患者胰蛋白酶驱动的炎性疾病时,WX-671与其他药物共同施用以增强治疗功效。在一个实施方案中,当治疗患者胰蛋白酶驱动的炎性疾病时,WX-UK1与其他药物共同施用以增强治疗功效。

[0071] 人胰蛋白酶-2和人胰蛋白酶-3

[0072] 胰蛋白酶通常被认为是在上胃肠道中释放的消化酶。已从人胰腺中克隆了三种胰蛋白酶亚型:用于阳离子胰蛋白酶的PRSS1、用于阴离子胰蛋白酶的PRSS2和用于中胰蛋白酶的PRSS3。虽然传统上被认为是胰酶,但不同形式的胰蛋白酶也可在由多种不同细胞类型(诸如神经元、上皮细胞和内皮细胞)合成的其他组织中释放。具体地,中胰蛋白酶在衍生自

正常结肠粘膜 (NCM-460) 的上皮细胞系中表达。在炎性肠病 (IBD) 的动物模型的结肠腔洗液和结肠组织中检测到胰蛋白酶样活性的显著增加。与健康个体中检测到的活性相比, 从 IBD 患者组织活检中收集的数据示出与胰蛋白酶样酶类似的丝氨酸蛋白酶活性增加。这些结果强烈表明肠胰蛋白酶活性不受控制地增加发生在慢性发炎的肠道中, 并且可能在 IBD 的发病机理中起作用。此外, 胰蛋白酶在胰腺中的过早激活导致通过自身消化的自我破坏, 并且因此导致胰腺炎。胰蛋白酶是蛋白酶激活受体 2 (PAR₂) 的有效激活因子, 是在整个体内广泛分布并且据信在炎症中起重要作用的 G 蛋白偶联受体。PAR 的特征在于独特的激活机制, 该机制涉及刺激受体的束缚配体的蛋白水解去掩蔽。

[0073] 人膜型丝氨酸蛋白酶 1 (MT-SP1) / 蛋白裂解酶

[0074] 出乎意料的是, 现已发现, 虽然到目前为止 WX-UK1 被认为是用于治疗实体肿瘤的潜在抗肿瘤、抗转移剂, 但其在治疗 MT-SP1 / 蛋白裂解酶驱动的炎症性疾病方面具有潜在用途, 包括但不限于炎性皮肤病和炎症血管疾病, 均为非癌性适应症。

[0075] 现已发现, WX-UK1 与蛋白裂解酶之间的缔合速率比 WX-UK1 与 uPA (先前已知的 WX-UK1 的靶标) 之间的缔合速率快。此外, 现已通过药物结合动力学研究发现, WX-UK1 与蛋白裂解酶之间的解离速率比 WX-UK1 与 uPA 之间的缔合速率慢。

[0076] 在一个实施方案中, 此类解离特征可能提供对选择性和毒性问题的更大控制, 因为缓慢的解离通常与高结合亲和力相关, 并且 WX-UK1 可能显示出明显的靶标选择性和广泛的治疗窗口。相反, 由于 WX-UK1 与附带靶标的潜在亲和力较低, 因此它也可能更快地与不期望的不良事件介导的靶标解离。在此类情况下, 药物主要靶标复合物的持续时间将比不期望复合物的持续时间长, 使得药物的有益作用可能持续超过不良事件。

[0077] 通过发现蛋白裂解酶是 WX-UK1 的高亲和力靶标, 据信与已被教导用于治疗癌症的 WX-UK1 (或其前药 WX-671) 的剂量相比, 可能需要更低剂量的 WX-UK1 或其前药 WX-671 来治疗蛋白裂解酶驱动的炎症性疾病。

[0078] MT-SP1 / 蛋白裂解酶是 II 型跨膜丝氨酸蛋白酶 (TTSP) 家族的成员, 其具有在宽泛范围的人体组织中检测到的所有 TTSP 的最广泛表达模式。已示出 MT-SP1 / 蛋白裂解酶将凝血级联与上皮信号传导和蛋白水解联系起来。蛋白裂解酶与凝血引发之间的联系可能有助于炎症中外源性途径激活的致病作用。研究示出, 蛋白裂解酶响应于炎症刺激而被激活。蛋白裂解酶裂解并激活尿激酶型纤溶酶原激活因子 (uPA)、肝细胞生长因子 (HGF) 和 PAR₂ 的原形式。

[0079] 蛋白裂解酶及其抑制剂肝细胞生长因子激活因子抑制剂 (HAI-1) 对于正常表皮屏障功能是必需的, 并且在此过程期间严格调节蛋白裂解酶活性。考虑到蛋白裂解酶在皮肤屏障形成中起的作用以及蛋白裂解酶活性的极其严格的调节, 不适当的升高可能对表皮分化产生不利影响, 并增强疾病表型或延长皮肤疾病的恢复。许多皮肤疾病伴有与炎症白细胞募集而导致细胞因子释放相关的炎症。

[0080] 此外, 最近的研究发现, 取决于其蛋白水解活性, MT-SP1 / 蛋白裂解酶通过激活内皮细胞中的 PAR₂ 来刺激促炎性细胞因子 IL-8 和 IL-6 的从头合成。此外, PAR₂ 已被确定为 MT-SP1 / 蛋白裂解酶诱导的 IL-8 表达的介体。MT-SP1 / 蛋白裂解酶在单核细胞中表达, 因此, 单核细胞 MT-SP1 / 蛋白裂解酶与内皮 PAR₂ 的相互作用可能导致炎症血管疾病, 包括但不限于动脉炎和动脉粥样硬化。

[0081] 最有可能的是,蛋白裂解酶涉及几种生理和病理生理功能,包括但不限于皮肤病、动脉炎、动脉粥样硬化、骨关节炎和某些病毒表面糖蛋白的激活。

[0082] 本发明化合物用于治疗肠易激综合征

[0083] 肠易激综合征(“IBS”)是指具有一组症状的功能性胃肠病,包括腹部疼痛和肠蠕动模式的变化,而没有任何潜在损伤的迹象。已示出胰蛋白酶-3在受刺激的肠上皮细胞和患有IBS的患者的组织中上调。这种上调通过蛋白酶激活受体-2依赖性机制,向人粘膜下肠神经元和小鼠感觉神经元发送信号,并在体内诱导内脏超敏反应。胰蛋白酶-3可用作患有IBS的患者上皮功能障碍的标志物。在一个实施方案中,在合适的时间段内向患有肠易激综合征的患者施用有效量的WX-UK1或其前药WX-671。在一个实施方案中,WX-UK1或其前药WX-671作为独立疗法单独施用。在一个实施方案中,WX-UK1或其前药WX-671与另一种药物共同施用。

[0084] 本发明化合物用于治疗胰腺炎

[0085] 胰腺消化酶作为失活的前体储存在胰腺腺泡细胞中,并且通常只有在到达小肠后才被激活。在正常情况下,消化酶的激活受到严格控制。胰蛋白酶原由胰腺以高浓度产生。在分泌到胃肠道中后,它们被肠激酶激活成为胰蛋白酶。胰蛋白酶是主要的消化酶,并且它们进一步激活其他胰酶。胰腺中的腺泡细胞合成并分泌胰蛋白酶抑制剂丝氨酸蛋白酶抑制剂Kazal 1型(SPINK 1),其用作防止胰蛋白酶在胰腺内激活的防护剂。胰蛋白酶原3是胰腺中次要的胰蛋白酶原亚型。与胰蛋白酶1和2相比,胰蛋白酶3降解胰腺SPINK1,这可导致过量的活性胰蛋白酶和胰腺炎的发展。胰蛋白酶原激活是决定胰腺炎严重程度的一个因素。在一个实施方案中,在合适的时间段内向患有胰腺炎的患者施用有效量的WX-UK1或其前药WX-671。在一个实施方案中,WX-UK1或其前药WX-671作为独立疗法单独施用。在一个实施方案中,WX-UK1或其前药WX-671与另一种药物共同施用。

[0086] 本发明化合物用于治疗肺损伤

[0087] 在一个实施方案中,在合适的时间段内施用有效量的WX-UK1或其前药WX-671能够停止或减轻与动物的肺损伤相关的症状。不受理论的约束,胰蛋白酶可通过激活补体系统并通过生成白细胞激活来诱导肺血管损伤。激活的白细胞及其分泌产物(包括氧自由基、蛋白酶和细胞因子)可随后在组织破坏中至关重要。胰蛋白酶和循环胰蛋白酶原的激活导致胰腺炎相关性肺损伤(PALI)。急性肺损伤(ALL)是肺中积液的病症。这使得难以将足够的氧气带入血流和重要器官中。急性呼吸窘迫综合征(ARDS)是ALI的一个示例,其特征在于肺广泛发炎。在肺中,胰蛋白酶不仅通过引发基质降解的蛋白水解级联还通过促炎作用诱导组织损伤。激活的胰蛋白酶会损伤肺脉管系统并增加内皮渗透性。在先前的实验室实验中,已示出胰蛋白酶导致肺脉管系统中的白细胞淤滞,并且因此激活的胰蛋白酶可增强肺微循环中的血管内凝血。在验尸研究中,已示出患有急性胰腺炎的患者在包括肺的不同组织中具有血管内纤维蛋白血栓。胰蛋白酶能够直接激活不同的补体因子,这可刺激细胞溶解和趋化性白细胞。已示出,补体会产生ARDS,从而增加发生呼吸功能不全的可能性。在一个实施方案中,在合适的时间段内向患有肺损伤的患者施用有效量的WX-UK1或其前药WX-671。在一个实施方案中,WX-UK1或其前药WX-671作为独立疗法单独施用。在一个实施方案中,WX-UK1或其前药WX-671与另一种药物共同施用。

[0088] 可使用相关的纯化丝氨酸蛋白酶和适当的合成底物来确定本发明化合物作为人

丝氨酸蛋白酶抑制剂的效果。可在不存在和存在本发明化合物的两种情况下测量相关丝氨酸蛋白酶对生色底物或荧光底物的水解速率。测定可在室温或37℃下进行。底物的水解导致氨基三氟甲基香豆素 (AFC) 的释放,其通过测量在405nm激发下510nm处发射的增加进行荧光光谱监测。在存在抑制剂的情况下荧光变化速率的降低指示酶被抑制。此类方法是本领域的技术人员已知的。该测定的结果表示为抑制常数 K_i 。

[0089] 在一个实施方案中,对于80kg的患者,可将WX-UK1以约0.1mg/kg至约4.0mg/kg、约0.3mg/kg至约3.5mg/kg、约0.6mg/kg至约2.8mg/kg、约1.0mg/kg至约2.1mg/kg以及约1.1mg/kg至约1.6mg/kg的剂量静脉内施用给患者。静脉输注可经由中心导管或外周导管施用。可借助于输液泵以500ml/h的速率在2小时内施用1000ml的总体积。在一个实施方案中,WX-UK1输注可在合适的时间段内每周给药一次。在一个实施方案中,WX-UK1输注可在合适的时间段内每周给药两次。在一个实施方案中,WX-UK1输注可在合适的时间段内每周给药三次。在一个实施方案中,WX-UK1输注可在合适的时间段内每周给药四次。在一个实施方案中,WX-UK1输注可在合适的时间段内每周给药五次。

[0090] 根据本文所示的方面,已经确定化合物N- α -(2,4,6-三异丙基苯基磺酰基)-3-脒基-(L)-苯丙氨酸4-乙氧基羰基哌嗪 (“WX-UK1”) 的高亲和力靶标对健康和疾病具有重要影响,并且指示了WX-UK1在治疗人炎性血管疾病中的重要用途。在本申请的提交日期之前,公开了施用WX-UK1以治疗(尤其是)癌症。然而,WX-UK1尚不用于治疗血管炎,包括但不限于动脉炎和动脉粥样硬化。在一个实施方案中,如下文详述的WX-UK1或其前药WX-671可用于治疗动脉炎。在一个实施方案中,WX-UK1或其前药WX-671可用于治疗动脉粥样硬化。

[0091] PAR₂被促炎性蛋白酶(诸如胰蛋白酶)激活,并且也被TF依赖性FVII/Xa/蛋白裂解酶途径激活。在一个实施方案中,据信WX-UK1抑制人胰蛋白酶和人蛋白裂解酶裂解人蛋白酶激活受体-2 (PAR₂) 的细胞外N末端结构域,并且因此PAR₂不能被激活。在一个实施方案中,通过阻断PAR₂的激活,减轻或终止了炎症过程。在一个实施方案中,据信WX-UK1抑制人胰蛋白酶和人蛋白裂解酶,并继而阻断PAR₂依赖性机制,该机制负责向感觉神经元(诸如初级传入神经和粘膜下肠神经元)发送信号,从而导致神经源性炎症和疼痛减少。根据本文所示的方面,WX-UK1或其前药WX-671可用作治疗PAR₂病的治疗活性化合物。

[0092] 根据本文所示的方面,已经确定化合物N- α -(2,4,6-三异丙基苯基磺酰基)-3-脒基-(L)-苯丙氨酸4-乙氧基羰基哌嗪 (“WX-UK1”) 的高亲和力靶标对健康和疾病具有重要影响,并且指示了WX-UK1在治疗人 α -1抗胰蛋白酶缺乏症 (A1AD) 中的重要用途。A1AD是一种遗传病,其导致最丰富的人丝氨酸蛋白酶抑制剂 α -1抗胰蛋白酶 (A1AT) 产生缺陷,从而导致血液和肺中的A1AT活性降低并且在肝细胞中沉积过多的异常A1AT蛋白。在本申请的提交日期之前,公开了施用WX-UK1以治疗(尤其是)癌症。然而,WX-UK1尚不用于治疗A1AD。在一个实施方案中,WX-UK1或其前药WX-671可用于治疗未满足医疗需求的人A1AD。

[0093] 在一个实施方案中,用于需要胰蛋白酶-3抑制剂来治疗疾病的患者的试剂盒包括一个或多个容器,该一个或多个容器包括多种固体形式的N- α -(2,4,6-三异丙基苯基磺酰基)-3-脒基-(L)-苯丙氨酸4-乙氧基羰基哌嗪 (“WX-671”),其中固体形式包括治疗有效量的WX-671以便治疗患者。在一个实施方案中,固体形式还包括药学上可接受的赋形剂或载体的药物组合物的一部分。在一个实施方案中,药物组合物是单一单位剂型。在一个实施方案中,药物组合物是片剂。在一个实施方案中,药物组合物是胶囊。

[0094] 在一个实施方案中,用于需要胰蛋白酶-2抑制剂来治疗疾病的患者的试剂盒包括一个或多个容器,该一个或多个容器包括多种固体形式的N- α -(2,4,6-三异丙基苯基磺酰基)-3-羟基脒基-(L)-苯丙氨酸4-乙氧基羰基哌嗪(“WX-671”),其中固体形式包括治疗有效量的WX-671以便治疗患者。在一个实施方案中,固体形式还包括药学上可接受的赋形剂或载体的药物组合物的一部分。在一个实施方案中,药物组合物是单一单位剂型。在一个实施方案中,药物组合物是片剂。在一个实施方案中,药物组合物是胶囊。

[0095] 实施例

[0096] 实施例1

[0097] 生物信息学分析

[0098] 如图2中示意性地示出,选择过程的起点是人蛋白酶体的~200胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶,它们中的大多数在稳态和疾病中起关键作用,并且具有用于由WX-UK1抑制的不同效力的所有潜在靶标。迭代过程的应用导致潜在的高亲和力靶标的选择逐渐减少。通过对具有胰蛋白酶样特异性的所有人胰凝乳蛋白酶样丝氨酸蛋白酶的序列数据库和可用结构信息进行全面分析,进行了循环迭代过程,其中通过测量所选蛋白酶的WX-UK1抑制来测试基于结构和序列的WX-UK1抑制标准,如图3所示阐明了关键的结构组分。在这些中选择用于进行生化分析的子集,该子集基于来自可能的WX-UK1:蛋白酶复合物的计算3D结构模型的检查和聚焦于相互作用表面上残基的序列对比,对可能的结合进行排序。制备所选蛋白酶的样品,相对于由WX-UK1-1抑制的抑制常数(K_i)和相互作用的亲和力(K_d)进行生物化学表征。 K_i 值通过一系列酶活性测定来确定,其中在存在白蛋白的情况下,在存在增加的WX-UK1浓度的情况下通过生色底物在37°C下的代谢周转来监测蛋白酶活性。在可能的情况下,使用现有技术的表面等离子体共振(BIACORE)来测定结合的解离常数 K_d ,从而监测缔合的实时动力学和解离速率常数,均在25°C下进行。

[0099] 实施例2

[0100] WX-UK1对各种人蛋白酶的抑制剂常数

[0101] 通过测量WX-UK1对生色底物的人丝氨酸蛋白酶裂解的影响来确定 K_i 值。为了测定 K_i 值,在添加生色底物以引发反应之前,将浓度系列的WX-UK1与目标人丝氨酸蛋白酶预先温育。使用线性回归根据斜率确定反应速度,并将其归一化为非抑制性反应的速度。针对WX-UK1浓度绘制归一化活性,然后使用方程式1通过非线性回归获得 K_i 值。

[0102] 方程式1:
$$\frac{v_i}{v_0} = \frac{K_i \cdot KM + [S]}{(K_i \cdot [S]) + KM \cdot (K_i + [I])}$$

[0103] KM 参数通过标准米氏(Michaelis-Menten)动力学获得。将丝氨酸蛋白酶添加到合适浓度的底物系列中,其浓度足够高以产生实验性 V_{max} 值。针对底物浓度绘制后续反应速度,然后使用米氏方程式(2)得出 KM 值。

[0104] 方程式2:
$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

[0105] 所有实验均于37°C下在HBS(30mM Hepes, pH=7.4; 150mM NaCl; 0.5% BSA)中进行至少三次。在405nm下以2读数/分钟的速度监测反应至少45分钟。由于WX-UK1保持在100% DMSO中,因此所有实验均包括不受抑制的DMSO对照,以排除不期望的DMSO对蛋白酶活性的影响。由于WX-UK1在水中的溶解性差,最大的最终WX-UK1浓度为250 μ M。底物浓度保持较高,

以便使每次运行的代谢周转保持在10%左右。

[0106] WX-UK1抑制人胰蛋白酶-1

[0107] 图4是UK1活性相对于人胰蛋白酶-1抑制剂浓度的图。

[0108] WX-UK1抑制人胰蛋白酶-2

[0109] 图5是UK1活性相对于人胰蛋白酶-2抑制剂浓度的图。

[0110] WX-UK1抑制人胰蛋白酶-3

[0111] 图6是UK1活性相对于人胰蛋白酶-3抑制剂浓度的图。

[0112] WX-UK1抑制人MT-SP1/蛋白裂解酶

[0113] 图7是UK1活性相对于人蛋白裂解酶(催化结构域)抑制剂浓度的图

[0114] 如上所述,对人蛋白酶体的~200胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶进行了生物信息学分析,它们中的大多数在稳态和疾病中起关键作用,并且是由WX-UK1抑制的所有潜在靶标。在这些中我们选择了进行生化分析的子集,该子集基于来自可能的WX-UK1:蛋白酶复合物的计算3D结构模型的检查和聚焦于相互作用表面上残基的序列对比,对可能的结合进行排序。基于各种标准缩小子集的选择范围。

[0115] 下表1列出了迄今该子集中蛋白酶中的一些的 K_i 值。

[0116] 表1: K_i 值

	蛋白酶	K_i (μ M)
		平均值 $\pm$ 标准偏差(n)
[0117]	人胰蛋白酶-3	0.019 $\pm$ 0.004 (6)
	人胰蛋白酶-2	0.075 $\pm$ 0.003 (6)
	人胰蛋白酶-6	0.10 $\pm$ 0.01 (4)
	人胰蛋白酶-1	0.19 $\pm$ 0.01 (3)
	人蛋白裂解酶-1	0.20 $\pm$ 0.01 (3)

	人 HATL5	0.7±0.1 (3)
	人肠激酶	0.71±0.04 (4)
	人凝血酶	0.8±0.1(3)
	人 uPA	0.9±0.1(3)
	人 FXIa	0.9±0.1(6)
	人双链 tPA	1.4±0.1(3)
	人 HAT	1.5±0.1(6)
	人纤溶酶	2.4±0.3(4)
	人 FIXa	2.5±0.2(3)
	人 FXa	2.6±0.4(3)
	人 C1s	3.1±0.4(3)
	人激活蛋白 C	3.9±0.2(3)
[0118]	人 Hepsin	4.3±0.5(5)
	人蛋白裂解酶-2	6.4±0.3(4)
	人脊骨蛋白	7.7±0.5(3)
	人类胰蛋白酶-ε	11±2(3)
	人 DESC-1	13±2(3)
	人 PRSS27 (IC50)	19±4(3)
	人血浆激肽释放酶	26±1(3)
	人 HGFA	28±5(4)
	人颗粒酶 A	>250 (3)
	人激肽释放酶-8	>250 (3)
	人激肽释放酶-1	>250 (3)
	人激肽释放酶-11	>250 (3)
	人前列腺蛋白(IC50)	>250 (3)

	蛋白酶	Ki (μM)
		平均值±标准偏差(n)
	大鼠 uPA	0.4±0.1 (3)
	牛阳离子胰蛋白酶-1	0.5±0.1 (6)
[0119]	犬 uPA	0.7±0.1 (4)
	兔 uPA	0.8±0.1 (3)
	人 uPA (培养基中的 Q192A)	2.9±0.1 (3)
	人 uPA (培养基中的 H99A)	14±0.4 (3)
	小鼠 uPA	45±6 (3)

[0120] 实施例3

[0121] WX-UK1与各种人蛋白酶的结合动力学

[0122] 表面等离子体共振 (SPR) 是由入射光刺激的传导电子在负介电常数材料与正介电常数材料之间的界面处的共振振荡。SPR是用于测量材料在平面金属 (通常为金或银) 表面或金属纳米颗粒的表面上的吸附的许多标准工具的基础。这是许多基于颜色的生物传感器应用和不同的芯片实验室传感器背后的基本原理。当表面等离子体波与局部颗粒或不规则物体 (诸如粗糙表面) 相互作用时, 能量的一部分可作为光重新发射。可从各个方向在金属膜后面检测到发射光。

[0123] 当必须确定两个配体的亲和力时, 必须确定结合常数。它是产品商的平衡值。也可

使用动态SPR参数来找到该值,并且与在任何化学反应中一样,它是缔合速率除以解离速率。为此,将诱饵配体固定在SPR晶体的葡聚糖表面上。通过微流系统,将带有猎物分析物的溶液注入诱饵层上方。当猎物分析物结合诱饵配体时,观察到SPR信号的增加(以响应单位RU表示)。在期望的缔合时间后,将不含猎物分析物的溶液(通常为缓冲液)注入微流体中,该微流体解离诱饵配体与猎物分析物之间的结合复合物。现在,随着猎物分析物从诱饵配体上解离,可观察到SPR信号的减少(以共振单位RU表示)。通过这些缔合速率(“结合速率”, k_a)和解离速率(“离解速率”, k_d),可计算出平衡解离常数(“结合常数”, K_D)。

[0124] 实际的SPR信号可通过入射光与金层的表面等离子体的电磁“耦合”来解释。该等离子体可受到跨金溶液界面的仅几纳米的层(即诱饵蛋白质和可能的猎物蛋白质)的影响。结合使反射角度变化。

[0125] Biacore专门测量生物分子相互作用,包括蛋白质-蛋白质相互作用、小分子/片段-蛋白质相互作用。其技术通常不仅用于测量结合亲和力,而且还用于测量动力学速率常数和热力学。该技术基于SPR。基于SPR的生物传感器可用于确定活性浓度以及根据亲和力和化学动力学两者表征分子相互作用。

[0126] 进行以下实验以确定WX-UK1与各种丝氨酸蛋白酶的结合动力学:

[0127] Biacore的缓冲液组成和稀释方法:

[0128] • 固定缓冲液(0.5L):

[0129] -30mM HEPES pH 7.4

[0130] -140mM NaCl

[0131] • 运行缓冲液(0.5L):

[0132] -30mM HEPES pH 7.4

[0133] -140mM NaCl

[0134] -0.5%BSA

[0135] -0.1%Tween20

[0136] -0.05%DMSO(稍后添加)

[0137] • 稀释:

[0138] -在添加DMSO之前移除50mL运行缓冲液(称为“-DMSO”)

[0139] -将225 μ L DMSO添加到运行缓冲液中

[0140] -移除具有DMSO的50mL运行缓冲液(称为“+DMSO”)

[0141] -浓度系列为4 μ M-0 μ M的WX-UK1储备液:

[0142] -制备在100%DMSO中的8mM WX-UK1储备液

[0143] -使用“-DMSO”储备液稀释至4 μ M。之后,所有稀释均使用“+DMSO”缓冲液进行

[0144] 图8是示出人uPA的设置示意图,并且图9示出了WX-UK1与人uPA结合的结合动力学。

[0145] 图10是示出人胰蛋白酶-1、人胰蛋白酶-3和人MT-SP1/蛋白裂解酶的设置示意图。图11示出了WX-UK1与胰蛋白酶-1结合的结合动力学。比较图9和图11,我们看到WX-UK1与胰蛋白酶-1的缔合速率是uPA的10倍,并且与胰蛋白酶-1的解离速率是uPA的1/2。图12示出了WX-UK1与人胰蛋白酶-3结合的结合动力学。图9和图12的比较示出,WX-UK1与胰蛋白酶-3的缔合速率是uPA的3倍,并且与胰蛋白酶-3的解离速率是uPA的1/100。图13示出了WX-

UK1与人MT-SP1/蛋白裂解酶结合的结合动力学。图9和图13的比较示出,WX-UK1与MT-SP1/蛋白裂解酶的缔合速率是uPA的3倍,并且与MT-SP1/蛋白裂解酶的解离速率是uPA的1/10。

[0146] 本领域的技术人员在仅仅使用常规实验方法的情况下就将认识到或者能够确定本文所述的化合物、组合物及其使用方法的许多等同形式。此类等同形式被认为在本公开的范围之内并且被以下实施方案覆盖。

[0147] 本领域的技术人员将理解的是,在不脱离如广泛描述的本发明的范围的情况下,可对如具体实施方案中所示的本发明作出多种变型和/或修改。因此,本发明的实施方案在所有方面均被认为是例示性而非限制性的。

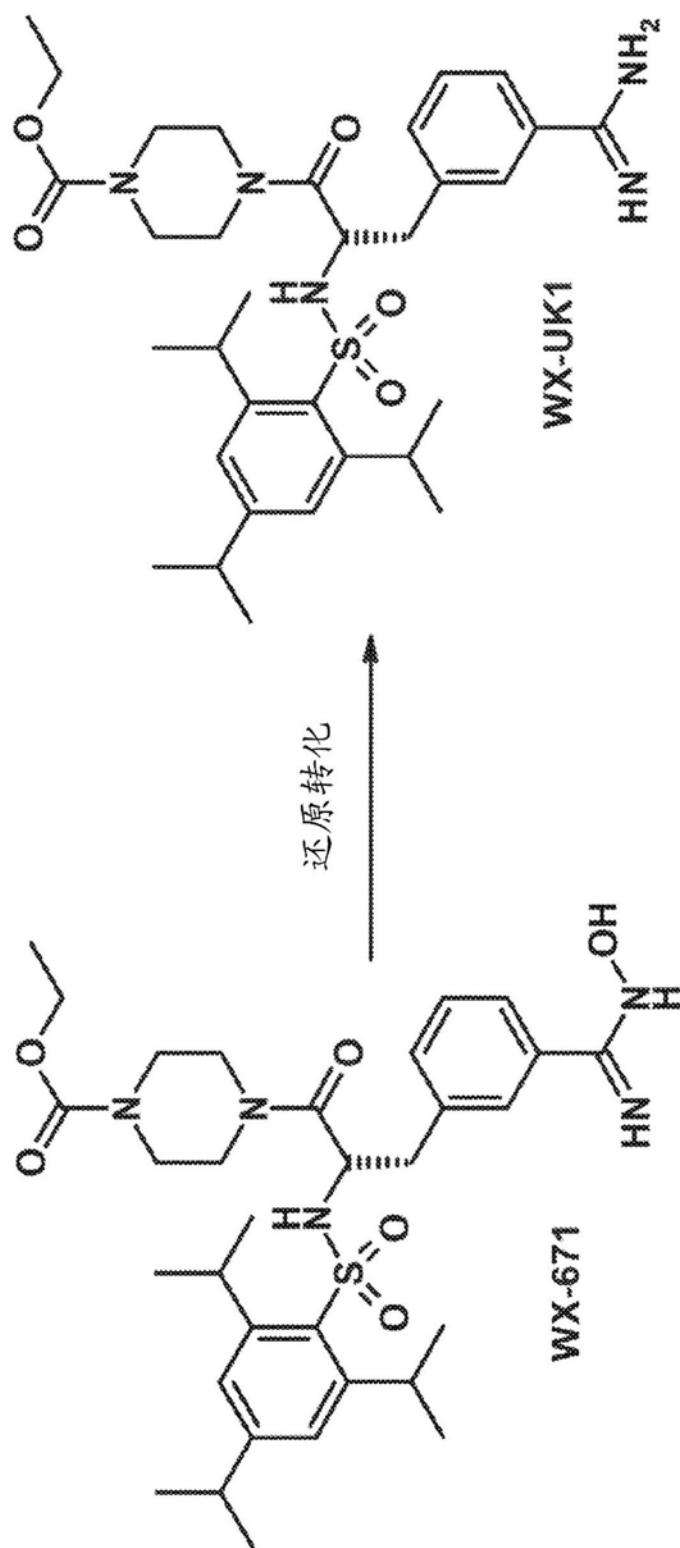


图1

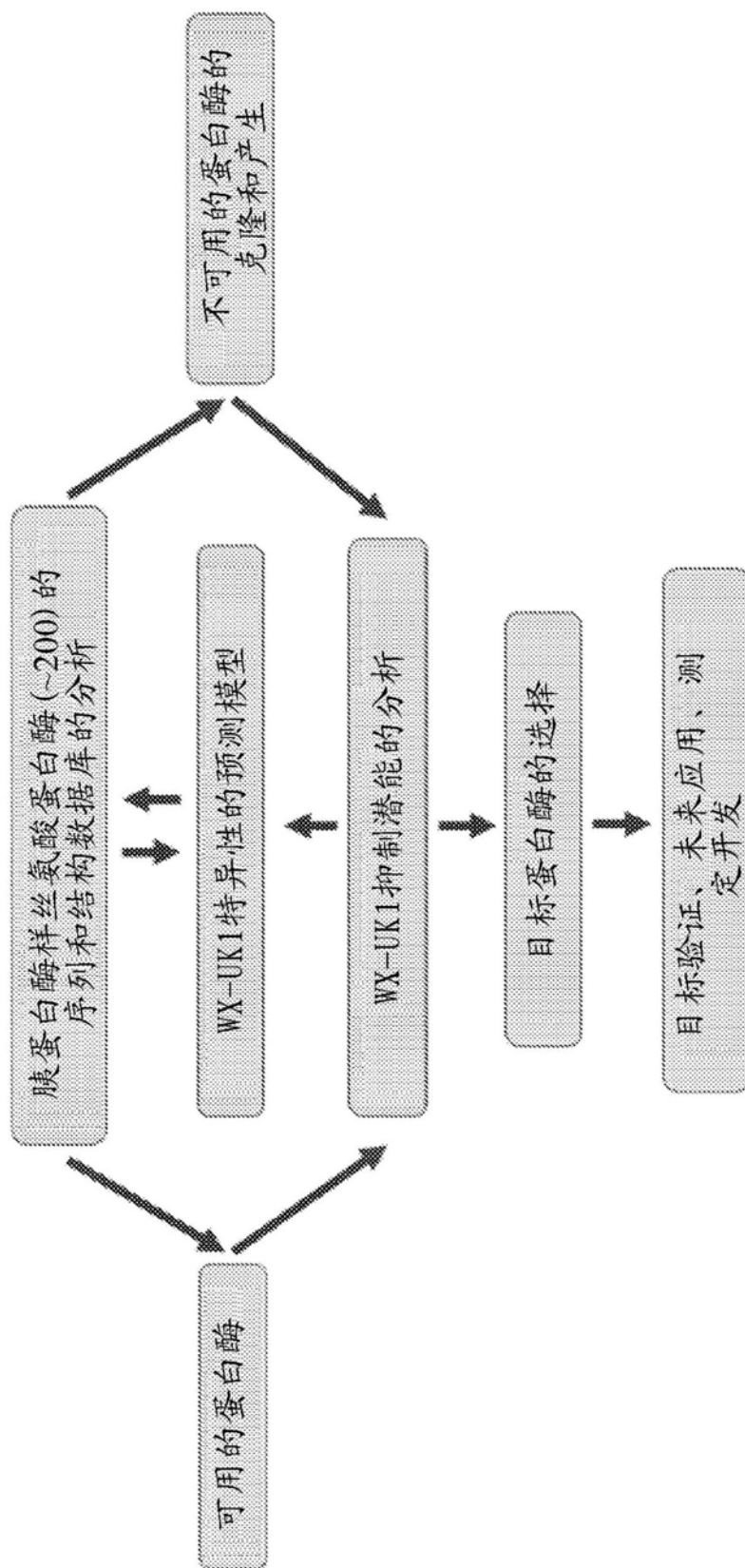


图2

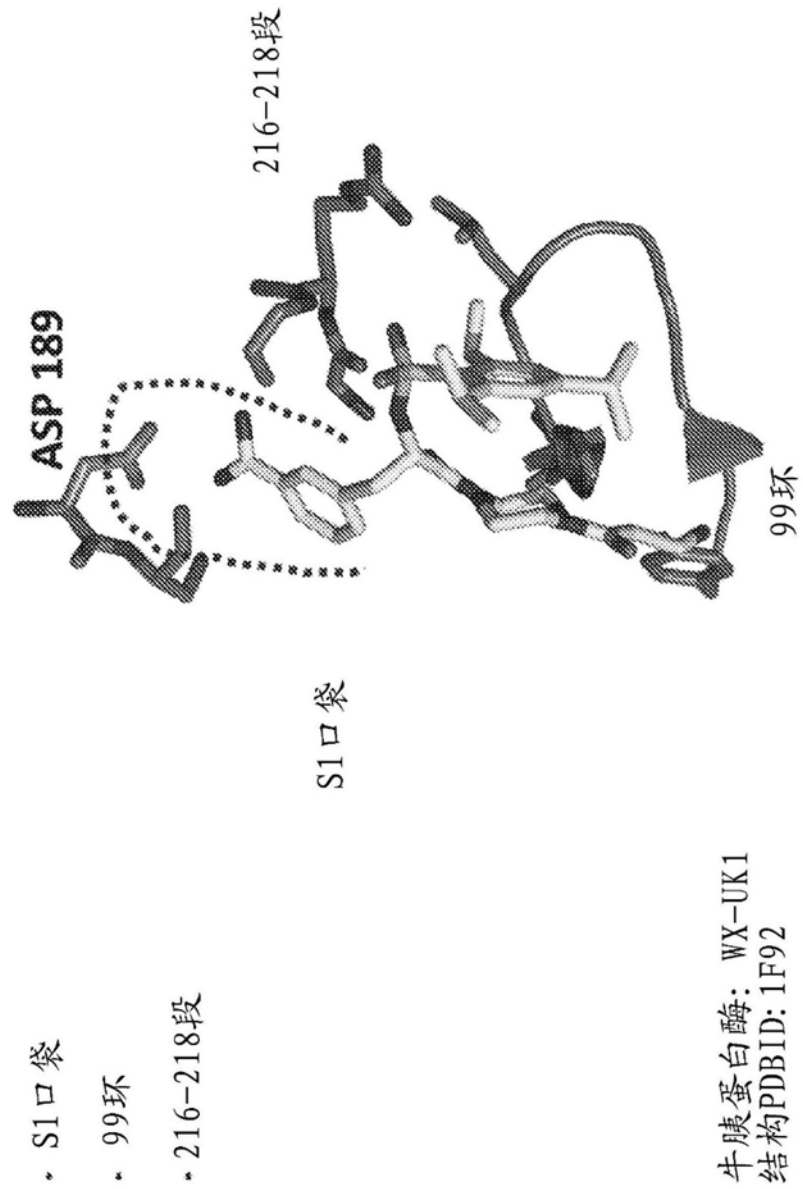


图3

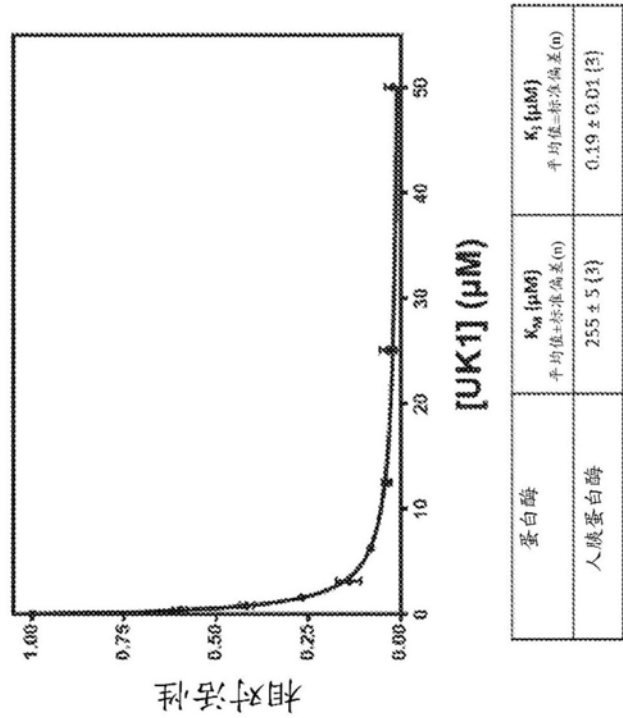


图4

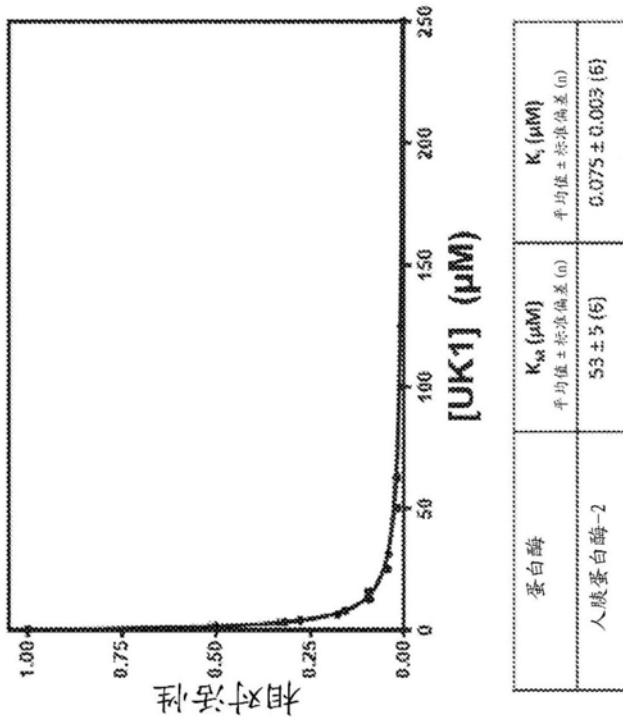


图5

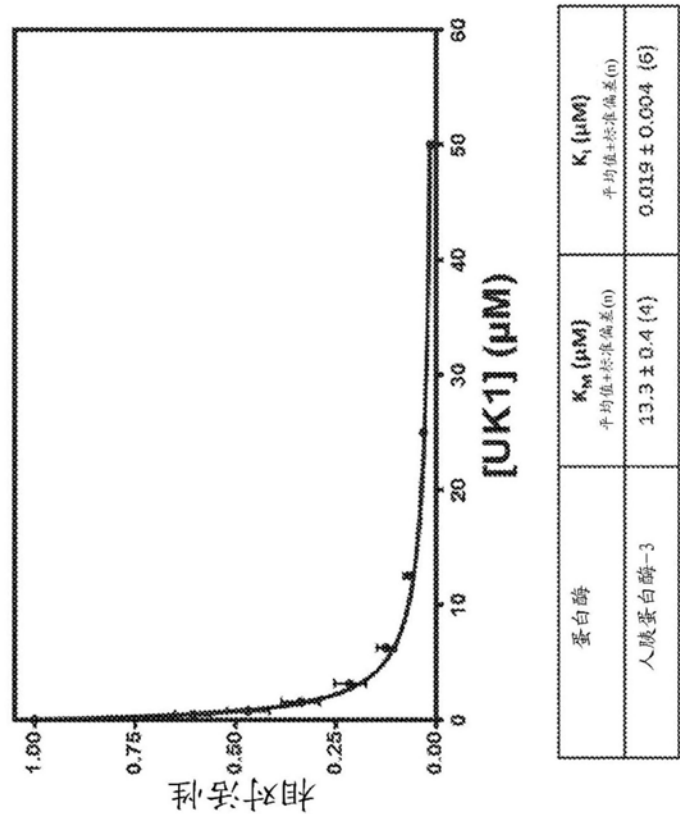


图6

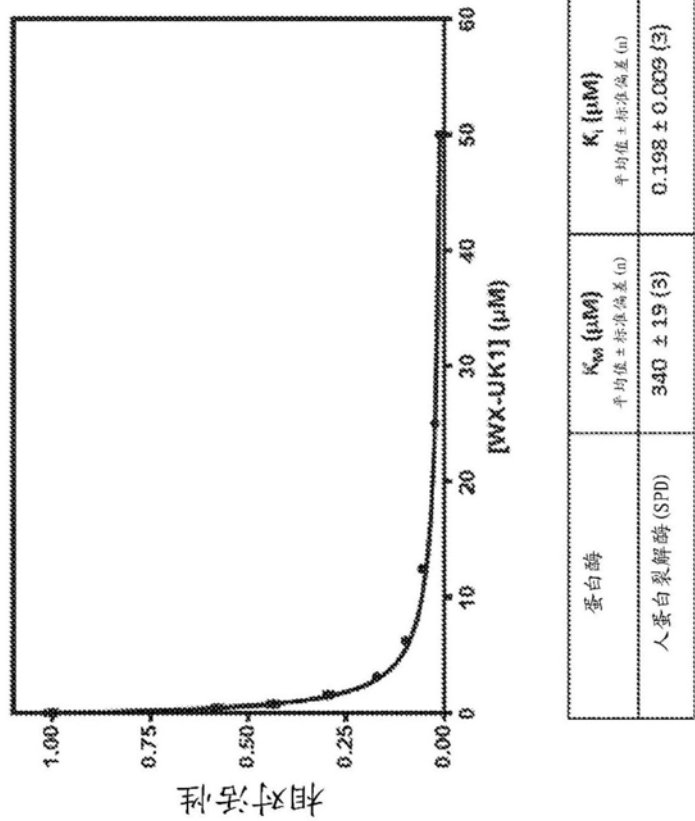
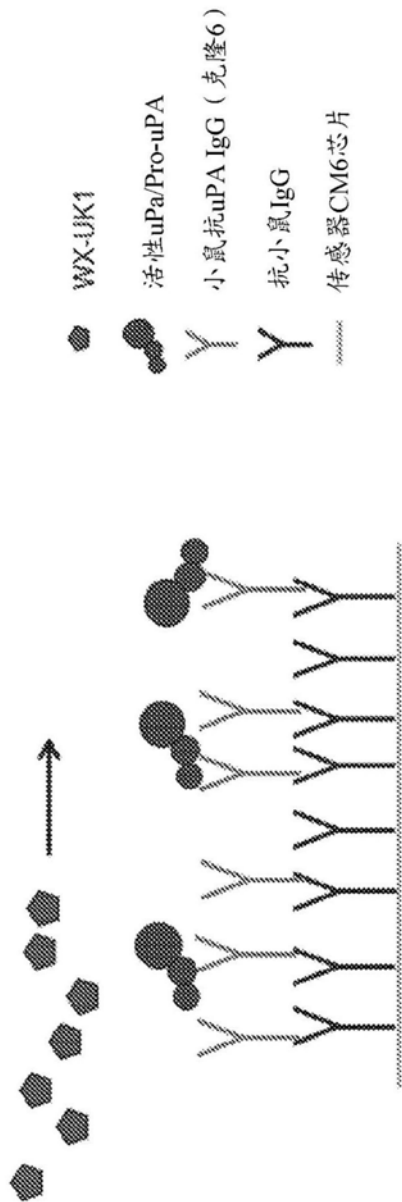


图7



- 固定：将小鼠IgG抗体(150,000Da)固定在芯片上，其中最终响应单位为大约8000RU
- 捕获1（抗uPA克隆6 (150,000Da), 200μg/mL）：大约950RU
- 捕获2（活性uPA (54,000Da), 5μg/mL）：大约240RU
- 分析物(WX-UK1 (668Da), 2μm-0.1μm): 最大响应=2RU
- 运行缓冲液: HBS+0.5% BSA+0.05% DMSO+0.1% Tween20, 温度: 25℃

图8

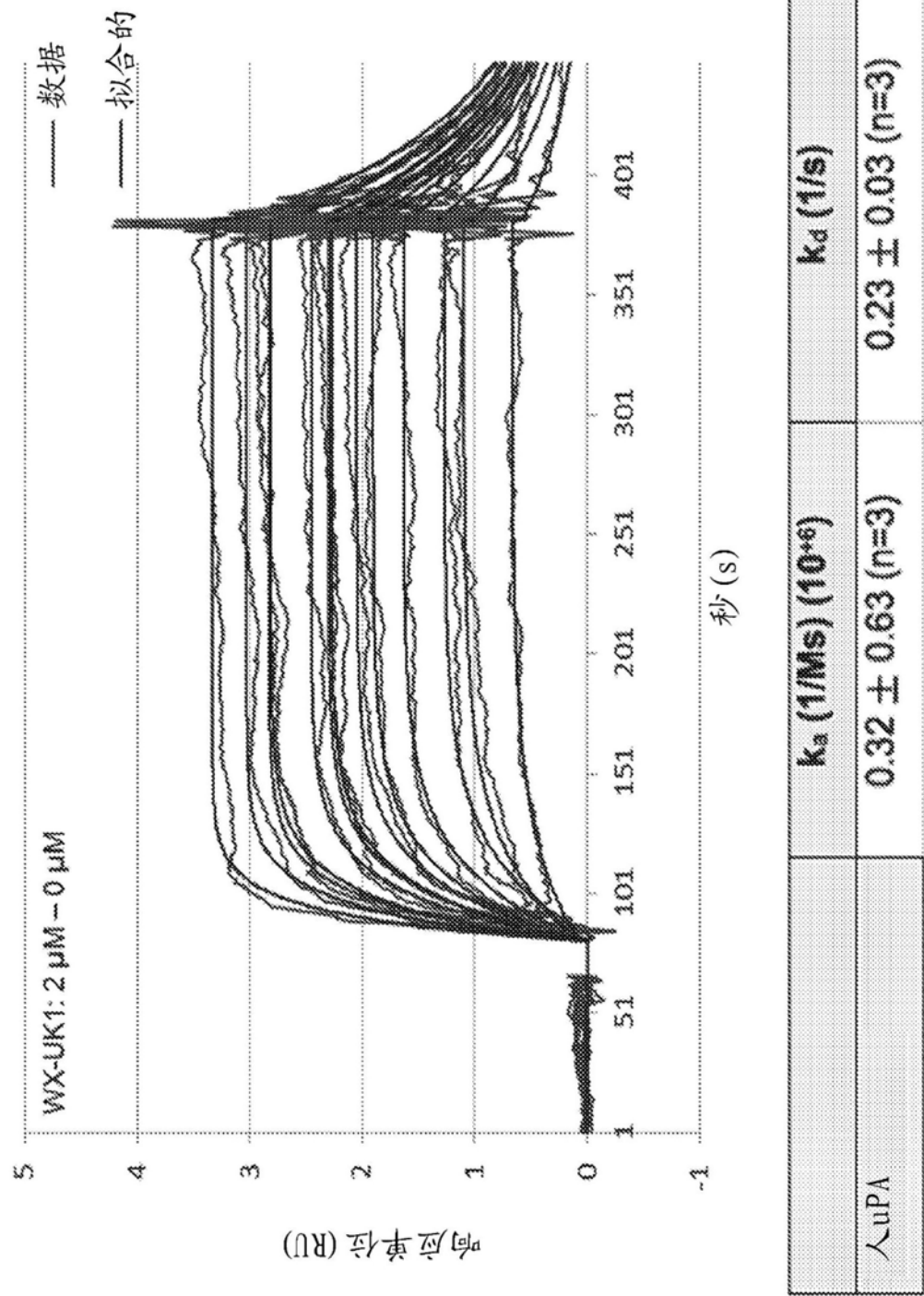


图9

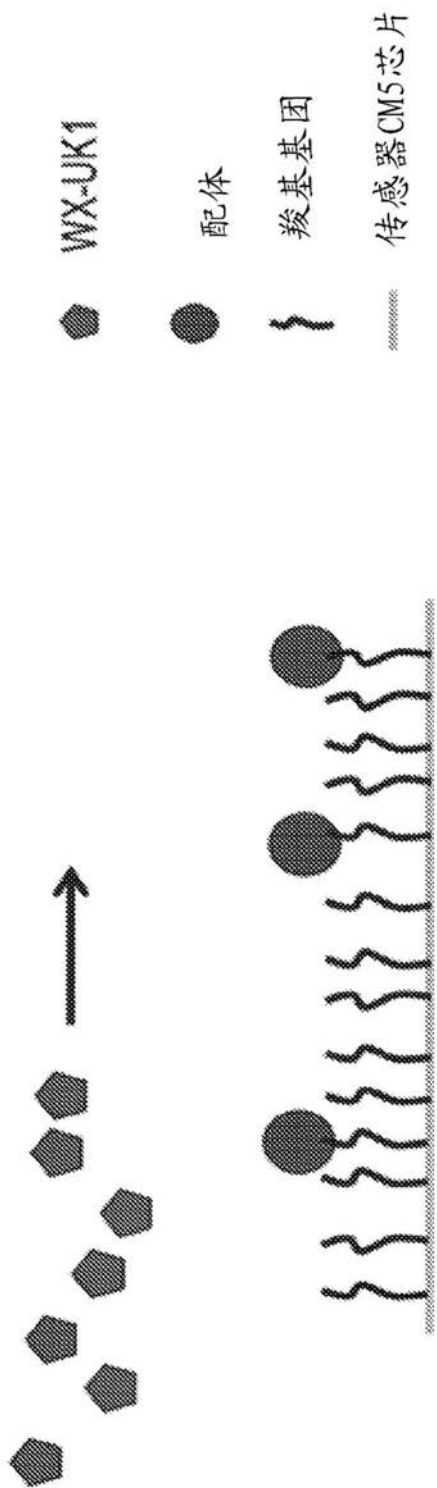


图10

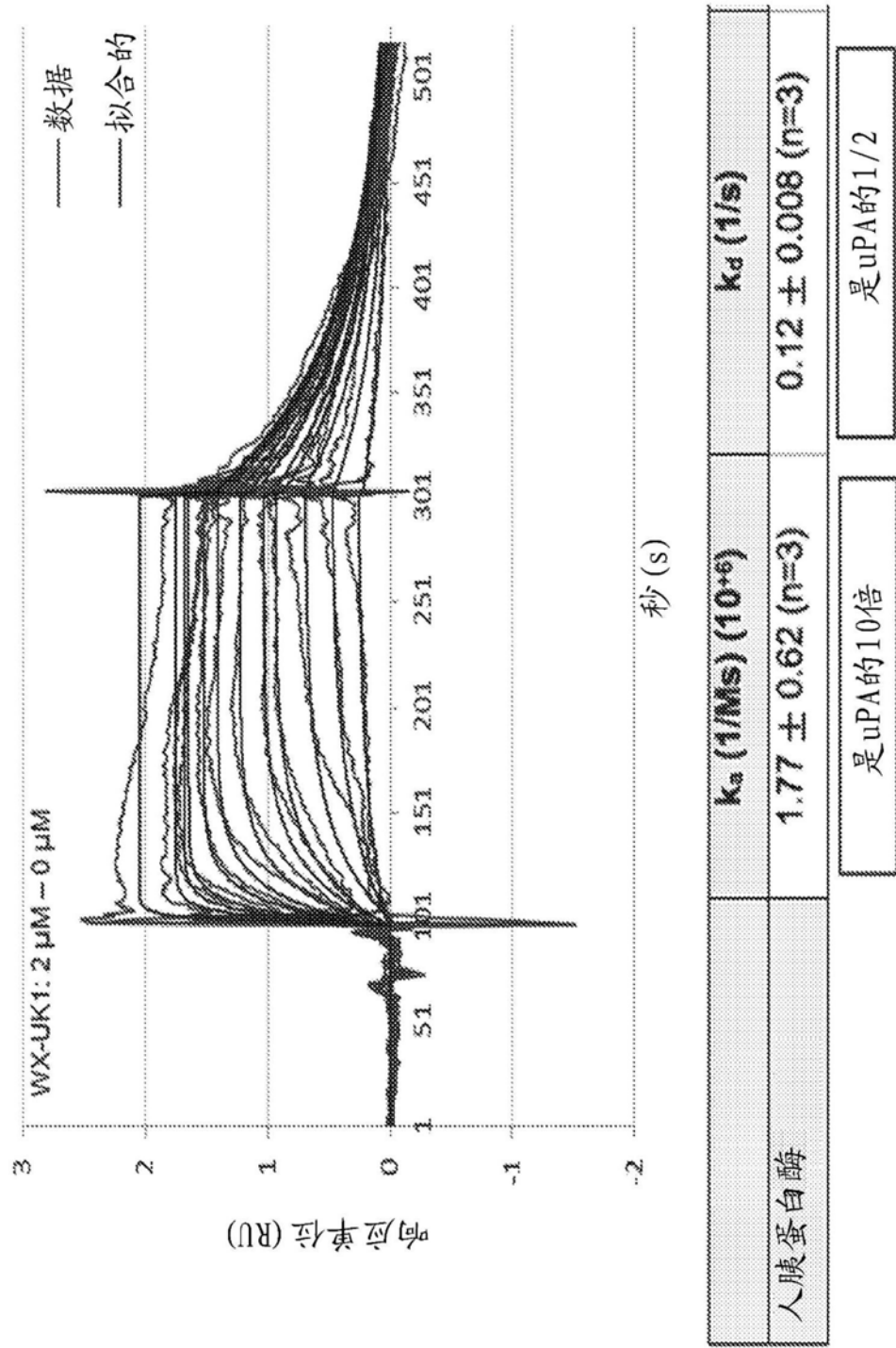


图11

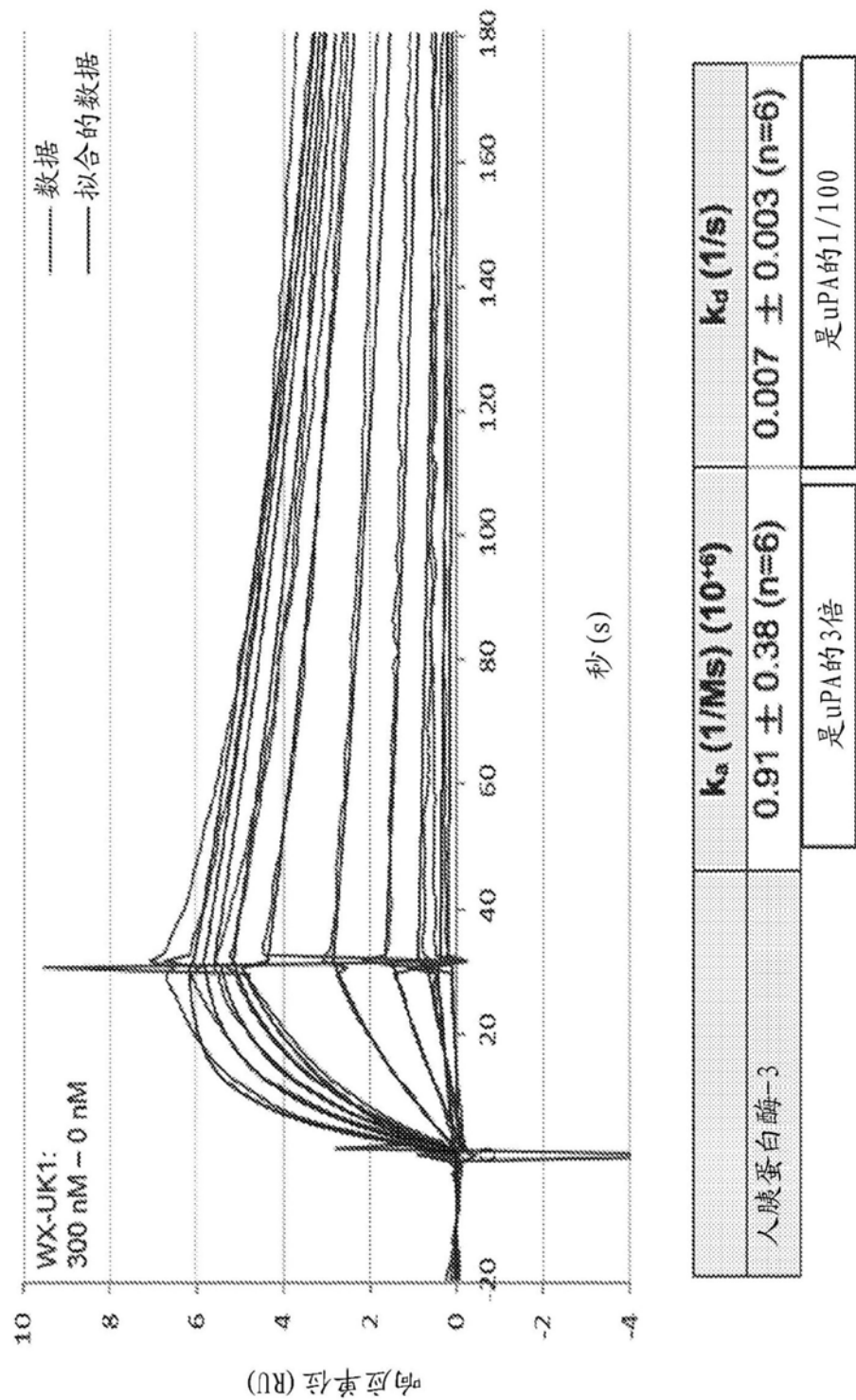


图12

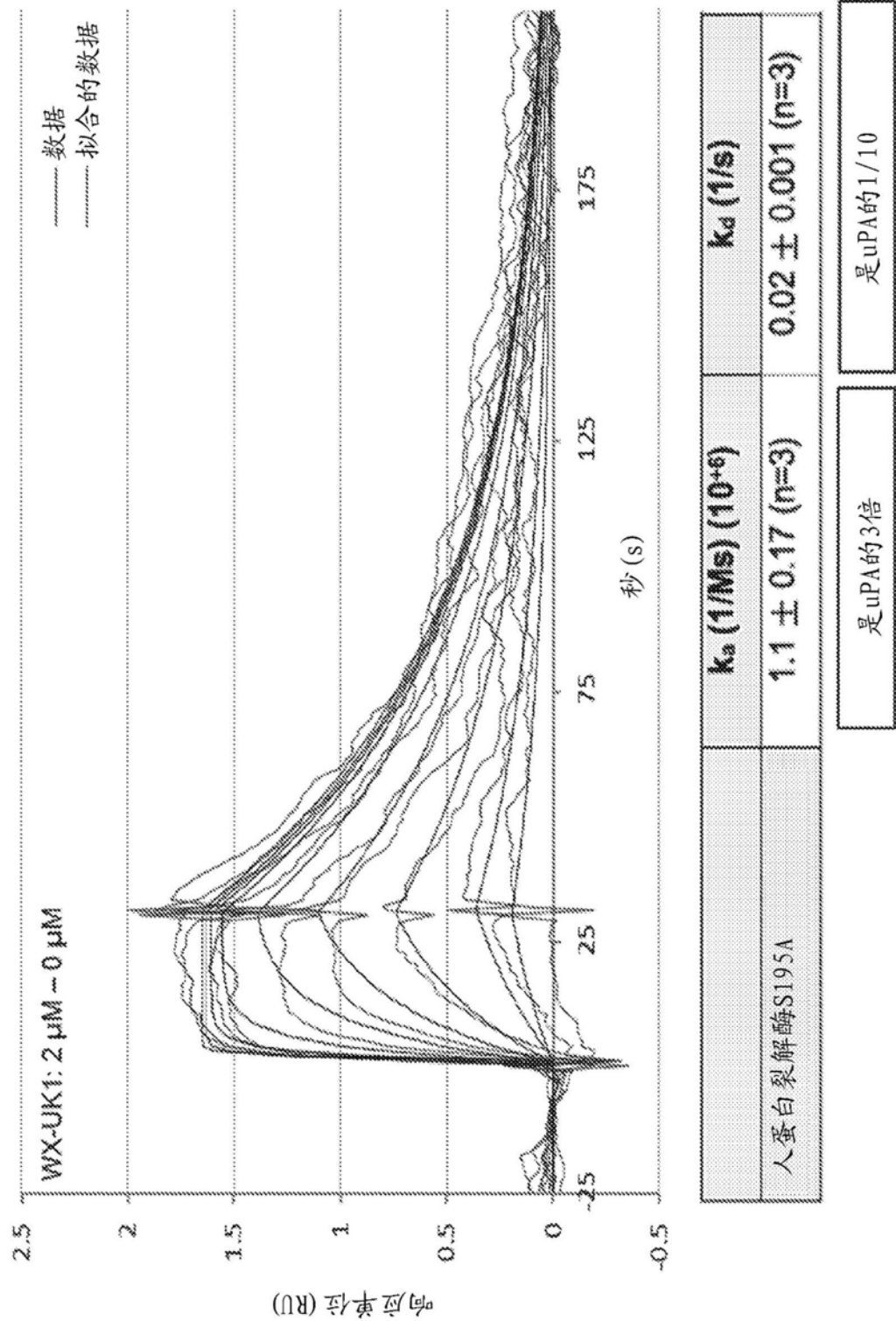


图13