

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 31/55 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03813413.6

[45] 授权公告日 2009 年 7 月 1 日

[11] 授权公告号 CN 100506231C

[22] 申请日 2003.5.27 [21] 申请号 03813413.6

[30] 优先权

[32] 2002. 6. 12 [33] US [31] 10/171,097

[86] 国际申请 PCT/US2003/016558 2003.5.27

[87] 国际公布 WO2003/105857 英 2003.12.24

[85] 进入国家阶段日期 2004.12.10

[73] 专利权人 坎莫森特里斯克斯公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 B·麦克马斯特

审查员 陈卫星

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 李 波 王景朝

权利要求书 2 页 说明书 28 页

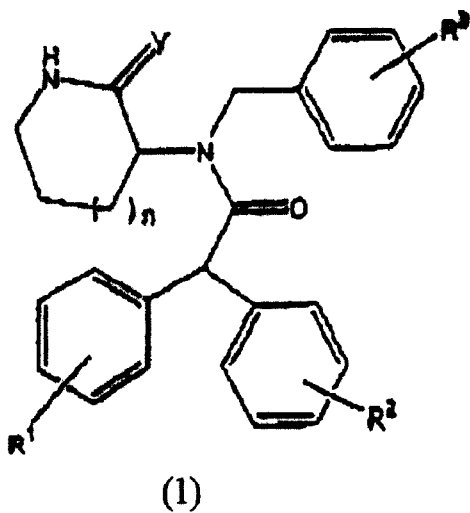
[54] 发明名称

抗炎组合物及其制药用途

[57] 摘要

本发明涉及包含活性化合物的药物组合物，其抑制趋化因子、MIP-1 α 和 RANTES 活性。本发明还涉及使用本药物组合物治疗炎性和免疫调节性紊乱和疾病的方法。

1. 一种组合物，包括药物可接受的载体和式(1)化合物：



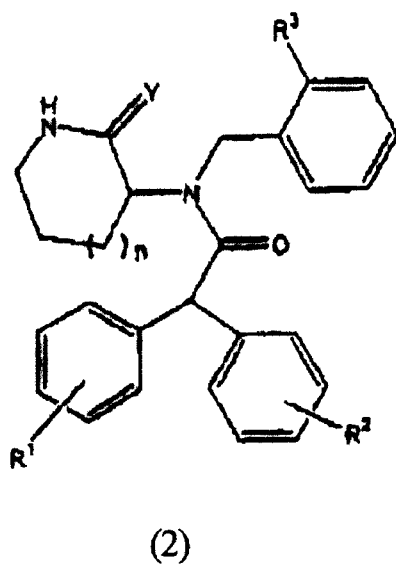
其中：

n 是 2；

Y 是氧或硫；

R^1 、 R^2 、和 R^3 分别独立地为氢或卤素。

2. 根据权利要求 1 所述的组合物，其中所述化合物是一种式(2)化合物：



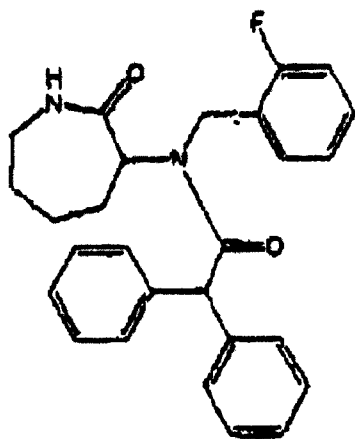
其中：

n 是 2；

Y 是氧或硫；并且

R^1 、 R^2 、和 R^3 分别独立地为氢或卤素。

3. 根据权利要求1的组合物, 其中 R^1 和 R^2 是氢。
4. 根据权利要求1的组合物, 其中 R^3 是卤素。
5. 根据权利要求4的组合物, 其中 R^3 是氯或氟。
6. 根据权利要求1的组合物, 其中 R^3 是氢。
7. 一种组合物, 包括药物可接受的载体和化合物 CCX-469:



CCX-469

8. 权利要求1或2的组合物在制备用于抑制趋化因子与 CCR1 受体结合的药物中的用途, 该趋化因子是指 MIP-1 α 或 RANTES。
9. 权利要求1或2的组合物在制备用于治疗炎症性疾病的药物中的用途。

抗炎组合物及其制药用途

联邦赞助研究或开发

防御高级研究项目代理(DARPA)基金 No.N65236-99-1-5420。

发明背景

本发明涉及包含活性化合物及其药物可接受的盐的药物组合物，其对于不同的趋化因子，例如 MIP-1 α 和 RANTES 与 CCR1 受体的结合具有抑制作用。本发明还涉及应用上述药物组合物治疗炎性和免疫调节性紊乱与疾病的方法。

人体健康有赖于身体发现、消灭外来的有可能侵占个体有用资源和/或诱发疾病的病原体的能力。免疫系统，其包括白细胞（白细胞(WBCs)：T 和 B 淋巴细胞，单核细胞，嗜酸性细胞，嗜碱性细胞，和中性粒细胞）、淋巴组织和淋巴管，是人体的防御系统。为了抵御感染，B 和 T 淋巴细胞在身体内循环，与抗原呈递细胞相互作用，检测病原体。一旦检测到侵入物，T 淋巴细胞聚集在感染部位，消灭病原体。趋化因子作为 T 淋巴细胞，中性粒细胞和巨噬细胞聚集和激活的分子指向标，标志病原体方位。

当保护人体免受病原体侵袭时，免疫系统也会产生故障。趋化因子发出不适当的信号将导致产生炎性紊乱，例如类风湿性关节炎，多发性硬化症及其他疾病。类风湿性关节炎中，骨关节中未调节的趋化因子吸引并活化浸润的巨噬细胞和 T-细胞。这些细胞的活动诱发滑膜细胞增殖，导致炎症以及最终的骨和软骨损耗(DeVries, Ran et al. 1999)。某些脱髓鞘性病例如多发性硬化症的一个标志就是趋化因子-介导的巨噬细胞和 T 细胞聚集至中枢神经系统(Kennedy 和 Karpus 1999)。聚集至移植物的破坏性 WBCs 的趋化因子涉及其随后的排异反应(DeVries, Ran et al.1999)。由于趋化因子在炎症和淋巴细胞发展过程中扮演了极其重要的角色，特异性操纵其活性的能力对于改善和阻断目前还没有令人满意的治疗方法的疾病将产生巨大的影响。另外，在没有昂贵的免疫抑制剂药物的全身和并发作用的情况下，移植排斥可能减至最小。

趋化因子，一组大于 40 的小肽(7-10 kD)，连接在 WBCs 表达的受体上，通过 G-蛋白-偶联的信号级联发出信号调节它们的化学趋化和化学刺激剂功

能。受体可能连接一个以上的配体；例如，受体 CCR1 连接 RANTES (活化时受调节的正常 T 细胞表达的因子)，MIP-1 α (巨噬细胞炎性蛋白)和 MIP-1 β 趋化因子。迄今为止，已知 24 种趋化因子受体。趋化因子的绝对数目，多配体结合受体，和 WBCs 的不同受体特性保证可严格控制的和特异性的免疫应答 (Rossi 和 Zlotnik 2000)。趋化因子活性可通过调节其相应的受体而加以控制，治疗相关的炎性和免疫性疾病，有利于器官和组织移植。

受体 CCR1 及其趋化因子配体，包括，例如 MIP-1 α ，MIP-1 β ，和 RANTES，是有希望的治疗靶点，因为它们涉及类风湿性关节炎，移植排斥(均综述于 (DeVries, Ran et al. 1999))，和多发性硬化症(Fischer, Santambrogio et al. 2000; Izikson, Klein et al. 2000; Rottman, Slavin et al. 2000)。事实上，已发现功能-阻断性抗体，修饰的趋化因子受体配体和小分子有机化合物，并成功地证明了其中一些具有预防或治疗某些趋化因子一介导的疾病的作用(综述于 (Rossi 和 Zlotnik 2000))。特别是，在类风湿性关节炎的一个实验模型中，当给予一种信号-阻断性、修饰的-RANTES 配体时，疾病的发展得到减弱(Plater-Zyberk, Hoogewerf et al. 1997)。尽管使用功能-阻断性抗体和小分子肽治疗是有前景的，其缺点是有降解的危险，给药时半衰期极短，并且大多数蛋白开发和制造费用昂贵。小分子有机化合物比较合适，因为它们在体内半衰期较长，产生作用所需剂量较小，能够经常口服给药，因此较为便宜。某些 CCR1 有机拮抗物在前已经进行了描述(Hesselgesser, Ng et al. 1998; Ng, May et al. 1999; Liang, Mallari et al. 2000; Liang, Rosser et al. 2000)。由于这些化合物已显示出在某些动物模型中治疗疾病是有效的(Liang, Mallari et al. 2000)，本领域中需要更多可用于药物中的化合物。申请人已发现 CCR1 的有效有机拮抗物，有望成为本领域重要的工具。

本文公开类型的哌嗪衍生物是已知的抗炎剂(参见例如，WO 98/56771，W097/44329，WO 99/37651，WO 99/37619，WO 00/53600)。本文公开的特定的哌嗪衍生物以前从未认定被为 CCR1 拮抗物。

发明概述

在一个具体实施方式中，本发明提供了包含药物可接受的载体和可抑制各种趋化因子与 CCR1 受体结合的活性化合物的组合物。该趋化因子包括例如 MIP-1 α 和 RANTES。

在另一个具体实施方式中, 本发明提供一种阻断 CCR1 受体的方法, 包括给予一种抑制多种趋化因子活性的化合物, 该趋化因子包括例如 MIP-1 α 和 RANTES。

在另一个具体实施方式中, 本发明提供治疗炎性和免疫调节性紊乱和疾病的方法, 包括给予本发明所述组合物。

发明详述

本发明提供了包括药物可接受的载体和抑制多种趋化因子与 CCR1 受体结合的活性化合物的组合物, 该趋化因子包括例如主要配体 MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-1 γ , 骨髓祖细胞抑制因子-1 (XIF-1), 血液滤过物 (hemofiltrate) C-C-1 (HCC-1), 白细胞诱素和 RANTES。

本发明组合物可用于治疗炎性紊乱。

定义

“烷基”是指一种饱和脂肪族基团, 包括直链烷基, 支链烷基, 或环烷基。在优选的实施方式中, 直链或支链烷基主链上碳原子数目为 10 或更少, 更优选的是 6 或更少, 最优选的是 4 或更少。同样, 优选的环烷基在其环结构上有 3—10 个碳原子, 更优选在环结构上有 3—6 个碳原子。烷基的实例包括, 但不限于, 甲基、乙基、丙基、异丙基、环丙基、丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、环丁基、戊基、己基、环己基等等。优选甲基和乙基。

“烷氧基”是指通过氧原子连接在母体分子部分上的如前述定义的烷基。烷氧基的实例包括, 但不限于, 甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、正-丁氧基、叔丁氧基、新戊氧基和正-己氧基。

“芳基”是指任何含有 5—10 个碳原子的单价芳香碳环基团。芳基可以是二环(即苯基(或 Ph))或多环(即萘基), 也可以是非取代或取代的。优选的芳基包括苯基、萘基、呋喃基、噻吩基、吡啶基、吡咯基、喹啉基或异喹啉基。

“卤代烷基”是指被一个或多个卤素原子取代的如上述定义的烷基。卤代烷基的实例包括, 但不限于, 三氟甲基、二氟甲基、三氯甲基、氯乙基、溴丁基、2-三氟乙基、1-氟甲基-2-氟乙基、3-溴-2-氟丙基、1-溴甲基-2-溴乙基等等。特别优选三氟甲基。

“卤素”是指氟、氯、溴和碘。

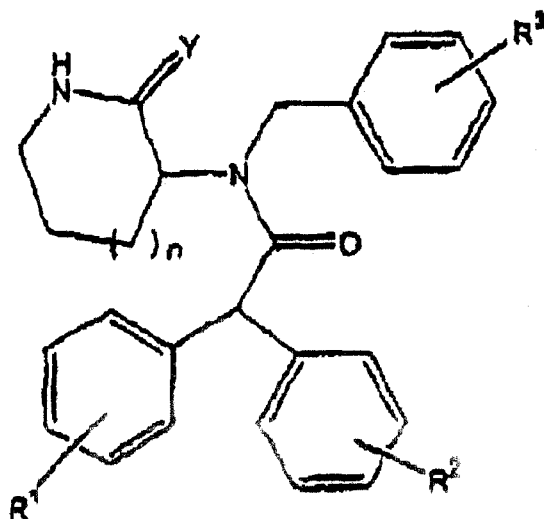
“杂环基”是指稳定的、饱和的、部分不饱和或芳族基团, 包含 5—10 个

环原子, 优选 5 或 6 个环原子。环可被取代基取代一次或多次。环可以是单、双或多环。杂环基由碳原子和 1-3 个杂原子组成, 杂原子可独立地选自氮、氧和硫。杂环基的实例包括吡啶、苯并噻唑啉、苯并咪唑、苯并呋喃、苯并吡喃、苯并噻唑啉、苯并噻吩、苯并噻唑、苯并噻吩基、呋唑、噻吩、呋喃、咪唑、1H-吡唑、吡啶、异吡啶、异噻啉、异噻唑、吗啉、噻唑(即 1,2,3-噻二唑)、吩嗪、吩噻嗪、吩噻嗪、酞嗪、哌啶、哌嗪、喋啶、嘌呤、吡嗪、吡唑、哒嗪、吡啶、嘧啶、吡咯、噻唑啉、噻啉、噻噻啉、四氢呋喃、四氢噻啉基、1,2,3,4-四氢异噻啉基、四氢噻吩基及其亚砷和砷衍生物、硫吗啉、噻唑、1,3,4-噻二唑、噻吩(thiene)、噻吩、1,3,5-三嗪、三唑(即 1,2,3-三唑)等等。

“取代的”是指包含至少一个, 优选 1-3 个取代基的部分。合适的取代基包括氢(H)和羟基(-OH)、氨基(-NH₂)、氧(-O-)、羰基(-CO-)、巯基、烷基、烯基、炔基、烷氧基、卤素、腈、硝基、芳基和杂环基。这些取代基任选地被 1-3 个取代基进一步取代。取代的取代基的例子包括, 酰胺、烷基硫醚、烷基磺基、烷氨基、二烷氨基、羧化物、烷氧羰基、烷芳基、芳烷基、烷杂环基等等。

抑制趋化因子、MIP-1 α 和 RANTES 活性的化合物

在一个具体实施方式中, 本发明活性化合物是式(1)化合物:

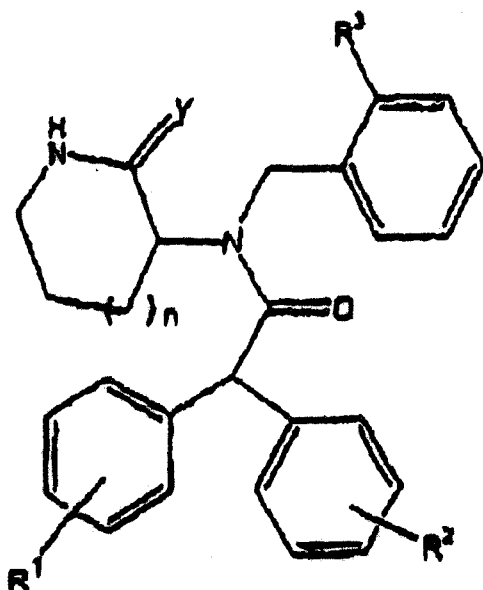


其中 n 是 0、1、或 2;

Y 是氧或硫;

R¹、R²、和 R³ 各自独立地为氢、烷基、烷氧基、卤素、卤代烷基或硝基。

优选的, 活性化合物是式(2):



其中 n 是 0、1、或 2；

Y 是氧或硫；并且

R^1 、 R^2 、和 R^3 各自独立地为氢、烷基、烷氧基、卤素、卤代烷基或硝基。

特别优选的，化合物(1)中 R^1 和 R^2 是氢， R^3 是卤素（特别优选的是氯或氟）或氢。

本发明应用的化合物可通过商业途径购得，也可根据已知方法制备(参见例如 FR 1,441, 071 和 JP 63-41907)。

测试

要证明本发明化合物是 CCR1 受体拮抗剂，如果它们可以抑制趋化因子 MIP-1 α 和 RANTES 的活性即可确定。优选的所述化合物具有以下特性：

- (1) 可有效地抑制趋化因子 MIP-1 α 或 RANTES 与 CCR1 受体结合；
- (2) 显著抑制对于 CCR1 的 Ca^{2+} 应答；和
- (3) 有限的非特异性 Ca^{2+} 应答。

体外标准结合测试可用于证实化合物与 CCR1 受体的亲和力(从而通过与受体的竞争性结合抑制 MIP-1 α 和 RANTES 的活性)。见下述文实施例。优选地，活性化合物 IC_{50} 值 $<10 \mu M$ ，更优选地， $<5 \mu M$ ，最优选地 $<1 \mu M$ 。

抑制 MIP-1 α 和 RANTES 的活性的化合物影响 MIP-1 α 和 RANTES 刺激的细胞内 Ca^{2+} 浓度。配体与 CCR1 受体的结合导致 G-蛋白诱导的磷脂酶 C 活化，其导致磷脂酰肌醇磷酸转化为磷酸肌醇和二酰基甘油。磷酸肌醇接着与细

胞内受体结合，将 Ca^{2+} 释放至细胞质中。除 Ca^{2+} 从细胞内贮库释放使 Ca^{2+} 浓度升高外，磷酸肌醇与其受体的结合导致细胞外钙离子穿过膜进入细胞内的流量增大。因此，由 MIP-1 α 和 RANTES 引起的 CCR1 受体的激活，以及随后由本发明化合物产生的活化抑制，均可通过测定细胞内游离的 Ca^{2+} 水平的增加确定。代表性地，也可以通过使用钙-敏感的荧光探针例如 quin-2、fura-2 和 indo-1 完成。参见下文实施例。活性化合物阻断 Ca^{2+} 应答的作用依赖于存在的活性化合物和趋化因子的数量。一般而言，当趋化因子为 10nM 时，10 μ M 活性化合物能够产生 20-100% 的 Ca^{2+} 应答抑制作用。

测定活性化合物是否产生了非特异性 Ca^{2+} 应答，可以通过下述方法进行：加入活性化合物，按照上述方法测量所述的 Ca^{2+} 应答，随后加入一种已知的其他趋化因子受体拮抗剂(例如缓激肽或 SDF-1，一种 CXCR4 配体)。比较应答结果表明活性化合物是非特异性结合。

药物组合物

用于给予活性化合物的药物组合物可以常规地以剂型单位的形式存在，可以以药物领域公知的任一种方法制备。所有的方法均包括下述步骤，将活性化合物与构成一种或多种辅助成分的载体混合。一般而言，药物组合物如下述制备：将活性化合物与液态载体或精细分割的固态载体或二者混合，然后，如果需要，将产物加工成希望的制剂。在药物组合物中，活性化合物的含量足以对疾病的过程或状况产生预期的作用。

包含活性化合物的药物组合物可以是适合口服的剂型，例如，片剂、含片、锭剂、含水或油性混悬液、分散性粉末或颗粒、乳剂、硬或软胶囊、或糖浆或酏剂。用于口服的组合物可通过任何生产药物组合物领域已知的方法制备，这些组合物还可包括一种或多种选自甜味剂、矫味剂、着色剂和防腐剂的试剂，以提供药学上美观和可口的制剂。片剂包括活性成分并混合以无毒的药物可接受的适于制备片剂的赋形剂。赋形剂例如为惰性稀释剂，例如碳酸钙、碳酸钠、乳糖、磷酸钙或磷酸钠；成粒剂或崩解剂，例如玉米淀粉、或海藻酸；粘合剂，例如淀粉、明胶或阿拉伯胶；及润滑剂，例如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石。片剂可以不包衣或通过已知的技术包衣，以达到延迟崩解、在胃肠道吸收从而在更长时间内提供持续作用。例如，缓释材料可使用单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。它们还可以通过美国专利 4,256,108、4,166,452、和 4,265,874 公开的

技术包衣以形成可控制释放的渗透性治疗片剂。

口服制剂也可作为硬明胶胶囊，其中活性组份与惰性固态稀释剂混合，例如，碳酸钙、磷酸钙或高岭土；或软明胶胶囊，其中活性组份与水或油介质混合，例如花生油、液态石蜡或橄榄油。

水性混悬液包括活性物质，它们与适合制备水性混悬液的赋形剂混合。这些赋形剂是悬浮剂，例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟基-丙基甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、西黄蓍胶和阿拉伯胶；分散剂或湿润剂可以是天然磷脂，例如卵磷脂、或烯化氧与脂肪酸的缩合物，例如聚氧乙烯硬脂酸酯、或环氧乙烷与长链脂肪醇的缩合物，例如十七烯氧鲸蜡醇、或环氧乙烷与脂肪酸和己糖醇的部分酯的缩合物，例如聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯、或环氧乙烷与脂肪酸和己糖醇酐的部分酯的缩合物，例如聚乙烯去水山梨糖醇单油酸酯。水性混悬液还可包括一种或多种防腐剂，例如乙基、或正-丙基对-羟苯甲酸酯，一种或多种着色剂，一种或多种矫味剂，和一种或多种甜味剂，例如蔗糖或糖精。

油性混悬液可通过将活性组份悬浮于植物油中配制，例如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油，或悬浮于矿物油中例如液态石蜡。油性混悬液可以包括一种增稠剂，例如蜂蜡、固体石蜡或鲸蜡醇。甜味剂如上述列举，可加入矫味剂以制得口感良好的制剂。这些组合物可加入抗氧化剂例如抗坏血酸进行保存防腐。

通过加入水而适于制备水性混悬液的分散性粉末和颗粒提供了与分散剂或湿润剂、助悬剂和一种或多种防腐剂混合的活性组份。合适的分散剂或湿润剂和助悬剂的例子如上文所述。其他赋形剂，例如甜味剂、矫味剂和着色剂，也可使用。

本发明药物组合物还可为水包油乳液的形式。油相可以是植物油，例如橄榄油或花生油，或矿物油，例如液态石蜡或其混合物。合适的乳化剂可以是天然树胶例如阿拉伯胶或西黄蓍胶，天然磷脂例如大豆磷脂、卵磷脂、和脂肪酸和己糖醇酐的酯或部分酯，例如去水山梨糖醇单油酸酯，和所述部分酯与环氧乙烷的缩合物，例如聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯。乳剂还包括甜味剂和矫味剂。

糖浆和酏剂可与甜味剂配制，例如甘油、丙二醇、山梨糖醇或蔗糖。这种

制剂还可包括湿润剂、防腐剂、矫味剂和着色剂。

药物组合物可为无菌可注射水性或油性混悬液形式。混悬液可使用上文所述的合适的分散剂或湿润剂和助悬剂，根据已知技术配制。无菌可注射制剂也可以是在无毒胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或混悬液，例如在 1,3-丁二醇中的溶液。可接受的载体和溶剂中能够应用的是水、林格溶液、和等渗氯化钠溶液。另外，无菌非挥发油通常作为溶剂或混悬介质而使用。基于此目的，任何非刺激性非挥发性油均可使用，包括合成的甘油单酯或甘油二酯。另外，发现脂肪酸例如油酸可用于制备可注射制剂。

本发明化合物还可以栓剂形式给药，用于直肠给药。这些组合物可通过混合药物与合适的非刺激性赋形剂制备，赋形剂常温下是固态但在直肠温度下是液态，从而在直肠中熔化释放出药物。这些材料是可可油和聚乙二醇。

对于局部应用，可以使用包含本发明化合物的霜、软膏、胶冻、溶液或混悬液等。(针对本申请的目的，局部应用包括口洗剂和漱口剂。)

本发明药物组合物和方法可以进一步包括本文中记载的其他治疗活性化合物，它们通常用于治疗上文所述的病理状况。

在治疗或预防需要调节趋化因子受体的状况中，适当的剂量水平一般是大约 0.01-500mg/kg 患者体重/天，可以以单剂或多剂给药。优选的，剂量水平为约 0.1 至约 250mg/kg/天；更优选，约 0.5 至约 100mg/kg/天。适当的剂量水平可为约 0.01 至 250 mg/kg/天，约 0.05 至 100mg/kg/天，或约 0.1 至 50mg/kg/天。在此范围内剂量可以是 0.05-0.5，0.5-5 或 5-50 mg/kg/天。对于口服给药，优选组合物为片剂形式，包含 1.0-1000mg 活性组份，特别是根据治疗的病人的症状调节剂量为 1.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、50.0、75.0、100.0、150.0、200.0、250.0、300.0、400.0、500.0、600.0、750.0、800.0、900.0、和 1000.0mg 活性组份。化合物每天给药 1-4 次，优选每天一次或两次。

可以理解的是，对于任何特定患者，特定剂量水平和给药频率都是不同的，其依赖于包括使用的特殊化合物的活性、代谢稳定性、化合物作用时间、年龄、体重、一般健康、性别、饮食、给药方式和时间、排泄率、联合用药、特定状况的严重性，和接受治疗的宿主等各种因素。

阻断 CCR1 受体的方法

本发明还提供了一种抑制 MIP-1 α 或 RANTES 与 CCR1 受体结合的方法。

通过在适合抑制趋化因子和 CCR1 受体结合的条件下使上文所述组合物与表达 CCR1 受体的细胞接触而实现。

治疗炎症和免疫调节紊乱和疾病的方法

本发明还提供了一种治疗炎症性疾病的方法，包括给予需要的患者治疗有效量的上文所述的组合物足够治疗炎症性疾病的时间。“治疗”是指预防、抑制或缓解紊乱或症状。

CCR1 提供了一个在哺乳动物，例如人体内干扰或促进嗜酸性细胞和/或淋巴细胞功能的靶点。抑制 CCR1 的化合物对于出于治疗目的的调节嗜酸性细胞和/或淋巴细胞功能尤其有效。相应地，本发明涉及对于预防和/或治疗各种炎症和免疫调节性紊乱和疾病有效的化合物。

例如，一种可抑制一项或多项 CCR1 功能的化合物可用于抑制(即减少或预防)炎症。结果是，可抑制一种或多种炎症过程，例如白细胞迁移、趋化性、胞吐(例如酶、组胺的)或炎性介质释放。例如，可根据本发明方法抑制对于炎性位点的嗜酸细胞性浸润(如哮喘)。

同样地，一种可促进一项或多项 CCR1 功能的化合物可用于刺激(诱导或增强)炎症应答，例如白细胞迁移、趋化性、胞吐(如酶、组胺的)或炎性介质释放，造成炎症过程的有益刺激。例如，会聚集嗜酸性细胞以用于抵抗寄生虫感染。

除灵长类，例如人之外，各种其他的哺乳动物可根据本发明的方法进行治疗。例如，哺乳动物，包括，但不限于，牛、绵羊、山羊、马、狗、猫、豚鼠、老鼠或其它牛类、羊类、马类、犬类、猫科、啮齿动物、鼠类物种均可被治疗。而且，该方法还可用于治疗其他物种，例如鸟类物种(如鸡)。

与炎症或感染相关的疾病或状况均可使用本发明的方法进行治疗。在一个优选的具体实施方式中，疾病或状况是指其中的嗜酸性细胞和/或淋巴细胞的功能被抑制或增强，以达到调节炎症应答的目的。

可用 CCR1 抑制剂治疗的人或其他物种的疾病或状况包括，但不限于：炎性或变应性疾病和状况，包括呼吸系统变应性疾病例如哮喘、过敏性鼻炎、过敏性肺部疾病、过敏性肺炎、嗜酸细胞性肺炎(如吕弗勒(氏)综合征，慢性嗜酸细胞性肺炎)，迟发型过敏性间质性肺病(ILD)(如特发性肺纤维化，或伴随类风湿性关节炎的 ILD、系统性红斑狼疮、强直性脊柱炎、系统性硬化症、斯耶

格伦(氏)综合征、多发性肌炎或皮炎); 全身性过敏反应或超敏反应, 药物变态反应(如对于盘尼西林、头孢菌素类), 昆虫螫伤变态反应; 自身免疫性疾病, 例如类风湿性关节炎、银屑病关节炎、多发性硬化症、脑白质病、脑脊髓炎、阿耳茨海默(氏)病、系统性红斑狼疮、重症肌无力、青少年型糖尿病; 肾小球性肾炎、自身免疫性甲状腺炎、贝切特(氏)病; Guillian-Barre 综合征、急性细胞介导的移植排斥(例如肾移植排斥)、移植排斥(如在移植术中), 包括同种异体移植物排斥或移植物抗宿主病; uricaria、皮肤血管炎、炎性肠病, 例如克隆(氏)病和溃疡性结肠炎; 脊柱关节病; 硬皮病; 银屑病(包括 T-细胞介导的银屑病)和炎性皮肤病例如皮炎、湿疹、特应性皮炎、过敏性接触性皮炎、荨麻疹; 血管炎(如引起坏死的, 表皮的, 和过敏性脉管炎); 嗜酸细胞性肌炎, 嗜酸细胞性筋膜炎; 白细胞浸润皮肤或器官的癌症。其中不良炎症应答能够被抑制的其他疾病或状况也可进行治疗, 包括但不限于, 再灌注损伤、再狭窄、动脉粥样硬化、某些血液恶性肿瘤、细胞因子诱导的中毒(如脓毒性休克、内毒素性休克)、多肌炎、皮炎。因此本发明化合物可用于预防或治疗多种炎性和免疫调节性紊乱和疾病。

体外标准测试可用于证实本发明组合物治疗炎性紊乱的有效性, 包括多发性硬化症实验性自身免疫性脑脊髓炎的动物模型和类风湿性关节炎的佐剂诱导的关节炎模型。

本发明组合物可通过口服、胃肠外(如肌内、腹膜内、静脉内、ICV、脑池内注射或输注, 皮下注射或植入)、吸入喷雾、鼻、阴道、直肠、舌下、或局部给药途径给药, 可单独或共同配制成合适的剂量单位制剂, 其中含有适于每种给药途径的无毒的药物可接受的载体, 佐剂和赋形剂。除了治疗温血动物, 例如大鼠、小鼠、马、牛、羊、狗、猫、猴子等, 本发明组合物对于治疗人也有效。

联合治疗

如上所述调节趋化因子受体活性从而预防和治疗炎性和免疫调节性紊乱和疾病的联合治疗, 通过本发明化合物和其他已知具有同样作用的化合物联合进行举例说明。

例如, 在治疗或预防炎症时, 本发明化合物可与抗炎或止痛剂结合, 例如阿片激动剂; 脂加氧酶抑制剂, 例如 5-脂加氧酶抑制剂; 环加氧酶抑制剂, 例

如环加氧酶-2 抑制剂; 白介素抑制剂, 例如白介素-1 抑制剂; NMDA 拮抗剂; 氧化氮抑制剂或氧化氮合成抑制剂; 非甾体抗炎剂; 或细胞因子抑制性抗炎剂, 例如扑热息痛, 阿司匹林, 可待因, 芬太尼, 布洛芬, 吲哚美辛, 痛力克, 吗啡, 萘普生, 非那西汀, 吡罗昔康; 甾体镇痛药, 舒芬太尼, sunlindac, 替尼达普等。同样地, 本发明的化合物可与下述药物联合给药: 疼痛缓解剂; 增效剂例如咖啡因, H₂-拮抗剂, 二甲硅油, 氢氧化铝或氢氧化镁; 解充血药例如苯福林, n-去甲麻黄碱, 伪麻黄碱, 氧甲唑啉, 肾上腺素, 蔡唑啉, 丁苄唑啉, 环己丙甲胺, 或左旋-脱氧-麻黄素; 止咳药例如可待因, 二氢可待因酮, 卡拉美芬, 咳必清, 或右旋甲吗喃; 利尿剂; 和镇静或非镇静抗性组胺剂。

下述实施例用于举例说明本发明, 并不限于此。

实施例

实施例 1: 材料和方法

A. 化合物样本

此处使用的化合物样本包括商业途径购得的小分子。源培养板包括在二甲基亚砜(DMSO)中的 1 或 5mg/ml 各个化合物。根据这些 CLIP (化合物库), 制作培养板, 其中每孔加入 10 种化合物, 用 20%DMSO 稀释至 5-50 μ g/ml 的浓度。向检验板上滴加一等分 20 μ l 的每种混合物, 在-20°C 条件下储存直至使用。

B. 细胞

CCR1 转染子

CCR1-NSO 细胞

表达稳定的转染子细胞系的 CCR1(CCR1-NSO)在 Iscove's 改良的 Dulbecco's 培养基(IMDM)中培养, 培养基含有 4.5g/L 葡萄糖, 5%胎牛血清(FBS), 10mM HCl, 250 μ g/l 黄嘌呤(来自于 0.1N NaOH 中 100X 黄嘌呤贮存液), 15 μ g/l 次黄嘌呤(来自于 0.1N NaOH 中 100X 次黄嘌呤贮存液), 10mg/L 胸苷(来自于 H₂O 中 100X 胸苷贮存液), 50 μ M β -巯基乙醇(BME) (来自于 H₂O 中 1000X BME 贮存液), 和 1.5mg/L 霉酚酸(来自于乙醇中 2.5mg/ml 霉酚酸贮存液)。细胞在 5%CO₂/95%空气, 100%湿度, 37°C 条件下生长, 当浓度为 0.5-1.0 $\times 10^6$ 细胞/ml 时进行收集。细胞以 1:4 每周传代培养两次。

CCR1-293 细胞

用人 CCR1 稳定转染人胚肾腺病毒-转化的细胞系 293(美国典型培养物保

藏中心(ATCC); Manassas, VA)。pIRESpuro 载体(Clontech; Palo Alto, CA)被工程化以包含一个促乳素信号序列, FLAG-表位克隆至 EcoRV-Not I 限制位点。人 CCR1 cDNA 克隆被亚克隆至 Not I 位点, 这样插入片段就可操作性连接到强 pCMV 启动子上。细胞在 Dubecco's 改良的 Eagle's 培养基中的 $2\mu\text{g/ml}$ 嘌呤霉素选择下, 在 $5\%\text{CO}_2/95\%$ 空气, 100% 湿度, 37°C 条件下成长, 该培养基中补充了 2mM L-谷氨酰胺, 1.5g/L 碳酸氢钠, 0.1mM 非必需氨基酸, 1.0mM 丙酮酸钠, 10% 胎牛血清。细胞以 1: 5 每周传代培养两次, 在 1×10^6 细胞/ml 时进行收集。

THP-1 细胞

THP-1 细胞得自 ATCC, 在 RPMI-1640 培养基中作为悬浮液培养, 该培养基补充了 2mM L-谷氨酰胺, 1.5g/L 碳酸氢钠, 4.5g/L 葡萄糖, 10mM HEPES, 1mM 丙酮酸钠, 0.05% 2-巯基乙醇和 10% FBS 进行补充。细胞在 $5\%\text{CO}_2/95\%$ 空气, 100% 湿度, 37°C 条件下成长, 以 1: 5 每周传代培养两次, 在 1×10^6 细胞/ml 时进行收集。

C.测定

CCR1 配体结合抑制

离心表达 CCR1 的细胞, 在分析缓冲液中(20mM HEPES pH 7.1, 140mM NaCl, 1mM CaCl_2 , 5mM MgCl_2 , 和 0.2% 牛血清白蛋白) 再悬浮, 达到浓度为 5.6×10^6 细胞/ml(CCR1-NSO)或 2.2×10^6 细胞/ml(CCR10293)。如下述方法进行筛选实验。首先, 将 0.09ml 细胞(5×10^5 CCR1-NSO 细胞/孔或 2×10^5 CCR1-293 细胞/孔)加入含有化合物的测试培养板中, 得到的每种化合物的最终浓度为约 $2\text{--}10\mu\text{M}$ 。然后加入 0.09ml 用测试缓冲液稀释至最终浓度为约 50pM , 收率约 30, 000 cpm 每孔的 ^{125}I 标记的 MIP-1 α (购自 Amersham; Piscataway, NJ), 密封培养板, 4°C 条件下在振荡平台中温育约 3 小时。抽吸反应物至在真空细胞收集器(Packard Instruments; Meiden, CT)上预先浸渍在 0.3% 聚乙烯亚胺(PEI)溶液中的 GF/B 玻璃滤器。在每孔中加入闪烁液($50\mu\text{l}$; Microscint 20, Packard Instruments), 密封培养板, 在一个高计数闪烁计数器(Packard Instruments)中进行放射性测量。只包含稀释剂(用于总计数)或过量的 MIP-1 α 或 MIP-1 β ($1\mu\text{g/ml}$, 用于非特异性结合)的对照孔用于计算每组化合物的占抑制总量的百分比。完成 CLIP 培养板测试后, 证实了抑制率为 40% 或

更高的孔。一经证实, CLIP 的各个化合物就要接受反应性(解褶积步骤)测试。 IC_{50} 值是能够减少标记的 MIP-1 α 与受体结合的 50% 的所需浓度。

钙动员

为了探测细胞内储存的钙的释放, 培养的细胞在细胞培养基中与 3 μ M INDO-1 AM 染料(分子探针; Eugene, OR)在室温下温育 45 分钟, 用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤。加入 INDO-1AM 后, 细胞在流通缓冲液(Hank's 平衡盐溶液(HBSS)和 1% FBS)中再悬浮。使用国际光子技术分光光度计(国际光子技术; New Jersey)测量钙动员, 在 350nm 激发, 在 400 nm 和 490 nm 处双重同步记录荧光发射。相对细胞内钙水平表示为 400 nm/490nm 发射比。37°C 条件下进行试验, 在样品杯中连续混合, 每个样品杯含有 10^6 细胞/2ml 流通缓冲液。使用的趋化因子配体范围为 1-100 nM。根据时间标绘发射比(代表性地, 2-3 分钟)。在 10 秒时加入候选的配体阻断性化合物(10-20 μ M), 然后在 60 秒时加入趋化因子(MIP-1 α ; R & D 系统; Minneapolis, MN), 在 150 秒时加入对照趋化因子(缓激肽; ICN 制药公司, Costa Mesa, CA)。在某些实验中, 同时加入候选的阻断化合物和细胞, 40 秒后再加入 MIP-1 α 。

趋化性测试

使用 5 μ m 孔聚碳酸酯、聚乙烯吡咯酮包被的过滤器在 96-孔趋化室(Neuroprobe; Gaithersburg, MD)进行趋化性测试。以基质-衍生的因子(SDF-1)作为特异性对照品。下部的室含有 29 μ l, 0.1 nM MIP-1 α 和多种量的抑制剂, 上部的室在 20 μ l 中含 100, 000 THP-1 细胞。趋化室在 37°C 温育 1-2 小时, 利用 CyQuant 测试(Molecular Probes)、测量核酸含量的荧光染料方法和显微镜观察确定下部的室中的细胞数量。

实施例 2: CCR1 结合 MIP-1 α 的抑制剂的检验

A. 测试

为了检验阻止受体 CCR1 与配体结合的小有机分子, 进行测试以探测在细胞表面与表达外源性 CCR1 的细胞结合的放射性配体(MIP-1 α)。如果一种化合物能够抑制结合, 不管其是否是竞争性抑制, 当与未抑制的对照进行比较时, 将观察到较少的放射性计数。

构建在细胞表面组成型表达人 CCR1 的 NSO 鼠类骨髓瘤细胞系(CCR1-NSO)和人胚胎肾(HEK)癌细胞系(CCR1-293)。这些细胞缺少结合 MIP-1 α 的其

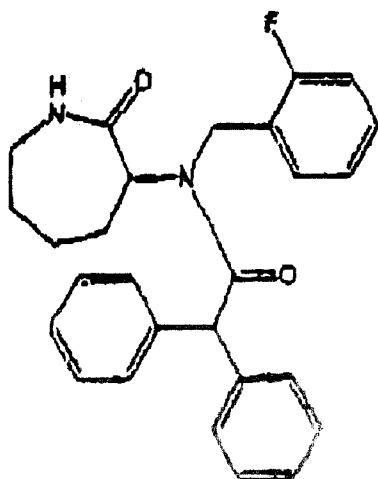
他趋化因子受体。在 CLIP 培养板中向每个孔加入相同数量的细胞，其中每孔含有 10 种候选的有机化合物。用放射标记的 MIP-1 α 温育细胞。洗涤细胞以移除未结合的配体，通过定量放射性计数确定结合的配体。通过未用任何有机化合物温育的细胞确定总计数；用未标记配体和标记的配体温育细胞，确定非特异性结合。抑制百分比以下述公式计算：

$$\% \text{抑制} = 1 - [(\text{样品 cpm}) - (\text{非特异性 cpm})] / [(\text{总 cpm}) - (\text{非特异性 cpm})] \times 100$$

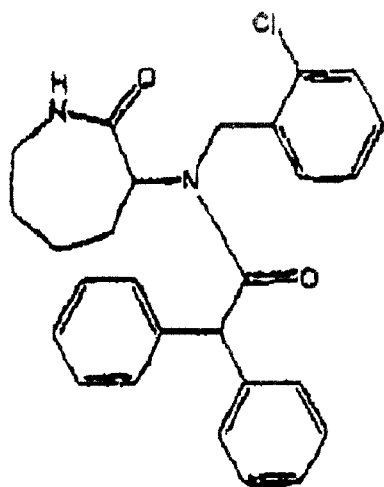
B. 使用 CCR1-NSO 细胞从化合物库中鉴定的抑制剂

在测试化合物的第 1 组中，标准化的标准差是 19%；因此，确认的显著抑制是大于 38%；40%抑制是选择的阈值。在受试孔数目中，58 个孔的内容物抑制 40%或更多的 MIP-1 α 结合。这 58 个孔的内容物在 CLIP 中重新测试，其中 6 个抑制 40%或更多的结合。这一结果表明 6 个孔中的每一个中的 10 种化合物至少有一种能够抑制 MIP-1 α 与 CCR1 结合。为了确认每个孔中究竟是 10 种化合物中的哪一种抑制了 MIP-1 α 的 CCR1 连接，测试每一种单独的化合物在测试中的抑制活性以对合并物解褶积。由于某些化合物可能共同作用以抑制结合，而解褶积测试只适用于单独检测化合物，因此本试验中没有找出联合作用有效而单独作用无效的化合物。鉴定三种候选化合物：

(1) CCX-469

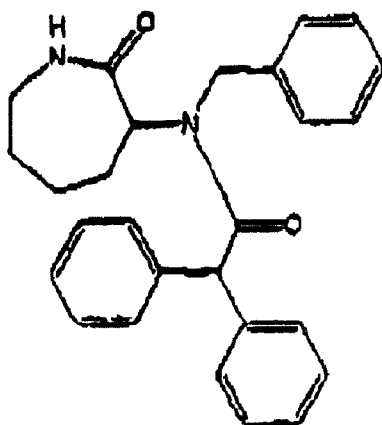


(2)CCX-285



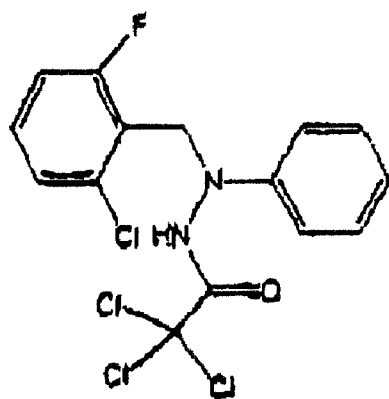
和

(3)CCX-193

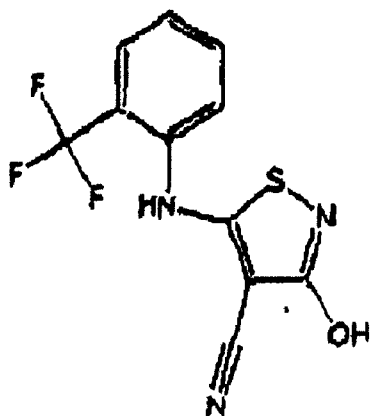


在第二组化合物的筛选中，标准化的标准差是 17%，表明 34%或更多的抑制活性是显著的：此外，阈值为 40%。这些 CLIPs 产生显示出高于 40%抑制的 39 个孔。当再次作为 CLIPs 被筛选时，14 个孔减少了超过 40%的配体。单独测试化合物以鉴定 13 个抑制性候选物：

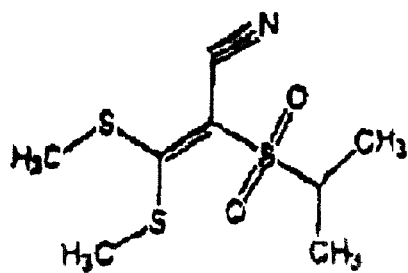
(4)CCX-6019



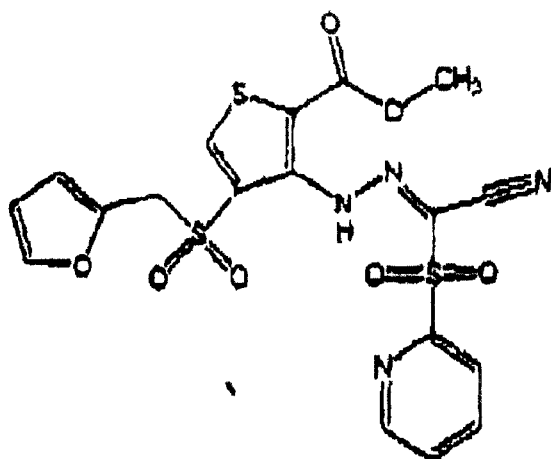
(5)CCX-2433



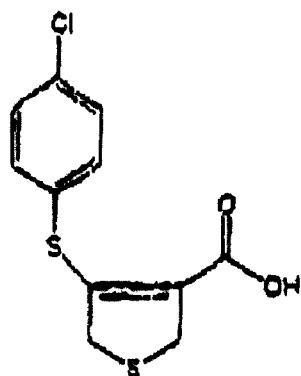
(6)CCX-2595



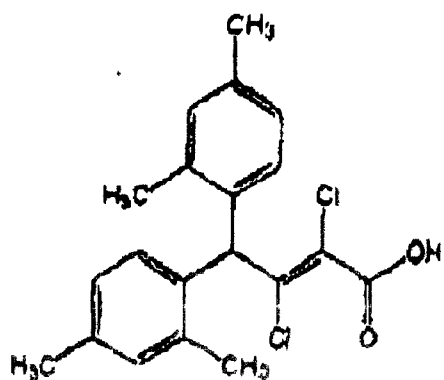
(7)CCX-3456



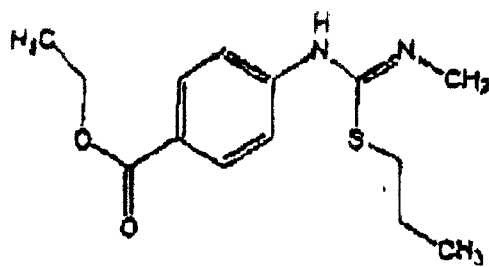
(8)CCX-4682



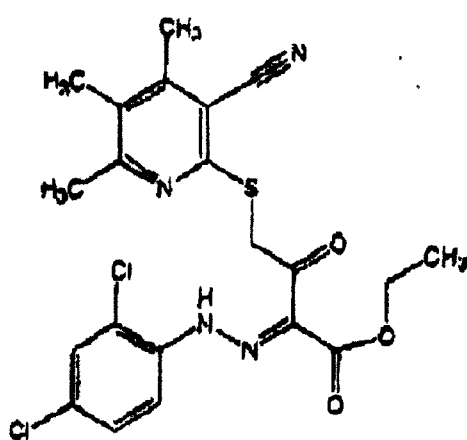
(9)CCX-541



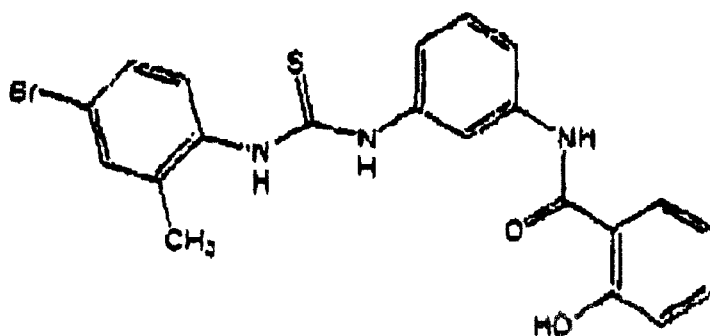
(10)CCX-238



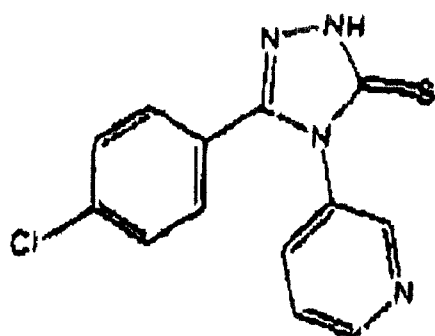
(11)CCX-4425



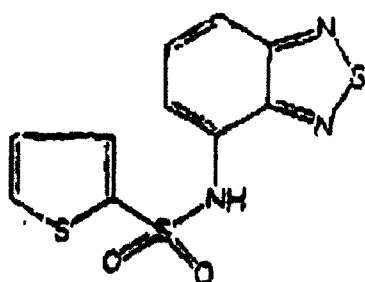
(12)CCX-1513



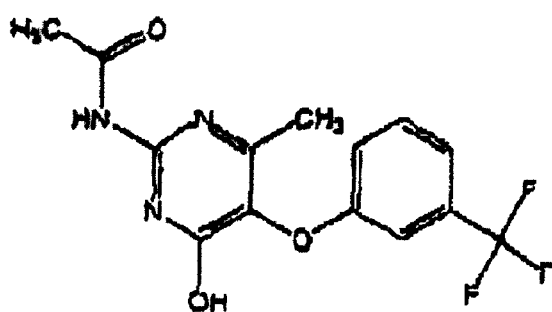
(13)CCX-3493



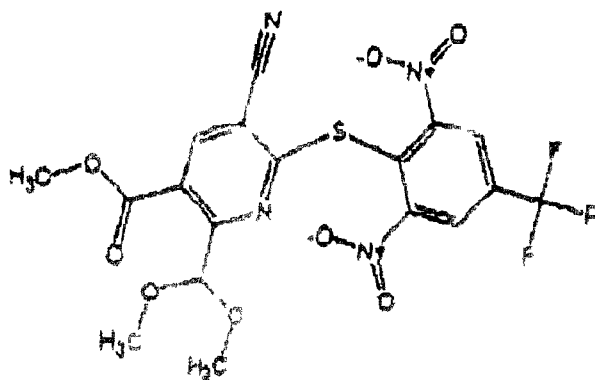
(14)CCX-6530



(15)CCX-4462



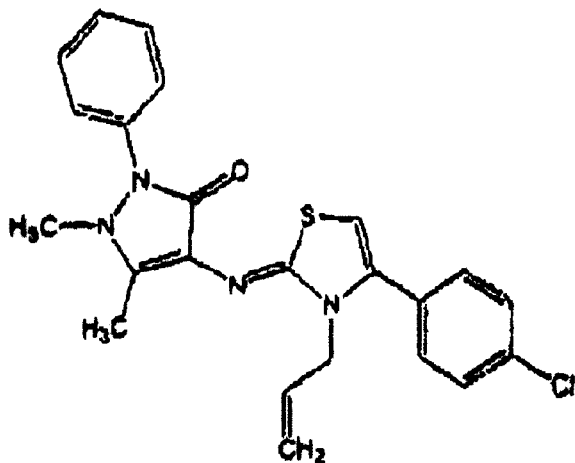
(16)CCX-5119



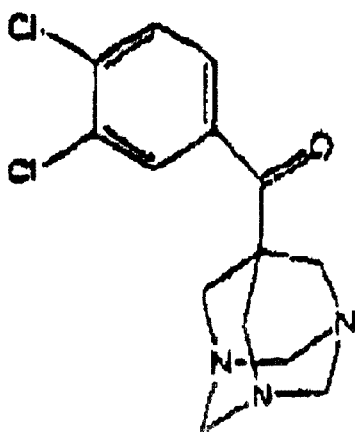
C. 使用 CCR1-293 细胞从化合物库中鉴定的抑制剂

使用 CCR1-293 细胞, 其以更高水平表达 CCR1, 结果是提高了噪音与信号比标准化的标准差, 大约为 10%。筛选第 1 组化合物, 46 个孔在初始筛选中显示出大于 20% 的配体结合抑制, CLIP 中的 10 个孔在第二次筛选中抑制配体结合。单独测试化合物, 鉴定出 6 个候选物:

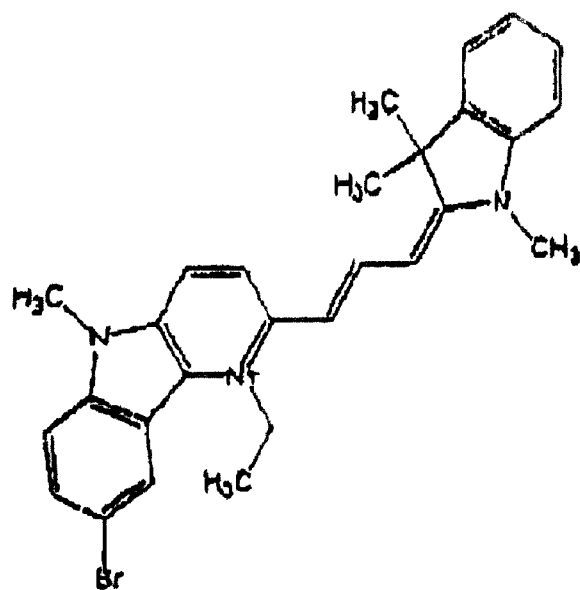
(17)CCX-1611



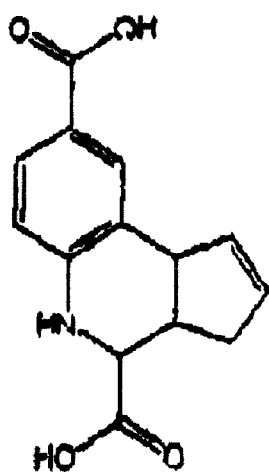
(18)CCX-1307



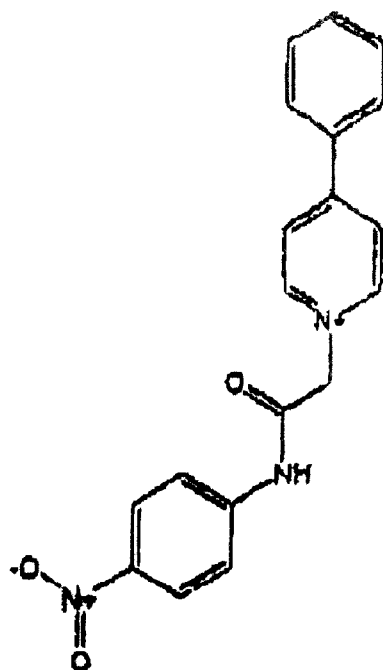
(19)CCX02324



(20)CCX-1959

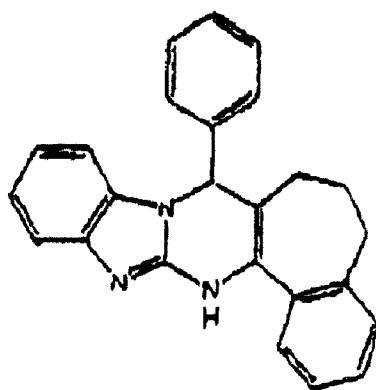


(21)CCX-1057



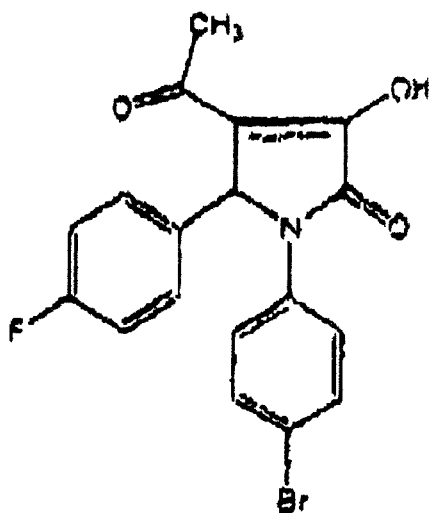
和

(22)CCX-1080

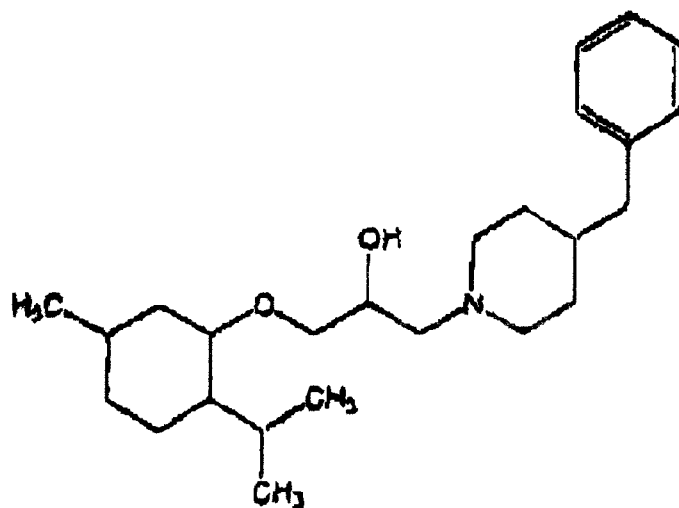


至于使用 CCR1-293 细胞进行的关于第 1 组化合物的测试, 第 2 组化合物筛选的标准化的标准差更小。很有可能是由于使用了这些细胞。在第 1 个试验中抑制结合的 35 个 CLIP 孔中 有 8 个孔得到验证 化合物的个别检验鉴定出 3 个候选物:

(23)CCX-5062

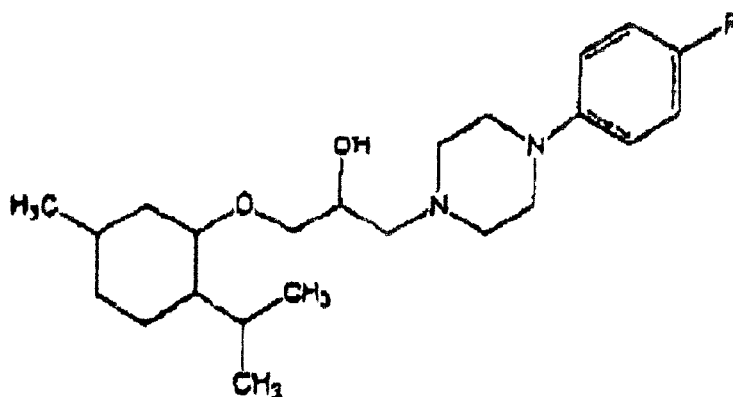


(24)CCX-3345



和

(25)CCX-3343



实施例 3: 剂量反应曲线

为了确定一种候选化合物对于 CCR1 的亲合性, 以及确定其抑制配体结合的能力, 在 1×10^{-8} - 1×10^{-4} M 范围的化合物浓度滴定抑制活性。这项测试基本上等同于 CLIP 筛选, 除了化合物用量发生了变化; 细胞数量和配体浓度保持不变。只有本实验时可商业购得的化合物进行了滴定。在鉴定的 22 个候选物中, 下述 16 个进行了剂量反应试验:

CCX-3343、CCX-1057、CCX-1307、CCX-1513、CCX-238、CCX-3345、CCX-3493、CCX-4425、CCX-4462、CCX-4682、CCX-469、CCX-5062、CCX-5119、CCX-541、CCX-6019 和 CCX-6530。

不能以剂量依赖性方式抑制 MIP-1 α 结合的测试化合物是 CCX-238、CCX-4425、和 CCX-4462。抑制活性根据其对于 CCR1 亲合力的不同而变化的化合物如表 1 所示。

表 1. CCR1-MIP-I α 结合的亲和值, 从最高往最低排列

化合物编号	细胞	IC ₅₀ (抑制常数; μ M)
CCX-1959	NSO	0.36
CCX-541	NSO	0.4
CCX-469	NSO/293	0.6/2
CCX-3493	NSO	1.7
CCX-2324	293	2*
CCX-1307	293	2*
CCX-1080	293	2*
CCX-1057	293	2*
CCX-3493	293	18
CCX-6019	NSO	25
CCX-4682	NSO	44
CCX-5119	293	45
CCX-6530	NSO	n.d.
CCX-1513	NSO	n.d.
CCX-4462	NSO	n.d.
CCX-5119	NSO	n.d.
n.d., 未确定的 (计算的)		
*在最高测试浓度部分阻断 MIP-I α 结合		

化合物 CCX-541 和 CCX-469 显示出的 CCR1 亲和值低于 1 μ M。化合物 CCX-5062、CCX-3345、和 CCX-3343 具有阻断活性, 但在最高测试浓度时不能够完全抑制 MIP-I α 结合; 估计它们的亲和值大约为 2 μ M。虽然化合物 CCX-6019、CCX-4682、CCX-1307 和 CCX-1057 显示出阻断活性, 它们的 CCR1 亲和值较低, 为 18-45 μ M。虽然鉴定出很多化合物能够抑制 CCR1 与 MIP-I α 配体结合, 只有两个化合物具有高 CCR1 亲和值: CCX-541 和 CCX-469。鉴定出了其他的亲和值较低的 MIP-I α 结合抑制性化合物, 但是由于抑制性质竞争性或非竞争性是未知的, 所以不能够清楚的得知这些化合物对于抑制其它 CCR1 配体结合例如 RANTES 是否更加有效。

实施例 4: CCR1 功能性测定

CCR1 是一种七次跨膜的 G-蛋白连接的受体。由这些受体连接诱导的信号级联级联的标志是钙离子从细胞内贮库的类似于脉冲的释放。进行钙动员测试以确定候选 MIP-1 α 抑制性化合物是否也能阻断 CCR1 信号传递。为了使用,希望候选化合物能够抑制特异性配体结合以及发出传递。

响应 MIP-1 α 结合的钙离子释放通过细胞可渗透的 INDO-1/AM 显示剂测定,其在游离的而不是螯合的钙离子存在下发出荧光。CCR1-293 或 THP-1 细胞用 INDO-1 加载,对响应加入 MIP-1 α 的钙离子释放进行测试。对于特异性对照,加入另外一种非 CCR1 结合趋化因子、缓激肽,其也是通过一种七次跨膜受体发出信号。没有化合物的情况下加入 MIP-1 α 时可以看到荧光信号脉冲。如果一种化合物特异性抑制 CCR1-MIP-1 α 信号传递,那么在加入 MIP-1 α 时将看不到任何信号脉冲,但在加入缓激肽时可看到一个脉冲。然而,如果一种化合物非特异性抑制信号传递,那么在加入 MIP-1 α 和缓激肽时将看不到任何脉冲。

如表2所示,在测试的选择的化合物,CCX-469、CCX-541、CCX-1513 和 CCX-3493 之中,只有 CCX-469 能够显著地并且特异地抑制 CCR1 的信号传递。CCX-541 和 CCX-1513 对于钙离子水平具有非特异性作用,CCX-3493 不能够影响信号传递,无论是 MIP-1 α 还是缓激肽诱导的。

表2. 钙信号传递抑制

化合物	MIP-1 α ¹	缓激肽 ¹	注释
CCX-541	n.s.	n.s.	化合物存在条件下,钙水平随着时间非特异性增加
CCX-469	-	+	THP-1 细胞的清楚而特异性的被抑制
CCX-1513	n.s.	n.s.	化合物存在条件下,钙水平随着时间非特异性增加
CCX-3493	+	-	无抑制
¹ +, 观察到脉冲; -未观察到脉冲; n.s. 非特异性信号(参见正文)			

实施例 5 (推论)

趋化因子主要功能之一是其能够吸引 WBCs 至病原体侵入位点。为了证实化合物不仅能够如钙动员试验确定的抑制 MIP-1 α 结合和 CCR1 信号传递:

而且能够抑制 CCR1 功能,进行了趋化性测试。THP-1 髓细胞单核细胞白血病细胞,其与单核细胞相似,可用作 MIP-1 α 化学吸引的靶点。THP-1 细胞位于微孔迁移室的上部的室中,而 MIP-1 α 和浓度增加的化合物加样于下部的室中。在无抑制剂时,THP-1 细胞响应 MIP-1 α 趋化因子迁移至下部的室中;如果一种化合物抑制 CCR1 功能,那么大多数 THP-1 细胞保持在上部的室中。

根据上文详述内容,提示了本领域技术人员本发明的许多变化形式,这些显而易见的变化包括在权利要求的保护范围之内。

参考文献

- DeVries, M. E., L. Ran, et al. (1999). "On the edge: the physiological and pathophysiological role of chemokines during inflammatory and immunological responses." Semin Immunol 11(2): 95-104.
- Fischer, F. R., L. Santambrogio, et al. (2000). "Modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: effect of altered peptide ligand on chemokine and chemokine receptor expression." J Neuroimmunol 110(1-2): 195-208.
- Hesselgesser, J., H. P. Ng, et al. (1998). "Identification and characterization of small molecule functional antagonists of the CCR1 chemokine receptor." J Biol Chem 273(25): 15687-92.
- Izlikson, L., R. S. Klein, et al. (2000). "Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking the CC chemokine receptor (CCR)2 [In Process Citation]." J Exp Med 192(7): 1075-80.
- Kennedy, K. J. and W. J. Karpus (1999). "Role of chemokines in the regulation of Th1/Th2 and autoimmune encephalomyelitis." J Clin Immunol 19(5): 273-9.
- Liang, M., C. Mallari, et al. (2000). "Identification and characterization of a potent, selective, and orally active antagonist of the CC chemokine receptor-1." J Biol Chem 275(25): 19000-8.
- Liang, M., M. Rosser, et al. (2000). "Species selectivity of a small molecule antagonist for the CCR1 chemokine receptor." Eur J Pharmacol 389(1): 41-9.
- Ng, H. P., K. May, et al. (1999). "Discovery of novel non-peptide CCR1 receptor antagonists." J Med Chem 42(22): 4680-94.
- Plater-Zyberk, C., A. J. Hoogwerf, et al. (1997). "Effect of a CC chemokine receptor antagonist on collagen induced arthritis in DBA/1 mice." Immunol Lett 57(1-3): 117-20.
- Rossi, D. and A. Zlotnik (2000). "The Biology of Chemokines and their Receptors." Annu. Rev. Immunol. 18(1): 217-242.
- Rottman, J. B., A. J. Slavin, et al. (2000). "Leukocyte recruitment during onset of experimental allergic encephalomyelitis is CCR1 dependent." Eur J Immunol 30(8): 2372-7.