



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105764513 A

(43)申请公布日 2016.07.13

(21)申请号 201480051365.5

(22)申请日 2014.09.18

(30)优先权数据

2013903589 2013.09.18 AU

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.03.17

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2014/050237 2014.09.18

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/039187 EN 2015.03.26

(71)申请人 堪培拉大学

地址 澳大利亚首都直辖区

(72)发明人 苏达·拉奥 安朱马·扎法尔

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 郑斌 彭鲲鹏

(51)Int.Cl.

A61K 31/496(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书5页 说明书144页 附图10页

(54)发明名称

干细胞调控II

(57)摘要

公开了用于调控癌症干细胞的方法和组合。更特别地,本发明公开了蛋白激酶C θ (PKC- θ)抑制剂用于抑制PKC- θ 过表达细胞(包括癌症干细胞)的生长、用于增强化疗药物或照射对癌细胞的生物学作用、用于治疗癌症(包括转移癌)和/或用于预防癌症复发的用途。

1. 一种用于改变PKC- θ 过表达细胞的(i)形成、(ii)增殖、(iii)维持、(iv)EMT或(v)MET中至少一个的方法,所述方法包括使所述PKC- θ 过表达细胞与形成、增殖、维持、EMT或MET调控量的PKC- θ 抑制剂相接触,由所述步骤组成或者基本上由所述步骤组成。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述PKC- θ 过表达细胞选自CSC和非CSC肿瘤细胞。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述PKC- θ 过表达细胞是CSC。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述PKC- θ 过表达细胞是非CSC肿瘤细胞。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中使所述PKC- θ 过表达细胞与PKC- θ 过表达细胞形成抑制量的所述PKC- θ 抑制剂相接触。

6. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中使所述PKC- θ 过表达细胞与PKC- θ 过表达细胞增殖抑制量的所述PKC- θ 抑制剂相接触。

7. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中使所述PKC- θ 过表达细胞与PKC- θ 过表达细胞EMT抑制量的所述PKC- θ 抑制剂相接触。

8. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中使所述PKC- θ 过表达细胞与PKC- θ 过表达细胞MET刺激或诱导量的所述PKC- θ 抑制剂相接触。

9. 根据权利要求2或权利要求3所述的方法,其中所述CSC是乳腺、前列腺、肺、膀胱、胰腺、结肠、黑素瘤、肝或胶质瘤的CSC。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述CSC是乳腺CSC。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述乳腺CSC是乳腺上皮CSC。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述乳腺上皮CSC是乳腺导管上皮CSC。

13. 根据权利要求2、3和9至12中任一项所述的方法,其中所述CSC的多能干细胞标志物Oct4或Sox2的表达受损或终止。

14. 根据权利要求2或权利要求4所述的方法,其中所述非CSC肿瘤细胞是乳腺、前列腺、肺、膀胱、胰腺、结肠、黑素瘤、肝或胶质瘤的非CSC肿瘤细胞。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述非CSC肿瘤细胞是乳腺非CSC肿瘤细胞。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述乳腺非CSC肿瘤细胞是乳腺上皮非CSC肿瘤细胞。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述乳腺上皮非CSC肿瘤细胞是乳腺导管上皮非CSC肿瘤细胞。

18. 根据权利要求2、3或9至13中任一项所述的方法,其中所述CSC表达选自以下的一种或更多种CSC标志物: ABCB5、ALDH1、ABCG2、 α_6 整联蛋白、 $\alpha_2\beta_1$ 整联蛋白、 β -连环蛋白活性、CD15、CD13、CD20、CD24、CD26、CD29、CD44、CD90、CD133、CD166、CD271、c-Met、Hedgehog-Gli、巢蛋白、CXCR4、LGR5、Trop2和Nodal-激活素。

19. 根据权利要求2、3或9至13中任一项所述的方法,其中所述CSC表达选自以下的一种或更多种CSC标志物: ALDH1、CD24、CD44、CD90、CD133、Hedgehog-Gli、 α_6 整联蛋白。

20. 根据权利要求2、3、9至13、18或19中任一项所述的方法,其中所述CSC表达CD24和CD44(例如,CD44^高、CD24^低)。

21. 根据权利要求1至20中任一项所述的方法,其中所述PKC- θ 抑制剂是选择性PKC- θ 抑制剂。

22. 根据权利要求1至20中任一项所述的方法,其中所述PKC- θ 抑制剂是非选择性PKC- θ

抑制剂。

23. 根据权利要求1至22中任一项所述的方法,其中所述PKC- θ 抑制剂降低PKC- θ 基因的表达或者所述基因的表达产物的水平或功能活性。

24. 根据权利要求1至22中任一项所述的方法,其中所述PKC- θ 抑制剂抑制所述PKC- θ 的功能,包括降低或终止其至少一个配体结合位点的活性。

25. 根据权利要求1至24中任一项所述的方法,其还包括在使所述PKC- θ 过表达细胞与所述PKC- θ 抑制剂相接触之前检测到所述PKC- θ 过表达细胞中PKC- θ 基因的过表达。

26. 根据权利要求1至25中任一项所述的方法,其还包括在使所述PKC- θ 过表达细胞与所述PKC- θ 抑制剂相接触之前检测到所述PKC- θ 过表达细胞的核中PKC- θ 的存在或量提高。

27. 根据权利要求1至26中任一项所述的方法,其还包括在使所述PKC- θ 过表达细胞与所述PKC- θ 抑制剂相接触之前检测到所述PKC- θ 过表达细胞中PKC- θ 与CD44或uPAR的启动子的结合。

28. 根据权利要求1至27中任一项所述的方法,其还包括在使所述PKC- θ 过表达细胞与所述PKC- θ 抑制剂相接触之前检测到所述PKC- θ 过表达细胞中PKC- θ 与染色质的结合。

29. 根据权利要求1至28中任一项所述的方法,其还包括检测到所述PKC- θ 过表达细胞表达一种或更多种CSC标志物(例如,如权利要求18至20中任一项所限定的)。

30. 一种用于在对象中治疗或预防癌症的方法,其通过抑制至少一种PKC- θ 过表达细胞的形成、增殖、维持,和/或通过抑制CSC的EMT,和/或通过刺激或诱导CSC的MET来进行,所述方法包括向所述对象施用有效治疗或预防所述癌症的量的PKC- θ 抑制剂。

31. 根据权利要求30所述的方法,其中所述癌症是转移癌。

32. 根据权利要求31所述的方法,其还包括确定所述对象患有所述转移癌或者处于发生所述转移癌的风险下,适当地,所述确定步骤在施用所述PKC- θ 抑制剂之前。

33. 根据权利要求30至32中任一项所述的方法,其中所述至少一种PKC- θ 过表达细胞是CSC。

34. 根据权利要求30至32中任一项所述的方法,其中所述至少一种PKC- θ 过表达细胞是非CSC肿瘤细胞。

35. 根据权利要求30至32中任一项所述的方法,其中所述至少一种PKC- θ 过表达细胞是CSC和非CSC肿瘤细胞。

36. 根据权利要求34或权利要求36所述的方法,其还包括向所述对象共施用至少一种癌症治疗,所述癌症治疗在所述对象中抑制所述非CSC肿瘤细胞增殖或者治疗或改善所述癌症的症状或者逆转或抑制所述癌症的发生或进展。

37. 根据权利要求36所述的方法,其中所述癌症治疗选自放射治疗、化学治疗、干细胞移植和抗体治疗。

38. 根据权利要求30至37中任一项所述的方法,其中所述癌症选自:乳腺癌、前列腺癌、肺癌、膀胱癌、胰腺癌、结肠癌、黑素瘤、肝癌或胶质瘤。

39. 根据权利要求30至37中任一项所述的方法,其中所述癌症是乳腺癌。

40. 一种用于在对象中治疗或预防癌症的方法,其中所述癌症包含CSC和非CSC肿瘤细胞,所述方法包括向所述对象施用有效抑制所述CSC之形成、增殖、维持或EMT或者刺激或诱导所述CSC之MET的量的PKC- θ 抑制剂。

41. 根据权利要求40所述的方法,其中所述癌症是转移癌。
42. 根据权利要求40或41所述的方法,其还包括在施用所述PKC- θ 抑制剂之前确定所述对象患有包含CSC和非CSC肿瘤细胞的癌症或者处于发生所述癌症的风险下。
43. 根据权利要求40至42中任一项所述的方法,其中所述癌症选自:乳腺癌、前列腺癌、肺癌、膀胱癌、胰腺癌、结肠癌、黑素瘤、肝癌或胶质瘤。
44. 根据权利要求40至42中任一项所述的方法,其中所述癌症是乳腺癌。
45. 根据权利要求40至44中任一项所述的方法,其还包括在向所述对象施用所述PKC- θ 抑制剂之前,检测到从所述对象获得的肿瘤样品中PKC- θ 基因的过表达,其中所述肿瘤样品包含所述CSC和/或所述非CSC肿瘤细胞。
46. 根据权利要求45所述的方法,其还包括在向所述对象施用所述PKC- θ 抑制剂之前,检测到从所述对象获得的肿瘤样品中一种或更多种CSC标志物(例如,如在权利要求18至20中任一项所限定的)的表达,其中所述肿瘤样品包含所述CSC和/或所述非CSC肿瘤细胞。
47. 一种用于在对象中治疗或预防癌症的方法,其中所述癌症包含CSC和非CSC肿瘤细胞,所述方法包括向所述对象共同施用癌症治疗或药剂以及有效抑制所述CSC之形成、增殖、维持或EMT或者刺激或诱导所述CSC之MET的量的PKC- θ 抑制剂,从而治疗或预防所述癌症,所述癌症治疗或药剂抑制所述非CSC肿瘤细胞的增殖、存活或活力。
48. 根据权利要求47所述的方法,其中所述癌症治疗或药剂选自:放射治疗、外科手术、化学治疗、激素消融治疗、促凋亡治疗和免疫治疗。
49. 根据权利要求47或权利要求48所述的方法,其中所述癌症治疗或药剂靶向快速分裂的细胞,或者破坏细胞周期或细胞分裂。
50. 根据权利要求47所述的方法,其中所述癌症是转移癌。
51. 根据权利要求47至50中任一项所述的方法,其还包括在所述共同施用之前确定所述对象患有包含所述CSC和所述非CSC肿瘤细胞的癌症或者处于发生所述癌症的风险下。
52. 根据权利要求47至51中任一项所述的方法,其中所述癌症选自:乳腺癌、前列腺癌、肺癌、膀胱癌、胰腺癌、结肠癌、黑素瘤、肝癌或胶质瘤。
53. 根据权利要求47至51中任一项所述的方法,其中所述癌症是乳腺癌。
54. 根据权利要求47至53中任一项所述的方法,其还包括在向所述对象施用所述PKC- θ 抑制剂之前检测到从所述对象获得的肿瘤样品中PKC- θ 基因的过表达,其中所述肿瘤样品包含所述CSC和/或所述非CSC肿瘤细胞。
55. 根据权利要求47至54中任一项所述的方法,其中所述CSC是乳腺CSC。
56. 根据权利要求47至55中任一项所述的方法,其还包括在向所述对象施用所述PKC- θ 抑制剂之前检测到所述CSC表达一种或更多种CSC标志物(例如,如在权利要求18至20中任一项所限定的)。
57. 根据权利要求47至56中任一项所述的方法,其中所述PKC- θ 抑制剂和所述癌症治疗剂以协同有效量施用。
58. 一种用于鉴定可用于在对象中抑制PKC- θ 过表达细胞的形成、增殖、维持或EMT或者用于刺激或诱导PKC- θ 过表达细胞的MET,或者用于治疗或预防癌症(例如,转移癌)的药剂的方法,其中所述癌症包含PKC- θ 过表达细胞,所述方法包括:使制备物与测试药剂相接触,其中所述制备物包含(i)含有对应于PKC- θ 至少一个生物学活性片段或其变体或衍生物的

氨基酸序列的多肽;或者(ii)含有能够产生PKC- θ 基因之转录物或其部分的核苷酸序列的多核苷酸,或者(iii)含有调节PKC- θ 基因表达之基因序列(例如,转录元件)至少一部分的多核苷酸,其与报道基因有效连接;以及相对于在所述测试药剂不存在下的正常或参照水平和/或功能活性,检测到所述多肽、转录物或转录物部分、或者所述报道基因之表达产物的水平和/或功能活性降低,表明所述药剂能够用于抑制所述PKC- θ 过表达细胞的形成、增殖、维持或EMT或者用于刺激或诱导所述PKC- θ 过表达细胞的MET,或者用于治疗或预防所述癌症。

59.根据权利要求58所述的方法,其中所述PKC- θ 过表达细胞选自CSC和非CSC肿瘤细胞。

60.根据权利要求58或权利要求59所述的方法,其中通过以下确定所述药剂抑制PKC- θ 与PKC- θ 配体之间的结合:使所述PKC- θ 和所述配体与所述药剂相接触,并测量所述PKC- θ 与所述配体之间的结合。

61.一种生产用于抑制PKC- θ 过表达细胞的形成、增殖、维持或EMT或者用于刺激或诱导PKC- θ 过表达细胞的MET,或者用于治疗或预防包含PKC- θ 过表达细胞的癌症(例如,转移癌)的药剂的方法,所述方法包括:如权利要求58至60中任一项所限定地对怀疑抑制PKC- θ 功能的药剂进行测试;以及基于其对所述抑制、刺激/诱导或治疗/预防测试呈阳性来合成所述试剂。

62.根据权利要求61所述的方法,其中所述PKC- θ 过表达细胞选自CSC和非CSC肿瘤细胞。

63.根据权利要求61或权利要求62所述的方法,其还包括对所述药剂进行衍生化,以及用可药用载体和/或稀释剂任选地配制衍生化药剂,以提高所述药剂用于抑制PKC- θ 过表达细胞的形成、增殖、维持或EMT或者用于刺激或诱导PKC- θ 过表达细胞的MET,或者用于治疗或预防包含PKC- θ 过表达细胞的癌症(例如,转移癌)的效力。

64.PKC- θ 抑制剂用于抑制PKC- θ 过表达细胞的形成、增殖、维持或EMT或者用于刺激或诱导PKC- θ 过表达细胞的MET,或者用于治疗或预防包含PKC- θ 过表达细胞(例如,CSC)的癌症(例如,转移癌)的用途。

65.PKC- θ 抑制剂用于制造用于抑制PKC- θ 过表达细胞的形成、增殖、维持或EMT或者刺激或诱导PKC- θ 过表达细胞的MET,或者用于治疗或预防包含PKC- θ 过表达细胞的癌症(例如,转移癌)的药物的用途。

66.根据权利要求65所述的用途,其中所述PKC- θ 过表达细胞选自CSC和非CSC肿瘤细胞。

67.根据权利要求66所述的用途,其中所述PKC- θ 抑制剂包含在载剂中或者以其他方式与载剂缔合,所述载剂选自:脂质体、胶束、树枝状聚合物、可生物降解颗粒、人工DNA纳米结构、基于脂质的纳米颗粒以及碳或金纳米颗粒。

68.根据权利要求67所述的用途,其中所述PKC- θ 抑制剂经由选自以下的载剂施用于所述对象:聚(乳酸)(PLA)、聚(乙醇酸)(PGA);聚合物聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA);聚(乙二醇)(PEG)和PLA-PEG共聚物或其任意组合。

69.一种用于增强癌症治疗或药剂对癌细胞的生物学作用的方法,其包括与癌症治疗或药剂一起向有此需要的对象施用有效量的PKC- θ 抑制剂。

70. 根据权利要求69所述的方法,其中所述癌症治疗或药剂是化疗药物或照射。

71. 一种用于抑制PKC- θ 过表达细胞的形成、增殖、维持或EMT或者用于刺激或诱导PKC- θ 过表达细胞的MET,或者用于治疗或预防包含PKC- θ 过表达细胞的癌症(例如,转移癌)的药物组合物,所述组合物包含PKC- θ 抑制剂以及抑制非CSC肿瘤细胞的增殖、存活或活力的药剂。

72. PKC- θ 抑制剂用于增强抑制非CSC肿瘤细胞之增殖、存活或活力的癌症治疗或药剂的效力的用途。

73. PKC- θ 抑制剂和抑制非CSC肿瘤细胞之增殖、存活或活力的癌症治疗或药剂用于治疗或预防包含PKC- θ 过表达细胞(例如,CSC)和非CSC肿瘤细胞的癌症的用途。

74. 根据权利要求73所述的用途,其中所述PKC- θ 抑制剂和任选的所述癌症治疗或药剂被制备或制造成用于该目的的药物。

干细胞调控II

[0001] 本申请要求于2013年9月18日提交的标题为“Stem Cell Modulation II”的澳大利亚临时申请No.2013903589的优先权,其内容通过引用整体并入本文。

技术领域

[0002] 本发明一般地涉及用于调控癌症干细胞的组合物和方法。更特别地,本发明涉及蛋白激酶C θ 抑制剂(PKC- θ)用于抑制PKC- θ 过表达细胞(包括癌症干细胞)的生长、用于增强化疗药物或照射对癌细胞的生物学作用、用于治疗癌症(包括转移癌)和/或用于预防癌症复发的用途。

背景技术

[0003] 上皮向间充质细胞转变(Epithelial-to-mesenchymal cell transition,EMT)是癌症进展和转移中的关键步骤。然而,仅有被称为癌症干细胞(cancer stem cell,CSC)或“前体”转移性细胞的小亚群肿瘤细胞潜在地在转移性肿瘤初发和复发中发挥着显著作用。CSC通过产生并支持更分化的非干细胞后代复制而引发肿瘤并驱动恶性肿瘤进展。(参见,例如,Kleffel等,2013.*Adv Exp Med Biol*.734:145-79;Chen等,2013.*Acta Pharmacologica Sinica* 34:732-740;Páez等,2012,*Clin Cancer Res*.18(3):645-53)。CSC已被证实是肿瘤发生、癌症转移、肿瘤复发、药物抵抗性以及化学治疗和放射治疗失败的根本原因。遗憾的是,CSC引起肿瘤形成和生长的机制以及肿瘤发生学中CSC特异性分化可塑性的潜在作用目前尚不清楚。

[0004] 有趣的是,CSC与正常干细胞共享许多相似的特性。例如,CSC具有自我更新能力,即,与分裂次数限制相反,CSC能够以通常比其他分裂中的肿瘤细胞更慢的速度产生额外的致肿瘤性癌症干细胞。CSC还具有分化成多种细胞类型的能力(即,其为多能的),这解释了以下组织学证据:不仅许多肿瘤包含宿主器官天然的多种细胞类型,而且通常还在肿瘤转移中保留了异质性。

[0005] CSC表达例如下表1中列出的某些细胞表面标志物:

[0006]

乳腺	结肠	胶质瘤	肝	肺	黑色素瘤	卵巢	胰腺	前列腺
	ABCB5							
ALDH1	ALDH1						ABCG2	
CD24	β -连环蛋白活性	CD15	CD13	ALDH1	ABCB5		ALDH1	ALDH1
CD44	CD24	CD90	CD24	ABCG2	ALDH1	CD24	CD24	CD44
CD90	CD26	CD133	CD44	CD90	CD20	CD44	CD44	CD133
CD133	CD29	α_6 整联蛋白	CD90	CD117	CD133	CD117	CD133	$\alpha_2 \beta_1$ 整联蛋白
Hedgehog-Gli活性	CD44	巢蛋白	CD133	CD133	CD271	CD133	δ -Met	α_6 整联蛋白
α_6 整联蛋白	CD133						CXCR4	Trop2
	CD166						巢蛋白	
	LGR5						Nodal-激活素	

[0007] 正常成体干细胞对化学治疗剂具有天然抵抗性,其具有多种泵出药物的泵(例如,多药抗性(multi-drug resistance,MDR)蛋白)和有效的DNA修复机制。此外,当化学治疗剂靶向快速复制的细胞时,其还具有较慢的细胞更新速度。CSC,作为正常干细胞的突变对应物,也可具有使其在药物治疗和放射治疗中存活下来的相似机制。换句话说,常规的化学治疗和放射治疗杀伤已分化细胞或正在分化的细胞,这形成了无法再生肿瘤的肿瘤大块。另一方面,产生已分化细胞和正在分化的细胞的CSC群体可仍未受影响并导致疾病复发。常规抗癌治疗的另一个危险是治疗(例如,化学治疗)可能仅留下化学治疗抗性的CSC,并且之后复发的肿瘤也将可能对化学治疗具有抗性。

[0008] 因此,迫切需要确定靶向细胞毒性的抗药性肿瘤起始CSC以用于预防和/或治疗疾病复发和远端转移扩散的新方法。

发明内容

[0009] 本发明部分地基于以下结论:PKC- θ 在CSC和非CSC肿瘤细胞中过表达并且对于控制CSC和非CSC肿瘤细胞的EMT以及形成和维持是重要的。本发明人还发现,通过抑制该酶的活性可抑制CSC和非CSC肿瘤细胞的EMT、形成和维持,以及诱导间充质向上皮细胞转变(mesenchymal-to-epithelial cell transition,MET)。因此,提出了PKC- θ 抑制剂可用于降低或抑制CSC和非CSC肿瘤细胞的增殖,包括抑制EMT、刺激或诱导MET和减少癌症复发,如下文所述。

[0010] 因此,在一个方面中,本发明提供了用于改变PKC- θ 过表达细胞的(i)形成、(ii)增殖、(iii)维持、(iv)EMT或(v)MET中至少一个的方法。这些方法一般包括使PKC- θ 过表达细胞与形成、增殖、维持、EMT或MET调控量的PKC- θ 抑制剂相接触,由所述步骤组成或者基本上由所述步骤组成。适当地,PKC- θ 过表达细胞选自CSC和非CSC肿瘤细胞,其示例性实例包括

乳腺、前列腺、肺、膀胱、胰腺、结肠、黑素瘤、肝或胶质瘤的CSC和非CSC肿瘤细胞。在一些实施方案中，CSC是乳腺CSC(例如，乳腺上皮CSC，包括乳腺导管上皮CSC)。在一些实施方案中，非CSC肿瘤细胞是乳腺非CSC肿瘤细胞(例如，乳腺上皮非CSC肿瘤细胞，包括乳腺导管上皮非CSC肿瘤细胞)。适当地，使PKC- θ 过表达细胞与PKC- θ 过表达细胞形成抑制、增殖抑制、维持抑制、EMT抑制量或者MET刺激/诱导量的PKC- θ 抑制剂中的一种或更多种相接触。在一些实施方案中，PKC- θ 过表达细胞中PKC- θ 的过表达包括PKC- θ 过表达细胞的核中PKC- θ 的存在或量提高。

[0011] 在PKC- θ 过表达细胞是CSC的一些实施方案中，CSC表达选自以下的一种或更多种(例如，1、2、3、4、5、6、7、8或更多种)CSC标志物：ABCB5、ALDH1、ABCG2、 α_6 整联蛋白、 $\alpha_2\beta_1$ 整联蛋白、 β -连环蛋白活性、CD15、CD13、CD20、CD24、CD26、CD29、CD44、CD90、CD133、CD166、CD271、c-Met、Hedgehog-Gli、巢蛋白、CXCR4、LGR5、Trop2和Nodal-激活素。在一些实施方案中，CSC表达选自以下的一种或更多种(例如，1、2、3、4、5、6、7、8或更多种)CSC标志物：ALDH1、CD24、CD44、CD90、CD133、Hedgehog-Gli、 α_6 整联蛋白。在该类型的示例性实例中，CSC表达CD24和CD44(例如，CD44^高、CD24^低)。

[0012] 合适的PKC- θ 抑制剂的非限制性实例包括核酸、肽、多肽、肽模拟物、碳水化合物、脂质或其他有机(含碳)分子或无机分子。在一些具体的实施方案中，PKC- θ 抑制剂选自小分子抑制剂和核酸分子(例如，抑制PKC- θ 基因转录或翻译或者介导RNA干扰的那些)。在一些实施方案中，PKC- θ 抑制剂使PKC- θ 基因表达或者PKC- θ 表达产物之水平或功能活性降低(例如，降低PKC- θ 多肽水平、降低PKC- θ 介导的磷酸化、抑制PKC- θ 与CD44或uPAR的启动子的结合、降低PKC- θ (例如，活性PKC- θ)与染色质的结合、降低PKC- θ 介导的鸟嘌呤交换因子GIV/Girdin抑制、降低PKC- θ 介导的调节性T细胞功能抑制或者降低PKC- θ 介导的EMT)至小于在抑制剂不存在下PKC- θ 基因表达或者相应PKC- θ 表达产物之水平或功能活性的约9/10、4/5、7/10、3/5、1/2、2/5、3/10、1/5、1/10、1/20、1/50、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 、 10^{-12} 、 10^{-13} 、 10^{-14} 或约 10^{-15} 。在一些实施方案中，PKC- θ 抑制剂是选择性PKC- θ 抑制剂。在另一些实施方案中，PKC- θ 抑制剂是非选择性PKC- θ 抑制剂。

[0013] 在一些实施方案中，用于改变PKC- θ 过表达细胞的(i)形成、(ii)增殖、(iii)维持、(iv)EMT或(v)MET中至少一个的方法还包括在使所述PKC- θ 过表达细胞与所述PKC- θ 抑制剂相接触之前检测到所述PKC- θ 过表达细胞中PKC- θ 的过表达(相对于正常细胞(例如，正常乳腺细胞)中PKC- θ 的表达)。在该类型的非限制性实例中，所述方法包括检测到CSC中PKC- θ 的过表达。在另一些非限制性实例中，所述方法包括检测到非CSC肿瘤细胞中PKC- θ 的过表达。在又一些非限制性实例中，所述方法包括检测到CSC和非CSC肿瘤细胞中PKC- θ 的过表达。

[0014] 在一些实施方案中，用于改变PKC- θ 过表达细胞的(i)形成、(ii)增殖、(iii)维持、(iv)EMT或(v)MET中至少一个的方法还包括在使所述PKC- θ 过表达细胞与所述PKC- θ 抑制剂相接触之前检测到所述PKC- θ 过表达细胞的核中PKC- θ 的存在或量提高(相对于正常细胞(例如，正常乳腺细胞)的核中PKC- θ 的量)。在该类型的示例性实例中，所述方法包括检测到CSC的核中PKC- θ 的存在或量提高。在另一些示例性实例中，所述方法包括检测到非CSC肿瘤细胞的核中PKC- θ 的存在或量提高。在又一些示例性实例中，所述方法包括检测到CSC和非CSC肿瘤细胞的核中PKC- θ 的存在或量提高。

[0015] 在一些实施方案中，用于改变PKC- θ 过表达细胞的(i)形成、(ii)增殖、(iii)维持、

(iv)EMT或(v)MET中至少一个的方法还包括在使所述PKC- θ 过表达细胞与所述PKC- θ 抑制剂相接触之前检测到所述PKC- θ 过表达细胞中PKC- θ 与CD44或uPAR的启动子的结合。在该类型的代表性实例中,所述方法包括检测到CSC中PKC- θ 与CD44或uPAR的启动子的结合。在另一些代表性实例中,所述方法包括检测到非CSC肿瘤细胞中PKC- θ 与CD44或uPAR的启动子的结合。在又一些代表性实例中,所述方法包括检测到CSC和非CSC肿瘤细胞中PKC- θ 与CD44或uPAR的启动子的结合。

[0016] 在一些实施方案中,用于改变PKC- θ 过表达细胞的(i)形成、(ii)增殖、(iii)维持、(iv)EMT或(v)MET中至少一个的方法还包括在使所述PKC- θ 过表达细胞与所述PKC- θ 抑制剂相接触之前检测到所述PKC- θ 过表达细胞中PKC- θ 与染色质的结合。在该类型的非限制性实例中,所述方法包括检测到CSC中PKC- θ 与染色质的结合。在另一些非限制性实例中,所述方法包括检测到非CSC肿瘤细胞中PKC- θ 与染色质的结合。在又一些非限制性实例中,所述方法包括检测到CSC和非CSC肿瘤细胞中PKC- θ 与染色质的结合。

[0017] 适当地,用于改变PKC- θ 过表达细胞的(i)形成、(ii)增殖、(iii)维持、(iv)EMT或(v)MET中至少一个的方法还包括检测到所述PKC- θ 过表达细胞表达如上宽泛所述的一种或更多种CSC标志物。

[0018] 在另一个方面中,本发明提供了用于在对象中治疗或预防癌症(例如,转移癌)的方法,其中所述癌症包含至少一种PKC- θ 过表达细胞。这些方法通常包括向所述对象施用有效改变至少一种PKC- θ 过表达细胞的(i)形成、(ii)增殖、(iii)维持、(iv)EMT或(v)MET中至少一个的量的PKC- θ 抑制剂,由所述步骤组成或者基本上由所述步骤组成。适当地,向所述对象施用有效抑制所述至少一种PKC- θ 过表达细胞的(i)形成、(ii)增殖、(iii)维持或(iv)EMT或者刺激或诱导所述至少一种PKC- θ 过表达细胞的(v)MET的量的PKC- θ 抑制剂。在一些实施方案中,PKC- θ 抑制剂是选择性PKC- θ 抑制剂。在另一些实施方案中,PKC- θ 抑制剂是非选择性PKC- θ 抑制剂。适当地,所述至少一种PKC- θ 过表达细胞选自CSC和非CSC肿瘤细胞。

[0019] 在一些实施方案中,所述癌症选自乳腺癌、前列腺癌、肺癌、膀胱癌、胰腺癌、结肠癌、黑素瘤、肝癌或胶质瘤。适当地,所述癌症是乳腺癌。在一些实施方案中,CSC产生激素抵抗的非CSC肿瘤细胞。

[0020] 在一些实施方案中,用于治疗或预防癌症的方法还包括在向对象施用PKC- θ 抑制剂之前,检测到从对象获得的肿瘤样品中PKC- θ 基因的过表达,其中所述肿瘤样品包含至少一种PKC- θ 过表达细胞(例如,CSC和/或非CSC肿瘤细胞)。

[0021] 在一些实施方案中,用于治疗或预防癌症的方法还包括在向对象施用PKC- θ 抑制剂之前,检测到从对象获得的肿瘤样品中如上宽泛所述的一种或更多种CSC标志物的表达,其中所述肿瘤样品包含至少一种PKC- θ 过表达细胞。

[0022] 在又一个方面中,本发明提供了用于在对象中治疗或预防癌症(例如,转移癌)的方法,其中所述癌症包含CSC和非CSC肿瘤细胞。这些方法通常包括向所述对象共同施用:(1)有效抑制CSC和/或非CSC肿瘤细胞的(i)形成、(ii)增殖或(iii)维持中至少一个;和/或抑制CSC的(iv)EMT;和/或刺激或诱导CSC的(v)MET的量的PKC- θ 抑制剂,以及(2)抑制非CSC肿瘤细胞之增殖、存活或活力的癌症治疗或药剂,从而治疗或预防癌症。适当地,向所述对象施用有效抑制CSC和/或非CSC肿瘤细胞的(i)形成、(ii)增殖或(iii)维持,和/或抑制CSC的(iv)EMT,和/或刺激或诱导CSC的(v)MET的量的PKC- θ 抑制剂。在一些实施方案中,PKC- θ

抑制剂是选择性PKC- θ 抑制剂。在另一些实施方案中,PKC- θ 抑制剂是非选择性PKC- θ 抑制剂。在一些实施方案中,癌症治疗或药剂选自放射治疗、外科手术、化学治疗、激素消融治疗、促凋亡治疗和免疫治疗。在该类型的示例性实例中,癌症治疗或药剂靶向快速分裂的细胞或者破坏细胞周期或细胞分裂。

[0023] 适当地,所述方法还包括在共同施用之前确定对象患有包含CSC和非CSC肿瘤细胞的癌症或者处于发生所述癌症的风险下。在一些实施方案中,所述癌症选自乳腺癌、前列腺癌、肺癌、膀胱癌、胰腺癌、结肠癌、黑素瘤、肝癌或胶质瘤。适当地,所述癌症选自乳腺癌、前列腺癌、肺癌、膀胱癌、胰腺癌、结肠癌、黑素瘤、肝癌或脑癌。

[0024] 在一些实施方案中,用于治疗或预防癌症的方法还包括在向对象施用PKC- θ 抑制剂之前检测到从对象获得的肿瘤样品中PKC- θ 的过表达(相对于正常细胞(例如,正常乳腺细胞)中PKC- θ 的表达),其中所述肿瘤样品包含CSC或非CSC肿瘤细胞或二者。

[0025] 在一些实施方案中,用于治疗或预防癌症的方法还包括在向对象施用PKC- θ 抑制剂之前检测到从对象获得的肿瘤样品的CSC和/或非CSC肿瘤细胞的核中PKC- θ 的存在或量提高(例如,相对于正常细胞(例如,正常乳腺细胞)的核中PKC- θ 的量),其中所述肿瘤样品包含CSC或非CSC肿瘤细胞或二者。

[0026] 在一些实施方案中,用于治疗或预防癌症的方法还包括在向对象施用PKC- θ 抑制剂之前检测到从对象获得的肿瘤样品的CSC和/或非CSC肿瘤细胞中PKC- θ 与CD44或uPAR的启动子的结合,其中所述肿瘤样品包含CSC或非CSC肿瘤细胞或二者。

[0027] 在一些实施方案中,用于治疗或预防癌症的方法还包括在向对象施用PKC- θ 抑制剂之前检测到从对象获得的肿瘤样品的CSC和/或非CSC肿瘤细胞中PKC- θ 与染色质的结合,其中所述肿瘤样品包含CSC或非CSC肿瘤细胞或二者。

[0028] 在一些实施方案中,用于治疗或预防癌症的方法还包括在向对象施用PKC- θ 抑制剂之前检测到CSC表达如上宽泛所述的一种或更多种CSC标志物。

[0029] 适当地,PKC- θ 抑制剂和癌症治疗剂以协同有效量施用。

[0030] 通常,PKC- θ 抑制剂和癌症治疗或药剂之一或两者按定期时间表施用,例如,每天、每周至少两次、每周至少三次、每周至少四次、每周至少五次、每周至少六次、每周、每隔一周、每三周、每四周、每月、每两个月、每三个月、每四个月和每六个月。

[0031] 在一些实施方案中,癌症治疗有可能使对象暴露于更高风险的致病生物感染。因此,在这些实施方案中,所述方法还包括与PKC- θ 抑制剂和/或癌症治疗/药剂同时、按顺序或单独施用至少一种抗感染剂,所述抗感染剂可有效对抗通过施用癌症治疗或药剂发生感染或具有增加的发生感染风险,其中所述抗感染剂选自抗微生物剂、抗生素、抗病毒剂、抗真菌剂、驱虫剂(anthelmintic)、抗原虫剂(antiprotozoal)和杀线虫剂。

[0032] 在又一个方面中,本发明提供了用于鉴定可用于以下用途的药剂的方法:用于抑制PKC- θ 过表达细胞(例如,CSC和/或非CSC肿瘤细胞)的(i)形成、(ii)增殖或(iii)维持;或者用于抑制PKC- θ 过表达细胞(例如,CSC)的(iv)EMT;或者用于刺激或诱导PKC- θ 过表达细胞(例如,CSC)的(v)MET;或者用于在对象中治疗或预防癌症,其中所述癌症包含PKC- θ 过表达细胞(例如,CSC和/或非CSC肿瘤细胞)。这些方法通常包括使制备物与测试药剂相接触,其中所述制备物包含:(i)含有对应于PKC- θ 至少一个生物学活性片段或其变体或衍生物的氨基酸序列的多肽;或者(ii)含有可产生PKC- θ 基因之转录物或其部分的核苷酸序列的多

核苷酸,或者(iii)含有调节PKC- θ 基因表达之基因序列(例如,转录元件)至少一部分的多核苷酸,其与报道基因有效连接。相对于在测试药剂不存在下的正常或参考水平和/或功能活性,检测到多肽、转录物或转录物部分、或者报道基因表达产物的水平和/或功能活性(例如,如上宽泛所述的)降低,表明所述药剂可用于抑制PKC- θ 过表达细胞(例如,CSC和/或非CSC肿瘤细胞)的(i)形成、(ii)增殖或(iii)维持;或者抑制PKC- θ 过表达细胞(例如,CSC)的(iv)EMT;或者用于刺激或诱导PKC- θ 过表达细胞(例如,CSC)的(v)MET;或者用于治疗或预防癌症。

[0033] 本发明的再一个方面提供了制备用于以下用途的药剂的方法:用于抑制PKC- θ 过表达细胞(例如,CSC和/或非CSC肿瘤细胞)的(i)形成、(ii)增殖或(iii)维持;或者用于抑制PKC- θ 过表达细胞(例如,CSC)的(iv)EMT;或者用于刺激或诱导PKC- θ 过表达细胞(例如,CSC)的(v)MET;或者用于在对象中治疗或预防癌症,其中所述癌症如上宽泛所述地包含PKC- θ 过表达细胞(例如,CSC和/或非CSC肿瘤细胞)。这些方法通常包括:如上宽泛所述地对怀疑抑制PKC- θ 的药剂进行测试;以及基于其对抑制测试呈阳性来合成药剂。适当地,所述方法还包括对所述药剂进行衍生化,以及任选地与可药用载体和/或稀释剂配制衍生化药剂,以提高所述药剂用于以下用途的效力:用于抑制PKC- θ 过表达细胞(例如,CSC和/或非CSC肿瘤细胞)的(i)形成、(ii)增殖或(iii)维持;或者用于抑制PKC- θ 过表达细胞(例如,CSC)的(iv)EMT;或者用于刺激或诱导PKC- θ 过表达细胞(例如,CSC)的(v)MET;或者用于在对象中治疗或预防癌症,其中所述癌症包含PKC- θ 过表达细胞(例如,CSC和/或非CSC肿瘤细胞)。

[0034] 本发明的另一个方面提供了用于以下用途的药物组合物:用于抑制CSC和/或非CSC肿瘤细胞的(i)形成、(ii)增殖或(iii)维持中的至少一个;和/或用于抑制CSC的(iv)EMT;和/或用于刺激或诱导CSC的(v)MET;和/或用于治疗或预防如上宽泛描述的包含CSC和/或非CSC肿瘤细胞之癌症。这些组合物通常包含PKC- θ 抑制剂和抑制非CSC肿瘤细胞增殖、存活或活力的第二/辅助药剂,由其组成或者基本上由其组成。在一些实施方案中,PKC- θ 抑制剂是选择性PKC- θ 抑制剂。在另一些实施方案中,PKC- θ 抑制剂是非选择性PKC- θ 抑制剂。

[0035] 在另一个方面中,本发明提供了PKC- θ 抑制剂用于以下的用途:用于改变PKC- θ 过表达细胞的(i)形成、(ii)增殖或(iii)维持、(iv)EMT或(v)MET中的至少一个;或者用于治疗或预防如上宽泛描述的包含PKC- θ 过表达细胞(例如,CSC或非CSC肿瘤细胞)的癌症。

[0036] 本发明的又一个方面提供了PKC- θ 抑制剂用于增强抑制非CSC肿瘤细胞之增殖、存活或活力的癌症治疗或药剂的效力的用途。

[0037] 在再一个方面中,本发明提供了PKC- θ 抑制剂和抑制非CSC肿瘤细胞之增殖、存活或活力的癌症治疗或药剂的用途,其用于治疗或预防如上宽泛描述的包含CSC和非CSC肿瘤细胞的癌症。在一些实施方案中,将所述PKC- θ 抑制剂和任选的所述癌症治疗或药剂制备或制造成用于该目的的药物。

附图说明

[0038] 图1A示出在MCF-1M模型中用PKC诱导物佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯(PMA)刺激MCF-7细胞导致了最大EMT的图解表示。MCF-7细胞未经刺激(NS)或者用TNF- α (20ng/mL)、

EGF(50ng/mL)、IL-6(50ng/mL)、TGF- β (2.5ng/mL)或PMA(20ng/mL)刺激60小时。使用Olympus 17X1显微镜拍摄每种刺激物的三个或更多个相差图像。在每幅图像中对至少200个细胞计数并计算经历EMT的细胞的平均百分比(%),随后绘图。结果以两次独立实验的平均值 \pm 标准误差示出。

[0039] 图1B是示出在MCF-IM模型中EMT标志物层粘连蛋白-5的形态学EMT变化和差异细胞内染色图案的照片表示。MCF-7细胞未经刺激(NS)或者用PMA(0.65ng/mL持续60小时)刺激(ST),随后通过相差显微镜拍摄照片或者分别用抗层粘连蛋白-5抗体(绿色)或DAPI染色剂(核染色)染色。使用Leica显微镜在60 \times 放大下拍摄MCF-7的共聚焦显微图像。

[0040] 图1C是示出在MCF-IM模型中较大的伤口愈合的照片表示。MCF-7细胞(i)经PMA(0.65ng/mL)刺激18小时,或者(ii)未经处理未经刺激(NS)。随后在时间点0小时(红色线)和18小时(绿色线)通过使用10 \times 放大的Olympus 17X1拍摄伤口愈合测定的相差图像。使两幅图像重叠(红色线和绿色线一起在一幅图像中)以示出处理的伤口愈合能力。

[0041] 图1D是在MCF-IM和基底/转移模型中较高的PKC激酶活性的图解表示。MCF-7细胞未经刺激(NS)或者用PMA(0.65ng/mL)刺激(ST)。对来自NS和经ST处理的MCF-7细胞和MDA-MD 231细胞的全细胞裂解物(WCL)、细胞质提取物(CE)或核提取物(NE)进行基于PKC ELISA的激酶测定。在450nm下测量吸光度。数据绘制为相比于阴性对照的相对激酶活性。数据表示三次独立实验的平均值 \pm SE,并且使用GraphPad Prism 5.03通过双尾配对t检验确定统计学显著性。

[0042] 图1E是示出在MCF-IM模型中CD44^高/CD24^低的癌症干细胞样(CSC)亚群分选的FACS设门策略的图解表示。MCF-7细胞是未经处理未刺激的(NS)或者用PMA(0.65ng/mL)刺激60小时(ST)。随后在FACS分选之前用Hoechst、APC-抗CD44和PE-抗CD24混合物对细胞进行染色。癌症干细胞样(CSC)群由CD44^高/CD24^低染色限定。首先对经PMA刺激的群作出CSC样亚群和NCSC亚群的设门并将这些设门复制到未刺激群以确定未刺激细胞中的CSC样群低于0.1%。示出了10次独立实验的代表性FACS图以突出设门策略。

[0043] 图1F是示出MCF-IM模型产生高百分比的CD44^高/CD24^低的亚群或CSC样亚群的图解表示。MCF-7细胞是未经处理未刺激的(NS)或者用PMA(0.65ng/mL)刺激60小时(ST)。使用图1E中所述的设门策略进行FACS分析,随后由十次独立实验绘制平均% CSC样亚群(误差条是标准误差)。

[0044] 图1G是示出MCF-IM模型导致乳腺球产生的照片和图解表示。乳腺球测定用 4×10^4 个MCF-7细胞/孔在超低附着6孔板中进行。细胞(A)未经刺激(NS)或者用(B)PMA(0.65ng/mL)或(C)TNF- α (10ng/mL)刺激。在测定开始6天后使用相差显微镜拍摄乳腺球的图像并绘图。实验一式两份地进行并且对每个孔中的乳腺球进行计数以得到平均值。数据表示两次独立实验的平均值 \pm SE。

[0045] 图1H是示出在MCF-IM模型中诱导的CSC样亚群具有不同的转录模式的图解表示。对未经刺激的(NS)或经PMA(0.65ng/mL持续60小时)刺激的MCF-7细胞以及经FACS分选的亚群癌症干细胞样(CSC样)亚群和非癌症干细胞样(NCSC)亚群进行基因CD44、层粘连蛋白-5、uPAR、纤连蛋白和整联蛋白- β 的转录物分析。对由分离自上述三个群的总RNA合成的cDNA进行**TaqMan®**实时PCR。将每个时间点产生的阈循环(C_t)值转化成任意拷贝数并相对于亲环素A参照水平归一化。mRNA水平以任意拷贝数表达,并且与未刺激细胞相比的倍数变化在

误差条上方示出。数据表示三次独立实验的平均值±标准误(SE)。

[0046] 图1I是示出在MCF-IM模型中诱导的CSC样亚群和NCSC亚群导致miR200家族成员的表达降低的图解表示。miR 200b和miR 200c的MicroRNA cDNA水平通过对未经处理未刺激(NS)的或经PMA刺激(0.65ng/mL持续60小时)的MCF-7细胞,经FACS分选的亚群癌症干细胞样(CSC样)亚群和非癌症干细胞(NCSC)样亚群进行**TaqMan®**microRNA实时分析来测量。将每个时间点产生的阈循环(C_t)值转化成任意拷贝数并归一化至RNU6B参照水平。MicroRNA水平以任意拷贝数表达,并且数据表示三次独立实验的平均值±标准误(SE)。

[0047] 图2A是示出在MCF-IM模型中广谱PKC抑制剂双吡喹马来酰亚胺-I抑制EMT的照片表示。在未经PKC特异性抑制剂预处理(ST-BIS)的情况下,或在PMA刺激之前用双吡喹马来酰亚胺(1 μ M)预处理1小时(ST+BIS)的情况下,拍摄未刺激(NS)MCF-7细胞和经PMA(0.65ng/ μ L持续60小时)MCF-7刺激(ST)细胞的相差显微镜图像。

[0048] 图2B是示出在MCF-IM模型中仅非常高浓度的双吡喹马来酰亚胺-I而不是Go 6976抑制CD44高CD24低的CSC样亚群的图解表示。在PMA(0.65ng/ μ L持续60小时)刺激(ST)之前,用载体单独或与双吡喹马来酰亚胺-I(100nm和1 μ M)或Go 6976(1 μ M)一起预孵育MCF-7细胞。细胞随后在冰上用Hoechst 33528、APC-抗CD44和PE-抗CD24染色20分钟并经过FACS分析。FACS图上的圆圈表示CD44^高/CD24^低CSC样亚群的适当设门,并且CSC样亚群%分别显示在所述设门上方。

[0049] 图2C是图2B中所示数据的替代图解表示。数据表示两次独立实验的平均值±标准误(SE)。

[0050] 图2D是示出1 μ M双吡喹马来酰亚胺-I在MCF-IM模型中减少乳腺球形成的照片表示。乳腺球测定用 4×10^4 个MCF-7细胞/孔在超低附着6孔板中进行。在PMA刺激(0.65ng/mL持续6天)(ST)或未刺激(NS)之前,用载体单独或与双吡喹马来酰亚胺-I(1 μ M持续1小时)一起预孵育MCF-7细胞。在6天的测定后拍摄乳腺球的相差显微图像,并仅对大于60 μ m的乳腺球进行计数。

[0051] 图2E是图2B所示数据的替代图解表示。数据表示两次独立实验的平均值±标准误(SE)。

[0052] 图2F是示出在MCF-IM模型中100mM双吡喹马来酰亚胺-I处理不能抑制关键诱导型EMT/CSC基因的转录的图解表示。MCF-7细胞是未经处理未刺激的(NS)或者在PMA(0.65ng/ μ L持续60小时)刺激(ST)之前经双吡喹马来酰亚胺-I(100nM)预处理1小时。对由总RNA合成的cDNA进行EMT/CSC基因-层粘连蛋白-5、uPAR和CD44的**TaqMan®**实时PCR分析。将每个时间点产生的阈循环(C_t)值转化成任意拷贝数并相对于亲环素A参照水平归一化。mRNA水平以与未刺激细胞相比的倍数变化表达。数据表示两次独立实验的平均值±标准误(SE)。

[0053] 图2G是示出在MCF-IM模型中1 μ M双吡喹马来酰亚胺-I处理抑制关键诱导型EMT/CSC基因的转录的图解表示。MCF-7细胞是未经处理未刺激的(NS)或者在PMA(0.65ng/ μ L持续60小时)刺激(ST)之前经双吡喹马来酰亚胺-I(1 μ M)预处理1小时。对由总RNA合成的cDNA进行EMT/CSC基因-层粘连蛋白-5、uPAR和CD44的**TaqMan®**实时PCR分析。将每个时间点产生的阈循环(C_t)值转化成任意拷贝数并相对于亲环素A参照水平归一化。mRNA水平以与未刺激细胞相比的倍数变化表达。数据表示两次独立实验的平均值±标准误(SE)。

[0054] 图2H是示出在MCF-IM模型中1 μ M Go6976处理不能抑制关键诱导型EMT/CSC基因的

转录的图解表示。MCF-7细胞是未经处理未刺激的(NS)或者在PMA(0.65ng/ μ L持续60小时)刺激(ST)之前经Go6976(1 μ M)预处理1小时。对由总RNA合成的cDNA进行EMT/CSC基因-层粘连蛋白-5、uPAR和CD44的**TaqMan®**实时PCR分析。将每个时间点产生的阈循环(C_t)值转化成任意拷贝数并相对于亲环素A参照水平归一化。mRNA水平以与未刺激细胞相比的倍数变化表达。数据表示两次独立实验的平均值 \pm 标准误(SE)。

[0055] 图2I是示出在基底/转移模型中广谱PKC抑制剂双吡啶马来酰亚胺-I抑制EMT的照片表示。在未经PKC特异性抑制剂预处理(-BIS)或者在经双吡啶马来酰亚胺(4 μ M)处理(+BIS)的情况下拍摄MDA-MB231细胞的相差显微镜图像。

[0056] 图2J是示出在基底/转移模型中双吡啶马来酰亚胺-I抑制CD44高CD24低CSC样亚群的图解表示。用载体单独或与双吡啶马来酰亚胺-I(4 μ M)一起孵育MDA-MB 231细胞。细胞随后在冰上用Hoechst 33528、APC-抗CD44和PE-抗CD24染色20分钟并经过FACS分析。CSC样亚群%显示在柱状图中。数据表示两次独立实验的平均值 \pm 标准误(SE)。

[0057] 图2K是示出在基底/转移模型中双吡啶马来酰亚胺-I处理抑制关键诱导型EMT/CSC基因的转录的图解表示。用载体单独或与双吡啶马来酰亚胺-I(4 μ M)一起孵育MDA-MB 231细胞。对由总RNA合成的cDNA进行EMT/CSC基因-层粘连蛋白-5、uPAR和CD44的**TaqMan®**实时PCR分析。将每个时间点产生的阈循环(C_t)值转化成任意拷贝数并相对于亲环素A参照水平归一化。mRNA水平以与未刺激细胞相比的倍数变化表达。数据表示两次独立实验的平均值 \pm 标准误(SE)。

[0058] 图3A是示出在MCF-IM模型中非常低浓度的PKC- θ 肽抑制剂废除EMT的照片表示。在未经抑制剂预处理或者在PMA刺激之前经PKC- θ 特异性肽(30 μ M)预处理24小时的情况下,拍摄未刺激(NS)MCF-7细胞和经PMA(0.65ng/ μ L持续60小时)刺激(ST)MCF-7细胞的相差显微图像。

[0059] 图3B是示出在MCF-IM模型中PKC- θ 肽抑制剂抑制CD44高CD24低CSC样亚群的图解表示。在PMA(0.65ng/ μ L持续60小时)刺激(ST)之前用载体单独或与PKC- θ 特异性肽(30 μ M)一起预孵育MCF-7细胞。细胞随后在冰上用Hoechst 33528、APC-抗CD44和PE-抗CD24染色20分钟并经过FACS分析。作出CD44^高/CD24^低CSC样亚群的适当设门并绘制柱状图。数据表示两次独立实验的平均值 \pm 标准误(SE)。

[0060] 图3C是示出在MCF-IM模型中PKC- θ 肽抑制剂处理降低关键诱导型EMT/CSC基因的转录的图解表示。在PMA(0.65ng/ μ L持续60小时)刺激(ST)之前用载体单独或与PKC- θ 特异性肽(30 μ M)一起预孵育MCF-7细胞。对由总RNA合成的cDNA进行EMT/CSC基因-CD44的**TaqMan®**实时PCR分析。将每个时间点产生的阈循环(C_t)值转化成任意拷贝数并相对于亲环素A参照水平归一化。mRNA水平以与未刺激细胞相比的倍数变化表达。数据表示两次独立实验的平均值 \pm 标准误(SE)。

[0061] 图3D是示出在MCF-IM模型中PKC- θ 敲低导致PMA诱导的CSC样亚群废除而PKC- β 敲除使PMA诱导的CSC样亚群增加的图解表示。用模拟siRNA(模拟物)、PKC- θ siRNA或PKC- β siRNA转染MCF-7细胞48小时,然后进行未处理未刺激(NS)或进行PMA刺激(ST)(0.65ng/mL持续60小时)。随后通过用Hoechst、APC-抗CD44和PE-抗CD24抗体染色混合物对细胞进行染色来进行FACS分析。作出CSC样亚群的适当设门并且CSC样亚群%显示在柱状图中。数据表示两次独立实验的平均值 \pm 标准误(SE)。

[0062] 图3E是示出在MCF-IM模型中PKC- θ 敲低使乳腺球形成减少的图解图示。乳腺球测定用 4×10^4 个MCF-7细胞/孔在超低附着6孔板中进行。用模拟siRNA(模拟物)或PKC- θ siRNA转染MCF-7细胞48小时,然后进行未处理未刺激(NS)或进行PMA刺激(ST)(0.65ng/mL持续60小时)。在测定6天后拍摄乳腺球的相差显微图像,仅对大于60 μ m的乳腺球进行计数并绘制柱状图。数据表示两次独立实验的平均值 \pm 标准误(SE)。

[0063] 图3F是示出在MCF-IM模型中PKC- θ 敲低导致关键诱导型EMT/CSC基因的转录抑制的图解表示,而PKC- β 敲低在MCF-IM模型中并不具有这种抑制作用。用模拟siRNA(模拟)或PKC- θ siRNA或PKC- β siRNA转染MCF-7细胞48小时,然后进行未处理未刺激(NS)或进行PMA刺激(ST)(0.65ng/mL持续60小时)。对由总RNA合成的cDNA进行EMT/CSC基因-uPAR和CD44的**TaqMan®**实时PCR分析。将每个时间点产生的阈循环(C_t)值转化成任意拷贝数并相对于亲环素A参照水平归一化。mRNA水平以与未刺激细胞相比的倍数变化表达。数据表示两次独立实验的平均值 \pm 标准误(SE)。

[0064] 图3G是示出PKC- θ NLS(核定位信号)突变的过表达减少PKC- θ 进入核中的照片表示。在共聚焦显微镜检查之前使PKC- θ WT(野生型)或PKC- θ NLS的过表达在MCF-IM模型中进行72小时。

[0065] 图3H是示出在MCF-IM模型中PKC- θ NLS(核定位信号)突变的过表达使CSC%降低的图解表示。在刺激(0.65ng/mL持续60小时)细胞之前使模拟载体、PKC- θ WT(野生型)或PKC- θ NLS的过表达在MCF-IM模型中进行72小时。随后通过用Hoechst、APC-抗CD44和PE-抗CD24抗体染色混合物对细胞进行染色来进行FACS分析。作出CSC样亚群的适当设门,计算高于模拟物的CSC样亚群的%增加并示于柱状图中。数据表示两次独立实验的平均值 \pm 标准误(SE)。

[0066] 图3I是示出在MCF-IM模型中PKC- θ NLS(核定位信号)突变的过表达导致关键诱导型EMT/CSC基因的转录抑制的图解表示。在刺激(0.65ng/mL持续60小时)细胞之前使模拟载体、PKC- θ WT(野生型)或PKC- θ NLS的过表达在MCF-IM模型中进行72小时。对由总RNA合成的cDNA进行EMT/CSC基因-uPAR和CD44的**TaqMan®**实时PCR分析。将每个时间点产生的阈循环(C_t)值转化成任意拷贝数并相对于亲环素A参照水平归一化。mRNA水平以与未刺激细胞相比的倍数变化表达。数据表示两次独立实验的平均值 \pm 标准误(SE)。

[0067] 图4A是示出在癌症干细胞中PKC- θ 与CD44基因的启动子区中的染色质缔合的图解表示。在MCF-IM、HMLE-IM和基底转移模型中用抗体抗PKC- θ 抗体对经免疫沉淀的DNA进行ChIP测定。使用CD44的启动子引物对这些经免疫沉淀的DNA进行实时PCR分析。数据以图解方式作为经免疫沉淀的DNA相对于无(nil)抗体对照的ChIP富集比示出并针对总输入DNA进行归一化。结果表示三次独立实验之一的ChIP富集比。

[0068] 图4B和4C是示出在MCF-IM模型中CSC诱导型基因的启动子区处PKC- θ 的活性形式PKC- θ (磷酸化)高度富集有染色质的图解表示。MCF-7细胞未经刺激(NS)或者经PMA(ST)(0.65ng/ μ L持续60小时)刺激。随后用抗体抗PKC- θ (磷酸化)对经免疫沉淀的DNA进行ChIP测定。使用(B)uPAR和(C)CD44的启动子引物对这些经免疫沉淀的DNA进行实时PCR分析。数据以图解方式作为经免疫沉淀的DNA相对于无抗体对照的ChIP富集比示出并相对于总输入DNA进行归一化。结果表示三次独立实验之一的ChIP富集比。

[0069] 图4D是示出在MCF-IM模型中PKC- θ 与CSC诱导型基因uPAR上的Po1 II物理上相互作用的图解表示。对未经刺激(NS)或者经PMA刺激(ST)(0.65ng/mL持续60小时)的MCF-7细

胞进行顺序ChIP。首先进行初次染色质免疫沉淀,然后对由初次免疫沉淀回收的染色质进行二次染色质免疫沉淀。所使用的抗体是:初次ChIP为抗Po1 II抗体,二次ChIP为抗PKC- θ 抗体。使用uPAR的启动子定向引物对经免疫沉淀的DNA进行实时PCR分析。数据以图解方式作为经免疫沉淀的DNA相对于无抗体对照的ChIP富集比示出并针对总输入DNA进行归一化。“无抗体”是指没有向交联DNA中添加抗体(既没有一抗也没有二抗)的样品。结果表示三次独立实验之一的ChIP富集比。

[0070] 图4E是示出在MCF-IM模型中PKC- θ 的药理学抑制或敲低使其在uPAR的启动子中的染色质缔合减小的图解表示。首先用载剂单独或与双咪唑马来酰亚胺-I(1 μ M)一起预孵育MCF-7细胞,随后用PMA(0.65ng/ μ L持续60小时)刺激(ST)。在单独的实验中,用模拟siRNA(模拟物)或PKC- θ siRNA转染细胞,随后在转染后48小时进行PMA刺激(ST)(0.65ng/mL持续60小时)。随后用抗PKC- θ 抗体对经免疫沉淀的DNA进行ChIP测定。通过使用uPAR的启动子引物对这些经免疫沉淀的DNA进行实时PCR分析。数据以图解方式作为经免疫沉淀的DNA相对于无抗体对照的ChIP富集比示出并针对总输入DNA进行归一化。结果表示三次独立实验之一的ChIP富集比。

[0071] 图5是示出在人正常和浸润性乳腺癌组织中活性PKC- θ 的核染色的照片表示。使用抗PKC- θ (磷酸化)抗体进行正常和人乳腺癌组织的核染色并拍摄显微照片。

[0072] 图6A是示出PKC- θ 特异性活性抑制剂化合物27(C27)的基于PKC ELISA的激酶测定的图解表示。在减去空白孔之后计算激酶活性。

[0073] 图6B是示出在没有(-)或有(+)C27抑制剂的情况下来自MCF-IM的核提取物或细胞质提取物的基于PKC ELISA的激酶测定的图解表示。在没有特异性免疫沉淀物的情况下进行总PKC活性的测定。

[0074] 图6C是示出在MCF-IM模型中CD44^高/CD24^低CSC亚群的FACS分析的图解表示。在未经PKC- θ 特异性活性抑制剂化合物27(-C27)预处理或者经化合物27(+C27)预处理(1 μ M持续24小时)的情况下,用PMA(0.65ng/mL持续60小时)刺激MCF-7细胞。

[0075] 图6D是示出通过对样品进行实时PCR的mRNA表达的图解表示。

[0076] 图6E和6F是示出在用载剂单独或用PKC- θ 特异性抑制剂化合物27(C27)处理MCF-IM之后核p50或核p65活性的图解表示。

[0077] 图6G是示出在经(+)或未经(-)化合物27处理之后MCF-IM核提取物在丝氨酸468(p468)处的磷酸化NF- κ B p65的免疫印迹的照片和图解表示。15 μ g蛋白质用于western印迹并且组蛋白H3抗体用作核对照。

[0078] 图6H是示出在经(+)或未经(-)化合物27处理之后MCF-IM核级分的总NF- κ B p65的免疫印迹的照片和图解表示。使用Image J软件对以下提供的western印迹进行密度计量分析。

[0079] 图6I是示出在经(+)或未经(-)化合物27处理之后MCF-IM细胞质级分的总NF- κ B p65的免疫印迹的照片和图解表示。使用Image J软件对以下提供的western印迹进行密度计量分析。

[0080] 图6J是示出用抗PKC- θ 抗体进行的经刺激MCF-IM细胞的半ChIP分析的照片表示。(WCL)是用于免疫沉淀(IP)实验的全细胞裂解物。WCL用抗PKC- θ 抗体进行免疫印迹。(-Ab)是没有抗体。用抗RNA Po1 II、抗p65抗体或抗PKC- θ 抗体进行免疫印迹。所有结果表示三次

独立实验或者三次重复(N=3)的代表性实验的平均值±标准误。* *, $P<0.01$; *, $P<0.05$;ns,不显著。

[0081] 发明详述

[0082] 1. 定义

[0083] 除非另有定义,否则本文所使用的全部技术和科学术语具有与本发明所属领域普通技术人员通常所理解的相同的含义。虽然类似于或等效于本文中所述方法和材料的任何方法和材料可用于实践或测试本发明,但是仅描述了优选的方法和材料。出于本发明的目的,以下术语定义如下。

[0084] 如本文所使用的未用数量词修饰的名词意指一个/种或多于一个/种(即,意指至少一个/种)的所述名词。举例来说,“要素”意指一个或多于一个要素。

[0085] 术语“共同施用”或“共施用”等意指施用包含两种或更多种活性剂的单一组合物,或者作为单独组合物和/或通过单独途径递送的每种活性剂同步或同时或在足够短的时间段内顺序施用,以使有效结果与当所有这些活性剂作为单一组合物施用时所获得的有效结果等同。“同时”意指活性剂在基本上相同的时间施用,并且理想地在同一制剂中一起施用。“同步”是指活性剂在接近的时间施用,例如,一种药剂在另一种药剂施用前或施用后约一分钟至约一天内施用。任何同步的时间都是可用的。然而,经常发生的情况是,当不同时施用时,药剂将在约一分钟内至约八小时内,并且适当地在少于约一小时至约四小时内施用。当同步施用时,药剂适当地施用在对象的同一部位处。术语“同一部位”包括确切位置,但也可以是在约0.5cm至约15cm,优选在约0.5cm至约5cm内。如本文所使用的术语“单独”意指所述药剂间隔施用,例如,间隔为约一天至数周或数月。所述活性剂可以以任一顺序施用。如本文所使用的术语“顺序”是指所述药剂按顺序施用,例如间隔为分钟、小时、天或周。如果合适的话,活性药剂可以按定期重复周期施用。

[0086] 术语“药剂”或“调节剂”包括诱导期望药理学和/或生理学作用的化合物。该术语还包括本文具体提及的那些化合物的可药用和药理学活性成分,所述化合物包括但不限于盐、酯、酰胺、前药、活性代谢物、类似物等。当使用上述术语时,则应理解,其包括活性药剂本身以及可药用的药理学活性的盐、酯、酰胺、前药、代谢物、类似物等。术语“药剂”不应被狭义解释,而应延伸至小分子;蛋白性分子如肽、多肽和蛋白质以及包含其的组合物;以及遗传分子例如RNA、DNA和模拟物及其化学类似物以及细胞制剂(cellular agent)。术语“药剂”包括能够产生和分泌本文所提及的多肽的细胞以及包含编码所述多肽的核苷酸序列的多核苷酸。因此,术语“药剂”延伸至包含载体(例如病毒或非病毒载体、表达载体)的核酸构建体以及用于在一系列细胞内分泌和表达的质粒。

[0087] “抗原结合分子”是指对靶抗原具有结合亲和力的分子。应当理解的是,该术语延伸至呈现抗原结合活性的免疫球蛋白、免疫球蛋白片段和非免疫球蛋白衍生的蛋白质骨架。

[0088] “抗原性或免疫原性活性”是指根据本发明的多肽、片段、变体或衍生物在其施用的动物(适当地哺乳动物)中产生抗原性或免疫原性应答,其中所述应答包括产生特异性结合多肽或其片段的要素。

[0089] “芳烷基”是指被如上所定义的芳基取代的如上所定义的烷基,例如,-CH₂苯基、-(CH₂)₂苯基、-(CH₂)₃苯基、-H₂CH(CH₃)CH₂苯基等及其衍生物。

[0090] 如本文所使用的“芳族”或“芳基”是指每个环中多至7个原子的任何稳定的单环或二环碳环,其中至少一个环是芳族的。这种芳基要素的实例包括但不限于:苯基、萘基、四氢化萘基、茚满基、联苯基、菲基、蒽基或茚基(acenaphthyl)。

[0091] 在某些情况下,取代基可以用包括零在内的碳数目范围限定,例如(C₀-C₆)亚烷基-芳基。如果认为芳基是苯基,则该定义将包括苯基本身以及例如-CH₂Ph、-CH₂CH₂Ph、CH(CH₃)CH₂CH(CH₃)Ph等。

[0092] 还应当认识到,本文所述的化合物可以具有不对称中心并因此能够以多于一种的立体异构形式存在。因此,本发明还涉及基本上纯的在一个或多个不对称中心处的异构体形式的化合物(例如,大于约90%ee,例如约95%ee或97%ee或大于99%ee)以及其混合物(包括外消旋混合物)。这些异构体可以是天然存在的或者可以通过不对称合成来制备,例如使用手性中间体或通过手性拆分。

[0093] 当提及抗原结合分子时,如本文所使用的术语“特异性结合”、“特异性免疫相互作用”等是指在蛋白质与其他生物制剂的异质群体存在下对抗原的存在具有决定作用的结合反应。因此,在指定的免疫测定条件下,特异性抗原结合分子与特定抗原相结合,并且不以显著量与样品中存在的其他蛋白质或抗原相结合。在该条件下与抗原特异性结合可能需要选择其对特定抗原具有特异性的抗原结合分子。例如对于所选择的蛋白质抗原,可以出现抗原结合分子,其与该抗原结合,但不与样品中存在的其他蛋白质相结合。可以使用多种免疫测定形式来选择与特定蛋白质特异性免疫相互作用的抗原结合分子。例如,固相ELISA免疫测定通常用于选择与蛋白质特异性免疫相互作用的单克隆抗体。参见Harlow和Lane(1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York中关于可用于测定特异性免疫反应性的免疫测定形式和条件的描述。

[0094] 术语“癌症干细胞”或CSC是指具有肿瘤起始和肿瘤维持能力(包括大量增殖、形成新肿瘤和维持癌症发展的能力)的细胞,即,具有驱动肿瘤形成和生长的无限增殖潜能的细胞。CSC在生物学上不同于大块肿瘤细胞,并且具有与干细胞相关的特征,特别是自我更新和繁殖并产生特定癌症样品中存在的所有细胞类型的能力。术语“癌症干细胞”或CSC包括干细胞(SC)中的基因改变和成为CSC的细胞中的基因改变两者。在具体实施方案中,CSC乳腺CSC(其适当地为CD24⁺CD44⁺)的示例性实例包括CD44^高CD24^低。

[0095] “编码序列”是指对编码基因的多肽产物做出贡献的任何核酸序列。与此相反,术语“非编码序列”是指不对编码基因的多肽产物做出贡献的任何核酸序列。

[0096] 在整个本说明书中,除非上下文另有要求,否则词语“包含”、“含有”和“包括”将被理解为暗示包括所声明的要素或步骤或者要素或步骤的组,而不排除任何其他的要素或步骤或者要素或步骤的组。因此,使用术语“包含”等表示所列要素是必需或强制性的,而其他要素是任选的并且可以存在或可以不存在。“由…组成”意指包括且限于短语“由…组成”之后所描述的内容。因此,短语“由…组成”表示所列要素是必需或强制性的,并且没有任何其他元素可以存在。“基本上由…组成”意指包括短语后列出的任何要素,并且限于对所列要素的公开内容中说明的活性或作用不干扰或无贡献的其他要素。因此,短语“基本上由…组成”表示所列要素是必需或强制性的,但其他要素是任选的并且可以存在或可以不存在,这取决于其是否影响所列要素的活性或作用。

[0097] “相当于”或“对应于”是指与参考核酸序列显示出大幅度序列同一性(例如,与参

考核酸序列的全部或部分具有至少约50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、97%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或甚至高达100%的序列同一性)的核酸序列,或者对参考氨基酸序列显示出大幅度序列相似性或同一性(例如,对参考氨基酸序列的全部或部分具有至少约50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、97%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或甚至高达100%的序列相似性或同一性)的氨基酸序列。

[0098] 术语“衍生化”、“衍生”等是指通过化学反应从另一种物质产生或获得化合物,例如,使化合物与添加的官能团试剂等反应向化合物中添加一个或多个反应基团。

[0099] 术语“衍生物”是指具有源自母体化合物(例如,本文公开的化合物)结构(例如,通过化学转变)的结构的化合物,其结构与本文所公开的那些化合物足够相似,并且基于这种相似性,本领域技术人员预计其表现出与所要求保护的化合物相同或相似的活性和效用或者作为前体诱导与所要求保护的化合物相同或相似的活性和效用。小分子的示例性衍生物包括母体化合物的盐、酯、酰胺、酯或酰胺的盐、以及N-氧化物。对于多肽,术语“衍生物”是指源自基本序列通过修饰(例如,通过与其他化学部分缀合或复合,或者通过本领域已知的翻译后修饰技术)产生的多肽。术语“衍生物”在其范围内还包括对亲本序列做出的改变,包括提供功能等同分子的添加或缺失。衍生物的制备可以通过本领域已知方法进行。

[0100] 如本文所使用的癌症干细胞的术语“分化”是指癌症干细胞向多能肿瘤祖细胞的变化以及多能肿瘤祖细胞向单能肿瘤祖细胞和/或末端分化肿瘤细胞的变化。

[0101] 在治疗或预防疾病的背景下,“有效量”是指以单一剂量或作为系列一部分向有此治疗或预防需要的个体施用一定量的药剂或组合物,所述量能够有效预防此疾病的症状发生、控制此种症状和/或治疗现有症状。有效量根据以下因素而变化:待治疗个体的健康和身体状况、待治疗个体的分类组、组合物的制剂、对医学状况的评估和其他相关因素。预期所述量将落在可通过常规试验确定的相对宽的范围。

[0102] 如本文所使用的术语“上皮向间充质转变”(EMT)是指从上皮表型到间充质表型的转变,其是胚胎发育的正常过程。EMT也是充当离子和流体转运体的损伤上皮细胞变为基质重塑间充质细胞的过程。在癌中,这种转变通常导致改变的细胞形态学、间充质蛋白质的表达和侵袭性提高。用于定义体外EMT的标准包括上皮细胞极性的丧失、分离成单个细胞以及随后在获得细胞运动性之后分散。(参见,Vincent-Salomon等,Breast Cancer Res.2003;5(2):101-106)。在EMT期间的表达、分布和/或功能改变以及因此涉及的分子种类包括生长因子(例如,转化生长因子(TGF)- β 、wnts);转录因子(例如,Snail、SMAD、LEF和核 β -连环蛋白);细胞至细胞粘附轴分子(钙粘素、连环蛋白);细胞骨架调节剂(Rho家族);以及细胞外蛋白酶(基质金属蛋白酶、血纤维蛋白溶酶原激活物)(参见Thompson等,Cancer Research 65,5991-5995,7月15日,2005)。

[0103] 如本文所使用的术语“间充质向上皮转化”(mesenchymal-to-epithelial transition,MET)是可逆的生物学过程,其包括由能动的、多极的或梭状的间充质细胞转化

为平面阵列的极化细胞(称为上皮细胞)。MET是EMT的逆过程。MET在正常发育、癌症转移和诱导多能性干细胞重编程中发生。

[0104] 如本文所使用的术语“上皮”是指身体内表面和外表面的覆盖物,包括血管和其他小腔的衬壁。其由形成相对薄的片层或层的上皮细胞的集合组成,这是由于组成细胞在侧面通过细胞-细胞连接互相大量地粘附。所述层是极化的并具有顶侧和底侧。尽管严格控制(tight regimentation)上皮细胞,但是上皮具有一定的可塑性,并且上皮层中的细胞可以改变形状,例如从平的变化到柱状或在一端收缩并在另一端扩张。然而,这些往往发生在细胞群体中而不是个体地发生(参见,Thompson等,2005,同上)。

[0105] 如本文所使用的术语“间充质”是指胚胎中胚层的部分,其由位于胶状基质中的松散堆积的非特化细胞组成,由其形成结缔组织、骨、软骨以及循环和淋巴系统。间充质是形成相对分散的组织网络的细胞集合。间充质不是完整的细胞层,并且细胞在其表面上通常仅具有一些点参与附接至其相邻细胞。这些附接还可涉及钙粘素缔合(参见,Thompson等,2005,同上)。

[0106] 术语“表达”是指基因产物的生物合成。例如,在编码序列的情况下,表达包括编码序列向mRNA的转录和mRNA向一种或更多种多肽的翻译。相反地,非编码序列的表达仅包括非编码序列向转录物的转录。

[0107] “表达载体”意指能够指导所述载体内包含的多核苷酸转录并且适当地合成由所述多核苷酸编码的肽或多肽的任何基因元件。此种表达载体对本领域的从业者是已知的。

[0108] 如本文所使用的术语“功能”是指生物学、酶或治疗功能。

[0109] 如本文所用的术语“基因”是指细胞基因组的任何和所有不连续的编码区,以及相关的非编码区和调控区。该术语旨在意指编码特异性多肽、内含子和邻近的参与表达调控的5'和3'非编码核苷酸序列的开放阅读框。在这点上,基因还可以包含控制信号(例如,启动子、增强子、终止子和/或与给定基因天然结合的多腺苷酸化信号或异源控制信号)。DNA序列可以是cDNA或基因组DNA或其片段。基因可被引入到适当的载体中用于染色体外保持或用于整合到宿主中。

[0110] 如应用于化学物质的术语“基团”是指形成分子一部分的一组原子。在一些情况下,基团可包括彼此结合以形成分子一部分的两个或更多个原子。基团可以是单价或多价(例如,二价)的以允许与一个或多个另外的基团的分子结合。例如,单价基团可以设想为其一个氢原子被移除以允许与分子的另一个基团相结合。基团可带正电或负电。例如,带正电基团可以设想为添加一个或更多个质子(即, H^+)的中性基团,并且带负电基团可设想为移除一个或更多个质子的中性基团。基团的非限制性实例包括但不限于:烷基、亚烷基、烯基、亚烯基、炔基、亚炔基、芳基、亚芳基、亚胺基、次亚胺基(iminylene group)、氢化物基团、卤素基团、羟基、烷氧基、羧基、硫代基、烷硫基、二硫基、氰基、硝基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、甲硅烷基和甲硅烷氧基。基团如烷基、烯基、炔基、芳基和杂环基),无论在单独或在复合词还是在基团的定义中使用,都可以被一个或更多个取代基任选地取代。如本文所使用的“任选地取代”是指可以被一个或更多个选自以下的基团进一步取代或者不被取代:烷基、烯基、炔基、芳基、卤素、卤代烷基、卤代烯基、卤代炔基、卤代芳基、羟基、烷氧基、烯氧基、芳氧基、苄氧基、卤代烷氧基、卤代烯氧基、卤代芳氧基、硝基、硝基烷基、硝基烯基、硝基炔基、硝基芳基、硝基杂环基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、烯基氨基、炔基氨基、芳基氨基、

基、二氢噻二唑基、二氢噻唑基、二氢噻吩基、二氢三唑基、二氢氮杂环丁烷基、亚甲二氧基苯甲酰基、四氢呋喃基和四氢噻吩基和及其N-氧化物。杂环基取代基的连接可以通过碳原子或通过杂原子进行。

[0114] 如本文所使用的“杂亚芳基”是指二价单环或多环体系,优选约3至约15元,其中在环体系中的一个或更多个(更优选1至3个)原子为杂原子,即非碳的素,例如,氮、氧和硫原子。杂亚芳基可以任选地被一个或更多个(适当地1至3个)芳基取代基取代。示例性的杂亚芳基包括例如1,4-亚咪唑基。

[0115] 如本文所使用的术语“杂环”、“杂脂肪族”或“杂环基”意在表示包含1至4个选自O、N和S的杂原子的5至10元非芳族杂环并且包括二环基团。

[0116] “杂环基烷基”基团是指被杂环基取代的如上所定义的烷基,例如,-CH₂吡咯烷-1-基、烷基-(CH₂)₂哌啶-1-基等及其衍生物。

[0117] 如本文所使用的术语“高”是指测量值大于正常,大于标准(如预定测量值或子组测量值),或者比另一个子组测量值相对更大。例如,CD44^高是指CD44的测量值大于正常CD44测量值。因此,“CD44^高”总是对应于对象身体的相关部分或来自对象身体的相关样品中可检测的CD44。可以根据本领域技术人员任何可用的方法来确定正常测量值。术语“高”还可以指等于或大于预定测量值(例如预定截断)的测量值。如果对象对于特定的标志物不是“高”的,则其对于此标志物为低。通常,应该选择用于确定对象是“高”还是“低”的截断使得划分成为临床相关的。

[0118] 本文中所使用的“同源物”表示基因或其产物,其与另一基因或产物通过来自于共同祖先DNA序列的血统相关联。

[0119] 本文中所使用的“同源性”相当于“序列同一性”或“序列相似性”并且不旨在要求血统或系统发育关联性上的同一性。

[0120] 术语“激素受体阴性(HR-)肿瘤”是指这样的肿瘤:在如通过标准方法(例如,患者生物样品中核的免疫组织化学染色)确定的一定阈值之上,其不表达用于刺激肿瘤增殖、存活或活力的激素的受体。所述阈值可例如使用Allred评分或基因表达来测量。例如,参见Harvey等(1999.J Clin Oncol 17:1474-1481)以及Badve等,(2008.J Clin Oncol 26(15):2473-2481)。在一些实施方案中,所述肿瘤不表达雌激素受体(ER-)和/或孕酮受体(PR-)。

[0121] 术语“激素受体阳性(HR+)肿瘤”是指这样的肿瘤:在如通过标准方法(例如,患者生物样品中核的免疫组织化学染色)确定的一定阈值之上,其表达用于刺激肿瘤增殖、存活或活力的激素的受体。所述阈值可例如使用Allred评分或基因表达来测量。例如,参见Harvey等(1999.J Clin Oncol 17:1474-1481)以及Badve等(2008.J Clin Oncol 26(15):2473-2481)。肿瘤表达雌激素受体(ER)或孕酮受体(PR),如通过标准方法(例如,患者生物样品中的核的免疫组织化学染色)确定的。

[0122] 如本文所使用的术语“激素抵抗性癌症”是指当与非激素抵抗性癌症相比时,对激素治疗或内分泌治疗的响应减小或消失的癌症。从生物学和临床观点来看,可以区分出几种模式的抵抗:A)尽管具有内分泌受体表达但固有地对内分泌受体(例如,雌激素受体)靶向不敏感的肿瘤(泛内分泌治疗抵抗(pan-endocrine therapy resistance)或从头抵抗(de novo resistance));B)具有激素依赖性但对一种或更多种特定内分泌治疗具有抵抗

性的肿瘤(药剂选择性抵抗;例如对他莫昔芬响应而对芳香酶抑制剂不响应);以及C)最初对内分泌治疗响应但随后进展的肿瘤(获得性抵抗)。所有类型的抵抗都包括在其中。在一些实施方案中,激素抵抗性癌症是在施用激素或内分泌治疗之前为激素抵抗的癌症(即,其为从头激素抵抗)。在另一些实施方案中,激素抵抗性癌症是最初并不抵抗激素,但在至少一次治疗激素或内分泌治疗后变成激素抵抗的癌症。

[0123] 如本文所使用的术语“激素治疗”或“内分泌治疗”定义为属于阻断或除去激素的治疗。该治疗可移除合成激素或激素原的腺体,阻断或抑制激素合成,或者防止或抑制激素结合其受体,或者下调或降解激素受体。

[0124] “杂交”在本文中用于表示互补核苷酸序列的配对以产生DNA-DNA杂交体或DNA-RNA杂交体。互补碱基序列是通过碱基配对规则相关的那些序列。在DNA中,A与T配对,C与G配对。在RNA中,U与A配对,C与G配对。在这点上,如本文所使用的术语“匹配”和“错配”指互补核酸链中配对核苷酸的杂交潜力。匹配的核苷酸有效地杂交,例如上述的典型A-T和G-C碱基对。错配是不能有效杂交的其他核苷酸的组合。在本发明中,优选的配对机制包括寡聚化合物的链的互补核苷或核苷酸碱基(核碱基)之间的氢键键合,该氢键键合可以为Watson-Crick氢键键合、Hoogsteen氢键键合或反向Hoogsteen氢键键合。例如,腺嘌呤和胸腺嘧啶是互补的核碱基,其通过形成氢键配对。杂交可以在如本领域技术人员已知的不同情况下发生。

[0125] 短语“特异性杂交”等是指在严格条件下分子只与特定核苷酸序列(当所述序列存在于复杂的混合物(例如全细胞)DNA或RNA中时)结合、成双链、或杂交。

[0126] 本文所使用的术语“烃基”包括含碳和氢的任何基团,包括饱和的、不饱和的、芳族的、直链或支链基团或环基团(包括多环基)。烃基包括但不限于: C_1-C_8 烷基、 C_2-C_8 烯基、 C_2-C_8 炔基、 C_3-C_{10} 环烷基、芳基(例如苯基和萘基)、Ar(C_1-C_8)烷基如苄基,其任何一个都可以被任选取代。

[0127] 本文所提到的“免疫相互作用”包括分子之间的任何相互作用、反应或其他形式的分子间缔合,特别是当其中一种分子是(或者模拟)免疫系统的一个组分的时候。

[0128] 如本文使用的术语“抑制剂”意指这样的药剂,其降低或抑制PKC- θ 多肽的功能或生物活性或者PKC- θ 基因(例如,PRKCQ——也称为PRKCT、PKCT、MGC126514、MGC141919、nPKC- θ)的表达。

[0129] “分离”意指这样的材料,其基本上或本质上不含通常在其天然状态下伴随其的组分。

[0130] 如本文所使用的术语“低”是指测量值低于正常,低于标准(如预定测量值或子组测量值),或者比另一个子组测量值相对更低。例如,CD24^低是指CD24测量值低于正常CD24测量值。可以根据本领域技术人员任何可用的方法来确定正常测量值。术语“低”还可以指测量值等于或低于预定测量值(例如预定截断)。

[0131] 术语“低级烷基”是指具有1至6个碳原子的直链和支链烷基,例如,甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、仲丁基、正戊基、正己基、2-甲基戊基等。在一些实施方案中,低级烷基是甲基或乙基。

[0132] 术语“低级烷氧基”是指具有1至6个碳原子的直链和支链烷氧基,例如,甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、叔丁氧基、仲丁氧基、正戊氧基、正己氧基、2-甲基戊

氧基等。通常,低级烷氧基是甲氧基或乙氧基。

[0133] “调控”是指直接或间接地提高或降低靶分子的水平或功能活性。例如,药剂可以通过与除靶分子之外的分子相互作用间接地调控水平/活性。在这点上,编码靶多肽的基因的间接调控在其范围内包括调控第一核酸分子表达,其中所述第一核酸分子的表达产物调控编码靶多肽的核酸分子表达。

[0134] 本文所使用的术语“寡核苷酸”是指由通过磷酸二酯键(或其相关的结构变体或合成类似物)连接的多种核苷酸残基(脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸,或其相关的结构变体或合成类似物)构成的聚合物。因此,虽然术语“寡核苷酸”通常是指由核苷酸残基及连接其的接头为天然的的核苷酸聚合物,但是应该理解,该术语在其范围内也包括包含但不仅限于肽核酸(PNA)、氨基磷酸酯、硫代磷酸酯、甲基磷酸酯、2-0-甲基核糖核酸等各种类似物。分子的精确大小可以根据特定的应用而变化。寡核苷酸的长度通常相当短,通常为约10至30个核苷酸残基,但是该术语可以指任何长度的分子,尽管术语“多核苷酸”或“核酸”通常用于大的寡核苷酸。

[0135] 如本文所使用的术语“有效相连”或“有效连接”是指将结构基因置于调控元件(包括但不限于启动子)的调节控制之下,从而控制基因的转录以及任选的翻译。在异源启动子/结构基因组合的构建中,通常优选的是,将基因序列或启动子定位在距基因转录起始位点一定距离处,所述距离与其天然设置(即该基因序列或启动子所来源的基因)中该基因序列或启动子与其控制的基因之间的距离大致相同。如本领域中已知的,可以在不丧失功能的情况下适应该距离的某些变化。类似地,调控序列元件相对于待在其控制下的异源基因的优选定位通过这一元件在天然设置(即,其所来源的基因)中的定位来限定。

[0136] 术语“过表达”可互换地指与正常细胞相比(通常在癌细胞中)以可检测的更高水平转录或翻译的基因(例如,PKC- θ 基因)。因此,过表达是指蛋白质和RNA二者的过表达(由于转录、转录后加工、翻译、翻译后加工增加,稳定性改变以及蛋白质降解改变),以及由于蛋白质运输模式改变(核定位增加)引起的局部过表达,以及增强的功能活性(例如,如底物的酶水解增加)。与正常细胞或比较细胞(例如,乳腺细胞)相比,过表达也可以是10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多。

[0137] 本文中可互换使用的术语“患者”、“对象”、“宿主”或“个体”指的是任何个体,特别是脊椎动物对象,并且甚至更特别是哺乳动物对象,对其来说,治疗或预防是期望的。落入本发明的范围内的合适的脊椎动物包括但不限于任何脊索动物亚门成员,所述脊索动物亚门包括灵长类(例如,人,猴子和类人猿,并且包括猴种,例如来自猕猴(*Macaca*)属(例如,食蟹猴(例如食蟹猴(*Macaca fascicularis*))和/或猕猴(猕猴(*Macaca mulatta*)))和狒狒(豚尾狒狒(*Papio ursinus*)),以及狨猴(来自狨属(*Callithrix*)的物种),松鼠猴(来自松鼠猴(*Saimiri*)属的物种)和绢毛猴(来自怪柳猴(*Saguinus*)属的物种),以及类人猿物种例如黑猩猩(黑猩猩(*Pan troglodytes*)));啮齿类(例如,小鼠、大鼠、豚鼠);兔类动物(例如,家兔、野兔);牛类动物(例如,牛);绵羊类动物(例如,绵羊);山羊类动物(例如,山羊);猪类动物(例如,猪);马类动物(例如,马);犬科动物(例如,狗);猫科动物(例如,猫);鸟类(例如,鸡、火鸡、鸭、鹅,陪伴鸟类例如金丝雀、虎皮鹦鹉等);海洋哺乳动物(例如,海豚、鲸);爬行动物(蛇、青蛙、蜥蜴等)和鱼。在具体的实施方案中,对象是灵长类动物,例如人。然而,应该理解,上述术语并不意味着症状存在。

[0138] “可药用载体”是指由非生物学上或其他方面不期望的材料组成的药物载剂,即,所述材料可以与所选择的活性剂一起施用于对象而不引起任何或实质性的不良反应。载体可包括赋形剂和其他添加剂(例如,稀释剂、清洁剂、着色剂、润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂、防腐剂、转染剂等)。

[0139] 类似地,如本文所提供的化合物的“可药用”盐、酯、酰胺、前药或衍生物是非生物学上或其他方面不期望的盐、酯、酰胺、前药或衍生物。

[0140] 术语“多核苷酸”、“遗传物质”、“遗传形式”、“核酸”和“核苷酸序列”包括如本领域技术人员所容易理解的RNA、cDNA、基因组DNA、合成形式和混合聚合物、正义链和反义链,并且可以是经化学或生物化学修饰的,或者可以包含非天然或衍生化的核苷酸碱。

[0141] “苯基烷基”是指被苯基取代的如上定义的烷基,例如,-CH₂苯基、-(CH₂)₂苯基、-(CH₂)₃苯基、CH₃CH(CH₃)CH₂苯基等及其衍生物。苯基烷基是芳烷基的一个子集。

[0142] 术语“多核苷酸变体”和“变体”是指显示出与参考多核苷酸序列具有显著序列同一性的多核苷酸或在本领域已知的严格条件下(例如参见Sambrook等, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, 1989)与参考序列杂交的多核苷酸。这些术语还包括其中一个或多个核苷酸已添加或缺失或者被不同核苷酸替换的多核苷酸。在这点上,本领域内所熟知的是,可以对参考多核苷酸做出包括突变、添加、缺失和替换在内的某些改变,由此使改变的多核苷酸保留参考多核苷酸的生物学功能或活性。术语“多核苷酸变体”和“变体”还包括天然等位基因变体。

[0143] 在本文中可互换使用的术语“多肽”、“蛋白性分子”、“肽”和“蛋白质”是指氨基酸残基的聚合物及其变体和合成类似物。因此,这些术语适用于氨基酸聚合物,其中一个或多个氨基酸残基是合成的非天然氨基酸(例如相应天然氨基酸的化学类似物)以及天然氨基酸聚合物。这些术语不排除修饰,例如,糖基化、乙酰化、磷酸化等。对象蛋白性分子的可溶形式是特别有用的。在定义范围内包括例如含有一种或更多种氨基酸类似物(包括例如具有替换连接基团的非天然氨基酸或多肽)的多肽。

[0144] 术语“多肽变体”指其中一个或多个氨基酸被替换为不同氨基酸的多肽。本领域内所熟知的是,如下所述,一些氨基酸可以改变为其他具有大致相似性质的氨基酸,而不改变该多肽的活性性质(保守替换)。这些术语还包括其中添加或缺失一个或多个氨基酸或者被不同氨基酸替换的多肽。

[0145] 术语“前药”以其最宽泛的含义使用,并且包括在体内转化成本发明化合物的那些衍生物。所述衍生物容易被本领域的技术人员所想到,并且包括例如其中游离羟基被转化成酯衍生物的化合物。

[0146] 如本文所用的术语“预防”是指其提高对象对患疾病或病症的抵抗力,或者换言之减少对象发生疾病或病症之可能性的预防性治疗,也指在发生疾病或病症开始后为了减轻或完全消除或防止其恶化的治疗。这些术语在其范围内还包括在可能易患疾病或病症但尚未被诊断为患病的对象中预防疾病或病症发生。

[0147] 如本文所使用的“外消旋体”是指对映体的混合物。

[0148] 术语“盐”和“前药”包括当施用于接受者时能够提供(直接或间接)本发明化合物或其活性代谢物或残余物的任何可药用盐、酯、水合物或任何其他化合物。合适的可药用盐包括可药用无机酸(例如,盐酸、硫酸、磷酸、硝酸、碳酸、硼酸、氨基磺酸和氢溴酸)的盐或可

药用有机酸(例如,乙酸、丙酸、丁酸、酒石酸、马来酸、羟基马来酸、富马酸、柠檬酸、乳酸、粘酸、葡萄糖酸、苯甲酸、琥珀酸、草酸、苯乙酸、甲基磺酸、甲苯磺酸、苯磺酸、水杨酸、对氨基苯磺酸、天冬氨酸、谷氨酸、依地酸、硬脂酸、棕榈酸、油酸、月桂酸、泛酸、鞣酸、抗坏血酸和戊酸)的盐。碱盐包括但不限于与可药用阳离子(例如,钠、钾、锂、钙、镁、铵和烷基铵)形成的那些。另外,碱性含氮基团可以用这样的试剂如低级烷基卤化物(例如,甲基、乙基、丙基和丁基氯化物、溴化物和碘化物),二烷基硫酸盐(如二甲基和二乙基硫酸盐)等季铵化。然而,可以理解,由于不可药用盐可用于可药用盐的制备,故其也落入本发明的范围之内。盐和前药的制备可以通过本领域中已知的方法来进行。例如,金属盐可以通过本发明的化合物与金属氢氧化物的反应来制备。酸式盐可以通过使适当的酸与本发明的化合物反应来制备。

[0149] 术语“选择性”是指抑制PKC- θ 或对PKC- θ 显示出拮抗作用,而不显著抑制另一种PKC酶(例如,PKC- α 、PKC- β 、PKC- γ 、PKC- δ 、PKC- ϵ 、PKC- ζ 、PKC- η 、PKC- λ 、PKC- μ 或PKC- ν)功能或对其有拮抗作用的化合物。相比之下,术语“非选择性”是指抑制PKC- θ 或对PKC- θ 显示出拮抗作用并且还显著抑制至少一种其他PKC酶(例如,PKC- α 、PKC- β 、PKC- γ 、PKC- δ 、PKC- ϵ 、PKC- ζ 、PKC- η 、PKC- λ 、PKC- μ 或PKC- ν)功能或对其有拮抗作用的化合物。通常,对PKC- θ 呈选择性的化合物表现出相对于另一种PKC(即,除PKC- θ 之外的PKC,如PKC- α 、PKC- β 、PKC- γ 、PKC- δ 、PKC- ϵ 、PKC- ζ 、PKC- η 、PKC- λ 、PKC- μ 或PKC- ν)的抑制或拮抗作用大约2倍、5倍、10倍、20倍、50倍或大约100倍的PKC- θ 选择性。在一些实施方案中,选择性化合物对PKC- θ 显示出为对另一种PKC(即,除PKC- θ 之外的PKC,如PKC- α 、PKC- β 、PKC- γ 、PKC- δ 、PKC- ϵ 、PKC- ζ 、PKC- η 、PKC- λ 、PKC- μ 或PKC- ν)至少大50倍的抑制或拮抗作用。在再另一些实施方案中,选择性化合物对PKC- θ 抑制或显示出为对另一种PKC(即,除PKC- θ 之外的PKC,如PKC- α 、PKC- β 、PKC- γ 、PKC- δ 、PKC- ϵ 、PKC- ζ 、PKC- η 、PKC- λ 、PKC- μ 或PKC- ν)至少大100倍的抑制或拮抗作用。在再另一些实施方案中,选择性化合物对PKC- θ 显示出为对另一种PKC(即,除PKC- θ 之外的PKC,如PKC- α 、PKC- β 、PKC- γ 、PKC- δ 、PKC- ϵ 、PKC- ζ 、PKC- η 、PKC- λ 、PKC- μ 或PKC- ν)大至少500倍的抑制或拮抗作用。在再另一些实施方案中,选择性化合物对PKC- θ 显示出为对另一种PKC(即,除PKC- θ 之外的PKC,如PKC- α 、PKC- β 、PKC- γ 、PKC- δ 、PKC- ϵ 、PKC- ζ 、PKC- η 、PKC- λ 、PKC- μ 或PKC- ν)至少大1000倍的抑制或拮抗作用。

[0150] 如本文所使用的术语“序列同一性”指的是比较窗口中的序列在核苷酸对核苷酸或氨基酸对氨基酸的基础上序列相同的程度。因此,“序列同一性百分比”按如下计算:在比较窗口中比较两条最佳比对的序列,确定在两条序列上均出现相同核酸碱基(例如A、T、C、G、I)或相同氨基酸残基(例如,Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys和Met)的位置数目以得到相匹配的位置数目,用匹配的位置数目除以比较窗口的总位置数目(即窗口大小),再将结果乘以100,以得到序列同一性的百分比。出于本发明的目的,“序列同一性”将被理解为通过合适的方法计算出的“匹配百分比”。例如,序列同一性分析可使用DNASIS计算机程序(windows 2.5版本;得自于Hitachi Software engineering Co.Ltd.,South San Francisco,California,USA),使用软件所附参考手册中使用的标准缺省值来进行。

[0151] “相似性”是指如表2中限定的相同或构成保守替换的氨基酸的百分比数。

[0152] 表2

	初始残基	示例性替换
[0153]	Ala	Ser
	Arg	Lys
	Asn	Gln, His
	Asp	Glu
	Cys	Ser
	Gln	Asn

	初始残基	示例性替换
[0154]	Glu	Asp
	Gly	Pro
	His	Asn, Gln
	Ile	Leu, Val
	Leu	Ile, Val
	Lys	Arg, Gln, Glu
	Met	Leu, Ile,
	Phe	Met, Leu, Tyr
	Ser	Thr
	Thr	Ser
	Trp	Tyr
	Tyr	Trp, Phe
	Val	Ile, Leu

[0155] 相似性可以使用序列比较程序如GAP(Deveraux等,1984,Nucleic Acids Research 12,387-395)来确定。以这种方式,可通过在对准中插入缺口来对于与本文引用的那些序列长度相似或很大不同的序列进行比较,这种缺口例如通过GAP所使用的比较算法确定。

[0156] 用来描述两种或更多种多核苷酸或多肽之间序列关系的术语包括“参考序列”、“比较窗口”、“序列同一性”、“序列同一性百分比”和“基本同一性”。“参考序列”包括核苷酸和氨基酸残基,长度为至少12个,但通常为15至18个,并且通常至少25个单体单元。因为两种多核苷酸可以各自包含(1)两种多核苷酸之间相似的序列(即,只是完整多核苷酸序列的一部分),以及(2)两种多核苷酸之间不同的序列,所以两种或更多种多核苷酸之间的序列比较通常通过比较两种多核苷酸在“比较窗口”中的序列进行,以确定和比较局部区域的序列相似性。“比较窗口”是指至少6个连续位置,通常约50至约100个,更通常约100至约150个

的概念节段,其中在两个序列进行最佳比对之后,将一个序列与邻近位置相同数目的参考序列进行比较。与用于两个序列最佳比对的参考序列(其不包含添加或缺失)相比,比较窗口可包含约20%或更少的添加或缺失(即,缺口)。用于比对比较窗口的序列最佳比对通过计算机化执行算法(Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA,Genetics Computer Group,575Science Drive Madison,WI,USA),或者通过任何所选的多种方法得到的校验和最佳比对(即,在比较窗口中产生最高同源性百分比)来进行。也可以参考BLAST程序家族,例如Altschul等1997,Nucl.Acids Res.25:3389公开的程序。序列分析的详细讨论可见于Ausubel等“Current Protocols in Molecular Biology,”John Wiley&Sons Inc,1994-1998第15章19.3单元。

[0157] 如本文所使用的“小分子”指的是分子量小于3千道尔顿(kDa)并且通常小于1.5千道尔顿,并且更优选地小于约1千道尔顿的组分。小分子可以是核酸、肽、多肽、肽模拟物、碳水化合物、脂质或其他有机(含碳)或无机分子。如本领域技术人员所理解的,根据本说明书,庞大的化学和/或生物混合物(通常为真菌、细菌或藻类提取物)库可以用本发明的任何测定法来筛选,以确定调控生物活性的化合物。“小有机分子”是分子量小于3千道尔顿,小于1.5千道尔顿或甚至小于约1kDa的有机化合物(或与无机化合物(例如,金属)复合的有机化合物)。

[0158] 如本文所使用的“严格性”指的是杂交过程中的温度和离子强度条件,以及某些有机溶剂的存在与否。严格性越高,则在序列之间观察到更程度的互补性。如本文所使用的“严格条件”是指在仅具有高比例互补碱基,优选具有精确互补性的多核苷酸杂交的温度和离子条件。所要求的严格性取决于核苷酸序列,并且取决于杂交过程中存在的各种部件,并且当使用核苷酸类似物时变化很大。通常,严格条件选择为比特定序列在确定的离子强度和pH下的热熔点(T_m)低约 10°C 至 20°C 。 T_m 是50%靶序列与互补探针杂交时的温度(在特定的离子强度和pH下)。应该理解的是,多核苷酸在至少低严格条件下,优选在至少中等严格条件下并且更优选在高严格条件下与靶序列杂交。本文提及的低严格条件包括并涵盖用于在 42°C 下杂交的至少约1%v/v至至少约15%v/v甲酰胺和至少约1M至至少约2M的盐,以及用于在 42°C 下洗涤的至少约1M至至少约2M盐。低严格条件还可以包括用于在 65°C 下杂交的1%牛血清白蛋白(BSA),1mM EDTA,0.5M NaHPO_4 (pH 7.2),7%SDS,以及用于在室温下洗涤的(i) $2\times\text{SSC}$,0.1%SDS;或者(ii)0.5%BSA,1mM EDTA,40mM NaHPO_4 (pH 7.2),5%SDS。中等严格条件包括并涵盖用于在 42°C 下杂交的至少约16%v/v至至少约30%v/v甲酰胺和至少约0.5M至至少约0.9M的盐,以及用于在 42°C 下洗涤的至少约0.5M至至少约0.9M的盐。中等严格条件还可以包括用于在 65°C 下杂交的1%牛血清白蛋白(BSA),1mM EDTA,0.5M NaHPO_4 (pH 7.2),7%SDS,以及用于在 42°C 下洗涤的(i) $2\times\text{SSC}$,0.1%SDS;或者(ii)0.5%BSA,1mM EDTA,40mM NaHPO_4 (pH 7.2),5%SDS。高严格条件包括并涵盖用于在 42°C 下杂交的至少约31%v/v至至少约50%v/v甲酰胺和至少约0.01M至至少约0.15M的盐,以及用于在 42°C 下洗涤的至少约0.01M至至少约0.15M的盐。高严格条件还可以包括用于在 65°C 下杂交的1%BSA,1mM EDTA,0.5M NaHPO_4 (pH 7.2),7%SDS,以及用于在超过 65°C 的温度下洗涤的(i) $0.2\times\text{SSC}$,0.1%SDS;或者(ii)0.5%BSA,1mM EDTA,40mM NaHPO_4 (pH 7.2),1%SDS。高严格条件的一个实施方案包括在 $6\times\text{SSC}$ 中在约 45°C 下杂交;接着在 $0.2\times\text{SSC}$,0.1%SDS中在 65°C 下洗涤一次或更多次。非常高的严格条件的一个实施方案包括在0.5M磷酸钠,7%

SDS中在65℃下杂交;接着在 $0.2 \times \text{SSC}$, 1% SDS中在65℃下洗涤一次或更多次。另一些严格条件是本领域中公知的。本领域技术人员应当理解,可以操纵多种因素以优化杂交的特异性。最终洗涤的严格性优化可用于确保高程度的杂交。关于详细实例,参见CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY(同上)第2.10.1至2.10.16页,以及MOLECULAR CLONING. A LABORATORY MANUAL(Sambrook等,编著)(Cold Spring Harbor Press 1989)第1.101至1.104节。

[0159] “基本上互补”是指寡核苷酸或其子序列充分互补以与靶序列杂交。因此,寡核苷酸或子序列的核苷酸序列不需要反映靶序列的精确互补序列。在一个优选的实施方案中,寡核苷酸不含有错配并具有靶序列。

[0160] 如本文所使用的术语“协同”是指PKC- θ 抑制剂当与癌症治疗或药剂联合施用(或者反之亦然)时的治疗效果大于当单独施用PKC- θ 抑制剂和癌症治疗或药剂时的预测加和和治疗效果。应用于PKC- θ 抑制剂和癌症治疗剂的术语“协同有效量”是指组合物(通常的药物组合物)中各组分的量,其有效抑制PKC- θ 过表达细胞(例如CSC)的(i)形成、(ii)增殖(iii)维持或(iv)EMT,或者刺激或诱导PKC- θ 过表达细胞(例如CSC)的(v)MET,并且抑制非CSC肿瘤细胞的增殖、存活或活力,从而治疗或预防癌症,并且其在PKC- θ 抑制剂剂量和癌症治疗剂剂量与抑制PKC- θ 过表达细胞(例如CSC)的(i)形成、(ii)增殖(iii)维持或(iv)EMT,或者刺激或诱导PKC- θ 过表达细胞(例如CSC)的(v)MET,以及抑制非CSC肿瘤细胞的增殖、存活或活力的剂量-响应图中(PKC- θ 抑制剂剂量轴或癌症治疗剂剂量轴上),不产生相交的效果。在本领域中用于确定协同作用的剂量响应曲线例如由Sande等(参见A. Goodman等,编辑, the Pharmacological Basis of Therapeutics, MacMillan Publishing Co., Inc., New York(1980)中第1080至1105页)进行了描述。使用95%置信界限,通过改变因素(例如,剂量水平、时间表和响应),并使用由PKC- θ 抑制剂和癌症治疗剂的各种组合的剂量响应曲线生成等效线图的计算机生成模型,可以确定最佳协同量。在剂量响应曲线上,CSC和非CSC肿瘤细胞的增殖、存活、或活力的最高抑制与最佳剂量水平相关。

[0161] 如本文所使用的术语“治疗”是指获得期望的药理学和/或生理学作用。该作用在部分或完全治疗疾病或病症(例如,癌症,包括转移癌)方面和/或该疾病或病症引起的不利效果方面可以是治疗性的。这些术语还涵盖哺乳类动物,特别是人类的疾病或病症的任何治疗,包括:(a)抑制疾病或病症,即,阻止其发展;或(b)缓解疾病或病症,即,使疾病或病症消退。

[0162] 如本文所使用的术语“肿瘤”是指任何赘生性细胞生长和增殖(无论是恶性或良性的),以及所有的癌前和癌细胞和组织。术语“癌症”和“癌”是指或描述哺乳类动物中通常以不受调节的细胞生长为部分特征的生理状态。如本文所使用的术语“癌症”是指非转移癌和转移癌,包括早期和晚期癌症。术语“癌前(precancerous)”是指通常先于癌症或发展成癌症的状态或生长。“非转移性”是指良性地,或仍然位于最初部位,并且没有渗透入除最初部位之外的淋巴或血管系统或组织的癌症。通常,非转移癌是0期、I期或II期癌症,并且偶尔III期癌症的任何癌症。“早期癌症”是指不入侵或转移性的癌症或是归类为0期、I期或II期癌症的癌症。术语“晚期癌症”通常是指III期或IV期癌症,但也可以指II期癌症或II期癌症的亚期。本领域的技术人员应理解,II期癌症分类为早期癌症或晚期癌症取决于癌症的具体类型。癌症的示例性实例包括但不限于,乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、胰腺癌、结肠

直肠癌、肺癌、肝细胞癌、胃癌、肝癌、膀胱癌、泌尿道癌、甲状腺癌、肾癌、癌、黑素瘤、脑癌、非小细胞肺癌、头和颈的鳞状细胞癌、子宫内膜癌、多发性骨髓瘤、直肠癌和食道癌。在一个示范性实施方案中，癌症是乳腺癌。

[0163] 如本文所使用的术语“肿瘤样品”是指包含从癌患者获得的肿瘤材料的样品。该术语包括临床样品，例如，通过手术切除获得的组织和通过活组织检查（例如，组织芯活检或细针穿刺活检）获得的组织。该术语也包括包含从除原发性肿瘤以外的部位获得的肿瘤细胞的样品（例如，循环肿瘤细胞）；以及保藏的肿瘤样品，例如，福尔马林固定的肿瘤样品、石蜡包埋的肿瘤样品或冷冻的肿瘤样品。该术语包括是患者肿瘤细胞（例如，来自原发性肿瘤细胞或循环肿瘤细胞的细胞培养样品）的子代的细胞。该术语包括可包含从体内肿瘤细胞分离的蛋白质或核酸物质的样品，例如，骨髓、血液、血浆、血清等。该术语还包括已富集肿瘤细胞或在获得其后以其他方式操纵的样品以及包含从患者肿瘤材料获得的多核苷酸和/或多肽的样品。

[0164] “载体”是指多核苷酸分子，优选例如来自在其中可以插入或克隆多核苷酸的质粒、噬菌体、酵母或病毒的DNA分子。载体优选地包含一个或更多个单一限制性位点，并且能够在包含靶细胞或组织或其祖细胞或组织的确定宿主细胞中自主复制，或者可以与特定宿主的基因组整合，从而使得所克隆序列是可复制的。因此，载体可以是自主复制载体，即，作为染色体外实体存在的载体，其复制不依赖于染色体的复制，例如，线性或闭合环状质粒、染色体外因子、微型染色体或人工染色体。该载体可以包含用于确保自我复制的任何手段。或者，载体可以是当被引入宿主细胞时可以整合在宿主细胞基因组中并与其整合的染色体一起进行复制的载体。载体系统可以包含单个载体或质粒，两个或更多个载体或质粒，其共同含有的整个DNA被引入宿主细胞的基因组或转位子中。载体的选择通常依赖于载体与待引入所述载体的宿主细胞的相容性。在本发明中，载体优选病毒性载体或病毒来源的载体，其在动物并且优选地在哺乳动物细胞中以可操作方式发挥功能。这种载体可来源于痘病毒、腺病毒或酵母。所述载体也可包括选择标志物，例如可用于选择合适转化体的抗生素抗性基因。这种抗性基因的实例是本领域技术人员已知的，包括nptII基因（赋予对抗生素卡那霉素和G418（**Geneticin®**）的抗性）和hph基因（赋予对抗生素潮霉素B的抗性）。

[0165] 如本文所用的，下划线或斜体的基因名称应表明基因，与其蛋白质产物相比，蛋白质产物用不加任何下划线或斜体的基因名称表示。例如，“PKC- θ ”应指PKC- θ 基因，而“PKC- θ ”应表示由所述PKC- θ 基因的转录和翻译和/或选择性剪接产生的一种或更多种蛋白质产物。

[0166] 除非另有特别说明，否则本文所述的每个实施方案被加以必要的改变以用于每个实施方案。

[0167] 2. 用于降低或终止癌症干细胞的增殖或活力的组合物和方法

[0168] 本发明部分基于以下结论：乳腺癌是富含CSC的，并且PKC- θ 在那些CSC和非CSC肿瘤细胞中是过表达的。基于这些发现，本发明人用PKC- θ 抑制剂治疗乳腺细胞、乳腺CSC和乳腺非CSC肿瘤细胞，并且发现了其特异性地抑制乳腺CSC和非CSC肿瘤细胞的形成、增殖或维持，抑制乳腺CSC的EMT，和/或刺激/诱导乳腺CSC中的MET。不希望受任何理论或操作方式束缚，提出了PKC- θ 在用于乳腺CSC发挥作用的PKC- θ 信号传导和后生(epigenetic)作用的两个水平方面均是重要的，并且该酶的过表达不仅刺激乳腺CSC和非CSC肿瘤细胞的产生和维

持,而且通常也刺激CSC和非CSC肿瘤细胞的产生。

[0169] 基于以上观察,本发明人提出,PKC- θ 抑制将导致CSC和/或非CSC肿瘤细胞的形成、增殖或维持降低,和/或CSC的EMT降低,和/或CSC的MET增加,进而导致由其分化更少的非CSC肿瘤细胞,以及用癌症治疗或药剂更有效地治疗非CSC肿瘤细胞。

[0170] 因此,根据本发明,提供了这样的方法和组合物:其利用PKC- θ 抑制剂以降低或终止CSC和/或非CSC肿瘤细胞的形成、增殖或维持,和/或降低或终止CSC的EMT,和/或刺激或诱导CSC的MET,以用于治疗或预防癌症(例如,转移癌)。在具体的实施方案中,PKC- θ 抑制剂与癌症治疗或药剂组合使用,所述癌症治疗或药剂降低那些细胞的非CSC肿瘤细胞后代的增殖、存活或活力。因此,本发明的方法和组合物可特别地用于治疗或预防如下文所述的癌症(包括转移癌)。

[0171] 2.1 PKC- θ 抑制剂

[0172] PKC- θ 抑制剂包括并涵盖减少PKC- θ 累积、功能或稳定,或者降低PKC- θ 基因表达的任何活性剂,并且这样的抑制剂包括但不限于小分子和大分子,例如,核酸、肽、多肽、肽模拟物、碳水化合物、多糖、脂多糖、脂质或其他有机(含碳)或无机分子。

[0173] 在一些实施方案中,PKC- θ 抑制剂是拮抗性核酸分子,其功能是抑制PKC- θ 转录物的转录或翻译。这种类型的典型转录物包括对应于以下序列中任何一个的核苷酸序列:(1)例如在基因库登录号:XM_005252496、XM_005252497、XM_005252498和XM_005252499中所述的人PKC- θ 核苷酸序列;(2)与(1)中所提及的序列中任一个具有至少70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的核苷酸序列;(3)在至少低、中等或高严格条件下与(1)中所提及的序列杂交的核苷酸序列;(4)编码以下氨基酸序列中任何一个的核苷酸序列:例如在GenPept登录号:XP_005252553、XP_005252554、XP_005252555和XP_005252556中所述的人PKC- θ 氨基酸序列;(5)编码以下氨基酸序列的核苷酸序列,所述氨基酸序列与(4)中提及的任一个序列具有至少70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的序列相似性;以及编码以下氨基酸序列的核苷酸序列,所述氨基酸序列与(4)中提及的任一个序列具有至少70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的序列同一性。

[0174] 示例性拮抗性核酸分子包括反义分子、适配体、核酸酶和三联体形成分子、RNAi和外部引导序列。核酸分子可以作为效应物、抑制剂、调节剂和靶分子所具有特异性活性的刺激物,或者功能性核酸分子可具有不依赖于任何其他分子的从头(de novo)活性。

[0175] 拮抗性核酸分子可以与任何大分子相互作用,例如DNA、RNA、多肽或糖链。因此,拮抗性核酸分子可以与PKC- θ mRNA或PKC- θ 的基因组DNA相互作用,或者其可以与PKC- θ 多肽相互作用。通常,拮抗性核酸分子基于靶分子与拮抗性核酸分子之间的序列同源性被设计成与其他核酸相互作用。在其他情况下,拮抗性核酸分子与靶分子之间的特异性识别不是基于拮抗性核酸分子与靶分子之间的序列同源性,而是基于形成允许特异性识别发生的三级结构。

[0176] 在一些实施方案中,反义RNA或DNA分子通过与靶mRNA结合和阻止蛋白翻译被用于直接阻断PKC- θ 的翻译。反义分子通过规范或不规范碱基配对而被设计成与靶核酸分子相互作用。反义分子与靶分子的相互作用可被设计成促进靶分子的破坏,例如,通过RNAseH介导的RNA-DNA杂合体降解。作为替代,反义分子可被设计成中断通常在靶分子中发生的加工功能,例如转录或复制。反义分子可以基于靶分子的序列进行设计。存在多种通过寻找靶分子的最易接近区域来优化反义效率的方法。非限制性方法包括体外选择实验和使用DMS和DEPC的DNA修饰研究。在具体实例中,反义分子以小于或等于 10^{-6} 、 10^{-8} 、 10^{-10} 或 10^{-12} 的解离常数(K_d)与靶分子相结合。在具体的实施方案中,采用来源于翻译起始位点(例如,-10和+10之间区域)的反义寡脱氧核苷酸。

[0177] 适配体是合适地以特异性方式与靶分子相互作用的分子。适配体通常是长度为15至50个碱基的小核酸,其折叠成确定的二级和三级结构,例如茎环或四方结构(G-quartets)。适配体可以与小分子(例如,ATP和茶碱(theophylline))以及大分子(例如,逆转录酶和凝血酶)结合。适配体可以以小于 10^{-12} M的 K_d 与靶分子非常紧密地结合。适当地,适配体以小于 10^{-6} 、 10^{-8} 、 10^{-10} 或 10^{-12} 的 K_d 结合靶分子。适配体可以以极高程度的特异性结合靶分子。例如,已分离了这样的适配体,其与靶分子和不同仅在分子的单一位置上的另一种分子的结合亲和力相差大于10,000倍。期望的是,适配体与靶分子的 K_d 比其与背景结合分子的 K_d 低至少10、100、1000、10,000或100,000倍。适用于产生目标靶标(例如,PKC- θ)的适配体的方法是“Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment”(SELEXTM)。所述SELEXTM方法在美国专利No.5,475,096和美国专利No.5,270,163(也参见WO 91/19813)中进行了描述。简要地说,在有利于结合的条件下使核酸混合物与靶分子相接触。将未结合的核酸与结合的核酸分开,并且解离核酸-靶标复合物。然后扩增解离的核酸以得到核酸的配体富集混合物,根据需要使其经过结合、分开、解离和扩增的重复循环,以产生对靶分子具有高特异性的高亲和力核酸配体。

[0178] 在另一些实施方案中,抗PKC- θ 核酸酶用于催化PKC- θ RNA的特异性切割。核酸酶作用机制包括核酸酶分子与互补靶RNA的序列特异性杂交,随后进行内切核酸酶裂解。存在多种不同类型的催化核酸酶或核酸聚合酶类型反应的核酸酶,其是基于天然系统中存在的核酸酶,例如锤头状核酸酶、发夹状核酸酶和四膜虫属核酸酶。还存在一些在天然系统不存在的核酸酶,但其已被改造成从头催化特异性反应。代表性的核酸酶切割RNA或DNA底物。在一些实施方案中,使用切割RNA底物的核酸酶。潜在RNA靶标内的特异性核酸酶切割位点最初通过扫描核酸酶切割位点的靶分子确定,其包括下列序列:GUA、GUU和GUC。一旦确定,可评估对应于靶基因中含有切割位点的区域的15至20个核苷酸的短RNA序列以预测可致使寡核苷酸序列不适宜的结构特征,例如二级结构。候选靶标的适宜性也可使用核糖核酸酶保护测定法,通过测试其与互补寡核苷酸的杂交可行性来进行评估。

[0179] 三联体形成功能性核酸分子是可以与双链核酸或单链核酸相互作用的分子。当三联体分子与靶区域相互作用时,形成了被称为三联体的结构,其中依赖于Watson-Crick和Hoogsteen碱基配对二者,三条DNA链形成复合物。三联体分子是优选的,因为其可以以高亲和力和特异性结合靶区域。通常期望的是,三联体形成分子与靶分子以小于 10^{-6} 、 10^{-8} 、 10^{-10} 或 10^{-12} 的 K_d 结合。

[0180] 外部导向序列(External guide sequence,EGS)是与靶核酸分子结合形成复合物

的分子,并且该复合物被裂解靶分子的RNase P识别。EGS可被设计成特异性地靶向选择的RNA分子。RNase P在细胞内帮助加工转移RNA(tRN)。通过使用产生靶RNA:EGS复合物以模拟天然tRNA底物的EGS,可以募集细菌性RNase P切割几乎任何RNA序列。类似地,RNA的真核EGS/RNase P定向裂解可用于在真核细胞内切割期望靶标。

[0181] 在另一些实施方案中,介导PKC- θ 基因或PKC- θ 转录物的RNA干扰(RNAi)的RNA分子可用于降低或终止基因表达。RNAi是指通过引入与靶基因的转录物同源的单链或(通常)双链RNA(dsRNA)干扰或破坏靶基因的产物。RNAi方法(包括双链RNA干扰(dsRNAi)或小干扰RNA(siRNA))已在多种生物体(包括哺乳动物细胞和秀丽新小杆线虫)中得到了广泛证实(Fire等,1998.Nature 391,806-811)。在哺乳动物细胞中,RNAi可由以下引发:21至23个核苷酸(nt)的小干扰RNA(siRNA)双链体(Chiu等,2002Mol.Cell.10:549-561;Elbashir等,2001.Nature 411:494-498);或者微RNA(miRNA)、功能性短发夹RNA(shRNA)或使用DNA模板与RNA聚合酶III启动子在体内表达的其他dsRNA(Zeng等,2002.Mol.Cell 9:1327-1333;Paddison等,2002.Genes Dev.16:948-958;Lee等,2002.Nature Biotechnol.20:500-505;Paul等,2002.Nature Biotechnol.20:505-508;Tuschl,T.,2002.Nature Biotechnol.20:440-448;Yu等,2002.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 99(9):6047-6052;McManus等,2002.RNA 8:842-850;Sui等,2002.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 99(6):5515-5520)。

[0182] 在具体的实施方案中,对应于PKC- θ 基因至少一部分的dsRNA本身以及特别是dsRNA产生性构建体用于减少或终止其表达。基因表达的RNAi介导抑制可以使用本领域报道的任何技术来实现,例如通过将编码茎环或发夹RNA结构的核酸构建体转染到靶细胞的基因组中;或者通过表达转染的核酸构建体,其PKC- θ 基因在会聚启动子之间具有同源性;或者在单一启动子后按照头对头或尾对尾复制。也可以使用任何类似的构建体,只要其产生能够在其上向后折叠并产生dsRNA的单一RNA,或者只要其产生两个单独的RNA转录物,所述RNA转录物然后退火以形成与靶基因具有同源性的dsRNA即可。

[0183] 对于RNAi不需要绝对的同源性,对于约200个碱基对的dsRNA具有所描述的约85%同源性的更低阈值(Plasterk和Ketting,2000,Current Opinion in Genetics and Dev.10:562-67)。因此,根据dsRNA的长度,RNAi编码核酸可以改变其包含的对靶基因转录物的同源性水平,即,100至200个碱基对的dsRNA与靶基因具有至少约85%的同源性,并且更长的dsRNA(即,300至100个碱基对)与靶基因具有至少约75%的同源性。表达单一RNA转录物(被设计成与单独表达的RNA退火)的RNA编码构建体或者由会聚启动子表达单独转录物的单一构建体的长度合适地为至少约100个核苷酸。表达单一RNA的RNA编码构建体通常为至少约200个核苷酸,所述单一RNA被设计成通过内部折叠形成dsRNA。

[0184] 如果所得的dsRNA对于目标用于破坏的细胞谱系中的基因产物是特异性的,则用于表达dsRNA形成性构建体的启动子可以是任何类型的启动子。或者,所述启动子的谱系特异性可在于其仅在特定发育谱系的细胞中表达。这在当用非靶细胞谱系中表达的基因观察到一些同源性重叠的情况下可能是有利的。该启动子也可通过外部控制因素或通过细胞内环境因素诱导。

[0185] 在一些实施方案中,约21至约23个核苷酸的RNA分子可以用于介导RNAi,所述RNA分子引导切割其所对应的特异性mRNA,例如如Tuschl等在美国2002/0086356中所述的。此种21nt至23nt RNA分子可以包含3'羟基,可以是单链或双链(例如两个21nt至23nt RNA)

的,其中所述dsRNA分子可以是平端的或者包含突出端(例如,5'、3')。

[0186] 在一些实施方案中,拮抗剂核酸分子是siRNA。siRNA可通过任何合适的方法制备。例如,可参照国际公开WO 02/44321,其公开了当配对碱基具有3'突出端时能够序列特异性降解靶mRNA的siRNA,其通过引用并入本文。使用模拟由酶dicer产生的siRNA的合成短双链RNA,可以在哺乳动物细胞中实现序列特异性基因沉默。siRNA可以是化学或体外合成的,或者可以是在细胞内被加工成siRNA的短双链发夹状RNA(shRNA)的结果。合成siRNA通常使用算法和常规DNA/RNA合成仪进行设计。供应商包括Ambion(Austin, Tex.)、ChemGenes(Ashland, Mass.)、Dharmacon(Lafayette, Colo.)、Glen Research(Sterling, Va.)、MWB Biotech(Esbersberg, Germany)、Proligo(Boulder, Colo.)和Qiagen(Vento, The Netherlands)。也可以使用试剂盒(例如,Ambion的SILENCER™ siRNA构建试剂盒)在体外合成siRNA。

[0187] 从载体产生siRNA更通常地通过短发夹RNA(shRNA)的转录实现。例如,用于产生含shRNA载体的试剂盒是可用的,例如Imgenex的GENESUPPRESSOR™构建试剂盒和Invitrogen的BLOCK-IT™诱导型RNAi质粒和慢病毒载体。此外,用于配制siRNA和向对象递送siRNA的方法也是本领域中公知的。例如,参见US 2005/0282188、US 2005/0239731、US 2005/0234232、US 2005/0176018、US 2005/0059817、US 2005/0020525、US 2004/0192626、US 2003/0073640、US 2002/0150936、US 2002/0142980和US 2002/0120129,其各自通过引用并入本文。

[0188] 示例性RNAi分子(例如,PKC-θ siRNA和shRNA)在本领域中进行了描述(例如,Ma等,2013.BMC Biochem.14:20和Kim等,2013,Immune Netw.13(2):55-62)或者可商购自Santa Cruz Biotechnology, Inc.(Santa Cruz, CA, USA)、OriGene Technologies, Inc.(Rockville, MD, USA)、Sigma-Aldrich Pty Ltd(Castle Hill, NSW, 澳大利亚)。

[0189] 本发明还考虑基于肽或多肽的抑制剂化合物。例如,多种PKC-θ异构酶和可变区特异性肽是已知的,其示例性实例包括:

[0190] (a)θV1衍生肽θV1-1和θV1-2,分别具有氨基酸序列GLSNFDCG[SEQ ID NO:1](PKC-θ残基8-15)或YVESENGQMYI[SEQ ID NO:2](PKC-θ残基36-46),如例如美国专利No.5,783,405中所公开的,其通过引用整体并入本文;

[0191] (b)θV5衍生肽,其具有氨基酸序列VKSPFDCS[SEQ ID NO:3](PKC-θ残基655-662)或DRALINS[SEQ ID NO:4]或经修饰肽VrSPFDCS[SEQ ID NO:5],如例如US 2004/0009922中所公开的,其通过引用整体并入本文;以及

[0192] (c)ψθ RACK衍生肽,其具有氨基酸序列KGDNVDLI[SEQ ID NO:6],KGENVDLI[SEQ ID NO:7],KGKEVDLI[SEQ ID NO:8],KGKNVDLI[SEQ ID NO:9],RGKNVELA[SEQ ID NO:10],RGENVELA[SEQ ID NO:11],KGKQVNLI[SEQ ID NO:12],KGKQVNLI[SEQ ID NO:13],KGDQVNLI[SEQ ID NO:14]或KGEQVNLI[SEQ ID NO:15],如例如US 2010/0311644中所公开的,其通过引用整体并入本文。

[0193] PKC-θ抑制肽,如例如以上描述的,可通过是融合蛋白的一部分进行修饰。融合蛋白可包括这样的转运蛋白或肽,其功能是增加肽抑制剂的细胞摄入,具有另一种期望的生物学作用如治疗作用,或者可以具有这两种功能。融合蛋白可通过本领域技术人员已知的方法生产。抑制肽可以以本领域已知的多种方式与另一条肽结合或以其他方式缀合。例如,

抑制肽可通过交联与载体肽或本文所述的其他肽结合,其中融合蛋白的两条肽均保留其活性。作为另一个实例,所述肽可通过一条肽的C端与另一条肽的N端的酰胺键彼此连接或以其他方式缀合。融合蛋白中抑制肽与其他成员之间的键可以是不能切割的(肽键)或者可切割的(例如,酯键或本领域已知的其他可切割键)。

[0194] 在一些实施方案中,转运蛋白或肽可为例如包含氨基酸序列CRQIKIWFQNRMMKWK [SEQ ID NO:16]的果蝇(*Drosophila*)触角足同源域衍生序列,并且可通过经N端Cys-Cys键交联而与抑制剂衔接(如例如Theodore等,1995.*J. Neurosci.* 15:7158-7167;Johnson等,1996.*Circ. Res.* 79:1086中所讨论的)。或者,抑制剂可通过来自人免疫缺陷病毒1型的反式激活调节蛋白(Tat)衍生转运多肽(例如,SEQ ID NO:17所示的Tat的第47至57位氨基酸;YGRKKRRQRRR)修饰,如Vives等,1997.*J. Biol. Chem.* 272:16010-16017,美国专利No.5,804,604和基因库登录号:AAT48070中所述的;或者用聚精氨酸修饰,如Mitchell等,2000.*J. Peptide Res.* 56:318-325和Rolhbard等,2000.*Nature Med.* 6:1253-1257中所描述的。抑制剂可通过本领域技术人员已知的其他方法进行修饰以增加抑制剂的细胞摄入。

[0195] 还可以通过将包含编码PKC- θ 抑制肽的核苷酸序列的核酸引入到细胞中将PKC- θ 抑制肽引入细胞中。核酸可以是重组表达载体的形式。PKC- θ 抑制肽编码序列可以有效与表达载体中的一种或多种转录控制元件(例如,启动子)连接。合适的载体包括:例如,重组逆转录病毒、慢病毒和腺病毒;逆转录病毒表达载体、慢病毒表达载体、核酸表达载体以及质粒表达载体。在一些情况下,表达载体整合到细胞的基因组中。在另一些情况下,表达载体在细胞中保持为附加体状态。

[0196] 合适的表达载体包括但不限于,病毒载体(例如,基于以下病毒的病毒载体:痘苗病毒、脊髓灰质炎病毒、腺病毒(例如,参见,Li等,*Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:2543-2549,1994;Borras等,*Gene Ther* 6:515-524,1999;Li和Davidson,*PNAS* 92:7700-7704,1995;Sakamoto等,*Hum Gene Ther* 5:1088-1097,1999;WO 94/12649,WO 93/03769;WO 93/19191;WO 94/28938;WO 95/11984和WO 95/00655)、腺相关病毒(例如,参见,Ali等,*Hum Gene Ther* 9:8186,1998,Flannery等,*PNAS* 94:6916-6921,1997;Bennett等,*Invest Ophthalmol Vis Sci* 38:2857-2863,1997;Jomary等,*Gene Ther* 4:683-690,1997,Rolling等,*Hum Gene Ther* 10:641-648,1999;Ali等,*Hum Mol Genet.* 5:591-594,1996;WO 93/09239中的Srivastava,Samulski等,*J. Vir.* 63:3822-3828,1989;Mendelson等,*Virology* 166:154-165,1988;以及Flotte等,*PNAS*(1993)90:10613-10617)、SV40、单纯性疱疹病毒、人免疫缺陷病毒(例如,参见,Miyoshi等,*PNAS* 94:10319-23,1997;Takahashi等,*J. Virol.* 73:7812-7816,1999);逆转录病毒载体(例如,鼠白血病病毒、脾坏死病毒和来自于逆转录病毒(例如,劳斯氏肉瘤病毒、哈维肉瘤病毒、禽白血病病毒、慢病毒、人免疫缺陷病毒、骨髓增生性肉瘤病毒和乳腺肿瘤病毒)的载体等。

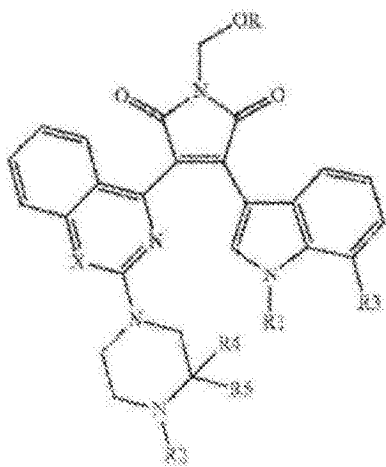
[0197] 本发明还考虑了这样的小分子药剂,其降低PKC- θ 的功能活性(例如,降低PKC- θ 介导的磷酸化、抑制PKC- θ 与CD44或uPAR的启动子的结合、减少PKC- θ (例如,活性PKC- θ)与染色质的结合、降低PKC- θ 介导的鸟嘌呤交换因子(GIV/Girdin)抑制、降低PKC- θ 介导的调节性T细胞功能抑制、降低PKC- θ 介导的EMT等)。

[0198] 适用于本发明的降低PKC- θ 功能活性的小分子药剂包括:抑制PKC- θ 功能活性的吡啶衍生物、抑制PKC- θ 功能活性的嘌呤化合物、抑制PKC- θ 功能活性的嘧啶衍生物、抑制PKC-

θ功能活性的苯胺化合物、抑制PKC-θ功能活性的吡啶衍生物等。

[0199] 在一些实施方案中,小分子PKC-θ抑制剂选自例如由Cooke等在美国公开No.2013/0157980(其通过引用整体并入本文)中所述的经取代吡啶衍生物。该类型的示例性衍生物包括根据式(I)的化合物:

[0200]



(I)

[0201] 或其可药用盐或水合物。

[0202] 在根据式(I)的化合物的一些实施方案中:

[0203] X是CH或N;

[0204] R是H或PO₃H₂;

[0205] R₁是H或C₁₋₄烷基;R₂是H或C₁₋₄烷基;R₃是H、C₁₋₄烷基、CN、Hal或OH;并且R₄和R₅彼此独立地选自H或C₁₋₄烷基,或者R₄和R₅与其所连接的碳原子一起形成3至6元环烷基。

[0206] 在根据式(I)的化合物的另一些实施方案中:

[0207] X是CH;

[0208] R是PO₃H₂;

[0209] R₁是H;

[0210] R₂是H或C₁₋₄烷基;R₃是H或C₁₋₄烷基;并且R₄和R₅彼此独立地为H,或者R₄和R₅与其所连接的碳原子一起形成3至6元环烷基。

[0211] 在根据式(I)的化合物的又一些实施方案中:

[0212] X是CH;

[0213] R是H;

[0214] R₁是H;

[0215] R₂是H或C₁₋₄烷基;R₃是H或C₁₋₄烷基;并且R₄和R₅彼此独立地为H,或者R₄和R₅与其所连接的碳原子一起形成3至6元环烷基。

[0216] 在根据式(I)的化合物的又一些实施方案中:

[0217] X是N;

[0218] R是PO₃H₂;

[0219] R₁是H;

[0220] R₂是H或C₁₋₄烷基;

[0221] R₃是H;并且

[0222] R₄和R₅彼此独立地为H,或者R₄和R₅与其所连接的碳原子一起形成3至6元环烷基。

[0223] 在根据式(I)的化合物的又一些实施方案中:

[0224] X是N;

[0225] R是PO₃H₂;

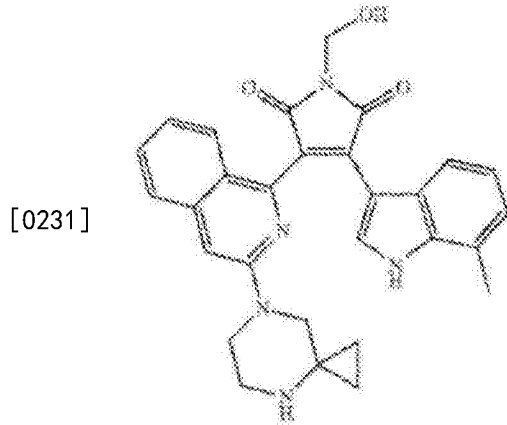
[0226] R1是H;

[0227] R2是H或C₁₋₄烷基;

[0228] R3是H;并且

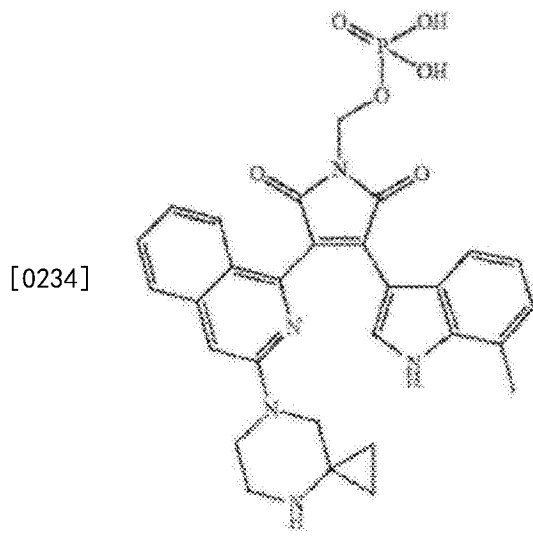
[0229] R4和R5彼此独立地为H或C₁₋₄烷基。

[0230] 在一些实施方案中,抑制PKC-θ功能活性的经取代吡啶衍生物包括根据式(II)的化合物:



[0232] 或其可药用盐。

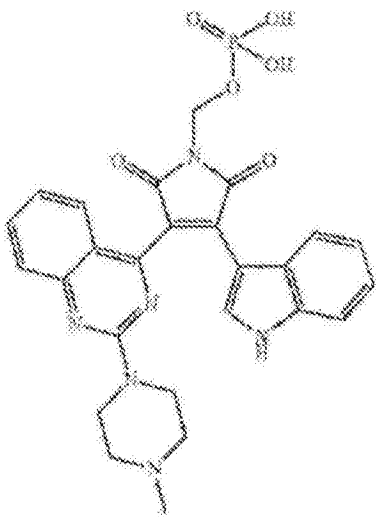
[0233] 在另一些实施方案中,抑制PKC-θ功能活性的经取代吡啶衍生物包括根据式(III)的化合物:



[0235] 或其可药用盐或水合物。

[0236] 在又一些实施方案中,抑制PKC-θ功能活性的经取代吡啶衍生物包括根据式(IV)的化合物:

[0237]



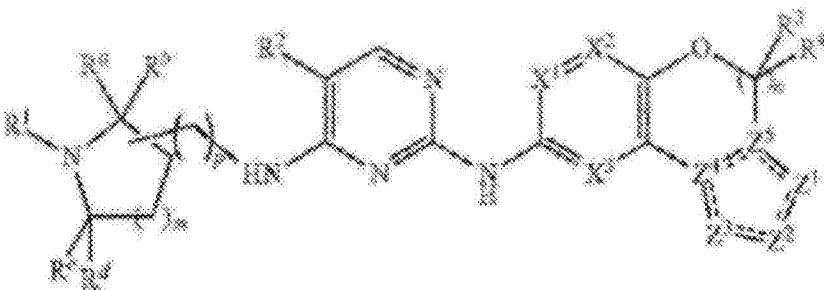
(IV)

[0238] 或其可药用盐。

[0239] 根据式(I)的化合物的代表性实例包括：磷酸单-[3-[3-(4,7-二氮杂-螺[2.5]辛-7-基)-异喹啉-1-基]-4-(7-甲基-1-H-吡咯-3-基)-2,5-二氧代-2,5-二氢-吡咯-1-基甲基]酯单水合物；3-[3-(4,7-二氮杂-螺[2.5]辛-7-基)-异喹啉-1-基]-1-羟甲基-4-(7-甲基-1H-吡咯-3-基)-吡咯-2,5-二酮或其可药用盐和磷酸单-{3-(1H-吡咯-3-基)-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-喹啉-4-基]-2,5-二氧代-2,5-二氢-吡咯-1-基甲基}酯或其可药用盐。

[0240] 在另一些实施方案中，小分子PKC- θ 抑制剂选自如例如Zhao等在美国公开No. 2013/0143875(其通过引用整体并入本文)中所述的嘧啶二胺衍生物。该类型的代表性衍生物包括根据式(V)的化合物：

[0241]



(V)

[0242] 其中：

[0243] R^1 选自氢、烷基、烯基、炔基、环烷基、 $-C(O)OR^{1a}$ 、 $-S(O)R^{1b}$ 和 $-S(O)_2R^{1c}$ ；其中 R^{1a} 、 R^{1b} 和 R^{1c} 各自独立地是氢、烷基或苯基-烷基；

[0244] R^a 、 R^b 、 R^c 和 R^d 独立地选自氢和烷基；

[0245] m 是1至5的整数；

[0246] p 是0至6的整数；

[0247] R^2 选自酰氧基、羟基、硫醇、酰基、烷基、烷氧基、经取代烷基、经取代烷氧基、氨基、经取代氨基、氨基酰基、酰胺基、叠氮基、羧基、羧基烷基、氰基、卤素、硝基、氨基酰氧基、氧酰胺基、硫代烷氧基、经取代硫代烷氧基、 $-SO$ -烷基、 $-SO$ -经取代烷基、 $-SO$ -芳基、 $-SO$ -杂芳基、 $-SO_2$ -烷基、 $-SO_2$ -经取代烷基、 $-SO_2$ -芳基、 $-SO_2$ -杂芳基和三卤代甲基；

[0248] X^1 、 X^2 和 X^3 是 CR^5 ，或者 X^1 、 X^2 和 X^3 之一是N并且其余的是 CR^5 ；

[0249] R^5 选自氢、卤素、烷基和经取代烷基；

[0250] R^3 和 R^4 在每次出现时独立地选自氢、烷基、经取代烷基、烷氧基、经取代烷氧基、酰基、酰胺基、酰氧基、氨基、经取代氨基、氨基酰基、氨基酰氧基、氧基氨基酰基、叠氮基、氰基、卤素、羟基、氧代、硫代酮基、羧基、羧基烷基、硫醇、硫代烷氧基、经取代硫代烷氧基、芳基、芳氧基、羟基氨基、烷氧基氨基、硝基、-SO-烷基、-SO-经取代烷基、-SO-芳基、-SO-杂芳基、-SO₂-烷基、-SO₂-经取代烷基、-SO₂-芳基和-SO₂-杂芳基或 R^3 和 R^4 与其所连接的碳原子一起形成碳环或杂环的4至8元环；

[0251] n 是1至3的整数；

[0252] Z^1 、 Z^2 和 Z^3 选自 CR^6R^{6a} 、N、O和S；

[0253] Z^4 和 Z^5 选自N、C和 CR^6 ；

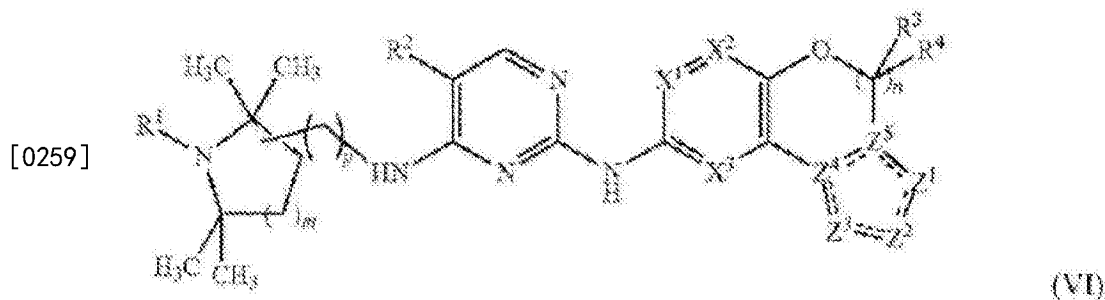
[0254] R^6 选自氢、卤素、烷基和经取代烷基；

[0255] R^{6a} 选自氢、卤素、烷基和经取代烷基或者不存在以满足化合价要求；并且

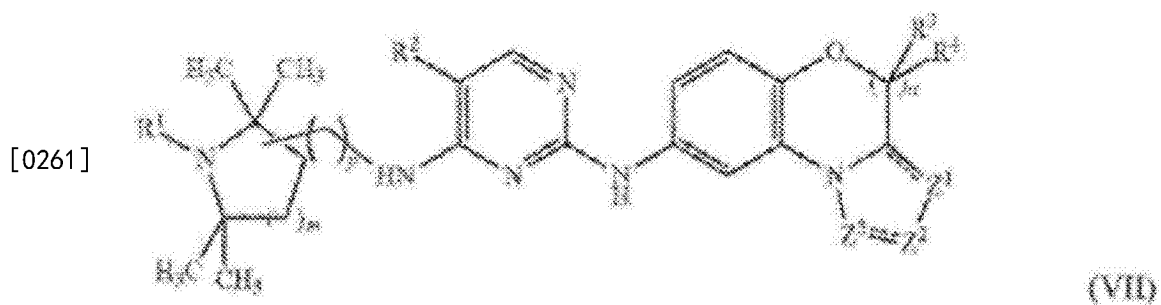
[0256] 虚线表示单键或双键；

[0257] 或其盐或溶剂合物或立体异构体。

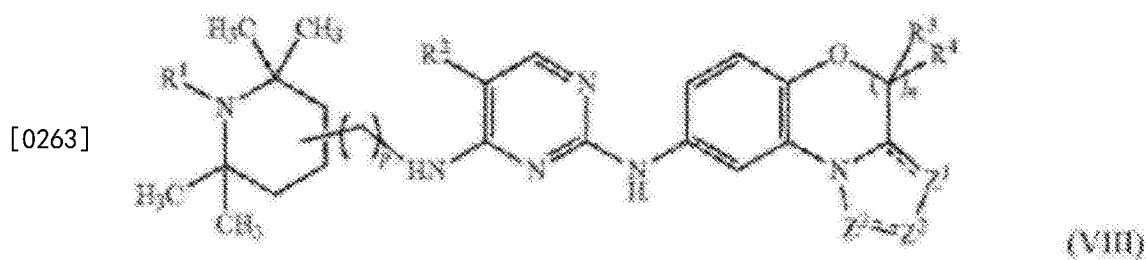
[0258] 在根据式(V)的化合物的一些实施方案中， R^a 、 R^b 、 R^c 和 R^d 表示低级烷基。这样的化合物的示例性实例包括其中 R^a 、 R^b 、 R^c 和 R^d 是甲基并且具有式(VI)的那些化合物：



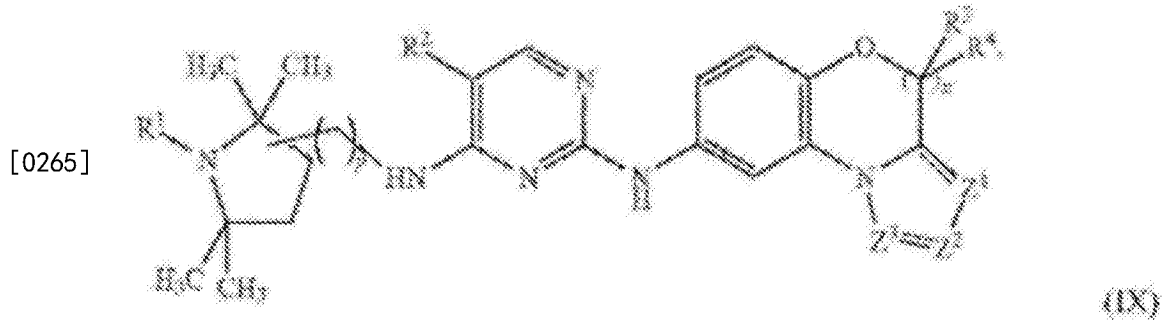
[0260] 在根据式(V)的化合物的另一些实施方案中， X^1 、 X^2 和 X^3 各自是CH。这些化合物具有下式(VII)：



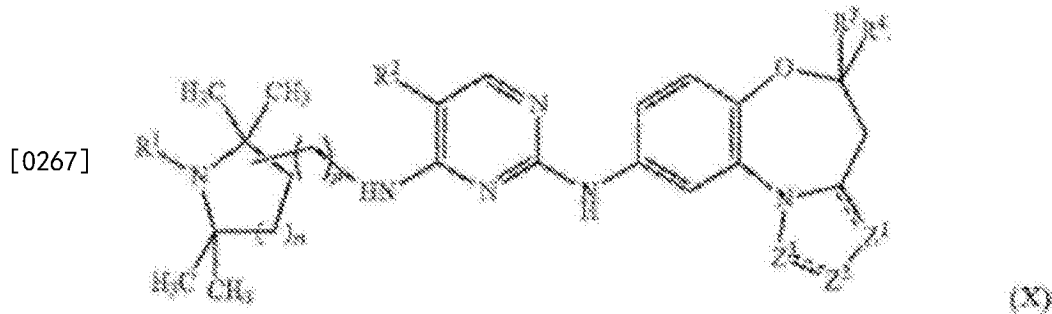
[0262] 在根据式(V)的化合物的另一些实施方案中， X^1 、 X^2 和 X^3 各自是CH；并且 m 是2。这些化合物具有下式(VIII)：



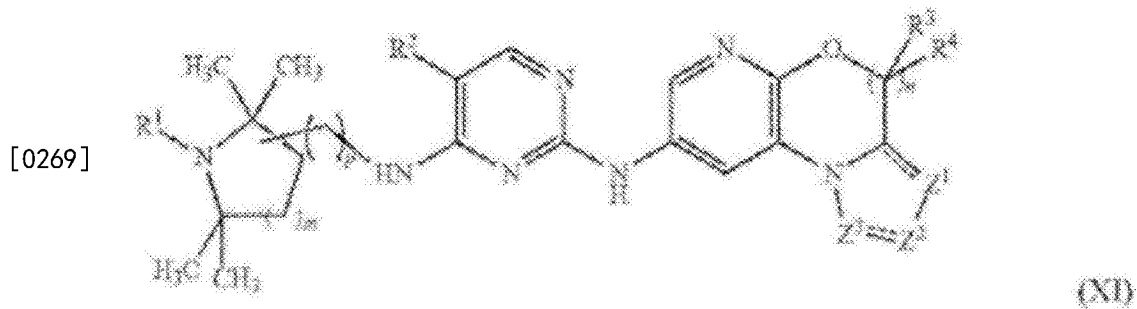
[0264] 在根据式(V)的化合物的又一些实施方案中, X^1 、 X^2 和 X^3 各自是CH; 并且m是1。这些化合物具有下式(IX):



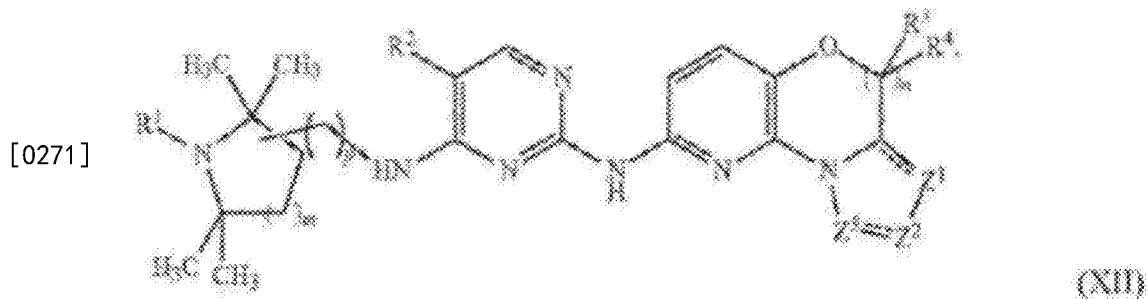
[0266] 在根据式(V)的化合物的又一些实施方案中, X^1 、 X^2 和 X^3 各自是CH; n是2; 并且一组 R^3 和 R^4 是氢。这些化合物具有下式(X):



[0268] 在根据式(V)的化合物的又一些实施方案中, X^2 是N并且 X^1 和 X^3 各自是CH。这些化合物具有下式(XI):

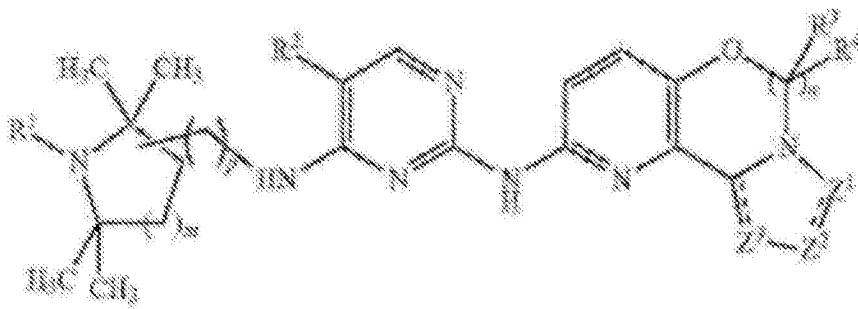


[0270] 在根据式(V)的化合物的又一些实施方案中, X^3 是N并且 X^1 和 X^2 各自是CH。这些化合物具有下式(XII):



[0272] 在根据式(V)的化合物的另一些实施方案中, Z^4 是C并且 Z^5 是N。这样的化合物具有下式(XIII):

[0273]



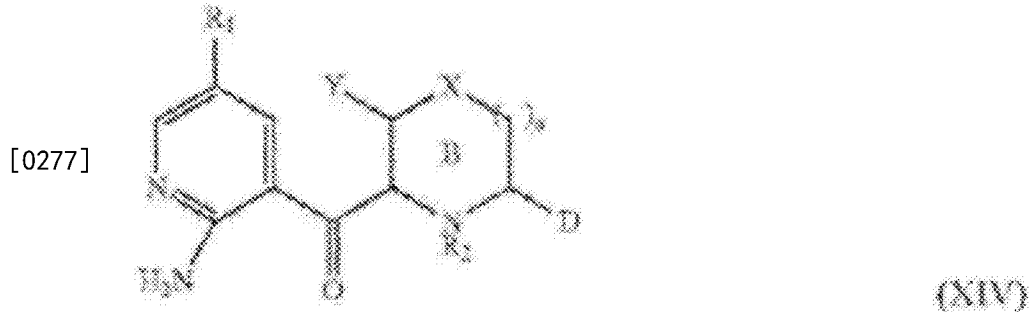
(XIII)

[0274] 式V的示例性化合物包括：N2-(4H-苯并[b]四唑并[1,5-d][1,4]咪唑-8-基)-5-氟-N4-(2,2,6,6-四甲基哌啶-4-基)嘧啶-2,4-二胺；N2-(4H-苯并[b]四唑并[1,5-d][1,4]咪唑-8-基)-5-氟-N4-(1,2,2,6,6-五甲基哌啶-4-基)嘧啶-2,4-二胺；N2-(4H-苯并[b]吡咯并[1,2-d][1,4]咪唑-8-基)-5-氟-N4-(2,2,6,6-四甲基哌啶-4-基)嘧啶-2,4-二胺；N2-(4H-苯并[b]吡咯并[1,2-d][1,4]咪唑-8-基)-5-氟-N4-(1,2,2,6,6-五甲基哌啶-4-基)嘧啶-2,4-二胺；N2-(4,4-二氟-4H-苯并[b]四唑并[1,5-d][1,4]咪唑-8-基)-5-氟-N4-(2,2,6,6-四甲基哌啶-4-基)嘧啶-2,4-二胺；N2-(4,4-二氟-4H-苯并[b]四唑并[1,5-d][1,4]咪唑-8-基)-5-氟-N4-(1,2,2,6,6-五甲基哌啶-4-基)嘧啶-2,4-二胺；N2-(4,4-二甲基-4H-苯并[b]四唑并[1,5-d][1,4]咪唑-8-基)-5-氟-N4-(2,2,6,6-四甲基哌啶-4-基)嘧啶-2,4-二胺；N2-(4,4-二甲基-4H-苯并[b]四唑并[1,5-d][1,4]咪唑-8-基)-5-氟-N4-(1,2,2,6,6-五甲基哌啶-4-基)嘧啶-2,4-二胺；N2-(5,5-二甲基-5H-苯并[e]四唑并[1,5-c][1,3]咪唑-9-基)-5-氟-N4-(2,2,6,6-四甲基哌啶-4-基)嘧啶-2,4-二胺；N2-(5,5-二甲基-5H-苯并[e]四唑并[1,5-c][1,3]咪唑-9-基)-5-氟-N4-(1,2,2,6,6-五甲基哌啶-4-基)嘧啶-2,4-二胺；N2-(8,9-二氢螺[苯并[b]四唑并[1,5-d][1,4]咪唑-4,1'-环丁烷]-8-基)-5-氟-N4-(2,2,6,6-四甲基哌啶-4-基)嘧啶-2,4-二胺；N2-(8,9-二氢螺[苯并[b]四唑并[1,5-d][1,4]咪唑-4,1'-环丁烷]-8-基)-5-氟-N4-(1,2,2,6,6-五甲基哌啶-4-基)嘧啶-2,4-二胺；5-氟-N2-(4-甲基-8,9-二氢-4H-苯并[b]四唑并[1,5-d][1,4]咪唑-8-基)-N4-(2,2,6,6-四甲基哌啶-4-基)嘧啶-2,4-二胺；5-氟-N2-(4-甲基-8,9-二氢-4H-苯并[b]四唑并[1,5-d][1,4]咪唑-8-基)-N4-(1,2,2,6,6-五甲基哌啶-4-基)嘧啶-2,4-二胺；N2-(4H-苯并[b]四唑并[1,5-d][1,4]咪唑-8-基)-5-氟-N4-((1,2,2,5,5-五甲基吡咯烷-3-基)甲基)嘧啶-2,4-二胺；N2-(4H-苯并[b]四唑并[1,5-d][1,4]咪唑-8-基)-5-氟-N4-((2,2,5,5-四甲基吡咯烷-3-基)甲基)嘧啶-2,4-二胺；N2-(4,4-二甲基-4H-苯并[b]四唑并[1,5-d][1,4]咪唑-8-基)-5-氟-N4-((1,2,2,5,5-五甲基吡咯烷-3-基)甲基)嘧啶-2,4-二胺；N2-(4,4-二甲基-4H-苯并[b]四唑并[1,5-d][1,4]咪唑-8-基)-5-氟-N4-(((3S)-2,2,5-三甲基吡咯烷-3-基)甲基)嘧啶-2,4-二胺；和N2-(4,4-二甲基-4H-苯并[b]四唑并[1,5-d][1,4]咪唑-8-

基)-5-氟-N4-((3R)-2,2,5-三甲基吡咯烷-3-基)甲基)嘧啶-2,4-二胺,

[0275] 或其盐或溶剂合物或立体异构体。

[0276] 替代性小分子PKC- θ 抑制剂化合物可选自如例如Maltais等在美国公开No.2013/0137703(其通过引用整体并入本文)中所述的氨基吡啶化合物。该类型的非限制性化合物具有式(XIV):



[0278] 或其可药用盐,

[0279] 其中:

[0280] R_1 是-H、C1-C3脂肪族基团、F或Cl。环B是5或6元单环杂芳环。X是-CH-、-S-或-NR₂-。 R_2 不存在或是-H。Y是-Y1或-Q1。Y1是任选地且独立地被一个或多个F取代的C1-10脂肪族基团。

[0281] Q1是苯基或具有0至3个独立地选自氮、氧和硫之杂原子的5至6元单环杂芳环;并且Q1任选地且独立地被一个或多个J_a取代。

[0282] D是环C或-Q-R₃。

[0283] 环C是具有1至2个氮原子的6至8元非芳香族单环环或具有1至3个选自氮、氧和硫之杂原子的8-12元非芳香族桥连二环环系统;并且环C任选地且独立地被一个或多个J_b取代。

[0284] Q是-NH-或-O-。

[0285] R_3 是被-OH或-NH₂取代的C1-10烷基;其中 R_3 中的三个至六个亚甲基单元可任选地形成C3-C6元环烷基环;并且 R_3 进一步独立地且独立地被一个或多个J_e取代。

[0286] 各J_a独立地是F或C1-C6烷基。

[0287] J_b是C1-C10烷基,其中多至三个亚甲基任选地被替代为-O-;并且其中C1-C10烷基任选地且独立地被一个或多个J_c取代;或者J_b是C3-C6环烷基或C5-C6杂芳基;或者J_b是任选地且独立地被J_d取代;或者同一碳原子上的两个J_b形成=O或螺C3-C6环烷基。

[0288] 各J_c独立地是F、-OH或C3-C6环烷基。

[0289] 各J_d独立地是F或Cl。

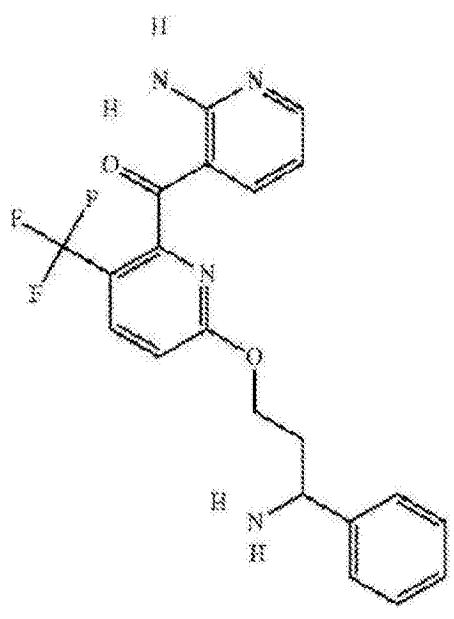
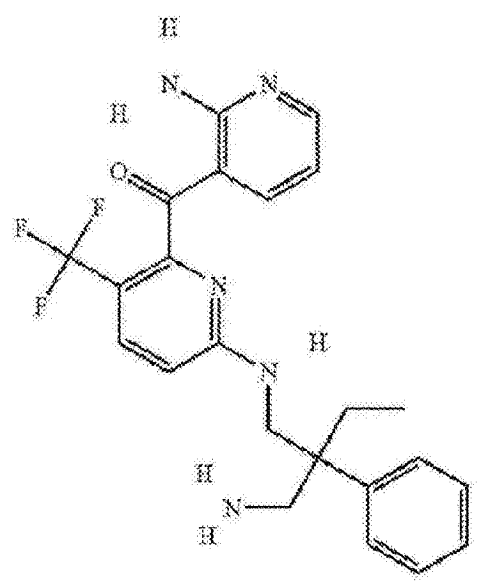
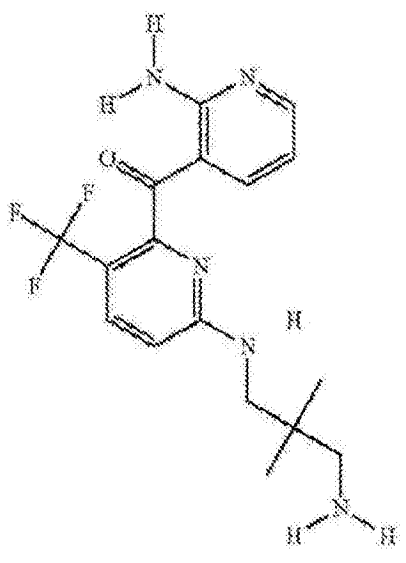
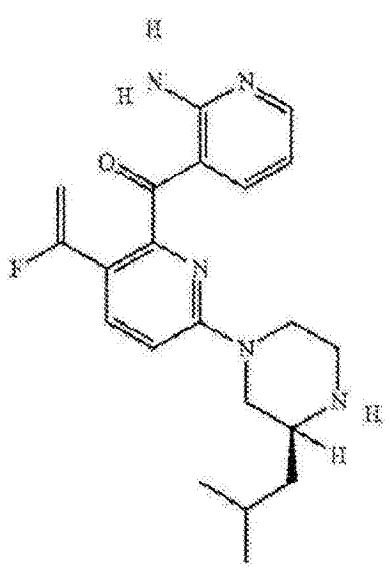
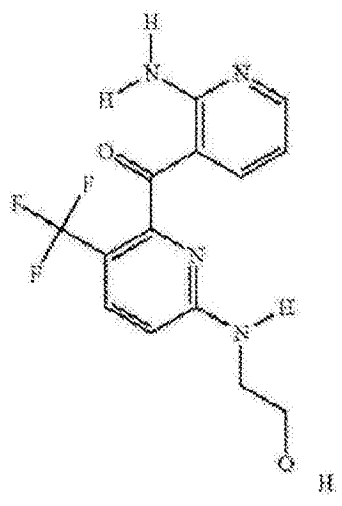
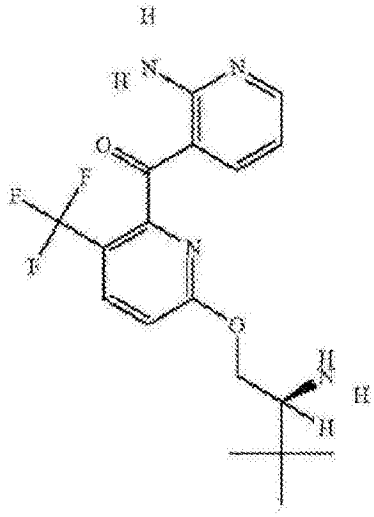
[0290] 各J_e独立地是苯基、具有1至3个独立地选自氮、氧和硫之杂原子的5至6元单环芳香族或非芳香族环;或者同一碳原子上的两个J_e形成螺C3-C6环烷基。

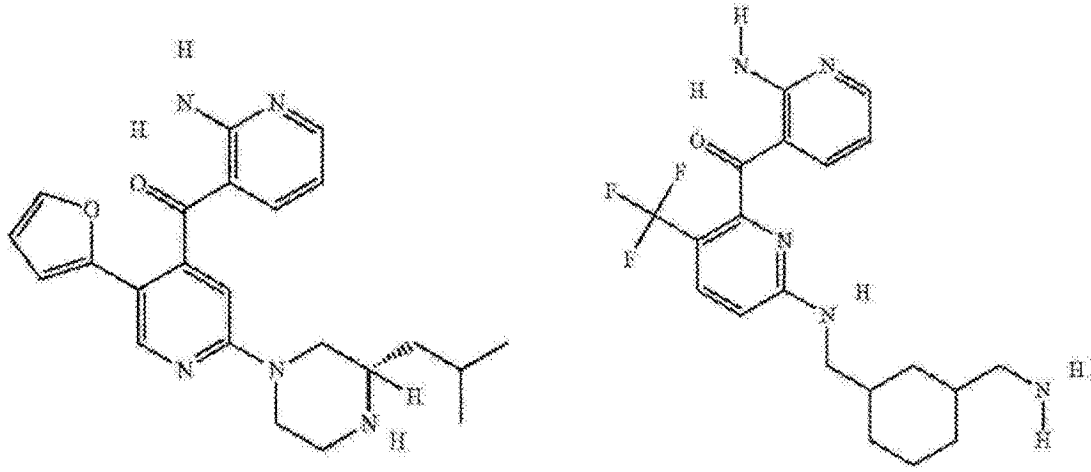
[0291] u是0或1。

[0292] 在一些实施方案中,环B是吡啶基;环C选自哌啶基、哌嗪基、二氮杂环庚基、三氮杂环庚基、azocanyl、diazocanyl、triazocanyl、吡啶基、吡唑基或二氮杂二环辛基;并且环C任选地且独立地被一个或多个J_b取代并且其余变量如上所述。

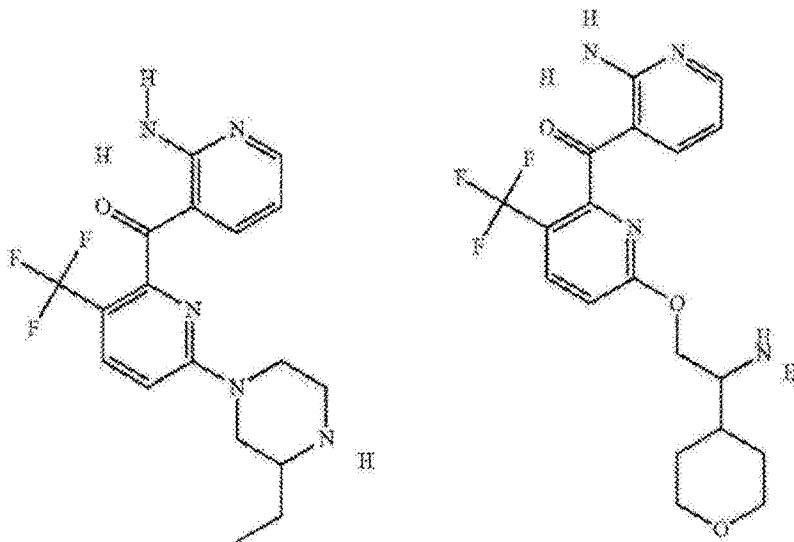
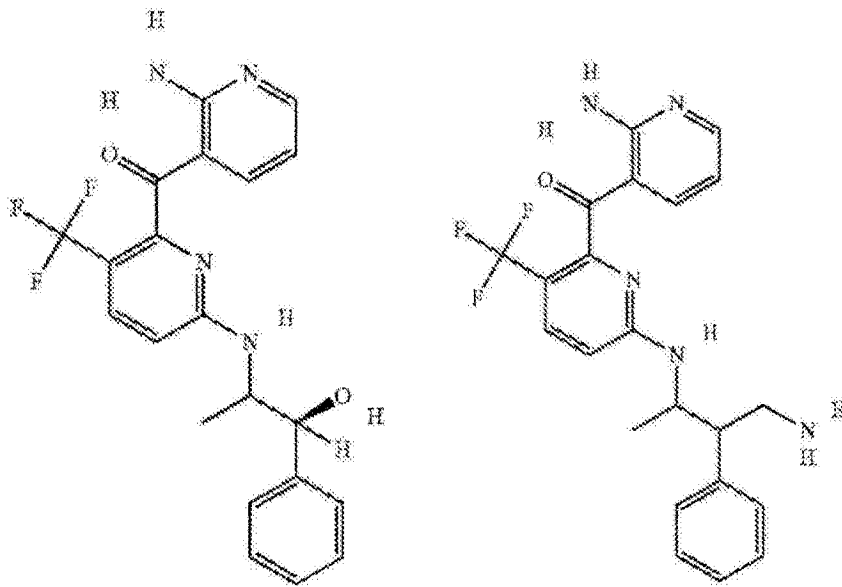
[0293] 代表性的根据式(XIV)的化合物包括:

[0294]

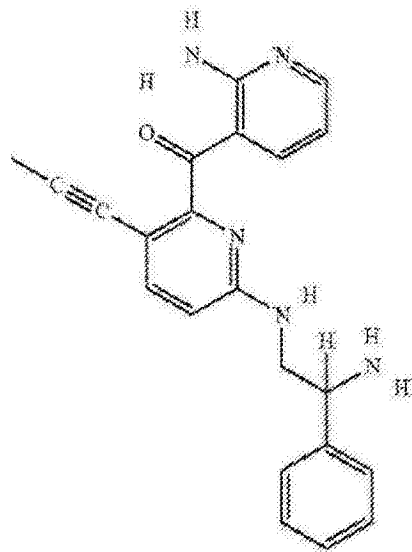
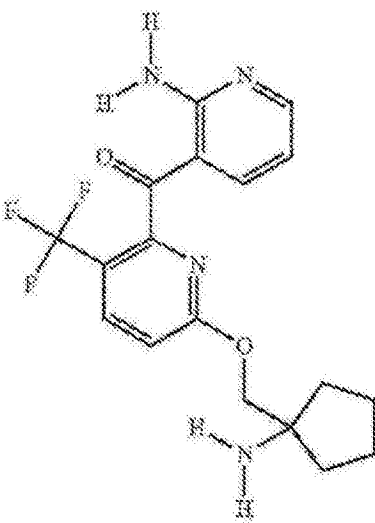
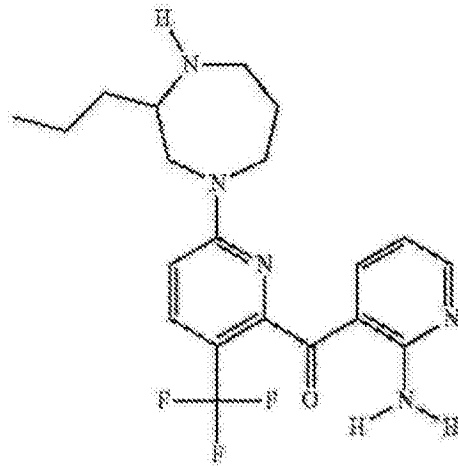
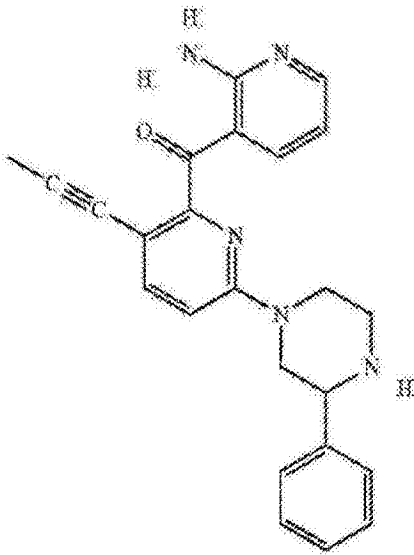
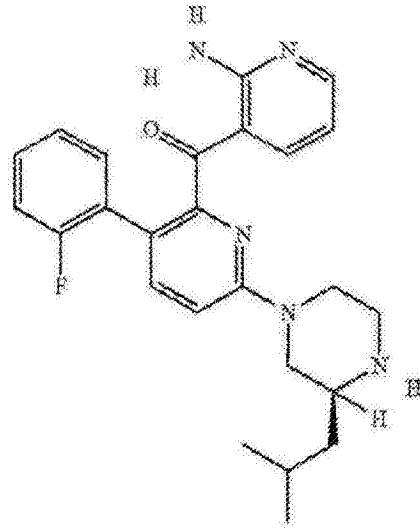
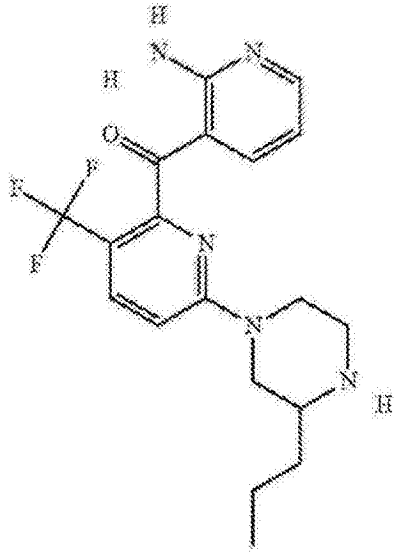


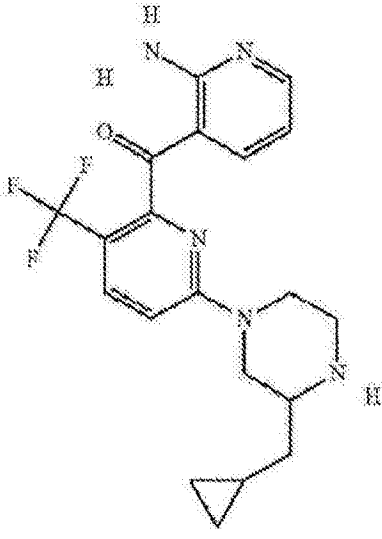
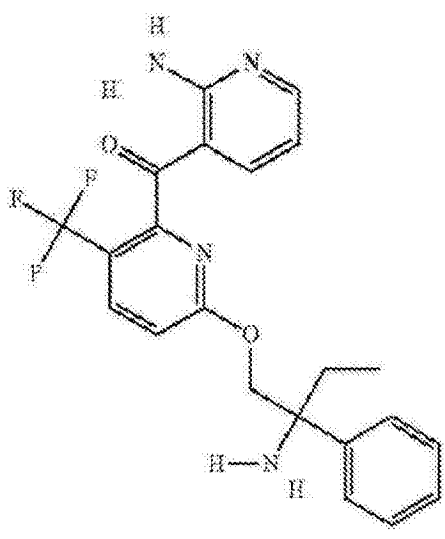


[0295]

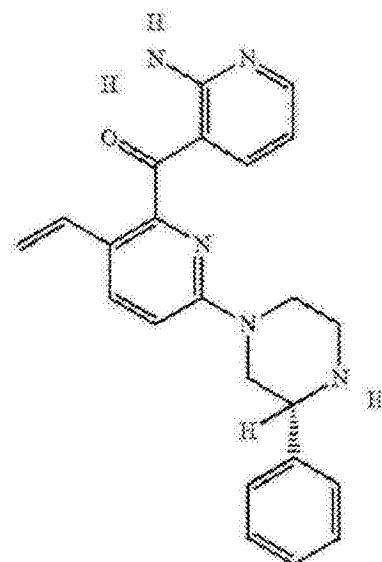
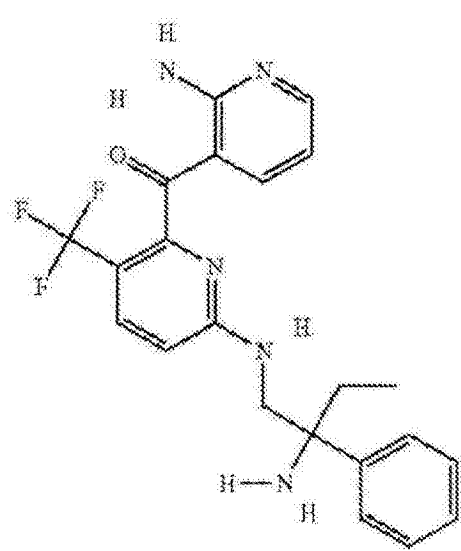
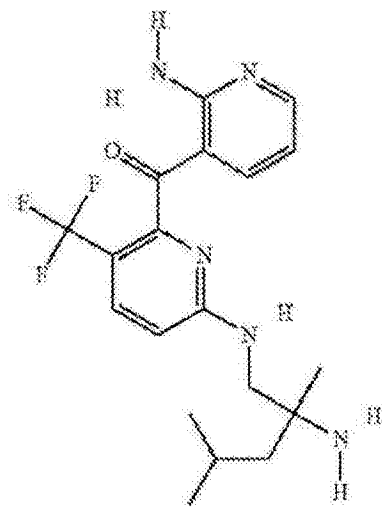
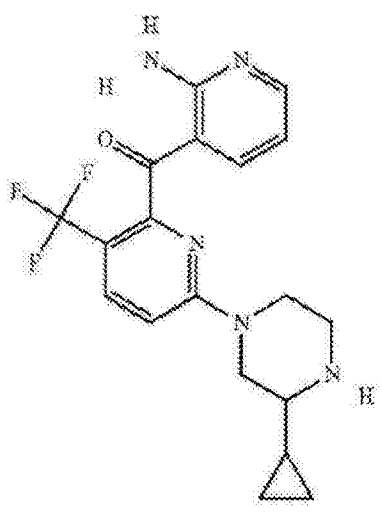


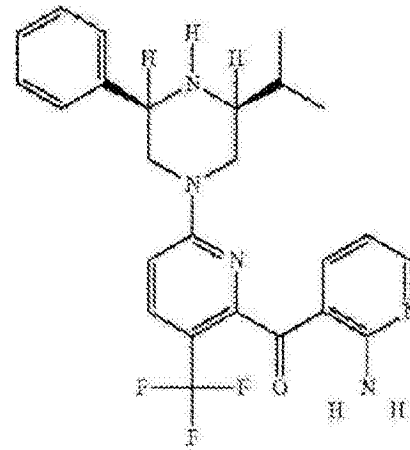
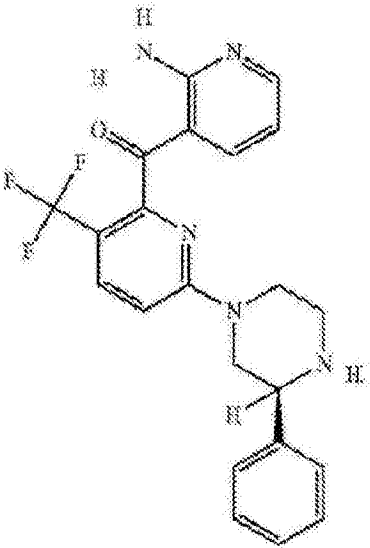
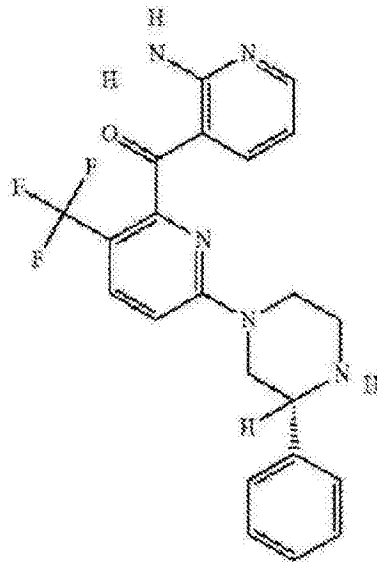
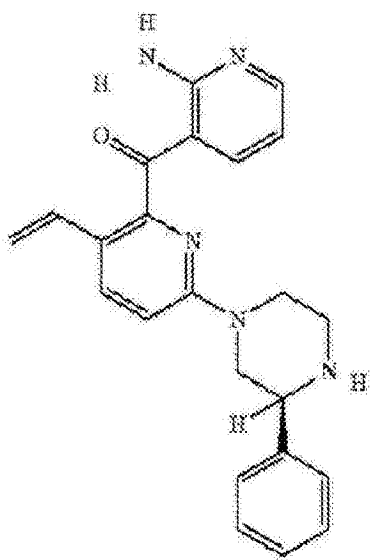
[0296]



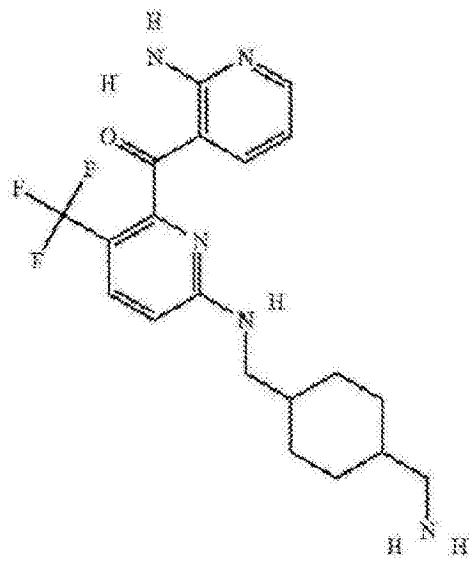
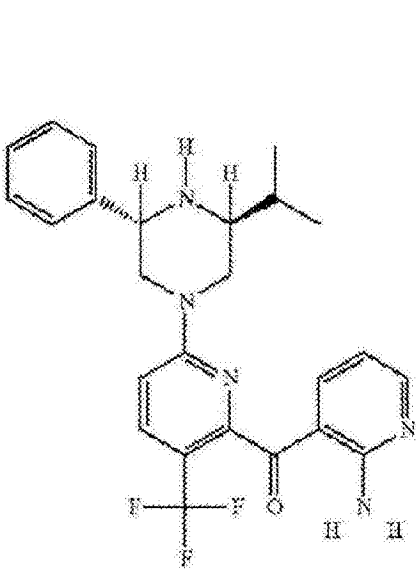


[0297]

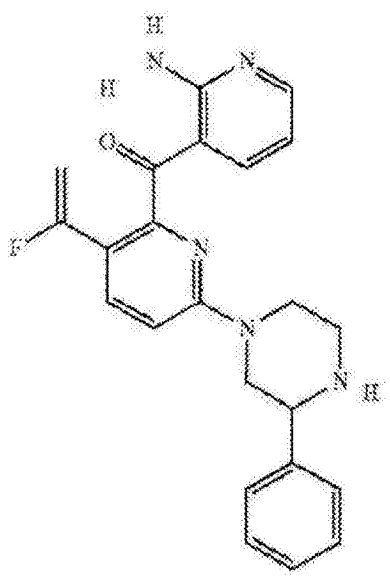
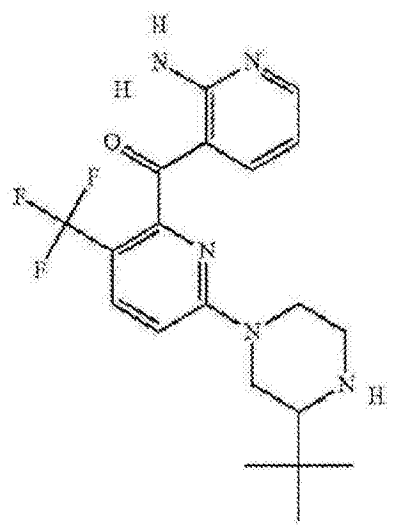
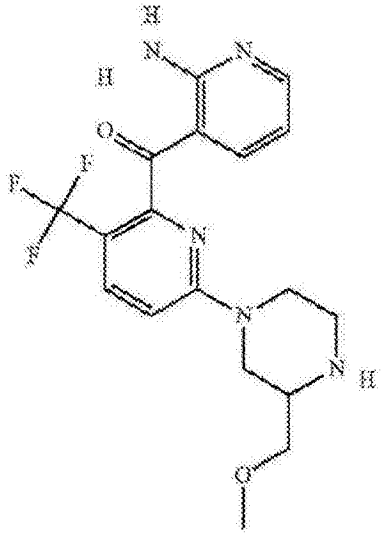
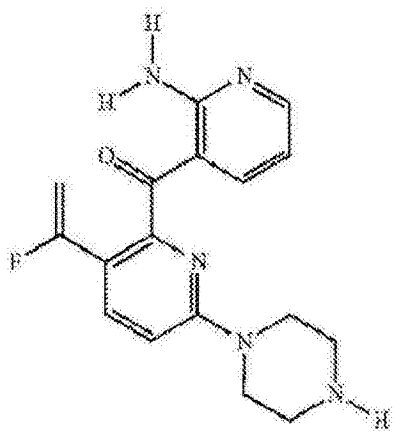
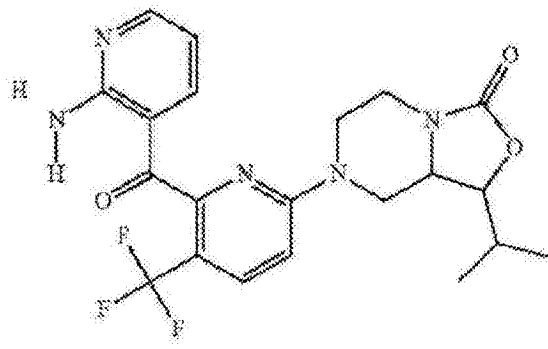
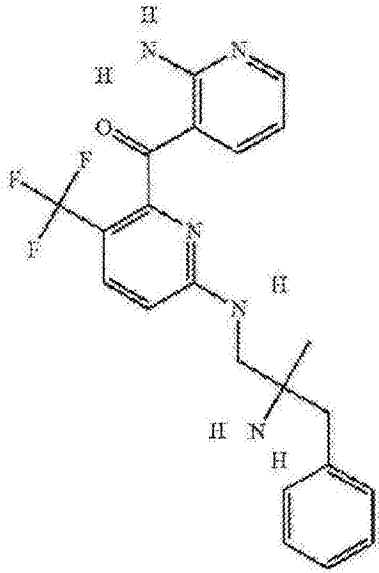


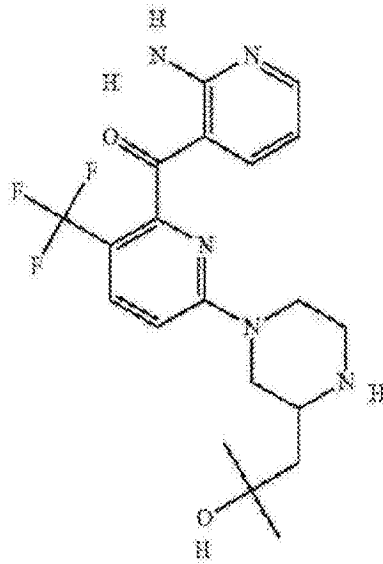
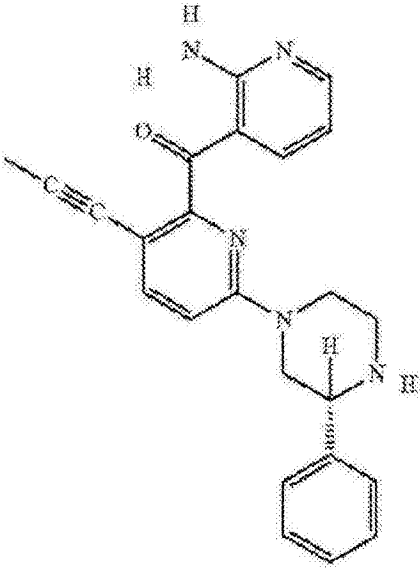


[0298]

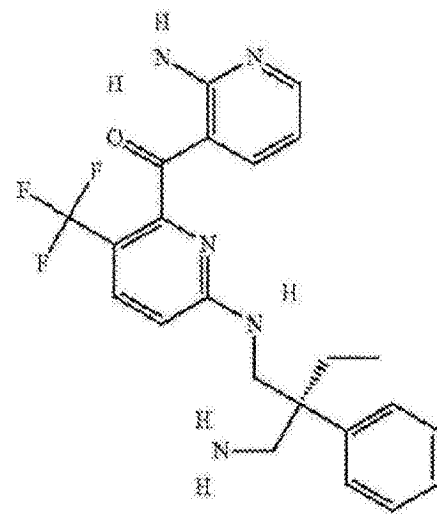
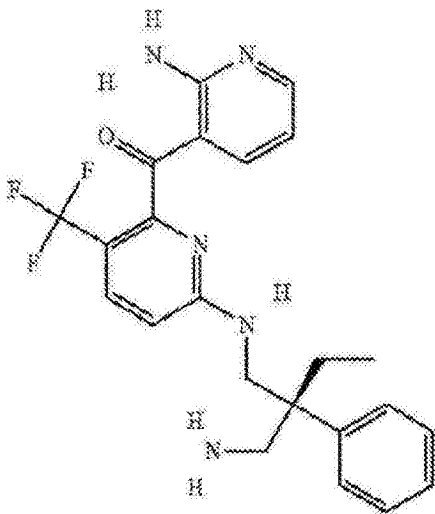
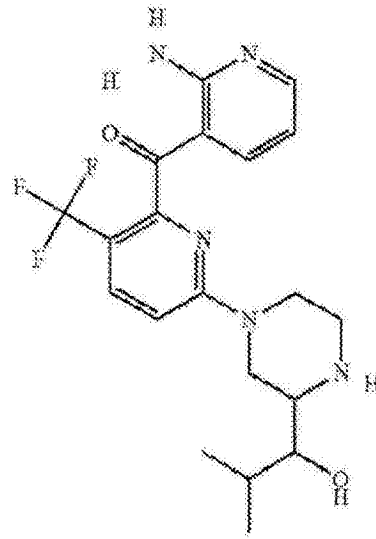
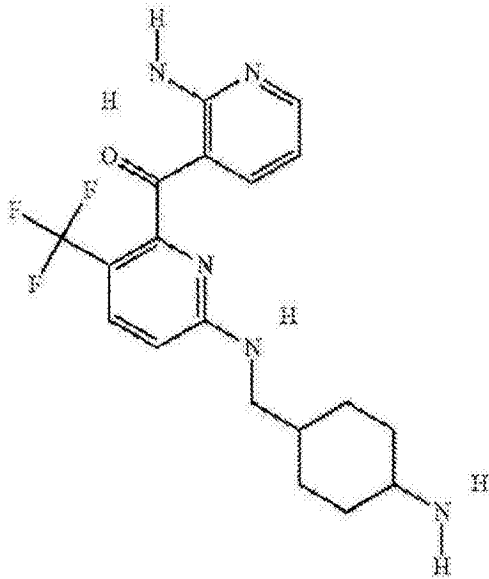


[0299]

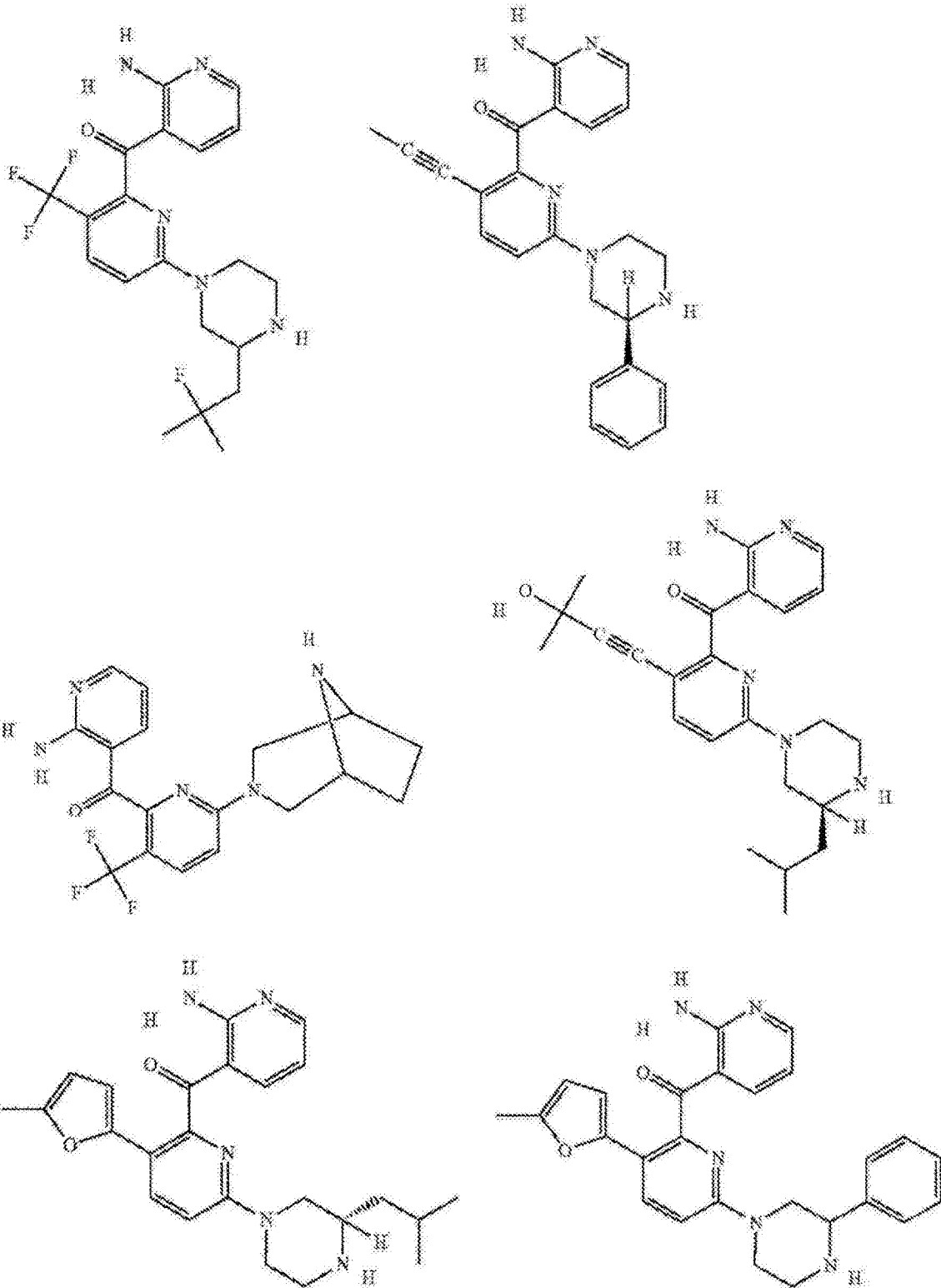


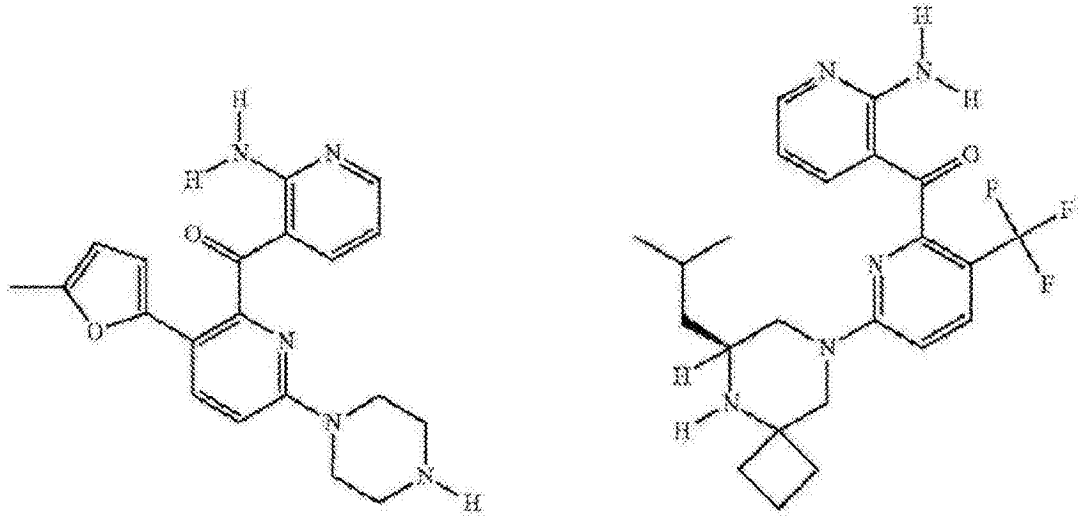


[0300]

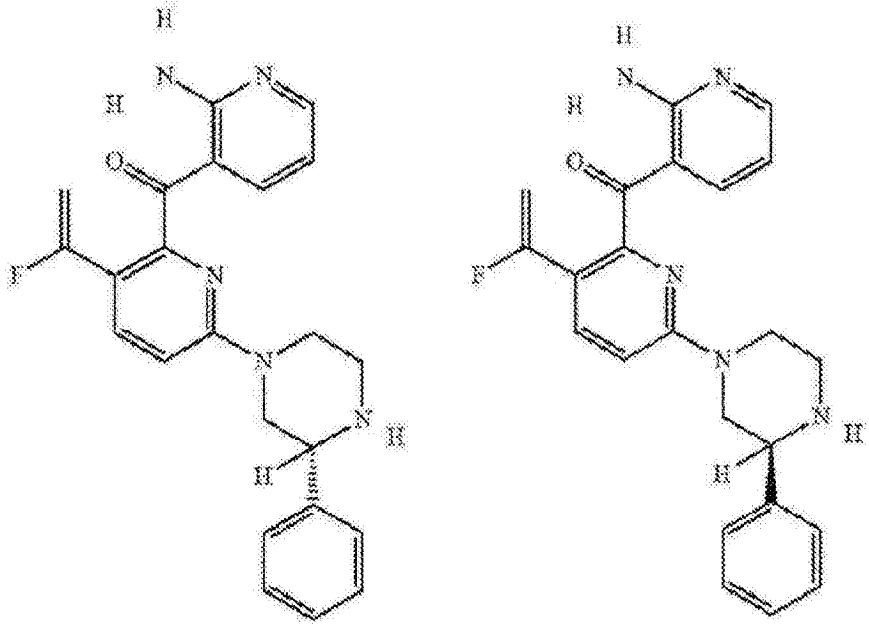
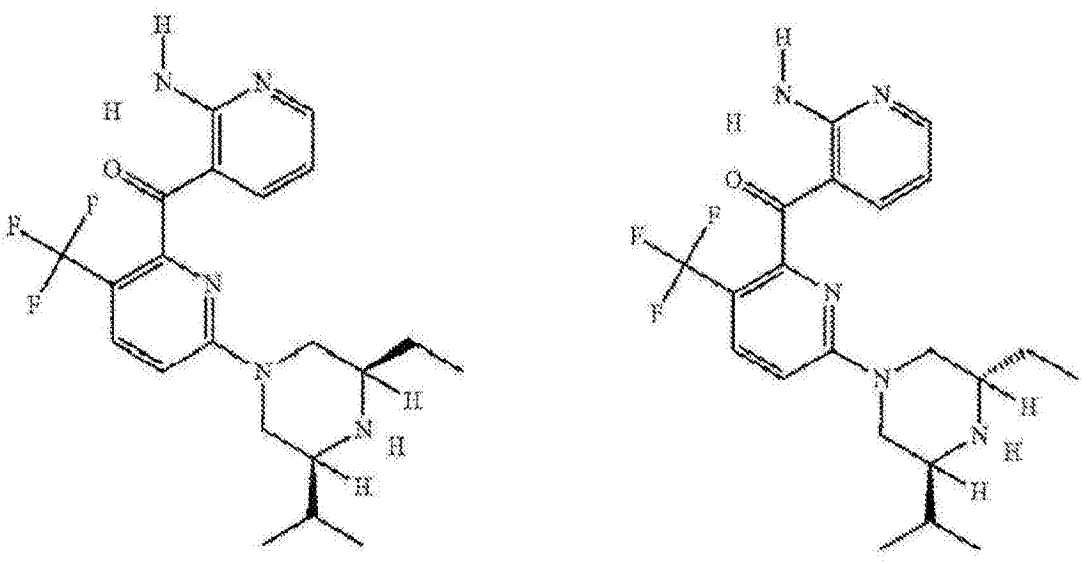


[0301]

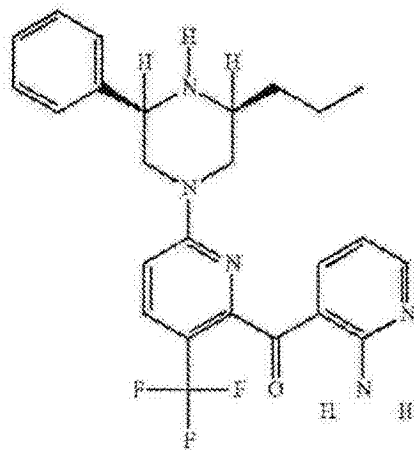
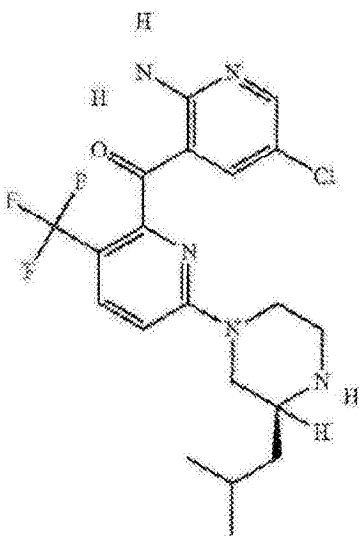
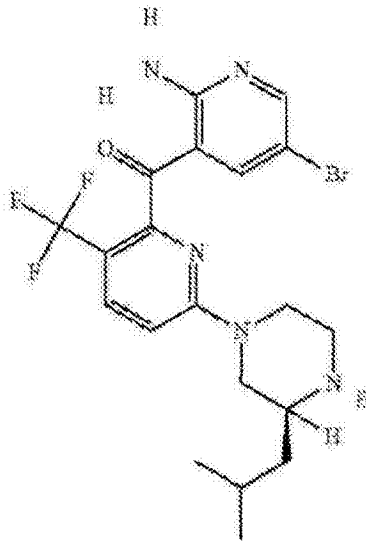
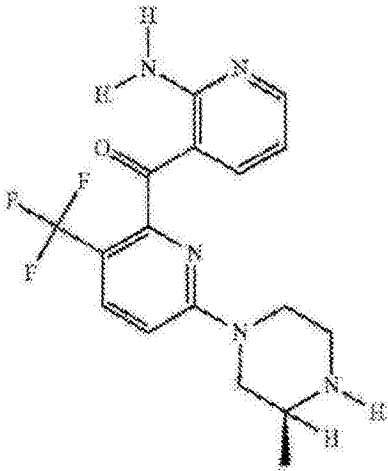
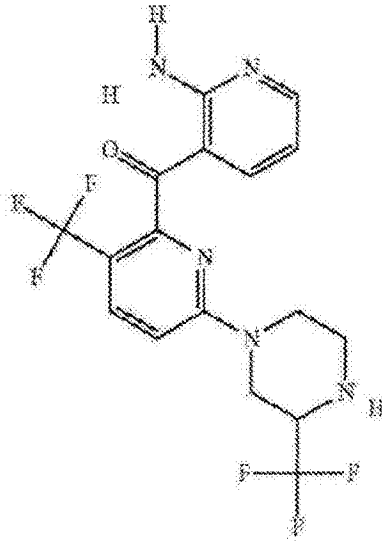
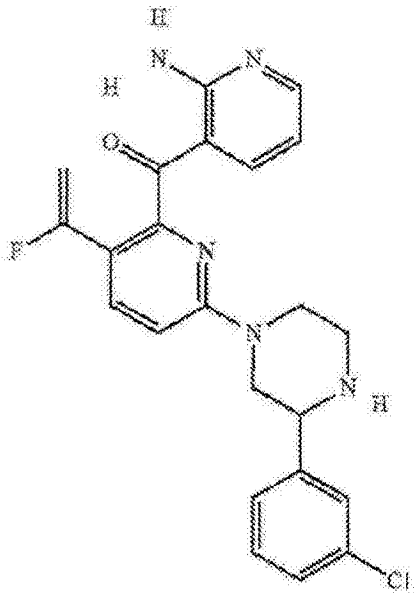


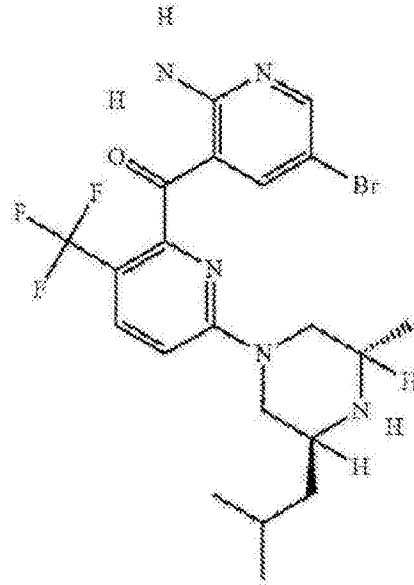
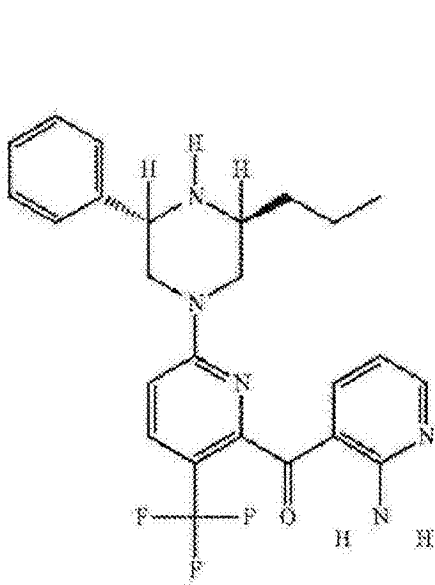


[0302]

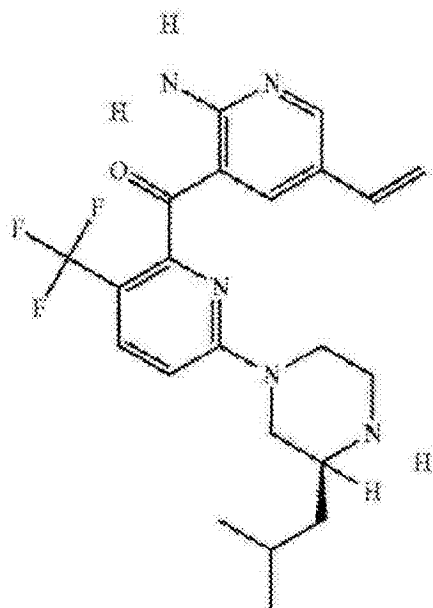
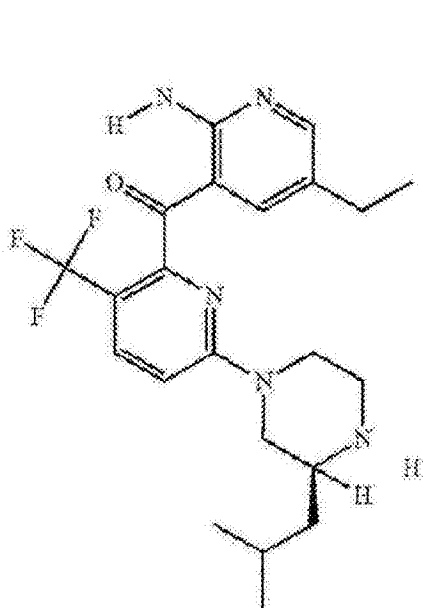
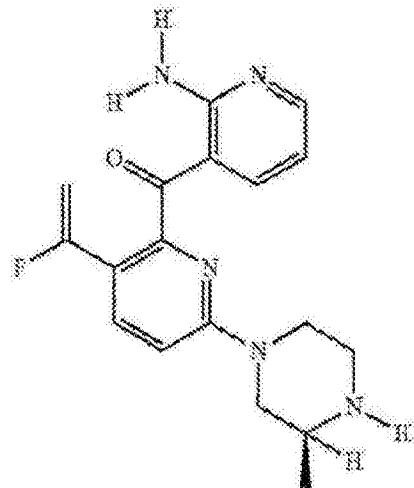
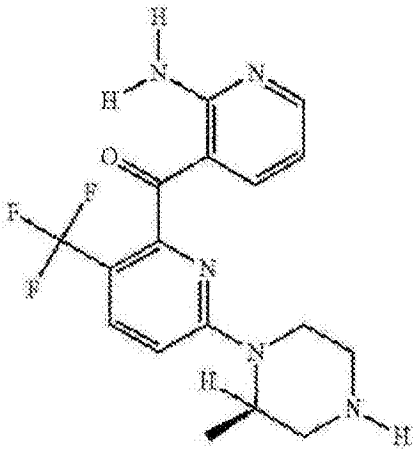


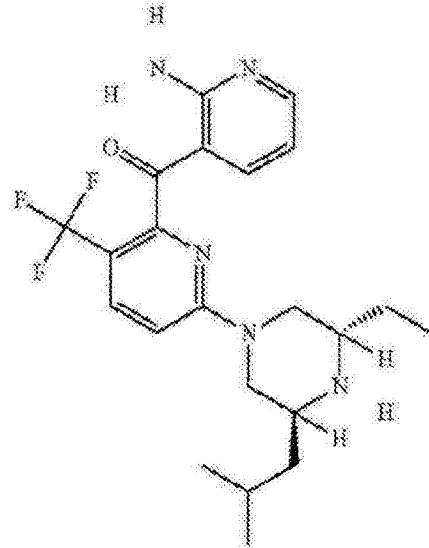
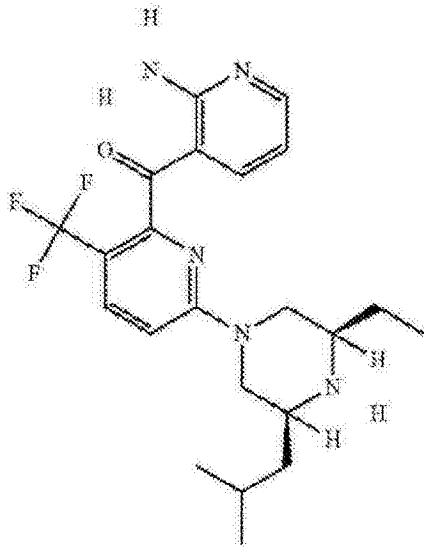
[0303]



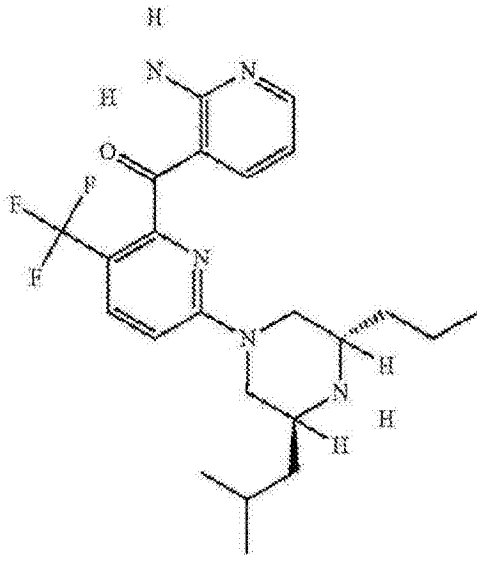
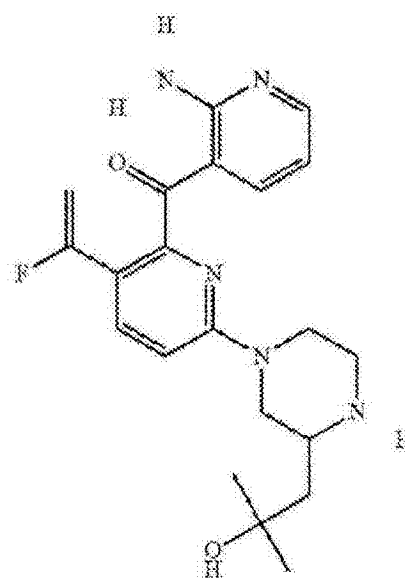
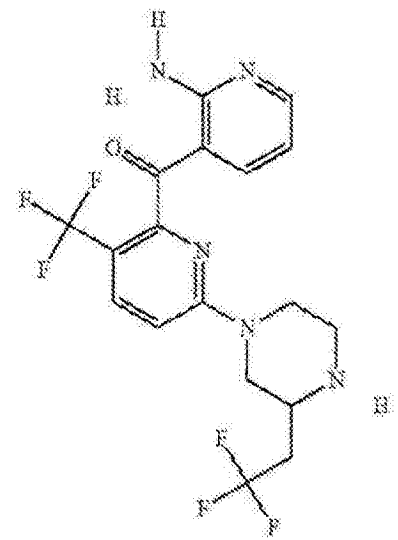
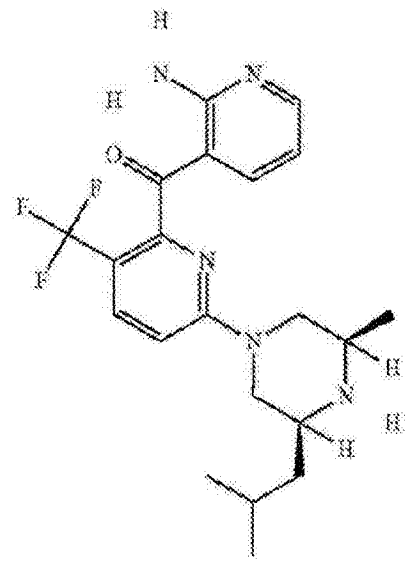


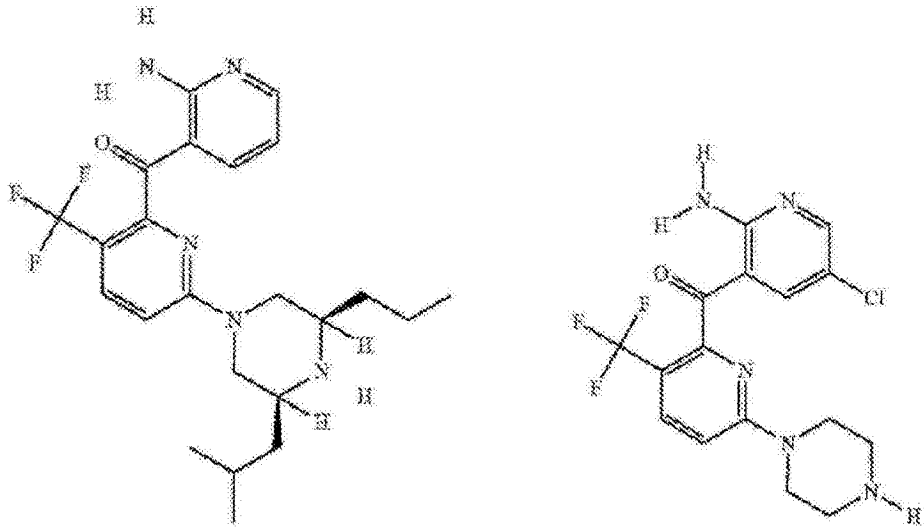
[0304]



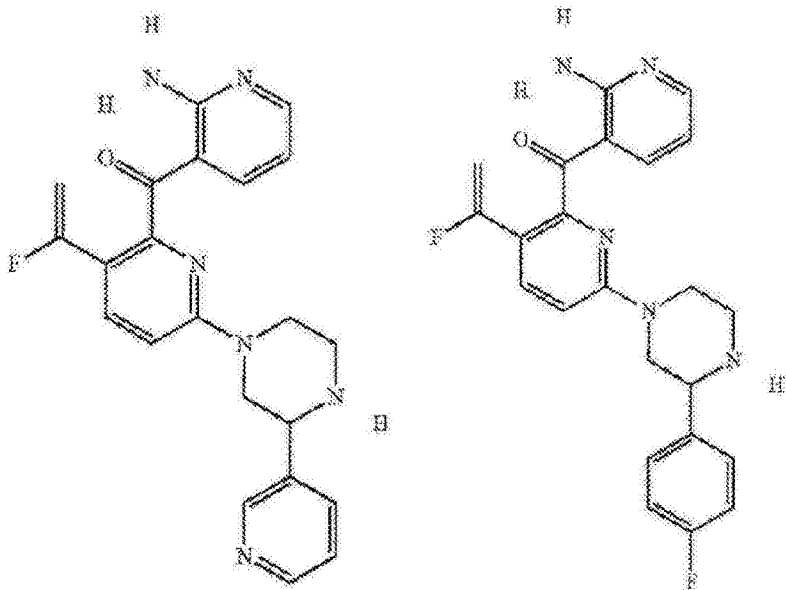
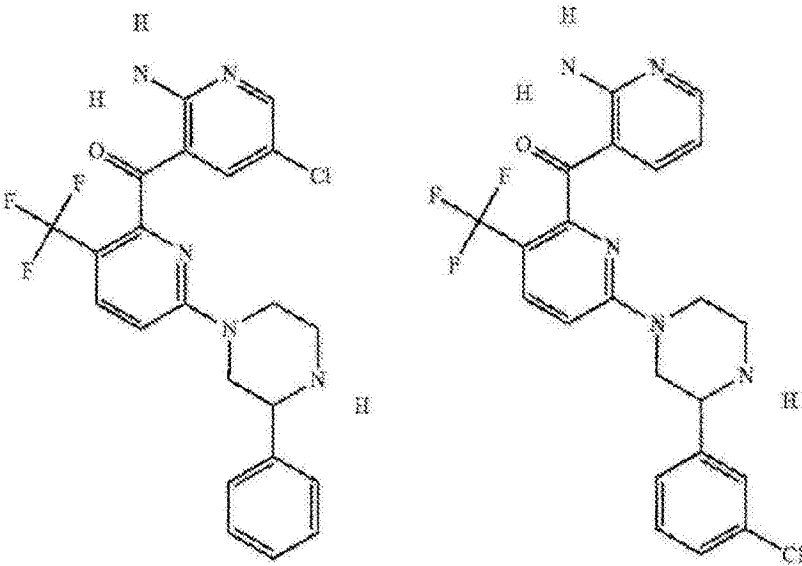


[0305]

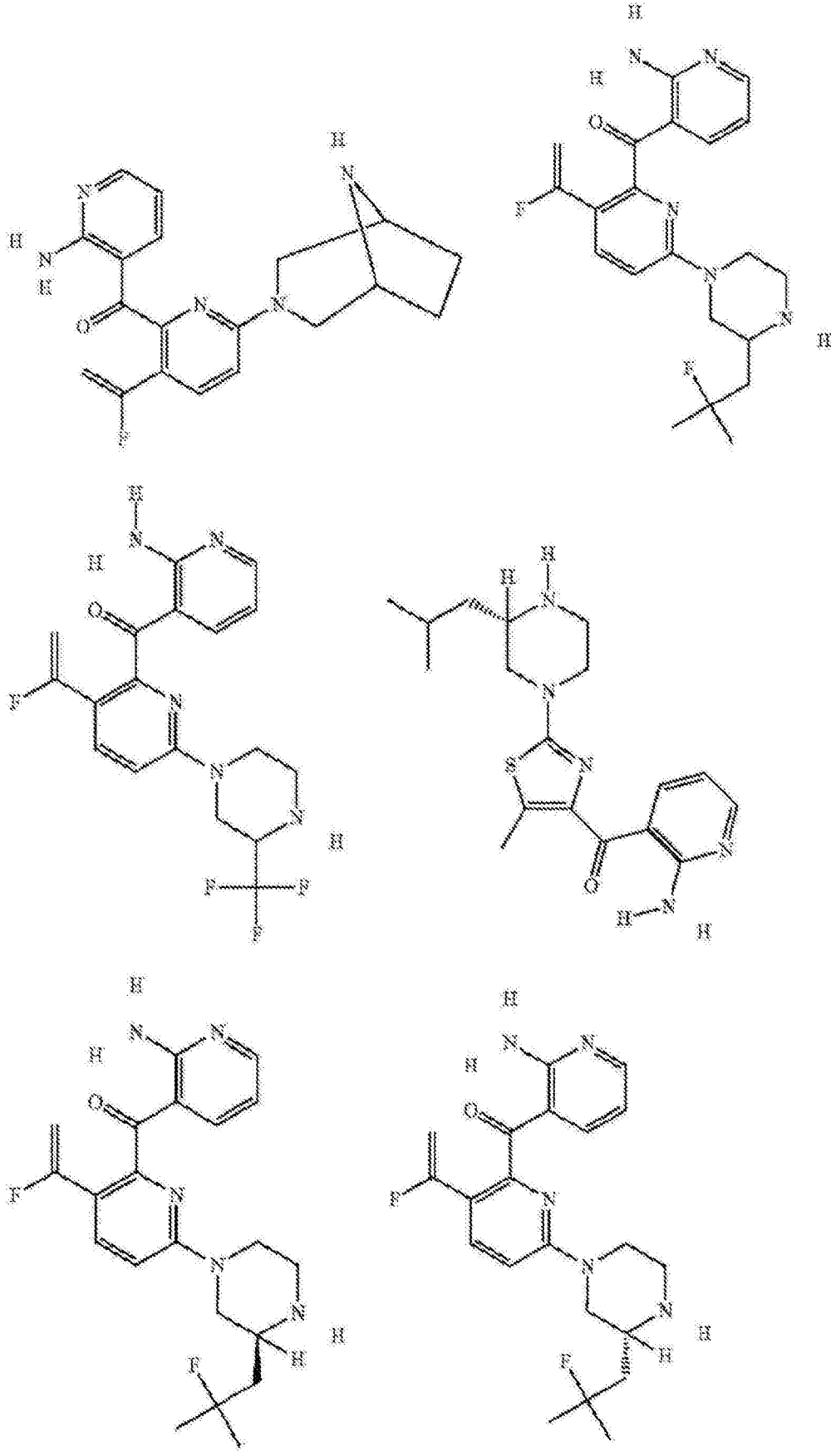


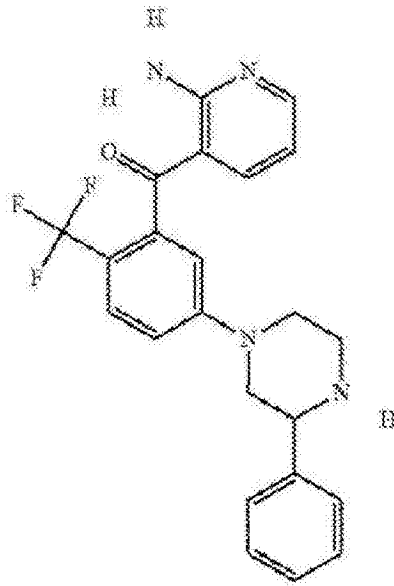
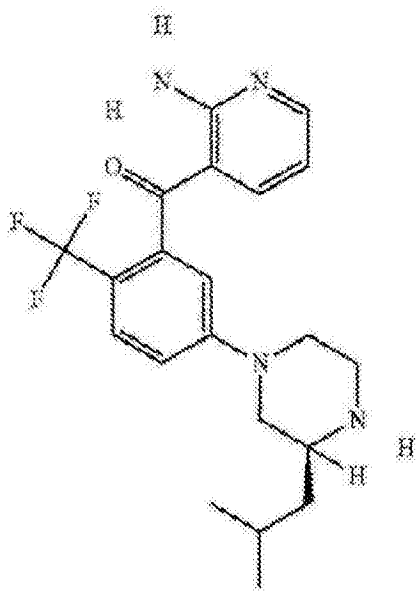


[0306]

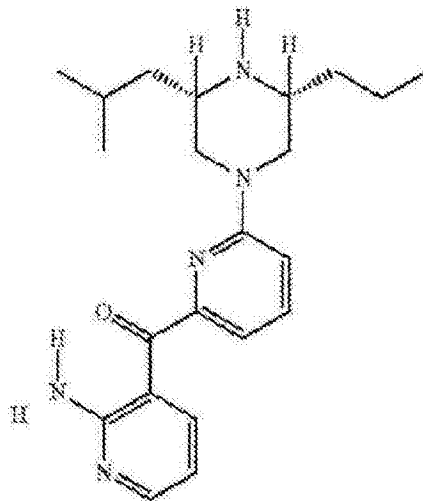
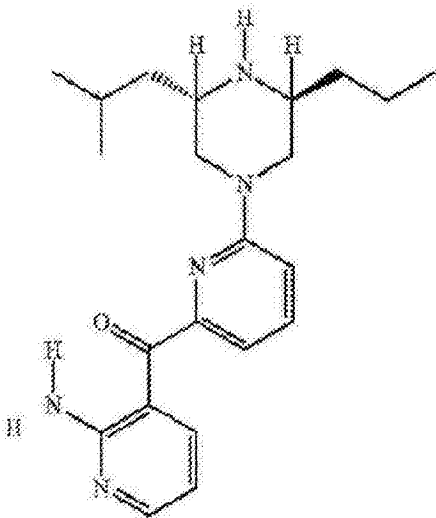
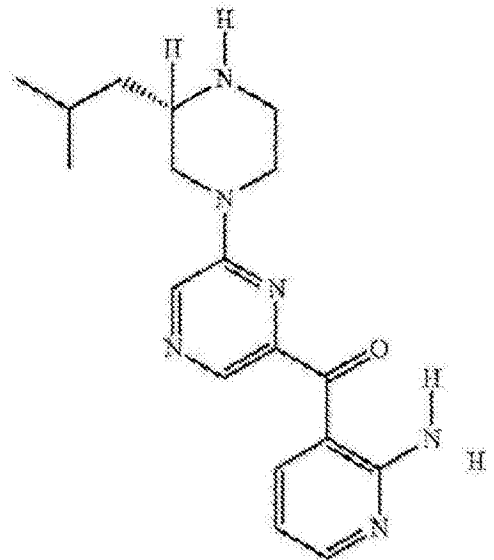
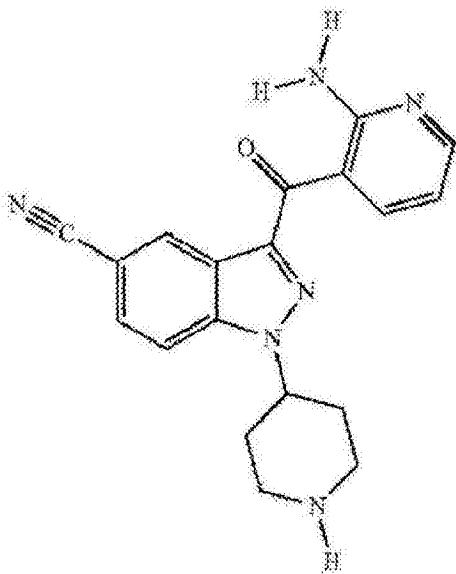


[0307]

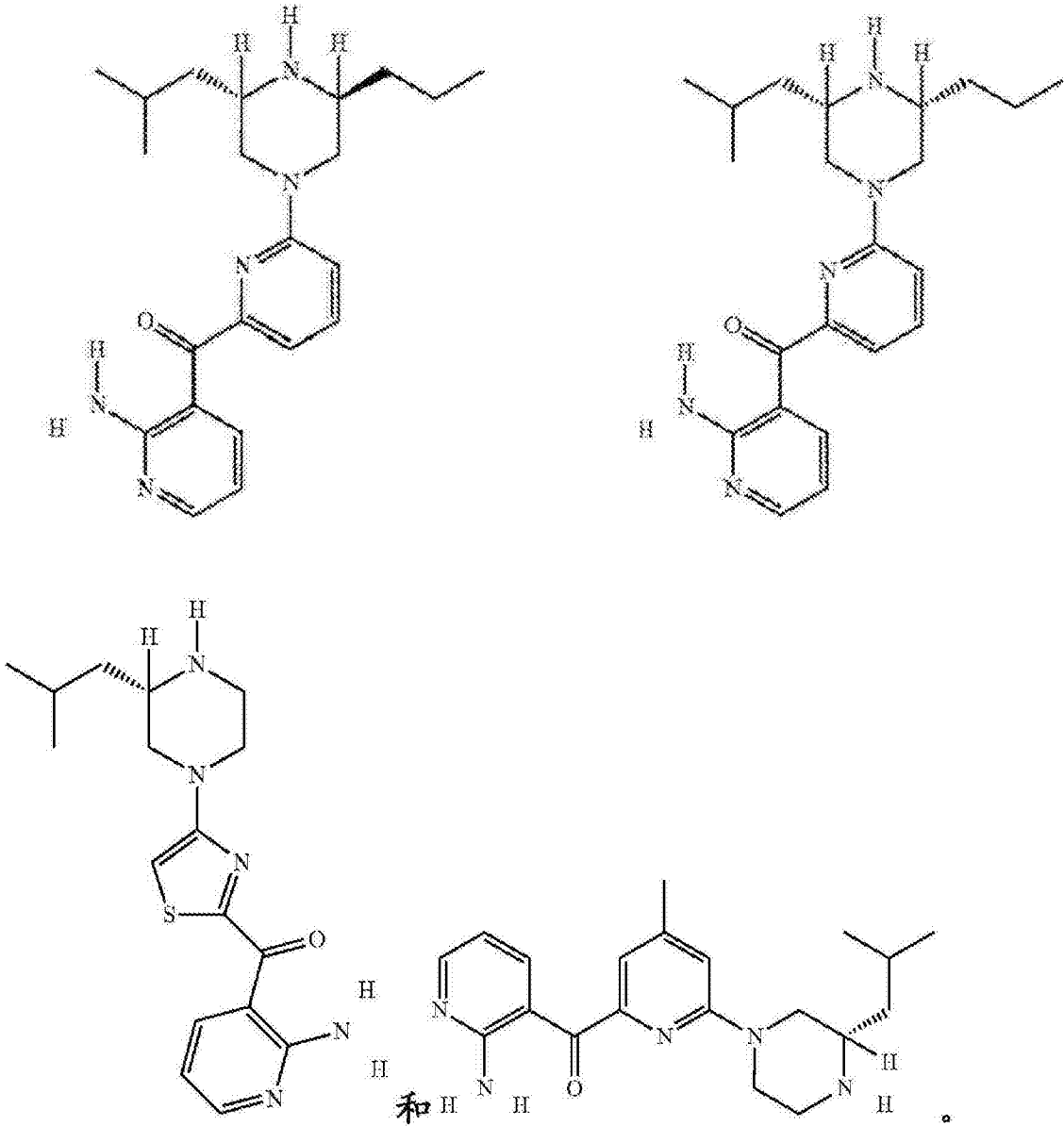




[0308]

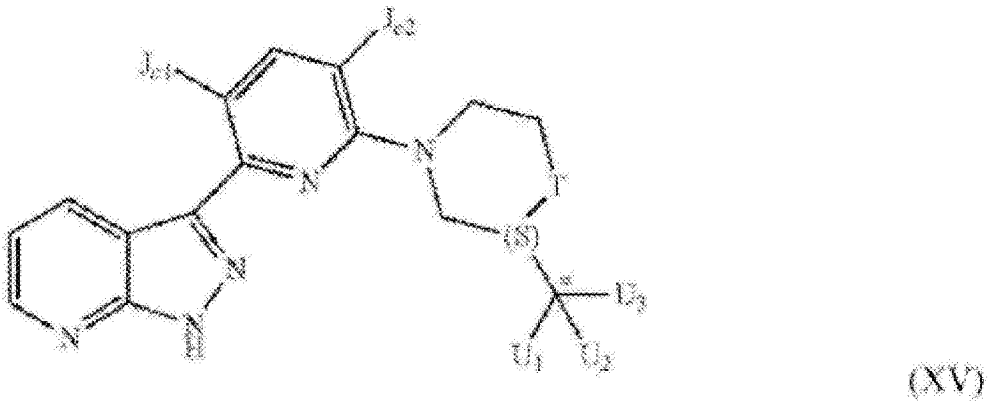


[0309]



[0310] 本发明还考虑了如例如Jimenez等在美国公开No.2013/0053395(其通过引用整体并入本文)中所述的吡啶并吡啶化合物。该类型的示例性衍生物包括根据式(XV)的化合物:

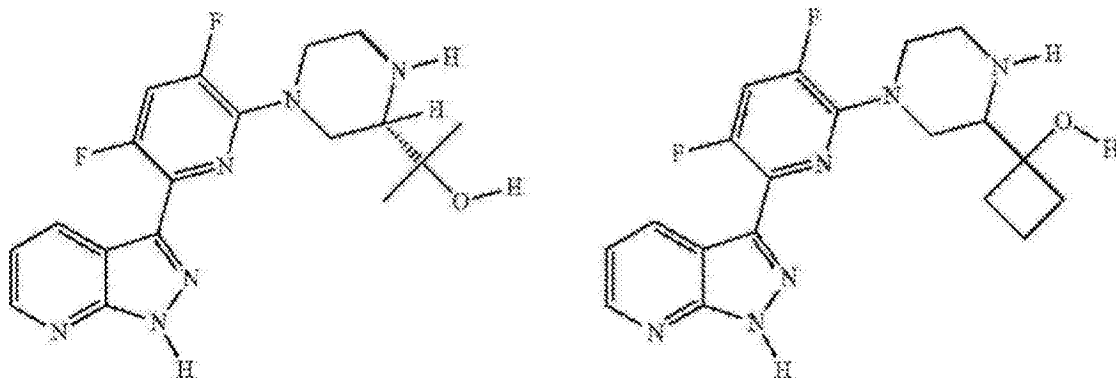
[0311]



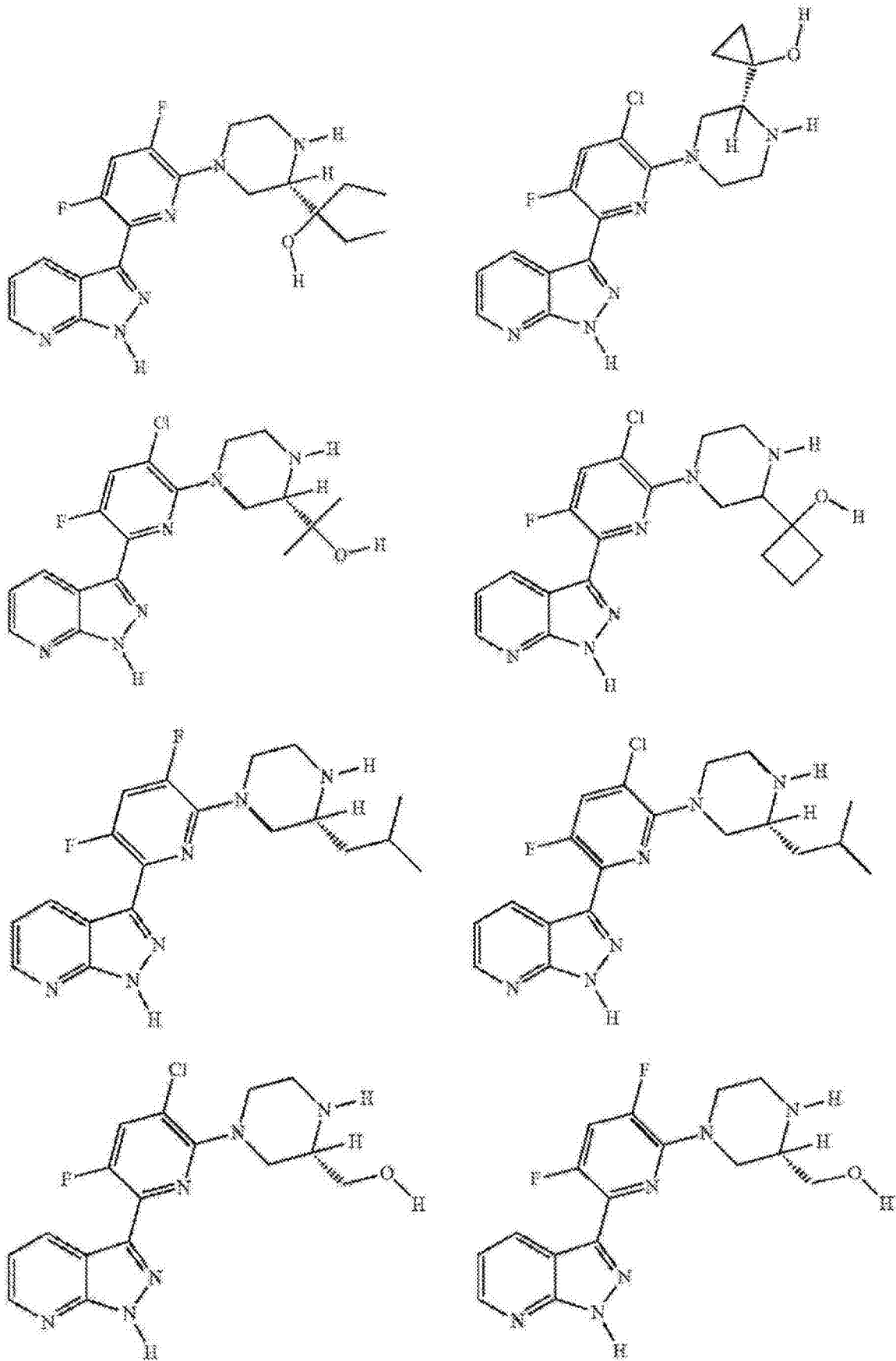
[0312] 或其可药用盐,

[0313] 其中:

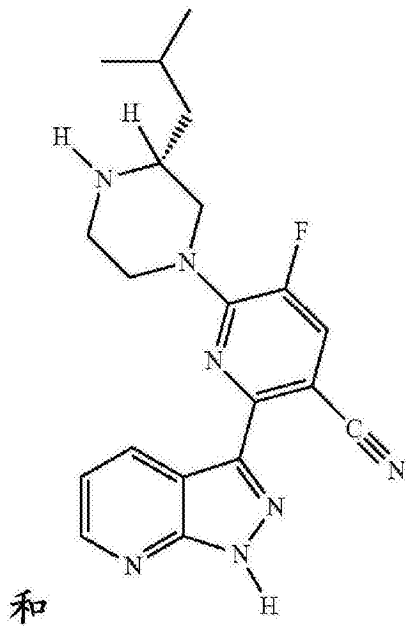
- [0314] T是-NH-或不存在；
- [0315] 各 J_{c1} 和 J_{c2} 独立地是-CN、-F、-Cl、-OR、-CH₂OR或-CF₃；
- [0316] 各 U_1 、 U_2 和 U_3 独立地是-H、Z或 J_b ，其中 U_1 、 U_2 和 U_3 中的不多于一个是-H，或者 U_1 、 U_2 和 U_3 中的两个连接在一起形成具有0至1个杂原子的C₁₋₆环烷基环，所述C₁₋₆环烷基环任选地且独立地被一个或更多个 J_e 取代；
- [0317] Z是Y₂-Q₂；
- [0318] Y₂不存在或者是任选地且独立地被一个或更多个 J_d 取代的C₁₋₆烷基。
- [0319] Q₂不存在或者是具有0至1个杂原子的任选地且独立地被一个或更多个 J_e 取代的C₃₋₈环烷基，其中Y₂和Q₂不同时不存在；
- [0320] 各 J_b 独立地是-F、-OR、-CN、-CF₃、-N(R)₂、-C(O)N(R)₂、任选地且独立地被一个或更多个 J_a 取代的C₁₋₆烷基；
- [0321] 各 J_a 独立地是-F、-OR、-N(R)₂或-C(O)N(R)₂；
- [0322] 各 J_d 独立地是-OR、-CN、-C(O)N(R)₂、-N(R)₂或F；
- [0323] 各 J_e 独立地是C₁₋₆烷基、-OR、-N(R)₂、-CF₃或F；并且
- [0324] 各R是-H或C₁₋₆烷基。
- [0325] 在一些实施方案中，在碳上存在由*表示的非手性中心。
- [0326] 根据式(XV)的化合物的非限制性实例包括由以下结构表示的化合物：
- [0327]



[0328]

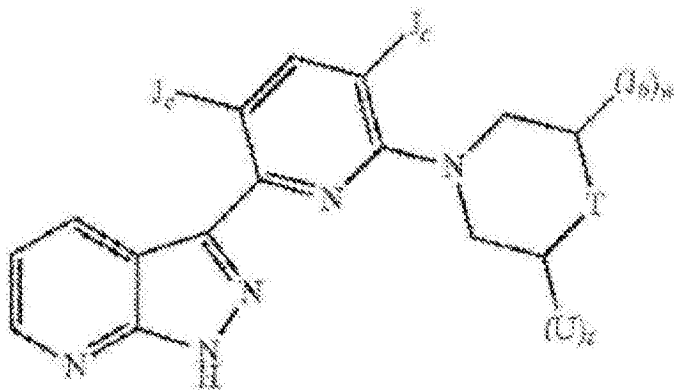


[0329]



[0330] 在又一些实施方案中,小分子PKC- θ 抑制剂选自如例如Boyal1等在美国公开 No.2012/0071494(其通过引用整体并入本文)中所述的吡唑并吡啶化合物。该类型的非限制性化合物由式(XVa)表示:

[0331]



(XVa)

[0332] 或其可药用盐,

[0333] 其中:

[0334] t 是0、1或2;

[0335] w 是0或1;

[0336] 各 J_c 独立地是 $-CN$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-OR$ 、 $-CH_2OR$ 或 $-CF_3$;

[0337] U 是 Z 或 J_b ;

[0338] Z 是 Y_2-Q_2 ;

[0339] Y_2 不存在或者是任选地且独立地被一个或更多个 J_d 取代的 C_{1-6} 烷基;

[0340] Q_2 不存在或者是具有0至1个杂原子的任选地且独立地被一个或更多个 J_e 取代的 C_{3-8} 环烷基,其中 Y_2 和 Q_2 不同时不存在;

[0341] 各 J_b 独立地是 $-F$ 、 $-OR$ 、 $-CN$ 、 $-CF_3$ 、 $-N(R)_2$ 、 $-C(O)N(R)_2$ 、任选地且独立地被一个或更多个 J_a 取代的 C_{1-6} 烷基;

[0342] 各 J_a 独立地是 $-F$ 、 $-OR$ 、 $-N(R)_2$ 或 $-C(O)N(R)_2$;

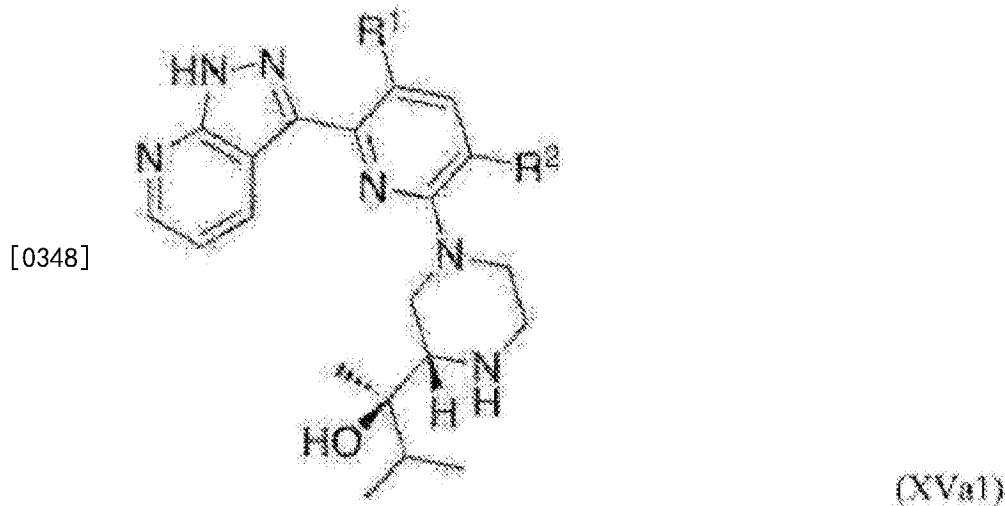
[0343] 各 J_d 独立地是 $-OR$ 、 $-CN$ 、 $-C(O)N(R)_2$ 、 $-N(R)_2$ 或 F ;

[0344] 各 J_e 独立地是-OR、-CF₃、-N(R)₂或F；

[0345] T是-CH₂-、-CH(J_b)-、-C(J_b)₂-、-NH-或-N(J_b)-；并且

[0346] 各R是-H或C₁₋₆烷基。

[0347] 在具体实施方案中，根据式XVa的化合物由式XVa1表示，如Jimenez等(2013, J. Med. Chem. 56 1799-180)所公开的，其通过引用整体并入本文：

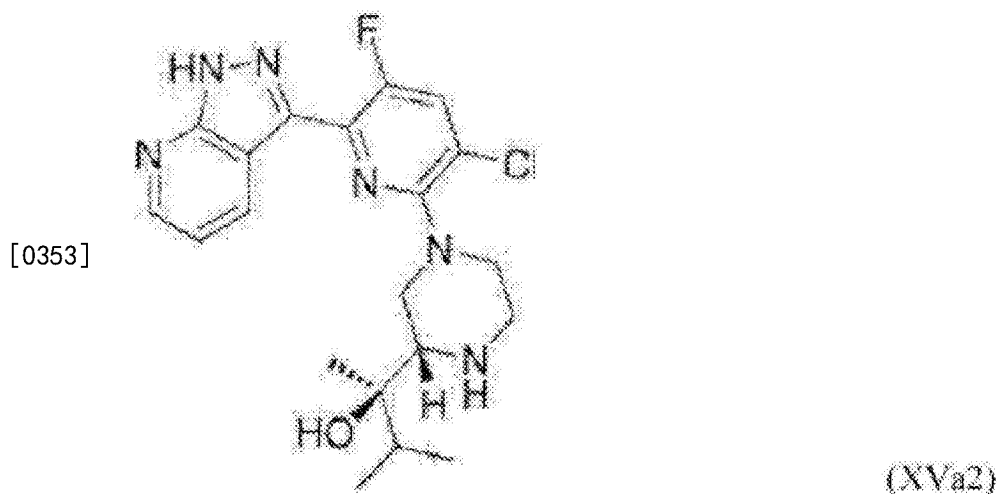


[0349] 其中：

[0350] R¹独立地是F、Cl或CF₃；并且

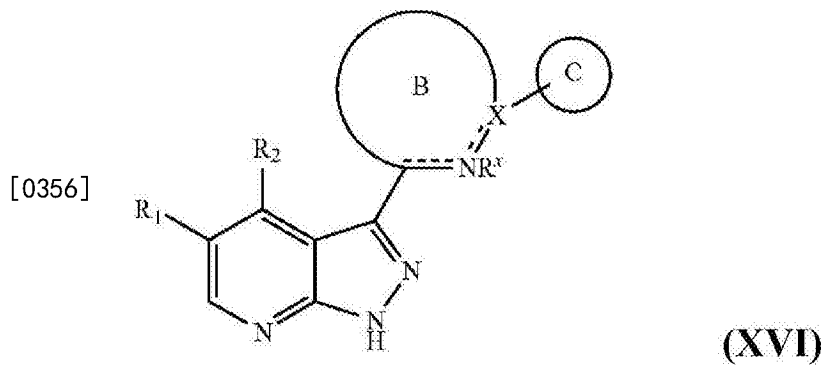
[0351] R²独立地是H、F、Cl、OH、CN或CH₂OH。

[0352] 在具体实施方案中，吡唑并吡啶化合物由式(XVa2)表示：



[0354] 该化合物在Jimenez等(2013, J. Med. Chem. 56 1799-180)中被命名为(R)-2-(S)-4-(3-氯-5-氟-6-(1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-3-基)吡啶-2-基)哌嗪-2-基)-3-甲基丁-2-醇或化合物27(本文中也称为“C27”)。

[0355] 在又一些实施方案中，小分子PKC-θ抑制剂选自如例如Brenchley等在美国公开No. 2012/0184534(其通过引用整体并入本文)中所述的三环吡唑并吡啶化合物。该类型的非限制性化合物由(XVI)式表示：



[0357] 或其可药用盐，

[0358] 其中：

[0359] R_1 是-H、卤素、 $-OR'$ 、 $-N(R')$ ₂、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)N(R')$ ₂、 $-NR' C(O)R'$ 、 $-NR' C(O)OR'$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、任选地且独立地被一个或多个 J_a 取代的 C_{1-10} 脂肪族基团或者任选地且独立地被一个或多个 J_b 取代的 C_{3-8} 脂环族基团(cycloaliphatic)。

[0360] R_2 是-H、卤素、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-OR'$ 、 $-N(R')$ ₂、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)N(R')$ ₂、 $-NR' C(O)R'$ 、 $-NR' C(O)OR'$ 、任选地且独立地被一个或多个 J_a 取代的 C_{1-10} 脂肪族基团或者任选地且独立地被一个或多个 J_b 取代的 C_{3-8} 脂环族基团。

[0361] X 是-C-或-N-。

[0362] R^x 不存在或是-H。

[0363] 环B是任选地与芳香族或非芳香族环稠合的5元单环杂芳环；并且环B任选地被一个Y取代并且独立地进一步任选地且独立地被一个或多个 J_c 取代。

[0364] Y 是-Y1-Q1。

[0365] Y_1 不存在或者是 C_{1-10} 脂肪族基团，其中 Y_1 中的多至三个亚甲基单元任选地且独立地被替代为 G' ，其中 G' 是-O-、 $-C(O)-$ 、 $-N(R')$ -或 $-S(O)_p-$ ；并且 Y_1 任选地且独立地被一个或多个 J_d 取代。

[0366] Q_1 不存在，或者是具有0至3个独立地选自氮、氧和硫之杂原子的饱和、部分不饱和或完全不饱和的 C_{3-8} 元单环的环；并且 Q_1 任选地且独立地被一个或多个 J_b 取代；其中 Y_1 和 Q_1 不同时不存在。

[0367] 环C是具有0至3个独立地选自氮、氧和硫之杂原子的饱和、部分不饱和或完全不饱和的 C_{3-8} 元单环的环，或者具有0至5个独立地选自氮、氧和硫之杂原子的饱和、部分不饱和或完全不饱和的8至12元二环环系统；并且环C任选地被一个Z取代并且独立地进一步任选地且独立地被一个或多个 J_b 取代。

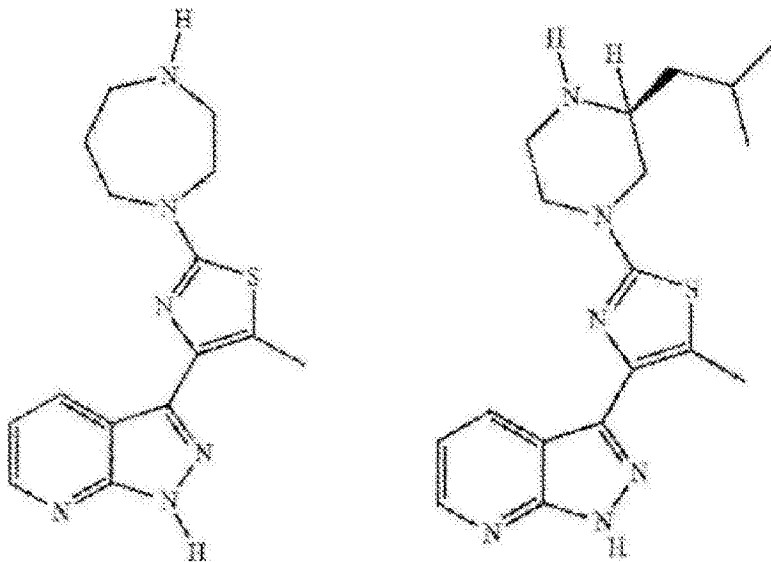
[0368] Z 是-Y2-Q2。

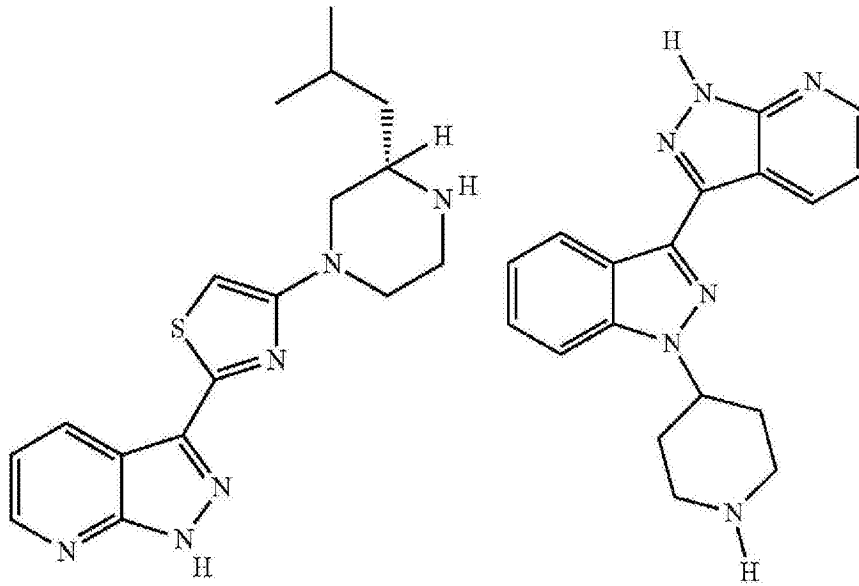
[0369] Y_2 不存在或者是 C_{1-10} 脂肪族基团，其中 Y_2 中的多至三个亚甲基单元任选地且独立地被替代为 G' ，其中 G' 是-O-、 $-C(O)-$ 、 $-N(R')$ -或 $-S(O)_p-$ ；并且 Y_2 任选地且独立地被一个或多个 J_d 取代。

[0370] Q_2 不存在，是具有0至3个独立地选自氮、氧和硫之杂原子的饱和、部分不饱和或完全不饱和的 C_{3-8} 元单环的环，或者具有0至5个独立地选自氮、氧和硫之杂原子的饱和、部分不饱和或完全不饱和的8至12元二环环系统；并且 Q_2 任选地且独立地被一个或多个 J_e 取代；其中 Y_2 和 Q_2 不同时不存在。

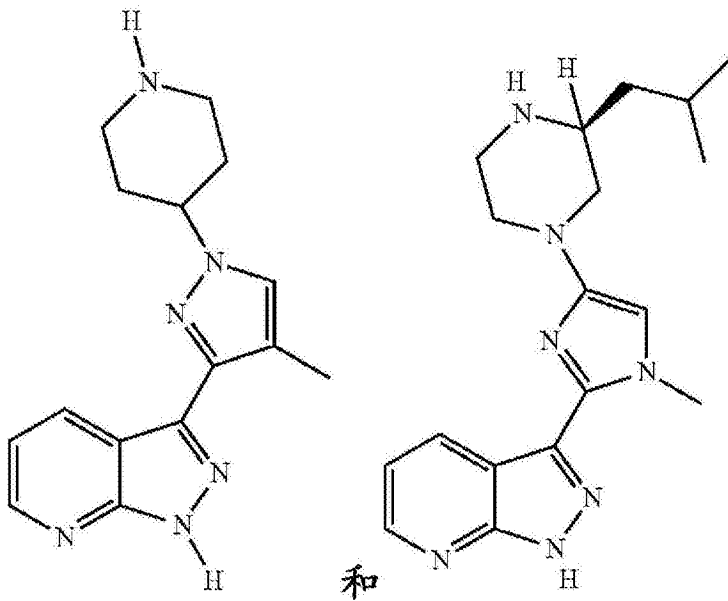
- [0371] 各R'独立地是-H或者任选地且独立地被一个或多个J_a取代的C₁₋₆烷基。
- [0372] 各J_a独立地是卤素、-OR、-N(R)₂、-C(O)OR、-C(O)N(R)₂、-NRC(O)R、-NRC(O)OR、-CN、-NO₂或氧代。
- [0373] 各J_b独立地是卤素、-OR、-N(R)₂、-C(O)OR、-C(O)N(R)₂、-NRC(O)R、-NRC(O)OR、-CN、-NO₂、氧代或任选地且独立地被J_a取代的C₁₋₆烷基。
- [0374] 各J_c独立地是卤素、-OR'、-N(R')₂、-C(O)OR'、-C(O)N(R')₂、-NR'C(O)R'、-NR'C(O)OR'、-CN、-NO₂或者任选地且独立地被一个或多个J_a取代的C₁₋₁₀脂肪族基团或者任选地且独立地被一个或多个J_b取代的C₃₋₈脂环族基团。
- [0375] 各J_d独立地是卤素、-CN或-NO₂。各J_e独立地是卤素、-CN、-NO₂、氧代、C₁₋₁₀脂肪族基团,其中至多三个亚甲基单元任选地且独立地被替代为G',其中G'是-O-、-C(O)-、-N(R')-或-S(O)_p-,并且所述脂肪族基团任选地且独立地被一个或多个J_d取代,或者J_e是任选地且独立地被一个或多个J_b取代的C₃₋₈脂环族基团。
- [0376] 各R独立地是-H或C₁₋₆烷基。
- [0377] 各p独立地是0、1或2。
- [0378] 根据式(XVI)的化合物的代表性实例包括:

[0379]

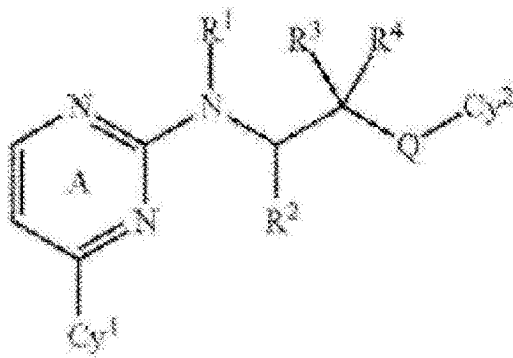




[0380]



[0381] 小分子PKC-θ抑制剂的又一些实施方案包括例如Fleming等在美国公开No.2011/0071134(其通过引用整体并入本文)中所述的2-(氨基取代的)-4-芳基嘧啶化合物。该类型的代表性化合物由式(XVII)表示:



[0382]

(XVII)

[0383] 或其可药用盐,

[0384] 其中：

[0385] R^1 和 R^2 各自独立地是H、 C_{1-3} 烷基或 C_{3-5} 环烷基；

[0386] R^3 是H或F；

[0387] R^4 是H、F、 $-OR^a$ 、 $-C(O)R^a$ 、 $-C(O)OR^a$ 或 $-N(R^a)_2$ ，或者 R^3 和 R^4 与其所连接的碳原子一起形成羰基；其中 R^a 在每次出现时独立地是H、 C_{1-3} 烷基或 C_{3-5} 环烷基；

[0388] 环A任选地被1或2个独立出现的 R^5 取代，其中各 R^5 独立地选自卤代， C_{1-4} 脂肪族基团， $-CN$ ， $-OR^b$ ， $-SR^c$ ， $-N(R^b)_2$ ， $-NR^bC(O)R^b$ ， $-NR^bC(O)N(R^b)_2$ ， $-NR^bCO_2R^c$ ， $-CO_2R^b$ ， $-C(O)R^b$ ， $-C(O)N(R^b)_2$ ， $-OC(O)N(R^b)_2$ ， $-S(O)_2R^c$ ， $-SO_2N(R^b)_2$ ， $-S(O)R^c$ ， $-NR^bSO_2N(R^b)_2$ ， $-NR^bSO_2R^c$ ，或者任选地被卤代、 $-CN$ 、 $-OR^b$ 、 $-SR^c$ 、 $-N(R^b)_2$ 、 $NR^bC(O)R^b$ 、 $-NR^bC(O)N(R^b)_2$ 、 $-NR^bCO_2R^c$ 、 $-CO_2R^b$ 、 $-C(O)R^b$ 、 $-C(O)N(R^b)_2$ 、 $-OC(O)N(R^b)_2$ 、 $-S(O)_2R^c$ 、 $-SO_2N(R^b)_2$ 、 $-S(O)R^c$ 、 $-NR^bSO_2N(R^b)_2$ 或 $-NR^bSO_2R^c$ 取代的 C_{1-4} 脂肪族基团，其中 R^b 在每次出现时独立地是H或 C_{1-4} 脂肪族基团，或者同一氮原子上的两个 R^b 与该氮原子一起形成除该氮原子之外还具有0至2个选自N、O或S之环杂原子的5至8元芳香族或非芳香族环；并且 R^c 在每次出现时独立地是 C_{1-4} 脂肪族基团；

[0389] Cy^1 选自：a)在环的间位或对位被出现一次的W取代的6元芳基或杂芳环，或者b)被出现一次的W取代的5元杂芳基环；

[0390] 其中 Cy^1 任选地被1至3个独立出现的 R^6 取代，其中 R^6 在每次出现时独立地选自卤代， C_{1-8} 脂肪族基团， $-CN$ ， $-OR^b$ ， $-SR^d$ ， $-N(R^E)_2$ ， $-NR^EC(O)R^b$ ， $-NR^EC(O)N(R^E)_2$ ， $-NR^ECO_2R^d$ ， $-CO_2R^b$ ， $-C(O)R^b$ ， $-C(O)N(R^E)_2$ ， $-OC(O)N(R^E)_2$ ， $-S(O)_2R^d$ ， $-SO_2N(R^E)_2$ ， $-S(O)R^d$ ， $-NR^ESO_2N(R^E)_2$ ， $-NR^ESO_2R^d$ ， $-C(=NH)-N(R^E)_2$ ，或者任选地被卤代、 $-CN$ 、 $-OR^b$ 、 $-SR^d$ 、 $-N(R^E)_2$ 、 $-NR^EC(O)R^b$ 、 $-NR^EC(O)N(R^E)_2$ 、 $-NR^ECO_2R^d$ 、 $-CO_2R^b$ 、 $-C(O)R^b$ 、 $-C(O)N(R^E)_2$ 、 $-OC(O)N(R^E)_2$ 、 $-S(O)_2R^d$ 、 $-SO_2N(R^E)_2$ 、 $-S(O)R^d$ 、 $-NR^ESO_2N(R^E)_2$ 、 $-NR^ESO_2R^d$ 或 $-C(=NH)-N(R^E)_2$ 取代的 C_{1-8} 脂肪族基团，其中 R^d 在每次出现时是 C_{1-6} 脂肪族基团，并且 R^E 在每次出现时独立地是H、 C_{1-6} 脂肪族基团、 $-C(=O)R^b$ 、 $-C(O)OR^b$ 或 $-SO_2R^b$ ，或者同一氮原子上的两个 R^E 与该氮原子一起形成除该氮原子之外还具有0至2个选自N、O或S之环杂原子的5至8元芳香族或非芳香族环；

[0391] W是 $-R^8$ 、 $V-R^8$ 、 L_1-R^7 、 $V-L_1-R^7$ 、 L_1-V-R^8 或 $L_1-V-L_2-R^7$ ；其中 L_1 和 L_2 各自独立地是任选经取代的 C_{1-6} 亚烷基链；V是 $-CH_2-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-C(O)-$ 、 $-CO_2-$ 、 $-NR^E-NR^EC(O)-$ 、 $-NR^ECO_2-$ 、 $-NR^ESO_2-$ 、 $-C(O)N(R^b)-$ 、 $-SO_2N(R^b)-$ 、 $-NR^EC(O)N(R^b)-$ 或 $-OC(O)-$ ； R^7 是H，卤代， $-OH$ ， $-N(R^F)_2$ ， $-CN$ ， $-OR^G$ ， $-C(O)R^G$ ， $-CO_2H$ ， $-CO_2R^G$ ， $-SR^G$ ， $-S(O)R^G$ ， $-S(O)_2R^G$ ， $-N(R^E)C(O)R^G$ ， $-N(R^E)CO_2R^G$ ， $-N(R^E)SO_2R^G$ ， $-C(O)N(R^F)_2$ ， $-SO_2N(R^F)_2$ ， $-N(R^E)C(O)N(R^F)_2$ ， $-OC(O)R^F$ ，或者选自 C_{1-10} 脂肪族基团、 C_{6-10} 芳基、3至14元杂环基或5至14元杂芳基的任选经取代的基团，其中 R^F 在每次出现时独立地是H、 C_{1-6} 脂肪族基团、 C_{6-10} 芳基、3至14元杂环基、5至14元杂芳基、 $-C(=O)R^b$ 、 $-C(O)OR^b$ 或 $-SO_2R^b$ ，或者同一氮原子上的两个 R^F 与该氮原子一起形成除该氮原子之外还具有0至2个选自N、O或S之环杂原子的任选地经取代的5至8元芳香族或非芳香族环；并且 R^G 在每次出现时是 C_{1-6} 脂肪族基团、 C_{6-10} 芳基、3至14元杂环基或5至14元杂芳基； R^8 是选自 C_{1-10} 脂肪族基团、 C_{6-10} 芳基、3至14元杂环基或5至14元杂芳基的任选经取代的基团；

[0392] Q是键、 CH_2 或 $C(=O)$ ；

[0393] Cy^2 是 C_{6-10} 芳基、5至10元杂芳基或5至10元杂环基环，其中每个环任选地被1至3个独立出现的 R^9 和出现一次的 R^{10} 取代，

[0394] 其中 R^9 的每一次出现独立地选自 C_{1-4} 脂肪族基团， $-N(R^b)_2$ ，卤代， NO_2 ， $-CN$ ， $-OR^b$ ， $-C$

(O)R^a, -CO₂R^a, -SR^c, -S(O)R^c, -S(O)₂R^c, -OS(O)₂R^c, -N(R^b)C(O)R^a, -N(R^b)CO₂R^a, -N(R^b)SO₂R^a, -C(O)N(R^b)₂, -SO₂N(R^b)₂, -N(R^b)C(O)N(R^b)₂, -OC(O)R^a, 或者任选地被 -N(R^b)₂、卤素、NO₂、-CN、-OR^b、-C(O)R^a、-CO₂R^a、-SR^c、-S(O)R^c、-OS(O)₂R^c、-S(O)₂R^c、-N(R^b)C(O)R^a、-N(R^b)CO₂R^a、-N(R^b)SO₂R^a、-C(O)N(R^b)₂、-SO₂N(R^b)₂、-N(R^b)C(O)N(R^b)或-OC(O)R^a取代的₁₋₄脂肪族基团,并且

[0395] R¹⁰选自苯基,或者5至6元杂环基或杂芳环。

[0396] 在某些实施方案中,式XVII的化合物具有一个或更多个或所有的以下限制:

[0397] 1)当Cy¹是在间位被W取代的苯基时,则:

[0398] a)当W是-OMe, R¹、R²、R³和R⁴各自是氢并且Q是键时,则当环A进一步被R⁵取代时, R⁵是除-CF₃或-C(O)N(R^b)₂之外的基团;并且

[0399] b)当W是-OMe, R¹、R²、R³和R⁴各自是氢并且Q是-CH₂-时, Cy²不是1H-苯并咪唑-1-基;

[0400] 2)当Cy¹是在对位被W取代的苯基并且R¹、R²、R³和R⁴各自是氢时,则:

[0401] a)当Q是键时,则W不是:i)-CONH₂; ii)-CONHR⁸,其中R⁸是选自苯基、-烷基苯基、烷基基或-烷基杂环的任选经取代的基团; iii)-CF₃; iv)-SO₂Me; v)-NH₂; vi)-tBu; vii)-CO₂H,当Cy²是吗啉时; viii)-O(苯基),当Cy²是咪唑时;和ix)-OMe;

[0402] b)当Q是-CH₂-时,则W不是:i)-CONH₂,当Cy²是任选经取代的咪唑或苯并咪唑时; ii)-CONHR⁸,其中R⁸是选自苯基、-烷基苯基或-烷基杂环的任选经取代的基团; iii)-CF₃; iv)-SO₂Me; v)-OH,其中Cy²是5至10元杂环基环; vi)tBu,当Cy²是5至10元杂环基环时;和vii)-OMe;以及3)当Cy¹是5元杂芳基环时,则:

[0403] a)当Cy¹是异噁唑, R¹、R²、R³和R⁴各自是氢, Q是键并且W是对氟苯基时,则Cy²是除吡啶基或N-吡咯烷基之外的基团;

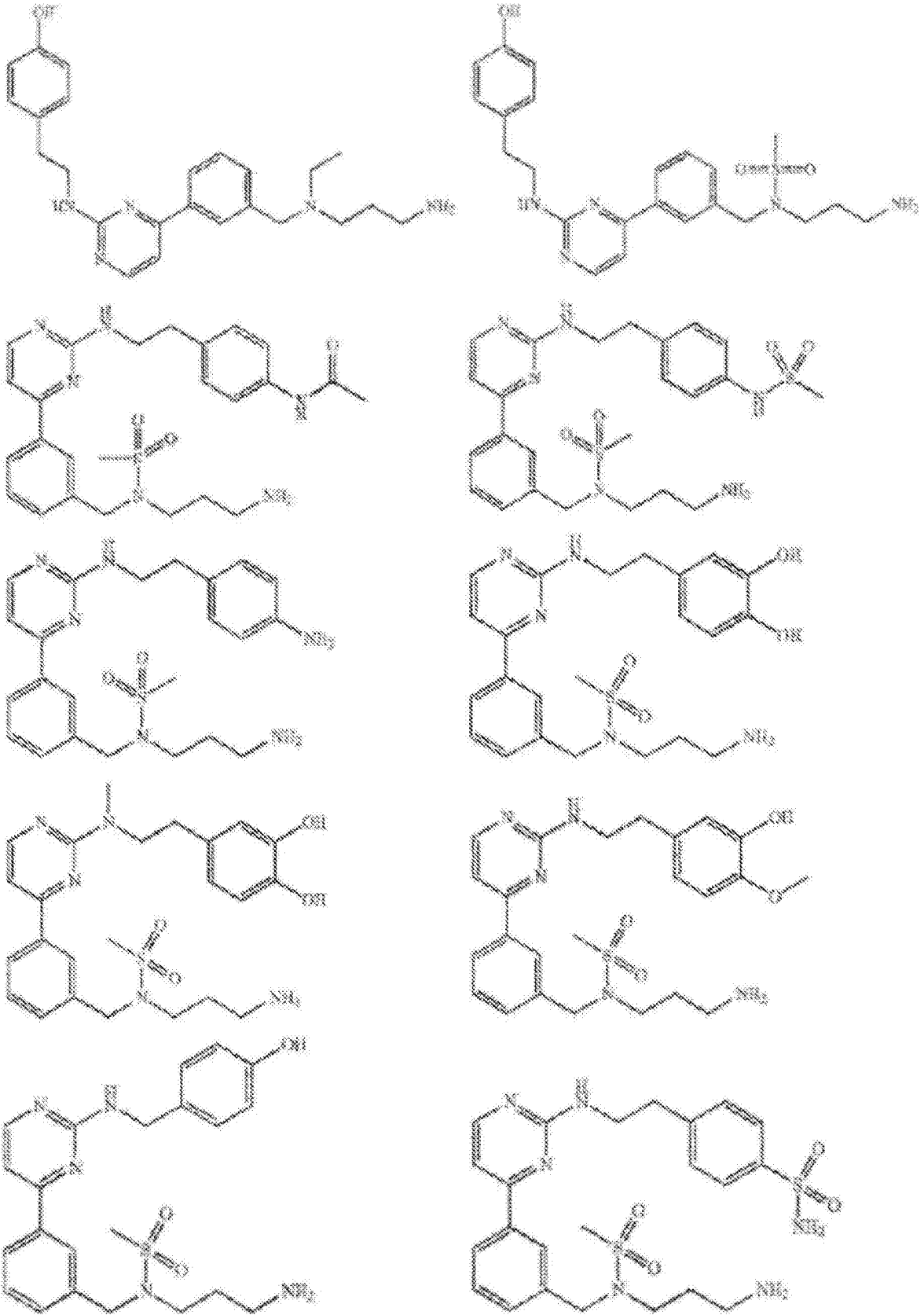
[0404] b)当Cy¹是三唑基, R¹、R²、R³和R⁴各自是氢, Q是键并且W是-(CH₂)₂N(环戊基)C(O)CH₂(萘基)时,则Cy²是除N-哌啶基之外的基团;

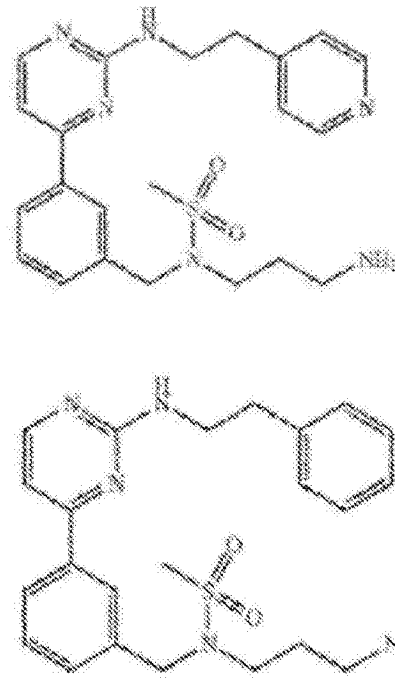
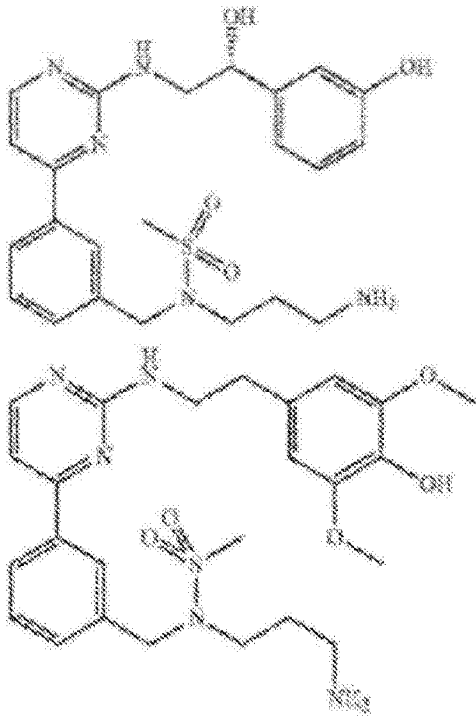
[0405] c)当Cy¹是咪唑基, R¹、R²、R³和R⁴各自是氢、Q是键并且W是间-CF₃-苯基,则R⁶是除C(O)OCH₂CH₃之外的基团;并且

[0406] d)当Cy¹是咪唑-5-基和W是对氟苯基时,则R⁶是除环己基之外的基团。

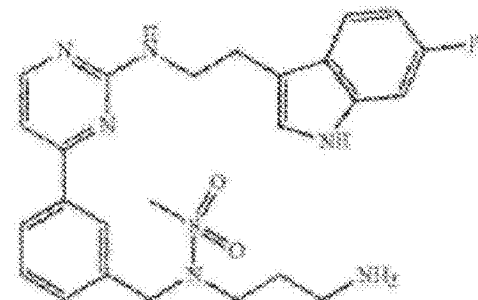
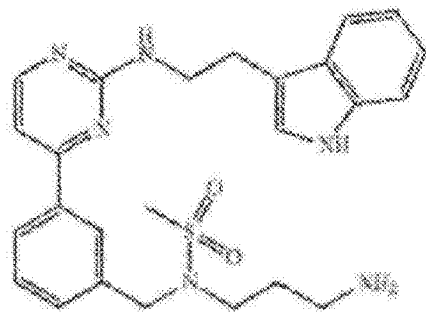
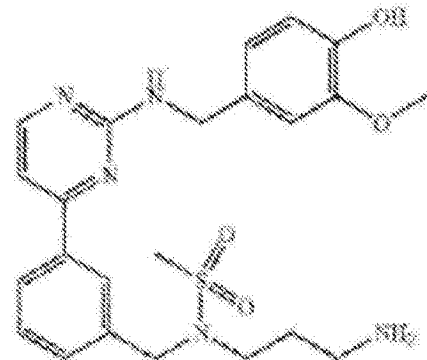
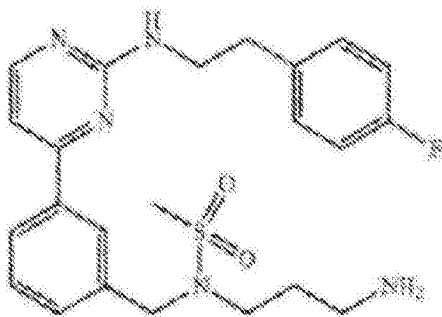
[0407] 该类型的非限制性化合物由以下结构表示:

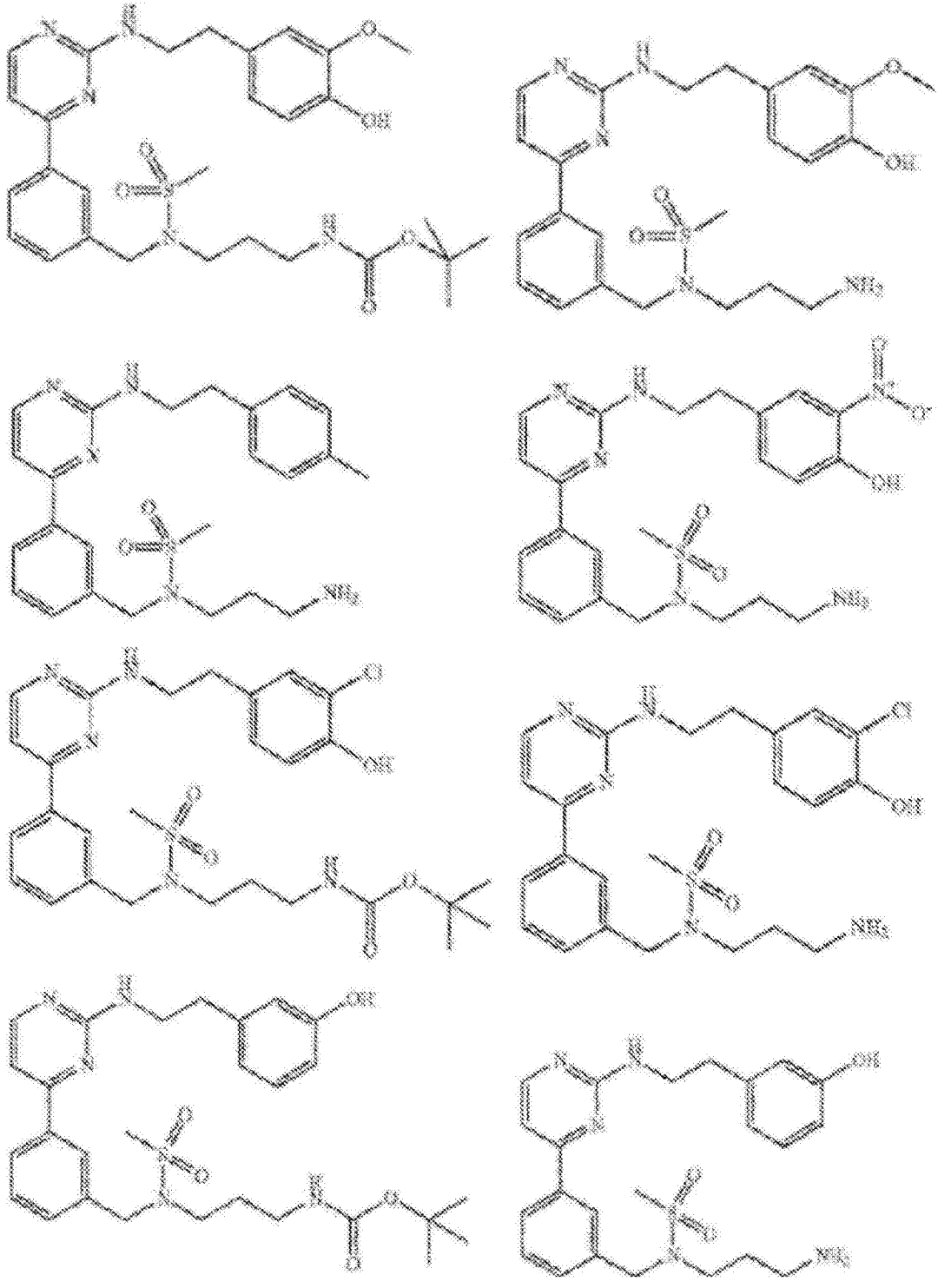
[0408]





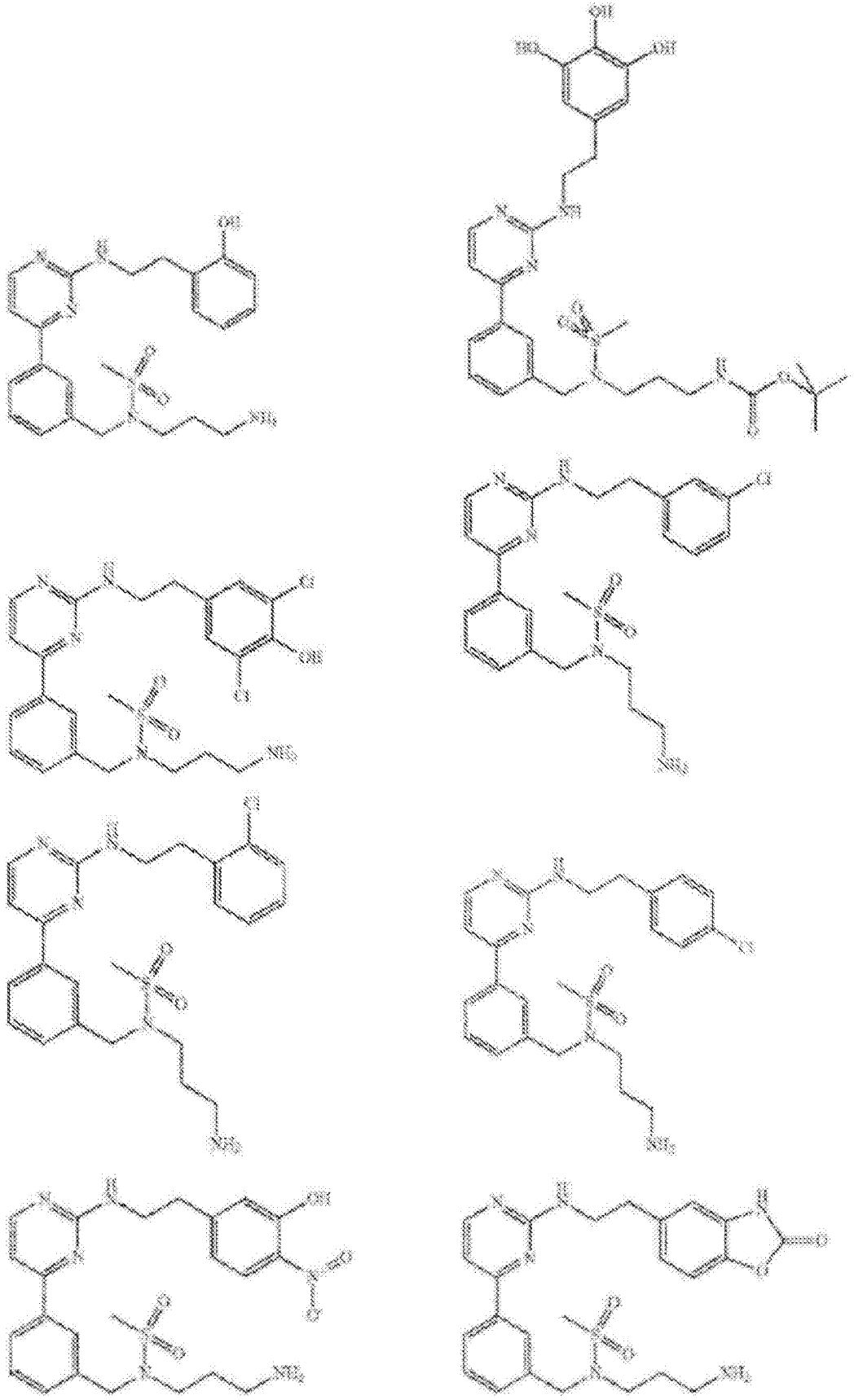
[0409]

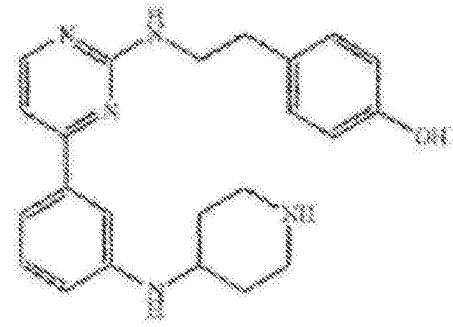
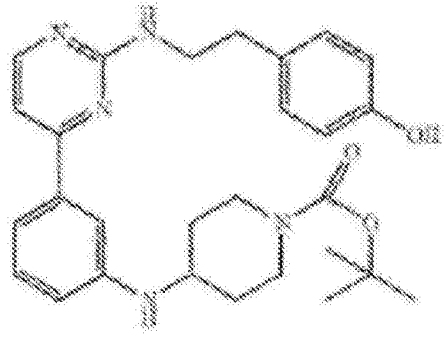
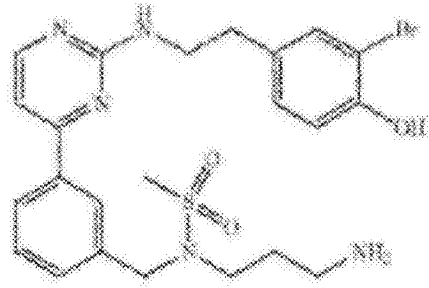
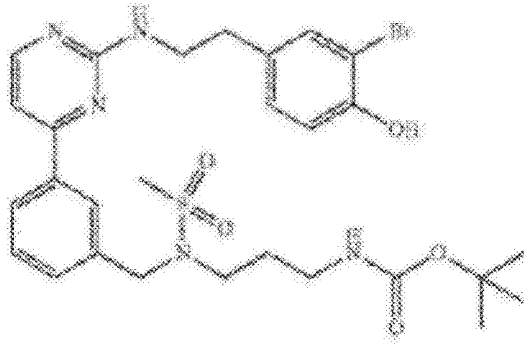




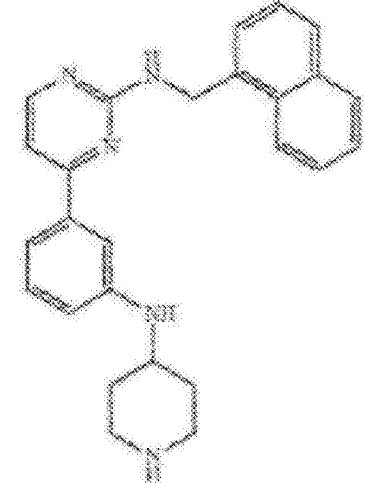
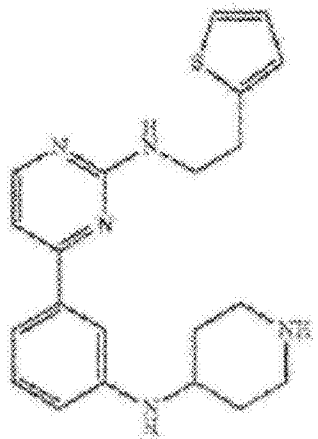
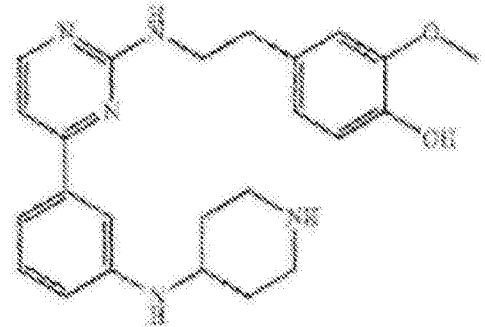
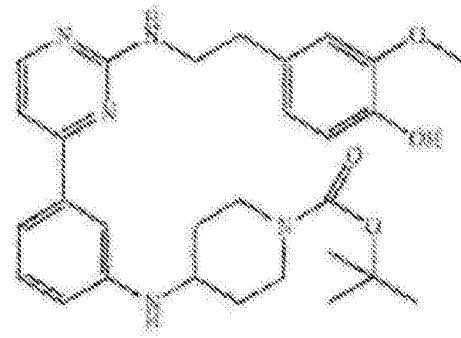
[0410]

[0411]

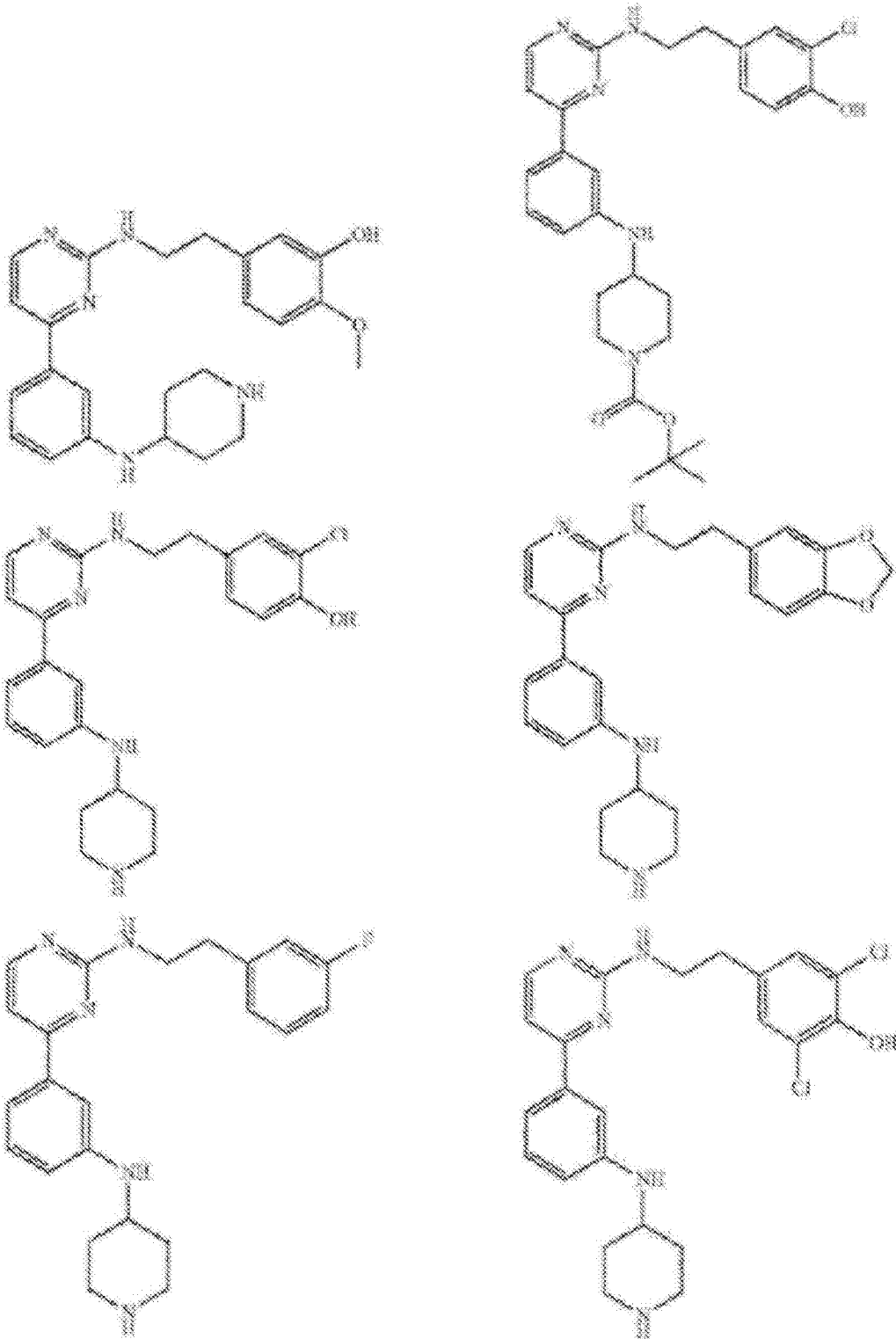


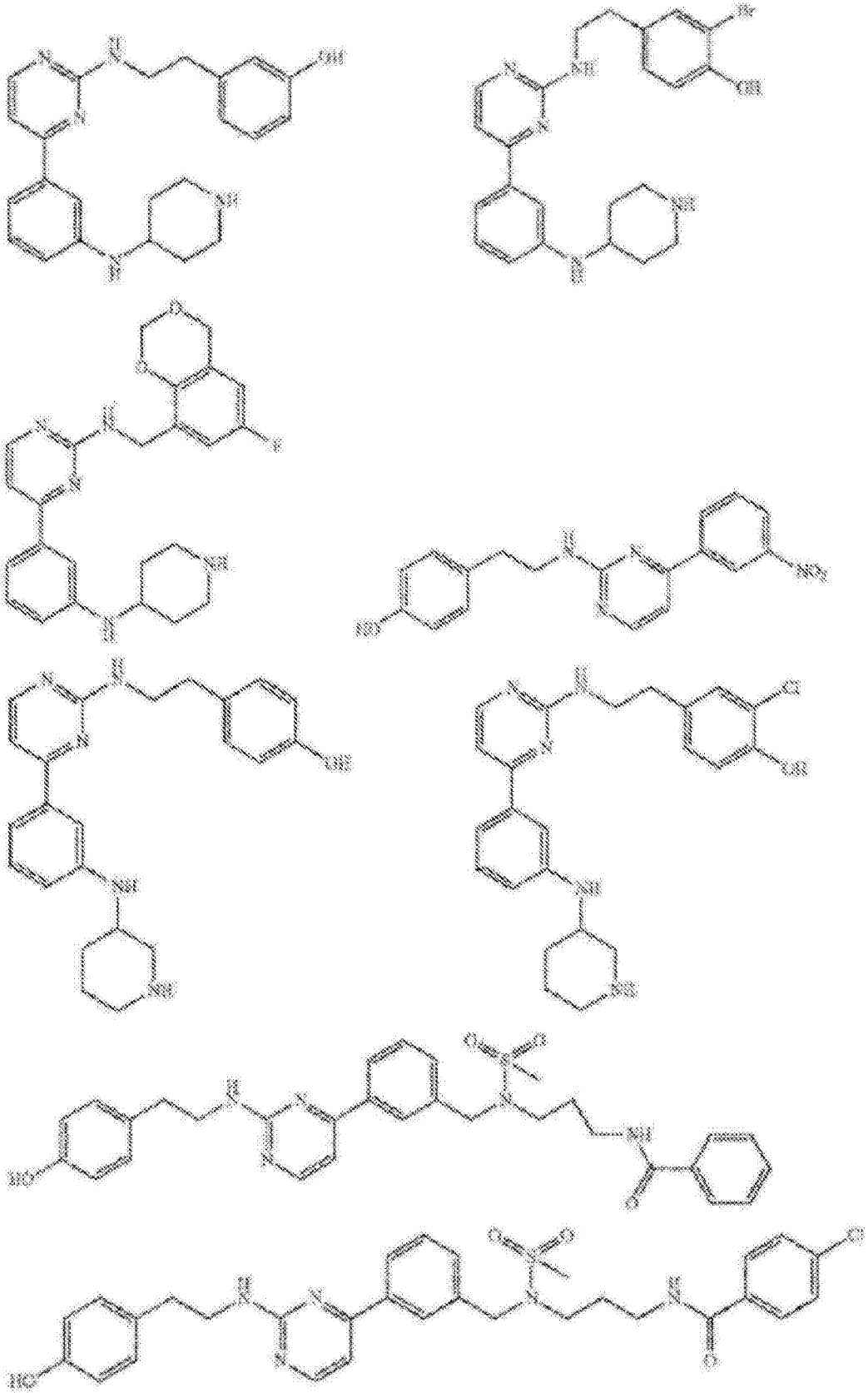


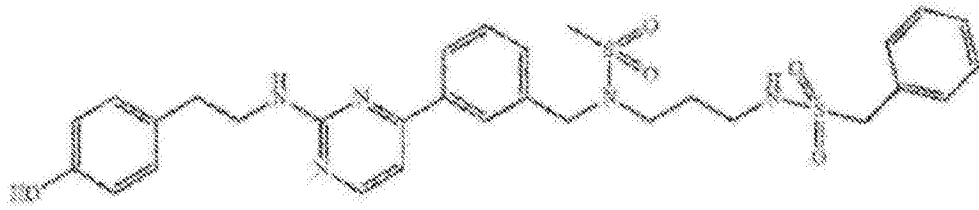
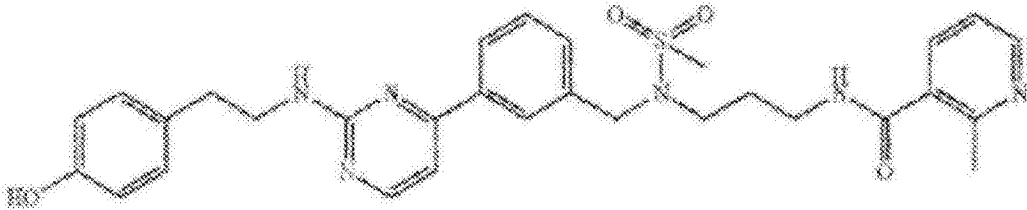
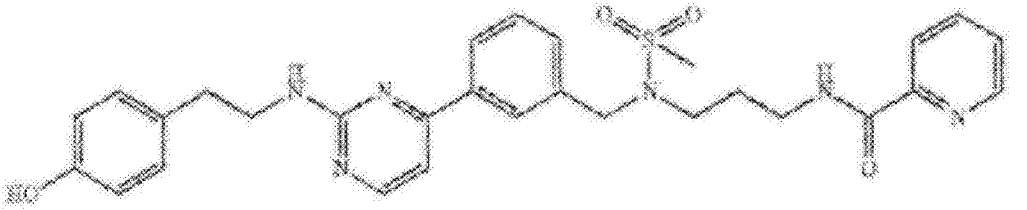
[0412]



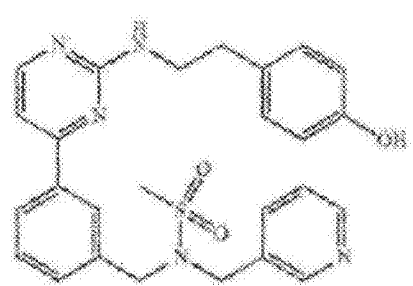
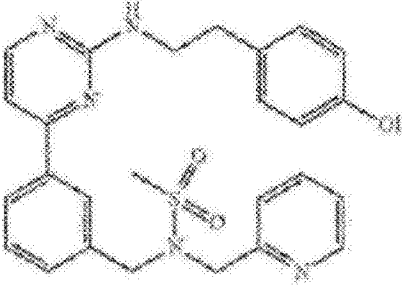
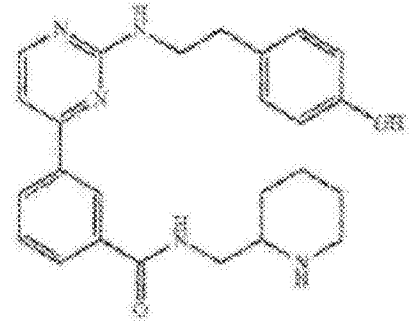
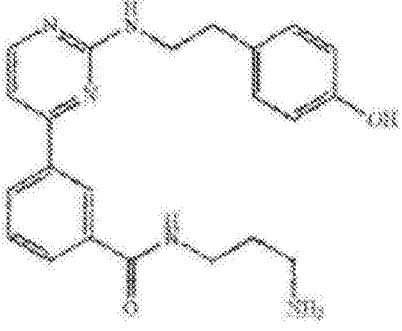
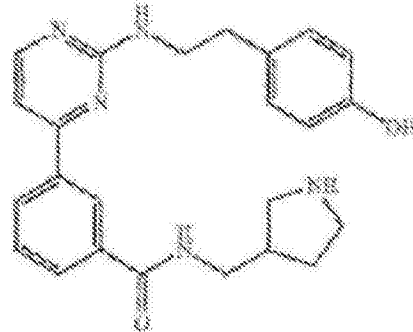
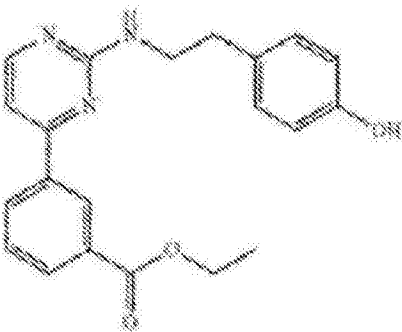
[0413]

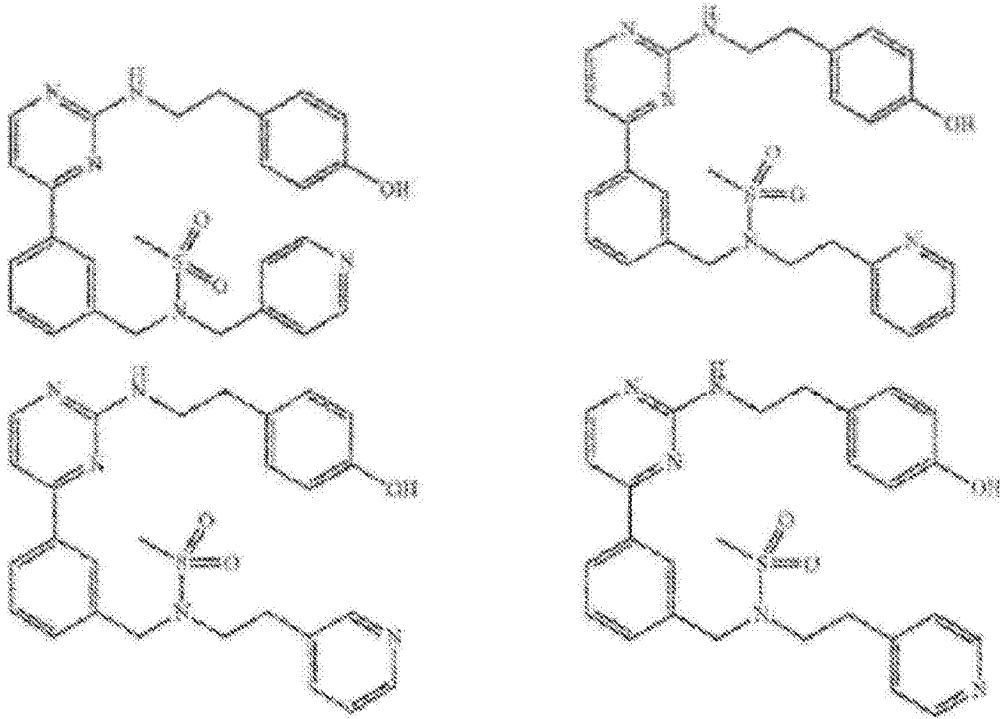




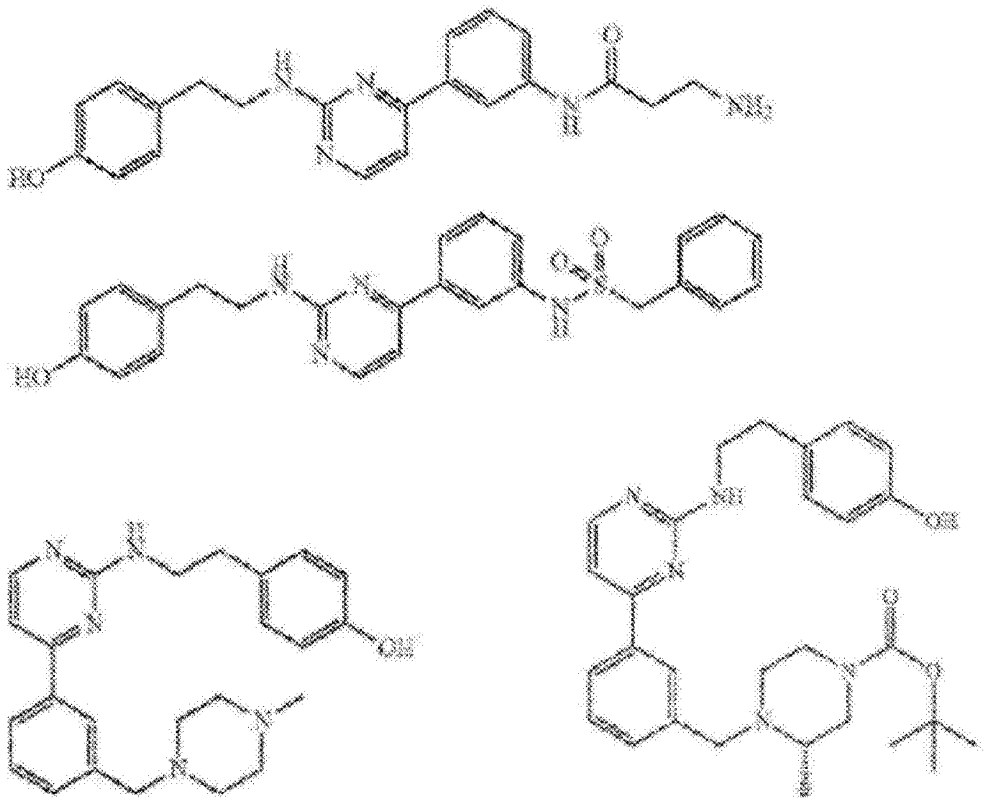


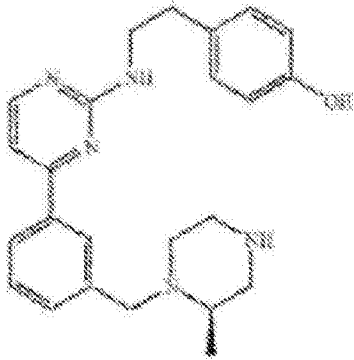
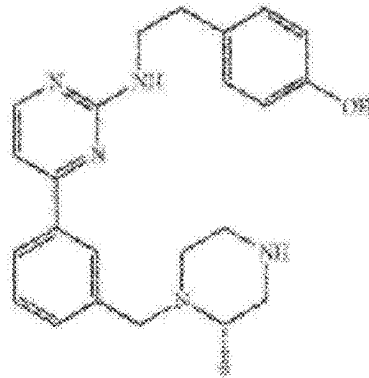
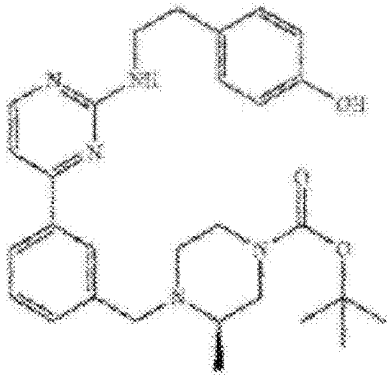
[0415]



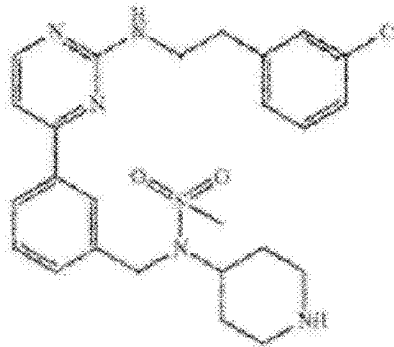
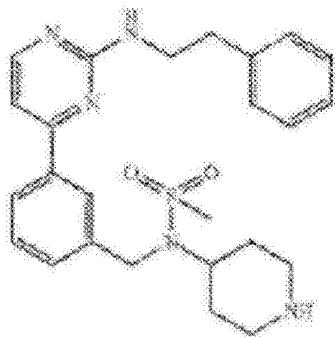
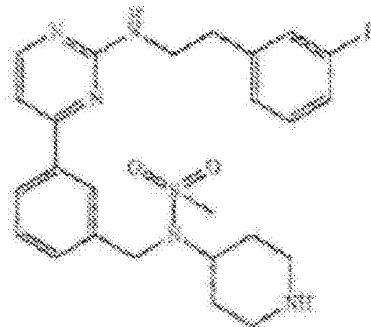
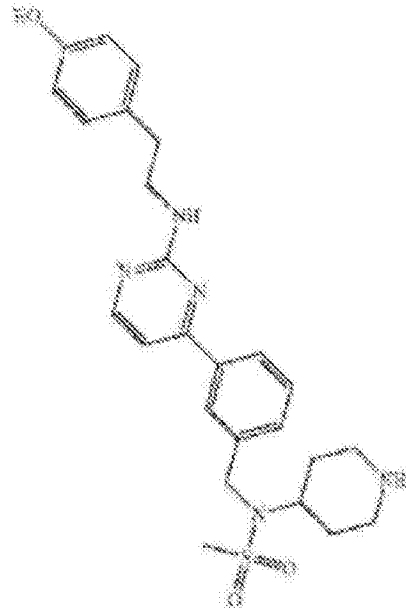


[0416]

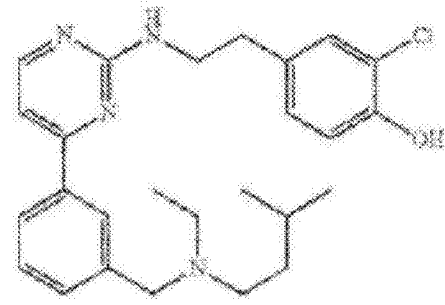
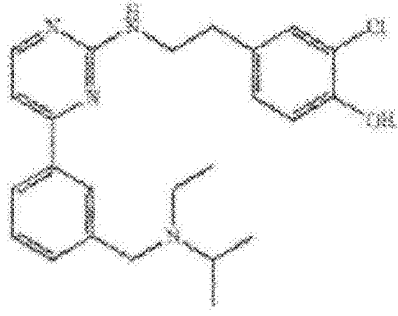
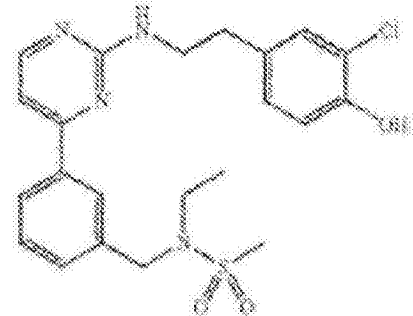
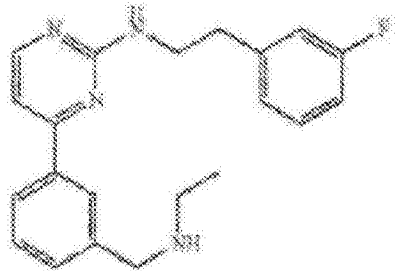
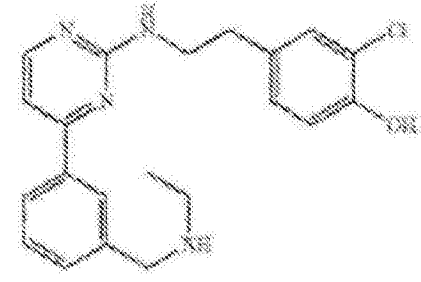
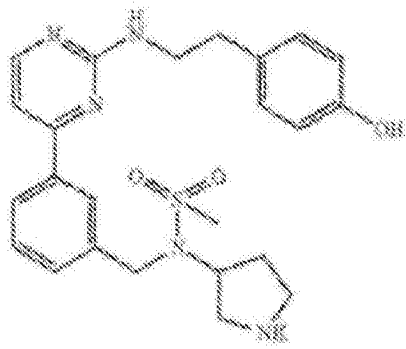
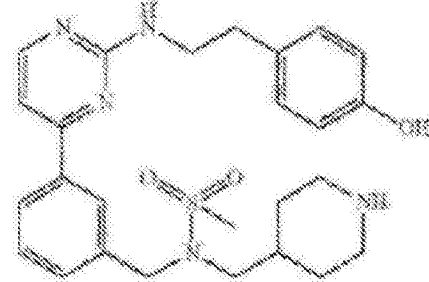
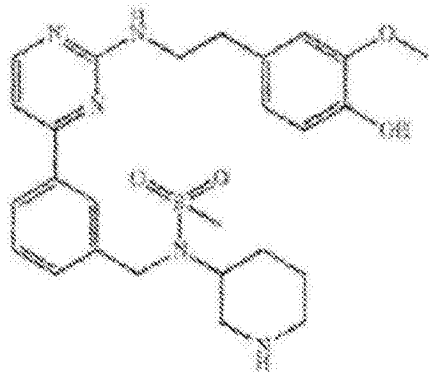
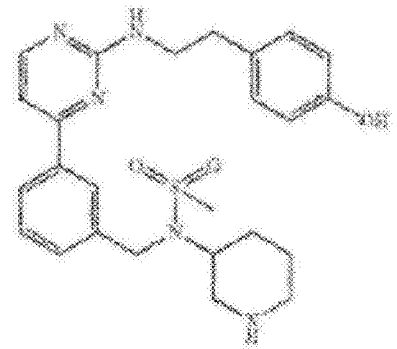
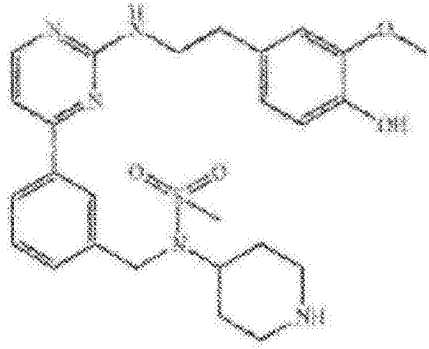


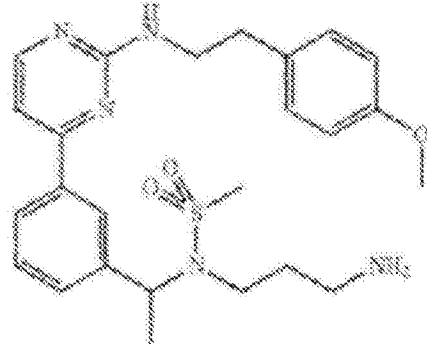
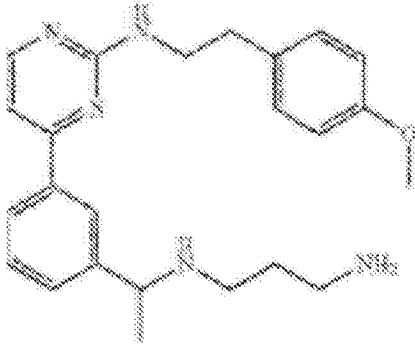
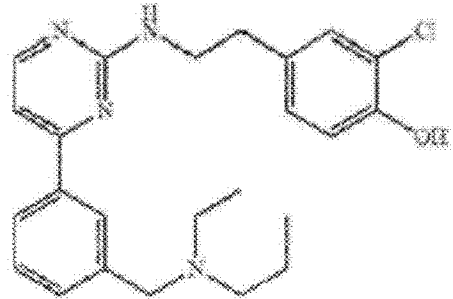
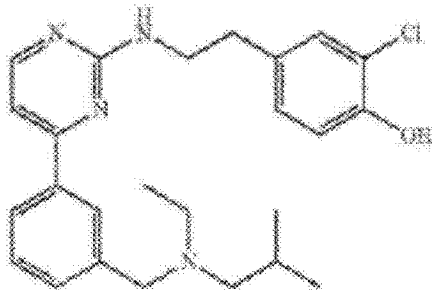


[0417]

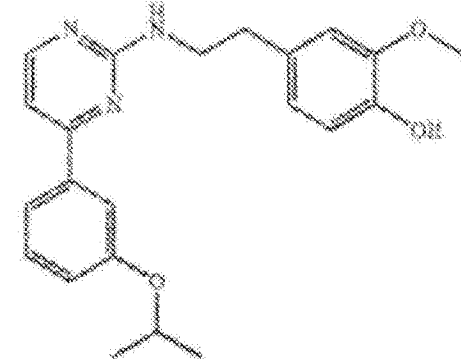
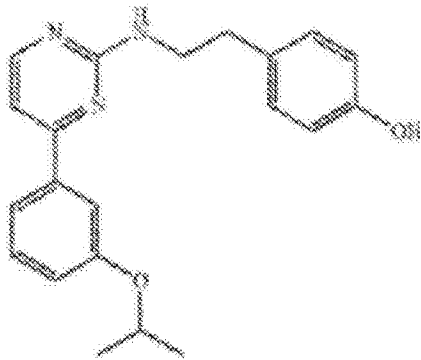
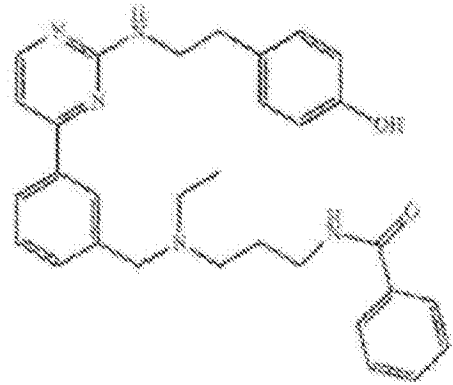
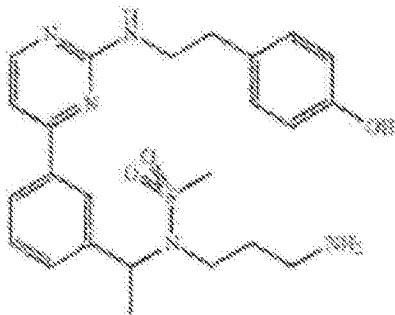


[0418]

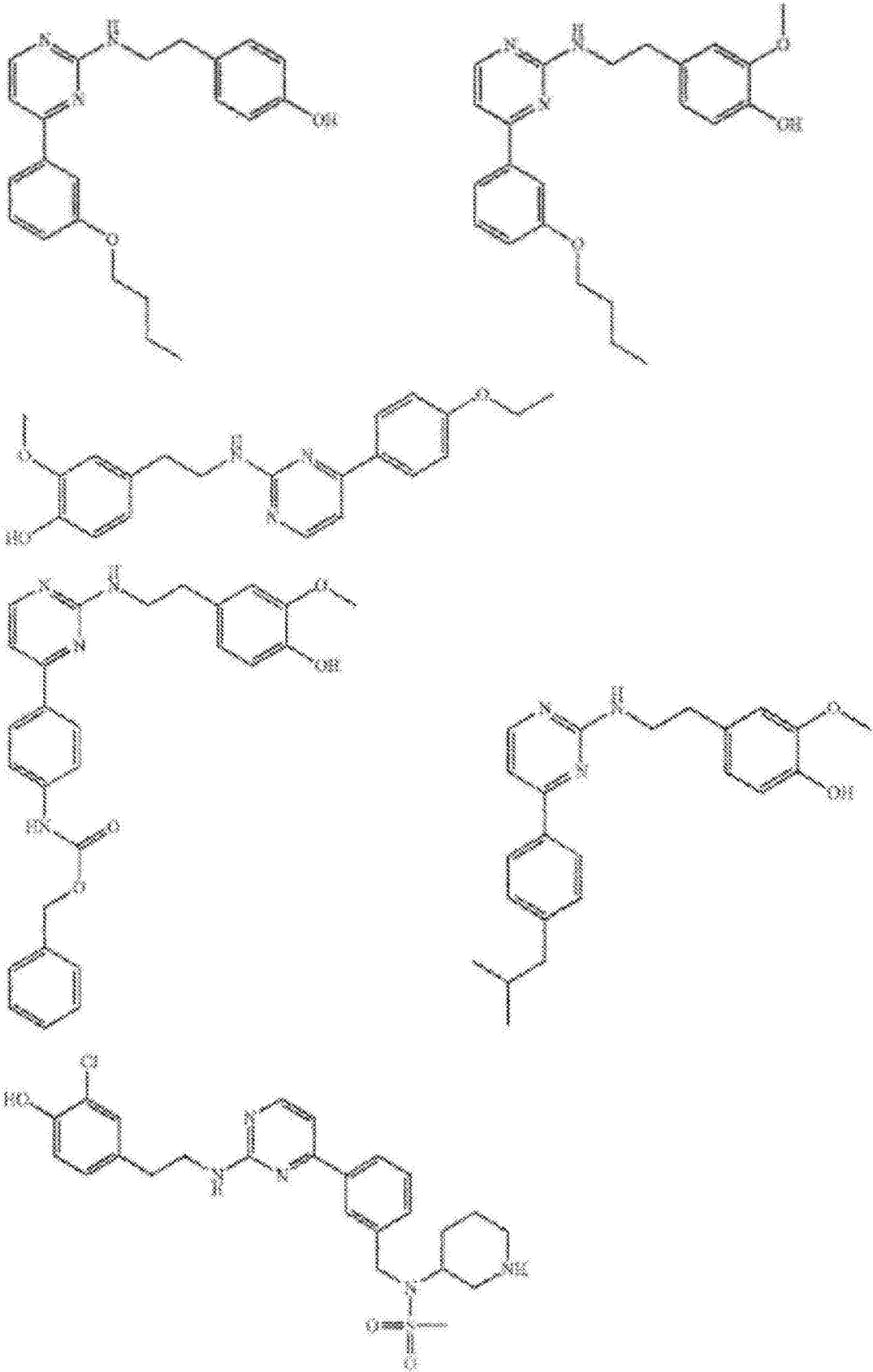




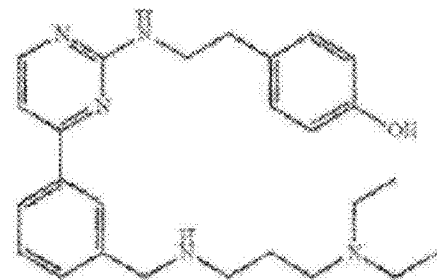
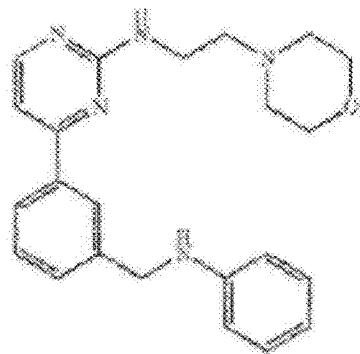
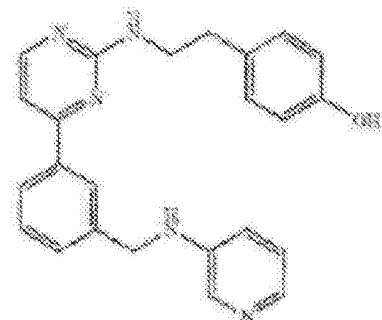
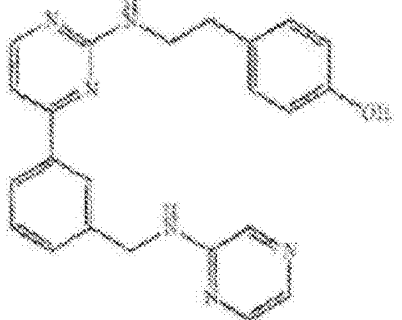
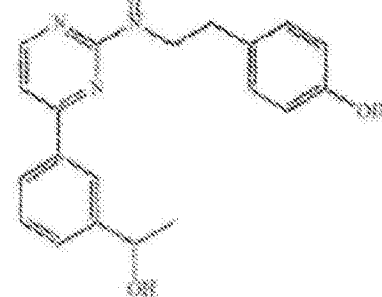
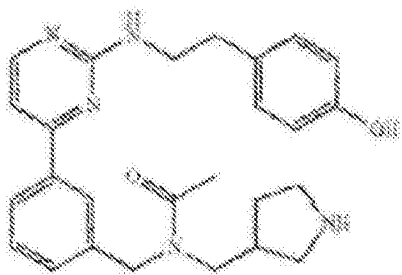
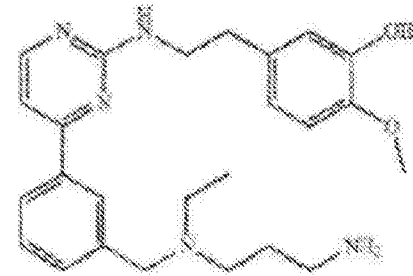
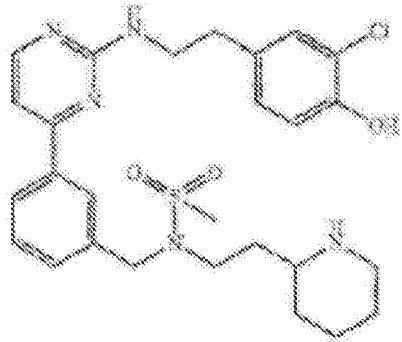
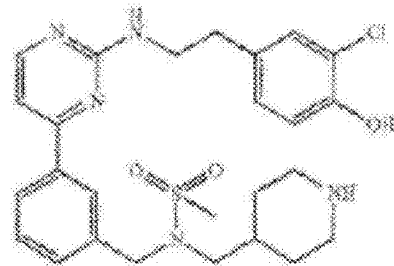
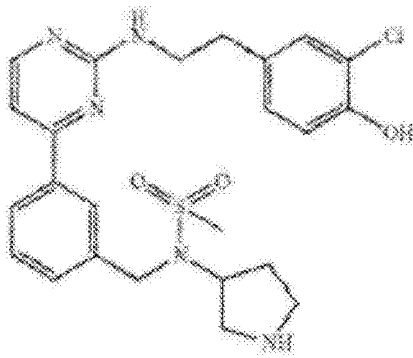
[0419]

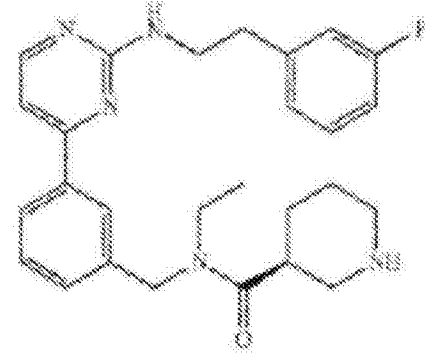
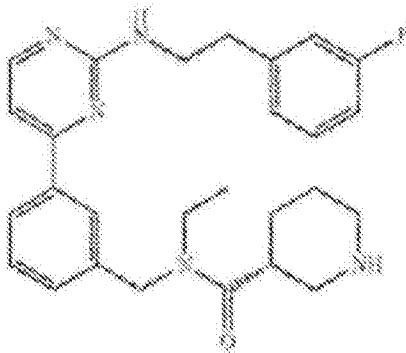
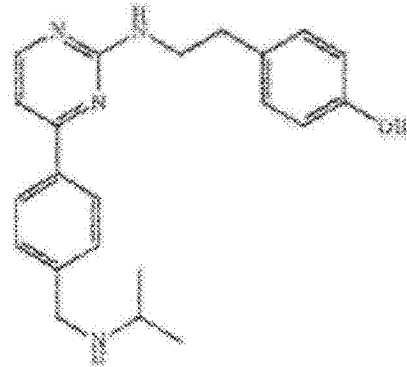
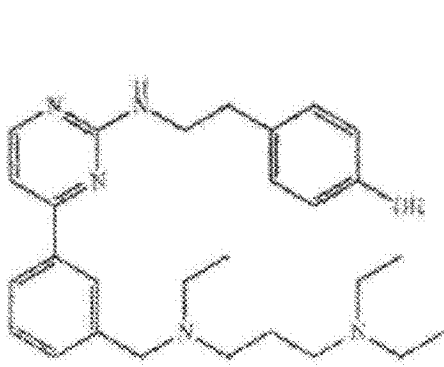


[0420]

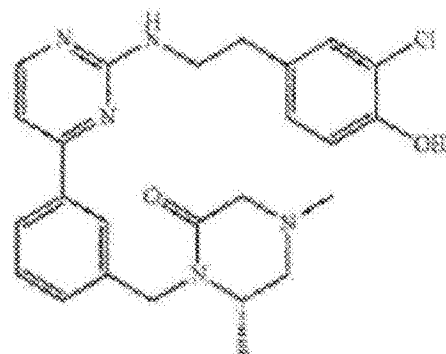
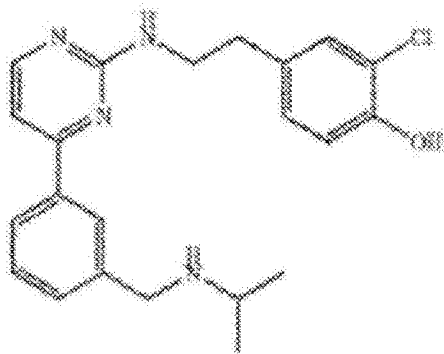
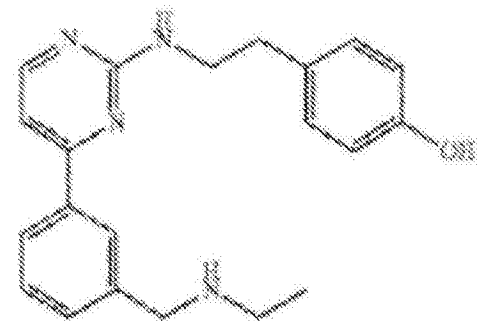
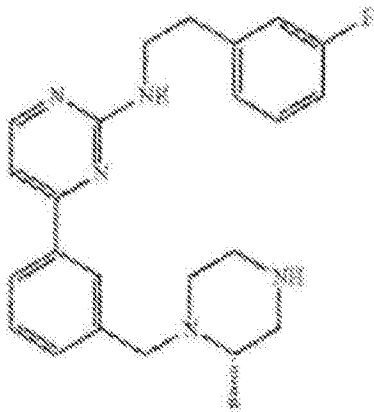


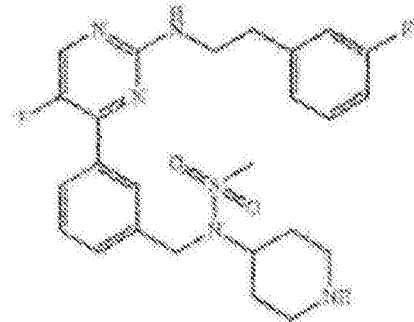
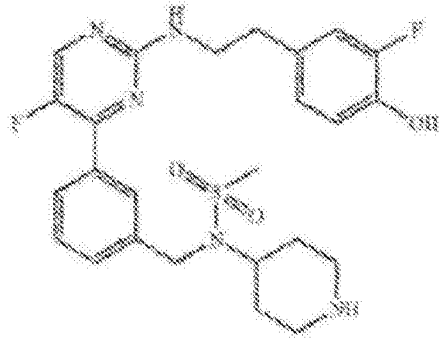
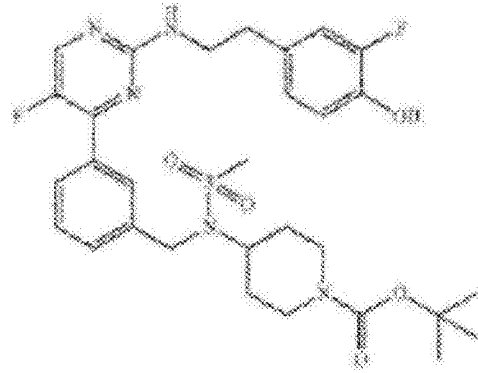
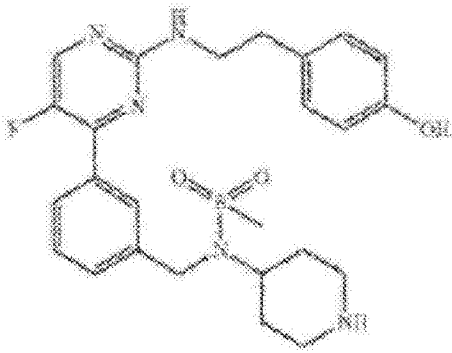
[0421]



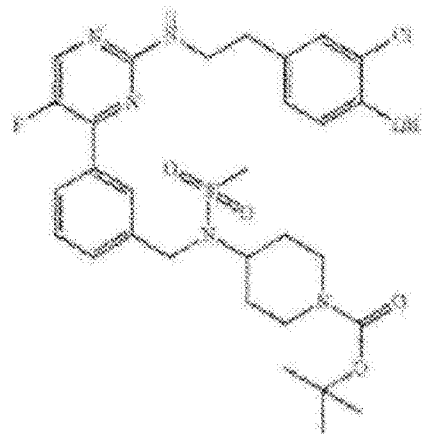
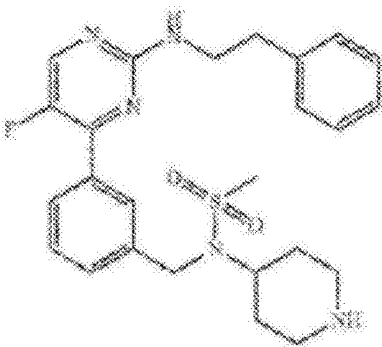
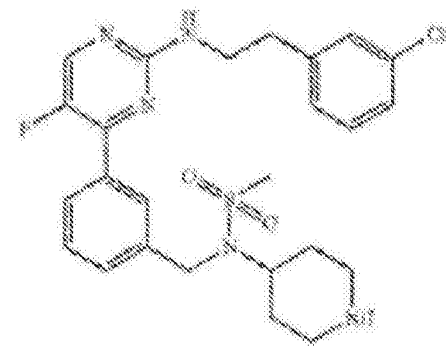
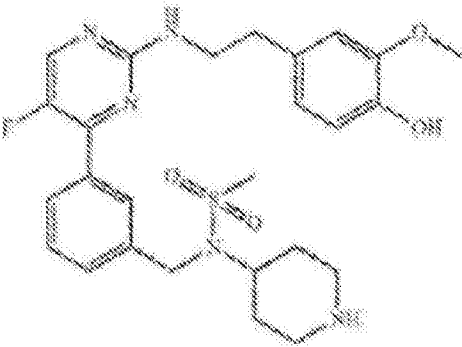


[0422]

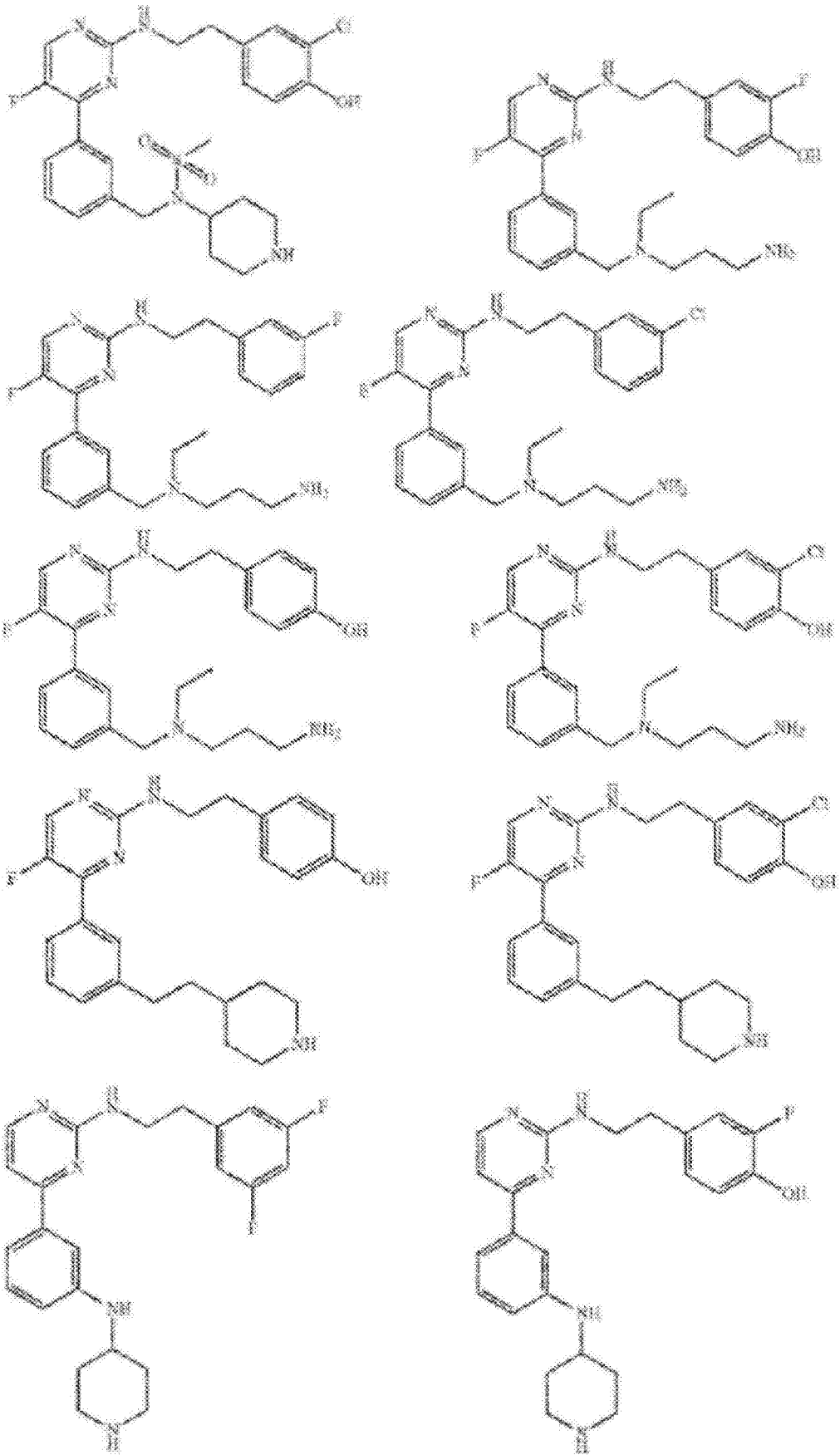


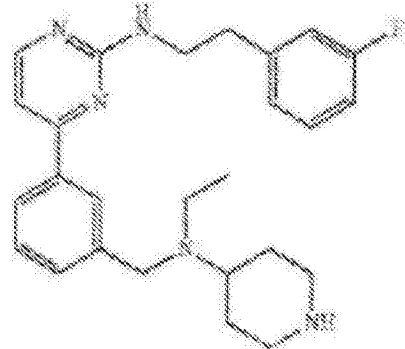
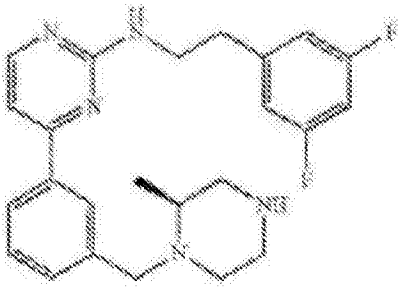
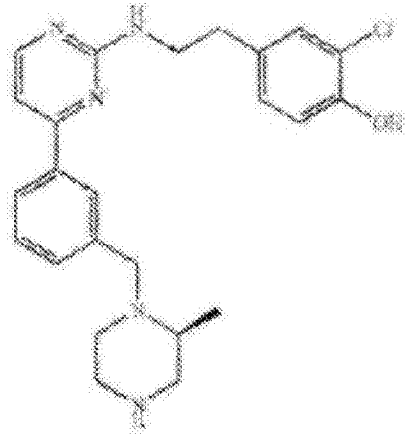
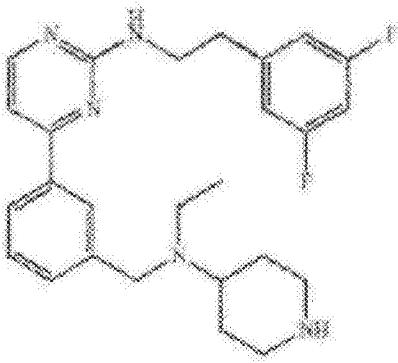


[0423]

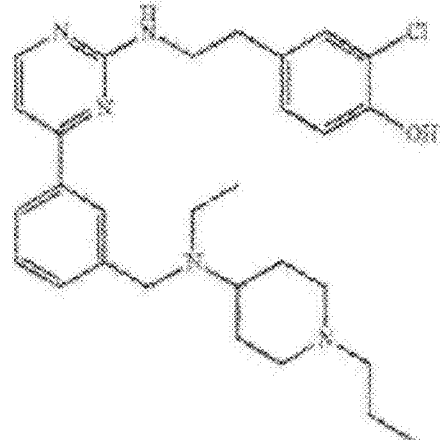
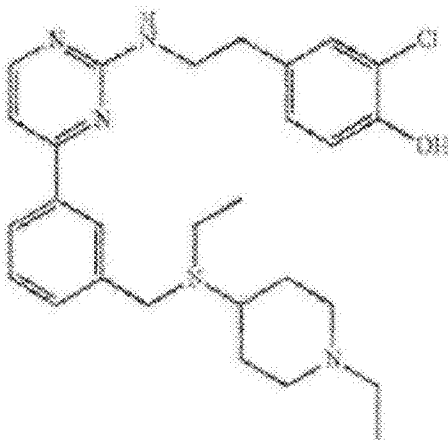
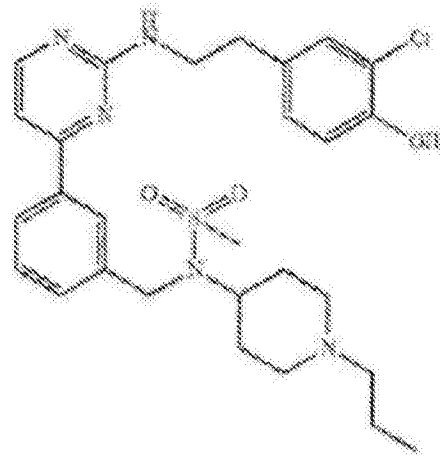
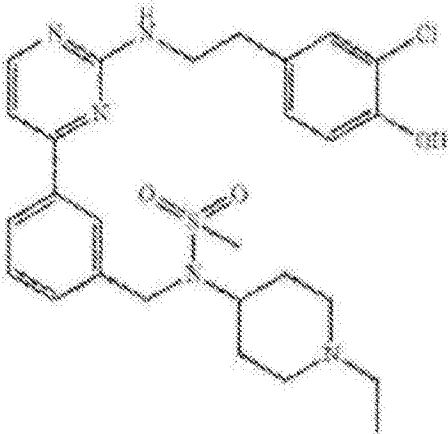


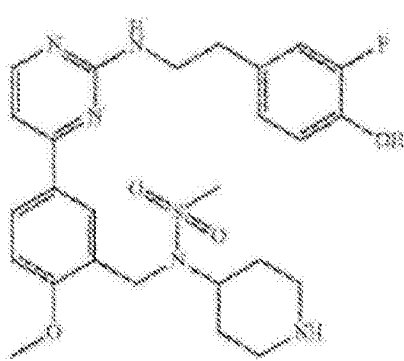
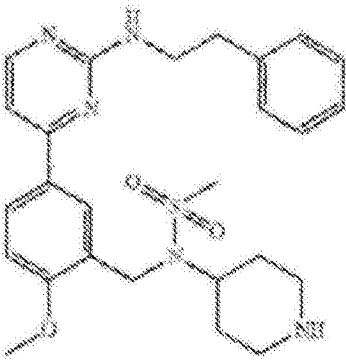
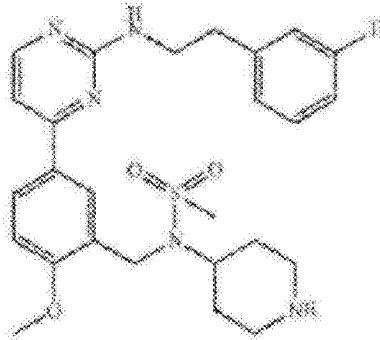
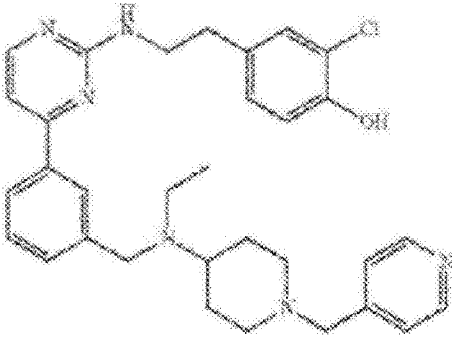
[0424]



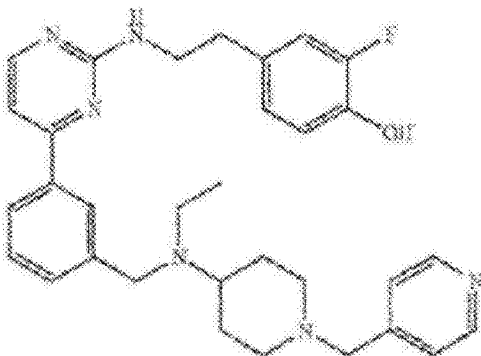
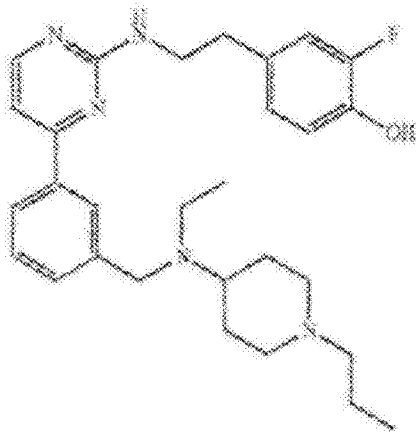
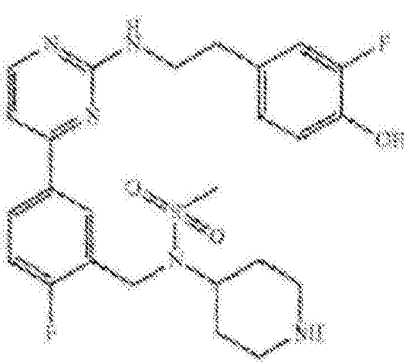
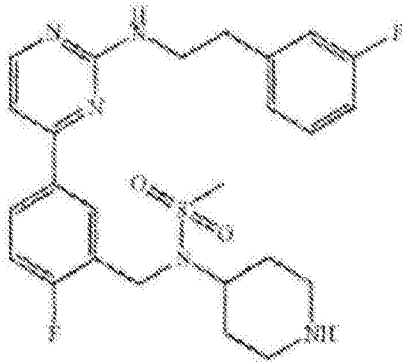


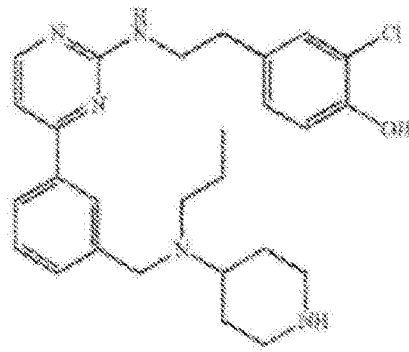
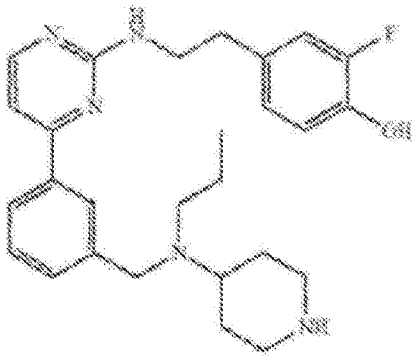
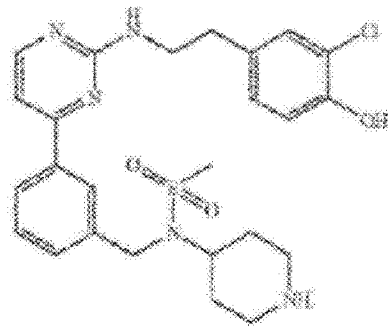
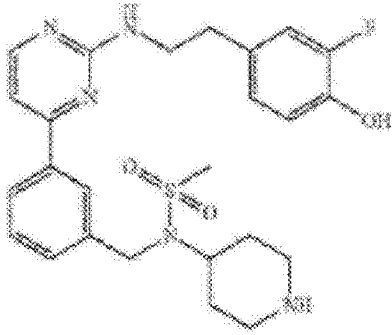
[0425]



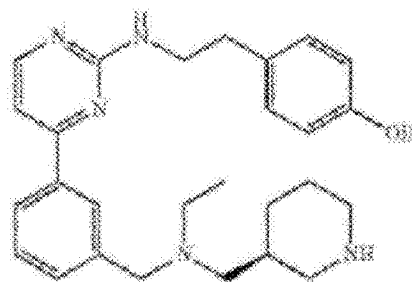
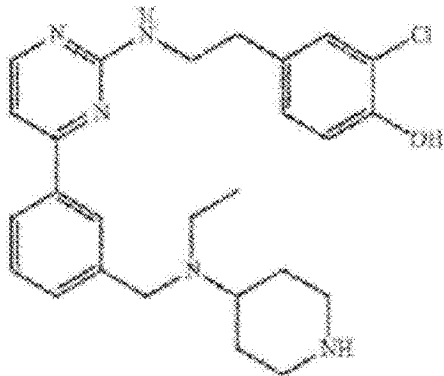
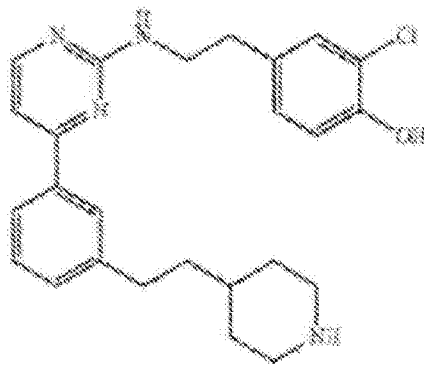
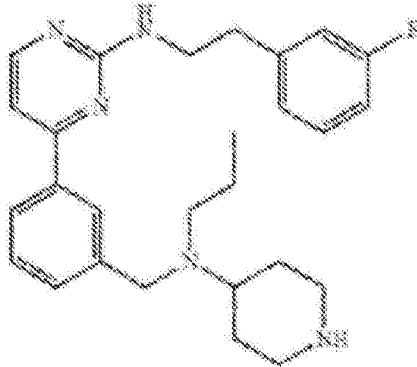


[0426]

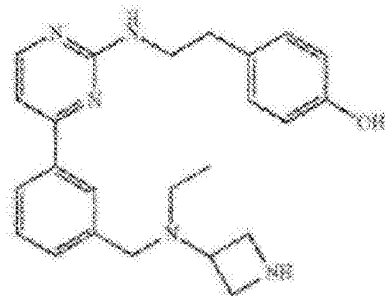
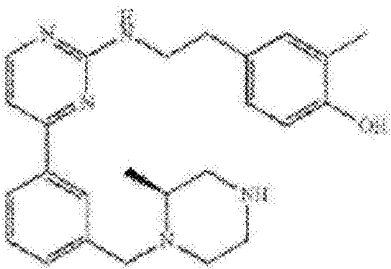
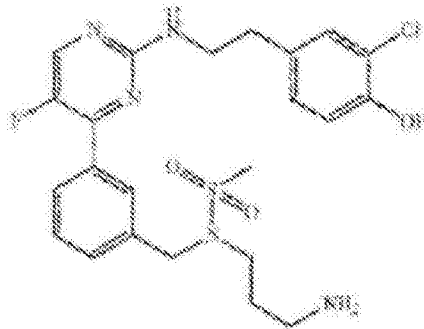
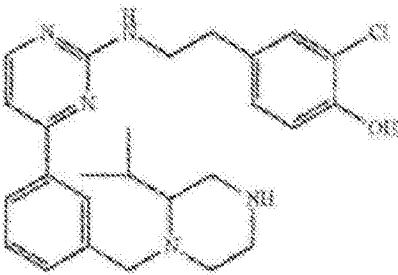
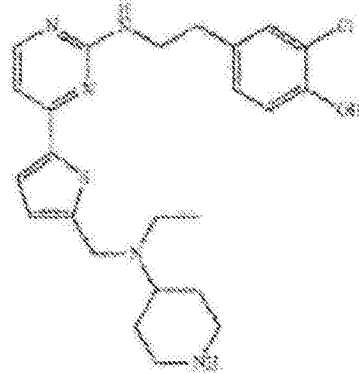
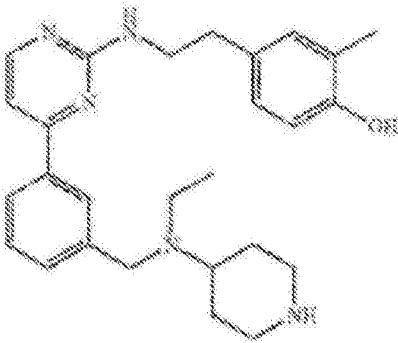
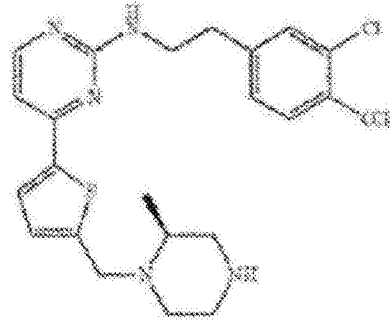
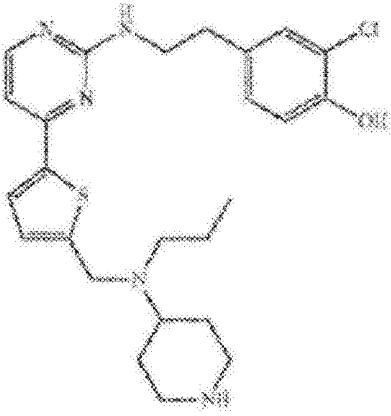


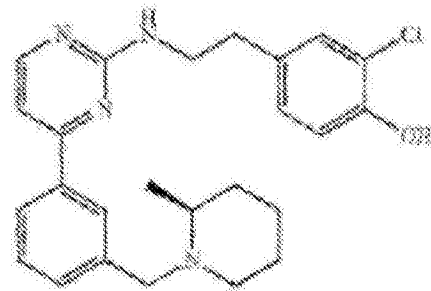
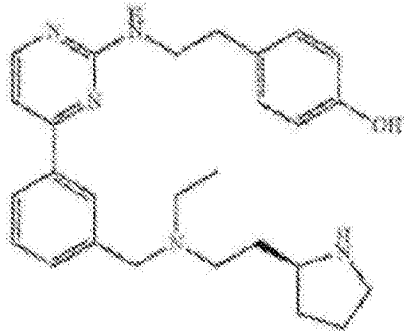
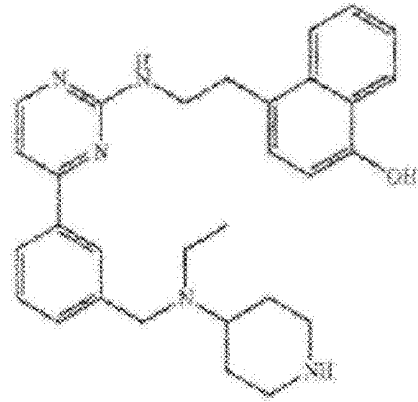
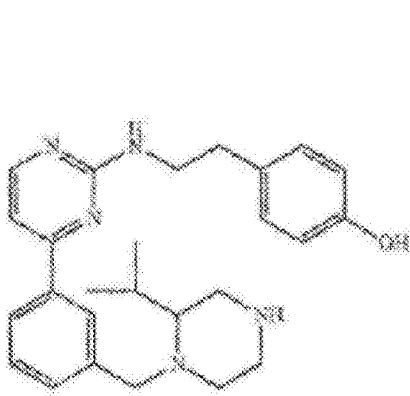


[0427]

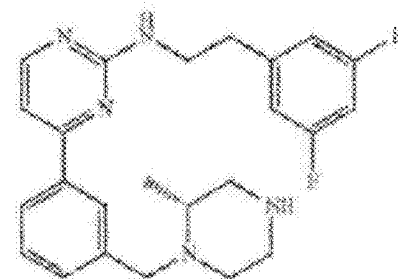
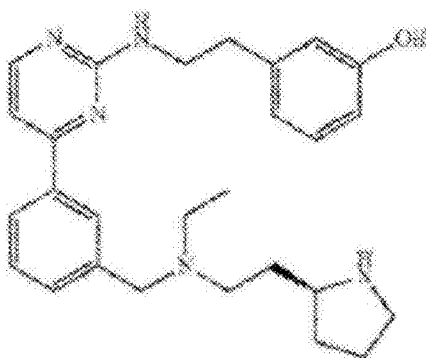
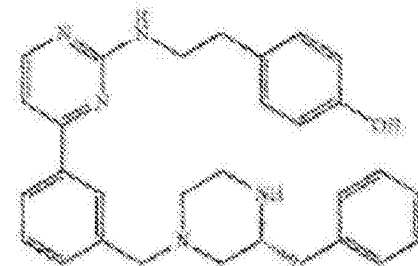
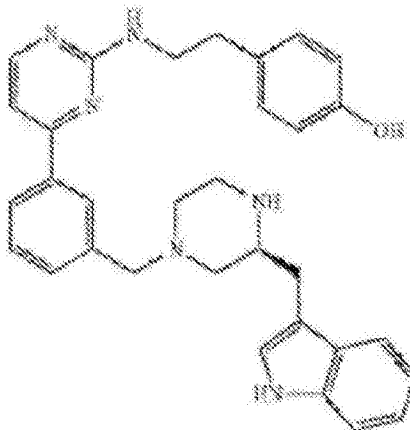


[0428]

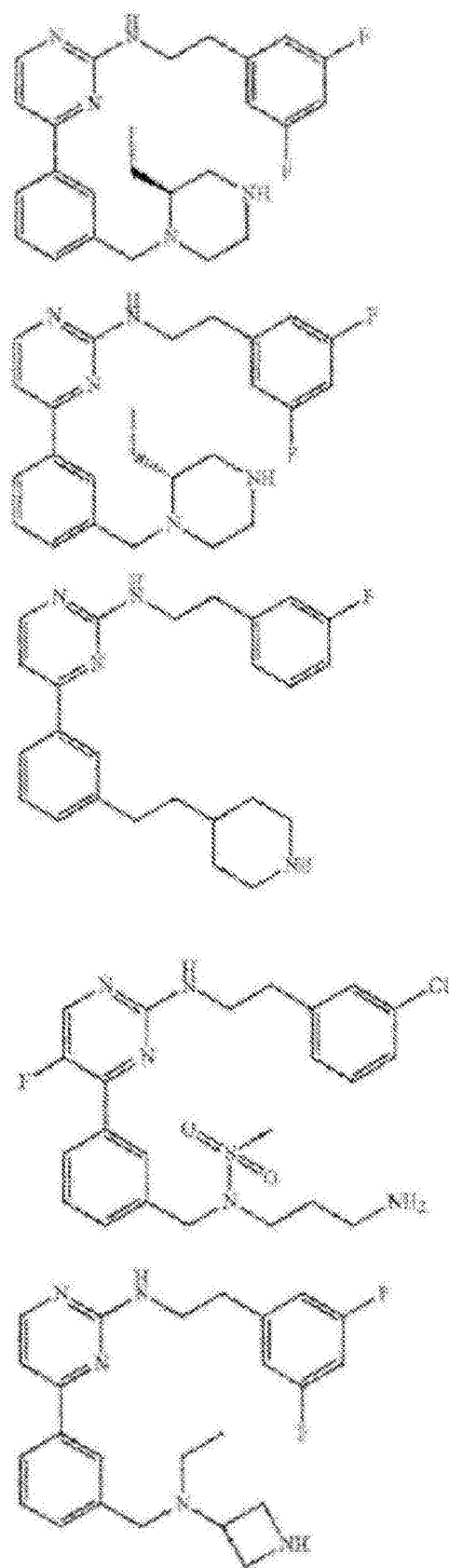
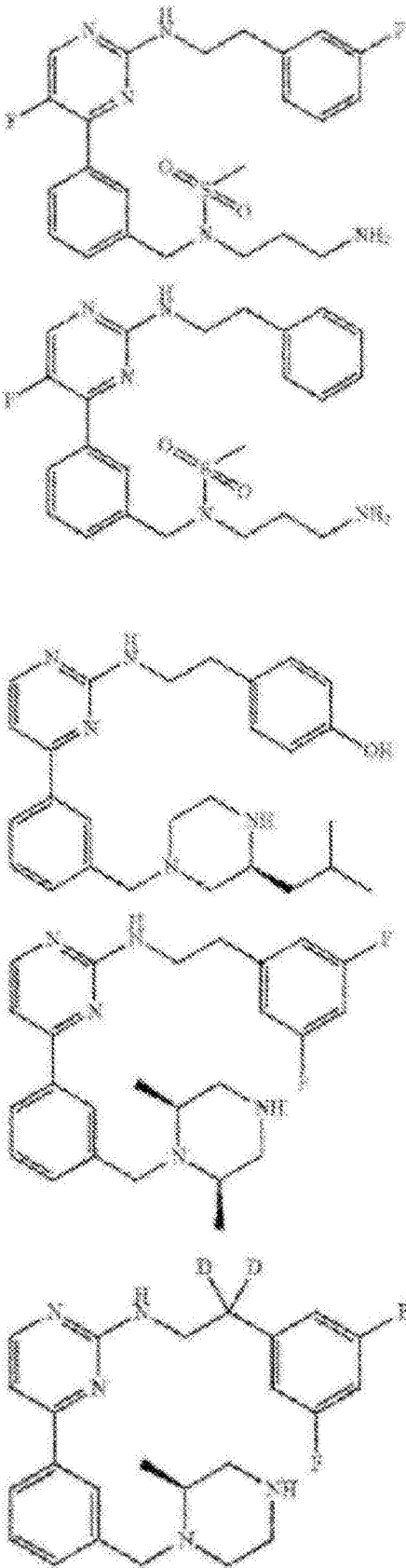


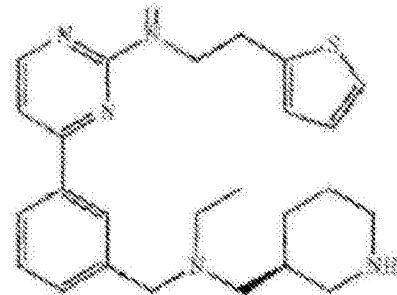
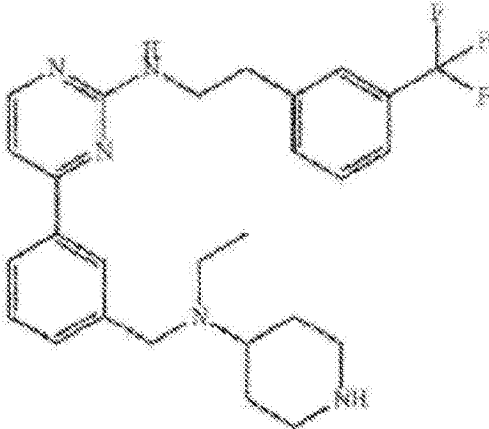
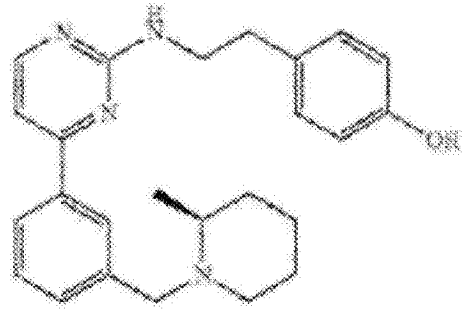
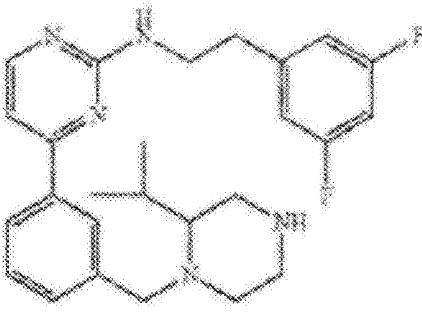


[0429]

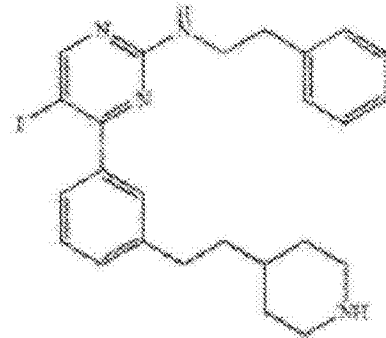
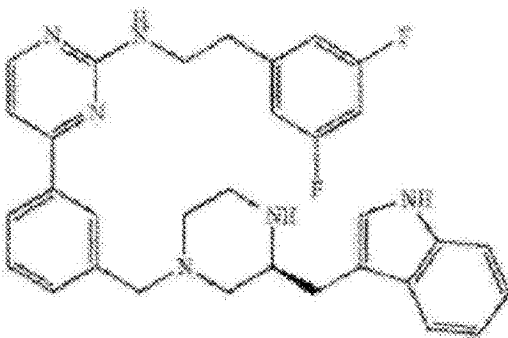
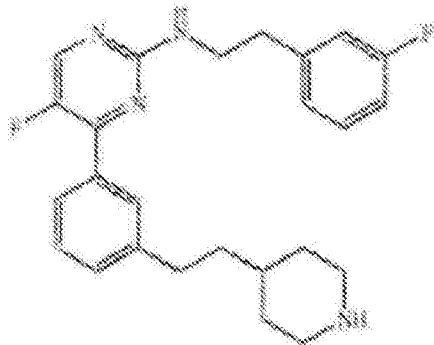
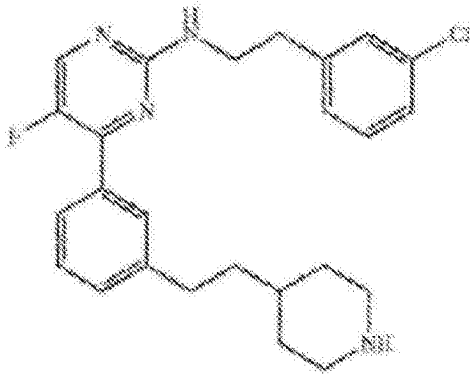


[0430]

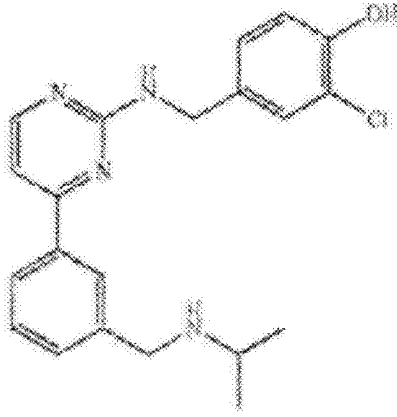
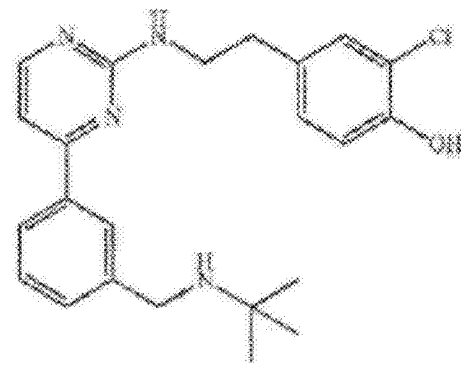
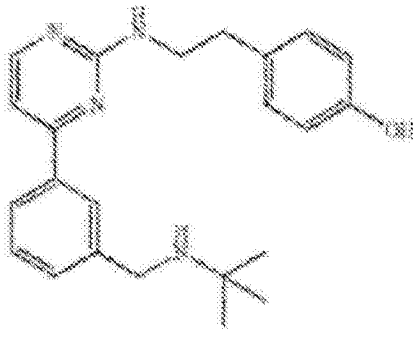
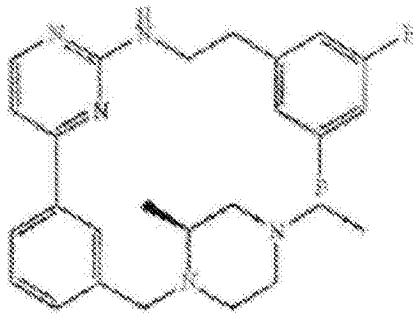
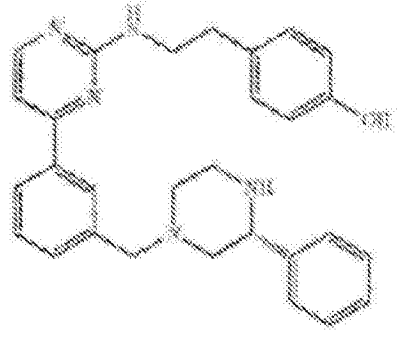
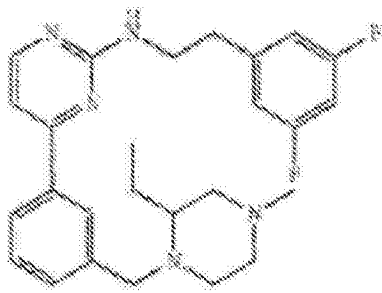
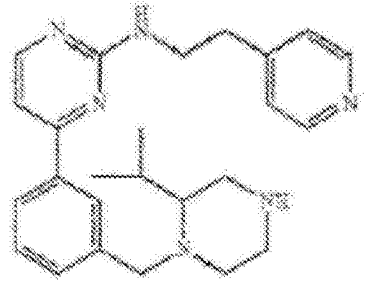
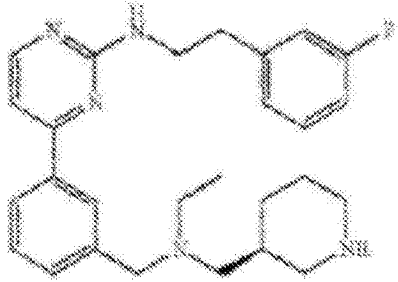
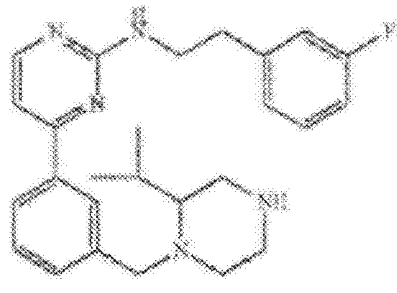
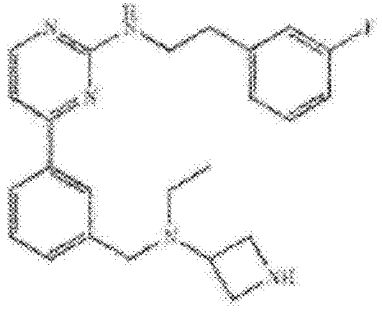




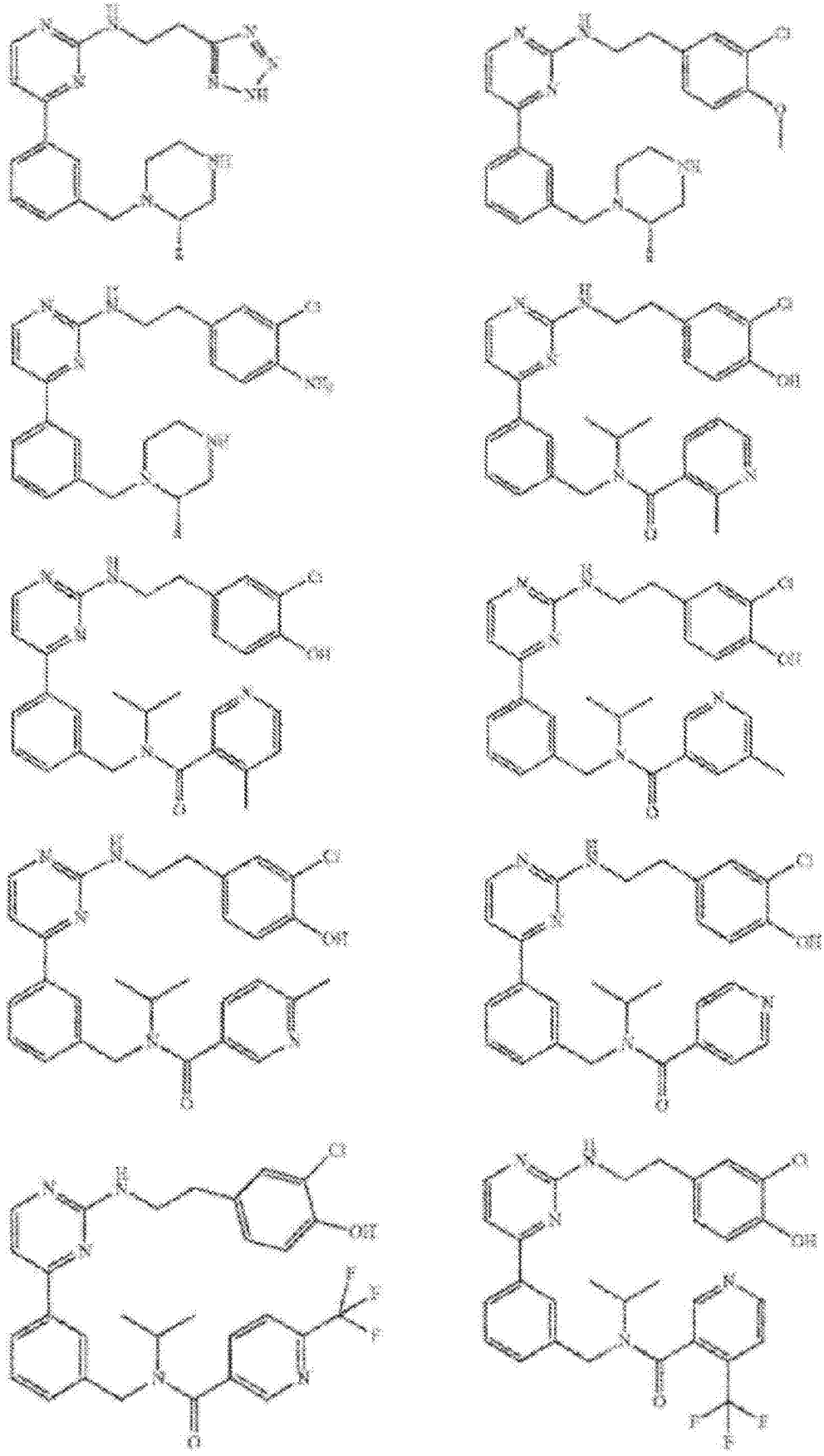
[0431]



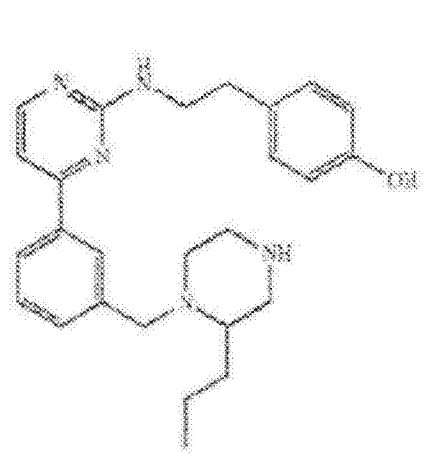
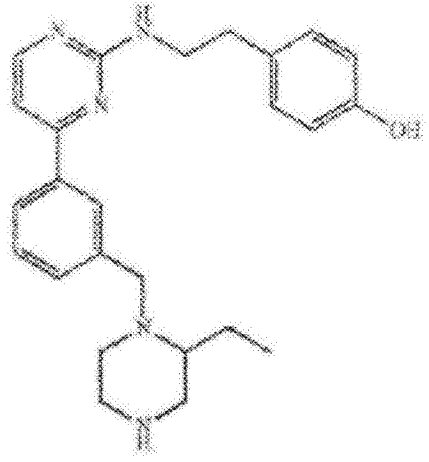
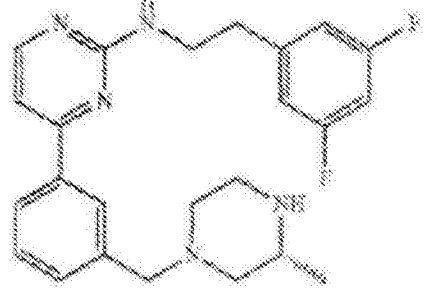
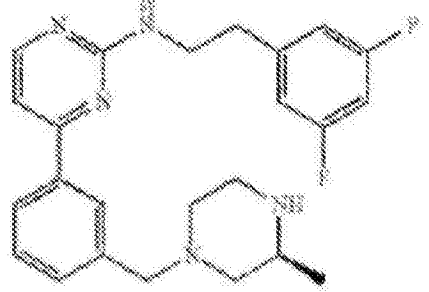
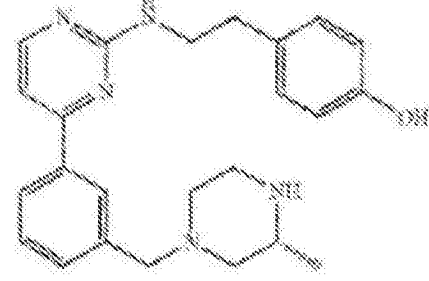
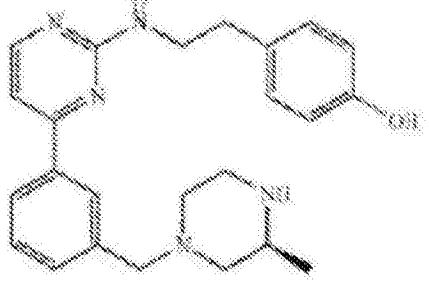
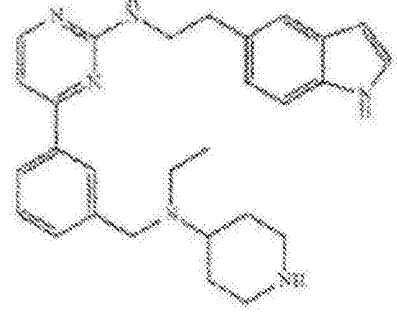
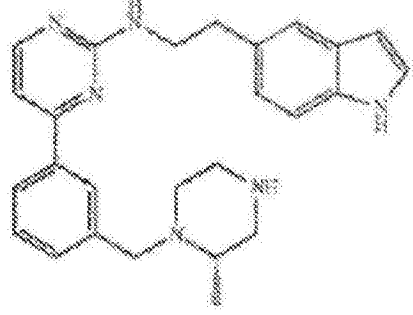
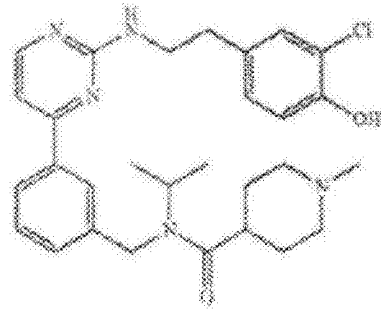
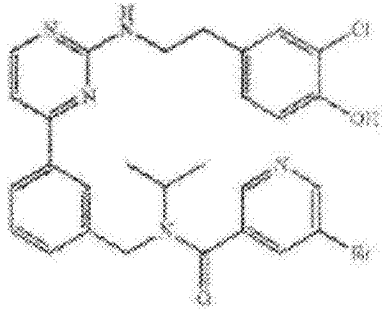
[0432]



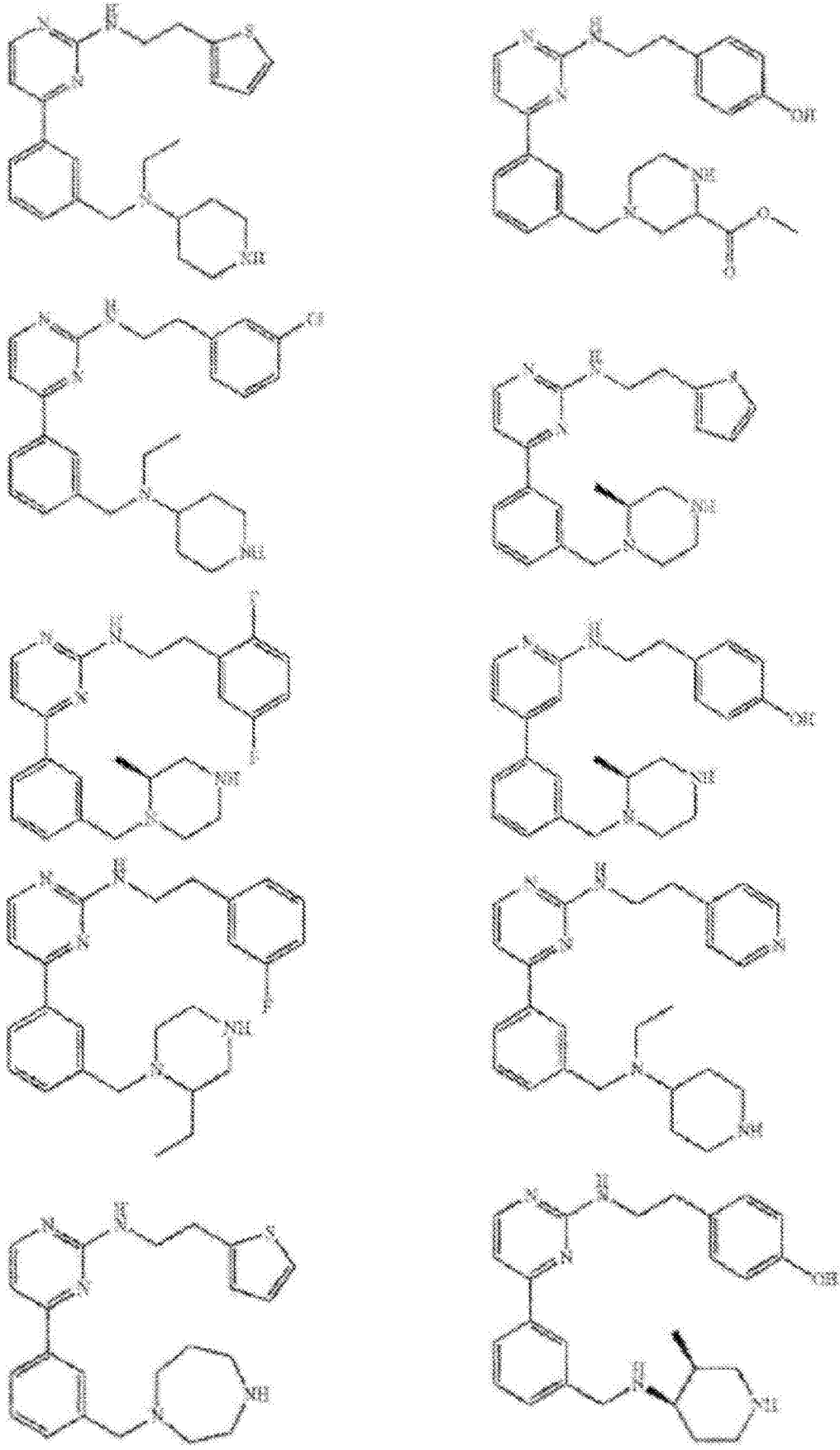
[0433]



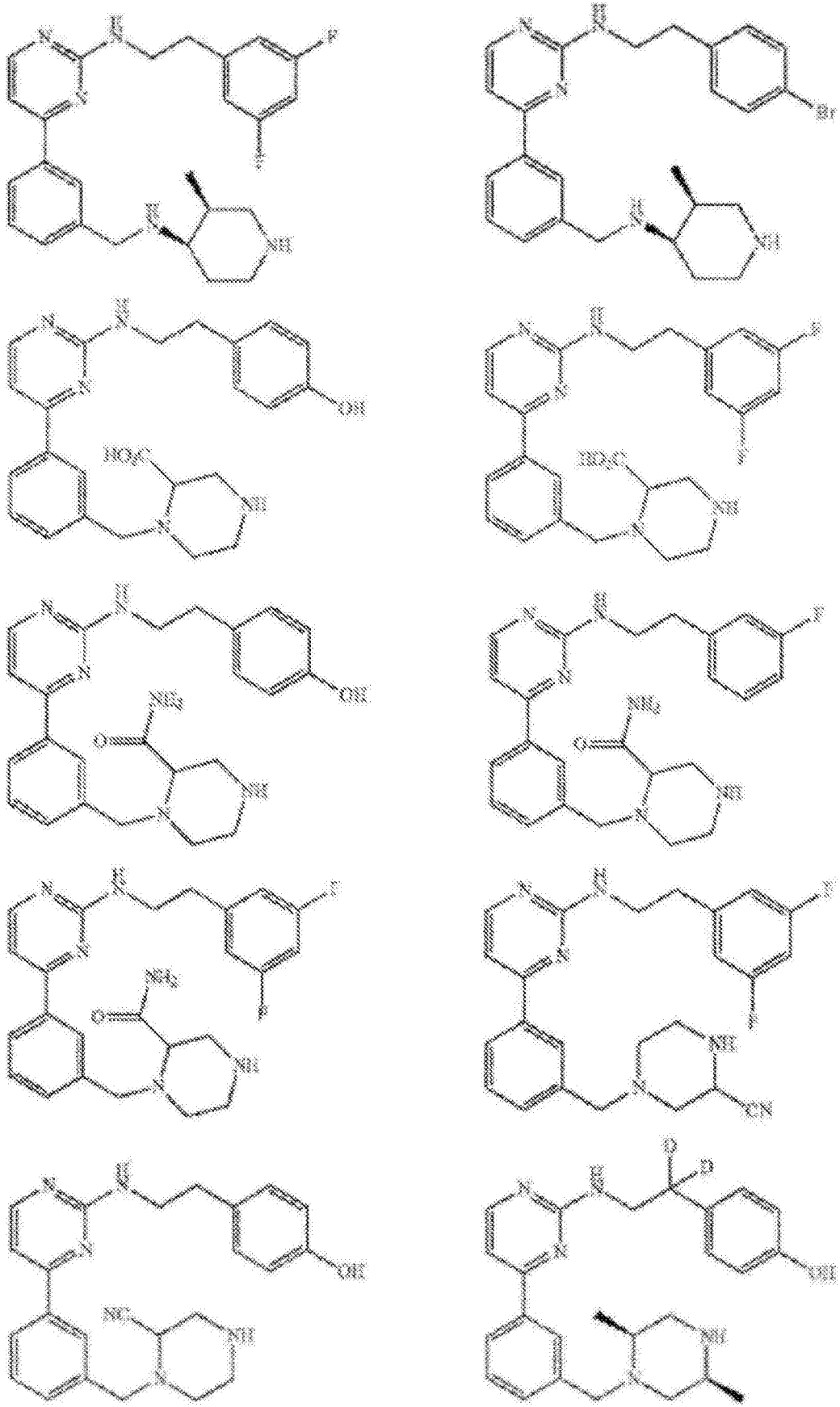
[0434]



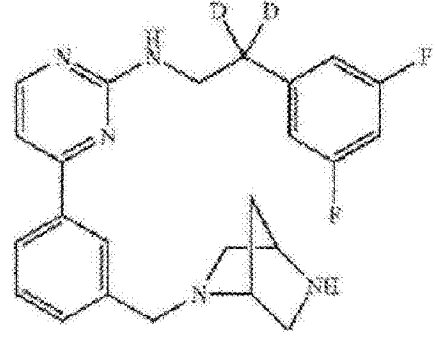
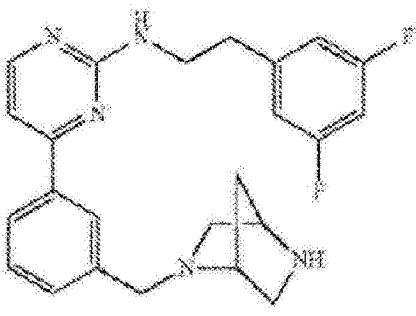
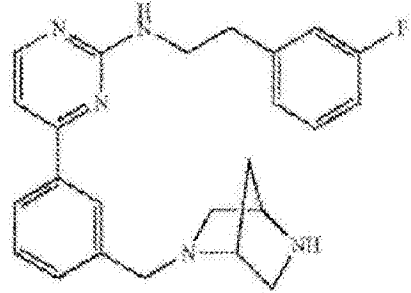
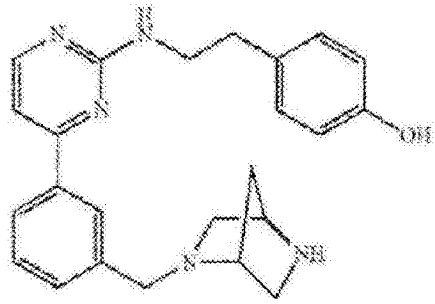
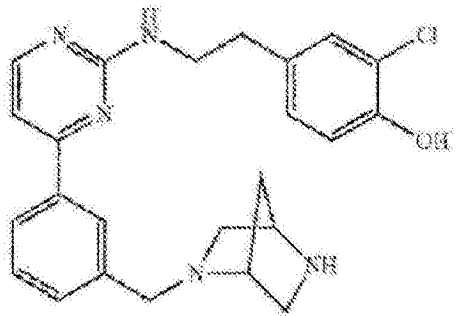
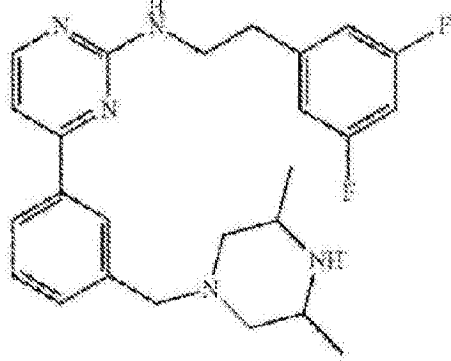
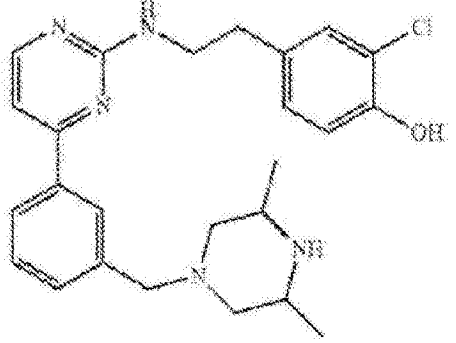
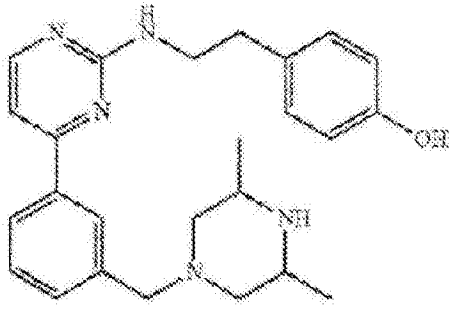
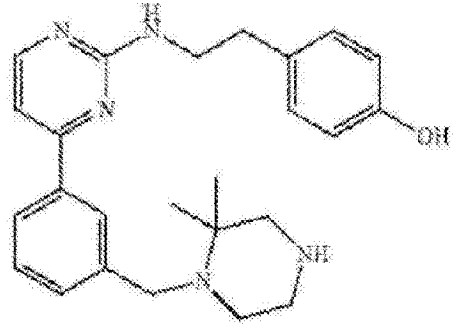
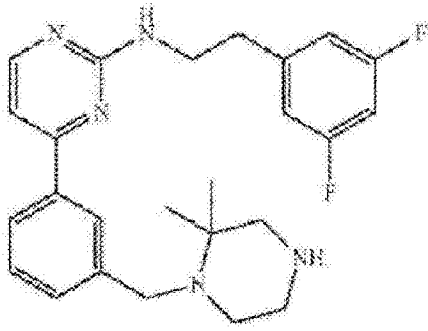
[0435]



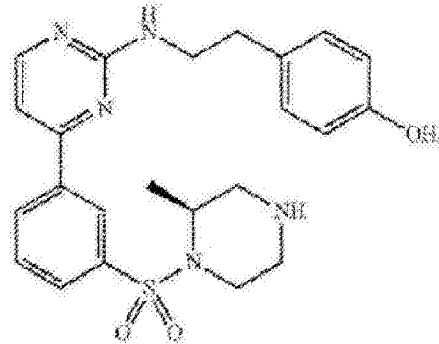
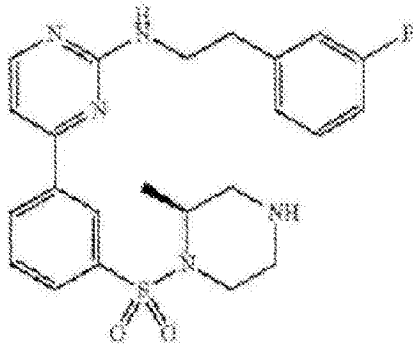
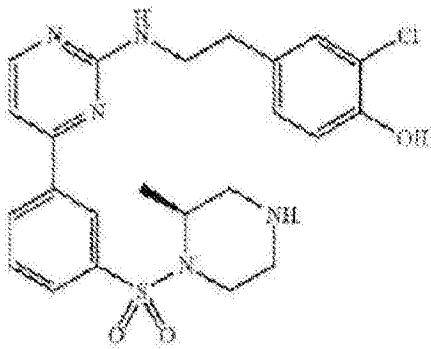
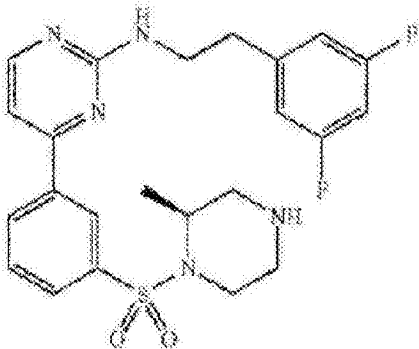
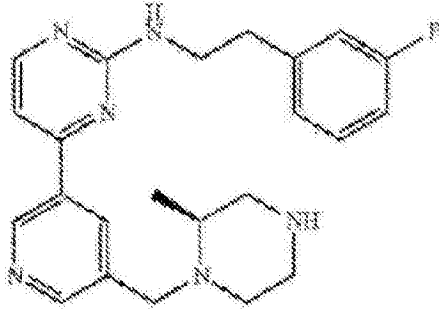
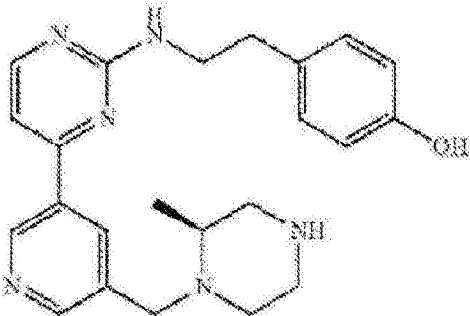
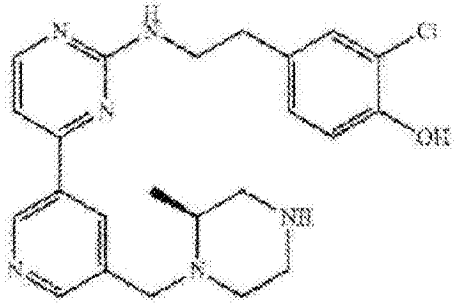
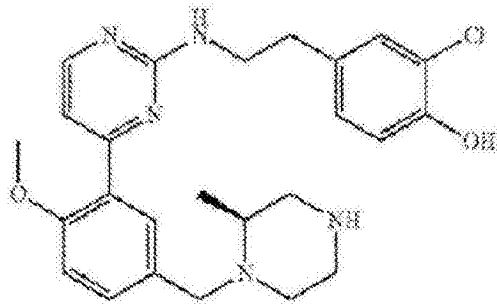
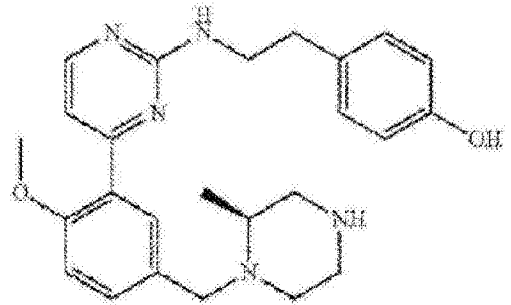
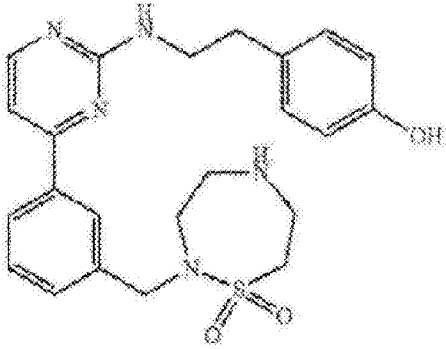
[0436]



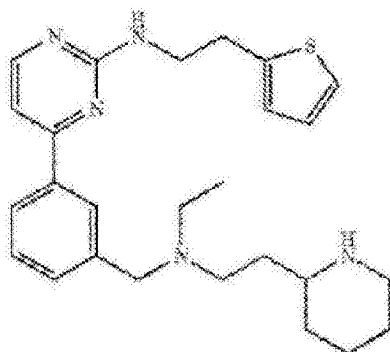
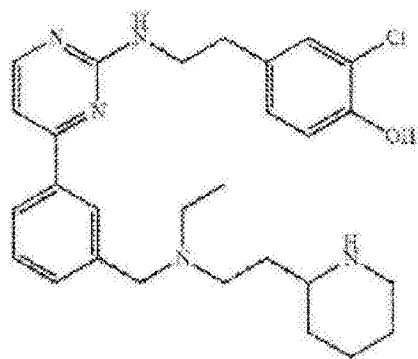
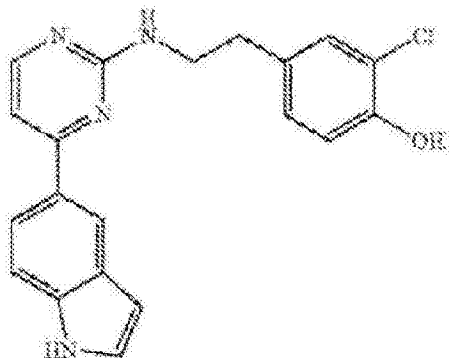
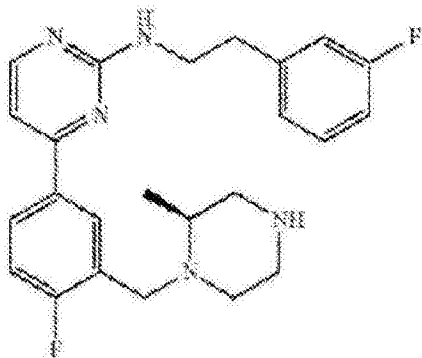
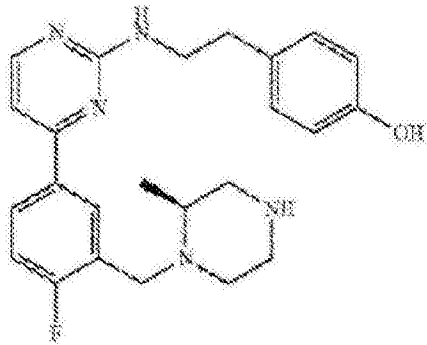
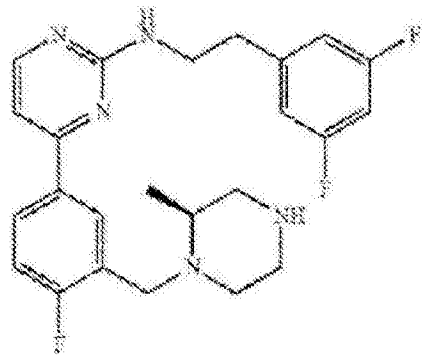
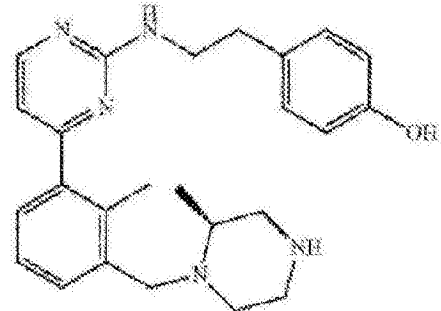
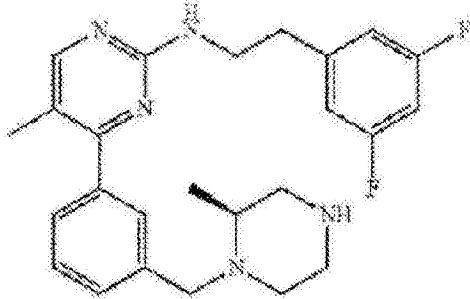
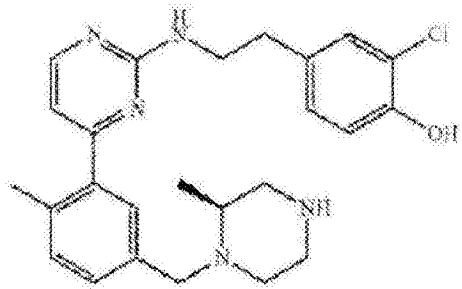
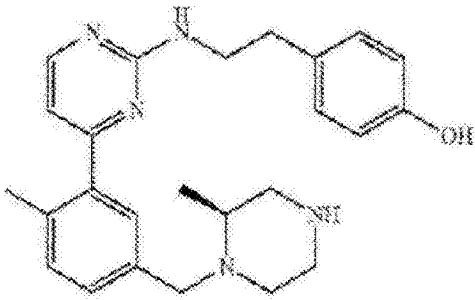
[0437]



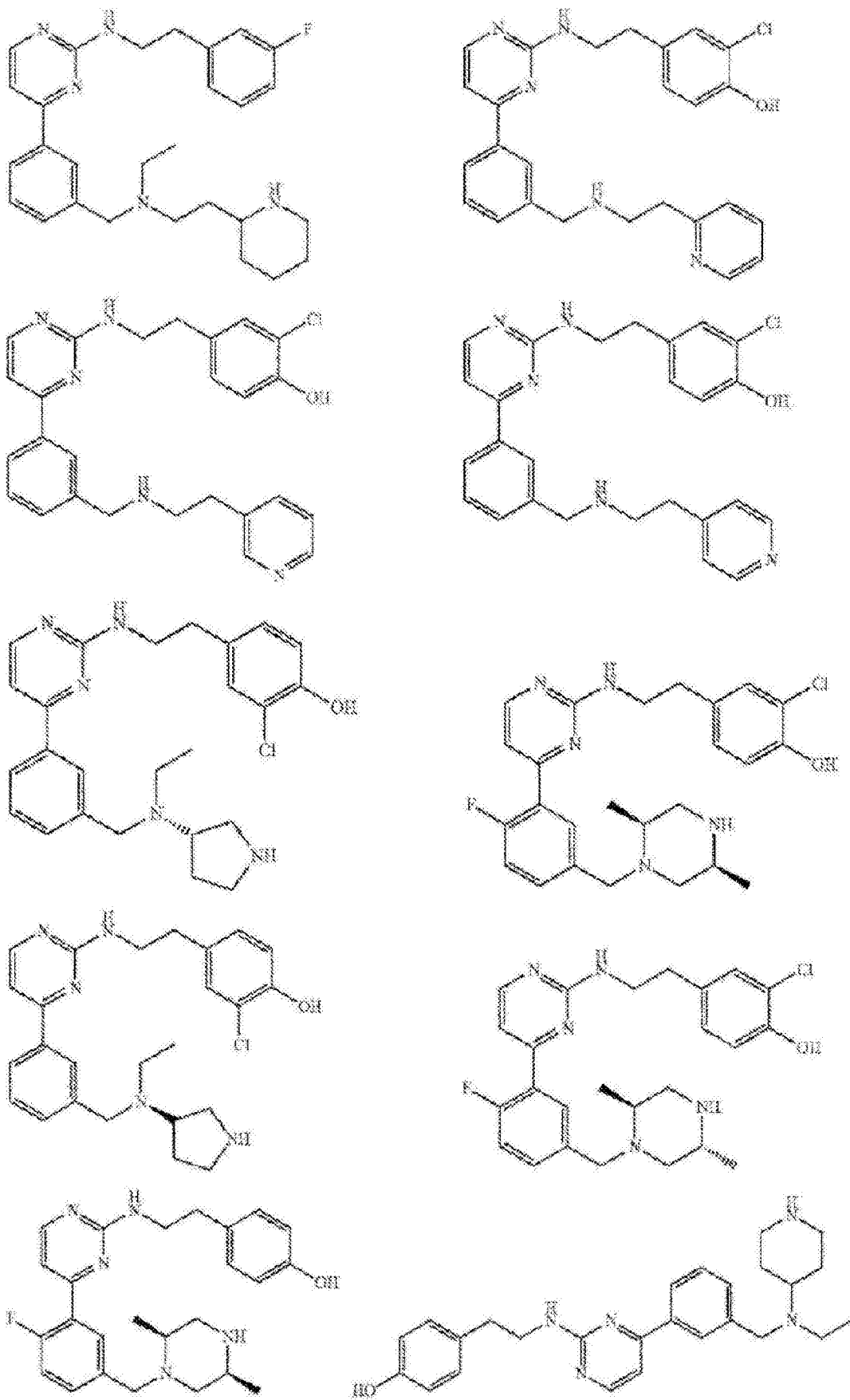
[0438]



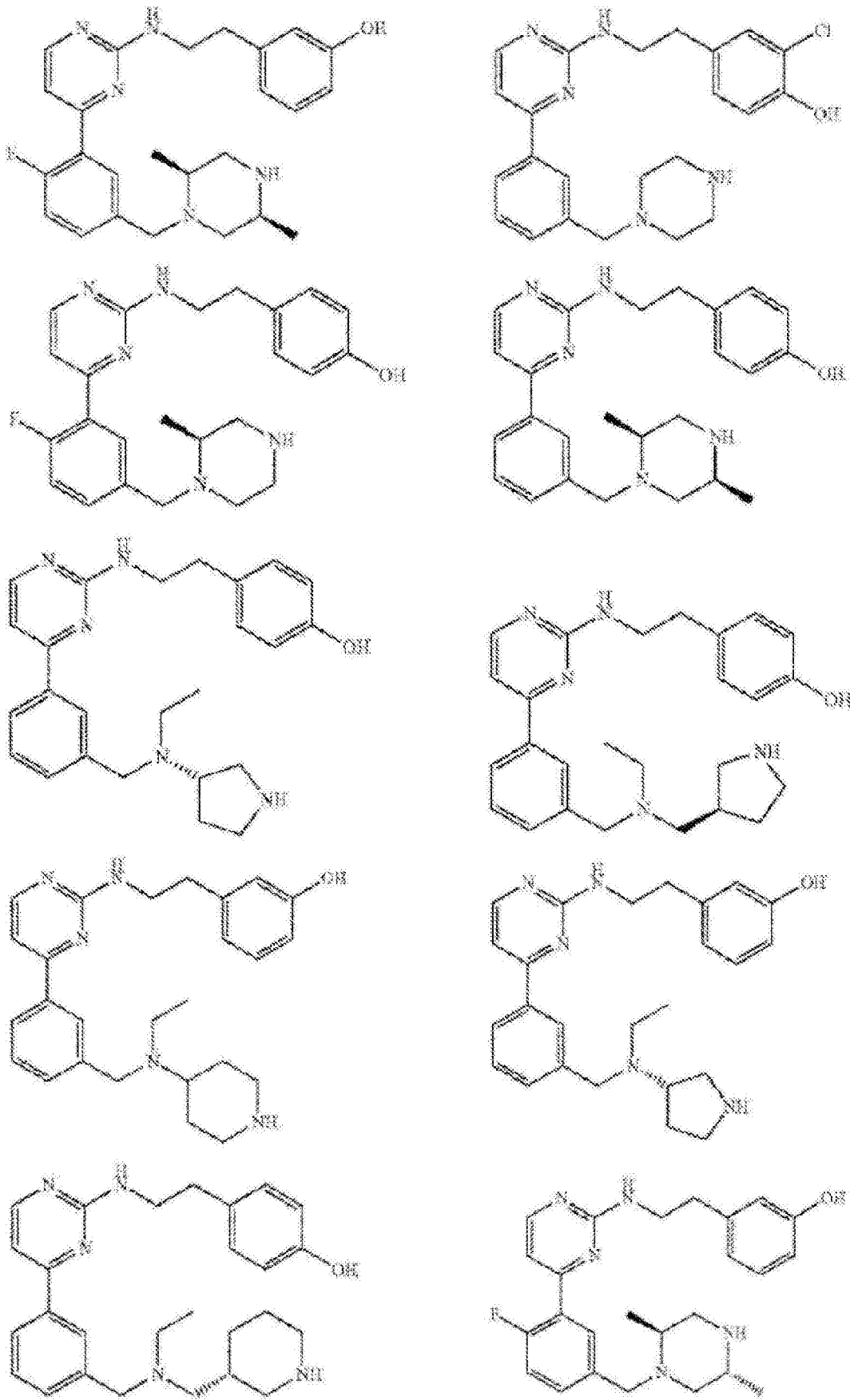
[0439]



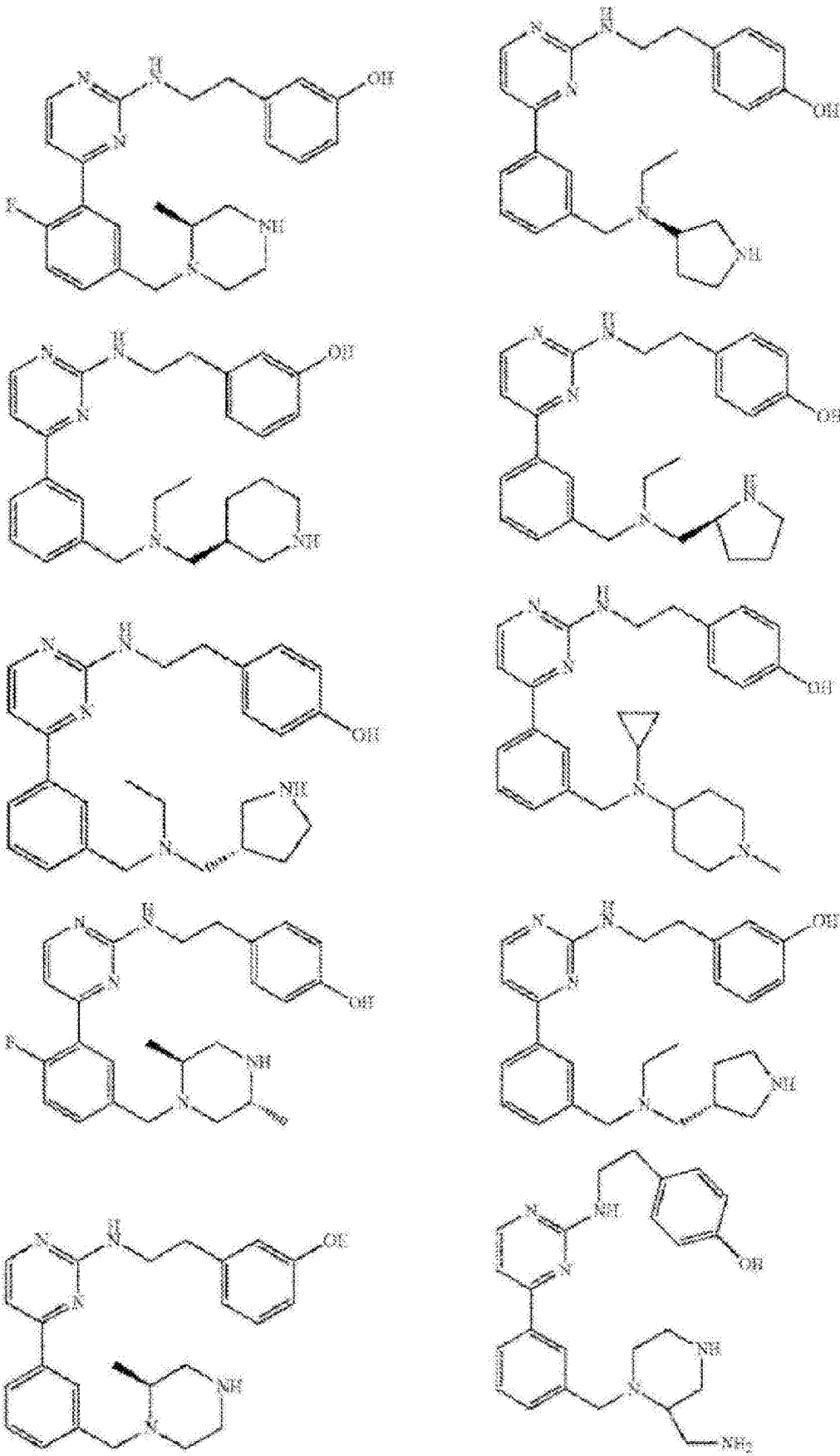
[0440]



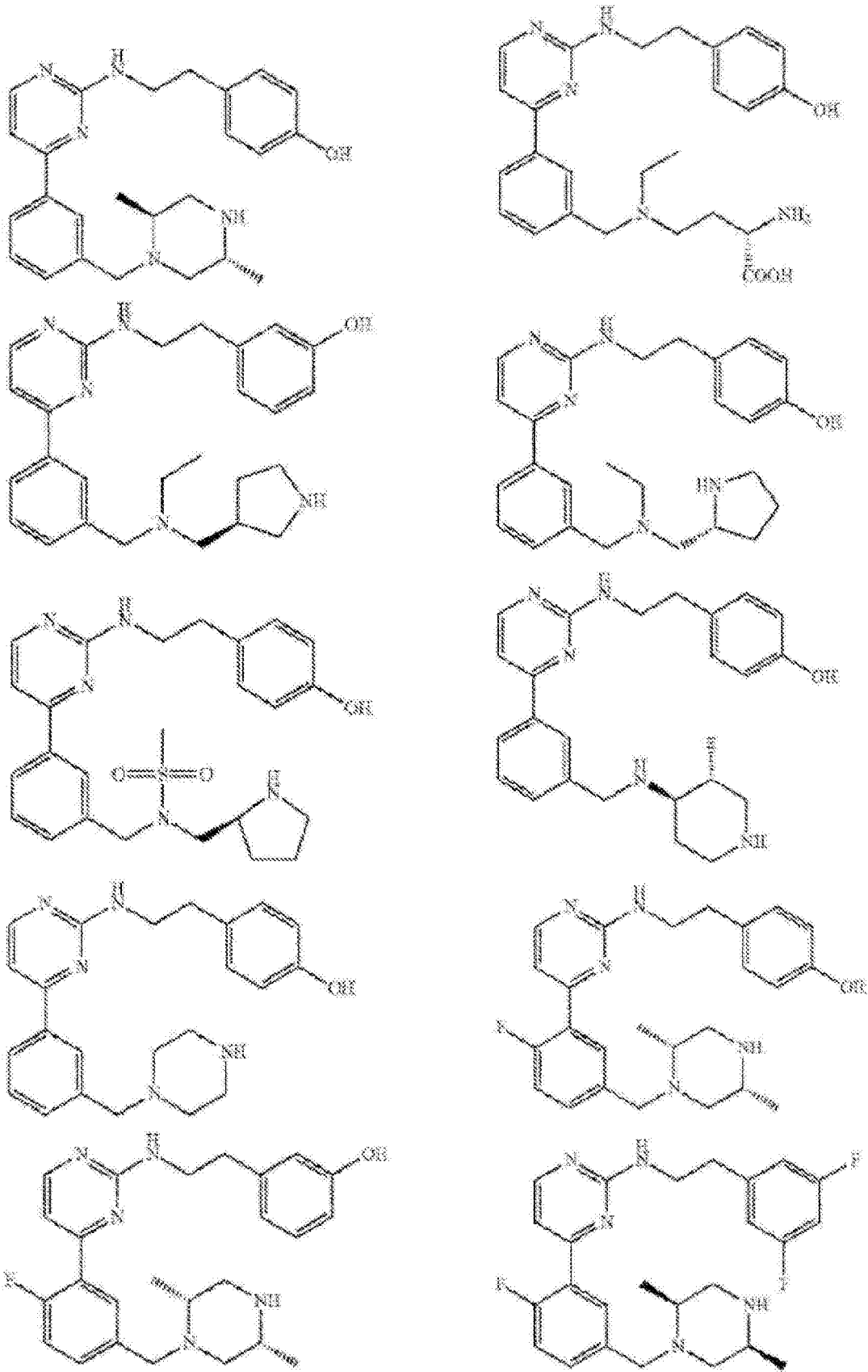
[0441]



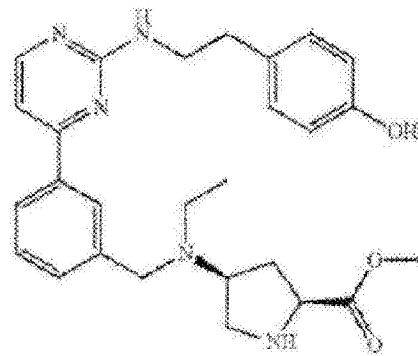
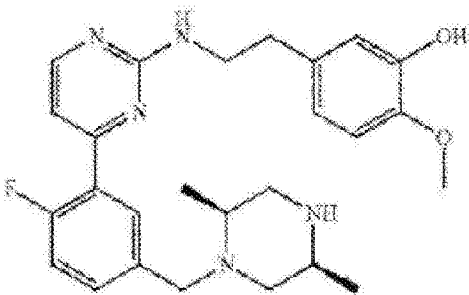
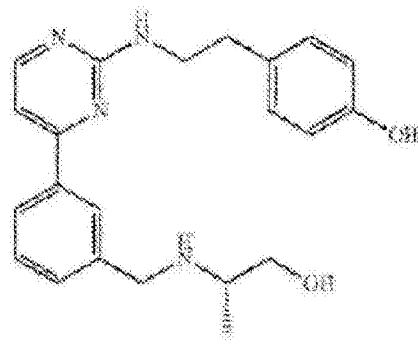
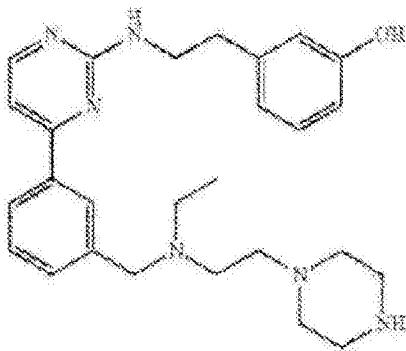
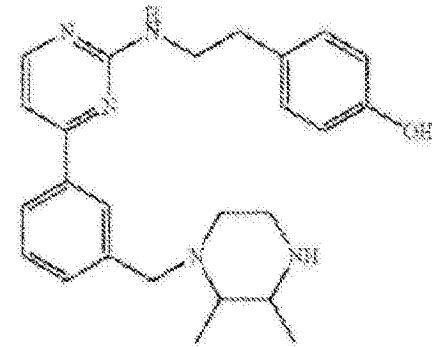
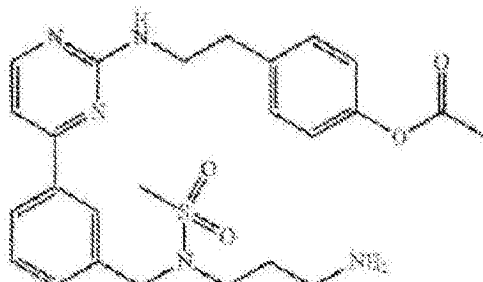
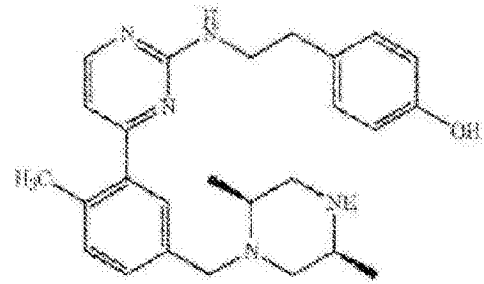
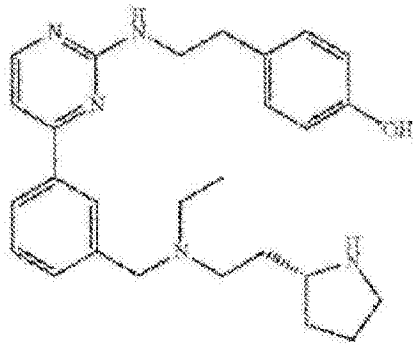
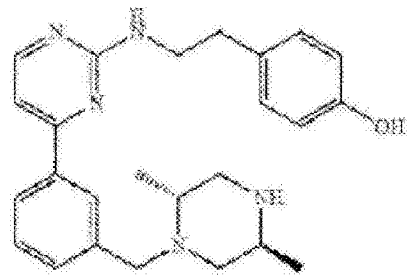
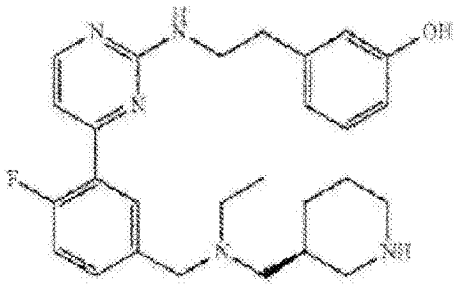
[0442]

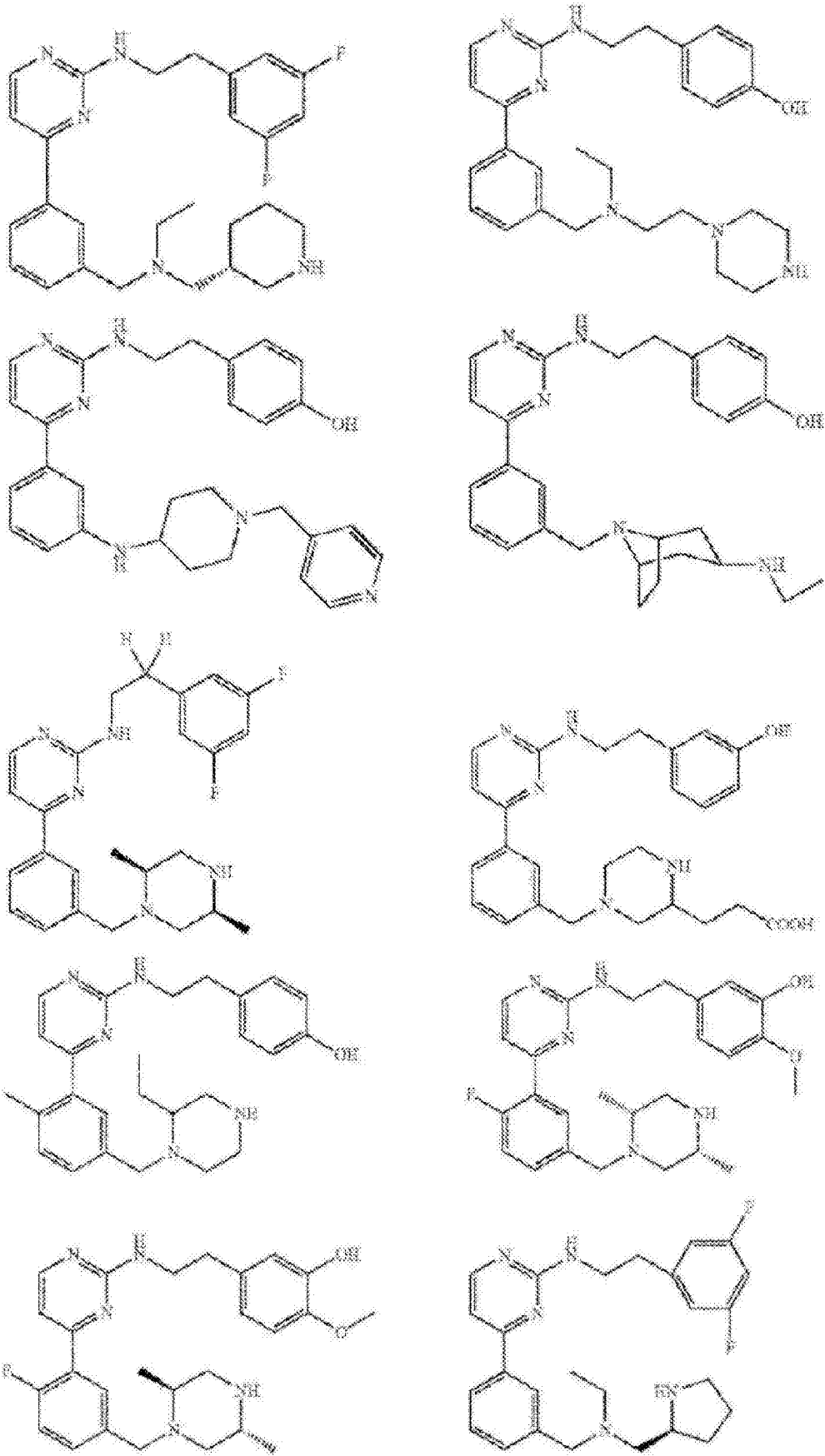


[0443]

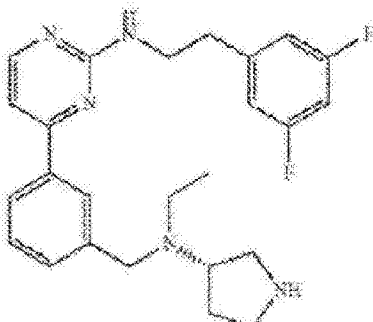
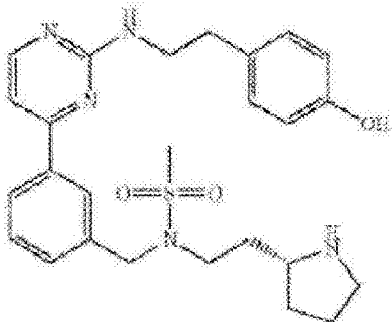
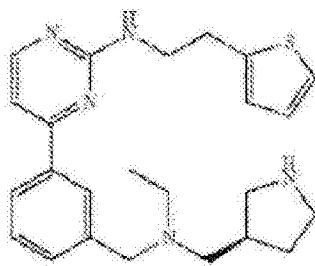
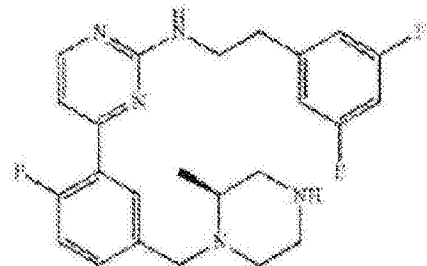
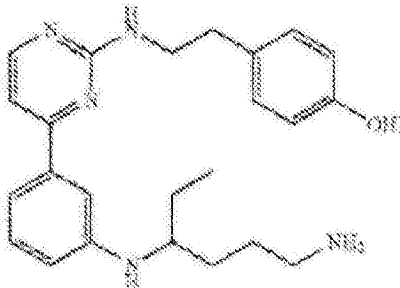
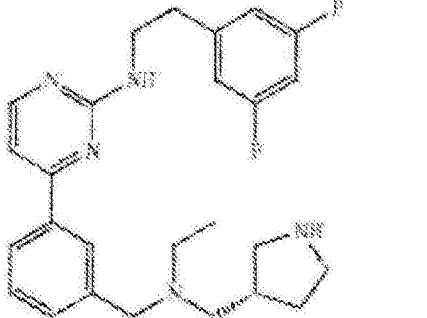
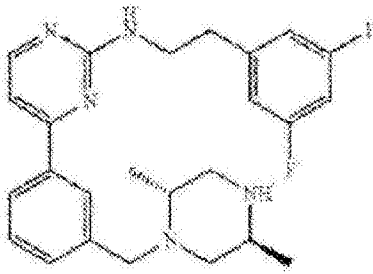
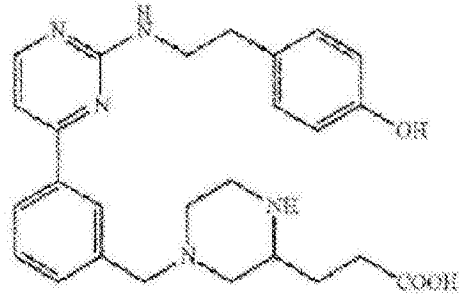
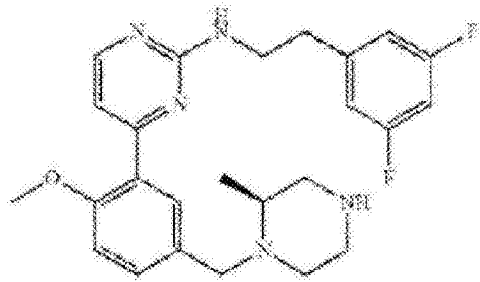
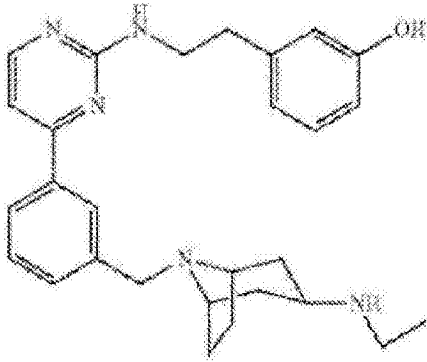


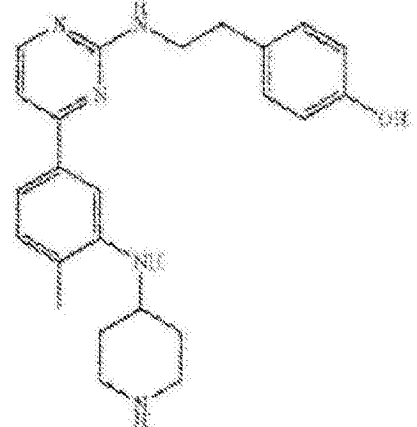
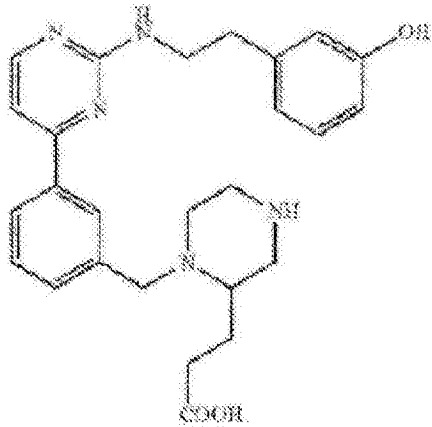
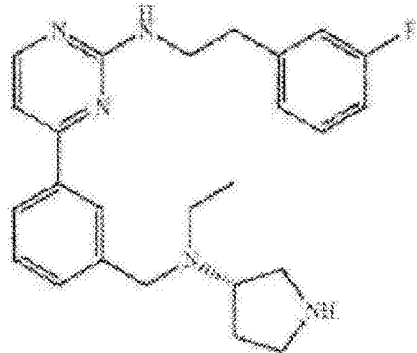
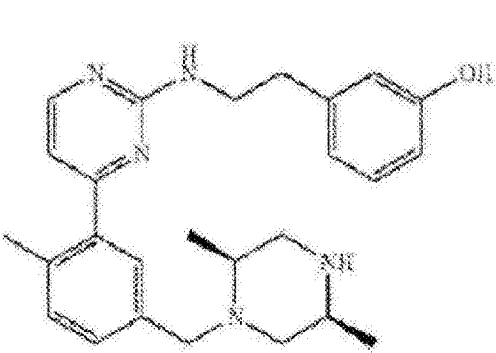
[0444]



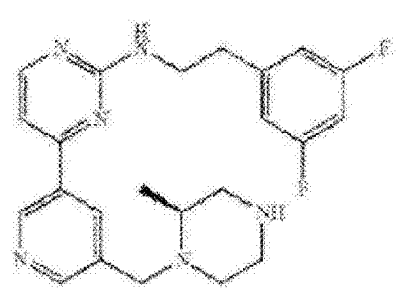
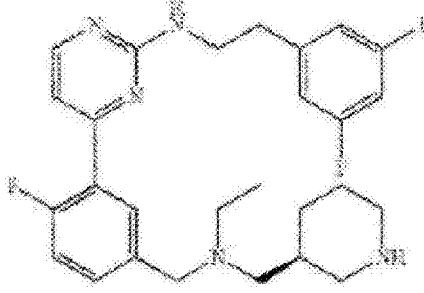
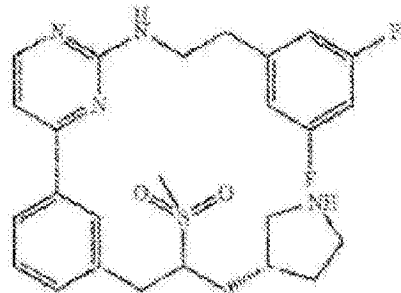
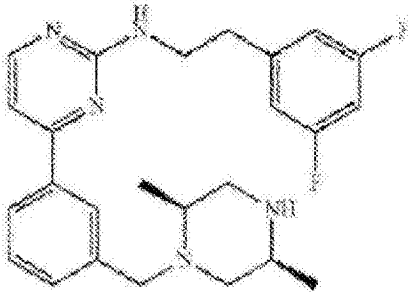
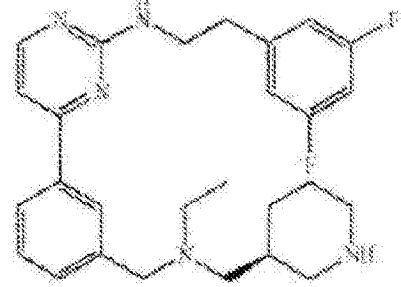
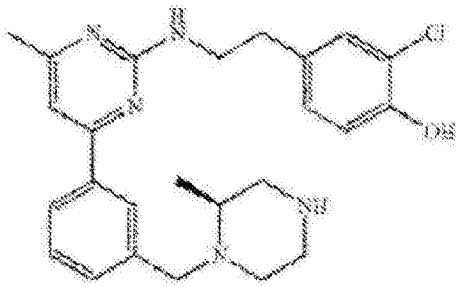


[0446]

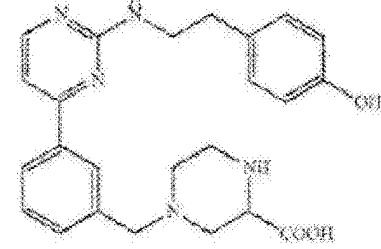
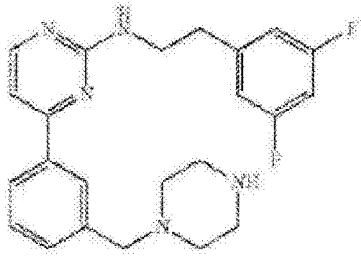
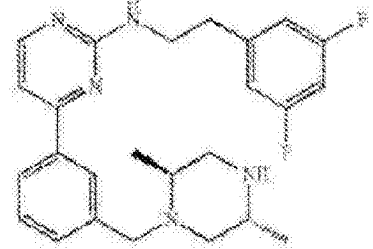
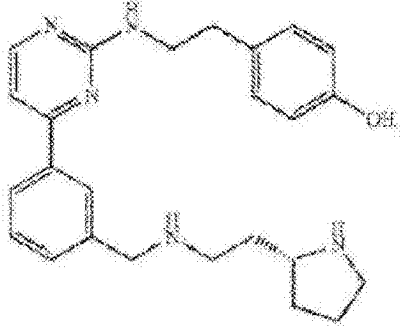
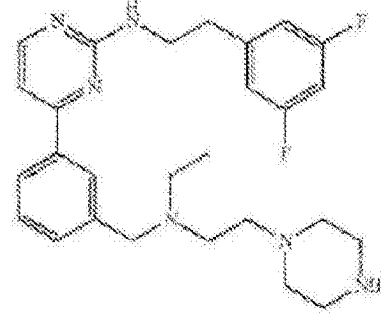
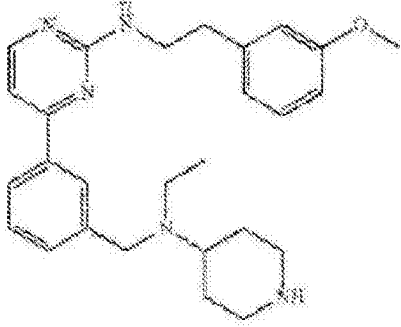
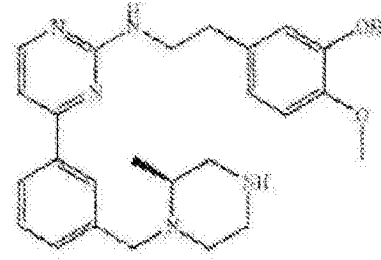
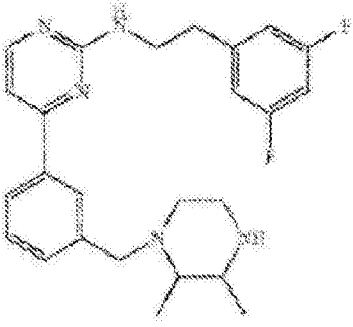
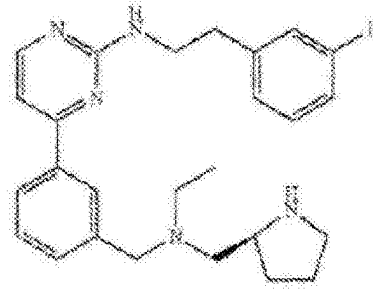
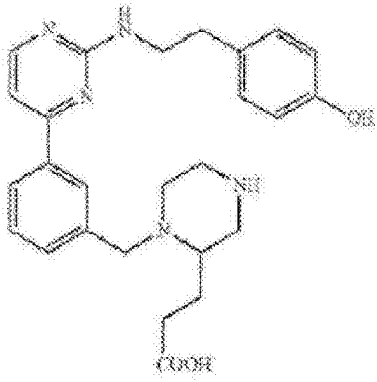


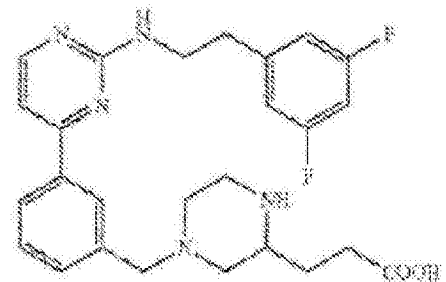
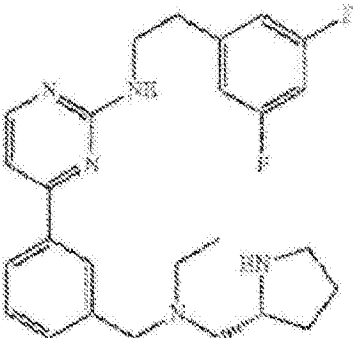
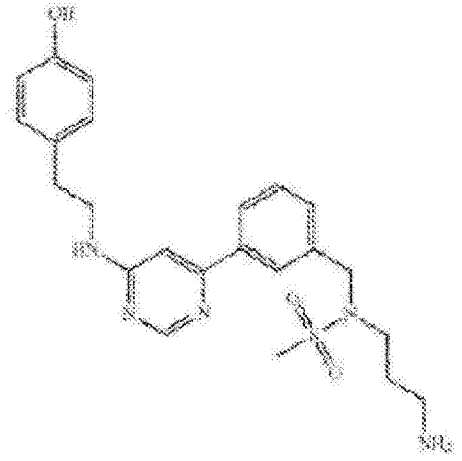
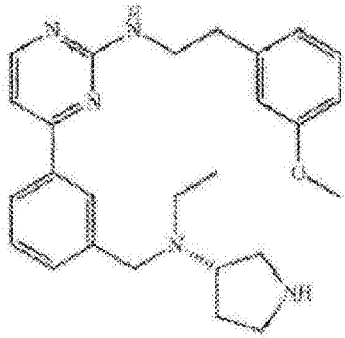


[0447]

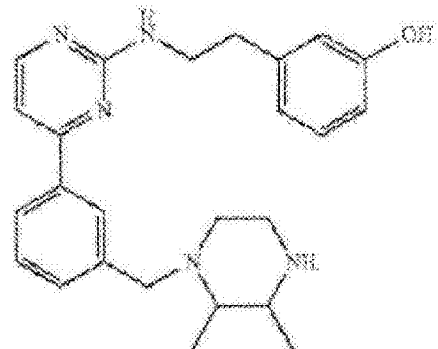
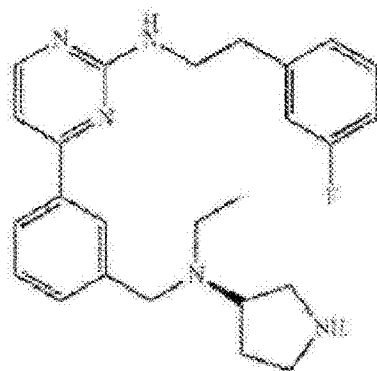
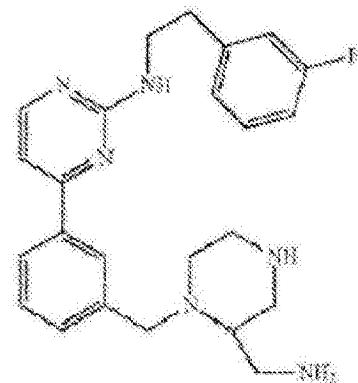
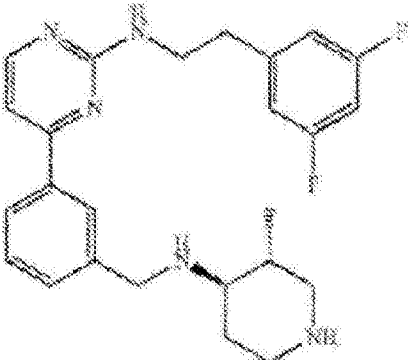


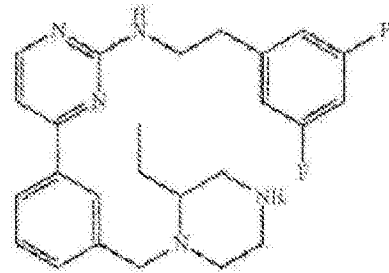
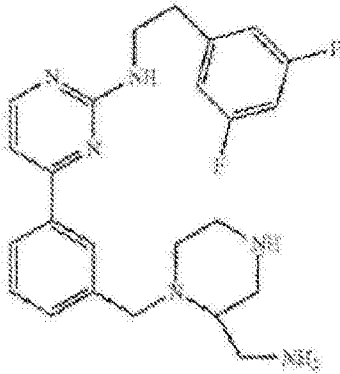
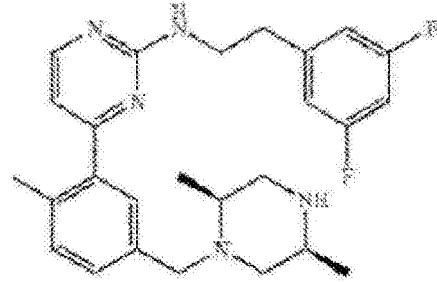
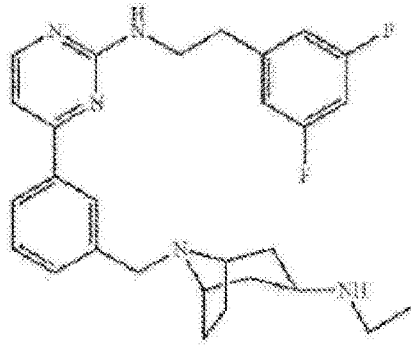
[0448]



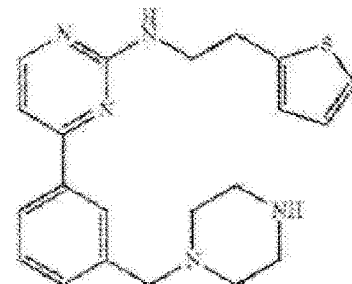
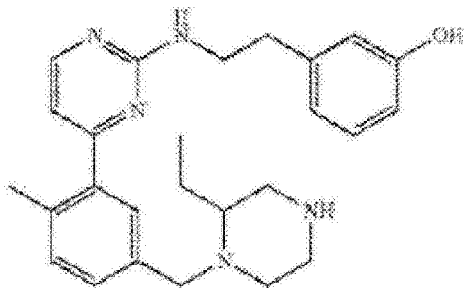
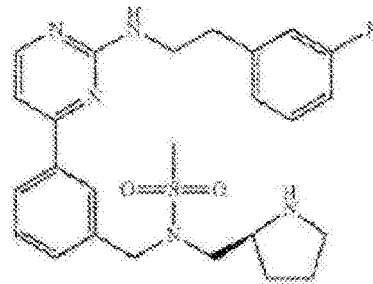
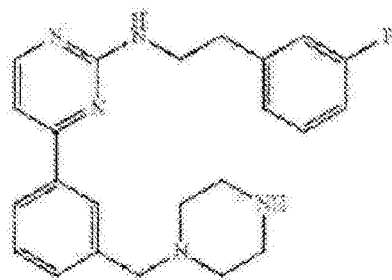
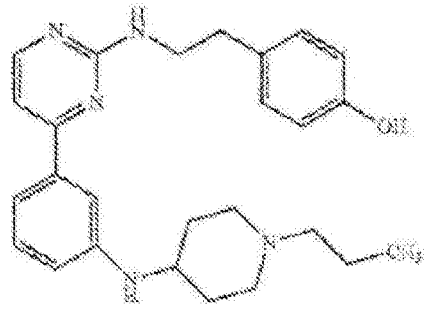
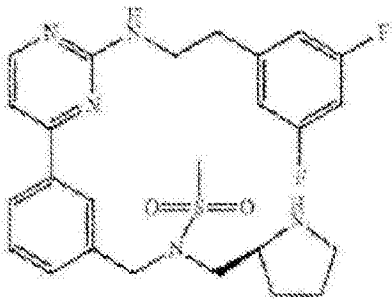


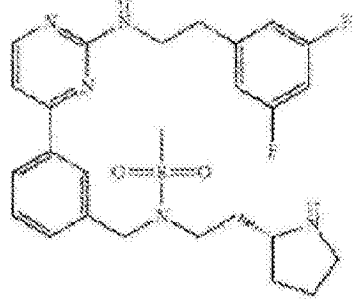
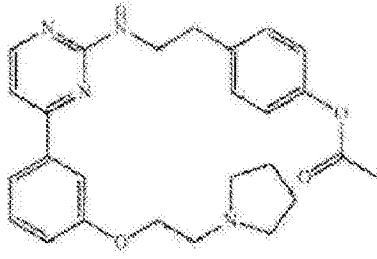
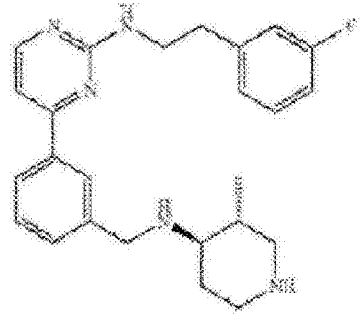
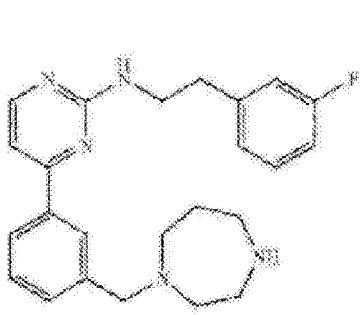
[0449]



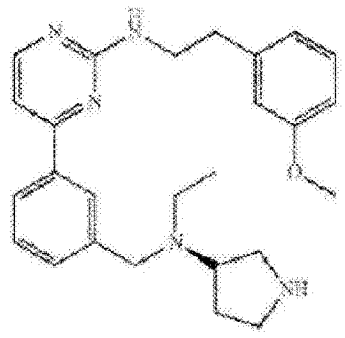
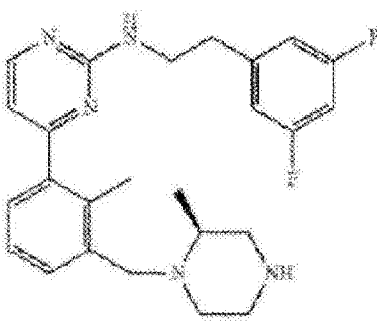
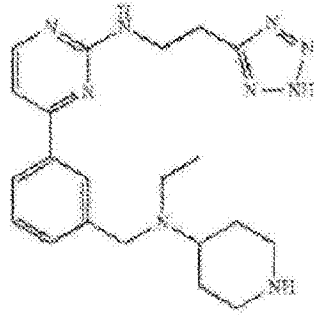
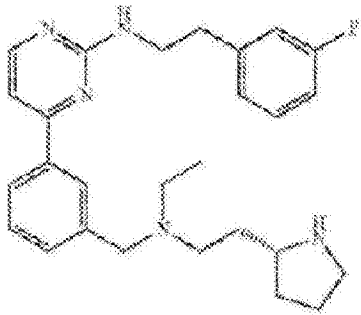
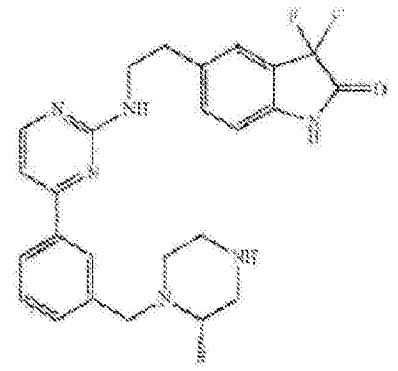
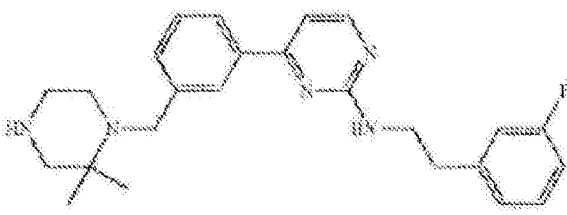


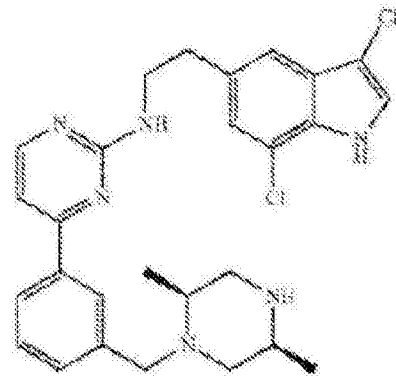
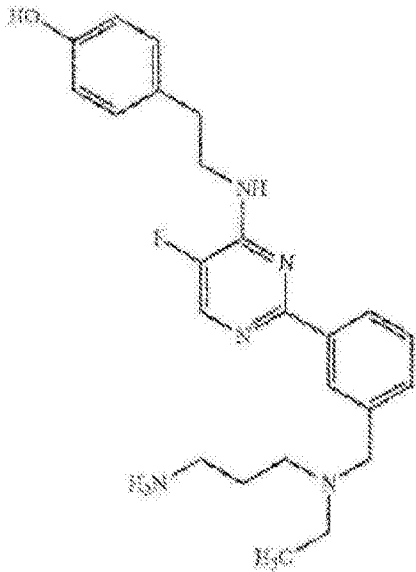
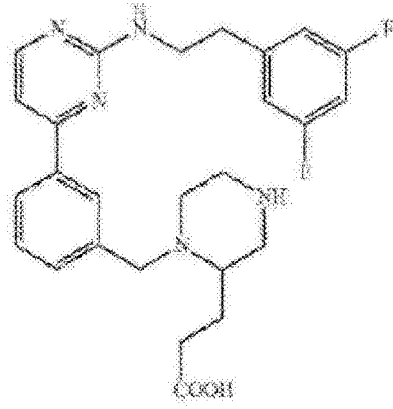
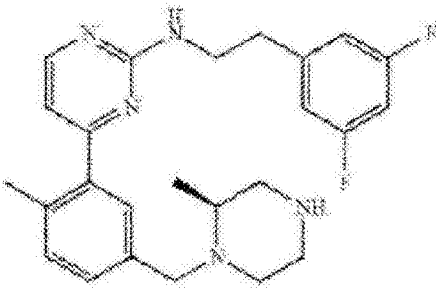
[0450]



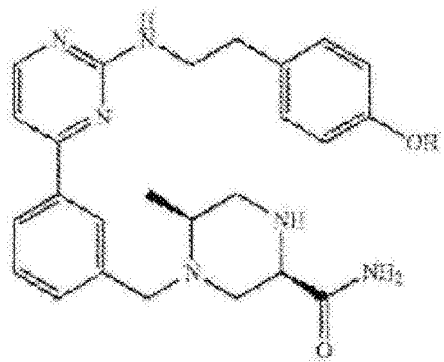
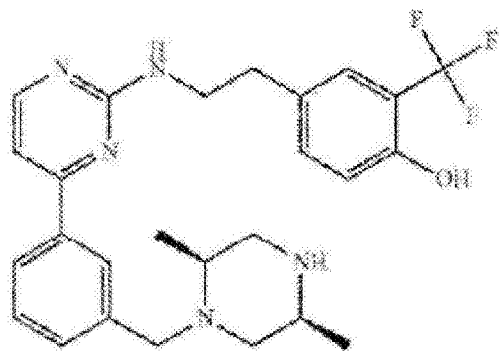
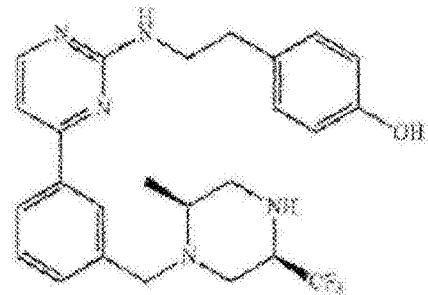
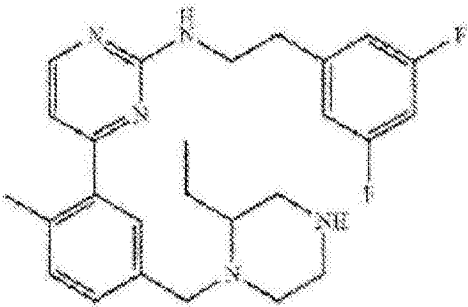


[0451]

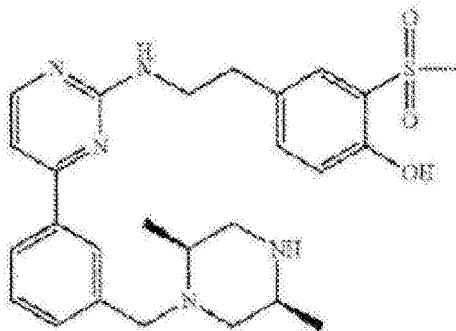
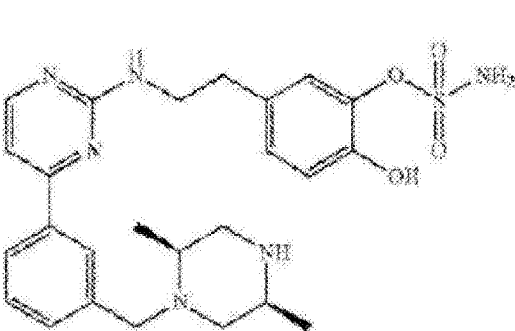
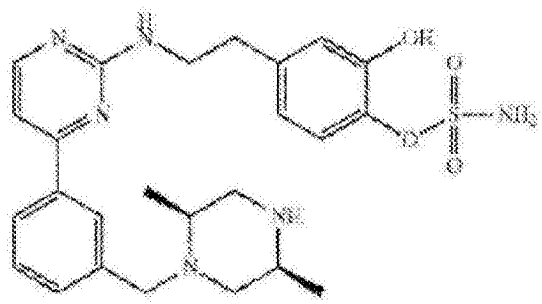
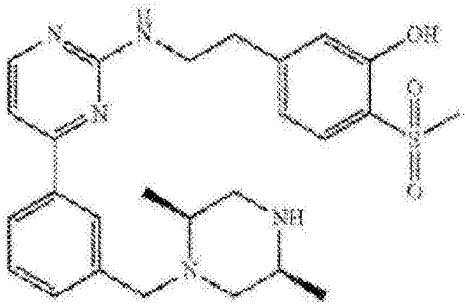
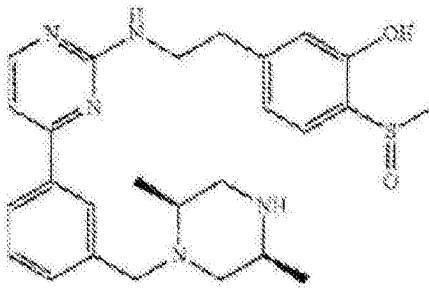
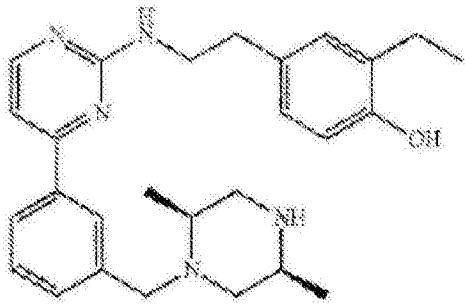
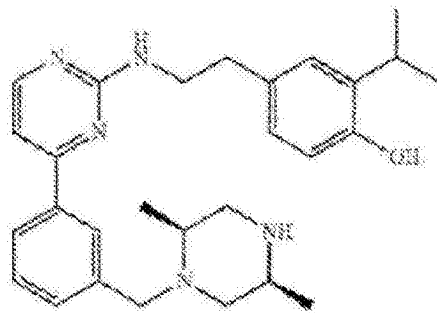
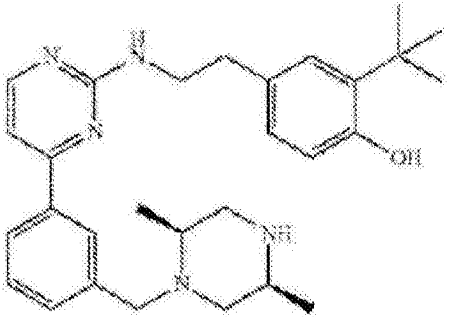
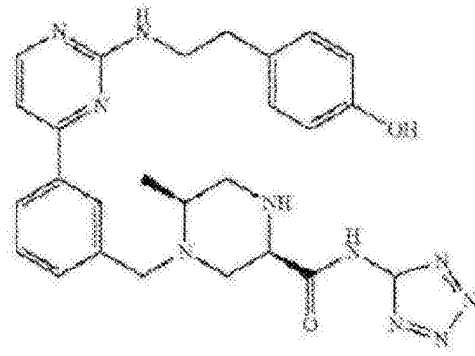
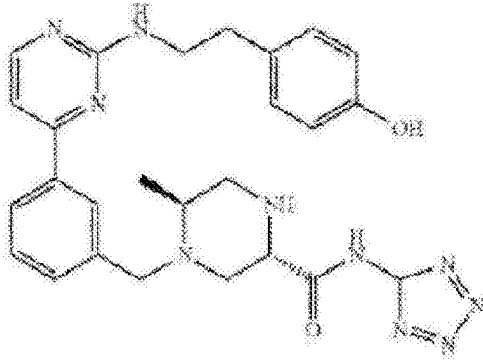




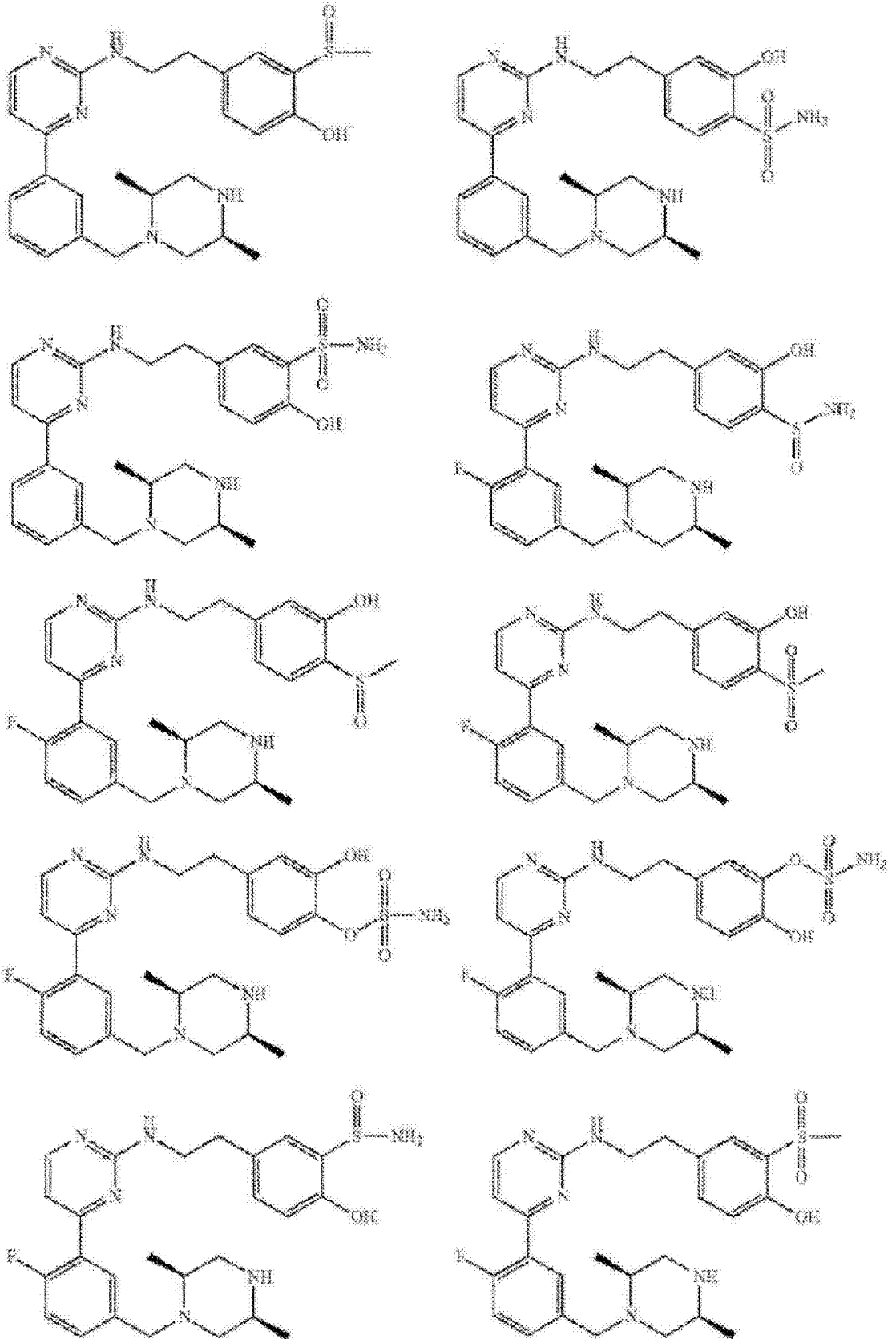
[0452]



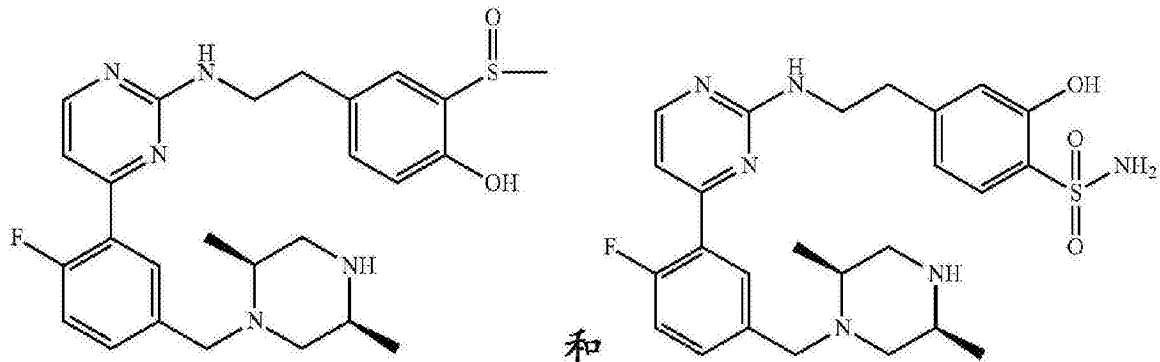
[0453]



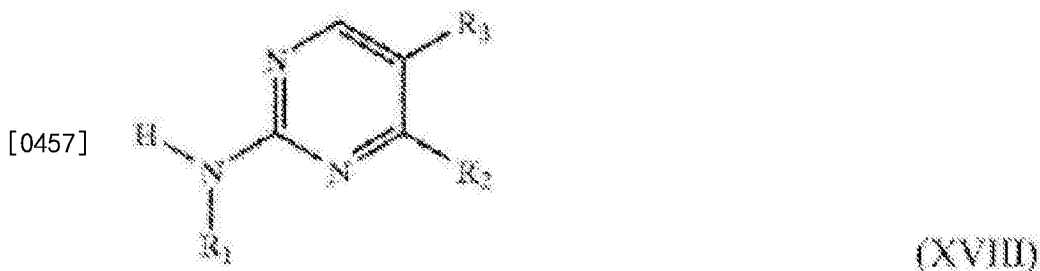
[0454]



[0455]

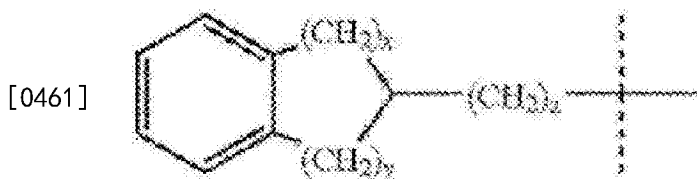


[0456] 在另一些实施方案中,小分子PKC- θ 抑制剂包括如例如由Cardozo等在美国公开No. 2005/0124640中所述的嘧啶衍生物,其通过引用整体并入本文。这种类型的代表性化合物由式(XVIII)表示:



[0458] 其中:

[0459] R_1 是 C_{1-8} 烷基、 C_{3-7} 环烷基、 C_{3-7} 环烷基- C_{1-8} 烷基、萘基、喹啉基、芳基- C_{1-8} 烷基或杂芳基- C_{1-8} 烷基,其中在每个 C_{1-8} 烷基中,亚甲基可以任选地被-NHC(O)-或-C(O)NH-替代,并且其中每个 C_{1-8} 烷基任选地被氧代基团或一个或更多个 C_{1-3} 烷基取代,其中 C_{1-8} 烷基的相同碳原子上的两个烷基取代基可以任选地结合以形成 C_{2-5} 亚烷基桥,并且其中所述芳基任选地在相邻碳原子上被 C_{3-6} 亚烷基桥基团取代,其中亚甲基任选地被氧、-S-、-S(O)-、-SO₂-或-N(R_6)-替代;

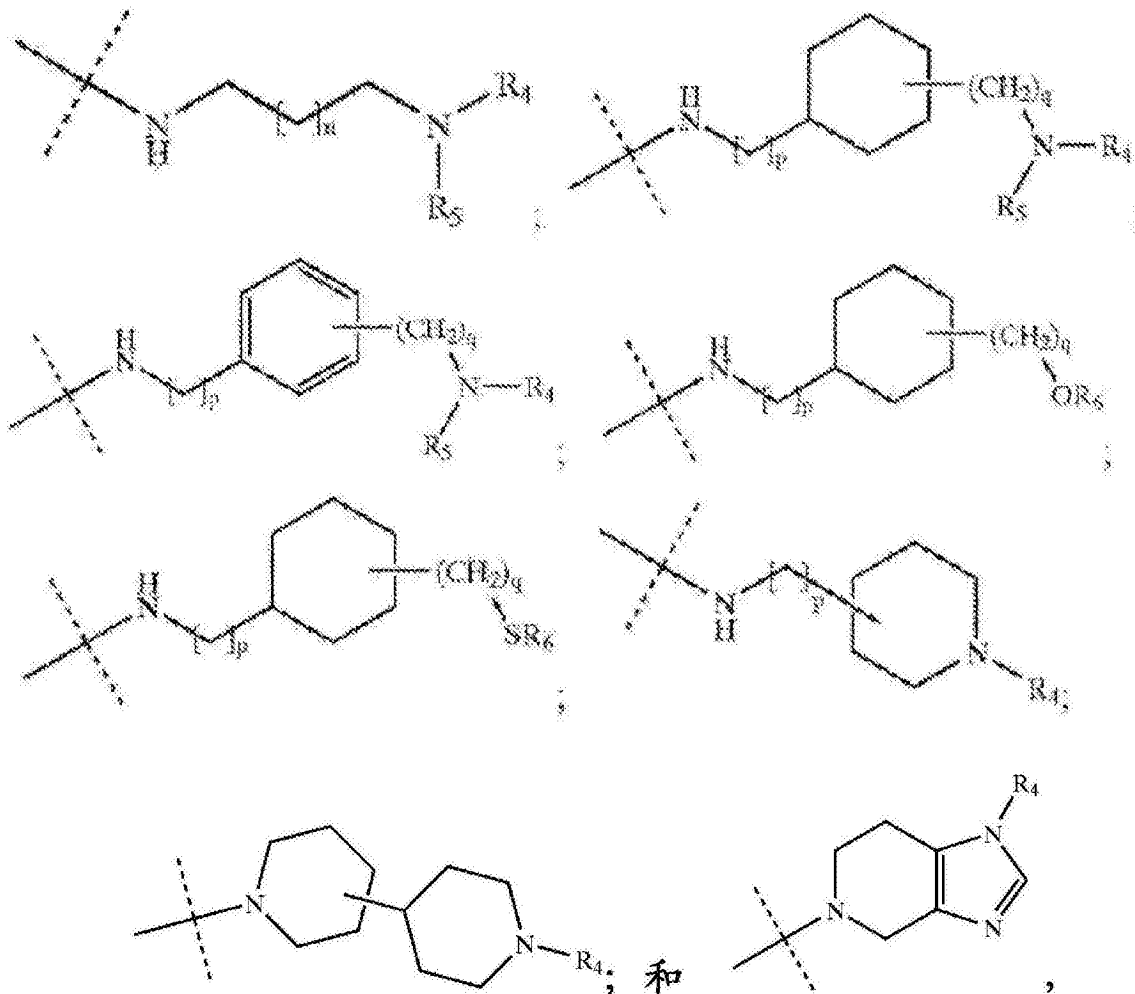
[0460] 或 R_1 具有下列结构:

[0462] 其中x和y独立地为0、1、2、3或4,条件是x+y为2至4,z是0、1或2,并且环中的一个或两个CH₂基团可任选地被-O-、-S-、-S(O)-、-SO₂-或-N(R_6)-替代;

[0463] 其中每个 R_1 基团任选地被一个或更多个以下基团取代: C_{1-6} 烷基、 C_{3-6} 环烷基、卤素、硝基、羟基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 烷硫基、芳基、芳基- C_{1-6} 芳基、芳氧基、芳硫基、氨基磺酰基、或任选地被一个或两个 C_{1-6} 烷基取代的氨基,其中每个芳基任选地被一个或更多个 C_{1-6} 烷基、卤素、硝基、羟基或任选地被一个或两个 C_{1-6} 烷基取代的氨基取代,并且其中在每个 C_{1-6} 烷基中,亚甲基可以任选地被-NHC(O)-或-C(O)NH-替代,并且其中每个 C_{1-6} 烷基任选地被一个或更多个卤素取代;

[0464] R_2 选自以下基团:

[0465]



[0466] 其中:

[0467] n是3至8的整数;

[0468] p是1至3的整数;

[0469] q是0至3的整数;

[0470] R₄和R₅各自独立地选自:氢、C₁₋₆烷基、芳基C₁₋₆烷基或脒基,其中每个芳基任选地被一个或多个C₁₋₆烷基、卤素、硝基、羟基或任选地被一个或两个C₁₋₆烷基取代的氨基取代,并且其中每个C₁₋₆烷基任选地被一个或多个卤素取代,并且其中所述脒基任选地被一至三个C₁₋₆烷基取代;

[0471] R₆是氢或C₁₋₆烷基;

[0472] 其中每个R₂基团任选地被一个或多个C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、CN、-OH、-NH₂或卤素取代;

[0473] R₃是卤素、氰基、硝基、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基羰基或氨基羰基,其中每个C₁₋₆烷基任选地被一个或多个卤素取代;

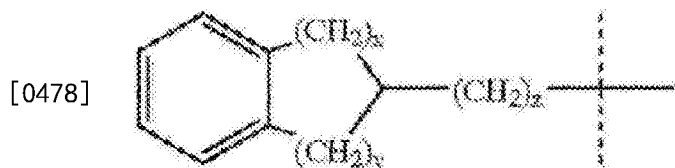
[0474] 或其互变异构体、可药用盐、溶剂合物或氨基保护的衍生物,

[0475] 在式(XVIII)的嘧啶衍生物化合物的一些实施方案中:

[0476] R₁是芳基-C₁₋₄烷基或杂芳基C₁₋₄烷基,其中在每个C₁₋₄烷基中,亚甲基可以任选地被-NHC(O)-或-C(O)NH-替代,并且其中每个C₁₋₄烷基任选地被氧代基团或一个或多个C₁₋₃

烷基取代,其中C₁₋₄烷基的相同碳原子上的两个烷基取代基可以任选地结合以形成C₂₋₅亚烷基桥,并且其中所述芳基任选地在相邻碳原子上被C₃₋₆亚烷基桥基团取代,其中亚甲基任选地被氧、硫或-N(R₆)-替代;

[0477] 或R₁具有下列结构:



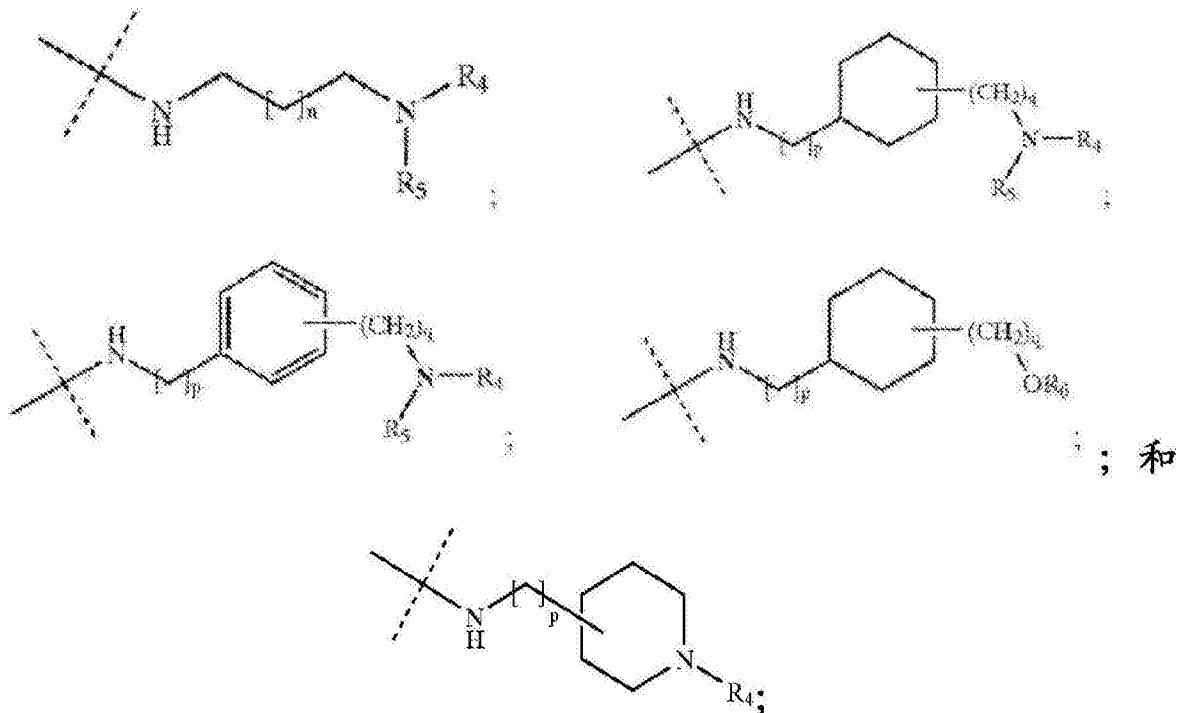
[0479] 其中x和y独立地为0、1、2或3,条件是x+y为2至3,并且z是0或1;

[0480] 其中“杂芳基”被定义为吡啶基、咪唑基、噻吩基、吡咯基、咪唑基或吡啶基;

[0481] 其中每个R₁基团任选地被一个或多个下列基团取代:C₁₋₆烷基、Cl、Br、F、硝基、羟基、CF₃、-OCF₃、-OCF₂H、-SCF₃、C₁₋₄烷氧基、C₁₋₄烷硫基、苯基、苄基、苯氧基、苯硫基、氨基磺酰基或任选地被一个或两个C₁₋₃烷基取代的氨基;

[0482] R₂选自下列基团:

[0483]



[0484] 其中:

[0485] n是5至7的整数;

[0486] p是1至2的整数;

[0487] q是1至2的整数;

[0488] R₄和R₅各自独立地选自氢、C₁₋₆烷基、芳基C₁₋₆烷基或脒基;

[0489] R₆是氢;

[0490] R₃是Br、Cl、F、氰基或硝基;

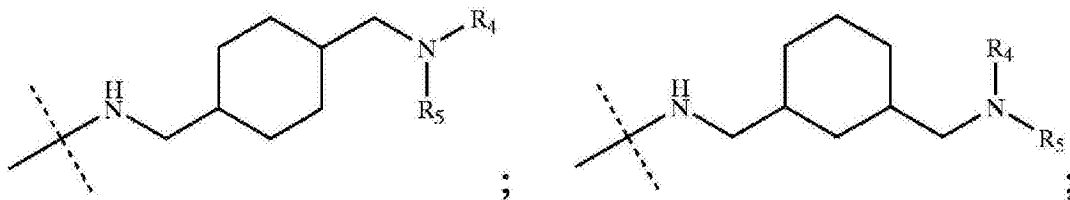
[0491] 或其互变异构体、可药用盐、溶剂合物或氨基保护的衍生物;

[0492] 在式(XVIII)的嘧啶衍生物化合物的另一些实施方案中:

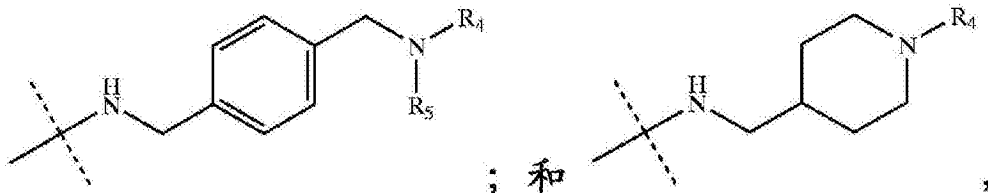
[0493] R₁是苯基-C₁₋₄烷基或萘基C₁₋₂烷基，

[0494] 其中每个R₁基团任选地被一个或多个下列基团取代：甲基、Cl、Br、F、硝基、羟基、CF₃、-OCF₃、-SCF₃、C₁₋₄烷氧基或C₁₋₄烷硫基；

[0495] R₂选自下列基团：



[0496]



[0497] 其中：

[0498] R₄和R₅各自独立地选自氢、C₁₋₃烷基或脞基；

[0499] R₃是Br、Cl、氰基或硝基；

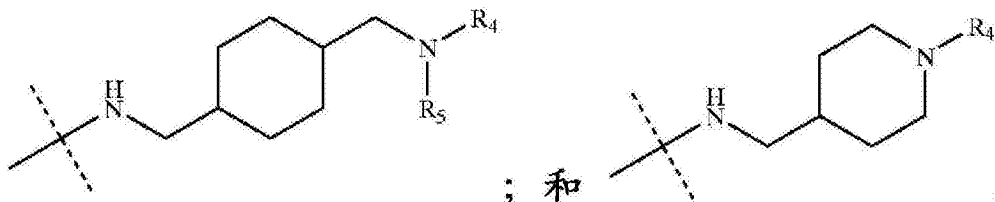
[0500] 或其互变异构体、可药用盐、溶剂合物或氨基保护的衍生物；

[0501] 在式(XVIII)的嘧啶衍生物化合物的又一些实施方案中：

[0502] R₁是苯基CH₂-

[0503] 其中所述苯基任选地被一个或多个下列基团取代：甲基、Cl、Br、F、硝基、羟基、CF₃、-OCF₃、-SCF₃、C₁₋₄烷氧基或C₁₋₄烷硫基；

[0504] R₂选自下列基团：



[0506] R₃是硝基；

[0507] R₄和R₅各自独立地选自氢、甲基或脞基；

[0508] 或其互变异构体、可药用盐、溶剂合物或氨基被保护的衍生物。

[0509] 式(XVIII)的嘧啶衍生物化合物的非限制性实例选自：

[0510] 4-([4-(氨基甲基)环己基]甲基)氨基)-2-[(2-氯苄基)氨基]嘧啶-5-羧酸乙酯；
 N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]-甲基}-5-硝基-N²-[(2R)-1,2,3,4-四氢萘-2-基]嘧啶-2,4-二胺；
 N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-5-硝基-N²-[(2S)-1,2,3,4-四氢萘-2-基]嘧啶-2,4-二胺；
 N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-5-硝基-N²-[(1R)-1,2,3,4-四氢萘-1-基]嘧啶-2,4-二胺；
 N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-5-硝基-N²-[(1S)-1,2,3,4-四氢萘-1-基]嘧啶-2,4-二胺；
 N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-N²-[2-(4-氯苄基)乙基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺；
 N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-N²-[2-(2-甲基苄基)乙基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺；
 N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-N²-[2-(3-甲基苄基)乙基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺；

N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -[2-(4-甲基苯基)甲基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -[2-(2-氟苄基)乙基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]-甲基}- N^2 -[2-(3-氟苄基)乙基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -[2-(4-氟苄基)乙基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^2 -(2-氨基苄基)- N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]间-乙基}- N^2 -(3,5-二甲氧基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -[3,5-双(三氟甲基)苄基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;3-[(2-[(2-氯苄基)氨基]-5-硝基嘧啶-4-基)氨基]甲基]苯基]甲烷胺;2-({[4-({[4-(氨基甲基)环己基]甲基)氨基]-5-硝基嘧啶-2-基]氨基}甲基)苯酚; N^2 -(5-氨基-2-氯苄基)- N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;4-({[4-(氨基甲基)环己基]甲基)氨基)-2-[(2-氯苄基)氨基]嘧啶-5-甲酰胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(2-氯苄基)-5-氟嘧啶-2,4-二胺;3-({[4-({[4-(氨基甲基)环己基]甲基)氨基]-5-硝基嘧啶-2-基]氨基}甲基)-N-[2-(2-甲基苄基)乙基]苯甲酰胺;(1S,2R)-2-({[4-({[4-(氨基甲基)环己基]甲基)氨基]-5-硝基嘧啶-2-基]氨基}甲基)环己醇;(1R,2R)-2-({[4-({[4-(氨基甲基)环己基]甲基)氨基]-5-硝基嘧啶-2-基]氨基}甲基)环己醇;甲基4-({[4-(氨基甲基)环己基]甲基)氨基)-2-[(2-氯苄基)氨基]嘧啶-5-羧酸酯;4-{{[4-({[4-(氨基甲基)环己基]甲基)氨基]-5-硝基嘧啶-2-基]氨基}-N-[2-(2-甲基苄基)乙基]丁酰胺;5-{{[4-({[4-(氨基甲基)环己基]甲基)氨基]-5-硝基嘧啶-2-基]氨基}-N-[2-(2-甲基苄基)乙基]戊酰胺;6-{{[4-({[4-(氨基甲基)环己基]甲基)氨基]-5-硝基嘧啶-2-基]氨基}-N-[2-(2-甲基苄基)乙基]己酰胺;(1R,3R)-3-({[4-({[4-(氨基甲基)环己基]甲基)氨基]-5-硝基嘧啶-2-基]氨基}甲基)-4,4-二甲基环己醇; N^4 -{(4-顺式-[(二甲氨基)甲基]环己基)甲基)- N^2 -(1-萘基甲基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^2 -[2-(甲硫基)苄基]-5-硝基- N^4 -(哌啶-4-基甲基)嘧啶-2,4-二胺;5-硝基- N^4 -(哌啶-4-基甲基)- N^2 -{2-[(三氟甲基)硫基]苄基}嘧啶-2,4-二胺; N^2 -(1-萘基甲基)-5-硝基- N^4 -(哌啶-4-基甲基)嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{(4-[(二甲氨基)甲基]环己基)甲基)- N^2 -[2-(甲硫基)苄基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{(4-[(二甲氨基)甲基]环己基)甲基)-5-硝基- N^2 -{2-[(三氟甲基)硫基]苄基}嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{(4-[(二甲氨基)甲基]环己基)甲基)- N^2 -(1-萘基甲基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{4-[(二甲氨基)甲基]苄基}- N^2 -[2-(甲硫基)苄基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{4-[(二甲氨基)甲基]苄基}-5-硝基- N^2 -{2-[(三氟甲基)硫基]苄基}嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{4-[(二甲氨基)甲基]苄基}- N^2 -(1-萘基甲基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -[(1-甲基哌啶-4-基)甲基]- N^2 -[2-(甲硫基)苄基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -[(1-甲基哌啶-4-基)甲基]-5-硝基- N^2 -{2-[(三氟甲基)硫基]苄基}嘧啶-2,4-二胺; N^4 -[(1-甲基哌啶-4-基)甲基]- N^2 -(1-萘基甲基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^2 -(2-氯苄基)- N^4 -[(1-间乙基哌啶-4-基)甲基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^2 -(2-甲氧基苄基)- N^4 -[(1-甲基哌啶-4-基)甲基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(2-甲氧基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-5-硝基- N^2 -[2-(三氟甲基)苄基]嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(-2,4-二氯苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(3-甲氧基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -[4-氟-2-(三氟甲基)苄基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(3-甲基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-

(氨基甲基)环己基]甲基)-5-硝基-N²-(吡啶-2-基甲基)嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)-环己基]甲基)-N²-(3-氯苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(4-氯苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(4-溴苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(2,4-二甲氧基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N.s-up.2-[2-氯-5-(三氟甲基)苄基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(2,5-二氯苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-5-硝基-N²-[2-(三氟甲氧基)苄基]嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(2-氯-6-甲基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(2,3-二氯苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]-甲基)-N²-(2-呋喃基甲基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-5-硝基-N²-(噻吩-2-基甲基)嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(2-氯苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-(6-氨基己基)-N²-(2-氯苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N-[4-(氨基甲基)苄基]-N²-(2-氯苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-(7-氨基庚基)-N²-(2-氯苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[3-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(2-氯苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(1-甲基-1-苯乙基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;4-(4,4'-联吡啶-1-基)-N-(2-氯苄基)-5-硝基吡啶-2-胺;N²-(2-氯苄基)-N⁴-({4-[(二甲氨基)甲基]环己基}甲基)-5-硝基嘧啶(N2-(2-chlorobenzyl)-N4-({4-[(dimethylamino)methyl]cyclohexyl}methyl)-5-nitropyri);N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]间乙基)-N²-(2,5-二氟苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-[4-(二氟甲氧基)苄基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(2-乙氧基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-5-硝基-N²-[(1S)-1-苯乙基]嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N.s-up.2-(2-甲基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(2-氟苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(3-氯-2-氟苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-5-硝基-N²-(4-戊基苄基)嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(4-丁氧基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(2,3-二甲氧基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)-环己基]甲基)-N²-(2,5-二甲氧基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N²-(2-氯苄基)-N⁴-[7-(二甲氨基)庚基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(1,1'-联苯-2-基甲基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(4-氟苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(2,4-二氟苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(3-氟-4-甲基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(2,3-二氟苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-5-溴-N²-(2-氯苄基)嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]-甲基)-N²-(2,6-二甲氧基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(2,6-二氟苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-[2-氟-3-(三氟甲基)苄基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(4-氯-2-氟苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-5-硝基-N²-(1-苯基环丙基)嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-

N^2 -[1-(2-氯苄基)-1-甲基乙基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(2,3-二氢-1-苯并呋喃-5-基甲基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -[(1,5-二甲基-1H-吡咯-2-基)甲基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(2-溴苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(2,3-二甲基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(2,4-二甲基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(2,5-二甲基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; $2N^4$ -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -[2-氟-5-(三氟甲基)苄基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -[2-(甲硫基)苄基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-5-硝基- N^2 -{2-[(三氟甲基)硫基]-苄基}嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(3-氟苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(6-氯-2-氟-3-甲基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(2-氯-6-氟-3-甲基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -2-萘基-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(1-萘基甲基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -[2-氟-4-(三氟甲基)苄基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(4-氯-2-甲基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(5-氯-2-甲基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(3-氯-2-甲基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]-甲基}- N^2 -[5-氟-2-(三氟甲基)苄基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(5-氯-2-氟苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(2,3-二氟-4-甲基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(5-氟-2-甲基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -1-萘基-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;{4-反式-[(2-[(2-氯苄基)氨基]-5-硝基嘧啶-4-基)氨基]甲基}环己基]甲基]环己基]甲基]-5-溴- N^2 -(2,5-二氯苄基)嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-5-溴- N^2 -(2,4-二氯苄基)嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-5-溴- N^2 -(2-溴苄基)嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-*N*.su-*p*.2-(环己基甲基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(2-萘基甲基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-5-溴- N^2 -[2-(三氟甲氧基)苄基]嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-5-溴- N^2 -[2-(三氟甲基)苄基]嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -[2-(二氟甲氧基)苄基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -[3-(二氟甲氧基)苄基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(2-氯-4-氟苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(2-氯-3,6-二氟苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-5-硝基- N^2 -(2,3,5-三氟苄基)嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-5-硝基- N^2 -(2,3,4,5-四氟苄基)嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-5-硝基- N^2 -[(1*R*)-1-苯乙基]嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]间乙基}- N^2 -2,3-二氢-1*H*-茛-2-基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -[(1*S*)-2,3-二氢-1*H*-茛-1-基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -[(1*R*)-2,3-二氢-1*H*-茛-1-基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环

己基}甲基)-N²-(4-氯-1-萘基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-N²-(4-甲氧基-2-萘基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-5-硝基-N²-喹啉-6-基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-反式-(氨基甲基)环己基]甲基}-N²-(2,5-二氯苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-反式-(氨基甲基)环己基]甲基}-N²-(2,3-二氯苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-N²-[2-(2-氯苄基)乙基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-N²-[2-(3-氯苄基)乙基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-N²-(2-氯-6-苯氧基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-5-溴-N²-2-萘基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-5-溴-N²-(1-萘基甲基)嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-5-硝基-N²-(吡啶-3-基甲基)嘧啶-2,4-二胺;4-({[4-(氨基甲基)环己基]甲基}氨基)-2-[(2-氯苄基)氨基]嘧啶-5-甲脒;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-N²-[4-(二甲氨基)苄基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-反式-(氨基甲基)环己基]甲基}-N²-(2-溴苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-(7-氨基庚基)-N²-(2-溴苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-(7-氨基庚基)-N²-(2,5-二氯苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N-({4-[(2-[(2-氯苄基)氨基]-5-硝基嘧啶-4-基}氨基)甲基]环己基}甲基)胍;N²-(3-氨基苄基)-M-{-[4(氨基甲基)环己基]甲基}-5-硝基-嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-5-硝基-N²-(2-硝基苄基)嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-N²-[2-(2-溴苄基)乙基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-N²-(2-溴苄基)-5-氯嘧啶-2,4-二胺;(4-[(2-[(2-(1H-吡啶-3-基)乙基]氨基)-5-硝基嘧啶)-4-基]氨基)甲基]环己基)氯化甲烷铵;N-({3-[(2-[(2-氯苄基)-氨基]-5-硝基嘧啶-4-基}氨基)甲基]环己基}甲基)胍;3-({[4-({[4-(氨基甲基)环己基]甲基}氨基)-5-硝基嘧啶-2-基]氨基)甲基}苯酚;(4-[(2-[(2-(1H-咪唑-4-基)乙基]氨基)-5-硝基嘧啶-4-基]氨基)甲基]环己基)-氯化甲烷铵;N²-(2-氯苄基)-M-({4-顺式-[(二甲氨基)甲基]环己基}甲基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-5-氯-N²-(2-氯苄基)嘧啶-2,4-二胺;N²-(2-氯苄基)-5-硝基-N⁴-(哌啶-4-基甲基)嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-5-硝基-N²-(2-苄乙基)嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-5-硝基-N²-(3-苄丙基)嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-5-硝基-N²-(4-苄丁基)嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-5-硝基-N²-(2-苄丙基)嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-N²-[2-(4-甲氧基苄基)乙基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-N²-[2-(3-甲氧基苄基)乙基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-N²-[2-(2-甲氧基苄基)乙基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;4-[(2-[(2-氯苄基)氨基]-5-硝基嘧啶-4-基}氨基)甲基]哌啶-1-甲脒;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-N²-(3,5-二氯苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-(5-氨基戊基)-N²-(2-氯苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;2-(苄基氨基)-4-(1,4,6,7-四氢-咪唑并[4,5-c]吡啶-5-基)-5-三氟甲基嘧啶;2-(4-氯苄基氨基)-4-(1,4,6,7-四氢咪唑并[4,5-c]吡啶-5-基)-5-硝基嘧啶;2-(2-氯苄基氨基)-4-(1,4,6,7-四氢咪唑并[4,5-c]吡啶-5-基)-5-硝基嘧啶;2-(苄基氨基)-4-(1,4,6,7-四氢咪唑并[4,5-c]吡啶-5-基)-5-硝基嘧啶;或N⁴-{[反式-4-(氨基甲基)环己基]甲基}-5-硝基-N²-[2-(三氟甲氧基)苄基]嘧啶-2,4-二胺。

[0511] 在一些实施方案中,式(XVIII)的嘧啶衍生物化合物选自:

[0512] N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-5-硝基- N^2 -[(2R)-1,2,3,4-四氢萘-2-基]嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -[2-(4-氯苄基)乙基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -[2-(3-甲基苄基)乙基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -[2-(4-甲基苄基)乙基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -[2-(3-氟苄基)乙基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -[2-(4-氟苄基)乙基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;(1R,3R)-3-({[4-({[4-(氨基甲基)环己基]甲基)氨基]-5-硝基嘧啶-2-基]氨基}甲基)-4,4-二甲苯环己醇; N^4 -({4-顺式-[(二甲氨基)甲基]环己基}甲基)- N^2 -(1-萘基甲基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^2 -[2-(甲硫基)苄基]-5-硝基- N^4 -(哌啶-4-基甲基)嘧啶-2,4-二胺;5-硝基- N^4 -(哌啶-4-基甲基)- N^2 -{2-[(三氟甲基)硫基]苄基}嘧啶-2,4-二胺; N^2 -(1-萘基甲基)-5-硝基- N^4 -(哌啶-4-基甲基)嘧啶-2,4-二胺; N^4 -({4-[[(二甲基氨基)甲基]环己基]甲基}- N^2 -[2-(甲硫基)苄基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -({4-[[(二甲基氨基)甲基]环己基]甲基}-5-硝基- N^2 -{2-[(三氟甲基)硫基]苄基}嘧啶-2,4-二胺; N^4 -({4-[[(二甲基氨基)甲基]环己基]甲基}- N^2 -(1-萘基甲基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{4-[[(二甲基氨基)甲基]苄基]- N^2 -[2-(甲硫基)苄基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{4-[[(二甲氨基)甲基]苄基]-5-硝基- N^2 -{2-[(三氟甲基)硫基]苄基}嘧啶-2,4-二胺; N^4 -[(1-甲基哌啶-4-基)甲基]- N^2 -[2-(甲硫基)苄基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -[(1-甲基哌啶-4-基)甲基]-5-硝基- N^2 -{2-[(三氟甲基)硫基]苄基}嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(2-甲氧基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-5-硝基- N^2 -[2-(三氟甲基)苄基]嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(2,4-二氯苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -[4-氟-2-(三氟甲基)苄基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(3-甲基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(3-氯苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -[2-氯-5-(三氟甲基)苄基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(2,5-二氯苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-5-硝基- N^2 -[2-(三氟甲氧基)苄基]嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(2-氯-6-甲基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(2,3-二氯苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[3-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(2-氯苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^2 -(2-氯苄基)- N^4 -({4-[[(二甲氨基)甲基]环己基]甲基}-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(2,5-二氟苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(2-乙氧基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(2-甲基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(2-氟苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(3-氯-2-氟苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(1,1'-联苯-2-基甲基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(2,4-二氟苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(-2,3-二氟苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -(2,6-二氟苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}- N^2 -[2-氟-3-(三氟甲基)苄基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺; N^4 -{[4-(氨基

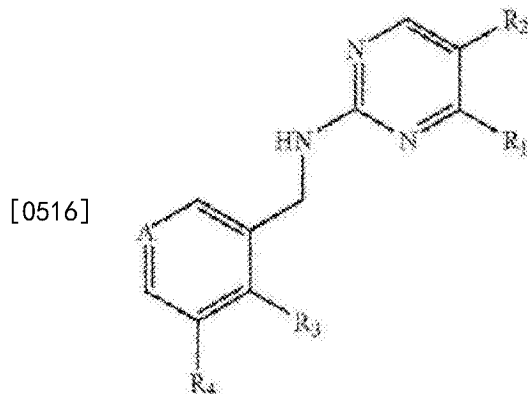
甲基)环己基]甲基)-N²-(4-氯-2-氟苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(2-溴苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(2,3-二甲基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-[2-(甲硫基)苄基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-5-硝基-N²-{2-[(三氟甲基)硫基]苄基}嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(3-氟苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(6-氯-2-氟-3-甲基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(2-氯-6-氟-3-甲基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-2-萘基-5-硝基-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(1-萘基甲基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(4-氯-2-甲基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(5-氯-2-甲基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(3-氯-2-甲基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-[5-氟-2-(三氟甲基)苄基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(5-氯-2-氟苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(2,3-二氟-4-甲基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(5-氟-2-甲基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-5-溴-N²-(2,5-二氯苄基)嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-5-溴-N²-(2-溴苄基)嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(环己基甲基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-5-溴-N²-[2-(三氟甲基)苄基]嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-[2-(二氟甲氧基)苄基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(2-氯-4-氟苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(2-氯-3,6-二氟苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-5-硝基-N²-(2,3,5-三氟苄基)嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-2,3-二氢-1H-茛-2-基-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(4-氯-1-萘基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(4-甲氧基-2-萘基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-5-硝基-N²-喹啉-6-基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-反式-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(2,3-二氯苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-[2-(2-氯苄基)乙基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-[2-(3-氯苄基)乙基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-5-溴-N²-2-萘基嘧啶-2,4-二胺;4-({[4-(氨基甲基)环己基]甲基}氨基)-2-[(2-氯苄基)氨基]嘧啶-5-甲腈;N⁴-{[4-反式-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(2-溴苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-(7-氨基庚基)-N²-(2-溴苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-(7-氨基庚基)-N²-(2,5-二氯苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N-({4-[(2-[(2-氯苄基)氨基]-5-硝基嘧啶-4-基)氨基]甲基}环己基)甲基)胍;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-5-硝基-N²-(2-硝基苄基)嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-[2-(2-溴苄基)乙基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基)-N²-(2-溴苄基)-5-氯嘧啶-2,4-二胺;N-({3-[(2-[(2-氯苄基)氨基]-5-硝基吡啶-4-基)氨基]甲基}环己基)甲基)胍 3-({[4-({[4-(氨基甲基)环己基]甲基}氨基)-5-硝基嘧啶-2-基]氨基}甲基)苯酚;N²-(2-氯苄基)-N⁴-({-4-顺式-[(二甲氨基)甲基]环己基}甲基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N²-(2-氯

苄基)-5-硝基-N⁴-(哌啶-4-基甲基)嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-5-硝基-N²-(2-苄乙基)嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-5-硝基-N²-(4-苯丁基)嘧啶-2,4-二胺;或N⁴-{[反式-4-(氨基甲基)环己基]甲基}-5-硝基-N²-[2-(三氟甲氧基)-苄基]嘧啶-2,4-二胺。

[0513] 在另一些实施方案中,式(XVIII)的嘧啶衍生物化合物选自:

[0514] N⁴-({4-[(二甲氨基)甲基]环己基}甲基)-N²-(1-萘基甲基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N²-[2-(甲硫基)苄基]-5-硝基-N⁴-(哌啶-4-基甲基)嘧啶-2,4-二胺;5-硝基-N⁴-(哌啶-4-基甲基)-N²-{2-[(三氟甲基)硫基]苄基}嘧啶-2,4-二胺;N²-(1-萘基甲基)-5-硝基-N⁴-(哌啶-4-基甲基)嘧啶-2,4-二胺;N⁴-({4-[(二甲氨基)甲基]环己基}甲基)-N²-[2-(甲硫基)苄基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-({4-[(二甲氨基)甲基]环己基}甲基)-5-硝基-N²-{2-[(三氟甲基)硫基]苄基}嘧啶-2,4-二胺;N⁴-({4-[(二甲氨基)甲基]环己基}甲基)-N²-(1-萘基甲基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{4-[(二甲氨基)甲基]苄基}-N²-[2-(甲硫基)苄基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{4-[(二甲氨基)甲基]苄基}-5-硝基-N²-{2-[(三氟甲基)硫基]苄基}嘧啶-2,4-二胺;N⁴-[(1-甲基哌啶-4-基)甲基]-N²-[2-(甲硫基)苄基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-[(1-甲基哌啶-4-基)甲基]-5-硝基-N²-{2-[(三氟甲基)硫基]苄基}嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-N²-(2-甲氧基苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-5-硝基-N²-[2-(三氟甲氧基)苄基]嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]-甲基}-N²-(2,3-二氯苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[3-(氨基甲基)环己基]甲基}-N²-(2-氯苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N²-(2-氯苄基)-N⁴-({4-[(二甲氨基)甲基]环己基}甲基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-N²-(2-溴苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-N²-[2-(甲硫基)苄基]-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-5-硝基-N²-{2-[(三氟甲基)硫基]苄基}嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-N²-(1-萘基甲基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-N²-(2,3-二氯苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N⁴-{[4-(氨基甲基)环己基]甲基}-N²-(2-溴苄基)-5-硝基嘧啶-2,4-二胺;N²-(2-氯苄基)-5-硝基-N⁴-(哌啶-4-基甲基)嘧啶-2,4-二胺;或N⁴-{[反式-4-(氨基甲基)环己基]甲基}-5-硝基-N²-[2-(三氟甲氧基)-苄基]嘧啶-2,4-二胺。

[0515] 替选的PKC-θ抑制剂嘧啶衍生物包括由Barbosa等在美国公开No.2010/0318929中所述的化合物,其通过引用整体并入本文。这些化合物由式(XIX)表示:

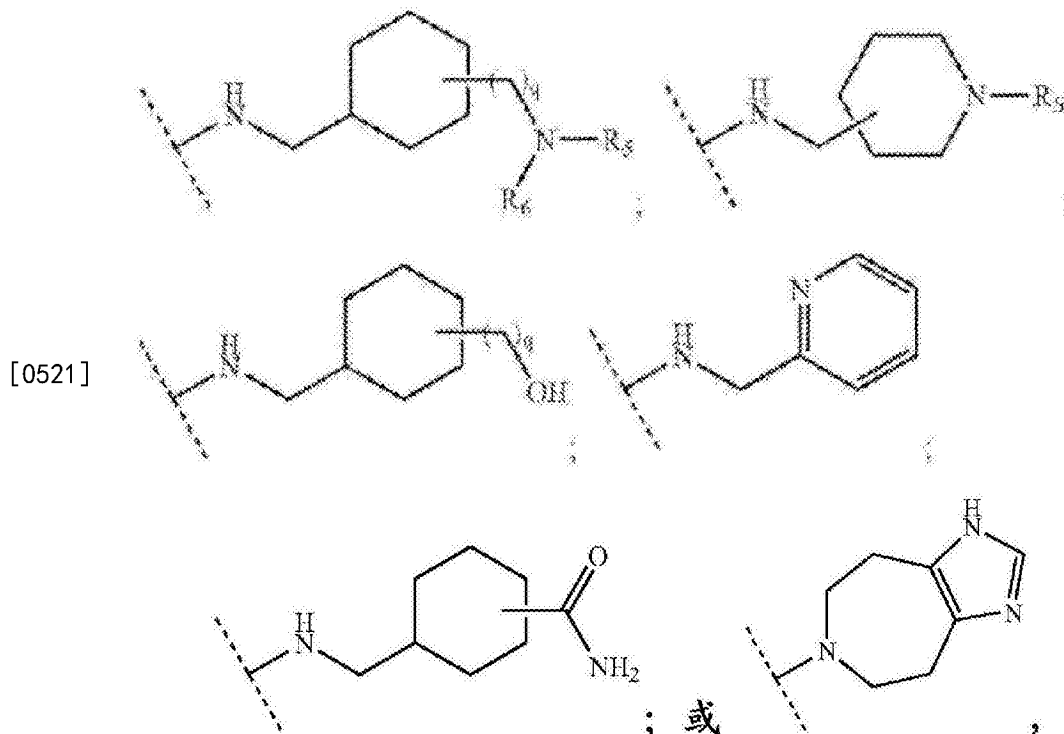


(XIX)

[0517] R_i选自下列组:

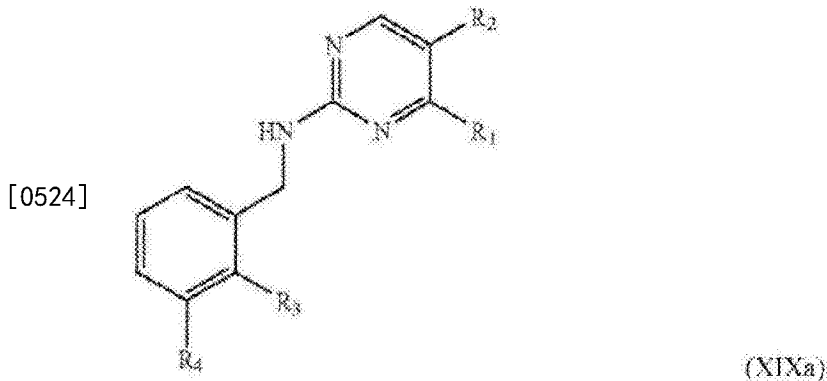
元环,其中所述亚甲基之一任选地被氧替代,(E)任选地被氨基、C₁₋₃烷基氨基或二-(C₁₋₃烷基)氨基取代的C₆炔基;并且A独立地选自碳或氮;或其互变异构体、可药用盐、溶剂合物或氨基保护的衍生物。

[0520] 在此类型的示例性实例中:R₁选自下列基团:



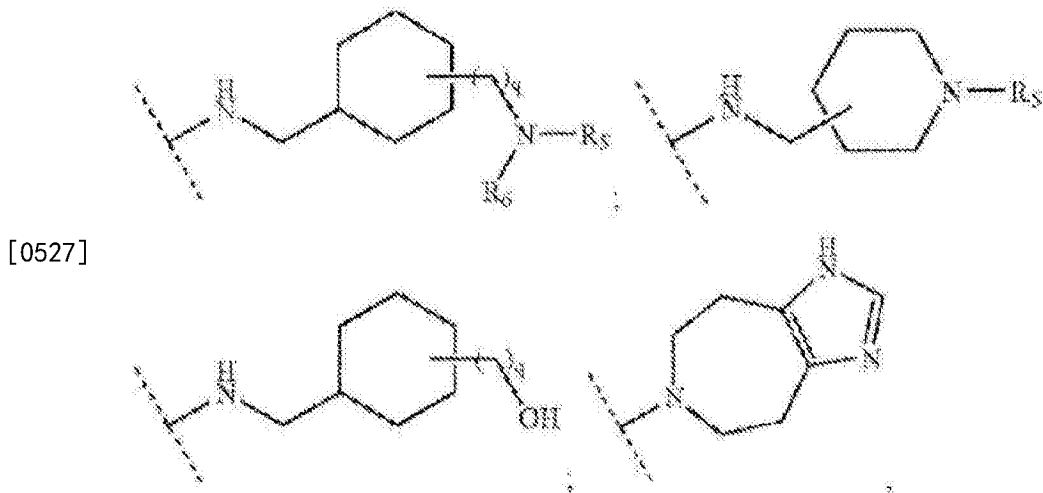
[0522] 其中:q是0或1,R₅、R₆各自独立地选自:(A)氢,(B)或者其中R₅和R₆一起构成亚甲基桥,该亚甲基桥连同它们之间的氮原子形成四至六元环,其中所述亚甲基之一任选地被氮原子替代,并且所述环任选和独立地被一个或多个下列基团取代:(iv)C₁₋₆烷基(v)COR₇,其中R₇是C₁₋₆烷氧基,(C)C₁₋₆烷基羰基,(D)C₁₋₆烷基磺酰基;R₂选自下列基团:(A)氰基,或(B)硝基;R₃选自下列基团:(A)C₁₋₃烷基,(B)C₁₋₃烷氧基,其任选地被氟取代,(C)卤素;R₄选自下列基团:(A)芳基,其被一个或多个下列基团取代:(i)C₁₋₃烷基,其被羟基或NR₂₀R₂₁取代,其中R₂₀和R₂₁各自独立地选自下列基团:(f)氢,(g)C₁₋₃烷基,其任选地被羟基或CONH₂取代,(h)或者其中R₂₀和R₂₁构成亚甲基桥,该亚甲基桥连同它们之间的氮原子形成五至六元环,(ii)CONH₂(iii)SO₂NH₂, (B)3-吡啶基,其任选地被C₁₋₃烷基取代,其中每个烷基任选地被氨基取代,(C)-NR₂₂R₂₃,其中R₂₂和R₂₃构成亚甲基桥,该亚甲基桥连同它们之间的氮原子形成五至六元环,其中所述亚甲基之一被C₁₋₃烷基取代,并且其中每个C₁₋₃烷基任选地被OH或NR₂₀R₂₁取代,其中R₂₀和R₂₁如前面所定义,(D)-CONR₂₄R₂₅,其中R₂₄和R₂₅各自独立地选自:(i)C₁₋₃烷基,其被C₁₋₃烷基氨基取代;并且A独立地选自碳或氮;或其互变异构体、可药用盐、溶剂合物或氨基保护的衍生物。

[0523] 在另一些示例性实例中,式(XIX)的化合物由式(XIXa)表示:

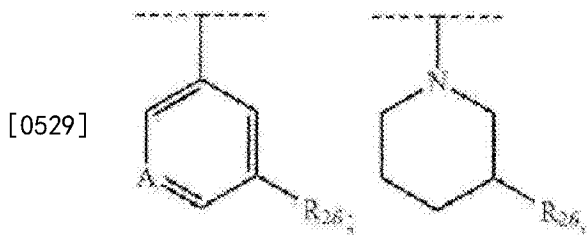


[0525] 其中：

[0526] R₁选自下列基团：



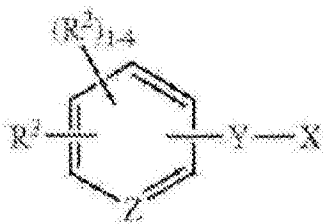
[0528] 其中：q是0或1，R₅、R₆各自独立地选自：(A)氢、(B)C₁₋₆烷基羰基、(C)C₁₋₆烷基磺酰基；R₂选自下列基团：(A)氰基或(B)硝基；R₃选自下列基团：(A)CH₃、(B)OCF₃、(C)Cl；R₄选自下列基团：



[0530] 其中：R₂₆选自下列基团：(A)C₁₋₃烷基，其被羟基或NR₂₇R₂₈取代，其中R₂₇和R₂₈各自独立地选自下列基团：(i)氢，(ii)C₁₋₃烷基，其任选地被羟基或CONH₂取代，(B)CONH₂(C)SO₂NH₂；并且A是碳或氮；或其互变异构体、可药用盐、溶剂合物或氨基保护的衍生物。

[0531] 还考虑作为小分子PKC-θ抑制剂的是例如由Ajioka等在美国公开No.2010/0120869中所述的苯胺化合物，其通过引用整体并入本文。这种类型的代表性化合物由式(XX)表示：

[0532]

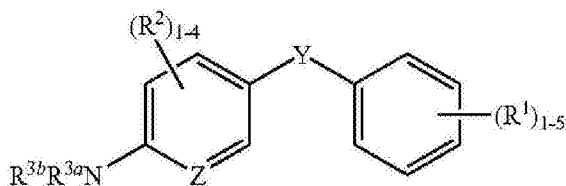


(XX)

[0533] 其中式XX的X是芳基或杂芳基,各自被1-5 R^1 基团取代。式XX的Y是-O-、-S(O) $_n$ -、-N(R^4)-和-C(R^4) $_2$ -,其中下标n是0-2。式XX的Z是-N=或-CH=。式XX的每个 R^1 独立地选自:H、卤素、C $_1$ -8烷基、C $_1$ -6杂烷基、C $_1$ -6卤代烷基、C $_2$ -6烯基、C $_2$ -6炔基、C $_1$ -6卤代烷氧基、-OR 1a 、-C(O)R 1a 、-C(O)OR 1a 、-C(O)NR 1a R 1b 、-NR 1a R 1b 、-SR 1a 、-N(R^{1a})C(O)R 1b 、-N(R^{1a})C(O)OR 1b 、-N(R^{1a})C(O)NR 1a R 1b 、-OP(O)(OR 1a) $_2$ 、-S(O) $_2$ OR 1a 、-S(O) $_2$ NR 1a R 1b 、-S(O) $_2$ -C $_1$ -6卤代烷基、-CN、环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基。式XX的每个 R^{1a} 和 R^{1b} 独立地为H或C $_1$ -6烷基。式XX的每个 R^2 独立地为H、卤素、C $_1$ -6烷基、C $_1$ -6卤代烷基、C $_2$ -6烯基、C $_2$ -6炔基、-NR 1a R 1b 、-NR 1a C(O)-C $_1$ -6烷基、-NR 1a C(O)-C $_1$ -6卤代烷基、-NR 1a -(CH $_2$)-NR 1a R 1b 、-NR 1a -C(O)-NR 1a R 1b 或-NR 1a -C(O)OR 1a , 替选地,相邻的 R^1 基团和相邻的 R^2 基团可结合以形成环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基。式XX的 R^3 是NR 3a R 3b 或-NCO。式XX的每个 R^{3a} 和 R^{3b} 独立地为H、C $_1$ -6烷基、-C(O)-C $_1$ -6烷基、-C(O)-C $_1$ -6卤代烷基、-(CH $_2$)-NR 1a R 1b 、-C(O)-NR 1a R 1b 、-C(O)OR 1a 、-C(S)CN、氨基酸残基、肽或寡肽。式XX的每个 R^4 独立地为H或C $_1$ -6烷基,或者当多于一个 R^4 基团与同一原子相连接时,所述 R^4 基团任选地结合以形成C $_5$ -8环烷基。式XX的化合物还包括其盐、水合物和前药。

[0534] 在一些实施方案中,式XX的苯胺化合物由式XXa表示:

[0535]



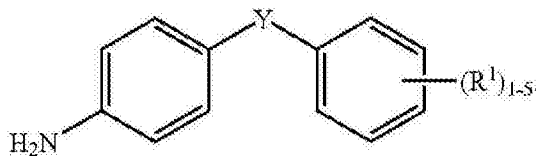
(XXa)

[0536] 其中式XXa的每个 R^1 独立地为H、卤素、C $_1$ -8烷基、C $_1$ -6杂烷基、C $_1$ -6卤代烷基、C $_2$ -6烯基、C $_2$ -6炔基、C $_1$ -6卤代烷氧基、-OR 1a 、-CN、环烷基、杂环烷基、芳基或杂芳基,并且式XXa的每个 R^{3a} 和 R^{3b} 独立地为H、-C(O)-C $_1$ -6烷基、氨基酸残基、肽或寡肽。

[0537] 在又一些实施方案中,式XXa的每个 R^1 独立地为H、卤素、C $_1$ -8烷基、C $_1$ -6卤代烷基、C $_1$ -6卤代烷氧基、-C(O)OR 1a 、环烷基或杂芳基。此外,式XXa的每个 R^2 独立地为H、卤素或-NR 1a C(O)-C $_1$ -6烷基。在另一些实施方案中,式XXa的每个 R^1 独立地为H、甲基、正丙基、异丙基、叔丁基、叔戊基、Cl、Br、CF $_3$ 、OCF $_3$ 、环戊基、吡咯基或CO $_2$ H,并且每个 R^2 独立地为H或Cl。在另一些实施方案中,式XX的 R^{3a} 是氨基酸残基,并且 R^{3b} 是H。合适地,所述氨基酸残基是精氨酸残基。

[0538] 在又一些实施方案中,式XX的苯胺化合物具有式XXb:

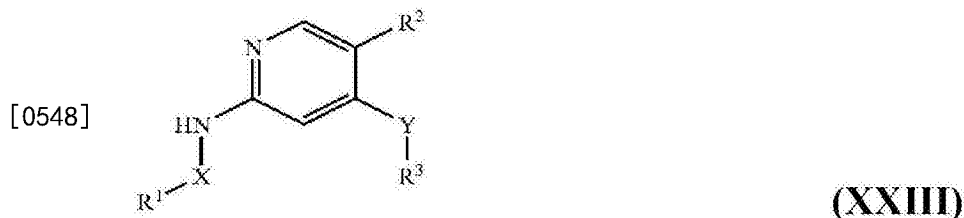
[0539]



[0540] 在一些实施方案中,式XXb的Y是S。在又一些实施方案中,式XXb的Y是O。在一些实施方案中,式XXb的每个 R^1 独立地为H、甲基、正丙基、异丙基、叔丁基、叔戊基、Cl、Br、CF $_3$ 、OCF $_3$ 、环戊基、吡咯基或CO $_2$ H。在另一些实施方案中,式XXb的每个 R^1 独立地为C $_1$ -8烷基或环烷

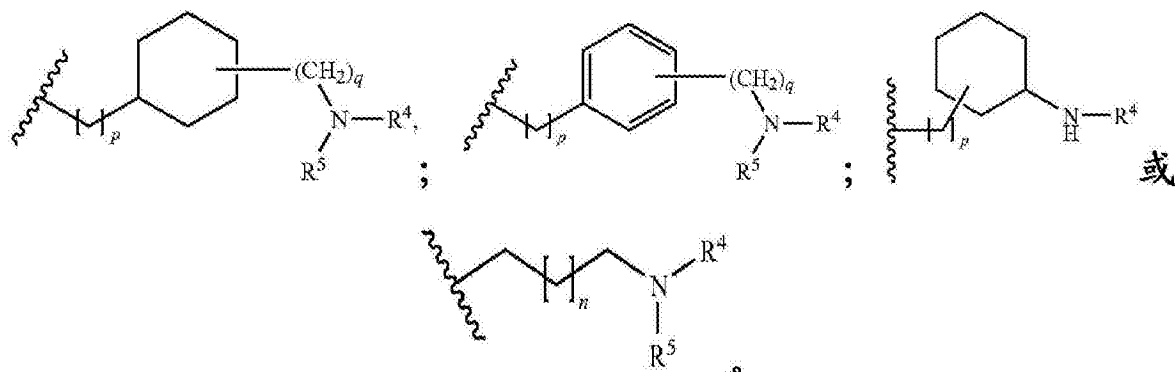
(3-氯-4-氟苯基)-N(2)-吡啶-2-基甲基-嘧啶-2,4-二胺;N-(3-{4-(1-苄基哌啶-4-基氨基)-2-[(吡啶-2-基甲基)-氨基]-嘧啶-5-基}苯基)-乙酰胺;3-[4-(1-苄基哌啶-4-基氨基)-2-[(吡啶-2-基甲基)-氨基]-嘧啶-5-基]-苯酚;和4-{4-(1-苄基哌啶-4-基氨基)-2-[(吡啶-2-基甲基)-氨基]-嘧啶-5-基}-N,N-二甲基苯甲酰胺。

[0547] 在又一些实施方案中,小分子PKC- θ 抑制剂选自例如由Brunette在美国专利申请公开US2006/0217417中公开的取代的吡啶化合物,其通过引用整体并入本文。这些化合物由式(XXIII)表示:



[0549] 其中X是键或C₁₋₆取代或未取代的烷基,在所述烷基中一个或两个亚甲基单元可被氧或硫原子替代;Y是-NH-、-O-或-S-;R¹是C₃₋₆取代或未取代的环烷基、取代或未取代的芳基、或者取代或未取代的杂芳基;R²选自以下:三氟甲基、氰基、-CONH₂、卤素和硝基;并且R³是

[0550]

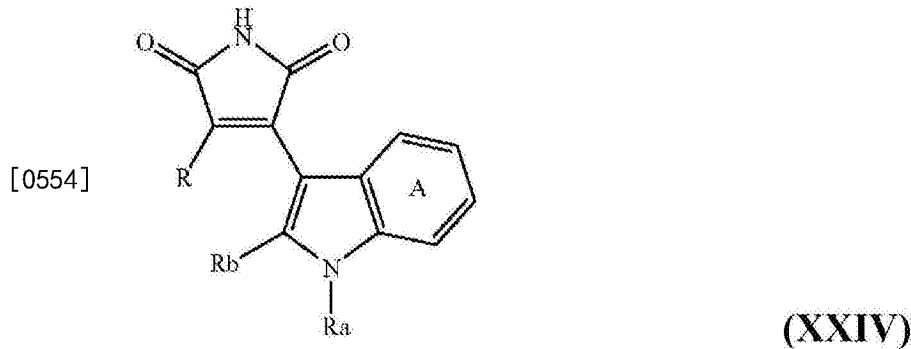


[0551] 其中,p是1至3的整数,1和3包括在内;q是0至3的整数,0和3包括在内;n是0至5的整数,0和5包括在内;R⁴和R⁵各自独立地选自氢、C₁₋₆经取代或经未取代的烷基,或者其中R⁴和R⁵一起构成亚甲基桥,该亚甲基桥连同它们之间的氮原子形成四至六元的经取代或未经取代的环,其中所述亚甲基之一任选地被氧、硫或NR基团替代,其中R是氢或C₁₋₆取代或未经取代的烷基;及互变异构体和可药用盐、溶剂合物或氨基保护的衍生物。

[0552] 具有式(XXIII)的化合物的非限制性实例包括:5-硝基-N4-哌啶-4-基甲基-N2-(2-三氟甲氧基苄基)-吡啶-2,4-二胺;N2-(2,3-二氯苄基)-5-硝基-N4-哌啶-4-基甲基吡啶-2,4-二胺;N2-[2-(3-氯苄基)-乙基]-5-硝基-N4-哌啶-4-基甲基吡啶-2,4-二胺;5-硝基-N2-苄乙基-N4-哌啶-4-基甲基吡啶-2,4-二胺;N4-(4-氨基甲基环己基甲基)-5-硝基-N2-(2-三氟甲氧基苄基)-吡啶-2,4-二胺;N4-(4-氨基甲基环己基甲基)-N2-(2,3-二氯苄基)-5-硝基吡啶-2,4-二胺;N4-(4-氨基甲基环己基甲基)-5-硝基-N2-苄乙基吡啶-2,4-二胺;N4-(4-氨基甲基环己基甲基)-N2-[2-(3-氯苄基)-乙基]-5-硝基-1-吡啶-2,4-二胺;N4-(4-氨基甲基环己基甲基)-5-硝基-N2-(2-氯苄基)-吡啶-2,4-二胺;N4-(4-反式-氨基甲基环己基甲基)-5-硝基-N-2-(2-三氟甲氧基苄基)-吡啶-2,4-二胺;N4-(4-反式-氨基环己

基甲基)-5-硝基-N2-(2-三氟甲氧基苄基)-吡啶-2,4-二胺;4-[(4-氨基甲基环己基甲基)-氨基]-6-(2-氯苄氨基)-烟酰胺;和4-[(4-氨基甲基环己基甲基)-氨基]-6-(2-氯苄氨基)-烟腈。

[0553] 在又一些实施方案中,小分子PKC- θ 抑制剂选自例如由Auberson在美国专利申请公开US2007/0142401中公开的吡啶基吡咯二酮衍生物,其通过引用整体并入本文。这些化合物由通式(XXIV)表示:



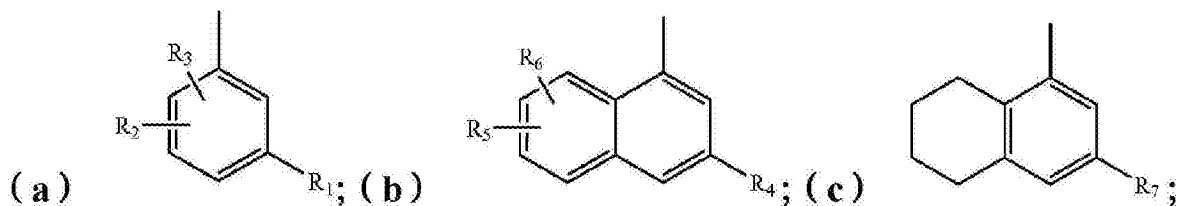
[0555] 其中

[0556] R_a 是H;C₁₋₄烷基;或被OH、NH₂、NHC₁₋₄烷基或N(二-C₁₋₄烷基)₂取代的C₁₋₄烷基;

[0557] R_b 是H;或C₁₋₄烷基;

[0558] R是式(a)、(b)、(c)、(d)、(e)或(f)的基团

[0559]



[0560]

[0561] 其中每个 R_1 、 R_4 、 R_7 、 R_8 、 R_{11} 和 R_{14} 是OH;SH;杂环残基;NR₁₆R₁₇,其中每个 R_{16} 和 R_{17} 独立地为H或C₁₋₄烷基,或者 R_{16} 和 R_{17} 与它们结合的氮原子一起形成杂环残基;或者式 α -X-R_c-Y(α)的基团,其中X是直接键、O、S或NR₁₈,其中 R_{18} 是H或C₁₋₄烷基, R_c 是C₁₋₄亚烷基或其中一个CH₂被CR_xR_y取代的C₁₋₄亚烷基,其中 R_x 和 R_y 中之一是H,另一个是CH₃,每个 R_x 和 R_y 是CH₃,或者 R_x 和 R_y 一起形成-CH₂CH₂-,并且Y与末端碳原子相结合并选自OH、杂环残基和-NR₁₉R₂₀,其中每个 R_{19} 和 R_{20} 独立地为H、C₃₋₆环烷基、C₃₋₆环烷基-C₁₋₄烷基、芳基-C₁₋₄烷基,或者在末端碳原子上任选地被OH取代的C₁₋₄烷基,或者 R_{10} 和 R_{20} 与它们结合的氮原子一起形成杂环残基;

[0562] 每个 R_2 、 R_3 、 R_5 、 R_6 、 R_9 、 R_{10} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{15} 和 R'_{15} 独立地为H、卤素、C₁₋₄烷基、CF₃、OH、SH、NH₂、C₁₋₄烷氧基、C₁₋₄烷硫基、NHC₁₋₄烷基、N-(二-C₁₋₄烷基)₂或CN;

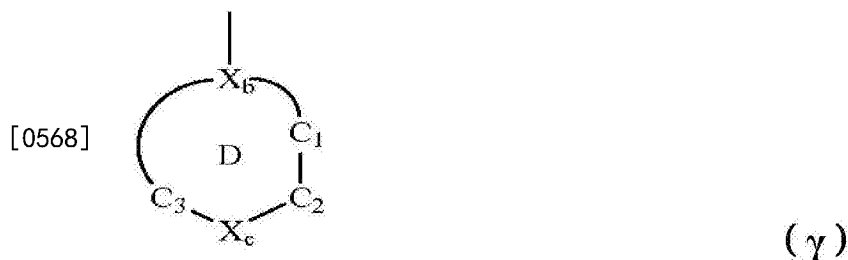
[0563] E是-N=且G是-CH=或者E是-CH=且G是-N=;以及

[0564] 环A任选地被取代，

[0565] 或其盐。

[0566] 在示例性实例中，杂环残基如R₁、R₄、R₇、R₈、R₁₁、R₁₄或Y或者分别由NR₁₆R₁₇或NR₁₉R₂₀形成的杂环残基是含有1或2个杂原子并且在一个或多个环碳原子和/或环氮原子(当存在时)上任选地经取代的三至八元饱和、不饱和或芳香族杂环。

[0567] 在具体的实施方案中，杂环残基R₁、R₄、R₇、R₈、R₁₁、R₁₄或Y或者分别由NR₁₆R₁₇或NR₁₉R₂₀形成的杂环残基是式(γ)残基。



[0569] 其中

[0570] 环D是5、6或7元饱和、不饱和或芳族环；

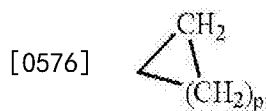
[0571] X_b是-N-、-C-或-CH-；

[0572] X_c是-N=、-NR_f-、-CR_f'=或-CHR_f'-，其中R_f是环氮原子的取代基，并且选自C₁₋₆烷基；酰基；C₃₋₆环烷基；C₃₋₆环烷基-C₁₋₄烷基；苯基；苯基C₁₋₄烷基；

[0573] 杂环残基；和式β-R₂₁-Y' (β)的残基

[0574] 其中R₂₁是被O打断的C₁₋₄亚烷基或C₂₋₄亚烷基，并且Y'是OH、NH₂、NH(C₁₋₄烷基)或N(C₁₋₄烷基)₂；并且R_f'是环碳原子的取代基并选自C₁₋₄烷基；

[0575] 任选地进一步被C₁₋₄-烷基取代的C₃-环烷基；



[0577] 其中，p是1、2或3；CF₃；

[0578] 卤素；OH；NH₂；-CH₂NH₂；-CH₂OH；哌啶-1-基；和吡咯烷基；

[0579] C₁和C₂之间的键是饱和或不饱和的；

[0580] 每个C₁和C₂独立地为任选地被一个或两个取代基取代的碳原子，所述取代基选自以上对环碳原子所指出的那些取代基；并且

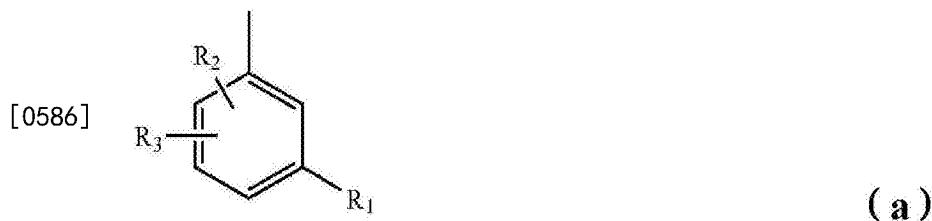
[0581] C₃与X_b以及C₁与X_b之间的线分别表示得到5、6或7元环D所需要的碳原子数。

[0582] 在根据式(XXIV)的化合物的另一些非限制性实例中，

[0583] R_a是H；CH₃；CH₂CH₃；或异丙基，

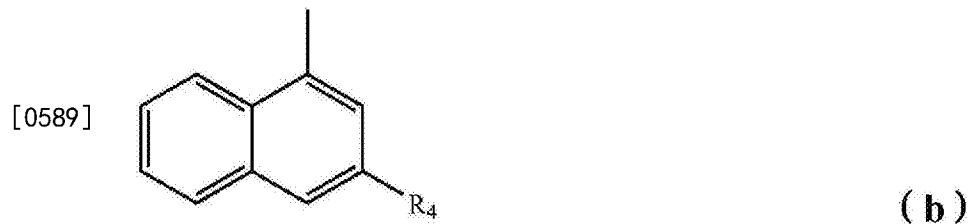
[0584] R_b是H；卤素；C₁₋₆烷氧基；或C₁₋₆烷基，以及任一

[0585] I.R是式(a)的基团



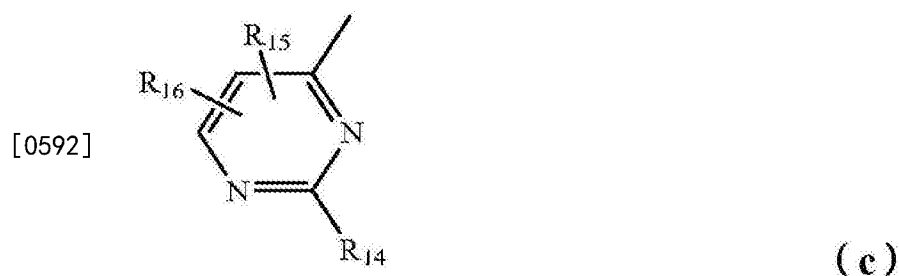
[0587] 其中R₁是在3位或4位上任选地被CH₃取代的哌嗪-1-基;或4,7-二氮杂螺(2.5)辛-7-基;R₂是Cl;Br;CF₃;或CH₃;并且R₃是H;CH₃;或CF₃;当Ra是H或CH₃,Rb是H并且R₁是4-甲基-1-哌嗪基时,R₃不是H;或者

[0588] II.R是式(b)的基团



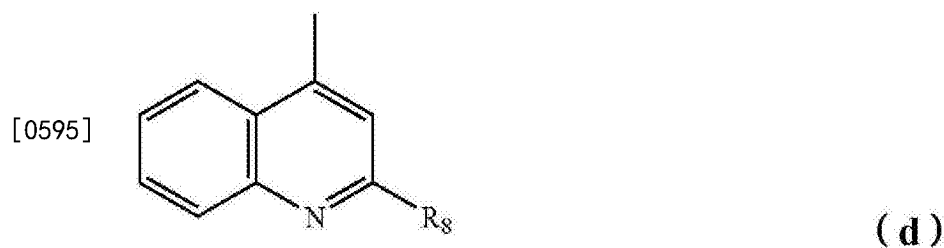
[0590] 其中R₄是在3位和/或4位上被CH₃取代的哌嗪-1-基;或4,7-二氮杂螺[2.5]辛-7-基;当R₄是4-甲基-1-哌嗪基时,Ra不是H或CH₃;或者

[0591] III.R是式(c)的残基



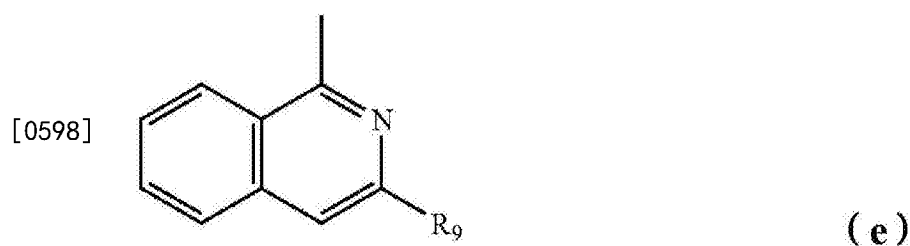
[0593] 其中R₁₄是在3位和/或4位上任选地被CH₃取代或者在3位上任选地被乙基、苯基-C₁₋₄烷基、C₁₋₄烷氧基-C₁₋₄烷基或卤代C₁₋₄烷基取代的哌嗪-1-基;或4,7-二氮杂螺[2.5]辛-7-基;R₁₅是卤素;CF₃;或CH₃;当Ra是H或CH₃,Rb是H并且R₁₄是4-甲基-1-哌嗪基;并且R₁₆是H、CH₃或CF₃时,R₁₅不是CH₃;当R₁₅是Cl,Ra是H或CH₃,Rb是H并且R₁₄是4-甲基-1-哌嗪基时,R₁₆不是H;或者

[0594] IV.R是式(d)的基团



[0596] 其中R₈是哌嗪-1-基、3-甲基-哌嗪-1-基或4-苄基哌嗪-1-基;或者

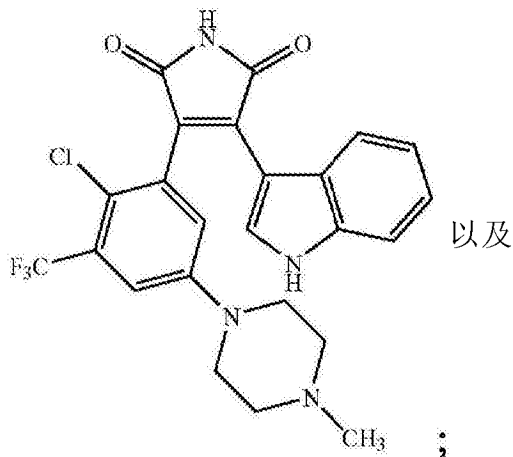
[0597] V.R是式(e)的基团



[0599] 其中R₉是4,7-二氮杂螺[2.5]辛-7-基;或在3位上被甲基或乙基以及任选地在4位上被甲基取代的哌嗪-1-基。

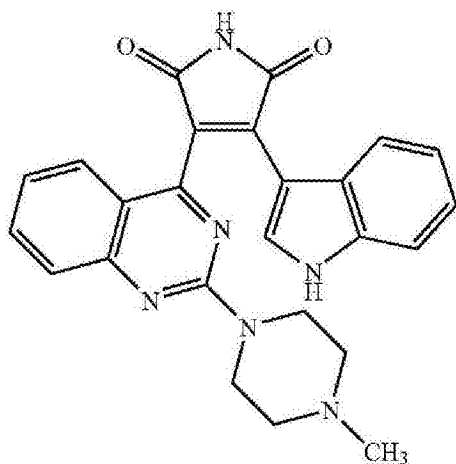
- [0600] 在根据式(XXIV)的化合物的一些实施方案中
- [0601] 当R是式(a)时
- [0602] R_1 是-(4-甲基-哌嗪-1-基)、1-哌嗪基、3-甲基哌嗪-1-基或-(4,7-二氮杂螺[2.5]辛-7-基)
- [0603] R_2 是2-Cl或2-CH₃
- [0604] R_3 是3-CH₃、3-CF₃或H
- [0605] R_a 是H或CH₃
- [0606] 并且当,
- [0607] R是式(b)时
- [0608] R_4 是-(4,7-二氮杂螺[2.5]辛-7-基)、3-甲基-哌嗪-1-基或4-甲基-3-甲基哌嗪-1-基
- [0609] R_a 是H或CH₃
- [0610] 并且当
- [0611] R是式(c)时
- [0612] R_{14} 是-4-甲基-哌嗪-1-基、3-甲基-哌嗪-1-基、-4,7-二氮杂螺[2.5]辛-7-基、1-哌嗪基、4-甲基-3-甲基-哌嗪基、3-甲氧基乙基-哌嗪-1-基、3-乙基哌嗪-1-基、3-苄基-哌嗪-1-基或3-CH₂F-哌嗪-1-基
- [0613] R_{15} 是Cl、Br、CF₃、F
- [0614] R_{16} 是CH₃、H、CH₂-CH₃
- [0615] R_a 是H或CH₃
- [0616] R_b 是H、CH₂-CH₂-CH₃、F、CH(CH₃)₂、Cl、OCH₃、CH₃或CH₂-CH₃
- [0617] 并且当
- [0618] R是式(d)时
- [0619] R_8 是3-甲基-哌嗪-1-基、4-苄基-1-哌嗪基或1-哌嗪基
- [0620] R_a 是CH₃或H
- [0621] 并且当
- [0622] R是式(e)时
- [0623] R_9 是-4,7-二氮杂螺[2.5]辛-7-基、3-乙基-哌嗪-1-基、3-甲基-哌嗪-1-基、4-甲基-3-甲基哌嗪-1-基或3-乙基-哌嗪-1-基
- [0624] R_a 是H、CH₂-CH₃或CH(CH₃)₂
- [0625] R_b 是CH₃、F、CH(CH₃)₂、OCH₃、CH₂-CH₃或Cl。
- [0626] 根据式(XXIV)的化合物的具体实施方案包括具有下式的3-[2-氯-5-(4-甲基哌嗪-1-基)-3-三氟甲基苯基]-4-(1H-吡啶-3-基)-吡咯-2,5-二酮

[0627]



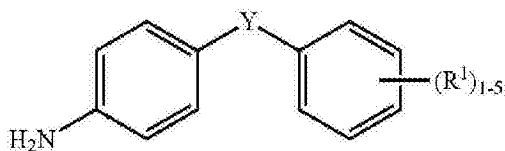
[0628] 具有下式的3-(1H-咪唑-3-基)-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-噻唑啉-4-基]-吡咯-2,5-二酮

[0629]



[0630] 在另一些实施方案中,PKC-θ抑制剂选自由Ajioka在美国专利申请公开US2013/0225687中公开的PKC-θ小分子化合物,其通过引用整体并入本文。这些化合物由式(XXV)表示:

[0631]



(XXV)

[0632] 其中:

[0633] Y选自-O-和-S-;并且

[0634] 每个R¹独立地选自:正丙基、异丙基、叔丁基、叔戊基、CF₃、OCF₃、环戊基、吡咯基,以及CO₂H及其盐、水合物和前药,从而选择性地抑制PKC-θ。

[0635] 本发明不仅包括已知的PKC-θ抑制剂,而且包括通过任何合适的筛选测定鉴定的PKC-θ抑制剂。因此,本发明扩展至筛选可用于以下用途的调节剂的方法:用于抑制PKC-θ并进而用于改变PKC-θ过表达细胞(例如,CSC)的以下特征中的至少一个:(i)形成、(ii)增殖、(iii)维持、(iv)EMT、或(v)MET,或者用于治疗或预防癌症(例如,转移癌)。在一些实施方案中,筛选方法包括:(1)使制备物与测试药剂相接触,其中所述制备物包含(i)含有对应于至少PKC-θ生物学活性片段或其变体或衍生物的氨基酸序列的多肽,或者(ii)含有可产生

PKC- θ 基因之转录物或其一部分的核苷酸序列的多核苷酸,或者(iii)含有调节PKC- θ 基因表达之基因序列(例如,转录元件)至少一部分的多核苷酸,其与报道基因有效地连接;以及(2)相对于在测试药剂不存在下的参考水平或功能活性,检测所述多肽、多核苷酸、或报道基因之表达产物的水平或功能活性的变化。相对于在测试药剂不存在下的正常或参考水平和/或功能活性,检测到多肽、转录物或转录物一部分、或者报道基因之表达产物的水平和/或功能活性降低,表明所述药剂可用于改变PKC- θ 过表达细胞(例如,CSC)的以下特征中的至少一个:(i)形成、(ii)增殖、(iii)维持、(iv)EMT、或(v)MET,或者用于治疗或预防癌症(例如,转移癌)。合适地,这通过分析或确定所述测试药剂是否改变PKC- θ 过表达细胞以下特征中的至少一个确认:(i)形成、(ii)增殖、(iii)维持、(iv)EMT、或(v)MET,或者是否治疗或预防癌症来确认。

[0636] 落入本发明范围内的调节剂包括PKC- θ 的水平或功能活性的抑制剂,包括PKC- θ 的拮抗性抗原结合分子和抑制剂肽片段、反义分子、核酶、RNAi分子和共抑制分子,以及多糖和脂多糖抑制剂。

[0637] 候选药剂包括许多化学物质类别,但是其通常是有机分子,优选分子量大于50且小于约2500道尔顿的小有机化合物。候选药剂包括与蛋白质结构相互作用,特别是氢键合所必需的官能团,并且通常包含至少一个胺、羰基、羟基或羧基,期望至少两个化学官能团。候选药剂经常包括被一个或更多个上述官能团取代的环状碳或杂环结构或芳香族或聚芳香族结构。候选药剂也存在于生物分子中,所述生物分子包括但不限于:肽、糖、脂肪酸、类固醇、嘌呤、嘧啶、其衍生物、结构类似物或组合。

[0638] PKC- θ 的小(非肽)分子调节剂是特别有利的。在这方面,小分子是理想的,这是因为此种分子在经口施用后更容易吸收,具有较少的潜在抗原决定簇,或者比更大的蛋白质基药物更有可能穿过细胞膜。小有机分子还可以具有实现以下的能力:进入合适的细胞并影响基因的表达(例如,通过与参与基因表达的调节区或转录因子相互作用);或者通过抑制或增强辅助分子的结合影响基因的活性。

[0639] 或者,以细菌、真菌、植物和动物提取物形式的天然化合物库是可用的或容易产生的。此外,天然或合成产生的库和化合物容易通过常规的化学、物理和生物化学方法进行修饰,并且可用于产生组合库。已知的药理学试剂可以经过定向或随机化学修饰(例如,酰化、烷基化、酯化、酰胺化等)以产生结构类似物。

[0640] 筛选也可以针对已知的药理学活性化合物和其化学类似物。

[0641] 筛选根据本发明的调节剂可以通过任何合适的方法来实现。例如,该方法可以包括使表达对应于编码PKC- θ 之基因的多核苷酸的细胞与怀疑的具有调节活性的试剂相接触以及筛选PKC- θ 的水平或功能活性的调节,或由多核苷酸编码的转录物的水平的调节,或所述多肽或转录物的下游细胞靶分子(以下称为靶分子)的活性或表达的调节。检测这种调节可以利用包括但不限于以下的技术来实现:ELISA;基于细胞的ELISA;抑制型ELISA;Western印迹法;免疫沉淀法;狭缝或斑点印迹测定法;免疫染色法;RIA;亲近闪烁测定法(scintillation proximity assay);采用抗原结合分子或例如荧光素或罗丹明等荧光物质的抗原缀合物的免疫荧光测定法;乌赫特朗尼双重扩散分析法;采用亲合素-生物素或链亲合素-生物素检测系统的免疫测定以及核酸检测方法,包括逆转录酶聚合酶链反应(RT-PCR)。

[0642] 应该理解的是,调控或表达PKC- θ 的核苷酸可以是天然存在于测试对象的细胞中,或者也可以出于测试的目的而引入宿主细胞中。此外,天然或引入的多核苷酸可以是组成型表达的,从而提供可用于筛选下调序列之编码产物表达的药剂的模型,其中所述下调可以在核酸或表达产物水平。此外,在将多核苷酸引入细胞中的情况下,该多核苷酸可以包含编码PKC- θ 的整个编码序列,或者其可以包含编码序列(例如,所述PKC- θ 的活性部位)的一部分或调节编码所述PKC- θ (例如,PKC- θ 的启动子)的对应基因之表达的一部分。例如,天然与多核苷酸相关联的启动子可以被引入测试对象的细胞中。在这种情况下,只有在使用启动子的情况下,才可以实现检测启动子活性的调节,例如,通过使该启动子与合适的报道基因多核苷酸(包括但不限于:绿色荧光蛋白(GFP)、萤光素酶、 β -半乳糖苷酶和儿茶酚胺乙酰转移酶(catecholamine acetyl transferase, CAT))有效地连接。表达的调节可以通过测量与报道多核苷酸相关的活性来确定。

[0643] 这些方法提供了用于进行假定的调节剂(例如,包含蛋白质药剂或者非蛋白质药剂的合成、组合、化学和天然库)的高通量筛选的机制。这些方法也将促进以下试剂的检测,所述试剂与编码靶分子的多核苷酸结合或者调节上游分子的表达,所述上游分子随后调节编码靶分子的多核苷酸的表达。因此,这些方法提供了检测直接或间接地调节根据本发明的靶分子之表达或活性的药剂的机制。

[0644] 在替代实施方案中,使用可商购PKC- θ 测定来筛选测试药剂,所述PKC- θ 测定的示例性实例包括ADP-Glo™ PKC- θ 激酶测定(Promega Corporation, Madison, WI)、PKC Theta KinEASE™ FP荧光素绿测定(EMD Millipore, Billerica, MA)以及或者使用美国专利申请公开US2008/0318929中公开的PKC- θ 测定。

[0645] 化合物还可以在动物模型中进一步测试以鉴定在体内作用方面最有效的那些化合物。这些分子可以充当用于药物进一步研发的“先导化合物”,例如通过使所述化合物经过顺序修饰、制作分子模型和合理药物设计中使用的其他常规方法来实现。

[0646] 3. 治疗和预防用途

[0647] 根据本发明,提出了抑制PKC- θ 功能的药剂可作用于治疗或预防癌症(例如,转移癌)或者改变以下中至少一个的活性剂:PKC- θ 过表达细胞(例如,CSC或非CSC肿瘤细胞)的(i)形成、(ii)增殖、或(iii)维持;(iv)PKC- θ 过表达细胞(例如,CSC)的EMT;或(v)PKC- θ 过表达细胞(例如,CSC)的MET。因此,根据本发明的PKC- θ 抑制剂化合物可适用于用于治疗或预防癌症(包括转移癌)的药物组合物。同样地,本发明考虑用于治疗、预防和/或缓解癌(特别是转移癌)症状的药物组合物,其中所述组合物包含有效量的PKC- θ 抑制剂和可药用载体和/或稀释剂。

[0648] 任何PKC- θ 抑制剂都可用于本发明的组合物和方法,只要该抑制剂是药学活性的即可。在一些实施方案中,PKC- θ 抑制剂是非选择性的PKC- θ 抑制剂。在一些特定的实施方案中,PKC- θ 抑制剂是选择性的PKC- θ 抑制剂。“药学活性”PKC- θ 抑制剂是当向有此需要的个体施用导致治疗或预防癌(特别是转移癌)(包括预防引起症状,控制此种症状,或治疗与转移癌相关的现有症状)和/或导致以下结果的形式:PKC- θ 过表达细胞(例如,CSC或非CSC肿瘤细胞)的(i)形成、(ii)增殖、或(iii)维持;或(iv)PKC- θ 过表达细胞(例如,CSC)的EMT的减少、减轻、消除或预防;和/或PKC- θ 过表达细胞(例如,CSC)的(v)MET增强。

[0649] 用于本发明方法的PKC- θ 抑制剂制剂以及所施用PKC- θ 抑制剂的量、施用模式是常

规的并且在本领域技术人员的技术范围内。不论已被治疗的恶性疾病(特别是转移癌)是否通过相对于合适对照测量指示该疾病病程的一个或更多个诊断参数确定。在动物实验的情况下,“合适对照”是不用PKC- θ 抑制剂处理或者用不含PKC- θ 抑制剂的药物组合物处理的动物。在人对象的情况下,“合适对照”可以是处理前的个体,或者可以是用安慰剂处理的人(例如,年龄匹配的或类似的对照)。根据本发明,转移癌的治疗包括并涵盖但不限于:(1)在患者中减轻、消除、减少、预防或阻止以下的发展:PKC- θ 过表达细胞(例如,CSC)的(i)形成、(ii)增殖、(iii)维持或(iv)EMT,或者增强PKC- θ 过表达细胞(例如,CSC)的MET;(2)在对象中治疗癌症(例如,转移癌);(3)在易患癌症但尚未被诊断患有癌症的对象中预防癌症(例如,转移癌),并因此,该治疗构成癌症预防性治疗;或者(iii)使癌症(例如,转移癌)消退。

[0650] 因此,本发明的组合物和方法适合于治疗以下个体:已诊断患有癌症(例如,转移癌)的个体;怀疑患有癌症(例如,转移癌)的个体;已知易于发生和认为有可能发生癌症(例如,转移癌)的个体;或者被认为先前治疗的癌症(例如,转移癌)有可能发生复发的个体。癌症(例如,转移癌)可以是激素受体阳性或激素受体阴性的。在一些实施方案中,癌症(例如,转移癌)是激素受体阴性的,并因此其是激素抵抗的或内分泌治疗抵抗的。在癌症是乳腺癌的一些实施方案中,乳腺癌(例如,非乳腺CMC肿瘤细胞)是激素受体阴性的(例如,雌激素受体(ER)阴性的和/或孕酮受体(PR)阴性的)。

[0651] 在一些实施方案中,并且根据预期施用模式,含PKC- θ 抑制剂的组合物通常包含按重量计约0.000001%至90%、约0.0001%至50%或约0.01%至约25%的PKC- θ 抑制剂,剩余部分是合适的药物载体或稀释剂等。PKC- θ 抑制剂的剂量可取决于多种因素,例如施用模式、受影响对象的物种、年龄、性别、重量和一般健康状况,并且可以很容易地由本领域技术人员使用标准方法确定。剂量也将考虑到PKC- θ 抑制剂与其靶分子的结合亲和力,其生物利用度以及其体内性质和药代动力学性质。在这个方面,施用药剂的精确量也可取决于执业医师的判断。在确定待施用以治疗或预防癌症(例如,转移癌)的药剂的有效量时,医师或兽医可以评估疾病或病症随时间的进展。在任何情况下,本领域技术人员可容易地确定PKC- θ 抑制剂的合适剂量而无需过度实验。施用于患者的活性物质的剂量应足以在患者中随时间产生诸如以下的有益响应:减少、减轻、终止或预防PKC- θ 过表达细胞(例如,CSC)的(i)形成、(ii)增殖、(iii)维持或(iv)EMT;和/或增强PKC- θ 过表达细胞(例如,CSC)的MET;和/或治疗或/或预防癌症(例如,转移癌)。剂量可以以合适的间隔施用以改善血液癌的症状。这样的间隔可以使用本领域技术人员已知的常规方法来确定,并且可以根据所采用的活性剂类型及其制剂而不同。例如,所述间隔可以是每天、每隔一天、每周、每两周、每月、每两月、每季度、每半年或每年。

[0652] 可以对剂量和间隔进行个体调整以提供足以维持PKC- θ 抑制作用的活性剂之血浆水平。全身施用的常用患者剂量为1mg/天至2000mg/天,通常1mg/天至250mg/天,并且典型地为10mg/天至150mg/天。就患者体重而言,常用剂量为0.02mg/kg/天至25mg/kg/天,通常0.02mg/kg/天至3mg/kg/天,典型地为0.2mg/kg/天至1.5mg/kg/天。就患者体表面积而言,常用剂量为0.5mg/m²/天至1200mg/m²/天,通常0.5mg/m²/天至150mg/m²/天,典型地为5mg/m²/天至100mg/m²/天。

[0653] 在本发明的具体实施方案中,通过PKC- θ 抑制剂抑制PKC- θ 将导致CSC(例如,乳腺癌CSC)的形成、增殖、维持或EMT减少,或者CSC(例如,乳腺癌CSC)的MET增强,进而导致由

CSC分化出更少的非CSC肿瘤细胞,以及与用癌症治疗或药剂一起更加有效的治疗非CSC肿瘤细胞。因此,本发明还考虑将抑制非CMC肿瘤细胞增殖、存活或活力的至少一种癌症治疗与所述PKC- θ 抑制剂共同施用。所述PKC- θ 抑制剂可以在癌症治疗之后用于治疗,或者在施用癌症治疗之前使用,或者与癌症治疗一起使用。因此,本发明考虑联合治疗,其采用PKC- θ 抑制剂和癌症治疗的共同施用,所述癌症治疗的非限制性实例包括放射治疗、外科手术、化学治疗、激素消融治疗、促凋亡治疗和免疫治疗。

[0654] 3.1放射治疗

[0655] 放射治疗包括诱导DNA损伤的辐射和波,例如, γ 辐照、X射线、紫外线辐照、微波、电子发射、放射性同位素等。治疗可以通过用上述形式的辐射照射局部肿瘤部位来实现。最有可能的是,所有这些因素造成大范围的损伤DNA,对DNA的前体、DNA的复制和修复以及染色体的装配和维持有影响。

[0656] X射线的剂量范围为对于长时间段(3至4周)的50至200伦琴的日剂量,至2000至6000伦琴的单剂量。放射性同位素的剂量范围变化很大,并取决于同位素的半衰期、发射辐射的强度和类型,以及肿瘤细胞的吸收。

[0657] 放射治疗的非限制性实例包括单次或分次的适形外部束放射治疗(conformal external beam radiotherapy)(分次的为50戈瑞至100戈瑞,持续4至8周),高剂量率近程放射治疗,永久性空隙近程治疗,全身放射性同位素(例如,镱89)。在一些实施方案中,放射治疗可以与放射增敏剂组合施用。放射增敏剂的示例性实例包括但不限于:乙丙昔罗(efaproxiral)、依他硝唑、全氟碳(fluosol)、米索硝唑、尼莫唑、替莫泊芬(temoporfin)和替拉扎明。

[0658] 3.2化学治疗

[0659] 化学治疗剂可以选自类别中的任一种或更多种:

[0660] (i)用于医学肿瘤学的抗增殖/抗肿瘤药及其组合,例如烷基化剂(例如,顺铂、卡铂、环磷酰胺、氮芥、美法仑、苯丁酸氮芥、白消安和亚硝基脲类);抗代谢物类(例如,抗叶酸剂诸如氟吡啶,如5-氟尿嘧啶和替加氟、雷替曲塞、甲氨蝶呤、阿糖胞苷和羟基脲);抗肿瘤抗生素类(例如,蒽环类,如阿霉素、博来霉素、多柔比星、道诺霉素、表柔比星、伊达比星、丝裂霉素-C、更生霉素和光辉霉素);抗有丝分裂剂类(例如长春花生物碱,如长春新碱、长春碱、长春地辛和长春瑞滨及紫杉烷类(如紫杉醇和多西他赛);以及拓扑异构酶抑制剂类(例如,表鬼臼乙毒素,如依托泊苷和替尼泊苷、安吡啶、拓扑替康及喜树碱);

[0661] (ii)细胞抑制剂,例如抗雌激素类(例如,他莫昔芬、托瑞米芬、雷洛昔芬、屈洛昔芬和艾多昔芬(iodoxifene));雌激素受体下调剂(例如,氟维司群)、抗雄激素类(例如,比卡鲁胺、氟他胺、尼鲁米特和环丙氯地孕酮);UH拮抗剂类或LHRH激动剂类(例如,戈舍瑞林、亮丙瑞林和布舍瑞林);孕激素类(例如,醋酸甲地孕酮);芳香酶抑制剂类(例如,阿那曲唑、来曲唑、伏氯唑(vorazole)和依西美坦)和5 α -还原酶抑制剂类(例如非那雄胺);

[0662] (iii)抑制癌细胞侵袭的药剂(例如,金属蛋白酶抑制剂,如马立马司他和尿激酶纤维蛋白溶酶原激活剂受体功能的抑制剂);

[0663] (iv)生长因子功能抑制剂,例如,这样的抑制剂包括生长因子抗体、生长因子受体抗体(例如,抗-erbB2抗体曲妥珠单抗[HerceptinTM]和抗-erbB1抗体西妥昔单抗[C225])、法尼基转移酶抑制剂、MEK抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂和丝氨酸/苏氨酸激酶抑制剂,例如,

表皮生长因子家族的其他抑制剂(例如,其他EGFR家族酪氨酸激酶抑制剂,如N-(3-氯-4-氟苯基)-7-甲氧基-6-(3-吗啉基丙氧基)喹唑啉-4-胺(吉非替尼、AZD1839)、N-(3-乙炔基苯基)-6,7-双(2-甲氧基乙氧基)喹唑啉-4-胺(埃罗替尼(Erlotinib)、OSI-774)和6-丙烯酰氨基-N-(3-氯-4-氟苯基)-7-(3-吗啉基丙氧基)喹唑啉-4-胺(CI 1033)),例如,血小板衍生长因子家族的抑制剂和例如肝细胞生长因子家族抑制剂;

[0664] (v)抗血管发生剂,例如抑制血管内皮生长因子之作用的那些药剂,(例如,抗血管内皮生长因子抗体贝伐单抗[AvastinTM],国际专利申请WO 97/22596、WO 97/30035、WO 97/32856和WO 98/13354中所公开的那些化合物)和以其他机制起作用的化合物(例如,罗喹美克、整合蛋白 $\alpha v\beta^3$ 功能的抑制剂和血管生成抑制素(angiostatin));

[0665] (vi)血管损伤剂,例如考布他汀(Combretastatin)A4和国际专利申请WO 99/02166、WO 00/40529、WO 00/41669、WO 01/92224、WO 02/04434和WO 02/08213中公开的化合物;

[0666] (vii)反义治疗(antisense therapy),例如,针对以上所列靶标的那些,如ISIS 2503、抗ras反义;和

[0667] (viii)基因治疗方法,包括例如替代异常基因如异常p53或异常GDEPT(基因导向的酶前药治疗(gene-directed enzyme pro-drug therapy))的方法,例如利用胞嘧啶脱氨酶、胸苷激酶或细菌硝基还原酶的那些方法以及提高患者对化学治疗或放射治疗抵抗的方法,例如多抗药性基因治疗。

[0668] 3.3免疫治疗

[0669] 免疫治疗方法包括例如提高患者肿瘤细胞免疫原性的离体和体内方法,例如,用细胞因子如白介素2、白介素4或粒细胞巨噬细胞集落刺激因子转染,降低T细胞无反应性的方法,使用经转染免疫细胞(例如经细胞因子转染的树突细胞)的方法,使用经细胞因子转染的肿瘤细胞系的方法和使用抗独特型抗体的方法。这些方法通常依赖于使用免疫效应细胞以及靶向并破坏癌细胞的分子。免疫效应物可以是例如对癌细胞表面上一些标志物具有特异性的抗体。单独的抗体可充当治疗效应物,或者其可以募集其他细胞来实际促进细胞杀伤。该抗体也可以与药物或毒素(化学治疗剂(chemotherapeutic)、放射性核素、蓖麻毒素A链、霍乱毒素、百日咳毒素等)缀合,并且仅作为靶向剂。或者,效应物可以是携带表面分子的淋巴细胞,所述表面分子直接或间接地与癌细胞靶标相互作用。多种效应细胞包括细胞毒性T细胞和NK细胞。

[0670] 3.4其他治疗

[0671] 其他癌症治疗的实例包括光疗、冷冻治疗、毒素治疗或促凋亡治疗。本领域技术人员将知道,该列举不是穷举可用于癌症和其他增生性病变之治疗方式的类型。

[0672] 众所周知的是,化学治疗和放射治疗靶向快速分裂的细胞和/或破坏细胞周期或细胞分裂。这些治疗作为治疗数种形式癌症的一部分提供,目的在于减缓其进展或通过治愈性治疗逆转疾病的症状。然而,这些癌症治疗可能会导致免疫受损状态和随后的致病性感染,因此本发明还延伸至联合治疗,其采用PKC- θ 抑制剂(癌症治疗)和针对感染有效的抗感染剂二者,所述感染由癌症治疗引起的免疫受损状态而导致发生或者由癌症治疗引起的免疫受损状态导致发生的风险增加。抗感染药物合适地选自抗微生物药(其包括但不限于杀死或抑制微生物(例如病毒、细菌、酵母、真菌、原生动物等)生长的化合物),并因此包括

抗生素、杀阿米巴药、抗真菌药、抗原虫药、抗疟药、抗结核药和抗病毒药物。抗感染药物在其范围内还包括驱肠虫药和杀线虫剂。示例性抗生素包括喹诺酮类(例如, 氨氟沙星(amifloxacin)、西诺沙星、环丙沙星、依诺沙星、氟罗沙星(fleroxacin)、氟甲喹、洛美沙星、萘啶酸、诺氟沙星、氧氟沙星、左氧氟沙星、洛美沙星、奥索利酸、培氟沙星、罗索沙星、替马沙星、托氟沙星、司帕沙星、克林沙星、加替沙星、莫西沙星、吉米沙星和加雷沙星(garenoxacin)); 四环素类; 甘氨环素类(glycylcycline)和恶唑烷酮类(例如, 氯四环素、地美环素、强力霉素、赖甲环素、美他环素、米诺环素、土霉素、四环素、替加环素、利奈唑胺(linezolid)、伊皮唑胺(eperezolid)); 糖肽类; 氨基糖苷类(例如, 阿米卡星、阿贝卡星、丁胺菌素、地贝卡星、阿司米星、庆大霉素、卡那霉素、黄霉素(menomycin)、奈替米星、核糖霉素、西索米星、大观霉素、链霉素、妥布霉素); β -内酰胺类(例如, 亚胺培南、美罗培南、比阿培南、头孢克洛、头孢羟氨苄、头孢孟多、头孢曲秦、头孢吡酮、头孢唑啉、头孢克肟、头孢甲肟、头孢地嗪、头孢尼西、头孢哌酮、头孢雷特、头孢噻肟、头孢替安、头孢咪唑、头孢匹胺、头孢泊肟、头孢磺啉、头孢他啶、头孢特仑、头孢替唑、头孢布烯、头孢唑肟、头孢曲松、头孢呋辛、头孢唑喃、氧甲头孢菌素(cephacettrile)、头孢氨苄、头孢甘酸、头孢噻啉、头孢噻吩、头孢吡硫、头孢拉定、头孢美唑(cefmetazole)、头孢西丁、头孢替坦、氨曲南、卡芦莫南、氟氧头孢、拉氧头孢、美西林、阿莫西林、氨苄西林、阿洛西林、羧苄西林、苄青霉素、卡非西林、氯唑西林、双氯西林、甲氧西林、美洛西林、奈夫西林、苯唑西林、青霉素G、哌拉西林、磺苄西林、替莫西林、替卡西林、头孢托仑、SC004、KY-020、头孢地尼、头孢布烯、FK-312、S-1090、CP-0467、BK-218、FK-037、DQ-2556、FK-518、头孢唑兰、ME1228、KP-736、CP-6232、Ro 09-1227、OPC-20000、LY206763); 利福霉素类; 大环内酯类(例如, 阿奇霉素、克拉霉素、红霉素、竹桃霉素、罗古霉素、蔷薇霉素、罗红霉素、醋竹桃霉素); 酮内酯类(例如, 泰利霉素、喹红霉素(cethromycin)); 香豆霉素类; 林可酰胺类(例如, 克林霉素、林可霉素)和氯霉素。

[0673] 示例性抗病毒药包括: 硫酸阿巴卡韦、无环鸟苷钠、盐酸金刚烷胺、安普那韦、西多福韦、甲磺酸地拉韦定、地达诺新、依非韦伦、泛昔洛韦、福米韦生钠、膦甲酸钠、更昔洛韦、硫酸茆地那韦、拉米夫定、拉米夫定/齐多夫定、甲磺酸那非那韦、奈韦拉平、磷酸奥塞米韦、利巴韦林、盐酸金刚乙胺、利托那韦、沙奎那韦、甲磺酸沙奎那韦、司他夫定、盐酸伐昔洛韦、扎西他滨、扎那米韦和齐多夫定。

[0674] 杀阿米巴剂或抗原虫剂的非限制性实例包括阿托伐醌、盐酸氯喹、磷酸氯喹、甲硝唑、盐酸甲硝唑、依西酸喷他脒。驱肠虫药可以是选自以下的至少一种: 甲苯咪唑、双羟萘酸噻嘧啉、丙硫咪唑、伊维菌素和噻苯哒唑。示例性抗真菌药可以选自: 两性霉素B、两性霉素B胆甾醇硫酸盐复合物、两性霉素B脂质复合物、两性霉素B脂质体、氟康唑、氟胞嘧啶、灰黄霉素微粉(griseofulvin microsize)、灰黄霉素超微粉(griseofulvin ultramicrosize)、伊曲康唑、酮康唑、制霉菌素和盐酸特比萘芬。抗疟药的非限制性实例包括: 盐酸氯喹、磷酸氯喹、强力霉素、硫酸羟氯喹、盐酸甲氟喹、磷酸伯氨喹、乙胺嘧啶以及乙胺嘧啶与磺胺多辛。抗结核药包括但不限于: 氯法齐明、环丝氨酸、氨苯砜、盐酸乙胺丁醇、异烟肼、吡嗪酰胺、利福布丁、利福平、利福喷丁和硫酸链霉素。

[0675] 如上所述, 本发明涵盖PKC- θ 抑制剂与另外的药剂一起共施用。应该理解的是, 在包含PKC- θ 抑制剂与另外的药剂一起施用的实施方案中, 组合中活性物质的剂量可各自包含有效量, 并且另外的药剂可以进一步增强对患者的治疗或预防益处。或者, PKC- θ 抑制剂

和另外的药剂可以一起包含用于预防或治疗癌症(例如,转移癌)的有效量。还应当理解的是,有效量可以在特定治疗方案的上下文中限定,包括例如施用时机和次数、施用模式、制剂等)。在一些实施方案中,PKC- θ 抑制剂和任选的癌症治疗按常规时间表施用。或者,癌症治疗可在症状出现时施用。如本文所使用的“常规时间表”是指预定的指定时间段。常规时间表可以包括长度相同或不不同的时间段,只要时间表是预定的即可。例如,常规时间表可以包括基于如下施用PKC- θ 抑制剂:每天、每两天、每三天、每四天、每五天、每六天、每周、每月或任何固定的天数或其间数周、每两个月、每三个月、每四个月、每五个月、每六个月、每七个月、每八个月、每九个月、每十个月、每十一个月、每十二个月等。或者,预定的常规时间表可以包括第一周每天,随后几个月按每月一次施用,此后按每三个月一次同时施用PKC- θ 抑制剂和癌症治疗。常规时间表将涵盖任何特定的组合,只要其在合适时间表包括的在某一天施用的时间之前确定即可。

[0676] 另外,本发明提供了用于降低、减轻、消除或预防PKC- θ 过表达细胞(例如,CSC)的(i)形成、(ii)增殖、(iii)维持或(iv)EMT;和/或增强PKC- θ 过表达细胞(例如,CSC)的(v)MET;以及用于预防或治疗癌(特别是转移癌)的药物组合物,其包含PKC- θ 抑制剂和任选的用于治疗癌的癌症治疗剂。本发明的制剂以可药用溶液剂施用,其通常包含可药用浓度的盐、缓冲剂、防腐剂、相容的载体、辅助剂和任选的其他治疗成分。根据待治疗的具体病症,制剂可全身或局部施用。制剂和施用的技术可参见“Remington's Pharmaceutical Sciences,”Mack Publishing Co.,Easton,Pa.的最新版本。合适的途径例如可包括经口、经直肠、经粘膜或经肠施用;肠胃外递送,包括肌内、皮下、髓内注射,以及鞘内、直接心室内、静脉内、腹膜内、鼻内或眼内注射。为了注射,可将本发明的活性剂或药物配制在水溶液中,适当地配制在生理学上相容的缓冲液,例如Hanks溶液、林格氏溶液(Ringer's solution)或生理盐水缓冲液中。对于经粘膜施用,在制剂中使用适于待渗透屏障的渗透剂。这样的渗透剂是本领域中通常已知的。

[0677] 可以使用本领域中公知的可药用载体容易地将药物配制成适用于经口施用的剂型(dosage)。此类载体使得本发明的化合物能够被配制或被待治疗患者经口摄取的剂型,例如片剂、丸剂、胶囊剂、液体剂(liquid)、凝胶剂、糖浆剂、浆剂(slurry)、混悬剂等。这些载体可选自:糖、淀粉、纤维素及其衍生物、麦芽、明胶、滑石、硫酸钙、植物油、合成油、多元醇、藻酸、磷酸盐缓冲溶液、乳化剂、等渗盐水和无热原水。

[0678] 用于肠胃外施用的药物制剂包括水溶性形式的活性化合物的水溶液。另外,活性化合物的混悬液可在适当时制备成油性注射混悬剂。合适的亲脂性溶剂或载剂包括脂肪油(例如芝麻油)或合成脂肪酸酯(例如油酸乙酯或甘油三酯)或脂质体。水性注射混悬剂可以包含提高所述混悬液粘度的物质,例如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或葡聚糖。任选地,所述混悬液还可以包含合适的稳定剂或试剂,从而提高化合物的溶解度以允许制备高度浓缩的溶液。

[0679] 用于经口使用的药物制剂可以通过以下获得:将活性化合物与固体赋形剂组合,任选地研磨所得混合物,并且在添加合适的助剂(如果需要的话)后加工颗粒混合物以获得片剂或糖衣丸芯。合适的赋形剂特别地是填充剂,例如糖(包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨糖醇);纤维素制剂,例如,玉米淀粉、小麦淀粉、大米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄蓍胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠或聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。如果需要的话,可以添

加崩解剂,例如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或藻酸或其盐(例如藻酸钠)。这样的组合物可以通过任何药学方法制备,但是所有的方法都包括将上述的一种或更多种药物与载体(其构成一种或更多种必需成分)组合在一起的步骤。通常,本发明的药物组合物可以以其自身已知的方式制备,例如,通过常规的混合、溶解、制粒、制糖衣丸(dragee-making)、研细(levigating)、乳化、包封、包埋或冻干过程来制备。

[0680] 糖衣丸芯设置有合适的包衣。出于这个目的,可以使用浓缩糖溶液,其可以任选地包含阿拉伯树胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、卡波普凝胶、聚乙二醇、或二氧化钛、漆溶液(lacquer solution)以及合适的有机溶剂或溶剂混合物。可以向片剂或糖衣丸包衣中添加染料或色素用于辨识或表征活性化合物剂量的不同组合。

[0681] 可以经口使用的药物包括由明胶制成的硬胶囊(push-fit capsule),以及由明胶和增塑剂(例如甘油或山梨糖醇)制成的软密封胶囊。所述硬胶囊可以包含与填充剂(例如乳糖)、粘合剂(例如淀粉)或润滑剂(例如滑石或硬脂酸镁)以及任选的稳定剂混合的活性成分。在软胶囊中,活性化合物可以溶解或混悬在合适的液体中,例如脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇。另外,可以添加稳定剂。

[0682] 本发明药物的剂型还可包括专门为此目的设计的注射或植入控制释放装置,或者修饰成以这种方式附加地起作用的其他形式的植入物。本发明药剂的控制释放可通过例如用疏水性聚合物(包括丙烯酸树脂、蜡、高级脂肪醇、聚乳酸和聚乙醇酸以及某些纤维素衍生物(例如羟丙基甲基纤维素))包被所述药剂来实现。另外,控制释放可通过使用另一些聚合物基质、脂质体或微球来实现。

[0683] 本发明的药物可以作为具有药学相容抗衡离子的盐提供。药学相容盐可以用许多酸形成,所述酸包括但不限于盐酸、硫酸、乙酸、乳酸、酒石酸、苹果酸、琥珀酸等。盐倾向于更溶于水或为相应游离碱形式的其他质子溶剂中。

[0684] 对于本发明方法中使用的任何化合物,治疗有效剂量可以首先由细胞培养物测定来估计。例如,剂量可以在动物模型中配制以达到包括如在细胞培养物中测定的IC₅₀(例如,实现PKC- θ 多肽活性的半数最大抑制的活性剂浓度)在内的循环浓度范围。这样的信息可用于更准确地确定在人的可用剂量。

[0685] 这类药物的毒性和治疗功效可通过标准药学方法在细胞培养物或实验动物中确定,例如,用于确定LD₅₀(群体50%致死的剂量)和ED₅₀(群体50%治疗有效的剂量)。毒性作用与治疗作用之间的剂量比是治疗指数,并且其可以表示为比率LD₅₀/ED₅₀。表现出大治疗指数的化合物是优选的。从这些细胞培养物测定和动物研究获得的数据可用于配制供人使用的剂量范围。这类化合物的剂量优选地在包括ED₅₀的循环浓度范围内,具有很少毒性或无毒性。剂量可以在该范围内根据所采用的剂型和所利用的施用途径而不同。精确制剂、施用途径和剂量可以由个体医生考虑患者的病症来选择。(参见例如Fingl等,1975,在“The Pharmacological Basis of Therapeutics”中,第1章,第1页)。

[0686] 或者,可以以局部方式而不是全身方式施用化合物,例如,通过向组织(优选皮下组织或网膜组织)直接注射化合物,常常以贮库(depot)制剂或持续释放制剂。

[0687] 此外,可以以靶向药物递送系统(例如,以适当靶向细胞或组织并被细胞或组织选择性吸收的颗粒)施用药物。在一些实施方案中,PKC- θ 抑制剂包含在载剂中或者以其他方式与载剂缔合,所述载剂选自:脂质体、胶束、树枝状聚合物、可生物降解颗粒、人工DNA纳米

结构、基于脂质的纳米颗粒以及碳或金纳米颗粒。在此类型的示例性实例中,所述载剂选自:聚(乳酸)(PLA)、聚(乙醇酸)(PGA);聚合物聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA);聚(乙二醇)(PEG)和PLA-PEG共聚物或其任意组合。

[0688] 在局部施用或选择性吸收的情况下,药剂的有效局部浓度可能与血浆浓度无关。

[0689] 为了使本发明可以被容易地理解并付诸实际效果,现将通过以下非限制性实施例来描述特别优选的实施方案。

实施例

[0690] 实施例1

[0691] PKC途径:EMT和CSC

[0692] 利用多种细胞测定使PKC途径与EMT和CSC相关联。首先,如通过形态学变化(图1A和B)、EMT标志物层粘连蛋白-5的细胞内染色(图1B)以及伤口愈合(迁移测定)(图1C)所观察的,PKC途径诱导物PMA在MCF-IM模型中引起最高的EMT变化。其次,在MCF-IM和基底/转移模型(图1D)中,PKC在细胞质和细胞核中都是有活性的。第三,如通过流式细胞术(FACS)分析(图1E和F)、乳腺球测定(图1G)以及CSC诱导型基因(图1H)和MicroRNA(图1I)的转录物分析中观察的,通过PMA诱导PKC途径导致CD44^高/CD24^低-CSC样细胞的产生。

[0693] 总体上,这些结果表明,PKC途径对EMT和CSC形成是重要的。

[0694] 实施例2

[0695] PKC活性的抑制减少EMT和CSC形成

[0696] 在基底转移模型(图2I, J和K)中以及在如通过形态学(图2A)、FACS(图2B和C)、乳腺球测定(图2D和E)和CSC诱导型基因的转录物分析(图2F和G)检测的MCF-IM模型中,广谱PKC途径抑制剂导致EMT和CSC形成的抑制。与此相反,用常规PKC抑制剂Go6976预孵育不阻止PMA诱导的EMT样形态学变化或CSC形成(图2C和H)。

[0697] 总体上,这些结果表明,PKC活性是EMT和CSC形成所必需的。

[0698] 实施例3

[0699] PKC- θ 信号传导和核作用的抑制导致EMT和CSC的消除

[0700] 如通过形态学(图3A)、FACS(图3B)以及转录物分析(图3C)所监测的,PKC- θ 特异性肽抑制剂在MCF-IM模型中消除EMT和CSC。PKC- θ 而不是PKC- β 的敲低在MCF-IM模型(图3D、E&F)中导致EMT和CSC的抑制。与MCF-IM模型(图3G、H和I)中PKC- θ 野生型载体的作用相比,PKC- θ NLS(核定位信号)突变的过表达降低PKC- θ 进入到细胞核中,因此导致EMT和CSC作用减少。

[0701] 总体上,这些结果表明,PKC- θ 是EMT和CSC形成的主调节子。此外,核PKC- θ 对EMT和CSC形成是重要的。

[0702] 实施例4

[0703] 在CSC中诱导型基因启动子上的核PKC- θ 的直接结合

[0704] 染色质免疫沉淀测定(ChIP)PKC- θ 显示在多种CSC模型(图4A)中PKC- θ 直接与CSC诱导型基因CD44的启动子相结合(tether)。PKC- θ (PKC- θ -磷酸)的活性形式与MCF-IM模型(图4B&C)中CSC诱导型基因-uPAR和CD44上的染色质相关联,并且该活性形式存在于活性转录标记RNA聚合酶-II(POL II)(图4D)中。PKC抑制剂以及PKC- θ 的敲低导致CD44基因启动子

上PKC- θ 的结合降低。

[0705] 总体上,这些结果表明,活性PKC- θ 是EMT和CSC形成的表观遗传学调节子。

[0706] 实施例5

[0707] 核活性PKC- θ :浸润性乳腺癌的标记

[0708] 在乳腺癌发展中,通过探究正常乳腺组织和来自患者的浸润性乳腺癌中的PKC- θ 蛋白质表达来分析PKC- θ 的临床相关性。当与来自健康个体的乳腺组织相比,在ER/PR⁺/Her-2⁻浸润性癌亚型中观察到PKC- θ 的强细胞质表达。此外,ER/PR⁺/Her-2⁻浸润性癌亚型具有微弱的活性PKC- θ (图5)核染色。不管受体状态如何,所有乳腺癌类型对于活性PKC- θ 显示出弱的细胞质免疫反应性,同时在经历有丝分裂的乳腺癌细胞中观察到强核染色。

[0709] 总体上,这些结果表明,细胞核中的活性PKC- θ 是侵袭性/浸润性乳腺癌的诊断标志物。

[0710] 实施例6

[0711] ATP竞争性PKC- θ 特异性抑制剂、化合物27在MCF-IM中阻止CSC形成以及经由PKC- θ 的信号传导是NF- κ B活性的先决条件

[0712] 新的、高选择性ATP竞争性PKC- θ 特异性抑制剂、化合物27(C27)(Jimenez, J.-M.等,2013.Design and optimization of selective protein kinase C theta(PKCtheta) inhibitors for the treatment of autoimmune diseases.Journal of Medicinal Chemistry 56:1799-1810)在体外PKC- θ 活性测定(图6A)以及在由用C27预处理的MCF-IM产生的核和细胞提取物(图6B和C)中终止PKC- θ 活性。如通过FACS(图6C)和CSC诱导型基因的转录(图6D)所测量的,C27还终止CSC形成。此外,C27显著地减小p50和p65核活性(图6E和F),这表明PKC- θ 也给间充质状态的NF- κ B蛋白质发信号。

[0713] 来自MCF-IM的核提取物的免疫印迹分析用抗磷酸化p65蛋白(丝氨酸-468)抗体进行。以下刺激诱导了丝氨酸468处的p65磷酸化(p65-P-468),并且此磷酸化在C27(图6G)的存在下受到抑制。然而,用pan-p65抗体的免疫印迹揭露了C27还抑制上皮和间充质状态(图6H)的细胞核中的p65丰度。另一方面,在C27处理的来自MCF-IM(图6I)的上皮和间充质细胞之细胞质级分中观察到p65的广泛积累。总的来说,这表明PKC- θ 活性对于在核中维持p65以及对于它在该转录因子的关键活性位点(丝氨酸468)处的磷酸化可能是全局需要的。

[0714] MCF-IM核提取物上的PKC- θ 半途ChIP(halfway ChIP)显示内源性PKC- θ 和p65或RNA Pol II之间存在关联(图5J)。因此,核PKC- θ 存在于NF- κ B和以间充质状态的活性转录复合物的附近。

[0715] 总的来说,这些数据表明,ATP竞争性PKC- θ 特异性抑制剂、化合物27阻止CSC形成以及活性PKC- θ 与活性NF- κ B家族成员协作。

[0716] 实验步骤

[0717] 细胞培养以及从NCSC中分离CSC

[0718] 将贴壁的人乳腺癌MCF-7和MDA-MB-231细胞在低葡萄糖DMEM(Gibco)中培养,并都补充有10%FCS、2mM L-谷氨酰胺和0.1%PSN抗生素。将细胞用0.65ng/ml的佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯(PMA)(Sigma-Aldrich)或20ng/ml的TGF- β (R&D systems)刺激指示的时间。对于双吡啶马来酰亚胺-I(Bisindolylmaleimide-I)(Calbiochem)或PKC- θ 肽抑制剂(Calbiochem)研究,在MCF-7细胞中刺激之前,将细胞分别用1 μ M或30 μ M的抑制剂预处理1小

时。在MDA-MB-231的情况下,将细胞分别用4 μ M或30 μ M双吡啶马来酰亚胺-I或PKC- θ 肽抑制剂处理。

[0719] 为了从非CSC(NCSC)中分离CSC,对用抗CD44-APC(559942,BD Biosciences)和抗CD24-PE抗体(555428,BD Biosciences)连同Hoechst33258一起染色的单细胞悬液进行荧光激活细胞分选(florescence activated cell sorting,FACS)以监测细胞活力。如在本工作中所使用,CSC定义为少数CD44^高/CD24^低,而NCSC定义为其余细胞群。

[0720] 乳腺球培养基组分购买自StemCell Technologies,并且如制造商指南推荐的进行乳腺球测定。简单地说,然后制备40,000个细胞/2ml细胞稀释液,并将2ml细胞接种在6孔-超低粘附的平底板(Costar)上。在第7天对每孔中大于60 μ m的乳腺球进行计数,并拍摄图片。

[0721] 相差显微术

[0722] 在使用Olympus荧光1 \times 71显微镜(Olympus)将细胞放大4倍(伤口愈合实验)或10倍(EMT)来观察的情况下进行相差显微术,并使用DPController软件(2002 Olympus optical Co.,LTD)捕捉图像,并使用Photoshop CS3(Adobe Systems Inc.)对图像进行分析。扫描使用10 μ m的比例尺。

[0723] 伤口愈合测定

[0724] 用无菌塑料尖端(tip)使MCF-7细胞单层划伤。将细胞用PBS洗涤两次并用DMEM洗涤一次。对于每个孔和显微术所需的时间零点在皿上做参考标记。将细胞用PMA(0.65ng/ml)处理60小时,并在匹配区域内拍摄第二次图像。使用Photoshop CS3(Adobe Systems Inc.)绘出伤口单层两侧的边缘并使其重叠。

[0725] 质粒

[0726] 在全长PKC- θ 野生型基因序列内使核定位点(Nuclear Localization Signal,NLS)突变,并以框克隆进具有如前所述(Sutcliffe等,2012.Front Immunol.3:260)的C末端HA标记的pTracer-CMV载体中。

[0727] 引物

[0728] 所使用的人TaqManTM引物组为:CD44、Hs00153304、CD24、Hs00273561、uPAR、Hs00182181、层粘连蛋白-5、Hs00194333、Zeb-1、Hs00611018、纤连蛋白、Hs00415006和整联蛋白- β 、Hs00168458(Applied Biosystems)。用于SYBR Green实时PCR的引物是:Zeb1(正义:

[0729] 5'-GTGCTGTAAGTGCCATTTCTCAGTA-3'和反义:

[0730] 5'-CAAGAGACAAATCAACAAATGCTAGTT-3')和亲环蛋白A(正义:

[0731] 5'-CTCCTTTGAGCTGTTTGAG-3'和反义:

[0732] 5'-CACCACATGCTTGCCATCC-3')。

[0733] 转染条件

[0734] 人PKC- θ siRNA(SC-36252)、p50siRNA(sc-44211)和p65siRNA(sc-44212)购自Santa Cruz Biotechnologies,并通过使用Lipofectamine 2000(Invitrogen)用10nM siRNA进行正向转染。

[0735] 总RNA分离和定量实时PCR分析

[0736] 使用**TRIzol**[®]试剂(Invitrogen)提取总RNA,并使用SuperscriptTMIII RNase

H-逆转录酶试剂盒(Invitrogen)合成第一链cDNA。如前所述(Sutcliffe等, 2009. *Molecular and Cellular Biology*. 29:1972-86)进行**TaqMan®**基因表达测定和SYBR Green实时PCR。用**TaqMan®**MicroRNA逆转录试剂盒(ABI4366596)进行MicroRNA测定,并如Sutcliffe等(2010, *Molecular Cell*. 41:704-719)中先前所述将数据相对于RNU6B归一化。

[0737] CHIP和连续CHIP测定

[0738] CHIP缓冲液购买自Upstate Biotechnology,并如前所述(Sutcliffe等, 2011. *Molecular Cell*. 41:704-719),根据由Upstate Biotechnology提供的方案进行ChIP测定。所使用的抗体为:抗PKC- θ (Santa Cruz, sc-212)、抗PKC- θ 磷酸s695(Abcam, ab76568)和Pol II c-21(Abcam, ab817)。用于RT-PCR的启动子引物是人CD44(正向: TGAGCTCTCCCTCTTTCCAC, 反向: TTGGATATCCTGGGAGAGGA)、uPAR(正向: GGGAAAGCAAAGCAAGGGTTA, 反向: GTTTTGTTCAGGAGGGATACTGG)和IL-6(正向: CTCACCCTCCAACAAAGATTT, 反向: CAGAATGAGCCTCAGACATC)。如由Sutcliffe等(2010, *Molecular Cell*. 41:704-719)先前所述的进行连续ChIP测定。

[0739] PKC活性测定

[0740] PKC活性测定购买自Enzo Life Sciences(DI-EKS-420A),并如先前所述(Sutcliffe, 2012. 同上)根据制造商的方案进行进行测定。

[0741] 免疫荧光

[0742] 在Bond自动化系统(Vision Biosystems)上按照标准方案进行免疫组织化学。简单地说,使5 μ M组织切片脱蜡,通过分级乙醇再水化,并分别用抗PKC- θ 或抗PKC- θ 磷酸抗体(如0539中所述的)染色。在pH 8下加热修复28分钟。Chromogen Fast Red(Leica Biosystems)和DAKO Envision试剂盒被用于使信号显现。苏木精复染色被用于使细胞核显现。在每次操作中,在每个载玻片上包含阳性和阴性同种型匹配的对照以确保不存在假阳性染色。

[0743] 如在Sutcliffe等, 2011. *Molecular Cell*. 41:704-719中先前所述的进行细胞内染色。

[0744] 数据分析

[0745] 使用Microsoft Excel(Microsoft)分析数据,并使用Prism(version 5.0, GraphPad software)生成图表。

[0746] 实施例6的PKC活性测定

[0747] 根据制造商的方案以及之前所述(Sutcliffe等, 2012. *Chromatinized Protein Kinase C-theta: Can It Escape the Clutches of NF-kappaB?* *Front Immunol* 3:260)进行PKC- θ 和PKC- β 活性测定。

[0748] 实施例6的NF- κ B活性测定

[0749] TransAM NF- κ B家族试剂盒被用于NF- κ B活性测定(43296, Active Motif)。根据制造商的指南进行测定。使用5 μ g来自MDA-MB231或MCF-1M衍生的全细胞、核和细胞质提取物的蛋白质,一式三份进行测定。Raji核提取物被用作阳性对照。野生型和突变共有寡核苷酸也分别被用作阴性和阳性对照。

[0750] 实施例6的免疫印迹分析

[0751] 采用抗PKC- θ (sc-212, SantaCruz)、抗p65(ab7970, Abeam)、抗p65磷酸化(ser-468)(3039, Cell Signaling)、抗p65磷酸化(ser-536)(3031, Cell Signaling)和RNA Pol II(c-21)(ab817, Abeam)抗体根据制造商的方案和之前所述的(Rao等, 2003. c-Rel is required for chromatin remodeling across the IL-2 gene promoter. Journal of immunology 170:3724-3731)进行免疫印迹分析。

[0752] 本文中所引用的每个专利、专利申请和出版物的公开内容在此通过引用整体并入本文。

[0753] 本文中任何参考文献的引用不应被理解为承认该文献可作为本申请的“现有技术”。

[0754] 整个说明书的目的是描述本发明的优选实施方案而非将本发明限制于任何一个实施方案或特征的特定集合。因此本领域技术人员将理解的是, 根据本公开内容, 可以对示例的具体实施方案做出多种修改和改变而不脱离本发明的范围。所有此种修改和改变旨在包括在所附权利要求的范围之内。

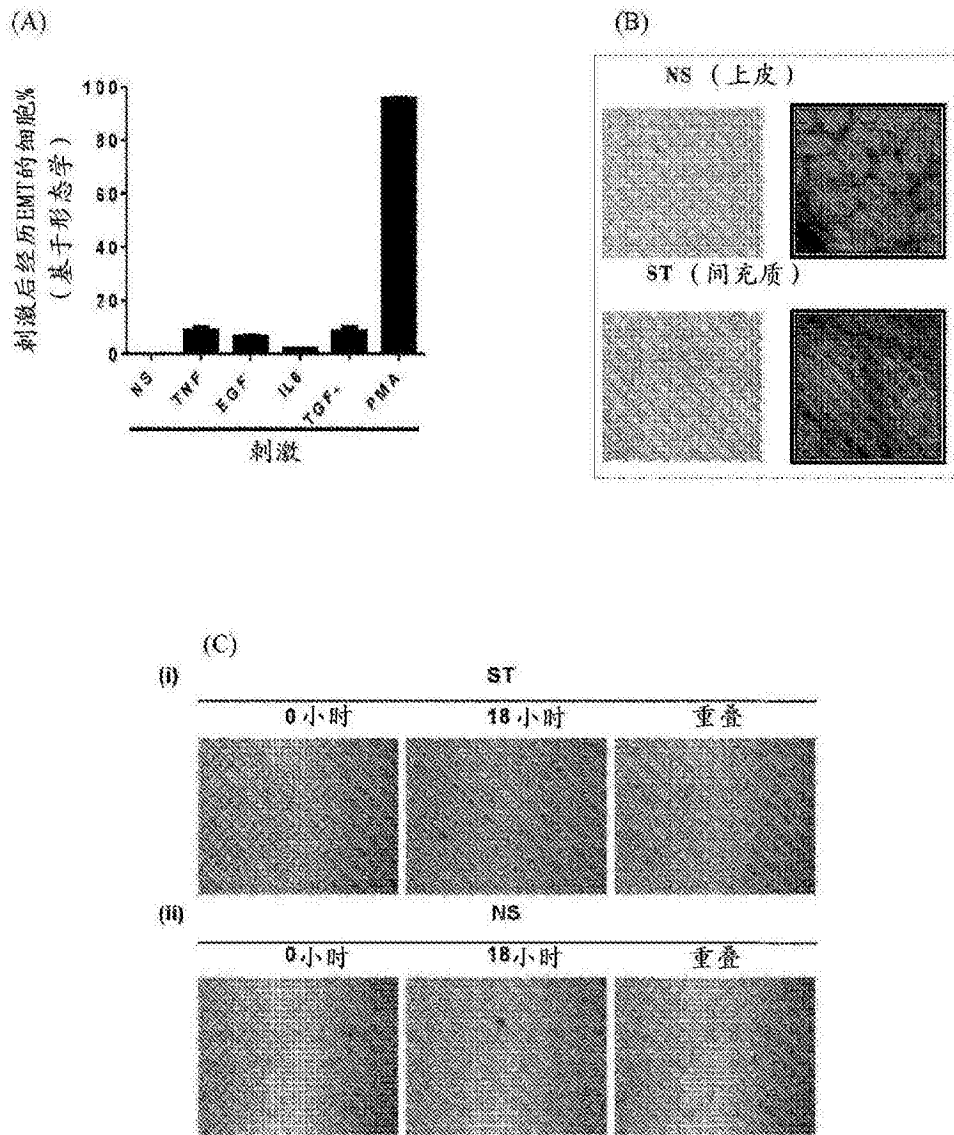


图1

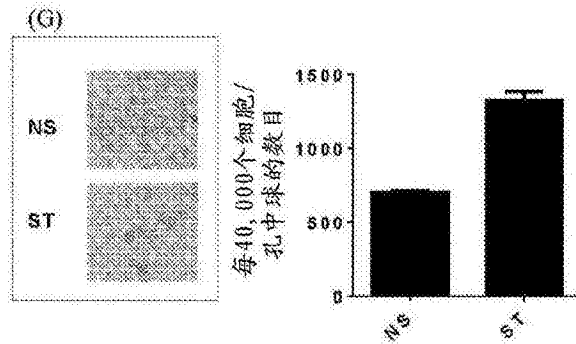
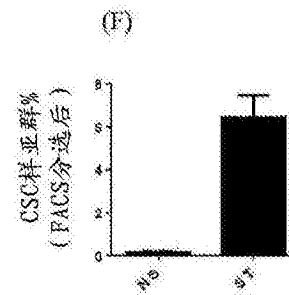
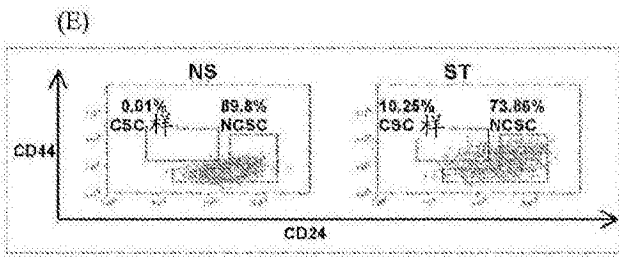
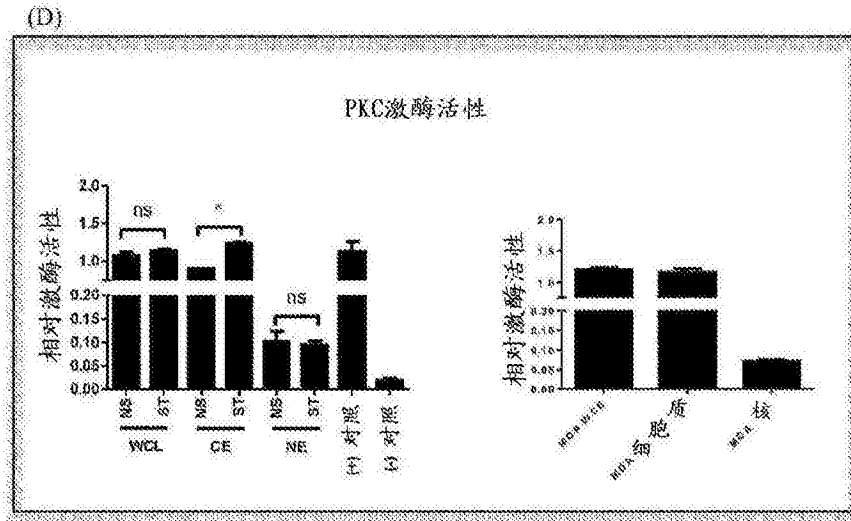


图1续

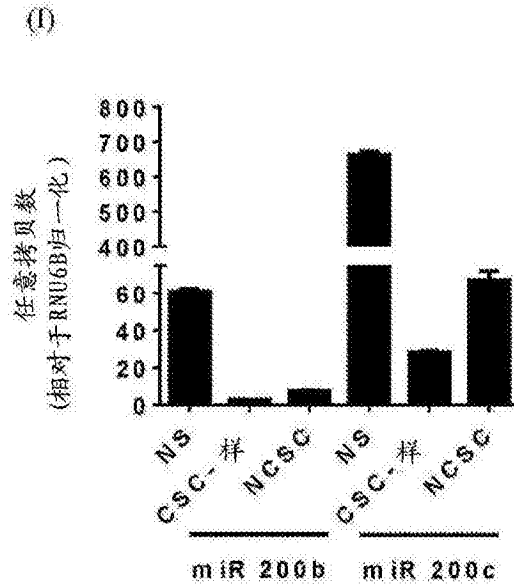
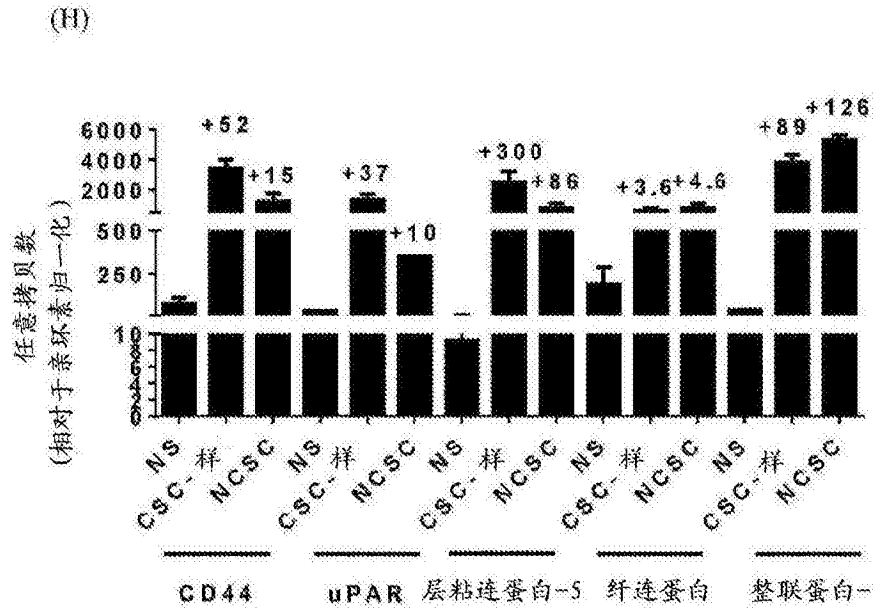


图1续

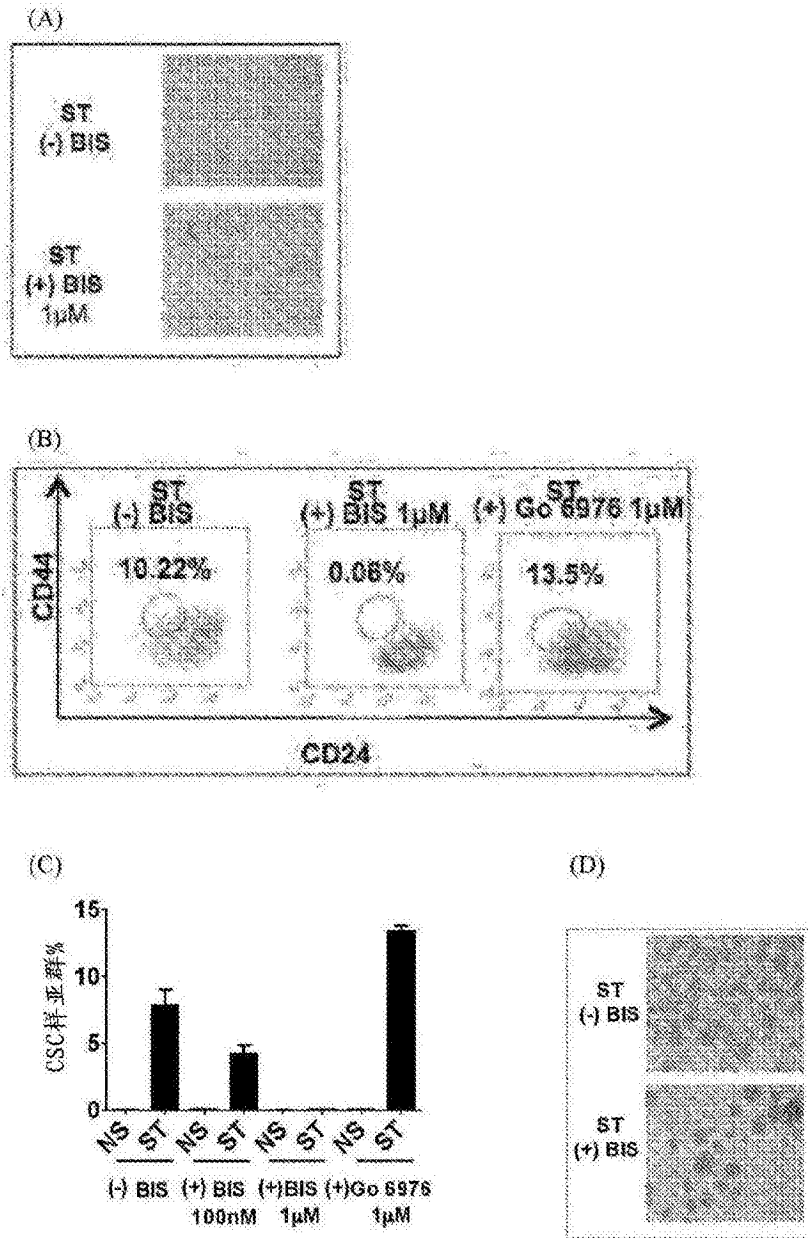


图2

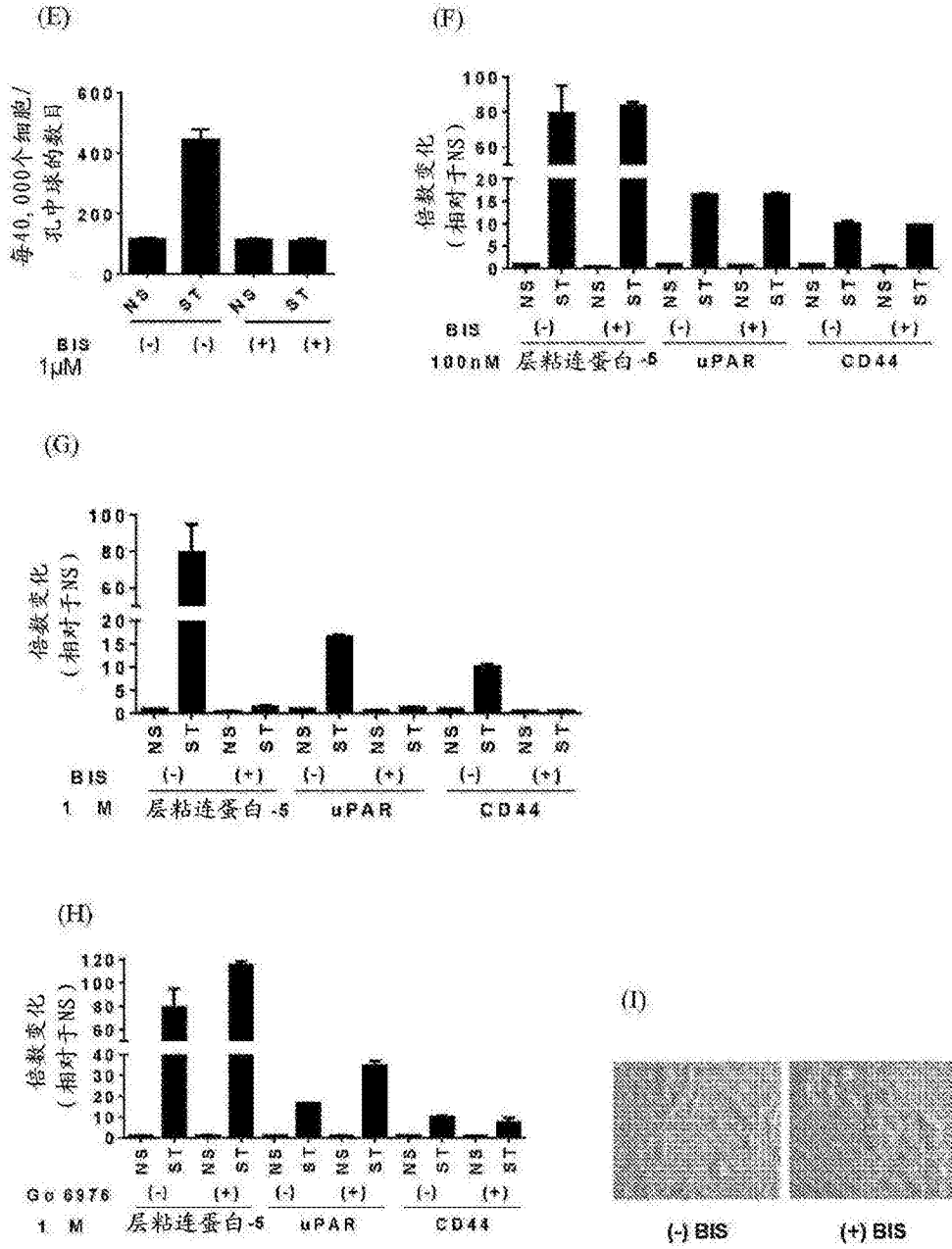
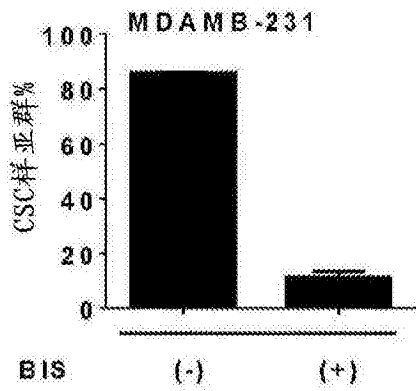


图2续

(J)



(K)

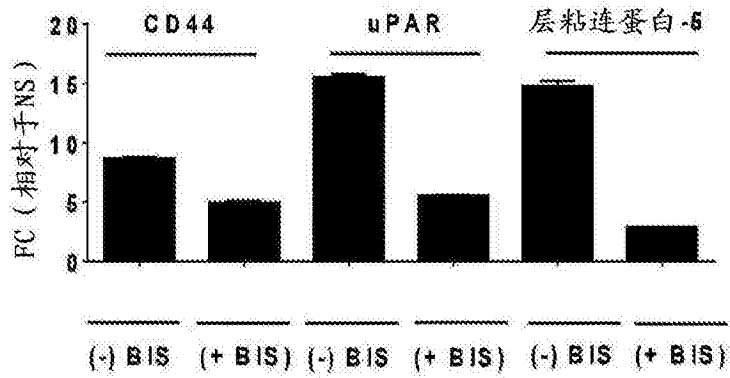


图2续

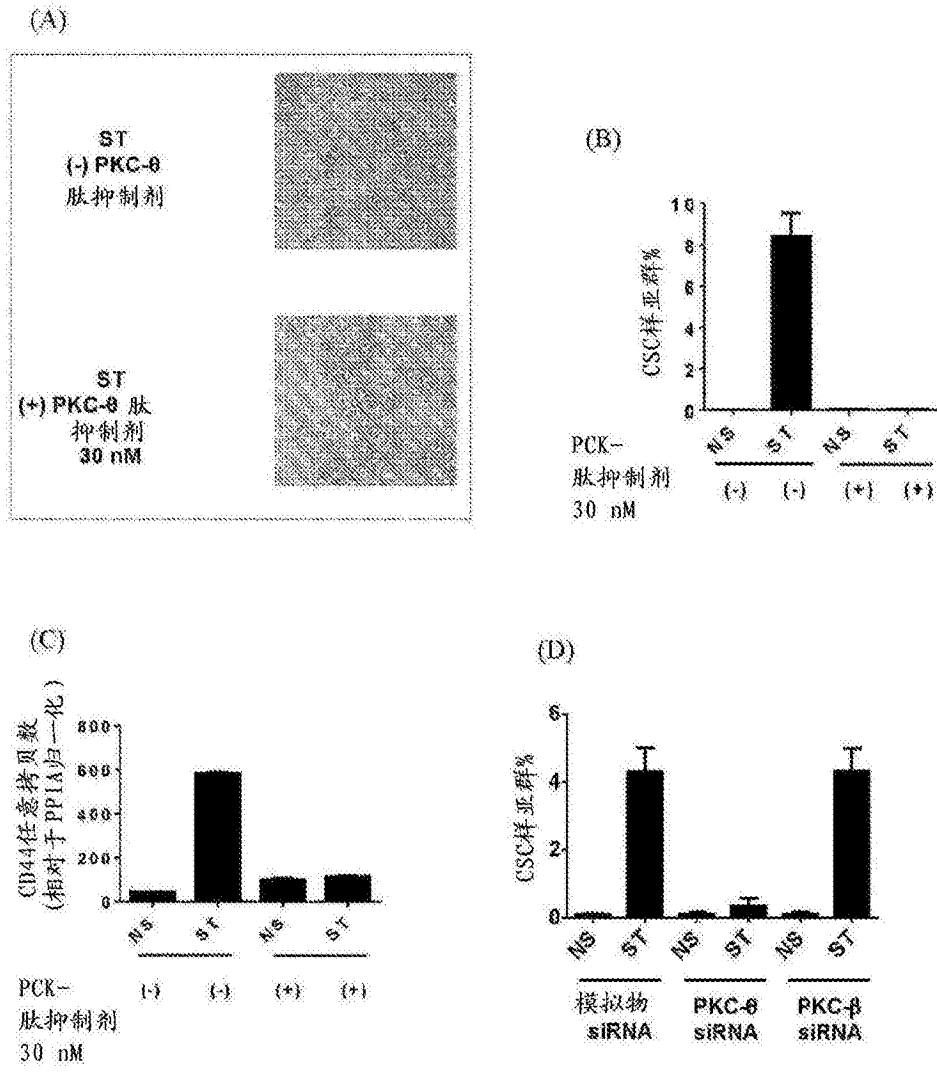


图3

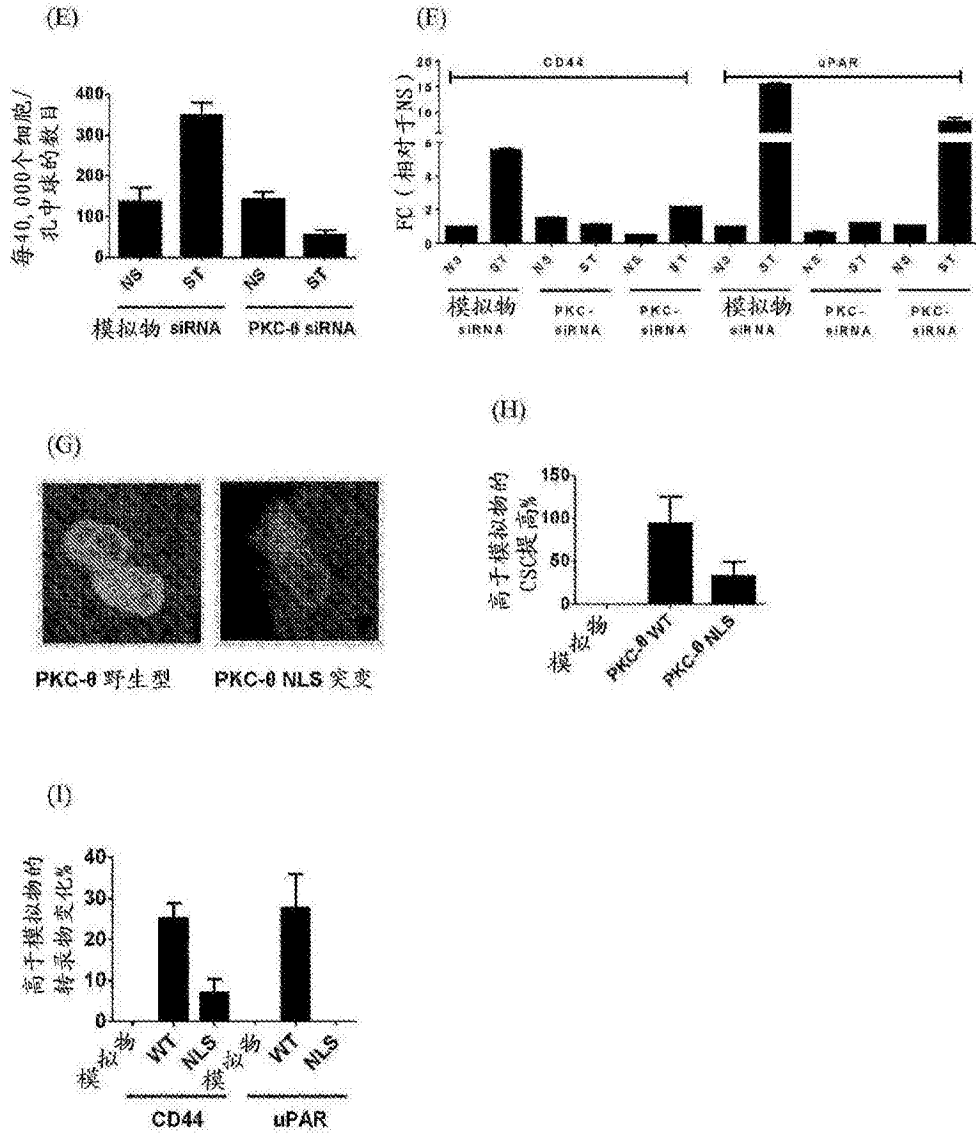


图3续

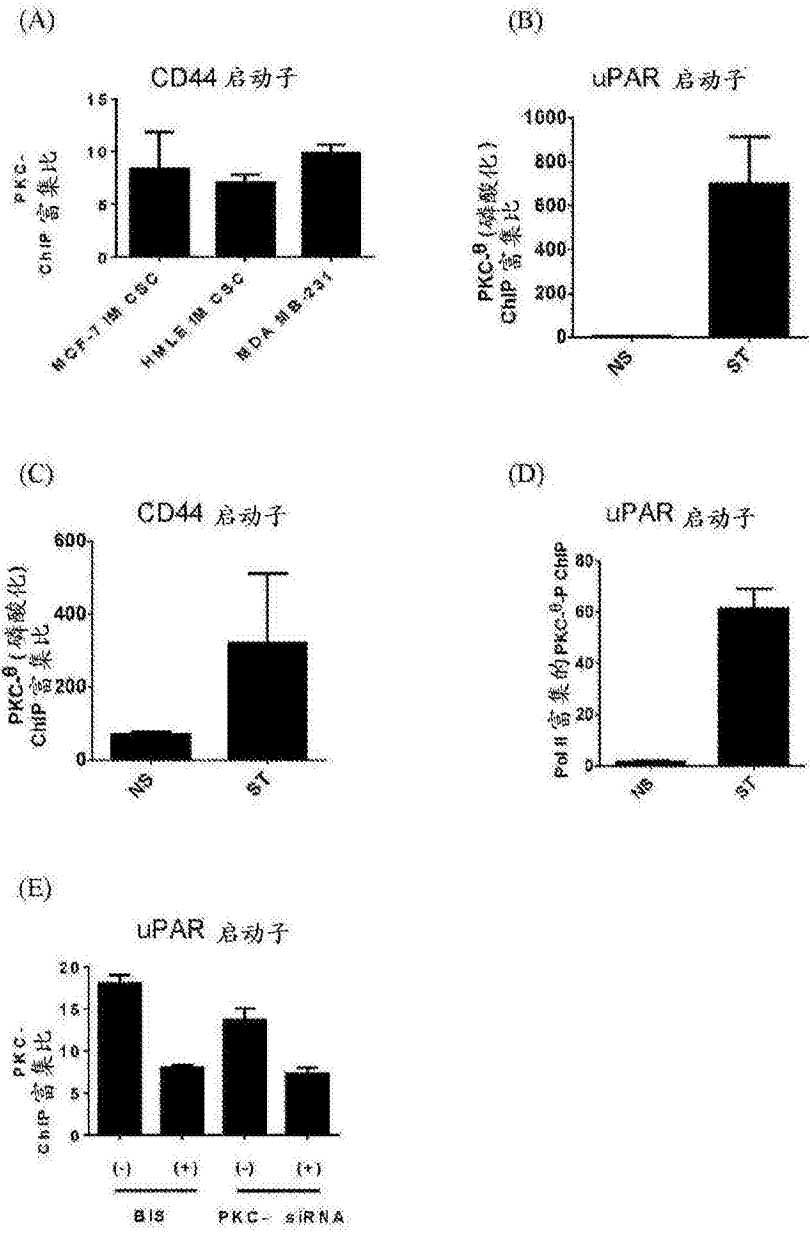


图4

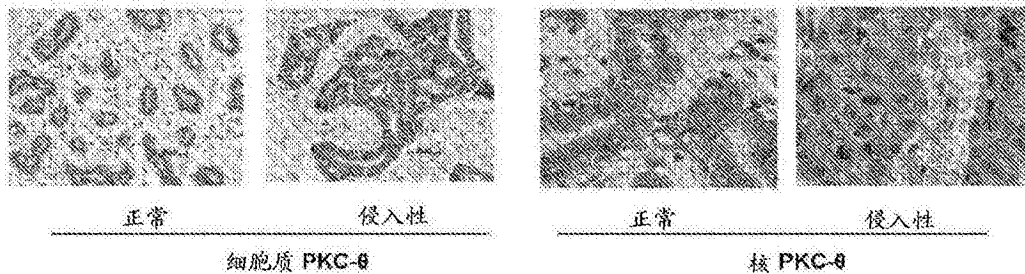


图5

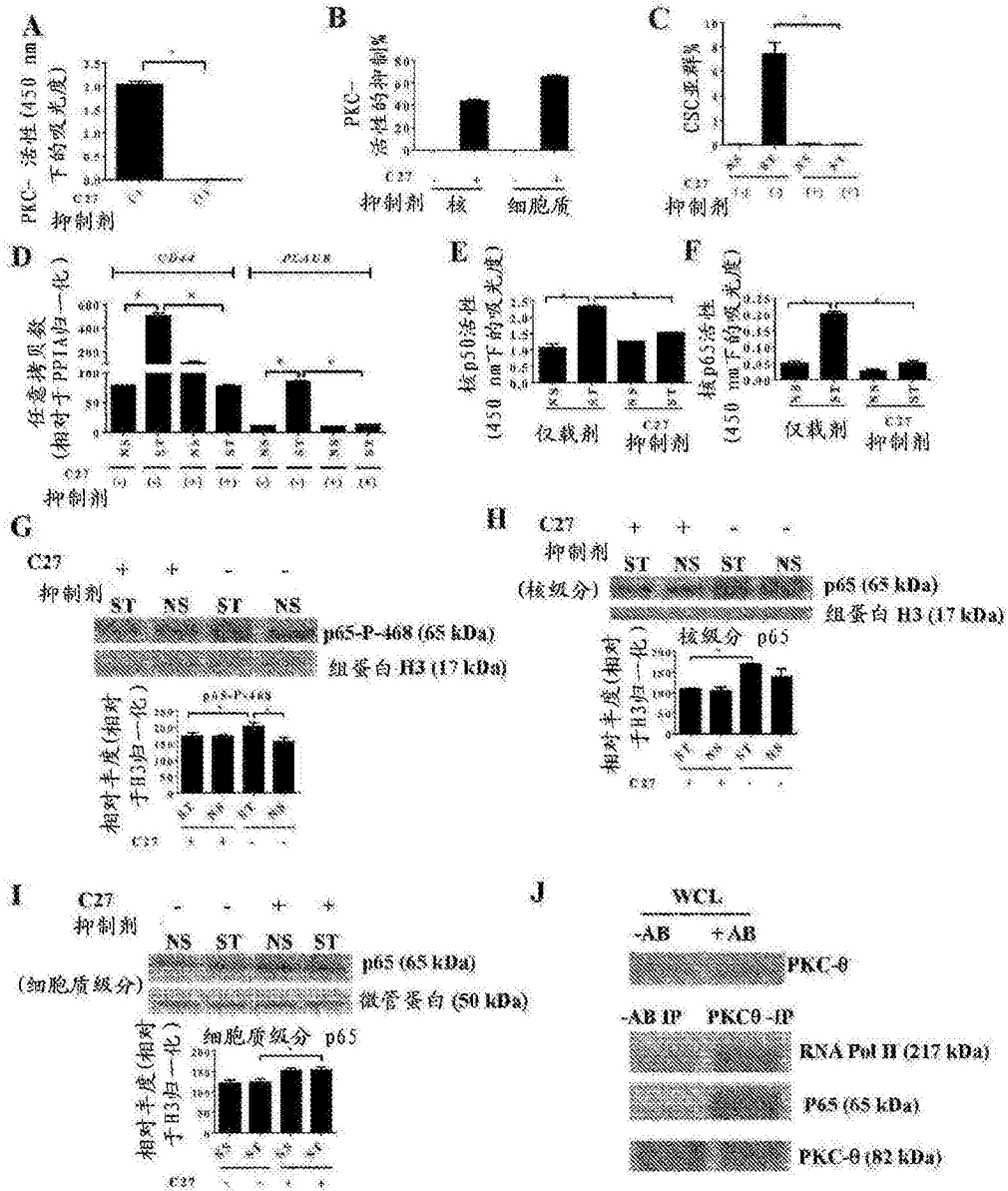


图6