



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103180318 B

(45)授权公告日 2017.05.10

(21)申请号 201180033583.2

专利权人 贝勒医学院

(22)申请日 2011.05.16

(72)发明人 J·E·布拉德纳 M·玛祖克
祁军

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103180318 A

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256

(43)申请公布日 2013.06.26

代理人 陈文平

(30)优先权数据

61/334,991 2010.05.14 US

61/370,745 2010.08.04 US

61/375,863 2010.08.22 US

61/467,376 2011.03.24 US

61/467,299 2011.03.24 US

(51)Int.Cl.

C07D 471/00(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.01.06

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/036667 2011.05.16

(87)PCT国际申请的公布数据

W02011/143657 EN 2011.11.17

(56)对比文件

US 20060142257 A1,2006.06.29,

Enyuan Shang et al..The first

bromodomain of Brdt, a testis-specific

member of the BET sub-family of double-

bromodomain-containing proteins, is

essential for male germ cell

differentiation.《Development》.2007,第134

卷(第19期),第3507-3515页.

审查员 刘广宇

(73)专利权人 达那-法伯癌症研究所

地址 美国马萨诸塞州

权利要求书3页 说明书74页 附图18页

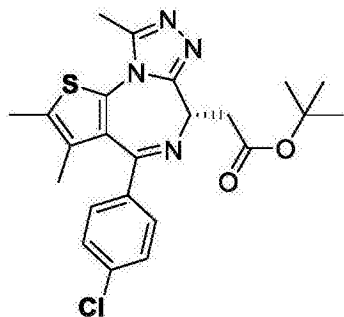
(54)发明名称

雄性避孕组合物以及使用方法

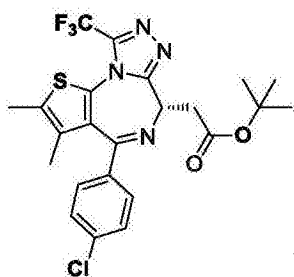
(57)摘要

本发明涉及用于实现雄性避孕的组合物和方法。

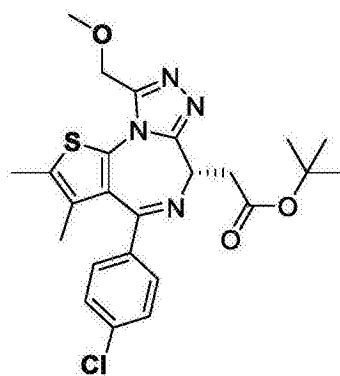
1. 化合物在制备用于减少或抑制雄性受试者中的精子发生的药物中的用途, 其中所述化合物选自以下结构式表示的任一化合物或其药学上可接受的盐:



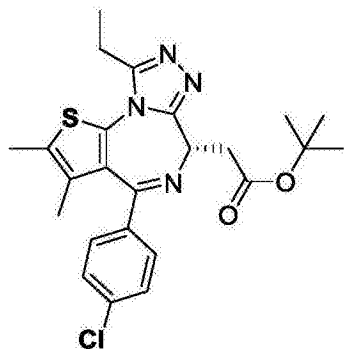
(S)-JQ1,



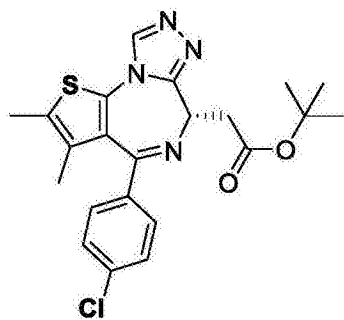
JQ11,



JQ18,

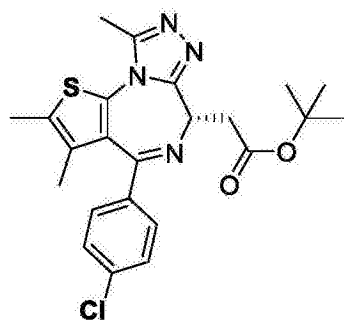


JQ19, 和



JQ21。

2. 如权利要求1所述的用途, 其中所述化合物是以下结构式表示的化合物或其药学上可接受的盐:



3. 如权利要求1-2中任一项所述的用途,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的量是足以减少精子数目和/或减少精子活动性的量。

4. 如权利要求1-2中任一项所述的用途,其中所述化合物或其药学上可接受的盐的量是足以引起无精子症、少精子症和/或弱精子症的量。

5. 如权利要求1-2中任一项所述的用途,其中所述化合物或其药学上可接受的盐在所述受试者中诱导避孕效果。

6. 如权利要求1-2中任一项所述的用途,其中所述药物是口服、经皮或通过注射给予的形式。

7. 如权利要求1-2中任一项所述的用途,其中所述药物是片剂或胶囊形式。

8. 如权利要求1-2中任一项所述的用途,其中所述药物是肠胃外注射、肌肉注射、静脉内注射、皮下植入、皮下注射或经皮制剂。

9. 如权利要求1-2中任一项所述的用途,其中所述化合物或其药学上可接受的盐是与药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂组合。

10. 如权利要求1-2中任一项所述的用途,其中所述受试者是人类。

11. 化合物在制备用于减少受试者中的雄性生育率的药物中的用途,其中所述化合物是如权利要求1-2中任一项所定义的化合物或其药学上可接受的盐。

12. 一种药用组合物,所述组合物以一个有效减少或抑制雄性受试者中的精子发生的量包括如权利要求1-2中任一项所定义的化合物或其药学上可接受的盐。

13. 如权利要求12所述药用组合物,其中所述药用组合物包括一个足以减少精子数目和/或抑制精子活动性的量的所述化合物或其药学上可接受的盐。

14. 如权利要求12所述药用组合物,其中所述药用组合物包括一个足以引起无精子症、少精子症和/或弱精子症的量的所述化合物或其药学上可接受的盐。

15. 如权利要求12所述药用组合物,其中所述药用组合物包括一个足以在所述受试者中诱导避孕效果的量的所述化合物或其药学上可接受的盐。

16. 如权利要求12所述的药用组合物,其中所述药用组合物是口服、经皮或通过注射给予的形式。

17. 如权利要求12所述的药用组合物,其中所述药用组合物是片剂或胶囊形式。

18. 如权利要求12所述的药用组合物,其中所述药用组合物是肠胃外注射、肌肉注射、静脉内注射、皮下植入、皮下注射或经皮制剂。

19. 如权利要求12所述的药用组合物,其中所述药用组合物进一步地包括一种药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。

20. 如权利要求12所述的药用组合物,其中所述受试者是人类。

21. 一种用于减少雄性生育率的试剂盒,所述试剂盒包括有效量的如权利要求1-2中任一项所定义的化合物或其药学上可接受的盐。

22. 如权利要求21所述的试剂盒,其中所述试剂盒进一步包括用于使用所述化合物或其药学上可接受的盐减少雄性生育力的说明。

雄性避孕组合物以及使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2010年5月14日提交的美国临时申请号61/334,991;2010年8月4日提交的美国临时申请号61/370,745;2010年8月22日提交的美国临时申请号61/375,863;2011年3月24日提交的美国临时申请号61/467,376;以及2011年3月24日提交的美国临时申请号61/467,299的权益。通过该引用以其全文将这些申请的内容结合在此。

[0003] 在联邦资助研究下做出本发明的权利陈述

[0004] 本工作由来自美国国立卫生研究院的以下拨款支持,拨款号:K08CA128972(布拉德纳(Bradner))。在本发明中政府具有一定的权利。

[0005] 发明背景

[0006] 尽管哺乳动物基因组的~4%对在精子发生期间于雄性精细胞中表达的基因进行编码,但是男性避孕药物仍难以解决。迄今为止,临床试验中的仅有药物是改变内源雄激素生产的甾酮类似物。缺乏男性避孕替代方案部分地是高无计划受孕率的原因,尤其是十几岁的少年,并且部分地是相关的产妇死亡率以及与单身母亲的流产与分娩相关的伦理、社会及经济成本的原因。为了着手处理这一男性避孕替代方案的缺乏,希望的是研发可以靶向精子发生特异性蛋白的小分子,已经显示这些精子发生特异性蛋白对于哺乳动物中的精子发生以及生育力是必需的。一个此类避孕靶标是布罗莫结构域睾丸特异性蛋白,BRDT。

[0007] BRDT是一种组织局限性的、染色质重塑蛋白,在粗线期精母细胞、双线期精母细胞以及球形精细胞中表达。在减数分裂后成熟期间,BRDT定位到细胞核并且通过双乙酰赖氨酸识别模块或布罗莫结构域重新组织超乙酰化的组蛋白。BRDT在精子发生中的必需作用是通过第一布罗莫结构域(BRDT(1))来介导的,该BRDT(1)以适度效价(20 μ M)结合组蛋白4(H4Kac4)的四-乙酰化氨基末端。鼠BRDT的结构研究已经证明,BRDT(1)部分地通过一个保守的天冬酰胺来结合二乙酰化的组蛋白4肽(H4K5ac8ac),这与对其他布罗莫结构域共激活因子蛋白的精子研究类似。BRDT的遗传研究已经证明,BRDT(1)编码区域的选择性缺失足以在纯合雄性小鼠中赋予不育,并且最近公开的一项对特发性男性不育的全基因组关联研究将BRDT的单核苷酸多态性鉴别为显著地与在欧洲男性中的少精子症或无精子症相关。这些见解建立了令人信服的理论以靶向BRDT用于避孕效果。

[0008] 发明概述

[0009] 如以下所述,本发明提供了用于实现雄性避孕的新颖化合物和组合物。本发明还提供了用于在雄性受试者中使用此类化合物和组合物的方法。

[0010] 在一个方面,本发明提供了用于在雄性受试者中减少或抑制精子发生的方法。在实施方案中,这些方法涉及给予该雄性受试者一个有效量的抑制布罗莫结构域睾丸特异性蛋白(BRDT)的化合物或其盐。

[0011] 在一个方面,本发明提供了用于在受试者中减少雄性生育率的方法。在实施方案中,这些方法涉及给予该雄性受试者一个有效量的抑制BRDT的化合物或其盐。

[0012] 在以上方面中,这些方法涉及以一种足以减少精子数目和/或减少精子活动性的量给予该化合物或其盐。

[0013] 在以上方面中,这些方法涉及以一种足以引起无精子症、少精子症和/或弱精子症的量给予该化合物或其盐。在实施方案中,这些方法在受试者中诱导避孕效果。

[0014] 在本发明的方面中,本发明提供了具有抑制BRDT的化合物或其药学上可接受的盐或药物前体的药用组合物。在实施方案中,该化合物或其盐以一个有效减少或抑制雄性受试者中的精子发生的量存在。

[0015] 在实施方案中,该化合物或其盐以一个有效减少精子数目和/或减少精子活动性的量存在。

[0016] 在实施方案中,该化合物或其盐以一个有效诱导无精子症、少精子症和/或弱精子症的量存在。在相关的实施方案中,该化合物或其盐以一个有效在受试者中诱导避孕效果的量存在。

[0017] 在任何以上方面中,该化合物或其盐是利用在此描述的任何给予剂量和/或给予途径来给予受试者。在实施方案中,该化合物或其盐是口服、经皮或通过注射给予受试者。在相关实施方案中,该化合物或其盐是以片剂或胶囊形式给予。在相关实施方案中,该化合物或其盐是通过肠胃外注射、肌肉注射、静脉内注射、皮下植入、皮下注射或经皮制剂来给予。

[0018] 在任何以上方面中,该化合物或其盐是与一种药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂组合给予。

[0019] 在任何以上方面中,该化合物或其盐的给予减少了附睾精子数目,程度为对照中存在的精子数目的至少约25%。在实施方案中,该化合物或其盐的给予减少了附睾精子数目,程度为对照中存在的精子数目的至少约10%。在相关实施方案中,给予该化合物或其盐后,剩余精子中仅有约5%显示出前进运动性。

[0020] 在任何以上方面中,该化合物或其盐的给予降低精子浓度至不大于3百万/mL、2百万/mL、1百万/mL、0.5百万/mL、0.25百万/mL或0.1百万/mL。在相关实施方案中,该化合物或其盐的给予降低精子浓度至不大于0.1百万/mL。

[0021] 在一个方面,本发明提供了用于减少雄性生育力的试剂盒。在实施方案中,这些试剂盒包括一个有效量的抑制BRDT的化合物或其药学上可接受的盐或药物前体。在实施方案中,这些试剂盒包含用于在任何在此描述的方法中使用该抑制剂的说明。

[0022] 在任何以上方面中,该化合物是JQ1或具有化学式I-XXII中任一个的化合物,或任何在此披露的化合物,或其衍生物或盐。在实施方案中,该化合物是JQ1或其药学上可接受的盐或药物前体。

[0023] 在任何以上方面中,该化合物或其盐是与至少一种额外的雄性避孕剂或装置组合给予。在实施方案中,该额外的雄性避孕用具是避孕套。在实施方案中,该额外的雄性避孕剂是睾酮生产、雄激素受体功能或稳定性的调节剂。

[0024] 本发明的额外目标与优点将部分在以下说明书中阐明,并且部分从本说明书中显而易见,或可以通过实践本发明习得。本发明的目标与优点将借助于在此披露的要素以及组合来实现或获得,包括哪些在附加权利要求中指明的那些。应理解,前述的一般说明以及以下的详细说明都是示例性的并且仅是解释性的并且不限制所要求的本发明。结合并入并且构成本说明书的一部分的附图说明了本发明的若干实施方案并且与本说明一起用于解释本发明的原理。

[0039] 1 mstattvapa gipatpgpvn ppppevsnp kpgkrtnqlq ymqnvvvktl wkhqfawpfy
 [0040] 61 qpvdai knl pdyhki knp mdmgtikr l ennywsase cmqdfntmft ncyiynkptd
 [0041] 121 divlmaqale kiflqkvaqm p qeevellppapkgkgrkpa agaqsagtqq vaavssvspa
 [0042] 181 tpfqsvp p tv sqtpviaatp vptitanvts vpvppaaapp ppatpivpvv pptppvvkkk
 [0043] 241 gvkrkadttt pttsaitasr sesppplsdp kqakvvarre sggrpikppk kdledgevpq
 [0044] 301 hagkkglse hlrycdsilr emlskkhaay awpfykpvda ealelhdyhd iikhpmdlst
 [0045] 361 vkrkmdgrey pdaqgfaadv rlmfsncyky nppdhevvam arklqdvfem rfakmpdepv
 [0046] 421 eapalpapaa pmvskgaess rsseesssds gssdseeera trlaelqeql kavheqlaal
 [0047] 481 sqapvnkpk kkekkek kkdkekek hk vkaeeek akvappakqa qqk kapakka
 [0048] 541 nstttagrql kkggkqasas ydseeeeegl pmsydekrql sldinrlpge klgrvvhiiq
 [0049] 601 srep slrdn pdeieidfet lkpttlrele ryvksclqkk qrkpfsasgk kqaakskeel
 [0050] 661 aqek kkelek rlqdvsgqls sskkparkek pgsapsggps rlsssssses gsssssgsss
 [0051] 721 dssdse

[0052] 所谓“Brd3核酸分子(Brd3 nucleic acid molecule)”意味着对BRD3多肽进行编码的多核苷酸。

[0053] 所谓“BRD4多肽(BRD4 polypeptide)”意味着与能够结合染色质或者调控转录的NP_055114具有至少85%同一性的蛋白或其片段。

[0054] 1 msaespggtr lrnlpvmgdg letsqmsttq aqaqqpana astnppppet snpnkpkrrt
 [0055] 61 nqlqyllrvv lktlwkhqfa wpfqqpvдав klnlpdyki iktpmdmgti kkr lennyw
 [0056] 121 naqeci qdfn tmftncyiyn kpgddivlma ealeklflqk inelpteete imivqakgrg
 [0057] 181 rgrketgtak pgvstvpntt qastppqtqt pqpnpvvqa tphfpavtp dliqt p vmt
 [0058] 241 vvpplqtp ppvppqpqp papapqvqs hppiiaatp pvktkkgvkr kadtttptti
 [0059] 301 dpiheppslp pepkttklgq rressrvkp pkkdvpdsqq hpapeksskv seqlkccsg
 [0060] 361 lkemfakkha ayawpfykp dvealglhdy cdiikhpmdm stiksklear eyrdaqefga
 [0061] 421 dvrlmfsncy kynppdhevv amarklqdvf emrfakmpde peepvvavss pavppptkv
 [0062] 481 appsssdsss dssdsdsst ddseeeraqr laelqeqlka vheqlaalsq pqqnkpkkke
 [0063] 541 kdkkekkek hkrkeeven kskakepp ktkknnssn snvskkep mkskppptye
 [0064] 601 seedckcpm syeekrqlsl dinklpgekl grvvhiqsr epslknsnpd eieidfetlk
 [0065] 661 pstlrelery vtsclrkkrk pqaekvdvia gsskmkgfss sesesssess ssdsedsetg
 [0066] 721 pa

[0067] 所谓“Brd4核酸分子(Brd4 nucleic acid molecule)”意味着对BRD4多肽进行编码的多核苷酸。

[0068] 所谓“BRDT多肽(BRDT polypeptide)”意味着与能够结合染色质或者调控转录的NP_001717具有至少85%同一性的蛋白或其片段。

[0069] 1 mslpsrqtai ivnppppeyi ntkkngrltn qlqylqkvvl kdlwkhsfsw pfqrpvdavk
 [0070] 61 lqlpdyt ii knpmdlntik krlenkyyak ascedfnt mfsncylynk pgddivlmaq
 [0071] 121 aleklfmql sqmpqeeqv gvkerikkgt qqn iavssak eksspsatek vfkqqeipsv
 [0072] 181 fpktsispln vvqgasvnss sqtaaavtkg vkrkadtttp atsavkasse fsptfteksv
 [0073] 241 alppikenmp knvlpsqqq ynvvktvkvt eqlrhseil kemlakkhfsyawpfynpvd

[0074] 301 vnalglhnyy dvvknpmldg tikekmdnqe ykdaykfaad vrlmfmcnyk ynppdhevv
[0075] 361 marmldqvfe thfskipiep vesmplcyik tditettgre ntneassegn ssddsederv
[0076] 421 krlaklqeql kavhqqlqvl sqvpfrklmk kkekskkekk kekvnsnen prkmceqmrl
[0077] 481 kekskrnqpk krkqqfiglk sedednakpm nydekrqlsl ninklpgdkl grvvhiqsr
[0078] 541 epslsnsnpd eieidfetlk astltreleky vsaclrkrpl kppakkimms keelhsqkkq
[0079] 601 elekrllldvn nqlnsrkrqt ksdktqpska venvsrlses sssssssses essssdlsss
[0080] 661 dssdsesemf pkftevvpnd spskenvkkm knecilpegr tgvvtqigycv qdtttsanttl
[0081] 721 vhtttphvm pphhqlafn yqelehlqtv knisplqilp psgdseqslsn gitvmhpsgd
[0082] 781 sdtmlesec qapvqkdiki knadswkslg kpvkpsgvmk ssdelfnqfr kaaiekevka
[0083] 841 rtqelirkhl eqntkelkas qenqrdlgnl ltvesfsnki qnkcsgeeqk ehqqsseaqd
[0084] 901 ksklwlldkr dlarqkeqer rrreamvgti dmtlqsdmt mfennfd

[0085] 所谓“BRDT核酸分子(BRDT nucleic acid molecule)”意味着对BRDT多肽进行编码的多核苷酸。

[0086] “给予(Administering)”在此定义为以一种方式提供试剂给受试者的手段,该方式使该试剂进入该受试者的身体。此类给予可以通过任何途径,包括但不限于,口腔的、经皮的、粘膜的(例如,阴道、直肠、口腔或鼻粘膜),通过注射(例如,皮下的、静脉内、肠胃外的、腹膜内的、鞘内的),或通过吸入(例如,口腔的或鼻的)。通过形成适合于希望的给予途径的形式给出药物制剂。

[0087] 所谓“试剂(agent)”或“化合物(compound)”意味着任何小分子的化学化合物、抗体、核酸分子、或多肽、或其片段。

[0088] 所谓“改善(ameliorate)”是指减少、抑制、减弱、减小、阻滞、或稳定疾病的发展或进展。

[0089] 所谓“改变(alteration)”意味着通过标准技术已知的方法(例如在此描述的方法)检测的基因或多肽的表达水平或活性的变化(增加或减少)。如在此所使用的,改变包括表达水平的10%变化,优选是表达水平的25%的变化、更优选是40%的变化、以及最优选是50%或更大的变化。

[0090] 所述的“类似物(analog)”意味着不是相同的但是具有类似的功能或者结构特征的分子。例如,多肽类似物保留了对应的天然存在的多肽的至少一些生物活性,同时相对于天然存在的多肽具有增强类似物的功能的某些生物化学修饰。这样的生物化学修饰可以增加类似物的蛋白酶抗性、膜通透性或半生期,而不改变,例如,配体结合。类似物可以包括非天然氨基酸。

[0091] 如在此所使用的,术语“烷基(alkyl)”意味着饱和的直链或支链非环烃,该烃典型地具有1-10个碳原子。代表性的饱和的直链烷基包括甲基、乙基、正丙基、正丁基、正戊基、正己基、正庚基、正辛基、正壬基以及正癸基;而饱和的支链烷基包括异丙基、仲-丁基、异丁基、叔-丁基、异戊基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2-甲基己基、3-甲基己基、4-甲基己基、5-甲基己基、2,3-二甲基丁基、2,3-二甲基戊基、2,4-二甲基戊基、2,3-二甲基己基、2,4-二甲基己基、2,5-二甲基己基、2,2-二甲基戊基、2,2-二甲基己基、3,3-二甲基戊基、3,3-二甲基己基、4,4-二甲基己基、2-乙基戊基、3-乙基戊基、2-乙基己基、3-乙基己基、4-乙基己基、2-甲基-2-乙基戊基、2-甲基-3-乙基戊基、2-甲基-4-

乙基戊基、2-甲基-2-乙基己基、2-甲基-3-乙基己基、2-甲基-4-乙基己基、2,2-二乙基戊基、3,3-二乙基己基、2,2-二乙基己基、3,3-二乙基己基等。包括在本发明的化合物中的烷基基团可以是未经取代的、或任选地经一个或多个取代基取代,诸如氨基、烷氨基、芳氨基、杂芳基氨基、烷氧基、烷硫基、氧基、卤素、酰基、硝基、羟基、氰基、芳基、杂芳基、烷芳基、烷基杂芳基、芳氧基、杂芳氧基、芳硫基、杂芳硫基、芳氨基、杂芳氨基、碳环基、碳环氧基、碳环硫基、碳环氨基、杂环基、杂环氧基、杂环氨基、杂环硫基等。对于本发明的化合物而言典型地优选低级烷基。

[0092] 如在此所使用的,术语“芳族环(aromatic ring)”或“芳基(aryl)”意味着单环或多环的芳族环或者包括碳和氢原子的环基团。适合的芳基基团的实例包括,但并不局限于,苯基、甲苯基、蒽基、茚基、茛基、萘基、萘基、和萘基、以及苯稠合的碳环部分,如5,6,7,8-四氢萘基。芳基基团可以是未经取代的或任选地经一个或多个取代基取代,例如,如此所述的用于芳基基团的取代基(包括但并不局限于烷基(优选是低级烷基或者经一个或多个卤素取代的烷基)、羟基、烷氧基(优选是低级烷氧基)、烷硫基、氰基、卤素、氨基、硼酸($-B(OH)_2$)、以及硝基)。在某些实施方案中,芳基基团是单环,其中该环包括6个碳原子。

[0093] 术语“非对映异构体(diastereomers)”指的是具有两个或更多个不对称中心并且其分子不是彼此镜像的立体异构体。

[0094] 术语“对映异构体(enantiomers)”是指一种化合物的两种互为不能重叠的镜像的立体异构体。两种对映异构体的等摩尔混合物称为“消旋混合物”或者“消旋体”。

[0095] 术语“卤素(halogen)”是指-F、-Cl、-Br或-I。

[0096] 术语“卤烷基(haloalkyl)”旨在包括以上定义的,经卤素单、双或多取代的烷基基团,例如氟甲基以及三氟甲基。

[0097] 术语“羟基(hydroxyl)”意味着-OH。

[0098] 如在此所使用的术语“杂原子(heteroatom)”是指除了碳或氢之外的任何元素的原子。优选杂原子是氮、氧、硫以及磷。

[0099] 术语“杂芳基(heteroaryl)”指的是芳族的5-8元单环、8-12元双环、或11-14元三环环系统,如果是单环则具有1-4个环杂原子,如果是双环则具有1-6个杂原子,或如果是三环则具有1-9个杂原子,所述杂原子选自O、N、或S,并且剩余环原子是碳。杂芳基基团可以任选地经一个或多个如在此描述的用于芳基基团的取代基取代。杂芳基基团的实例包括,但并不局限于,吡啶基、呋喃基、苯并二氧杂环戊烯基、噻吩基、吡咯基、噁唑基、噁二唑基、咪唑基、噻唑基、异噻唑基、喹啉基、吡唑基、异噻唑基、哒嗪基、嘧啶基、吡嗪基、三嗪基、三唑基、噻二唑基、异噻唑基、吡唑基、苯丙噻唑基、苯并呋喃基、吡嗪基、咪唑并吡啶基、四唑基、苯并咪唑基、苯并噻唑基、苯并噻二唑基、苯并噻二唑基、以及吡啶基。

[0100] 如在此所使用的术语“杂环的(heterocyclic)”指的是在一个环状结构内包含除了碳之外的至少一个原子(例如,S、O、N)的有机化合物。这些有机化合物中的该环状结构可以是芳族的或者,在某些实施方案中,是非芳族的。杂环部分的一些实例包括,但并不局限于,吡啶、嘧啶、吡咯烷、呋喃、四氢呋喃、四氢噻吩、以及二噁烷。

[0101] 术语“同分异构体(isomers)”或者“立体异构体(stereoisomers)”指的是具有相同的化学构成,但是原子或基团的空间安排不同的化合物。

[0102] 术语“同位素衍生物(isotopic derivatives)”包括化合物的衍生物,其中这些化

合物中的一个或多个原子被这些原子的相应的同位素替换。例如,含有碳原子(C^{12})的化合物的同位素衍生物可以是其中该化合物的该碳原子被 C^{13} 同位素替换的同位素衍生物。

[0103] 所谓“计算机建模(computer modeling)”意味着应用计算程序确定以下一项或多项:配体对于结合部分的定位和结合邻近,被结合配体占用的空间,结合部分与配体之间的互补接触表面的量,给定配体对结合部分进行结合的变形能,以及配体与结合部分之间的氢键能、范德华相互作用、疏水性相互作用、和/或静电相互作用能的一些估算。计算机建模还可以提供模型系统与候选化合物的特征比较。例如,计算机建模实验可以比较本发明的一个药效团模型与一个候选化合物,以便评估该候选化合物与该模型的适宜性。

[0104] 所谓“计算机系统(computer system)”意味着用于分析原子坐标数据的硬件装置、软件装置以及数据存储装置。本发明的基于计算机的最小硬件装置包括中央处理器(CPU)、输入装置、输出装置以及数据存储装置。理想的是,提供一个监视器对结构数据进行可视化。该数据存储装置可以是随机存取存储器(RAM)或者对本发明的计算机可读媒质进行存取的装置。这样的系统的实例是从Silicon Graphics Incorporated公司以及Sun Microsystems公司可得到的运行基于Unix的,Windows NT或IBM OS/2的操作系统的微型计算机工作站。

[0105] 所谓“计算机可读媒质(computer readable media)”意味着可以被计算机直接读取并且存取,例如使得该媒质适合于在以上提到的计算机系统中使用的任何媒质。该媒质包括,但并不局限于,磁存储媒质如软磁盘、硬磁盘存储媒质以及磁带;光存储媒质如光盘或只读光盘(CD-ROM);电存储媒质如RAM和只读存储器(ROM);以及这些分类的混合体如磁/光存储媒质。

[0106] 在本披露中,“包括(comprises、comprising)”、“包含(containing)”以及“具有(having)”等具有美国专利法指定的意义并且意味着“包括(includes、including)”等;“基本上由...组成(consisting essentially of或consists essentially)”同样具有美国专利法指定的意义并且该术语是开放性的,允许超出所叙述的存在,只要所叙述的基本或新特征不被超过叙述的存在改变,但是排除现有技术实施方案。

[0107] “检测(detect)”指的是识别有待检测的分析物的存在、缺乏或者量。

[0108] 所谓“可检测的标记物(detectable label)”意味着一种组合物,当把该组合物连接到一个感兴趣的分子时,使后者变成通过光谱、光化学、生物化学、免疫化学、或化学的手段可检测的。例如,有用的标记物包括放射性同位素、磁珠、金属珠、胶粒、荧光染料、高电子密度试剂、酶(例如,如通常在酶联免疫吸附试验(ELISA)中所使用的)、生物素、异羟基洋地黄毒甙元、或半抗原。

[0109] 所谓“有效量(effective amount)”意味为另外的能育雄性提供避孕所需要的试剂量。用于实施本发明以治疗性地处理疾病的一种或多种活性化合物的有效量随给药方式,受试者的年龄、体重以及总体健康状况而变化。最终地,主治医生或者兽医会决定适当的量以及给药方案。这样的量被指为“有效(effective)”量。

[0110] 术语“对映异构体(enantiomers)”是指一种化合物的两种互为不能重叠的镜像的立体异构体。两种对映异构体的等摩尔混合物称为“消旋混合物”或者“消旋体”。

[0111] 术语“卤素(halogen)”是指-F、-Cl、-Br或-I。

[0112] 术语“卤烷基(haloalkyl)”旨在包括以上定义的,经卤素单、双或多取代的烷基基

团,例如氟甲基以及三氟甲基。

[0113] 术语“羟基(hydroxyl)”意味着-OH。

[0114] 如在此所使用的术语“杂原子(heteroatom)”是指除了碳或氢之外的任何元素的原子。优选杂原子是氮、氧、硫以及磷。

[0115] 术语“杂芳基(heteroaryl)”指的是芳族的5-8元单环、8-12元双环、或11-14元三环环系统,如果是单环则具有1-4个环杂原子,如果是双环则具有1-6个杂原子,或如果是三环则具有1-9个杂原子,所述杂原子选自O、N、或S,并且剩余环原子是碳。杂芳基基团可以任选地经一个或多个取代基取代。杂芳基基团的实例包括,但并不局限于,吡啶基、呋喃基、苯并二氧杂环戊烯基、噻吩基、吡咯基、噁唑基、噁二唑基、咪唑基、噻唑基、异噻唑基、喹啉基、吡唑基、异噻唑基、哒嗪基、嘧啶基、吡嗪基、三嗪基、三唑基、噻二唑基、异喹啉基、吲唑基、苯丙噻唑基、苯并呋喃基、吲嗪基、咪唑并吡啶基、四唑基、苯并咪唑基、苯并噻唑基、苯并噻二唑基、苯并噁二唑基、以及吲哚基。

[0116] 如在此所使用的术语“杂环的(heterocyclic)”指的是在一个环状结构内包含除了碳之外的至少一个原子(例如,S、O、N)的有机化合物。这些有机化合物中的该环状结构可以是芳族的或者非芳族的。杂环部分的一些实例包括,但并不局限于,吡啶、嘧啶、吡咯烷、呋喃、四氢呋喃、四氢噻吩、以及二噁烷。

[0117] 术语“同分异构体(isomers)”或者“立体异构体(stereoisomers)”指的是具有相同的化学构成,但是原子或基团的空间安排不同的化合物。

[0118] 术语“同位素衍生物(isotopic derivatives)”包括化合物的衍生物,其中这些化合物中的一个或多个原子被这些原子的相应的同位素替换。例如,含有碳原子(C^{12})的化合物的同位素衍生物可以是其中该化合物的该碳原子被 C^{13} 同位素替换的同位素衍生物。

[0119] 本发明提供了多个对于开发高特异性药物是有用的靶点以便减少雄性受试者中的生育力。此外,本发明的方法提供了一种容易的手段以便鉴别安全用于雄性受试者的其他避孕疗法。此外,本发明的方法提供了以高体积通量、高灵敏度、以及低复杂度实际上地分析任何数量的用于作用于在此描述的疾病的化合物的途径。

[0120] 所谓“适宜性(fitting)”意味着通过自动、或半自动的手段确定试剂分子的一个或多个原子与BET家族成员的一个或多个原子或结合位点(例如,BRD2、BRD3、BRD4以及BRDT的布罗莫结构域)之间的相互作用,并且确定这种相互作用稳定的程度。用于适宜性的不同的基于计算机的方法在此进一步地描述。

[0121] 所谓“片段(fragment)”意味着多肽或者核酸分子的一部分。这一部分包含,优选地,参考核酸分子或多肽的整个长度的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、或90%。一个片段可以包含10、20、30、40、50、60、70、80、90,或100、200、300、400、500、600、700、800、900,或1000个核苷酸或氨基酸。

[0122] “杂交(hybridization)”意味着互补核碱基之间的氢键合,该氢键合可以为沃森-克里克(Watson-Crick)、霍氏(Hoogsteen)或反霍氏(reversed Hoogsteen)氢键合。例如,腺嘌呤和胸腺嘧啶是通过氢键的形成进行配对的互补核碱基。

[0123] 所谓“分离的多核苷酸(isolated polynucleotide)”意味着脱离了基因的核酸(例如,DNA),该基因在衍生出本发明的核酸分子的有机体的天然存在的基因组中,该核酸在该基因侧面。因此该术语包括,例如,重组DNA,该重组DNA合并进入载体、自主复制质粒或

病毒、或原核生物或真核生物的基因组DNA,或者该重组DNA作为不依赖于其他序列的分离的分子存在(例如,通过聚合酶链反应(PCR)或限制性内切核酸酶消化产生的cDNA或者基因组的或cDNA的片段。此外,该术语包括从DNA分子转录的RNA分子,以及是对另外的多肽序列进行编码的杂合基因的一部分的重组DNA。

[0124] 所谓“分离的多肽(isolated polypeptide)”意味着本发明的从天然伴随它的组分中分离的多肽。典型地,当该多肽以重量计为至少60%时,将它从它天然关联的蛋白和天然存在的有机分子中分离。优选地,制品是以重量计至少75%、更优选是至少90%、并且最优选是至少99%的本发明的多肽。本发明的分离的多肽可以,例如,通过从天然源提取、对这样的多肽进行编码的重组核酸的表达、或化学合成蛋白而得到。可以通过任何适当的方法测量纯度,例如,柱色谱法、聚丙烯酰胺凝胶电泳、或高效液相色谱(HPLC)分析。

[0125] 所谓“标记(marker)”意味着在与疾病或失调相关联的表达水平或活性方面具有改变的任何蛋白或多核苷酸。

[0126] 在如此所使用的,“获得一种试剂(obtaining an agent)”中的“获得(obtaining)”包括合成、购买、或以另外的方式获得该试剂。

[0127] “获得化合物(obtaining compound)”中的术语“获得(obtaining)”旨在包括购买、合成或以其他方式获得该化合物。

[0128] 如在此所使用的术语“光学异构体(optical isomers)”包括互为不能重叠的镜像的分子,也被称为手性分子。

[0129] 在此使用的短语“肠胃外给药(parenteral administration和administered parenterally)”意味着除了肠内以及局部给药之外的给药方式,通常是通过注射,并且包括但并不局限于,静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眼眶内、心内、真皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊髓内以及胸骨内注射以及输注。

[0130] “药学上可接受的(Pharmaceutically acceptable)”指由联邦或州政府的监管机构批准或可批准,或者美国药典中或其他公认药典中列出用于在动物(包括人类)中使用。

[0131] “药学上可接受的赋形剂、载体或辅助剂(Pharmaceutically acceptable excipient, carrier or adjuvant)”指这样一种赋形剂、载体或辅助剂,它们可以与一种试剂(例如,任何在此描述的化合物)一起给予受试者,并且它们不破坏这些试剂的药理学活性并且当以足够递送治疗量的该试剂的剂量给予时是无毒的。

[0132] 术语“多环基(polycyclyl)”或者“多环的基团(polycyclic radical)”指的是两个或更多个环的环基团(例如,环烷基、环烯基、环炔基、芳基和/或杂环基),其中两个或更多个碳被两个邻接的环共用,例如,这些环是“稠环”。通过非相邻的原子连接的环称为“桥”环。多环的每个环可以经以上描述的取代基取代,例如,卤素、羟基、烷基羰基氧基、芳基羰基氧基、烷氧基羰基氧基、芳氧基羰基氧基、羧基、烷基羰基、烷氧基羰基、氨羰基、烷基硫羰基、烷氧基、磷酸根、膦酸基、亚膦酸基、氰基、氨基(包括烷基氨基、二烷基氨基、芳氨基、二芳氨基、以及烷基芳氨基)、酰胺基(包括烷基羰基氨基、芳基羰基氨基、氨基甲酰基以及脲基)、脒基、亚胺基、硫氢基、烷硫基、芳硫基、硫代羧酸根、硫酸根、磺酸基、氨磺酰基、亚磺酰氨基、硝基、三氟甲基、氰基、叠氮基、杂环基、烷基、烷基芳基、或芳族的或杂芳族的部分。

[0133] 如在此所使用的术语“多晶型(polymorph)”指的是本发明的化合物或其络合物的固体晶型。相同化合物的不同多晶型表现出不同的物理、化学和/或光谱特性。不同的物理

特性包括,但并不局限于,稳定性(例如,对热或光)、可压缩性以及密度(在配制和产品制造方面重要)、以及溶解速率(能够影响生物可利用率)。稳定性的不同可由化学反应性(例如,差分氧化,一种剂型当包括一种多晶型时比包括另一种多晶型褪色更快)或力学特征(例如,存储时破碎为动力学上有利的多晶型的片剂转化成热力学上更稳定的多晶型)或两者(例如,具有一种多晶型的片剂在高湿度时更容易断裂)的变化引起。多晶型的不同的物理特性可以影响它们的加工。

[0134] 术语“药物前体(prodrug)”包括具有可在体内代谢的部分的化合物。通常,药物前体在体内通过酯酶或者其他机制代谢为活性药物。药物前体的实例以及它们的应用在本领域是众所周知的(参见,例如,Berge等人(1977)“药物盐(Pharmaceutical Salts)”《药物科学杂志》(J.Pharm.Sci) 66:1-19)。可以在化合物的最终分离和纯化时原位制备这些药物前体,或通过经纯化的化合物以自由酸形式或羟基分开地与适合的酯化剂进行反应。通过用羧酸进行处理,可以将羟基基团转化成酯类。药物前体部分的实例包括经取代的和未经取代的、支链或无支链的低级烷基酯部分(例如,丙酸酯类),低级烯基酯类,二-低级烷基-氨基低级烷基酯类(例如,二甲基氨基乙基酯),酰氨基低级烷基酯类(例如,乙酰氧基甲基酯),酰氧基低级烷基酯类(例如,新戊酰氧基甲基酯),芳基酯类(苯基酯),芳基-低级烷基酯类(例如,苯甲基酯),经取代的(例如,用甲基、卤素、或甲氧基取代基)芳基和芳基-低级烷基酯类,酰胺类,低级烷基酰胺类,二-低级烷基酰胺类,以及羟基酰胺类。优选的药物前体部分是丙酸酯类和酰基酯类。也包括在体内通过其他机制转化成活性形式的药物前体。

[0135] 此外,横跨碳-碳双键的立体化学的表示也与通常的化学领域相反:“Z”指的是经常被称为“顺式(cis)”(相同侧)的构象而“E”指的是经常被称为“反式(trans)”(相反侧)的构象。本发明的化合物包括这两种构型,顺式/反式和/或Z/E。

[0136] 关于手性中心的命名,术语“d”以及“l”构型正如国际理论与应用化学联合会(IUPAC)所定义的。关于术语非对映异构体、消旋体、差向异构体以及对映异构体,这些将在它们通常的语境中使用以便描述制品的立体化学。

[0137] 所谓“减少(reduces)”意味着至少10%、25%、50%、75%、或100%的负的改变。

[0138] 所谓“参考(reference)”意味着标准或对照状况。

[0139] “参考序列(reference sequence)”是定义的作为序列比较的基础的序列。参考序列可以是规定序列的子集或者整体,例如全长cDNA或基因序列的区段、或者该完整的cDNA或基因序列。对多肽而言,参考多肽序列的长度将通常是至少约16个氨基酸,优选地是至少约20个氨基酸,更优选地是至少约25个氨基酸,并且甚至更优选地是约35个氨基酸、约50个氨基酸、或约100个氨基酸。对核酸而言,参考核酸序列的长度将通常是至少约50个核苷酸、优选地是至少约60个核苷酸、更优选地是至少约75个核苷酸、并且甚至更优选地是约100个核苷酸或约300个核苷酸或它们附近的或者它们之间的任一整数。

[0140] 所谓“特异性结合(specifically binds)”意味着一种化合物或抗体识别并且结合本发明的多肽,但是基本上并不识别并且结合天然地包括本发明的多肽的样品(例如,生物样品)中的其他分子。

[0141] 在本发明的方法中有用的核酸分子包括对本发明的多肽或其片段进行编码的任何核酸分子。这样的核酸分子不需要与内源性核酸序列具有100%的同一性,但是将典型地表现出基本的同一性。与内源性序列具有“基本同一性(substantial identity)”的多核苷

酸典型地能够与双链核酸分子的至少一条链杂交。在本发明的方法中有用的核酸分子包括对本发明的多肽或其片段进行编码的任何核酸分子。这样的核酸分子不需要与内源性核酸序列具有100%的同一性,但是将典型地表现出基本的同一性。与内源性序列具有“基本同一性(substantial identity)”的多核苷酸典型地能够与双链核酸分子的至少一条链杂交。所谓“杂交(hybridize)”意味着在不同的严格条件下进行配对以便在互补的多核苷酸序列(例如,在此描述的基因)、或其部分之间形成双链分子。(例如,参见Wahl(瓦尔),G.M.和S.L.Berger(伯格)(1987)《酶学方法》(Methods Enzymol.) 152:399),Kimmel(基默尔),A.R.(1987)《酶学方法》(Methods Enzymol.) 152:507)。

[0142] 例如,严格的盐浓度通常将是小于约750mM的氯化钠和75mM的柠檬酸三钠、优选地是小于约500mM的氯化钠和50mM的柠檬酸三钠、并且更优选地是小于约250mM的氯化钠和25mM的柠檬酸三钠。在缺少有机溶剂(例如,甲酰胺)下可以获得低严格杂交,而在至少约35%的甲酰胺、并且更优选地是至少约50%的甲酰胺存在下可以获得严格杂交。严格的温度条件将通常包括至少约30℃、更优选地是至少约37℃、并且最优选地是至少约42℃的温度。不同的另外的参数,例如杂交时间、清洁剂(例如,十二烷基硫酸钠(SDS))浓度、以及载体DNA的包含或排除,对本领域的普通技术人员是熟知的。根据需要通过组合这些不同的条件实现不同的严格水平。在一个优选的实施方案中,杂交将会在30℃、在750mM的氯化钠、75mM的柠檬酸三钠、以及1%的SDS中发生。在一个更优选的实施方案中,杂交将会在37℃、在500mM的氯化钠、50mM的柠檬酸三钠、1%的SDS、35%的甲酰胺、以及100μg/ml的变性的鲑精DNA(ssDNA)中发生。在一个最优选实施方案中,杂交将会在42℃、在250mM的氯化钠、25mM的柠檬酸三钠、1%的SDS、50%的甲酰胺、以及200μg/ml的ssDNA中发生。这些条件的有用的变体对于本领域的普通技术人员将是显而易见的。

[0143] 对于大多数的应用,杂交之后的洗涤步骤也将会在严格度方面不同。通过盐浓度和温度可以定义洗涤严格条件。如上所述,通过降低盐浓度或增加温度可以增加洗涤严格度。例如,用于洗涤步骤的严格盐浓度将为优选地小于约30mM的氯化钠和3mM的柠檬酸三钠、并且最优选地是小于约15mM的氯化钠和1.5mM的柠檬酸三钠。用于洗涤步骤的严格的温度条件将通常包括至少约25℃、更优选地是至少约42℃、并且甚至更优选地是至少约68℃的温度。在一个优选的实施方案中,洗涤步骤将会在25℃、在30mM的氯化钠、3mM的柠檬酸三钠、以及0.1%的SDS中发生。在一个更优选的实施方案中,洗涤步骤将会在42℃、在15mM的氯化钠、1.5mM的柠檬酸三钠、以及0.1%的SDS中发生。在一个更优选的实施方案中,洗涤步骤将会在68℃、在15mM的氯化钠、1.5mM的柠檬酸三钠、以及0.1%的SDS中发生。这些条件的另外的变体对于本领域的普通技术人员将是显而易见的。杂交技术对于本领域的普通技术人员是熟知的并且描述于例如Benton(本顿)与Davis(戴维斯)(《科学》(science) 196:180, 1977);Grunstein(古恩斯坦)和Hogness(霍格内斯)(《美国科学院院刊》(Proc.Natl.Acad.Sci.,USA) 72:3961,1975);Ausubel(奥苏贝尔)等人(《分子生物学实验手册》,威利出版社期刊全文数据库,纽约(Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience,New York,) 2001);Berger(伯格)和Kimmel(基默尔)(《分子克隆技术指南》(Guide to Molecular Cloning Techniques),1987,学术出版社,纽约(Academic Press,New York));以及Sambrook(萨姆布鲁克)等人,《分子克隆实验指南》,冷泉港实验室出版社,纽约,(Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor

Laboratory Press, New York)。

[0144] 所谓“基本上同一的 (substantially identical)”意味着相对于参考氨基酸序列 (例如, 在此描述的任一氨基酸序列) 或核酸序列 (例如, 在此描述的任一核酸序列), 一种多肽或核酸分子表现出至少85%的同一性。优选地, 相对于用于比较的序列, 这样的序列在氨基酸水平或核酸上为至少85%、90%、95%、99%或甚至100%的同一。

[0145] 使用序列分析软件 (例如, 威斯康星大学生物技术中心 (麦迪逊大学道1710, 威斯康星州53705 (1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705)) 遗传计算组的序列分析软件包, BLAST、BESTFIT、GAP、或PILEUP/PRETTYBOX程序) 典型地测量序列同一性。这种软件通过将同源性程度分配给不同的取代、缺失、和/或其他修饰进行相同或相似序列的匹配。保守取代典型地包括以下组内的取代: 甘氨酸、丙氨酸; 缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸; 天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺; 丝氨酸、苏氨酸; 赖氨酸、精氨酸; 以及苯丙氨酸、酪氨酸。在确定同一性程度的示例性方法中, 可以使用BLAST程序, 其中在 e^{-3} 到 e^{-100} 之间的概率分数表示密切相关的序列。

[0146] 所谓“减少 (reduces)”或“增加 (increases)”意味着相对于参考, 分别地至少约10%、25%、50%、75%、或100%的负的或正的改变。

[0147] 所谓“均方根偏差 (root mean square deviation)”是指离均差的平方的算术平均数的平方根。

[0148] 所谓“减少细胞存活 (reducing cell survival)”意味着相对于参考细胞, 抑制细胞的生存力或诱导细胞死亡。

[0149] 所谓“参考 (reference)”意味着标准或对照状况。

[0150] “参考序列 (reference sequence)”是定义的作为序列比较的基础的序列。参考序列可以是规定序列的子集或者整体, 例如全长cDNA或基因序列的区段、或者该完整的cDNA或基因序列。对多肽而言, 参考多肽序列的长度将通常是至少约16个氨基酸, 优选地是至少约20个氨基酸, 更优选地是至少约25个氨基酸, 并且甚至更优选地是约35个氨基酸、约50个氨基酸、或约100个氨基酸。对核酸而言, 参考核酸序列的长度将通常是至少约50个核苷酸、优选地是至少约60个核苷酸、更优选地是至少约75个核苷酸、并且甚至更优选地是约100个核苷酸或约300个核苷酸或它们附近的或者它们之间的任一整数。

[0151] 所谓“受试者 (subject)”意味着哺乳动物, 包括但并不局限于, 人或非人类的哺乳动物, 例如牛、马、犬、绵羊、或猫。

[0152] 所谓“特异性结合 (specifically binds)”意味着一种化合物或抗体识别并且结合本发明的多肽, 但是基本上并不识别并且结合天然地包括本发明的多肽的样品 (例如, 生物样品) 中的其他分子。

[0153] 术语“巯基 (sulfhydryl 或 thiol)”意味着-SH。

[0154] 如在此所使用的, 术语“互变异构体 (tautomers)”指的是通过互变异构化容易地进行相互转化的有机分子的同分异构体, 其中氢原子或质子在该反应中迁移, 在一些场合伴随着单键与相邻双键的转换。

[0155] 如在此所使用的术语“治疗 (treat、treating、treatment等)”指的是减少或改善失调和/或与其相关联的症状。所谓“改善 (ameliorate)”是指减少、抑制、减弱、减小、阻滞、或稳定疾病的发展或进展。将被理解的是, 尽管不能排除, 治疗失调或违和并不要求完全地

消除该失调、违和或与其相关联的症状。

[0156] 如在此所使用的术语,“预防(prevent、preventing、prevention)“、“预防性治疗(prophylactic treatment)”等指的是减少失调或违和在受试者中的发展的可能性,该受试者没有失调或违和,但是有发展失调或违和的风险或者容易发展失调或违和。

[0157] “有效量(effective amount)”指的是对经治疗的受试者赋予避孕效果的化合物的量。这种效果可以是客观的(即通过一些测试或标记是可测量的)或主观的(即受试者给出了作用的指征或感觉到了作用)。在此描述的化合物的有效量可以在每千克体重约1mg到约5000mg的范围内。有效剂量还会根据给药途径,以及与其他药剂共同使用的可能性而改变。在本发明的实施方案中,“一个有效量(an effective amount)”的试剂或组合物是足以实现避孕的量。

[0158] 将在此提供的范围理解为该范围内的所有值的简略表达。例如,将1至50的范围理解为包括下组的任一数、数的组合、或者下组的子范围,该组由以下各项组成:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、或50。

[0159] 除非明确声明或从上下文显而易见,如在此所使用的,术语“或(or)”被理解为包括在内。除非明确声明或从上下文显而易见,如在此所使用的,术语“一个、一种(a、an)”、“该(the)”被理解为单数的或复数的。

[0160] 术语“包括(including)”在此用作意思是短语“包括但不限于(including but not limited to)”,并且与后者互换地使用。

[0161] 除非明确声明或从上下文显而易见,如在此所使用的,术语“约(about)”被理解为在本领域的正常容差范围内,例如,在平均数的2标准差之内。约可以被理解为在声明值的10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、或0.01%之内。除非从上下文显而易见,在此提供的所有数值被该术语约修饰。

[0162] 在此的变量的任何定义中的一系列化学基团的陈述包括该变量作为任何单个基团或所列出基团的组合的定义。在此针对变量或方面的实施方案的陈述包括该实施方案作为任何单个的实施方案或与任何其他实施方案或其部分的组合。

[0163] 在此提供的任何化合物、组合物或方法可以与在此提供的一个或多个任何其他化合物、组合物和方法进行组合。

[0164] 附图简要说明

[0165] 图1是人类BRDT(1)与人类BRD4(1)以及鼠BRDT(1)的序列比较。蛋白序列比对揭示了同源(homologous)以及直源(orthologous)结构域之间的高度序列同一性。同一的(红色)以及相似的(黄色)残基被高亮。以上描绘的残基序列是主要螺旋元件的图示。(+) -JQ1与BRDT(1)之间的接触用黑星来描绘。介导乙酰基-赖氨酸识别的保守的天冬酰胺用蓝星来描绘。

[0166] 图2A-2C显示了(+) -JQ1对BRDT的抑制。图2A是活性(+) -JQ1对映异构体的结构。图2B是使用邻近检测测定法显示的(+) -JQ1(IC₅₀:11nM)对BRDT结合至合成的生物素酰化的H4Kac4的竞争性抑制图。图2C包括一个显示了利用500nM的所指化合物的测定结果的图。误差棒显示标准差。

[0167] 图3是人类BRDT与人类BRD4的MAFFT比对。

[0168] 图4是人类BRDT与小鼠BRDT的MAFFT比对。

[0169] 图5A-5H显示了对来自用JQ1或载体对照处理的小鼠的睾丸的总体分析以及组织学分析。图5A包括一张图,该图提供了对来自注射对照或JQ1的9周龄小鼠的睾丸的总体分析。图5B包括来自用对照或JQ1处理的、3-6周、6-9周或6-12周龄的小鼠的睾丸重量(mg)的图示。数据表示平均值±平均值的标准误(SEM),并且用从双尾t-检验获得的P值进行注释(*表示 $P < 0.05$ 的显著性)。图5C-5F包括组织学染色,显示了从3-6周龄用对照(图5C)或JQ1(图5D)进行处理的6周龄小鼠的睾丸的组织学,以及从6-12周龄用对照(图5E)或JQ1(图5F)进行处理的12周龄小鼠的睾丸的组织学。睾丸间质细胞的管间岛在附图5C-5F中用箭头标绘。塞托利细胞(V)在图5F中的若干小管中被高亮。图5G以及5H包括组织学染色,显示了来自从6-12周龄用对照(图5G)或JQ1(图5H)进行处理的雄性的附睾的组织学。与被成熟精子致密填充的对照附睾腔(图5G)相比,在JQ1处理的小鼠的附睾腔(附图5H)中观察到更少精子和多个大的有核细胞(黑箭头)。图5C-5H是以相同放大倍数进行拍照。

[0170] 图6A以及6B显示附睾精子计数以及受精潜力。图6A是一个图示,显示了从自6-9周龄用JQ1或对照进行处理的雄性的整个附睾获得的精子计数,或从自6-12周龄进行处理的雄性的附睾尾部(尾)获得的精子计数。图6B包括一个图,显示了从与用对照或JQ1处理5周的雄性交配的超排卵雌性获得的卵母细胞的体外发育潜力。所有数据表示平均值±SEM,并且用从双尾t-检验获得的P值进行注释(*表示 $P < 0.05$ 的显著性)。

[0171] 图7A-7C显示了对用JQ1或载体对照处理的小鼠的睾丸的分子分析。图7A包括一个图,显示了对从6-12周龄用JQ1或对照溶液进行处理的雄性的定量RT-PCR结果。被测试的小鼠基因是Plzf(前髓细胞白血病锌指或Zbtb16)、Stra8(受视黄酸基因8刺激)、Brdt(布罗莫结构域,睾丸特异性的)、Ccna1(细胞周期蛋白A1)、Hist1h1t(组蛋白簇1、组蛋白1、睾丸特异性的)、Papo1b(聚(A)聚合酶β或Tpap)、Klf17(Kruppel样因子17或Zfp393)以及Prm1(鱼精蛋白1)。数据表示平均值±SEM,并且用从双尾t-检验获得的P值进行注释(*表示 $P < 0.05$ 的显著性;Prm1的P值是0.06)。图7B以及7C包括用对照处理的(图7B)以及用JQ1处理的(图7C)睾丸中的TNP2的免疫组织化学染色图像。

[0172] 图8A-8C显示JQ1对精子计数以及睾丸质量的作用。在一个重复研究中,用JQ1对C57B6小鼠进行处理(50mpk×8周)。图8A包括一个显示测试小鼠中的精子计数的图。图8B包括一个显示测试小鼠中的睾丸重量的图。图8C包括来自测试小鼠的精子的相衬成像。

[0173] 图9A-9C显示JQ1的作用在去除时被逆转。图9A包括一个图,显示了在JQ1处理终止后两个月以及四个月的测试小鼠中的精子运动性水平。图9B包括一个图,显示了在JQ1处理终止后两个月以及四个月的测试小鼠中的睾丸重量。图9C包括一个图,显示了在JQ1处理终止后两个月以及四个月的测试小鼠中的精子计数。

[0174] 发明详细说明

[0175] 本发明至少部分地基于以下发现:表观遗传读出物蛋白的布罗莫结构域与额外末端(BET)亚家族的小分子抑制剂(JQ1)对于精子发生过程中的染色质重塑是必需的。生化分析确证JQ1对该BRDT乙酰基-赖氨酸结合袋的占据阻止了乙酰化组氨酸H4的识别。本发明还基于以下发现:用JQ1处理小鼠减少了精子数目并降低了精子移动性,连同减小了睾丸大小。尽管JQ1处理的雄性正常交配,但是JQ1明显在精母细胞期的抑制作用引起受精卵母细胞剧烈减少以及雄性中的可逆避孕效果。因此,本发明是针对一种新颖类型的雄性避孕剂,

该避孕剂可以跨越血液睾丸屏障并且在精子发生期间抑制布罗莫结构域活性。

[0176] 含有布罗莫结构域的蛋白

[0177] 基因调控基本上被可逆的、非共价的大分子组装控制。至RNA聚合酶的信号转导要求更高级的蛋白复合体,该复合体被能够解释染色质的翻译后修饰状态的组装因子在空间上调控。表观遗传读出物是结构上不同的蛋白,各自具有一个或多个进化上保守的效应物模块,该效应物模块识别组蛋白或DNA的共价修饰。组蛋白尾上的赖氨酸残基的 ϵ -N-乙酰化(Kac)与开放的染色质构造以及转录激活相关联³。乙酰基-赖氨酸的背景特异的分子识别主要由布罗莫结构域介导。

[0178] 作为转录因子复合体(TAF1、PCAF、Gcn5以及CBP)的组分以及表观遗传记忆的决定子⁴,含有布罗莫结构域的蛋白有重要的生物学意义。有含有总共57种不同的布罗莫结构域的41种人类蛋白。尽管大量序列不同,但所有的布罗莫结构域共享一个保守的折叠,该折叠包括由确定底物特异性的不同环区(ZA与BC环)连接的四个 α 螺旋(α Z、 α A、 α B、 α C)的一个左旋束。具有肽底物的共晶体结构表明乙酰基-赖氨酸被一个中心疏水腔识别并且通过与存在于大多数布罗莫结构域中的天冬酰胺残基的氢键得以锚定⁵。布罗莫结构域和额外末端(BET)家族(BRD2、BRD3、BRD4以及BRDT)共享一种共同结构域构造以及一种更趋异的C端募集结构域,该共同结构域构造包括表现高水平的序列保守性的两个N端布罗莫结构域⁶。

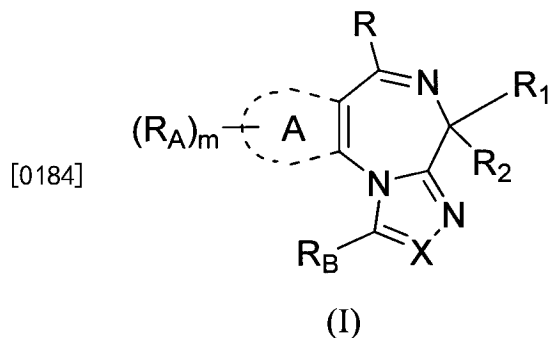
[0179] 本发明特征在于用于抑制人类布罗莫结构域蛋白的组合物和方法。

[0180] 本发明的化合物

[0181] 本发明提供了多种化合物(例如,JQ1和具有在此描述的化学式的化合物),这些化合物结合在BET家族成员(例如BRDT、BRD2、BRD3、BRD4)的第一布罗莫结构域的apo晶体结构的结合袋中。不希望受理论限制,这些化合物特别有效于降低雄性生育力。在一个方法中,使用分子对接程序对有助于降低雄性生育力的化合物进行选择以鉴别有望结合至布罗莫结构域结构结合袋的化合物。在某些实施方案中,本发明的化合物可以阻止、抑制、或破坏、或减少BET家族成员(例如,BRD2、BRD3、BRD4、BRDT)的至少10%、25%、50%、75%、或100%的生物活性,和/或例如通过结合到布罗莫结构域apo结合袋内的结合位点破坏这类蛋白的亚细胞定位。

[0182] 在某些实施方案中,本发明的化合物是小分子,其分子量小于约1000道尔顿、小于800、小于600、小于500、小于400、或小于约300道尔顿。本发明的化合物的实例包括JQ1和其他化合物,这些化合物结合到BET家族成员(例如,BRD4(下文指BRD4(1);PDB ID 2OSS))的第一布罗莫结构域的apo晶体结构的结合袋。JQ1是一种新型的噻吩并-三唑并-1,4-二氮杂环庚烷。本发明进一步提供了这些化合物的药学上可接受的盐。

[0183] 在一个方面,该化合物是具有化学式I的化合物:



- [0185] 其中
- [0186] X是N或CR₅;
- [0187] R₅是H、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基,其中的每一个任选地经取代;
- [0188] R_B是H、烷基、羟烷基、氨基烷基、烷氧基烷基、卤烷基、羟基、烷氧基、或-COO-R₃,其中的每一个任选地被取代;
- [0189] 环A是芳基或杂芳基;
- [0190] 每一个R_A独立地是烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基,其中的每一个任选地经取代;或者任何两个R_A与各自附接的多个原子一起可以形成一个融合的芳基或杂芳基基团;
- [0191] R是烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基;其中的每一个任选地经取代;
- [0192] R₁是-(CH₂)_n-L,其中n是0-3并且L是H、-COO-R₃、-CO-R₃、-CO-N(R₃R₄)、-S(O)₂-R₃、-S(O)₂-N(R₃R₄)、N(R₃R₄)、N(R₄)C(O)R₃、任选地取代的芳基、或任选地取代的杂芳基;
- [0193] R₂是H、D、卤素、或任选地经取代的烷基;
- [0194] 每一个R₃独立地选自下组,该组由以下各项组成:
- [0195] (i) H、芳基、经取代的芳基、杂芳基、或经取代的杂芳基;
- [0196] (ii) 杂环烷基或经取代的杂环烷基;
- [0197] (iii) -C₁-C₈烷基、-C₂-C₈链烯基或-C₂-C₈炔基,每一个包含0、1、2、或3个选自O、S、或N的杂原子;-C₃-C₁₂环烷基、经取代的-C₃-C₁₂环烷基、-C₃-C₁₂环烯基、或经取代的-C₃-C₁₂环烯基,其中的每一个可以任选地经取代;以及
- [0198] (iv) NH₂, N=CR₄R₆;
- [0199] 每一个R₄独立地是H、烷基、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基,其中的每一个任选地经取代;
- [0200] 或将R₃和R₄与它们附接的氮原子一起以形成一个4-10元环;
- [0201] R₆是烷基、链烯基、环烷基、环烯基、杂环烷基、芳基、或杂芳基,其中的每一个任选地经取代;或将R₄和R₆与它们附接的碳原子一起以形成一个4-10元环;
- [0202] m是0、1、2、或3;
- [0203] 假设
- [0204] (a) 如果环A是噻吩基, X是N, R是苯基或取代的苯基, R₂是H, R_B是甲基, 并且R₁是-(CH₂)_n-L, 其中n是1并且L是-CO-N(R₃R₄), 那么不将R₃和R₄与它们附接的氮原子一起形成一个吗啉代环;
- [0205] (b) 如果环A是噻吩基, X是N, R是经取代的苯基, R₂是H, R_B是甲基, 并且R₁是-(CH₂)_n-L, 其中n是1并且L是-CO-N(R₃R₄), 并且R₃和R₄之一是H, 那么R₃和R₄中的另一个不是甲基、羟乙基、烷氧基、苯基、经取代的苯基、吡啶基或经取代的吡啶基;并且
- [0206] (c) 如果环A是噻吩基, X是N, R是经取代的苯基, R₂是H, R_B是甲基, 并且R₁是-(CH₂)_n-L, 其中n是1并且L是-COO-R₃, 那么R₃不是甲基或乙基;
- [0207] 或其一种盐、溶解物或水合物。
- [0208] 在某些实施方案中, R是芳基或杂芳基, 其中的每一个任选地经取代。
- [0209] 在某些实施方案中, L是H、-COO-R₃、-CO-N(R₃R₄)、-S(O)₂-R₃、-S(O)₂-N(R₃R₄)、N(R₃R₄)、N(R₄)C(O)R₃或任选地经取代的芳基。在某些实施方案中, 每一个R₃独立地选自下组,

该组由以下各项组成：H，包含选自O、S、或N的0、1、2或3个杂原子的 $-C_1-C_8$ 烷基；或 NH_2 ， $N=CR_4R_6$ 。

[0210] 在某些实施方案中， R_2 是H、D、卤素或甲基。

[0211] 在某些实施方案中， R_B 是烷基、羟烷基、卤烷基、或烷氧基；其中的每一个任选地经取代

[0212] 在某些实施方案中， R_B 是甲基、乙基、羟甲基、甲氧基甲基、三氟甲基、 $COOH$ 、 $COOMe$ 、 $COOEt$ 、或 $COOCH_2OC(O)CH_3$ 。

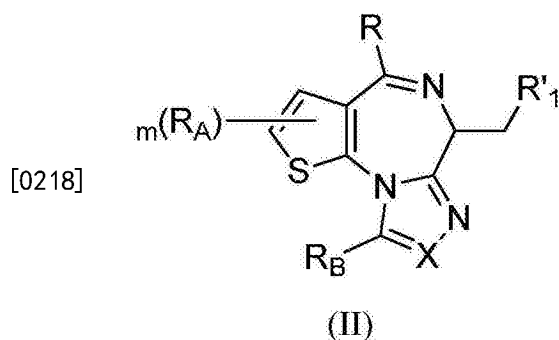
[0213] 在某些实施方案中，环A是5或6元芳基或杂芳基。在某些实施方案中，环A是硫代呋喃基、苯基、萘基、联苯基、四氢萘基、茚满基、吡啶基、呋喃基、吡咯基、噻吩基、吡嗪基、咪唑基、噁唑基、噻吩基、噻唑基、三唑基、异噻唑基、喹啉基、吡咯基、或5,6,7,8-四氢异喹啉基。

[0214] 在某些实施方案中，环A是苯基或噻吩基。

[0215] 在某些实施方案中， m 是1或2，并且至少一次出现的 R_A 是甲基。

[0216] 在某些实施方案中，每一个 R_A 独立地是H、一个任选地经取代的烷基，或任何两个 R_A 与各自附接的多个原子一起可以形成一个芳基。

[0217] 在另一个方面，该化合物是具有化学式II的化合物：



[0219] 其中

[0220] X 是N或 CR_5 ；

[0221] R_5 是H、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基，其中的每一个任选地经取代；

[0222] R_B 是H、烷基、羟烷基、氨基烷基、烷氧基烷基、卤烷基、羟基、烷氧基、或 $-COO-R_3$ ，其中的每一个任选地经取代；

[0223] 每一个 R_A 独立地是烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基，其中的每一个任选地经取代；或者任何两个 R_A 与各自附接的多个原子一起可以形成一个融合的芳基或杂芳基基团；

[0224] R 是烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基，其中的每一个任选地经取代；

[0225] $R'1$ 是H、 $-COO-R_3$ 、 $-CO-R_3$ 、任选地经取代的芳基、或任选地经取代的杂芳基；

[0226] 每一个 R_3 独立地选自下组，该组由以下各项组成：

[0227] (i) H、芳基、经取代的芳基、杂芳基、经取代的杂芳基；

[0228] (ii) 杂环烷基或经取代的杂环烷基；

[0229] (iii) $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 链烯基或 $-C_2-C_8$ 炔基，每一个包含0、1、2、或3个选自O、S、或N的杂原子； $-C_3-C_{12}$ 环烷基、经取代的 $-C_3-C_{12}$ 环烷基； $-C_3-C_{12}$ 环烯基、或经取代的 $-C_3-C_{12}$ 环

烯基;其中的每一个可以任选地经取代;

[0230] m是0、1、2、或3;

[0231] 假设如果R'₁是-COO-R₃,X是N,R是经取代的苯基,并且R_B是甲基,那么R₃不是甲基或乙基;

[0232] 或其一种盐、溶解物或水合物。

[0233] 在某些实施方案中,R是芳基或杂芳基,其中的每一个任选地经取代。在某些实施方案中,R是苯基或吡啶基,其中的每一个任选地经取代。在某些实施方案中,R是对-C1-苯基、邻-C1-苯基、间-C1-苯基、对-F-苯基、邻-F-苯基、间-F-苯基或吡啶基。

[0234] 在某些实施方案中,R'₁是-COO-R₃、任选地经取代的芳基、或任选地经取代的杂芳基;并且R₃是-C₁-C₈烷基,它包含0、1、2、或3个选自O、S、或N的杂原子,并且它可以任选地经取代。在某些实施方案中,R'₁是-COO-R₃,并且R₃是 甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、仲丁基、或叔丁基;或R'₁是H或任选地经取代的苯基。

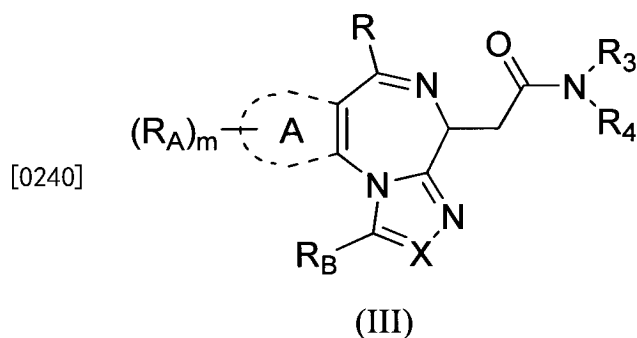
[0235] 在某些实施方案中,R_B是甲基、乙基、羟甲基、甲氧基甲基、三氟甲基、COOH、COOMe、COOEt、COOCH₂OC(O)CH₃。

[0236] 在某些实施方案中,R_B是甲基、乙基、羟甲基、甲氧基甲基、三氟甲基、COOH、COOMe、COOEt、或COOCH₂OC(O)CH₃。

[0237] 在某些实施方案中,每一个R_A独立地是一个任选地经取代的烷基,或任何两个R_A与各自附接的多个原子一起可以形成一个融合的芳基。

[0238] 在某些实施方案中,每一个R_A是甲基。

[0239] 在另一个方面,该化合物是具有化学式III的化合物:



[0241] 其中

[0242] X是N或CR₅;

[0243] R₅是H、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基,其中的每一个任选地经取代;

[0244] R_B是H、烷基、羟烷基、氨基烷基、烷氧基烷基、卤烷基、羟基、烷氧基、或-COO-R₃,其中的每一个任选地经取代;

[0245] 环A是芳基或杂芳基;

[0246] 每一个R_A独立地是烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基,其中的每一个任选地经取代;或者任何两个R_A与各自附接的多个原子一起可以形成一个融合的芳基或杂芳基基团;

[0247] R是烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基,其中的每一个任选地经取代;

[0248] 每一个R₃独立地选自下组,该组由以下各项组成:

[0249] (i) H、芳基、经取代的芳基、杂芳基、或经取代的杂芳基;

- [0269] R_5 是H、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基,其中的每一个任选地经取代;
- [0270] R_B 是H、烷基、羟烷基、氨基烷基、烷氧基烷基、卤烷基、羟基、烷氧基、或 $-COO-R_3$,其中的每一个任选地经取代;
- [0271] 环A是芳基或杂芳基;
- [0272] 每一个 R_A 独立地是烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基,其中的每一个任选地经取代;或者任何两个 R_A 与各自附接的多个原子一起可以形成一个融合的芳基或杂芳基基团;
- [0273] R_1 是 $-(CH_2)_n-L$,其中n是0-3并且并且L是H、 $-COO-R_3$ 、 $-CO-R_3$ 、 $-CO-N(R_3R_4)$ 、 $-S(O)_2-R_3$ 、 $-S(O)_2-N(R_3R_4)$ 、 $N(R_3R_4)$ 、 $N(R_4)$ C(O) R_3 、任选地经取代的芳基、或任选地经取代的杂芳基;
- [0274] R_2 是H、D、卤素、或任选地经取代的烷基;
- [0275] 每一个 R_3 独立地选自下组,该组由以下各项组成:
- [0276] (i) H、芳基、经取代的芳基、杂芳基、或经取代的杂芳基;
- [0277] (ii) 杂环烷基或经取代的杂环烷基;
- [0278] (iii) $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 链烯基或 $-C_2-C_8$ 炔基,每一个包含0、1、2、或3个选自O、S、或N的杂原子; $-C_3-C_{12}$ 环烷基、经取代的 $-C_3-C_{12}$ 环烷基、 $-C_3-C_{12}$ 环烯基、或经取代的 $-C_3-C_{12}$ 环烯基,其中的每一个可以任选地经取代;以及
- [0279] (iv) NH_2 , $N=CR_4R_6$;
- [0280] 每一个 R_4 独立地是H、烷基、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基,其中的每一个任选地经取代;
- [0281] 或将 R_3 和 R_4 与它们附接的氮原子一起以形成一个4-10元环;
- [0282] R_6 是烷基、链烯基、环烷基、环烯基、杂环烷基、芳基、或杂芳基,其中的每一个任选地经取代;或将 R_4 和 R_6 与它们附接的碳原子一起以形成一个4-10元环;
- [0283] m是0、1、2、或3;
- [0284] 假设
- [0285] (a) 如果环A是噻吩基,X是N, R_2 是H, R_B 是甲基,并且 R_1 是 $-(CH_2)_n-L$,其中n是0并且L是 $-CO-N(R_3R_4)$,那么不将 R_3 和 R_4 与它们附接的氮原子一起形成一个吗啉代环;
- [0286] (b) 如果环A是噻吩基,X是N, R_2 是H, R_B 是甲基,并且 R_1 是 $-(CH_2)_n-L$,其中n是0并且L是 $-CO-N(R_3R_4)$,并且 R_3 和 R_4 之一是H,那么 R_3 和 R_4 中的另一个不是甲基、羟乙基、烷氧基、苯基、经取代的苯基、吡啶基或经取代的吡啶基;并且
- [0287] (c) 如果环A是噻吩基,X是N, R_2 是H, R_B 是甲基,并且 R_1 是 $-(CH_2)_n-L$,其中n是0并且L是 $-COO-R_3$,那么 R_3 不是甲基或乙基;或者
- [0288] 其一种盐、溶解物或水合物。
- [0289] 在某些实施方案中, R_1 是 $-(CH_2)_n-L$,其中n是0-3并且L是 $-COO-R_3$ 、任选地经取代的芳基、或任选地经取代的杂芳基;并且 R_3 是 $-C_1-C_8$ 烷基,它包含0、1、2、或3个选自O、S、或N的杂原子,并且它可以任选地经取代。在某些实施方案中,n是1或2并且L是烷基或 $-COO-R_3$,并且 R_3 是甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、仲丁基、或叔丁基;或n是1或2并且L是H或任选地经取代的苯基。
- [0290] 在某些实施方案中, R_2 是H或甲基。
- [0291] 在某些实施方案中, R_B 是甲基、乙基、羟甲基、甲氧基甲基、三氟甲基、 $COOH$ 、 $COOMe$ 、

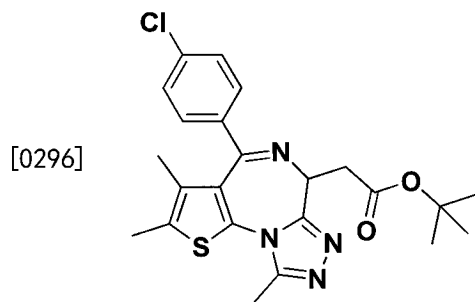
COOEt、COOCH₂OC(O)CH₃。

[0292] 在某些实施方案中,环A是苯基、萘基、联苯基、四氢萘基、茚满基、吡啶基、呋喃基、吡咯基、嘧啶基、哒嗪基、吡嗪基、咪唑基、噁唑基、噻吩基、噻唑基、三唑基、异噁唑基、喹啉基、吡咯基、吡唑基、或5,6,7,8-四氢异喹啉基。

[0293] 在某些实施方案中,每一个R_A独立地是一个任选地经取代的烷基,或任何两个R_A与各自附接的多个原子一起可以形成一个芳基。

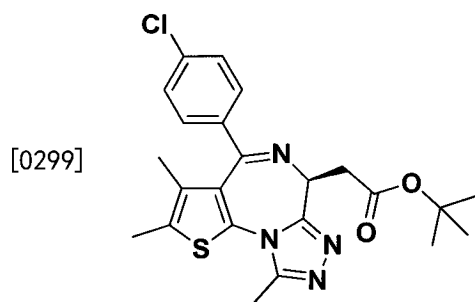
[0294] 本发明的方法还涉及具有化学式V-XXII的化合物并且涉及在此所述的任何化合物

[0295] 在另一个方面,该化合物是由以下化学式表示的化合物:



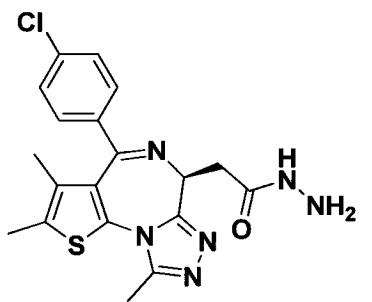
[0297] 或其一种盐、溶解物或水合物。

[0298] 在某些实施方案中,该化合物是 (+) -JQ1:

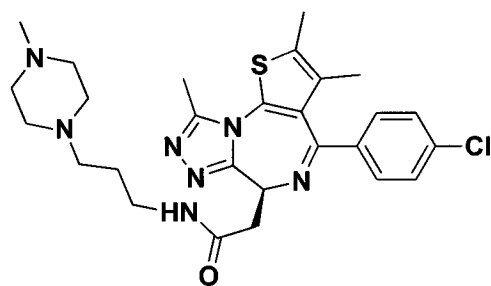
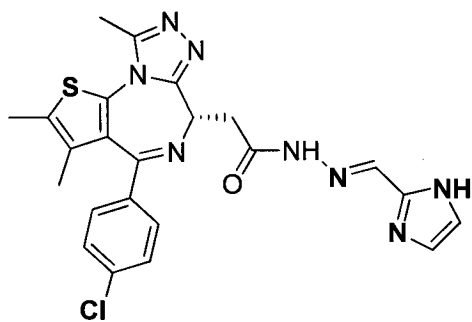


[0300] 或其一种盐、溶解物或水合物。

[0301] 在另一个方面,该化合物是由以下化学式表示的化合物:

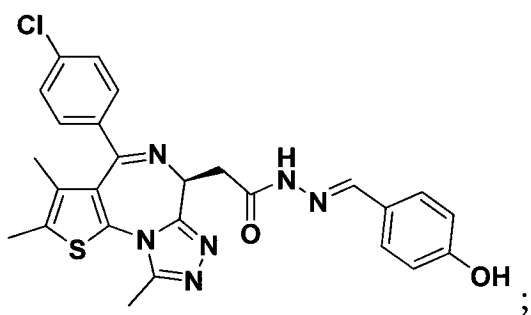


[0302]



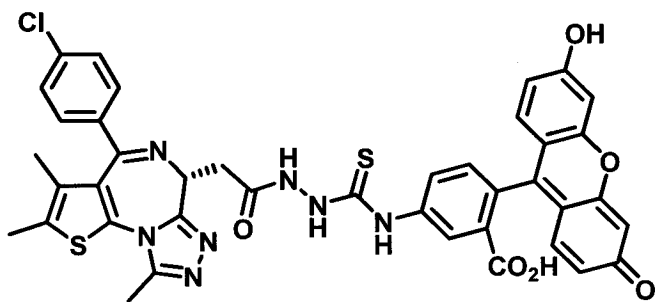
或

[0303]

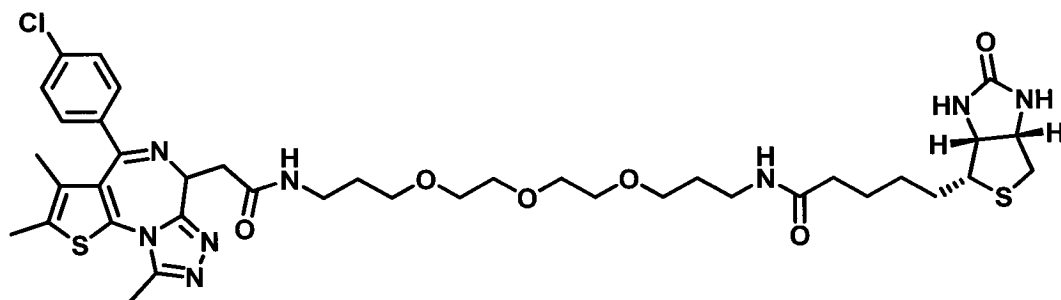


[0304] 或其一种盐、溶解物或水合物。

[0305] 在另一个方面,该化合物是由以下化学式表示的化合物:



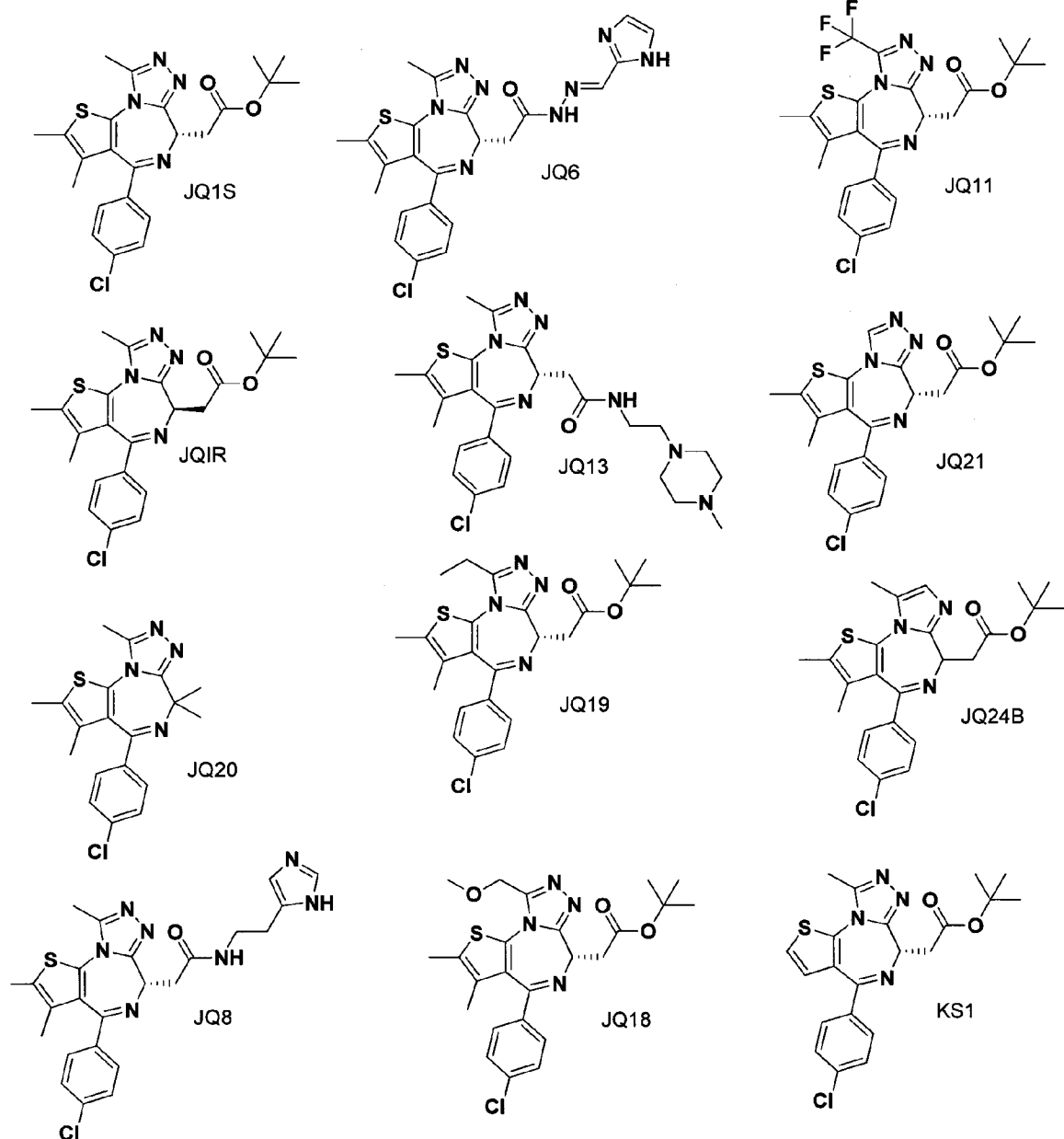
[0306] 或



[0307] 或其一种盐、溶解物或水合物。

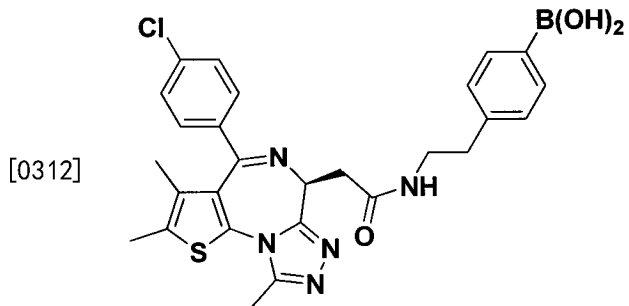
[0308] 在另一个方面,该化合物是由以下化学式中任一个所表示的化合物:

[0309]



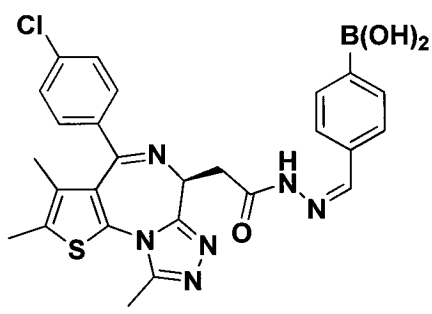
[0310] 或其一种盐、溶解物或水合物。

[0311] 在另一个方面,该化合物是由以下化学式中任一所表示的化合物:



或

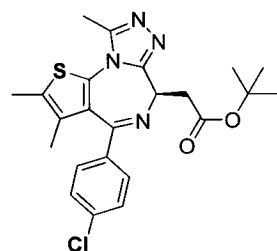
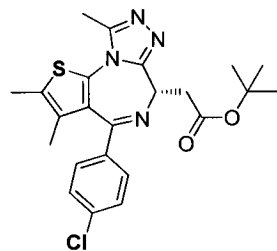
[0313]



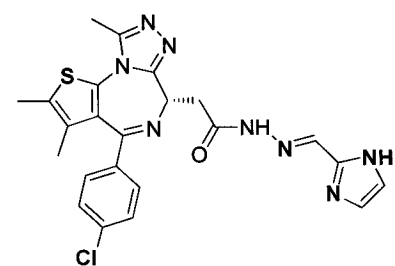
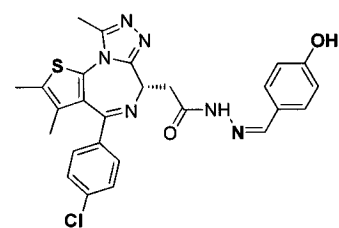
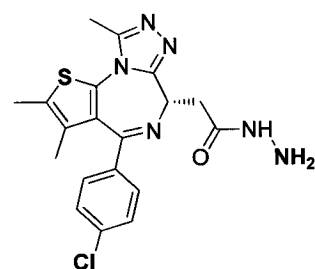
;

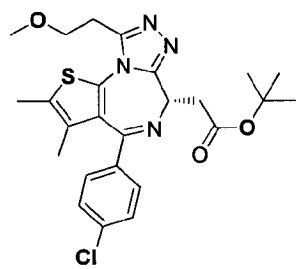
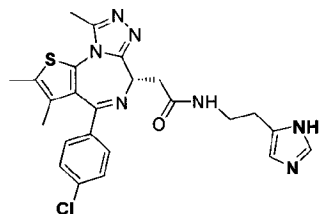
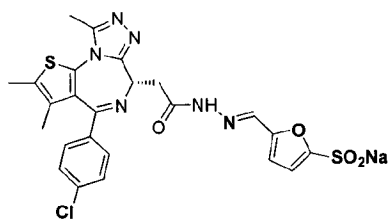
[0314] 或其一种盐、溶解物或水合物。

[0315] 在另一个方面,该化合物是由以下结构中任一个所表示的化合物:

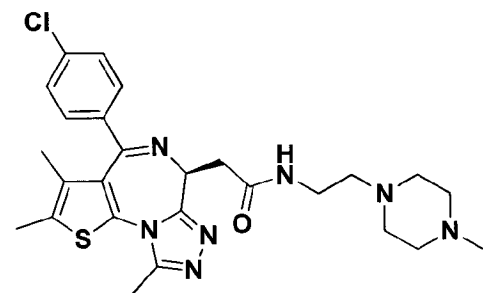
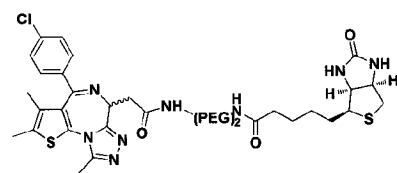
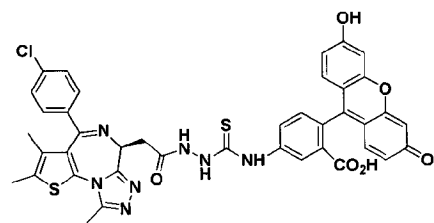
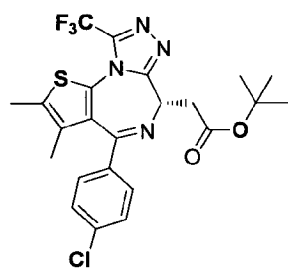


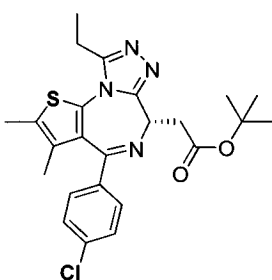
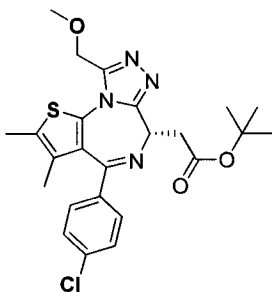
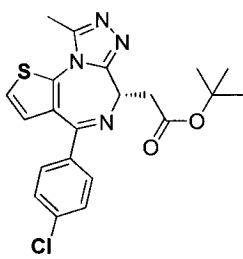
[0316]



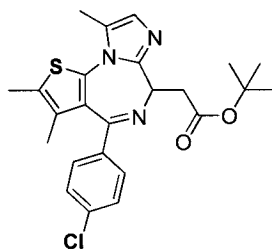
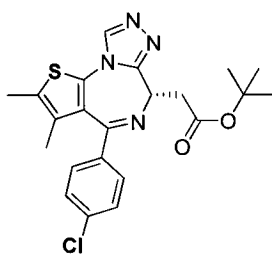
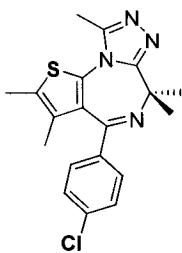


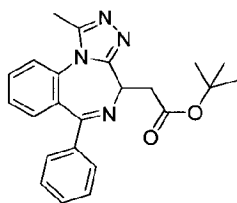
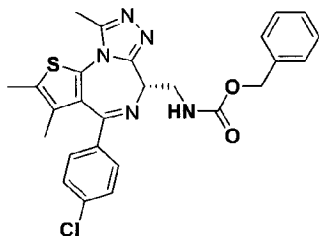
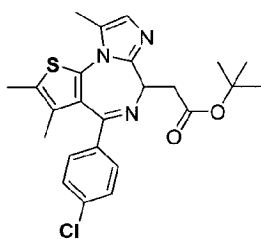
[0317]



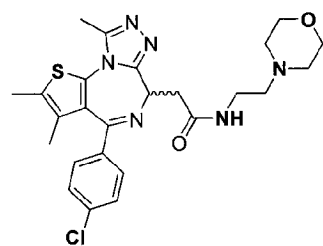
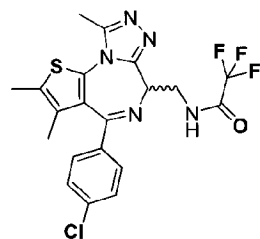
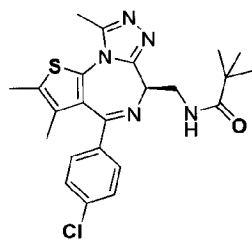
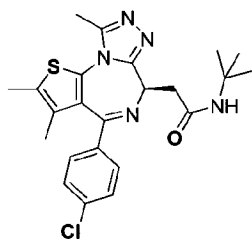


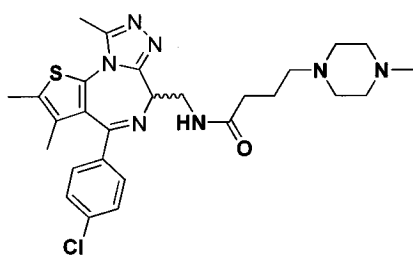
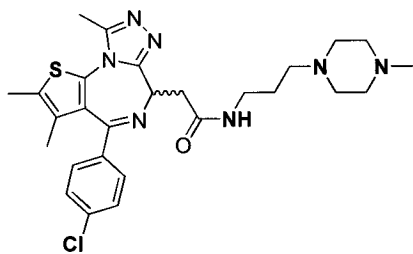
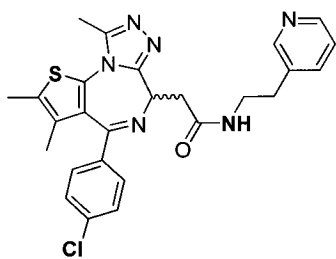
[0318]



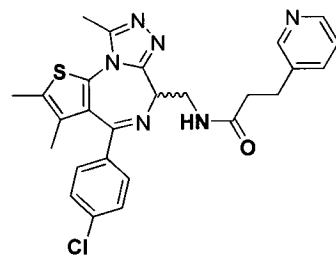
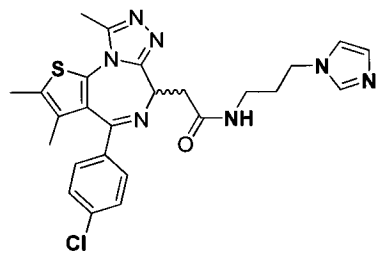
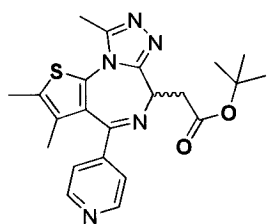


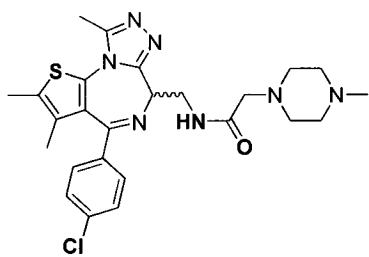
[0319]





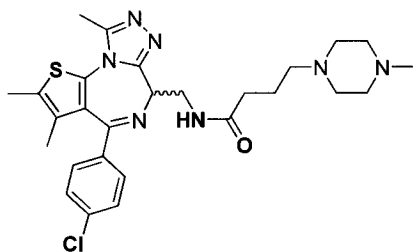
[0320]





或

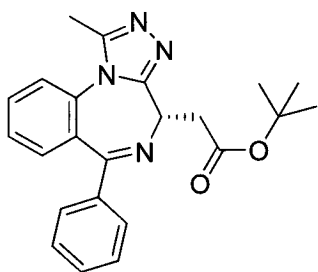
[0321]



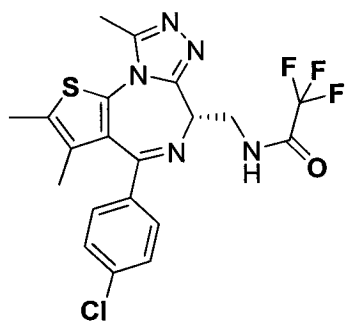
;

[0322] 或其一种盐、溶解物或水合物。

[0323] 在某些实施方案中,本发明的一种化合物可由以下结构之一表示:

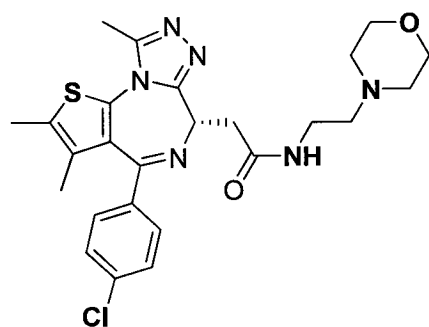


,

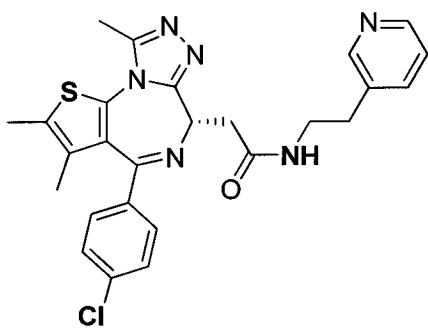


[0324]

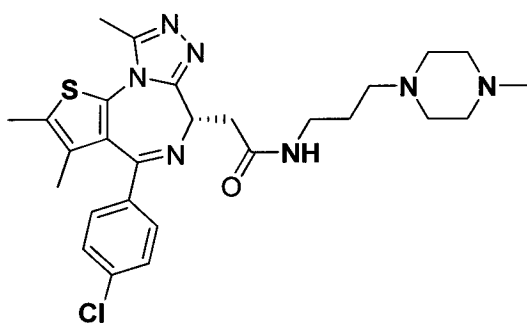
,



,

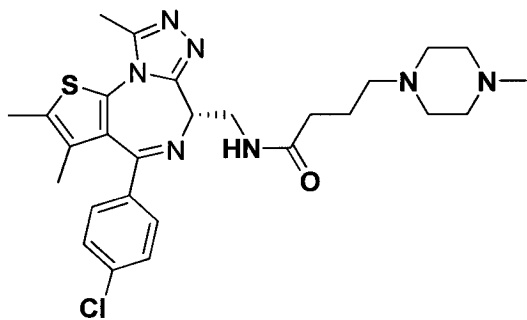


,

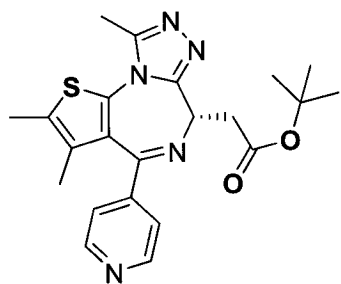


,

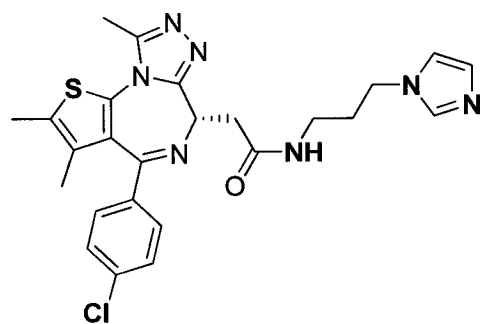
[0325]



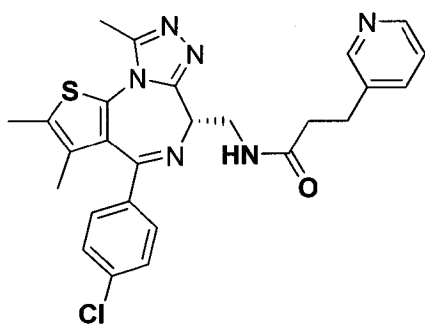
,



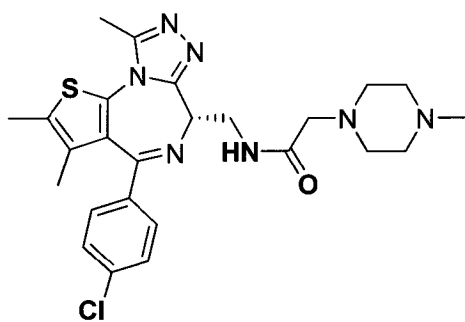
,



,

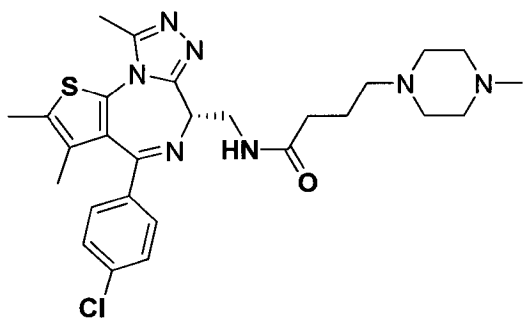


,

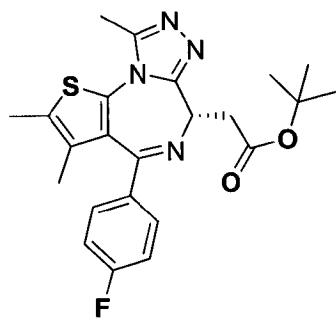


,

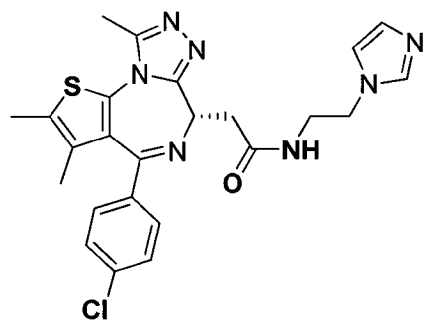
[0326]



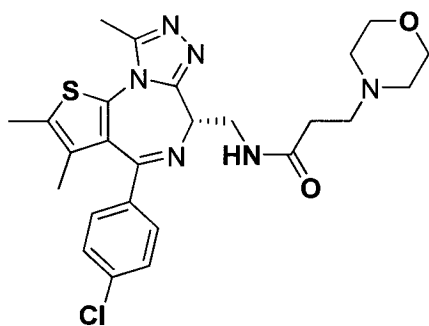
,



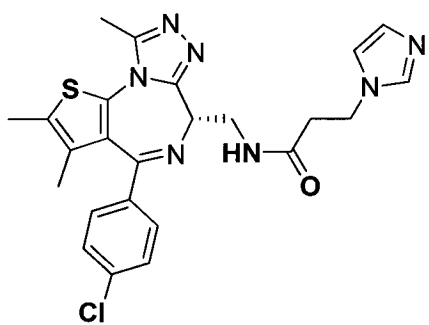
,



,

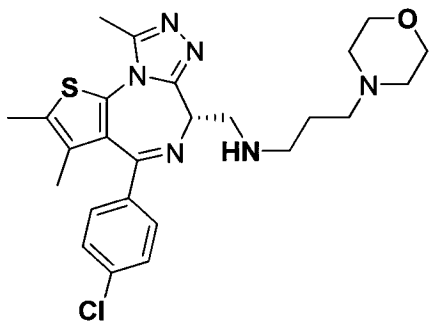


,

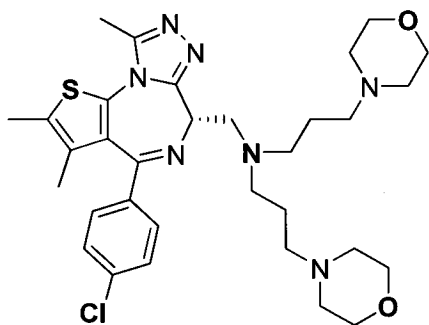


,

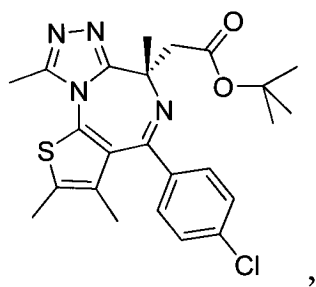
[0327]



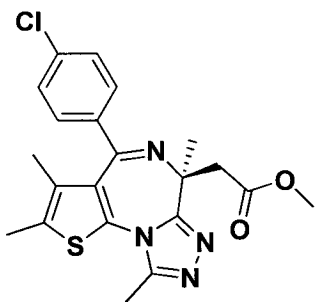
,



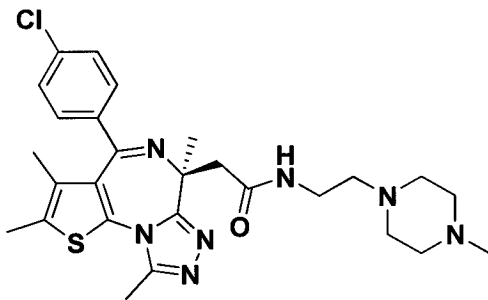
,



,

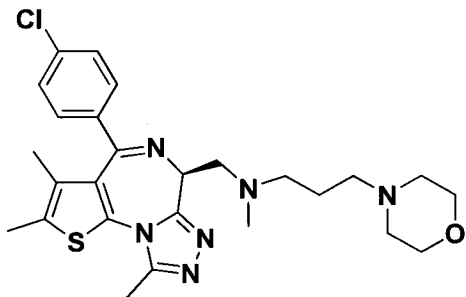


,

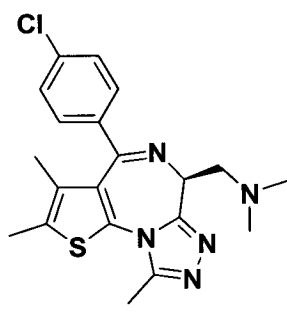


,

[0328]



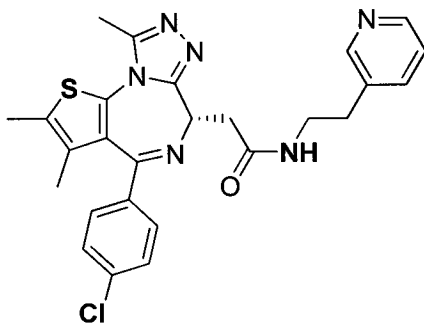
, 或



;

[0329] 或其一种盐、溶解物或水合物。

[0330] 在一个实施方案中,该化合物由以下结构表示:

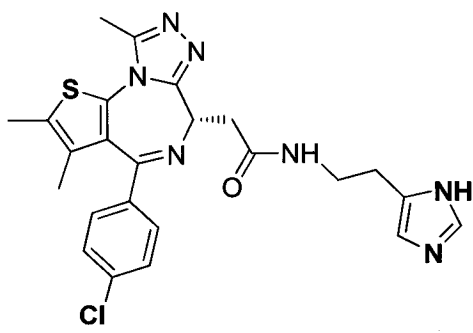


[0331]

[0332] 或其一种盐、溶解物或水合物。

[0333] 在另一个实施方案中,该化合物由以下结构表示:

[0334]



;

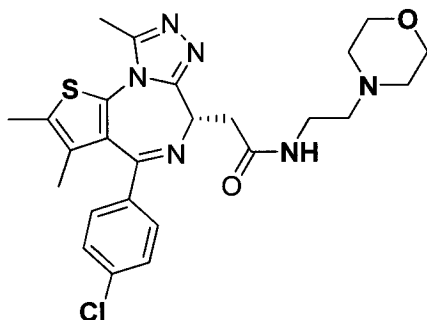
[0335]

或其一种盐、溶解物或水合物。

[0336]

在另一个实施方案中,该化合物由以下结构表示:

[0337]



[0338]

或其一种盐、溶解物或水合物。

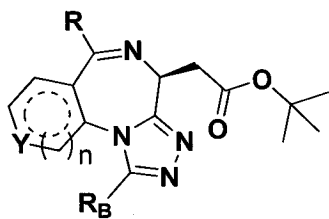
[0339]

在某些实施方案中,本发明的化合物可以具有与在此列出的任何化合物相反的手性。

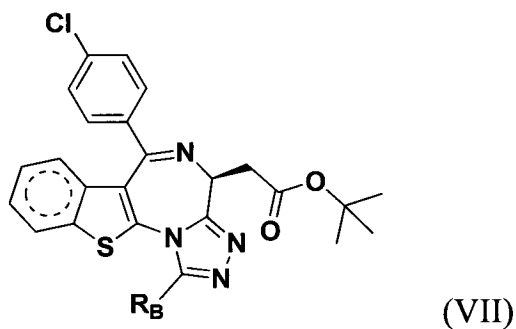
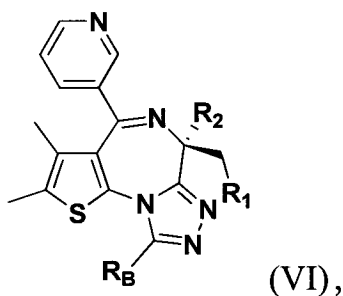
[0340]

在某些实施方案中,该化合物是一种由化学式 (V)、(VI)、或 (VII) 表示的化合物:

[0341]



(V),

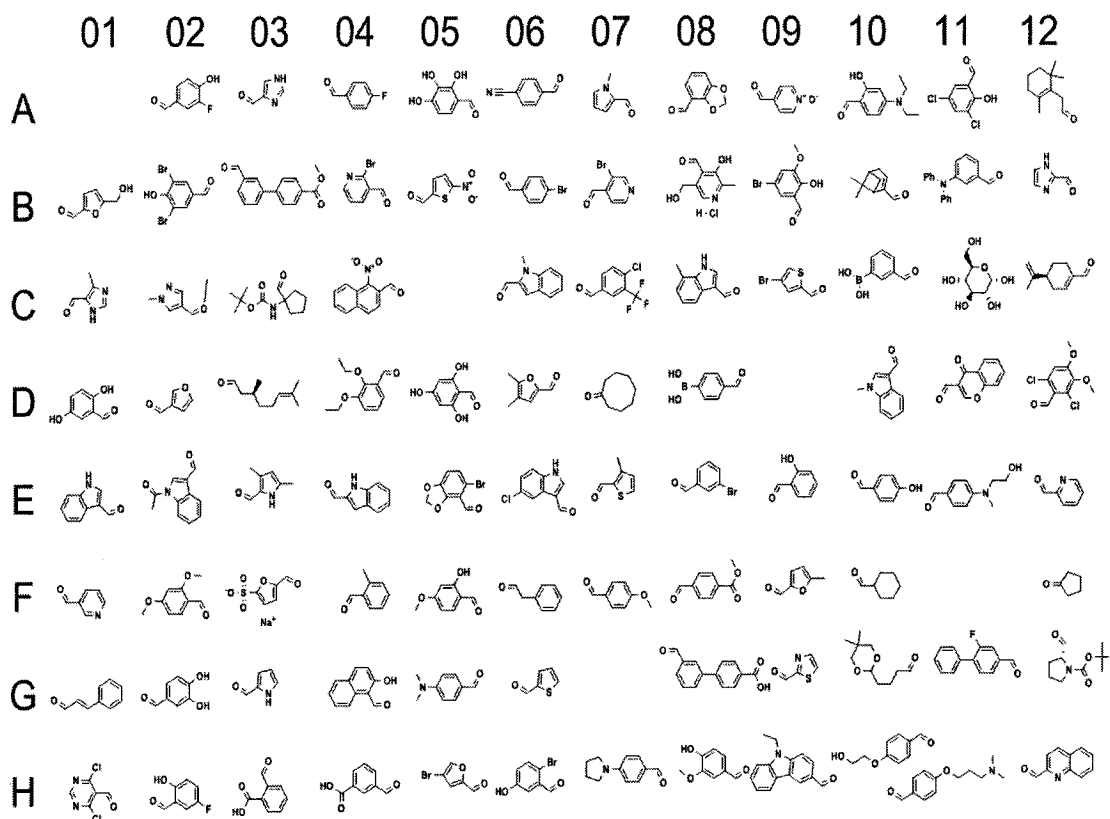


[0343] 其中, R 、 R_1 、以及 R_2 和 R_B 具有如在化学式 (I) 中相同的意义; Y 是 O、N、S、或 CR_5 , 其中 R_5 具有如在化学式 (I) 中相同的意义; n 是 0 或 1; 并且化学式 (VII) 中的虚线圈表示芳族的或者非芳族的环; 或其一种盐、溶解物或水合物。

[0344] 在化学式 I-IV 和 VI (或在此的任何化学式) 中任一的某些实施方案中, R_6 表示下面表 A 中列出的醛的非羰基部分 (即, 对具有化学式 R_6CHO 的醛而言, R_6 是该醛的非羰基部分)。在某些实施方案中, R_4 和 R_6 一起表示表 A 中列出的酮的非羰基部分 (即, 对化学式 $R_6C(O)R_4$ 的酮而言, R_4 和 R_6 是该酮的非羰基部分)。

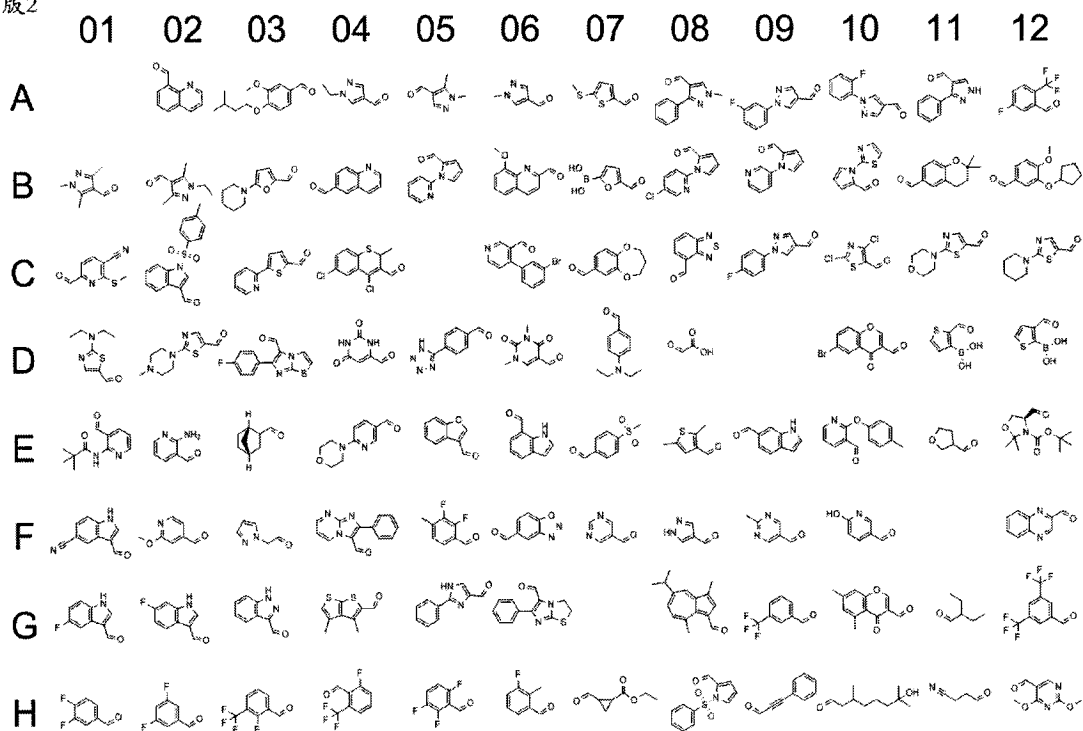
[0345] 表 A:

版1

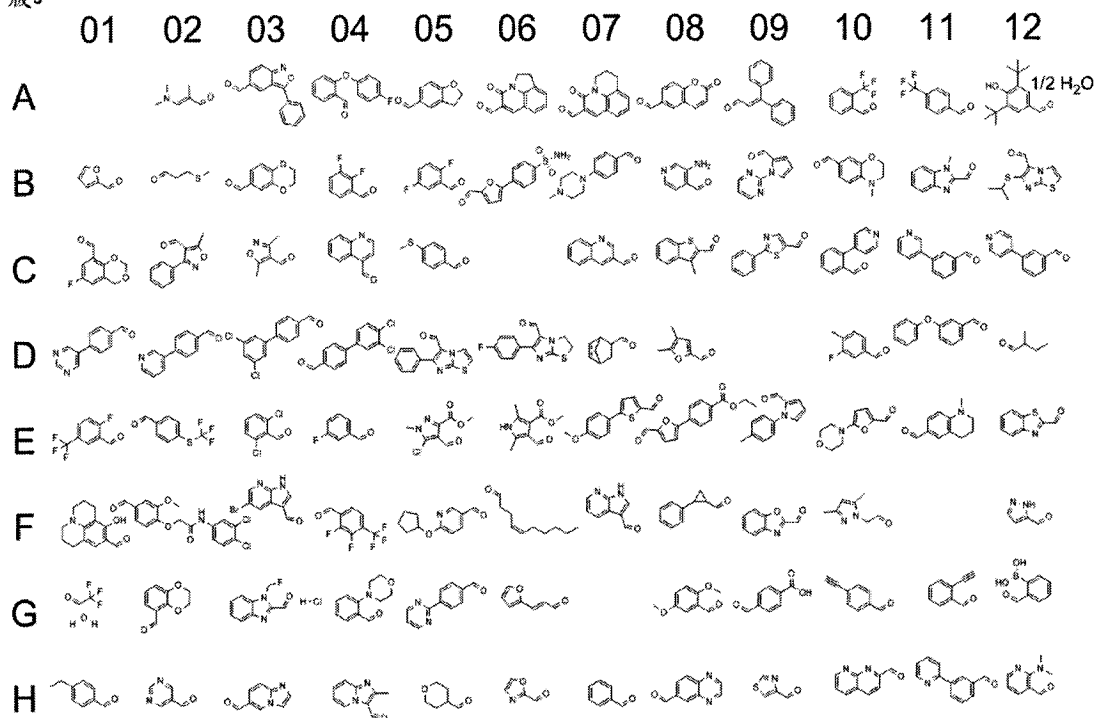


[0346]

版2

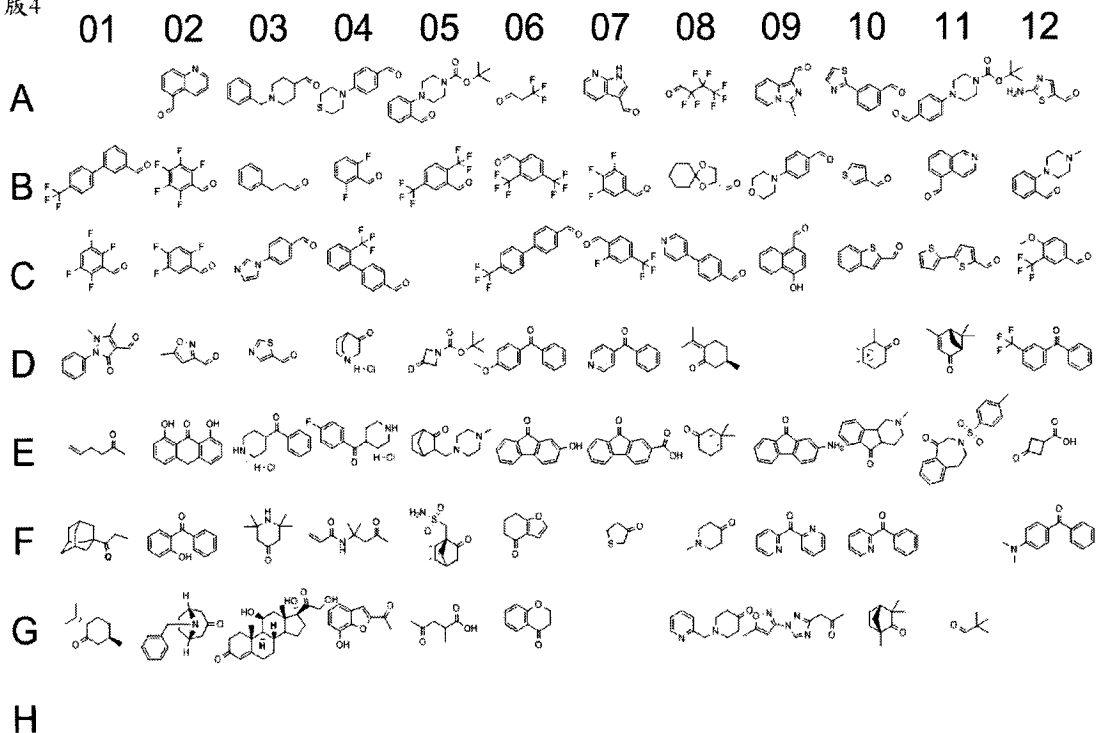


版3



[0347]

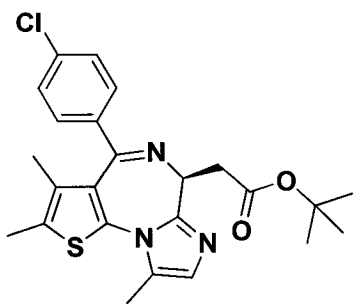
版4



[0348]

在一个实施方案中,该化合物是由以下化学式表示的化合物:

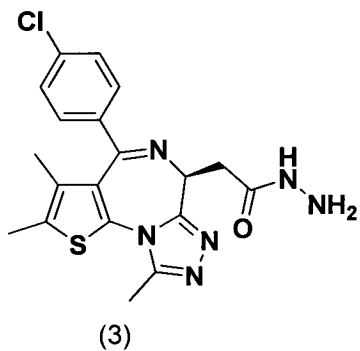
[0349]



或其一种盐、溶解物或水合物。

(VIII),

[0350] 在某些实施方案中,该化合物是(消旋的)JQ1;在某些实施方案中,这种化合物是(+)-JQ1。在某些实施方案中,该化合物是选自下组,该组由以下各项组成:

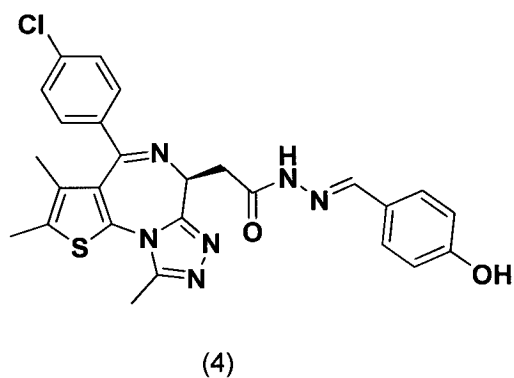


(3)

[0351]

和

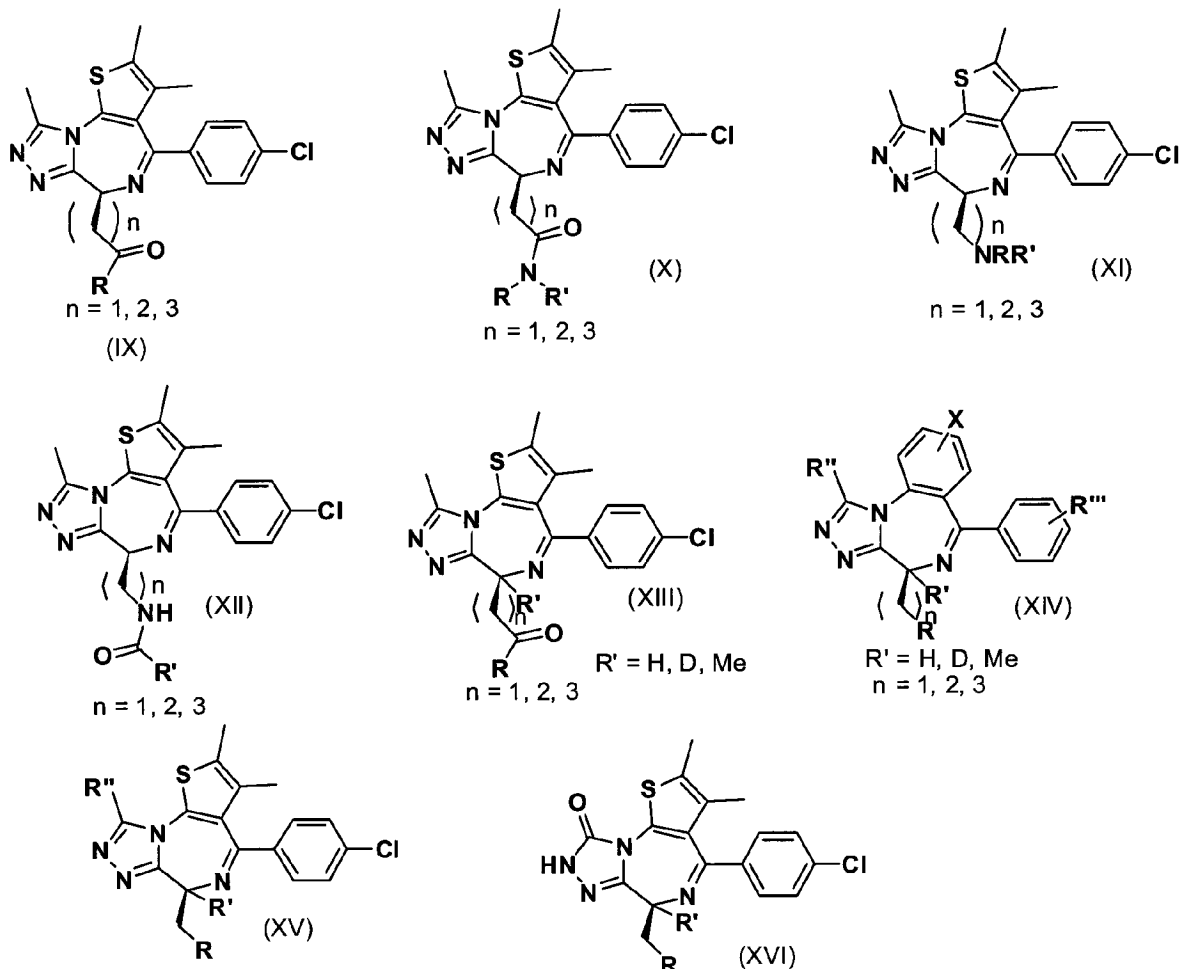
或其一种盐、溶解物或水合物。



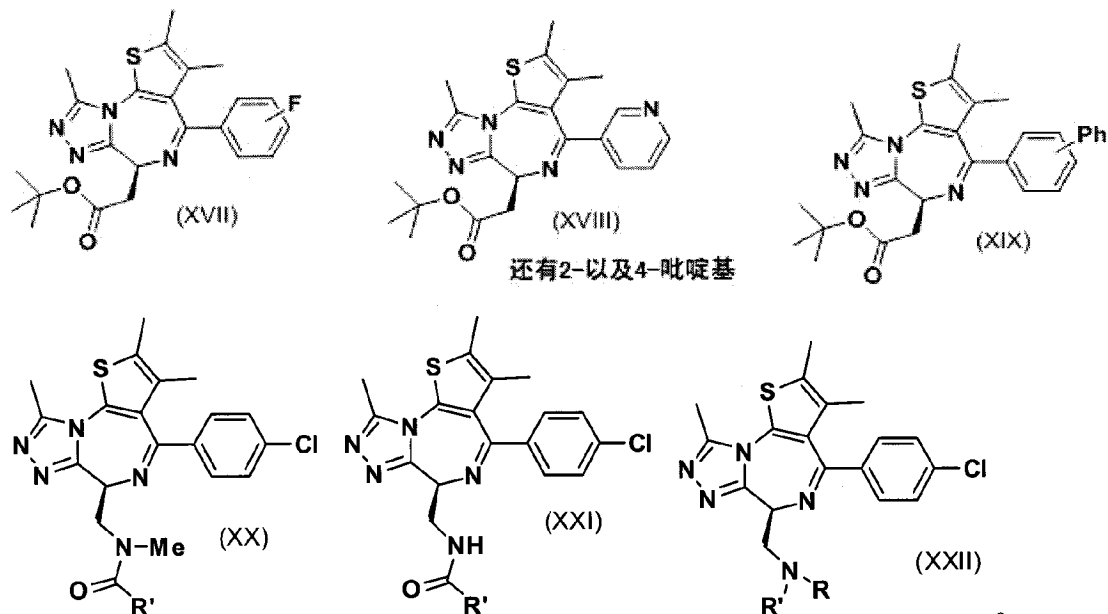
(4)

[0352] 化合物的额外的实例包括根据以下化学式中任一个所述的化合物:

[0353]



$R'' = \text{OMe}, \text{CH}_2\text{OH}, \text{CH}_2\text{NH}_2, \text{CH}_2\text{OMe}$



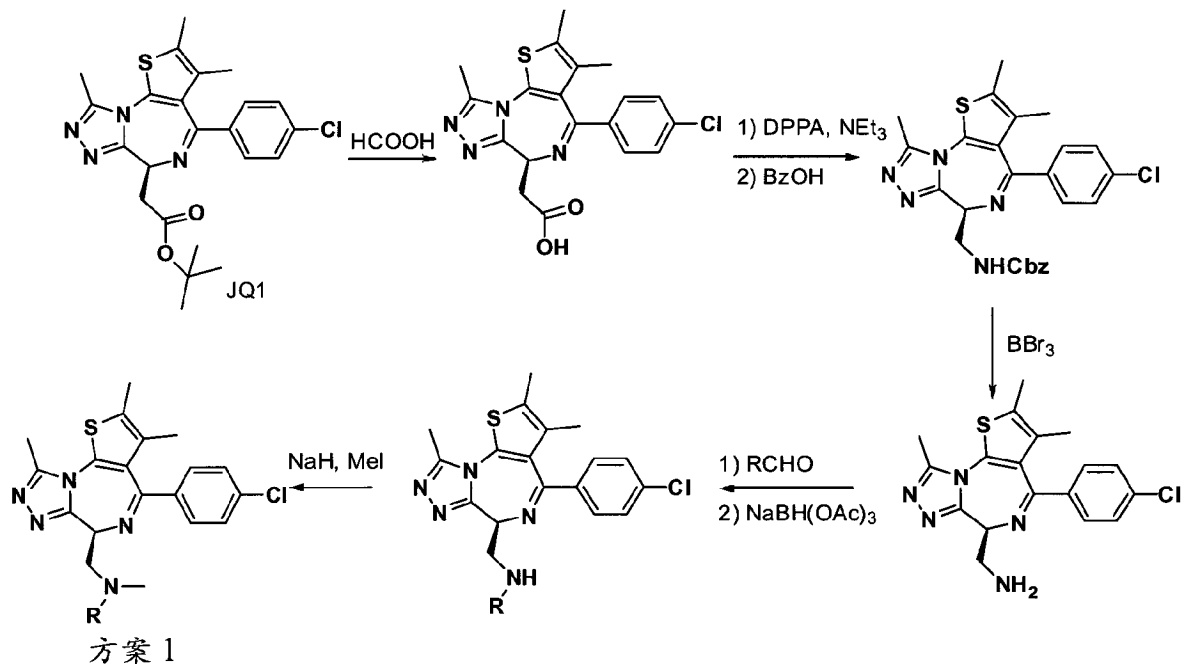
[0354] 在化学式IX-XXII中,R和R'可以是,例如,H、芳基、经取代的芳基、杂芳基、杂芳基、杂环烷基、-C₁-C₈烷基、-C₂-C₈链烯基、-C₂-C₈炔基、-C₃-C₁₂环烷基、经取代的-C₃-C₁₂环烷基、-C₃-C₁₂环烯基、或经取代的-C₃-C₁₂环烯基,其中的每一个可以任选地经取代。在化学式

XIV中,X可以是用于如在此所描述的芳基基团的任何取代基。

[0355] 可以通过多种方法制备本发明的化合物,其中一些方法在本领域是已知的。例如,下文提供的化学实例提供了用于制备化合物JQ1 (作为消旋体) 以及对映异构体 (+)-JQ1 和 (-)-JQ1 的合成方案 (见方案S1和S2)。可以替换适当的起始材料通过类似的方法制备具有化学式 (I) - (VIII) 的多种化合物。

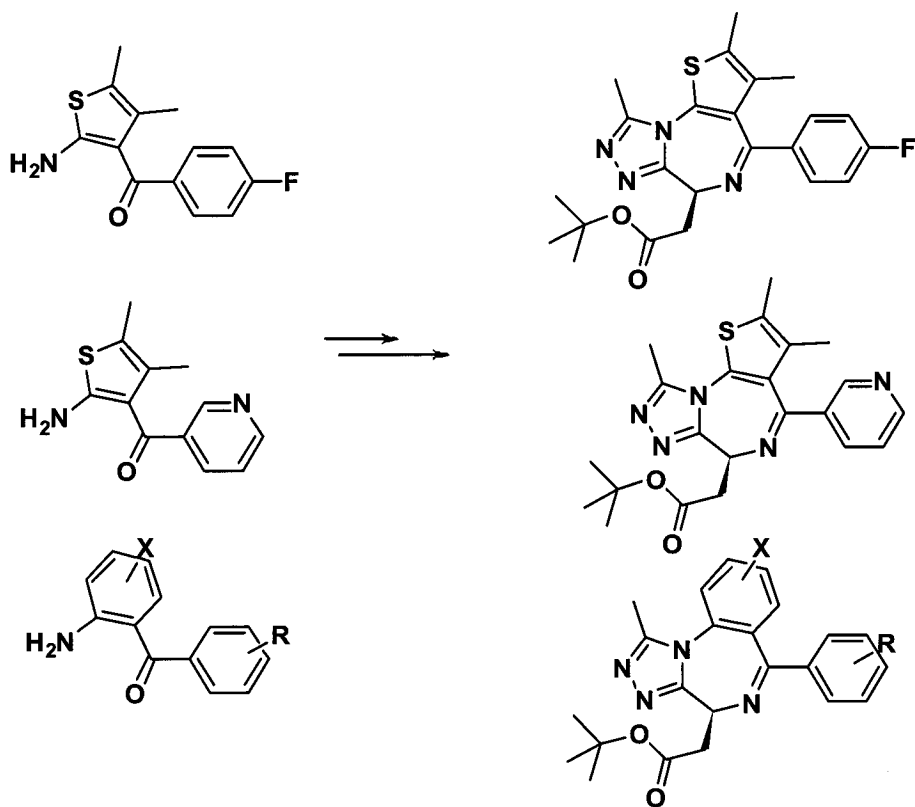
[0356] 例如,从JQ1起始,类似的胺可以按照下面所示的方案1制备。

[0357]



[0358] 如方案1中所示,JQ1的叔丁基酯的水解提供羧酸,用二苯基磷酰基叠氮化物(DPPA)处理该羧酸并使其经历克尔蒂斯(Curtius)重排条件以提供苄氧羰基(Cbz)保护的胺,然后脱保护产生该胺。该胺基团的后续加工,例如通过还原氨化,产生仲胺,这种仲胺可以被进一步地烷基化以提供叔胺。

[0359]

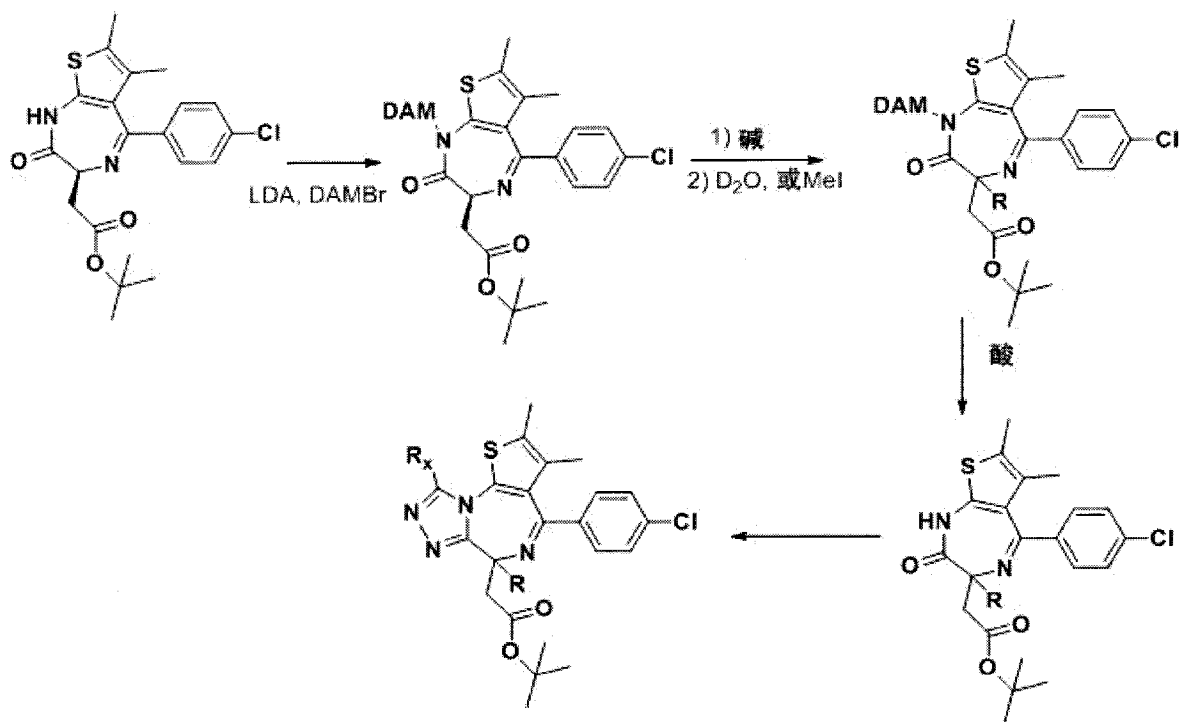


方案 2

[0360] 方案2列出了本发明的化合物的另外的实例的合成,例如具有化学式I的化合物,其中稠环核心被修饰(例如,通过如化学式I中环A的不同的芳基环的取代)。使用具有适当官能度的氨基二芳基酮(例如,替换以下方案S1中的氨基二芳基酮S2)提供了具有多种稠环核心和/或芳基基团附属物(相应于化学式I中的基团R)的新颖化合物。这样的氨基二芳基酮是可商购的或者可以通过多种方法制备,其中一些方法在本领域是已知的。

[0361] 方案3提供了用于制备本发明的另外的化合物的其他示例性合成方案。

[0362]



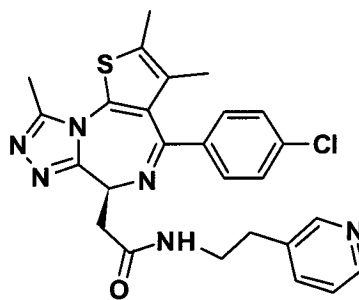
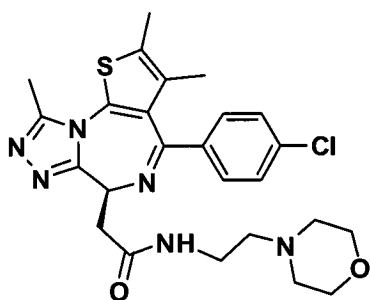
方案 3

[0363] 如方案3所示,用R部分 (DAM=二甲氨基亚甲基保护基团) 对耦合的二环前体 (参见以下用于合成这种化合物的方案S1) 进行官能化,并且然后通过与酰肼进行反应对其进行加工以形成三环的耦合核心。通过选择合适的酰肼可以改变取代基 R_x 。

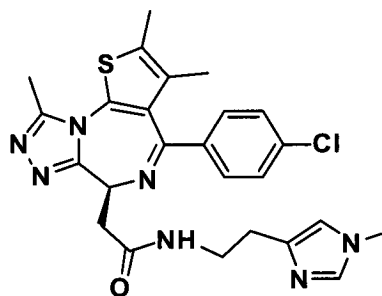
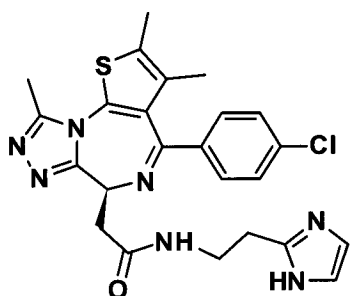
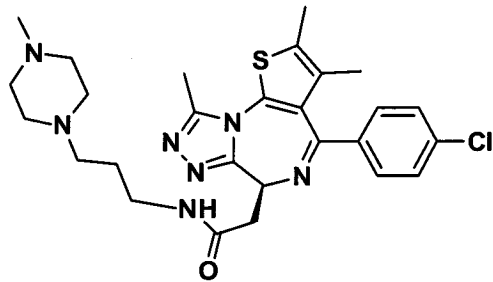
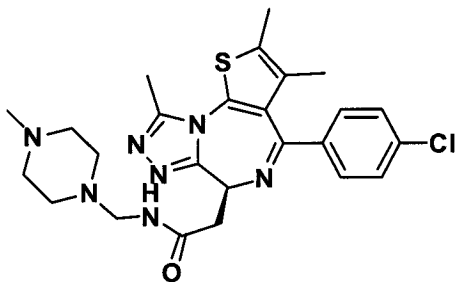
[0364] 本发明的化合物的其他实例 (可以通过在此描述的方法制备) 包括:

[0365] 酰胺类:

[0366] 可以通过例如以下的步骤制备酰胺类:制备相应的羧酸或酯,随后用适当的胺在标准条件下对其进行酰胺化。在某些实施方案中,酰胺提供了具有含有末端氮的环 (例如,吡啶基、哌啶基、哌嗪基、咪唑基 (包括N-甲基-咪唑基)、吗啉基等) 的二碳“连接子”。示例性的酰胺结构包含:

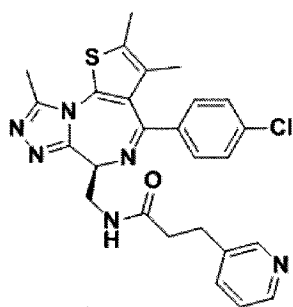
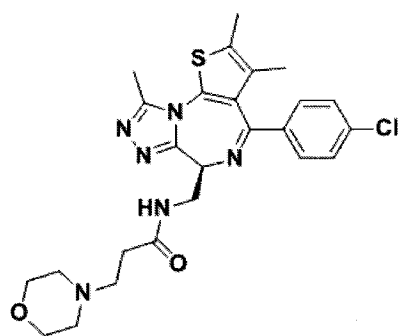


[0367]



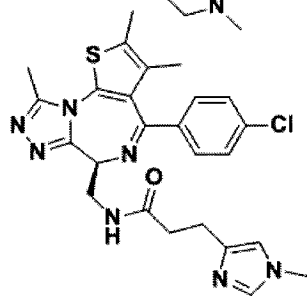
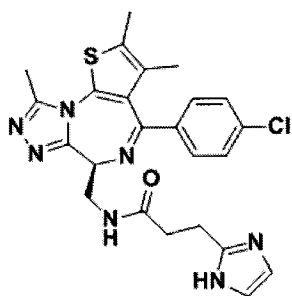
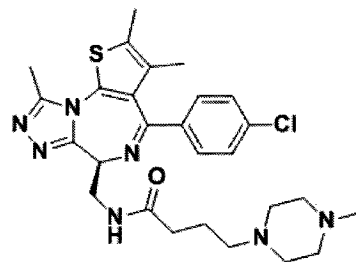
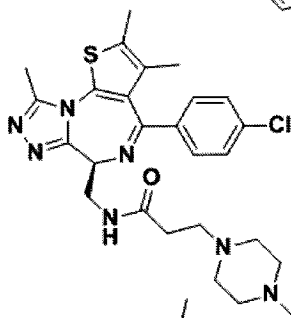
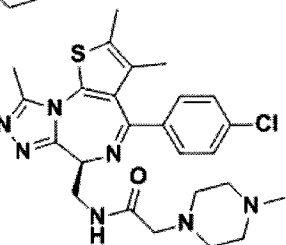
[0368] 优选使用酰胺部分与含有末端氮的环之间的二碳接头。

[0369] “反向酰胺类”：



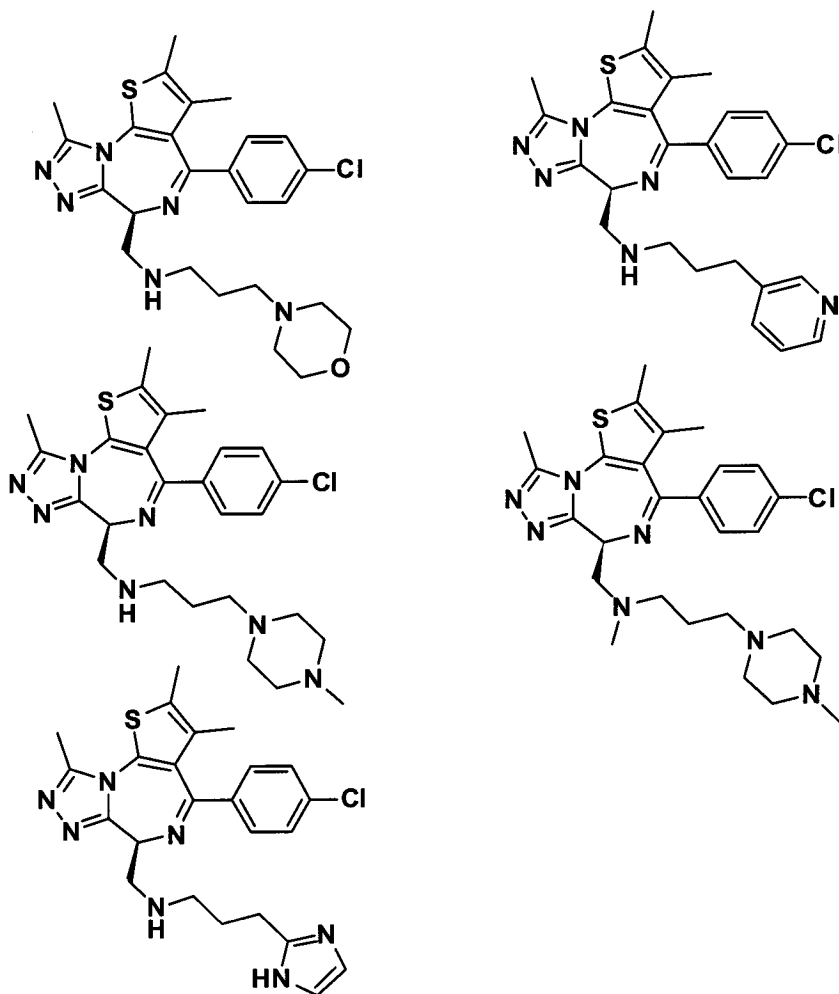
N 位置可以不同

[0370]

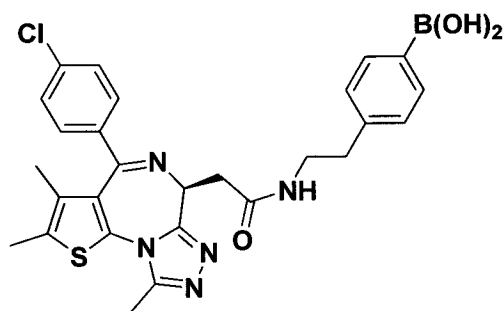


[0371] 仲胺类:

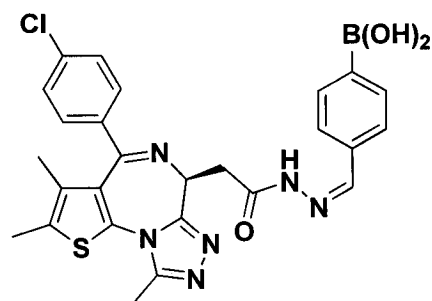
[0372]



[0373] 硼酸类:



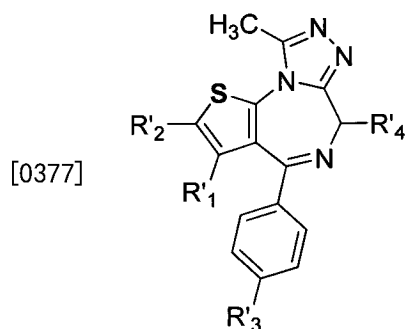
[0374]



[0375] 在某些实施方案中,具有至少一个手性中心的化合物以消旋形式存在。在某些 实施方案中,具有至少一个手性中心的化合物是在对映异构体意义上富集的,即,具有至少约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、99%或100%的对映异构

体过量(e.e.)。在某些实施方案中,化合物与在此描述的化合物(+)-JQ1((S)-叔丁基2-(4-(4-氯苯基)-2,3,9-三甲基-6H-噻吩并[3,2-f][1,2,4]三唑并[4,3-a][1,4]二氮杂环庚-6-基)乙酸酯)具有相同的绝对构型。

[0376] 在于此披露的任一化学式的某些实施方案中,该化合物不由以下结构表示:



[0378] 其中:

[0379] R'_1 是 C_1 - C_4 烷基;

[0380] R'_2 是氢、卤素、或任选地经卤素原子或羟基基团取代的 C_1 - C_4 烷基;

[0381] R'_3 是卤素原子、任选地经卤素原子取代的苯基、 C_1 - C_4 烷基、 C_1 - C_4 烷氧基、或氰基; $-NR_5-(CH_2)_m-R_6$, 其中 R_5 是氢原子或 C_1 - C_4 烷基, m 是 0-4 的整数, 并且 R_6 是任选地经卤素原子取代的苯基或吡啶基; 或 $-NR_7-CO-(CH_2)_n-R_8$, 其中 R_7 是氢原子或 C_1 - C_4 烷基, n 是 0-2 的整数, 并且 R_8 是任选地经卤素原子取代的苯基或吡啶基; 并且

[0382] R'_4 是 $-(CH_2)_a-CO-NH-R_9$, 其中 a 是 1-4 的整数, 并且 R_9 是 C_1 - C_4 烷基; C_1 - C_4 羟烷基; C_1 - C_4 烷氧基; 或任选地经 C_1 - C_4 烷基、 C_1 - C_4 烷氧基、氨基或羟基基团取代的苯基或吡啶基, 或 $-(CH_2)_b-COOR_{10}$, 其中 b 是 1-4 的整数, 并且 R_{10} 是 C_1 - C_4 烷基。

[0383] 术语“药学上可接受的盐 (pharmaceutically acceptable salt)”还指的是由在此披露的化合物 (例如, JQ1, 具有化学式 I-XXII 的化合物) 或在此描述的任何其他化合物制备的盐, 这种盐具有酸性官能团, 如羧酸官能团, 以及药学上可接受的无机或有机碱。适合的碱包括, 但并不局限于, 碱金属, 如钠、钾、以及锂, 的氢氧化物; 碱土金属, 如钙和镁, 的氢氧化物; 其他金属, 如铝和锌, 的氢氧化物; 氨、和有机胺类, 如未经取代的或经羟基取代的单-、二-、或三烷基胺; 二环己胺; 三丁基胺; 吡啶; N -甲基- N -乙基胺; 二乙胺; 三乙胺; 单-、双-或三-(2-羟基-低级烷基胺类), 如单-、双-、或三-(2-羟基乙基)胺、2-羟基-叔丁胺、或三-(羟基甲基)甲胺, N,N -二-低级烷基- N -(羟基低级烷基)-胺, 如 N,N -二甲基- N -(2-羟基乙基)胺; N -甲基-D-葡萄糖胺; 以及氨基酸类, 如精氨酸、赖氨酸等。术语“药学上可接受的盐 (pharmaceutically acceptable salt)”还指的是由在此披露的化合物, 或在此描述的任何其他化合物制备的盐, 这种盐具有碱性官能团, 如氨基官能团, 以及药学上可接受的无机或有机酸。适合的酸包括, 但并不局限于, 硫酸氢盐、柠檬酸、乙酸、草酸、盐酸、溴化氢、碘化氢、硝酸、磷酸、异烟酸、乳酸、水杨酸、酒石酸、抗坏血酸、琥珀酸、马来酸、苯磺酸 (besylic acid)、富马酸、葡萄糖酸、glucaronic acid、糖二酸、甲酸、苯甲酸、谷氨酸、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸 (benzenesulfonic acid)、以及对甲苯磺酸。

[0384] 本发明的方法

[0385] 本发明还涉及使用在此描述的新颖化合物以及其他的BRDT抑制剂作为雄性避孕药。此类化合物是在本领域已知的, 并且描述于例如 W02009084693 或相对应的

US2010286127中。

[0386] 因此,在一个方面,本发明提供了用于减少或抑制精子排出的方法,这些方法涉及将一个有效量的BRDT抑制剂给予雄性受试者。在实施方案中,该抑制剂是具有在此描绘的化学式的化合物,其衍生物,或其药学上可接受的盐或药物前体。

[0387] 在实施方案中,这些方法涉及以一个足以抑制精子发生的量给予该抑制剂。

[0388] 在实施方案中,这些方法涉及以一种足以诱导无精子症或少精子症的量给予该抑制剂。

[0389] 在实施方案中,这些方法包括以一个量给予该抑制剂,该量足以降低精子浓度至不大于3百万/mL、2百万/mL、1百万/mL、0.5百万/mL、0.25百万/mL或0.1百万/mL。在相关实施方案中,这些方法包括以一个量给予该抑制剂,该量足以降低精子浓度至不大于0.1百万/mL。

[0390] 在实施方案中,该抑制剂是与一种药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂组合给予。

[0391] 在实施方案中,该抑制剂是口服、经皮或通过注射给予受试者。在相关实施方案中,该抑制剂是以片剂或胶囊形式给予。在相关实施方案中,该抑制剂是通过肠胃外注射、肌肉注射、静脉内注射、皮下植入、皮下注射或经皮制剂来给予。

[0392] 在实施方案中,该抑制剂是与至少一种另外的雄性避孕剂或装置组合使用。在相关实施方案中,该另外的雄性避孕用具是避孕套。在其他相关实施方案中,该额外的雄性避孕剂是睾酮生产、雄激素受体功能或稳定性的调节剂。

[0393] 药用组合物

[0394] 本发明的特征是多种药用组合物,这些组合物包含在此描述的一种或多种化合物、其衍生物,或其药学上可接受的盐或药物前体作为一种或多种活性成分。这些药用组合物包含一种药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂,它们包括任何药学上的试剂,这些试剂本身不诱导产生对接受该组合物的受试者有害的免疫反应,并且可以给予它们而无过度毒性。如在此使用,术语“药学上可接受的”指由联邦或州政府的监管机构批准,或者美国药典、欧洲药典中或其他公认药典中列出的用于在哺乳动物中、更特别是在人类中使用。这些组合物作为雄性避孕剂可以是有用的。

[0395] 对药学上可接受的载体、稀释剂以及其他赋形剂的充分讨论存在于《雷明顿氏药理学全书》(Remington's Pharmaceutical Sciences) (第17版,Mack出版公司) 以及《雷明顿:试剂的科学与实践》(Remington:The Science and Practice of Pharmacy) (第21版,Lippincott Williams & Wilkins出版社) 中,通过引用将其结合在此。该药用组合物的配制应该适合于给予模式。在实施方案中,该药用组合物 适合于给予人类,并且可以是无菌的、非微粒的和/或无热源的。

[0396] 药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂包括但不限于盐水、缓冲盐水、右旋糖水、甘油、乙醇、无菌等渗水缓冲液,及其组合。

[0397] 这些组合物中还可以存在湿润剂,乳化剂以及润滑剂,例如月桂基硫酸钠与硬脂酸镁,连同着色剂,脱模剂,包衣剂,甜味剂,调味剂和芳香剂,防腐剂、以及抗氧化剂。

[0398] 药学上可接受的抗氧化剂的实例包括但不限于:(1) 水溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠以及类似物;(2) 油溶性抗氧化剂,例

如抗坏血酸棕榈酸酯、丁羟茴醚(BHA)、二叔丁基对甲酚(BHT)、卵磷脂、棕榈酯、 α -生育酚、以及类似物;以及(3)金属螯合剂,例如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸、以及类似物。

[0399] 在实施方案中,该药用组合物是以固体形式(例如适合于复原的低压冻干粉剂)、液体溶液、悬浮液、乳液、片剂、药丸、胶囊、缓释配制品或粉剂提供。

[0400] 在实施方案中,该药用组合物是以液体形式供给,例如,在指示了该药用组合物中的活性成分的量 and 浓度的密封容器内。在相关的实施方案中,该药用组合物的液体形式是在熔封容器中供给。

[0401] 用于配制本发明的药用组合物的方法是常规的并且在本领域是熟知的(参见Remington(雷明顿)以及Remington's(雷明顿氏))。本领域的一个技术人员可以容易地配制具有希望特征(例如,给药途径、生物安全性、以及释放曲线)的药用组合物。

[0402] 用于制备这些药用组合物的方法包括将该活性成分与一种药学上可接受的载体、以及任选的一种或多种辅助成分相关联的步骤。这些药用组合物可以通过将该活性成分与液体载体、或精细分散的固体载体、或这两者均匀并紧密相关联来制备,并且然后如果需要,对该产品进行塑形。用于制备这些药用组合物(包括多层剂型的制备)的额外的方法描述于《安塞尔氏药用剂型和药物递送系统》(Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems)(第9版,Lippincott Williams & Wilkins公司)中,通过引用将其结合在此。

[0403] 递送方法

[0404] 本发明的药用组合物可以通过口腔或非口腔手段(例如,局部地,经皮的或通过注射)给予受试者。此类给药模式以及用于制备在其中使用的适当的药用组合物的方法描述于《吉巴尔迪氏药学监护药物递送系统》(Gibaldi's Drug Delivery Systems in Pharmaceutical Care)(第1版,美国健康系统药剂师学会(American Society of Health-System Pharmacists)),通过引用将其结合在此。

[0405] 在实施方案中,该药用组合物是以固体形式口服给予。

[0406] 适合用于口腔给予的药用组合物可以是胶囊、扁囊剂、药丸、片剂、锭剂(使用一种香料基,通常是蔗糖以及阿拉伯胶或黄芪胶)、粉剂、颗粒,或作为一种在水性或非水性液体中的溶液或悬浮液,或作为一种水包油或油包水液体乳液,或作为一种酞剂或糖浆,或作为软锭剂(使用一种惰性基,例如明胶以及甘油,或蔗糖以及阿拉伯胶)和/或作为口洗剂以及类似物,每一个包含预先确定量的在此描述的一种或多种化合物,其衍生物,其药学上可接受的盐或药物前体作为一种或多种活性成分。该活性成分还可以作为大丸药、药糖剂或糊剂给予。

[0407] 在用于口腔给予的固体剂型中(例如,胶囊、片剂、药丸、糖衣片、粉剂、颗粒以及类似物),该活性成分是与一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂(例如柠檬酸钠或磷酸二钙)和/或任何以下项进行混合:(1)填充剂或增充,例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和/或硅酸;(2)粘合剂,例如像羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯胶;(3)增湿剂,例如甘油;(4)崩解剂,例如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、藻酸、某些硅酸盐以及碳酸钠;(5)溶液阻滞剂,例如石蜡;(6)吸收加速剂,例如季铵化合物;(7)湿润剂,例如像乙酰基醇以及单硬脂酸甘油酯;(8)吸收剂,例如高岭土以及膨润土;(9)

润滑剂,例如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠、及其混合物;以及(10)着色剂。在胶囊、片剂以及药丸的情况下,这些药用组合物还可以包括缓冲剂。类似类型的固体组合物还可以使用以下物质来制备:软以及硬填充明胶胶囊中的填充剂,以及赋形剂,例如乳糖(lactose)或乳糖(milk sugar),以及高分子量聚乙二醇、以及类似物。

[0408] 片剂可以通过任选地与一种或多种辅助成分进行压缩或模制来制造。压缩片剂可以使用以下物质来制备:粘合剂(例如,明胶或羟丙基甲基纤维素)、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂(例如,淀粉乙醇酸钠或交联的羧甲基纤维素钠)、表面活性剂和/或分散剂。模制片剂可以通过在合适的机器中将粉状活性成分与惰性液体稀释剂的混合物进行模制来制造。

[0409] 这些片剂和其他固体剂型,例如糖衣片、胶囊、药丸以及颗粒,可以任选地进行评分或用包衣或壳(例如肠溶包衣以及其他本领域熟知的包衣)来制备。

[0410] 还可以使用例如不同比例的羟丙基甲基纤维素(以提供希望的释放曲线)、其他聚合物基质、脂质体和/或微球配制这些药用组合物以提供活性成分在其中的缓慢的、延长的或受控的释放。这些药用组合物还可以任选地包含遮光剂并且可以是仅释放这一种或多种活性成分的组合物,优选是在胃肠道的某一部分释放,任选地,以一种延迟方式释放。包埋组合物的实例包括聚合物和蜡类。该活性成分还可以是与本领域熟知的一种或多种药学上接受的载体、赋形剂或稀释剂(如果适当的话)的微胶囊化形式(参见,例如,Remington(雷明顿)以及Remington's(雷明顿氏))。

[0411] 这些药用组合物可以(例如)通过细菌截留滤器过滤,或通过合并进入呈无菌固体组合物形式的灭菌剂来灭菌,这些无菌固体组合物可以在使用前即刻溶解于无菌水或一些其他无菌可注射介质中。

[0412] 在实施方案中,该药用组合物是以液体形式口服给予。

[0413] 用于活性成分口腔给予的液体剂型包括药学上可接受的乳液、微乳液、溶液、悬浮液、糖浆和酏剂。除了该活性成分,该液体剂型可以包含在本领域内通常使用的惰性稀释剂,例如像水或其他溶剂,稳定剂以及乳化剂,例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油类(特别是,棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油以及芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇以及山梨聚糖的脂肪酸酯,以及它们的混合物。除了惰性稀释剂,这些液体药用组合物可以包括辅助剂,例如湿润剂、乳化剂以及悬浮剂、甜味剂、调味剂、着色剂、芳香剂以及防腐剂,以及类似物。

[0414] 除了这一种或多种活性成分外,悬浮液可以包含悬浮剂,例如但不限于,乙氧基异硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇以及脱水山梨糖醇酯、维晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂以及黄芪胶,以及它们的混合物。

[0415] 在实施方案中,这些药用组合物是通过非口腔手段给予,例如通过局部施用、经皮施用、注射、等。在相关实施方案中,这些药用组合物是通过注射、输注或植入(例如,静脉内的、肌内的、关节内的、皮下的,等)来肠胃外给予。

[0416] 用于肠胃外用途的组合物可以按单位剂型存在(例如,在安瓿中或在包含若干剂量的小瓶中),并且其中可以加入合适的防腐剂。此类组合物的形式可以是一种溶液、悬浮液、乳液、输注装置、用于植入的递送装置,或者它可以存在为一种在使用前用水或另一合适的载体复原的干粉剂。还可以采用一种或多种共载体,例如乙醇。除了这一种或多种活性

成分,这些组合物可以包含合适的肠胃外可接受的载体和/或赋形剂或者这一种或多种活性成分可以合并进入到用于控释的微球、微胶囊、纳米颗粒、脂质体、或类似物中。此外,这些组合物还可以包含悬浮剂、增溶剂、稳定剂、pH调节剂、和/或分散剂。

[0417] 这些药用组合物可以是无菌注射剂形式。为了制备这样的一种组合物,将该活性成分溶解或悬浮于一种肠胃外可接受的液体载体中。示例性的载体和溶剂包括但不限于水,通过加入适量的盐酸、氢氧化钠或合适的缓冲液调整到合适的pH值的水,1,3-丁二醇、林格氏溶液(Ringer's solution)、以及等渗氯化钠溶液。该药用组合物还可以包含一种或多种防腐剂(例如对羟基苯甲酸甲酯、乙酯或正丙酯)。为了改进溶解度,可以添加一种溶解增强剂或增溶剂,或该溶剂可包含10%-60% w/w的丙二醇或类似物。

[0418] 这些药用组合物可以包含一种或多种药学上可接受的无菌等渗水性或非水性溶液、分散液、悬浮液或乳液,或者无菌粉剂,它可以就在使用前即刻复原于无菌的可注射溶液或分散液中。此类药用组合物可以包含抗氧化剂;缓冲剂;抑菌剂;溶质,它赋予该配制品与预期接受者的血液的等渗性;悬浮剂;增稠剂;防腐剂;以及类似物。

[0419] 可以在本发明的药用组合物中采用的合适的水性以及非水性载体的实例包括水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇、以及类似物),以及它们的合适的混合物,植物油,例如橄榄油,以及可注射的有机酯,例如油酸乙酯。例如可以通过使用包衣材料,例如卵磷脂,在分散液的情况下通过维持所需要的颗粒大小,以及通过使用表面活性剂,来维持适当的流动性。

[0420] 在一些实施方案中,为了延长活性成分的效果,希望的是减缓来自皮下或肌肉注射的化合物的吸收。这可以通过使用晶体的液体悬浮液或具有差的水溶性的非晶体材料来完成然后该活性成分的吸收率取决于其溶解率,反过来,溶解率可以取决于结晶大小以及晶体形式。可替代地,通过将化合物溶解或悬浮于一种油载体中,来完成肠胃外给予的活性成分的延迟吸收。此外,可以通过包含延迟吸收的试剂(例如,单硬脂酸铝和明胶)来实现可注射的药物形式的延长吸收。

[0421] 控释的肠胃外组合物可以是水悬浮液,微球,微胶囊,磁性微球,油溶液,油悬浮液,乳液的形式,或者该活性成分可以合并进入一种或多种生物相容性的载体、脂质体、纳米颗粒、植入物或输注装置。

[0422] 用于在制备微球和/或微胶囊中使用的材料包括可生物降解的/生物易蚀的聚合物,例如羧基乳酸聚酯(polyglactin)、聚氰基丙烯酸异丁酯、聚2-羟基乙基-L-谷氨酰胺以及聚乳酸。

[0423] 当配制一种控释的肠胃外配制品时,可以使用的生物相容载体包括碳水化合物(例如葡聚糖)、蛋白,例如清蛋白、脂蛋白或抗体。

[0424] 用于在植入物中使用的材料可以是非可生物降解的(例如聚二甲基硅氧烷)或可生物降解的(例如像聚己内酯、聚乳酸、聚乙醇酸或聚邻醚)。

[0425] 在实施方案中,这一种或多种活性成分是通过气溶胶给予。这是通过制备一种湿气溶胶、脂质体制剂或含有该化合物的固体颗粒来完成。可以使用一种非水性(例如氟碳推进剂)悬浮液。该药用组合物还可以使用一种声波喷雾器来进行给予,该声波喷雾器可以使该试剂对剪切的暴露最小化,而这种剪切可以导致该化合物降解。

[0426] 普通地,湿气溶胶是通过将这一种或多种活性成分与常规的药学上可接受的载体

以及稳定剂一起配制一种水性溶液或悬浮液来制造。这些载体和稳定剂随该具体化合物的要求而变化,但是典型地包括非离子表面活性剂(吐温类(Tweens)、普流尼克类(Pluronics)或聚乙二醇)、无毒蛋白(像血清白蛋白)、脱水山梨糖醇酯、油酸、卵磷脂、氨基酸(例如甘氨酸)、缓冲剂、盐类、糖类或糖醇类。气溶胶通常从等渗溶液制备。

[0427] 一种或多种活性成分的用于局部或经皮给予的剂型包括粉剂、喷雾剂、软膏、糊剂、乳膏、洗剂、凝胶、溶液、贴剂以及吸入剂。如适当的,这一种或多种活性成分可以在无菌条件下与药学上可接受的载体,以及与任何防腐剂、缓冲剂或推进剂进行混合。

[0428] 适合在本发明中使用的经皮贴剂披露于《经皮药物递送:研发问题与研究方案》(Transdermal Drug Delivery:Developmental Issues and Research Initiatives)(Marcel Dekker Inc.公司,1989)以及美国专利号4,743,249、4,906,169、5,198,223、4,816,540、5,422,119、5,023,084中,通过引用将其结合在此。该经皮贴剂还可以是任何本领域熟知的经皮贴剂,包括经阴囊贴剂。在此类经皮贴剂中的药用组合物可以包含本领域熟知的一种或多种吸收增强剂或皮肤渗透促进剂(参见,例如,美国专利号4,379,454以及4,973,468,通过引用将其结合于此)。用于在本发明中使用的经皮治疗系统可以基于离子导入法、扩散,或这两种作用的组合。

[0429] 经皮贴剂具有附加的优点:提供一种或多种活性成分至身体的受控递送。此类剂型可以通过将这一种或多种活性成分溶解或分散于一种适当介质中来制造。吸收增强剂还可以用以增加该活性成分跨皮肤的流量。此流量速率可以通过提供一种速率控制膜亦或将这一种或多种活性成分分散在一种聚合物基质或凝胶中来进行控制。

[0430] 此类药用组合物可以是以下形式:乳膏、软膏、洗剂、搽剂、凝胶、水凝胶、溶液、悬浮液、黏着剂、喷雾剂、糊剂、硬膏以及其他种类的经皮药物递送系统。这些组合物还可以包括药学上可接受的载体或赋形剂,例如乳化剂、抗氧化剂、缓冲剂、防腐剂、增湿剂、穿透增强剂、螯合剂、凝胶形成剂、软膏基、香料以及皮肤保护剂。

[0431] 乳化剂的实例包括但不限于自然发生树胶,例如阿拉伯树胶或黄芪胶,自然发生磷脂,例如大豆卵磷脂和脱水山梨糖醇单油酸酯衍生物。

[0432] 抗氧化剂的实例包括但不限于丁基羟基茴香醚(BHA)、抗坏血酸及其衍生物、生育酚及其衍生物、以及半胱氨酸。

[0433] 防腐剂的实例包括但不限于对羟基苯甲酸酯类、例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯以及氯化苄烷铵。

[0434] 增湿剂的实例包括但不限于甘油、丙二醇、山梨糖醇以及脲。

[0435] 穿透增强剂的实例包括但不限于丙二醇、DMSO、三乙醇胺、N,N-二甲基乙酰胺、N,N-二甲基甲酰胺、2-吡咯烷酮及其衍生物、四氢糠醇、丙二醇、二甘醇单乙基或单甲基酯连同单月桂酸丙二醇酯或月桂酸甲酯、桉油精、卵磷脂、Transcutol®以及Azone®。

[0436] 螯合剂的实例包括但不限于EDTA钠、柠檬酸以及磷酸。

[0437] 凝胶形成剂的实例包括但不限于聚羧乙烯、纤维素衍生物、膨润土、藻酸盐、明胶以及聚乙烯吡咯烷酮。

[0438] 除了这一种或多种活性成分,本发明的这些软膏、糊剂、乳膏以及凝胶可以包含赋形剂(例如动物以及植物脂肪)、油类、蜡类、石蜡、淀粉、黄芪胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅酮、膨润土、硅酸、滑石以及氧化锌,或它们的混合物。

[0439] 粉剂以及喷雾剂可以包含赋形剂,例如乳糖、滑石、硅酸、氢氧化铝、硅酸钙以及聚酰胺粉末,或这些物质的混合物。喷雾剂可以额外包含惯常的推进剂,例如氯氟烃以及挥发性的未取代的烃类,例如丁烷或丙烷。

[0440] 可注射的贮藏形式是通过在可生物降解聚合物(例如多乳酸化合物-聚乙交酯)中形成一种或多种本发明的化合物的微胶囊基质来制造的。取决于化合物对聚合物的比率以及所采用的具体聚合物的性质,化合物的释放率可以受到控制。其他可生物降解的聚合物的实例包括聚邻醚以及聚酸酐。贮藏型可注射配制品还可以通过将药物截留于与身体组织相容的脂质体或微乳液中来进行制备。

[0441] 皮下植入物在本领域是熟知的并且适合在本发明中使用。皮下植入方法优选是非刺激性的并且是具机械弹性的。该植入物可以是骨架型、贮存型(reservoir type),或其杂合体。在骨架型装置中,该载体材料可以是多孔的或无孔的、固体的或半固体的、以及对这些活性化合物是可透过的或不可透过的。该载体材料可以是可生物降解的或可以在给予后缓慢腐蚀。在一些情况下,该基质是非可降解的,而是依赖于该活性化合物扩散通过该基质来使该载体材料降解。可替代的皮下植入方法利用贮存装置,其中该或这些活性化合物被一种速率控制膜包围,例如一种独立于组分浓度的膜(具有零级动力学)。由被一种速率控制膜包围的基质组成的装置也适合使用。

[0442] 贮存类型以及骨架型装置都可以包含多种材料,例如聚二甲基硅氧烷(例如Silastic™)或其他硅酮橡胶。基质材料可以是不溶解性的聚丙烯、聚乙烯、聚氯乙烯、乙酸乙基乙烯酯、聚苯乙烯与聚甲基丙烯酸酯,连同棕榈酰硬脂酸甘油酯、硬脂酸甘油酯、以及山萘酸甘油酯类型的甘油酯。材料可以是疏水的或亲水的聚合物并且任选地包含增溶剂。

[0443] 皮下植入装置可以用任何合适的聚合物制造的缓释胶囊,例如像描述于美国专利号5,035,891以及4,210,644中的,通过引用将其结合在此。

[0444] 一般而言,为了提供对药物化合物的释放以及经皮透过的速率控制,至少四种不同方法是适用的。这些方法是:缓调膜系统(membrane-moderated system)、受控粘合扩散系统(adhesive diffusion-controlled system)、基质分散类型系统(matrix dispersion-type system)以及微贮存室系统(microreservoir system)。应理解,通过使用这些方法的合适混合可以获得受控释放的经皮和/或局部的组合物。

[0445] 在缓调膜系统中,该活性成分存在于一种贮存室中,该贮存室完全由一种浅隔间封装,该浅隔间从一种药物不可透过的层压板(例如金属塑料层压板)以及一种速率控制聚合膜(例如微孔或无孔聚合膜,例如乙烯-乙酸乙烯酯共聚物)模制而来。该活性成分是通过该速率控制聚合膜而释放。在该药物贮存室中,该活性成分可以被分散在一种固体聚合物基质中亦或悬浮于一种不可滤出的粘稠液体基质中,例如硅酮流体。在该聚合膜的外表面上,施加一种粘合聚合物薄层以达到该经皮系统与皮肤表面的紧密接触。该粘合聚合物优选是一种低过敏原性的并且与该活性药物物质相容的聚合物。

[0446] 在受控粘合扩散系统中,该活性成分的贮存室是通过以下来形成:直接将该活性成分分散在一种粘合聚合物中并且然后通过例如溶剂浇铸,将该含有该活性成分的粘合剂散布在一种药物基本上不可透过的金属塑料衬背平板上以形成一种薄的药物贮存室层。

[0447] 基质分散类型系统的特征在于:该活性成分的贮存室是通过基本上均匀地将该活性成分分散在一种亲水的或亲脂的聚合物基质中来形成。然后将该含药物聚合物模制成

盘,该盘具有基本上良好界定的表面积以及受控的厚度。该粘合聚合物沿圆周伸展以形成围绕该盘的一条粘合剂带。

[0448] 微贮存室系统可以被认为是贮存室与基质分散类型系统的组合。在这一情况下,该活性物质的贮存室是通过以下来形成:首先将药物固体悬浮在水溶性聚合物的水性溶液中并且然后将该药物悬浮液分散在一种亲脂聚合物中以形成大量不可滤出的药物贮存室微小球。

[0449] 可以配制任何以上所述的受控释放、延长释放以及持续释放组合物来在约30分钟至约1周内、在约30分钟至约72小时内、在约30分钟至24小时内、在约30分钟至12小时内、在约30分钟至6小时内、在约30分钟至4小时内以及在约3小时至10小时内释放该活性成分。在实施方案中,这一种或多种活性成分的有效浓度是在将这些药用组合物给予受试者后,在该受试者中持续4小时、6小时、8小时、10小时、12小时、16小时、24小时、48小时、72小时或更长。

[0450] 递送方法

[0451] 当本发明的这一种或多种化合物是作为药物给予人类或动物时,可以将它们以其本身给予或作为一种包含与药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂相组合的活性成分的药用组合物进行给予。

[0452] 本发明的药用组合物中的活性成分的给予的实际剂量水平以及时间过程可以变化,以获得一个量的活性成分,该量对于具体患者、组合物以及给予模式而言有效达到希望的治疗响应,而对该患者没有毒性。一般地,本发明的化合物或药用组合物是以一个有效量或数额来进行给予,足以减少或抑制雄性受试者中的精子排出。在实施方案中,该化合物或药用组合物的给予抑制精子发生,诱导无精子症,或诱导少精子症。

[0453] 示例性的剂量范围包括每天0.01mg至250mg、每天0.01mg至100mg、每天1mg至100mg、每天10mg至100mg、每天1mg至10mg、以及每天0.01mg至10mg。本发明的化合物的优选剂量是患者可承受的并且不发展严重的或不可接受的副作用的最大量。在实施方案中,本发明的这一种或多种化合物是以每天每千克体重约10毫克至约100mg、每天约0.1至约10mg/kg、或每天约1.0mg至约10mg/kg体重的浓度来进行给予。

[0454] 在实施方案中,该药用组合物包含数量范围在1与10mg之间(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、或10mg)的本发明的一种或多种化合物。

[0455] 在实施方案中,该治疗有效剂量产生从约0.1ng/ml至约50-100μg/ml的化合物血清浓度。这些药用组合物典型地应该提供每天每千克体重从约0.001mg至约2000mg的化合物的剂量。例如,用于全身性给予人类患者的剂量的范围可以是1-10μg/kg、20-80μg/kg、5-50μg/kg、75-150μg/kg、100-500μg/kg、250-750μg/kg、500-1000μg/kg、1-10mg/kg、5-50mg/kg、25-75mg/kg、50-100mg/kg、100-250mg/kg、50-100mg/kg、250-500mg/kg、500-750mg/kg、750-1000mg/kg、1000-1500mg/kg、1500-2000mg/kg、5mg/kg、20mg/kg、50mg/kg、100mg/kg、500mg/kg、1000mg/kg、1500mg/kg、或2000mg/kg。制备药用剂量单位形式以提供每一剂量单位形式约从1mg至约5000mg(例如从约100至约2500mg)的该化合物或必要成分的组合。

[0456] 在实施方案中,该药用组合物包括以一个量的本发明的一种或多种化合物,该量足以降低精子浓度至不大于3百万/mL精液,例如不大于2百万/mL、1百万/mL、0.5百万/mL、0.25百万/mL或0.1百万/mL。在相关实施方案中,该药用组合物包括以一个量的本发明的一

种或多种化合物,该量足以降低精子浓度至不大于0.1百万/mL。

[0457] 有效量的确定是很好地处于本领域内的那些技术人员的能力内,尤其在根据在此提供的具体披露下。一般地,本发明的有功效的或有效量的一种或多种化合物是通过以下来进行确定:首先给予低剂量的这一种或多种化合物并且然后递增地增加该给予量或剂量直至在治疗的受试者中观察到希望的效果(例如精液中减少的精子水平),同时具有最小的或可接受的毒副作用。用于确定本发明的药用组合物的给予的适当剂量与给药方案的适用方法描述于例如《古德曼和吉尔曼氏疗法药理基础》(Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics),Goodman(古德曼)等人,编辑,第11版,McGraw-Hill 2005,以及《雷明顿:试剂的科学与实践》(Remington:The Science and Practice of Pharmacy),第20和21版,Gennaro(詹纳罗)与费城科技大学(University of the Sciences in Philadelphia),编辑,Lippincott Williams & Wilkins出版社(2003与2005),通过引用将其结合在此。

[0458] 试剂盒

[0459] 本发明提供了用于实现雄性避孕的试剂盒。在实施方案中,该试剂盒包括一种或多种在此描述的化合物或药用组合物。在实施方案中,该试剂盒提供了使用说明书。使用说明书可以有关在此描述的任何方法。在相关实施方案中,这些说明书有关于使用这一种或多种化合物或药用组合物用于减少或抑制精子排出。在实施方案中,该试剂盒提供了以由管理药品或生物产品的制造、使用或销售的政府机构规定的形式的提示,该提示反映该机构批准制造、使用或销售该试剂盒以及其中用于给予人类的组分。

[0460] 本发明还提供了包装在指示了化合物量的熔封容器(例如,安瓿或sachette)中的一种或多种化合物或一种或多种药用组合物。在实施方案中,化合物或药用组合物是作为液体供给。在其他实施方案中,化合物或药用组合物是作为一种干燥的无菌的低压冻干粉剂或处于熔封容器中的无水浓缩物来供给,并且可以例如用水或盐水复原为用于给予受试者的适当浓缩物。

[0461] 本发明还提供了含有这一种或多种化合物或这一种或多种药用组合物的经皮贴剂。

[0462] 在实施方案中,该试剂盒以多于一剂量单位提供了一种或多种化合物或一种或多种药用组合物。该试剂盒可以包含从1至约120或更多、从1至约60、从1至约30、从1至约10、从1至约7剂量单位。在其中这一种或多种化合物或这一种或多种药用组合物被适配为经24小时周期释放治疗有效量的该活性成分的情况下,该试剂盒合宜地包括1、约5、约7、约10、约14、或约30剂量单位。在其中这一种或多种化合物或一种或多种药用组合物被适配为经12小时周期提供治疗有效量的该活性成分的情况下,该试剂盒合宜地包括1、2、约10、约14、约30或约60剂量单位。在其中这一种或多种化合物或这一种或多种药用组合物被适配为经约3至约10小时(例如,约6或8小时)周期提供治疗有效量的该活性成分的情况下,该试剂盒合宜地包括约1、约4、约40、约60或约120剂量单位。本领域的一个技术人员将认识到其他数目的剂量单位可以包括在该试剂盒中,而不实质上偏离本发明。

[0463] 筛选方法

[0464] 如在此所述,本发明提供了化学化合物的特定实例,这些化学化合物包括JQ1、连同结合布罗莫结构域结合袋的及作为雄性避孕剂有用的其他取代的化合物。然而,本发明

并不是局限于此。本发明进一步提供了一种用于鉴别能够抑制精子发生的试剂(包括核酸、肽、小分子抑制剂、以及模拟物)的简单手段。此类化合物还有望作为雄性避孕剂是有用的。

[0465] 在具体实施方案中,通过测定精子发生对本发明的化合物或其他试剂的作用进行分析。本发明的减少精子发生的试剂以及化合物被鉴别为与雄性避孕剂一样有用。

[0466] 事实上,可以在本发明的方法中使用特异结合到BET家族成员或减少BET家族成员生物活性的任何试剂。本发明的方法对于高通量低成本地筛选减少或另外抑制精子发生的候选试剂是有用的。然后,分离特异结合到BET家族成员布罗莫结构域的候选试剂,并且在体外测定或体内测定中对其抑制精子发生的能力进行了活性测试。本领域普通技术人员应当理解候选试剂对于细胞的作用典型地是和未与该候选试剂接触的对照细胞进行比较。因此,这些筛选方法包括将与候选试剂进行接触的睾丸中的精子发生与未经处理的对照睾丸中存在的精子发生进行比较。

[0467] 一旦得以鉴别,本发明的试剂(例如,特异结合至和/或对抗布罗莫结构域的试剂)可以用作雄性避孕剂。潜在的布罗莫结构域拮抗剂包括结合到BET家族成员布罗莫结构域并且减少其活性的有机分子、肽、肽模拟物、多肽、核酸配体、适体、以及抗体。可以对候选试剂测试它们减少精子发生的能力。

[0468] 测试化合物和提取物

[0469] 在某些实施方案中,根据本领域已知的方法,从天然产物或合成(或半合成)提取物的文库或从化学品库,或从多肽或核酸库中鉴别出BET族成员拮抗剂(例如特异地结合并降低一种布罗莫结构域的活性的试剂)。药物研究和开发领域的技术人员将会理解,测试提取物或化合物的确切来源对本发明的(这些)筛选过程不是关键的。事实上,使用在此描述的这些方法可以对任何数目的未知化学提取物或化合物进行筛选。此类提取物或化合物的实例包括但不限于,植物基提取物、真菌基提取物、原核生物基提取物或动物基提取物,发酵液,和合成的化合物,以及现有多肽的变体。

[0470] 细菌、真菌、植物和动物提取物形式的天然多肽库可从许多来源(包括Biotics公司(萨西克斯郡,英国(Sussex,UK))、Xenova公司(斯劳,英国(Slough,UK))、Harbor Branch Oceanographics Institute研究所(皮尔斯堡,佛罗里达州(Ft.Pierce,Fla.)),以及PharmaMar,U.S.A.公司(剑桥,马萨诸塞州(Cambridge,Mass.))处商购。可以使用本领域已知的以及在此描述的方法对此类多肽进行改性以包括一个蛋白转导域。此外,如果希望,根据本领域已知的方法,例如通过标准提取和分级分离方法,来产生天然的和合成产生的库。用于合成分子库的方法的实例均能够在本领域中找到,例如在:DeWitt(德威特)等人,《美国科学院院刊》(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.) 90:6909,1993;Erb等人,《美国科学院院刊》91:11422,1994;Zuckermann(佐克曼)等人,《医药化学杂志》(J.Med.Chem.) 37:2678,1994;Cho(曹)等人,《科学》(Science) 261:1303,1993;Carrell(卡洛尔)等人,《德国应用化学英文国际版》(Angew.Chem.Int.Ed.Engl.) 33:2059,1994;Carell(卡瑞尔)等人,《德国应用化学英文国际版》33:2061,1994;以及Gallop(盖洛普)等人,《医药化学杂志》37:1233,1994中找到。此外,如果希望,使用标准的化学、物理、或生物化学方法可容易对任何库或化合物进行改性。

[0471] 众多方法也可以用于产生任何数量的多肽、化学化合物(包括但不限于,糖基化合物、脂质基化合物、肽基化合物、以及核酸基化合物)的随机或定向合成(例如,半合成或

全合成)。合成化合物库可商购自Brandon Associates公司(梅里马克,新罕布什尔州(Merrimack,N.H.))和Aldrich Chemical公司(密尔沃基,威斯康辛州(Milwaukee,Wis.))。可替代地,待用作候选化合物的化学化合物可使用本领域的普通技术人员已知的标准合成技术和方法,从容易得到的起始原料进行合成。对用此处所描述的方法得以鉴别的这些化合物有用的合成化学转换和基团保护法(保护和脱保护)在本领域中是已知的,并且包括,例如,在R.Larock(拉洛克),《综合有机转换》(Comprehensive Organic Transformations),VCH出版公司(1989);T.W.Greene(格林)和P.G.M.Wuts(伍兹),《有机合成中的保护基团》(Protective Groups in organic Synthesis),第二版,John Wiley and Sons公司(1991);L.Fieser(费塞尔)和M.Fieser(费塞尔),《费塞尔和费塞尔有机合成试剂》(Fieser and Fieser's Reagents for organic Synthesis),约翰威立父子出版公司(John Wiley and Sons)(1994);以及L.Paquette(帕奎特),编辑,《有机合成试剂百科全书》(Encyclopedia of Reagents for organic Synthesis),约翰威立父子出版公司(John Wiley and Sons)(1995),及其多次再版中描述的那些方法。

[0472] 化合物的库可以出现在溶液中(例如Houghten(霍腾),《生物技术》(Biotechniques) 13:412-421,1992),或在珠上(Lam(兰姆),《自然》(Nature) 354:82-84,1991),芯片上(Fodor(福多),《自然》364:555-556,1993),细菌(Ladner(拉德纳),美国专利号5,223,409)上,孢子上(Ladner(拉德纳),美国专利号5,223,409),质粒上(Cull(卡尔)等人,《美国科学院院刊》(Proc Natl Acad Sci USA) 89:1865-1869,1992)或在噬菌体上(Scott(斯科特)和Smith(史密斯),《科学》249:386-390,1990);Devlin(德弗林),《科学》249:404-406,1990;Cwirla(萨瓦拉)等人,《美国科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.)》87:6378-6382,1990;Felici(费利奇),《分子生物学杂志》(J.Mol.Biol.) 222:301-310,1991;Ladner(拉德纳)同前)。

[0473] 此外,药物研究和开发领域的普通技术人员很容易理解,只要可能就应该使用用于去重复化(例如分类去重复、生物去重复,以及化学去重复,或其任何组合)或消除已知活性的多种材料的复制或重复的方法。

[0474] 当发现一种粗提物具有BET族成员布罗莫结构域结合活性时,对该阳性前导提取物的进一步分级分离是必要的,以分离对该观察效果负责的分子结构。因此,该提取、分级分离和纯化过程的目标是在该粗提物中仔细表征或鉴别减少精子发生的一种化学实体。此类异质性提取物的分级分离和纯化方法在本领域内是已知的。如果希望,根据本领域已知的方法,对显示出可用作治疗的化合物进行化学改性。

[0475] 实例

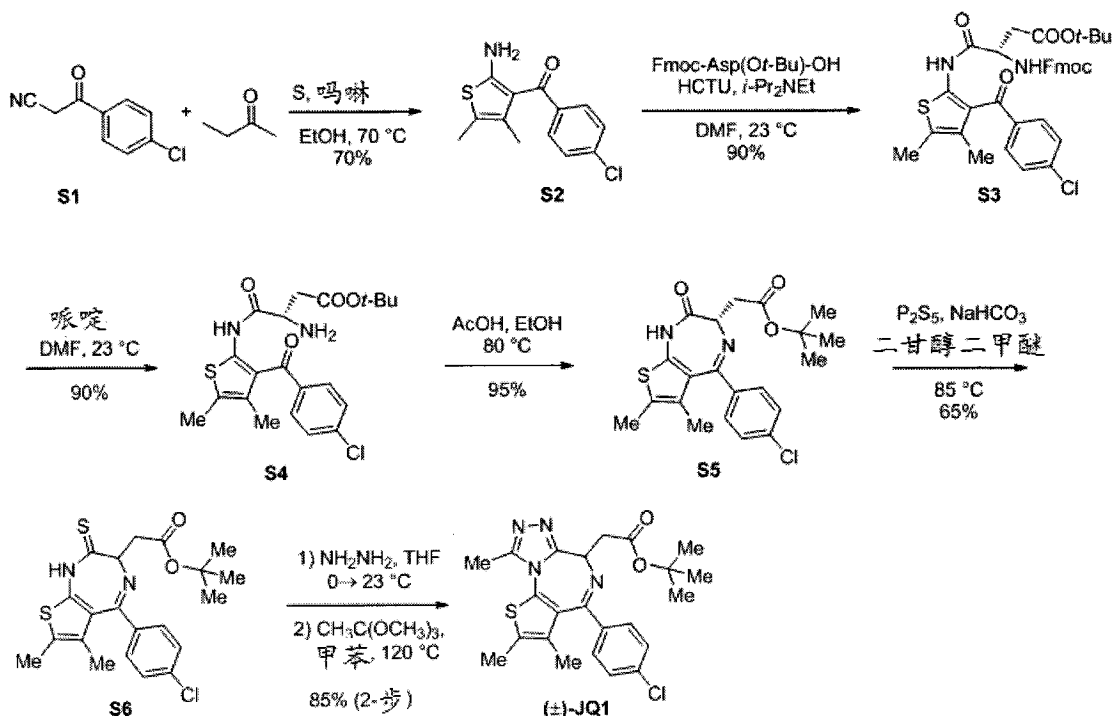
[0476] 应理解,本发明不应该解释为局限于这些现在描述实例;而是,本发明应该解释为包括任何以及所有在此提供的应用以及普通技术人员技艺之内的所有同等变体。

[0477] I. 化学实例-制剂的合成和方法

[0478] 本发明的化合物可以用此处描述的方法,和/或根据由此处描述的本领域的普通技术人员已知的方法进行合成。

[0479] 方案S1. 消旋布罗莫结构域抑制剂(±)-JQ1的合成。

[0480]



[0481] (2-氨基-4,5-二甲基噻吩-3-基)(4-氯苯基)甲酮(S2)

[0482] 根据以上所示的方案制备该化合物JQ1。

[0483] 将固体硫磺(220mg, 6.9mmol, 1.00当量)在23℃加入到4-氯苯甲酰基乙腈S1(1.24g, 6.9mmol, 1当量), 2-丁酮(0.62ml, 6.9mmol, 1当量), 以及吗啉(0.60ml, 6.9mmol, 1.00当量)的乙醇(20ml, 0.35M)溶液中²¹。该然后将该混合物加热至70℃。12小时后, 将该反应混合物冷却至23℃并且倒入盐水(100ml)中。将该水层用乙酸乙酯(3×50ml)进行萃取。将这些合并的有机层用盐水(50ml)洗涤, 用无水硫酸钠干燥, 过滤并且在减压下进行浓缩。将残余物用快速柱色谱法(Combiflash RF系统, 40克硅凝胶, 梯度0至100%的乙酸乙酯-己烷)纯化以获得黄色固体状的S2(1.28g, 70%)。

[0484] (S)-叔丁基-3-([[(9H-苻-9-基)甲氧基]羰基]氨基)-4-[[3-(4-氯苯甲酰基)-4,5-二甲基噻吩-2-基]氨基]-4-氧丁酸酯(S3)

[0485] 将(2-(6-氯-1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲铵六氟磷酸酯(HCTU)(827mg, 2.0mmol, 2.00当量), 和N,N-二异丙基乙胺(0.72ml, 4.0mmol, 4.00当量)依次加入到9-苻甲氧羰基-天冬氨酸β-叔丁基酯[Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH](864mg, 2.1mmol, 2.10当量)的N,N-二甲基甲酰胺溶液中(1.5ml, 1.0M)。然后将该混合物在23℃搅拌5分钟。再添加固体S2(266mg, 1.0mmol, 1当量)。将该反应混合物在23℃搅拌。16小时后, 添加乙酸乙酯(20ml)和盐水(20ml)。将这两个层分离, 并且将该水层用乙酸乙酯(2×20ml)萃取。将这些合并的有机层用盐水(30ml)洗涤, 用无水硫酸钠干燥, 过滤而且在减压下进行浓缩。将残余物用快速柱色谱法(Combiflash RF系统, 40克硅凝胶, 梯度0至100%的乙酸乙酯-己烷)纯化以获得棕色油状的S3(625mg, 90%)。

[0486] (S)-叔丁基3-氨基4-((3-(4-氯苯甲酰基)-4,5-二甲基噻吩-2-基)氨基)-4-氧丁酸酯(S4)

[0487] 将化合物S3(560mg, 0.85mmol, 1当量)在23℃溶解于20%哌啶的DMF溶液中

(4.0ml, 0.22M)。30分钟后,将乙酸乙酯(20ml)和盐水(20ml)加入到该反应混合物中。将这两个层分离,并且将该水层用乙酸乙酯(2×20ml)萃取。将这些合并的有机层用盐水(3×25ml)洗涤,用无水硫酸钠干燥,过滤并且在减压下进行浓缩。将残余物用快速柱色谱法(Combiflash RF系统,24克硅凝胶,梯度0至100%的乙酸乙酯-己烷)纯化以获得黄色固体状的游离胺S4(370mg,90%)。该对映异构体的纯度降至75%(用采用AS-H柱的Berger超临界流体色谱法(SFC)确定)。

[0488] (S)-叔丁基2-(5-(4-氯苯基)-6,7-二甲基-2-氧-2,3-二氢-1H-噻吩并[2,3-e][1,4]二氮杂环庚-3-基)乙酸酯(S5)

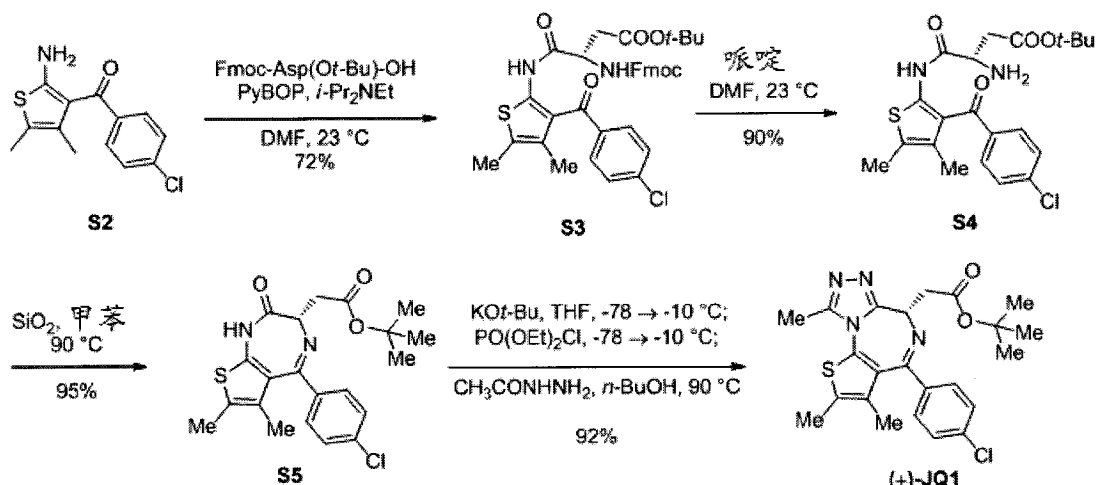
[0489] 将氨基酮(S4)(280mg,0.63mmol)溶解于10%乙酸乙醇溶液中(21ml,0.03M)。该反应混合物被加热至85℃。30分钟后,将所有的溶剂在减压下去除。将残余物用快速柱色谱法(Combiflash RF系统,12克硅凝胶,梯度0至100%的乙酸乙酯-己烷)纯化以获得白色固体状的化合物S5(241mg,95%)。S5的对映异构体纯度为67%(用采用AS-H柱的Berger超临界流体色谱法(SFC)确定)。叔丁基2-(5-(4-氯苯基)-6,7-二甲基-2-硫代-2,3-二氢-1H-噻吩并[2,3-e][1,4]二氮杂环庚-3-基)乙酸酯(S6)

[0490] 将五硫化二磷(222mg,1.0mmol,2.00当量)、碳酸氢钠(168mg,2.0mmol,4.00当量)依次加到S5(210mg,0.5mmol,1当量)的二甘醇二甲醚溶液(1.25ml,0.4M)中。将该反应混合物加热至90℃。16h后,添加盐水(20ml)和乙酸乙酯(35ml)。将这两个层分离,并且将该水层用乙酸乙酯(3×30ml)萃取。将这些合并的有机层用盐水(2×15ml)洗涤,用无水硫酸钠干燥,过滤并且在减压下进行浓缩。将残余物用快速柱色谱法(Combiflash RF系统,24克硅凝胶,梯度0至100%的乙酸乙酯-己烷)纯化以获得棕色固体状的含有回收的S5(73mg,34%)的S6(141mg,65%)。

[0491] 叔丁基2-(4-(4-氯苯基)-2,3,9-三甲基-6H-噻吩并[3,2-f][1,2,4]三唑并[4,3-a][1,4]二氮杂环庚-6-基)乙酸酯[(±)JQ1]

[0492] 在0℃将肼(0.015ml,0.45mmol,1.25当量)加到S6(158mg,0.36mmol,1当量)的THF(2.6ml,0.14M)溶液中。将该反应混合物加温至23℃,并且在23℃搅拌1小时。将所有的溶剂在减压下去除。该得到的肼直接使用,无需纯化。然后将该肼溶解于原乙酸三甲酯和甲苯(6ml,0.06M)的2:3混合物中。将该反应混合物加热至120℃。2h后,将所有的溶剂在减压下去除。将残余物用快速柱色谱法(Combiflash系统,4克硅凝胶,梯度0至100%的乙酸乙酯-己烷)纯化以获得白色固体状的JQ1(在两步中,140mg,85%)。这些反应条件进一步使该手性中心差向异构化,产生消旋体,JQ1(用采用AS-H柱的Berger超临界流体色谱法(SFC)确定)。

[0493] 方案S2.富含对映异构体的(+)-JQ1的合成。



[0495] (S)-叔丁基-3-({[(9H-芴-9-基)甲氧基]羰基}氨基)-4-{{[3-(4-氯苯甲酰基)-4,5-二甲基噻吩-2-基]氨基}-4-氧丁酸酯(S3)

[0496] 将(苯并三唑-1-基氧基)三吡咯烷基磷(PyBOP)(494mg, 0.95mmol, 0.95当量)、N,N-二异丙基乙胺(0.50ml, 2.8mmol, 2.75当量)依次加入到9-芴甲氧羰基-天冬氨酸β-叔丁基酯[Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH](411mg, 1.00mmol, 1.0当量)的N,N-二甲基甲酰胺溶液中(1.0ml, 1.0M)中。然后在23℃将该混合物搅拌5分钟。然后添加固体状S2(266mg, 1.0mmol, 1当量)。将该反应混合物在23℃搅拌4h后,添加乙酸乙酯(20ml)和盐水(20ml)。将这两个层分离,并且将该水层用乙酸乙酯(2×20ml)萃取。将这些合并的有机层用盐水洗涤,用无水硫酸钠干燥,过滤并且在减压下进行浓缩。将残余物用快速柱色谱法(Combiflash RF系统, 40克硅胶, 梯度0至100%的乙酸乙酯-己烷)纯化以获得棕色油状的S3(452mg, 72%)。

[0497] (S)-叔丁基3-氨基4-((3-(4-氯苯甲酰基)-4,5-二甲基噻吩-2-基)氨基)-4-氧丁酸酯(S4)

[0498] 将化合物S3(310mg, 0.47mmol, 1当量)在23℃下溶解于20%吡啶的DMF溶液中(2.2ml, 0.22M)。30分钟后,将乙酸乙酯(20ml)和盐水(20ml)加入到该反应混合物中。将这两个层分离,并且将该水层用乙酸乙酯(2×20ml)萃取。将这些合并的有机层用盐水(3×25ml)洗涤,用无水硫酸钠干燥,过滤并且在减压下进行浓缩。将残余物用快速柱色谱法(Combiflash RF系统, 24克硅胶, 梯度0至100%的乙酸乙酯-己烷)纯化以获得黄色固体状的游离胺S4(184mg, 90%)。该对映异构体的纯度是91%(用采用AS-H柱的Berger超临界流体色谱法(SFC)确定)。

[0499] (S)-叔丁基2-(5-(4-氯苯基)-6,7-二甲基-2-氧-2,3-二氢-1H-噻吩并[2,3-e][1,4]二氮杂环庚-3-基)乙酸酯(S5)

[0500] 将氨基酮(S4)(184mg, 0.42mmol)溶解于甲苯(10ml, 0.04M)中。添加硅胶(300mg),并且将该反应混合物加热至90℃。3h后,将该混合物冷却至23℃。将该硅胶进行过滤并且用乙酸乙酯进行洗涤。将这些合并的滤液浓缩。将残余物用快速柱色谱法(Combiflash RF系统, 12克硅胶, 梯度0至100%的乙酸乙酯-己烷)纯化以获得白色固体状的化合物S5(168mg, 95%)。S5的对映异构体纯度为90%(用采用AS-H柱的Berger超临界流体色谱法(SFC)确定)。

[0501] (S)-叔丁基2-(4-(4-氯苯基)-2,3,9-三甲基-6H-噻吩并[3,2-f][1,2,4]三唑并[4,3-a][1,4]二氮杂环庚-6-基)乙酸酯[(+)-JQ1]

[0502] 在-78℃将叔丁醇钾(1.0M THF溶液,0.3ml,0.30mmol,1.10当量)加到S5(114mg,0.27mmol,1当量)的THF(1.8ml,0.15M)溶液中。将该反应混合物加温至-10℃,并且在23℃搅拌30min。将该反应混合物冷却至-78℃。将氯磷酸二乙酯(0.047ml,0.32mmol,1.20当量)加入反应混合物中²²。将该获得的混合物经45min加温至-10℃。将乙酰肼(30mg,0.40mmol,1.50当量)加入反应混合物中。将该反应混合物在23℃搅拌。1h后,将1-丁醇(2.25ml)加到反应混合物中,将其加热至90℃。1h后,将所有溶剂在减压下去除。将残余物用快速柱色谱法(Combiflash RF系统,4克硅胶,梯度0至100%的乙酸乙酯-己烷)纯化以获得对映异构体纯度(用采用AS-H柱的Berger超临界流体色谱法确定,85%己烷-甲醇,210nm, t_R (R-对映异构体)=1.59min, t_R (S-对映异构体)=3.67min)为90%的白色固体状的(+)-JQ1(114mg,92%)。用制备型HPLC(采用OD-H柱的Agilent高压液相色谱)将该产物进一步纯化以获得大于99%ee的S-对映异构体。

[0503] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3 , 25℃) δ 7.39 (d, J =8.4Hz, 2H), 7.31 (d, J =8.4Hz, 2H), 4.54 (t, J =6.6MHz, 1H), 3.54-3.52 (m, 2H), 2.66 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 1.67 (s, 3H), 1.48 (s, 9H)。

[0504] ^{13}C NMR (150MHz, CDCl_3 , 25℃) δ 171.0, 163.8, 155.7, 150.0, 136.9, 131.1, 130.9, 130.6, 130.3, 128.9, 81.2, 54.1, 38.1, 28.4, 14.6, 13.5, 12.1。

[0505] HRMS (ESI) 计算针对 $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{ClN}_2\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 457.1460, 发现457.1451m/z。

[0506] TLC (EtOAc), R_f : 0.32 (UV)

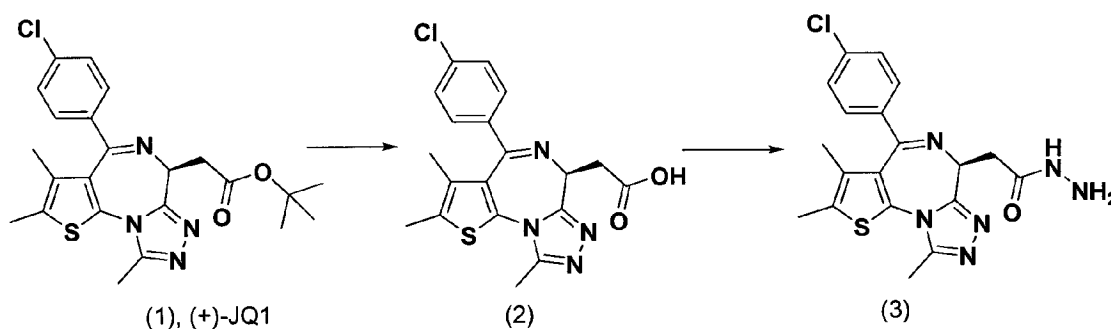
[0507] $[\alpha]_D^{25} = +75$ (c 0.5, CHCl_3)

[0508] 采用Fmoc-D-Asp (Ot-Bu)-OH作为起始材料,以相似的方式合成(-)-JQ1,并且用制备型HPLC(采用OD-H柱的Agilent高压液相色谱)将该产品进一步纯化以获得大于99%ee的R-对映异构体。 $[\alpha]_D^{25} = -72$ (c 0.5, CHCl_3)

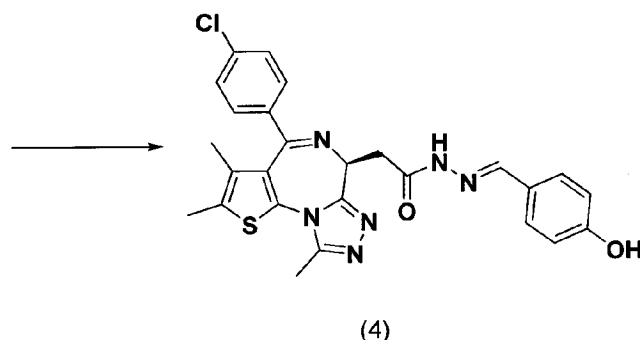
[0509] 另外的化合物的合成

[0510] 如方案S3图示制备本发明的另外的化合物。

[0511] 方案S3.肼衍生物的合成



[0512]



[0513] 如方案S3所示,将(+)-JQ1 (1)的叔丁基醚进行裂解以生成自由酸(2),这种自由酸与肼偶联生成酰肼(3)。与4-羟基苯甲醛的反应生成脎(4)。

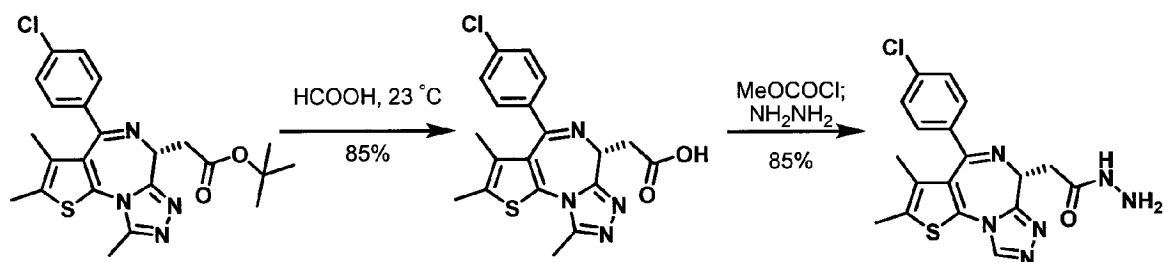
[0514] 酰肼(3)和脎(4)二者均在至少一个生物测定中显示出活性。

[0515] 通过酰肼(3)与多种含有羰基的化合物(见上表A)的反应制备一种化合物库。

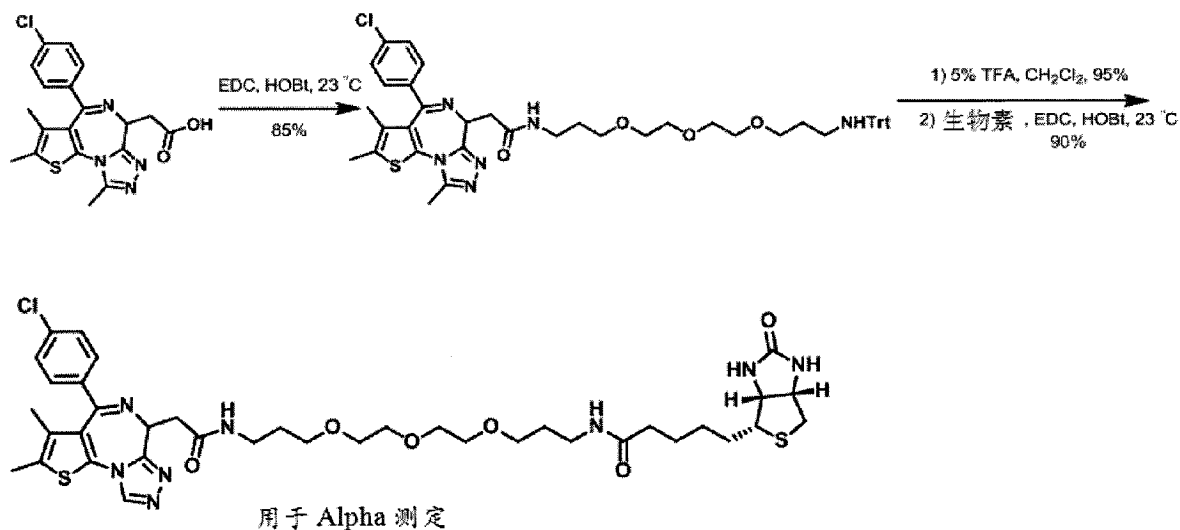
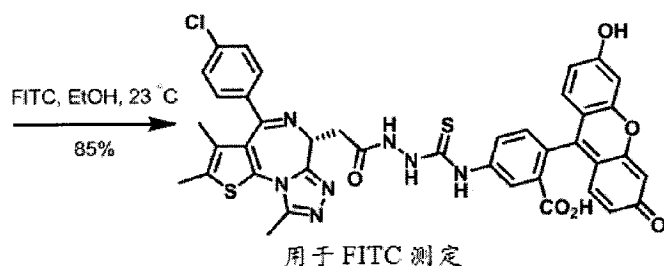
[0516] 制备另外化合物用作,如,测试开发的探针。在下面的方案S4中示出一个示例性的合成。

[0517] 方案S4.可用作探针的衍生物的合成。

[0518]

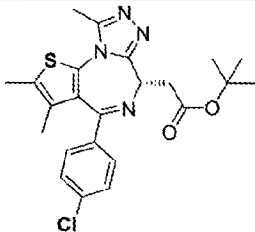
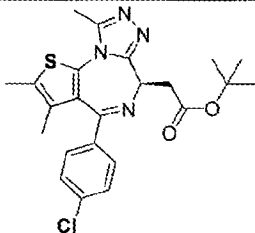


[0519]



[0520] 制备如下表中所示的另外的化合物:

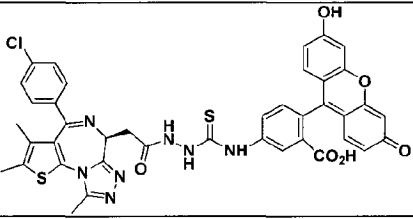
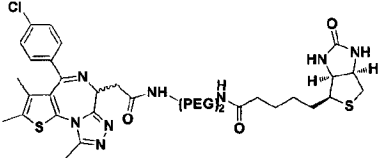
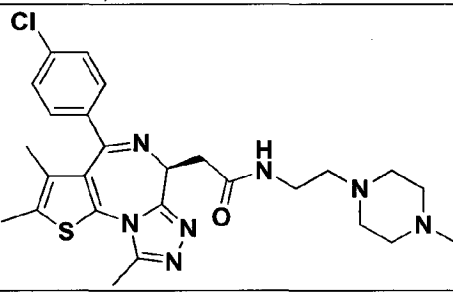
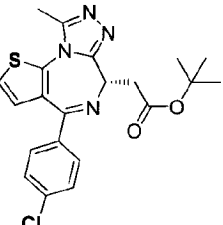
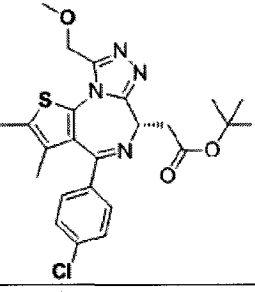
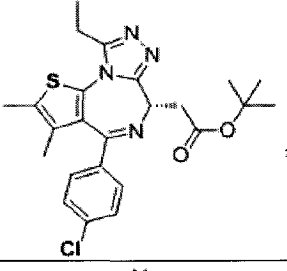
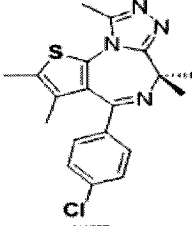
[0521]

化合物名称	结构	MS $[M+H]^+$ m/z (观察到的)
(S)-JQ1		457.1
(R)-JQ1		457.1

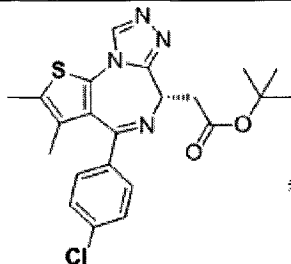
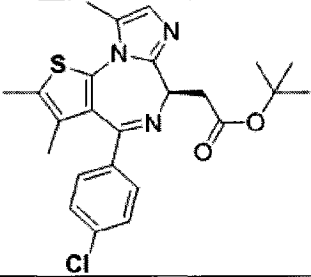
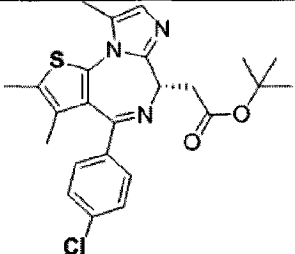
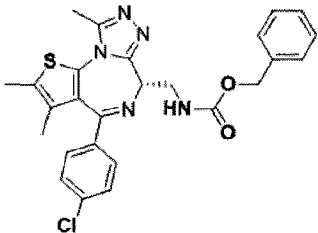
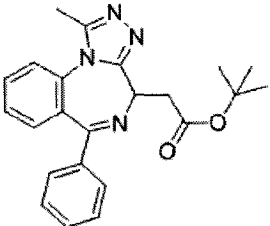
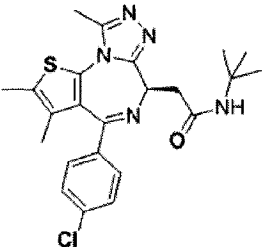
[0522]

JQ3		415.1
JQ4		519.1
JQ6		493.1
JQ7		579.0
JQ8		494.1
JQ10		501.1
JQ11		511.1

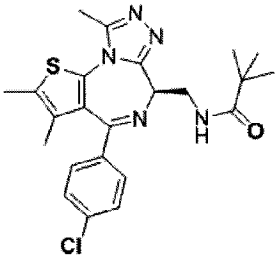
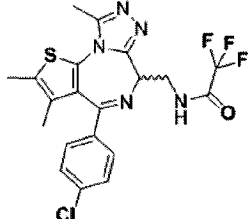
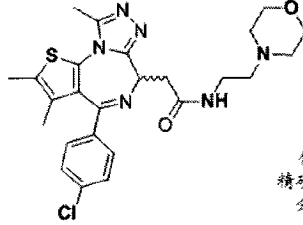
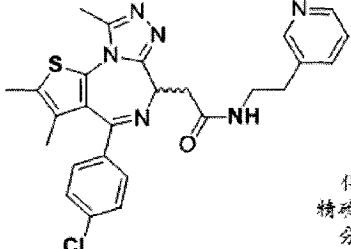
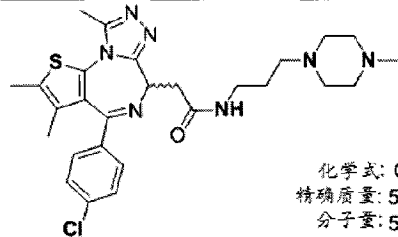
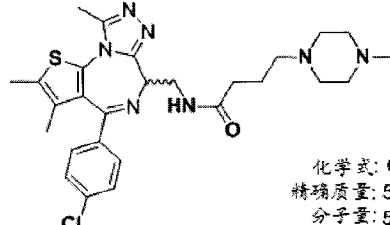
[0523]

JQ1-FITC		804.1
JQ1-生物素		829.3
JQ13		526.2
KS1		429.1
JQ18	 化学式: C₂₄H₂₇ClN₄O₃S 精确质量: 486.14924 分子量: 487.01418	487.1
JQ19	 化学式: C₂₄H₂₇ClN₄O₂S 精确质量: 470.15432 分子量: 471.01478	471.1
JQ20	 化学式: C₁₈H₁₉ClN₄S 精确质量: 370.10190 分子量: 370.89896 JQ1-II-023	370.1

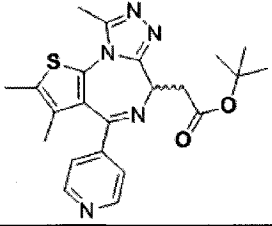
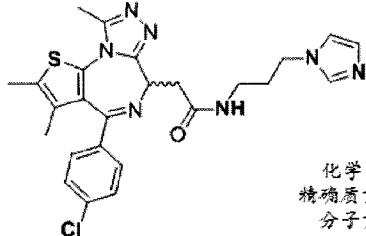
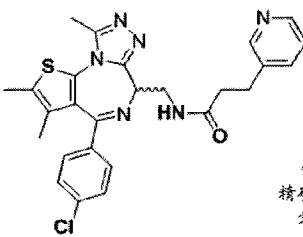
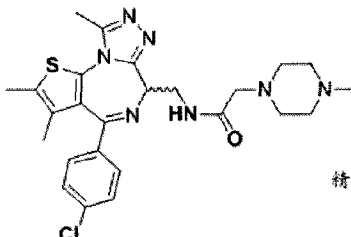
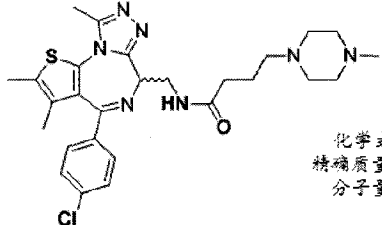
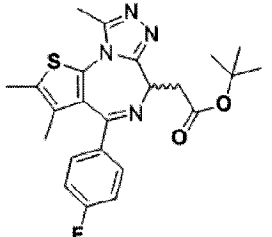
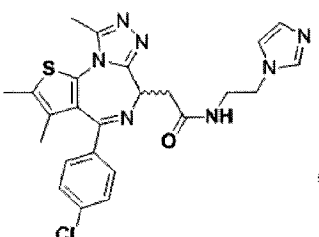
[0524]

JQ21	 JQI-II-024 化学式: $C_{22}H_{23}ClN_4O_2S$ 精确质量: 442.12302 分子量: 442.96162	443.1
JQ24A	 化学式: $C_{24}H_{26}ClN_3O_2S$ 精确质量: 455.1434 分子量: 456.0001	456.1
JQ24B	 化学式: $C_{24}H_{26}ClN_3O_2S$ 精确质量: 455.1434 分子量: 456.0001	456.1
JQ25	 化学式: $C_{26}H_{24}ClN_5O_2S$ 精确质量: 505.1339 分子量: 506.0191	506.1
JQB	 化学式: $C_{23}H_{24}N_4O_2$ 精确质量: 388.1899 分子量: 388.4623	389.2
JQ30	 化学式: $C_{23}H_{26}ClN_5OS$ 精确质量: 455.1547 分子量: 456.0034	456.2

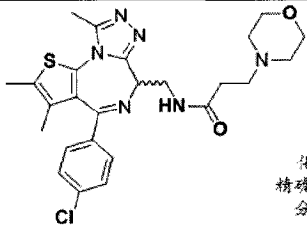
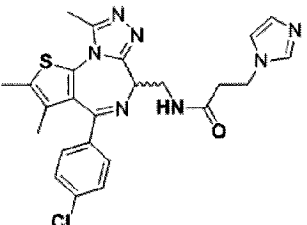
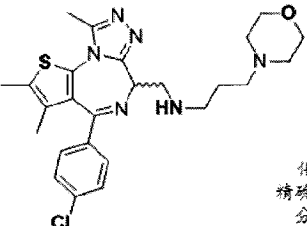
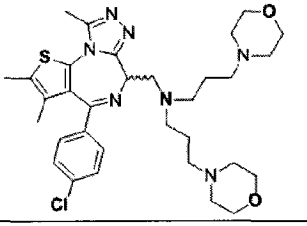
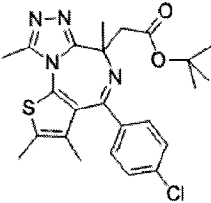
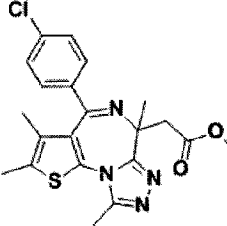
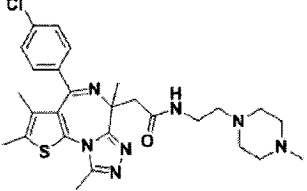
[0525]

JQ31	 化学式: $C_{23}H_{26}ClN_5OS$ 精确质量: 455.1547 分子量: 456.0034	456.2
JQ32	 化学式: $C_{20}H_{17}ClF_3N_5OS$ 精确质量: 467.0794 分子量: 467.8951	468.1
JQ33	 化学式: $C_{25}H_{28}ClN_6O_2S$ 精确质量: 512.1761 分子量: 513.0548	512.2
JQ34	 化学式: $C_{26}H_{25}ClN_6OS$ 精确质量: 504.1499 分子量: 505.0343	505.1
JQ35	 化学式: $C_{27}H_{34}ClN_7OS$ 精确质量: 539.2234 分子量: 540.1232	540.2
JQ36	 化学式: $C_{27}H_{34}ClN_7OS$ 精确质量: 539.2234 分子量: 540.1232	540.2

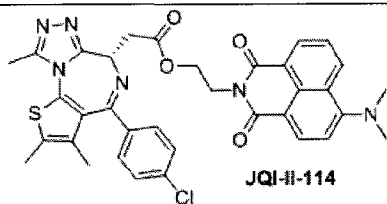
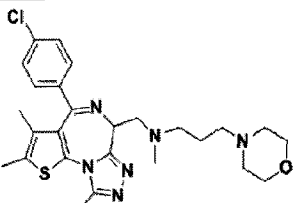
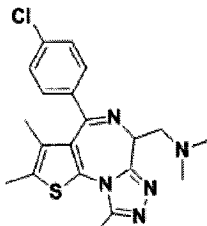
[0526]

JQ37	 化学式: $C_{22}H_{25}N_5O_2S$ 精确质量: 423.1729 分子量: 423.5312	424.2
JQ38	 化学式: $C_{25}H_{26}ClN_7OS$ 精确质量: 507.1608 分子量: 508.0382	508.2
JQ39	 化学式: $C_{26}H_{25}ClN_6OS$ 精确质量: 504.1499 分子量: 505.0343	505.1
JQ40	 化学式: $C_{25}H_{30}ClN_7OS$ 精确质量: 511.1921 分子量: 512.0700	512.2
JQ41	 化学式: $C_{27}H_{34}ClN_7OS$ 精确质量: 539.2234 分子量: 540.1232	540.2
JQ42	 化学式: $C_{23}H_{25}FN_4O_2S$ 精确质量: 440.1682 分子量: 440.5336	441.2
JQ43	 化学式: $C_{24}H_{24}ClN_7OS$ 精确质量: 493.1452 分子量: 494.0117	494.1

[0527]

JQ44	 化学式: $C_{25}H_{29}ClN_6O_2S$ 精确质量: 512.1761 分子量: 513.0548	513.2
JQ45	 化学式: $C_{24}H_{24}ClN_7OS$ 精确质量: 493.1452 分子量: 494.0117	494.1
JQ46	 化学式: $C_{25}H_{31}ClN_6OS$ 精确质量: 498.1969 分子量: 499.0712	499.2
JQ47	 化学式: $C_{32}H_{44}ClN_7O_2S$ 精确质量: 625.2966 分子量: 626.2555	626.3
JQ48	 精确质量: 470.1543 分子量: 471.0148	471.2
JQ49	 精确质量: 428.1074 分子量: 428.9350	429.1
JQ50	 精确质量: 539.2234 分子量: 540.1232	540.2

[0528]

JQ51	 JQ1-H-114 精确质量: 666.1816 分子量: 667.1764	667.2
JQ52	 精确质量: 512.2125 分子量: 513.0978	513.2
JQ53	 精确质量: 399.1284 分子量: 399.9402	400.1

[0529] 每个化合物的色谱数据与该指定结构相一致。

[0530] II. 生物活性以及处理方法

[0531] 实例1: JQ1是BRDT的抑制剂

[0532] 用乙酰基-赖氨酸竞争性小分子靶向人类布罗莫结构域的可行性是最近建立的(Filippakopoulos(菲力卡普洛斯)等人,《自然》(Nature) 468:1067 (2010))。指标研究鉴别了BET家族共激活蛋白BRD4的一种有效的噻烯杂卓抑制剂((+)-JQ1;图2A;K_d=90nM)(Filippakopoulos(菲力卡普洛斯)等人),而BRD4涉及癌症发病机理。人BRD4(1)对人BRDT(1)的蛋白序列比对揭示了81%的同一性以及89%的相似性,包括所有的预测与(+)-JQ1接触的表面残基(图1与3)。基于这些见解以及通过差示扫描荧光测定法((菲力卡普洛斯)等人)建立的结合至BRDT(1)的初步证据,就(+)-JQ1对BRDT(1)的生化影响以及功能影响进行了评估。

[0533] 为了评估对BRDT(1)的竞争性结合,采用了一种均匀的发光邻近测定(luminescence proximity assay)(α-筛选),该测定能够就合成的生物素酰化的四-乙酰化的组蛋白4肽(H4Kac4,残基1-20)对重组的已附加表位的BRDT(1)的结合进行定量。(+)-JQ1的剂量范围研究证明,对H4Kac4结合的有效抑制,其最大抑制浓度半值(IC₅₀)是11nM(图2B)。相反,(-)-JQ1立体异构体对与BRDT(1)是无活性的,这建立了一个立体特异性的配体竞争性结合事件。

[0534] 实例2: JQ1在精子发生中抑制BRDT活性

[0535] 为了确定在体内阻断BRDT功能的可能后果,就给予雄性小鼠的JQ1对精子发生的影响进行了评估。鼠BRDT(1)与人BRDT(1)显示出90%的氨基酸序列同一性以及95%的相似性,包括所有影响分子识别的表面残基(图4),这支持了在鼠模型系统中使用JQ1的可靠性。经3-或6-周时段,每天对幼年或成年C57BL6/J/129S5杂交雄性小鼠给予JQ1(50mg/kg/天)

或载体对照的腹膜内注射。处理3周之后,将小鼠处死或在继续接受JQ1的同时与雌性交配。观察到与对照雄性相比,JQ1处理的雄性普遍具有总体更小的睾丸(图5A)。在每一时间点,JQ1处理的雄性经历了明显的且显著的睾丸体积减小(图5B)。从3-6周龄进行处理的雄性显示出减少至对照的75.4%,从6-9周龄进行处理的雄性显示出减少至对照的54.7%,并且用JQ1处理持续6周的雄性(6-12周龄)显示出最剧烈的减少,减少至对照的40.6%(图5B)。与这些睾丸体积减少相一致,JQ1处理的雄性的小管更狭窄,且在其内腔内具有明显且丰富的精子的小管数量与数目减少(图5C-5F)。而观察到来自对照小鼠的大量的细精管充满精子(图5C和5E),但在JQ1处理的雄性中具有精子的小管的数目以及这些小管中的精子量减少(图5D以及5F)。与睾丸重量减小(图5)相一致,在JQ1处理的雄性(6周处理)中最瞩目的发现是细精管退化,其中很少小管含有显著数目的成熟精子(图5E以及5G)。对JQ1处理的雄性的附睾的组织学分析还显示出一个类似发现,其中与在对照中观察到的丰度相比,在JQ1处理的雄性的附睾内腔中观察到更少的精子(图5G与5H)。这些结果与一个来自重复研究的发现一致,在该重复研究中,用JQ1处理C57B6小鼠(图8A-8C)。

[0536] 为了特征化这些缺陷,在处理3周后确定精子数目(3-6周龄)。发现附睾精子数目减少至对照的27.8%,而在处理6周后,JQ1处理的小鼠的附睾尾中的精子是对照的10.9%(图6A)。此外,虽然来自对照的附睾尾中85%的精子显示出前进移动性,但是JQ1处理导致仅有5%的精子具有前进移动性。因此,JQ1处理在数量上减少了精子数目并且在质量上降低了精子移动性。这些发现表型模拟了那些在BRDT(1)缺陷型小鼠中所观察到的(Shang(商)等人,《发育》(Development) 134:3507 (2007))。此外,JQ1处理的雄性的睾丸的产睾酮的管间间质细胞在组织学上似乎是正常的(图6),并且在这些小鼠中雄性激素作用似乎是没有缺陷的,因为JQ1处理的雄性的响应睾酮的贮精囊是总体正常的。最后,由于JQ1对细精管室具有显著的影响,所以它必须能够有效跨越血液:睾丸屏障以改变精子发生。

[0537] 实例3:JQ1是BRDT活性的可逆抑制剂

[0538] 为了进一步就JQ1对雄性生育力以及受精潜力的后果进行评估,将对照($n=2$)以及JQ1处理持续3周($n=3$)的雄性每只与2雌性共处并且经受处理持续额外3周。虽然对照雄性使所有4雌性都受孕,但是JQ1对这些雄性具有避孕效果(一只未能使两只雌性受孕,而另外两笼每一个中的2只雌性里仅有1只怀孕)。当这些相同雄性被测试对超排卵雌性的致育力时(每笼2雌性),在5周处理后,所有雌性显示交配栓,表明JQ1未改变交配行为,这与这些雄性中的正常的睾酮相应组织一致。从其输卵管壶腹收集这些雌性的卵母细胞并且培养2天以确定它们的交配后发育潜力(图6B)。虽然来自与对照交配的雌性的大部分卵母细胞发育成2细胞(72.8%)以及4细胞(70.1%)胚胎,但是来自与JQ1雄性交配的雌性的很少卵母细胞发育成2细胞(10.1%)或4细胞(6.6%)胚胎,这与它们的低精子计数、降低的移动性、以及生育力缺陷一致。重要地,发现JQ1对雄性生育力的影响是可逆的。JQ1停止之后,在随后的第一个月内,6只JQ1处理的成年雄性小鼠中的6只致育产生两窝后代(每窝 7.25 ± 0.58 个崽)。这些结果与JQ1处理停止之后雄性小鼠中的精子移动性、睾丸重量以及精子计数回归正常水平的发现相一致(附图9A-9C)。

[0539] 实例4:JQ1介导BRDT抑制的分子分析

[0540] 为了在分子上定义JQ1起作用的精子发生阶段,对从JQ1处理小鼠以及对照分离的睾丸进行了定量RT-PCR(图7A)。与对照雄性相比,在JQ1处理小鼠的睾丸中,在精子发生早

期表达的基因(例如Plzf,它是精原干细胞以及早期分裂精原细胞的标记(Buaas(伯尔斯)等人,《自然遗传学》(Nat.Genet.) 36:647(2004);以及Costoya(科斯托亚)等人《自然遗传学》(Nat.Genet.) 36:653(2004))以及Stra8(它主要表达在进行分化的精原细胞以及前细线期精母细胞中(Zhou(周)等人,Biol.Reprod.(生殖生物学) (79:35(2008))分别富集了2.0倍以及1.3倍,。然而,在JQ1处理小鼠的睾丸中,在减数分裂或精子发生期间表达的基因比对照低2.1倍至4.0倍,这些基因包括Brdt(在中-至后精母细胞中表达)(Shang(商)等人,《基因表达模式》(Gene Expr.Patterns) 4:513(2004))、Ccna1(在粗线期精母细胞中表达)(Sweeney(斯威尼)等人,《发育》(Development) 122:53(1996))、Papolb(在步骤1-7球形精细胞中表达)(Kashiwabara(柏原)等人,《发育生物学》(Dev.Biol.) 228:106(2000))、Klf17(在步骤4-7精细胞中表达)(Yan(严)等人,Mech.Dev.(发育机理) 118:233(2002))、以及Prml(在步骤7-16精细胞中表达)(Kleene(克林)等人,《发育生物学》(Dev.Biol.) 105:71(1984))。与Brdt敲除研究(Shang(商)等人,《发育》(Development) 134:3507(2007))不同,其中粗线期精母细胞表达基因Hist1h1t上调,JQ1处理导致这一基因下调2.6倍,与Ccna1的抑制一致。与以上述这些mRNA发现以及组织学分析一致,JQ1处理减少了转录蛋白1(TNP1)阳性的精细胞的数目(图7B和7C),TNP1在步骤10-15精细胞的细胞核中表达(Zhao(赵)等人,Biol.Reprod.(生殖生物学) 71:1016(2004))。

[0541] 在医药领域,雄性避孕的药理学方法仍是一个长期挑战。在此描述的结果提供了使用高效并且选择性的化学探针将BRDT的氨基端布罗莫结构域作为靶标用于雄性避孕的药理学验证。JQ1成为一种用于新类型药物的前导化合物,这些新类型 药物在哺乳动物中可以穿过血液:睾丸屏障,在精子发生期间抑制布罗莫结构域活性,削弱精子症子的发生以及移动性,减少受精卵母细胞的数目并且产生可逆的避孕效果。由于人类以及小鼠BRDT蛋白是高度保守的并且具有接近同一性的基于我们的结构预测的布罗莫结构域口袋,所以这些发现完全可以转移至人,并且提供了一种针对雄性避孕剂的新颖且有效的策略。

[0542] 使用下面的方法和材料获得了在此报告的这些结果。

[0543] (+)-JQ1

[0544] 按前述来制备该直接作用的小分子布罗莫结构域抑制剂(Filippakopoulos(菲力卡普洛斯)等人,《自然》(Nature) 468:1067(2010))。

[0545] 蛋白克隆、表达和纯化

[0546] 按前述,将人BRDT的N-端结构域进行克隆,在E-Coli(大肠杆菌)中进行表达并且纯化(Filippakopoulos(菲力卡普洛斯)等人)。

[0547] BRDT邻近测定

[0548] 对制造商的方案(PerkinElmer公司,美国)少许修改地进行测定。将所用试剂稀释于50mM HEPES、150mM NaCl、0.1%w/v BSA、0.01%w/v吐温20中,pH=7.5并且允许在加到板上前平衡至室温。在添加α珠子至母液之后,所有后续步骤都在弱光条件下进行。2x的各组溶液,BRDT终浓度为80nM,Ni-包衣的受体珠终浓度为25μg/ml,并且将10μL的80nM生物素酰化的H4-四乙酰基添加至384孔板(AlphaPlate-384,PerkinElmer公司,美国)。在内部(in-house)于CEM Liberty 9008005微波肽合成仪上合成针对BRDT的生物素酰化肽:H4-四乙酰基,生物素-PEG2-SGRGKacGGKacGLGKacGGAKacRHRK-COOH。用多道移液器(用于优化实验)亦或Biotek EL406液体处理器进行添加至孔的操作。在1分钟的1000rpm旋转下降

(spin-down)后,使用Janus Workstation(PerkinElmer公司,美国)通过针转移(pin transfer),添加来自备料板(stock plate)的100nl化合物。与以上溶液一样,将这些经链霉抗生物素蛋白包衣的供体珠(最终25 μ g/ml)以2x、10 μ l体积进行添加。这一添加之后,将这些板用箔密封以避光并且防止蒸发。将这些板再次在1000rpm旋转下降1分钟。接下来,在对测定进行读数之前,将这些板在房间里与读板仪(用于温度平衡)孵育1.5小时。在Envision 2104(PerkinElmer公司,美国)上利用该制造商的方案进行 α 筛选(AlphaScreen)测量。

[0549] 序列比对

[0550] 从美国国家心脏、肺以及血液研究所(US National Heart, Lung and Blood Institute)获得含全长布罗莫结构域蛋白的氨基酸序列(人BRDT登录号Q58F21;人BRD4登录号060885;小鼠BRDT登录号Q91Y44)。使用MAFFT(v6.240)产生全长BRDT与BRD4的多重序列比对(Katoh(加藤)等人,《核酸研究》(Nucleic Acids Res.) 33:511(2005);Katoh(加藤)等人,《核酸研究》(Nucleic Acids Res.) 30:3059(2002);以及Katoh(加藤)与Toh(杜),《生物信息学简报》(Brief Bioinform.) 9:286(2008))。对于含有潜在的大不可比对区域的序列,适合选择E-INS-i算法,并且对于进化上高度保守的序列,适合于使用BLOSUM62评分矩阵。缺口罚分以及偏移值设置为默认参数。

[0551] 小鼠研究

[0552] 将(+)-JQ1以50mg/ml溶解在DMSO中并且然后1:10稀释在(2-羟丙基)- β -环糊精(西格玛—奥德里奇公司(Sigma-Aldrich),圣路易斯,密苏里州(St.Louis,MO))中。将随后的混合物以小鼠体重的1%腹膜内地注射进入雄性小鼠(最终量是50mg/kg/天)。将对照1:10溶解在(2-羟丙基)- β -环糊精中并且进行类似的注射。将用于这些研究的幼年或成年C57BL6/J/129S5杂交小鼠在注射前进行每日称重并且随意饲喂。这些研究得到贝勒医学院(Baylor College of Medicine)实验动物管理委员会(Administrative Committee on Laboratory Animal Care)的批准,并且所有试验是根据NIH的实验动物照管与使用指南(NIH guide for the Care and Use of Laboratory Animals)进行。

[0553] 组织学分析

[0554] 使用高碘酸品红以及苏木精如前述(Kumar(库马尔)等人,《自然遗传学》15:201(1997))进行对布安氏(Bouin's)固定睾丸以及附睾的组织学分析。使用布安氏固定睾丸按照所述(Zhao(赵)等人,Biol.Reprod.(生殖生物学) 71:1016(2004))进行兔抗TNP2(1:600)染色以及苏木精复染。

[0555] 附睾精子计数

[0556] 按照所述(Roy(罗伊)等人,Faseb J.(美国实验生物学联合会会刊) 21:1013(2007)),对从成年小鼠的整个附睾或附睾尾部分离的精子进行计数。简言之,解剖附睾并且放置于预温的M2培养基上,切碎,并且在计数之前在CO₂培养箱中于37℃进行孵育。

[0557] 受精以及配体发育潜力

[0558] 为了评估处理小鼠的精子与雌性交配并且使卵母细胞受精的能力,用5IU孕马血清促性腺素(PMSG;Calbiochem公司,EMD,Gibbstown,新泽西州)注射21天龄C57BL6/J/129S5杂交雌性,接着在48小时后注射5IU人体绒毛膜促性腺素(hCG;Calbiochem公司,EMD,Gibbstown,新泽西州),并且与经处理的雄性进行交配。按照所述(Andreu(安德鲁)-Vieyra

(维埃拉)等人, PLoS Biol. (植物实验室生物学) 8:e1000453 (2010); 以及Burns (伯恩斯) 等人, 《科学》(Science) 300:633 (2003)), 从具有交配栓的雌性的输卵管的壶腹分离卵母细胞, 计数, 并且在M16培养基(西格玛-奥德里奇公司, 圣路易斯(St. Louis), 密苏里州)中培养24小时(用于2细胞胚胎的计数)以及48小时(用于4细胞胚胎的计数)。

[0559] 定量RT-PCR分析

[0560] 使用TRIzol试剂(Invitrogen公司, 卡尔斯巴德, 加利福尼亚州(Carlsbad, CA))分离来自小鼠睾丸的总RNA。然后使用Superscript III反转录酶(Invitrogen公司, 卡尔斯巴德, 加利福尼亚州)将总RNA进行反转录。使用SYBR green master mix以及定制的引物进行定量PCR(表1)。

[0561] 表1. 定量PCR的引物

[0562]

基因名称	正向	反向
<i>Plzf</i>	TGGAGAAGCATTTGGGTATCTACTC	AAGACGGCATGCTCAACACA
<i>Stra8</i>	GAGTGAGGCCAGCATATGTC	CCTCTGGATTTTCTGAGTTGCA
<i>Brdt</i>	GCTTTGGGACTCCACAACACTACTATG	GATTGTCCATTTTCCCCTTGATC
<i>Ccna1</i>	TTTCCCCAATGCTGGTTGA	AACCAAAATCCGTTGCTTCCT
<i>Hist1h1t</i>	GCTGATTCCTGAGGCCCTTT	CAGGGCAGCAAGGGACAT
<i>Pap0lb</i>	CGCCAACAGAGAAACAACATTTAG	CCAACCAGGATTCGGATCTTT
<i>Klf17</i>	CCTCCCGTTTGTCTCAACTTG	GGTGCATAGCCTGTTCTTATTG
<i>Prm1</i>	TGCACAGAATAGCAAGTCCATCA	TGTGGCGAGATGCTCTTGAA

[0563] 对每一样品而言, 所有定量PCR测定进行重复的两份。使用Gapdh作为该定量的内部对照。

[0564] 其他实施方案

[0565] 从上述的描述中看出, 很明显可以对在此描述的本发明进行变体和修改以使其适合于不同的用途和情况。这样的实施方案也在下述权利要求的范围内。

[0566] 在此的变量的任何定义中的一系列要素的详述包括作为所列出要素的任何单个要素或组合(或子组合)的那个变量的定义。在此的实施方案的详述包括作为任何单个实施方案或与任何其他实施方案或其部分结合的实施方案。

[0567] 通过引用将在这个说明书中提到的所有专利和出版物结合在此, 其程度如同将每一个单独的专利和出版物具体并且个别地指明通过引用结合在此。在此所述的主体可以涉及美国临时专利申请61/334,991、61/370,745以及61/375,663的主题, 它们各自通过本引用结合在此。

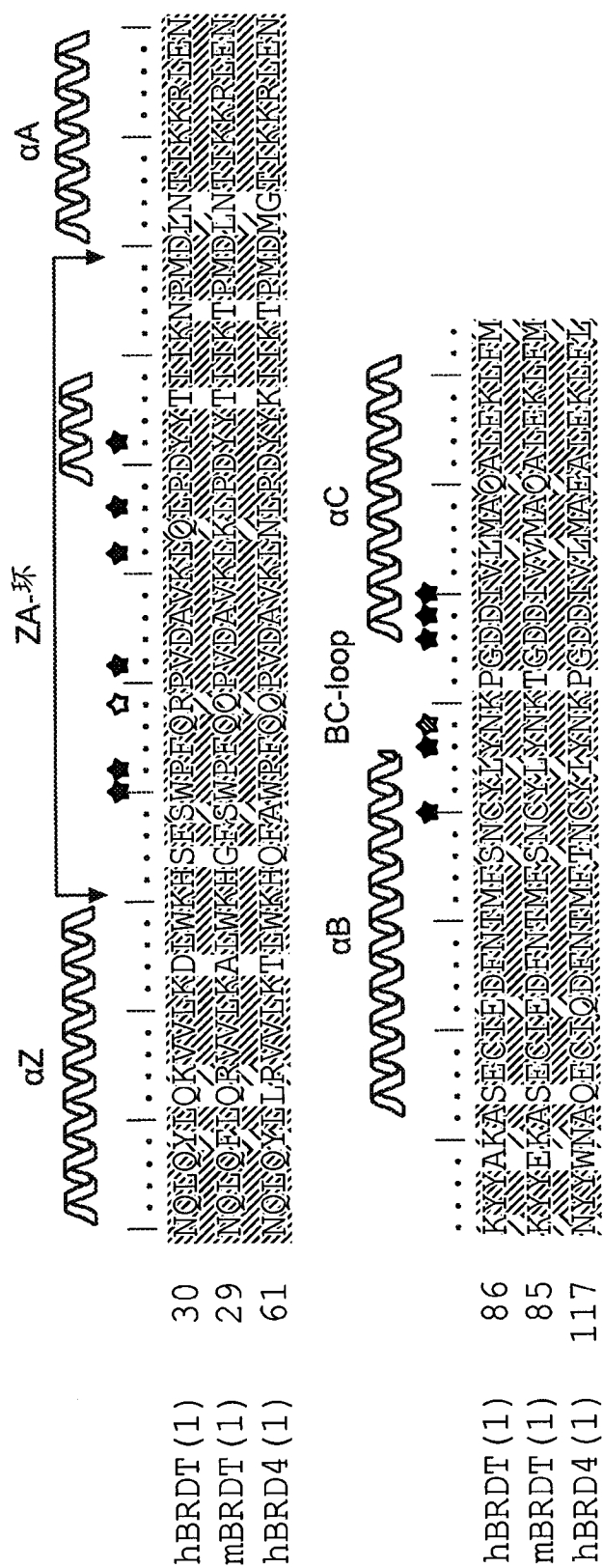


图1

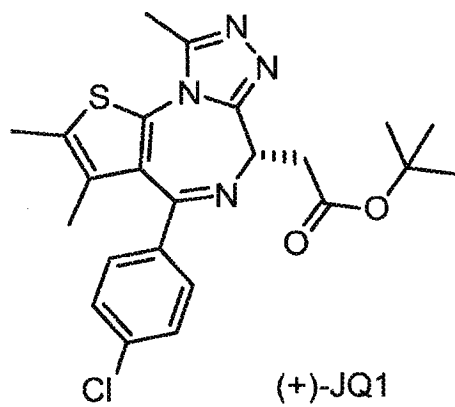


图2A

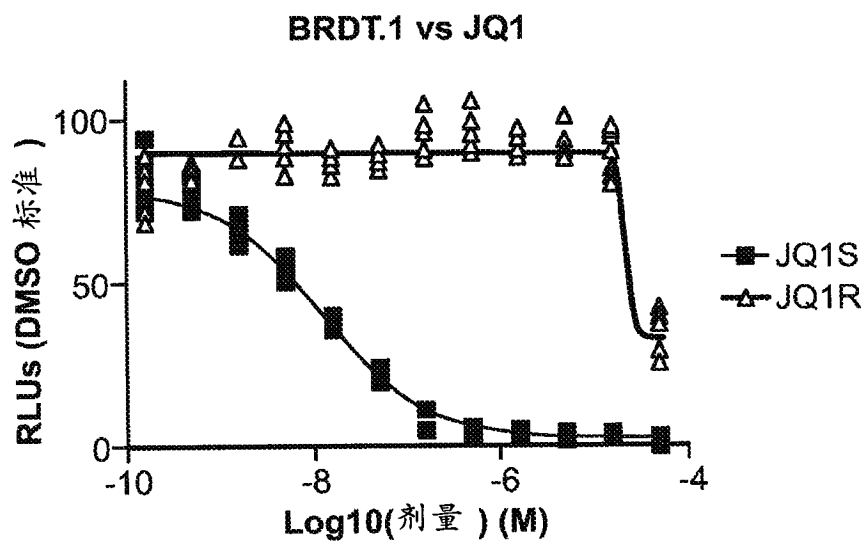


图2B

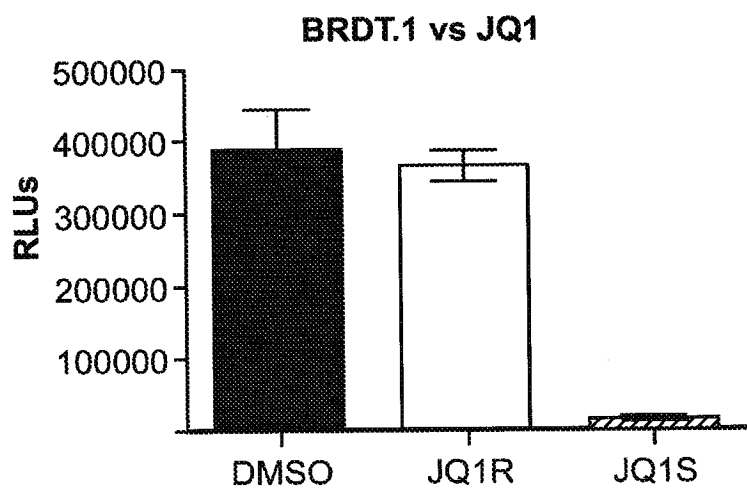


图2C

[illegible]

(续)

BRDT BRD4	QLNSRKRQTKSDKTQPSKAVENVRLSESSSSSSSESSSSDLSSSDSSDSESEMF -----IAGSSKMGFSSSESSSES-SSSDSEDSETEMAP *.. .. *****.. *****.* * K----- KSKKKGHPGREQKKHHHHHQQMQAPVPQQPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPP * -----FTE----- SMPQQAAPAMKSSPPFFIATQVPVLEPQLPGSVFDPIGHFTQPIHLPPQPELPPHLPQPP **; ----- EHSTPPHLNQHAVVSPPALHNALPQQPSRPSNRAAALPPKPARPPAVSPALTQTPLLPPQ -----VKP----- PMAQPPQVLLEDEEPAPPLTSMQMQLYLQQLQKVQPPPTLLPSVKVQSPPPPLPPPPH *;* ----- PSVQQQLQQPP BRDT BRD4
BRDT BRD4	----- PSVQQQLQQPP BRDT BRD4

(续)

BRDT	-----NDS
BRD4	PGQQPPPPQAKPQQVIQHHSPRHHKSDPYSTGHLREAPSLMIHSPQMSQFQSLTHQS ::*
BRDT	PSKENVKKMKNECIPPEGRGTGVTQIGYCVQDTSANTTLVHQTPSHVMPPNHHQLAFNY
BRD4	PPQQNVQPKKQEL---RAASVVQPQPLVVVKEEKIHSPIIRSEPFSPSLRPEPPKHPESI *.:**:*:* .. : * * . . :.:.: . * : * : . .
BRDT	QELEHLQTVKNISPLQ-----ILPPSGDSEQLSNGITVMHPSGDSDTTMLESECQAPV--
BRD4	KAPVHLPQRPPEMKPVDVGRPVIRPPEQNAP-----PPGAPDKDKQKQEPKTPVAP : ** :.:*: : * ** : : * * . . : * : * : *
BRDT	QKDIKIKNADSWKSL--GKPVKPSGVMKSSDELFNQFRKAAIEKEVKARTQELIRKHLEQ
BRD4	KKDLKIKNMGSWASLVQKHPTTPSSSTAKSSDSFEQFRRAAREKEEREKALKQAQAEHAEK :*:*:*:* . ** * * : * . . * * . : * : * : * : *
BRDT	NTKELKASQENQRDLGNGLTV-----ESFSNKIQKCSGEEQKEHQQSSEA-----
BRD4	EKERLRQERMRSREDEDALEQARRAHEEFARRRQEQQQQRRQEQQQQQAATAAATP :.:*: : . *: : * : : * : : * : : * : : *
BRDT	---QDKSKLWLLKDRDLARQKEQERRRRREAMVGTIDMTLQSDIMTFENNFD
BRD4	QAQSSQPQSMLDQQRELARKREQERRRRREMAAATIDMNFQSDLLSIFEENLF .:.: * :.:*:.:*:.:*:.:*:.:*:.:*:.:*:.:*:.:*:

图3

84

(
续)

hBRDT
mBRDT

VNALGLHNYDVVKNPMDLGTIKEKMDNQEYKDAYKFAADVRLFMNCYKYNPPDHEVVT
ADALGLHNYDVVKNPMDLGTIKGKMDNQEYKDAYEFAADVRLFMNCYKYNPPDHEVVA
.:*****

hBRDT
mBRDT

MARMLQDVFEFTHFSKIPVESPFLCYIKTDITETTGRENTNEASSEGNSDDSEDERV
MARTLQDVFEFELHFAKIPDEPIESMHACHLTNTSAQALSRESSEASGDASSESEDERV
*** *****

hBRDT
mBRDT

KRLAKLQEQLKAVHQQLQVLSQVPFRKLNKKKKEKSKKEKKNNSNENPRKMCQMR
QHLAKLQEQLNVAHQQLQVLSQVPLRKLKKKNEKSKRAPKRKKVNNRNDENPRKKPKQMKQ
:*****

hBRDT
mBRDT

KEKSKRNQPKRKQQFIGLKSEDEDNAKPMNYDEKRQLSLNINKLPGDKLGRVVHIIQSR
KEKAKINQPKKKKPL---LKSEEDNAKPMNYDEKRQLSLDINKLPGDKLGRIVHIIQSR
:**

hBRDT
mBRDT

EPSLSNSNPDEIEIDFETLKASTLRELEKYVSACLKRPLKPPAKKIMMSKEELHSQKKQ
EPSLRNSNPDEIEIDFETLKASTLRELEKYVLACLRKRSCLKPQAKKVRSKEELHSEKKL
*** *****

hBRDT
mBRDT

ELEKRLLDVNNQLSRKRQTK-----SDKTQPSKA
ELERRLLDVNNQLSRKRQTKRPAKVEKPPPPPPPPPPPELASGRLTDSSSSSGS
:**

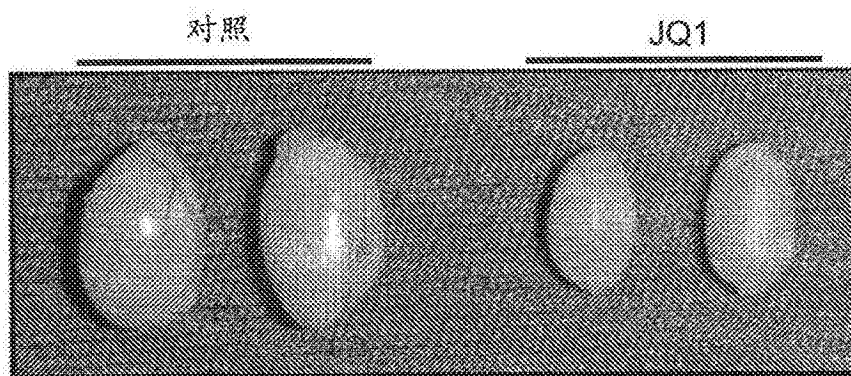


图5A

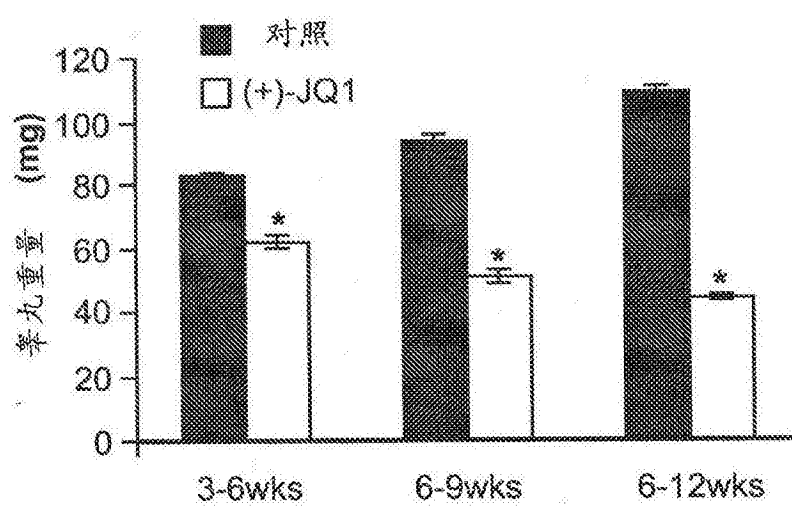


图5B

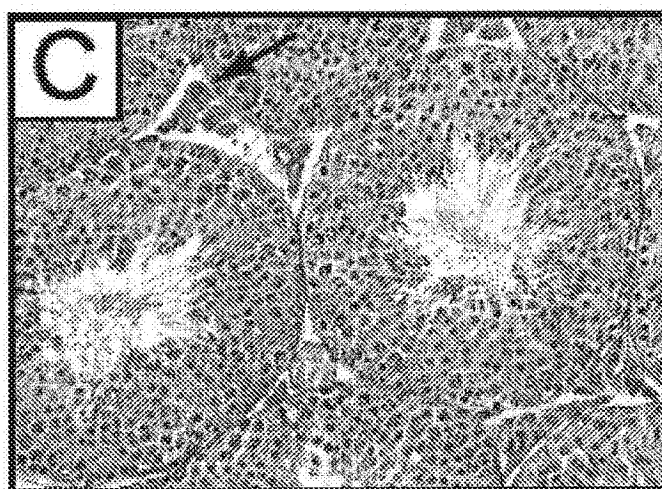


图5C

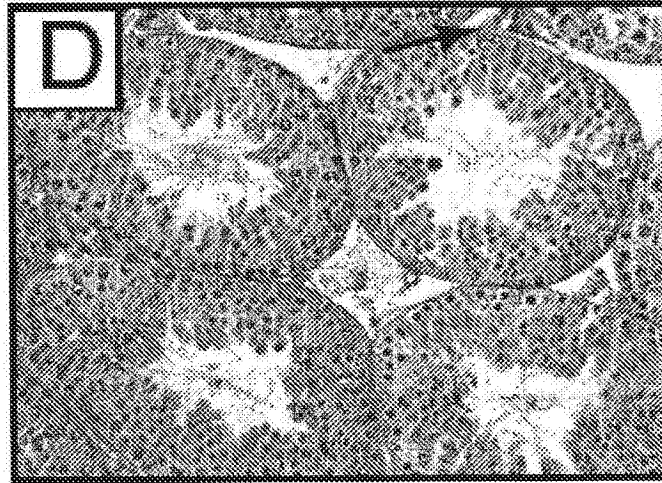


图5D

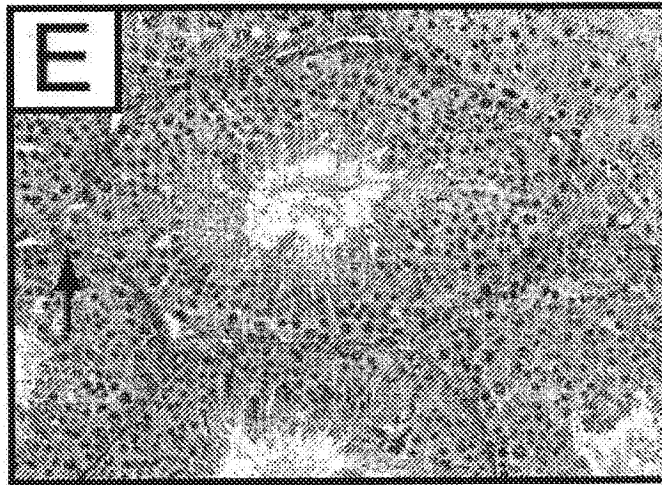


图5E

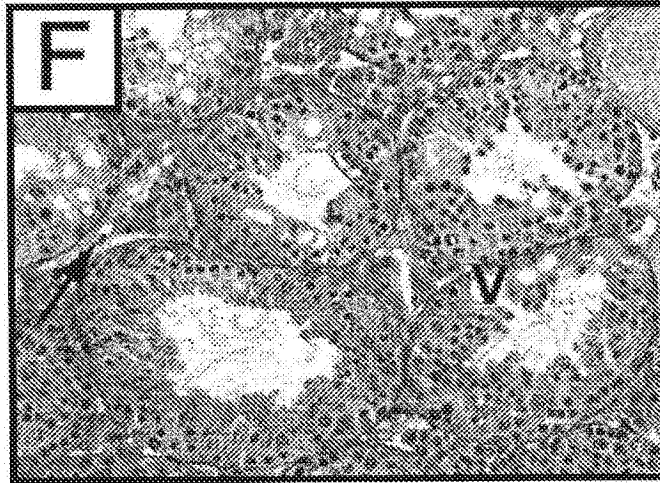


图5F

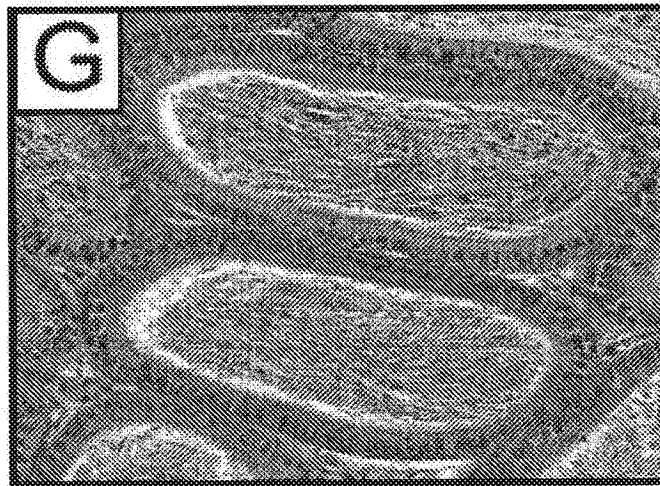


图5G



图5H

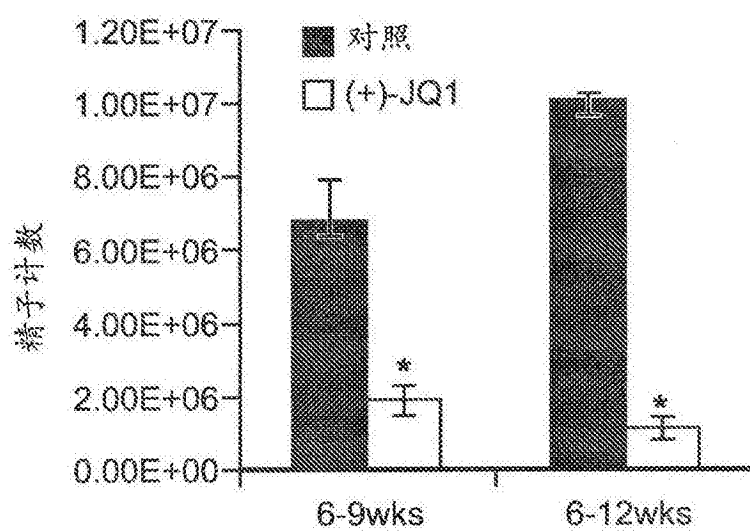


图6A

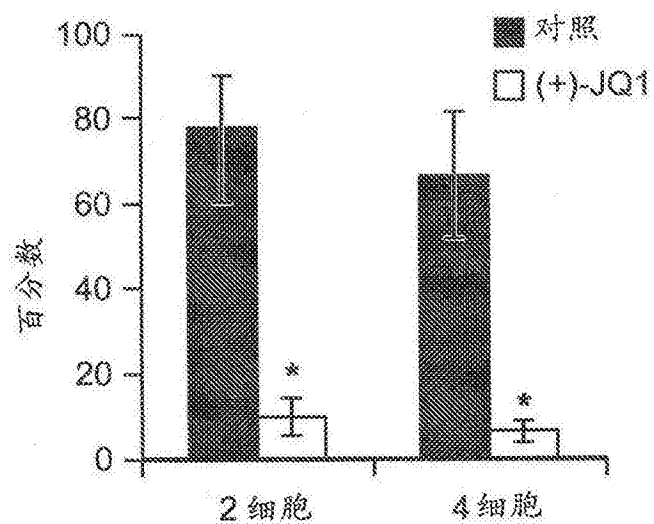


图6B

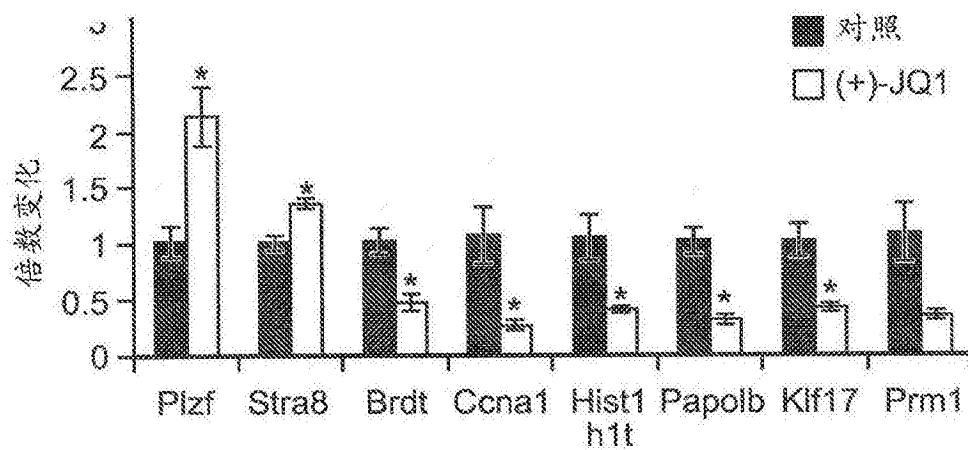


图7A

抗-TNP2

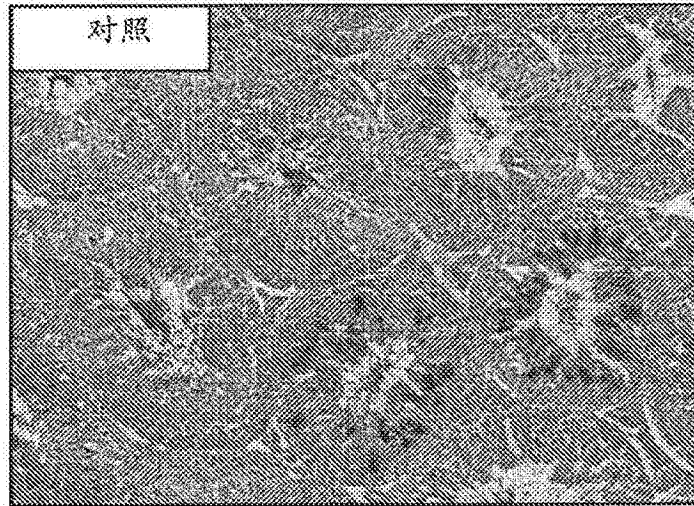


图7B

抗-TNP2

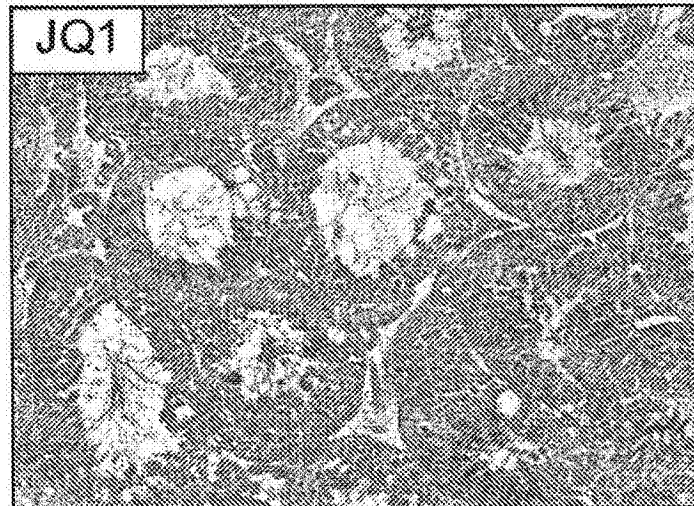


图7C

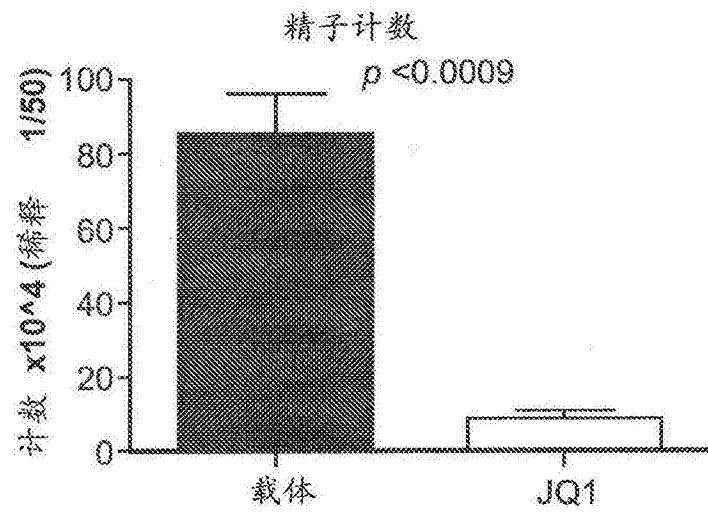


图8A

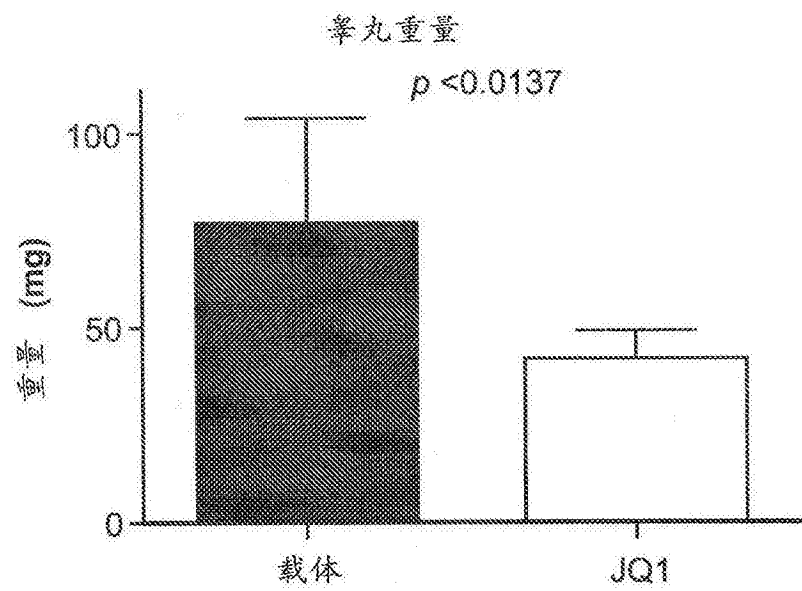
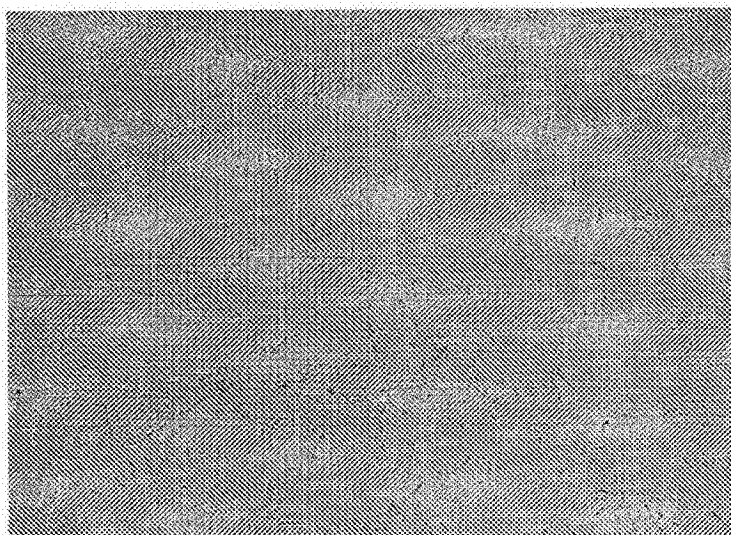
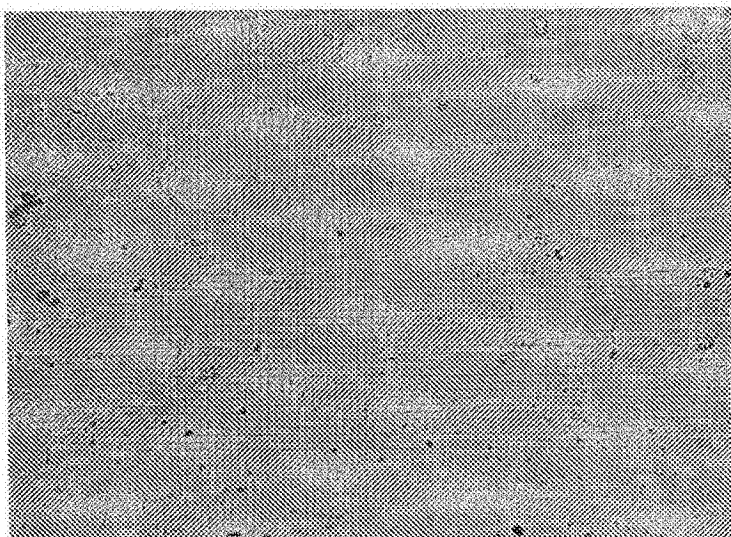


图8B



载体

图8C



(+)~JQ1 50 mpk 8 周)

图8D

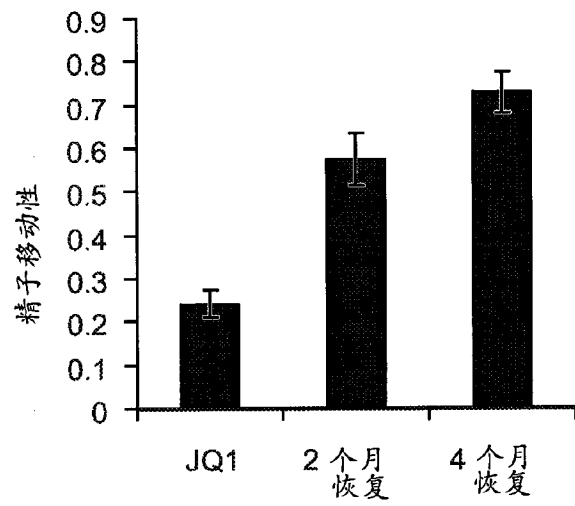


图9A

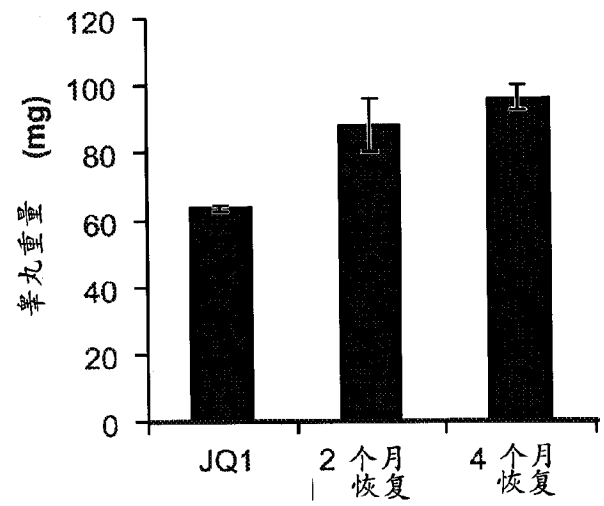


图9B

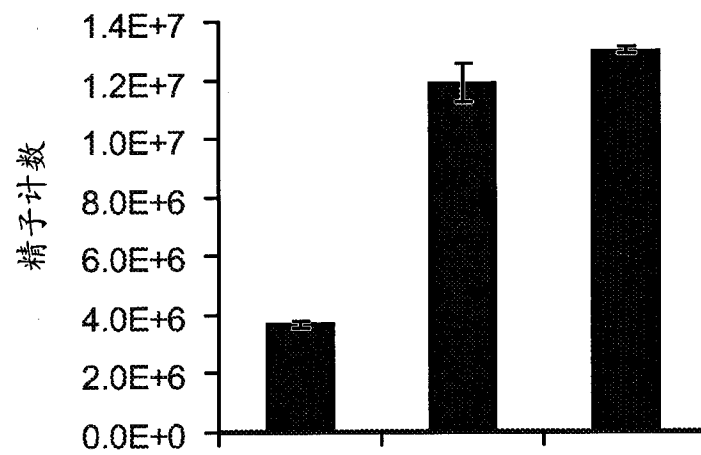


图9C