



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106535882 B

(45)授权公告日 2019.06.04

(21)申请号 201480079337.4

(22)申请日 2014.06.06

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 106535882 A

(43)申请公布日 2017.03.22

(30)优先权数据  
201400495 2014.05.22 EA

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2016.11.14

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/EA2014/000013 2014.06.06

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02015/176730 RU 2015.11.26

(73)专利权人 俄罗斯制药技术有限责任公司  
地址 俄罗斯圣彼得堡

(72)发明人 谢尔盖·阿莱克谢耶夫维奇·休兰丁  
米哈伊尔·尤维奇·比亚霍夫  
利亚·瓦列维奇·齐马费约

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240

代理人 张英 沈敬亭

(51)Int.Cl.  
A61K 31/10(2006.01)  
A61K 31/498(2006.01)  
A61K 31/505(2006.01)  
A61K 31/34(2006.01)  
A61K 31/185(2006.01)  
A61K 31/435(2006.01)  
A61K 31/495(2006.01)  
A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件  
CN 103209960 A, 2013.07.17, 说明书表7实施例65, 117.

Evgenia Stepanova等.Targeting angiogenesis driven by fibroblast growth factor using RPT835, an FGFR2 inhibitor..《Journal Of Clinical Oncology》.2013, 第31卷(第15期),

审查员 刘琳

权利要求书2页 说明书18页 附图15页

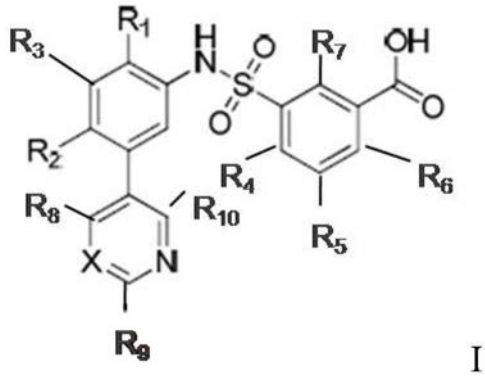
(54)发明名称

干扰成纤维细胞生长因子受体和FRS2相互作用用于预防和治疗癌症和其他疾病的选择性抑制剂

(57)摘要

本发明涉及药物并包括抑制剂的用途,该抑制剂选择性地干扰成纤维细胞生长因子受体和FRS2之间的相互作用,并且干扰与FRS2复合体的其他组分的相互作用。相对于其他抑制剂和单克隆抗体,使用本发明中描述的选择性抑制剂引起抗肿瘤功效的已经证明的增强,治疗的毒性降低以及使用低剂量浓度实现完全阻断和实施长期治疗的可能性。本发明的优点包括治疗恶性肿瘤和其他疾病的新类型的医学药剂的开发。

1. 通式I的化合物:



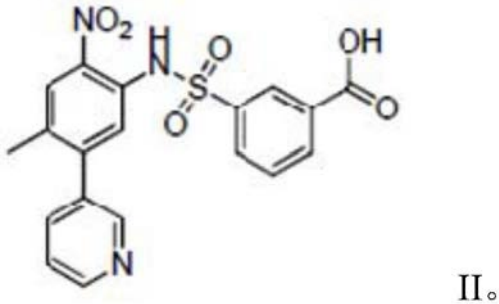
或其药用盐;

其中, R<sub>1</sub>独立地选自-NH<sub>2</sub>, -NO<sub>2</sub>, -H;

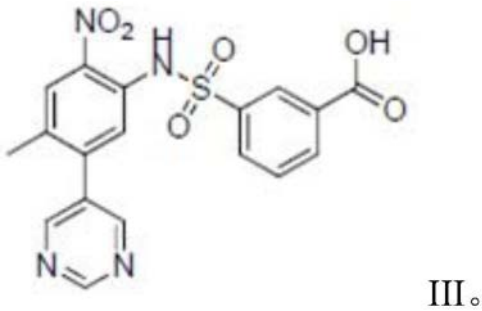
X是CH或N;

R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub>、R<sub>8</sub>、R<sub>9</sub>、R<sub>10</sub>是-H。

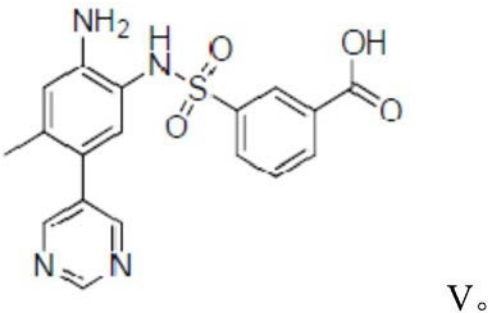
2. 根据权利要求1所述的化合物, 所述化合物是式II的化合物:



3. 根据权利要求1所述的化合物, 所述化合物是式III的化合物:



4. 根据权利要求1所述的化合物, 所述化合物是式V的化合物:



5. 一种药物组合物, 包含治疗有效量的根据权利要求1至4中任一项所述的化合物和至少一种药用载体。

6. 根据权利要求5所述的药物组合物,包含至少一种其他治疗活性药剂。
7. 根据权利要求1至4中任一项所述的化合物在制备用于预防或治疗癌症的药物中的应用。
8. 根据权利要求1至4中任一项所述的化合物在制备用于预防或治疗风湿性疾病的药物中的应用。

## 干扰成纤维细胞生长因子受体和FRS2相互作用用于预防和治疗癌症和其他疾病的选择性抑制剂

### 背景技术

[0001] 我们知道恶性肿瘤的发展是基于细胞过度增殖的,并且还在肿瘤中形成血管,通过这些血管对其喂养(血管生成)(J.Folkman et al.Nature;339,58(1989))。新血管由已经存在的内皮形成并是许多疾病和病症的重要组成部分,这些疾病和病症包括如肿瘤的生长和散播、类风湿性关节炎、牛皮癣、动脉粥样硬化、糖尿病性视网膜病变、晶状体后纤维增生、新生血管性青光眼、血管瘤、移植角膜和其他组织的免疫排斥以及慢性炎症。

[0002] 肿瘤细胞以及内皮细胞的增殖可以由自然界中直接发生的各种因素引起。这些因素结合到肿瘤、内皮细胞和其他细胞表面上的受体,这就导致受体激活并随着后续分裂而在所述细胞内传导信号。

[0003] 根据充足的数据,来自成纤维细胞生长因子(FGFR)的受体通常会藻肿瘤细胞上表达,这会导致肿瘤本身的细胞和内皮细胞增殖,促进肿瘤进展。通常激活突变的FGFR也会改变疾病的进展和对所施用的治疗的敏感性。

[0004] FGFR家族参与生理过程,如各种细胞的血管生成、迁移、增殖、分化和存活性。

[0005] 这个家族共计18个因子,其可以有条件地分为两组:经典组(FGF1-10,16-18和20)和激素样组(FGF19,21和23)[Beenken et al.2009]。成纤维细胞生长因子(FGF)与由5种类型表示的FGFR特异性结合。FGFR的1-4型是具有酪氨酸激酶活性的标准受体,即,胞内部分由酪氨酸激酶表示。酪氨酸激酶激活过程和细胞内的进一步信号传导都是基于对所有这些受体而言固有的磷酸化过程。FGFR的细胞外部分由3个免疫球蛋白样结构域组成;II和III结构域包含配体结合区。由于可变剪接,结构域III会改变形状并处于两种状态-IIIb和IIIc。这可以影响与配体结合的强度和针对受体的治疗剂的活性[Eswarakumar et al.2005;Brooks et al.2012]。此外,当FGF与结构域IIIc的各种亚单元-1 $\alpha$ 或1 $\beta$ 结合时,存在关于肿瘤细胞不同增殖活性的信息[Tomlinson et al.2010]。FGF涉及肝素结合蛋白的组。为了将信号传递到细胞并激活胞内过程,FGF应该与细胞表面上的受体和硫酸乙酰肝素(肝素)结合[Abuharbeid et al.2006]。这使FGF受体激活机制不同于不需要硫酸肝素的其它因子,特别是VEGF。激素样FGF对硫酸肝素具有低亲和力。当FGF与受体结合时,主要的胞内通路RAS-RAF-MAPK和PI3K-AKT-mTOR随着信号传播进入核而激活[Turner et al.2010]。从FGFR向胞内激酶进行信号传递的主要组件是FRS2蛋白[Ong et al.2000;Kouhara et al.1997]。FRS2是当FGFR与配体结合并与Shp2和Grb2形成复合体时激活的“船坞蛋白”,由此FRS2的激活引发两种信号通路RAS-RAF-MAPK和PI3K-AKT-mTOR的激活。

[0006] 目前,已经产生了大量阻断/抑制各种FGFR类型的活性的靶药物。它们包括酪氨酸激酶的抑制剂,并还有单克隆抗体。酪氨酸激酶的现有抑制剂通过阻断相同或通常是几种受体的各个活性部分而降低胞内酪氨酸激酶的活性。非选择性阻断与对肿瘤细胞、血管细胞以及表达相关受体类型的其他结构的作用效率的降低有关。已知如果FGF受体的结构域III改变形状(IIIb和IIIc),则针对FGFR的治疗性单克隆抗体的效率可以显著降低[Wesche et al.2011;Tsimafeyeu et al.2012]。如果FGFR以各种同种型存在于细胞上,也会发生相

同的情况[Dienstmann et al.2013]。酪氨酸激酶的现有低分子抑制剂对一种类型的FGF受体不具有选择性作用,阻断几种类型的FGF,并且还阻断其他受体。因此,布立尼布(brivanib)、多维替尼(dovatinib)抑制FGFR和血管内皮生长因子的受体[Ayers et al.2007;Sarker et al.2008],帕纳替尼(ponatinib)、BGJ398、AZD4547、JNJ-42756493、BAY 1163877抑制几种类型的FGFR并且,虽然程度较轻,但也抑制血管内皮生长因子和一些其他激酶的受体[Gozgit et al.2012;Arai et al.2014;Gavine et al.2012;Perera et al.2014;Heroult et al.2014]。此外,经证明某些肿瘤的细胞表达其FGFR类型(例如,肾癌-EGFR1[Tsimafeyeu et al.2011],乳癌的腔型(luminal type of breast cancer)-EGFR1[Tenhagen et al.2012],三阴性乳癌-EGFR2[Tannheimer et al.2000],胃癌-EGFR2[Xie et al.2013],膀胱癌-EGFR3[Gust et al.2013]等。因此,同时阻断几种类型的FGFR是不必要的,并且可能不仅导致毒性增加,而且会致效率降低。许多工作表明,以纳米分子浓度的现有的酪氨酸激酶低分子抑制剂会抑制FGFR的胞内酪氨酸激酶的活性,然而对FRS2的磷酸化作用(活性)影响微弱。换句话说,即使当FGFR的胞内酪氨酸激酶的活性受到抑制时,FGFR和FRS2之间的相互作用似乎也是重要的,并且其缺失可能是抗性的因素。因此,例如,还没有关于布立尼布对FRS2作用的信息(Huynh et al.2008);纳米分子浓度的多维替尼影响EGFR1/3的磷酸化作用,并且以较小程度抑制FRS2的活性(Zhang et al.2014);作为FGFR最佳选择性的抑制剂,帕纳替尼抑制FGFR的磷酸化作用,IC<sub>50</sub>处于3~18nmol/L的范围内,而FRS2—仅为33~40nmol/L(Gozgit et al.2012);高选择性抑制剂AZD4547,通过以IC<sub>50</sub>限=2nmol/L抑制EGFR2的活性,在使用100nmol/L的浓度时抑制FRS2的活性(Gavine et al.2012)。这意味着现有抑制剂对FRS2具有弱的间接抑制作用,而且不引起对FGFR与FRS2的相互作用的干扰。

## 发明内容

[0007] 本发明描述了抑制剂,其作用机制包括以上提及的每种情况:

[0008] 1) 干扰FGFR和FRS2的相互作用,这会导致磷酸化作用的降低和FRS2的活性丧失,并且还,有可能,但并非一定,破坏与FRS2复合体的其他组件的相互作用。

[0009] 2) 缺少对FGFR的胞内酪氨酸激酶和受体本身的磷酸化作用的影响。

[0010] 3) 缺少对具有酪氨酸激酶活性的其他受体的胞内酪氨酸激酶以及它们的磷酸化作用的影响。

[0011] 4) 不与FGFR的活性中心和其他受体的活性中心结合。

[0012] 5) 选择性干扰FRS2与主要是一种类型的FGFR、或在某些情况下是几种类型的FGFR的相互作用。

[0013] 还有,缺少抑制剂决定的表达的毒性预期是由于选择性作用所致。

[0014] 本发明中描述的抑制剂会干扰FGFR与FRS2的相互作用,这会显著影响FRS2蛋白,其活性会降低(实施例1)。在所描述的抑制剂的作用机制中最重要的是缺失对常见FGFR的活性的影响以及对由酪氨酸激酶表示的受体的胞内部分的影响,和缺少对具有酪氨酸激酶活性的其他受体的活性的影响(实施例2)。这表征了抑制剂的高度选择性作用,并强调了破坏FGFR-FRS2的相互作用的重要性,而不需要阻断受体的激酶活性和其他机制。的是,要注意到抑制剂并不与FGFR的活性中心发生相互作用,并且不干扰FGFR与配体的结合(实施例

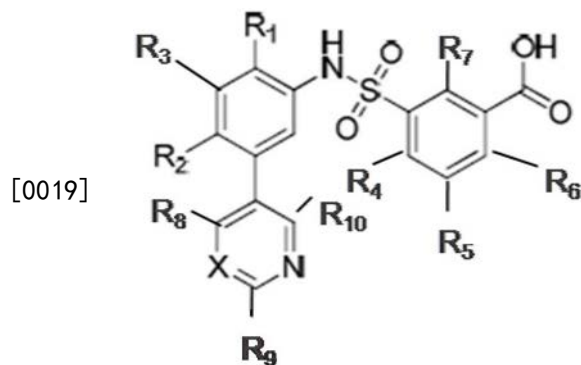
3)。

[0015] FRS2—从受体至胞内细胞的主要信号传导器—的活性降低,导致细胞内信号转导受到抑制。此外,所描述的抑制剂不可以立即影响信号通路RAS-RAF-MAPK和PI3K-AKT-mTOR的其他组件,这表征其仅相对于FGFR和FRS2的相互作用的选择性作用(实施例4,5)。对于一些类型的所描述的抑制剂,不能排除针对信号通路的一个或多个组件的作用(实施例6)。然而,这可能既是对信号通路组件结构的独立影响,又是FGFR-FRS2阻断的结果。此外,所描述的抑制剂可以干扰具有Shp2和/或Grb2的复合体FRS2,这可能导致效果的增强,但是并不是强制性的,而同时在限制信号传导中的主要因素是阻断FGFR-FRS2相互作用(实施例7)。所描述的抑制剂可以仅仅抑制如实施例8中对于FGFR2描述的一种FGFR类型,或几种类型(实施例6)。在大多数情况下,应该排除抑制剂活性对某种FGFR类型的同种型的依赖性(实施例9)。

[0016] 这种选择性干扰FGFR和FRS2的相互作用引起抑制剂的所需治疗效果,例如,抑制内皮细胞迁移的增殖、形成血管的管状结构、成熟血管的生长(实施例10和11),抑制肿瘤细胞的增殖(实施例12),减缓肿瘤生长(实施例13),发展肿瘤中的坏死(实施例14),减缓其他疾病的发展(实施例15)。所描述的抑制剂的选择性影响和缺少对其他靶标的影响会导致表观毒性的降低,这是使用治疗剂中非常重要的(实施例16)。

[0017] 本发明的主要目的是具有以上性质的抑制剂的用途,其选择性地干扰成纤维细胞生长因子受体与FRS2的相互作用以及与FRS2复合体的其他组件的相互作用。这种干扰2型FGFR和FRS2的相互作用的抑制剂的实例,可以由化学式I定义的物质。

[0018] 式I

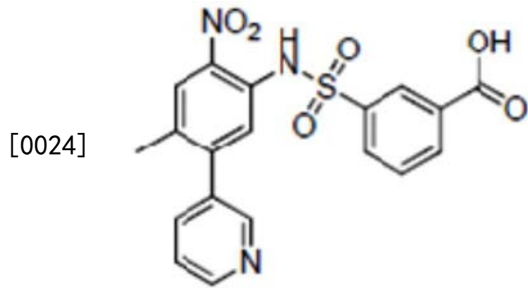


[0020] R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub>、R<sub>8</sub>、R<sub>9</sub>、R<sub>10</sub>可以相同或不同并可以独立地包括基团-NH<sub>2</sub>,-NO<sub>2</sub>,-CH<sub>3</sub>,-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>,-F,-Cl,-Br,-I,-CF<sub>3</sub>,-OCH<sub>3</sub>,-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>,-H,取代或未取代的伯、仲和叔烷基基团,取代或未取代的芳基基团,取代或未取代的烯基基团,取代或未取代的炔基基团,取代或未取代的杂环基团,取代或未取代的杂环基烷基基团,取代或未取代的烷氧基烷基基团,取代或未取代的芳氧基烷基基团,取代或未取代的杂环氧基烷基基团。

[0021] X可以由CH<sub>1</sub>N或CH或N表示。

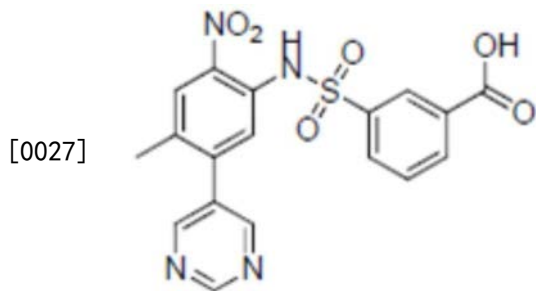
[0022] 作为由通式I表示的选择性地干扰成纤维细胞生长因子受体与FRS2的相互作用抑制剂的实例,在本发明中我们可以由式II示范并相对于3-(N-(4-甲基-2-硝基-5-(吡啶-3-基)苯基)氨磺酰基)苯甲酸介绍化学物质RPT835。

[0023] 式II



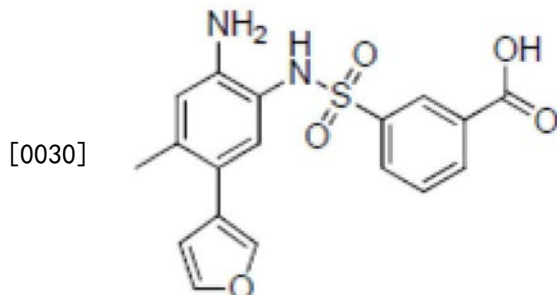
[0025] 除此之外,类似的抑制剂可以涉及3-(N-(4-甲基-2-硝基-5-(嘧啶-5-基)苯基)氨磺酰基)苯甲酸并由式III表示。

[0026] 式III



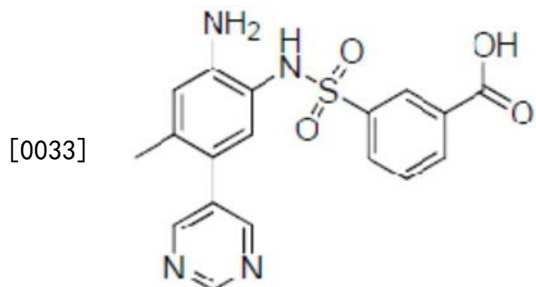
[0028] 或涉及3-(N-(5-(呋喃-3-基)-4-甲基-2-硝基苯基)氨磺酰基)苯甲酸并由式IV表示,

[0029] 式IV



[0031] 可以涉及3-(N-(2-氨基-4-甲基-5-(嘧啶-5-基)苯基)氨磺酰基)苯甲酸并由式V描述。

[0032] 式V



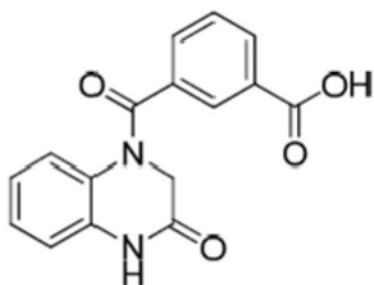
[0034] 另外,本发明中描述的抑制剂可以结合几个选自式I、II、III、IV、V的组分。因此,这种结合的物质化学式可以,例如,是像这样的(式VI)。

[0035] 式VI

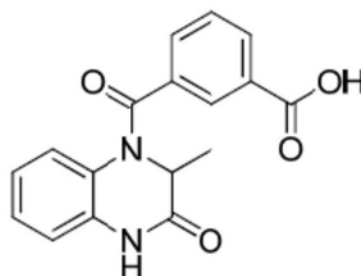


式 VIII

[0042]



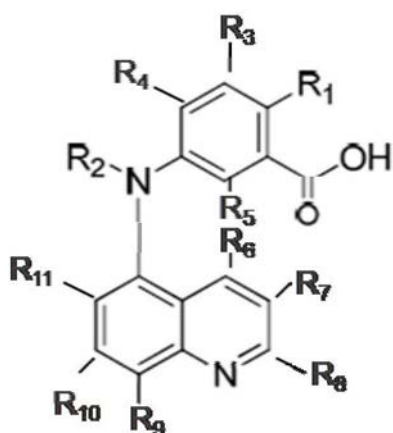
式 IX



[0043] 干扰成纤维细胞生长因子受体和FRS2的相互作用的抑制剂也可以选自式X描述的任何类型的物质X。

[0044] 式X

[0045]

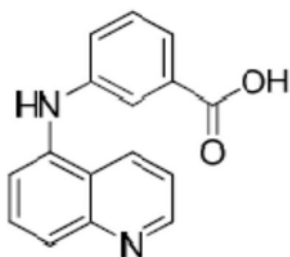


[0046]  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_7$ 、 $R_8$ 、 $R_9$ 、 $R_{10}$ 、 $R_{11}$ 可以相同或不同并可以独立地包括基团 $-NH_2$ 、 $-CH_2NH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-CH_3$ 、 $-F$ 、 $-Cl$ 、 $-Br$ 、 $-I$ 、 $-CF_3$ 、 $-OCH_3$ 、 $-C_2H_5$ 、 $-H$ ，取代或未取代的伯、仲和叔烷基基团，取代或未取代的芳基基团，取代或未取代的烯基基团，取代或未取代的炔基基团，取代或未取代的杂环基团，取代或未取代的杂环烷基基团，取代或未取代的烷氧基烷基基团，取代或未取代的芳氧基烷基基团，取代或未取代的杂环氧基烷基基团。

[0047] 属于这个类别的化学物质的最简单的实例可以是具有式XI的3-(喹啉-5-基胺)苯甲酸。

[0048] 式XI

[0049]



[0050] 而且，抑制剂可以包括式I-XI中描述的所有结构并代表组合的物质。

[0051] 由式I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI表示的化学物质可以由药用盐、互变异构体、药用互变异构体盐及其组合表示。

[0052] 抑制剂的治疗用途

[0053] 为了使用本发明中描述的抑制剂,在治疗实践中,它们需要以药用形式,包括静脉内注射以及通过以下方式给予至哺乳动物,优选人:口服、肌内、皮下、腹膜内、脑脊髓内、关节内、滑膜内、鞘内、局部或吸入。抑制剂也可以通过肿瘤内、肿瘤周围、病灶内和病灶周围途径给予而确保除了系统治疗效果之外的局部疗效。

[0054] 这种给予方式包括药用载体,以其本质而言既没有毒性,也没有治疗作用。根据剂型的物理化学特性和药代动力学的影响,用于制备基于本发明中描述的抑制剂的药物的辅助物质可分为以下组群:

- [0055] • 成型
- [0056] • 稳定
- [0057] • 延释
- [0058] • 增溶
- [0059] • 校正

[0060] 可以使用载体。这种载体的实例是离子交换物质、明矾、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白(如人血浆蛋白)、缓冲物质如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的偏甘油酯混合物、水、盐或电解质、例如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢二钾、氯化钠、锌盐、胶体二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、具有纤维素基质的物质和聚乙二醇。

[0061] 用于拮抗剂的局部或凝胶形式的载体包括多糖,例如羧基甲基纤维素或甲基纤维素的钠盐、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酸酯、聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段的聚合物、聚乙二醇和醇。在所有情况下,从仓库接收的常规剂型用于给予。这种形式包括,例如,微胶囊、纳米胶囊、脂质体、创可贴(Band-Aids)、吸入药剂、气溶胶、舌下片剂和具有物质恒定释放的药物。

[0062] 具有物质恒定释放的药物的一些合适的实例包括含有抑制剂的固体疏水性聚合物的半透明基质;这种基质具有某种形式,例如,它们可以是膜或微胶囊。具有恒定释放的基质的实例有聚醚,由Langer等(J. Biomed. Mater. Res. 15, 167 (1981))和Langer (Chem. Tech. 12 (1982) 描述的水凝胶[例如,聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)],或聚(乙烯醇),聚丙交酯(美国专利No. 3773919),由Sidman等(Biopolymers 22, 547 (1983))描述的L-谷氨酸和 $\gamma$ -乙基-L-谷氨酸的共聚物,非降解乙烯乙酸乙烯酯(Langer et al. 见上文),乳酸和乙醇酸的降解共聚物,如Lupron Depot<sup>TM</sup>(注射的微球,由乳酸和乙醇酸的聚合物和醋酸亮丙瑞林构成)和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。虽然如乙烯乙酸乙烯酯和乳酸与乙醇酸的共聚物的这些聚合物能恒定释放分子超过100天,但某些水凝胶可以在较短的时间内释放蛋白。为了稳定的目的,可以基于作用机制开发合理的策略。例如,如果发现在由于二硫键交换形成分子间SS-键连中表达的聚集机制,则通过修饰巯基残基、冻干除去酸性溶液、湿度控制、使用合适的添加剂和开发特定聚合物基质溶液就可以实现稳定化作用。

[0063] 具有抑制剂恒定释放的化合物也包括脂质体中的包封。含有抑制剂的脂质体可以通过本领域已知的方法获得,例如,由Epstein等(Proc. Nat. Acad. Sci. 82, 3688 (1985)); Huag等(Procc. Nat. Acad. Sci. 77, 4030 (1980)); 美国专利No. 4544545和美国专利No. 4544545描述的方法。脂质体通常具有小值(约200~800埃)并且属于单层类型,其中脂质的含量是高于30mol%的胆固醇;所选择的比率可以改变以选择最佳的治疗条件。具有长周期循环的脂质体由美国专利No. 5013556所涵盖。

[0064] 使用本发明的另一种方式是将抑制剂引入到具有某种形式的物品中。这种物品可

以用于调节内皮细胞的生长和血管生成。此外,此类产品可以用于调节肿瘤和转移瘤侵袭。

[0065] 所描述的抑制剂和另一种治疗剂的结合(缀合)是可能的。所描述的抑制剂可以以与其他治疗活性和/或佐剂药物组合的各种模式使用而用于增强治疗作用,并且还能降低副作用和不良事件的频率。

[0066] 在预防和治疗疾病期间,所描述的抑制剂的所需剂量将取决于疾病的类型,其严重和进展的程度,抑制剂注射是否用于预防或治疗目的,以前的治疗,患者的病例记录和他的/对抑制剂的反应和主治医生的指示。当抑制剂治疗通过在抑制剂指示时刻实施的效率的标准被认为是有效的之时,抑制剂可以以各种方式,同时或作为一系列指示在一段时间内向患者给予。

[0067] 本发明中描述的抑制剂可以用于治疗各种肿瘤性和非肿瘤性疾病和病症。对这种治疗有响应的肿瘤和闭合状态,例如,包括乳癌、非小细胞和小细胞肺癌、气管肿瘤、胃癌、食管癌、结肠直肠癌、肝癌、胰腺癌、胆囊和胆道癌、胃肠道肿瘤、卵巢癌、子宫颈癌、子宫内膜癌、子宫内膜增生、子宫内膜异位症、肉瘤、头颈癌、肝母细胞瘤、黑素瘤、皮肤癌、血管瘤、海绵状血管瘤、成血管细胞瘤、肾上腺癌、视网膜母细胞瘤、星形细胞瘤、成胶质细胞瘤、神经鞘肿瘤、少突胶质细胞瘤、成神经管细胞瘤、成神经细胞瘤、横纹肌母细胞瘤(rhabdomyosarcoma)、平滑肌肉瘤、肾细胞癌、膀胱癌和尿路上皮癌、阴茎癌、前列腺癌、肾母细胞瘤(Wilms tumor)、生殖细胞肿瘤、神经内分泌肿瘤、未鉴定的原发部位肿瘤、白血病和淋巴瘤、与斑痣性错构瘤病(phacomatosis)相关的异常血管增殖。

[0068] 对于对这种治疗响应的非癌症疾病都存在使用抑制剂的可能性,非癌症疾病包括如风湿病、包括动脉粥样硬化的心血管疾病、呼吸系统疾病、消化系统疾病、包括肾小球肾炎的肾病、包括牛皮癣的皮肤疾病、糖尿病性和其他视网膜病变、成纤维细胞增生、新生血管性青光眼、内分泌疾病和代谢疾病、角膜和其他组织的移植、慢性炎症、腹水、先兆子痫、心包积液(例如,与心包炎有关)和胸腔积液、神经疾病。

[0069] 取决于疾病的类型和其严重程度,向患者给予的初始剂量将为0.001mg/kg~200mg/kg,或更优选1mg/kg~100mg/kg,或甚至更优选10mg/kg~50mg/kg,并可以通过一种或多种单独的处方/给予或通过恒定输注引入。取决于上述因素,通常的每日剂量可以从约1mg/kg变化至100mg/kg和更多。对于在几天和更长时间内重复的处方,取决于病症,重复治疗直到实现疾病症状的所期抑制作用。然而,可以使用其他剂量模式。通过常规方法和分析,例如用于肿瘤的X射线显像方法确定治疗的成功。

[0070] 根据本发明的用途,可以通过连续给予抑制剂或与对此目的有效的另一种物质组合改善抑制剂在预防或治疗疾病中的效力,物质如例如肿瘤坏死因子、干扰素、白细胞介素、单克隆抗体、生长因子“traps”和其他能够中和或抑制血管内皮的生长因子和/或其受体和/或肝细胞的生长因子和/或其受体和/或表皮生长因子和/或其受体和/或胎盘生长因子和/或其受体和/或胰岛素样生长因子和/或其受体和/或成纤维细胞生长因子和/或其受体和/或mTOR和/或其他胞内激酶的活性的抑制剂,或一种或多种常用治疗剂,如例如烷基化化合物、抗生素、抗代谢物、蒽环霉素、长春花碱、表鬼臼毒素、其他细胞抑制剂。本发明中描述的抑制剂与抗炎药物,治疗心血管疾病药物的组合也是可能的。这样的物质可以存在于给予的组合物中或分开给予。此外,可以连续给予或与放射治疗组合给予根据方法的抑制剂。

[0071] 将一种或多种抑制剂按照如果适用的治疗有效剂量(例如在观察肿瘤坏死或其转移灶时确定的)给予至患有肿瘤的患者。继续这种治疗直到观察到进一步的改善停止,或者临床检查表明肿瘤或其转移灶消失。如果疾病发展,则给予一种或几种上述物质或使用其他治疗方法。由于另外的物质的效力会变化,则合乎需要的是通过标准筛选对比其对肿瘤的影响。实施重复给予抑制剂和另外的试剂直到达到所需的临床效果。另外,如果需要,将一种或多种抑制剂与其他物质组合引入。标准治疗效果评价量表用于利用抑制剂治疗其他疾病,例如,类风湿性疾病。

[0072] 可以与支持和伴随的治疗药物一起,例如,与促红细胞生成素、刺激白细胞增多或增加血小板和/或嗜中性粒细胞、巨噬细胞的数量试剂一起,与营养支持剂、非类固醇抗炎药、血液组分、皮质类固醇、唑来膦酸、抗RANKL抗体、止吐药等一起使用本发明中描述的抑制剂。

[0073] 以下作为实施例提供了使用本发明中描述的抑制剂的合理性的几个证据。以下实施例仅作为举例说明而提出,而不应该视为限制本发明的内容。

### 具体实施方式

[0074] 实施例1(研究结果):当加入抑制剂RPT835时干扰FGFR2与FRS2的相互作用

[0075] 为了评价本发明式II表征的RPT835抑制剂的效果,使用表达FGFR2的胃癌细胞KATO III进行FRS2磷酸化。向细胞中加入浓度为1mg/mL的FGF-2和10mg/mL的肝素刺激FGFR。以各种浓度加入RPT835。一部分细胞留用而不添加抑制剂,而一部分细胞一未添加抑制剂,或刺激剂(对照组)。

[0076] 用于评价FGFR和FRS2的磷酸化作用水平的两种标准方法:

[0077] -使用手工工作的免疫印迹法(Western blotting);

[0078] -使用自动系统Wes<sup>TM</sup>(ProteinSimple;SantaClara,CA)的自动毛细管电泳和免疫检测。

[0079] 相比于未刺激的细胞,用成纤维细胞生长因子刺激KATO III细胞导致FGFR(4.3倍)、FRS2 $\alpha$ (11.4倍)、p44/42(MAPK,12倍)和AKT(4倍)的活性显著增强(磷酸化作用)。据观察,mTOR蛋白和p70S6激酶的磷酸化作用程度较低(图1)。

[0080] 当抑制剂RPT835添加到细胞中时,观察到了对FGFR和FRS2之间相互作用的干扰,这本身表明FRS2磷酸化作用降低相当大(图2)而并未影响普通FGFR的磷酸化作用(图3)。此外,通过使用抑制剂RPT835,FRS2的半最大抑制浓度(IC<sub>50</sub>)小于10nM。

[0081] 基于所获得的数据,我们可以得出结论,FGF刺激了从FGF受体到胞内激酶的整个信号通路,包括FGFR和FRS2的相互作用。抑制剂RPT835不影响FGFR的活性,但导致对FGFR和FRS2的相互作用的干扰,这反过来以纳摩尔浓度影响FRS2活性的抑制。

[0082] 实施例2(研究结果):RPT835抑制剂不影响FGFR的酪氨酸激酶活性。

[0083] 先前的实施例证实了抑制剂RPT835对FGFR的磷酸化作用的影响缺失。在本研究中,为了反驳RPT835作为酪氨酸激酶抑制剂的作用机制,在添加RPT835之前和之后评价了普通FGFR和磷-FGF的水平。

[0084] 与实施例1一样,使用了强烈表达FGFR2的胃癌细胞KATO III。一部分细胞刺激浓度1mg/mL的FGF-2和10mg/mL的肝素。另一部分的细胞保留未刺激。将按照剂量1、10、100、

1000nM的抑制剂RPT835加入细胞中。保留对照组而未加入RPT835。

[0085] 使用具有免疫检测和使用自动系统Wes™ (ProteinSimple; Santa Clara, CA) 的标准免疫印迹法和自动毛细管电泳评价FGFR磷酸化作用的水平。

[0086] 抑制剂RPT835对FGF-2刺激的FGFR2的磷酸化作用没有任何影响(图4), 即, 即使在最大浓度下也未显示出对酪氨酸激酶的抑制活性。

[0087] 实施例3(研究结果): 抑制剂RPT835不抑制FGF-2与FGFR2的结合

[0088] 实施非放射活性酶联FGF2结合分析测试以评价RPT835是否影响FGFR2和配体(FGF-2)的结合。在FGF-2的结合分析测定中, 使用了由人胞外结构域FGFR2 $\alpha$  (IIIc) 和人IgG1的Fc片段构成的重组嵌合蛋白FGFR2-Fc。FGFR2 $\alpha$ 包含所有3个免疫球蛋白样结构域并代表对FGF-2具有高亲和力的结构域IIIc FGFR2。将96-孔板片用FGFR2-Fc蛋白涂覆, 然后将下列物质加入孔中:

[0089] 1) 仅仅FGF-2

[0090] 2) FGF-2+肝素

[0091] 3) 各种浓度的抑制剂RPT835+FGF-2+肝素

[0092] 4) 一部分孔保留未加刺激剂(FGF-2+肝素) 和RPT835(阴性对照物)。

[0093] 在培养之后, 使用相应的抗体进行酶联免疫分析测试并随后测定OD<sub>650</sub> (波长650nm处的光密度)。

[0094] 在没有添加抑制剂和肝素的第一组中, 证明FGF-2与蛋白FGFR2-Fc结合良好。FGF2与受体的结合是剂量依赖性的。在第二组中, 添加肝素改善了FGF-2与受体的结合。在这种情况下, 为了实现相同的结合强度, 可以以比没有肝素更小的剂量使用FGF-2。在阴性对照组中, 信号为阴性(小于阳性对照的1%)。结果如图5中所示。它们证实了这种方法的显著性: 在肝素存在下, FGF-2与FGFR2-Fc结合, 而不与其结合。

[0095] 下一个任务是评价抑制剂RPT835对FGF-2和FGFR2-Fc的结合的影响。浓度为1~1000nM的RPT835不影响配体与受体的结合(图6A)。为了排除RPT835对结合的非特异性影响, 实施了一个另外的酶联免疫分析测定, 其中用固定的抗-FGF-2抗体涂覆孔。将不同浓度的FGF-2 $\pm$ RPT835加入到孔中。浓度为1~1,000nM的RPT835不影响FGF-2与抗-FGF-2抗体的结合(图6B)。

[0096] 研究的总结结果证明, 本发明作为实施例提供的抑制剂RPT835不干扰配体(即, FGF-2) 与其受体(即, 与FGFR2) 的结合。

[0097] 实施例4(研究结果): 在使用由式V、IX、XI确定的抑制剂期间对FGFR与FRS2的相互作用的干扰

[0098] 本发明中确定的具有相应式V、IX、XI的抑制剂V、IX、XI也干扰从FGFR至FRS2的信号传递。通过化学合成, 我们收到了指定的化合物。根据标准方法培养了表达FGFR2的胃癌细胞Snu16。一部分细胞留作阴性对照物, 将FGF-2加入到另一部分(阳性对照) 中。治疗组包括: 加入根据式V的抑制剂并随后刺激FGF-2, 加入根据式IX的抑制剂并随后刺激FGF-2, 加入根据式XI的抑制剂并随后刺激FGF-2。使用蛋白免疫印迹方法评价各种激酶的磷酸化水平。

[0099] 结果: 在无刺激和无处理的细胞中, FGFR2、FRS2的磷酸化水平较低(无磷酸化作用); 刺激FGF-2之后的细胞具有高水平的FGFR2和FRS2活性(比阴性对照物高14和17倍); 在

加入抑制剂的细胞中,除了没有报道FRS2磷酸化作用之外,相比于刺激的FGF-2对照物,FGFR2的活性水平没有变化(在所有情况下IC<sub>50</sub>的抑制浓度都小于10nM)。此外,抑制剂经证明并不影响其他胞内激酶,包括Akt,Erk 1/2。

[0100] 也对细胞数进行了计数。与添加FGF-2的细胞不一样,未添加抑制剂和FGF-2的细胞增殖较弱。当加入抑制剂时,细胞数量与阴性对照组(p=0.5)相当,并且确信小于具有FGF-2刺激和不添加抑制剂的组(p<0.0001)。

[0101] 因此,式V、IX、XI中描述的物质是FGFR2和FRS2之间的相互作用的选择性抑制剂,其影响表达FGFR的肿瘤细胞的增殖活性。

[0102] 实施例5(研究结果):本发明中描述的抑制剂对各种胞内激酶的影响的评价

[0103] 为了证明抑制剂仅对从FGFR到FRS2的信号的传输的选择性作用而不影响胞内激酶、胞内激酶的磷酸化水平,特别是p44/42(MAPK),Akt,mTOR,p70S6。

[0104] 为了评价本发明中由式II表征的抑制剂RPT835对所列出的激酶的磷酸化作用的影响,使用了表达FGFR2的胃癌细胞KATO III。向细胞中加入浓度为1mg/mL的FGF-2和10mg/mL的肝素以刺激FGFR。以各种浓度加入RPT835。部分细胞没有添加抑制剂而部分细胞一没有添加抑制剂和刺激剂(对照组)。

[0105] 为了评价磷酸化水平,使用了2种标准方法:

[0106] -使用手动工作的蛋白免疫印迹法。

[0107] -使用自动系统Wes™(ProteinSimple;SantaClara,CA)的自动毛细管电泳和免疫检测。

[0108] 与未刺激的细胞相比,用成纤维细胞生长因子刺激细胞KATO III导致活性(磷酸化作用)p44/42(MAPK,12倍)、AKT(4倍)显著增强。据报道,蛋白质mTOR和激酶p70S6的磷酸化作用程度都较小。

[0109] 随着加入抑制剂RPT835,相比于仅用FGF-2刺激的细胞(未加入RPT835),所列出的激酶的活性没有改变。磷酸化水平如图7中所示。

[0110] 因此,RPT835对其他胞内激酶的磷酸化作用没有影响。

[0111] 实施例6(研究结果):评价由式VII确定的抑制剂对FGFR1、FGFR2、FGFR3、VEGFR1和胞内激酶的影响。

[0112] 根据上述方法与步骤,通过免疫印迹法进行分析1-3型成纤维细胞生长因子受体,FRS2的磷酸化水平以及VEGFR1和胞内激酶PI3K、p44/42(MAPK)、Akt、mTOR的磷酸化水平。

[0113] 内皮细胞HUVEC、Caki-1型人肾细胞癌、胃癌细胞KATO III都用于本研究中。所有提到的细胞都表达各种类型的所提及的受体。正如实施例5中一样,一部分细胞刺激FGF-2和/或VEGF-A,一部分细胞用式VIII描述的抑制剂培养,一部分细胞未刺激和处理。

[0114] 与未刺激的细胞相比,FGF-2强烈刺激所有三种类型的FGFR以及PI3K,Akt和FRS2的磷酸化作用(对于所有比较,P<0.0001)。VEGF-A对1-3型的FGFR和FRS2没有影响(对于所有比较,P>0.3),但显著增加了VEGFR1、mTOR、PI3K、MAPK的磷酸化水平(对于所有比较,P<0.001)。式VIII的抑制剂显著降低了FRS2(14倍,P=0.001)和PI3K(10倍,P=0.017)并微弱降低FGFR2(1.5倍)和FGFR3(1.8倍),VEGFR1(2.3倍)的磷酸化作用。抑制剂对其他激酶没有影响。此外,FGFR1的磷酸化水平甚至升高(图8)。

[0115] 因此,这项研究证明了一些干扰FGFR2和FRS2的相互作用的抑制剂对其他激酶和

受体的可能影响。这种效应不能否认,并且这可能与主要机制相关联—破坏FGFR和FRS2的结合,这导致下级激酶的逐步磷酸化作用抑制。对其他受体(例如,VEGFR1)的影响不明显,但这有可能就像交叉的一样。FGFR1磷酸化水平升高可以用于未来和本发明中所描述的抑制剂使用期间的治疗。

[0116] 实施例7(研究结果):本发明中描述的抑制剂可以干扰FRS2与Shp2和/或Grb2的复合体

[0117] 已知FRS2与Shp2和Grb2发生相互作用,通过这些蛋白将信号传递到胞内激酶。这项研究的目的是证明本发明中描述的抑制剂可以影响FRS2与Shp2和Grb2的相互作用,但这并不是定义它们的作用机制:主要机制是干扰FGFR和FRS2的相互作用。

[0118] 在具有90 $\mu$ l/孔大小的96-孔板中锯切胃癌细胞Snu16。在阻尼培养箱中37 $^{\circ}$ C的温度下于5%CO<sub>2</sub>和95%空气中培养24小时后,按照100 $\mu$ g/mL的体积向细胞中加入所测试的由式VI描述的溶解试剂,然后加入FGF-2作为刺激剂。

[0119] 通过自动化的蛋白免疫印迹法培养天数后,在这些细胞中研究以下蛋白质的磷酸化水平:FGFR2,FRS2 $\alpha$ ,FRS2 $\beta$ ,Shp2,Grb2。在经过另外24小时培养后,计数细胞。

[0120] 根据式VI的抑制剂并未抑制FGFR2的磷酸化作用(未发现与对照物的差异),然而,它显著地(12倍)抑制了FRS2 $\alpha$ 和FRS2 $\beta$ 的磷酸化作用(IC<sub>50</sub><10nM)。除此之外,在一些细胞中观察到Shp2和Grb2蛋白磷酸化作用的某些抑制作用(超过10倍)。因此,通过Shp2和/或Grb2的磷酸化要素将细胞分成两个组:

[0121] -具有FRS2和Shp2和/或Grb2的磷酸化抑制作用的组

[0122] -具有FRS2的磷酸化抑制作用而无对Shp2和/或Grb2的磷酸化作用的影响的组。

[0123] 在下一轮培养后,细胞的数目在两个组之间,并且还和对照组(刺激FGF-2,没有用抑制剂培养)是相等的。参见表1中的结果。正如从表中可以看出,相比于对照组,不管Shp2和/或Grb2的磷酸化作用,抑制剂都显著地抑制了肿瘤细胞的增殖。

[0124] 因此,对肿瘤细胞增殖具有抑制作用的定义的因素是对FGFR和FRS2的相互作用的干扰。在这种情况下,Shp2和/或Grb2的磷酸化水平可以是不同的,这并不会由本发明中描述的抑制剂影响对增殖活性的抑制作用。

[0125] 实施例8(研究结果):加入抑制剂RPT835选择性干扰FGFR2与FRS2的相互作用

[0126] 本研究的目的是评价本发明中指定的具有式II的抑制剂RPT835对FGF2和FRS2的相互作用的特异性作用,并评价对其他类型的FGFR和FRS2的相互作用的影响。对于本实验,选择2个细胞系:

[0127] -胃癌KATO III,表达FGFR2,和

[0128] -乳癌MDA MB 134,表达FGFR1。

[0129] 研究方案与前述实施例是相同的:在RPT835存在下培养细胞,然后用FGF-2和肝素刺激。另一部分细胞在RPT835存在下进行培养。使用手动和自动化蛋白免疫印迹法评价FGFR1(在乳癌细胞中)和FGFR2(在胃癌细胞中)以及FRS2 $\alpha$ (在两种细胞系中)和一些胞内激酶(在乳癌细胞中)的磷酸化作用。

[0130] 在细胞KATO III中,抑制剂RPT835以100nM的剂量将FRS2 $\alpha$ (FGFR2系统)的磷酸化作用完全降低至初始水平。以10nM的浓度,观察到对FRS2 $\alpha$ 磷酸化的抑制作用超过50%(图2)。在这种情况下,没有观察到对受体本身的激酶活性的影响(图3)。

[0131] 在乳癌细胞MDA MB 134中,抑制剂RPT835对FRS2 $\alpha$ (系统FGFR1)的磷酸化作用以及对FGFR1本身,还有胞内激酶都没有影响(图9)。从图中可以看出,注意到对于一些胞内激酶和FGFR1的磷酸化水平增加并不太不显著。

[0132] 因此,本实施例确证了抑制剂RPT835的选择性作用及其在系统FGFR2中的活性。抑制剂RPT835仅仅影响对FGFR2与FRS2的相互作用的干扰而不影响其他类型的FGFR与FRS2相互作用。

[0133] 实施例9(研究结果):本发明中描述的抑制剂表现出不管FGFR同种型如何都活性

[0134] 已知FGFR的各种同种型的出现可以影响阻断这些受体的药物的治疗活性。这项研究的目的是为了证明本发明中描述的抑制剂关于某种类型的FGFR内的任何同种型都会显示出活性。

[0135] 本研究评价了由本发明式II确定的抑制剂RPT835的影响作用,对由表示两种最常见的同种型IIIb和IIIc代表的FGFR2与FRS2的相互作用的干扰作用。为此,选择仅表达FGFR2IIIc的胚胎成骨细胞(hFOB)的人细胞系以及表达FGFR2IIIb(所有主要形式的同种型C1、C2、C3)的乳癌SUM-52的人细胞系。

[0136] 细胞分成以下组:

[0137] 1a) hFOB

[0138] 1b) hFOB,刺激FGF-1(100ng/mL)

[0139] 1c) hFOB,用RPT835(1micron)培养并刺激FGF-1(100ng/mL)

[0140] 2a) SUM-52

[0141] 2b) SUM-52,刺激FGF-1(100ng/mL)

[0142] 2c) SUM-52,用RPT835(1micron)培养和刺激FGF-1(100ng/mL)

[0143] 抑制剂RPT835可靠地抑制了两个细胞系的细胞的增殖,表达FGFR2IIIc或FGFR2IIIb(图10)。在FRS2 $\alpha$ 磷酸化水平评价期间这些组之间没有有意义的差异任一组一抑制剂完全抑制了磷酸化作用(图11)。

[0144] 因此,本发明中描述的抑制剂RPT835关于某种类型的FGFR的限制内的任何同种型都表现出活性。

[0145] 实施例10(研究结果):本发明中描述的抑制剂的抗血管生成活性

[0146] 本研究中使用了18只第一代F1杂交小鼠(C57B1/6 $\times$ DBA/2),体重为22~30g,雄性。从养殖场“Stolbovaya”的分部接收小鼠(命名编号M02.13.00011)。在实验中使用了先前描述的方法[Passaniti A.,1992]。对照组和实验组具有至少3只小鼠。在冰上制备含有肝素60常规单位/mL、VEGF(200ng/mL,BD Biosciences)或bFGF(100ng/mL,BD Biosciences)的Matrigel(BD Biosciences)的等分试样(1000mc1)。将含有肝素60常规单位/mL的Matrigel用作阴性对照。将Matrigel在小鼠中皮下注射于背部侧部分。注射后,Matrigel迅速形成单一的硬凝胶状植入物。将一定重量的抑制剂溶解于DMSO中至浓度为 $10^{-2}$ M。将等分试样冷冻至 $-20^{\circ}\text{C}$ ,并在注射前立即解冻。不允许溶液再冷冻。在Matrigel植入的第0、3和6天腹膜内给予测试的标准对象:剂量为10mg/kg的贝伐单抗和RPT835-15mg/kg。这些组的描述如表2中所示。给予Matrigel后7天,用乙醚使小鼠入睡而去除植入物。将植入物固定于10%中性福尔马林中长达24~36小时并封闭于石蜡中用于进一步的组织学研究。

[0147] 皮下注射1000mc1不含生长因子的Matrigel并未诱导微血管生成以及基质和内皮

细胞迁移到植入物中。

[0148] 在含有100ng/mL bFGF的Matrigel的注射中一般会观察到微血管、管状结构和迁移的细胞的数量显著增加(对于所有指标 $p < 0.001$ )。在注射200ng/mL VEGF后显示出类似的效果(对于所有指标 $p < 0.001$ )。

[0149] 在给予阻断相应刺激剂活性的物质之后,观察到迁移的细胞、管状结构和功能性微血管的数量显著减少。给予贝伐单抗完全阻断了含有VEGF的植入物中的血管生成(对于所有测试参数 $p < 0.001$ ),而不是由bFGF诱导的血管生成(对于所有测试参数 $p > 0.05$ )。抑制剂RPT835有效抑制了通过bFGF刺激的血管生成。相比于对照组,迁移的细胞( $p < 0.001$ )、管状结构( $p = 0.016$ )和功能性微血管的数量( $p < 0.001$ )下降超过2倍。研究结果提供于图12和图13。

[0150] 因此,本研究已经确立,以15mg/kg的剂量三次给予下,抑制剂RPT835在统计学上显著地阻断了由bFGF刺激的血管生成。贝伐单抗按照相同的操作模式对抗VEGF刺激的血管生成是有效的,但在使用bFGF时无效。

[0151] 获得的数据间接表明,作为本发明中描述的抑制剂的实施例的RPT835是一种具有独立(self-contained)作用机制的有前景的抗血管生成物质。

[0152] 实施例11(研究结果):本发明中描述的抑制剂和FGFR/VEGFR的酪氨酸激酶的典型抑制剂-布立尼布对内皮细胞的增殖活性的影响的比较。

[0153] 内皮细胞HUVEC锯切于96-孔板中并培养24小时。之后,向细胞中加入以下物质:

[0154] 1) 抑制剂RPT835,或

[0155] 2) 本发明中由式IX描述的抑制剂,或

[0156] 3) 布立尼布-FGFR/VEGFR的多激酶抑制剂,并还向所有细胞中加入浓度为25ng/mL的FGF-2。

[0157] 一般将细胞培养96小时并随后计算。

[0158] 细胞增殖的结果如图14中所示。

[0159] 本发明中描述的抑制剂(RPT835和式IX的抑制剂)对内皮细胞产生显著的抗增殖作用,与布立尼布的FGFR/VEGFR的酪氨酸激酶的典型抑制剂不同。

[0160] 实施例12(研究结果):抑制剂RPT835体外对具有FGFR的各种表达的肿瘤细胞的增殖的影响

[0161] 已经于实施例4、7、9中提供用本发明中描述的抑制剂培养期间对肿瘤细胞增殖活性的抑制作用。

[0162] 本研究使用另外的细胞系:SKOV3(卵巢癌,ATCC#HTB-77),HS578T(乳腺癌,ATCC#HTB-126),T47D(乳腺癌,ATCC#HTB-1336),非小细胞肺癌A549的修饰的细胞系,皮肤Mel Kor的转移性黑色素瘤细胞系(RF专利No.2287578)和抗血管生成活性-细胞系SVEC-4-10(内皮细胞,ATCC#CRL-2181)的另外研究。

[0163] 将细胞在37°C和5%CO<sub>2</sub>下培养于含有10%牛胚胎血清(FCS,HyClone)、2mM谷氨酰胺(PANECO)、抗生素(100IU/mL青霉素和100mg/mL链霉素(全部来自PANECO))的RPMI-1640(PANECO)(SKOV3,HS578T,T47D,Mel-Kor)或DMEM(PANECO)(SVEC-4-10)的环境中。70%~80%单层的细胞用于实验。

[0164] 在含有0.1%FCS血清的环境中,将细胞一式三份地以低密度(30t细胞/mL)接种于

96-孔孔板上。第二天,将所测试的抑制剂RPT835按照所需浓度加入到孔腔中,并在6小时后加入成纤维细胞生长因子(100ng/mL bFGF (BD Bioscience))。环境,抗生素和药物每3天更换一次。在实验开始后7天内通过修改的“Crystal Violet促有丝分裂方法”测定细胞生长。用PBS漂洗细胞,用1%的多聚甲醛在PBS上固定,并用0.5%的结晶紫(Sigma Chemical Co)在乙醇中的溶液染色。将染料溶解于乙醇中,并在分光光度计上540~560nm下测定。细胞增殖活性抑制曲线由细胞数量的百分比(Y轴)对孔板的孔腔中的抑制剂RPT835浓度(X轴)的依赖性进行构建。从存活细胞的百分比变得低于50%开始(IC<sub>50</sub>),在程序GraphPad Prizm 5中计算样品的浓度。实验以每次实验重复三次而重复至少3次。

[0165] 图15显示了化合物RPT835在体外对肿瘤和内皮细胞培养物的抗增殖作用。

[0166] 正如由图中可以看出,抑制剂RPT835在不同程度上抑制了肿瘤和内皮细胞的抗增殖活性。增殖抑制程度取决于FGFR2的表达状态:受体表达得越艰难,抑制剂RPT835越有效。因此,当使用强烈表达FGFR2的SVEC-4-10细胞系时观察到最大抑制效果。在SKOV3和HS578T的具有低FGFR2-表达的细胞中发现了增殖的中度影响。所测试的抑制剂RPT835未阻断几乎不表达FGFR2的转移性黑素瘤Mel Kor和乳癌T47D的细胞系的增殖活性。

[0167] 在用具有显著表达FGFR2(IC<sub>50</sub>=10nM/L)的非小细胞肺癌A549的改性细胞系培养抑制剂RPT835期间实现了最大抑制效果。

[0168] 因此,在体外研究中,抑制剂RPT835已经证明对肿瘤和内皮细胞产生了抗增殖作用,这与FGFR2的表达强度相关。这强调了抑制剂的特异性活性。

[0169] 实施例13(研究结果):取决于使用抑制剂RPT835的FGFR2表达水平的体内肿瘤生长

[0170] 向8周龄的免疫缺陷雌性小鼠(裸鼠)给予具有FGFR2的各种表达的人细胞系的 $2 \times 10^6$ 个肿瘤细胞:

[0171] -强表达FGFR2的三阴性乳癌细胞系SUM52PE(购自Asterand, Inc. (Detroit, MI))

[0172] -弱表达FGFR2的三阴性乳癌细胞系HS578T(购自ATCC (CRL-125))

[0173] -不表达FGFR2的非小细胞肺癌细胞系NCI-H226(购自ATCC (CRL-5826))

[0174] 在肿瘤生长建立(1mm<sup>3</sup>)后,根据肿瘤类型将这些小鼠分为对照组和治疗组。

[0175] 对照组1(N=10):SUM52PE,每天通过胃管给水。

[0176] 治疗组1(N=10):SUM52PE,每天通过胃管以30mg/kg的剂量给予抑制剂RPT835。

[0177] 对照组2(N=10):HS578T,每天通过胃管给水。

[0178] 治疗组2(N=10):HS578T,每天通过胃管以30mg/kg的剂量给予抑制剂RPT835。

[0179] 对照组3(N=10):NCI-H226,每天通过胃管给水。

[0180] 治疗组3(N=10):NCI-H226,每天通过胃管以30mg/kg的剂量给予抑制剂RPT835。

[0181] 每3天测量肿瘤尺寸和动物体重。当肿瘤达到2,000mm<sup>3</sup>的大小或在实验第60天时,将小鼠进行安乐死。

[0182] 在第1组中的肿瘤生长图如图16中所示,肿瘤体积如表3中所示。给予抑制剂RPT835的小鼠据观察具有肿瘤SUM52PE的侵袭性生长显著减慢(P<0.000,从实验的第16天开始)。在第31天时,这些组中的肿瘤的平均尺寸变化超过2倍,而在对照组中等于 $2,712.2 \pm 37\text{mm}^3$ ,在治疗组中为 $1,080.7 \pm 49\text{mm}^3$ 。肿瘤生长减缓达60.2%。根据本研究规则(肿瘤体积>2,000mm<sup>3</sup>),对照组的小鼠进行安乐死。继续观察来自治疗组的小鼠。在该组中发现疾病

稳定(在随后的观察期间内没有肿瘤生长),其被评价为阳性效应(积极影响)。

[0183] 因此,抑制剂RPT835证明了在关于强表达FGFR2的三阴性乳癌SUM52PE的体内实验中的抗肿瘤功能。

[0184] 在第2组中肿瘤生长图如图17中所示。

[0185] 正如在图中所见,抑制剂RPT835也对弱表达FGFR2的三阴性乳癌HS578T的肿瘤生长产生了一定的抑制作用。然而,相比于将抑制剂RPT835用于具有FGFR2的强表达的三阴性乳癌模型中,差异并不显著。因此,到研究的第31天,治疗和对照组2中的肿瘤的平均尺寸为 $703 \pm 89.1 \text{mm}^3$ 和 $1,053 \pm 179.8 \text{mm}^3$ ,相应地到第40天为 $1,104 \pm 162.2 \text{mm}^3$ 和 $1,592 \pm 335 \text{mm}^3$  ( $P=0.01$ )。在第31天和第40天时的肿瘤生长减缓分别为33.2%和30.6%。

[0186] 第3组中的肿瘤生长图示如图18中所示。

[0187] 在实验的第31天时,在不表达FGFR2的非小细胞肺癌NCC-H226的生长方面,对照组和治疗组之间没有发现显著差异:平均肿瘤体积相应地为 $1,114 \pm 280.6 \text{mm}^3$ 和 $1,053 \pm 259.7 \text{mm}^3$  ( $P=0.619$ )。

[0188] 根据体内研究的结果,得出主要结论:1) 抑制剂RPT835提供了明显的抗肿瘤作用;2) 在使用抑制剂RPT835时肿瘤生长减缓程度取决于FGFR2的表达水平。

[0189] 实施例14(体内研究结果):抑制剂RPT835引起一些肿瘤的治疗性病理学形态变化(pathomorphosis)

[0190] 免疫缺陷小鼠(裸鼠,治疗开始时小鼠年龄为8周龄;养殖场“Pushchino”)皮下接种人卵巢癌SKOV-3的FGFR2表达系的细胞。当平均肿瘤体积达到 $200 \text{mm}^3$ 时,将小鼠随机分成对照组(采用紫杉醇和卡铂(caroplatin)的标准化疗法)和治疗组(抑制剂RPT835)。每组10只小鼠。按照每日50mg/kg的剂量分配抑制剂RPT835。每周测量肿瘤体积两次。当肿瘤体积达到 $2,000 \text{mm}^3$ 时,对小鼠进行安乐死。研究肿瘤组织的病理学形态变化。

[0191] 在对照组中并未发现病理学形态变化(图19)。肿瘤组织无变化。

[0192] 当使用抑制剂RPT835时,在治疗组中观察到宏观和微观两者上明显的治疗性病理学形态变化(图20)。在肿瘤中发现了大面积坏死(大面积坏死占超过75%的肿瘤,活肿瘤细胞仅保留在肿瘤的外周)。还观察到仍在活化的组织内的血管的早期损伤。在肿瘤细胞中观察到营养不良。

[0193] 因此,得出的结论是,抑制剂RPT835导致一些肿瘤、特别是卵巢癌的治疗性病变。

[0194] 实施例15(体内研究结果):本发明中描述的抑制剂对于风湿性疾病的效力。

[0195] 胶原诱导的关节炎模型用于本研究中。通过皮内注射结合弗氏佐剂的II型胶原在小鼠中诱导关节炎。将小鼠随机分为每组5只动物的2组:

[0196] -第1组:对照组,通过管道给水40天。

[0197] -第2组:通过管道给予100mg/kg的由本发明中式III描述的抑制剂40天。

[0198] 在第41天时,对小鼠进行安乐死,研究组织。

[0199] 在对照组中发现了滑膜炎、软骨破坏、组织T-和B-淋巴细胞和嗜中性粒细胞的大量关节周围浸润。

[0200] 在治疗组中仅发现单一中性粒细胞的不显著浸润。

[0201] 因此,本发明中描述的抑制剂可以有效用于风湿性疾病和结缔组织疾病。

[0202] 实施例16(体内研究结果):本发明中描述的抑制剂没有产生显著的毒性。

[0203] 在实施例13中描述的体内研究中评价了抑制剂RPT835的毒性。根据标准程序,当使用抑制剂与对照组相比时,评价了所有不良事件以及动物的体重减轻。在本研究中既没有发现体重减轻,也未发现治疗的任何不良副作用。

[0204] 除此之外,在一项独立研究中的以下卷册中研究了抑制剂RPT835的急性毒性:

[0205] -研究了药物的急性毒性。在急性给予14天后的毒性测定的结果、试验动物的观察数据以及尸检数据容许将药物关联于IV类低毒性药物(H.Hodge et al.Clinical Toxicology of Commercial Products.Acute Poisoning.Ed.IV,Baltimore,1975,427p.; K.K.Sidorov,1977)。急性给予后动物的状态证明了药物按照超过最大治疗剂量(约4.3mcg/kg)几十至几百倍的剂量都具有良好的耐受性。中位致死剂量(LD<sub>50</sub>)超过了2,000.0mg/kg。

[0206] -基于宏观和微观的结果,药物在单次给予后对胃肠道的粘膜没有刺激作用。

[0207] -根据诱变作用(染色体畸变)的研究结果,药物没有致突变性。

[0208] -药物并未显示出在免疫复合体、一般过敏反应、肥大细胞的脱粒和结膜试验的反应中发现的任何过敏性质。

[0209] 基于本研究的结果,已经关于使用作为本发明中描述的抑制剂的实施例的抑制剂RPT835的无显著毒性做出结论。

[0210] 表1

[0211] 采用由本发明式VI确定的抑制剂的胃癌细胞Snu16根据细胞内激酶的磷酸化抑制程度的增殖差异

[0212]

| 组别  | 组间对比           |                                    |   |
|---|----------------|------------------------------------|---|
|   | 对照组            | 具有 FRS2 和 Shp2 和/或 Grb2 的磷酸化抑制作用的组 | 具有 FRS2 的磷酸化抑制作用而无对 Shp2 和/或 Grb2 的磷酸化作用的影响的组 |
| 对照组   | -              | 显著增殖, P<0.0001                     | 显著增殖, P<0.0001                                |
| 具有 FRS2 和 Shp2 和/或 Grb2 的磷酸化抑制作用的组            | 抑制作用, P<0.0001 | -                                  | 无差异, P=0.8                                    |
| 具有 FRS2 的磷酸化抑制作用而无对 Shp2 和/或 Grb2 的磷酸化作用的影响的组 | 抑制作用, P<0.0001 | 无差异, P=0.8                         | -   |

[0213] 表2

[0214] 实验中研究抑制剂RPT835(本发明中的式II)的抗血管生成性质的对照组和测试组的描述

[0215]

| 编号 | 组别   | 描述             |
|----|------|----------------|
| 1  | 阴性对照 | 无生长因子的Matrigel |

|   |           |                      |
|---|-----------|----------------------|
| 2 | 阳性对照1     | Matrigel+bFGF        |
| 3 | 阳性对照2     | Matrigel+VEGF        |
| 4 | 贝伐单抗1     | Matrigel+bFGF+贝伐单抗   |
| 5 | 贝伐单抗2     | Matrigel+VEGF+贝伐单抗   |
| 6 | 抑制剂RPT835 | Matrigel+bFGF+RPT835 |

[0216] 表3

[0217] 体内使用抑制剂RPT835(本发明中的式II)的三阴性乳癌SUM52PE的对照组和治疗组1中的肿瘤尺寸(中位值,mm<sup>3</sup>)

| 天  | 对照<br>(媒介物) | 抑制剂<br>RPT835 | 差异显著<br>性, <i>P</i> |
|----|-------------|---------------|---------------------|
| 7  | 48.0        | 48.0          | 0.775               |
| 10 | 112.0       | 112.0         | 0.316               |
| 13 | 218.5       | 181.0         | 0.032               |
| 16 | 375.0       | 256.0         | <0.0001             |
| 19 | 900.0       | 417.0         | <0.0001             |
| 22 | 1261.0      | 591.0         | <0.0001             |
| 25 | 1609.5      | 831.5         | <0.0001             |
| 28 | 1875.0      | 958.5         | <0.0001             |
| 31 | 2727.0      | 1088.0        | <0.0001             |
| 34 | -           | 1134          | -                   |
| 37 | -           | 1174          | -                   |
| 40 | -           | 1208          | 0.167*              |

[0219] \*34和40天之间的对比。

FGF-2 刺激胃癌细胞 KATO III 中的信号通路，经由 FGFR 2 实施

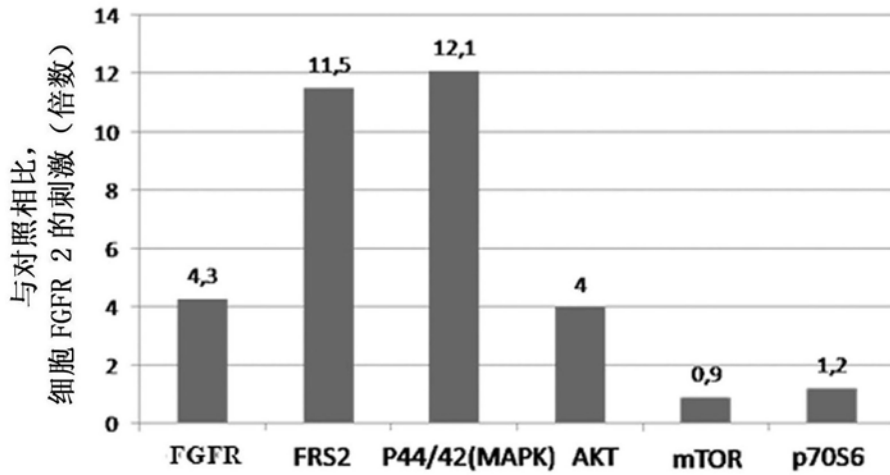


图1

抑制剂 RPT835 (本发明中的式 II) 导致 FRS2 的磷酸化作用显著降低

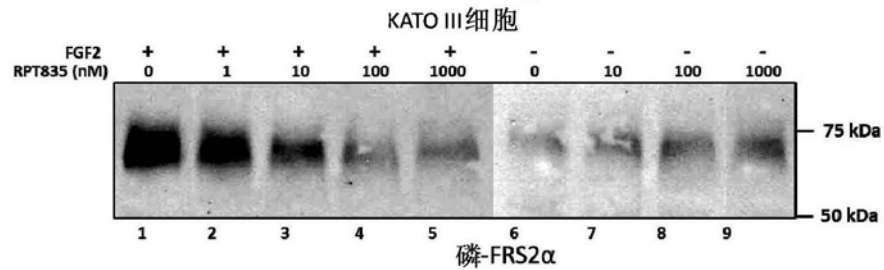


图2

抑制剂 RPT835 (本发明中的式 II) 并未表现出对具有和不具有 FGF-2 刺激的普通 FGFR 的磷酸化作用的影响

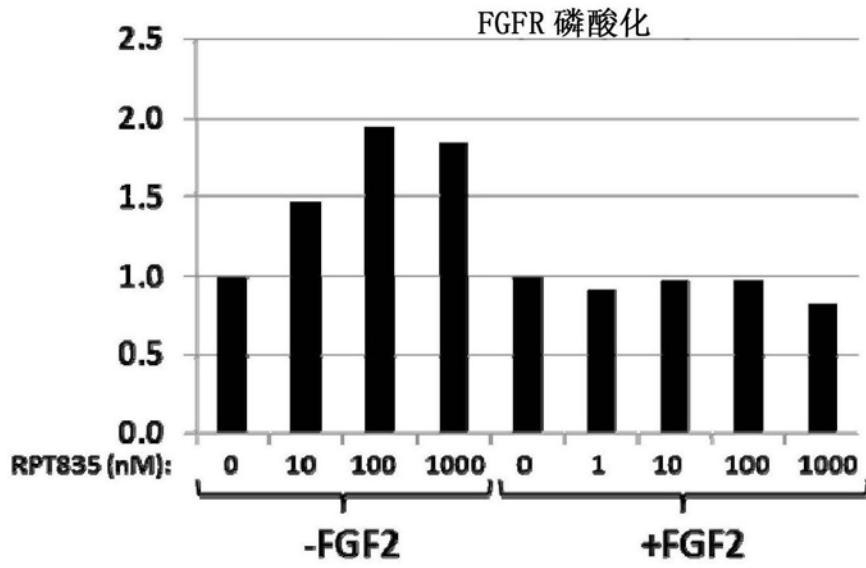


图3

抑制剂 RPT835 (本发明中的式 II) 并未抑制 FGFR2 的酪氨酸激酶活性

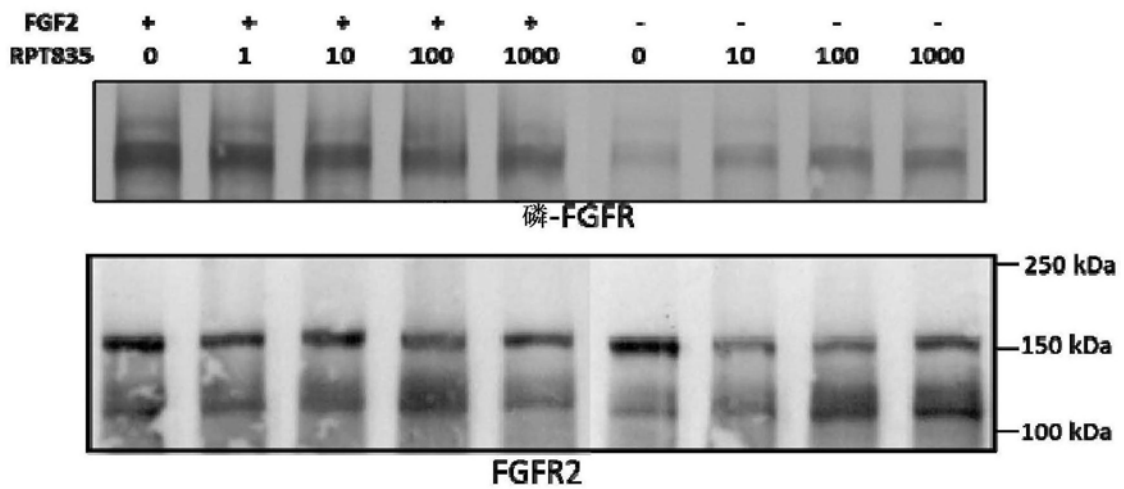
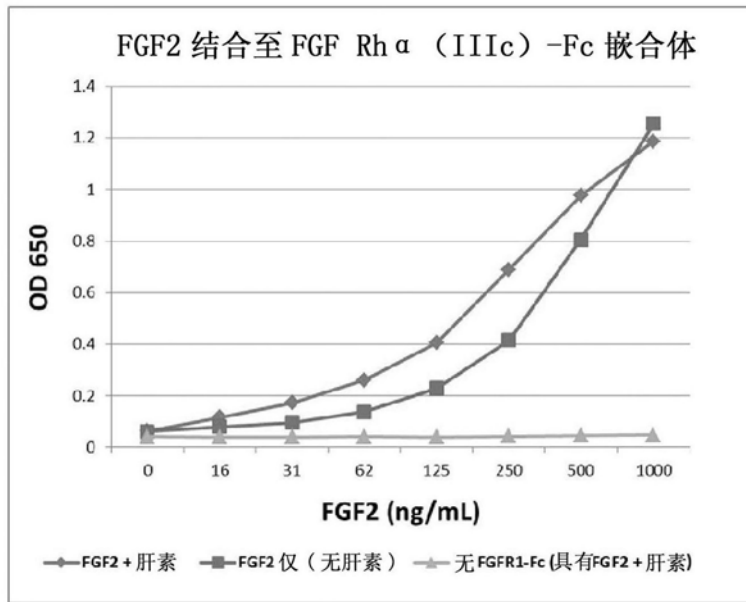


图4

在肝素存在或不存在下，FGF-2 与 FGFR2-Fc 的结合



抑制剂 RPT835 (本发明中的式 II) 并未影响 FGF-2 与 FGFR2-Fc 或抗 FGF-2 抗体的结合

图5

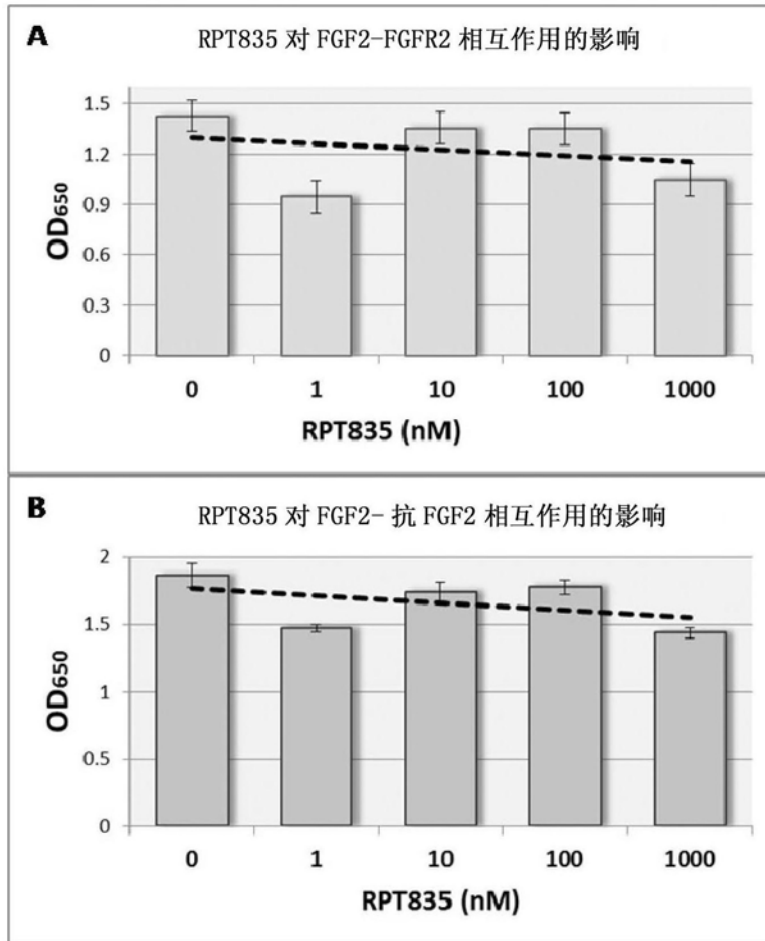


图6

抑制剂 RPT835 (本发明中的式 II) 并未对胞内激酶如 p44/42 (MAPK)、Akt、mTOR、p70S6 的磷酸化作用产生影响

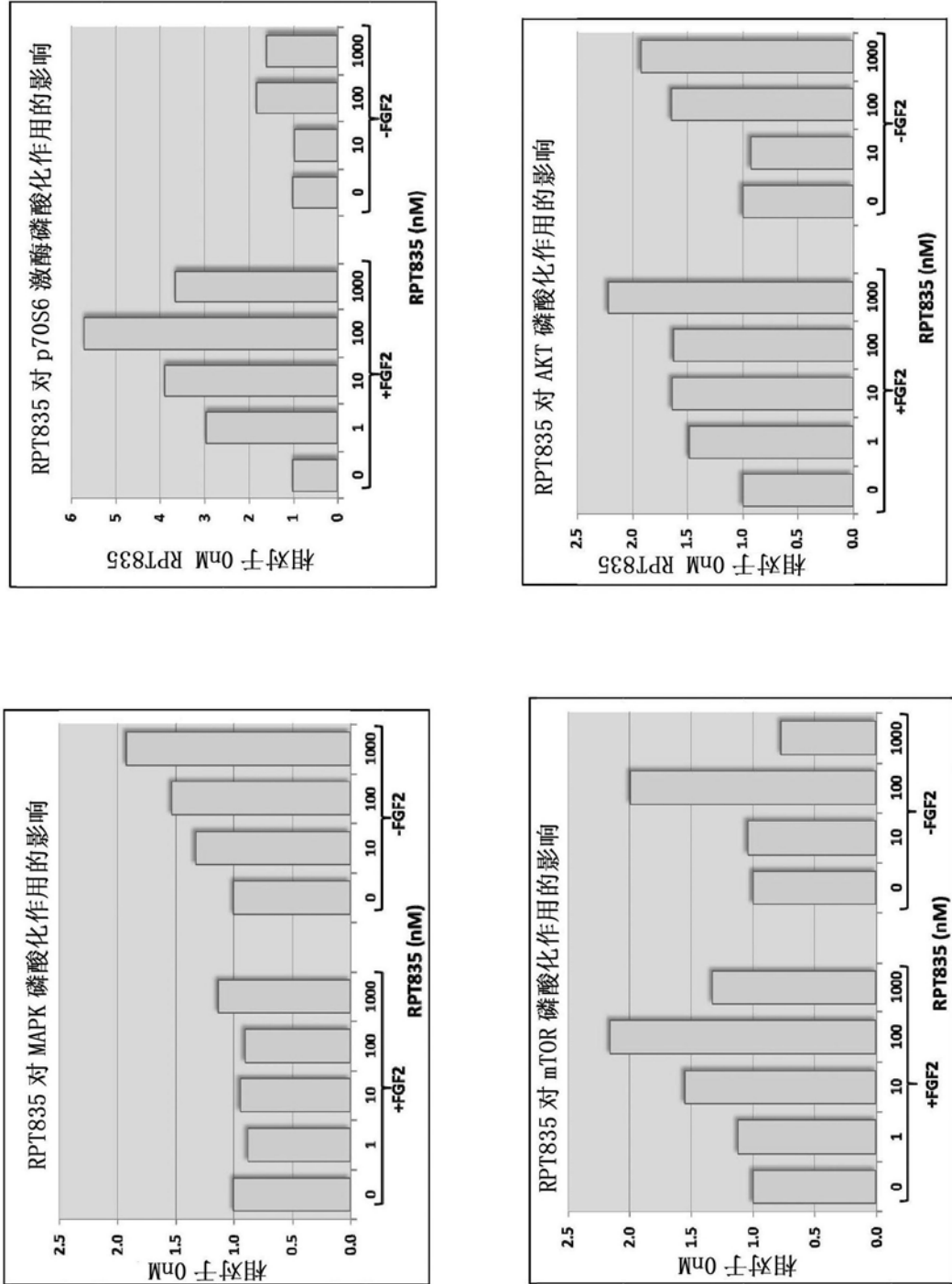


图7

使用各种浓度的由式 VIII 描述的抑制剂的 FGFR1 的磷酸化

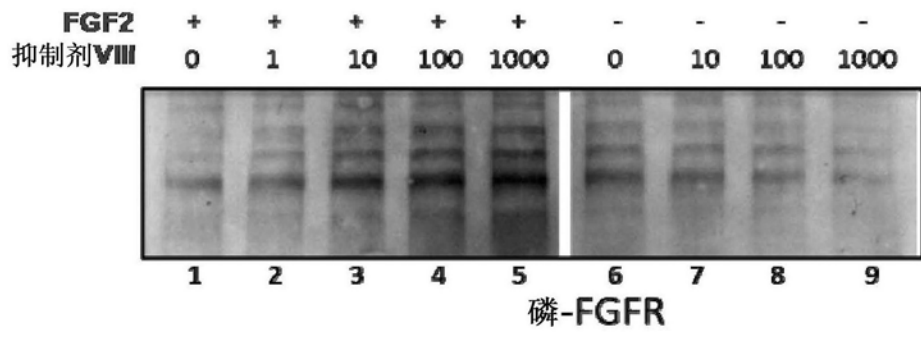
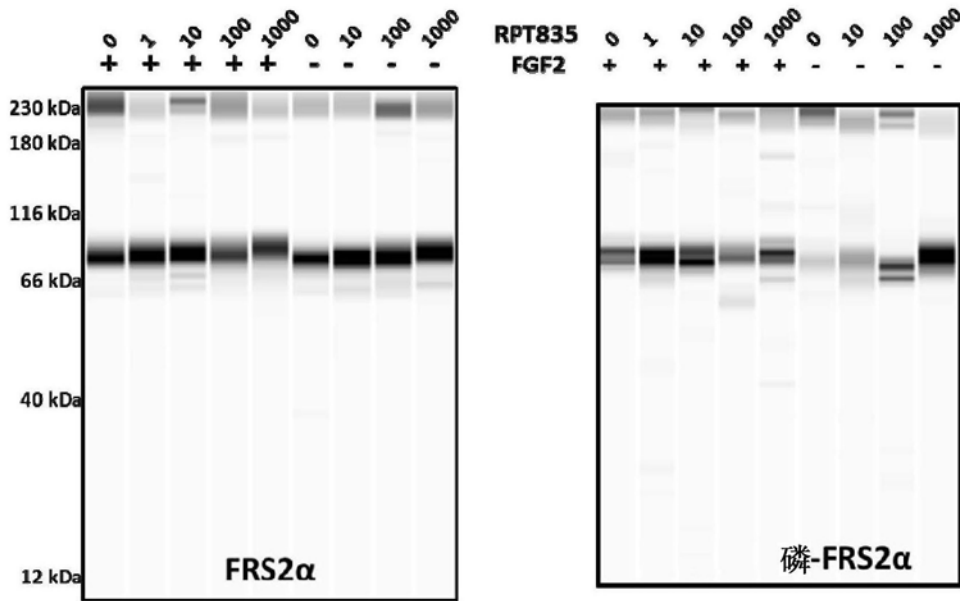


图8

抑制剂 RPT835 (本发明中的式 II) 并未影响 FRS2  $\alpha$  (A)、普通 FGFR1, 胞内激酶 (B) 的磷酸化作用, 二者均有和没有 FGF-2 刺激

A



B

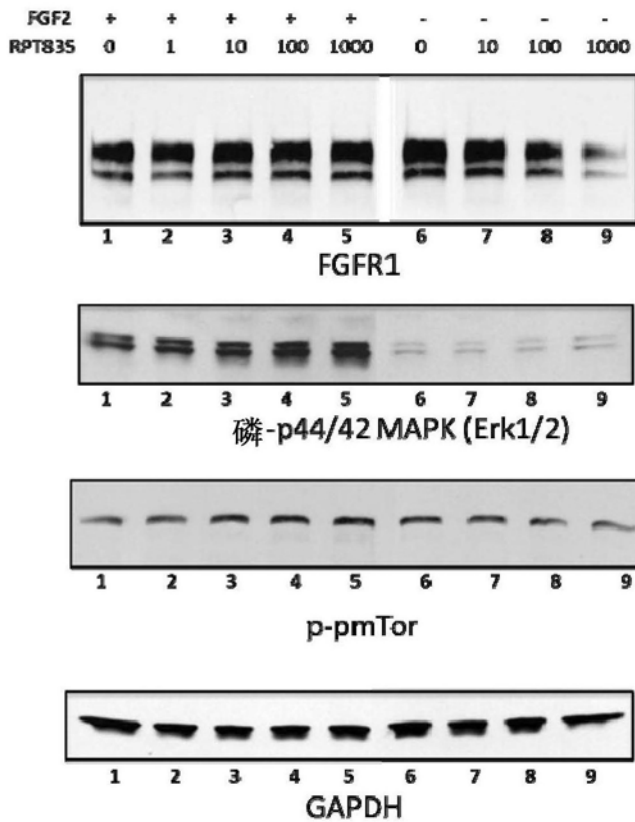


图9

表达 FGFR2 III b 和 IIIc 的细胞在用抑制剂 RPT835 (本发明中的式 II) 培养期间的增殖

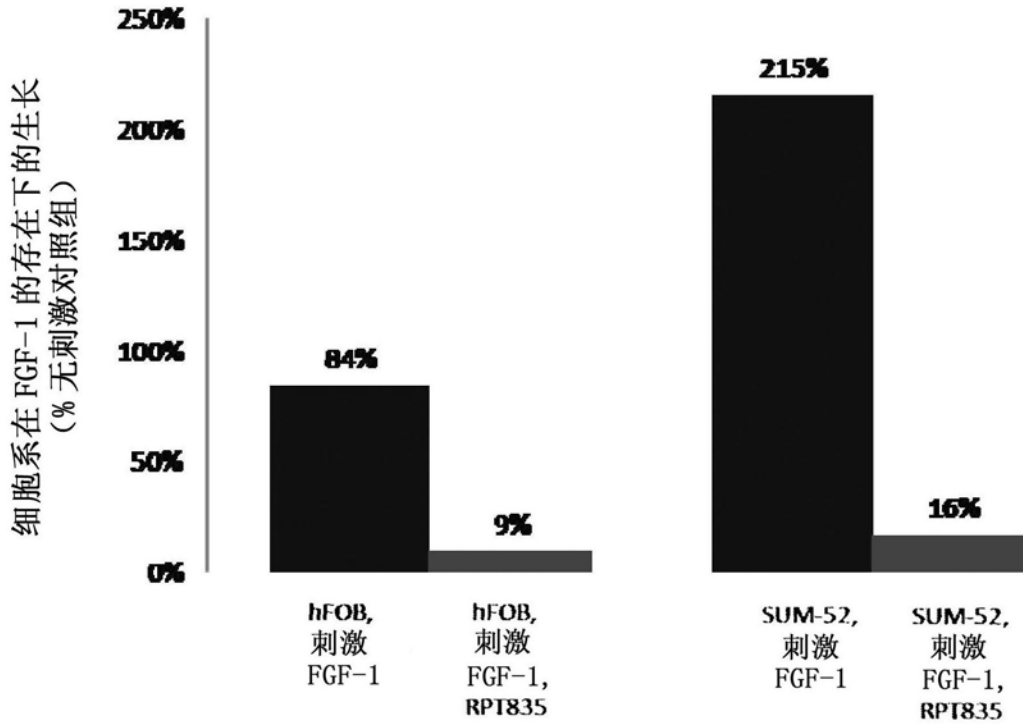


图10

抑制剂 RPT835 (本发明中的式 II) 导致表达 FGFR2 IIIb 或 FGFR2 IIIc 的细胞系中 FRS2  $\alpha$  的磷酸化作用显著降低 (通过蛋白免疫印迹法评价)

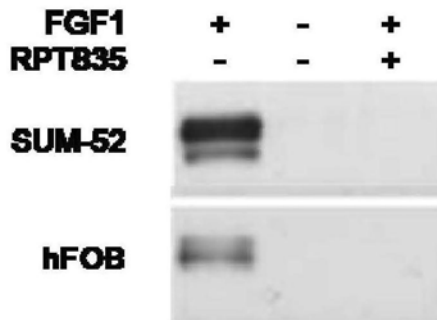


图11

贝伐单抗 (10 mg/kg) 和抑制剂 RPT835 (本发明中的式 II) (15 mg/kg) 对 Matrigel 植入物的血管生成活性的影响。各个对照组和测试组的截止 Matrigel 植入物的显微照片。用苏木精和伊红染色。放大 200。

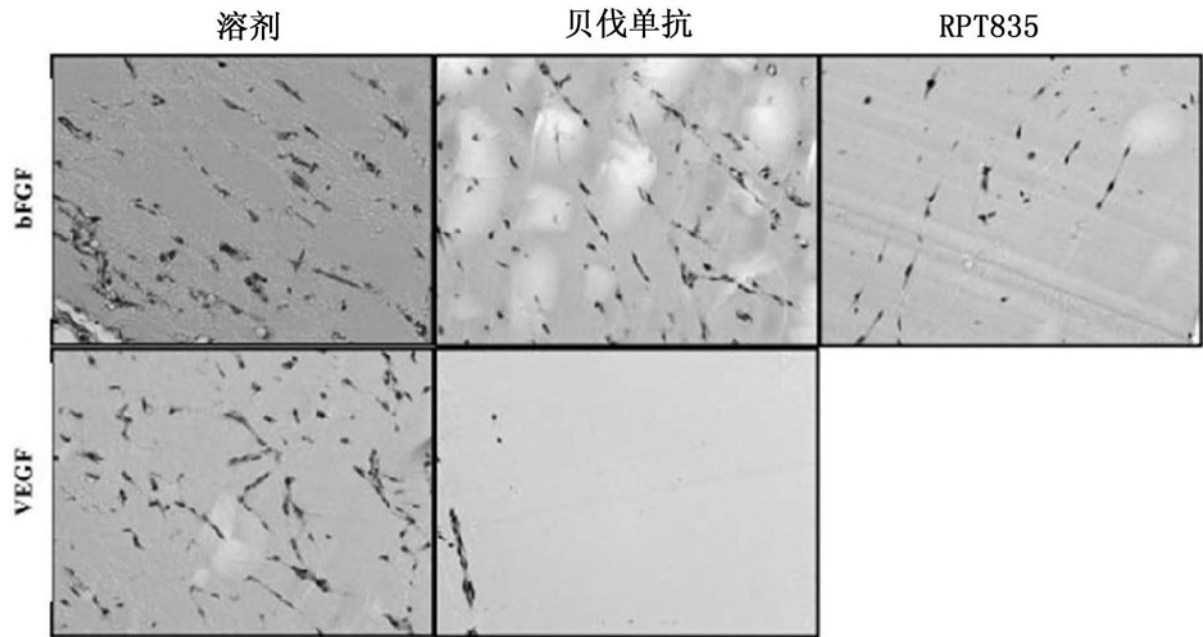


图12

贝伐单抗 (10 mg/kg) 和抑制剂 RPT835 (本发明中的式 II) (15 mg/kg) 对 Matrigel 植入物的血管生成活性的影响: 移植细胞的数量 (A), 管状结构的数量 (B) 和功能性微血管的数量 (C). \* -  $p < 0,001$ ; \*\* -  $p = 0,016$ .

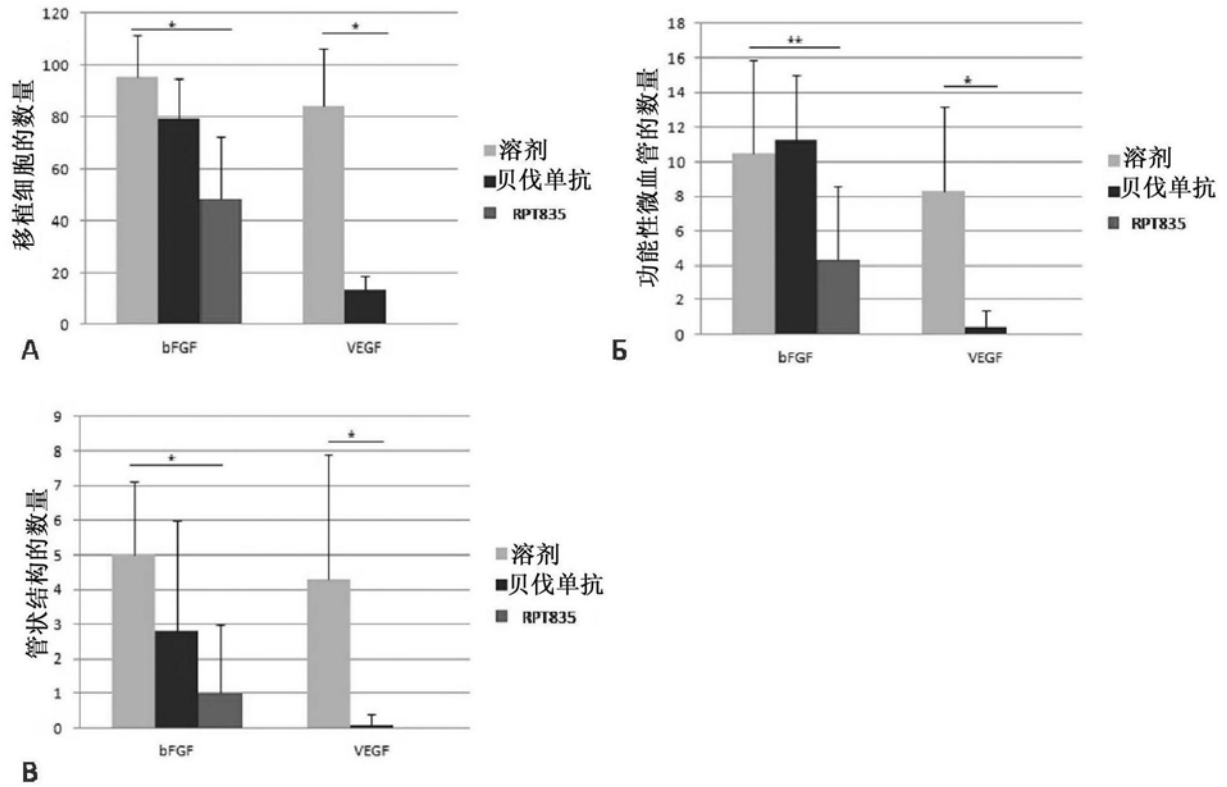
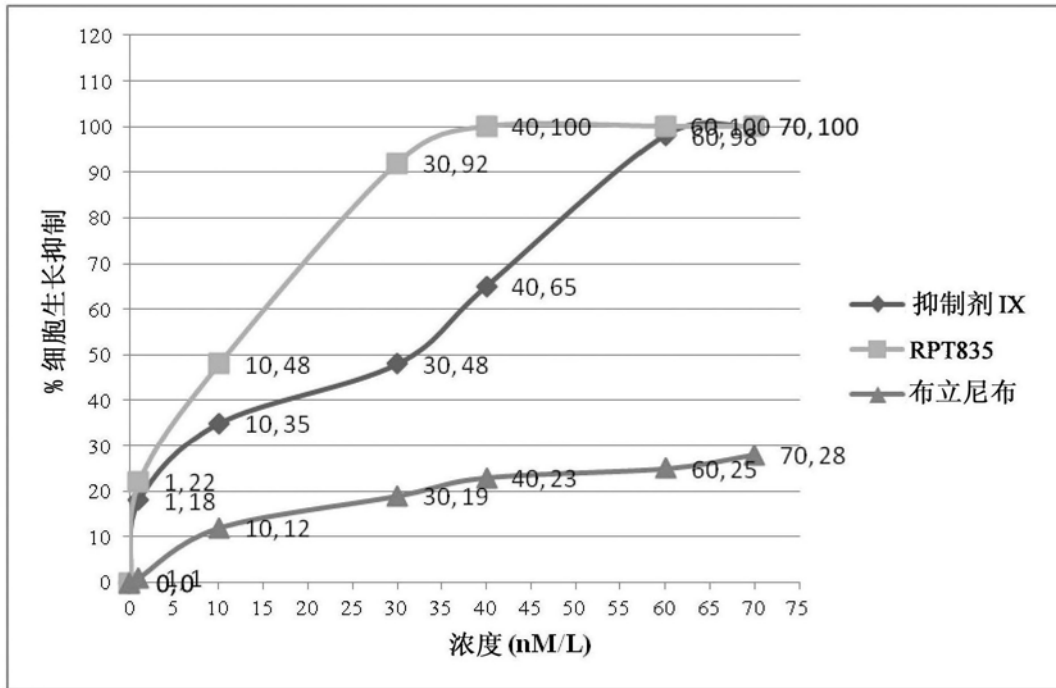


图13

相比于酪氨酸激酶典型抑制剂—布立尼布，其中添加本发明中的抑制剂的  
内皮细胞 HUVEC 的增殖抑制作用



| 细胞系   | FGFR2 状态 | 细胞生长抑制作用<br>IC50, nmol/L |        |      |
|-------|----------|--------------------------|--------|------|
|       |          | 抑制剂 IX                   | RPT835 | 布立尼布 |
| HUVEC | 放大       | 32                       | 11     | 289  |

图14

用抑制剂 RPT835 (本发明中的式 II) 体外抑制肿瘤和内皮细胞的增殖活性

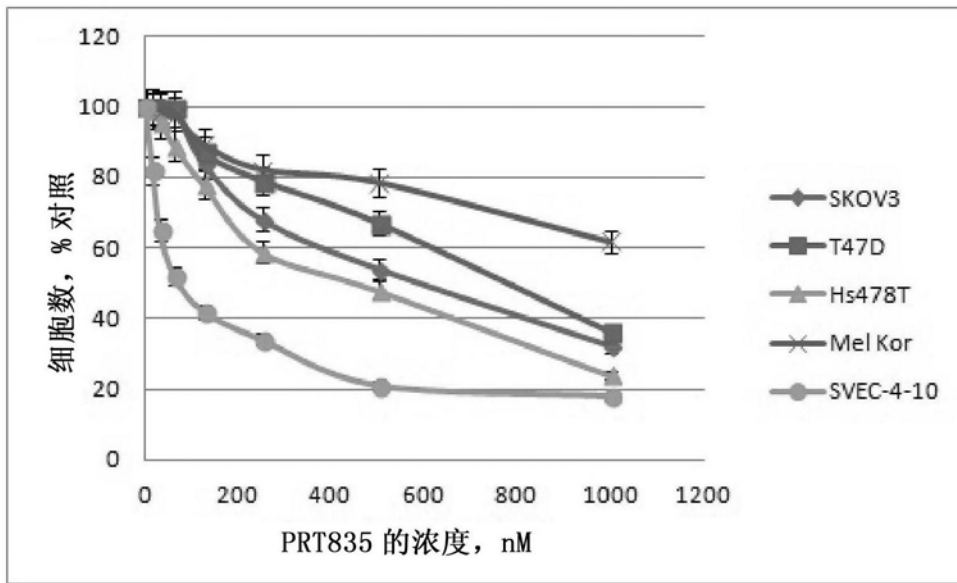


图15

使用抑制剂 RPT835 (本发明中的式 II) 体外抑制三阴性乳癌 SUM52PE 的肿瘤生长

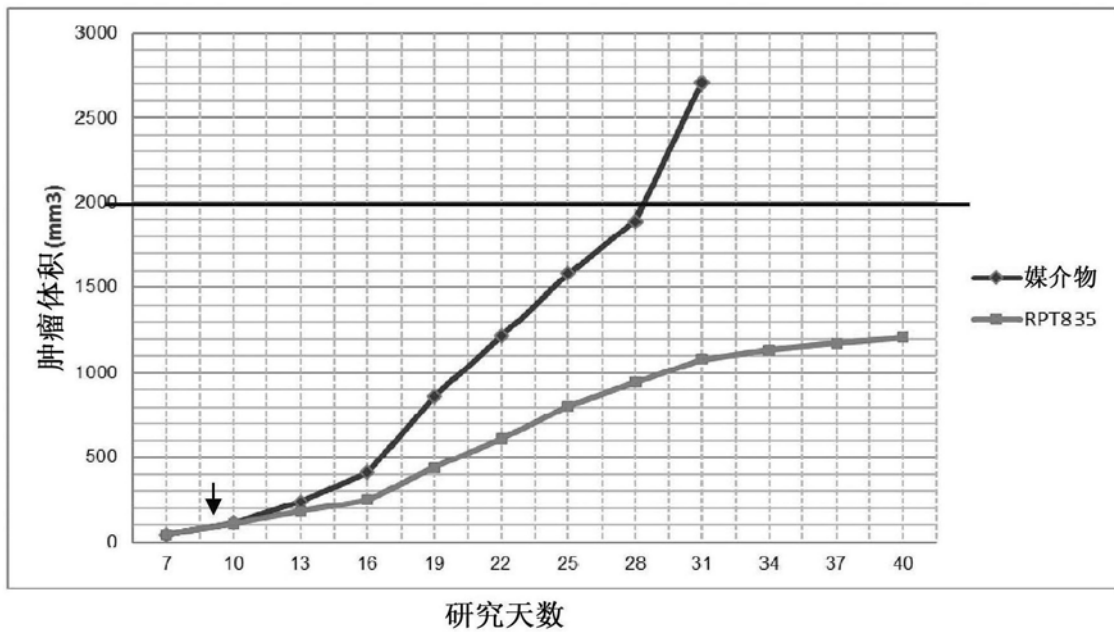
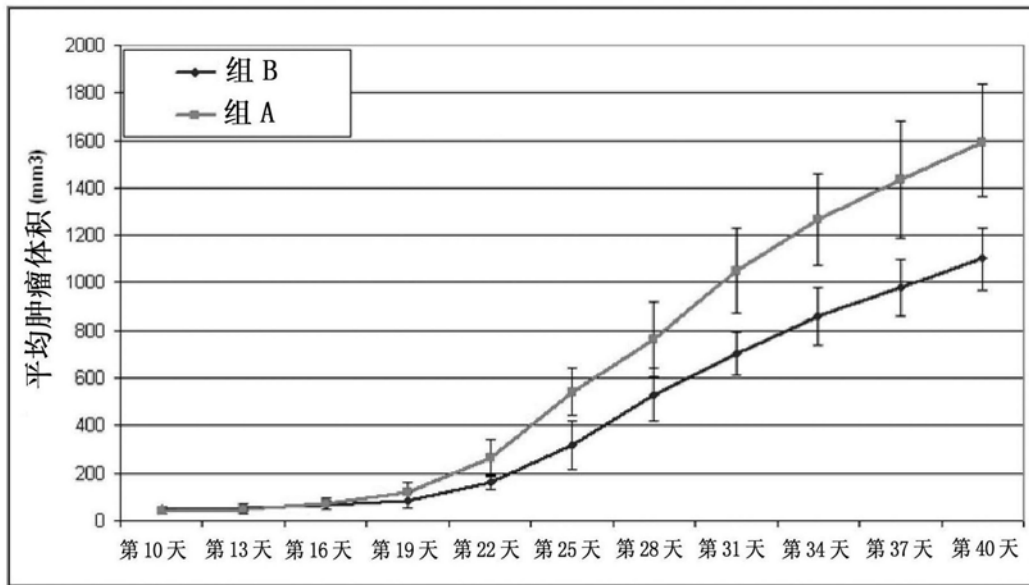


图16

使用抑制剂 RPT835 (本发明中的式 II) 的  
体内三阴性乳癌 HS578T 肿瘤生长抑制作用



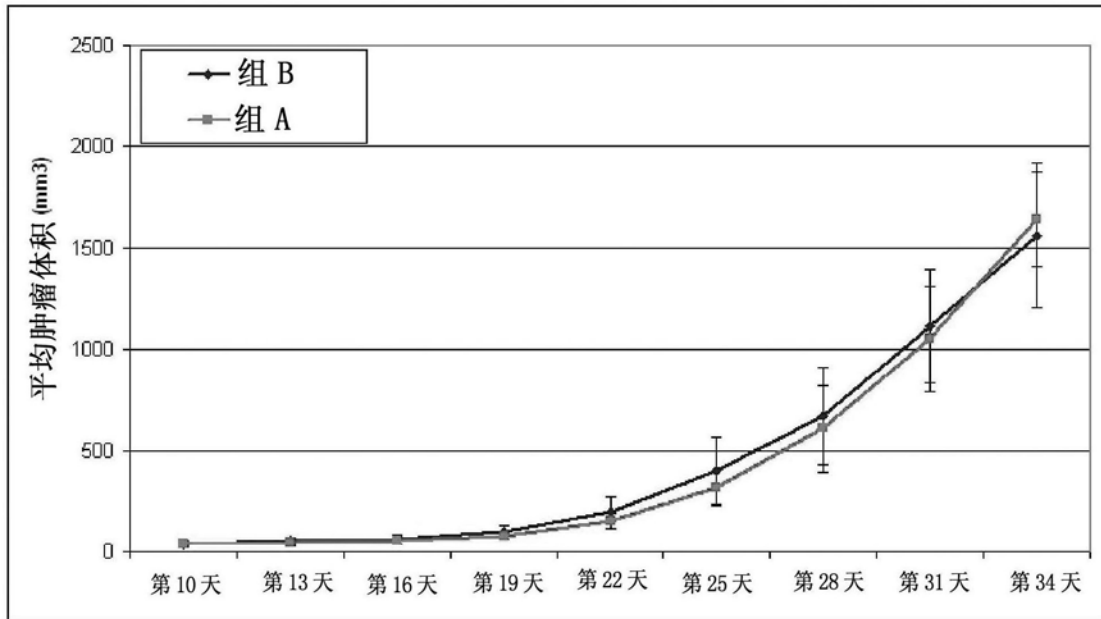
标识:

组 A - 对照组 2

组 B - 治疗组 2

图17

在不表达 FGFR2 的非小细胞肺癌 NCI-H226 的模型中，  
抑制剂 RPT835（本发明中式 II）的体内抗肿瘤活性



标识:

组 A - 对照组 3

组 B - 治疗组 3

图18

对照组（标准化疗法）中卵巢肿瘤  
SKOV-3 的组织中无病理学形态变化

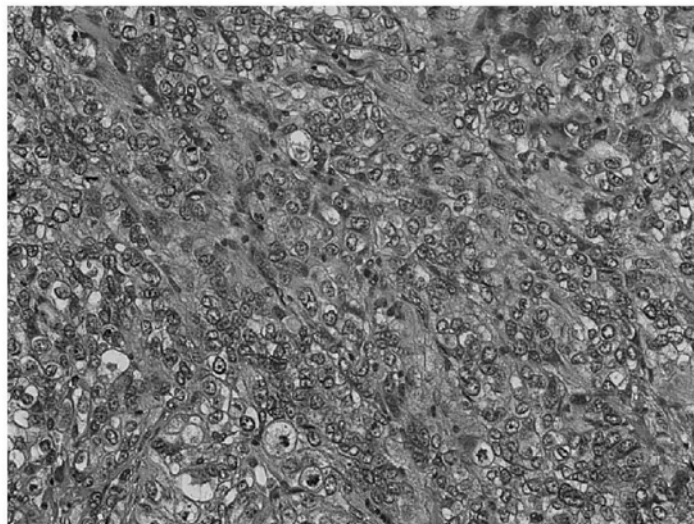


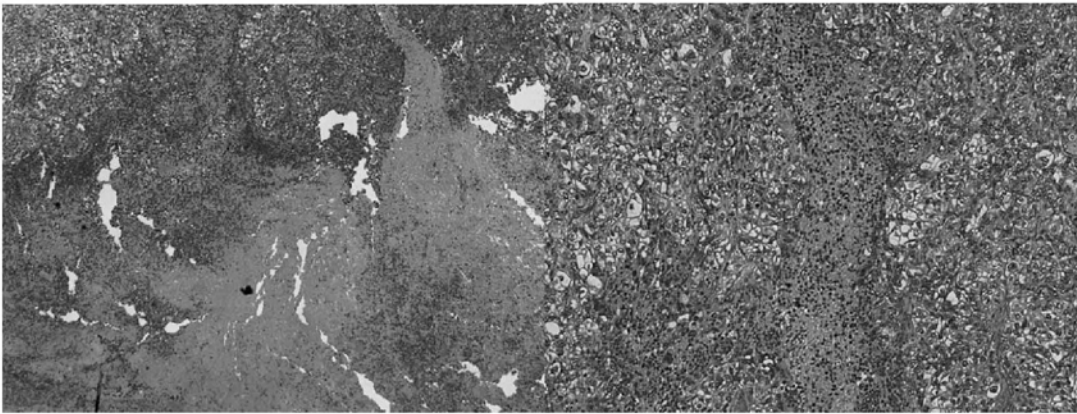
图19

在抑制剂 RPT835（本发明中的式 II）的治疗组中卵巢肿瘤 SKOV-3 的组织中的显著治疗性病变

**A**  
实验动物的肿瘤坏死性变化（肉眼可见）



**B**  
肿瘤的组织中的大面积坏死  
(大面积坏死占超过 75% 的肿瘤，活肿瘤细胞仅保留在肿瘤的外周)



**C**  
仍然存活的组织内的血管损伤。在肿瘤细胞中观察到营养不良

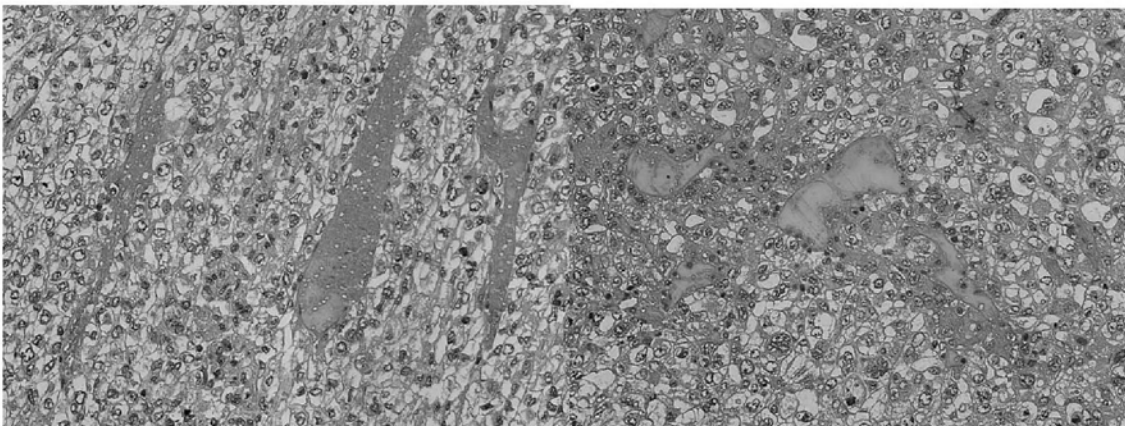


图20