

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580033834.1

[51] Int. Cl.

A61K 31/506 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

[43] 公开日 2007年9月12日

[11] 公开号 CN 101035535A

[22] 申请日 2005.10.17

[21] 申请号 200580033834.1

[30] 优先权

[32] 2004.10.18 [33] US [31] 60/619,744

[86] 国际申请 PCT/AU2005/001602 2005.10.17

[87] 国际公布 WO2006/042362 英 2006.4.27

[85] 进入国家阶段日期 2007.4.4

[71] 申请人 梅特维特科学私人有限公司

地址 澳大利亚南澳大利亚

[72] 发明人 A·L·迪尤尔 T·P·休斯

A·B·里昂

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 林柏楠

权利要求书 1 页 说明书 14 页

[54] 发明名称

4 - ( 4 - 甲基哌嗪 - 1 - 基甲基 ) - N -  
[ 4 - 甲基 - 3 - ( 4 - ( 吡啶 - 3 - 基 )  
嘧啶 - 2 - 基氨基 ) 苯基 ] - 苯甲酰胺用于  
抑制酪氨酸激酶受体 c - f m s 的用途

[57] 摘要

本发明涉及 4 - ( 4 - 甲基哌嗪 - 1 - 基甲基 ) -  
N - [ 4 - 甲基 - 3 - ( 4 - ( 吡啶 - 3 - 基 ) 嘧啶 - 2 -  
基氨基 ) 苯基 ] - 苯甲酰胺 ( 也称作伊马替尼 ( ima-  
tinib )、格利维克 ( gleevec )、格列卫 ( glivec )、  
cgp57148b 或 8TI571 ) 或其可药用盐用于制造治疗 c  
- fms 相关疾病的药物中的用途, 所述的 c - fms 相  
关疾病包括绒毛膜癌、恶性组织细胞病、胚胎性  
癌、子宫内膜癌、脑小神经胶质瘤、结节病、累及  
小神经胶质细胞的标准和变异的克 - 雅病或肌萎缩  
性侧索硬化。

1. 4-(4-甲基哌嗪-1-基甲基)-N-[4-甲基-3-(4-(吡啶-3-基)嘧啶-2-基氨基)苯基]-苯甲酰胺(化合物 I)的用途,其用于制造治疗 c-fms 相关疾病的药物。

2. 根据权利要求 1 所述的用途,其中 c-fms 相关性疾病选自绒毛膜癌、恶性组织细胞病、胚胎性癌、子宫内膜癌、脑小神经胶质瘤、结节病、累及小神经胶质细胞的标准和变异的克-雅病或肌萎缩性侧索硬化。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的用途,其中化合物 I 是单甲磺酸盐形式。

4. 商业包装,包含化合物 I 或其可药用盐以及根据权利要求 1 或 2 的使用说明书。

5. 治疗患有或可能患有选自绒毛膜癌、恶性组织细胞病、胚胎性癌、子宫内膜癌、脑小神经胶质瘤、结节病、累及小神经胶质细胞的标准和变异的克-雅病或肌萎缩性侧索硬化的 c-fms 相关性疾病的温血动物、优选人患者的方法,其包括向所述动物施用有效量的式 I 化合物。

#### 4-(4-甲基哌嗪-1-基甲基)-N-[4-甲基-3-(4-(吡啶-3-基)嘧啶-2-基氨基)苯基]- 苯甲酰胺用于抑制酪氨酸激酶受体 c-fms 的用途

本发明涉及 4-(4-甲基哌嗪-1-基甲基)-N-[4-甲基-3-(4-(吡啶-3-基)嘧啶-2-基氨基)苯基]-苯甲酰胺(化合物 I)或其可药用盐用于制造治疗 c-fms 相关疾病的药物的用途。

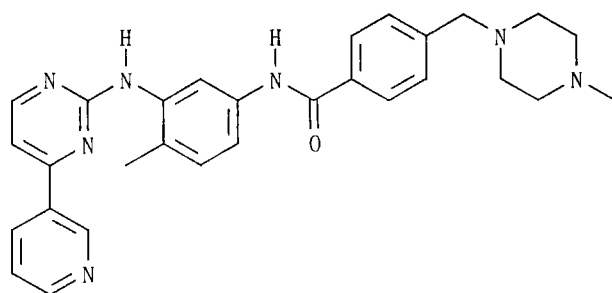
起初作为单核吞噬细胞谱系生长因子描述的巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF 或 CSF-1)还参与免疫和炎症反应、骨代谢和妊娠。M-CSF 的生物学活性通过酪氨酸激酶受体 c-fms 介导。c-fms 是配体诱导的蛋白质酪氨酸激酶并且属于受体亚家族 III。c-fms 原癌基因编码巨噬细胞集落刺激因子-1 (CSF-1)的唯一已知的受体。其由将细胞外部分(即包含 5 个免疫球蛋白重复的配体结合结构域)与细胞内的酪氨酸激酶结构域(由两个部分构成,该两个部分的两侧为非催化插入序列(激酶插入序列))分开的单一跨膜结构域组成。M-CSF 或 CSF-1/酪氨酸激酶受体 c-fms 对在单核细胞与巨噬细胞分化、胚胎发生植入、胎盘发育以及人乳房的催乳分化中具有基本生理功能。人 c-fms 原癌基因的 mRNA 为可从 ENTREZ [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) 获得的 X03663 并参见 Coussens L 等人, Nature 1986, 320(6059) 277-280。

在上皮来源的原发肿瘤中检测到了 M-CSF 和 c-fms 的 mRNA 和蛋白质的异常过表达。酪氨酸激酶受体 c-fms 的异常高表达与包括乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌和子宫内膜癌在内的多种恶性肿瘤的侵袭行为相关。

4-(4-甲基哌嗪-1-基甲基)-N-[4-甲基-3-(4-(吡啶-3-基)嘧啶-2-基氨基)苯基]-苯甲酰胺(在下文称作化合物 I)是在治疗慢性粒细胞白血病(缩写为 CML)和胃肠道间质瘤(缩写为 GIST)具有较高功效的蛋白质激酶抑制剂。化合物 I 靶向 CML 特异性酪氨酸激酶 bcr-abl, 但是它还是血小板来源生

长因子受体(PDGF-R)、干细胞因子(c-kit)、c-abl 和 abl 相关基因(ARG)的有效抑制剂。据报道,与酪氨酸激酶受体 c-kit 和 PDGFR $\beta$  相比, M-CSF 受体 c-fms 的磷酸化不受化合物 I 的影响。至今从未描述过化合物 I 可以用于抑制 c-fms 或者用于制造治疗 c-fms 相关疾病的药物。

化合物 I 是具有下式的 4-(4-甲基哌嗪-1-基甲基)-N-[4-甲基-3-(4-(吡啶-3-基)嘧啶-2-基氨基)苯基]-苯甲酰胺



4-(4-甲基哌嗪-1-基甲基)-N-[4-甲基-3-(4-(吡啶-3-基)嘧啶-2-基氨基)苯基]-苯甲酰胺的制备描述于 EP-A-0 564 409 中。

化合物 I 的可药用盐是可药用酸加成盐,例如与无机酸如盐酸、硫酸或磷酸形成的盐,或者与适宜有机羧酸或磺酸,例如脂肪族单羧酸或脂肪族二羧酸如三氟乙酸、乙酸、丙酸、乙醇酸、琥珀酸、马来酸、反丁烯二酸、羟基马来酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸或草酸,或者氨基酸如精氨酸或赖氨酸,芳香羧酸如苯甲酸、2-苯氧基-苯甲酸、2-乙酰氧基-苯甲酸、水杨酸、4-氨基水杨酸,芳香-脂肪族羧酸如扁桃酸或肉桂酸,芳杂环羧酸如烟酸或异烟酸,脂肪族磺酸如甲磺酸、乙磺酸或 2-羟基乙磺酸,或者芳香磺酸如苯磺酸、对甲苯磺酸或萘-2-磺酸形成的盐。

化合物 I 的单甲磺酸加成盐(在下文称作“盐 I”)和其晶体形式例如  $\alpha$  晶体形式和  $\beta$  晶体形式描述于例如在 1999 年 1 月 28 日公布的 PCT 专利申请 WO99/03854 以及欧洲专利号 998 473 中。

所有的 WO (数字)文献意思是指相应的 PCT 专利申请的 WIPO 公布。

现在令人惊奇地发现,化合物 I 或其可药用盐如盐 I 能够抑制属于受体亚家族 III 且参与 M-CSF 依赖性细胞系增殖的酪氨酸激酶受体 c-fms。

本发明涉及化合物 I 或其可药用盐如盐 I 用于制备治疗 c-fms 相关疾病(如 c-fms 相关的肿瘤性疾病和 c-fms 相关的非肿瘤性疾病)的药物的用途。

本发明涉及化合物 I 或其可药用盐如盐 I 用于制备治疗 c-fms 相关性癌症,例如 c-fms 相关性卵巢癌如 c-fms 相关性卵巢浆液性癌或 c-fms 相关性晚期卵巢上皮癌的药物用途。

本发明涉及化合物 I 或其可药用盐如盐 I 用于制备治疗 c-fms 相关性乳腺癌的药物用途。

本发明涉及化合物 I 或其可药用盐如盐 I 用于制备治疗 c-fms 相关性骨代谢疾病的药物用途。

本发明涉及化合物 I 或其可药用盐如盐 I 用于制备预防和/或治疗 c-fms 相关性转移癌,例如 c-fms 相关性骨转移癌如 c-fms 相关性乳腺癌骨转移癌的药物用途。

本发明涉及化合物 I 或其可药用盐如盐 I 用于制备治疗 c-fms 相关性炎症疾病如 c-fms 相关性类风湿性关节炎的药物用途。

c-fms 相关性疾病意思是指其中有 c-fms 参与的疾病,特别是与未患 c-fms 相关性疾病的患者相比 c-fms 蛋白质或 mRNA 或两者过表达的疾病。本定义还包括这些情况,即 c-fms 受体的配体水平过表达的情况和 c-fms 受体组成型活性的情况。

c-fms 相关性肿瘤疾病意思是指 c-fms 所参与的下列疾病:绒毛膜癌、肝细胞癌、乳腺癌、恶性组织细胞病、急性粒细胞白血病、胚胎性癌、膀胱癌、肾癌、前列腺癌、胃癌、子宫内膜癌、脑小神经胶质瘤、黑素瘤和转移癌。

c-fms 相关性非肿瘤性疾病意思是指类风湿性关节炎、结节病、累及小神经胶质细胞的标准和变异的克-雅病、多发性硬化、阿尔茨海默病、肌萎缩性侧索硬化和动脉粥样硬化。

本发明的一个实施方案涉及化合物 I 或其可药用盐用于制造治疗 c-fms 相关性疾病的药物的用途,所述疾病选自绒毛膜癌、恶性组织细胞病、胚

胎性癌、子宫内膜癌、脑小神经胶质瘤、结节病、累及小神经胶质细胞的标准和变异的克-雅病或肌萎缩性侧索硬化。

根据本发明的一个实施方案，向患者施用化合物 I 或其可药用盐如盐 I。剂量表示为所施用的化合物 I 游离碱的剂量，例如对于 100 mg 的剂量而言，施用 119.5 mg 的盐 I 相当于 100 mg 的化合物 I 游离碱。例如，400 mg 剂量的化合物 I 应理解为施用了相当于 400 mg 化合物 I 游离碱的 478 mg 的盐 I。

取决于物种、年龄、个体状况、施用方式以及临床表现，向大约 70 kg 体重的温血动物施用有效量的化合物 I，例如大约 100-1000 mg，如 200-800 mg，如 200-600 mg，如 400 mg 日剂量的化合物 I。对于患有 c-fms 介导或 c-fms 相关性疾病的成年患者，推荐起始日剂量为 200-400 mg 的化合物 I。对于在用日剂量为 400 mg 化合物 I 治疗后对治疗没有足够反应的患者，可以考虑安全地增加剂量，并且对患者进行治疗直到患者从治疗中受益并且没有出现限制性毒性。例如，以这种方式本领域的技术人员可以确定待施用于患者的化合物 I 或其可药用盐的有效量。

根据本发明，将化合物 I 甲磺酸盐(盐 I)例如  $\alpha$  晶体形式、 $\beta$  晶体形式或其混合物形式的化合物 I 甲磺酸盐向需要治疗 c-fms 相关性疾病的患者施用。

**实施例 1: 化合物 I 或其可药用盐在临床相关浓度抑制巨噬细胞集落刺激因子受体 c-fms 的酪氨酸激酶**

## 材料和方法

### 骨髓单核细胞(BMMNC)的分离

在知情同意后，从健康志愿者的后路髂棘处抽取正常骨髓(BM)。通过在 Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, 1.077 g/dL; Nycomed Pharma) 上于 400g 离心 30 分钟收集低密度骨髓单核细胞。

### CD34<sup>+</sup>细胞的分离

使用 MACS<sup>®</sup> CD34<sup>+</sup> 祖细胞选择性分离试剂盒(Miltenyi Biotech)并按照产品说明书从 BMMNC 分离 CD34<sup>+</sup> 祖细胞(纯度>90%)。

### 造血集落分析

使用 Johnson G.R. 1980. J Cell Physiol 103:371-383 的修改方法在半固体琼脂上分析 BMMNC 或 CD34<sup>+</sup>细胞的集落形成。简言之,在每个 35mm 细胞培养皿(Falcon)中接种  $5.0 \times 10^4$  个 BMMNC 细胞或  $7.5 \times 10^3$  个 CD34<sup>+</sup> 细胞,细胞在补充有 0.33%琼脂(Bacto<sup>™</sup> Agar, Difco)、25% FCS 和 2mM L-谷氨酰胺的 1.0mL IMDM (JRH Biosciences)中培养。通过加入 4 种生长因子((4HGF), IL-3、IL-6、G-CSF、GM-CSF, 每一种终浓度为 10 ng/mL)(Peprotech)、5 种生长因子((5HGF), IL-3、IL-6、G-CSF、GM-CSF、干细胞因子(SCF), 每一种终浓度为 10 ng/mL)(Peprotech)、M-CSF(25 ng/mL)或 GM-CSF (10 ng/mL) (Peprotech)刺激集落生长。向集落培养物中还加入化合物 I (0.3  $\mu$ M 至 30  $\mu$ M)、抗 c-fms 抗体(2-4A5, Santa Cruz Biotechnology Inc) (1  $\mu$ g/mL)或者抗 c-kit 抗体(Sigma) (1  $\mu$ g/mL)。将培养物在潮湿的箱中于 37°C + 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 2 周,之后用 3%戊二醛固定。将固定的培养物依次对醋酸萘酚酯酶(如 Lojda, Z.等人, 1979. Enzyme histochemistry: a laboratory manual, Springer-Verlag, Berlin 所述)和氯醋酸酯酶(见例如 Kubota K.等人, 1980, Exp. Hematol. 8:339-44)染色,然后用劳克坚牢蓝(BDH)染色以分别鉴定单核细胞/巨噬细胞、嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞集落。按照标准对集落记分(>50 个细胞)。

### M-CSF ELISA

如先前所述,例如在 Dewar A 等人, 2003, Leukemia 17:1713-21 中所述,从正常供体的血沉棕黄层分离单核细胞。在 24 孔板中于无血清培养基(SDM;补充有 2mM L-谷氨酰胺、200  $\mu$ g/mL 转铁蛋白、10  $\mu$ g/mL 胰岛素

(Actrapid<sup>®</sup>, Novo Nordisk)、 $10^{-4}$ M  $\beta$ -巯基乙醇、50  $\mu$ g/mL 低密度脂蛋白 (Sigma) 的 IMDM/1% BSA) 培养获得单核细胞培养物( $1 \times 10^5$ /mL), 并用 20 ng/mL GM-CSF 刺激。以 24 小时的间隔收获一次上清液, 收集 5 天, 使用 R&D Systems 的 DuoSet<sup>®</sup> ELISA 发育系统并按照产品说明书分析 M-CSF。

### c-Fms 向 FDC-P1 细胞内的转导

用 MSW/IRES/GFP/cfms(St Jude Children's Research Hospital 的 M. Roussel 惠赠) 通过 Fugene(Roche) 转染产生稳定产生 Psi-2 病毒的细胞系并且在 FACStar<sup>PLUS</sup> 流式细胞仪(Becton Dickinson) 上分选, 收集表达绿色荧光蛋白(GFP) 的细胞。这些细胞用于通过共培养来感染 FDC-P1 细胞, 并且将表达 c-fms 蛋白质(FDC-cfms) 的 FDC-P1 细胞选出培养于补充有 10% FCS、200 mM L-谷氨酰胺和 60 ng/mL rhM-CSF 的 DMEM 中。

### 增殖分析

将 FDC-cfms 细胞以  $5.0 \times 10^4$ /mL 的密度重悬于包含 10% FCS 的 DMEM 中, 并用鼠 IL-3 (1:2000) (S. Read 博士提供, IMVS) 或者 rhM-CSF (60ng/mL) (Peprotech) 刺激。加入终浓度为 0.5 $\mu$ M-5.0 $\mu$ M 的化合物 I, 一式三份, 在 12、24 和 48 小时收获细胞。将细胞在已知体积内固定, 并且加入固定体积的已知密度的 Flow-Check<sup>TM</sup> Fluorospheres (Beckman Coulter)。使用 Coulter XL-MCS 分析型流式细胞仪并基于 FS 对 SS(对应于 beads/细胞) 图的分析确定细胞数量。

### 细胞裂解

将 FDC-c-fms 于 37°C、存在或不存在化合物 I 的条件在无血清培养基 (DMEM, JRH Biosciences) 中培养 1 小时。在饥饿之后, 将细胞以  $1.5 \times 10^7$ /mL 的密度重悬于含有或不含有化合物 I 的 DMEM 中, 用 60 ng/mL rhM-CSF 于 37°C 刺激 2 分钟, 然后在补充有 0.5 M NaF、0.1 M

NaPPI、0.5 M NaVO<sub>4</sub>、0.1 M PMSF 和完全的蛋白酶抑制剂(Roche)的 TSE (50 mM tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)中的 1% NP40 中裂解。

### 免疫沉淀

使用 2.5 µg/mL 的抗 c-fms 抗体(2-4A5, Santa Cruz Biotechnology Inc)和 G 蛋白琼脂糖(Amersham)从 FDC-c-fms 细胞提取物中免疫沉淀 c-Fms。在 4°C 免疫沉淀 2 小时,然后将样品充分洗涤并重悬于 30 µL 还原上样缓冲液(抗磷酸酪氨酸印迹)或非还原上样缓冲液(抗 c-fms 印迹)中。在每一 IP 中使用等量的蛋白质,如使用 Micro BCA™ 蛋白质分析试剂(Pierce)所确定。

### Western 印迹分析

免疫沉淀物在 8% SDS-PAGE 中电泳并电转移印迹至 PVDF 膜(Amersham)。膜用抗磷酸化酪氨酸抗体(1/1000 PY20(Santa Cruz Biotechnology Inc)和 1/2000 4G10 (Cell Signalling Technology®)的混合物)或者抗 c-fms 抗体(R&D Systems)探测。使用缀合有碱性磷酸酶的抗小鼠 Ig 的抗体检测并使用 ECF 底物(Amersham)呈色。使用 Typhoon 9410(Amersham)在 488nm 激发光下获得膜的图像,并使用 ImageQuant™ 软件定量。

### c-Fms 表达的流式细胞术分析

在化合物 I 存在下,在无血清的 IMDM 中培养 FDC-c-fms 细胞( $5 \times 10^5$ ) 1 小时,然后用 0.5 µg 抗 c-fms 抗体染色。通过用缀合有 R-藻红蛋白的抗小鼠抗体(SouthernBiotech)染色来检测结合的抗体,并使用 Coulter XL-MCS 分析型流式细胞仪分析细胞。

### 统计学分析和药物动力学数据分析

使用 ANOVA 分析数据，当概率值 $<0.05$  时认为差异具有显著性。使用 Hill 方程  $y=100/(1+10^{(\log IC_{50}-x) \times Hill \text{ 斜率}})$  (其中  $y$  为抑制水平， $x$  为药物浓度的对数) 计算  $IC_{50}$  值。

## 结果

### 抗 c-Fms 抑制用 M-CSF 或 GM-CSF 刺激的单核细胞/巨噬细胞集落的生长

化合物 I 抑制用 M-CSF 或 GM-CSF 所刺激的单核细胞/巨噬细胞谱系细胞(从正常供体分离的)的生长, 见例如 Dewar, A.L 等人, 2003 *Leukemia* 17:1713-21。与相关的 III 类受体酪氨酸激酶 c-kit 和 PDGFR 相反, 高达  $10 \mu M$  的化合物 I 不影响 c-fms 的磷酸化, 见例如 Buchdunger, E. 等人, 2000. *J Pharmacol Exp Ther* 295:139-145。

用 4HGF 或 5HGF 刺激使用来自正常供体的骨髓单核细胞建立起来的集落培养物, 并且检测抗 c-kit 抗体与化合物 I 的组合对单核细胞/巨噬细胞生长的影响, 见下表 1A。在缺乏化合物 I 的情况下, 向用 4HGF 刺激的培养物中加入抗 c-kit 抗体不影响集落数量。在这些实验中使用的抗 c-kit 抗体的剂量( $1 \mu g/mL$ ) 足以完全抑制 SCF 受体, 因为将其加入到用 4HGF 和 SCF (5HGF) 刺激的培养物中与加入到 4HGF 单独刺激的培养物中相比, 使集落生长降低至同一水平。见下表 1A。在不加入 SCF 和化合物 I 的情况下, 抗 c-kit 抗体不影响单核细胞/巨噬细胞生长, 这表明在自分泌的 SCF 产生后靶向 c-kit 信号转导途径不会产生抑制。在下表中, 缩写“SEM”代表平均值的标准误差, “cc”代表浓度。

表 1A: 化合物 I 通过抑制 c-fms 而抑制单核细胞/巨噬细胞的集落形成。用 4HGF (IL-3, IL-6, G-CSF, GM-CSF)、4HGF+抗 c-kit 抗体(+KIT)、5HGF (IL-3, IL-6, G-CSF, GM-CSF, CSF)、5HGF+抗 c-kit 抗体(+KIT)刺激来自正常 BM 的 MNC, 并检查对单核细胞/巨噬细胞集落形成的影响。

化合物 I Cc ( $\mu$ l)	5HG F	5HGF SEM	4HG F	4HGF SEM	5HGF +KIT	5HGF +KIT SEM	4HGF +KIT	4HGF +KIT SEM
0	100	14.43	38.46	11.27	53.85	1.92	39.1	7.88
0.3	37.82	6.78	24.36	11.23	50.64	7.05	21.79	3.9
1	33.33	6.31	42.31	21.18	48.08	10.18	21.15	9.09
5	2.56	1.28	3.85	3.85	7.69	1.11	3.21	2.31
10	0.64	0.64	0	0	4.49	1.7	5.13	3.21
30	0	0	0	0	0	0	0	0

为检查 c-fms 在集落生长中的作用，向用 M-CSF 或 GM-CSF 刺激之后的培养物中加入抗 c-fms 抗体。在 M-CSF 刺激的培养物中，仅观察到单核细胞/巨噬细胞集落，在 1.0  $\mu$ M 化合物 I 存在下，集落被抑制高达 80%，见下表 1B。

表 1B: 通过加入抗 c-fms 抗体抑制了用 M-CSF 刺激的源自 CD34+祖细胞的单核细胞/巨噬细胞的生长

	巨噬细胞	SEM	巨噬细胞	SEM
抗 c-fms 抗体	-	-	+	+
M-CSF	+	+	+	+
化合物 I Cc ( $\mu$ M)				
0	100	12.95	0	0
1	15.57	3.895	0	0
5	0	0	0	0
10	0	0	0	0

抗 c-fms 抗体足以完全抑制单核细胞/巨噬细胞集落，这证明生长依赖于 M-CSF，见上面表 1B。

向 GM-CSF 刺激的培养物中加入 1.0  $\mu$ M 化合物 I 使单核细胞/巨噬细胞集落生长降低大约 80%。相反，低于 10.0  $\mu$ M 浓度的化合物 I 不影响嗜酸性粒细胞的生长，见下表 1C。

表 1C: 用 GM-CSF 刺激的源自 CD34+祖细胞的单核细胞/巨噬细胞集落的生长

	巨噬细胞	SEM	嗜酸性粒细胞	SEM	巨噬细胞	SEM	嗜酸性粒细胞	SEM
抗 c-fms 抗体	-	-	-	-	+	+	+	+
GM-CSF	+	+	+	+	+	+	+	+
化合物 I cc ( $\mu$ M)								
0	100	7.14	100	7.36	0	0	95.8	10.20
1	28.86	5.79	94.15	6.50	0	0	93.96	11.67
5	0	0	83.47	8.35	0	0	66.89	12.45
10	0.53	0.53	59.62	9.52	0	0	24.35	6.84

化合物 I 和抗 c-fms 抗体均不影响 GM-CSF 刺激后的嗜酸性粒细胞集落生长。

向 GM-CSF 刺激的培养物中加入抗 c-fms 抗体完全消除了单核细胞/巨噬细胞集落的生长而没有影响嗜酸性粒细胞的生长, 这表明 GM-CSF 直接刺激嗜酸性粒细胞生长而间接刺激单核细胞/巨噬细胞集落的生长。

用 GM-CSF 对单核细胞进行刺激诱导 M-CSF 蛋白质的分泌并且因为 GM-CSF 间接刺激抗 c-fms 可抑制性的单核细胞/巨噬细胞集落生长, 因此检查了在培养系统中 GM-CSF 是否诱导 M-CSF 自分泌产生。在培养物建立后 24 小时检测到低水平(20 pg/mL)的 M-CSF(数据未显示), 在 5 天中 M-CSF 水平逐渐增加至大约 70 pg/mL。加入 1.0  $\mu$ M 化合物 I 不影响培养的单核细胞产生 M-CSF, 而 5.0  $\mu$ M 化合物 I 使第 5 天的 M-CSF 产生降低 30%。据估计, 所产生的 M-CSF 的最大水平为 70pg/mL, 而这比在本研究中所加入的 M-CSF 浓度低 300-500 倍。亚最佳浓度的 M-CSF 可以足以诱导单核细胞生长和分化, GM-CSF 能够单独支持单核细胞/巨噬细胞生长, 但是协同作用以增强 M-CSF 的作用。

#### 化合物 I 抑制 M-CSF 依赖性细胞系的增殖

由于化合物 I 似乎通过 c-fms 来介导其对单核细胞/巨噬细胞发育的抑制作用, 所以研究了化合物 I 对依赖于鼠 IL-3 或人 M-CSF 的细胞系的影响

响。用鼠 IL-3 刺激的对照培养物显示，在所检查的化合物 I 剂量范围内，在 12 或 24 h 对细胞生长不具有化合物 I-特异性的影响，见表 2A。在 48 h 时，在 IL-3 存在下 FDC-c-fms 的增殖被 2.5  $\mu\text{M}$  化合物 I 降低 15% 并且被 5.0  $\mu\text{M}$  化合物 I 降低 40%，这表明化合物 I 对这些细胞具有适中的毒性作用。

表 2A

IL-3 化合物 I cc( $\mu\text{M}$ )	12 H	SEM	24 H	SEM	48 H	SEM
0	125433	2899	257726	6837	1123171	25940
0.5	131724	1659	281975	5626	1107666	29249
1	126472	3478	264007	11736	1068150	69927
2.5	131857	3210	247613	8415	940233	34057
5	106917	3304	197435	6599	682771	28252

表 2B

M-CSF 化合物 I cc( $\mu\text{M}$ )	12 H	SEM	24 H	SEM	48 H	SEM
0	132174	5401	310859	10028	1453642	50607
0.5	133296	3123	339185	5220	1577777	108291
1	130010	3034	311035	9293	1362802	63713
2.5	117025	3559	174818	15978	295134	7763
5	68324	2040	20830	1708	20149	4695

表 2A 和 2B: 治疗浓度的化合物 I 抑制 M-CSF 刺激的表达 c-fms 的细胞系的生长但不抑制 IL-3 刺激的表达 c-fms 的细胞系的生长。在 12、24 和 48 小时计数细胞(细胞数/mL)。用鼠 IL-3 刺激的对照培养物显示，在 48 小时时 2.5  $\mu\text{M}$  或更高浓度的化合物 I 对生长的抑制较小(2A)。在 12 和 24 小时未见影响。使用 S 型模型预测的  $\text{IC}_{50}$  值为 5.9  $\mu\text{M}$ ，这表明较高浓度的化合物 I 具有轻微的药物毒性(未显示)。用 M-CSF 对细胞的刺激表明，在 12 小时时 5.0  $\mu\text{M}$  化合物 I 抑制生长并且在 24 和 48 h 小时 2.5  $\mu\text{M}$  化合物 I 抑制生长(2B)，化合物 I 的  $\text{IC}_{50}$  值为 1.1  $\mu\text{M}$ 。

当 M-CSF 是唯一的刺激源时，可见在起始培养后的 12 小时，5.0  $\mu\text{M}$  化合物 I 使细胞生长抑制 50%。在 24 小时时，用 2.5  $\mu\text{M}$  化合物 I 刺激的

培养物的细胞计数比未用化合物 I 刺激的培养物的细胞计数低 45%，并且 5.0  $\mu\text{M}$  化合物 I 刺激的培养物的细胞计数低于接种时的细胞计数。化合物 I 对 M-CSF 刺激的 FDC-c-fms 培养物的影响在 48 小时时最深远，2.5  $\mu\text{M}$  化合物 I 使细胞计数相对于对照而言降低 80%，并且 5.0  $\mu\text{M}$  化合物 I 使细胞的浓度低于接种时的水平。

### 化合物 I 抑制 c-Fms 的磷酸化

为了确定化合物 I 是否直接介导对 M-CSF 受体的抑制作用，检查了化合物 I 对 FDC-c-fms 细胞系的 c-fms 磷酸化的影响。未用 M-CSF 刺激的饥饿的 FDC-c-fms 细胞显示 c-fms 没有磷酸化。用 M-CSF 刺激的饥饿的 FDC-c-fms 细胞显示出受体磷酸化，并且 1.0  $\mu\text{M}$  化合物 I 使这种磷酸化降低大约 30%。当化合物 I 为 2.5  $\mu\text{M}$  时，c-fms 磷酸化降低 75%，当化合物为 5.0  $\mu\text{M}$  时未观察到明显的磷酸化。经数据分析，得知化合物 I 抑制 c-fms 磷酸化的 IC<sub>50</sub> 值为 1.42  $\mu\text{M}$ ，这与增殖实验中得到的数值相似。

### 化合物 I 不影响 c-Fms 蛋白质的表达

在单核细胞上 c-Fms 低水平表达，并且在向巨噬细胞分化过程中其显著表达。在 M-CSF 缺乏情况下，c-fms 的成熟细胞表面形式相对稳定，然而配体的结合通过内化和溶酶体内的降解下调了受体表达。由于 M-CSF 受体的磷酸化被化合物 I 抑制，所以探测了 Western 印迹膜的 c-fms 蛋白质以证实这不是由于 c-fms 表达的降低造成的。在这些印迹膜中检测到了两条 c-fms 带，170kDa 的带代表完全糖基化的 c-fms 蛋白，130kDa 的带代表不成熟形式的非糖基化形式。对 170kDa 和 130kDa 带的强度进行了定量，并且一致检测到 170kDa 蛋白质更高。两种形式的 c-fms 的表达不受化合物 I 处理的影响，见下表 4A。使用流式细胞术证实了化合物 I 不影响 c-fms 表达，其中在用 0.5 $\mu\text{M}$ -2.5  $\mu\text{M}$  化合物 I 处理的 FDC-c-fms 细胞中 c-fms 的表面表达没有差别，并且略低于 5.0  $\mu\text{M}$  化合物 I 处理细胞中的表达，见表 4B。

表 4A: 对 c-fms 种类的 Western 印迹定量

		c-fms 种类	
		130kd	170kd
无 M-CSF		152478	530176
M-CSF + 化合物 I cc ( $\mu$ M)	0	188656	537484
	0.5	146299	455754
	1	147714	460596
	2.5	117604	438912
	5	97043	454761
	对照 IC	19097	153239

IC = 同种型对照

表 4B: 通过流式细胞术检测的表面 c-fms

化合物 I cc ( $\mu$ M)	平均荧光强度
0	63
0.5	69
1	52
2.5	54
5	37

据证明, 蛋白质酪氨酸激酶抑制剂化合物 I 的体外特性可以扩展到包括 c-fms。抑制能力低于对 Abl ( $IC_{50} = 0.025 \mu$ M)、c-kit ( $IC_{50} = 0.1 \mu$ M) 或 PDGF 受体酪氨酸激酶 ( $IC_{50} = 0.25 \mu$ M) 的抑制能力。Western 印迹表明, 使 c-fms 酪氨酸磷酸化抑制 50% 所需化合物 I 的浓度为  $1.4 \mu$ M。在该研究中, 在用饱和剂量 M-CSF 进行特异受体刺激后的 c-fms 免疫沉淀物中检查了化合物 I 对 c-fms 磷酸化的影响。

化合物 I 可用于治疗涉及异常 c-fms 激活的疾病, 包括普通的癌症如乳腺癌和上皮性卵巢癌以及炎症性疾病如类风湿性关节炎。已经在包括乳腺癌和卵巢癌在内的广泛的人类癌症中证明了 c-fms 的异常表达, 并且已经证明 c-fms 的激活通过尿激酶依赖性机制刺激肿瘤侵袭, 见 Kacinski B.M.

1997, *Mol Reprod Dev* 46:71-4, Sapi E 和 B.M. Kacinski, 1999, *Proc Soc Exp Biol Med* 220:1-8。乳腺肿瘤和晚期卵巢上皮癌中 c-fms 异常表达与肿瘤细胞的侵袭性和不利的临床预后相关, 并且乳腺肿瘤产生 M-CSF 暗示着促进乳腺癌的骨转移, 见 Toy E.P.等人, 2001, *Gynecol. Oncol.* 80:194-200, Sapi E. 2004 *Exp Biol Med* 229:1-11。化合物 I 对 c-fms 磷酸化的潜在抑制作用在潜在的药物毒性方面具有重要的暗示。在造血系统之外, c-fms 信号在妊娠中起着重要的作用, 其影响植入前胚胎发育和哺乳动物乳腺发育, 见 Pollard J.W. 1997, *Mol Reprod Dev* 46:54-60。通过 M-CSF 刺激, c-fms 还在骨代谢和炎症过程中起着重要作用, 见 Fixe P.和 V. Praloran, 1998, *Cytokine* 10: 32-37。目前, 虽然明确证明患者充分耐受化合物 I, 但是必须考虑到长期使用化合物 I 治疗的后果是化合物 I 潜在影响这些过程。

实施例 2: 含有 4-[(4-甲基-1-哌嗪-1-基甲基)-N-[4-甲基-3-[[4-(3-吡啶基)-2-嘧啶基]氨基]苯基]苯甲酰胺单甲磺酸盐晶体形式的胶囊

以下列组成制备含有 119.5 mg 标题化合物(=盐 I)(对应于 100 mg 化合物 I(游离碱))作为活性物质的胶囊:

<u>组成</u>	盐 I	119.5 mg
	微晶纤维素	200 mg
	PVPPXL	15 mg
	微粉硅胶(Aerosil)	2 mg
	硬脂酸镁	1.5 mg
	-----	
		338.0 mg

胶囊通过将组分混合并且将混合物填充至 1 号明胶胶囊中制备。