



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105722838 A

(43) 申请公布日 2016. 06. 29

(21) 申请号 201480060785. X *A61K 31/437(2006. 01)*
(22) 申请日 2014. 09. 25 *A61P 29/00(2006. 01)*
(30) 优先权数据 *A61P 1/00(2006. 01)*
61/882, 473 2013. 09. 25 US
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2016. 05. 06
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/057499 2014. 09. 25
(87) PCT国际申请的公布数据
W02015/048318 EN 2015. 04. 02
(71) 申请人 沃泰克斯药物股份有限公司
地址 美国马萨诸塞
(72) 发明人 M·J·鲍伊德 A·阿洛诺夫
H·奥多德 J·格林
(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038
代理人 李华英
(51) Int. Cl.
C07D 471/04(2006. 01)

权利要求书1页 说明书23页 附图4页

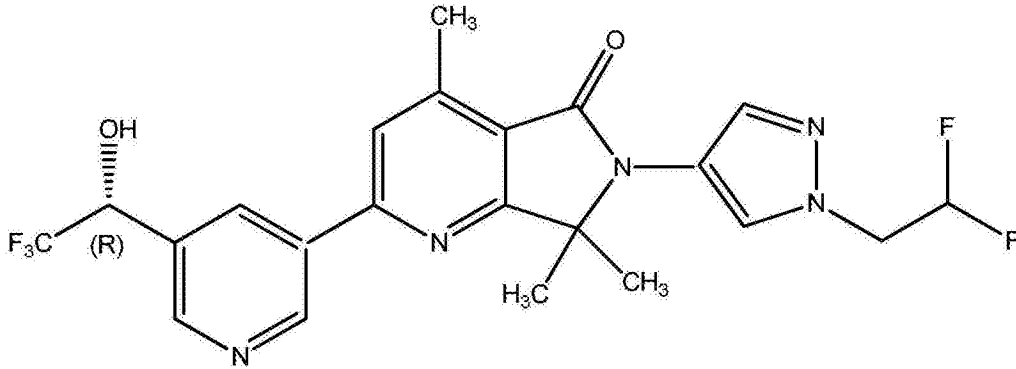
(54) 发明名称

磷脂酰肌醇 3- 激酶 - γ 的选择性抑制剂

(57) 摘要

本发明涉及用作 PI3K γ 的选择性抑制剂的化合物。本发明还提供包含该化合物的药学上可接受的组合物和使用该组合物治疗各种疾病、病症或障碍的方法。

1. 下式的化合物：



或其药学上可接受的盐。

2. 药物组合物，包含根据权利要求1的化合物和药学上可接受的载体、辅料或赋形剂。

3. 治疗选自自身免疫疾病或炎性疾病的疾病或病症或减轻其严重性的方法，所述自身免疫疾病或炎性疾病选自哮喘、特应性皮炎、鼻炎、过敏性疾病、慢性阻塞性肺病(COPD)、脓毒性休克、特发性肺纤维化、中风、烧伤、关节病、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、动脉粥样硬化、急性胰腺炎、银屑病、炎性肠病、溃疡性结肠炎、克罗恩病和格雷夫斯病，该方法包括对所述患者施用权利要求1的化合物或其盐或其药物组合物的步骤。

4. 权利要求3的方法，其中所述疾病或障碍是类风湿性关节炎。

5. 抑制生物样品中PI3K- γ 激酶活性的方法，包括使所述生物样品接触权利要求1的化合物或包含该化合物的组合物。

6. 选择性地抑制PI3K- γ 同工型超过抑制至少另一种PI3K同工型的方法，包括使生物样品接触权利要求1的化合物或包含该化合物的组合物，或者对有此需要的患者施用权利要求1的化合物或包含该化合物的组合物。

7. 权利要求6的方法，其中至少另一种PI3K同工型选自PI3K- α 、PI3K- β 、PI3K- δ 及其组合。

磷脂酰肌醇3-激酶- γ 的选择性抑制剂

技术领域

[0001] 本发明涉及用作磷脂酰肌醇3-激酶的 γ 同工型(PI3K γ)的抑制剂的化合物。本发明还提供包含该化合物的药学上可接受的组合物和使用该化合物和组合物治疗各种障碍的方法。

背景技术

[0002] PI3K是催化肌醇环的3'-OH上的膜脂质磷脂酰肌醇(PI)的磷酸化以产生PI 3-磷酸[PI(3)P,PIP],PI 3,4-二磷酸[PI(3,4)P₂,PIP₂]和PI 3,4,5-三磷酸[PI(3,4,5)P₃,PIP₃]的脂质激酶家族。PI(3,4)P₂和PI(3,4,5)P₃作为各种胞内信号蛋白的补充位点,其转而形成信号复合物,从而将胞外信号传递至质膜的细胞质表面。

[0003] 迄今为止,已经鉴定出了8种哺乳动物的PI3K,包括四种I类PI3K。Ia类包括PI3K α ,PI3K β 和PI3K δ 。所有Ia类酶都是杂二聚体复合物,其包含与含SH2结构域的p85适配子亚基相关的催化亚基(p110 α ,p110 β 或p110 δ)。Ia类PI3K通过酪氨酸激酶信号传递被激活,并且涉及细胞增殖和存活。PI3K α 和PI3K β 还与各种人类癌症中的肿瘤发生有关。因而,PI3K α 和PI3K β 的药物抑制剂对于治疗各种类型的癌症是有用的。

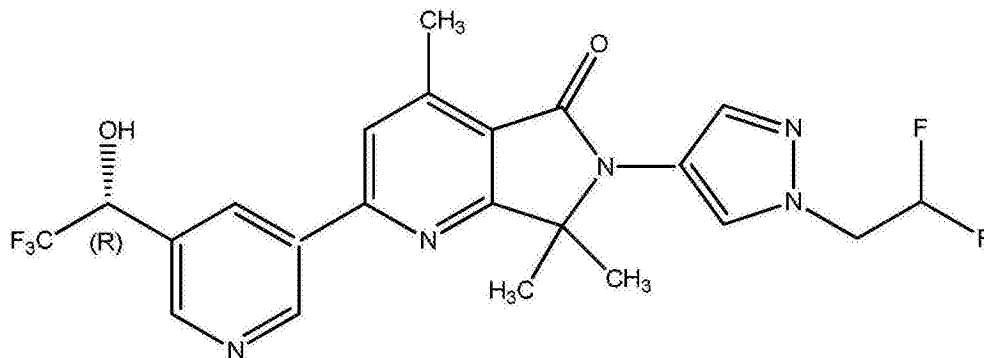
[0004] PI3K γ 是唯一的Ib类PI3K成员,由催化亚基p110 γ 组成,p110 γ 与p101调节亚基相关。PI3K γ 通过G蛋白偶合受体(GPCR)经由与杂三聚体G蛋白的 $\beta\gamma$ 亚基相结合而得到调控。PI3K γ 主要在造血细胞和心肌细胞中表达,并且涉及炎症和肥大细胞功能。因而,PI3K γ 的药物抑制剂对于治疗各种炎症性疾病、过敏反应和心血管疾病是有用的。

[0005] 尽管许多PI3K γ 抑制剂已经研发成功,但是仍然需要另外的化合物来抑制PI3K γ ,以用于治疗各种障碍和疾病。特别期望的是具有改善的体内药代动力学/药效学行为的那些PI3K γ 抑制剂,例如增加药物暴露于靶组织、同时将非靶向效应降至最低的那些PI3K γ 抑制剂。每单位剂量较大的暴露相对于在靶组织上暴露减少了脱靶暴露。通常,剂量限定的毒性发生在牵涉药物从循环中清除或就口服施用活性剂而言在胃肠道(GI)中清除的器官中。清除减少和生物利用度改善增加了血浆中的C_{max},同时限制了消除器官(例如肾、肝和GI)中的C_{max}。此外,吸收增加和清除减少(改善的生物利用度)通常导致患者之间在暴露方面的变化性减少,由此也改善了施用的活性剂的安全性。此外,显示改善的物理特性(例如较高的水溶性)的活性剂也是期望的。

发明内容

[0006] 已经发现本发明的化合物(R)-6-(1-(2,2-二氟乙基)-1H-吡唑-4-基)-4,7,7-三甲基-2-(5-(2,2,2-三氟-1-羟基乙基)吡啶3-基)-6,7-二氢-5H-吡咯并[3,4-b]吡啶-5-酮及其药学上可接受的组合物是有效的和选择性的PI3K γ 的抑制剂,当与另外的PI3K γ 抑制剂比较时,其具有改善的药代动力学/药效学特性。因此,本发明的特征在于具有如下结构的化合物:

[0007]



化合物 1

[0008] 本发明还提供了包含式I的化合物和药学上可接受的载体、辅料或赋形剂(vehicle)的药物组合物。这些化合物和药物组合物对于治疗各种疾病或减轻所述疾病严重性是有用的,所述疾病包括炎性疾病和自身免疫调节障碍,例如哮喘、特应性皮炎、鼻炎、过敏性疾病、慢性阻塞性肺病(COPD)、脓毒性休克、特发性肺纤维化、中风、烧伤、关节病、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、动脉粥样硬化、急性胰腺炎、银屑病、炎性肠病(IBD)、溃疡性结肠炎、克罗恩氏病和格雷夫斯病。

[0009] 本发明提供的化合物和组合物对于PI3K在生物学和病理学现象中的研究,由这些激酶介导的胞内信号转导通道的研究和新型激酶抑制剂的对比评价也是有用的。

附图说明

[0010] 图1显示以2.5mg/kg BID、5mg/kg BID和10mg/kg BID(20mg/kg/天)在治疗小鼠胶原蛋白诱发的关节炎(CIA)模型中测试的化合物1的结果。

[0011] 图2显示以2.5mg/kg BID、5mg/kg BID和10mg/kg BID(20mg/kg/天)在CIA模型中测试的化合物1的结果。仅显示在登记时显示临床关节炎征候的那些爪的结果。

[0012] 图3显示以2.5mg/kg BID、5mg/kg BID和10mg/kg BID(20mg/kg/天)在CIA模型中测试的化合物1的结果。仅显示在登记时显示无临床关节炎征候的那些爪的结果。

[0013] 图4显示以5mg/kg BID和10mg/kg BID在IBD模型中测试的化合物1的结果。

[0014] 发明详述

[0015] 定义和一般术语

[0016] 除非另有说明,应当使用本文所用的下列定义。出于本发明的目的,化学元素的鉴别按照元素周期表,CAS版,和Handbook of Chemistry and Physics,第75版,1994进行。另外,有机化学的一般原理参见“Organic Chemistry”,Thomas Sorrell,University Science Books,Sausalito:1999和“March’s Advanced Organic Chemistry”,第5版,Smith,M.B.和March,J.编辑,John Wiley&Sons,New York:2001,其全部内容通过引用并入本文。

[0017] 画有确定的立体化学中心的化合物是立体化学纯的,但是具有仍然未确定的绝对立体化学。这样的化合物可以具有R或S构型。在那些其中这样的绝对归属已经测定的情况下,手性中心在绘图中将被标记为R或S。尽管在本文中的化合物1被画为R-构型,但是本发明包括S-构型的实施方案以及R和S构型的外消旋混合物的实施方案。

[0018] 本发明的特征还在于包含本发明的任意化合物和药学上可接受的载体、辅料或赋

形剂的药物组合物。

[0019] 在一个实施方案中,本发明的特征在于抑制患者的PI3K激酶活性的方法,通过给该患者施用化合物1或其药物组合物来进行。在进一步的实施方案中,相对于PI3K- α ,PI3K- β 或PI3K- γ 选择性抑制PI3K- γ 。

[0020] 在另一个实施方案中,本发明的特征在于治疗患者的选自如下的疾病或病症或减轻其严重性的方法:例如,哮喘、特应性皮炎、鼻炎、过敏性疾病、慢性阻塞性肺病(COPD)、脓毒性休克、特发性肺纤维化、中风、烧伤、关节病、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、动脉粥样硬化、急性胰腺炎、银屑病、炎性肠病、溃疡性结肠炎、克罗恩氏病和格雷夫斯病,通过给该患者施用化合物1或其药物组合物来进行。

[0021] 本发明的特征还在于抑制体外生物样品中PI3K- γ 激酶活性的非治疗性方法,包括使该生物样品接触化合物1或包含该化合物的组合物。

[0022] 本发明的组合物、制剂和施用

[0023] 在另一个方面,本发明提供了一种包含化合物1的药物组合物。例如,本发明提供了一种包含化合物1或其药学上可接受的衍生物和药学上可接受的载体、辅料或赋形剂的药物组合物。在一个实施方案中,本发明组合物中化合物的量为使得能有效地可测量地抑制生物样品或患者中的PI3K γ 的量。在一个实施方案中,配制本发明的组合物,用于向需要该组合物的患者的给药。在进一步的实施方案中,配制本发明的组合物,用于口服给予患者。本文所用的术语“患者”是指动物,优选哺乳动物,最优选人。

[0024] 同样可以理解的是,某些本发明化合物可以以游离形式存在而用于治疗,或者在合适的情况中,作为其药学上可接受的衍生物存在。根据本发明,药学上可接受的衍生物包括但不限于药学上可接受的前体药物、盐、酯、这类酯的盐或者任意其它加合物或衍生物,其一旦对需要的患者给药即能够直接或间接提供本文其它部分所述的化合物或其代谢物或残留物。本文所用的术语“其抑制活性的代谢物或残留物”是指其代谢物或残留物也是PI3K γ 抑制剂。

[0025] 本文所用的术语“药学上可接受的盐”是指这样的盐,在合理的医学判断范围内,其适用于接触人和低等动物的组织,没有过度的毒性、刺激性、过敏反应等。

[0026] 药学上可接受的盐是本领域公知的。例如,S.M.Berge等人在J.Pharmaceutical Sciences,66:1-19,1977中详细描述了药学上可接受的盐,通过参考引入本文。本发明化合物的药学上可接受的盐包括从适合的无机和有机酸与碱衍生的盐。药学上可接受的无毒性酸加成的盐为与无机酸或有机酸形成的氨基的盐,所述无机酸例如盐酸,氢溴酸,磷酸,硫酸和高氯酸,所述有机酸例如乙酸,草酸,马来酸,酒石酸,柠檬酸,琥珀酸或丙二酸,或通过使用本领域中所使用的其它方法例如离子交换形成的氨基的盐。其它药学上可接受的盐包括己二酸盐,藻酸盐,抗坏血酸盐,天冬氨酸盐,苯磺酸盐,苯甲酸盐,硫酸氢盐,硼酸盐,丁酸盐,樟脑酸盐,樟脑磺酸盐,柠檬酸盐,环戊烷丙酸盐,二葡萄糖酸盐,十二烷基硫酸盐,乙磺酸盐,甲酸盐,富马酸盐,葡庚糖酸盐,甘油磷酸盐,葡萄糖酸盐,半硫酸盐,庚酸盐,己酸盐,氢碘酸盐,2-羟基乙磺酸盐,乳糖酸盐,乳酸盐,月桂酸盐,月桂基硫酸盐,苹果酸盐,马来酸盐,丙二酸盐,甲磺酸盐,2-萘磺酸盐,烟酸盐,硝酸盐,油酸盐,草酸盐,棕榈酸盐,扑酸盐,果胶酸盐,过硫酸盐,3-苯基丙酸盐,磷酸盐,苦味酸盐,新戊酸盐,丙酸盐,硬脂酸盐,琥珀酸盐,硫酸盐,酒石酸盐,硫氰酸盐,对甲苯磺酸盐,十一烷酸盐,戊酸盐等。由适当的碱产生

的盐包括碱金属,碱土金属,铵和 $N^+(C_{1-4}\text{烷基})_4$ 的盐。本发明也包括如本文所公开的化合物的任意碱性含氮基团的季铵化产物。通过这类季铵化作用可以得到水或油可溶或可分散的产物。代表性的碱金属或碱土金属盐包括钠,锂,钾,钙,镁等。适当的话,其它的药学上可接受的盐包括利用抗衡离子例如卤离子,氢氧根,羧酸根,硫酸根,磷酸根,硝酸根, C_{1-8} 磺酸根和芳基磺酸根形成的无毒的铵盐,季铵盐和胺阳离子盐。

[0027] 如上所述,本发明的药学上可接受的组合物另外包含药学上可接受的载体、辅料或赋形剂,本文所用的载体,辅料,赋形剂包括适合于期望的特定剂型的任意的和所有的溶剂,稀释剂或其它液体赋形剂,分散剂或助悬剂,表面活性剂,等渗剂,增稠剂或乳化剂,防腐剂,固体粘合剂,润滑剂等。在Remington:Science and Practice Pharmacy,第21版,2005,ed.D.B.Troy,Lippincott Williams&Wilkins,Philadelphia,和Encyclopedia Pharmaceutical Technology,eds.J.Swarbrick和J.C.Boylan,1988-1999,Marcel Dekker,New York中,公开了用于配制药学上可接受的组合物的各种载体和用于其制备的已知技术,将它们的内容都通过参考引入本文。除了与本发明的化合物不相容(例如产生任何不良的生物学效应或者其它以有害方式与药学上可接受的组合物的任何其它组分相互作用)的任何常规载体介质,其使用都涵盖在本发明的范围内。

[0028] 能够作为药学上可接受的载体的材料的一些实例包括但不限于:离子交换剂,氧化铝,硬脂酸铝,卵磷脂,血清蛋白(例如人血清白蛋白),缓冲物质(例如磷酸盐),甘氨酸,山梨酸或山梨酸钾,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,磷酸氢钾,氯化钠,锌盐),胶体二氧化硅,三硅酸镁,聚乙烯吡咯烷酮,聚丙烯酸酯,蜡类,聚乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物,羊毛脂,糖类(例如乳糖,葡萄糖和蔗糖),淀粉(例如玉米淀粉和马铃薯淀粉),纤维素及其衍生物,例如羧甲基纤维素钠,乙基纤维素和醋酸纤维素;西黄蓍胶粉;麦芽;明胶;滑石粉;赋形剂例如可可脂和栓剂用蜡;油类例如花生油,棉籽油;红花油;芝麻油;橄榄油;玉米油和大豆油;二醇例如丙二醇或聚乙二醇;酯类,例如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,例如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原的水;等渗盐水;林格液;乙醇;和磷酸盐缓冲液,以及其它无毒的可相容的润滑剂,例如月桂基硫酸钠和硬脂酸镁;根据制剂人员的判断,在组合物中也可以存在着色剂,释放剂,包衣剂,甜味剂,调味剂和芳香剂,防腐剂和抗氧化剂。

[0029] 本发明的组合物可经口服,胃肠外,通过吸入型喷雾,局部,直肠,鼻,颊,阴道内或通过植入物储库来施用。本文所用的术语“胃肠外”包括皮下,静脉内,肌内,关节内,滑膜内,胸骨内,鞘内,眼内,肝内,内部创口,硬膜外,脊柱内和颅内注射或输注技术。优选地,将该组合物经口服,腹膜内或静脉内施用。本发明组合物的无菌注射形式可以是水性或油性混悬液。这些混悬液可以根据本领域已知的技术,使用适当的分散剂或润湿剂和助悬剂来配制。无菌注射制剂也可以是在无毒的胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌注射溶液或混悬液,例如在1,3-丁二醇中的溶液。可以采用的可接受的载体和溶剂为水,林格液和等渗氯化钠溶液。另外,一般可以使用无菌的不挥发性油作为溶剂或混悬介质。

[0030] 为此,可以采用任何温和的不挥发性油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。在注射剂的制备中可以使用脂肪酸,例如油酸及其甘油酯衍生物,还可以使用例如天然的药学上可接受的油类,例如橄榄油或蓖麻油,特别是它们的聚氧乙烯化形式。这些油溶液或混悬液也可以包含长链醇类稀释剂或分散剂,例如羧甲基纤维素或在药学上可接受的剂型包括乳

剂和混悬液的配制中常用的类似的分散剂。其它常用的表面活性剂,例如吐温类,司盘类和其它制备药学上可接受的固体,液体或其它剂型中常用的乳化剂或生物利用度增强剂也可以用于配制目的。

[0031] 本发明的药学上可接受的组合物可以以任何口服可接受的剂型来口服施用,包括但不限于胶囊,片剂,水性混悬液或溶液。在口服的片剂的情况下,常用的载体包括乳糖和玉米淀粉。通常也可以加入润滑剂例如硬脂酸镁。对于胶囊形式的口服,有用的稀释剂包括乳糖和干玉米淀粉。当需要口服水性混悬液时,将活性成分与乳化剂和助悬剂混合。如果需要,也可以加入某些甜味剂,调味剂或着色剂。

[0032] 可替代地,本发明的药学上可接受的组合物可以以栓剂形式用于直肠给药。这些栓剂可以通过将药物与适当的非刺激性赋形剂混合来制备,所述赋形剂在室温下是固体,但在肠温下是液体,因此会在直肠中融化而释放出药物。这种物质包括可可脂,蜂蜡和聚乙二醇类。

[0033] 用于口服的液体剂型包括但不限于药学上可接受的乳剂,微乳,溶液,混悬液,糖浆和酏剂。除了活性化合物以外,液体剂型还可以含有本领域常用的惰性稀释剂,例如水或其它溶剂;增溶剂和乳化剂,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,二甲基甲酰胺,油类(特别是棉籽油,花生油,玉米油,胚油,橄榄油,蓖麻油和芝麻油),甘油,四氢糠醇,聚乙二醇和脱水山梨糖醇的脂肪酸酯,及它们的混合物。除了惰性稀释剂以外,该口服组合物还可以包括助剂,例如湿润剂,乳化剂与助悬剂,甜味剂,矫味剂和芳香剂。

[0034] 可注射制剂(例如无菌注射的水性或油性混悬液)可以根据已知技术使用适合的分散剂或湿润剂和助悬剂来配制。无菌注射制剂也可以是在无毒的胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌注射溶液,混悬液或乳液,例如在1,3-丁二醇中的溶液。可以采用的可接受的载体和溶剂有水,林格液,U.S.P.和等渗氯化钠溶液。另外,一般使用无菌的不挥发性油作为溶剂或混悬介质。为此,可以使用任何温和的不挥发性油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。另外,在注射剂的制备中也可以使用脂肪酸,例如油酸。

[0035] 可注射制剂可以在使用前进行灭菌,例如通过细菌截留性过滤器过滤,或者掺入灭菌固体组合物形式的灭菌剂,其中该灭菌固体组合物可以在使用前溶解或分散在无菌的水或其它无菌注射介质中。

[0036] 为了延长本发明化合物的作用,经常需要延缓化合物在皮下或肌肉注射后的吸收。这可以利用水溶性差的晶体或无定形物质的液体混悬液来实现。化合物的吸收速率取决于它的溶解速率,而后者又取决于晶体大小和晶型。可替代地,将化合物溶解或混悬在油类介质中,实现了胃肠外给药的化合物形式的延迟吸收。可注射的储库型制剂可以通过在生物可降解的聚合物例如聚丙交酯-乙交酯中形成化合物的微囊基质来制备。根据化合物与聚合物的比例和所使用的特定聚合物的性质,可以控制化合物的释放速率。其它生物可降解聚合物的实例包括聚(原酸酯)和聚(酸酐)。储库型可注射制剂也可以通过将化合物包裹在与机体组织相容的脂质体或微乳中来制备。可以将本发明的化合物掺入另外的常规缓释制剂,以便在数小时至数天至数个月的期望的时间期限内提供其控释。

[0037] 用于直肠或阴道给药的组合物优选是栓剂,它们可通过将本发明化合物与适当的无刺激性赋形剂或载体如可可脂,聚乙二醇或栓剂用蜡混合来制备,所述无刺激性的赋形

剂或载体在环境温度下是固体,但是在体温下是液体,因此在直肠或阴道腔中融化,释放出活性化合物。

[0038] 用于口服的固体剂型包括胶囊,片剂,丸剂,粉剂和颗粒剂。在这些固体剂型中,将活性化合物与至少一种惰性的药学上可接受的赋形剂或载体混合,所述赋形剂或载体例如为柠檬酸钠或磷酸二钙,和/或a)填充剂或增量剂,例如淀粉,乳糖,蔗糖,葡萄糖,甘露糖醇和硅酸,b)粘合剂,例如羧甲基纤维素,藻酸盐,明胶,聚乙烯吡咯烷酮,蔗糖和阿拉伯胶,c)润湿剂,例如甘油,d)崩解剂,例如琼脂,碳酸钙,马铃薯或木薯淀粉,海藻酸,某些硅酸盐和碳酸钠,e)溶解延迟剂,例如石蜡,f)吸附促进剂,例如季铵化合物,g)湿润剂,例如鲸蜡醇和甘油单硬脂酸酯,h)吸附剂,例如高岭土和膨润土,和i)润滑剂,例如滑石粉,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。对于胶囊,片剂和丸剂,剂型还可以包含缓冲剂。

[0039] 也可以采用相似类型的固体组合物作为软或硬的填充胶囊中的填充剂,并使用赋形剂例如乳糖(lactose)或奶糖(milk sugar)以及高分子聚乙二醇等。片剂,锭剂,胶囊,丸剂和颗粒剂等固体剂型可以制备成具有包衣和外壳,例如肠溶衣和药物制剂领域中公知的其它包衣。它们可以任选地含有遮光剂,也可以是仅仅或优先在胃肠道的某一部分(任选以延迟的方式)释放活性成分的组合。可以使用的包埋组合物的实例包括聚物质和蜡类。也可以采用相似类型的固体组合物作为软或硬的填充胶囊中的填充剂,并使用赋形剂例如乳糖或奶糖以及高分子量聚乙二醇等。

[0040] 活性化合物也可以是微囊包封的形式,并含有一种或多种如上所述的赋形剂。片剂,锭剂,胶囊,丸剂和颗粒剂等固体剂型可以制备成带有包衣和外壳,例如肠溶衣,释放控制性包衣和药物制剂领域公知的其它包衣。在这些固体剂型中,可以将活性化合物与至少一种惰性稀释剂,例如蔗糖,乳糖或淀粉混合。在正常情况下,这些剂型还可以包含除惰性稀释剂以外的其它物质,例如压片润滑剂和其它压片助剂,例如硬脂酸镁和微晶纤维素。对于胶囊,片剂和丸剂,这些剂型还可以包含缓冲剂。它们可以任选地含有遮光剂,也可以是仅仅或优先在胃肠道的某一部分(任选以延迟的方式)释放活性成分的组合。可以使用的包埋组合物的实例包括聚物质和蜡类。

[0041] 本发明的化合物的局部或透皮给药剂型包括软膏剂,糊剂,乳剂(霜剂),洗剂,凝胶剂,粉剂,溶液,喷雾剂,吸入剂或贴剂。根据需要,在无菌条件下将活性组分与药学上可接受的载体和任何需要的防腐剂或缓冲剂混合。眼科制剂,滴耳剂和滴眼剂也涵盖在本发明的范围内。另外,本发明涵盖透皮贴剂的使用,它们具有控制化合物向机体递送的附加优点。这类剂型可以通过将化合物溶解或分散在恰当的介质中来制备。还可以使用吸收增强剂以增加化合物穿过皮肤的通量。可以通过提供速率控制膜或者将化合物分散在聚合物基质或凝胶中来控制速率。

[0042] 本发明的化合物优选配制成单位剂型,以利于给药并保持剂量的均匀性。本文所用的短语“单位剂型”是指适合所要治疗的患者的药物的物理分离单元。但是,应当理解,本发明的化合物和组合物的每日总剂量是由主治医师在合理的医学判断范围内确定的。任何特定的患者或生物体的具体有效剂量水平取决于很多因素,包括所要治疗的疾病和疾病的严重性;所使用的具体化合物的活性;所使用的具体组合物;患者的年龄,体重,一般健康状况,性别和饮食;给药时间,给药途径和所使用的具体化合物的排泄速率;治疗的持续时间;

与所使用的具体化合物联合或同时使用的药物,以及医学领域公知的类似因素。

[0043] 可以与载体物质混合来生产单一剂型中的组合物的本发明化合物的量各不相同,取决于所治疗的宿主,具体的给药方式。优选,应当配制组合物使得可以将0.01-100mg/kg体重/天、例如0.1-100mg/kg和0.1-10mg/kg体重/天剂量的抑制剂给予接受这些组合物的患者。

[0044] 根据所要治疗或预防的具体病症或疾病,也可以在本发明的组合物中存在治疗或预防该病症时通常会采用的另外的治疗剂。在本文中使用时,治疗或预防一种具体疾病或病症时通常会施用的另外的治疗剂被认为是“适合所要治疗的疾病或病症的”。下文中提供了另外的治疗剂的实例。

[0045] 另外的治疗剂在本发明组合物中的含量不超过通常它在包含该治疗剂作为唯一活性剂的组合物中的含量。优选地,在本发明公开的组合物中存在的另外的治疗剂的含量是其通常在包含该治疗剂作为唯一治疗活性剂的组合物中的含量的约50%-100%。

[0046] 本发明化合物和组合物的用途

[0047] 在本发明的一个方面,本发明特征在于治疗PI3K γ 介导的病症或疾病或者减轻所述病症或疾病严重性的方法。本文所用的术语“PI3K γ 介导的疾病”是指其中已知PI3K γ 同工型起作用的任何疾病和其它有害病症。

[0048] 因此,在进一步的实施方案中,本发明化合物选择性抑制PI3K γ -同工型。在一个实施方案中,本发明化合物在体外试验中以至少20倍的选择性相对于PI3K α 同工型选择性抑制PI3K γ -同工型。在另一个实施方案中,本发明的PI3K γ 选择性化合物在体外试验中以至少20倍的选择性相对于各个 α , β 和 δ 同工型抑制 γ 同工型。本发明还包括使用本发明化合物和组合物的选择性在体内治疗有这类治疗需要的患者。

[0049] 本发明的化合物或组合物可以与一种或多种另外的治疗剂一起给予,其中另外的治疗剂适用于待治疗的疾病,并且另外的治疗剂和本发明的化合物或组合物一起作为单一剂型给予,或作为多重剂型的一部分与本发明化合物或组合物分开给予。另外的治疗剂可以与本发明的化合物同时或不同时给予。在后者情况中,给予可以是按照例如6小时,12小时,1天,2天,3天,1周,2周,3周,1个月或2个月错开进行。

[0050] 本发明提供了一种抑制生物样品中PI3K γ 激酶活性的方法,该方法包括将生物样品与本发明的化合物或组合物接触。本文所用的术语“生物样品”是指活生物体外的样品,包括但不限于细胞培养物或其提取物;得自哺乳动物的活检材料或其提取物;和血液,唾液,尿液,粪便,精液,泪液或其它体液或其提取物。生物样品中的激酶活性,特别是PI3K γ 激酶活性的抑制可用于本领域技术人员已知的多种目的。这些目的的实例包括但不限于生物标本贮藏和生物检验。在一个实施方案中,抑制生物样品中PI3K γ 激酶活性的方法限定于非治疗方法。

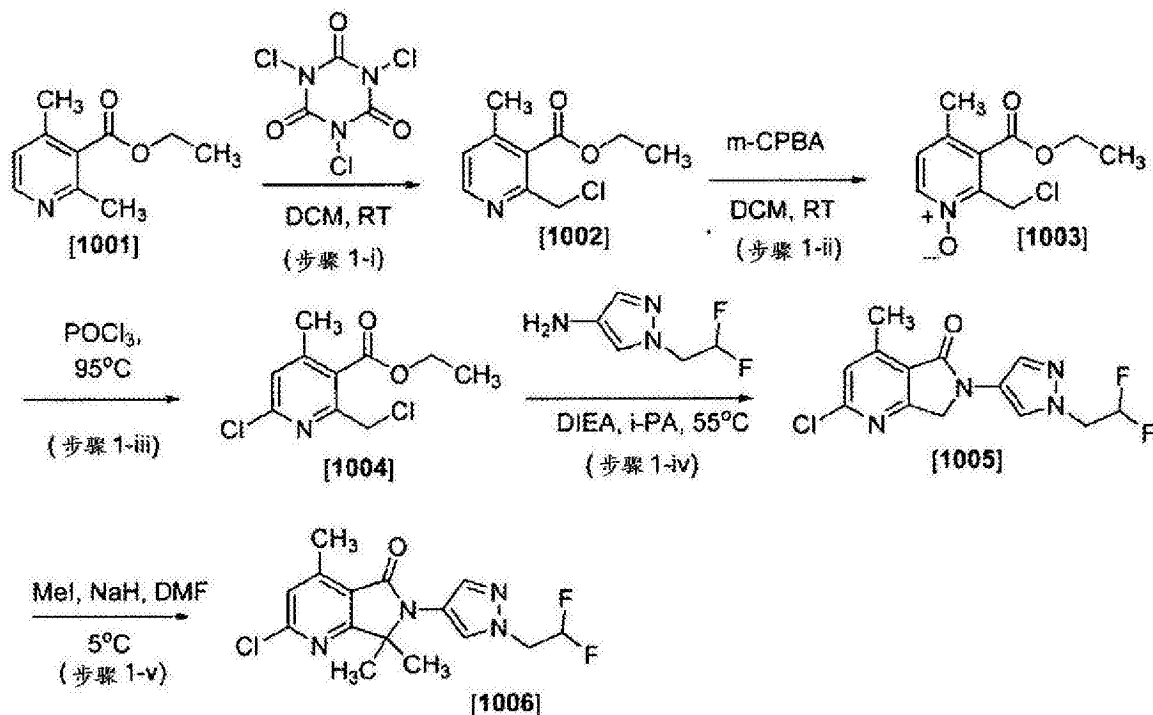
[0051] 本发明化合物的制备

[0052] 本文所用的所有缩写,符号和规定的含义与当代的科学文献中所用的那些一致。参见,例如Janet S.Dodd,ed.,ACS Style Guide:A Manual Authors and Editors,第2版,Washington,D.C.:American Chemical Society,1997。以下定义描述了本文所用的术语和缩写:

[0053] ATP 腺苷三磷酸

- | | | |
|--------|---|-----------------------|
| [0054] | Brine | 饱和NaCl水溶液 |
| [0055] | CRED | 羰基还原酶 |
| [0056] | DCM | 二氯甲烷 |
| [0057] | DIEA | 二异丙基乙胺 |
| [0058] | DMA | 二甲基乙酰胺 |
| [0059] | DMAP | 4-二甲氨基吡啶 |
| [0060] | DMF | 二甲基甲酰胺 |
| [0061] | DMSO | 二甲亚砜 |
| [0062] | dppfPdCl ₂ | 1,1'-双(二苯基膦基)-二茂铁二氯-钯 |
| [0063] | DTT | 二硫苏糖醇 |
| [0064] | ESMS | 电喷雾质谱法 |
| [0065] | Et ₂ O | 乙醚 |
| [0066] | EtOAc | 乙酸乙酯 |
| [0067] | EtOH | 乙醇 |
| [0068] | HEPES | 4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪乙磺酸 |
| [0069] | HPLC | 高效液相色谱法 |
| [0070] | LC-MS | 液相色谱法-质谱法 |
| [0071] | mCPBA | 间-氯过苯甲酸 |
| [0072] | Me | 甲基 |
| [0073] | MeOH | 甲醇 |
| [0074] | MTBE | 甲基叔丁基醚 |
| [0075] | MC | 甲基纤维素 |
| [0076] | NAD | 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 |
| [0077] | NMP | N-甲基吡咯烷酮 |
| [0078] | Ph | 苯基 |
| [0079] | RTorrt | 室温(20℃—25℃) |
| [0080] | tBu | 叔芳基丁基 |
| [0081] | TBME | 叔丁基甲基醚 |
| [0082] | TCA | 三氯乙酸 |
| [0083] | THF | 四氢呋喃 |
| [0084] | TEA | 三乙胺 |
| [0085] | 合成方法 | |
| [0086] | 一般可以通过本文所述的方法或通过本领域技术人员公知的其它方法制备化合物1。 | |
| [0087] | 实施例1. 2-氯-6-(1-(2,2-二氟乙基)-1H-吡唑-4-基)-4,7,7-三甲基-6,7-二氢-5H-吡咯并[3,4-b]吡啶-5-酮(化合物1006)的制备 | |

[0088]



方案 1

[0089] 正如方案1的步骤1-i中所示,在氮气气氛中向2,4-二甲基吡啶-3-甲酸乙酯(化合物1001,20.2g,112.5mmol)在二氯甲烷(100mL)中的溶液中逐步加入1,3,5-三氯-1,3,5-三嗪(triazinane)-2,4,6-三酮(31.4g,135.0mmol),历时15分钟。将该反应混合物在室温搅拌18小时。过滤得到的白色沉淀,然后依次用饱和NaHCO₃水溶液(2x100mL)和盐水(100mL)洗涤滤液。干燥有机相(Na₂SO₄),过滤,真空浓缩,得到2-(氯甲基)-4-甲基烟酸乙酯(22.9g,化合物1002),为黄色油状物:ESMS(M+H)=213.96。然后将该物质不经进一步纯化用于下一步:

[0090] 正如方案1的步骤1-ii中所示,向2-(氯甲基)-4-甲基烟酸乙酯(化合物1002,112.0g,524.2mmol)在二氯甲烷(484mL)中的溶液中加入3-氯过氧化苯甲酸(141.0g,629.0mmol)。将该反应混合物在室温在氮气气氛中搅拌过夜。用二氯甲烷(200mL)稀释该混合物,依次用饱和NaHCO₃水溶液(100mL)、饱和Na₂CO₃水溶液(100mL的2M溶液)和盐水洗涤。干燥有机相(Na₂SO₄),过滤,真空浓缩,得到2-(氯甲基)-3-(乙氧羰基)-4-甲基吡啶-1-氧化物(化合物1003):ESMS(M+H)=230.25。然后将该物质不经进一步纯化用于下一步:

[0091] 正如方案1的步骤1-iii中所示,将2-(氯甲基)-3-(乙氧羰基)-4-甲基吡啶-1-氧化物(化合物1003,69.3g,301.8mmol)在磷酰氯(450.1mL,4.8mol)中的溶液在氮气气氛中搅拌,在95°C加热60小时。将该反应混合物冷却至室温,真空蒸馏出磷酰氯。将得到的深色残余物溶于二氯甲烷(100mL),倾倒在1L烧杯中的冰(500g)上。将得到的混合物搅拌10分钟。用饱和NaHCO₃水溶液将该混合物的pH调整至稍高于7。分离有机相,再用二氯甲烷反萃取水相。连续用盐水洗涤合并的有机相,用Na₂SO₄干燥,过滤,真空浓缩。使用EtOAc/己烷(1:3)使残余物通过硅胶垫,减压除去挥发性物质后得到80%纯的产物(正如根据¹HNMR分析所示的)。通过中压硅胶色谱法进一步纯化该物质(10-25%EtOAc/己烷,330g Teledyne ISCO

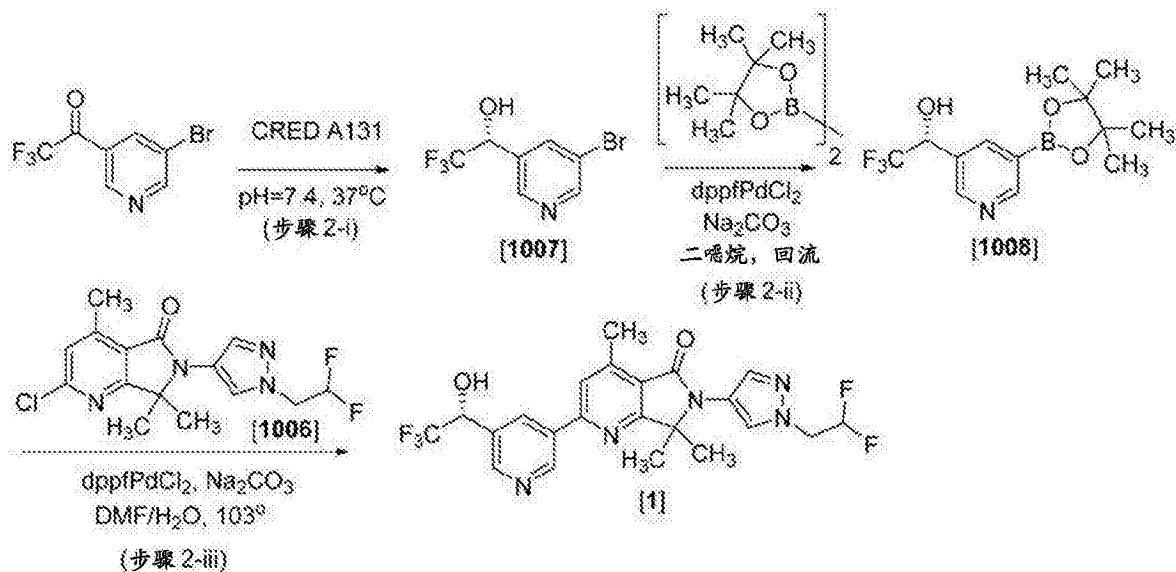
柱),得到6-氯-2-(氯甲基)-4-甲基烟酸乙酯(化合物1004,36.5g):ESMS(M+H)=248.04.

[0092] 正如方案1的步骤1-iv中所示,向1-(2,2-二氟乙基)吡啶-4-胺(48.2g,327.5mmol)在异丙醇(1.7L)中的溶液中加入6-氯-2-(氯甲基)-4-甲基烟酸乙酯(化合物1004,65.0g,262.0mmol),然后加入N,N-二异丙基乙胺(45.6mL,262.0mmol)。将该反应混合物在55℃加热72小时。将得到的白色混悬液冷却至室温,过滤,再用异丙醇(200mL)和乙醚(500mL)洗涤。将得到的固体在50℃真空烘箱干燥过夜,得到56g 2-氯-6-(1-(2,2-二氟乙基)-1H-吡啶-4-基)-4-甲基-6,7-二氢-5H-吡咯并[3,4-b]吡啶-5-酮(化合物1005):¹HNMR(300MHz,DMSO-d₆) δ 8.28(s,1H),7.87(d,J=0.5Hz,1H),7.52(s,1H),6.37(tt,J=54.9,3.7Hz,1H),4.85(s,2H),4.67(td,J=15.2,3.7Hz,2H),2.65(s,3H)。该物质包含7%的非环化副产物[6-氯-2-(((1-(2,2-二氟乙基)-1H-吡啶-4-基)氨基)甲基)-4-甲基烟酸乙酯],就这样用于随后的反应。

[0093] 正如方案1的步骤1-v中所示,向2-氯-6-(1-(2,2-二氟乙基)-1H-吡啶-4-基)-4-甲基-6,7-二氢-5H-吡咯并[3,4-b]吡啶-5-酮(化合物1005,46.0g,147.1mmol)在DMF(782.0mL)中的溶液中加入碘甲烷(20.1mL,323.6mmol)。将该混合物冷却至5℃,逐步加入氢化钠(12.9g,323.6mmol的60%矿物油分散液),历时15分钟。将该反应混合物在3℃搅拌45分钟。HPLC分析显示一甲基化(10%)、二甲基化(74%)和三甲基化(15%)产物与消耗的原料的混合物。再经过1小时后,再加入氢化钠(1.29g,32.36mmol的60%矿物油分散液),HPLC分析显示84%二甲基化期望的产物和16%三甲基化副产物。通过添加饱和NH₄Cl水溶液(1L)、硫代硫酸钠(400mL)和水(1L)终止反应。用EtOAc(800mL)将水相萃取2次。干燥合并的有机相(Na₂SO₄),过滤,真空浓缩。通过中压硅胶色谱法纯化残余物(0-40%EtOAc/己烷梯度,使用800g Teledyne ISCO柱),得到2-氯-6-(1-(2,2-二氟乙基)-1H-吡啶-4-基)-4,7,7-三甲基-6,7-二氢-5H-吡咯并[3,4-b]吡啶-5-酮(化合物1006,24g),为白色固体:¹HNMR(400MHz,DMSO-d₆) δ 8.21(s,1H),7.83(s,1H),7.54(s,1H)6.58-6.25(m,1H),4.67(td,J=15.1,3.7Hz,2H),2.65(s,3H),1.51(s,6H)。

[0094] 实施例2:(R)-6-(1-(2,2-二氟乙基)-1H-吡啶-4-基)-4,7,7-三甲基-2-(5-(2,2,2-三氟-1-羟基乙基)吡啶-3-基)-6,7-二氢-5H-吡咯并[3,4-b]吡啶-5-酮(化合物1)的制备

[0095]



方案 2

[0096] 正如方案2的步骤2-i中所示,将水(10L)加入到20L反应器中,然后加入KH₂PO₄(136g)。将该混合物搅拌至达到均匀,得到0.1M KH₂PO₄缓冲液。通过添加2M NaOH将该缓冲液的pH调整至pH7.5。使内部温度达到37°C。取出约500mL缓冲液用于随后添加NAD和CRED A131细胞浆(cellpaste)(Almac Group, Ltd.)。因此,将NAD(20g)在缓冲液(100mL)中的溶液加入到剩余的9.5L缓冲液中,然后加入1-(5-溴吡啶-3-基)-2,2,2-三氟乙-1-酮(1020g)在MTBE(1.5L)中的溶液。异丙醇(1L)用于再冲洗烧瓶进入反应。通过将CRED A131 cellpaste(100g)在缓冲液(400mL)中的混悬液添加该反应混合物中启动还原。在该反应过程中,从搅拌的混合物中取出双相反应样品(~2mL),用EtOAc(10mL)萃取,用MgSO₄干燥,蒸发,通过¹HNMR在DMSO-d₆中分析,以便监测原料向产物的转化率。在1小时后,观察到50%的转化率。在3小时后,观察到>99%的转化率。用2M NaOH将该反应体系的pH调整至11,搅拌30分钟,以使每变性。用2M HCl将pH调整至9。向该反应混合物中加入EtOAc(5L)或硅藻土(650g),持续搅拌10分钟。通过硅藻土垫过滤得到的乳状液,以分离有机相和水相。用EtOAc(2L)洗涤垫,分离有机层。用EtOAc(6L)萃取水层,用盐水(4L)洗涤合并的有机相,通过添加MgSO₄(200g)和搅拌30分钟干燥。过滤,真空除去挥发性物质,得到淡黄色油状物,在静置时快速固化。将固体打碎成块,在环己烷(2L)中搅拌成淤浆。向该混合物中加入EtOAc(~500mL),在45°C搅拌以溶解该固体。然后再真空浓缩该混合物,直到白色固体开始从溶液中沉淀。再加入环己烷(2L),用冰浴将该溶液冷却至0°C。搅拌30分钟后,通过过滤采集固体,用环己烷(500mL)洗涤,真空烘箱干燥,得到812g(R)-1-(5-溴吡啶-3-基)-2,2,2-三氟乙-1-醇(化合物1007, 99.95% ee, 通过HPLC分析),为颗粒状白色固体:¹HNMR(400MHz, DMSO-d₆) δ8.72(s, 1H), 8.61(s, 1H), 8.08(s, 1H), 5.09-5.15(m, 1H)。

[0097] 正如方案2的步骤2-ii中所示,向(1R)-1-(5-溴-3-吡啶基)-2,2,2-三氟乙醇(化合物1007, 49.5g, 193.3mmol)、4,4,5,5-四甲基-2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-1,3,2-二氧杂环戊硼烷(58.9g, 232.0mmol)和KOAc(37.9g, 386.6mmol)在二噁烷(1.2L)中的溶液通氮气20分钟。向该反应混合物中加入dppfPdCl₂*DCM(7.8g, 9.7mmol)。再给该混合物通氮气20分钟,加热至回流2小时。冷却至室温后,通过硅酸镁载体垫(400mL)过

滤该混合物,用50%EtOAc/CH₂Cl₂(1.5L)洗涤饼状物。减压浓缩得到的滤液,得到黄色油状物,用己烷(800mL)稀释,真空浓缩,得到泡沫状黄色固体。将该黄色固体与己烷(800mL)一起搅拌2小时,得到白色固体沉淀。通过过滤采集白色固体,干燥,得到(1R)-2,2,2-三氟-1-[5-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-3-吡啶基]乙醇(化合物1008,48.4g):¹HNMR(400MHz,CDCl₃) δ 8.97(s,1H),8.78(s,1H),8.29(s,1H),5.10-5.21(m,1H);1.38(s,6H),1.29(s,6H)。

[0098] 正如方案2的步骤2-iii中所示,向2-氯-6-(1-(2,2-二氟乙基)-1H-吡啶-4-基)-4,7,7-三甲基-6,7-二氢-5H-吡咯并[3,4-b]吡啶-5-酮(化合物1006,42.0g,123.3mmol)、(1R)-2,2,2-三氟-1-[5-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-3-吡啶基]乙醇(化合物1008,46.7g,148.0mmol)和Na₂CO₃(28.8g,271.3mmol)在DMF(630mL)和水(210mL)中的溶液中通氮气30分钟。向该混合物中加入dppfPdCl₂*DCM(2.99g,3.699mmol),给该混合物再通氮气30分钟。将该反应混合物加热至103℃,搅拌2小时。将该混合物冷却至室温,用水(2L)稀释。用EtOAc(1L)将水相萃取2次。高度真空下真空浓缩合并的有机相,以除去DMF。用EtOAc稀释残余物,用水洗涤,然后用盐水洗涤。干燥有机相(Na₂SO₄),过滤,真空浓缩。通过中压硅胶色谱法纯化粗残余物(0-100%EtOAc/己烷梯度,使用1500g Teledyne ISCO柱),得到54g期望的产物,为淡红色泡沫状固体。将该固体溶于二氯甲烷。压过硅酸镁载体垫(200mL),依次用EtOAc/CH₂Cl₂混合物[首先40%(1L),然后60%(1L),然后80%(1L)]洗涤。合并滤液,真空浓缩。用庚烷(400mL)将残余物稀释2次,真空浓缩,得到饼状物,然后用TBME洗涤,以除去淡黄色,在60℃真空烘箱干燥4天,得到(R)-6-(1-(2,2-二氟乙基)-1H-吡啶-4-基)-4,7,7-三甲基-2-(5-(2,2,2-三氟-1-羟基乙基)吡啶-3-基)-6,7-二氢-5H-吡咯并[3,4-b]吡啶-5-酮(化合物1,47g):¹HNMR(400MHz,CDCl₃) δ 9.33(s,1H),8.75(s,1H),8.54(s,1H),8.01(s,1H),7.75(s,1H),7.62(s,1H),6.14(tt,J=55.4,3.6Hz,1H),5.28-5.11(m,1H),4.51(td,J=13.5,4.2Hz,2H),4.33(d,J=4.6Hz,1H),2.82(s,3H),1.68(s,6H)。

[0099] 对PI3K- γ 脂质激酶的体外效能

[0100] 实施例3.PI3K抑制试验

[0101] 使用来自Beckman Coulter的Biomek FX,将10个100%DMSO中2.5倍连续稀释的本发明化合物各1.5 μ L加入到96孔聚苯乙烯平板[Corning, Costar Item No.3697]的单个孔中(后面称为“测试孔”)。一个测试孔还含有1.5 μ L不含化合物的DMSO。另一个孔在DMSO中含有已知能完全抑制酶的浓度的抑制剂(后面称为“背景孔”)。使用Titertek Multidrop,将50 μ L反应混合物[100mM HEPES pH 7.5,50mM NaCl,10mM DTT,0.2mg/mL BSA,60 μ M磷脂酰肌醇(4,5)二磷酸酯diC16(PI(4,5)P₂;Avanti Polar Lipids,Cat.No.840046P)和关注的PI3K同工型(同工型的浓度参见表1)]加入到各个孔中。为启动反应,将50 μ L ATP混合物[20mM MgCl₂,6 μ M ATP(100 μ Ci/ μ mol ³³P-ATP)]加入到各个孔中,然后将各个孔在25℃下温育30分钟。各个孔的最终浓度为50mM HEPES 7.5,10mM MgCl₂,25mM NaCl,5mM DTT,0.1mg/mL BSA,30 μ M PI(4,5)P₂,3 μ M ATP和关注的PI3K同工型(参见表3)。各个孔中最终化合物浓度为10 μ M-1nM。

[0102] 表1

[0103]

PI3K同工型浓度	PI3K- α	PI3K- β	PI3K- γ	PI3K- δ
-----------	----------------	---------------	----------------	----------------

反应混合物中的酶浓度	4nM	20nM	4nM	4nM
最终酶浓度	2nM	10nM	2nM	2nM

[0104] 在温育后,各个孔中的反应通过加入50 μ L终止溶液[30%TCA/水,10mM ATP]淬灭。然后将各个淬灭的反应混合物转移到96孔玻璃纤维滤板中[Corning, Costar Item No.3511]。将平板真空过滤,然后用150 μ L的5%TCA/水在改良的Bio-Tek Instruments ELX-405自动平板洗涤器中洗涤3次。将50 μ L闪烁流体加入各个孔中,并将平板在Perkin-Elmer TopCount™ NXT液体闪烁计数器上读数,从而获得代表抑制值的³³P-数。

[0105] 从各个测试孔获得的数值中减去背景孔的数值,将数据拟合入Morrison和Stone, Comments Mol.Cell Biophys.2:347-368,1985中描述的竞争紧密结合 K_i 等式中。化合物1的PI3K γ 抑制程度随ATP浓度呈线性改变,显示竞争性抑制,其中 K_i 值为 $8+/-4$ nM。此外,还观察到化合物1对PI3K- α 、PI3K- β 、PI3K- δ 同工型测试的同工型选择性且确定对PI3K γ 15倍以上的选择性,如表2中所示。

[0106] 表2. 化合物1的PI3K同工型选择性

[0107]

Isoform	K_i (μ M)	选择性倍数
PI3K α	0.28 \pm 0.09	30
PI3K β	0.22 \pm 0.03	26
PI3K δ	0.16 \pm 0.05	19
PI3K γ	0.008 \pm 0.004	NA

[0108] 细胞效能

[0109] PI3K是由调节亚基和催化亚基组成的多亚基复合物。这类酶催化磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(PIP2)的磷酸化,得到第二信使磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸(PIP3)。受体活化导致PIP3水平瞬时增加。PIP3作为质膜上的停泊位点起作用,从而补充和活化包含蛋白质(例如Akt、PDK-1、Tek激酶等)的普列克底物蛋白同源性(PH)结构域。然后它们调节关键细胞功能,例如生长、代谢、迁移、呼吸暴发等。当下游效应物在PI3K信号传导途经中是常见的时,它是确定PI3K同工型在活化时补充的受体。基于此,众多基于生化-pAkt的和功能性试验用于分析PI3K γ 抑制剂相对于另外的PI3K同工型的效能和选择性。

[0110] 实施例4. THP-1细胞中MCP-1刺激的pAkt

[0111] 趋化因子如MCP-1结合其受体,导致PI3K γ 信号传导途经活化。PI3K γ 导致PIP3生成和下游分子(如PDK-1和Akt)活化。Akt磷酸化是细胞中PI3K活性的量度。在本试验中,使THP-1细胞(人单核细胞系)饥饿过夜,以耗尽pAkt水平。随后用MCP-1刺激3分钟导致PI3K γ 诱导的苏氨酸308和丝氨酸473位点上Akt的磷酸化。固定细胞,染色胞内phosphoAKT (Ser473),然后使用BD FACSCalibur™细胞计数器分析,得到细胞PI3K γ 活性的测量值。在本试验中化合物1具有 $0.24\pm 0.07\mu$ M的 IC_{50} 。参见表3。

[0112] 表3. 化合物1在PI3K- $\alpha/\beta/\delta$ 依赖性体外试验中的效能

[0113]

细胞试验	PI3K 同工型 依赖性	IC ₅₀ (μM) 平均值 ±标准偏差	试验次数 (N)
THP-1/MCP-1/pAkt 分离的白细胞突发性 氧化作用试验 (oxidative burst)	PI3K γ	0.24 ± 0.07	20
全血突发性氧化作用试验	PI3K γ	0.22 ± 0.08	3
	PI3K γ	0.57 ± 0.08	3

[0114] 实施例5.全血和白细胞突发性氧化作用试验

[0115] 中性白细胞、单核细胞和巨噬细胞是先天免疫性的关键介体。它们释放活性氧 (ROS) 作为先天性免疫炎症应答的组成部分。ROS 产生被炎症介体诱导, 如趋化因子、细菌肽类和募集先天性免疫细胞至炎症部位的补体。这些炎症介体触发 PI3K γ 活化并且启动下游信号传导级联, 其导致在生成 ROS 的质膜处完全 NADPH 氧化酶复合物装配。根据生成的 ROS 确定全血和棕黄层中性白细胞和单核细胞中的 PI3K γ 功能活性。用 TNF- α 将细胞刺激 10 分钟, 然后用细菌细胞壁衍生的趋化性肽 fMLP 刺激 20 分钟, 并且加载非荧光染料二氢罗丹明 1, 2, 3 (DHR)。由细胞产生的 ROS 由此将 DHR 氧化成荧光罗丹明, 导致细胞中的荧光罗丹明含量增加。根据中性白细胞和单核细胞在 fMLP 刺激后生成 ROS 的能力确定 PI3K γ 功能活性。使用 BD FACSCalibur™ 分析白细胞和全血样品, 以便对荧光罗丹明的细胞阳性定量。棕黄层细胞在血清的存在下生成 IC₅₀s, 并且全血试验在不存在血清下生成 IC₅₀s。化合物 1 在棕黄层白细胞试验中具有 0.22 μM 的 IC₅₀ 并且在全血试验中具有 0.57 μM 的 IC₅₀, 参见表 3。

[0116] 实施例6. THP-1 细胞中 CSF-1 刺激的 pAkt

[0117] 生长因子、细胞因子和其它受体酪氨酸激酶配体 (如 CSF1) 结合其受体, 导致 IA 类 PI3K 信号传导途经活化。PI3K 活化导致生成 PIP3 和下游分子 (如 PDK-1 和 Akt) 活化。Akt 磷酸化是细胞中 PI3K 活性的量度。使 THP-1 细胞 (人单核细胞系) 饥饿过夜以耗尽 pAkt 水平。用 CSF-1 刺激 5 分钟导致 PI3K $\alpha/\beta/\delta$ 诱导的苏氨酸 308 和丝氨酸 473 位点上 Akt 的磷酸化。固定细胞, 染色胞内 phosphoAkt (Ser473), 然后使用 BD FACSCalibur™ 细胞计数器分析。这是细胞 IA 类 PI3K 抑制的测量值。化合物 1 在本试验中具有 >9.7 μM 的 IC₅₀, 显示于 IA 类 PI3Ks 的选择性。参见表 4。

[0118] 实施例7. 人 B 细胞增殖试验

[0119] B 细胞的发育和活性高度依赖于 PI3K δ 。PI3K γ 通过 B 细胞受体 (BCR) 复合物在信号传导过程中具有必需和非多余的作用。IgM 诱导的 Ca⁺ 流入和增殖在缺乏 PI3K- δ 或使用 PI3K- δ 抑制剂的小鼠中减弱。PI3K γ 在任何 B 细胞活性中都不起作用。BCR 复合物对 PI3K γ 的特异性使得它成为用于评价 PI3K γ 在细胞中抑制作用程度的理想的 PI3K γ 试验。在测试化合物的存在下用抗-IgM 刺激纯化的人 B 细胞。4 天后, 使用 cell titer-glo 测量细胞存活率/增殖率, 以便测定各孔中细胞的 ATP 含量。增殖缺乏或减少是 PI3K γ 抑制作用程度的测量值。化合物 1 具有 3.05 ± 0.44 μM 的 IC₅₀, 显示 11-倍于 PI3K- δ 的选择性窗。参见表 4。

[0120] 实施例8. HUVEC 增殖试验

[0121] PI3Ks 是调节细胞存活、生长和细胞周期进入的众多生长因子下游的重要信号传导分子。PI3K- α 和 PI3K- β 同工型调节细胞周期进入; 抑制任一同工型导致细胞生长下降。HUVECs 是表达 PI3K α 和 PI3K β 同工型的初级人脐静脉内皮细胞。抑制 PI3K α 或 PI3K β 同工型任

一种或它们两者将抑制HUVECs细胞生长。将化合物在HUVECs上铺展,化合物处理后96小时,使用cell titer-glo测量细胞增殖率/存活率,以便测定各孔中细胞的ATP含量。增殖缺乏或减少是PI3K α 和/或PI3K β 抑制作用程度的测量值。化合物1在本试验中具有 $>19\mu\text{M}$ 的IC₅₀,显示 >74 -倍于PI3K α/β 的选择性。参见表4。

[0122] 实施例9.MCF-7增殖试验

[0123] PI3K-Akt信号传导途经调节许多正常细胞过程,包括细胞增殖、存活和生长,它们对于肿瘤发生而言是关键的。PI3K信号传导途经失调通常发生在人癌中。MCF7是人乳腺癌细胞系,其在p110 α 蛋白的螺旋结构域中具有活化E545K PI3K α 杂合突变,导致PI3K- α 途径活动过度。抑制MCF7细胞中的PI3K- α 信号传导抑制细胞生长且由此可以在MCF7增殖试验中评价PI3K- α 抑制剂。将化合物加入到MCF7细胞中,化合物处理后96小时,使用cell titer-glo测量细胞增殖率/存活率,以便测定各孔中细胞的ATP含量。增殖缺乏或减少是PI3K α 抑制作用程度的测量值。化合物1在本试验中具有 $>17\mu\text{M}$ 的IC₅₀,由此显示 >67 -倍于PI3K α 的选择性。参见表4。

[0124] 如上所述,化合物1具有极佳的效能,在PI3K γ 相关细胞试验中为 $0.25\mu\text{M}$;在基于细胞的试验中具有 12 -倍于PI3K- δ 的选择性;和 40 - 80 倍于PI3K α 和PI3K β 的选择性。

[0125] 表4. 化合物1在PI3K $\alpha/\beta/\delta$ 依赖性体外试验中的效能

[0126]

细胞试验	PI3K 同工型 依赖性	IC ₅₀ (μM) 平均值 \pm SD	试验次数(N)
THP-1/CSF-1/pAkt	PI3K- $\alpha/\beta/\delta$	$>9.7 \pm 0.7$	20
B 细胞/IgM/增殖	PI3K γ	3.05 ± 0.44	5
HUVEC 增殖	PI3K- α/β	>19	5
MCF7 增殖	PI3K- α	$>17^{**}$	4

[0127] *每个试验数据(μM) $\rightarrow 20. >20, 19.8$

[0128] **每个试验数据(μM) $\rightarrow 15.7, >20, 18, 17$

[0129] 药物代谢

[0130] 实施例10. 重组CYP酶导致的化合物1代谢

[0131] 包含重组CYP酶(CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6、2E1和3A4)的微粒体用于测定该CYP催化化合物1的氧化。因此,将化合物1($1\mu\text{M}$)与各重组CYPs在辅因子NADPH的存在下一起温育。通过LC-MS/MS测定温育期结束时剩余的母体药物百分比并且与开始时存在的百分比比较。结果如表5中所示。尽管是以低表观率,但是仅在与CYP3A4一起温育中检测到化合物1的代谢。

[0132] 表5. 化合物1与重组CYP酶一起温育的稳定性*

[0133]

CYP	1A2	2B6	2C8	2C9	2C19	2D6	2E1	3A4
%母体 剩余 @30min	105	107	105	108	118	100	105	92

[0134] *数据表示为平均值(SD)

[0135] 实施例11. 化合物1对CYP酶的抑制

[0136] 评价人肝微粒体中化合物1(0.01—100 μ M)可逆地抑制CYP酶(CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6和3A4)的潜能。抑制试验以特定底物浓度(接近其解离常数(K_m)值)使用针对每种CYP酶的选择性CYP探针进行。数据如表6中所示。化合物1是CYP1A2、2B6和2C8的中度抑制剂;IC₅₀值为4—7 μ M。

[0137] 表6. 化合物1对在人肝微粒体中的CYP酶的抑制

[0138]

底物	酶	IC ₅₀ (μ M)
30 μ M 非那西丁	CYP1A2	7
100 μ M 安非他酮	CYP2B6	4
2.5 μ M 紫杉醇	CYP2C8	7
2.5 μ M 双氯芬酸	CYP2C9	32
30 μ M S-美芬妥英	CYP2C19	21
10 μ M 丁呋洛尔	CYP2D6	64
50 μ M 睾酮	CYP3A4	>75
2.5 μ M 咪达唑仑	CYP3A4	19

[0139] 还在人肝微粒体中采用IC₅₀转移试验评价使用化合物1对CYP3A4的时间依赖性抑制。在本研究中,将0.1—50 μ M的化合物1与人肝微粒体在NADPH的存在下和它不存在下一起预温育0和30分钟。然后用缓冲液将温育体系稀释10—倍并且测定剩余CYP3A4(睾酮-6- β -羟化酶)活性,历时10分钟期限。在NADPH的存在下或其不存在下化合物1的IC₅₀没有显著性改变(IC₅₀变化=1)。

[0140] 这一结果在追踪研究中得到验证,其中在与10或50 μ M化合物1一起预温育后评价人肝微粒体中的CYP3A4时间-依赖性抑制,历时期限为0、5、10、15和30分钟。本研究中,在两种浓度下,与阳性对照米非司酮的K_{obs}=0.053/min相比,观察到的CYP3A4活性缺失的速率常数(K_{obs})为0.0039/min。来自这些研究的两个结果的数据显示化合物1不以时间依赖性方式抑制CYP3A4。

[0141] 实施例12. 酶诱导

[0142] 在为人肝癌细胞系的DPX2细胞中以0.1—30 μ M的6个浓度评价化合物1活化孕烷-X受体(PXR)的潜能,该细胞系中人PXR基因和连接至人CYP3A4基因的两个启动子的荧光素酶报道基因被稳定地超表达。将利福平用作阳性对照,化合物1显示得到应答的显著活化水平,其为具有EC₅₀值>30 μ M的阳性对照的5%。

[0143] 还评价了在肝细胞中化合物1诱导CYP1A2和CYP3A4的潜能。将0.1—30 μ M的化合物1与培养的冷藏保存的来自3个不同供体的初级人肝细胞一起温育48小时,并且与阳性对照的作用比较(即CYP诱导物:50 μ M奥美拉唑,CYP1A2;和10 μ M利福平,CYP3A4)。通过使用LC-MS/MS监测特异性CYP探针底物的代谢物形成测定CYP活性(非那西丁,CYP1A2;和睾酮,CYP3A4)。通过RT-PCR分析CYP信使核糖核酸(mRNA)以证实CYP诱导潜能。结果如表7中所示。

[0144] 在暴露于化合物1后在全部3个肝细胞批号中CYP1A2或CYP3A4活性和mRNA水平的改变均低于阳性对照的20%。这些体外数据表明在暴露于人肝细胞中48小时后,化合物1具有的诱导CYP1A2或CYP3A4的潜能较低。

[0145] 表7. 化合物1在人肝细胞中的CYP1A2和CYP3A4诱导

[0146]

处理	CYP1A2 诱导潜能 ^a		
	人肝细胞批号#		
	LMP	YOW	8123
	非那西丁 O-脱烷基化 (mRNA 信息)		
50μM 奥美拉唑	36.3 (71.5)	17.9 (83.6)	25.7 (118.0)
0.5 μM 化合物 1	0.7 (0.6)	1.1 (0.5)	0.6 (0.6)*
1.0 μM 化合物 1	0.8 (0.6)	1.1 (0.4)	0.5 (0.5)
5.0 μM 化合物 1	0.9 (0.7)	1.1 (0.6)	0.8 (0.5)
10.0 μM 化合物 1	1.0 (0.8)	1.2 (1.3)	0.7 (1.2)
20.0 μM 化合物 1	1.1 (0.7)	1.3 (0.8)	1.2 (2.6)
30.0 μM 化合物 1	1.1 (1.4)	1.5 (NR ²)	1.3 (NR ²)
处理	CYP3A4 诱导潜能 ^a		
	人肝细胞批号#		
	LMP	YOW	8123
	睾酮-6β-羟基化 (mRNA 信息)		
10μM 利福平	13.2 (10.4)	16.0(29.3)	40.4 (210.3)
0.5 μM 化合物 1	0.9 (1.0)	1.0 (1.3)	0.3 (0.4)
1.0 μM 化合物 1	0.8 (0.7)	0.8 (0.2)	0.5 (0.3)
5.0 μM 化合物 1	1.1 (1.1)	0.9 (NR ¹)	0.4 (0.5)
10.0 μM 化合物 1	1.1 (1.5)*	0.8 (NR ¹)	0.4 (1.1)
20.0 μM 化合物 1	1.4 (3.0)	0.6 (NR ¹)	0.6 (0.7)
30.0 μM 化合物 1	1.0 (2.5)	0.6 (NR ¹)	0.7 (NR ²)

[0147] ^a表示为相对于溶剂对照的倍数改变

[0148] NR¹未报道,因为响应低于赋形剂对照

[0149] NR²未报道,因为细胞毒性

[0150] 实施例13. 流出物潜在的渗透性

[0151] 使用Caco-2和MadinDarby犬肾(MDCK)野生型细胞系评价化合物1的渗透性。使细胞暴露于顶面上(测量A-至-B方向上的渗透性)或底外侧(测量B-至-A方向上的渗透性)的缓冲液中的药物并且在37°C温育1小时。结果如表7中所示。在MDCK和Caco-2细胞系中在A-至-B方向上的渗透性均较高(分别为33和18x10⁻⁶cm/秒)。

[0152] 通过使用人P-gp(MDR)超表达的MDCK细胞系对化合物1是否为流出物转运蛋白底物进行评价。在该细胞系中检测赋形剂转运(流出率=35.1),表明化合物1是P-gp底物。参见表8。

[0153] 表8. Caco-2、MDCK-WT和MDCK-MDR1细胞系中流出率和化合物1回收的概述

[0154]

细胞系	化合物1 浓度	平均 P _{表现} ($\times 10^{-6}$ cm/秒) \pm SD		平均% 收率 \pm SD	流出率
		A>B	B>A		
Caco-2	5 μ M	A>B	32.6	87	1.9
		B>A	60.7	96	
MDCK-WT	1 μ M	A>B	17.55	90	1.4
		B>A	23.78	93	
MDCK- MDR1	1 μ M	A>B	0.98	97	35.1
		B>A	34.33	87	

[0155] 体内药代动力学

[0156] 实施例14. 静脉内推注给药

[0157] 在静脉内施用单一推注剂量后, 化合物1在所有测试种类中具有低全身清除率和长半衰期。参见表9。化合物1在小鼠、大鼠、狗和猴子的肝血流中的清除率值表示约为5.4%、3.6%、13%和26%。分布体积大于全身水体积, 表明化合物1分布于组织。

[0158] 表9. 单一IV推注施用后化合物1的平均药代动力学参数

[0159]

种类	标示剂 量 ^b (mg/kg)	AUC _{ALL} (μ g*hr/mL)	AUC _{INF} (μ g*hr/mL)	DN_AUC _{INF} (μ g*hr/mL)	CL (mL/min/kg)	% HBF ^a	T _{1/2} (hr)	V _{ss} (L/kg)
小鼠	0.45	1.09	1.53	3.4	4.9	5.4	4.3	1.8
大鼠	0.5	2.69	3.1	6.2	2.8	3.6	8.2	1.8
狗	0.5	1.9	2.0	4.0	5.4	13	10.7	3.9
猴子	0.5	0.7	0.74	1.5	11.5	26	6.6	3.3

[0160] ^aHBF, 肝血流

[0161] ^b对小鼠、大鼠和猴子测量的剂量分别为0.32、0.47、0.5和0.46mg/kg。PK计算基于标示剂量。

[0162] 实施例15. 口服生物利用度

[0163] 如表10中所示, 给小鼠、大鼠和猴子施用单剂量的化合物1后, 化合物1的口服生物利用度高(>80%)。在猴子中的生物利用度(大于100%)可以解释为IV与口服剂量之间的10倍差异。化合物1在所有种类中被快速吸收, 其中在给药的约1-3小时内观察到最大全身浓度。

[0164] 表10. 给小鼠、大鼠、狗和猴子单一口服施用后化合物1的平均药代动力学参数

[0165]

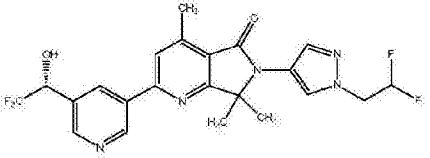
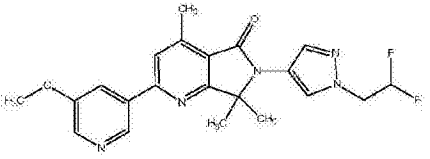
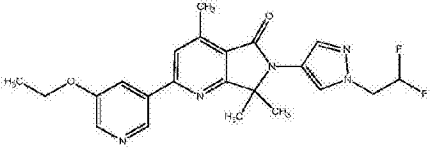
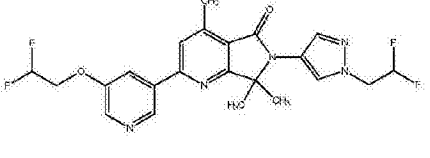
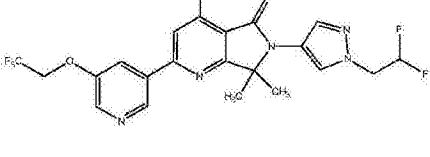
种类	标示剂量 ^c (mg/kg)	AUC _{ALL} ($\mu\text{g}^*\text{hr}/\text{mL}$)	AUC _{INF} ($\mu\text{g}^*\text{hr}/\text{mL}$)	DN_AUC _{INF} ($\mu\text{g}^*\text{hr}/\text{mL}$)	C _{max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	T _{max} (hr)	T _{1/2} (hr)	MRT (hr)	F %
小鼠 ^a	1	2.72	2.76	2.76	0.29	2	3.8	5.8	81
大鼠 ^b	1	5	5.11	5.14	0.26	3.33	12.5	18.3	84
狗 ^b	3 [*]	9.11	9.29	3.1	1.29	0.83	7.3	9	77
猴子 ^b	5	12.3	12.5	2.5	1.35	1.67	8.5	10.5	126

[0166] ^a赋形剂:0.2%,MC/1%SLS[0167] ^b喷雾干燥的分散液,赋形剂:2%TPGS/1.5%HPMCAS-HF/1.5%PVP-VA,含有50mM柠檬酸盐pH5[0168] ^c对小鼠、大鼠和猴子测量的剂量分别为0.95、0.68、2.6和4.4mg/kg。PK计算基于标示剂量。

[0169] 表11提供国际专利申请公开号W02011/087776(“776申请”)中所述的PI3K抑制剂的药代动力学数据,所述PI3K抑制剂各自具有与化合物1相同的核心药效团结构。分别参见第229、229、234和242页上的‘776申请的化合物705、709、735和772。静脉内递送后化合物1的全身血浆清除率显著地(2.5倍—8倍)低于使用其它化合物在研究中观察到的结果。血浆清除率数据与静脉内数据、口服暴露、AUC和C_{max}值一致。这些数据表明化合物1与这些化合物相比具有预料不到的有利的药代动力学特性。

[0170] 表11.口服施用的化合物1与对比化合物相比的平均药代动力学参数

[0171]

化合物编号	结构	大鼠IV ¹ AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$)	大鼠IV CL ($\text{mL}/\text{min}/\text{kg}$)	大鼠PO ² AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{mL}$)	大鼠PO C_{max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
I		3.1	2.8	18	1.0
A (WO2011/087776 中的 705 号)		0.22	22	0.3	0.06
B (WO2011/087776 中的 709 号)		0.33	22	0.6	0.12
C (WO2011/087776 中的 735 号)		0.59	11	3	0.2
D (WO2011/087776 中的 772 号)		1.2	7	9	0.5

[0172] ¹静脉内推注研究,0.5mg/kg标示剂量;赋形剂355PEG400/25%NMP/40%水

[0173] ²口腔管饲法研究,3mg/kg标示剂量;赋形剂0.2%MC/1%SLS

[0174] 实施例16.大鼠中的组织分布

[0175] 化合物1在5mg/kg口服剂量施用于雄性大鼠后充分分布入大部分组织。参见表12。脑和脑脊髓液(CSF)是显示极低暴露于化合物1的器官,其中 C_{max} 分别为111ng/g和27ng/mL (<0.1%的血浆暴露)。化合物1充分分布于肝和肾,其中 C_{max} 分别为11400和4770ng/g。组织与血浆比遵循肝>肾>心脏>肺>脾>脑>CSF的趋势。化合物1在每个检查器官中的消除动力学遵循血浆动力学。没有证据显示单剂量施用后化合物1的组织蓄积。

[0176] 表12.单一5mg/kg口服剂量后化合物1的平均组织和血浆浓度以及组织与血浆比

[0177]

组织	化合物 1 浓度 (ng/ml 或 ng/g)					组织与血浆比				
	0.5	2	7	24	48	0.5	2	7	24	48
剂量后小时数	0.5	2	7	24	48	0.5	2	7	24	48
脑	74	129	111	30	9.35	0.04	0.07	0.05	0.06	0.07
CSF	20	23.3	27	5	BQL	0.01	0.01	0.01	0.01	BQL
心脏	1730	3280	3100	771	196	0.98	1.67	1.40	1.46	1.39
肾	3070	4980	4770	1600	673	1.75	2.54	2.16	3.03	4.76
肝	8710	13700	11400	3010	750	4.96	6.99	5.13	5.69	5.32
肺	2180	2710	2700	617	185	1.24	1.38	1.22	1.17	1.31
脾	1290	1790	491	125	BQL	0.74	1.15	0.81	0.93	0.88
血浆	1760	1960	2210	592	141	--	--	--	--	

[0178] BQL = 低于可计量限。将化合物1在含有50mM柠檬酸盐pH5的2%TPGS/1.5%HPMCAS-HF/1.5%PVP-VA中的喷雾干燥的分散液给药。

[0179] 实施例17. 小鼠CIA模型中的化合物1

[0180] 将化合物1以2.5mg/kg BID(5mg/kg/天)、5mg/kg BID(10mg/kg/天)或10mg/kg BID(20mg/kg/天)在治疗小鼠的胶原蛋白诱发的关节炎(CIA)模型中测试。以30mg/kg BID(60mg/kg/天)口服给予用作参比标准品的Syk小分子抑制剂福他替尼。将化合物1在12/12-小时BID给药方案中给药10天,直到研究结束。用0.2%MC,1%SLS配制化合物1。给药体积为10mL/kg。在最终剂量后2、4和12小时采集末端血浆样品。采集全部4个爪和膝并且加工处理用于组织病理学。

[0181] 使用化合物1治疗在CIA模型中显示显著的有益效果,正如通过评价临床关节炎评分和关节的组织病理学所确定的。与赋形剂对照相比,用2.5mg/kg BID化合物1(*d2-11)、5mg/kg BID化合物1(*d2-11)、10mg/kg BID化合物1(*d2-11)或30mg/kg BID福他替尼(*d2-11)治疗的小鼠的每日测定的关节炎评分显著地下降至正常。参见图1。当仅考虑登记时显示临床关节炎征候的那些爪(治疗爪)时,使用5mg/kg BID化合物1(*d5-11)或10mg/kg BID化合物1(*d2-11)治疗的小鼠的临床关节炎评分显著下降,但使用30mg/kg BID福他替尼治疗组没有这种情况。参见图2。当仅考虑登记时未显示临床关节炎征候的那些爪(预防爪)时,与赋形剂对照组比较,使用2.5mg/kg BID化合物1(*d2,4-11)、5mg/kg化合物1BID(*d2-11)、10mg/kg化合物1BID(*d2-11)或30mg/kg BID福他替尼(*d5-9)治疗的小鼠的临床关节炎评分均显著下降。参见图3。

[0182] 如表13中所示,与赋形剂对照组相比,用30mg/kg BID福他替尼(25%)、2.5mg/kg BID化合物1(28%)、5mg/kg BID化合物1(63%)或10mg/kg BID化合物1(89%)治疗的小鼠的表示为曲线下的面积(AUC)的临床关节炎评分显著下降至正常。当仅考虑治疗爪时,用10mg/kg BID化合物1(79%)治疗的小鼠的关节炎评分AUC显著地下降。当仅考虑预防爪时,与赋形剂对照组相比,用30mg/kg BID福他替尼(32%)、2.5mg/kg BID化合物1(42%)、5mg/kg

kg BID化合物1(81%)和10mg/kg BID化合物1(98%)治疗的小鼠的关节炎评分AUC均显著地下降。

[0183] 表13.CIA模型中化合物1的临床关节炎评分

[0184]

治疗(mg/kg BID)	临床评分数据			组织病理学总计评分		
	所有爪评分	治疗爪评分	预防性爪评分	6 个关节		
	AUC(SEM)	AUC(SEM)	AUC(SEM)	爪(SEM)	膝盖(SEM)	
首次用于实验	*0(SE0.00)		*0(0.00)	*0 (0.00)	*0 (0.00)	*0 (0.00)
赋形剂对照 (0.2%MC/1%SLS)	31.69(1.42)	55.75(7.5)	71.00(6.96)	11.3 (0.69)	12.69 (0.46)	8.63 (1.51)
福他替尼,30	*23.61(1.84)	46.15(6.04)	*48.30(7.71)	9.80 (8.0)	10.25 (0.94)	8.90 (0.97)
化合物 1,2.5	*22.76(2.33)	49.25(8.51)	*41.35(8.37)	7.70 (1.03)	8.14 (1.05)	6.83 (1.19)
化合物 1,5	*11.84(2.48)	34.00(7.59)	*13.35(6.03)	*3.27 (0.88)	*3.64 (1.08)	*2.53 (0.74)
化合物 1,10	*3.34(1.42)	*11.75(5.47)	*1.60(1.60)	*0.75 (0.42)	*0.79 (0.50)	*0.68 (0.57)

[0185] * $p < 0.05$ ANOVA或与赋形剂对比的克(鲁斯卡尔)-瓦(利斯)二氏检验

[0186] 实施例18.小鼠IBD模型中的化合物1

[0187] 在CD40诱导的结肠炎模型中测试PI3K γ 抑制剂化合物1,以便测定其对疾病过程的作用。通过将抗-CD40单克隆抗体(激动剂,即活化抗体对于中和抗体)注入T和B细胞缺陷小鼠(Rag 1^{-/-}小鼠)以便诱发全身性和肠性炎症、导致通过先天免疫途经的结肠炎和消耗性疾病来诱发IBD的CD40模型(参见,例如Immunity 25,309-318,2006年8月)。简言之,给Rag1敲除小鼠IP注射抗-CD40单克隆抗体FGK45。从第0天开始,用PBS、赋形剂或5mg/kg b.i.d.或10mg/kg b.i.d.化合物1治疗小鼠。将化合物1以10/14-小时b.i.d.给药方案IP施用7天。用5%NMP/15%PEG-400/80%的0.5%HPMC-E50水溶液配制化合物1。在研究结束时,在最终剂量后2小时采集血清和结肠样品用于药物浓度分析。在本研究期间每日测量体重。在研究结束时,分析在最终剂量后2小时采集的血浆样品中的化合物1浓度。使用高效液相色谱法/串连质谱(HPLC/MS/MS)法测定浓度。

[0188] 注射抗-CD40单克隆抗体并用赋形剂或PBS治疗的小鼠在第1天开始时具有体重减轻(测量为距离基线的百分比改变)并且在第3-4天时达到峰值,然后恢复至基线。正如图4中所示,体重减轻诱发的疾病在PBS治疗组中在第3和4天时分别为17.2%和17%,且赋形剂治疗组中在第3和4天时分别为12.8%和12.6%。图4还显示与赋形剂对照组相比,使用5mg/

kg b.i.d. (*p<0.05d3, **p<0.01d4) 或 10mg/kg b.i.d. (**p<0.001d3-4) 化合物1 治疗的小鼠中体重减轻得到显著抑制。

[0189] 表14 化合物1 在CD40-诱导的IBD模型中的组织浓度

治疗,mg/kg b.i.d.	2h 组织药物浓度		结肠:血浆
	血浆(ng/mL)	结肠(ng/mg)	
[0190] 化合物 1,5	4020±4520	6110±6350	1.5
化合物 1,10	6220±6190	7480±9700	1.2

[0191] 尽管为清楚理解的目的已经通过示例和实施例在一定程度上详细描述了上述本发明,但是显而易见的,本领域技术人员根据本发明的教导可以在不脱离待批权利要求精神或范围的情况下对本发明进行一些改变和变型。

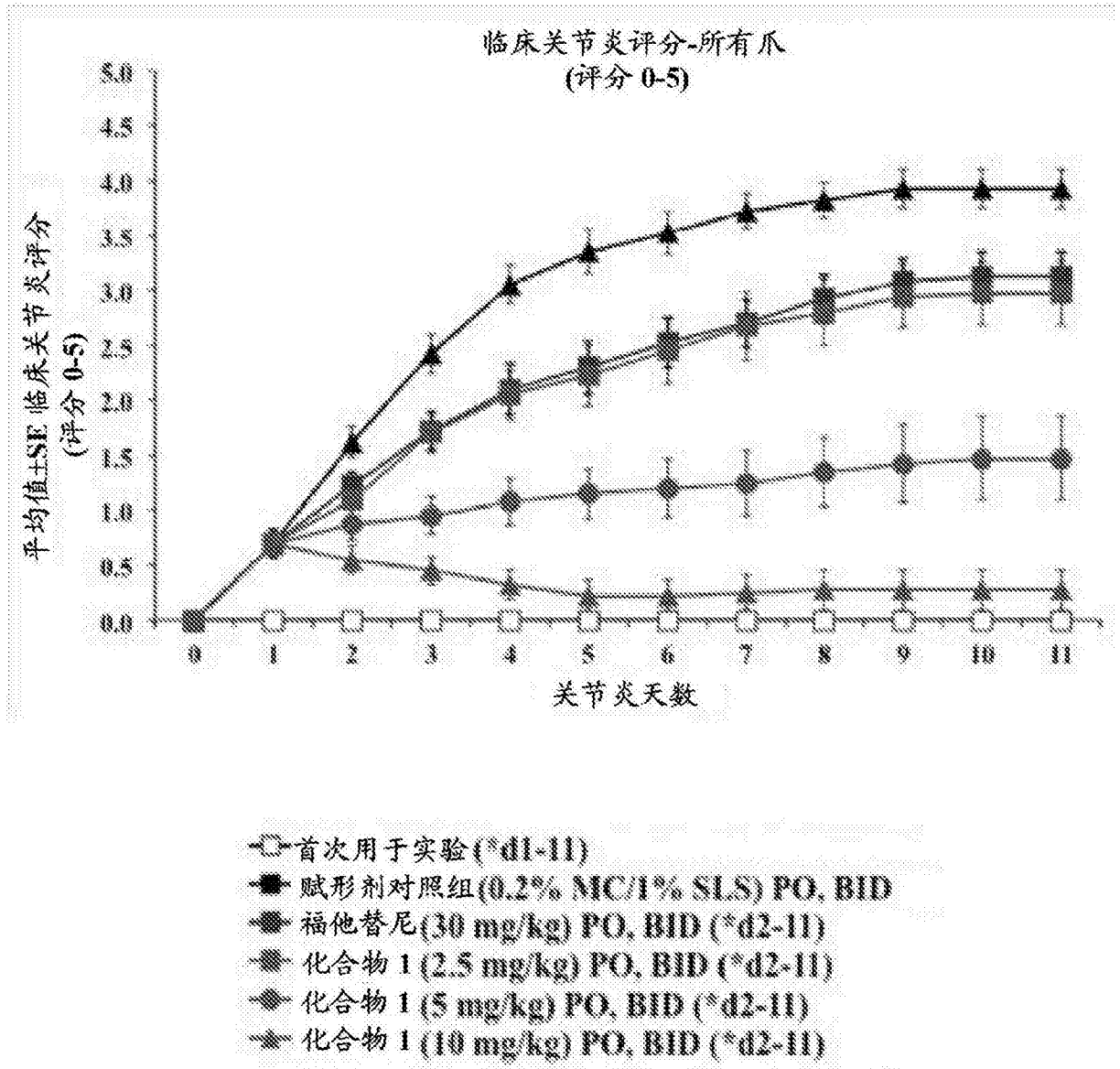


图1

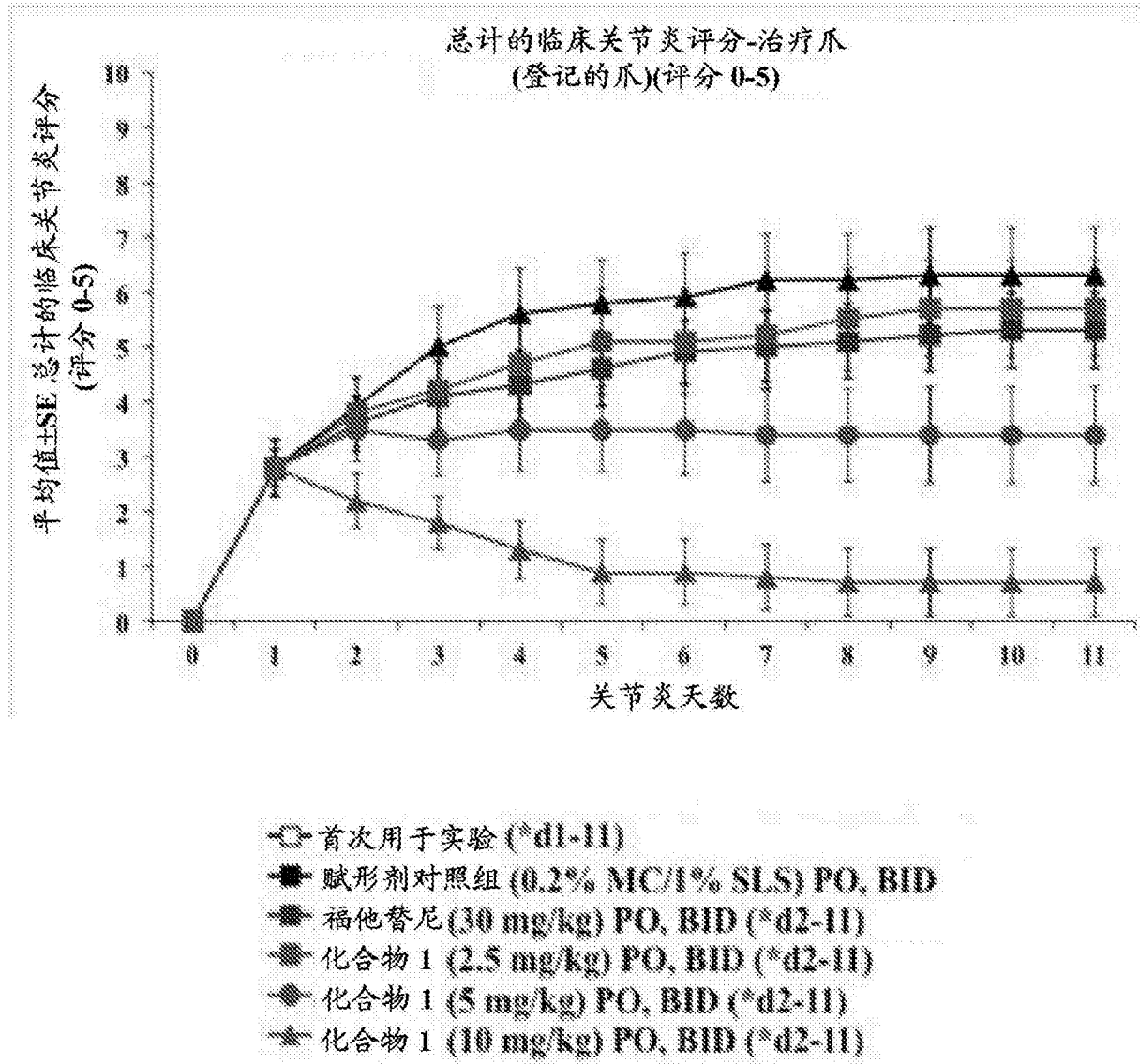


图2

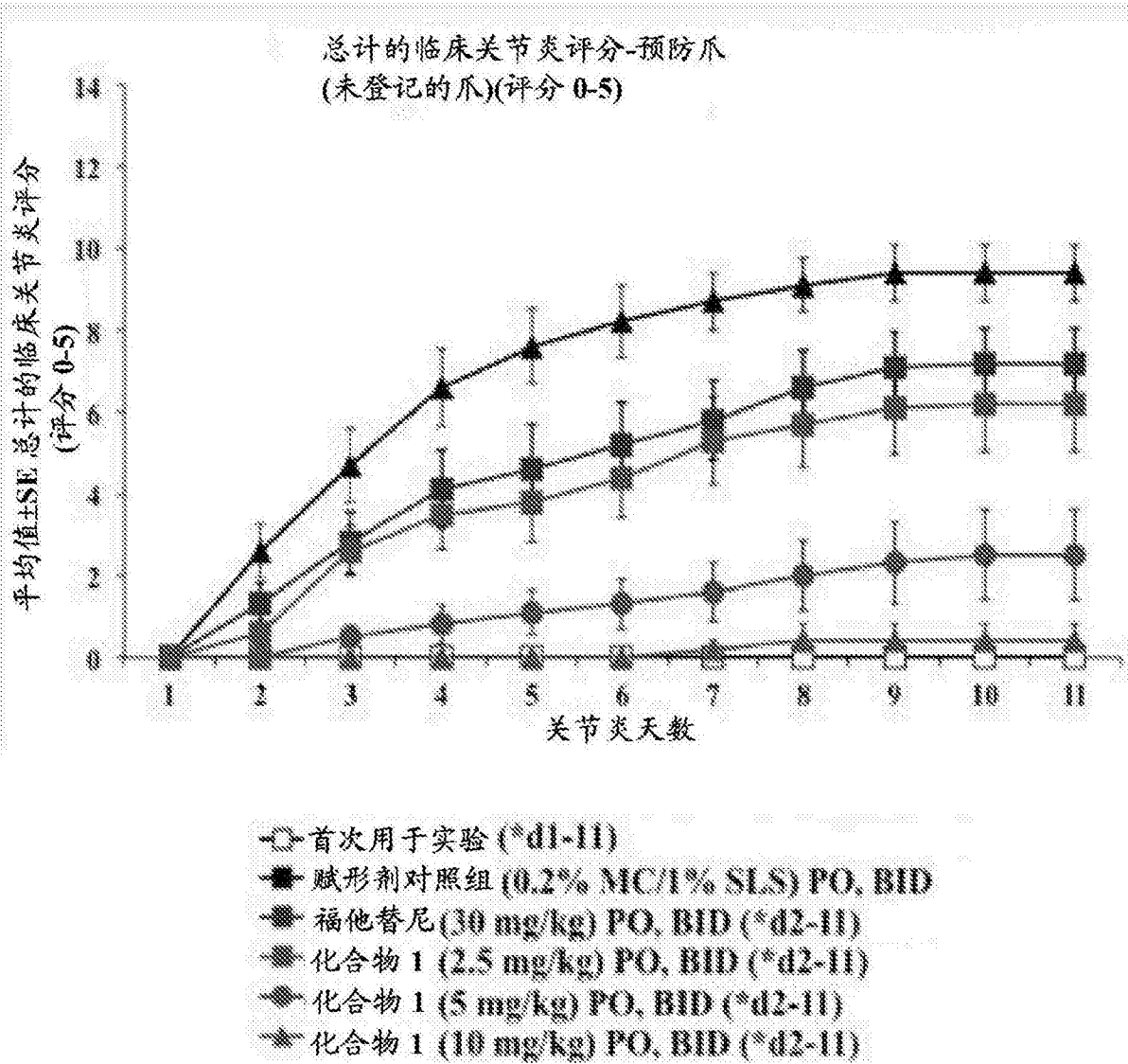


图3

小鼠 CD40 诱发的结肠炎模型中 VRT-1098813 体重减轻下降

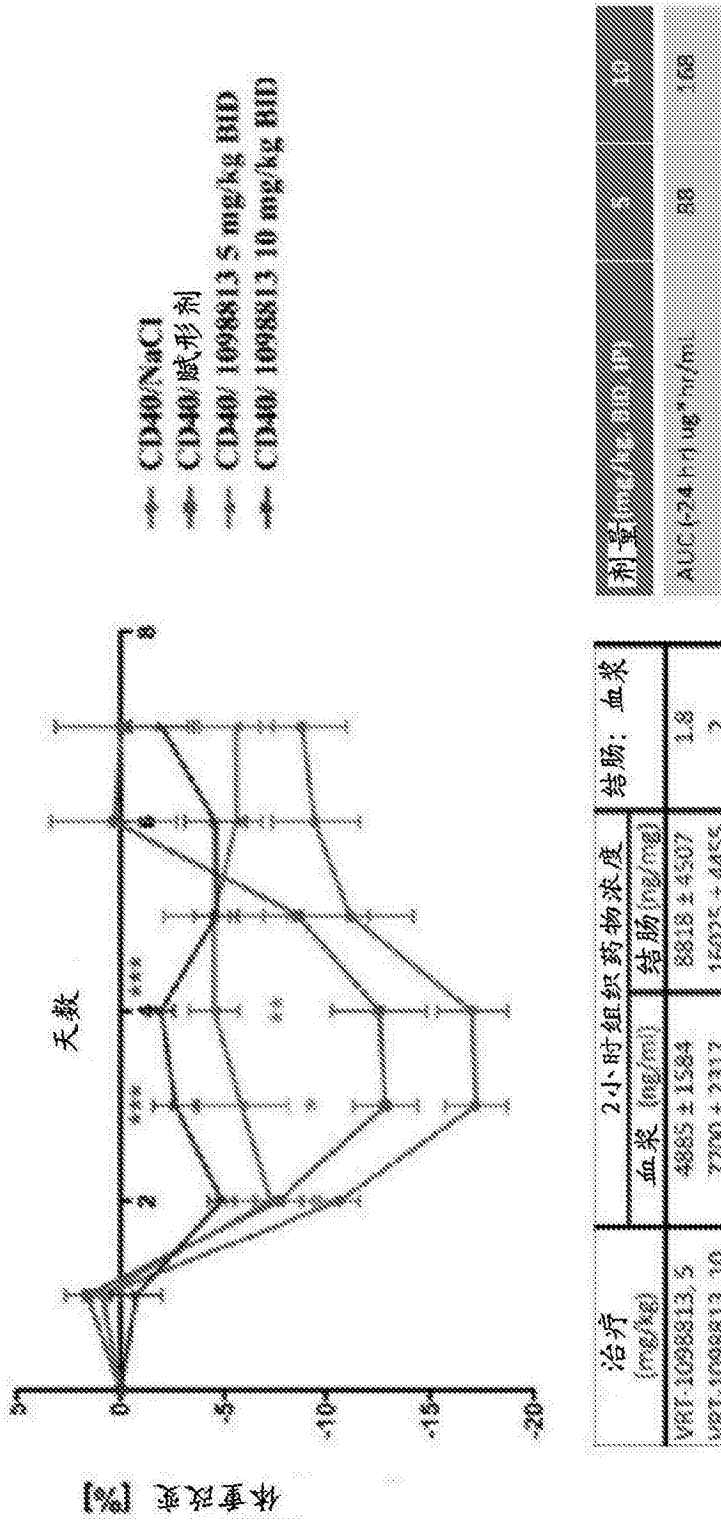


图4

- * 在第3和4天时疾病诱发的 BW 减轻达到峰值, 然后恢复
- * 5 和 10mg/kg BID IP 治疗在第3和4天时显著地使 BW 减轻下降

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, 与赋形剂对照组相比的 ANOVA; n=4治疗组