(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102164638 A
(43)申请公布日 2011.08.24

(21)申请号 200980138246.2

(22)申请日 2009.09.21

(30)优先权数据
MI2008A001720 2008.09.29 IT
61/193,283 2008.11.13 US

(85)PCT申请进入国家阶段日
2011.03.29

(86)PCT申请的申请数据
PCT/EP2009/062214 2009.09.21

(87)PCT申请的公布数据
WO2010/034693 EN 2010.04.01

(71)申请人 意大利法尔马科有限公司
地址 意大利米兰

(72)发明人 T·奥尔多尼 P·马斯卡尼
A 伦巴迪 T·巴尔布伊

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247
代理人 黄革生 林柏楠

(51)Int.Cl.
A61P 11/10(2006.01)
A61K 31/16(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页

(54)发明名称

组蛋白脱乙酰酶抑制剂在治疗费城-阴性骨髓增生综合征中的用途

(57)摘要

本发明描述了能够抑制组蛋白脱乙酰酶家族中的一种或多种酶的物质(组蛋白脱乙酰酶抑制剂)在治疗性治疗费城-阴性骨髓增生综合征(真性红细胞增多症、原发性血小板增多或特发性骨髓纤维化)中的用途。上述物质的剂量显著低于治疗其它肿瘤综合征通常所用的剂量,并且可以是10至150mg/天/患者。

CN 102164638 A

1. 二乙基-[6-(4-羟基氨基甲酰基-苯基氨基甲酰基氧基甲基)-萘-2-基-甲基]-氯化铵或其它可药用盐和/或溶剂化物，其用于治疗费城-阴性骨髓增生综合征。

2. 权利要求1的二乙基-[6-(4-羟基氨基甲酰基-苯基氨基甲酰基氧基甲基)-萘-2-基-甲基]-氯化铵，其特征在于它是一水合物形式。

3. 权利要求1的二乙基-[6-(4-羟基氨基甲酰基-苯基氨基甲酰基氧基甲基)-萘-2-基-甲基]-氯化铵，其特征在于它是一水合物晶体形式。

4. 权利要求1的二乙基-[6-(4-羟基氨基甲酰基-苯基氨基甲酰基氧基甲基)-萘-2-基-甲基]-氯化铵，其特征在于日剂量为每位患者10至150mg。

5. 权利要求4的二乙基-[6-(4-羟基氨基甲酰基-苯基氨基甲酰基氧基甲基)-萘-2-基-甲基]-氯化铵，其特征在于日剂量为每位患者30至120mg。

6. 权利要求5的二乙基-[6-(4-羟基氨基甲酰基-苯基氨基甲酰基氧基甲基)-萘-2-基-甲基]-氯化铵，其特征在于日剂量为每位患者50至100mg。

7. 权利要求1的二乙基-[6-(4-羟基氨基甲酰基-苯基氨基甲酰基氧基甲基)-萘-2-基-甲基]-氯化铵，其特征在于费城-阴性骨髓增生综合征是真性红细胞增多症。

8. 权利要求1的二乙基-[6-(4-羟基氨基甲酰基-苯基氨基甲酰基氧基甲基)-萘-2-基-甲基]-氯化铵，其特征在于费城-阴性骨髓增生综合征是原发性血小板增多。

9. 权利要求1的二乙基-[6-(4-羟基氨基甲酰基-苯基氨基甲酰基氧基甲基)-萘-2-基-甲基]-氯化铵，其特征在于费城-阴性骨髓增生综合征是原发性骨髓纤维化。

10. 权利要求1的二乙基-[6-(4-羟基氨基甲酰基-苯基氨基甲酰基氧基甲基)-萘-2-基-甲基]-氯化铵，其特征在于费城-阴性骨髓增生综合征是继发性骨髓纤维化。

11. 权利要求1的二乙基-[6-(4-羟基氨基甲酰基-苯基氨基甲酰基氧基甲基)-萘-2-基-甲基]-氯化铵，其特征在于它不与其它活性成分组合施用。

12. 权利要求1的二乙基-[6-(4-羟基氨基甲酰基-苯基氨基甲酰基氧基甲基)-萘-2-基-甲基]-氯化铵，其特征在于它与至少一种其它细胞抑制活性成分组合施用。

组蛋白脱乙酰酶抑制剂在治疗费城－阴性骨髓增生综合征中的用途

[0001] 描述

[0002] 骨髓增生综合征是肿瘤型障碍，其通常源于骨髓多能性干细胞，也就是说，所述的细胞通过分化可以形成多种类型的血细胞。

[0003] 骨髓增生综合征分为4种类型：慢性粒细胞白血病（CML）、真性红细胞增多症（PV）、原发性（essential）血小板增多（ET）和特发性骨髓纤维化（IM）。

[0004] 慢性粒细胞白血病的分子基础很久以前即为已知的，并且存在于费城染色体的形成或9；22易位，以及BCR-ABL融合基因的产生；在这些情况中，称为费城－阳性骨髓增生综合征，特异性ABL酪氨酸激酶抑制剂（例如伊马替尼（imitinib）或达沙替尼（desatinib））的应用可能选择性干扰细胞病理学响应，限制非特异性细胞毒性对健康细胞损伤的可能结果。

[0005] 对于其它3种病理学，归为费城－阴性骨髓增生综合征，最近已经确定了分子基础［参见，例如：Robert Kralovics等人，The New England Journal of Medicine 352，1779-1790(2005)；ChloéJames等人，Nature 434，1144-1148(2005)］，并且似乎与基因突变影响的JAK2酪氨酸激酶相关。

[0006] 对于这些综合征，目前的治疗还提供了应用具有非特异性作用的细胞抑制药，主要是羟基脲，一段治疗期后，该药物存在诱导发展成脊髓发育不良状态和形成白血病的病理学风险。

[0007] 在欧洲，费城－阴性骨髓增生综合征的发病率约为每年每100,000名居民中有5例。

[0008] 因此，需要开发新的药物，甚至对于费城－阴性骨髓增生综合征（PV、ET和IM）该药物以更选择性的方式和在无毒剂量下发挥作用。

[0009] 组蛋白脱乙酰酶（HDAC）是能够除去与组蛋白或其它蛋白质的N-端部分的赖氨酸残基结合的乙酰基的酶。

[0010] 基于结构同源性，HDAC可以分为4个类型。I类HDAC(HDAC 1、2、3和8)类似于RPD3酵母蛋白质，并且位于细胞核内。II类HDAC(HDAC 4、5、6、7、9和10)类似于HDA1酵母蛋白质，并且位于细胞核和细胞质中。III类HDAC在结构上不同于与SIR2酵母蛋白质相关的NAD-依赖性酶的形式。IV类（HDAC 11）是由具有特殊结构特征的单一酶组成。I、II和IV类的HDAC是锌酶，并且可以被多种类型的分子抑制：异羟肟酸衍生物、环四肽、短链脂肪酸、氨基苯甲酰胺、亲电子酮的衍生物等。III类HDAC不被异羟肟酸抑制，并且它们的抑制剂具有不同于其它类型的抑制剂的结构特征。

[0011] 本发明相关的表述“组蛋白脱乙酰酶抑制剂”应当被理解为表示能够抑制被分类为I类、II类或IV类的组蛋白脱乙酰酶中至少一种酶的活性的天然、重组或合成来源的任何分子。

[0012] 组蛋白脱乙酰酶抑制剂是一类具有抗肿瘤和抗炎活性的分子。

[0013] 在肿瘤细胞中，组蛋白脱乙酰酶抑制剂抑制细胞增殖并且诱导细胞死亡和分化

[Gaofeng Bi 和 Guosheng Jiang,Cellular & Molecular Immunology 3,285-290(2006)]。

[0014] 组蛋白脱乙酰酶抑制剂还能调节免疫活性细胞部分的细胞因子和其它促炎因子的产生,并且在体内已经证实具有抗炎特性[Frédéric Blanchard 和 Céline Chipoy,Drug Discovery Today 10,197-204(2005);IM Adcock,British Journal of Pharmacology 150,829-831(2007)]。

[0015] 目前,对于肿瘤病理学和炎性病理学的多种临床研究正在进行中,并且应用多种抑制剂取得了不同阶段的进步[Marielle Paris 等人,Journal of Medicinal Chemistry 51,1505-1529(2008)]。

[0016] 最近,批准了组蛋白脱乙酰酶抑制剂(Zolinza,伏立诺他(vorinostat))用于治疗皮肤 T 细胞淋巴瘤。

[0017] 在以下专利中,描述了目前处于临床研究阶段的某些组蛋白脱乙酰酶抑制剂及其其它类似物:WO 2004/092115、WO 2005/019174、WO 2003/076422、WO 1997/043251、WO 2006/010750、WO 2006/003068、WO 2002/030879、WO 2002/022577、WO 1993/007148、WO 2008/033747、WO 2004/069823、EP 0847992 和 WO 2004/071400,将其全部内容并入本文作为参考。

[0018] WO 97/43251(无水形式)和 WO 2004/065355(一水合物晶体形式)中描述的二乙基-[6-(4-羟基氨基甲酰基-苯基氨基甲酰基氧基甲基)-萘-2-基甲基]-氯化铵是具有良好抗炎活性的 HDAC 抑制剂,将其并入本文作为参考;该活性物质还称为 ITF2357 和/或 Givinostat。

[0019] 在脂多糖(LPS)-刺激的培养的人外周血单核细胞(PBMC)中,10 至 22nM 的 ITF2357 降低了 50%肿瘤坏死因子 α(TNFα)的释放,12nM 的 ITF2357 降低了 50%细胞内白介素(IL)-1α 的释放,12.5 至 25nM 的 ITF2357 降低了 50% IL-1β 的分泌,并且 25nM 的 ITF2357 降低了 50%干扰素-γ(IFNγ)的产生。小鼠口服施用 1.0 至 10mg/kg ITF2357 降低超过 50%的 LPS-诱导的血清 TNFα 和 IFNγ[Flavio Leoni 等人,Molecular Medicine 11,1-15(2005)]。

[0020] 最近报道了亚微摩尔浓度的 ITF2357 能够抑制患有 PV 或 ET 的患者中获得的干细胞的产克隆活性[V.Guerini 等人,Leukemia 22,740-747(2008)]。但是,获得抑制产克隆活性的浓度远低于获得分子标志物($JAK2^{V617F}$ 和 STAT 蛋白质)修饰或细胞毒效应所需的浓度;这些结果的不确定性使得难以提供将体外获得的这些效应移植到体内治疗情形中,特别是对于人的任何治疗性治疗。

[0021] 发明描述

[0022] 现在我们发现并且这构成本发明的一个方面,给患有真性红细胞增多症、原发性血小板增多或骨髓纤维化的患者施用二乙基-[6-(4-羟基氨基甲酰基-苯基氨基甲酰基氧基甲基)-萘-2-基甲基]-氯化铵、优选一水合物形式、更优选一水合物晶体形式引起完全或部分响应;另外,在最初确诊为脾肿大的患者中,观察到脾体积的显著减小。

[0023] 我们还发现并且这构成本发明的第二个方面,治疗人费城-阴性骨髓增生综合征的该活性物质的治疗剂量显著低于治疗肿瘤综合征通常所用的剂量,并且该治疗剂量可以是 10 至 150mg/天/患者、优选 30 至 120mg/天/患者并且甚至更优选 50 至 100mg/天/患者。

[0024] 完全以实例的方式，治疗皮肤 T 细胞淋巴瘤所示的 Zolinza™（伏立诺他）的剂量为 400mg/ 天。

[0025] 本发明涉及二乙基 -[6-(4- 羟基氨基甲酰基 - 苯基氨基甲酰基氧基甲基)- 萘 -2- 基甲基]- 氯化铵、优选一水合物形式、更优选一水合物晶体形式在治疗性治疗费城 - 阴性骨髓增生综合征（真性红细胞增多症、原发性血小板增多或特发性骨髓纤维化）中的用途。该活性成分可以单独应用，即不与其它活性成分组合，或者与其它细胞抑制活性成分组合，例如完全以实例的方式，羟基脲或哌泊溴烷。

[0026] 本发明还涉及该活性成分以低于治疗肿瘤病理学（例如：皮肤 T 细胞淋巴瘤）所用的日剂量在治疗费城 - 阴性骨髓增生综合征中的治疗性用途，这些剂量为 10 至 150mg/ 天 / 患者、优选 30 至 120mg/ 天 / 患者并且甚至更优选 50 至 100mg/ 天 / 患者。

[0027] 本发明相关的术语“治疗”应当被理解为表示缓解、减轻、最小化、消除或阻断疾病病理状态或进程引起的有害效应的治疗作用。

[0028] 特别的化合物对于组蛋白脱乙酰酶的抑制活性可以在体外应用例如酶试验来测量，所述的酶试验证实抑制这些酶中的至少一种酶。该类型的试验是文献中已知的：参见，例如 P.A.Marks 等人，J.Natl.Cancer Inst.92 1210-1215(2000)；L.M.Butler 等人，Cancer Res.605165-5170(2000)；V.M.Richon 等人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95 3003-3007(1998)；M.Yoshida 等人，J.Biol.Chem.265 17174-17179(1990)；测量 HDAC 抑制的试剂盒也是可商购获得的（例如，Biomol International LP(USA)；HDAC1 Fluorimetric Drug Discovery Kit，产品号 BML-AK511-0001）。

[0029] 以下实施例旨在说明本发明，而不是限制其范围。

[0030] 实施例 1

[0031] ITF2357 在患有费城 - 阴性骨髓增生综合征的患者中的临床研究。设计：II 期，开放，非随机研究。

[0032] 研究中的人群：27 名具有 $JAK2^{V617F}$ 突变的患者，患有标准药理学治疗（羟基脲）不足以控制的骨髓增生综合征。

[0033] 研究下的药物：ITF2357，剂量为每天 50mg 两次。

[0034] 治疗周期：连续施用至多 24 周。

[0035] 主要目的：评价 ITF2357 在治疗患有 $JAK2^{V617F}$- 阳性骨髓增生疾病 (PV、ET、IM) 的患者中的有效性和耐受性。

[0036] 次要目的：通过定量 PCR 评价治疗对突变的 JAK2 等位基因负荷的作用。

[0037] 初步数据的检查（治疗持续时间 4 至 12 周）表明给患有真性红细胞增多症、原发性血小板增多或骨髓纤维化的患者施用 ITF2357 在约 60％的病例中诱导完全或部分响应；另外，在最初表现为脾肿大的患者中观察到脾体积显著减小。

[0038] 实施例 2

[0039] 对人细胞系 SET-2 克隆效率的比较效应

[0040] $JAK2^{V617F}$ 突变的人细胞系 SET-2（由具有原发性血小板增多的白血病转化的患者的外周血建立的原巨核细胞系）来自德国细胞库 DSMZ（目录号 ACC 608)，并且其生长在含培养基 (RPMI 1640+Hepes 缓冲液 1M+ 青霉素 10.000IU/mL+ 链霉素 10.000μg/mL+20％胎牛血清）的 24 孔板中。先前的试验用于测定细胞的最佳数量，从而在每个培养皿中产生足

够数量的克隆以便可重复计数。在 SET-2 系的情况下，数量对应为 3×10^3 个细胞 / 培养皿。当获得足够数量的细胞时，通过离心（以 10^3rpm 离心 10 分钟）收集细胞，然后以 90×10^3 个细胞 /mL 的浓度悬浮于培养基中。将 100μL 的悬浮液加入至如厂家描述所制备的 3.0mL 的甲基纤维素 (Methocult™，目录号 H4230，Stemcell Technologies) 中，然后加入 50μL 的 63 倍浓缩的 HDAC 抑制剂的 0.1% DMSO 溶液。对于每种化合物，试验 5 个系列稀释度 (1000-12nM 范围)。然后用无菌塑料巴斯德吸管小心地混合含 HDAC 抑制剂的甲基纤维素溶液，避免形成气泡。最后，应用配有 18G 针的注射器将 1mL 溶液均匀地分布在培养皿 (35mm 直径，带有格网，目录号 174926Nunc) 中。对于每个试验点制备 2 份培养皿。将 2 份试验平皿放在带有无菌水槽的更大的培养皿中，确保恒定的湿度。然后，将所有的平皿维持在 37℃ 的一定的湿度和 CO_2- 控制的无菌培养箱中。生长 14 天后，通过应用双目显微镜测量每个平皿中的克隆数量。计算出平皿每个分隔中克隆的平均数量，并且根据不含任何化合物（对照平皿）获得的克隆数量来测定克隆形成的抑制百分数。应用 GraphPad Prism 5.0 软件计算出 EC_{50} 值（降低 50% 克隆数量所需的浓度），并且报告在下表中。还报告了 rhHDAC1 抑制值：酶是从 BPS Biosciences（目录号 50001）获得的，并且试验是应用 BIOMOL 试剂盒根据厂家说明书进行的。

[0041] 表 1

[0042]

代码	发明者	INN	化学种类	EC_{50} μM	IC_{50} nM (rhHDAC1)
ITF2357	Italfarmaco	Givinostat	异羟肟酸	0.028-0.054*	121
MGCD-0103	MethylGene	Mocetinostat	苯甲酰胺	1.196**	17
KD-5170	Kalypsys	---	S,乙酰基-α-巯基酮	<20%抑制，1 μM	24
SNDX-275	Bayer Schering	恩替诺他 (Entinostat)	苯甲酰胺	1.820**	293

[0043] *）两次不同试验获得的数值

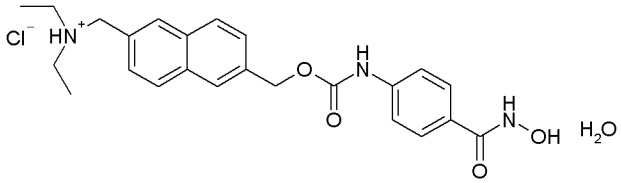
[0044] **）在相同试验中对于 ITF2357，$p < 0.05$

[0045] 尽管 Mocetinostat 和 Entinostat 被认为是 I 类特异性 HDAC 抑制剂 [Zhou,N. 等人，J Med Chem 51,4072(2008) 和 Jones,P. 等人，J Med Chem 51,2350(2008)]，KD-5170 被报道是广谱 I 类和 II 类 -HDAC 抑制剂 [WO 2007/067795；Payne,J.E. 等人，Bioorg Med Chem Lett 18,6093(2008)]，与 ITF2357 相同。

[0046] 尽管没有证实抑制 SET-2 细胞克隆效率是治愈费城 - 阴性、$JAK2^{V617F}$- 阳性骨髓增生综合征的预测，但是，如果相比其它 HDAC 抑制剂，ITF2357 的有效抑制作用似乎表明组蛋白脱乙酰酶抑制的存在不是获得 ITF2357 关于费城 - 阴性骨髓增生综合征所示的临床功效所必需的。

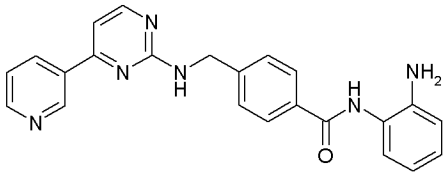
[0047] 试验化合物对应于以下结构式：

[0048]



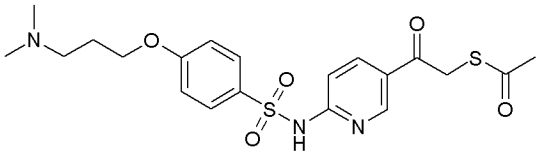
[0049] Givinostat(ITF2357)

[0050]



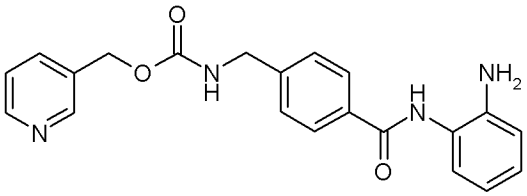
[0051] Mocetinostat(MGCD-0103)

[0052]



[0053] KD-5170

[0054]



[0055] 恩替诺他(MS-275;SNDX-275)