



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107849033 A

(43)申请公布日 2018.03.27

(21)申请号 201680035893.0

(74)专利代理机构 北京博思佳知识产权代理有限公司 11415

(22)申请日 2016.04.15

代理人 林祥

(30)优先权数据

62/152,350 2015.04.24 US

(51)Int.Cl.

C07D 413/14(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.12.19

C07D 413/06(2006.01)

C07D 271/10(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/027715 2016.04.15

C07D 209/04(2006.01)

A61K 31/4245(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/172001 EN 2016.10.27

A61P 29/00(2006.01)

A61P 19/00(2006.01)

A61K 31/404(2006.01)

(71)申请人 儿童医学中心公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 D·A·威廉姆斯 S·德维塔

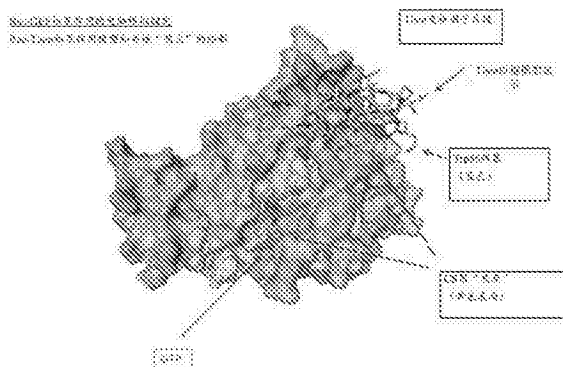
权利要求书2页 说明书19页 附图16页

(54)发明名称

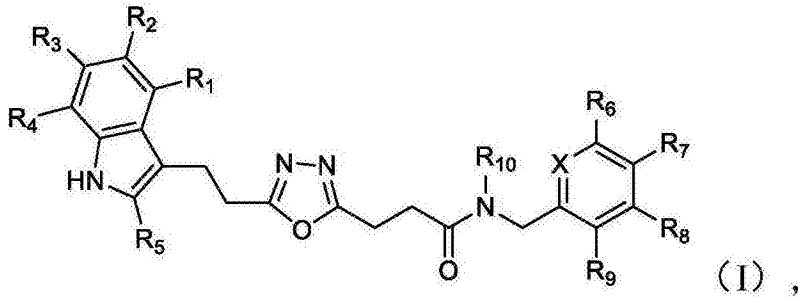
用于治疗Rac-GTP酶介导的病症的化合物

(57)摘要

本公开内容涉及包括某些通过定量的高通量分析鉴定有效地治疗Rac-GTP酶介导的病症(例如,急性成淋巴细胞性白血病或慢性骨髓性白血病)的化合物的组合物,以及用于制造这些化合物的方法和这些化合物用于治疗Rac-GTP酶介导的病症的用途。



1. 一种药物组合物,其包括药学上可接受的载体和式(I)的化合物或其盐:



其中,X是N或CH;

R₁、R₂、R₃、R₄和R₅中的每一个独立地为H、C₁-C₁₀烷基、C₂-C₁₀烯基、C₂-C₁₀炔基、C₃-C₂₀环烷基、C₃-C₂₀环烯基、C₁-C₂₀杂环烷基、C₁-C₂₀杂环烯基、芳基、杂芳基、卤素、OR_a、SR_a、COOR_a、OC(O)R_a、C(O)R_a、C(O)NR_aR_b、S(O)₂NR_aR_b或NR_aR_b;

R₆、R₇、R₈和R₉中的每一个独立地为H、C₁-C₁₀烷基、C₂-C₁₀烯基、C₂-C₁₀炔基、C₃-C₂₀环烷基、C₃-C₂₀环烯基、C₁-C₂₀杂环烷基、C₁-C₂₀杂环烯基、芳基、杂芳基、卤素、OR_a、SR_a、COOR_a、OC(O)R_a、C(O)R_a、C(O)NR_aR_b、S(O)₂NR_aR_b或NR_aR_b;或者R₆和R₇、R₇和R₈或者R₈和R₉连同与它们连接的碳原子为芳基、杂芳基、C₃-C₂₀环烷基或者C₁-C₂₀杂环烷基;

R₁₀为C₁-C₁₀烷基;

每个R_a独立地为H、C₁-C₁₀烷基、C₂-C₁₀烯基、C₂-C₁₀炔基、C₃-C₂₀环烷基、C₃-C₂₀环烯基、C₁-C₂₀杂环烷基、C₁-C₂₀杂环烯基、芳基或杂芳基;以及

每个R_b独立地为H、C₁-C₁₀烷基、C₂-C₁₀烯基、C₂-C₁₀炔基、C₃-C₂₀环烷基、C₃-C₂₀环烯基、C₁-C₂₀杂环烷基、C₁-C₂₀杂环烯基、芳基或杂芳基。

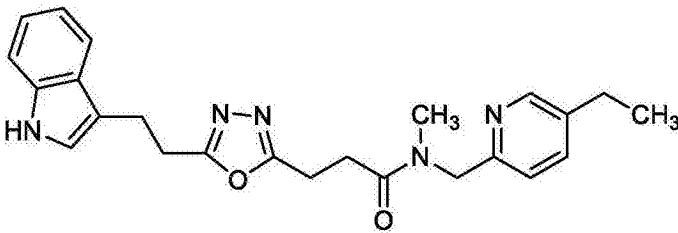
2. 根据权利要求1所述的组合物,其中X为N。

3. 根据权利要求2所述的组合物,其中R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇、R₈和R₉中的每一个独立地为H或C₁-C₁₀烷基。

4. 根据权利要求3所述的组合物,其中R₇为CH₂CH₃。

5. 根据权利要求4所述的组合物,其中R₁₀为CH₃。

6. 根据权利要求5所述的组合物,其中所述化合物为



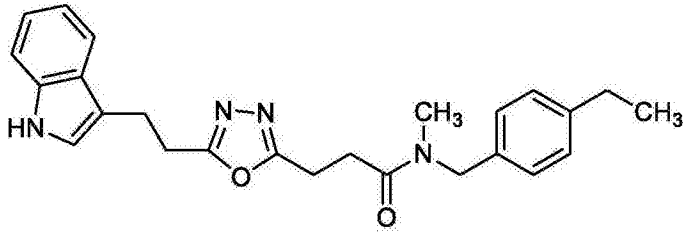
7. 根据权利要求1所述的组合物,其中X为CH。

8. 根据权利要求7所述的组合物,其中R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇、R₈和R₉中的每一个独立地为H或C₁-C₁₀烷基。

9. 根据权利要求8所述的组合物,其中R₇为CH₂CH₃。

10. 根据权利要求9所述的组合物,其中R₁₀为CH₃。

11. 根据权利要求10所述的组合物,其中所述化合物为



12. 根据权利要求1所述的组合物,所述组合物进一步包括抗癌药物。
13. 根据权利要求12所述的组合物,其中所述抗癌药物为地塞米松、长春新碱或PAK抑制剂。
14. 一种用于治疗受试者中的Rac-GTP酶介导的病症的方法,所述方法包括将有效量的根据权利要求1-13中任一项所述的药物组合物给予对其有需求的受试者。
15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述Rac-GTP酶介导的病症是癌症。
16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述癌症是白血病。
17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述癌症是儿科急性淋巴细胞性白血病。
18. 根据权利要求14所述的方法,其中所述Rac-GTP酶介导的病症是炎性病症。
19. 根据权利要求14所述的方法,其中所述Rac-GTP酶介导的病症是骨吸收病症。
20. 根据权利要求1-13中任一项所述的组合物,所述组合物用作药物。

用于治疗Rac-GTP酶介导的病症的化合物

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请根据35U.S.C. §119 (e) 要求2015年4月24日提交的美国临时申请第62/152,350号的优先权,在此将其全文并入作为参考。

背景技术

[0003] Rho GTP酶包括小GTP酶的Ras超家族的一个分支。它们在包括细胞迁移、细胞极化、膜运输、细胞骨架排列、增殖、细胞凋亡和转录调节的许多种细胞过程中发挥着关键作用 (Etienne-Manneville, S. 等人 (2002) .Nature 420,629-635.; Boettner, B. 等人 (2002) .Gene 286,155-174)。因此,Rho GTP酶涉及到包括心血管疾病和癌症的许多人疾病的发病机理 (Hall, A. Science 1998,279,509-514; Wennerberg, K. 和 Der, C. J. (2004) J. Cell Sci.117,1301-1312.; Ridley, A. J. (2006) Trends Cell Biol.16,522-529)。Rho家族由在人体内编码至少25种蛋白质的22种基因组成,包括Rac。Rho家族成员与GTP结合,并在无活性的GDP-结合态和活性GTP-结合态之间转换。在这种情况下,许多Rho家族成员在其活性态时表现出GTP酶活性。这种状态之间的循环由以下调节:鸟嘌呤核苷酸交换因子 (GEFs); GTP酶激活蛋白 (GAPs); 和起负调节物作用的GDP解离抑制因子 (GDIs) (Malumbres, M. 等人 (2003) Nat. Rev. Cancer 3,459-465)。在休眠细胞中,Rho GTP酶主要以无活性的GDP结合态存在,而在生长刺激时,GEF得以激活,并随后刺激鸟嘌呤核苷酸交换活性,以促进活性GTP结合的Rho的形成。当与GTP结合时,活性Rho GTP酶与包括蛋白激酶和具有衔接子功能的其他蛋白质的下游效应器相互作用。Rho GTP酶固有的GTP水解功能性之后由Rho特异性GTP酶激活蛋白所刺激。这将Rho蛋白质返回其无活性状态。Rac-特异性RhoGEF包括Tiam1和Trio (Gao, Y. 等人 (2004) .Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101,7618-7623.)

[0004] Rac亚家族另外还与细胞转化有关,因此,Rho GTP酶的异常活性与癌症有关。它们在Ras和其他致癌基因造成的转化中发挥重要作用。Rac1的Rac1b剪接受体已经显示是具有组成型活性和转化的;在乳腺癌和结肠癌中均已观察到其超量表达 (Qiu, R. G. 等人 (1995) Nature 374,457-459; Khosravi-Far, R. 等人 (1995) Mol. Cell. Biol. 15,6443-6453; Renshaw, M. W. 等人 (1996) Curr. Biol. 6,76-83; Ferraro, D. 等人 (2006) Oncogene 25,3689-3698)。例如,在脑肿瘤中已经观察到Rac3突变体,Rac1和Rac3均与成胶质细胞瘤侵袭有关 (Hwang, S. L. 等人 (2005) J. Clin. Neurosci. 12,571-574)。

[0005] 在恶性肿瘤细胞中,异常的Rho GTP酶活性由Rho GTP酶表达的变化,或者调节Rho功能的GEF或GAP的混乱的功能产生 (Karnoub, A. E. 等人 (2004) .Breast Cancer Res. Treat. 84,61-71.)。由于Rho参与细胞转化的证据,Rho GTP酶是抗癌治疗的可能靶标。抑制GEF与其各自的Rho家族成员的相互作用的化合物是可用的Rho活性抑制剂,并表现出极好的特异性。迄今,小分子NSC23766 (即N6-[2-[[4-(二乙基氨基)-1-甲基丁基]氨基]-6-甲基-4-嘧啶基]-2-甲基-4,6-噻啉二胺三盐酸盐) 已经被鉴定与Rac1结合并防止其被Rac-特异性RhoGEF激活。但是,一些GEF活性不受阻断。

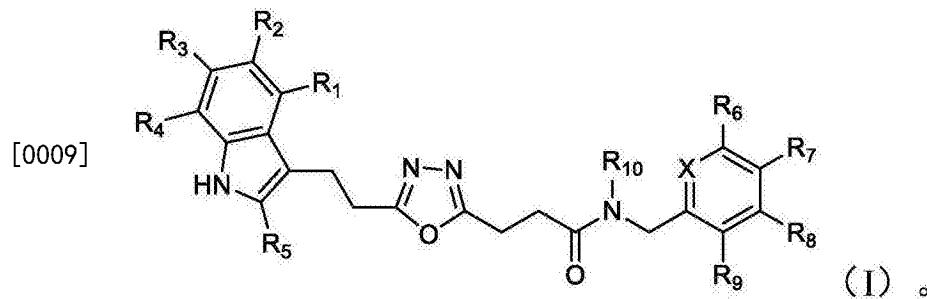
[0006] 慢性骨髓性白血病 (CML) 是特征在于表达费城染色体产物p210-BCR-ABL的恶性疾

病。其也称作是慢性粒细胞性白血病 (CGL), 是白血球的癌症, 特征在于骨髓中主要骨髓细胞的生长增强且上调以及这些细胞在血液中积累。鼠科动物模型中 Rho GTP 酶 Rac1 和 Rac2 的缺乏已经显示出 p210-BCR-ABL-介导的增殖显著降低。另外已经显示, Rac 在其他类型的白血病例如 MLL-介导的急性白血病中发挥重要作用 (Mizukawa B. 等人, Blood 2011; 118: 5235-45)。以上证据强烈表明, Rac 是白血病治疗的潜在靶标 (E K Thomas 等人, Leukemia 22, 898-904, May 2008)。

发明内容

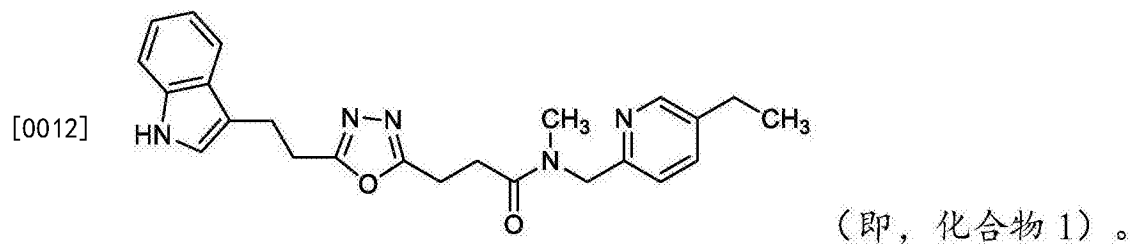
[0007] 本公开内容是基于通过锚定到 Rac-GTP 酶蛋白质上的分析鉴定某些抗癌化合物的发现。具体地, 通过该分析鉴定的这些化合物中的一种或多种化合物出人意料地表现出优异的抑制肿瘤细胞增殖方面的活性且具有对于正常细胞的低毒性。

[0008] 一方面, 本公开内容的特征在于药物组合物, 该药物组合物包括药学上可接受的载体和式 (I) 的化合物或其盐 (例如, 作为活性剂):



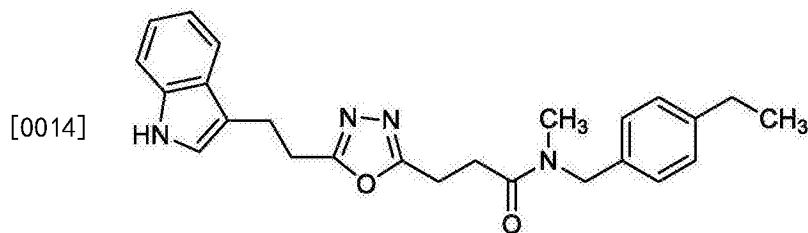
[0010] 在式 (I) 中, X 是 N 或 CH; R₁、R₂、R₃、R₄ 和 R₅ 中的每一个独立地为 H、C₁-C₁₀ 烷基、C₂-C₁₀ 烯基、C₂-C₁₀ 炔基、C₃-C₂₀ 环烷基、C₃-C₂₀ 环烯基、C₁-C₂₀ 杂环烷基、C₁-C₂₀ 杂环烯基、芳基、杂芳基、卤素、OR_a、SR_a、COOR_a、OC(O)R_a、C(O)R_a、C(O)NR_aR_b、S(O)₂NR_aR_b 或 NR_aR_b; R₆、R₇、R₈ 和 R₉ 中的每一个独立地为 H、C₁-C₁₀ 烷基、C₂-C₁₀ 烯基、C₂-C₁₀ 炔基、C₃-C₂₀ 环烷基、C₃-C₂₀ 环烯基、C₁-C₂₀ 杂环烷基、C₁-C₂₀ 杂环烯基、芳基、杂芳基、卤素、OR_a、SR_a、COOR_a、OC(O)R_a、C(O)R_a、C(O)NR_aR_b、S(O)₂NR_aR_b 或 NR_aR_b; 或者 R₆ 和 R₇、R₇ 和 R₈ 或者 R₈ 和 R₉ 连同与它们连接的碳原子为芳基、杂芳基、C₃-C₂₀ 环烷基或者 C₁-C₂₀ 杂环烷基; R₁₀ 为 C₁-C₁₀ 烷基; 每个 R_a 独立地为 H、C₁-C₁₀ 烷基、C₂-C₁₀ 烯基、C₂-C₁₀ 炔基、C₃-C₂₀ 环烷基、C₃-C₂₀ 环烯基、C₁-C₂₀ 杂环烷基、C₁-C₂₀ 杂环烯基、芳基或杂芳基; 并且每个 R_b 独立地为 H、C₁-C₁₀ 烷基、C₂-C₁₀ 烯基、C₂-C₁₀ 炔基、C₃-C₂₀ 环烷基、C₃-C₂₀ 环烯基、C₁-C₂₀ 杂环烷基、C₁-C₂₀ 杂环烯基、芳基或杂芳基。

[0011] 参考式 (II), 上述化合物的子集是其中 X 是 N 的那些化合物。在这些化合物中, R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇、R₈ 和 R₉ 中的每一个可以独立地为 H 或 C₁-C₁₀ 烷基 (例如, CH₂CH₃)。例如, 在这些化合物中, R₇ 可以是 CH₂CH₃, R₁₀ 可以是 CH₃。这些化合物的例子为



[0013] 参考式 (II), 上述化合物的另一子集是其中 X 是 CH 的那些化合物。在这些化合物

中, R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 和 R_9 中的每一个可以独立地为H或 C_1 - C_{10} 烷基(例如, CH_2CH_3)。例如, 在这些化合物中, R_7 可以是 CH_2CH_3 , R_{10} 可以是 CH_3 。这些化合物的例子为



(即, 化合物 2)。

[0015] 术语“烷基”是指饱和的直链或支链烃部分, 例如 $-CH_3$ 或 $-CH(CH_3)_2$ 。术语“烯基”是指含有至少一个双键的直链或支链烃部分, 例如 $-CH=CH-CH_3$ 。术语“炔基”是指含有至少一个叁键的直链或支链烃部分, 例如 $-C\equiv C-CH_3$ 。术语“环烷烃”是指饱和的环烃部分, 例如环己基。术语“环烯基”是指含有至少一个双键的非芳香族环烃部分, 例如环己烯基。术语“杂环烷基”是指具有至少一个环杂原子(例如N、O或S)的饱和环状部分, 例如4-四氢吡喃基。术语“杂环烯基”是指具有至少一个环杂原子(例如N、O或S)和至少一个环双键的非芳香族环状部分, 例如吡喃基。术语“芳基”是指具有一个或多个芳环的烃部分。芳基部分的例子包括苯基(Ph)、次苯基、萘基、亚萘基、茚基、蒽基和菲基。术语“杂芳基”是指含有至少一个杂原子(例如N、O或S)的具有一个或多个芳环的部分。杂芳基部分的例子包括咪唑基、亚咪唑基、芴基、吡咯基、噻吩基、噁唑基、咪唑基、噻唑基、吡啶基、嘧啶基、喹啉基、喹啉基、异喹啉基和吲哚基。

[0016] 在一些实施方式中, 本文所述的组合物可以进一步包括抗癌药物。例如, 抗癌药物可以是地塞米松、长春新碱或PAK抑制剂。

[0017] 另一方面, 本公开内容的特征在于用于治疗Rac-GTP酶介导的病症的方法。该方法包括将有效量的一种或多种上述化合物给予对其有需求的受试者。Rac-GTP酶介导的病症的例子包括心血管疾病、免疫缺陷疾病、炎性病症和癌症。Rac的例子包括Rac1、Rac2和Rac3。Rac-GTP酶的例子包括Rac1-GTP酶、Rac2-GTP酶和Rac3-GTP酶。

[0018] 术语“进行治疗”或“治疗”是指将一种或多种上述化合物基于给予具有患有这些化合物能可用这些化合物治疗的病症和/或该病症的症状和/或易患该病症的受试者, 其目的在于给予治疗效果, 例如, 治愈、减轻、改变、影响、改善或防止预防上述病症、上述病症的症状或对上述病症其的易感性。

[0019] 本文所述的化合物包括化合物自身, 以及如果可用的话, 其盐、前药和溶剂化物。前药的例子包括在给予受试者时能够提供活性化合物的酯或其他药学上可接受的衍生物。溶剂化物是指在活性化合物和药学上可接受的溶剂之间形成的复合物。药学上可接受的溶剂的例子包括水、乙醇、异丙醇、乙酸乙酯、乙酸和乙醇胺。

[0020] 在本发明范围内还涉及用于治疗上述病症、含有一种或多种上述化合物的组合物以及该组合物在制造用于上述治疗的药物中的用途。

[0021] 以下说明中对一个或多个实施方式的细节进行阐明。从说明书、附图和权利要求来看, 其他的特征、目的和优势将会是显而易见的。

附图说明

[0022] 图1描述了Rac和其各自的GEF Tiam之间的相互作用的电脑模拟锚定。

- [0023] 图2a显示了蛋白质印迹分析,其表明化合物1导致Rac激活的剂量依赖性降低,但对总的Rac水平没有显著影响。
- [0024] 图2b显示了自DMSO、NSC23766和化合物1获得的Pull-Down实验的定量。
- [0025] 图3a显示了说明通过MTS分析测量的SEM细胞中化合物1的剂量依赖性增殖抑制的图。
- [0026] 图3b显示了说明通过MTS分析测量的P12-Ichikawa细胞中化合物1的剂量依赖性增殖抑制的图。
- [0027] 图3c显示了说明通过MTS分析测量的Loucy细胞中化合物1的剂量依赖性增殖抑制的图。
- [0028] 图4a显示了在SEM细胞系中DMSO、NSC23766和化合物1对细胞凋亡和细胞死亡的影响。
- [0029] 图4b显示了在P12细胞系中DMSO、NSC23766和化合物1对细胞凋亡和细胞死亡的影响。
- [0030] 图5显示了集落形成单位测定中DMSO、NSC23766和化合物1的毒性测试结果。
- [0031] 图6显示了在用剂量为250mg/Kg的化合物1或者载体每天2次处理21天的白血病小鼠中的最后一次给予之后化合物1或载体的血浆水平。
- [0032] 图7显示了通过使用Elisa分析在由用化合物1或载体处理的小鼠中的白血病胚细胞浸润的脾上测定的Rac激活状态。
- [0033] 图8a显示了用化合物1和载体处理的组中的小鼠的相对重量。
- [0034] 图8b显示了当小鼠以仰卧位被成像时自用化合物1和载体处理的小鼠获得的生物发光数据。
- [0035] 图8c显示了当小鼠以俯卧位被成像时自用化合物1和载体处理的小鼠获得的生物发光数据。
- [0036] 图9显示了当小鼠以仰卧位和俯卧位被成像时从用化合物1和载体处理21天的组中的小鼠获得的代表性实际图像。
- [0037] 图10a显示的蛋白质印迹分析,其表明化合物1导致CDC42激活的剂量依赖性降低,但对总的CDC42水平没有显著影响。
- [0038] 图10b显示了自DMSO、NSC23766和化合物1获得的Pull-Down实验的定量。
- [0039] 图11a显示了化合物1对RHOA激活的蛋白质印迹分析以及自DMSO、NSC23776和化合物1获得的Pull-Down实验的定量。
- [0040] 图11b显示了化合物1对RAS激活的蛋白质印迹分析以及自DMSO、NSC23776和化合物1获得的Pull-Down实验的定量。
- [0041] 图12a显示了通过细胞滴度Glo分析测量的SEM细胞中化合物2的剂量依赖性增殖抑制。
- [0042] 图12b显示了在SEM细胞系中DMSO、NSC23766和化合物2对细胞凋亡和细胞死亡的影响。
- [0043] 图12c显示了在集落形成单元测定中DMSO、NSC23766和化合物2的毒性测试结果。
- [0044] 图13a显示了用化合物2和载体处理的组中的小鼠的相对重量。
- [0045] 图13b显示了当小鼠以仰卧位被成像时自用化合物2和载体处理的小鼠获得的生

物发光数据。

[0046] 图13c显示了当小鼠以仰卧位被成像时从用化合物2和载体处理15天的组中的小鼠获得的代表性实际图像。

[0047] 图14a显示了含有化合物2和地塞米松的药物组合的等效应图。

[0048] 图14b显示了含有化合物2和长春新碱的药物组合的等效应图。

[0049] 图14c显示了含有化合物2和PF-3758309的药物组合的等效应图。

具体实施方式

[0050] 本公开内容涉及使用以下技术鉴定出具有抗癌活性的某些化合物：基于Rho家族成员Rac与其特异性激活物GEF Tiam之间相互作用的高通量分析，以及化合物各自在Rac 2晶体结构上的电脑模拟锚定。该化合物出人意料地表现出在体外对白血病细胞增殖的抑制，在某些化合物的情形中，表现出对正常骨髓细胞的最小毒性。

[0051] 本文所述的所有化合物均可以通过本领域公知的方法制备，和/或由市售来源获得。例如，这些化合物可以由Evotec AG的EVOsource数据库鉴定，并可以自市售来源例如Sigma-Aldrich (St. Louis, MI) 购买。合成的化合物可以通过适当的方法例如柱层析、高效液相色谱或重结晶提纯。

[0052] 本文所述的化合物可以含有非芳香族双键和一个或多个不对称中心。因此，它们可以作为外消旋体、外消旋混合物、单一对应异构体、单个非对应异构体、非对应异构混合物和顺式-异构形式或反式-异构形式存在。所有这些异构形式均被预期。

[0053] 该化合物可以通过筛选方法例如鉴定抑制癌细胞增殖的化合物的分析来鉴定。另外可选地或者额外地，化合物可以使用鉴定抑制目标蛋白质（例如，Rac-GTP酶）激活的分析和/或通过目标蛋白质结构上锚定的化合物的电脑模拟分析来鉴定。

[0054] 例如，筛选方法可以包括将白血病细胞系（例如，REM、SEM、MV411、RS411、Jurkat、Raji、Nomo-1、Maim6或ML2）暴露于不同剂量的化合物不同的时间段。基于在化合物的存在下细胞增殖的能力可以鉴定抑制细胞存活的候选化合物。这种筛选方法可以在包括来自特定细胞系的细胞、液体培养基和候选化合物的容器中进行。例如，容器可以是培养皿、组织培养瓶、24-孔板、48-孔板、96-孔板、384-孔板、1536-孔板、3456-孔板或任何其他适当容器。在高通量筛选方法中，容器的每个孔可以含有不同的候选化合物。如本领域所认识的，筛选方法可以是自动的，以获得高通量。例如，MTS分析可以在标准的微量滴定板中在液体培养基中进行。此外，由于板的手动筛选可能是慢的、人工密集的并且有主观性的，在高通量筛选方法中可以使用自动染色方法，以区分活细胞与死细胞。

[0055] 本公开内容另外提供了药物组合物，其包括至少一种（例如，至少2、3、4、5或至少6种）式(I)所示的化合物（例如，化合物1-2）或其药学上可接受的盐以及药学上可接受的载体。

[0056] 本文所述的化合物可以诱导增殖抑制。诱导增殖抑制可以指诱导或提高细胞中增殖信号的阻抑。例如，诱导增殖抑制可以指诱导或提高细胞中的细胞死亡。作为另一例子，诱导增殖抑制可以指诱导或提高细胞中的凋亡。作为另一例子，诱导增殖抑制可以指诱导或提高细胞中的休眠状态。作为再另一例子，诱导增殖抑制可以指诱导或提高自噬。因此，本文所述的化合物可以用于诱导细胞中的增殖抑制的方法。该方法包括使细胞与对于诱导

细胞中增殖阻抑有效量的本文所述的化合物、盐或组合物接触。该接触可以在体内或体外进行。

[0057] 在一些实施方式中,本公开内容的特征在于治疗Rac-GTP酶介导的病症的方法。该方法包括将有效量的含有一种或多种上述化合物的药物组合物给予对其有需求的受试者(例如,患者)。Rac-GTP酶介导的病症的例子包括心血管病症、免疫缺陷病症、炎性病症和癌症。

[0058] 本公开内容中使用的术语“患者”是指动物、人或非人,根据本文所述的方法的治疗被提供给所述动物、人或非人。该术语包括,但不限于,鸟类;爬行动物;两栖动物和哺乳动物;例如,人,其他灵长类动物,猪,啮齿动物例如小鼠和大鼠、兔、豚鼠、仓鼠,牛,马,羊,狗,绵羊和山羊。优选的受试者是人、家畜和家养宠物例如猫和狗。

[0059] 细胞增殖和/或分化病症的例子包括癌症,例如癌瘤、肉瘤、转移性病症和造血肿瘤性病症,例如白血病。

[0060] 转移性肿瘤可以由许多种原发性肿瘤类型(包括但不限于前列腺、结肠、肺、乳腺、骨和肝来源)引起。例如,当肿瘤细胞从原发性肿瘤散发,粘附于血管内皮,渗透到周围组织内并生长以在与原发性肿瘤分离的位置形成独立的肿瘤时,转移发展。

[0061] 术语“癌症”是指具有自主性生长能力的细胞。这些细胞的例子包括具有异常状态或条件的细胞,其特征在于迅速增殖的细胞生长。该术语是要是指包括癌性生长,例如肿瘤(例如,实体瘤);致癌过程、转移组织和恶性转化的细胞、组织或器官,无论其组织病理学类型或侵袭性阶段。另外包括各种器官系统例如呼吸、心血管、肾、生殖、血液、神经、肝、胃肠和内分泌系统的恶性肿瘤,以及包括恶性肿瘤的腺癌,例如大多数结肠癌、肾细胞癌、前列腺癌和/或睾丸肿瘤、非小细胞肺癌、小肠癌和食道癌。“自然产生”的癌包括任何并非通过将癌细胞移植到受试者内而实验诱导的癌,其包括,例如,自发产生的癌、患者暴露于致癌物质导致的癌、插入转基因致癌基因或敲除肿瘤抑制基因造成的癌和感染例如病毒感染导致的癌。术语“癌瘤”在本领域中认可并指上皮偶或内分泌组织的恶性肿瘤。该术语还不包括癌肉瘤,其包括由癌性组织和肉瘤样组织组成的恶性肿瘤。“腺癌”是指源自腺组织的癌或者其中肿瘤细胞形成可识别的腺样结构的癌。

[0062] 术语“肉瘤”在本领域认可并指间叶细胞来源的恶性肿瘤。术语“造血肿瘤细胞病症”包括涉及造血来源的增殖性细胞/肿瘤细胞的病症。造血肿瘤细胞病症可以由骨髓谱系、淋巴谱系或红系谱系或其前体细胞引起。

[0063] 可以使用本公开内容的方法和组合物治疗的癌症包括,例如,胃癌、结肠癌、直肠癌、口腔/咽癌、食道癌、喉癌、肝癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、膀胱癌、皮肤癌、骨癌、肾癌、脑/中枢神经系统癌、头癌、颈癌和喉癌;何杰金氏病、非何杰金氏白血病、肉瘤、绒膜癌和淋巴瘤等。

[0064] 被认为处于患癌风险的个体可以具体受益于本发明,主要是因为存在任何病症的迹象之前可以开始预防性治疗。“处于风险”的个体包括,例如,以已经在统计学上显示促进易感个体中癌症的水平暴露于致癌物质(例如,通过消耗,例如通过吸入和/或摄取)。另外包括由于暴露于紫外线辐射或其环境、职业和/或遗传而有风险的个体,以及表现出癌前状态的病征例如息肉的个体。类似地,癌症或转移发展极早期的个体(即,在个体体内或在个体组织中的特定位点处仅存在有一个或数个异常细胞)可以受益于这种预防性治疗。

[0065] 可以用本文所述的化合物治疗的细胞增殖性和/或分化性病征的其他例子包括炎性疾病和骨吸收病。炎性病征的例子包括神经退行性病、多发性硬化、全身性红斑狼疮、类风湿性关节炎、动脉粥样硬化、脑炎、脑膜炎、肝炎、肾炎、败血症、肉样瘤病、银屑病、湿疹、荨麻疹、I型糖尿病、哮喘、结膜炎、耳炎、过敏性鼻炎、慢性阻塞性肺病、鼻窦炎、皮炎、炎症性肠病、溃疡性结肠炎、克罗恩氏病、白塞氏综合征 (Behcet's syndrome)、痛风、病毒感染、细菌感染、器官移植状况、皮肤移植状况、移植排斥 (包括同种异体移植排斥和移植抗宿主病)、脊柱关节病、硬皮病、血管炎和银屑病 (包括T-细胞介导的银屑病)。其他炎性病征已经描述于,例如,美国专利No.20020155166公开,在此将其全部内容并入作为参考。

[0066] 在一些实施方式中,本公开内容的特征在于治疗患者中有害的血管生成的方法。该方法包括给予被诊断为患有有害的血管生成或处于其风险中的患者有效量的含有一种或多种本文所述化合物的药物组合物。该方法可以任选地包括鉴定 (例如,诊断) 患者患有有害的血管生成或处于其风险中的步骤。

[0067] 在一些实施方式中,本公开内容的特征在于治疗与有害的血管生成有关的病情的方法。该方法包括给予被诊断为患有与有害的血管生成有关的病情或处于其风险中的患者有效量的含有一种或多种本文所述化合物的药物组合物,其中与有害的血管生成有关的病情不是癌症。该方法可以任选地包括鉴定 (例如,诊断) 患者患有与有害的血管生成有关的病情或处于其风险中的步骤。在一实施方式中,该病情是类风湿性关节炎、狼疮、银屑病、糖尿病视网膜病变、早产儿视网膜病变、黄斑变性、角膜移植排斥、新生血管性青光眼、晶状体后纤维组织形成、虹膜发红 (rubeosis)、Osler-Weber综合征、心肌血管形成、斑块新生血管形成、毛细血管扩张或血管纤维瘤或者其任意组合。

[0068] 治疗方法

[0069] 熟练的从业者将会认识到,患者可以由医师 (或兽医,如适合于被诊断的患者) 通过任何本领域已知的方法,例如通过评估患者的病史、进行诊断性测试和/或使用成像技术被诊断为患有本文所述的病情 (例如癌症) 或处于其风险中。

[0070] 熟练的从业者还将认识到,不需要由诊断患者的相同个体将本文所述的组合物给予所述患者 (或为患者开该组合物)。例如,可以由诊断和/或开处方的个体和/或任何其他个体包括患者本人 (例如,当患者能够自我给予时) 给予该组合物 (和/或可以监督给予)。

[0071] 在患者被诊断为患有任意这些病征或病情或者具有任何与患者发展该病征或病情的可能性增加有关的风险因子 (例如,患者最近已经、正在或将要暴露于致癌物质) 的那一天,可以由例如医师或兽医给予 (或处方给) 患者治疗本文所述病征 (例如癌症) 的组合物的有效量。组合物可以间歇地或连续地给予患者。例如,例如,可以给予组合物至少大约1、2、4、6、8、10、12、14、18或20天或大于20天 (例如,1、2、3、5或6个月),或者直至患者不再表现出该病情或病征的症状,或者直至患者被诊断为不再处于该病情或病征的风险中。在指定的一天,可以连续给予组合物一整天,或者间歇给予或者给予每天至多23小时,例如,每天至多20、15、12、10、6、3或2小时,例如,每天至多1小时。

[0072] 如果患者需要用化疗、放疗、免疫治疗、基因治疗和/或手术 (例如,因为由医师或兽医处方) 治疗,则患者可以在给予化疗、放疗和/或手术之前、在给予化疗、放疗和/或手术过程中和/或在给予化疗、放疗和/或手术之后用本文所述的组合物治疗。例如,就化疗、免疫治疗、基因治疗和放疗而言,可以在给予化疗、免疫治疗、基因治疗或放疗之前的0-20天

开始(并且给予多种剂量时,在每个单独的剂量之前),例如,在给予之前的至少30分钟(例如,大约1、2、3、5、7或10小时,或者大约1、2、4、6、8、10、12、14、18或20天,或者大约20天),间歇地或者连续地将组合物给予患者。另外可选地或者额外地,可以在给予化疗、免疫治疗、基因治疗或放疗的同时,将组合物给予患者。另外可选地或者额外地,可以在给予化疗、免疫治疗、基因治疗或放疗之后,例如,在给予之后立刻开始,给予患者该组合物,并间歇地或连续地持续大约1、2、3、5、7或10小时,或大约1、2、5、8、10、20、30、50或60天,一年,无限期,或者直至医师确定不再有必要给予该组合物。就手术过程而言,可以在手术过程之前、手术过程中和/或手术过程之后,将组合物全身或局部地给予患者。可以在该过程之前,将组合物间歇地或连续地给予患者1小时、2小时、3小时、4小时、6小时、12小时或大约1、2、4、6、8、10、12、14、18、20天,或20天以上。可以在紧靠手术之前的时期给予,并任选地继续整个过程,或者可以在手术开始之前至少15分钟(例如,在手术开始之前至少30分钟、1小时、2小时、3小时、6小时或24小时)时停止给予。另外可选地或额外地,可以在该过程中例如通过局部给予将组合物给予患者。另外可选地或额外地,可以在过程之后,例如,在该过程完成之后立刻开始,将组合物给予患者,并继续大约1、2、3、5、7或10小时,或者大约1、2、5、8、10、20、30、50或60天,1年,无限期,或者直至患者在完成该过程之后不再患有癌症或者处于其风险中。

[0073] B-细胞慢性淋巴细胞性白血病(B-CLL)的治疗可以包括给予联合化疗方案。在许多情形中,氟达拉滨与烷基化剂或者与单克隆抗体组合可以用于治疗B-CLL。例如,氟达拉滨可以在与烷基化剂例如环磷酰胺或苯达莫司汀的联合疗法中给予。氟达拉滨也可以与单克隆抗体例如阿仑单抗(alemtuzumab)、利妥昔单抗或奥法木单抗(ofatumumab)联合给予。氟达拉滨也可以与以下所有联合给予用于治疗B-CLL:烷基化剂、蒽环霉素(anthracycline)抗生素、长春花生物碱和皮质类固醇。例如,氟达拉滨可以与环磷酰胺、阿霉素、长春新碱和强的松龙一起给予。

[0074] 对急性成淋巴细胞性白血病(ALL)的治疗可以包括给予以下:强的松、长春新碱、蒽环霉素、L-天冬酰胺酶、环磷酰胺。

[0075] 对慢性骨髓性白血病(CML)的治疗可以包括给予伊马替尼(imatinib)。对幼淋巴细胞白血病的治疗可以包括嘌呤类似物、瘤可宁和包括以下的各种化疗:环磷酰胺、阿霉素、长春新碱、强的松环磷酰胺、阿霉素、长春新碱和强的松、依托泊苷、博来霉素VAPEC-B和阿仑单抗。

[0076] 对包括白血病的疾病的治疗可以包括以下治疗剂以及这些治疗方案的组合:在许多情形中,以下的组合:氟达拉滨,烷基化剂例如环磷酰胺或苯达莫司汀,单克隆抗体例如阿仑单抗、利妥昔单抗或奥法木单抗,蒽环霉素抗生素例如阿霉素(doxirubicin)、长春花生物碱,蒽环霉素,L-天冬酰胺酶、环磷酰胺、伊马替尼、嘌呤类似物、瘤可宁、环磷酰胺、阿霉素、长春新碱、强的松环磷酰胺、阿霉素、长春新碱和强的松龙、依托泊苷、博来霉素VAPEC-B和阿仑单抗和/或皮质类固醇。

[0077] 联合疗法

[0078] 在一些实施方式中,本公开内容所述的化合物或其药学上可接受的盐可以与其他治疗剂结合使用,以治疗疾病例如癌症。例如,附加试剂可以是本领域认可用于治疗上述化合物治疗的病症或病情的治疗剂。在一些实施方式中,附加试剂可以是抗癌药物,例如地塞

米松、长春新碱或PAK抑制剂(例如,Murray等人,PNAS,Vol.107,No.20,9446-9451(2010)中所述的PF-3758309)。附加试剂还可以是给予治疗组合物有益属性的试剂(例如,影响组合物粘度的试剂)。

[0079] 本公开内容预期的联合疗法包括,例如,在单一药物制剂中或者在单独的药物制剂中给予一种或多种本文所述的化合物或其药学上可接受的盐和附加试剂。另外可选地或额外地,联合疗法可以包括在同一药物制剂或单独的药物制剂中给予至少两种本文所述的化合物或其药学上可接受的盐。换言之,共同给予应当指给予受试者至少两种药剂,以提供两种药剂组合的有益效果。例如,可以同时或顺序,给予药剂。

[0080] 在一些实施方式中,本文所述的方法可以与上述的疗法或联合疗法组合使用。

[0081] 药物制剂和剂型

[0082] 当用作药物时,本申请中所述的化合物可以药物组合物的形式给药。这些组合物可以用制药领域公知的方式制备,并可以通过许多种途径给药,其取决于是需要局部还是全身治疗,并取决于待治疗的面积。给药可以是局部的(包括经皮、表皮、眼和至粘膜,包括鼻内、阴道和直肠释放)、肺(例如,通过吸入或吹入粉末或气雾剂,包括通过雾化器;气管内或鼻内)、口服或肠胃外。肠胃外给药包括静脉内、动脉内、皮下、腹膜内、肌肉内注射或灌注;或者颅内例如鞘内或脑室内给药。肠胃外给药可以是单一单次剂量的形式,或者可以是,例如,通过连续灌注泵给药。用于局部给药的药物组合物和制剂可以包括经皮贴剂、油膏、乳液、乳膏、凝胶、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体和粉末。常规的药物载体、水相、粉末或油性基底、增稠剂等可以是必需的或合意的。

[0083] 含有至少一种上述化合物和药学上可接受载体的药物组合物也在本公开内容的范围以内。而且,本公开内容涵盖将有效量的本文所述化合物例如以药物组合物给予患有癌症例如本文所述者的患者的方法。“有效量”或“有效的量”是指活性化合物对治疗的患者赋予治疗效果所要求的量。如本领域技术人员所认可,有效剂量将取决于以下而变化:所治疗病症的类型、给药途径、赋形剂使用和与其他疗法治疗共使用的可能性。

[0084] 治疗化合物的剂量、毒性和治疗效力可以通过标准的药学方法在细胞培养物或实验动物中测定,例如,测定LD50(使群体50%致死的剂量)和ED50(在50%群体中治疗有效的剂量)。毒性和治疗效果之间的剂量比是治疗指数,其可以表达为比例LD50/ED50。表现出高治疗指数的化合物是优选的。尽管可以使用表现出毒性副作用的化合物,应当注意设计将这些化合物靶向受影响组织的递送系统,以使对未感染细胞的潜在损伤最小,从而降低副作用。

[0085] 由细胞培养分析和动物研究获得的数据可以用于配置一系列用于人的剂量。这些化合物的剂量优选地位于包括毒性极小或没有毒性的ED50的循环浓度的范围内。取决于使用的剂型和采用的给药途径,剂量可以在该范围内变化。对于任何本文所述治疗方法中使用的化合物来说,治疗有效剂量最初可以由细胞培养分析估计。剂量可以在动物模型中计算,以实现细胞培养中测定的包括IC50(即,实现症状的最大半抑制的测试化合物的浓度)的循环血浆浓度范围。该信息可用于更准确地确定人体内可用的剂量。例如,血浆水平可以通过高效液相色谱测量。

[0086] 典型的剂量范围可以为每天体重的大约0.01 μ g/kg至大约50mg/kg(例如,大约0.1 μ g/kg至大约25mg/kg,大约1 μ g/kg至大约10mg/kg,大约10 μ g/kg至大约5mg/kg,大约0.1mg/

kg至大约1mg/kg)。在一些实施方式中,合适的日剂量范围可以为体重的大约10 μ g/kg至大约100 μ g/kg。

[0087] 为了实施本公开内容所述的方法,可以将具有一种或多种上述化合物的组合物肠胃外、口服、经鼻、直肠、局部和/或经颊给药给予。如本文所使用,术语“肠胃外”是指皮下、皮内、静脉内、肌肉内、关节内、动脉内、滑膜内、胸骨内、鞘内、病灶内或颅内注射以及任何合适的输注技术。

[0088] 注射用无菌组合物可以是无毒的肠胃外可接受稀释剂或溶剂中的溶液或悬液,例如,缓冲盐水或1,3-丁二醇溶液。可以使用的可接受的载体和溶剂中,有甘露醇、水、林格氏溶液和等渗氯化钠溶液。此外,固定油常规用作溶剂或悬浮介质(例如,合成的单甘油酯或二甘油酯)。脂肪酸例如油酸及其甘油酯衍生物可用于制备注射液,其为药学上可接受的天然油,例如橄榄油或蓖麻油,特别是其聚氧乙烯化的形式。这些油溶液或悬液还可以含有长链醇稀释剂或分散剂、羧甲基纤维束或类似的分散剂。出于制剂的目的,也可以使用常用于制造药学上可接受的固体、液体或其他剂型的其他常用的表面活性剂,例如TWEEN或SPAN,或其他类似的乳化剂或生物利用率促进剂。

[0089] 用于口服给药的组合物可以是任何口服可接受的剂型,包括胶囊、片剂、乳液和水悬液、分散液和溶液。在片剂的情形中,常用的载体包括乳糖和玉米淀粉。典型地,还可以加入润滑剂,例如硬脂酸镁。对于胶囊形式的口服给药,可用的稀释剂包括乳糖和干燥玉米淀粉。当水悬液或乳液口服给药时,活性成分可以悬浮或溶解在结合有乳化剂或悬浮剂的油相中。如果需要,可以加入某些甜味剂、风味剂或着色剂。

[0090] 可以根据药物制剂领域公知的技术制备鼻气雾剂或吸入组合物。例如,使用苯醇或其他合适的防腐剂、提高生物利用率的吸收促进剂、碳氟化合物和/或本领域已知的其他增溶剂或分散剂,可以将这些组合物制备成盐水溶液。

[0091] 具有一种或多种上述化合物的组合物还可以以用于直肠给药的栓剂的形式给药。

[0092] 就与组合物的活性成分相容(优选地能够使活性成分稳定)并对要治疗的受试者无害而言,药物组合物中的载体必须是“可接受”的。可以使用一种或多种增溶剂作为递送上述活性化合物的药物赋形剂。其他载体的例子包括胶体二氧化硅、硬脂酸镁、纤维素、月桂基硫酸钠和D&C Yellow#10。

[0093] 治疗化合物还可以与将保护治疗化合物不从体内迅速消除的载体一起制备,例如控释制剂,包括植入物和微囊密封的递送系统。可以使用可生物降解、生物相容性聚合物,例如乙烯醋酸乙烯酯、聚酞、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。这些制剂可以使用标准技术制备,或者可以购自,例如,Alza Corporation和Nova Pharmaceuticals公司。也可以使用脂质体悬液(包括靶向具有针对细胞抗原的单克隆抗体的所选择细胞的脂质体)作为药学上可接受的载体。这些可以根据本领域技术人员已知的方法制备,例如,如美国专利No.4,522,811所述。

[0094] 药物组合物可以与给药说明书一起包括在容器、包装或分配器中。

[0095] 合适的药物组合物的配制方法是本领域已知的。参见,例如,以下系列的书:Drugs and the Pharmaceutical Sciences:a Series of Textbooks and Monographs(Dekker, NY)。

[0096] 针对它们治疗上述疾病的效力通过本文所述的筛选方法可以预先筛选上述化合

物,然后通过额外的动物实验和/或临床试验加以确认。其他的筛选方法对本领域普通技术人员来说也将是显而易见的。

[0097] 合成

[0098] 本公开内容所述的化合物,包括其盐,均可以使用已知的有机合成技术制备,并根据无数可能的合成路径中的任何一个合成,例如,通过与Gerard等人ACS Comb.Sci.2011,13,365类似的方法。

[0099] 用于制备本申请的化合物的反应可以在合适的溶剂中进行,该溶剂可以由有机合成领域的技术人员很容易地选择。在反应进行的温度例如范围可以为从溶剂凝固点到溶剂沸点的温度,合适的溶剂与起始原料(反应物)、中间体或产物可以是基本上没有反应性的。指定的反应可以在一种溶剂或一种以上溶剂的混合物中进行。取决于特定的反应步骤,用于特定反应步骤的适当溶剂可以由技术人员来选择。

[0100] 本申请中所述化合物的制备可以涉及许多种化学基团的保护和脱保护。对保护和脱保护的需要以及适当保护基的选择可以由本领域技术人员很容易地确定。保护基的化学性质可以见于,例如,T.W.Greene和P.G.M.Wuts,Protective Groups in Organic Synthesis,3rd Ed.,Wiley&Sons,Inc.,New York(1999),在此将其全文并入作为参考。

[0101] 反应可以根据本领域已知的任何适当方法监测。例如,产物的形成可以通过光谱学方式检测,例如,核磁共振谱(例如,¹H或¹³C)、红外光谱、分光光度法(例如,UV-可见)、质谱或通过色谱方法监测,例如高效液相色谱(HPLC)、液相色谱-质谱(LCMS)或薄层色谱(TLC)。如何由光学非活性起始原料制备光学活性形式的方法是本领域已知的,例如,通过外消旋混合物的拆分,或者通过立体选择性合成。本文所述的化合物中还可以存在许多烯烃、C=N双键等的几何异构体,所有这些稳定的异构体均在本申请内被预期。对本申请化合物的顺式和反式几何异构体进行了说明,其均可以分离成异构体混合物或独立的异构体形式。

[0102] 化合物外消旋混合物的拆分可以通过许多种本领域已知方法中的任意方法进行。示例的方法包括使用作为具有光学活性的、形成盐的有机酸的手性拆分酸进行部分重结晶。用于重结晶方法的合适的拆分剂为,例如,光学活性的酸,例如D型和L型的酒石酸、二乙酰酒石酸、二苯甲酰酒石酸、扁桃酸、苹果酸、乳酸或各种光学活性的樟脑磺酸,例如β-樟脑磺酸。其他适合于部分结晶方法的拆分剂包括立体异构纯形式的α-甲基苄基胺(例如,S和R形式或者非对映异构纯的形式)、2-苯基甘氨酸(2-phenylglycinol)、去甲麻黄碱、麻黄碱、N-甲基麻黄碱、环己基乙基胺、1,2-二氨基环己基等。

[0103] 外消旋混合物的拆分还可以通过通过在装填有光学活性拆分剂(例如,二硝基苯甲酰基苄基甘氨酸)的柱子上洗脱进行。合适的洗脱溶剂组合物可以由本领域技术人员确定。

[0104] 本申请的化合物还包括互变异构的形式。互变异构形式原因在于相邻双键与单键交换连同质子的伴随迁移。互变异构形式包括质子异变互变异构体,其为具有相同经验式和总电荷的异构质子化状态。质子异变互变异构体的例子包括酮-烯醇对、酰胺-亚胺酸对、内酰胺-内酰亚胺对、烯胺-亚胺对和其中质子可以占据杂环体系两个或更多个位置的环形式,例如1H-和3-H-咪唑、1H-、2H-和4H-1,2,4-三唑、1H和2H-异吲哚和1H和2H-吡唑。互变异构形式可以处于平衡中,或者通过适当的取代在立体上锁定成一种形式。

[0105] 本申请所述的化合物还可以包括中间体或最终化合物中出现的原子的所有同位

素。同位素包括原子数相同、但质量数不同的那些原子。例如，氢的同位素包括氕和氘。

[0106] 所有的化合物及其药学上可接受的盐均可以与其他物质例如水和溶剂一起存在(例如,水合物和溶剂化物),并可以被分离。

[0107] 在一些实施方式中,本申请所述的化合物或其盐是基本上分离的。“基本上分离的”是指化合物至少部分地或基本上与其形成或被检测到的环境分离。部分分离可以包括,例如,富含本申请所述化合物的组合物。基本上分离可以包括含有至少大约50wt%、至少大约60wt%、至少大约70wt%、至少大约80wt%、至少大约90wt%、至少大约95wt%、至少大约97wt%或者至少大约99wt%的本申请所述化合物或其盐的组合物。用于分离化合物及其盐的方法是本领域常规的。

[0108] 本文所用的措辞“药学上可接受”是指在可靠的医学判断的范围内适合于与人体和动物的组织接触使用且没有过量毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症,与合理的收益/风险比例相称的那些化合物、原料、组合物和/或剂型。

[0109] 本申请还包括本文所述化合物的药学上可接受的盐。如本文所用,“药学上可接受的盐”是指所公开化合物的衍生物,其中母体化合物通过将现有的酸或碱部分转化成其盐的形式而被修饰。药学上可接受的盐的例子包括,但不限于,碱性残基例如胺的无机或有机酸盐;酸性残基例如羧酸的碱金属盐或有机盐等。本申请的药学上可接受的盐包括例如由无毒的无机酸或有机酸形成的母体化合物的常规的无毒盐。本申请的药学上可接受的盐可以由含有碱性或酸性部分的母体化合物通过传统的化学方法合成。通常,这些盐可以通过使这些化合物的游离酸或碱形式与化学计量的适当碱或酸在水中或有机溶剂中或者在二者的混合溶剂中反应来制备;通常,优选非水介质,如醚、乙酸乙酯、醇(例如,甲醇、乙醇、异丙醇或丁醇)或乙腈(ACN)。合适的盐的例子见于Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418; 和Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2 (1977), 在此将其全文并入作为参考。试剂盒

[0110] 本申请还包括可用于例如治疗或预防Rac-GTP酶介导的病症(例如癌症)的试剂盒,其包括一个或多个含有药物组合物的容器,所述药物组合物包括治疗有效量的本申请化合物。如果需要,这样的试剂盒可以进一步包括一个或多个不同的常规试剂盒组分,例如,具有一种或多种药学上可接受载体的容器、额外的容器等,这对于本领域技术人员来说将会是显而易见的。试剂盒中还可以包括作为插入物或作为标签的指示待给予的组分的量的说明书、给药指导和/或用于混合组分的指导。

[0111] 在此将本文所引的所有出版物(例如,专利、专利申请和文章)的内容全文并入作为参考。

[0112] 实施例

[0113] 以下具体实施例应当理解成仅仅是说明性的,绝非以任何方式对本发明内容的其余部分加以限定。无需进一步赘述,据信本领域技术人员可以基于本文的说明在其最充分的程度上利用本发明。

[0114] 实施例1: Rac抑制剂的电脑模拟筛选

[0115] 方法

[0116] Rac-GEF相互作用为了进行对于Rac抑制剂的病毒筛选,要求在Rac2晶体结构上进行电脑模拟锚定。进行Rac-GEF相互作用的电脑模拟锚定,以解释Rac蛋白质上潜在的目标

位点,小分子结合到该目标位点上将导致干扰GEF与蛋白质相互作用。图1显示了GEF TIAM与RAC (TIAM-Rac) 的模型。Rac以灰色显示, TIAM显示为锚定模型。Tiam的Trp56残基以蓝色突出显示。绘出的是中断Rac-GEF相互作用的潜在位置,“热点”。绘出的“热点”定义为Tiam和Rac具有显著相互作用的目标位置,其表示成黄色表面。另外存在有GTP分子。

[0117] 电脑模拟筛选对来自Evotex AG文库的1400万种化合物进行筛选。对于药物样特性的特定过滤产生480万种化合物。选择这些化合物用于锚定。应用内部算法以使选择的化合物之间的化学多样性最大化。进行化合物在Rac2晶体结构上的电脑模拟锚定,选择前120万种化合物进行进一步评价。这代表所选择的化合物的前30%。将这些化合物分两组进行分析。通过将化合物锚定在Rac1结构上对第一组化合物进行分析,并基于Rac-1和Rac-2中的类似结合模式、在Rac1和Rac2中的高锚定分数以及与针对已知活性化合物的结合假说匹配的药效团进行选择。第二组化合物的分析设计使用ASP和Chemscore的评分功能进行再评分,并选择对于3种评分方法即Gold、GSP和Schemsc来说均具有高分值的化合物。

[0118] 结果经选择多样性集合和进行外观检验,从第1组选择75种化合物。经选择多样性集合和进行外观检验时,从第2组选择77种化合物。这152种优先的化合物中的100种购自商业来源以用于进行一步筛选。

[0119] 实施例2:筛选导向化合物

[0120] 剂量依赖性增殖抑制通过Cell Titer Glo在两种白血病细胞系SEM和P12中对选自自最初的电脑模拟筛选的100种化合物进行增殖抑制分析。将用于增殖分析的细胞沉淀并再悬浮。然后将细胞悬液分开,以所需的浓度加入要测试的化合物,随后进行平板培养。在孵育期间之后,加入Cell Titer Glo试剂(Promega CellTiter 96[®],水相非放射性细胞增殖分析),并孵育。随后使用酶标仪在490nm处测量吸收。分析每种化合物对细胞增殖的影响。

[0121] 为了确定应当进一步继续研究这些化合物中的哪些,进行生物化学Pull-Down分析,以确认通过Rac和GTP酶之间相互作用的破坏指示的Rac激活的特异性抑制。该分析最初要求对细胞进行处理,然后进行Pull-Down,并进行蛋白质免疫印迹分析。首先将细胞在不含血清的培养基中饥饿2小时。然后将其再悬浮在含有血清的培养基,以所需的浓度加入抑制剂。在孵育所需的时间之后,将细胞沉淀,并用镁裂解缓冲液(Millipore Mg²⁺裂解/洗涤缓冲液)溶解。然后用Pak Beads(Millipore Rac/cdc42分析试剂(PAK-1PBD),琼脂糖)收集Rac蛋白质和结合的蛋白质。随后将结合的蛋白质用裂解缓冲液除去,并进行蛋白质免疫印迹分析。

[0122] 从上述分析中鉴定出化合物1作为导向化合物。图2a显示的蛋白质免疫印迹分析表明,化合物1导致Rac激活的剂量依赖性降低,但对总的Rac水平没有显著影响。图2b显示了自化合物1获得的3组独立的Pull-Down实验的定量。另外显示了作为已知的Rac1结合抑制剂和被Rac-特异性RhoGEF激活的Rac活性的抑制剂的化合物DMSO和化合物NSC23766的蛋白质免疫印迹和Pull-Down分析结果。

[0123] 实施例3:分析化合物1抑制白血病细胞系的效力

[0124] 分析导向化合物即化合物1在不同剂量下对三种不同的白血病细胞系SEM、P12和Loucy的细胞增殖的影响。为了对细胞增殖的百分比抑制率进行定量,完成以上实施例2中所述的Cell Titer Glo分析。图3a-3c显示的三张图说明了化合物1在SEM、P12和Loucy细胞

中剂量依赖性增殖抑制,如MTS分析所测量。如这三张图中所示,化合物1针对SEM、P12和Loucy细胞表现出的IC₅₀值分别是43.8 μ M、39.2 μ M和160 μ M。

[0125] 使用Annexin V染色使用基于流式的分析进一步分析化合物1对细胞凋亡和细胞死亡的影响。结果显示于图4a和4b中,其显示了DMSO、NSC23766和化合物1在SEM和P12细胞系中对细胞凋亡和细胞死亡的影响。如这两张图所示,化合物1在SEM和P12细胞系中以剂量依赖性的方式导致细胞凋亡和细胞死亡。

[0126] 实施例4:评价化合物1的毒性

[0127] 在集落形成单位分析(CFU分析)中测试化合物1的毒性,该分析通过将正常的骨髓造血细胞和祖细胞在补充有不同剂量化合物1、NSC23766和DMSO的半固体培养基中进行平板培养。测试结果显示于图5。如图5所示,化合物1针对正常的骨髓细胞没有表现出毒性。

[0128] 实施例5:用于评价化合物1的药代动力学和抗白血病活性的体内分析

[0129] 分析化合物1在小鼠中的药代动力学和抗白血病活性。具体地,将SEM白血病细胞系用编码mCherry标签和荧光素酶的载体标记。将500,000个标记的细胞注射到免疫缺陷的小鼠(NSG小鼠)中。建立白血病之后(如通过生物发光成像所评价),以250mg/Kg的剂量用化合物1或用载体每天2次处理小鼠21天。在处理过程中,每隔一天对小鼠进行成像,记录BLI,并分析。最后一剂之后2小时,将小鼠处死,收获器官用于PK和PD分析。图6显示最后一次给药之后化合物1的血浆水平。图7显示了通过使用Elisa分析在用化合物1或载体处理的小鼠中的白血病胚细胞浸润的脾上测定的Rac激活状态。如图7所示,与载体相比较,化合物1降低了Rac激活。

[0130] 进一步地,图8a显示了用化合物1和载体处理的组中小鼠的相对重量。如图8a所示,这两组中小鼠的相对重量(即,其各自基于每组中小鼠的平均重量,并在处理之前标准化至平均重量)几乎相同,表明化合物1没有表现出毒性或者表现出毒性低。图8b和8c分别显示了当小鼠以仰卧位和俯卧位被成像时自用化合物1和载体处理的小鼠获得的生物发光数据。如这两张图所示,以任一位置被成像时,化合物1均显著降低了小鼠中的生物发光,表明该化合物有效地抑制了白血病增殖。图9显示了当小鼠以仰卧位和俯卧位被成像时从用化合物1和载体治疗21天的组中的小鼠获得的代表性实际图像。

[0131] 实施例6:评价化合物1对CDC42、RHOA和RAS激活的影响

[0132] 对化合物1进行测试,以评价其对CDC42激活的影响。在该情形中,用CDC42效应器结构域包被用于免疫沉淀的小珠。图10a显示的蛋白质印迹分析表明,化合物1导致CDC42激活的剂量依赖性降低,但对总的CDC42水平没有显著影响。图10b显示了自化合物1获得的5组独立的Pu11-Down实验的定量。还显示了DMSO和NSC23766的蛋白质印迹分析和Pu11-Down分析结果。

[0133] 对化合物1进行进一步测试,以评价其对RHOA和RAS激活的影响。图11a显示了化合物1对RHOA激活的蛋白质印迹分析,以及自DMSO、NSC23766和化合物1获得的Pu11-Down实验的定量。图11b显示了化合物1对RAS激活的蛋白质印迹分析,以及自DMSO、NSC23766和化合物1获得的Pu11-Down实验的定量。如图11a和11b所示,化合物1对RHOA和RAS激活没有显著影响。

[0134] 实施例7:化合物1和Rac1之间结合的评价

[0135] 在两个组独立的结合分析即2D NMR光谱和同源时间分辨荧光分析(HTRF)中,测试

化合物1与Rac1结合的效力。

[0136] 在2D NMR分析中,使用含有50 μ M Rac1和250 μ M或400 μ M化合物1的样品。自上述样品获得的NMR谱表明该化合物与Rac1没有任何结合。而且,在HTRF分析中没有观察到结合。

[0137] 总之,上述结果表明,化合物1基本上不与Rac1结合。就该实施例和实施例6中显示的结果而言,无意拘泥于任何理论,据信化合物1通过与Rac1上游的蛋白质结合抑制Rac1激活。

[0138] 实施例8:化合物1的激酶筛选和GPCR图谱

[0139] 测试化合物1抑制40种激酶的活性以及作为拮抗剂和激动剂与12种GPCR结合的效力。下表1显示了化合物1和NSC23766的激酶抑制百分比。下表2显示了化合物1和NSC23766的GPCR结合百分比。如表1和表2所示,化合物1没有表现出所测试的40种激酶的显著抑制,没有表现出与所测试12种GPCR的显著结合,说明该化合物对所分析的蛋白质没有脱靶效应。

[0140] 表1. 激酶筛选结果

[0141]

激酶	NSC23766 (抑制百分比)	化合物 1 (抑制百分比)
PIK3C2A (PI3K-C2 α)	-3.3	-1.3
PIK3C2B (PI3K-C2 β)	-1.8	-10.9
PIK3C3 (hVPS34)	-17.8	-12.5
PIK3CA/PIK3R1 (p110 α /p85 α)	-0.4	11.0
PIK3CD/PIK3R1 (p110 δ /p85 α)	-5.8	9.0
LIMK1	-14.2	-1.1
LIMK2	-3.5	0.4
MAP3K2 (MEKK2)	14.3	5.9
MYLK (MLCK)	1.6	1.2
CDC42 BPA (MRCKA)	-1.8	2.8
CDC42 BPB (MRCKB)	-4.6	3.3
CDK5/p25	11.4	1.0
EGFR (ErbB1)	24.6	-10.4
EPHB1	19.8	7.1
FRAP1 (mTOR)	27.0	0.9
IGF1R	42.9	-7.4
MAP2K2 (MEK2)	20.7	13.3
MAPK3 (ERK1)	11.5	6.7
MAPK8 (JNK1)	-1.1	0.4
MAPK9 (JNK2)	-8.9	10.9
PAK1	24.4	22.7
PAK2 (PAK65)	0.3	-8.5
PAK3	6.3	-10.2
PAK4	-0.2	6.4
PAK6	8.9	-0.6
PAK7 (KIAA1264)	4.9	-11.5
PDGFRA (PDGFR α)	34.8	15.1
ROCK1	-2.0	-4.6
ROCK2	-14.7	-2.0
SYK	39.4	7.0
ABL1	19.3	0.6
AKT1 (PKB α)	-23.3	-6.7
AKT2 (PKB β)	-22.9	11.5
CDK1/cyclin B	1.3	-2.3
FLT3	31.4	-15.3
JAK1	50.6	-3.3
JAK2	37.7	-11.6
JAK3	21.9	-16.3
KIT	26.3	-4.2
SRC	43.6	8.7

[0142] 表2.GPCR结合分析结果

[0143]

GPCR	NSC23766 (结合百分比)	化合物 1 (结合百分比)	
B2	-16	5	拮抗剂
CCR4	44	18	拮抗剂
M1	81	5	拮抗剂
M2	90	-4	拮抗剂
M3	22	12	拮抗剂
M4	92	28	拮抗剂
M5	75	17	拮抗剂
MC5R	20	0	拮抗剂
MTNR1A	14	16	拮抗剂
MTNR1B	-34	-2	拮抗剂
SSTR1	-7	-3	拮抗剂
SSTR5	-11	-6	拮抗剂
B2	4	2	激动剂
CCR4	1	10	激动剂
M1	-9	-4	激动剂
M2	1	1	激动剂
M3	-1	1	激动剂
M4	0	1	激动剂
M5	0	0	激动剂
MC5R	10	0	激动剂
MTNR1A	-1	0	激动剂
MTNR1B	3	4	激动剂
SSTR1	0	0	激动剂
SSTR5	2	0	激动剂

[0144] 实施例9: 导向化合物1的优化

[0145] 进行SAR,以鉴定具有改善的性质的化合物的类似物。合成在该SAR研究中鉴定出的56种化合物。在其当中,对48种化合物进行细胞增殖分析测试。基于测试结果,化合物2表现出最强的抑制癌细胞增殖的效果,并鉴定为另一导向化合物。

[0146] 实施例10: 评价化合物2抑制白血病细胞系的效力及其毒性

[0147] 分析不同剂量的化合物2在SEM白血病细胞系上对细胞增殖的影响,并与相同细胞系上化合物1的效果进行比较。如图12a所示,在抑制SEM细胞增殖方面,化合物2表现出提高的效力。

[0148] 使用Annexin V染色使用流式分析进一步分析化合物2对细胞凋亡和细胞死亡的影响。结果显示于图12b,其显示DMSO、NSC23766和化合物2在SEM细胞系中对细胞凋亡和细

胞死亡的影响。如图12所示,化合物2以剂量依赖性的方式在SEM细胞系中导致细胞凋亡和细胞死亡。

[0149] 另外在集落形成单位分析(CFU分析)中对化合物2进行了毒性测试,其通过在补充有不同剂量的化合物2、NSC23766和DMSO的半固体培养基中对正常骨髓造血细胞和祖细胞进行平板培养进行。测试结果显示于图12c。如图12c所示,化合物1针对正常骨髓细胞没有表现出毒性。

[0150] 实施例11:评价化合物2和Rac1之间的结合

[0151] 在两组独立的结合分析即2D NMR光谱和同源时间分辨荧光分析(HTRF)中,测试化合物2与Rac1结合的效力。

[0152] 在2D NMR分析中,使用含有50 μ M Rac1和250 μ M或400 μ M化合物2的样品。获得的NMR谱表明该化合物与Rac1没有任何显著结合。在HTRF结合分析中将该化合物加入至Tiam1-Rac复合物没有导致蛋白质荧光发射的干扰,说明化合物与复合物之间没有结合。

[0153] 总之,上述结果表明,化合物2基本上不与Rac1结合。无意拘泥于任何理论,据信化合物2通过与Rac1上游的蛋白质结合抑制Rac1激活。

[0154] 实施例12:评价化合物2的抗白血病活性的体内分析

[0155] 评价化合物2在小鼠中的抗白血病活性。具体地,将细胞系P12-ICHIKAWA用共表达荧光素酶和mCherry荧光标记的慢病毒载体标记。将分选的mCherry阳性P12-ICHIKAWA细胞注射到免疫缺陷(NSG)小鼠中。注射之后大约3周,基于通过体内生物发光成像(BLI)定量评价的肿瘤负荷的测定,小鼠开始处理。小鼠接受每日两次口服剂量的化合物2(50mg/Kg体重)或安慰剂。化合物2组和载体组每组具有8只小鼠。一周进行3次BLI分析,以评价肿瘤负荷。通过评价经处理的小鼠与载体组的体重,对毒性进行评价(参见图13a)。由于在载体组中由于疾病的非常有攻击性的性质,开始处理之后第18天停止实验。以仰卧位和俯卧位对小鼠进行成像。图13b总结了以仰卧位的化合物2组和载体组中的标准化至处理开始时的BLI值。

[0156] 如这些图13b所示,化合物2显著降低了当以仰卧位被成像时的小鼠中的生物发光,表明该化合物有效地抑制了白血病增殖。此外,如图13a所示,化合物2组中的小鼠表现出与载体组中类似的体重减轻,表明化合物2对小鼠没有毒性。图13c显示了当小鼠以仰卧位被成像时从用化合物2和载体处理15天的组中的小鼠获得的代表性实际图像。

[0157] 实施例13:评价化合物2与其他抗癌化合物结合的抗白血病活性

[0158] 评价化合物2与以下三种抗癌化合物中的每一种结合的抗白血病活性:地塞米松(Dex)、长春新碱(VCR)和PF-3758309(即,p21-激活的激酶(PAK)的抑制剂),它们被充分表征为的RAC和CDC42的效应器。组合每种药物的五种剂量,使用增殖分析作为读出(ATPLite®,来自PerkinElmer),进行结合实验。在Ras-成熟的P12-ICHIKAWA细胞上对药物组合进行测试,将药物组合加入到培养基中之后72小时,记录增殖数据。使用CalcuSyn软件获得等效图,用于分析药物相互作用。结果总结于图14a-14c。如这三张图所示,所有三种组合均表现出协同作用,因为每种组合的中值组合指数(CI)均小于1。具体地,含有化合物2和PAK抑制剂PF-3758309的组合表现出最高的协同作用,中值CI为0.34。

[0159] 其他实施方式

[0160] 本说明书中公开的所用特征均可以任何组合结合。本说明书公开的每个特征均可

以被达到相同、等同或类似目的的另外可选的特征代替。因此,除非另外明确指出,所公开的每种特征仅仅是总的等同或类似特征系列的一个例子。

[0161] 本领域技术人员可以从上述说明中容易地确定本发明的基本特征,在不偏离其精神和范围的情况下,可以对本发明进行许多种改变和修饰,以使其适应于许多种用途和条件。因此,其他实施方式也在以下权利要求的范围以内。

Rac-GEF相互作用的电脑模拟图

Rac-Tiam相互作用模型和关键“热点”的绘制

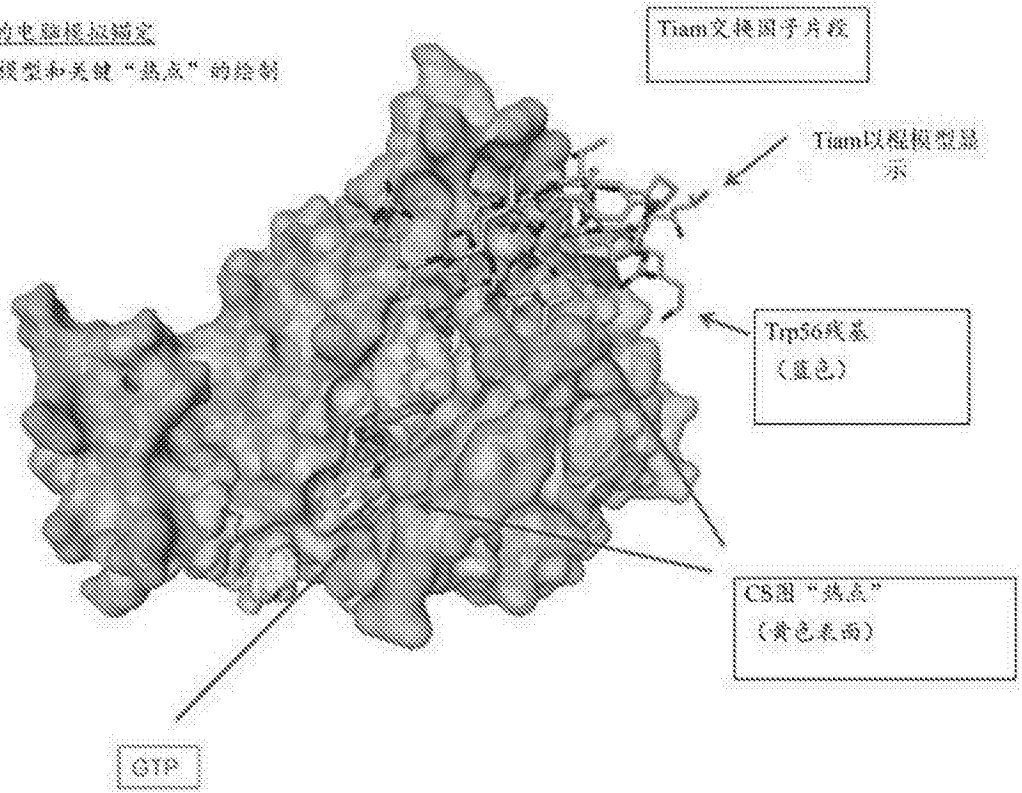


图1

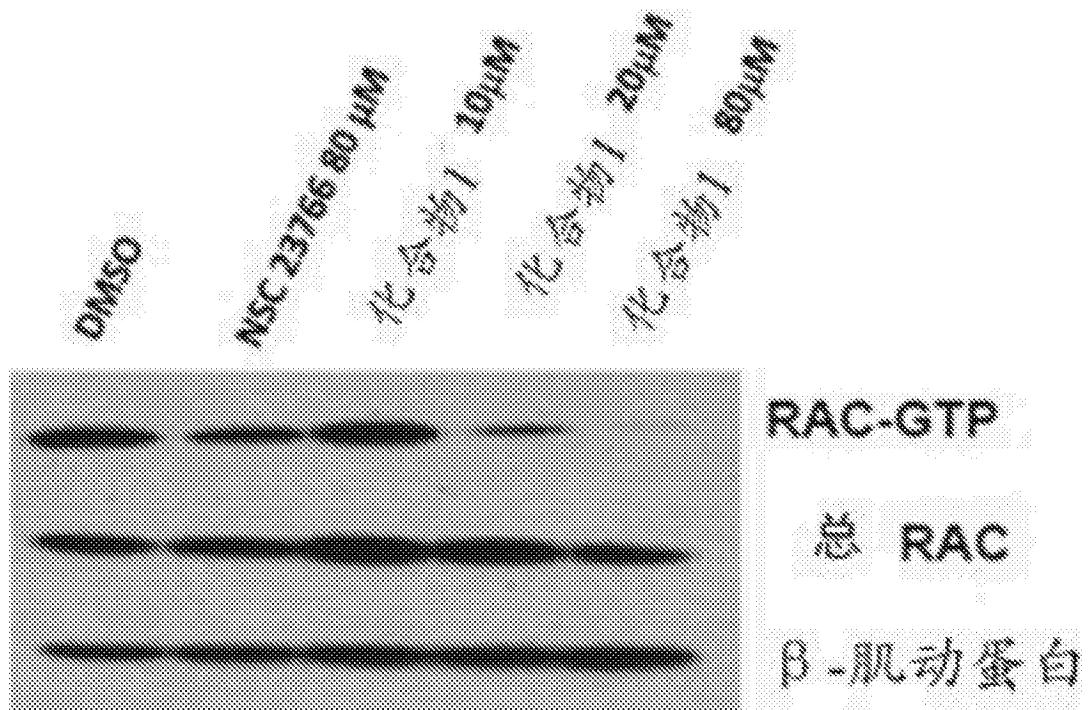


图2A

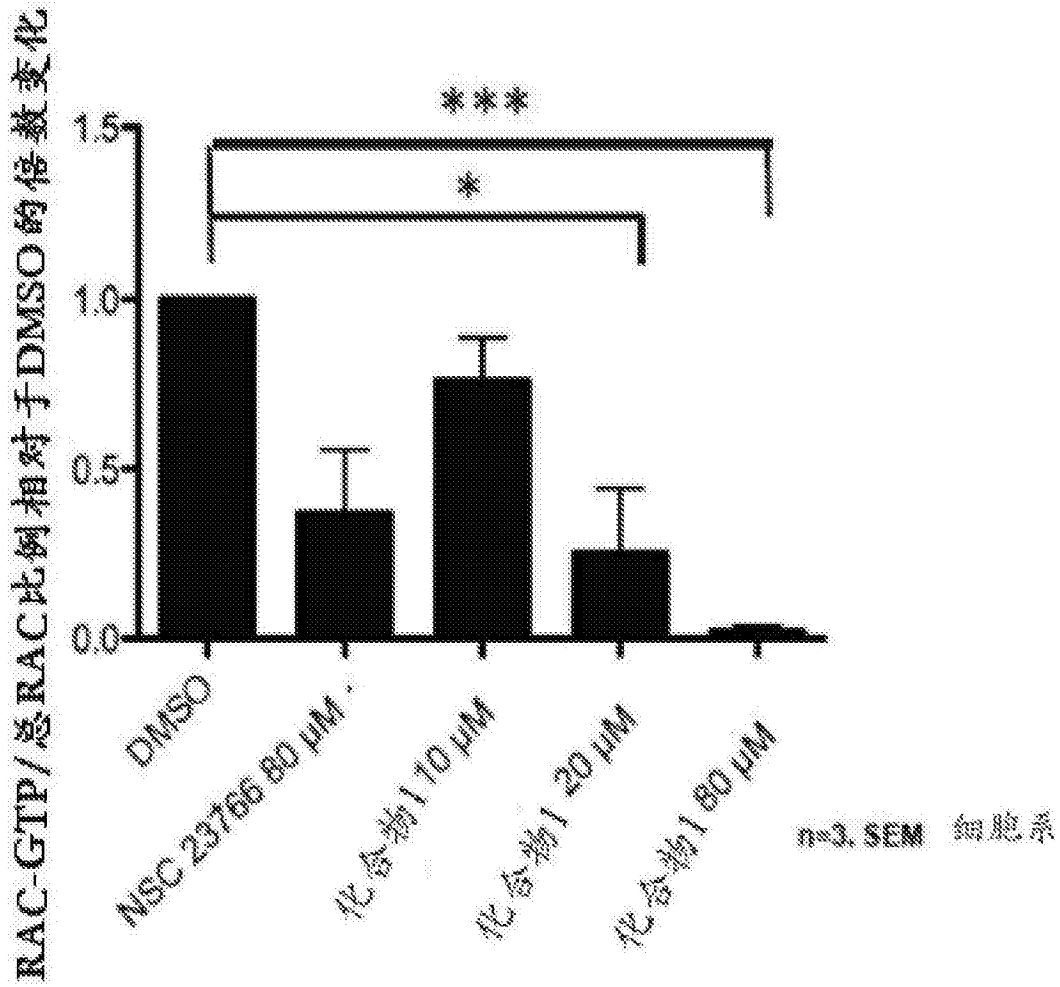


图2B

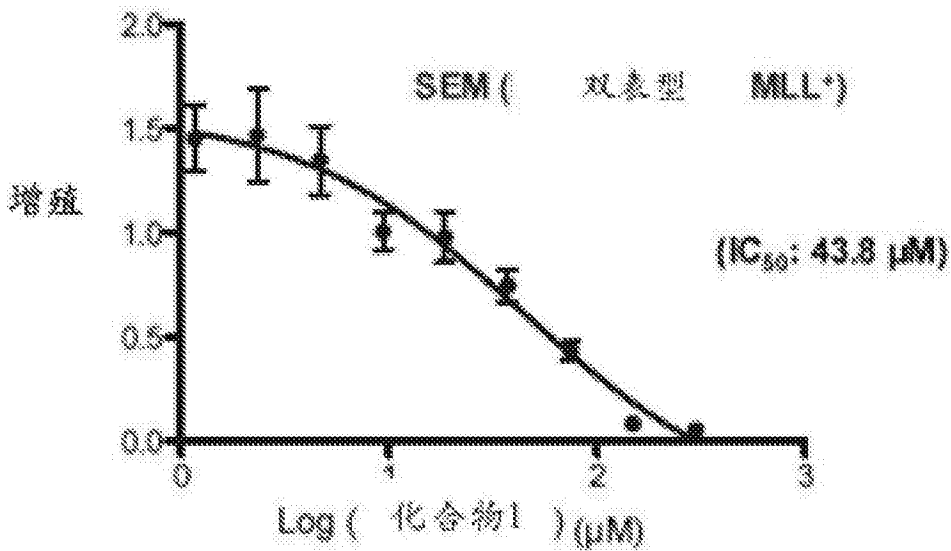


图3A

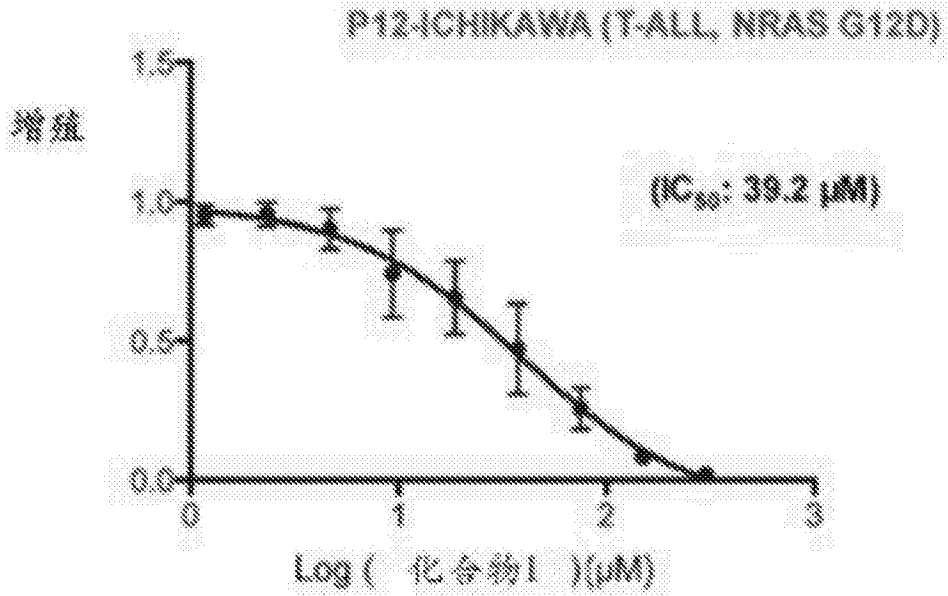


图3B

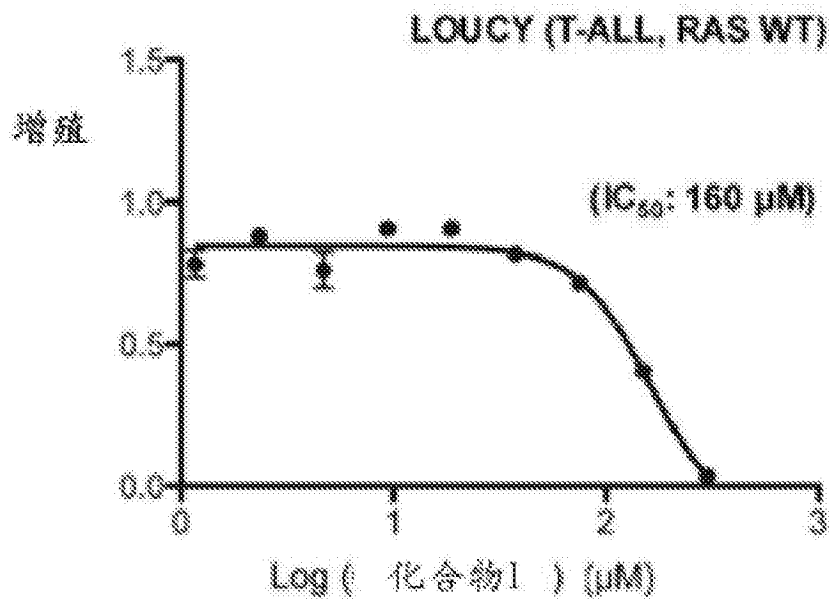


图3C

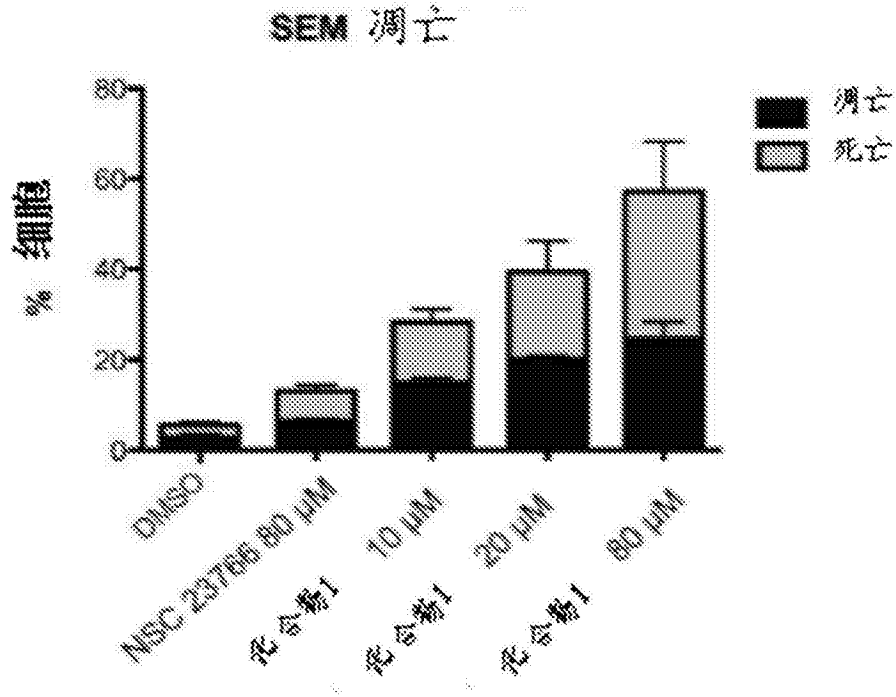


图4A

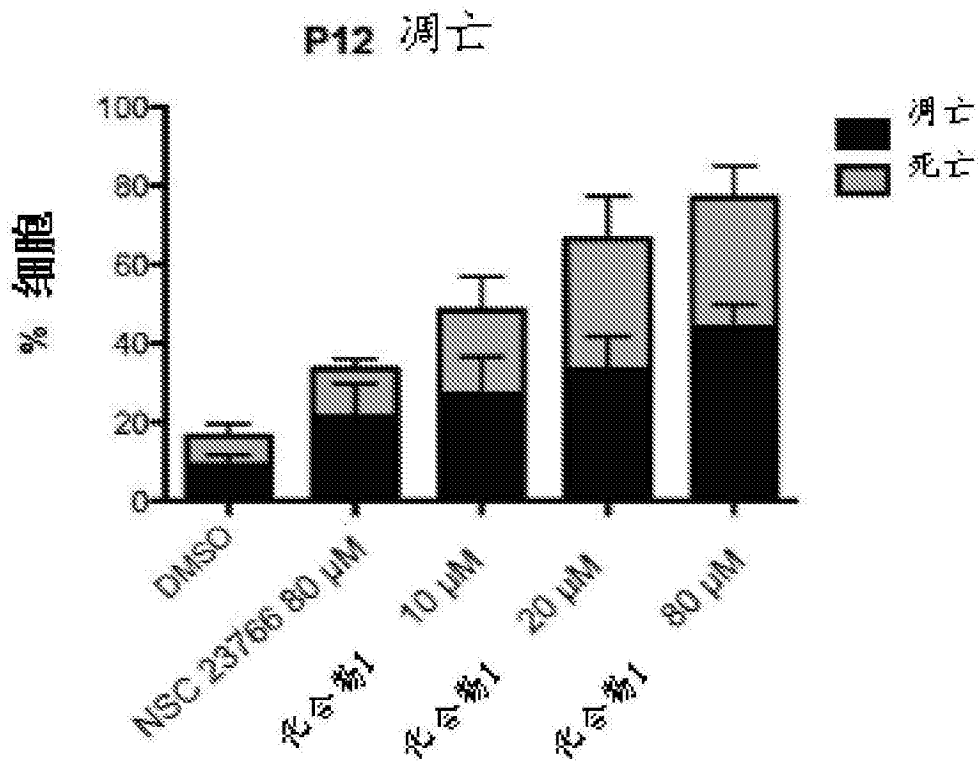


图4B

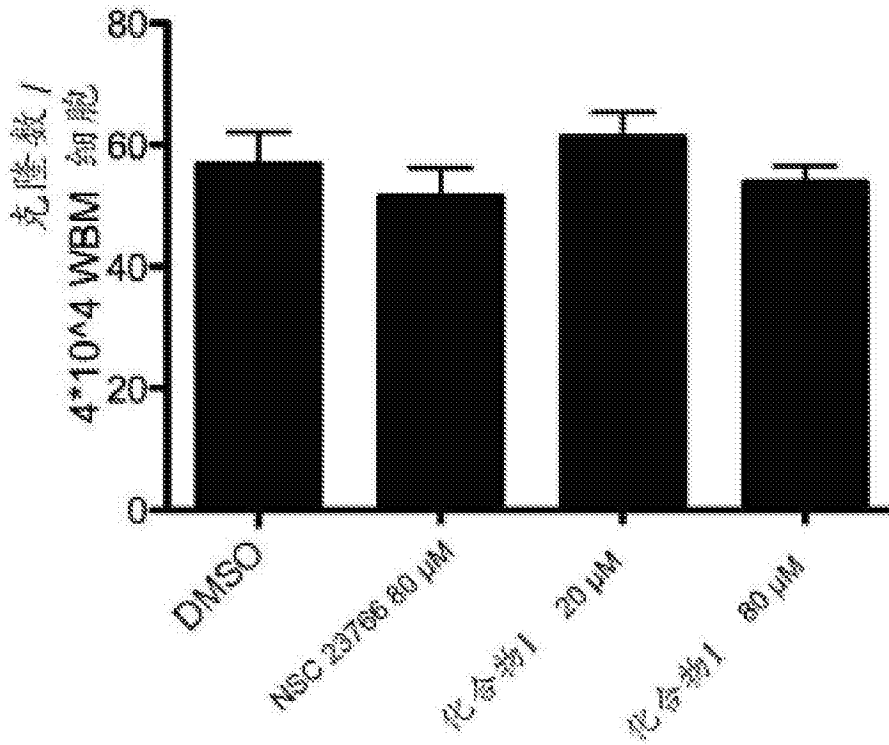


图5

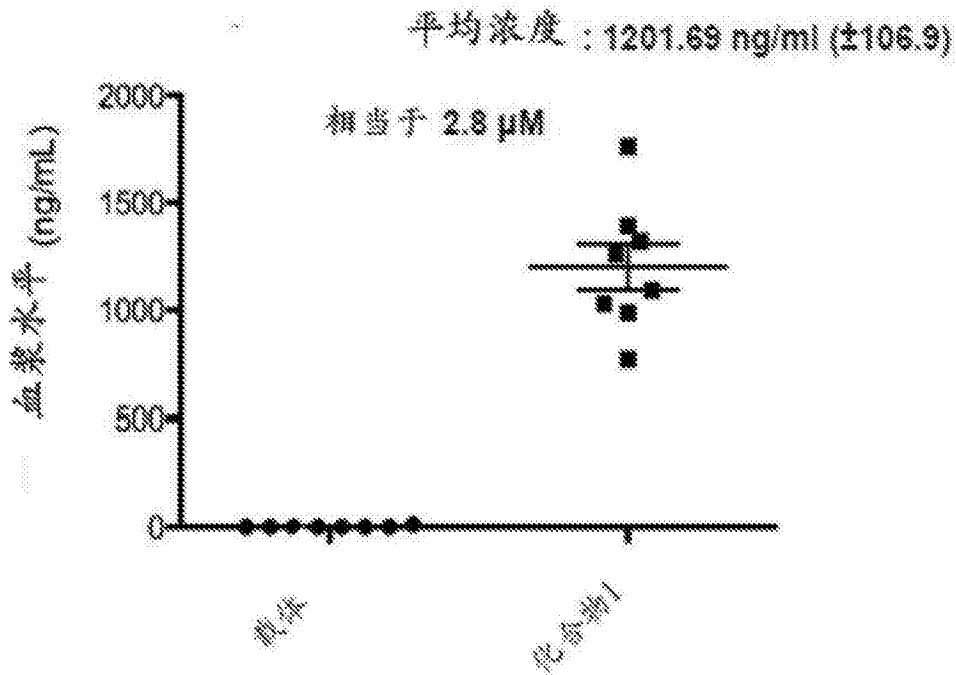


图6

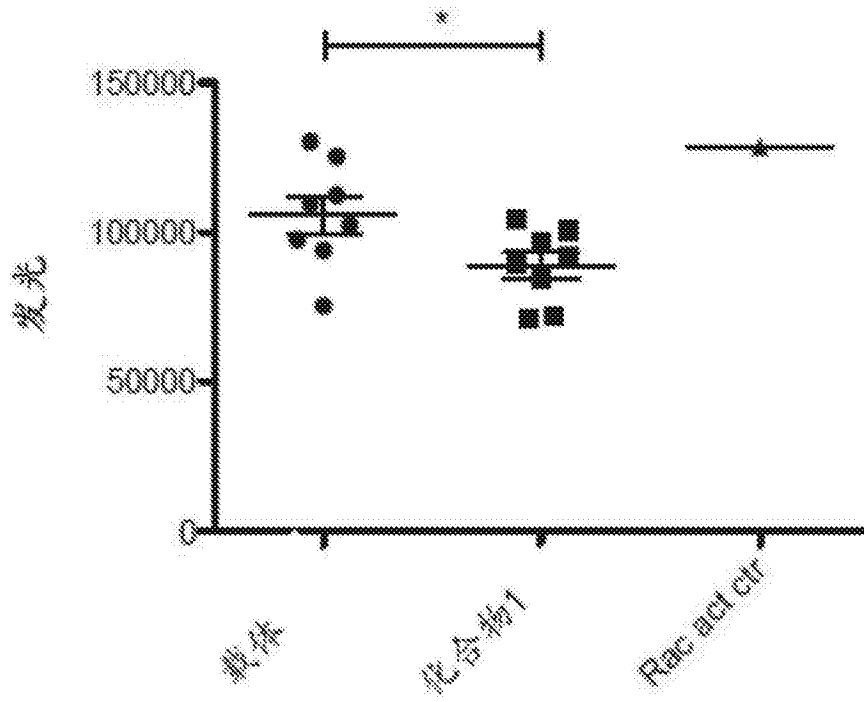


图7

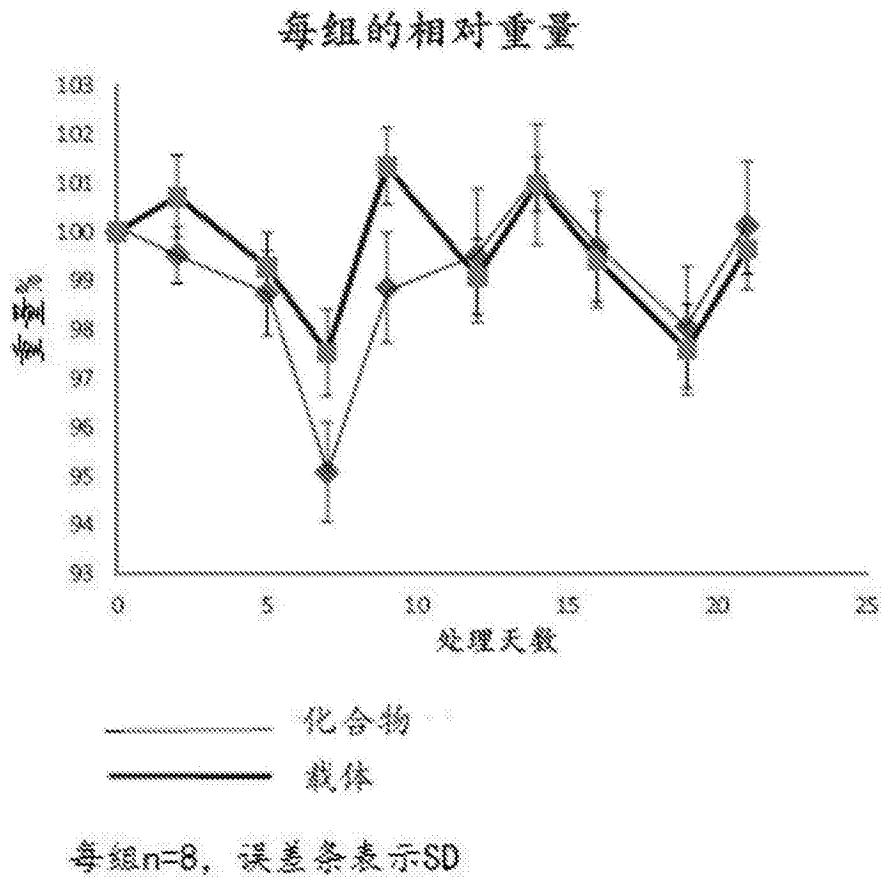


图8A

每组的相对仰卧位BLI

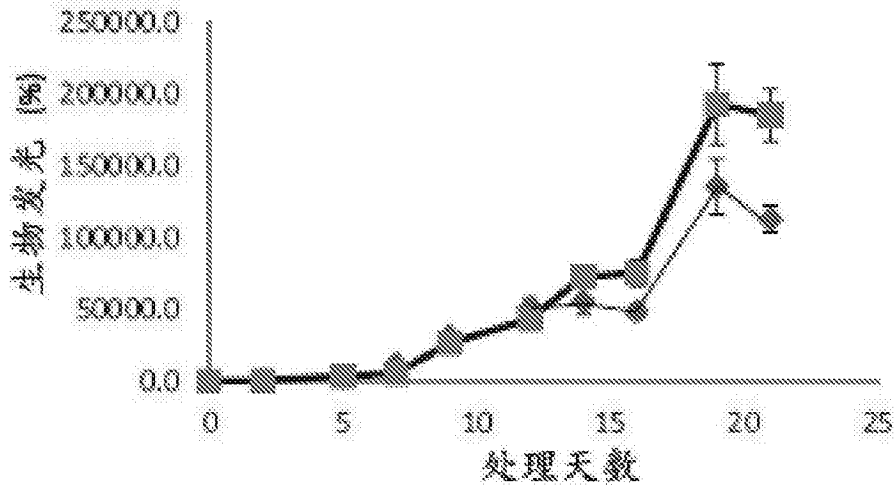
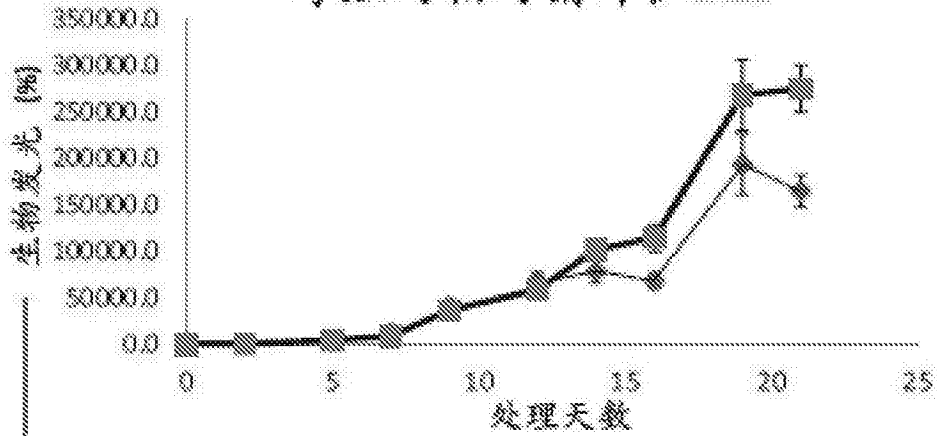


图8B

每组的相对俯卧位BLI



仰卧: T检验 第16天 $p=0.01$ 俯卧: T检验 第16天 $p=0.01$
仰卧: T检验 第21天 $p=0.003$ 俯卧: T检验 第21天 $p=0.002$

图8C

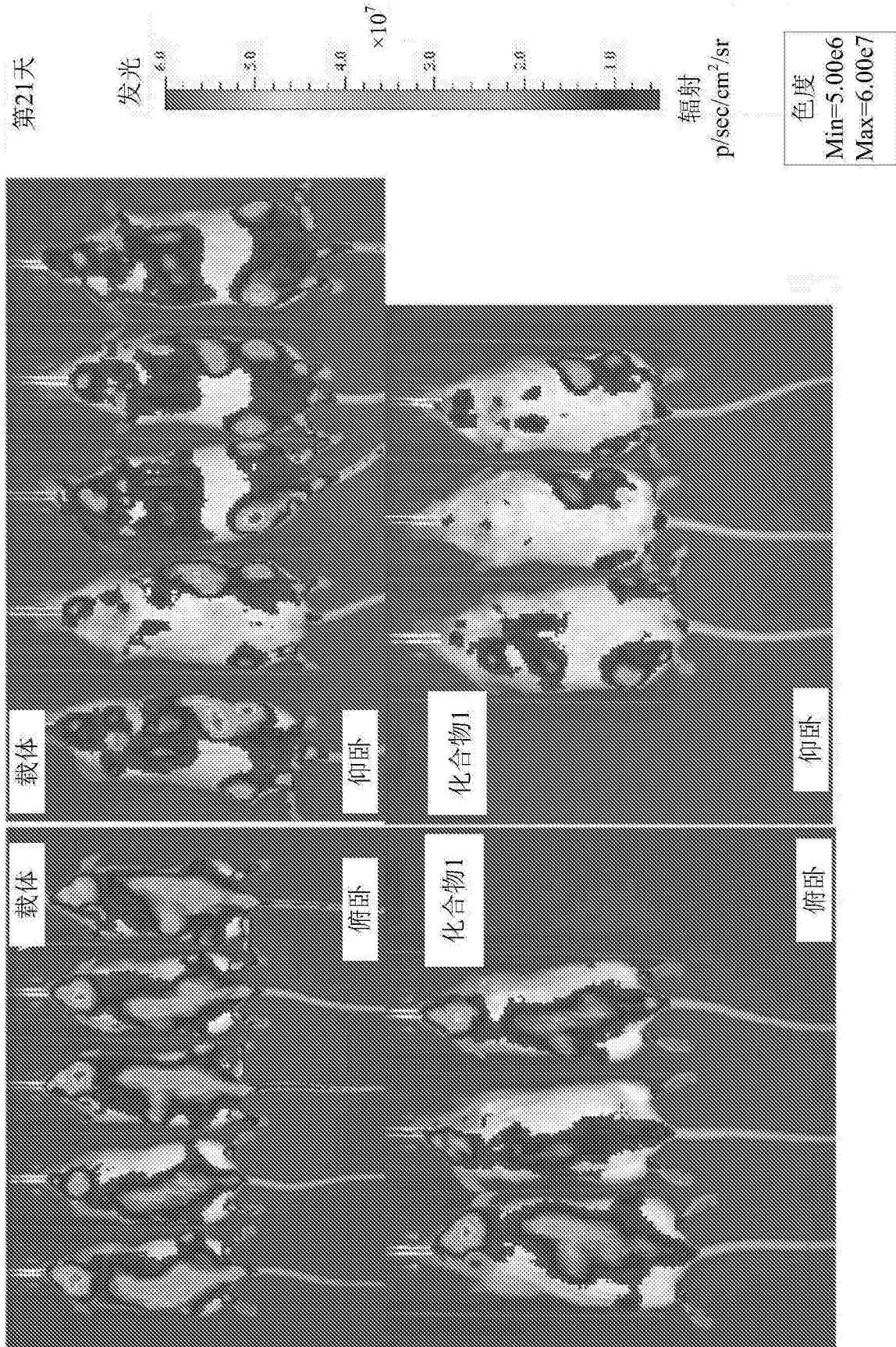


图9

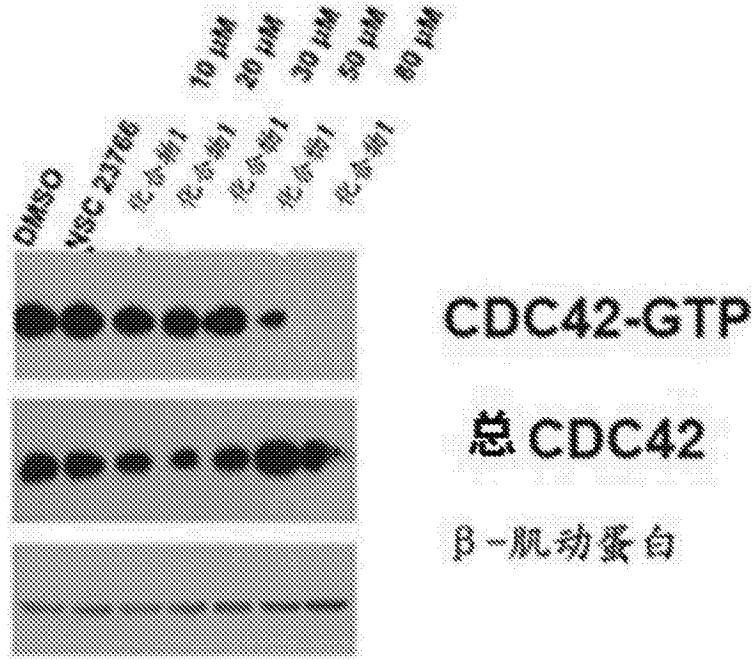


图10A

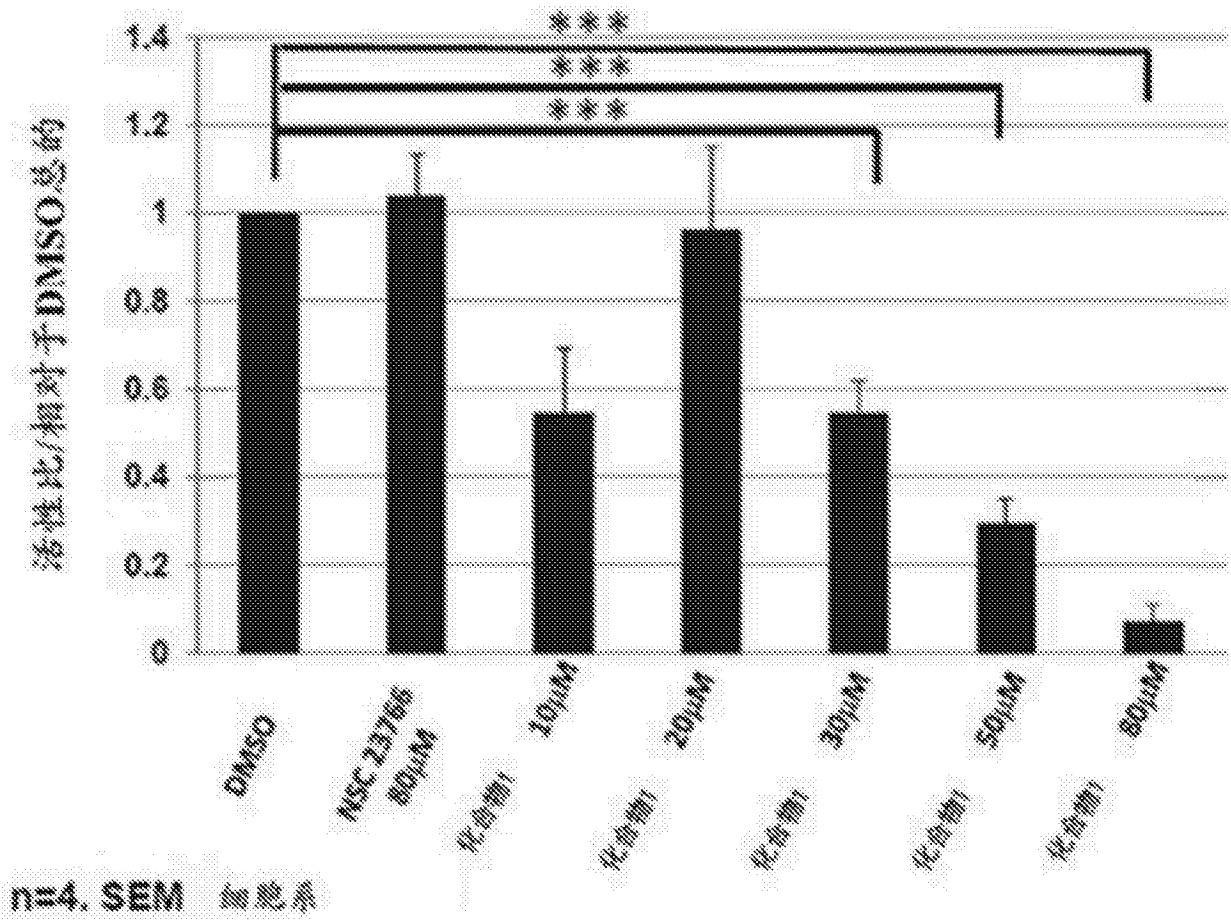


图10B

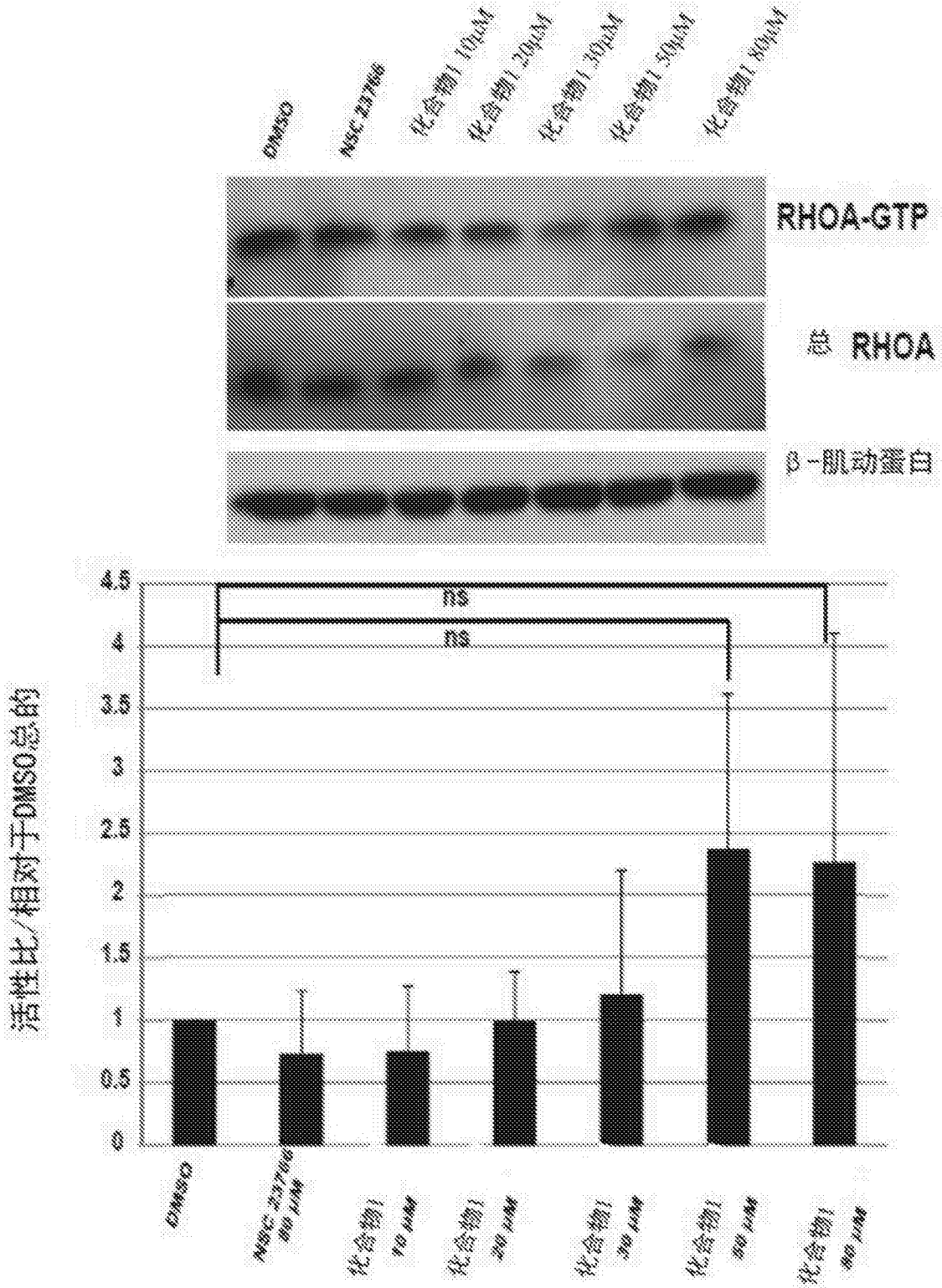


图11A

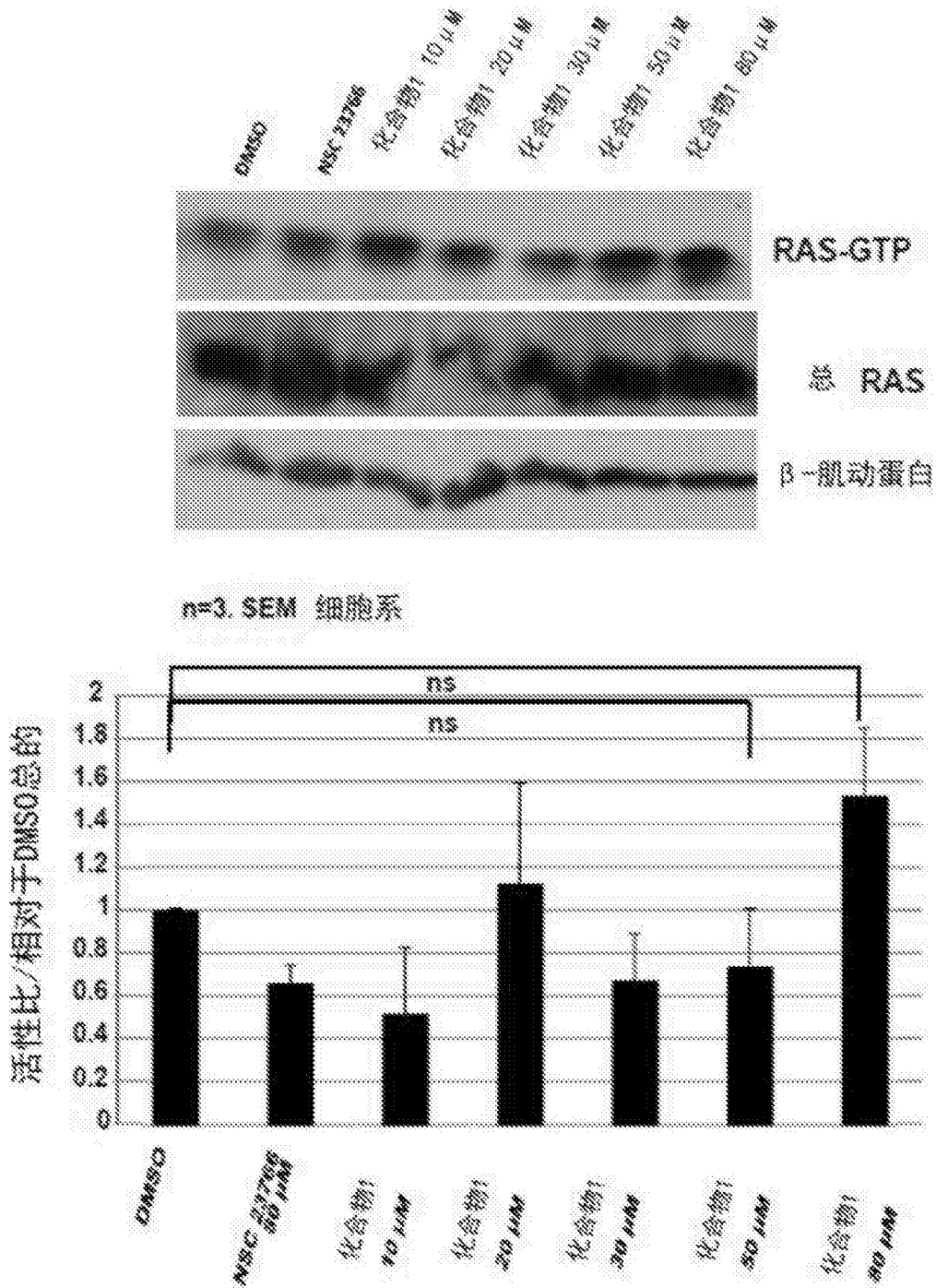


图11B

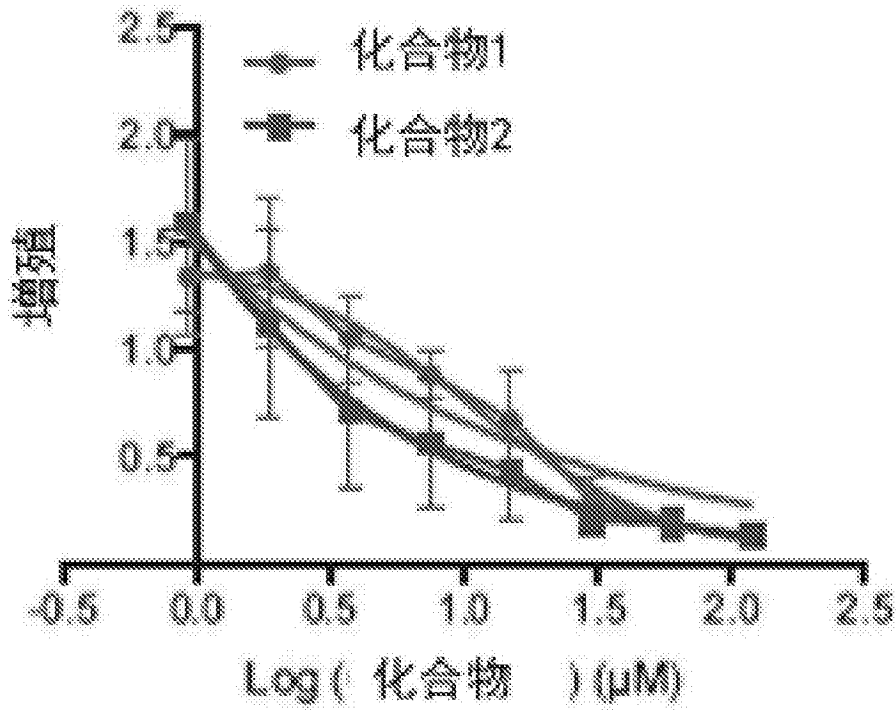


图12A

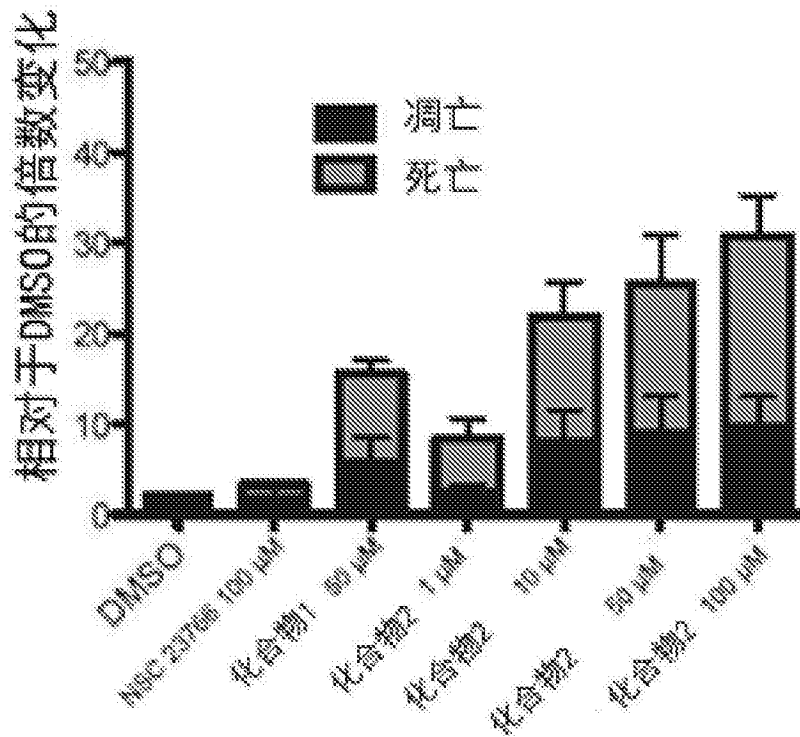


图12B

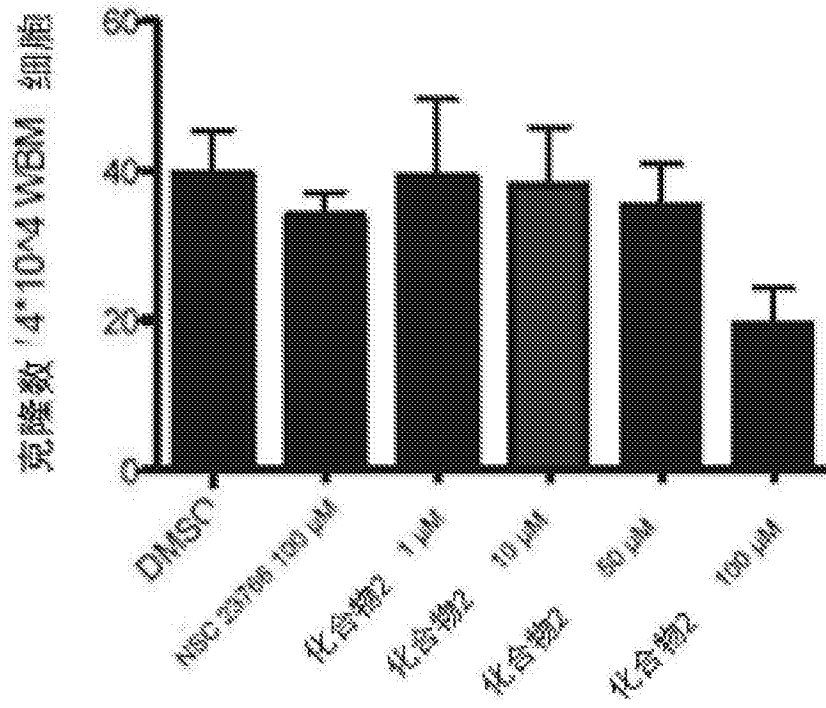


图12C

每组的相对重量

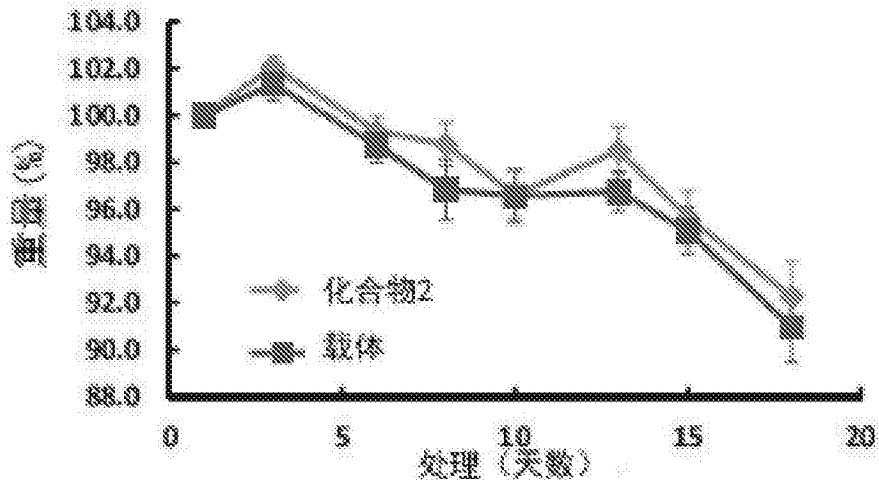


图13A

每组的仰卧位BLI (标准化至处理开始时)

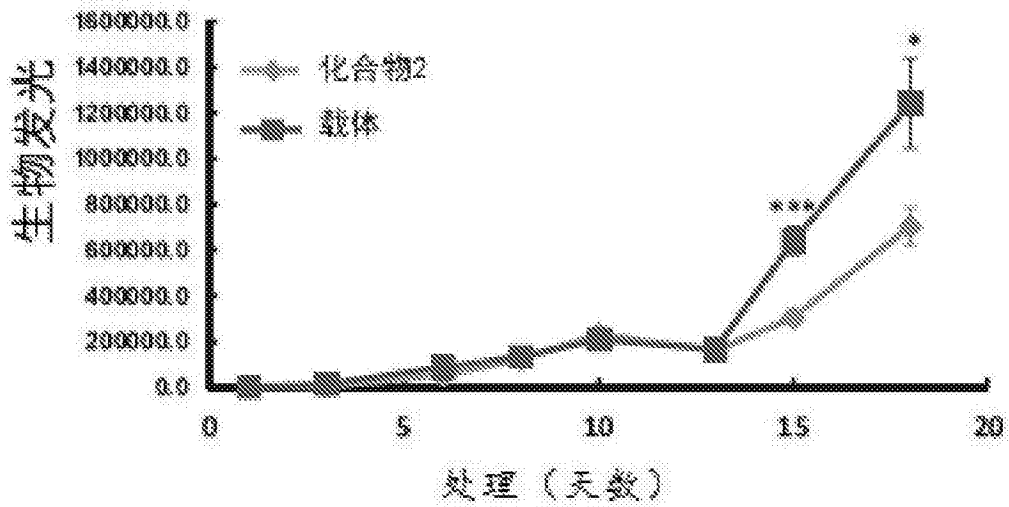


图13B

第15天 (以仰卧位被成像)

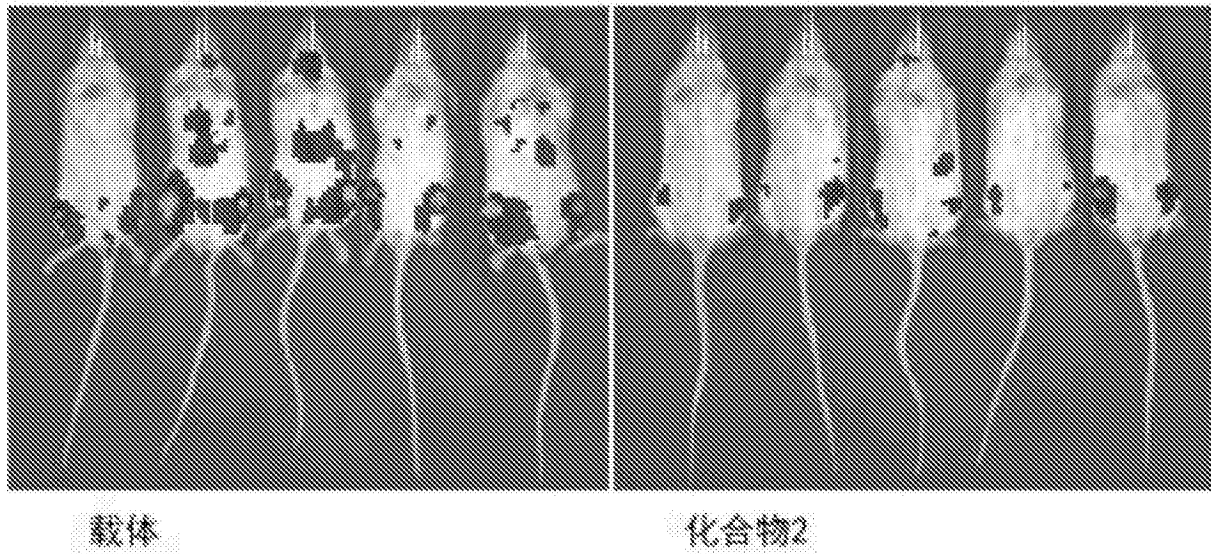


图13C

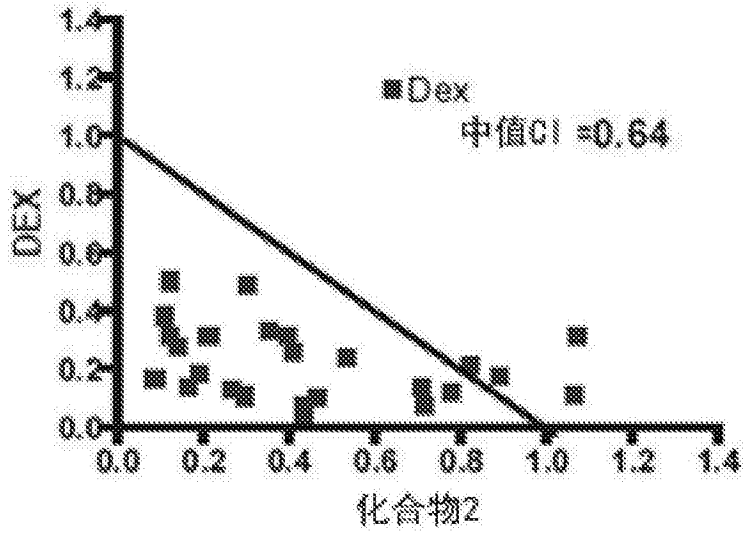


图14A

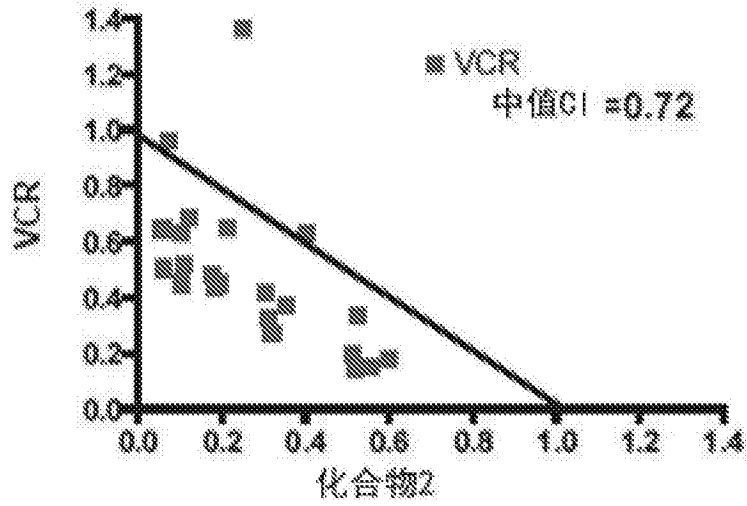


图14B

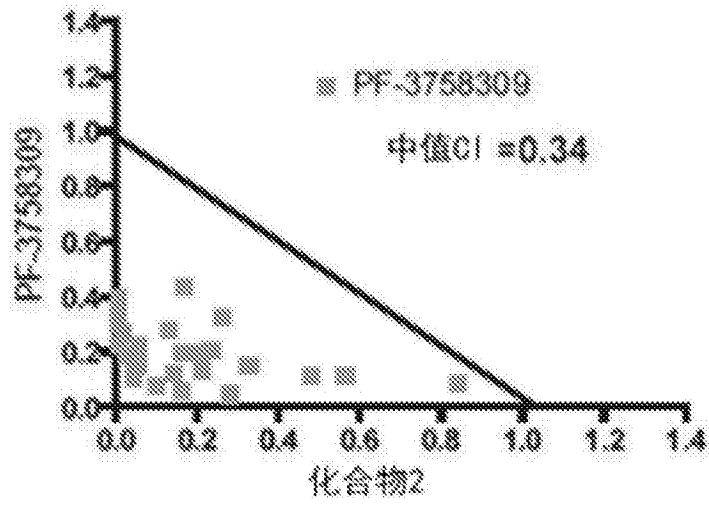


图14C