



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111107902 A

(43)申请公布日 2020.05.05

(21)申请号 201880031879.2

(22)申请日 2018.03.14

(30)优先权数据

62/471,174 2017.03.14 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.11.14

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/022345 2018.03.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/170067 EN 2018.09.20

(71)申请人 丹娜法伯癌症研究所

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 L·D·瓦伦斯基 J·普里茨

F·沃切特

(74)专利代理机构 北京博思佳知识产权代理有限公司 11415

代理人 艾佳

(51)Int.Cl.

A61P 35/00(2006.01)

C07D 333/70(2006.01)

C07D 495/04(2006.01)

C07K 14/47(2006.01)

A61K 31/5375(2006.01)

A61K 31/45(2006.01)

权利要求书11页 说明书38页

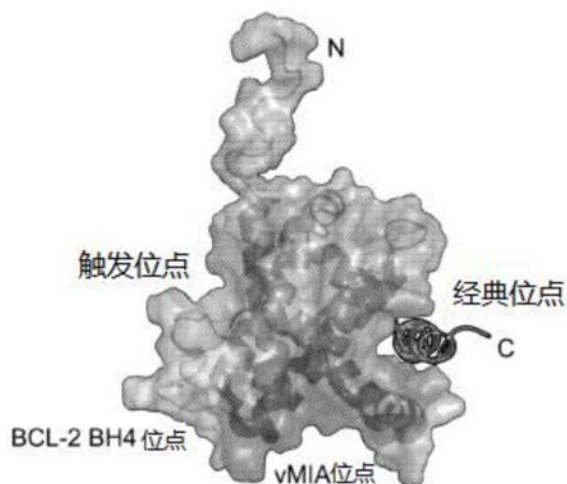
序列表2页 附图19页

(54)发明名称

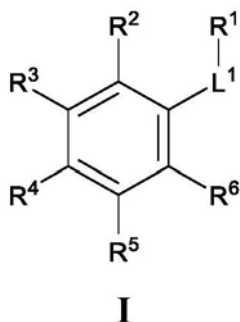
BAX活化的用于诱导细胞死亡的小分子致敏

(57)摘要

本文提供了可用于致敏和/或活化BAX的促凋亡活性的包含式I、II或III的化合物的组合物以及包含式IV部分的化合物的组合物。还提供了治疗与BAX相关的疾病(例如,癌症)的方法和鉴定致敏和/或活化BAX多肽的促凋亡活性的化合物的方法。



1. 一种组合物, 包含式I的化合物或其药学上可接受的盐



和一种或多种药学上可接受的载体, 其中:

L^1 选自由键、 C_{1-3} 亚烷基、 $-O-$ 、 $-O(C_{1-3}$ 亚烷基) $-$ 、 C_{1-3} 氰基亚烷基、 $-S-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-S(C_{1-3}$ 亚烷基) $-$ 和 $-C(O)-$ 组成的组;

R^1 选自由卤素、 OH 、 C_{1-3} 烷基、 C_{1-3} 卤代烷基、 NH_2 、 CN 、苯基、5-6元杂芳基和5-6元杂环烷基组成的组, 其中, 所述苯基、5-6元杂芳基和5-6元杂环烷基各自任选地被1个、2个或3个独立选择的 R^A 基团取代;

R^2 选自由 H 、卤素、 OH 、 CN 、 C_{1-3} 烷基和 $C(O)OC_{1-3}$ 烷基组成的组;

R^3 选自由 H 、卤素、 OH 、 NH_2 、 $C(O)C_{1-3}$ 烷基和 $C(S)C_{1-3}$ 烷基组成的组;

R^4 选自由 H 、卤素、 OH 、 NH_2 、 CN 、 C_{1-3} 烷基、 C_{1-3} 卤代烷基和 $O(C_{1-3}$ 氰烷基)组成的组;

R^5 选自由 H 、卤素、 OH 、 NH_2 和 $C(O)C_{1-3}$ 烷基组成的组;

R^6 选自由 H 、卤素、 OH 、 CN 、 C_{1-3} 烷基和 $C(O)OC_{1-3}$ 烷基组成的组;

每个 R^A 独立地选自由 OH 、 NH_2 、 CN 、 C_{1-3} 烷基、 C_{1-3} 羟烷基、 $C(O)OH$ 、 $C(O)C_{1-3}$ 烷基和 $C(O)N(C_{1-3}$ 烷基) $_2$ 组成的组, 其中, 所述 C_{1-3} 烷基任选地被 NH_2 取代。

2. 如权利要求1所述的组合物, 其中, L^1 选自由键、 $-CH_2-$ 、 $-O-$ 、 $-OCH_2-$ 、 $-CH(CN)-$ 、 $-S-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-SCH_2-$ 和 $-C(O)-$ 组成的组。

3. 如权利要求1所述的组合物, 其中, L^1 是 $-O-$ 、 $-CH_2-$ 或 $-OCH_2-$ 。

4. 如权利要求1至3中任一项所述的组合物, 其中, R^1 选自由 Cl 、 CH_3 、 CF_3 、 NH_2 、 CN 、苯基、5-6元杂芳基和5-6元杂环烷基组成的组, 其中, 所述苯基、5-6元杂芳基和5-6元杂环烷基各自任选地被1个或2个独立选择的 R^A 基团取代。

5. 如权利要求1至3中任一项所述的组合物, 其中, R^1 选自由 Cl 、 CH_3 、 CF_3 、 NH_2 、 CN 、苯基、吡啶基、呋喃基、噻吩基、吡咯基、噻唑基、恶唑基、吡唑基、1,2,4-噻二唑基、哌啶基、吗啉基和4,5-二氢噻唑基组成的组, 其中, 所述苯基、吡啶基、呋喃基、噻吩基、吡咯基、噻唑基、恶唑基、吡唑基、1,2,4-噻二唑基、哌啶基、吗啉基和4,5-二氢噻唑基各自任选地被1个或2个独立选择的 R^A 基团取代。

6. 如权利要求1至5中任一项所述的组合物, 其中, 每个 R^A 独立地选自由 OH 、 NH_2 、 CN 、 CH_3 、 CH_2OH 、 $CH_2CH_2NH_2$ 、 $C(O)OH$ 、 $C(O)CH_3$ 和 $C(O)N(CH_3)_2$ 组成的组。

7. 如权利要求1至3中任一项所述的组合物, 其中, R^1 是苯基, 任选地被1个或2个独立选择的 R^A 基团取代。

8. 如权利要求1至3中任一项所述的组合物, 其中, R^1 是苯基、4-羟基苯基、3-羟基苯基、4-氨基苯基、4-羧基苯基或4-羟甲基苯基。

9. 如权利要求1至8中任一项所述的组合物, 其中, R^2 选自由 H 、 Cl 、 CN 、 CH_3 和 $C(O)OCH_3$ 组

成的组。

10. 如权利要求1至8中任一项所述的组合物,其中, R^2 是H或 CH_3 。

11. 如权利要求1至10中任一项所述的组合物,其中, R^3 选自由H、F、Cl、 NH_2 、C(O) CH_3 和C(S) CH_3 组成的组。

12. 如权利要求1至10中任一项所述的组合物,其中, R^3 为H。

13. 如权利要求1至12中任一项所述的组合物,其中, R^4 选自由H、Cl、 NH_2 、CN、 CH_3 、 CF_3 和 OCH_3CN 组成的组。

14. 如权利要求1至12中任一项所述的组合物,其中, R^4 是H或OH。

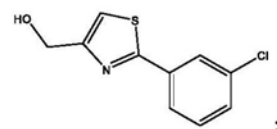
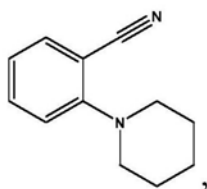
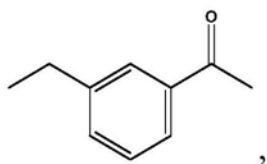
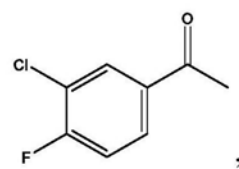
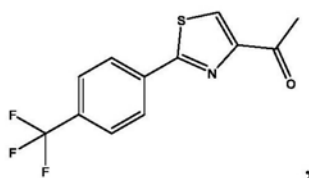
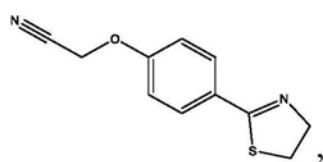
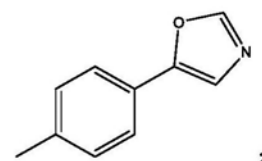
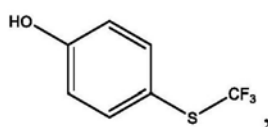
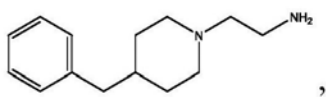
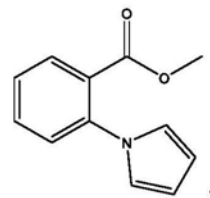
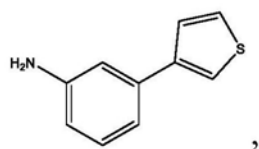
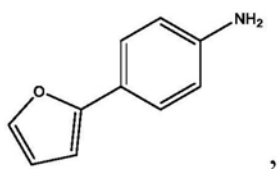
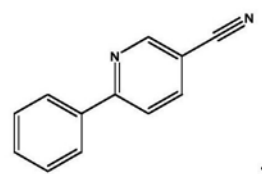
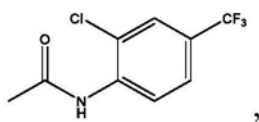
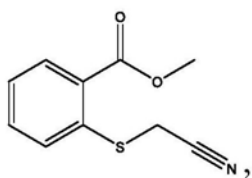
15. 如权利要求1至14中任一项所述的组合物,其中, R^5 选自由H、F、Cl、 NH_2 和C(O) CH_3 组成的组。

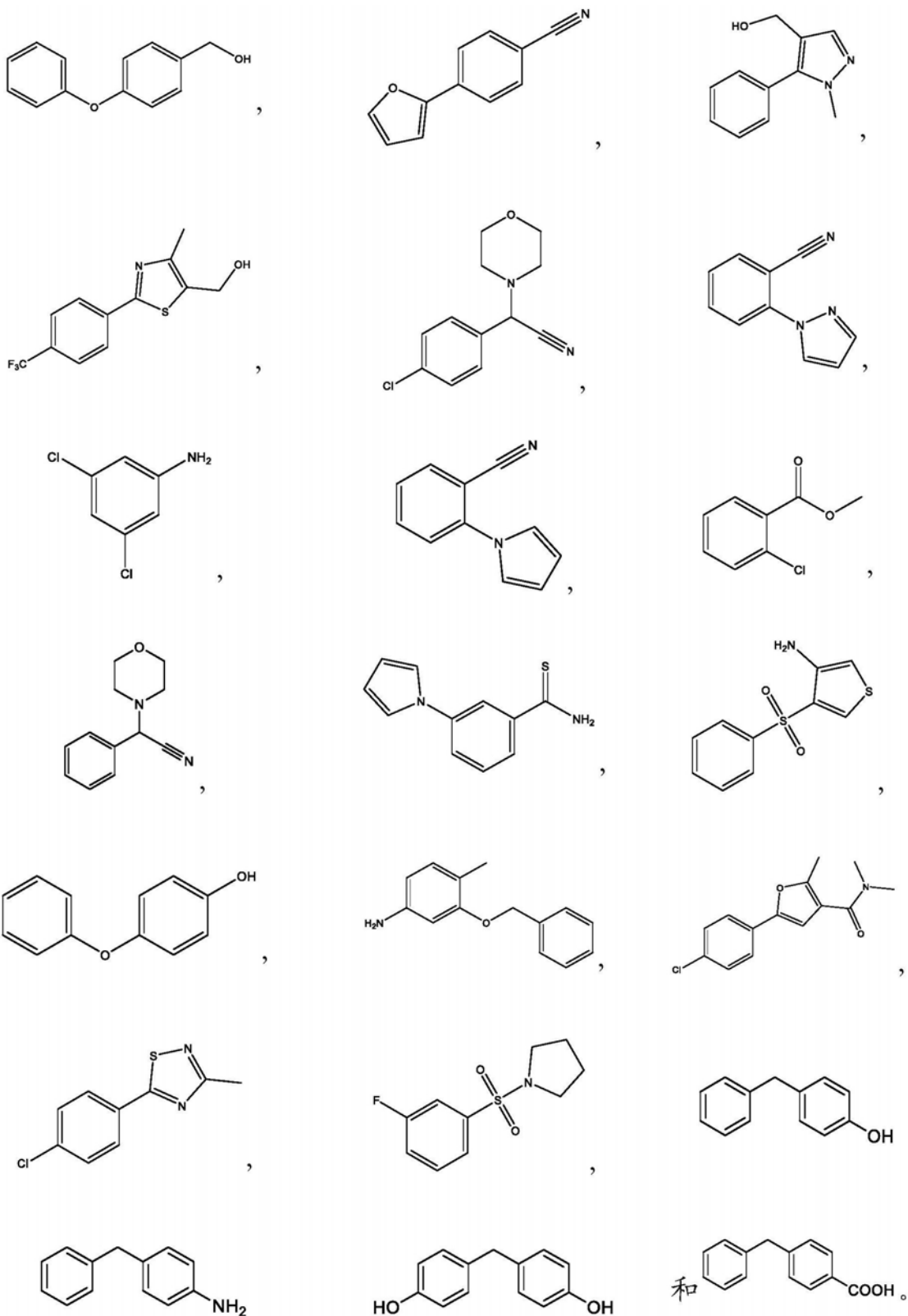
16. 如权利要求1至14中任一项所述的组合物,其中, R^5 是H或 NH_2 。

17. 如权利要求1至16中任一项所述的组合物,其中, R^6 选自由H、Cl、CN、 CH_3 和C(O) OCH_3 组成的组。

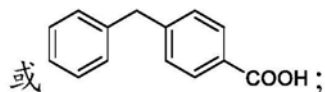
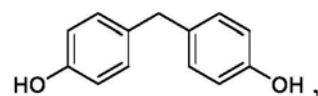
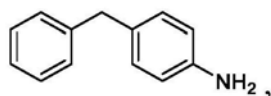
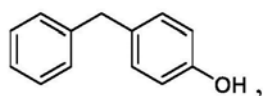
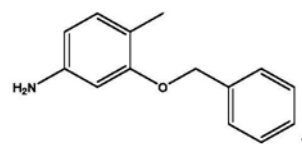
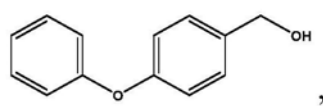
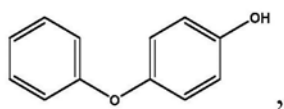
18. 如权利要求1至16中任一项所述的组合物,其中, R^6 为H。

19. 如权利要求1所述的组合物,其中,式I的化合物选自由以下或其药学上可接受的盐组成的组:



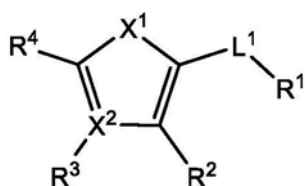


20. 如权利要求1所述的组合物,其中,所述式I的化合物是:



或其药学上可接受的盐。

21. 一种组合物, 包含式II的化合物或其药学上可接受的盐



II

和一种或多种药学上可接受的载体, 其中:

X^1 是NH或S;

X^2 是C或N;

L^1 选自由键、-C(O)-、-C(O)O-和-SO₂-组成的组;

R^1 选自由C₁₋₃烷基、NH₂、二(C₁₋₃烷基)氨基和5-6元杂环烷基组成的组;

R^2 选自由H、卤素、C₁₋₃烷基和C(O)OC₁₋₃烷基组成的组;

R^3 选自由H、C₁₋₃烷基和5-6元杂芳基组成的组;或者当 X^2 为N时, R^3 不存在;以及

R^4 选自由H和C₁₋₃烷基组成的组。

22. 如权利要求21所述的组合物, 其中, X^1 为NH。

23. 如权利要求21所述的组合物, 其中, X^1 是S。

24. 如权利要求21至23中任一项所述的组合物, 其中, X^2 为C。

25. 如权利要求21至23中任一项所述的组合物, 其中, X^2 为N。

26. 如权利要求21至25中任一项所述的组合物, 其中, R^1 选自由CH₃、CH₂CH₃、NH₂、N(CH₂CH₃)₂、哌啶基和二氢噻吩-3(2H)-酮基组成的组。

27. 如权利要求21至25中任一项所述的组合物, 其中,- L^1 - R^1 形成选自由以下组成的组的基团:NH₂、C(O)OCH₃、C(O)OCH₂CH₃、C(O)N(CH₂CH₃)₂、SO₂-哌啶基和二氢噻吩-3(2H)-酮基。

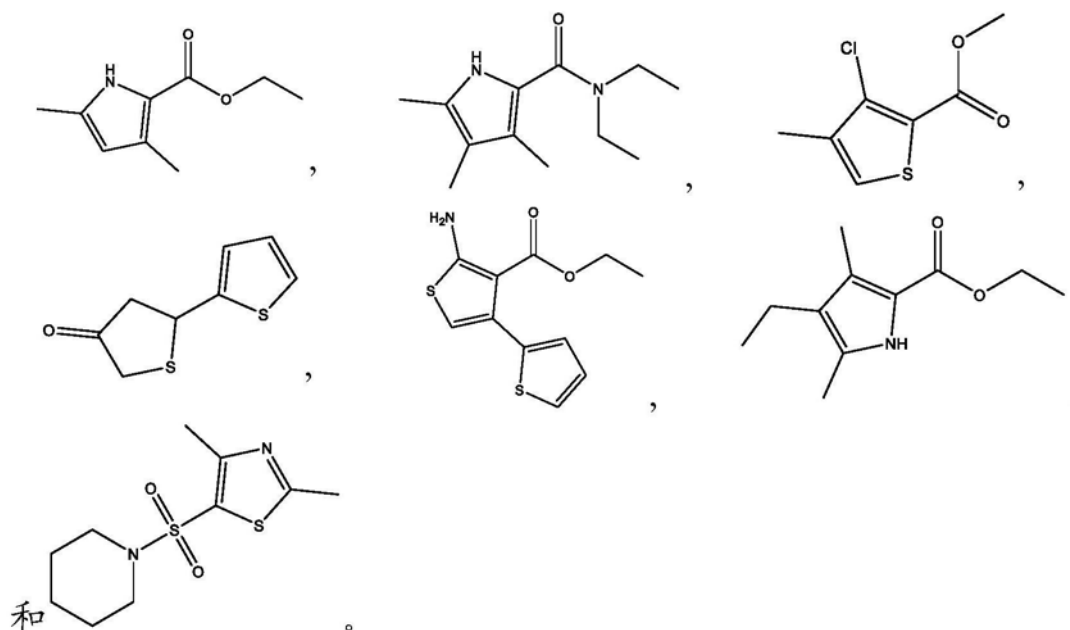
28. 如权利要求21至27中任一项所述的组合物, 其中, R^2 选自由H、Cl、CH₃和C(O)OCH₃组成的组。

29. 如权利要求21至28中任一项所述的组合物, 其中, R^3 选自由H、CH₃、CH₂CH₃和噻吩基组成的组。

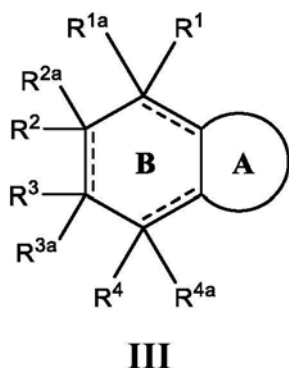
30. 如权利要求21至29中任一项所述的组合物, 其中, R^4 选自由H和C₁₋₃烷基组成的组。

31. 如权利要求21所述的组合物, 其中, 所述式II的化合物选自由以下或其药学上可接

受的盐组成的组：



32. 一种组合物, 包含式III的化合物或其药学上可接受的盐



和一种或多种药学上可接受的载体, 其中:

====指单键或双键;

环A与环B形成稠合环, 环A选自由5-6元环烷基、5-6元杂芳基和5-6元杂环烷基组成的组, 其中, 环A任选地被1个、2个或3个独立选择的 R^A 基团取代;

R^1 选自由H、C(=O)OC₁₋₃烷基、OC(=O)C₁₋₃烷基、C(S)NH₂和=N-OH组成的组;

R^{1a} 为H; 或当 R^{1a} 所连接的碳原子形成双键时, R^{1a} 不存在;

R^2 选自由H和卤素组成的组;

R^{2a} 为H; 或当 R^{2a} 所连接的碳原子形成双键时, R^{2a} 不存在;

R^3 选自由H、卤素、C₁₋₃烷基、C₁₋₃羟烷基、NHC(=O)C₁₋₃烷基和(C₁₋₃亚烷基)NHC₁₋₃烷基组成的组;

R^{3a} 为C₁₋₃烷基; 或当 R^{3a} 所连接的碳原子形成双键时, R^{3a} 不存在;

R^4 选自由H和C₁₋₃烷基组成的组;

R^{4a} 为H; 或当 R^{4a} 所连接的碳原子形成双键时, R^{4a} 不存在; 以及

每个 R^A 独立地选自由=O、=S、CN、C₁₋₃烷基、C₁₋₃羟烷基、S(C₁₋₃烷基)和C(=O)OH组成的组。

33. 如权利要求32所述的化合物, 其中, 环A是5-6元杂芳基, 其任选地被1个、2个或3个

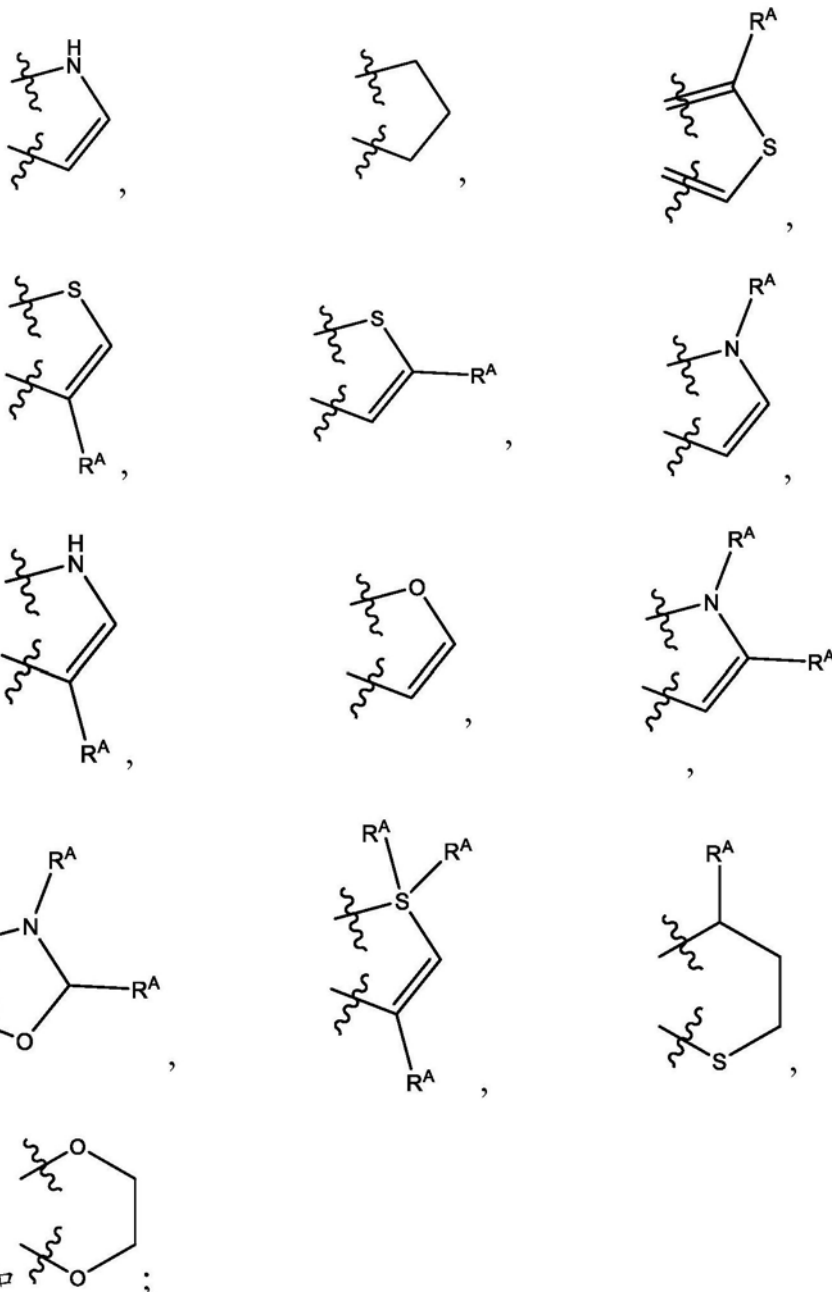
独立选择的R^A基团取代。

34. 如权利要求32所述的化合物, 其中, 环A为5-6元杂环烷基, 其任选地被1个、2个或3个独立选择的R^A基团取代。

35. 如权利要求32至34中任一项所述的化合物, 其中, 每个R^A独立地选自由=O、=S、CN、CH₃、CH₂OH、SCH₃和C(O)OH组成的组。

36. 如权利要求32所述的化合物,其中,环A是未取代的5-6元环烷基。

37. 如权利要求32所述的化合物,其中,环A选自由以下组成的组:

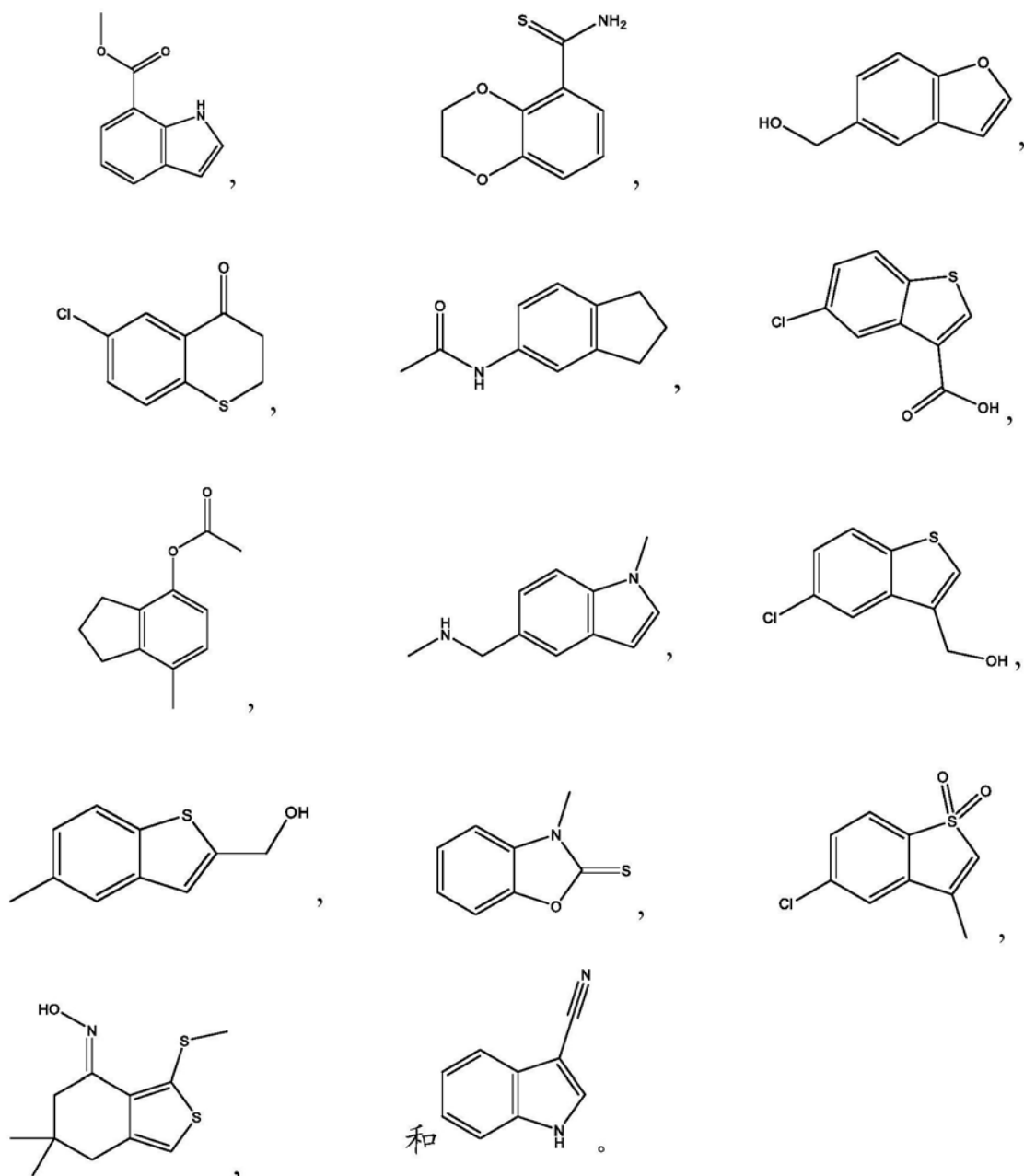


其中,每个都表示连接耦合环A和环B的键。

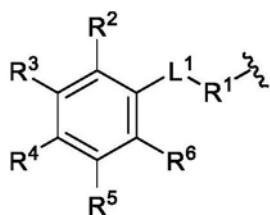
38. 如权利要求32至37中任一项所述的组合物, 其中, R^1 选自由 H 、 $C(=O)OCH_3$ 、 $OC(=O)CH_3$ 、 $C(S)NH_2$ 和 $=N-OH$ 组成的组。

39. 如权利要求32至38中任一项所述的组合物,其中,R²选自由H和C1组成的组。

40. 如权利要求32至39中任一项所述的组合物,其中, R^{2a} 为H。
41. 如权利要求32至39中任一项所述的组合物,其中, R^{2a} 不存在。
42. 如权利要求32至41中任一项所述的组合物,其中 R^3 选自由H、Cl、 CH_3 、 CH_2OH 、NHC(O) CH_3 和 CH_2NHCH_3 组成的组。
43. 如权利要求32至42中任一项所述的组合物,其中, R^{3a} 为 CH_3 。
44. 如权利要求32至42中任一项所述的组合物,其中, R^{3a} 不存在。
45. 如权利要求32至44中任一项所述的组合物,其中, R^4 选自由H和 CH_3 组成的组。
46. 如权利要求32所述的组合物,其中,所述式III的化合物选自由以下或其药学上可接受的盐组成的组:



47. 一种组合物,包含含有式IV部分的化合物或其药学上可接受的盐:



IV

和一种或多种药学上可接受的载体,其中:

L^1 选自由键、 C_{1-3} 亚烷基、 $-O-$ 、 $-O(C_{1-3}$ 亚烷基) $-$ 、 C_{1-3} 氰基亚烷基、 $-S-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-S(C_{1-3}$ 亚烷基) $-$ 和 $-C(O)-$ 组成的组;

R^1 选自由亚苯基、5-6元亚杂芳基和5-6元亚杂环烷基组成的组,其各自任选地被1个、2个或3个独立选择的 R^A 基团取代;

R^2 选自由H、卤素、OH、CN、 C_{1-3} 烷基和 $C(O)OC_{1-3}$ 烷基组成的组;

R^3 选自由H、卤素、OH、 NH_2 、 $C(O)C_{1-3}$ 烷基和 $C(S)C_{1-3}$ 烷基组成的组;

R^4 选自由H、卤素、OH、 NH_2 、CN、 C_{1-3} 烷基、 C_{1-3} 卤代烷基和 $O(C_{1-3}$ 氰烷基)组成的组;

R^5 选自由H、卤素、OH、 NH_2 和 $C(O)C_{1-3}$ 烷基组成的组;

R^6 选自由H、卤素、OH、CN、 C_{1-3} 烷基和 $C(O)OC_{1-3}$ 烷基组成的组;

每个 R^A 独立地选自由OH、 NH_2 、CN、 C_{1-3} 烷基、 C_{1-3} 羟烷基、 $C(O)OH$ 、 $C(O)C_{1-3}$ 烷基和 $C(O)N(C_{1-3}$ 烷基) $_2$ 组成的组,其中,所述 C_{1-3} 烷基任选地被 NH_2 取代。

48. 如权利要求47所述的组合物,其中, L^1 选自由键、 $-CH_2-$ 、 $-O-$ 、 $-OCH_2-$ 、 $-CH(CN)-$ 、 $-S-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-SCH_2-$ 和 $-C(O)-$ 组成的组。

49. 如权利要求47或48所述的组合物,其中, R^1 是亚苯基,其任选地被1个或2个独立选择的 R^A 基团取代。

50. 如权利要求47至49中任一项所述的组合物,其中,每个 R^A 独立地选自由OH、 NH_2 、CN、 CH_3 、 CH_2OH 、 $CH_2CH_2NH_2$ 、 $C(O)OH$ 、 $C(O)CH_3$ 和 $C(O)N(CH_3)_2$ 组成的组。

51. 如权利要求47至50中任一项所述的组合物,其中, R^2 选自由H、Cl、CN、 CH_3 和 $C(O)OCH_3$ 组成的组。

52. 如权利要求47至51中任一项所述的组合物,其中, R^3 选自由H、F、Cl、 NH_2 、 $C(O)CH_3$ 和 $C(S)CH_3$ 组成的组。

53. 如权利要求47至52中任一项所述的组合物,其中, R^4 选自由H、Cl、 NH_2 、CN、 CH_3 、 CF_3 和 OCH_3CN 组成的组。

54. 如权利要求47至53中任一项所述的组合物,其中, R^5 选自由H、F、Cl、 NH_2 和 $C(O)CH_3$ 组成的组。

55. 如权利要求47至54中任一项所述的组合物,其中, R^6 选自由H、Cl、CN、 CH_3 和 $C(O)OCH_3$ 组成的组。

56. 一种致敏和/或活化BAX的促凋亡活性的方法,包括使包含BAX的细胞样品或组织样品与权利要求1至55中任一项所述的组合物接触。

57. 一种在受试者中致敏和/或活化BAX的促凋亡活性的方法,包括向所述受试者施用权利要求1至55中任一项所述的组合物。

58. 一种在受试者中治疗癌症的方法,包括向所述受试者施用治疗有效量的权利要求1

至55中任一项所述的组合物。

59. 如权利要求58所述的方法, 其中, 所述癌症选自由以下组成的组: 乳腺癌、前列腺癌、淋巴瘤、皮肤癌、胰腺癌、结肠癌、黑素瘤、恶性黑素瘤、卵巢癌、脑癌、原发性脑癌、头颈癌、神经胶质瘤、胶质母细胞瘤、肝癌、膀胱癌、非小细胞肺癌、头颈恶性肿瘤、乳腺恶性肿瘤、卵巢恶性肿瘤、肺癌、小细胞肺癌、威尔姆斯氏肿瘤、宫颈癌、睾丸癌、膀胱恶性肿瘤、胰腺恶性肿瘤、胃癌、结肠恶性肿瘤、前列腺恶性肿瘤、泌尿生殖道癌、甲状腺癌、食道癌、骨髓瘤、多发性骨髓瘤、肾上腺癌、肾细胞癌、子宫内膜癌、肾上腺皮质癌、恶性胰腺胰岛素瘤、恶性类癌、绒毛膜癌、蕈样霉菌病、恶性高钙血症、宫颈增生、白血病、神经母细胞瘤、横纹肌肉瘤、卡波济氏肉瘤、真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、软组织肉瘤、骨源性肉瘤、原发性巨球蛋白血症和视网膜母细胞瘤。

60. 如权利要求58所述的方法, 其中, 所述癌症是白血病。

61. 如权利要求60所述的方法, 其中, 所述白血病选自由以下组成的组: 急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、慢性粒细胞白血病、急性粒细胞白血病、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病和毛细胞白血病。

62. 如权利要求60所述的方法, 其中, 所述白血病选自由以下组成的组: 急性成淋巴细胞白血病、急性骨髓性白血病、慢性成淋巴细胞白血病和慢性骨髓性白血病。

63. 一种鉴定致敏和/或活化BAX多肽的促凋亡活性的化合物的方法, 所述方法包括:

a) 在适合于致敏和/或活化BAX多肽的促凋亡活性的条件下, 使包含氨基酸序列SEQ ID NO:1的所述BAX多肽的结合位点与所述化合物体外接触; 以及

b) 确定所述化合物是否结合一个或多个氨基酸残基, 所述氨基酸残基选自由以下组成的组: Ile80、Ala81、Ala82、Val83、Asp84、Thr85、Asp86、Ser87、Pro88、Val91、Phe116、Lys119、Leu120、Val121、Lys123、Ala124、Thr127、Leu132和Ile136;

其中, 所述BAX多肽的结合位点包含BAX多肽的 $\alpha 3$ - $\alpha 4$ 发夹和 $\alpha 5$ - $\alpha 6$ 发夹的连接。

64. 如权利要求63所述的方法, 其中, 所述确定步骤通过饱和转移差NMR、HSQC NMR、表面等离子体共振、生物层干涉测量法或竞争性荧光偏振测定法执行。

65. 如权利要求63或64所述的方法, 其中, 所述化合物与所述BAX多肽的结合导致所述化合物的NMR光谱的信号变化。

66. 如权利要求63至65中任一项所述的方法, 进一步包括检测所述化合物对所述BAX多肽的活化。

67. 如权利要求66所述的方法, 其中, 所述检测步骤包括进行选自由以下组成的组的测定: 检测BAX寡聚化、基于抗体的BAX构象检测、线粒体细胞色素c释放测定、脂质体释放测定、细胞死亡测定、线粒体或细胞形态测定、线粒体钙通量测定、线粒体跨膜定量测定和半胱天冬酶3活性或膜联蛋白V结合的定量。

68. 如权利要求63至67中任一项所述的方法, 其中, 所述化合物以 $<1\text{mM}$ 的亲合力结合至所述结合位点。

69. 如权利要求56至68中任一项所述的方法, 其中, 所述化合物致敏所述BAX多肽的促凋亡活性的活化。

70. 如权利要求56至68中任一项所述的方法, 其中, 所述化合物活化所述BAX多肽的促凋亡活性。

71. 如权利要求56至70中任一项所述的方法, 其中, 所述方法进一步包括施用活化BAX促凋亡活性的另外的治疗剂。

72. 如权利要求71所述的方法, 其中, 所述另外的治疗剂是BIM SAHB_{A2}。

BAX活化的用于诱导细胞死亡的小分子致敏

[0001] 联邦政府资助的研究或开发

[0002] 本发明是在国立卫生研究院授予的批准号NIH1R35,CA197583的政府支持下完成的。政府拥有发明的某些权利。

技术领域

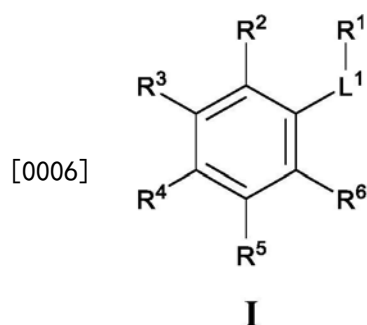
[0003] 本申请提供了含有式I、式II或式III的化合物的组合物,以及含有包括式IV部分的化合物的组合物,其可用于致敏和/或活化BAX的促凋亡活性。还描述了治疗与BAX相关的疾病(例如,癌症)的方法以及鉴定致敏和/或活化BAX多肽的促凋亡活性的化合物的方法。

背景技术

[0004] BAX是由9个 α -螺旋组成的21kDa球状蛋白,并且作为BCL-2家族调控的线粒体凋亡途径的关键效应物起作用。 $\alpha 5/\alpha 6$ 发夹形成蛋白质的疏水核心, α -螺旋1和 α -螺旋6的并置产生配体相互作用表面,该表面调节BAX活化的起始,并且在蛋白质的相对面,自身抑制的 $\alpha 9$ 螺旋存在于由 α -螺旋2、 α -螺旋3和 α -螺旋4的部分组成的疏水沟中(参见例如,Suzuki et al,Ce11,200,103:645-654)。BAX是一种可以从细胞溶质单体转化为致死的线粒体寡聚体的凋亡调节因子。

发明内容

[0005] 本申请尤其提供包含以下的组合物:式I的化合物或其药学上可接受的盐,



[0007] 和一种或多种药学上可接受的载体,其中: L^1 选自由键、 C_{1-3} 亚烷基、 $-O-$ 、 $-O(C_{1-3}$ 亚烷基) $-$ 、 C_{1-3} 氰基亚烷基、 $-S-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-S(C_{1-3}$ 亚烷基) $-$ 和 $-C(O)-$ 组成的组; R^1 选自由卤素、OH、 C_{1-3} 烷基、 C_{1-3} 卤代烷基、 NH_2 、CN、苯基、5-6元杂芳基和5-6元杂环烷基组成的组,其中,所述苯基、5-6元杂芳基和5-6元杂环烷基各自任选地被1个、2个或3个独立选择的 R^A 基团取代; R^2 选自由H、卤素、OH、CN、 C_{1-3} 烷基和 $C(O)OC_{1-3}$ 烷基组成的组; R^3 选自由H、卤素、OH、 NH_2 、 $C(O)C_{1-3}$ 烷基和 $C(S)C_{1-3}$ 烷基组成的组; R^4 选自由H、卤素、OH、 NH_2 、CN、 C_{1-3} 烷基、 C_{1-3} 卤代烷基和 $O(C_{1-3}$ 氰基)组成的组; R^5 选自由H、卤素、OH、 NH_2 和 $C(O)C_{1-3}$ 烷基组成的组; R^6 选自由H、卤素、OH、CN、 C_{1-3} 烷基和 $C(O)OC_{1-3}$ 烷基组成的组;每个 R^A 独立地选自由OH、 NH_2 、CN、 C_{1-3} 烷基、 C_{1-3} 羟烷基、 $C(O)OH$ 、 $C(O)C_{1-3}$ 烷基和 $C(O)N(C_{1-3}$ 烷基) $_2$ 组成的组,其中,所述 C_{1-3} 烷基任选地被 NH_2 取代。

[0008] 在一些实施方案中,式I的 L^1 选自由键、 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{OCH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{CN})-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{SO}_2-$ 、 $-\text{SCH}_2-$ 和 $-\text{C}(\text{O})-$ 组成的组。在一些实施方案中, L^1 是 $-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-$ 或 $-\text{OCH}_2-$ 。

[0009] 在一些实施方案中,式I的 R^1 选自由 Cl 、 CH_3 、 CF_3 、 NH_2 、 CN 、苯基、5-6元杂芳基和5-6元杂环烷基组成的组,其中,所述苯基、5-6元杂芳基、5-6元杂环烷基各自任选地被1个或2个独立选择的 R^A 基团取代。

[0010] 在一些实施方案中,式I的 R^1 选自由 Cl 、 CH_3 、 CF_3 、 NH_2 、 CN 、苯基、吡啶基、呋喃基、噻吩基、吡咯基、噻唑基、恶唑基、吡唑基、1,2,4-噻二唑基、哌啶基、吗啉基和4,5-二氢噻唑基组成的组,其中,所述苯基、吡啶基、呋喃基、噻吩基、吡咯基、噻唑基、恶唑基、吡唑基、1,2,4-噻二唑基、哌啶基、吗啉基和4,5-二氢噻唑基各自任选地被1个或2个独立选择的 R^A 基团取代。

[0011] 在一些实施方案中,式I的每个 R^A 独立地选自由 OH 、 NH_2 、 CN 、 CH_3 、 CH_2OH 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 、 $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ 和 $\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 组成的组。

[0012] 在一些实施方案中,式I的 R^1 是苯基,任选地被1个或2个独立选择的 R^A 基团取代。在一些实施方案中,式I的 R^1 是苯基、4-羟基苯基、3-羟基苯基、4-氨基苯基、4-羧基苯基或4-羟甲基苯基。

[0013] 在一些实施方案中,式I的 R^2 选自由 H 、 Cl 、 CN 、 CH_3 和 $\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$ 组成的组。在一些实施方案中,式I的 R^2 是 H 或 CH_3 。

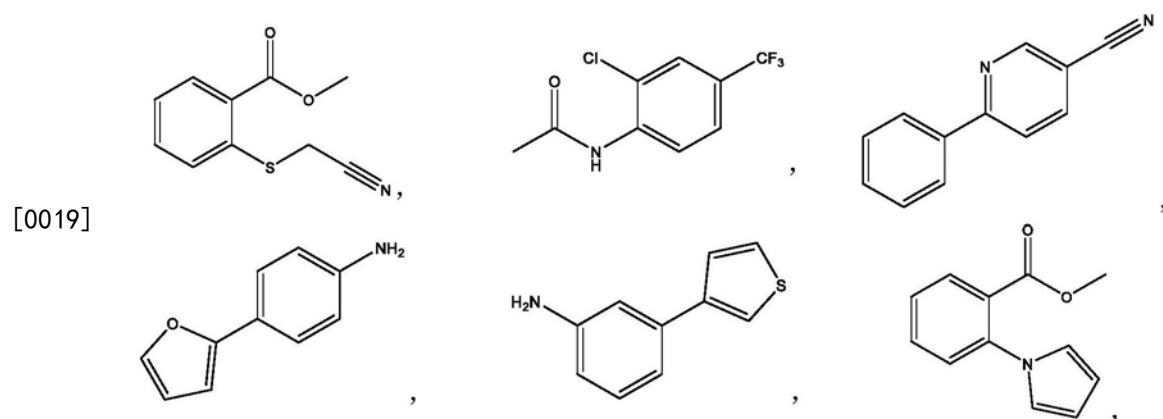
[0014] 在一些实施方案中,式I的 R^3 选自由 H 、 F 、 Cl 、 NH_2 、 $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ 和 $\text{C}(\text{S})\text{CH}_3$ 组成的组。在一些实施方案中,式I的 R^3 是 H 。

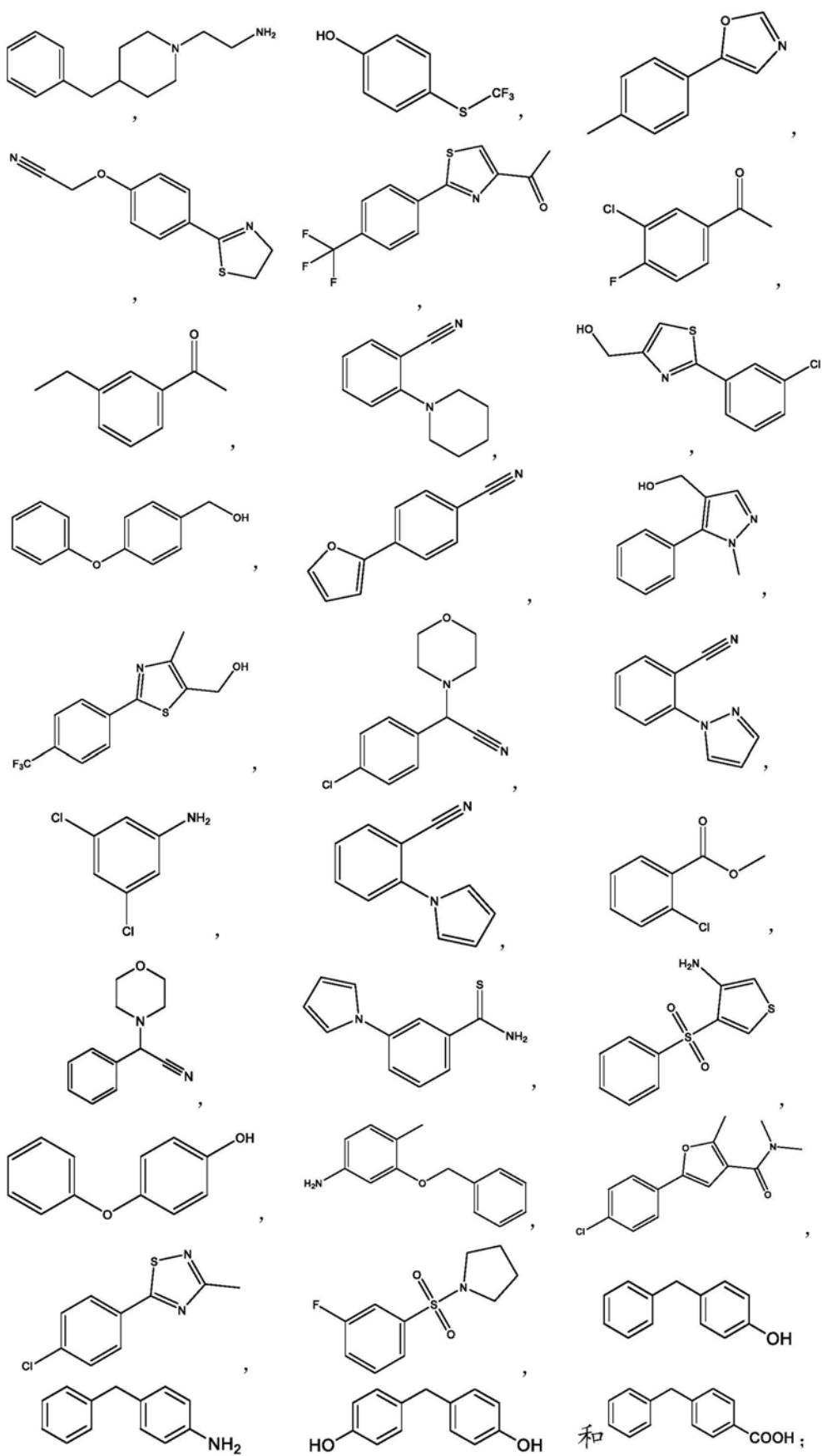
[0015] 在一些实施方案中,式I的 R^4 选自由 H 、 Cl 、 NH_2 、 CN 、 CH_3 、 CF_3 和 OCH_3CN 组成的组。在一些实施方案中,式I的 R^4 是 H 或 OH 。

[0016] 在一些实施方案中,式I的 R^5 选自由 H 、 F 、 Cl 、 NH_2 和 $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ 组成的组。在一些实施方案中,式I的 R^5 是 H 或 NH_2 。

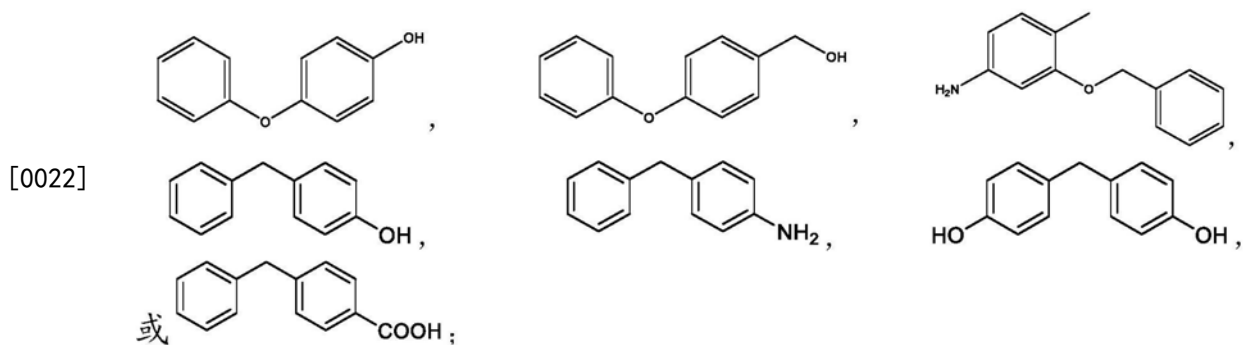
[0017] 在一些实施方案中,式I的 R^6 选自由 H 、 Cl 、 CN 、 CH_3 和 $\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$ 组成的组。在一些实施方案中,式I的 R^6 是 H 。

[0018] 在一些实施方案中,式I的化合物选自由以下或其药学上可接受的盐组成的组:



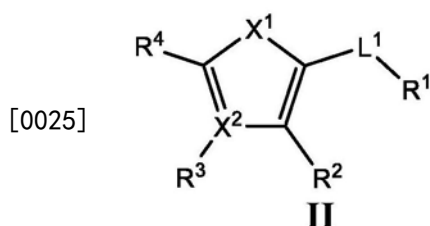


[0021] 在一些实施方案中,式I的化合物是:



[0023] 或其药学上可接受的盐。

[0024] 本申请还提供了包含以下的组合物：式II的化合物或其药学上可接受的盐，



[0026] 和一种或多种药学上可接受的载体，其中： X^1 是NH或S； X^2 是C或N； L^1 选自由键、-C(O)-、-C(O)O-和-SO₂-组成的组； R^1 选自由C₁₋₃烷基、NH₂、二(C₁₋₃烷基)氨基和5-6元杂环烷基组成的组； R^2 选自由H、卤素、C₁₋₃烷基和C(O)OC₁₋₃烷基组成的组； R^3 选自由H、C₁₋₃烷基和5-6元杂芳基组成的组；当 X^2 为N时， R^3 不存在； R^4 选自由H和C₁₋₃烷基组成的组。

[0027] 在一些实施方案中，式II的 X^1 是NH。

[0028] 在一些实施方案中，式II的 X^1 是S。

[0029] 在一些实施方案中，式II的 X^2 是C。

[0030] 在一些实施方案中，式II的 X^2 是N。

[0031] 在一些实施方案中，式II的 R^1 选自由CH₃、CH₂CH₃、NH₂、N(CH₂CH₃)₂、哌啶基和二氢噻吩-3(2H)-酮基(onyl)组成的组。

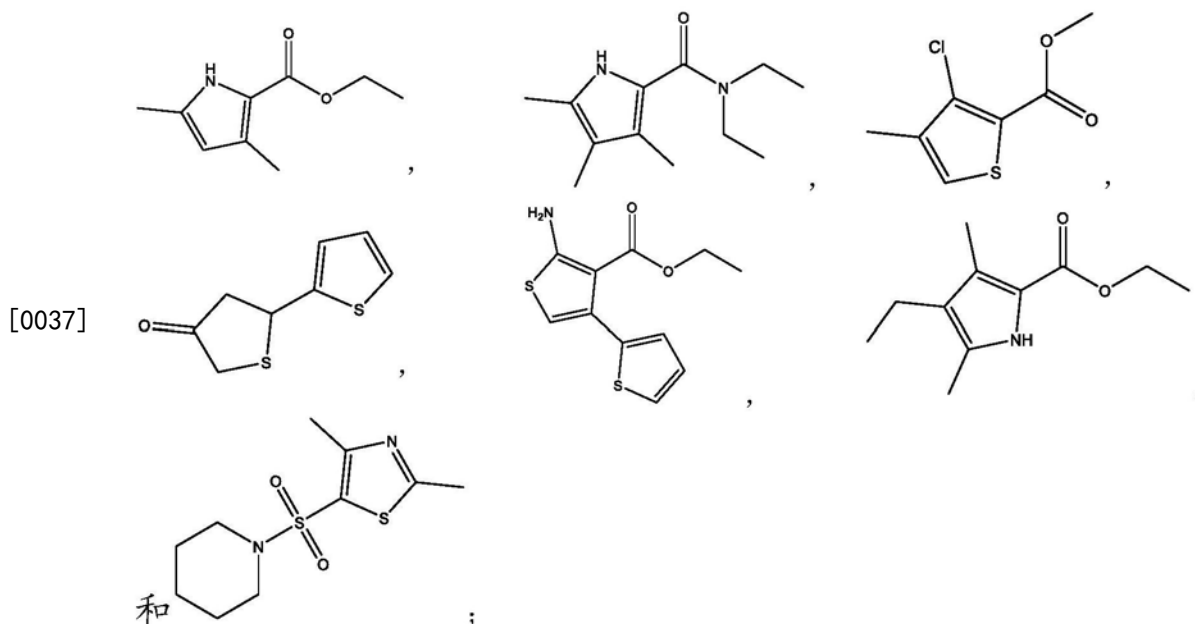
[0032] 在一些实施方案中，式II的-L¹-R¹形成选自由NH₂、C(O)OCH₃、C(O)OCH₂CH₃、C(O)N(CH₂CH₃)₂、SO₂-哌啶基和二氢噻吩-3(2H)-酮基组成的组的基团。

[0033] 在一些实施方案中，式II的 R^2 选自由H、Cl、CH₃和C(O)OCH₂CH₃组成的组。

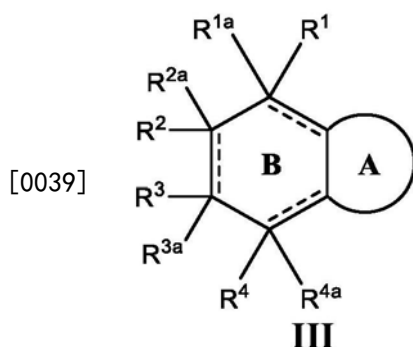
[0034] 在一些实施方案中，式II的 R^3 选自由H、CH₃、CH₂CH₃和噻吩基组成的组。

[0035] 在一些实施方案中，式II的 R^4 选自由H和C₁₋₃烷基组成的组。

[0036] 在一些实施方案中，式II的化合物选自由以下或其药学上可接受的盐组成的组：



[0038] 本申请还提供了包含以下的组合物：式III的化合物或其药学上可接受的盐，

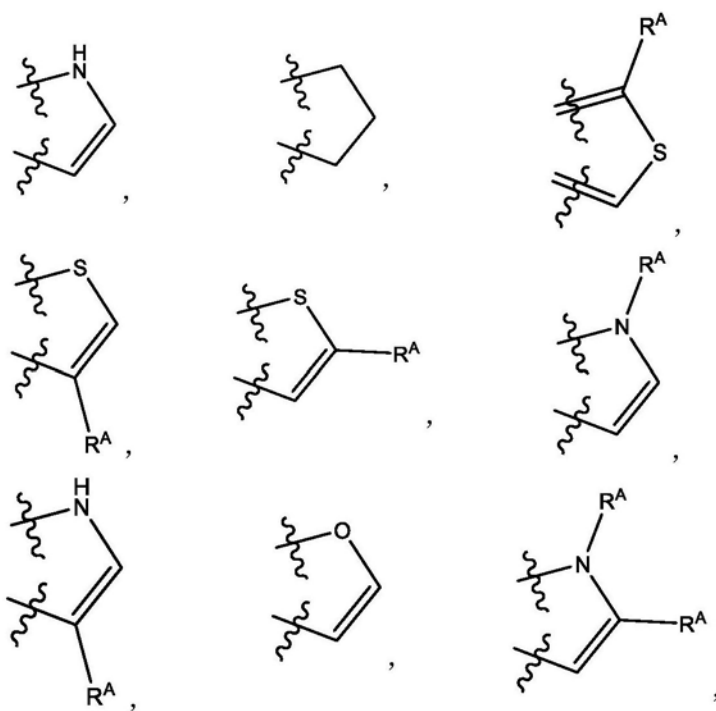


[0040] 和一种或多种药学上可接受的载体，其中：——指单键或双键；环A与环B形成稠合环，环A选自由5-6元环烷基、5-6元杂芳基和5-6元杂环烷基组成的组，其中，环A任选地被1个、2个或3个独立选择的 R^A 基团取代； R^1 选自由H、C(O)OC₁₋₃烷基、OC(O)C₁₋₃烷基、C(S)NH₂和=N-OH组成的组； R^{1a} 是H；当 R^{1a} 所连接的碳原子形成双键时， R^{1a} 不存在； R^2 选自由H和卤素组成的组； R^{2a} 是H；当 R^{2a} 所连接的碳原子形成双键时， R^{2a} 不存在； R^3 选自由H、卤素、C₁₋₃烷基、C₁₋₃羟烷基、NHC(O)C₁₋₃烷基和(C₁₋₃亚烷基)NHC₁₋₃烷基组成的组； R^{3a} 是C₁₋₃烷基；当 R^{3a} 所连接的碳原子形成双键时， R^{3a} 不存在； R^4 选自由H和C₁₋₃烷基组成的组； R^{4a} 是H；当 R^{4a} 所连接的碳原子形成双键时， R^{4a} 不存在；每个 R^A 独立地选自由=O、=S、CN、C₁₋₃烷基、C₁₋₃羟烷基、S(C₁₋₃烷基)和C(O)OH组成的组。

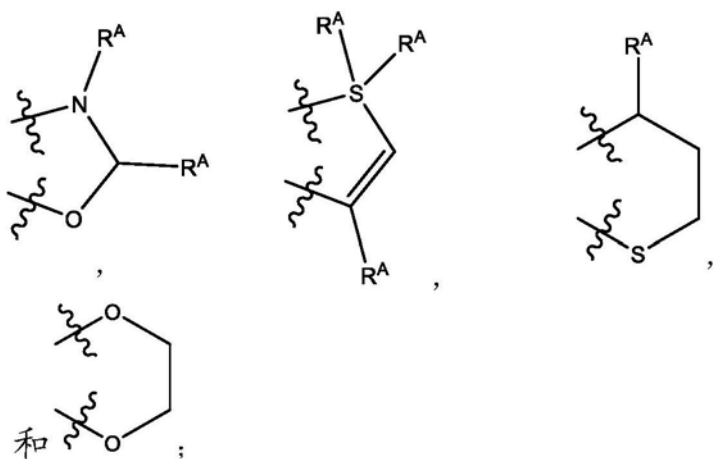
[0041] 在一些实施方案中，环A是5-6元杂芳基，任选地被1个、2个或3个独立选择的 R^A 基团取代。在一些实施方案中，环A是5-6元杂环烷基，任选地被1个、2个或3个独立选择的 R^A 基团取代。在一些实施方案中，式III的每个 R^A 独立地选自由=O、=S、CN、CH₃、CH₂OH、SCH₃和C(O)OH组成的组。在一些实施方案中，环A是未取代的5-6元环烷基。

[0042] 在一些实施方案中，环A选自由以下组成的组：

[0043]

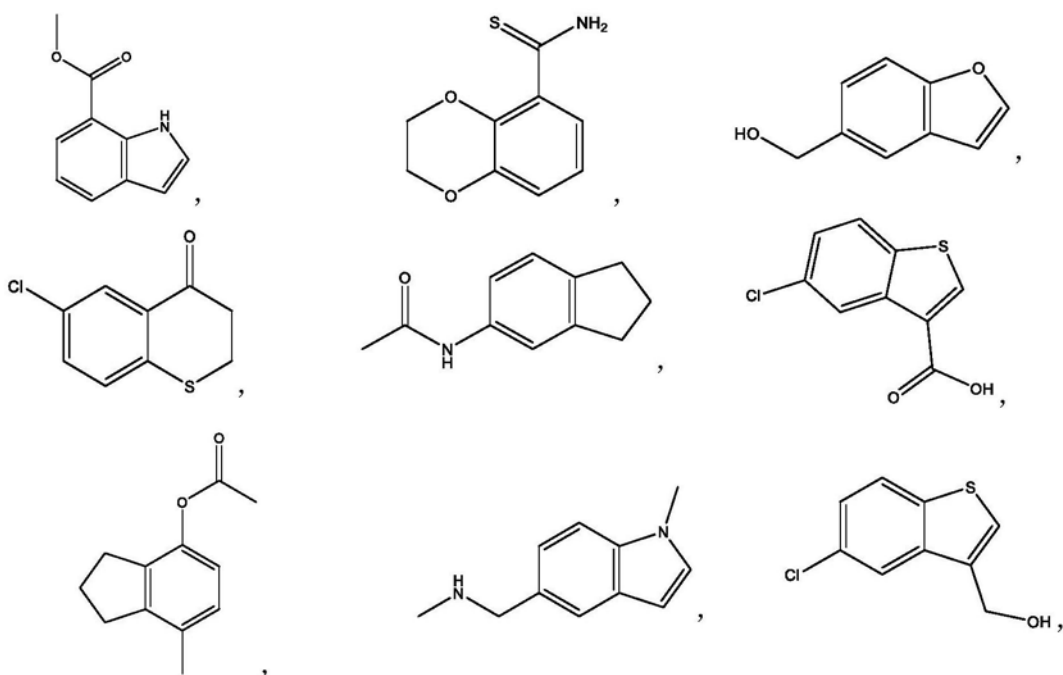


[0044]

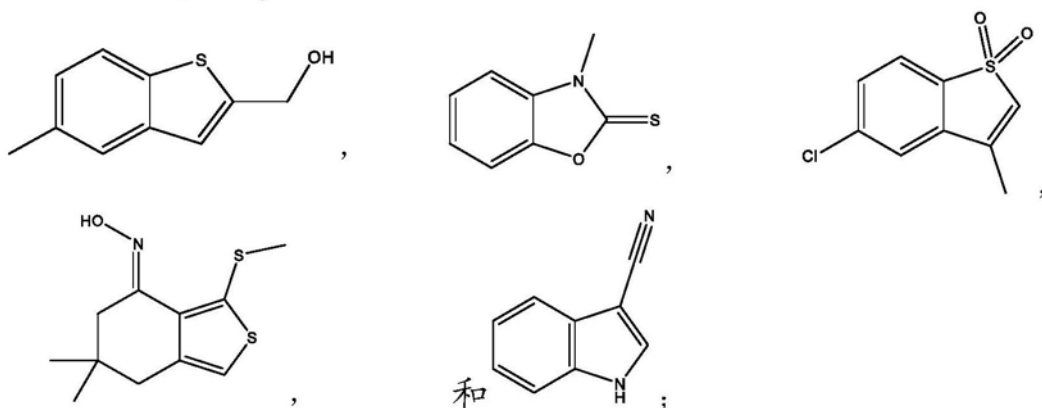
[0045] 其中,每个  都表示连接耦合环A和环B的键。[0046] 在一些实施方案中,式III的 R^1 选自由H、C(O)OCH₃、OC(O)CH₃、C(S)NH₂和=N-OH组成的组。[0047] 在一些实施方案中,式III的 R^2 选自由H和Cl组成的组。[0048] 在一些实施方案中,式III的 R^{2a} 是H。在一些实施方案中,式III的 R^{2a} 不存在。[0049] 在一些实施方案中,式III的 R^3 选自由H、Cl、CH₃、CH₂OH、NHC(O)CH₃和CH₂NHCH₃组成的组。[0050] 在一些实施方案中,式III的 R^{3a} 是CH₃。在一些实施方案中,式III的 R^{3a} 不存在。[0051] 在一些实施方案中,式III的 R^4 选自由H和CH₃组成的组。

[0052] 在一些实施方案中,式III的化合物选自由以下或其药学上可接受的盐组成的组:

[0053]

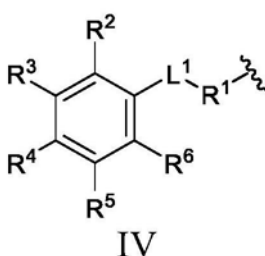


[0054]



[0055] 本申请还提供了一种组合物,包含含有式IV部分的化合物或其药学上可接受的盐:

[0056]



[0057] 和一种或多种药学上可接受的载体,其中:L¹选自由键、C₁₋₃亚烷基、-O-、-O (C₁₋₃亚烷基)-、C₁₋₃氰基亚烷基、-S-、-SO₂-、-S (C₁₋₃亚烷基)-和-C (O)-组成的组;R¹选自由亚苯基、5-6元亚杂芳基 (heteroarylene) 和5-6元亚杂环烷基 (heterocycloalkylene) 组成的组,其中,它们各自任选地被1个、2个或3个独立选择的R^A基团取代;R²选自由H、卤素、OH、CN、C₁₋₃烷基和C (O) OC₁₋₃烷基组成的组;R³选自由H、卤素、OH、NH₂、C (O) C₁₋₃烷基和C (S) C₁₋₃烷基组成的组;R⁴选自由H、卤素、OH、NH₂、CN、C₁₋₃烷基、C₁₋₃卤代烷基和O (C₁₋₃氰烷基) 组成的组;R⁵选自由H、卤素、OH、NH₂和C (O) C₁₋₃烷基组成的组;R⁶选自由H、卤素、OH、CN、C₁₋₃烷基和C (O) OC₁₋₃烷基组成的组;每个R^A独立地选自由OH、NH₂、CN、C₁₋₃烷基、C₁₋₃羟烷基、C (O) OH、C (O) C₁₋₃烷基和C

(O) N (C₁₋₃烷基)₂组成的组,其中,所述C₁₋₃烷基任选地被NH₂取代。

[0058] 在一些实施方案中,式IV的L¹选自由键、-CH₂-、-O-、-OCH₂-、-CH(CN)-、-S-、-SO₂-、-SCH₂-和-C(O)-组成的组。

[0059] 在一些实施方案中,式IV的R¹是亚苯基,任选地被1个或2个独立选择的R^A基团取代。

[0060] 在一些实施方案中,式IV的每个R^A独立地选自由OH、NH₂、CN、CH₃、CH₂OH、CH₂CH₂NH₂、C(O)OH、C(O)CH₃和C(O)N(CH₃)₂组成的组。

[0061] 在一些实施方案中,式IV的R²选自由H、Cl、CN、CH₃和C(O)OCH₃组成的组。

[0062] 在一些实施方案中,式IV的R³选自由H、F、Cl、NH₂、C(O)CH₃和C(S)CH₃组成的组。

[0063] 在一些实施方案中,式IV的R⁴选自由H、Cl、NH₂、CN、CH₃、CF₃和OCH₃CN组成的组。

[0064] 在一些实施方案中,式IV的R⁵选自由H、F、Cl、NH₂和C(O)CH₃组成的组。

[0065] 在一些实施方案中,式IV的R⁶选自由H、Cl、CN、CH₃和C(O)OCH₃组成的组。

[0066] 本申请还提供了致敏和/或活化BAX的促凋亡活性的方法,包括使包含BAX的细胞样品或组织样品与本文提供的组合物接触。

[0067] 本申请进一步提供了在受试者中致敏和/或活化BAX的促凋亡活性的方法,包括向受试者施用本文提供的组合物。

[0068] 本申请进一步提供了治疗受试者的癌症的方法,包括向所述受试者施用治疗有效量的本文提供的组合物。

[0069] 在一些实施方案中,所述癌症选自由以下组成的组:乳腺癌、前列腺癌、淋巴瘤、皮肤癌、胰腺癌、结肠癌、黑色素瘤、恶性黑色素瘤、卵巢癌、脑癌、原发性脑癌、头颈癌、神经胶质瘤、胶质母细胞瘤、肝癌、膀胱癌、非小细胞肺癌、头颈恶性肿瘤、乳腺恶性肿瘤、卵巢恶性肿瘤、肺癌、小细胞肺癌、威尔姆斯氏肿瘤、宫颈癌、睾丸癌、膀胱恶性肿瘤、胰腺恶性肿瘤、胃癌、结肠恶性肿瘤、前列腺恶性肿瘤、泌尿生殖道癌、甲状腺癌、食道癌、骨髓瘤、多发性骨髓瘤、肾上腺癌、肾细胞癌、子宫内膜癌、肾上腺皮质癌、恶性胰腺胰岛素瘤、恶性类癌、绒毛膜癌、蕈样霉菌病、恶性高钙血症、宫颈增生、白血病、神经母细胞瘤、横纹肌肉瘤、卡波济氏肉瘤、真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、软组织肉瘤、骨源性肉瘤、原发性巨球蛋白血症和视网膜母细胞瘤。在一些实施方案中,癌症是白血病。在一些实施方案中,所述白血病选自由以下组成的组:急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、慢性粒细胞白血病、急性粒细胞白血病、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病和毛细胞白血病。在一些实施方案中,所述白血病选自由以下组成的组:急性成淋巴细胞白血病、急性骨髓性白血病、慢性成淋巴细胞白血病和慢性骨髓性白血病。

[0070] 本申请进一步提供了一种鉴定致敏和/或活化BAX多肽的促凋亡活性的化合物的方法,该方法包括:

[0071] a) 在适合于致敏和/或活化BAX多肽的促凋亡活性的条件下,使包含氨基酸序列 SEQ ID NO:1的所述BAX多肽的结合位点与所述化合物体外接触;以及

[0072] b) 确定所述化合物是否结合一个或多个氨基酸残基,所述氨基酸残基选自由以下组成的组:Ile80、Ala81、Ala82、Val83、Asp84、Thr85、Asp86、Ser87、Pro88、Val91、Phe116、Lys119、Leu120、Val121、Lys123、Ala124、Thr127、Leu132和Ile136;

[0073] 其中,所述BAX多肽的结合位点包含BAX多肽的α3-α4发夹和α5-α6发夹的连接。

[0074] 在一些实施方案中,所述确定步骤通过饱和转移差NMR、HSQC NMR、表面等离子体共振、生物层干涉测量法或竞争性荧光偏振测定法执行。

[0075] 在一些实施方案中,所述化合物与BAX多肽的结合导致所述化合物的NMR谱的信号变化。

[0076] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括检测所述化合物对BAX多肽的活化。在一些实施方案中,所述检测步骤包括执行选自以下组成的组的测定:检测BAX寡聚化、基于抗体的BAX构象检测、线粒体细胞色素c释放测定、脂质体释放测定、细胞死亡测定、线粒体或细胞形态测定、线粒体钙通量测定、线粒体跨膜定量测定和半胱天冬酶3活性或膜联蛋白V结合的定量。

[0077] 在一些实施方案中,化合物以 $<1\text{mM}$ 的亲和力结合至所述结合位点。在一些实施方案中,所述化合物致敏BAX多肽的促凋亡活性的活化。在一些实施方案中,所述化合物活化BAX多肽的促凋亡活性。

[0078] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括施用活化BAX促凋亡活性的另外的治疗剂。在一些实施方案中,所述另外的治疗剂是BIM SAHBA₂。

[0079] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术术语和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。本文描述了用于本发明的方法和材料;另外,也可以使用本领域已知的合适方法和材料。所述材料、方法和示例仅是说明性的,无意进行限制。本文提及的所有出版物、专利申请、专利、序列、数据库条目和其他参考文献通过引用整体并入本文。在有冲突的情况下,以本说明书(包括定义)为准。

附图说明

[0080] 图1a显示了包含一系列调节其促凋亡活性的表面沟的BAX,包括BH3结合触发和经典位点,以及抑制性BCL-2 BH4和vMIA相互作用袋。

[0081] 图1b显示了通过依次在10个、3个、单个池中进行顺序STD-NMR筛选来鉴定本文所述的化合物(也称为BAX相互作用片段(BIF))的方法,产生了56个候选BIF。

[0082] 图1c显示BIF-44对脂质体(黑色,左侧)、极小的直接BAX活化活性(黑色,中间)无独立影响,但在添加BIM SAHBA₂后显著增强了脂质体释放的动力学和数量(黑色,右侧),超过了由BIM SAHBA₂和BAX组合单独达到的最大释放水平(灰色,右侧)。误差棒是技术三次重复并且使用独立的脂质体和蛋白质制品重复至少两次得到相似结果的实验的平均值 $\pm$ SD。

[0083] 图1d显示了竞争性STD NMR证明BIF-44 STD信号不受与BIM SAHBA₂共孵育的影响。

[0084] 图2a-2b显示了脂质体释放测定法表明BIF-44在宽剂量范围内几乎没有或没有直接BAX活化作用,但与BIM SAHBA₂共孵育后,致敏BH3触发的直接BAX活化(图2b)。误差棒为技术三次重复的实验的平均值 $\pm$ SD。

[0085] 图2c-2d显示了竞争性荧光偏振测定法(FPA)表明BIF-44不能与FITC BIM SAHBA₂有效竞争BAX相互作用(图2c),但确实可以以剂量响应方式与FITC-vMIA竞争(图2d)。相应的N末端乙酰化肽用作每种测定中用于竞争的阳性对照:Ac-BIM SAHBA₂,蓝色(图2c);AcvMIA,紫色(图2d)。误差棒为技术四次重复的实验的平均值 $\pm$ SD。

[0086] 图2e显示了与vMIA肽共孵育(灰色)但不与BIM SAHBA₂共孵育后,竞争性STD-NMR表现出BIF-44 STD信号(黑色)的抑制,与图2c-2d中显示的竞争性FPA结果一致。数据代表至

少两个独立实验。

[0087] 图3a-3e显示了BIF-44类似物的结构-活性关系。提供了BIF-44类似物的化学结构(左)、STD结合(灰色)和BAX介导的脂质体释放致敏活性。误差棒是技术三次重复的脂质体释放实验的平均值 $\pm$ SD(右)。数据代表至少两个独立实验。

[0088] 图4a-4e显示了BIF-44靶向BAX的vMIA结合区域并影响构象动力学。

[0089] 图4a显示了在添加BIF-44 (6:1, BIF:BAX) 之后测量的 ^{15}N -BAX的化学位移变化, 被绘制成BAX残基数的函数。反映高于2SD截止点($\geq 0.018\text{ppm}$ 显著性阈值)的化学位移变化的最显著影响被着色为红色并位于 $\alpha 3$ - $\alpha 4$ 发夹和 $\alpha 5$ - $\alpha 6$ 发夹的连接处。1SD截止点阈值($\geq 0.012\text{ppm}$ 显著性阈值)处的显著变化被着色为橙色, 涵盖 $\alpha 5$ 和 $\alpha 6$ 核心的内部残基以及 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 的离散并列残基。

[0090] 图4b显示了在图4a的残基图中以红色和橙色条表示的残基被相应地映射到单体BAX (PDB ID: 1F16) 的带状图。最突出的化学位移变化(2SD截止点) 位于与vMIA肽(紫色) 相互作用有关的区域。第二组化学位移变化(1SD截止点) 定位于 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 以及 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 的内部并列残基, 提示从邻近疏水核到BAX N末端面的 $\alpha 1$ -环- $\alpha 2$ 区的变构传感。

[0091] 图4c显示了在BIF-44滴定之后, 基于观察到的 ^{15}N -BAX (黑色, 2SD, 灰色1SD) 的化学位移变化的BIF-44的分子对接。在表面(左) 和带状(中, 右) 视图上显示BIF-44与由BAX的疏水性 $\alpha 5$ 和 $\alpha 6$ 螺旋以及 $\alpha 3$ - $\alpha 4$ 发夹形成的深裂紧密结合。

[0092] 图4d显示了在存在(灰色) 或不存在(黑色) BIF-44的情况下, 在BAX的100ns分子动力学模拟过程中每个BAX残基的 C_{α} 的RMSF值。

[0093] 图4e显示了未配体形式的BAX和配体形式的BAX之间的RMSF (Δ RMSF) 的差异。超过一个SD阈值的残基以灰色显示, 指示BIF-44结合之后增加的迁移率, 并定位于BAX的 $\alpha 1$ - $\alpha 2$ 区。N-末端和C-末端的非结构部分的残基(分别为残基1-15和残基188-192) 被从图中排除。

[0094] 图5a-5d显示了HXMS揭示在BIF-44结合之后 $\alpha 1$ - $\alpha 2$ 环和BAX BH3结构域的变构去保护。

[0095] 图5a显示了与未配体BAX相比, 在脂质体环境中向BAX (30 μM , 10:1 BIF:BAX) 中添加BIF-44触发了氘掺入的区域特异性增加, 如通过HXMS测量的。相对差异图反映了BIF-44/BAX的相对氘掺入量减去BAX的相对氘掺入量。深灰色阴影表示图中低于显著性阈值0.5Da的变化, 而浅灰色阴影和白色区域分别突出显示高于基线显著性阈值0.5Da和更严格阈值0.8Da的变化。数据代表至少两个独立实验。

[0096] 图5b显示了BIF-44诱导的去保护区域包含对应于氨基酸46-74的肽片段, 其在带状图(左, PDB ID: 1F16) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO: 1, 右) 中以黑色突出显示, 并被映射到BAX的关键 $\alpha 1$ - $\alpha 2$ 环和BH3区。

[0097] 图5c-5d显示了通过与抗BAX BH3抗体(图5c) 共孵育, 但不与BAX 6A7抗体(图5d) (其结合至构象活化的BAX的N端残基) 共孵育抑制由BIF-44诱导的去保护作用。由BAX BH3抗体和BAX 6A7抗体鉴定的BAX氨基酸序列分别用浅灰色和深灰色加下划线。相对差异图反映了BIF-44/BAX/BH3 Ab(图5c) 和BIF-44/BAX/6A7 Ab(图5d) 的相对氘掺入减去BAX的相对氘掺入。数据代表至少两个独立实验。

[0098] 图6a-6c显示了BIF-44致敏BH3触发的BAX构象活化和细胞色素c释放活性。

[0099] 图6a显示了在暴露于BIF-44 (浅灰色边框)、BIM SAHB_{A2} (深灰色) 或两种配体(黑

色)之后,在脂质体存在下BAX的对比HXMS图。相对差异图反映了BIF-44/BAX(浅灰色边框)、BIM SAHB_{A2}/BAX(深灰色)和BIF-44/BIM SAHB_{A2}/BAX(黑色)的相对氘掺入减去BAX的相对氘掺入。深灰色阴影表示图中低于显著性阈值0.5Da的变化,而浅灰色阴影和白色区域分别突出显示高于基线显著性阈值0.5Da和更严格阈值0.8Da的变化。数据代表至少两个独立实验。

[0100] 图6b显示在带状图(PDB ID:1F16)和氨基酸序列(SEQ ID N0:1)中以绿色突出显示了通过用协同BIF-44/BIM SAHB_{A2}组合处理BAX而诱导的去保护的主要区域($\alpha 1$, $\alpha 1$ - $\alpha 2$ 环和 $\alpha 2$)。

[0101] 图6c显示了来自分离的Alb^{Cre}Bax^{f/f}Bak^{-/-}小鼠肝线粒体的BIF-44剂量反应性敏感BIM SAHB_{A2}触发的BAX介导的细胞色素c释放。误差棒是技术三次重复并且使用线粒体的独立制备和处理再重复两次得到相似结果的实验的平均值 $\pm$ SD。

[0102] 图7a-7c显示了BIF-44/BAX相互作用的STD和CPMG NMR分析。

[0103] 图7a-7b显示了在BAX蛋白存在和不存在的条件下BIF-44的STD NMR。在BAX存在或不存在的条件下,非共振条件显示对BIF-44的芳香区域无影响(图7a)。仅在BAX存在的条件下才能检测到BIF-44的STD信号(STD=非共振减去共振),反映了配体-蛋白质相互作用(图7b)。

[0104] 图7c显示了在BAX存在和不存在的条件下BIF-44的CPMG NMR。BAX蛋白的添加增强了BIF-44配体的横向弛豫率 R_2 ,这可通过¹H-NMR信号的急剧下降反映并表明配体-蛋白质相互作用。

[0105] 图8a-8b显示了FITC-BIM SAHB_{A2}和vMIA肽直接结合至BAX。荧光偏振测定法证明了BAX与FITC-BIM SAHB_{A2}(图8a)和FITC-vMIA(图8b)肽之间存在直接相互作用。误差棒为四次重复的实验的平均值 $\pm$ SD。

[0106] 图9显示了BIF-44滴定后BAX的¹⁵N-HSQC分析。以4:1、6:1和8:1(BIF:BAX)的比例添加BIF-44时测得的¹⁵N-BAX化学位移变化被绘制为BAX残基数的函数。每个剂量比(≥ 0.012 、0.018和0.022ppm显著性阈值)在1SD截止点阈值处的显著变化分别被着色成黑色、蓝色和红色。

[0107] 图10显示了等温滴定量热法(ITC)测量,该测量表明BIF-44以 $37 \pm 12 \mu\text{M}$ 的解离常数(KD)与BAX结合。结合的原始热量被拟合成单点结合模型。将浓度为1mM的BIF-44注射到含有0.15mM BAX的细胞中(每次注射2 μL)。样品在20mM磷酸钾缓冲液(pH6.2,1%DMSO)中被稀释至指定浓度。

[0108] 图11显示了BIF-44致敏BAX-介导的脂质体释放与添加顺序无关。无论是在添加BIM SAHB_{A2}的同时(左)、在添加BIM SAHB_{A2}之前(右)还是在添加BIM SAHB_{A2}之后(中间)添加BIF-44,都可以达到相同水平的BAX活化。BAX和BIF-44的浓度分别为750nM和113 μM (150x)。样品在脂质体释放测定缓冲液(10mM HEPES、200mM KCl、1mM MgCl₂, pH 7.0)中被稀释。

[0109] 图12显示了BIF-44在¹H-NMR谱图中没有表现出谱线变宽,这与两种已知的小分子聚集体4-ADPA和I4PTH不同。样品在20mM磷酸钾缓冲液(pH6.2,10%D₂O)中被稀释至指定浓度。

[0110] 图13显示了BIF-44没有表现出T2衰减的快速或剂量依赖性降低,而聚集化合物4-ADPA显示出迅速T2衰减(上图,灰色)。BIF-44具有与浓度无关的长衰变时间(下图)。样品在

20mM磷酸钾缓冲液 (pH6.2, 10%D₂O) 中被稀释至指定浓度。

[0111] 图14显示了指示BIF-44在溶液中不聚集的动态光散射。虽然4-ADPA (灰色) 和I4PTH (黑色) 显示出光散射的剂量依赖性增加, 但BIF-44信号保持平坦。样品在20mM磷酸钾缓冲液 (pH6.2) 中被稀释至指定浓度。

[0112] 图15显示了整体对接以限定BAX上的BIF-44结合位点。使用HSQC结果指导对接, 将BIF-44对接至所有20种NMR溶液结构 (PDB:1F16)。显示了针对每个模型的具有最佳结合得分的姿势。BIF-44结合袋 (下图, 黑色) 由以下残基组成: Ile80、Ala81、Ala82、Val83、Asp84、Thr85、Asp86、Ser87、Pro88、Val91、Phe116、Lys119、Leu120、Val121、Lys123、Ala124、Thr127、Leu132和Ile136。

具体实施方式

[0113] 对于如此小的蛋白质, 针对BAX已定义了令人惊讶的大系列的调控表面和复杂构象变化, 如图1a所示。在其构象失活状态下, BAX主要在细胞溶质中, 并且也可能通过由抗凋亡蛋白 (例如BCL-X_L) 介导的逆向转运过程往返于线粒体外膜 (MOM) 区域 (参见, 例如Edlich et al, Cell, 2011, 145:104-116)。响应于压力, 仅BH3直接活化蛋白 (例如BIM、BID和PUMA) 可以直接且顺序地接合 $\alpha 1/\alpha 6$ 触发位点和典型疏水沟, 从而引发和增殖BAX同源-寡聚反应 (参见例如Czabotar et al, Cell, 2013, 152:519-531; Edwards et al, Chem. Biol. 2013, 20:888-902; Gavathiotis et al, Mol. Cell, 2010, 40:481-492; Gavathiotis et al, Nature, 2008, 455:1076-1081), 而BCL-2典型沟、BCL-2 BH4基序和巨细胞病毒vMIA蛋白可以结合并抑制BAX (参见, 例如Barclay et al, Mol. Cell, 2015, 57:873-886; Ma et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2012, 109:20901-20906; Petros et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2001, 98:3012-3017)。BAX在凋亡诱导中的核心作用来自其经历重大构象变化的能力, 这种变化导致不可逆的线粒体转运、膜内同源寡聚和MOM穿孔 (参见例如Walensky et al, Trends Biochem. Sci. 2011, 36:642-652)。叛逃的BAX活化细胞的固有风险可能是其多方面调控的机制的基础。

[0114] 鉴于BCL-2家族蛋白在健康和疾病期间的凋亡调控中的核心作用, 正在努力解除抗凋亡蛋白在癌症中的作用, 其中促凋亡成员的隔离和失活推动了细胞永生。具体来说, 该机制 (通过所述机制抗凋亡蛋白 (例如BCL-2) 部署表面沟以捕获促凋亡蛋白的凋亡触发BCL-2同源物3 (BH3) 螺旋) 现已用于制造venetoclax, 一种选择性BCL-2袋抑制剂 (参见, 例如Souers et al, Nat. Med. 2013, 19:202-208; Sattler et al, Science, 1997, 275:983-986)。这种“抑制所述抑制剂”的治疗策略正被用于开发针对涉及癌症的广谱抗凋亡靶标的药物, 包括BCL-X_L (参见例如Lessene et al, Nat. Chem. Biol. 2013, 9:390-397; Tao et al, ACS Med. Chem. Lett. 2014, 5:1088-1093; Tse et al, Cancer Res. 2008, 68:3421-3428)、MCL-1 (参见例如Bruncko et al, J. Med. Chem. 2015, 58:2180-2194; Cohen et al, Chem. Biol. 2012, 19:1175-1186; Kotschy et al, Nature, 2016, 538:477-482; Levenson et al, Cell Death Dis. 2015, 6:e1590; Pelz et al, J. Med. Chem. 2016, 59:2054-2066; Stewart et al, Nat. Chem. Biol. 2010, 595-601) 和BFL-1/A1 (参见例如Huhn et al, Cell Chem. Biol. 2016, 23:1123-1134)。

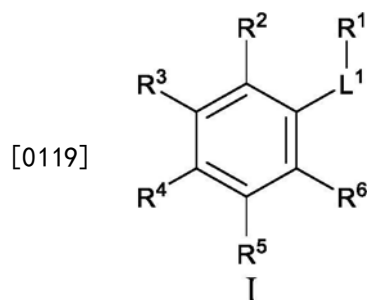
[0115] 已经发现由促凋亡BH3结构域直接活化BAX的 $\alpha 1/\alpha 6$ 触发位点, 据认为采用“活化所

述活化剂”策略驱动癌细胞死亡也值得进行治疗性探索(参见例如Gavathiotis et al, Mol.Cell,2010,40:481-492;Gavathiotis et al,Nature,2008,455:1076-1081)。先前报道通过生物信息学筛选启动了这项工作,因为与高度稳定的抗凋亡靶标相比,用于直接实验筛选的BAX的生产受到表达足够量的重组BAX的挑战以及BAX在溶液中尤其是暴露于潜在的活化剂时普遍不稳定的障碍。生物信息学以及后续的生物化学和细胞验证工作产生了第一个直接选择性的BAX活化剂分子(BAM)(参见例如Gavathiotis et al, Nat.Chem.Biol.2012,8:639-645)。本申请通过克服先前的后勤挑战并通过核磁共振(NMR)光谱法直接进行小分子片段筛选,为潜在的临床开发提供了BAX活化化合物。

[0116] 因此,本申请提供了在可能以其他方式被BCL-2(参见例如Barclay et al, Mol.Cell,2015,57:873-886)或巨细胞病毒vMIA多肽(参见例如Ma et al, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.2012,109:20901-20906)的BAX抑制性BH4结构域自然闭塞的区域中的深疏水袋处与BAX接合的化合物或分子片段。另外,本申请描述了分子接合通过 α 1- α 2环和BAX BH3螺旋的变构动员致敏BAX,突出了涉及BH3介导的BAX的直接活化和同源寡聚的关键机制步骤(参见例如Gavathiotis et al,Mol.Cell,2010,40:481-492;Wang et al,Mol.Cell.Biol.1998,18:6083-6089)。

[0117] 化合物和组合物

[0118] 本申请尤其提供包含以下的组合物:式I的化合物或其药学上可接受的盐



[0120] 和一个或多个药学上可接受的载体,其中, L^1 选自由键、 C_{1-3} 亚烷基、 $-O-$ 、 $-O(C_{1-3}$ 亚烷基) $-$ 、 C_{1-3} 氰基亚烷基、 $-S-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-S(C_{1-3}$ 亚烷基) $-$ 和 $-C(O)-$ 组成的组; R^1 选自由卤素、OH、 C_{1-3} 烷基、 C_{1-3} 卤代烷基、 NH_2 、CN、苯基、5-6元杂芳基和5-6元杂环烷基组成的组,其中,所述苯基、5-6元杂芳基和5-6元杂环烷基各自任选地被1个、2个或3个独立选择的 R^A 基团取代; R^2 选自由H、卤素、OH、CN、 C_{1-3} 烷基和 $C(O)OC_{1-3}$ 烷基组成的组; R^3 选自由H、卤素、OH、 NH_2 、 $C(O)C_{1-3}$ 烷基和 $C(S)C_{1-3}$ 烷基组成的组; R^4 选自由H、卤素、OH、 NH_2 、CN、 C_{1-3} 烷基、 C_{1-3} 卤代烷基和 $O(C_{1-3}$ 氰烷基)组成的组; R^5 选自由H、卤素、OH、 NH_2 和 $C(O)C_{1-3}$ 烷基组成的组; R^6 选自由H、卤素、OH、CN、 C_{1-3} 烷基和 $C(O)OC_{1-3}$ 烷基组成的组;每个 R^A 独立地选自由OH、 NH_2 、CN、 C_{1-3} 烷基、 C_{1-3} 羟烷基、 $C(O)OH$ 、 $C(O)C_{1-3}$ 烷基和 $C(O)N(C_{1-3}烷基)_2$ 组成的组,其中,所述 C_{1-3} 烷基任选地被 NH_2 取代。

[0121] 在一些实施方案中,式I的 L^1 选自由键、 $-CH_2-$ 、 $-O-$ 、 $-OCH_2-$ 、 $-CH(CN)-$ 、 $-S-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-SCH_2-$ 和 $-C(O)-$ 组成的组。

[0122] 在一些实施方案中,式I的 L^1 是 $-O-$ 、 $-CH_2-$ 或 $-OCH_2-$ 。

[0123] 在一些实施方案中,式I的 R^1 选自由Cl、 CH_3 、 CF_3 、 NH_2 、CN、苯基、5-6元杂芳基和5-6元杂环烷基组成的组,其中,所述苯基、5-6元杂芳基、5-6元杂环烷基各自任选地被1个或2

个独立选择的 R^A 基团取代。

[0124] 在一些实施方案中,式I的 R^1 选自由 Cl 、 CH_3 、 CF_3 、 NH_2 、 CN 、苯基、吡啶基、呋喃基、噻吩基、吡咯基、噻唑基、恶唑基、吡唑基、1,2,4-噻二唑基、哌啶基、吗啉基和4,5-二氢噻唑基组成的组,其中,所述苯基、吡啶基、呋喃基、噻吩基、吡咯基、噻唑基、恶唑基、吡唑基、1,2,4-噻二唑基、哌啶基、吗啉基和4,5-二氢噻唑基各自任选地被1个或2个独立选择的 R^A 基团取代。

[0125] 在一些实施方案中,式I的每个 R^A 独立地选自由 OH 、 NH_2 、 CN 、 CH_3 、 CH_2OH 、 $CH_2CH_2NH_2$ 、 $C(O)OH$ 、 $C(O)CH_3$ 和 $C(O)N(CH_3)_2$ 组成的组。

[0126] 在一些实施方案中,式I的 R^1 是苯基,任选地被1个或2个独立选择的 R^A 基团取代。

[0127] 在一些实施方案中,式I的 R^1 是苯基,任选地被1个或2个独立选择的 R^A 基团取代,其中,每个 R^A 独立地选自由 OH 、 NH_2 、 CH_2OH 和 $C(O)OH$ 组成的组。

[0128] 在一些实施方案中,式I的 R^1 是苯基、4-羟基苯基、3-羟基苯基、4-氨基苯基、4-羧基苯基或4-羟甲基苯基。

[0129] 在一些实施方案中,式I的 R^2 选自由 H 、 Cl 、 CN 、 CH_3 和 $C(O)OCH_3$ 组成的组。

[0130] 在一些实施方案中,式I的 R^2 是 H 或 CH_3 。

[0131] 在一些实施方案中,式I的 R^3 选自由 H 、 F 、 Cl 、 NH_2 、 $C(O)CH_3$ 和 $C(S)CH_3$ 组成的组。

[0132] 在一些实施方案中,式I的 R^3 是 H 。

[0133] 在一些实施方案中,式I的 R^4 选自由 H 、 Cl 、 NH_2 、 CN 、 CH_3 、 CF_3 和 OCH_3CN 组成的组。

[0134] 在一些实施方案中,式I的 R^4 是 H 或 OH 。

[0135] 在一些实施方案中,式I的 R^5 选自由 H 、 F 、 Cl 、 NH_2 和 $C(O)CH_3$ 组成的组。

[0136] 在一些实施方案中,式I的 R^5 是 H 或 NH_2 。

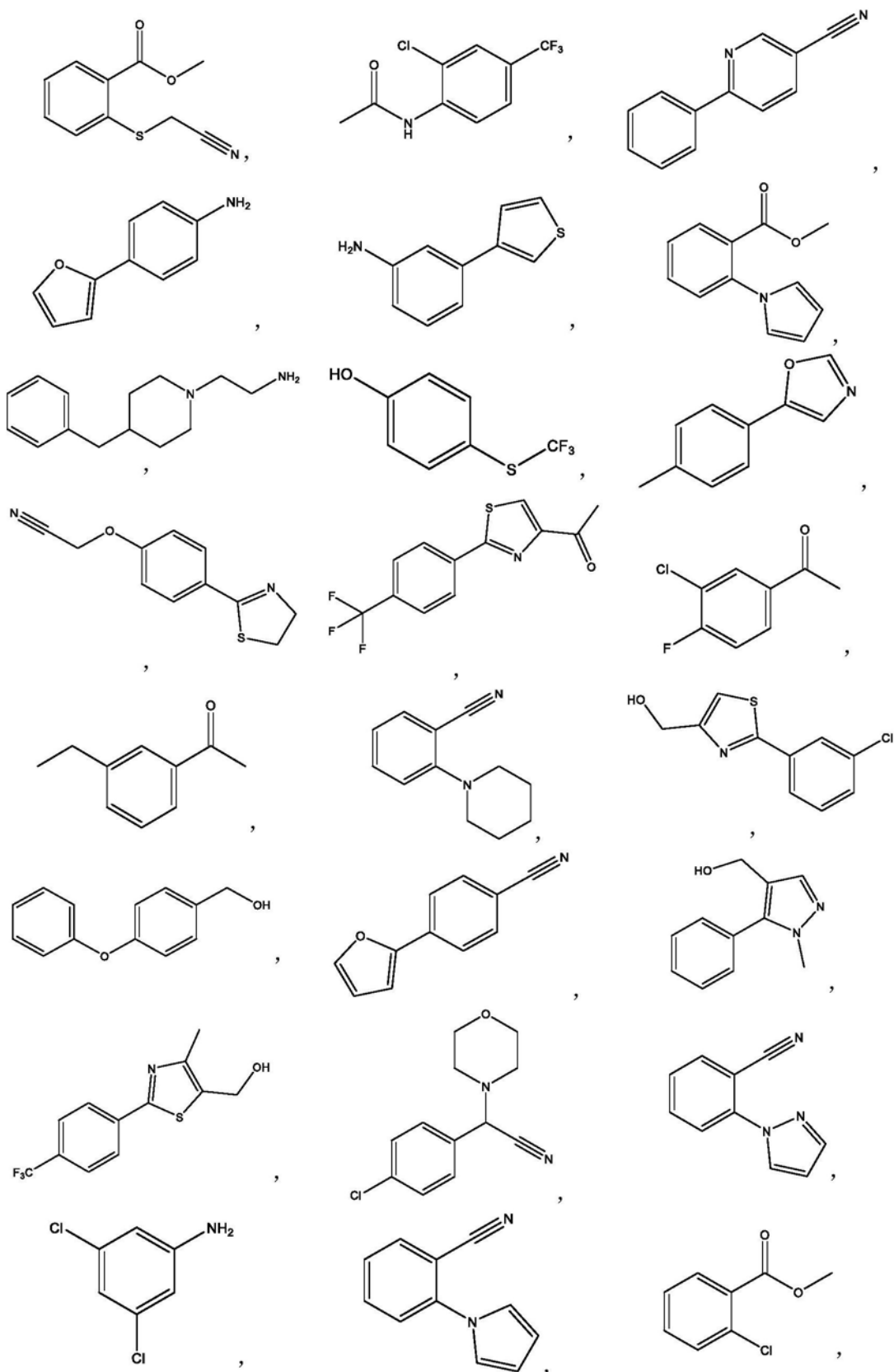
[0137] 在一些实施方案中,式I的 R^6 选自由 H 、 Cl 、 CN 、 CH_3 和 $C(O)OCH_3$ 组成的组。

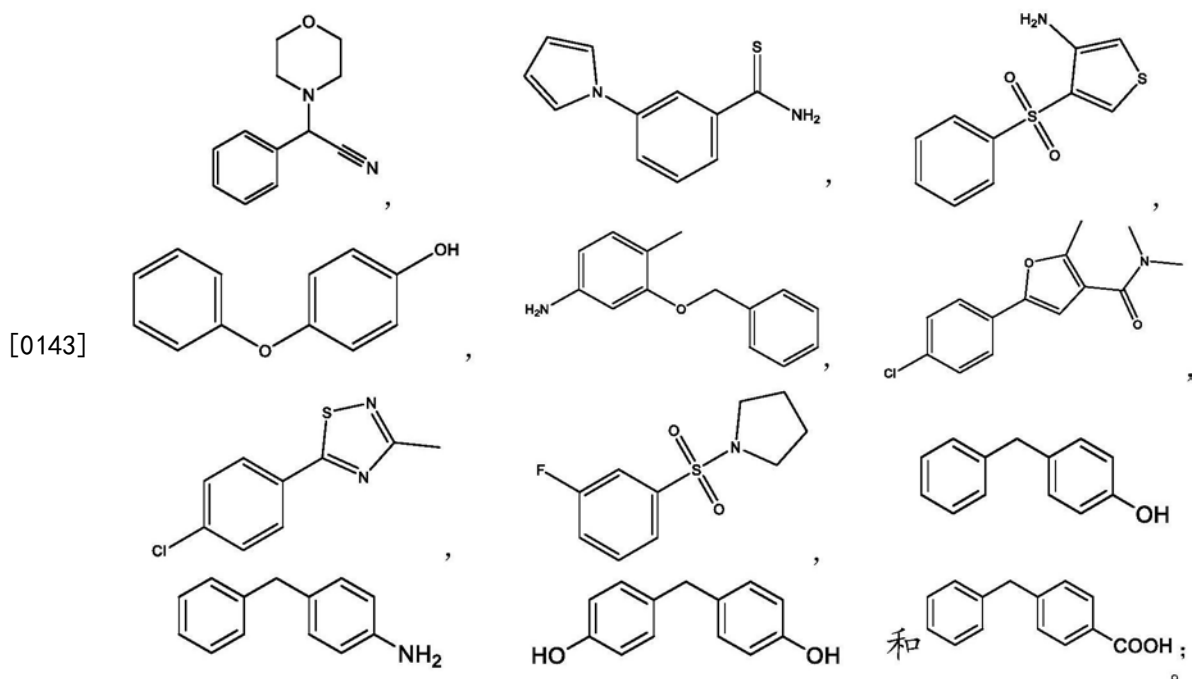
[0138] 在一些实施方案中,式I的 R^6 是 H 。

[0139] 在一些实施方案中,式I的 L^1 选自由键、 $-CH_2-$ 、 $-O-$ 、 $-OCH_2-$ 、 $-CH(CN)-$ 、 $-S-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-SCH_2-$ 和 $-C(O)-$ 组成的组;式I的 R^1 选自由 Cl 、 CH_3 、 CF_3 、 NH_2 、 CN 、苯基、5-6元杂芳基和5-6元杂环烷基组成的组,其中,苯基、5-6元杂芳基和5-6元杂环烷基各自任选地被1个或2个独立选择的 R^A 基团取代;式I的每个 R^A 独立地选自由 OH 、 NH_2 、 CN 、 CH_3 、 CH_2OH 、 $CH_2CH_2NH_2$ 、 $C(O)OH$ 、 $C(O)CH_3$ 和 $C(O)N(CH_3)_2$ 组成的组;式I的 R^2 选自由 H 、 Cl 、 CN 、 CH_3 和 $C(O)OCH_3$ 组成的组;式I的 R^3 选自由 H 、 F 、 Cl 、 NH_2 、 $C(O)CH_3$ 和 $C(S)CH_3$ 组成的组;式I的 R^4 选自由 H 、 Cl 、 NH_2 、 CN 、 CH_3 、 CF_3 和 OCH_3CN 组成的组;式I的 R^5 选自由 H 、 F 、 Cl 、 NH_2 和 $C(O)CH_3$ 组成的组;式I的 R^6 选自由 H 、 Cl 、 CN 、 CH_3 和 $C(O)OCH_3$ 组成的组。

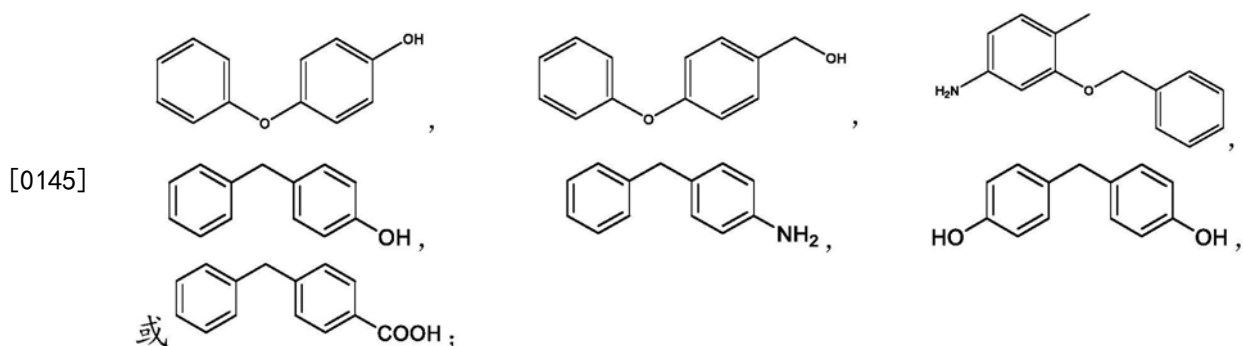
[0140] 在一些实施方案中,式I的 L^1 选自由键、 $-CH_2-$ 、 $-O-$ 、 $-OCH_2-$ 、 $-CH(CN)-$ 、 $-S-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-SCH_2-$ 和 $-C(O)-$ 组成的组;式I的 R^1 为苯基,其任选地被1个或2个独立选择的 R^A 基团取代;式I的每个 R^A 独立地选自由 OH 、 NH_2 、 CN 、 CH_3 、 CH_2OH 、 $CH_2CH_2NH_2$ 、 $C(O)OH$ 、 $C(O)CH_3$ 和 $C(O)N(CH_3)_2$ 组成的组;式I的 R^2 选自由 H 、 Cl 、 CN 、 CH_3 和 $C(O)OCH_3$ 组成的组;式I的 R^3 选自由 H 、 F 、 Cl 、 NH_2 、 $C(O)CH_3$ 和 $C(S)CH_3$ 组成的组;式I的 R^4 选自由 H 、 Cl 、 NH_2 、 CN 、 CH_3 、 CF_3 和 OCH_3CN 组成的组;式I的 R^5 选自由 H 、 F 、 Cl 、 NH_2 和 $C(O)CH_3$ 组成的组;式I的 R^6 选自由 H 、 Cl 、 CN 、 CH_3 和 $C(O)OCH_3$ 组成的组。

[0141] 在一些实施方案中,式I的化合物选自由以下或其药学上可接受的盐组成的组:



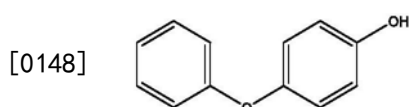


[0144] 在一些实施方案中,式I的化合物是:



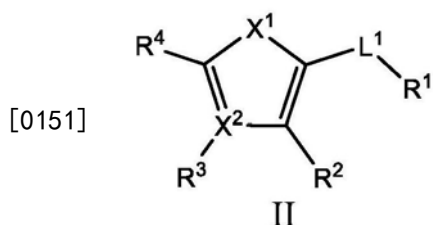
[0146] 或其药学上可接受的盐。

[0147] 在一些实施方案中,式I的化合物是:



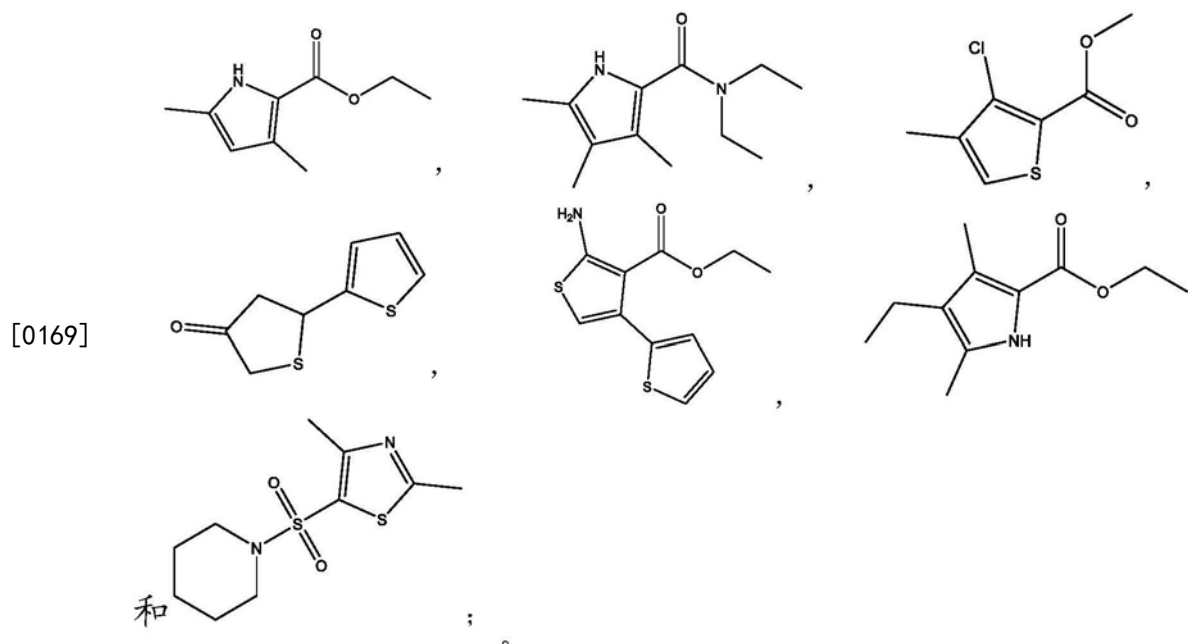
[0149] 或其药学上可接受的盐。

[0150] 本申请还提供了包含以下的组合物:式II的化合物或其药学上可接受的盐

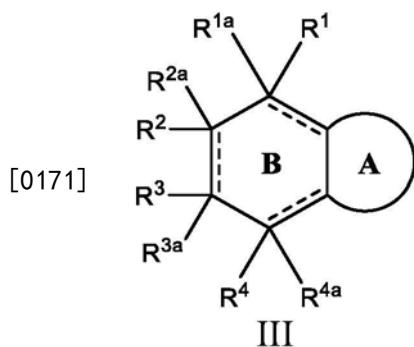


[0152] 和一种或多种药学上可接受的载体,其中, X^1 是NH或S; X^2 是C或N; L^1 选自由键、-C(O)-、-C(O)O-和-SO₂-组成的组; R^1 选自由C₁₋₃烷基、NH₂、二(C₁₋₃烷基)氨基和5-6元杂环烷基组成的组; R^2 选自由H、卤素、C₁₋₃烷基和C(O)OC₁₋₃烷基组成的组; R^3 选自由H、C₁₋₃烷基和5-6元杂芳基组成的组;当 X^2 为N时, R^3 不存在; R^4 选自由H和C₁₋₃烷基组成的组。

- [0153] 在一些实施方案中,式II的 X^1 是NH。
- [0154] 在一些实施方案中,式II的 X^1 是S。
- [0155] 在一些实施方案中,式II的 X^2 是C。
- [0156] 在一些实施方案中,式II的 X^2 是N。
- [0157] 在一些实施方案中,式II的 X^1 为NH,并且式II的 X^2 为C。
- [0158] 在一些实施方案中,式II的 X^1 为NH,并且式II的 X^2 为N。
- [0159] 在一些实施方案中,式II的 X^1 为S,并且式II的 X^2 为C。
- [0160] 在一些实施方案中,式II的 X^1 为S,并且式II的 X^2 为N。
- [0161] 在一些实施方案中,式II的 R^1 选自由 CH_3 、 CH_2CH_3 、 NH_2 、 $N(CH_2CH_3)_2$ 、哌啶基和二氢噻吩-3(2H)-酮基组成的组。
- [0162] 在一些实施方案中,式II的 $-L^1-R^1$ 形成选自由 NH_2 、 $C(O)OCH_3$ 、 $C(O)OCH_2CH_3$ 、 $C(O)N(CH_2CH_3)_2$ 、 SO_2 -哌啶基和二氢噻吩-3(2H)-酮基组成的组的基团。
- [0163] 在一些实施方案中,式II的 R^2 选自由H、Cl、 CH_3 和 $C(O)OCH_2CH_3$ 组成的组。
- [0164] 在一些实施方案中,式II的 R^3 选自由H、 CH_3 、 CH_2CH_3 和噻吩基组成的组。
- [0165] 在一些实施方案中,式II的 R^4 选自由H和 C_{1-3} 烷基组成的组。
- [0166] 在一些实施方案中,式II的 X^1 为NH或S;式II的 X^2 为C或N;式II的 L^1 选自由键、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)O-$ 和 $-SO_2-$ 组成的组;式II的 R^1 选自由 CH_3 、 CH_2CH_3 、 NH_2 、 $N(CH_2CH_3)_2$ 、哌啶基和二氢噻吩-3(2H)-酮基组成的组;式II的 R^2 选自由H、Cl、 CH_3 和 $C(O)OCH_2CH_3$ 组成的组;式II的 R^3 选自由H、 CH_3 、 CH_2CH_3 和噻吩基组成的组;式II的 R^4 选自由H和 C_{1-3} 烷基组成的组。
- [0167] 在一些实施方案中,式II的 X^1 为NH或S;式II的 X^2 为C或N;式II的 $-L^1-R^1$ 形成选自由 NH_2 、 $C(O)OCH_3$ 、 $C(O)OCH_2CH_3$ 、 $C(O)N(CH_2CH_3)_2$ 、 SO_2 -哌啶基和二氢噻吩-3(2H)-酮基组成的组的基团;式II的 R^2 选自由H、Cl、 CH_3 和 $C(O)OCH_2CH_3$ 组成的组;式II的 R^3 选自由H、 CH_3 、 CH_2CH_3 和噻吩基组成的组;式II的 R^4 选自由H和 C_{1-3} 烷基组成的组。
- [0168] 在一些实施方案中,式II的化合物选自由以下或其药学上可接受的盐组成的组:



- [0170] 本申请还提供了包含以下的组合物:式III的化合物或其药学上可接受的盐



[0172] 和一种或多种药学上可接受的载体,其中,====指单键或双键;环A与环B形成稠合环,环A选自自由5-6元环烷基、5-6元杂芳基和5-6元杂环烷基组成的组,其中,环A任选地被1个、2个或3个独立选择的 R^A 基团取代; R^1 选自自由H、C(O)OC₁₋₃烷基、OC(O)C₁₋₃烷基、C(S)NH₂和=N-OH组成的组; R^{1a} 是H;当 R^{1a} 所连接的碳原子形成双键时, R^{1a} 不存在; R^2 选自自由H和卤素组成的组; R^{2a} 是H;当 R^{2a} 所连接的碳原子形成双键时, R^{2a} 不存在; R^3 选自自由H、卤素、C₁₋₃烷基、C₁₋₃羟烷基、NHC(O)C₁₋₃烷基和(C₁₋₃亚烷基)NHC₁₋₃烷基组成的组; R^{3a} 是C₁₋₃烷基;当 R^{3a} 所连接的碳原子形成双键时, R^{3a} 不存在; R^4 选自自由H和C₁₋₃烷基组成的组; R^{4a} 是H;当 R^{4a} 所连接的碳原子形成双键时, R^{4a} 不存在;每个 R^A 独立地选自自由=O、=S、CN、C₁₋₃烷基、C₁₋₃羟烷基、S(C₁₋₃烷基)和C(O)OH组成的组。

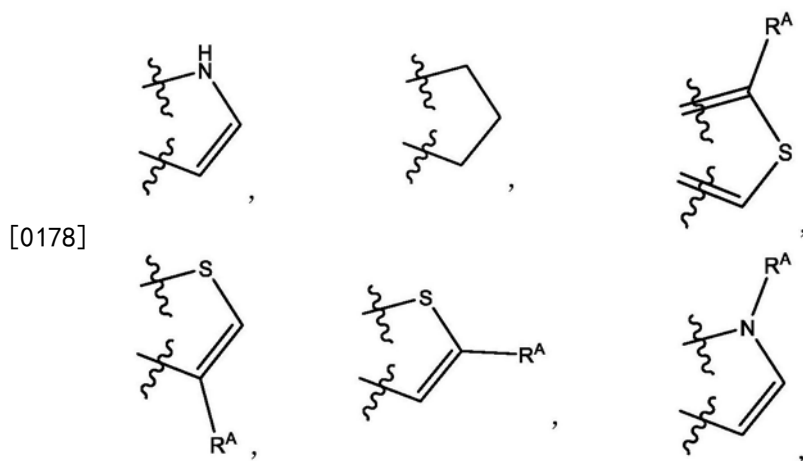
[0173] 在一些实施方案中,环A是5-6元杂芳基,任选地被1个、2个或3个独立选择的 R^A 基团取代。

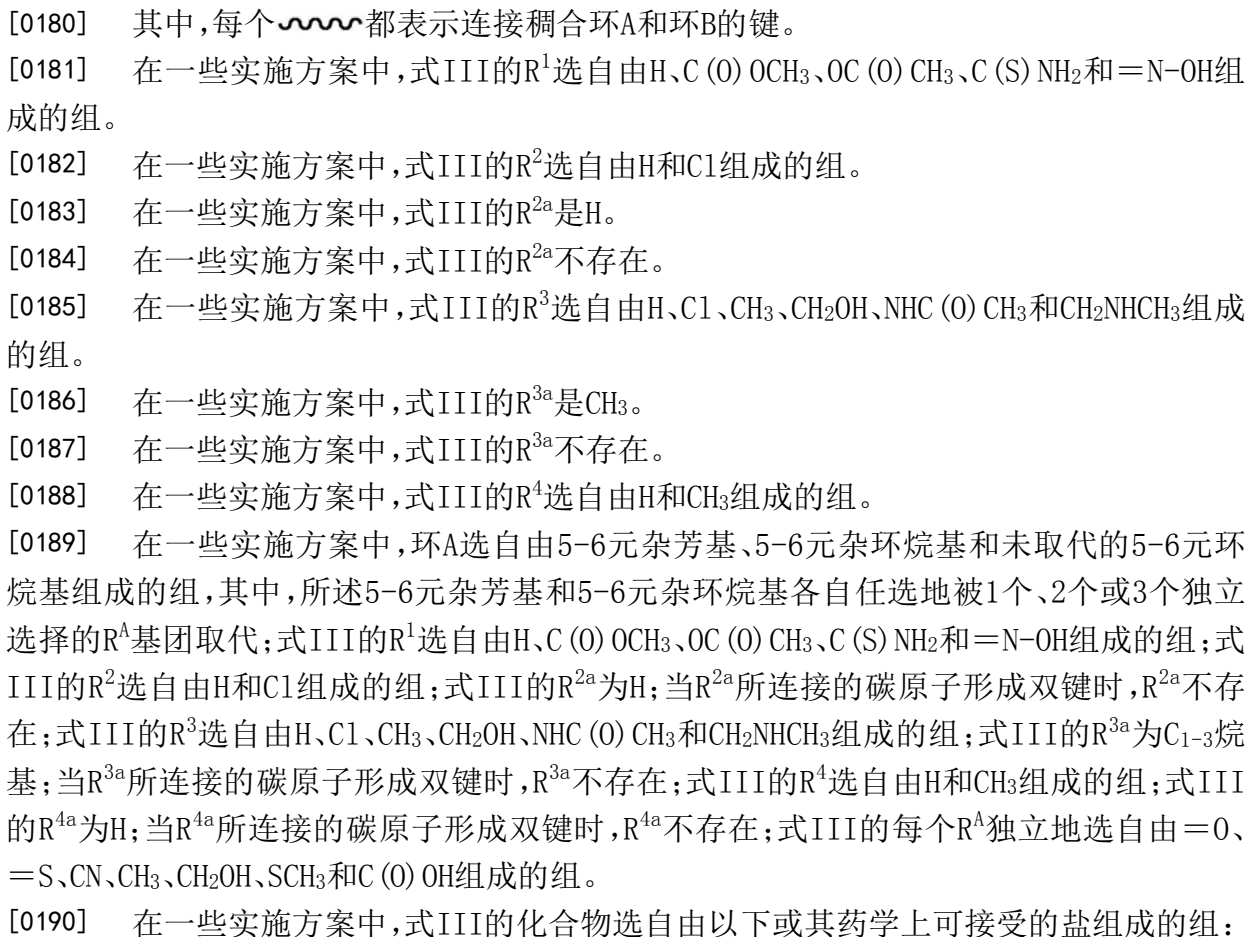
[0174] 在一些实施方案中,环A是5-6元杂环烷基,任选地被1个、2个或3个独立选择的 R^A 基团取代。

[0175] 在一些实施方案中,式III的每个 R^A 独立地选自自由=O、=S、CN、CH₃、CH₂OH、SCH₃和C(O)OH组成的组。

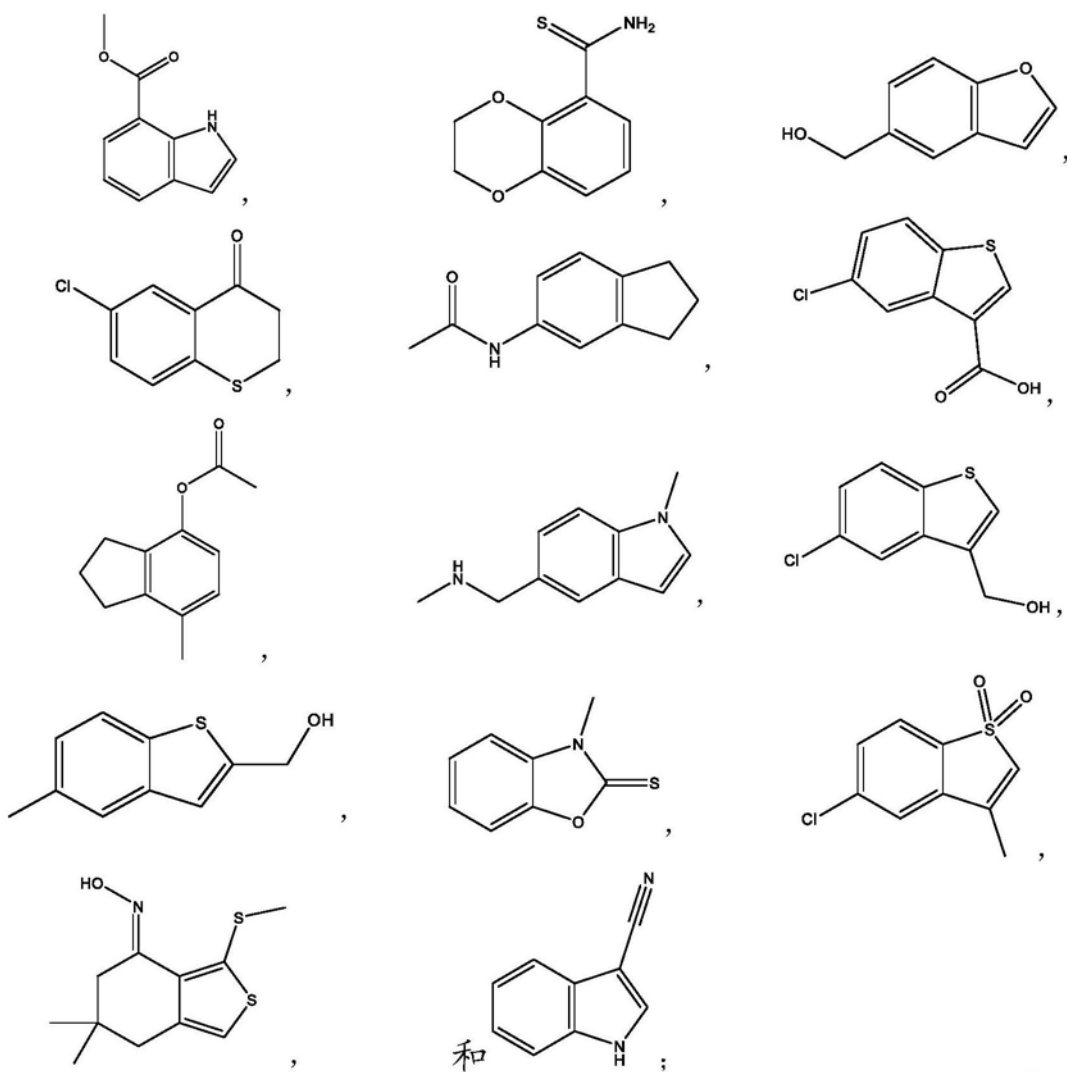
[0176] 在一些实施方案中,环A是未取代的5-6元环烷基。

[0177] 在一些实施方案中,环A选自自由以下组成的组:



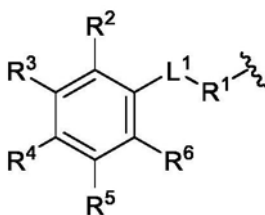


[0191]



[0192] 本申请还提供了一种组合物,其包含含有式IV的部分的化合物或其药学上可接受的盐,

[0193]



[0194]

IV

[0195] 和一种或多种药学上可接受的载体,其中,L¹选自由键、C₁₋₃亚烷基、-O-、-O (C₁₋₃亚烷基)-、C₁₋₃氰基亚烷基、-S-、-SO₂-、-S (C₁₋₃亚烷基)-和-C (O)-组成的组;R¹选自由亚苯基、5-6元亚杂芳基 (heteroarylene) 和5-6元亚杂环烷基 (heterocycloalkylene) 组成的组,其中,它们各自任选地被1个、2个或3个独立选择的R^A基团取代;R²选自由H、卤素、OH、CN、C₁₋₃烷基和C (O) OC₁₋₃烷基组成的组;R³选自由H、卤素、OH、NH₂、C (O) C₁₋₃烷基和C (S) C₁₋₃烷基组成的组;R⁴选自由H、卤素、OH、NH₂、CN、C₁₋₃烷基、C₁₋₃卤代烷基和O (C₁₋₃氰烷基) 组成的组;R⁵选自由H、卤素、OH、NH₂和C (O) C₁₋₃烷基组成的组;R⁶选自由H、卤素、OH、CN、C₁₋₃烷基和C (O) OC₁₋₃烷基组成的组;每个R^A独立地选自由OH、NH₂、CN、C₁₋₃烷基、C₁₋₃羟烷基、C (O) OH、C (O) C₁₋₃烷基和C

(O) N (C₁₋₃烷基)₂组成的组,其中,所述C₁₋₃烷基任选地被NH₂取代。

[0196] 在一些实施方案中,式IV的L¹选自由键、-CH₂-、-O-、-OCH₂-、-CH(CN)-、-S-、-SO₂-、-SCH₂-和-C(O)-组成的组。

[0197] 在一些实施方案中,式IV的R¹是亚苯基,其任选地被1个或2个独立选择的R^A基团取代。

[0198] 在一些实施方案中,式IV的每个R^A独立地选自由OH、NH₂、CN、CH₃、CH₂OH、CH₂CH₂NH₂、C(O)OH、C(O)CH₃和C(O)N(CH₃)₂组成的组。

[0199] 在一些实施方案中,式IV的R²选自由H、Cl、CN、CH₃和C(O)OCH₃组成的组。

[0200] 在一些实施方案中,式IV的R³选自由H、F、Cl、NH₂、C(O)CH₃和C(S)CH₃组成的组。

[0201] 在一些实施方案中,式IV的R⁴选自由H、Cl、NH₂、CN、CH₃、CF₃和OCH₃CN组成的组。

[0202] 在一些实施方案中,式IV的R⁵选自由H、F、Cl、NH₂和C(O)CH₃组成的组。

[0203] 在一些实施方案中,式IV的R⁶选自由H、Cl、CN、CH₃和C(O)OCH₃组成的组。

[0204] 在一些实施方案中,式IV的L¹选自由键、-CH₂-、-O-、-OCH₂-、-CH(CN)-、-S-、-SO₂-、-SCH₂-和-C(O)-组成的组;式IV的R¹为亚苯基,其任选地被1个或2个独立选择的R^A基团取代;式IV的每个R^A独立地选自由OH、NH₂、CN、CH₃、CH₂OH、CH₂CH₂NH₂、C(O)OH、C(O)CH₃和C(O)N(CH₃)₂组成的组;式IV的R²选自由H、Cl、CN、CH₃和C(O)OCH₃组成的组;式IV的R³选自由H、F、Cl、NH₂、C(O)CH₃和C(S)CH₃组成的组;式IV的R⁴选自由H、Cl、NH₂、CN、CH₃、CF₃和OCH₃CN组成的组;式IV的R⁵选自由H、F、Cl、NH₂和C(O)CH₃组成的组;式IV的R⁶选自由H、Cl、CN、CH₃和C(O)OCH₃组成的组。

[0205] 当用作药物时,本文提供的组合物可以以药物组合物的形式施用。这些组合物可以如本文或其他文献所述进行制备,并且可以通过各种途径施用,这取决于是否需要局部或全身治疗以及要治疗的区域。可以局部(包括经皮、表皮、眼部和粘膜(包括鼻内、阴道和直肠递送))、肺部(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)、口服或肠胃外施用。肠胃外施用包括静脉内、动脉内、皮下、腹膜内肌肉注射或腹膜内肌肉输注;或颅内(例如鞘内或脑室内)施用。肠胃外施用可以是单次推注剂量形式,或者可以是例如通过连续灌注泵。

[0206] 用于局部施用的药物组合物可以包括透皮贴剂、软膏、洗剂、乳膏、凝胶、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体和粉剂。常规药物载体;水性、粉末或油性基质;增稠剂等可能是必需的或期望的。

[0207] 还提供了包含作为活性成分的本文提供的化合物(例如,式I-III的化合物或包含式IV部分的化合物)或其药学上可接受的盐与一种或多种药学上可接受的载体(例如赋形剂)的组合物。在制备本文提供的组合物时,活性成分通常与赋形剂混合,被赋形剂稀释或封装在例如胶囊、小袋、纸或其他容器的形式的这种载体中。当赋形剂用作稀释剂时,它可以是固体、半固体或液体材料,它们充当活性成分的媒介物、载体或介质。因此,所述组合物可以是片剂、丸剂、粉剂、锭剂、小袋、扁囊剂、酏剂、混悬剂、乳剂、溶液、糖浆、气雾剂(作为固体或液体介质)、软膏、软凝胶胶囊和硬凝胶胶囊、栓剂、无菌注射液和无菌包装粉末的形式。

[0208] 合适的赋形剂的例子包括但不限于乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯胶、磷酸钙、藻酸盐、黄芪胶、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、

水、糖浆和甲基纤维素。所述组合物可以另外包括但不限于润滑剂,例如滑石、硬脂酸镁和矿物油;润湿剂;乳化剂和悬浮剂;防腐剂,例如甲基苯甲酸酯和丙基羟基苯甲酸酯;甜味剂;调味剂或其组合。

[0209] 所述活性成分可以在宽剂量范围内有效,并且通常以治疗有效量施用。然而,应理解,通常将由医师根据相关情况(包括待治疗的病状;选择的施用途径;施用的实际化合物或组合物;个体受试者的年龄、体重和反应;受试者症状的严重程度等)确定实际施用的化合物和/或组合物的量。

[0210] 在本说明书的不同地方,描述了二价连接取代基。具体意图是每个二价连接取代基包括正向形式和反向形式的连接取代基。例如, $-(NR(CR'R'))_n-$ 包括 $-(NR(CR'R'))_n-$ 和 $-(CR'R')_nNR-$ 。如果该结构明确需要连接基团,则为该基团列出的马库什变量应被理解为连接基团。

[0211] 如本文所用,短语“任选地被取代”是指未被取代或被取代。如本文所用,术语“取代的”是指氢原子被去除并被取代基取代。应当理解,在给定原子上的取代受化合价的限制。

[0212] 在所有定义中,术语“ C_{n-m} ”表示包括端点的范围,其中 n 和 m 为整数并表示碳数。实例包括 C_{1-4} 、 C_{1-6} 等。

[0213] 如本文所用,单独使用或与其他术语(例如氰基亚烷基)组合使用的术语“ C_{n-m} 亚烷基”是指具有 n 至 m 个碳的二价烷基连接基团。亚烷基基团的实例包括但不限于亚甲基、乙烯-1,2-二酰基(ethan-1,2-diyl)、丙烯-1,3-二酰基(propan-1,3-diyl)、丙烯-1,2-二酰基等。在一些实施方案中,亚烷基部分包含1个至3个碳原子或1个至2个碳原子。

[0214] 如本文所用,术语“ C_{n-m} 氰基亚烷基”是指具有 n 至 m 个碳的二价烷基连接基团,其中,所述烷基连接基团被一个或多个氰基(即, $-CN$)基团取代。在一些实施方案中,氰基亚烷基含有1个氰基。

[0215] 如本文所用,单独使用或与其他术语组合使用的术语“ C_{n-m} 烷基”是指具有 n 个至 m 个碳的可以是直链或支链的饱和烃基基团。烷基部分的实例包括但不限于化学基团,例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基;较高级的同系物,例如2-甲基-1-丁基、正戊基、3-戊基、正己基、1,2,2-三甲基丙基等。在一些实施方案中,烷基包含1个至3个碳原子或1个至2个碳原子。

[0216] 如本文所用,“卤素”是指F、Cl、Br或I。在一些实施方案中,卤素是F、Cl或Br。在一些实施方案中,卤素为F或Cl。

[0217] 如本文所用,单独使用或与其他术语组合使用的术语“ C_{n-m} 卤代烷基”是指具有一个卤原子至 $2s+1$ 个卤原子(其可以相同或不同)的烷基基团,其中“ s ”是烷基中的碳原子数,其中,烷基基团具有 n 个至 m 个碳原子。在一些实施方案中,卤代烷基基团包含1个至3个碳原子或1个至2个碳原子。在一些实施方案中,卤代烷基基团含有1个卤代基团。

[0218] 如本文所用,单独使用或与其他术语组合使用的术语“ C_{n-m} 羟烷基”是指具有一个羟基(即 $-OH$)至 $2s+1$ 个羟基的烷基基团,其中“ s ”为烷基中的碳原子数,其中,烷基基团具有 n 个至 m 个碳原子。在一些实施方案中,羟烷基基团包含1个至3个碳原子或1个至2个碳原子。在一些实施方案中,羟烷基基团含有1个羟基基团。

[0219] 如本文所用,单独使用或与其他术语组合使用的术语“ C_{n-m} 氰烷基”是指具有一个

氰基基团(即-CN)至 $2s+1$ 个氰基基团的烷基基团,其中“s”为烷基基团中的碳原子数,其中烷基基团具有n个至m个碳原子。在一些实施方案中,氰烷基基团包含1个至3个碳原子或1个至2个碳原子。在一些实施方案中,氰烷基基团含有1个氰基。

[0220] 如本文所用,术语“二(C_{n-m} -烷基)氨基”是指式-N(烷基)₂的基团,其中两个烷基基团各自独立地具有n个至m个碳原子。在一些实施方案中,每个烷基基团独立地具有1-3个碳原子或1-2个碳原子。

[0221] 如本文所用,“环烷基”是指包括成环的烷基和/或烯基基团的非芳族环烷基基团。环烷基基团可包括单环或多环(例如具有2、3或4个稠合环)基团和螺环。环烷基基团可具有3、4、5或6个成环碳(即 C_{3-6} 环烷基)。环烷基基团的成环碳原子可任选地被氧代或硫代(例如,=O或=S)取代。环烷基基团的实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基等。在一些实施方案中,环烷基具有3-6个成环碳原子(即, C_{3-6} 环烷基基团)。

[0222] 如本文所用,术语“杂芳基”是指具有至少一个选自硫、氧和氮的杂原子环成员的芳族单环或多环杂环。在一些实施方案中,所述杂芳基环具有1、2、3或4个独立地选自氮、硫和氧的杂原子环成员。在一些实施方案中,所述杂芳基具有5-6个环原子和1、2、3或4个独立地选自氮、硫和氧的杂原子环成员。示例性的五元环杂芳基包括但不限于噻吩基、呋喃基、吡咯基、咪唑基、噻唑基、恶唑基、吡唑基、异噻唑基、异恶唑基、1,2,3-三唑基、四唑基、1,2,3-噻二唑基、1,2,3-恶二唑基、1,2,4-三唑基、1,2,4-噻二唑基、1,2,4-恶二唑基、1,3,4-三唑基、1,3,4-噻二唑基和1,3,4-恶二唑基。示例性的六元环杂芳基包括但不限于吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、三嗪基和哒嗪基。

[0223] 如本文所用,术语“杂环烷基”是指具有1、2、3或4个成环杂原子(其选自O、N或S)的非芳族单环或多环杂环。包括在杂环烷基中的是单环4-、5-和6-元杂环烷基基团。示例性的杂环烷基基团包括吡喃基、氧杂环丁烷基、氮杂环丁烷基、吗啉基、硫代吗啉基、哌嗪基、四氢呋喃基、四氢噻吩基、哌啶基、吡咯烷基、异恶唑烷基、异噻唑烷基、吡唑烷基、恶唑烷基、噻唑烷基、咪唑烷基等。杂环烷基基团的成环碳原子和杂原子可以任选地被氧代或硫代取代(例如,=O、=S)。杂环烷基基团可以通过成环的碳原子或成环的杂原子被连接。在一些实施方案中,所述杂环烷基基团包含0至3个双键。在一些实施方案中,所述杂环烷基基团包含0至2个双键。杂环烷基的定义中还包括具有一个或多个与环烷基环稠合(即具有共同键)的芳族环的部分,例如哌啶、吗啉、氮杂茺等的苯并或噻吩基衍生物。包含稠合芳环的杂环烷基可以通过包括稠合芳环的成环原子的任何成环原子被连接。在一些实施方案中,杂环烷基具有5-6个环原子,具有1个或2个独立地选自氮、氧或硫的杂原子。

[0224] 如本文所用,术语“亚苯基”是指二价苯基连接基团。

[0225] 如本文所用,术语“亚杂芳基”是指二价杂芳基连接基团。在一些实施方案中,亚杂芳基具有5-6个环原子。

[0226] 如本文所用,术语“亚杂环烷基”是指二价杂环烷基连接基团。在一些实施方案中,亚杂环烷基具有5-6个环原子。

[0227] 在某些地方,定义或实施方案是指特定的环(例如,吡丁啶环、吡啶环等)。除非另有说明,否则这些环可以连接至任何环成员,只要不超过原子的化合价即可。例如,吡丁啶环可以被连接在环的任何位置,而吡啶-3-基环被连接在3-位。

[0228] 如本文所用的术语“化合物”是指包括所描述结构的所有立体异构体、几何异构

体、互变异构体和同位素。除非另有说明,本文通过名称或结构标识为一种特定互变异构形式的化合物旨在包括其他互变异构形式。

[0229] 本文提供的化合物还包括互变异构形式。互变异构形式由单键与相邻双键的交换以及伴随的质子迁移产生。互变异构形式包括质子移变互变异构体,其是具有相同经验式和总电荷的异构质子化状态。典型的质子移变互变异构体包括酮-烯醇对、酰胺-亚胺酸对、内酰胺-内酰亚胺对、烯胺-亚胺对以及环形式,其中,质子可占据杂环系统的两个或多个位置,例如1H-和3H-咪唑、1H-,2H-和4H-1,2,4-三唑、1H-和2H-异吡啶以及1H-和2H-吡唑。互变异构形式可以通过适当的取代处于平衡,或被空间锁定成一种形式。

[0230] 本文所用的术语“药学上可接受的”是指在合理的医学判断范围内适合与人和动物的组织接触而没有过度毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症的与合理的利益/风险比相称的那些化合物、组合物和/或剂型。

[0231] 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为其盐形式而被修饰。药学上可接受的盐的实例包括但不限于,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性盐或有机盐等等。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无毒盐。本申请的药学上可接受的盐可以通过常规化学方法由含有碱性或酸性部分的母体化合物合成。通常,可以通过使这些化合物的游离酸或碱形式与化学计算量的合适碱或酸在水中或在有机溶剂中或在两者的混合物中反应来制备这些盐。通常,非水介质例如醚、乙酸乙酯、醇(例如甲醇、乙醇、异丙醇或丁醇)或乙腈(MeCN)是优选的。合适的盐的清单可见于Remington's Pharmaceutical Sciences,17th ed.,Mack Publishing Company,Easton,Pa.,1985,p.1418 and Journal of Pharmaceutical Science,66,2(1977)。制备盐形式的常规方法描述于例如Handbook of Pharmaceutical Salts:Properties,Selection,and Use,Wiley-VCH,2002。

[0232] 使用方法

[0233] 本申请进一步提供了一种致敏和/或活化BAX的促凋亡活性的方法。在一些实施方案中,该方法包括使包含BAX的细胞样品或组织样品与本文提供的组合物(例如,包含式I-III的化合物或包含式IV部分的化合物或其药学上可接受的盐的组合物)接触。如本文所用,术语“接触”是指在体外系统中将指定组分聚集在一起。例如,使BAX多肽与本文提供的组合物“接触”包括将本发明的化合物引入到包含细胞或纯化的制剂的样品(例如细胞样品或组织样品)中,所述细胞或纯化的制剂含有BAX多肽。在一些实施方案中,包含式I-III的化合物或包含式IV部分的化合物的组合物在细胞样品或组织样品中致敏通过另一种促凋亡剂活化的BAX多肽的促凋亡活性(即,增强由促凋亡剂诱导的BAX多肽的促凋亡活性)。在这样的实施方案中,本文所述的组合物本身可以活化或可以不活化BAX多肽的促凋亡活性。在一些实施方案中,包含式I-III的化合物或包含式IV部分的化合物的组合物在细胞样品或组织样品中活化BAX多肽的促凋亡活性。在这样的实施方案中,可以在另一种促凋亡剂存在或不存在的条件下施用所述组合物。

[0234] 在一些实施方案中,本申请提供了一种在受试者中致敏和/或活化BAX的促凋亡活性的方法。在一些实施方案中,所述方法包括向受试者施用本文提供的化合物或组合物。在一些实施方案中,本文提供的化合物或组合物在受试者中致敏BAX的促凋亡活性的活化(例

如,当所述组合物与另一种促凋亡剂组合施用时)。在一些实施方案中,本文提供的化合物或组合物在受试者中活化BAX的促凋亡活性(例如,当在另一种促凋亡剂存在或不存在的情况下施用组合物时)。如本文所用,术语“受试者”是指任何动物,包括哺乳动物。受试者的实例包括但不限于,小鼠、大鼠、兔子、狗、猫、猪、牛、绵羊、马、灵长类动物和人。在一些实施方案中,受试者是人。在一些实施方案中,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的本文提供的组合物。如本文所用,短语“治疗有效量”是指引起研究人员、兽医、医生或其他临床医生在组织、系统、动物、个体或人体内寻求的生物学或医学反应的活性化合物或药剂的量。

[0235] 本申请进一步提供了一种治疗受试者的癌症的方法。在一些实施方案中,所述方法包括向需要这种治疗的受试者施用治疗有效量的本文提供的组合物。

[0236] 示例性癌症包括但不限于:乳腺癌、前列腺癌、淋巴瘤、皮肤癌、胰腺癌、结肠癌、黑色素瘤、恶性黑色素瘤、卵巢癌、脑癌、原发性脑癌、头颈癌、神经胶质瘤、胶质母细胞瘤、肝癌、膀胱癌、非小细胞肺癌、头颈恶性肿瘤、乳腺恶性肿瘤、卵巢恶性肿瘤、肺癌、小细胞肺癌、威尔姆斯氏肿瘤、宫颈癌、睾丸癌、膀胱恶性肿瘤、胰腺恶性肿瘤、胃癌、结肠恶性肿瘤、前列腺恶性肿瘤、泌尿生殖道癌、甲状腺癌、食道癌、骨髓瘤、多发性骨髓瘤、肾上腺癌、肾细胞癌、子宫内膜癌、肾上腺皮质癌、恶性胰腺胰岛素瘤、恶性类癌、绒毛膜癌、蕈样霉菌病、恶性高钙血症、宫颈增生、白血病、神经母细胞瘤、横纹肌肉瘤、卡波济氏肉瘤、真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、软组织肉瘤、骨源性肉瘤、原发性巨球蛋白血症和视网膜母细胞瘤。

[0237] 示例性白血病和淋巴瘤包括但不限于:红细胞白血病、急性巨核细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病(APML)、急性粒细胞白血病、急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、急性成淋巴细胞白血病(ALL)(例如B谱系ALL和T谱系ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性粒细胞白血病、幼淋巴细胞白血病(PLL)、毛细胞白血病(HLL)、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(WM)、非霍奇金淋巴瘤、周围性T细胞淋巴瘤、成人T细胞白血病/淋巴瘤(ATL)、皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)、大颗粒淋巴细胞白血病(LGF)、霍奇金病和里德-斯滕伯格病。

[0238] 在一些实施方案中,所述白血病选自由以下组成的组:急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、慢性粒细胞白血病、急性粒细胞白血病、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病和毛细胞白血病。

[0239] 在一些实施方案中,所述白血病选自由以下组成的组:急性成淋巴细胞白血病、急性骨髓性白血病、慢性成淋巴细胞白血病和慢性骨髓性白血病。

[0240] 本申请进一步提供了用于鉴定活化BAX多肽的促凋亡活性的化合物的方法。在一些实施例中,所述方法包括:

[0241] a) 在适合于活化BAX多肽的促凋亡活性的条件下,使所述包含氨基酸序列SEQ ID NO:1的BAX多肽的结合位点与化合物体外接触;以及

[0242] b) 确定所述化合物是否结合一个或多个氨基酸残基,所述氨基酸残基选自由以下组成的组:Ile80、Ala81、Ala82、Val83、Asp84、Thr85、Asp86、Ser87、Pro88、Val91、Phe116、Lys119、Leu120、Val121、Lys123、Ala124、Thr127、Leu132、Ile136;

[0243] 其中,所述BAX多肽的结合位点包含BAX多肽的 $\alpha 3$ - $\alpha 4$ 发夹和 $\alpha 5$ - $\alpha 6$ 发夹的连接。

[0244] 在一些实施方案中,所述确定步骤通过饱和转移差NMR、HSQC NMR、表面等离子体

共振、生物层干涉法或竞争性荧光偏振测定法进行。

[0245] 在一些实施方案中,所述化合物与BAX多肽的结合导致所述化合物的NMR谱的信号变化。

[0246] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括检测所述化合物对BAX多肽的活化。

[0247] 在一些实施方案中,所述检测步骤包括执行选自由以下组成的组的测定:检测BAX寡聚化、基于抗体的BAX构象检测、线粒体细胞色素c释放测定、脂质体释放测定、细胞死亡测定、线粒体或细胞形态测定、线粒体钙通量测定、线粒体跨膜定量测定和半胱天冬酶3活性或膜联蛋白V结合的定量。

[0248] 在一些实施方案中,所述化合物以<1mM,例如<750nM,<500nM,<250nM,<100nM,<50nM,<25nM,<10nM等的亲和力结合至所述结合位点。

[0249] 在一些实施方案中,本文提供的方法进一步包括向受试者、体外细胞样品、组织样品和/或器官样品施用一种或多种另外的治疗剂(例如,化学治疗剂)和/或执行一种或多种另外的医学技术(例如,放射疗法、外科手术等)。

[0250] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括施用选自由以下组成的组的一种或多种另外的治疗剂:诱导凋亡的试剂;多核苷酸(例如反义、核酶、siRNA);多肽(例如酶和抗体);生物模拟物(例如BH3模拟物);结合并抑制抗凋亡蛋白的试剂(例如,抑制抗凋亡BCL-2蛋白的试剂);生物碱;烷基化剂;抗肿瘤抗生素;抗代谢物;激素;铂化合物;单克隆或多克隆抗体(例如与抗癌药、毒素、防御素等偶联的抗体);毒素;放射性核素;生物反应调节剂(例如干扰素,例如IFN- α 等)和白介素(例如IL-2等);过继免疫治疗剂;造血生长因子;诱导肿瘤细胞分化的试剂(例如全反式视黄酸等);基因治疗试剂(例如反义治疗试剂和核苷酸);肿瘤疫苗;血管生成抑制剂;蛋白体抑制剂;NF κ B调节剂;抗CDK化合物;HDAC抑制剂等等。

[0251] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括施用一种或多种另外的治疗剂(例如,抑制抗凋亡BCL-2蛋白的试剂),所述治疗剂结合并抑制抗凋亡蛋白例如ABT-263、obatoclox、棉酚衍生物、IAP抑制剂和靶向抗凋亡蛋白(例如MCL-1 SAHB,BID SAHB,BAD SAHB,BIM SAHB等)的固定肽。

[0252] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括施用一种或多种另外的治疗剂(例如,促凋亡剂),所述另外的治疗剂结合并活化BAX(例如,BIM SAHB_{A2})的促凋亡活性。结合并活化BAX的促凋亡活性的化合物的其他实例可以在例如美国专利号9,303,024;美国专利公开号US 2016-0171150;Gavathiotis et al,Nat.Chem.Biol.2012,8:639-645;Brahmbhatt et al,Biochem.J.2016,473:1073-1083;Xin et al,Nat.Comm.2014,5:4935;和Zhao et al,Mol.Cell.Biol.2014,34:1198-1207中找到;其每个的公开内容通过引用整体并入本文中。

[0253] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括施用诱导或刺激细胞凋亡的一种或多种另外的治疗剂。诱导细胞凋亡的试剂包括但不限于,放射线(例如,X射线、 γ 射线、UV);激酶抑制剂(例如表皮生长因子受体(EGFR)激酶抑制剂、血管生长因子受体(VGFR)激酶抑制剂、成纤维细胞生长因子受体(FGFR)激酶抑制剂、血小板衍生生长因子受体(PDGFR)激酶抑制剂和Bcr-Abl激酶抑制剂,例如GLEEVEC);反义分子;抗体(例如HERCEPTIN、RITUXAN、ZEVALIN和AVASTIN);抗雌激素(例如雷洛昔芬和他莫昔芬);抗雄激素(例如氟他胺、比卡鲁胺、非那雄胺、氨基谷氨酰胺、酮康唑和皮质类固醇);环氧合酶2(COX-2)抑制剂(例如塞来

昔布、美洛昔康、NS-398和非甾体抗炎药 (NSAIDs)) ; 抗炎药 (例如, 保泰松、DECADRON、DELTASONE、地塞米松、地塞米松强溶胶、DEXONE、HEXADROL、羟氯喹、METICORTEN、ORADEXON、ORASONE、羟基保泰松、PEDIAPRED、苯基丁氮酮、PLAQUENIL、泼尼松龙、强的松、PRELONE和TANDEARIL) ; 和癌症化疗药物 (例如, 伊立替康 (CAMPTOSAR)、CPT-11、氟达拉滨 (FLUDARA)、达卡巴嗪 (DTIC)、地塞米松、米托蒽醌、MYLOTARG、VP-16, 顺铂、卡铂、奥沙利铂、5-FU、阿霉素, 吉西他滨、硼替佐米, 吉非替尼, 贝伐单抗, TAXOTERE或TAXOL) ; 细胞信号分子; 神经酰胺和细胞因子和星形孢菌素等。

[0254] 在一些实施方案中, 所述受试者是需要其的受试者 (例如, 被鉴定为需要这种治疗的受试者, 例如患有或有可能患有本文所提供的一种或多种疾病的受试者)。鉴定需要这种治疗的受试者可以由受试者或卫生保健专业人员判断, 并且可以是主观的 (例如, 意见) 或客观的 (例如, 可通过测试或诊断方法测量的)。

[0255] 在一些实施方案中, 受试者先前未经历化学疗法。在一些实施方案中, 受试者没有患有血小板减少症, 或没有患血小板减少症的风险, 例如由于针对癌症或淋巴瘤的治疗由化学疗法、放射疗法或骨髓移植所导致血小板减少症。

[0256] 在一些实施方案中, 在施用本文提供的组合物的同时、在施用本文提供的组合物之前或之后施用另外的治疗剂。在一些实施方案中, 本文提供的组合物在外科手术过程中施用。在一些实施方案中, 本文提供的组合物在外科手术过程中与另外的治疗剂组合施用。

[0257] 如本文所用, 术语“治疗”是指以下的一种或多种: (1) 抑制疾病; 例如, 抑制正在经历或表现出疾病、病症或障碍的病理或症状的个体中的疾病、病症或障碍 (即, 阻止病理和/或症状的进一步发展); (2) 改善疾病; 例如, 改善正在经历或表现出疾病、病症或障碍的病理或症状的个体中的疾病、病症或障碍 (即逆转病理和/或症状), 例如降低疾病的严重程度或减轻或缓解疾病的一种或多种症状。在一些实施方案中, 此类术语是指在施用一种或多种疗法后的以下一个、两个、三个或更多个结果: (1) 癌细胞群的稳定、减少或消除, (2) 延长癌症缓解时间, (3) 降低癌症的复发率, (4) 癌症复发时间的延长, (6) 患者生存率的提高。

[0258] 实施例

[0259] 将通过具体实施例更详细地描述本发明。提供以下实施例用于说明性目的, 不旨在以任何方式限制本发明。本领域技术人员将容易地认识到可以改变或修改各种非关键参数以产生基本相同的结果。

[0260] 实施例1. 肽合成

[0261] 如先前所述使用Fmoc化学进行固态肽合成 (参见例如Bird et al, Methods Enzymol. 2008, 446:369-386; Bird et al, Curr. Protoc. Chem. Biol. 2011, 3:99-117)。将 ν MIA ($^{131}\text{EALKKALRRHRFLWQRRQRA}^{150}-\text{CONH}_2$) (SEQ ID NO:2) 和BIM SAHB A_2 ($^{145}\text{Ac-EIWIAQELRXIGDXFNAYYA}^{164}-\text{CONH}_2$, X=装订氨基酸) (SEQ ID NO:3) 肽用乙酰基或荧光素异硫氰酸酯 (FITC)- β -丙氨酸进行N末端衍生以用于NMR和生化实验中的指示应用。肽通过LC-MS被纯化至>95%纯度, 并通过氨基酸分析被定量。冻干的肽在100%DMSO或DMSO- d_6 中重构并稀释到指定的含水缓冲液中以供实验使用。

[0262] 实施例2. 全长BAX的表达和纯化

[0263] 使用pTYB1载体在BL21 (DE3) 大肠杆菌中表达重组全长BAX (参见例如Suzuki et al, Cell, 2000, 103:645-654; Gavathiotis et al, Nature, 2008, 455:1076-1081)。将细胞

沉淀重悬于pH 7.2的20mM Tris、250mM NaCl中,并通过两次穿过冷却至4℃的微流化仪(Microfluidics)被裂解。裂解物通过以20,000rpm离心被澄清。通过使用几丁质树脂(New England Biolabs)在4℃下进行批次亲和结合来纯化BAX,然后将其加载至重力流柱中进行洗涤和洗脱。通过在4℃下在50mM二硫苏糖醇中温育36小时来切割内含肽-几丁质结合域标签。使用FPLC系统(GE Healthcare Life Sciences)通过尺寸排阻色谱法(Superdex 75 10/300;20mM磷酸钾,pH6.2)分离纯蛋白。

[0264] 实施例3.通过STD-NMR筛选片段

[0265] Ro3多样性化合物文库购自Maybridge,由¹H-NMR表征,然后被分成10个一组,以使光谱重叠最小化。四十种化合物在筛选之前被排除,作为鉴定行为不良的化合物的质量控制措施的部分。将片段池添加到5μM未标记的全长人BAX溶液(在20mM磷酸钾缓冲液中,pH6.2,10% (v/v) D₂O中)中,最终化合物浓度为300μM。使用液体处理机器人(Gilson)将样品混合并加载到5mm NMR管中。STD-NMR测量是在装有氦冷却的低温探头的Varian Inova 500-MHz光谱仪上在25℃进行的。通过一系列的50ms高斯脉冲,持续总共3秒钟,可以实现蛋白质的低功率饱和;以0.8ppm进行共振辐射,以30ppm进行非共振辐射。标准激发雕刻用于溶剂抑制。每个实验进行14分钟。通过比较每个池的共振STD谱和非共振STD谱对结果进行初步分析以确定装订物(binder)的存在,96个池中有37个池显示蛋白质相互作用的证据。随后,使用内部显示分析和显示软件对每个池进行分析,以鉴定单个装订物,从而允许精确校准共振谱和非共振谱。然后将池中产生阳性STD信号的化合物再分为三个一组,以进行重新测试。在两个实验中均显示STD的那些化合物从Maybridge重新订购,并作为单一化合物以及在竞争性结合实验中被测试。

[0266] 为了获得用于配体筛选的足够数量和稳定的重组全长BAX,将生产方法规模扩大到48升的总培养量,并使用温度受控(设定为4℃)微流化器对细菌沉淀进行顺序裂解,然后将裂解物与几丁质亲和树脂批次结合,进行二硫苏糖醇(DTT)洗脱,并通过尺寸排阻色谱法进行纯化。使用这种方法,产生用于初步筛选的21.6mg浓度为0.64mg/mL的BAX蛋白,代表总产量为每升细菌培养物0.45mg纯全长蛋白。如上所述,然后通过饱和转移差异(STD)NMR进行配体筛选以鉴定与BAX相互作用的分子。STD-NMR测量了目标蛋白质的选择性辐照后配体的¹H-NMR信号变化,其中从蛋白质到配体的磁化转移导致反映配体-蛋白质相互作用的信号减少。

[0267] 1000种化合物的Maybridge Ro3文库用于BAX筛选。在分析的96个池中,有37个检测到STD阳性信号,代表86个单独的检索结果(hit),然后在三个池中重新筛选,最终产生了56个已确认的相互作用物(图1b)。订购了53种市售化合物,它们作为单项物通过STD被重新测试,并被确认为BAX相互作用片段(BIF1-53)。表1中显示了从STD NMR和脂质体释放测定获得的结果。活性化合物BIF-1至BIF-53的结构示于表2中。

[0268] 表1.

	STD-装订 物 (binder)	STD-NMR 竞争片段/肽		脂质体释放测定	
		vMIA	BIM SAHB _{A2}	致敏剂	活化剂
BIF-1	+	+	-	-	-
BIF-2	+	-	+	-	-
BIF-3	+	-	-	-	-
BIF-4	+	-	-	-	-
BIF-5	+	-	-	-	-
BIF-6	+	+	-	-	-
BIF-7	+	-	-	-	-
BIF-8	+	-	-	-	-
BIF-9	+	-	-	-	-
BIF-10	+	-	-	-	-
BIF-11	+	-	-	-	-
BIF-12	+	-	-	-	-
BIF-13	+	+	-	-	-
BIF-14	+	-	-	-	-
BIF-15	+	-	-	-	+
BIF-16	+	-	-	-	-
BIF-17	+	-	-	-	-
BIF-18	+	-	-	-	-
BIF-19	+	-	-	+	-
BIF-20	+	-	+	-	-
BIF-21	+	-	-	-	-
BIF-22	+	-	-	-	-
BIF-23	+	-	+	-	+
BIF-24	+	-	-	-	-
BIF-25	+	+	-	+	-
BIF-26	+	+	-	-	-
BIF-27	+	+	-	+	-
BIF-28	+	-	-	-	+
BIF-29	+	-	-	-	-
BIF-30	+	-	-	-	-
BIF-31	+	+	-	-	-
BIF-32	+	-	-	-	-
BIF-33	+	+	-	-	-
BIF-34	+	-	-	-	-
BIF-35	+	-	-	-	-
BIF-36	+	-	-	-	-
BIF-37	+	-	-	-	-
BIF-38	+	-	-	-	-
BIF-39	+	-	-	-	-

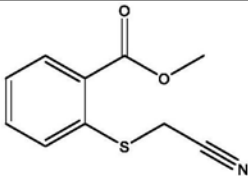
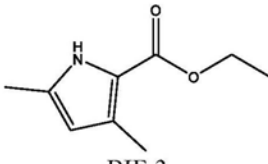
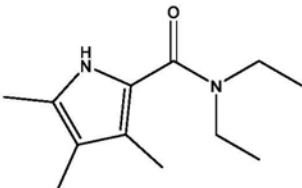
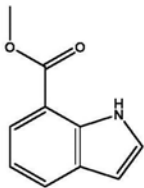
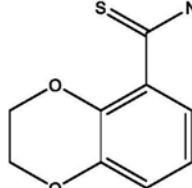
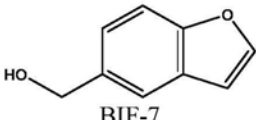
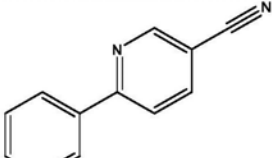
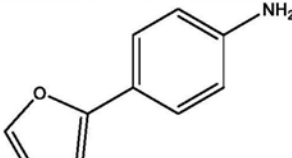
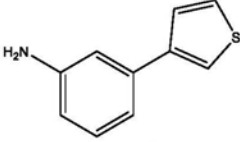
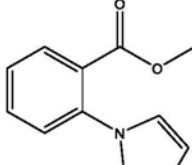
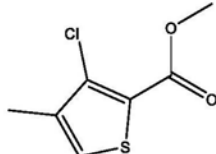
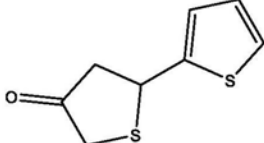
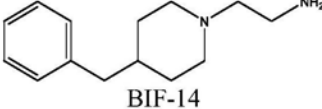
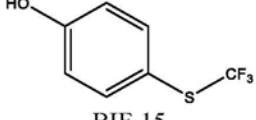
[0269]

[0270]

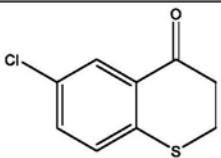
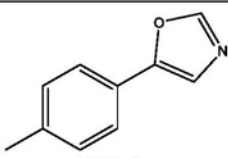
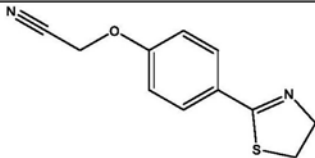
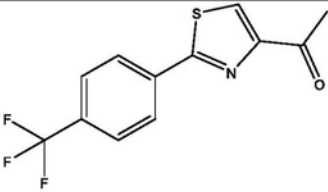
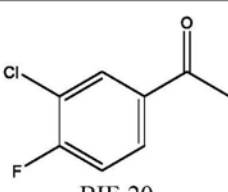
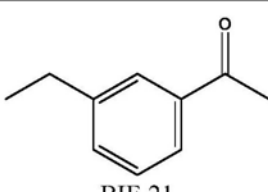
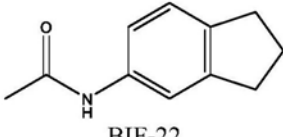
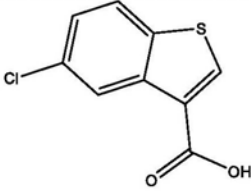
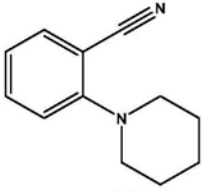
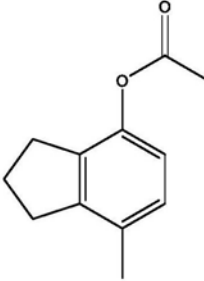
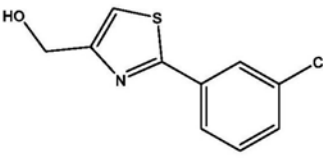
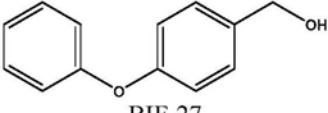
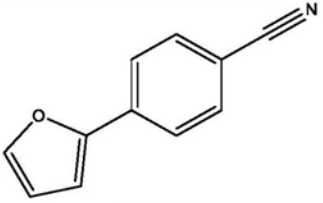
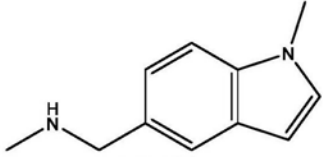
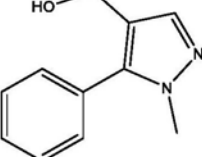
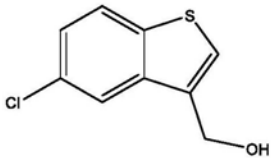
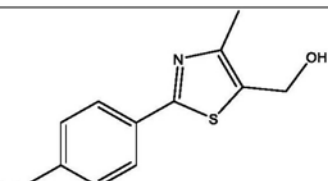
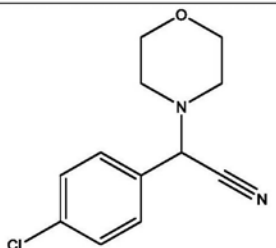
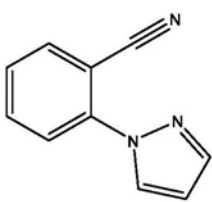
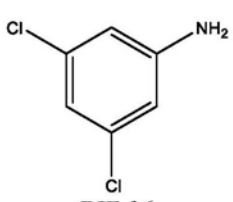
BIF-40	+	-	-	-	-
BIF-41	+	-	-	+	-
BIF-42	+	-	-	-	-
BIF-43	+	-	-	-	-
BIF-44	+	+	-	+	-
BIF-45	+	-	+	+	-
BIF-46	+	-	+	+	-
BIF-47	+	-	-	-	-
BIF-48	+	-	-	-	-
BIF-49	+	+	-	-	+
BIF-50	+	+	-	-	-
BIF-51	+	-	-	+	-
BIF-52	+	-	-	-	-
BIF-53	+	-	-	-	-
	53	11	5	8	4

[0271] 表2.

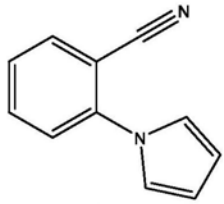
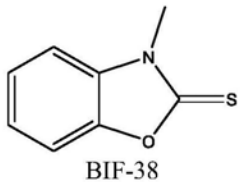
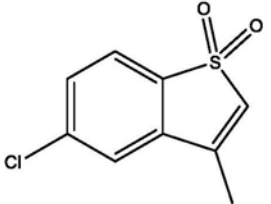
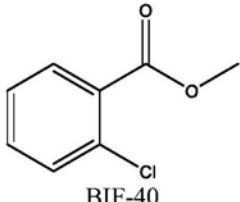
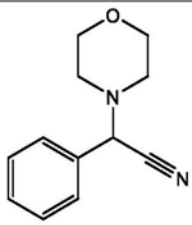
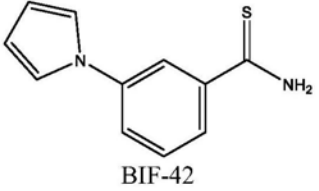
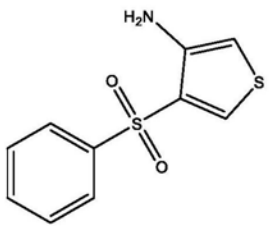
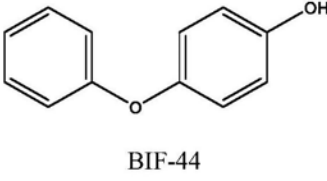
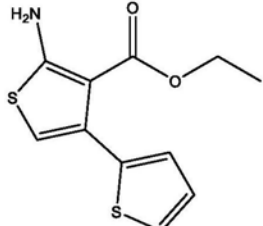
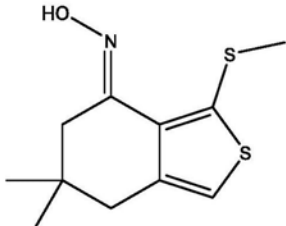
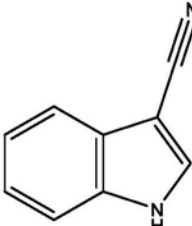
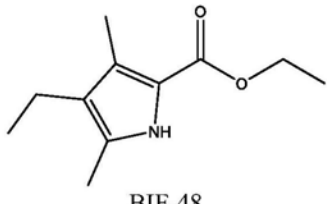
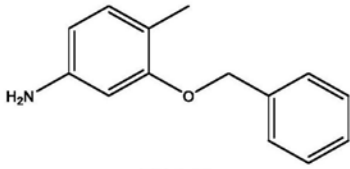
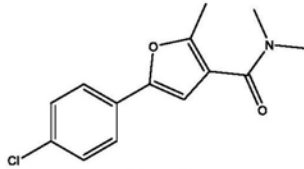
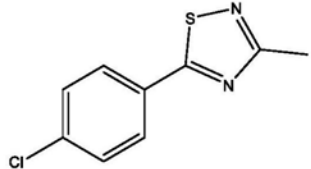
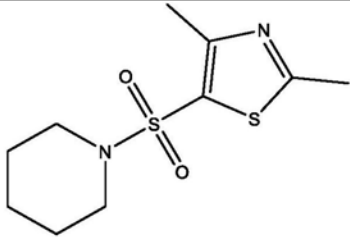
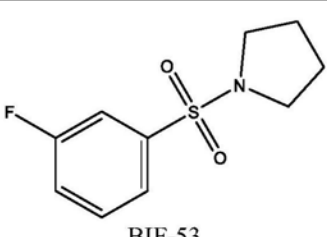
[0272]

 BIF-1	 BIF-2	 BIF-3
 BIF-4	 BIF-5	 BIF-6
 BIF-7	 BIF-8	 BIF-9
 BIF-10	 BIF-11	 BIF-12
 BIF-13	 BIF-14	 BIF-15

[0273]

 BIF-16	 BIF-17	 BIF-18
 BIF-19	 BIF-20	 BIF-21
 BIF-22	 BIF-23	 BIF-24
 BIF-25	 BIF-26	 BIF-27
 BIF-28	 BIF-29	 BIF-30
 BIF-31	 BIF-32	 BIF-33
 BIF-34	 BIF-35	 BIF-36

[0274]

 BIF-37	 BIF-38	 BIF-39
 BIF-40	 BIF-41	 BIF-42
 BIF-43	 BIF-44	 BIF-45
 BIF-46	 BIF-47	 BIF-48
 BIF-49	 BIF-50	 BIF-51
 BIF-52	 BIF-53	

[0275] 实施例4. 脂质体释放测定

[0276] 如前所述,通过脂质体挤出形成具有类似于线粒体外膜的脂质组成的大单层囊泡(LUV)(参见例如,Leshchiner et al,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,2013,110:E986-995; Lovell et al,Cell,2008,135:1074-1084)。简而言之,在氯仿中产生了包含48:28:10:10:4摩尔比的磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、二油酰磷脂酰丝氨酸和四油酰心磷脂(Avanti Polar Lipids)的脂质混合物。首先通过在氮气下蒸发溶剂,然后通过真空过夜,接着在氮气下于-80℃储存,形成脂质膜。脂质膜在1mL分析缓冲液(10mM HEPES,200mM

KCl, 1mM MgCl₂, pH 7.0) 中水合, 并与荧光团和猝灭剂对8-氨基萘-1,3,6-三磺酸 (ANTS, 12.5mM) 和对二甲苯双吡啶鎓溴化物 (DPX, 45mM) 混合。脂质体通过5次冷冻/解冻循环形成, 然后通过100nm聚碳酸酯膜被挤出, 并使用Sephacrose CL-2B尺寸排阻柱进行纯化。为了测量BAX活化, 在脂质体存在下在指定时间点将BAX (750nM) 添加到指定浓度的分子片段中, 然后添加BIM SAHBA₂ (750nM)。该测定在黑色不透明的384孔板 (每孔30μl) 中进行。在室温下, 使用分光荧光计 (Tecan Infinite M1000) 在355nm的激发波长、540nm的发射波长和20nm的带宽下监控ANTS/DPX随时间的释放。通过添加Triton X-100至终浓度为0.2% (v/v) 确定最大释放。根据下面的式1计算释放百分比, 其中F是观察到的释放, F₀和F₁₀₀分别是基线和最大荧光。

[0277] 式1.

$$[0278] \quad ((F-F_0)/(F_{100}-F_0)) \times 100$$

[0279] 为了确定任意已鉴定的BIF是否影响BAX的功能, 在上述脂质体释放测定中筛选了53种BIF, 上述脂质体释放测定被设计成鉴定 (1) 直接BAX活化剂和 (2) 由钉书钉式 (stapled) BIM BH3螺旋、BIM SAHBA₂ (aa 145-164) 诱导的直接BAX活化的致敏剂或抑制剂 (参见例如, Gavathiotis等, Nature, 2008, 455:1076-1081)。首先, 读取脂质体和单独化合物的基线荧光, 随后添加BAX以评估直接活化; 然后, 将BIM SAHBA₂添加到该混合物中, 并监测组合的效果, 并与化合物不存在的情况下BIM SAHBA₂和BAX的触发活性进行比较。使用这种测定形式, 鉴定了4种BAX介导的脂质体释放的直接活化剂和8种BIM SAHBA₂触发的BAX活化致敏剂, 如表1所示。直接活化剂曲线图以阳性对照BIM SAHBA₂肽举例说明, 该肽在存在单独的BAX的情况下诱导时间响应性脂质体释放 (图1c)。BIF-44的活性最显著地反映了新型致敏剂曲线图, 当作为单剂孵育时, BIF-44对BAX的影响最小, 但与BIM SAHBA₂结合使用时, BAX介导的最大释放从单独使用BIM SAHBA₂的50%跃升至组合使用的80%, 并显示出更快的动力学 (图1c)。

[0280] 另外, 发现BAX-介导的脂质体释放的BIF-44致敏与BIF-44和BIM SAHBA₂的添加顺序无关。无论是在添加BIM SAHBA₂的同时 (左)、在添加BIM SAHBA₂之前 (右) 还是添加BIM SAHBA₂之后 (中间) 添加BIF-44, 都达到了相同水平的BAX活化, 如图11所示。

[0281] 实施例5. 竞争性STD-NMR

[0282] 在20mM磷酸钾缓冲液 (pH6.2) 中, 将单独化合物添加到含有或不含5μM竞争肽的5μM BAX中。如上所述测量STD-NMR。相对于肽不存在的情况, 由vMIA或BIM SAHBA₂竞争的片段在肽存在的情况下显示出降低的饱和转移差。

[0283] 在表征直接BAX活化剂分子 (即BAM) 的现有工作中, 在BH3触发位点观察到BAM与BIM SAHBA₂之间的直接竞争 (参见例如Gavathiotis et al, Nat.Chem.Biol. 2012, 8:639-645)。在评估新鉴定的BAX致敏活性时, 令人惊讶地发现BIM SAHBA₂对STD信号没有影响 (图1d), 从而提高了对于BIF-44的替代相互作用机制的可能性。

[0284] 为了评估所观察的BIF-44活性的基于结构的可重复性和选择性, 评估了一系列BIF-44类似物的结合和功能特性。已发现BIF-44样二芳基醚 (其既可以用胺取代相同位置的羟基基团, 将羟基移至间位, 又可以用亚甲基基团取代醚键), 所有都保留了如STD NMR所评估的与vMIA竞争的BAX结合活性, 并表现出强大的BAX致敏活性 (图3a-3c)。相反, 第二个芳环中带有对羟基的二芳基醚或用羧酸酯基取代BIF-44羟基的二芳基醚几乎没有或没有

BAX结合或致敏活性(图3d-3e)。为结构活性关系提供证据的这些数据支持BIF-44在结合BAX、与vMIA竞争以及致敏BH3介导的BAX活化方面的作用的特异性。

[0285] 实施例6.CPMG NMR

[0286] 使用标准方法进行CPMG实验(例如,参见Hajduk et al, J. Am. Chem. Soc., 1997, 119:12257-12261)。NMR分析在pH6.2的20mM磷酸钾缓冲液中使用添加或没有添加BAX (5 μ M) 的浓度为300 μ M的BIF-44。施加了0.5毫秒的 τ (tau) 延迟(每个CPMG回波周期1毫秒), 回波周期数对应于500毫秒。如所报道的, 将激发雕刻用于溶剂抑制(参见例如Hwang et al, J. Magn. Reson. A, 1995, 112:275-279)。

[0287] 鉴于在脂质体释放和BIM SAHBA₂竞争性STD二级筛选中对于BIF-44均获得结果, 使用正交NMR测量证实了基于STD的BIF-44/BAX相互作用结果(图7a-图7b)。如上所述, 利用与配体相比蛋白质的较快T2弛豫时间的方法Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) -NMR被应用以监测与BAX孵育之后BIF-44信号的潜在变化。蛋白质-配体复合物的形成减少了配体的弛豫时间, 导致¹H-NMR信号的可测量降低(参见例如Dias et al, ACS Med. Chem. Lett. 2014, 5:23-28; Stockman et al, Prog. Nucl. Mag. Reson. Spectrosc. 2002, 41:187-231)。在BAX存在的情况下, 观察到信号急剧下降, 表明BIF-44结合(图7c)。此外, 已经证实, 当使用宽摩尔比10-175:1的BIF-44与BAX时, BIF-44对BAX介导的脂质体释放几乎没有或没有独立的触发作用(图2a), 但在BIM SAHBA₂存在的情况下, BIF-44剂量反应性增强了BAX介导的脂质体释放的动力学和最大水平(图2b)。

[0288] 实施例7. 荧光偏振(FP) 测定

[0289] 将FITC肽(25nM) 与重组全长BAX的系列稀释液在结合缓冲液(20mM磷酸钾, pH6.2) 中孵育。对于竞争性FP, 将FITC肽(25nM) 与固定浓度的BAX (250nM) 混合, 并与乙酰化肽或本文所述化合物的系列稀释液一起孵育。使用SpectraMax M5酶标仪在平衡状态下测量荧光偏振。使用Prism软件7 (GraphPad) 对剂量反应曲线进行非线性回归分析。

[0290] 最后, 使用竞争性荧光偏振测定法的替代方法, 如最初由STD证实的(图1d), 证实对于BAX的BIF-44接合不存在BIM SAHBA₂竞争。对于该实验, FITC-BIM SAHBA₂和BAX之间的直接相互作用被用作N末端乙酰化BIM SAHBA₂和BIF-44进行比较竞争的基础(图8a)。然而对于BAX结合, Ac-BIM SAHBA₂与FITC-BIM SAHBA₂进行剂量反应性竞争, 而BIF-44几乎没有影响(图2c)。因此, 在一系列的三级筛选实验中, 已确定BIF-44直接与BAX结合, 相互作用不被BIM SAHBA₂竞争, 并且剂量反应性地致敏BIM SAHBA₂触发的BAX介导的膜穿孔。

[0291] 还测试了所鉴定的BIF是否可以与抑制性vMIA肽竞争BAX相互作用。vMIA是一种与阻断BAX介导的细胞凋亡有关的巨细胞病毒蛋白, 其可确保宿主细胞在病毒感染和复制过程中存活(参见例如Arnoult et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2004, 101:7988-7993; Poncet et al, J. Biol. Chem. 2004, 279:22605-22614)。vMIA的BAX结合结构域通过与由螺旋 α 1/ α 2、 α 3/ α 4和 α 5/ α 6与C末端 α 9螺旋的一部分之间的柔性环形成的离散袋结合来实现其抑制作用, 从而通过稳定 α 3/ α 4发夹和 α 5/ α 6发夹来防止BAX-活化构象变化。出人意料的是, BIF-44与FITC-vMIA剂量反应性地竞争BAX相互作用, 如通过竞争荧光偏振分析(FPA) 评估的(图2d, 图8b)。竞争性STD NMR证实了这一发现, 其证明与vMIA肽共孵育后, BIF-44 STD信号减少(图2e)。

[0292] 实施例8.HSQC NMR

[0293] 如先前所述产生一致的¹⁵N标记的重组BAX (参见例如, Suzuki et al, Cell, 2000, 103:645-654; Gavathiotis et al, Nature, 2008, 455:1076-1081)。在pH 6.0的25mM磷酸钠、50mM NaCl溶液、10% (v/v) D₂O中制备具有指定片段摩尔比的蛋白质样品。在配备有低温探针的Bruker 600MHz NMR光谱仪上在25℃采集的相关¹H-¹⁵N HSQC光谱, 在Topspin (Bruker) 中进行处理, 并使用CcpNmr分析进行分析 (参见例如Vranken et al, Proteins, 2005, 59:687-696)。加权平均化学位移差按式2计算, 其中 $\Delta H / \Delta N$ 是对于指示交叉峰值¹H或¹⁵N的变化 (p.p.m.)。

[0294] 式2.

$$[0295] \quad \Delta = \sqrt{1/2 * ((\Delta H)^2 + (\Delta N/5)^2)}$$

[0296] 不存在条形表示没有化学位移差, 或存在重叠或未分配的脯氨酸或残基。如先前报道的那样, 应用BAX交叉峰分配 (参见例如, Suzuki et al, Cell, 2000, 103:645-654)。根据标准方法 (参见例如Marintchev et al, Methods Enzymol, 2007, 430:283-331), 基于所有残基上的平均化学位移加上标准偏差计算化学位移变化的显著性阈值。

[0297] 在BIF-44滴定后进行¹⁵N-BAX NMR, 并鉴定出一系列焦点的剂量响应性化学位移变化, 这些变化共定位于BAX上的与vMIA结合位点相关的非常区域 (图4a, 图9)。最突出的变化 (2SD) 位于 $\alpha 3$ - $\alpha 4$ 发夹和 $\alpha 5$ - $\alpha 6$ 发夹的连接处, 其并列形成结合界面 (图4b)。尤其有趣的是随着BIF-44剂量的增加而变得增强并定位于 $\alpha 5$ 和 $\alpha 6$ 的内部螺旋区域 (即BAX的疏水核) 以及 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 之间的相邻内部相互作用表面 (图4a-4b和图9) 上的更微妙变化 (1SD), 后一个螺旋是关键性的BH3基序, 必须变得外翻并暴露才能确保BAX活化和寡聚。因此, 这些NMR数据不仅证实了关于BIF-44与vMIA在非常相似的相互作用位点竞争的STD和FPA数据, 而且还表明BIF-44接合诱导通过 $\alpha 5$ - $\alpha 6$ 疏水核传递至 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 的内表面 (在其N端表面处的与BIM BH3介导的BAX直接活化相关的区域) 的结构回响 (参见例如Gavathiotis et al, Mol. Cell, 2010, 40:481-492; Gavathiotis et al, Nature, 2008, 455:1076-1081)。为了进一步建立BIF-44致敏活性的机制假说, 将HSQC NMR结果用于计算BIF-44/BAX复合物的对接结构。示出了BIF-44接合由疏水核心 $\alpha 5$ 和 $\alpha 6$ 螺旋以及 $\alpha 3$ 和 $\alpha 4$ 之间的环形成的深袋 (图4c)。

[0298] 实施例9. 分子对接

[0299] 然后进行分子动力学 (MD) 模拟, 其评估BIF-44存在或不存在时在对接位点处的蛋白质运动。计算表明, 涉及BAX的 $\alpha 1$ - $\alpha 2$ 区的构象柔韧性有特定的提高 (图4d-4e), 该位点远离BIF-44对接位置, 但受变构感应的影响, 如剂量反应性HSQC NMR结果所证明的 (图9)。图15显示了本文所述测量中鉴定出的BAX的新结合位点。

[0300] Schrodinger软件套件 (版本2016-2) 用于对接计算。使用OPLS3力场在MacroModel中生成分子BIF-44的构象 (参见例如, Harder et al, J. Chem. Theory Comput. 2016, 12:281-296)。使用Maestro的PrepWiz wizard中的默认参数分别制备Bax (PDB: 1F16) 的20个NMR构象中的每一个。对接受体网格 (半径1nm) 定义在Ala124 (具有最大HSQC位移的氨基酸) 的中心。然后使用Glide Extra Precision (XP) 模式将BIF-44对接在所有20个结构上 (参见例如Friesner et al, J. Med. Chem. 2006, 49:6177-6196)。然后手动检查得分最高的姿势是否与实验确定的复合物的HSQC位移保持一致。

[0301] 实施例10. 分子动力学模拟

[0302] 来自PDB ID 1F16的BAX的第一个NMR结构被用作MD计算的起始结构。使用Maestro

中蛋白质制备工作流程的默认参数来制备蛋白质(参见例如Sastry et al, J.Comput.Aided Mol.Des.2013,27:221-234)。质子化状态是使用Epik模块预测在pH7.0下发生的那些状态(参见例如Shelley et al, J.Comput.Aided Mol.Des.2007,21:681-691)。使用Desmond中的System Builder工作流程将蛋白质预先浸泡在TIP3P水分子的立方盒中(参见例如Jorgensen et al, The Journal of Chemical Physics, 1983, 79:926-935)。调整盒子的大小,使所有肽原子距离边界至少1nm。除去所有重叠的溶剂分子,用适当的抗衡离子电荷中和系统,然后加入150mM NaCl以模拟缓冲液条件。所有的MD模拟都是使用Desmond软件包执行的,并施加OPLS3力场以对所有相互作用进行建模。周期性边界条件始终保持不变。使用粒子网状Ewald方法计算远距离静电相互作用(参见例如Essmann et al, J.Chem.Phys.1995,103:8577-8593),并且范德华和短距离静电相互作用在0.9nm处被平滑地截短。使用Nose-Hoover恒温器维持300K的恒定系统温度(参见例如,Hoover et al, Phys.Rev.A.Gen.Phys.1985,31:1695-1697),并且使用Martina-Tobias-Klein方法将系统压力维持在1atm(参见例如Martyna et al, J.Chem.Phys.1994,101:4177-4189)。使用RESPA积分器对运动式进行积分(参见例如Humphreys et al, J.Phys.Chem., 1994, 98:6885-6892),键合和短程相互作用的2.0fs时间步长以及非键合相互作用的6.0fs时间步长超过0.9nm截止点。Desmond中的默认参数用于在模拟之前松弛系统(例如,参见Guo et al, Chem.Biol.Drug Des.2010,75:348-359)。按照此过程,进行了100ns的生产模拟,并以4ps的间隔保存配置。基于回转计算半径和RMSD判断所有模拟已收敛。

[0303] 实施例11. 氘交换质谱

[0304] 如先前所述进行氢-氘交换质谱法(HXMS)实验(参见例如Barclay et al, Mol.Cell, 2015, 57:873-886; Lee et al, Nat.Struct.Mol.Biol.2016, 23:600-607)。以18倍稀释将氘标记加入到每种BAX蛋白、分子、肽和/或抗体(BAX BH3, Abgent AP1302a; BAX 6A7, Santa Cruz Biotechnology sc-23959)混合物的预先平衡等份式样(15分钟, 室温)的D₂O缓冲液(10mM HEPES、200mM KCl、1mM MgCl₂, pD7.0)中进行氘标记。在指定时间点,通过添加等体积的淬灭缓冲液(0.8M氯化胍, 0.8%甲酸[v/v])淬灭标记反应。每个氘标记实验至少重复两次。通过在冰上用40μg胃蛋白酶和20μg因子XIII孵育5分钟来进行蛋白水解。然后如前所述对消化的样品进行处理和分析(参见例如Barclay et al, Mol.Cell, 2015, 57:873-886)。显示了所有评估条件共有的已鉴定肽的相对氘水平。确定每种肽的平均氘掺入的误差为+/-0.25Da或以下。通过从氘标记样品的平均质量中减去未氘代对照样品的平均质量,计算出每种肽的相对氘水平。使用DynamX 3.0 (Waters Corporation)处理所有质谱。氘水平未针对反向交换进行校正,因此被报告为相对水平(参见例如,Wales et al, Mass Spectrom.Rev.2006, 25:158-170)。

[0305] 为了评估BIF-44致敏机制是否源自α1-α2区的变构动员(涉及通过N端触发位点的BAX活化的BH3介导起始),在BIF-44存在或不存在的条件下,对BAX和脂质体的混合物进行如上所述的比较氢-氘交换质量(HXMS)光谱。HXMS通过测量主链酰胺氢的氘掺入来探测蛋白质结构(参见例如Engen et al, Anal.Chem.2009, 81:7870-7875)。当被稀释到氘缓冲液中时,柔性和/或暴露的蛋白质区域的主链氢会与氘快速交换,而埋藏结构域和/或包含涉及主链酰胺氢的氢键的区域(例如在α螺旋中)表现出减缓或抑制的氘交换(参见例如Laiken et al, Biochemistry, 1969, 8:519-526; Printz et al,

Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.1972,69:378-382;Shi et al,Anal.Chem.2013,85:11185-11188)。在此发现,与BAX一起孵育后,BIF-44诱导了对应于氨基酸46-74位的肽片段的局部去保护,该区域涵盖了BAX的 $\alpha 1$ - $\alpha 2$ 环的末端和BH3 $\alpha 2$ 螺旋(图5a-b)。为了进一步验证该发现的特异性,在观察到的BIF-44诱导的去保护作用上测试了结合BAX离散区域的两种抗体的影响。有理由认为,如果BIF-44特异性地动员或暴露BAX的BH3区,则BAX-BH3特异性抗体会迅速结合并抑制该区域进入氘交换。相反,结合至蛋白质的代替区域的抗体例如6A7,在BH3触发的BAX活化时变得暴露(aa 12-24)(参见例如,Gavathiotis et al,Nature,2008,455:1076-1081;Hsu et al,J.Biol.Chem.1997,272:13829-13834),将作为阴性对照。事实上,已发现BH3 Ab选择性抑制了观察到的由BIF-44促进的BAX BH3区域中的氘交换(图5c),而6A7抗体对BIF-44介导的去保护没有抑制作用(图5d)。综上所述,NMR、MD和HXMS结果在将在非典型相互作用位点的BIF-44结合与 $\alpha 1$ - $\alpha 2$ 区的变构动员联系在一起上是一致的,其中BH3诱导的构象变化引发BAX活化。

[0306] 为了研究BIF-44和BIM SAHB_{A2}在不同位点的接合如何协同作用以触发BAX活化,在BIF-44、BIM SAHB_{A2}或其组合存在的情况下,对BAX进行HXMS分析。BIM SAHB_{A2}和BIF-44的氢-氘交换图谱显著不同,这与它们的不同接合位点和不同作用机制一致。而BIM SAHB_{A2}直接与由 α -螺旋1和 α -螺旋6汇合形成的N端触发位点结合,并取代 $\alpha 1$ - $\alpha 2$ 环导致6A7表位暴露(参见例如Gavathiotis et al,Mol.Cell,2010,40:481-492;Barclay et al,Mol.Cell,2015,57:873-886)。BIF-44接合远端位点,引起位于远端 $\alpha 1$ - $\alpha 2$ 环和BH3 $\alpha 2$ 螺旋的局部变构变化(图6a)。联合处理显著增强了基本上整个 $\alpha 1$ - $\alpha 2$ 区的去保护作用(图6a-6b),这与BIF-44有效地致敏BIM SAHB_{A2}介导的BAX构象活化的能力一致。

[0307] 实施例12.线粒体细胞色素c释放测定

[0308] 分离来自Alb^{Cre}Bax^{f/f}Bak^{-/-}小鼠的肝线粒体(0.5mg/mL)并如所述进行释放测定(参见例如Walensky et al,Mol.Cell,2006,24:199-210)。简而言之,将线粒体与100nM BAX、250nM BIM SAHB_{A2}和/或指定浓度的BIF-44在室温下在实验缓冲液(200mM甘露醇、68mM蔗糖、10mM HEPES-KOH[pH7.4]、110mM KCl、1mM EDTA、蛋白酶抑制剂)中孵育45分钟(参见例如,Llambi et al,Mol.Cell,2011,44:517-531)。通过离心分离沉淀物和上清液级分,并使用比色ELISA(R&D Systems)对细胞色素c进行定量。根据式3计算释放到上清液中的细胞色素c的百分比(%细胞色素c释放),其中,细胞色素_{C_{sup}}和细胞色素_{C_{max}}分别代表在化合物处理样品或1%(v/v)Triton X-100处理样品的上清液中检测到的细胞色素c的量。

[0309] 式3.

[0310] %细胞色素c释放=[细胞色素_{C_{sup}}]/[细胞色素_{C_{max}}]*100

[0311] 最后,为了将这些有趣的机制发现与生理环境联系起来,测试了BIF-44致敏BAX介导的线粒体细胞凋亡的能力,如通过从处理过的小鼠肝线粒体中释放的细胞色素c测量的。如通过HXMS观察到的,与BAX N末端区域构象活化中的协同作用一致,BIF-44剂量反应性致敏的BIM SAHB_{A2}诱导触发BAX介导的细胞色素c从线粒体释放(图6c)。因此,NMR筛选鉴定了小分子BAX致敏剂,它通过新变构机制促进BH3介导的直接BAX活化的启动。

[0312] 实施例13.等温滴定热量法(ITC)

[0313] 通过向细胞中加入0.15mM重组BAX蛋白并在25℃下使用Affinity ITC(TA仪器)通过注射器注射2.0 μ L 1.0mM配体进行总共30次注射来测量结合亲和力。BAX和BIF-44溶液是

在20mM磷酸钾缓冲液 (pH6.2) 中制备的,最终浓度为2% (v/v) DMSO。在滴定之前,将样品在4℃下离心15分钟。ITC实验重复两次,并使用NanoAnalyze软件包 (TA仪器) 利用单结合位点模型分析数据,并根据式4计算热力学参数,其中 ΔG 、 ΔH 和 ΔS 是结合的自由能、焓和熵的变化。ITC测量结果如图10所示。

[0314] 式4.

[0315] $\Delta G = \Delta H - T \Delta S = -RT \ln K_B$

[0316] 实施例14. 基于NMR的小分子聚集体检测

[0317] 为了检测谱线加宽,获得标准的¹H-NMR光谱。通过如上所述进行的测量分子的CPMG NMR谱图来产生T2衰减曲线。回波周期数对应于衰减时间。在指定衰减时间测量芳香峰的强度,并在10ms衰减时间处将其归一化为最大强度1。使用Prism软件 (Graphpad) 将曲线拟合到单相衰减模型。激发雕刻用于溶剂抑制。两种分析的样品均在20mM磷酸钾缓冲液、pH 6.2、10% (v/v) D₂O中被制备。这些测量的结果描述于图12-13中。

[0318] 实施例15. 动态光散射

[0319] 在室温下,在DynaPro-99仪器上以90°探测器角度测量样品,每次测量的采集时间为10秒。由100mM储备液 (20mM磷酸钾缓冲液中, pH6.2, DMSO终浓度为1%) 稀释化合物。动态光散射测量的结果如图14所示。

[0320] 其他实施方式

[0321] 应当理解,尽管已经结合本发明的具体实施方式描述了本发明,但是前述描述旨在说明而不是限制本发明的范围,本发明的范围由所附权利要求的范围限定。其他方面、优点和修改在所附权利要求的范围内。本发明所涉及的领域的普通技术人员应该理解,本文针对本发明的任何特定实施方案描述的任何特征可以与本文描述的本申请的任何其他实施方案的其他特征的一个或多个特征组合,且进行适当的修改以确保组合的兼容性。这样的组合被认为是本申请的一部分。

序列表

<110> 丹娜法伯癌症研究所

<120> BAX活化的用于诱导细胞死亡的小分子致敏

<130> 00530-0334P01

<140> 62/471,174

<141> 2017-03-14

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 192

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

Met Asp Gly Ser Gly Glu Gln Pro Arg Gly Gly Gly Pro Thr Ser Ser
1           5           10           15
Glu Gln Ile Met Lys Thr Gly Ala Leu Leu Leu Gln Gly Phe Ile Gln
          20           25           30
Asp Arg Ala Gly Arg Met Gly Gly Glu Ala Pro Glu Leu Ala Leu Asp
          35           40           45
Pro Val Pro Gln Asp Ala Ser Thr Lys Lys Leu Ser Glu Cys Leu Lys
          50           55           60
Arg Ile Gly Asp Glu Leu Asp Ser Asn Met Glu Leu Gln Arg Met Ile
65           70           75           80
Ala Ala Val Asp Thr Asp Ser Pro Arg Glu Val Phe Phe Arg Val Ala
          85           90           95
Ala Asp Met Phe Ser Asp Gly Asn Phe Asn Trp Gly Arg Val Val Ala
          100          105          110
Leu Phe Tyr Phe Ala Ser Lys Leu Val Leu Lys Ala Leu Cys Thr Lys
          115          120          125
Val Pro Glu Leu Ile Arg Thr Ile Met Gly Trp Thr Leu Asp Phe Leu
          130          135          140
Arg Glu Arg Leu Leu Gly Trp Ile Gln Asp Gln Gly Gly Trp Asp Gly
145          150          155          160
Leu Leu Ser Tyr Phe Gly Thr Pro Thr Trp Gln Thr Val Thr Ile Phe
          165          170          175
Val Ala Gly Val Leu Thr Ala Ser Leu Thr Ile Trp Lys Lys Met Gly
          180          185          190

```

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<223> 人工序列描述:合成肽

<400> 2

Glu Ala Leu Lys Lys Ala Leu Arg Arg His Arg Phe Leu Trp Gln Arg

1 5 10 15

Arg Gln Arg Ala

20

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述:合成肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10) .. (10)

<223> 任意装订氨基酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14) .. (14)

<223> 任意装订氨基酸

<400> 3

Glu Ile Trp Ile Ala Gln Glu Leu Arg Xaa Ile Gly Asp Xaa Phe Asn

1 5 10 15

Ala Tyr Tyr Ala

20

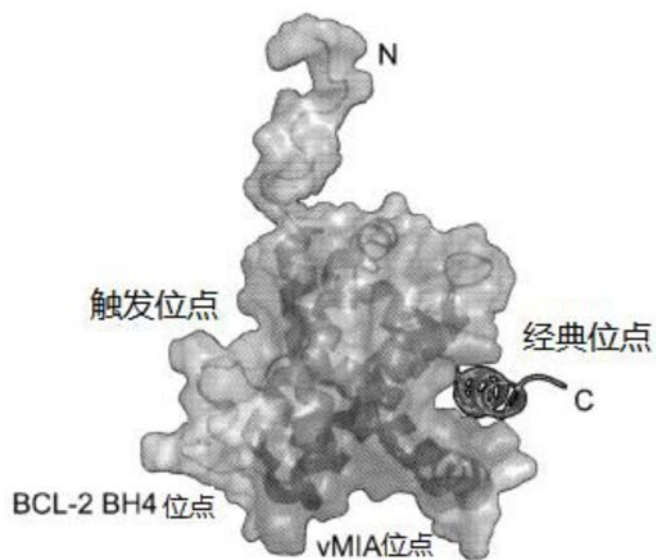


图1A

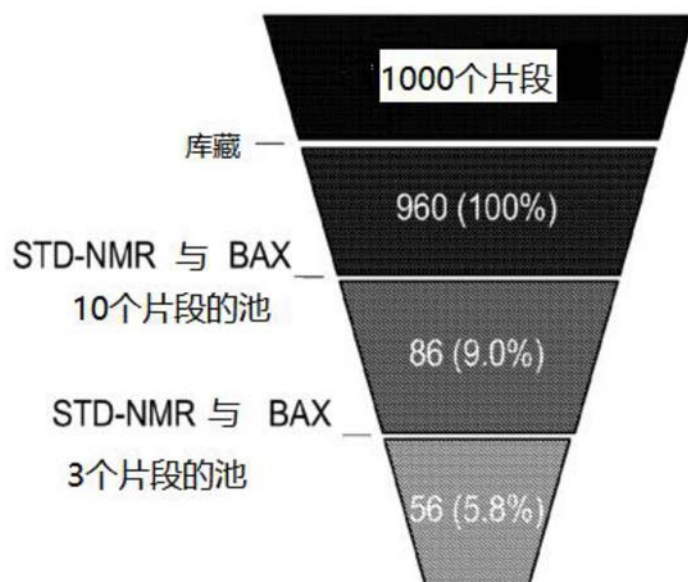


图1B

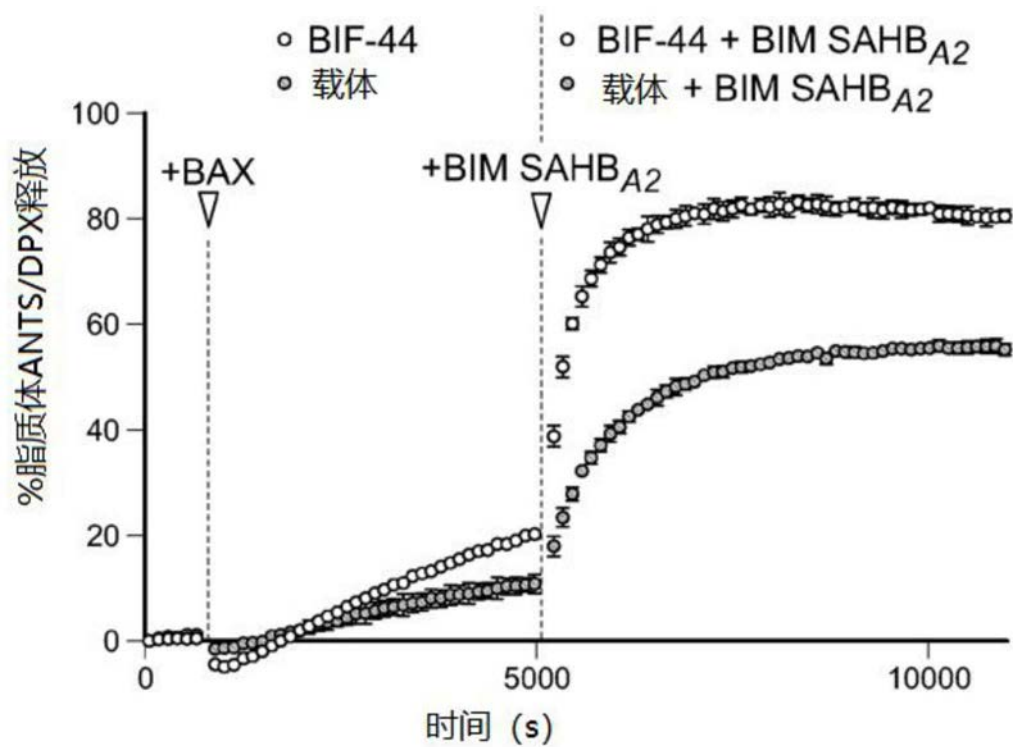


图1C

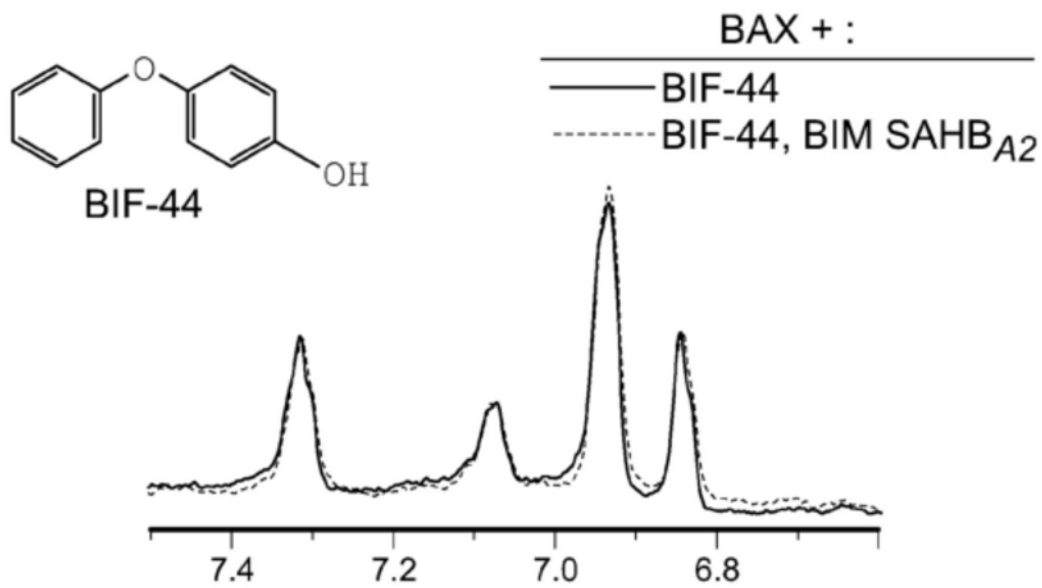


图1D

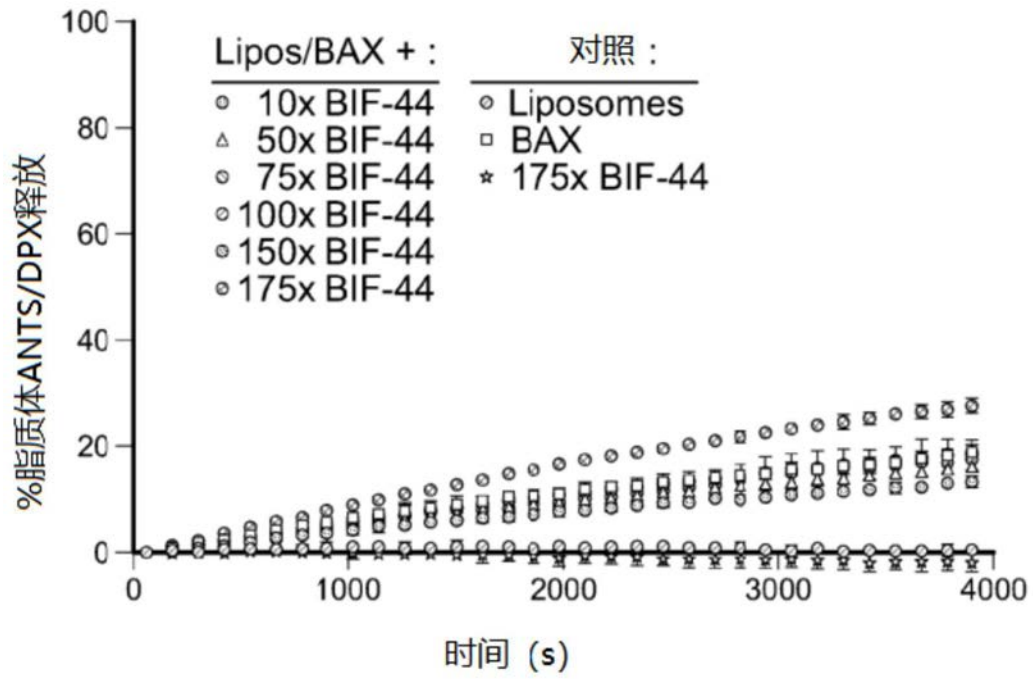


图2A

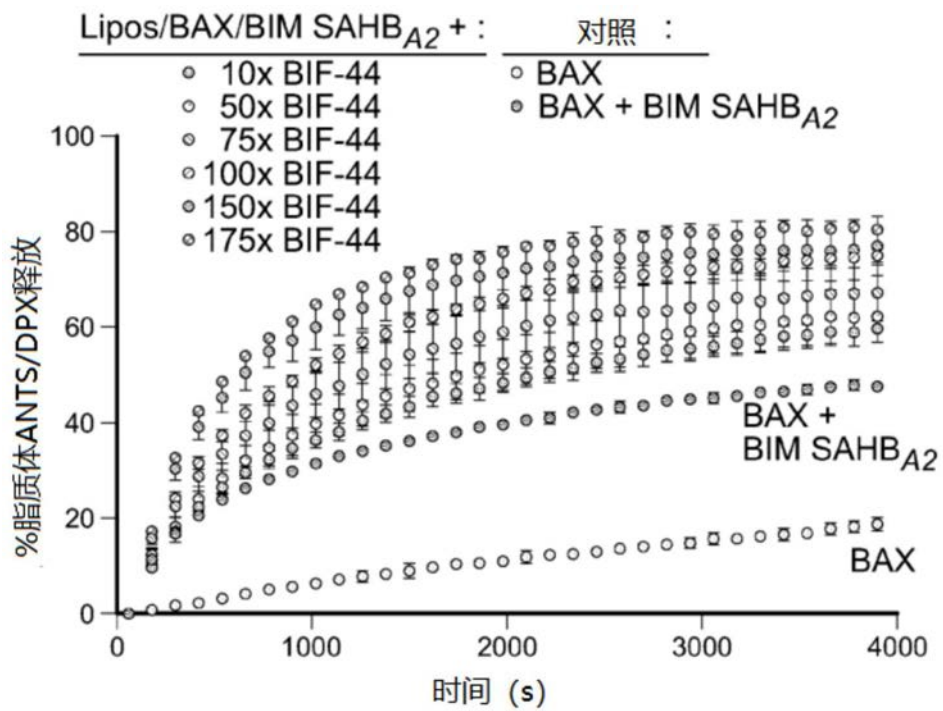


图2B

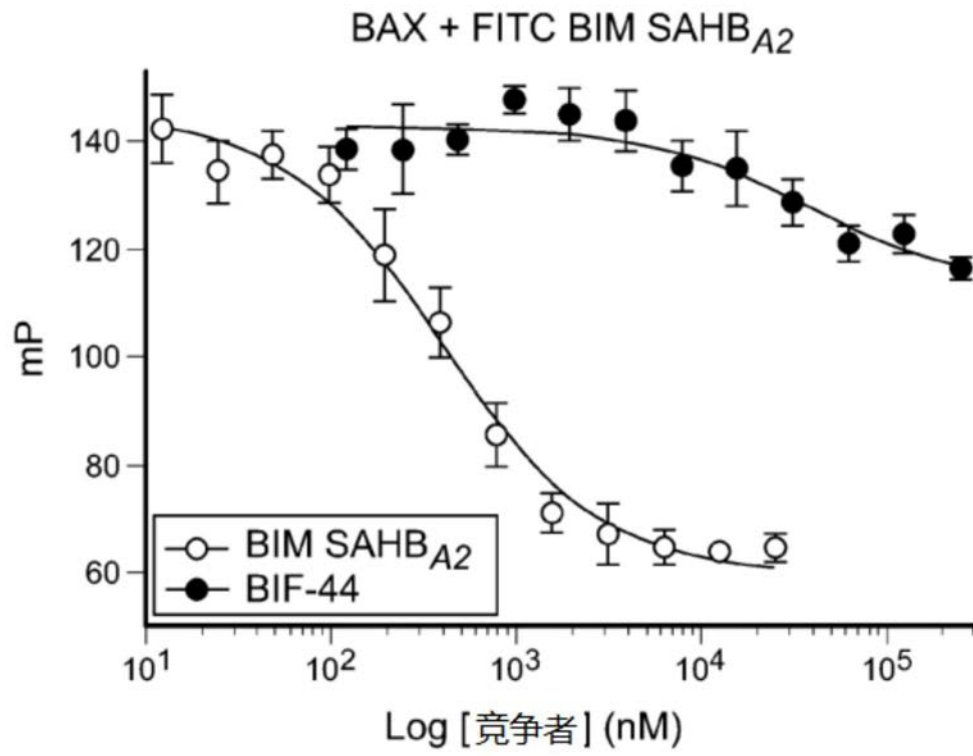


图2C

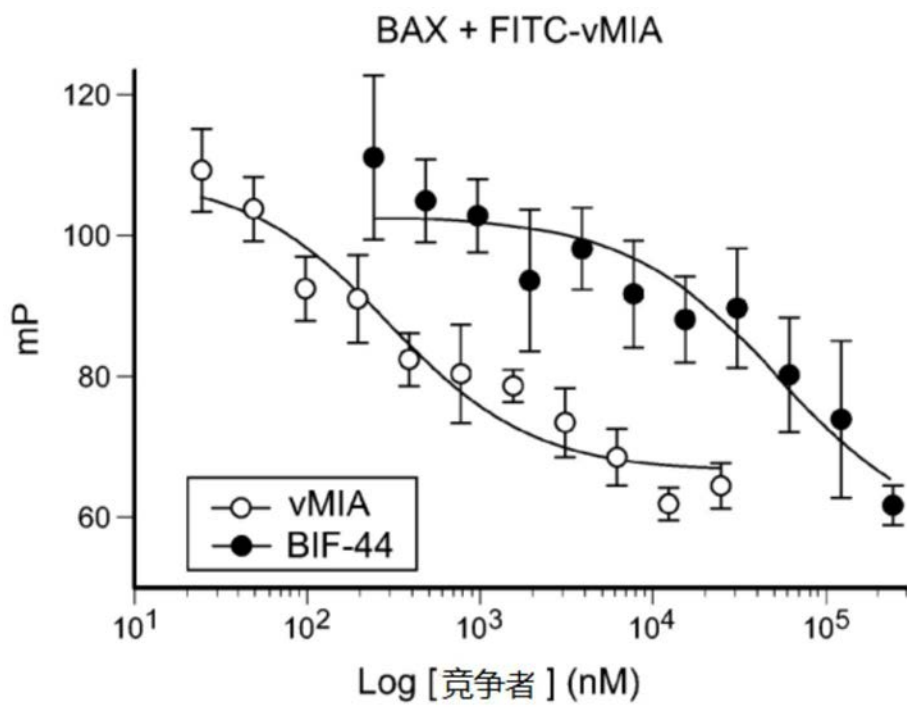


图2D

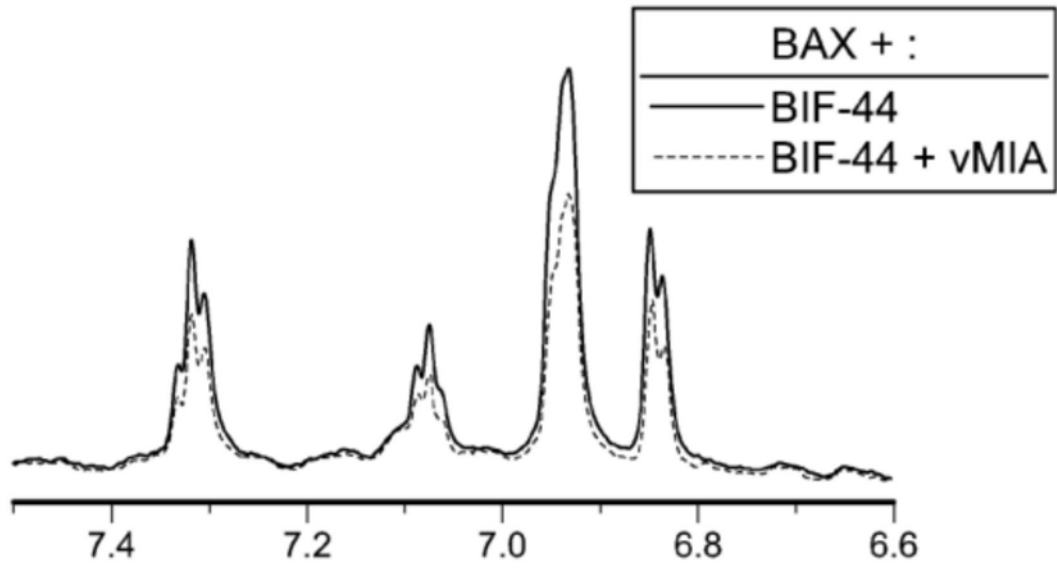


图2E

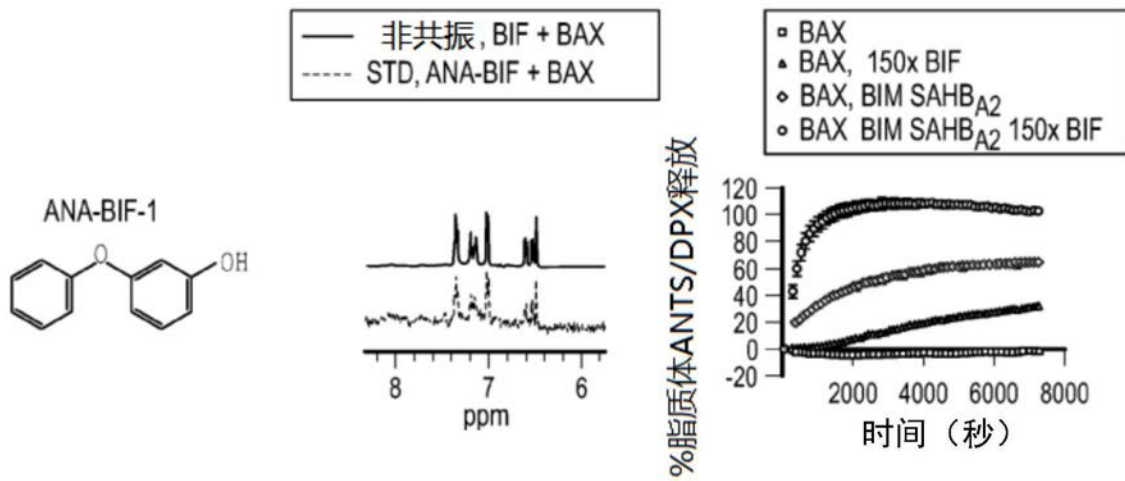


图3A

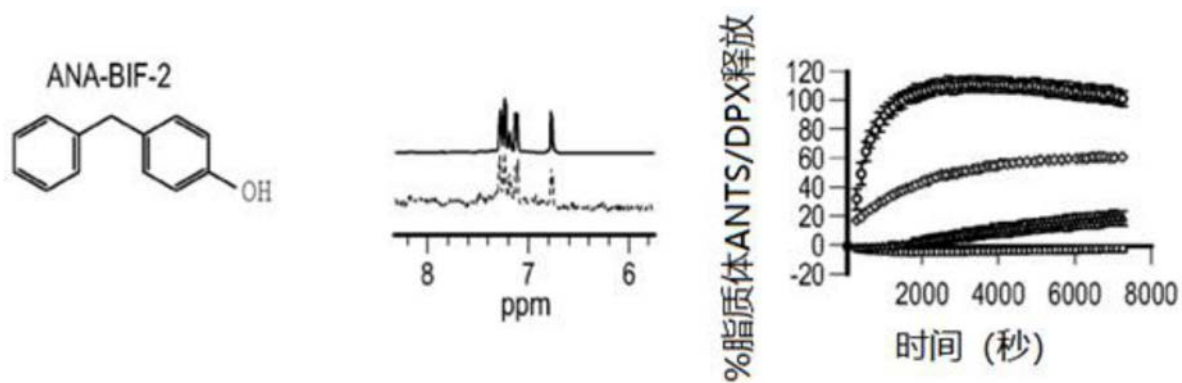


图3B

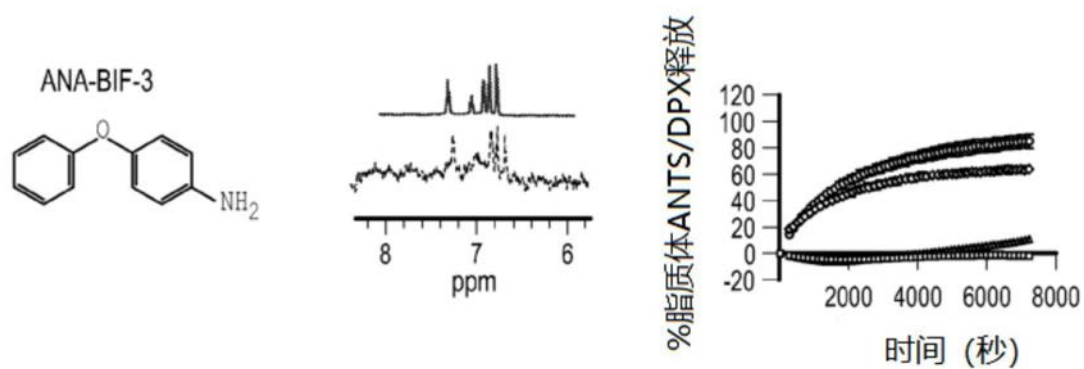


图3C

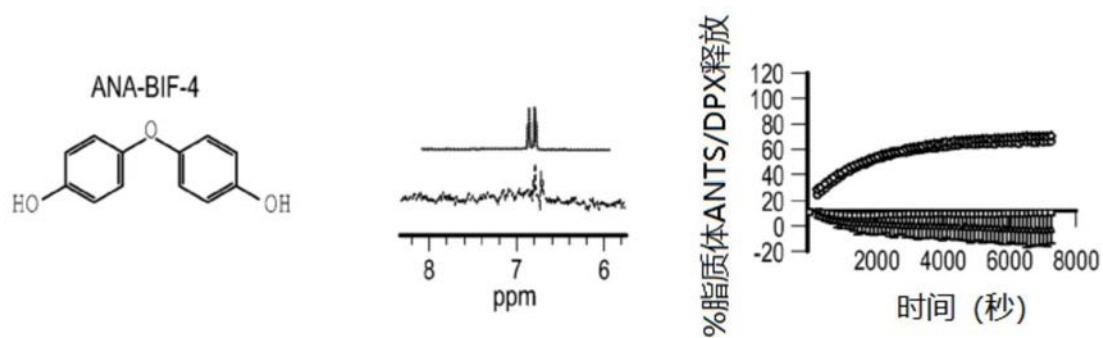


图3D

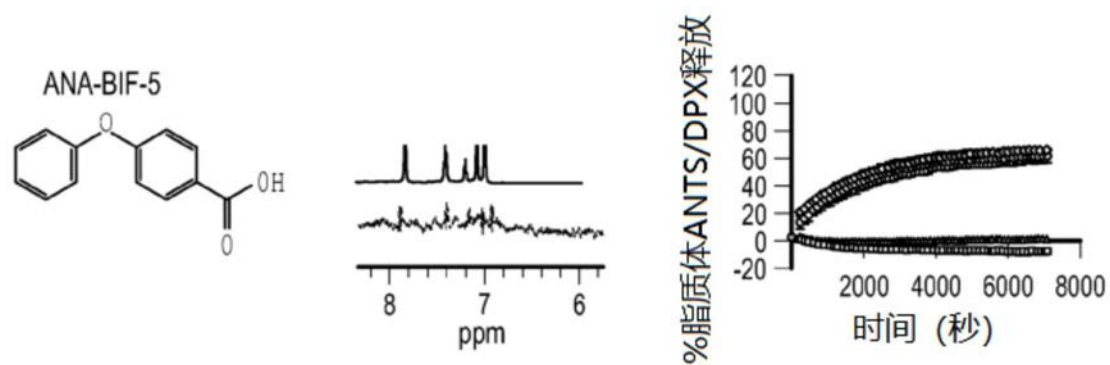


图3E

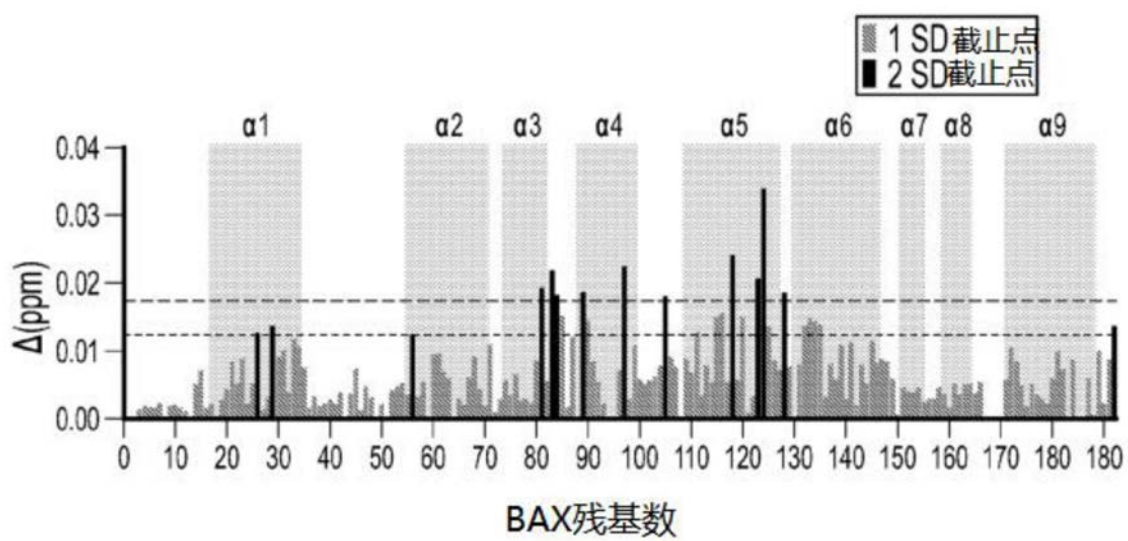


图4A

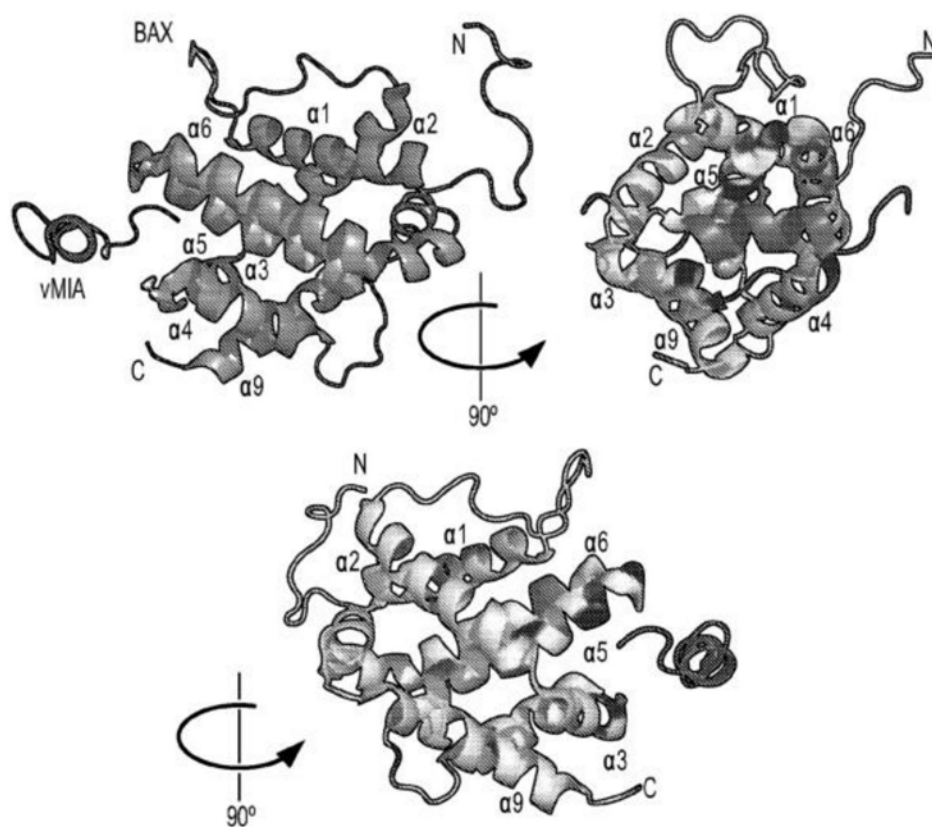


图4B

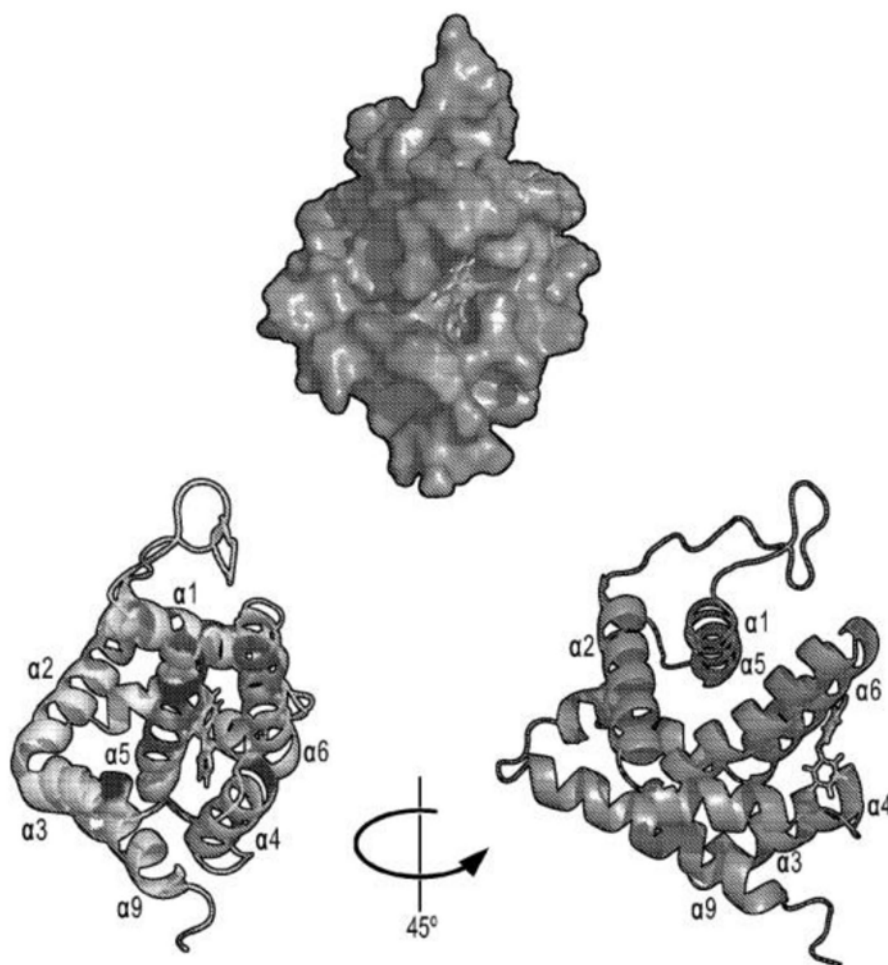


图4C

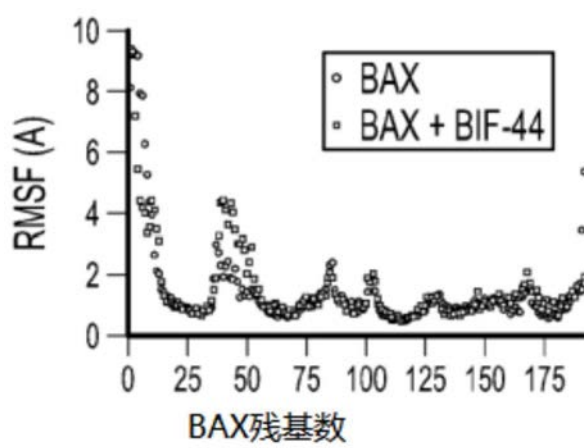


图4D

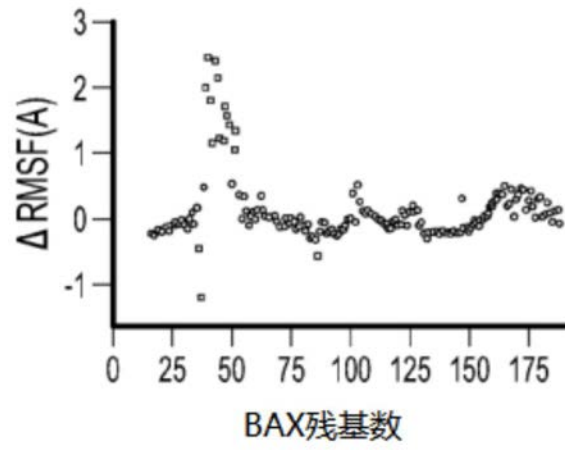


图4E

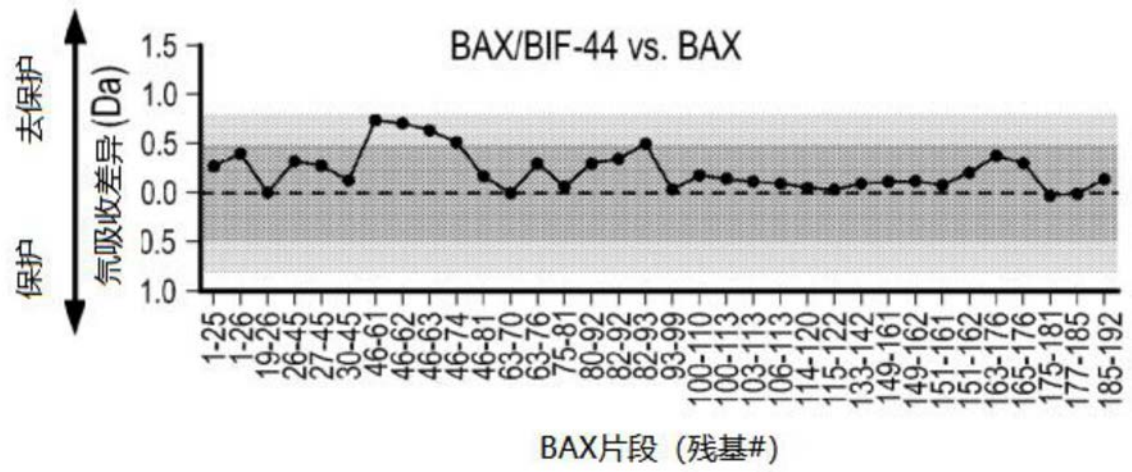


图5A

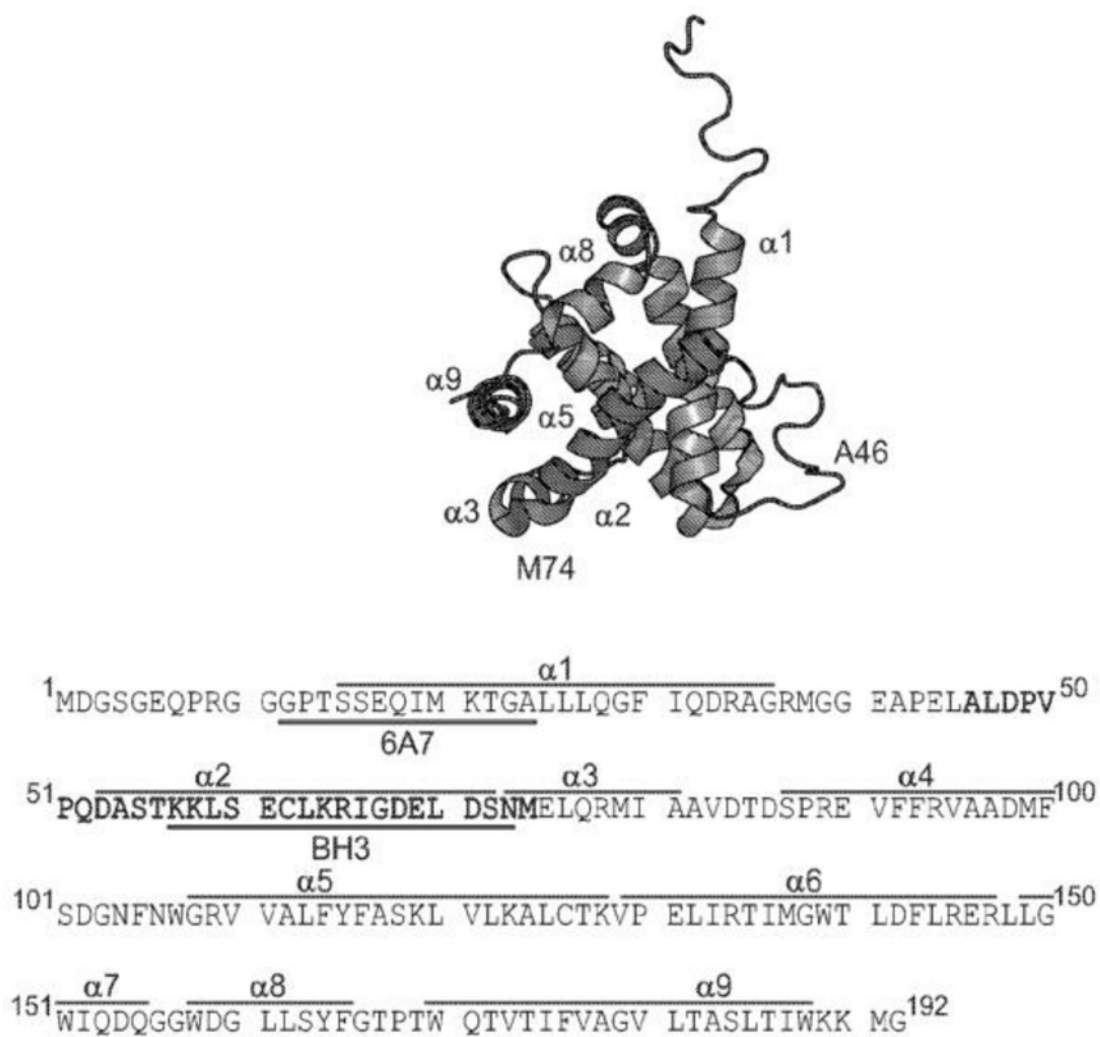


图5B

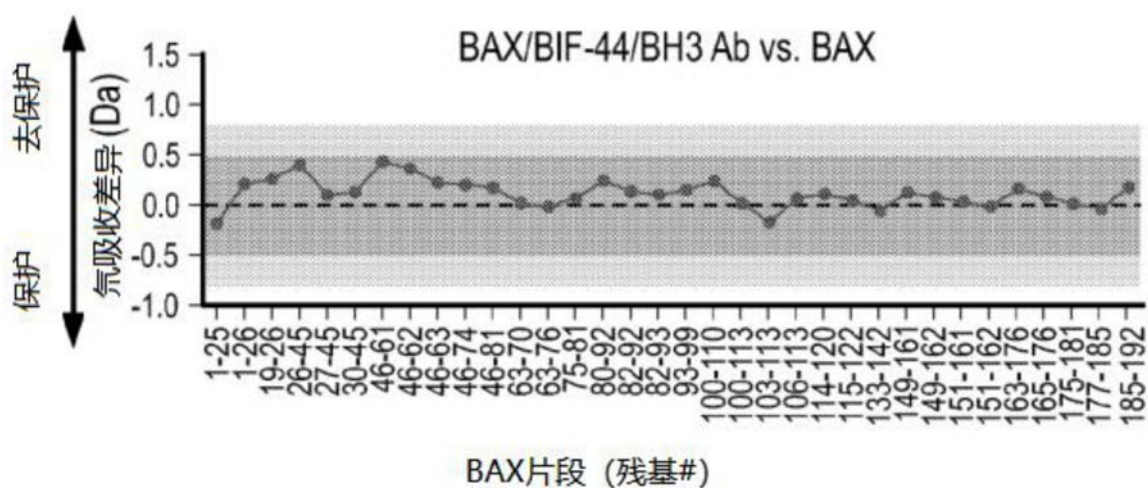


图5C

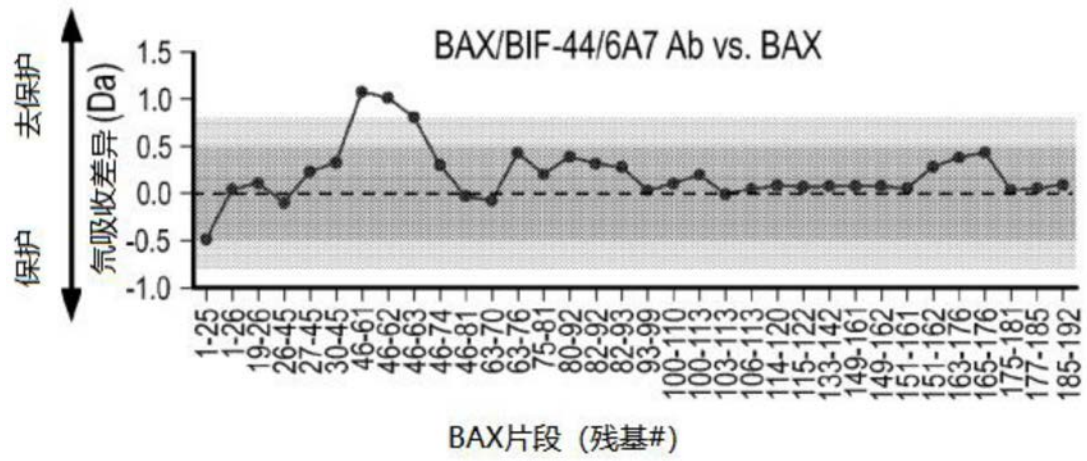


图5D

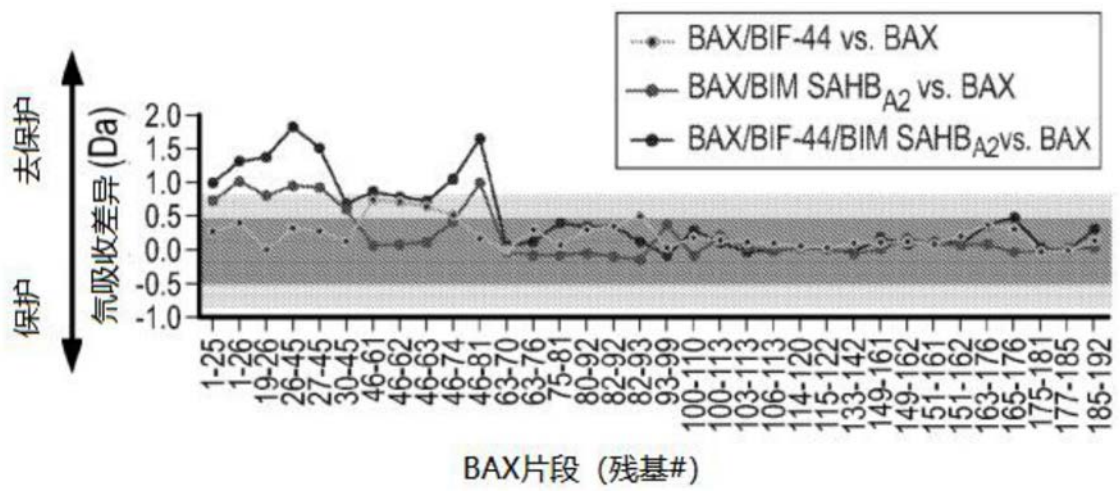


图6A

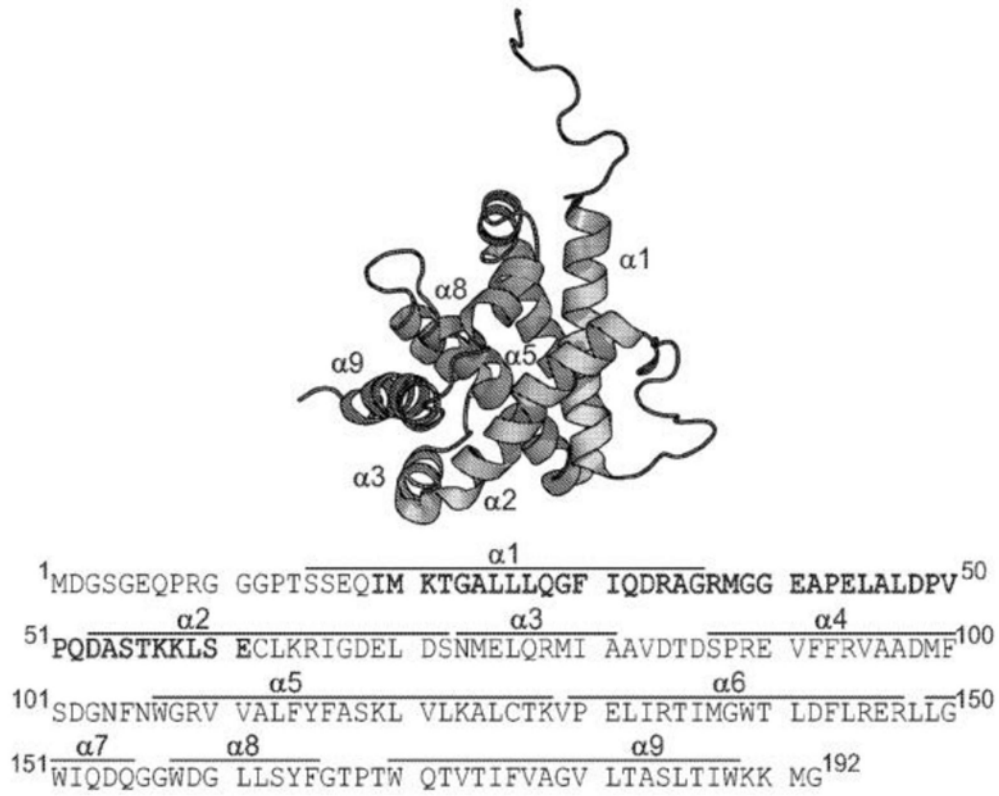


图6B

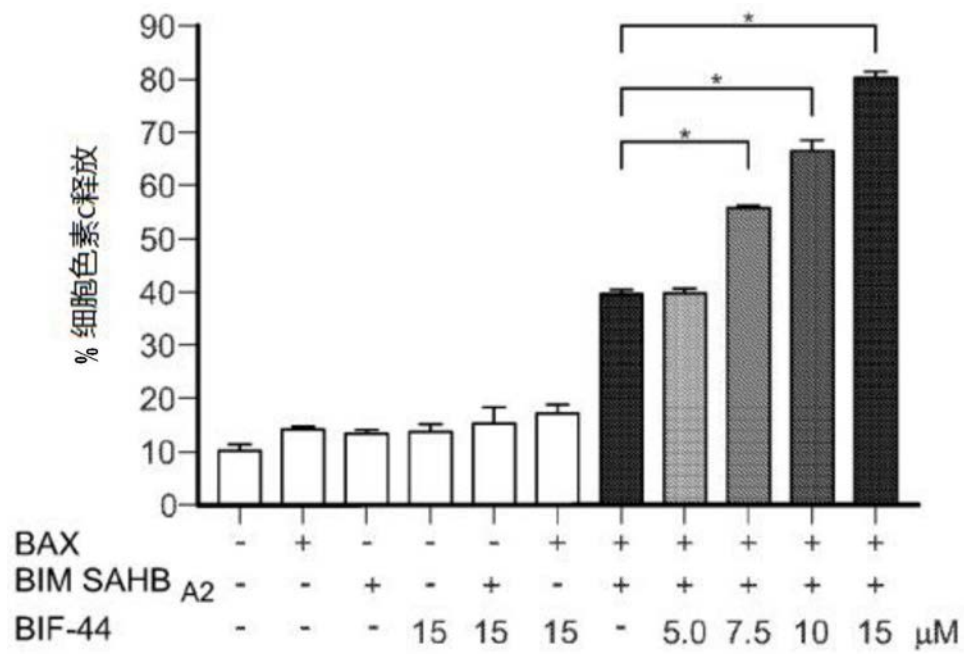


图6C

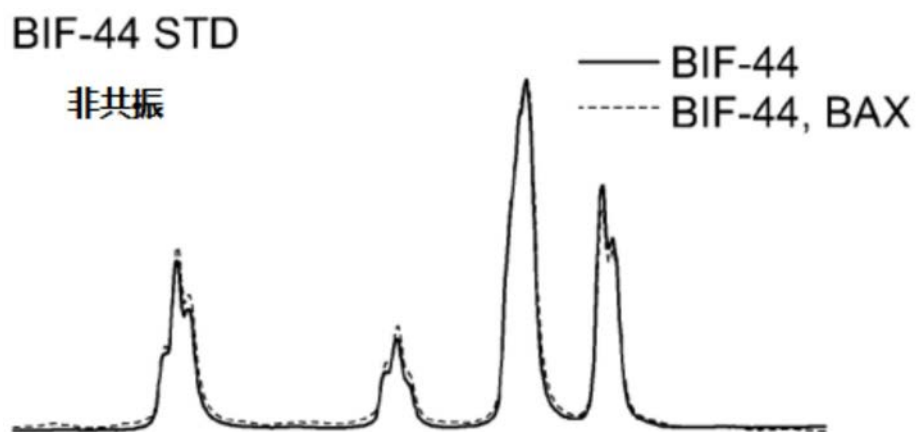


图7A

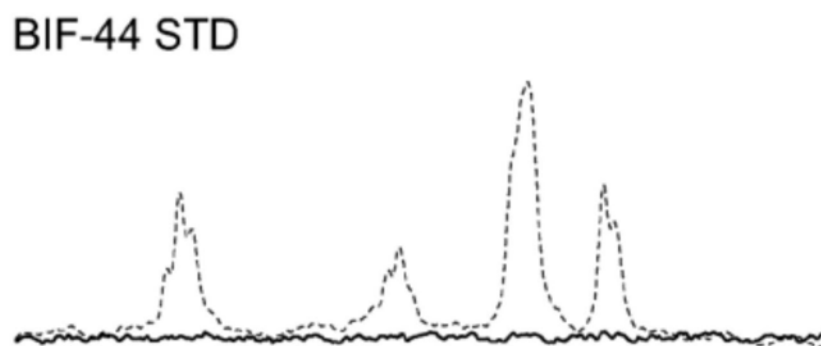


图7B

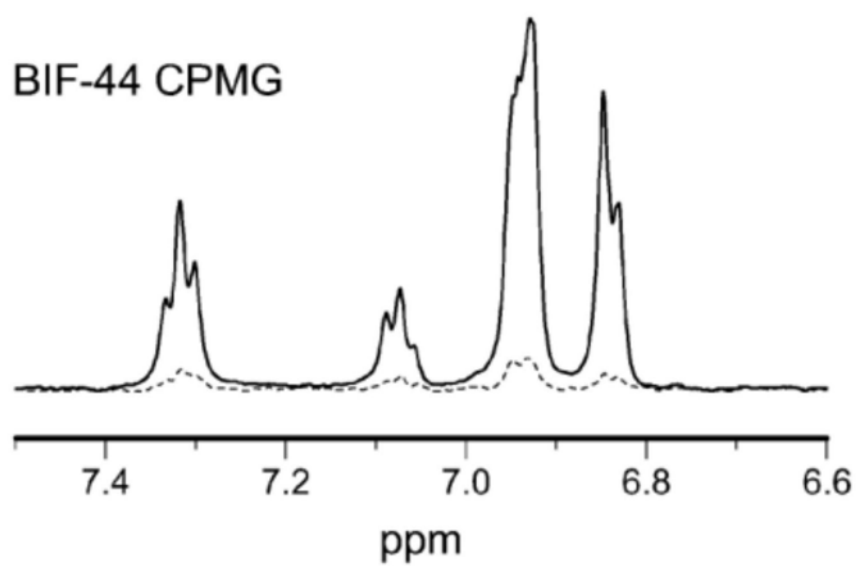


图7C

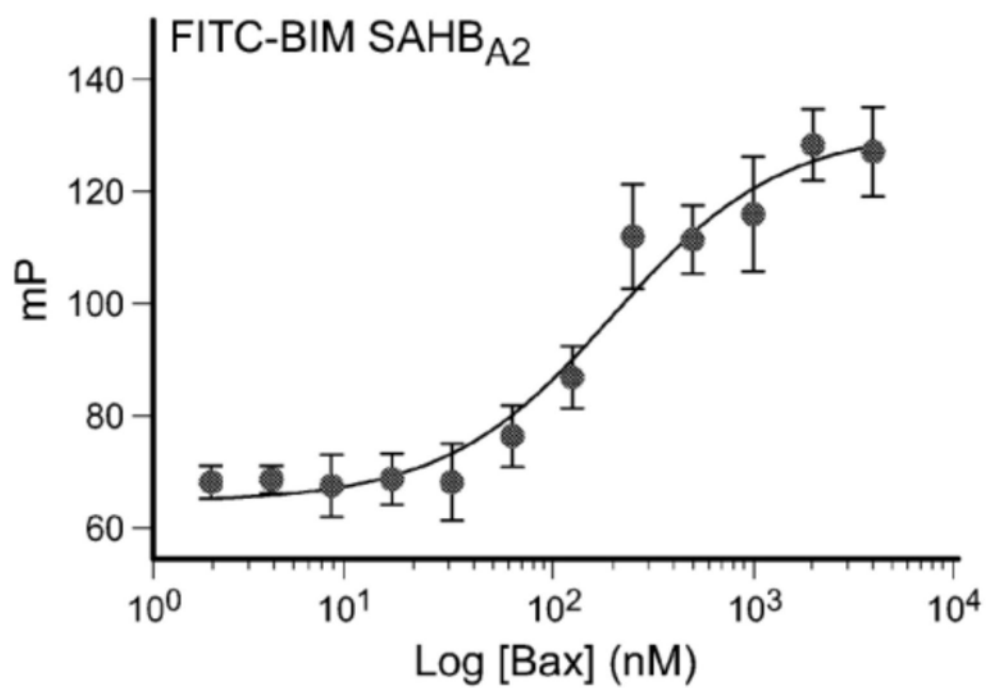


图8A

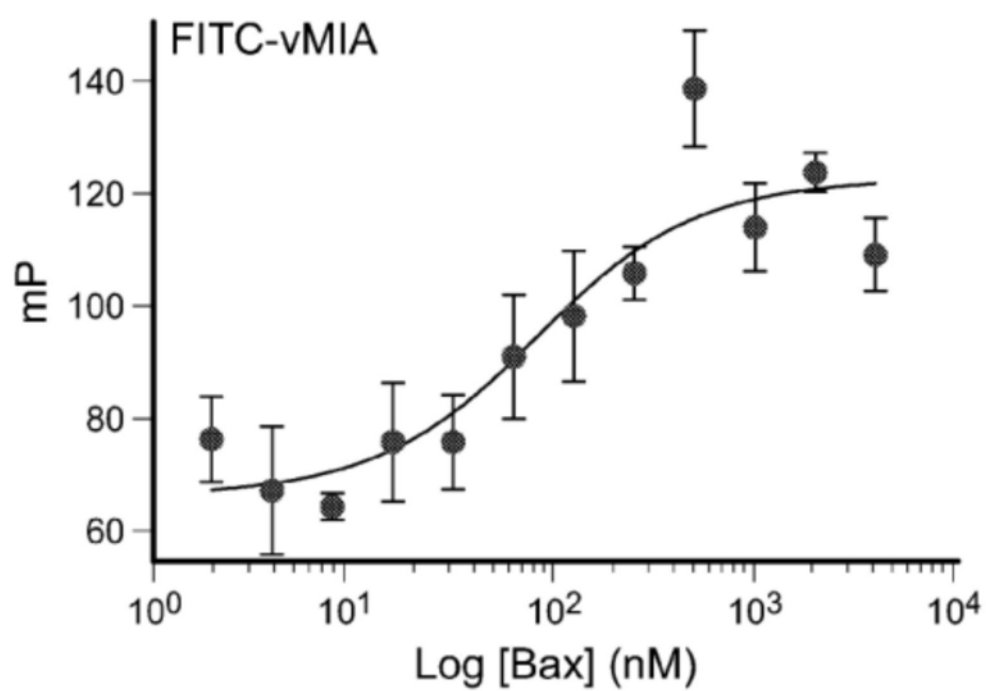


图8B

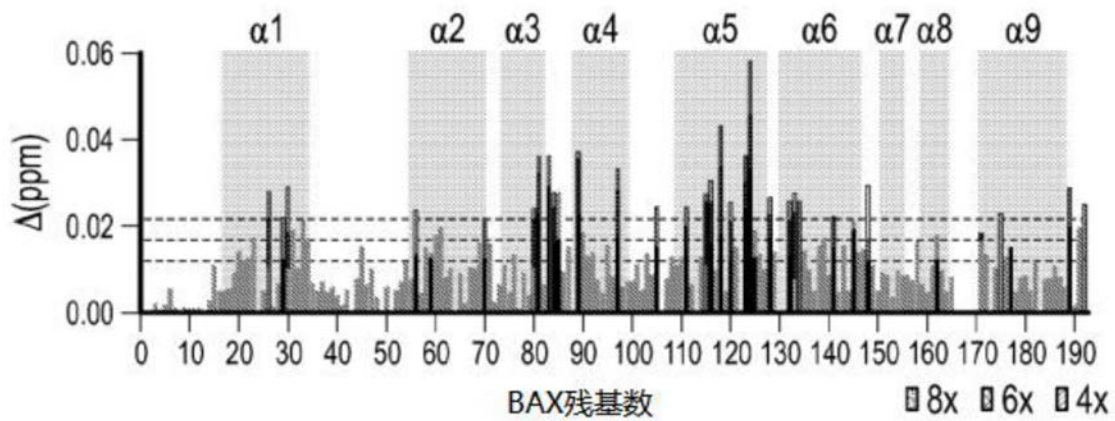


图9

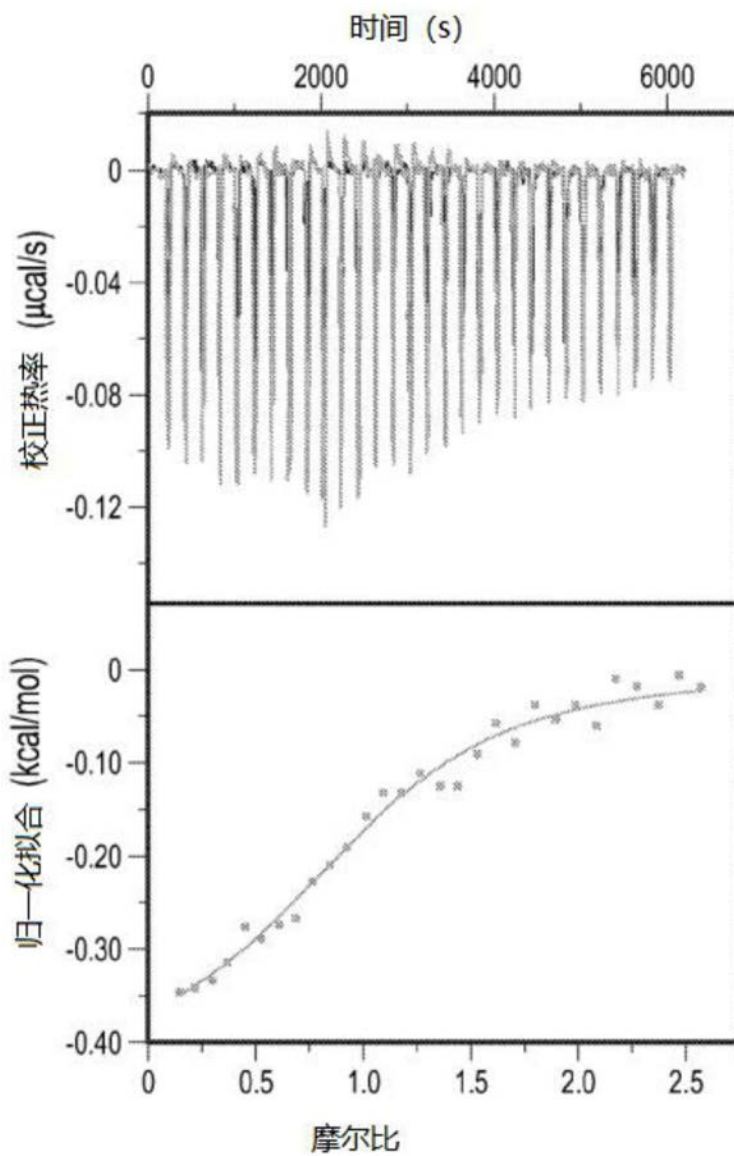


图10

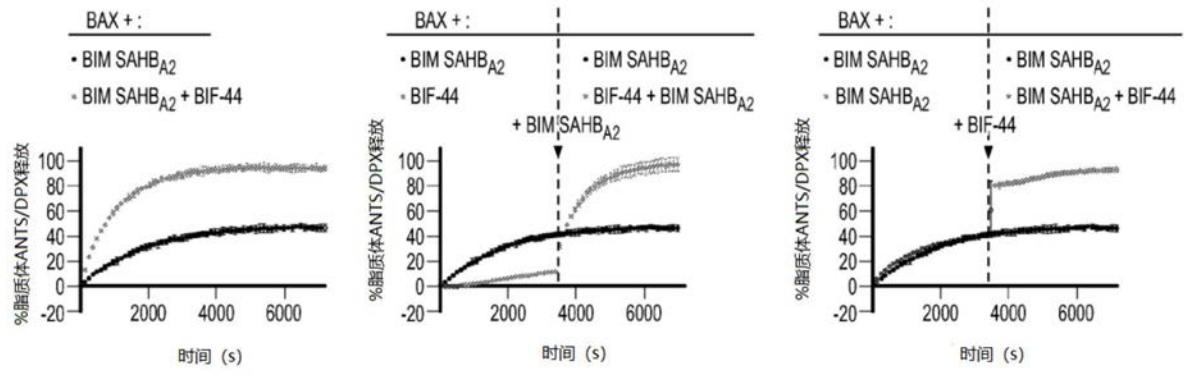


图11

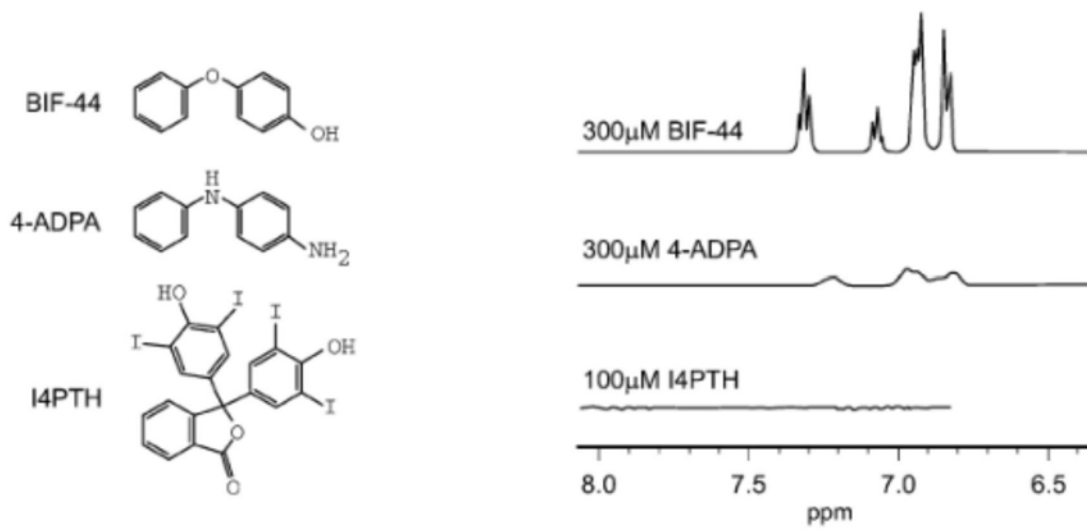


图12

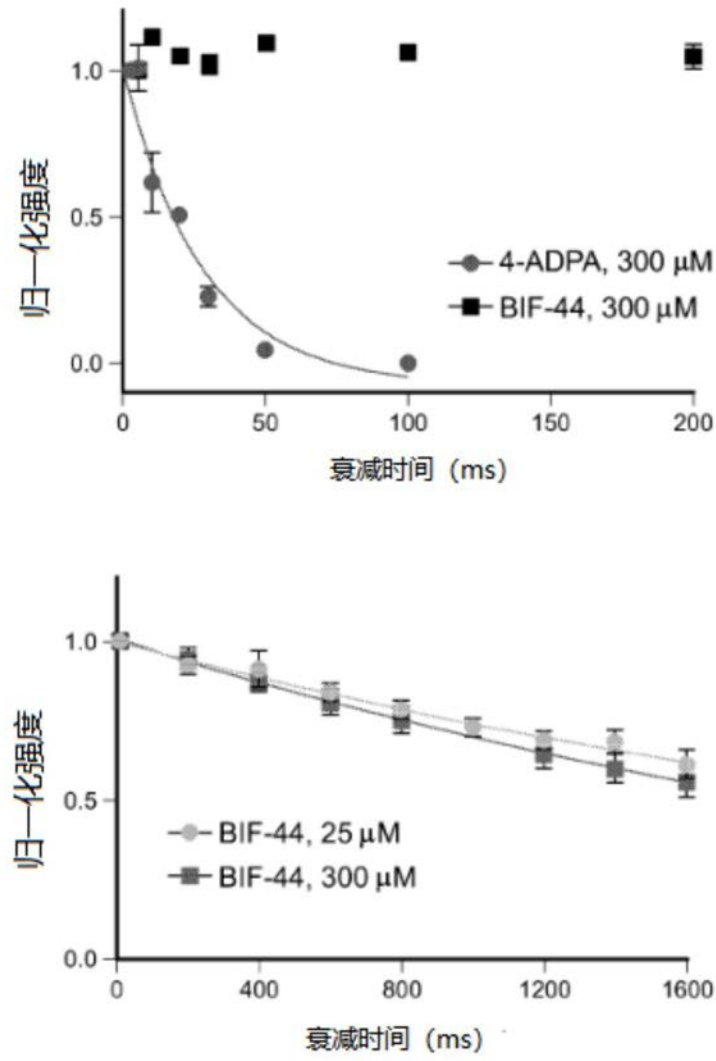


图13

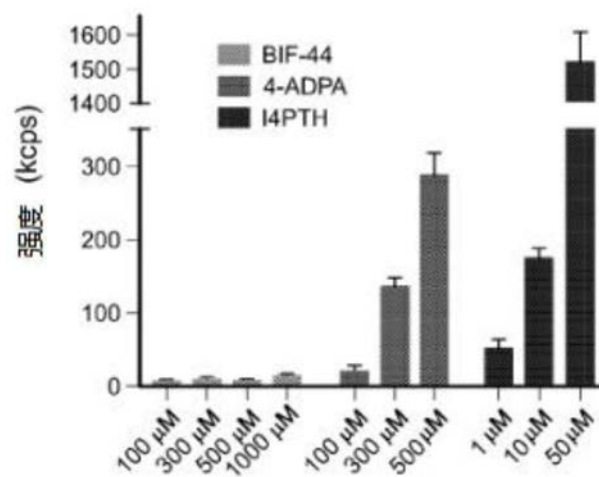


图14

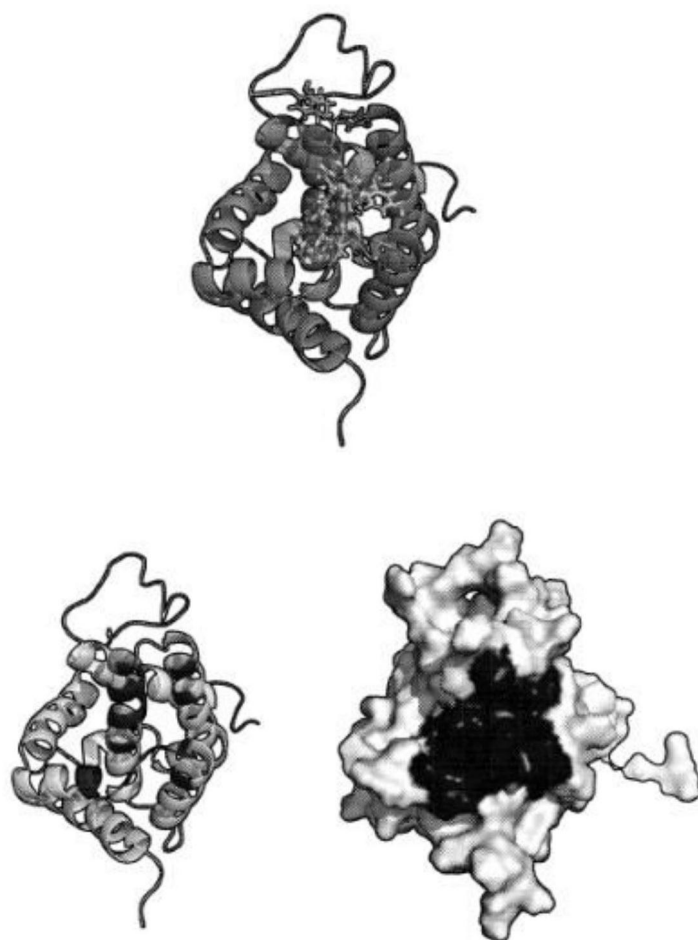


图15