



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108366990 B

(45) 授权公告日 2021.09.03

(21) 申请号 201680068271.8

(22) 申请日 2016.09.26

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108366990 A

(43) 申请公布日 2018.08.03

(30) 优先权数据
62/232,377 2015.09.24 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.05.22

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/053815 2016.09.26

(87) PCT国际申请的公布数据
W02017/053990 EN 2017.03.30

(73) 专利权人 加利福尼亚大学董事会
地址 美国加利福尼亚
专利权人 蒙特利尔大学

(72) 发明人 艾梅·埃丁格
斯蒂芬·哈内斯伊恩

(74) 专利代理机构 北京三环同创知识产权代理
有限公司 11349

代理人 邵毓琴

(51) Int.Cl.

A61K 31/40 (2006.01)

C07D 207/08 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2015009731 A2, 2015.01.22

US 9115054 B2, 2015.08.25

WO 2009053481 A1, 2009.04.30

US 8309768 B2, 2012.11.13

Stephen Hanessia等.constrained
azacyclic analogues of the
immunomodulatory agent FTY720 as
molecular probes for sphingosine 1-
phosphate receptors.《Bioorganic &
Medicinal Chemistry Letters》.2006,第17卷
491-494.

Rebecca Fransson等.Design, synthesis,
and antileukemic activity of
stereochemically defined constrained
analogues of FTY720 (GILENYA).《ACS
medicinal Chemistry letters》.2013,第4卷
969-973.

审查员 刘会英

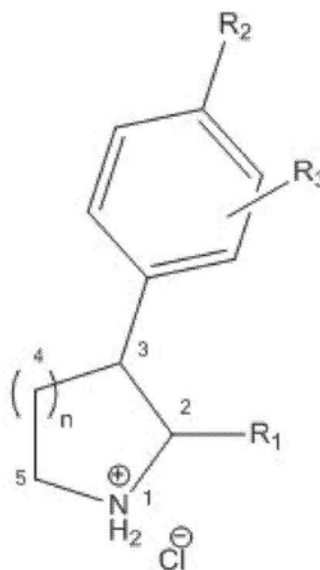
权利要求书3页 说明书44页 附图74页

(54) 发明名称

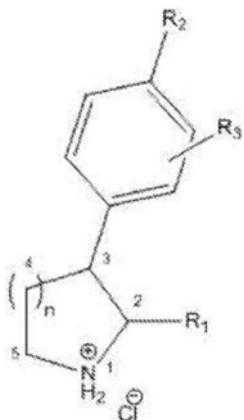
合成的鞘脂类分子、药物、它们的合成方法
及治疗方法

(57) 摘要

提供了包括氮杂环约束的鞘脂类化合物的小分子及它们的合成方法。还提供了涉及治疗疾病例如肿瘤、癌症和其它疾病的制剂和药物。还提供含有治疗有效剂量的一种或多种以药学上有效的盐或以纯的形式存在的小分子化合物的治疗剂,包括但不限于用于口服、静脉内或肌内给药的制剂。



1. 一种化合物,所述化合物为:



其中:

R_1 是选自 CH_3 、 CH_2OH 和 CH_2OCH_3 ;

R_2 是脂族链 C_6-C_{14} ;

R_3 是氢;

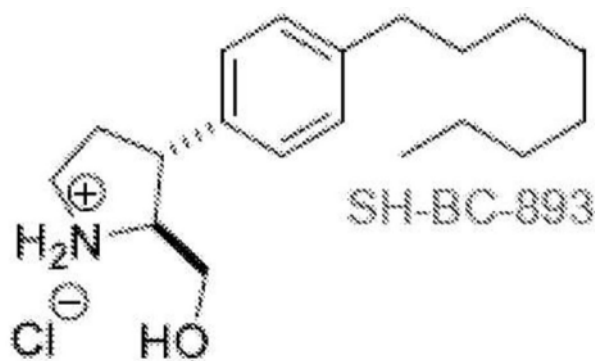
n 是1;并且

其中苯基能够围绕杂环胺在位置3至4之间移动。

2. 根据权利要求1的化合物,其中所述化合物具有立体化学,并且其中所述立体化学为(2R,3R)、(2R,3S)、(2R,4R)、(2R,4S)、(2S,3R)、(2S,3S)、(2S,4R)或(2S,4S)。

3. 根据权利要求1的化合物,其中所述化合物能够对人类肿瘤细胞具有细胞毒性作用,并且其中所述细胞毒性作用由所述人类肿瘤细胞的存活百分比的降低定义。

4. 根据权利要求1的化合物,其中所述化合物为



5. 根据权利要求1的化合物,其中所述化合物能够抑制包括人类肿瘤细胞的肿瘤的生长,其中生长由至少一种生长评估定义,并且其中所述至少一种生长评估选自以下组的一种或多种:肿瘤直径增加、肿瘤生物发光增加、肿瘤体积增加、肿瘤质量增加或肿瘤细胞增殖速率增加。

6. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物能够对人类肿瘤细胞具有细胞毒性作用,并且其中所述细胞毒性作用由所述人类肿瘤细胞的存活百分比的降低定义,其中为以下中的至少一种:

- 所述细胞毒性作用通过小于10微摩尔的局部50%抑制浓度(IC_{50})来实现,其中所述局部 IC_{50} 由降低所述人类肿瘤细胞的存活百分比等于50%的所述化合物的浓度定义;

• 所述人类肿瘤细胞来源于至少一种肿瘤,并且其中所述至少一种肿瘤选自以下组中的一种或多种:结肠癌、前列腺癌、肺癌、胰腺癌、乳腺癌和白血病;和

• 所述人类肿瘤细胞具有至少一种肿瘤特征的特征,其中所述至少一种肿瘤特征选自以下组中的一种或多种:缓慢生长、快速生长、侵袭性、恶性、Ras阳性、PTEN阴性、良性、转移性、结节性和原发性。

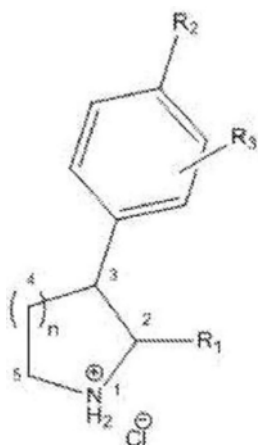
7. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物能够进行以下中的至少一种:

对人类细胞施加生物能量应激,其中所述生物能量应激具有降低人类细胞可用的至少一种营养物质的特征,并且其中所述至少一种营养物质选自以下组中一种或多种:葡萄糖、氨基酸、核苷酸和脂质;和

其中所述化合物不能以小于或等于1微摩尔的局部化合物浓度活化人类细胞中的鞘氨醇-1磷酸(S1P)受体1和3。

8. 一种用于治疗人类癌症的药物,所述药物包含:

含有治疗有效量的一种或多种氮杂环约束的鞘脂类小分子化合物的药物制剂,所述化合物为:



其中:

R_1 是选自 CH_3 、 CH_2OH 和 CH_2OCH_3 ;

R_2 是脂族链 C_6-C_{14} ;

R_3 是氢;

n 是1;并且

其中苯基能够围绕五元杂环胺在位置3至4之间移动。

9. 根据权利要求8所述的药物,其中所述一种或多种氮杂环约束的鞘脂类小分子化合物能够对人类肿瘤细胞具有细胞毒性作用,其中所述细胞毒性作用由所述人类肿瘤细胞的存活百分比的降低定义。

10. 根据权利要求8所述的药物,其中所述人类癌症是以下中的至少一种:结肠癌、前列腺癌、肺癌、胰腺癌、乳腺癌、或白血病。

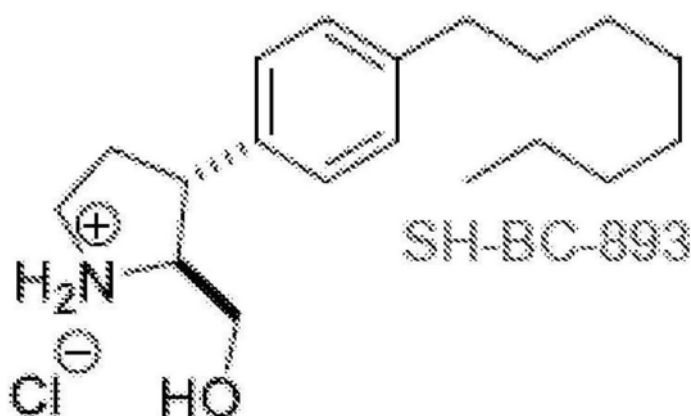
11. 根据权利要求8所述的药物,其中所述药物制剂能够抑制包括人类肿瘤细胞的肿瘤的生长,其中生长由至少一种生长评估定义,并且其中所述至少一种生长评估选自以下组的一种或多种:肿瘤直径增加、肿瘤生物发光增加、肿瘤体积增加、肿瘤质量增加或肿瘤细胞增殖速率增加。

12. 根据权利要求8所述的药物,其中所述药物为以下中的至少一种:

- 一种或多种氮杂环约束的鞘脂类小分子化合物当被摄入人受试者体内时不能以有效剂量在人受试者中诱导心动过缓;和
- 还包括至少一种FDA批准的化合物选自以下组中的一种或多种:甲氨蝶呤、吉西他滨、他莫昔芬、紫杉醇、多西他赛和恩扎鲁胺。

13. 权利要求1所述的化合物或权利要求8所述的药物在制备用于治疗人类癌症的药物中的用途,其中所述癌症选自以下组中的一种或多种:结肠癌、前列腺癌、肺癌、胰腺癌、乳腺癌和白血病。

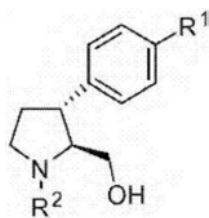
14. 权利要求1所述的化合物或权利要求8所述的药物用于根据权利要求13所述的用途,其中所述化合物是或者所述一种或多种氮杂环约束的鞘脂类小分子化合物是:



15. 权利要求8所述的药物用于根据权利要求13所述的用途,其中所述药物制剂为以下至少一种:

- 不诱导所述人受试者的心动过缓;
- 抑制包括人类肿瘤细胞的肿瘤的生长,其中生长是由至少一种生长评估定义,并且其中所述至少一种生长评估选自以下组的一种或多种:肿瘤直径增加、肿瘤生物发光增加、肿瘤体积增加、肿瘤质量增加或肿瘤细胞增殖速率增加;和
- 与至少一种FDA批准的化合物组合,其中所述至少一种FDA批准的化合物选自以下组中的一种或多种:甲氨蝶呤、吉西他滨、他莫昔芬、紫杉醇、多西他赛和恩扎鲁胺。

16. 一种化合物,所述化合物为:



其中:

R_1 是 C_8H_{15} 或者 C_8H_{17} ;并且

R_2 是氢。

合成的鞘脂类分子、药物、它们的合成方法及治疗方法

[0001] 关于联邦资助研究或开发的声明

[0002] 本发明是由国立癌症研究所资助的T32CA009054、国防部资助的W81XWH-11-1-0535以及国立卫生研究院资助的R01GM089919和R21CA178230的授权号下的政府支持完成的。政府对本发明享有一定的权利。

技术领域

[0003] 本发明一般涉及合成的鞘脂类分子,由这些分子形成的药物,合成这些分子的方法,以及使用这些治疗剂治疗疾病或肿瘤的方法。

背景技术

[0004] 鞘脂是一类鞘氨醇的脂肪酸衍生物分子。这些分子通常存在于细胞膜中,并可触发许多不同的信号级联反应。一种常见的鞘脂是鞘氨醇,其可被磷酸化形成鞘氨醇-1磷酸(S1P),其化学结构提供在图1中。

[0005] S1P受体存在于许多类型细胞的表面上。S1P受体通过S1P结合激活。存在五种类型的S1P受体,每一种都引发不同的信号转导途径。S1P与S1P受体的结合可激活不同的细胞功能,包括细胞增殖和分化、细胞存活、细胞侵入、淋巴细胞运输和细胞迁移。

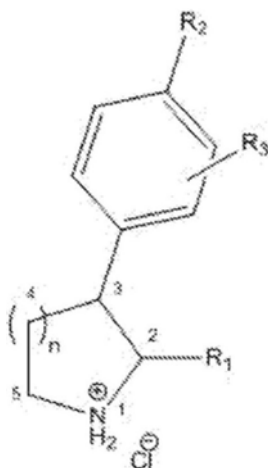
[0006] FTY720,其化学结构提供在图2中,是一种通过刺激S1P受体发挥功能的免疫抑制剂前药。在其活性的磷酸化状态下,FTY720结合五种S1P受体中的四种。FTY720-磷酸酯与S1P1的结合引起受体激活,随后持续下调受体,并随后在次级淋巴器官中隔离淋巴细胞。目前,FTY720已上市治疗复发缓解型多发性硬化症(MS)。先前的公开描述了用于选择性结合不同S1P受体亚型的广泛种类的FTY720类似物。

发明内容

[0007] 在许多实施方式中,本发明涉及鞘脂类分子的氮杂环约束的类似物性质的小分子、合成方法、由这些小分子形成的药物以及公开了使用此类治疗剂治疗疾病的方法。

[0008] 在一些实施方式中,本发明的方面涉及具有以下分子式的化合物:

[0009]



[0010] 其中：

[0011] R_1 是选自烷基链, $(CH_2)_n OH$, $CHOH$ -烷基, $CHOH$ -炔烃, $(CH_2)_n OMe$, $(CH_2)_n PO(OH)_2$ 及其酯, $CH=CHPO(OH)_2$ 及其酯, $(CH_2CH_2)_n PO(OH)_2$ 及其酯和 $(CH_2)_n OPO(OH)_2$ 及其酯, $(CH_2)_n PO_3$ 及其酯的任选的官能团, 其中Me是烷基、烯烃或炔烃；

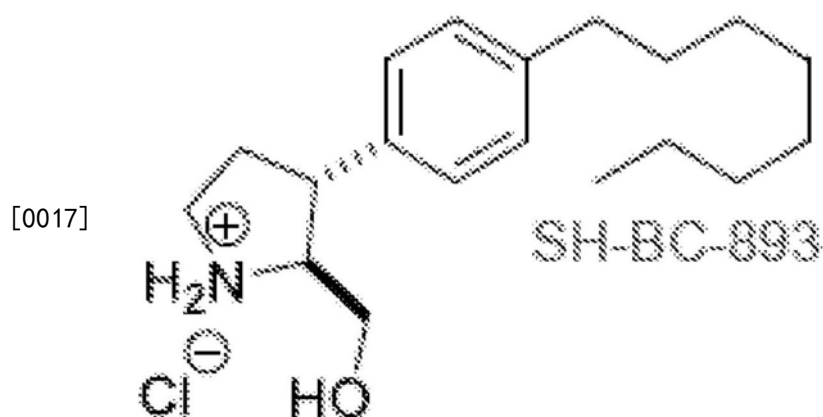
[0012] R_2 是脂族链 (C_6 - C_{14})；

[0013] R_3 是包含氢, 卤素, 烷基, 烷氧基, 叠氮化物 (N_3), 醚, NO_2 或氰化物 (CN) 的单-、二-、三-或四-芳族取代基；

[0014] n 是独立选自1至3的整数；和

[0015] 其中苯基可以围绕杂环胺在位置3至5之间移动。

[0016] 在其他实施方式中, 该化合物具有特定的分子式：



[0018] 在甚至其他实施方式中, 所述化合物的立体化学是 (2R, 3R), (2R, 3S), (2R, 4R), (2R, 4S), (2S, 3R), (2S, 3S), (2S, 4R) 或 (2S, 4S)。

[0019] 在更多实施方式中, 所述化合物能够对人类肿瘤细胞具有由人类肿瘤细胞的存活百分比的降低来定义的细胞毒性作用。

[0020] 在甚至更多的实施方式中, 所述细胞毒性作用是通过适当的局部50%抑制浓度 (IC_{50}) 来实现, 其中所述局部 IC_{50} 是由降低所述人类肿瘤细胞的存活百分比等于50%的所述化合物的浓度来定义的。

[0021] 在甚至更多的实施方式中, 所述人类肿瘤细胞来源于结肠癌, 前列腺癌, 肺癌, 胰腺癌, 乳腺癌和白血病。

[0022] 在另外甚至更多的实施方式中, 所述人类肿瘤细胞的特征在于缓慢生长, 快速生长, 侵袭性, 恶性, Ras阳性, PTEN阴性, 良性, 转移性, 结节性和原发性。

[0023] 在许多其他实施方式中, 所述化合物能够对人类细胞施加生物能量应激, 其特征是人类细胞可用的至少一种营养物质的减少, 并且其中所述至少一种营养物质是葡萄糖, 氨基酸, 核苷酸和脂质中的任何一种。

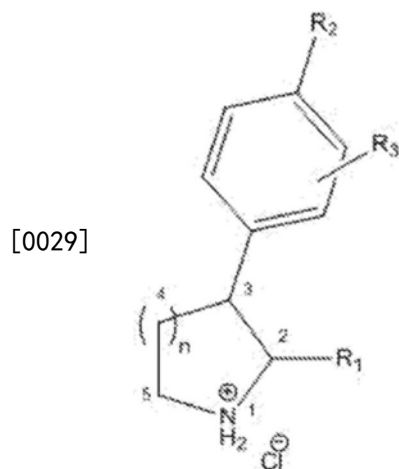
[0024] 在另外许多其他实施方式中, 生物能量应激导致肿瘤细胞相对于非肿瘤细胞的更大百分比的细胞死亡。

[0025] 在许多更多的实施方式中, 所述化合物能够抑制肿瘤直径增加, 肿瘤生物发光增加, 肿瘤体积增加, 肿瘤质量增加或肿瘤细胞增殖速率增加。

[0026] 在更多的实施方式中, 所述化合物不能激活人细胞中的鞘氨醇鞘氨醇-1磷酸 (S1P) 受体1、2、3、4和5。

[0027] 在一些实施方式中,本发明的方面涉及用于治疗人类疾病的药物,包括:

[0028] 含有治疗有效量的一种或多种氮杂环约束的鞘脂类小分子化合物的药物制剂,所述化合物包括:



[0030] 其中:

[0031] R_1 是选自烷基链, $(CH_2)_n OH$, $CHOH$ -烷基, $CHOH$ -炔烃, $(CH_2)_n OMe$, $(CH_2)_n PO(OH)_2$ 及其酯, $CH=CHPO(OH)_2$ 及其酯, $(CH_2CH_2)_n PO(OH)_2$ 及其酯和 $(CH_2)_n OPO(OH)_2$ 及其酯, $(CH_2)_n PO_3$ 及其酯的任选的官能团,其中Me是烷基、烯炔或炔烃;

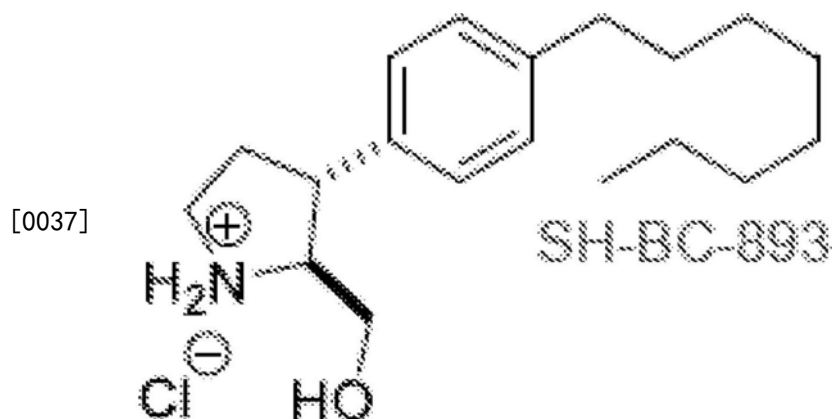
[0032] R_2 是脂族链 (C_6 - C_{14});

[0033] R_3 是包含氢, 卤素, 烷基, 烷氧基, 叠氮化物 (N_3), 醚, NO_2 或氰化物 (CN) 的单-、二-、三-或四-芳族取代基;

[0034] n 是独立选自1至3的整数;和

[0035] 其中苯基可以围绕杂环胺在位置3至5之间移动。

[0036] 在其他实施方式中,氮杂环约束的鞘脂类小分子化合物包括:



[0038] 在甚至其他实施方式中,人类疾病是结肠癌,前列腺癌,肺癌,胰腺癌,乳腺癌,白血病或肥胖症。

[0039] 在甚至更多的实施方式中,所述一种或多种氮杂环约束的鞘脂类小分子化合物能够对人类肿瘤细胞具有由人类肿瘤细胞的存活百分比的降低来定义的细胞毒性作用。

[0040] 在甚至更多的实施方式中,所述细胞毒性作用是通过适当的局部50%抑制浓度 (IC_{50}) 来实现,其中所述局部 IC_{50} 是由降低所述人类肿瘤细胞的存活百分比等于50%的所述一种或多种氮杂环约束的鞘脂类小分子化合物的浓度来定义的。

[0041] 在另外甚至更多的实施方式中,所述人类肿瘤细胞的特征在于缓慢生长,快速生长,侵袭性,恶性,Ras阳性,PTEN阴性,良性,转移性,结节性和原发性。

[0042] 在许多其他实施方式中,所述一种或多种氮杂环约束的鞘脂类小分子化合物能够对人类细胞施加生物能量应激,其特征不在于人类细胞可用的至少一种营养物质的减少,并且其中所述至少一种营养物质是葡萄糖,氨基酸,核苷酸或脂质。

[0043] 在另外许多其他实施方式中,生物能量应激导致肿瘤细胞相对于非肿瘤细胞的更大百分比的细胞死亡。

[0044] 在另外许多其他的实施方式中,所述药物制剂能够抑制肿瘤直径增加,肿瘤生物发光增加,肿瘤体积增加,肿瘤质量增加或肿瘤细胞增殖速率增加。

[0045] 在更多的实施方式中,所述一种或多种氮杂环约束的鞘脂类小分子化合物不能激活人细胞中的鞘氨醇-1磷酸(S1P)受体1、2、3、4和5。

[0046] 在许多更多的实施方式中,所述一种或多种氮杂环约束的鞘脂类小分子化合物当被摄入人类受试者体内时不能在人类受试者中以有效剂量诱导心动过缓。

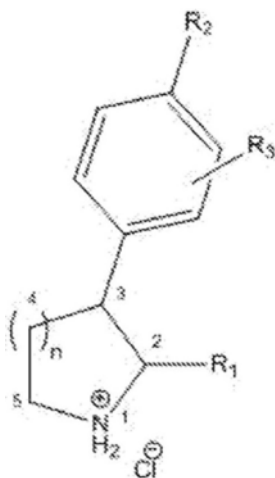
[0047] 在另外许多更多的实施方式中,所述药物与至少一种FDA批准的用于治疗肿瘤的化合物组合。

[0048] 在其他具体的实施方式中,所述至少一种FDA批准的化合物是甲氨蝶呤,吉西他滨,他莫昔芬,紫杉醇,多西他赛或恩扎鲁胺。

[0049] 在一些实施方式中,本发明的方面涉及治疗人类疾病的方法,所述方法包括:

[0050] 将药物制剂给予人类受试者,所述药物制剂含有治疗有效量的一种或多种氮杂环约束的鞘脂类小分子化合物,所述化合物包括:

[0051]



[0052] 其中:

[0053] R_1 是选自烷基链, $(CH_2)_n OH$, $CHOH$ -烷基, $CHOH$ -炔烃, $(CH_2)_n OMe$, $(CH_2)_n PO(OH)_2$ 及其酯, $CH=CHPO(OH)_2$ 及其酯, $(CH_2CH_2)_n PO(OH)_2$ 及其酯和 $(CH_2)_n OPO(OH)_2$ 及其酯, $(CH_2)_n PO_3$ 及其酯的任选的官能团,其中Me是烷基、烯炔或炔烃;

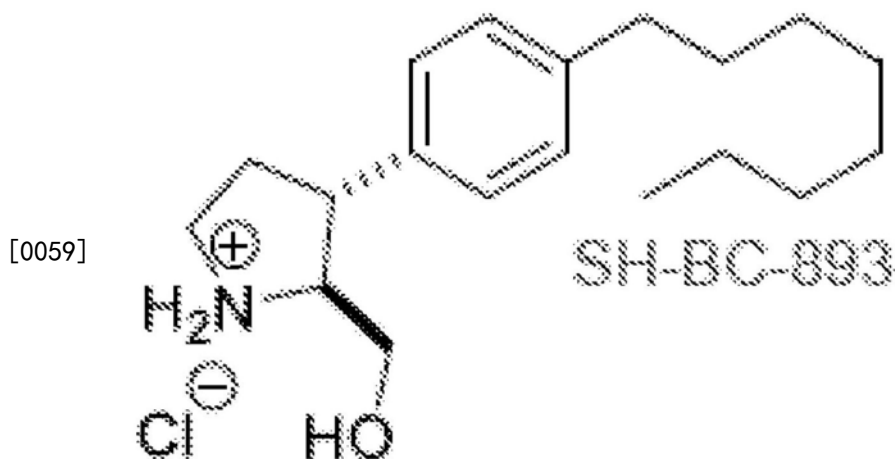
[0054] R_2 是脂族链(C_6-C_{14});

[0055] R_3 是包含氢,卤素,烷基,烷氧基,叠氮化物(N_3),醚, NO_2 或氰化物(CN)的单-、二-、三-或四-芳族取代基;

[0056] n 是独立选自1至3的整数;和

[0057] 其中苯基可以围绕杂环胺在位置3至5之间移动。

[0058] 在其他实施方式中,氮杂环约束的鞘脂类小分子化合物包括:



[0060] 在甚至其他实施方式中,治疗方法包括所述人类受试者被诊断为至少一种疾病。

[0061] 在甚至更多的实施方式中,所述至少一种疾病是结肠癌、前列腺癌、肺癌、胰腺癌、乳腺癌、白血病或肥胖症。

[0062] 在另外甚至更多的实施方式中,所述药物制剂不诱导所述人类受试者的心动过缓。

[0063] 在另外甚至更多的实施方式中,所述药物制剂抑制肿瘤直径增加,肿瘤生物发光增加,肿瘤体积增加,肿瘤质量增加或肿瘤细胞增殖速率增加。

[0064] 在许多其他实施方式中,所述人类疾病的特征在于缓慢生长,快速生长,侵袭性,恶性,Ras阳性,PTEN阴性,良性,转移性,结节性或原发性。

[0065] 在另外许多其他实施方式中,所述治疗方法与FDA批准的护理标准组合。

[0066] 在许多其他实施方式中,所述药物制剂与至少一种FDA批准的化合物组合。

[0067] 在许多其他实施方式中,所述至少一种FDA批准的化合物是甲氨蝶呤、吉西他滨、他莫昔芬、紫杉醇、多西他赛或恩扎鲁胺。

附图说明

[0068] 参照以下附图和数据图,将更全面地理解说明书和权利要求,所述附图和数据图作为本发明的示例性实施方式呈现,并且不应被解释为对本发明范围的完整叙述。

[0069] 图1提供了根据现有技术的鞘氨醇-1-磷酸的分子结构。

[0070] 图2提供了根据现有技术的FTY720的分子结构。

[0071] 图3和4提供了根据本发明的各种实施方式的治疗性小分子类似物的分子结构。

[0072] 图5至22提供了根据本发明的各种实施方式用于生产治疗性小分子类似物的反应途径。

[0073] 图23和24提供了根据本发明的各种实施方式的治疗性小分子类似物的分子结构。

[0074] 图25至27提供了描述根据本发明的各种实施方式的治疗性小分子类似物的作用机制的方面的示意图。

[0075] 图28提供了根据本发明的各种实施方式的治疗性小分子类似物的分子结构。

[0076] 图29提供了总结根据本发明的各种实施方式的芳基相对于羟甲基的立体化学影

响对治疗性小分子类似物杀死前列腺癌细胞能力的影响研究的数据图。

[0077] 图30提供了根据本发明的各种实施方式的治疗性小分子类似物的分子结构。

[0078] 图31提供了总结根据本发明各种实施方式的吡咯烷环的氮上的电荷对治疗性小分子类似物杀死前列腺癌细胞能力的影响研究的数据图。

[0079] 图32提供了总结根据本发明的各种实施方式的治疗性小分子类似物对S1P受体激活作用研究的数据图。

[0080] 图33提供了总结化合物5相对于FTY720在体外完整细胞中磷酸化效率研究的数据图。

[0081] 图34和35提供了总结根据本发明的各种实施方式的治疗性小分子类似物对心率的影响研究的数据图。

[0082] 图36提供了显示根据本发明的各种实施方式的治疗性小分子类似物对心率的影响的遥测读数。

[0083] 图37提供了总结根据本发明实施方式的治疗性小分子类似物对淋巴细胞隔离作用研究的数据图。

[0084] 图38和39提供了根据本发明的各种实施方式的治疗性小分子类似物的分子结构。

[0085] 图40提供了总结根据本发明的各种实施方式的各种治疗性小分子类似物影响营养转运蛋白表达的能力研究的数据图。

[0086] 图41提供了总结关于根据本发明的各种实施方式的治疗性小分子类似物在结直肠癌移植瘤模型中影响肿瘤活性的能力研究的数据图。

[0087] 图42和图43提供了根据本发明的各种实施方式的治疗性小分子类似物的分子结构。

[0088] 图44提供了根据本发明的各种实施方式的几种能够诱导空泡化(vacuolation)、CD98损失和细胞死亡的鞘脂的图示。

[0089] 图45提供了根据本发明的各种实施方式的治疗性小分子类似物的分子结构。

[0090] 图46提供了根据本发明的各种实施方式的链尾长度对各种小分子类似物的影响的图示。

[0091] 图47提供了根据本发明的各种实施方式的治疗性小分子类似物的分子结构。

[0092] 图48提供了根据本发明的各种实施方式的几种能够诱导空泡化,CD98损失和细胞死亡的小分子类似物的图示。

[0093] 图49提供了根据本发明的各种实施方式的治疗性小分子类似物的分子结构。

[0094] 图50提供了根据本发明的各种实施方式的能够诱导空泡化和CD98损失的几种小分子类似物的点状图。

[0095] 图51A至51G提供了治疗性小分子类似物的分子结构,显微镜捕获图像和详述小分子类似物触发营养转运蛋白内化和代谢变化而不激活S1P受体的能力的图形数据。

[0096] 图52A和52B提供了详述根据本发明实施方式即使在抗细胞凋亡的细胞中也不发生由小分子类似物引起的诱导性细胞死亡的图形数据。

[0097] 图53A至53I提供了详述根据本发明的实施方式的小分子类似物选择性杀死癌细胞的能力的图形数据。

[0098] 图54A至54F提供了详述了根据本发明的实施方式的小分子类似物选择性杀死表

达癌基因或缺乏肿瘤抑制基因的细胞并抑制体内肿瘤生长的能力图形数据和显微镜捕获图像。

[0099] 图55A-55F提供了详述了根据本发明的实施方式的小分子类似物诱导空泡化的能力的显微镜捕获图像和图形数据。

[0100] 图56A至56E提供了表征根据本发明的实施方式由小分子类似物诱导的空泡化(vacuolation)的显微镜捕获图像。

[0101] 图56F和57A至57D提供了蛋白质印迹法(western-blot)数据和显微镜捕获图像,详述了根据本发明实施方式小分子类似物破坏PIKfyve定位而不破坏活性的能力。

[0102] 图58A至图58D提供了图形数据和显微镜捕获图像,详述了根据本发明的实施方式小分子类似物破坏PIKfyve定位而不破坏活性的能力。

[0103] 图59A至59C提供了图形数据和显微镜捕获图像,详述了根据本发明的实施方式小分子类似物激活PP2A作为诱导营养转运蛋白丢失和空泡化的手段的能力。

[0104] 图60A至60E提供了图形数据和显微镜捕获图像,详述了根据本发明的实施方式小分子类似物而不是其他鞘脂类,经由两种截然不同的PP2A依赖机制诱导表面营养转运蛋白丢失和空泡化的能力。

[0105] 图61A至61H提供了图形数据和显微镜捕获图像,详述了根据本发明的实施方式小分子类似物减少自噬通量和巨胞饮泡(macropinosome)降解的能力。

[0106] 图62A和62B提供了图形数据和显微镜捕获图像,详述了根据本发明的实施方式小分子类似物改变PIKfyve定位但不改变活性的能力。

[0107] 图63A至63F提供了图形数据和显微镜捕获图像,详述了根据本发明的实施方式空泡化增强了小分子类似物体外和体内的抗肿瘤作用。

[0108] 图64A和64B提供了详述根据本发明实施方式空泡化增强了细胞死亡的图形数据。

[0109] 图65A至65J提供了图形数据和显微镜捕获图像,详述了小分子类似物饿死前列腺癌细胞并限制前列腺肿瘤生长的能力。

[0110] 图66A至66C提供蛋白质印迹法(western-blot)数据、图形数据和显微镜捕获图像,详述了根据本发明的实施方式小分子类似物在体外和体内阻断前列腺癌细胞中脂质和氨基酸摄取的能力,而66D和E显示对肿瘤细胞的选择性毒性。

[0111] 图67提供了根据本发明实施方式小分子类似物抑制前列腺癌进展的能力的显微镜捕获图像。

具体实施方式

[0112] 现在转向附图和数据,公开了能够从多种治疗机制(包括触发细胞营养转运蛋白下调和阻断溶酶体融合反应)治疗疾病(包括肿瘤和癌症)的分子,由这些分子形成的药物,这些分子的合成方法以及使用这种治疗剂治疗病症的方法。在一些实施方式中,分子是约束的氮杂环鞘脂类化合物。小分子的另外的实施方式是非对映异构体3-和4-C-芳基吡咯烷。实施方式可以以纯化合物形式或以药学上有效的盐的形式存在。在其他实施方式中,提供了涉及疾病治疗的制剂和药物。在一些这样的实施方式中,这些制剂和药物靶向癌症例如白血病、前列腺癌、结肠癌、肺癌、胰腺癌和乳腺癌以及潜在的其他疾病,包括其中致癌性Ras突变或PTEN缺失与肿瘤细胞相关的疾病。在其它实施方式中,靶向疾病涉及进食紊乱,

例如肥胖。治疗性实施方式含有治疗有效剂量的一种或多种小分子化合物,其以药学上有效的盐或纯的形式存在。实施方式允许各种制剂,包括但不限于用于口服、静脉内或肌肉内施用的制剂。其他另外的实施方式提供使用治疗量的小分子的疾病治疗方案。

[0113] 除了药物和治疗的实施方式之外,实施方式还涉及氮杂环约束的鞘脂类分子诱导细胞中细胞生物能量的变化的能力。由于获得营养物质的减少,该机制的实施方式会引起生物能量应激。因此,在一些实施方式中,应激将导致肿瘤细胞的死亡;在其他实施方式中,应激不会在正常健康的细胞中引起毒性。本发明的许多实施方式涉及这些分子降低细胞表面上的营养转运蛋白、低密度脂蛋白降解、巨胞饮泡降解和自噬的能力。

[0114] 定义

[0115] 为了说明的目的,除非另有说明,否则使用以下定义。

[0116] “鞘氨醇-1磷酸(S1P)”是磷脂化的生物化学分子,其衍生自脂肪酸并参与多种细胞信号反应。分子的结构如图1所示。

[0117] “S1P受体”是由S1P靶向的一类G蛋白偶联受体。存在五种亚型,包括S1P受体1,S1P受体2,S1P受体3,S1P受体4和S1P受体5。

[0118] “蛋白质磷酸酶2(PP2A)”是具有丝氨酸/苏氨酸磷酸酶活性的酶,具有广泛的底物特异性和不同的细胞功能。已知该酶影响各种信号转导途径,包括几个致癌信号级联。

[0119] “FTY720”(2-氨基-2-[2-(4-辛基苯基)乙基]丙烷-1,3-二醇盐酸盐),如图2所示,是合成的免疫调节剂,其在带有疏水性脂族链的芳族部分上带有氨基二醇官能团。该分子也被称为芬戈莫德,并以商品名GilenyaTM出售用于治疗复发缓解型多发性硬化症。

[0120] 技术术语

[0121] “酰基”是指-R-C=O基团。

[0122] “醇”是指具有键合到饱和的烷烃样化合物的-OH基团的化合物(ROH)。

[0123] “烷基”是指当从烷烃中除去氢原子时残留的部分结构。

[0124] “烷基膦酸酯”是指键合到磷酸酯的酰基, $\text{RCO}_2\text{PO}_3^{2-}$ 。

[0125] “烷烃”是指仅含有单键的碳和氢的化合物。

[0126] “烯烃”是指含有碳-碳双键的烃, $\text{R}_2\text{C}=\text{CR}_2$ 。

[0127] “炔烃”是指含有碳-碳三键的烃结构。

[0128] “烷氧基”是指特征在于键合到氧原子的烷基的分子结构的一部分。

[0129] “芳基”是指衍生自芳环的任何官能团或取代基。

[0130] “胺”分子是含有一个或多个键合到氮原子的有机取代基的化合物, RNH_2 、 R_2NH 或 R_3N 。

[0131] “氨基酸”是指在羧基旁边的碳原子上具有氨基的双官能化合物, $\text{RCH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ 。

[0132] “叠氮化物”是指 N_3 。

[0133] “氰化物”是指CN。

[0134] “酯”是含有 $-\text{CO}_2\text{R}$ 官能团的化合物。

[0135] “醚”是指具有键合到相同氧原子的两个有机取代基的化合物,即 $\text{R}-\text{O}-\text{R}'$ 。

[0136] “卤素”或“卤代”是指氟(F)、氯(Cl)、溴(Br)或碘(I)。

[0137] “烃”是指完全由元素碳(C)和氢(H)组成的有机化合物。

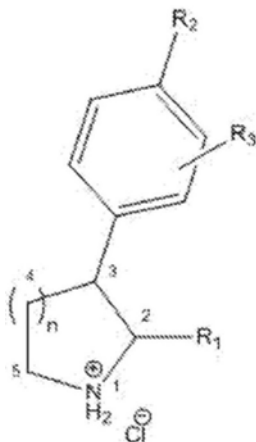
[0138] “磷酸酯”、“膦酸酯”或“PO”是指含有元素磷(P)和氧(O)的化合物。

[0139] 以上和整个申请分子式中的“R”是指任何合适的有机分子。

[0140] C-芳基氮杂环约束的吡咯烷分子

[0141] 根据本发明实施方式的化合物是基于非对映异构体3-和4-C-芳基2-羟甲基吡咯烷。根据本发明的实施方式的化学化合物在图3中示出,并如下图所示。实施方式包含如图3所示的分子,此类分子的磷酸酯,此类分子的磷酸酯或其药学上可接受的盐,其中:

[0142]



[0143] R_1 是选自烷基链, $(CH_2)_n OH$, $CHOH$ -烷基, $CHOH$ -炔烃, $(CH_2)_n OMe$, $(CH_2)_n PO(OH)_2$ 及其酯, $CH=CHPO(OH)_2$ 及其酯, $(CH_2CH_2)_n PO(OH)_2$ 及其酯和 $(CH_2)_n OPO(OH)_2$ 及其酯, $(CH_2)_n PO_3$ 及其酯的任选的官能团,其中Me是烷基、烯烃或炔烃;

[0144] R_2 是脂族链 (C_6-C_{14});

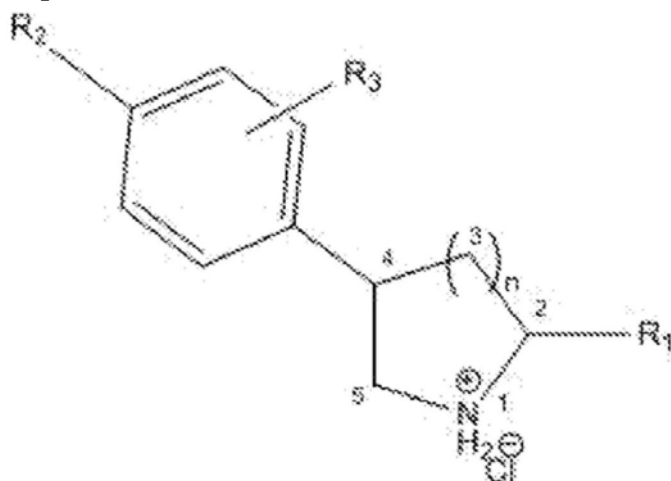
[0145] R_3 是包含氢, 卤素, 烷基, 烷氧基, 叠氮化物 (N_3), 醚, NO_2 或氰化物 (CN) 的单-、二-、三-或四-芳族取代基;

[0146] n 是独立选自1、2、3的整数;和

[0147] 其中苯基可以围绕五个碳原子移动,例如从环位置3至4至5等。

[0148] 在进一步的实施方式中,C-芳基可以移到3或4位,其中未被C-芳基占据的位置现在为H(即 CH_2),如图4所示,并转载如下。

[0149]



[0150] 在另外的实施方式中,可以将烷基、 CH_2OH 或 $(CH_2)_n OH$ 基团添加至位置5。

[0151] 在另外其他实施方式中,就其位置而言, R_2 和 R_3 取代基可以围绕苯环具有不同的组合。

[0152] 在另外其他实施方式中, R_2 可以是不饱和烃链。

[0153] 在另外其他实施方式中, R_1 可以是具有1至6个碳的烷基。

[0154] 应理解的是, 本发明中的化合物可作为立体异构体存在, 包括磷酸酯, 麟酸酯, 对映异构体, 非对映异构体, 顺式(cis), 反式(trans), 顺式(syn), 反式(anti), 溶剂化物(包括水合物), 互变异构体及其混合物都考虑在本发明的化合物内(例如参见图3a至3b, 5a, 6a, 7c和9)。

[0155] 在化合物为磷酸酯或麟酸酯的许多实施方式中, R_1 可以是例如 $(CH_2)_n PO(OH)_2$ 及其酯, $CH=CHPO(OH)_2$ 及其酯, $(CH_2CH_2)_n PO(OH)_2$ 及其酯和 $(CH_2)_n OPO(OH)_2$ 及其酯。

[0156] 要求保护的发明也可涉及药学上可接受的盐。“药学上可接受的盐”保留了化合物的理想生物活性而没有不希望的毒理学效应。盐可以是具有合适的酸的盐, 包括但不限于盐酸, 氢溴酸, 硫酸, 磷酸, 硝酸等; 乙酸, 草酸, 酒石酸, 琥珀酸, 苹果酸, 苯甲酸, 双羟萘酸, 海藻酸, 甲磺酸, 萘磺酸等。并且, 掺入的阳离子可以包括铵, 钠, 钾, 锂, 铯, 铜, 钡, 铷, 钙等; 或有机阳离子如四烷基铵和三烷基铵阳离子。酸性盐和阳离子盐的组合也是有用的。包括其他酸的盐和/或阳离子的盐, 例如具有三氟乙酸、氯乙酸和三氯乙酸的盐。

[0157] 适用于本发明实践的其它氮杂环约束的鞘脂类分子以及修饰的氮杂环约束的鞘脂类分子对于本领域技术人员将是显而易见的。一些分子可以包括任何非对映异构体C-芳基吡咯烷化合物。此外, 即使分子在结构上与上述化合物不同, 这些分子也可以采用多种作用机制来抑制肿瘤生长, 而不诱导有毒的S1P受体活性。

[0158] C-芳基约束的吡咯烷分子的合成

[0159] 实施方式包括以适当取代的吡咯酮或1-溴-4-辛基苯开始的非对映异构的C-芳基吡咯烷。氮杂环约束的鞘脂类小分子化合物的一些列出的实施方式来源于类似的反应。

[0160] 化合物3: 化合物3和4的合成以吡咯酮3a (3a, 来自图5) 的不同立体异构体(对化合物4的(2S, 4R)) 开始。化合物3是化合物6、9和10的前体。为了合成中间体(2R, 3S)-叔丁基-3-(4-溴苯基)-2-((叔丁基二苯基硅烷氧基)甲基)-5-氧代吡咯烷-1-羧酸酯(3b), 在氩气下将1,4-二溴苯(9.44g, 40mmol)溶于无水 Et_2O (86mL)中。将该溶液冷却至 $-20^{\circ}C$, 滴加 $n-BuLi$ (己烷中2.5M, 16mL, 40mmol)。加完后, 将该溶液在 $-20^{\circ}C$ 下搅拌1小时。然后将 $CuBr \cdot DMS$ (4.11g, 20.0mmol)一次性加入到所述混合物中。将铜酸盐混合物在 $-20^{\circ}C$ 下再搅拌1小时, 然后冷却至 $-78^{\circ}C$ 。在另一个干燥的烧瓶中, 在氩气下将3a(1.8g, 4.0mmol)溶于无水 Et_2O (22mL)中, 并且还冷却至 $-78^{\circ}C$ 。将 $TMSCl$ (1.02mL, 8mmol)加入到后一溶液中。将该溶液通过套管逐滴转移到所述铜酸盐混合物中。将该混合物在 $-78^{\circ}C$ 下搅拌1小时, 并升温至室温过夜。将反应淬灭并用饱和 NH_4Cl 和0.5M NH_4OH 的1:1溶液洗涤三次, 然后用盐水洗涤。用 $MgSO_4$ 干燥有机层, 过滤, 减压浓缩。然后通过快速色谱法(己烷: $EtOAc$, 10:1至6:1)纯化残余物以提供3b。

[0161] 为了合成化合物3c (2R, 3S)-叔丁基-2-((叔丁基二苯基硅烷氧基)甲基)-3-(4-辛基苯基)-5-氧代吡咯烷-1-羧酸酯, 按照以下步骤进行。将1-辛炔(398 μ L, 2.70mmol)和儿茶酚硼烷(1.0M在THF中, 2.70mL, 2.70mmol)的溶液在 $70^{\circ}C$ 下在氩气氛下加热2小时。使反应混合物冷却至室温。向所述反应混合物中加入化合物3b(1.1g, 1.8mmol)的DME(21.9mL)溶液, 然后加入 $Pd(PPh_3)_4$ (62mg, 0.054mmol)和1N $NaHCO_3$ 水溶液(16.8mL)。将所述反应混合物在剧烈搅拌下回流4小时。将所述混合物冷却至室温并加入盐水溶液。用 Et_2O 将所述混合物萃取3次, 用 $NaSO_4$ 干燥合并的有机层并过滤。减压除去溶剂, 通过快速色谱法(己烷: $EtOAc$, 8:

1至6:1)纯化残余物,得到浅黄色油状物。然后将该油溶于EtOAc (30mL)中并加入Pd/C (10%, 192mg, 0.18mmol)。将空气从烧瓶中抽出并用H₂代替。如TLC所示完成(过夜)后,将反应混合物通过硅藻土过滤。减压除去溶剂,得到氢化产物化合物3c (0.80g, 两步69%), 为浅黄色油状物。

[0162] 为了合成中间化合物3d ((R)-叔丁基-2-((叔丁基二苯基硅烷氧基)甲基)-3-(4-辛基苯基)-5-氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-3-羧酸酯), 进行以下步骤: 将3c (257mg, 0.40mmol) 在无水THF (4.0mL) 中的溶液在氩气氛下冷却至-78℃。将LiHMDS (1M, 在THF中, 0.44mL, 0.44mmol) 滴加到该溶液中。将混合物在-78℃搅拌1小时。在氩气氛下的另一个烧瓶中, 也将PhSeBr (104mg, 0.44mmol) 在无水THF (1mL) 中的溶液冷却至-78℃。然后将苯硒基溴溶液通过套管逐滴转移到反应混合物中。将该混合物在-78℃下搅拌2小时, 在TLC上不再可见起始物质。用饱和NH₄Cl溶液淬灭反应, 用CH₂Cl₂稀释并分离两相。将水相用CH₂Cl₂萃取两次并用MgSO₄干燥合并的有机相, 过滤。减压除去溶剂。将残余物溶于烧瓶中的CH₂Cl₂ (2mL) 中并冷却至-78℃。将过氧化氢溶液 (H₂O中的30% (w/w), 204μL) 和吡啶 (160μL, 2.2mmol) 依次加入到溶液中。使该溶液升温至室温并搅拌1小时。用饱和NH₄Cl溶液淬灭反应, 并用CH₂Cl₂萃取三次。合并有机层, 用NaSO₄干燥并过滤。减压除去溶剂, 通过快速色谱法 (己烷:EtOAc, 6:1) 纯化残余物, 得到呈黄色油状的3d (192mg, 两步75%)。

[0163] 中间体化合物3e ((2R,3R)-叔丁基-2-((叔丁基二苯基硅烷氧基)甲基)-3-(4-辛基苯基)-5-氧代吡咯烷-1-羧酸酯) 是使用以下步骤从3d合成。将Pd/C (10%, 28mg, 0.027mmol) 加入到3d (170mg, 0.27mmol) 的EtOAc (30mL) 溶液中。将空气从烧瓶中抽出并用H₂代替。如TLC所示完成(过夜)后, 将反应混合物通过硅藻土过滤。减压除去溶剂, 通过快速色谱法 (己烷:EtOAc, 6:1) 纯化残余物, 得到浅黄色油状的氢化产物化合物3e (150mg, 88%)。

[0164] 中间体化合物3f ((2R,3R,5S)-叔丁基-5-烯丙基-2-((叔丁基二苯基硅烷氧基)甲基)-3-(4-辛基苯基)吡咯烷-1-羧酸酯) 是通过至少以下步骤合成: 在氩气氛下将化合物3e (105mg, 0.16mmol) 和无水THF (2.7mL) 加入干燥的烧瓶中, 然后将溶液冷却至-78℃。滴加三乙基硼氢化锂 (1.0M, 在THF中, 80μL, 0.080mmol), 并将该混合物在-78℃下搅拌1小时。在另一干燥的烧瓶中, 在氩气下将对甲苯磺酸吡啶盐 (22.0mg, 0.088mmol) 溶于无水MeOH (1.80mL) 中, 并且也冷却至-78℃。将该溶液通过套管逐滴转移到反应混合物中。校准pH值为弱酸性 (pH~6), 否则应加入更多的对甲苯磺酸吡啶盐。使混合物升温至室温并搅拌过夜。反应用饱和NaHCO₃溶液淬灭, 用CH₂Cl₂萃取三次。合并有机层, 用NaSO₄干燥并过滤。减压除去溶剂, 得到黄色油状的粗O-甲基缩醛产物 (48mg)。然后在氩气氛下将该油状物溶于无水CH₂Cl₂ (0.34mL) 中, 并将溶液冷却至-78℃。将烯丙基三甲基硅烷 (59μL, 0.365mmol) 和四氯化钛 (1.0M, 在CH₂Cl₂中, 80μL, 0.080mmol) 顺序加入到所述溶液中。将橙色混合物在-78℃下搅拌1小时, 用水淬灭并用CH₂Cl₂萃取三次。合并有机层, 用NaSO₄干燥并过滤。减压除去溶剂, 通过快速色谱法 (己烷:EtOAc, 6:1) 纯化残余物, 得到浅黄色油状的氢化产物3f (20mg, 两步41%)。

[0165] 下一个中间体化合物3g或者 (2R,3R,5R)-叔丁基-2-((叔丁基二苯基硅烷氧基)甲基)-5-(羟甲基)-3-(4-辛基苯基)吡咯烷-1-羧酸酯是通过以下合成。在氩气氛下, 将化合物3f (57mg, 0.085mmol) 溶于配备有冷凝器的干燥烧瓶中的无水甲苯 (1.8mL) 中。然后将N-

烯丙基三苯胺 (51mg, 0.17mmol) 和格拉布 (Grubb's) 第二代催化剂 (14.4mg, 0.017mmol) 依次加入到化合物3f的溶液中。将混合物回流3天, 冷却至室温并用盐水淬灭。用 CH_2Cl_2 萃取该混合物三次。合并有机层, 用 NaSO_4 干燥并过滤。减压除去溶剂, 并且通过快速色谱法 (己烷: EtOAc, 40:1至20:1) 纯化残余物, 得到呈黄色油状物的二取代链烯烃异构体 (40mg, 70%)。将该油 (40mg, 0.06mmol) 溶于MeOH和 CH_2Cl_2 (1:1) 的溶液 (6mL) 中并冷却至 -78°C 。在所述溶液中通入臭氧气泡, 直到深蓝色持续。TLC不再观察到烯烃原料。然后向溶液中通入氩气气泡以去除残留的臭氧, 直到观察不到更多的蓝色。小心加入二甲基硫化物 (0.4mL), 使反应缓慢温热至室温, 搅拌过夜。减压除去溶剂。将残余物溶于MeOH (1.96mL) 中并冷却至 0°C 。加入硼氢化钠 (6.8mg, 0.180mmol) 并将反应在 0°C 下搅拌4小时。通过TLC不再观察到醛起始物质。用饱和 NH_4Cl 溶液猝灭反应, 用 CH_2Cl_2 萃取三次。合并有机层, 用 NaSO_4 干燥, 过滤。减压除去溶剂, 通过快速色谱法 (己烷: EtOAc, 8:1至4:1) 纯化残余物, 得到3g (23.8mg, 两步75%), 为黄色油状物 (23.8mg, 三步42%)。

[0166] 最后, 化合物3 ((2R, 3R, 5R) -2, 5-双(羟甲基) -3-(4-辛基苯基) 吡咯烷鎓氯化物) 的合成以下列步骤结束: 将HCl (4M在1, 4-二恶烷中, 1.6mL, 6.4mmol) 加入到具有3g (21mg, 0.032mmol) 的烧瓶中, 并将溶液在室温下搅拌直到通过TLC显示完成 (24-48小时)。减压除去溶剂, 并将1, 4-二恶烷 (2mL) 加入到烧瓶中, 蒸发除去残余的HCl。通过快速色谱法 (CH_2Cl_2 : EtOH, 4:1至1:1) 纯化粗混合物, 得到黄色油状物。将该油状物溶于水中, 通过塑料注射器过滤器 (孔径: $0.45\mu\text{m}$) 过滤, 冻干, 得到呈黄色固体的化合物3 (10.0mg, 88%)。

[0167] 化合物4: 根据合成化合物3的程序获得化合物4, 如图6所示。初始分子化合物4a是化合物3a的立体异构体。

[0168] 化合物9: 化合物9 ((4S, 5R) -5-(羟甲基) -4-(4-辛基苯基) 吡咯烷-2-酮) 的合成以化合物3c开始, 如图7所示。在 0°C 下, 将三氟乙酸 (6.2mmol, 0.48mL) 和 H_2O (0.05mL) 的溶液 (9:1) 加入到具有3c (40mg, 0.062mmol) 的烧瓶中。15分钟后, 将溶液温热至室温并搅拌过夜。TLC不再观察到原料。减压除去溶剂。将残余物溶于 CH_2Cl_2 中, 用饱和 NaHCO_3 溶液萃取三次。用盐水洗涤有机层, 用 MgSO_4 干燥并过滤。减压除去溶剂, 残余物通过快速色谱法 (CH_2Cl_2 : MeOH: NH_4OH , 100:8:1) 纯化, 得到呈白色固体的9 (12.0mg, 63%)。

[0169] 化合物10: 根据合成化合物9的程序获得化合物10的合成。如图8所示, 化合物10的合成过程从化合物3e开始。

[0170] 化合物11: 根据合成化合物9的程序获得化合物11的合成。如图9所示, 化合物11的合成过程从化合物4e开始。

[0171] 化合物5: 如图10所示, 化合物5的合成从化合物4c开始。以下述方式合成第一中间体5a ((2S, 3R) -叔丁基-2-((叔丁基二苯基硅烷氧基) 甲基) -3-(4-辛基苯基) 吡咯烷-1-羧酸酯)。将化合物4c (120mg, 0.187mmol) 在无水THF (2.4mL) 中的溶液冷却至 0°C 。加入硼烷二甲基硫醚络合物 (2M的THF溶液, 0.37mL, 0.748mmol), 使反应温热至室温并搅拌过夜。TLC不再观察到原料。减压除去溶剂。将残余物与MeOH (2mL) 共同蒸发两次后, 将其溶于 CH_2Cl_2 中, 用饱和 NaHCO_3 溶液萃取三次。用盐水洗涤有机层, 用 MgSO_4 干燥并过滤。减压除去溶剂, 通过快速色谱法 (己烷: EtOAc, 8:1) 纯化残余物, 得到浅黄色油状物5a (94.6mg, 81%)。

[0172] 下一个中间体化合物5b ((2S, 3R) -叔丁基-2-(羟甲基) -3-(4-辛基苯基) 吡咯烷-1-羧酸酯) 的合成始于将5a (271mg, 0.432mmol) 的无水THF (14.3mL) 溶液冷却至 0°C 。加入四

丁基氟化铵溶液(1M在THF中,0.756mL,0.756mmol),使反应温热至室温并搅拌过夜。TLC不再观察到起始原料。用饱和NaHCO₃溶液将反应淬灭,用CH₂Cl₂萃取三次。用盐水洗涤有机层,用MgSO₄干燥并过滤。减压除去溶剂,通过快速色谱法(己烷:EtOAc,6:1至4:1)纯化残余物,得到呈无色油状物的5b(155mg,92%)。

[0173] 在合成化合物5((2S,3R)-2-(羟甲基)-3-(4-辛基苯基)吡咯烷鎓氯化物)的最后步骤中,将HCl(4M在1,4-二恶烷中,0.98mL,3.9mmol)加入到化合物5b(15mg,0.039mmol)的烧瓶中,并将溶液在室温下搅拌直至通过TLC显示完成(24至48小时)。减压除去溶剂,并将1,4-二恶烷(2mL)加入到烧瓶中,并蒸发除去残余的HCl。通过快速色谱法(CH₂Cl₂:EtOH,7:1至4:1)纯化粗混合物,以得到黄色油状物。将该油状物溶于水中,通过塑料注射器过滤器(孔径:0.45μm)过滤,冻干,得到呈黄色固体的化合物5(11.0mg,88%)。

[0174] 化合物5-P:如图11所示,化合物5-P的合成从化合物5b开始。在起始步骤中,化合物5c(叔丁基(2S,3R)-2-(((二叔丁氧基磷酰基)氧基)甲基)-3-(4-辛基苯基)吡咯烷-1-羧酸酯)是由中间体化合物5b合成。在氩气氛下在室温下,将二叔丁基N,N-二乙基亚磷酰胺(31μL,28mg,0.104mmol)和1H-四唑(15mg,0.212mmol)依次加入到化合物5b(14mg,0.036mmol)的无水THF(0.45mL)溶液中。在此温度下将混合物搅拌过夜,然后冷却至-78℃。向该混合物中加入m-CPBA(72%,25mg,0.104mmol)在CH₂Cl₂(0.45mL)中的溶液,并将反应升温回到室温。0.5小时后,用饱和NaHCO₃水溶液淬灭反应,并用EtOAc萃取三次。用盐水洗涤有机层,用MgSO₄干燥并过滤。减压除去溶剂,通过快速色谱法(己烷:EtOAc,4:1至2:1)纯化残余物,得到呈无色油状物的化合物5c(10mg,48%)。

[0175] 在下一步中,由化合物5c合成化合物5-P(((2S,3R)-3-(4-辛基苯基)吡咯烷-1-鎓-2-基)磷酸氢甲酯)。将HCl(4M在1,4-二氧杂环己烷中,0.34mL,1.35mmol)加入到具有5b(5mg,0.009mmol)的烧瓶中,并将该溶液在室温下搅拌24小时。减压除去溶剂,将1,4-二恶烷(2mL)加入到烧瓶中,并蒸发除去残余的HCl。通过快速色谱法(i-PrOH:NH₄OH:H₂O,8:2:1至8:4:1)纯化粗混合物,得到呈白色固体的5-P(2.5mg,78%)。

[0176] 化合物6:根据用于合成化合物5的程序获得化合物6。用于合成化合物6的起始分子为中间化合物3c,如图12所示。

[0177] 化合物7:用于合成化合物7的起始分子是中间体化合物3e,如图13所示。根据合成化合物5的程序获得化合物7,在合成中间体化合物7b((2R,3R)-叔丁基-2-(羟甲基)-3-(4-辛基苯基)吡咯烷-1-羧酸酯)方面不同。为了合成中间体化合物7b,将化合物7a(22mg,0.035mmol)在无水THF(1.14mL)中的溶液冷却至0℃。加入四丁基氟化铵溶液(1M在THF中,61μL,0.061mmol),使反应温热至室温并搅拌过夜。由TLC指示起始材料并非全部消耗。然后将反应物加热至40℃48小时,用饱和NaHCO₃溶液淬灭,并用CH₂Cl₂萃取三次。用盐水洗涤有机层,用MgSO₄干燥并过滤。减压除去溶剂,通过快速色谱法(己烷:EtOAc,6:1至4:1)纯化残余物,得到呈无色油状物的7b(12.5mg,92%)。

[0178] 化合物8:根据用于合成化合物5和7的程序获得化合物8。用于合成化合物6的起始分子为中间化合物4e,如图14所示。

[0179] 化合物12:化合物12的合成从中间体化合物6b开始,如图15所示。为了合成中间体化合物12a,将三乙胺(22μL,0.154mmol)加入到化合物6b(30mg,0.077mmol)在无水CH₂Cl₂(0.30mL)中的溶液中,然后将溶液冷却至0℃。将甲磺酰氯(9.0μL,0.116mmol)加入到该溶

液中,使反应升温至室温并搅拌过夜。将反应倒入水中并用EtOAc萃取三次。用盐水洗涤有机层,用MgSO₄干燥并过滤。减压除去溶剂,通过快速色谱法(己烷:EtOAc,3:1至2:1)纯化残余物,得到呈无色油状物的12a(34.0mg,94%)。

[0180] 为了合成中间体化合物12b,将化合物12a(29mg,0.062mmol)在无水THF(0.06mL)中的溶液冷却至0℃。将三乙基硼氢化锂(1.0M在THF中,248μL,0.248mmol)加入到该溶液中,使反应温热至室温并搅拌5小时。将反应倒入水中并用EtOAc萃取三次。用盐水洗涤有机层,用MgSO₄干燥并过滤。减压除去溶剂,通过快速色谱法(己烷:EtOAc,14:1)纯化残余物,得到呈无色油状物的12b(20.7mg,89%)。

[0181] 最后,为了合成化合物12,将HCl(4M在1,4-二恶烷中,0.68mL,2.7mmol)加入到具有12b(10mg,0.027mmol)的烧瓶中,并将溶液在室温下搅拌过夜。减压除去溶剂,并将1,4-二恶烷(1mL)加入到烧瓶中并蒸发以除去残余的HCl。通过快速色谱法(CH₂Cl₂:EtOH,9:1至3:1)纯化粗混合物,得到黄色油状物。将该油状物溶于水中,通过塑料注射器过滤器(孔径:0.45μm)过滤,冻干,得到呈黄色固体的12(8.0mg,96%)。

[0182] 化合物13:根据用于合成化合物12的程序获得化合物13。用于合成化合物13的起始分子为中间化合物5b,如图16所示。

[0183] 化合物14:图17说明了合成化合物14的过程。化合物14的合成从中间体化合物6b开始。将化合物6b(35mg,0.090mmol)在无水THF(0.75mL)中的溶液冷却至0℃。将氢化钠(60%分散在矿物油中,7.2mg,0.180mmol)加入到溶液中,接着加入甲基碘(26mg,12μL,0.180mmol)。使反应升温至室温,并搅拌过夜。将混合物倒入水中,并用EtOAc萃取三次。用盐水洗涤有机层,用MgSO₄干燥并过滤。减压除去溶剂,通过快速色谱法(己烷:EtOAc,4:1)纯化残余物,得到呈无色油状物的14a(33mg,92%)。

[0184] 为了合成化合物14,将HCl(4M在1,4-二恶烷中,0.75mL,3.0mmol)加入到具有化合物14a(12mg,0.030mmol)的烧瓶中,并将溶液在室温下搅拌过夜。减压除去溶剂,将1,4-二恶烷(1mL)加入到烧瓶中,并蒸发除去残留的HCl。通过快速色谱法(CH₂Cl₂:EtOH,9:1至4:1)纯化粗混合物,以得到黄色油状物。将该油状物溶于水中,通过塑料注射器过滤器(孔径:0.45μm)过滤,冻干,得到呈黄色油状物的12(9.9mg,98%)。

[0185] 化合物15:根据用于合成化合物14的程序获得化合物15。用于合成化合物15的起始分子为中间化合物5b,如图18所示。

[0186] 化合物16:图19示出了合成化合物16的过程。化合物16a是根据Ian Manners报道的生成对-十二烷基C₆H₄Br的程序而合成。(Dorn,H.,等,Macromolecules,2003,36,291-297)。化合物16b、16c都是已知的化合物,并且光谱数据与所提出的结构一致,并与文献中报道的那些结果相匹配。(Barracclough,P.等,1995,51,4195-4212;Van Huis,C.A.等,J.J.Bioorg.Med.Chem.2009,17,2501-2511)。

[0187] 为了合成中间体化合物16a,在0℃下在氩气下,将溴化辛基镁溶液(2.0M在乙醚中,10.6mL,21.2mmol)滴加到1,4-二溴苯(5g,21.2mmol)的乙醚溶液(12.5mL)和PdCl₂(dppf)。在室温下搅拌48小时后,将混合物回流2.5小时,暴露于空气中,倒入水中并用乙醚萃取三次。用盐水洗涤合并的有机层,用MgSO₄干燥并过滤。减压除去溶剂,通过制备型薄层色谱(20×20cm,1000μm,4个平板在己烷中)纯化残余物,得到呈无色油状物的化合物16a(4.4g,77%)。该产物含有少量杂质,并在后续反应中直接使用。

[0188] 为了合成中间体化合物16b,将饱和 NaHCO_3 溶液(200mL)加入反式-4-羟基-L-脯氨酸(5g,38.0mmol)的二恶烷和水(1:1,100mL)溶液中。将溶液冷却至 0°C ,逐滴加入 $(\text{Boc})_2\text{O}$ (9.2g,9.7mL,41.8mmol)。反应在室温下搅拌过夜。加入2M HCl 将pH保持在3,用 EtOAc 萃取反应混合物。合并有机层,用 MgSO_4 干燥并过滤。减压除去溶剂,得到呈无色油状的粗产物(8.0g,91%)。将该粗油状物(1.5g,6.5mmol)溶于 CH_2Cl_2 (32mL)中,并一次性加入三氯异氰脲酸(1.5g,6.5mmol)。然后将该混合物冷却至 0°C ,向反应中加入TEMPO(51mg,0.325mmol)。将混合物在 0°C 下搅拌0.5小时,然后温热至室温,再搅拌0.5小时。TLC上不再可见起始物质。然后向混合物中加入水(5mL)。搅拌10分钟后,真空除去有机物,用乙酸乙酯(20mL)稀释,通过硅藻土过滤。用 HCl 溶液(1M,40mL)酸化滤液,用水(10mL)洗涤四次,用盐水(10mL)洗涤,用 MgSO_4 干燥并过滤。减压除去溶剂,得到呈白色固体的化合物16b(1.35g,91%),其直接用于下一步而无需纯化。

[0189] 为了合成中间体化合物16c,将中间体化合物16b(1.35g,5.9mmol)在无水 CH_2Cl_2 (27mL)中的溶液冷却至 0°C 。向溶液中加入叔丁醇(1.7mL,17.7mmol)和DMAP(72mg,0.59mmol)。搅拌5分钟后,向溶液中加入1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐(1.19g,6.2mmol)。使反应升温至室温并搅拌过夜。用饱和 NaHCO_3 溶液淬灭混合物,并用 CH_2Cl_2 萃取三次。用盐水洗涤有机层,用 MgSO_4 干燥并过滤。减压除去溶剂,通过快速色谱法(己烷: EtOAc ,8:1)纯化残余物,得到呈浅黄色油状物的16c(0.96g,57%)。

[0190] 为了合成中间体化合物16d,在 -78°C 下,向1-溴-4-辛基苯(16a)(94mg,0.350mmol)的THF(0.53mL)溶液中滴加 $n\text{-BuLi}$ (2.5M在己烷中,146 μL ,0.364mmol)。搅拌0.5小时后,向所述混合物中加入在THF(0.1mL)中的16c(40mg,0.14mmol),并将该溶液在 -78°C 再搅拌2小时。然后将反应温热至 -40°C ,并搅拌过夜。在 -40°C 下,用饱和 NH_4Cl 溶液淬灭反应混合物,并使其温热至室温。分离有机层,并用 CH_2Cl_2 萃取水层三次。用盐水洗涤合并的有机层,用 MgSO_4 干燥并过滤。减压除去溶剂,通过快速色谱法(己烷: EtOAc ,12:1至8:1)纯化残余物,以得到呈淡黄色油状物的化合物16d(21mg,32%)。

[0191] 为了合成中间体化合物16e,将伯吉斯(Burgess')试剂(15mg,0.064mmol)加入到16e(15mg,0.032mmol)在甲苯(0.3mL)中的溶液中。将混合物在氩气下加热回流4小时,然后冷却至室温并用 EtOAc 稀释。用水、盐水洗涤混合物,用 MgSO_4 干燥并过滤。减压除去溶剂,通过快速色谱法(己烷: EtOAc ,12:1至8:1)纯化残余物,以得到呈浅黄色油状物的化合物16e(10mg,67%)。

[0192] 为了合成中间体化合物16f,将 Pd/C (10%,4.6mg,0.004mmol)加入到16e(20mg,0.044mmol)的 MeOH (1.0mL)溶液中。将空气从烧瓶中抽出并用 H_2 代替。如TLC所示完成(过夜)后,通过硅藻土过滤反应混合物。减压除去溶剂,通过快速色谱法(己烷: EtOAc ,12:1至8:1)纯化残余物,以得到呈白色固体的氢化产物化合物16f(19mg,95%),m.p.(82.5-83.5 $^\circ\text{C}$)。

[0193] 为了合成中间体化合物16g,将氢化铝锂(1.3mg,0.033mmol)在无水THF(1.0mL)中的混合物冷却至 0°C 。然后向混合物中缓慢加入在THF(1.0mL)中的16f(15mg,0.033mmol)。在 0°C 下搅拌1小时后,用水淬灭反应,用 CH_2Cl_2 稀释,用水和盐水洗涤,用 MgSO_4 干燥并过滤。减压除去溶剂,通过快速色谱法(己烷: EtOAc ,4:1)纯化残余物,以得到呈淡黄色油状物的化合物16g(11.4mg,90%)。

[0194] 最后,合成化合物16,将HCl (4M在1,4-二恶烷中,1.2mL,4.621mmol) 加入到具有16g (9mg,0.023mmol) 的烧瓶中,并在室温下搅拌该溶液直至由TLC (1-5h) 显示完成。减压除去溶剂,向烧瓶中加入1,4-二恶烷 (2mL),并蒸发以除去残余的HCl。通过快速色谱法 (CH_2Cl_2 :EtOH,8:1至4:1) 纯化粗混合物,以得到黄色油状物。将该油状物溶于水中,通过塑料注射器过滤器 (孔径:0.45 μm) 过滤,冻干,以得到呈浅黄色固体的化合物5 (7.0mg,93%)。

[0195] 化合物17:根据合成化合物16的步骤获得化合物17,如图20所示。化合物17b是已知的化合物,光谱数据与所提出的结构一致并与文献中报道的那些相符。(Chabaud,P.等,Tetrahedron,2005,61,3725-3731。)

[0196] 化合物18:化合物18的合成示于图21中。根据合成化合物16g的步骤合成化合物18a。

[0197] 为了合成中间体化合物18b,将Crabtree's 催化剂 (5.0mg,0.006mmol) 加入到化合物18a (16mg,0.041mmol) 的无水 CH_2Cl_2 (0.8mL) 溶液中。然后使该浅橙色混合物经受72psi的氢气压力72小时。减压除去溶剂并通过快速色谱法 (己烷:EtOAc,10:1至8:1) 纯化残余物,以得到呈浅黄色油状物的反式氢化产物18b (11.6mg,72%)。

[0198] 最后,为了合成化合物18,将HCl (4M在1,4-二恶烷中,0.75mL,3.0mmol) 加入到具有18b (11.6mg,0.030mmol) 的烧瓶中,并将该溶液在室温下搅拌直到通过TLC (1-2h) 显示完成。减压除去溶剂,并将1,4-二恶烷 (2mL) 加入到烧瓶中,并蒸发除去残余的HCl。通过快速色谱法 (CH_2Cl_2 :EtOH,8:1至4:1) 纯化粗混合物,以得到黄色油状物。将该油状物溶于水中,通过塑料注射器过滤器 (孔径:0.45 μm) 过滤,冻干,以得到呈浅黄色固体的18 (8.5mg,88%)。

[0199] 化合物19:化合物19的合成示于图22中。根据合成化合物18的步骤获得化合物19。根据合成16g的步骤获得化合物19a。

[0200] 药物制剂及其治疗

[0201] 在实施方式中,将小分子氮杂环约束的鞘脂类分子配制成用于治疗的治疗药物。许多实施方式涉及用含有氮杂环约束的鞘脂类分子的药物治疗的方法。在一些实施方式中,药物靶向以增殖性生长或过量营养消耗例如肿瘤、癌症或肥胖症为例的病症。其他实施方式将具有改变养分转运的药物。甚至其他实施方式将具有激活PP2A酶的药物。在甚至其他实施方式中,药物能够错误定位含FYVE指酶磷酸肌醇激酶 (PIKfyve)。

[0202] 在许多这样的实施方式中,治疗剂的施用模式包括但不限于口服,透皮,透粘膜 (例如舌下、鼻、阴道或直肠) 或非肠胃 (例如皮下、肌内、静脉内、推注或连续输注)。所需药物的实际用量取决于诸如受影响个体的大小、年龄和疾病严重程度等因素。所需药物的实际用量也取决于各种氮杂环约束的鞘脂类化合物的有效抑制浓度范围。不同的类似化合物具有不同的有效抑制浓度范围,如以下表1至6中更详细地显示和描述的。

[0203] 在一些实施方式中,氮杂环约束的鞘脂类化合物以治疗有效量作为治疗过程的一部分施用。如本文所用,“治疗”是指改善待治疗的病症的至少一种症状或提供有益的生理效应。例如,一种症状的这种改善可能是抑制肿瘤增殖。肿瘤增殖的评估可以多种方式进行,包括但不限于评估肿瘤直径的变化,肿瘤生物发光的变化,肿瘤体积的变化,肿瘤质量的变化或肿瘤细胞增殖速率的变化。

[0204] 治疗有效量可以是足以防止减轻、改善或消除对这种治疗敏感的疾病或病理状况

的症状的量,所述疾病或病理状况例如癌症像白血病、前列腺癌、结肠癌、肺癌、胰腺癌或乳腺癌,或其中致癌Ras突变为改变的细胞提供多种代谢优势的疾病。在一些实施方式中,治疗有效量是足以减少营养物例如葡萄糖或氨基酸向细胞的运输的量。

[0205] 化合物的剂量、毒性和治疗功效可以例如通过细胞培养物或实验动物中的标准药物步骤来确定,例如用于测定LD₅₀(群体的50%致死的剂量)和ED₅₀(群体的50%治疗有效的剂量)。毒性与治疗效果之间的剂量比是治疗指数,它可以表示为比率LD₅₀/ED₅₀。优选表现出高治疗指数的化合物。尽管可能使用表现出毒性副作用的化合物,但应注意设计一种将此类化合物靶向受影响组织的位点的递送系统,以减少对非肿瘤细胞的潜在损害,并且从而减少副作用。

[0206] 从细胞培养测定或动物研究获得的数据可以用于配制用于人的剂量范围。如果系统地提供药物,则这些化合物的剂量优选在包括ED₅₀的循环浓度范围内,而毒性很小或没有毒性。剂量可以在该范围内变化,这取决于所使用的剂型和使用的施用途。对于在本发明的方法中使用的任何化合物,治疗有效剂量可以从细胞培养分析开始估计。剂量可以在动物模型中配制以达到循环血浆浓度或在待治疗的局部环境中处于一定范围内,所述范围包括如在细胞培养中确定的IC₅₀(即,达到肿瘤生长的半数最大抑制的测试化合物的浓度)。这些信息可以用来更准确地确定人体中有用的剂量。例如,可以通过与质谱联用的液相色谱法来测量血浆中的水平。

[0207] “有效量”是足以实现有益或期望的结果的量。例如,治疗量是达到所需治疗效果的量。该量可以与预防有效量相同或不同,其中预防有效量是预防疾病或疾病症状发作所必需的量。有效量可以以一次或多次施用、应用或剂量施用。组合物的治疗有效量取决于所选择的组合物。该组合物可以每天一次或多次或每周一次或多次给药;包括隔日一次。本领域技术人员将认识到,某些因素可能影响有效治疗受试者所需的剂量和时间,包括但不限于疾病或失调的严重程度,先前的治疗,受试者的一般健康和/或年龄以及其他存在的疾病。此外,用治疗有效量的本文所述组合物治疗受试者可以包括单一治疗或一系列治疗。例如,可以每天施用几次分开的剂量,一次剂量,或循环施用化合物以实现期望的治疗结果。可以施用单一的氮杂环约束的鞘脂类小分子化合物,或者也可以施用各种氮杂环约束的鞘脂类小分子化合物的组合。

[0208] 也可以添加改善这些化合物的溶解度的试剂。例如,所要求保护的化合物可根据所选择的施用途与一种或多种佐剂和/或药学上可接受的载体一起配制。对于口服应用,可以加入明胶、调味剂或包衣材料。通常,对于溶液或乳液,载体可以包括含水或醇/水溶液,对于乳液或悬浮液包括盐水和缓冲介质。非肠胃载体可以包括氯化钠和氯化钾等等。另外,静脉内载体可以包括流体和营养补充剂、电解质补充剂等。

[0209] 也可以存在防腐剂和其他添加剂,如抗微生物剂,抗氧化剂,螯合剂和惰性气体。(一般参见Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Mack,(1980),其公开内容通过引用并入本文)。

[0210] 免疫抑制剂化合物FTY720的抗增殖活性

[0211] FTY720,其化学结构如图2所示,是一种众所周知的免疫抑制剂。当用作免疫抑制剂时,FTY720是需要体内磷酸化的前体药物。一旦被磷酸化,FTY720通过激活并下调S1P受体将淋巴细胞隔离至次级淋巴组织而起到功能拮抗剂的作用。通过隔离淋巴细胞,FTY720

通过从血液循环中除去这些免疫细胞来抑制免疫系统。

[0212] FTY720也是有效的抗增殖剂。(Lee,T.K.等,(2005) Clin.Cancer Res.11,8458-8466;Azuma,H.等,(2002) Cancer Res.62,1410-1419;Chua,C.W.等,(2005) Int.J.Cancer, 117,1039-1048;Azuma,H.等,(2003) J.Urol.169,2372-2377;Neviani,P.等,(2007) J.Clin.Invest.117,2408-2421;其公开内容通过引用并入本文)。近年来,科学家们开始提出将FTY720用作抗癌剂(参见例如Byrd,J.C.等,US2013/0123366,其公开内容通过引用并入本文)。尽管在动物模型中有效,FTY720不能用于人类癌症患者,因为活性磷酸化形式通过对S1P受体1和S1P受体3的作用引发深度心动过缓。(Camm,J.,等(2014) Am.Heart J.168, 632-644;Cohen,J.A.,(2011) Ann.Neurol.69,759-777;Sanna,M.G.等,(2004) J.Biol.Chem.279,13839-13848,其公开内容在此引入作为参考)。这种S1P受体的激活已经消除了FTY720作为抗癌药物的效用。

[0213] FTY720是以名称fingolimod(商标名Gilenya)注册的用于治疗多发性硬化症(MS)的成功的FDA批准的药物。在用于治疗MS的剂量下,FTY720已被证明具有良好的耐受性。然而,为了治疗癌症,需要增加FTY720的剂量到有效量。已显示这一必需量的FTY720经由S1P受体1和3的激活引起心动过缓(参见例如Lee,T.K.等,Clin.Cancer Res.2005,11,8458-8466;Azuma,H.等,Cancer Res.2002,62,1410-1419;Chua,C.W.等,Int.J.Cancer 2005, 117,1039-1048;Azuma,H.等,J.Urol.2003,169,2372-2377;Neviani,P.等,J.Clin.Invest.2007,117,2408-2421.Sanna,M.G.等,J.Biol.Chem.2004,279,13839-13848;和Koyrakh,L.等,Am.J.Transplant.2005,5,529-536;其公开内容通过引用并入本文)。因此,尽管FTY720的治疗癌症的潜力,但剂量限制性心动过缓的副作用使得它不能用于癌症治疗。最近,科学家发表了FTY720可以治疗与S1P受体激活无关的肿瘤细胞。(Romero Rosales,K.等,(2011) .Biochem.J.439,299-311,其公开内容在此引入作为参考)。发现FTY720诱导饥饿样死亡,继发于通过涉及蛋白质磷酸酶2A激活(PP2A)的机制下调氨基酸和葡萄糖的质膜转运蛋白。这表明,不激活S1P受体但保留降低营养转运蛋白表达的能力的鞘脂类分子可能是安全有效的抗癌剂。

[0214] 本领域众所周知的是,所有活细胞都表达转运蛋白以从细胞外环境提供营养物质,例如葡萄糖和氨基酸。因此,抑制肿瘤细胞的营养转运蛋白也可能对非肿瘤性健康细胞产生影响。这种效应可能对健康细胞有害或甚至是有毒的。然而,针对肿瘤细胞的营养转运系统仍然是攻击癌症和其他肿瘤的有趣的,虽然是冒险的,实验性的设想。

[0215] 靶向肿瘤营养转运蛋白的一种治疗可能性是使用竞争性抑制剂(例如根皮素)。然而,竞争性的营养物质运输抑制剂是较差的抗癌药物候选物,因为它们必须达到毫摩尔浓度才能有效。另一方面,针对调节营养转运蛋白运输的进化保守途径可能是可行的。例如,当用鞘脂植物鞘氨醇处理时,酵母下调氨基酸转运蛋白,引发适应性生长停滞(Chung,N.等,J.Biol.Chem.276,35614-21(2001),其公开内容通过引用并入本文)。神经酰胺(一种天然存在的鞘脂)和FDA批准的药物FTY720也下调营养转运蛋白并在哺乳动物细胞中诱导饥饿(Guenther,G.G.等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.105,17402-7(2008);Romero Rosales,K.等,Biochem.J.439,299-311(2011).Welsch,C.A.等,J.Biol.Chem.279,36720-36731(2004);Azuma,H.等,Cancer Res.62,1410-1419(2002);Pchejetski,D.等,Cancer Res.70,8651-8661(2010).Neviani,P.等,J.Clin.Invest.117,(2007);Chua,C.W.等,

Int.J.Cancer 117,1039-48 (2005) .Lee,T.K.等,Clin.Cancer Res.11,8458-8466 (2005) ;在此将其公开引入作为参考)。尽管转运蛋白丢失减缓了肿瘤的生长,但巨胞饮作用(macropinocytosis)和自噬通路的激活会对鞘脂诱导的饥饿提供耐受,特别是在具有活化的Ras的肿瘤中,这两种通路都被上调。(Commisso,C.等,Nature 497,633-7 (2013);White,E.Genes Dev.27,2065-2071 (2013);其公开通过引用并入本文)。因此,很难发现靶向营养摄取的理想抗肿瘤化合物,因为其机理复杂,并且化合物可能需要靶向多种营养转运蛋白通路以减缓肿瘤生长,其可包括下调营养转运蛋白的表达以及阻断巨胞饮作用(macropinocytosis)和自噬通路以及其他营养物质获取机制。

[0216] 其它鞘脂类化合物

[0217] 在先前的研究中,制备了一系列2,3,5-三取代的吡咯烷作为由通用吡咯烷核心支架A代表的FTY720约束的氮杂环类似物(图23)(Hanessian,S.等,(2007) Bioorg.Med.Chem.Lett.17,491-494,其公开通过引用并入本文)。与FTY720磷酸盐相比,(2R,3R,5R)-2,5-二羟甲基-3-(4-辛基)苯基吡咯烷(化合物1)和相应的对映异构体(化合物2)的这些磷酸化形式对S1P4和S1P5比S1P1和S1P3显示出显著的选择性。该观察确认FTY720的构象弹性氨基二醇部分的化学修饰可导致对S1P受体的选择性亲和性(Clemens,J.J.等,(2005) Bioorg.Med.Chem.Lett.15,3568-3572;Davis,M.D.等,(2005) J.Biol.Chem.280,9833-9841;Zhu,R.等,(2007) J.Med.Chem.50,6428-6435;Forrest,M.等,(2004) J.Pharmacol.Exp.Ther.309,758-768;其公开通过引用并入本文)。

[0218] 另一项研究报道了在一系列立体化学独特的2-羟甲基4-O-芳基甲基吡咯烷中更易于合成FTY720约束的类似物,其在表达BCR-Abl的细胞系中表现出显著的抗白血病活性,例如(2R,4S)-类似物B(图24)(Fransson,R.等,(2013) ACS.Med.Chem.Lett.4,969-973,其公开通过引用并入本文)。因为对映异构体(2S,4R)-非对映异构体的活性降低了六倍,显示立体化学依赖性。然而,这一系列约束的FTY720类似物对其他类型的癌细胞系(包括许多来源于实体瘤)表现出较弱的活性。

[0219] C-芳基约束的吡咯烷化合物的机制

[0220] 因此,与先前研究形成鲜明对比,基于C-芳基约束的吡咯烷类似物系列的安全且有效的抗癌剂如本发明的实施方式所表示的不涉及FTY720的S1P受体相关的剂量限制毒性。在具体的实施方式中,已经发现C-芳基吡咯烷作为约束的氮杂环鞘脂类分子是有希望的肿瘤生长抑制剂。因此,实施方式将C-芳基吡咯烷作为约束的氮杂环鞘脂类分子作为不激活S1P受体的有效增殖抑制剂。此外,本发明的实施方式,特别是化合物SH-BC-893,是新型抗肿瘤鞘脂类化合物,其缺乏神经酰胺和FTY720的药理学负担。本发明的实施方式通过同时阻断对于LDL,巨胞饮泡(macropinosome)和自噬体的降解以及从细胞表面下调葡萄糖和氨基酸转运蛋白至关重要的溶酶体融合反应来影响抗癌活性。

[0221] 已发现现有技术分子如FTY720可抑制肿瘤生长并引起严重的心动过缓(图25)。另一方面,C-芳基氮杂环约束的鞘脂类化合物抑制肿瘤生长但不诱导心动过缓症状。现在已知高剂量FTY720激活S1P受体诱导心动过缓表型。具有约束的吡咯烷的某些鞘脂类分子不激活S1P受体,因此,这些分子不会导致心动过缓(图25和34-36)。如此,本发明的实施方式涉及抑制S1P受体活化的鞘脂类分子的约束的吡咯烷部分。

[0222] C-芳基氮杂环约束的鞘脂类化合物和FTY720通过生物能量机制抑制和杀死与S1P

激活无关的肿瘤。在此机制中，鞘脂类化合物通过阻止获得关键营养素和生物燃料（例如葡萄糖和氨基酸）而使肿瘤细胞饥饿至死亡（图26）。因此，本发明的许多实施方式涉及氮杂环约束的鞘脂类化合物，其使肿瘤细胞缺少关键营养物质和氨基酸的而饥饿。

[0223] 肿瘤细胞能够通过几种不同的通路获得营养。这些通路包括通过氨基酸或葡萄糖转运通道穿过细胞膜的营养物质传递（1），经由LDL受体的低密度脂蛋白（LDL）输入（2），自噬（3）和巨胞饮作用（4）（图26）。因此，本发明的多个实施方式涉及约束的鞘脂类分子作为通过营养转运蛋白阻止接触营养、LDL内吞作用、自噬或巨胞饮作用的治疗。

[0224] 生物能量机制的详细图示描绘在图27中。如图所示，氮杂环约束的鞘脂类分子（101）可诱导两条平行通路：营养转运蛋白内化通路（103）和/或空泡通路（105）。总体而言，两种通路最终导致细胞内营养物质（111）&（125）的减少，这导致处理的细胞经受生物能应激（127）。然而，不同的细胞类型对应激反应不同。健康的正常细胞（129）变得静止（133），并且简单地适应较低的营养速率。然而，转化的肿瘤细胞（131）对高水平的营养物质“上瘾”，因此无法适应生物能量学应激。尽管缺乏营养物质，这些肿瘤细胞仍然试图合成大分子，当储量耗尽时，最终会发生细胞死亡（133）。

[0225] 营养转运蛋白内化通路（103）和空泡通路（105）各自以激活PP2A复合物（107）&（113）的氮杂环约束的鞘脂类分子开始。因为这些通路是不同的，所以认为激活的PP2A复合物对于两条通路是不同的。PP2A是具有90多种异构体的异三聚体复合物，因此鞘脂类分子很可能诱导不同的PP2A复合物，从而引发两种不同的通路。

[0226] 在营养物质转运内化通路（103）中，PP2A激活（107）直接导致营养转运蛋白从细胞表面丢失（109）。转运蛋白的这种丢失降低了细胞外空间的营养物质（例如葡萄糖和氨基酸）的可用性（111）。可用营养物质的减少至少部分促成了生物能应激（127）。

[0227] 在平行空泡通路（105）中，PP2A激活（113）可导致激酶PIKfyve错误定位（115）。因此，PIKfyve不与细胞的多泡体结合，减少与LDL囊泡、巨噬细胞和自噬体的溶酶体融合（117）。因此，溶酶体融合体的缺乏降低了LDL降解（119）、巨胞饮泡降解（121）和自噬（123），这继而降低了细胞接近相应细胞外（111）和细胞内（125）营养物质。同样，可利用的营养物质的减少有助于生物能量应激（127）。

[0228] 通过理解生物能应激机制，人们将能够辨别C-芳基氮杂环约束的鞘脂类化合物能够治疗任何和所有癌症类型和类别。一个在所有肿瘤中一致的标志是对合成代谢的不灵活的承诺。因此，预计任何癌症类别，包括但不限于特征为缓慢生长，快速生长，侵袭性，恶性，Ras阳性，PTEN阴性，良性，转移性，结节性，原发性，实体肿瘤或血癌，对氮杂环约束的鞘脂类化合物敏感。因此，预计所述分子对几乎所有的癌性组织有效，包括但不限于白血病，前列腺癌，结肠癌，胰腺癌或乳腺癌。此外，所描述的鞘脂类化合物应克服患者中和患者内的肿瘤异质性的并发症。克服异质性也会降低许多目前针对肿瘤基因型特异性治疗常见的耐药性。

[0229] 除肿瘤性疾病外，生物能应激模型可预测C-芳基氮杂环约束的鞘脂类化合物可治疗某些代谢性疾病。具体而言，可以用这些化合物治疗过量营养物摄入的疾病，例如肥胖症。预计通过限制细胞内的营养摄取，患者会失去过量的体重。完全预期C-芳基氮杂环约束的鞘脂类化合物在人类患者中有效。如以下示例性实施方式中所述，鞘脂类化合物对多种人类肿瘤细胞系，小鼠中的细胞系移植瘤和小鼠中的原发性肿瘤有效。由于在每种这些模

型以及小鼠中患者来源的癌症类器官和患者来源的癌症移植瘤中的成功,预计这些分子最终还将在人类临床试验中获得成功。此外,预计这些化合物可以与其他癌症治疗或药物组合并且改善其功效,所述其他癌症治疗或药物包括但不限于FDA批准的护理标准、甲氨蝶呤、吉西他滨、他莫昔芬、紫杉醇、多西他赛和恩扎鲁胺。

[0230] 根据生物能量机制,本发明的许多实施方式涉及氮杂环约束的鞘脂类化合物,其能够由于增加的应激而杀伤肿瘤细胞。在其他实施方式中,鞘脂类化合物对正常健康细胞没有毒性。在更多实施方式中,鞘脂类化合物诱导营养运输内化通路和/或空泡通路。本发明的实施方式涉及能够减少细胞接近细胞外或细胞内营养物质的鞘脂类化合物。更具体的实施方式涉及能够降低表面营养转运蛋白、LDL降解、巨胞饮泡降解或自噬的量的这些化合物。此外,其他实施方式涉及PP2A激活、PIKfyve错位定位或溶酶体融合减少。

[0231] 总而言之,本文所述的C-芳基氮杂环约束的鞘脂类化合物对抗癌症和肿瘤,没有本领域其他方法固有的致死副作用,而所述副作用使得FTY720作为抗癌剂不能有效地使用。因此,下面给出了小分子氮杂环约束的鞘脂类分子,基于这种小分子的治疗剂,和掺入这种治疗剂用于治疗癌症和其他疾病的治疗方案的实施方式。

[0232] 示例性实施方式

[0233] 生物数据支持在各种实施方式中使用上述氮杂环约束的鞘脂类化合物来治疗疾病。先前的研究已经证实FTY720的柔性氨基二醇部分的化学修饰影响对S1P受体的选择性结合。(Clemens, J. J. 等, Davis等, Zhu等和Forrest等, 以上引用的)。注意到根据本公开内容的FTY720的氮杂环约束的类似物的实施方式杀死和/或抑制肿瘤细胞的生长,减少致命性副作用如心动过缓的风险。因此,使用这些化合物治疗各种疾病的实施方式避免了与先前方法相关的缺陷。如将讨论的,数据支持如下命题:根据本公开的小分子氮杂环约束的鞘脂类分子的实施方式优于现有的FTY720相关分子和相关治疗方法。

[0234] 氮杂环约束的鞘脂类小分子的实施方式的预期治疗功效源于其在使用PC3和DU15前列腺癌细胞的初步研究中显示的生物学活性。另外的研究证明了使用SW-620和SW-480结肠癌细胞、A-549肺癌细胞、PANC-1胰腺癌细胞、MDA-MB-231乳腺癌细胞和Sup-B15白血病细胞的氮杂环约束的鞘脂类小分子实施方式的生物学活性。如下所述,包括吡咯烷中的氮上的电荷变化和磷酸化位点的损失的次要化学和结构修饰对所述分子的活性具有不同的影响。吡咯烷(内酰胺)中氮的电荷变化导致活性丧失。磷酸化位点的缺失对活性有轻微影响。因此,非内酰胺类似物仍然显示出超过FTY720对照的治疗优势。氮杂环约束的鞘脂类化合物的实施方式至少通过阻断溶酶体融合反应来减缓肿瘤生长并杀死癌细胞,所述溶酶体融合反应对于巨胞饮泡和自噬体降解以及从细胞表面下调葡萄糖和氨基酸转运蛋白是必需的。

[0235] 氮杂环受约束的鞘脂类化合物的优化和对癌细胞的影响:

[0236] 在第一个实施方式中,进行细胞培养测定以证明不同小分子的杀伤能力。使用先前提出的化合物1-4(图23),化合物5-8(图28)和对照化合物FTY720(图2)治疗已建成的PC3和DU145前列腺癌细胞系(图29和表1)。进行Cell Titer Glo测定以测量癌症细胞系的增殖。如表1所示,化合物1-8各自能够保留其抗癌活性。

[0237]

| 表 1. 在前列腺癌细胞系中的 IC ₅₀ 值(μM)。(平均值±SEM, n≥3) | | |
|---|----------|----------|
| | PC3 | DU145 |
| FTY720 | 2.6±0.2 | 3.1±0.2 |
| 1 | 7.0±0.3 | 7.3±0.8 |
| 2 | 6.1±1.0 | 5.7±0.4 |
| 3 | 4.9±0.6 | 5.3±0.2 |
| 4 | 3.4±0.6 | 4.0±0.6 |
| 5 | 4.0±0.7 | 3.8±0.4 |
| 6 | 3.0±0.4 | 3.7±0.4 |
| 7 | 5.5±0.7 | 5.3±0.7 |
| 8 | 6.5±0.3 | 5.4±0.3 |
| 9 | >20 | >20 |
| 10 | >20 | >20 |
| 11 | >20 | >20 |
| 12 | 4.1±0.4 | 5.0±0.1 |
| 13 | 4.4±0.6 | 5.1±0.6 |
| 14 | 1.9±0.3 | 5.6±0.1 |
| 15 | 6.3±0.3 | 5.9±0.3 |
| 16 | 6.3±0.1 | 4.9±0.1 |
| 17 | 6.6±0.1 | 5.8±0.2 |
| 18 | 14.4±0.9 | 17.6±2.3 |
| 19 | 9.8±1.3 | 10.6±1.0 |
| 20 | 8.0±0.9 | 6.1±0.5 |

[0238] 化合物5-8是化合物1-4的截短形式,其不含5-羟甲基。由于化合物5和6在前列腺癌细胞系中与FTY720一样有活性,因此该结构式不会降低化合物1-4的活性。这些发现还表明,在这一系列C-芳基类似物中的立体化学对于与抗癌靶标的相互作用来说并不重要。

[0239] 在另一个示例性实施方式中,进行进一步的细胞培养测定以确定吡咯烷环中的氮上的电荷是否对活性是重要的。具体而言,在前列腺癌细胞增殖测定中,将含内酰胺环的化合物9-11(图30)与相应的类似物6-8(图28)进行比较。如图31和表1所示,中和吡咯烷中的氮的电荷导致活性显著损失,表明与靶的静电相互作用对于化合物活性可能是关键的。

[0240] 在又一个示例性实施方式中,进行细胞培养测定以证明磷酸化对S1P受体活性的影响。磷酸化可能对导致心动过缓的S1P受体活性产生影响。心动过缓,阻止FTY720在癌症患者中使用的剂量限制性毒性,起源于FTY720-P对S1P受体1和3的作用。(Camm, J. 等, (2014) Am. Heart J. 168, 632-644; Cohen, J. A., Chun, J. (2011) Ann. Neurol. 69, 759-777; Sanna, M. G. 等, (2004) J. Biol. Chem. 279, 13839-13848; 其公开内容通过引用并入本文)。通过鞘氨醇激酶的磷酸化可以使化合物有能力激活S1P受体。例如,已知当磷酸化时,FTY720激活S1P受体1和3。因为化合物5可以被磷酸化,所以评价了化合物5及其磷酸5-P(图28)对S1P受体的活性(图32)。正如预期的那样,阳性对照S1P以纳摩尔浓度激活其所有受体(1-5)。相反,根据各种实施方式的氮杂环约束的鞘脂类分子的示例性实施方式不会或仅较弱地激活S1P受体。具体而言,基于细胞培养的测定表明类似物5、5-P和6未能激活S1P受体2、3、4或5(图32)。S1P受体1但仅在比S1P对照剂量高1000倍(>1μM)下被较弱地激活。这些结果

是出乎意料的,考虑到在先前的报道中已证明其它C-芳基约束的鞘脂类化合物诱导S1P受体(Hanessian,S.等,(2007) Bioorg.Med.Chem.Lett.17,491-494,上面引用的)。这些结果证明鞘脂类化合物的当前实施方式缺乏阻止使用FTY720和其他鞘脂类化合物治疗肿瘤的S1P受体活性。

[0241] 在另一个示例性实施方式中,体外研究显示,类似物5在PC3和SW620细胞中比FTY720略微更有效地磷酸化并且输出到培养基中(图33,孵育16小时后前列腺(PC3)或结肠癌(SW620)细胞中的磷酸化化合物,表示为通过UPLC-MS/MS回收的总化合物的百分比)。这进一步证明S1P受体激活的丧失不是低效磷酸化的结果。

[0242] 在更多示例性实施方式中,进一步检查化合物5和5-P在体内激活多种S1P受体的能力。具体而言,检查小鼠心率和淋巴细胞隔离(sequestration)。当S1P受体3被激活时,小鼠心率降低导致心动过缓,而在人类中,该作用可能由S1P受体1介导。在小鼠和人类中,当S1P受体1被激活时,淋巴细胞被隔离。正如预期的那样,与盐水载体相比,前药FTY720和活化药物FTY720-P均使心率降低约50%并明显隔离淋巴细胞(图34-37)。另一方面,与盐水对照相比,化合物5和5-P对心率或淋巴细胞隔离没有显著影响(图34-37)。

[0243] 如图36中详述的遥测读数所示,与化合物5(C)和对照(A,盐水)相比,FTY720(B)减慢心率。如A中所示,在给予生理盐水后,观察到在规律的间隔中具有明显可辨别的P波的正常窦性心律(代表心房除极化)和QRS复合波(代表心室除极)。该追踪中的心率约为每分钟600次(BPM)。相反,如B中所示,在施用FTY720时,在该追踪中观察到约200BPM的心动过缓。不再存在明显的P波,并且R-R节律变得更加可变,表明注射药物后的最低心率是由抑制窦房结传导而不是仅仅减少窦性心律导致。最后,如C中所示,对于示例性实施方式化合物5,类似于盐水注射,在注射后存在具有明确且一致的P波和QRS复合波的正常窦性心律。该追踪中的心率约为600BPM,类似于生理盐水。

[0244] 这种体内数据共同表明示例性实施方式化合物5缺乏阻止在癌症患者中使用FTY720的剂量限制性S1P1和S1P3活性。此外,与母体FTY720不同,活性化合物例如5的磷酸化对小鼠的心率没有不利影响。

[0245] 在又一个实例中,用甲基部分代替2-羟甲基部分(化合物12-15)以除去分子的任何磷酸化可能性(图38)。如所料,化合物12和14不能激活任何S1P受体(图23)。然而,用不可磷酸化部分取代也不限制化合物12-15抑制癌细胞系增殖的能力(表1)。出乎意料地,这些化合物几乎与母体2-羟甲基化合物和FTY720一样有效。因此,这些分子证明化合物的2-羟甲基部分和磷酸化对于抑制癌症生长都不是需要的。

[0246] 在另一个示例性研究中,检查了C-芳基环位置对活性的影响。化合物12-15中的C-芳基吡咯烷的位置从位置3转移至位置4以产生化合物16-19(图39)。在癌细胞系增殖测定中的评价表明4-C-芳基吡咯烷16和17与3-C-芳基吡咯烷12-15和FTY720一样有活性(表1)。然而化合物18和19具有活性但效力较弱(表1)。该结果表明,该系列中吡咯烷核心支架上的取代基的相对位置和立体化学对抗癌活性没有主要负面影响。

[0247] 用于筛选如表1所示的化合物的Cell Titer Glo增殖测定不能很好地区分抑制细胞生长的化合物与细胞毒性的化合物。因此,为了确定根据本发明的实施方式的类似物是否是细胞毒性的,使用活体染料排除和流式细胞术进行研究(表2)。测试了化合物3-6和14,发现其具有细胞毒性,引起PC3前列腺癌细胞中的细胞死亡,其IC₅₀类似于Cell Titer Glo

测定中所观察到的(表1和2)。

[0248]

| 表 2. 通过活体染料排除和流式细胞术测定的 PC3 前列腺癌细胞中细胞活力的 IC_{50} (μM) | |
|---|----------------|
| FTY720 | 4.8 ± 0.1 |
| 3 | 8.3 ± 0.2 |
| 4 | 6.4 ± 0.3 |
| 5 | 5.5 ± 0.4 |
| 6 | 5.4 ± 0.6 |
| 14 | 4.6 ± 0.4 |
| 20 | 10.0 ± 0.2 |
| 21 | 10.7 ± 0.6 |

[0249] 已经观察到本发明一些实施方式的合适效力,包括至少化合物3-6、14在前列腺癌细胞系中的应用,用这些化合物测试了其他癌细胞系。来自活体染料排除测定的结果显示在结肠(SW-620)、肺(A-549)、胰腺(PANC-1)、乳房(MDA-MB-231)和白血病(SupB-15)癌细胞系中与FTY720相似的活性(表3)。表3显示癌细胞系中的 IC_{50} 值,以 μM 表示(ND表示未测定)。在前列腺癌细胞系中有活性的化合物也杀死了BCR-Ab1阳性白血病细胞,与FTY720具有相似效力。与对映异构体4-0-芳基甲基醚化合物20和21不同,4-C-芳基-2-羟甲基吡咯烷16-19在其对BCR-Ab1阳性白血病细胞的活性中未显示出明显的立体化学差异。(Fransson, R. 等, (2013) ACS.Med.Chem.Lett. 4, 969-973)。化合物4-6、14像FTY720一样,对肺癌细胞系A-549的活性稍低。

[0250]

| 表 3 在各种癌细胞系中的 IC_{50} 值 (μM) (平均值 \pm SEM, $n \geq 3$) | | | | | |
|--|----------------|----------------|----------------|--------------------|------------------|
| | 结肠 (SW-620) | 肺 (A-549) | 胰腺 (PANC-1) | 乳腺 (MDA-MB-231) | 白血病 (SupB-15) |
| FTY720 | 2.8 ± 0.1 | 6.0 ± 0.4 | 4.6 ± 0.5 | 4.0 ± 0.1 | 6.8 ± 0.7 |
| 4 | 2.6 ± 0.0 | 4.7 ± 0.6 | 3.5 ± 0.3 | 4.6 ± 0.5 | ND |
| 5 | 2.5 ± 0.1 | 8.9 ± 1.4 | 3.3 ± 0.5 | 2.1 ± 0.2 | 5.1 ± 0.9 |
| 6 | 2.1 ± 0.2 | 8.4 ± 1.2 | 5.0 ± 0.9 | 4.9 ± 0.6 | 5.9 ± 0.1 |
| 14 | 2.7 ± 0.2 | 7.8 ± 1.8 | 4.8 ± 0.6 | 4.0 ± 0.0 | 7.5 ± 0.4 |
| 20 | 7.0 ± 1.2 | 10.7 ± 0.2 | 8.0 ± 1.5 | 9.1 ± 0.3 | 7.7 ± 0.8 |
| 21 | 4.9 ± 0.9 | 9.5 ± 1.1 | 8.8 ± 0.6 | 6.4 ± 0.4 | 2.0 ± 0.2 |

[0251] 如上所述,本文所述的本发明实施方式的广泛活性与包括营养转运蛋白下调的癌细胞的生物能量作用机制一致。因此,为了直接检查约束的吡咯烷鞘脂类分子在营养运输上的作用,用几种类似物以它们的 IC_{50} 和这个剂量的两倍处理后,检查了氨基酸转运蛋白相关蛋白4F2细胞表面抗原重链(4F2hc)的表面水平。化合物4、5和6降低4F2hc表面水平,其功效类似于FTY720(图40)。这些结果与用于饥饿和杀死肿瘤细胞的生物能量机制一致。

[0252] 在甚至另一个示例性研究中,约束的吡咯烷鞘脂类化合物在移植瘤动物研究中的抗肿瘤效力。每天用10mg/kg FTY720或20mg/kg的化合物5或15通过腹膜内注射来处理携带皮下SW620移植瘤肿瘤的裸鼠。所有三种化合物抑制肿瘤生长(图41)。这些结果表明,吡咯烷鞘脂类化合物能够通过生物能量机制治疗肿瘤。此外,这些化合物保留了FTY720的许多有益能力,例如水溶性,口服生物利用度和抗肿瘤活性,但不再引发心动过缓。因此,这些化合物对于肿瘤的药物和治疗是理想的。

[0253] 进一步优化氮杂环约束的鞘脂类化合物及其对营养转运、空泡和细胞死亡的影响

[0254] 对于它们下调营养转运蛋白和诱导细胞质空泡化的能力,修饰和分析了氮杂环约束的鞘脂类化合物空泡化。化合物的修饰包括改变烃链的长度,不饱和度和附加链上存在或不存在芳基部分,以及在两个立构中心处的立体化学。一般来说,细胞毒性与营养转运蛋白下调和空泡化正相关。因此,产生最大空泡化和转运蛋白丢失的分子预计具有最大的抗肿瘤活性,因此对于药物和治疗方案是理想的。

[0255] 基于上文所述的生物能量机制,鞘脂和鞘脂类分子可以结合变构调节位点以激活PP2A。PP2A是具有可以控制底物特异性的90个亚型的异源三聚体复合物。因此,表示出两种不同的PP2A复合物被鞘脂类分子激活以诱导2种不同的表型:营养转运蛋白下调和空泡化。修饰氮杂环约束的鞘脂类化合物的目的是确定哪些特征最大程度地诱导营养转运蛋白的下调和空泡化。

[0256] 在示例性研究中,通过流式细胞术定量氨基酸转运蛋白相关蛋白CD98的表面水平来监测营养转运蛋白下调。如在下文的材料和方法部分中更详述的空泡测定所确定的,空泡评分为0至84的范围。通过测量在48小时时经由活体染料排除试验测定杀死一半鼠造血细胞系FL5.12的浓度来确定 IC_{50} 。该数据是针对各种天然存在的鞘脂和合成的鞘脂类化合物获得的。

[0257] 根据本发明的实施方式,结构-活性-关系(SAR)策略建立在用天然存在的鞘脂鞘氨醇(化合物106)和神经鞘氨醇(化合物107)以及中等可溶的短链C2-神经酰胺(化合物109)和二氢-C2-神经酰胺(化合物110)(其通常用于代替极端疏水(但生理学的)的长链神经酰胺(图42和43))获得的结果。鞘氨醇(106)和神经鞘氨醇(107)都触发了营养转运蛋白丢失和空泡化,并且分别以3.6和3.5 μ M的 IC_{50} 有效杀死细胞(图44和表4)。由于需要50 μ M C2-神经酰胺(109)引起与2.5 μ M鞘氨醇(106)相似的转运蛋白损失,C2-神经酰胺(109)触发营养转运蛋白丢失,并且与鞘氨醇(106)相比效力降低(表4)。C2-神经酰胺不会以任何剂量引起空泡化。与先前报道它不激活PP2A一致(Chalfant,C.E.等,Y.A.J.Lipid Res.2004,45,496,其公开内容通过引用并入本文),二氢-C2-神经酰胺(110)不能杀死细胞,不能有效触发CD98下调,并且不引起空泡化(表4和图44)。虽然C2-神经酰胺(109)的活性远低于鞘氨醇(106),但二甲基鞘氨醇(108)的效力几乎是5倍($IC_{50}=0.77\mu$ M)(表4和图44)。有趣的是,鞘氨醇的饱和减少空泡化,而转运蛋白丢失和细胞毒性不受影响。这些结果表明,不同的天然存在的鞘脂结构可激活不同的PP2A复合物,导致营养转运蛋白下调或空泡化。一些鞘脂激活了营养转运蛋白下调和空泡化通路,而另一些只激活了一种通路,甚至其他鞘脂也不激活任一种通路。

表 4. 0-苄基和 0-芳基吡咯烷类似物的活性

| 项目 | 化合物; 立体化学 | R** | 化合物编号 | IC ₅₀ (μM) [95% CI] | %CD98 下调 | 空泡化评分 |
|----|---------------|---------------------------------|-------|--------------------------------|----------|-------|
| 1 | FTY720 | | 101 | 2.4 [2.1-2.7] | 68±3 | 82±4 |
| 2 | 鞘氨醇 | | 106 | 3.6 [3.5-3.7] | 48±2 | 57±6 |
| 3 | 神经鞘氨醇 | | 107 | 3.5 [3.3-3.7] | 47±3 | 38±6 |
| 4 | 二甲基鞘氨醇 | | 108 | 0.8 [0.7-0.9] | 69±2 | 72±3 |
| 5 | C2-神经酰胺 | | 109 | 33.0 [23.3-47.0] | 47±3 | 0 |
| 6 | 二氢-C2-神经酰胺 | | 110 | 抑制细胞生长 | 13±40 | |
| | 0-苄基 | | | | | |
| 7 | (2R, 4S) | C ₆ H ₁₃ | 111 | 2.7 [2.6-2.8] | 30±2 | 0 |
| 8 | (2R, 4S) | C ₆ H ₁₁ | 112 | 5.5 [5.3-5.7] | 30±4 | 0 |
| 9 | (2R, 4S) | C ₈ H ₁₇ | 102 | 2.0 [1.8-2.2] | 63±3 | 33±2 |
| 10 | (2R, 4S) | C ₈ H ₁₅ | 113 | 1.4 [1.3-1.6] | 64±1 | 27±1 |
| 11 | (2R, 4S) | C ₁₂ H ₂₅ | 114 | 10.1 [8.7-11.6] | 13±3 | 3±1 |
| 12 | (2R, 4S) | C ₁₂ H ₂₃ | 115 | 2.8 [2.4-3.3] | 52±1 | 33±3 |
| 13 | (2R, 4S) | C ₁₄ H ₂₉ | 116 | 10.5 [9.7-11.3] | 12±3 | 4±2 |
| 14 | (2R, 4S) | C ₁₄ H ₂₇ | 117 | 5.1 [5.0-5.3] | 19±3 | 8±1 |
| 15 | (2S, 4R) | C ₆ H ₁₁ | 118 | 5.7 [3.9-8.3] | 9±3 | 5±2 |
| 16 | (2S, 4R) | C ₈ H ₁₇ | 103 | 3.0 [2.9-3.2] | 48±2 | 47±2 |
| 17 | (2S, 4R) | C ₈ H ₁₅ | 119 | 2.4 [2.3-2.4] | 41±3 | 70±1 |
| 18 | (2S, 4R) | C ₁₀ H ₂₁ | 120 | 3.6 [3.4-3.7] | 28±1 | 36±5 |
| 19 | (2S, 4R) | C ₁₂ H ₂₅ | 121 | 3.9 [3.7-4.2] | 14±4 | 30±2 |
| 20 | (2S, 4R) | C ₁₂ H ₂₃ | 122 | 2.4 [2.3-2.5] | 40±2 | 76±6 |
| 21 | (2S, 4R) | C ₁₄ H ₂₉ | 123 | 5.7 [5.5-5.9] | 19±1 | 3±3 |
| 22 | (2S, 4R) | C ₁₄ H ₂₇ | 124 | 7.3 [6.7-8.1] | 20±3 | 1±1 |
| | 0-芳基系列 | | | | | |
| 23 | (2S, 3R) | C ₈ H ₁₇ | 104 | 1.9 [1.8-2.1] | 54±1 | 81±3 |
| 24 | (2S, 3R) | C ₈ H ₁₅ | 125 | 1.7 [1.6-1.8] | 58±3 | 84±2 |
| 25 | (2R, 3S) | C ₈ H ₁₇ | 105 | 1.7 [1.4-2.1] | 47±3 | 53±3 |

[0258]

[0259]

**化合物结构参见图 45

IC₅₀ 值以 95% 置信区间给出, CD98 和空泡化评分是平均值±SEM。在所有情况下 n≥3

[0260] 基于天然存在的鞘脂数据, 它表明含有 0-苄基和 C-芳基的鞘脂类吡咯烷类似物也可以改变它们激活营养转运蛋白下调或空泡化通路的能力。因此, 合成并测试了几种鞘脂类分子的变体。结果包括在表 4-6 和图 45-50 中。

[0261] 在一些特定的实施方式中, 用 C6、C8、C10、C12 或 C14 烃链产生 0-苄基化合物 102 和 103 的链长 (图 45)。测定这些化合物的细胞毒性、对营养转运蛋白水平和空泡化的影响 (表 4 和图 46)。

[0262] 在具有完全饱和链的两个立体化学系列 (2R, 4S) 和 (2S, 4R) 中, 类似物 114 (C12)、116 (C14)、121 (C12) 和 123 (C14) 在转运蛋白和空泡化测定中丢失活性 (图 46, 表 4)。当烃链部分不饱和时, 如类似物 115 (C12) 和 122 (C12) 中那样, 较长链是可忍受的 (表 4)。当分别如类似物 114 和 115 以及对映异构体 121 和 122 所示的两个立体化学系列中的不饱和时, C12 类

似物更活跃的发现表明,引入双键可使得次理想的长链烃在靶蛋白中的疏水结合位点的更加匹配。回想一下,鞘氨醇(116)在空泡化方面比其饱和的同类神经鞘氨醇(117)更好(表4)。

[0263] 化合物117和124含有不饱和的C14链,并且不诱导强烈的空泡化或降低转运蛋白水平(表4和图46)。在这种具有较短C6烃链的O-苄基系列(化合物111、112和118)中的类似物也比C8烃链化合物(102、103、113和119)的活性低(表4)。这些结果表明,该系列中的C8烃链长度在转运蛋白和空泡化测定中都导致最佳的效力,尽管在该链部分不饱和的情况下,如化合物115和122中的C12链是可忍受的(表4)。

[0264] 有趣的是,在对应于化合物103的不饱和(2S,4R)系列中,峰值空泡化评分高于峰值转运蛋白丢失评分,而在对应于102的不饱和(2R,4S)系列中,这些活性被逆转,观察到转运蛋白丢失比空泡化更多(图46)。例如,(2S,4R)不饱和化合物119触发空泡化是(2R,4S)不饱和对映异构体113的两倍,而113的趋势相反,其导致转运蛋白丢失几乎是119的两倍(表4)。当饱和化合物102和103进行比较时,对映异构体化合物在转运蛋白和空泡化测定中的这些不同活性也是明显的,但是没有那么强。这些结果表明,某些对映异构体可能具有期望的性质(例如诱导更大的空泡化),这可能导致期望的临床结果。

[0265] 注意到值得注意的是,103的不饱和(2S,4R)类似物在空泡化测定中比匹配的饱和化合物活性高得多。部分不饱和度增加了转运蛋白的丢失,但程度较轻。由于烃链中的不饱和度增加了每次测定中所有化合物的活性,因此评估不饱和度是否也会增强结构相关的C-芳基系列的活性,如(2S,3R) 104中(图42和45)。在任何测定中,不饱和类似物125并不显著地比其饱和对应物104具有更高的活性(表4)。然而,化合物104在诱导空泡化方面比相应的饱和O-苄基类似物103更好(表4)。

[0266] 类似于O-苄基系列,观察到在C-芳基系列内最佳活性存在立体化学依赖性。因此,C-芳基类似物(2R,3S) 105不是和对映体(2S,3R) 104一样诱导空泡,分别为53和81的得分(表4)。

[0267] 总之,由103表示的O-苄基系列中的(2S,4R)立体化学导致更好的空泡化,而102中的对映体(2R,4S)立体化学促进营养转运蛋白下调。这些结果可以反映不同PP2A异源三聚体的差异亲和力。C8烃链长度在两种测定中都是有利的,并且在该最佳尾部长度的下,不饱和度对活性仅有轻微的正面影响。与O-苄基对应物103和102相比,用C-芳基(2S,3R)和(2R,3S)类似物104和105观察到更好的空泡化。

[0268] 在更多实施方式中,检查O-烷基吡咯烷类似物的各种改变,并与鞘氨醇(106)和神经鞘氨醇(107)进行比较(图47)。用吡咯烷环代替鞘氨醇(106)和神经鞘氨醇(107)的极性氨基二醇部分不会显著改变对映异构类似物126-129的 IC_{50} 值,除了126比母体化合物鞘氨醇具有3倍以上的细胞毒性(表5,图48)。与母体相比,类似物126的CD98转运蛋白丢失和空泡化稍大,与其增加的细胞毒性一致。然而,与鞘氨醇相比,不饱和类似物127在转运蛋白和空泡化测定中表现出降低的活性,而没有伴随 IC_{50} 的增加。鞘氨醇(106)和神经鞘氨醇(107)对营养转运蛋白具有相似的作用,然而鞘氨醇(106)的空泡化比神经鞘氨醇(107)好得多(图48)。出乎意料地,这种关系在约束的类似物中逆转,其中对映体完全饱和的约束的神经鞘氨醇类似物126和128在空泡化测定中比不饱和鞘氨醇类似物127和129(表5,图48)的活性高2-4倍。

表 5 0-烷基吡咯烷类似物的活性

| 项目 | 化合物; 立体化学 | R** | 化合物编号 | IC ₅₀ (μM) [95% CI] | %CD98 下调 | 空泡化评分 |
|--|------------|---------------------------------|-------|--------------------------------|----------|-------|
| 1 | FTY720 | | 101 | 2.4[2.1-2.7] | 68±3 | 82±4 |
| 2 | 鞘氨醇 | | 106 | 3.6[3.5-3.7] | 48±2 | 57±6 |
| 3 | 神经鞘氨醇 | | 107 | 3.5[3.3-3.7] | 47±3 | 38±6 |
| 4 | 二甲基鞘氨醇 | | 108 | 0.8[0.7-0.9] | 69±2 | 72±3 |
| [0269] 5 | C2-神经酰胺 | | 109 | 33.0[23.3-47.0] | 47±3 | 0 |
| 6 | 二氢-C2-神经酰胺 | | 110 | 抑制细胞生长 | 13±4 | 0 |
| 7 | (2R, 4S) | C ₁₂ H ₂₅ | 126 | 1.2[1.1-1.3] | 57±2 | 53±3 |
| 8 | (2R, 4S) | C ₁₂ H ₂₃ | 127 | 2.6[2.6-2.7] | 34±2 | 9±5 |
| 9 | (2S, 4R) | C ₁₂ H ₂₅ | 128 | 2.5[2.4-2.6] | 45±3 | 36±5 |
| 10 | (2S, 4R) | C ₁₂ H ₂₃ | 129 | 3.3[3.1-3.5] | 30±1 | 20±4 |
| **化合物结构参见图 47 | | | | | | |
| IC ₅₀ 值以 95% 置信区间给出, CD98 和空泡化评分是平均值±SEM。在所有情况下 n≥3 | | | | | | |

[0270] 尽管 (2R, 4S) 立体异构体在空泡化方面略优于 (2S, 4R) 形式, 立体化学在 0-烷基系列中仅具有适度的作用 (表 5, 图 48)。总之, 与 0-苄基系列不同, 约束对鞘氨醇 (106) 的转运蛋白和空泡化作用具有负面影响, 而对神经鞘氨醇 (107) 不起作用。

[0271] 在甚至更多的实施方式中, 中和几种类似物的吡咯烷氮的电荷并随后测定 (图 49)。正如预期的那样, 由于缺乏碱性氮, 0-苄基系列中的 N-乙酰基类似物 131 的效力比类似物 102 低 10 倍, 类似于 C2-神经酰胺 (109) 与鞘氨醇 (106) 之间效力的相似差异 (表 6)。此外, 在所测试的最高剂量下, 类似物 131 没有表现出空泡化活性 (表 6)。也评估了 N-乙酰化对非常有效地诱导空泡化的 C-芳基化合物如 104 和 125 的作用。尽管转运蛋白活性的丢失并不显著, 但化合物 134 和 135 也未诱导空泡化 (表 6)。因此, C-芳基系列中的 N-乙酰化吡咯烷鞘脂类似物可用于仅产生营养转运蛋白下调但对空泡化没有影响的应用。

表 6. N-取代和不饱和度对 O-苄基和 O-芳基吡咯烷类似物的活性的影响

| 项目 | 化合物; 立体化学 | R1** | R2** | 化合物编号 | IC ₅₀ (μM) [95% CI] | %CD98 下调 | 空泡化评分 |
|----|---------------|--------------------------------|--------------|-------|-----------------------------------|-------------|-------|
| 1 | FTY720 | | | 101 | 2.4[2.1-2.7] | 68±3 | 82±4 |
| 2 | 鞘氨醇 | | | 106 | 3.6[3.5-3.7] | 48±2 | 57±6 |
| 3 | 二氢鞘氨醇 | | | 107 | 3.5[3.3-3.7] | 47±3 | 38±6 |
| 4 | 二甲基鞘氨醇 | | | 108 | 0.8[0.7-0.9] | 69±2 | 72±3 |
| 5 | C2-神经酰胺 | | | 109 | 33.0[23.3-47.0] | 47±3 | 0 |
| 6 | 二氢-C2-神经酰胺 | | | 110 | 抑制细胞生长 | 13±4 | 0 |
| | O-苄基系列 | | | | | | |
| 7 | (2R, 4S) | C ₆ H ₁₇ | H | 102 | 2.0[1.8-2.2] | 63±3 | 33±2 |
| 8 | (2R, 4S) | C ₆ H ₁₅ | H | 113 | 1.4[1.3-1.6] | 64±1 | 27±1 |
| 9 | (2S, 4R) | C ₆ H ₁₇ | H | 103 | 3.0[2.9-3.2] | 48±2 | 47±2 |
| 10 | (2R, 4S) | C ₆ H ₁₅ | Me | 130 | 1.9[1.8-2.1] | 31±4 | 26±2 |
| 11 | (2R, 4S) | C ₆ H ₁₇ | Ac | 131 | 29.7[ND] | 37±3 | 1±1 |
| 12 | (2R, 4S) | C ₆ H ₁₇ | HN=C-NH 2 | 132 | 14.2[12.5-16.1] | 35±1 | 0 |
| 13 | (2S, 4R) | C ₆ H ₁₇ | HN=C-NH 2 | 133 | 17.3[15.9-18.9] | 34±3 | 0 |
| | O-芳基系列 | | | | | | |
| 14 | (2S, 3R) | C ₆ H ₁₇ | H | 104 | 1.9[1.8-2.1] | 54±1 | 81±3 |
| 15 | (2S, 3R) | C ₆ H ₁₅ | H | 125 | 1.7[1.6-1.8] | 58±3 | 84±2 |
| 16 | (2S, 3R) | C ₆ H ₁₇ | Ac | 134 | 39.7[37.1-42.4] | 40±4 | 0 |
| 17 | (2S, 3R) | C ₆ H ₁₅ | Ac | 135 | 46.2[43.5-49.0] | 40±2 | 2±2 |

**化合物结构参见图 49

IC₅₀ 值以 95% 置信区间给出, CD98 和空泡化评分是平均值±SEM。在所有情况下 n≥3

[0273] N-乙酰化降低效力的发现与之前的观察结果一致,即吡咯烷中的氮的正电荷对于增强的化合物活性是关键的。由于二甲基鞘氨醇(108)在测试的鞘脂中表现出最好的效力、转运蛋白丢失和空泡化(表4-6,图44),所以推测N-甲基类似物130将代表具有吡咯烷骨架良好的模拟物。出乎意料地,N-甲基类似物130没有比母体113更具有活性,并且其诱导转运蛋白丢失和空泡化的能力降低(表6)。

[0274] 为了确定增加吡咯烷氮原子的碱性是否也会增加效力,生成胍基类似物132和133(表6)。然而,与同系列的母体化合物103和102相比,这些化合物的效力降低了5-7倍。而且,即使在测试的最高浓度(30μM)下,诱导空泡形成的能力也丧失了。这些结果表明,尽管碱性很重要,但吡咯烷氮环境中的空间效应可能在与细胞靶标相互作用中发挥作用。

[0275] 总而言之,约束的氮杂环鞘脂类类似物的这些SAR研究表明,在(2S,4R)-O-苄基吡咯烷系列(例如化合物119)中具有不饱和C 8烃链的化合物,将比具有相同立体化学的饱和、更长或更短链类似物具有更高的整体活性(图50)。如119中的(S,R)立体化学与更好的空泡化能力相关联,而对映异构体(R,S)化合物(如102和113)在引发营养转运蛋白丢失方面略好(表4和图46和50)。然而,在C-芳基系列中,对映异构体之间转运蛋白下调的差异变得可以忽略(化合物104和105分别为54%和47%)。在所测试的吡咯烷类似物中,饱和与不饱和C-芳基类似物104和125分别是空泡化和转运蛋白丢失的最有效诱导剂,导致在低 μM 范围内的强效细胞毒性(图50)。鉴于这种情况,预测这些化合物具有高抗肿瘤活性。

[0276] 氮杂环约束的鞘脂类化合物破坏肿瘤细胞中的营养物质

[0277] 如上所述,鞘脂类化合物可通过下调营养转运蛋白来抑制肿瘤生长。然而,肿瘤细胞除了使用细胞表面营养转运蛋白之外,还可以通过巨胞饮作用和自噬获得营养。在此,提供了实施方式,其中氮杂环约束的鞘脂类化合物可以通过抑制巨胞饮作用或自噬来阻断肿瘤细胞获得营养物质。在一个实施方式中,鞘脂类化合物激活PP2A导致脂质激酶PIKfyve的错定位。在另一个实施方式中,鞘脂类化合物触发细胞溶质空泡化。在甚至其他实施方式中,所述化合物阻断对于低密度脂蛋白(LDL)、自噬体和巨胞饮泡降解至关重要的溶酶体融合反应。实施方式涉及选择性杀死表达活化的Ras或缺乏肿瘤抑制剂PTEN的细胞的鞘脂类化合物。更多实施方式涉及化合物治疗不表现典型Warburg表型的肿瘤的能力。此外,一些实施方式涉及化合物在不显著影响正常增殖组织的情况下抑制肿瘤生长的能力。

[0278] 作为C-芳基氮杂环约束的鞘脂类化合物的能力的原理证明,在一系列示例性实施方式实验中对化合物SH-BC-893进行了彻底检查。(在本申请中也称为化合物5和化合物104的SH-BC-893的化学结构,以及FTY720的化学结构示于图51A)。以下提供结果以及许多相关的数据表和图表(表7和8以及图51-67)。在实施方式中,SH-BC-893诱导营养转运蛋白丢失并模拟饥饿,而没有FTY720的S1P受体相关毒性。SH-BC-893缺少阻止FTY720在癌症患者中使用的鞘氨醇-1-磷酸(S1P)受体活性(图51B)。SH-BC-893仍然触发氨基酸转运蛋白(例如4F2hc或丙氨酸-丝氨酸-半胱氨酸转运蛋白2(ASCT2))和葡萄糖转运蛋白(例如葡萄糖转运蛋白1(GLUT1))的选择性内化(图51C和51D)。其他表面蛋白,如CD147(与4F2hc具有相似功能的伴侣蛋白)不受影响。如果细胞是营养受限的,则经由Bcl-XL过量表达阻断细胞凋亡不会阻止SH-BC-893诱导的细胞死亡(图51E、52A和52B)。相反,不依赖转运蛋白的膜渗透营养物质甲基丙酮酸和二甲基- α -酮戊二酸拯救了SH-BC-893处理的细胞(图51E)。这些结果证实SH-BC-893通过限制营养的获取来杀死细胞。

[0279] 细胞通过增加氧化磷酸化来适应营养限制。通过测量还原形式的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)的荧光寿命,可以监测糖酵解和氧化磷酸化的相对速率。较高比率的与游离NADH结合的蛋白质(增加的寿命)与多种细胞类型在体外和体内的氧化磷酸化增加相关。寡霉素和鱼藤酮/抗霉素A是本领域已知的用于诱导糖酵解的分子,而2-脱氧葡萄糖(2DG)是糖酵解抑制剂并随后增加氧化磷酸化。通过去除获取葡萄糖和氨基酸的细胞饥饿也已知增加氧化磷酸化。

[0280] 如预期的那样,用寡霉素或鱼藤酮/抗霉素A处理的细胞通过增加糖酵解来补偿氧化磷酸化的损失,减少结合的NADH部分(图51F)。相反,糖酵解抑制剂2-DG和饥饿增加了氧化磷酸化和结合到游离的NADH比例。SH-BC-893模拟氨基酸和葡萄糖饥饿的作用,增加结合

的NADH分数和细胞耗氧量(图51F和51G)。细胞对抗炎药FTY720的反应类似。因此,由SH-BC-893触发的代谢变化与在限制获取关键代谢底物的细胞中看到的代谢变化类似。

[0281] 与上文描述的生物能量机制一致,具有较高合成代谢率的细胞应该对鞘脂类化合物更敏感。在测试该机制的示例性实验中,用SH-BC-893处理具有不同合成代谢率的鼠FL5.12细胞。FL5.12细胞的合成代谢率可以通过调节它们所需的生长因子IL-3的水平来进行滴定;比较在高和低IL-3中生长的FL5.12细胞允许在恒定的遗传背景下评估升高的生长因子信号传导和合成代谢的影响。高浓度的IL-3驱动有氧糖酵解和快速倍增时间(12小时)。降低IL-3水平减缓增殖并增加氧化磷酸化而不损害细胞活力(图53A和53B)。在低IL-3培养基中的维持降低了代谢适应(图53B)和保护细胞免受SH-BC-893诱导的死亡的需要(图53A),表明具有低合成代谢的细胞(例如健康组织)没有具有高合成代谢的细胞(例如肿瘤细胞)对鞘脂类化合物的治疗敏感。事实上,与本发明的具体实施方式一致,未转化的鼠OP9骨髓基质细胞和原代鼠胚胎成纤维细胞(MEF)对SH-BC-893的敏感性低于人类癌细胞系,所述人类癌细胞系包括DLD-1,LS180,SW48,SW480,SW620,MDA-MB-231和PANC-1(图53C)。许多这些癌细胞系在Ras中携带活化突变。事实上,在Lox-STOP-Lox-KRasG12D MEFs中Cre表达后K-Ras活化足以限制代谢灵活性并使细胞对SH-BC-893敏感(图53D和53E)(细胞系描述在:Tuveson DA等,Cancer Cell 5:375-87 2004,其公开内容通过引用并入本文)。在其他实施方式中,肿瘤抑制因子PTEN的丢失产生类似的作用(图54A和54B)。重要的是,致癌基因突变不影响表达K-Ras G12D或PTEN缺陷的MEF中的表面营养转运蛋白下调(图54C)。

[0282] 这些结果表明,正常细胞和转化的细胞都表达SH-BC-893靶标,但对化合物表现出不同的敏感性。敏感性的差异源于肿瘤细胞无法适应降低代谢。与这些结果一致,具有灵活代谢的健康细胞(例如正常人外周血单核细胞(PBMC))对SH-BC-893具有抗性,而结肠癌细胞SW620对集落形成试验高度敏感(图53F)。总之,这些数据表明构成的合成代谢会使癌细胞对SH-BC-893敏感并且可以产生可接受的治疗指数。

[0283] 在许多实施方式中,进行示例性实验以确定氮杂环约束的鞘脂-脂质分子是否抑制体内肿瘤生长。为了进行这种实验,在小鼠中产生了表达萤光素酶的SW620移植瘤。来自生物发光成像(BLI)的结果,厚度测量和处死实验的肿瘤质量显示SW620肿瘤被SH-BC-893和FTY720降低至相似程度(图53G-1和54D)。在处死时SH-BC-893以低微摩尔浓度存在于肿瘤和血浆中(图54E)。如预期的那样,处理过的小鼠出现轻度体重减轻,因为在正常细胞和转化细胞中营养通路将受到限制(图54F)。这些结果表明,鞘脂类分子如SH-BC-893可以提供安全有效的手段来靶向肿瘤,包括例如Ras-驱动的癌症或具有PTEN缺失的肿瘤。

[0284] 本发明的某些实施方式涉及氮杂环约束的鞘脂类分子以抑制巨胞饮作用和自噬,与生物能量机制一致。该机制的这一方面是出乎意料的,因为最初认为这些分子只会降低营养转运蛋白表面表达。然而,考虑到Ras激活会增加巨胞饮作用和自噬,并且SH-BC-893对于具有活化的Ras的肿瘤细胞非常有效的发现导致了假设:氮杂环约束的鞘脂类分子也可能影响巨胞饮和自噬通路。发现SH-BC-893在未转化的和癌细胞中都诱导同样显著的细胞溶质空泡化(图55A、56A、56B和56C)。这些空泡含有腔内囊泡(ILV)以及无定形的部分降解的材料,表明它们起源于多泡体(MVB)或另一个晚期内吞腔室(图55B)。对于晚期内体标志物Lamp1和Rab7,空泡为阳性的(图55C);对于早期内体标志物EEA1和Rab5和脂质染色尼罗红为阴性(图56D)。在空泡内或附近观察到酸化的点(可能是溶酶体)以及通过GFP-LC3标记

为自噬体的材料(图55C、55D和56E)。总之,这些结果表明,氮杂环约束的鞘脂类分子,如SH-BC-893,会增大MVBs。

[0285] 磷脂酰肌醇3,5-二磷酸(PI(3,5)P₂)是磷脂酰肌醇3-磷酸5-激酶(PI3P5-激酶)的产物。PIKfyve调节MVB中的膜融合和ILV形成。用抑制剂YM201636降低PIKfyve活性产生表型上类似于由SH-BC-893和FTY720产生的那些的PI3P阳性、PI(3,5)P₂阴性空泡(图55A、55E、56A和56F)。在MVB膜中发现Ca²⁺通道瞬时受体电位阳离子通道,粘脂蛋白亚家族成员1(TRPML1),其由PIKfyve产生的PI(3,5)P₂激活。

[0286] 用FTY720或YM201636处理的细胞在空泡膜中积累TRPML1(图55E)。此外,PIKfyve,其支架蛋白Vac14或其效应蛋白TRPML1的过量表达拯救了由FTY720或YM201636诱导的细胞中的空泡化(图55F)。注意,不与PIKfyve结合的Vac14的突变体形式没有拯救FTY720-或YM201636诱导的空泡化中的细胞(图55F)。总之,这些数据表明,鞘脂类分子可以通过干扰PIKfyve活性来扩大MVBs。

[0287] 与抑制剂YM201636不同,FTY720出乎意料地不抑制PIKfyve激酶活性或降低PI(3,5)P₂水平(图57A和57B)。在本发明的某些实施方式中,鞘脂类分子错误定位PIKfyve,防止其与TRPML1结合并诱导空泡化,而不是抑制PIKfyve激酶活性。尽管PIKfyve如预期的那样定位于YM201636诱导的空泡的界膜,PIKfyve存在于FTY720处理的细胞中空泡之间的团块中(图57C和56F)。经验证的识别内源性PIKfyve和Vac14的抗体证实了该结果(图57C、58A和58B)。

[0288] 与它们完全不同的作用机制一致,YM201636消除了PI(3,5)P₂探针的膜结合,而在FTY720或SH-BC-893处理的细胞中,PI(3,5)P₂探针与PIKfyve共定位在空泡之间的点(图56F)。此外,PIKfyve(图57D)和PI(3,5)P₂(图58D)都不与PI(3,5)P₂效应蛋白TRPML1共定位在FTY720或SH-BC-893处理的细胞中的空泡上。由于TRPML1均存在于YM201636和SH-BC-893诱导的空泡上(图55E和58D),PIKfyve而非TRPML1被FTY720和SH-BC-893错误地定位。FTY720和SH-BC-893也从YM201636处理的细胞中的TRPML1阳性空泡消除PIKfyve(图57D)。与其缺乏空泡化活性一致(图55A),在存在或不存在YM201636的情况下,神经酰胺不破坏PIKfyve-TRPML1共定位(图57D)。这些结果表明,鞘脂类分子通过错误定位PIKfyve诱导空泡化,导致PI(3,5)P₂在其跨膜效应蛋白TRPML1的不同区室中产生。

[0289] 此外,本发明的许多实施方式涉及经由活化PP2A的机制诱导营养转运蛋白内化的氮杂环约束的鞘脂类分子。这些实施方式反映神经酰胺、FTY720和SH-BC-893通过激活PP2A触发营养转运蛋白丢失(图59A和59B)。不同于神经酰胺,二氢神经酰胺通过单一饱和键不会激活PP2A,不会杀死细胞,并且不会触发转运蛋白丢失或空泡化(图59A和60A)。因此,PP2A的活化对于某些鞘脂结构是非常独特的。FTY720和SH-BC-893对PP2A的激活也诱导空泡化,并且由于PP2A抑制剂花萼海绵诱癌素A(calyculinA)和SV40小t抗原均自阻断这种作用(图59C)。值得注意的是,YM201636诱导的空泡化不受PP2A抑制的影响(图60B)。此外,抑制PP2A将PIKfyve恢复至用FTY720或SH-BC-893处理的细胞的空泡内的适当位置(图57D)。由于神经酰胺通过激活PP2A触发转运蛋白丢失,但缺乏诱导空泡化的能力并且不会使PIKfyve错误定位,因此建议不同组合的PP2A异源三聚体或不同的PP2A池可促进营养转运蛋白内化和空泡化通路。与该建议一致,数据显示由FTY720和SH-BC-893内化的氨基酸和葡萄糖转运蛋白不与PIKfyve复合物共定位(图60C)。此外,用YM201636触发空泡化并不降低

表面营养转运蛋白水平,并且通过过量表达Vac14防止空泡化不干扰FTY720的营养转运蛋白下调(图60D和60E)。总之,这些数据表明鞘脂类化合物通过两种不同的PP2A依赖性机制破坏PIKfyve定位和营养转运蛋白在正常细胞和转化细胞中的运输。

[0290] 在其他实施方式中,氮杂环约束的鞘脂类分子抑制自噬。在更具体的实施方式中,鞘脂类分子通过防止由于PIKfyve和PI(3,5)P₂的错误定位导致的自噬体-溶酶体融合而抑制自噬通量。在其他具体的实施方式中,分子通过防止自噬体形成来抑制自噬通量。

[0291] 本领域已知细胞通过增加自噬通量来适应营养应激。然而,自噬体-溶酶体融合反应依赖于经由PI(3,5)P₂激活的TRPML1通道的Ca²⁺释放。缺乏PIKfyve和PI(3,5)P₂与TRPML1共定位(图57D和58D),表明鞘脂类药物如SH-BC-893可能限制自噬通量。氯喹(CQ)是稳定瞬时自噬体的分子。用CQ处理细胞以稳定自噬溶酶体,随后用FTY720、SH-BC-893或YM201636处理。每种处理都减少LC3阳性自噬体与LAMP1阳性溶酶体的融合(图61A和61B)。鞘脂类分子和YM201636也降低了每个细胞LC3斑点的总数,表明自噬体形成减少(图61C)。磷脂酰肌醇5-磷酸(PI(5)P)对葡萄糖耗竭时自噬体生物合成是必不可少的。PI(5)P是通过使PI(3,5)P₂去磷酸化产生的,因此PI(5)P也可能在SH-BC-893处理的细胞中错位定位,因此也有助于破坏自噬体形成。事实上,在通过识别已知与自噬体形成相关的WIPI2蛋白来检测新生自噬体的实验中,FTY720和SH-BC-893处理减少了低营养培养基中自噬体的数量而不影响PI5P水平(图61D、61E和62A)。因此,SH-BC-893抑制自噬体形成和降解。作为对照,Vac14过量表达限制了空泡化(图55F,61F和62B)并拯救了SH-BC-893处理的细胞中的自噬通量(图61A,61B,61D和61E)。总之,这些数据表明,氮杂环约束的鞘脂类分子在多个水平(包括形成和溶酶体融合)通过错误定位PIKfyve阻断自噬通量。

[0292] 在甚至其他实施方式中,鞘脂类化合物通过防止巨胞饮泡与溶酶体融合来抑制巨胞饮作用。在具有活化的Ras的细胞中,巨胞饮作用也可能赋予对营养转运蛋白下调的耐受。然而,巨胞饮泡降解也需要PI(3,5)P₂。尽管表达K-RasG12D的细胞以5-(N-乙基-N-异丙基)阿米洛利(EIPA)敏感的方式有效地巨胞饮葡聚糖,YM201636和SH-BC-893都显著减少了巨胞饮泡与溶酶体的融合(图61G和61H)。不能与溶酶体融合的巨胞饮泡将不能提供营养物质,如氨基酸。因此,通过干扰PIKfyve的定位,鞘脂类化合物限制了获取溶酶体来源的营养物质,同时它还下调了氨基酸和葡萄糖的转运蛋白。

[0293] 在更多的实施方式中,氮杂环约束的鞘脂类分子经由空泡化诱导肿瘤细胞死亡。为了评估空泡化对SH-BC-893的抗肿瘤活性的相对贡献,单独和组合使用YM201636(仅空泡化)和神经酰胺(转运蛋白丢失,没有空泡化)处理细胞。YM201636单独使用仅具有最小的细胞毒性,但当与神经酰胺组合时,该组合在多种癌细胞系中显著增强细胞死亡而不增加营养转运蛋白丢失(图60D、63A、63B、64A)。此外,Vac14过量表达的没有空泡化的细胞(图55F和61F)对SH-BC-893和FTY720诱导的死亡耐受。然而,Vac14过量表达的细胞没有免受非空泡化鞘脂神经酰胺诱导的死亡(图63C、63D和64B)。总之,这些数据表明,空泡化有助于鞘脂类分子如SH-BC-893杀死癌细胞。

[0294] 为了评估空泡化是否增强体内SH-BC-893的抗肿瘤活性,用空白或SH-BC-893处理携带表达空载体或Vac14的SW480移植瘤的小鼠。在仍然很小时收获肿瘤,以限制可能混淆SH-BC-893诱导的空泡化的显微分析的肿瘤坏死。如体外所见,Vac14过量表达赋予SH-BC-893对空泡化和生长抑制的耐受(图63E和63F)。这些结果表明,空泡化有助于SH-BC-893在

体外和体内的抗肿瘤作用。

[0295] 因此,本发明的实施方式涉及治疗方法,所述治疗方法涉及氮杂环约束的鞘脂类分子在慢生长或原发性肿瘤中诱导饥饿样表型的治疗用途。本发明的更多实施方式涉及治疗方法,所述治疗方法涉及鞘脂类分子杀死缓慢生长或原发肿瘤的治疗用途。更具体的实施方式涉及这些分子在体内良好耐受或缺乏毒性的能力。

[0296] 因为SH-BC-893的活性与代谢率有关,所以不清楚是否表现出典型Warburg表型的生长缓慢的肿瘤也是敏感的。为了确定敏感性,在经验证的基因工程小鼠模型中评估SH-BC-893对于仅在前列腺中缺乏p53和PTEN表达的侵入性去势耐受前列腺癌(invasive castration-resistant prostate cancer) (pDK0) (Wu X等,Am J Clin Exp Urol.2014;2(2):111-20; **Schwarzenböck S**等,Theranostics.2012;2(3):318-330;Chen Z等,Nature.2005;436(7051):725-730;其公开内容通过引用并入本文)。源自在这些小鼠中生长的肿瘤的细胞(小鼠前列腺癌上皮细胞,mPCE)表现出糖酵解减少,并且不依赖于细胞外葡萄糖和氨基酸用于存活(图65A和65B)。然而,SH-BC-893仍然产生与饥饿一致的表型,因为结合的NADH部分增加并且细胞渗透的营养物质保护mPCE细胞免于死亡(图65A和65C)。前列腺癌细胞依赖于外源LDL用于生长和存活。因此,SH-BC-893不仅空泡化mPCE细胞并下调4F2hc,而且还显著降低LDL受体表面水平(LDLr)、LDL摄取和脂滴积聚(图55B,65D-H,66A和66B)。神经酰胺和YM201636都降低了表面LDLr水平,但是LDLr仍然积聚在不同的细胞内区室中(图66A)。与它们阻断溶酶体融合的能力一致(图61),YM201636和SH-BC-893都减少了LDL与Lysotracker Blue共定位(图65F和65G)。为了与溶酶体中LDL降解的抑制保持一致,细胞脂滴含量与空泡化的程度呈负相关(图66B)。总之,鞘脂类化合物,如SH-BC-893,通过下调营养转运蛋白和阻断溶酶体营养物的生成,饥饿慢性生长的肿瘤(如前列腺癌)。

[0297] 还评估了饥饿诱导的鞘脂类药物影响慢生长或原发肿瘤生长的能力。在携带mPCE皮下同系异体移植物的C57BL/6小鼠中,每天通过灌胃给予60mg/kg SH-BC-893,并且减慢60%的肿瘤生长,与用20mg/kg i.p.给药的SW620移植瘤的结果相似(图53G-1和65I)。在120mg/kg时,SH-BC-893抑制了90%以上的前列腺肿瘤生长(图65I)。SH-BC-893也使pDK0小鼠的原发肿瘤生长减少62%(60mg/kg)或82%(120mg/kg)(图65J)。SH-BC-893在组织学上减缓了前列腺肿瘤的进展,消除了侵袭性疾病并显著减少了细胞多形性、色素沉着和核异型性;给予SH-BC-893的小鼠仅表现出前列腺上皮内瘤形成,而腺癌存在于所有给予空白的动物中(图67)。如所预期的,如果氨基酸转运蛋白被下调(图65D),SH-BC-893处理的肿瘤中TORC1依赖性核糖体蛋白S6磷酸化降低(图66C)。SH-BC-893使Akt活性稍微升高,与TORC1介导的负反馈损失一致。因此,鞘脂类化合物,如SH-BC-893,对于具有特定分子缺陷和代谢特征的肿瘤是有效的。

[0298] SH-BC-893在正常细胞和转化细胞中产生等同的转运蛋白丢失和空泡化,因此也限制了正常细胞接近营养物质(图51C,51E,56B和56C)。如此,给予SH-BC-893的pDK0小鼠获得比未给予的小鼠更轻的重量(图66D)。然而,即使用最高剂量的SH-BC-893处理的小鼠体重也增加,并且所有给予的小鼠都表现出正常的行为和活动水平。处死时的血液化学分析表明,SH-BC-893在抗肿瘤剂量时对肝脏或肾脏无毒性(表7)。用120mg/kg SH-BC-893给予的动物中血清肌酸磷酸激酶的轻微升高提示响应于营养限制的轻度肌肉分解代谢。重要的是,用120mg/kg SH-BC-893处理11周的小鼠的常规全血细胞计数和肠隐窝的组织病理学证

明,SH-BC-893对增殖正常的健康组织的影响极小(表8和图66E)。对正常组织的毒性缺乏与未转化的细胞能够适应在低代谢灵活性肿瘤细胞中引发生物能量危机的营养应激的发现一致(图53D和53E)。总之,通过破坏膜运输来阻断平行的营养通路是一种安全有效的手段,以在具有不同代谢过程的癌细胞中靶向构成合成代谢。

表 7 给予 SH-BC-893 的 pDKO 小鼠的血液化学

[0299]

| | 空白 | SH-BC-893 | |
|--|----|-----------|-----------|
| | | 60 mg/kg | 120 mg/kg |

[0300]

| | | | |
|---------------------------|------------|------------|-------------|
| 碱性磷酸酶 | 93±5.4 | 77±7.8 | 83±6.2 |
| 血清谷氨酸-丙酮酸转氨酶 (Ala 氨基转移酶) | 65±10.4 | 78±25 | 91±17.2 |
| 血清谷氨酸草酰乙酸转氨酶 (Asp 氨基转移酶) | 809±200 | 640±136 | 907±171 |
| 肌酸磷酸激酶 | 5,017±1199 | 5,340±2366 | 10,441±3014 |
| 白蛋白 | 3±0.2 | 3±0.2 | 3±0.1 |
| 总蛋白 | 6±0.3 | 5±0.4 | 6±0.2 |
| 球蛋白 | 3±0.13 | 2±0.18 | 2±0.03 |
| 总胆红素 | 0.2±0.03 | 0.1±0 | 0.2±0.03 |
| 血尿素氮 | 29±3.1 | 19±1.1 | 23±1.5 |
| 肌酸 | <0.2 | <0.2 | <0.2 |
| 胆固醇 | 187±8.8 | 134±15.8 | 107±7.5 |
| 葡萄糖 | 264±43 | 282±24 | 307±28 |
| Ca ²⁺ | 11±0.8 | 10±0.7 | 10±0.1 |
| P | 13±0.6 | 11±1.0 | 13±0.1 |
| HCO ³⁻ | 19±5.8 | 20±3.2 | 17±2.8 |
| 平均值±SEM, n = 4; 在处死时获得的数据 | | | |

表 8: 给予 SH-BC-893 的 pDKO 小鼠的血细胞计数

[0301]

| | 空白 | SH-BC-893 | |
|---------------------------------|------|-----------|-----------|
| | | 60 mg/kg | 120 mg/kg |
| 白细胞 [10 ³ 细胞/ μL] | 5±1 | 5±1 | 8±1 |
| %中性粒细胞 | 16±5 | 14±3 | 19±5 |
| %淋巴细胞 | 76±7 | 77±4 | 73±5 |
| 红细胞 [M/ μL] | 9±0 | 8±1 | 9±1 |
| 血细胞比容 | 38±3 | 32±5 | 41±3 |
| 平均值±SEM, n = 4; 在处死时获得的数据 | | | |

[0302] 未转化的细胞对FTY720诱导的死亡的相对耐受可能源自正常细胞在应激下代谢静止的能力。具体而言,在癌细胞中,为了支持生物合成和增殖,致癌突变驱动葡萄糖和氨基酸转运蛋白的表达。(McCracken,A.N.&Edinger,A.L.Trends Endocrinol.Metab.24, 200-8 (2013),其公开内容通过引用并入本文)。致癌Ras突变还通过降解经由巨胞饮作用获

得的细胞外蛋白质来促进氨基酸获取。(Palm,W.等,Cell 162,1-12 (2015);Commisso,C.等,Nature 497,633-7 (2013);其公开内容通过引用并入本文)。许多癌细胞对这种高营养流入“上瘾”。例如,降解酶L-天冬酰胺酶是急性淋巴细胞白血病的有效疗法,因为这些细胞不能合成足够的天冬酰胺以满足其合成代谢需求(Pieters,R.等,Cancer 117,238-249 (2011),公开通过引用并入本文)。临床前研究表明,其他类型的癌症表现出类似的依赖性,依赖于输入的精氨酸、丝氨酸或甘氨酸用于生长和存活。(Feun,L.G.等,Curr.Opin.Clin.Nutr.Metab.Care 18,78-82 (2015);Jain,M.等,Science.336,1040-1044 (2012);Maddocks,O.D.K.等,Nature 493,542-6 (2013),其公开内容通过引用并入本文)。这些结果表明,限制营养物质摄取对于许多类型的肿瘤和癌症可能是广泛有效的治疗方法。

[0303] 实验材料和方法

[0304] 初始优化研究中的生物学步骤:

[0305] 细胞培养研究:在补充有10%胎牛血清(FCS,Sigma-Aldrich)、10mM Hepes (Mediatech)、55μM的β-巯基乙醇(Sigma-Aldrich)、2mM的L-谷氨酰胺(Mediatech)和抗生素的RPMI 1640 (Mediatech)中,将Sup-B15细胞维持在2-3百万/mL。所有贴壁细胞维持在70-80%汇合。细胞在下列培养基中培养:PC3&A549,补充有10%FCS和抗生素的Ham's F12K (Corning Cell Gro);DU145细胞,补充有10%FCS、1mM丙酮酸钠(Mediatech)和抗生素的MEM (Corning Cell Gro);SW620&MDA-MB-231,含10%FCS、1mM丙酮酸钠(Mediatech)和抗生素的DMEM (Corning Cell Gro);Panc-1细胞,补充有10%FCS和抗生素的DMEM (Corning Cell Gro)。所有上述细胞系均可从ATCC获得。

[0306] 活性试验:在透明底部96孔黑色细胞培养板(cat#655090,Greiner Bio-One,NC, USA)中进行Cell Titer Glo试验(Cell Titer Glo发光细胞活力测定试剂盒,cat#G7571, Promega公司)。在1,000细胞/孔以100μl体积接种后,在药物添加之前将细胞静置至少24小时。72小时后,通过在室温(RT)下加入10μl的0.1%Triton-X100在PBS中振荡1分钟来制备用于分析的细胞。然后加入Cell Titer-Glo细胞裂解试剂(20μl),然后1分钟震荡并在室温下黑暗中温育10分钟。使用IVIS成像系统(IVIS Lumina II,Perkin Elmer,USA)检测发光。还使用DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吲哚)通过活体染料排除通过流式细胞术在PC3细胞中测定72小时IC₅₀值。使用GraphPad Prism(GraphPad Software,Inc,La Jolla,CA)确定IC₅₀。通过流式细胞术测定SupB-15活力。用其它细胞系进行Cell Titer Glo测定。

[0307] S1P1-5活化:使用稳定过量表达不同人类S1P受体亚型的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。过量表达S1P1、S1P4和S1P5的CHO细胞在含有补充有10%FBS、50μg/ml庆大霉素和0.5mg/ml G418的α-MEM的培养基中培养。过量表达S1P2和S1P3的CHO细胞在含有10%FBS、50μg/ml庆大霉素和0.5mg/ml G418的RPMI中培养。诱导之前,使细胞无血清24小时。在含有0.1mg/ml不含脂肪酸的BSA的无血清DMEM中,在不存在或存在各种化合物或S1P的情况下进行诱导10分钟。使用缓冲液制备蛋白质裂解物,所述缓冲液含有(50mM Tris pH 7.4,150mM NaCl,10%甘油,1%Triton X-100,2mM EDTA,2mM EGTA,40mMβ-甘油磷酸酯,50mM氟化钠,10mM焦磷酸钠,2mM二硫苏糖醇,0.2mM原钒酸钠)。细胞在MSE超声波粉碎机中通过一次5秒破裂的匀化,离心并取出用于蛋白质测定。通过SDS-PAGE(10%聚丙烯酰胺凝胶)分离等量的蛋白质,转移至硝酸纤维素膜并进行蛋白质印迹分析。使用IRDye®二抗对条带进行染

色,并通过LICOROdyssey®Fc成像系统进行观察。抗磷酸-Thr202/Tyr204-p42/p44-MAPK和磷酸-Ser PKC底物的抗体来自德国的Cell Signaling, Frankfurt am Main。如前所述产生并表征抗总p42和总p44的多克隆抗血清。(Huwiler, A.; Pfeilschifter, J. Br. J. Pharmacol. 1994, 113, 1455-1463; 其公开内容通过引用并入本文)。

[0308] 心率:向C57BL/6小鼠手术植入DSI TA-ETAF20心电图遥测设备(Data Sciences International, St. Paul, MN)。使用PhysioTel遥测系统和Dataquest A.R.T 4.0软件(DSI)收集并记录心电图数据。将遥测装置植入小鼠的腹腔中,将生物电位导线缝合在胸壁中。手术后每12小时施用丁丙诺啡(0.05mg/kg)用于疼痛处理,并且恩氟沙星(3mg/kg)作为抗生素在手术后7天每天2次施用。在启动基线遥测记录之前,允许小鼠在手术后两周恢复。从自由移动的清醒小鼠中取得的ECG数据计算心率。将小鼠分成两组,每组3只小鼠,并用单剂量的空白(0.9%盐水或20%酸化的DMSO的0.9%生理盐水)、10mg/kg FTY720、FTY720-磷酸盐、5或5-P处理,和心率持续监测10小时。小鼠休息两周,此时重复实验,并将所述小鼠分配到另外的组。这些实验是根据所有国家或地方的指导和法规进行的,并且由UCI机构动物护理和使用委员会批准。

[0309] 淋巴细胞隔离:向雌性8-24周龄C57BL6小鼠腹膜内注射空白(0.9%盐水或20%酸化的DMSO的0.9%生理盐水),10mg/kg FTY720、FTY720-磷酸盐、5或5-P。12小时后,在氯胺酮/甲苯噻嗪麻醉下从眼眶后窝采集血液。将10μL全血添加至190μL ACK红细胞裂解缓冲液中,在37℃下在室温下孵育3-5分钟,通过离心回收白细胞。使用血细胞计数器计数有核细胞(Hoechst33342阳性)以获得白细胞计数。单独地将50μL全血加入到1mL ACK红细胞裂解缓冲液中,并在室温下孵育3-5分钟。用FACS洗涤液(含0.05%NaN₃的PBS中FCS2%)洗涤细胞并重复红细胞裂解。将试管被到出并在冰上重新分散在具有识别B220、CD4或CD8(全部来自Biolegend, San Diego)的直接缀合的抗体的100μL的FACS封闭(含0.05%NaN₃的PBS中FCS10%)中30分钟。在BD LSR II流式细胞仪上分析细胞;分析仅限于活细胞(DAPI阴性)。这些实验根据所有国家或地方指导和规定进行,并且由UCI机构动物护理和使用委员会批准。

[0310] SW620和SW480移植瘤研究:对于SW620移植瘤研究,将悬浮于具有2%FCS的PBS中的表达250万萤光素酶的SW620结肠癌细胞皮下注射到7周龄雄性裸鼠(Charles Rivers Labs, Cr1:NU(NCr)-Foxn1nu)的侧腹。当肿瘤体积达到100mm³时,将小鼠分配到具有匹配的平均肿瘤体积和动物重量的组。用空白(0.9%生理盐水)、10mg/kg FTY720或20mg/kg化合物5或化合物15对含有7只小鼠的四组进行腹膜内处理。在处理7和11天后用卡尺测量肿瘤长度和宽度。使用公式体积(mm³)=长度[mm]×(宽度[mm])²×0.52计算肿瘤体积。显示了随时间的每个肿瘤体积的平均倍数变化。

[0311] 对于SW480移植瘤的研究,通过在NSG小鼠的侧腹皮下注射250万个细胞来产生移植瘤。一旦肿瘤达到100mm³,通过腹膜内注射或如所示的口腔灌胃施用根据本发明的各种实施方式的化合物(例如化合物5/104)。使用上述公式计算肿瘤体积;使用IVIS成像系统(Xenogen)测量BLI。切除SW480肿瘤并将其固定在2.5%戊二醛的0.1M磷酸盐缓冲液(pH 7.4)中,并在4℃避光保存直至包埋。

[0312] 根据所有国家或地方指导和规定进行这些实验,并且由UCI机构动物护理和使用委员会批准。

[0313] 营养转运蛋白表达: 使用藻红蛋白 (PE) 偶联的小鼠抗人 4F2hc 抗体 (BD Pharmingen, cat#556077) 在 6 小时测量表面 4F2hc 表达; 分析仅限于活细胞。PE 缀合的小鼠 IgG1, k (cat#555749, BD Pharmingen) 用作同种型对照。在 BD LSR II 流式细胞仪和 FlowJo 软件 (Treestar) 上分析细胞。

[0314] 质谱定量: 用 10 μ M FTY720 或 5 对在 6 孔板的一个孔中的 100 万个 PC3 或 500 万个 SW620 细胞处理 16 小时。将培养基 (100 μ l) 从孔中移出并与 100 μ l 乙腈合并。通过刮擦收集细胞, 沉淀并重新分散在 100 μ l HPLC 级水中, 然后加入 100 μ l 乙腈。加入 75 纳克未定量化合物 (FTY720 和 FTY720-P 用于分析 5 的磷酸化, 或者 5 和 5-P 用于分析 FTY720/FTY720-P 的磷酸化) 作为内标, 以允许校正样品制备过程中化合物的损失。通过离心 (15,000 rpm, 在微量离心机中 10 分钟) 从两个样品中去除沉淀的蛋白质, 并将上清液转移至冰上的含有 100 μ l 乙腈 + 0.2% 乙酸的干净试管。通过离心再次除去不溶物质, 并分析上清液的化合物含量。使用乙腈 (+0.2% 乙酸) 梯度洗脱, 通过配备有 C18 反相柱 (Waters) 的 UPLC-MS/MS (Waters Micromass Quattro Premier XE) 分析 20 微升该去蛋白样品。仪器以正离子模式运行。用于多反应监测的离子转换通道为: 对于 FTY720 为 308 \rightarrow 255, 对于 FTY720-P 为 388 \rightarrow 255, 对于 5 为 290 \rightarrow 104, 对于 5-P 为 370 \rightarrow 272, 驻留时间为 200 毫秒。FTY720 和 5 的锥孔电压为 30V, FTY720-P 和 5-P 的锥孔电压为 20V。使用纯化合物产生标准曲线以进行定量; 标准曲线从 50-1000 ng/ml 是线性的, 其中 R^2 为 0.98 或更大。内标回收率在 80-120% 范围内, 与仪器建立的准确度一致, 并且对于磷酸化和非磷酸化化合物是类似的。

[0315] 细胞分析: 通过活体染料排除和流式细胞术测定活力和 4F2hc 表达。用 XF24 细胞外通量分析仪 (Seahorse Biosciences) 测量氧气消耗; 将值以总蛋白为标准。共焦显微镜在 Zeiss LSM780 或 Nikon Eclipse Ti 上进行; 使用装备有 DIC 滤片的 Nikon TE2000-S 监测空泡化。在底层为 0.5% 琼脂糖的含有 0.35% 琼脂糖的 DMEM-10 中测量 SW620 细胞的锚定非依赖性生长。根据 IRB 方法 2015-1883 (Edinger) 和 2001-2058 (ICTS), 由 CTSA 支持的 UCI 临床和转化科学研究所进行的正常献血者程序获得 PBMNCs。经由 Ficoll-Paque 密度梯度沉降从全血中分离 PBMNCs。将平板在 37°C 下在含有 5% CO₂ 的潮湿空气中孵育, 并在 12 天后计数群落。

[0316] 进一步优化研究中的生物学步骤:

[0317] 化合物: 除了 C2-神经酰胺 (109)、二氢-C2-神经酰胺 (110)、14-17、21-24 和 31-35 在 DMSO 中制备以及鞘氨醇 (106)、神经鞘氨醇 (107) 和二甲基鞘氨醇 (108) 在乙醇中制备之外, 在水中制备化合物储备物 (5-25 mM)。

[0318] 细胞培养研究: 将 FL5.12 细胞 (最初从 Craig Thompson, Memorial Sloan Kettering Cancer Center 获得的鼠造血细胞) 在补充有 10% 胎牛血清 (FCS, Sigma-Aldrich)、10 mM Hepes (Mediatech)、500 pg/ml 重组 IL-3 (cat#575502, Biolegend)、55 μ M β -巯基乙醇 (Sigma-Aldrich)、2 mM L-谷氨酰胺 (Mediatech) 和抗生素的 RPMI 1640 (Mediatech) 中保持在 0.1-0.5 百万/ml。使用 Look-Out Mycoplasma PCR 检测试剂盒 (cat# MP0035, Sigma) 每 3 个月对细胞筛选支原体。

[0319] 活性试验: 使用 DAPI (4', 6-二脒基-2-苯基吲哚) 通过活体染料排除在 48 小时通过流式细胞术测定 IC₅₀ 值。使用 GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA) 计算 IC₅₀ 值。

[0320] 营养转运蛋白表达: 使用藻红蛋白 (PE) 缀合的大鼠抗小鼠 CD98 抗体 (Biolegend,

cat#128208) 在3h测量表面CD98 (4F2hc, SLC3A2) 表达;分析仅限于活细胞。使用PE缀合的Rat IgG2a,k (cat#400508, Biolegend) 作为同种型对照。为了染色,将200,000个细胞沉淀,重新分散于含有0.25μL抗-CD98抗体的100μL FACS封闭(含有10%FCS和0.05%NaN₃的PBS)中,在冰上孵育30分钟,用1mL FACS洗涤(含有2%FCS和0.05%NaN₃的PBS),并在BD LSR II 流式细胞仪上分析。用FlowJo软件 (Treestar) 处理数据。

[0321] 空泡化试验:使用明场显微镜和配备有DIC滤片的Nikon TE2000-S荧光显微镜在100X下评估细胞。除非另有说明,在2.5μM化合物中经过3小时的孵育周期后对空泡化进行定量。为了计算空泡化评分,定性评估了至少15个各个细胞/实验中的空泡化严重程度。如下将分数分配给各个细胞:0=无空泡,1=非常小的空泡,2=多个很好定义的空泡,3=多个大空泡。为了计算与化合物有关的空泡化评分,使用下列公式:空泡化评分=[(3类中%细胞×3)+(2类中%细胞×2)+(1类中%细胞×1)]/3。

[0322] 将评分除以3,以使具有100%3类中细胞的化合物将具有100的空泡化评分。进行三个单独的实验并将空泡化评分平均以产生平均值+/-SEM。所有细胞都由一名实验室成员在确认对单独评分的具有相似结果的5种化合物不知情之后进行评分。

[0323] 为了确定这种定性空泡化评分如何反映空泡化的真实度,开发并验证了基于ImageJ的宏观空泡检测。手动追踪细胞轮廓,并将与同一视野中的细胞相对应的一组轮廓保存为感兴趣的ZIP区域(ROI)文件以供进一步处理。将Otsu阈值应用于每个细胞。将得到的反向的图像,应用半径为2的中值滤片,并且使用分水岭变换来分离彼此过于靠近的连接组分。接下来,使用ImageJ“分析粒子”功能检测生成图像中的所有连接组分,并计算其相应的面积和圆形成度。将面积小于20像素或圆形成度>0.8的连接组分确定为空泡。验证了其他连接的组分是缺乏分割的结果。为了克服这种缺乏分割,使用ImageJ“Find Maxima”功能检测这些连接组分内的强度的最大值。如果发现超过一个最大值,则通过分水岭对组分进行分割,并且每个新组分都要独立进行圆形成度和面积测试。将空泡图像处理结果与手动检测到的空泡进行比较,并显示86%的检测准确度。

[0324] 为了增加对比度,用CFSE (5 (6)-羧基荧光素/N-羧基琥珀酰亚胺酯) 对细胞染色。对于这些测定,在感兴趣的化合物中孵育3小时后,在黑暗中将200,000个细胞在1mL 1μM CFSE中染色20分钟。在Zeiss LSM780共焦显微镜上评估细胞。使用宏观ImageJ确定空泡占据的胞质溶胶的百分比。计算空泡百分比时排除了核。使用该宏观方法来评价用鞘氨醇、神经鞘氨醇和二甲基鞘氨醇处理的细胞,确定空泡化评分≈空泡面积%的两倍,验证空泡化评分作为空泡化程度的半定量测量。用这种算法和共焦显微镜对所有样品进行定量是不可行的,因为评估的化合物数量很大。

[0325] 统计显示至少3次独立实验的平均值+/-SEM (CD98丢失或空泡化)。对于IC₅₀研究,在GraphPad Prism中计算IC₅₀的95%置信区间。

[0326] 进一步优化研究的一般化学步骤:

[0327] 一般化学信息:涉及水分敏感化合物的所有反应在干燥、无氧、氩气和无水溶剂的正压下在火焰干燥的玻璃器皿中进行。无水溶剂在使用前在氩气正压下蒸馏并通过标准方法干燥。通过SDS (溶剂输送系统) 干燥THF、乙醚、CH₂Cl₂和甲苯。市售级试剂不经进一步纯化即可使用。二氧化硅柱色谱在230-400目硅胶上进行。薄层色谱(TLC) 在玻璃背底的硅胶板上进行。通过UV光(254nm) 或通过用高锰酸钾溶液或钼酸铈铵染色然后加热进行观察。在

Bruker AV-400和AV-500MHz光谱仪上在室温(298K)下记录¹H和¹³C NMR谱。以CDCl₃ (δH: 7.26ppm和δC: 77.0ppm) 或MeOD (δH: 3.31ppm和δC: 49.0ppm) 为参考,化学位移以百分分之几的分率(ppm)报告。偶合常数(J)以赫兹(Hz)报告。多重性以多重(m),单重(s),双重(d),三重(t),四重(q),五重(quin.)和宽(br.)给出。在FT-IR光谱仪上记录红外光谱并以厘米倒数(cm⁻¹)记录。在25℃,在589nm的Anton Paar MCP 300旋光计上测定旋光度。具体旋转度以10⁻¹deg cm²g⁻¹为单位给出。高分辨率质谱(HRMS)是通过具有电喷雾电离(ESI)的“Centre régional de spectroscopie de masse de l'Université Montréal”与定量飞行时间(TOF)检测器连接进行。通过HPLC(从最终痕量扣除空白)用0.1%甲酸的H₂O和含0.1%甲酸的MeOH的洗脱液以0.50mL/min(除非另有说明)的流速和214nm处的UV检测评估纯度分析。色谱柱:Sunfire C8=100×4.6mm,粒径=5μ。Hypersil Gold C8=100×2.1mm,粒径=3μ。按照R.Fransson等(S.ACS Med.Chem.Lett.,2013,4,969-973,其公开内容通过引用并入本文)所述制备叔丁基(2R,4S)-2-(羟甲基)-4-((4-辛基苄基)氧基)吡咯烷-1-羧酸酯,叔丁基(2S,4R)-2-(羟甲基)-4-((4-辛基苄基)氧基)吡咯烷-1-羧酸酯,(2R,4S)-2-(甲氧基甲基)-4-((4-辛基苄基)氧基)吡咯烷盐酸盐和(2S,4S)-2-甲基-4-((4-辛基苄基)氧基)吡咯烷盐酸盐。

[0328] 通用方法A:在0℃下,向在THF和DMF中的相关醇(1当量)分批加入NaH(3当量),并将所得混悬液在该温度下搅拌30分钟。同时加入1-溴-十二烷(3当量)和四-N-丁基碘化铵(TBAI)(0.1当量),使所得混合物升温至室温,搅拌48小时。滴加水(15mL)后,用乙酸乙酯(2×20mL)萃取所述溶液。干燥(MgSO₄)合并的有机物,过滤并真空浓缩。通过硅胶柱色谱法(己烷到10%乙酸乙酯在己烷中)纯化残余物,得到油状物。

[0329] 通用方法B:在氩气下,向在无水CH₂Cl₂中相关的烯丙基醚(1当量)(c=0.06M)中加入烯烃(10当量)和Grubbs I催化剂(20摩尔%)。将所得混合物在室温下搅拌24小时,然后加入另外的Grubbs I催化剂(15mol%)和烯烃(10当量),将其在室温下再搅拌24小时。将反应混合物真空浓缩并通过二氧化硅柱色谱法(参见具体化合物的条件)纯化,得到油状物。

[0330] 通用方法C:将相关的炔(3当量)和儿茶酚硼烷(1M,在THF中,3当量)在70℃下在氩气下回流2小时。然后使反应混合物冷却至室温。向其中添加在1,2-二甲氧基乙烷中的适当的芳基溴(1当量)(12mL/mmol)、Pd(PPh₃)₄(3mol%)和NaHCO₃水溶液(1M,10mL/mmol)。所得混合物在85℃下和氩气下回流5小时。然后使反应混合物冷却至室温,并用乙醚萃取三次。将合并的有机物干燥(Na₂SO₄),过滤并真空浓缩。通过硅胶柱色谱法(除非另有说明,己烷到20%乙酸乙酯在己烷中)纯化残余物,得到油状物。

[0331] 通用方法D:将相关的(E)-烯烃(1当量)溶于乙酸乙酯(c=0.04M)中,并向其中加入一份Pd/C(10%)。在真空下将空气从烧瓶中去除并用氢气气球代替。在室温下搅拌得到的混合物(参见具体化合物的反应时间),然后通过硅藻土垫过滤,得到油状物,其不经进一步纯化即使用。

[0332] 通用方法E:向相关的无水THF中的TBS保护的醇(1当量)加入TBAF(1M在THF中,参见各化合物的当量),并将所得混合物在室温下搅拌17小时。用水稀释反应混合物并用乙酸乙酯萃取两次。将合并的有机物干燥(MgSO₄),过滤并真空浓缩。通过硅胶柱色谱(10%乙酸乙酯的己烷溶液至30%乙酸乙酯的己烷溶液,除非另有说明)纯化残余物,得到油状物。

[0333] 通用方法F:向相关的1,4-二恶烷中N-Boc保护的醇(1当量)加入1,4-二恶烷中4M

HCl (参见各化合物的量), 并且所得混合物在室温下搅拌17小时。将反应混合物真空浓缩并与1,4-二恶烷共蒸发两次以上以确保除去所有的HCl。通过用二乙醚研磨三次或通过二氧化硅柱色谱(参见具体化合物的条件)纯化所得残余物, 得到固体产物。将一部分该固体溶于最少量的HPLC级水中, 过滤(孔径=0.45 μ m)并冻干用于生物测试。

[0334] 通用方法G: 将相关的HCl盐溶于CH₂Cl₂中并用饱和NaHCO₃水溶液萃取三次。干燥(MgSO₄)有机层, 过滤并真空浓缩, 得到相应的游离碱, 其不经进一步纯化即可使用。将该残余物(0.9当量)溶于最少量的CH₂Cl₂中, 并在氩气氛下加入1,3-二-Boc-2-(三氟甲基磺酰基)胍(1当量)和N,N-二异丙基乙胺(1.5当量)。反应在室温下搅拌17小时。蒸发CH₂Cl₂并将残余物通过硅胶柱色谱(CH₂Cl₂到10%MeOH在CH₂Cl₂中)纯化, 得到油状物。

[0335] 通用方法H: 将相关HCl盐溶于CH₂Cl₂中并用饱和NaHCO₃水溶液萃取三次。干燥(MgSO₄)有机层, 过滤并真空浓缩, 得到相应的游离碱, 其不经进一步纯化即使用。将该残余物(1当量)溶于CH₂Cl₂中, 并在0℃下滴加乙酸酐(1.5当量)。使反应混合物达到室温, 并在室温下搅拌17小时。通过硅胶柱色谱法(己烷到50%乙酸乙酯在己烷中)纯化残余物, 得到油状物。

[0336] SH-BC-893的体外和体内表征的步骤:

[0337] 细胞培养和试剂: 从ATCC获得OP9, DLD-1, SW48, SW620, MDA-MB-231, PANC-1, HOS, MG-63和Zr75-1细胞。SW480细胞由Marian Waterman (UCI, Irvine CA), HeLa细胞由Christine Sütterlin (UCI, Irvine CA) 提供, LS180细胞由Bruce Blumberg (UCI, Irvine CA) 提供和FL5.12细胞由Craig Thompson (Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY) 提供。具有和不具有Cre介导的STOP盒(cassette)删除的p53^{-/-}; LSL-KRasG12D MEFs由David Tuveson博士(Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY) 友情提供。原代p53^{+/+}; PTEN^{+/+}, p53^{-/-}; PTEN^{+/+}和p53^{-/-}; PTEN^{-/-}MEFs是使用标准技术从C57BL/6小鼠的胚胎内部产生。将由p53^{-/-}-PTEN^{-/-}小鼠前列腺组织产生的mPCE细胞维持在含有10%FBS、25 μ g/ml脑垂体提取物、5 μ g/ml牛胰岛素和6ng/ml重组人表皮生长因子的DMEM中。将FL5.12细胞保存在补充有10%胎牛血清(FCS)、10mM HEPES、55 μ M 2-巯基乙醇、抗生素、2mM L-谷氨酰胺和500pg/ml rIL-3的RPMI 1640培养基中。通过在2周培养中逐渐降低IL-3浓度, 使FL5.12细胞适应在25pg/ml IL-3中生长。DLD-1和Zr75-1细胞在与FL5.12相同的培养基中培养, 但没有IL-3。将HeLa, OP9, MG-63和MEF细胞在含有4.5g/L葡萄糖和补充有10%FCS和抗生素的L-谷氨酰胺的DMEM中培养。通过使DMEM从化学组分缺乏氨基酸和葡萄糖并补充10%透析的FCS来产生饥饿培养基。在补充有10%FCS、抗生素和1mM丙酮酸钠的DMEM中培养LS180, SW48, PANC-1, MDA-MB-231, SW480和SW620细胞。使用1 μ g/ml的碘化丙啶或DAPI通过活体染料排除来测量细胞活力。用PE缀合的抗CD98分析细胞表面4F2hc水平限于由DAPI排除测定的活细胞。在含有0.5%琼脂糖底层的0.35%低熔点琼脂糖的DMEM-10中, 测量SW620细胞的锚定非依赖性生长。根据IRB方法2015-1883 (Edinger) 和2001-2058 (ICTS), 从在UCI由CTSA支持的临床和转化科学研究所运行的正常献血者程序获得PBMCs。P40Px-EGFP质粒由Seth Field (UCSD, San Diego) 提供, mCherry-Vac14WT和mCherry-Vac14L156R质粒由Thomas Weide (University Hospital of Muenster, 德国) 提供, mCherry-TRPML1、EGFP-TRPML1和mCherry-ML1N*2质粒由Haoxing Xu (University of Michigan, Ann Arbor) 提供, 以及PIKfyve和Vac14shRNA质粒由Anand

Ganesan (UCI, Irvine) 提供。

[0338] 光学显微镜:使用Nikon TE2000-S荧光显微镜进行明视野和落射荧光显微术;共焦显微镜在Zeiss LSM780共焦显微镜或Nikon Eclipse Ti旋转盘共焦显微镜上进行。抗体获自:来自eBioscience的Murine 4F2hc (cat#128208) 和Lamp1 (cat#53-1079-42);来自BD Biosciences的人类4F2hc (cat#556077);来自Novus Biologicals的人类GLUT1 (cat#NB300-666);来自Cell Signaling Technology的LC3 (cat#4108);来自Tocris的PIKfyve (cat#4082);来自Sigma-Aldrich的Vac14 (cat#SAB4200074);来自Lifespan Biosciences的WIPI2 (cat#LS-C154557-100)。使用ImageJ软件中的JACoP插件确定共定位。在无血清DMEM中孵育16小时后测量巨胞饮作用。(LSL)之前或(KRasG12D)之后引入Cre的p53-/-; LSL-K-RasG12D MEFs是饥饿16小时的血清,然后用巨胞饮作用抑制剂5-(N-乙基-N-异丙基)阿米洛利(EIPA, 75 μ M)处理1小时或SH-BC-893处理6小时。加入俄勒冈绿葡聚糖(Oregon Green dextran) (Life Technologies, cat#D7173) (1mg/mL) 和溶酶体示踪剂红(Lysotracker Red) (Life Technologies, cat#L-7525) (1:2,000稀释) 30分钟,并在旋转盘共聚焦显微镜上评估活细胞。对于Dil-LDL摄取,将mPCE在含有10%活性炭处理的血清的培养基中孵育24小时,然后用20 μ g/ml Dil-LDL (Life Technologies, cat#L3482) +/-SH-BC-893孵育6小时和Lysotracker Blue (Life Technologies, cat#L-7525) 孵育30分钟。为了检测表面LDL受体,在4 $^{\circ}$ C下将Dil-LDL加入到用SH-BC-893处理3小时的mPCE细胞中或加入用LDL受体抗体(R&D Systems, cat#AF2255) 染色的细胞中。切下SW480肿瘤并将其固定在2.5%戊二醛的0.1M磷酸盐缓冲液(pH7.4)溶液中,并在4 $^{\circ}$ C下避光保存直至包埋。肿瘤样品由UCI Irvine的病理研究服务核心设备进行处理。

[0339] 电子显微镜:将用FTY720处理的FL5.12细胞用2.5%戊二醛/2.5%甲醛的0.1M二甲胂酸钠缓冲液溶液固定,并在4 $^{\circ}$ C下储存直至包埋。将细胞用1%四氧化锇固定,连续脱水,包埋在eponat12树脂中,切割超薄切片,安装在栅格上,并用乙酸铀酰和柠檬酸铅染色。在Philips CM10透射电子显微镜上分析样品。显示两个独立实验的代表图像。

[0340] 体内研究:根据加利福尼亚大学欧文分校(University of California, Irvine)的机构动物护理和使用委员会进行小鼠实验,之后与UCI的Chao Family Comprehensive Cancer Center的生物统计共享资源协商进行功效分析。通过在10-16周龄的雄性或雌性NSG小鼠的侧腹皮下注射500万个细胞来生产移植瘤。以同样的方式产生前列腺同种移植瘤,但在雄性6-8周龄的C57BL/6小鼠中产生。一旦肿瘤达到100mm³,通过所述的腹膜内(i.p.)注射或口服灌胃给药SH-BC-893。使用公式体积(mm³) = 长度[mm] \times (宽度[mm])² \times 0.52计算肿瘤体积;使用IVIS成像系统(Xenogen)测量BLI。为了在C57BL6基础上产生pDK0小鼠,从Jackson实验室获得Pten^{flox}小鼠(储存号0045597)和p53^{flox}小鼠(储存号008462),并从NCI-Frederick Mouse Repository获得PB-Cre4小鼠(品系#01XF5)。通过在UC Irvine的转基因小鼠设备的协助下进行的体外受精来产生年龄匹配的pDK0雄性群组。6-7周龄开始进行处理。在确定SH-BC-893处理正常小鼠没有改变泌尿生殖道(GU tract)重量(n=3)后,通过分离pDK0小鼠的完整泌尿生殖道(GU)并减去年龄匹配的小鼠的正常GU道的平均重量(n=3)来确定肿瘤重量。肿瘤样本由加州大学欧文分校的病理研究服务核心设备进行处理和成像。由IDEXX BioResearch分析血液化学,并使用Hemavet血液学系统进行全血计数。

[0341] NADH荧光寿命成像显微镜 (FLIM):使用与Ti:蓝宝石激光系统(Spectra-Physics

Mai Tai) 结合的Zeiss 780显微镜获取寿命图像。激发波长为740nm,并且使用二向色滤光片(690nm)从激光中分离荧光信号。使用63X 1.15水浸物镜。图像采集设置为:图像大小为256x 256像素,扫描速度为25.21秒/像素。通过混合检测器(HPM-100Hamamatsu)检测荧光。收集数据直至获得100个计数图像最亮像素。在每个成像时间段通过具有4.04nsec的单一指数的测量荧光素的荧光衰减校准FLIM系统。如前所述进行FLIM图像的Phasor转化和单个细胞平均寿命分析(Digman MA等,Biophys J.2008;94(2):L14-L16;Pate KT等,EMBO J.2014;33(13):1454-73;Stringari C等,Sci Rep.2012;2:568;其公开内容通过引用并入本文)。数据由UCI荧光动力学实验室开发的SimFCS软件处理。当确定结合的NADH部分时排除核。显示平均值 \pm SEM,来自两个独立实验的 $n \geq 45$ 个细胞。

[0342] 相干反斯托克斯拉曼光谱(CARS):CARS成像系统详述于(Suhalim JL等,Biophys J.2012;102(8):1988-1995,其公开内容通过引用并入本文)中。用4%甲醛固定细胞并用60X水的物镜成像。样品上的激光功率为10mW,像素驻留时间为10ms。使用定制的Matlab程序从CARS图像估计脂滴面积。采用四组分Otsu阈值法分离脂滴,细胞质,细胞核和背景。脂滴面积被定义为由细胞质覆盖的像素数量上由脂滴覆盖的像素的数量。

[0343] PIKfyve体外激酶测定:在HEK293T细胞中表达FLAG-PIKfyve,用FLAG-珠纯化,并用FLAG肽洗脱。通过在含有或不含FTY720的2X脂质混合物缓冲液[40mM Tris-HCl(pH 7.4),200mM NaCl,1mM EGTA]中通过超声产生PI3P和磷脂酰丝氨酸(C16)脂质体。用 Mg^{2+} -ATP溶液[6.5mM HEPES(pH 7.3),2.5mM $MnCl_2$,10mM $MgCl_2$,1mM β -甘油磷酸,0.1mM ATP和 $[^{32}P]$ - γ -APT]孵育FLAG-PIKfyve和脂质混合物15分钟。加入4M HCl终止反应,用甲醇/氯仿(1:1)提取磷酸肌醇。将磷酸肌醇点在二氧化硅薄层色谱板上并用2M乙酸/1-丙醇(35:65)分离。将膜干燥,暴露于Phosphor成像仪,并用ImageQuant定量来自PI(3,5)P2点的计数。

[0344] 通过HPLC测量PI(3,5)P2:用PBS冲洗HeLa细胞两次,并在肌醇标记培养基(含有5 μ g/ml转铁蛋白,5 μ g/ml胰岛素,10%透析FCS,20mM HEPES,2mM L-谷氨酰胺的无肌醇DMEM)和10 μ Ci/ml myo-[2- 3 H]肌醇中孵育48小时。用4.5%高氯酸溶解细胞,刮下,并在4 $^{\circ}$ C下以14,000 \times g离心10分钟。用100mM EDTA冲洗细胞沉淀,再次离心,并重新悬浮于50 μ l水中。为了将脂质脱酰化,加入1ml甲醇/40%甲胺/丁醇(45.7%甲醇,10.7%甲胺,11.4%丁醇),然后将混合物转移至玻璃小瓶中并在55 $^{\circ}$ C下孵育1小时。冷却至室温后,将样品真空干燥并重新混悬在0.5ml水中。将脂质用等体积的丁醇/乙醚/甲酸乙酯(20:4:1)萃取两次。将水相真空干燥并重新混悬在75 μ l水中,并通过HPLC分析50 μ l的各样品。PI(3,5)P2水平表示为总磷脂酰肌醇的百分比。

[0345] PP2A磷酸酶活性:使用PP2A免疫沉淀磷酸酶测定试剂盒(EMD Millipore)测量PP2A活性。简而言之,将PP2A的催化亚基用4 μ g抗-PP2AC亚基从FL5.12细胞裂解物中免疫沉淀。洗涤四次后,通过在存在或不存在C2-神经酰胺、二氢-C2-神经酰胺、FTY720、SH-BC-893或血球凝集素A的情况下,根据制造商的说明书通过磷酸肽的去磷酸化来评估免疫沉淀的PP2A的活性。

[0346] SH-BC-893的质谱定量分析:作为内标,将75ng FTY720加入到以1:1与乙腈结合的50 μ l血浆或50 μ l肿瘤匀浆(0.25M蔗糖,25mM KCl,50mM Tris HCl,0.5mM EDTA,pH 7.4;1:9wt:体积)中。通过离心(15,000rpm10分钟)沉淀并去除蛋白质,并将上清液转移到含有50 μ l乙腈+0.2%乙酸在冰上的新试管中。用乙腈+0.2%乙酸进行第二次去蛋白质化后,使用

Waters Micromass Quattro Premier XE通过UPLC-MS/MS分析20 μ l脱蛋白样品,所述 Waters Micromass Quattro Premier XE配备有C18反相柱(Waters)和乙腈+0.2%乙酸梯度洗脱。仪器以正离子模式运行。用于SH-BC-893的多反应监测的离子转换通道为290 \rightarrow 104,停留时间为200毫秒。锥孔电压是30V。用于定量的标准曲线从50-1000ng/ml是线性的, R^2 为0.98或更高。内标回收率>80%。假设1gm=1mL,计算肿瘤浓度。

[0347] 统计方法和数据分析:使用用于单个成对比较的配对t检验来确定显著性。利用Tukey的方法,并且在进行多重比较时报告调整的p值。在数据不正态分布的肿瘤研究中,使用Mann-Whitney U检验将处理的小鼠与对照进行比较。*, $P<0.05$;**, $P<0.01$;***, $P<0.001$;n.s.,不显著($P>0.05$)。对于CARS实验中的脂滴面积,将对照组与实验组之间的平均值与双尾ANOVA进行比较。

[0348] 等同原则

[0349] 虽然以上描述包含本发明的许多具体实施方式,但这些不应被解释为对本发明范围的限制,而是作为其一个实施方式的示例。因此,本发明的范围不应由所示出的实施方式来确定,而应由所附权利要求及其等同方案来确定。

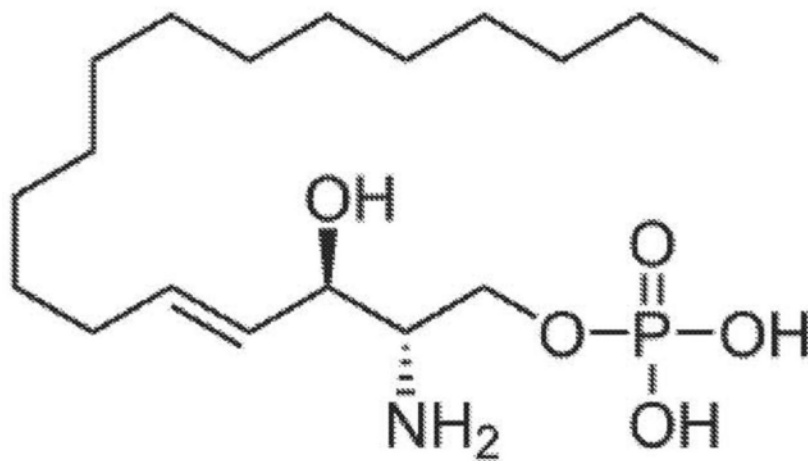


图1

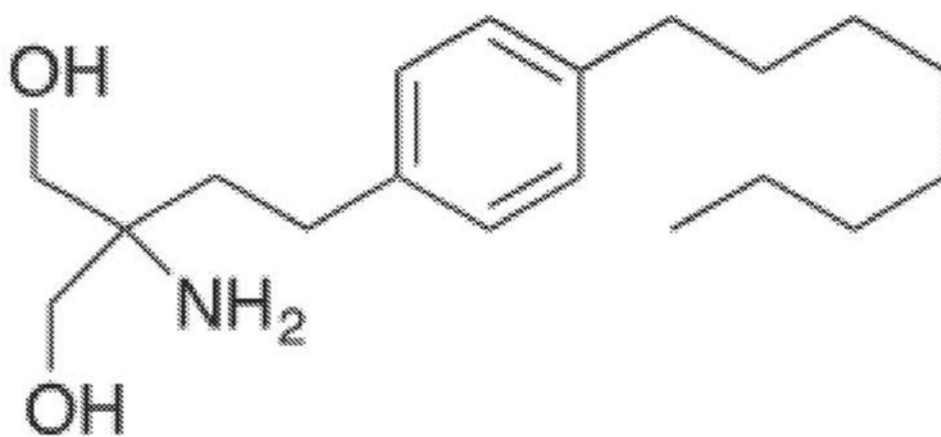


图2

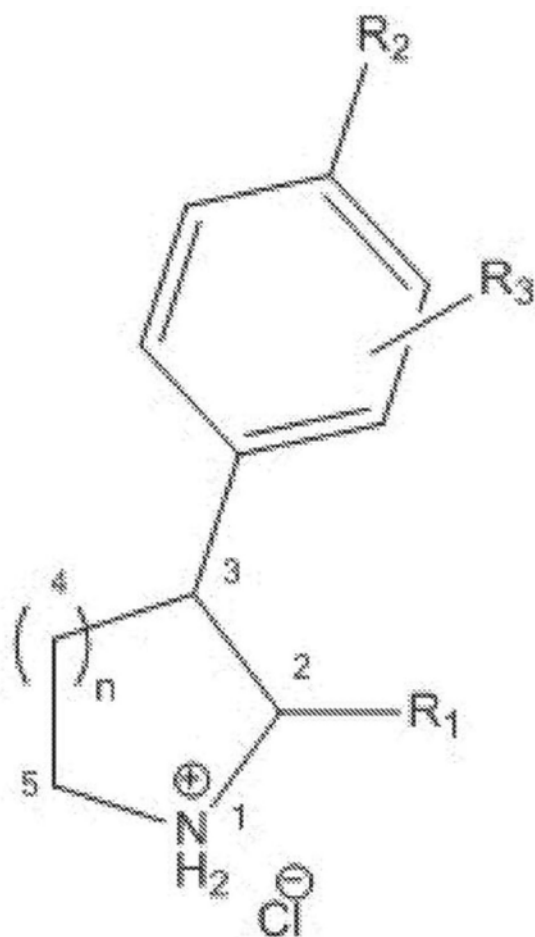


图3

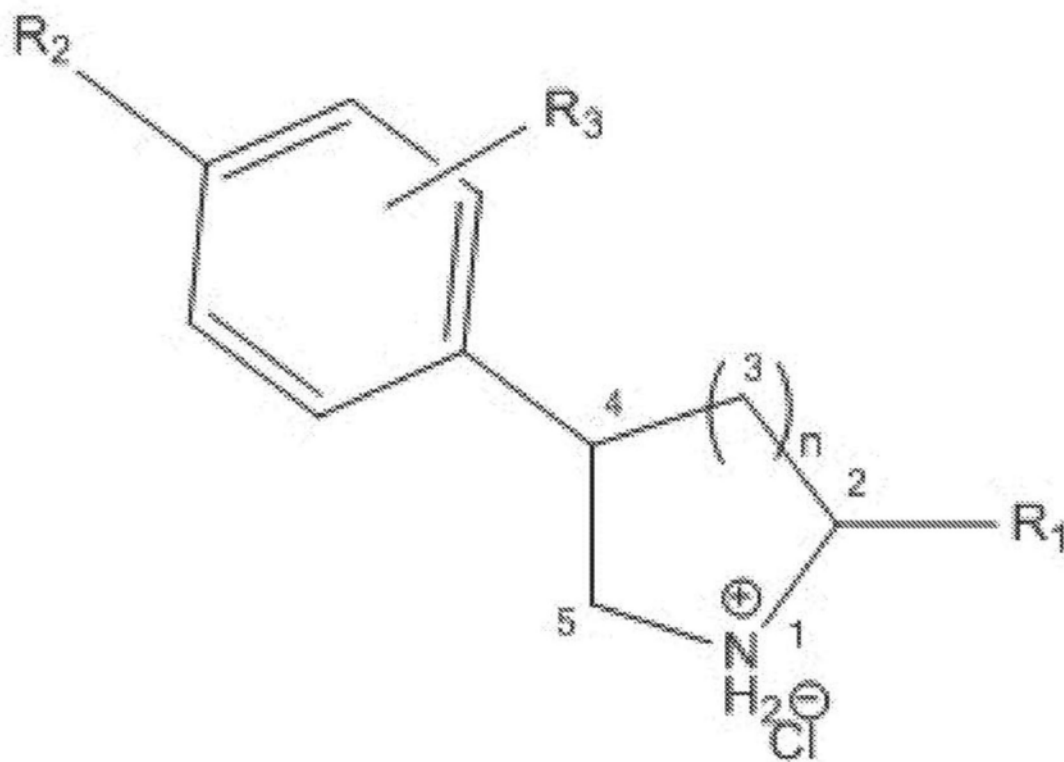


图4

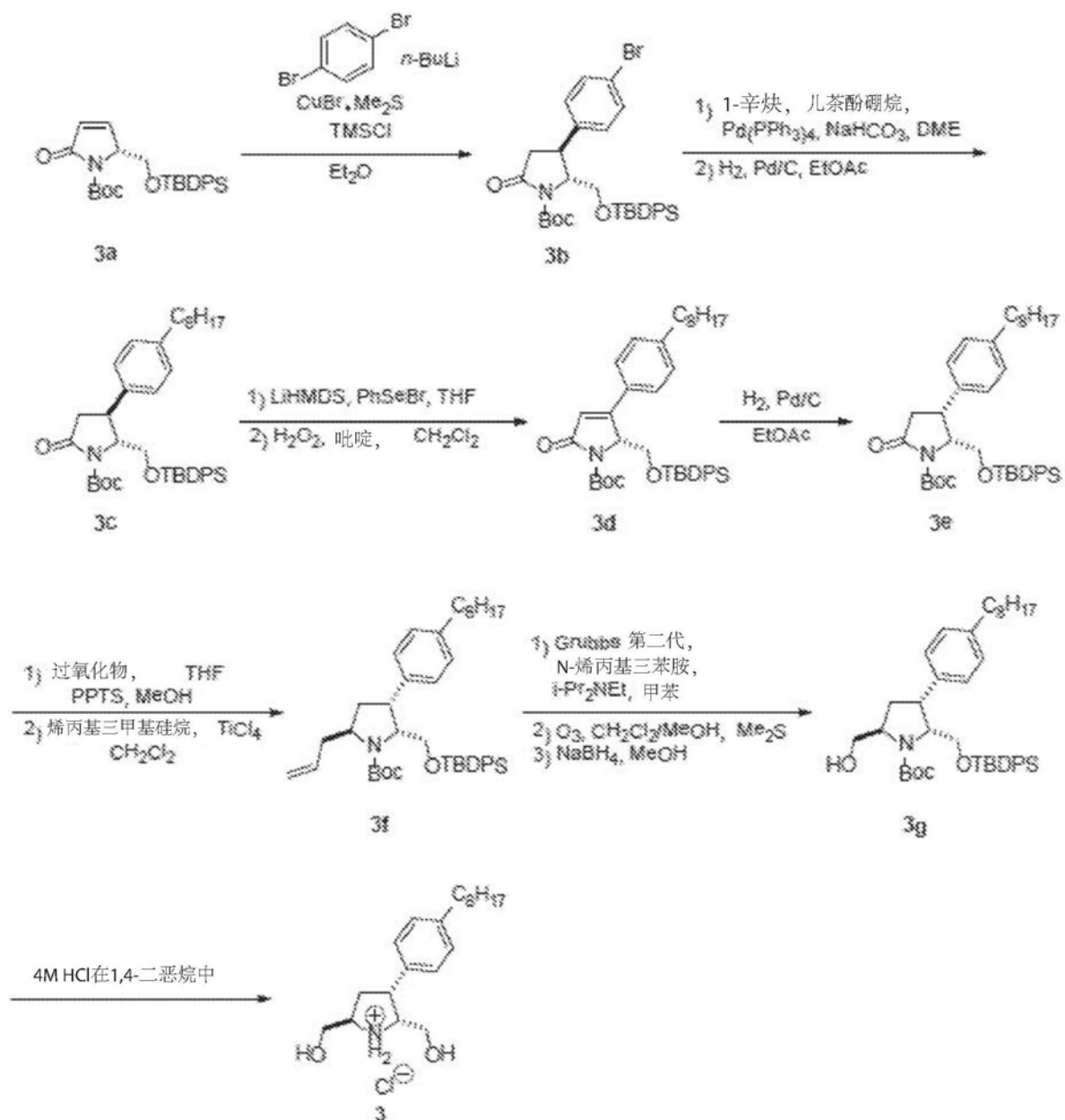


图5

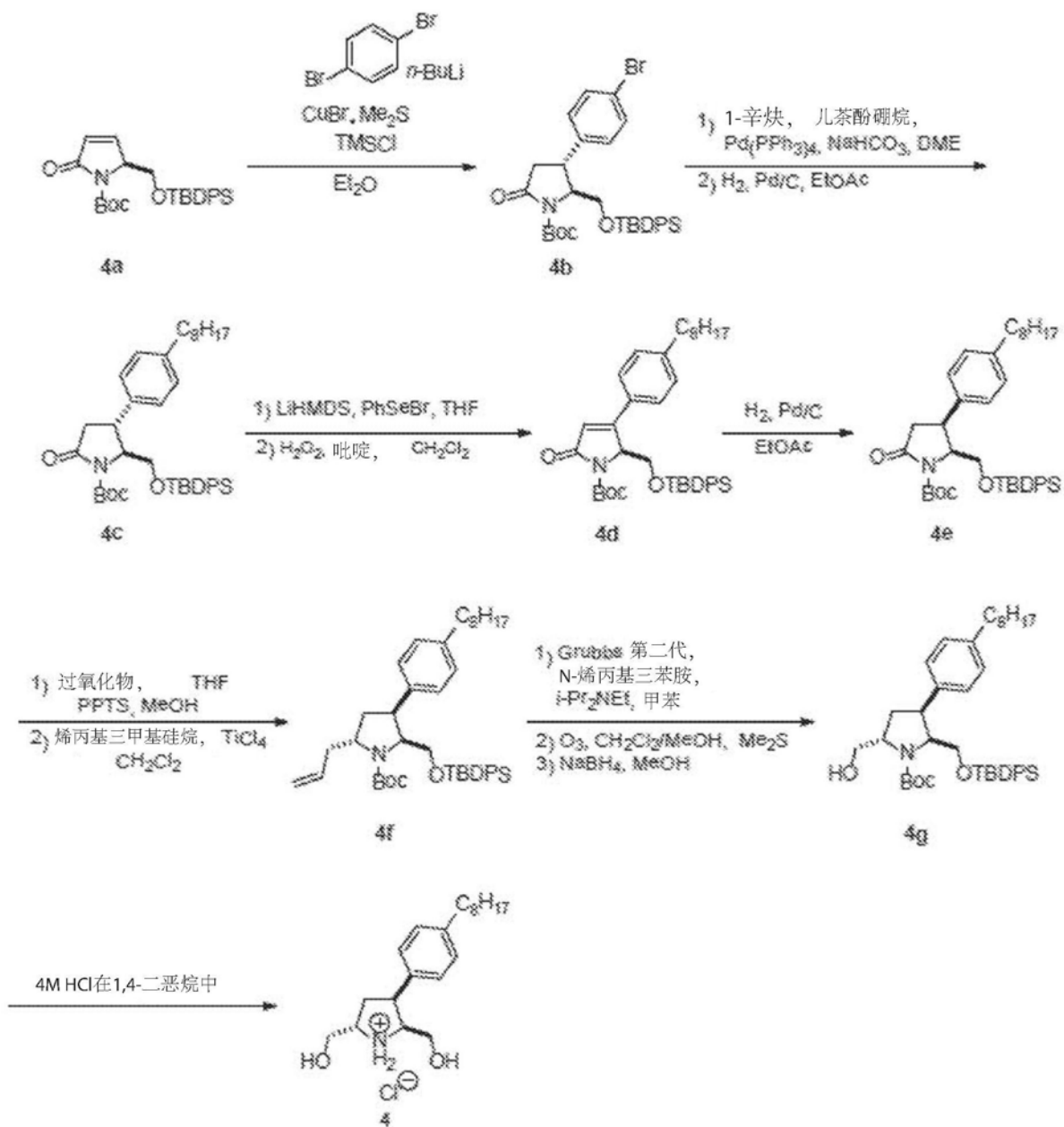


图6

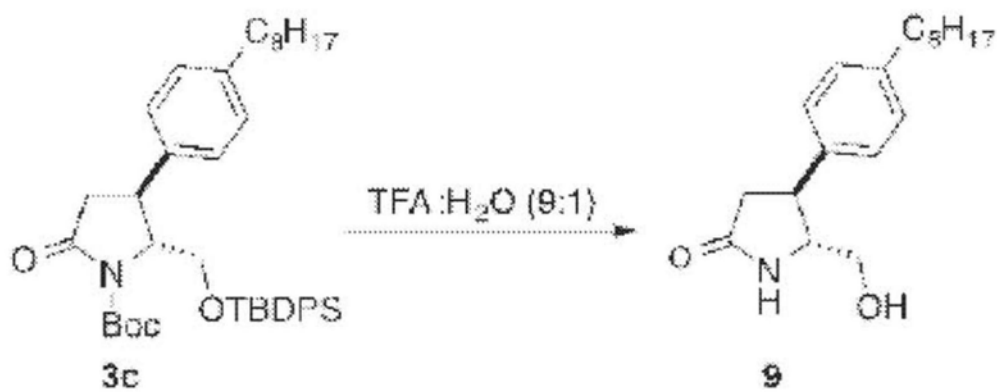


图7

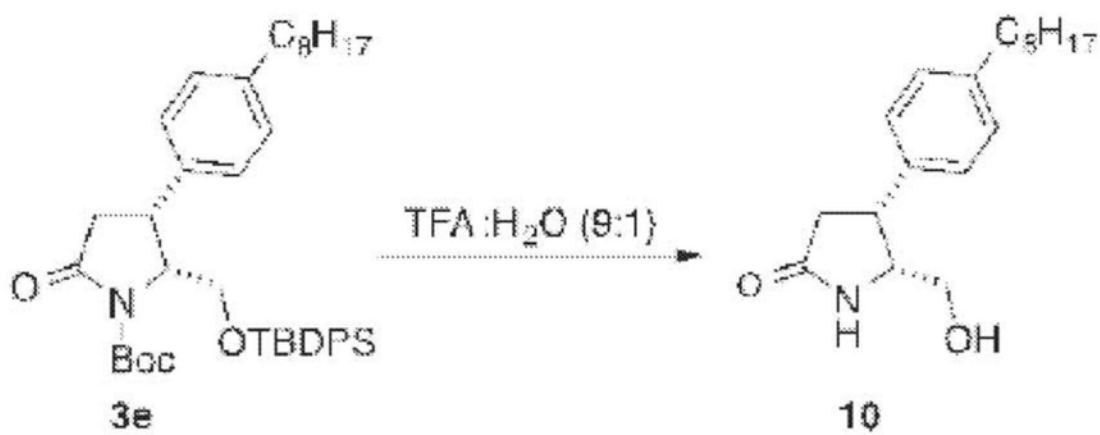


图8

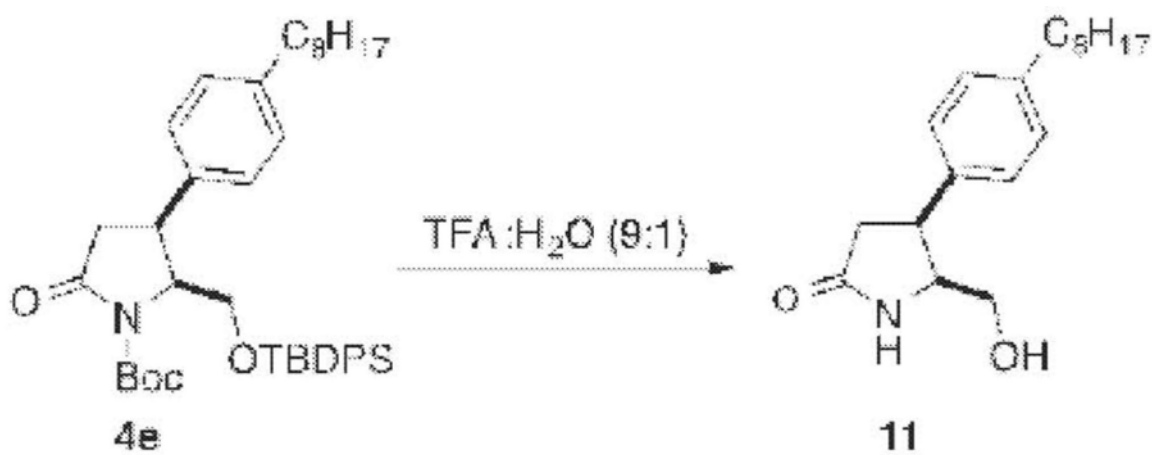


图9

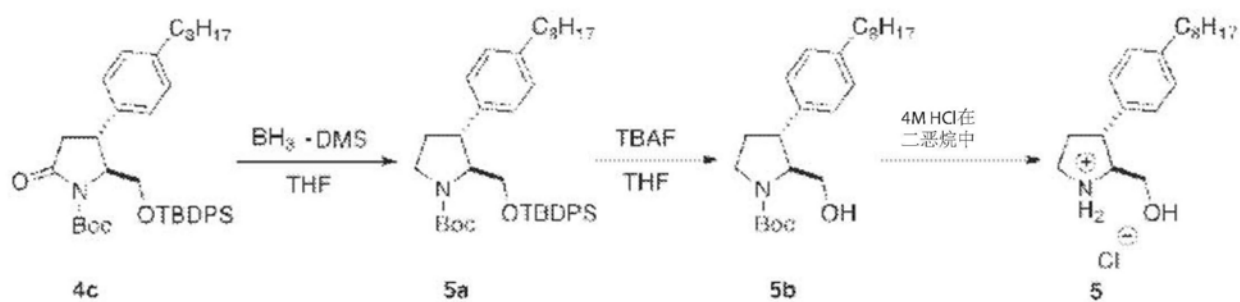


图10

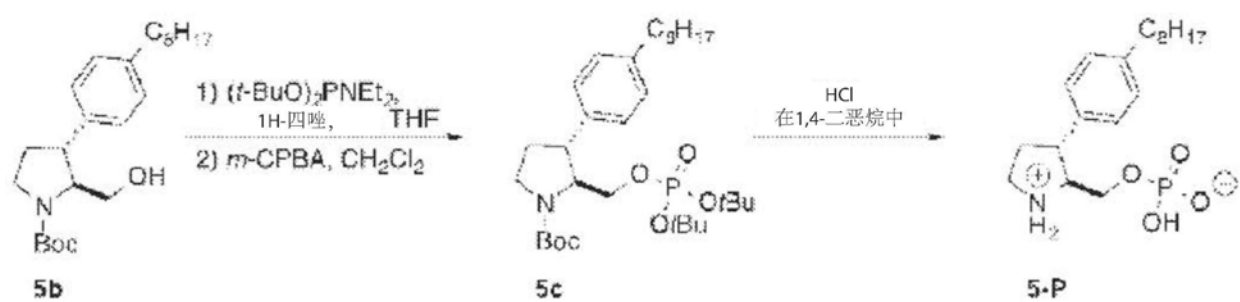


图11

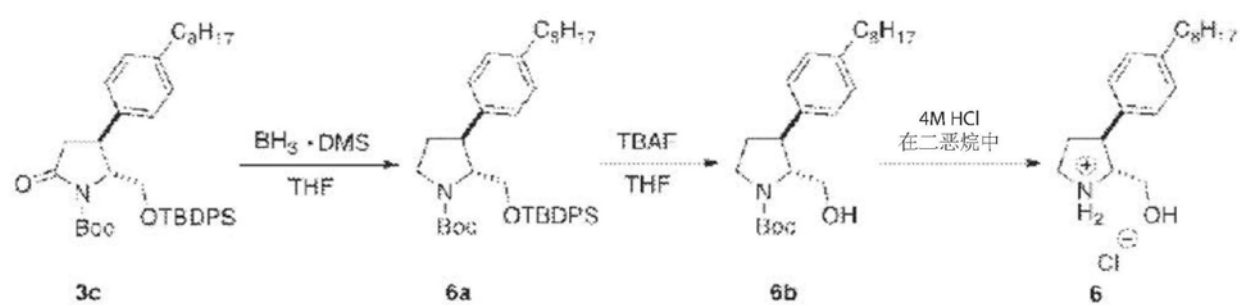


图12

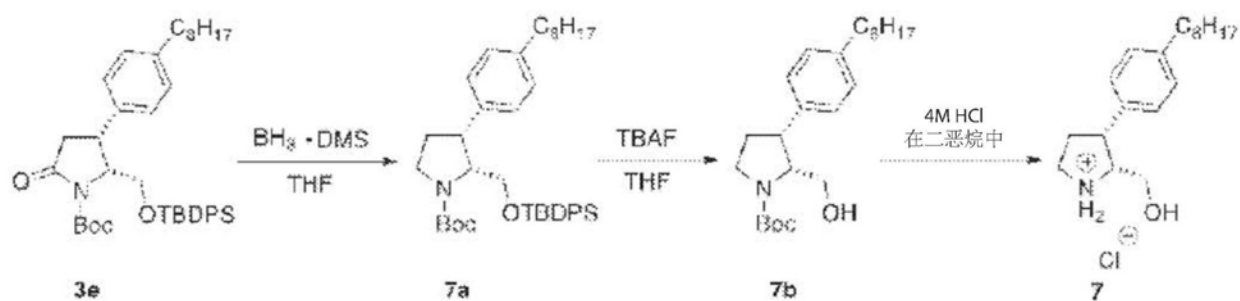


图13

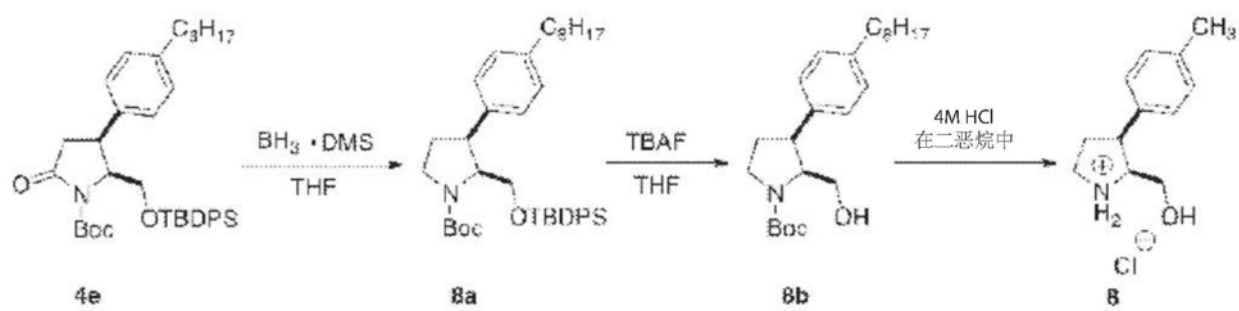


图14

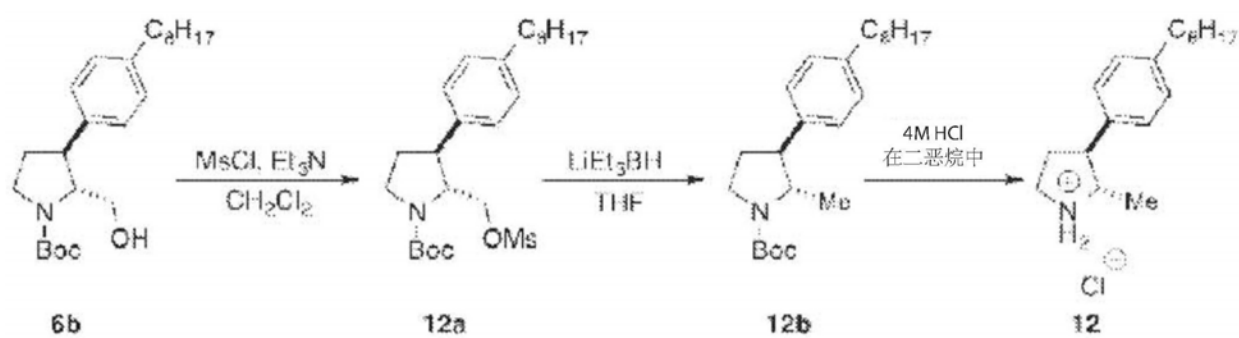


图15

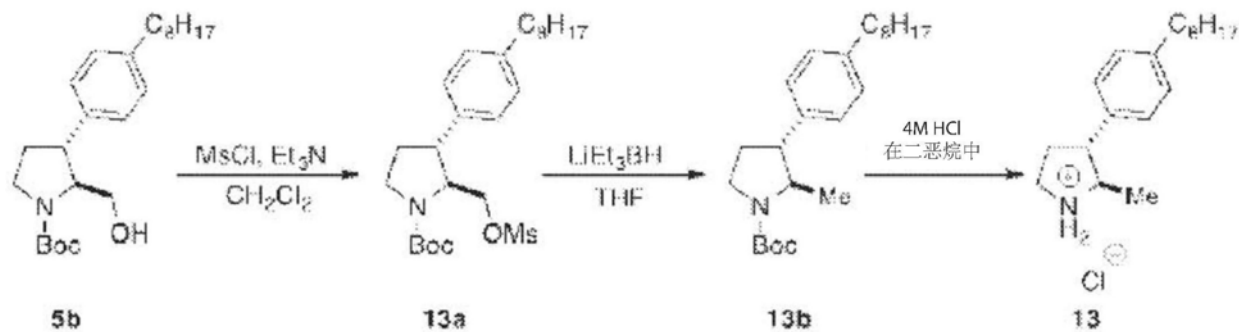


图16

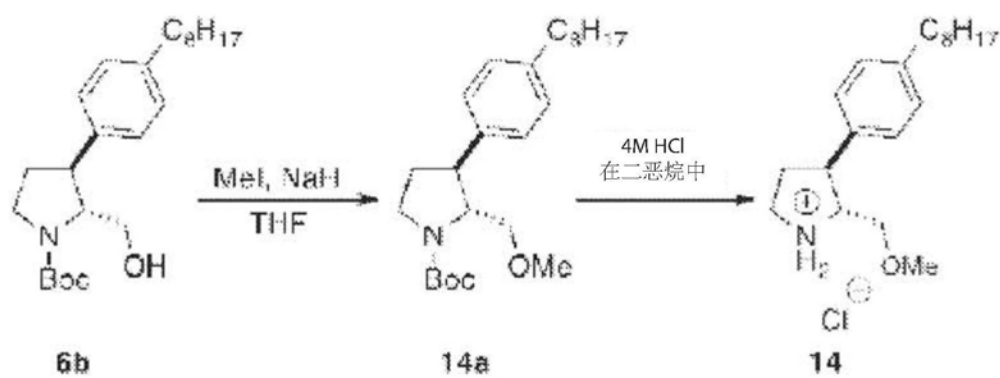


图17

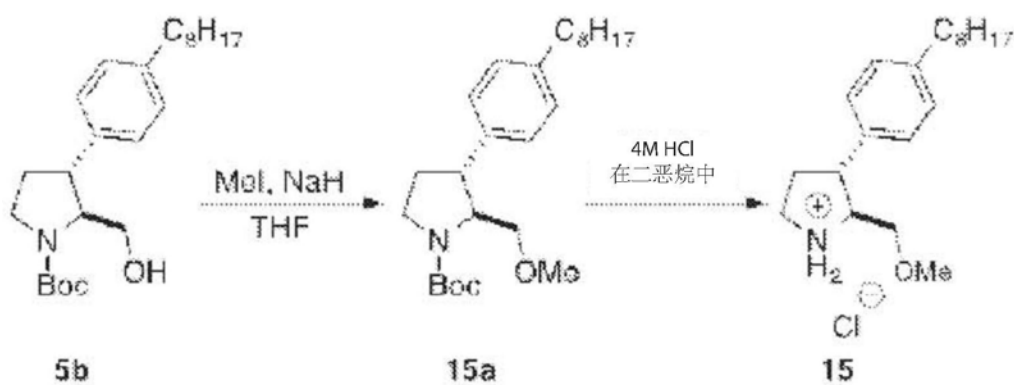


图18

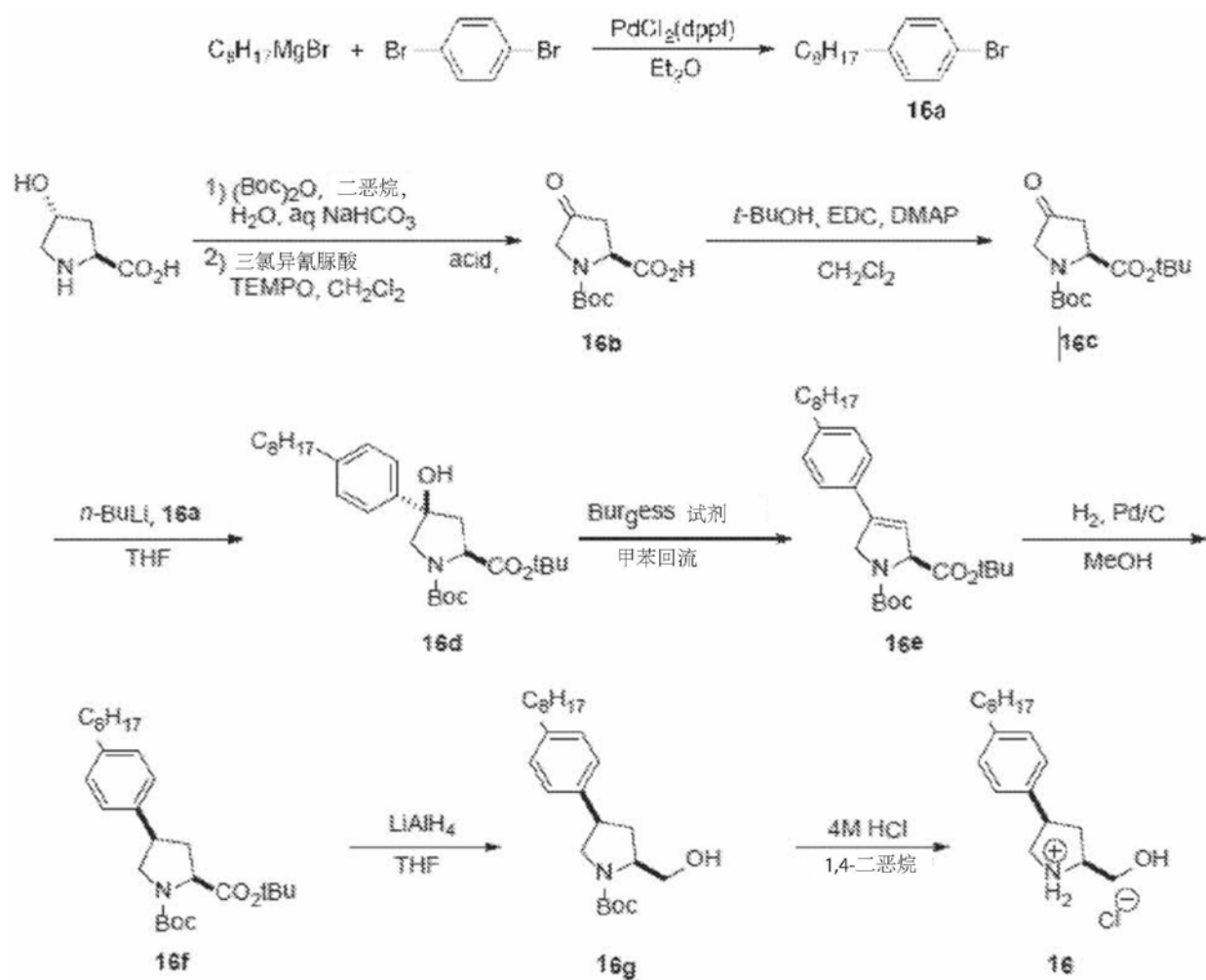


图19

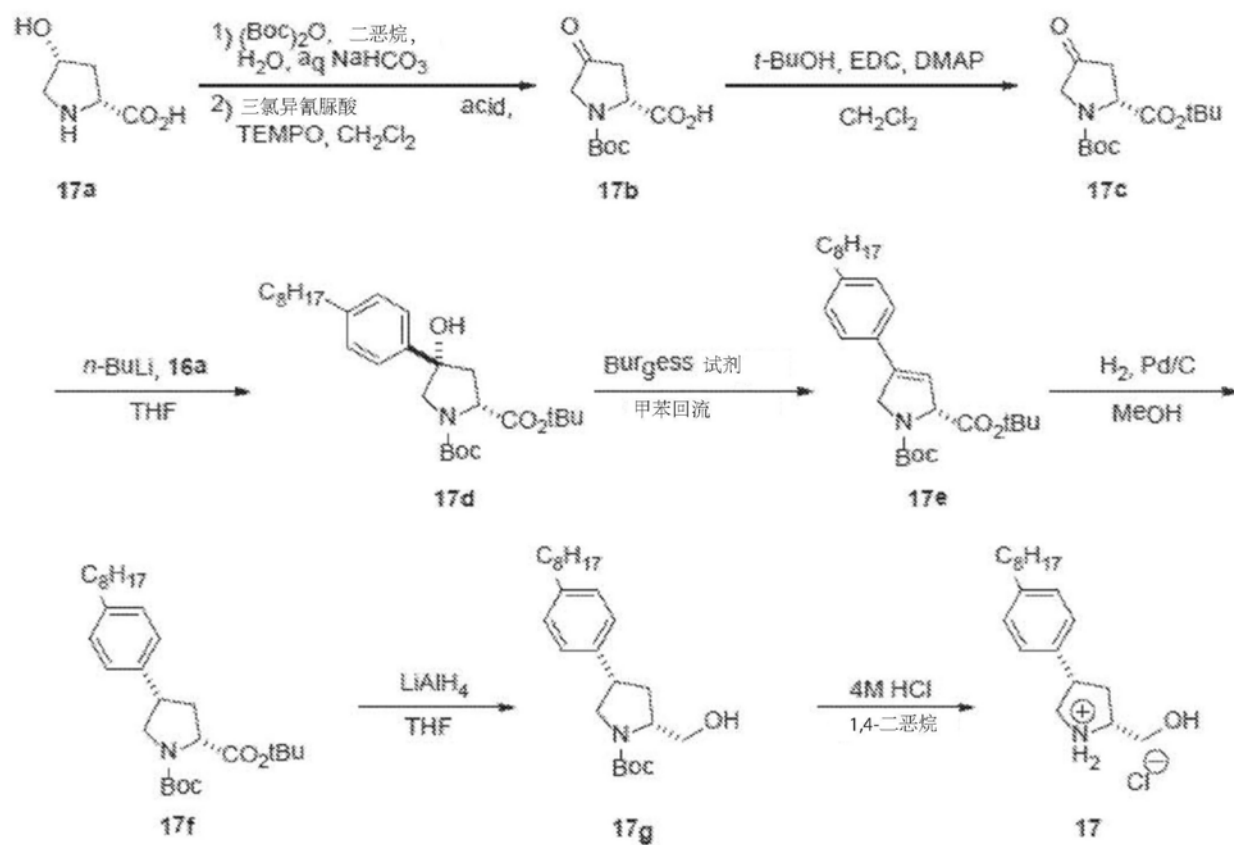


图20

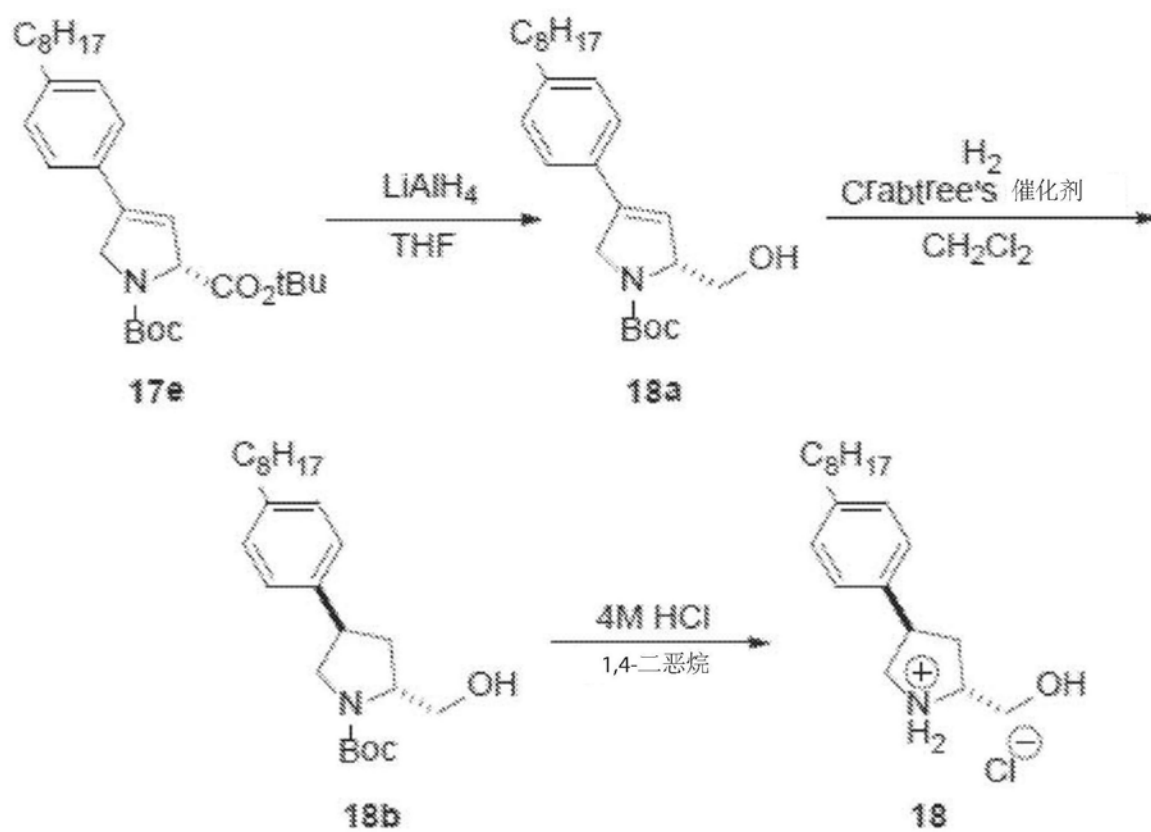


图21

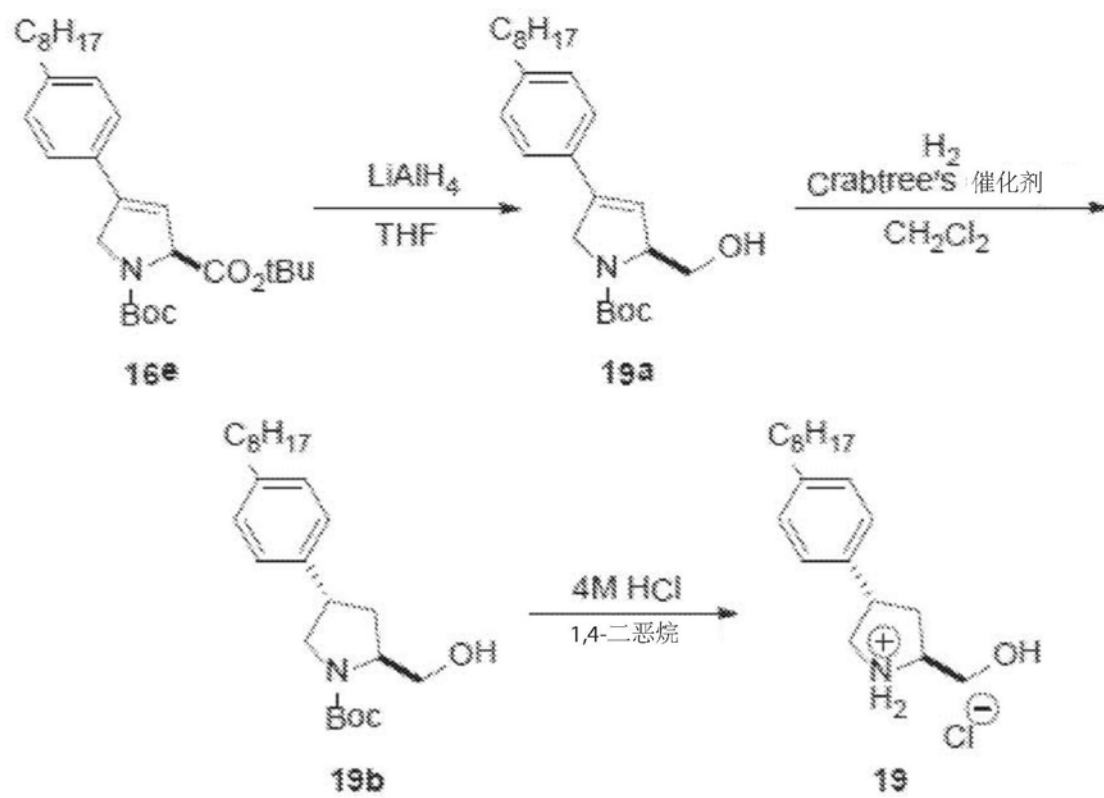
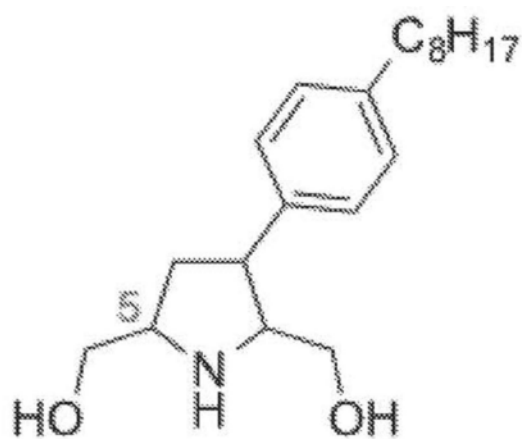


图22



通用约束的C-芳基类似物A

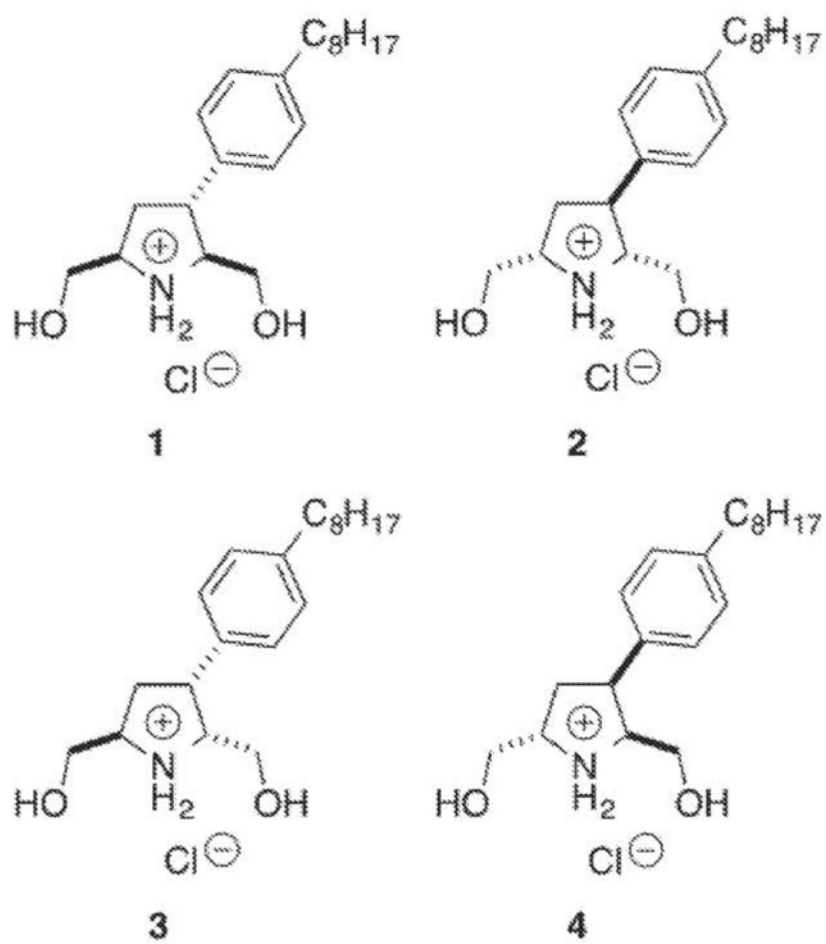
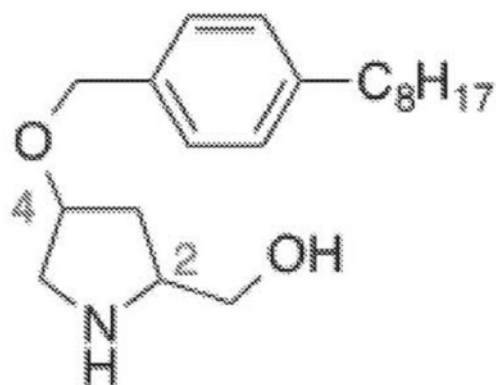


图23



抗白血病O-芳基甲基 (2R,4S)
和 (2S,4R) 吡咯烷类似物B

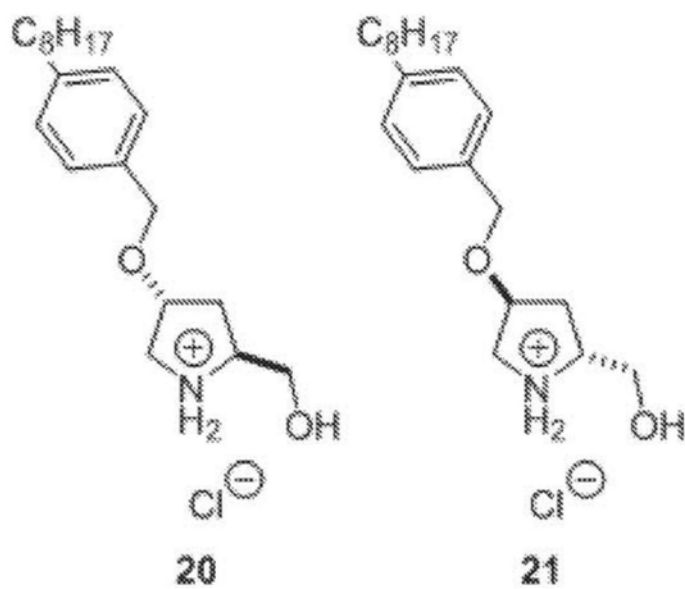


图24

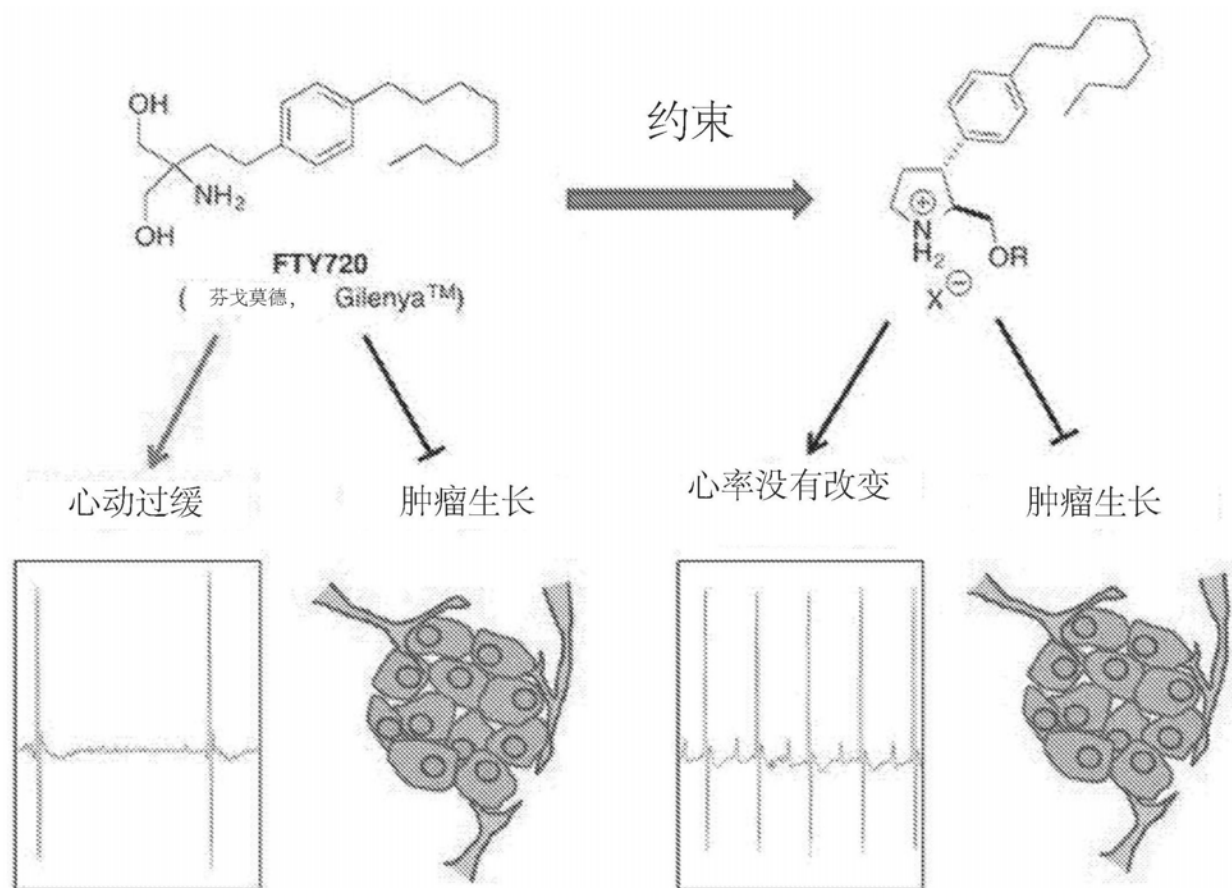
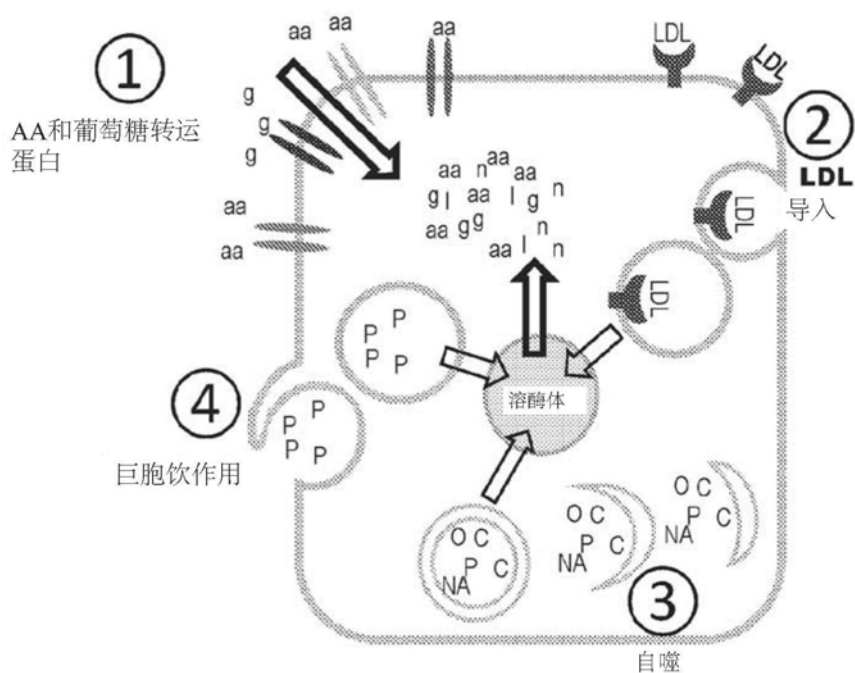
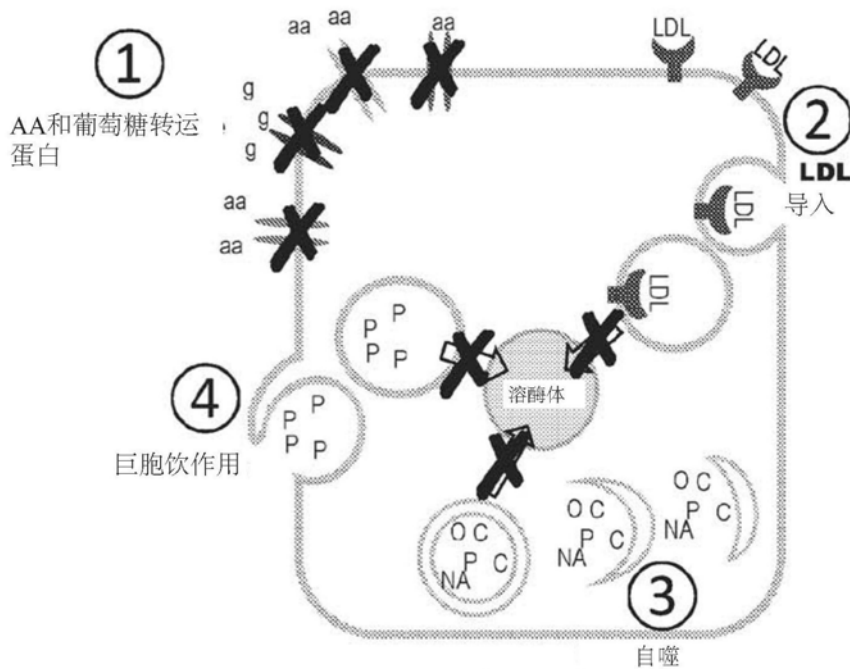


图25



未处理的



处理的

图例

- aa-氨基酸
- C-碳水化合物
- g-葡萄糖
- l-脂质
- LDL-低密度脂蛋白
- n-核苷酸
- NA-核酸
- O-细胞器
- P-蛋白质
- X-受阻

图26

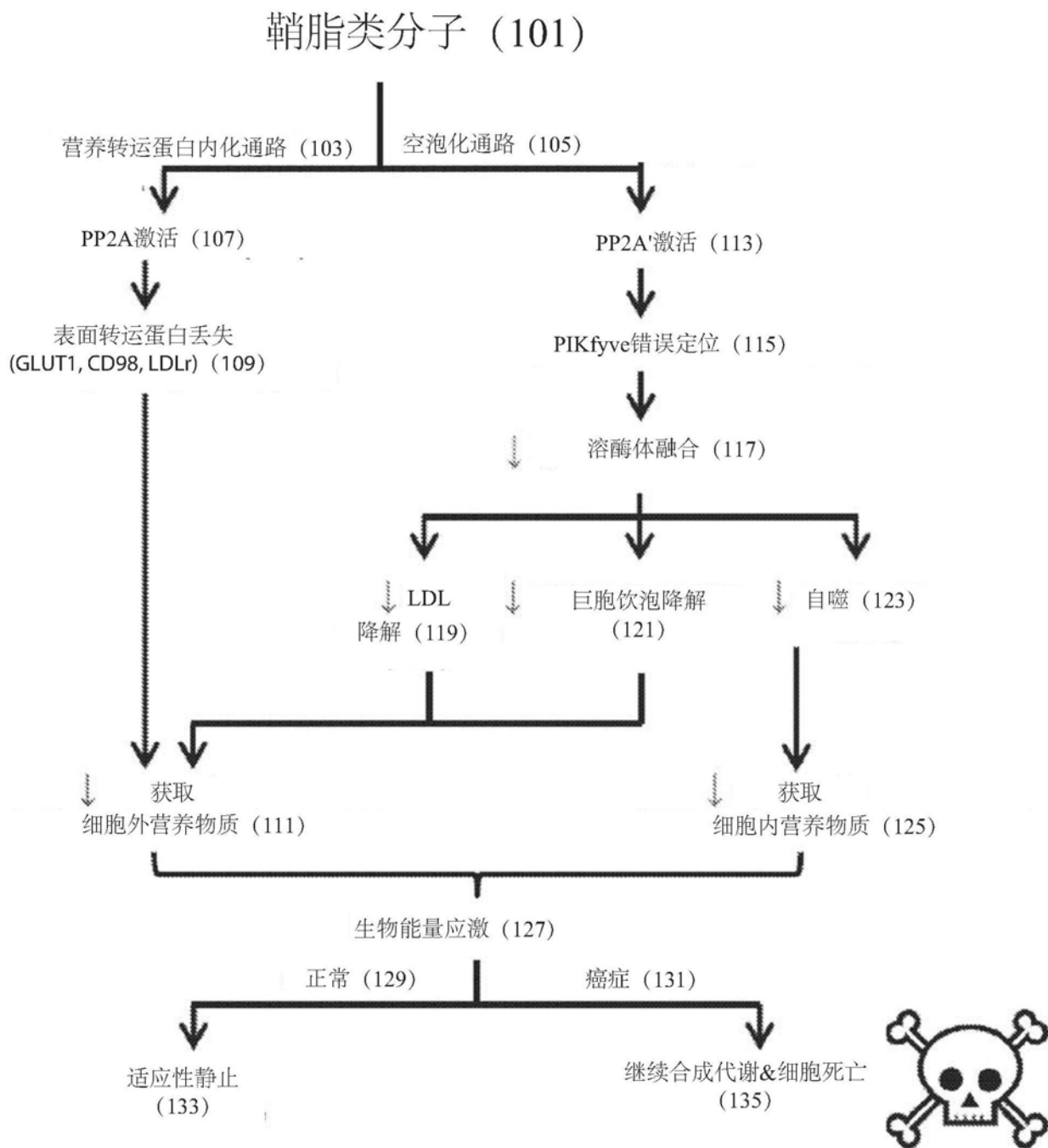


图27

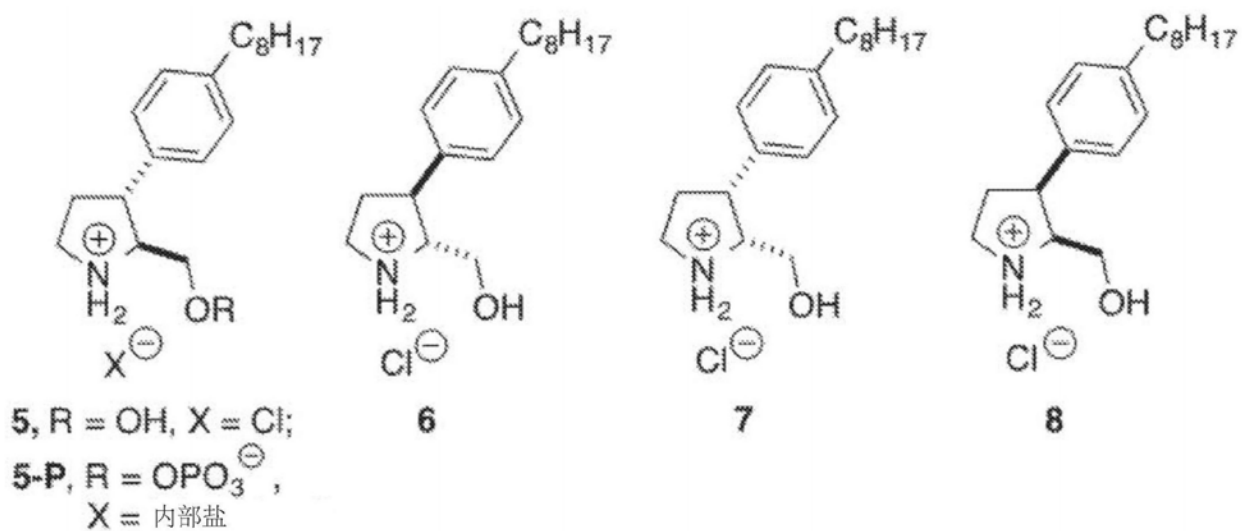


图28

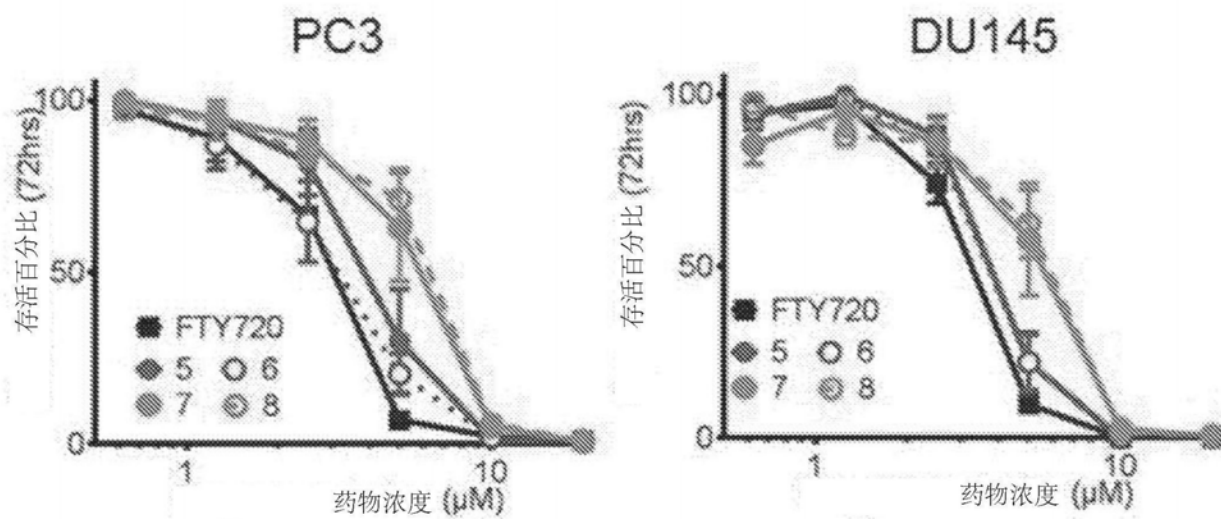


图29

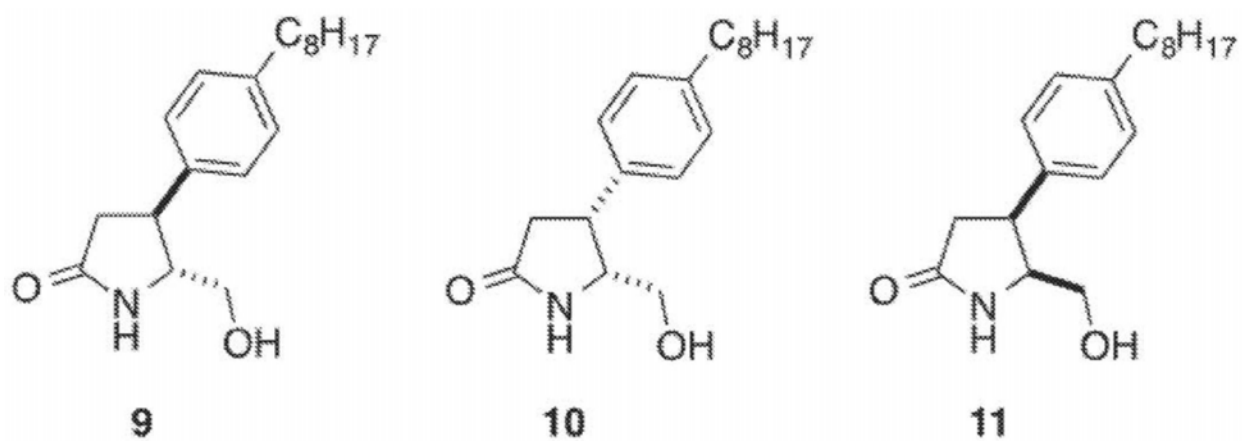


图30

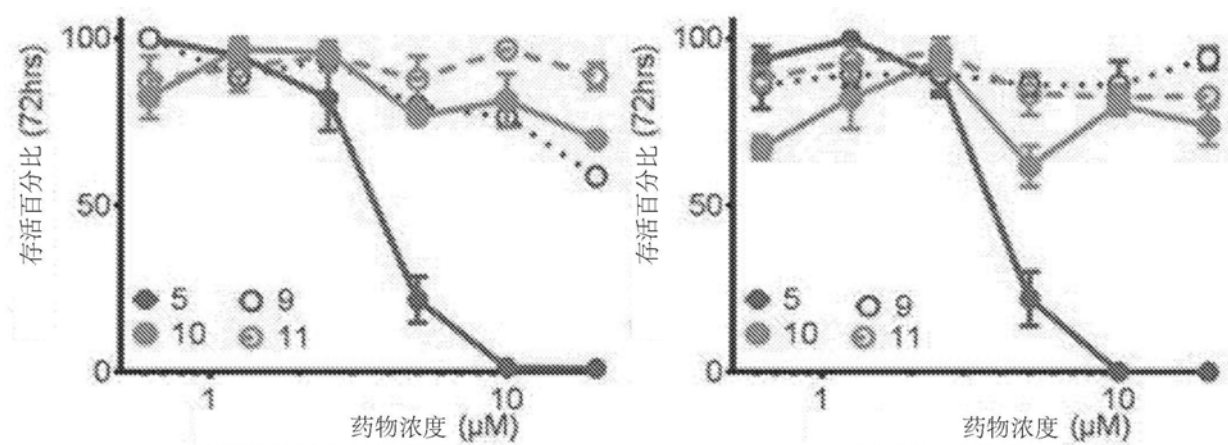


图31

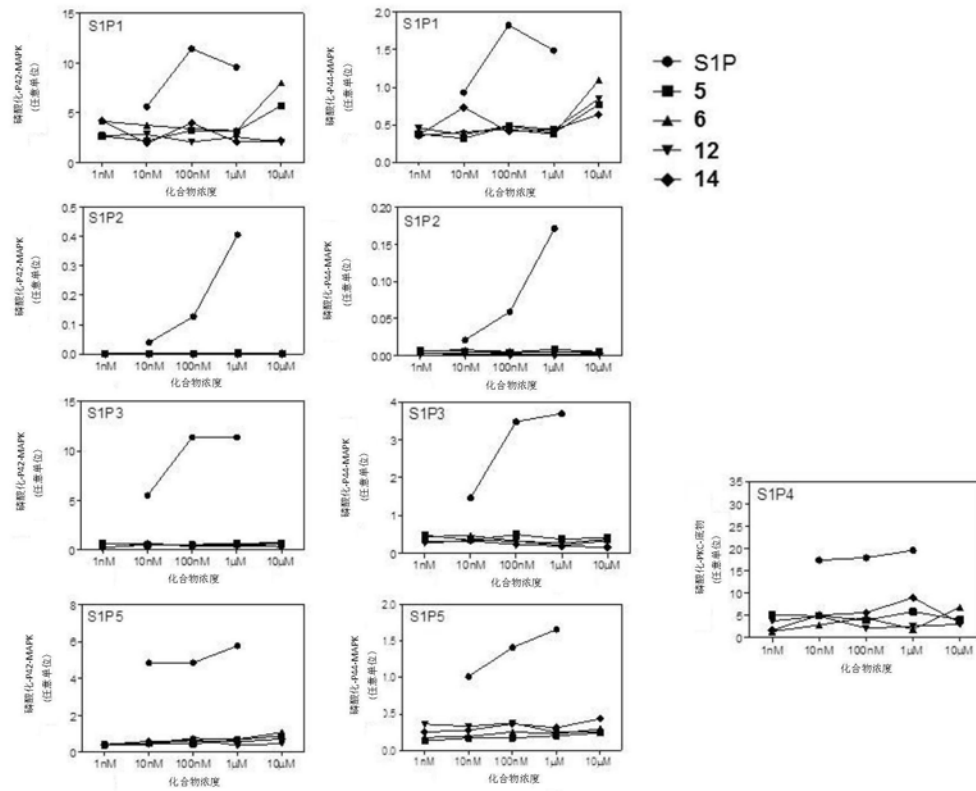


图32

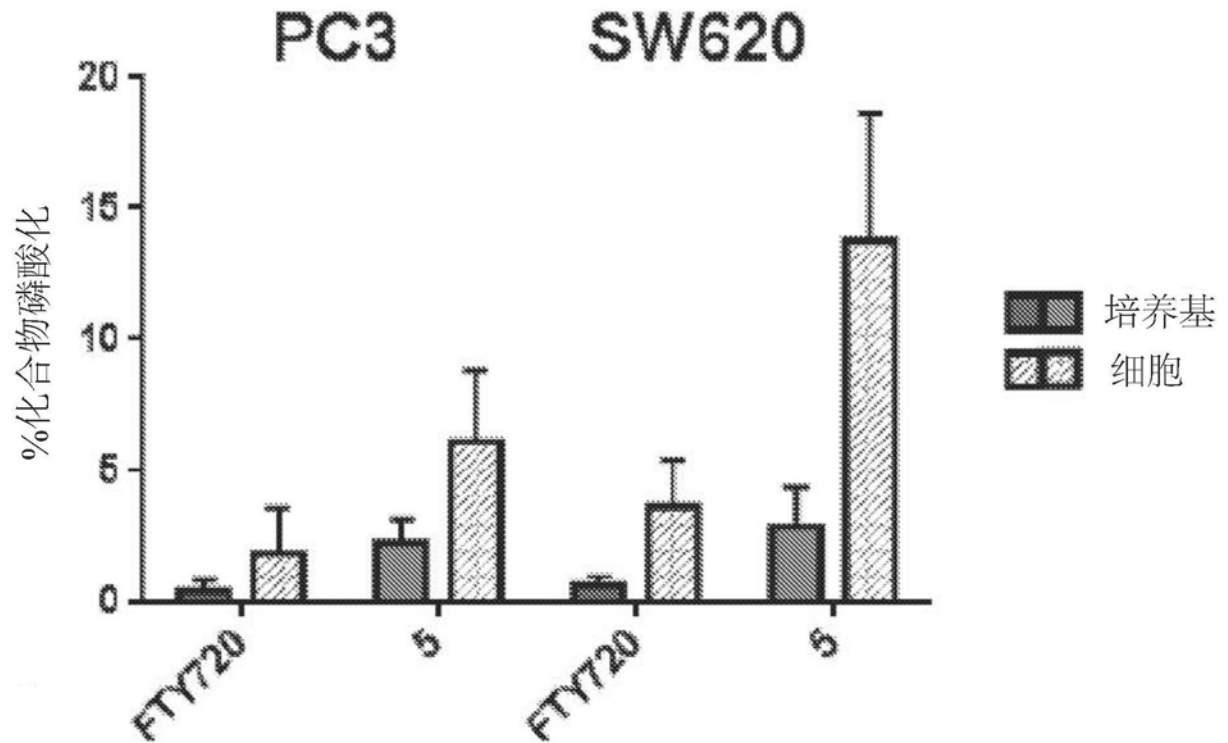


图33

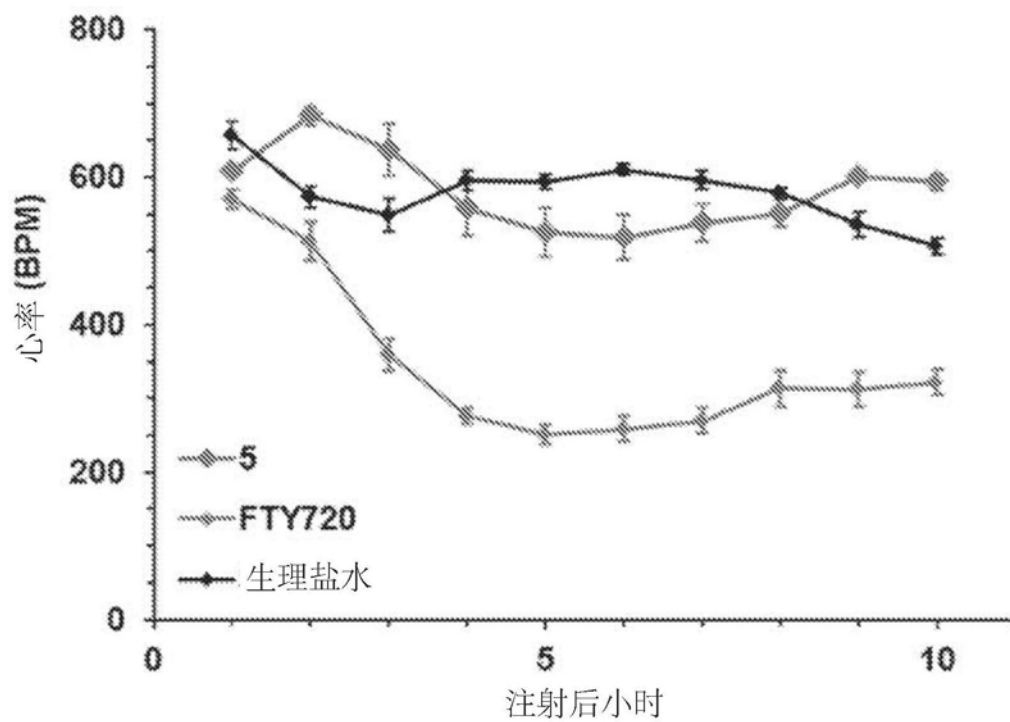


图34

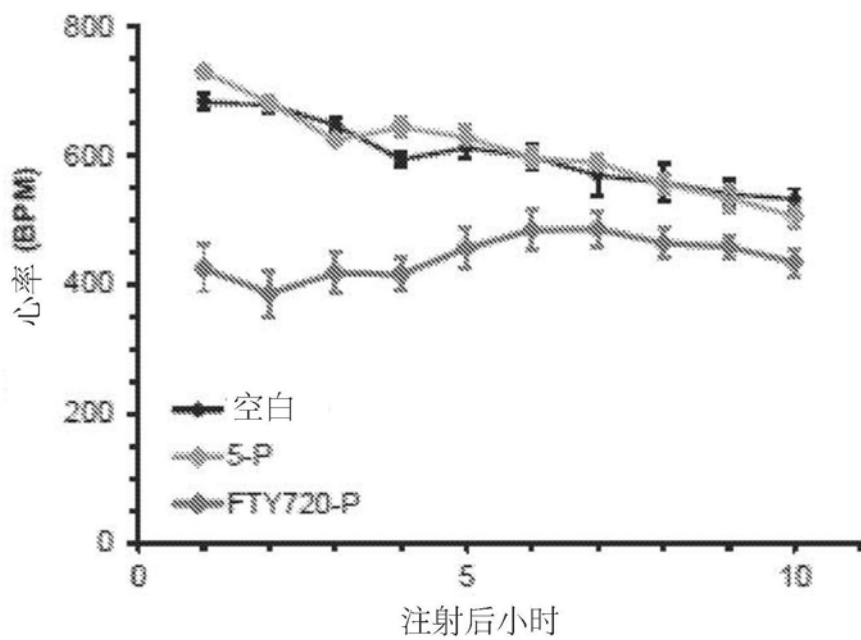


图35

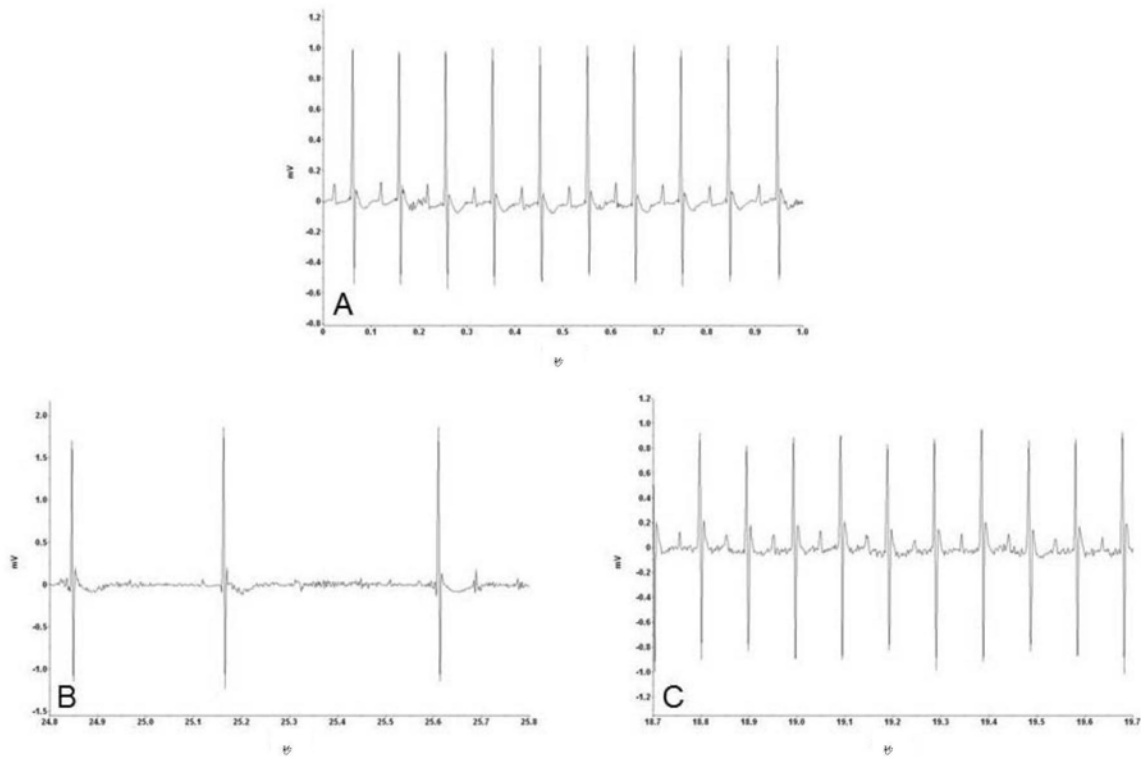


图36

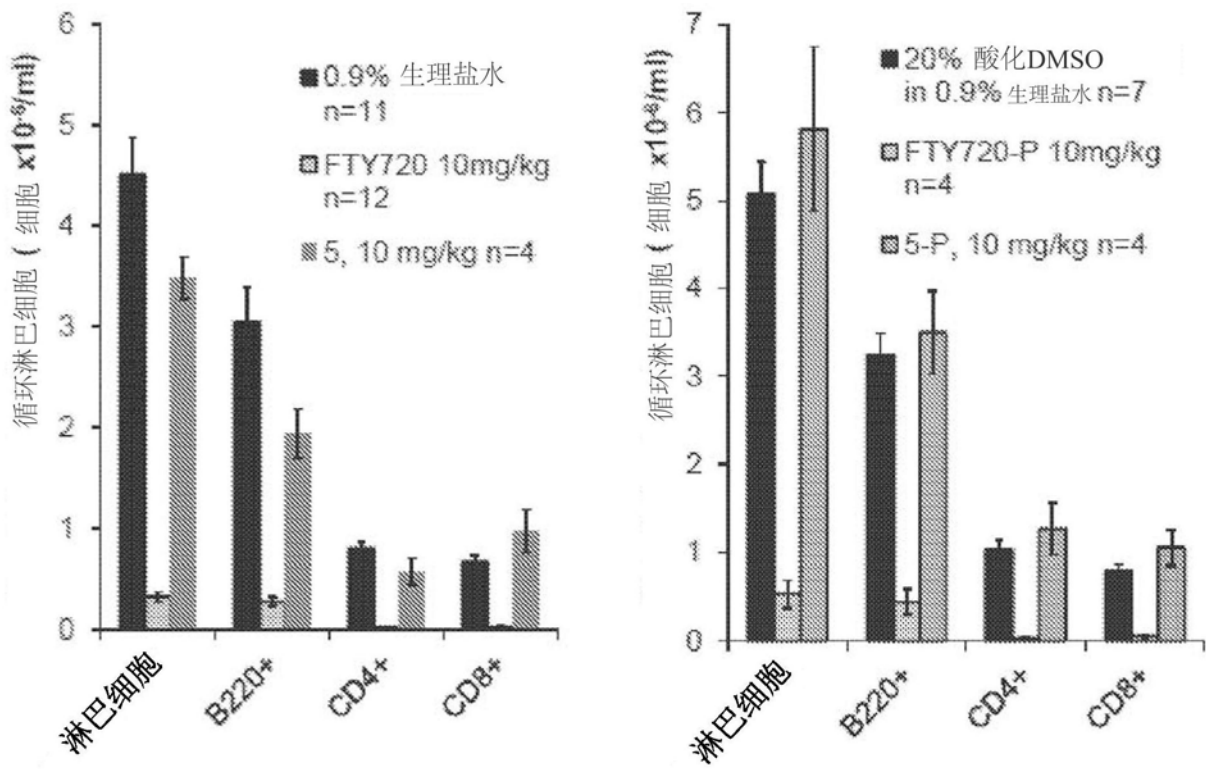


图37

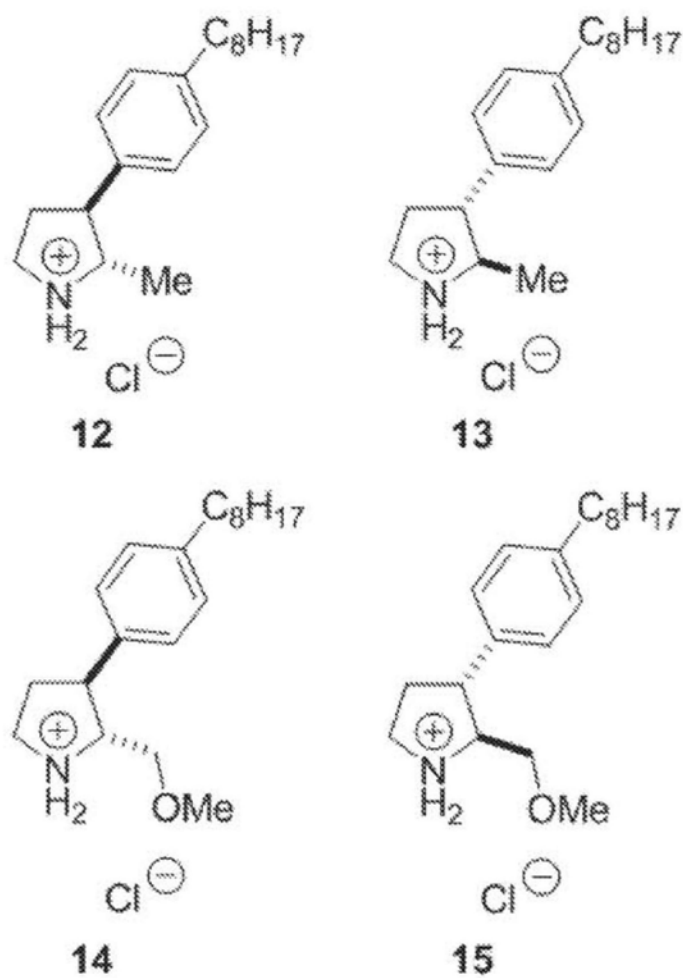


图38

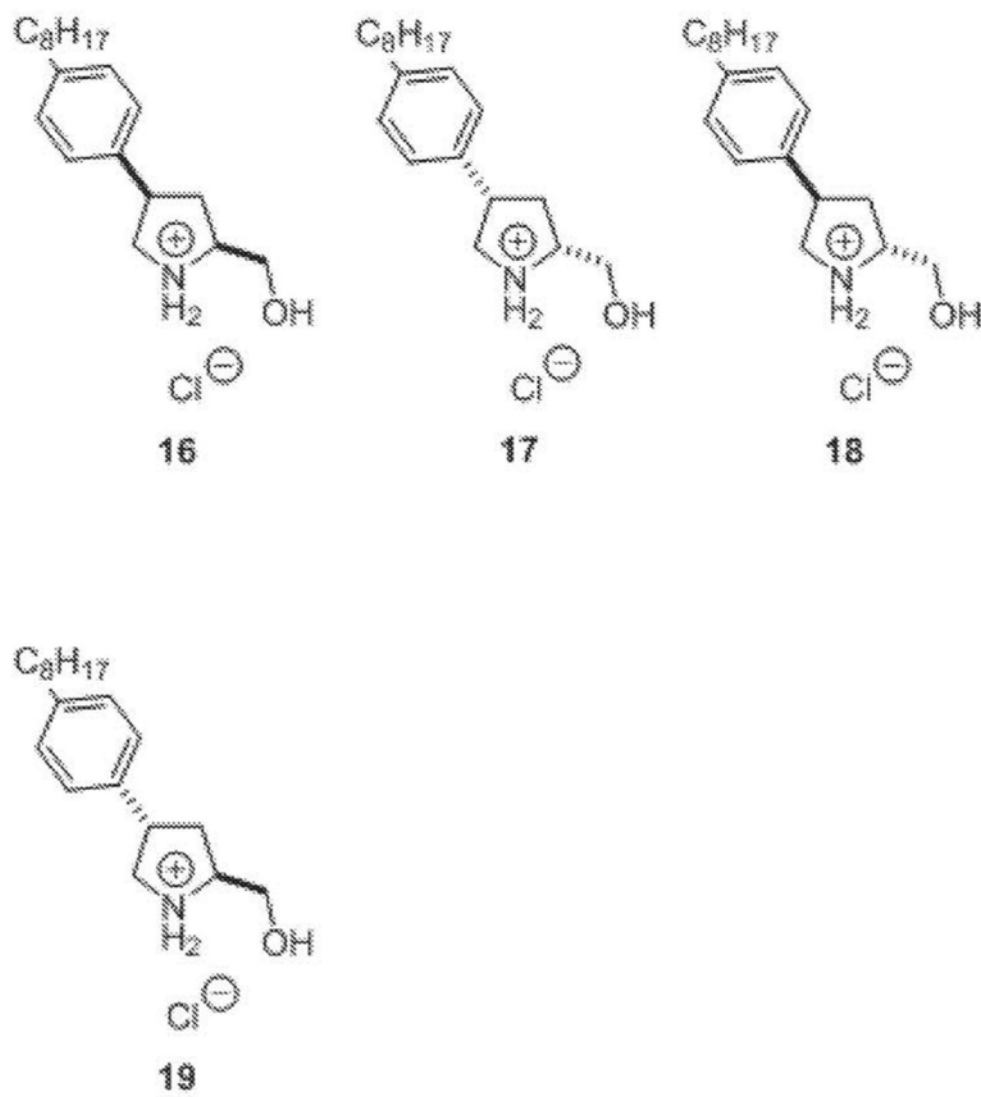


图39

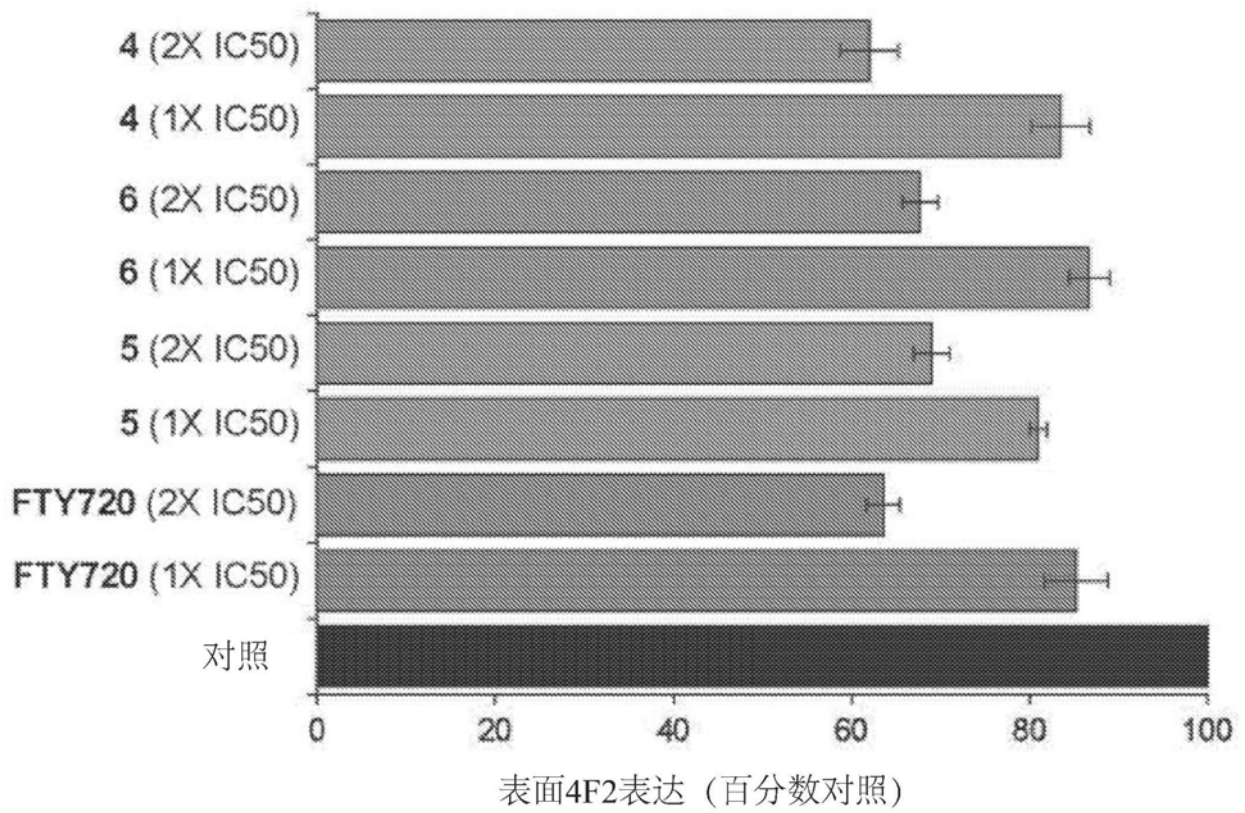


图40

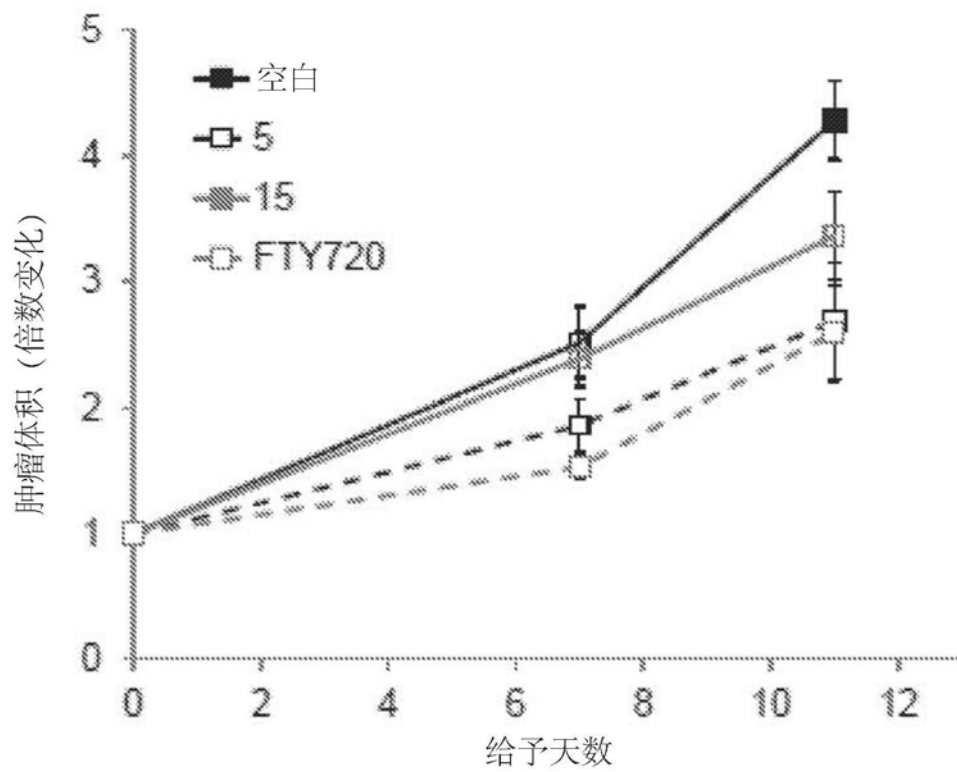


图41

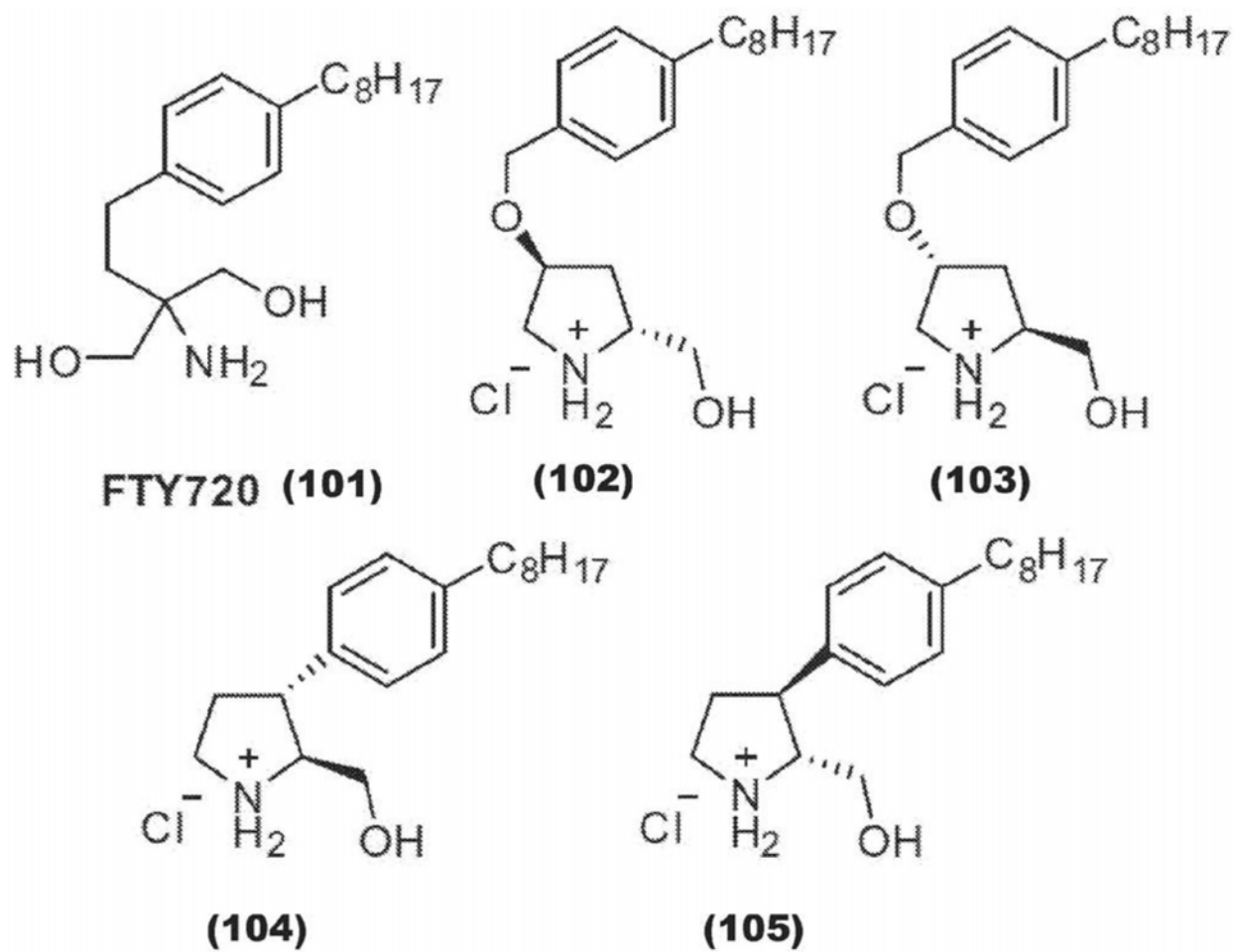


图42

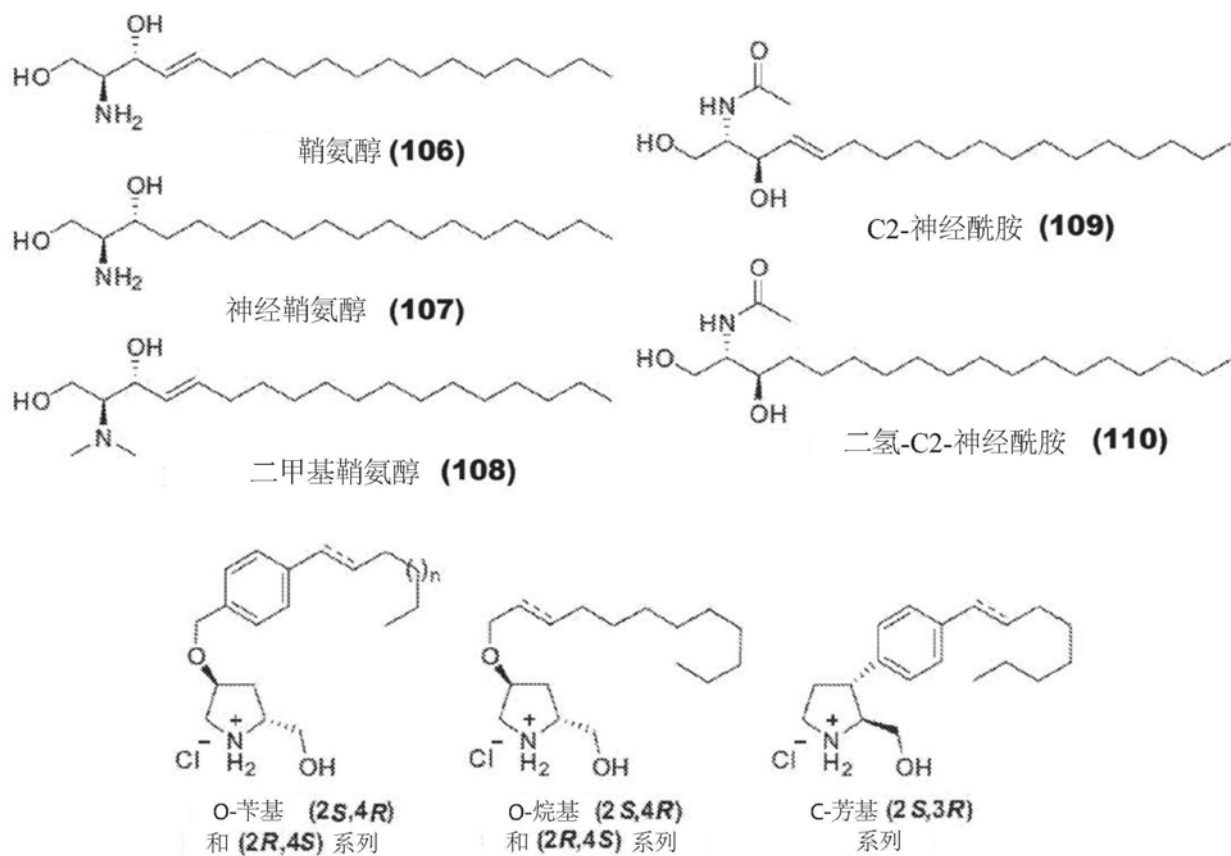


图43

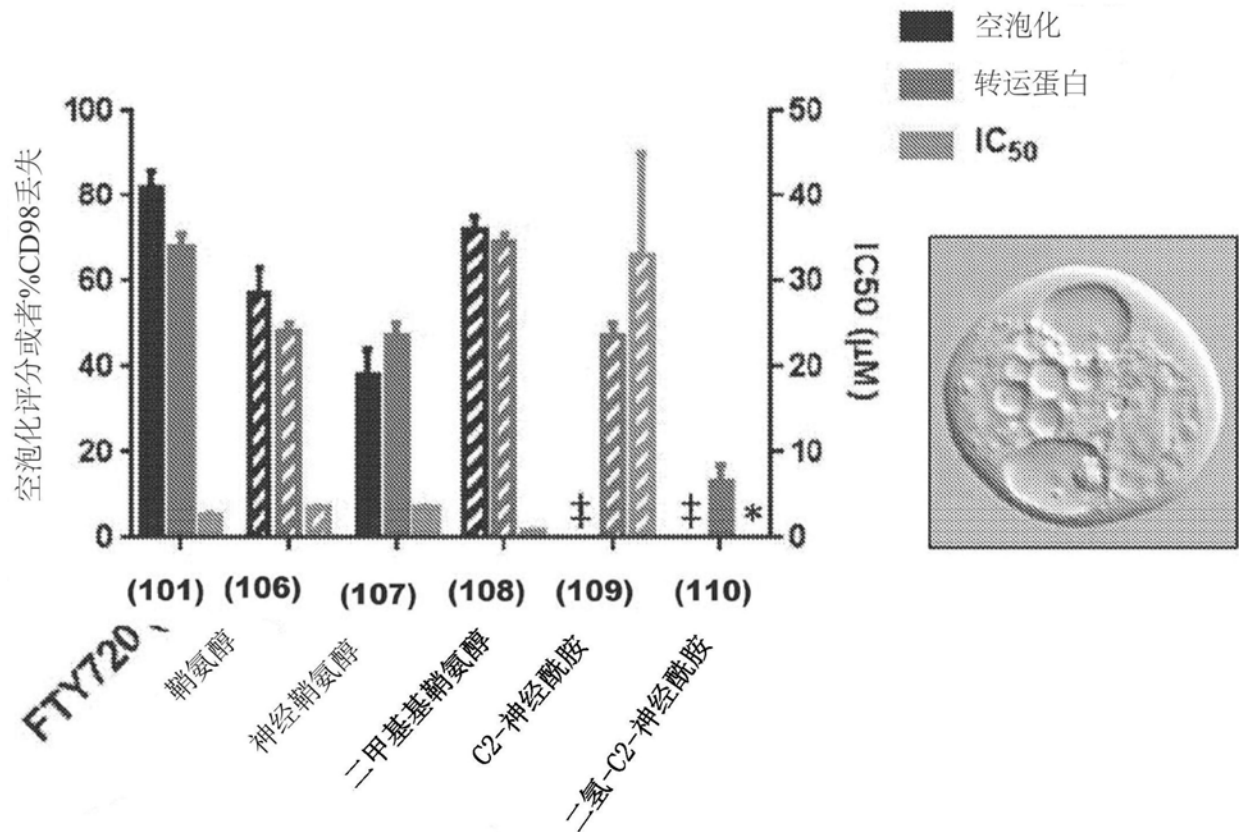


图44

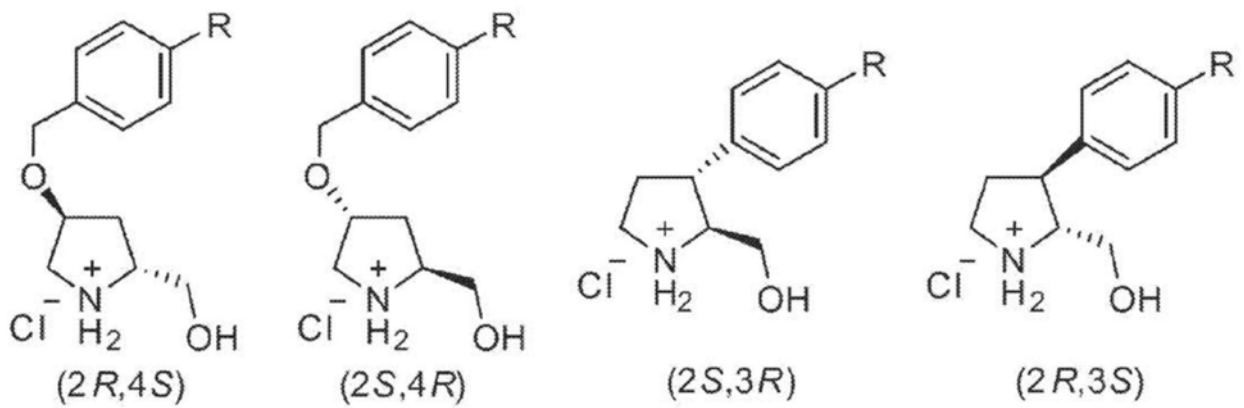


图45

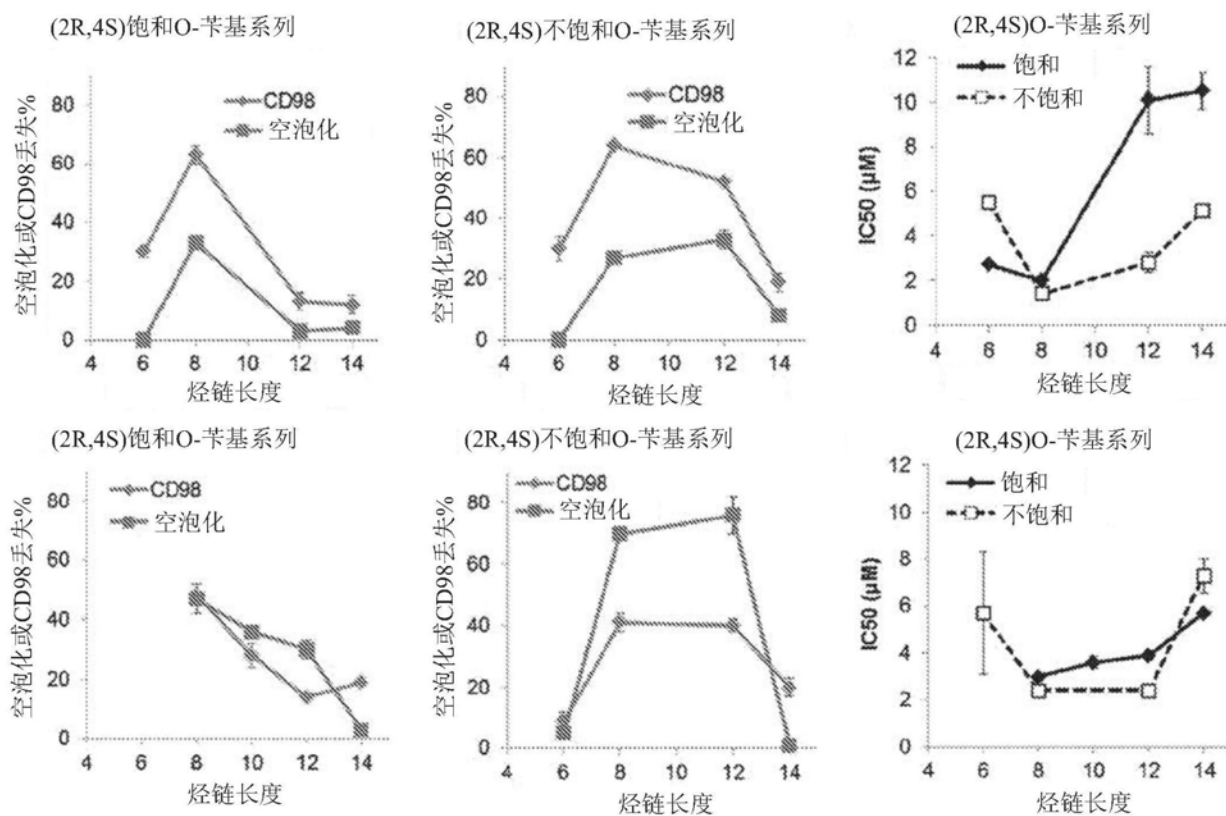


图46

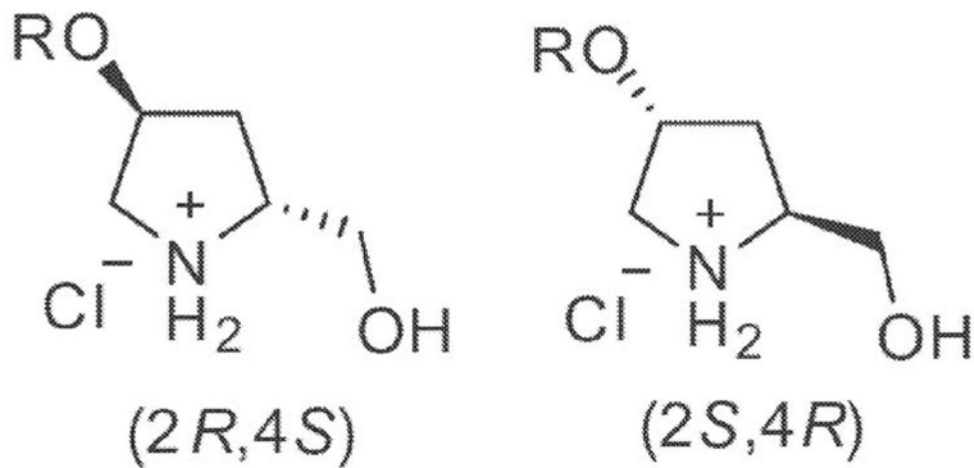


图47

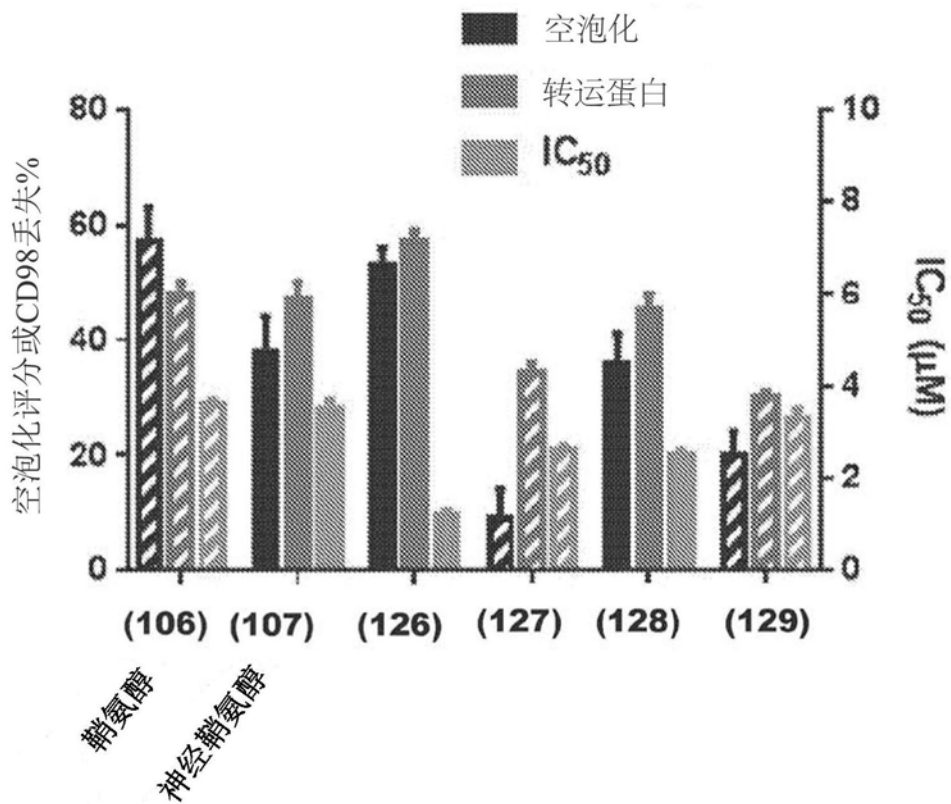


图48

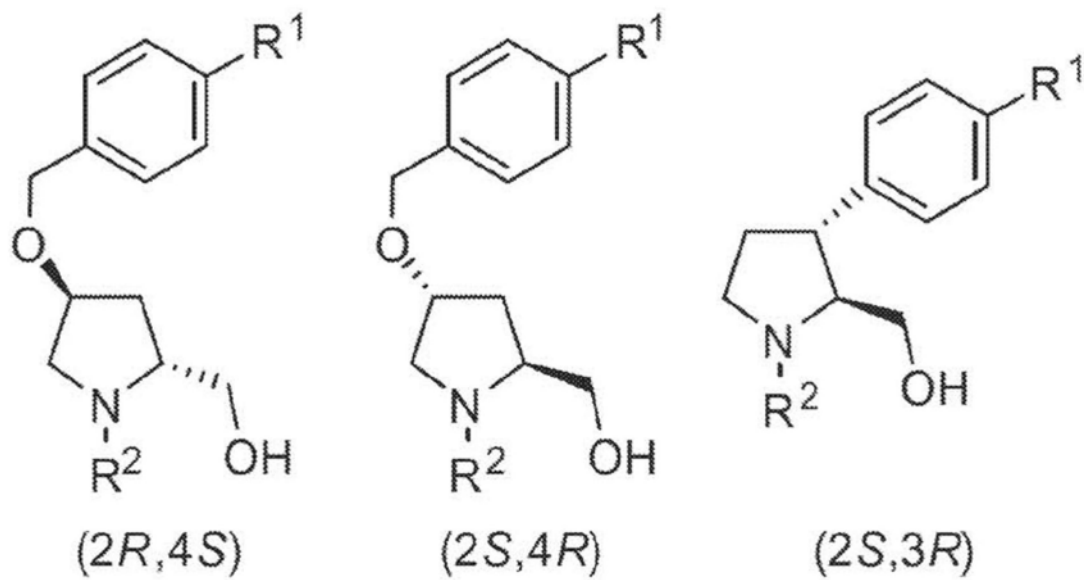
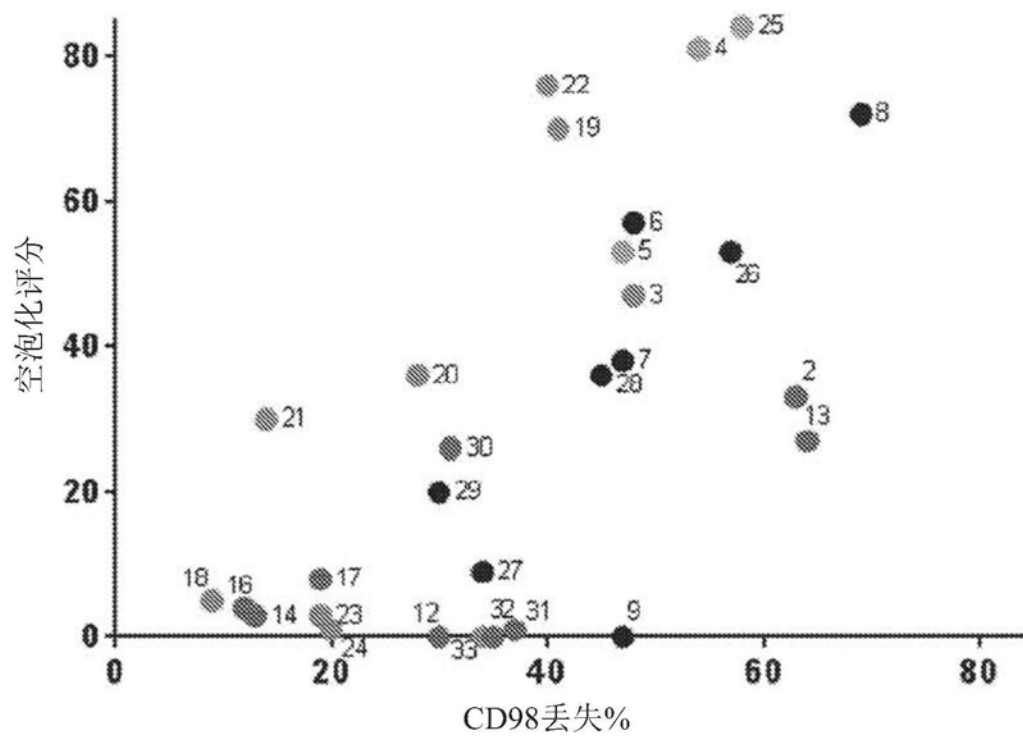
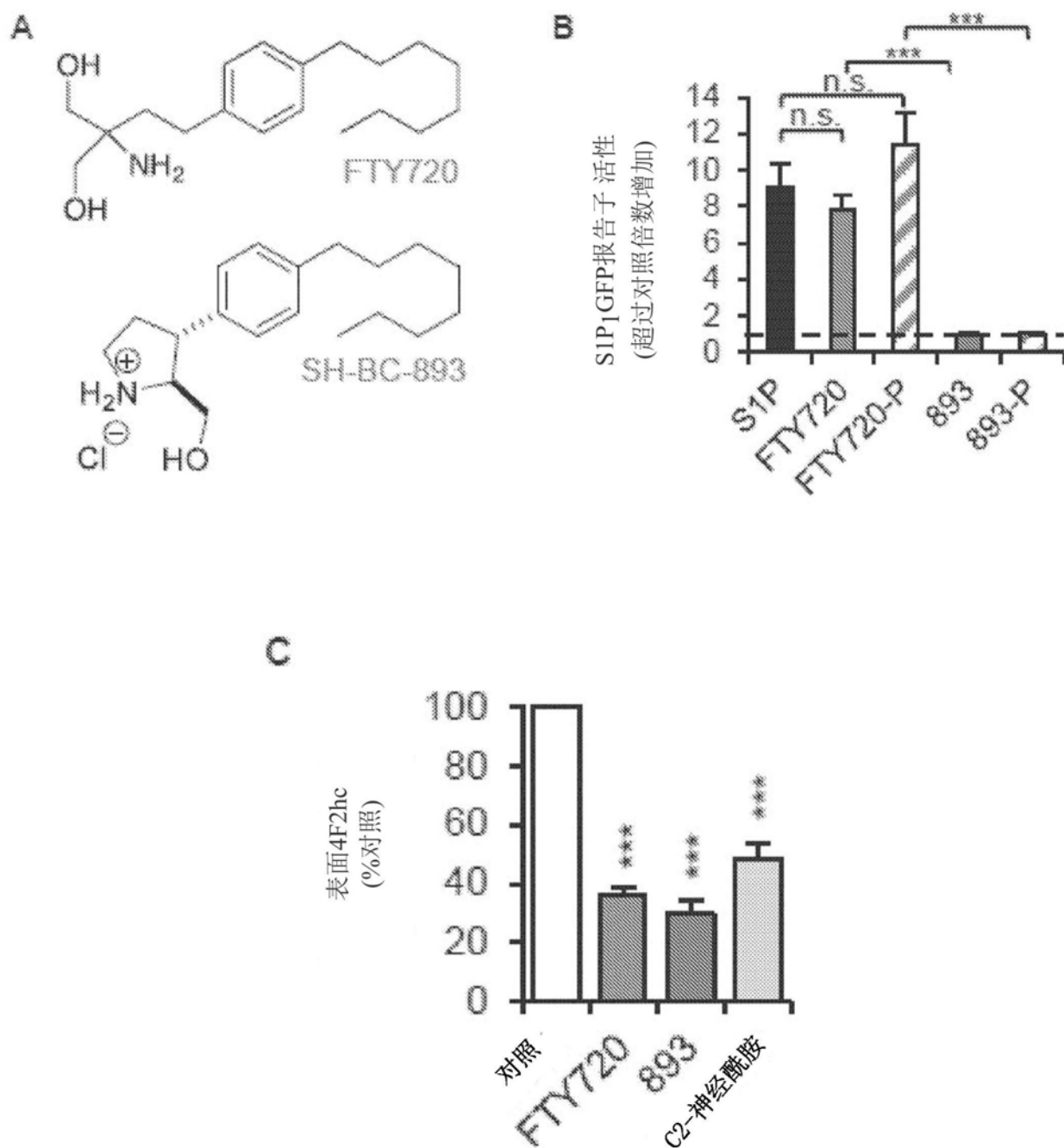


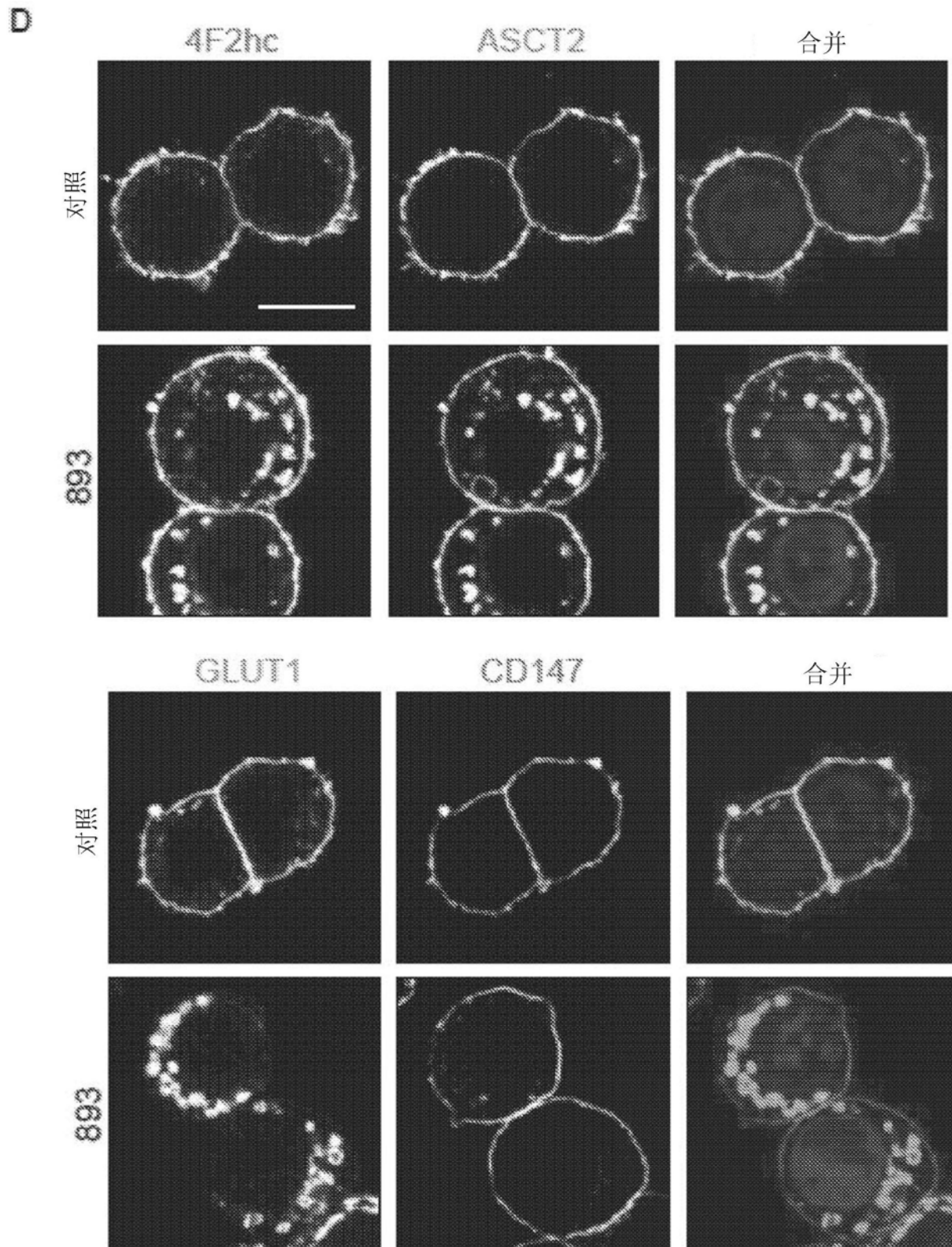
图49



注:化合物#没有百位;因此,化合物104=4且化合物125=25

图50





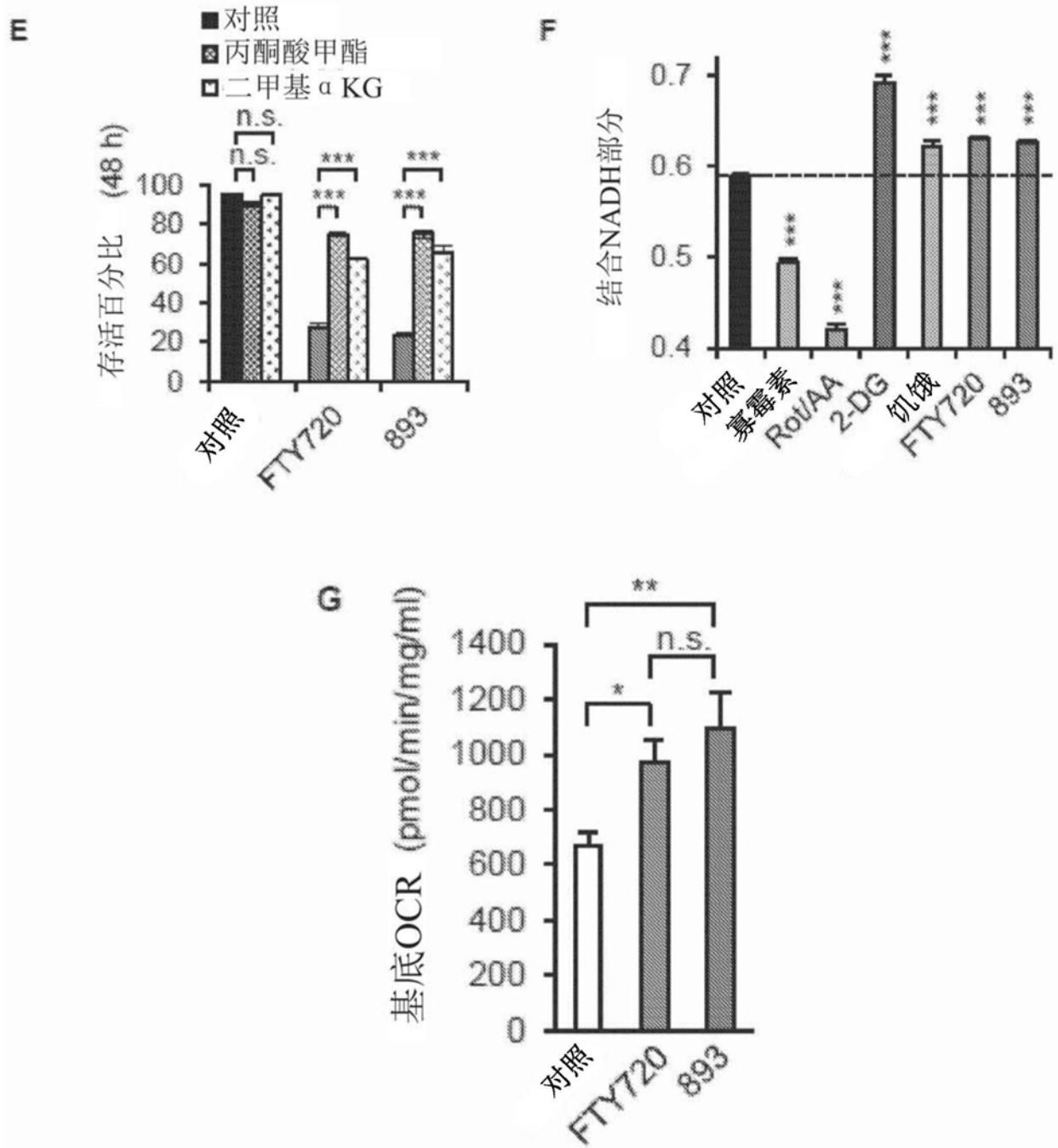


图51

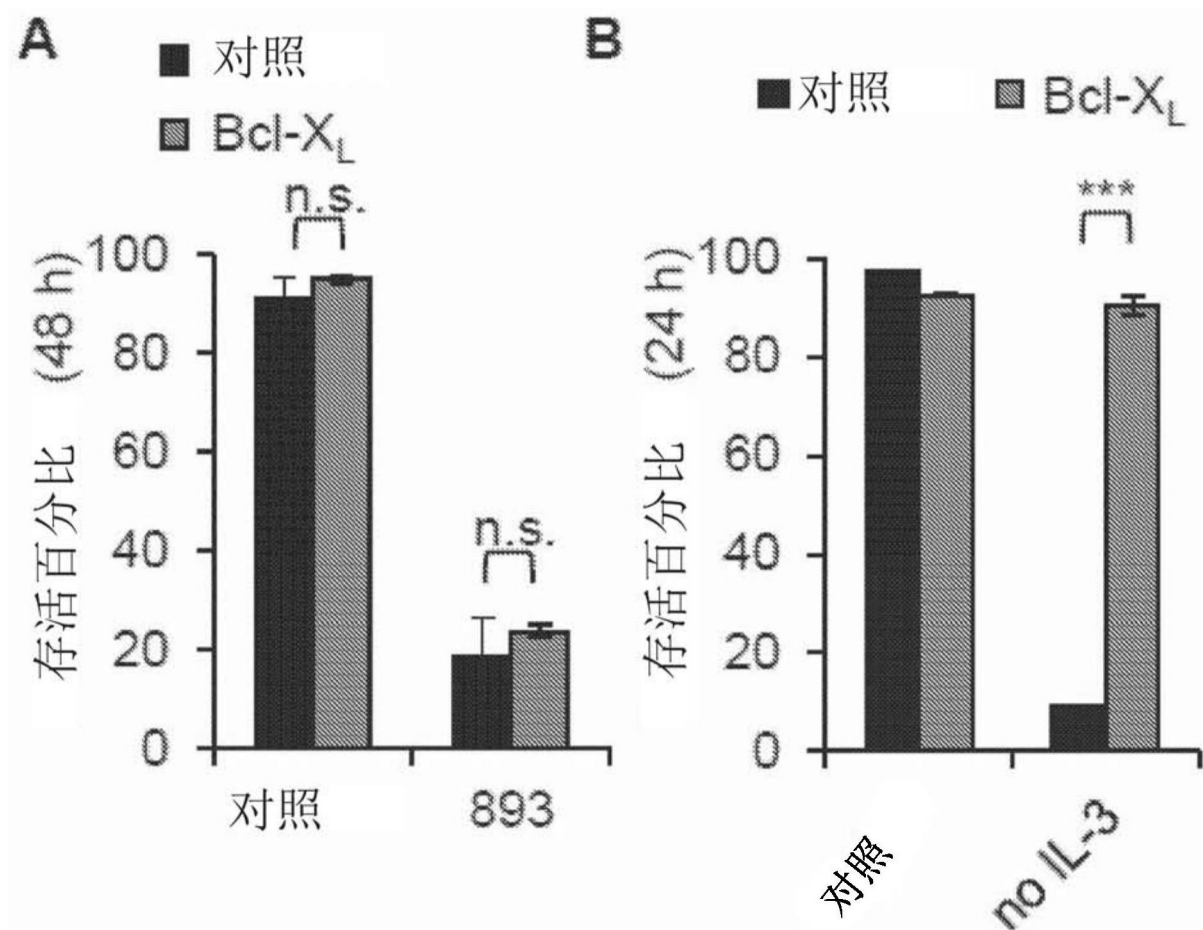
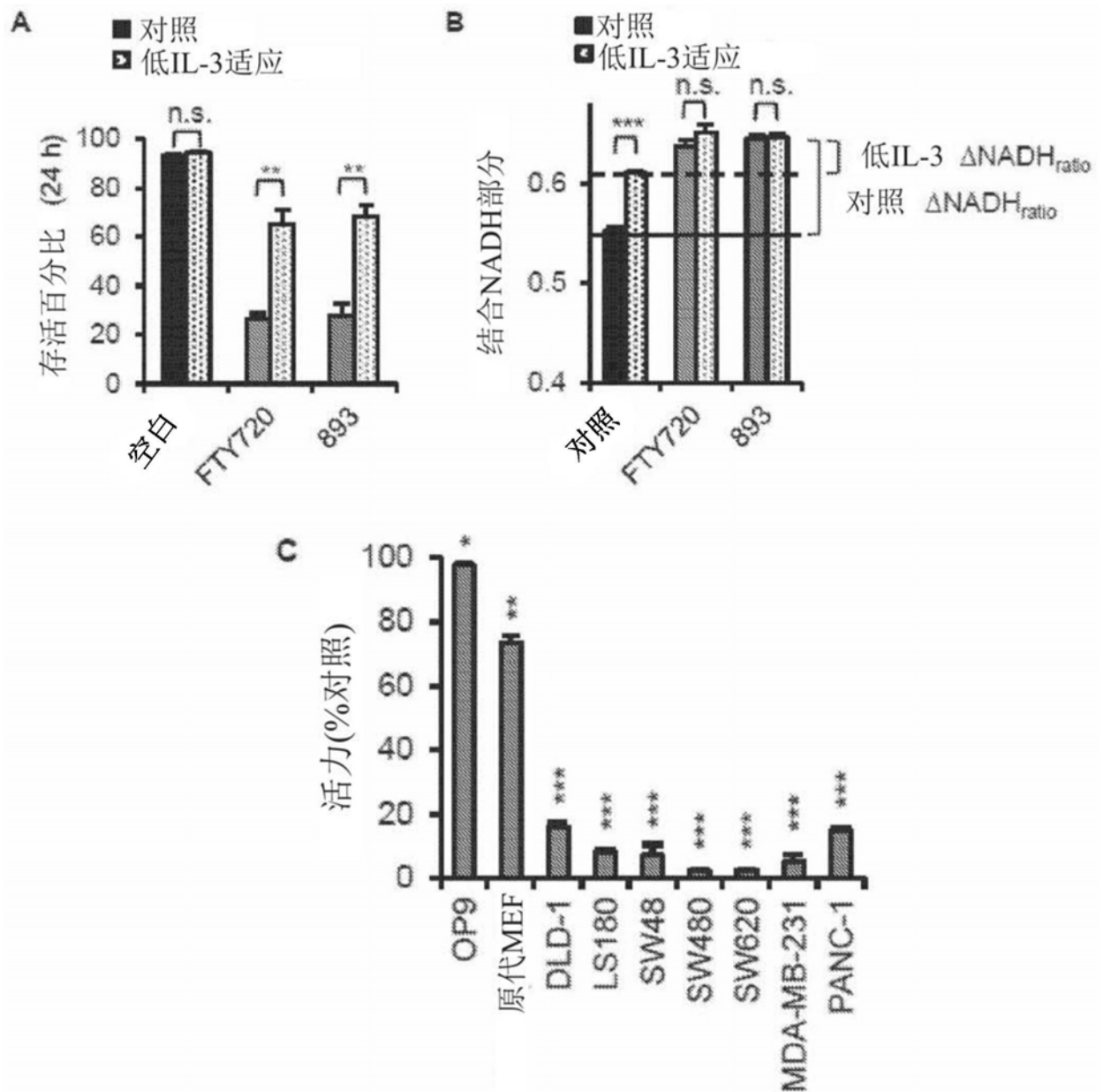
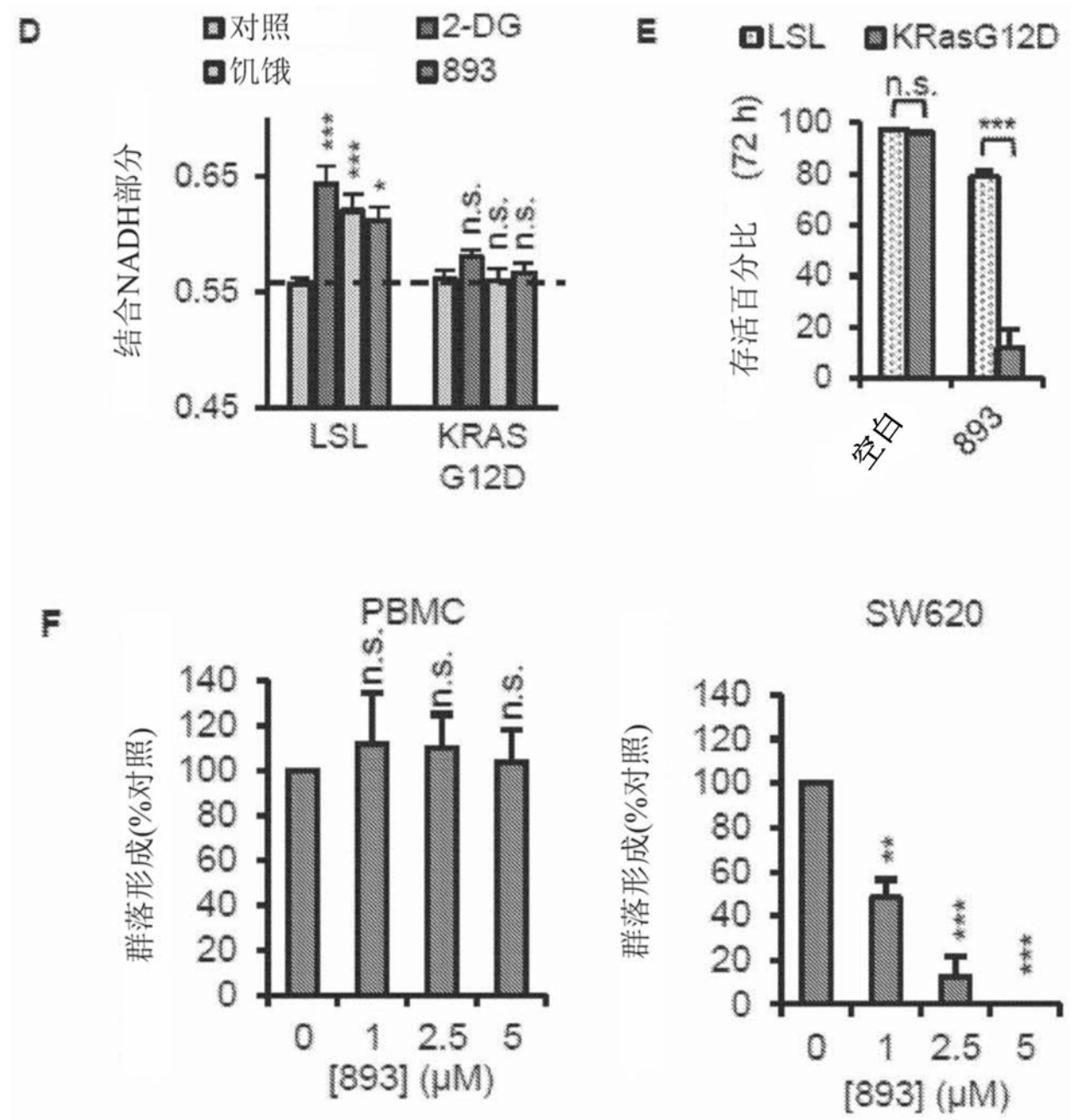


图52





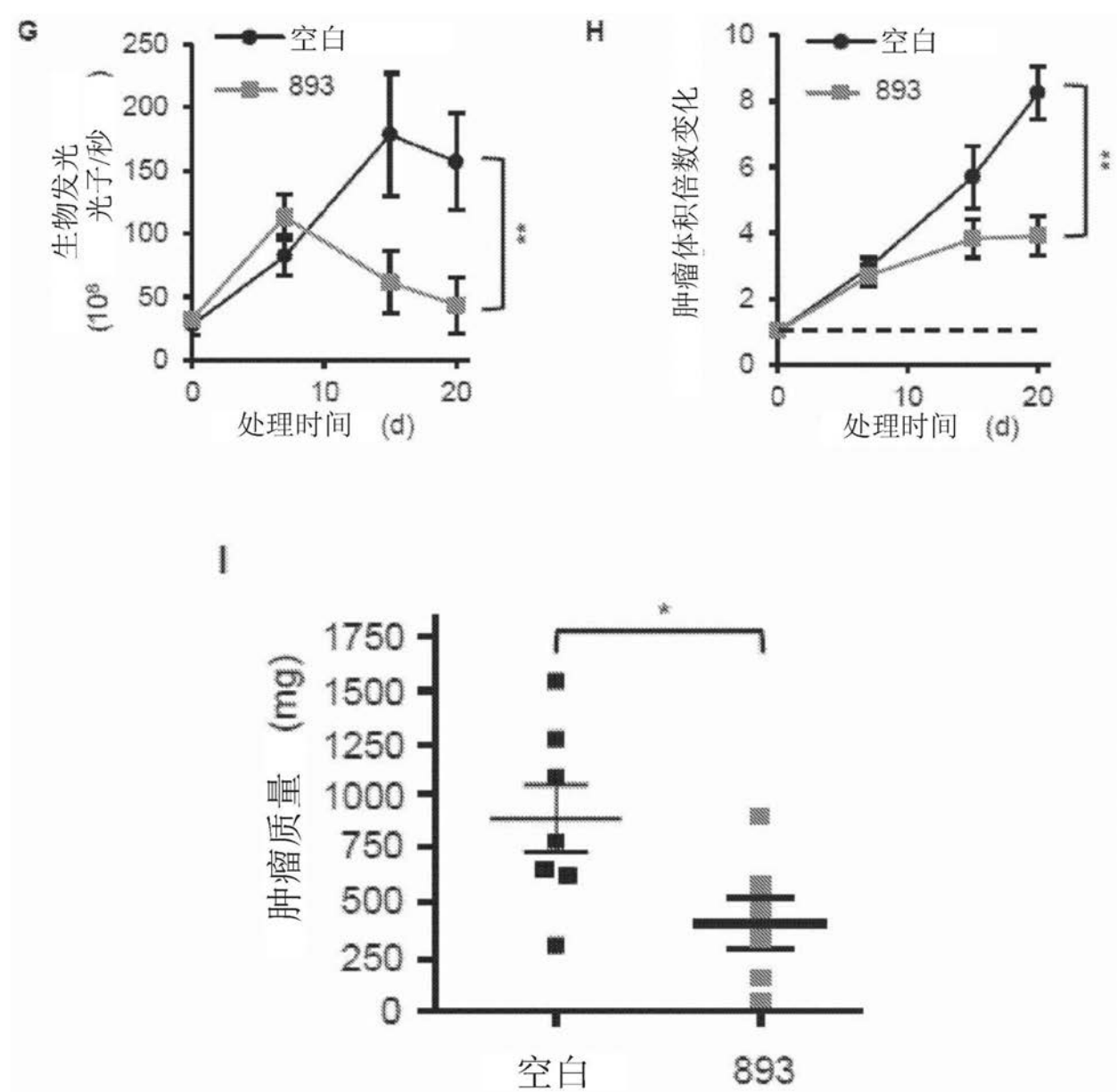
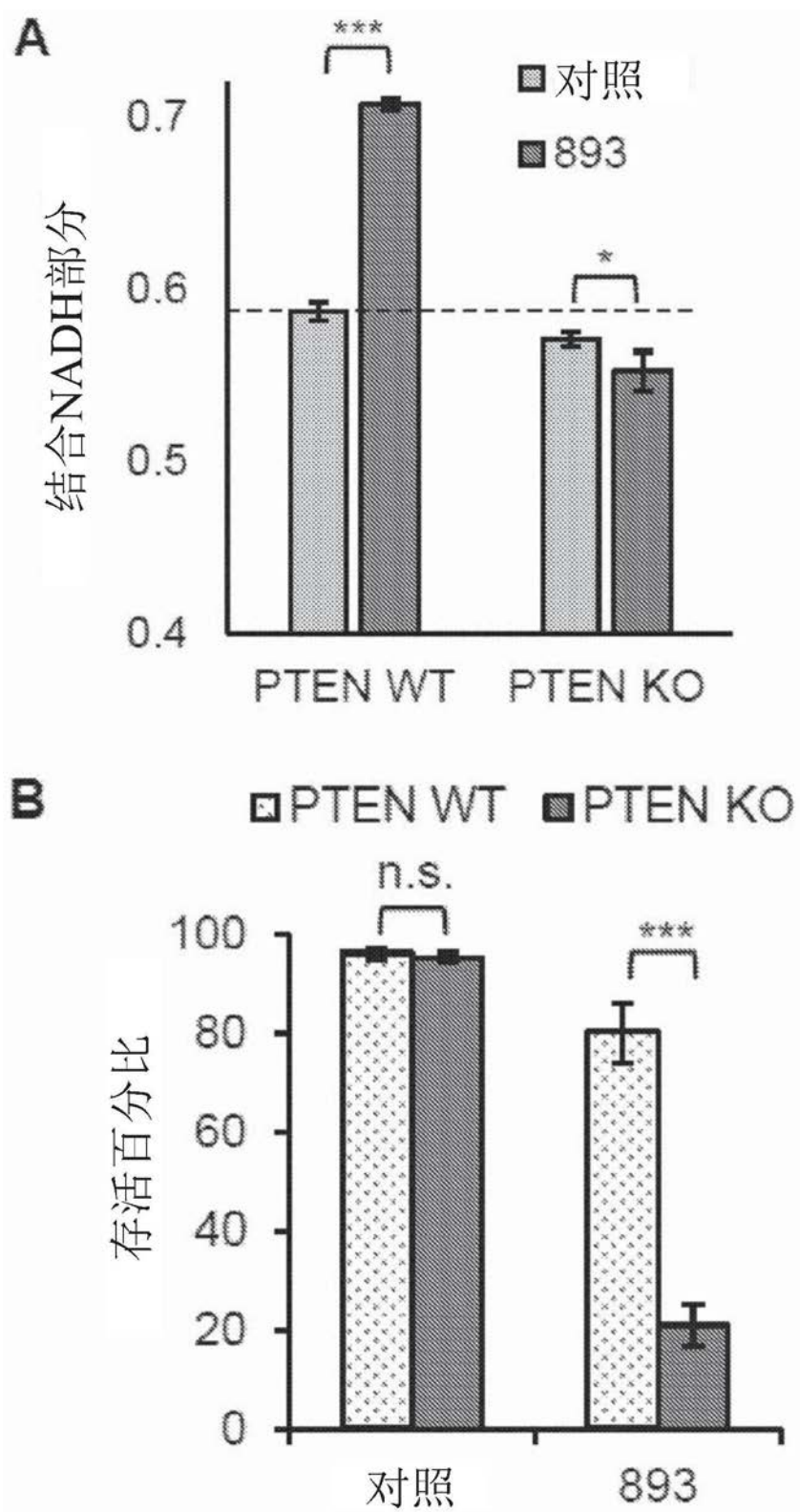
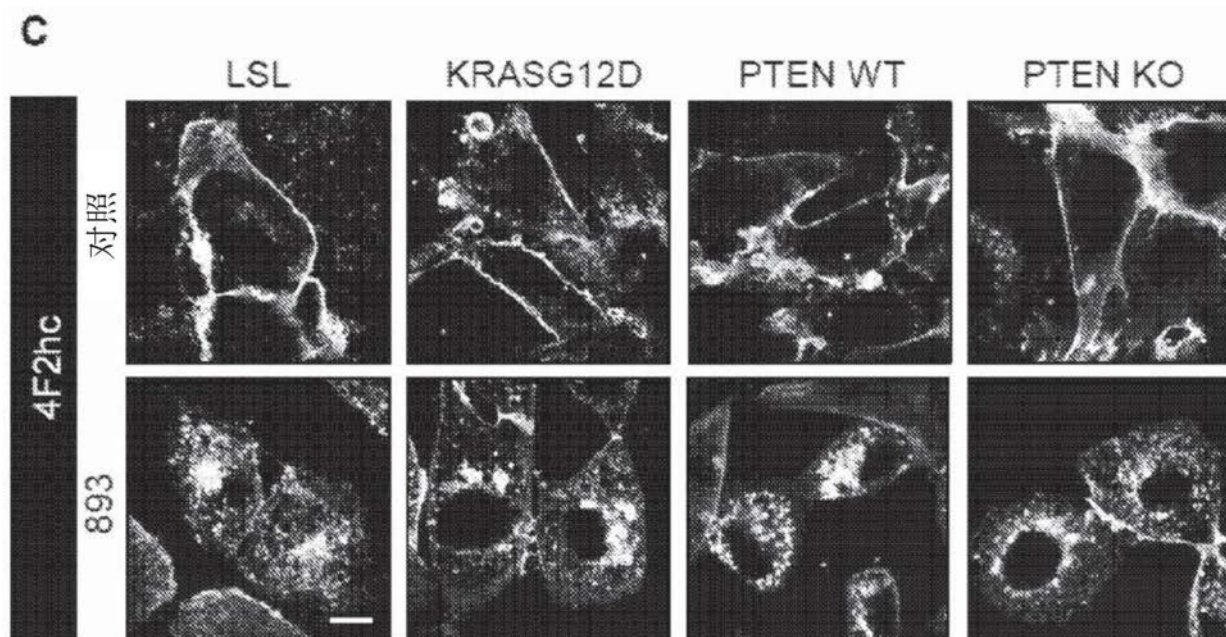
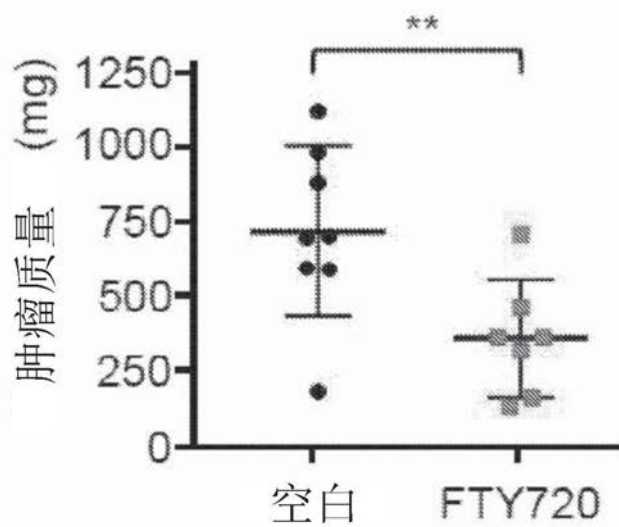


图53





D



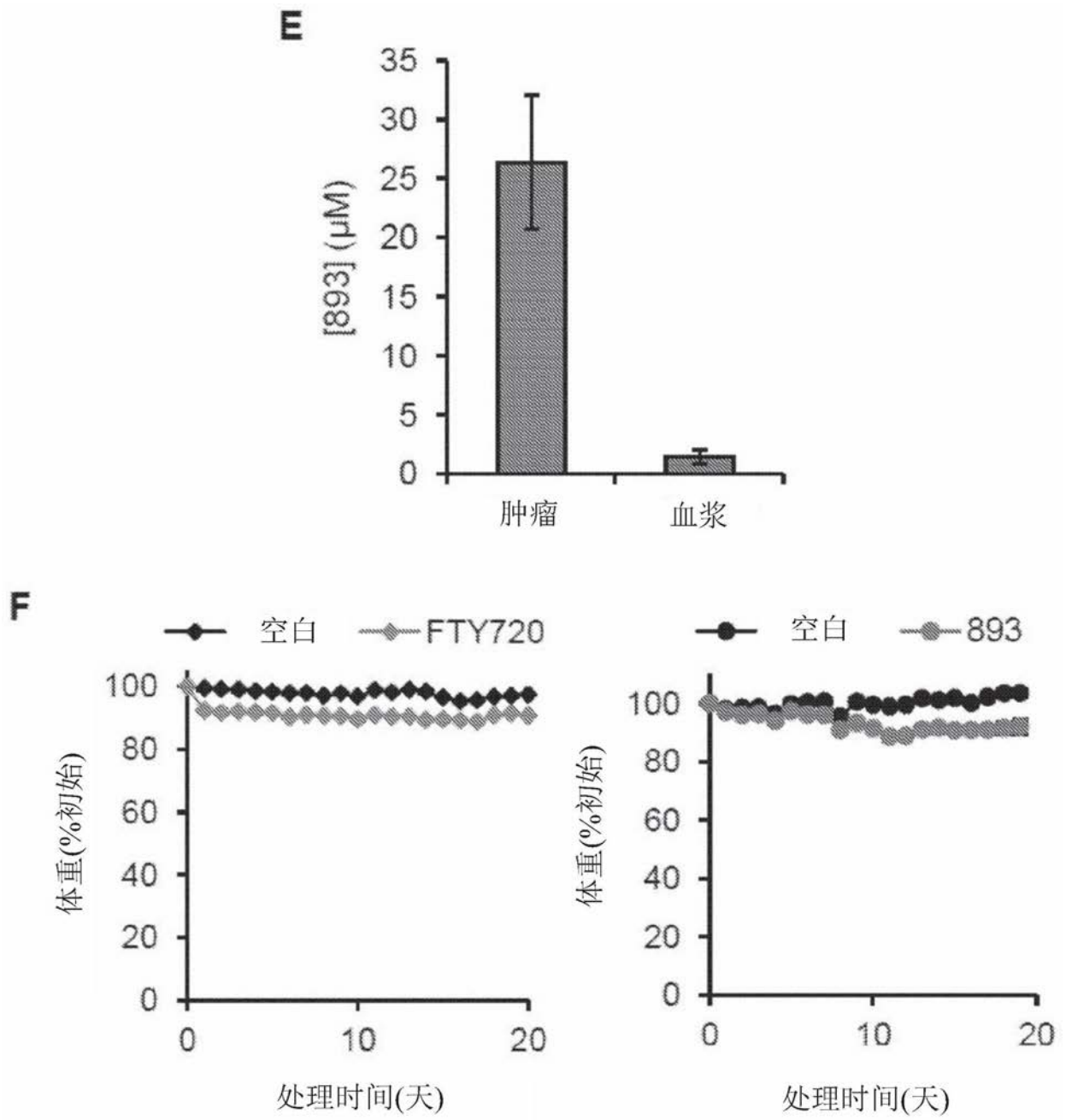
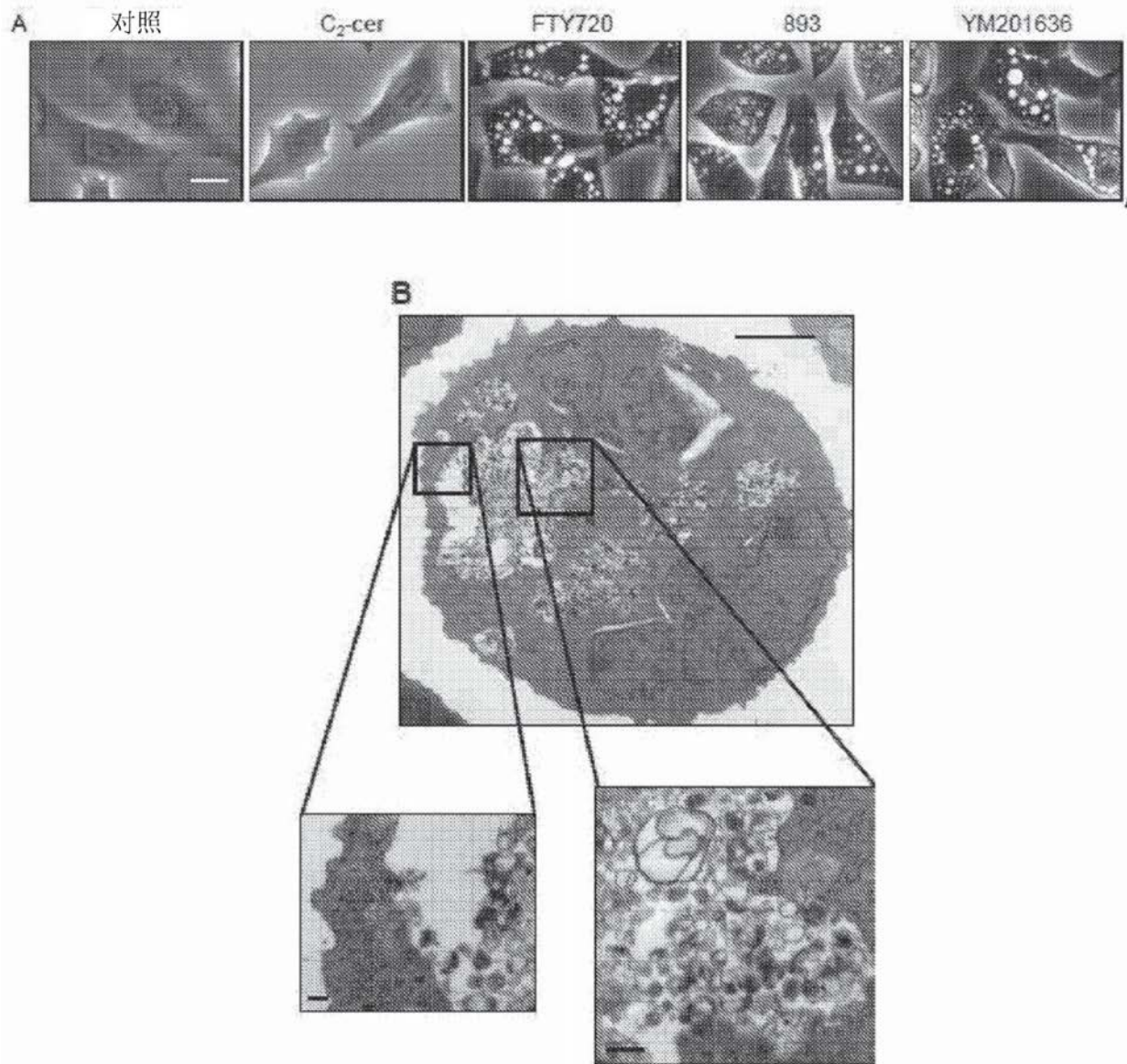
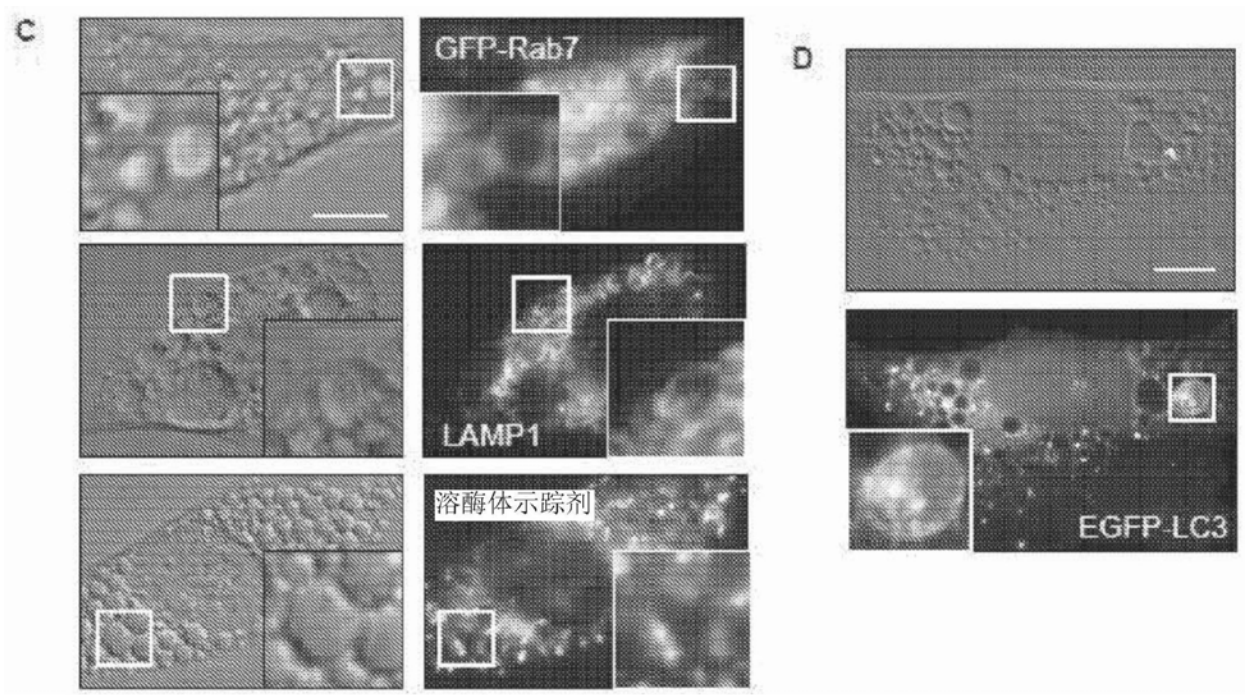


图54





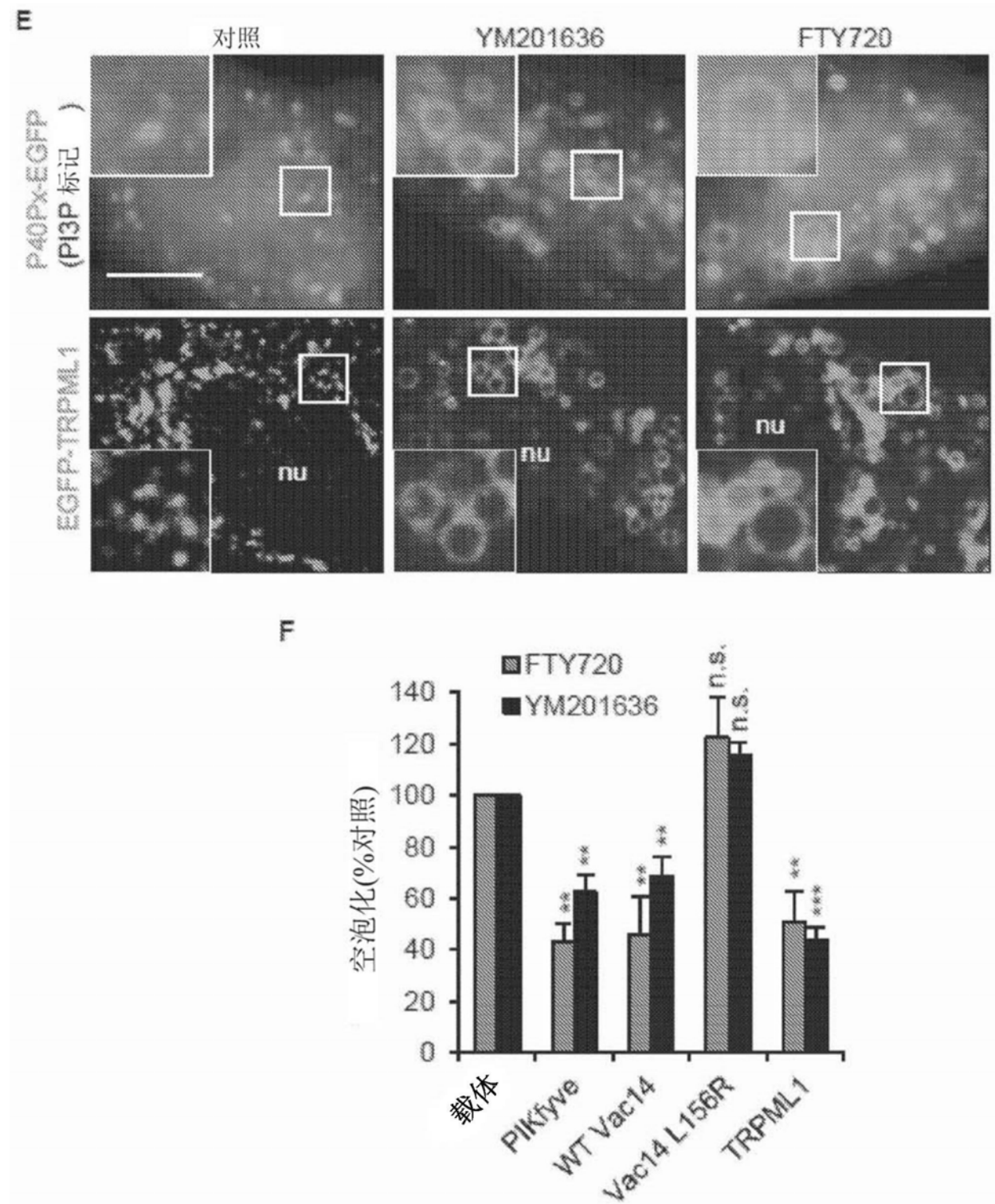
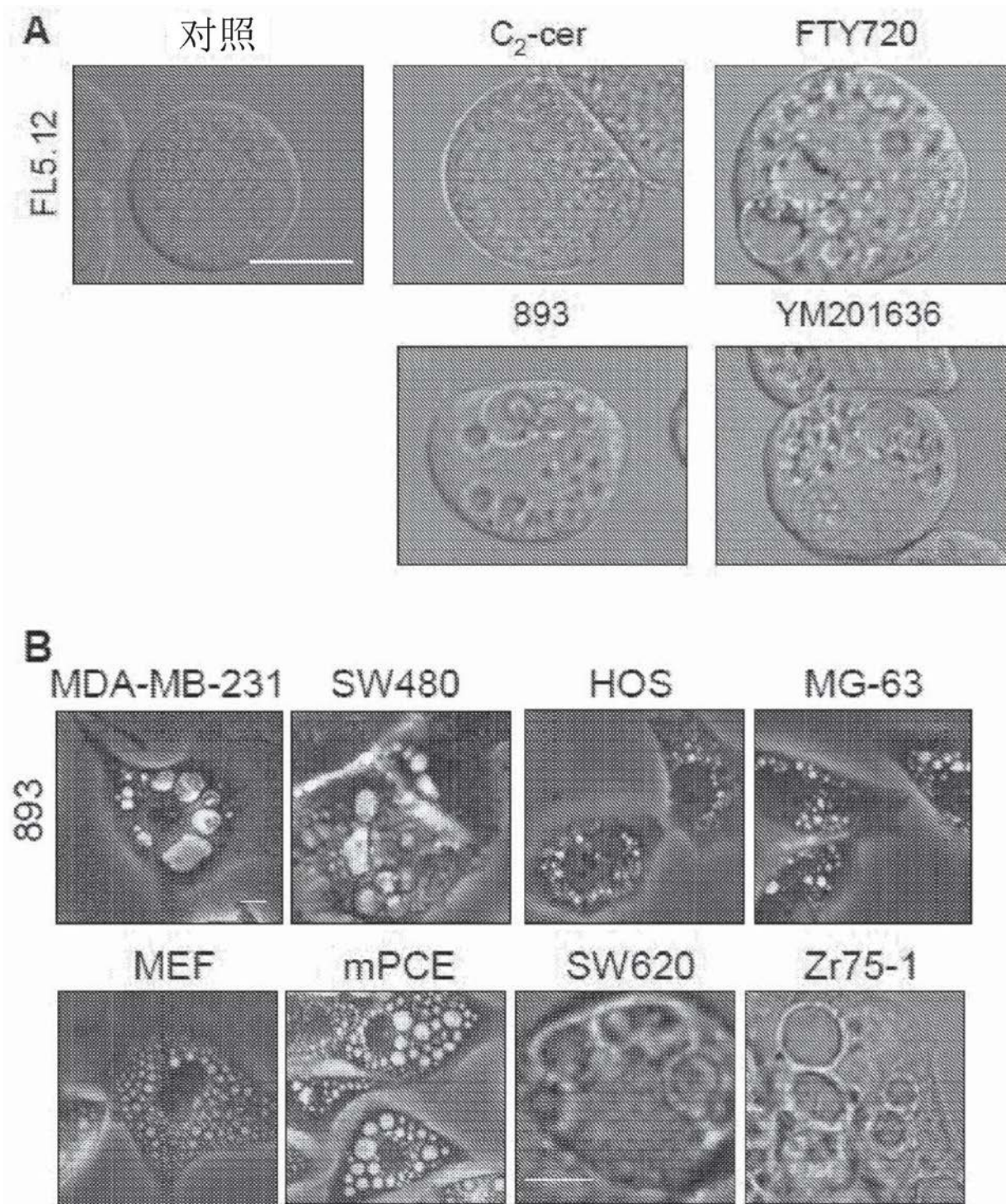
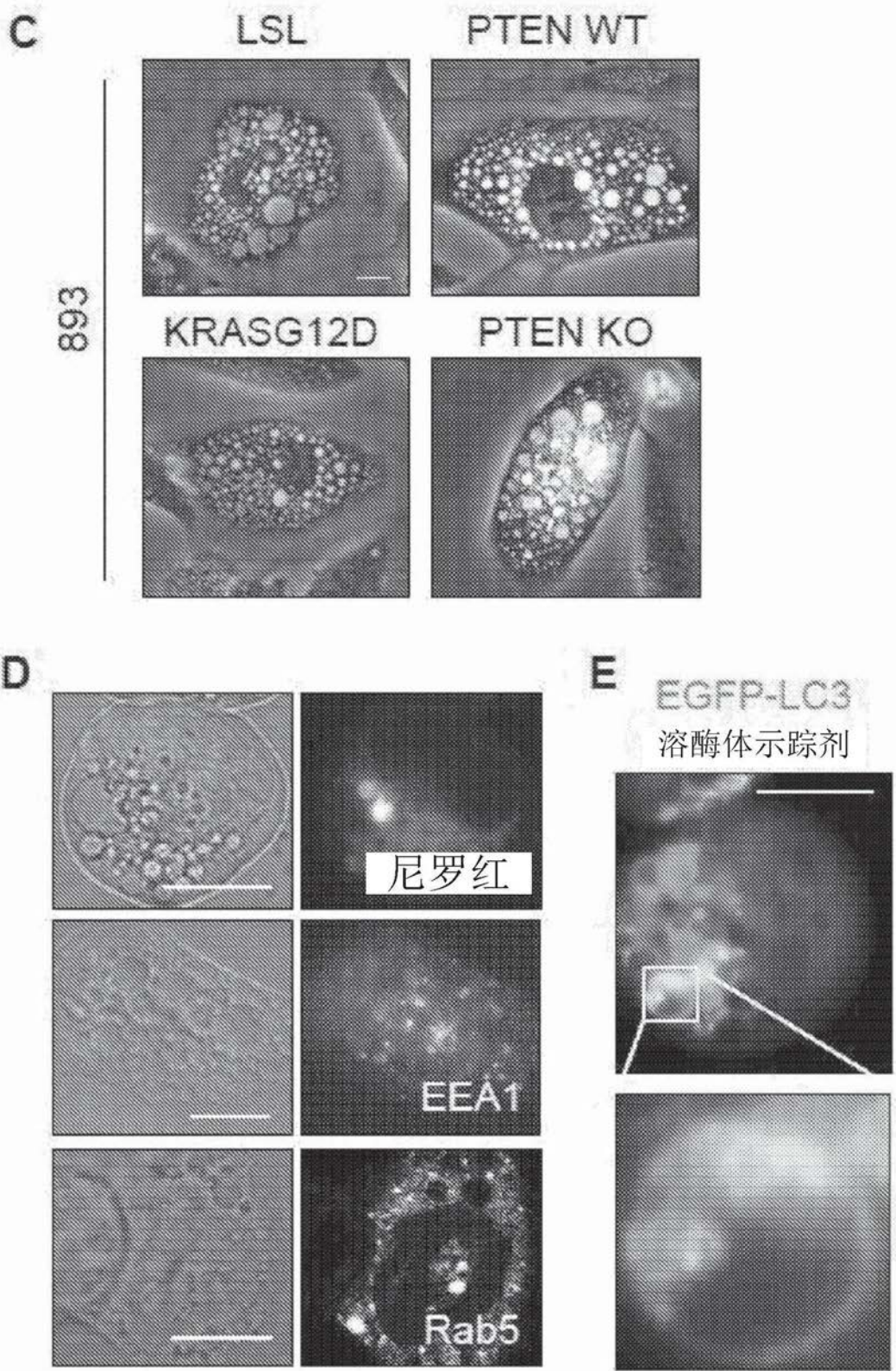


图55





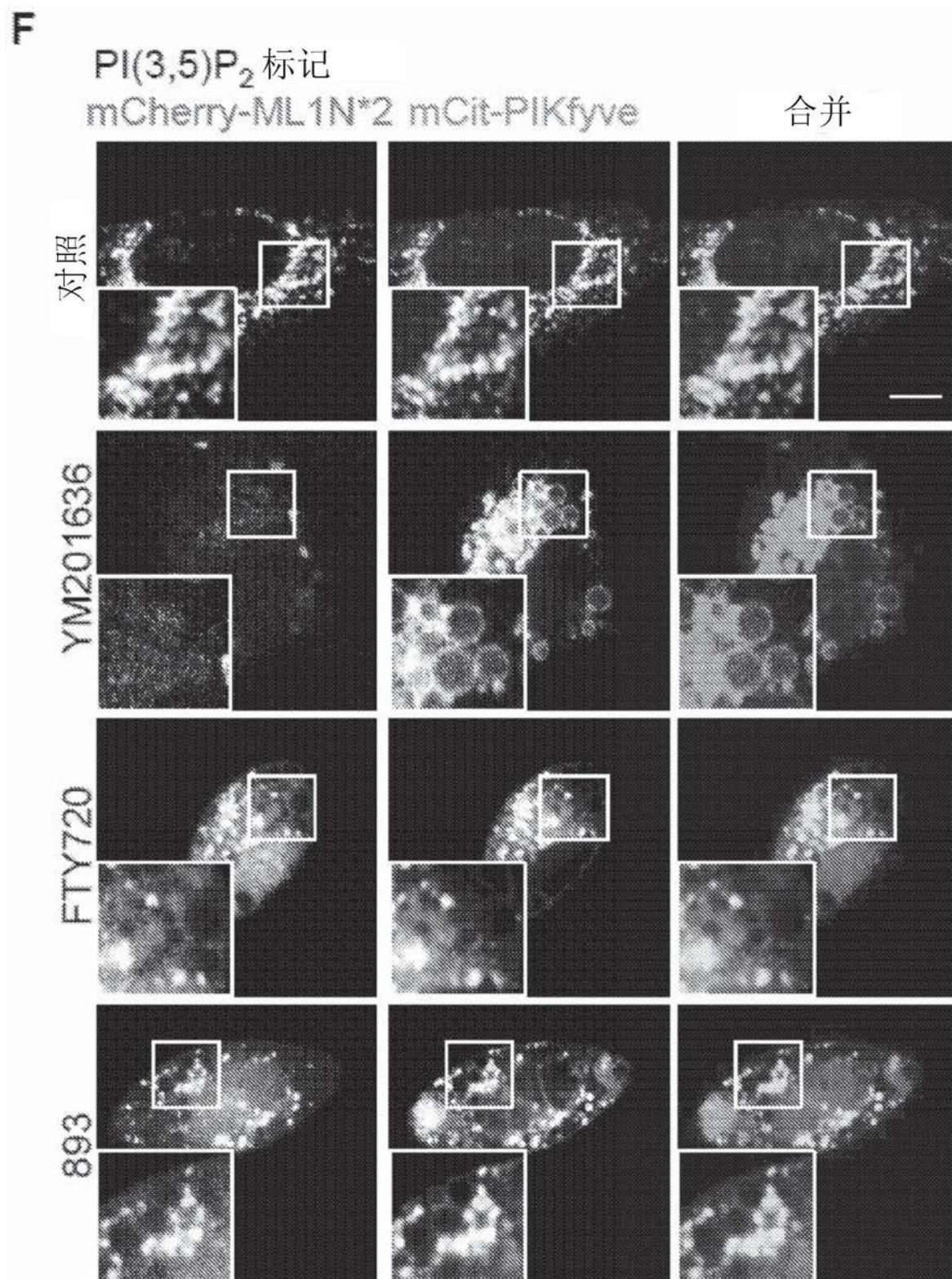
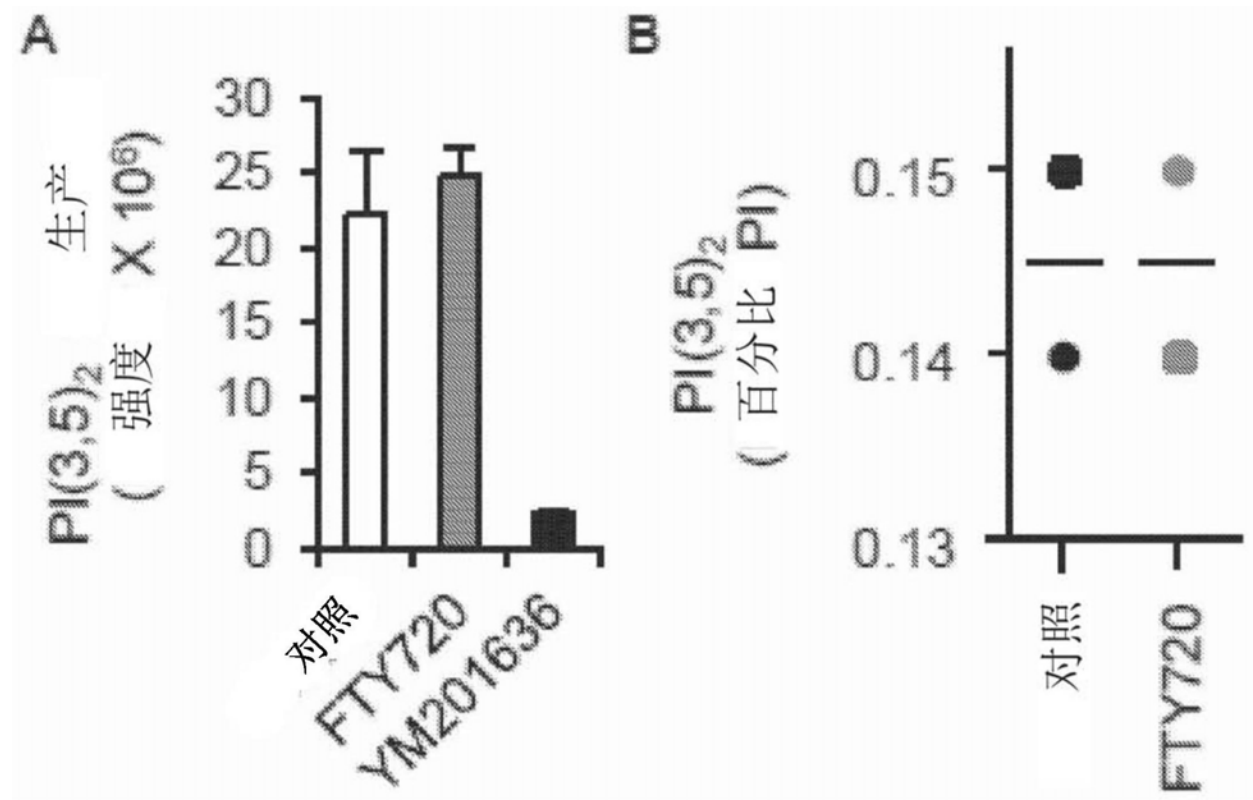
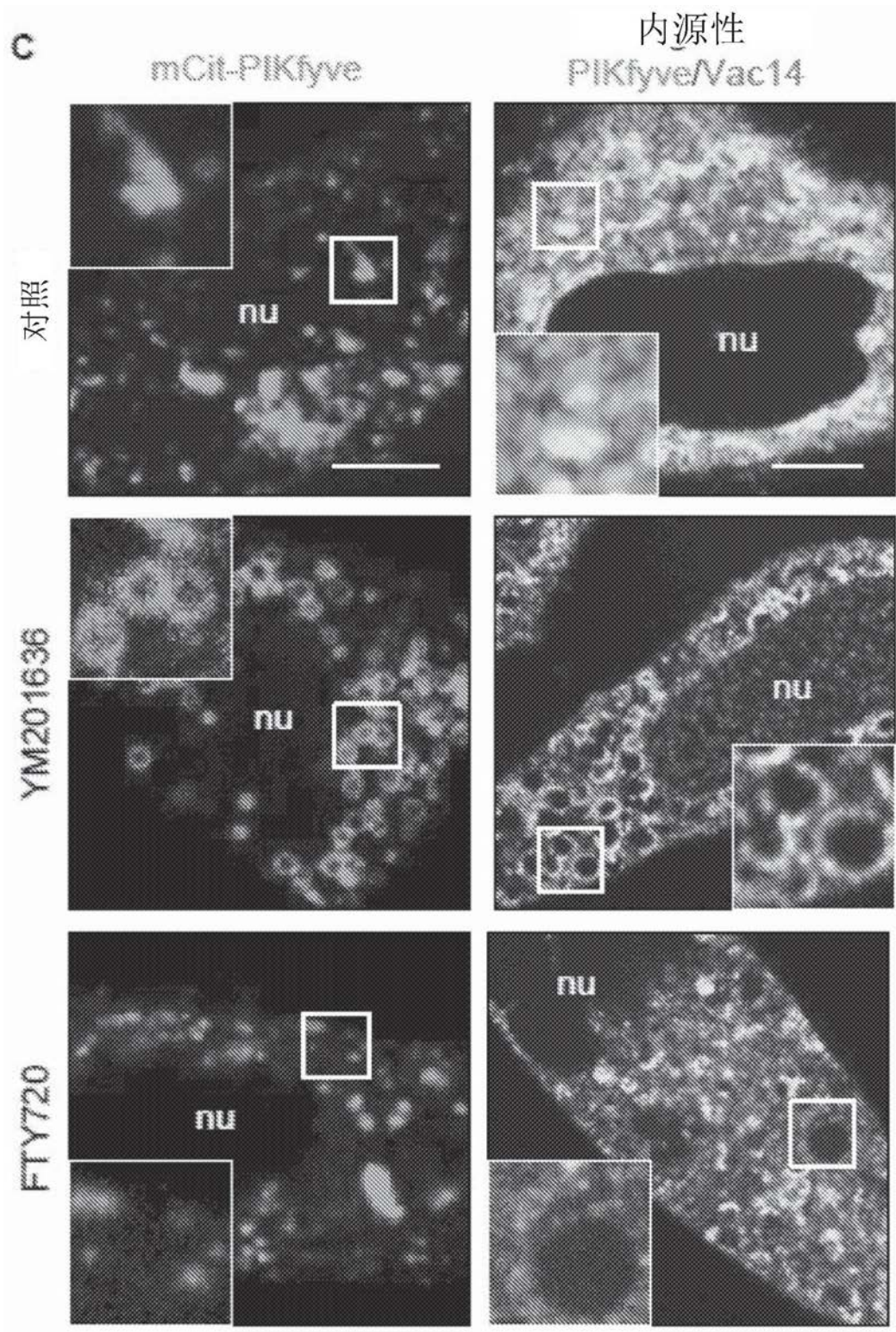


图56





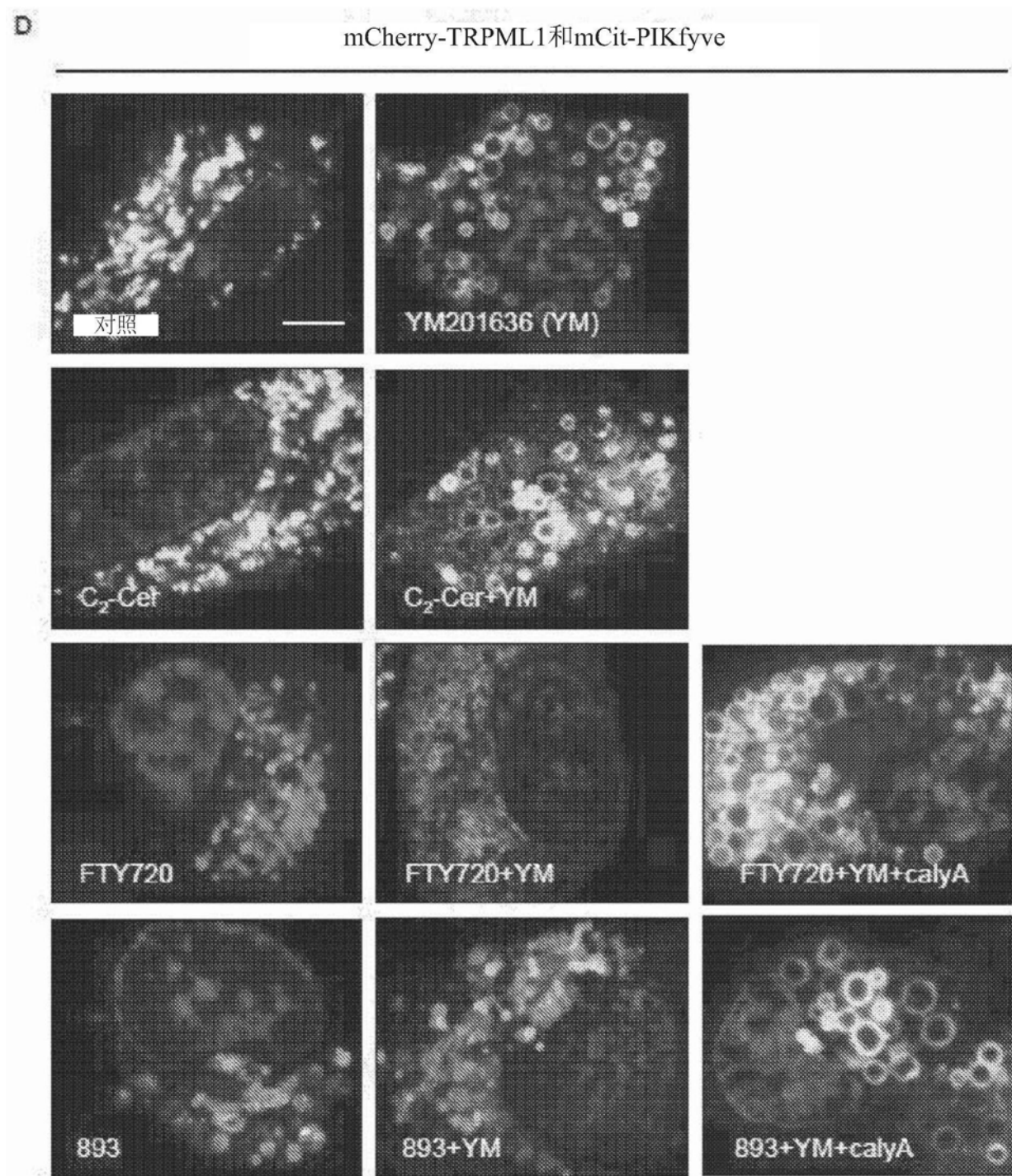
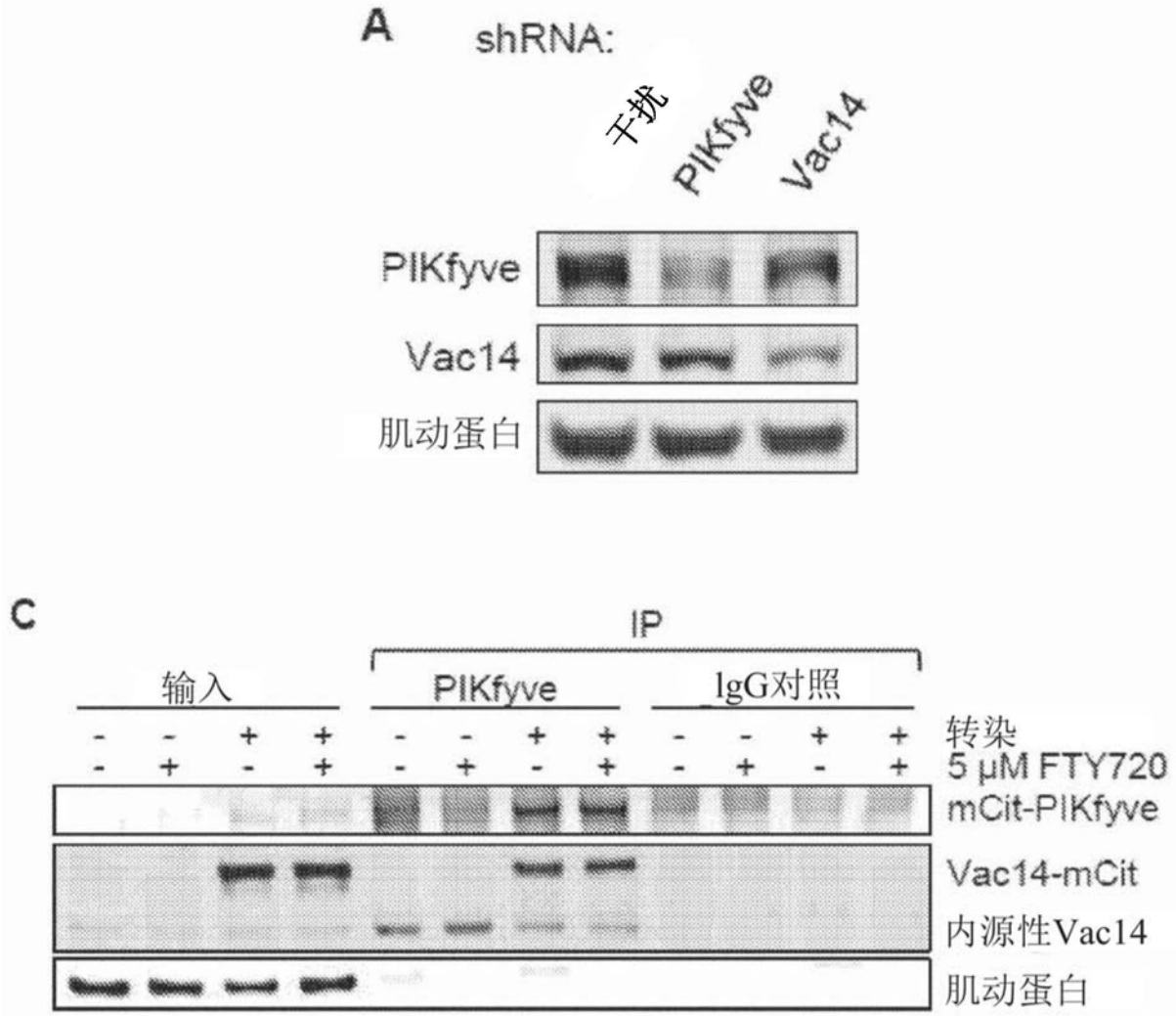
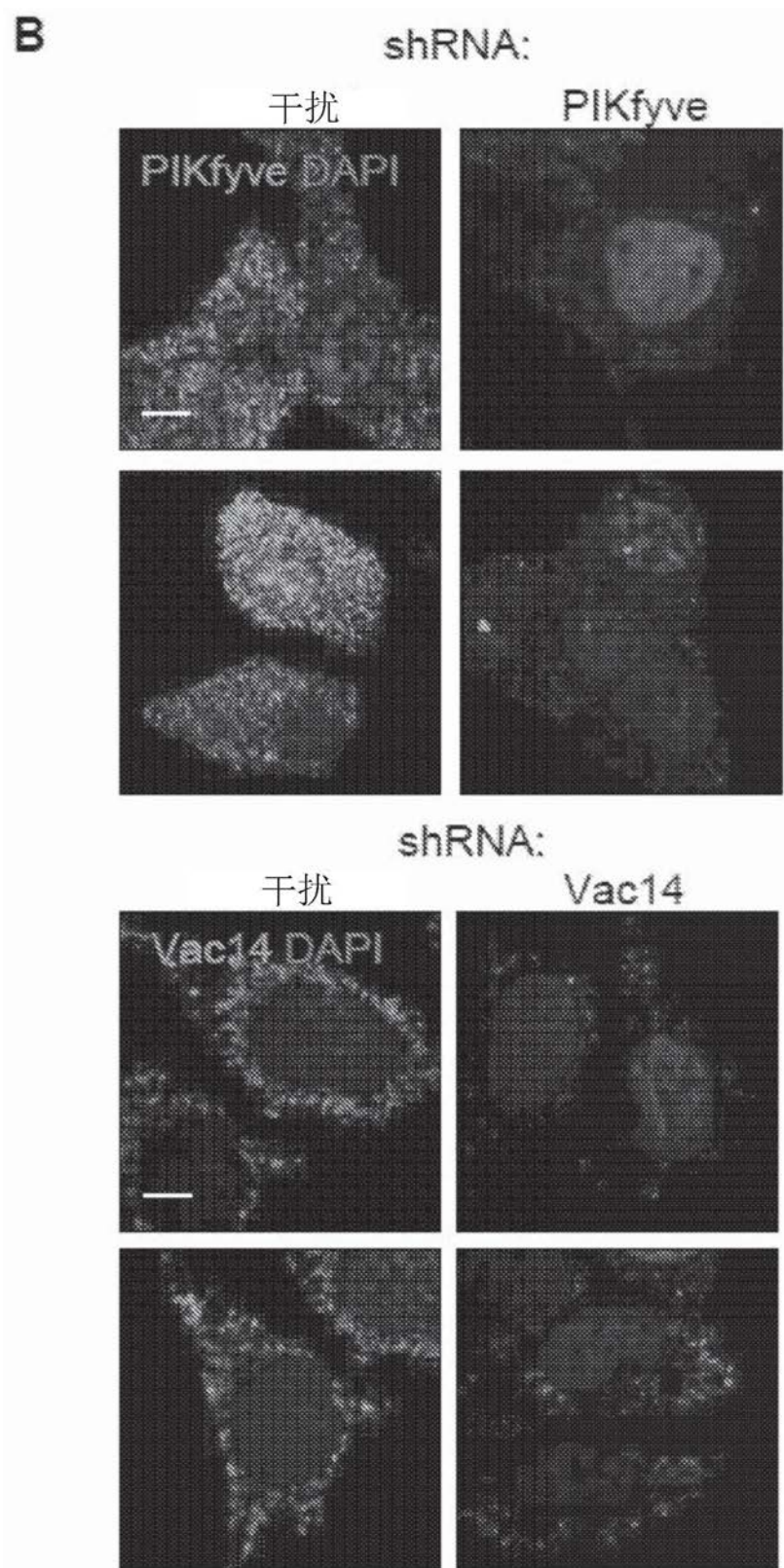


图57





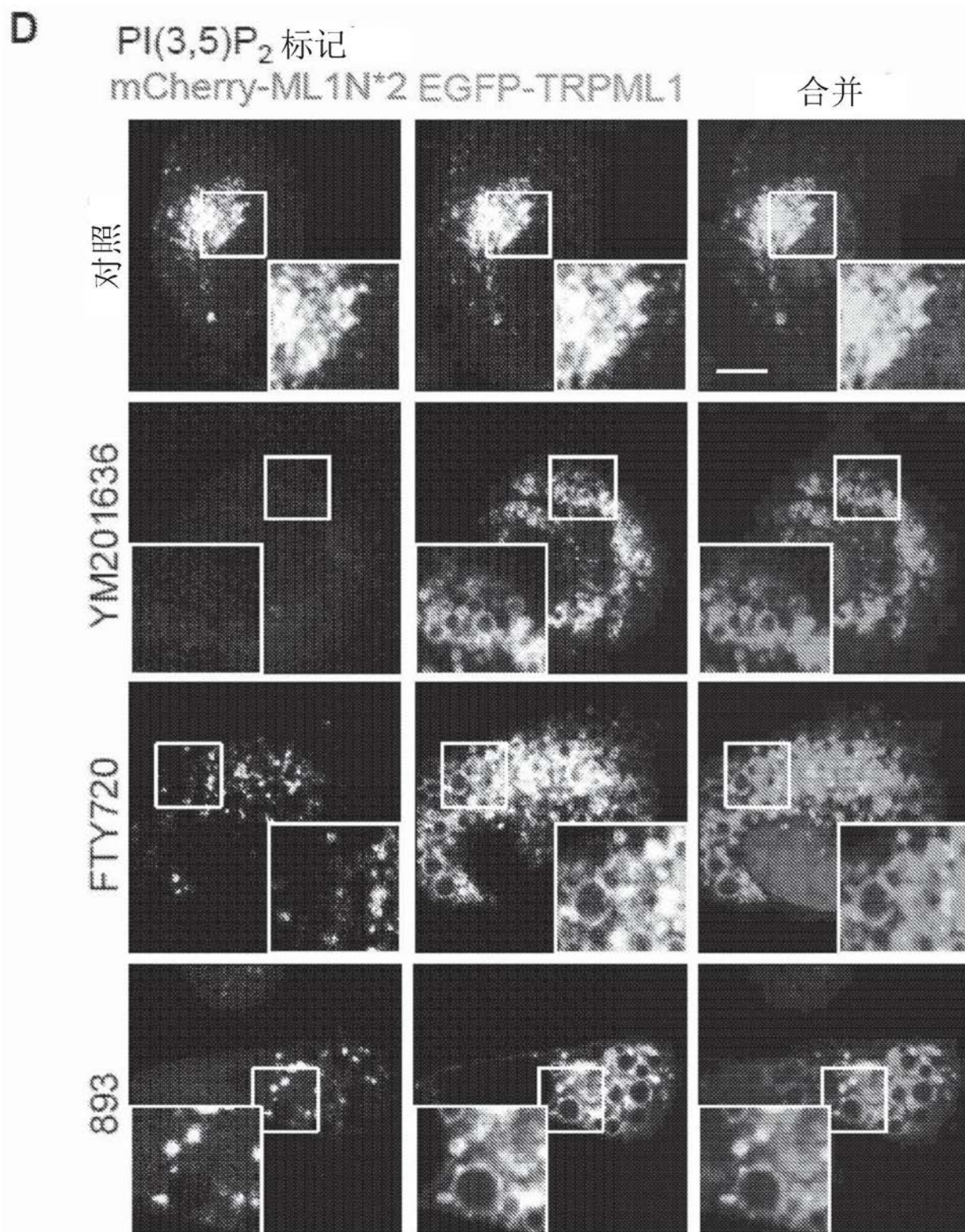
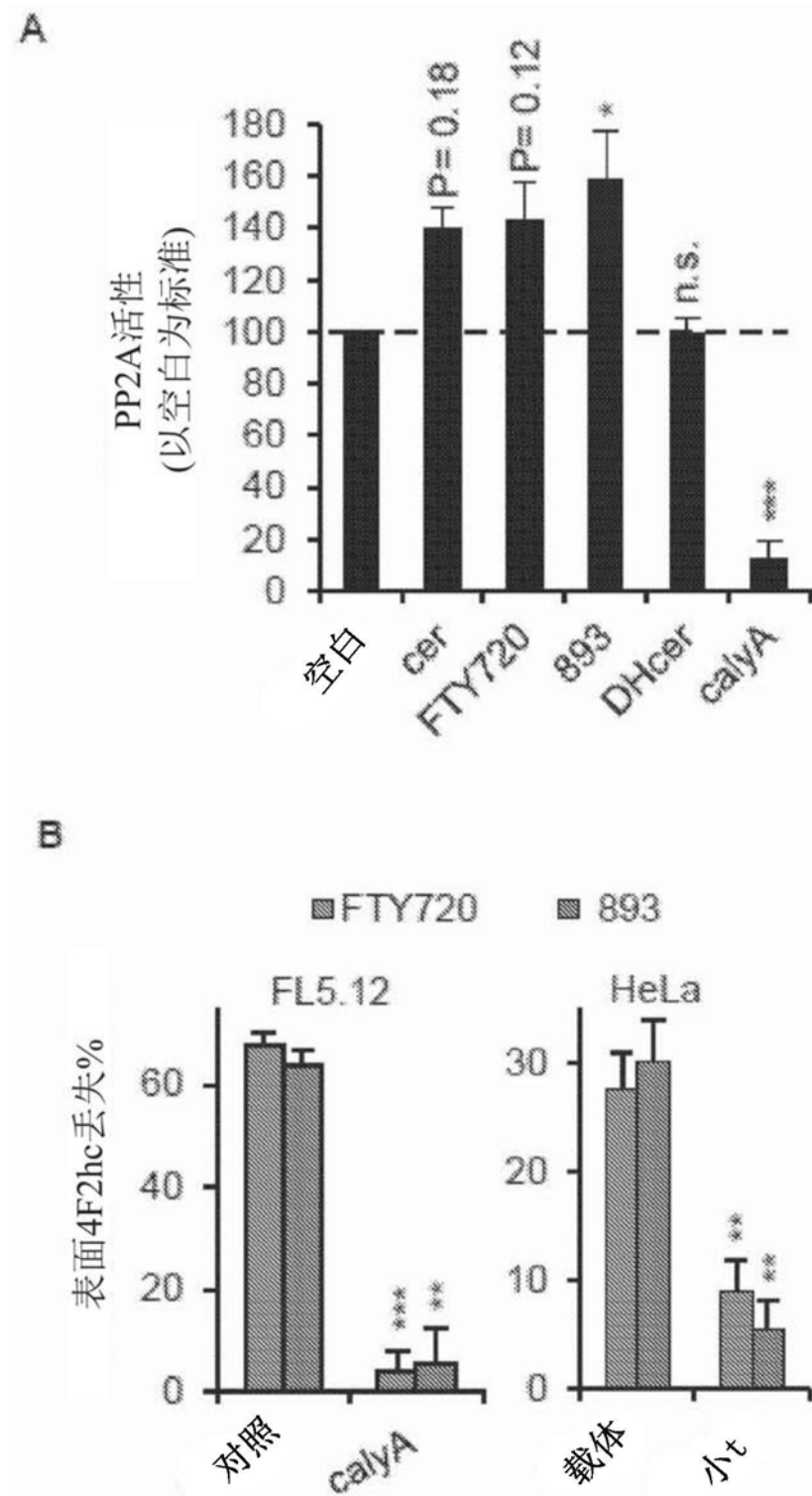


图58



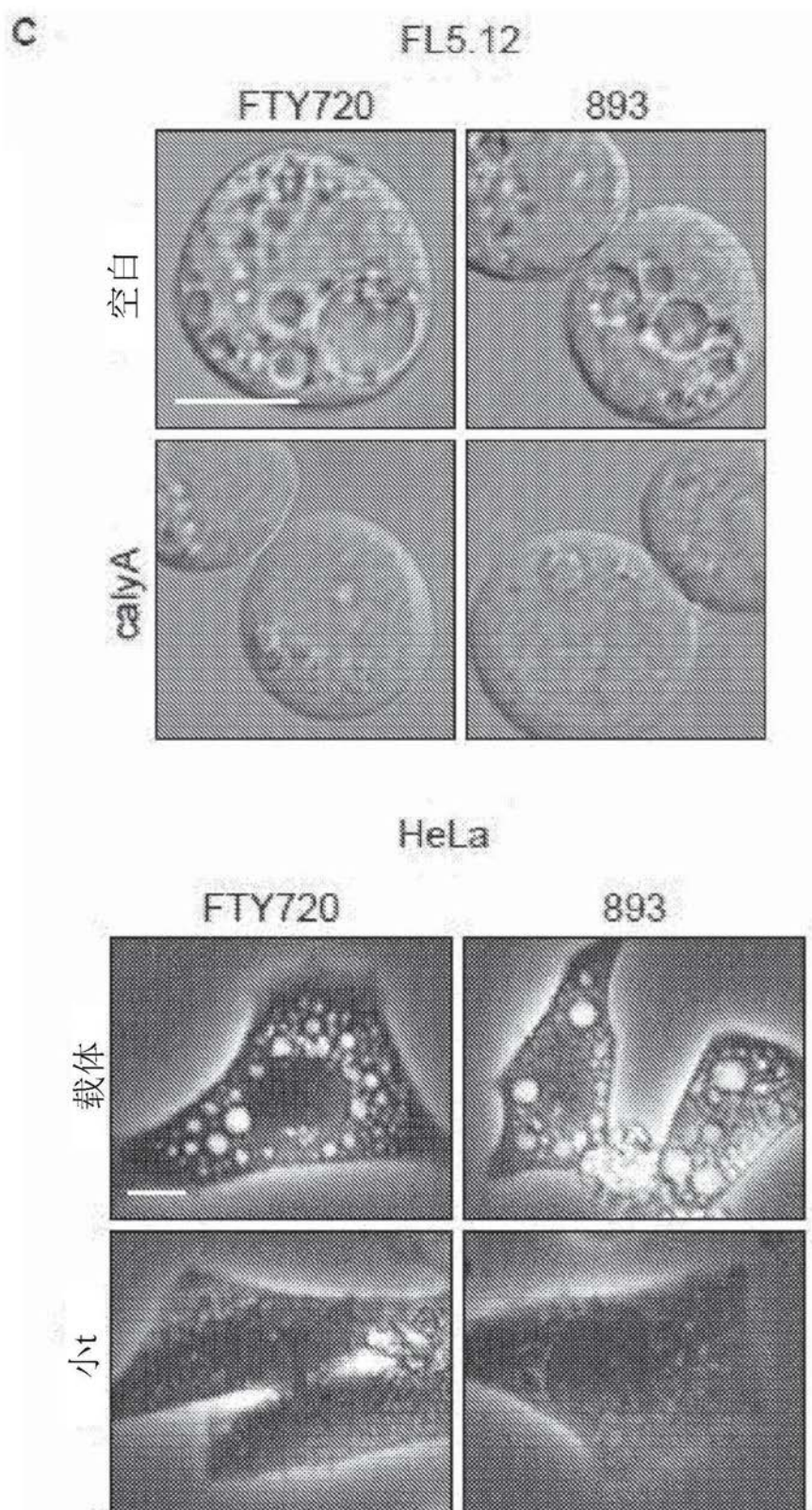
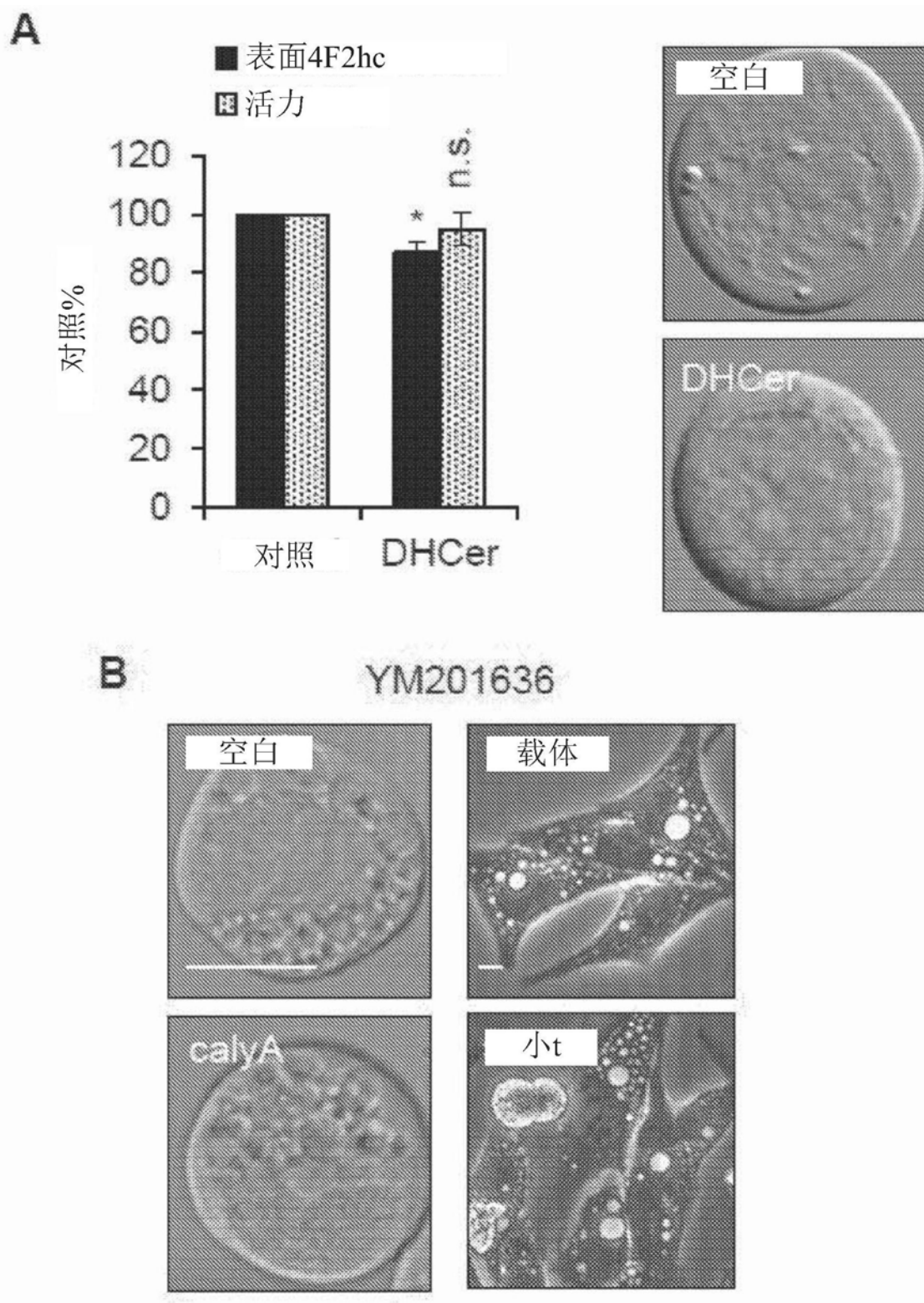
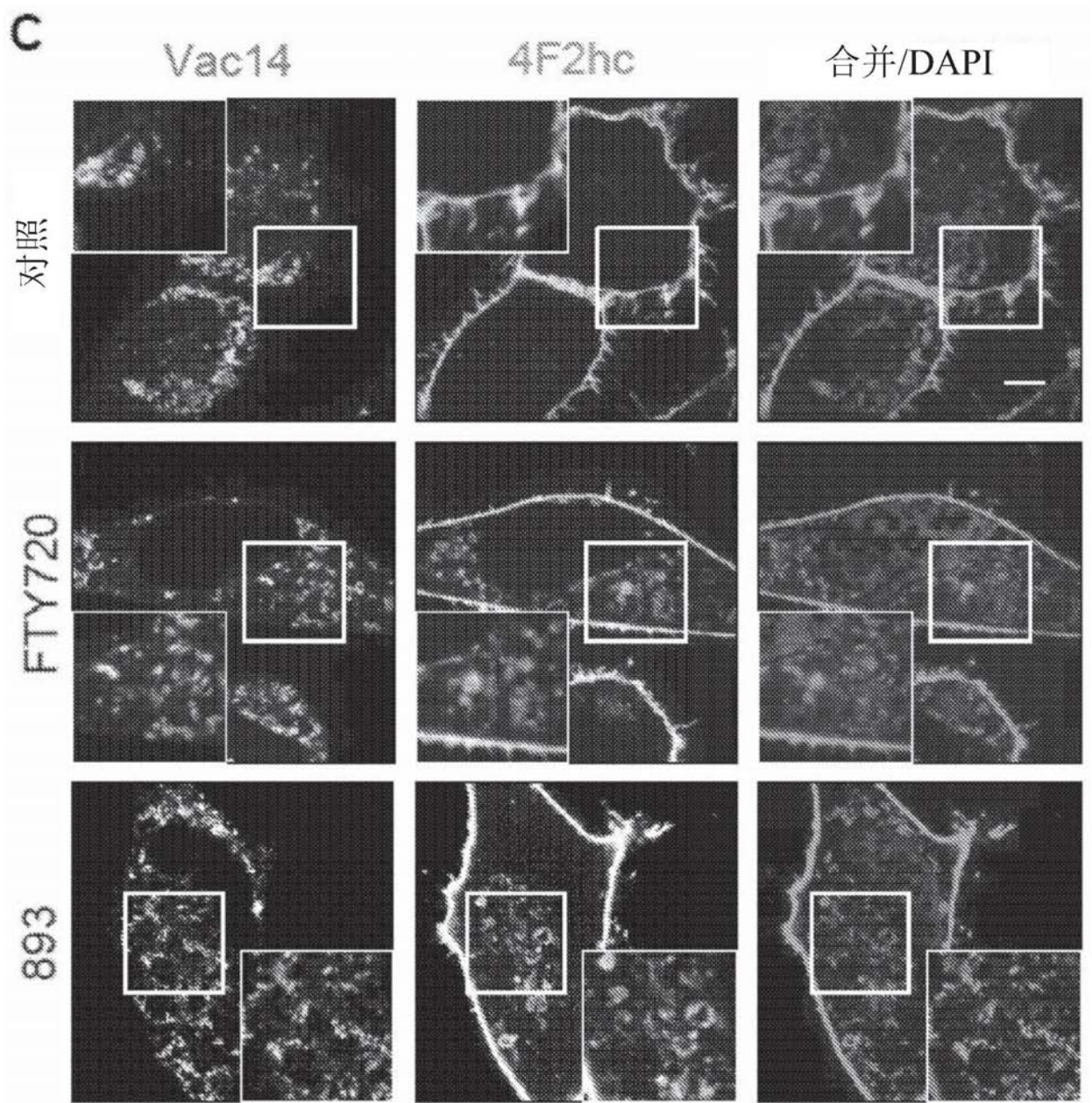


图59





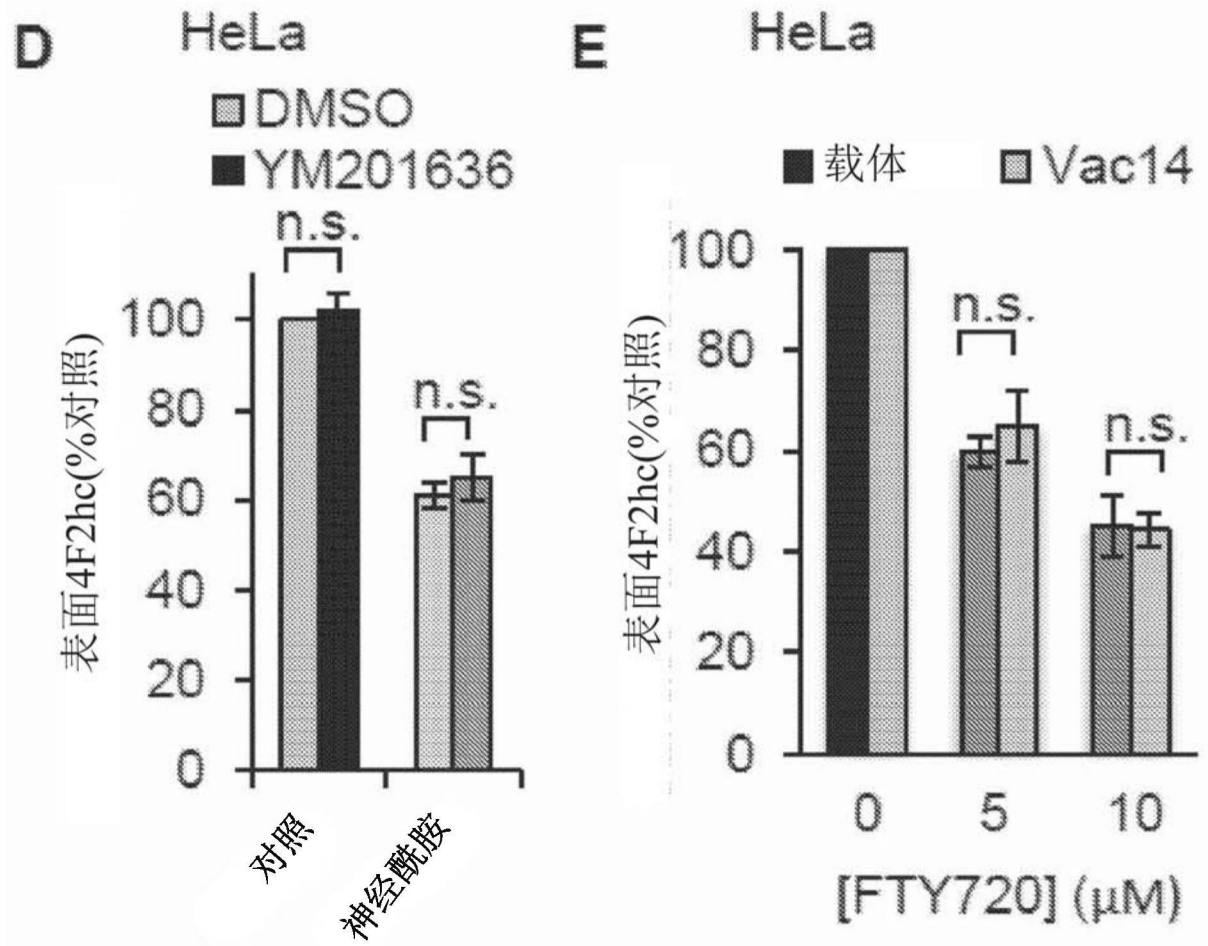
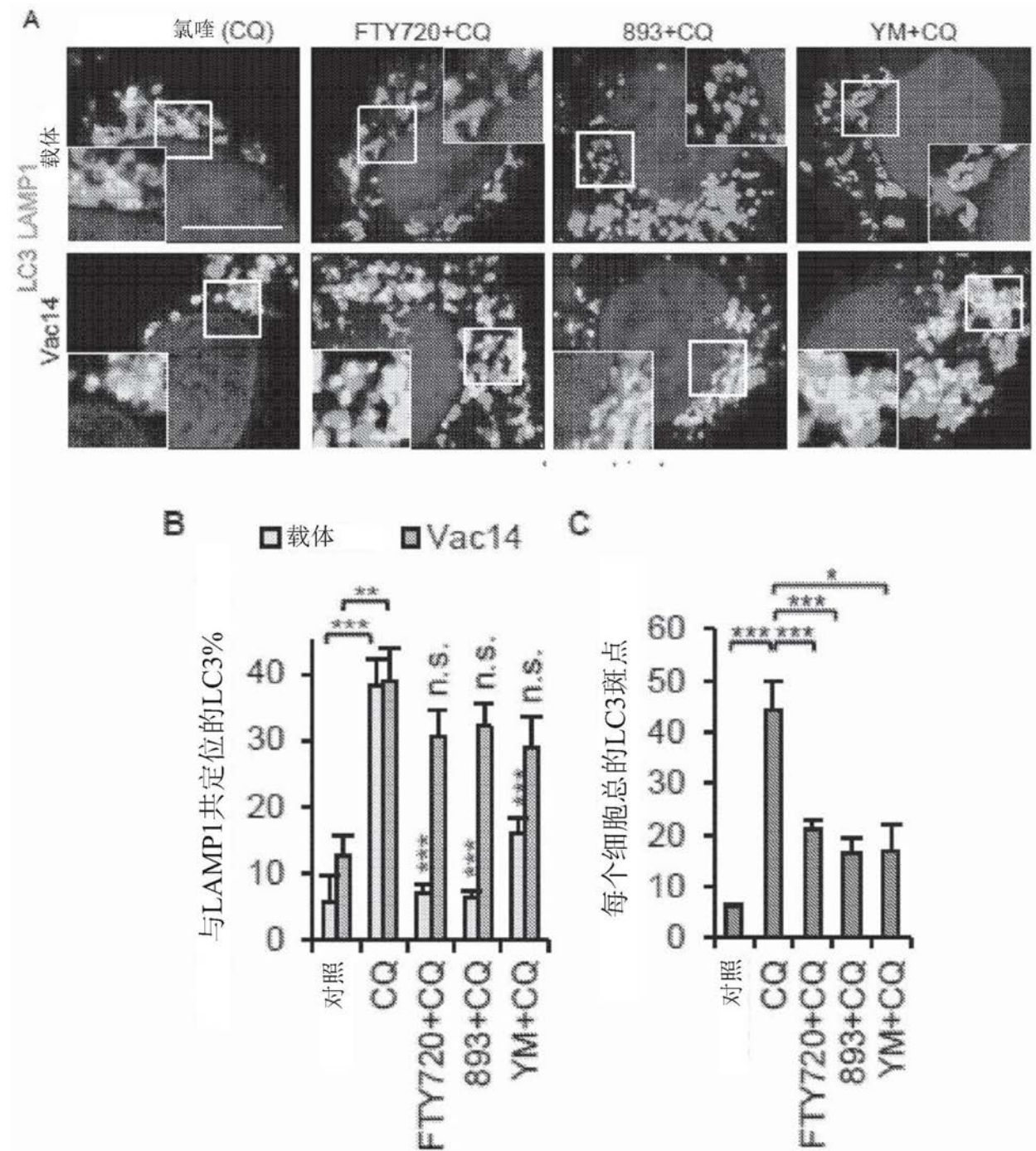
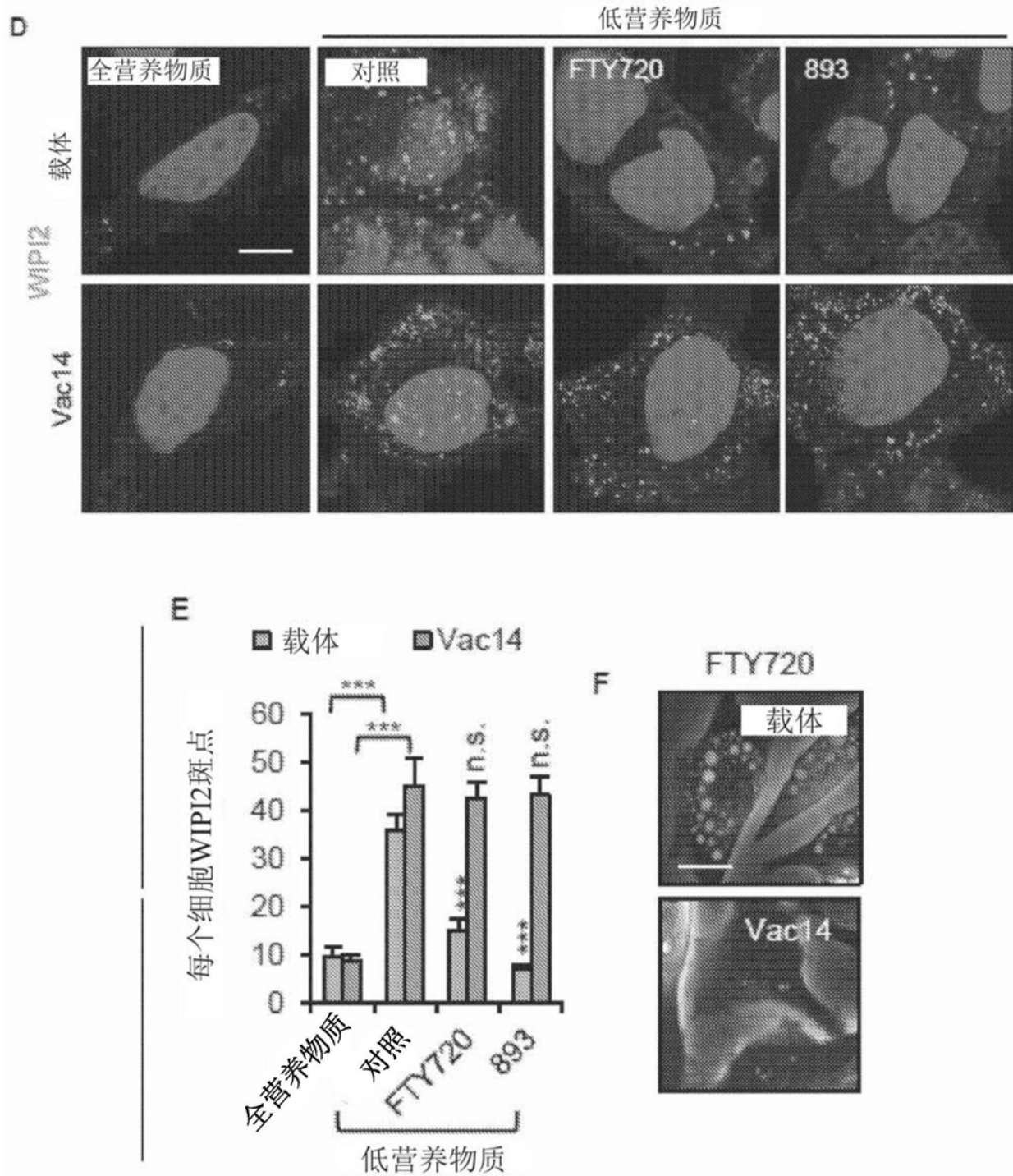


图60





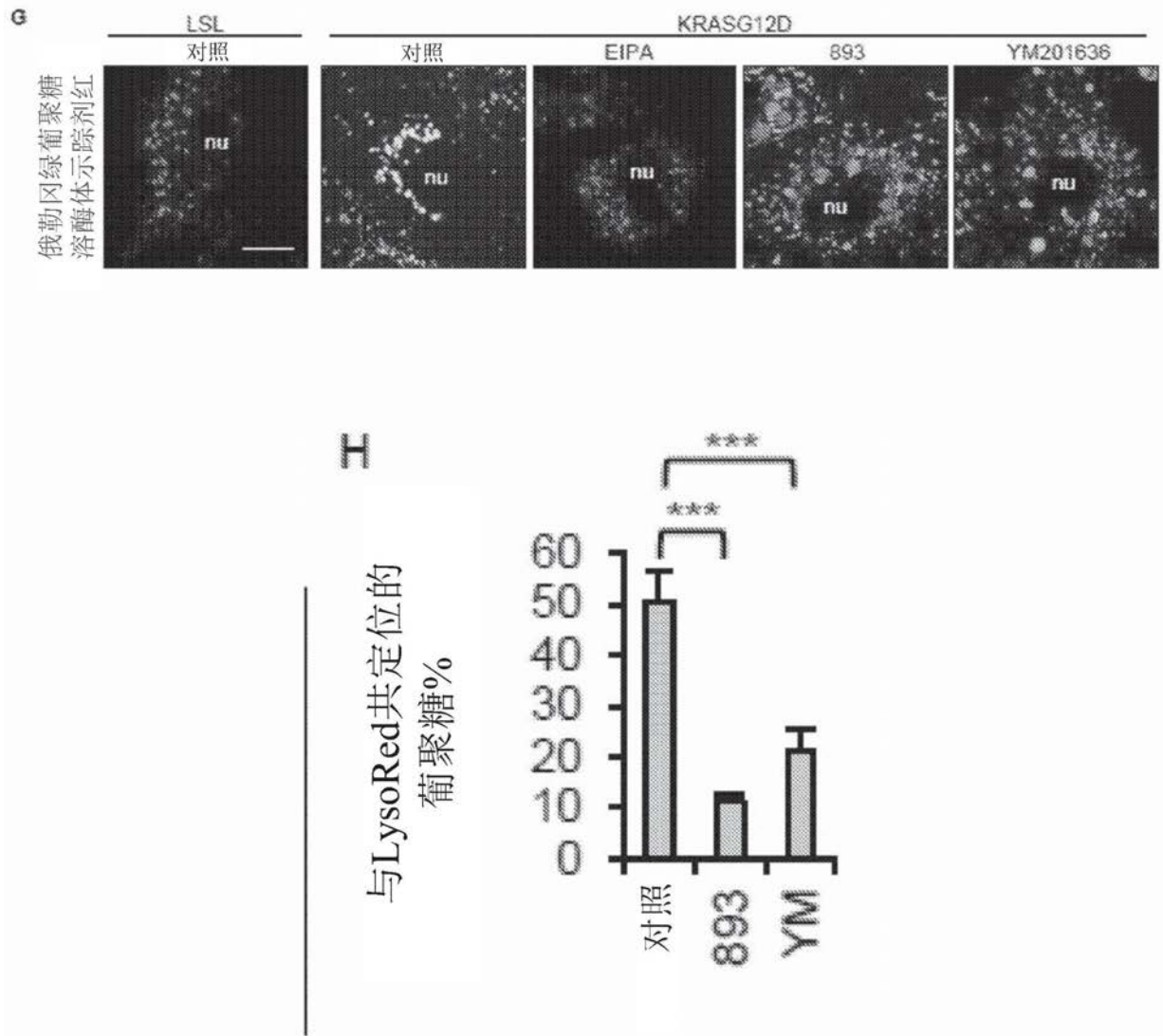


图61

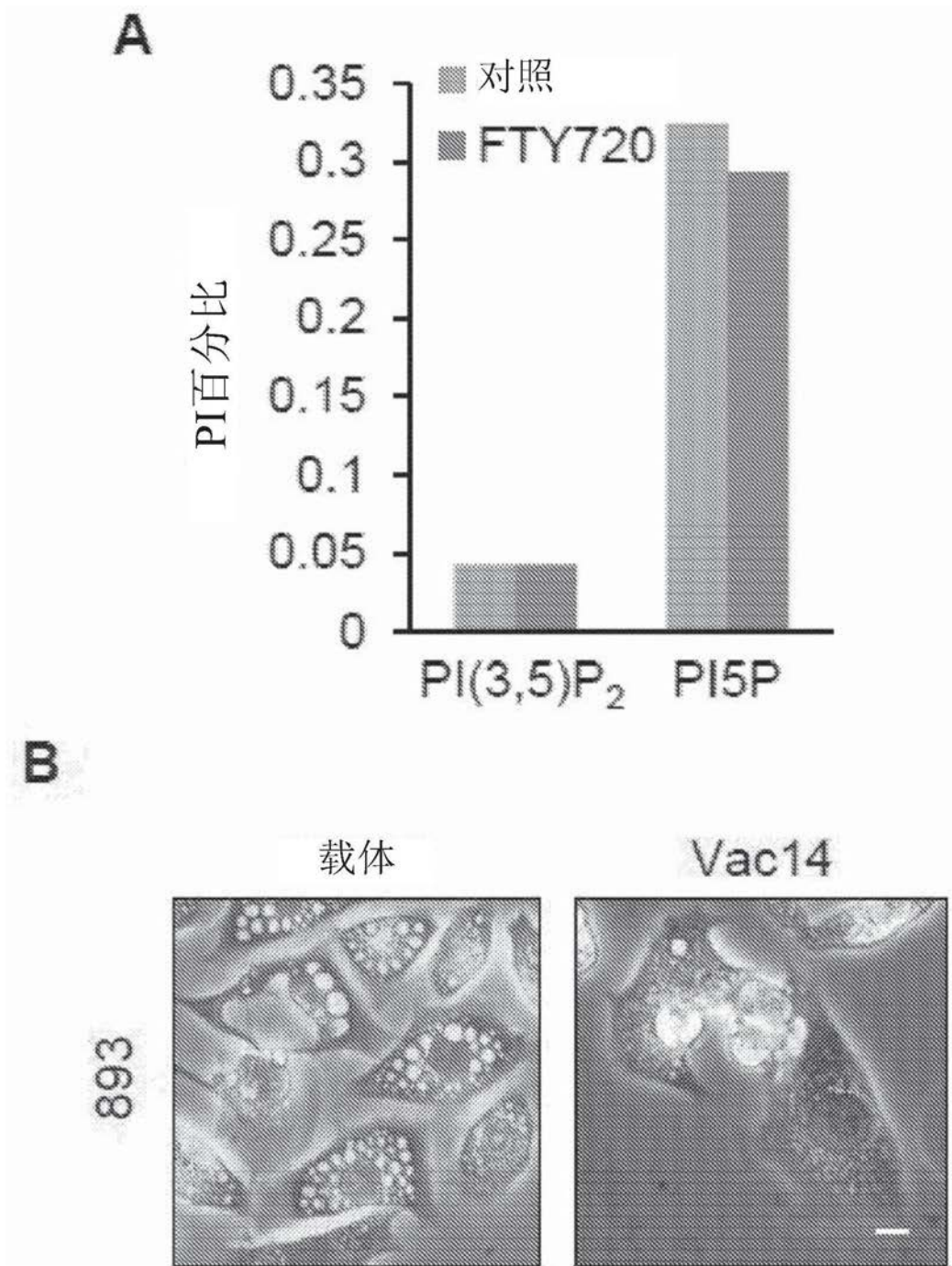
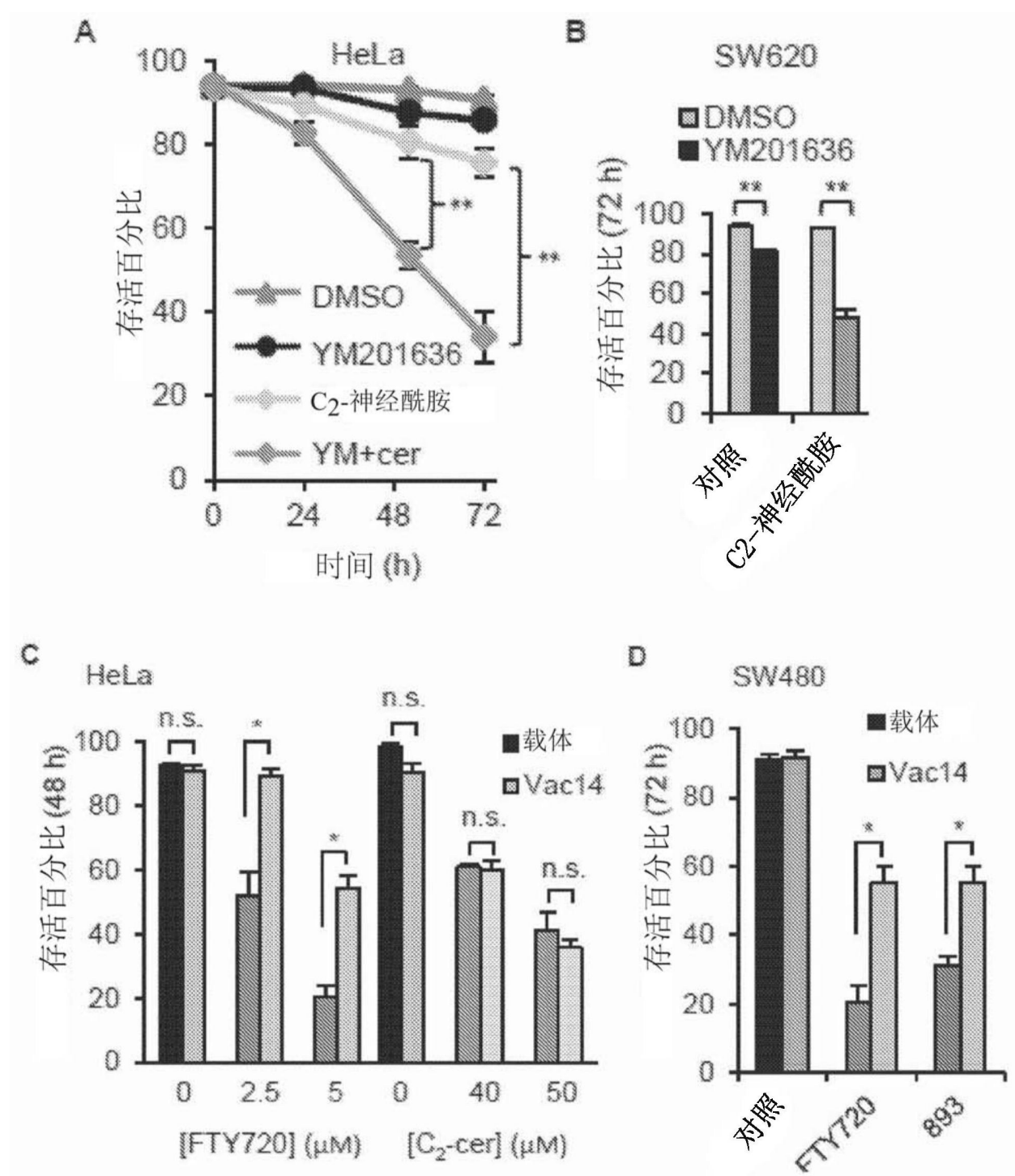


图62



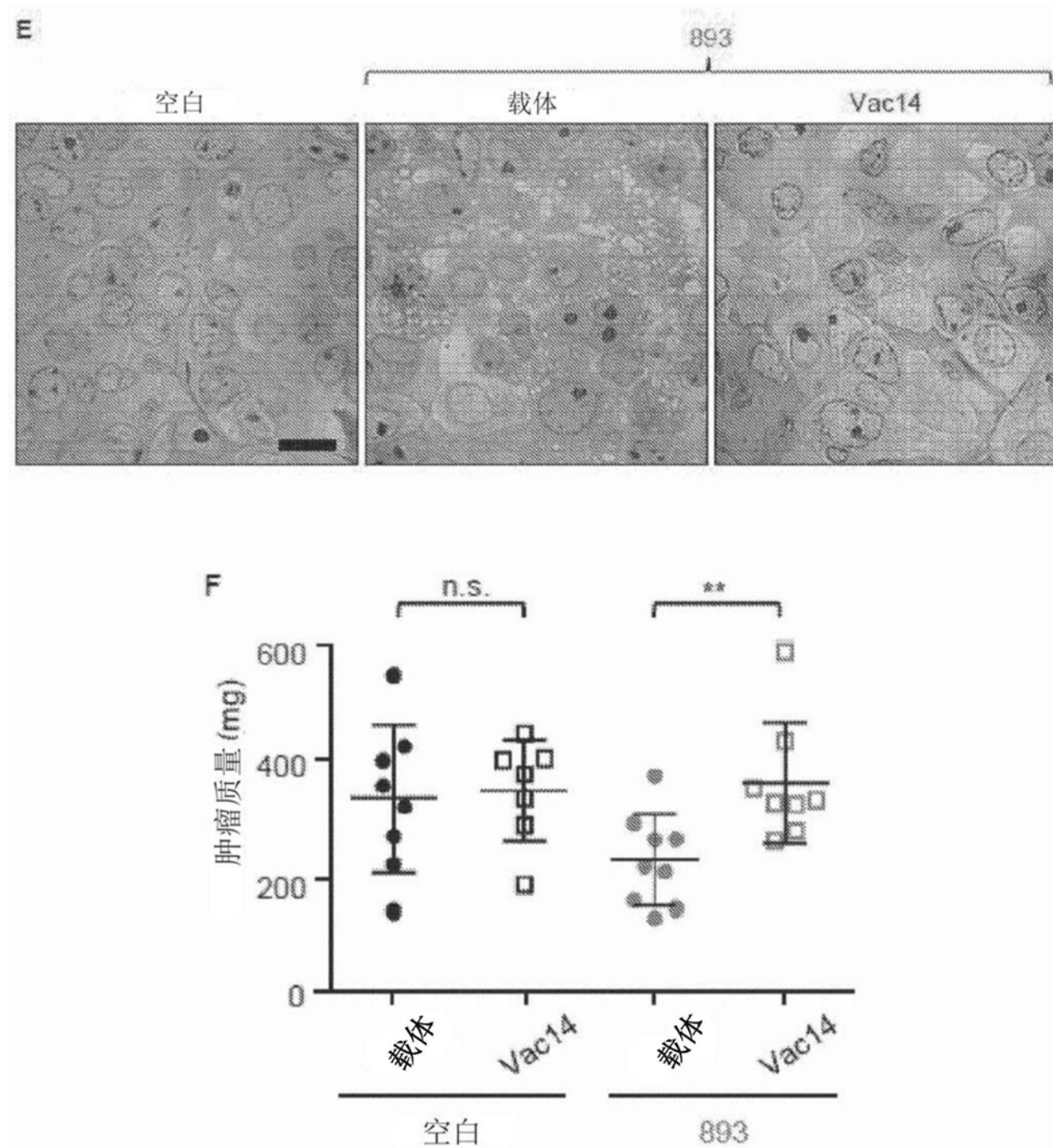


图63

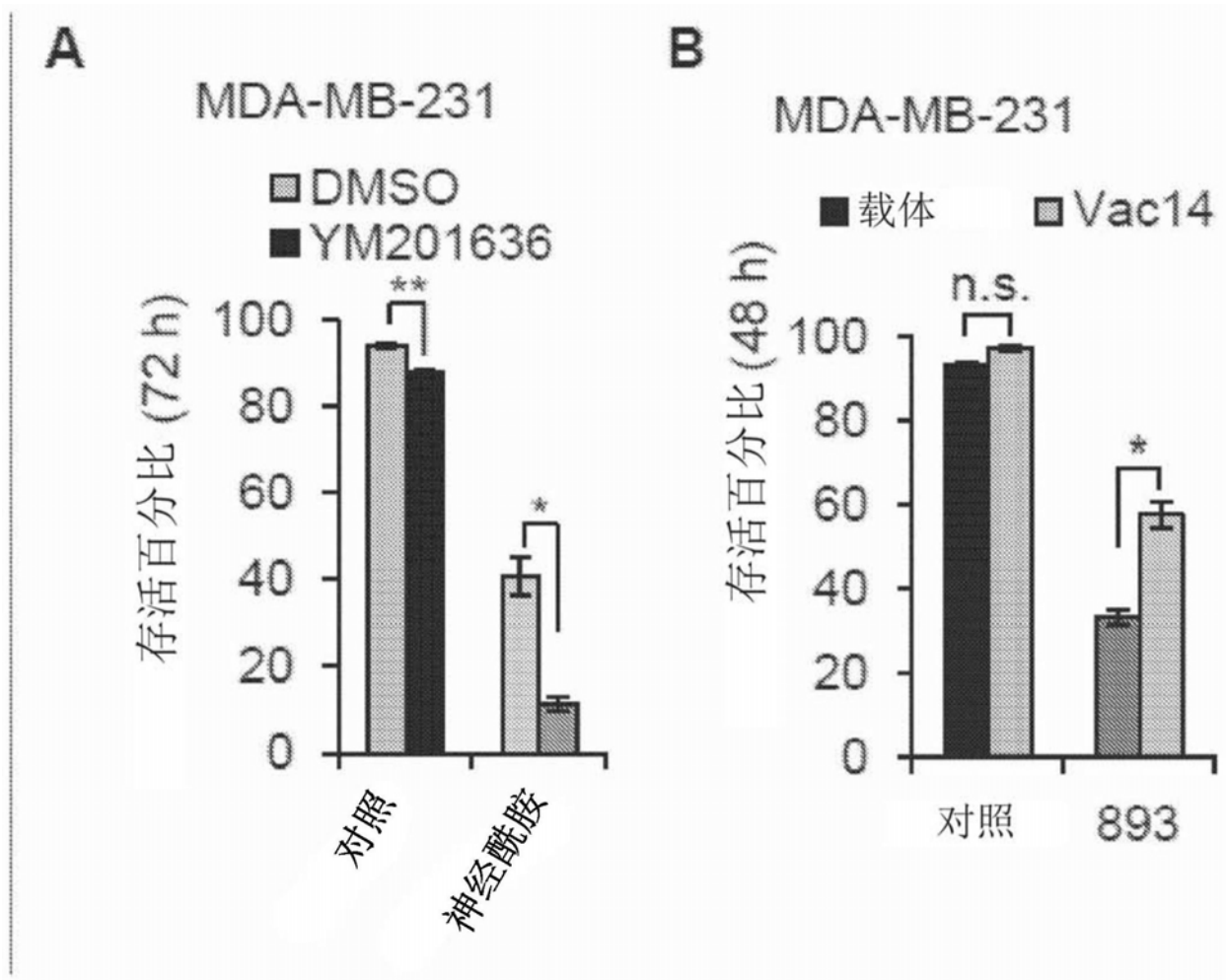
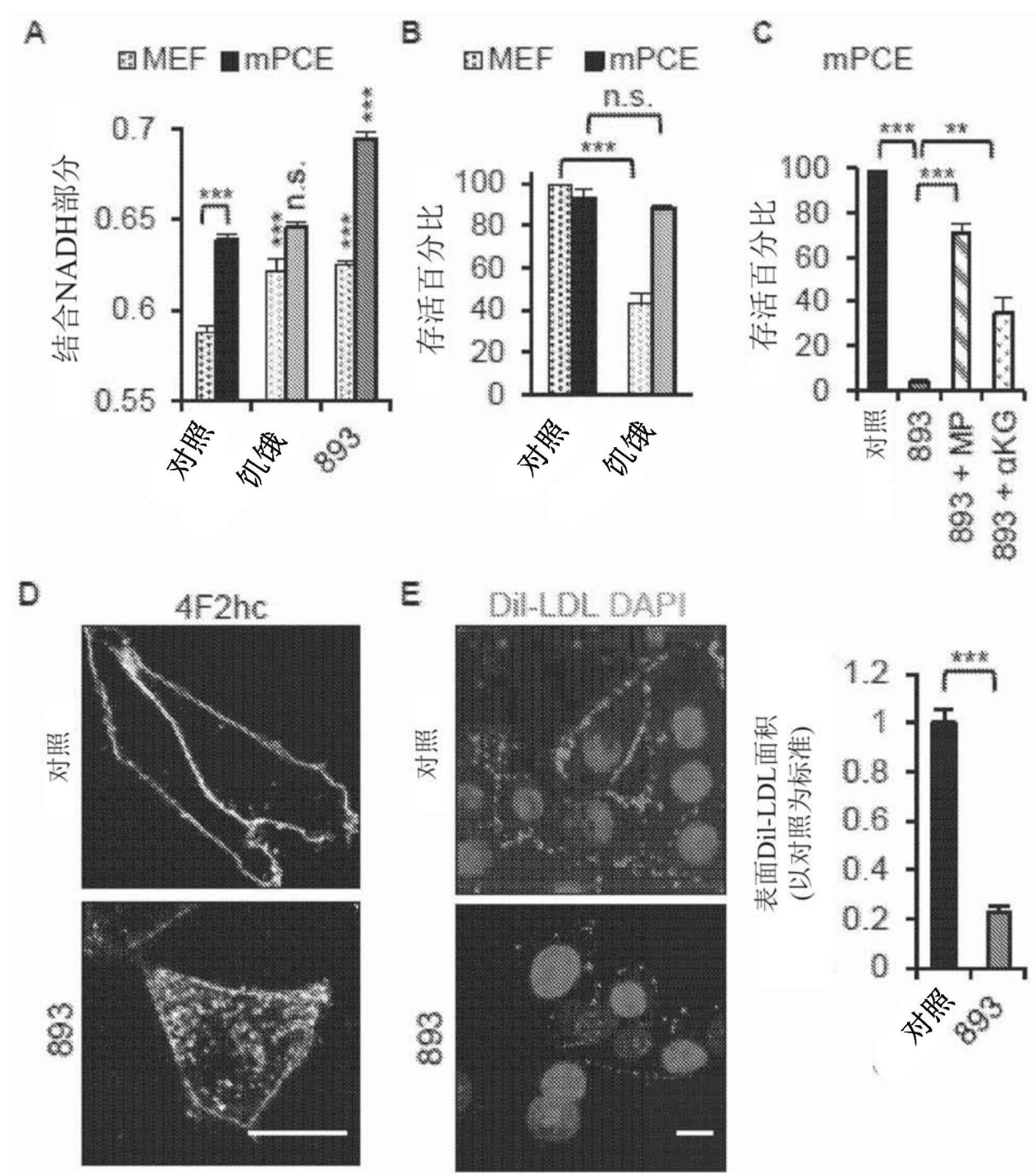
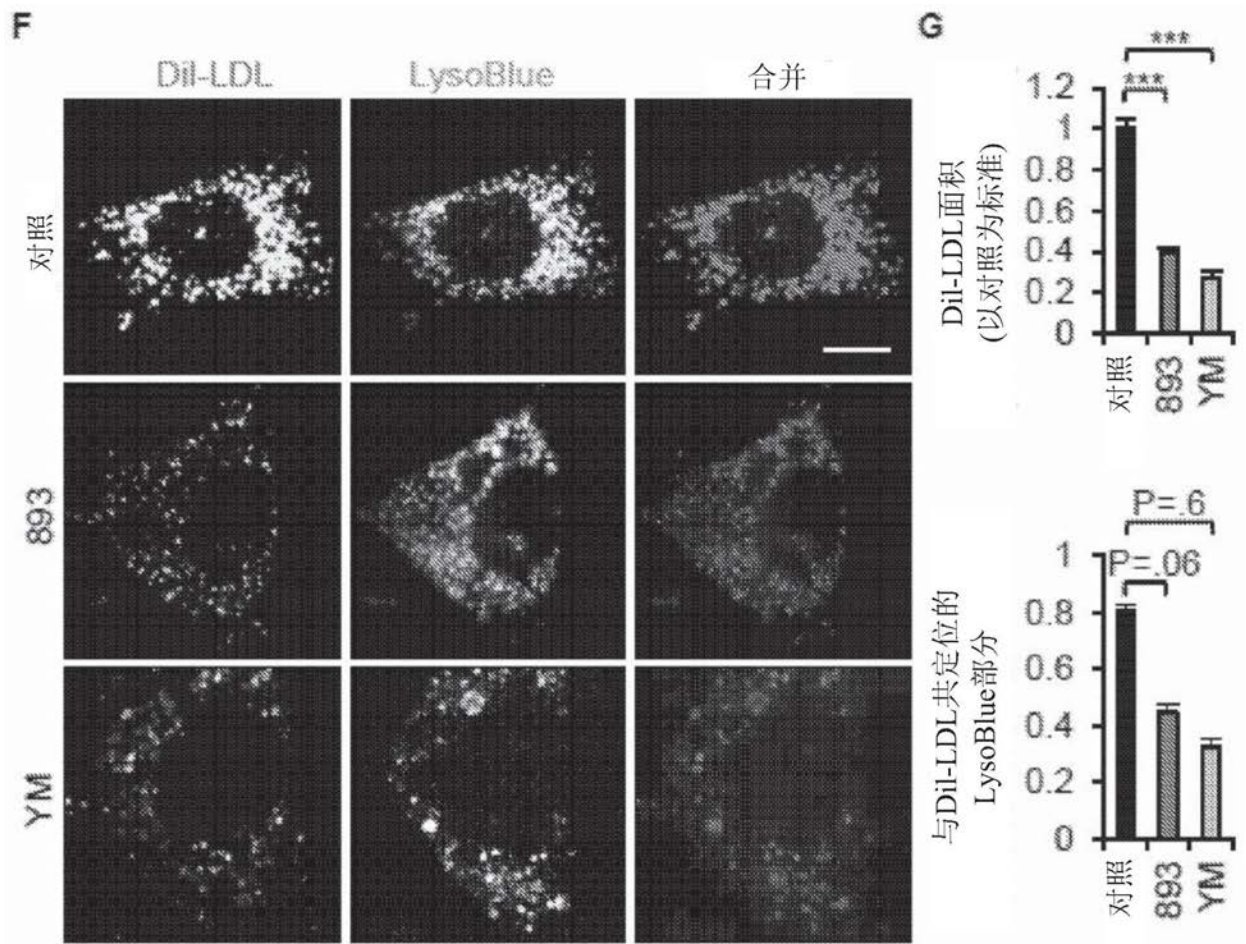


图64





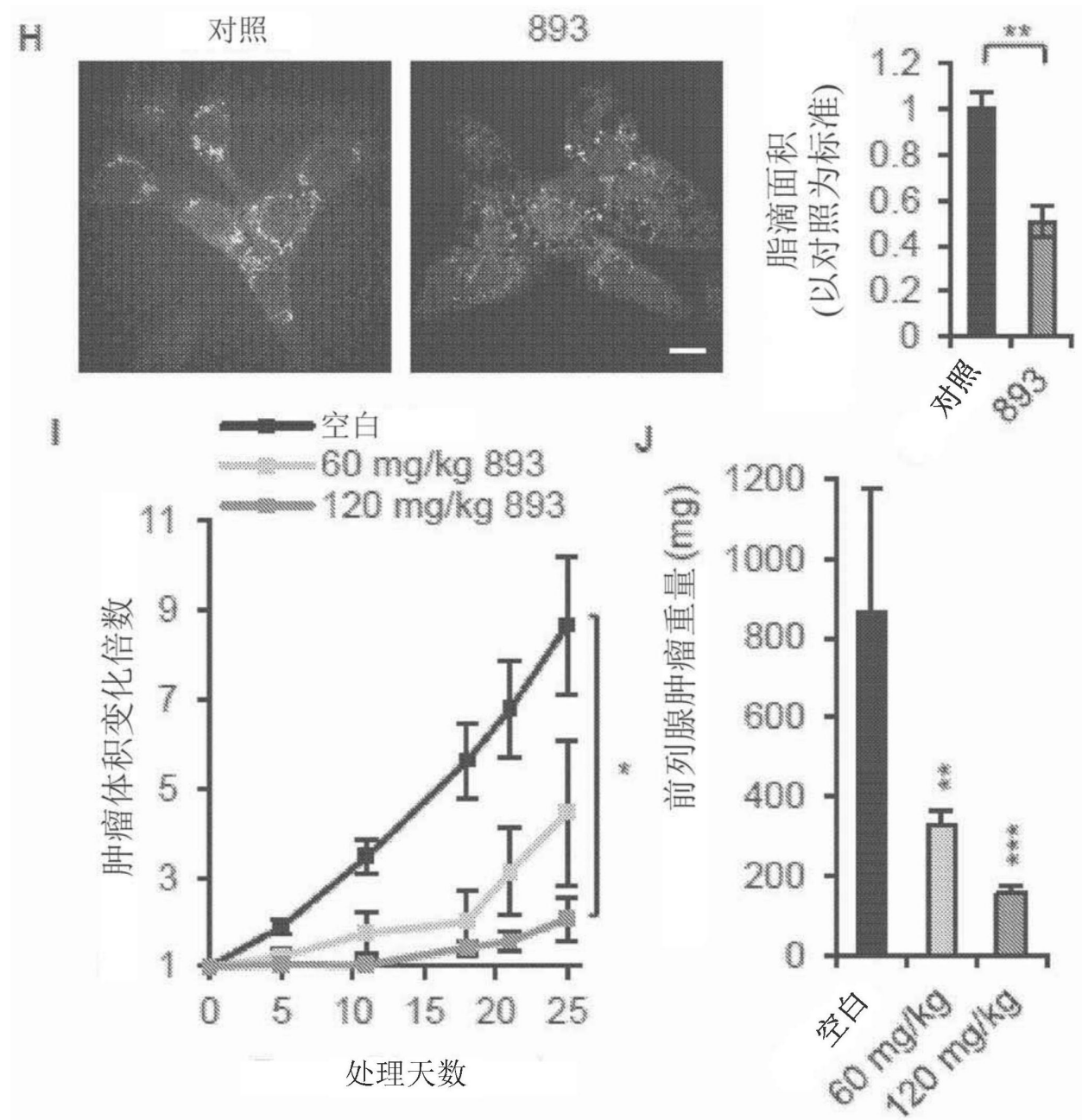
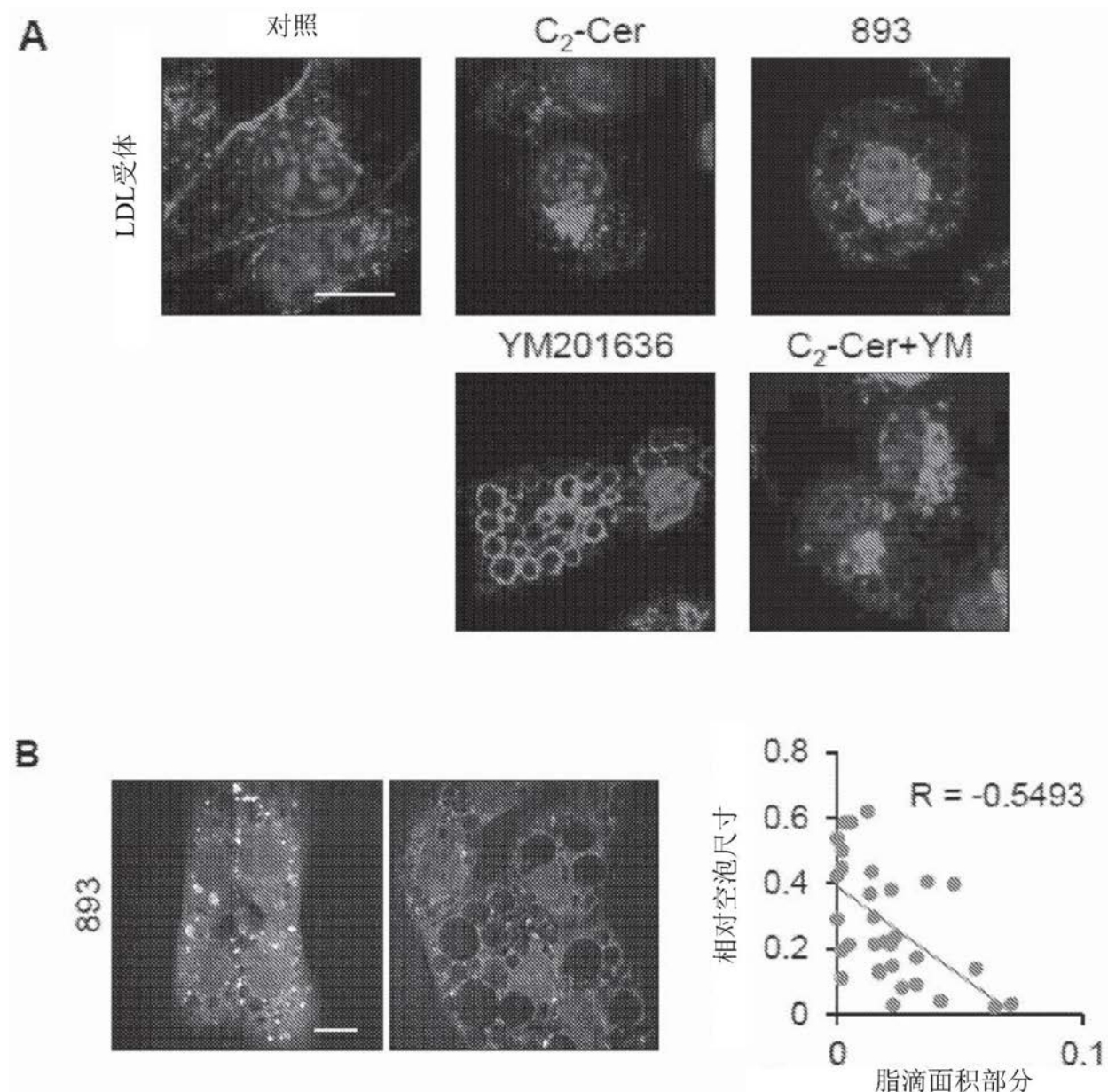
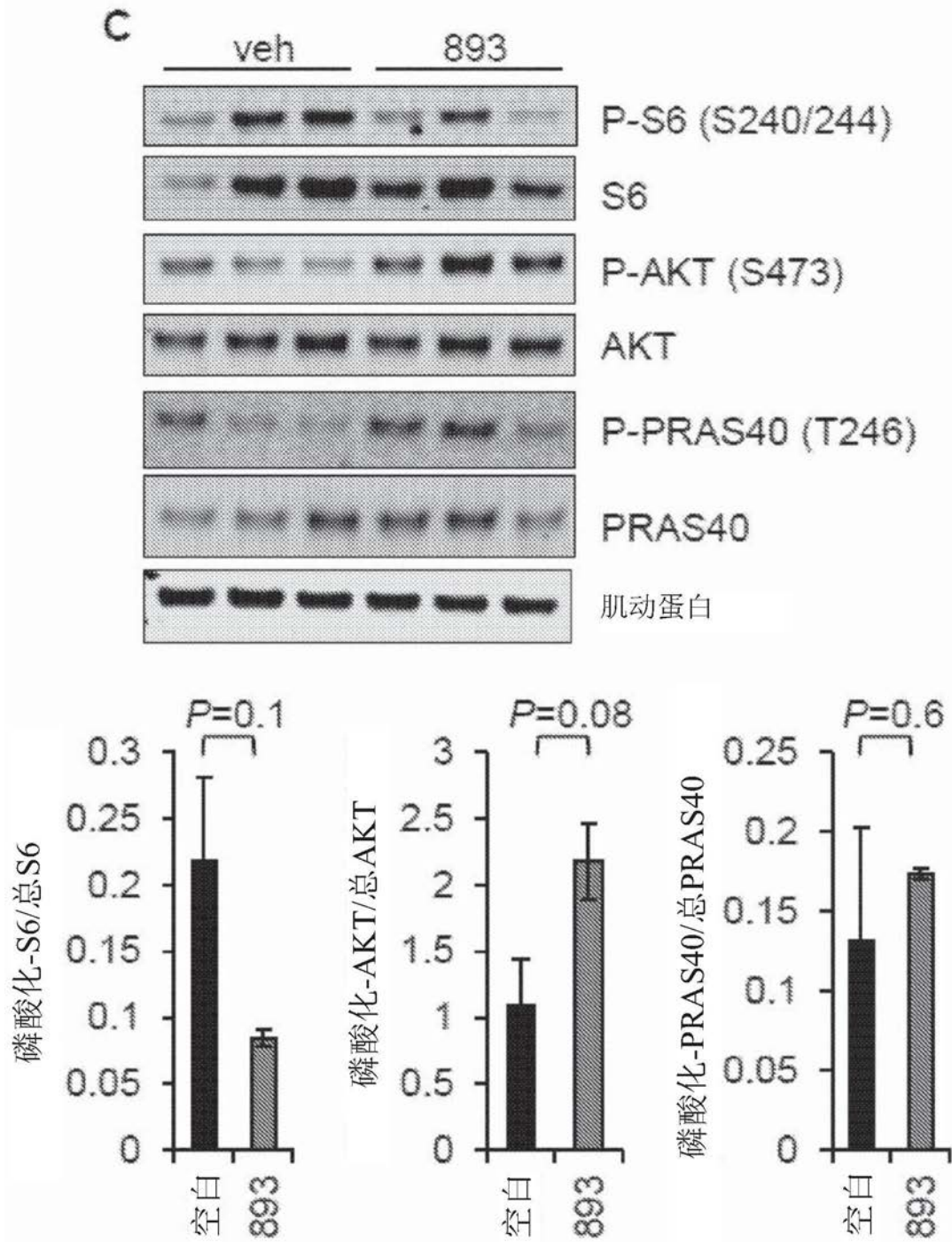


图65





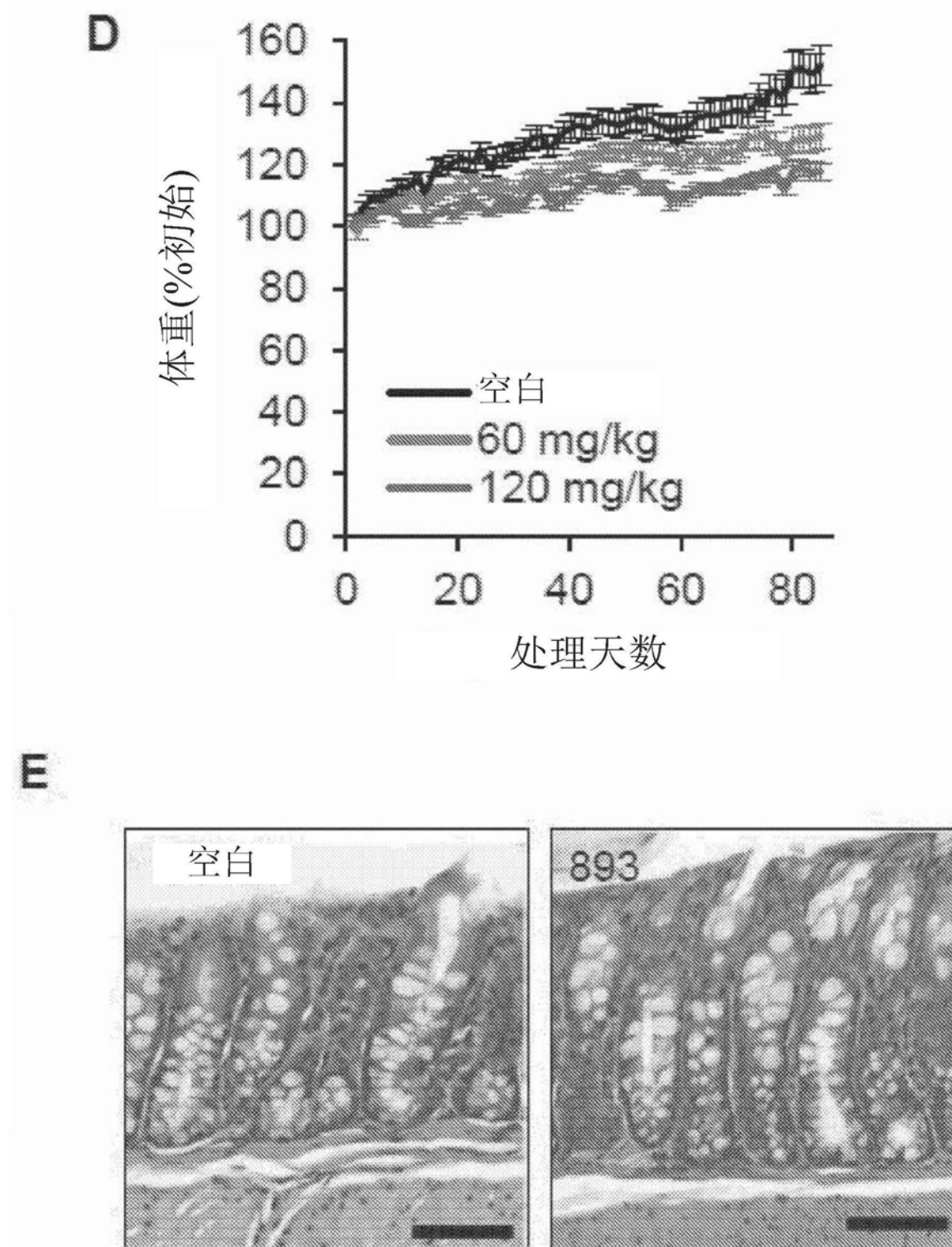
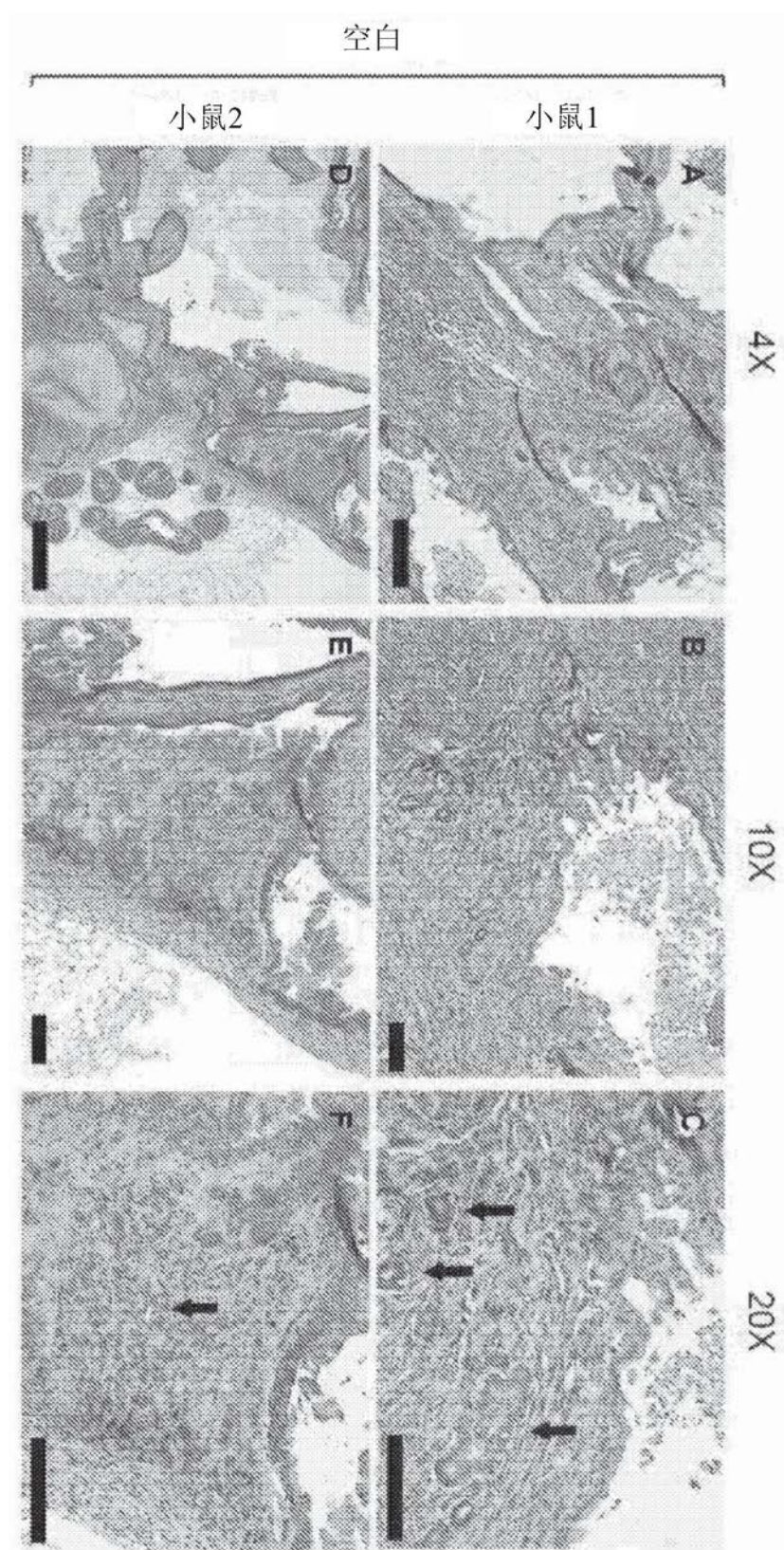


图66



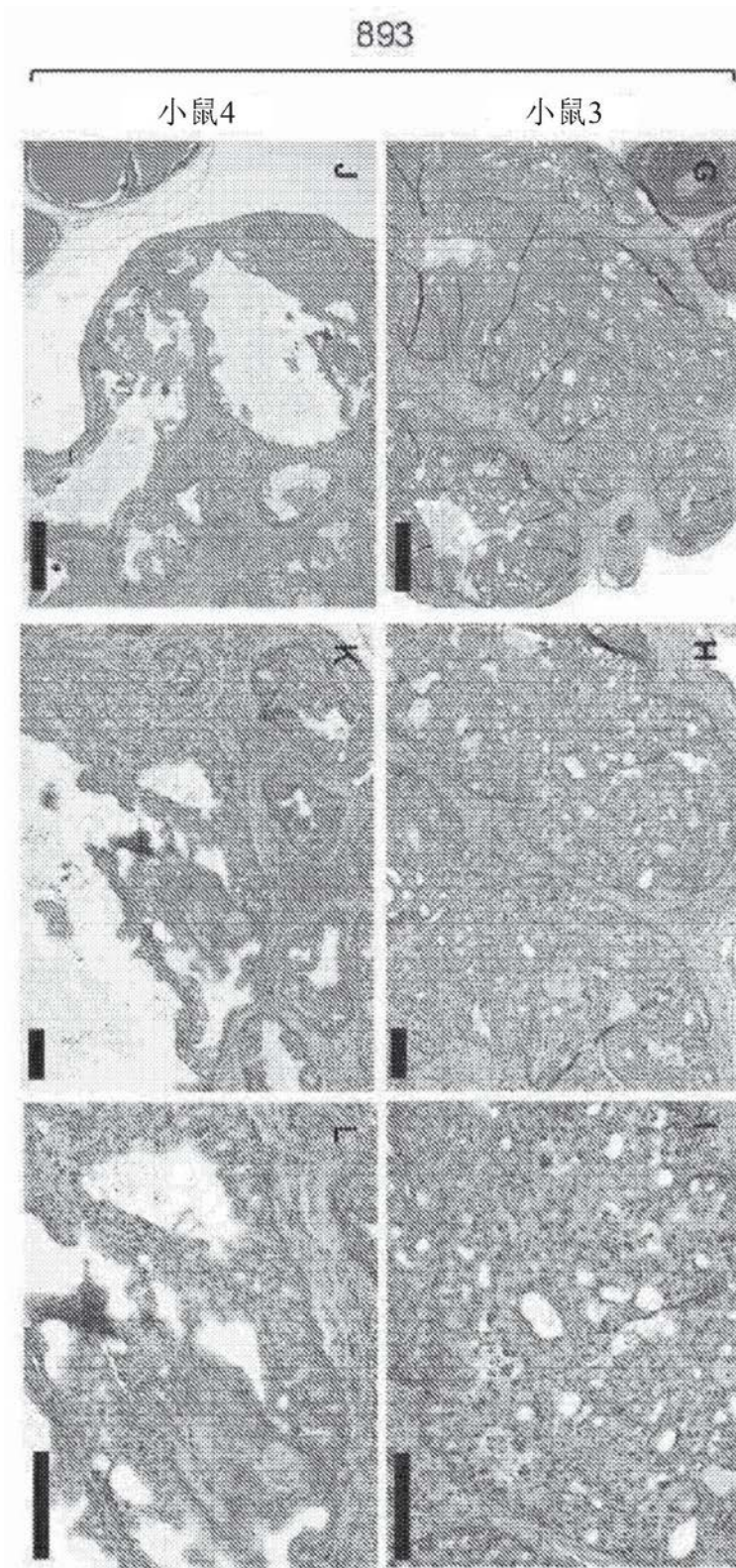


图67