



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106074368 B

(45)授权公告日 2019.01.22

(21)申请号 201610578370.2

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

(22)申请日 2013.03.14

利商标事务所 11038

(65)同一申请的已公布的文献号

代理人 徐达

申请公布号 CN 106074368 A

(51) Int.CI.

(43)申请公布日 2016.11.09

A61K 9/08(2006.01)

(30)优先权数据

A61K 9/19(2006.01)

61/617,073 2012.03.29 US

A61K 31/4709(2006.01)

(62)分案原申请数据

A61K 47/40(2006.01)

201380024610.9 2013.03.14

A61P 35/00(2006.01)

(73)专利权人 先进癌症治疗有限责任公司

A61P 35/02(2006.01)

地址 美国肯塔基

审查员 马冰

(72)发明人 P·钱德 G·H·塔博斯基

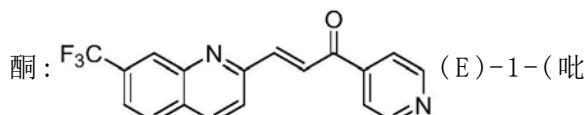
权利要求书1页 说明书18页 附图5页

(54)发明名称

PFKFB3抑制剂和用作抗癌治疗剂的方法

(57)摘要

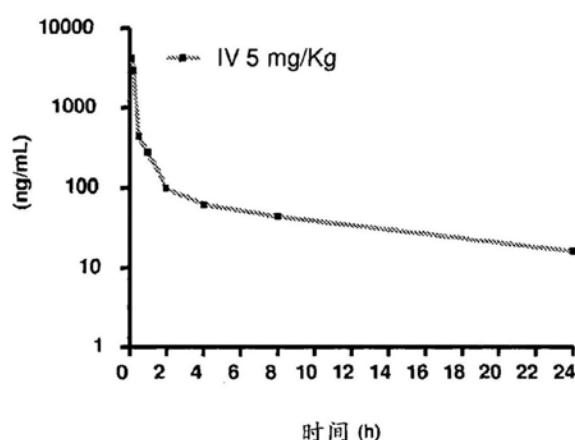
本文提供的是新化合物、(E)-1-(吡啶-4-基)-3-(7-(三氟甲基)喹啉-2-基)-丙-2-烯-1-



本文提供的是新化合物、(E)-1-(吡啶-4-基)-3-(7-(三氟甲基)喹啉-2-基)-丙-2-烯-1-酮是6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酶3(PFKFB3)的抑制剂，其具有令人意想不到地更好的体外和体内功效和药物动力学的性质。也提供的是，包含化合物的药物组合物和使用化合物在体内治疗癌和肿瘤，以及在细胞中抑制糖酵解流出和PFKFB3酶活性的方法。

时间与在BalbC小鼠中PFK-158的血浆浓度

(IV 给药， 5 mg/kg)



1. 药物组合物,包括:

(E)-1-(吡啶-4-基)-3-(7-(三氟甲基)喹啉-2-基)-丙-2-烯-1-酮或其药学上可接受的盐;和

环糊精。

2. 权利要求1的药物组合物,其中所述环糊精选自碘丁基醚- β -环糊精和羟丙基- β -环糊精。

3. 权利要求2的药物组合物,其中所述环糊精是碘丁基醚- β -环糊精。

4. 权利要求1的药物组合物,还包含甘露醇。

5. 权利要求1-4中任一项的药物组合物,其中所述药物组合物是水溶液或冻干物。

6. 含水药物组合物,包含:

(E)-1-(吡啶-4-基)-3-(7-(三氟甲基)喹啉-2-基)-丙-2-烯-1-酮或其药学上可接受的盐;和

碘丁基醚- β -环糊精。

7. 权利要求6的含水药物组合物,其中所述(E)-1-(吡啶-4-基)-3-(7-(三氟甲基)喹啉-2-基)-丙-2-烯-1-酮或其药学上可接受的盐具有5mg/ml的浓度。

8. 权利要求7的含水药物组合物,其中所述碘丁基醚- β -环糊精具有30%w/v的浓度。

9. 权利要求8的含水药物组合物,其中所述组合物具有3.5的pH。

10. 权利要求8的含水药物组合物,其中所述组合物具有3.0的pH。

11. 冻干的药物组合物,包含:

(E)-1-(吡啶-4-基)-3-(7-(三氟甲基)喹啉-2-基)-丙-2-烯-1-酮或其药学上可接受的盐;和

环糊精。

12. 权利要求11的冻干的药物组合物,其中所述环糊精选自碘丁基醚- β -环糊精和羟丙基- β -环糊精。

13. 权利要求12的冻干的药物组合物,其中所述环糊精是碘丁基醚- β -环糊精。

PFKFB3抑制剂和用作抗癌治疗剂的方法

[0001] 本申请是母案为中国发明专利申请201380024610.9的分案申请。

技术领域

[0002] 目前公开的主题涉及新抗癌试剂、(E)-1-(吡啶-4-基)-3-(7-(三氟甲基)喹啉-2-基)-丙-2-烯-1-酮，作为所为6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酶3(PFKFB3)的抑制剂和使用前述抑制剂以在哺乳动物、包括人类中治疗癌和肿瘤的方法。

背景技术

[0003] 糖酵解途径是十步骤系列反应，其在几乎所有生物中形成主要的代谢途径。通过糖酵解途径的流出是响应于细内和外胞情况而被调节的。不可逆的糖酵解反应是那些通过己糖激酶，磷酸果糖激酶，和丙酮酸激酶催化的。在代谢路径中，这类酶是用于控制的潜在的靶，和所有3种酶在糖酵解中用于这种目的。PFKFB酶(PFKFB 1-4)合成果糖-2,6-二磷酸(F2,6BP)，其激活6-磷酸果糖-1-激酶(PFK-1)，在糖酵解途径中的必需控制点。

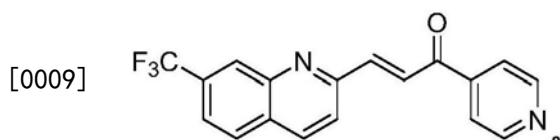
[0004] 肿瘤细胞优选使用糖酵解以满足它们对能量和生物合成前体的增加的需求。恶性的肿瘤细胞具有糖酵解速率，其是比它们正常的组织的起源的那些糖酵解速率高至多200倍。一种癌攻击策略已经是通过多种方法使饥饿癌细胞以治疗癌。减少或阻断癌细胞中存在的增强糖酵解流出原理已经刺激了最近的兴趣。

[0005] 尽管在癌的诊断和治疗中存在更大理解和药物进展，依然估计的是，去年几乎13%的所有人死亡是由于癌。因此，仍然存在对于安全的和有效抗癌治疗的需要，具体地是那些通过原理例如糖酵解流出(其是在癌细胞中过表达的)靶向肿瘤细胞的治疗。

发明概述

[0007] 本文提供的是PFKFB3抑制剂，其如与先前描述的喹啉基-丙烯酮衍生物相比，已经显示了无法预见地更好的体外性质，体内药物动力学性质，体内耐受性和安全性数据，和肿瘤生长的体内抑制。

[0008] 在一个实施方案中，用于治疗癌的化合物被提供，其由(E)-1-(吡啶-4-基)-3-(7-(三氟甲基)喹啉-2-基)-丙-2-烯-1-酮，或其药学上可接受的盐组成，具有下式：



[0010] 在另一个实施方案中，用于治疗癌的药物组合物被提供，药物组合物包括：

[0011] (a) 有效量的(E)-1-(吡啶-4-基)-3-(7-(三氟甲基)喹啉-2-基)-丙-2-烯-1-酮或其药学上可接受的盐；和

[0012] (b) 至少一种药学上可接受的载体。

[0013] 在另一个实施方案中，治疗癌的方法被提供，方法包括给予需要其的受试者有效量的(E)-1-(吡啶-4-基)-3-(7-(三氟甲基)喹啉-2-基)-丙-2-烯-1-酮或其药学上可接受的盐。

[0014] 在另一个实施方案中,治疗肿瘤的方法被提供,方法包括给予需要其的受试者有效量的(E)-1-(吡啶-4-基)-3-(7-(三氟甲基)喹啉-2-基)-丙-2-烯-1-酮或其药学上可接受的盐。

[0015] 在依然另一个实施方案中,在细胞中抑制糖酵解流出的方法被提供,方法包括使细胞接触有效量的(E)-1-(吡啶-4-基)-3-(7-(三氟甲基)喹啉-2-基)-丙-2-烯-1-酮或其药学上可接受的盐。

[0016] 在另一个实施方案中,在细胞中抑制PFKFB3的酶活性的方法被提供,方法包括使细胞接触有效量的(E)-1-(吡啶-4-基)-3-(7-(三氟甲基)喹啉-2-基)-丙-2-烯-1-酮或其药学上可接受的盐。

[0017] 这些和其它目的,特征,实施方案,和优势对于那些阅读详述说明之后的本领域普通技术人员将是变得明显的。本文所有百分比,比和比率是以重量计,除非另有说明。所有温度是以摄氏度(°C)计,除非另有说明。

[0018] 附图的简要说明

[0019] 图1显示PFKFB3的酶活性的抑制与PFK-158的浓度(ADP-Glo™测试)。

[0020] 图2显示通过Jurkat细胞的¹⁴C 2脱氧葡萄糖摄取的抑制与PFK-158的浓度。

[0021] 图3显示通过F2,6BP水平的测量的在Jurkat细胞中PFKFB3酶活性的抑制与PFK-158的浓度。

[0022] 图4显示时间与在BalbC小鼠中PFK-158的血浆浓度药物动力学特征(IV给药,5mg/kg)。

[0023] 图5显示时间与在SD大鼠中PFK-158的血浆浓度药物动力学特征(IV给药,30mg/kg)。

[0024] 图6显示,在Lewis肺癌模型中对照和治疗组的平均肿瘤体积作为时间的函数(LLC)。

[0025] 图7显示,在CT-26鼠结肠癌同系模型中对照和治疗组的平均肿瘤体积作为时间的函数。

[0026] 图8显示,在Bx-PC3胰腺癌异种移植物模型中对照和治疗组的平均肿瘤体积作为时间的函数。

[0027] 实施方案的说明

[0028] 目前-公开的主题的一个或多个实施方案细节是在本文件中被举出的。描述于本文件的实施方案的修改,和其它实施方案,对于那些在研究提供在本文件中的信息之后的本领域普通技术人员将是明显的。

[0029] 尽管下列术语被认为是由本领域普通技术人员良好理解,定义是被举出的以方便解释目前公开的主题。

[0030] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与由目前描述的主题所属领域普通技术人员所通常理解的相同的含意。

[0031] 按照常设专利法条约,当用于本申请,包括权利要求时,术语“一,”“一个,”和“所述”意指“一个或更多个”。因此,例如,提及“一个细胞”包括的多个这种细胞,等。

[0032] 除非另有说明,用于申请文件和权利要求的表达成分的量,性质例如反应条件等的所有数量应是理解为在所有情况下是被术语“约”修饰的。因此,除非相反指明,在本申请

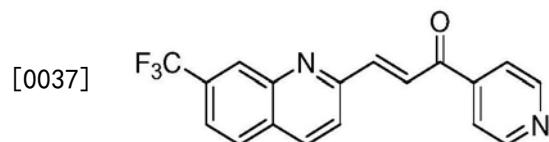
文件和权利要求中举出的数字的参数是近似值,其可以变化,这取决于通过目前-公开的主题应得到的所需的性质。

[0033] 如本文使用的术语“癌”意指由以下导致的疾病:不受控制的细胞分裂,和细胞转移,或在其他位置建立新的生长的能力。术语“恶性的,”“恶性肿瘤,”“新生物、”“肿瘤、”和其变体意指癌细胞或多组癌细胞。

[0034] 如本文使用的术语“抗癌试剂、”“抗癌化合物、”“抗肿瘤化合物、”“抗肿瘤试剂、”“抗癌治疗剂”和其变体意指化合物,其可以预防癌细胞和肿瘤的增殖或杀死癌细胞。

[0035] 特异性类型的癌包括,但是不限于,多形性成胶质细胞瘤,皮肤癌,结缔组织癌,脂肪癌,乳腺癌,肺癌,胃癌,胰腺癌,卵巢和生殖器官癌,子宫颈癌,子宫癌,肛门生殖器癌,肾癌,膀胱癌,肝癌,结直肠或结肠癌和消化(GI)道癌,前列腺癌和生殖器官癌,中枢神经系统(CNS)癌,视网膜癌,血癌,和淋巴样癌,和头颈癌。

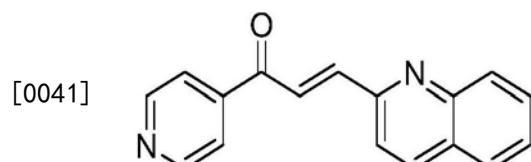
[0036] 6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酶3,或PFKFB3,是用于发展抗癌治疗的分子靶标。现在已经被发现的是,PFKFB3抑制剂(E)-1-(吡啶-4-基)-3-(7-(三氟甲基)喹啉-2-基)-丙-2-烯-1-酮具有与先前描述的喹啉基-丙烯酮相比无法预见地更好的性质。



[0038] (E)-1-(吡啶-4-基)-3-(7-(三氟甲基)喹啉-2-基)-丙-2-烯-1-酮(PFK-158)

[0039] (E)-1-(吡啶-4-基)-3-(7-(三氟甲基)喹啉-2-基)-丙-2-烯-1-酮,也在本文可替换地被提及为PFK-158,显示针对靶蛋白质PFKFB3和癌细胞的无法预见的更好体外功效,和更好的药物动力学,安全性,和在肿瘤抑制中的体内功效。

[0040] 1-吡啶-3-基-3-喹啉-3-基-丙烯酮已经在Chesney等人的2012年1月3日发布的美国专利号8,088,385中公开,这种化合物、也称为PFK-015,具有在肿瘤治疗小鼠研究中显示的功效。



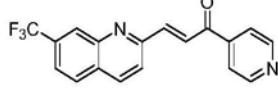
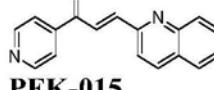
[0042] 1-吡啶-3-基-3-喹啉-3-基-丙烯酮(PFK-015)

[0043] PFK-158与PFK-015的不同在于喹啉环的7位引入三氟甲基取代基。但的,PFK-015药物性质,例如在通常被认为对于胃肠外的施用至癌患者而言是安全的药物溶剂中的溶解度和稳定性,使得化合物不适于在治疗癌患者中使用。

[0044] 研究暗示,尽管与PFK-015相比具有结构类似性,立即公开的化合物显示令人意想不到地更好的体外性质,体内药物动力学性质,体内耐受性和安全性性质,和体内抑制肿瘤生长。总的说来,这些无法预见的更好的性质表明,PFK-158是癌和自身免疫疾病的相对安全的和有效治疗。

[0045] 比较PFK-158与PFK-015的体外数据显示,PFK-158显示在抑制PFKFB3种酶活性,抑制2脱氧葡萄糖摄取,和体外杀死癌细胞中更好的能力。参见下文表1。

[0046] 表1:用于PFK-158与PFK-015的比较IC₅₀数据

化合物	IC_{50} , PFKFB3 的 酶活性, ADP Glo™ 测试 ¹	IC_{50} , 在细 胞 中 PFKFB3 的酶活性 ²	IC_{50} , 2 脱氧 葡萄糖摄取 的抑制 ³	IC_{50} , Jurkat 细 胞系 (白血 病细胞系) 的毒性 ⁴
 PFK-158	137+15 nM	1.6+0.8 μM	0.8+0.1 μM	0.33+0.1 μM
		318+19 nM	4.7+1.6 μM	1.2+0.1 μM

[0047] [0048] ¹使用市售的ADP Glo™测试试剂盒(Promega, Madison, WI)测定的

[0049] [0049] ²通过根据Van Schaftingen的方法(Eur. J. Biochem. 129:191 (1982))测量果糖-2,6-二磷酸水平,在细胞中测量PFKFB3抑制。实验条件参见实施例2。

[0050] [0050] ³在细胞中抑制PFKFB3导致抑制通过细胞的葡萄糖摄取。测试被发展以测定抑制细胞的摄取的浓度。实验性细节参见实施例2。

[0051] [0051] ⁴实验性细节参见实施例1。

[0052] [0052] 表1结果显示,令人意想不到地,当与结构类似的PFK-015相比时,本发明的化合物显示2倍或几乎2倍更好的功效。

[0053] [0053] 此外,PFK-158也显示无法预见的和更好的药物动力学性质。如在表2中所显示,在Balbc小鼠中得到的本发明化合物的关键药物动力学参数,例如 $T_{1/2}$ (半衰期), C_{max} (最大浓度),AUC(在曲线下面积),或Cl(清除率)显示,与在相同的浓度施用的(IV给药)PFK-015相比,PFK-158显示无法预见的和更好的药物动力学。与PFK-015相比,PFK-158显示更高 C_{max} 和AUC,更长半衰期,和更低清除率。

[0054] [0054] 表2:药物动力学参数

[0055]

化合物	$T_{1/2}$ (hr)	C_{max} (ng/ml)	$AUC_{0-\infty}$ (ng.h/mL)	Cl (mL/min/kg)
-----	-------------------	----------------------	-------------------------------	-------------------

[0056]

1-(吡啶-4-基)-3-(7-(三氟甲基) 喹啉-2-基) 丙-2-烯 1-酮(PFK-158)	10.5	4176	3235	26
1-吡啶-4-基-3-(喹啉-2-基)-丙烯酮(PFK-015)	5.0	3053	1804	46

[0057] [0057] 此外,所述上述化合物在人肝微粒体中的体外稳定性作为时间的函数,显示本发明的化合物是无法预见地和显著地更稳定的(在稳定性中接近2倍改善)。参见下文表3。

[0058] [0058] 表3:在人肝微粒体中在1hr之后代谢的百分比

化合物	在 1 hr 之后代谢的百分比
1-(吡啶-4-基)-3-(7-(三氟甲基) 喹啉-2-基) 丙-2-烯 1-酮(PFK-158)	37%
1-吡啶-4-基-3-(喹啉-2-基)-丙烯酮(PFK-015)	67%

[0060] 若干最大耐受的剂量研究和毒理学研究被实施,并且结果指明了 PFK-158 是比 PFK-015 更安全的。研究在 C57/B16 小鼠和 SD 大鼠中被实施。通过在使用 3 天实施 / 3 天停止计划表的研究期间的优于 10% 体重丧失或动物死亡测定最大耐受的剂量 (MTDs)。对于 PFK-158, MTD 没有被达到,并且因此是定义为 >45 mg/kg, 而 PFK-015 的 MTD 在 30 mg/kg 是显著更低的。参见下文表 4。

[0061] 表 4: 最大耐受的剂量 (MTD)

化合物	MTD
1-(吡啶-4-基)-3-(7-(三氟甲基) 喹啉-2-基) 丙-2-烯 1-酮(PFK-158)	没有达到, >45 mg/kg
1-吡啶-4-基-3-(喹啉-2-基)-丙烯酮(PFK-015)	30 mg/kg

[0063] 使用重复给药计划表,在 SD 大鼠中实施毒理学研究,比较 PFK-158 和 PFK-015。在范围是从 5 至 30 mg/kg 的剂量水平实施研究,和监测动物的重量丧失,行为,临床迹象,和临床化学。在研究结束时,大体病理学和组织病理学被实施。任何实施的测定中不存在关于 PFK-158 的不良观察,这表明, PFK-158 是非常良好耐受的,和 MTD 将是高于 30 mg/kg。PFK-015 的相同的研究在 2 个剂量水平 (12 和 25 mg/kg) 被实施,和在两个剂量水平的不良观察包括体重丧失,减少食物消耗,临床嗜睡,白细胞、淋巴细胞和嗜中性粒细胞计数中的增加,肉眼和显微镜发现,临床病理学发现,和死亡。基于这些结果, PFK-015 的 MTD 在大鼠中被测定为是 12 mg/kg。在两种化合物之间 MTD 值中的不同是无法预见的,和根据药物动力学特征是无法预见的。毒理学研究表明 PFK-158 是比结构类似的 PFK-015 显著更安全的。

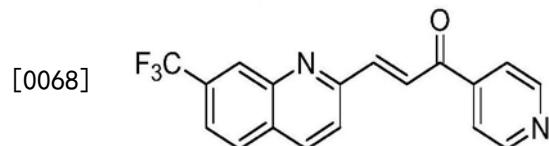
[0064] 在小鼠癌模型中被实施的是测定 PFK-158 抑制肿瘤生长的功效的研究。采用单独的和与目前用于治疗癌患者的化合物组合的 PFK-158 进行这些研究。研究在肺癌模型,胰腺癌模型中,和在结肠癌模型中被实施。在各种情况中,本发明的化合物显示显著活性,其具有范围是从 50% 至 70% 的肿瘤生长抑制、与用于那些研究的对照相当的抗肿瘤活性(临床使用的以治疗这些肿瘤类型的化疗药剂例如紫杉醇,吉西他滨,和伊立替康(irinotecan),没有令人注目的体重丧失或死亡(参见实施例 4 和 图 6-8))。用 PFK-015 治疗的动物显示类似活性但是治疗不是良好耐受的,因为体重丧失高于 15% 被观察到,同时观察到其它临床观察,其表明不良副作用。PFK-158 是比结构类似的 PFK-015 更好耐受的和更安全的。这种耐受性益处是显著的,因为它允许不同的抗癌化合物的组合以增加肿瘤生长抑制,没有增加致命的副作用,所述副作用最小化这类组合的益处。

[0065] 另外, PFK-158 的溶解度性质使得,如果需要,可以使用磷脂的水基乳液,或在不含乳化剂,不含溶剂的水基溶液中施用化合物。令人意想不到地,在上述提及的制剂中,根据本发明的化合物不在这些溶液中进行快速光致异构化。因此,无法预见的增加的益处简化施用至患有癌或自身免疫疾病的患者,并且不必需要琥珀输液管或过度小袋以减少 UV 暴

露。

[0066] I. 化合物

[0067] 在一个实施方案中,化合物(E)-1-(吡啶-4-基)-3-(7-(三氟甲基)喹啉-2-基)-丙-2-烯-1-酮被提供,所述化合物具有下列结构式:



[0069] 和包括其任何药学上可接受的盐,异构体,前药,或代谢物。

[0070] II. 化学合成

[0071] 使用下文在方案I或II中描述的一般方法,连同有机合成领域的技术人员已知的合成方法和其变体制备(E)-1-(吡啶-4-基)-3-(7-(三氟甲基)喹啉-2-基)-丙-2-烯-1-酮,或PFK-158。

[0072] 如在下文方案中简要描述的,可以通过相应的喹啉醛与相应的未经取代的乙酰基衍生物在适宜的碱的存在下的反应制备本发明的化合物。或者,醛也可以是与磷酰基叉基(phosphorylidene)衍生物反应,以得到所需的产物。

[0073] 下文描述的是用于制备本发明的化合物的两种详细的合成方案。

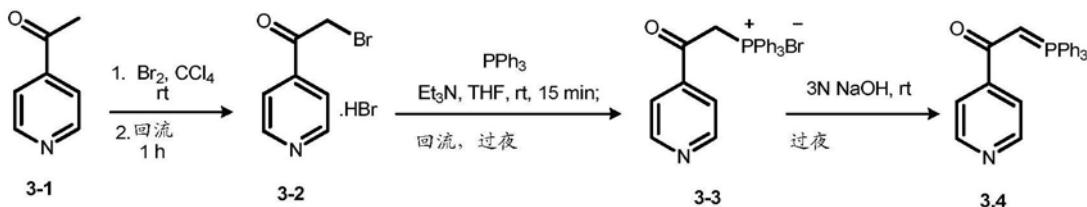
[0074] 方案1:



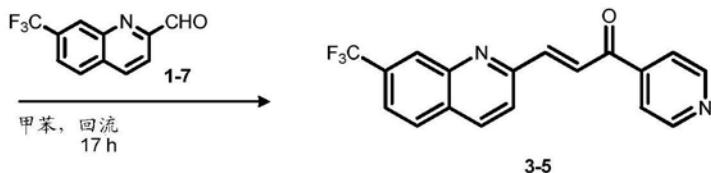
[0076] 1-吡啶-4-基-3-[7-三氟甲基]喹啉-2-基]丙-2-烯-1-酮(3-5)的制备:

[0077] 在室温,三乙基胺(0.96mL,6.6mmol,0.5eq)被加入至7-(三氟甲基)喹啉-2-甲醛(1-7)(3g,13.32mmol)和4-乙酰基吡啶(4-1)(1.93g,15.98mmol,1.2eq.)在异丙基醇(75mL)中的混合物。将反应混合物在室温搅拌4h,然后加热回流16小时。反应混合物被浓缩至35mL和冷却至0℃。通过过滤收集沉淀的产物,将其采用冷冻了的异丙基醇(5x 2mL)良好洗涤,和在真空下干燥,以得到化合物3-5(1.47g,33%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆):δ8.90(d,J=5.40Hz,2H),8.66(d,J=8.70Hz,1H),8.42-8.36(m,2H),8.33-8.26(m,2H),8.02(d,J=5.40Hz,2H),7.95-7.87(m,2H)。HPLC纯度(面积%):100%以1000ppm计在DMSO中。

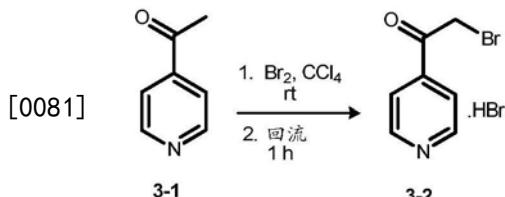
[0078] 方案2:



[0079]

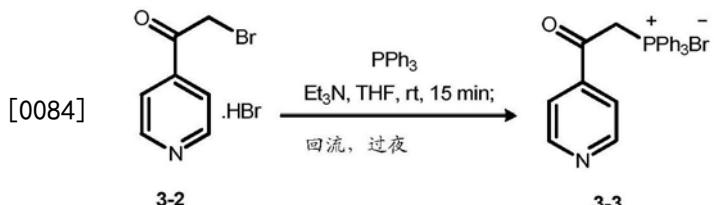


[0080] 2-溴代-1-吡啶-4-基-乙酮氢溴酸盐(3-2)的制备:



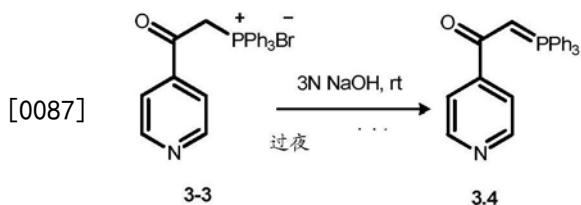
[0082] 在室温将溴(131.92g, 825.49mmol)缓慢加入至搅拌的3-1(100g, 825.491mmol)在CC₄(2.5L)中的溶液。然后将反应混合物缓慢加热至回流1h[反应是放热的, 和一旦它达到72℃可以是剧烈的]。产物被沉淀出来, 作为浅黄色固体。然后反应混合物被冷却至室温, 和产物通过过滤收集, 将其采用乙醚(总计1.5L)洗涤3次和干燥, 以得到化合物3-2(234.6g)。

[0083] (2-氧化-2-吡啶-4-基-乙基)-三苯基-磷鎓溴化物(3-3)的制备



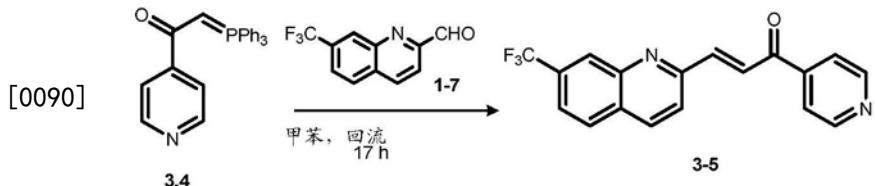
[0085] 在氮环境下在室温将在脱氧的THF (5L) 中的三苯基膦 (219.46g, 836.72mmol) 以6个相等的部分加入至3-2 (234g, 835.05mmol) 在THF (2L) 中的细悬浮液。然后在室温三乙基胺 (84.49g, 835.05mmol) 被加入, 和所得混合物在室温被搅拌15min, 和然后加热回流过夜, 采用剧烈的搅拌。然后反应混合物被冷却至室温。沉淀的浅棕色固体通过过滤收集, 将其采用乙醚 (总计1.5L) 洗涤3次, 和干燥, 以得到化合物3-3 (385.85g)。

[0086] 1-吡啶-4-基-2-(三苯基- λ^5 -磷烷叉基(phosphanylidene))乙酮(3-4)的制备



[0088] 在室温将3N水性氢氧化钠溶液(2.85L)缓慢加入至3-3(385.85g,834.59mmol)在甲醇(0.762L)和蒸馏水(1.43L)的混合的溶剂系统中的溶液,和在室温将反应混合物搅拌过夜。在减压下蒸发甲醇,和在含水残余物中的所得产物通过过滤收集,用蒸馏水(2L)和乙醚(1.5L)洗涤,和干燥,以得到产物3-4(115g,36%),为棕色固体。

[0089] 1-吡啶-4-基-3-[7-(三氟甲基)喹啉-2-基]丙-2-烯-1-酮(3-5)的制备:



[0091] 在室温将7-(三氟甲基) 嘧咻-2-甲醛1-7 (50g, 222mmol) 加入至3-4 (84.6g, 0.222mol) 在甲苯 (1L) 中的溶液。反应混合物被缓慢加热回流, 和保持在回流下17h (通过 TLC和质谱监测反应的进程)。在减压下蒸馏出甲苯, 和残余物是从温热乙醇结晶的, 得到纯的3-5 (46.14g, 63.3%)。对于 $C_{18}H_{14}N_2O_2$ ($M+H^+$) 329.3计算的MS被发现是329.3。 1H NMR (300MHz, DMSO-d₆) : 88.90 (d, $J=5.40\text{Hz}$, 2H), 8.66 (d, $J=8.70\text{Hz}$, 1H), 8.42–8.36 (m, 2H), 8.33–8.26 (m, 2H), 8.02 (d, $J=5.40\text{Hz}$, 2H), 7.95–7.87 (m, 2H)。HPLC纯度99.74% (面积%)。

[0092] III. 药物组合物

[0093] (E)-1-(吡啶-4-基)-3-(7-(三氟甲基)喹啉-2-基)-丙-2-烯-1-酮(PFK-158),包括其药学上可接受的盐,可以或单独,或作为药物组合物的一部分被施用于受试者。

[0094] 本文也提供的是药物组合物、所述药物组合物包含PFK-158。这些药物组合物含有在药学上可接受的载体中的PFK-158。药物制剂可以被制备用于静脉内或胃肠外的施用，如下文更详细所讨论的。PFK-158也可以被重构以形成药学上可接受的组合物（包括在人类中医药学上可接受的组合物），其用于施用。

[0095] 术语“载体”，如本文使用的，包括药学上可接受的载体，赋形剂或稳定剂，其对于细胞或哺乳动物是无毒性的，所述细胞或哺乳动物暴露于采用的剂量和浓度的载体，赋形剂或稳定剂。

[0096] PFK-158的治疗有效量,其被用于在本文描述的实施方案范围内,将随着受试者不同而稍微变化和将取决于受试者的状况和递送途径。作为一般建议,从约0.1至约500mg/kg的剂量将具有治疗功效,其中所有重量是基于活性化合物的重量而计算的,包括其中采用的是盐的情况。

[0097] 依照目前公开的方法,PFK-158可以作为溶液,悬浮液,或乳液被肌内地,皮下地,动脉内地,或静脉内施用。或者,化合物或其盐也可以作为脂质体悬浮液被静脉内,动脉内地,或肌内地施用。

[0098] 本文提供的其它实施方案是适用于静脉内或肌内注射的药物组合物。如果溶液是所需的,水是选择的载体。关于水基溶液,乳化剂和或药学上可接受的有机的赋形剂,例如甘油,丙二醇,聚乙二醇,或其混合物,可以是适宜的。如果乳化剂是需要的以保持溶液或乳液稳定,那么乳化剂例如,而不限于,从多乙氧基化的蓖麻油(polyethoxylated castor oil)和称为**乳浮® (Cremophor®)**、RH 40乳浮(RH 40**Cremophor®**)的和所有它们的衍生物衍生的,从多乙氧基化的失水山梨糖醇和油酸和称为吐温60或**80®**、聚山梨酯60或**80®**和所有它们的衍生物衍生的,从α-生育酚和衍生物衍生的,可以是适宜的。形成包涵体复合物的分子如环糊精,例如**Captisol®**或**Kleptose®**的使用,允许得到没有溶剂或乳化剂的水基制剂。在任何实例中,制备的溶液然后可以在那些本领域技术人员已知的适宜的方式中被灭菌,和典型地通过过滤通过0.22-微米过滤器被灭菌。灭菌之后,

溶液可以被分散入适当的容器,例如去热原的玻璃小瓶。分散优选地通过无菌的方法完成。灭菌的内容物然后可以是放置于小瓶和,如果所需的,小瓶内容物可以是冻干的。

[0099] 除了本发明的化合物,包括其药学上可接受的盐,药物组合物可以包含其它添加剂、例如pH-调节添加剂。具体的是,适用的pH-调节试剂包括酸,例如盐酸,碱或缓冲剂、例如乳酸钠,乙酸钠,磷酸钠,柠檬酸钠,硼酸钠,或葡萄糖酸钠。此外,组合物可以包含抗微生物防腐剂。适用的抗微生物防腐剂包括羟苯甲酯,羟苯丙酯,和苄基醇。当制剂被放置在设计用于多-剂量应用的小瓶中时典型地采用的是本文描述的所述抗微生物防腐剂。药物组合物可以使用本领域熟知的技术被冻干。

[0100] 在另一个实施方案中,提供的是,可注射的,稳定,无菌制剂在密封的容器中包括在单位剂型中的PFK-158或其药学上可接受的盐。化合物是以冷冻干产物的形式提供,其能够采用适宜的药学上可接受的载体被重构以形成液体制剂,所述液体制剂适用于被注射入受试者。单位剂型典型地包含从约10mg至约10克的化合物盐。

[0101] 本文提供的附加的实施方案包括本文公开的活性化合物的脂质体制剂。用于形成脂质体混悬剂的技术是本领域熟知的。

[0102] IV. 抑制细胞增殖和治疗癌的方法

[0103] (E)-1-(吡啶-4-基)-3-(7-(三氟甲基)喹啉-2-基)-丙-2-烯-1-酮(PFK-158)和包含化合物的组合物适用于抑制细胞增殖和/或治疗癌。

[0104] 在某些实施方案中,用于抑制细胞增殖或治疗癌的方法包含将所述如本文所描述的抗癌化合物PFK-158给予至需要其的受试者。所述活性化合物、如上述举出的,包括化合物和其药学上可接受的盐。在某些实施方案中,所述活性化合物存在于如本文上文所描述的药物制剂中。

[0105] 目前公开的化合物可以提供用于多种的肿瘤和癌的治疗,所述肿瘤和癌包括,而不限于,多形性成胶质细胞瘤,皮肤癌,结缔组织癌,脂肪癌,乳腺癌,肺癌,胃癌,胰腺癌,卵巢和生殖器官癌,子宫颈癌,子宫癌,肛门生殖器癌,肾癌,膀胱癌,肝癌,结直肠或结肠癌和消化(GI)道癌,前列腺癌和生殖器官癌,中枢神经系统(CNS)癌,视网膜癌,血癌,和淋巴样癌,和头颈癌。

[0106] 如本文所定义的涉及治疗癌的“有效量”是如下量:所述量将减少,降低,抑制,或以其他方式废除癌细胞或肿瘤生长的。在某些实施方案中,本文描述的化合物可以被区域性递送至受试者机体的特定的患病的区域或多个区域。在某些实施方案(其中这类治疗被认为是更适宜的)中,化合物可以全身性被施用。例如,化合物可以被静脉内施用。

[0107] 此外,可以理解治疗癌的治疗益处可以通过组合治疗与一个或多个附加的抗癌试剂或治疗而实现。这类组合的选择将取决于多种因素,其包括,而不限于,疾病的类型,受试者的年龄和一般健康状况,疾病发展的侵占性,和受试者耐受含有组合的药剂的能力。

[0108] 因此,多种化学化合物、也描述为“抗癌试剂”或“化疗药剂”可以与PFK-158组合使用。这类化合物包括,但是不限于,烷化剂、DNA嵌入剂,蛋白质合成抑制剂、DNA或RNA合成的抑制剂,DNA碱基类似物,拓扑异构酶抑制剂、抗血管发生试剂,和端粒末端转移酶抑制剂或端粒DNA结合化合物。例如,适宜的烷化剂包括烷基磺酸酯或盐,例如白消安,英丙舒凡,和哌泊舒凡;氮丙啶类,例如benzodizepa,卡波醌,美妥替哌,和乌瑞替派;乙烯亚胺类和甲基三聚氰胺类,例如六甲蜜胺,曲他胺,三亚乙基磷酰胺,三亚乙基硫代磷酰胺,和三羟甲蜜

胺；氮芥类例如苯丁酸氮芥，蔡氮芥，环磷酰胺，雌莫司汀，异环磷酰胺，氮芥，氮芥氧化物盐酸化物、美法仑，新氮芥(novembichine)，苯芥胆甾醇(phenesterine)，泼尼莫司汀，曲磷胺，和尿嘧啶氮芥；亚硝基脲类，例如卡莫司汀，氯脲菌素(chlorozotocin)，福莫司汀，洛莫司汀，尼莫司汀，和雷莫司汀。

[0109] 用于治疗癌的抗生素包括放线菌素D(放线菌素D)，柔红霉素，多柔比星，伊达比星，博来霉素硫酸盐，丝裂霉素(mytomycin)，普卡霉素，和链佐星。化疗药物抗代谢药包括巯嘌呤，硫鸟嘌呤，克拉屈滨，氟达拉滨磷酸盐，氟尿嘧啶(5-FU)，氟尿苷，阿糖胞苷，喷司他丁，甲氨蝶呤，和硫唑嘌呤，阿昔洛韦，腺嘌呤β-1-D-阿糖胞苷，甲氨蝶呤，氨基蝶呤，2-氨基嘌呤，阿非科林，8-阿扎鸟嘌呤，偶氮丝氨酸，6-氮杂尿嘧啶，2'-叠氮基-2'-脱氧核苷类，5-溴脱氧胞苷，阿糖胞苷β-1-D-阿糖胞苷，重氮氧基正亮氨酸，二脱氧核苷类，5-氟脱氧胞苷，5-氟脱氧尿苷，和羟基脲。

[0110] 化疗药物蛋白质合成抑制剂包括相思豆毒蛋白，金精三羧酸，氯霉素，大肠菌素E3，环己酰亚胺，白喉毒素，伊短菌素A，依米丁，红霉素，乙硫氨酸，氟化物、5-氟色氨酸，夫西地酸，鸟苷酰基亚甲基二磷酸酯或盐(guanylyl methylene diphosphonate)和鸟苷酰基亚氨二磷酸酯或盐(guanylyl imidodiphosphate)，卡那霉素，春日霉素，黄色霉素，和0-甲基苏氨酸。附加的蛋白质合成抑制剂包括蒴莲根毒素，新霉素，正缬氨酸，密旋霉素，巴龙霉素，嘌罗霉素，蓖麻毒蛋白，志贺毒素，焦土霉素，司帕霉素，大观霉素，链霉素，四环素，疏链丝菌肽，和甲氧苄啶。DNA合成的抑制剂，包括烷化剂例如二甲基硫酸酯或盐，丝裂霉素C，氮芥类和硫芥类，嵌入试剂，例如吖啶类染料，放线菌素，多柔比星，蒽类，苯并芘，溴乙啶、二碘化丙啶-交结剂(propidium diiodide-intertwining)，和试剂，例如偏端霉素和纺锤菌素，也可以与PKF-158在药物组合物中组合。拓扑异构酶抑制剂、例如库马霉素，萘啶酸，新生霉素，和奥索利酸，细胞分裂的抑制剂，包括秋水仙胺(colcemide)，秋水仙碱(colchicine)，长春碱，和长春新碱；和RNA合成抑制剂包括放线菌素D，鹅膏毒环肽(amanitine)和其它真菌蝇蕈毒素，蛹虫草菌素(3'-脱氧腺苷)，二氯呋喃核糖基苯并咪唑，利福平，曲张链菌素，和利迪链菌素(streptolydigin)也可以与PKF-158组合以提供适宜的癌治疗。

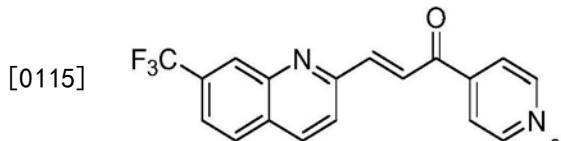
[0111] 因此，可以用于与PKF-158组合治疗的目前抗癌试剂包括，但是不限于，阿霉素(adrimycin)，5-氟尿嘧啶(5FU)，依托泊苷，喜树碱，放线菌素-D，丝裂霉素，顺铂，过氧化氢，卡铂，奥沙利铂，丙卡巴肼，氮芥，环磷酰胺、异环磷酰胺，美法仑，苯丁酸氮芥，bisulfan，亚硝基脲，放线菌素D(放线菌素D)，duanorubicin，多柔比星，博来霉素，plicomycin，他莫昔芬，紫杉醇，多西他赛，transplatinun，长春碱，长春新碱，甲氨蝶呤，伊立替康，亚叶酸，贝伐珠单抗，西妥昔单抗，舒尼替尼(sutinibib)，伊马替尼，替莫唑胺，吉西他滨等。

[0112] 涉及本发明化合物和另一个治疗剂、例如另一个化疗药剂的组合治疗可以被测试，可以通过在基本上相同的时间使用两种试剂而被实现。或者，采用本发明化合物的治疗可以通过范围是从分钟至周的间隔在采用所述其它试剂的治疗之前或在采用所述其它试剂的治疗之后。

[0113] 化疗药剂的施用的一个方式是通过胃肠外的施用，其需要试剂在溶剂中的溶解度适用于胃肠外的施用。适宜的溶剂或溶剂混合物的非限制实施例包括乳浮，吐温，聚乙二

醇,和/或与胃肠外的溶液例如盐水(0.9%氯化钠在注射用水中)组合的聚丙二醇,D5W或D10W(分别为,5%或10%葡萄糖或葡萄糖在注射用水中),和乳酸林格溶(乳酸钠林格溶)。

[0114] 因此,在一个实施方案中,被提供的是用于治疗癌的化合物,其由(E)-1-(吡啶-4-基)-3-(7-(三氟甲基)喹啉-2-基)-丙-2-烯-1-酮,或其药学上可接受的盐组成,所述化合物具有下式:



[0116] 在另一个实施方案中,用于治疗癌的药物组合物被提供,所述组合物包括:(a)有效量的(E)-1-(吡啶-4-基)-3-(7-(三氟甲基)喹啉-2-基)-丙-2-烯-1-酮或其药学上可接受的盐;和(b)至少一种药学上可接受的载体。在又一实施方案中,组合物还包含第二抗癌试剂。在某些实施方案中,第二抗癌试剂选自紫杉醇,多西他赛,顺铂,卡铂,奥沙利铂,多柔比星,长春新碱,长春碱,5-FU,伊立替康,甲氨蝶呤(methotrexate),亚叶酸,贝伐珠单抗,西妥昔单抗,舒尼替尼,伊马替尼,替莫唑胺,和吉西他滨。这类药物组合物适用于治疗多种通过抑制PFKFB3可治疗的癌,其包括多形性胶质细胞瘤,皮肤癌,结缔组织癌,脂肪癌,乳腺癌,肺癌,胃癌,胰腺癌,卵巢和生殖器官癌,子宫颈癌,子宫癌,肛门生殖器癌,肾癌,膀胱癌,肝癌,结直肠或结肠癌和消化(GI)道癌,前列腺癌和生殖器官癌,中枢神经系统(CNS)癌,视网膜癌,血癌,和淋巴样癌,和头颈癌。

[0117] 在另一个实施方案中,治疗癌的方法被提供,方法包括给予需要其的受试者有效量的(E)-1-(吡啶-4-基)-3-(7-(三氟甲基)喹啉-2-基)-丙-2-烯-1-酮或其药学上可接受的盐。方法适用于治疗多种通过抑制PFKFB3可治疗的癌,包括多形性胶质细胞瘤,皮肤癌,结缔组织癌,脂肪癌,乳腺癌,肺癌,胃癌,胰腺癌,卵巢和生殖器官癌,子宫颈癌,子宫癌,肛门生殖器癌,肾癌,膀胱癌,肝癌,结直肠或结肠癌和消化(GI)道癌,前列腺癌和生殖器官癌,中枢神经系统(CNS)癌,视网膜癌,血癌,和淋巴样癌,头颈癌等。在又一实施方案中,方法还包含给予第二抗癌试剂。在特定实施方案中,第二抗癌试剂选自紫杉醇,多西他赛,顺铂,卡铂,奥沙利铂,多柔比星,长春新碱,长春碱,5-FU,伊立替康,甲氨蝶呤,亚叶酸,贝伐珠单抗,西妥昔单抗,舒尼替尼,伊马替尼,替莫唑胺,和吉西他滨。第二抗癌试剂可以是与(E)-1-(吡啶-4-基)-3-(7-(三氟甲基)喹啉-2-基)-丙-2-烯-1-酮联合施用的,或可以在(E)-1-(吡啶-4-基)-3-(7-(三氟甲基)喹啉-2-基)-丙-2-烯-1-酮之前或在(E)-1-(吡啶-4-基)-3-(7-(三氟甲基)喹啉-2-基)-丙-2-烯-1-酮之后被施用。

[0118] 在另一个实施方案中,治疗肿瘤的方法被提供,方法包括给予需要其的受试者有效量的(E)-1-(吡啶-4-基)-3-(7-(三氟甲基)喹啉-2-基)-丙-2-烯-1-酮或其药学上可接受的盐。在又一实施方案中,方法还包含给予第二抗癌试剂。在特定实施方案中,第二抗癌试剂选自紫杉醇,多西他赛,顺铂,卡铂,奥沙利铂,多柔比星,长春新碱,长春碱,5-FU,伊立替康,甲氨蝶呤,亚叶酸,贝伐珠单抗,西妥昔单抗,舒尼替尼,伊马替尼,替莫唑胺,和吉西他滨。第二抗癌试剂可以是与(E)-1-(吡啶-4-基)-3-(7-(三氟甲基)喹啉-2-基)-丙-2-烯-1-酮联合施用的,或可以在(E)-1-(吡啶-4-基)-3-(7-(三氟甲基)喹啉-2-基)-丙-2-烯-1-酮之前或在(E)-1-(吡啶-4-基)-3-(7-(三氟甲基)喹啉-2-基)-丙-2-烯-1-酮之后被施用。

[0119] 在依然另一个实施方案中,在细胞中抑制糖酵解流出的方法被提供,方法包括使

细胞接触有效量的 (E)-1-(吡啶-4-基)-3-(7-(三氟甲基)喹啉-2-基)-丙-2-烯-1-酮或其药学上可接受的盐。

[0120] 在另一个实施方案中,在细胞中抑制PFKFB3的酶活性的方法被提供,方法包括使细胞接触有效量的 (E)-1-(吡啶-4-基)-3-(7-(三氟甲基)喹啉-2-基)-丙-2-烯-1-酮或其药学上可接受的盐。

[0121] 这些和其它实施方案将根据下列实施例被进一步理解。

实施例

[0122] 下列实施例被给出仅仅为了说明,和不意欲限制本发明的范围。

[0123] 实施例1

[0124] 癌细胞增殖的抑制

[0125] PFK-158杀死癌细胞或抑制癌细胞的增殖的能力是如下测量的:使用MTT测试,**alamarBlue®**测试(Invitrogen, Grand Island, NY),或CellTiter Glo™测试(Promega, Madison, WI),使用48或72小时暴露。不同癌细胞系的MTT测试结果是显示在下文表5中,并且所述结果显示,PFK-158在低纳摩尔浓度针对若干类型的癌细胞系抑制癌细胞增殖。

[0126] 所需的肿瘤细胞系的细胞以 2×10^5 细胞/ml在96孔板中被铺板。次日两次将在相等的体积的介质中指定浓度的本发明的化合物加入至细胞。72小时之后,细胞被溶解和经受使用细胞Titer-Glo™发光的细胞活力测试试剂盒的三磷酸腺苷测定。试验以一式三份被实施。当使用MTT测试或**alamarBlue®**测试时,实验条件是基本上类似;在孵育时期结束时,将20微升的MTT溶液加入每个孔,和将样品温育附加的4小时,漂洗,和在570nm测量吸光度。细胞增殖的抑制结果被报告为IC₅₀(导致细胞群体的增殖50%抑制浓度)和被列举在下文表5中。细胞系包括肺,结肠,前列腺,乳腺,卵巢,和胰腺癌细胞系。

[0127] 表5:PFK-158(MTT测试,48小时)在下表的细胞系中的IC₅₀值。

细胞系	IC ₅₀ (nM)
A498	3512
A549	8654
HCT116	3399
HT29	4134
MiaPaCa-2	3353
SKOV-3	2625
SW620	2668
PC-3	1180
BT474	1952
SK-BR-3	1598

[0129] 实施例2

[0130] 重组PFKFB3,PFKFB3在细胞中,和葡萄糖摄取在细胞中的抑制

[0131] 为了测定PFK-158是否抑制酶活性,可诱导的双功能的6-磷酸果糖-2-激酶/果糖2,6-二磷酸酶(PFKFB3)被表达和纯化。PFKFB3如下制备:通过在大肠杆菌(E.coli)中表达,和通过GST柱和柱色谱法纯化。SDS PAGE coumassie染色凝胶剂指明了,纯度是高的(>95%)。重组蛋白质是纯的和有活性的,如通过市售的激酶活性测试(ADP-Glo™, Promega, Madison, WI)的结果所确定的。相同的测试被使用以测定抑制蛋白质,和结果显示在图1中,

表示PFK-158的抑制曲线,导致IC₅₀的137+15nM。

[0132] 也可以根据Van Schaftingen方法(Eur.J.of Biochem,129:191(1982)),在细胞中通过测量果糖-2,6-二磷酸水平,测量PFKFB3的抑制。这种方法可以实现在细胞环境中的抑制的测量,比纯的重组蛋白质更相关的模型。简而言之,Jurkat细胞以1x10⁵细胞/mL被铺板和与不同浓度的PFK-158一同温育,持续3小时。样品被采集和细胞被溶解。提取物被表征,如于先前的报告中所描述,和被归一化至蛋白质浓度。结果显示PFK-158具有1.6+0.8μM的IC₅₀。参见图3。

[0133] PFKFB3的抑制导致抑制糖酵解。若干反馈或前馈激活和抑制原理存在,以至于,通过反馈原理,抑制PFKFB3的活性可能抑制通过细胞的葡萄糖摄取。测试被发展以测定在暴露PFK-158之后是否存在抑制葡萄糖摄取。简而言之,Jurkat细胞以10⁵细胞/mL被铺板在RPMI 1640中,其补充有10%胎牛血清和50μg/mL硫酸庆大霉素。细胞是立即用赋形剂或0.5 μmol/L的PFK-158处理,持续3小时,和随后被放置在不含葡萄糖的RPMI 1640中,持续30min。¹⁴C-2-脱氧葡萄糖(0.25μCi/mL;Perkin Elmer)被加入,持续附加的60min,和细胞然后用冰冷不含葡萄糖的RPMI 1640洗涤3次。细胞溶解产物被采集在500μL的0.1%SDS中,和针对400μL的溶解产物测量闪烁计数(计数/min)。计数是被归一化至蛋白质浓度。结果表明PFK-158具有847+150nM的IC₅₀。参见图2。

[0134] 这些结果证实了,本发明的化合物是有效的PFKFB3的抑制剂,和具有低纳摩尔浓度IC₅₀,如在下文表6中总结的。

[0135] 表6:PFK-158(Jurkat细胞)的IC₅₀(nM)

[0136]

Rec PFKFB3	细胞的 PFKFB3 (F2,6BP)	葡萄糖摄取	细胞生长
137+15	1620+400	847+150	328+15

[0137] 实施例3

[0138] 药物动力学

[0139] 在小鼠和大鼠中IV(静脉内)施用之后,在小鼠中测定PFK-158的药物动力学(PK)参数。通常研究设计包括六只7至8周龄的动物(雄性或雌性)。

[0140] 在采用10%DMSO,10%PEG-200,10%Solutol:乙醇(1:1)和70%D5W溶液或任何其它药学上可接受的胃肠外的制剂IV施用之后,测定使用5mg/kg的剂量的小鼠药物动力学性质。血样是在不同间隔采集的。血浆样品被萃取和使用LC-MS/MS方法分析。类似方案是用于大鼠PK研究(Sprague Dawley大鼠;30mg/kg),尽管大鼠PK研究的制剂不同(30%Captisol,pH 3.0溶液)。时间与血浆浓度曲线被制备,如在图4(BalbC小鼠)和5(SD大鼠)中分别所显示。药物动力学参数被计算和在下文表7中被提供。

[0141] 表7:PK参数(IV给药;5mg/kg在BalbC小鼠中;30mg/kg在Sprague Dawley大鼠中)。

	T _{1/2b} (h)	C _{max} (ng/mL)	AUC _{0-inf} (ng.h/ml)
[0142] 小鼠(5 mg/kg)	10.4	4,176	3,235
大鼠(30 mg/kg)	8.6	18,883	3,298

[0143] 结果显示,本发明的化合物具有适当地长半衰期,其支持暴露于长时期的时间,高

最大浓度,和高AUC,其支持高药物浓度和暴露。

[0144] 实施例4

[0145] 功效研究

[0146] 在肿瘤模型中体内研究PFK-158的功效。若干肿瘤模型用于这些研究(Lewis肺癌,或LLC模型,CT-26结肠癌肿瘤模型,或BXPC3胰腺癌模型)。用于LLC研究的实验性方案如下文描述的。接下来是皮下接种肿瘤细胞,肿瘤开始发展和一旦肿瘤达到所需的100-125mm³的平均体积,治疗被启动。在两个组中监测肿瘤体积,和每周3次测量对照和治疗组的平均值,以及体重。

[0147] 简而言之,在7-8周龄的正常的雌性C57BL/6小鼠是用于研究。小鼠被饲养于微隔离装置居住环境,供给随意获取的食物和水,和在开始研究之前留验,持续4天。在37°C,在5%CO₂的气氛中,在空气中,LLC细胞是保持在单层培养物中,所述培养物在DMEM培养基中,所述培养基补充有10%热灭活的胎小牛血清,100U/ml青霉素和100μg/ml链霉素,和L-谷氨酰胺(2mM)。肿瘤细胞被每周两次常规传代培养。生长在指数相中的细胞被采集,和被针对肿瘤接种计数。采用在0.1ml的PBS中的LLC肿瘤细胞(3x 10⁵)在右肋腹皮下接种各小鼠,以用于肿瘤发展。当无胸腺的裸小鼠被使用时,如用于BxPC3模型的,然后小鼠的应变是稍微不同的。此外,Matrigel的使用支持肿瘤发展,意味着,细胞是悬浮在100μl的培养基/Matrigel(1:1)的混合物中,和然后被皮下移植在右肋腹区域中。在细胞移植之后每日监测动物的肿瘤生长。当肿瘤体积达到约100-125mm³时,小鼠被随机分组,每组为8只小鼠,仅仅使用具有最接近平均值的肿瘤体积的小鼠。肿瘤体积如下测量:使用式V=L×W×H×π/6,其中L和W表示肿瘤的较长和较短直径和H表示肿瘤的高度。随机化之后开始治疗。在第1,3,5,7,9,11,和13天,以60mg/kg的剂量,IP施用PFK-158。针对来自药物治疗的可能毒性作用,观察动物。体重被记录,和显示化合物是非常良好耐受的,同时存在不令人注目的体重丧失。结果显示在图6中。

[0148] 使用不同模型,类似方案被用于其它研究;不同包括Balbc/裸小鼠的使用;给予较大量数的癌细胞;和Matrigel的使用。若干研究的结果显示在图6-8中,和显示本发明的化合物在不同肿瘤类型中抑制肿瘤体内生长,同时是非常良好耐受的,不伴有可见的体重丧失,也没有动物死亡。另外,当PFK-158与其它化疗药剂组合时,观察到附加的或协同作用。

[0149] 实施例5

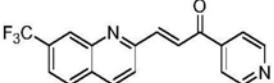
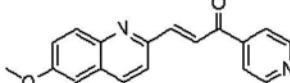
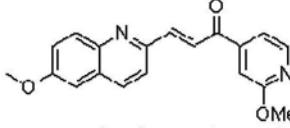
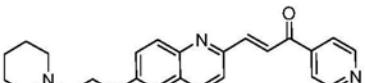
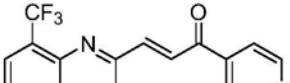
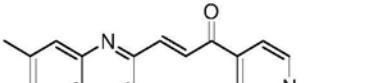
[0150] PFK-158与喹啉基-丙烯酮化合物的比较

[0151] 使用的是与在上述表1中详细描述的相同的方法,以比较PFK-158与5个结构类似的喹啉基-丙烯酮化合物,其在PFK-015骨架上携带功能团:1-吡啶-4-基-3-(喹啉-2-基)-丙烯酮,3-(6-甲氧基-喹啉-2-基)-1-吡啶-4-基-丙烯酮(PFK-138),1-(2-甲氧基-吡啶-4-基)-3-(6-甲氧基-喹啉-2-基)-丙烯酮(PFK-144),3-(6-(2-哌啶-1-基-乙氧基)-喹啉-2-基)-1-吡啶-4-基-丙烯酮(PFK-150),1-吡啶-4-基-3-(8-三氟甲基-喹啉-2-基)-丙烯酮(PFK-153),和3-(7-甲基-喹啉-2-基)-1-吡啶-4-基-丙烯酮(PFK-154)。

[0152] 结果显示,当与各个列举的PFK-015的喹啉基-丙烯酮变体相比时,PFK-158显示更好的体外PFKFB3和2脱氧葡萄糖的抑制和针对Jurkat细胞的更好功效。在很多情况下,与测定的化合物相比,PFK-158显示2至6倍改善的表现。参见下文表8。

[0153] 表8:PFK-158与喹啉基-丙烯酮化合物的IC₅₀比较

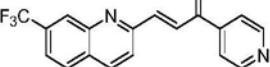
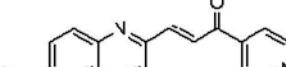
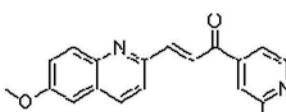
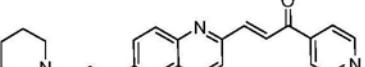
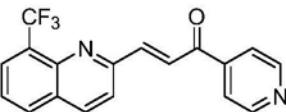
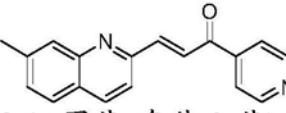
[0154]

化合物	IC_{50} , PFKFB3 的 酶 活 性 , ADP-Glo™ 测 试	IC_{50} , PFKFB3 在 细 胞 中 的 酶 活 性	IC_{50} , 2 脱 氧葡萄糖摄 取 的 抑 制	IC_{50} , Jurkat 细胞系 (白血病细胞系) 的 毒 性
 PFK-158	137+15 nM	1.6+0.8 μM	0.8+0.1 μM	0.33+0.1 μM
 3-(6-甲氧基-喹啉-2-基)-1-吡啶-4-基-丙烯酮(PFK-138)	431+34 nM	7.4+1.8 μM	2.2+0.3 μM	1.2+0.2 μM
 1-(2-甲氧基-吡啶-4-基)-3-(6-甲氧基-喹啉-2-基)-丙烯酮(PFK-144)	654+94 nM	10.7+0.3 μM	3.1+0.5 μM	1.7+0.3 μM
 3-(6-(2-哌啶-1-基-乙氧基)-喹啉-2-基)-1-吡啶-4-基-丙烯酮(PFK-150)	802+177 nM	15.6+1.4 μM	3.8+0.8 μM	2.5+0.4 μM
 1-吡啶-4-基-3-(8-三氟甲基-喹啉-2-基)-丙烯酮(PFK-153)	173+23 nM	6.0+0.6 μM	1.2+0.6 μM	0.9+0.1 μM
 3-(7-甲基-喹啉-2-基)-1-吡啶-4-基-丙烯酮(PFK-154)	622+39 nM	11.3+0.6 μM	2.2+0.6 μM	1.3+0.1 μM

[0155] 此外,当与测定的化合物相比时,PFK-158也显示无法预见的和更好的药物动力学性质。如在表9中所显示,在Balbc小鼠中得到的关键药物动力学参数,例如 $T_{1/2}$ (半衰期), C_{max} (最大浓度),AUC(在曲线下面积),或C1(清除率)显示,与在相同的浓度施用(IV给药)的结构类似的喹啉基-丙烯酮相比,PFK-158展示无法预见的和更好的药物动力学。与测定的化合物相比,PFK-158显示更高 C_{max} 和AUC,更长半衰期,和更低清除率。

[0156] 表9: PFK-158与喹啉基-丙烯酮化合物的药物动力学比较

[0157]

化合物	T _{1/2} (hr)	C _{max} (ng/ml)	AUC _{0-inf} (ng.h/mL)	Cl (mL/min/kg)
 PFK-158	10.5	4176	3235	26
 3-(6-甲氧基-喹啉-2-基)-1-吡啶-4-基-丙烯酮(PFK-138)	0.7	991	541	154
 1-(2-甲氧基-吡啶-4-基)-3-(6-甲氧基-喹啉-2-基)-丙烯酮(PFK-144)	2.8	1504	696	120
 3-(6-(2-哌啶-1-基-乙氧基)-喹啉-2-基)-1-吡啶-4-基-丙烯酮(PFK-150)	2.5	40	63	1327
 1-吡啶-4-基-3-(8-三氟甲基-喹啉-2-基)-丙烯酮(PFK-153)	3.8	397	225	327
 3-(7-甲基-喹啉-2-基)-1-吡啶-4-基-丙烯酮(PFK-154)	6.1	672	1105	75

[0158] 当综合考虑时,体外数据和体内药物动力学数据显示,与测定的类似物相比,PFK-158是令人意想不到地更好的。PFK-158具有更好的体外细胞的活性和体内药物动力学性质的组合;PFK-158的近似的类似物不具有与PFK-158相同的针对PFKFB3和癌细胞的活性水平,也不具有观察到的PFK-158的例外的药物动力学性质。

[0159] 实施例6

[0160] 用于IV施用的制剂

[0161] PFK-158和其盐可以在**乳浮®**基制剂中制备。在一个实施方案中,10mg PFK-158是溶解在1ml的1:1v:v**乳浮®**:乙醇溶液中,使用剧烈的搅拌。一旦化合物有效溶解,过滤溶液和然后以1:9的比率将其加入至盐水,注射用水,乳酸林格液,或D5W,导致澄清的溶液,不含颗粒,具有约1mg/ml的PFK-158浓度。组合物是至少6小时化学稳定的,和可以被施用于

哺乳动物、包括人类。

[0162] 在另一个实施方案中,可以采用PFK-158的盐,例如盐酸盐PFK-158,HCl,制备溶液。可以采用乳化剂例如吐温**80®**等,制备类似制剂。

[0163] 在其它实施方案中,附加的赋形剂被加入以增加PFK-158或PFK-158,HCl的浓度。适宜的赋形剂包括聚乙二醇,聚丙二醇,羧甲纤维素钠,聚乙烯基-吡咯烷酮等。

[0164] 在另一个实施方案中,PFK-158的乳液是如下制备:采用w/w基础:1%PFK-158,15%E80(脂质基赋形剂),5%大豆油,2%聚山梨酯80,10%蔗糖,67%水,pH被调节至5.5,和然后使用任何可利用的高速混合机,良好混合组合物。所得乳液是稳定的,和可以是安全地静脉内施用至哺乳动物、包括人类。在另一个实施方案中,乳液包含0.5%PFK-158,10%大豆油,5.5%Miglyol 812,5%PL90G,10%蔗糖,和69%DI水。成分被混合,和然后使用高速混合机将其乳化。很多不同赋形剂是适宜用于乳液的制备,只要所述赋形剂可以实现需要尺寸,稳定性,和活性浓度。

[0165] 在另一个实施方案中,含有环糊精的溶液也可以被用于给予PFK-158和其盐至癌患者。在一个实施方案中,30%w/v**Captisol®**在注射用水中的溶液被制备;然后,实现5mg/ml PFK-158,HCL溶液需要的量被加入,和搅拌溶液直到实现完全溶解,和pH被调节至3.5。这种溶液可以被安全地施用于哺乳动物、包括人类。任选地,溶液可以被冻干。注射用水的加入导致冻干物的完全再溶解,基于这一点,所述溶液是适用于IV施用至哺乳动物。

[0166] 实施例7

[0167] 在大鼠和狗中采用40mg/kg的IV药物动力学参数

[0168] 在另一个实施方案中,在大鼠和狗中,在更高浓度,环糊精基溶液被用于考察PFK-158,2HCl的PK特征。

[0169] 溶液如下制备:采用40%w/v**Captisol®**在注射用水中,5%甘露醇,和pH 2.3柠檬酸盐缓冲剂,导致8mg/ml浓度的PFK-158,2HCl。这种溶液以40mg/kg的剂量被安全施用IV至大鼠和狗。在24小时内采血样,并且分析所述血样。分别针对雄性和雌性大鼠,计算出 $37,600 \pm 2800 \text{ hr.ng/mL}$ 和 $27,700 \pm 5800 \text{ hr.ng/mL}$ 的血浆AUC_{0→t}值,和 $51,400 \pm 6300 \text{ ng/mL}$ 和 $39,500 \pm 10,000 \text{ ng/mL}$ 的血浆C_{max}值。以相同的方式计算在狗中药物动力学参数:分别针对雄性和雌性狗,得到 $16,100 \pm 700$ 和 $15,900 \pm 2600 \text{ hr.ng/mL}$ 的血浆AUC_{0→24}值,和 6960 ± 1180 和 $6900 \pm 900 \text{ ng/mL}$ 的血浆C_{5min}值。结果显示在两种物种中的高暴露。

[0170] 实施例8

[0171] 在狗中采用40mg/kg的毒理学研究

[0172] 在另一个实施方案中,所述PFK-158(以其双阳离子的形式)的潜在毒性被考察,采用40mg/kg,在雄性和雌性比格狗中,使用每周3天、持续总共3周的给药方案。在生命(in-life)相期间,通过监测所有临床迹象,考察所述PFK-158的潜在毒性,取血和尿样品以用于全部临床化学专门小组和尿分析,监测体重和食物摄取。在终止时实施大体尸检和完全组织病理学。

[0173] 结果显示,采用40mg/kg的剂量每周3次,持续3周施用的PFK-158是非常良好耐受的,和其不存在毒性的迹象。这种剂量是鉴定为NOAEL(无明显不良事件水平)和对应于800mg/m²的人等效剂量(HED)。如上述实施例4所示,在若干癌模型中,在30mg/kg的IV剂量

或90mg/m²的HED, PFK-158显示良好活性。PFK-158因此具有宽的治疗窗,这支持它发展。

[0174] 引用的所有文件是通过引用并入本文;引用任何文件不应被解释为承认它是关于本发明的现有技术。

[0175] 尽管本发明的具体的实施方案已被显示和描述,对于本领域的技术人员将明显的是,在没有偏离本发明的精神和范围情况下,多种其它变化和修饰可以被进行。因此在所附权利要求中意欲涵盖所有在本发明范围内的这类变化和修饰。

PFK-158 ADP GLO

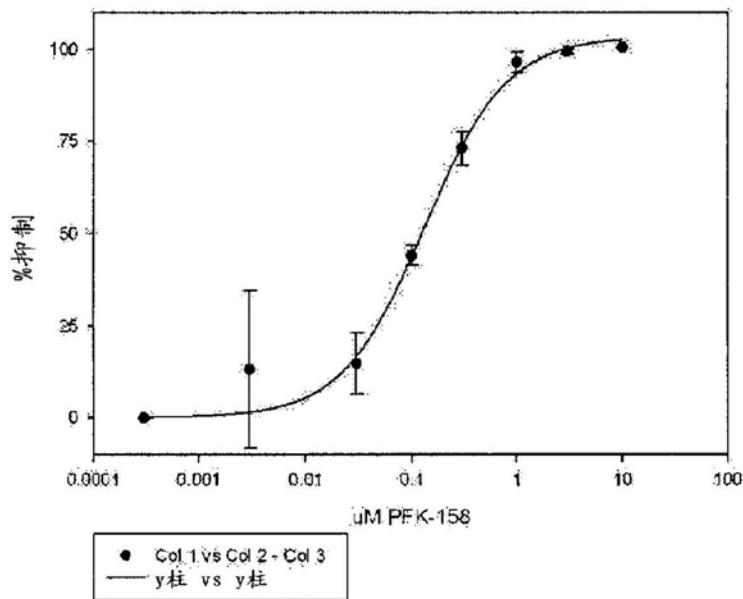


图1

PFK-158 葡萄糖摄取

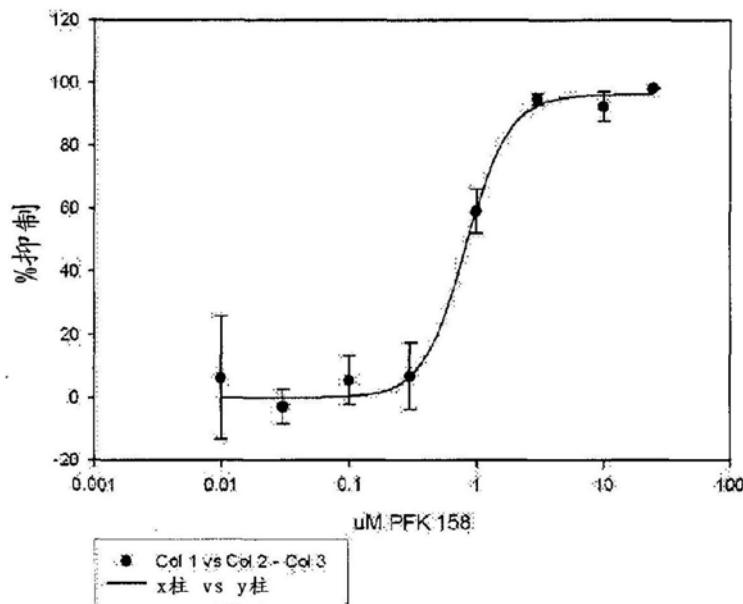


图2

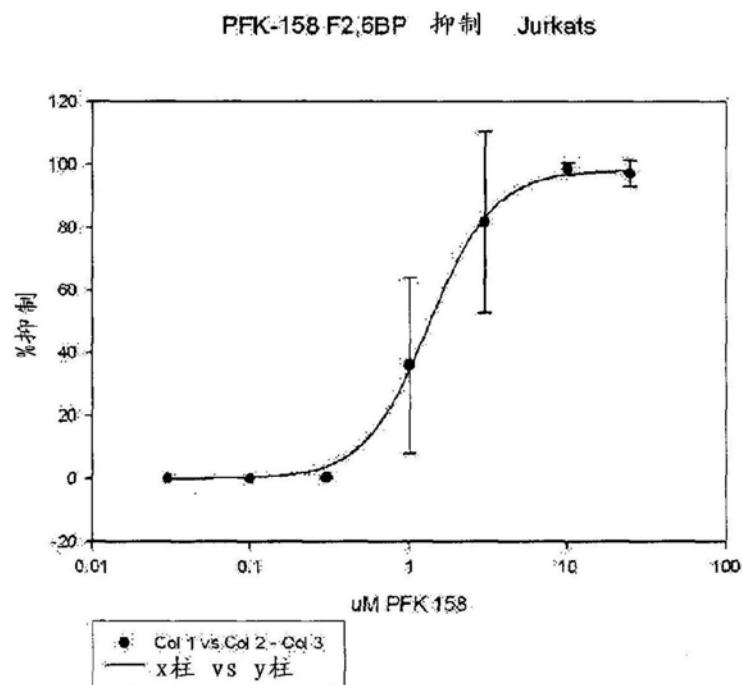


图3

时间与在Ba1bC小鼠中PFK-158的血浆浓度
(IV 给药, 5 mg/kg)

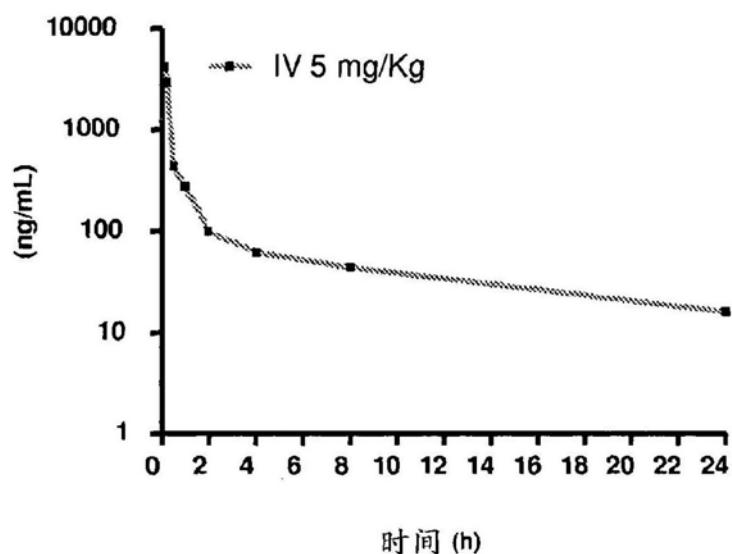


图4

时间与在SD大鼠中PFK-158的血浆浓度
(IV 给药, 30 mg/kg)

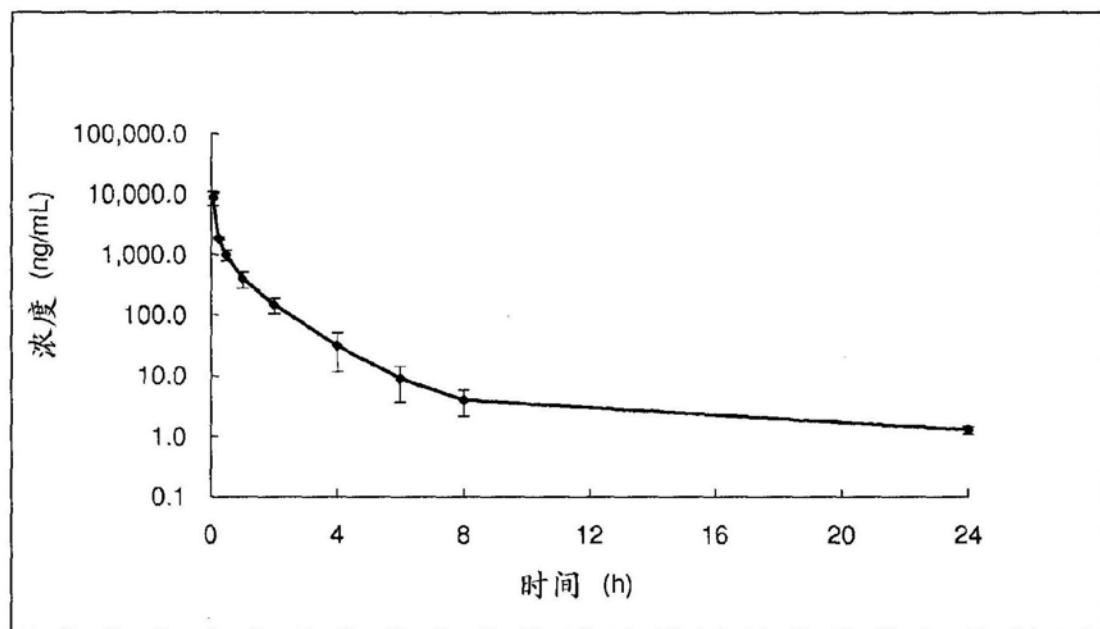


图5

Lewis肺癌模型

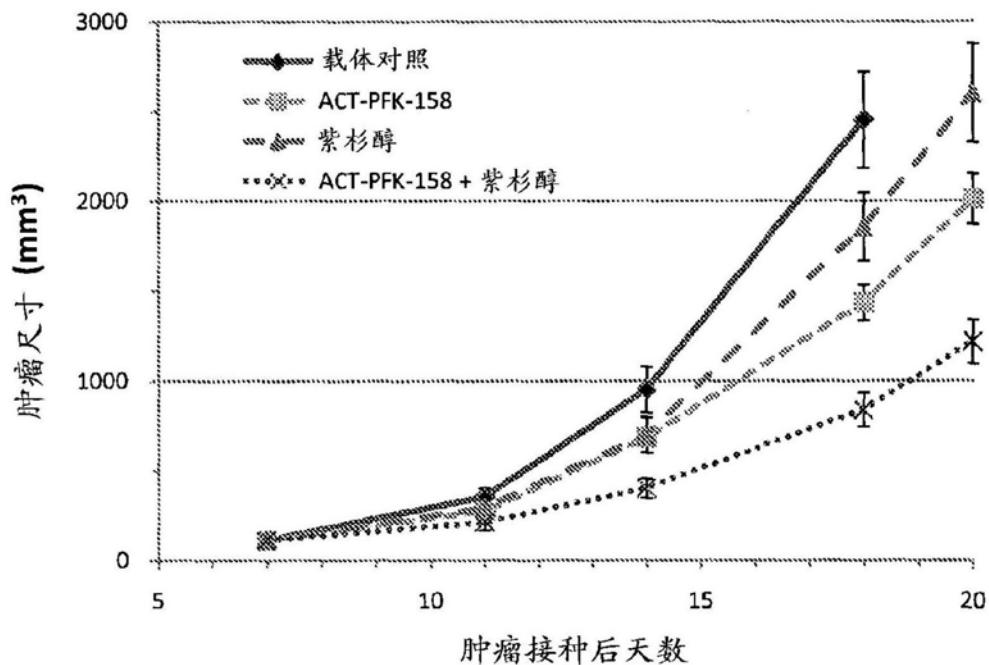


图6

CT-26鼠结肠癌模型

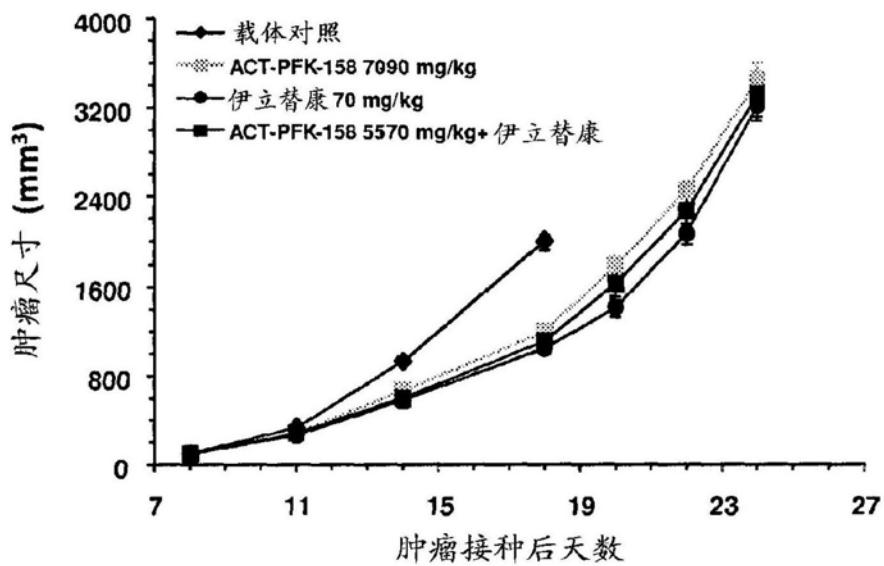


图7

Bx-PC3胰腺癌模型

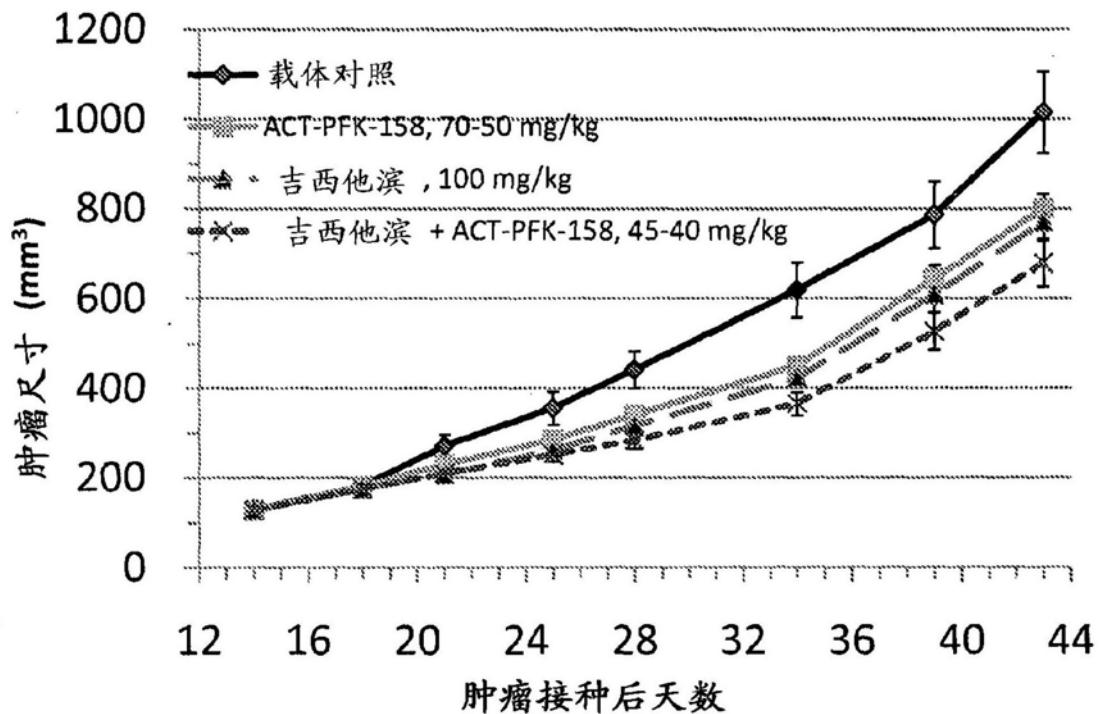


图8