



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101977620 B

(45) 授权公告日 2014. 05. 07

(21) 申请号 200980110610. 4

(22) 申请日 2009. 03. 13

(30) 优先权数据

0805035. 3 2008. 03. 18 GB

0805036. 1 2008. 03. 18 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 09. 17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2009/000687 2009. 03. 13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/115776 EN 2009. 09. 24

(73) 专利权人 英国技术集团国际有限公司

地址 英国伦敦

(72) 发明人 G·詹森 A·杰克曼

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 李进 刘健

(51) Int. Cl.

A61K 38/05(2006. 01)

A61P 19/00(2006. 01)

A61P 35/02(2006. 01)

(56) 对比文件

W0 03/020748 A1, 2003. 03. 13, 全文.

W0 03/020300 A1, 2003. 03. 13, 全文.

W0 03/072091 A1, 2003. 09. 04, 全文.

Gibbs D et al. BGC 945, a novel
tumor-selective thymidylate synthase
inhibitor targeted to alpha-folate
receptor-overexpressing tumors.《Cancer research》. 2005, 第 64 卷 (第 24
期), 11721-11728.Henderson E A et al. Targeting the
alpha-folate receptor with cyclopenta(g)
quinazoline-based inhibitors of
thymidylate synthase. 《Bioorganic and
medicinal chemistry》. 2006, 第 14 卷 (第 14
期), 5020-5042.Jackman A L et al. Antifolates targeted
specifically to the folate receptor.
《Advanced drug delivery reviews》. 2004, 第 56
卷 (第 8 期), 1111-1125.

审查员 高欣

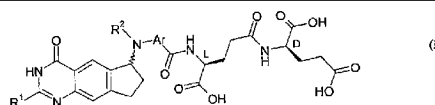
权利要求书1页 说明书19页 附图5页

(54) 发明名称

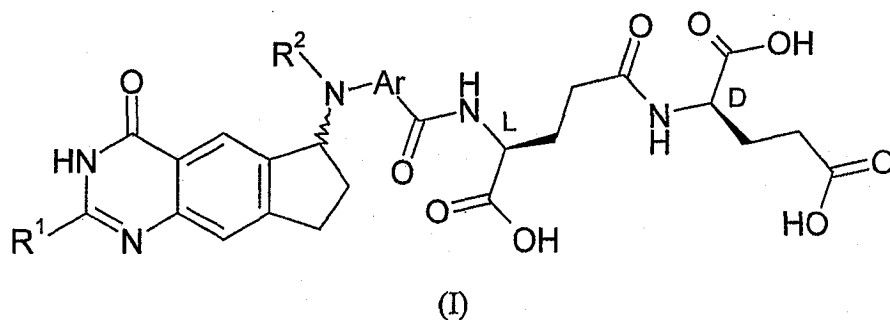
用于治疗类风湿性关节炎或急性骨髓性白血
病的环戊二烯并 [G] 喹唑啉衍生物

(57) 摘要

一种含 L-Glu-γ-D-Glu 二肽基团的式 (I) 环戊二烯并 [g] 喹唑啉衍生物: 其中: R¹ 是氨基、C₁₋₄烷基、C₁₋₄羟基烷基、C₁₋₄氟代烷基或甲氧基-C₁₋₄-烷基; R² 是氢、C₁₋₄烷基、C₃₋₄链烯基、C₃₋₄链炔基、C₂₋₄羟基烷基、C₂₋₄卤代烷基或 C₁₋₄氰基烷基; 和 Ar 是可任选带有一个或两个取代基的亚苯基、噻吩二基、噻唑二基、吡啶二基或嘧啶二基, 所述取代基选自卤代、羟基、氨基、硝基、氰基、三氟甲基、C₁₋₄烷基和 C₁₋₄烷氧基。化合物 (I) 任选呈现药学上可接受的盐或酯的形式; 可用于治疗类风湿性关节炎或急性骨髓性白血病。



1. 含 L-Glu- γ -D-Glu 二肽基团的式 (I) 环戊二烯并 [g] 喹唑啉化合物在制备用于治疗骨髓性白血病的药物中的用途：



其中：

R¹ 是甲基或羟甲基；

R² 是甲基或丙-2-炔基；和

Ar 是 1,4-亚苯基或 2-氟代-1,4-亚苯基；

化合物 (I) 任选地为药学上可接受的盐或酯的形式。

2. 根据权利要求 1 所述的用途，其中环戊二烯并 [g] 喹唑啉化合物是：

N-{N-[4-[N-(2-甲基-4-氧代-3,4,7,8-四氢-6H-环戊二烯并 [g] 喹唑啉-6-基)-N-(丙-2-炔基)氨基]苯甲酰基]-L- γ -谷氨酰基}-D-谷氨酸；或

N-{N-[4-[N-(2-羟基甲基-4-氧代-3,4,7,8-四氢-6H-环戊二烯并 [g] 喹唑啉-6-基)-N-(丙-2-炔基)氨基]苯甲酰基]-L- γ -谷氨酰基}-D-谷氨酸；

或其药学上可接受的盐或酯。

3. 根据权利要求 2 所述的用途，其中环戊二烯并 [g] 喹唑啉化合物作为其 6S 异构体存在。

4. 根据权利要求 1 所述的用途，其中环戊二烯并 [g] 喹唑啉化合物与药学上可接受的稀释剂或载体一起给予。

5. 根据权利要求 1-4 任一项所述的用途，其中所述药物用于治疗急性骨髓性白血病。

用于治疗类风湿性关节炎或急性骨髓性白血病的环戊二烯并 [g] 喹唑啉衍生物

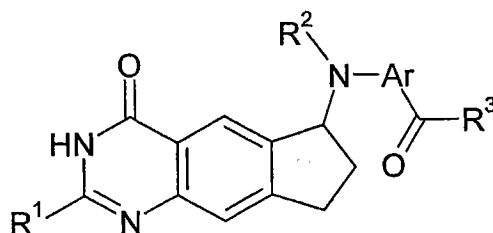
[0001] 发明背景

[0002] 本发明涉及环戊二烯并 [g] 喹唑啉衍生物的应用。更特别是其涉及用于治疗类风湿性关节炎 (RA) 和急性骨髓性白血病 (AML) 的环戊二烯并 [g] 喹唑啉衍生物。

[0003] 已经开发出显示涉及它们的既抑制胸苷酸合成酶 (TS) 的能力并且也涉及它们对抗多种细胞系的抗癌活性的良好活性水平的环戊二烯并 [g] 喹唑啉衍生物。

[0004] WO 94/11354 A1 (British Technology Group Limited) 公开了下式三环化合物：

[0005]



[0006] 其中 R¹ 是氢、氨基、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基、C₁₋₄ 羟基烷基或 C₁₋₄ 氟代烷基；

[0007] R² 是氢、C₁₋₄ 烷基、C₃₋₄ 链烯基、C₃₋₄ 链炔基、C₂₋₄ 羟基烷基、C₂₋₄ 卤代烷基或 C₁₋₄ 氰基烷基；

[0008] Ar 是可任选带有一个或两个取代基的亚苯基、噻吩二基、噻唑二基、吡啶二基或嘧啶二基，所述取代基选自卤代、羟基、氨基、硝基、氰基、三氟甲基、C₁₋₄ 烷基和 C₁₋₄ 烷氧基；和

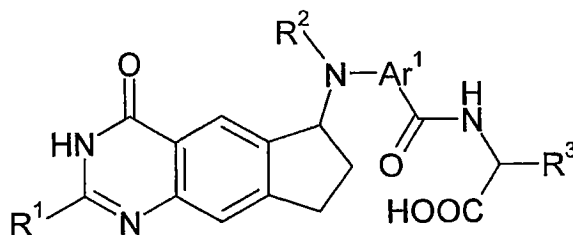
[0009] R³ 是下式之一的基团：

[0010] $\text{-NHCH(CO}_2\text{H)-A}^1\text{-Y}^1$ $\text{-NH-A}^3\text{-Y}^3$

[0011] 或 R³ 是 N- 连接的天然存在的氨基酸，其选自 L- 丙氨酸、L- 亮氨酸、L- 异亮氨酸、L- 缬氨酸和 L- 苯基丙氨酸。在公开的化合物中的是 L-Glu-γ-D-Glu 化合物 CB300638，其也在 Clinical Cancer Research, 5, 1999 年 11 月 (增刊), #566 (Theti 等) 和 Proceedings of the American Association for Cancer Research, 41, 2000 年 3 月, #33 (Jackman 等) 中提到，以及在 J. Med. Chem., 2000, 43, 1910-1926 中的第 1923 页作为化合物 7b 公开。

[0012] WO 95/30673 A1 (British Technology Group Limited) 公开了下式的环戊二烯并 [g] 喹唑啉：

[0013]



[0014] 其中 R¹ 是氢、氨基、C₁₋₄ 烷基、C₁₋₄ 烷氧基、C₁₋₄ 羟基烷基或 C₁₋₄ 氟代烷基；

[0015] R² 是氢、C₁₋₄ 烷基、C₃₋₄ 链烯基、C₃₋₄ 链炔基、C₂₋₄ 羟基烷基、C₂₋₄ 卤代烷基或 C₁₋₄ 氰基

烷基；

[0016] Ar^1 是可任选带有一个或两个取代基的亚苯基、噻吩二基、噻唑二基、吡啶二基或嘧啶二基，所述取代基选自卤代、羟基、氨基、硝基、氰基、三氟甲基、 C_{1-4} 烷基和 C_{1-4} 烷氧基；和

[0017] R^3 是下式之一的基团：

[0018] $-\text{A}^1-\text{Ar}^2-\text{A}^2-\text{Y}^1 \quad -\text{A}^5-\text{CON}(\text{R})\text{CH}(\text{Y}^4)\text{Y}^5 \quad -\text{A}^8-\text{X}-\text{Ar}^4$

[0019] 叶酸受体 (α -FR；膜相关叶酸-结合蛋白) 的 α -同工型是糖基磷脂酰肌醇锚定的细胞膜蛋白质，其对叶酸和更具生物相关性还原的叶酸具有非常高度的亲合力 ($K_d \sim 0.1\text{nM}$)。叶酸内化的机制是受体-介导的内吞作用。 α -FR 在许多癌症中过度表达，尤其是在卵巢源性癌中过度表达，其中在 90% 的病例中高度和均匀地过度表达；参见 *Cancer Res.* 51, 5329-5338, 1991 (Campbell 等, 1991)。此外，高 α -FR 表达已与进行性的、抗铂疾病和差的预后相关联-参见 *Int. J. Cancer* 74, 193-198, 1997 和 *Int. J. Cancer* 79, 121-126, 1998 (两者均为 Toffoli 等)。 β -同工型在上皮和非上皮来源的肿瘤中广泛表达，其表达水平一般分别为低/中和高，见在 *Critical Rev. Therap. in Drug Carrier Systems* 15, 587-627, 1998 (Reddy 和 Low) 中的综述。

[0020] 叶酸受体 (α 和 β) 在一些成人正常组织中表达 (低至中度表达)。已经报告，与对 RFC (还原性-叶酸载体) 的亲合力比较，一般类别的环戊二烯并 [g] 喹啉中的某些化合物，对于 α -叶酸受体表达人肿瘤细胞系具有高水平选择性。在 WO 03/020300 A1、WO 03/020706 A1 和 WO03/020748 A1 (BTG International Limited) 中公开了这样的化合物。L-Glu- γ -D-Glu 化合物 CB300945 在公开的化合物中，其也在 *Tetrahedron*, 63(7), 2007 年 2 月 12 日, 1537-1543 (Bavetsias 等) 和 *Cancer Research* 65, 2005 年 12 月 15 日, 11721-11728 (Gibbs 等) 中提到。

[0021] 通常在胎盘组织和在造血细胞中找到 FR- β ，其在骨髓单核细胞系中表达，并且尤其在嗜中性粒细胞成熟期间或单核细胞或巨噬细胞激活期间表达水平提高。然而，在正常造血细胞上表达的 FR- β ，不同于在激活的巨噬细胞上的表达，例如，是非功能性的，其不能结合叶酸和使其内化。FR- β 在得自慢性骨髓源性白血病 (CML) 患者的恶性细胞上表达并在大约 70% 的 AML 患者的恶性细胞上表达。

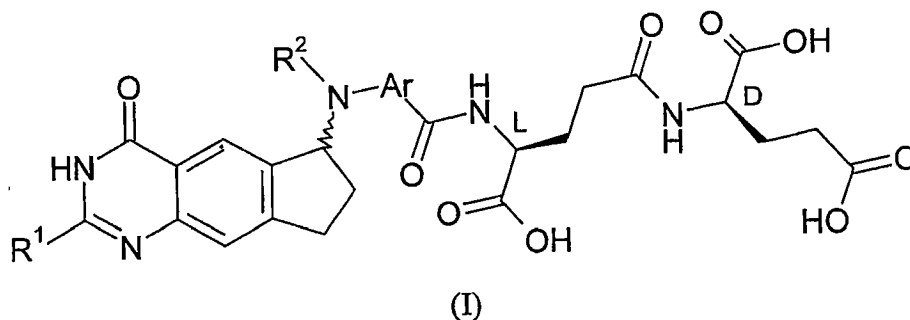
[0022] WO 03/072091-A1 (The Ohio State University Research Foundation) 采用以下发现，即在通过 FR- β 诱导剂使来自骨髓性白血病患者的恶性细胞中 FR- β 的表达增加。骨髓性白血病细胞，优选 AML 细胞中的 FR- β 表达是功能性的，其结合叶酸并使其内化，此与在大多数正常造血细胞中的 FR- β 表达不同，其是非功能性的。这样的功能性的 FR- β 是与叶酸共轭的治疗剂的靶。

[0023] Jansen 在第 13 届蝶啶和叶酸的化学和生物学的国际学术讨论会 (13th International Symposium on Chemistry & Biology of Pteridines & Folates) 的题为 "Antifolates in chronic inflammatory diseases/rheumatoid arthritis: what can we learn from cancer and vice versa," *Pteridines*, 16:46, 2005 的摘要中指出，甲氨蝶呤 (MTX) 是类风湿性关节炎患者的治疗方案中的锚定药物 (anchor drug)。他进一步推测表现结合亲合性的、基于环戊二烯并 [g] 喹啉的 TS 抑制剂，接近叶酸并因而可为在治疗癌症及炎症疾病中有意义的 FR-靶药物。

[0024] 发明简述

[0025] 作者现在已经发现,某些普通种类的环戊二烯并 [g] 喹唑啉中的化合物对 β -叶酸受体表达细胞系具有意想不到的高水平的选择性。这样的化合物具有两个结构特征,即三环结构和在与叶酸比较时对谷氨酸盐侧链的修饰。因此,本发明包括含有 L-Glu- γ -D-Glu 二肽基团的式 (I) 环戊二烯并 [g] 喹唑啉衍生物:

[0026]



[0027] 其中:

[0028] R^1 是氨基、 C_{1-4} 烷基、 C_{1-4} 羟基烷基、 C_{1-4} 氟代烷基或甲氧基- C_{1-4} -烷基;

[0029] R^2 是 C_{1-4} 烷基、 C_{3-4} 链烯基、 C_{3-4} 链炔基、 C_{2-4} 羟基烷基、 C_{2-4} 卤代烷基或 C_{1-4} 氰基烷基;和

[0030] Ar 是可任选带有一个或两个取代基的亚苯基、噻吩二基、噻唑二基、吡啶二基或嘧啶二基,所述取代基选自卤代、羟基、氨基、硝基、氰基、三氟甲基、 C_{1-4} 烷基和 C_{1-4} 烷氧基。

[0031] 化合物 (I) 任选为药学上可接受的盐或酯的形式;

[0032] 所述化合物用于治疗类风湿性关节炎或急性骨髓性白血病。

[0033] 本发明化合物显示一个或多个以下优点:

[0034] 1. 当生长在生理浓度的叶酸中时,细胞过度表达 β -FR 的高选择性,并具有 RFC 的正常表达;

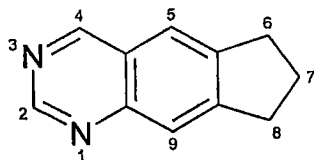
[0035] 2. 有效的 TS 抑制,对 RFC 的低亲合力和对 β -FR 中等至高亲合力;

[0036] 3. TS-特异活性和体内抗水解酶;和

[0037] 4. 在用中等 β -FR 表达的主要的中国仓鼠卵巢细胞系筛选中的选择活性。

[0038] 在本说明书中,术语烷基、链烯基和链炔基包括直链和支链基团,但是提及单个烷基,诸如丙基时,则仅特指直链基团。类似的约定应用在其它通称上。而且,用于环戊二烯并 [g] 喹唑啉核的编号系统为如下显示的常规编号系统:

[0039]



[0040] 本文以标准方式指定氨基酸残基 (Pure and Applied Chemistry, 1974, 40, 317 和 European Journal of Biochemistry, 1984, 138, 9)。因此,例如,依据上下文, γ -谷氨酰基表示残基 $H_2NCH(CO_2H)CH_2CH_2CO-$ 或 $-NHCH(CO_2H)CH_2CH_2CO-$,在这些残基中的碳原子从 α -羧基碳原子开始编码为 1 位。

[0041] 将会观察到的是,本发明的环戊二烯并 [g] 喹唑啉含至少三个不对称碳原子 [存

在于基团 $-N(R^2)-$ 与三环系统的附着点上和在基团 $L-Glu-\gamma-D-Glu$ 的 α -碳原子上], 并且因此可存在外消旋体和光学活性形式。应该理解的是, 本发明包括外消旋体和光学活性形式两者, 如何通过立体有择合成或通过分离异构体化合物的混合物, 可获得这样的光学活性形式, 这应是公知常识。应该认识到, 一个异构体可比另一个更有意义, 这是由于其展示出的活性或由于较优越的物理特性, 例如水溶性的性质所致。

[0042] 也应该理解的是, 式 (I) 的环戊二烯并 [g] 喹唑啉可展示出互变异构现象, 并且在本说明书中显示的结构式仅代表一种可能的互变异构形式。

[0043] 也应该理解的是, 某些式 (I) 的环戊二烯并 [g] 喹唑啉可以溶剂化物以及非溶剂化物的形式, 例如, 水合物的形式存在。

[0044] 当 R^1 或 R^2 为 C_{1-4} 烷基时, 其适宜的值, 或者可存在于 Ar 上的 C_{1-4} 烷基取代基的适宜的值, 是例如甲基、乙基、丙基或异丙基。

[0045] 可存在于 Ar 上的 C_{1-4} 烷氧基取代基的适宜的值是, 例如, 甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基或丁氧基。

[0046] 可存在于 Ar 上的卤代取代基的适宜的值是, 例如, 氟代、氯代或溴代。

[0047] 当 R^2 是 C_{3-4} 链烯基时, 其适宜的值是, 例如, 丙-2-烯基、丁-2-烯基、丁-3-烯基或 2-甲基丙-2-烯基; 和当其为 C_{3-4} 链炔基时的适宜的值是, 例如, 丙-2-炔基或丁-3-炔基。

[0048] 当 R^2 是 C_{2-4} 羟基烷基时, 其适宜的值是, 例如, 2-羟基乙基或 3-羟基丙基; 当其为 C_{2-4} 卤代烷基时的适宜的值是, 例如, 2-氟代乙基、2-氯代乙基、2-溴代乙基、3-氟代丙基、3-氯代丙基或 3-溴代丙基; 和当其为 C_{1-4} 氰基烷基时的适宜的值是, 例如, 氰基甲基、2-氰基乙基或 3-氰基丙基。

[0049] 当 Ar 是亚苯基时的适宜的值是, 例如, 1,3- 或 1,4- 亚苯基, 特别是 1,4- 亚苯基。

[0050] 当 Ar 是噻吩二基时的适宜的值是, 例如, 噻吩-2,4-二基或噻吩-2,5-二基; 当其为噻唑二基时的适宜的值是, 例如, 噻唑-2,4-二基或噻唑-2,5-二基; 当其为吡啶二基时的适宜的值是, 例如, 吡啶-2,4-二基、吡啶-2,5-二基、吡啶-2,6-二基或吡啶-3,5-二基; 和当其为嘧啶二基时的适宜的值是, 例如, 嘧啶-2,4-二基、嘧啶-2,5-二基或嘧啶-4,6-二基。

[0051] 如所指出的, Ar 可携带一个或两个取代基。当存在取代时, Ar 中的优选的取代水平, 是或者两个取代基或者特别是一个取代基; 而一个或两个取代基可便利地位于邻近结合至基团 $-CO-L-Glu-\gamma-D-Glu$ 的原子, 卤代取代基, 诸如氟代是优选的。

[0052] 本发明的环戊二烯并 [g] 喹唑啉的适宜的药学上可接受的盐形式是, 例如, 与无机酸或有机酸, 例如盐酸、氢溴酸、三氟乙酸或顺丁烯二酸所成的酸加成盐; 或碱金属, 例如钠、碱土金属, 例如钙的盐或铵盐, 例如, 四(2-羟基乙基)铵盐。

[0053] 本发明的环戊二烯并 [g] 喹唑啉的适宜的药学上可接受的酯形式是, 例如, 与最多至 6 个碳原子的脂族醇形成的酯, 例如, 甲基、乙基或叔丁基酯。

[0054] 该化合物含三个羧基。盐或酯可为单-酸-二-盐或-酯、二-酸-单-盐或-酯, 或甚至三-盐或-酯。优选 R^1 是 C_{1-4} 烷基或 C_{1-4} 羟基烷基。更优选 R^1 是甲基, 或特别是羟基甲基。

[0055] 优选 R^2 是甲基、乙基、丙基、丙-2-烯基、丙-2-炔基、2-羟基-乙基、2-氟乙基、

2- 溴乙基或 2- 氰基乙基。更优选 R^2 是甲基, 或特别是丙 -2- 炔基。

[0056] 优选 Ar 是可任选带一个或两个选自氯代和特别为氟代的取代基的 1,4- 亚苯基; 噻吩 -2,5- 二基、噻唑 -2,5- 二基或吡啶 -2,5- 二基。更优选 Ar 是 1,4- 亚苯基或具有 2- 氟代取代基的 1,4- 亚苯基, 如 2,6- 二氟代 -1,4- 亚苯基或特别是 2- 氟代 -1,4- 亚苯基, 或是吡啶 2,5- 二基。最优选 Ar 是 1,4- 亚苯基或 2- 氟代 -1,4- 亚苯基。

[0057] 本发明的优选的环戊二烯并 [g] 喹唑啉具有式 (I), 其中 R^1 是 C_{1-4} 烷基或 C_{1-4} 羟基烷基, 特别是羟基甲基;

[0058] R^2 是甲基、乙基、丙基、丙 -2- 烯基、丙 -2- 炔基、2- 羟基乙基、2- 氟乙基、2- 溴乙基或 2- 氰基乙基; 和

[0059] Ar 是可任选带有一个或两个选自氯代且特别为氟代的取代基的 1,4- 亚苯基; 噻吩 -2,5- 二基、噻唑 -2,5- 二基或吡啶 -2,5- 二基。

[0060] 本发明的进一步优选的环戊二烯并 [g] 喹唑啉具有式 (I), 其中 R^1 是甲基或羟基甲基;

[0061] R^2 是甲基或丙 -2- 炔基; 和

[0062] Ar 是 1,4- 亚苯基或具有 2- 氟代取代基的 1,4- 亚苯基, 如 2,6- 二氟代 -1,4- 亚苯基或特别是 2- 氟代 -1,4- 亚苯基, 或是吡啶 2,5- 二基。

[0063] 本发明特别优选环戊二烯并 [g] 喹唑啉具有式 (I), 其中 R^1 是甲基或羟基甲基;

[0064] R^2 是甲基或优选丙 -2- 炔基; 和

[0065] Ar 是 1,4- 亚苯基或 2- 氟代 -1,4- 亚苯基。

[0066] 本发明的特别具体优选的环戊二烯并 [g] 喹唑啉是:

[0067] $N\{N\{4-[N(2\text{-甲基-4-氧代-3,4,7,8-四氢-6H-环戊二烯并[g]喹唑啉-6-基})-N(丙-2-炔基)氨基]苯甲酰基}\}-L-\gamma\text{-谷氨酰基}\}-D\text{-谷氨酸};$ 或

[0068] $N\{N\{4-[N(2\text{-羟基甲基-4-氧代-3,4,7,8-四氢-6H-环戊二烯并[g]喹唑啉-6-基})-N(丙-2-炔基)氨基]苯甲酰基}\}-L-\gamma\text{-谷氨酰基}\}-D\text{-谷氨酸};$ 或其药学上可接受的盐或酯;

[0069] 以及这两个化合物的 6S 异构体。

[0070] 尽管本发明化合物可以作为立体异构体的混合物存在, 但优选的是将它们拆分为一种光学活性异构形式。这样的需要使该化合物的合成变得复杂, 并且因此优选它们含尽可能少的不对称碳原子, 以与实现所需的活性相符。

[0071] 然而, 如前所指出的, 本发明的环戊二烯并 [g] 喹唑啉含至少三个不对称碳原子。在环系统的 6 位上的这些不对称碳原子优选具有 6S 取向而不是 6R 取向。上文描述的优选的化合物 (I) 因而优选在该不对称碳原子上具有这样的构型, 或不优选为其中这些不对称碳原子的一个或两个未经拆分的混合物。

[0072] 可通过任何已知的可适用制备化学相关化合物的方法制备本发明的环戊二烯并 [g] 喹唑啉。

[0073] 本发明的环戊二烯并 [g] 喹唑啉本身可为活性的, 或可为在体内转化为活性化合物的前药。可将本发明的环戊二烯并 [g] 喹唑啉, 以包含与药学上可接受的稀释剂或载体组合的环戊二烯并 [g] 喹唑啉的药用组合物的形式, 给予包括人的温血动物。该组合物可为适宜口服使用的形式, 例如, 片剂、胶囊剂、水性或油性溶液剂、混悬剂或乳剂; 适宜局部

应用的形式,例如,乳膏剂、油膏剂、凝胶剂或者水性或油性溶液剂或混悬剂;适宜经鼻应用的形式,例如,嗅剂、鼻喷雾剂或滴鼻剂;适宜经阴道或直肠应用的形式,例如,栓剂;适宜经吸入给药形式,例如,作为细微粉碎的粉剂,诸如干粉剂、微晶形式或液体气雾剂;适宜经舌下或颊应用的形式,例如,片剂或胶囊剂;或适宜胃肠外应用的形式(包括静脉、皮下、肌肉内、血管内或输注应用),例如,灭菌水性或油性溶液剂、乳剂或混悬剂。一般,可通过常规方式采用常规赋形剂制备以上的组合物。

[0074] 通常环戊二烯并 [g] 喹唑啉将以动物的每平方米体表面积 50-25000,特别为 50-5000mg,即大约 1500,特别为 1-100mg/kg 范围的剂量给予温血动物。然而,当需要时,可采用超出该范围的剂量,特别是,当优选的给药模式包括使用皮下输注时,则剂量范围可增大至 1-1000mg/kg。优选采用的每日的剂量范围为 10-250mg/kg,特别为 30-150mg/kg。然而,每日剂量将必须依据被治疗的主体、特定的给药途径和被治疗的疾病的严重程度而作出变化。因此,可通过治疗任何具体患者的执业医师确定最佳剂量。

[0075] 因此,本发明也包括在需要这样治疗的患者中治疗类风湿性关节炎或急性骨髓性白血病的方法,该方法包括给予所述患者有效量的如上文定义的环戊二烯并 [g] 喹唑啉衍生物。

[0076] 通常以每平方米动物体表面积 5-25000,特别为 5-500mg,即大约 0.1-500,特别为 0.1-10mg/kg 的剂量范围给予该化合物。然而,当需要时,可采用超出该范围的剂量。可采用局部给予本发明环戊二烯并 [g] 喹唑啉。因此,例如,对于局部给药,可采用的每天剂量范围在,例如,0.1-10mg/kg。

[0077] 可以单位剂型,即以各自包含单位剂量或单位剂量的倍数或约数量的不连续部分的形式,例如,片剂或胶囊剂,配制含该喹唑啉的组合物。这样的单位剂型可,例如,含范围在 1-250 或 1-500mg 的一定量的环戊二烯并 [g] 喹唑啉。

[0078] 通过以下实施例阐述本发明。

[0079] 图的简述

[0080] 图 1:RA-滑膜组织的免疫组织化学:(A)兔同种型(isotype)染色、(B)FR- β 染色和 (C)巨噬细胞染色(3A5)的光学显微镜检查。(D)FR- β 、(E)CD-68(巨噬细胞)以及 (F)D 和 E 的合并的免疫荧光(双重)染色。注意:核被染成蓝色(Dapi-染色)。

[0081] 图 2:(A)在 MTX 治疗前 RA 患者($n = 15$)的滑膜组织中的 3A5(巨噬细胞)和 FR- β 阳性细胞/ mm^2 之间的相关性。滑膜里衬下层(sublining layer)/ mm^2 的阳性细胞计数中值,对于 FR- β 为 126(范围:9-630)而对于 3A5 为 219(范围:11-622)。线性回归: $R = 0.64$; $p = 0.04$ 。(B)用 MTX 治疗 4 个月后的 DAS28 改善(Δ DAS28)和 FR- β 在巨噬细胞上的表达(阳性细胞/ mm^2)之间的相关性($R = 0.31$; $p = 0.11$)。

[0082] 图 3:滑膜组织和离体培养的 RA 外周血淋巴细胞(PBLs)中的 FR- β mRNA 表达。在 RA 患者的外周血淋巴细胞(PBLs; $n = 9$)、单核细胞($n = 9$)、离体培养的巨噬细胞($n = 25$)、离体活化的 T-细胞($n = 22$)和滑膜组织($n = 7$)中所测定的 FR- β mRNA 表达的中值。在这些样品中的 FR- β 表达显示为在 CHO- β 细胞(用 FR- β 转染的中国仓鼠卵巢(Chinese Hamster Ovarian)细胞;在这些细胞中的表达设定为 1.00)中表达的百分率。

[0083] 图 4:对于新一代叶酸拮抗剂,FR- α (白色柱)和 FR- β (灰色柱)的相对结合亲和力。通过在材料和方法章节中描述的 [^3H]-叶酸置换 FR- α 表达 KB-细胞和 FR- β 转染

的 CHO- β 细胞,测定药物的 FR- α 和 FR- β 结合亲和力。结合亲和力表现为相对叶酸结合亲和力的百分率。结果为 3-5 次分开的实验的均值 $\pm$ SD (SD < 30%)。为了比较, RFC 对叶酸拮抗剂的亲和力表示为:基于先前公布的资料,++++(高亲和力)、+++ (中等亲和力)、++ (低亲和力)、+ (亲和力差)、+/- (亲和力非常差)。

[0084] 图 5:由加或不加 1 μ M 叶酸的 BGC 945(A)、CB300635(B) 和增补或不增补叶酸 (1 μ M) 或亚叶酸 (20nM) 的 AG2034(C/D) 对 CHO/WT 和 CHO/FR- β 细胞的生长抑制。结果为 3 次实验的均值 (SD < 20%)。

[0085] 发明详述

[0086] 实施例 1:开发作为新一代叶酸拮抗剂,以激活类风湿性关节炎患者滑膜组织中的巨噬细胞的潜在递送途径的叶酸受体- β

[0087] 引言

[0088] 叶酸拮抗剂甲氨蝶呤 (MTX) 是在治疗类风湿性关节炎 (RA) 患者中最广泛应用的缓解病情的抗风湿药物 (DMARD) 的锚定-药物。其或者作为单一药物使用或者与其它 DMARDs (如,柳氮磺胺吡啶和羟基氯喹) 联合使用,并且在大多数包括生物药剂 (抗-TNF α 或-CD20 单克隆抗体) 的治疗策略中 MTX 的应用是必要的。

[0089] MTX 的细胞药理学的首要关键步骤是可由至少 3 种不同途径介导的细胞通路;还原型叶酸载体 (RFC)、膜-相关叶酸受体 (MFR) 或质子偶合 (低 pH) 叶酸转运蛋白 (PCFT)。后者转运蛋白主要涉及肠内叶酸摄取。其它转运途径通过促进天然还原型叶酸辅因子和叶酸拮抗剂如 MTX 的摄取保持着免疫活性细胞 (immune competent cells) 的生理和药理学关联性。RFC 和 MFR 在 (抗) 叶酸摄取 (跨膜载体对内吞作用 / 饮液作用 (potocytosis)、底物特异性 (低亲和力叶酸 / 高亲和力 MTX 对高亲和力叶酸 / 低亲和力 MTX) 和组织特异性 (组成型表达对限制性表达) 的机制上有所不同。

[0090] 对于 MFR,已经鉴定三种同工型 (α 、 β 和 γ)。MFR 的 α -同工型在特殊类型的癌症 (卵巢癌) 中过度表达,而 γ -同工型是来自造血细胞的分泌蛋白。已经描述 FR- β 同工型在 RA 患者和关节炎动物模型的发炎的滑膜液中活化的巨噬细胞上的选择性表达。随后, FR- β 被公认为对于关节炎成像和对于在治疗上的选择性抗体-引导的或叶酸-偶联物引导的毒素和其它小分子 / 高分子的传递是有吸引力的靶。迄今为止,仅已在癌细胞 / 组织过度表达 FR α 上探究用叶酸拮抗剂靶向 FR。

[0091] 在过去的几十年,已经从围绕抗 MTX 的公共机制的观点设计并临床评价第二代叶酸拮抗剂,所述机制包括经由 RFC 削弱的转运、有缺陷的聚谷氨酰基作用 (polyglutamylation)、增强的靶酶 DHFR 的活性和 / 或增加的药物流出。基于该背景,第二代抗叶酸剂 (antifolates) 包括更有效经由 RFC 转运、更有效聚谷氨酰基作用或独立的聚谷氨酰基作用,或靶向叶酸代谢中的除 DHFR 外的其它关键酶,如,胸苷酸合成酶 (TS) 或甘氨酸核糖核苷酸转甲酰基酶 (transformylase) 的化合物。在本研究中,发明人开始调查独特的第二代抗叶酸剂是否可用作对于 RA 患者滑膜组织中 FR- β 表达细胞和 / 或免疫活性细胞的选择性靶向药物。发明人已经确定 TS 抑制剂 BGC 945 为实现高 FR- β 结合亲和力和低 RFC 亲和力标准,因此使在 FR- β 表达细胞中能选择性摄取药物的原型抗叶酸药物。

[0092] 材料和方法

[0093] 药物

[0094] 叶酸自 Sigma Chem. Co, St. Louis, MO 获得, L- 亚叶酸自 Merck Eprova, Schaffhausen, 瑞士获得, 甲氨蝶呤自 Pharmachemie, Haarlem, Netherlands 和培美曲塞 (Pemetrexed)/ **ALIMTA**[®] (Eli Lilly) 经由 Vumc 药理学部获得。以下叶酸拮抗剂药物自指定的公司 / 研究所获得 ; 雷替曲塞 (Raltitrexed)/ **Tomudex**[®] / ZD 1694 (AstraZeneca, UK)、PT523 和 PT644 (Dr. A. Rosowsky, Harvard Medical School, Boston, MA)、G W1843 (Glaxo Wellcome, USA)、CB300635 (Institute of Cancer Research, Sutton, UK)、BGC 9331 和 BGC 945 (6RS 和 6S) (BTG International Limited, London, UK)、5,10- 二脱氮四氢叶酸 (DDA THF) (Eli Lilly, Indianapolis, IN) 和 AG2034 (Agouron/Pfizer Pharmaceuticals, San Diego, CA)。在表 2 和 3 中描述了这些叶酸拮抗剂的化学结构。[3', 5', 7,9-³H] 叶酸 (20-40Ci/mmol, MT783) 购自 Moravek, Brea, CA。

[0095] 细胞系

[0096] 使野生型中国仓鼠卵巢 (CHO-WT) 细胞、用 FR- β 转染的 CHO 细胞 (CHO-FR- β) 和表达 FR- α 的人鼻咽表皮样瘤 KB 细胞 (美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection), Manassas, VA) 生长在补充了 10% 胎牛血清、2mM L- 谷氨酰胺、0.15mg/ml 脯氨酸和 100 单位 /ml 青霉素和链霉素的无叶酸的 RPMI 1640 培养基 (Gibco, Grand Island, NY) 中。CHO-FR- β 和 KB 细胞的 [³H] 叶酸结合能力分别为 0.5-1pmol/10⁶ 细胞和 20-40pmol/10⁶ 细胞。将人单核细胞 - 巨噬细胞 THP1 细胞 (美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection), Manassas, VA) 生长在补充了 10% 胎牛血清、2mM L- 谷氨酰胺、0.15mg/ml 脯氨酸和 100 单位 /ml 青霉素和链霉素的、含 2.2 μ M 叶酸的 RPMI 1640 培养基 (Gibco, Grand Island, NY) 中。所有细胞系均保存在 37°C 的含 5% CO₂ 的潮湿空气中。

[0097] 滑膜组织样本

[0098] 在本研究中, 发明人分析了源自 15 位处于治疗前和用 MTX (MTX 的起始剂量 : 7, 5mg/ 周 ; 在 12 周内逐步增加至 15mg/ 周) 治疗 4 个月后的活动期疾病的 RA- 患者的膝关节的滑膜组织活组织切片。活动性疾病定义为 ≥ 6 个肿胀或触痛关节和对医师的和患者的疾病活性的中等或更差水平的评估 (疾病活性评分 ≥ 28 ; DAS-28)。所有患者至少临床累及 1 个膝关节。允许用低剂量泼尼松 (< 10 mg/ 天) 和伴随的稳定剂量的非甾体抗炎药物 (NSAID) 治疗。在纳入本研究之前, 没有患者曾经使用过 MTX。在使用其它的 DMARDs 的患者中, 终止治疗后历经 28 天的廓清期 (washout phase)。如先前作为被莱顿大学医学中心 (荷兰) 医学伦理委员会 (Medical Ethics committees of Leiden University Medical Center (Netherlands)) 和利兹大学医学中心 (UK) (Leeds University Medical Centre (UK)) 认可的关节研究的部分所描述的内容, 实施关节 (内窥) 镜检查操作 (arthroscopy procedure)。参见 Arthritis Rheum. 2002 ; 46 (8) : 2034-2038 和 2000 ; 43 (8) : 1820-1830 (均由 Kraan 等著)。

[0099] 发明人将 7 例来自机械性关节损伤的患者的样本纳入非炎症对照滑膜组织, 所述样本由荷兰, 阿姆斯特丹, VU 大学医学中心整形外科系 (VU University Medical Center, Amsterdam, Netherlands) Dr. B. J. van Royen 提供。为了收集周围血液样本, 所有患者签署知情同意表, 并且对于“DMARD 耐药性”的研究经荷兰, 阿姆斯特丹, VU 大学医学中心医学伦

理委员会认可。

[0100] FR- β 免疫组织化学

[0101] 采用如先前所描述的 3-步免疫过氧化酶方法,对来自 RA 患者和对照组的滑膜组织活检组织进行低温恒温器切片(4 μ m)免疫组织化学染色。参见 Cancer Res. 2001; 61(8):3458-3464(Maliepaard 等)和 2000;60(18):5269-5277(Scheffer 等)。用 FR- β (稀释度 1:3000),同种型(isotype)对照组:正常兔-血清的特异性抗体染色切片。分别用 3A5(稀释度 1:100)和抗-CD3-PE(稀释度 1:25;Dako,Glostrup,Denmark)单克隆抗体(同种型对照组:鼠免疫球蛋白)染色巨噬细胞和 T-细胞。将生物素化的猪抗-兔 IgG(Dako;稀释度 1:200)和兔抗-鼠 IgG(Dako;稀释度 1:300)用作次级抗体。采用 0.4mg/ml AEC(氨基乙基咔唑)显色。在用苏木素对比染色后,封片。如先前所描述的,通过数字影像分析法,分析染色的切片的 FR- β 、3A5 和 CD3 表达。参见 Arthritis Res. Ther. 2005;7(4):R862-R867(Haringman 等)。简言之,为了将各标记代表的区域用于图像采集,使用 400x 放大倍率。用 3-像素重叠将这些区域分成 6 个高倍视野(hpfs)。通过分析 18 个连续的 hpfs,对每 mm² 内膜里衬层和滑膜里衬下层的阳性细胞的损伤数目计数,评估阳性细胞。

[0102] 双重-标记的免疫荧光

[0103] 通过猪-抗-兔 HRP-标记的抗体(稀释度 1:200;Dako, Glostrup, Denmark)探测 FR- β 并且依据制造商的说明书,用若丹明/thyramine(红色荧光素)显色(稀释度 1:1000)。通过利用链霉亲和素 Alexa-488 作为底物(稀释度 1:750;绿色荧光素;Molecular Probes,Eugene,OR)的山羊-抗-鼠生物素化的抗体(稀释度 1:100;Dako, Glostrup,Denmark)探测 CD68。用含 1 μ g/ml DAPI(用于核染色)(Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA)的 Vectashield 封片。用荧光显微镜(Leica DMRB, Rijswijk, Netherlands)检查细胞。

[0104] 分离 RA-患者外周血细胞和培养条件

[0105] 通过对 Ficoll-Paque Plus(Amersham Pharmacia Biotechnologies, UK)进行梯度离心法(于 400 $\times$ g 35 分钟),从新鲜获得的血液样本中分离外周血单核细胞。离心后,小心收集核分裂间期细胞(interphase)并用补充了 1% BSA 的磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次。计数淋巴细胞部分并将其再悬浮于含 10% FCS、2mM L-谷氨酰胺和 100 μ g/ml 青霉素和链霉素的 IMDM 培养基(Invitrogen, Breda, Netherlands)中。于 37 $^{\circ}$ C 在培养瓶中孵育 2 小时后,通过粘着分离单核细胞,随后通过在 10ng/ml 巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)(Strathmann Biotech,Hamburg,Germany)的存在下,培养单核细胞 7 天使 RNA 提取或巨噬细胞分化。

[0106] 通过以 1 $\times$ 10⁶ 个细胞/ml 密度,用单克隆抗-CD28(5 μ g/ml, CLB-CD28/1Sanquin, Amsterdam, Netherlands)和抗-CD3(1 μ g/ml, CLB-T3/4.E, Sanquin, Netherlands),在山羊抗-鼠(Dako,Glostrup,Denmark)涂布的 24 孔板中孵育,收集单核细胞粘着后留在混悬液中的外周血淋巴细胞(PBLs),用于 RNA 分离或用于 T-细胞激活。48 小时刺激后,收集活化的 T-细胞用于 RNA 分离和通过使用流式细胞仪(flow-cytometry)(FACScalibur, Becton & Dickinson)检测 CD25 表达来测定活化状态。

[0107] 在 RA-患者的滑膜组织和外周血细胞中的 FR- β mRNA 表达

[0108] 使用 Qiagen RNeasy Plus 分离试剂盒 (Qiagen, Venlo, Netherlands), 按照制造商提供的说明书分离自 RA 患者的自滑膜组织的 RNA ($n = 7$)、PBLs ($n = 9$)、单核细胞 ($n = 9$)、巨噬细胞 ($n = 25$) 和活化的 T- 细胞 ($n = 22$)。在 RNA 分离之前, 通过在液氮中添加 RPE 缓冲液后预冷的研钵中研磨冷冻的滑膜组织样本, 将它们粉碎。使用 NanodropND-1000 分光光度计 (Nanodrop Technologies, Wilmington, USA) 测定 RNA 总浓度。先前描述的实时逆转录-PCR (RT-PCR) 方法被用于同时检测 FR- β 和甘油醛-3-磷酸盐 (内参基因) 的 mRNA 水平。参见 Cancer Res. 2006 ;66 (11) :5875-5882 (Qi 等)。

[0109] 采用自 Applied Biosystems (Foster City, CA) 的 Taqman Reverse Tran-script Reagents, 按照制造商的方案, 实施逆转录步骤。简言之, 在逆转录酶中, 将 400ng 的总 RNA 与随机六聚物引物 (random hexamer primers) ($50 \mu\text{mol/L}$)、RN 酶抑制剂 (1 个单位/ μL)、MultiScribe 逆转录酶 (5 个单位/ μL) 和三磷酸脱氧核苷混合物 (各为 2.5mmol/L) 混合。首先将 $10\text{-}\mu\text{L}$ 反应混合物于 25°C 孵育 10 分钟, 然后于 48°C 孵育 30 分钟和最后于 95°C 孵育 5 分钟。

[0110] 在 $12.5 \mu\text{L}$ 的 PCR Mastermix (Applied Biosystems)、各 $0.5 \mu\text{L}$ 的正向引物和反向引物 (CTGGCTCCTTGGCTG-AGTTC, ' GCCCAGCCTGGTTATCCA) 和 $0.5 \mu\text{L}$ 的 Taqman 探针 (6F AM-TCCTCCCAGACTACCTGCCCTCAGC-TAMERA) 的存在下, 实施后来的对于 FR- β 的实时 PCR 步骤。控制 GAPDH 基因的引物和 Taqman 探针购自 Applied Biosystems。PCR 条件为于 50°C 下 2 分钟, 然后于 95°C 下 10 分钟, 随后于 90°C 下每次 15 秒 40 个循环, 最后于 60°C 下 1 分钟。采用 Gene Amp 5700 序列探测系统 (Applied Biosystems) 监测并记录所产生的荧光数据。所有样本按一式三份设立并规格化为 GAPDH 值。

[0111] 对新的一代叶酸拮抗剂的 FR- β /FR- α 和 RFC 结合亲合力的分析

[0112] 基本上如先前所描述的实施竞争性结合 [^3H]-叶酸和对 FR- β 和 FR- α 的新的抗-叶酸药物的完整的细胞结合试验。参见 Mol. Pharmacol. 1995 ;48 :459-47 和 Cancer Res. 1995 ;55 (17) :3795-3802 (两者均为 Westerhof 等)。简言之, 通过在 PBS+1mM EDTA 上孵育, 将 CHO- β 细胞 (FR- β 转染的中国仓鼠卵巢细胞) 和 KB 细胞 (FR- α 表达细胞) 分开。将分离的细胞悬浮于冰冷的 HEPES- 缓冲盐水 (140mM NaCl 、 20mM HEPES 、 6mM KCl 、 2mM MgCl_2 、 6mM D-葡萄糖 , 用 NaOH 调节至 pH 7.4) 中, 分别至细胞浓度为 3×10^6 和 1×10^6 个细胞/ml。将 1ml 的细胞悬液加至含在缺乏或存在递增浓度的天然叶酸或叶酸拮抗剂下的 $100\text{pmol } [^3\text{H}]\text{-叶酸}$ (比放射性 : $2,000\text{dpm/pmol}$) 的一系列 Eppendorf 管中。于 4°C 下, 10 分钟后, 将细胞在 Eppendorf 离心管中离心 (30s, $10,000\text{rpm}$), 吸取上清液, 将细胞团块再悬浮于 $200 \mu\text{L}$ 水中并分析放射性 (Optima Gold 闪烁液, United Technologies, Packard, Brussels, Belgium)。通过在 1000- 倍摩尔过量的未标记的叶酸的存在下检测细胞-相关放射性测定 [^3H] 的非特异结合 (通常 $< 2\%$ 特异性结合)。测定需要从 FR- β 或 FR- α 置换 50% 的 [^3H] 叶酸的天然叶酸和选择的叶酸拮抗剂的浓度并且呈现为相对于叶酸的结合亲合力。为了比较, 自先前的研究提出天然叶酸和叶酸拮抗剂的 RFC 的亲合力的数据。参见 Mol Pharmacol 1995 ;48 :459-471 Westerhof 等) 和 Cancer Res. 2005 ;65 (24) : 11721-11728 (Gibbs 等)。

[0113] 细胞增殖抑制试验以 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的密度将 CHO-WT 和 CHO-FR β 细胞接种于 24- 孔组织培养板的各孔中。24 小时后, 加入在缺乏或存在 (阻断 FR) $1 \mu\text{M}$ 叶酸下的 8 个浓度

(以 2.5- 倍增量递增) 的叶酸拮抗剂药物。72 小时孵育后, 如先前所描述的, 通过胰蛋白酶化作用收获细胞并计数, 以了解细胞发育能力。参见 Mol. Pharmacol. 1999 ;55(4) : 761-769(Jansen 等)。

[0114] 在其它实验中, 用人单核-巨噬细胞 THP1 细胞测试叶酸拮抗剂的抗增殖作用。最后, 将含 1.25×10^5 个细胞的 1ml 的细胞悬液置于 24- 孔组织培养板的各孔中并与 8 个浓度(以 2.5- 倍增量递增) 的叶酸拮抗剂一起孵育。在 72 小时药物暴露后, 用血球计进行细胞计数和通过台盼蓝染色排除法 (trypan blue exclusion) 检查发育能力。

[0115] 结果

[0116] FR- β 滑膜组织免疫组化

[0117] 所有 RA 滑膜组织的免疫组化染色显示在内膜里衬层以及滑膜里衬下层高度表达 FR- β 。FR- β 的染色模式与 3A5(巨噬细胞) 染色一致, 尽管 T- 细胞区域显示无染色(图 1A-C)。实际上, 更详细的荧光显微镜分析证实 FR- β 和 CD68(巨噬细胞标记物) 共同定位于滑膜组织浸润巨噬细胞和内膜巨噬细胞的细胞膜上(图 1D-F)。在整形外科对照组的非炎性滑膜组织中, 未观察到对 FR- β 的染色, 与数目低的巨噬细胞(未显示) 一致。

[0118] 通过计算机辅助的数字影像分析法分析染色结果。发现滑膜里衬下层中的 3A5 和 FR- β 表达(细胞计数/mm²) 之间存在显著相关性 ($p = 0.04$) (图 2A)。滑膜里衬下层/mm² 中的阳性细胞计数中值, 对 FR- β 为 126(范围 9-630), 而对 3A5 为 219(范围 11-622)。巨噬细胞的中值数在用 MTX 治疗后 4 个月后减少(滑膜里衬下层/mm² 中的阳性细胞计数自 219 减至 119, $p = 0.14$)。在用 MTX 治疗 4 个月后, FR- β 表达与 DAS28 改善 (Δ DAS28) 正相关 ($r = 0.31$), 但是并未达到统计学上的显著性意义 ($p = 0.11$) (图 2B)。

[0119] RA 患者的 RA- 滑膜组织和外周血细胞中的 FR- β mRNA 表达

[0120] 为了进一步确认滑膜组织中 FR- β 的差异表达, 通过滑膜组织活组织切片检查的 PCR 分析, 测定 FR- β mRNA 水平, 与 RA- 患者的外周血细胞, 包括淋巴细胞、体外活化的 T- 细胞和外周血液单核细胞和离体单核细胞- 衍生的巨噬细胞中的 FR- β mRNA 水平进行比较。用相对于 CHO-FR- β 细胞(设定为 100%) 呈现 FR- β mRNA 水平。FR- β mRNA 表达排列为 RA- 滑膜组织最高(与 CHO- β 细胞比较, 中值为 17%) > 离体单核细胞- 衍生的巨噬细胞(与 CHO- β 细胞比较, 3%) > 外周血淋巴细胞 (PBLs) (0.7%) >> 单核细胞 (0.02%) 和离体活化的 T- 细胞 (< 0.001%) (图 3)。

[0121] FR- β 和 FR- α 对叶酸拮抗剂的结合亲合力的比较

[0122] FR α 对选择的叶酸拮抗剂的结合亲合力先前已由 Westerhof 等报告, 但是它们与 FR- β 同工型重叠或差异至何程度尚未确定。为此目的, 测定由 FR- β 与 FR α 相比较的对 DHFR、TS 和 GARTF 酶的一系列叶酸- 基抑制剂的结合亲合力, 并且在图 4 中显示。至于叶酸, FR- β 与 FR α 两者均展示对该组 DHFR 的叶酸拮抗剂抑制剂的相当低的亲合力。FR- β 对 MTX 的结合亲合力大约比叶酸的 50- 倍。对 PT523 的结合亲合力比对 MTX (0.3% 的叶酸) 的显著低, 而 PT644, PT523 的 5- 甲基类似物, 显示与 MTX 相当的亲合力。众所周知, FR- α 对于所有的测试的叶酸- 基 TS 抑制剂展示出良好的结合亲合力, 但是 FR- β 对培美曲塞、雷替曲塞和 BGC 9331 的结合亲合力比 FR α 的显著低 (16-30 倍)。观察到 FR- β 对 TS 抑制剂 CB300635 (叶酸的 161%) 和 (6RS)-BGC 945 (叶酸的 89%) 和 (6S)-BGC 945 (叶酸的 46%) 的高结合亲合力的保持力。FR- β 也展示出对 GARTF 酶抑制剂 DDATHF (叶酸的

27%) 和 AG2034(叶酸的 54%) 的特异性 (proficient) 结合亲和力,即使是 FR α 对这些化合物的结合亲和力为 2.5- 倍高。综合起来,这些结果证明 FR- β 对叶酸拮抗剂的结合亲和力存在大的差异,其中多个叶酸拮抗剂比 MTX 显示显著较高的结合亲和力。

[0123] 叶酸拮抗剂诱导的 FR- β 表达细胞的生长抑制

[0124] 为了调查用于目前研究的叶酸拮抗剂是否将全部转达 (convey) 对巨噬细胞 - 样类型的细胞的潜在生长抑制作用,此参数被用于调查人单核细胞 - 巨噬细胞 THP1 细胞 (表 1)。与 RFC 作为 THP1 细胞中主要转运途径一致的是,观察到所有叶酸拮抗剂的强有力的生长抑制作用,除了 CB300635 和 BGC 945,这两个化合物对 RFC 的亲和力差。由于 THP1 细胞系模型是 FR- 阴性的 (与活化的滑膜巨噬细胞对比),对 FR- β 显示最高结合亲和力的三个叶酸拮抗剂 (CB300635、AG2034 和 BGC945) 的效能进行评价,该效能通过激发 CHO-FR- β 细胞的细胞生长抑制而靶向 FR- β 。对抗 CHO/WT 细胞,BGC 945 仅在细胞外浓度 > 1000nM 时诱导生长抑制 (图 5A)。显著地,在显著低的 BGC 945 浓度 (10-50nM) 诱导 CHO-FR- β 细胞的生长抑制。向这些细胞培养物中加入的叶酸使 BGC 945 的活性完全消除,与 FR 的阻断一致。尽管显示对 FR- β 的最高结合亲和力,CB300635 没有显著地诱导 CHO-FR- β 细胞中的生长抑制的效力 (图 5B)。共同 - 给予叶酸消除 CB300635 活性的信息提示,FR- β 涉及细胞对该化合物的摄取。最后,AG2034 可利用两种组成型表达的 RFC 和 FR 作为细胞进入的通路 (图 5)。如此,AG2034 显示对抗 CHO/WT 细胞的生长抑制潜力并且在更大程度上显示对 CHO-FR- β 细胞的生长抑制潜力 (图 5C/D)。始终如一地,通过 FR- β 阻断 (用叶酸) 和 RFC 阻断 (用 LV) 消除 AG2034 的生长抑制作用仅为部分的 (图 5C/D)。

[0125] 讨论

[0126] 由于 MTX 是治疗 RA 的许多治疗方案中的锚定 - 药物,对可辅助预知和 / 或改善 MTX 的治疗反应的遗传学、生化和代谢参数的描述已经获得相当可观的最新利益。该项研究特别集中在细胞膜转运 MTX 的作用上,该作用在活化的滑膜巨噬细胞中主要由叶酸受体 β 同工型介导。给出的注意是 FRs 的分子和功能特性以及组成型表达的 RFC 有相当差异,FR- β 的更好理解的特性可通过 FR- β 超过 RFC 的选择性靶向来促进更有利的治疗窗。

[0127] 发明人在本文显示,FR- β 表达主要与巨噬细胞共同定位于 RA 患者的内膜里衬层和滑膜里衬下层,并且可因此为有吸引力的叶酸拮抗剂的靶。对第二代叶酸拮抗剂系列的结合亲和力进行筛选,其中的一些证明具有抗癌活性,揭示该组 DHFR 抑制剂均具有相当低的 FR- β 亲和力。此与先前报告的、证明 FR 的 α 同工型对具有 2,4-NH₂- 基结构的叶酸拮抗剂的亲和力低的结构活性关系一致 (参见表 2)。有趣的是,虽然证明 FR α 对所有测试的胸苷酸合酶的叶酸 - 基抑制剂具有相对高的结合亲和力,对于 FR- β 而言,此仅保留分享 3- 环结构和 / 或谷氨酸盐侧链修饰的共同的化学特性的 3 个化合物 (CB300635、GW1843 和 BGC 945) (参见表 2 和 3)。后者的修饰也显著抑制其经由 RFC 的转运能力,并且因而使之产生更大的 FR- 选择性。实际上,通过 BGC 945 的选择性靶向 FR- α 而非 RFC 在 FR α 过表达细胞系中得到证明。除了叶酸 - 基 TS 抑制剂外,还有 FR- β 也展示出对分类为可由 RFC 和 FR 两者转运的叶酸拮抗剂药物的叶酸 - 基 GARTF 酶抑制剂 (AG2034 和 DDATHF) 的中等至高的结合亲和力。

[0128] FR- β - 转染的 CHO 细胞被用作模型系统,以评估通过传达抗增殖作用的 FR- β - 介导的细胞摄取叶酸拮抗剂的功效。该细胞系模型可具临床代表性,其以与 RA 患者滑膜组织

中的 FR- β mRNA 水平一致的 [3H]- 叶酸结合水平和 FR- β mRNA 水平 (图 4) 为基础。观察到对于 BGC

[0129] 945, 对照组 (RFC- 表达) CHO 细胞和 FR- β 转染的细胞之间的活性的最大差异, 与经由 RFC 转运的差亲合力和高 FR- β 结合亲合力相一致。FR- β 介导的 BGC 945 的摄取可通过阻断受体与过量的叶酸接触而被抑制剂, 此意味着使滑膜组织 / 血浆中天然叶酸循环, 可或者通过受体占领 / 竞争或者通过受体向下调节削弱体内 BGC 945 的潜在活性。

[0130] 实施例 2: 本发明的化合物

[0131] 表 3 显示以下本发明化合物的结构:

- | | | |
|--------|----------------------|----------------------|
| [0132] | • CB300638 (BGC 638) | • CB300944 |
| [0133] | • (6S)-CB300638 | • CB300945 (BGC 945) |
| [0134] | • CB300935 | • (6S)-CB300945 |
| [0135] | • CB300936 | • CB300947 |
| [0136] | • CB300940 | • CB300951 |

[0137] 依据在 WO 94/11354 A1、WO 03/020300 A1、WO 03/020706 A1、WO 03/020748 A1、J Med. Chem., 2000, 43, 1910-1926、Tetrahedron, 63 (7), 2007, 1537-1543 (Bavetsias 等) 和 Cancer Research 65, 2005, 11721-11728 (Gibbs 等) 中给出的方法制备这些化合物。

[0138] 实施例 3: 制剂

[0139] 以下阐述在人中的治疗或预防应用的、含式 (I) 的环戊二烯并 [g] 喹唑啉, 特别是药理学上可接受的盐的形式的代表性药物剂型:

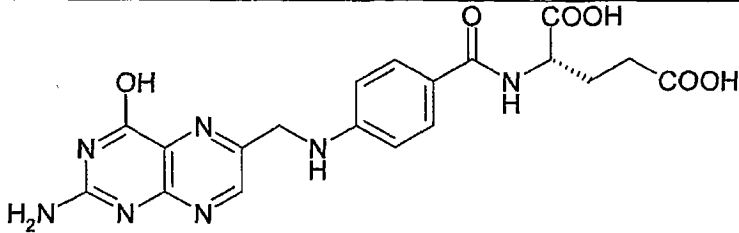
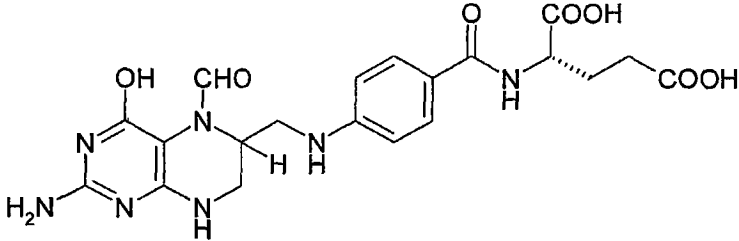
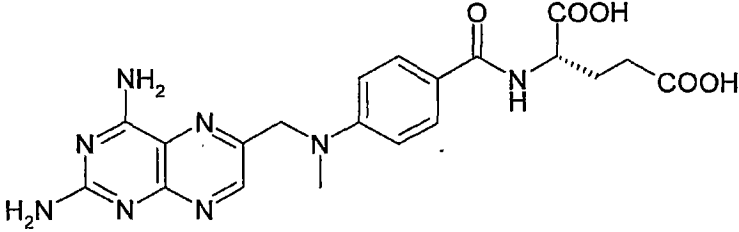
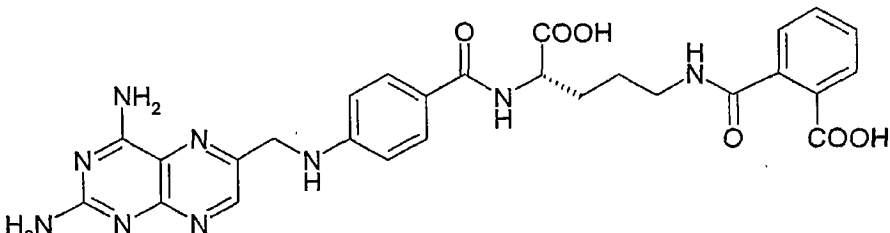
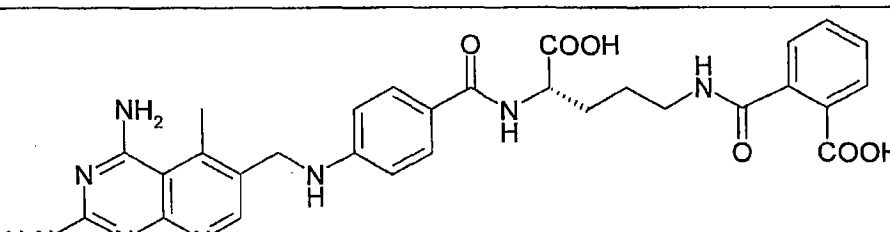
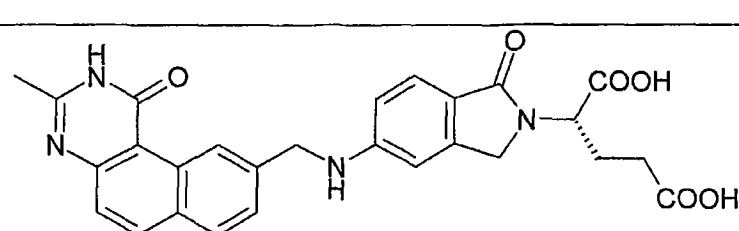
- | | | |
|--------|---------------------|--------|
| [0140] | (a) <u>片剂 I</u> | mg/ 片 |
| [0141] | 环戊二烯并 [g] 喹唑啉盐 | 100 |
| [0142] | 乳糖 Ph. Eur. | 182.75 |
| [0143] | 交联羟甲纤维素钠 | 12.0 |
| [0144] | 玉米淀粉糊 (5% w/v 糊剂) | 2.25 |
| [0145] | 硬脂酸镁 | 3.0 |
| [0146] | (b) <u>片剂 II</u> | mg/ 片 |
| [0147] | 环戊二烯并 [g] 喹唑啉盐 | 50 |
| [0148] | 乳糖 Ph. Eur. | 223.75 |
| [0149] | 交联羟甲纤维素钠 | 6.0 |
| [0150] | 玉米淀粉 | 15.0 |
| [0151] | 聚乙烯吡咯烷酮 (5% w/v 糊剂) | 2.25 |
| [0152] | 硬脂酸镁 | 3.0 |
| [0153] | (c) <u>片剂 III</u> | mg/ 片 |
| [0154] | 环戊二烯并 [g] 喹唑啉盐 | 1.0 |
| [0155] | 乳糖 Ph. Eur. | 93.25 |
| [0156] | 交联羟甲纤维素钠 | 4.0 |
| [0157] | 玉米淀粉糊 (5% w/v 糊剂) | 0.75 |
| [0158] | 硬脂酸镁 | 1.0 |
| [0159] | (d) <u>胶囊剂</u> | mg/ 胶囊 |

[0160]	环戊二烯并 [g] 喹唑啉盐	10.0
[0161]	乳糖 Ph. Eur.	488.5
[0162]	硬脂酸镁	1.5
[0163]	(e) <u>注射剂 I</u>	(50mg/ml)
[0164]	环戊二烯并 [g] 喹唑啉盐	5.0% w/v
[0165]	1M 氢氧化钠溶液	15.0% v/v
[0166]	0.1M 盐酸 (调节 pH 至 7.6)	
[0167]	聚乙二醇 400	4.5% w/v
[0168]	注射用水至 100%	
[0169]	(f) <u>注射剂 II</u>	(10mg/ml)
[0170]	环戊二烯并 [g] 喹唑啉盐	1.0% w/v
[0171]	磷酸钠 BP	3.6% w/v
[0172]	0.1M 氢氧化钠溶液	15.0% v/v
[0173]	注射用水至 100%	
[0174]	(g) <u>注射剂 III</u>	(1mg/ml, 缓冲至 pH 6)
[0175]	环戊二烯并 [g] 喹唑啉盐	0.1% w/v
[0176]	磷酸钠 BP	2.26% w/v
[0177]	柠檬酸	0.38% w/v
[0178]	聚乙二醇	4003.5% w/v
[0179]	注射用水至 100%	
[0180]	可通过药学领域熟悉的常规方法制备以上制剂。可采用常规措施,例如,用邻苯二甲酸二乙酸纤维素包衣料对片剂 (a) 至 (c) 进行肠溶包衣。	
[0181]	表 1. 叶酸拮抗剂对抗人单核细胞 - 巨噬细胞 THP1 细胞 [#] 的生长抑制作用	

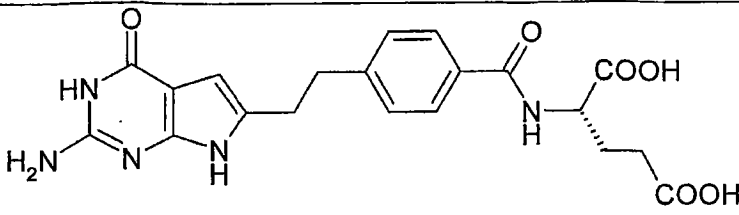
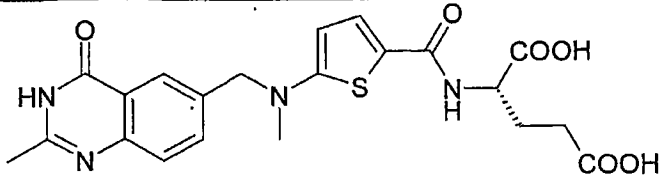
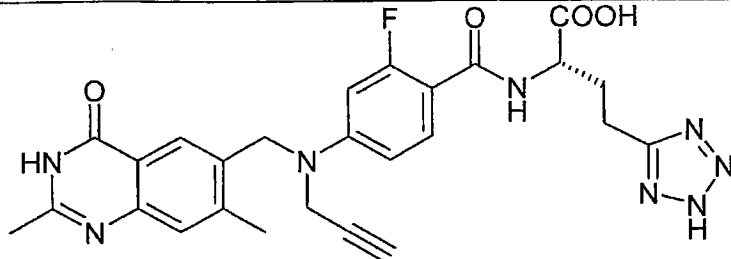
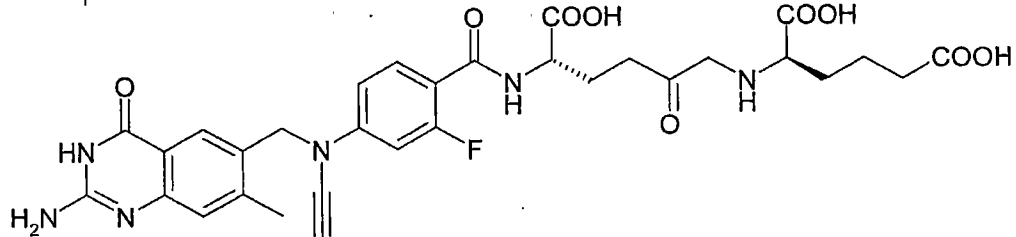
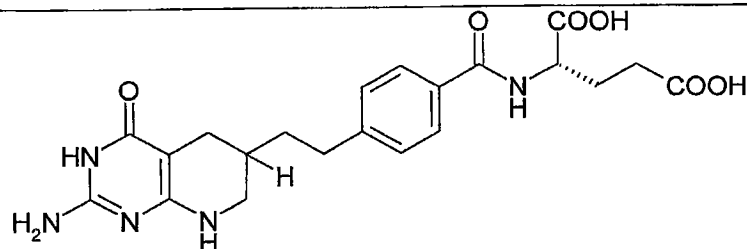
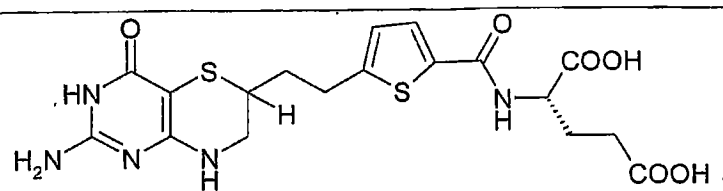
	叶酸拮抗剂	IC ₅₀ (nM)	
	MTX	7.1 ± 0.5	
	PT523	2.2 ± 0.3	
	PT644	1.0 ± 0.4	[#] THP-1 细胞生长在含 2.2 μM 叶酸(其将阻断任何 FR 活性)的 RPMI-1640 培养基中。
	雷替曲塞	2.4 ± 0.5	
	培美曲塞	10.7 ± 2.2	
[0182]	GW1843	1.6 ± 0.1	
	BGC 9331	8.7 ± 0.8	药物暴露时间; 72 小时。结果为 3 个分开的实验的均值± S.D..
	CB300635	4850 ± 285	
	BGC 945	3630 ± 350	
	DDATHF	9.8 ± 0.8	
	AG2034	3.2 ± 0.2	

[0183] 表 2 :比较性化合物的结构

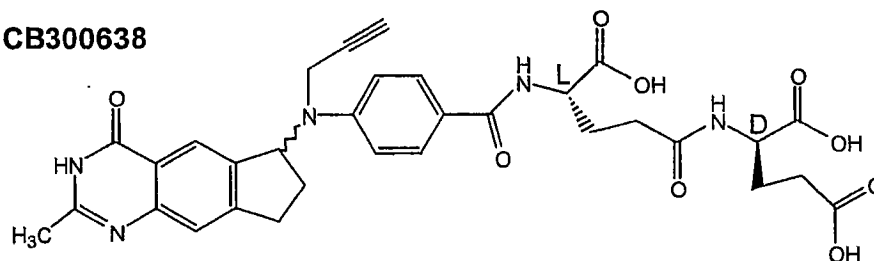
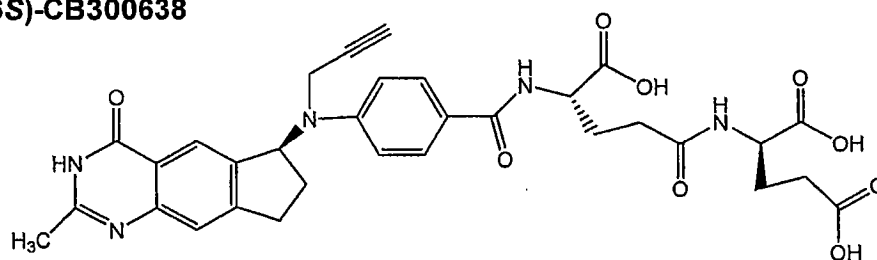
[0184]

名称	结构
叶酸	
亚叶酸	
MTX	
PT523	
PT644	
GW1843	

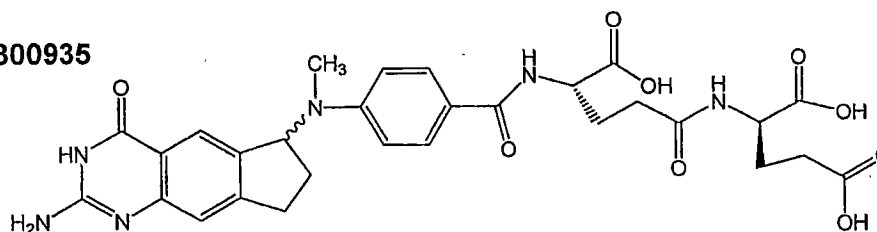
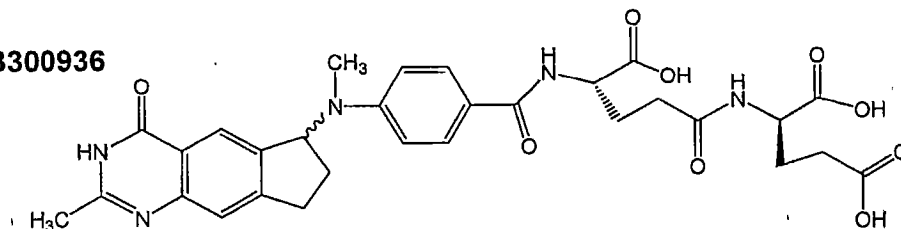
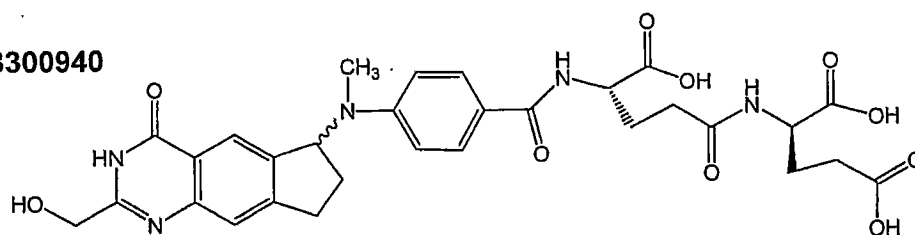
[0185]

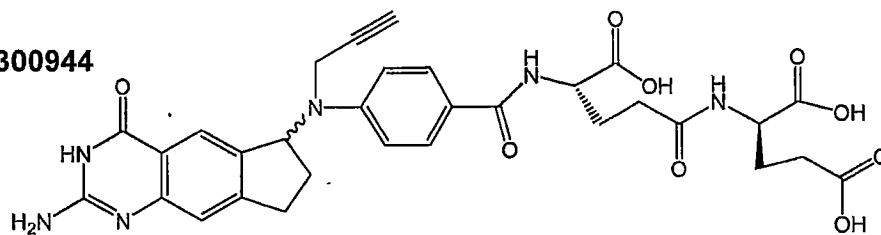
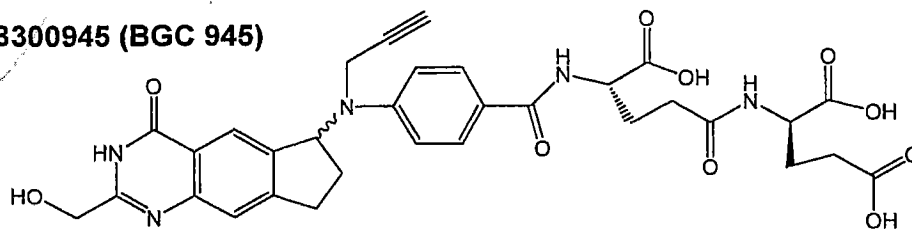
名称	结构
培美曲塞	
雷替曲塞	
BGC 9331	
CB300635	
DDATHF	
AG2034	

[0186] 表 3 : 本发明化合物的结构

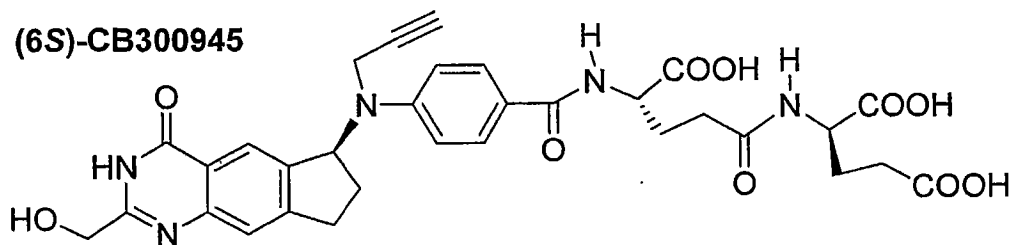
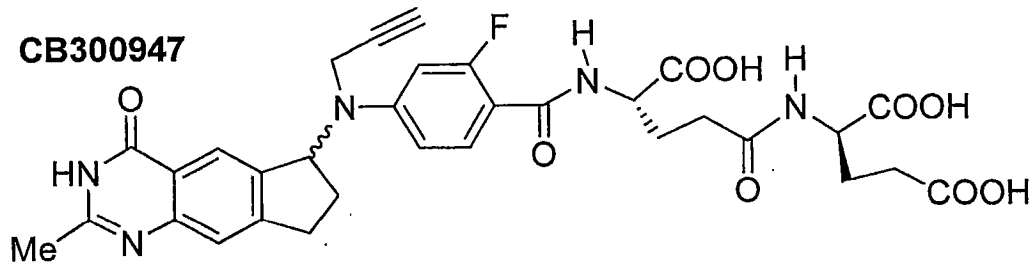
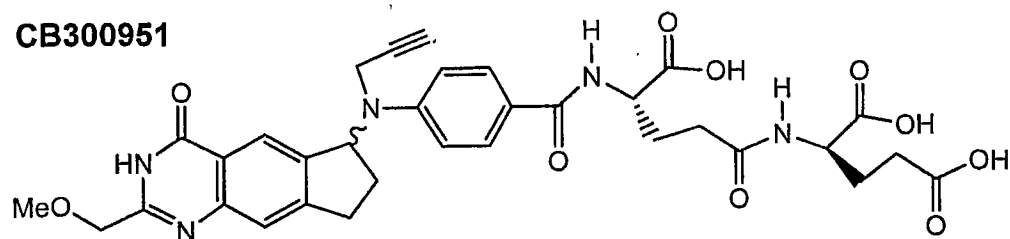
CB300638**(6S)-CB300638**

[0187]

CB300935**CB300936****CB300940**

CB300944**CB300945 (BGC 945)****(6S)-CB300945**

[0188]

**CB300947****CB300951**

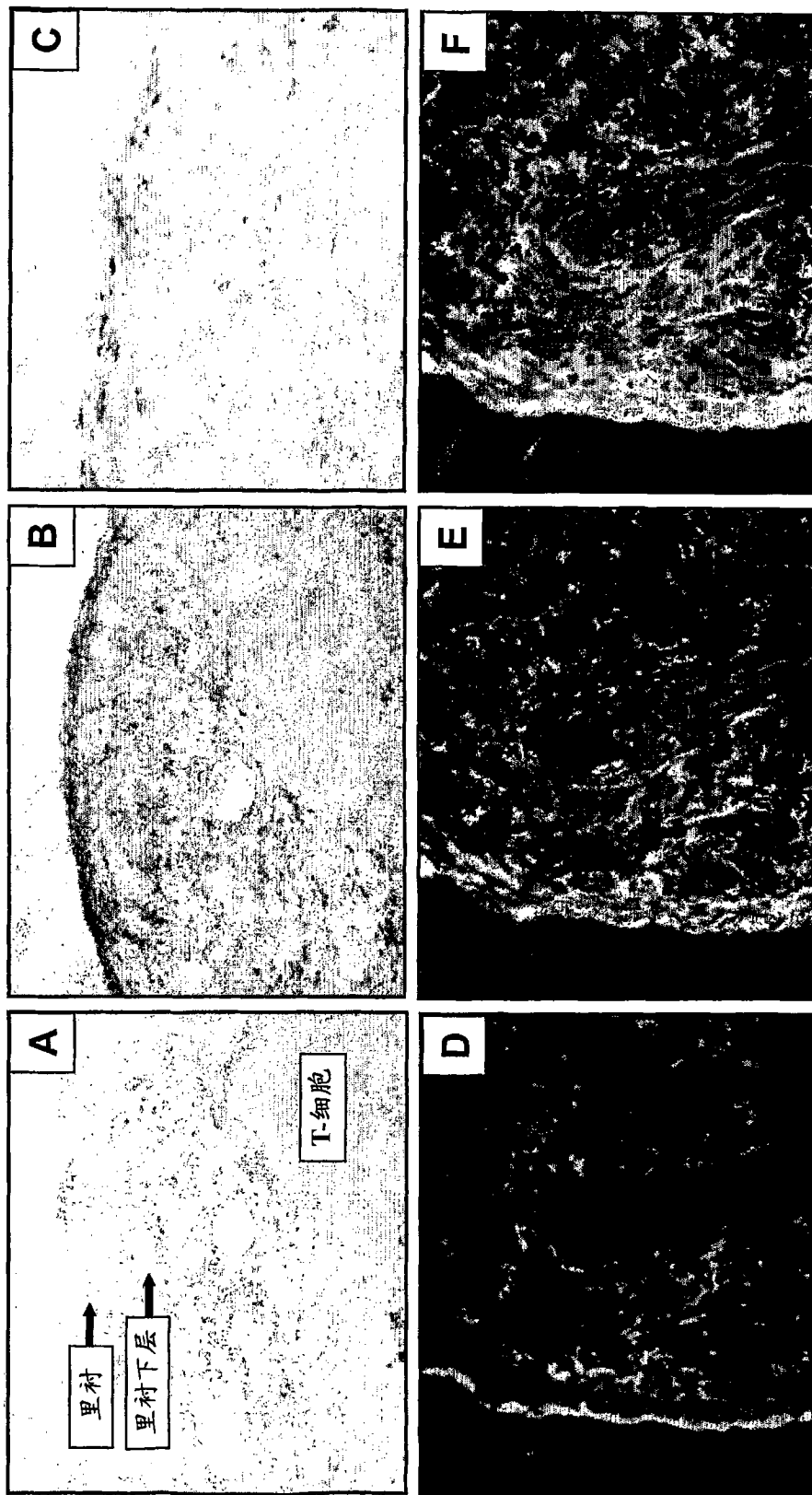


图 1

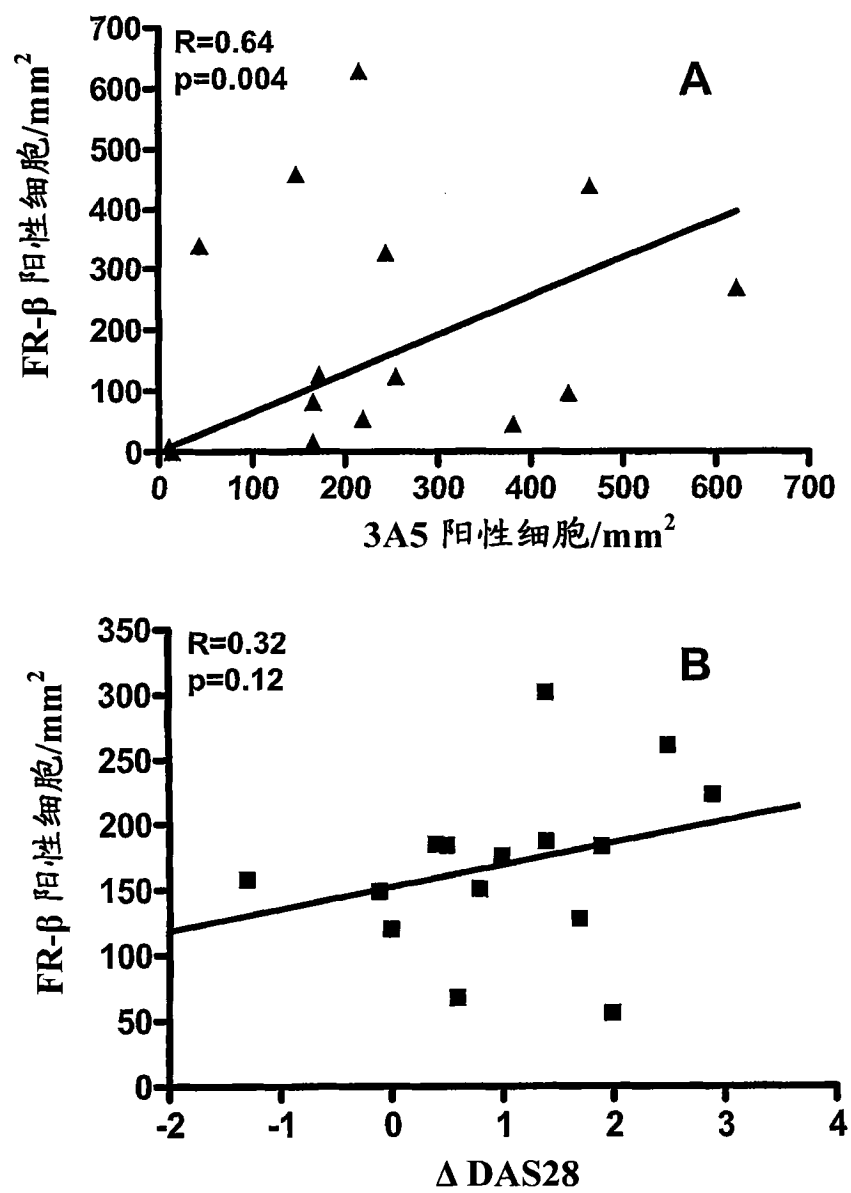


图 2

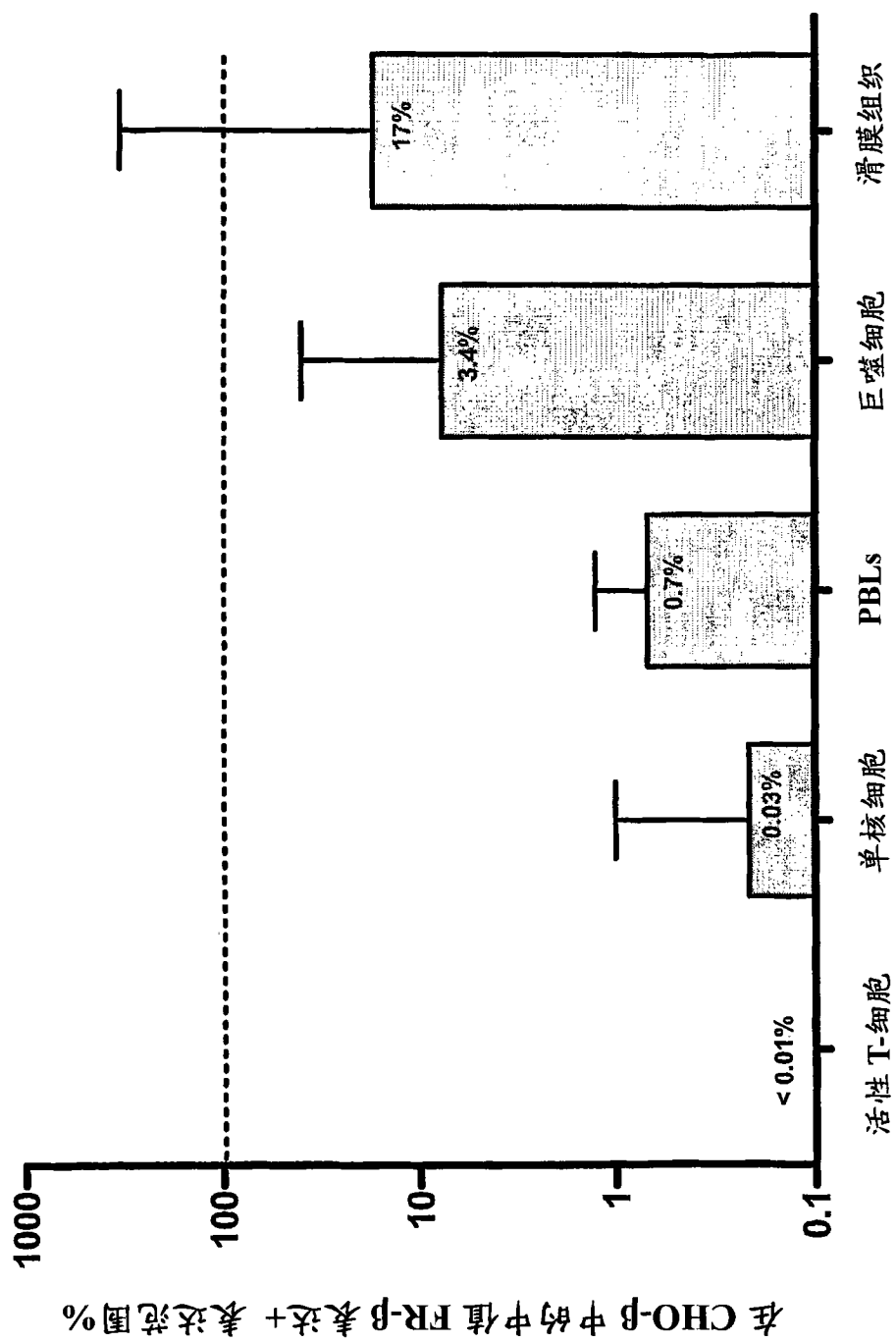


图 3

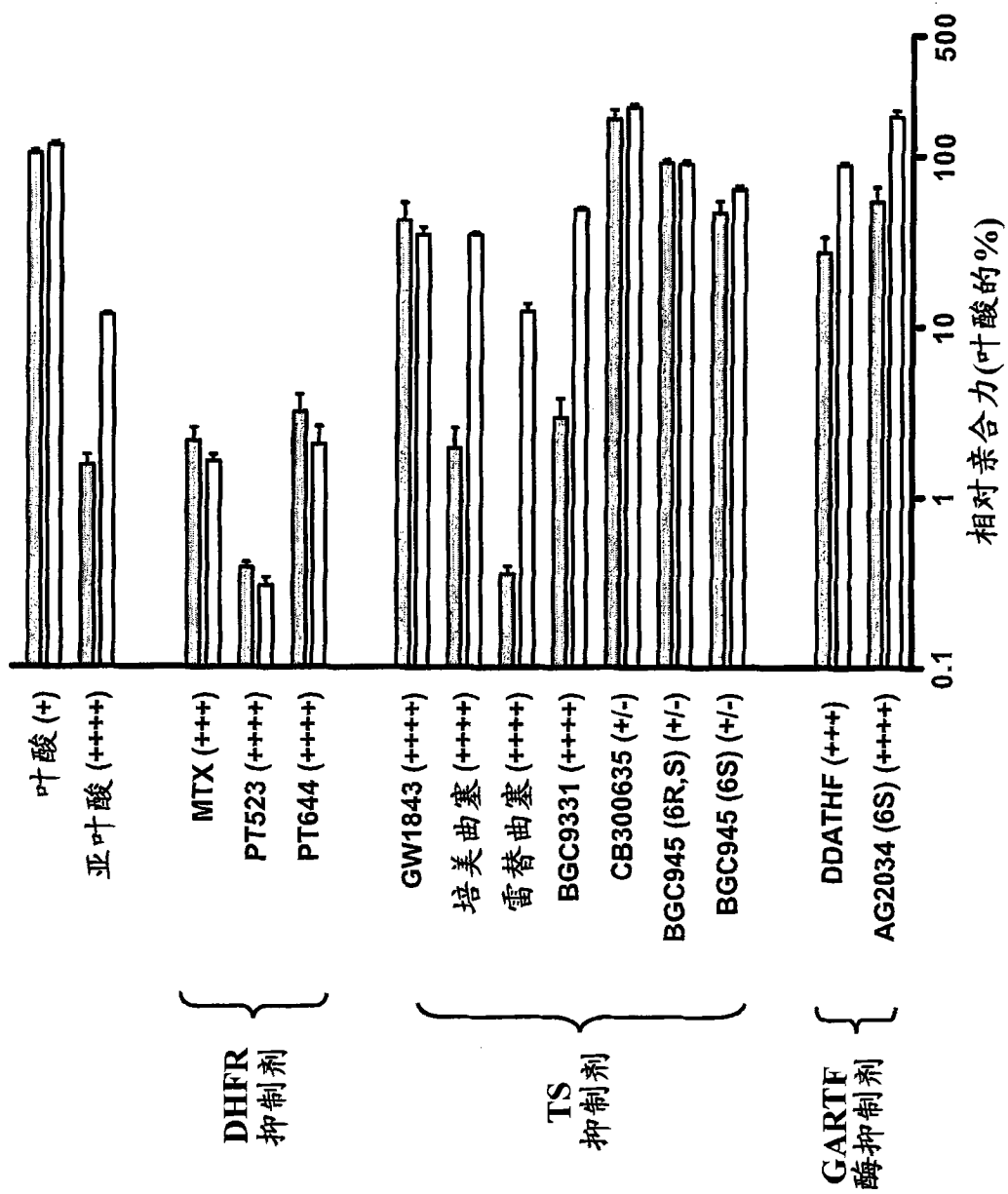


图 4

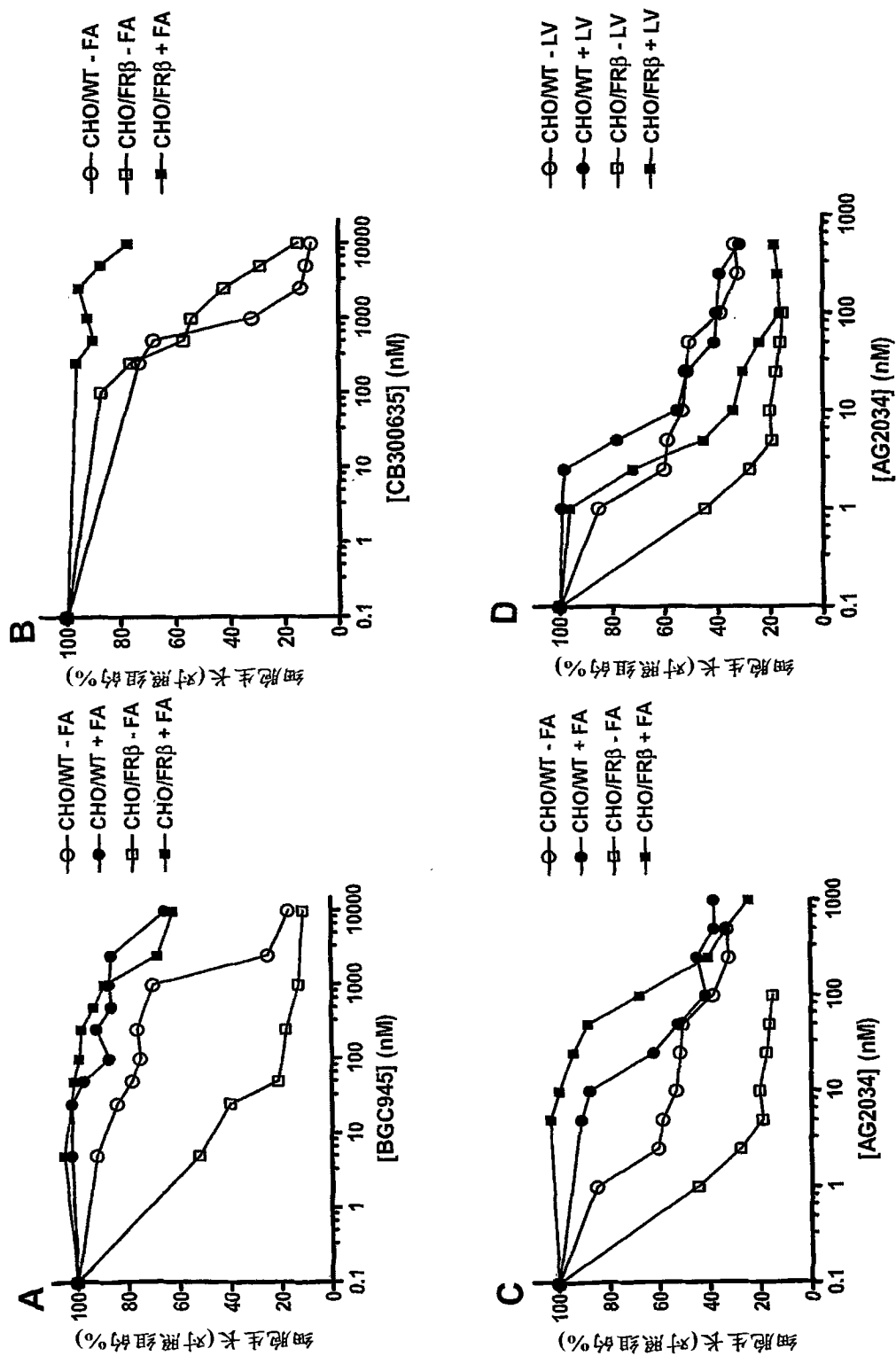


图 5