

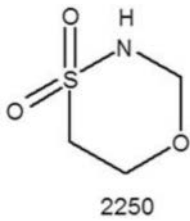


(21) 申请号 202080042181.8	A61P 21/00 (2006.01)
(22) 申请日 2020.05.21	A61P 19/02 (2006.01)
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 114025766 A	A61P 7/06 (2006.01)
(43) 申请公布日 2022.02.08	A61P 1/00 (2006.01)
(30) 优先权数据 62/851,424 2019.05.22 US	A61P 1/12 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2021.12.08	A61P 1/08 (2006.01)
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/IB2020/054852 2020.05.21	A61P 1/14 (2006.01)
(87) PCT国际申请的公布数据 W02020/234828 EN 2020.11.26	A61P 29/00 (2006.01)
(73) 专利权人 盖斯特里希医药公司 地址 瑞士沃尔胡森	A61P 25/04 (2006.01)
(72) 发明人 H·莫勒 J·C·科斯廷 T·米勒	A61P 9/12 (2006.01)
(74) 专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713 专利代理师 王思琪 王建秀	A61P 27/02 (2006.01)
(51) Int. Cl.	A61P 17/14 (2006.01)
A61K 31/54 (2006.01)	A61P 11/00 (2006.01)
A61K 31/549 (2006.01)	A61P 17/04 (2006.01)
A61K 31/39 (2006.01)	A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/18 (2006.01)	A61P 17/00 (2006.01)
A61K 31/185 (2006.01)	A61P 3/10 (2006.01)
A61P 17/10 (2006.01)	A61P 9/00 (2006.01)
(56) 对比文件	A61P 9/10 (2006.01)
US 2019091233 A1, 2019.03.28	A61P 25/00 (2006.01)
WO 2016098054 A1, 2016.06.23	A61P 37/02 (2006.01)
尚海旭等.GAPDH功能多样性.《生理科学进展》.2011,第42卷(第5期),第371页左栏第一段.	
审查员 杨玥	
权利要求书2页 说明书28页 附图14页	

(54) 发明名称  
用于抑制GAPDH的噻嗪啉化合物

(57) 摘要  
用某些噻嗪啉样化合物和/或相关化合物抑制GAPDH的方法。

1. 包含化合物的组合物在制备用于在需要其的个体中治疗神经内分泌肿瘤的药物中的用途,其中所述化合物是:



2. 根据权利要求1所述的用途,其中向所述个体施用2250。

3. 根据权利要求1或2所述的用途,其中通过静脉内、皮下、肌肉内、局部、口服、腹膜内、鞘内、鼻内、经眼、肺内、经皮、经气管或其组合,向所述个体施用所述组合物。

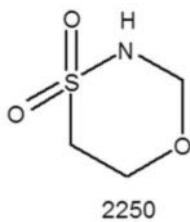
4. 根据权利要求3所述的用途,其中通过眼内向所述个体施用所述组合物。

5. 根据权利要求4所述的用途,其中通过玻璃体内注射向所述个体施用所述组合物。

6. 根据权利要求3所述的用途,其中通过吸入向所述个体施用所述组合物。

7. 包含GAPDH抑制剂的组合物在制备用于在治疗神经内分泌癌的方法中使用的药物中的用途,所述方法包括获得包含来自个体的细胞的生物样品,裂解所述细胞,监测裂解的细胞中的GAPDH活性作为癌症的生物标志物,以及向所述个体施用所述组合物,

其中所述GAPDH抑制剂是:



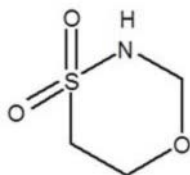
8. 根据权利要求7所述的用途,其中对细胞裂解物进行酶活性测定,在所述酶活性测定中检测NAD<sup>+</sup>浓度的变化,并基于所述酶活性测定中与对照溶剂相比NAD<sup>+</sup>浓度的降低来监测施用的GAPDH抑制剂对GAPDH的抑制。

9. 根据权利要求7或8所述的用途,其中所述细胞是外周血单核细胞。

10. 根据权利要求7或8所述的用途,其中所述方法包括分析所述细胞以测定随时间推移的GAPDH抑制水平。

11. GAPDH抑制剂化合物在制备用于鉴别候选者的方法中使用的试剂中的用途,其中所述方法包括将从已经接受GAPDH抑制剂化合物的个体获得的外周血单核细胞裂解,监测裂解的外周血单核细胞中的GAPDH活性,对所述裂解的外周血单核细胞进行酶活性测定,在所述酶活性测定中检测NAD<sup>+</sup>浓度的变化,基于所述酶活性测定中与对照溶剂相比NAD<sup>+</sup>浓度的降低,监测施用的GAPDH抑制剂对GAPDH的抑制,测定所述外周血单核细胞中GAPDH的抑制程度,以及如果所述GAPDH抑制剂化合物对GAPDH的抑制程度大于预定阈值,则将所述个体鉴别为用所述GAPDH抑制剂化合物治疗的合适候选者,

其中所述GAPDH抑制剂化合物是:



2250

或其药学上可接受的盐。

12. 根据权利要求11所述的用途,其中所述阈值是30%、40%或50%的GAPDH抑制。
13. 根据权利要求11或12所述的用途,其中所述GAPDH抑制剂化合物是化合物2250。
14. GP-2250和丝裂霉素在制备用于治疗间皮瘤的试剂盒中的用途。
15. GP-2250和顺铂在制备用于治疗间皮瘤的试剂盒中的用途。
16. GP-2250和紫杉醇在制备用于治疗胰腺癌的试剂盒中的用途。
17. GP-2250和吉西他滨在制备用于治疗神经内分泌癌的试剂盒中的用途。

## 用于抑制GAPDH的噁嗪啉化合物

### 技术领域

[0001] 本公开涉及通过施用本公开的一种或多种抗GAPDH剂来治疗、抑制、预防或减少个体的病症和疾病的组合物和方法。

### 背景技术

[0002] 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)参与大量复杂的细胞通路。除了在基础条件下大部分GAPDH所在的细胞质外, GAPDH还存在于颗粒部分, 例如细胞核、线粒体和小囊泡部分。当细胞暴露于各种应激源时, 会发生GAPDH的动态亚细胞重新分布。特别是, GAPDH是能量代谢和通过细胞质中的有氧糖酵解产生ATP和丙酮酸的重要酶。虽然增加的GAPDH基因表达和酶促功能与细胞增殖和肿瘤发生有关, 但例如氧化应激等条件会损害GAPDH催化活性并导致细胞衰老和凋亡。已经鉴别了GAPDH的各种相互作用配偶体, 包括蛋白质、各种RNA种类和端粒DNA, 但GAPDH对细胞增殖影响的潜在机制仍不清楚。

[0003] 几项研究表明, GAPDH具有独立于其在糖酵解中的典型作用的多效性。GAPDH功能多样性主要是由于不同氨基酸残基的翻译后修饰所致或由于蛋白质-蛋白质相互作用改变了其从细胞溶胶到细胞核、线粒体或细胞外微环境的定位所致。GAPDH的非糖酵解功能包括调节细胞死亡、自噬、DNA修复和RNA输出, 并且在生理和病理条件例如癌症和神经退行性病症中, 观察到它们。

[0004] GAPDH的寡聚状态及其聚集倾向主要取决于各种信号分子。该酶的氧化还原敏感性半胱氨酸残基, 包括活性部位的Cys-152, 也是活性氧(reactive oxygen specie, ROS)或活性氮(reactive nitrogen species, RNS)的靶标, 因此, GAPDH聚集受其他几种诱导细胞氧化应激/硝化应激的刺激的影响。除了癌症, 这种酶的多功能性决定了GAPDH改变与其他几种疾病有关, 尤其是神经退行性病症, 例如阿尔茨海默病(AD)、帕金森病(PD)和亨廷顿病(HD)。

[0005] GAPDH的非糖酵解作用包括生理病理功能, 例如基因表达调节、DNA修复和复制、神经退行性变、发病机制、细菌毒力、管状成束(tubular bundling)、蛋白质-蛋白质相互作用、RNA输出以及细胞凋亡和自噬。例如, 已发现GAPDH在细胞周期S期间, 在组蛋白H2B基因的转录诱导中作为Oct-1共激活剂复合物的关键组分起作用。有趣的是, GAPDH直接与Oct-1相互作用, 并且它具有可以与一般的转录机制相关的内在激活结构域。

[0006] GAPDH还可以充当细胞中的葡萄糖传感器, 刺激自噬降解。事实上, 在葡萄糖饥饿期间, AMPK依赖性GAPDH磷酸化对于SIRT1激活和自噬刺激至关重要。在这些条件下, 细胞质GAPDH被激活的AMPK磷酸化, 促进GAPDH重新分布到细胞核中。在细胞核内, GAPDH直接与SIRT1相互作用, 取代SIRT1的阻遏物并增强SIRT1脱乙酰酶活性。一般而言, 除了与胞质定位有关之外, 其中它在糖酵解中的主要作用得到了很好的表征, GAPDH的多种活性还与其向细胞核或不同亚细胞区室的易位有关。

[0007] 细胞核GAPDH参与多种功能, 例如自噬和细胞死亡、DNA修复、保护端粒免于快速降

解。GAPDH在细胞核中的聚集促使其糖酵解活性下降。在氧化应激期间,当DNA受损时,同时发生GAPDH的亚硝基化和向细胞核易位,并且它可以与聚(ADP-核糖)聚合酶1(PARP1)结合或直接与受损的DNA结合。在这些应激条件下,PARP1被受损的DNA激活并使用NAD<sup>+</sup>合成聚(ADP-核糖)。此外,易位到细胞核的GAPDH结合并激活PARP1。PARP1的过度激活会耗尽细胞内NAD<sup>+</sup>,因此GAPDH的NAD<sup>+</sup>结合位点变得游离,并且该酶获得结合DNA的能力。如果单链DNA片段含有切割位点,则GAPDH会与这种损伤形成稳定的共价加合物。因此,GAPDH与DNA形成不可逆复合物似乎是自杀事件,该事件在多次损伤累积的情况下会阻碍DNA修复,并且可能是导致细胞死亡的因素。

[0008] 此外,由于进入细胞核的GAPDH存在参与了一个或多个细胞凋亡级联反应的启动,因此GAPDH已在神经元凋亡中显示出内在作用。对各种病例的研究证明了GAPDH在HD和PD等几种神经元疾病中的作用,一个有吸引力的假设是,GAPDH与这些疾病相关的突变蛋白结合,导致易位到细胞核,在那里GAPDH的存在参与细胞凋亡的启动。因此,已经报道了细胞核GAPDH在与变性敏感性黑质多巴胺能神经元相关的死后PD大脑中增加。此外,GAPDH被认为是阿尔茨海默病大脑中淀粉样蛋白斑块的主要成分,据报道它还与神经退行性疾病相关蛋白相互作用,包括淀粉样蛋白 $\beta$ 蛋白前体(A $\beta$ PP)。非天然GAPDH同种型能够与可溶性A $\beta$ 结合,表明GAPDH直接参与淀粉样蛋白聚集。

[0009] 胞质GAPDH还以主要受翻译后修饰和蛋白质-蛋白质相互作用调节的方式参与细胞凋亡。事实上,GAPDH在Siah1结合位点附近的Thr237处被Akt2磷酸化,从而防止其与Siah1结合和细胞凋亡。复合物GAPDH/Akt2的形成是在卵巢癌细胞中鉴定的有利于肿瘤细胞存活并避免细胞凋亡的机制。胞质GAPDH参与肿瘤存活的另一种方式是逃避不依赖半胱天冬酶的细胞死亡(caspase-independent cell death,CICD)。通过将Akt稳定为其激活和磷酸化形式,过表达的GAPDH可防止FoxO细胞核内在化调节Bcl-6,Bcl-6是具有抗凋亡功能的Bcl-xL抑制剂。

[0010] 此外,许多研究已经证明了胞质GAPDH与微管动力学、囊泡转运和膜募集和融合之间的功能联系。GAPDH在正常条件下可以与微管蛋白和肌动蛋白相互作用,并在应激时与应激纤维相互作用,应激纤维调节其糖酵解功能,从而促进其失活。这些在细胞转运中的作用受酶的翻译后磷酸化调节,使其参与早期的分泌途径转运。由Rab2促进的丝氨酸/苏氨酸激酶充当GAPDH介导的分泌活性的调节剂,推动膜转运的方向。GAPDH还具有作为细胞不稳定血红素伴侣的作用。GAPDH有助于运输和递送大量胞质血红素。它结合外源性和内源性血红素,使其可以为胞质的(例如iNOS)或细胞核的下游蛋白质靶标所用。通过这种方式,GAPDH不仅保护细胞免受血红素毒性的影响,而且还参与其动员。

[0011] 在基础条件下,线粒体中的GAPDH水平非常低,并且其在应激条件下(例如血清剥夺和DNA损伤)会强烈增加。当内源性表达GAPDH时,线粒体GAPDH通过与电压依赖性阴离子通道1(voltage dependent anion channel 1,VDAC1)的关联诱导促凋亡线粒体膜透化(mitochondrial membrane permeabilization,MMP)。线粒体的外源性表达还会导致内跨膜电位的丧失、基质肿胀、线粒体内膜的透化以及两种促凋亡蛋白(例如细胞色素c和凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor,AIF))的释放。此外,在心脏缺血和再灌注(I/R)过程中,发现GAPDH与线粒体显著相关,促进将受损线粒体直接摄取到多细胞器溶酶体样(lysosomal-like,LL)结构中进行消除,而独立于巨自噬途径。

[0012] 这种酶的复杂功能与其易位到不同的亚细胞区室有关。GAPDH介导的自噬和GAPDH聚集可能影响癌细胞生长和神经退行性病症。癌症相关因素可以调控GAPDH细胞核易位,这是调节自噬和细胞死亡机制的基础。细胞核GAPDH的自噬刺激可能会影响癌细胞命运,作为癌细胞中的促存活因子,即使在压力条件下也能支持细胞快速增殖所产生的能量消耗。此外,GAPDH聚集体的形成或GAPDH与特定疾病相关蛋白的相互作用可能与神经元细胞死亡和线粒体功能障碍有关。鉴于其多样化和复杂的功能,安全有效地调控、抑制和调节GAPDH活性的有效疗法将为广泛的医学领域提供强大的工具。

[0013] 因此,对通过施用一种或多种抗GAPDH剂来治疗、抑制、预防或减少个体的病症和疾病以及改善现有治疗剂的性能、结果和耐受性的新组合和方法的需求,长期存在且未得到满足。

### 发明内容

[0014] 一方面,本公开包括抑制GAPDH的方法,包括向需要抑制GAPDH的个体施用在体内水解或代谢而形成羟乙磺酸羟甲胺(isethionic acid hydroxymethylamide)的化合物。

[0015] 一方面,本公开包括在需要其的个体中抑制的GAPDH的方法,所述方法通过向所述个体施用包含本公开的化合物的组合物。

[0016] 一方面,本公开包括,通过向个体施用包含本公开的化合物的组合物来抑制个体的细胞中约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%或约100%的GAPDH活性的方法。

[0017] 一方面,本公开包括,通过向个体施用包含本公开的化合物的组合物来在需要其的个体中减少或抑制三磷酸腺苷(ATP)产生的方法。

[0018] 一方面,本公开包括,通过向个体施用包含本公开的化合物的组合物来在需要其的个体中预防、抑制或减少由GAPDH活性引起或与之相关的疾病、病症或疾病状况的至少一种体征或症状的方法。

[0019] 一方面,本公开包括增加需要其的个体的肿瘤中活性物质(reactive species)的产生或定位的方法,包括向个体施用包含本公开的化合物的组合物。

[0020] 一方面,本公开包括一种预防、抑制或减少施用于患有GAPDH介导的疾病、病症或疾病状况的个体的药物的至少一种副作用的方法,所述方法通过向所述个体施用包含本公开的化合物的组合物。

[0021] 在一个方面,本公开包括鉴别GAPDH抑制剂的方法,包括将测试化合物与溶剂组合以形成溶液,使溶液与缓冲液中的重组GAPDH接触以形成反应混合物,并对反应混合物的等分试样进行酶活性测定,检测酶活性测定中NAD<sup>+</sup>浓度的变化,通过确定与对照溶剂相比在酶活性测定中降低NAD<sup>+</sup>浓度的测试化合物来鉴别抑制GAPDH的测试化合物。

[0022] 一方面,本公开包括治疗患有GAPDH介导的疾病、病症或疾病状况的个体的方法,包括获得包含个体的细胞的生物样品,裂解细胞,监测裂解的细胞中的GAPDH活性,作为GAPDH介导的疾病的生物标志物,以及向个体施用包含GAPDH抑制剂的组合物。

[0023] 一方面,本公开包括用于鉴别适合用GAPDH抑制剂化合物治疗的候选者的方法,包括向个体施用GAPDH抑制剂化合物,从个体获得外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),裂解PBMC,监测裂解的PBMC中的GAPDH活性,对裂解的PBMC进行

酶活性测定,在酶活性测定中检测NAD<sup>+</sup>浓度的变化,基于酶活性测定中与对照溶剂相比NAD<sup>+</sup>浓度的降低,来监测施用的GAPDH抑制剂对GAPDH的抑制,测定PBMC中GAPDH的抑制程度,以及如果GAPDH抑制剂化合物对GAPDH的抑制程度大于预定阈值,则将个体鉴别为用GAPDH抑制剂化合物治疗的合适候选者。

[0024] 一方面,本公开包括治疗方法,包括根据本文所述方法鉴别适合用GAPDH抑制剂治疗的候选者,并用本公开的化合物治疗候选者。

[0025] 一方面,本公开包括通过向个体施用包含本公开的化合物的组合物来在需要其的个体中治疗黄斑变性的方法。

[0026] 在一些方面,本公开可以包括羟乙磺酸羟甲胺或其药学上可接受的盐、水合物、酯或溶剂化物,和包含羟乙磺酸羟甲胺或其药学上可接受的盐、水合物、酯或溶剂化物以及赋形剂、缓冲剂或载体的组合物。

[0027] 一方面,本公开包括甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)与本公开化合物的复合物或缀合物。

[0028] 本公开的主题的其他特征和特性,以及操作方法、相关结构要素的功能和部分的组合,以及制造经济性,将在考虑以下说明、附图以及所附权利要求后变得显而易见,所有这些都构成本说明书的一部分。

## 附图说明

[0029] 图1:GAPDH酶活性的抑制:在37°C下孵育长达60分钟后,用甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性测定试剂盒(Abcam ab204732)测试了GP-2250(100 $\mu$ M和250 $\mu$ M)处理对重组GAPDH(rGAPDH)活性的影响。与未处理的对照相比,100 $\mu$ M和250 $\mu$ M GP-2250以剂量和时间依赖性方式抑制rGAPDH活性高达40%。由于酶的热不稳定性,与30分钟的时间点相比,60分钟时的对照值略有下降。GP-2250曲线是测量数据,未归一化为对照。数据表示为平均值 $\pm$ S.D。

[0030] 图2:ROS的形成:在37°C下孵育90分钟后,使用荧光ROS检测测定(ROS/超氧化物检测测定试剂盒,Abcam(ab139476))在两种胰腺癌细胞系a)PancTuI和b)BxPC3中测试用所示浓度的GP-2250处理对ROS形成的影响。阴性对照(NC+NAC)含有ROS抑制剂(它是测定试剂盒的一部分)加N-乙酰半胱氨酸(NAC;5mM)。未处理的对照(U)。数据表示为平均值 $\pm$ S.D。与未处理的对照(U)相比计算的显著性水平。 $*p<0.05$ , $**p<0.01$ , $***p<0.001$ 。

[0031] 图3:PancTuI细胞系中ATP降低:在37°C下孵育a)3小时、b)6小时和c)24小时后,与细胞活力(浅色柱)相比,用所示浓度的GP-2250处理对ATP量(深色柱)的影响。ATP的强烈降低反映了GP-2250对能量代谢的损害。ATP的降低先于细胞活力降低,因此不是由细胞活力受损引起的。用发光检测试剂盒(Abcam ab113849)测量ATP,用MTT测试(Sigma M5655)测量细胞活力。数据以相对于未处理对照(NC)的变化百分比给出,表示为平均值 $\pm$ S.D。与NC相比的显著性水平。 $*p<0.05$ , $**p<0.01$ , $***p<0.001$ 。

[0032] 图4:BxPC3细胞系中ATP降低:在37°C下孵育a)3h、b)6h和c)24h后,与细胞活力(浅色柱)相比,用所示浓度的GP-2250处理对ATP量(深色柱)的影响。ATP的强烈降低反映了GP-2250对能量代谢的损害。ATP的降低先于细胞活力降低,因此不是由细胞活力受损引起的。用发光检测试剂盒(Abcam ab113849)测量ATP,用MTT测试(Sigma M5655)测量细胞活力。数据以相对于未处理对照(NC)的变化百分比给出,表示为平均值 $\pm$ S.D。与NC相比的显著性

水平。 $*p<0.05$ ,  $**p<0.01$ ,  $***p<0.001$ 。

[0033] 图5:癌蛋白Bax和Bcl-2表达的调节:在PancTul细胞中,通过蛋白质印迹,以 $\alpha$ -微管蛋白作为对照,测试了用200 $\mu$ M GP-2250处理0h、6h、12h和24h对癌蛋白a) Bax和b) Bcl-2表达的影响。随着与GP-2250一起孵育的时间推移,促凋亡蛋白Bax的表达增加,而抗凋亡Bcl-2的表达降低。

[0034] 图6:GP-2250与吉西他滨之间的协同作用:在源自人胰腺癌(Bo80)的原代细胞系中测试了细胞活力。将细胞与GP-2250(200 $\mu$ M、500 $\mu$ M、1000 $\mu$ M)或吉西他滨(G; 100 $\mu$ M、1000 $\mu$ M)单独或与两种药物的组合在37 $^{\circ}$ C下孵育24h。GP-2250(200 $\mu$ M)和吉西他滨(100 $\mu$ M或1000 $\mu$ M)的浓度本身是无活性的。当组合时,观察到惊人的协同作用。活细胞的数量减少了70-75%。使用MTT测定通过比色法测试细胞活力。活细胞将黄色MTT染料转化为紫色甲臜(Sigma M5655)。

[0035] 图7A-7B:GP-2250与丝裂霉素C或顺铂在间皮瘤细胞系JL-1和MSTO-211H中的协同作用。图7A:当将JL-1细胞与GP-2250(200 $\mu$ M, 750 $\mu$ M)或丝裂霉素C(MMC; 0.5 $\mu$ M, 1.0 $\mu$ M)单独或与两种药物的组合在37 $^{\circ}$ C下孵育24h时,通过在本身无活性的浓度(250 $\mu$ M GP-2250和1.0 $\mu$ M MMC)下的组合观察到细胞毒性的协同作用。图7B:当将JMSTO-211H细胞与GP-2250(250 $\mu$ M, 1000 $\mu$ M)或顺铂(CisP; 0.5 $\mu$ M, 2.5 $\mu$ M)单独或与两种药物的组合在37 $^{\circ}$ C下孵育24h时,通过在本身无活性的浓度(250 $\mu$ M GP-2250和2.5 $\mu$ M CisP)下的组合观察到细胞毒性的协同作用。通过组合处理,活细胞的数量减少了约25%。使用MTT测定通过比色法测试细胞活力。活细胞将黄色MTT染料转化为紫色甲臜(Sigma M5655)。

[0036] 图8A-8B:继发性抗性测试。在细胞毒性处理和重新生长的4个周循环后(见正文),在AsPC-1胰腺癌细胞系(浅色柱)中,分别用BrdU和MTT测定测试了GP-2250(图8A)和吉西他滨(图8B)的细胞毒性效力。对照对应于未经药物处理培养4周的细胞(深色柱)。没有证据表明GP-2250的继发性抗性,因为其细胞毒性效力在4个周处理循环后保持不变。相比之下,吉西他滨产生了继发性抗性,如在4个周处理循环后其细胞毒性效力降低所示。

[0037] 图9:继发性抗性测试。在细胞毒性处理和重新生长的6个周循环后(见正文),在PancTul胰腺癌细胞系(浅色柱)中使用BrdU测定测试了GP-2250的细胞毒性效力。对照对应于未经药物处理培养4周的细胞(深色柱)。没有证据表明GP-2250存在继发性抗性,因为其细胞毒性效力在6个周处理循环后保持不变。

[0038] 图10A-10B:继发性抗性测试。在细胞毒性治疗和重新生长的8个周循环后(见正文),在Bo80胰腺原发性癌细胞系(浅色柱)中用BrdU测定测试了GP-2250(图10A)和吉西他滨(图10B)的细胞毒性效力。对照对应于未经药物处理培养8周的细胞(深色柱)。没有证据表明GP-2250存在继发性抗性,因为其细胞毒性效力在8个周处理循环后保持不变。相比之下,吉西他滨出现了部分继发性抗性,如在8个周处理循环后其细胞毒性效力降低所示。

[0039] 图11显示了在PDX小鼠模型中,与对照处理(圆圈)相比,用GP-2250单一疗法(正方形)或Nab-紫杉醇单一疗法(深色三角形)和作为联合疗法(浅色三角形)处理的患者来源的胰腺肿瘤组织(Bo 122)的相对肿瘤生长率。组合处理导致肿瘤体积部分消退。

[0040] 图12显示了在PDX小鼠模型中,与对照处理(圆圈)相比,用GP-2250单一疗法(正方形)或吉西他滨单一疗法(深色三角形)和作为联合疗法(浅色三角形)处理的Bo80患者来源的肿瘤组织的相对肿瘤生长率。组合处理导致肿瘤体积消退。



[0041] 图13显示了胰腺癌组织的相对肿瘤体积。2250 (500mg/kg BW) 与标准药剂吉西他滨 (50mg/kg) 的组合组,在使用组合 (浅色三角形) 时观察到显著的相对肿瘤体积消退,如对于PDX小鼠模型中Bo103患者来源的胰腺癌组织所示。对照用圆圈表示,吉西他滨单一疗法用深色三角形表示。处理中断10天后肿瘤生长恢复,但在第70天左右恢复治疗后再次减少。(数据+/-SEM.)

[0042] 图14:在2250 (500mg/kg\*BW) 与标准药剂吉西他滨 (50mg/kg\*BW) 的组合组中,肿瘤生长以部分缓解为特征,如对于PDX小鼠模型中Bo69患者来源的胰腺癌组织所示。对照用圆圈表示,2250用正方形表示,吉西他滨单一疗法用深色三角形表示。当使用组合时,观察到显著的相对肿瘤体积减小。

[0043] (数据+/-SEM.)

[0044] 图15显示了在PDX小鼠模型中,与对照处理 (菱形) 相比,用GP-2250单一疗法 (正方形) 或吉西他滨单一疗法 (深色三角形) 和作为联合疗法 (浅色三角形) 处理的患者来源的胰腺肿瘤 (Bo 70) 相对生长率。组合处理导致疾病稳定。

[0045] 图16A显示了与对照相比,用GP-2250单一疗法 (浅灰色) 或吉西他滨单一疗法 (深灰色) 处理的体外相对QGP-1神经内分泌肿瘤细胞活力。图16B显示了组合处理的协同效应。

[0046] 图17显示了与对照处理 (圆圈) 相比,用GP-2250单一疗法 (正方形) 或吉西他滨单一疗法 (深色三角形) 和作为联合疗法 (浅色三角形) 处理的小鼠模型中相对QGP-1细胞异种移植肿瘤生长率。组合处理导致QGP-1肿瘤部分消退。

[0047] 图18显示了在小鼠PDX模型中,与对照处理 (圆圈) 相比,用吉西他滨单一疗法 (深色三角形) 和作为联合疗法 (浅色三角形) 处理的患者来源的神经内分泌肿瘤 (Bo 99) 的相对肿瘤生长率。组合处理导致肿瘤体积消退。

[0048] 图19显示了在用对照、单独的吉西他滨、单独的GP-2250以及吉西他滨和GP-2250的组合治疗后形成的来自晚期胰腺癌患者的化疗抗性干细胞的数量。

## 具体实施方式

[0049] 虽然本公开主题的方面可以以多种方式来体现,但以下描述仅旨在公开这些形式中的一些,作为本公开涵盖的主题的具体实例。因此,本公开的主题并不旨在限于如此描述和说明的形式或方面。

[0050] 为了便于理解本发明,下文定义了许多术语。本文定义的术语具有本发明相关领域的普通技术人员通常所理解的含义。诸如“一 (a)”、“一 (an)”和“所述”等术语并非旨在仅指单个实体,而是包括可以使用具体实例进行说明的一般类别。本文的术语用于描述本发明的具体方面,但除了在权利要求中概述之外,它们的使用不限制本发明。

[0051] 当在权利要求和/或说明书中使用术语“抑制”、“减少”或“预防”或这些术语的任何变体都包括实现所需结果的任何可测量的降低或完全抑制。

[0052] 本公开的抗GAPDH剂可以施用于需要抑制GAPDH活性的任何个体。此类个体可能处于患有多种疾病、病症和疾病状况的风险中,或正患有多种疾病、病症和疾病状况。例如,此类疾病、病症和疾病状况的特征可以是糖酵解受损、蛋白质降解通路受损、蛋白质聚集不受控制、有氧糖酵解、线粒体功能障碍、葡萄糖摄取或代谢增加、新血管形成、自身免疫反应、免疫反应、过度血管生成、正常细胞功能障碍性凋亡和/或自噬受损。本文所用短语“GAPDH

介导的病症、疾病或疾病状况”涵盖需要抑制GAPDH活性的个体中的任何一种或多种病症、疾病或疾病状况,包括但不限于特征可以为以下的疾病、病症和疾病状况:糖酵解受损、蛋白质降解通路受损、蛋白质聚集不受控制、有氧糖酵解、线粒体功能障碍、葡萄糖摄取或代谢增加、新血管形成、自身免疫反应、免疫反应、过度血管生成、正常细胞凋亡功能障碍性凋亡和/或自噬受损,包括但不限于本文讨论的任何一种或多种病症、疾病或疾病状况。

[0053] 本公开提供了抑制GAPDH以靶向具有有氧糖酵解的细胞的方法和组合物。在这种类型的代谢中,只有一小部分葡萄糖通量用于能量产生,并且可以通过GAPDH抑制来降低。有氧糖酵解存在于几乎所有类型的肿瘤细胞中,但不存在于正常细胞中。因此,本公开提供了具有广谱抗GAPDH活性而对正常细胞没有普遍毒性的方法和组合物。此外,本公开提供了用于调节以有氧糖酵解能量代谢运行的细胞的方法和组合物,例如激活的内皮细胞和激活的免疫细胞。

[0054] 在一些方面,本公开提供了不可逆地抑制GAPDH的方法和组合物。因此,与需要连续剂量给药且效果最低的现有疗法(例如抗体)相比,本公开提供了令人惊讶且出乎意料的优势。本公开提供了通过不可逆地结合GAPDH活性部位使GAPDH永久地失活的方法。

[0055] 在一些方面,本公开提供了调节线粒体功能和蛋白质产生以减少、抑制、预防和/或消除癌症干细胞(CSC)的方法和组合物。在一些方面,本公开提供了增加肿瘤和癌性细胞中的活性物质,例如活性氧,从而降低癌细胞活力而不影响正常细胞的方法和组合物。在一些方面,本公开提供了诱导癌细胞/肿瘤周围促结缔组织增生组织逆转为正常细胞外基质的方法和组合物。在一些方面,本公开提供了减少、抑制、预防和/或消融细胞因子的方法和组合物。在一些方面,本公开提供了用于向经受引起细胞因子释放或细胞因子水平增加的疗法/状况的个体施用的方法和组合物。在一些方面,本公开提供用于在免疫疗法中减少、抑制、预防和/或消融细胞因子而不干扰靶向癌细胞细胞毒性的方法和组合物,该免疫疗法包括但不限于T细胞参与疗法,例如CAR-T和双特异性疗法。

[0056] 在一些方面,本公开还提供用于治疗、减少、抑制或预防以下的方法和组合物:失弛缓症、艾迪生病、成人斯蒂尔病、无丙种球蛋白血症、斑秃、淀粉样变性、强直性脊柱炎、抗GBM/抗TBM肾炎、抗磷脂综合征、自身免疫性血管性水肿、自身免疫性自主神经功能障碍、自身免疫性脑脊髓炎、自身免疫性肝炎、自身免疫性内耳病(AIED)、自身免疫性心肌炎、自身免疫性卵巢炎、自身免疫性睾丸炎、自身免疫性胰腺炎、自身免疫性视网膜病变、自身免疫性荨麻疹、轴突和神经元神经病(AMAN)、巴洛病(Baló disease)、白塞病(Behcet's disease)、良性黏膜类天疱疮、大疱性类天疱疮、卡斯尔门病(Castleman disease, CD)、乳糜泻(Celiac disease)、恰加斯氏病、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病(Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, CIDP)、慢性复发性多灶性骨髓炎(Chronic recurrent multifocal osteomyelitis, CRMO)、Churg-Strauss综合征(Churg-Strauss Syndrome, CSS)、嗜酸性肉芽肿病(Eosinophilic Granulomatosis, EGPA)、瘢痕性类天疱疮、Cogan综合征(Cogan's syndrome)、冷凝集素病、先天性心脏传导阻滞、柯萨奇心肌炎(Coxsackie myocarditis)、CREST综合征(局限性硬皮病)、克罗恩病、疱疹样皮炎、皮炎、德维克病(视神经脊髓炎)、盘状狼疮、Dressler综合征(Dressler's syndrome)、子宫内膜异位症、嗜酸性食管炎(Eosinophilic esophagitis, EoE)、嗜酸性筋膜炎、结节性红斑、原发性混合型冷球蛋白血症(Essential mixed cryoglobulinemia)、埃文斯综合征

(Evans syndrome)、纤维肌痛、纤维化性肺泡炎、巨细胞动脉炎(颞动脉炎)、巨细胞心肌炎、肾小球肾炎、肺出血-肾炎综合征(Goodpasture's syndrome)、移植物抗宿主病(graft versus host disease,GVHD)、肉芽肿性多血管炎、格雷夫斯病、格林-巴利综合征(Guillain-Barre syndrome)、桥本甲状腺炎、溶血性贫血、过敏性紫癜(Henoch-Schonlein purpura,HSP)、妊娠疱疹、妊娠类天疱疮(pemphigoid gestationis,PG)、化脓性汗腺炎(Hidradenitis Suppurativa,HS)(反常性痤疮)、低丙种球蛋白血症(Hypogammaglobulinemia)、IgA肾病、IgG4相关硬化病(IgG4-related sclerosing disease)、免疫性血小板减少性紫癜(Immune thrombocytopenic purpura,ITP)、包涵体肌炎(Inclusion body myositis,IBM)、间质性膀胱炎(Interstitial cystitis,IC)、幼年关节炎、幼年糖尿病(1型糖尿病)、青少年型肌炎(Juvenile myositis,JM)、川崎病、兰伯特-伊顿综合征(Lambert-Eaton syndrome)、白细胞破碎性血管炎、扁平苔藓、硬化性苔藓、木样结膜炎(Ligneous conjunctivitis)、线状IgA病(Linear IgA disease,LAD)、狼疮、慢性莱姆病(Lyme disease chronic)、梅尼埃病(Meniere's disease)、显微镜下多血管炎(Microscopic polyangiitis,MPA)、混合性结缔组织病(Mixed connective tissue disease,MCTD)、蚕蚀性角膜溃疡、Mucha-Habermann病、多灶性运动神经病(Multifocal Motor Neuropathy,MMN)或MMNCB、多发性硬化症、重症肌无力、肌炎、发作性睡病、新生儿狼疮、视神经脊髓炎、中性粒细胞减少症、眼瘢痕性类天疱疮(Ocular cicatricial pemphigoid)、视神经炎、复发性风湿病(Palindromic rheumatism,PR)、PANDAS、副肿瘤性小脑变性(Paraneoplastic cerebellar degeneration,PCD)、阵发性睡眠性血红蛋白尿(Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria,PNH)、帕里-龙贝格综合征(Parry Romberg syndrome)、扁平部睫状体炎(Pars planitis)(周边葡萄膜炎)、Parsonage-Turner综合征、天疱疮、周围神经炎、静脉周围脑脊髓炎(Perivenous encephalomyelitis)、恶性贫血(Pernicious anemia,PA)、POEMS综合征、结节性多动脉炎、I、II、III型多腺体综合征、风湿性多肌痛、多肌炎、心肌梗死后综合征、心包切开术后综合征、原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎、孕酮皮炎、银屑病、银屑病关节炎、纯红细胞再生障碍(Pure red cell aplasia,PRCA)、坏疽性脓皮病(Pyoderma gangrenosum)、雷诺现象、反应性关节炎、反射性交感神经营养不良、复发性多软骨炎、下肢不宁综合征(Restless legs syndrome,RLS)、腹膜后纤维化、风湿热、类风湿性关节炎、结节病、施密特综合征、巩膜炎、硬皮病、干燥综合征、精子和睾丸自身免疫、僵人综合征(Stiff person syndrome,SPS)、亚急性细菌性心内膜炎(Subacute bacterial endocarditis,SBE)、苏萨克综合征(Susac's syndrome)、交感性眼炎(Sympathetic ophthalmia,SO)、大动脉炎、颞动脉炎/巨细胞动脉炎、血小板减少性紫癜(Thrombocytopenic purpura,TTP)、托洛萨-亨特综合征(Tolosa-Hunt syndrome,THS)、横贯性脊髓炎、1型糖尿病、溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis,UC)、未分化结缔组织病(Undifferentiated connective tissue disease,UCTD)、葡萄膜炎、血管炎、白癜风、伏格特-小柳-原田病(Vogt-Koyanagi-Harada Disease)、肿瘤、癌症,包括但不限于癌、白血病、淋巴瘤、黑素瘤、骨髓瘤、肉瘤、转移性实体瘤和混合型癌症、皮肤病(包括但不限于银屑病、毛细血管扩张症、创伤颗粒化(wound granularization)、硬皮病、感染(例如,猫抓病、细菌性溃疡等)导致的新血管形成)、黄斑变性或年龄相关失明、糖尿病性溃疡、慢性溃疡和创伤、中风、外伤性脑损伤、视网膜新血管形成、角膜新血管形成(例如由沙眼、感染、炎

症、移植或外伤引起的)、糖尿病性视网膜病变、糖尿病性视网膜水肿、糖尿病性黄斑水肿、缺血性视网膜病变、高血压性视网膜病变、闭塞性视网膜病变、早产儿视网膜病变、外伤后新血管形成、感染后新血管形成、移植后新血管形成、视网膜脱离或视网膜变性后的新血管形成、新生血管性青光眼、前房和/或前房角新血管形成、脉络膜新血管形成(choroidal neovascularization, CNV)、视网膜下新血管形成、晶状体后纤维增生症、眼组织胞浆菌病综合征、近视变性、血管样条纹、葡萄膜炎、虹膜发红(rubeosis)、晶状体后纤维增生症、眼组织胞浆菌病和特发性中心性浆液性脉络膜视网膜病变、肌萎缩侧索硬化症、结节病、硬皮病、狼疮、帕金森病、硬化症、史-约综合征、瘤形成、血管性血友病(Von Willebrand disease)、血管炎和川崎病。

[0057] 本公开还提供了用于治疗患有心血管疾病的个体的方法和组合物,该心血管疾病包括但不限于动脉粥样硬化、再狭窄、粥样斑和血管瘤。动脉粥样硬化是一种慢性血管损伤,其中动脉壁中的一些正常血管平滑细胞(VSMC)改变其性质并在动脉粥样硬化斑块中形成致密的毛细血管网络。这些脆弱的微血管会导致出血,从而导致血液凝固,随后流向心肌的血流量减少和心脏病发作。再狭窄通常发生在冠状动脉搭桥手术、动脉内膜切除术和心脏移植之后,尤其是在心脏球囊血管成形术、斑块切除术、激光消融或血管内支架植入术之后。

[0058] 本文所用术语“基本上(substantially)”和“基本上(substantial)”是指相当的度(degree)或程度(extent)。例如,当与事件、情况、特征或属性结合使用时,这些术语可以指所述事件、情况、特征或属性恰好发生的情形以及所述事件、情况、特征或属性非常接近发生的情形,例如考虑本文所述实例的典型耐受水平或可变性。

[0059] 本文所用术语“约”用于通过规定给定值可以“略高于”或“略低于”端点来为数值范围端点提供灵活性。该术语的灵活性程度可以由具体变量决定,并且将在本领域技术人员知识范围内根据经验和本文的相关描述来确定。例如,在一方面,灵活性程度可以在数值的约±10%内。另一方面,灵活性程度可以在数值的约±5%内。另一方面,灵活性程度可以在数值的约±2%、±1%或±0.05%内。

[0060] 通常在本文中,术语“或”包括“和”以及“和/或”。

[0061] 如本文所用,为方便起见,可将多个化合物或步骤呈现在共同列表中。然而,这些列表应解释为如同列表中的每个成员都被单独标识为单独和唯一的成员。因此,在没有相反表示的情况下,仅基于其在共同群体中的呈现,此类列表中的任何个体成员均不应解释为,事实上等同于同一列表中任何其他成员。

[0062] 本发明的化合物可以以游离酸形式、游离碱形式、药学上可接受的盐、药学上可接受的水合物、药学上可接受的酯、药学上可接受的溶剂化物、药学上可接受的前药、药学上可接受的代谢物的形式以及药学上可接受的立体异构体的形式使用。这些形式都在本发明的范围内。实际上,使用这些形式相当于使用中性化合物。

[0063] “药学上可接受的盐”、“水合物”、“酯”或“溶剂化物”是指本发明化合物的具有所需药理学活性并且既不是生物学上的也不是在其他方面不合需要的盐、水合物、酯或溶剂化物。有机酸可用于产生盐、水合物、酯或溶剂化物,例如乙酸盐、己二酸盐、藻酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐、硫酸氢盐、氨基磺酸盐、硫酸盐、萘酸盐(naphthylate)、丁酸盐、柠檬酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十

二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、葡萄糖庚酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸庚酸盐、己酸盐、2-羟基乙磺酸盐、乳酸盐、马来酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、草酸盐、甲苯磺酸盐和十一酸盐。无机酸可用于产生盐、水合物、酯或溶剂化物,例如盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐和硫氰酸盐。其他药学上可接受的盐包括但不限于盐酸盐、氢溴酸盐、硫酸盐、磷酸盐、酒石酸盐、富马酸盐、马来酸盐、草酸盐、乙酸盐、丙酸盐、琥珀酸盐、扁桃酸盐、甲磺酸盐、苯磺酸盐和甲苯磺酸盐。

[0064] 盐、水合物、酯或溶剂化物也可以与有机碱形成。酸性化合物的药学上可接受的碱加成盐可以通过常规方法与有机碱和无机碱形成。例如,碱金属和碱土金属氢氧化物、碳酸盐和碳酸氢盐例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙、碳酸钾、碳酸氢钠、碳酸镁等,氨、伯胺、仲胺和叔胺等。也可以通过用合适的铝络合物例如氯化铝六水合物等处理相应的钠盐来获得本发明化合物的铝盐。无毒的有机碱包括但不限于三乙胺、丁胺、哌嗪和三(羟甲基)-甲胺。合适的碱盐、水合物、酯或溶剂化物的实例包括氨的氢氧化物、碳酸盐和碳酸氢盐,碱金属盐例如钠盐、锂盐和钾盐,碱土金属盐例如钙盐和镁盐、铝盐和锌盐。适合形成本发明化合物的药学上可接受的碱加成盐、水合物、酯或溶剂化物的有机碱包括无毒且强度足以形成此类盐、水合物、酯或溶剂化物的那些有机碱。为了说明的目的,此类有机碱的类型可包括单-、二-和三烷基胺,例如甲胺、二甲胺、三乙胺和二环己胺;单-、二-或三羟基烷基胺,例如单-、二-和三乙醇胺;氨基酸,例如精氨酸和赖氨酸;胍;N-甲基-葡萄糖胺(N-methyl-glucosamine);N-甲基-葡糖胺(N-methyl-glucamine);L-谷氨酰胺;N-甲基-哌嗪;吗啉;乙二胺;N-苄基-苯乙胺;(三羟甲基)乙胺等。参见例如“Pharmaceutical Salts,” J.Pharm.Sci., 66:1, 1-19(1977)。因此,碱性含氮基团可以用试剂季铵化,该试剂包括:低级烷基卤化物,例如甲基、乙基、丙基和丁基氯化物、溴化物和碘化物;二烷基硫酸盐,例如二甲基、二乙基、二丁基和二戊基硫酸盐;长链卤化物,例如癸基、月桂基、肉豆蔻基和硬脂酰基氯化物、溴化物和碘化物;和芳烷基卤化物,例如苄基和苯乙基溴化物。

[0065] 可以通过将噻嗪样化合物的游离碱溶解在含有适当酸或碱的水溶液或含水醇溶液或其他合适溶剂中并通过蒸发溶液分离盐,来制备碱性化合物的盐、水合物、酯或溶剂化物。或者,可以使噻嗪样化合物化合物的游离碱与酸反应,也可以使具有酸性基团的噻嗪样化合物与碱反应,从而使反应在有机溶剂中进行,在这种情况下,盐直接分离或可以通过浓缩溶液获得。

[0066] “药学上可接受的前药”是指本发明化合物的衍生物,其在表现出药理作用之前经历生物转化。配制前药的目的是改善化学稳定性、改善患者接受度和顺应性、改善生物利用度、延长作用持续时间、改善器官选择性、改善制剂(例如增加水溶性)和/或减少副作用(例如毒性)。可以使用本领域已知的方法从本发明的化合物容易地制备前药,例如Burger's Medicinal Chemistry and Drug Chemistry, Fifth Ed., Vol.1, pp.172-178, 949-982 (1995)所述的方法。例如,本发明的化合物可以通过将一个或多个羟基或羧基转化为酯而转化为前药。此外,还包括本发明化合物的N-保护形式,作为本发明化合物的药学上可接受的前药的非限制性实例。

[0067] “药学上可接受的代谢物”是指经过代谢转化的药物。在进入体内后,大多数药物是可能会改变其物理性质和生物效应的化学反应底物。这些代谢转化通常会影响化合物的极性,并改变药物在体内分布和排出体外的方式。然而,在某些情况下,药物的代谢是治疗

效果所必需的。例如,抗代谢物类的抗癌药物必须在转运到癌细胞后转化为其活性形式。由于药物必须经过某种代谢转化,因此在药物代谢中起作用的生化反应可能是多种多样的。尽管其他组织也可能参与,但药物代谢的主要部位是肝脏。

[0068] 此外,某些组合物、浓度、剂量方案、剂量、综合征或疾病状况、步骤等可以在一个具体方面的语境中予以讨论。应当理解,这仅仅是出于方便,并且这样的公开同样适用于在本文中发现的其他方面。例如,针对施用本公开的抗GAPDH剂的方法描述的方法步骤、活性剂、试剂盒或组合物的列表将找到对与例如以下的方法步骤、活性剂、试剂盒或组合物相关的方面的直接支持:治疗、预防、抑制或减少由GAPDH活性引起或与之相关的疾病、病症或疾病状况的至少一种体征或症状;治疗、预防、抑制或减少施用于患有由GAPDH活性引起或与之相关的疾病、病症或疾病状况的个体的药物的至少一种副作用;治疗、预防、抑制或减少由GAPDH活性引起或与之相关的疾病、病症或疾病状况的体征或症状的发生率;调控血管形成;调节血管形成;调节血管生成;和调节GAPDH活性,即使这些方法步骤、活性剂、试剂盒或组合物没有在说明书的该方面的语境中重新列出。

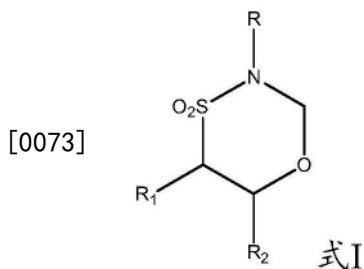
[0069] 本文所用且本领域熟知的术语“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”是指用于获得有益或期望的结果,包括临床结果的方法。有益的或期望的临床结果可以包括但不限于减轻或改善一种或多种症状或疾病状况、减轻疾病程度、稳定(即不恶化)疾病状态、延迟或减缓疾病进展、改善或缓解疾病状态、减少疾病复发和缓解(无论是部分还是全部),无论是可检测的还是不可检测的。“治疗(treating)”和“治疗(treatment)”也可以意味着与未接受治疗的预期生存期相比延长生存期。除了可用作治疗方法之外,本文所述的方法还可用于预防或预防疾病。本文所用术语“治疗”可以指本发明化合物的任何施用,并且包括:(i) 预防或抑制正在经历或表现出疾病的病理学或症状学的哺乳动物例如人的疾病(即阻止病理学和/或症状学的进一步发展);或(ii) 改善正在经历或表现出疾病的病理学或症状学的哺乳动物例如人的疾病(即,逆转病理学和/或症状学)。术语“控制”包括预防、治疗、根除、改善或以其他方式减少被控制的疾病状况的严重性。

[0070] 浓度、量和其他数值数据在本文中可以以范围格式表达或呈现。应当理解,这类范围格式仅仅是出于方便和简洁而使用,因此应该灵活地解释为不仅包括明确列举为范围限制的数值,而且还包括包含在该范围内的所有个体数值或子范围,如同每个数值和子范围都被明确地列举一样。作为说明,数值范围“约0.01至约2.0”应解释为不仅包括明确列举的约0.01至约2.0的值,而且还包括所示范围内的个体值和子范围。因此,包括在该数值范围内的是个体值,例如0.5、0.7和1.5,以及子范围,例如0.5-1.7、0.7-1.5和1.0-1.5等。此外,不论所述范围的宽度或特征如何,这类解释都应当适用。此外,应注意除非另有说明,否则所有百分比均以重量计。

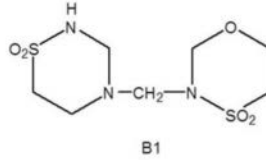
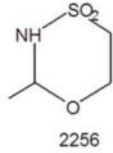
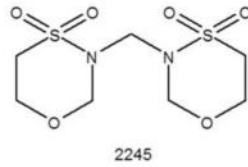
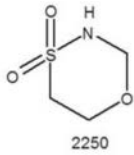
[0071] 在理解本公开的范围时,本文所用术语“包括”或“包含”及其派生词旨在是开放式术语,其指定存在陈述的特征、元素、成分、组、整数和/或步骤,但不排除存在其他未陈述的特征、元素、成分、组、整数和/或步骤。上述内容也适用于具有相似含义的词语,例如术语“包括”、“具有”及其派生词。本文所用术语“由……组成”及其派生词旨在是封闭式术语,其指定存在陈述的特征、元素、成分、组、整数和/或步骤,但排除存在其他未陈述的特征,元素、成分、组、整数和/或步骤。本文所用术语“基本上由……组成”旨在指定存在陈述的特征、元素、成分、组、整数和/或步骤以及不会实质上影响特征、元素、成分、组、整数和/或步

骤的基本和新颖特性的那些。应当理解,提及这些过渡术语中的任何一个(即“包含”、“由……组成”或“基本上由……组成”)为替换未具体使用的任何其他过渡术语提供了直接支持。例如,将一个术语从“包含”修改为“基本上由……组成”会由于该定义而得到直接支持。

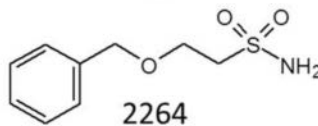
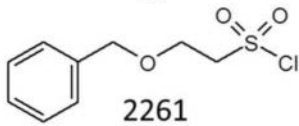
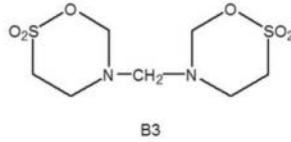
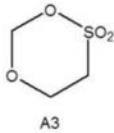
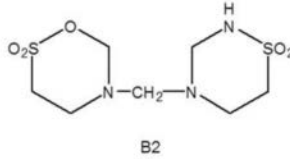
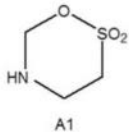
[0072] 一些噁噻嗪样化合物描述于2015年12月17日提交的PCT/IB2015/059741中,该专利申请通过引用而整体并入本文。在某些方面,本发明使用式I的噁噻嗪样化合物,其中R是H、体内可切割接头或基团或水溶液中的离去基团,并且R<sub>1</sub>和R<sub>2</sub>独立地是H、烷基、芳基、取代的烷基、取代的苯基、取代的芳基或其组合。在一些方面,取代的烷基、取代的苯基或取代的芳基可以被任何合适的分子取代,包括例如一个或多个卤素或含卤素的分子、一个或多个羟基、一个或多个酰基、一个或多个酰氧基、一个或多个烷氧基、一个或多个芳基、一个或多个羧基、一个或多个羰基、一个或多个烷基羧基、一个或多个烷基磺氧基、一个或多个烷基羰基、一个或多个硝基、一个或多个氰基、一个或多个酰氨基、一个或多个苯基、一个或多个甲苯基、一个或多个氯苯基、一个或多个烷氧基苯基、一个或多个卤代苯基、一个或多个苯并噁唑基、一个或多个或多个噁唑啉基、一个或多个苯并咪唑基、一个或多个噁唑基、一个或多个噻唑基、一个或多个吡啶基等,或其组合。在一些方面,烷基或取代的烷基可以是C1至C30烷基。在一些方面,烷基可以是分支的或未分支的。在一些方面,芳基可以是杂环的、多环的或单环的。



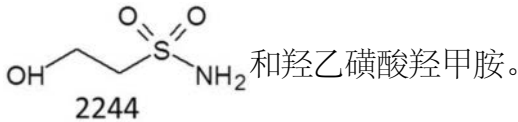
[0074] 示例性的噁噻嗪样化合物包括以下:



[0075]



[0076]



和羟乙磺酸羟甲胺。

[0077] 在某些方面,根据本文的公开,2250(四氢1,4,5-噁噻嗪-4-二氧化物或1,4,5-噁噻嗪-4-二氧化物)用于抑制GAPDH并用于治疗、预防、抑制或减少根据本文公开的由GAPDH引起或与之相关的疾病、病症、疾病状况的至少一种体征或症状,例如包括但不限于由以下引起或与之相关的疾病、病症、疾病状况或症状:糖酵解受损、蛋白质降解通路受损、蛋白质聚集不受控制、有氧糖酵解、线粒体功能障碍、葡萄糖摄取或代谢增加、新血管形成、自身免疫反应、免疫反应、过度血管生成、正常细胞功能障碍性凋亡和/或自噬受损。

[0078] 在某些方面,本公开提供了作为化合物的、在组合物中并且用于根据本公开的方法施用的羟乙磺酸羟甲胺。

[0079] 在某些方面,本公开还包括与本公开的一种或多种化合物结合的GAPDH。例如,本公开包括GAPDH和本公开的一种或多种上述化合物的复合物或缀合物。

[0080] 本文所用“复合物”是指与GAPDH复合的本公开的一种或多种化合物,其中本公开的至少一种化合物与GAPDH结合或被GAPDH隔离。本文所用“缀合物”是指与GAPDH共价结合的本公开的一种或多种化合物。

[0081] 在一些方面,一种或多种前述化合物可以共价结合于GAPDH的一个或多个半胱氨酸。在一些方面,一种或多种前述化合物可以共价结合于GAPDH的催化(活性部位)半胱氨酸-SH,即GAPDH的Cys-152。



[0082] 在某些方面,本公开包括在体外或体内水解而形成羟乙磺酸羟甲胺的化合物。在一些方面,此类化合物可包括2250和式I的化合物,其中R为水溶液中的离去基团。在某些方面,本公开包括向个体施用化合物,其中该化合物在体内水解或代谢而形成羟乙磺酸羟甲胺。这类化合物的实例包括2250和式I的化合物,其中R是水溶液中的离去基团。在某些方面,本公开包括通过向个体施用在体内水解或代谢而形成羟乙磺酸羟甲胺的化合物来抑制GAPDH的方法。在某些方面,本公开包括通过施用本公开的化合物来抑制NF $\kappa$ B(NF kappa B)的方法。在某些方面,本公开包括通过施用本公开的化合物来降低Bcl-2表达的方法。在某些方面,本公开包括通过施用本公开的化合物来增加Bax表达的方法。

[0083] 在某些方面,本发明还涉及含有本文所述化合物、复合物或缀合物的组合物,例如药物组合物,包括其药学上可接受的溶液,以及含有本公开的组合物的可施用组合物、试剂盒、医疗设备和药物容器。

[0084] 本文所述术语“有效量”或“治疗有效量”是指会引起研究人员、兽医、医生或其他临床医生所寻求的组织、系统、动物或人的生物学或医学反应的主题化合物的量。在一个实例中,治疗有效量包含约0.0001至约10,000mg/kg、约0.001mg/kg至约5,000mg/kg、约0.01mg/kg至约1,000mg/kg、约0.05mg/kg至约750mg/kg、约0.1mg/kg至约600mg/kg、约1mg/kg至约500mg/kg、约10mg/kg至约400mg/kg、约20mg/kg至约300mg/kg、约200mg/kg至约500mg/kg、约300mg/kg至约400mg/kg、约250mg/kg、300mg/kg、400mg/kg、420mg/kg、450mg/kg、约500mg/kg个体体重,或在任何公开范围内的剂量或范围。

[0085] 本文所用术语“施用(administration of)”或“施用(administering a)”化合物应理解为意指以可引入需要治疗的个体的身体的形式向该个体提供本发明的化合物,例如静脉内、皮下、肌肉内、局部、口服、腹膜内、经眼(ophthalmically)、通过玻璃体内注射、鞘内、鼻内、肺内、经皮、眼内、通过吸入、经气管、玻璃体内或其组合。在一些方面,本发明的化合物可以以治疗有用的形式和治疗有用的量施用,包括但不限于:口服剂型,例如片剂、胶囊、糖浆、悬浮剂等;可注射剂型,例如静脉内(IV)、肌肉内(IM)或腹膜内(IP)、鼻内等;肠内或肠胃外、透皮剂型,包括乳膏、胶冻剂、粉剂或贴剂;颊剂型(buccal dosage form);吸入粉剂、喷雾剂、悬浮剂等;和直肠栓剂。

[0086] 根据所需的具体施用途径,可以使用本领域众所周知的多种药学上可接受的载体。这些包括固体或液体填充剂、稀释剂、水溶助剂、表面活性剂和封装物质。可以包括任选的药物活性材料,其基本上不干扰一种或多种噁嗪啉样化合物的活性。

[0087] 本文所用术语“静脉内施用”包括注射、输注和其他静脉内施用方式。

[0088] 本文用于描述载体、稀释剂或赋形剂的术语“药学上可接受的”必须与制剂的其他成分相容并且对其接受者无害。

[0089] 一方面,本公开包括施用单独或与至少一种第二活性剂组合的本公开的一种或多种化合物。例如,在一些方面,本公开包括向需要其的个体施用本公开的一种或多种化合物与抗血管生成剂、抗自身免疫剂和/或抗肿瘤剂。

[0090] 一方面,本公开包括施用本公开的一种或多种化合物以在需要其的个体中抑制GAPDH活性。一方面,本公开包括抑制个体的细胞中约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%或约100%的GAPDH活性的方法。

[0091] 一方面,本公开包括通过施用本公开的一种或多种化合物以在需要其的个体中抑

制GAPDH活性来减少或抑制该个体中腺苷三磷酸(ATP)的产生。

[0092] 一方面,本公开包括通过向需要其的个体施用本公开的一种或多种化合物来抑制GAPDH活性,以治疗、预防、抑制或减少由GAPDH活性引起或与之相关的疾病、病症或疾病状况的至少一种体征或症状,例如,包括但不限于由以下引起或与之相关的疾病、病症或疾病状况:糖酵解受损、蛋白质降解通路受损、蛋白质聚集不受控制、有氧糖酵解、线粒体功能障碍、葡萄糖摄取或代谢增加、新血管形成、自身免疫反应、免疫反应、过度血管生成、正常细胞功能障碍性凋亡和/或自噬受损。

[0093] 在一些方面,本公开包括通过向需要其的个体施用本公开的一种或多种化合物以不可逆地抑制GAPDH来抑制GAPDH活性。在一些方面,本公开包括通过向需要其的个体施用本公开的一种或多种化合物来抑制GAPDH活性,以调节线粒体功能和蛋白质产生从而减少、抑制、预防和/或消除癌症干细胞(CSC)。在一些方面,本公开包括通过向需要其的个体施用本公开的一种或多种化合物来抑制GAPDH活性,以在肿瘤和癌细胞中增加活性物质例如活性氧产生或定位,从而降低癌细胞活力而不影响正常细胞。在一些方面,本公开包括通过向需要其的个体施用本公开的一种或多种化合物来抑制GAPDH活性,以诱导癌细胞/肿瘤周围促结缔组织增生组织逆转为正常细胞外基质。在一些方面,本公开包括通过施用本公开的一种或多种化合物来抑制GAPDH活性,以减少、抑制、预防和/或消融细胞因子。在一些方面,本公开包括,通过向经受引起细胞因子释放或细胞因子水平增加的疗法/疾病状况的个体共施用本公开的一种或多种化合物,以预防、抑制或减少该个体中的细胞因子释放或细胞因子水平增加,来治疗该个体。在一些方面,本公开包括通过向需要其的个体施用本公开的一种或多种化合物来抑制GAPDH活性,以减少、抑制、预防和/或消融细胞因子而不干扰免疫疗法中靶向癌细胞的细胞毒性,该免疫疗法包括但不限于T细胞参与疗法,例如CAR-T和双特异性疗法。

[0094] 在一些方面,本公开包括用于治疗患有癌症、自身免疫病、血管生成或本文公开的其他疾病、病症、疾病状况或症状的个体的方法和组合物,包括选择患有与GAPDH相关的癌症、自身免疫病、血管生成或本文公开的其他疾病、病症、疾病状况或症状的个体,并向所选个体施用一种或多种包含本公开的噻嗪样化合物的GAPDH抑制剂。

[0095] 在一些方面,本公开包括用于治疗个体的与GAPDH相关的癌症、自身免疫病、新血管形成和/或过度血管生成的方法和组合物,包括向个体施用一种多种包含本公开的噻嗪样化合物的GAPDH抑制剂。

[0096] 在一些方面,本公开包括用于选择患有与GAPDH相关的癌症、自身免疫病、新血管形成和/或过度血管生成的个体以用一种或多种噻嗪样化合物进行治疗的方法,包括检测个体的生物样品中的GAPDH和选择用本公开的多种噻嗪样化合物之一进行治疗的个体。在一些方面,个体中与GAPDH相关的癌症、自身免疫病、新血管形成和/或过度血管生成通过从个体分离细胞样品或生物样品并评估细胞样品或生物样品中的GAPDH活性来确定。

[0097] 在一些方面,本公开包括通过使含有GAPDH的细胞样品或生物样品与一种或多种噻嗪样化合物接触并确定细胞样品或生物样品中的GAPDH是否受到抑制,并从一种或多种噻嗪样化合物中选择至少一种抑制GAPDH的化合物,来筛选一种或多种噻嗪样化合物对GAPDH抑制的方法。在一些方面,高于阈值的GAPDH抑制(例如,比对照高至少30%)表明该化合物具有抗癌、抗自身免疫、抗新血管形成和/或抗过度血管生成活性。

[0098] 在一些方面,本公开包括通过使含有GAPDH的细胞样品或生物样品与一种或多种噁嗪样化合物接触并确定细胞样品或生物样品中的GAPDH是否受到抑制,来确定一种或多种噁嗪样化合物是否抑制GAPDH的方法。

[0099] 在一些方面,本公开包括评价噁嗪样化合物的抗癌、自身免疫、新血管形成和/或过度血管生成特性用于治疗癌症、自身免疫病、新血管形成和/或过度血管生成的方法,包括使细胞样品或生物样品与噁嗪样化合物接触并确定细胞样品或生物样品中的GAPDH是否受到抑制,其中噁嗪样化合物对GAPDH的抑制表明噁嗪样化合物可用于治疗癌症、自身免疫病、新血管形成和/或过度血管生成。

[0100] 可以将本公开的抗GAPDH剂施用于处于患有多种疾病、病症和疾病状况风险中的个体或患有多种疾病、病症和疾病状况的个体。此类疾病、病症和疾病状况的特征可以是新血管形成和/或过度血管生成。本公开还提供了用于调控和调节血管形成、调控和调节血管生成以及预防、治疗、抑制或减少新血管形成和/或过度血管生成(也称为血管生成相关或新血管形成相关疾病、病症和疾病状况)的方法和组合物。此类疾病、病症和疾病状况的非限制性实例包括以下中的一种或多种:肿瘤、癌症,包括但不限于癌、白血病、淋巴瘤、黑色素瘤、骨髓瘤、肉瘤、转移性实体瘤和混合型癌症、皮肤病(包括但不限于银屑病、毛细血管扩张症、创伤颗粒化、硬皮病、感染(例如,猫抓病、细菌性溃疡等)导致的新血管形成)、黄斑变性或与年龄相关失明、糖尿病性溃疡、慢性溃疡和创伤、中风、外伤性脑损伤、视网膜新血管形成、角膜新血管形成(例如由沙眼、感染、炎症、移植或外伤引起的)、糖尿病性视网膜病变、糖尿病性视网膜水肿、糖尿病性黄斑水肿、缺血性视网膜病变、高血压性视网膜病变、闭塞性视网膜病变、早产儿视网膜病变、外伤后新血管形成、感染后新血管形成、移植后新血管形成、视网膜脱离或视网膜变性后新血管形成、新生血管性青光眼、前房和/或前房角新血管形成、脉络膜新血管形成(CNV)、视网膜下新血管形成、晶状体后纤维增生症、眼组织胞浆菌病综合征、近视变性、血管样条纹、葡萄膜炎、虹膜发红、晶状体后纤维增生症、眼组织胞浆菌病和特发性中心性浆液性脉络膜视网膜病变、肌萎缩侧索硬化症、结节病、硬皮病、狼疮、帕金森病、硬化症、史-约综合征、瘤形成、血管性血友病、血管炎和川崎病。

[0101] 本公开还提供了用于治疗患有心血管疾病的个体的方法和组合物,该心血管疾病包括但不限于动脉粥样硬化、再狭窄、粥样斑和血管瘤。动脉粥样硬化是一种慢性血管损伤,其中动脉壁中的一些正常血管平滑细胞(VSMC)改变其性质并在动脉粥样硬化斑块中形成致密的毛细血管网络。这些脆弱的微血管会导致出血,从而导致血液凝固,随后流向心肌的血流量减少和心脏病发作。再狭窄通常发生在冠状动脉搭桥手术、动脉内膜切除术和心脏移植之后,尤其是在心脏球囊血管成形术、斑块切除术、激光消融或血管内支架植入术之后。它涉及微血管的广泛生长。通过抑制心血管组织中的血管生成,本文提供的方法可用于治疗这些心血管疾病。

[0102] 一方面,本公开涉及治疗黄斑变性。特别是,向需要其的个体施用含有本公开的化合物的眼科制剂。本公开的眼科适应症包括患有或未患有糖尿病性黄斑水肿特别是糖尿病性黄斑水肿的人中所有形式的糖尿病性视网膜病变。糖尿病性视网膜病变是一种影响数百万人的严重疾病状况。一方面,通过玻璃体内注射施用本公开的组合物。

[0103] 在一些方面,本公开包括通过向需要其的个体施用本公开的一种或多种化合物来抑制GAPDH活性,以减少、抑制和/或预防该个体中的新血管形成和/或过度血管生成。在一

些方面,至少一种体征或症状可以包括皮疹、肌肉痛、关节痛、疲劳、贫血、炎症、腹痛、腹胀、腹泻、恶心、反酸、体重增加、发烧、持续性头痛、出血并发症(例如,出血)、高血压、低血压、低血细胞计数、肿瘤生长、恶病质、光敏感、眼发红、眼刺激或其组合。

[0104] 一方面,本公开包括通过向个体共施用一种或多种噻嗪样化合物抑制GAPDH活性而预防、抑制或减少施用于患有由新血管形成和/或过度血管生成引起或与之相关的疾病、病症或疾病状况的个体的药物的至少一种副作用。在一些方面,至少一种副作用可以包括以下中的一种或多种:出血并发症(例如,出血)、高血压、腹泻、疲劳、低血细胞计数、创伤愈合减少、发痒、皮肤干燥或干裂、眼睛干燥或流眼水、疼痛(pain)、头痛、皮疹、头晕、体重减轻、脱发、肿胀、异常挫伤、癫痫发作、肌无力、麻木、感染、发烧、发冷、疼痛(ache)、疼痛(pain)、食欲不振、体重变化、关节痛/肿胀,或其组合。

[0105] 一方面,本公开包括通过共施用本公开的一种或多种噻嗪样化合物与化疗药物来抑制GAPDH活性而增加化疗药物的治疗指数(例如,降低毒性、增加药物的肿瘤摄取、增加效力等)的方法和组合物。在一些方面,化疗药物可以包括曲妥珠单抗、阿仑单抗、贝伐珠单抗、博纳吐单抗、本妥昔单抗、英夫利昔单抗、依库珠单抗、赛妥珠单抗、达克珠单抗、西妥昔单抗、地诺单抗、地努妥昔单抗(dinutuximab)、替伊莫单抗(ibritumomab tiuxetan)、易普利姆玛(ipilimumab)、纳武单抗(nivolumab)、奥比曲妥珠单抗、奥法木单抗、帕尼单抗、派姆单抗(pembrolizumab)、帕妥珠单抗、利妥昔单抗、曲妥珠单抗。在一些方面,该组合通过使协同疗法(co-therapy)毒性变小来增加治疗指数。较低的毒性允许递送更多的化疗药物,同时保持可接受的副作用。还预期协同疗法更有效,因此,可以使用更少的化疗药物来获得与先前组合物提供的相同结果。

[0106] 本文所用短语“共施用”或“联合施用”是指在时间上并列施用两种(或多种)药剂。共施用或组合可以通过以下方式来实现:将两种药剂混合成单一制剂,或者分别但同时施用两种药剂,或分别并且在彼此的短时间内施用。例如,通常在6-168小时的时间范围内共施用两种药剂。在这种情况下,可以以任一顺序施用药剂,即可以首先施用化疗药物,或者可以首先施用本公开的一种或多种噻嗪样化合物。在一些方面,以单一制剂共施用或依次且分别共施用这两种药剂。

[0107] 一方面,本公开涉及降低用化疗药物治疗且处于化疗药物相关毒性风险的患者中的这类毒性的方法,该方法包括用一种或多种噻嗪样化合物和化疗药物治疗所述患者,从而使所述患者的化疗药物相关毒性风险降低。在一个实施方案中,化疗药物相关毒性是心脏毒性、肾毒性、肝毒性、肺毒性、皮肤病毒性或胃肠毒性。例如,一些化疗药物可能会对心脏造成直接损伤(急性或慢性),包括蒽环素。化疗药物,包括顺铂、环磷酰胺和异环磷酰胺,会产生尿路/肾毒性。具有肺毒性的药物,包括博来霉素,可引起严重的肺部影响。皮肤病毒性也常见于化疗药物,包括暂时性皮疹(卡莫司汀、阿糖胞苷、吉西他滨、天冬酰胺酶和甲基苄肼)、光敏性(丝裂霉素、5-FU、甲氨蝶呤、长春碱和达卡巴嗪)、皮炎、色素沉着过度、荨麻疹、指甲变化、脱发和再放射反应(radiation recall)。胃肠毒性,包括口腔炎或腹泻,也很常见。

[0108] 在一些方面,患者患有癌症或肿瘤,包括但不限于胆道癌;脑癌,包括胶质母细胞瘤和髓母细胞瘤;乳腺癌;三阴性乳腺癌;子宫癌;输卵管癌;宫颈癌;绒毛膜癌;结肠癌;膀胱癌;子宫内膜癌;视网膜母细胞瘤;阴道癌;外阴癌;食道癌;口腔癌;胃癌;肾癌;血液肿

瘤,包括急性淋巴细胞性和骨髓性白血病;多发性骨髓瘤;AIDS相关白血病和成人T细胞白血病淋巴瘤;上皮内肿瘤,包括鲍恩病和佩吉特病;肝癌(liver cancer)(肝肿瘤(hepatocarcinoma));肺癌;头或颈癌或口腔癌(口腔、喉、食道、鼻咽、下颌、扁桃体、鼻、唇、唾液腺、舌头等);淋巴瘤,包括霍奇金病和淋巴细胞淋巴瘤;神经母细胞瘤;神经内分泌肿瘤;口腔癌,包括鳞状细胞癌;肾上腺癌;肛门癌;血管肉瘤;阑尾癌;胆管癌;骨癌;类癌瘤;软组织肉瘤;横纹肌肉瘤;眼癌;卵巢癌,包括源自上皮细胞、基质细胞、生殖细胞和间充质细胞的卵巢癌,以及输卵管癌;胆囊癌;胰腺癌;前列腺癌;直肠癌;肉瘤,包括平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、脂肪肉瘤、纤维肉瘤和骨肉瘤;皮肤癌,包括黑素瘤、卡波西肉瘤、基底细胞癌和鳞状细胞癌;睾丸癌,包括胚组织瘤(精原细胞瘤、非精原细胞瘤[畸胎瘤、绒毛膜癌])、间质瘤和生殖细胞瘤;阴茎癌;血管内皮瘤;胃肠癌;输尿管癌;尿道癌;脊柱癌;脑垂体癌;原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤;甲状腺癌,包括甲状腺腺癌和髓样癌;和肾癌,包括腺癌和肾母细胞瘤。在一些方面,癌症或肿瘤包括乳腺癌、前列腺癌、结肠直肠癌、淋巴瘤、多发性骨髓瘤和黑素瘤。

[0109] 可以在细胞培养物或实验动物中,通过标准制药程序测定此类分子的毒性和治疗效力,例如,通过测定LD<sub>50</sub>(对50%的群体致死的剂量)和ED<sub>50</sub>(对50%的患者治疗有效的剂量)。毒性效果与治疗效果的剂量比是治疗指数,其可以表示为LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>比值。

[0110] 如本文所用,关于化疗药物的术语“治疗指数”表示化疗药物的安全性。在一些方面,治疗指数可以包括比较引起治疗效果(例如,杀伤癌细胞)的治疗剂的量与引起毒性(例如,肝毒性)的治疗剂的量。预期根据某些实施方案,使用本文所述的组合物和/或方法可以出现改善的治疗指数,包括但不限于当:(1)化疗药物的剂量增加到高于当前治疗剂量;(2)化疗药物的剂量与当前治疗剂量保持相同;或(3)化疗药物的剂量降低到低于当前治疗剂量。在一些实施方案中,包括本段中情境中所述组合物和方法,可以引发如使用当前治疗剂量所见的改善或类似的治疗效果,没有更坏的毒性、具有更少的毒性或没有毒性。

[0111] 一方面,本公开包括通过以下方式抑制GAPDH活性的方法:向需要其的个体施用本公开的一种或多种化合物,以通过向个体施用一种或多种噻嗪样化合物来下调血管形成,从而预防个体中的新血管形成。

[0112] 一方面,本公开包括通过以下方式抑制GAPDH活性的方法:向需要其的个体施用本公开的一种或多种化合物,以通过向个体施用一种或多种噻嗪样化合物来下调血管生成,从而预防个体中的不希望过度血管生成。

[0113] 一方面,本公开包括通过以下方式抑制GAPDH活性的方法:向需要其的个体施用本公开的一种或多种化合物,以通过向个体施用一种或多种噻嗪样化合物来抑制糖酵解受损,从而预防个体中的不希望过度血管生成。

[0114] 一方面,本公开包括通过以下方式抑制GAPDH活性的方法:向需要其的个体施用本公开的一种或多种化合物,以通过向个体施用一种或多种噻嗪样化合物来预防、抑制、减少或逆转蛋白质降解通路受损,从而预防个体中的不希望过度血管生成。

[0115] 一方面,本公开包括通过以下方式抑制GAPDH活性的方法:向需要其的个体施用本公开的一种或多种化合物,以对于蛋白质聚集不受控制通过向个体施用一种或多种噻嗪样化合物,从而预防个体中的不希望过度血管生成。

[0116] 一方面,本公开包括通过以下方式抑制GAPDH活性的方法:向需要其的个体施用本

公开的一种或多种化合物,以对于有氧糖酵解通过向个体施用一种或多种噻嗪样化合物,从而预防个体中的不希望过度血管生成。

[0117] 一方面,本公开包括对于线粒体功能障碍通过向需要其的个体施用本公开的一种或多种化合物来抑制GAPDH活性的方法。

[0118] 一方面,本公开包括通过以下方式抑制GAPDH活性的方法:向需要其的个体施用本公开的一种或多种化合物,以对于增加的葡萄糖摄取或代谢通过向个体施用一种或多种噻嗪样化合物,从而预防个体的不希望过度血管生成。

[0119] 一方面,本公开包括通过以下方式抑制GAPDH活性的方法:向需要其的个体施用本公开的一种或多种化合物,以对于自身免疫反应通过向个体施用一种或多种噻嗪样化合物,从而预防个体中的不希望过度血管生成。

[0120] 一方面,本公开包括通过以下方式抑制GAPDH活性的方法:向需要其的个体施用本公开的一种或多种化合物,以对于免疫反应通过向个体施用一种或多种噻嗪样化合物,从而预防个体中的不希望过度血管生成。

[0121] 一方面,本公开包括通过以下方式抑制GAPDH活性的方法:向需要其的个体施用本公开的一种或多种化合物,以对于正常细胞的功能障碍性凋亡通过向个体施用一种或多种噻嗪样化合物,从而预防个体中的不希望过度血管生成。

[0122] 一方面,本公开包括通过以下方式抑制GAPDH活性的方法:向需要其的个体施用本公开的一种或多种化合物,以对于自噬受损通过向个体施用一种或多种噻嗪样化合物,从而预防个体中的不希望过度血管生成。

[0123] 一方面,本公开包括通过向个体施用一种或多种噻嗪样化合物来抑制、减少或预防GAPDH活性,其中所述一种或多种噻嗪样化合物与个体GAPDH活性中心中的活性(催化性)半胱氨酸-SH相互作用,从而使个体中的GAPDH失活。

[0124] 在一些方面,本公开包括以剂量和时间依赖性方式降低个体中GAPDH的催化活性。例如,本公开的化合物对GAPDH的抑制可归因于酶失活所致,例如通过与GAPDH的催化性半胱氨酸共价相互作用使酶失活。这种相互作用对本公开的化合物在患者中的药代动力学和给药方案具有重大影响。在一些方面,GAPDH活性一旦共价失活,则只能通过合成新的酶蛋白来恢复。因此,靶标抑制的持续时间由GAPDH酶的半衰期决定。测量被代谢和排泄的本公开的游离化合物的血液水平作为抑制靶标的指标变得过时了。在一些方面,由于这种现象,施用于患者的本公开化合物的血液水平不反映酶的活性状态。酶抑制的持续时间会远远超过血液中游离的本公开化合物的存在。因此,本公开化合物的给药间隔基于GAPDH酶蛋白的半衰期。

[0125] 一方面,用静脉内、口服或其组合施用的一种或多种噻嗪样化合物或其组合治疗患者。一方面,用静脉内、口服或其组合施用的2250(也称为“化合物2250”、“C-2250”或“GP-2250”)治疗患者。

[0126] 一方面,向患者施用一种或多种噻嗪样化合物或其组合,并联合施用一种或多种治疗药物,用于治疗患有由以下引起或与之相关的疾病、病症或疾病状况的个体:糖酵解受损、蛋白质降解通路受损、蛋白质聚集不受控制、有氧糖酵解、线粒体功能障碍、葡萄糖摄取或代谢增加、新血管形成、自身免疫反应、免疫反应、过度血管生成、正常细胞功能障碍性凋亡和/或自噬受损,例如抗VEGF抗体、贝伐珠单抗、雷珠单抗、布洛赛珠单抗

(brolucizumab)、拉帕替尼、舒尼替尼、索拉非尼、阿西替尼、卡博替尼、乐伐替尼、普纳替尼、雷莫芦单抗、瑞格非尼(reorafenib)、凡德他尼、帕唑帕尼、培加他尼(pegaptanib)、贝伐西尼(bevasiranib)、阿柏西普、噻唑烷二酮、康柏西普和兰帕利珠单抗(lampalizumab)、皮质类固醇、免疫抑制剂,例如环孢霉素、他克莫司、抗炎药,例如富马酸二甲酯、1-磷酸鞘氨醇(S1P)受体调节剂,例如辛波莫德、芬戈莫德、塞拉非莫德(ceralifimod)、奥扎莫德(ozanimod)、珀奈莫德(ponesimod)、自身免疫调节剂肽,例如醋酸格拉替雷(glatiramer acetate)和类似的随机大小的肽、生物药物,例如抗体、融合蛋白和基于干扰素的药物。

[0127] 在一些方面,本公开包括联合施用一种或多种噁嗪啉样化合物与以下中的一种或多种的组合:托珠单抗、抗组胺药、解热药、抗炎化合物、皮质类固醇、糖皮质激素、TNF-抑制剂(例如依那西普)、司妥昔单抗、T细胞耗竭抗体疗法,例如阿仑单抗和抗胸腺细胞球蛋白(ATG)、基于IL-1R的抑制剂(阿那白滞素)、依鲁替尼和环磷酰胺。

[0128] 可以通过任何合适的方法施用本发明的化合物。口服施用的固体剂型包括胶囊、片剂、丸剂、粉剂、口腔崩解片和颗粒剂。在此类固体剂型中,混合所提供的组合物与至少一种惰性、药学上可接受的赋形剂和/或填充剂或增量剂(例如,淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅酸)、粘合剂(例如,羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶)、润湿剂(例如甘油)、崩解剂(例如琼脂、碳酸钙、马铃薯淀粉、木薯淀粉、藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠)、溶液阻滞剂(例如石蜡)、吸收促进剂(例如季铵化合物)、湿润剂(例如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯)、吸收剂(例如高岭土和膨润土)和润滑剂(例如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠)及其混合物。在胶囊、片剂和丸剂的情况下,剂型可以包含缓冲剂。

[0129] 使用诸如乳糖(lactose)或乳糖(milk sugar)以及高分子量聚乙二醇等赋形剂,类似类型的固体组合物可用作软和/或硬填充明胶胶囊中的填充剂。片剂、糖衣丸、胶囊、丸剂和颗粒剂的固体剂型可制备为具有包衣和外壳,例如肠溶衣和药物配制领域众所周知的其他包衣。它们可以任选地包含不透明剂并且可以是这样的组合物,即它们仅在肠道特定部分中释放所提供的组合物,或释放所提供的组合物靶向肠道特定部分,任选地以延迟方式。可以使用的包埋组合物的实例包括聚合物物质和蜡。使用诸如乳糖(lactose)或乳糖(milk sugar)以及高分子量聚乙二醇等赋形剂,类似类型的固体组合物可用作软和硬填充明胶胶囊中的填充剂。

[0130] 在某些方面,胶囊可以含有含羟丙基甲基纤维素(HPMC)、明胶、葡甲胺和鱼明胶中的一种或多种的赋形剂制剂。在某些方面,胶囊可以含有与牛磺罗定和/或牛磺胺(taurultam)组合的化合物2250。胶囊还可以任选地含有番茄红素、鞣花酸(多酚)、姜黄素、胡椒碱、飞燕草素、白藜芦醇、异硫氰酸酯例如萝卜硫素、辣椒素和萜萜酰胺中的一种或多种。

[0131] 当以微粒或纳米颗粒的形式使用时,本发明要求保护的化合物可达到更高的血液水平。本发明包括片剂形式或封装在胶囊中的本公开化合物的微粒和/或纳米颗粒。

[0132] 在某些方面,本公开涉及向患者口服施用噁嗪啉样化合物。在一些方面,将噁嗪啉样化合物配制成胶囊或片剂。在某些方面,口服剂型含有约50-1000mg的噁嗪啉样化合物。在某些方面,口服剂型含有约100-500mg的噁嗪啉样化合物。在某些方面,口服剂型含有约

200-400mg的噁噻嗪样化合物。在某些方面,口服剂型含有约250-350mg的噁噻嗪样化合物。在某些方面,噁噻嗪样化合物是C-2250。

[0133] 在一些方面,在组合物中以约0.01至约500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度提供噁噻嗪样化合物。在一些方面,在组合物中以约0.1至约100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度提供噁噻嗪样化合物。在一些方面,在组合物中以约10至约50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度提供噁噻嗪样化合物。

[0134] 在一些方面,将噁噻嗪样化合物以约0.001至约5wt.%、约0.01至约3.5wt.%、约0.1至约3wt.%、约0.5至约2.5wt.%或约1至约2wt.%的浓度提供在组合物中。在一些方面,将噁噻嗪样化合物以约0.01至约1.5%的浓度提供在组合物中。在一些方面,将噁噻嗪样化合物以约0.1%至约1%的浓度提供在组合物中。在一些方面,将噁噻嗪样化合物以约100至约5000 $\mu\text{M}$ 、约250至约2500 $\mu\text{M}$ 、约500至约2000 $\mu\text{M}$ 、约750至约1500 $\mu\text{M}$ 、约1000至约1250 $\mu\text{M}$ 的浓度或上述范围内的任何其他浓度提供在组合物中。

[0135] 在一些方面,将噁噻嗪样化合物以单位剂型提供于组合物中。本文所用“单位剂型”是含有一定量噁噻嗪样化合物、适合根据良好的医疗实践以单剂量施用于动物(例如哺乳动物,例如人类个体)的组合物。这些组合物可含有约0.1mg(毫克)至约500mg,例如约5mg至约350mg的噁噻嗪样化合物。可以改变用本发明的组合物治疗的频率以达到并维持所需的目标血浆水平。因此,治疗方案的非限制性实例包括每天、每天两次、每天三次、每周、每两周、每月及其组合。或者,本发明的组合物还可以被施用为连续输注或推注,推注之后进行一次、两次、三次或更多次不同的连续输注,例如以不同的速率和剂量施用药物,此类方案任选地被一次或多次其他推注中断。

[0136] 在某些方面,在施用预期会导致个体糖酵解受损、蛋白质降解通路受损、蛋白质聚集不受控制、有氧糖酵解、线粒体功能障碍、葡萄糖摄取或代谢增加、新血管形成、自身免疫反应、免疫反应、过度血管生成、正常细胞的功能障碍性凋亡和/或自噬受损的治疗剂之前,向个体施用本公开的一种或多种噁噻嗪样化合物。例如,一方面,在施用预期会导致(例如,直接或间接引起或促进)个体糖酵解受损、蛋白质降解通路受损、蛋白质聚集不受控制、有氧糖酵解、线粒体功能障碍、葡萄糖摄取或代谢增加、新血管形成、自身免疫反应、免疫反应、过度血管生成、正常细胞的功能障碍性凋亡,和/或自噬受损的治疗剂前的约12-96小时,例如24、48或72小时,施用本公开的一种或多种噁噻嗪样化合物。一方面,在施用预期会导致个体糖酵解受损、蛋白质降解通路受损、蛋白质聚集不受控制、有氧糖酵解、线粒体功能障碍、葡萄糖摄取或代谢增加、新血管形成、自身免疫反应、免疫反应、过度血管生成、正常细胞的功能障碍性凋亡和/或自噬受损的治疗剂之前,以一个剂量或多个剂量施用本公开的一种或多种噁噻嗪样化合物。在某些方面,与预期会导致个体糖酵解受损、蛋白质降解通路受损、蛋白质聚集不受控制、有氧糖酵解、线粒体功能障碍、葡萄糖摄取或代谢增加、新血管形成、自身免疫反应、免疫反应、过度血管生成、正常细胞的功能障碍性凋亡和/或自噬受损的治疗剂同时向个体施用本公开的一种或多种噁噻嗪样化合物。在某些方面,在向个体施用预期会促进个体糖酵解受损、蛋白质降解通路受损、蛋白质聚集不受控制、有氧糖酵解、线粒体功能障碍、葡萄糖摄取或代谢增加、新血管形成、自身免疫反应、免疫反应、过度血管生成、正常细胞的功能障碍性凋亡和/或自噬受损的治疗剂后约1至约24小时、约4至约18小时、约6至约15小时或约8至约12小时内,向个体施用噁噻嗪样化合物。

[0137] 在某些方面,在预期会发生糖酵解受损、蛋白质降解通路受损、蛋白质聚集不受控



制、有氧糖酵解、线粒体功能障碍、葡萄糖摄取或代谢增加、新血管形成、自身免疫反应、免疫反应、过度血管生成、正常细胞的功能障碍性凋亡和/或自噬受损血管生成期间,根据方案施用本公开的一种或多种噁嗪嗪样化合物。例如,一方面,在施用预期会导致个体糖酵解受损、蛋白质降解通路受损、蛋白质聚集不受控制、有氧糖酵解、线粒体功能障碍、葡萄糖摄取或代谢增加、新血管形成、自身免疫反应、免疫反应、过度血管生成、正常细胞的功能障碍性凋亡和/或自噬受损的治疗剂之前、期间和/或之后,施用本公开的一种或多种噁嗪嗪样化合物,所述施用为患者一生的每天、每隔一天、每两周或每周,为直至缓解,为数年、数月、2-12周的时期、3-10周的时期或4-8周的时期。

[0138] 一方面,一种或多种噁嗪嗪样化合物以组合物形式提供并施用于需要其的个体,其总日剂量可以是约0.001g至约1000g,例如约0.01g至约500g、0.1-300g、0.5-200g、1-100g或所述范围内的任何量。日剂量可以以可口服施用组合物的形式施用。日剂量可以以胶囊、片剂或药学上可接受的溶液的形式施用。日剂量可以以含有浓度为约0.01至约5%w/v、约0.1至约3%w/v、约0.5至约2.5%w/v或约1至约2%w/v的化合物2250的形式施用。

[0139] 日剂量可以以含有浓度为以下的一种或多种噁嗪嗪样化合物的形式施用:约0.001 $\mu$ g/ml至约1000 $\mu$ g/ml、约0.01 $\mu$ g/ml至约750 $\mu$ g/ml、约0.05 $\mu$ g/ml至约500 $\mu$ g/ml、约0.1 $\mu$ g/ml至约300 $\mu$ g/ml、约0.5 $\mu$ g/ml至约200 $\mu$ g/ml、约1 $\mu$ g/ml至约100 $\mu$ g/ml、约5 $\mu$ g/ml至约50 $\mu$ g/ml、约10 $\mu$ g/ml至约25 $\mu$ g/ml或约15 $\mu$ g/ml至约20 $\mu$ g/ml。日剂量可以以含有一种或多种增溶剂例如多元醇的形式施用。

[0140] 在组合物中提供的噁嗪嗪样化合物的有效剂量可以包括含有约0.01-500mg/kg、约1-100mg/kg/天或约5-50mg/kg/天的噁嗪嗪样化合物的剂量单位。在一些方面,每隔一天、每两周或每周施用剂量单位。

[0141] 任何具体患者的具体有效剂量会取决于多种因素,包括新血管形成和/或过度血管生成、病症或疾病的严重性或概率;所用具体化合物的活性;患者的年龄、体重、一般健康、性别和饮食;具体化合物的制剂;施用时间和途径;施用持续时间;与所用具体化合物联合使用或同时使用的治疗剂;以及医学领域已知的类似因素。随着GAPDH介导的病症、疾病或疾病状况恶化或改善,有效剂量也可以随时间而变化。对于慢性病,个体可以在数天、数周、数月、数年或个体的一生中接受有效剂量。施用或共施用的次数和频率可以根据GAPDH介导的病症、疾病或疾病状况的概率或严重性以及患者对施用的具体化合物和/或施用于个体的第二治疗活性剂的具体反应而变化。

[0142] 在另一方面,本公开提供了用于筛选测定以鉴别其他GAPDH抑制剂的方法、试剂盒、装置或设备。可以测定一种或多种测试化合物对GAPDH的结合和抑制。一方面,本公开涉及将测试化合物与合适的缓冲液或溶剂(例如溶解测试化合物的缓冲液或溶剂)混合,使测试化合物与缓冲液中的重组GAPDH接触以形成反应混合物,并对反应混合物的等分试样进行酶活性测定以鉴别抑制GAPDH的化合物。

[0143] 在一些方面,可以在多孔板中并且使用重组GAPDH探针来检测与对照溶剂相比NAD<sup>+</sup>浓度的变化,进行酶活性测定。在一些方面,酶活性测定可以包括焦磷酸钠缓冲液。在某些方面,重组GAPDH探针可以与砷酸钠、NAD<sup>+</sup>和甘油醛-3-磷酸(G3P)一起孵育。酶活性可以使用酶标仪分光光度计测量,其例如在室温下NAD<sup>+</sup>的减少导致的340nm处的吸光度增加。在一些方面,首先可以将重组GAPDH稀释到焦磷酸钠缓冲液中,例如稀释至100 $\mu$ l的体积。随

后,可以使用重复移液器将另外的100 $\mu$ l含有砷酸钠、NAD<sup>+</sup>和G3P的反应混合物快速添加到每个孔中,可以将板混合,例如在读板仪中混合5秒,然后进行吸光度测量。在一些方面,可以在20分钟内每10-20秒测量一次吸光度,并根据线性期吸光度的变化计算速率。与对照溶剂相比,还原NAD<sup>+</sup>的速率降低表明GAPDH的抑制。

[0144] 一方面,本公开提供了鉴别GAPDH抑制剂的方法,包括将测试化合物与溶剂混合以形成溶液,使溶液与缓冲液中的重组GAPDH接触以形成反应混合物,并对反应混合物的等分试样进行酶活性测定,在酶活性测定中检测NAD<sup>+</sup>浓度的变化,通过确定在酶活性测定中与对照溶剂相比降低NAD<sup>+</sup>浓度的测试化合物来鉴别抑制GAPDH的测试化合物。

[0145] 在另一方面,本公开提供了用于提供用于临床使用的生物标志物的方法、试剂盒、装置或设备。在一些方面,本公开提供了用于在患有癌症或处于患有癌症风险中的患者中使用的生物标志物。在一些方面,本公开提供了通过以下方式来使用GAPDH作为生物标志物的方法:从个体获得外周血单核细胞(PBMC)、裂解PBMC并监测裂解的PBMC中的GAPDH活性。在一些方面,该方法包括对PBMC裂解物进行酶活性测定,在酶活性测定中检测NAD<sup>+</sup>浓度的变化,并基于酶活性测定中与对照溶剂相比NAD<sup>+</sup>浓度的降低来监测施用的GAPDH抑制剂对GAPDH的抑制。

[0146] 外周血单核细胞(PBMC)中的GAPDH抑制可以作为癌性组织中GAPDH抑制状态的生物标志物。类似于癌组织,本公开的化合物可以共价抑制PBMC中的GAPDH。然而,与癌细胞相反,GAPDH在PBMC中不是限速的,并且不会对这些细胞有害。假设GAPDH蛋白在PBMC中的半衰期与在患者癌组织中的半衰期相同或相似。PBMC中GAPDH的抑制程度可以直接反映在靶组织中GAPDH的活性状态。

[0147] 在一些方面,本公开提供了通过以下方式跟踪用本公开的一种或多种化合物治疗的患者中GAPDH抑制程度的方法:从个体获得外周血单核细胞(PBMC),裂解PBMC,监测裂解的PBMC中GAPDH活性,对裂解的PBMC进行酶活性测定,在酶活性测定中检测NAD<sup>+</sup>浓度的变化,基于酶活性测定中与对照溶剂相比NAD<sup>+</sup>浓度的降低,监测施用的GAPDH抑制剂对GAPDH的抑制,测定PBMC中GAPDH的抑制程度,并且如果具体化合物对GAPDH的抑制程度大于预定阈值,例如约50%、约60%、约70%、约80%、约90%或约95%,则将个体鉴别为用本公开的具体GAPDH抑制剂化合物治疗的合适候选者。

[0148] 实施例

[0149] 将参考以下实施例进一步描述本公开的方面,这些实施例仅出于说明目的而提供,并且不应用于限制本发明的范围或解释本发明。

[0150] 实施例1

[0151] 合成了本公开的各种噁嗪啉样化合物并分析了与GAPDH的相互作用。经鉴别羟乙磺酸酰胺和亚甲基二醇为水解产物。活性瞬时活性中间体是羟乙磺酸羟甲胺。该中间体与GAPDH活性中心的活性半胱氨酸-SH共价相互作用并使该酶失活。纯化共价标记的酶,使用各种分析方法鉴别活性中间体,所述分析方法包括标记肽的质谱,其被阐明。

[0152] 实施例2

[0153] 测定了本公开的化合物对LPS刺激的细胞因子释放的抑制,并且发现所述抑制在高葡萄糖(10mM)下比在低葡萄糖(0.5mM)下更高。庚酸是阳性对照。

[0154] 实施例3

[0155] 使用乳酸产生作为间接测量,本公开的化合物对LPS刺激的影响伴随着乳酸的减少。LPS刺激产生类似Warburg的糖酵解增加。GAPDH仅在如此高的糖酵解条件下才变得限速。

[0156] 实施例4

[0157] 重组GAPDH直接被2250抑制。孵育时间可能很关键,因为它是无细胞测定。在啮齿动物体外和体内测试了半最大或完全抑制GAPDH所需的具体剂量。这些体外和体内数据提供了在不同程度上抑制组织(例如癌组织)中GAPDH所需剂量的靶标相关量度,与诸如诱导细胞凋亡或ROS产生等细胞测定相比,这是对本公开化合物的影响的更直接测量。

[0158] 使用本公开化合物的PET相容衍生物,例如通过掺入Fluor 18,直接检测了患者中本公开的化合物对GAPDH的占有程度。

[0159] 实施例5

[0160] GAPDH是在有氧糖酵解条件下运行的细胞(例如肿瘤细胞)中的限速糖酵解酶。因此预计部分抑制会损害肿瘤细胞的能量代谢。这与正常细胞相反。它们的能量代谢主要基于氧化磷酸化。GAPDH在正常细胞中不是糖酵解的限速酶,因此耐受GAPDH的部分抑制。使用100 $\mu$ M和250 $\mu$ M浓度的2250相比对照测试GAPDH酶活性的程度。结果如图1所示,图1显示了GAPDH酶活性的抑制。在37 $^{\circ}$ C下孵育高达60分钟后,用甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性测定试剂盒(Abcam ab204732)测试了用GP-2250(100 $\mu$ M和250 $\mu$ M)处理对重组GAPDH(rGAPDH)活性的影响。与未处理的对照相比,rGAPDH活性被100 $\mu$ M和250 $\mu$ M GP-2250以剂量和时间依赖性方式抑制高达40%。由于酶的热不稳定性,与30分钟的时间点相比,60分钟的对照值略有下降。GP-2250曲线是测量数据,未归一化为对照。数据表示为平均值 $\pm$ S.D。

[0161] 使用重组蛋白的GAPDH活性测定显示出以时间和浓度依赖性方式的显著活性抑制。值得注意的是,GP-2250的部分抑制作用足以损害肿瘤细胞的能量代谢。这可以通过ATP的降低来证明,ATP的降低是通过GP-2250的浓度实现的,该浓度对应于部分GAPDH抑制所需的浓度。(参见图4)。

[0162] 实施例6

[0163] 如图2所示,在两种胰腺癌细胞系a) Panc Tu1和b) BxPC3中测试了用各种浓度的GP-2250处理对ROS形成的影响。在两个细胞系中,ROS的增加都是浓度依赖性的。BxPC3细胞系比Panc Tu1对形成ROS更敏感。形成ROS所需的相当高浓度(等于或高于500 $\mu$ M)的GP-2250很可能是由于该细胞测定中90分钟的短孵育时间所致。预计GP-2250的效力在更长的孵育时间下会更高。

[0164] 图2显示了ROS的形成:在两种胰腺癌细胞系a) Panc Tu1和b) BxPC3中,使用荧光ROS检测测定(RoS/超氧化物检测测定试剂盒,Abcam(ab139476)),在37 $^{\circ}$ C下与GP-2250一起孵育90分钟后,测试了用所示浓度的GP-2250处理对ROS形成的影响,阴性对照(NC+NAC)含有ROS抑制剂(它是测定试剂盒的一部分)加上N-乙酰半胱氨酸(NAC;5mM)。未处理的对照(U)。数据表示为平均值 $\pm$ S.D。与未处理的对照(U)相比计算的显著性水平。 $*p<0.05$ , $**p<0.01$ , $***p<0.001$ 。

[0165] 实施例7

[0166] 肿瘤细胞中的ATP水平视为GP-2250对其能量代谢影响的量度。如图3所示,在Panc Tu1细胞系中在3小时、6小时和24小时测试了ATP。如图4所示,还在BxPC3细胞系中在3小

时、6小时和24小时测试了ATP。在两个分析的细胞系中,ATP的量根据GP-2250的浓度和孵育时间而降低。在250 $\mu$ M下,使用PancTu1在3小时后和使用敏感更低的BxPC3在6小时,ATP的降低已经很明显。正是这种浓度导致GAPD的部分抑制(图1),从而将GAPD抑制与ATP的降低联系起来,这本身就是诱导细胞凋亡的充分信号。ATP的降低不是由于细胞毒性所致。GP-2250对细胞活力的任何损害都需要比降低ATP所需浓度高的浓度。

[0167] 图3显示了PancTuI细胞系中ATP的降低:37 $^{\circ}$ C下孵育a) 3h、b) 6h和c) 24h后,与细胞活力(浅色柱)相比,用所示浓度的GP-2250处理对ATP量的影响(深色柱)。ATP的强烈下降反映了GP-2250对能量代谢的损害。ATP的降低先于细胞活力的降低,因此不是由细胞活力受损引起的。用发光检测试剂盒(Abcam ab113849)测量ATP,用MTT测试(Sigma M5655)测量细胞活力。数据以相对于未处理对照(NC)的变化百分比给出,表示为平均值 $\pm$ S.D.与NC相比的显著性水平。 $*p<0.05$ , $**p<0.01$ , $***p<0.001$ 。

[0168] 图4显示了BxPC3细胞系中ATP降低:在37 $^{\circ}$ C下孵育a) 3h、b) 6h和c) 24h后,与细胞活力(浅色柱)相比,用所示浓度的GP-2250处理对ATP量(深色柱)的影响。ATP的强烈降低反映了GP-2250对能量代谢的损害。ATP的降低先于细胞活力降低,因此不是由细胞活力受损引起的。用发光检测试剂盒(Abcam ab113849)测量ATP,用MTT测试(Sigma M5655)测量细胞活力。数据以相对于未处理对照(NC)的变化百分比给出,表示为平均值 $\pm$ S.D.与NC相比的显著性水平。 $*p<0.05$ , $**p<0.01$ , $***p<0.001$ 。

[0169] 实施例8

[0170] 细胞凋亡通路由ATP降低或ROS增加触发。它们导致促凋亡(死亡)蛋白Bax与抗凋亡(存活)蛋白Bcl-2之间的平衡发生变化。线粒体被去稳定,凋亡半胱天冬酶级联反应最终完成凋亡细胞的自杀。GP-2250(200 $\mu$ M)随着孵育时间的增加而增加了Bax的表达并降低了Bcl-2的表达,如蛋白质印迹所示(图5)。Bax的增加和Bcl-2的降低表明,GP-2250通过内在的线粒体通路触发细胞凋亡。此外,足以改变Bax/Bcl-2比率的GP-2250浓度(200 $\mu$ M)对应于部分GAPDH抑制的浓度(250 $\mu$ M)(图1)。这一发现将GAPDH抑制与细胞凋亡诱导联系起来。

[0171] Bax和Bcl-2的表达比率受转录因子NF $\kappa$ B(NF kappa B)的控制。NF $\kappa$ B支持肿瘤细胞的存活。它通过增加Bcl-2的表达发挥抗细胞凋亡作用,并通过增加抗氧化酶的表达来防止ROS。2250诱导Bcl-2表达降低并增加ROS这一发明支持2250直接或间接抑制NF $\kappa$ B的观点。

[0172] 图5显示了癌蛋白Bax和Bcl-2表达的调节:在PancTu1细胞中,通过蛋白质印迹,以 $\alpha$ -微管蛋白作为对照,测试了用200 $\mu$ M GP-2250处理0h、6h、12h和24h对癌蛋白a) Bax和b) Bcl-2表达的影响。随着与GP-2250一起孵育的时间推移,促凋亡蛋白Bax的表达增加,而抗凋亡Bcl-2的表达降低。

[0173] 实施例9

[0174] 在减少化疗药物相关毒性和协同增加细胞毒性的实施例中,在患者来源的胰腺癌细胞系(Bo80)和2个间皮瘤细胞系(JL-1, MST0-211H)中测试了GP-2250与化疗药物吉西他滨、丝裂霉素C和顺铂的以下组合。

[0175] (1)GP-2250与吉西他滨的协同作用:在原代胰腺癌细胞(Bo80)中测试时,当以各自的无活性剂量(200 $\mu$ M GP-2250加100 $\mu$ M或1000 $\mu$ M吉西他滨)组合药物时,GP-2250与吉西他滨在本身无活性浓度下的组合导致强烈的细胞毒性(图6)。使用与GP-2250的组合可以在体外降低化疗药物相关毒性,同时保持高效力。因此,在患者来源的异种移植小鼠模型中

测试了GP-2250与吉西他滨的组合,以评估该药物组合的体内治疗潜力(参见图12-15;图18)。

[0176] 图6显示了GP-2250与吉西他滨之间的协同作用:在源自人胰腺癌的原代细胞系(Bo80)中测试了细胞活力。将细胞与GP-2250(200 $\mu$ M、500 $\mu$ M、1000 $\mu$ M)或吉西他滨(G;100 $\mu$ M、1000 $\mu$ M)单独或与两种药物的组合在37 $^{\circ}$ C下孵育24h。GP-2250(200 $\mu$ M)和吉西他滨(100 $\mu$ M或1000 $\mu$ M)的浓度本身是无活性的。当组合时,观察到惊人的协同作用。活细胞的数量减少了70-75%。使用MTT测定通过比色法测试细胞活力。活细胞将黄色MTT染料转化为紫色甲臜(Sigma M5655)。

[0177] (2) 针对间皮瘤细胞JL-1和MST0-211H所示的与丝裂霉素C与顺铂的协同作用:GP-2250与丝裂霉素C或顺铂中的每一种组合时具有显著的协同作用(图7A和7B)。重要的是,协同作用在本身无活性的药物剂量下是明显的。CisP和丝裂霉素C各自的细胞毒作用可以通过GP-2250明显增强高达30%。使用组合可通过减少化疗药物剂量,在实现高效力的同时降低化疗药物相关毒性。

[0178] 图7A和图7B显示了GP-2250与丝裂霉素C或顺铂在间皮瘤细胞系JL-1和MST0-211H中的协同作用。图7A:当将JL-1细胞与GP-2250(200 $\mu$ M,750 $\mu$ M)或丝裂霉素C(MMC;0.5 $\mu$ M,1.0 $\mu$ M)单独或与两种药物的组合在37 $^{\circ}$ C下孵育24h时,通过在本身无活性的浓度(250 $\mu$ M GP-2250和1.0 $\mu$ M MMC)下的组合观察到细胞毒性的协同作用。图7B:当将JMST0-211H细胞与GP-2250(250 $\mu$ M,1000 $\mu$ M)或顺铂(CisP;0.5 $\mu$ M,2.5 $\mu$ M)单独或与两种药物的组合在37 $^{\circ}$ C下孵育24h时,通过在本身无活性的浓度(250 $\mu$ M GP-2250和2.5 $\mu$ M CisP)下的组合观察到细胞毒性的协同作用。通过组合处理,活细胞的数量减少了约25%。使用MTT测定通过比色法测试细胞活力。活细胞将黄色MTT染料转化为紫色甲臜(Sigma M5655)。

[0179] 实施例10

[0180] 对2250的继发抗性进行了测试,以模拟在长达8周的时间内重复大剂量药物施用。吉西他滨用作比较药物。预期潜在的继发性抗性自身表现为任一药物损害细胞活力的能力降低。该研究用3种胰腺肿瘤细胞系AsPC-1、PancTu1和Bo80进行,后者是源自胰腺癌患者的原代细胞系。用2250或吉西他滨以破坏80-90%的细胞剂量将细胞每周一次处理24小时。随后,更换培养基,让细胞在没有药物的情况下重新生长6天。

[0181] 对两种药物重复这种每周一次的细胞杀伤和重新生长循环,持续4周、6周和8周。4、6和8周末处理的培养物用作对照。在4、6和8周的每个处理循环的2小时、24小时和6天,用BrdU测定或MTT测定测试细胞活力。与未处理的对照相比,在第4周结束时(图8A)、第6周结束时(图9)和第8周结束时(图10A),GP-2250在所有三种细胞系中的细胞毒性效力均未显示降低。没有观察到GP-2250诱导的继发性抗性,因为其细胞毒性效力与未处理的对照相当。因此,预期GP-2250在癌症患者的长期治疗期间提供持续的益处。相比之下,在第4周结束时吉西他滨的部分继发性抗性已经明显,如其在所有测试浓度下的细胞毒性效力降低所示(图8B)。在第8周证实了吉西他滨细胞毒性效力降低(图10B)。

[0182] 图8A-8B:继发性抗性测试。在细胞毒性处理和重新生长的4个周循环后(见正文),在AsPC-1胰腺癌细胞系(浅色柱)中,分别用BrdU和MTT测定测试了GP-2250(图8A)和吉西他滨(图8B)的细胞毒性效力。对照对应于未经药物处理培养4周的细胞(深色柱)。没有证据表明GP-2250的继发性抗性,因为其细胞毒性效力在4个周处理循环后保持不变。相比之下,吉

西他滨已经产生了继发性抗性,如在4个周处理循环后其细胞毒性效力降低所示。

[0183] 图9显示了继发性抗性测试的结果。在细胞毒性处理和重新生长的6个周循环后(见正文),在PancTu1胰腺癌细胞系(浅色柱)中使用BrdU测定测试了GP-2250的细胞毒性效力。对照对应于未经药物处理培养4周的细胞(深色柱)。没有证据表明GP-2250存在继发性抗性,因为其细胞毒性效力在6个周处理循环后保持不变。

[0184] 图10A-10B继发性抗性测试。在细胞毒性处理和重新生长的8个周循环后(见正文),在Bo80胰腺原代癌细胞系(浅色柱)中用BrdU测定测试了GP-2250(图10A)和吉西他滨(图10B)的细胞毒性效力。对照对应于未经药物处理培养8周的细胞(深色柱)。没有证据表明GP-2250存在继发性抗性,因为其细胞毒性效力在8个周处理循环后保持不变。相比之下,吉西他滨已经出现了部分继发性抗性,如在8个周处理循环后其细胞毒性效力降低所示。

[0185] 实施例11

[0186] 如图11-15和图18所示,制作并测试组合疗法的患者来源的异种移植物(PDX)鼠模型。PDX模型实验中的所有疗法和对照都是腹膜内施用。将胰腺癌组织植入小鼠内,并使其生长至 $200\text{mm}^3$ 的规定体积。

[0187] 图11显示了,与对照处理(圆圈)相比,用GP-2250单一疗法(正方形)或Nab-紫杉醇单一疗法(深色三角形)和作为组合疗法(浅色三角形)处理的患者来源的胰腺肿瘤组织(Bo122)的相对肿瘤生长率。组合处理导致肿瘤体积部分消退。在2250( $500\text{mg}/\text{kg}\cdot\text{BW}$ )与标准药剂nab-紫杉醇( $15\text{mg}/\text{kg}\cdot\text{BW}$ )的组合组中,肿瘤体积的特征为部分消退,如PDX鼠标模型中患者来源的胰腺癌组织Bo122所示。 $*p<0.05$ 。

[0188] 图12显示了在PDX小鼠模型中,与对照处理(圆圈)相比,用GP-2250单一疗法(正方形)或吉西他滨单一疗法(深色三角形)和作为组合疗法(浅色三角形)处理的Bo80患者来源的肿瘤组织的相对肿瘤生长率。组合处理导致显著的肿瘤消退。

[0189] 图12:在2250( $500\text{mg}/\text{kg}\cdot\text{BW}$ )与标准药剂吉西他滨( $50\text{mg}/\text{kg}$ )的组合组中,使用组合时观察到明显的相对肿瘤体积消退,如PDX小鼠模型中Bo80患者来源的胰腺癌组织所示。数据 $\pm$ SEM。 $***p<0.001$ 。

[0190] 图13:在2250( $500\text{mg}/\text{kg}\cdot\text{BW}$ )与标准药剂吉西他滨( $50\text{mg}/\text{kg}$ )的组合组中,使用组合时观察到显著的相对胰腺肿瘤体积消退(浅色三角形),如PDX小鼠模型中Bo103患者来源的胰腺癌组织所示。对照用圆圈表示,吉西他滨单一疗法用深色三角形表示。肿瘤生长在处理中断10天后恢复,但在第70天左右恢复处理后再次减少。数据 $\pm$ SEM。 $***p<0.001$ 。

[0191] 图14:在2250( $500\text{mg}/\text{kg}\cdot\text{BW}$ )与标准药剂吉西他滨( $50\text{mg}/\text{kg}\cdot\text{BW}$ )的组合组中,胰腺肿瘤生长以部分缓解为特征。对照用圆圈表示,2250用正方形表示,吉西他滨单一疗法用深色三角形表示。当使用组合时,观察到显著的部分相对肿瘤体积减小,如PDX小鼠模型中Bo69患者来源的胰腺癌组织所示。(数据 $\pm$ SEM.)。 $***p<0.001$ 。

[0192] 图15显示了在患者来源的胰腺癌组织PDX小鼠模型中,与对照处理(菱形)相比,用GP-2250单一疗法(正方形)或吉西他滨单一疗法(深色三角形)和作为组合疗法(浅色三角形)处理的Bo70胰腺肿瘤相对生长率。

[0193] 图15:在2250( $500\text{mg}/\text{kg}\cdot\text{BW}$ )与标准药剂吉西他滨( $50\text{mg}/\text{kg}\cdot\text{BW}$ )的组合组中,肿瘤生长的特征是疾病稳定,如对于PDX小鼠模型中患者来源的胰腺癌组织Bo70所示。数据 $\pm$ SEM。 $***p<0.001$ 。

[0194] 实施例12

[0195] 使用神经内分泌细胞系QGP-1在体外,并使用具有QGP-1细胞异种移植物和Bo99患者来源的胰腺癌组织移植物在体内,测试神经内分泌肿瘤。图16A显示了在体外用GP-2250单一疗法(浅灰色)或吉西他滨单一疗法(深灰色)相对于对照的相对QGP-1肿瘤细胞活力。图16B显示了组合疗法的协同作用。

[0196] GP-2250和吉西他滨各自在QGP-1细胞中显示出浓度依赖性细胞毒作用(图16A)。两种物质的组合具有协同作用,例如,在175 $\mu$ M GP-2250与吉西他滨(0.01 $\mu$ M)的浓度下和在200 $\mu$ M GP-2250与吉西他滨(0.001 $\mu$ M和0.01 $\mu$ M)的浓度下(图16B)。

[0197] 图17显示了,在小鼠异种移植模型中,与对照治疗(圆圈)相比,用GP-2250单一疗法(正方形)或吉西他滨单一疗法(深色三角形)和作为组合疗法(浅色三角形)处理的相对QGP-1细胞肿瘤生长率。

[0198] 图17显示GP-2250(500mg/kg\*BW)与吉西他滨(50mg/kg\*BW)组合组的肿瘤生长以部分缓解为特征,并且当使用组合时,观察到显著的部分相对肿瘤体积消退,如对于异种移植小鼠模型中QGP-1细胞所示。数据+/-SD。\*\*\*p<0.001。

[0199] 图18显示了在PDX小鼠模型中,与对照处理(圆圈)相比,用吉西他滨单一疗法(深色三角形)和作为组合疗法(浅色三角形)处理的患者来源的神经内分泌肿瘤(Bo 99)的相对Bo 99肿瘤生长率。组合处理导致肿瘤体积消退。在2250(500mg/kg BW)与标准药剂吉西他滨(50mg/kg)的组合组中,当使用组合时,在小鼠PDX模型中观察到相对神经内分泌肿瘤体积的显著消退。肿瘤生长在处理中断10天后恢复,但在第74天左右恢复处理后再次减少。仅在组合中对2250进行了测试。数据+/-SEM。

[0200] 实施例12

[0201] 收集来自晚期3期和4期胰腺癌人类患者的化疗抗性干细胞,并使其生长以获得更大的干细胞群。然后将化疗抗性干细胞暴露于几种浓度的单独吉西他滨、单独GP-2250以及吉西他滨加GP-2250的组合。如图19所示,在所有测试浓度下,单独的吉西他滨的作用最小,单独的GP-2250在较高浓度下有一些作用。然而,吉西他滨和GP-2250的组合对干细胞产生了非常显著的细胞毒性。

[0202] 虽然已经参考某些说明性实施例,相当详细地描述和表明了本公开的主题,包括特征的各种组合和子组合,但是本领域技术人员应当容易地理解包含在本公开范围内的其他方面及其变化和修改。此外,这些方面、组合和子组合的描述并不旨在传达所要求保护的主体需要除权利要求中明确记载的那些之外的特征或特征组合。因此,本公开的范围旨在包括涵盖在所附权利要求的精神和范围内的所有修改和变化。

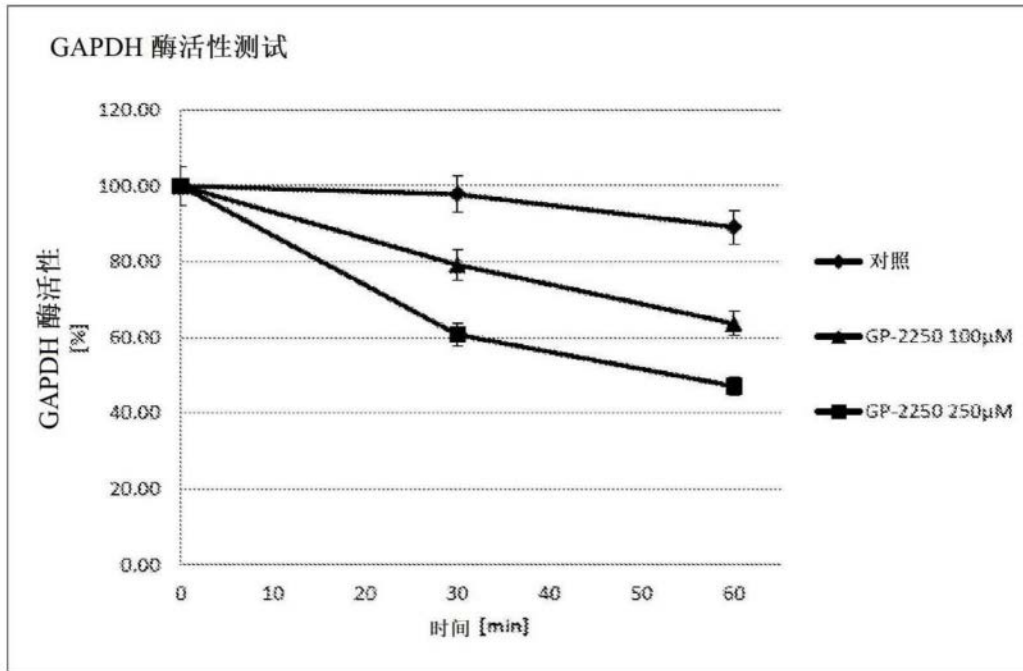


图1



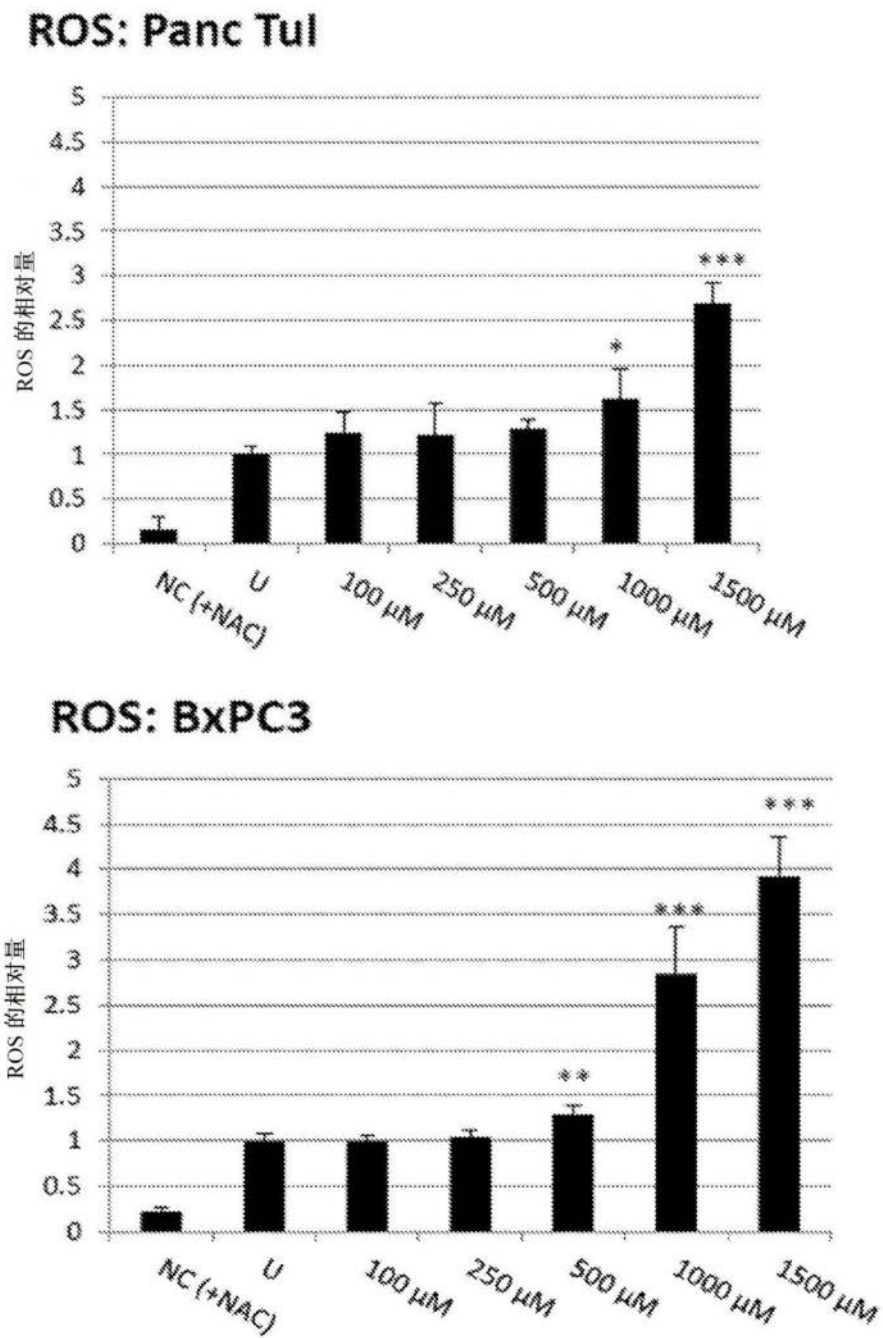


图2

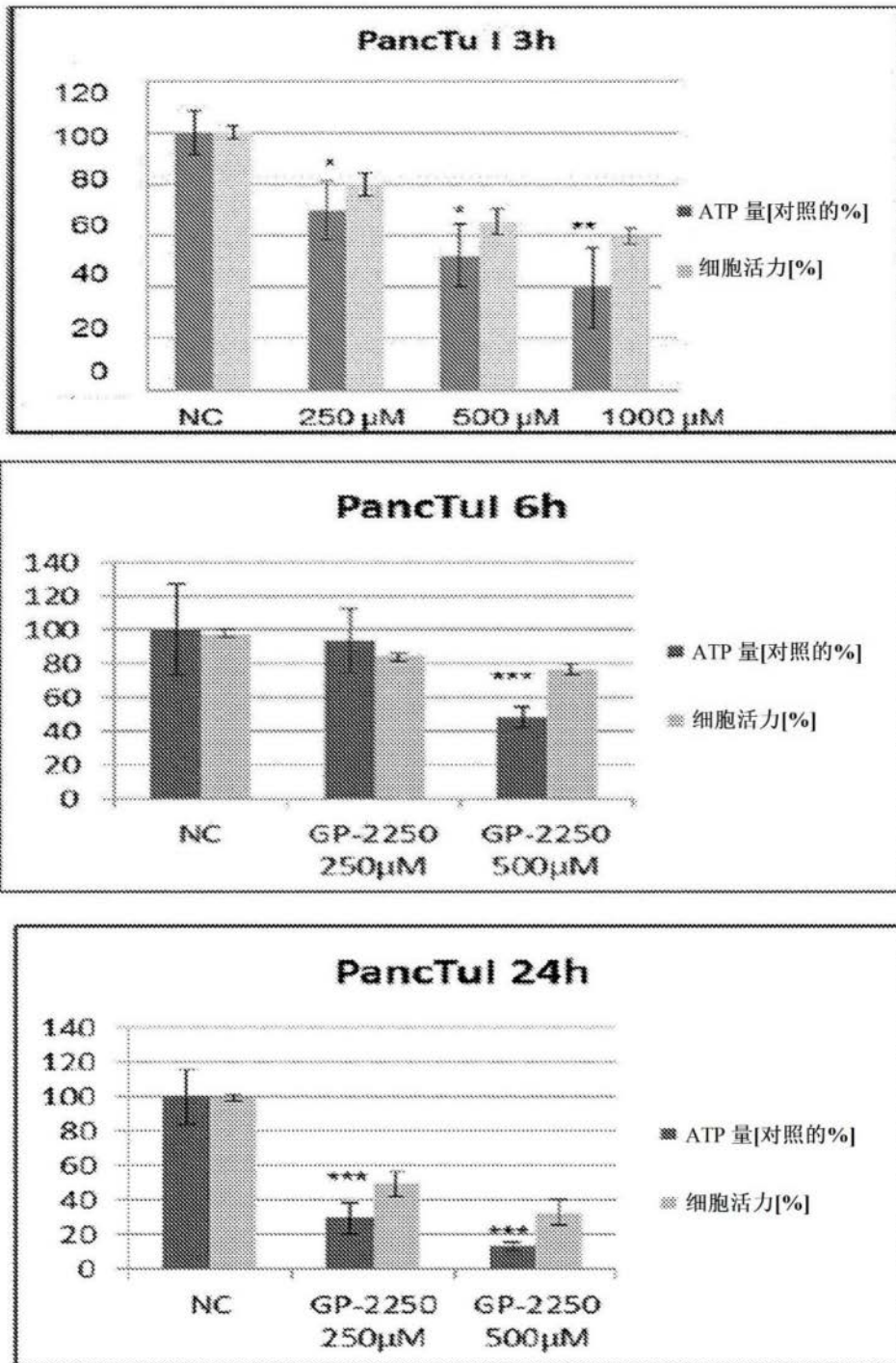


图3

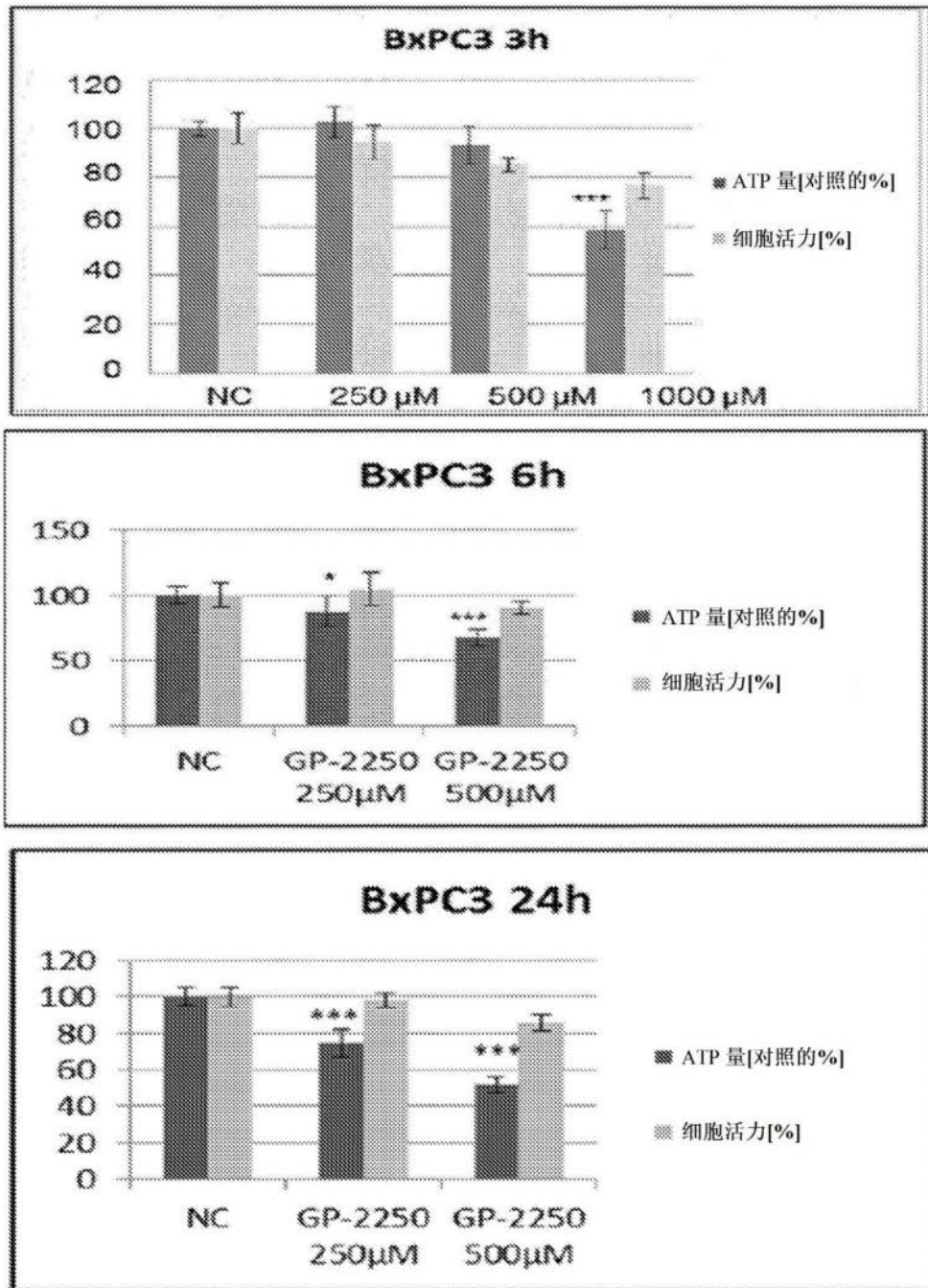


图4

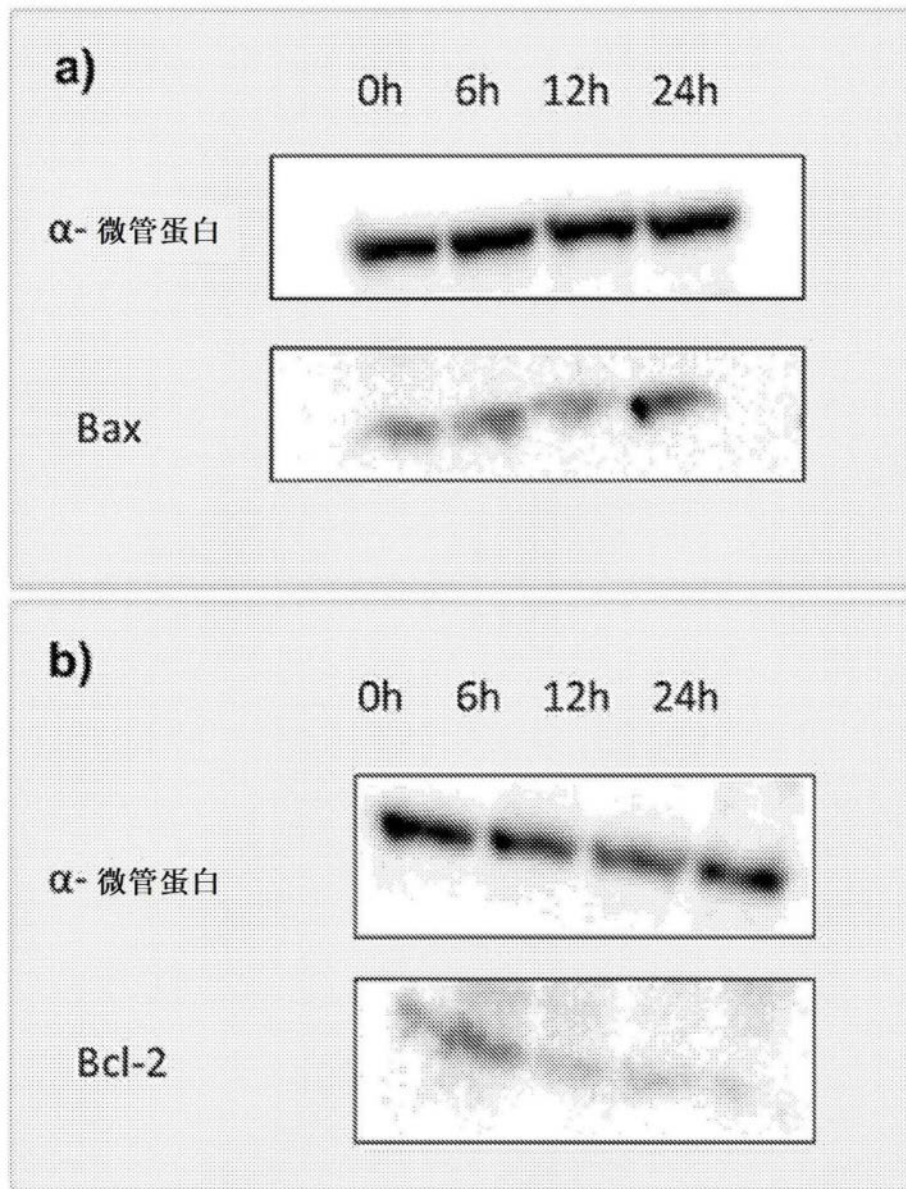


图5

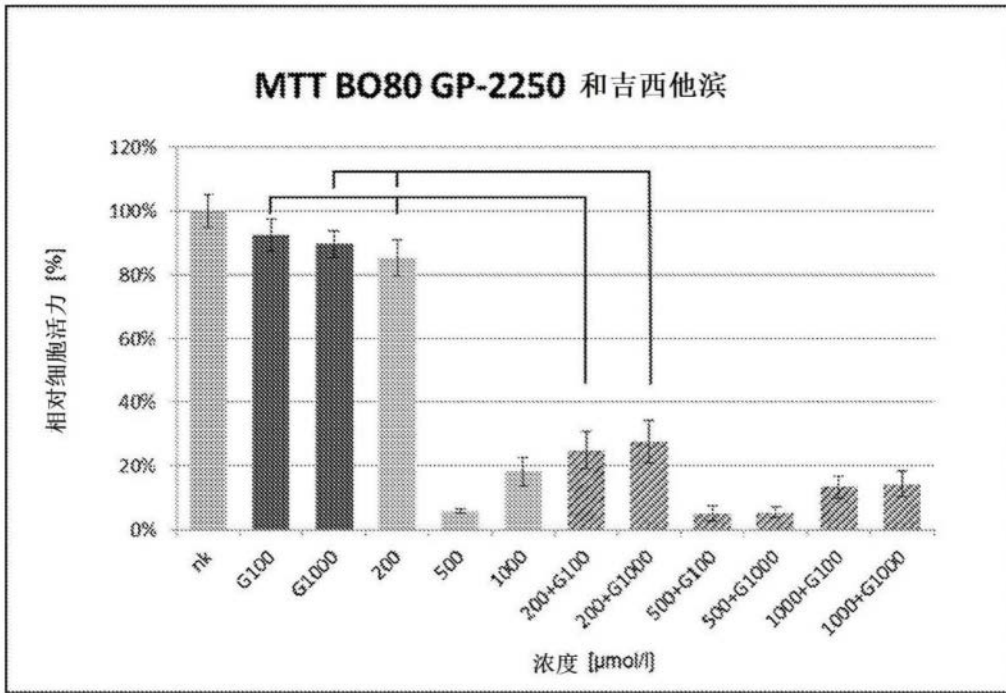


图6

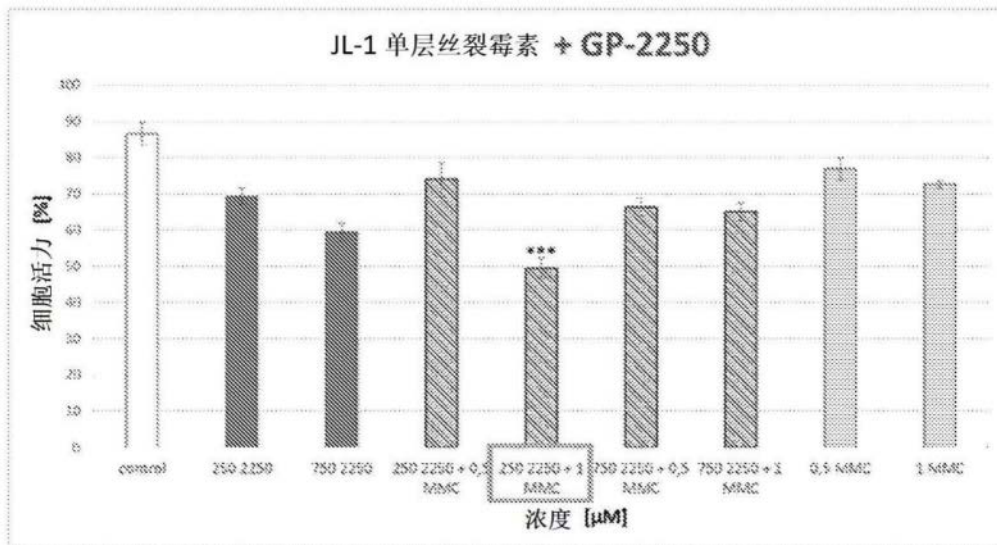


图7A

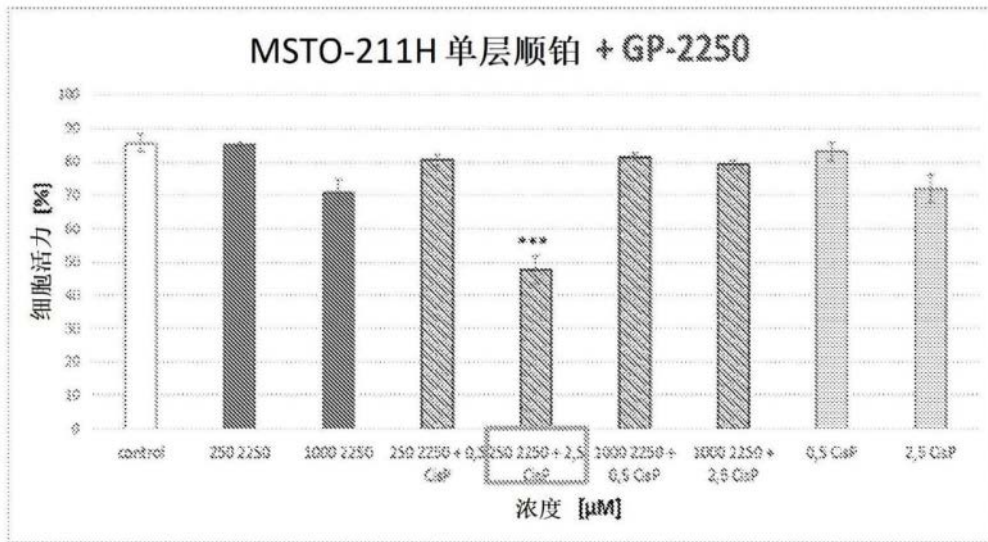


图7B

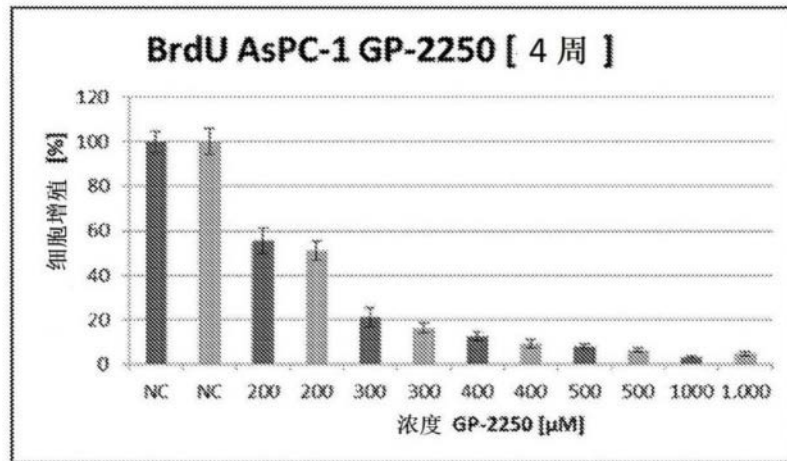


图8A

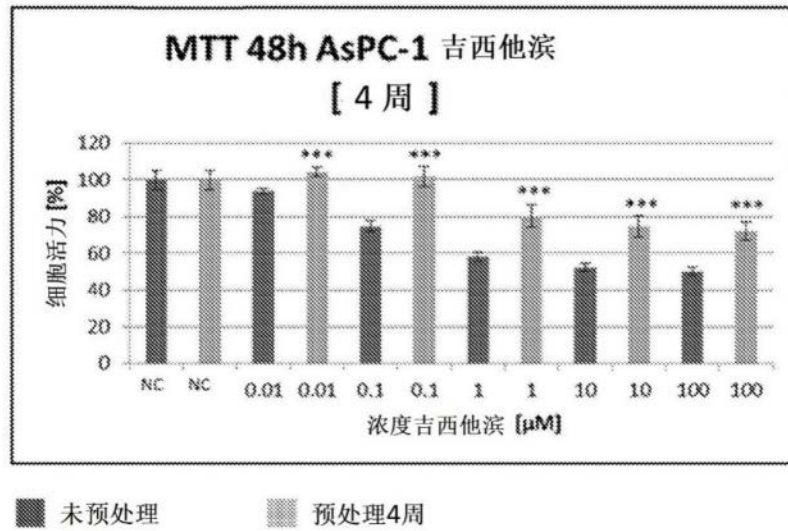


图8B

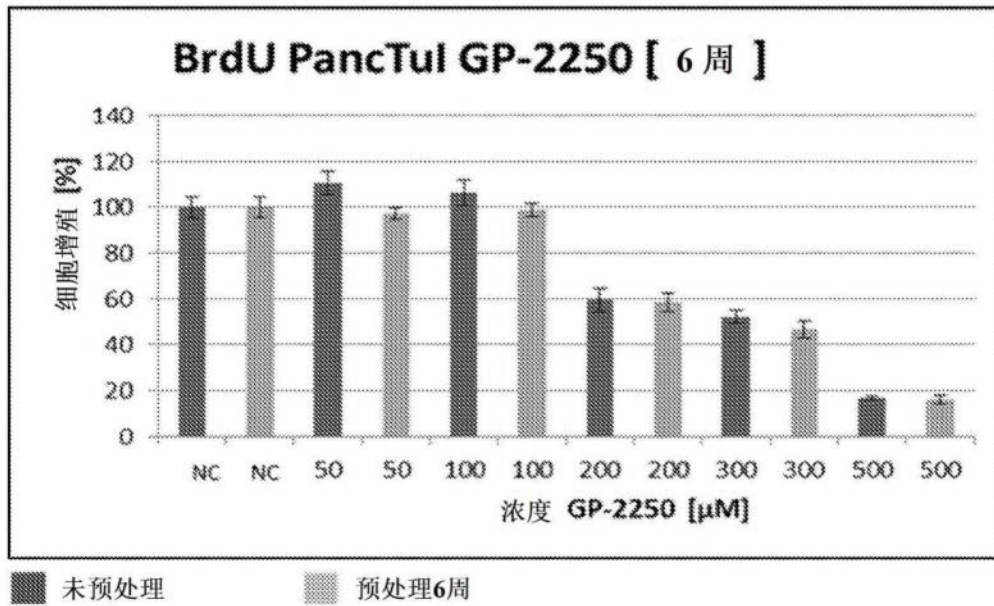


图9

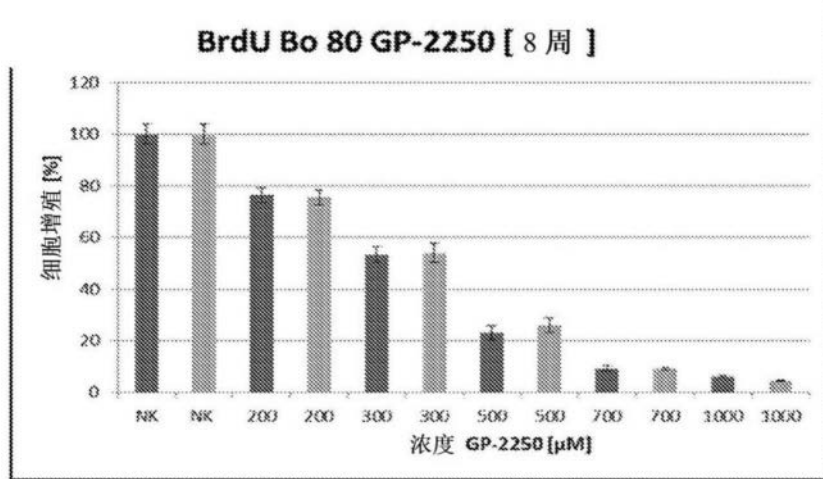
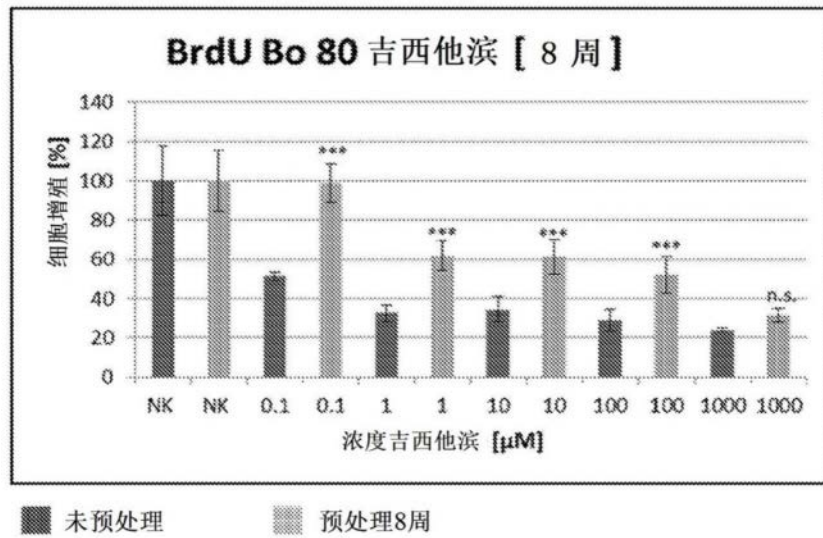


图10A



■ 未预处理      ▨ 预处理8周

图10B



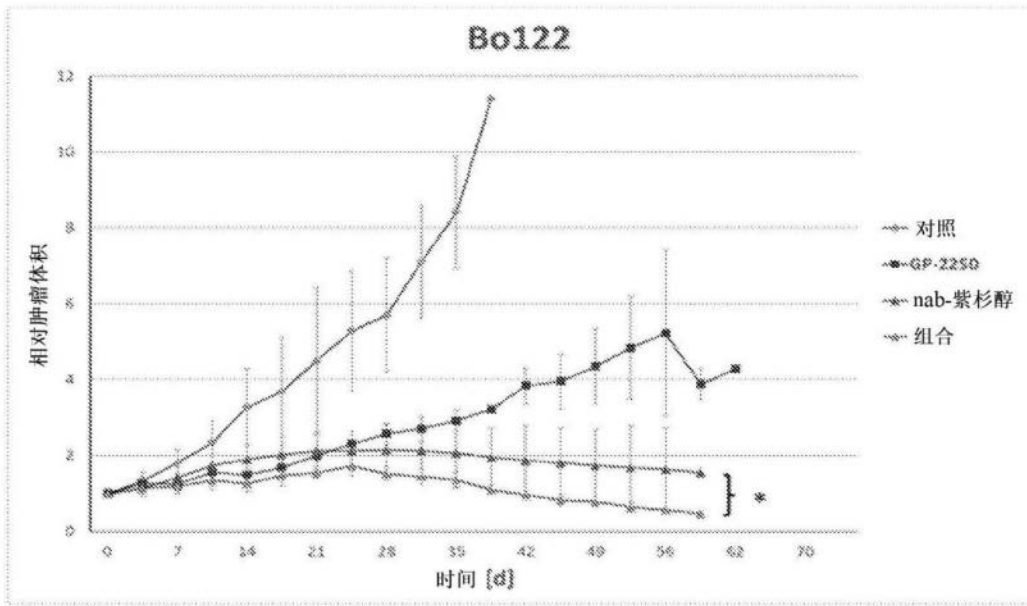


图11

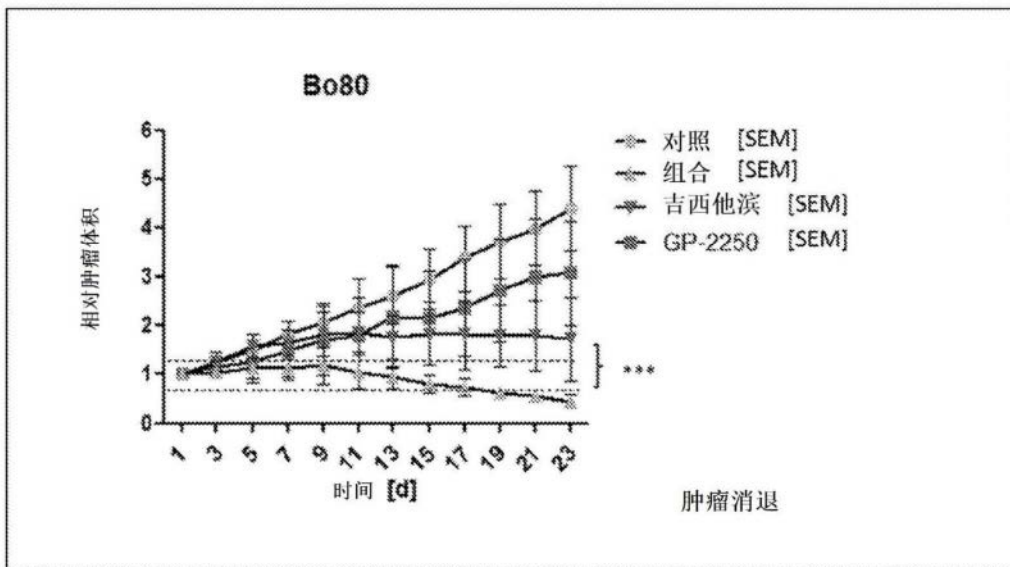


图12

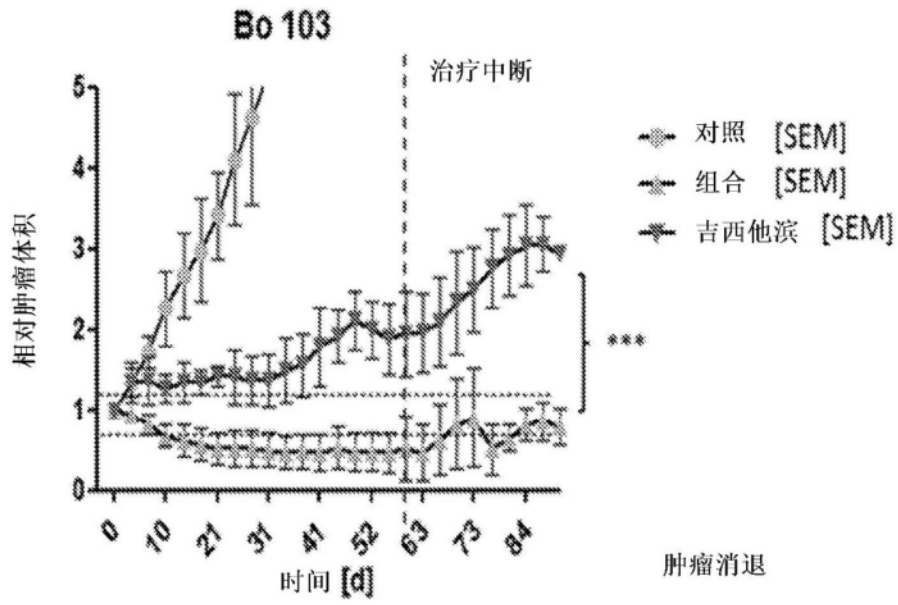


图13

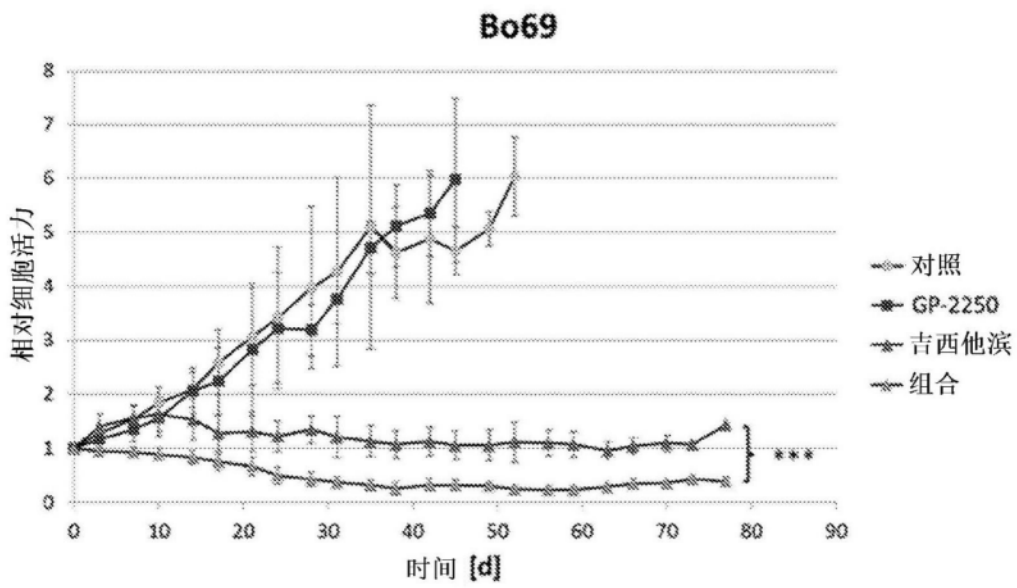


图14

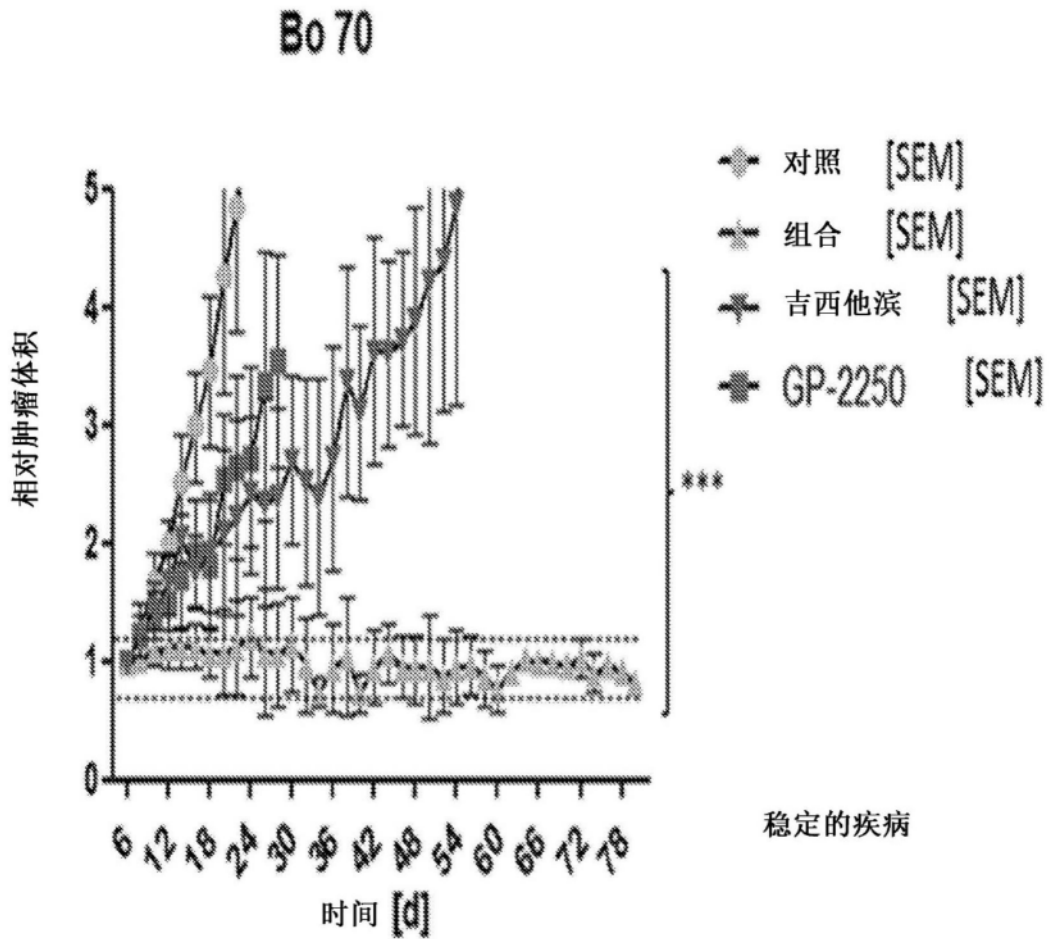


图15

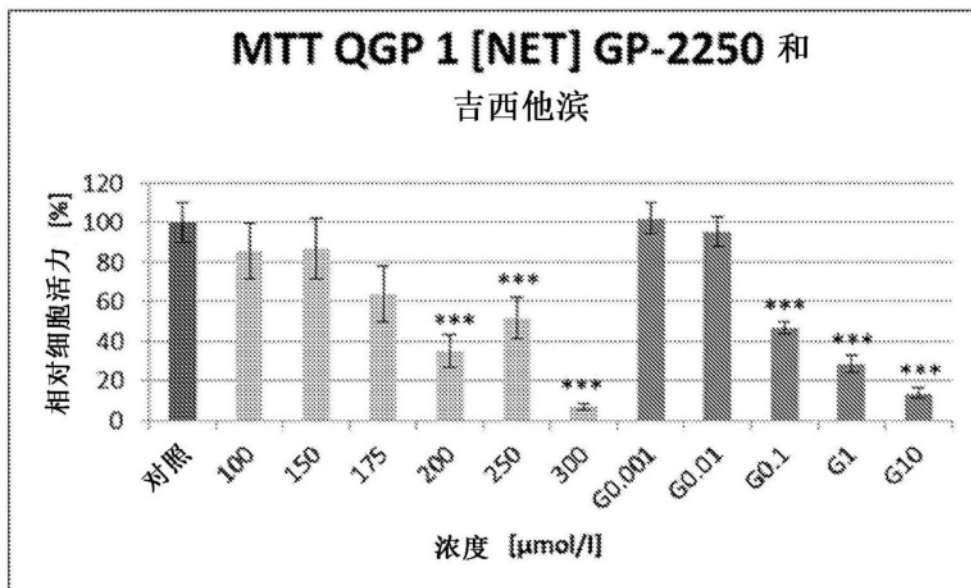


图16A

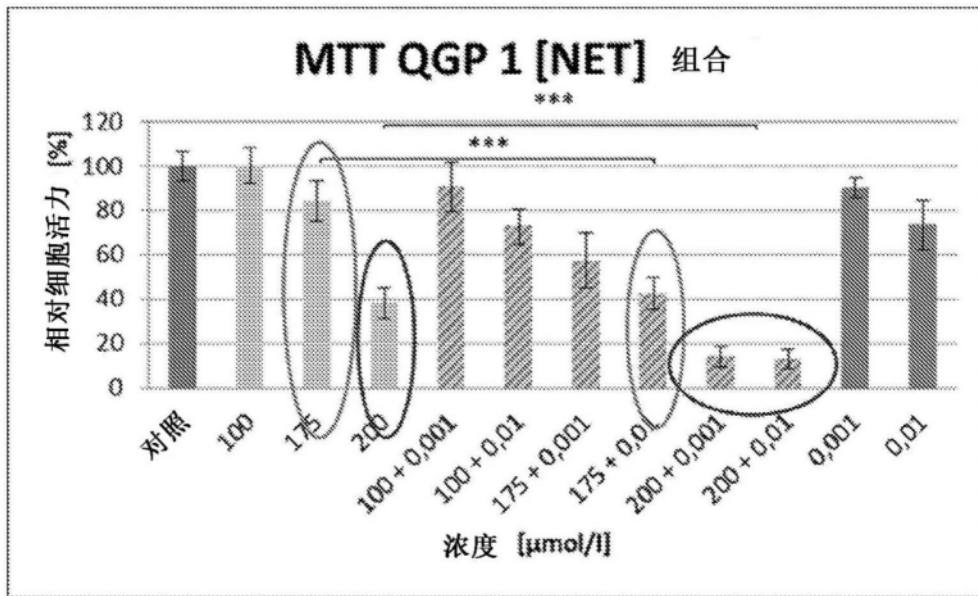


图16B

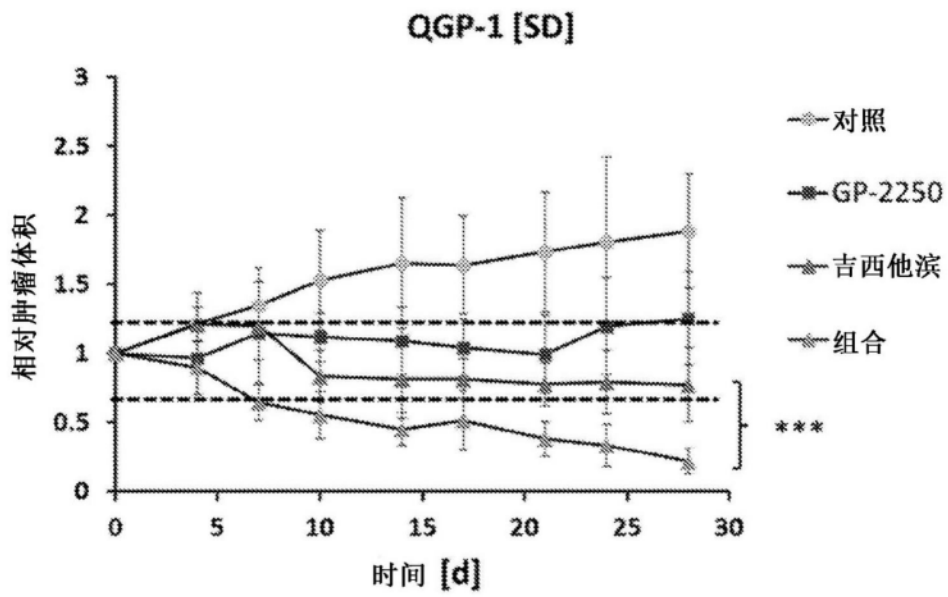


图17

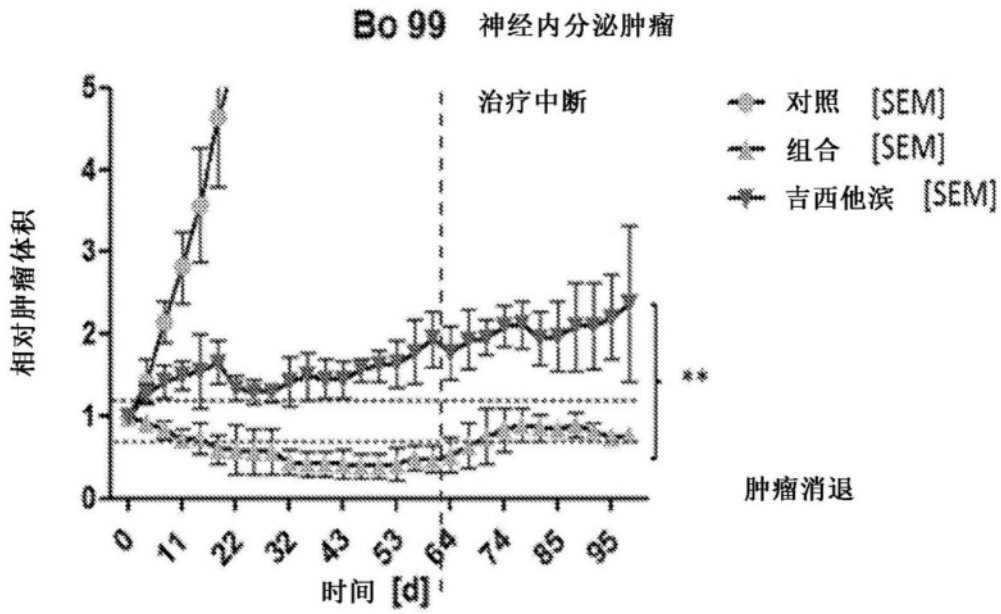


图18

### GP-2250 减少胰腺癌干细胞

作为单一疗法和与吉西他滨的组合是有效的

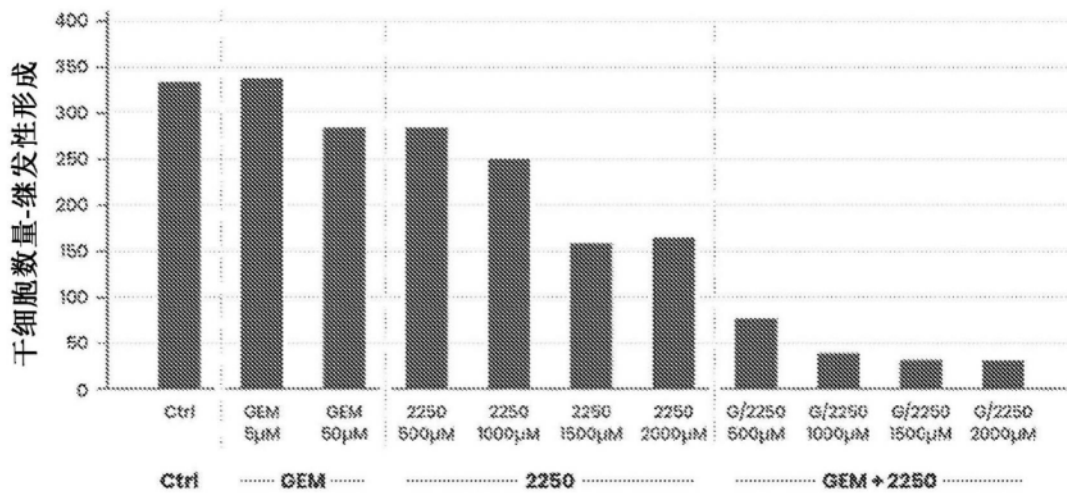


图19