



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108727453 A

(43)申请公布日 2018. 11. 02

(21)申请号 201710261800.2	C07J 17/00(2006.01)
(22)申请日 2017.04.20	C07J 43/00(2006.01)
(71)申请人 华东理工大学	C07J 53/00(2006.01)
地址 200237 上海市徐汇区梅陇路130号	A61K 31/566(2006.01)
(72)发明人 李洪林 朱丽丽 王霞 全丽娜	A61K 31/565(2006.01)
刁妍妍	A61K 31/567(2006.01)
(74)专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266	A61K 31/5685(2006.01)
代理人 崔佳佳 陆凤	A61K 31/569(2006.01)
(51) Int. Cl.	A61K 31/568(2006.01)
C07J 1/00(2006.01)	A61K 31/57(2006.01)
C07J 9/00(2006.01)	A61K 31/573(2006.01)
C07J 5/00(2006.01)	A61K 31/58(2006.01)
C07J 3/00(2006.01)	A61K 31/585(2006.01)
C07J 7/00(2006.01)	A61K 31/56(2006.01)
C07J 21/00(2006.01)	A61K 31/575(2006.01)
C07J 71/00(2006.01)	A61P 35/00(2006.01)
	A61P 31/00(2006.01)
	A61P 29/00(2006.01)

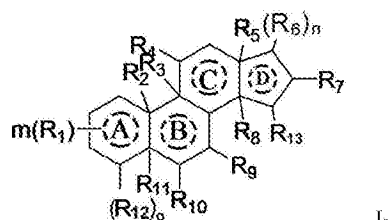
权利要求书16页 说明书31页 附图3页

(54)发明名称

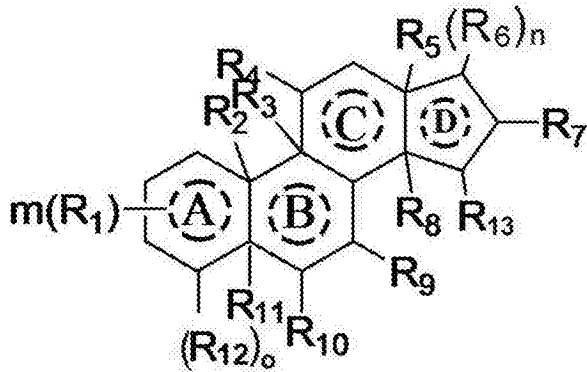
新型PD-1抑制剂及其应用

(57)摘要

本发明涉及作为PD-1阻断剂的甾体类衍生物及其应用。具体而言,本发明涉及下式I所示化合物、含有下式I化合物的药物组合物及所述化合物在治疗PD-1介导的相关疾病以及制备治疗PD-1介导相关疾病的药物中的用途:



1. 式I所示化合物或其药学上可接受的盐、前药、溶剂化物在制备PD-1抑制剂中的用途：



I

式中，

A、B、C、D各自独立选自饱和或不饱和的5-6元碳环或杂环；

R₁选自：氢、羰基、羟基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、羧基、磺酸酯基、氰基、N,N-二烷基、C1-C6烷基甲酰氧基、C1-C6烷基甲酰氧基甲基、羟亚氨基；

m为0-6，优选1-4的任一整数；

R₂选自：氢、C1-C6烷基；

R₃选自：氢、卤素；

R₄选自：氢、羰基、羟基、取代苯基（优选被C1-6烷基取代或未取代的氨基取代的苯基）、5元或6元杂环取代的甲酰氧基；或者R₃和R₄可以连接在一起构成含有杂原子的3-5元环，优选含有氧的3元环；

R₅选自：氢、羟基、C1-C6烷基；

R₆独立选自：氢、羟基、取代或未取代的C1-C10直链或支链烷基、羰基、乙炔基、C1-C10烷基甲酰基、C1-C10卤代烷基甲酰基、羟甲基甲酰基、乙酰氧基C1-6酰基、C1-C6烷基氨基甲酰基、羧基取代的C1-C6烷基、C1-C10烷基甲酰氧基、取代或未取代的C2-C10烯基、卤代C1-C3烷硫基甲酰基、4-(2-磺酸基乙胺基)-2-丁基、5元或6元杂环取代的甲酰氧基；

n为1或2；或者，两个R₆可以连接在一起构成取代或未取代的含有杂原子的3-6元环，优选含有氧的5元环；

R₇选自：氢、羟基、C1-C6烷基、C1-C6烷酯基、13,16-环烷基、16,17-环氧基、15,16-环烷基；或者，R₆和R₇可以连接在一起构成取代或未取代的含有1-3个杂原子的3-6元环，优选含有2个氧的5元环；

R₁₃为氢；

或者，R₇和R₁₃可以连接在一起构成取代或未取代的3-5元碳环，优选3元碳环；

R₈选自：氢、卤素、羟基、C1-C6烷基；

R₉选自：氢、羟基、C1-C6烷硫酯基、C1-C10卤代烷亚硫酰基、C1-C6烷氧基甲酰基；

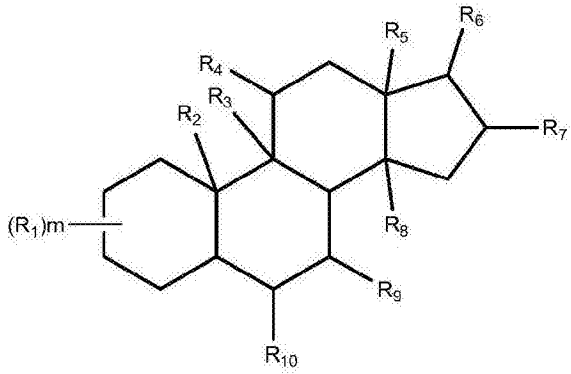
R₁₀选自：氢、卤素、羰基、C1-C6烷基；或者，R₉和R₁₀可以连接在一起构成取代或未取代的3-5元碳环，优选3元碳环；

R₁₁选自：氢、C1-C6烷基；

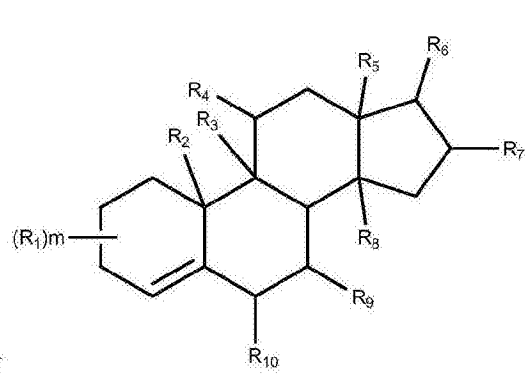
R₁₂选自：氢、羟基、C1-C6烷基；o为1或2；或者，R₁₁和R₁₂可以连接在一起构成含有杂原子的3-5元环，优选含有氧的3元环。

2. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,A为苯环、环己烷、环己烯,或环己二烯;B环为环己烷或环己烯;C环为环己烷或环己烯;D环为环戊烷或环戊烯。

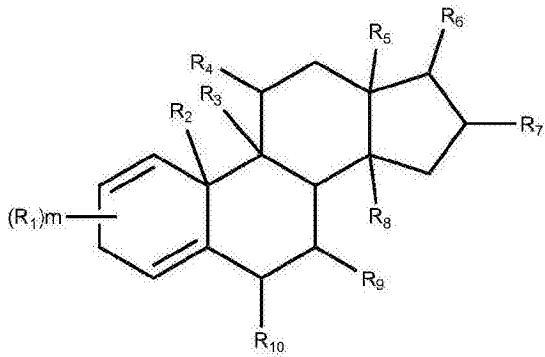
3. 如权利要求1或2所述的用途,其特征在于,所述化合物如通式II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII所示:



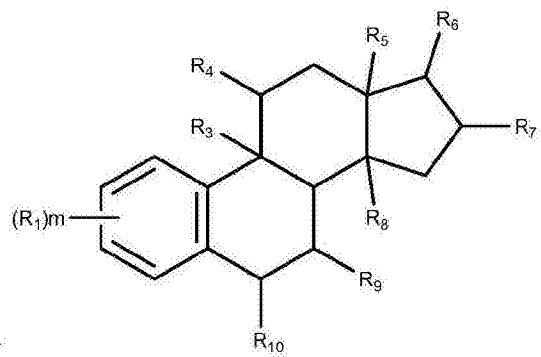
II



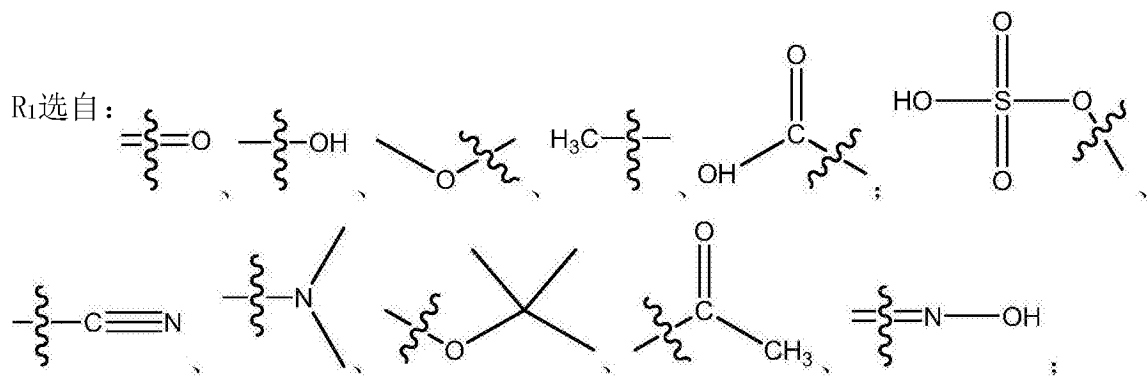
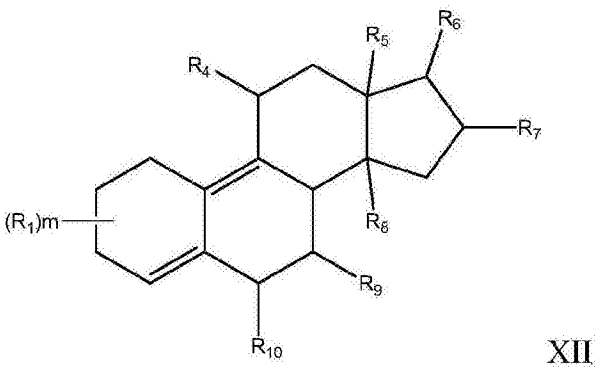
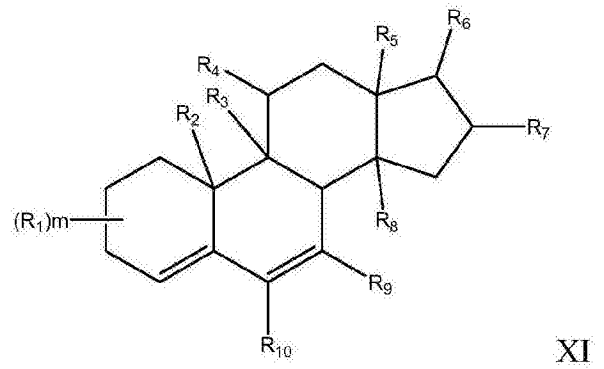
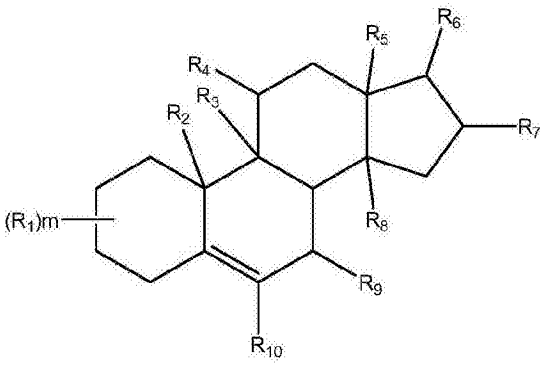
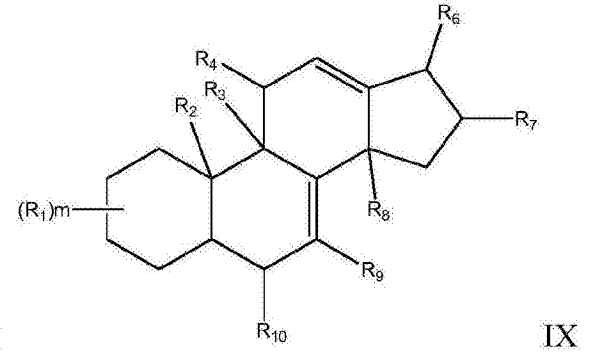
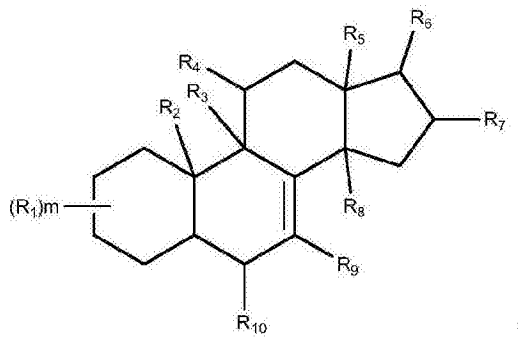
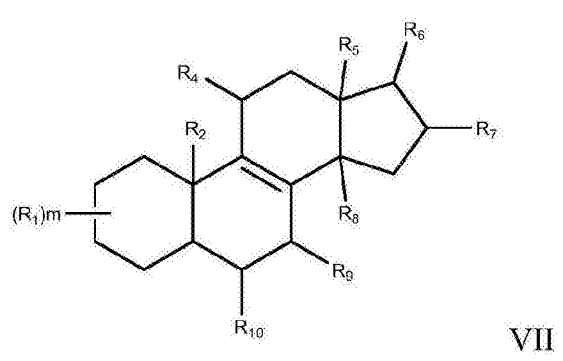
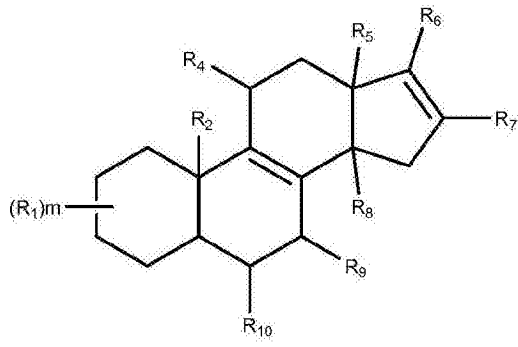
III

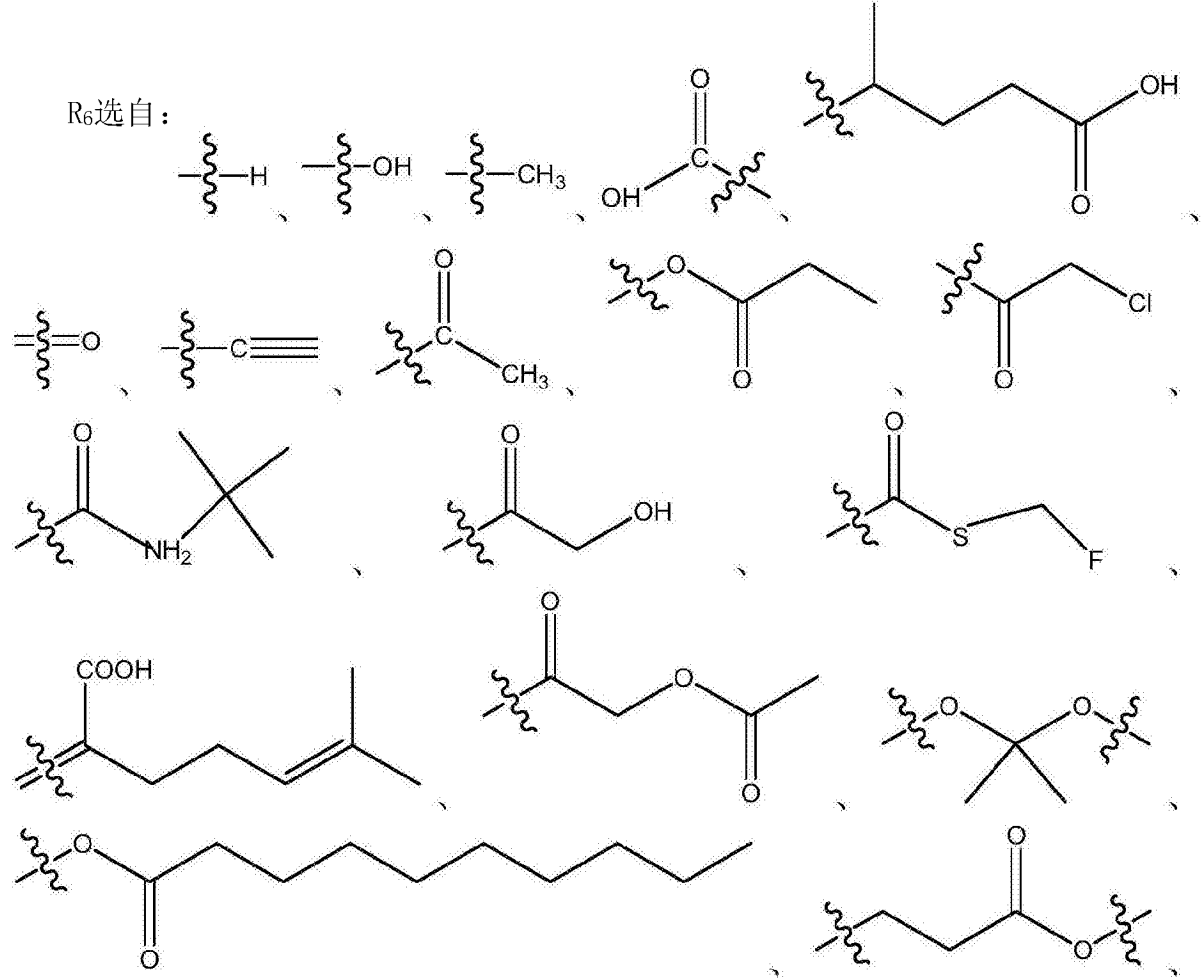
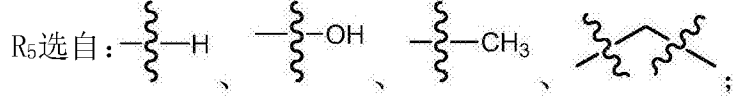
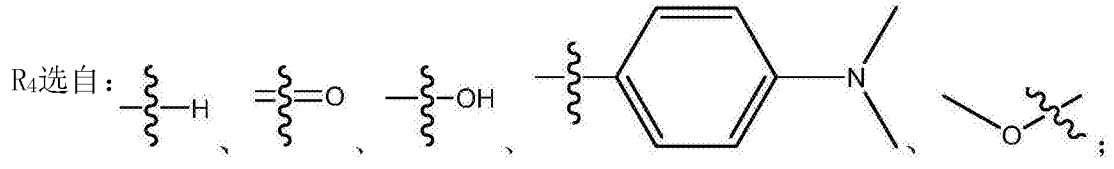
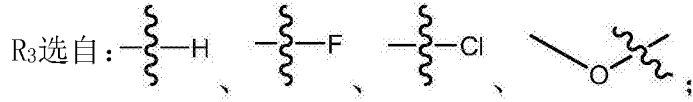
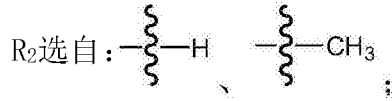


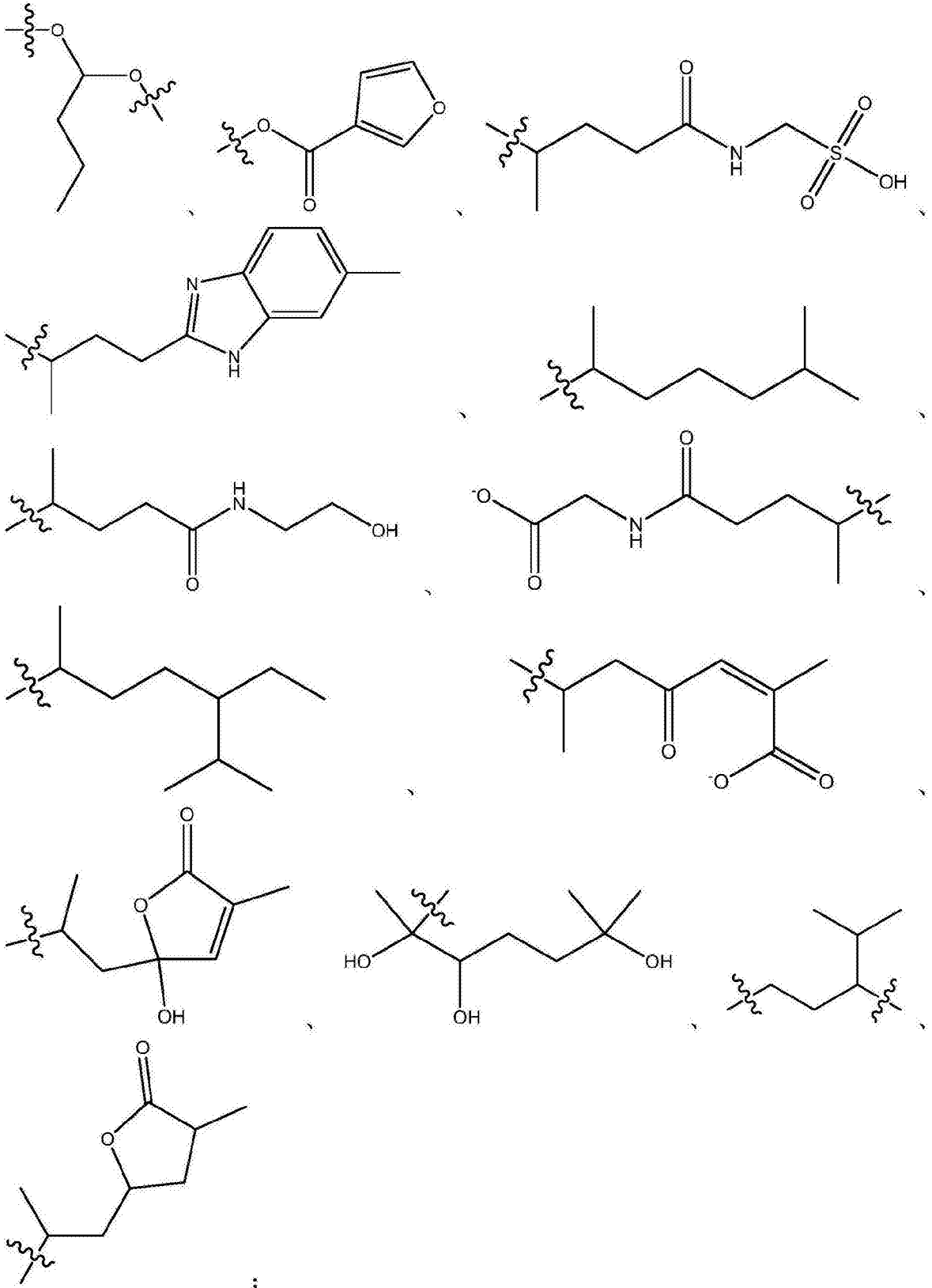
IV



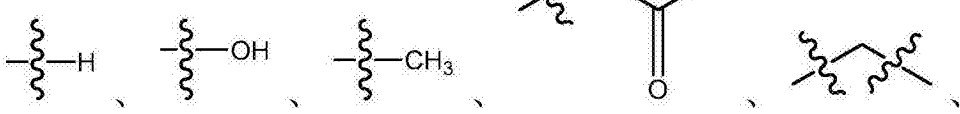
V

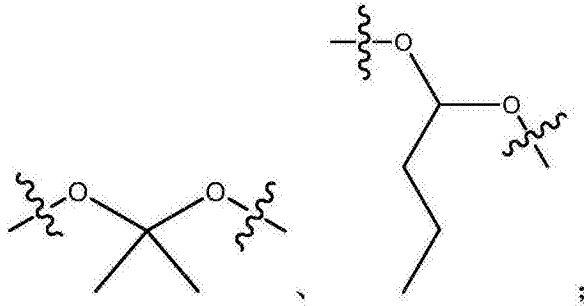






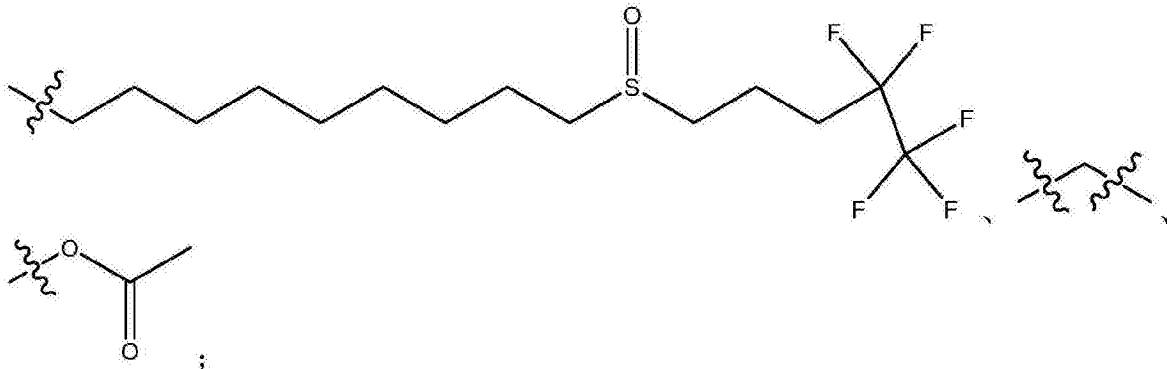
R₇选自:





R₈选自：、；

R₉选自：、、



R₁₀选自：、、、、、；

m为0-4, 优选1-4的任一整数。

4. 如权利要求1或2所述的用途, 其特征在于,

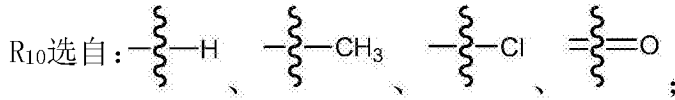
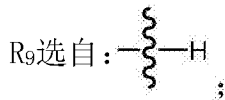
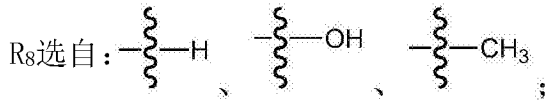
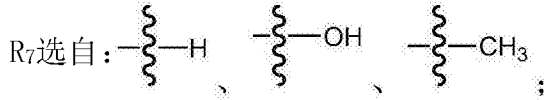
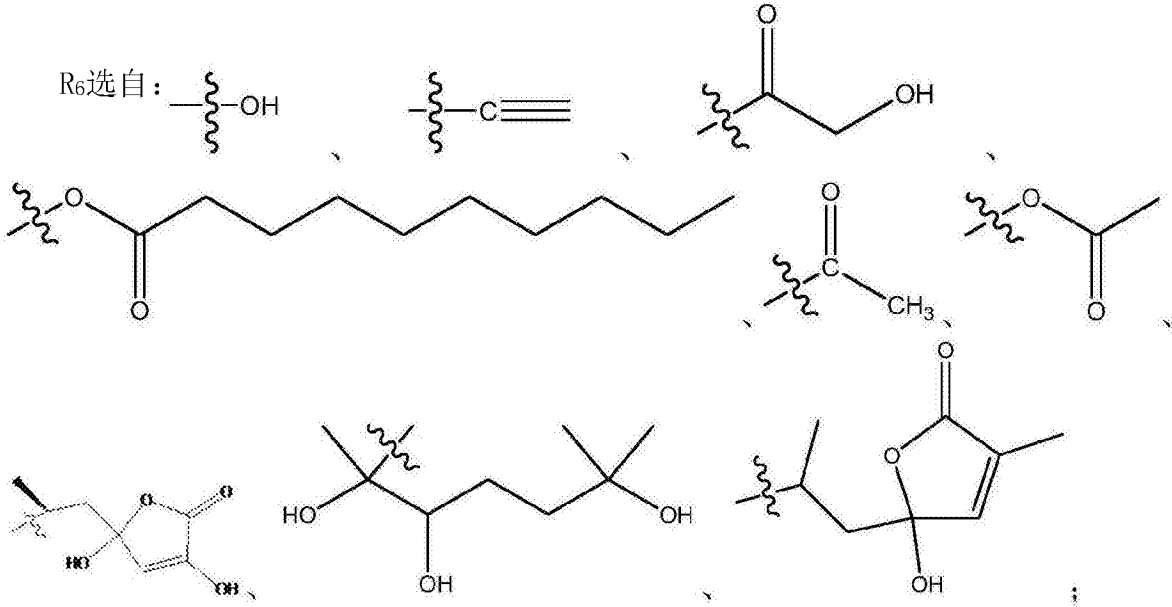
R₁选自：、、

R₂选自：、；

R₃选自：、；

R₄选自：、、

R₅选自：；

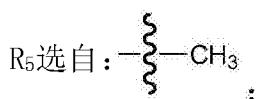
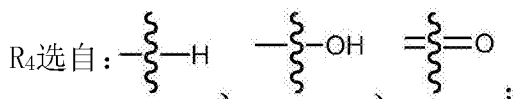
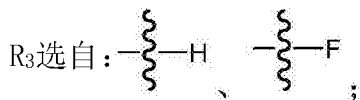
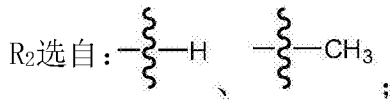
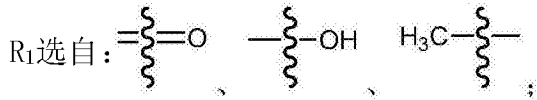


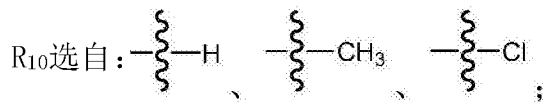
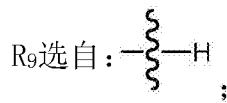
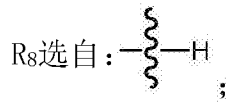
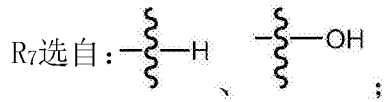
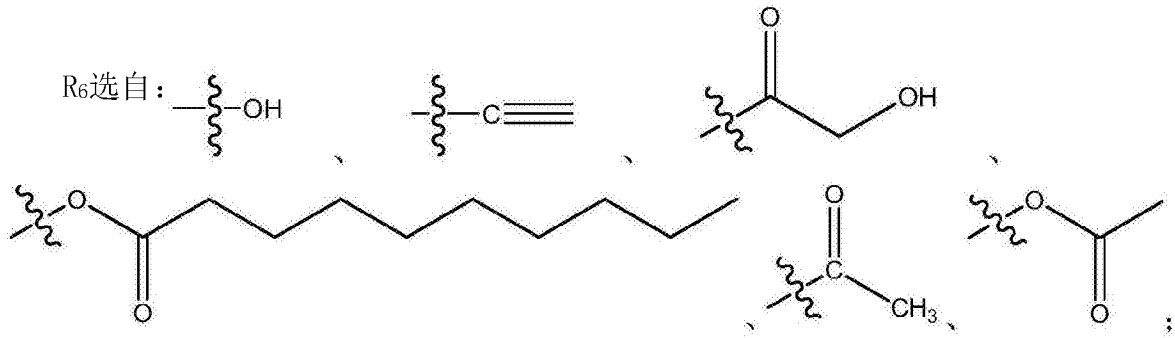
m为0-4, 优选1-4的任一整数;

R₁₁和R₁₃各自为氢;

R₁₂选自: 氢、甲基。

5. 如权利要求4所述的用途, 其特征在于,

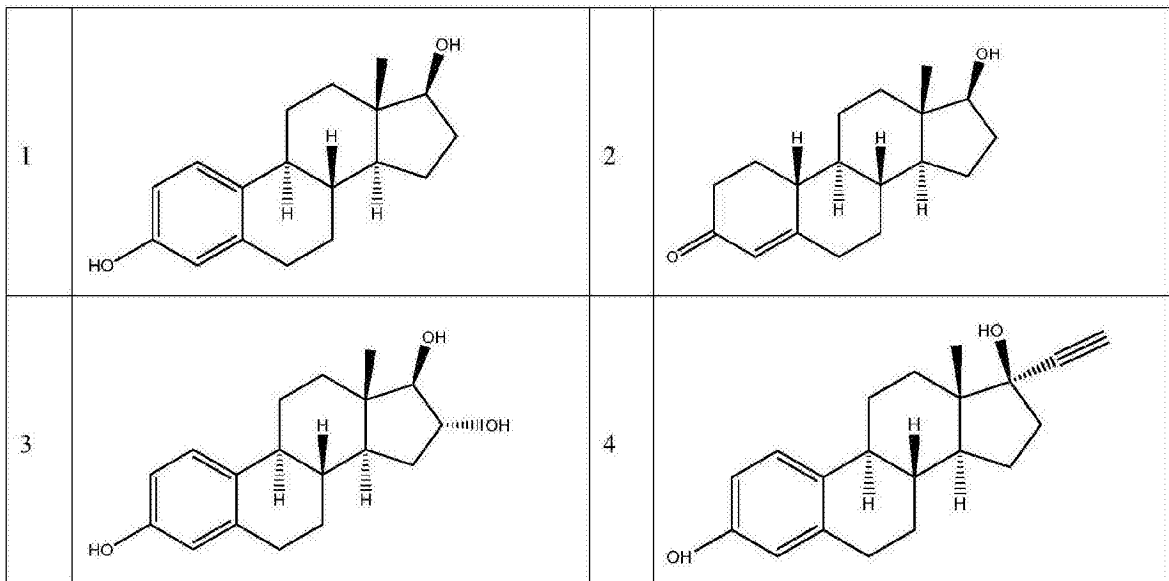


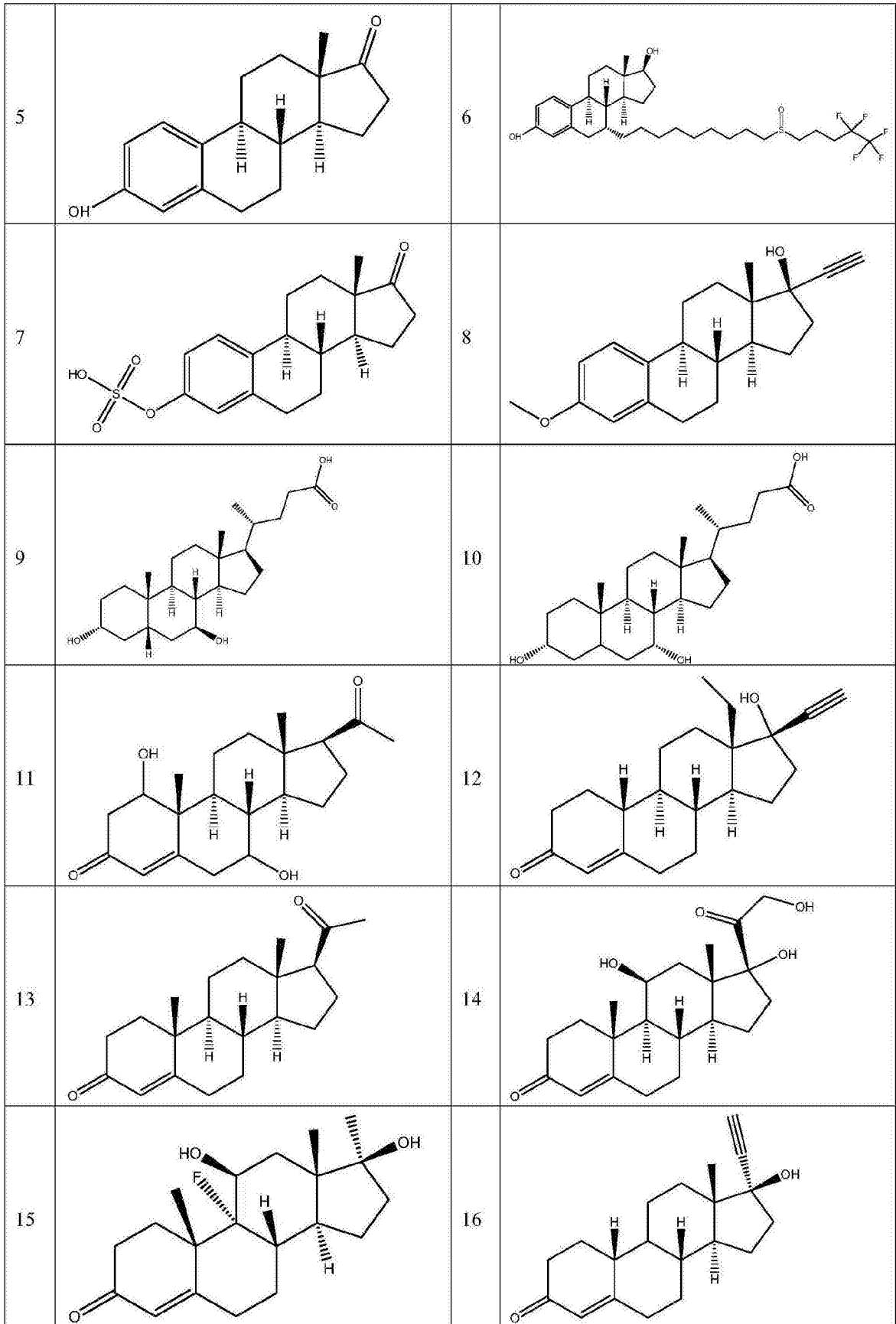


m为0-4, 优选1-4的任一整数；

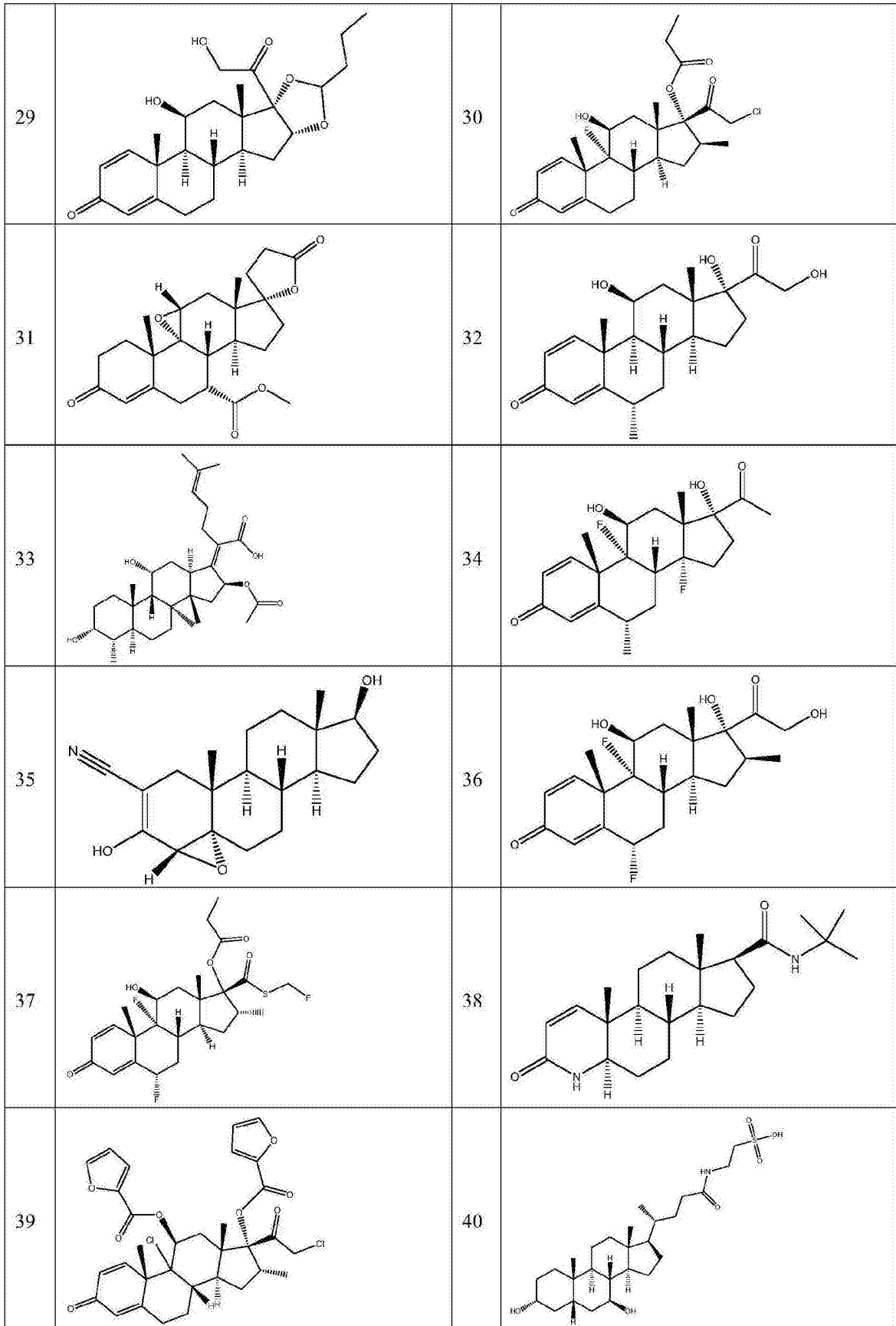
R₁₁、R₁₂和R₁₃各自为氢。

6. 以下化合物或其药学上可接受的盐、前药、溶剂化物在制备PD-1抑制剂中的用途：

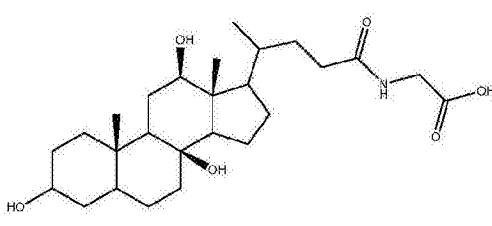
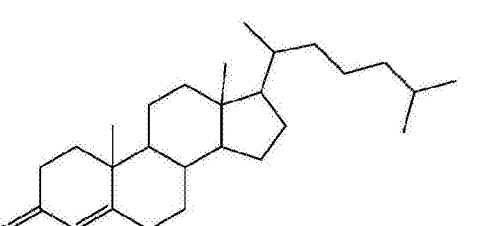
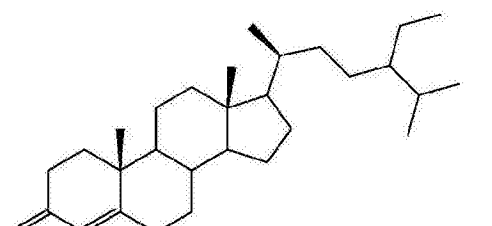
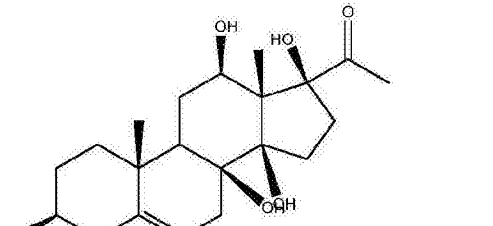
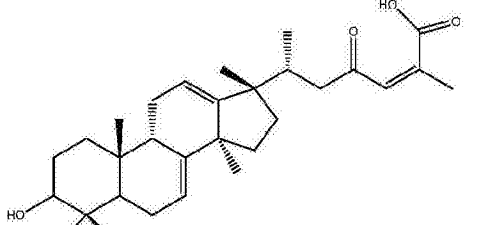
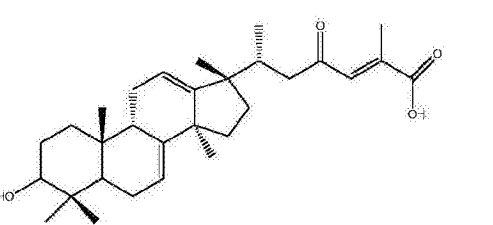
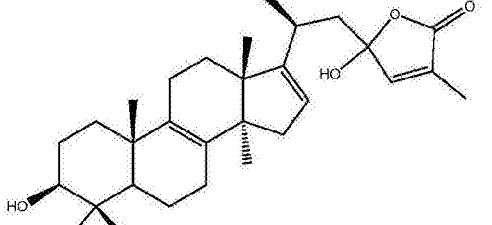
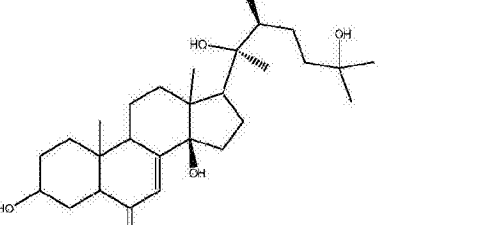
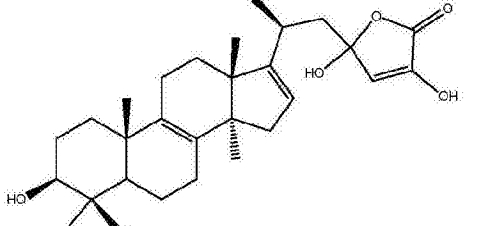
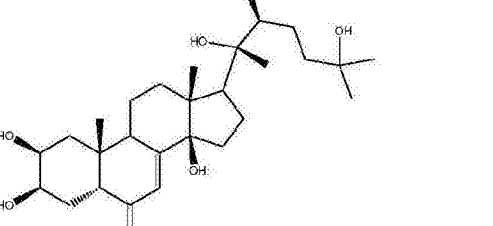
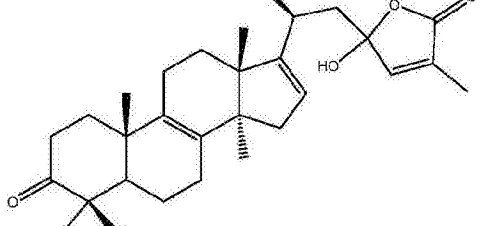
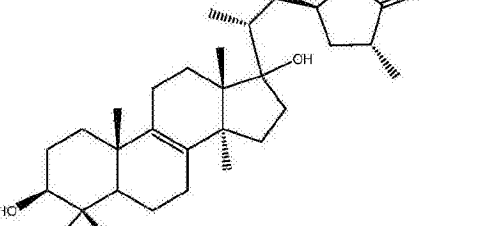


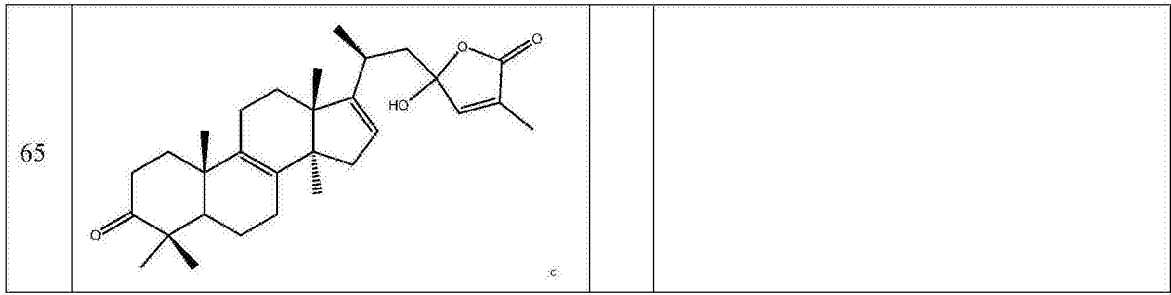


17		18	
19		20	
21		22	
23		24	
25		26	
27		28	

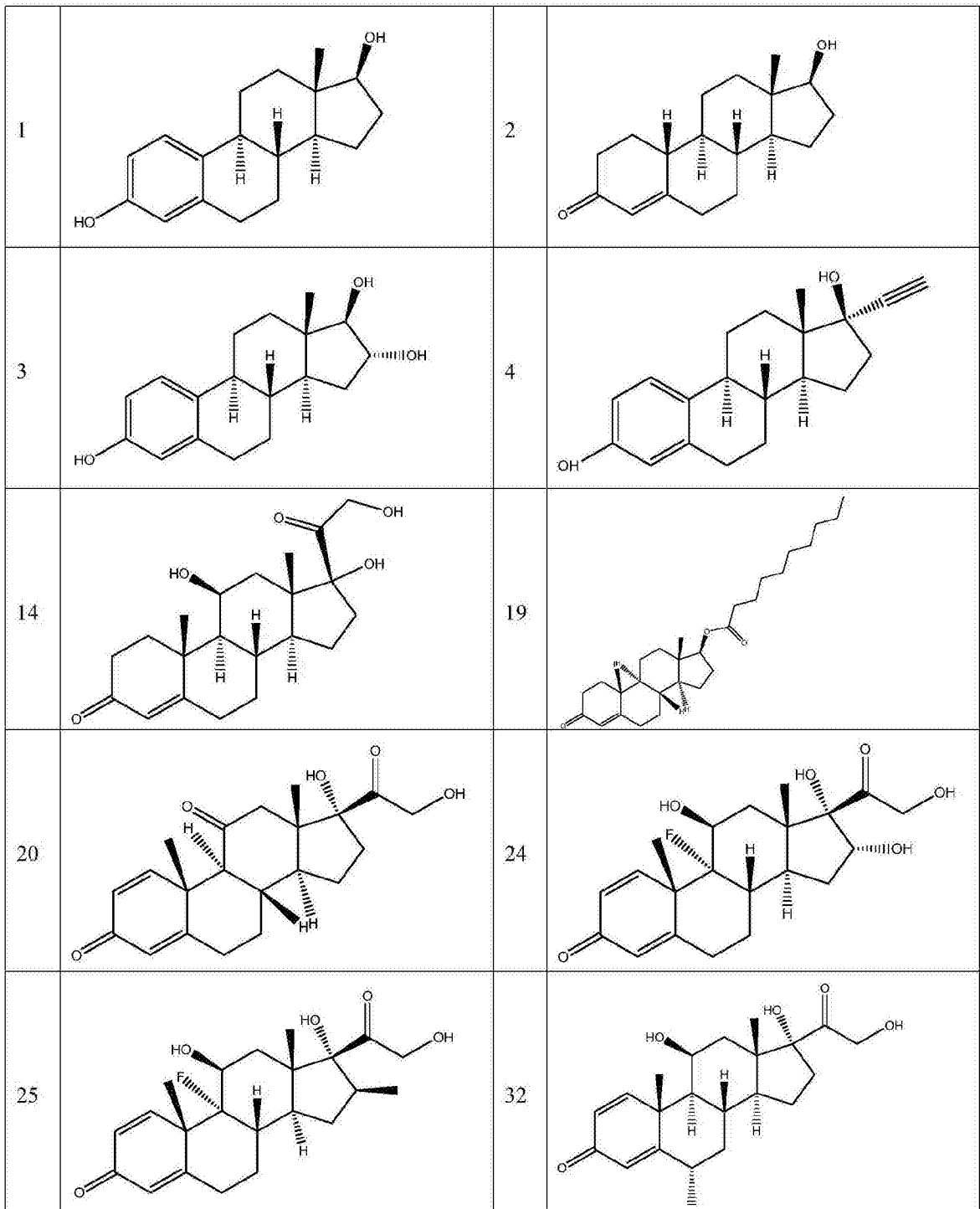


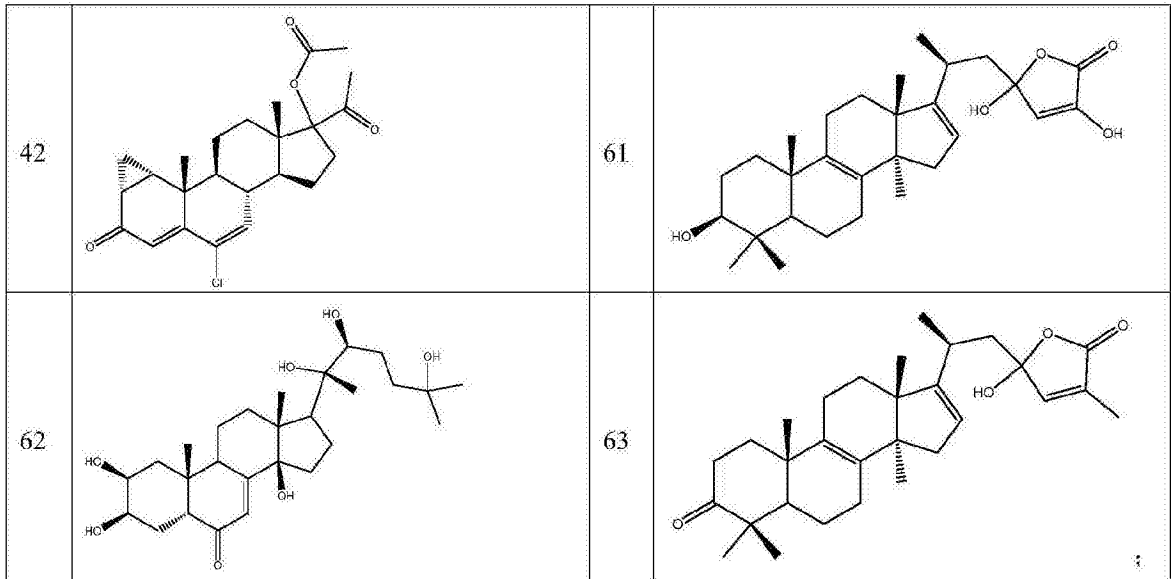
41		42	
43		44	
45		46	
47		48	
49		50	
51		52	

53		54	
55		56	
57		58	
59		60	
61		62	
63		64	

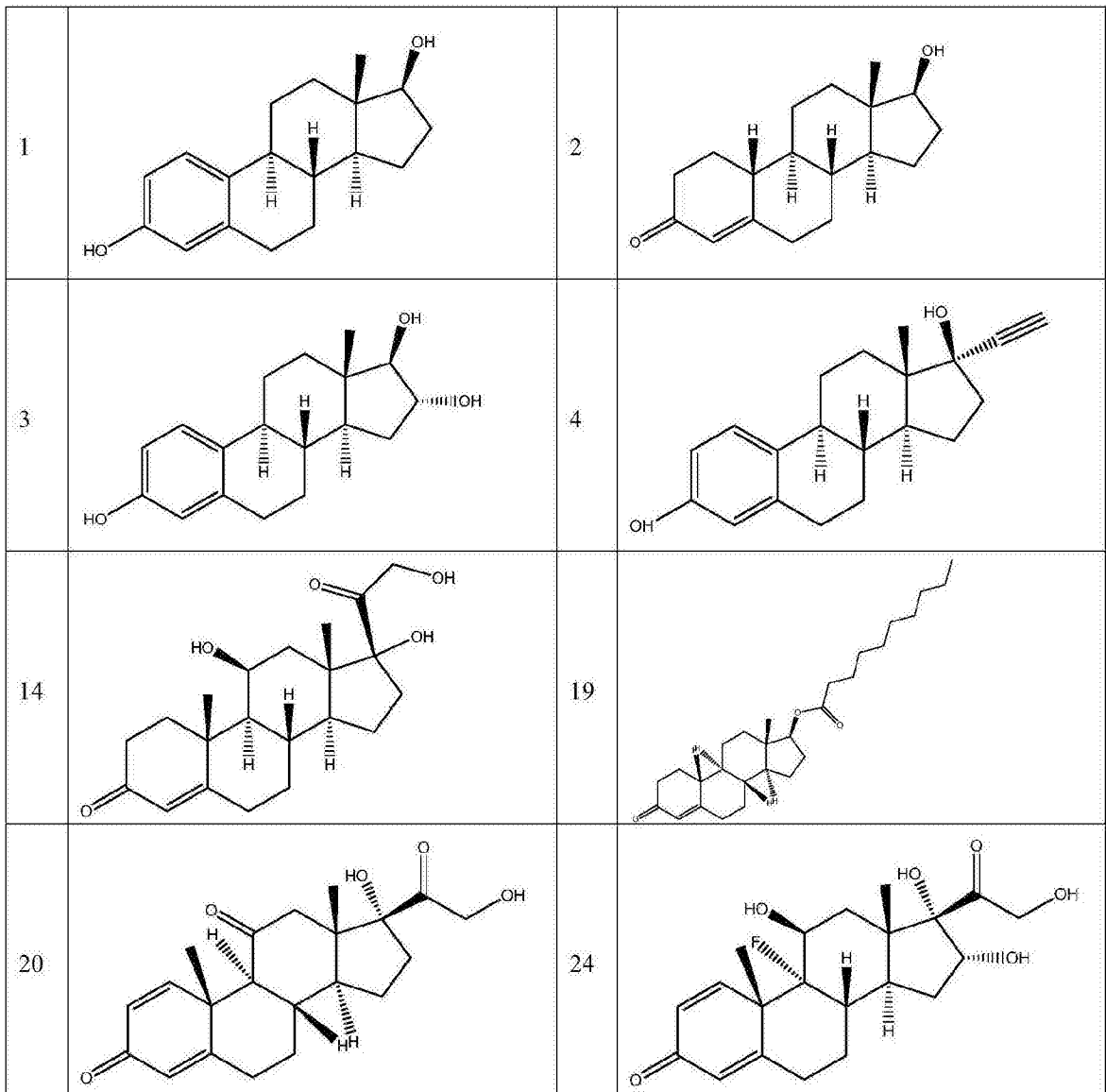


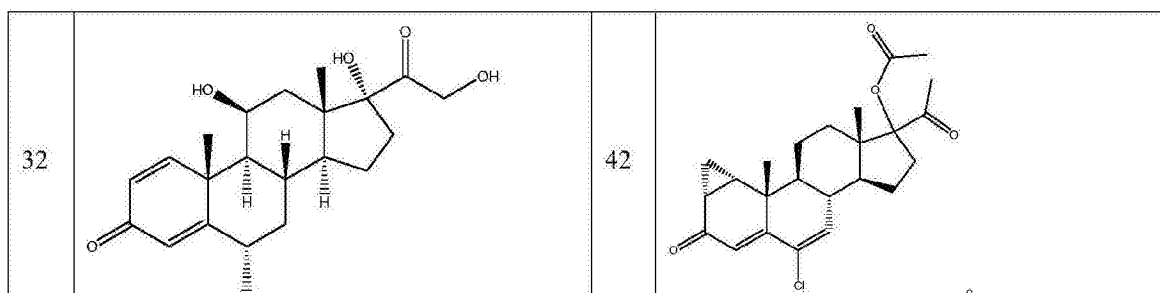
7. 如权利要求6所述的用途,其特征在于,所述化合物是以下化合物:





优选地,所述化合物是以下化合物:





8. 如权利要求1所述的用途,其特征在于,所述用途是用于制备抑制PD-1与PD-L1结合或抑制肿瘤、或治疗细菌、病毒或真菌引起的感染或治疗炎性疾病的药物。

9. 如权利要求8所述的用途,其特征在于,所述肿瘤包括但不限于:黑色素瘤、肺癌(优选非小细胞肺癌)、肾癌、卵巢癌、前列腺癌、乳腺癌、结肠癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈癌、子宫癌、直肠癌、肛门癌、胃癌、睾丸癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、何杰金氏病、非何杰金淋巴瘤、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、小儿实体瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管生成、脊轴瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮样癌、鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤;

所述病毒包括但不限于:肝炎病毒(甲型、乙型和丙型)、疱疹病毒、流感病毒、腺病毒、冠状病毒、麻疹病毒、登革热病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒;

所述细菌包括但不限于:衣原体、立克次氏体、分枝杆菌、葡萄球菌、肺炎球菌、霍乱、破伤风;

所述真菌包括但不限于:假丝酵母、曲霉、皮炎芽酵母;

所述炎性疾病包括但不限于:强直性脊柱炎、自身免疫性溶血性贫血、关节炎、重症肌无力、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、恶性贫血、多肌炎。

10. 一种药物组合物,所述药物组合物含有权利要求1-8中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、前药、溶剂化物,以及药学上可接受的载体或赋形剂。

11. 如权利要求10所述的药物组合物,其特征在于,所述药物组合物还包含其它抑制PD-1与PD-L1结合的药物。

12. 如权利要求11所述的药物组合物,其特征在于,所述其它抑制PD-1与PD-L1结合的药物是十字孢碱。

新型PD-1抑制剂及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及药物化学领域；具体来说，本发明涉及靶向hPD-1蛋白的甾体类衍生物及其应用。

背景技术

[0002] 总所周知，人体内有个强大而复杂的免疫系统，它对外可以抵御入侵的细菌和病毒，对内可以清除损伤及衰老的细胞，甚至还可以监视突变的细胞。免疫系统主要分为抗原提呈细胞 (APC) 和T细胞。APC可以加工并提呈抗原，T细胞接受到APC提呈的特异性抗原信号，再在APC表面的共刺激分子的作用下，不断的增殖活化。T细胞的活化不仅需要APC提供的第一信号的刺激，而且需要共刺激分子提供的第二信号的刺激。这些共刺激分子不仅提供增强免疫的共刺激信号，而且还提供抑制免疫的共抑制信号，它俩共同作用从而达到条件免疫的效果。这些共抑制信号被称为免疫检查点。T细胞表面存在着一系列的免疫抑制性分子，如PD-1、CTLA-4、Tim-3、SLAM等，这些免疫抑制性分子可以与其相应的配体结合从而激活免疫抑制调节通路，导致T细胞功能的衰竭。其中，PD-1/PD-L1通路是目前的一个研究热点。

[0003] PD-1是T细胞表面一个重要的免疫抑制受体，由288个氨基酸组成的免疫球蛋白超家族I型跨膜糖蛋白，最初是通过消减杂交技术从小鼠处于凋亡状态的杂交瘤及造血祖细胞系克隆获得，被认为与细胞凋亡相关而命名为程序性死亡分子-1 (programmed death-1, PD-1)。PD-1蛋白主要在T细胞、B细胞、NK细胞呈诱导性上调表达。PD-L1和PD-L2是PD-1的两个内源性配体，PD-L1在活化的T细胞、B细胞、单核细胞和多种类型的肿瘤细胞中均有表达，而PD-L2主要表达于活化的巨噬细胞、树突细胞、骨髓来源的基质细胞和个别肿瘤细胞上。因此，PD-L1比PD-L2更普遍。大量研究表明活化的T细胞上的PD-1与其配体相互作用可显著抑制效应性T细胞的生物学功能，从而可能会引起一些肿瘤的免疫逃逸、自身免疫性疾病、病毒感染性疾病等的发生。阻断PD-1与PD-L1/PD-L2的相互作用具有很好的应用前景。

[0004] 目前针对于PD-1与PD-L1通路的抗体主要分为两种：1、结合PD-1，从而阻断PD-1与PD-L1的相互作用；2、结合PD-L1，从而阻断PD-1与PD-L1的相互作用。结合PD-1的抗体主要以Nivolumab和Pembrolizumab为代表；结合PD-L1的抗体主要以BMS-936559和MPDL3280A为代表。但是这些大分子的抗体药物具有生产成本高、易产生免疫原性等缺点。因此研究生产成本低、不易产生免疫原性、易透过组织，具有更好的稳定性的小分子药物具有良好的应用前景。据报道，施贵宝公司研究的化合物BMS-8，BMS-202与PD-L1具有很好的结合，为我们设计阻断PD-1/PD-L1的相互作用的小分子药物提供了参考。

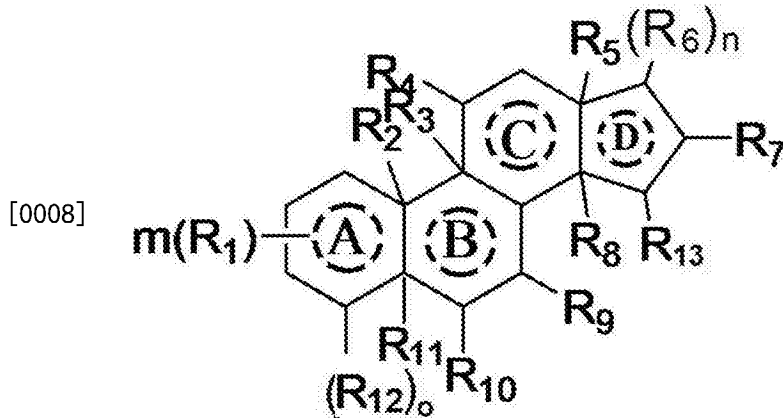
[0005] 综上所述，研究开发小分子抑制剂作为阻断PD-1/PD-L1相互作用的候选药物具有重要的临床意义和应用前景。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供能够作为阻断PD-1/PD-L1相互作用的小分子药物，这种小

分子药物应具备生产成本低、不易产生免疫原性、易透过组织,具有更好的稳定性等优点。

[0007] 在第一方面,本发明提供式I所示化合物或其药学上可接受的盐、前药、溶剂化物在制备PD-1抑制剂中的用途:



[0009] 式中,

[0010] A、B、C、D各自独立选自饱和或不饱和的5-6元碳环或杂环;

[0011] R₁选自:氢、羰基、羟基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、羧基、磺酸酯基、氰基、N,N-二烷基、C1-C6烷基甲酰氧基、C1-C6烷基甲酰氧基甲基、羟亚氨基;

[0012] m为0-6,优选1-4的任一整数;

[0013] R₂选自:氢、C1-C6烷基;

[0014] R₃选自:氢、卤素;

[0015] R₄选自:氢、羰基、羟基、取代苯基(优选被C1-6烷基取代或未取代的氨基取代的苯基)、5元或6元杂环取代的甲酰氧基;或者R₃和R₄可以连接在一起构成含有杂原子的3-5元环,优选含有氧的3元环;

[0016] R₅选自:氢、羟基、C1-C6烷基;

[0017] R₆独立选自:氢、羟基、取代或未取代的C1-C10直链或支链烷基、羰基、乙炔基、C1-C10烷基甲酰基、C1-C10卤代烷基甲酰基、羟甲基甲酰基、乙酰氧基C1-6酰基、C1-C6烷基氨基甲酰基、羧基取代的C1-C6烷基、C1-C10烷基甲酰氧基、取代或未取代的C2-C10烯基、卤代C1-C3烷硫基甲酰基、4-(2-磺酸基乙胺基)-2-丁基、5元或6元杂环取代的甲酰氧基;

[0018] n为1或2;或者,两个R₆可以连接在一起构成取代或未取代的含有杂原子的3-6元环,优选含有氧的5元环;

[0019] R₇选自:氢、羟基、C1-C6烷基、C1-C6烷酯基、13,16-环烷基、16,17-环氧基、15,16-环烷基;或者,R₆和R₇可以连接在一起构成取代或未取代的含有1-3个杂原子的3-6元环,优选含有2个氧的5元环;

[0020] R₁₃为氢;

[0021] 或者,R₇和R₁₃可以连接在一起构成取代或未取代的3-5元碳环,优选3元碳环;

[0022] R₈选自:氢、卤素、羟基、C1-C6烷基;

[0023] R₉选自:氢、羟基、C1-C6烷硫酯基、C1-C10卤代烷亚硫酰基、C1-C6烷氧基甲酰基;

[0024] R₁₀选自:氢、卤素、羰基、C1-C6烷基;或者,R₉和R₁₀可以连接在一起构成取代或未取代的3-5元碳环,优选3元碳环;

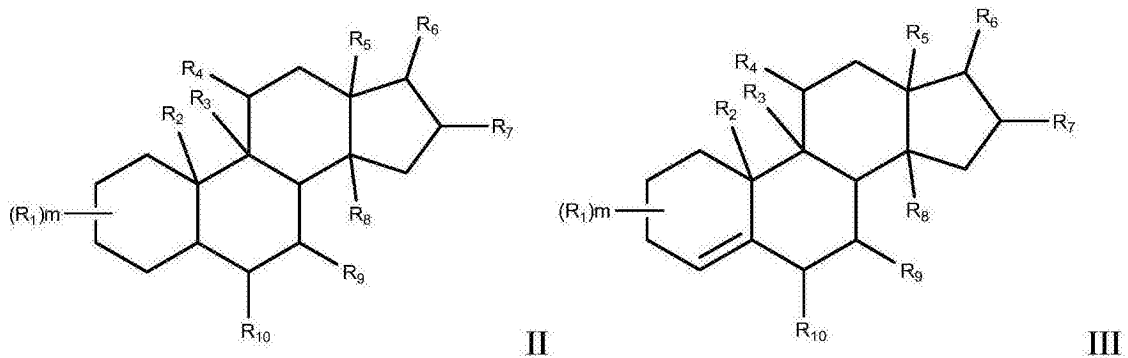
[0025] R₁₁选自:氢、C1-C6烷基;

[0026] R_{12} 选自：氢、羟基、C1-C6烷基； α 为1或2；或者， R_{11} 和 R_{12} 可以连接在一起构成含有杂原子的3-5元环，优选含有氧的3元环。

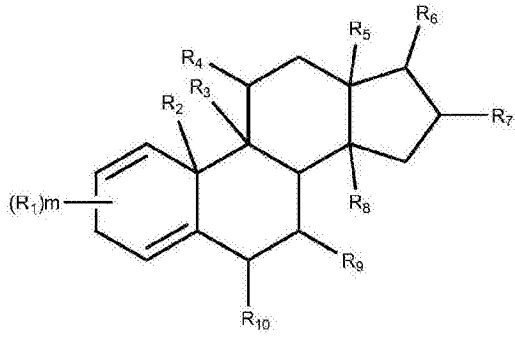
[0027] 在具体的实施方式中，A为苯环、环己烷、环己烯，或环己二烯；B环为环己烷或环己烯；C环为环己烷或环己烯；D环为环戊烷或环戊烯。

[0028] 在具体的实施方式中，所述化合物如通式II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII所示：

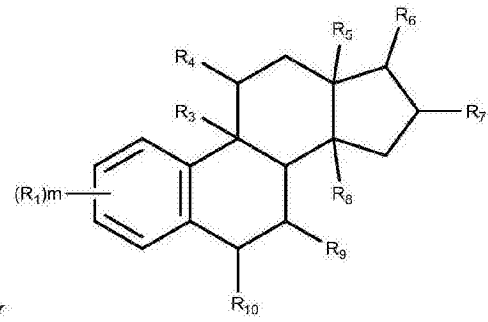
[0029]



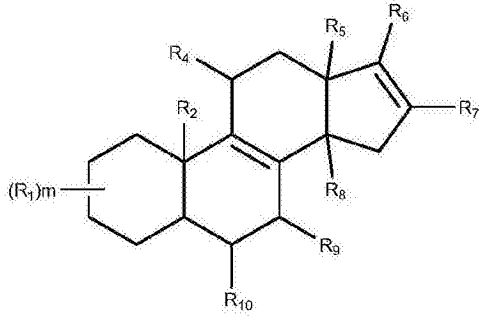
[0030]



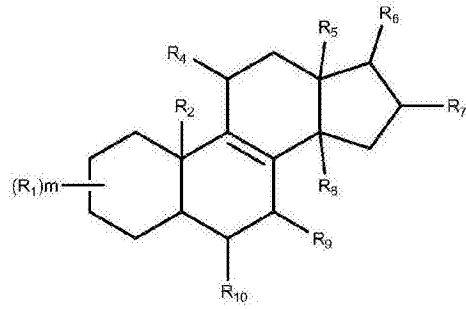
IV



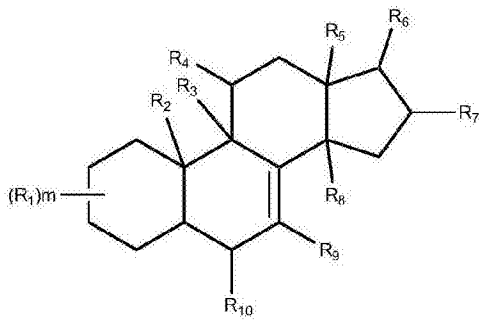
V



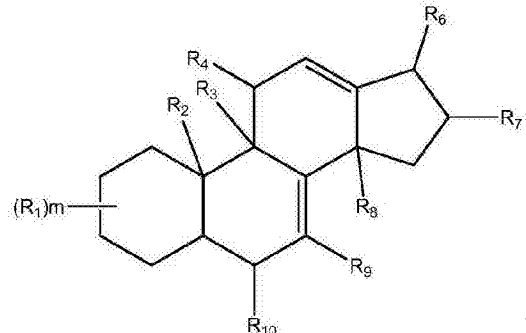
VI



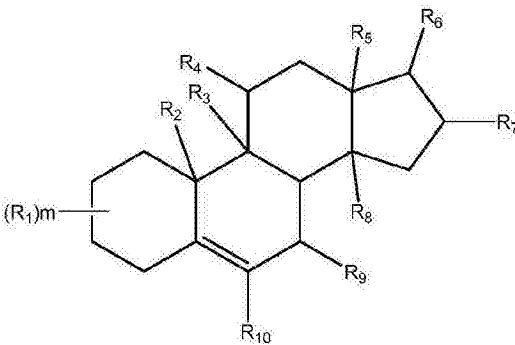
VII



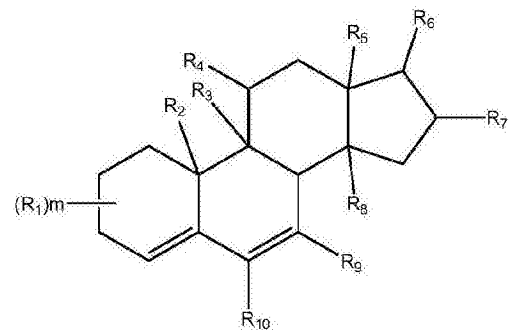
VIII



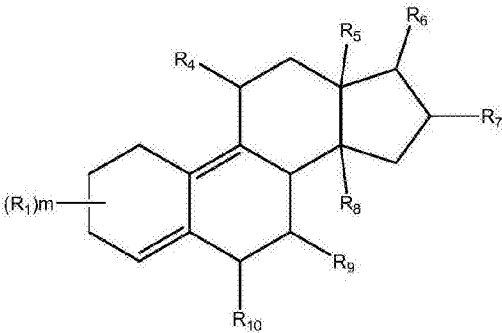
IX



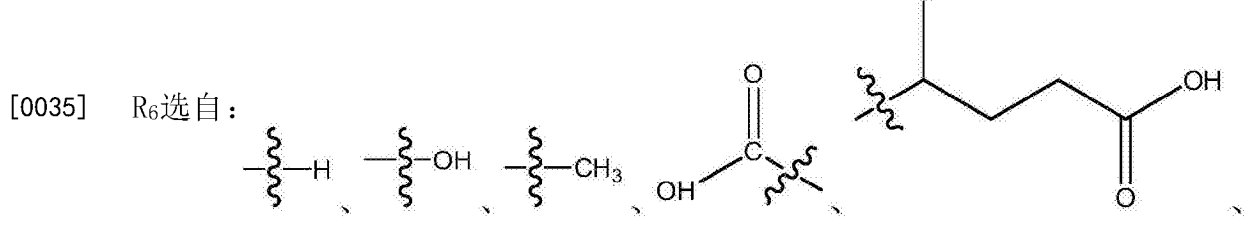
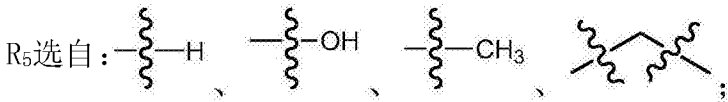
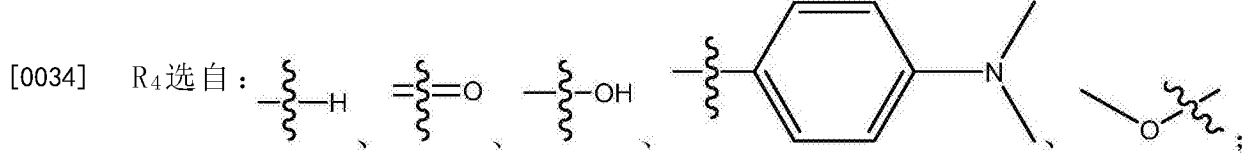
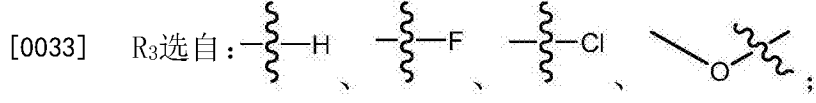
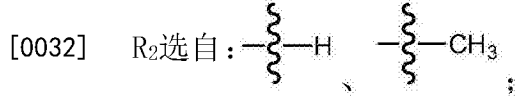
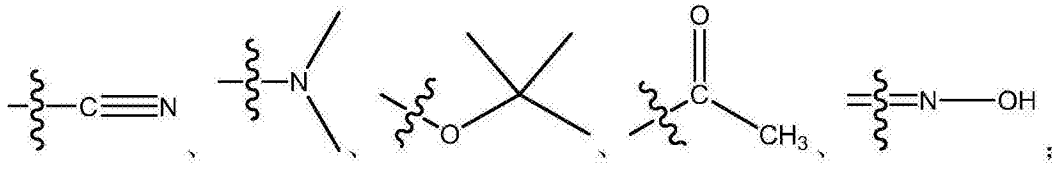
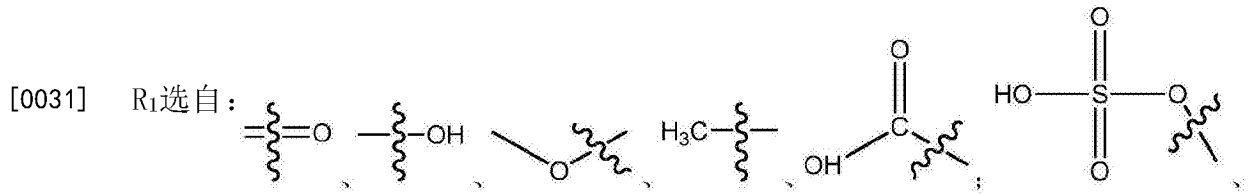
X

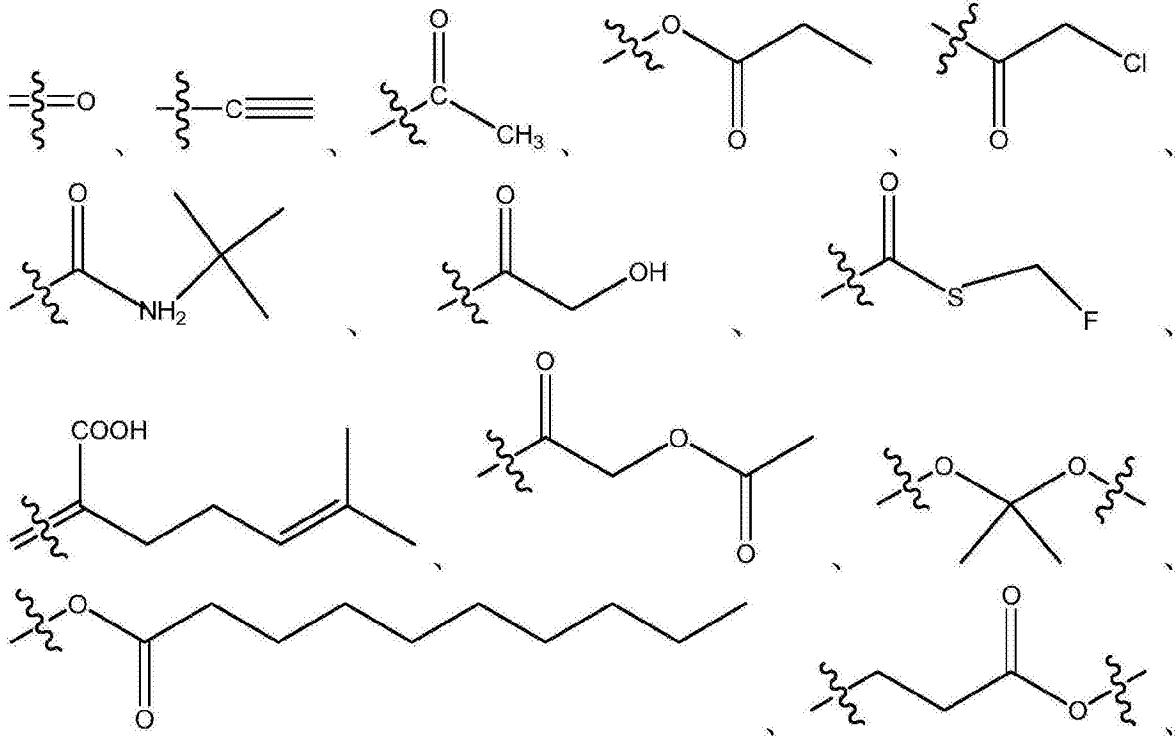


XI

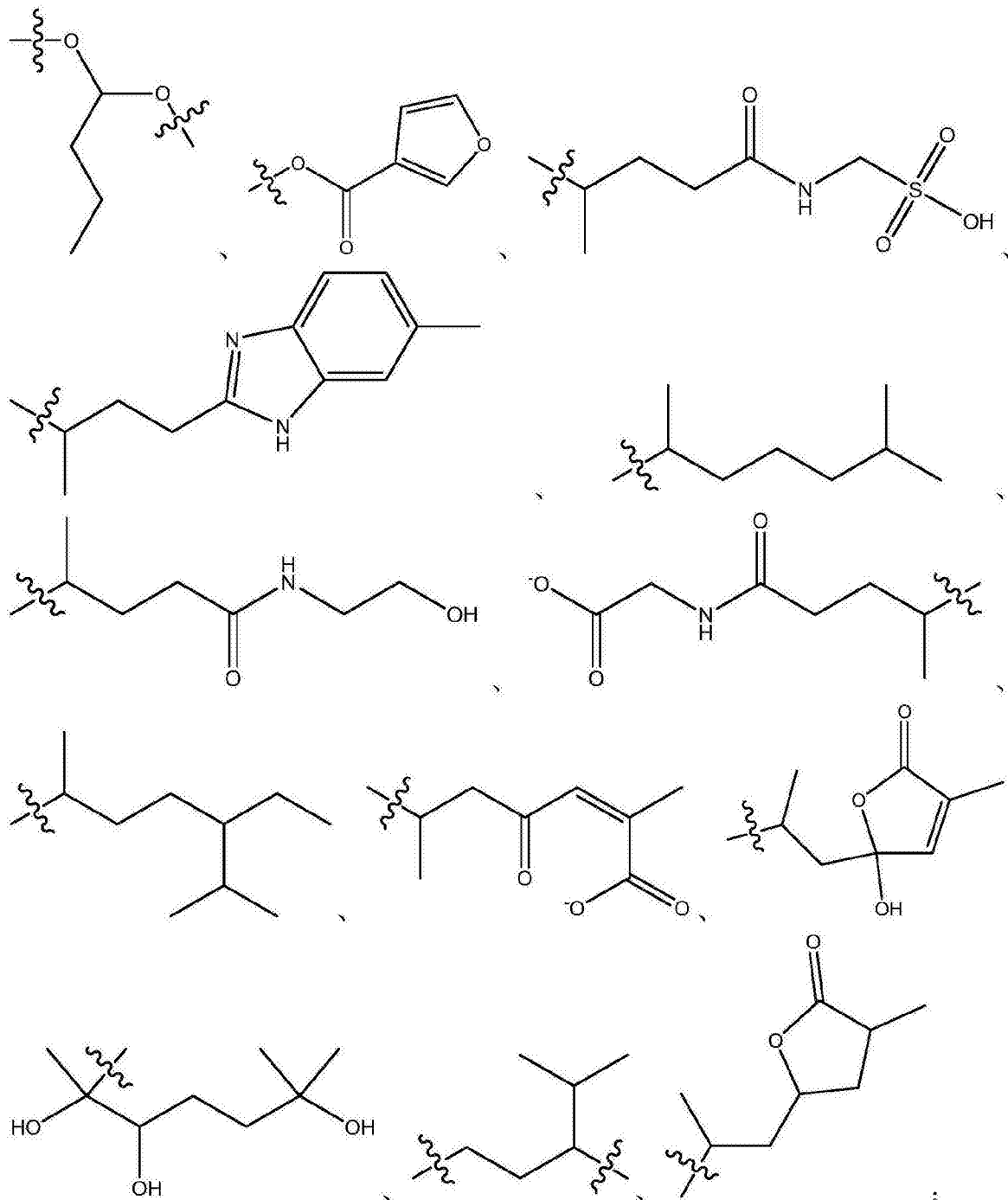


XII



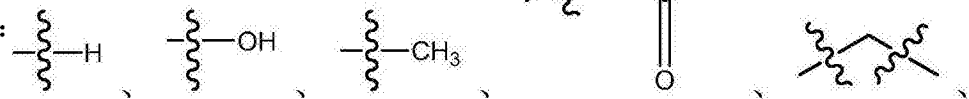


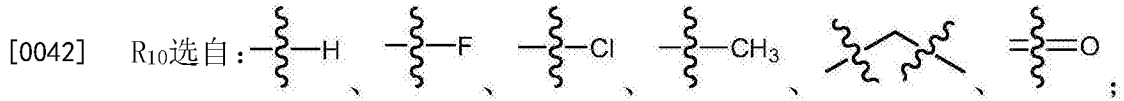
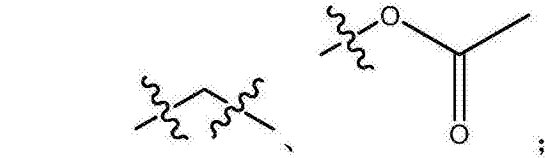
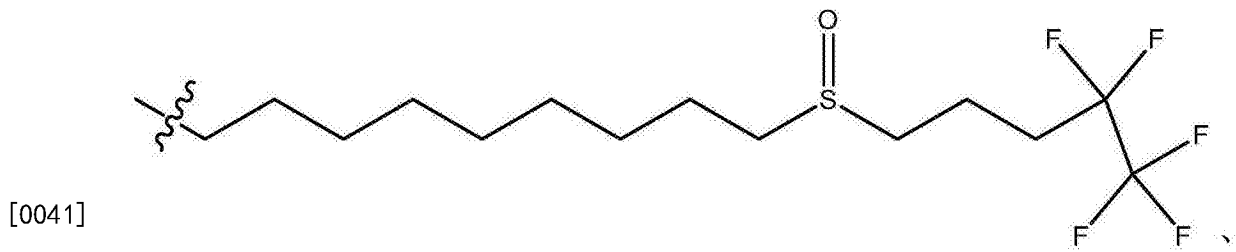
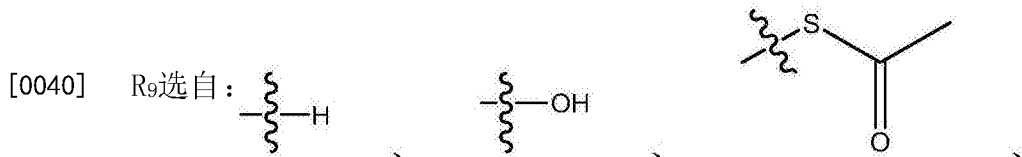
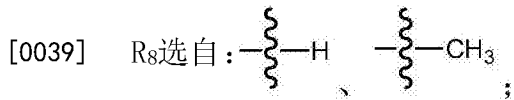
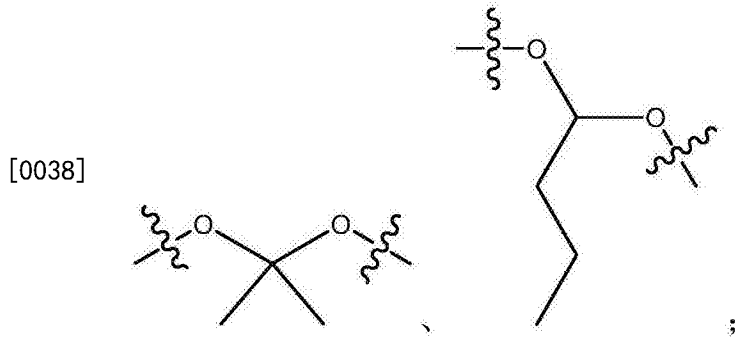
[0036]



[0037]

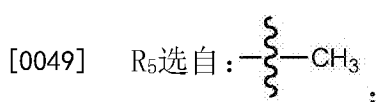
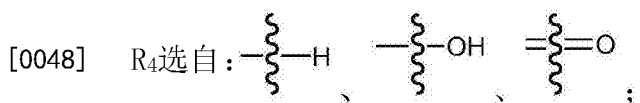
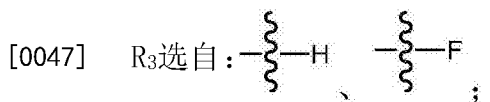
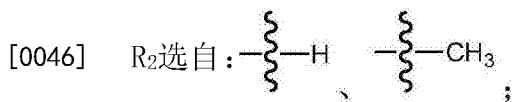
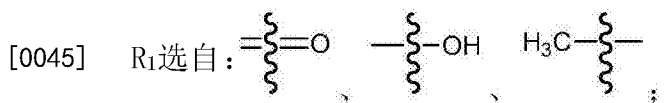
R₇选自:

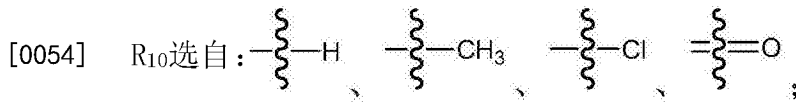
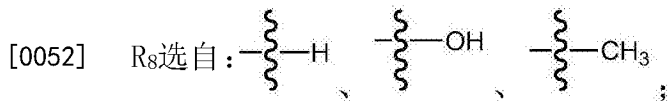
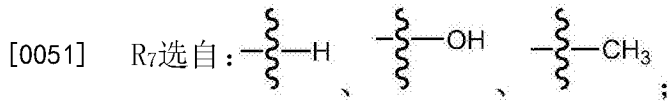
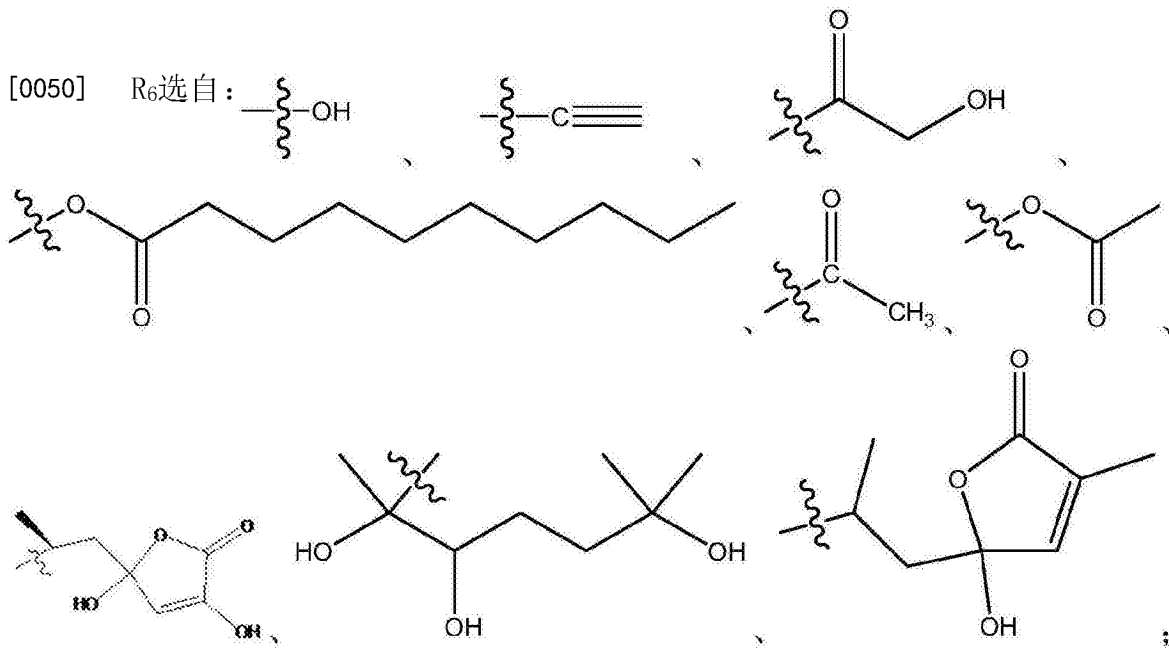




[0043] m为0-4, 优选1-4的任一整数。

[0044] 在具体的实施方式中,



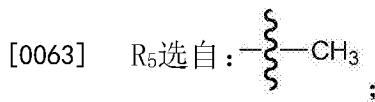
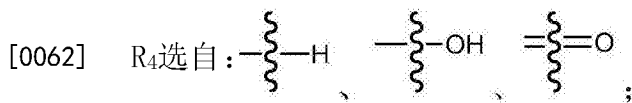
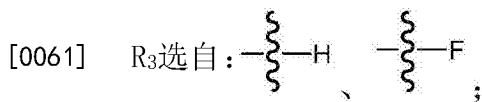
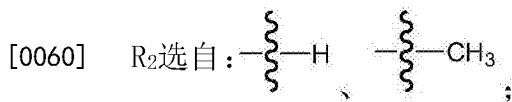
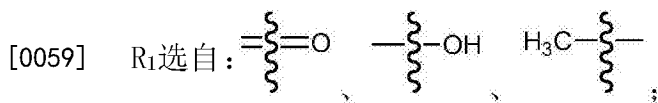


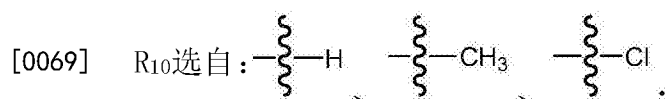
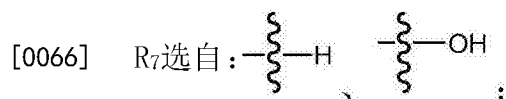
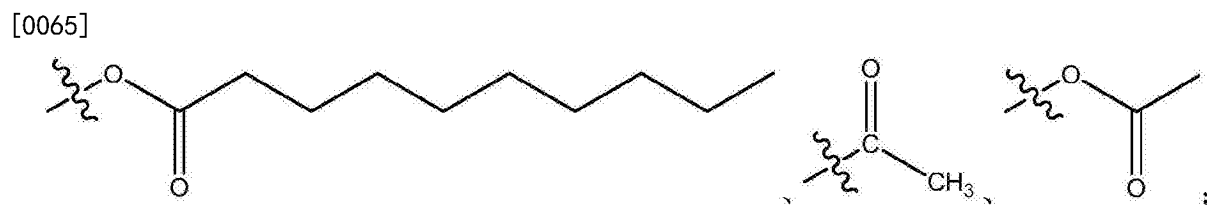
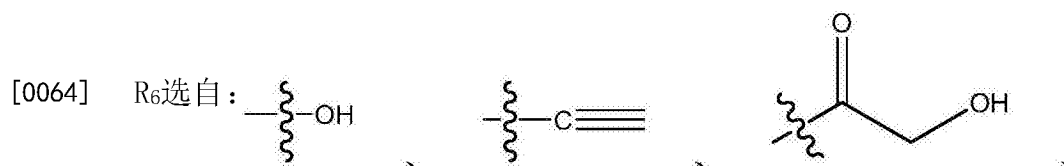
[0055] m为0-4, 优选1-4的任一整数;

[0056] R₁₁和R₁₃各自为氢;

[0057] R₁₂选自: 氢、甲基。

[0058] 在具体的实施方式中,



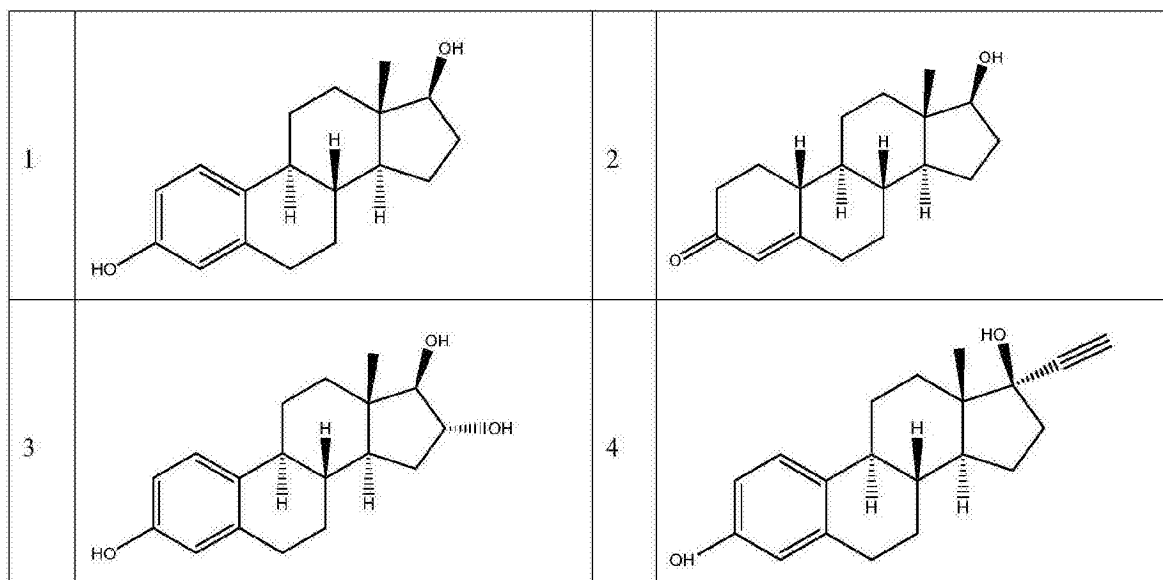


[0070] m为0-4, 优选1-4的任一整数;

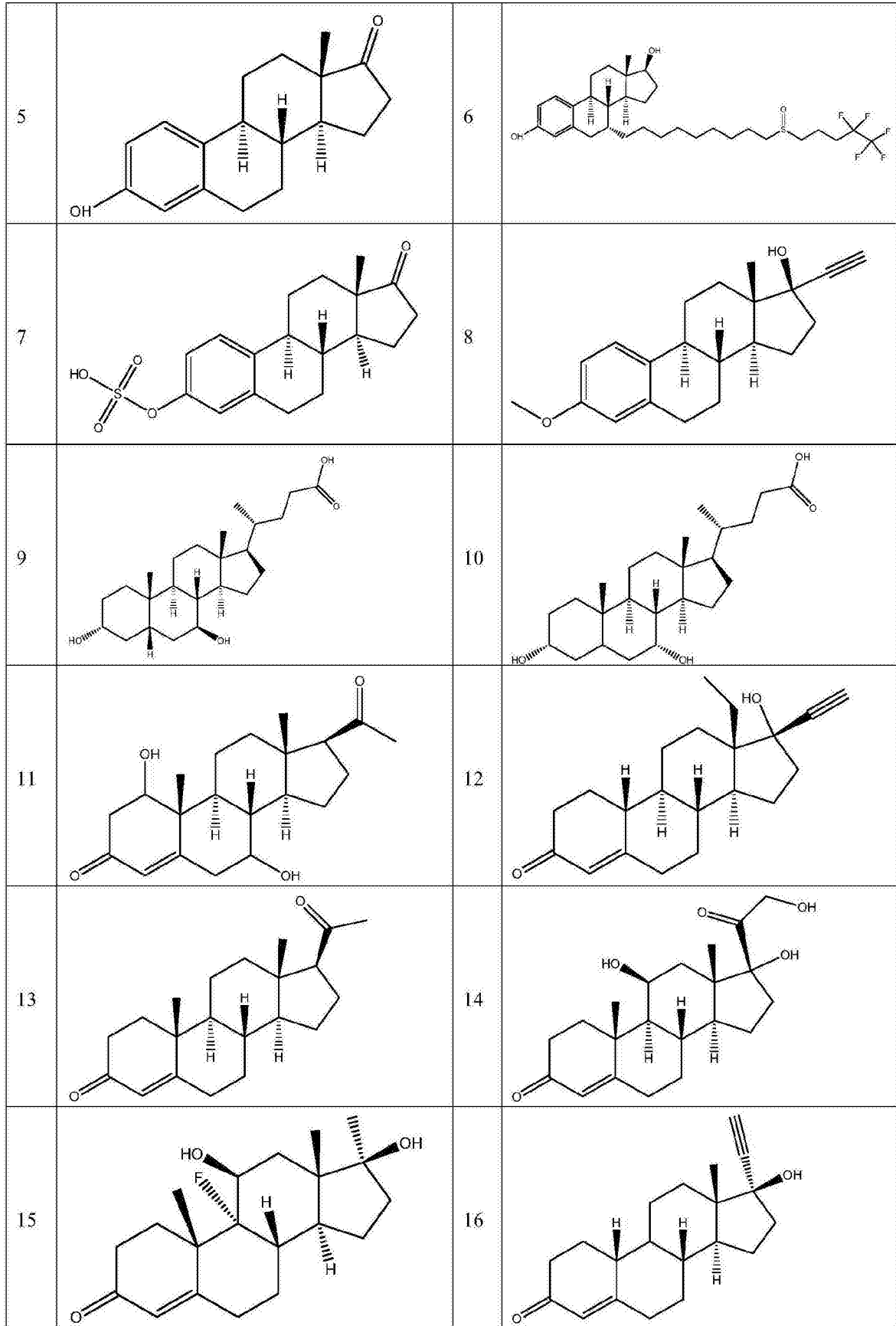
[0071] R₁₁、R₁₂和R₁₃各自为氢。

[0072] 在第二方面, 本发明提供以下化合物或其药学上可接受的盐、前药、溶剂化物在制备PD-1抑制剂中的用途:

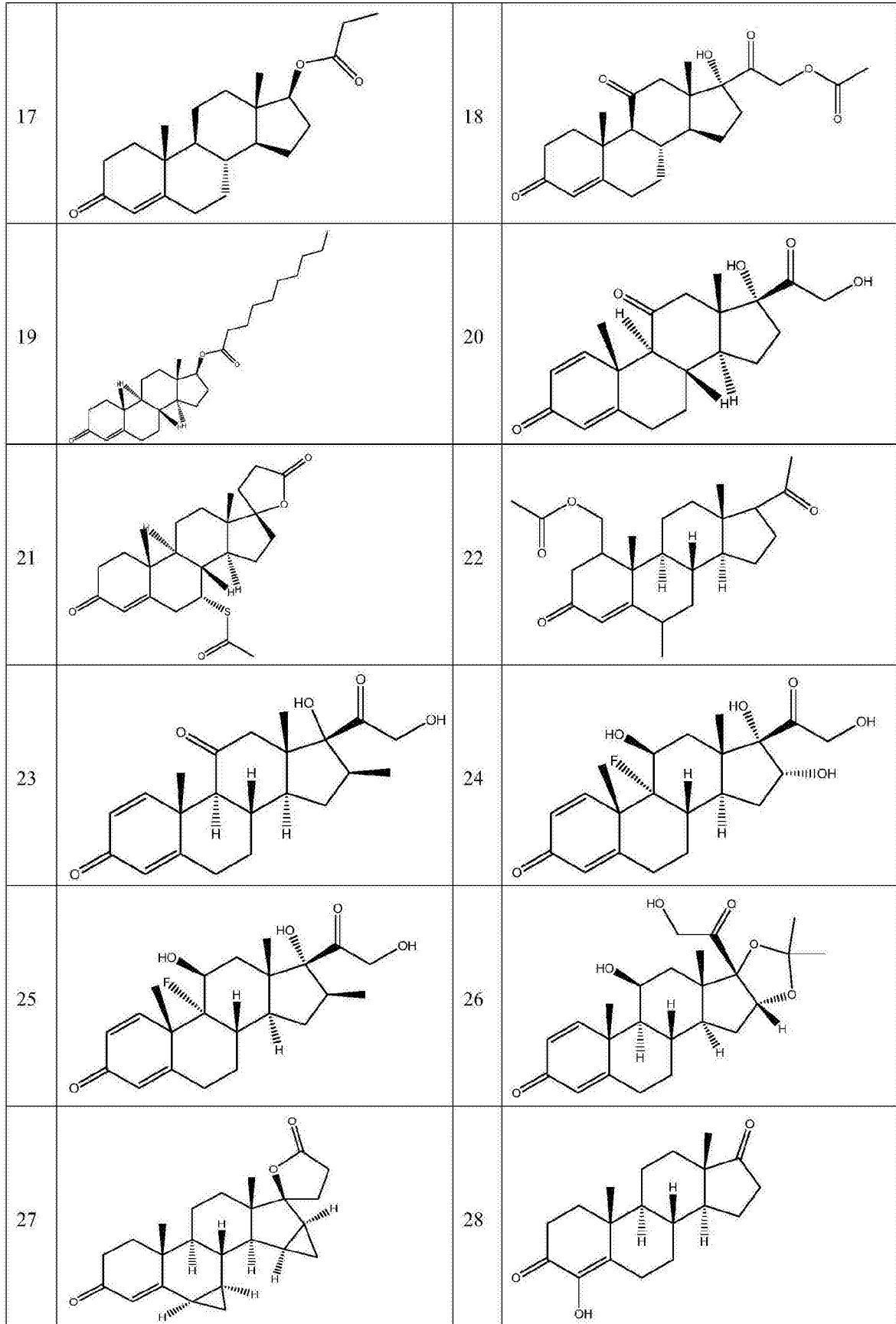
[0073]



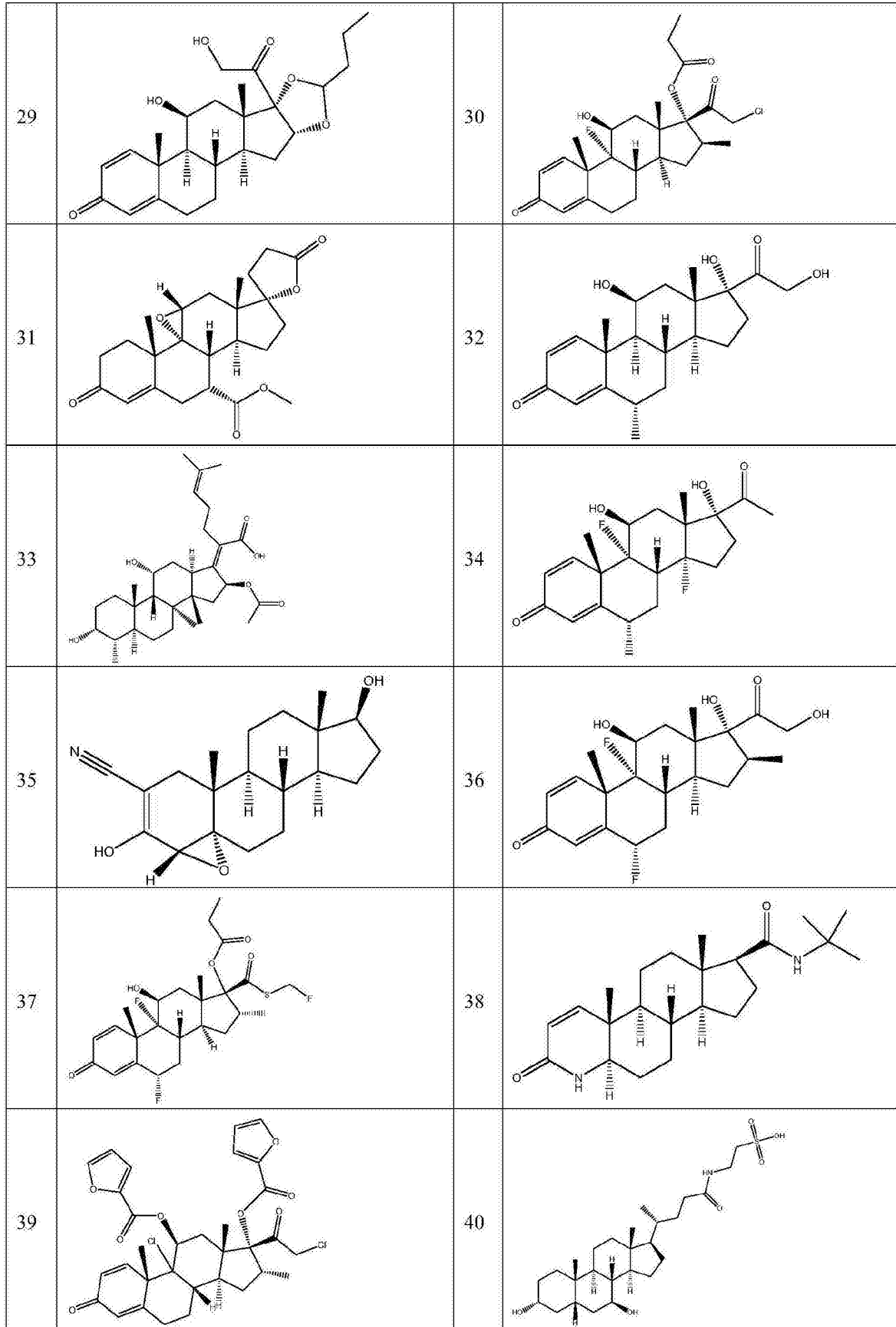
[0074]



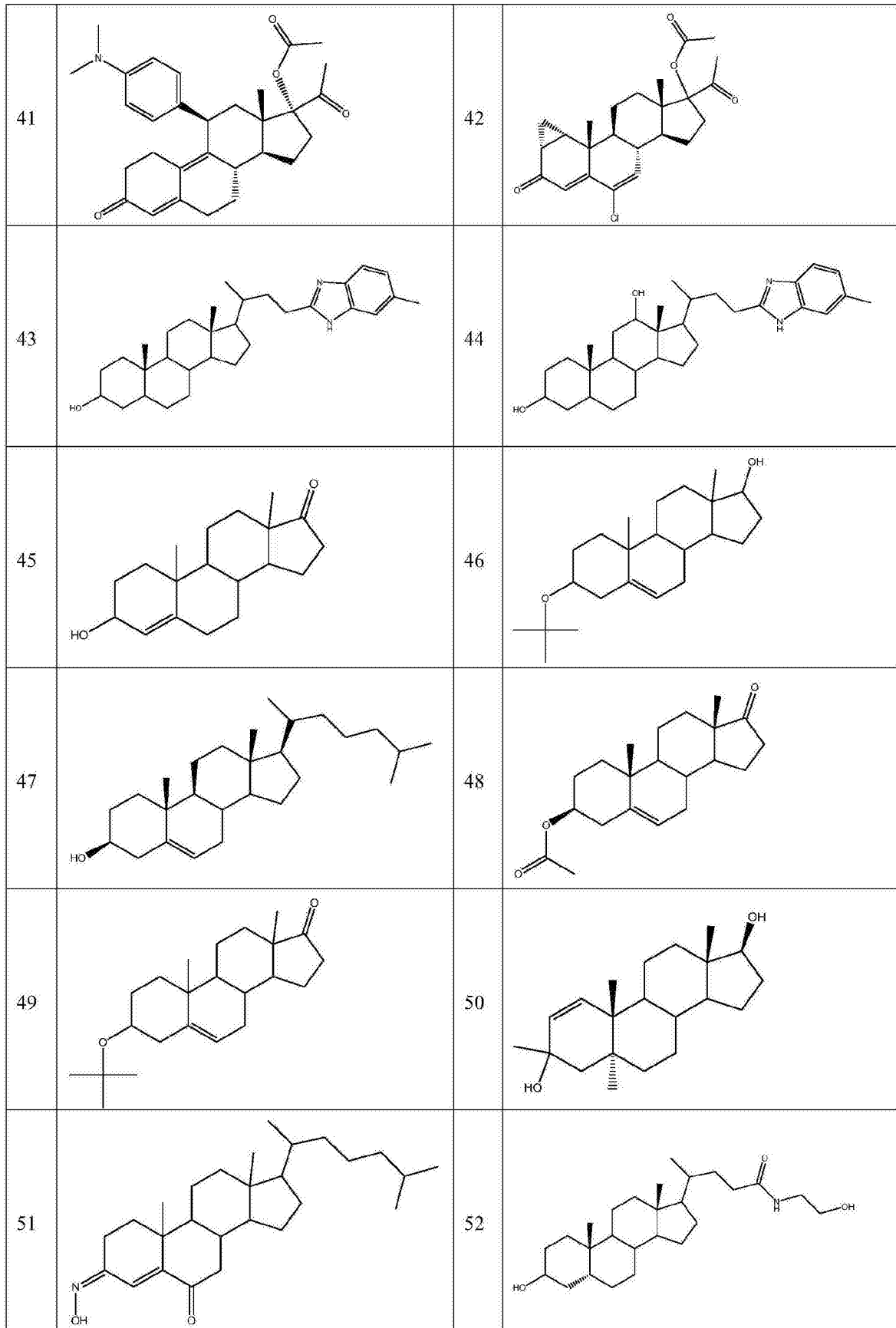
[0075]



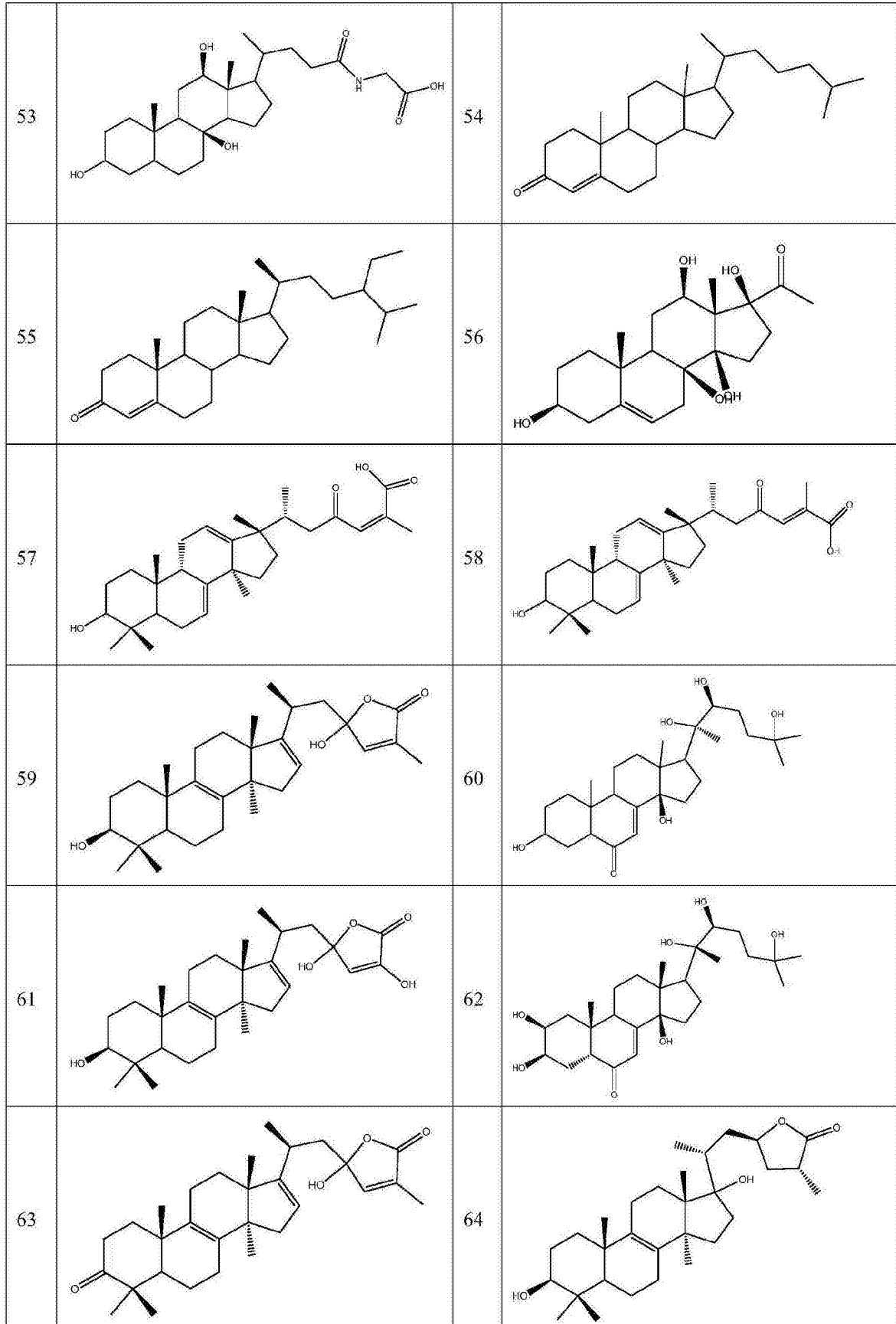
[0076]



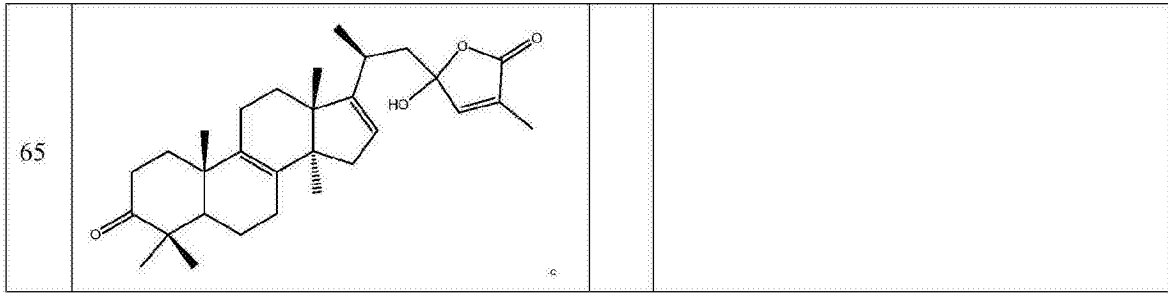
[0077]



[0078]

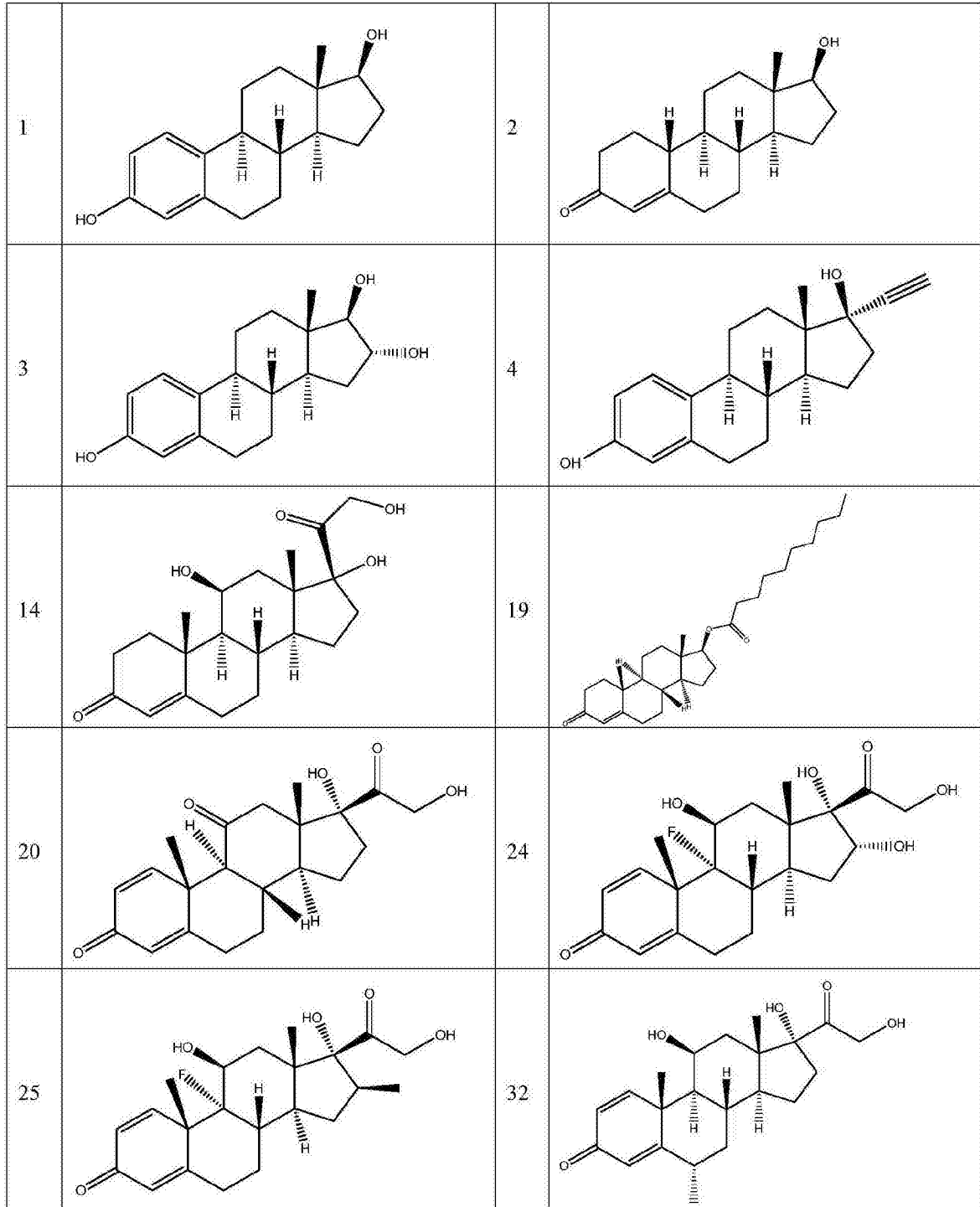


[0079]

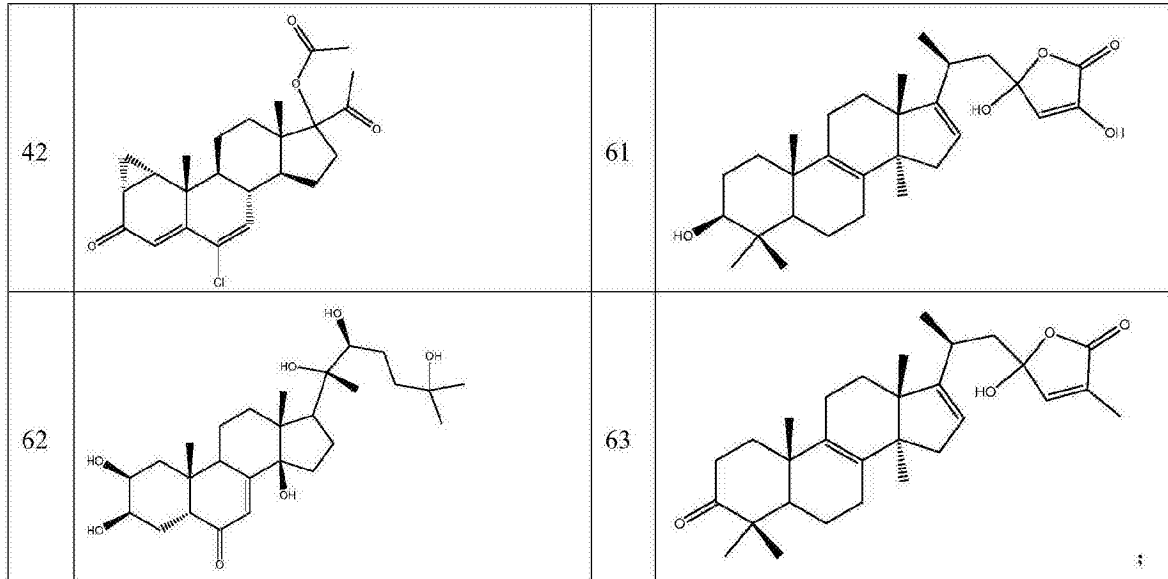


[0080] 在具体的实施方式中,本发明的化合物是以下化合物:

[0081]

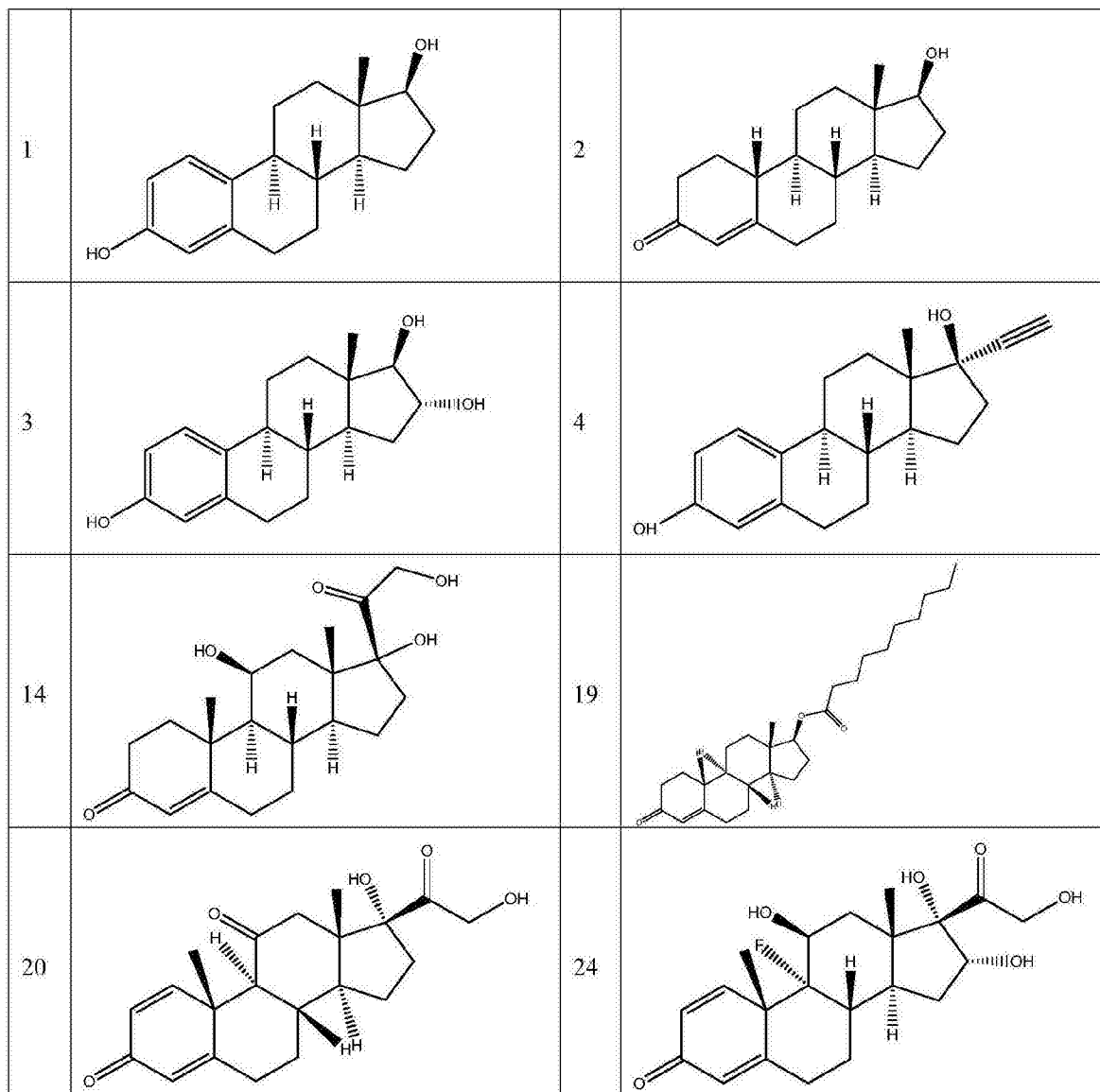


[0082]

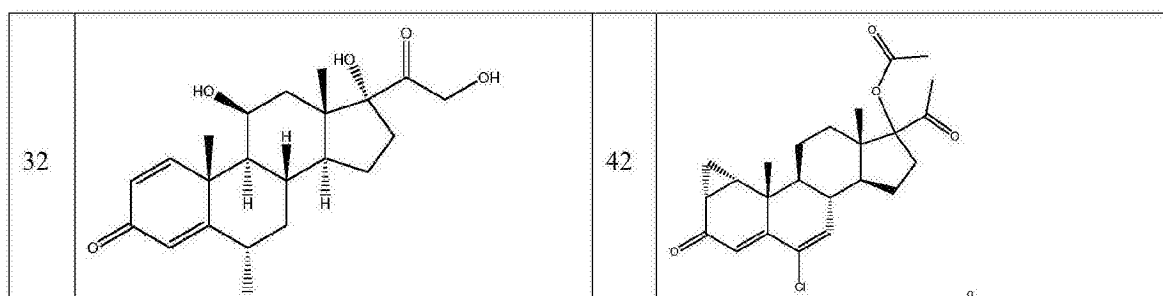


[0083] 优选地,所述化合物是以下化合物:

[0084]



[0085]



[0086] 在具体的实施方式中,所述用途是用于制备抑制PD-1与PD-L1结合或抑制肿瘤、或治疗细菌、病毒或真菌引起的感染或治疗炎症疾病的药物。

[0087] 在具体的实施方式中,所述肿瘤包括但不限于:黑色素瘤、肺癌(优选非小细胞肺癌)、肾癌、卵巢癌、前列腺癌、乳腺癌、结肠癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈癌、子宫癌、直肠癌、肛门癌、胃癌、睾丸癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、何杰金氏病、非何杰金淋巴瘤、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织

肉瘤、尿道癌、阴茎癌、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、小儿实体瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管生成、脊轴瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮样癌、鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤；

[0088] 所述病毒包括但不限于：肝炎病毒(甲型、乙型和丙型)、疱疹病毒、流感病毒、腺病毒、冠状病毒、麻疹病毒、登革热病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒；

[0089] 所述细菌包括但不限于：衣原体、立克次氏体、分枝杆菌、葡萄球菌、肺炎球菌、霍乱、破伤风；

[0090] 所述真菌包括但不限于：假丝酵母、曲霉、皮炎芽酵母；

[0091] 所述炎性疾病包括但不限于：强直性脊柱炎、自身免疫性溶血性贫血、关节炎、重症肌无力、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、恶性贫血、多肌炎。

[0092] 在第三方面，本发明提供一种药物组合物，所述药物组合物含有本发明第一方面所述的化合物或其药学上可接受的盐、前药、溶剂化物，以及药学上可接受的载体或赋形剂。

[0093] 在具体的实施方式中，所述药物组合物还包含其它抑制PD-1与PD-L1结合的药物。

[0094] 在具体的实施方式中，所述其它抑制PD-1与PD-L1结合的药物是十字孢碱。

[0095] 在优选的实施方式中，本发明提供一种抑制PD-1与PD-L1结合的方法，包括步骤：利用本发明的化合物或药物组合物抑制PD-1与PD-L1结合。

[0096] 在优选的实施方式中，所述抑制PD-1与PD-L1结合的方法是在体外进行的非治疗方法。

[0097] 应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

附图说明

[0098] 图1显示实施例2的纯化后的人PD-1蛋白经14% SDS-PAGE凝胶电泳结果。该目的条带位置大小约为13kDa，与理论大小相符。

[0099] 图2显示实施例3纯化后人PD-1的Western blot鉴定图。

[0100] 图3显示小分子化合物2与人PD-L1蛋白竞争性结合人PD-1蛋白的SPR图，显示该小分子化合物可以阻断人PD-1与人PD-L1的结合。

[0101] 图4a显示小分子化合物2在肿瘤细胞与T细胞共培养体系中的MTT实验，表明该小分子化合物443可以通过阻断人PD-1蛋白与人PD-L1蛋白，从而使T细胞对肿瘤细胞产生一定的杀伤作用。

[0102] 图4b显示小分子化合物2在肿瘤细胞与T细胞共培养体系中联合阳性药十字孢碱(STS)给药的MTT实验，表明该小分子化合物443与阳性药十字孢碱(STS)联合给药比单独给药的效果更好。

具体实施方式

[0103] 发明人经过广泛而深入的研究，出乎意料地发现一系列甾体类衍生物，这些衍生

物能够竞争性地与人PD-1蛋白结合,从而成为研究PD-1/PD-L1免疫检查点阻断剂的小分子先导药物,进而为抗肿瘤药物的开发提供物质基础。在此基础上完成了本发明。

[0104] 除非另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语具有与所公开的发明所属领域的技术人员的普遍理解相同的含义。为便于理解本发明,对本发明涉及的相关术语作如下定义,但本发明的范围并不限于这些具体的定义。

[0105] 基团定义

[0106] 在本文中,“PD-1蛋白”是指人体内T细胞表面的一个重要的抑制性受体。其有两个配体,分别为PD-L1和PD-L2。PD-L1与活化的T细胞中的PD-1结合后,起到抑制T细胞的抗肿瘤作用。因此,阻断PD-1/PD-L1通路对于抑制或杀伤肿瘤细胞有着积极作用。

[0107] 在本文中,“烷基”指碳链长度为1-10个碳原子的饱和的支链或直链烷基,优选的烷基包括长2-8个碳原子、1-6个、1-4个碳原子、1-3个碳原子不等的烷基或环烷基。烷基的例子包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、庚基、环甲烷等。烷基可以被1个或多个取代基取代,例如被卤素或卤代烷基取代。例如,烷基可以是被1-4个氟原子取代的烷基,或者烷基可以是被氟代烷基取代的烷基。

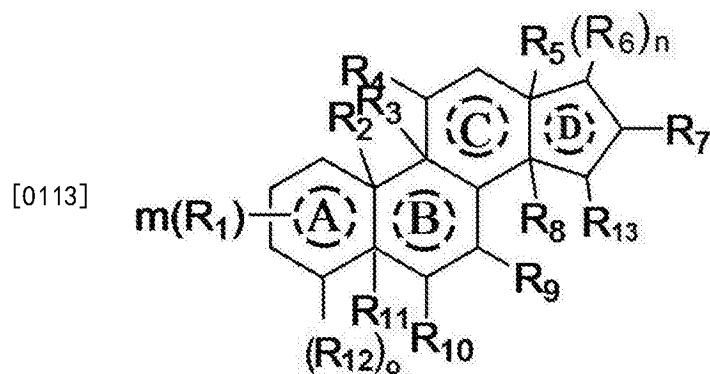
[0108] 在本文中,“烷氧基”是指烷基取代的氧基。优选的烷氧基是长1-6个碳原子的烷氧基,更优选为长1-4个碳原子的烷氧基。烷氧基的例子包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基等。

[0109] 在本文中,“卤素”指氟、氯、溴和碘。在优选的实施方式中,卤素是氯或氟。

[0110] 本发明的化合物

[0111] 本发明人出乎意料地发现了一系列甾体类衍生物,这些化合物在分子及动物水平测试中显示可以结合PD-1,并且阻断PD-1与PD-L1的相互作用,同时毒性较低、安全性较好、具有良好的成药前景。

[0112] 在具体的实施方式中,本发明的化合物是下式I所示化合物或其药学上可接受的盐、前药、或溶剂化物:



[0114] 式中,

[0115] A、B、C、D各自独立选自饱和或不饱和的5-6元碳环或杂环;

[0116] R₁选自下组:氢、羰基、羟基、C₁-C₆烷氧基、C₁-C₆烷基、羧基、磺酸酯基、氰基、N,N-二烷基、C₁-C₆烷基甲酰氧基、C₁-C₆烷基甲酰氧基甲基、羟亚氨基;m为0-6,优选1-4的任一整数;

[0117] R₂选自:氢、C₁-C₆烷基;

[0118] R₃选自:氢、卤素;

[0119] R₄选自:氢、羰基、羟基、取代苯基(优选被C1-6烷基取代或未取代的氨基取代的苯基)、5元或6元杂环取代的甲酰氧基;或者R₃和R₄可以连接在一起构成含有杂原子的3-5元环,优选含有氧的3元环;

[0120] R₅选自:氢、羟基、C1-C6烷基;

[0121] R₆独立选自:氢、羟基、取代或未取代的C1-C10直链或支链烷基、羰基、乙炔基、C1-C10烷基甲酰基、C1-C10卤代烷基甲酰基、羟甲基甲酰基、乙酰氧基C1-6酰基、C1-C6烷基氨基甲酰基、羧基取代的C1-C6烷基、C1-C10烷基甲酰氧基、取代或未取代的C2-C10烯基、卤代C1-C3烷硫基甲酰基、4-(2-磺酸基乙胺基)-2-丁基、5元或6元杂环取代的甲酰氧基;

[0122] n为1或2;或者,两个R₆可以连接在一起构成取代或未取代的含有杂原子的3-6元环,优选含有氧的5元环;

[0123] R₇选自:氢、羟基、C1-C6烷基、C1-C6烷酯基、13,16-环烷基、16,17-环氧基、15,16-环烷基;或者,R₆和R₇可以连接在一起构成取代或未取代的含有1-3个杂原子的3-6元环,优选含有2个氧的5元环;

[0124] R₁₃为氢;

[0125] 或者,R₇和R₁₃可以连接在一起构成取代或未取代的3-5元碳环,优选3元碳环;

[0126] R₈选自:氢、卤素、羟基、C1-C6烷基;

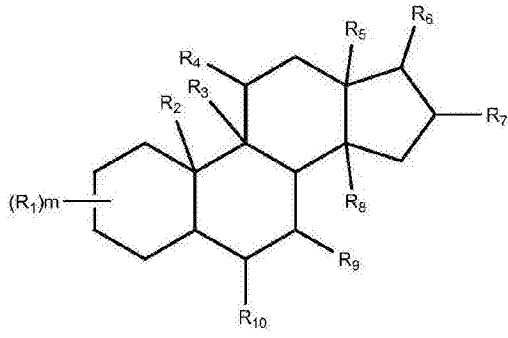
[0127] R₉选自:氢、羟基、C1-C6烷硫酯基、C1-C10卤代烷亚硫酰基、C1-C6烷氧基甲酰基;

[0128] R₁₀选自:氢、卤素、羰基、C1-C6烷基;或者,R₉和R₁₀可以连接在一起构成取代或未取代的3-5元碳环,优选3元碳环;

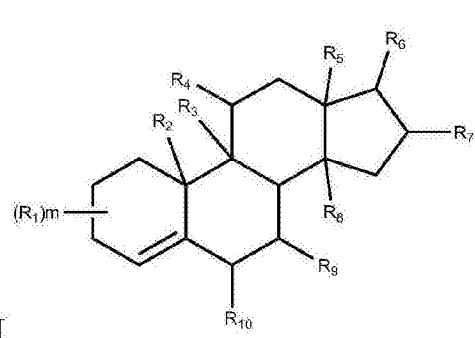
[0129] R₁₁选自下组:氢、C1-C6烷基;

[0130] R₁₂选自下组:氢、羟基、C1-C6烷基;o为1或2;或者,R₁₁和R₁₂可以连接在一起构成含有杂原子的3-5元环,优选含有氧的3元环。

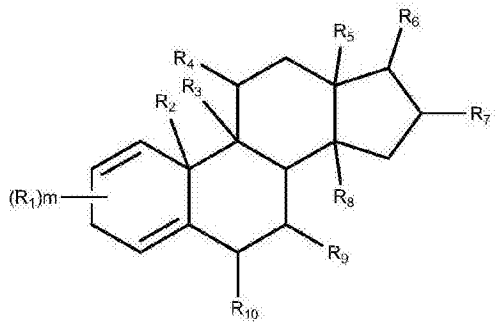
[0131] 在优选的实施方式中,A可以为苯环、环己烷、环己烯,或环己二烯;B环为环己烷或环己烯;C环为环己烷或环己烯;D环为环戊烷或环戊烯。例如,式I所示化合物可以如通式II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII所示:



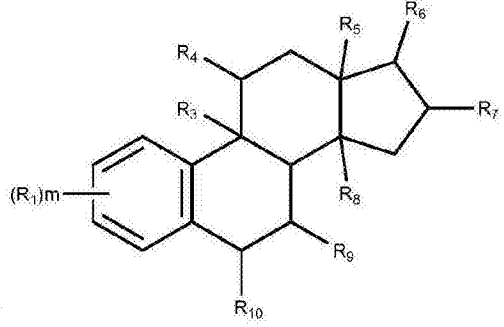
II



III

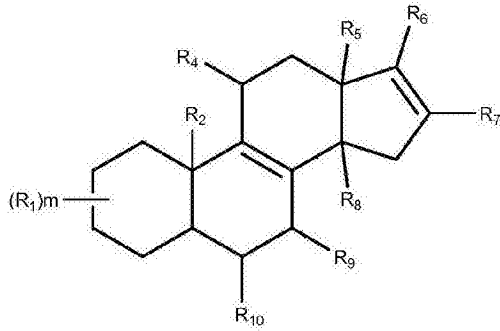


IV

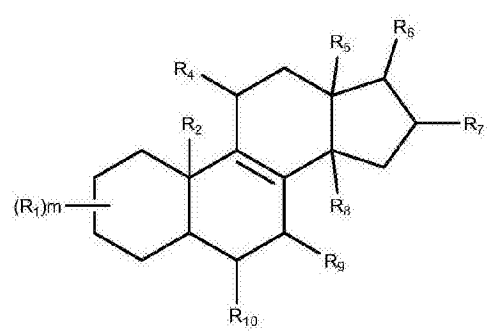


V

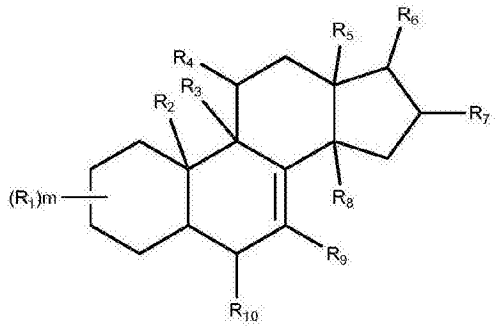
[0132]



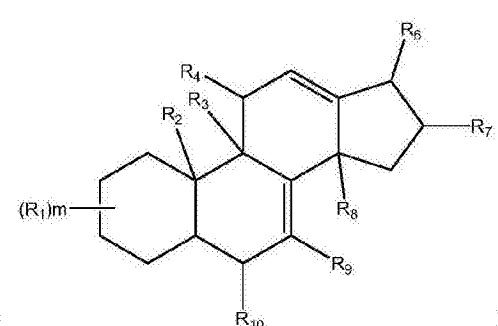
VI



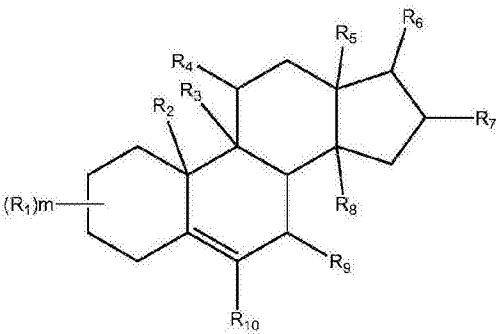
VII



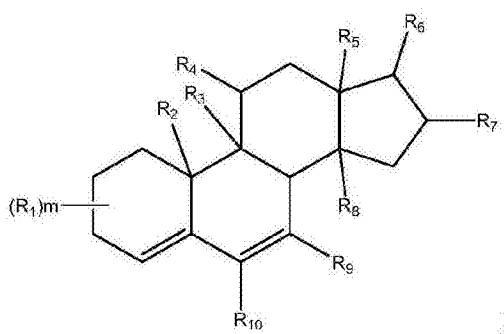
VIII



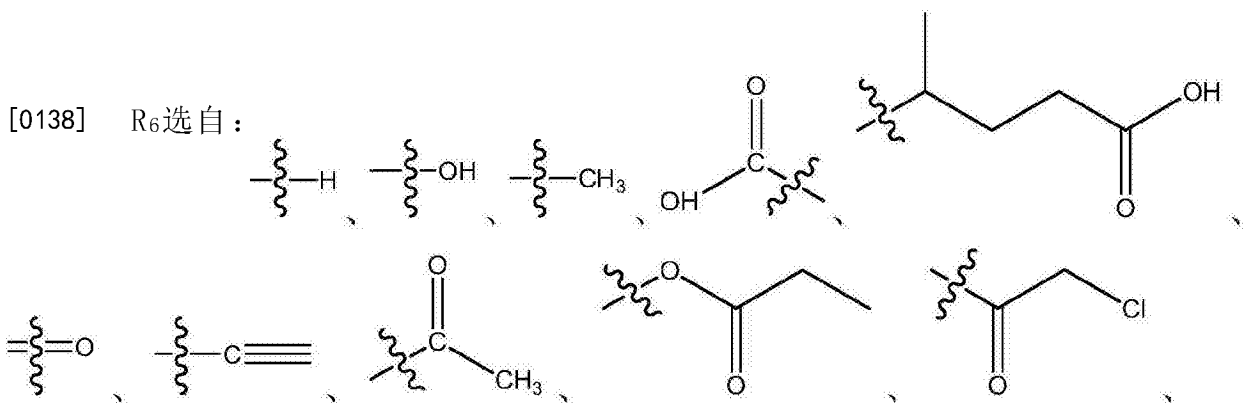
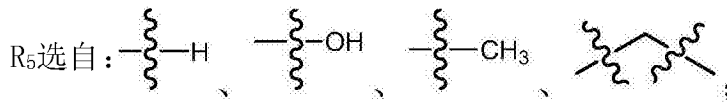
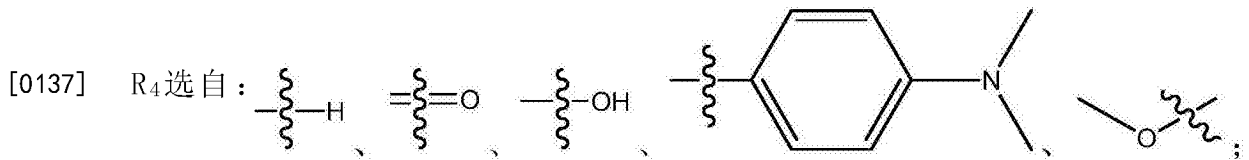
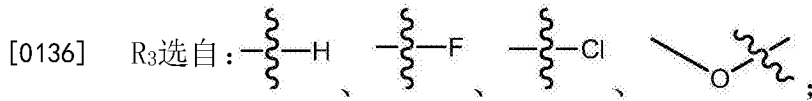
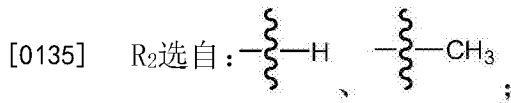
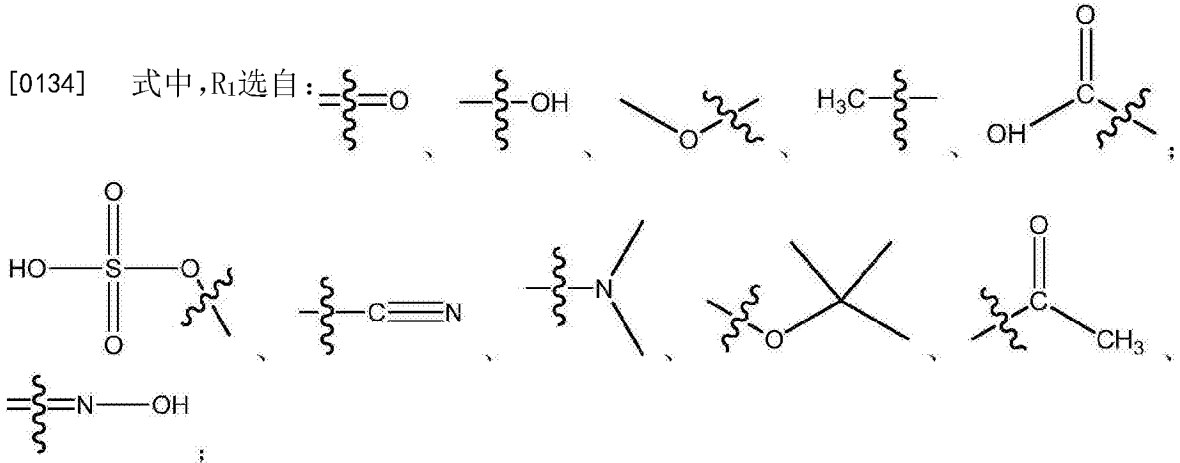
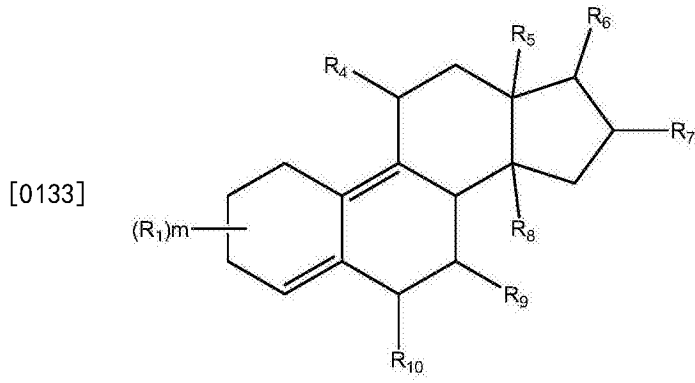
IX



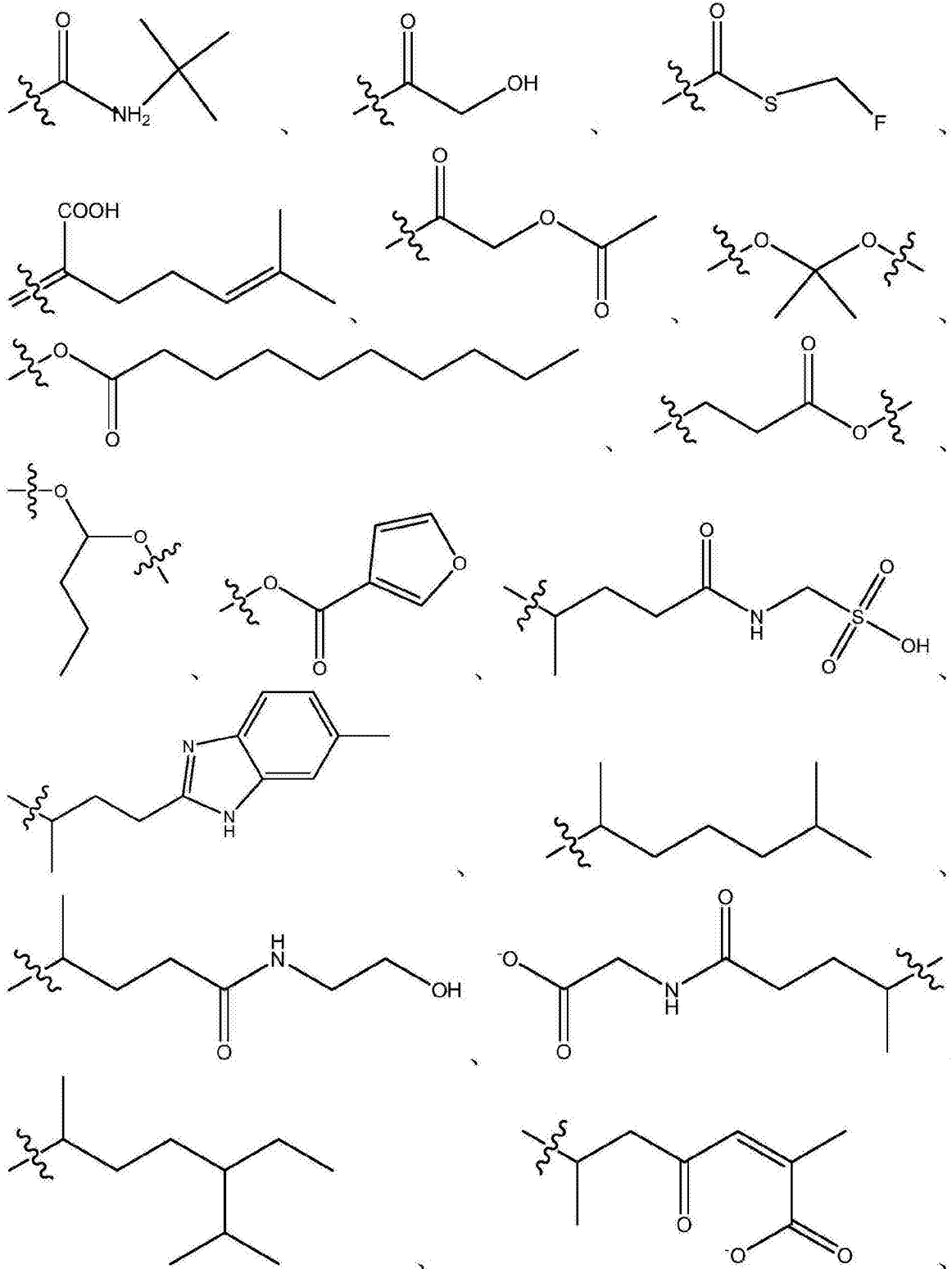
X



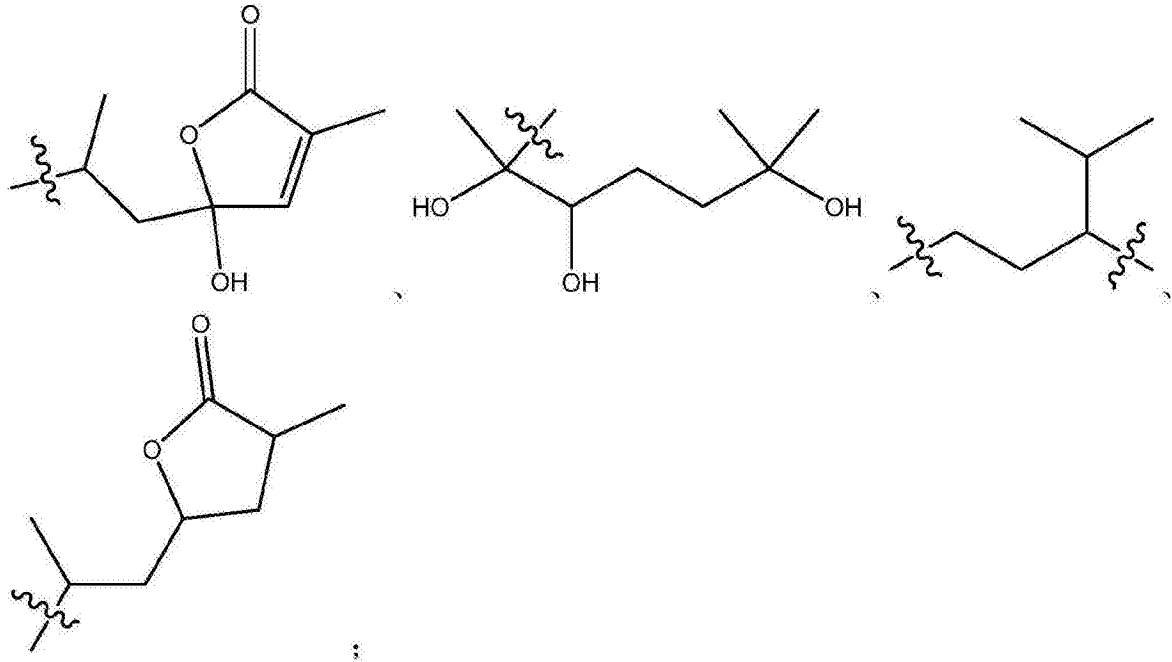
XI



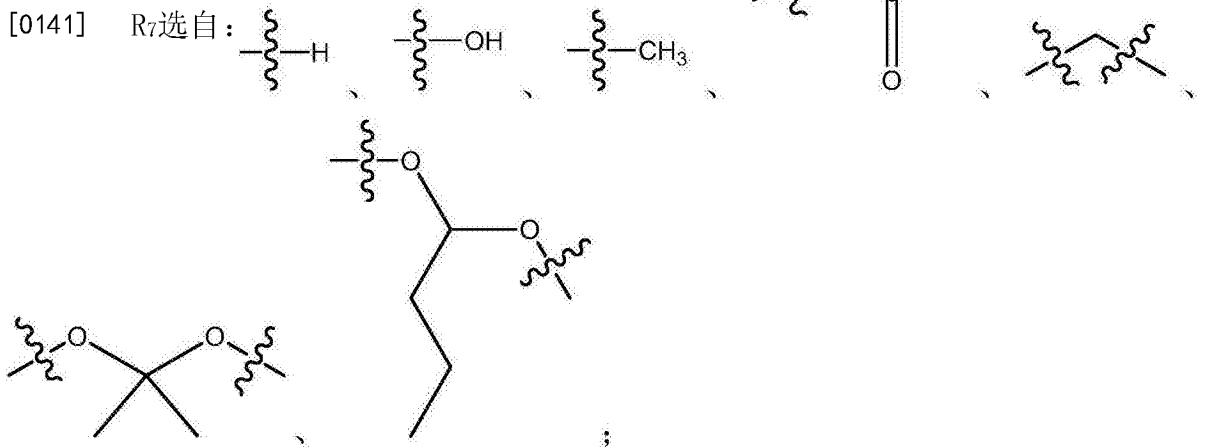
[0139]



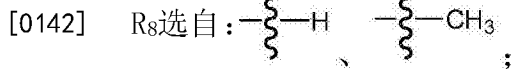
[0140]



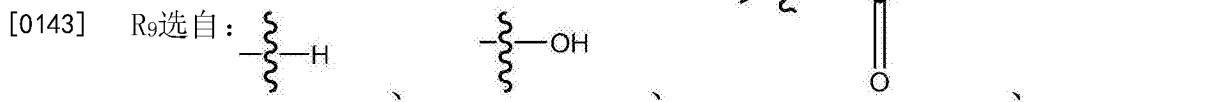
[0141] R₇选自:

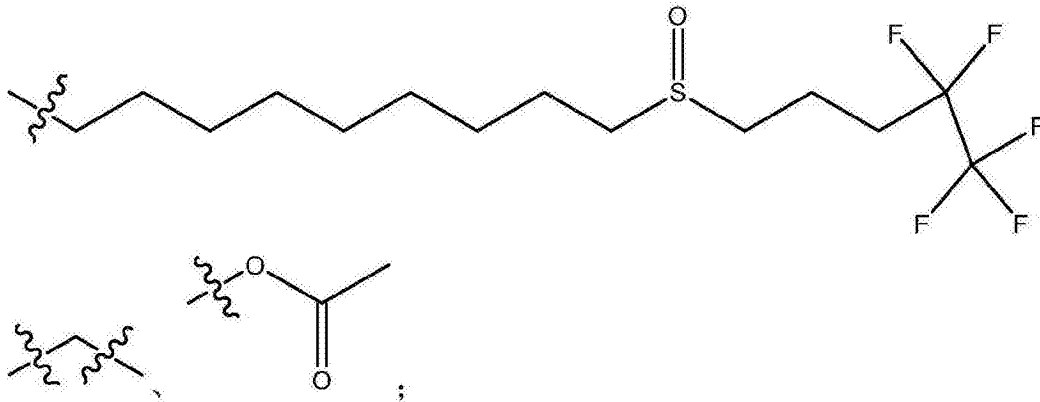


[0142] R₈选自:



[0143] R₉选自:





[0144] R_{10} 选自：;

[0145] m 为0-4, 优选1-4的任一整数。

[0146] 在具体的实施方式中, 本发明的通式中的所有取代基可以分别是本发明具体公开的任一化合物中的相应基团。

[0147] 具体地说, 本发明的化合物包括但不限于: 编号为1-65的化合物。

[0148] 由于本发明的化合物与人PD-1蛋白具有良好的结合亲和力, 这些化合物能作为PD-1/PD-L1结合的阻断剂或调解PD-1/PD-L1结合程度的调节剂。因此, 本发明化合物能够用于制备抑制PD-1与PD-L1结合或抑制肿瘤、或治疗细菌、病毒或真菌引起的感染或治疗炎症性疾病的药物; 例如, 一种药物组合物, 该组合物含有治疗有效量的本发明化合物或其药学上可接受的盐、前药或溶剂化物, 以及药学上可接受的载体或赋形剂。

[0149] 本发明的化合物显然还可以与其他机理的阻断PD-1/PD-L1通路的药物以及其他抗肿瘤药物联合以增强彼此的作用。因此, 上述药物组合物中还可包括药学上可接受的其他阻断PD-1/PD-L1通路的药物。例如, 所述其他阻断PD-1/PD-L1通路的药物包括但不限于: 靶向PD-1蛋白的nivolumab、pembrolizumab、pidilizumab、以及靶向PD-L1的MPDL3280A、MDX1105、MEDI4736等。在优选的实施方式中, 所述的药物组合物还可包括其他抗肿瘤药物, 所述抗肿瘤药物包括但不限于: Ipilimumab、ramucirumab、trametinib、ceritini、dabrafenib等。

[0150] 本发明化合物可以其药学上可接受的盐的形式施用, 所述药学上可接受的盐的例子包括但不限于: 无机和有机酸盐, 例如盐酸盐、氢溴酸盐、硫酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、酒石酸盐、马来酸盐、富马酸盐、扁桃酸盐和草酸盐; 以及与碱例如钠羟基、三(羟基甲基)氨基甲烷 (TRIS, 胺丁三醇) 和N-甲基葡糖胺形成的无机和有机碱盐。

[0151] 本领域技术人员熟知, 本发明的药物组合物的具体剂型取决于要采用的给药方式。例如, 本发明的药物组合物可采用的给药方式包括但不限于: 肠外, 皮下, 静脉, 肌肉, 腹腔内, 透皮, 口腔, 颅内, 鼻腔或外用途径给药形式, 用于治疗肿瘤或其他疾病。而药物组合物中活性成分的含量可由医学领域的技术人员根据, 例如患者的性别, 年龄, 总体健康状况等实际情况自主决定。

[0152] 基于本发明的化合物的活性, 本领域技术人员不难想到可将其制备成抑制PD-1与PD-L1结合的药物或抑制肿瘤、或治疗细菌、病毒或真菌引起的感染或治疗炎症性疾病的药物。

[0153] 在具体实施方式中,所述肿瘤包括但不限于:黑色素瘤、肺癌(优选非小细胞肺癌)、肾癌、卵巢癌、前列腺癌、乳腺癌、结肠癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈癌、子宫癌、直肠癌、肛门癌、胃癌、睾丸癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、何杰金氏病、非何杰金淋巴瘤、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、小儿实体瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管生成、脊轴瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮样癌、鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤。

[0154] 在其他实施方式中,所述抑制PD-1与PD-L1结合的药物还可用于治疗细菌、病毒或真菌感染。例如,以下病毒引起的感染:肝炎病毒(甲型、乙型和丙型)、疱疹病毒、流感病毒、腺病毒、冠状病毒、麻疹病毒、登革热病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒等;以下细菌引起的感染:衣原体、立克次氏体、分枝杆菌、葡萄球菌、肺炎球菌、霍乱、破伤风等;或以下真菌引起的致病感染:假丝酵母、曲霉、皮炎芽酵母等。

[0155] 在其他实施方式中,所述抑制PD-1与PD-L1结合的药物还可以用于治疗炎性疾病,包括但不限于:强直性脊柱炎、自身免疫性溶血性贫血、关节炎、重症肌无力、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、恶性贫血、多肌炎等。

[0156] 在本发明的化合物或药物组合物的基础上,本发明还提供了阻断PD-1与PD-L1结合的方法,包括利用本发明的化合物或药物组合物阻断PD-1与PD-L1结合的步骤。在具体的实施方式中,所述阻断PD-1与PD-L1结合的方法是体外非治疗性的。

[0157] 本发明的优点:

[0158] 1. 本发明首次发现了一系列甾体类衍生物;

[0159] 2. 本发明的化合物能与PD-1蛋白具有良好的结合,其中,结合亲和力最高的化合物与PD-1蛋白的结合情况优于天然PD-L1蛋白与PD-1蛋白的结合情况;

[0160] 3. 本发明的化合物具有较高的特异性,组织亲和力,不易产生免疫原性以及具有较好的组织渗透性;

[0161] 4. 本发明的化合物的生产成本较低。

[0162] 以下结合具体实施案例对本发明的技术方案进一步描述,但以下实施案例不构成对本发明的限制,所有依据本发明的原理和技术手段采用的各种施用方法,均属于本发明范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数按重量计算。

[0163] 实施例1. 人PD-1表达载体构建

[0164] 根据相关文献选取目的基因为人PD-1的34-150位氨基酸。利用NcoI和NdeI两个酶切位点将目的基因克隆到pET-28a载体上。首先根据NcoI和NdeI两个酶切位点设计特异性引物将人PD-1基因进行PCR扩增。之后利用传统克隆的方法将载体质粒和PCR产物分别利用NcoI和NdeI两个限制性内切酶进行双酶切,然后在T4连接酶的作用下进行连接形成重组质粒,最后将重组质粒转化到大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中。过夜培养后挑取单克隆进行鉴定。

[0165] 实施例2. 人PD-1蛋白的表达与纯化

[0166] 选取公司测序后序列完全匹配的菌液小培过夜,提质粒,然后将质粒转化到表达宿主E. coli BL21 (DE3)中,进行表达。挑取转化到E. coli BL21 (DE3)的单克隆,置于含有卡

那霉素的20mL 2×YT培养基中于37℃的摇床中培养过夜。次日将小培产物转移至含有卡那霉素的TB培养基中,37℃下培养至OD600为0.6-0.8,加入0.5mM IPTG在37℃下诱导5-7h。在4000rpm下离心收菌,用裂解缓冲液(50mM Tris-HCl,pH 8.0,50mM NaCl,1mM DTT,0.5mM EDTA,5%甘油)裂解大肠杆菌,然后再高压破碎,在12000rpm下离心60min,取沉淀。用洗杂缓冲液(20mM Tris-HCl,pH 8.0,2M尿素,2.5% Triton X-100)洗杂三次,取沉淀。然后再用溶解缓冲液(20mM Tris-HCl,pH 8.0,8M尿素)溶解蛋白,离心取上清。取3kDa的超滤浓缩管浓缩蛋白至5mL左右,加入到1L的复性缓冲液(50mM Tris-HCl,pH 8.0,50mM L-Arg,24mM NaCl,1mM KCl,1mM EDTA)中,用稀释法在4℃下复性24h。随后用3kDa的浓缩管浓缩蛋白,至20mL左右,将蛋白装入透析袋中,在透析缓冲液(50mM Tris-HCl,pH 8.0,150mM NaCl,1mM DTT)中透析过夜,目的是为了置换出复性buffer中的L-Arg。浓缩,过阳离子交换柱和分子筛进行纯化。将过完分子筛后的蛋白进行14% SDS-PAGE凝胶电泳,鉴定纯化后的蛋白纯度。结果如图1所示,所纯化得到的蛋白分子量在13kDa左右,与理论计算得到的人PD-1蛋白的分子量相符,并且蛋白纯度较高。

[0167] 实施例3.人PD-1蛋白的鉴定

[0168] 将纯化后的人PD-1蛋白进行14% SDS-PAGE凝胶电泳,然后进行转膜,设定转膜电流为300mA,转膜时间为45min。然后将膜用5%的脱脂奶粉在室温下封闭2h。取出后用鼠抗人PD-1单克隆抗体在4℃下孵育过夜,在1×TBST溶液中漂洗三次,用山羊抗鼠单克隆抗体在室温下孵育2h,在1×TBST溶液中漂洗三次。加入显影液后,在全自动化学发光图像分析系统下显影。结果如2所示,在10-15kDa之间有蛋白条带,并且能在PD-1抗体下显影,因此说明纯化得到的蛋白确实是人PD-1蛋白。

[0169] 实施例4.SPR进行小分子化合物的筛选及结合常数的测定

[0170] 实例中所用的化合物1-42购买于Adamas、TCI、Sigma、J&K公司,化合物43-53购买于specs公司,化合物54-65由第二军医大学张卫东教授惠赠。

[0171] 将小分子化合物通过Biacore T200进行表面等离子体共振(SPR)进行与人PD-1蛋白之间的结合情况的筛选,得到响应值比较高的化合物后进行结合常数的测定。具体实验步骤如下:首先将纯化后的蛋白换液至50mM Hepes,pH 8.0,250mM NaCl,1mM DTT缓冲液中,用pH4.5的醋酸钠将蛋白稀释至50μg/ml,使用氨基偶联试剂盒将蛋白偶联在CM7芯片上,以10μl/min的流速结合600s,最后的偶联量约为15000RU。偶联结束后。将CM7芯片用缓冲液(1.05×PBS,0.05%P20)平衡至稳定状态。然后用运行缓冲液(1.05×PBS,0.05%P20,1%DMSO)将化合物稀释至一系列不同浓度,随运行缓冲液流经芯片表面,流速30μL/min,结合时间90s,解离时间120s。最后数据用BIAevaluation2.0软件分析,利用稳态拟合得到KD值。下表1中列出了所测化合物的KD值。

[0172] 表1.本发明的小分子化合物与重组人PD-1蛋白的结合亲和力

	Id	K _D (μM)	Id	K _D (μM)	Id	K _D (μM)
[0173]	1	1.00	2	0.93	3	0.55
	4	0.87	5	5.44	6	1.83
	7	2.33	8	2.40	9	1.65
	10	2.03	11	2.70	12	1.71
	13	5.90	14	0.69	15	3.69
	16	3.91	17	2.36	18	6.89
	19	0.41	20	0.99	21	4.04
	22	9.21	23	6.03	24	0.36
	25	0.70	26	3.10	27	4.77
[0174]	28	4.31	29	4.49	30	1.88
	31	3.62	32	0.74	33	2.59
	34	6.11	35	15.32	36	1.37
	37	5.96	38	2.82	39	20.14
	40	9.25	41	3.15	42	0.70
	43	3.25	44	6.35	45	9.12
	46	8.56	47	7.48	48	3.00
	49	6.55	50	9.46	51	10.22
	52	9.99	53	6.58	54	4.89
	55	8.54	56	23.10	57	3.25
	58	1.36	59	6.21	60	3.22
	61	0.95	62	0.69	63	0.87
	64	6.25	65	3.95。		

[0175] 实施例5.用热迁移进行验证人PD-1与小分子化合物的结合

[0176] 将纯化好的人PD-1蛋白用测试缓冲液(50mM Hepes,pH8.0,250mM NaCl,1mM DTT)稀释至0.5mg/ml,再加入热迁移染料至终浓度为3×,加入化合物至终浓度400μM,最后取20 μL加入到96孔板中,冰上孵育10min。用Quantstudio flex 6RT-PCR来检测荧光值变化,设定温度从25℃慢慢升温至95℃,在升温过程中实时检测荧光值的强弱。用Protein Thermal Shift Software v1.0计算得到ΔT_m值。每次实验平行三组。结果如表2所示,表2中化合物的T_m值大于1.5℃,认为与蛋白之间有结合,并且可以稳定人PD-1之间的构象。

[0177] 表2.化合物作用于PD-1前后的ΔT_m值

[0178]

Id	ΔT _m (°C)
1	1.64
2	1.68
13	2.09
21	3.18

25	3.45
30	21.47
42	18.03

[0179] 实施例6.人PD-L1蛋白与小分子化合物2竞争性结合PD-1的SPR实验

[0180] 根据上述实例中的结果结果,本发明人选取化合物2与人PD-L1竞争性的结合PD-1,探究小分子化合物2是否可以阻断PD-1与PD-L1的结合。人PD-L1蛋白购买于北京义翘神州生物技术有限公司。具体实验步骤如下,通过氨基偶联的方法将50 μ g/ml人PD-L1蛋白偶联到CM5芯片上。偶联量约为3780RU。将不同浓度的化合物2与3 μ M人PD-1蛋白在冰上孵育30min。随运行缓冲液(1.05 \times PBS,0.05%P20,1%DMSO)流经芯片表面,流速30 μ L/min,结合时间90s,解离时间120s。最后数据用BIAevaluation2.0软件分析,结果如图3所示。随着小分子化合物2浓度升高,使结合在人PD-L1蛋白上的人PD-1蛋白降低,因此响应值降低。该实验结果可以表明小分子化合物2可以阻断人PD-1与人PD-L1的结合。

[0181] 实施例7.小分子化合物2联合给药的MTT细胞实验

[0182] 利用Western blot实验检测BxPC-3细胞中人PD-L1蛋白的表达量。结果显示BxPC-3中本身就会表达人PD-L1,加入500U/ml IFN- γ 刺激后,PD-L1的表达量有所增加。

[0183] MTT细胞实验具体步骤如下,首先进行细胞铺板,每孔5000个预先用IFN- γ (500U/ml)刺激过的肿瘤细胞BxPC-3。之后再加入预先用PHA,PMA激活过的10000个T细胞Jurkat共培养或者不加Jurkat作对照,同时加入不同浓度的小分子化合物2,培养72h。结果如图4所示。

[0184] 联合给药的MTT实验步骤如下,首先进行细胞铺板,每孔5000个预先用IFN- γ (500U/ml)刺激过的肿瘤细胞BxPC-3。之后再加入预先用PHA,PMA激活过的10000个T细胞Jurkat共培养,同时加入12.5 μ M化合物2,次日加入0.5 μ M的阳性药十字孢碱进行联合给药。继续培养48h。最后加入MTT,孵育4h后,吸走培养基,用100 μ l DMSO溶解MTT,在490nm处测其吸光值。结果如图4所示。

[0185] 讨论:本发明的甾体类小分子化合物2与人PD-1蛋白具有很好的结合,并能在一定程度上稳定人PD-1蛋白的构象,利用SPR实验测定其与人PD-1蛋白之间的KD值为0.93 μ M。并且通过小分子化合物2与人PD-L1竞争性的结合人PD-1的实验发现,该化合物在结合人PD-1的同时可以阻断人PD-1与人PD-L1的结合。最后通过联合给药的MTT实验得知我们的小分子化合物2可以通过阻断人PD-1与人PD-L1的结合使Jurkat细胞对肿瘤细胞具有一定的杀伤作用,并且与十字孢碱联合给药的效果更佳。

[0186] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

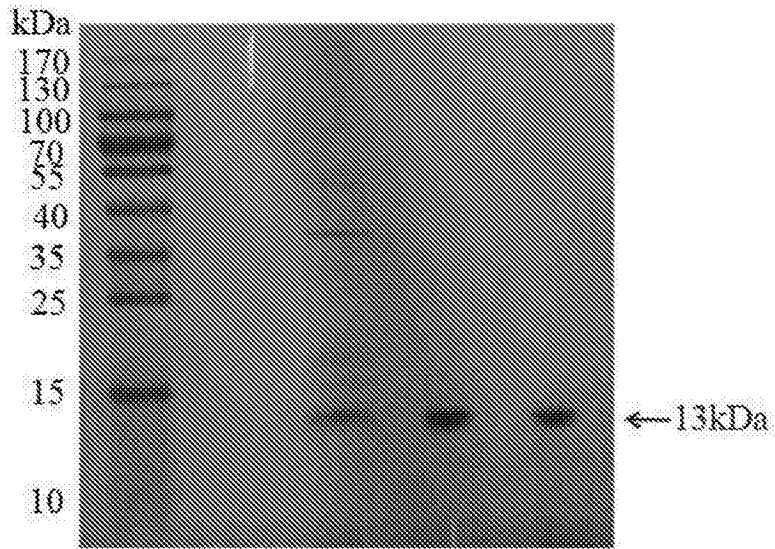


图1

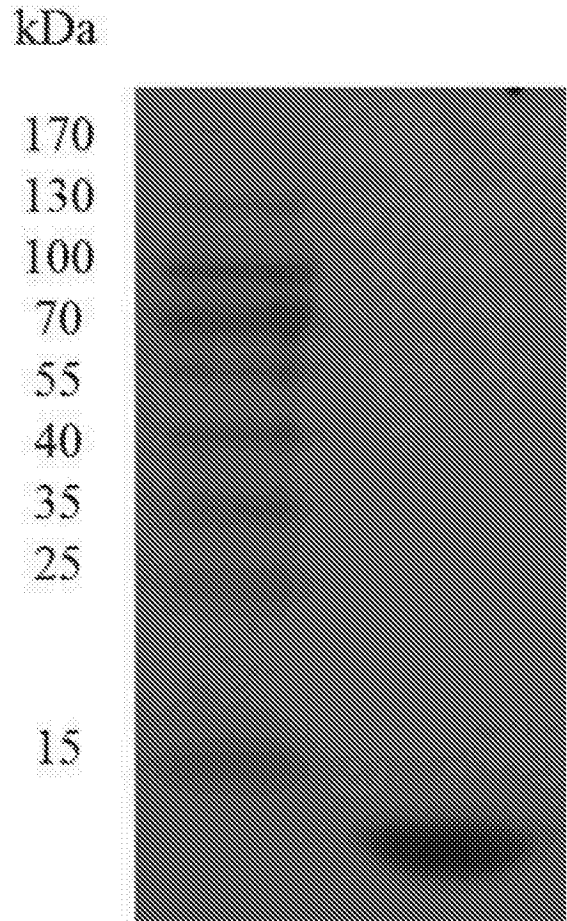


图2

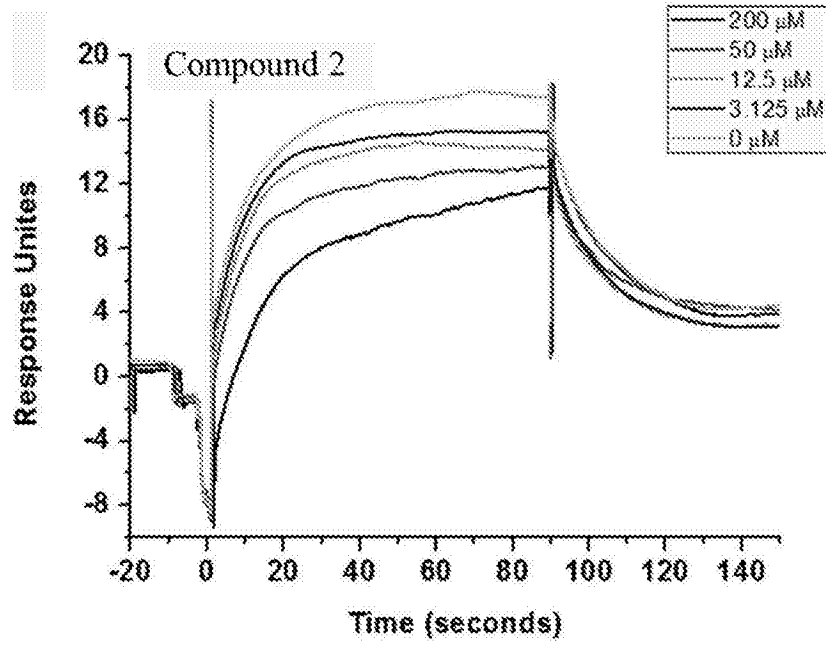


图3

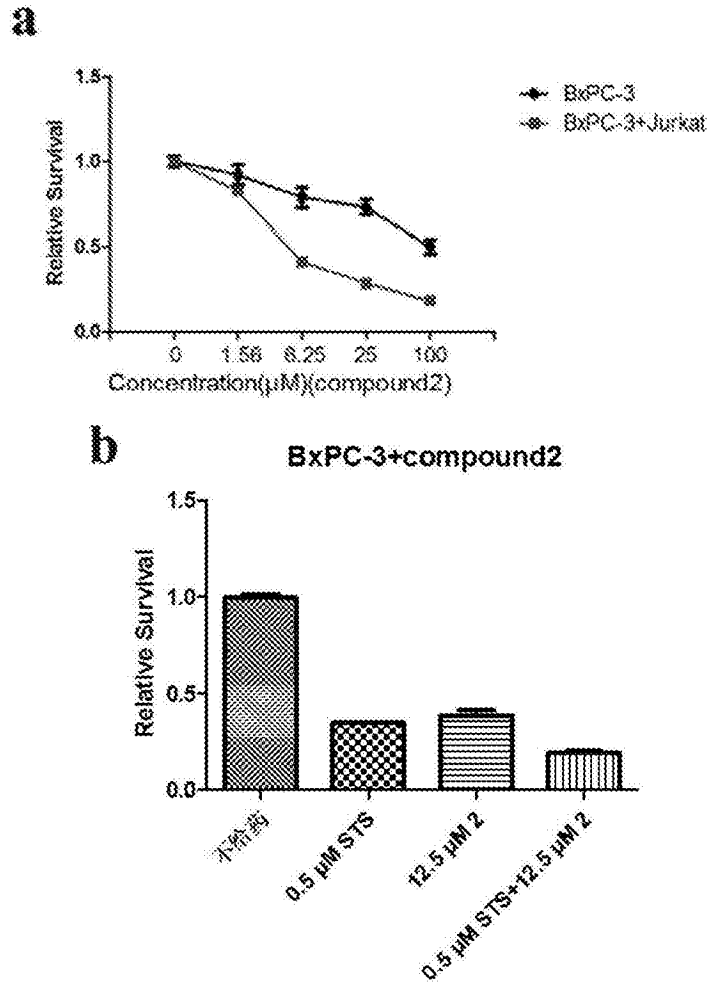


图4