(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116270644 A
(43)申请公布日 2023.06.23

(21)申请号 202310574464.2

(22)申请日 2023.05.22

(71)申请人 劲方医药科技(上海)有限公司
地址 201203 上海市浦东新区中国(上海)自由贸易试验区张江路1206号8幢2、3、4、5层

(72)发明人 周福生 兰炯 吕强

(74)专利代理机构 北京植众德本知识产权代理有限公司 16083
专利代理师 关巍

(51)Int.Cl.
A61K 31/496(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)
A61K 31/4433(2006.01)

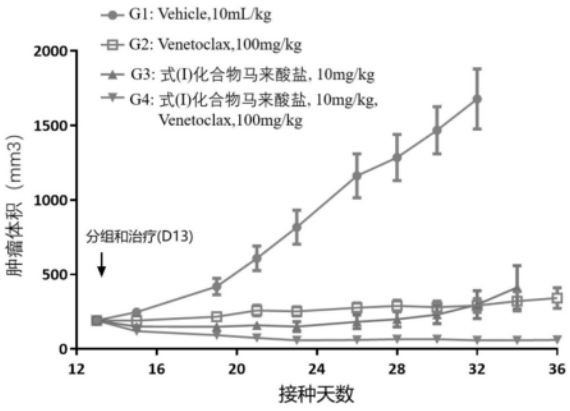
权利要求书1页 说明书11页 附图12页

(54)发明名称

CDK9抑制剂与BCL-2抑制剂联用的药物组合及其用途

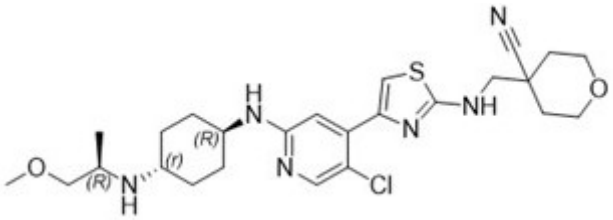
(57)摘要

本发明提供一种包括治疗有效量的CDK9抑制剂和治疗有效量的BCL-2抑制剂的药物组合物或药盒、其在制备治疗癌症的药物或药物组合或药盒中的应用以及CDK9抑制剂和BCL-2抑制剂的联用用途，该组合物在癌细胞中联合使用具有较好的协同效应。



CN 116270644 A

1.一种药物组合物或药盒，其特征在于，包括治疗有效量的CDK9抑制剂和治疗有效量的Venetoclax，所述CDK9抑制剂为式(I)化合物、其立体异构体、溶剂化物或其药学上可接受的盐。



(I)

2.根据权利要求1所述的药物组合物或药盒，其中，所述式(I)化合物的药学上可接受的盐包括马来酸盐和/或富马酸盐。

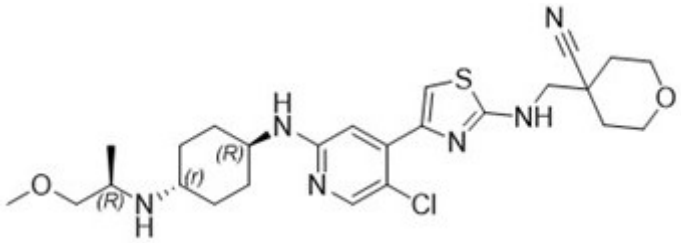
3.根据权利要求1所述的药物组合物或药盒，其中，所述CDK9抑制剂和Venetoclax的质量比例为0.004-250。

4.根据权利要求3所述的药物组合物或药盒，其中，所述CDK9抑制剂和Venetoclax的质量比例为20:(200-700)或20:(575-700)。

5.根据权利要求1所述的药物组合物或药盒，其中，所述CDK9抑制剂的给药剂量选自0.01-5000mg/天，BCL-2抑制剂的给药剂量选自0.01-1000mg/天。

6.根据权利要求1-5任一项所述的药物组合物或药盒在制备治疗CDK9介导的疾病或疾病状态的药物中的应用。

7.CDK9抑制剂与Venetoclax在制备治疗CDK9介导的疾病或疾病状态的药物或药盒或药物组合中的应用，所述CDK9抑制剂为式(I)化合物、其立体异构体、溶剂化物或其药学上可接受的盐。



(I)

8.根据权利要求7所述的应用，其中，所述式(I)化合物的药学上可接受的盐包括马来酸盐和/或富马酸盐。

9.根据权利要求7所述的应用，其中，所述CDK9抑制剂和Venetoclax的质量比例为0.004-250。

10.根据权利要求7所述的应用，其中，所述CDK9抑制剂和Venetoclax的质量比例为20:(200-700)或20:(575-700)。

11.根据权利要求6或7所述的应用，其中，所述CDK9介导的疾病或疾病状态为癌症。

12.根据权利要求11所述的应用，其中，所述癌症为实体瘤或血液瘤。

13.根据权利要求11所述的应用，其中，所述癌症为非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞癌、胰腺癌、前列腺癌、膀胱癌、肝癌、皮肤癌、神经胶质瘤、乳腺癌、黑色素瘤、恶性胶质瘤、横纹肌肉瘤、卵巢癌、星形胶质瘤、尤因氏肉瘤、成视网膜细胞瘤、上皮细胞癌、结肠癌、肾癌、胃肠间质瘤、白血病、淋巴癌和鼻咽癌。

CDK9抑制剂与BCL-2抑制剂联用的药物组合及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及医药技术领域，具体涉及一种包含CDK9抑制剂与BCL-2抑制剂的药物产品及其在治疗癌症中的用途。

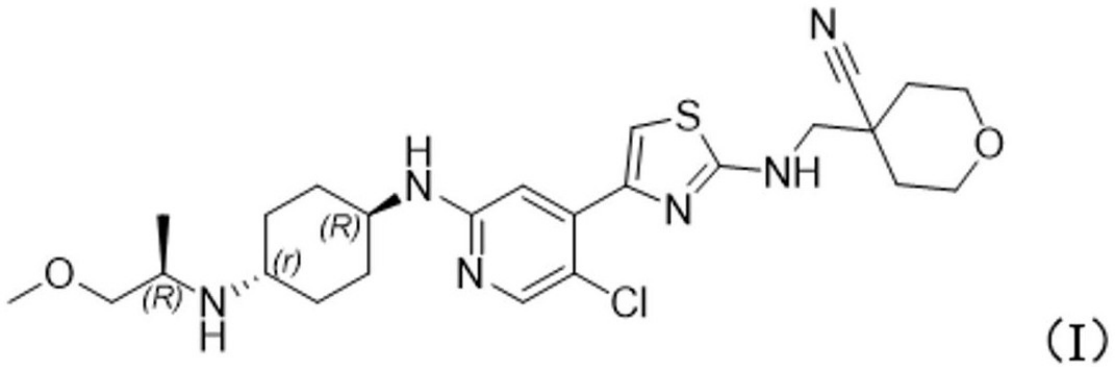
背景技术

[0002] 真核细胞的增殖分裂是一个精确而复杂的调控过程。增殖过程是通过细胞周期来完成的，细胞周期的有序进行是通过其严格的分子调控机制。目前已发现主要有三大类分子参与细胞周期调控:细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinases, CDK)、细胞周期蛋白(cyclins)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂(cyclin-dependent kinaseinhibitors,CKI)，其中CDK处于中心地位。CDK家族已发现13个成员(CDK1-CDK13)，研究发现CDK9的表达水平或(和)激酶活性的异常会引起细胞内多种蛋白表达或(和)其mRNA水平异常。据报道，在多种血液系统恶性肿瘤中存在CDK9通路失调，可以说CDK9 是肿瘤发生发展过程中最关键分子之一(Shapiro GI. J Clin Oncol, 2006, 24: 1770-83; Boffo S ,Damato A ,Alfano L ,et al .,Journal of Experimental&Clinical Cancer Research ,2018 ,37(1):36)。

[0003] 细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)抑制剂已被证明可用于治疗癌症。尽管作为单一疗法的CDK抑制剂在某些癌症中具有功效，但仍然需要开发有效剂量和给药方案，将CDK抑制剂与其他癌症治疗剂联合施用，以治疗、预防涉及细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)活性的疾病、障碍或病症。

发明内容

[0004] 本发明的一方面，提供一种药物组合物或药盒，其包括治疗有效量的CDK9抑制剂和治疗有效量的BCL-2抑制剂，所述CDK9抑制剂为式(I)化合物、其立体异构体、溶剂化物或其药学上可接受的盐。所述CDK9抑制剂和BCL-2抑制剂联合使用具有明显的协同效果。

[0005] 

(I)

[0006] 在一实施方案中，所述式(I)化合物的药学上可接受的盐包括马来酸盐和/或富马酸盐，优选为式(I)化合物的马来酸盐。

[0007] 在一实施方式中，所述BCL-2抑制剂特异性地抑制BCL-2蛋白，且不会抑制BCL-xl或BCL-w蛋白。

[0008] 在一实施方案中,所述BCL-2抑制剂包括选自Navitoclax (ABT-263)、Venetoclax (ABT-199)、Pelcitoclax (APG-1252)、A-1155463、A-1331852、ABT-737、Obatoclax、S44563、TW-37、AT101、HA14-1和Sabutoclax中的一种或多种。

[0009] 在一实施方案中,所述BCL-2抑制剂为Venetoclax (ABT-199)。

[0010] 在一实施方案中,所述药物组合物或药盒包含式(I)化合物的马来酸盐和Venetoclax (ABT-199)。

[0011] 在一实施方案中,所述CDK9抑制剂和BCL-2抑制剂的质量比例为0.001-1000,例如可以为0.001-1000、0.001-500、0.004-250、0.004-242.72、0.01-100或0.1-10。

[0012] 在一实施方式中,所述药物组合物或药盒包含1-1000nM CDK9抑制剂和1-1000nM BCL-2抑制剂。

[0013] 在一实施方式中,所述药物组合物或药盒包含4.12-1000 nM CDK9抑制剂。

[0014] 在一实施方式中,所述药物组合物或药盒包含10mg/kg CDK9抑制剂或相当于10 mg/kg CDK9抑制剂的药物剂量。

[0015] 在一实施方式中,所述药物组合物或药盒包含4.12-1000 nM BCL-2抑制剂。

[0016] 在一实施方式中,所述药物组合物或药盒包含100 mg/kg BCL-2抑制剂或相当于100 mg/kg BCL-2抑制剂的药物剂量。

[0017] 在一实施方式中,所述药物组合物或药盒包含1-1000 nM式(I)化合物马来酸盐和1-1000 nM Venetoclax (ABT-199)。

[0018] 在一实施方式中,所述药物组合物或药盒包含4.12-1000 nM式(I)化合物马来酸盐和4.12-1000 nM Venetoclax (ABT-199)。

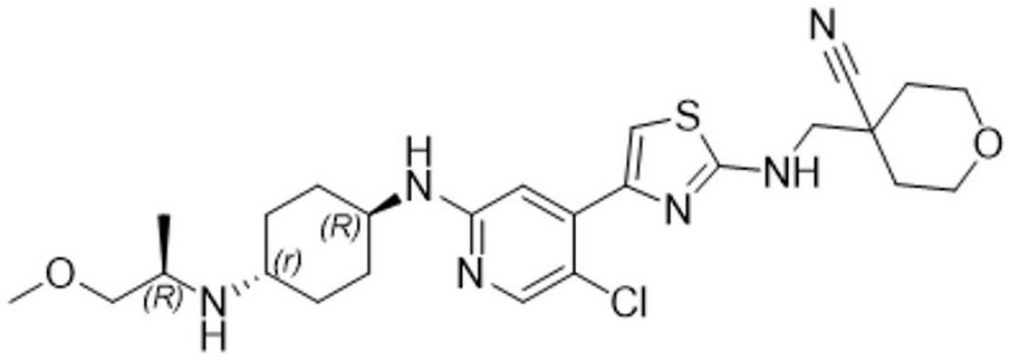
[0019] 在一实施方式中,所述药物组合物或药盒包含相当于10 mg/kg式(I)化合物马来酸盐和100 mg/kg Venetoclax (ABT-199)的药物剂量。

[0020] 在一实施方式中,所述药物组合物或药盒包含式(I)化合物马来酸盐和Venetoclax (ABT-199),其质量比例为0.004-250,例如可以为0.004-242.72、0.02-0.03、0.02-0.035、0.025-0.03或0.1。

[0021] 在一实施方式中,所述药物组合物或药盒包含式(I)化合物马来酸盐和Venetoclax (ABT-199),其质量比例为(4.12-1000):(4.12-1000),例如可以为20:(200-700)或20:(575-700)。

[0022] 本发明的另一方面,提供一种上述药物组合物或药盒在制备治疗CDK9介导的疾病或疾病状态的药物中的应用。

[0023] 本发明的另一方面,提供CDK9抑制剂与BCL-2抑制剂在制备治疗CDK9介导的疾病或疾病状态的药物或药盒或药物组合中的应用,所述CDK9抑制剂为式(I)化合物、其立体异构体、溶剂化物或其药学上可接受的盐。所述CDK9抑制剂和BCL-2抑制剂联合使用具有明显的协同效果。

[0024] 

(I)

[0025] 在一实施方案中,所述式(I)化合物的药学上可接受的盐包括马来酸盐和/或富马酸盐,优选为式(I)化合物的马来酸盐。

[0026] 在一实施方案中,所述BCL-2抑制剂特异性地抑制BCL-2蛋白。

[0027] 在一实施方案中,所述BCL-2抑制剂包括选自Navitoclax (ABT-263)、Venetoclax (ABT-199)、Pelcitoclax (APG-1252)、A-1155463、A-1331852、ABT-737、Obatoclax、S44563、TW-37、AT101、HA14-1和Sabutoclax中的一种或多种。

[0028] 在一实施方案中,所述BCL-2抑制剂为Venetoclax (ABT-199)。

[0029] 在一实施方案中,所述应用中CDK9抑制剂和BCL-2抑制剂的质量比例为0.001-1000,例如可以为0.001-1000、0.001-500、0.004-250、0.01-100或0.1-10。

[0030] 在一实施方式中,所述应用中CDK9抑制剂为式(I)化合物马来酸盐,所述BCL-2抑制剂为Venetoclax (ABT-199),其质量比例为0.004-250,例如可以为0.004-242.72、0.02-0.03、0.02-0.035、0.025-0.03或0.1。

[0031] 在一实施方式中,所述应用中CDK9抑制剂为式(I)化合物马来酸盐,所述BCL-2抑制剂为Venetoclax (ABT-199),其质量比例为(4.12-1000) : (4.12-1000),例如可以为20:(200-700)或20:(575-700)。

[0032] 本发明还提供CDK9抑制剂的给药剂量,其选自0.01-5000mg/天,优选为1-1500mg/天,可选为10mg/天、50mg/天、100mg/天、150mg/天、200mg/天、250mg/天、300mg/天、350mg/天、400mg/天、400mg/天、500mg/天、550mg/天、600mg/天、650mg/天、700mg/天、750mg/天、800mg/天、8500mg/天、900mg/天、950mg/天、1000mg/天、1200mg/天、1250mg/天、1300mg/天、1400mg/天、1500mg/天。

[0033] 本发明还提供BCL-2抑制剂的给药剂量,其选自0.01-1000mg/天,优选为1-500mg/天,可选为10mg/天、50mg/天、100mg/天、150mg/天、200mg/天、250mg/天、300mg/天、350mg/天、400mg/天、400mg/天、500mg/天、550mg/天、600mg/天、650mg/天、700mg/天、750mg/天、800mg/天、8500mg/天、900mg/天、950mg/天、1000mg/天。

[0034] 在一实施方案中,上述CDK9介导的疾病或疾病状态为癌症。

[0035] 在一实施方案中,所述癌症为实体瘤或血液瘤。

[0036] 在一实施方案中,所述癌症为非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞癌、胰腺癌、前列腺癌、膀胱癌、肝癌、皮肤癌、神经胶质瘤、乳腺癌、黑色素瘤、恶性胶质瘤、横纹肌肉瘤、卵巢癌、星形胶质瘤、尤因氏肉瘤、成视网膜细胞瘤、上皮细胞癌、结肠癌、肾癌、胃肠间质瘤、白血病、淋巴癌和鼻咽癌。

[0037] 在一实施方案中,所述疾病或疾病状态选自MDS-RAEB(骨髓增生异常综合征-原始

细胞增多症)、组织细胞性淋巴瘤、急性B细胞白血病、急性巨核细胞白血病、急性髓系白血病和急性早幼粒细胞白血病。

[0038] 本发明的另一方面,提供一种治疗癌症的方法,包括向有需要的受试者施用治疗有效量的上述CDK9抑制剂和治疗有效量的上述BCL-2抑制剂,其中,所述治疗有效量的CDK9抑制剂和治疗有效量的其他癌症治疗剂可以同时给药、独立地配制并共同给药或独立地配制并相继给药。

[0039] 在一实施方式中,所述治疗癌症的方法还包括向受试者施用其它疗法,所述其它疗法选自放射疗法、手术、化学疗法、基因疗法、DNA疗法、病毒疗法、RNA疗法、免疫疗法、骨髓移植、纳米疗法、单克隆抗体疗法、光疗法中的一种或多种。所述其它疗法可以是辅助疗法或新辅助疗法的形式。

附图说明

[0040] 图1为实施例1中式(I)化合物马来酸盐与Venetoclax联合作用对肿瘤细胞HL-60的生长抑制矩阵图。

[0041] 图2为实施例1中Bliss统计学模型中计算得到的平均协同值。

[0042] 图3为实施例1中HSA统计学模型中计算得到的平均协同值。

[0043] 图4为实施例1中Loewe统计学模型中计算得到的平均协同值。

[0044] 图5为实施例1中ZIP统计学模型中计算得到的平均协同值。

[0045] 图6为实施例2中式(I)化合物马来酸盐与Venetoclax联合作用对肿瘤细胞Kaumi-1的生长抑制矩阵图。

[0046] 图7为实施例2中Bliss统计学模型中计算得到的平均协同值。

[0047] 图8为实施例2中HSA统计学模型中计算得到的平均协同值。

[0048] 图9为实施例2中Loewe统计学模型中计算得到的平均协同值。

[0049] 图10为实施例2中ZIP统计学模型中计算得到的平均协同值。

[0050] 图11为实施例3中各组荷瘤小鼠的肿瘤生长曲线(平均值±标准误)。

[0051] 图12为实施例3中各组单只荷瘤小鼠的肿瘤生长曲线。

[0052] 图13为实施例3中荷瘤小鼠的相对动物体重变化(平均值±标准误)。

具体实施方式

[0053] I.定义和说明

除非另有说明,本文所用的下列术语和短语旨在具有下列含义。一个特定的术语或短语在没有特别定义的情况下不应该被认为是不确定的或不清楚的,而应该按照普通的含义去理解。当本文中出现商品名时,意在指代其对应的商品或其活性成分。

[0054] 如本文使用的和除非另作说明,术语“包含”,“包括”,“具有”,“含有”,包括其语法上的等同形式,通常应当理解为开放式且非限制性的,例如,不排除其他未列举的要素或步骤。

[0055] 如本文所用,术语“抑制”的使用是相对于对照的。本领域技术人员将容易地确定用于每个实验的适当对照。例如,将用化合物处理的受试者或细胞中的降低了的反应与未用化合物处理的受试者或细胞中的反应进行比较。本发明中所有范围的公开应当视为对范

围内所有子范围和所有点值的公开。例如:1-1000的公开应当视为也公开了1-200,200-300等范围,同时也公开了200、300、400、500、600、700、800、900和1000等点值。

[0056] 术语“药学上可接受的”,是针对那些化合物、材料、组合物和/或剂型而言,它们在可靠的医学判断的范围之内,适用于与人类和动物的组织接触使用,而没有过多的毒性、刺激性、过敏性反应或其它问题或并发症,与合理的利益/风险比相称。

[0057] 化合物可以作为药学上可接受的盐存在于药物组合物中。术语“药学上可接受的盐”是指本发明化合物的盐,由本发明发现的具有特定取代基的化合物与相对无毒的酸或碱制备。当本发明的化合物中含有相对酸性的功能团时,可以通过在纯的溶液或合适的惰性溶剂中用足够量的碱与这类化合物的中性形式接触的方式获得碱加成盐。药学上可接受的碱加成盐包括钠、钾、钙、铵、有机胺或镁盐或类似的盐。当本发明的化合物中含有相对碱性的官能团时,可以通过在纯的溶液或合适的惰性溶剂中用足够量的酸与这类化合物的中性形式接触的方式获得酸加成盐。药学上可接受的酸加成盐的实例包括无机酸盐,所述无机酸包括例如盐酸、氢溴酸、硝酸、碳酸,碳酸氢根,磷酸、磷酸一氢根、磷酸二氢根、硫酸、硫酸氢根、氢碘酸、亚磷酸等;以及有机酸盐,所述有机酸包括如乙酸、丙酸、异丁酸、马来酸、丙二酸、苯甲酸、琥珀酸、辛二酸、反丁烯二酸、乳酸、扁桃酸、邻苯二甲酸、苯磺酸、对甲苯横酸、柠檬酸、酒石酸、富马酸和甲磺酸等类似的酸;还包括氨基酸(如精氨酸等)的盐,以及如葡糖醛酸等有机酸的盐。本发明的某些特定的化合物含有碱性和酸性的官能团,从而可以被转换成任一碱或酸加成盐。

[0058] 本发明的药学上可接受的盐可由含有酸根或碱基的母体化合物通过常规化学方法合成。一般情况下,这样的盐的制备方法是:在水或有机溶剂或两者的混合物中,经由游离酸或碱形式的这些化合物与化学计量的适当的碱或酸反应来制备。

[0059] 除了盐的形式,本发明所提供的化合物还存在前药形式。本文所描述的化合物的前药容易地在生理条件下发生化学变化从而转化成本发明的化合物。此外,前体药物可以在体内环境中通过化学或生化方法被转换到本发明的化合物。例如,当将前药置于具有合适的酶或化学试剂的透皮贴剂储库中时,可以将前药缓慢转化为本发明的化合物。

[0060] 本发明的某些化合物可以以非溶剂化形式或者溶剂化形式存在,包括水合物形式。一般而言,溶剂化形式与非溶剂化的形式相当,都包含在本发明的范围之内。溶剂化形式通常与非溶剂化形式等价,应包括在本发明范围内。本发明的某些化合物可以多晶型或无定形形式存在。通常,就本发明所考虑的应用而言,所有物理形式是等价的,应包括在本发明范围内。

[0061] 本发明的化合物可以存在特定的几何或立体异构体形式。本发明设想所有的这类化合物,包括顺式和反式异构体、(-)-和(+)-对映体、(R)-和(S)-对映体、非对映异构体、(D)-异构体、(L)-异构体、阻转异构体(或也可以称为旋转异构体)等,及其外消旋混合物和其他混合物,例如对映异构体或非对映体富集的混合物,所有这些混合物都属于本发明的范围之内。

[0062] 本文所披露的化合物可以作为阻转异构体存在,其为在由于与分子其他部分的空间相互作用,围绕分子中单键的旋转被阻止或大大减慢时出现的构象立体异构体。本文所披露的化合物包括作为纯的个别阻转异构体制剂、每一种的富集制剂或者每一种的非特定混合物的所有阻转异构体。如果围绕单键的旋转势垒足够高,并且构象之间的互变足够缓

慢，那么可以容许异构体种类的分离和分开。异构体种类的分离和分开通过熟知并且广为接受的符号“M”或“P”适当表示。术语“癌症”是指以异常细胞的不受控制的生长为特征的疾病。癌细胞可以局部或通过血流和淋巴系统扩散到身体的其他部位。本文描述了各种癌症的实例，包括但不限于非小细胞肺癌、小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞癌、胰腺癌、前列腺癌、膀胱癌、肝癌、皮肤癌、神经胶质瘤、乳腺癌、黑色素瘤、恶性胶质瘤、横纹肌肉瘤、卵巢癌、星形胶质瘤、尤因氏肉瘤、成视网膜细胞瘤、上皮细胞癌、结肠癌、肾癌、胃肠间质瘤、白血病、淋巴癌、和鼻咽癌等。术语“肿瘤”和“癌症”在本文中可互换使用，例如，这两个术语包括固体和液体，例如弥漫性或循环性肿瘤。如本文所用，术语“癌症”或“肿瘤”包括癌前病变以及恶性癌症和肿瘤。

[0063] 本发明中所述“有效量”或“治疗有效量”包含足以改善或预防医学病症的症状或病症的量。有效量还意指足以允许或促进诊断的量。用于特定患者或兽医学受试者的有效量可依据以下因素而变化：如待治疗的病症、患者的总体健康情况、给药的方法途径和剂量以及副作用严重性。有效量可以是避免显著副作用或毒性作用的最大剂量或给药方案。

[0064] “受试者”、“个体”或“患者”在本文可互换使用，它们是指脊椎动物，优选地哺乳动物，更优选地人。哺乳动物包括但不限于小鼠、猿、人、农场动物、竞技动物和宠物。

[0065] 所施用的化合物的量可以取决于所治疗的受试者、受试者的年龄、健康状况、性别和体重、并行治疗(如果有)的种类、病情的严重程度、所需效果的性质、治疗的方式和频率以及开处方医师的判断。给药频率还可以取决于对动脉氧分压的药效学作用。然而，可以根据个别受试者调整最优选的剂量，如本领域技术人员所理解并且不经过度实验即可确定的。这通常包括调整标准剂量(例如，如果患者体重低，那么减小剂量)。

[0066] 术语“药物组合物”是指一种或多种本中请的化合物或其盐与药学上可接受的载体组成的混合物。药物组合物的目的是有利于对有机体给予本申请的化合物。发明的药物组合物可包括一种或多种药学上可接受的盐、抗氧化剂、水性和非水性载体、和/或佐剂，如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。

[0067] 本发明的所述“药物组合物”还可以以任何合适的给药方式，例如口服、肠胃外、直肠、经肺或局部给药等方式施用于需要这种治疗的患者或受试者。当用于口服给药时，所述药物组合物可制成口服制剂，例如口服固体制剂，如片剂、胶囊剂、丸剂、颗粒剂等；或，口服液体制剂，如口服溶液剂、口服混悬剂、糖浆剂等。当制成口服制剂时，所述药物制剂还可包含适宜的填充剂、粘合剂、崩解剂、润滑剂等。

[0068] 术语“药学上可接受的载体”是指对有机体无明显刺激作用，而且不会损害该活性化合物的生物活性及性能的那些辅料。合适的辅料是本领域技术人员熟知的，例如碳水化合物、蜡、水溶性和/或水可膨胀的聚合物、亲水性或疏水性材料、明胶、油、溶剂、水、脂质体、聚合物胶束或无机纳米载体等。

[0069] 本发明的药物组合物可以制成药学上可接受的任一剂型，用于经口、经鼻、局部(包括口腔和舌下)、经直肠、经阴道和/或胃肠外给予，例如，可以配制成片剂、锭剂、胶囊剂、丸剂、溶液剂、混悬剂、糖浆剂、注射剂、栓剂、吸入剂或喷雾剂。

[0070] 术语“协同效应(synergism)”指的是联合应用的两种药物的作用比它们单独作用更为有效的现象，相对于拮抗作用。

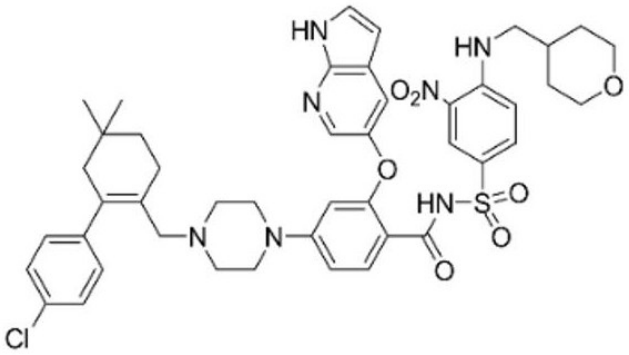
[0071] 术语“治疗”包括预防和治疗，例如，治疗CDK9介导的疾病包括预防和/或治疗CDK9

介导的疾病。

[0072] 本发明所述“联合”的给药方式选自同时给药、独立地配制并共同给药或独立地配制并相继给药。

[0073] 本发明中，所谓“联合”或“联用”是一种给药方式，其包括两种药物先后，或同时给药的各种情况，此处所谓“同时”是指在同一给药周期给予CDK9抑制剂与BCL-2抑制剂，例如在2天内，或1天内给予两种药物。所谓“先后或相继”给药，则包括在不同给药周期内分别给予CDK9抑制剂与BCL-2抑制剂的情况。这些给药方式，均属于本发明所述的联合给药。

[0074] 本发明所述BCL-2抑制剂包括其、其立体异构体、溶剂化物或其药学上可接受的盐。例如，在一个实施方案中，本发明所述药物组合物包括式(I)化合物与Venetoclax(

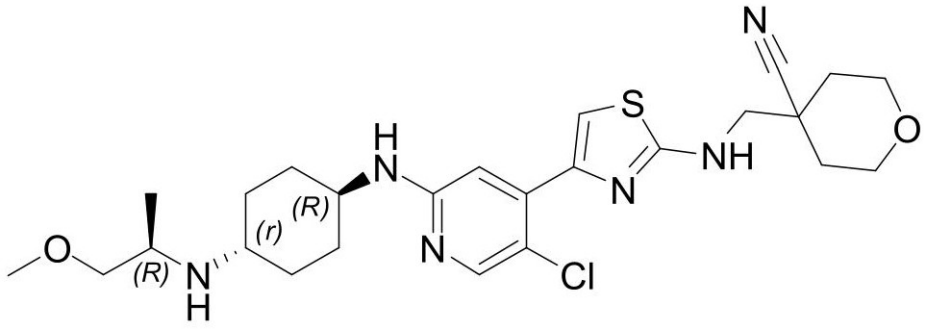


，II)，又称ABT199或ABT-199、GDC0199，意即包括使用Venetoclax或式(II)所示化合物的立体异构体、溶剂化物或其药学上可接受的盐。

[0075] II.具体实施方式

本发明中公开的CDK抑制剂是一种有效的、选择性的 CDK9 抑制剂，结构式如下式(I)所示，其名称为4-(((4-(5-氯-2-(((1R,4r)-4-(((R)-1-甲氧基丙基-2-基)氨基)环己基)氨基)吡啶-4-基)噻唑-2-基)氨基)甲基)四氢-2H-吡喃-4-甲腈，式(I)化合物及其药学上可接受的盐的制备方法公布于国际申请专利PCT/CN 2018/070108和PCT/CN2020/094527中。

[0076]



(I)

式(I)化合物的一种立体异构体为4-(((4-(5-氯-2-(((1S,4r)-4-(((S)-1-甲氧基丙-2-基)氨基)环己基)氨基)吡啶-4-基)噻唑-2-基)氨基)甲基)-四氢-2H-吡喃-4-甲腈。

[0077] 式(I)化合物的另一种立体异构体为4-(((4-(5-氯-2-(((1R,4s)-4-(((S)-1-甲氧基丙-2-基)氨基)环己基)氨基)吡啶-4-基)噻唑-2-基)氨基)甲基)-四氢-2H-吡喃-4-甲腈。

[0078] 式(I)化合物的另一种立体异构体为4-(((4-(5-氯-2-(((1S,4s)-4-(((R)-1-甲

氧基丙-2-基)氨基)环己基)氨基)吡啶-4-基)噻唑-2-基)氨基)甲基)-四氢-2H-吡喃-4-甲腈。

[0079] 细胞培养(实施例1-2)

倒置显微镜下观察细胞生长状态,选取处于对数生长期的细胞,在生物安全柜中进行无菌操作。转移细胞悬液到离心管中,离心沉淀细胞,吸弃上清,用新鲜完全培养基重悬细胞,然后按恰当比例分散到新的培养瓶,放入37℃,5% CO_2培养箱中培养。

[0080] 联用组细胞存活比例计算方法

两药合用后的细胞存活比例(% cell survival rate)计算公式为:细胞存活比例=(1-(DMSO对照RLU-药物RLU)/(DMSO对照RLU-空白对照RLU))×100%。DMSO对照为不含药物的溶媒对照,空白对照为不含药物和溶媒的培养基对照。

[0081] 细胞存活比例计算结果解读

细胞存活比例计算结果图中(图1、图6),横坐标为本申请式(I)化合物马来酸盐的浓度(药物在孔溶液中的有效浓度),纵坐标为联用药物的浓度(药物在孔溶液中的有效浓度),分别以横坐标和纵坐标浓度刻度为垂点作垂线,两条垂线的交点所在网格中的数值为使用该两个浓度的药物联用组的细胞存活比例。例如,图1中,横坐标读值为37.04 nM,纵坐标读值为0 nM,分别以该两个浓度刻度为垂点作垂线,两条垂线的交点所在网格中的数值为82.8,则细胞存活比例为82.8%,表明Venetoclax浓度为0 nM,即,式(I)化合物马来酸盐单独用药时,细胞存活比例为82.8%。

[0082] 协同效应评价方法

采用统计学方法评价两种药物联用对肿瘤细胞的联用效果。使用的统计学软件为R systems,统计学模型为Bliss、HSA、Loewe、ZIP,当协同值＞5为有协同效应,协同值＞10为有明显的协同效应,协同值＜-5为拮抗效应,协同值＜-10为有明显的拮抗效应。通过协同值进一步判断两种药物联合用药的最终药效。

[0083] 实施例1 式(I)化合物马来酸盐与BCL-2抑制剂Venetoclax联合作用对HL-60肿瘤细胞的影响

将人急性早幼粒性白血病细胞HL-60 (ATCC, CCL-240)以每孔5000个细胞的数量接种到96孔板,待细胞贴壁(24h)后,加入式(I)化合物马来酸盐与Venetoclax药物稀释成一定的梯度浓度,每浓度2个复孔加药。6h后用Cell Titer-Glo法进行细胞活力检测,每孔加入1/2体积的 CellTiter Glo裂解液(Progema, G7573),震板2分钟,静置10分钟,在仪器Envision上读取RLU值。

[0084] 细胞存活比例计算结果如图1所示,在人急性早幼粒性白血病细胞HL-60中,式(I)化合物马来酸盐在37.04 nM时的细胞存活率为82.8%,Venetoclax在1000 nM时的细胞存活率为64.5%,37.04 nM的式(I)化合物马来酸盐与1000 nM 的Venetoclax联用的细胞存活率为26.4%。

[0085] 联用效果如图2-5所示,在人急性早幼粒性白血病细胞HL-60中,4.12 nM-1000 nM的式(I)化合物马来酸盐与4.12 nM-1000 nM的Venetoclax联用,通过Bliss(图2)、HSA(图3)、Loewe(图4)、ZIP(图5)四种统计学模型中计算得到的平均协同值分别为21.302、21.319、19.075、21.814,均远大于5。表明式(I)化合物马来酸盐与Venetoclax在肿瘤细胞中联合使用具有很好的协同效应。

[0086] 实施例2 式(I)化合物马来酸盐与BCL-2抑制剂Venetoclax联合作用对Kaumi-1肿瘤细胞的影响

将人急性淋巴白血病细胞Kasumi-1(ATCC, CRL-2724)以每孔4000个细胞的数量接种到96孔板,待细胞贴壁(24h)后,加入式(I)化合物马来酸盐与Venetoclax药物稀释成一定的梯度浓度,每浓度2个复孔加药。24h后用Cell Titer-Glo法进行细胞活力检测,每孔加入1/2体积的 CellTiter Glo裂解液(Progema, G7573),震板2分钟,静置10分钟,在仪器Envision上读取RLU值。

[0087] 细胞存活比例计算结果如图6所示,在人急性淋巴白血病细胞Kasumi-1中,式(I)化合物马来酸盐在37.04 nM时的细胞存活率为54.4%,Venetoclax在1000 nM时的细胞存活率为40.9%,37.04 nM的 式(I)化合物马来酸盐与1000 nM 的Venetoclax联用的细胞存活率为2.7%。

[0088] 联用效果如图7-10所示,在人急性淋巴白血病细胞Kasumi-1中,4.12 nM-1000 nM的式(I)化合物马来酸盐与4.12 nM-1000 nM的Venetoclax联用,通过Bliss(图7)、HSA(图8)、Loewe(图9)、ZIP(图10)四种统计学模型中计算得到的平均协同值分别为5.502、12.611、9.139、5.924,均大于5。表明式(I)化合物马来酸盐与Venetoclax在肿瘤细胞中联合使用具有很好的协同效应。

[0089] 实施例3 式(I)化合物马来酸盐与BCL-2抑制剂Venetoclax联合使用在HL-60人急性早幼粒细胞白血病模型上的体内抗肿瘤药效学评价

材料和试剂:

HL-60(ATCC, CCL-240),青霉素-链霉素(Gibco, 15140-122),IMDM (Gibco, 12440053),FBS (Gibco, 10099-141C),KH_2PO_4(General reagent, G82821B),DMSO (AMRESCO, 231)。

[0090] 实验过程中每天观察动物的健康状况,如动物体重下降10%,给药剂量减半;体重下降15%,停止给药直到体重恢复;或动物瘤体积超过2,000 mm^3,立即处以安乐死。健康状况出现以下情况,通知兽医并处以安乐死:

明显消瘦,体重降低大于20%。

[0091] 不能自由取食和饮水。

[0092] 动物出现感染、肿瘤严重破溃或血瘤。

[0093] 动物出现以下临床症状且持续恶化:立毛、弓背、耳、鼻眼或足色发白、呼吸急促、抽搐、腹泻、疼痛、脱水、濒死。

[0094] 实验动物:

BALB/c裸小鼠,6-8周龄,雌性,购买于北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号20170011005453,饲养环境SPF级。

[0095] 实验药物:

Venetoclax(ABT199)购自上海与昂化工有限公司,批号1257044-40-8。

[0096] 配置方法: 式(I)化合物马来酸盐尾静脉注射,溶媒为50 mM的PBS(将0.3402 g KH_2PO_4溶解到50 mL超纯水中,调节pH=7.0-7.2,高压灭菌);Venetoclax溶媒为5%DMSO+50% PEG400+5%Tween80+ddH_2O,高压灭菌。

[0097] 实验方法及步骤:

HL-60细胞用IMDM培养基，添加20% FBS和1%青霉素-链霉素，在37℃，5% CO_2的培养箱中培养。收集细胞，调整细胞密度为2.0×10^8/mL；小鼠右侧背部皮下接种，接种体积为每只动物0.20 mL(含50% Matrigel)，接种量为每只动物2×10^7个细胞。当肿瘤长到140-230 mm^3时(D13)，从中挑选32只荷瘤鼠，随机分为4组，每组8只小鼠，给药方法按照表1的实验方案进行。小鼠给药体积均为10 mL/kg。每天用电子天平对动物进行称重，每周3次用游标卡尺测量肿瘤体积。

[0098] 表1 治疗药物的给药方案

组别	治疗药物	动物数	给药途径	剂量(mpk)	给药频率	给药周期(天)
G1	Vehicle	8	p.o	--	q.d	23
G2	Venetoclax	8	p.o	100	q.d	23
G3	式（I）化合物马来酸盐	8	i.v.	10	biw	23
G4	式（I）化合物马来酸盐+Venetoclax	8	i.v+p.o	式（I）化合物马来酸盐10、Venetoclax 100	biw +q.d	23

[0099] 注：p.o 为口服；i.v 为尾静脉注射；q.d为每天一次；biw为每周2次，连续给药2天，停药5天。

[0100] 主要评价指标为：

肿瘤体积：Tumor volume (TV) = $(L\times W^2)/2$，其中L为肿瘤的长径，W为肿瘤的宽径。

[0101] 肿瘤生长抑制率(tumor growth inhibition, TGI)：

TGI (%) = $[1-(avT_{i-0}/avC_{i-0})]\times100\%$；其中avTi-0是给药组在特定天的平均肿瘤体积，减去该给药组在开始给药当天的平均肿瘤体积；其中avCi-0是溶媒对照组在特定天的平均肿瘤体积，减去溶媒对照组在开始给药当天的平均肿瘤体积。

[0102] 瘤重抑制率(tumor weight inhibition, TWI)：

瘤重的抑制率(TWI)=$(1-TW_{treatment/Dx}/TW_{control/Dx})\times100\%$; 其中$TW_{control}$: 对照组平均肿瘤重量(g)，$TW_{treatment}$: 治疗组平均肿瘤重量(g)。

[0103] 相对体重变化(Relative change of body weight, RCBW)：

RCBW (%) = $(BW_i-BW_0)/BW0\times100\%$；其中$BW_i$是动物在特定天的体重，$BW_0$是该动物在开始给药当天的体重。

[0104] 实验结果及结论

所有实验数据的分析和作图都使用GraphPad Prism 软件(GraphPad Software)完成。各组的肿瘤体积和动物体重用双因素方差分析(Two-way ANOVA，Dunnett's multiple comparisons test)进行统计学比较，终点时各组的肿瘤重量用单因素方差分析(One-way ANOVA，Dunnett's multiple comparisons test)进行统计学比较。当$P<0.05$时，认为具有统计学显著性差异。肿瘤体积、重量和动物体重均以平均值(Mean)±标准误(SEM)表示。结果如下表2所示。

[0105] 表2

组别	肿瘤体积（mm^3）		TGI Day32(%)	体重		RCBW Day32(%)
	接种后 Day 13	接种后 Day32		接种后 (Day 13, g)	接种后 (Day 32, g)	
G1	191.72±9.73	1677.88±201.67	--	19.26±0.25	21.46±0.35	11.47±2.07
G2	191.32±11.36	291.53±45.75***	93.3	19.90±0.27	20.18±0.21	1.47±0.91***
G3	191.04±10.11	297.60±93.88***	92.8	19.60±0.36	20.07±0.40	2.41±1.05**
G4	191.38±8.69	58.55±10.73***	108.9	19.85±0.21	19.79±0.30	-0.36±0.67***

[0106] 注:**p＜0.01,***p＜0.001,分别与G1溶媒对照组比较。

[0107] 各治疗组对HL-60荷瘤鼠的肿瘤生长的影响(见图11和图12);各组荷瘤鼠的体重变化见图13。

[0108] 结果表明,在HL-60人急性早幼粒细胞白血病模型上,式(I)化合物马来酸盐以10mg/kg每周两次(连续给2天,停药5天)经尾静脉注射给药,及Venetoclax以100mg/kg每天一次经口服,对动物体重无明显影响,均能显著性抑制HL-60肿瘤生长,且式(I)化合物马来酸盐与Venetoclax联合使用显著优于各自单药的药效。

[0109] 前述对本发明的具体示例性实施方案的描述是为了说明和例证的目的。这些描述并非想将本发明限定为所公开的精确形式,并且很显然,根据上述教导,可以进行很多改变和变化。对示例性实施例进行选择和描述的目的在于解释本发明的特定原理及其实际应用,从而使得本领域的技术人员能够实现并利用本发明的各种不同的示例性实施方案以及各种不同的选择和改变。本发明的范围意在由权利要求书及其等同形式所限定。

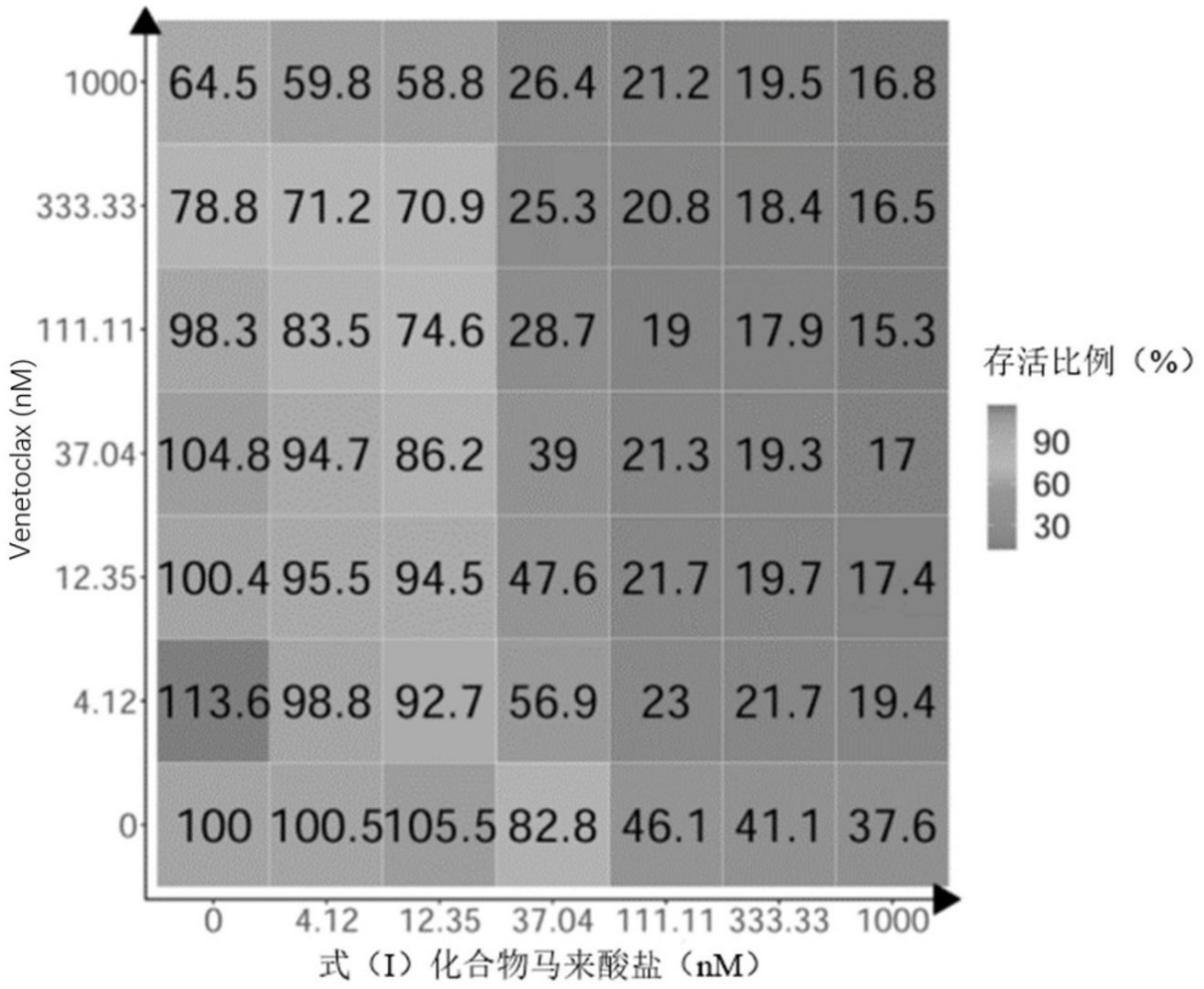

Venetoclax (nM)
1000
333.33
111.11
37.04
12.35
4.12
0
64.5 59.8 58.8 26.4 21.2 19.5 16.8
78.8 71.2 70.9 25.3 20.8 18.4 16.5
98.3 83.5 74.6 28.7 19 17.9 15.3
104.8 94.7 86.2 39 21.3 19.3 17
100.4 95.5 94.5 47.6 21.7 19.7 17.4
113.6 98.8 92.7 56.9 23 21.7 19.4
100 100.5 105.5 82.8 46.1 41.1 37.6
0 4.12 12.35 37.04 111.11 333.33 1000
式（I）化合物马来酸盐（nM）
存活比例（%）
90
60
30

图 1

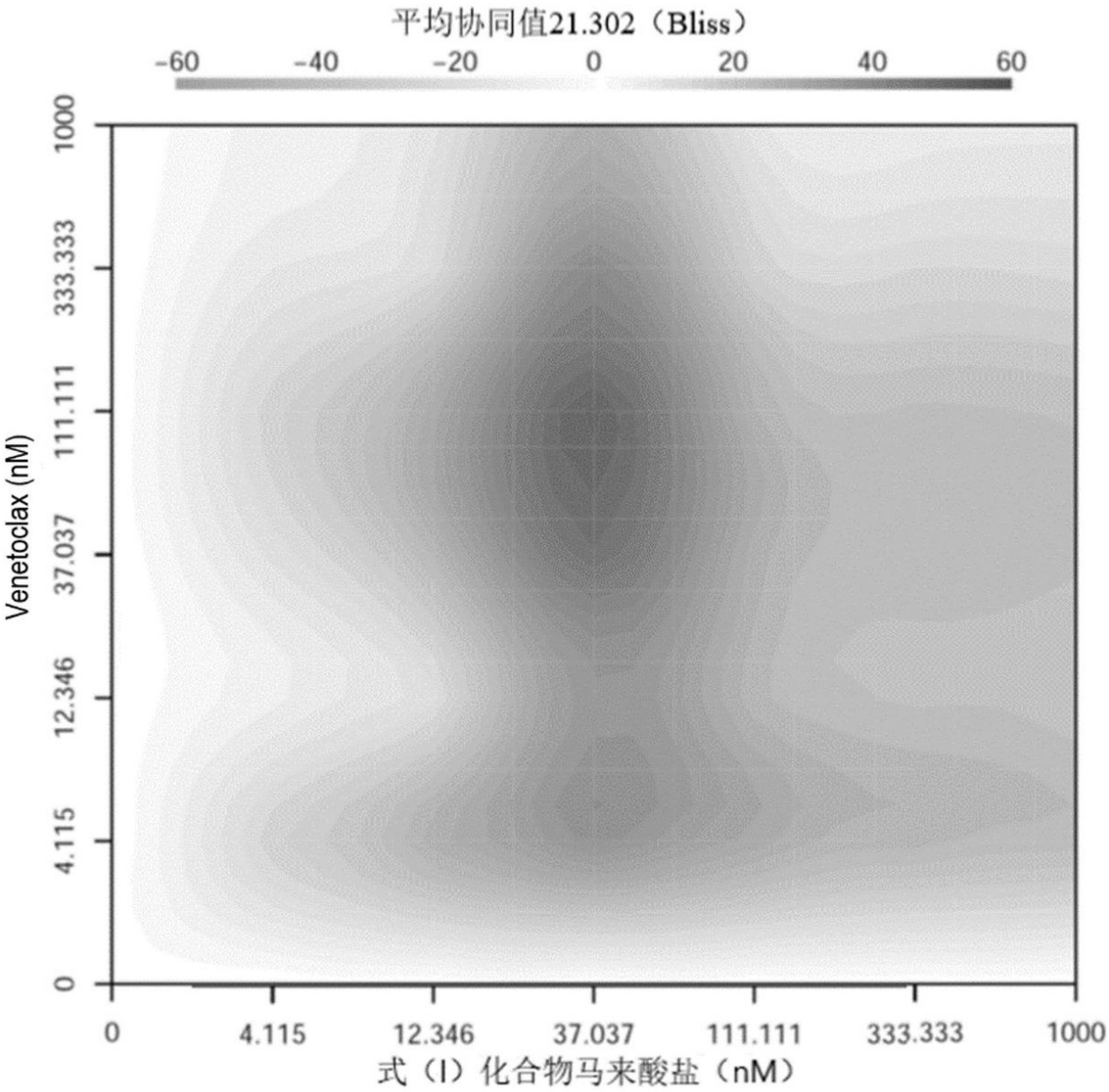

平均协同值21.302（Bliss）
-60
-40
-20
0
20
40
60
Venetoclax (nM)
0
4.115
12.346
37.037
111.111
333.333
1000
式（I）化合物马来酸盐（nM）

图 2

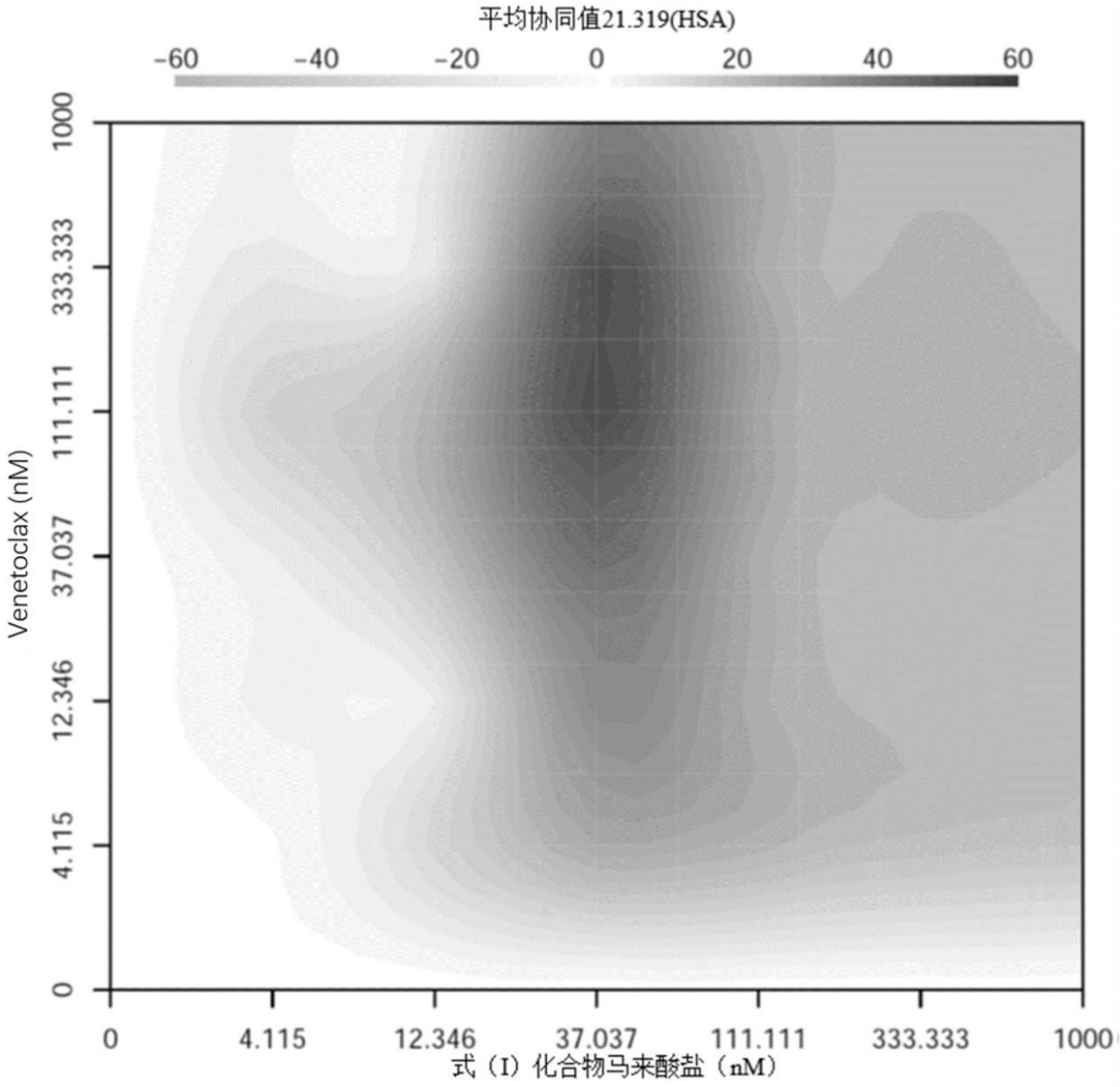

平均协同值21.319(HSA)
-60
-40
-20
0
20
40
60
Venetoclax (nM)
0
4.115
12.346
37.037
111.111
333.333
1000
式（I）化合物马来酸盐（nM）

图 3

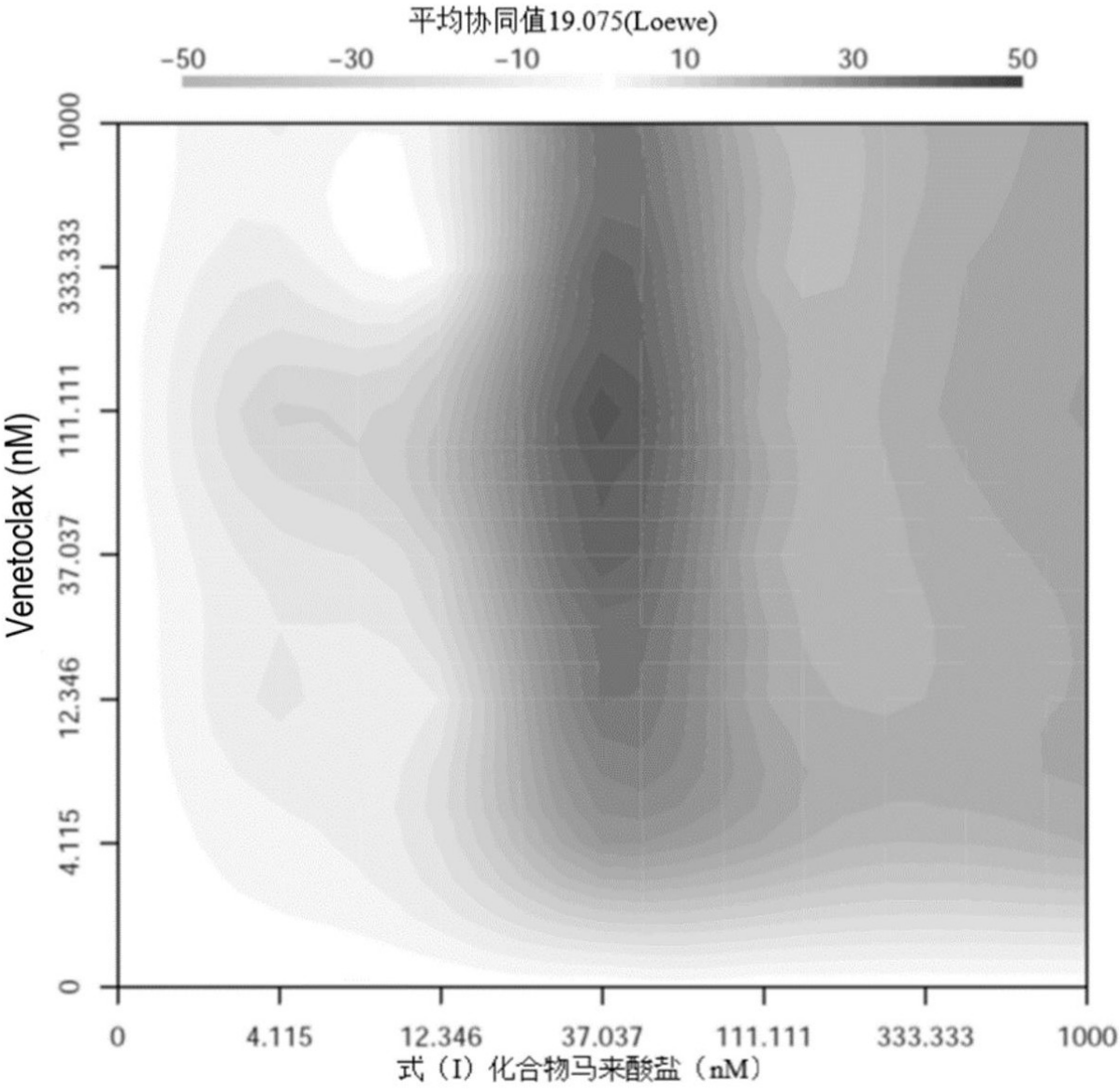

平均协同值19.075(Loewe)
-50
-30
-10
10
30
50
Venetoclax (nM)
0
4.115
12.346
37.037
111.111
333.333
1000
式（I）化合物马来酸盐（nM）

图 4

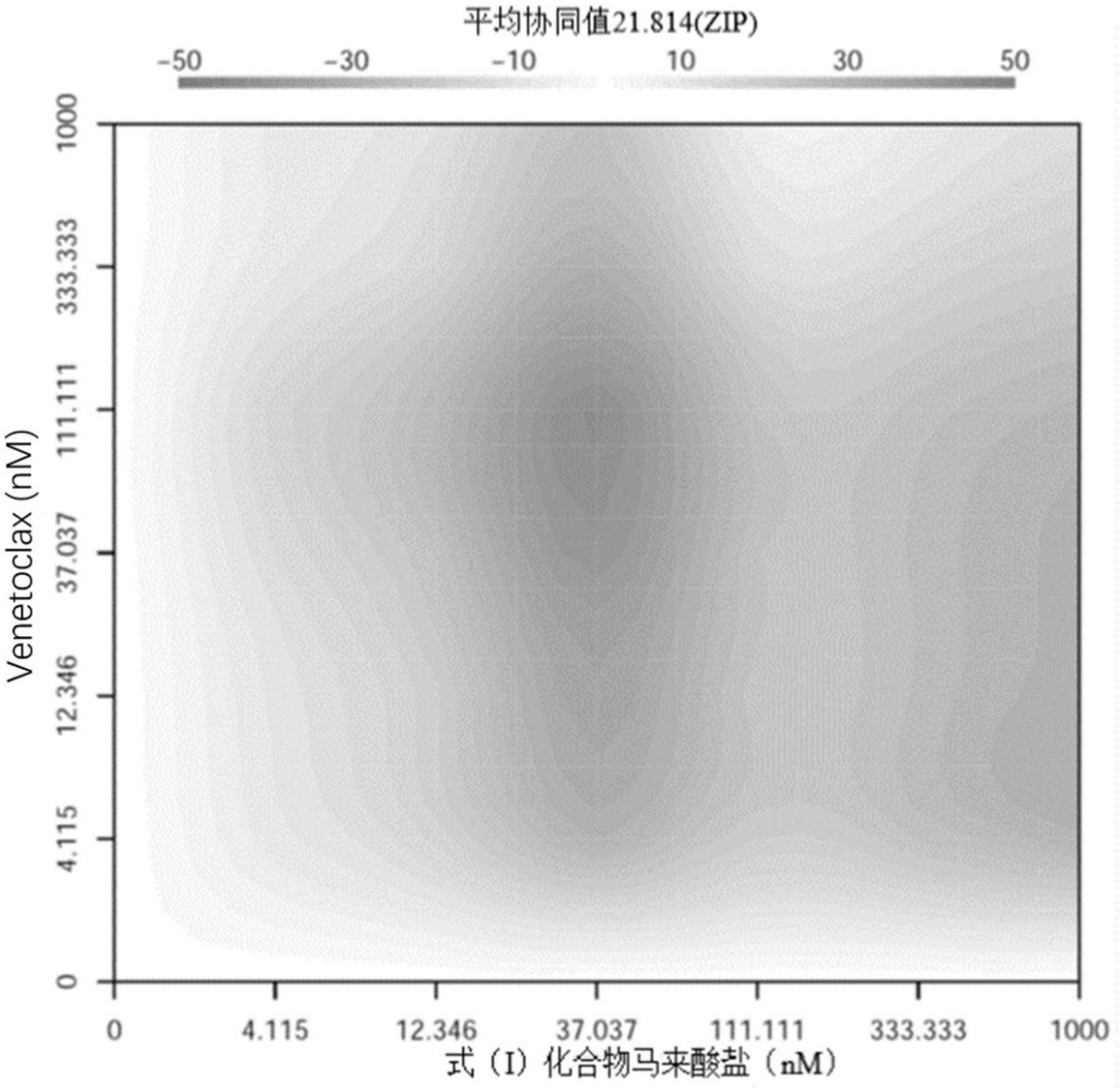

平均协同值21.814(ZIP)
-50
-30
-10
10
30
50
Venetoclax (nM)
0
4.115
12.346
37.037
111.111
333.333
1000
式（I）化合物马来酸盐（nM）

图 5

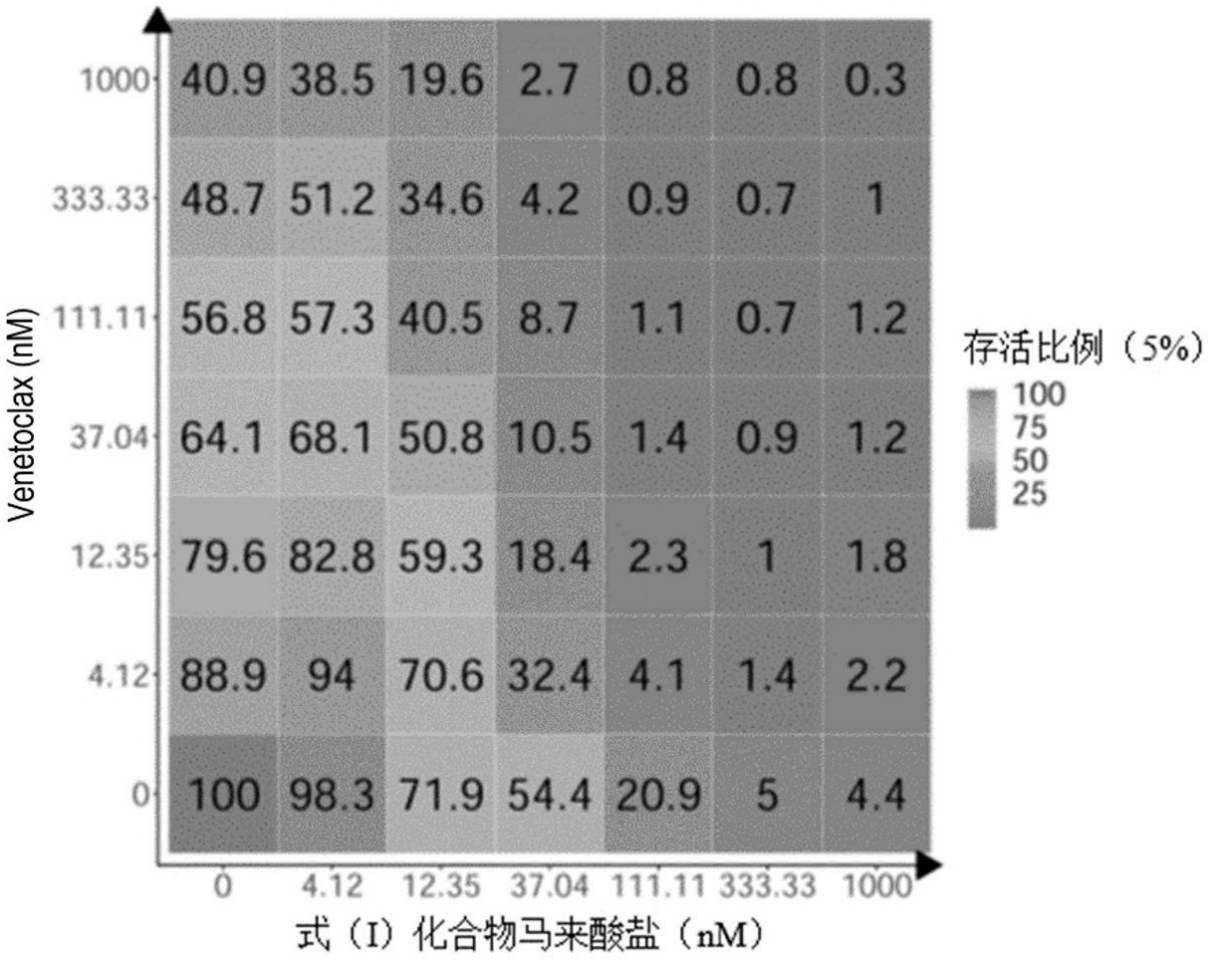

Venetoclax (nM)
1000
333.33
111.11
37.04
12.35
4.12
0
40.9 38.5 19.6 2.7 0.8 0.8 0.3
48.7 51.2 34.6 4.2 0.9 0.7 1
56.8 57.3 40.5 8.7 1.1 0.7 1.2
64.1 68.1 50.8 10.5 1.4 0.9 1.2
79.6 82.8 59.3 18.4 2.3 1 1.8
88.9 94 70.6 32.4 4.1 1.4 2.2
100 98.3 71.9 54.4 20.9 5 4.4
0 4.12 12.35 37.04 111.11 333.33 1000
式（I）化合物马来酸盐（nM）
存活比例（5%）
100
75
50
25

图 6

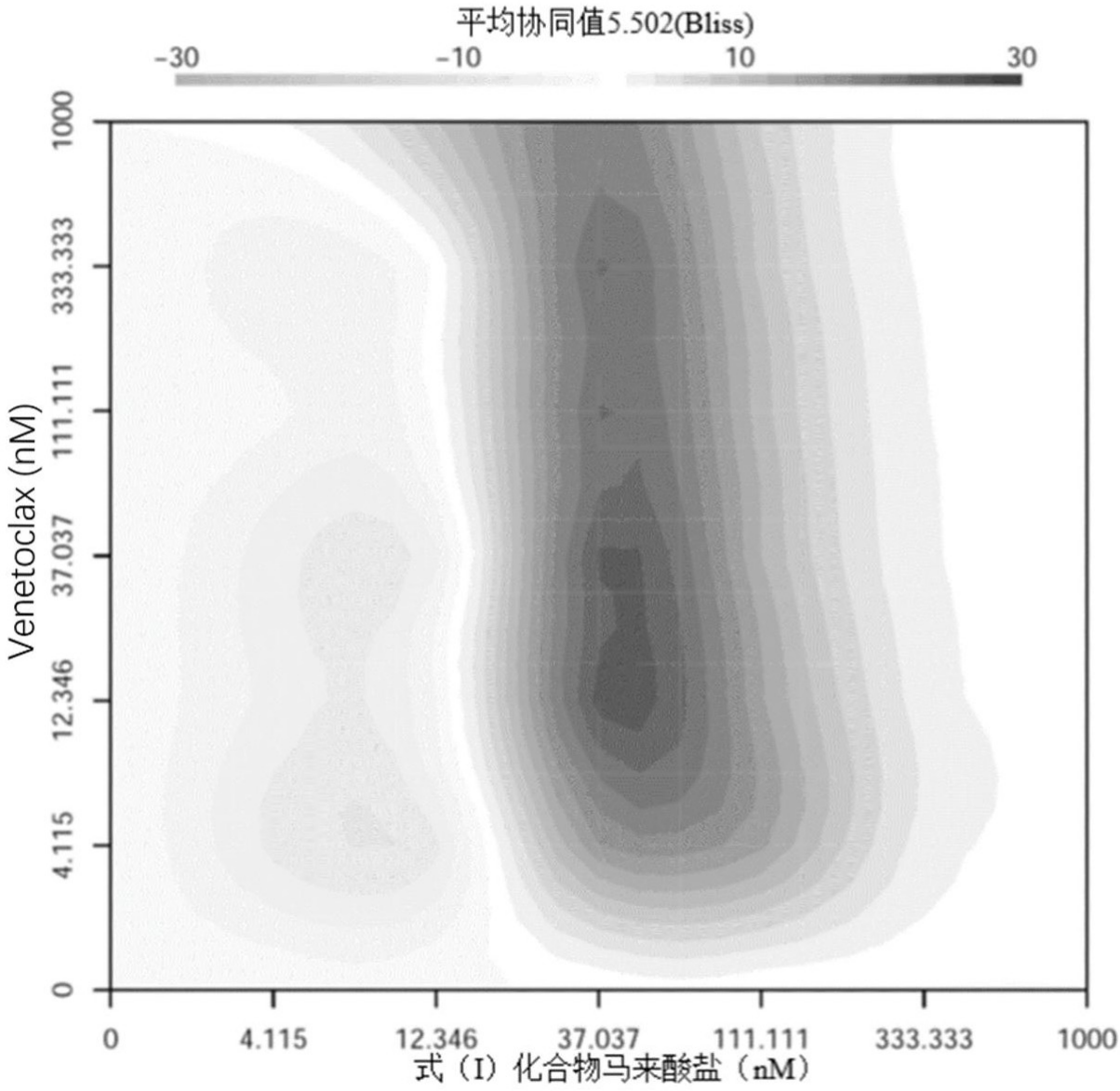

平均协同值5.502(Bliss)
-30
-10
10
30
Venetoclax (nM)
0
4.115
12.346
37.037
111.111
333.333
1000
式（I）化合物马来酸盐（nM）

图 7

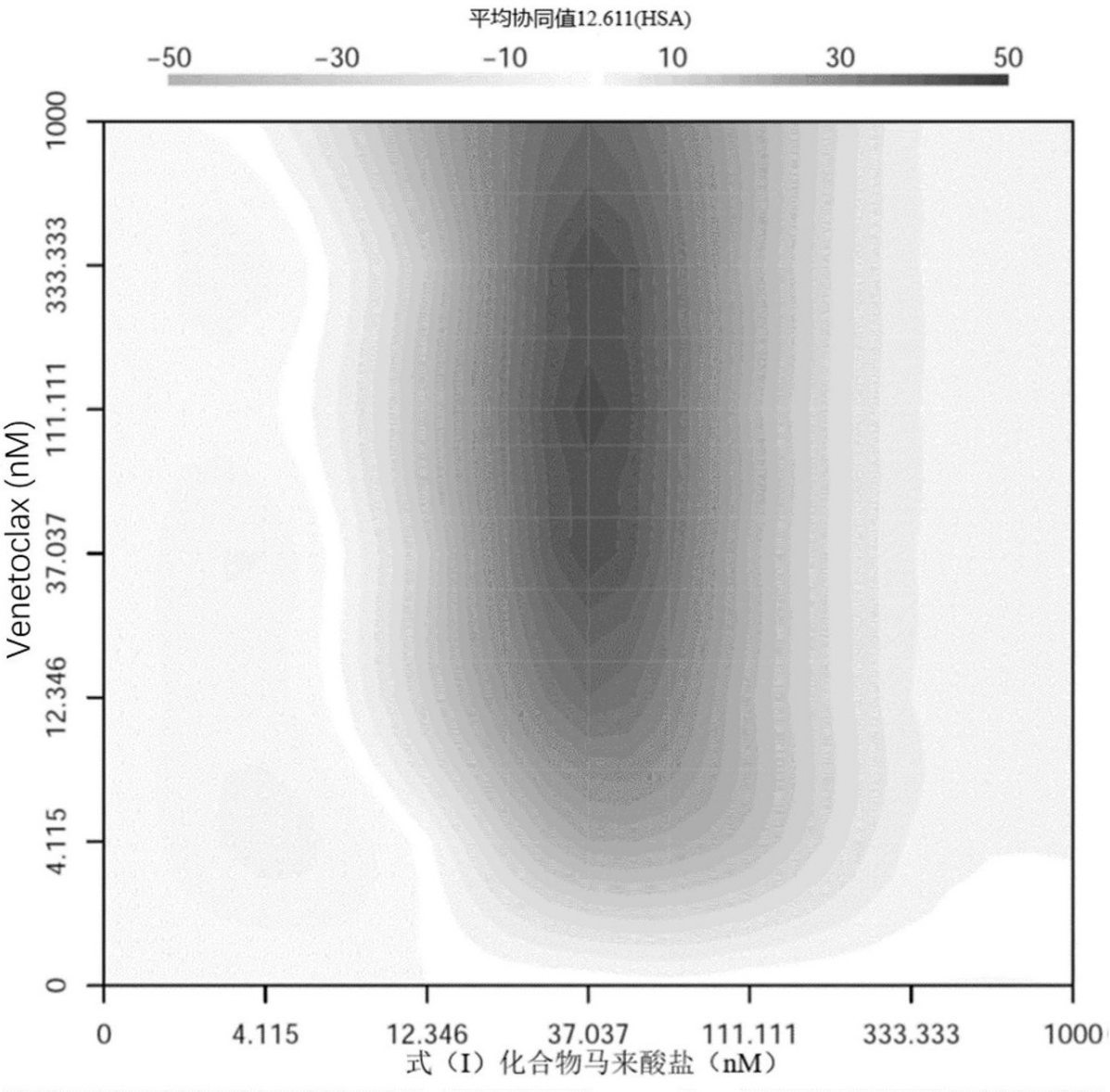

平均协同值12.611(HSA)
-50
-30
-10
10
30
50
Venetoclax (nM)
0
4.115
12.346
37.037
111.111
333.333
1000
0
4.115
12.346
37.037
111.111
333.333
1000
式（I）化合物马来酸盐（nM）

图 8

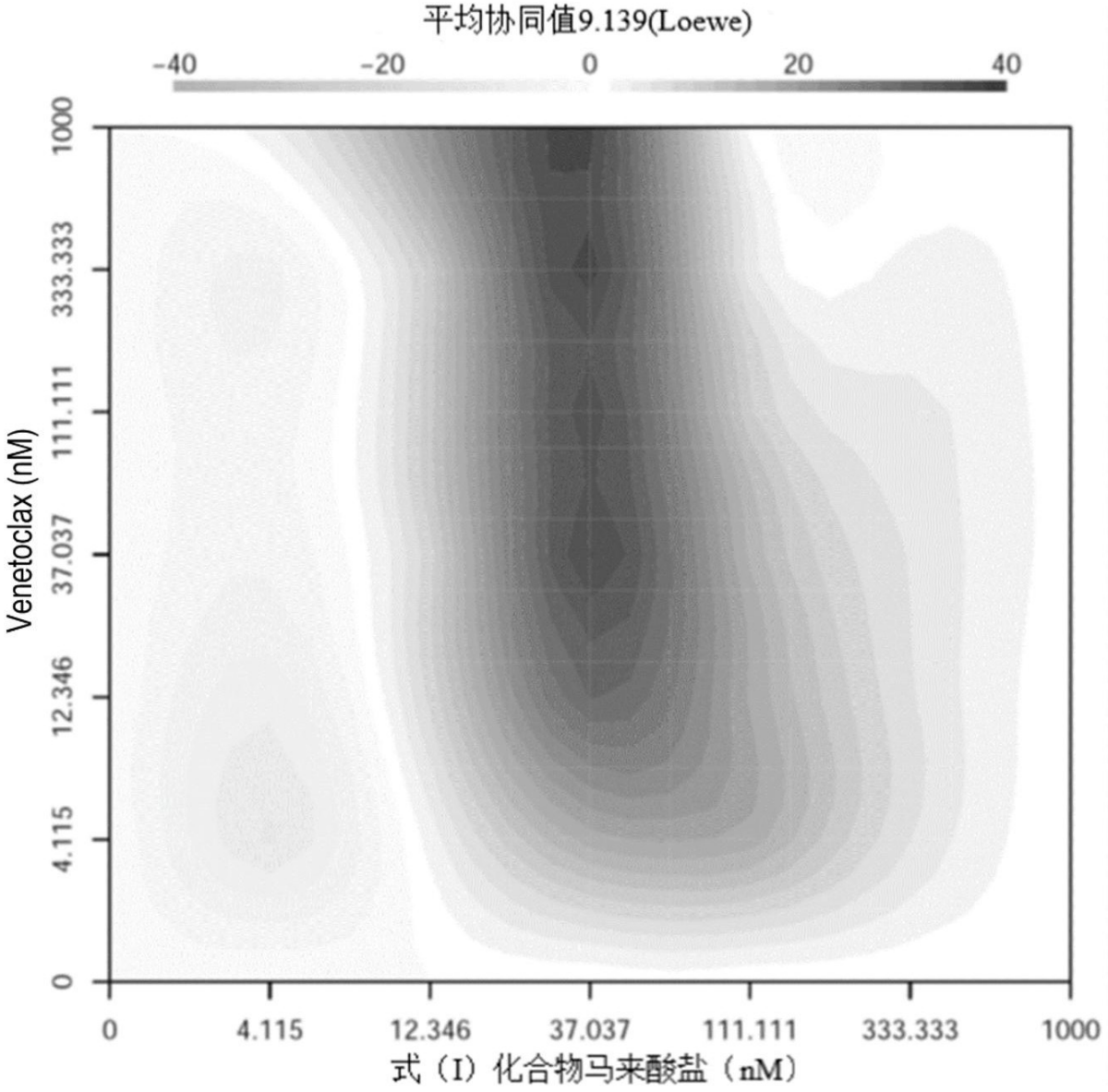

平均协同值9.139(Loewe)
-40
-20
0
20
40
Venetoclax (nM)
0
4.115
12.346
37.037
111.111
333.333
1000
式（I）化合物马来酸盐（nM）

图 9

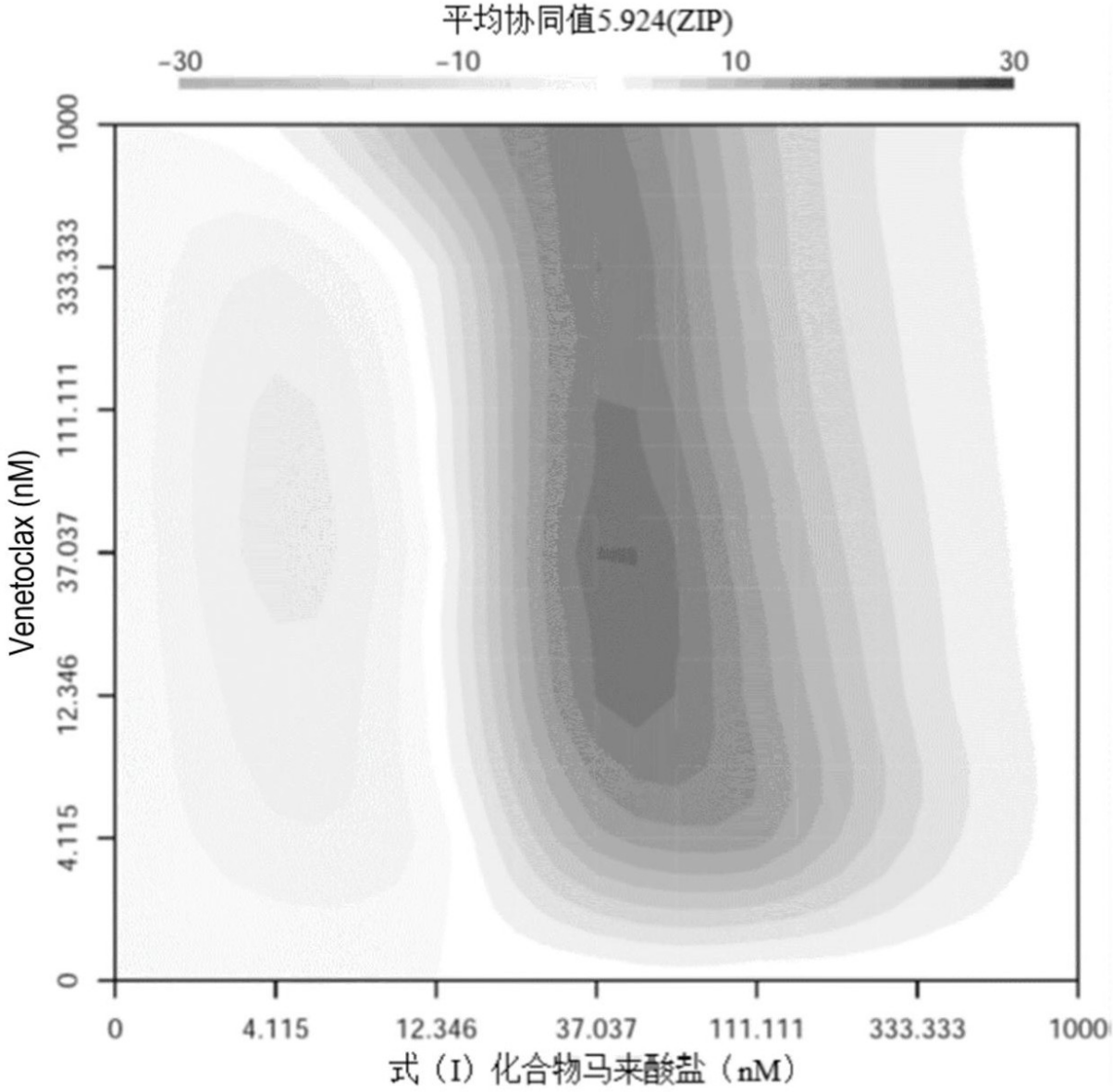

平均协同值5.924(ZIP)
-30
-10
10
30
Venetoclax (nM)
0
4.115
12.346
37.037
111.111
333.333
1000
式（I）化合物马来酸盐（nM）

图 10

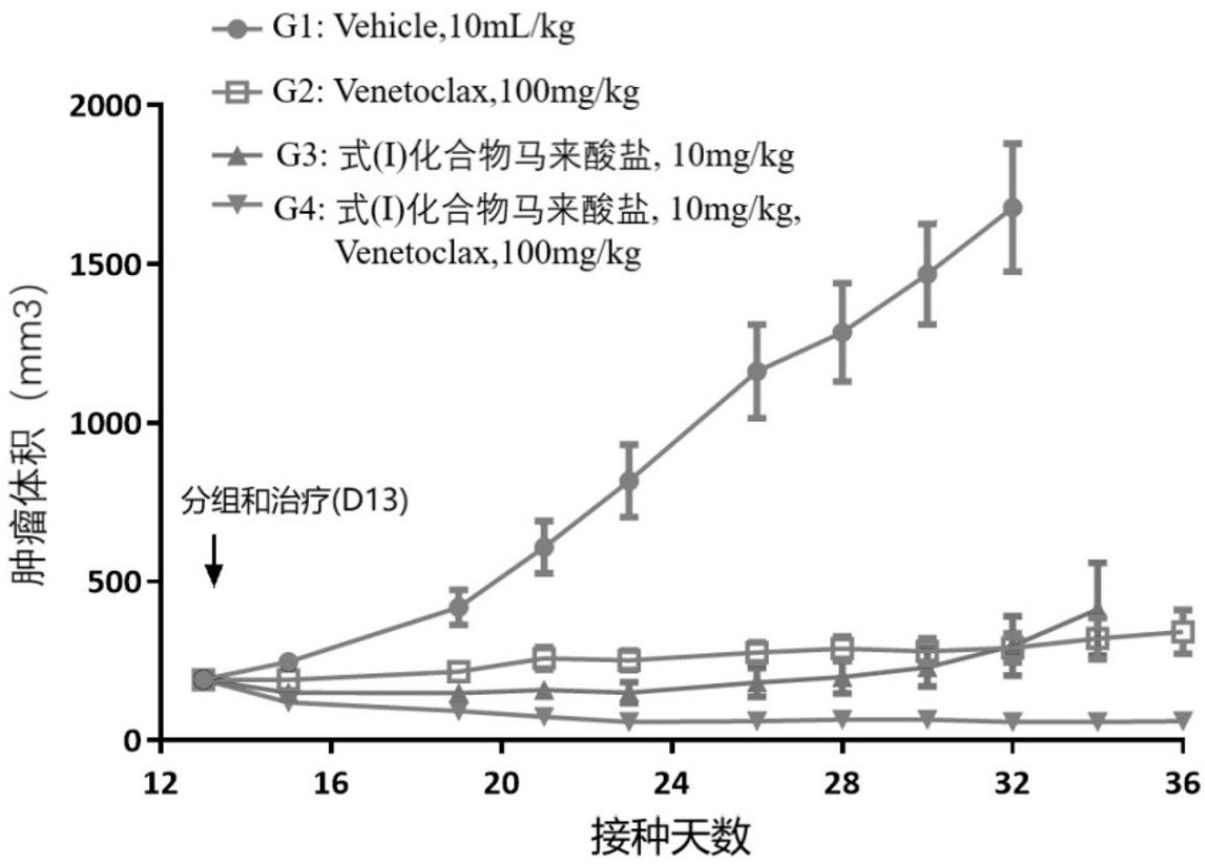

G1: Vehicle,10mL/kg
G2: Venetoclax,100mg/kg
G3: 式(I)化合物马来酸盐, 10mg/kg
G4: 式(I)化合物马来酸盐, 10mg/kg,
Venetoclax,100mg/kg
肿瘤体积（mm3）
2000
1500
1000
500
0
分组和治疗(D13)
12
16
20
24
28
32
36
接种天数

图 11

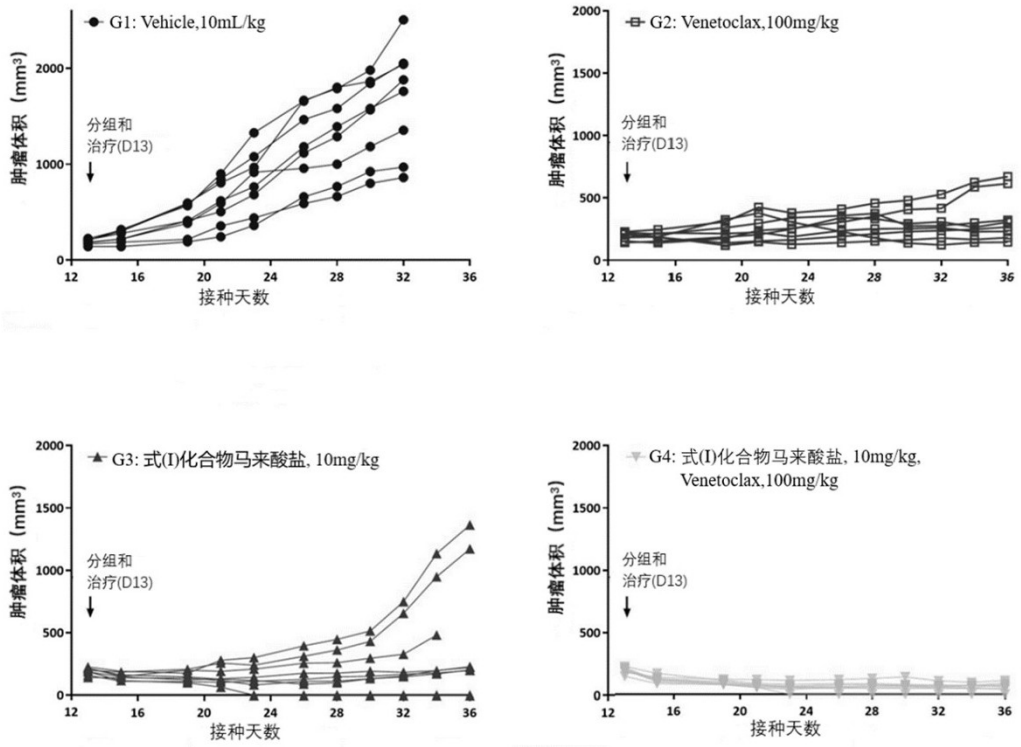

G1: Vehicle,10mL/kg
G2: Venetoclax,100mg/kg
G3: 式(I)化合物马来酸盐, 10mg/kg
G4: 式(I)化合物马来酸盐, 10mg/kg, Venetoclax,100mg/kg
肿瘤体积（mm³）
分组和治疗(D13)
接种天数

图 12

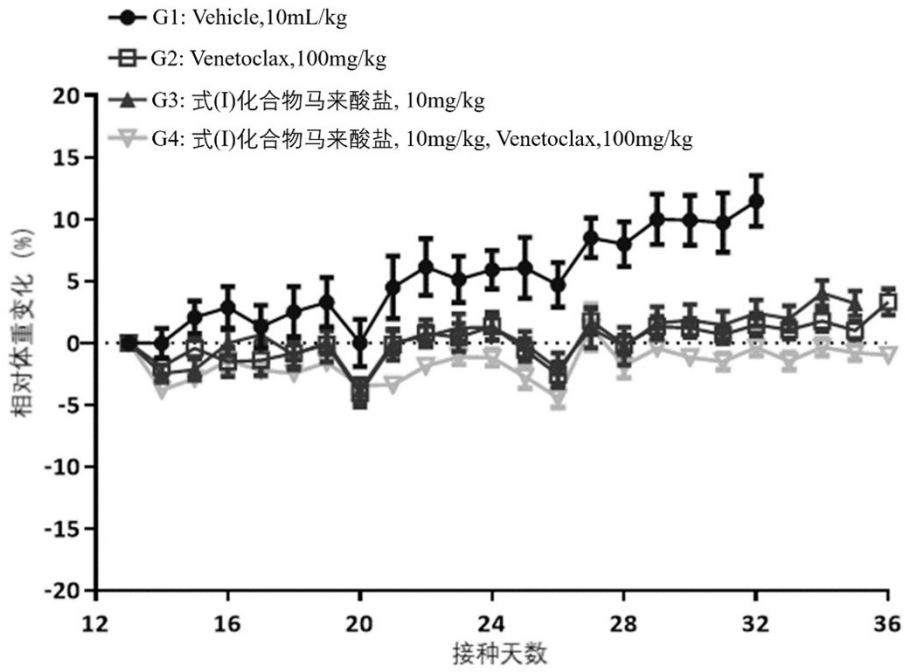

G1: Vehicle,10mL/kg
G2: Venetoclax,100mg/kg
G3: 式(I)化合物马来酸盐, 10mg/kg
G4: 式(I)化合物马来酸盐, 10mg/kg, Venetoclax,100mg/kg
相对体重变化（%）
接种天数

图 13