



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104603130 B

(45)授权公告日 2018.04.27

(21)申请号 201380030902.3

(22)申请日 2013.04.11

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104603130 A

(43)申请公布日 2015.05.06

(30)优先权数据
61/624,215 2012.04.13 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.12.11

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2013/036193 2013.04.11

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/155317 EN 2013.10.17

(73)专利权人 EPIZYME股份有限公司
地址 美国马萨诸塞州
专利权人 卫材研发管理有限公司

(72)发明人 凯文·韦恩·孔茨 黄冠宗

崔贤旭 克里斯汀·桑德斯
史蒂文·马修 阿拉尼·钱达
弗兰克·方

(74)专利代理机构 北京聿宏知识产权代理有限公司 11372

代理人 吴大建 刘华联

(51)Int.Cl.
C07D 407/12(2006.01)
A61K 31/444(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件
CN 101808988 A,2010.08.18,
WO 2011140324 A1,2011.11.10,
WO 2012005805 A1,2012.01.12,
CN 1989131 A,2007.06.27,
WO 2011140325 A1,2011.11.10,
WO 2012142504 A1,2012.10.18,

审查员 姚旻

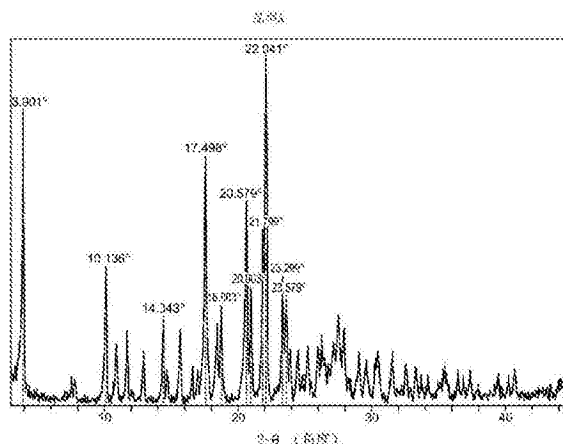
权利要求书2页 说明书38页 附图17页

(54)发明名称

人类组蛋白甲基转移酶EZH2抑制剂的盐形式

(57)摘要

本发明提供了N-((4,6-二甲基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-3-基)甲基)-5-(乙基(四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-4-甲基-4'-(吗啉基甲基)-[1,1'-联苯基]-3-甲酰胺氢溴酸盐。本发明还提供了该化合物的特定晶型。



1. N-((4,6-二甲基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-3-基)甲基)-5-(乙基(四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-4-甲基-4'-(吗啉基甲基)-[1,1'-联苯基]-3-甲酰胺氢溴酸盐。

2. 根据权利要求1所述的化合物,其是单氢溴酸盐。

3. 一种药物组合物,其包含权利要求1或2所述化合物以及药学上可接受的载体或稀释剂。

4. 一种制备权利要求1所述化合物的方法,其包括使N-((4,6-二甲基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-3-基)甲基)-5-(乙基(四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-4-甲基-4'-(吗啉基甲基)-[1,1'-联苯基]-3-甲酰胺与氢溴酸结合。

5. N-((4,6-二甲基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-3-基)甲基)-5-(乙基(四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-4-甲基-4'-(吗啉基甲基)-[1,1'-联苯基]-3-甲酰胺氢溴酸盐的晶型A,其中所述晶型A显示具有多个特征峰的X射线粉末衍射谱图,所述多个特征峰以 2θ 角度表示为 $3.9\pm 0.3^\circ$ 、 $10.1\pm 0.3^\circ$ 、 $14.3\pm 0.3^\circ$ 、 $17.5\pm 0.3^\circ$ 、 $18.7\pm 0.3^\circ$ 、 $20.6\pm 0.3^\circ$ 、 $20.9\pm 0.3^\circ$ 、 $21.8\pm 0.3^\circ$ 、 $22.0\pm 0.3^\circ$ 、 $23.3\pm 0.3^\circ$ 和 $23.6\pm 0.3^\circ$ 2θ 角。

6. 根据权利要求5所述的晶型A,其特征在于,所述晶型A显示与图1基本一致的X射线粉末衍射图谱。

7. 根据权利要求5所述的晶型A,其特征在于,所述晶型A显示具有特征峰的X射线粉末衍射谱图,其以 2θ 角度表示为 3.9° 、 10.1° 、 14.3° 、 17.5° 、 18.7° 、 20.6° 、 20.9° 、 21.8° 、 22.3° 、 23.3° 和 23.6° 2θ 角。

8. 根据权利要求5所述的晶型A,其特征在于,所述晶型A显示具有以 $^\circ\text{C}$ 为单位表示的、在温度 $255\pm 5^\circ\text{C}$ 处的特征峰的差示扫描量热谱图。

9. 根据权利要求5所述的晶型A,其特征在于,所述晶型A显示与图3基本一致的差示扫描量热谱图。

10. 一种制备权利要求5-9中任意一项所述的晶型A的方法,所述方法包括使N-((4,6-二甲基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-3-基)甲基)-5-(乙基(四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-4-甲基-4'-(吗啉基甲基)-[1,1'-联苯基]-3-甲酰胺与氢溴酸结合。

11. 一种重结晶权利要求5-9中任意一项所述的晶型A的方法,所述方法包括以下步骤:
(a) 将晶型A溶解于第一溶剂中,以及 (b) 加入第二溶剂以便所述晶型A重结晶。

12. 根据权利要求11所述的方法,其特征在于,所述第一溶剂是乙醇,并且所述第二溶剂是MTBE。

13. 根据权利要求11或12所述的方法,所述方法包括 (a) 将晶型A溶解于乙醇中; (b) 加热混合物; (c) 向混合物中加入MTBE,形成包含所述晶型的沉淀,并滤出该沉淀以使得所述晶型重结晶。

14. 一种药物组合物,其包含权利要求5-9中任意一项所述的晶型A以及药学上可接受的载体或稀释剂。

15. 权利要求1或2所述的化合物或权利要求5-9中任意一项所述的晶型A用于制备用于治疗有需要的受试者的癌症的药物的用途。

16. 一种制备N-((4,6-二甲基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-3-基)甲基)-5-(乙基(四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-4-甲基-4'-(吗啉基甲基)-[1,1'-联苯基]-3-甲酰胺的方法,所述方法包括使5-(乙基(四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-4-甲基-4'-(吗啉基甲基)-[1,1'-联苯基]-3-

羧酸与3-(氨基甲基)-4,6-二甲基-二氢-吡啶-2(1H)-酮的盐反应。

人类组蛋白甲基转移酶EZH2抑制剂的盐形式

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求在2012年4月13日提交的美国临时申请号61/624,215的优先权和权益,其全部内容通过引用被全部并入本发明。

背景技术

[0003] 据估计,在2012年,超过160万人被诊断患有癌症。例如,女性中最常见类型的癌症是乳腺癌,并且这种疾病是导致影响女性的所有癌症的最高死亡率之一的原因。当前对乳腺癌的治疗被限制于完整或部分的乳房切除术、放射治疗或化疗。在2012年,约230000个癌症病例为乳腺癌,其将导致预计40000人死亡。参见Siegel等人,Ca Cancer J Clin 2012; 62:10-29。

[0004] 一些癌症死亡是由包括白血病、骨髓瘤和淋巴瘤的血液癌症引起的。2012年,约80000起癌症病例是淋巴瘤,其将导致预计20000人死亡。

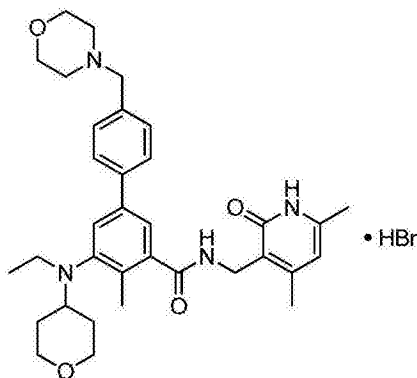
[0005] 放射治疗、化疗和手术是癌症治疗的主要方法。然而,这些治疗仅当癌症在早期阶段被检测出时最为有效。一旦癌症达到浸润性/转移性阶段,入侵细胞或转移细胞系可以逃过检测,从而导致复发,其需要高毒性治疗的使用。此时,癌细胞和病人的未受影响的细胞均暴露于高毒性治疗下,其除了其它并发症外,还导致了免疫系统的衰弱。

[0006] 因此,本领域对治疗病人体内的诸如乳腺癌或淋巴瘤等癌症的新方法仍有需要。

发明内容

[0007] 因此,本发明提供N-((4,6-二甲基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-3-基)甲基)-5-(乙基(四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-4-甲基-4'-(吗啉基甲基)-[1,1'-联苯基]-3-甲酰胺氢溴酸盐:

[0008]



[0009] 本发明还提供了N-((4,6-二甲基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-3-基)甲基)-5-(乙基(四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-4-甲基-4'-(吗啉基甲基)-[1,1'-联苯基]-3-甲酰胺氢溴酸盐的具体晶型形式(“晶型A”,或“N-((4,6-二甲基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-3-基)甲基)-5-(乙基(四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-4-甲基-4'-(吗啉基甲基)-[1,1'-联苯基]-3-甲酰胺氢溴酸盐的晶型A”)。如本文所描述的,在此提供的氢溴酸盐以及晶型A,显示出可被利用以便获得新的药学性质以及可用于原料药和成品药开发中的物理性质。

[0010] 在一个实施方式中,该氢溴酸盐是晶体。在另一个实施方式中,所述氢溴酸盐基本不含杂质。在另一个实施方式中,所述氢溴酸盐是基本不含无定形的 N-((4,6-二甲基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-3-基)甲基)-5-(乙基(四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-4-甲基-4'-(吗啉基甲基)-[1,1'-联苯基]-3-甲酰胺氢溴酸盐的晶体固体。

[0011] 在另一个方面,本发明提供了一种药物组合物,其包括上文所述的氢溴酸盐以及药学上可接受的载体或稀释剂。

[0012] 在一个方面,上文所述的氢溴酸盐是使用包括将N-((4,6-二甲基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-3-基)甲基)-5-(乙基(四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-4-甲基-4'-(吗啉基甲基)-[1,1'-联苯基]-3-甲酰胺与氢溴酸结合的方法制备的。

[0013] N-((4,6-二甲基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-3-基)甲基)-5-(乙基(四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-4-甲基-4'-(吗啉基甲基)-[1,1'-联苯基]-3-甲酰胺的晶型A可以根据X射线粉末衍射谱图确定。相应地,在一个实施方式中,该晶型显示出一个或多个特征峰的X射线粉末衍射谱图,其以2- θ 角度表示为大约3.9+/-0.3度、大约17.5+/-0.3度和大约22.0+/-0.3度2- θ 角。在另一个实施方式中,该晶型显示出具有特征峰的X射线粉末衍射谱图,其以2- θ 角度表示为大约3.9+/-0.3度、大约17.5+/-0.3度和大约22.0+/-0.3度2- θ 角。在另一个实施方式中,该晶型显示出具有特征峰的X射线粉末衍射谱图,其以2- θ 角度表示为大约3.9+/-0.3度、10.1+/-0.3度、14.3+/-0.3度、17.5+/-0.3度、18.7+/-0.3度、20.6+/-0.3度、20.9+/-0.3度、21.8+/-0.3度、22.0+/-0.3度、23.3+/-0.3度和23.6+/-0.3度2- θ 角。在另一个实施方式中,该晶型显示出与图1基本一致的X射线粉末衍射谱图。在另一个实施方式中,该晶型显示出与表1基本一致的X射线粉末衍射谱图。

[0014] 晶型A还可以根据其差示扫描量热谱图确定。在一个实施方式中,该晶型显示出具有以 $^{\circ}\text{C}$ 为单位表示的、在255+/-5 $^{\circ}\text{C}$ 处的特征峰的差示扫描量热谱图。在一个实施方式中,该晶型展现出与图3基本一致的差示扫描量热谱图。

[0015] 在一个方面,晶型A是使用包括将N-((4,6-二甲基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-3-基)甲基)-5-(乙基(四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-4-甲基-4'-(吗啉基甲基)-[1,1'-联苯基]-3-甲酰胺与氢溴酸结合的方法制备的。

[0016] 在另一个方面,本发明提供了重结晶晶型A的方法,其包括以下步骤:(a) 将晶型A溶解于第一溶剂中,以及(b) 加入第二溶剂以便所述晶型重结晶。在一个实施方式中,所述第一溶剂是乙醇,并且所述第二溶剂是MTBE。在另一个实施方式中,该方法包括(a) 将晶型A溶解于乙醇中;(b) 加热混合物;(c) 向混合物中加入MTBE,形成包含所述晶型的沉淀,并滤出该沉淀以使得所述晶型重结晶。

[0017] 在另一个方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含晶型A以及药学上可接受的载体或稀释剂。

[0018] 本发明还提供了一种治疗癌症的方法,其包括向有需要的受试者给予治疗有效量的前文所述的氢溴酸盐化合物、晶型A或含有这些化合物中的任何一种的药物组合物。各种癌症都可以被治疗,包括非霍奇金氏淋巴瘤或乳腺癌。

[0019] 在另一个方面,本发明还提供了一种在有需要的受试者体内抑制EZH2组蛋白甲基转移酶活性的方法,其包括向所述受试者给予有效量的前文所述的氢溴酸盐化合物、晶型A或含有这些化合物中的任何一种的药物组合物。

[0020] 在另一个方面,本发明还提供了一种在体外抑制EZH2组蛋白甲基转移酶活性的方法,其包括给予有效量的前文所述的氢溴酸化合物、晶型A或含有这些化合物中的任何一种的药物组合物。

[0021] 本发明还提供了前文所述的氢溴酸化合物、晶型A或含有这些化合物中的任何一种的药物组合物制备用于治疗有需要的受试者的癌症的药物的用途。

附图说明

[0022] 图1描述晶型A的X射线粉末衍射谱图(单氢溴酸盐)。

[0023] 图2描述化合物I的二氢溴酸盐的X射线粉末衍射谱图。

[0024] 图3描述晶型A的差示扫描量热热谱图。

[0025] 图4描述晶型A的动态蒸汽吸附,其证明此化合物具有低吸湿性。

[0026] 图5描述晶型A在高温下持续三天的HPLC分析。晶型A在这段时间内产生极少的杂质。

[0027] 图6描述化合物I的钠盐的动态蒸汽吸附,其证明此化合物具有显著的吸湿性。

[0028] 图7描述化合物I的半硫酸盐的动态蒸汽吸附,其证明此化合物具有中等的吸湿性。

[0029] 图8显示化合物I的单氢溴酸盐的差示扫描热量数据,其说明此化合物结晶不良。

[0030] 图9描述合成中间体5的X射线粉末衍射谱图。

[0031] 图10描述晶型B的X射线粉末衍射谱图。

[0032] 图11描述化合物I的单氢溴酸盐的X射线晶体结构。

[0033] 图12-14显示来自化合物I的氢溴酸盐在人淋巴瘤细胞系(human lymphoma cell line cell line)中的体内研究的结果。

[0034] 图15-16显示化合物I的氢溴酸盐对于淋巴瘤小鼠异种移植模型的抗癌作用。

[0035] 图17描述合成中间体2的X射线粉末衍射谱图。

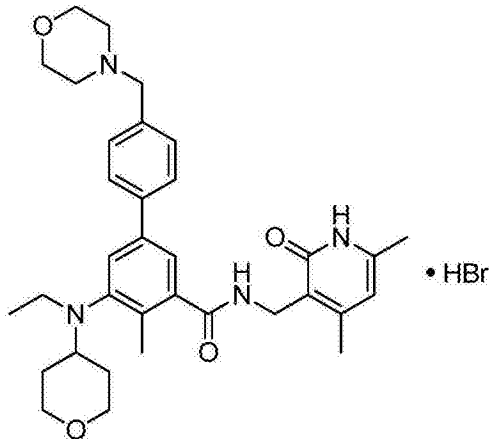
[0036] 图18A和B显示(A)化合物I的三盐酸盐的X射线粉末衍射谱图,以及(B)化合物I的单盐酸盐的动态蒸汽吸附,其证明此化合物具有显著的吸湿性。

具体实施方式

[0037] HBr盐形式和晶型形式A

[0038] 本发明提供了N-((4,6-二甲基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-3-基)甲基)-5-(乙基(四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-4-甲基-4'-(吗啉基甲基)-[1,1'-联苯基]-3-甲酰胺氢溴酸盐:

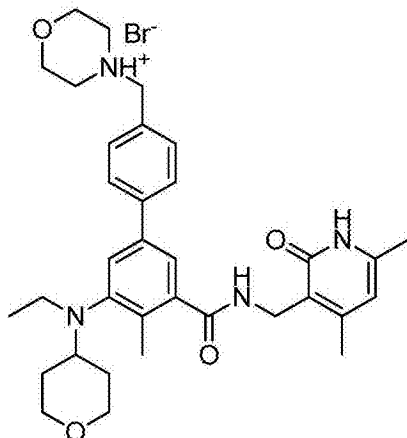
[0039]



[0040] 本发明所使用的“化合物I”指的是N-((4,6-二甲基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-3-基)甲基)-5-(乙基(四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-4-甲基-4'-(吗啉基甲基)-[1,1'-联苯基]-3-甲酰胺。化合物I的氢溴酸盐可被使用以在受试者体内或体外抑制组蛋白甲基转移酶活性。化合物I的氢溴酸盐还可被使用以治疗有需要的受试者体内的癌症。

[0041] 化合物I可以在其一个或多个诸如吗啉、二取代苯胺和/或吡啶酮片段的碱性位点被质子化。因此,在某些实施方式中,此处提供的是化合物I的单氢溴酸盐、二氢溴酸盐或三氢溴酸盐。在一个实施方式中,此处提供的是化合物I的单氢溴酸盐。当该化合物是单氢溴酸盐时,该化合物可以在任意碱性位点被质子化。在一个非限制性的实施方式中,化合物I在吗啉取代基的氮上被质子化,提供具有如下结构的化合物I的单氢溴酸盐:

[0042]



[0043] 该特定的单氢溴酸盐可以被称为“4-((3'-((4,6-二甲基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-3-基)甲基)氨基甲酰基)-5'-(乙基(四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-4'-甲基-[1,1'-联苯基]-4-基)甲基)吗啉-4-鎓溴化物”。图11描述了这个特定的盐形式的X射线晶体结构。

[0044] 相比其自由碱形式以及该自由碱的其它盐,化合物I的氢溴酸盐具有许多更优越的物理性质。具体地,相对于化合物I的其它盐形式,化合物I的氢溴酸盐具有低吸湿性。对于需要在治疗中有效的化合物,通常需要该化合物最低程度地吸湿。高度吸湿的药物形式可能不稳定,因为当被储存于不同湿度的环境时,该药物形式的溶出速率可能改变。同样地,吸湿性会影响化合物的大规模处理和生产,因为当制备含有吸湿活性试剂的药物组合时,难以确定该试剂的真实重量。与化合物I的其它盐形式相比,化合物I的氢溴酸盐具有低吸湿性。因此,其可以在理想时期内储存并且不受例如溶解性、密度或甚至化学成分的不

利改变的影响。

[0045] 除了上述优点之外,化合物I的氢溴酸盐可以以高度结晶的形式制备,其对制备药物制剂有用,并将改进该药物化合物的一般处理、操作和储存。在优选实施方式中,化合物I的氢溴酸盐的晶体形式是被称为“晶型A”的形式。

[0046] 一种物质以多于一种晶体形式存在的能力被定义为多态性;具体物质的不同晶体形式被称为“同质多形体”。通常,多态性受到物质分子改变其构型或形成不同的分子内或分子间相互作用、尤其是氢键的能力的影响,其反映在不同晶型的晶格中的不同的原子排列上。相反地,物质的总体外部形式被认为是“形态”,其指的是呈现的晶体和平面的外部形状,与内部结构无关。基于不同的条件,诸如,例如,生长率、搅拌以及存在的杂质,晶体可以显示出不同的形态。

[0047] 物质的不同晶型可能具有不同的晶格能,因此,在固体状态,其可以显示不同的物理性质,例如外形、密度、熔点、颜色、稳定性、溶解性、溶出速率等,其可以反之影响特定晶型的稳定性、溶出速率和/或生物利用度,以及其用作药物或药物组合物的合适宜性。

[0048] 晶型A高度结晶,并显示出低吸湿性。同样地,这种晶型可以重复性地获取,并在结晶化条件方面的轻微改变不会导致不同的晶体形式。

[0049] 出于多种原因,期望获得化合物I的氢溴酸盐的不同晶型。原因之一在于个别晶型在结晶化中可以掺入不同的杂质或化学残留物。例如,在化合物I转化为晶型A的过程中,杂质可以被去除。

[0050] 不希望被理论所限定,显示出紧密晶体形态的晶型形式具有便于过滤和便于流动方面的优点。显示出紧密晶体形态的晶型A因此具有这些优点。

[0051] 在某些实施方式中,根据在X射线粉末衍射分析中的特征峰,晶型A可以被确认。X射线粉末衍射,也被称为XRPD,是使用X射线、中子或电子在粉末、微晶或其它用于材料结构表征固体材料上衍射的科学技术。在一个实施方式中,晶型A显示具有一个或多个特征峰的X射线粉末衍射谱图,其以 $2-\theta$ 角度表示为大约 3.9 ± 0.3 度、大约 17.5 ± 0.3 度和大约 22.0 ± 0.3 度 $2-\theta$ 角。在另一个实施方式中,该晶型显示具有以约 3.9 ± 0.3 度、约 17.5 ± 0.3 度和约 22.0 ± 0.3 度的 $2-\theta$ 角表达的特征峰的X射线粉末衍射谱图。

[0052] 在一个实施方式中,晶型A显示具有至少5个特征峰的X射线粉末衍射谱图,其以 $2-\theta$ 角度表示为大约 3.9 ± 0.3 度、 10.1 ± 0.3 度、 14.3 ± 0.3 度、 17.5 ± 0.3 度、 18.7 ± 0.3 度、 20.6 ± 0.3 度、 20.9 ± 0.3 度、 21.8 ± 0.3 度、 22.0 ± 0.3 度、 23.3 ± 0.3 度和 23.6 ± 0.3 度 $2-\theta$ 角。在另一个实施方式中,晶型A显示具有至少6个特征峰的X射线粉末衍射谱图,其以 $2-\theta$ 角度表示为大约 3.9 ± 0.3 度、 10.1 ± 0.3 度、 14.3 ± 0.3 度、 17.5 ± 0.3 度、 18.7 ± 0.3 度、 20.6 ± 0.3 度、 20.9 ± 0.3 度、 21.8 ± 0.3 度、 22.0 ± 0.3 度、 23.3 ± 0.3 度和 23.6 ± 0.3 度 $2-\theta$ 角。在另一个实施方式中,晶型A显示具有至少7个特征峰的X射线粉末衍射谱图,其以 $2-\theta$ 角度表示为大约 3.9 ± 0.3 度、 10.1 ± 0.3 度、 14.3 ± 0.3 度、 17.5 ± 0.3 度、 18.7 ± 0.3 度、 20.6 ± 0.3 度、 20.9 ± 0.3 度、 21.8 ± 0.3 度、 22.0 ± 0.3 度、 23.3 ± 0.3 度和 23.6 ± 0.3 度 $2-\theta$ 角。在另一个实施方式中,晶型A展现具有至少8个特征峰的X射线粉末衍射谱图,其以 $2-\theta$ 角度表示为大约 3.9 ± 0.3 度、 10.1 ± 0.3 度、 14.3 ± 0.3 度、 17.5 ± 0.3 度、 18.7 ± 0.3 度、 20.6 ± 0.3 度、 20.9 ± 0.3 度、 21.8 ± 0.3 度、 22.0 ± 0.3 度、 23.3 ± 0.3 度和 23.6 ± 0.3 度 $2-\theta$ 角。在另一个实施方式中,晶型A展现具有至少9个特征

峰的X射线粉末衍射谱图,其以 $2-\theta$ 角度表示为大约 3.9 ± 0.3 度、 10.1 ± 0.3 度、 14.3 ± 0.3 度、 17.5 ± 0.3 度、 18.7 ± 0.3 度、 20.6 ± 0.3 度、 20.9 ± 0.3 度、 21.8 ± 0.3 度、 22.0 ± 0.3 度、 23.3 ± 0.3 度和 23.6 ± 0.3 度 $2-\theta$ 角。在另一个实施方式中,晶型A展现具有至少10个特征峰的X射线粉末衍射谱图,其以 $2-\theta$ 角度表示为大约 3.9 ± 0.3 度、 10.1 ± 0.3 度、 14.3 ± 0.3 度、 17.5 ± 0.3 度、 18.7 ± 0.3 度、 20.6 ± 0.3 度、 20.9 ± 0.3 度、 21.8 ± 0.3 度、 22.0 ± 0.3 度、 23.3 ± 0.3 度和 23.6 ± 0.3 度 $2-\theta$ 角。

[0053] 在又一个实施方式中,该晶型展现具有特征峰的X射线粉末衍射谱图,其以 $2-\theta$ 角度表示为大约 3.9 ± 0.3 度、大约 14.3 ± 0.3 度、大约 18.7 ± 0.3 度、大约 23.3 ± 0.3 度和大约 23.6 ± 0.3 度 $2-\theta$ 角。

[0054] 在又一个实施方式中,该晶型展现具有特征峰的X射线粉末衍射谱图,其以 $2-\theta$ 角度表示为大约 3.9 ± 0.3 度、大约 10.1 ± 0.3 度、大约 14.3 ± 0.3 度、大约 17.5 ± 0.3 度、大约 18.7 ± 0.3 度、大约 20.6 ± 0.3 度、大约 20.9 ± 0.3 度、大约 21.8 ± 0.3 度、大约 22.0 ± 0.3 度、大约 23.3 ± 0.3 度和大约 23.6 ± 0.3 度 $2-\theta$ 角。在另一个实施方式中,该晶型显示出与图1基本一致的X射线粉末衍射谱图。在另一个实施方式中,该晶型显示出与表1列出的 $2-\theta$ 角度值基本一致的X射线粉末衍射谱图。

[0055] 这里所使用的术语“大约”,在涉及 $2-\theta$ 角度值时是指规定值 ± 0.3 度 $2-\theta$ 。

[0056] 包含晶型A的药物组合物可以通过该组合物的X射线粉末衍射谱图与晶型A的X射线粉末衍射谱图对比而识别。可以理解,包含晶型A的药物组合物可能显示出与纯的晶型A的X射线粉末衍射谱图不完全相同的X射线粉末衍射谱图。

[0057] 在某些实施方式中,根据在差示扫描量热谱图中观测到的特征峰,晶型A是可以识别的。差示扫描量热法或DSC是一种热分析技术,其中提高样品的温度所需的热量与参照物之差作为温度的函数被测量。在一个实施方式中,晶型A显示具有以 $^{\circ}\text{C}$ 为单位表示的、在大约 $255\pm 5^{\circ}\text{C}$ 处的特征峰的差示扫描热量约。在另一个实施方式中,晶型A显示出具有在 $250-255^{\circ}\text{C}$ 的温度范围被观测的单个吸热峰的差示扫描量热谱图。在另一个实施方式中,晶型A显示与图3基本一致的差示扫描量热谱图。

[0058] 在某些实施方式中,晶型A可能包含杂质。杂质的非限制性示例包括不合需要的晶型形式或残存的有机或无机分子,例如溶剂、水或盐。在一个实施方式中,晶型A基本不含杂质。在另一个实施方式中,晶型A包含按重量计少于10%的总杂质。在另一个实施方式中,晶型A包含按重量计少于5%的总杂质。在另一个实施方式中,晶型A包含按重量计少于1%的总杂质。在另一个实施方式中,晶型A包含按重量计少于0.1%的总杂质。在另一个实施方式中,晶型A包含按重量计少于10%的总杂质。

[0059] 在某些实施方式中,晶型A是基本不含无定形的化合物I氢溴酸盐的结晶固体。本文中所使用的术语“基本不含无定形的化合物I氢溴酸盐”,意思是该化合物含有不显著量的无定形的化合物I氢溴酸盐。在某些实施方式中,呈现的是按重量计至少约95%的结晶晶型A。在本发明的另一个实施方式中,呈现的是按重量计至少约99%的结晶晶型A。

[0060] 在另一个实施方式中,晶型A基本不含晶型B。

[0061] 本发明的盐及其晶体形式晶型A可以与其它物质一同出现或可以被分离。在一些实施方式中,本发明的盐或其晶体形式是基本分离的。“基本分离”的意思是该盐或其晶体形式至少部分或基本从其形成或探测到的环境中分开。部分分离可以包括,例如,富含本发

明的盐的组合物。基本分离可以包括含有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约97%或至少约99%的化合物I的氢溴酸盐和晶型A的组合物。分离化合物及其盐的方法为本领域的常规方法。

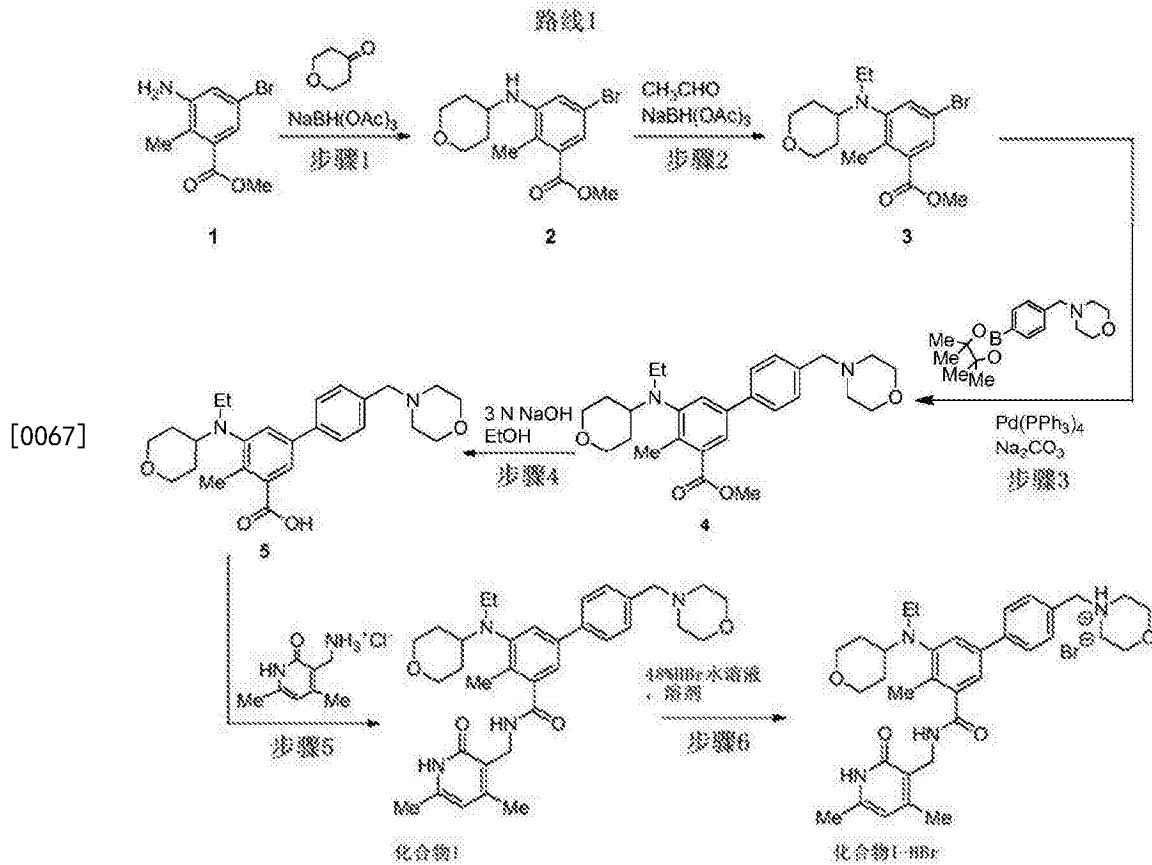
[0062] 化合物I的氢溴酸盐和晶型A都可以作为任何合理的互变异构体或合理的互变异构体的混合物出现。本发明所使用的“互变异构体”指的是以平衡状态存在的,并且容易从一种异构体形式转变为另一种的两种或多种结构异构体中的一种,。示例包酮-烯醇异构体,诸如丙酮/丙烯-2-醇等等。化合物I的氢溴酸盐和晶型A 可以具有一个或多个互变异构体,并因此包括各种异构体,即,吡啶-2(1H)-酮以及对应的吡啶-2-醇。这些化合物的所有这些异构体形式明确地包括在本发明中。

[0063] HBr盐形式和晶型A的制备

[0064] 化合物I的氢溴酸盐以及晶型A可以使用已知的技术制备。通常,盐形式是通过在溶液中将自由碱化合物与含有该盐形式所需的阴离子的酸结合,然后从反应溶液中分离固体盐产物而制备的(例如,通过结晶化、沉淀、蒸发等等)。可以采用其它形成盐的技术。

[0065] 下面的路线1概述了用于制备自由碱化合物I以及化合物I的氢溴酸盐的特定实施方式。简单地说,在步骤1中,3-氨基-5-溴-2-甲基苯甲酸甲酯(1)与二氢-2H-吡喃-4(3H)-酮在还原胺化条件反应以形成5-溴-2-甲基-3-((四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)苯甲酸甲酯(2)。在步骤2中,再次利用还原胺化以形成5-溴-3-(乙基(四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-2-苯甲酸甲酯(3)。然后,在步骤3中,该化合物在Suzuki 偶联条件下反应以形成5-(乙基(四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-4-甲基-4'-(吗啉基甲基)-[1,1'-联苯基]-3-苯甲酸甲酯(4),其在步骤4中水解为相应的酸(5)。在步骤5中,酸(5)在酰胺偶联反应条件下与3-(氨基甲基)-4,6-二甲基-二氢-吡啶 -2(1H)-酮盐酸盐反应以形成化合物I。

[0066] 如下 所示,然后化合物I可以与HBr水溶液反应以形成化合物I的氢溴酸盐。



构。例如,可以使用第一溶剂溶解晶型化合物,随后可以加入第二溶剂(例如,反溶剂)以造成晶型从溶剂中沉淀。在一个实施方式中,水被加入到第一溶剂中以帮助晶型溶解。

[0072] 可用于晶型A重结晶的溶剂的非限定性示例如下所示:甲醇、乙醇、乙酸乙酯、甲基叔丁基醚、水、异丙醇、四氢呋喃、丙酮、乙腈和2-甲基四氢呋喃及其组合。对于晶型A重结晶有用的溶剂组合的非限定性示例是(溶剂和反溶剂,其中水可以被加入到第一溶剂中以帮助晶型溶解):甲醇/水和乙酸乙酯、异丙醇/水和乙酸乙酯、四氢呋喃/水和乙酸乙酯、丙酮和乙酸乙酯、乙腈/水和乙酸乙酯、乙醇/水和甲基叔丁基醚、异丙醇/水和甲基叔丁基醚、乙醇/水和四氢呋喃、异丙醇/水和丙酮,以及乙醇/水和乙酸乙酯。在具体实施方式中,所述溶剂组合是甲醇/水和乙酸乙酯、异丙醇/水和乙酸乙酯、乙醇/水和2-甲基四氢呋喃,以及甲醇/2-甲基四氢呋喃。

[0073] 在一个方面,晶型A是使用包括将N-((4,6-二甲基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-3-基)甲基)-5-(乙基(四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-4-甲基-4'-(吗啉基甲基)-[1,1'-联苯基]-3-甲酰胺与氢溴酸结合的方法制备的。

[0074] 在另一个方面,本发明提供了一种重结晶晶型A的方法,其包含以下步骤:(a)将晶型A溶解于第一溶剂中,以及(b)加入第二溶剂,以便所述晶型重结晶。在一个实施方式中,第一溶剂是乙醇并且第二溶剂是MTBE。在另一个实施方式中,该方法包括(a)将晶型A溶解于乙醇中;(b)加热混合物;(c)将MTBE加入到混合物中,形成包含所述晶型的沉淀,并且过滤该沉淀以便所述晶型重结晶。

[0075] 药物组合物

[0076] 在另一个方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含化合物I的氢溴酸盐以及药学上可接受的载体或稀释剂。本发明还提供了一种药物组合物,其包含晶型A以及药学上可接受的载体或稀释剂。

[0077] 术语“药物组合物”包括适于向人类等哺乳动物给药的制剂。当本发明的化合物作为药物向人类等哺乳动物给药时,它们可以本身给药或作为含有例如0.1%至99.9%(更优选地,0.5至90%)的活性成分的药物组合物与药学上可接受的载体结合被给予。

[0078] 本发明所述的化合物(即,化合物I的氢溴酸盐和晶型A)可以与根据常规药物组合技术的药学上可接受的载体结合。本发明使用的“药学上可接受的载体”可以包括适合具体所需剂型的任意的和所有的溶剂、稀释剂或其它液体载体,分散剂或助悬剂、表面活性试剂、等渗试剂、增稠或乳化试剂、防腐剂、固体连接物、润滑剂等。Remington's Pharmaceutical Sciences, Sixteenth Edition, E.W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980) 公开了用于制备药物组合物的多种载体及其制备技术。除了常规载体介质与化合物不相容,例如产生任意不良生物作用或与药物组合物的任意其它组分以有害的方式相互作用的情况以外,其用途被考虑在本发明的范围内。可以用作药学上可接受的载体的材料的一些示例包括但不限于,糖,例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,例如玉米淀粉和土豆淀粉;纤维素及其衍生物,例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;西黄蓍胶粉;麦芽;胶质;滑石;赋形剂,例如可可脂和栓剂蜡;油,例如花生油、棉籽油;红花油、芝麻油;橄榄油;花生油和豆油;二醇类,例如丙二醇;酯类,例如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲试剂,例如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原水;等渗盐水;林格氏溶液(Ringer's solution);乙醇,磷酸盐缓冲溶液,以及其他诸如十二烷基硫酸钠和硬脂酸镁的无毒可兼

容的赋形剂,以及染色剂、释放剂、包衣剂、甜化、调味和香味剂,防腐剂和抗氧化剂也可以根据配方制定者的判断出现在组合物中。

[0079] 此外,载体可以使用各种形式,其取决于用于给药的所需制剂的剂型,例如,口服、经鼻、经直肠、经阴道、非肠道(包括静脉内注射或输液)。在制备用于口服剂型的组合物时,任意常见的药物介质均可以被采用。对于口服液体制剂的情况(如悬浮剂、溶剂、乳剂和酞剂),常见的药物介质包括,例如,水、乙二醇、油、酒精、调味剂、防腐剂、染色剂等;气雾剂;或对于口服固体制剂的情况(如粉末剂、胶囊剂和片剂),载体例如淀粉、糖、微晶纤维素、稀释剂、粒化剂、赋形剂、粘结剂、崩解剂等。

[0080] 湿润剂、乳化剂和赋形剂,例如月桂基磺酸钠和硬脂酸镁,以及染色剂、释放剂、包衣剂、甜化、调味和香味试剂、防腐剂和抗氧化剂也可以出现在组合物中。

[0081] 药学上可接受的抗氧化剂的示例包括:水溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸、半胱氨酸盐酸盐、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠等;油溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸棕榈酸盐、丁基羟基茴香醚(BHA)、丁基羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、生育酚等;以及金属螯合剂,例如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸等。

[0082] 包含所述化合物的药物组合物可以被配制以具有任意所需浓度。在一些实施方式中,该组合物被配制以便其包含至少治疗有效量。在一些实施方式中,该组合物被配制以便其包含不会造成一种或多种不希望的副作用的含量。

[0083] 由于化合物I的氢溴酸盐的晶体形式在其制备过程中更容易保持,所以固体剂型是用于本发明的药物组合物的优选剂型。用于口服给药的固体剂型,诸如胶囊、片剂、丸剂、粉剂和颗粒剂,是特别优选的。如果需要,片剂可以本领域技术人员已知的技术包衣。

[0084] 所述药物组合物包括适于口服、舌下、经鼻、经鼻、经直肠、经阴道、非肠道(包括静脉内注射或输液)给药的那些药物组合物,虽然最适合的途径将取决于被治疗的病况的性质和严重性。该组合物可以方便地以固体剂型的形式存在,并且通过任意医药领域熟知的方法制备。在某些实施方式中,所述药物组合物以丸剂、胶囊、锭剂或片剂的形式被配制以用于口服给药。在其它实施方式中,所述药物组合物是悬液的形式。

[0085] 本发明提供的化合物适于作为药物组合物中的活性试剂,该药物组合物尤其对于治疗EZH2相关的疾病、特别是癌症有效。各种实施方式中的药物组合物具有药学有效量的化合物I的氢溴酸盐或晶型A,以及其它药学上可接受的赋形剂、载体、填充剂、稀释剂等。

[0086] 治疗或药学“有效量”是向病人给药时改善疾病或病变的症状(例如,预防癌症的各种形态学和躯体症状)的化合物(化合物I的氢溴酸盐或晶型A)的量。在实施例中,有效量的化合物I的氢溴酸盐或晶型A是足以治疗受试者体内癌症的量。该量可以根据诸如受试者的尺寸和重量、疾病的类型或本发明的具体化合物等因素而变化。构成“有效量”的化合物I的氢溴酸盐或晶型A的量将根据化合物、疾病状态及其严重程度、需要治疗的病人的年龄等而有所变化。有效量可以由虑及其知识以及本公开的本领域一般技术人员常规地确定。

[0087] 给药方案可以影响药学有效量的构成。化合物I的氢溴酸盐或晶型A,以及包含这些化合物中任意一种的组合物,可以在疾病发作之前或之后向受试者给药。进一步,若干分次剂量,以及交错剂量可以每日地或按序地给药,或者该剂量可以被连续地注入或者可以为弹丸注射(bolus injection)。进一步,该剂量可以根据治疗的迫切程度或预防的情况而被适当地增加或降低。

[0088] 治疗方法

[0089] 本发明的化合物(即化合物I的氢溴酸盐,以及晶型A)抑制EZH2或其突变体的组蛋白甲基转移酶的活性,因此,在本发明的一个方面,这里公开的某些化合物是用于治疗或预防某些病变或疾病的候选。本发明提供了一种用于治疗可通过调节组蛋白或其它蛋白质的甲基化状态影响其过程的病变和疾病的方法,其中,所述甲基化状态至少部分由EZH2的活性介导。组蛋白甲基化状态的调节可以反过来影响由甲基化激活的靶标基因和/或由甲基化抑制的靶标基因的表达水平。所述方法包括向需要这种治疗的受试者给予治疗有效量的本发明的化合物。

[0090] EZH2介导的蛋白质甲基化起作用的失调可以是癌症或癌前病变。本发明进一步提供本发明的化合物(即化合物I的氢溴酸盐,以及晶型A)在可通过调节调节EZH2介导的甲基化影响其过程的癌症或癌前病变的治疗中的用途,或在制备对于这种癌症或癌前病变有用的药剂中的用途。示例性的可被治疗的癌症包括淋巴瘤,其包括非霍奇金氏淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤(FL)和弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL);黑色素瘤;和白血病,包括CML。示例性的癌前病变包括骨髓增生异常综合征(MDS;早先被认为是白血病前期)。

[0091] 在另一个实施方式中,本发明提供了一种治疗淋巴瘤的方法,其包括向有需要的受试者给予有效量的化合物I的氢溴酸盐。

[0092] 在又一个实施方式中,本发明提供了一种治疗淋巴瘤的方法,其包括向有需要的受试者给予有效量的晶型A。

[0093] 本发明还提供了通过向需要这种治疗的受试者给予治疗有效量的本发明的化合物(即化合物I的氢溴酸盐,以及晶型A)防止有需要的受试者体内的EZH2介导的蛋白质甲基化起作用的失调的方法。所述失调可以是癌症,例如其中EZH2介导的蛋白质甲基化起作用的癌症。本发明还提供了本发明的化合物(即化合物I的氢溴酸盐,以及晶型A)用于制备对于预防至少部分与EZH2介导的蛋白质甲基化相关的细胞增殖失调有用的药物的用途。

[0094] 本发明的化合物可用于调节蛋白质(例如组蛋白)的甲基化,例如调节组蛋白甲基转移酶或组蛋白脱甲基酶的酶活性。至少部分本发明的化合物可以在体内或体外用于调节蛋白质的甲基化。组蛋白甲基化已被报道涉及癌症中某些基因的异常表达以及对非神经元细胞中神经元基因的沉寂。至少部分本发明描述的化合物是治疗这些疾病的候选,即减少甲基化或使甲基化大致恢复至其在对应正常细胞中的水平。

[0095] 作为甲基化调节物的化合物可以被用于调节细胞增殖。例如,在一些情况下,过量的增值可以使用减少甲基化的试剂降低,而不足的增殖可以使用增加甲基化的试剂促进。因此,可以被本发明的化合物治疗的疾病可以包括过度增殖疾病,例如良性细胞生长和恶性细胞生长。

[0096] 本发明所使用的“有需要的受试者”是其中EZH2介导的蛋白质甲基化起部分作用的失调的受试者,或相对于广大人群,发展成这种失调的风险较高的受试者。需要治疗的受试者可以患有癌前病变。优选地,需要治疗的受试者患有癌症。“受试者”包括哺乳动物,所述哺乳动物可以是,例如,人类,或任何合适的诸如灵长类、小鼠、大鼠、狗、猫、牛、马、山羊、骆驼、绵羊或猪的非人类哺乳动物。在一个实施方式中,所述哺乳动物是人类。

[0097] 本文中所使用的术语“细胞增殖失调”指的是其中细胞的无调节和/或异常增长会导致不希望的病变或疾病的发展的病变,其可能是或不是癌性的。可以使用本发明的化合

物治疗的示例性的细胞增殖失调包括但不限于,赘生物、良性肿瘤、恶性肿瘤、癌前病变、原位肿瘤、实体肿瘤、免疫学肿瘤、血液肿瘤、癌症、癌、白血病、淋巴瘤、肉瘤和快速分裂的细胞。本文使用的术语“快速分裂的细胞”定义为以超出或大于预期的或观测自同一组织的相邻或并列的细胞的速率分裂的任何细胞。细胞增殖失调包括癌前期或癌前病变。在一个方面,本发明提供的方法用于治疗或减轻癌症的症状或识别用于这种目的合适候选物。术语“癌症”包括实体瘤以及血液肿瘤和/或恶性肿瘤。“癌前细胞”或“癌前的细胞”是显示癌前或癌前的病变细胞增殖失调的细胞。“癌细胞”或“癌前的细胞”是显示癌症的细胞增殖失调的细胞。任何可重现的测定方法可以被用于鉴定癌症或癌前细胞。组织样品(例如,活检样品)的癌细胞或癌前细胞可以通过组织学分类或分级鉴定。癌细胞或癌前细胞可以通过使用合适的分子标记鉴定。

[0098] 可以使用一种或多种本发明的化合物治疗的示例性的非癌性病变或失调包括但不限于,类风湿性关节炎;炎症;自身免疫病;淋巴增殖病变;肢端肥大症;类风湿性脊椎炎;骨关节炎;痛风,其它关节炎病变;败血症;感染性休克;内毒素性休克;革兰阴性细菌败血症;中毒性休克综合征;哮喘;成人呼吸窘迫综合征;慢性阻塞性肺病;慢性肺部炎症;炎症性肠病;克罗恩氏病;牛皮癣;湿疹;溃疡性结肠炎;胰囊性纤维化;肝纤维化;急性和慢性肾脏病;过敏性大肠综合征;轻度瘫痪(pyresis);再狭窄;脑型疟疾;中风和缺血性损伤;神经创伤;阿兹海默病;亨丁顿舞蹈症;帕金森病;急慢性疼痛;过敏性鼻炎;过敏性结膜炎;慢性心力衰竭;急性冠脉综合征;恶疾;疟疾;麻风;利什曼病;莱姆病;莱特尔氏病;急性滑膜炎;肌肉变性,滑液囊炎;肌腱炎;腱鞘炎;患疝气、破裂或椎间盘突出症;骨硬化病;血栓症;再狭窄;硅肺病;肺动脉瓣狭窄;骨吸收疾病诸如骨质疏松症;移植物抗宿主反应;多发性硬化;狼疮;纤维肌痛;艾滋病和其它病毒性疾病诸如带状疱疹、单纯疱疹I或II、流感病毒和巨细胞病毒;以及糖尿病。

[0099] 可以使用一种或多种本发明的化合物治疗的示例性的癌症包括但不限于,肾上腺皮质癌、艾滋病相关的癌症、艾滋病相关的淋巴瘤、肛门癌、直肠癌、肛管癌、阑尾癌、儿童小脑星形细胞瘤、儿童脑星形细胞瘤、基底细胞癌、皮肤癌(非黑色素瘤)、胆道癌、肝外胆管癌、肝内胆管癌、膀胱癌、尿路膀胱癌、骨关节炎、骨肉瘤和恶性纤维组织细胞瘤、脑癌、脑瘤、脑干胶质瘤、小脑星形细胞瘤、脑星形细胞瘤/恶性胶质瘤、室管膜瘤、成神经管细胞瘤、幕上原始神经外胚层肿瘤、视通路和下丘脑胶质瘤、乳腺癌、支气管腺瘤/良性瘤、类癌瘤、胃肠道癌、神经系统癌、神经系统淋巴瘤、中枢神经系统癌症、中枢神经系统淋巴瘤、子宫颈癌、儿童癌症、慢性淋巴性白血病、慢性骨髓性白血病、慢性骨髓增生异常、结肠癌、皮肤T细胞淋巴瘤、淋巴瘤、蕈样肉芽肿、塞扎里综合征、子宫内膜癌、食管癌、颅外生殖细胞肿瘤、性腺外生殖细胞肿瘤、肝外胆管癌、眼癌、眼内黑色素瘤、成视网膜细胞瘤、胆癌、胃部(胃)癌、胃肠道类癌肿瘤、胃肠道间质瘤(GIST)、生殖细胞瘤、卵巢生殖细胞肿瘤、妊娠性滋养层细胞瘤、头部和颈部癌症、肝细胞(肝)癌、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、眼内黑色素瘤、眼癌(ocular cancer)、胰岛细胞瘤(内分泌胰腺)、卡波西肉瘤、肾癌(kidney cancer)、肾癌(renal cancer)、肾癌(kidney cancer)、喉癌、急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞样白血病、慢性淋巴性白血病、慢性髓细胞性白血病、毛细胞白血病、唇和口腔癌、肝癌、肺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、艾滋病相关淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、成神经管细胞瘤、黑色素瘤、眼内(眼)黑色素瘤、Merkel细胞癌、恶性间皮

癌、间皮瘤、颈部转移性鳞状上皮癌、口腔癌、舌癌、多发性内分泌肿瘤综合征、蕈状真菌病、骨髓增生异常综合征、骨髓增生异常/骨髓增生性疾病、慢性髓细胞性白血病、急性髓性白血病、多发性骨髓瘤、慢性骨髓增殖性疾病、鼻咽癌、成神经细胞瘤、口腔癌、口腔癌(oral cavity cancer)、口咽癌、卵巢癌、卵巢上皮癌、卵巢低潜在恶性肿瘤、胰腺癌、胰岛细胞胰腺癌、鼻腔和鼻窦癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、鼻咽癌、嗜铬细胞瘤、松果体母细胞瘤和小脑幕上原始神经外胚层肿瘤、垂体瘤、浆细胞肿瘤/多发性骨髓瘤、胸膜肺母细胞瘤、前列腺癌、直肠癌、肾盂输尿管、移行细胞癌、成视网膜细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾腺癌、尤文氏肉瘤家族肿瘤、卡波西肉瘤、软组织肉瘤、子宫癌、子宫肉瘤、皮肤癌(非黑色素瘤)、皮肤癌(黑色素瘤)、Merkel细胞癌、小肠癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃(胃部)癌、幕上原始神经外胚层肿瘤、睾丸癌、喉癌、胸腺瘤、胸腺瘤和胸腺癌、甲状腺癌、肾盂输尿管和其它泌尿器官的移行细胞癌、妊娠滋养细胞肿瘤、尿道癌、子宫内膜癌、子宫肉瘤、子宫体癌、阴道癌、外阴癌和威尔姆瘤。

[0100] “血液系统细胞增殖失调”是涉及血液系统细胞的细胞增殖失调。血液系统细胞增殖失调可以包括淋巴瘤、白血病、髓样肿瘤、肥大细胞肿瘤、脊髓发育不良、良性单克隆丙球蛋白病、淋巴瘤样肉芽肿病、淋巴瘤样丘疹病、真性红细胞增多、慢性粒细胞白血病、特发性髓样化生和特发性血小板增多症。血液系统细胞增殖失调可以包括血液系统细胞的增生、发育异常和化生。在一个方面,本发明的化合物可以用于治疗选自本发明的血液癌的癌症或本发明的血液细胞增殖失调或用以识别适用于这种目的合适候选者。本发明的血液癌可以包括多发性骨髓瘤、淋巴瘤(包括霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、儿童淋巴瘤以及淋巴细胞和皮肤起源的淋巴瘤)、白血病(包括儿童白血病、毛细胞白血病、急性淋巴性白血病、急性髓细胞白血病、慢性淋巴性白血病、慢性粒细胞白血病、慢性髓细胞白血病和肥大细胞白血病)、髓样肿瘤和肥大细胞肿瘤。

[0101] “肺部细胞增殖失调”是涉及肺细胞的细胞增殖失调。肺部细胞增殖失调可以包括影响肺细胞的所有形式的细胞增殖失调。肺部细胞增殖失调可以包括肺癌、肺部癌前病变、肺部良性赘生物或病变、以及肺部恶性赘生物和病变、以及体内除肺外其它组织和器官能的转移的病变。在一个方面,本发明的组合物可以被用于治疗肺癌或肺部细胞增殖失调,或识别用于这种目的合适候选者。肺癌可以包括肺部各种形式的癌症。肺癌可以包括恶性肺部肿瘤、原位癌、典型类癌肿瘤、和非典型类癌肿瘤。肺癌可以包括小细胞肺癌(“SCLC”)、非小细胞肺癌(“NSCLC”)、鳞状细胞癌、小细胞癌、大细胞癌、腺细胞癌和间皮瘤。肺癌可以包括“瘢痕癌”、细支气管肺泡癌、巨细胞癌、梭细胞癌和大细胞神经内分泌癌。肺癌可以包括具有组织学和超微结构特异性(例如混合细胞类型)的肺部肿瘤。

[0102] 肺部细胞增殖失调可以包括影响肺部细胞的所有形式的细胞增殖失调。肺部细胞增殖失调可以包括肺癌、肺部的癌前病变。肺部细胞增殖失调可以包括肺的增生、化生、异型增生。肺部细胞增殖失调可以包括石棉诱导的增生、鳞状上皮化生、良性反应性间皮化生。肺部细胞增殖失调可以包括复层鳞状上皮替换柱状上皮、粘膜异型增生。暴露于吸入性有害环境物质(如香烟烟雾和石棉)的个体会增加患肺细胞增生失调的风险。会使个体更易患肺细胞增殖失调的在前的肺部疾病包括坏死性肺疾病、硬皮病、类风湿疾病、结节病、间质性肺炎、肺结核、反复性肺炎、特发性肺纤维化、肉芽肿、石棉沉着病、纤维化性肺炎和霍奇金病。。

[0103] “结肠细胞增殖失调”是一种涉及结肠细胞的细胞增殖性疾病。一方面,本发明的组合物可用于治疗结肠癌或结肠细胞增殖失调,或用于识别用于这样的目的合适的候选者。结肠癌可以包括各种形式的结肠癌。结肠癌可以包括偶发性和遗传性结肠癌。结肠癌可以包括恶性结肠肿瘤、原位癌、典型类癌肿瘤和不典型类癌肿瘤。结肠癌可以包括腺癌、鳞状细胞癌、腺细胞癌。结肠癌可以与遗传性综合征相关,所述遗传性综合征包括遗传性非息肉病性结肠直肠癌、家族性腺瘤性息肉病、加德纳氏综合征、黑斑息肉综合征、Turcot综合征(又名“胶质瘤息肉病综合征”)、幼年性息肉病。结肠癌可由遗传性综合征引起,所述遗传性综合征包括遗传性非息肉病性结肠直肠癌、家族性腺瘤性息肉病、加德纳氏综合征、黑斑息肉综合征、Turcot综合征、幼年性息肉病。

[0104] 结肠细胞增殖失调可以包括影响结肠细胞的所有形式的细胞增殖性失调。结肠细胞增殖失调可以包括结肠癌、结肠癌前病变、结肠腺瘤性息肉病、结肠异时性病变。结肠细胞增殖失调可以包括腺瘤。结肠细胞增殖失调可以用结肠细胞的增生、化生和异型增生表征。可使个体更易患结肠细胞增生性失调的在先所患的结肠疾病可以包括在先的结肠癌。会使个体更易患结肠细胞增生性的当前疾病障碍可以包括克罗恩病和溃疡性结肠炎。结肠细胞增殖失调与基因突变相关,所述基因突变包括p53、ras、FAP和DCC的基因突变。由于存在选自包括p53、ras、FAP和DCC的基因突变,个体患结肠细胞增殖失调的风险升高。

[0105] 结肠细胞增殖失调可以包括影响结肠细胞的所有形式的细胞增殖失调。结肠细胞增殖失调可以包括结肠癌、结肠癌前病变、结肠的腺瘤性息肉和结肠异时性病变。结肠细胞增殖失调可以包括腺瘤。结肠细胞增殖失调可以以结肠的增生、化生和发育异常为特征。使个体倾向于发展结肠增殖失调的先前的结肠疾病可以包括先前的结肠癌。使个体倾向于发展结肠增殖失调的当前的结肠疾病可以包括克罗恩氏病和溃疡性结肠炎。结肠细胞增殖失调可以与基因内的突变相关,所述基因选自p53、ras、FAP和DCC。由于p53、ras、FAP和DCC基因的突变,个体发展结肠细胞增殖失调的风险可能增加。

[0106] “胰腺细胞增殖失调”是涉及胰腺细胞的细胞增殖失调。胰腺细胞增殖失调可以包括影响胰腺细胞的所有形式的细胞增殖失调。胰腺细胞增殖失调包括胰腺癌、胰腺癌初癌或癌前状态、胰腺增生、胰腺的异型增生、胰腺良性肿瘤或病变、胰腺恶性肿瘤或病变,以及在胰腺以外的身体的其它组织和器官中的转移病灶。胰腺癌包括所有形式的胰腺癌。胰腺癌可以包括导管腺癌、腺鳞癌、多形性巨细胞癌、粘液腺癌、破骨细胞样巨细胞癌、粘液性囊腺癌、腺泡细胞癌、未分类的大细胞癌、小细胞癌、胰母细胞瘤、乳头状肿瘤、粘液性囊腺瘤、乳头状囊性肿瘤、浆液性囊腺瘤。胰腺癌还包括具有组织学和超微结构的异质性的胰腺肿瘤(例如,混合细胞型)。

[0107] “前列腺细胞增殖失调”是涉及前列腺细胞的细胞增殖失调。前列腺的细胞增殖失调可以包括影响前列腺细胞的所有形式的细胞增殖失调。前列腺细胞增殖失调包括前列腺初癌或癌前状态、前列腺良性肿瘤或病变、前列腺恶性肿瘤或病变,以及在前列腺以外的身体的其它组织和器官中的转移病灶。前列腺细胞增殖失调可以包括前列腺的增生、化生和异型增生。

[0108] “皮肤细胞增殖失调”是涉及皮肤细胞的细胞增殖失调。皮肤细胞增殖失调可以包括影响皮肤细胞的所有形式的细胞增殖失调。皮肤细胞增殖失调可以包括皮肤初癌或癌前状态、皮肤良性肿瘤或病变、黑色素瘤、皮肤的恶性黑色素瘤或其他恶性肿瘤或病变,以及

在皮肤以外的身体的其它组织和器官中的转移病灶。皮肤细胞增殖失调可以包括皮肤的增生、化生和异型增生。

[0109] “卵巢细胞增殖失调”是涉及卵巢细胞的细胞增殖失调。卵巢细胞增殖失调可以包括影响卵巢细胞的所有形式的细胞增殖失调。卵巢细胞增殖失调可以包括卵巢初癌或癌前状态、卵巢良性肿瘤或病变、卵巢癌、卵巢恶性肿瘤或病变,以及在卵巢以外的身体的其它组织和器官中的转移病灶。卵巢细胞增殖失调可以包括卵巢的增生、化生和异型增生。

[0110] “乳房细胞增殖失调”是涉及乳房细胞的细胞增殖失调。乳房细胞增殖失调可以包括影响乳腺细胞的所有形式的细胞增殖失调。乳房细胞增殖失调可以包括乳腺癌、乳腺初癌或癌前状态、乳房良性肿瘤或病变、乳腺恶性增生或病变,以及在乳房以外的身体的其它组织和器官中的转移病灶。乳腺细胞增殖失调可以包括乳腺的增生、化生和异型增生。

[0111] 乳房细胞增殖失调可以是乳房的癌前状态。本发明的组合物可用于治疗的乳房的癌前状态。乳房的癌前状态可以包括非典型乳腺增生、导管原位癌(DCIS)、导管内癌、小叶原位癌(LCIS)、小叶癌、乳房的0阶段或0级增长或病变(例如0阶段或0级别乳腺癌,或原位癌)。乳房的癌前状态可根据被美国癌症联合委员会(AJCC)认可的TNM分期表来分期,其中原发肿瘤(T)被指定为T0或Tis期;区域淋巴结(N)被指定为N0期;以及远处转移(M)被指定为M0期。

[0112] 乳房细胞增殖性障碍可以是乳腺癌。一方面,本发明的组合物可用于治疗乳腺癌,或用于识别用于这样的目的的合适的候选者。乳腺癌可包括各种形式的乳腺癌。乳腺癌包括各种形式的乳房癌症。乳腺癌可以包括原发性乳腺上皮癌。乳腺癌可以包括其中乳房被其他肿瘤如淋巴瘤、肉瘤或黑色素牵涉的乳房癌。乳腺癌可以包括乳房的癌、乳房导管癌、乳房小叶癌,乳房未分化癌、乳腺叶状囊肉瘤、乳房血管肉瘤和原发性乳腺淋巴瘤癌。乳腺癌可以包括I期、II期、IIIA期、IIIB期、IIIC期和IV期乳腺癌。乳房导管癌可以包括侵入性癌、带有主要的导管内成分的原位侵入性导管癌、炎性乳腺癌,以及具有选自粉刺、粘液(胶体)、骨髓、淋巴细胞浸润骨髓、乳头状、硬癌、管状的组织学类型的乳房导管癌。乳房小叶癌包括带有主要的原位成分的侵入性小叶癌、侵入性小叶癌和浸润性小叶癌。乳腺癌可以包括派杰氏病(Paget's disease)、导管内癌合并派杰氏病和侵入性导管癌合并派杰氏病。乳腺癌可以包括具有组织学和超微结构的异质性(例如,混合细胞型)的乳腺肿瘤。

[0113] 本发明的化合物可用于治疗乳腺癌,或用于识别用于这样的目的候选者。要治疗的乳腺癌可以包括家族性乳腺癌。要治疗的乳腺癌可以包括散发性乳腺癌。要治疗的乳腺癌可出现于男性受试者。要治疗的乳腺癌可出现于女性受试者。要治疗的乳腺癌可出现于绝经前的女性受试者或绝经后的女性受试者。要治疗的乳腺癌可出现于年龄等于或大于30岁的受试者,或小于30岁的受试者。要治疗的乳腺癌可出现于年龄等于或大于50岁的受试者,或小于50岁的受试者。要治疗的乳腺癌可出现于年龄等于或大于70岁的受试者,或小于70岁的受试者。

[0114] 可将要治疗的乳腺癌分类,以识别BRCA1, BRCA2或p53的家族性突变或自发性突变。可将要治疗的乳腺癌分类为具有HER2/neu基因扩增的、HER2/neu 过度表达的或具有低、中、高水平的HER2/neu表达的。可将要治疗的乳腺癌根据选自雌激素受体(ER), 孕酮受体(PR), 人表皮生长因子受体-2、Ki-67、CA15-3、CA27-29和c-Met的标记物来分类。可将要治疗的乳腺癌分类为未知ER的、富含ER的或缺乏ER的乳腺癌。可将要治疗的乳腺癌分类为

ER阴性或ER 阳性的乳腺癌。乳腺癌的ER分类可以通过任何具有重复性的方法来施行。乳腺癌的ER分类可以按Onkologie 27:175-179 (2004) 中的规定来施行。可将要治疗的乳腺癌分类为未知PR的、富含PR的或缺乏PR的乳腺癌。可将要治疗的乳腺癌分型为PR阴性或PR阳性的乳腺癌。可将要治疗的乳腺癌分型为受体阳性或受体阴性的乳腺癌。可将要治疗的乳腺癌根据CA15-3或CA27-29或两者的升高的血液水平来分类。

[0115] 要治疗的乳腺癌可以包括乳房的局部肿瘤。要治疗的乳腺癌可包括与阴性的前哨淋巴结 (SLN) 活检相关的乳房肿瘤。要治疗的乳腺癌可包括与阳性的前哨淋巴结 (SLN) 活检相关的乳房肿瘤。要治疗的乳腺癌可包括与一个或多个阳性的腋淋巴结相关的乳房肿瘤，其中腋窝淋巴结已经被采用任何适用的方法来分期。要治疗的乳腺癌可以包括已被分类为有淋巴结阴性的状态 (例如，淋巴结阴性) 或淋巴结阳性的状态 (例如，淋巴结阳性) 的乳房肿瘤。要治疗的乳腺癌可以包括已转移到身体其他位置的乳房肿瘤。要治疗的乳腺癌可以包括已转移到选自骨、肺、肝或脑的位置的乳房肿瘤。可将要治疗的乳腺癌根据选自转移的、局部的、区域的、局部区域的、局部晚期的、远处的、多中心的、双侧的、同侧的、对侧的、初诊的、复发的、不宜动手术的特性的进行分类。

[0116] 本发明的化合物可施用于相对于大多数人有上升的患乳腺癌风险的受试者，以治疗或预防乳房细胞增殖失调，或治疗或预防乳腺癌，或者用来识别用于这样的目的的适合的候选者。相对于大多数人有上升的患乳腺癌风险的受试者是有乳腺癌家族史或个人史的女性受试者。相对于大多数人有上升的患乳腺癌风险的受试者有BRCA1或BRCA2或两者兼而有之的生殖细胞系或自发性突变的女性受试者。相对于大多数人有上升的患乳腺癌风险的受试者有乳腺癌的家族史和BRCA1 或BRCA2或两者兼而有之的生殖细胞系或自发性突变的女性受试者。相对于大多数人有上升的患乳腺癌风险的受试者是大于30岁、大于40岁、大于50岁、大于60岁、大于70岁、大于80岁或大于90岁的女性受试者。相对于大多数人有上升的患乳腺癌风险的受试者是患有非典型乳腺增生、原位导管癌 (DCIS)、导管内癌、小叶型原位癌 (LCIS)、小叶瘤或乳房的0阶段生长或病变 (例如，0 阶段或0级乳腺癌或原位癌)。

[0117] 要治疗的乳腺癌可以根据Scarff-Bloom-Richardson分级系统进行组织学分级，其中乳腺肿瘤已经被指定为有丝分裂分数为1、2或3；核多型性分数为1、2或 3；小管形成分数为1、2或3；以及Scarff-Bloom-Richardson总分为3和9之间。要治疗的乳腺癌可以根据乳腺癌治疗国际共识专家组指定肿瘤级别，所述级别选自1级、1-2级、2级、2-3级或3级。

[0118] 在一个实施方式中，本发明提供的是一种治疗乳腺癌的方法，其包括向有需要的受试者给予有效量的化合物I的氢溴酸盐。

[0119] 在另一个实施方式中，本发明提供的是一种治疗乳腺癌的方法，其包括向有需要的受试者给予有效量的晶型A。

[0120] 要治疗的癌症可以根据美国癌症联合委员会 (AJCC) TNM分期系统进行分期，肿瘤 (T) 已被指定为TX、T1、T1mic、T1a、T1b、T1c、T2、T3、T4、T4a、T4b、T4c或T4d期；区域淋巴结 (N) 已被指定为NX、N0、N1、N2、N2a、N2b、N3、N3a、N3b或N3c期；远处转移 (M) 可以被指定为MX、M0或M1期。要治疗的癌症可以根据美国癌症联合委员会 (AJCC) 分期为I期、IIA期、IIB期、IIIA期、IIIB期、IIIC期或IV期。要治疗的癌症可以根据AJCC分级分为GX级 (例如，等级无法进行评估)、1级、2级、3级或4级。要治疗的癌症可以根据AJCC病理分类 (PN) 进行分期，其中包括PNX、PN0、PN0 (I-)、PN0 (1+)、PN0 (mo1-)、PN0 (mo1+)、PN1、PN1 (mi)、PN1a、PN1b、

PN1c、PN2、pN2a、pN2b、PN3、pN3a、pN3b或pN3c。

[0121] 要治疗的癌症可以包括已经被确定为小于或等于约2厘米直径的肿瘤。待治疗的癌症可以包括已被确定为约2至约5厘米直径的肿瘤。待治疗的癌症可以包括已经被确定为大于或等于大约3厘米直径的肿瘤。要治疗的癌症可以包括已被确定为大于5厘米直径的肿瘤。待治疗的癌症可以根据微观形貌分类为良好分化的、中等分化的、不良分化的或未分化的。待治疗的癌症可以以被处理可以根据有丝分裂计数(例如,细胞分裂量)或细胞核的多型性(例如,细胞的改变)来分类。待治疗的癌症可以根据微观形貌分类为与坏死面积(例如,正在死亡或退化的细胞的面积)相关。要治疗的癌症可以分类为具有异常核型、具有异常的染色体数目或具有一个或多个外观异常的染色体。要治疗的癌症可分类为非整倍体、三倍体、四倍体或具有改变的倍性。要治疗的癌症可以分类为具有染色体易位,或整个染色体的缺失或重复,或部分染色体删除、复制或扩增的区域。要治疗的癌症可以通过DNA细胞分析术、流式细胞分析术、图像细胞分析术来评价。要治疗的癌症可以分类为在细胞分裂的合成期(例如在细胞分裂的S期)具有10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 或90%的细胞。要治疗的癌症可以分类成具有低的S期细胞比率或高的S期细胞比率。

[0122] 如本文所述的“正常细胞”是不能被归类为“细胞增殖失调”的一部分的细胞。正常细胞缺乏可能会导致不必要的病症或疾病的发展的不受管制的生长或不正常的生长,或缺乏此两者。优选地,正常细胞具有正常运行的细胞周期检查点控制机制。

[0123] 如本文所述的“接触细胞”是指其中物质的化合物或其它组合物与细胞直接接触或者足够近以诱导所期望的细胞中的生物效应的状态。

[0124] 本文所使用的“候选化合物”是指已经或将被在一个或多个体外或体内生物测试中进行检测,以确定该化合物是否在细胞、组织、系统、动物或人类中可能引起研究者或临床医生所寻求的所需的生物学或医学反应的本发明的化合物(即化合物I的氢溴酸盐,以及晶型A)。候选化合物是指本发明中的化合物。所述生物学或医学反应可以是癌症的治疗。所述生物学或医学反应可以是细胞增殖失调的治疗或预防。生物学反应或效果还可以包括发生在体外或在动物模型中的细胞增殖或生长的变化,以及在体外可观察到的其他生物学变化。体外或体内生物测试可以包括但不限于酶的活性测试、电泳迁移率变动分析测试、报告基因测试、体外细胞存活率测试和本文所描述的测试。

[0125] 本文所使用的“单药治疗”是指向需要的受试者给予单一的活性的或治疗的化合物的给药。优选地,单药治疗包括治疗上有效量的活性化合物给药。例如,用本发明的一种化合物(即化合物I的氢溴酸盐,以及晶型A)对需要治疗癌症的受试者进行癌症单药治疗。单药治疗可与联合治疗相比,所述联合治疗为多个活性化合物的组合联合给药,优选在组合中每个成分均以治疗有效剂量存在。在一个方面,用本发明的化合物进行的单药治疗在诱导所需的生物效应方面比联合治疗更为有效。

[0126] 本文所使用的“治疗中”或“治疗”描述了为对抗疾病、病症或紊乱的目的对患者的管理和护理,并包括向其给予本发明的化合物(即化合物I的氢溴酸盐,以及晶型A),以减轻疾病、病症或紊乱的症状或并发症,或消除疾病、病症或紊乱。术语“治疗”还可以包括体外的细胞或动物模型的治疗。

[0127] 本发明的化合物(即化合物I的氢溴酸盐,以及晶型A)也可用于预防疾病、病症或紊乱,或用于识别用于这样的目的的合适的候选者。本文使用的“预防中”或“预防”描述了

减少或消除这样的疾病、病症或紊乱的症状或并发症的发作。

[0128] 本文所使用的术语“缓解”是为了描述一个过程,经过该过程一种疾病的体征或症状的严重程度降低。重要的是,所述体征或症状可缓解而没有消除。在一个优选的实施方式中,本发明的药物组合物的给药导致疾病的症状或体征的消除,然而,消除不是必需的。有效剂量应该被期望能减轻症状或体征的严重程度。例如,诸如癌症的疾病,它可以发生在多个位置,如果在多个位置中的至少一个位置中的癌症的严重程度减轻了,那么它的体征或症状就缓解了。

[0129] 本文所使用的术语“严重程度”是为了描述癌症从癌前或良性状态转化成恶性状态的潜力。作为另选或附加,严重程度用于描述癌症的阶段,例如,根据 TNM分期系统(被国际抗癌联盟(UICC)和美国癌症联合委员会(AJCC)所接受)或其他本领域认可的方法。癌症的阶段是指癌症的基于各种因素的范围或严重程度,所述因素例如为原发性肿瘤的位置、肿瘤大小、肿瘤数目、淋巴结转移(进入淋巴结的癌症的扩散)。作为另选或附加,严重程度是通过本领域公认的方法来描述肿瘤的分级(见美国国家癌症研究所, www.cancer.gov)。肿瘤分级是用来依据显微镜下看到的癌细胞的异常程度以及该肿瘤可能的生长和扩散的快速程度来为癌细胞分类的体系。确定肿瘤级别时会考虑许多因素,包括细胞的结构和增长方式。用于确定肿瘤级别的具体因素随癌症类型的不同而不同。严重程度还描述了组织学分级,也称为分化,这是指相同的组织类型中有多少类似于正常细胞的肿瘤细胞(见美国国家癌症研究所, www.cancer.gov)。此外,严重程度描述了细胞核级别,所述细胞核级别是指肿瘤细胞中的细胞核的大小和形状,以及正在分裂的肿瘤细胞的百分比(参见,美国国家癌症研究所, www.cancer.gov)。

[0130] 在本发明的另一个方面,严重程度还可以描述肿瘤已经分泌生长因子、降解细胞外基质、变为血管化、失去与并列组织的附着力或转移的程度。此外,严重程度可以形容原发性肿瘤已经转移到的位置的数量。最后,严重程度可以包括不同类型和位置的肿瘤的治疗的难度。例如,不能手术的肿瘤、有更多通道进入到全身多个系统的那些肿瘤(血液学和免疫学肿瘤)和那些最能抵抗传统治疗方法的肿瘤被认为是最严重的。在这些情况下,延长受试者的寿命和/或减轻疼痛、减少癌变细胞的比例或将细胞限制在一个系统内,以及改善癌症分期/肿瘤分级/组织学分级/细胞核级别被认为是缓解癌症的症状或体征。

[0131] 本文所使用的术语“症状”被定义为疾病、病、受伤或身体某部分不正常的表现。症状能被经历所述症状的人感觉或注意到,但可能不容易被其他人注意到。其他人被定义为非卫生保健专业人员。

[0132] 本文所使用的术语“体征”也被定义为身体某部分不正常的表现。但体征可以由医生、护士或其他卫生保健人员发现。

[0133] 癌症是可导致几乎任何体征或症状的一组疾病。症状和体征将取决于癌症的位置、癌症的大小以及其影响附近器官或组织的程度。如果癌细胞扩散(转移),那么症状可出现在身体的不同部位。

[0134] 随着癌症的生长,其开始压迫附近的器官、血管和神经。这种压力导致癌症的一些症状和体征。如果癌症是在一个关键的区域,如脑的某些部位,即使是最小的肿瘤也能导致早期症状。

[0135] 但有时癌症起始于除非癌症已经变得相当大,否则不会引起任何症状的地方。例

如,胰腺的癌症通常不会生长到大得足以从身体的外部感觉到。有些胰腺癌不引起症状,直到它们开始在附近的神经周围生长(这会导致背痛)。其他的在胆管周围生长,这会阻止胆汁的流动,因此导致皮肤泛黄,称为黄疸。到胰腺癌导致这些体征或症状的时候,通常已经到了晚期。

[0136] 癌症也可造成如发烧、疲劳或体重减轻的症状。这可能是由于癌症细胞利用了身体的能量供应或释放了改变人体新陈代谢的物质。或者,癌症可导致免疫系统以产生这些症状的方式反应。

[0137] 有时,癌症细胞释放物质到血液中,引起通常不被认为是癌症导致的症状。例如,一些胰腺癌可以释放引起血液凝块在腿部静脉发展的物质。有些肺癌会产生影响血钙水平的激素样物质,从而影响神经和肌肉并导致虚弱和头晕。

[0138] 癌症存在几个当癌症细胞的各种亚型存在时会产生的症状或体征。大多数癌症患者会在某一段时间伴随着疾病而体重减轻。不明原因的(非故意的)减重10磅或更多可能是癌症的第一个体征,特别是胰腺癌、胃癌、食道癌或肺癌。

[0139] 发烧常常伴随着癌症,但更经常出现在疾病晚期。几乎所有的癌症患者会在某一段时间内会发烧,特别是如果癌症或其治疗影响免疫系统,从而使得身体更难以对抗感染。在很少的情况下,发烧可能是癌症的早期体征,如白血病或淋巴瘤。

[0140] 随着癌症的进展,疲劳成为一个重要的症状。然而在诸如白血病的癌症中,或者如果癌症正引起一个持续的失血、如在某些结肠或胃癌中,那么它可能发生于癌症早期。

[0141] 疼痛可能是某些癌症如骨肿瘤或睾丸癌的早期症状。但最常见的是,疼痛是癌症晚期的一种症状。

[0142] 伴随皮肤癌(见下一节),一些内部的癌症可引起可见的皮肤体征。这些变化包括皮肤看起来较暗(色素沉着)、黄色(黄疸)或红色(红斑)、瘙痒或过度毛发生长。

[0143] 作为另选或附加,肿瘤亚型存在特定的体征或症状。排便习惯或膀胱功能的变化可能表明癌症。长期便秘、腹泻或大便的大小的变化可能是结肠癌的一个体征。排尿疼痛、尿中带血或膀胱功能的变化(如更加频繁或更加不频繁的排尿),可能与膀胱或前列腺癌有关。

[0144] 皮肤状况的变化或新的皮肤状况的出现可能预示癌症。皮肤癌可能会流血,看起来像不愈合的疮。持久的嘴疮可能是口腔癌,尤其是在吸烟、咀嚼烟草或经常喝酒的患者中。阴茎或阴道上的溃疡可能是感染或早期癌症的体征。

[0145] 不寻常的出血或排泄可能预示癌症。不寻常的出血可以发生在癌症早期或晚期。唾液(痰)带血可能是肺癌的一个体征。便血(或暗或黑便)可能是结肠癌或直肠癌的一个体征。子宫颈或子宫内膜(子宫的内层)的癌症可以引起阴道出血。尿中带血可能是膀胱或肾脏癌的体征。来自乳头的血性溢液可能是乳腺癌的一个标志。

[0146] 乳房或其他身体部位增厚或有肿块可能表明癌症的存在。许多癌症可以通过主要是在乳房、睾丸、淋巴结(腺)、身体的软组织处的皮肤察觉。肿块或增厚可能是癌症的早期或晚期体征。任何肿块或增厚可以是癌症的征兆,特别是新形成的或已经长到一定的大小。

[0147] 消化不良或吞咽困难可能预示癌症。尽管这些症状通常有其他原因,但是消化不良或吞咽困难问题可能是食道癌、胃癌、或咽(喉)癌的体征。

[0148] 疣或痣的近期变化可能预示癌症。任何疣、痣或雀斑的颜色、大小或形状的变化或

失去其明确的边界表明癌症的潜在发展。例如,皮肤的病变可能是黑色素瘤。

[0149] 持续咳嗽或声音嘶哑可能预示癌症。咳嗽不消失可能是肺癌的一个标志。声音嘶哑可能是喉部(喉头)或甲状腺癌的一个体征。

[0150] 虽然上面列出的症状和体征在癌症中比较常见,但是还有许多其它不常见的症状和体征这里没有列出。

[0151] 所述癌症治疗可以导致肿瘤尺寸变小。肿瘤尺寸变小也可以被称为“肿瘤衰退”。优选地,在治疗后,相对于治疗前肿瘤尺寸将减小5%或以上;更优选地,肿瘤尺寸减小10%或以上;更优选地,减小20%或以上;更优选地,减小30%或以上;更优选的是,减小40%或以上;更优选的是,减小50%或以上;最优选的,减小大于75%或以上。肿瘤的大小可通过任何可再现的测量手段测量。肿瘤的尺寸可通过其直径测量。

[0152] 癌症治疗可以导致肿瘤体积减小。优选地,在治疗后,相对于治疗之前肿瘤体积将减少5%或更大;更优选的是,肿瘤体积减小10%或以上;更优选地,减少20%或以上;更优选地,减少30%或以上;更优选的是,减少40%或以上;更优选的是,减少50%或以上;最优选的,大于75%或更大的减少。肿瘤的面积可通过任何可再现的测量手段测量。

[0153] 癌症治疗可以导致肿瘤数目减少。优选的是经过治疗,相对于治疗之前肿瘤数目将减少5%或更多;更优选地是肿瘤数目减少10%或更多;更优选地,减少20%或更多;更优选地,减少30%或更多;更优选地,减少40%或更多;更优选的是,减少50%或更多;最优选的是,减少大于75%。肿瘤数目可通过任何可再现的测量手段测量。肿瘤的数量可以通过对肉眼可见的或特定的放大倍率下的肿瘤进行计数来测量。优选地,所述特定的放大倍率为2倍、3倍、4倍、5倍、10倍或50倍。

[0154] 癌症治疗可以导致在远离原发肿瘤部位的其他组织或器官的转移灶的数量减少。优选的是,经过治疗,相对于治疗之前转移灶的数目将减少5%或更多;更优选地,转移灶的数量减少了10%或更多;更优选地,减少了20%或更多;更优选的是,减少了30%或更多;更优选的是,减少了40%或更多;更优选的是,减少了50%或更多;最优选的是,减少大于75%。转移灶的数目可通过任何可再现的测量手段测量。转移灶的数目可通过对肉眼可见的或特定的放大倍率下的转移灶进行计数来测量。优选地,所述指定的放大倍率为2倍、3倍、4倍、5倍、10倍或50倍。

[0155] 癌症治疗可以导致接受治疗的受试者群体同仅接受载体的群体相比,平均生存期增加。优选地,平均生存期将增加超过30天;更优选超过60天;更优选超过90天;最优选超过120天。群体的平均生存期的增加可由任何可再现的测量手段测量。群体的平均生存期的增加可例如通过计算用活性化合物开始治疗后的群体的平均存活时间来测量。群体的平均生存期的增加也可例如通过计算采用活性化合物进行第一轮治疗结束后的群体的平均存活时间来测量。

[0156] 癌症治疗可以导致接受治疗的受试者群体同未接受治疗的受试者群体相比,平均生存期增加。优选地,平均生存期将增加超过30天;更优选超过60天;更优选超过90天;最优选超过120天。群体的平均生存期的增加可由任何可再现的测量手段测量。群体的平均生存期的增加可例如通过计算群体用活性化合物开始治疗后的平均存活时间来测量。群体的平均生存期的增加也可例如通过计算群体采用活性化合物进行第一轮治疗结束后的平均存活时间来测量。

[0157] 癌症治疗可以导致接受治疗的受试者群体同采用非本发明的化合物进行单药治疗的受试者群体相比,平均生存期增加。优选地,平均生存期将增加将超过 30天;更优选地,增加将超过60天;更优选地,增加将超过90天;最优选地,增加将超过120天。群体的平均生存期的增加可由任何可再现的测量手段测量。群体的平均生存期的增加可例如通过计算群体用活性化合物开始治疗后的平均存活时间来测量。群体的平均生存期的增加也可例如通过计算群体采用活性化合物进行第一轮治疗结束后的平均存活时间来测量。

[0158] 癌症治疗可以导致接受治疗的受试者群体同仅接收载体的受试者群体相比,死亡率降低。癌症治疗可以导致治疗的受试者群体受试者同未接受治疗的受试者群体相比,死亡率降低。癌症治疗可以导致接受治疗的受试者群体同采用非本发明的化合物进行单药治疗的受试者群体相比,死亡率降低。优选地,死亡率减少将超过2%;更优选地,减少将超过5%;更优选地,减少将超过10%;最优选地,减少将超过25%。接受所述治疗的受试者群体死亡率的减少可由任何可再现的测量手段测量。群体死亡率的减少可例如通过计算用活性化合物开始治疗后每单位时间与疾病相关的平均死亡人数来测量。群体死亡率的减少也可以例如通过计算用活性化合物完成第一轮治疗后每单位时间与疾病相关的平均死亡人数来测量。

[0159] 癌症治疗可以导致肿瘤的生长速度降低。优选地,在治疗后,相对于治疗之前肿瘤的生长速度将降低至少5%;更优选地,肿瘤的生长速度将降低至少10%;更优选地,将降低至少20%;更优选地,降低至少30%;更优选地,将降低至少 40%;更优选地,将降低至少 50%;更优选地,将降低至少50%;更优选地,将降低至少75%。测量肿瘤的生长速率可由任何可再现的测量手段测量。根据每单位时间肿瘤直径的变化,可以测量肿瘤的生长速度。

[0160] 癌症治疗可以导致肿瘤再生减少。优选地,在治疗后,肿瘤再生将少于5%;更优选地,肿瘤再生将少于10%;更优选地,肿瘤再生将少于20%;更优选地,肿瘤再生将少于30%;更优选地,肿瘤再生将少于40%;更优选地,肿瘤再生将少于50%;甚至更优选地,肿瘤再生将少于50%;最优选地,肿瘤再生将少于75%。肿瘤生长可由任何可再现的测量手段测量。肿瘤再生可以通过例如测量经过治疗后先前肿瘤收缩后的肿瘤直径的增加来测量。肿瘤治疗结束后肿瘤复发失败表明肿瘤再生的减少。

[0161] 对细胞增殖失调的治疗或预防可以导致细胞增殖率降低。优选地,在治疗后,细胞增殖率将降低至少5%;更优选地,将降低至少10%;更优选地,将降低至少20%;更优选地,将降低至少30%;更优选地,将降低至少40%;更优选地,将降低至少50%;甚至更优选地,将降低至少50%;最优选地,将降低至少75%。细胞增殖率可由任何可再现的测量手段测量。细胞增殖率可通过例如测量每单位时间组织样本中分裂的细胞数量来测量。

[0162] 对细胞增殖失调的治疗或预防可以导致增殖细胞比例减少。优选地,在治疗后,增殖细胞比例将减少至少5%;更优选地,将减少至少10%;更优选地,将减少至少20%;更优选地,将减少至少30%;更优选地,将减少至少40%;更优选地,将减少至少50%;甚至更优选地,将减少至少50%;最优选地,将减少至少75%。增殖细胞比例可由任何可再现的测量手段测量。优选地,增殖细胞比例通过例如量化组织样本中分裂细胞数目与非分裂细胞的数量相对量来测量。增殖细胞比例可以等同于有丝分裂指数。

[0163] 对细胞增殖失调的治疗或预防可以导致细胞增殖的面积或区域的尺寸减小。优选地,在治疗后,相对于治疗之前细胞增殖的面积或区域的尺寸将减小至少5%;更优选地,将

减小至少10%；更优选地，将减小至少20%；更优选地，将减小至少30%；更优选地，将减小至少40%；更优选地，将减小至少50%；甚至更优选地，将减小至少50%；更优选地，将减小至少75%。细胞增殖的面积或区域的尺寸可由任何可再现的测量手段测量。细胞增殖的面积或区域的尺寸可以以细胞增殖区域的直径或宽度来测量。

[0164] 对细胞增殖失调的治疗或预防可以导致具有异常外观或形态的细胞数目或比例减少。优选地，在治疗后，相对于治疗之前具有异常形态的细胞数量将减少至少5%；更优选地，将被减少至少10%；更优选地，将减少至少20%；更优选地，将减少至少30%；更优选地，将减少至少40%；更优选地，将减少至少50%；甚至更优选的是，将减少至少50%；以及最优选地，将减少至少75%。细胞的异常外观或形态可由任何可再现的测量手段测量。异常的细胞形态可以通过例如使用倒置的组织培养显微镜来显微镜测量。细胞形态异常可以表现为核多型性的形式。

[0165] 本文所使用的术语“选择性地”是指在一个群体中比在另一个群体中倾向于发生的频率更高。比较的群体可以是细胞群。优选地，本发明的化合物(即化合物I的氢溴酸盐，以及晶型A)选择性地作用于癌症或癌症前期的细胞，但不包括正常细胞。本发明的化合物选择性地作用来调节一个分子靶标(例如，靶蛋白甲基转移酶)，但不显著调节另一种分子靶标(例如，非靶蛋白甲基转移酶)。本发明还提供了一种选择性地抑制酶(例如蛋白甲基转移酶)活性的方法。优选地，如果事件发生于群体A的频率大于发生于群体B的2倍，那么相对于群体B，事件选择性地发生于群体A。如果相对于群体B五倍以上更频繁地发生于群体A，那么事件是选择性地发生。如果相对于群体B十倍以上更频繁地发生于群体A，那么事件是选择性地发生；更优选地，五十倍以上；甚至更优选地，一百倍以上；最优选地，相对于群体B一千倍以上更频繁地发生于群体A。例如，如果与正常细胞相比细胞凋亡两倍以上更频繁地发生于肿瘤细胞，那么可以说细胞凋亡选择性地发生在癌细胞中。

[0166] 本发明化合物可以调节分子靶标(例如，靶蛋白甲基转移酶)的活性。调节是指刺激或抑制分子靶标的活性。优选地，如果刺激或抑制了相对于只是缺少所述化合物存在的相同条件下的分子靶标的活性的至少两倍的分子靶标的活性，那么本发明的化合物调节了分子靶标的活性。更优选地，如果刺激或抑制了相对于缺少所述化合物存在的相同条件下的分子靶标的活性的至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少50倍、至少100倍的分子靶标的活性，那么本发明的化合物调节了分子靶点的活性。分子靶标的活性可由任何可再现的测量手段测量。分子靶标的活性可在体外或体内测定。例如，分子靶标的活性可以通过酶活性测定方法或DNA结合分析法在体外测定，或者分子靶标的活性可通过测定报告基因的表达在体内测定。

[0167] 如果所述化合物的加入没有刺激或抑制相对于只是缺少所述化合物存在的相同条件下的分子靶标活性的10%以上的分子靶标活性，那么本发明的化合物没有显著调节分子靶标的活性。

[0168] 本文所使用的术语“同工酶选择性的”是指相比同一种酶的第二种异构体优先抑制或刺激所述酶的第一种异构体(例如，相比蛋白甲基转移酶的 β -异构体优先抑制或刺激其 α -异构体)。优选地，本发明的化合物表明所需剂量上最小值为四倍差，优选十倍的差，更优选为五十倍差来实现生物效应。优选地，本发明的化合物表明了整个抑制范围的这种差别，并且所述差别体现在对于感兴趣的分子靶标的 IC_{50} 值，即50%抑制。

[0169] 向细胞或有需要的受试者给予本发明的化合物可以导致所感兴趣的蛋白甲基转移酶的活性的调节(即,刺激或抑制)。

[0170] 对癌症或细胞增殖障碍的治疗可以导致细胞死亡,优选地,细胞死亡会导致细胞群中至少10%的细胞数减少。更优选地,细胞死亡意味着减少至少20%;更优选地,减少至少30%;更优选地,减少至少40%;更优选地,减少了至少50%;最优选地,减少至少75%。细胞群中的细胞数目可由任何可再现的测量手段测量。在细胞群中的细胞数目可以通过荧光激活细胞分类(FACS)、免疫荧光显微镜和光学显微镜测量。测量细胞死亡的方法如Li et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 100(5):2674-8, 2003所示。在一个方面,细胞死亡以凋亡形式发生。

[0171] 优选地,有效量的本发明的化合物对正常细胞没有显著的细胞毒性。当给予治疗有效量的化合物在正常细胞中诱导细胞死亡不超过10%时,治疗有效量的所述化合物对正常细胞没有显著的细胞毒性。当给予治疗有效量的化合物在正常细胞中诱导细胞死亡不超过10%时,治疗有效量的所述化合物对正常细胞的生存力没有显著影响。在一个方面,细胞死亡以凋亡形式发生。

[0172] 使本发明的化合物接触细胞可以选择性地诱导或激活癌细胞中的细胞死亡。向有需要的受试者给予本发明的化合物可以选择性地诱导或激活癌细胞中的细胞死亡。细胞与本发明化合物或其药学上可接受的盐、前体药物、代谢物、多晶型物或溶剂化物相接触可能或可以选择性地诱导一个或多个受细胞增殖性疾病影响的细胞的细胞死亡。优选地,向有需要的受试者给予本发明的化合物可选择性地诱导一个或多个受细胞增殖性疾病影响的细胞的细胞死亡。

[0173] 本发明涉及一种通过向有需要的受试者给予本发明的化合物来治疗或预防癌症(例如可以通过调节EZH2介导的蛋白甲基化影响这一过程)的方法,其中给予本发明的化合物会导致一个或多个下列结果:通过在细胞周期中的一个或多个阶段(例如,G1、G1/S、G2/M)的细胞积累、细胞衰老的诱导或肿瘤细胞分化的促进来预防癌细胞增殖;通过细胞毒性作用促进癌细胞中的细胞死亡、坏死或凋亡,而不造成显著的正常细胞中的细胞死亡,在动物中的抗肿瘤活性的治疗指数至少为2。如本文所使用的,“治疗指数”是最大耐受剂量除以有效剂量。本发明还涉及用于识别治疗或预防癌症的合适的候选者的方法。

[0174] 对于本文讨论的公知技术或等效技术的详细描述,本领域的普通技术人员可以参考通用参考文本。所述参考文本包括Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc. (2005); Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (2000); Coligan et al., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, N.Y.; Enna et al., Current Protocols in Pharmacology, John Wiley & Sons, N.Y.; Fingl et al., The Pharmacological Basis of Therapeutics (1975), Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 18th edition (1990)。当然,这些文本在制造或应用本发明的一个方面时可被提及。

[0175] 实施例

[0176] 材料和方法

[0177] 粉末X射线衍射

[0178] 所有样品的PXRD在Rigaku MultiFlex上测定(靶标:Cu;管电压:40kV;管电流:30mA)。

[0179] 差示扫描量热

[0180] 所有样品的DSC在Mettler-Toledo DSC 1/700上测定(运行条件:起始温度 35℃,最终温度325℃,加热速率30℃/min)。

[0181] X射线晶体学

[0182] 使用非常小量的paratone油将具有晶体维度0.28x 0.22x 0.06mm的无色片状晶体安装在尼龙环上。使用基于Bruker CCD(电荷耦合设备)的、装备有Oxford Cryostream低温装置的衍射计在173K收集数据。使用 ω 和 Φ 扫描0.5°每帧持续 45s以测定数据。图像的总数量基于来自COSMO程序的结果,其中在0.83 Å冗余度期望为4.0,完整性为100%。使用APEX II软件检索晶胞参数并且使用SAINT 精修所有观测到的反射。使用修正Lp尺度的SAINT软件进行数据精简,并且使用SADABS多扫描技术吸进行修正,其由George Sheldrick提供。使用 SHELXS-97程序通过直接方法解出结构,并通过最小二乘法在F², SHELXL-97 上对其进行精修,其被包含在SHELXTL-PC V 6.10中。

[0183] 图11中显示的结构是在空间群P2₁/c (#14)中解出的。所有非氢原子都各向异性精修。氢通过几何方法计算,并且精修为riding模型。用于衍射研究的晶体在数据收集过程中不显示分解。所有绘图在50%椭圆体完成。

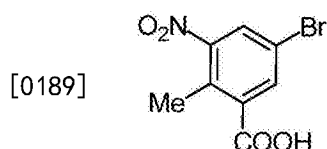
[0184] 动态蒸汽吸附

[0185] DVS是在VTI模型SGA-100系统上测定的。测定方法:使用重量蒸气吸附系统使相对湿度(RH)以可控的形式改变,以5%的梯度从5.0%至95.0%,然后回到5.0%,并测定样品在各阶段的重量百分变化(wt%)。

[0186] HPLC

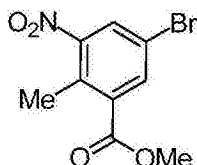
[0187] 在Agilent 1200HPLC四元液相泵中进行HPLC,用联机的脱气器低压混合。分析方法条件:8μL样品(使用50mL甲醇稀释20mg ER-581982-06以提供大约0.4mg/mL的溶液)被注入Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18(4.6x 150mm,3.5um),色谱条件:流动相A,含有5mM甲酰胺的水;流动相B,5mM甲酰胺在50/45/5 的乙腈/甲醇/水中;流速,1.5ml/min;梯度:从第0至3分钟,以10%B洗脱;从第3至7分钟线性增加至70%B;第7至12分钟以70%B洗脱;从第12至 15分钟,线性增加至100%B。在第15至20分钟以100%B洗脱;柱温,35℃;检测,UV230nm。化合物I的近似保留时间=10.7min。

[0188] 晶型A的合成



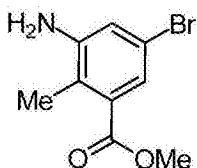
[0190] 5-溴-2-甲基-3-硝基苯甲酸 室温下,向搅拌中的2-甲基-3-硝基苯甲酸(100g, 552mmol)的浓H₂SO₄(400mL)溶液中分批地加入1,3-二溴-5,5-二甲基-2,4-咪唑烷二酮(88g, 308mmol),然后将反应混合物在室温下搅拌5h。将反应混合物倾入冰水,将沉淀的固体滤出,用水洗涤并真空干燥,以得到固体的目标化合物(140 g, 98%)。分离出的化合物直接用于下一步。¹H NMR(DMSO-d₆, 400MHz) δ8.31(s, 1H), 8.17(s, 1H), 2.43(s, 3H)。

[0191]



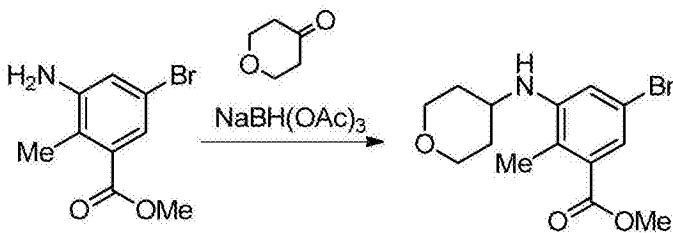
[0192] 5-溴-2-甲基-3-苯甲酸甲酯 室温下,向搅拌中的5-溴-2-甲基-3-硝基苯甲酸(285g,1105mmol)的DMF(2.8L)溶液内加入碳酸钠(468g,4415mmol),随后加入碘代甲烷(626.6g,4415mmol)。将得到的反应混合物在60℃加热8 h。反应完成后(使用TLC检测),将反应混合物过滤(移除碳酸钠)并用乙酸乙酯(1LX3)洗涤。合并后的滤液用水洗涤(3L X 5),水相使用乙酸乙酯(1L X 3)反萃。合并后的有机层使用无水硫酸钠干燥,过滤并减压浓缩得到固体目标产物(290g,产率97%)。分离后的化合物直接用于下一步。¹H NMR(CDCl₃, 400 MHz) δ8.17 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 3.96 (s, 3H), 2.59 (s, 3H)。

[0193]



[0194] 3-氨基-5-溴-2-甲基苯甲酸甲酯(1) 向搅拌中的5-溴-2-甲基-3-硝基苯甲酸甲酯(290g,1058mmol)的乙醇(1.5L)溶液中加入氯化铵水溶液(283g,5290mmol 溶于1.5L水)。得到的混合物在80℃下搅拌,向其中分批加入铁粉(472g,8451 mmol)。得到的反应混合物在80℃下加热12h。TLC确定反应完成后,反应混合物使用硅藻土®热过滤,使用甲醇(5L)洗涤硅藻土床,然后使用含30%MeOH的DCM(5L)洗涤。合并的滤液在真空中浓缩,得到的残渣使用碳酸氢钠溶液(2L)稀释,并使用乙酸乙酯(5LX3)萃取。合并的有机层使用无水硫酸钠干燥,过滤并在减压浓缩得到固体的目标化合物(220g,85%)。该化合物直接用于下一步。¹H NMR(CDCl₃, 400MHz) δ7.37 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.80 (bs, 2H), 2.31 (s, 3H)。

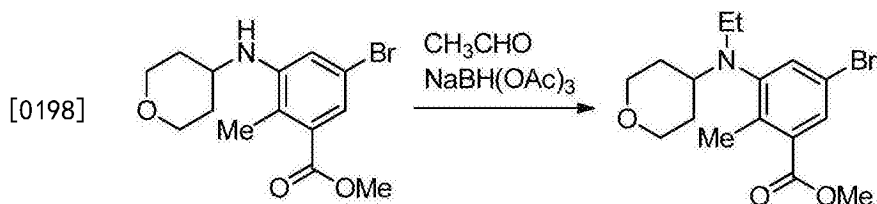
[0195]



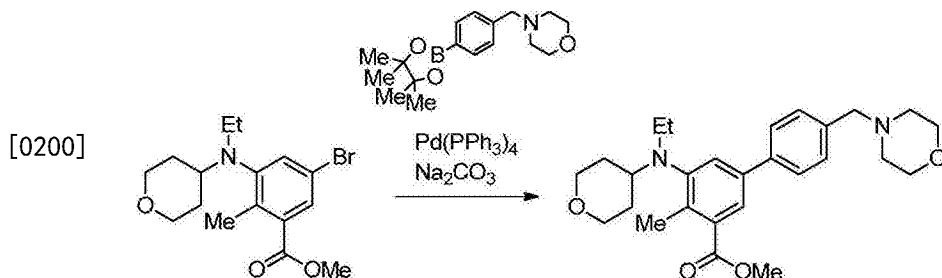
[0196] 5-溴-2-甲基-3-((四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)苯甲酸甲酯(2) 将3-氨基-5-溴-2-甲基苯甲酸酯(455.8g,1.87mol)、1,2-二氯乙烷(4.56L)以及乙酸(535ml,9.34 mol)加到反应器中。向混合物中加入二氢-2H-吡喃-4(3H)-酮(280g,2.80mol)和三乙酰氧基硼氢化钠(594g,2.80mol),保持内温低于40℃。混合物在25℃下搅拌2.5h后,使用氢氧化钠(448g,11.20mol)的水溶液(5.61L)淬灭反应。在室温下搅拌20分钟后,分离有机层并使用乙酸乙酯(3.65L)萃取水层。合并有机层,用饱和食盐水(1.5L)洗涤并在真空下浓缩。

[0197] 残余物使用乙酸乙酯(1.8L)处理,并加热至65-70℃。混合物在65-70℃下搅拌15分钟以得到澄清溶液,随后使用正庚烷(7.3L)处理,保持温度在60-70℃之间。自正庚烷被完全加入溶液中时起,混合物在65-70℃保持15分钟,并随后允许在3h内冷却至18-22℃。得到的悬液在18-22℃搅拌4h,在1h内冷却至0-5℃并在0-5℃保持2h。滤出沉淀物,使用正庚

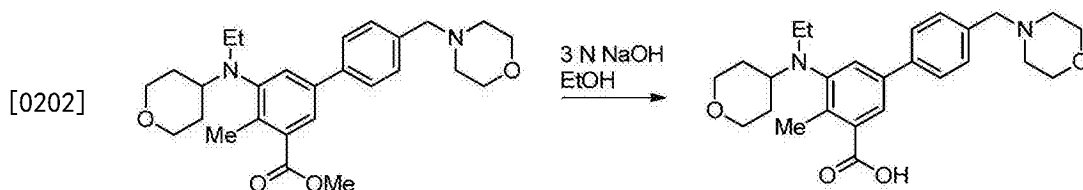
烷(1.4L)洗涤两次并在真空下干燥以得到目标化合物(540g,88%)。该化合物的XRPD图谱如图17所示。



[0199] 5-溴-3-(乙基(四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-2-甲基苯甲酸甲酯(3) 向搅拌中的5-溴-2-甲基-3-((四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)苯甲酸甲酯(14g,42.7mmol)的二氯甲烷(150mL)溶液中加入乙醛(3.75g,85.2mmol)和乙酸(15.3g,256mmol)。得到的反应混合物在室温下搅拌15分钟。将混合物冷却至0℃并加入三乙酰氧基硼氢化钠(27g,128mmol)。反应混合物在室温下搅拌3小时。TLC确定反应完成后,向反应混合物中加入碳酸氢钠溶液直至其pH达到7-8,分离有机相并用乙酸乙酯萃取水相。合并后的有机层使用无水硫酸钠干燥,过滤并减压浓缩。粗品化合物使用柱层析色谱纯化(100-200目硅胶),使用乙酸乙酯:正己烷洗脱,以得到粘性的液体目标化合物(14g,93%)。¹H NMR(DMSO-d₆,400MHz) δ7.62(s,1H),7.52(s,1H),3.80(bs,5H),3.31(t,2H),2.97-3.05(m,2H),2.87-2.96(m,1H),2.38(s,3H),1.52-1.61(m,2H),1.37-1.50(m,2H),0.87(t,3H,J=6.8Hz)。



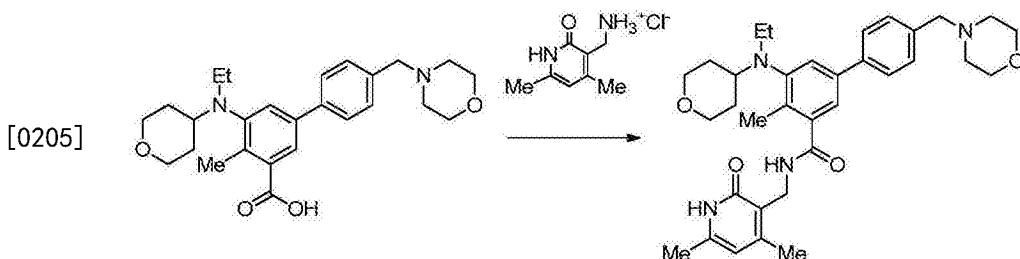
[0201] 5-(乙基(四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-4-甲基-4'-(吗啉基甲基)-[1,1'-联苯基]-3-苯甲酸甲酯(4) 5-溴-3-(乙基(四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-2-甲基苯甲酸甲酯(580g,1.63mol)、4-(4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧化硼-2-基)苄基)吗啉(592g,1.95mol),1,4-二氧六环(3.86L)、碳酸钠(618g,5.83mol)和水(771ml)的混合物,通过在20℃向混合物通入氮气气泡20min脱气,并使用四(三苯基膦)钯(0)(14.11g,12.21mmol)处理。得到的混合物脱气额外20分钟,并且随后加热至87-89℃持续17h。冷却至20℃后,该混合物使用乙酸乙酯(5.80L)和(R)-2-氨基-3-巯基丙酸(232g)的水(2.320L)溶液稀释。在20℃搅拌1小时后,分离有机层并使用(R)-2-氨基-3-巯基丙酸(232g)的水溶液(2.320L)洗涤。合并水层并使用乙酸乙酯(5.80L)萃取。合并有机层,使用氢氧化钠(93g)的水溶液(2.32L)洗涤,并且在35℃真空浓缩,以得到橙色油状的目标化合物(1.21kg,产率164%)。



[0203] 5-(乙基(四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-4-甲基-4'-(吗啉基甲基)-[1,1'-联苯基]-3-羧酸(5):5-(乙基(四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-4-甲基-4'-(吗啉基甲基)-[1,1'-联苯

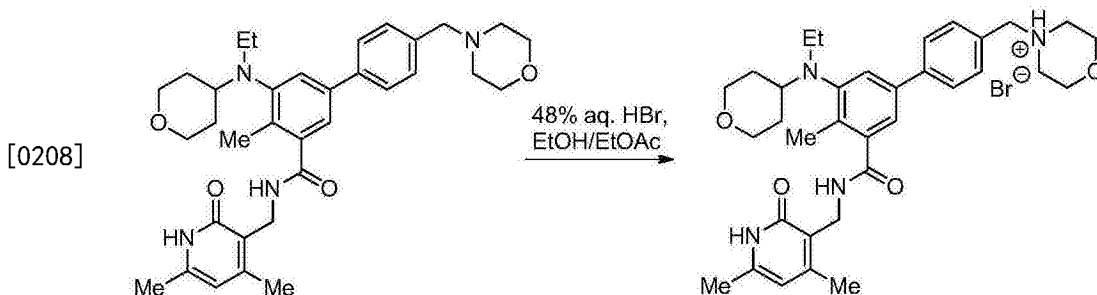
基]-3-羧酸甲酯(69.0g,152.5mmol)(基于上一步中的理论产率)在乙醇(380mL)中悬浮,并且使用氢氧化钠(24.84g,621.0mmol)的水(207mL)溶液处理。混合物在40℃搅拌18h。冷却至0-5℃后,使用1N盐酸(580mL)将混合物中和至pH 6.5,并使温度保持在低于25℃。随后,混合物使用二氯甲烷(690mL)和甲醇(69.0mL)的混合物萃取两次。有机层在真空下浓缩以给出黄色固体的粗产物(127g)。

[0204] 在70℃,将粗产物溶于2-甲基四氢呋喃(656mL),然后使用IPA(828mL)处理。混合物被允许在3-4h内冷却至室温,并在室温下搅拌过夜。滤出沉淀物,使用IPA(207mL)洗涤两次,并在真空下干燥以得到灰白色的固体目标化合物(53.54g,80%)。该化合物的XRPD图谱如图9所示。



[0206] N-((4,6-二甲基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-3-基)甲基)-5-(乙基(四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-4-甲基-4'-(吗啉基甲基)-[1,1'-联苯基]-3-甲酰胺(化合物I) 5-(乙基(四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-4-甲基-4'-(吗啉基甲基)-[1,1'-联苯基]-3-羧酸(540g,1.23mol)和3-(氨基甲基)-4,6-二甲基-二氢-吡啶-2(1H)-酮盐酸盐(279g,1.48mol)的混合物被悬浮于DMSO(2.70L)中,并使用三乙胺(223ml,1.60mol)处理。混合物在25℃搅拌30min,并使用EDC-HCl(354g,1.85mol)和HOBt水合物(283g,1.85mol)处理。反应混合物在室温下搅拌16h。加完三乙胺(292ml,2.09mol)后,混合物被冷却至15℃,用水(10.1L)稀释,保持温度低于30℃,并在19-25℃搅拌4h。将产生的沉淀过滤,用水(2.70L)洗涤两次,并在真空下干燥以得到粗产物(695g,重量-重量分析=78%)。

[0207] 为了进一步纯化产品,进行重结晶。将粗品(20.00g,34.92mmol)悬浮于乙醇(190ml)和水(10.00ml)的混合物中并加热至75℃直至得到澄清溶液。该溶液被允许过夜冷却至室温。沉淀物被滤出,用乙醇(30.0ml)和水(30.0ml)的混合物洗涤两次,并在35℃真空干燥以得到灰白色的固体目标化合物(14.0g,70%回收自粗品,90%产率,基于重量-重量试验)。



[0209] 4-((3'-(((4,6-二甲基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-3-基)甲基)氨基甲酰基)-5'-(乙基(四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-4'-甲基-[1,1'-联苯基]-4-基)甲基)吗啉-4-鎓溴化物(晶型A):将粗品N-((4,6-二甲基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-3-基)甲基)-5-(乙基(四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-4-甲基-4'-(吗啉基甲基)-[1,1'-联苯基]-3-甲酰胺(595g,464g基于重

量-重量试验810.3mmol) 悬浮于乙醇(3.33L)中。加热至70℃后,使用48% HBr水溶液(97ml, 850.8mmol)处理该混合物并在70℃搅拌30min。得到的橘红色溶液使用乙酸乙酯(3.33L)处理,保持温度高于60℃。混合物在18h内缓慢地冷却至室温。混合物在1h内冷却至0℃并在该温度下搅拌5.5h。滤出得到的沉淀,使用乙酸乙酯(1.39L)洗涤两次,并在真空下干燥以得到灰白色的固体目标化合物(515 g,产率97%)。

[0210] 晶型A的重结晶:将4-(3'-(((4,6-二甲基-2-氧代-1,2-二氢吡啶-3-基)甲基)氨基甲酰基)-5'-(乙基(四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)-4'-甲基-[1,1'-联苯基]-4-基)甲基吗啉-4-鎓溴化物(晶型A)(0.50g,0.77mmol;HPLC测定95.6%纯度)悬浮于乙醇(3.0mL)中,并加热至80℃直至得到澄清的溶液。向溶液内缓慢地加入 MTBE(5.0mL)。得到的溶液被允许在3h内冷却至18-22℃,并在18-22℃搅拌15h。滤出沉淀,使用MTBE(2mL)洗涤两次,并在真空下干燥,以得到0.45g 目标化合物((89%回收,HPLC测定纯度96.6%)。晶型A(单氢溴酸盐)的X射线粉末衍射图谱如图1所示。下面的表1列出了最明显的峰。

[0211] 表1

[0212]

峰(2-θ角)
3.9
10.1
14.3
17.5
18.7
20.6
20.9
21.8
22.0
23.3
23.6

[0213] 化合物I的氢溴酸盐和晶型A的评估

[0214] 若干不同的化合物I的盐形式被制备并筛选,包括盐酸盐、氢溴酸盐、半硫酸盐、钠盐、磷酸盐、硝酸盐、马来酸盐、丙二酸盐和L-酒石酸盐。其中,就方便制备以及吸湿性方面来说,氢溴酸盐(HBr)具有最优秀的物理化学性质。

[0215] 对化合物I的自由碱以及该化合物的HCl盐的进行了详细研究。在使用XRD 和DSC进行的初步晶型筛选中,从化合物I的自由形式中,检测到至少5种不同的晶体形态。由于在自由形式的结晶化过程中观测到的高度可变性,其它盐的晶体形态被追求。在筛选的盐中,单盐酸盐、单氢溴酸盐、半硫酸盐、磷酸盐、马来酸盐L-酒石酸盐和钠盐形式为晶体。磷酸盐和马来酸盐吸湿性非常强,L-酒石酸盐具有弱结晶性。

[0216] 难以从化合物I的HCl盐中得到高度的结晶性。得到晶体和无定型物质的混合物,无关结晶条件。如图8中所示,化合物I的单盐酸盐的DSC数据表明了 在 190.5℃吸热时某些程度上的非结晶性。同样地,化合物I单盐酸盐的动态蒸汽吸附(DVS)数据被获得,并被发现显示出一些吸湿性:在75%相对湿度(RH)、25℃时,观测到4-6%之间的增重(图18B)。这也

许归因于该单盐酸盐的一定程度上的非结晶性本性。参见例如图18A,其显示无定形的化合物I三盐酸盐。由于结晶度的水平是不可控的,所以HCl盐没有被考虑进行进一步开发。

[0217] 如图6所示,化合物I的钠盐的DVS分析显示出显著地吸湿性:在75%相对湿度(RH)、25℃时,观测到大约15%的增重。如图7所示,化合物I的半硫酸盐显示出中强的吸湿性:在75%相对湿度(RH)、25℃时,观测到9-11%之间的增重。这可能归因于该化合物的高度非结晶性本性,因为半硫酸盐DSC数据表明了在不清楚的吸热条件下,程度非常高的非结晶性。

[0218] 在这些晶体化合物中,单氢溴酸盐是结晶性最好,并且吸湿性最小(见图1、3和4)。进一步说,单氢溴酸盐高度稳定,并且抵抗杂质的产生(图5描述了晶型A在三天内于高温下的HPLC分析。晶型A在100℃三天内产生极少的杂质)。有趣的是,化合物I的二-HBr盐被发现根本上是无定形的(图2)。

[0219] 化合物I的单氢溴酸盐的两种不同的晶体形式(晶型A和B)通过不同的溶剂体系获得,并使用XRD、DSC、和TGA-DSC分析表征。来自典型批次的化合物I的这两种不同的晶体形式的XRD和DSC数据如图1、图3和图10所示。晶型B由粉末XRD图谱表征,其峰位于8.5、10.9、16.7、17.4、20.9、22.1和 25.7 ± 0.2 度 $2-\theta$ 处(见图10)。在此二者之间,晶型A被发现本质上更加晶体性。动态蒸汽吸附(DVS)研究显示晶型A是非吸湿性的(图4)。在热力学分析中,观测到起始温度大约为251℃的单吸热峰。此外,从DSC分析中,很明显地,晶型A的重结晶显著增加了材料的结晶性(见图3)。

[0220] 在多种实验规模的运行中,晶型A得到重现性,结晶化条件的轻微改变没有导致不同的晶体形态。

[0221] 野生型和突变PRC2酶试验

[0222] 一般材料

[0223] 从Sigma-Aldrich公司购买可能的最高纯度的S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosylmethionine, SAM)、S-腺苷同型半胱氨酸(S-adenosylhomocysteine, SAH)、N-二甘氨酸(bicine)、KCl、吐温20(Tween20)、二甲基亚砜(DMSO)和牛皮胶(BSG)。二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)购自EMD。3H-SAM购自American Radiolabeled Chemicals,其特异性活性为80Ci/mmol。384孔链霉亲和素闪光板(Flashplates)购自PerkinElmer公司。

[0224] 底物

[0225] 人体组蛋白H3氨基酸残基21-44的代表性肽是由21st Century Biochemicals公司用C端G(K-生物素)连接-亲和和标签结构域和C端酰胺帽合成的,其要么包括未修饰过的赖氨酸27(H3K27me0)要么包括二甲基化的赖氨酸27(H3K27me2)。通过高效液相色谱(HPLC)将此肽纯化至95%以上的纯度,通过液相色谱-质谱联用(LC-MS)来确认。序列列出如下:

[0226] H3K27me0:ATKAARKSAPATGGVKKPHRYRPGGK(生物素)-酰胺(SEQ ID NO:1)

[0227] H3K27me2:ATKAARK(me2)SAPATGGVKKPHRYRPGGK(生物素)-酰胺(SEQ ID NO:2)

[0228] 鸡红细胞寡聚核小体根据已确定的程序从鸡血中纯化。

[0229] 重组PRC2复合物

[0230] 人类PRC2复合物作为4-组分酶复合物纯化,其利用一种杆状病毒表达系统在草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*, sf9)细胞中共表达。表达的亚基为野生型EZH2(NM_004456)或从野生型EZH2构造产生的突变型EZH2Y641F、Y641N、Y641H、Y641S或Y641C、EED

(NM_003797)、Suz12 (NM_015355) 和RbAp48 (NM_005610)。EED亚基包含N端FLAG标签,其用于纯化来自于sf9细胞裂解物的整个4-组分复合物。通过SDS-PAGE和安捷伦生物分析仪(Agilent Bioanalyzer)分析来确定复合物的纯度满足或超过95%。使用布拉德福德(Bradford)法、以牛血清白蛋白(BSA)标准液作为对照来确定酶浓缩母液的浓度(通常为0.3-1.0mg/mL)。

[0231] 对多肽底物的PRC2酶试验的一般程序

[0232] 所有的试验均在由20mM的N-二甘氨酸(pH值=7.6)、0.5mM的DTT、0.005%的BSG和0.002%的吐温20构成的缓冲液中进行,缓冲液在使用当天制备。用配有384通道吸量管头的板伴侣(Platemate)2×3(Thermo公司)将在100%DMSO(1μL)中的化合物点到384孔聚丙烯V形底板(Greiner公司)中。作为最大信号对照,将二甲基亚砜(1μL)加入到列11、12、23、24,行A-H的孔中,作为最小信号对照,将SAH(PRC2的已知的产物和抑制剂)(1μL)加入到列11、12、23、24,行I-P的孔中。含有野生型PRC2酶和H3K27me0肽或是Y641的任意突变型酶和H3K27me2肽的混合物(40μL)通过Multidrop Combi分液器(Thermo公司)加入。在25℃下将化合物和PRC2一起孵育30分钟,然后加入包含非放射性和³H-SAM的混合物的混合物(10μL)以引发反应(最终体积=51μL)。在所有情况下,终浓度如下:野生型或突变型PRC2酶是4nM,SAH在最小信号对照孔中为1mM,DMSO浓度为1%。其余组分的终浓度显示于下表2中。通过加入非放射性的SAM(10μL)至终浓度为600μm来终止该试验,这样³H-SAM被稀释到不再检测到其并入肽底物的程度。然后将384孔聚丙烯板中的50μL的反应物转移到384孔闪光板中,将生物素化的肽结合到链亲和素表面至少1小时,之后在Biotek ELx405洗板机中用0.1%的吐温20洗涤三次。然后将板在PerkinElmer TopCount读板器上读数以测定结合到闪光板表面的³H-标记的肽的量,其是以每分钟衰变(dpm)或者被称为每分钟计数(cpm)来测量。

[0233] 表2:基于EZH2同一性的每一个试验变化(野生型或Y641突变的EZH2)的组分的终浓度

[0234]

PRC2 酶 (表现为 EZH2 同一性)	肽 (nM)	非放射性 SAM (nM)	³ H-SAM (nM)
野生型	185	1800	150
Y641F	200	850	150
Y641N	200	850	150

[0235]

Y641H	200	1750	250
Y641S	200	1300	200
Y641C	200	3750	250

[0236] 对寡聚核小体底物的野生型PRC2酶试验的一般步骤

[0237] 该试验是在由20mM的N-二甘氨酸(pH值=7.6)、0.5mM的DTT、0.005%的BSG、100mM的KCl和0.002%的吐温20组成的缓冲液中进行,其在使用当天制备。用配有384通道吸量管头的板伴侣2×3(Thermo公司)将在100%的DMSO(1μL)中的化合物点到384孔聚丙烯V形底

板(Greiner公司)中。作为最大信号对照,将二甲基亚砜(1 μ L)加入到列11、12、23、24,行A-H的孔中,作为最小信号对照,将SAH(PRC2的已知的产物和抑制剂)(1 μ L)加入到列11、12、23、24,行I-P的孔中。将含有野生型PRC2酶和鸡红细胞寡聚核小体的混合物(40 μ L)通过Multidrop Combi分液器(Thermo公司)加入。将化合物和PRC2一起在25 $^{\circ}$ C孵育30分钟,然后加入包含非放射性和 3 H-SAM的混合物的混合物(10 μ L)以引发反应(终体积=51 μ L)。终浓度如下:野生型PRC2酶是4nM,非放射性的SAM是430nM, 3 H-SAM为120nm,鸡红细胞寡聚核小体为120nm,SAH的最小信号对照孔为1mM,二甲基亚砜浓度为1%。通过加入非放射性的SAM(10 μ L)至终浓度为600 μ M来终止该反应, 3 H-SAM被稀释到不能再检测到其并入鸡红细胞寡聚核小体底物的程度。然后将384-孔聚丙烯板中的50 μ L的反应物转移到384孔闪光板,将鸡红细胞核小体固定至板表面,之后在Biotek ELx405洗板机中用0.1%的吐温20洗涤三次。然后将板在PerkinElmer TopCount 读板器上读数以测定结合到闪光板表面的 3 H标记的鸡红细胞寡聚核小体的量,其是以每分钟衰变(dpm)或者被称为每分钟计数(cpm)来测量。

[0238] %抑制计算

$$[0239] \quad \% \text{ inh} = 100 - \left(\frac{\text{dpm}_{\text{cmpd}} - \text{dpm}_{\text{min}}}{\text{dpm}_{\text{max}} - \text{dpm}_{\text{min}}} \right) \times 100$$

[0240] 其中,dpm=每分钟衰变,cmpd=试验孔信号,min和max分别是最小和最大信号对照。

[0241] 4参数IC₅₀拟合

$$[0242] \quad Y = \text{底部} + \frac{(\text{顶部} - \text{底部})}{1 + \left(\frac{X}{\text{IC}_{50}} \right)^{\text{Hill 系数}}}$$

[0243] 其中,顶部和底部通常允许浮动,但也可以在3参数拟合中分别固定为100或0。Hill系数通常允许浮动,但也可以在3参数拟合中固定为1。Y为抑制率%,X是化合物浓度。

[0244] 多肽底物(例如,EZH2野生型和Y641F)的PRC2酶试验的IC₅₀值列于下表3中。

[0245] WSU-DLCL2甲基化试验

[0246] WSU-DLCL2悬浮细胞从DSMZ(德国微生物菌种保藏中心,Braunschweig,德国)购买。RPMI/Glutamax培养基、青霉素-链霉素、热灭活胎牛血清和D-PBS 购自Life Technologies公司(Grand Island,纽约州,美国)。提取缓冲液和中和缓冲液(5X)购自Active Motif公司(Carlsbad,加利福尼亚州,美国)。兔抗组蛋白H3抗体购自Abcam公司(Cambridge,马萨诸塞州,美国)。兔抗H3K27me3 和结合了HRP的抗兔IgG购自Cell Signaling Technology公司(Danvers,马萨诸塞州,美国)。TMB“超级敏感”底物来自BioFX实验室(Owings Mills,马里兰州,美国)。无IgG的牛血清白蛋白购自Jackson ImmunoResearch公司(West Grove,宾夕法尼亚州,美国)。含Tween的PBS(10X PBST)从KPL公司(Gaithersburg,马里兰州,美国)购买。硫酸购自Ricca Chemical公司(Arlington,德克萨斯州,美国)。Immulon ELISA板购自Thermo公司(Rochester,纽约州,美国)。V形底细胞培养板购自Corning公司(Corning,纽约州,美国)。V形底聚丙烯板购自Greiner Bio-One公

司(Monroe,北卡罗来纳州,美国)。

[0247] WSU-DLCL2悬浮细胞维持在生长培养基中(补充有10%v/v的热灭活的胎牛血清和100单位/mL的青霉素-链霉素的RPMI 1640),在37℃、5%CO₂中培养。根据试验条件,细胞在板振荡器上、在分析培养基中(补充有20%v/v的热灭活的胎牛血清和100单位/mL的青霉素-链霉素的RPMI 1640)、在37℃、5%CO₂中孵育。

[0248] WSU-DLCL2细胞在分析培养基中以每毫升50000个细胞的浓度向96孔V形底细胞培养板中以每孔200μL的量接种。将96孔源板的化合物(1μL)直接加入到V形底细胞板中。将板在37℃、5%CO₂下在滴度板摇床上孵育96小时。孵育四天后,将板以241×g转速离心五分钟,将培养基从细胞板的每个孔中轻轻地吸出,而不干扰细胞沉淀。将沉淀重悬于200μL的DPBS,然后将板再次以241×g转速离心五分钟。将上清液吸出,将冷(4℃)提取缓冲液(100μL)加入到每个孔中。在4℃下,将板在定轨摇床上孵育2小时。将平板以3427×g的转速离心10分钟。将上清液(每孔80μL)转移到其在96孔V形底聚丙烯板上的相应的孔中。把5×中和缓冲液(每孔20μL)加入到含有上清液V形底聚丙烯板中。含粗蛋白制剂(CHP)的V形底聚丙烯板在定轨摇床上孵育五分钟。将粗组蛋白制剂(每孔2μL)分别加入到包含100μL包被缓冲液(1×PBS+BSA 0.05%w/v)的重复的96孔ELISA板的孔中。将平板密封并在4℃下孵育过夜。第二天,将板用每孔300μL的1×PBST洗涤三次。以每孔300μL ELISA稀释剂((PBS(1×)的BSA(2%w/v)和吐温20(0.05%v/v))将孔阻断两小时。将板用1×PBST洗涤三次。对于组蛋白H3检测板,加入100μL/每孔的在ELISA稀释剂中以1:10000稀释的抗组蛋白H3抗体(Abcam公司,ab1791)。对于H3K27 三甲基化检测板,加入100μL/每孔的在ELISA稀释剂中以1:2000稀释的抗H3K27me₃。板在室温下孵育90分钟。用每孔300μL的1×PBST将板洗涤三次。对于组蛋白H3的检测,向每孔加入100μL的在ELISA稀释剂中以1:6000稀释的结合HRP的抗兔IgG抗体。对于H3K27me₃的检测,向每孔加入100μL在ELISA稀释剂中以1:4000稀释的结合HRP的抗兔IgG抗体。将板在室温下孵育90分钟。用每孔300μL 1×PBST将板洗涤四次。每孔中加入100μL的TMB底物。将组蛋白H3板在室温下孵育5分钟。将H3K27me₃板在室温下孵育10分钟。用硫酸1N(每孔100μL)使反应停止。每个板的吸光度在450nm处读数。

[0249] 首先,每孔的比例通过下式确定:
$$\frac{\text{H3K27me3 OD450 值}}{\text{组蛋白 H3 OD450 值}}$$

[0250] 每个板包括八个只用DMSO处理的对照孔(最小抑制),以及八个作为最大抑制的对照孔(背景孔)。

[0251] 计算每种对照类型的比值的平均值,将其用于确定板上每个测试孔的抑制百分数。从25μM开始,将测试化合物在DMSO中连续地三倍稀释,以获得一共十组测试浓度。确定抑制百分数,用每浓度的化合物的重复孔来产生IC₅₀曲线。该试验的IC₅₀值列于下表3。

[0252] 抑制百分数 = $100 - \left(\frac{(\text{个体测试样本比率}) - (\text{背景平均比率})}{(\text{最小抑制比率}) - (\text{背景平均比率})} \right) * 100$

[0253] 细胞增殖分析

[0254] WSU-DLCL2悬浮细胞从DSMZ(德国微生物菌种保藏中心,Braunschweig,德国)购买。RPMI/Glutamax培养基、青霉素-链霉素、热灭活胎牛血清购自Life Technologies公司(Grand Island,纽约州,美国)。V形底聚丙烯384孔板购自Greiner Bio-One公司(Monroe,北卡罗来纳州,美国)。细胞培养384孔白色不透明板购自Perkin Elmer公司(Waltham,马萨

诸塞州,美国)。Cell-Titer Glo® 购自Promega公司(Madison,威斯康星州,美国)。SpectraMax M5酶标仪器购自Molecular Devices LLC公司(Sunnyvale,加利福尼亚州,美国)。

[0255] WSU-DLCL2悬浮细胞维持在生长培养基(补充有10%v/v的热灭活的胎牛血清的RPMI 1640)中,在37°C、5%CO₂中培养。在试验条件下,细胞在分析培养基(补充有20%v/v的热灭活的胎牛血清和100units/mL的青霉素-链霉素的RPMI 1640)中、在37°C、5%CO₂中孵育。

[0256] 为了评估化合物对WSU-DLCL2细胞系的增殖的效果,将指数生长的细胞在最终体积为50u1的分析培养基中以1250个细胞/ml的密度接种于384孔白色不透明板中。通过在DMSO中从10mM(在试验中化合物的最高终浓度为20μM, DMSO为0.2%)开始进行一式三份的九点的连续3倍稀释来制备化合物源板。将来自于化合物储存板的100nL的等分加入到细胞板中其各自的孔中。100%抑制对照由终浓度为200nM的十字孢碱处理的细胞组成,0%抑制对照由用DMSO处理的细胞组成。加入化合物后,将分析板于37°C、5%CO₂、相对湿度>90%的条件下孵育6天。向细胞板加入35μl的Cell Titer Glo®试剂,通过存在于细胞培养物中ATP的量化来测量细胞的存活率。在Spectramax M5中读取发光值。抑制50%细胞存活率的浓度通过使用的标准化的剂量响应曲线的4参数拟合来确定。该试验的IC₅₀值也列于下表3中。

[0257] 表3

[0258]

	EZH2 IC50 多肽 v2	Y641F IC50	WSU prolifer IC50	WSU ELISA IC50
化合物 I(自由碱)	0.01299	0.01107	0.369	0.29

[0259] 体内研究-SUDHL10人淋巴瘤细胞株

[0260] 小鼠

[0261] 雌性Fox Chase SCID® 小鼠(CB17/Icr-Prkdescid/IcrIcoCr1,北京Vitalriver Laboratory Animal Co.,LTD)研究第一天的年龄是6-8周,体重(BW)范围是16.0-21.1g。该动物以自由采食水(无菌的)和辐照灭菌干颗粒食品喂养。在静态微分隔器(static microisolators)中的玉米穗轴垫料上以12小时的光照循环,于20-22°C(68-72°F)和40-60%的湿度下培养。在约束、饲养、手术治疗、饲料和液体管理和医疗照顾方面的所有的程序符合Guide for Care and Use of Laboratory Animals的建议。

[0262] 肿瘤细胞培养物

[0263] 人淋巴瘤细胞株SUDHL10取自DSMZ,并在包含100单位/mL青霉素G钠盐、100g/mL链霉素以及10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中作为悬浮培养物保持在CR0。在调湿培养箱的细胞培养瓶中,在37°C下,5%CO₂和95%空气的氛围中培养该细胞。仅通道12以下的培养物被用作植入。

[0264] 体内肿瘤植入

[0265] SUDHL10人淋巴瘤细胞株在对数中期生长过程中收集,并且在含有50%基质胶™

(BD Biosciences) 的PBS中再悬浮。每只老鼠在右侧经皮下接受 1×10^7 个细胞(0.2mL细胞悬液)。当平均体积接近理想的80-120mm³范围时,在两个维度上用卡钳测量肿瘤以控制生长。肿瘤尺寸,以mm³计,使用下式计算:

$$[0266] \quad \text{肿瘤体积} = \frac{w^2 \times l}{2}$$

[0267] 其中w=肿瘤的宽度,l=肿瘤的长度,以mm计。肿瘤的重量可以通过假定1mg等价于肿瘤体积1mm³估算。10天后,具有72-256mm³肿瘤的老鼠被分类为四组(n=16每组),平均肿瘤体积为173-179mm³。

[0268] 测试样品

[0269] 化合物I的氢溴酸盐在室温下储存并避光保存。在每个处理日,通过将粉末在0.5%羧甲基纤维素钠(NaCMC)和0.1%Tween[®] 80的去离子水溶液中悬浮来制备新鲜的化合物制剂。载体、0.5%NaCMC和0.1%Tween[®] 80的去离子水溶液以相同的时间表用于处理对照组。给药之前制剂在4℃避光保存。

[0270] 处理计划

[0271] 使用剂量范围125-500mg/kg的化合物I的氢溴酸盐,以BID(每12小时一次,一日两次)的日程在28天内通过口腔喂食来处理小鼠。每剂量以0.2mL/20g小鼠(10mL/kg)的体积输送,并根据最后记录的单个动物的体重调节。在第25天,每组中8只具有最小肿瘤的小鼠被选择用于肿瘤生长延迟端点(观测直到第60天)。其余动物在第28天,最后给药后3小时被执行安乐死,以用于收集肿瘤。

[0272] 中值(median)肿瘤体积(MTV)和肿瘤生长抑制(TGI)分析

[0273] 疗效在处理的最后一天确定。为各组确定MTV(n),即此动物数量n的中值肿瘤体积,n可在最后一天被评估。肿瘤生长抑制百分数(%TGI)可以以几种方式定义。首先,指定对照组的MTV(n)和药物处理组的MTV(n)之间的差值被表达为对照组的MTV(n)的百分比:

$$[0274] \quad \%TGI = \left(\frac{MTV(n)_{\text{对照}} - MTV(n)_{\text{处理}}}{MTV(n)_{\text{对照}}} \right) \times 100$$

[0275] 计算%TGI的另外一种方法是考虑从第1天到第n天肿瘤大小的变化,n为处理的最后一天。

$$[0276] \quad \%TGI = \left(\frac{\Delta MTV_{\text{对照}} - \Delta MTV_{\text{处理}}}{\Delta MTV_{\text{对照}}} \right) \times 100$$

[0277] $\Delta MTV_{\text{对照}} = MTV(n)_{\text{对照}} - MTV(1)_{\text{对照}}$

[0278] $\Delta MTV_{\text{处理}} = MTV(n)_{\text{处理}} - MTV(1)_{\text{处理}}$

[0279] 肿瘤生长延迟分析

[0280] 在最后处理日后,每组8只小鼠被留活以用于肿瘤生长延迟分析。肿瘤每周两次使用卡尺测量,并且每只动物当其肿瘤达到2000mm³的端点体积时或在预定的最后研究日,被执行安乐死,以先者为准。进行Kaplan Meier存活率分析。

[0281] 毒性

[0282] 在第1-5天每天为动物称重,之后每周两次为动物称重直到研究结束。针对任何不

利的、治疗相关的副作用的明显迹象对小鼠进行频繁地检查,并记录下来。对最大耐受剂量(maximum tolerated dose,MTD)的可接受的毒性定义为在试验期间由于TR死亡造成的、少于20%、不多于10%的死亡率的组均体重损失。如果死亡归因于由临床症状和/或尸体剖检证明的处理副作用,或由于在给药期间的不明原因,那么死亡被归类为TR。如果有证据表明死亡与处理副作用无关,那么死亡被归类为NTR。给药间隔期间的NTR死亡通常将归类为NTRa(由于意外或人为失误)或NTRm(由于尸体剖检确认的肿瘤通过入侵和/或转移散播)。当群组表现不支持TR分类且尸体解剖以排除给药剂量错误不可行时,在给药期间死于不明原因的口服处理的动物可以分为NTRu。

[0283] 采样

[0284] 在第28天,具有最大肿瘤的8只小鼠以预定方法取样,以评估肿瘤内的靶点抑制。从特定小鼠中在无RNA酶条件下收集肿瘤并均分。测定总肿瘤重量。冻结的肿瘤组织在液氮中速冻并使用研钵及研杵磨碎。

[0285] 统计和图像分析

[0286] 所有统计和图像分析均使用适用于Windows的Prism 3.03(GraphPad)进行。为了测试对照和处理组之间在整个治疗时间过程内的统计学显著性,使用重复测量的方差分析测试和随后的Dunnets多重比较试验。Prism以在 $P>0.05$ 时为非显著的(ns),在 $0.01<P<0.05$ 时为显著的(用符号“*”表示),在 $0.001<P<0.01$ 时为非常显著的(“**”),在 $P<0.001$ 时极其显著的(“***)”来报告结果。为了该研究中的肿瘤生长延迟,每组中留在研究中的动物的百分比对时间,出现在Kaplan-Meier 生存图中。

[0287] 组蛋白提取

[0288] 为了分离组蛋白,将60-90mg的肿瘤组织在1.5ml的核提取缓冲液(10mM Tris-HCl,10mM MgCl₂,25mM KCl,1% Triton X-100,8.6%蔗糖,加上Roche 蛋白酶抑制剂片剂1836145)中匀浆,在冰上孵育5分钟。细胞核通过在4℃、600g的转速下离心5分钟收集,在PBS中洗涤一次。去除上清液,提取组蛋白一小时(每15分钟用0.4N冷硫酸震荡一次)。通过在4℃、10000g的转速下离心10分钟来净化提取物,转移到包括10倍体积的冰冷丙酮的新鲜的微量离心管中。在-20℃下组蛋白沉淀2小时-过夜,通过在10000g的转速下离心10分钟来获得沉淀并重悬于水。

[0289] 酶联免疫吸附测定(ELISA)

[0290] 组蛋白在包被缓冲液(PBS+0.05%BSA)中以相同的浓度制备,得到了0.5 ng/ μ l的样品,将100 μ l的样品或标准物成对地加入到两个96孔ELISA板(Thermo Labsystems公司,Immulon 4HBX#3885)中。将板密封,在4℃孵育过夜。第二天,在Bio Tek洗板机中将板用300 μ l/孔的PBST(PBS+0.05%吐温20;10 \times PBST,KPL#51-14-02)洗涤3次。将板中反应用300 μ l/孔的稀释剂(PBS+2%BSA+0.05%吐温20)阻断,在室温下孵育2小时,用PBST洗涤3次。所有的抗体在稀释剂中稀释。将100 μ l/孔的抗H3K27me3(CST#9733,50%甘油母液1:1000)或抗总H3(Abcam ab1791,50%甘油1:10000)加入到每个板中。在室温下将板孵育90分钟,用PBST洗涤3次。将100 μ l/孔的抗Rb-IgG-HRP(Cell Signaling Technology 公司,7074)以1:2000加入到H3K27Me3板中,以1:6000加入到H3板中,并在室温下孵育90分钟。用PBST洗涤板4次。为了检测,加入100 μ l/孔的TMB底物(BioFx Laboratories,#TMBS),将板在黑暗、室温下孵育5分钟。用100 μ l/孔的1N H₂SO₄终止反应。在SpectaMax M5酶标仪上读取在450nm处

的吸光度。

[0291] 结果

[0292] 使用化合物I的氢溴酸盐以最大耐受剂量500mg/kg每日两次和MTD的部分(1/2 和 1/4MTD) 处理携带SUDHL10移植瘤的小鼠。所有剂量在28天内耐受,而无任何显著的体重减轻。由于给药错误,在第15天,500mg/kg组出现了一例非治疗相关的死亡。在第28天,相对于载体,所有剂量都导致了肿瘤生长抑制(表4),并且250mg/kg和500mg/kg BID组引发了衰退(TGI>100%)。

[0293] 表4:

[0294] SUDHL10移植瘤中化合物I的氢溴酸盐引发的肿瘤生长抑制值概要

[0295]

组	第1天的%TGI	第8天的%TGI
125mg/kg BID	54	57
250mg/kg BID	101	113
500mg/kg BID	104	115

[0296] 图12A显示不同处理组的SUDHL10移植瘤关于时间的生长。重复量测变异数分析和Dunnett事后测试分析中125mg/kg的BID组与载体组无显著不同,但是第28天的中值肿瘤体积明显小于对照组(二因素方差分析和Bonferroni事后测试, $p<0.0001$)。对于此两组,化合物I的氢溴酸盐以250mg/kg BID和500mg/kg BID给药28天引发的可比较的衰退反应如第28天的端点肿瘤重量,是相近的(图 12B)。

[0297] 从在第28天(最后给药后3小时)收集的肿瘤中分离出的组蛋白,接受总体H3K27me3水平的ELISA分析。图13显示由明显的取决于剂量的化合物I的氢溴酸盐处理的H3K27me3标记的减量调节。此图显示了在来自以化合物I的氢溴酸盐处理28天的小鼠的SUDHL10肿瘤中的总体H3K27me3甲基化。

[0298] 在第25天,每组中8只具有最小肿瘤的小鼠被选取进行肿瘤生长延迟研究以评估第28天给药停止后的肿瘤再生长。当其肿瘤尺寸达到2000mm³或在第60 天时(取其在前者),小鼠被执行安乐死。这些数据被用以进行Kaplan Meier存活率分析。图14A显示了肿瘤的再生长是明显地取决于剂量的,并且所有以500 mg/kg BID的最高剂量处理28天的小鼠存活至第60天。仅两只250mg/kg组中的小鼠在第60天前需要被执行安乐死。125mg/kg组中的小鼠相对于载体处理的小鼠具有明显的存活率优势,其有着较高的15.5天的平均存活率(图14B)。

[0299] 化合物I的氢溴酸盐对于小鼠移植模型上的Pfeiffer人弥漫性大B细胞淋巴瘤的抗癌作用

[0300] 在Pfeiffer小鼠移植瘤模型上测试化合物I的单氢溴酸盐的抗癌活性,该模型是人弥漫性大B细胞淋巴瘤的移植模型。5周大的雌性NSG小鼠(Jackson Labs,Bar Harbor, Maine)被皮下植入20至25mg肿瘤碎片。治疗自肿瘤植入后大约31天起,当平均肿瘤达到大约365mm³时。治疗计划如表5所示。

[0301] 表5. 给药计划

[0302]

组	动物数	治疗	途径和时间表
A	9	载体(0.5% 甲基纤维素, 0.1% 吐温-80)	PO; qdx28
B	9	34.2 mg/kg 化合物 I (HBr 盐)	PO; qdx28
C	9	114 mg/kg 化合物 I (HBr 盐)	PO; qdx28
D	9	342 mg/kg 化合物 I (HBr 盐)	PO; qdx28
E	9	1140 mg/kg 化合物 I (HBr 盐)	PO; qdx12 [§]

[0303] [§]由于化合物耐受度的问题,仅向该组给予12日剂量。

[0304] 肿瘤体积贯穿在整个实验中。肿瘤体积在治疗开始后每周两次测定。通过卡尺测定,使用长椭球体积公式 $(L \times W^2) / 2$ 计算肿瘤负荷 ($\text{mg} = \text{mm}^3$),其中L和W是各自垂直的长和宽尺寸(mm)。

[0305] 第一天是治疗的第一天,第28天是治疗的最后一天。该研究在最后给药的 36天后终止,所以第64天是研究终点。该研究中用以评价功效的主要终点是完全肿瘤衰退(CR)、组间的肿瘤尺寸和研究结束时的肿瘤抑制百分比。完全的反应被限定为在研究结束时肿瘤尺寸减小至不可检测的尺寸($<20\text{mm}^3$)。肿瘤抑制百分比数值通过公式 $[1 - (\Delta T / \Delta C)] \times 100$ 计算,其中 ΔT 和 ΔC 是每个治疗组(T) 和载体对照组(C) 的平均肿瘤体积变化 (Δgrowth)。T₀ 和 C₀ (首次给药前一天) 被用作起始肿瘤体积。此外,最后一次给药后一天测得的肿瘤体积 (T₂₉ 和 C₂₉) 被用于计算 ΔT 和 ΔC 。当该值大于100%时,其被认为是100%。用于计算肿瘤抑制率百分比的公式如下所示。

$$[0306] \quad \text{肿瘤抑制百分比} = \left\{ 1 - \frac{T_{29} - T_{09}}{C_{29} - C_{09}} \right\} \times 100\%$$

[0307] 在处理期间,发现动物不能耐受1142mg/kg的化合物I的氢溴酸盐每日处理,并且该组(E组)中的三只动物在处理一周后由于失去多于20%的基线体重而需要安乐死。因此,对该组的给药在12次给药后停止。其它三个给药组中的动物,除了D组(342mg/kg化合物I的氢溴酸盐)中的一只动物,均良好地耐受了28天的治疗,具有极少的体重损失。相对小鼠体重如图15所示。第0天得到的动物体重被用作图中的基线体重。

[0308] 化合物I的氢溴酸盐在Pfeiffer模型中显示潜在且持久的抗癌活性,在四个给药组中的三个组中具有100%的CR率(表6)。此外,即使在治疗停止后36天,肿瘤再生长也未被观测到。这表明在治疗过程中,所有肿瘤细胞均被杀死。虽然在最低剂量组(B组,34.2mg/kg)中观测到了肿瘤的再生长,但是明显的肿瘤停滞活性在治疗期间被观测到(图16)。肿瘤仅在治疗停止后开始生长(图16)。该结果还表明在组B中观测到的肿瘤停滞活性的确是测

试样品引发的活性。

[0309] 表6.结果概要表

[0310]

组	处理	CR	TV (平均值±StDev)	肿瘤抑制百分比	P 值 ^e
A	载体	0	2882±2190	n/a	n/a
B	34.2 mg/kg	0	497±287	93%	P<0.05

[0311]

	Cmp I (HBr)				
C	114 mg/kg Cmp I (HBr)	9	0	100%	P<0.05
D	342 mg/kg Cmp I (HBr)	8 ^l	0	100%	P<0.05
E	1140 mg/kg Cmp I (HBr)	6 ^y	0	100%	P<0.05

[0312] ^e一次方差分析 (ANOVA) 随后Dunnett's多重比较检验 (Prism软件5.02版本, Lake Forest, CA)。

[0313] ^l1只动物因低体重在第36天被施以安乐死。

[0314] ^y3只动物因低体重分别在第7、9和11天被施以安乐死。

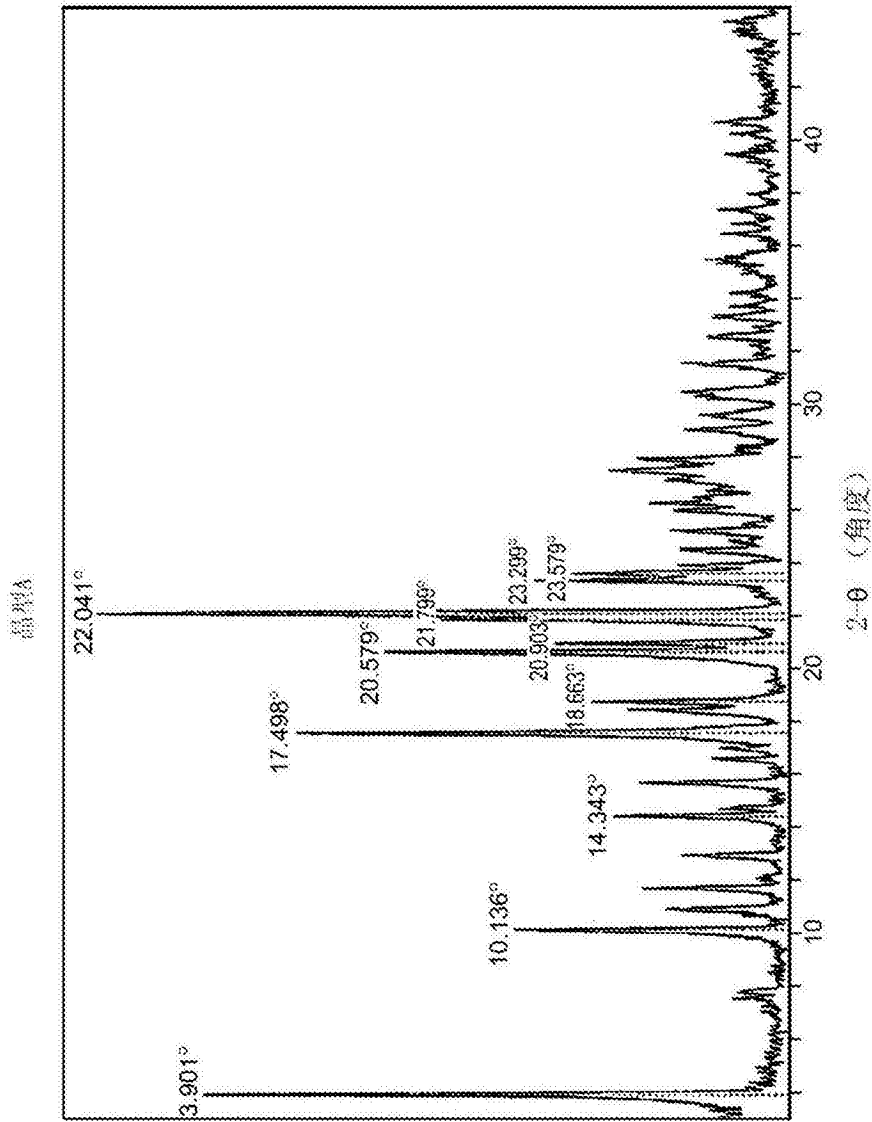


图1

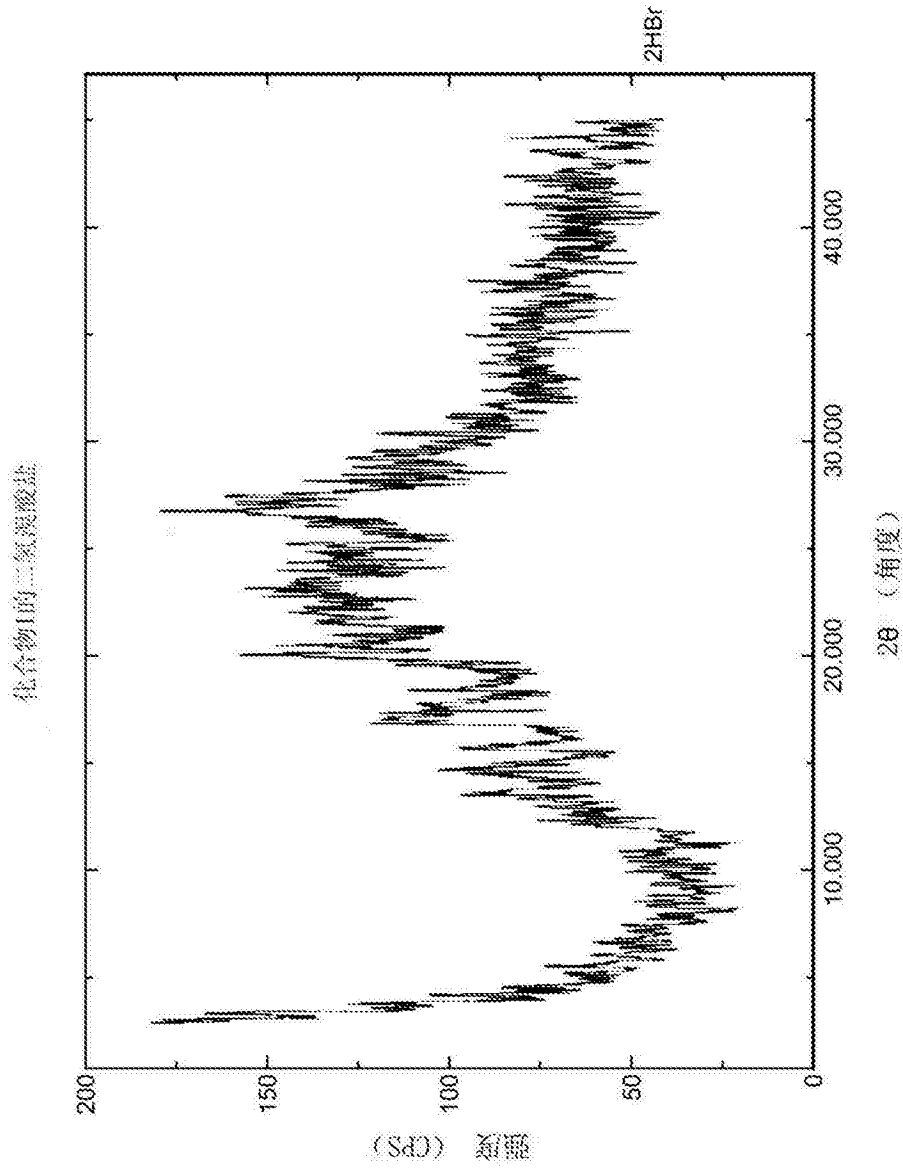


图2

差热A

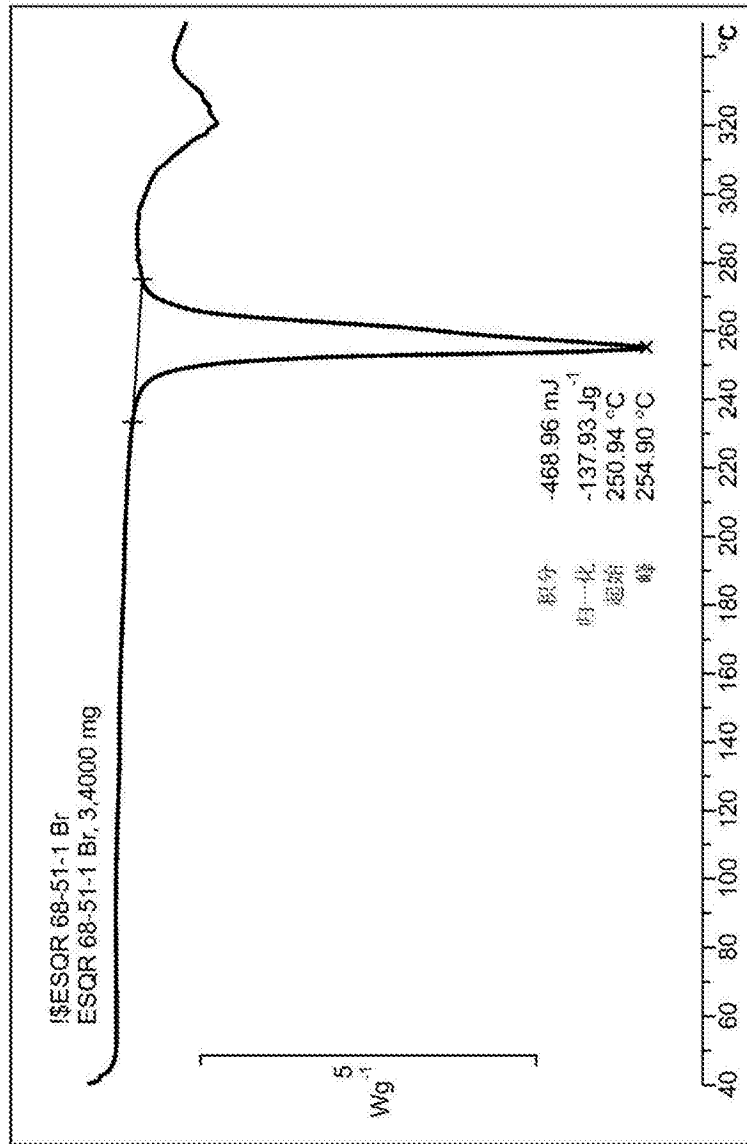


图3

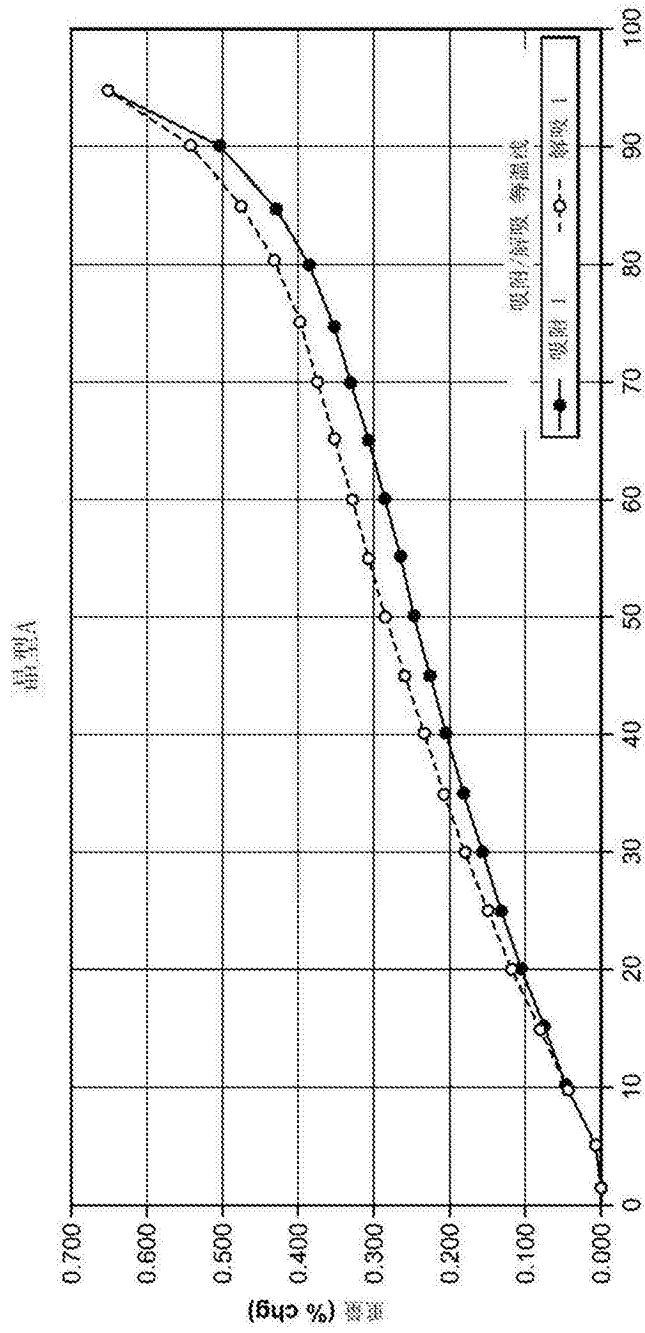


图4

时间	t=0	t=16 h	t=24 h	t=3 天
自由碱	100.0	98.6	97.5	94.0
HBr 碱	100.0	99.1	97.7	98.3

时间	t=0	t=16 h	t=24 h	t=3 天
自由碱	98.3	97.9	97.9	97.3
HBr 碱	98.8	98.6	98.5	98.5

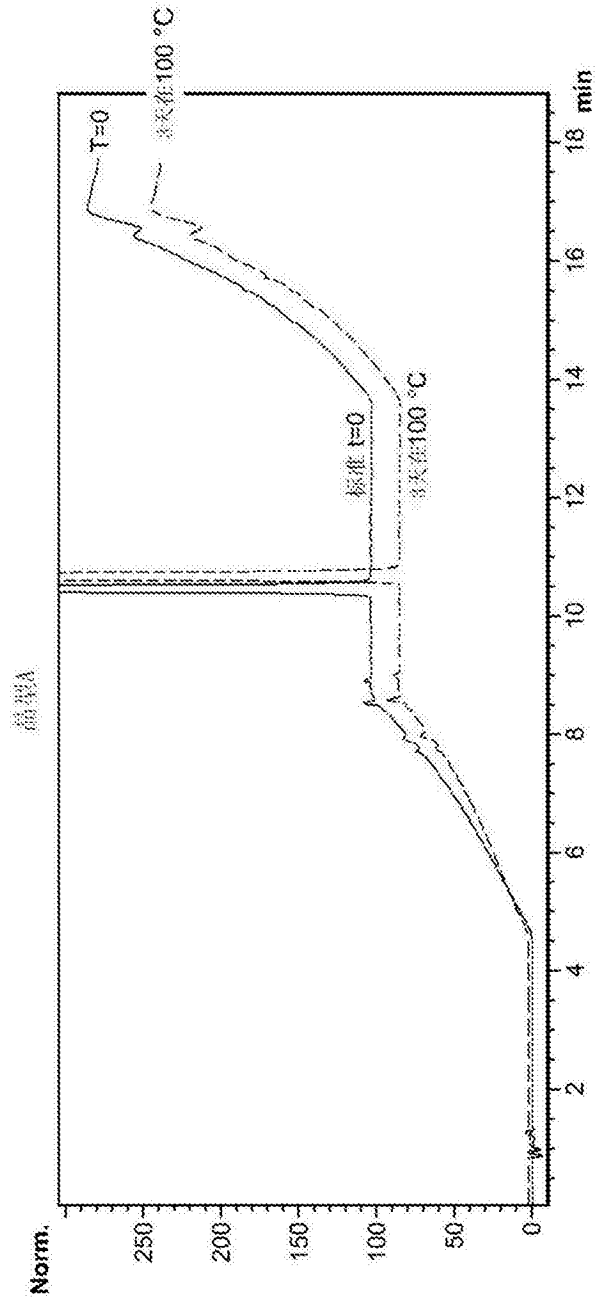


图5

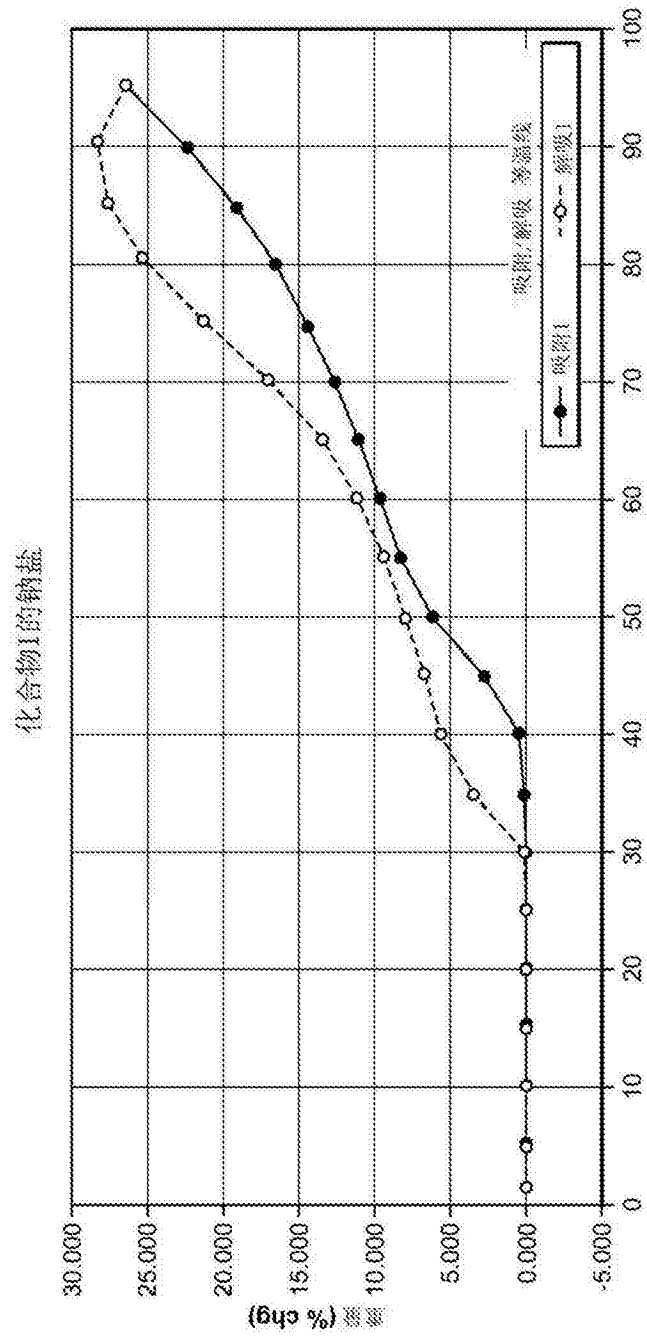


图6

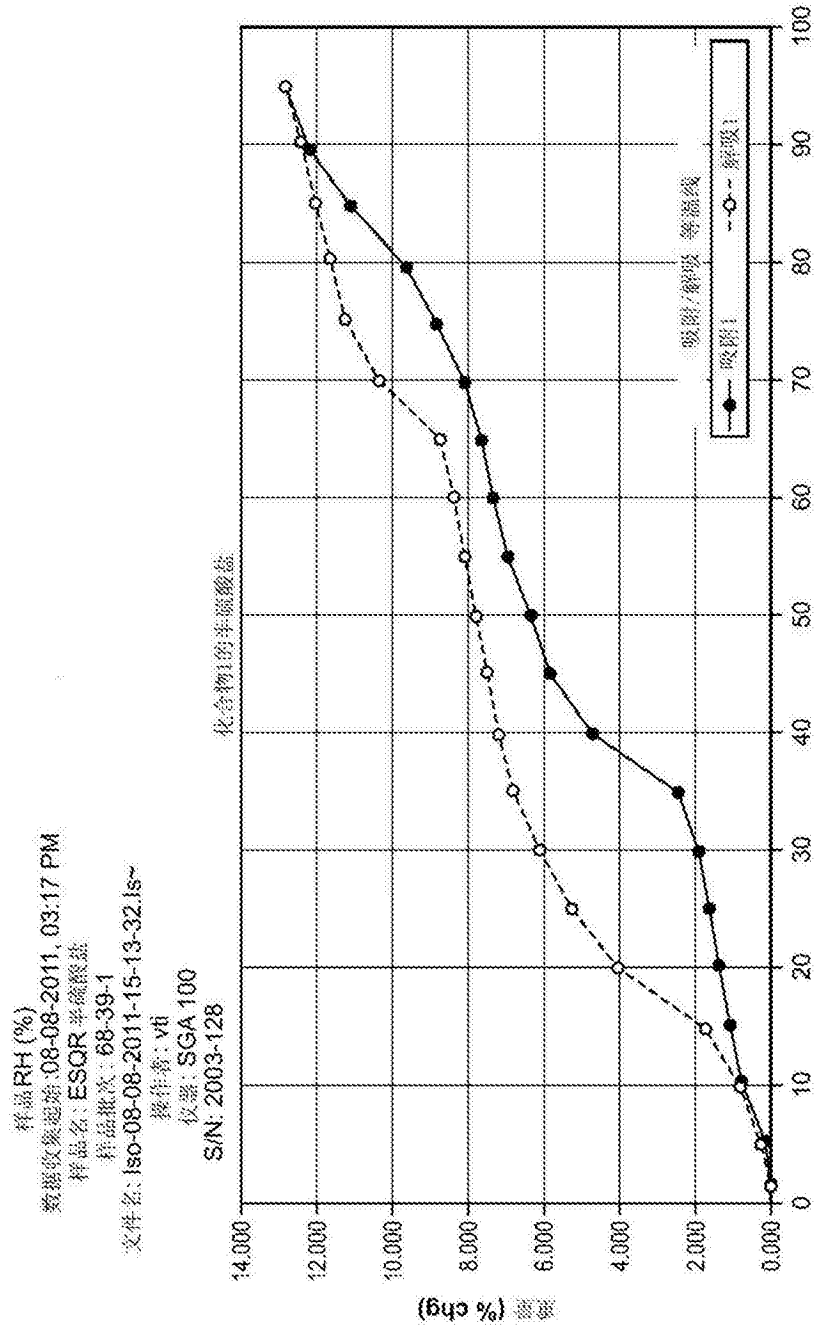


图7

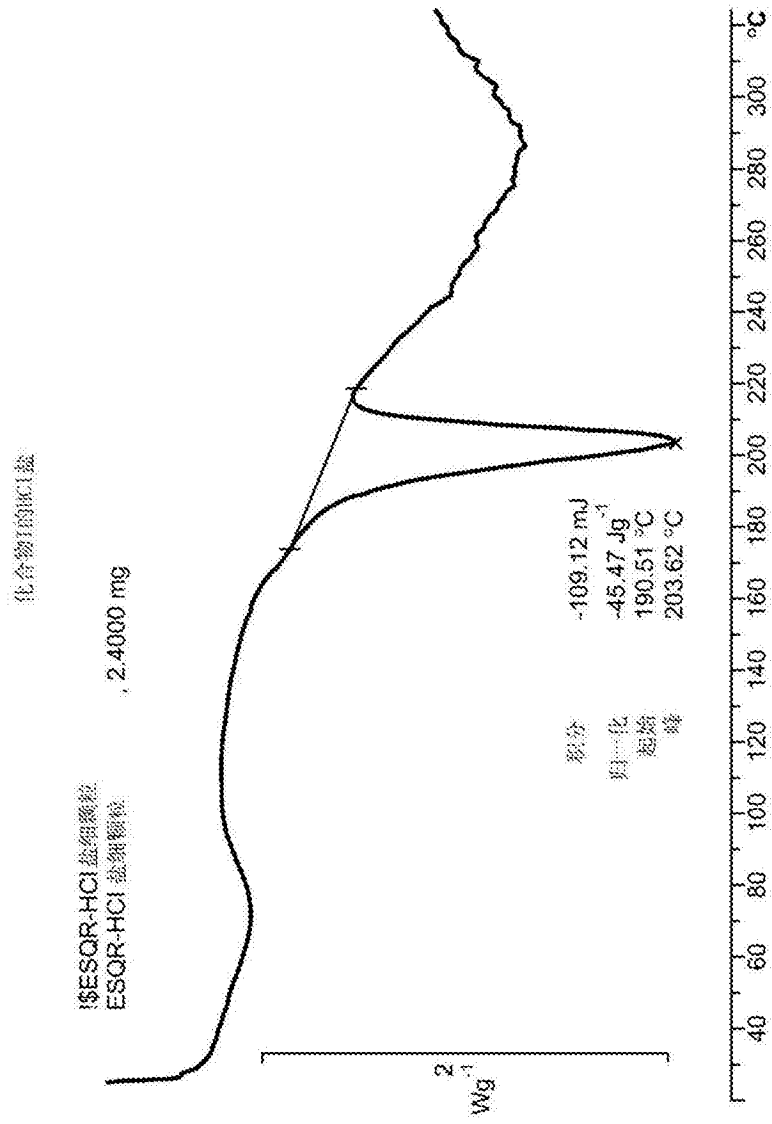


图8

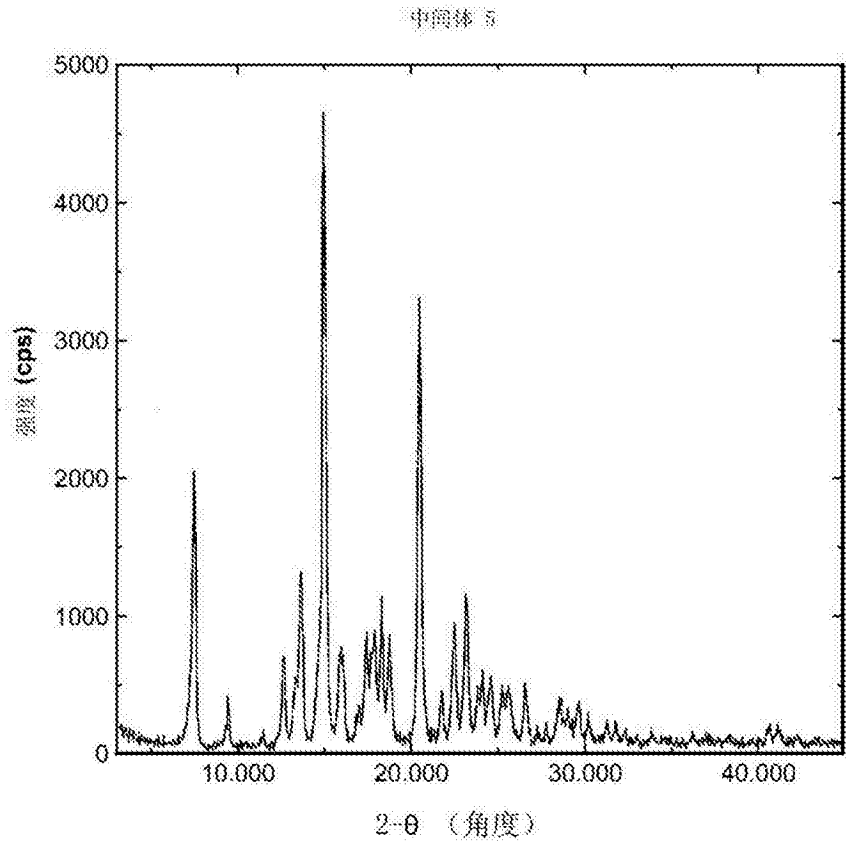


图9

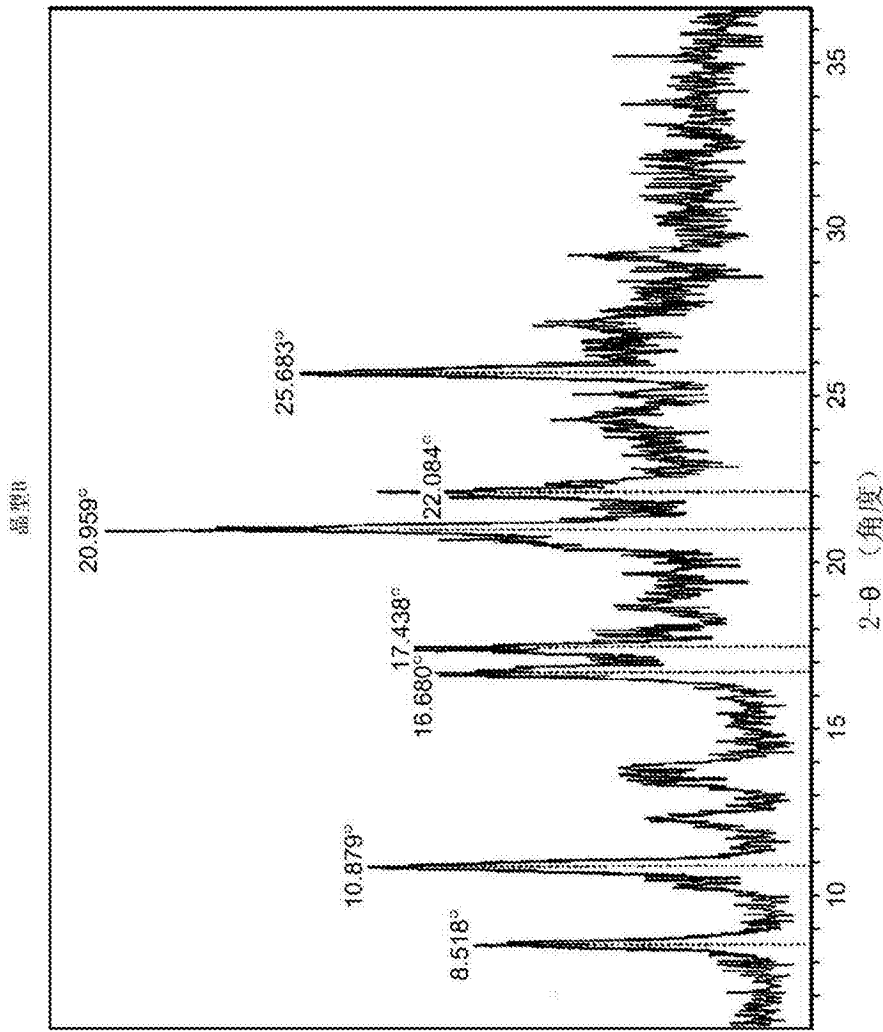


图10

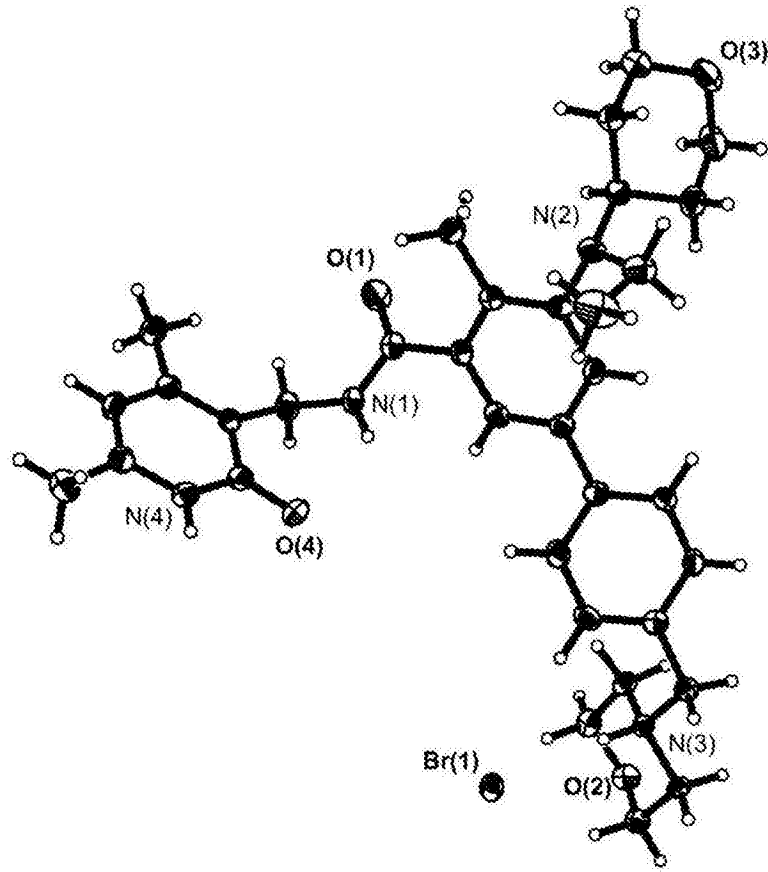


图11

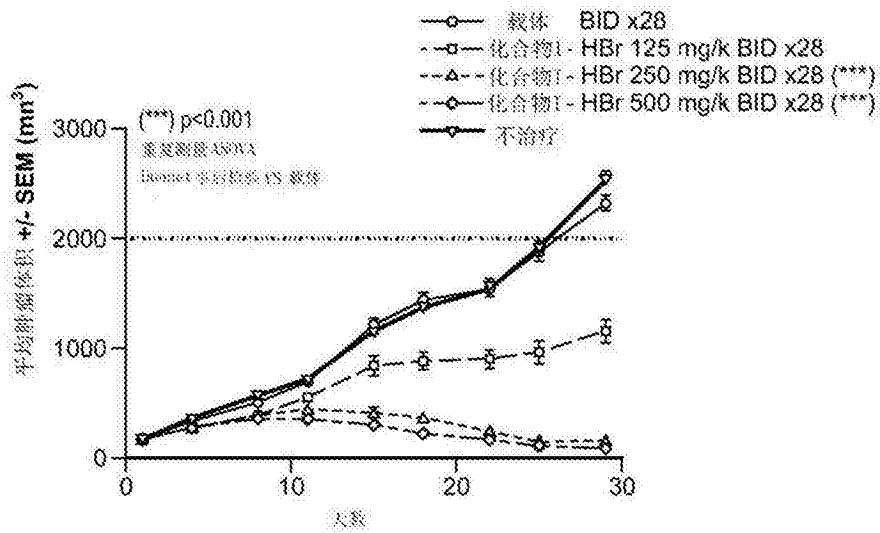


图12A

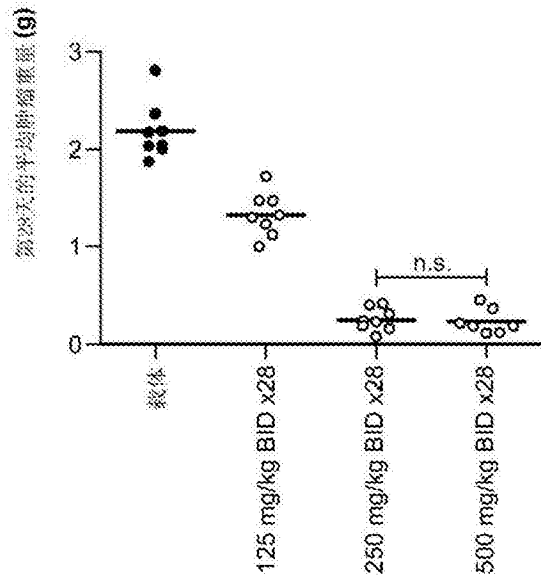


图12B

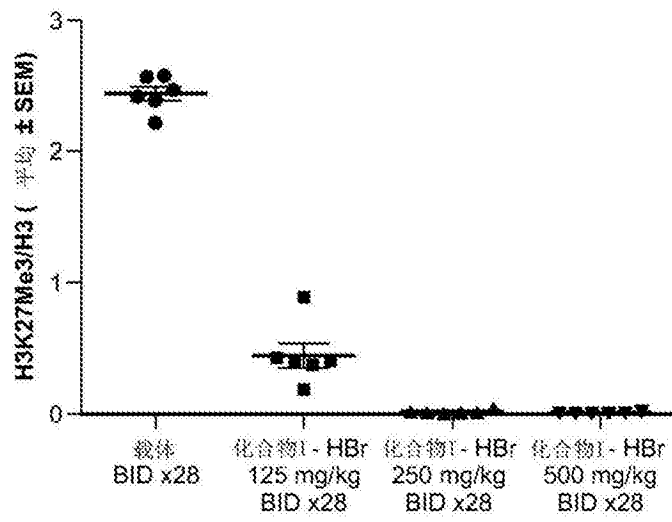


图13

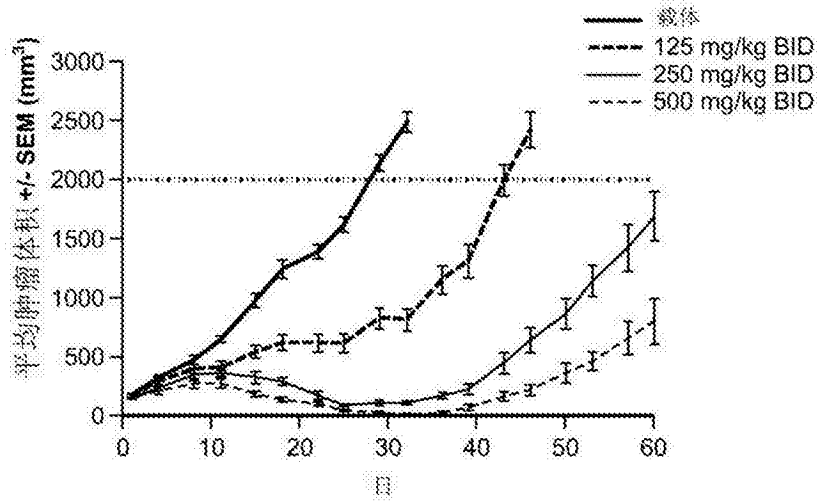


图14A

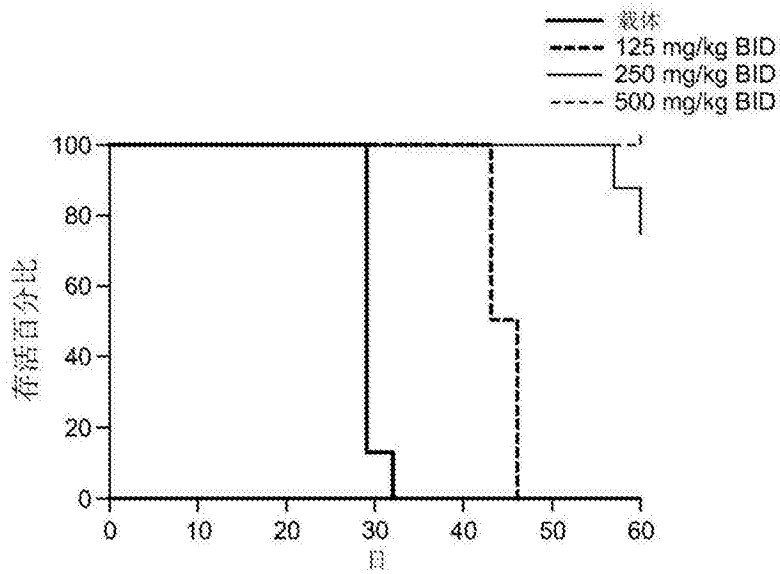


图14B

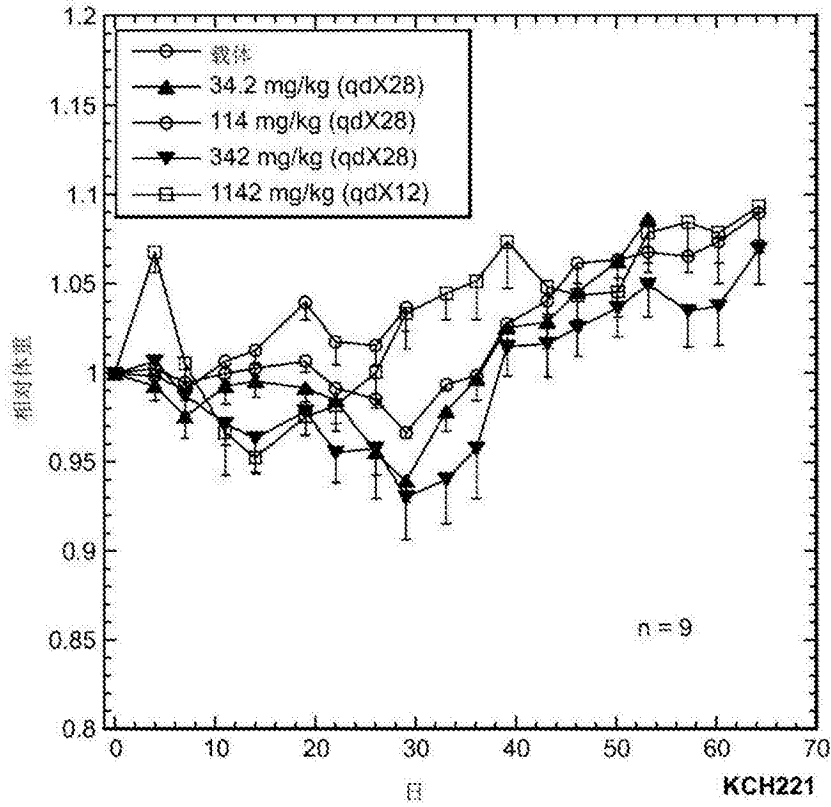


图15

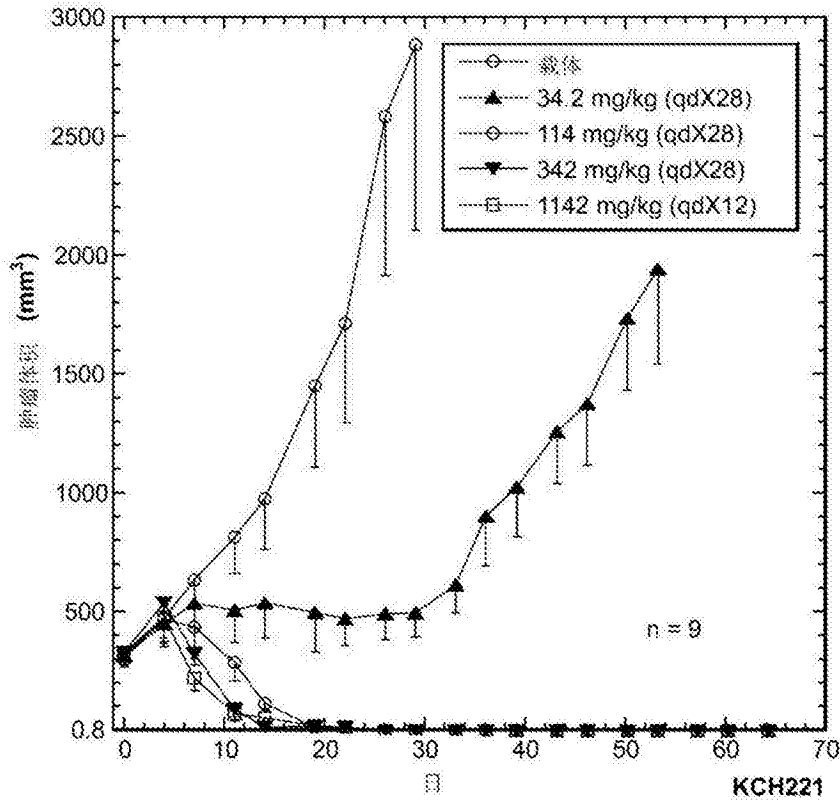


图16

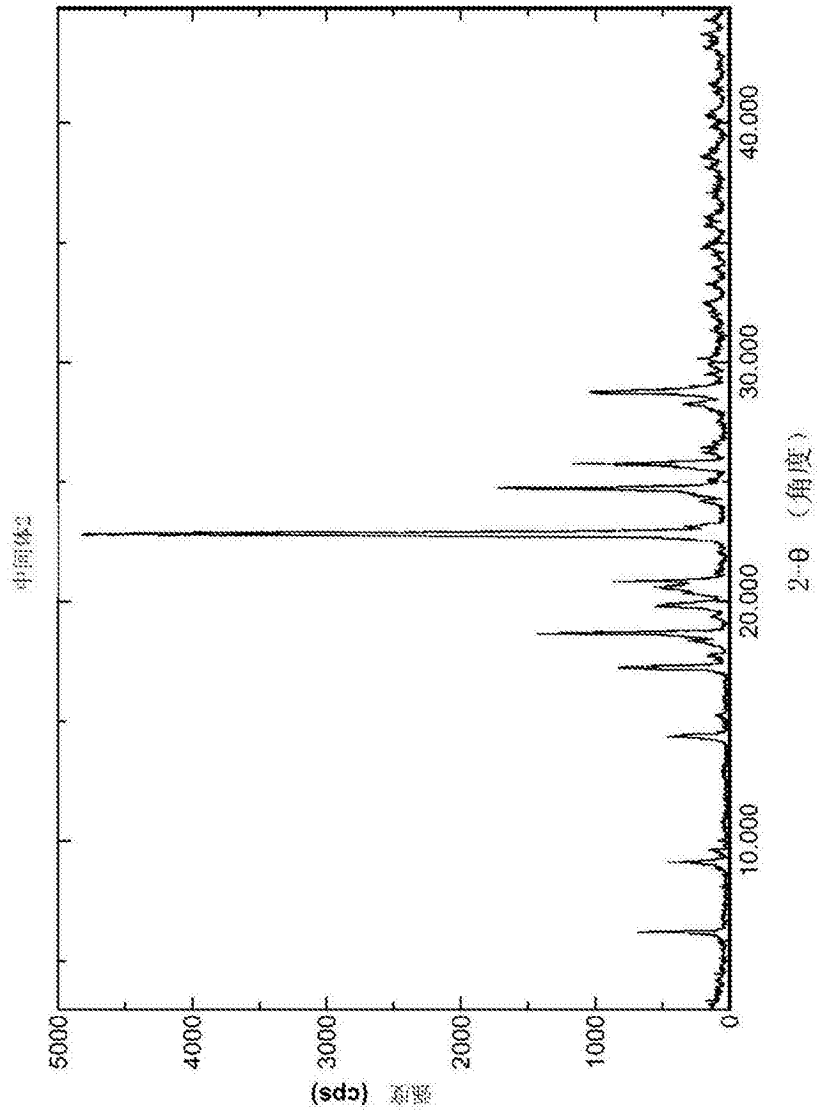


图17

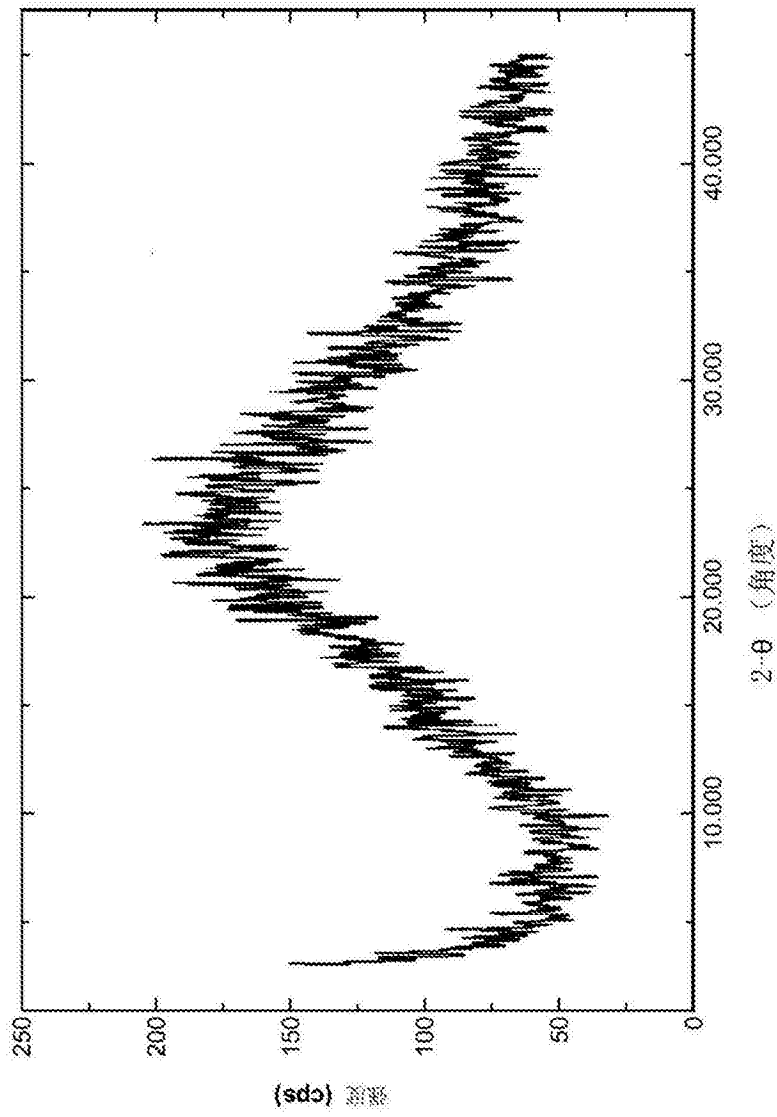


图18A

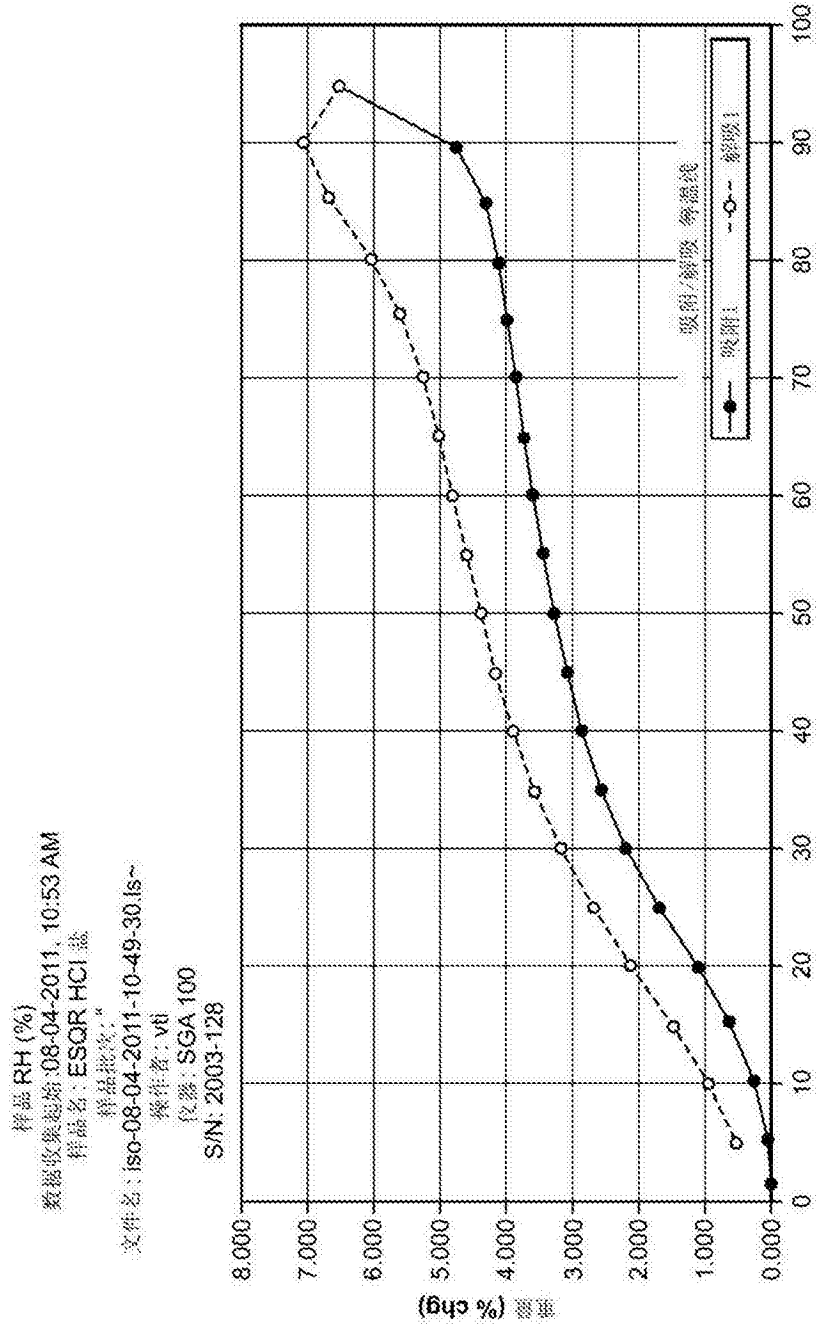


图18B