

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103119160 B

(45) 授权公告日 2016. 06. 01

(21) 申请号 201180033570. 5

代理人 陈文平

(22) 申请日 2011. 05. 16

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C12N 15/09(2006. 01)

61/334, 991 2010. 05. 14 US

US 5854238 A, 1998. 12. 29,

61/370, 745 2010. 08. 04 US

US 2007/218135 A1, 2007. 09. 20,

61/375, 863 2010. 08. 22 US

WO 2010/049466 A1, 2010. 05. 06,

61/467, 321 2011. 03. 24 US

WO 2009/084693 A1, 2009. 07. 09,

61/467, 376 2011. 03. 24 US

US 2008/0081781 A1, 2008. 04. 03,

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

审查员 张锦广

2013. 01. 06

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/036647 2011. 05. 16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/143651 EN 2011. 11. 17

(73) 专利权人 达那 - 法伯癌症研究所

地址 美国马萨诸塞州

专利权人 布里格姆及妇女医院

(72) 发明人 J · E · 布拉德纳 J · 布朗

J · 普鲁兹基

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

权利要求书5页 说明书74页 附图7页

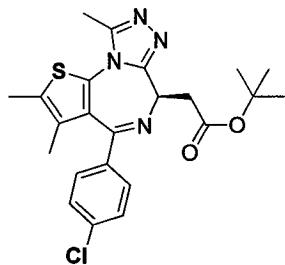
(54) 发明名称

用于调节代谢的组合物和方法

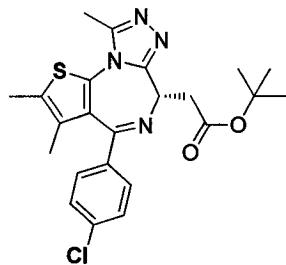
(57) 摘要

本发明提供了多种组合物，这些组合物包含一种有效量的抑制 BET 蛋白（例如，Brd2、Brd3、Brd4）的试剂，以及使用此类组合物来治疗或预防代谢性综合征、肥胖症、II 型糖尿病、胰岛素耐受性以及相关的其特征为代谢或脂肪累积方面发生不希望的改变的失调的方法。

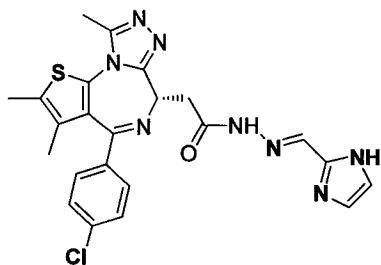
1.由以下结构式表示的任一化合物或其盐、溶剂合物或水合物在制备用于治疗脂肪形成、治疗或预防肥胖症或体重增加、治疗肝脏脂肪变性、减少皮下脂肪或内脏脂肪、抑制食物摄取或增加代谢、保护对抗胰岛素耐受性的药物中的用途，



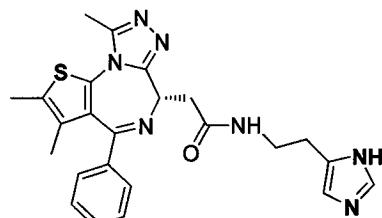
(R)-JQ1、



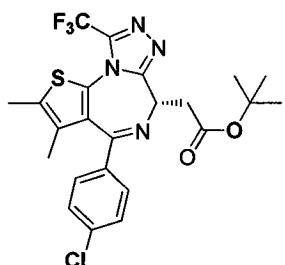
(S)-JQ1、



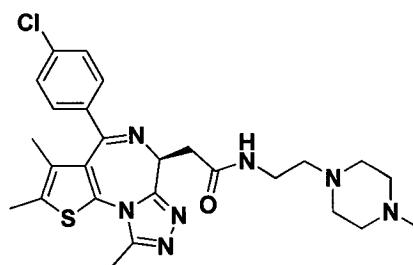
JQ6、



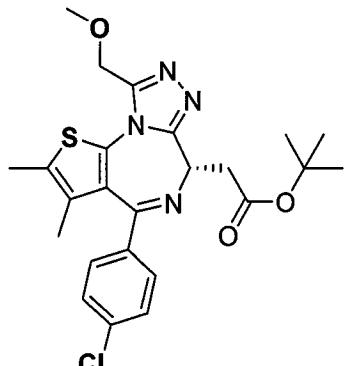
JQ8、



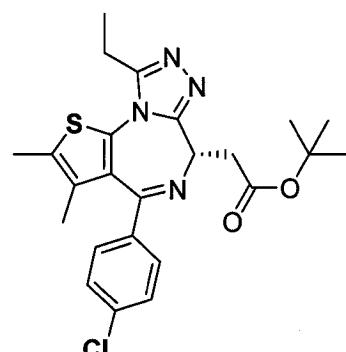
JQ11、



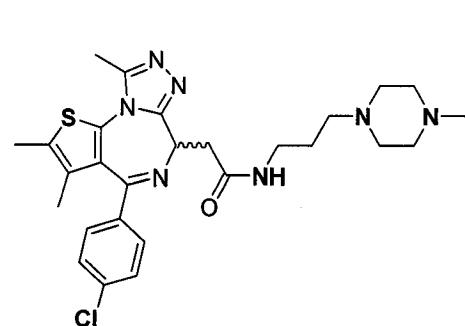
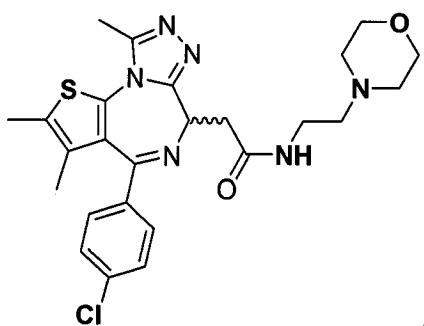
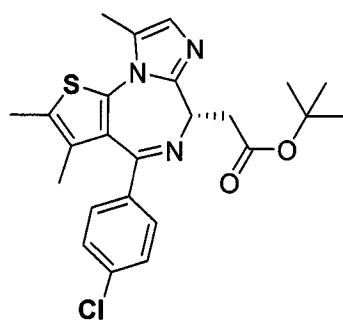
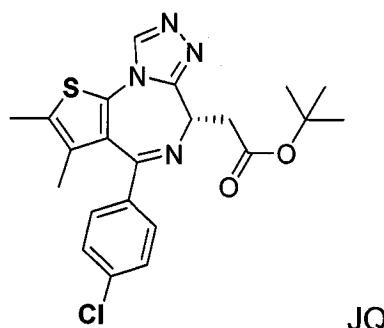
JQ13、



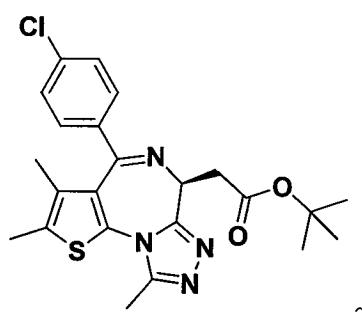
JQ18、



JQ19、



2. 根据权利要求1所述的化合物的用途,其中所述化合物是由以下式所表示的化合物或其药学上可接受盐



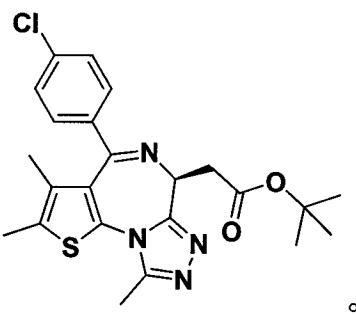
3. 根据权利要求1所述的化合物的用途,其中所述治疗脂肪形成包括降低C/EBP $\alpha$ 和/或PPAR $\gamma$ 多肽或多核苷酸的水平。

4. 根据权利要求1所述的化合物的用途,其中所述治疗脂肪形成包括降低了甾醇调节结合蛋白(SREBP)、过氧化物酶体增殖因子激活型受体2(PPAR $\gamma$ 2)、脂肪酸合酶(FAS)、乙酰辅酶A羧化酶 $\beta$ 、硬脂酰辅酶A脱氢酶1(SCD1)以及二酰基甘油酰基转移酶1(DGAT)的水平。

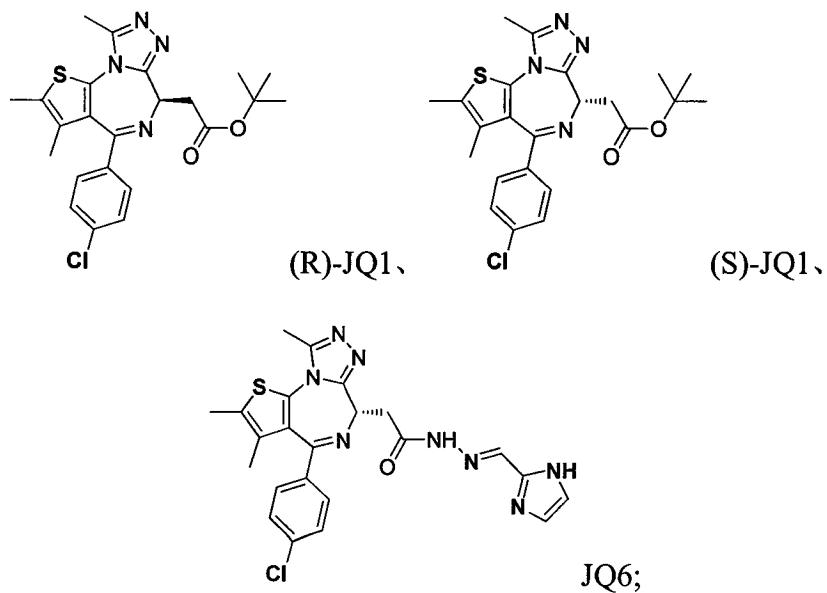
5. 根据权利要求1所述的化合物的用途,其中所述药物是用于局部地或全身性地给予。

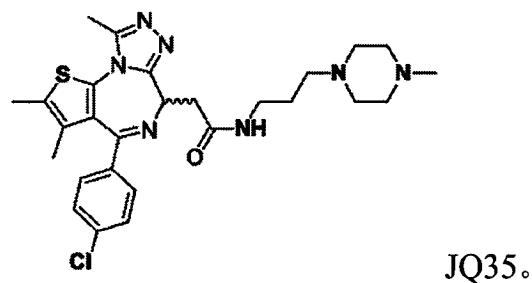
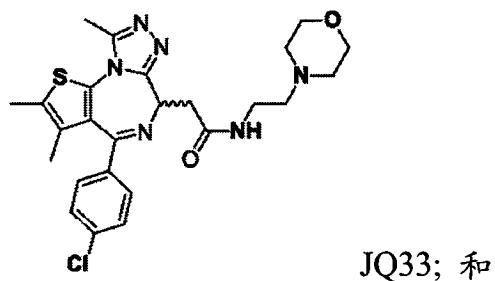
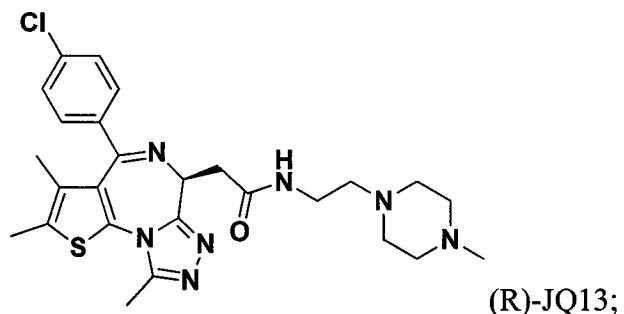
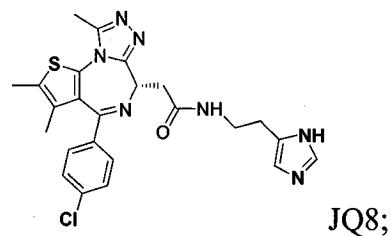
6. 一种用于体重失调治疗的试剂盒,该试剂盒包含一种有效量的、权利要求1所述的化合物以及使用该试剂盒的说明。

7. 根据权利要求6所述的试剂盒,其中所述化合物是由以下式所表示的化合物或其药学上可接受盐

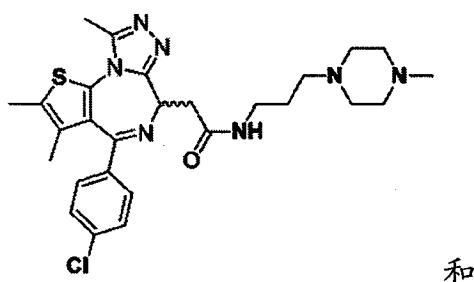


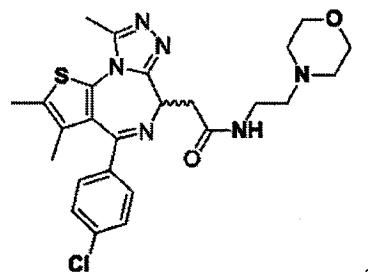
8. 根据权利要求1所述的用途,其中所述化合物选自以下化合物或其任一者的药学上可接受盐





9. 根据权利要求8所述的用途,其中所述化合物选自以下化合物或其任一者的药学上可接受盐





10. 根据权利要求1或3-4中任一项所述的用途，其中所述治疗脂肪形成、治疗或预防肥胖症或体重增加、治疗肝脏脂肪变性、减少皮下脂肪或内脏脂肪、抑制食物摄取或增加代谢、保护对抗胰岛素耐受性包括抑制Brd4蛋白的结合活性。

## 用于调节代谢的组合物和方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于2010年5月14日提交的美国临时专利申请号61/334,991;2010年8月4日提交的美国临时专利申请号61/370,745;2010年8月22日提交的美国临时专利申请号61/375,863;2011年3月24日提交的美国临时专利申请号61/467,376以及2011年3月24日提交的美国临时专利申请号61/467,321的优先权。通过该引用以其全文将这些申请的每一个的内容结合在此。

[0003] 在联邦资助研究下做出本发明的权利陈述

[0004] 本工作由来自美国国立卫生研究院的以下拨款支持,拨款号:K08CA128972(布拉德纳(Bradner));K08HL105678-01(布朗(Brown))。在本发明中政府具有一定的权利。

[0005] 发明背景

[0006] 代谢性综合征以及肥胖症代表了在所有的工业化国家中的主要的健康问题。代谢性综合征是一组伴发的心脏病和糖尿病的危险因素并且增加了病人对于重病的危险,包括心脏病、中风以及糖尿病。代谢性综合征的潜在危险因素包括胰岛素耐受性以及腹型肥胖。肥胖症在西方世界中是最显著的营养性失调,估计其患病率从30%至50%。肥胖症与冠状动脉疾病、中风以及II型糖尿病的增加的发病率相关。肥胖症主要地不只是行为问题。恰恰相反,观察到的肥胖受试者与正常受试者之间的机体组成的差异起因于代谢的不同以及神经病学/代谢相互作用的差异。在一定程度上,这些差异看来像是由于基因表达和/或基因产物或活性的差别。控制机体组成 的遗传因素的性质是未知的。鉴于代谢性综合征以及肥胖症的严重性和流行率,存在着对用于治疗和预防代谢性综合征、肥胖症、II型糖尿病、胰岛素耐受性以及相关的其特征为在代谢或脂肪累积方面发生不希望的改变的失调的组合物以及方法的大量需求。

[0007] 发明概述

[0008] 如下所述,本发明的特征是用于治疗和/或预防代谢性综合征、肥胖症、II型糖尿病、胰岛素耐受性以及相关的其特征为在代谢或脂肪累积方面发生不希望的改变的失调的组合物以及方法。

[0009] 在一个方面中,本发明提供了一种抑制脂肪形成的方法,该方法包括将脂肪细胞或前脂肪细胞与一种有效量的抑制溴基结构域和额外末端(bromodomain and extra-terminal)(BET)蛋白的试剂进行接触。

[0010] 在另一个方面中,本发明提供了一种抑制脂肪细胞生物学功能的方法,该方法包括将脂肪细胞与一种有效量的抑制溴基结构域和额外末端(BET)蛋白的试剂进行接触。

[0011] 在又另一个方面中,本发明提供了一种治疗或预防人类的代谢性综合征的方法,该方法包括向该人类给予一种有效量的抑制溴基结构域和额外末端(BET)蛋白的试剂,由此治疗或预防该人类的代谢性综合征。

[0012] 在另外的方面中,本发明提供了一种治疗或预防人类的肥胖症或体重增加的方法,该方法包括向该人类给予一种有效量的抑制溴基结构域和额外末端(BET)蛋白的试剂,由此治疗或预防该人类的肥胖症或体重增加。

[0013] 在另一个方面中，本发明提供了一种抑制人类的肝脏脂肪变性的方法，该方法包括向该人类给予一种有效量的抑制溴基结构域和额外末端(BET)蛋白的试剂，由此抑制肝脏脂肪变性。

[0014] 在另外一个方面中，本发明提供了一种减少人类的皮下脂肪或内脏脂肪的方法，该方法包括向该人类给予一种有效量的抑制溴基结构域和额外末端(BET)蛋白的试剂，由此减少该人类的皮下脂肪或内脏脂肪。

[0015] 在又另一个方面中，本发明提供了一种抑制人类的食物摄取或增加人类的代谢的方法，该方法包括向该人类给予一种有效量的抑制溴基结构域和额外末端(BET)蛋白的试剂，由此抑制该人类的食物摄取或增加该人类的代谢。

[0016] 在一个此外的方面中，本发明提供了一种用于体重失调治疗的试剂盒，该试剂盒包含一种有效量的、溴基结构域和额外末端(BET)蛋白的抑制剂以及该试剂盒在此处披露的任何方法中的使用的说明。

[0017] 在上述方面或在此描绘的本发明的任何其他方面的不同实施方案中，该方法抑制脂肪细胞分化、增殖或过度生长。在另一个实施方案中，该方法减少脂肪酸合成、脂肪生成、脂滴的积累。在另外的实施方案中，该方法减少腹型肥胖、致动脉粥样硬化血脂异常、血压升高、胰岛素耐受性、或II型糖尿病。在其他实施方案中，该试剂是具有化学式I-XXII中任一的化合物，或任何其他在此处的化合物，或其衍生物。在又一个实施方案中，该化合物是JQ1。在此外的实施方案中，该试剂是抑制性核酸分子。在又一个实施方案中，该抑制性核酸分子是一种减少Brd2、Brd3或Brd4的表达的siRNA、shRNA或反义核酸分子。在其他实施方案中，该溴基结构域和额外末端(BET)蛋白是Brd2、Brd3或Brd4。在一个另外的实施方案中，该方法降低C/EBP $\alpha$ 和/或PPAR $\gamma$ 多肽或多核苷酸的水平。在另外的实施方案中，该方法降低了甾醇调节结合蛋白(SREBP)、过氧化物酶体增殖因子激活型受体2(PPARg2)、脂肪酸合酶(FAS)、乙酰辅酶A羧化酶B、硬脂酰辅酶A脱氢酶1(SCD1)以及二酰基甘油酰基转移酶1(DGAT)的水平。在又此外的实施方案中，将该试剂局部地或全身性地给药。在另一个实施方案中，溴基结构域和额外末端(BET)蛋白的该抑制剂是JQ1。

[0018] 本发明提供了多种组合物，这些化合物包含一种有效量的BET家族抑制剂，以及使用此类组合物来治疗或预防代谢性综合征、肥胖症、II型糖尿病、胰岛素耐受性以及相关的其特征为在代谢或脂肪累积方面发生不希望的改变的失调的方法。从详细的说明中，以及从权利要求中，本发明的其它特征和优点将是显而易见的。定义

[0019] 所谓“脂肪形成(adipogenesis)”意味着脂肪细胞的数量的增加。脂肪形成典型地包括脂肪细胞的超常增生(数量上的增加)。脂肪细胞过度生长是已存在的脂肪细胞在大小上的增加，这是甘油三酸酯累积的结果。当能量吸收超过能量消耗时，发生过度生长。超常增生起因于来自脂肪组织中前体细胞的新的脂肪细胞生成。典型地，超常增生包括前脂肪细胞的增殖以及它们分化形成脂肪细胞。

[0020] 所谓“体重失调(body weight disorder)”意味着任何致使体重异常的失调或疾病。

[0021] 所谓“溴基结构域和额外末端(BET)蛋白的抑制剂”意味着任何抑制或减少BET蛋白家族成员活性的试剂。

[0022] 如在此所述的，所谓“JQ1”意味着(+)-JQ1((S)-叔丁基2-(4-(4-氯苯基)-2,3,9-

三甲基-6H-噻吩并[3,2-f][1,2,4]三唑并[4,3-a][1,4]二氮杂环庚-6-基)乙酸酯)。

[0023] 所谓“代谢性综合征(metabolic syndrome)”意味着一种或多种危险因素,这些因素增加了受试者发展冠心病、中风、周围血管疾病和/或II型糖尿病的倾向。与代谢性综合征相关的危险因素包括腹型肥胖(即,在腹部中或周围的过度的脂肪组织),致动脉粥样硬化血脂异常,包括但不限于高甘油三酸酯、低HDL胆固醇以及高LDL胆固醇、血压升高、胰岛素耐受性或葡萄糖耐受不良、前血栓状态(例如,在血液里的高的纤维蛋白原或纤溶酶原激活物抑制剂-1)、促炎的状态(例如,在血液中的升高的C-反应蛋白)。本发明的试剂对于治疗或预防具有一种或多种前面提及的危险因素的受试者的代谢性综合征是有用的。

[0024] 所谓“肥胖症(obesity)”意味着机体脂肪相对于去脂肪体重的过量。具有 30或更高的体重指数(BMI)的受试者被认为是肥胖的。

[0025] 所谓“体重指数(BMI)”是受试者的以千克计的体重除以他们的以米计的身高的平方。

[0026] 所谓“体重增加”意味着相对于在一个较早的时间点的个人的体重,或相对于一个参考体重的体重的增加。在一个实施方案中,参考体重相当于大约25的BMI。

[0027] 所谓“溴基结构域(bromodomain)”意味着识别乙酰化的赖氨酸残基的多肽的一部分。在一个实施方案中,BET家族成员多肽的溴基结构域包括大约110个氨基酸并且共享一种保守的折叠,该折叠包括被不同的环区连接的四个 $\alpha$ 螺旋的一种左旋束,这些环区与染色质相互作用。

[0028] 所谓“BET家族多肽(BET family polypeptide)”意味着包括两个溴基结构域和一种额外末端(ET)结构域的多肽或其片段,其具有转录调控活性或乙酰化的赖氨酸结合活性。示例性的BET家族成员包括BRD2、BRD3、BRD4以及BRDT。

[0029] 所谓“BRD2多肽(BRD2 polypeptide)”意味着与能够结合染色质或者调控转录的NP\_005095具有至少85%同一性的蛋白质或其片段。

[0030] 一个示例性的BRD2多肽的序列如下:

[0031] MLQNVTPHNKLPGEGNAGLLGLGPEAAAPGKRIRKPSLLYEGFESPTMASVPAL

[0032] QLTPANPPPPEVSNPK

[0033] KPGRTVNQLQYLHKVVMKALWKHQFAWPFRQPVDALKGLPDYHKIIKQPMD

[0034] MGTIKRRLENNYYWAASE

[0035] CMQDFNTMFTNCYIYNKPTDDIVLMAQTLEKIFLQKVASMPQEEQELVVTIPKN

[0036] SHKKGAKLAALQGSVT

[0037] SAHQVPAVSSVSHTALYTPPPEIPTTVLNIPHSPVISSPLLKSLHSAGPPLLAVTAA

[0038] PPAQPLAKKKGVK

[0039] RKADTTPTPTAILAPGSPASPPGSLEPKAARLPPMRRESGRPIKPPRKDLPDSQQ

[0040] QHQSSKKGKLSEQL

[0041] KHCNGILKELLSKKHAAYAWPFYKPVDASALGLHDYHDIIKHPMDLSTVKRKM

[0042] ENRDYRDAQEFAADVRL

[0043] MFSNCYKYNPPDHVVAMARKLQDVFEFRYAKMPDEPLEPGPLPVSTAMPPGL

[0044] AKSSSESSSESSSESS

[0045] SEESEEDEEDEEEESESSDSEEERAHLAELQEQLRAVHEQLAALSQGPISKPK

- [0046] RKREKKEKKKRKA
- [0047] EKHRGRAGADEDDKGPRAPRPPQPKSKKASGSAGGSAALGPSFGPSGGSGTK
- [0048] LPKKATKTAPPALPTG
- [0049] YDSEEEEESRPMSYDEKRQLSLDINKLPGEKLGRVVHIIQAREPSLRDSNPEEIEID
- [0050] FETLKPKSTLRELE
- [0051] RYVLSCLRKKPRKPYTIKKPGKTKELALEKKRELEKRLQDVSGQLNSTKKPP
- [0052] KKANEKTESSSAQQVA
- [0053] VSRLSASSSSSDSSSSSSSSSDTSDSDSG
- [0054] 所谓“BRD2核酸分子(BRD2 nucleic acid molecule)”意味着对BRD2多肽或其片段进行编码的多核苷酸。
- [0055] 所谓“BRD3多肽(BRD3 polypeptide)”意味着与能够结合染色质或者调控转录的NP\_031397.1具有至少85%同一性的蛋白质或其片段。
- [0056] 一个示例性的BRD3多肽的序列如下：
- [0057] 1 mstattvapa gipatpgpvn ppppevsnps kpgrktnqlq ymqnvvvktl wkhqfawpfy
- [0058] 61 qpvdaiklnl pdyhkiiknp mdmgtikkrl ennyywsase cmqdfntmft ncyiynkptd
- [0059] 121 divlmaqale kiflqkvqaqm pqeevellpp apkkgkrkpa agaqsagtqq vaavssvspa
- [0060] 181 tpfqsvppty sqtpviaatp vptitanvts vpvpaaapp ppatpivpvv pptppvvkkk
- [0061] 241 gvkrkadttt pttsaitasr sesppplsdp kqakvvarre sggrpikppk kdledgevpq
- [0062] 301 hagkgklse hlrycdsilr emlskkhaay awpfykpvda ealelhdyhd iikhpmndl
- [0063] 361 vkrkmdgrey pdaqgfaadv rlmfsnciyky nppdhevvam arklqdvfem rfakmpdepv
- [0064] 421 eapalpapaa pmvskgaess rsseessds gssdseeera trlaelqeql kavheqla1
- [0065] 481 sqapvnkpkk kkekkekek kkdkekekek hkvkaeeekk akvappakqa qqkkapakka
- [0066] 541 nsttagrql kkggkqasas ydseeeeeeg1 pmsydekrql sldinrlpge klgrvhiiq
- [0067] 601 srepsslrdsn pdeieidft lkpttlrele ryvksclqkk qrkpfsasgk kqaakskee1
- [0068] 661 aqekkkelek rlqdvgqqls sskkparkek pgapsqgps rlssssses gsssssgsss
- [0069] 721 dssdse
- [0070] 所谓“Brd3核酸分子(Brd3 nucleic acid molecule)”意味着对BRD3多肽进行编码的多核苷酸。
- [0071] 所谓“BRD4多肽(BRD4polypeptide)”意味着与能够结合染色质或者调控转录的NP\_055114具有至少85%同一性的蛋白质或其片段。
- [0072] 1 msaespgptr lrlnlpvmgdg letsqmsttq aqaqpqpana astnpppet snpnkpkqrqt
- [0073] 61 nqlqy11rvv 1ktlwkhqfa wpfqqpvdav klnlpddyki iktpmdmgti kkrlnnyyw
- [0074] 121 naqeciqdfn tmftnciyiyn kpgddivlma ealeklflqk inelpteete imivqakgrg
- [0075] 181 rgrketgtak pgvstvpntt qastppqtqt pqpnpppvqa tphpfpavtp dlivqtpvmt
- [0076] 241 vvppqplqtp ppvppqpqpp papapqpvqs hppiiaatpq pvktkkgvkr kadttptti
- [0077] 301 dpiheppslp pepkttklgq rressrpvkp pkkdvpdsqq hpapeksskv seqlkccsgi
- [0078] 361 1kemfakkha ayawpfykpv dvealglhdy cdiikhpmdm stiksklear eyrdaqefga
- [0079] 421 dvrlmfscy kynppdhevv amarklqdvf emrfakmpde peepvvavss pavppptkvv
- [0080] 481 appsssdsss dsssdssst ddseeeraqr laelqeqlka vheqlaalsq pqqnkpkkk

[0081] 541 kdkkekkek hkrkeeveen kkskakeppp kktknnssn snvskkeppap mkskppptye  
 [0082] 601 seeedckpm syeekrqlsl dinklpgekl grvvhiqsr epslknspd eieidfetlk  
 [0083] 661 pstlrelery vtsclrkkrk pqaekvdvia gsskmkgfss sesesssess ssdsedsetg  
 [0084] 721 pa

[0085] 所谓“Brd4核酸分子(Brd4 nucleic acid molecule)”意味着对BRD4多肽进行编码的多核苷酸。

[0086] 所谓“BRDT多肽(BRDT polypeptide)”意味着与能够结合染色质或者调控转录的NP\_001717具有至少85%同一性的蛋白质或其片段。

[0087] 1 ms1psrqta ivnpppseyi ntkngrltn qlqylqkvvl kdlwkhsfsw pfqrpvadavk  
 [0088] 61 lqlpdyytii knpmdlntik krlnkyak aseciedfnt mfsnclynk pgddivlmaq  
 [0089] 121 aleklfmqkl sqmpqeeqvv gvkerikkgt qqniavssak eksspsatek vfkqqeipsv  
 [0090] 181 fpktsispln vvqgasvnss sqtaaqvtkg vkrkadttt atsavkasse fsptfteksv  
 [0091] 241 alppikenmp knvlpdsqqq ynvvkvtvkt eqlrhcseil kemlakkhs yaawpfynpvd  
 [0092] 301 vnalglhnny dvvknpmldlg tikekmdnqe ykdaykfaad vrlmfmncyk ynppdhevvt  
 [0093] 361 marmlqdvfe thfskipiep vesmplcyik tditettgre ntneassegn ssddsederv  
 [0094] 421 krlaklqeql kavhqqlqvl sqvpfrklnk kkeksskek kekvnnnsnen prkmceqmrl  
 [0095] 481 kekskrnqpk krkqqfiglk sedednakpm nydekrqlsl ninklpgdk1 grvvhiqsr  
 [0096] 541 epslsnsnlpd eieidfetlk astlreleky vsaclrkrl kppakkimms keelhsqkkq  
 [0097] 601 elekrlldv nqlnsrkrqt ksdktpksa venvsrlses ssssssses essssdlsss  
 [0098] 661 dssdsesemf pkftevkpnd spskenvkkm knecilpegr tgvtqigycv qdttsantl  
 [0099] 721 vhqttpshvm ppnhhqlafn yqelehltv knisplqlip psgdseqlsn gitvhpsgd  
 [0100] 781 sdttmlesec qapvqkdiki knadswks1g kpvpkpsgvmk ssdelfnqfr kaaiekevka  
 [0101] 841 rtqelirkhl eqntkelkas qenqrldlgng ltvesfnki qnkcsgeeek ehqqsseaqd  
 [0102] 901 ksklwllkdr dlarqkeqer rrreamvgti dm1lqsdint mfennfd

[0103] 所谓“BRDT核酸分子(BRDT nucleic acid molecule)”意味着对BRDT多肽进行编码的多核苷酸。

[0104] 所谓“化合物(compound)”意味着任何小分子的化学化合物、抗体、核酸分子、或多肽、或其片段。

[0105] 术语“非对映异构体(diastereomers)”指的是具有两个或更多个不对称中心并且其分子不是彼此镜像的立体异构体。

[0106] 术语“对映异构体(enantiomers)”是指一种化合物的两种互为不能重叠的镜像的立体异构体。两种对映异构体的等摩尔混合物称为“消旋混合物(racemic mixture)”或者“消旋体(racemate)”。

[0107] 术语“卤素(halogen)”是指-F、-Cl、-Br或-I。

[0108] 术语“卤烷基(haloalkyl)”旨在包括在此定义的,经卤素单、双或多取代的烷基基团,例如氟甲基以及三氟甲基。

[0109] 术语“羟基(hydroxyl)”意味着-OH。

[0110] 如在此所使用的术语“杂原子(heteroatom)”是指除了碳或氢之外的任何元素的原子。优选杂原子是氮、氧、硫以及磷。

[0111] 如在此所使用的，术语“烷基(alkyl)”意味着饱和的直链或支链非环烃，该烃典型地具有1-10个碳原子。代表性的饱和的直链烷基包括甲基、乙基、正丙基、正丁基、正戊基、正己基、正庚基、正辛基以及正癸基；而饱和的支链烷基包括异丙基、仲-丁基、异丁基、叔-丁基、异戊基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2-甲基己基、3-甲基己基、4-甲基己基、5-甲基己基、2,3-二甲基丁基、2,3-二甲基戊基、2,4-二甲基戊基、2,3-二甲基己基、2,4-二甲基己基、2,5-二甲基己基、2,2-二甲基戊基、2,2-二甲基己基、3,3-二甲基戊基、3,3-二甲基己基、4,4-二甲基己基、2-乙基戊基、3-乙基戊基、2-乙基己基、3-乙基己基、4-乙基己基、2-甲基-2-乙基戊基、2-甲基-3-乙基戊基、2-甲基-4-乙基戊基、2,2-二乙基戊基、3,3-二乙基己基、2,2-二乙基己基、3,3-二乙基己基等。包括在本发明的化合物中的烷基基团可以是未经取代的、或可任选地经一个或多个取代基取代，诸如氨基、烷氨基、芳氨基、杂芳基氨基、烷氧基、烷硫基、氨基、酰基、硝基、羟基、氰基、芳基、杂芳基、烷芳基、烷基杂芳基、芳氧基、杂芳氧基、芳硫基、杂芳硫基、芳氨基、杂芳氨基、碳环基、碳环氧基、碳环硫基、碳环氨基、杂环基、杂环氧基、杂环氨基、杂环硫基等。对于本发明的化合物而言典型地优选低级烷基。

[0112] 如在此所使用的，术语“芳族环(aromatic ring)”或“芳基(aryl)”意味着单环或多环的芳族环或者包括碳和氢原子的环基团。适合的芳基基团的实例包括，但并不局限于，苯基、甲苯基、蒽基、芴基、茚基、和萘基、以及苯稠合的碳环部分，如5,6,7,8-四氢萘基。芳基基团可以是未经取代的或可任选地经一个或多个取代基取代，例如，在此所描述的用于芳基基团的取代基(包括但并不局限于烷基(优选是低级烷基或者经一个或多个卤素取代的烷基)、羟基、烷氧基(优选是低级烷氧基)、烷硫基、氰基、卤素、氨基、硼酸(-B(OH)<sub>2</sub>)、以及硝基)。在某些实施方案中，芳基基团是单环，其中该环包括6个碳原子。

[0113] 术语“杂芳基(heteroaryl)”指的是芳族的5-8元单环、8-12元双环、或11-14元三环环系统，如果是单环则具有1-4个环杂原子，如果是双环则具有1-6个杂原子，或如果是三环则具有1-9个杂原子，所述杂原子选自O、N、或S，并且剩余环原子是碳。杂芳基基团可以可任选地经一个或多个例如像在此描述的用于芳基基团的取代基取代。杂芳基基团的实例包括，但并不局限于，吡啶基、呋喃基、苯并二氧杂环戊烯基、噻吩基、吡咯基、噁唑基、噁二唑基、咪唑基、噻唑基、异噁唑基、喹啉基、吡唑基、异噻唑基、哒嗪基、嘧啶基、吡嗪基、三嗪基、三唑基、噻二唑基、异喹啉基、吲唑基、苯丙噁唑基、苯并呋喃基、吲嗪基、咪唑并吡啶基、四唑基、苯并咪唑基、苯并噻唑基、苯并噁二唑基、苯并噁二唑基、以及吲哚基。

[0114] 如在此所使用的术语“杂环的(heterocyclic)”指的是在一个环状结构内包含除了碳之外的至少一个原子(例如，S、O、N)的有机化合物。这些有机化合物中的该环状结构可以是芳族的或者，在某些实施方案中，是非芳族的。杂环部分的一些实例包括，但并不局限于，吡啶、嘧啶、吡咯烷、呋喃、四氢呋喃、四氢噻吩、以及二噁烷。

[0115] 术语“同分异构体(isomers)”或者“立体异构体(stereoisomers)”指的是具有相同的化学构成，但是原子或基团的空间安排不同的化合物。

[0116] 术语“同位素衍生物(isotopic derivatives)”包括化合物的衍生物，其中这些化合物中的一个或多个原子被这些原子的相应的同位素替换。例如，含有碳原子(C<sup>12</sup>)的化合物的同位素衍生物可以是其中该化合物的该碳原子被C<sup>13</sup>同位素替换的同位素衍生物。

[0117] 所谓“计算机建模(computer modeling)”意味着应用计算程序确定以下一项或多项：配体对于结合部分的定位和结合邻近，被结合配体占用的空间，结合部分与配体之间的互补接触表面的量，给定配体对结合部分进行结合的变形能，以及配体与结合部分之间的氢键能、范德华相互作用、疏水性相互作用、和/或静电相互作用能的一些估算。计算机建模还可以提供模型系统与候选化合物的特征比较。例如，计算机建模实验可以比较本发明的一个药效团模型与一个候选化合物，以便评估该候选化合物与该模型的适宜性。

[0118] 所谓“计算机系统(computer system)”意味着用于分析原子坐标数据的硬件装置、软件装置以及数据存储装置。本发明的基于计算机的最小硬件装置包括中央处理器(CPU)、输入装置、输出装置以及数据存储装置。理想的是，提供一个监视器对结构数据进行可视化。该数据存储装置可以是随机存取存储器(RAM)或者对本发明的计算机可读媒质进行存取的装置。这样的系统的实例是从SiliconGraphics Incorporated公司以及Sun Microsystems公司可得到的运行基于Unix的，Windows NT或IBM OS/2的操作系统的微型计算机工作站。

[0119] 所谓“计算机可读媒质(computer readable media)”意味着可以被计算机直接读取并且存取例如从而使得该媒质适合于在以上提到的计算机系统中使用的任何媒质。该媒质包括，但并不局限于，磁存储媒质如软磁盘、硬磁盘存储媒质以及磁带；光存储媒质如光盘或只读光盘(CD-ROM)；电存储媒质如RAM和只读存储器(ROM)；以及这些分类的混合体如磁/光存储媒质。

[0120] 所谓“可检测的标记物(detectable label)”意味着一种组合物，当把该组合物连接到一个感兴趣的分子时，使后者变成通过光谱、光化学、生物化学、免疫化学、或化学的手段可检测的。例如，有用的标记物包括放射性同位素、磁珠、金属珠、胶粒、荧光染料、高电子密度试剂、酶(例如，如通常在酶联免疫吸附试验(ELISA)中所使用的)、生物素、异羟基洋地黄毒甙元、或半抗原。

[0121] 所谓“疾病(disease)”意味着损害或妨碍细胞、组织、或器官正常功能的任何违和或失调。易于用在此描述的化合物进行治疗的疾病的实例包括代谢性综合征、肥胖症、II型糖尿病、胰岛素耐受性、以及相关的其特征为在代谢或脂肪累积方面发生不希望的改变的失调。

[0122] 所谓“有效量(effective amount)”意味着相对于未治疗的病人，改善疾病的症状所需的药剂的量。用于实施本发明以治疗性地处理疾病的一种或多种活性化合物的有效量随给药方式，受试者的年龄、体重以及总体健康状况而变化。最终地，主治医生或者兽医会决定适当的量以及给药方案。这样的量被指为“有效(effecting)”量。

[0123] 术语“对映异构体(enantiomers)”是指一种化合物的两种互为不能重叠的镜像的立体异构体。两种对映异构体的等摩尔混合物称为“消旋混合物(racemate)”或者“消旋体(racemate)”。

[0124] 术语“卤素(halogen)”是指-F、-Cl、-Br或-I。

[0125] 术语“卤烷基(haloalkyl)”旨在包括以上定义的，经卤素单、双或多取代的烷基基团，例如氟甲基以及三氟甲基。

[0126] 术语“羟基(hydroxyl)”意味着-OH。

[0127] 如在此所使用的术语“杂原子(heteroatom)”是指除了碳或氢之外的任何元素的

原子。优选杂原子是氮、氧、硫以及磷。

[0128] 如在此所使用的术语“杂环的(heterocyclic)”指的是在一个环状结构内包含除了碳之外的至少一个原子(例如,S,O,N)的有机化合物。这些有机化合物中的该环状结构可以是芳族的或者非芳族的。杂环部分的一些实例包括,但并不局限于,吡啶、嘧啶、吡咯烷、呋喃、四氢呋喃、四氢噻吩、以及二噁烷。

[0129] 术语“同分异构体(isomers)”或者“立体异构体(stereoisomers)”指的是具有相同的化学构成,但是原子或基团的空间安排不同的化合物。

[0130] 术语“同位素衍生物(isotopic derivatives)”包括化合物的衍生物,其中这些化合物中的一个或多个原子被这些原子的相应的同位素替换。例如,含有碳原子(C<sup>12</sup>)的化合物的同位素衍生物可以是其中该化合物的该碳原子被C<sup>13</sup>同位素替换的同位素衍生物。

[0131] 本发明提供了多个对于开发高特异性药物是有用的靶点以便治疗以在此描述的方法为特征的失调。此外,本发明的方法提供了一种容易的手段以便识别安全用于受试者的疗法。此外,本发明的方法提供了以高体积通量、高灵敏度以及低复杂度实际上地分析任何数量的用于作用于在此描述的疾病的化合物的途径。

[0132] 所谓“适宜性(fitting)”意味着通过自动、或半自动的手段确定试剂分子的一个或多个原子与BET家族成员的一个或多个原子或结合位点(例如,BRD2、BRD3、BRD4以及BRDT的溴基结构域)的相互作用,并且确定这种相互作用稳定的程度。用于适宜性的不同的基于计算机的方法在此进一步地描述。

[0133] 如在此所使用的术语“光学异构体(optical isomers)”包括互为不能重叠的镜像的分子,也被称为手性分子。

[0134] 所谓“分离的多核苷酸(isolated polynucleotide)”意味着脱离了基因的核酸(例如,DNA),该基因在衍生出本发明的核酸分子的有机体的天然存在的基因组中。因此该术语包括,例如,重组DNA,该重组DNA合并进入载体、自主复制质粒或病毒、或原核生物或真核生物的基因组DNA,或者该重组DNA作为不依赖于其他序列的分离的分子存在(例如,通过聚合酶链反应(PCR)或限制性内切核酸酶消化产生的cDNA或者基因组的或cDNA的片段。此外,该术语包括从DNA分子转录的RNA分子,以及是对另外的多肽序列进行编码的杂合基因的一部分的重组DNA。

[0135] 所谓“分离的多肽(isolated polypeptide)”意味着本发明的从天然伴随它的组分中分离的多肽。典型地,当该多肽以重量计为至少60%时,将它从它天然关联的蛋白质和天然存在的有机分子中分离。优选地,制品是以重量计至少75%、更优选是至少90%、并且最优选是至少99%的本发明的多肽。本发明的分离的多肽可以,例如,通过从天然源提取、对这样的多肽进行编码的重组核酸的表达、或化学合成蛋白质而得到。可以通过任何适当的方法测量纯度,例如,柱色谱法、聚丙烯酰胺凝胶电泳、或高效液相色谱(HPLC)分析。

[0136] 所谓“标记(marker)”意味着在与疾病或失调相关联的表达水平或活性方面具有改变的任何蛋白质或多核苷酸。

[0137] 在如此所使用的,“获得一种试剂(obtaining an agent)”中的“获得(obtaining)”包括合成、购买、或以另外的方式获得该试剂。

[0138] 在此使用的短语“肠胃外给药(parenteral administration和administered parenterally)”意味着除了肠内以及局部给药之外的给药方式,通常是通过注射,并且包

括但并不局限于，静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眼眶内、心内、真皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊髓内以及胸骨内注射以及输注。

[0139] 术语“多环基(*polycyclyl*)”或者“多环的基团(*polycyclic radical*)”指的是两个或更多个环的环基团(例如,环烷基、环烯基、环炔基、芳基和/或杂环基),其中两个或更多个碳被两个邻接的环共用,例如,这些环是“稠环”。通过非相邻的原子连接的环称为“桥”环。多环的每个环可以经以上描述的取代基取代,例如,卤素、羟基、烷基羰基氧基、芳基羰基氧基、烷氧基羰基氧基、芳氧基羰基氧基、羧基、烷基羰基、烷氧基羰基、氨基羰基、烷基硫羰基、烷氧基、磷酸根、膦酸基、亚膦酸基、氰基、氨基(包括烷氨基、二烷氨基、芳氨基、二芳氨基、以及烷基芳氨基)、酰胺基(包括烷基羰基氨基、芳基羰基氨基、氨基甲酰基以及脲基)、脒基、亚胺基、硫氢基、烷硫基、芳硫基、硫代羧酸根、硫酸根、磺酸基、氨基磺酰基、亚磺酰氨基、硝基、三氟甲基、氰基、叠氮基、杂环基、烷基芳基、或芳族的或杂芳族的部分。

[0140] 如在此所使用的术语“多晶型(*polymorph*)”指的是本发明的化合物或其络合物的固体晶型。相同化合物的不同多晶型表现出不同的物理、化学和/或光谱特性。不同的物理特性包括,但并不局限于,稳定性(例如,对热或光)、可压缩性以及密度(在配制和产品制造方面重要)、以及溶解速率(能够影响生物可利用率)。稳定性的不同可由化学反应性(例如,差分氧化,一种剂型当包括一种多晶型时比包括另一种多晶型褪色更快)或力学特征(例如,存储时破碎为动力学上有利的多晶型的片剂转化成热力学上更稳定的多晶型)或两者(例如,具有一种多晶型的片剂在高湿度时更容易断裂)的变化引起。多晶型的不同的物理特性可以影响它们的加工。

[0141] 术语“药物前体(*prodrug*)”包括具有可在体内代谢的部分的化合物。通常,药物前体在体内通过酯酶或者其他机制代谢为活性药物。药物前体的实例以及它们的应用在本领域是众所周知的(参见,例如,Berge等人(1977)“药物盐(*Pharmaceutical Salts*)”《药物科学杂志》(*J.Pharm.Sci*)66:1-19)。可以在化合物的最终分离和纯化时原位制备这些药物前体,或通过将经纯化的化合物以自由酸形式或羟基分开地与适合的酯化剂进行反应。通过用羧酸进行处理,可以将羟基基团转化成酯类。药物前体部分的实例包括经取代的和未经取代的、支链或无支链的低级烷基酯部分(例如,丙酸酯类),低级烯基酯类,二-低级烷基-氨基低级烷基酯类(例如,二甲基氨基乙基酯),酰氨基低级烷基酯类(例如,乙酰氨基甲基酯),酰氨基低级烷基酯类(例如,新戊酰氨基甲基酯),芳基酯类(苯基酯),芳基-低级烷基酯类(例如,苯甲基酯),经取代的(例如,用甲基、卤素、或甲氧基取代基)芳基和芳基-低级烷基酯类,酰胺类,低级烷基酰胺类,二-低级烷基酰胺类,以及羟基酰胺类。优选的药物前体部分是丙酸酯类和酰基酯类。也包括在体内通过其他机制转化成活性形式的药物前体。

[0142] 此外,横跨碳-碳双键的立体化学的表示也与通常的化学领域相反:“Z”指的是经常被称为“顺式(*cis*)”(相同侧)的构象而“E”指的是经常被称为“反式(*trans*)”(相反侧)的构象。本发明的化合物包括这两种构型,顺式/反式和/Z/E。

[0143] 关于手性中心的命名,术语“d”以及“l”构型正如国际理论与应用化学联合会(IUPAC)所定义的。关于术语非对映异构体、消旋体、差向异构体以及对映异构体,这些将在它们通常的语境中使用以便描述制品的立体化学。

[0144] 所谓“减少(*reduces*)”意味着至少10%、25%、50%、75%、或100%的负的改变。

[0145] 所谓“参考(reference)”意味着标准或对照状况。

[0146] “参考序列(reference sequence)”是定义的作为序列比较的基础的序列。参考序列可以是规定序列的子集或者整体,例如全长cDNA或基因序列的区段、或者该完整的cDNA或基因序列。对多肽而言,参考多肽序列的长度将通常是至少大约16个氨基酸,优选地是至少大约20个氨基酸,更优选地是至少大约25个氨基酸,并且甚至更优选地是大约35个氨基酸、大约50个氨基酸、或大约100个氨基酸。对核酸而言,参考核酸序列的长度将通常是至少大约50个核苷酸、优选地是至少大约60个核苷酸、更优选地是至少大约75个核苷酸、并且甚至更优选地是大约100个核苷酸或大约300个核苷酸或它们附近的或者它们之间的任一整数。

[0147] 所谓“特异性结合(specifically binds)”意味着一种化合物或抗体识别并且结合本发明的多肽,但是基本上并不识别并且结合天然地包括本发明的多肽的试样(例如,生物试样)中的其他分子。

[0148] 在本发明的方法中有用的核酸分子包括对本发明的多肽或其片段进行编码的任何核酸分子。这样的核酸分子不需要与内源性核酸序列具有100%的同一性,但是将典型地表现出基本的同一性。与内源性序列具有“基本同一性(substantial identity)”的多核苷酸典型地能够与双链核酸分子的至少一条链杂交。在本发明的方法中有用的核酸分子包括对本发明的多肽或其片段进行编码的任何核酸分子。这样的核酸分子不需要与内源性核酸序列具有100%的同一性,但是将典型地表现出基本的同一性。与内源性序列具有“基本同一性(substantial identity)”的多核苷酸典型地能够与双链核酸分子的至少一条链杂交。所谓“杂交(hybridize)”意味着在不同的严格条件下进行配对以便在互补的多核苷酸序列(例如,在此描述的基因)、或其部分之间形成双链分子。(例如,参见Wahl,G.M.和S.L.Berger(1987)《酶学方法》(Methods Enzymol.)152:399),Kimmel,A.R.(1987)《酶学方法》(Methods Enzymol.)152:507)。

[0149] 例如,严格的盐浓度通常将是小于大约750mM的氯化钠和75mM的柠檬酸三钠、优选地是小于大约500mM的氯化钠和50mM的柠檬酸三钠、并且更优选地是小于大约250mM的氯化钠和25mM的柠檬酸三钠。在缺少有机溶剂(例如,甲酰胺)下可以获得低严格杂交,而在至少大约35%的甲酰胺、并且更优选地是至少大约50%的甲酰胺存在下可以获得严格杂交。严格的温度条件将通常包括至少大约30°C、更优选地是至少大约37°C、并且最优选地是至少大约42°C的温度。不同的另外的参数,如杂交时间、清洁剂(例如,十二烷基硫酸钠(SDS))浓度、以及载体DNA的包含或排除,对本领域的普通技术人员是熟知的。根据需要通过组合这些不同的条件实现不同的严格水平。在一个优选的实施方案中,杂交将会在30°C、在750mM的氯化钠、75mM的柠檬酸三钠、以及1%的SDS中发生。在一个更优选的实施方案中,杂交将会在37°C、在500mM的氯化钠、50mM的柠檬酸三钠、1%的SDS、35%的甲酰胺、以及100μg/ml的变性的鲑精DNA(ssDNA)中发生。在一个最优选的实施方案中,杂交将会在42°C、在250mM的氯化钠、25mM的柠檬酸三钠、1%的SDS、50%的甲酰胺、以及200μg/ml的ssDNA中发生。这些条件的有用的变体对于本领域的普通技术人员将是显而易见的。

[0150] 对于大多数的应用,杂交之后的洗涤步骤也将会在严格度方面不同。通过盐浓度和温度可以定义洗涤严格条件。如上所述,通过降低盐浓度或增加温度可以增加洗涤严格度。例如,用于洗涤步骤的严格盐浓度将为优选地小于大约30mM的氯化钠和3mM的柠檬酸三

钠、并且最优选地是小于大约15mM的氯化钠和1.5mM的柠檬酸三钠。用于洗涤步骤的严格的温度条件将通常包括至少大约25°C、更优选地是至少大约42°C、并且甚至更优选地是至少大约68°C的温度。在一个优选的实施方案中，洗涤步骤将会在25°C、在30mM的氯化钠、3mM的柠檬酸三钠、以及0.1%的SDS中发生。在一个更优选的实施方案中，洗涤步骤将会在42°C、在15mM的氯化钠、1.5mM的柠檬酸三钠、以及0.1%的SDS中发生。在一个更优选的实施方案中，洗涤步骤将会在68°C、在15mM的氯化钠、1.5mM的柠檬酸三钠、以及0.1%的SDS中发生。这些条件的另外的变体对于本领域的普通技术人员将是显而易见的。杂交技术对于本领域的普通技术人员是熟知的并且描述于例如Benton与Davis(《科学》(science)196:180, 1977); Grunstein和Hogness(《美国科学院院刊》(Proc. Natl. Acad. Sci., USA)72:3961, 1975); Ausubel等人(《分子生物学实验手册》, 威利出版社期刊全文数据库, 纽约(Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York,)2001); Berger和Kimmelman(《分子克隆技术指南》(Guide to Molecular Cloning Techniques), 1987, 学术出版社, 纽约(Academic Press, New York)); 以及Sambrook等人,《分子克隆实验指南》, 冷泉港实验室出版社, 纽约, (Molecular Cloning:A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)。

[0151] 所谓“基本上同一的(substantially identical)”意味着相对于参考氨基酸序列(例如,在此描述的任一氨基酸序列)或核酸序列(例如,在此描述的任一核酸序列),一种多肽或核酸分子表现出至少85%的同一性。优选地,相对于用于比较的序列,这样的序列在氨基酸水平或核酸上为至少85%、90%、95%、99%或甚至100%的同一。

[0152] 使用序列分析软件(例如,威斯康星大学生物技术中心(麦迪逊大学道1710,威斯康星州53705())遗传计算组的序列分析软件包,BLAST、BESTFIT、GAP、或PILEUP/PRETTYBOX程序)典型地测量序列同一性。这种软件通过将同源性程度分配给不同的取代、缺失、和/或其他修饰进行相同或相似序列的匹配。保守取代典型地包括以下组内的取代:甘氨酸、丙氨酸;缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸;天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺;丝氨酸、苏氨酸;赖氨酸、精氨酸;以及苯丙氨酸、酪氨酸。在确定同一性程度的示例性方法中,可以使用BLAST程序,其中在 $e^{-3}$ 到 $e^{-100}$ 之间的概率分数表示密切相关的序列。

[0153] 所谓“增加(increases)”意味着相对于参考,至少大约10%、25%、50%、75%、或100%的正的改变。

[0154] 所谓“均方根偏差(root mean square deviation)”是指离均差的平方的算术平均数的平方根。

[0155] 所谓“受试者(subject)”意味着哺乳动物,包括但并不局限于,人或非人类的哺乳动物,如牛、马、犬、绵羊、或猫。

[0156] 所谓“特异性结合(specifically binds)”意味着一种化合物或抗体识别并且结合本发明的多肽,但是基本上并不识别并且结合天然地包括本发明的多肽的试样(例如,生物试样)中的其他分子。

[0157] 术语“巯基(sulphydryl或thiol)”意味着-SH。

[0158] 如在此所使用的,术语“互变异构体(tautomers)”指的是通过互变异构化容易地进行相互转化的有机分子的同分异构体,其中氢原子或质子在该反应中迁移,在一些场合伴随着单键与相邻双键的转换。

[0159] 如在此所使用的术语“治疗(treat、treating、treatment等)”指的是减少或改善失调和/或与其相关联的症状。所谓“改善(ameliorate)”是指减少、抑制、减弱、减小、阻滞、或稳定疾病的发展或进展。将被理解的是，尽管不能排除，治疗失调或违和并不要求完全地消除该失调、违和或与其相关联的症状。

[0160] 如在此所使用的术语，“预防(prevent、preventing、prevention)”、“预防性治疗(prophylactic treatment)”等指的是减少失调或违和在受试者中的发展的可能性，该受试者没有失调或违和，但是有发展失调或违和的风险或者容易发展失调或违和。

[0161] “有效量(effective amount)”指的是对经治疗的受试者产生治疗作用的化合物的量。这种治疗效果可以是客观的(即通过一些测试或标记是可测量的)或主观的(即受试者给出了作用的指征或感觉到了作用)。在此描述的化合物的有效量可以在每千克体重大约1mg到大约5000mg的范围内。有效剂量还会根据给药途径，以及与其他药剂共同使用的可能性而改变。

[0162] 将在此提供的范围理解为该范围内的所有值的简略表达。例如，将1至50的范围理解为包括下组的任一数、数的组合、或者下组的子范围，该组由以下各项组成：1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、或50。

[0163] 如在此所使用的术语“治疗(treat、treating、treatment等)”指的是减少或改善失调和/或与其相关联的症状。将被理解的是，尽管不能排除，治疗失调或违和并不要求完全地消除该失调、违和或与其相关联的症状。

[0164] 除非明确声明或从上下文显而易见，如在此所使用的，术语“或(or)”被理解为包括在内。除非明确声明或从上下文显而易见，如在此所使用的，术语“一个、一种(a、an)”、“该(the)”被理解为单一的或复数的。

[0165] 除非明确声明或从上下文显而易见，如在此所使用的，术语“大约(about)”被理解为在本领域的正常容差范围内，例如，在平均数的2标准差之内。大约可以被理解为在声明值的10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、或0.01%之内。除非从上下文显而易见，在此提供的所有数值被该术语大约修饰。

[0166] 在此的变量的任何定义中的一系列化学基团的陈述包括该变量作为任何单个基团或所列出基团的组合的定义。在此针对变量或方面的实施方案的陈述包括该实施方案作为任何单个的实施方案或与任何其他实施方案或其部分的组合。

[0167] 在此提供的任何组合物或方法可以与在此提供的一个或多个任何其他组合物和方法进行组合。

[0168] 附图简要说明

[0169] 附图1包含八张显微照片，展示了BET蛋白家族成员的抑制以剂量依赖性的方式阻滞3T3L1细胞中的脂肪形成，3T3L1细胞是一种广泛地用作针对脂肪形成的模型的细胞系。用不同剂量的活性JQ1(S)对映异构体或无活性的对照JQ1(R)对映异构体来处理细胞。接着将药物处理细胞用油红O染色，作为对指示脂肪细胞分化程度的脂类累积的测量。如所示，JQ1(S)对映异构体抑制了脂类累积。

[0170] 附图2A和2B是图表，展示了在脂肪细胞分化过程中，BET蛋白家族成员的抑制阻滞3T3L1细胞中C/EBP $\alpha$ 和PPAR $\gamma$ 的表达。C/EBP $\alpha$ 以及PPAR $\gamma$ 是脂肪形成必需的正调节蛋白。附

图2A是随着时间在对照以及JQ1处理的3T3L1细胞中 的C/EBP $\alpha$ 表达水平的图表。附图2B是随着时间在对照以及JQ1处理的3T3L1细胞中的PPAR  $\gamma$  表达水平的图表。使用RT-PCR获得结果。

[0171] 附图3A-3E是图表,展示了BET家族成员的抑制阻滞ob/ob小鼠的体重增加,ob/ob小鼠是一种缺乏瘦蛋白的鼠类肥胖症模型。附图3A是用JQ1处理之前以及处理14天之后的ob/ob小鼠体重的图表。附图3B是随着时间对照以及JQ1处理的ob/ob小鼠的体重图表。附图3C是图表,展示了在14天的处理期内,对照处理的以及JQ1处理的ob/ob小鼠的体重增加总量。附图3D是在14天的处理期内,对照处理以及JQ1处理的ob/ob小鼠的食物摄取总量的图表。附图3E是在14天的处理期内,对照处理的以及JQ1处理的ob/ob小鼠的饲料效率的图表。重要地是,相对于对照小鼠,JQ1阻滞了ob/ob小鼠的体重增加。

[0172] 附图4A和4B是图表,展示了BET蛋白家族成员的抑制降低ob/ob小鼠中肝脏以及脂肪组织的重量。附图4A定量测定了用载体或JQ1处理的ob/ob小鼠的肝脏重量。附图4B定量测定了用载体或JQ1处理的ob/ob小鼠的皮下脂肪重量。

[0173] 附图5包含两张显微照片,展示了BET蛋白家族成员的抑制完全阻滞小鼠肥胖症模型中的脂肪肝形成。将这些切片用苏木精和伊红染色。大的脂滴普遍存在于从仅接受载体的ob/ob小鼠上获得的切片中。值得注意地是,在用JQ1处理过的小鼠中,肝脏形态学是正常的。

[0174] 附图6A-6F展示了BET蛋白家族成员的抑制减少了控制肝脏中脂肪累积的基因的表达。附图6A-6F是一组图表,展示了在载体处理的以及JQ1处理的ob/ob小鼠中的基因表达。有趣地是,JQ1降低了SREBP(附图6A)、PPAR  $\gamma$  2(附图6B)、FAS(这不具有统计学显著性)(附图6C)、ACCB(附图6D)、SCD1(附图6E)以及DGAT(附图6F)的表达。

[0175] 附图7A-7C展示了溴基结构域的抑制降低了用标准饲料饲养的小鼠中的内脏脂肪量。附图7A是用标准饲料饲养的小鼠中的、用载体处理以及JQ1处理的小鼠(每天给药50mg/kg)的随着时间的体重图表。附图7B是一个图表,比较了载体 对照或JQ1处理8周之后的小鼠内脏脂肪。附图7C是一个图表,比较了载体对照或JQ1处理8周之后的小鼠皮下脂肪。

[0176] 附图8展示了该溴基结构域的抑制阻滞响应于高脂肪饮食的体重增加。附图8是在用高脂肪饮食饲养的小鼠中的、用载体处理以及JQ1处理的小鼠(每天给药50mg/kg)的随着时间的体重图表。

[0177] 附图9A&9B展示了溴基结构域的抑制保护对抗接受高脂肪饮食8周之后的胰岛素耐受性。附图9A是一个将胰岛素注射入小鼠后的血糖图,该小鼠已经食用高脂肪饮食7周并且每天用载体对照或JQ1进行处理。附图9B是附图9A中的数据的曲线下面积(AUC)的一个图表。

[0178] 发明详细说明

[0179] 本发明的特征是用于治疗和预防代谢性综合征、肥胖症、II型糖尿病、胰岛素耐受性、肝脏脂肪变性以及相关的其特征为在代谢或脂肪累积方面发生不希望的改变的失调的组合物以及方法。

[0180] 本发明至少部分地基于抑制一个或多个BET蛋白家族成员的试剂的发现,这些试剂阻滞体重增加并且负向调节大量在脂肪形成中具有功能的转录因子,并且还在其他组织如肝脏或肌肉组织中控制脂类进行分区以及的脂肪的异位累积。BET蛋白家族(包括BRD1、

BRD2、BRD3、BRD4以及BRDT)是染色质重塑的重要调节子并且有可能通过降低转录因子(包括SREBP以及PPAR $\gamma$  2)以及由这些转录因子调节的靶基因(包括脂肪酸合酶(FAS)、ACC $\beta$ 、SCD1以及DGAT)的表达来控制脂肪细胞分化(注意:技术上而言,FAS数据不满足统计显著性)。使用对具有溴基结构域的BET家族具有生化选择性的、细胞可渗透的有效的小分子抑制剂(JQ1)获得了在此报告的这些结果。本发明进一步提供了能够调节该溴基结构域家族的有关化合物的用途,该溴基结构域家族是一个含有识别核染色质上乙酰基-赖氨酸残基的溴基结构域的多肽家族。赖氨酸乙酰化已经成为与细胞生物学和疾病生物学广泛相关的信号修饰。靶向可逆地介导侧链乙酰化的酶已是药物发现研究的一个活跃领域。迄今为止,成功的成果局限于核染色质背景下的共价键修饰的“写入物”(乙酰转移酶)和“擦除物”(组蛋白脱乙酰基酶)

[0181] 最近对BRD4的高分辨率的共晶结构的表征显示了与乙酰基-赖氨酸结合腔的优异的形状互补性。JQ1结合到BRD4的串联溴基结构域是乙酰基-赖氨酸竞争的并且在人类细胞中从染色质替代BRD4。这些数据建立了靶向表观遗传“读出物”的蛋白质-蛋白质相互作用的可行性,从而阻滞脂肪细胞分化。此外,此类化合物在一个良好建立的鼠类肥胖症模型(ob/ob小鼠)中的延伸的体内用途表明BET蛋白的抑制阻滞体重增加,减少脂肪组织重量并且抑制肝脏中的脂肪累积。在肝脏中,脂肪累积的减少伴随着控制脂肪合成的基因表达的显著减少。在此报告的这些数据确立了抑制BET蛋白的试剂是肥胖症以及相关代谢失调(包括脂肪肝)的有效抑制剂。肥胖症和脂肪肝的治疗对代谢性综合征、II型糖尿病、胰岛素耐受性以及相关的其特征为在代谢或脂肪累积方面发生不希望的改变的失调,及其症状有益。

#### [0182] 代谢性综合征

[0183] 代谢性综合征是一组伴发的心脏病和糖尿病的危险因素并且增加了病人对重病的危险,包括心脏病、中风以及糖尿病。在一个实施方案中,用于代谢性综合征的标准包括腰围增加(腹型肥胖)、甘油三酸酯升高、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)减少、血压升高和/或空腹血糖值升高。具体地,150mg/dL或更高的甘油三酸酯水平;男性低于40mg/dL并且女性低于50mg/dL的高密度脂蛋白(HDL)胆固醇;130/85mm Hg或更高的血压水平;或100mg/dL或更高的空腹血糖值。对大多数美国人而言,女性35英寸或更高并且男性40英寸或更高的腰围被视为是异常地增加的。具有该列出的标准的至少三个异常水平的个体被视为患有代谢性综合征。许多医师相信代谢性综合征有可能与胰岛素的耐受性相关联。代谢性综合征增加患动脉粥样硬化心血管疾的危险1.5-3倍,并且提高患2型糖尿病的危险3-5倍。它影响超过26%的成人或超过5000万的美国人。

[0184] 代谢性综合征的临床管理集中于降低患动脉粥样硬化性心血管疾病的危险,以及降低尚未发展出临床糖尿病的病人患2型糖尿病的危险。最近公布的结果表明五分之一的美国成人患有代谢性综合征。目前治疗代谢性综合征的方法是不充足的。本发明的包含抑制一种或多种BET蛋白(例如,Brd2、Brd3、Brd4)的生物学活性的试剂的组合物有用于代谢性综合征的预防或治疗,或者有用于任何一种或多种与代谢性综合征相关联的危险因素的预防或治疗。

#### [0185] 含有溴基结构域的蛋白质

[0186] 基因调控基本上被可逆的、非共价的大分子组装控制。至RNA聚合酶的信号转导要

求更高级的蛋白质复合体,该复合体被能够解释染色质的翻译后修饰状态的组装因子在空间上调控。表观遗传读出物是结构上不同的蛋白质,各自具有一个或多个进化上保守的效应物模块,该效应物模块识别组蛋白或DNA的共价修饰。组蛋白尾上的赖氨酸残基的ε-N-乙酰化(Kac)与开放的染色质构造以及转录激活相关联<sup>3</sup>。乙酰基-赖氨酸的背景特异的分子识别主要由溴基结构域介导。

[0187] 作为转录因子复合体(TAF1、PCAF、Gcn5以及CBP)的组分以及表观遗传记忆的决定子<sup>4</sup>,含有溴基结构域的蛋白质有重要的生物学意义。有含有总共57种不同的溴基结构域的41种人类蛋白质。尽管大量序列不同,但所有的溴基结构域共享一个保守的折叠,该折叠包括由确定底物特异性的不同环区(ZA与BC环)连接的四个α螺旋(α<sub>Z</sub>、α<sub>A</sub>、α<sub>B</sub>、α<sub>C</sub>)的一种左旋束。具有肽底物的共晶体结构表明乙酰基-赖氨酸被一种中心疏水腔识别并且通过与存在于大多数溴基结构域中的天冬酰胺残基的氢键得以锚定<sup>5</sup>。溴基结构域和额外末端(BET)家族(BRD2、BRD3、BRD4以及BRDT)共享一种共同结构域构造以及一种更趋异的C端募集结构域,该共同结构域构造包括表现高水平的序列保守性的两个N端溴基结构域<sup>6</sup>。

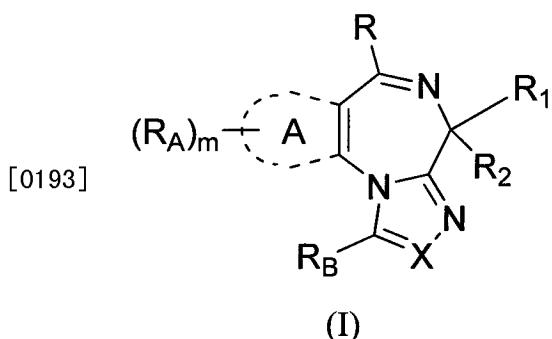
[0188] 本发明特征在于用于抑制人类溴基结构域蛋白质的组合物和方法。

[0189] 本发明的化合物

[0190] 本发明提供了多种化合物(例如,JQ1和具有在此描述的化学式的化合物),这些化合物结合在BET家族成员(例如BRD2、BRD3、BRD4)的第一溴基结构域的apo晶体结构的结合袋中。本发明提供了此类化合物以及其他本领域中已知的BRD2、BRD3以及BRD4抑制剂于在此描述的方法中的用途。此类化合物描述于,例如,W02009084693以及相对应的US2010286127中,将其通过引用结合在此。不希望受理论的约束,这些化合物可以特别有效地抑制脂肪形成、脂肪细胞分化以及脂肪细胞生物学活性的有害方面(例如,过度的脂肪合成、过度的脂肪累积/脂肪细胞过度生长、脂肪细胞炎症、器官纤维化)。在一种方法中,使用分子对接程序对以下化合物进行选择:有用于代谢性综合征、肥胖症、II型糖尿病、胰岛素耐受性以及相关的其特征为在代谢或脂肪累积方面发生不希望的改变的失调的治疗的化合物,以鉴别预期结合到溴基结构域结构结合袋的化合物。在某些实施方案中,本发明的化合物可以阻止、抑制、或破坏、或减少BET家族成员(例如,BRD2、BRD3、BRD4、BRDT)的至少10%、25%、50%、75%、或100%的生物活性,和/或例如通过结合到溴基结构域apo结合袋内的结合位点破坏这类蛋白质的亚细胞定位。

[0191] 在某些实施方案中,本发明的化合物是小分子,其分子量小于大约1000道尔顿、小于800、小于600、小于500、小于400、或小于大约300道尔顿。本发明的化合物的实例包括JQ1和其他化合物,这些化合物结合到BET家族成员(例如,BRD4(下文指BRD4(1);PDB ID 2OSS))的第一溴基结构域的apo晶体结构的结合袋。JQ1是一种新型的噻吩并-三唑并-1,4-二氮杂环庚烷。本发明进一步提供了这些化合物的药学上可接受的盐。

[0192] 在一个方面,该化合物是具有化学式I的化合物:



[0194] 其中

[0195] X是N或CR<sub>5</sub>;

[0196] R<sub>5</sub>是H、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基,其中的每一个可任选地经取代;

[0197] R<sub>B</sub>是H、烷基、羟烷基、氨基烷基、烷氧基烷基、卤烷基、羟基、烷氨基、或-COO-R<sub>3</sub>,其中的每一个可任选地经取代;

[0198] 环A是芳基或杂芳基;

[0199] 每一个R<sub>A</sub>独立地是烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基,其中的每一个可任选地经取代;或者任何两个R<sub>A</sub>与各自附接的多个原子一起可以形成一个融合的芳基或杂芳基基团;

[0200] R是烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基;其中的每一个可任选地经取代;

[0201] R<sub>1</sub>是-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-L,其中n是0-3并且并且L是H、-COO-R<sub>3</sub>、-CO-R<sub>3</sub>、-CO-N(R<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)、-S(O)<sub>2</sub>-R<sub>3</sub>、-S(O)<sub>2</sub>-N(R<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)、N(R<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)、N(R<sub>4</sub>)C(O)R<sub>3</sub>、可任选地经取代的芳基、或可任选地经取代的杂芳基;

[0202] R<sub>2</sub>是H、D、卤素、或可任选地经取代的烷基;

[0203] 每一个R<sub>3</sub>独立地选自下组,该组由以下各项组成:

[0204] (i)H、芳基、经取代的芳基、杂芳基、或经取代的杂芳基;

[0205] (ii)杂环烷基或经取代的杂环烷基;

[0206] (iii)-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>链烯基或-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基,每一个包含0、1、2、或3个选自O、S、或N的杂原子;-C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>环烷基、经取代的-C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>环烷基、-C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>环烯基、或经取代的-C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>环烯基,其中的每一个可以可任选地经取代;以及

[0207] (iv)NH<sub>2</sub>,N=CR<sub>4</sub>R<sub>6</sub>;

[0208] 每一个R<sub>4</sub>独立地是H、烷基、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基,其中的每一个可任选地经取代;

[0209] 或将R<sub>3</sub>和R<sub>4</sub>与它们附接的氮原子一起以形成一个4-10元环;

[0210] R<sub>6</sub>是烷基、链烯基、环烷基、环烯基、杂环烷基、芳基、或杂芳基,其中的每一个可任选地经取代;或将R<sub>4</sub>和R<sub>6</sub>与它们附接的碳原子一起以形成一个4-10元环;

[0211] m是0、1、2、或3;

[0212] 假设

[0213] (a)如果环A是噻吩基,X是N,R是苯基或经取代的苯基,R<sub>2</sub>是H,R<sub>B</sub>是甲基,并且R<sub>1</sub>是-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-L,其中n是1并且L是-CO-N(R<sub>3</sub>R<sub>4</sub>),那么不将R<sub>3</sub>和R<sub>4</sub>与它们附接的氮原子一起形成一个吗啉代环;

[0214] (b)如果环A是噻吩基,X是N,R是经取代的苯基,R<sub>2</sub>是H,R<sub>B</sub>是甲基,并且R<sub>1</sub>是-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-

L, 其中n是1并且L是-CO-N(R<sub>3</sub>R<sub>4</sub>), 并且R<sub>3</sub>和R<sub>4</sub>之一是H, 那么R<sub>3</sub>和R<sub>4</sub>中的另一个不是甲基、羟乙基、烷氧基、苯基、经取代的苯基、吡啶基或经取代的吡啶基; 并且

[0215] (c) 如果环A是噻吩基, X是N, R是经取代的苯基, R<sub>2</sub>是H, R<sub>B</sub>是甲基, 并且R<sub>1</sub>是-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-L, 其中n是1并且L是-COO-R<sub>3</sub>, 那么R<sub>3</sub>不是甲基或乙基;

[0216] 或其一种盐、溶解物或水合物。

[0217] 在某些实施方案中, R是芳基或杂芳基, 其中的每一个可任选地经取代。

[0218] 在某些实施方案中, L是H、-COO-R<sub>3</sub>、-CO-N(R<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)、-S(O)<sub>2</sub>-R<sub>3</sub>、-S(O)<sub>2</sub>-N(R<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)、N(R<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)、N(R<sub>4</sub>)C(O)R<sub>3</sub>或可任选地经取代的芳基。在某些实施方案中, 每一个R<sub>3</sub>独立地选自下组, 该组由以下各项组成:H, 包含选自O、S、或N的0、1、2或3个杂原子的-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基; 或NH<sub>2</sub>, N=CR<sub>4</sub>R<sub>6</sub>。

[0219] 在某些实施方案中, R<sub>2</sub>是H、D、卤素或甲基。

[0220] 在某些实施方案中, R<sub>B</sub>是烷基、羟烷基、卤烷基、或烷氧基; 其中的每一个可任选地经取代

[0221] 在某些实施方案中, R<sub>B</sub>是甲基、乙基、羟甲基、甲氧基甲基、三氟甲基、COOH、COOMe、COOEt、或COOCH<sub>2</sub>OC(O)CH<sub>3</sub>。

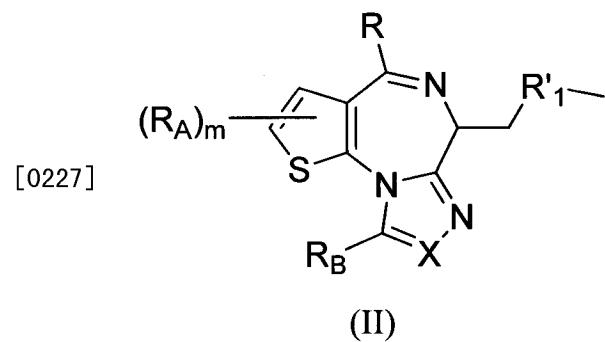
[0222] 在某些实施方案中, 环A是5或6元芳基或杂芳基。在某些实施方案中, 环A是硫代呋喃基、苯基、萘基、联苯基、四氢萘基、茚满基、吡啶基、呋喃基、吲哚基、嘧啶基、哒嗪基、吡嗪基、咪唑基、噁唑基、噻吩基、噻唑基、三唑基、异噁唑基、喹啉基、吡咯基、吡唑基、或5,6,7,8-四氢异喹啉基。

[0223] 在某些实施方案中, 环A是苯基或噻吩基。

[0224] 在某些实施方案中, m是1或2, 并且至少一次出现的R<sub>A</sub>是甲基。

[0225] 在某些实施方案中, 每一个R<sub>A</sub>独立地是H、一个可任选地经取代的烷基, 或任何两个R<sub>A</sub>与各自附接的多个原子一起可以形成一个芳基。

[0226] 在另一个方面, 该化合物是具有化学式II的化合物:



[0228] 其中

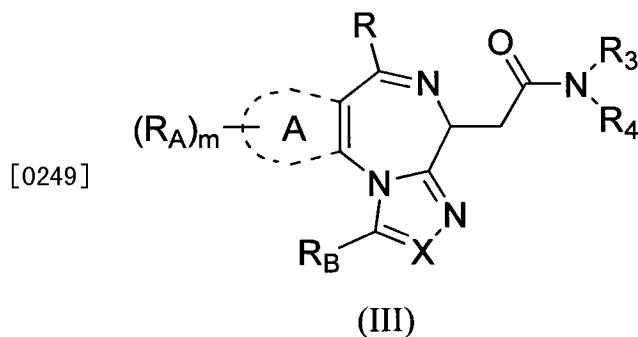
[0229] X是N或CR<sub>5</sub>;

[0230] R<sub>5</sub>是H、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基, 其中的每一个可任选地经取代;

[0231] R<sub>B</sub>是H、烷基、羟烷基、氨基烷基、烷氧基烷基、卤烷基、羟基、烷氧基、或-COO-R<sub>3</sub>, 其中的每一个可任选地经取代;

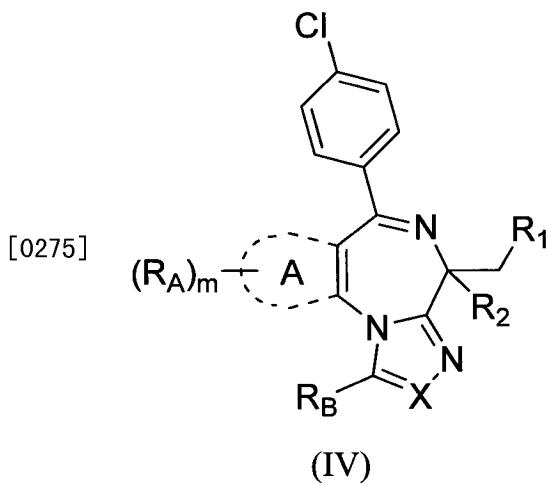
[0232] 每一个R<sub>A</sub>独立地是烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基, 其中的每一个可任选地经取代; 或者任何两个R<sub>A</sub>与各自附接的多个原子一起可以形成一个融合的芳基或杂芳基基团;

- [0233] R是烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基，其中的每一个可任选地经取代；  
 [0234] R'1是H、-COO-R<sub>3</sub>、-CO-R<sub>3</sub>、可任选地经取代的芳基、或可任选地经取代的杂芳基；  
 [0235] 每一个R<sub>3</sub>独立地选自下组，该组由以下各项组成：  
   (i)H、芳基、经取代的芳基、杂芳基、经取代的杂芳基；  
 [0237] (ii)杂环烷基或经取代的杂环烷基；  
 [0238] (iii)-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>链烯基或-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基，每一个包含0、1、2、或3个选自O、S、或N的杂原子；-C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>环烷基、经取代的-C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>环烷基；-C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>环烯基、或经取代的-C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>环烯基；其中的每一个可以可任选地经取代；  
 [0239] m是0、1、2、或3；  
 [0240] 其条件是如果R'1是-COO-R<sub>3</sub>，X是N，R是经取代的苯基，并且R<sub>B</sub>是甲基，那么R<sub>3</sub>不是甲基或乙基；  
 [0241] 或其一种盐、溶解物或水合物。  
 [0242] 在某些实施方案中，R是芳基或杂芳基，其中的每一个可任选地经取代。在某些实施方案中，R是苯基或吡啶基，其中的每一个可任选地经取代。在某些实施方案中，R是对-C<sub>1</sub>-苯基、邻-C<sub>1</sub>-苯基、间-C<sub>1</sub>-苯基、对-F-苯基、邻-F-苯基、间-F-苯基或吡啶基。  
 [0243] 在某些实施方案中，R'1是-COO-R<sub>3</sub>、可任选地经取代的芳基、或可任选地经取代的杂芳基；并且R<sub>3</sub>是-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基，它包含0、1、2、或3个选自O、S、或N的杂原子，并且它可以可任选地经取代。在某些实施方案中，R'1是-COO-R<sub>3</sub>，并且R<sub>3</sub>是甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、仲丁基、或叔丁基；或R'1是H或可任选地经取代的苯基。  
 [0244] 在某些实施方案中，R<sub>B</sub>是甲基、乙基、羟甲基、甲氧基甲基、三氟甲基、COOH、COOMe、COOEt、COOCH<sub>2</sub>OOC(O)CH<sub>3</sub>。  
 [0245] 在某些实施方案中，R<sub>B</sub>是甲基、乙基、羟甲基、甲氧基甲基、三氟甲基、COOH、COOMe、COOEt、或COOCH<sub>2</sub>OOC(O)CH<sub>3</sub>。  
 [0246] 在某些实施方案中，每一个R<sub>A</sub>独立地是一个可任选地经取代的烷基，或任何两个R<sub>A</sub>与各自附接的多个原子一起可以形成一个融合的芳基。  
 [0247] 在某些实施方案中，每一个R<sub>A</sub>是甲基。  
 [0248] 在另一个方面，该化合物是具有化学式III的化合物：



- [0250] 其中  
 [0251] X是N或CR<sub>5</sub>；  
 [0252] R<sub>5</sub>是H、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基，其中的每一个可任选地经取代；  
 [0253] R<sub>B</sub>是H、烷基、羟烷基、氨基烷基、烷氧基烷基、卤烷基、羟基、烷氧基、或-COO-R<sub>3</sub>，其中的每一个可任选地经取代；

- [0254] 环A是芳基或杂芳基；
- [0255] 每一个R<sub>A</sub>独立地是烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基，其中的每一个可任选地经取代；或者任何两个R<sub>A</sub>与各自附接的多个原子一起可以形成一个融合的芳基或杂芳基基团；
- [0256] R是烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基，其中的每一个可任选地经取代；
- [0257] 每一个R<sub>3</sub>独立地选自下组，该组由以下各项组成：
- [0258] (i)H、芳基、经取代的芳基、杂芳基、或经取代的杂芳基；
- [0259] (ii)杂环烷基或经取代的杂环烷基；
- [0260] (iii)-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>链烯基或-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基，每一个包含0、1、2、或3个选自O、S、或N的杂原子；-C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>环烷基、经取代的-C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>环烷基、-C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>环烯基、或经取代的-C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>环烯基，其中的每一个可以可任选地经取代；以及
- [0261] (iv)NH<sub>2</sub>, N=CR<sub>4</sub>R<sub>6</sub>；
- [0262] 每一个R<sub>4</sub>独立地是H、烷基、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基，其中的每一个可任选地经取代；
- [0263] 或将R<sub>3</sub>和R<sub>4</sub>与它们附接的氮原子一起以形成一个4-10元环；
- [0264] R<sub>6</sub>是烷基、链烯基、环烷基、环烯基、杂环烷基、芳基、或杂芳基，其中的每一个可任选地经取代；或将R<sub>4</sub>和R<sub>6</sub>与它们附接的碳原子一起以形成一个4-10元环；
- [0265] m是0、1、2、或3；
- [0266] 假设：
- [0267] 如果环A是噻吩基，X是N，R是苯基或经取代的苯基，R<sub>B</sub>是甲基，那么不将R<sub>3</sub>和R<sub>4</sub>与它们附接的氮原子一起形成一个吗啉代环；并且
- [0268] 如果A是噻吩基，X是N，R是经取代的苯基，R<sub>2</sub>是H，R<sub>B</sub>是甲基，并且R<sub>3</sub>和R<sub>4</sub>之一是H，那么R<sub>3</sub>和R<sub>4</sub>中的另一个不是甲基、羟乙基、烷氧基、苯基、经取代的苯基、吡啶基或经取代的吡啶基；以及
- [0269] 或其一种盐、溶解物或水合物。
- [0270] 在某些实施方案中，R是芳基或杂芳基，其中的每一个可任选地经取代。在某些实施方案中，R是苯基或吡啶基，其中的每一个可任选地经取代。
- [0271] 在某些实施方案中，R是对-C<sub>1</sub>-苯基、邻-C<sub>1</sub>-苯基、间-C<sub>1</sub>-苯基、对-F-苯基、邻-F-苯基、间-F-苯基或吡啶基。在某些实施方案中，R<sub>3</sub>是H、NH<sub>2</sub>、或N=CR<sub>4</sub>R<sub>6</sub>。
- [0272] 在某些实施方案中，每一个R<sub>4</sub>独立地是H、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基；其中的每一个可任选地经取代。
- [0273] 在某些实施方案中，R<sub>6</sub>是烷基、链烯基、环烷基、环烯基、杂环烷基、芳基、或杂芳基，其中的每一个可任选地经取代。
- [0274] 在另一个方面，该化合物是具有化学式IV的化合物：



[0276] 其中

[0277] X是N或CR<sub>5</sub>；

[0278] R<sub>5</sub>是H、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基，其中的每一个可任选地经取代；

[0279] R<sub>B</sub>是H、烷基、羟烷基、氨基烷基、烷氧基烷基、卤烷基、羟基、烷氧基、或-COO-R<sub>3</sub>，其中的每一个可任选地经取代；

[0280] 环A是芳基或杂芳基；

[0281] 每一个R<sub>A</sub>独立地是烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基，其中的每一个可任选地经取代；或者任何两个R<sub>A</sub>与各自附接的多个原子一起可以形成一个融合的芳基或杂芳基基团；

[0282] R<sub>1</sub>是-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-L，其中n是0-3并且L是H、-COO-R<sub>3</sub>、-CO-R<sub>3</sub>、-CO-N(R<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)、-S(O)<sub>2</sub>-R<sub>3</sub>、-S(O)<sub>2</sub>-N(R<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)、N(R<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)、N(R<sub>4</sub>)C(O)R<sub>3</sub>、可任选地经取代的芳基、或可任选地经取代的杂芳基；

[0283] R<sub>2</sub>是H、D、卤素、或可任选地经取代的烷基；

[0284] 每一个R<sub>3</sub>独立地选自下组，该组由以下各项组成：

[0285] (i)H、芳基、经取代的芳基、杂芳基、或经取代的杂芳基；

[0286] (ii)杂环烷基或经取代的杂环烷基；

[0287] (iii)-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>链烯基或-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基，每一个包含0、1、2、或3个选自O、S、或N的杂原子；-C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>环烷基、经取代的-C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>环烷基、-C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>环烯基、或经取代的-C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>环烯基，其中的每一个可以可任选地经取代；以及

[0288] (iv)NH<sub>2</sub>,N=CR<sub>4</sub>R<sub>6</sub>；

[0289] 每一个R<sub>4</sub>独立地是H、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、或杂芳基，其中的每一个可任选地经取代；

[0290] 或将R<sub>3</sub>和R<sub>4</sub>与它们附接的氮原子一起以形成一个4-10元环；

[0291] R<sub>6</sub>是烷基、链烯基、环烷基、环烯基、杂环烷基、芳基、或杂芳基，其中的每一个可任选地经取代；或将R<sub>4</sub>和R<sub>6</sub>与它们附接的碳原子一起以形成一个4-10元环；

[0292] m是0、1、2、或3；

[0293] 假设

[0294] (a)如果环A是噻吩基，X是N，R<sub>2</sub>是H，R<sub>B</sub>是甲基，并且R<sub>1</sub>是-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-L，其中n是0并且L是-CO-N(R<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)，那么不将R<sub>3</sub>和R<sub>4</sub>与它们附接的氮原子一起形成一个吗啉代环；

[0295] (b)如果环A是噻吩基，X是N，R<sub>2</sub>是H，R<sub>B</sub>是甲基，并且R<sub>1</sub>是-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-L，其中n是0并且L

是 $-CO-N(R_3R_4)$ ,并且 $R_3$ 和 $R_4$ 之一是H,那么 $R_3$ 和 $R_4$ 中的另一个不是甲基、羟乙基、烷氧基、苯基、经取代的苯基、吡啶基或经取代的吡啶基;并且

[0296] (c)如果环A是噻吩基,X是N, $R_2$ 是H, $R_B$ 是甲基,并且 $R_1$ 是 $-(CH_2)_n-L$ ,其中n是0并且L是 $-COO-R_3$ ,那么 $R_3$ 不是甲基或乙基;或者

[0297] 其一种盐、溶解物或水合物。

[0298] 在某些实施方案中, $R_1$ 是 $-(CH_2)_n-L$ ,其中n是0-3并且L是 $-COO-R_3$ 、可任选地经取代的芳基、或可任选地经取代的杂芳基;并且 $R_3$ 是 $-C_1-C_8$ 烷基,它包含0、1、2、或3个选自O、S、或N的杂原子,并且它可以可任选地经取代。在某些实施方案中,n是1或2并且L是烷基或 $-COO-R_3$ ,并且 $R_3$ 是甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、仲丁基、或叔丁基;或n是1或2并且L是H或可任选地经取代的苯基。

[0299] 在某些实施方案中, $R_2$ 是H或甲基。

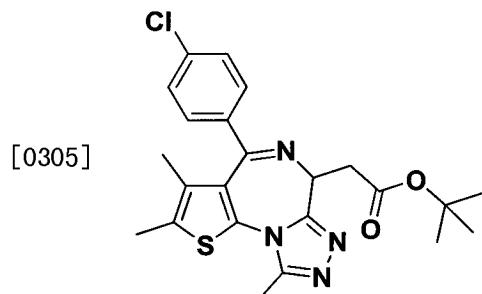
[0300] 在某些实施方案中, $R_B$ 是甲基、乙基、羟甲基、甲氧基甲基、三氟甲基、COOH、COOMe、COOEt、COOCH<sub>2</sub>O(0)CH<sub>3</sub>。

[0301] 在某些实施方案中,环A是苯基、萘基、联苯基、四氢萘基、茚满基、吡啶基、呋喃基、吲哚基、嘧啶基、哒嗪基、吡嗪基、咪唑基、噁唑基、噻吩基、噻唑基、三唑基、异噁唑基、喹啉基、吡咯基、吡唑基、或5,6,7,8-四氢异喹啉基。

[0302] 在某些实施方案中,每一个 $R_A$ 独立地是一个可任选地经取代的烷基,或任何两个 $R_A$ 与各自附接的多个原子一起可以形成一个芳基。

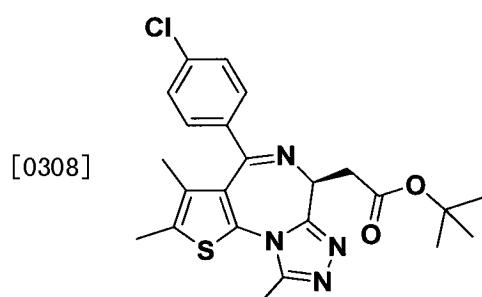
[0303] 本发明的方法还涉及具有化学式V-XXII的化合物,并且涉及在此所述的任何化合物。

[0304] 在另一个方面,该化合物是由以下化学式表示的化合物:



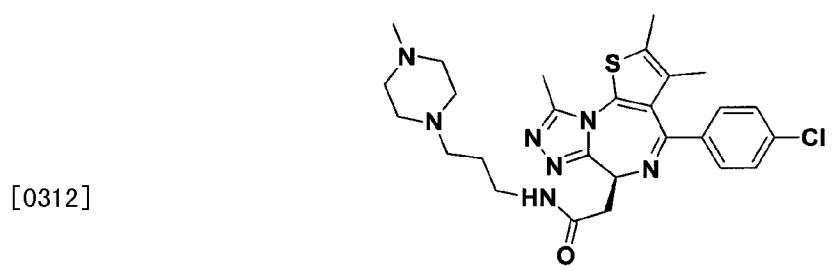
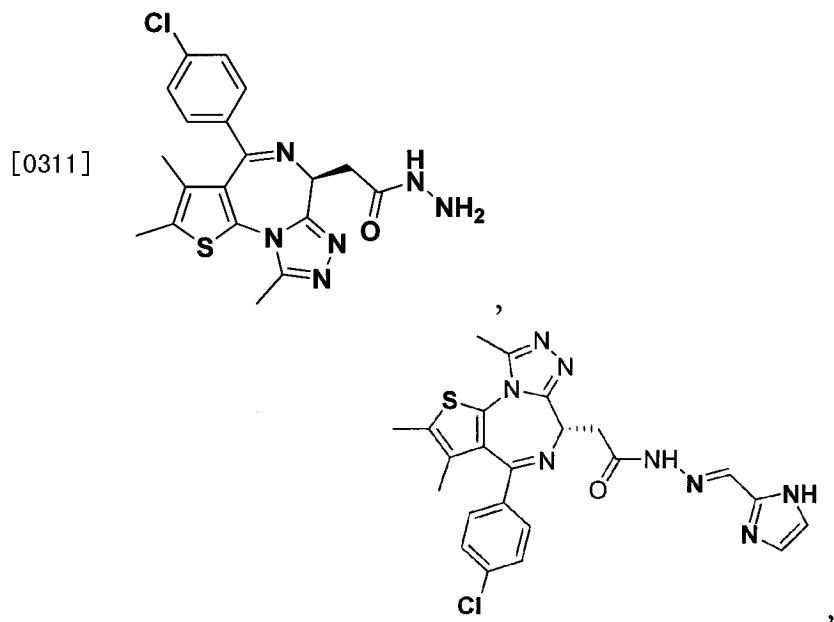
[0306] 或其一种盐、溶解物或水合物。

[0307] 在某些实施方案中,该化合物是(+)-JQ1:

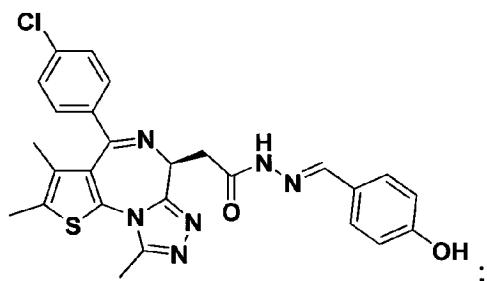


[0309] 或其一种盐、溶解物或水合物。

[0310] 在另一个方面,该化合物是由以下化学式表示的化合物:

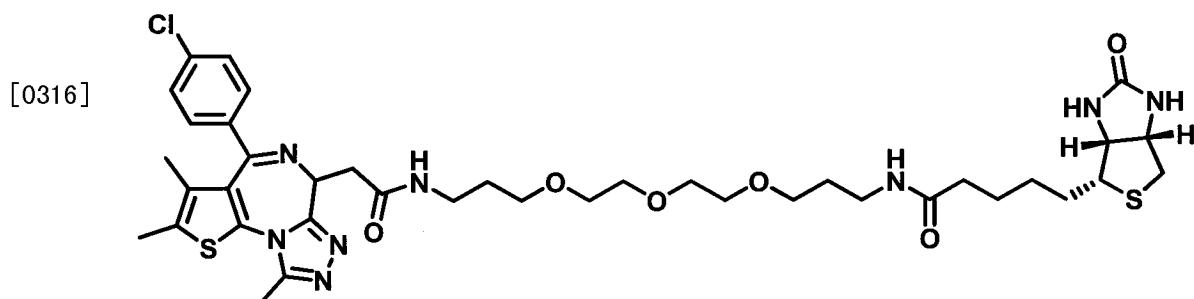
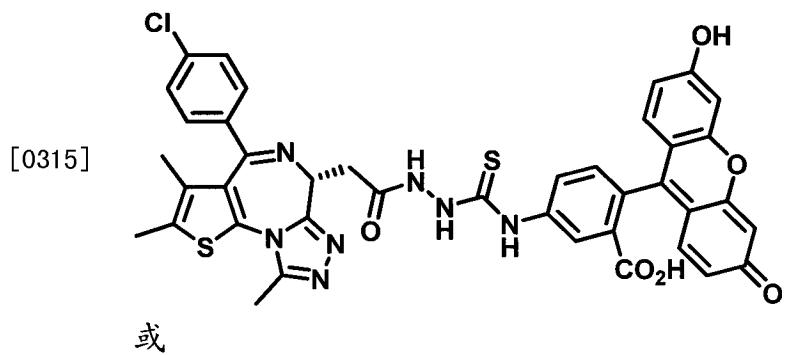


或



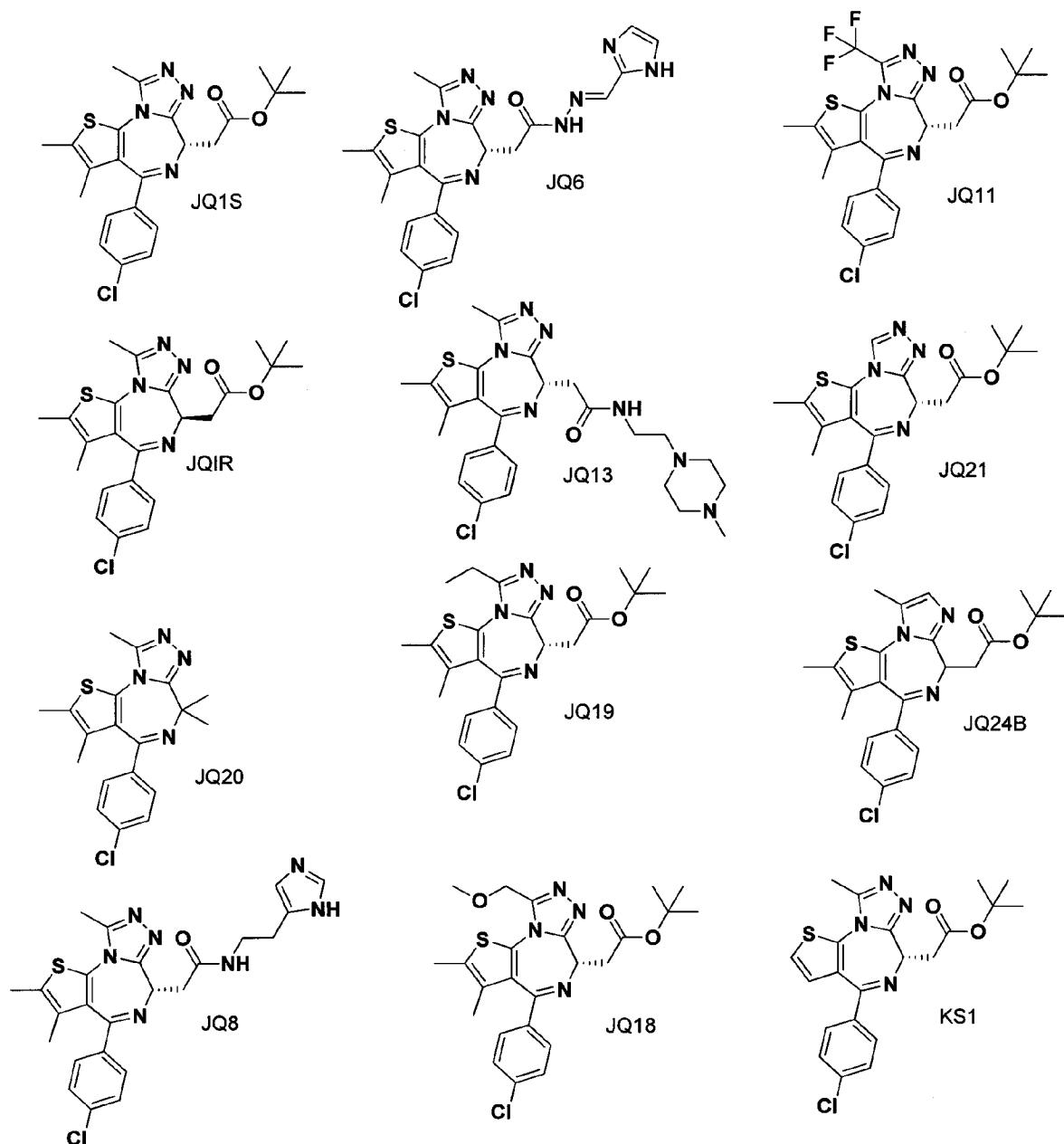
[0313] 或其一种盐、溶解物或水合物。

[0314] 在另一个方面,该化合物是由以下化学式表示的化合物:



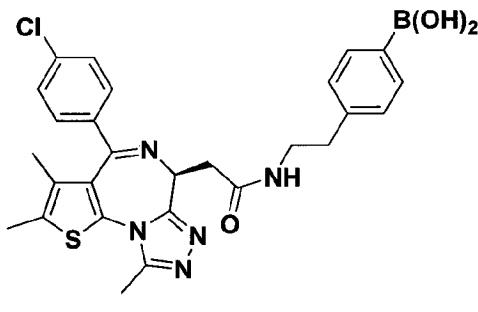
[0318] 在另一个方面中，该化合物是由以下化学式中任一个表示的化合物：

[0319]



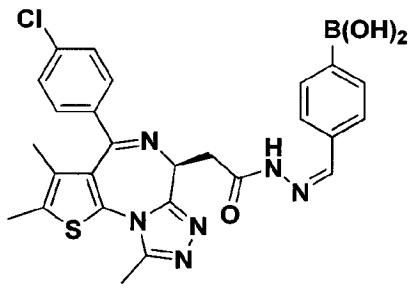
[0320] 或其一种盐、溶解物或水合物。

[0321] 在另一个方面中,该化合物是由以下化学式中任一个表示的化合物:



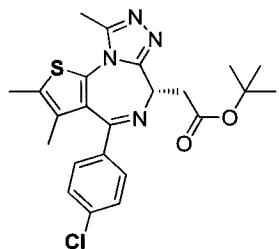
或

[0322]

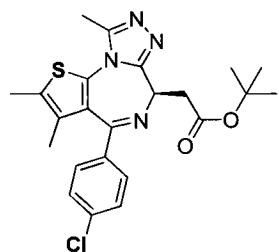


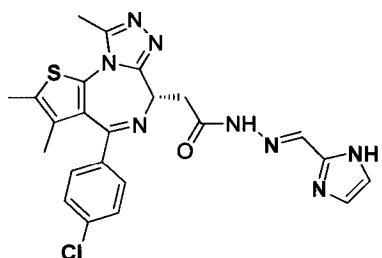
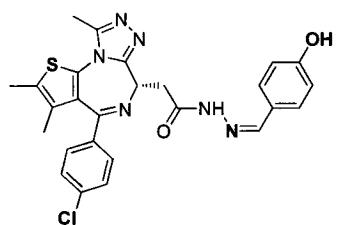
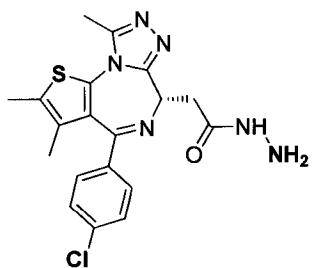
[0323] 或其一种盐、溶解物或水合物。

[0324] 在另一个方面中，该化合物是由以下结构中任一个表示的化合物：

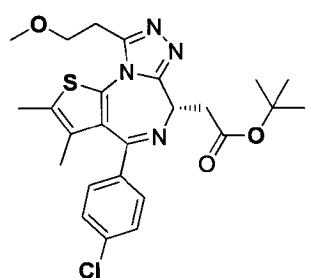
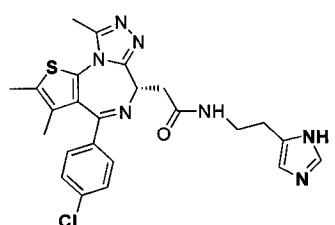
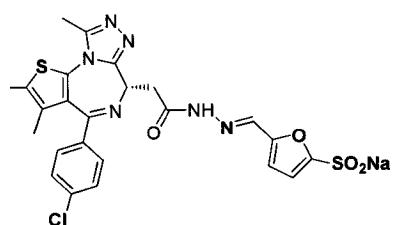


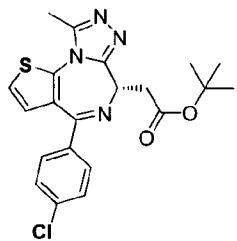
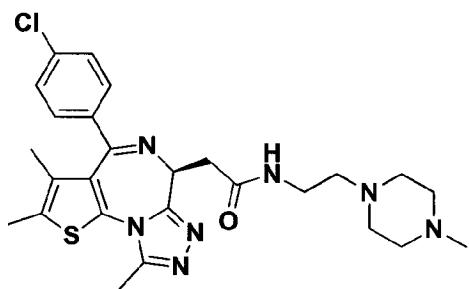
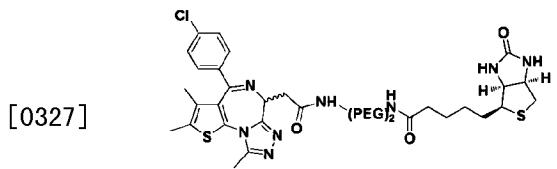
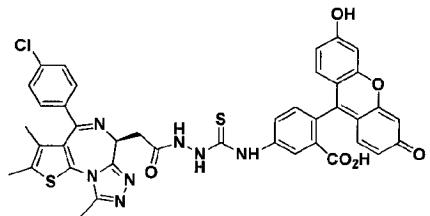
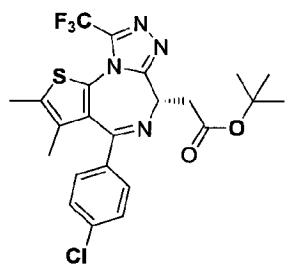
[0325]

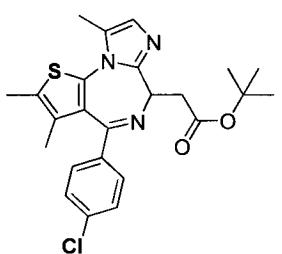
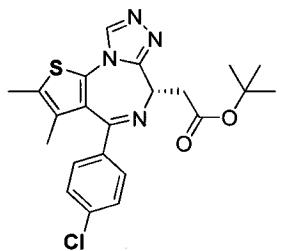
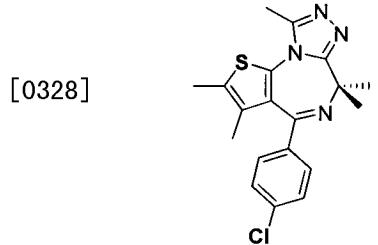
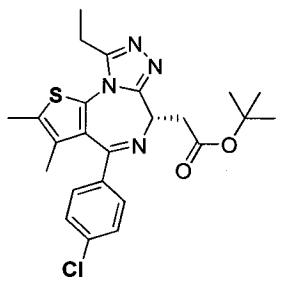
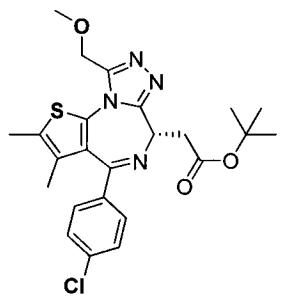


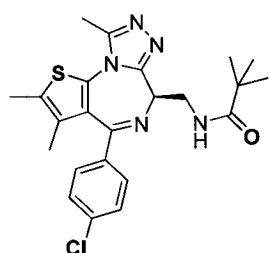
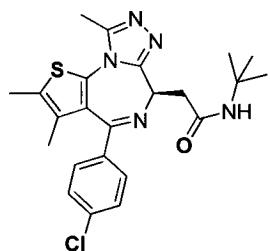
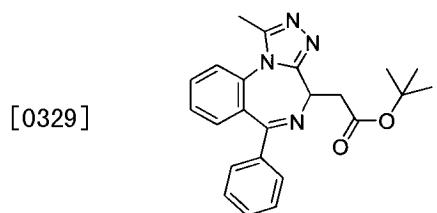
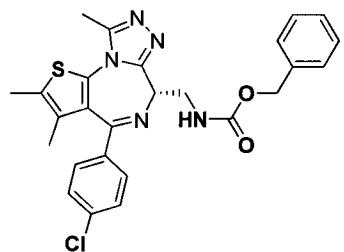
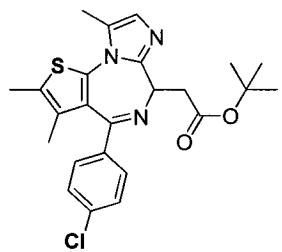


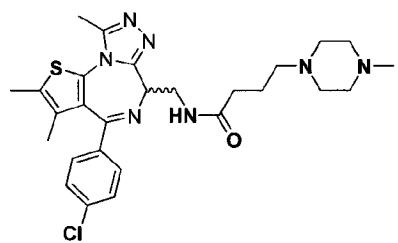
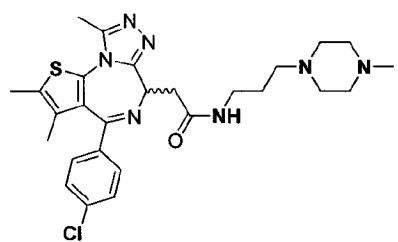
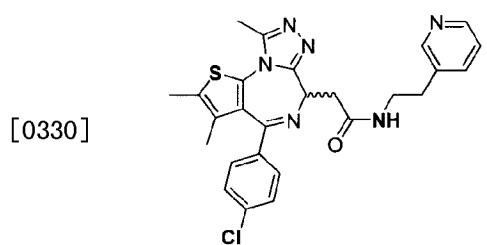
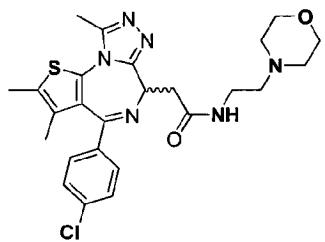
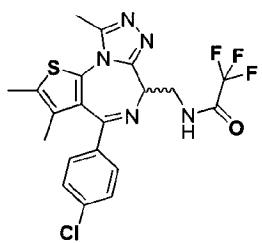
[0326]

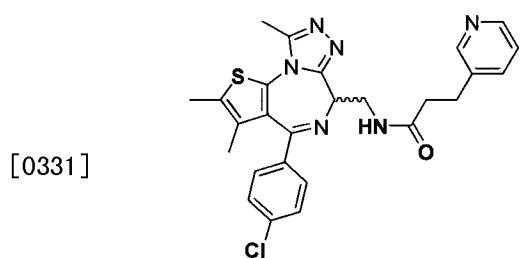
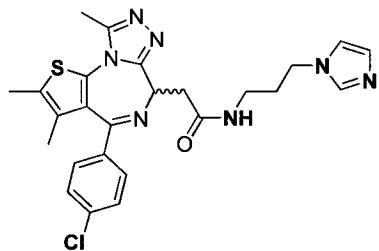
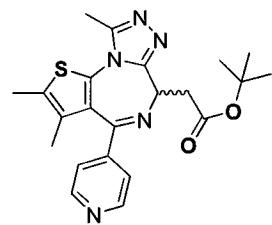




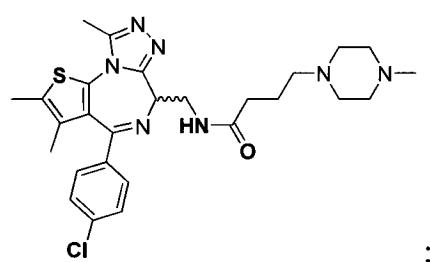








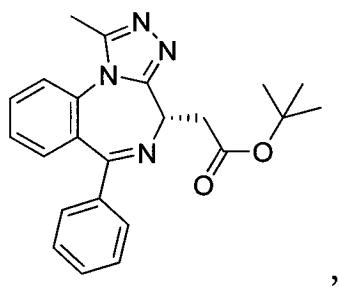
或



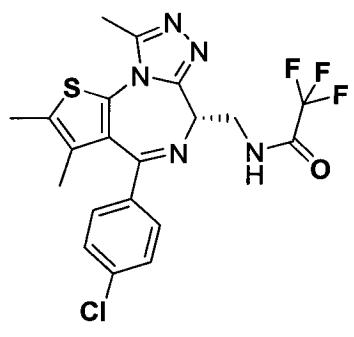
；

[0332] 或其一种盐、溶解物或水合物。

[0333] 在某些实施方案中,本发明的一种化合物可由以下结构之一表示:

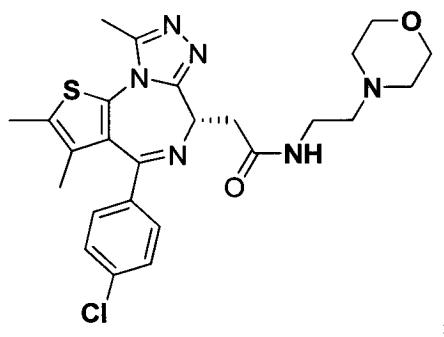


，

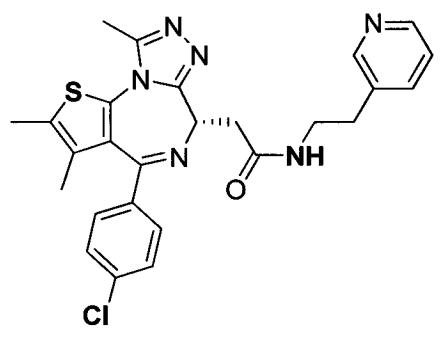


，

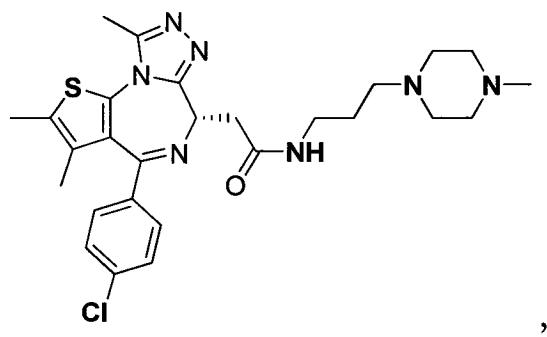
[0334]



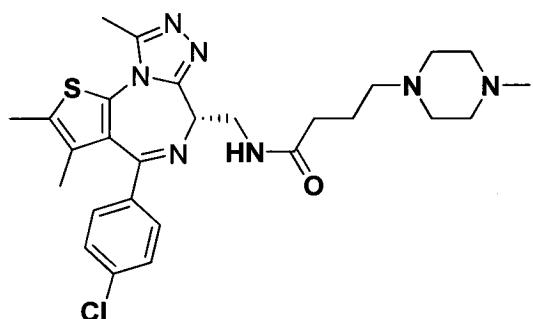
，



，

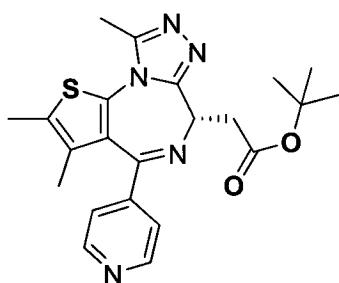


,

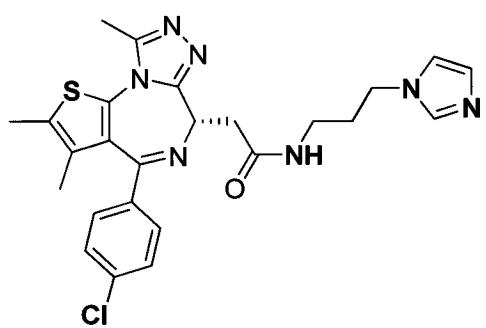


,

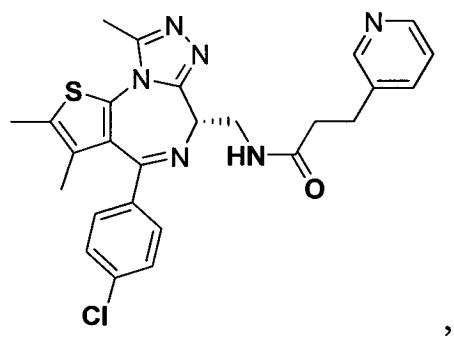
[0335]



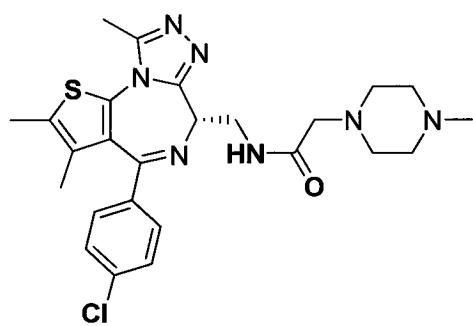
,



,

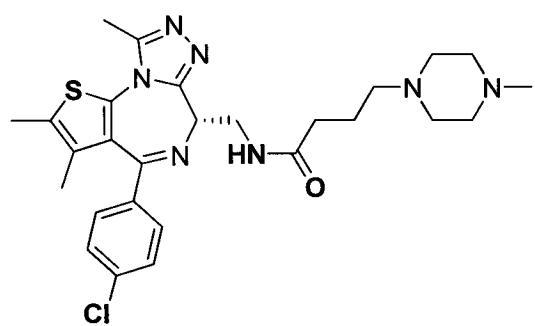


,

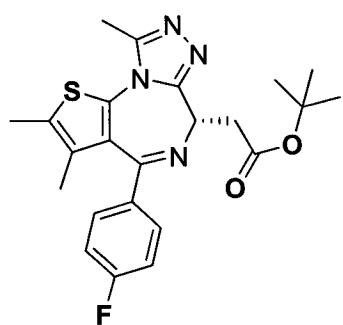


,

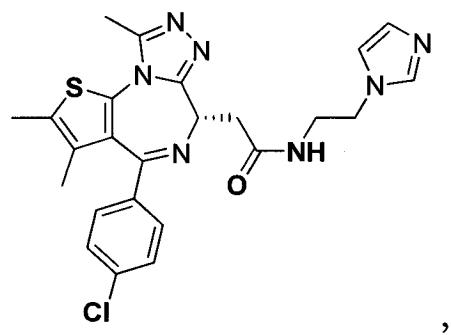
[0336]



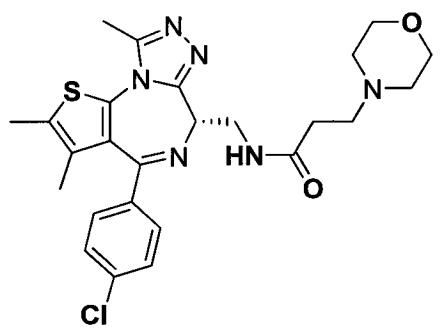
,



,

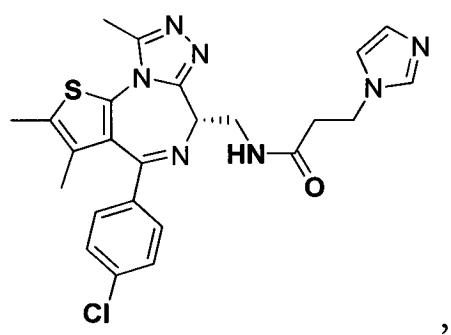


,

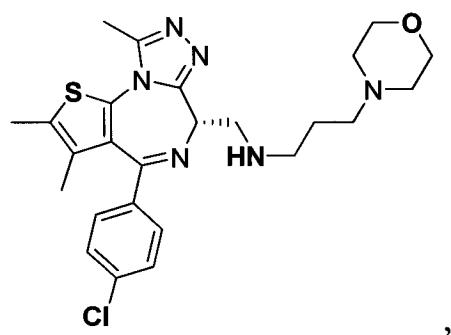


,

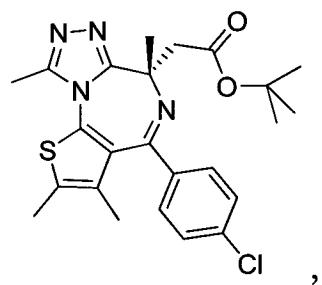
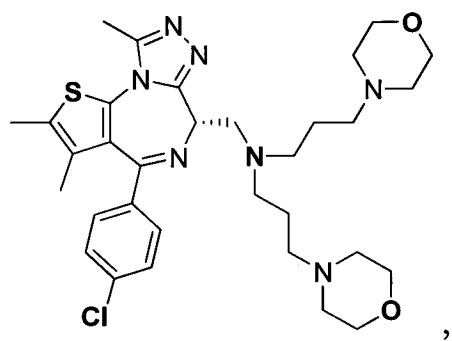
[0337]



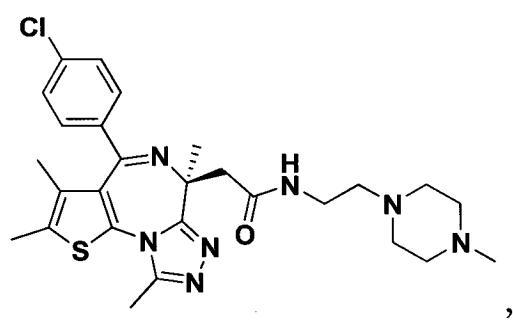
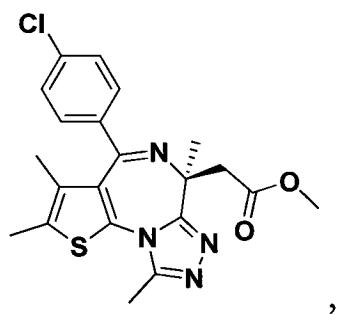
,

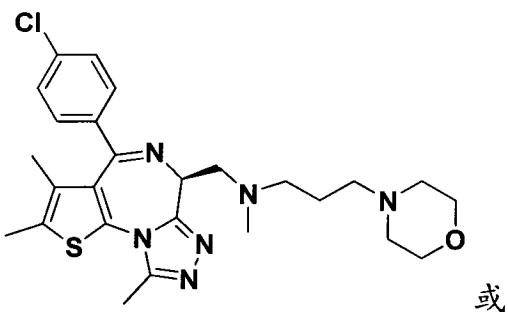


,

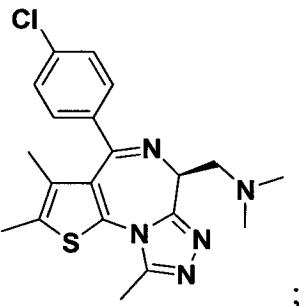


[0338]



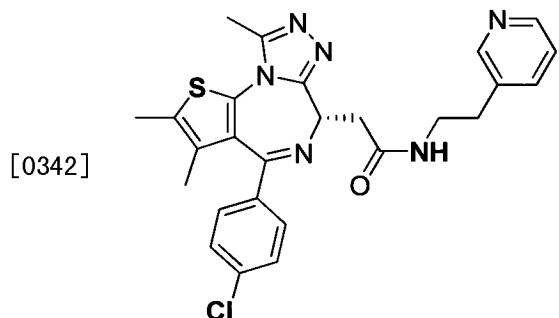


[0339]



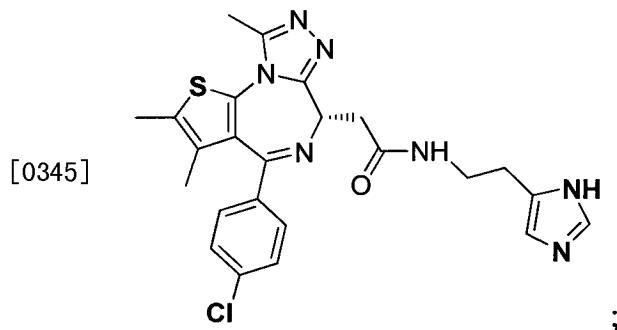
[0340] 或其一种盐、溶解物或水合物。

[0341] 在一个实施方案中,该化合物由以下结构表示:



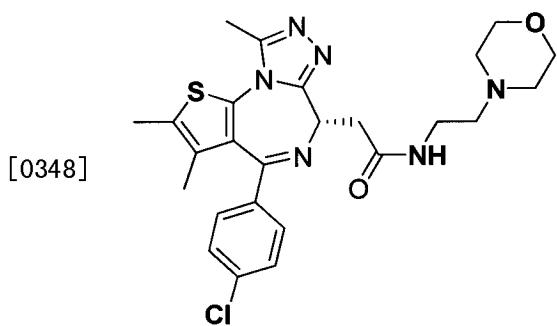
[0343] 或其一种盐、溶解物或水合物。

[0344] 在另一个实施方案中,该化合物由以下结构表示:



[0346] 或其一种盐、溶解物或水合物。

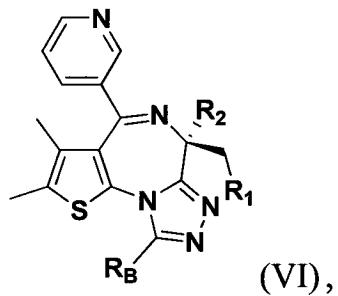
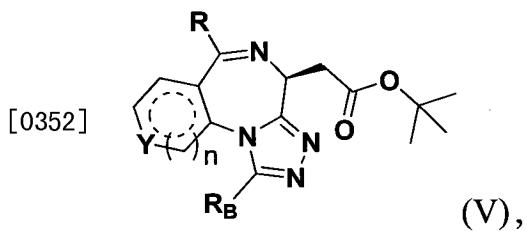
[0347] 在另一个实施方案中,该化合物由以下结构表示:



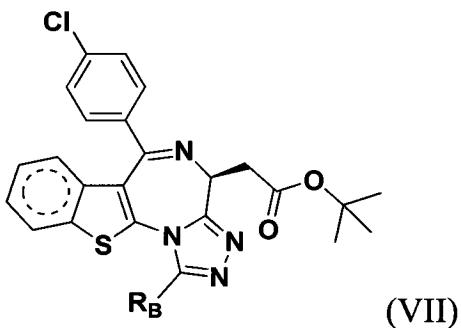
[0349] 或其一种盐、溶解物或水合物。

[0350] 在某些实施方案中,本发明的化合物可以具有与在此列出的任何化合物相反的手性。

[0351] 在某些实施方案中,该化合物是由化学式(V)、(VI)、或(VII)表示的化合物:



[0353]



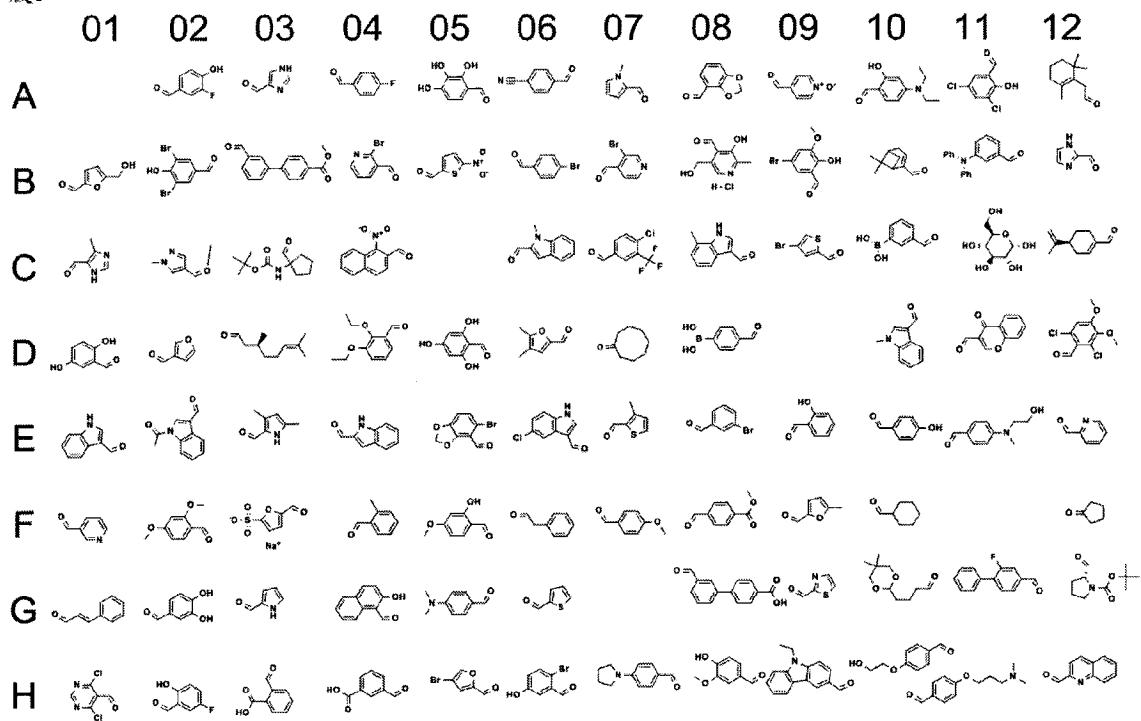
[0354] 其中,R、R<sub>1</sub>、以及R<sub>2</sub>和R<sub>B</sub>具有如在化学式(I)中相同的意义;Y是O、N、S、或CR<sub>5</sub>,其中R<sub>5</sub>具有如在化学式(I)中相同的意义;n是0或1;并且化学式(VII)中的虚线圈表示芳族的或者非芳族的环;或其一种盐、溶解物或水合物。

[0355] 在化学式I-IV和VI(或在此的任何化学式)中任一的某些实施方案中,R<sub>6</sub>表示下面表A中列出的醛的非羰基部分(即,对具有化学式R<sub>6</sub>CHO的醛而言,R<sub>6</sub>是该醛的非羰基部分)在某些实施方案中,R<sub>4</sub>和R<sub>6</sub>一起表示表A中列出的酮的非羰基部分(即,对化学式R<sub>6</sub>C(O)R<sub>4</sub>的酮而言,R<sub>4</sub>和R<sub>6</sub>是该酮的非羰基部分)

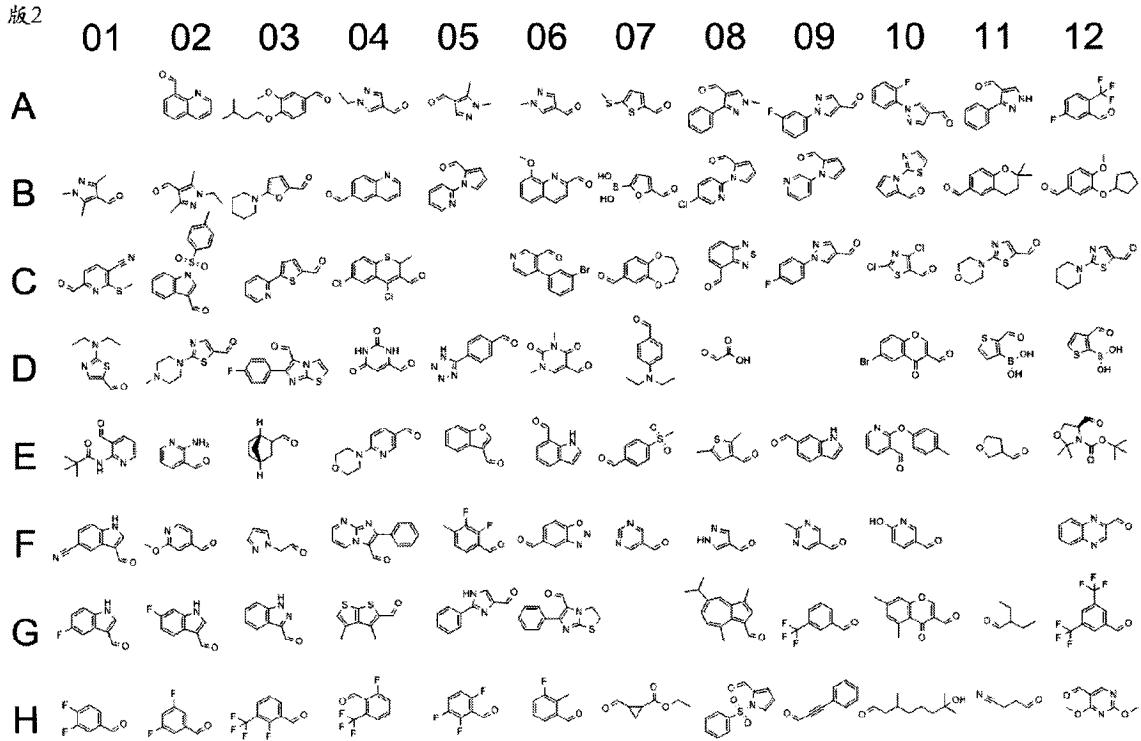
[0356] 表A:

[0357]

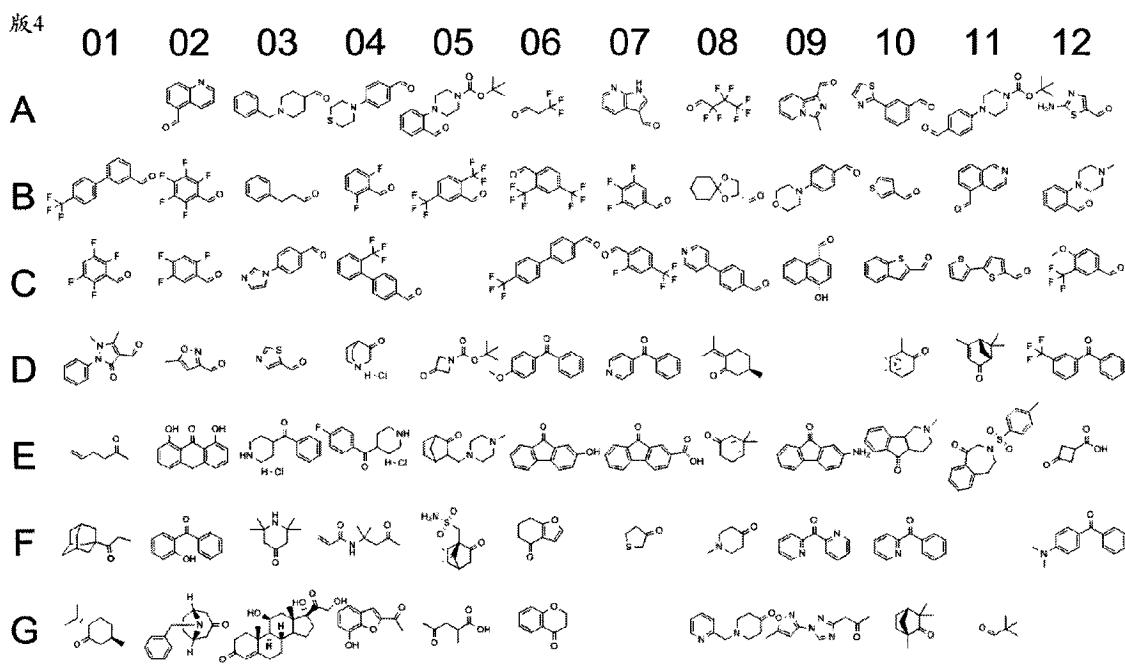
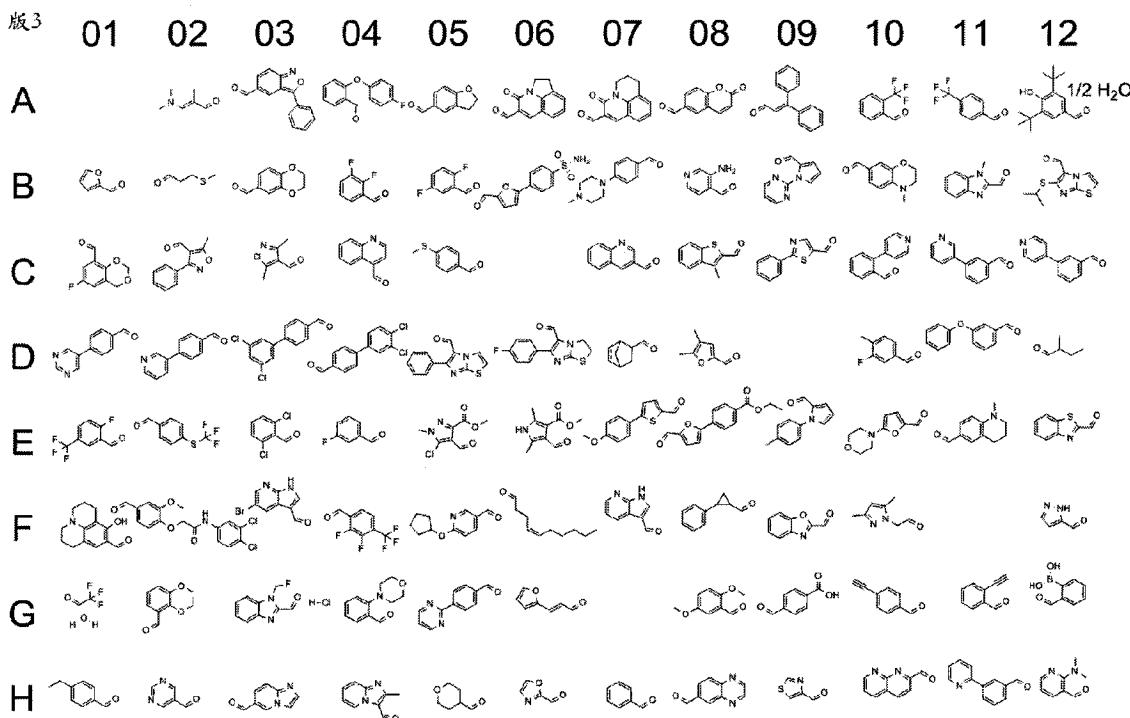
版1



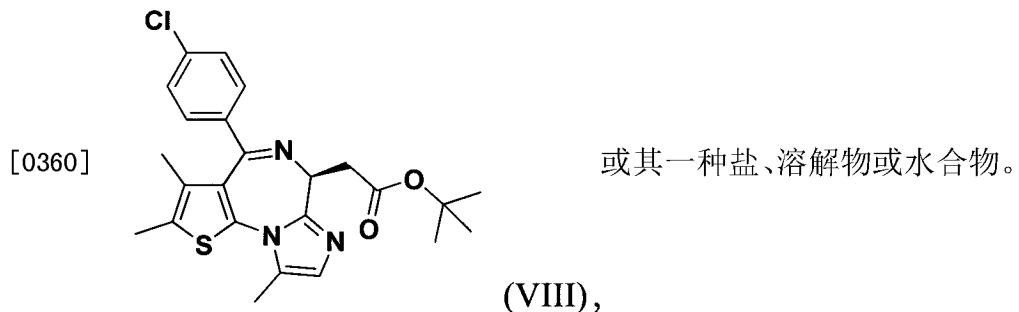
版2



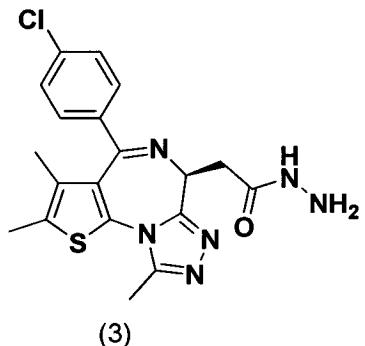
[0358]



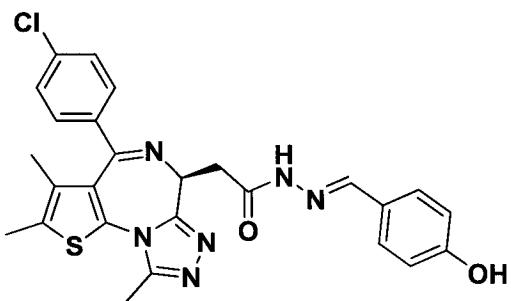
[0359] 在一个实施方案中,该化合物是由以下化学式表示的化合物:



[0361] 在某些实施方案中,该化合物是(消旋的)JQ1;在某些实施方案中,这种化合物是(+)-JQ1。在某些实施方案中,该化合物是选自下组,该组由以下各项组成:



[0362] 和

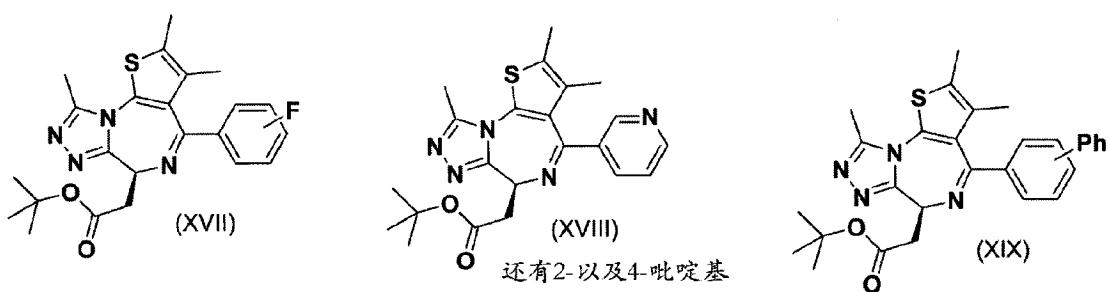
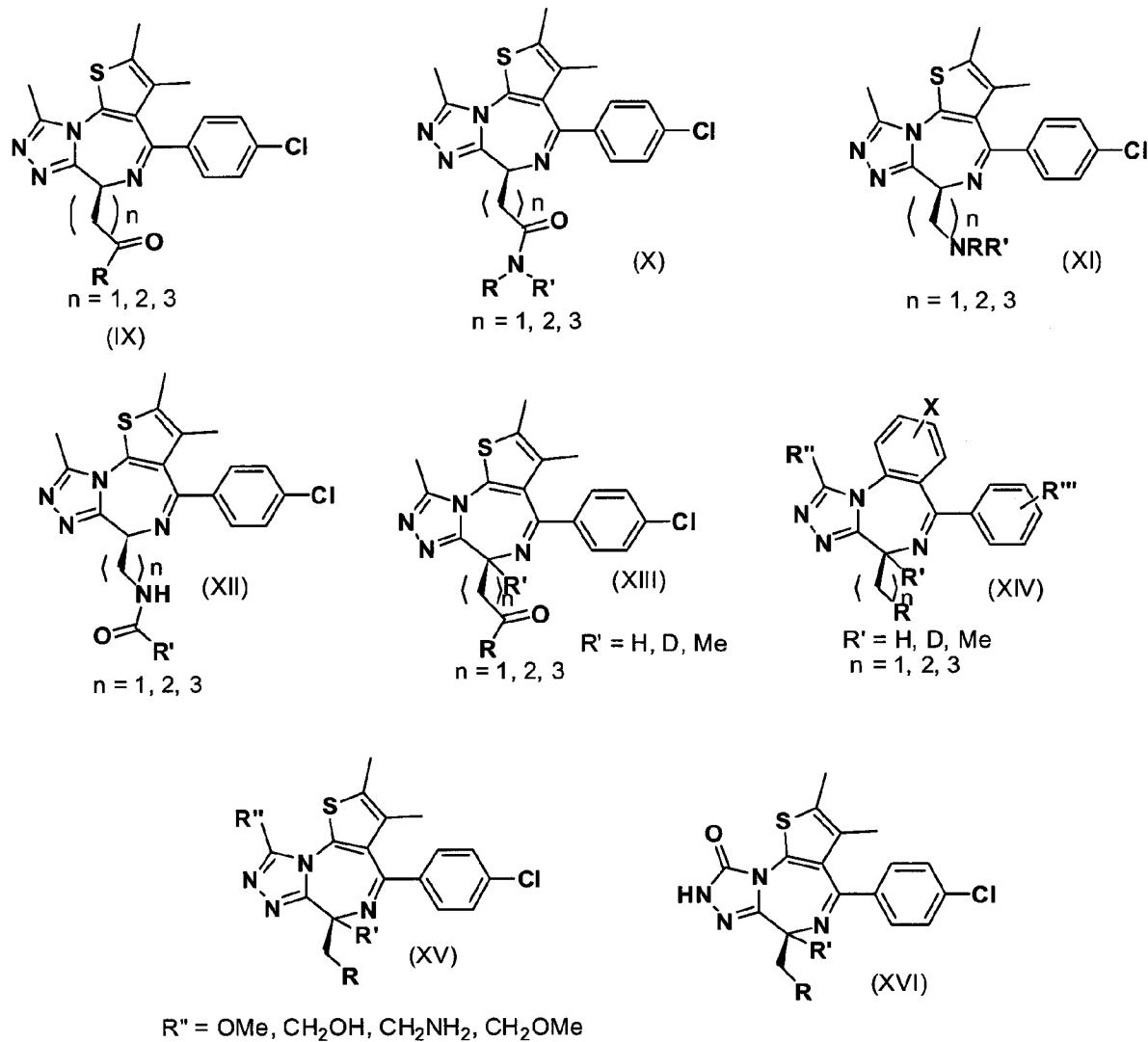


(4) ;

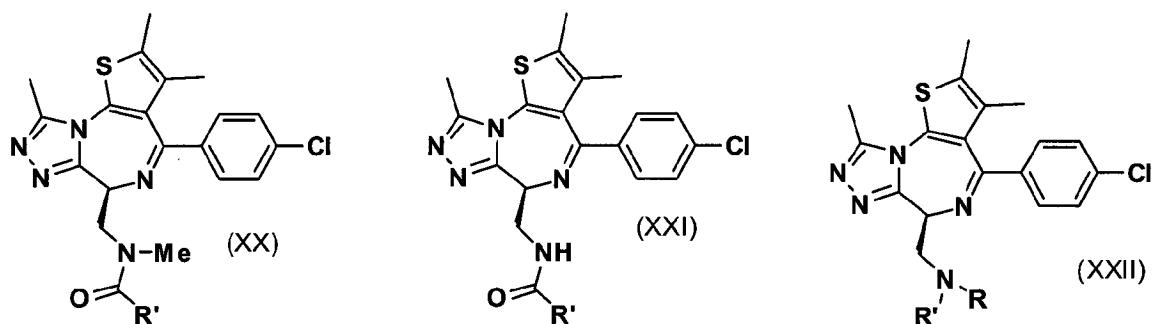
[0363] 或其一种盐、溶解物或水合物。

[0364] 化合物的另外的实例包括根据以下化学式中任一所述的化合物:

[0365]



[0366]



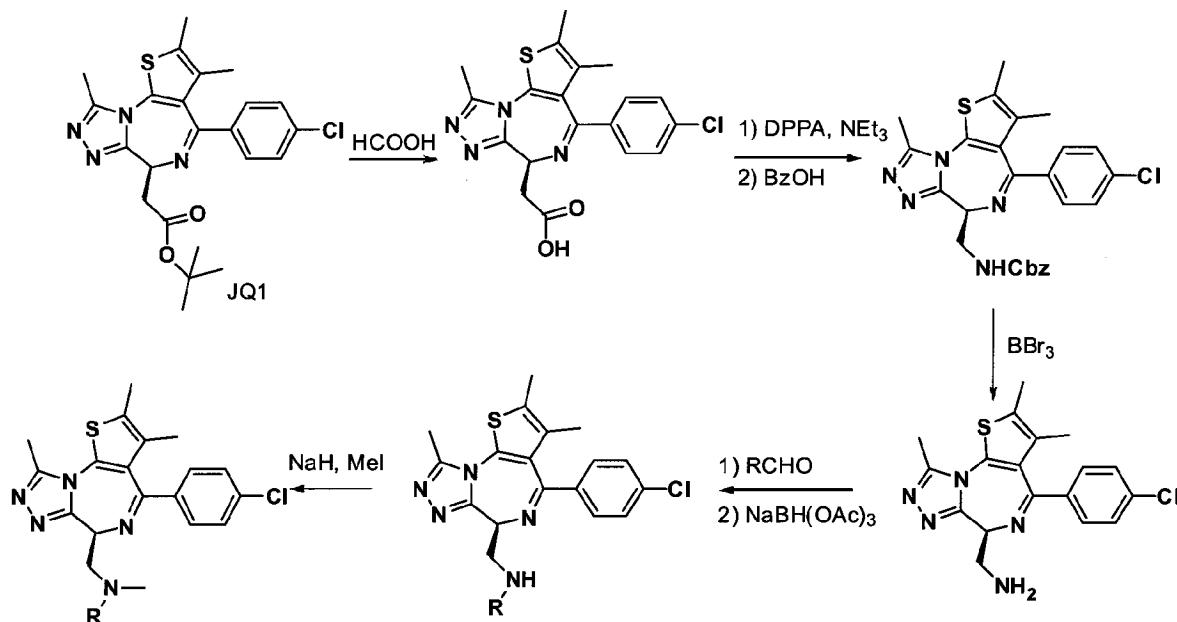
[0367] 或其一种盐、溶解物或水合物。

[0368] 在化学式IX-XXII中,R和R'可以是,例如,H、芳基、经取代的芳基、杂芳基、杂芳基、杂环烷基、-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>链烯基、-C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基、-C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>环烷基、经取代的-C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>环烷基、-C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>环烯基、或经取代的-C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>环烯基,其中的每一个可以可任选地经取代。在化学式XIV中,X可以是用于如在此所描述的芳基基团的任何取代基。

[0369] 可以通过多种方法制备本发明的化合物,其中一些方法在本领域是已知的。例如,下文提供的化学实例提供了用于制备化合物JQ1(作为消旋体)以及对映异构体(+)-JQ1和(-)-JQ1的合成方案(见方案S1和S2)。可以替换适当的起始材料通过类似的方法制备具有化学式(I)-(VIII)的化合物。

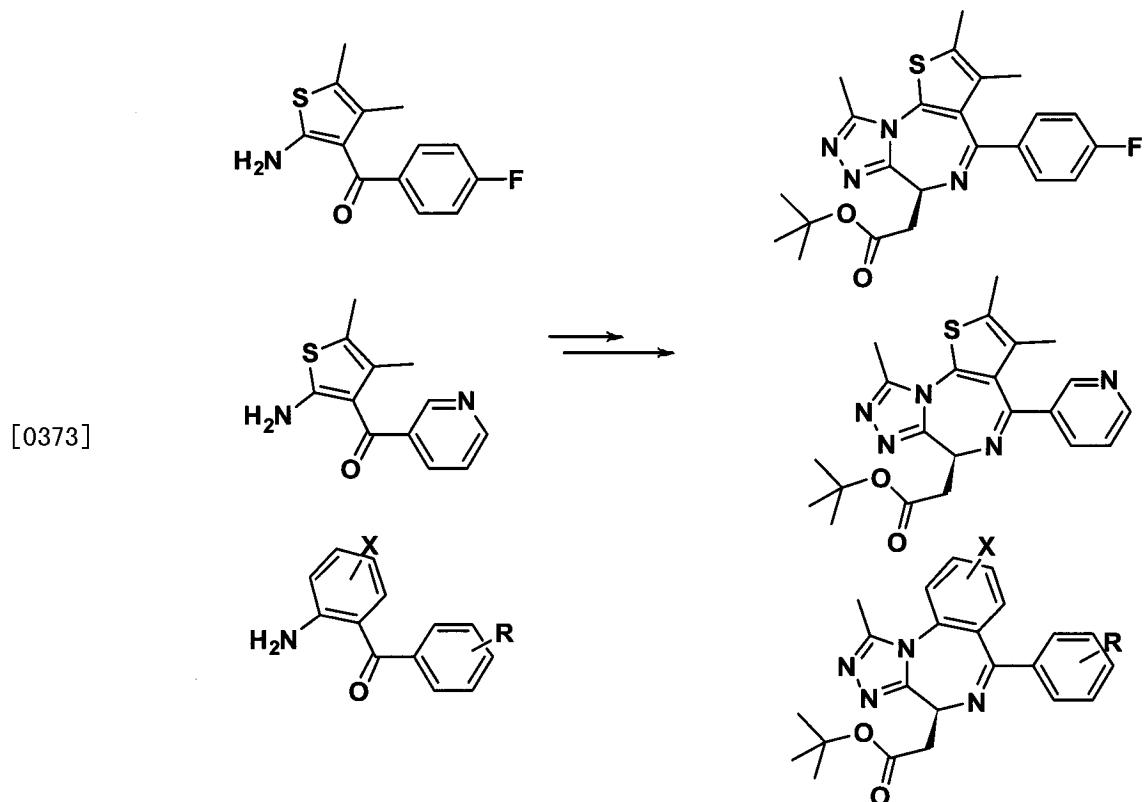
[0370] 例如,从JQ1起始,类似的胺可以按照下面所示的方案1制备。

[0371]



方案 1

[0372] 如方案1中所示,JQ1的叔丁基酯的水解提供羧酸,用二苯基磷酰基叠氮化物(DPPA)处理该羧酸并使其经历克尔蒂斯(Curtius)重排条件以提供苄氧羰基(Cbz)保护的胺,然后脱保护产生该胺。该胺基团的后续加工,例如通过还原氨基化,产生仲胺,这种仲胺可以被进一步地烷基化以提供叔胺。

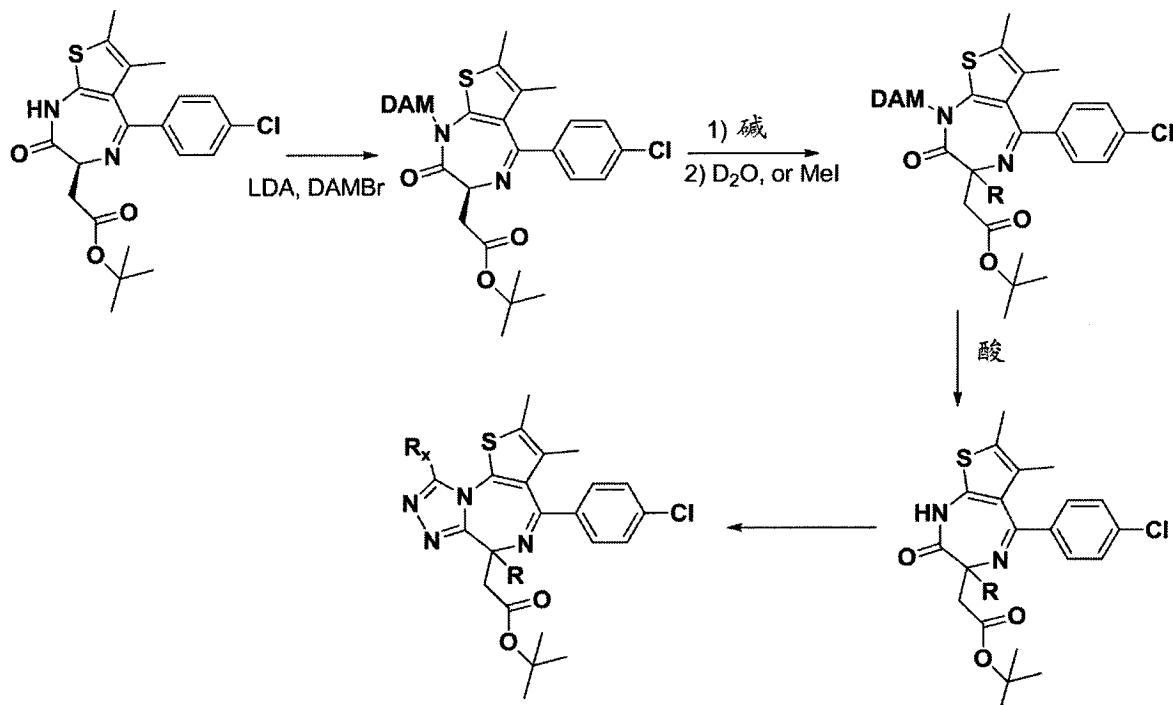


### 方案 2

[0374] 方案2列出了本发明的化合物的另外的实例的合成,例如具有化学式I的化合物,其中稠环核心被修饰(例如,通过如化学式I中环A的不同的芳基环的取代)。使用具有适当官能度的氨基二芳基酮(例如,替换以下方案S1中的氨基二芳基酮)提供了具有多种稠环核心和/或芳基基团附属物(相对于化学式I中的基团R)的新颖化合物。这样的氨基二芳基酮是可商购的或者可以通过多种方法制备,其中一些方法在本领域是已知的。

[0375] 方案3提供了用于制备本发明的另外的化合物的其他示例性合成方案。

[0376]



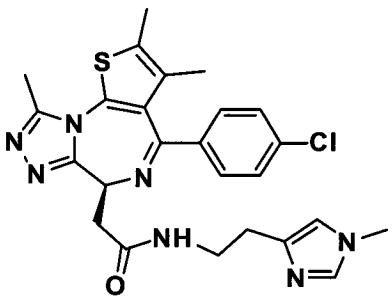
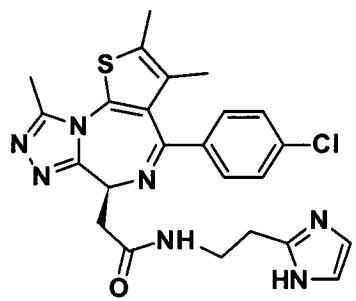
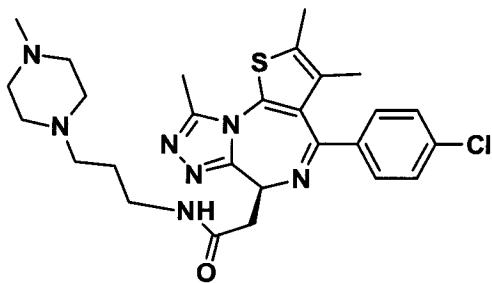
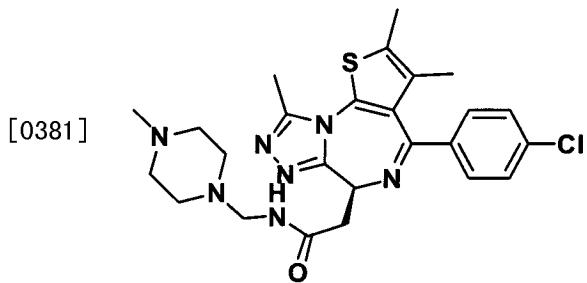
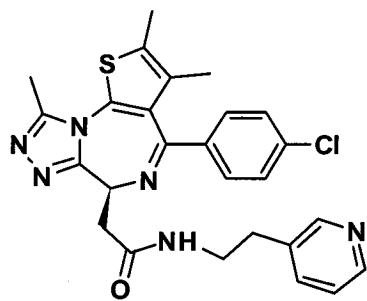
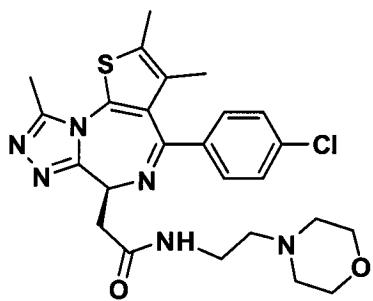
### 方案 3

[0377] 如方案3所示,用R部分(DAM=二甲氨基亚甲基保护基团)对稠合的二环前体(参见以下用于合成这种化合物的方案S1)进行官能化,并且然后通过与酰肼进行反应用对其进行加工以形成三环的稠合核心。通过选择合适的酰肼可以改变取代基R<sub>x</sub>。

[0378] 本发明的化合物的其他实例(可以通过在此描述的方法制备)包括:

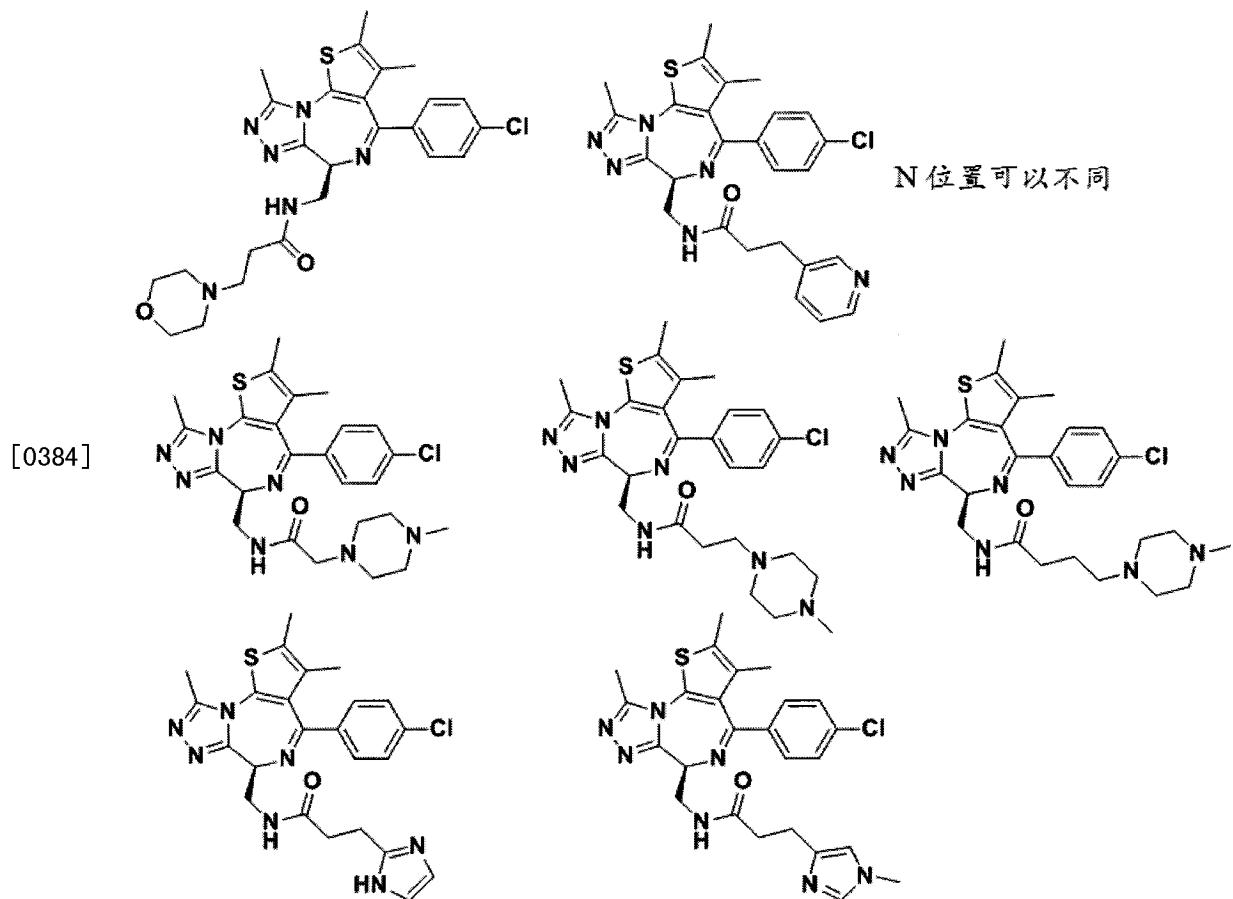
[0379] 酰胺类:

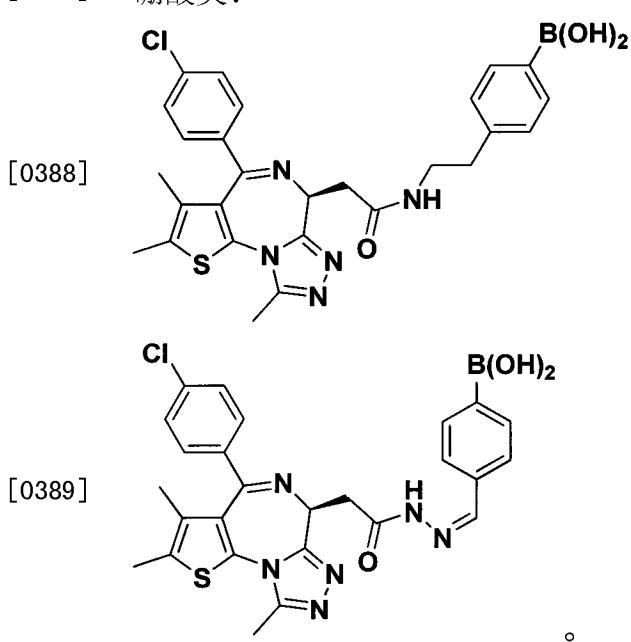
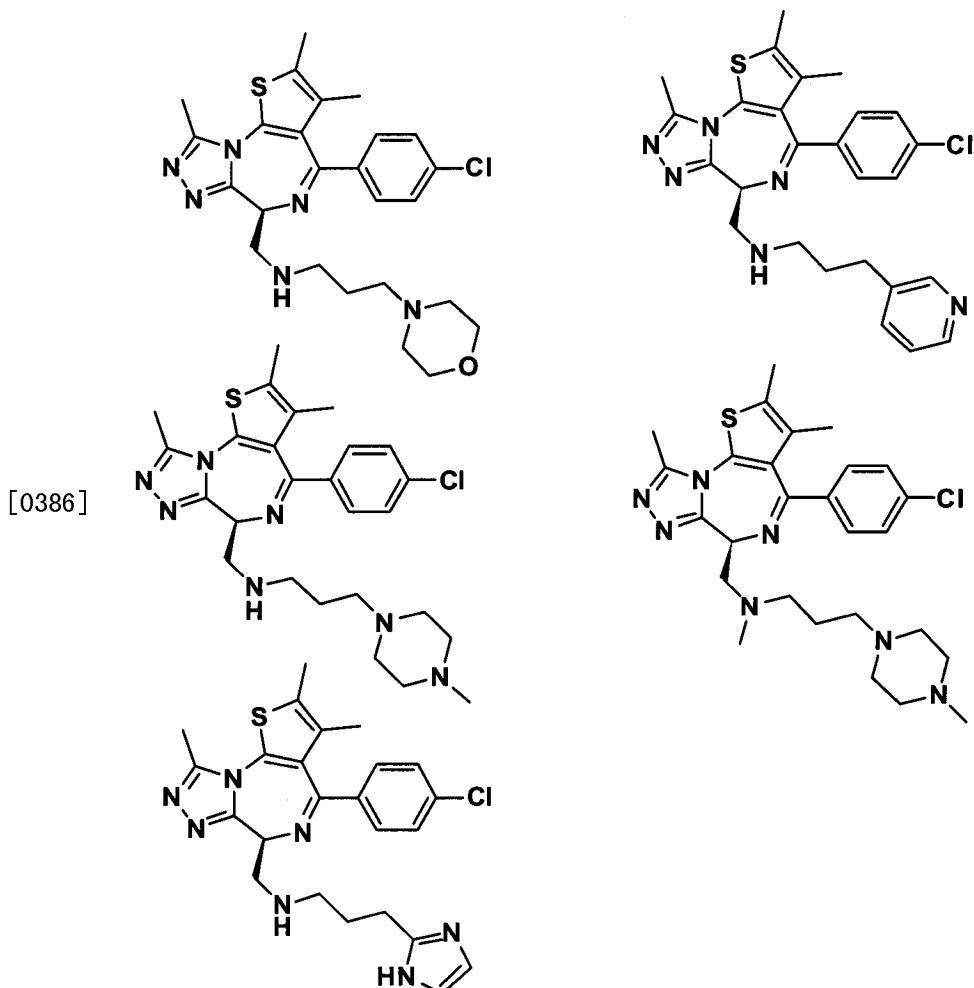
[0380] 可以通过例如以下的步骤制备酰胺类:制备相应的羧酸或酯,随后用适当的胺在标准条件下对其进行酰胺化。在某些实施方案中,酰胺提供了具有含有末端氮的环(例如,吡啶基、哌啶基、哌嗪基、咪唑基(包括N-甲基-咪唑基)、吗啉基等)的二碳“连接子”。示例性的酰胺结构包含:



[0382] 优选使用酰胺部分与含有末端氮的环之间的二碳链接子。

[0383] “反向酰胺类”：

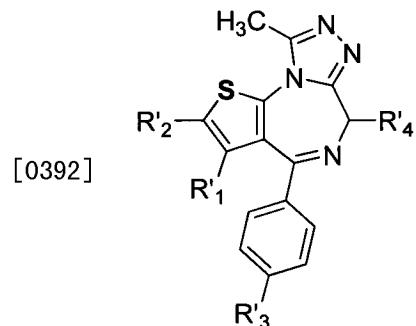




[0390] 在某些实施方案中，具有至少一个手性中心的化合物以消旋形式存在。在某些实施方案中，具有至少一个手性中心的化合物是在对映异构体意义上富集的，即，具有至少大约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、99%或100%的对映异

构体过量(e.e.)。在某些实施方案中,化合物与在此描述的化合物(+)-JQ1((S)-叔丁基2-(4-(4-氯苯基)-2,3,9-三甲基-6H-噻吩并[3,2-f][1,2,4]三唑并[4,3-a][1,4]二氮杂环庚-6-基)乙酸酯)具有相同的绝对构型。

[0391] 在于此披露的任一化学式的某些实施方案中,该化合物不由以下结构表示:



[0393] 其中:

[0394] R'1是C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基;

[0395] R'2是氢、卤素、或可任选地经卤素原子或羟基基团取代的C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基;

[0396] R'3是卤素原子、可任选地经卤素原子取代的苯基、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷氧基、或氰基; -NR<sub>5</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sub>6</sub>, 其中R<sub>5</sub>是氢原子或C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基,m是0-4的整数, 并且R<sub>6</sub>是可任选地经卤素原子取代的苯基或吡啶基; 或-NR<sub>7</sub>-CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sub>8</sub>, 其中R<sub>7</sub>是氢原子或C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基,n是0-2的整数, 并且R<sub>8</sub>是可任选地经卤素原子取代的苯基或吡啶基; 并且

[0397] R'4是-(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>-CO-NH-R<sub>9</sub>, 其中a是1-4的整数, 并且R<sub>9</sub>是C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基; C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>羟烷基; C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷氧基; 或可任选地经C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷氧基、氨基或羟基基团取代的苯基或吡啶基, 或-(CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>-COOR<sub>10</sub>, 其中b是1-4的整数, 并且R<sub>10</sub>是C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基。

[0398] 术语“药学上可接受的盐(pharmaceutically acceptable salt)”还指的是由在此披露的化合物(例如,JQ1,具有化学式I-XXII的化合物)或在此描述的任何其他化合物制备的盐,这种盐具有酸性官能团,如羧酸官能团,以及药学上可接受的无机或有机碱。适合的碱包括,但并不局限于,碱金属,如钠、钾、以及锂,的氢氧化物;碱土金属,如钙和镁,的氢氧化物;其他金属,如铝和锌,的氢氧化物;氨、和有机胺类,如未经取代的或经羟基取代的单-、二-、或三烷基胺;二环己胺;三丁基胺;吡啶;N-甲基-N-乙基胺;二乙胺;三乙胺;单-、双-或三-(2-羟基-低级烷基胺类),如单-、双-、或三-(2-羟基乙基)胺、2-羟基-叔丁胺、或三-(羟基甲基)甲胺,N,N-二-低级烷基-N-(羟基低级烷基)-胺,如N,N-二甲基-N-(2-羟基乙基)胺,或三-(2-羟基乙基)胺;N-甲基-D-葡萄糖胺;以及氨基酸类,如精氨酸、赖氨酸等。术语“药学上可接受的盐(pharmaceutically acceptable salt)”还指的是由在此披露的化合物,或在此描述的任何其他化合物制备的盐,这种盐具有碱性官能团,如氨基官能团,以及药学上可接受的无机或有机酸。适合的酸包括,但并不局限于,硫酸氢盐、柠檬酸、乙酸、草酸、盐酸、溴化氢、碘化氢、硝酸、磷酸、异烟酸、乳酸、水杨酸、酒石酸、抗坏血酸、琥珀酸、马来酸、苯磺酸()、富马酸、葡萄糖酸、glucaronic acid、糖二酸、甲酸、苯甲酸、谷氨酸、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸(),以及对甲苯磺酸。

[0399] 抑制性核酸

[0400] 本发明的抑制性核酸分子是抑制BET蛋白或核酸分子(例如,Brd2、Brd3、Brd4)表达的那些寡核苷酸。此类寡核苷酸包括结合编码BET多肽的核酸分子(例如,反义分子、

siRNA、shRNA)的单链以及双链的核酸分子(例如,DNA、RNA及其类似物)以及直接结合到BET多肽(例如,Brd2、Brd3、Brd4)上从而调节其生物活性的核酸分子(例如,适体)。

[0401] 核酶

[0402] 可以使用包含本发明的反义BET序列的催化性RNA分子或核酶来抑制体内BET核酸分子的表达。核酶序列包含在反义RNA中赋予对它们的RNA-切割活性,由此增加这些构建体的活性。靶标RNA特异性核酶的设计和用途描述于Haseloff等人,《自然》(Nature)334:585-591,1988,以及美国专利申请公开号2003/0003469A1中,将它们各自通过引用结合在此。

[0403] 因此,本发明的特点还有在结合臂包括具有八至十九个之间的连续核碱基的反义RNA的催化性RNA分子。在本发明的一个优选实施方案中,该催化性核酸分子在锤头(hammerhead)或发夹基序中形成。此类锤头基序的实例由Rossi等人,《艾滋病研究和人体逆转录酶病毒》(Aids Research and Human Retroviruses)8:183,1992所描述。发卡基序的实例由Hampel等人,1989年9月20日提交的“用于裂解特定的RNA序列的RNA催化剂”(RNA Catalyst for Cleaving Specific RNA Sequences)(1988年9月20日提交的美国序列号07/247,100的部分继续);Hampel和Tritz,《生物化学》(Biochemistry),28:4929,1989以及Hampel等人,《核酸研究》(Nucleic Acids Research),18:299,1990描述。这些特定的基序不局限在本发明中,并且本领域的普通技术人员将认识到在本发明的酶性核酸分子中有重要作用的全部都如以下:它具有特异性底物结合部位,该部位与一个或多个靶基因RNA区互补,并且它在该底物结合部位内或周围具有核苷酸序列,这些序列赋予该分子RNA切割活性。

[0404] 小发卡RNA由具有可任选的3'UU-突出的茎-环结构组成。同时可以有变化,茎的范围可以从21至31bp(理想地是25至29bp),并且环的范围可以从4至30bp(理想地是4至23bp)。就shRNA在细胞中的表达而言,可以使用包含聚合酶III H1-RNA或U6启动子,一种用于茎-环的RNA插入的克隆位点,以及4-5-胸苷转录终止信号的质粒载体。该聚合酶III启动子通常具有明确定义的起始与终止位点并且它们的转录本无聚腺苷酸尾巴。用于这些启动子的终止信号由聚胸苷段(polythymidine tract)确定并且在第二个尿苷之后,该转录本典型地被切割。在表达的shRNA中,这个位置处的切割产生一种与合成的siRNA的3'突出类似的3'UU突出。用于在哺乳动物细胞中表达shRNA的此外的方法描述于上文引用的参考文献中。

[0405] siRNA

[0406] 短的二十一至二十五个核苷酸双链RNA在下调基因表达上是有效的(Zamore等人,《细胞》(Cell)101:25-33;Elbashir等人,《自然》(Nature)411:494-498,2001,通过引用结合在此)。McCaffrey等人(《自然》(Nature)418:38-39,2002)已经体内证实了siRNA方法在哺乳动物中的疗效。

[0407] 给出靶基因的序列,可以设计出siRNA来使该基因失活。例如,可以将此类siRNA直接给药于受影响组织,或全身性地给药。可以使用BET基因的核酸序列来设计小干扰RNA(siRNA)。这些21至25个核苷酸的siRNA可以用作,例如,治疗剂以治疗血管疾病或失调。

[0408] 可以采用本发明的抑制性核酸分子作为用于RNA干扰(RNAi)介导的BET表达敲低的双链RNA。在一个实施方案中,在脂肪细胞或前脂肪细胞中减少了BET的表达。RNAi是一种用于减少感兴趣的特异性蛋白的细胞表达的方法(综述于Tuschl,《化学生物化学》

(Chembiochem)2:239–245,2001;Sharp,《基因&发育》(Genes&Devel.)15:485–490,2000;Hutvagner和Zamore,《遗传发育新见》(Curr.Opin.Genet.Devel.)12:225–232,2002;以及Hannon,《自然》(Nature)418:244–251,2002中)。越来越多地使用siRNAs引入细胞(通过dsRNA的转染或使用基于质粒的表达系统的siRNA表达)来在哺乳动物细胞中创造功能缺失的表型。

[0409] 在本发明的一个实施方案中,双链RNA(dsRNA)分子被制成包含本发明的核碱基低聚物的八至十九个之间的连续核碱基。该dsRNA可以是两种不同的RNA链,它们具有双链的RNA链或单一的自身双链化的RNA链(短发卡(sh)RNA)。典型地,dsRNA有大约21或22个碱基对,但是如果希望的话,可以更短或更长(多达大约29个核碱基)。可以使用标准技术(例如,化学合成或体外转录)制备dsRNA。例如,可向Ambion公司(德克萨斯州,奥斯丁(Austin, Tex.))以及Epicentre公司(威斯康辛州,麦迪逊(Madison,Wis.))购买试剂盒。用于在哺乳动物细胞中表达dsRNA的方法描述于Brummelkamp等人,《科学》(Science)296:550–553,2002;Paddison等人,《基因&发育》(Genes&Devel.)16:948–958,2002;Paul等人,《自然生物技术》(Nature Biotechnol.)20:505–508,2002;Sui等人,《美国科学院院刊》(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)99:5515–5520,2002;Yu等人,《美国科学院院刊》(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)99:6047–6052,2002;Miyagishi等人,《自然生物技术》(Nature Biotechnol.)20:497–500,2002;以及Lee等人,《自然生物技术》(Nature Biotechnol.)20:500–505,2002,将它们各自通过引用结合在此。

[0410] 小发卡RNA由具有可任选的3'UU-突出的茎-环结构组成。同时可以有变化,茎的范围可以从21至31bp(理想地是25至29bp),并且环的范围可以从4至30bp(理想地是4至23bp)。就shRNA在细胞中的表达而言,可以使用包含聚合酶III H1-RNA或U6启动子,一种用于茎-环的RNA插入的克隆位点以及4–5–胸昔转录终止信号的质粒载体。该聚合酶III启动子通常具有明确定义的起始与终止位点并且它们的转录本无聚腺苷酸尾巴。用于这些启动子的终止信号由聚胸昔段(polythymidine tract)确定并且在第二个尿昔之后,该转录本典型地被切割。在表达的shRNA中,这个位置处的切割产生一种与合成的siRNA的3'突出类似的3'UU突出。在哺乳动物细胞中,用于表达shRNA的此外的方法描述于上文引用的参考文献中。

#### [0411] 核碱基低聚物的递送

[0412] 裸露的抑制性核酸分子或其类似物能够进入哺乳动物细胞并且抑制感兴趣的基因的表达。尽管如此,可能希望的是利用一种辅助寡核苷酸或其他核碱基低聚物递送进入细胞的配制品(参见,例如,美国专利号5,656,611、5,753,613、5,785,992、6,120,798、6,221,959、6,346,613以及6,353,055,将它们各自通过引用结合在此)。

#### [0413] 筛选方法

[0414] 如以上所描述的,本发明提供了化学化合物的具体实例,这些化学化合物包括JQ1、以及结合溴基结构域结合袋的以及抑制脂肪形成、脂肪细胞分化与脂肪细胞生物学活性(例如,脂肪合成、脂肪累积)的其他经取代的化合物。然而,本发明并不是局限于此。本发明进一步提供了一种用于鉴别试剂(包括核酸、肽、小分子抑制子、以及模拟物)的简单手段,这些试剂能够抑制脂肪形成、脂肪细胞分化以及脂肪细胞生物学活性(例如,脂肪合成、脂肪累积)。预期此类化合物还可用于代谢性综合征、肥胖症、II型糖尿病、胰岛素耐受性以

及相关的其特征为在代谢或脂肪累积方面发生不希望的改变的失调的治疗或预防。

[0415] 具体地,本发明的某些方面至少部分的基于以下发现:降低BET家族成员多肽的生物活性的试剂作为对于代谢性综合征、肥胖症、II型糖尿病、胰岛素耐受性以及相关的其特征为在代谢或脂肪累积方面发生不希望的改变的失调的治疗或预防可能是有用的。在具体实施方案中,通过测定脂肪形成、脂肪细胞分化、脂肪细胞生物学活性(例如,脂肪合成、脂肪累积)、转录因子以及其他在脂肪形成、体重增加以及脂肪累积(例如,内脏脂肪、皮下脂肪、脂肪肝)中具有功能的蛋白质的表达对本发明的化合物或其他试剂的作用进行分析。本发明的降低脂肪形成、脂肪细胞分化、脂肪细胞生物学活性(例如,脂肪合成、脂肪累积)、转录因子以及其他在脂肪形成、体重增加以及脂肪累积(例如,内脏脂肪、皮下脂肪、脂肪肝)中具有功能的蛋白质的表达的试剂以及化合物被鉴别为有用于代谢性综合征、肥胖症以及相关的其特征为在代谢方面发生不希望的改变的失调的治疗或预防。

[0416] 事实上,可以在本发明的方法中使用特异结合到BET家族成员或减少BET家族成员生物活性的任何试剂。本发明的方法有用于高通量低成本筛选以下候选试剂用于代谢性综合征、肥胖症以及相关的其特征为在代谢方面发生不希望的改变的失调的治疗或预防,这些试剂减少、放慢、或者抑制脂肪形成、脂肪细胞分化、脂肪细胞生物学活性(例如,脂肪合成、脂肪累积)、转录因子以及其他在脂肪形成、体重增加以及脂肪累积(例如,内脏脂肪、皮下脂肪、脂肪肝)中具有功能的蛋白质的表达。然后,分离特异结合到BET家族成员的溴基结构域的候选试剂,并且针对其治疗代谢性综合征、肥胖症、II型糖尿病、胰岛素耐受性以及相关的其特征为在代谢或脂肪累积方面发生不希望的改变的失调的能力,在体外测定或体内测定中进行活性测试。本领域普通技术人员应当理解候选试剂对于细胞的作用典型地是和未与该候选试剂接触的对照细胞进行比较。如此,这些筛选方法包括将与候选试剂进行接触的脂肪细胞的生物活性和未处理的对照脂肪细胞的生物活性进行比较。在其他实施方案中,使用ob/ob小鼠、db/db小鼠或另外的肥胖症动物模型(如饲喂高脂肪饮食)来测定候选试剂的生物活性。

[0417] 在其他实施方案中,将用候选试剂处理的细胞中的BET家族成员的表达或活性与未处理的对照样品进行比较,以便鉴别降低接触过的细胞中的BET家族成员的生物活性的候选化合物。可以通过本领域熟知的程序,如蛋白质印迹法、流式细胞计量术、免疫细胞化学、结合到磁和/或溴基结构域特异抗体覆盖的珠、原位杂交、荧光原位杂交(FISH)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、微型阵列分析、反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)、RNA印迹法、或比色测定法,如布拉福德测定法(Bradford Assay)和劳里测定法(Lowry Assay),对多肽表达或活性进行比较。

[0418] 在一个工作实例中,将一个或多个候选试剂以不同的浓度添加到含有脂肪细胞或前脂肪细胞的培养基中。减少脂肪形成转录因子或其他在该细胞中表达的脂肪形成蛋白(例如,C/EBP- $\alpha$ 、PPAR  $\gamma$ 、SREBP、脂肪酸合酶(FAS)、ACC  $\beta$ 、SCD1、DGAT)的表达的试剂被认为是在本发明中有用的;可以将这样的试剂用作,例如一种疗法以预防、延迟、改善、稳定、或治疗代谢性综合征、肥胖症、II型糖尿病、胰岛素耐受性以及相关的其特征为在代谢或脂肪累积方面发生不希望的改变的失调。一旦经鉴别,就可以将本发明的试剂(例如,特异结合到和/或拮抗溴基结构域的试剂)用于治疗代谢性综合征、肥胖症、II型糖尿病、胰岛素耐受性以及相关的其特征为在代谢或脂肪累积方面发生不希望的改变的失调。根据本发明的方

法得以鉴别的试剂被局部或全身性地递送以治疗代谢性综合征、肥胖症、II型糖尿病、胰岛素耐受性以及相关的其特征为在代谢或原位脂肪累积方面发生不希望的改变的失调。

[0419] 潜在的溴基结构域拮抗剂包括结合到BET家族成员溴基结构域并且减少其活性的有机分子、肽、肽模拟物、多肽、核酸配体、适体、以及抗体。可以对候选试剂减少脂肪细胞分化或生物活性的能力进行测试。

[0420] 测试化合物和提取物

[0421] 在某些实施方案中,根据本领域已知的方法,从天然产物或合成(或半合成)提取物的大库或从化学品库,或从多肽或核酸库中鉴别出BET族成员拮抗剂(例如特异地结合并降低一种溴基结构域的活性的试剂)。药物研究和开发领域的技术人员将会理解,测试提取物或化合物的确切来源对本发明的(这些)筛选过程不是关键的。在筛选中使用的试剂可以包括已知作为用于代谢性综合征、肥胖症、II型糖尿病或其他的其特征为在代谢或脂肪累积方面发生不希望的改变的失调的治疗的疗法的那些。可替代地,事实上,使用在此描述的这些方法可以对任何数量的未知化学提取物或化合物进行筛选。此类提取物或化合物的实例包括但不限于,植物基提取物、真菌基提取物、原核生物基提取物或动物基提取物,发酵液,和合成的 化合物,以及现有多肽的变体。

[0422] 细菌、真菌、植物和动物提取物形式的天然多肽库可从许多来源(包括Biotics公司(萨西克斯郡,英国(Sussex,UK))、Xenova公司(斯劳,英国( Slough,UK)、Harbor Branch Oceangraphics Institute研究所(皮尔斯堡,福罗里达州(Ft.Pierce,Fla.)),以及PharmaMar,U.S.A.公司(剑桥,马萨诸塞州())处商购。可以使用本领域已知的以及在此描述的方法对此类多肽进行修饰以包括一个蛋白质转导域。此外,如果希望,根据本领域已知的方法,例如通过标准提取和分级分离方法,来产生天然的和合成产生的库。用于合成分子库的方法的实例均能够在本领域中找到,例如在:DeWitt等人,《美国科学院院刊》(Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.)90:6909,1993;Erb等人,《美国科学院院刊》91:11422,1994;Zuckermann等人,《医药化学杂志》(J.Med.Chem.)37:2678,1994;Cho等人,《科学》(Science)261:1303,1993;Carrell等人,《德国应用化学英文国际版》(Angew.Chem.Int.Ed.Engl.)33:2059,1994;Carell等人,《德国应用化学英文国际版》33:2061,1994;以及Gallo等,《医药化学杂志》37:1233,1994中找到。此外,如果希望,使用标准的化学、物理、或生物化学方法可容易对任何库或化合物进行修改。

[0423] 众多方法也可以用于产生任何数量的多肽、化学化合物(包括但不限于,糖基化合物、脂质基化合物、肽基化合物、以及核酸基化合物)的随机或定向合成。合成化合物库可商购自Brandon Associates公司(梅里马克,新罕布什尔州(Merrimack,N.H.))和Aldrich Chemical公司(密尔沃基,威斯康辛州(Milwaukee,Wis.))。可替代地,待用作候选化合物的化学化合物可使用本领域的普通技术人员已知的标准合成技术和方法,从容易得到的起始原料进行合成。对用此处所描述的方法得以鉴别的这些化合物有用的合成化学转换和基团保护法(保护和脱保护)在本领域中是已知的,并且包括,例如,在R.Larock,《综合有机转换》(Comprehensive Organic Transformations),VCH出版公司(1989);T.W.Greene和P.G.M.Wuts,《有机合成中的保护基团》(Protective Groups in Organic Synthesis),第二版,(1991);L.Fieser和M.Fieser,《费塞尔和费塞尔有机合成试剂》(Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis),(1994);以及L.Paquette,编辑,《有机合成

试剂百科全书》(Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis), (1995), 及其多次再版中描述的那些方法。

[0424] 化合物的库可以出现在溶液中(例如Houghten,《生物技术》(Biotechniques)13: 412-421,1992), 或在珠上(Lam,《自然》(Nature)354:82-84,1991), 芯片上(Fodor,《自然》364:555-556,1993), 细菌(Ladner,美国专利号5,223,409)上, 孢子上(Ladner,美国专利号5,223,409), 质粒上(Cull等人,《美国科学院院刊》89:1865-1869,1992)或在噬菌体上(Scott和Smith,《科学》249:386-390,1990); Devlin,《科学》249:404-406,1990; Cwirla等人,《美国科学院院刊》87:6378-6382,1990; Felici,《分子生物学杂志》(J.Mol.Biol.)222: 301-310,1991; Ladner同前)。

[0425] 此外, 药物研究和开发领域的普通技术人员很容易理解, 只要可能就应该使用用于去重复化(例如分类去重复、生物去重复, 以及化学去重复, 或其任何组合)或消除已知活性的多种材料的复制或重复的方法。

[0426] 当发现一种粗提物具有BET族成员溴基结构域结合活性时, 对该阳性前导提取物的进一步分级分离是必要的, 以分离对该观察效果负责的分子结构。因此, 该提取、分级分离和纯化过程的目标是在该粗提物中仔细表征或鉴别降低了脂肪形成、脂肪细胞分化或脂肪细胞生物学活性的一种化学实体。此类异质性提取物的分级分离和纯化方法在本领域内是已知的。如果希望, 根据本领域已知的方法, 对显示出可用作治疗的化合物进行化学修饰。

[0427] 本发明提供了治疗代谢性综合征、肥胖症、胰岛素耐受性以及相关的疾病和/或失调或其症状的方法, 该方法包括给予受试者(例如哺乳动物如人类)一种治疗有效量的包含具有此处的化学式的化合物的药用组合物。因此, 一个实施方案是一种治疗患有或易患代谢性综合征、肥胖症、II型糖尿病、胰岛素耐受性以及相关的 其特征为在代谢或脂肪累积方面发生不希望的改变的失调或其症状的受试者的方法。该方法包括给予该哺乳动物足以治疗该疾病或失调或其症状的一种治疗量的在此化合物的步骤, 在这样的条件下使得该疾病或失调得以治疗。

[0428] 此处的这些方法包括给予该受试者(包括经鉴别需要此类治疗的受试者)一种有效量的此处描述的化合物, 或此处描述的组合物以产生这种效果。确定需要这样治疗的受试者可以是受试者或医疗保健专业人士的判断, 并且可以是主观的(例如意见)或客观的(例如是通过测试或诊断方法可测量的)。

[0429] 本发明的这些治疗方法(包括预防治疗)总体上包括将治疗有效量的此处的这些化合物, 如一种具有此处的化学式的化合物, 给予需要其的受试者(例如动物、人类), 包括哺乳动物, 尤其是人类。此类治疗将适当地给予患有、具有、易患一种疾病、失调或其症状或在处于危险中的受试者, 尤其是人类。那些在“危险中()”的受试者的确定可以通过诊断测试或受试者或卫生保健提供者(例如基因测试、酶或蛋白标记、标记(如此处定义的)、家族病史等)的任何客观的或主观的确定来做出。此处的这些化合物还可以用在任何其他失调的治疗中, 其中可以涉及代谢、脂肪累积、脂肪形成、脂肪细胞分化或脂肪细胞生物学活性方面的不希望的改变。

[0430] 在一个实施方案中, 本发明提供了一种监控治疗进程的方法。该方法包括在患有或易患与脂肪形成、脂肪细胞分化或脂肪细胞生物学活性中不希望的改变相关联的失调及

其症状的受试者中确定诊断标记(Marker)(例如体重增加、脂肪酸合成、甘油三酸酯运输、胰岛素耐受性或此处描绘的、受此处的一种化合物调节的任何其他靶标,一种蛋白或其指示剂等等)的水平或诊断措施(例如筛选、测定)的步骤,其中已对该受试者施用了治疗量的足以治疗这种疾病及其症状的此处的一种化合物。在本方法中确定的标记水平可以与健康正常对照和其他受折磨的病人中的已知标记水平相比较,以确定该受试者的疾病状况。在优选实施方案中,对受试者中的标记的第二水平在晚于该第一水平的确定的一个时间点进行确定,并且对这两个水平进行比较以监测病程或该治疗的效果。在某些优选的实施方案中,根据本发明,在开始治疗前对该受试者中的标记的预治疗水平进行确定;然后将标记的这个预治疗水平与治疗开始后的该受试者中的标记的水平进行比较,以确定该治疗的效果。

#### [0431] 药物治疗

[0432] 在其它实施方案中,使用此处描述的方法发现的有药用价值的试剂(例如JQ1或具有此处描绘的化学式的化合物),例如,通过合理的药物设计,可用作用于现有化合物的结构修饰的一种药物或信息。这类方法可用于筛选对代谢性综合征、肥胖症、II型糖尿病、胰岛素耐受性以及相关的其特征为在代谢或脂肪累积方面发生不希望的改变的失调有效果的试剂。

[0433] 对于治疗用途而言,用此处披露的方法得以鉴别的这些组合物或试剂可以全身性地给药,例如配制在药学上可接受的缓冲液如生理盐水中。优选的给药途径包括,例如,在病人体内提供连续的、持续的药物水平的皮下注射、静脉注射、腹腔注射、肌内注射或皮内注射。使用一种在生理上可接受的载体中的、在此处得以鉴别的治疗有效量的治疗剂来对人类病人或其它动物进行治疗。对合适的载体以及它们的配制进行了描述,例如,在E.W.Martin著作的《雷明顿氏药学全书》(Remington's Pharmaceutical Sciences)中进行了描述。待被给药的治疗剂的用量的变化取决于给药方式、该病人的年龄和体重,以及代谢性综合征、肥胖症、II型糖尿病、胰岛素耐受性以及相关的其特征为在代谢或脂肪累积方面发生不希望的改变的失调的临床症状。总体上,尽管在某些情况下,由于该化合物特异性增加会需要较低的用量,但是用量会处于在其他与代谢性综合征、肥胖症、II型糖尿病、胰岛素耐受性以及相关的其特征为在代谢或脂肪累积方面发生不希望的改变的失调相关联的疾病的治疗中使用的其他试剂所用的那些量的范围内。以减少脂肪形成、脂肪细胞分化、脂肪细胞生物学活性的一种剂量将化合物进行给药,这个剂量通过本领域的技术人员已知的方法或使用任何测量体重增加或脂肪累积的测定法来确定。

#### [0434] 药用组合物的配制

[0435] 用于治疗代谢性综合征、肥胖症、II型糖尿病、胰岛素耐受性以及相关的其特征为在代谢或脂肪累积方面发生不希望的改变的失调的化合物的给予可以通过任何合适的手段,这些手段产生有效改善、减少、或稳定代谢性综合征、肥胖症、II型糖尿病、胰岛素耐受性以及相关的其特征为在代谢或脂肪累积方面发生不希望的改变的失调的与其他组分组合的治疗剂的浓度。该化合物可以任何合适量地包含于任何合适的载体物质中,并且总体上以该组合物总重的1-95%(按重量计)存在。该组合物可以是以一种适合于肠胃外(例如,皮下、静脉内、肌肉内、或腹膜内)给药途径的剂型来提供。这些药用组合物可以按常规药物实践(见,例如,《雷明顿:试剂的科学与实践》(第20版)(Remington: The Science and

Practice of Pharmacy(20th ed.),ed.),A.R.Gennaro,Lippincott Williams&Wilkins,2000,以及《制药技术百科全书》(Encyclopedia of Pharmaceutical Technology),编辑,J.Swarbrick与J.C.Boylan,1988-1999年,Marcel Dekker公司,纽约)进行配制。在一个具体的实施方案中,将一种本发明的试剂直接对脂肪细胞或对肝脏进行给药。一种用于将本发明的化合物对肝脏进行给药的手段是经由门静脉或肝动脉。另一种将本发明的化合物对组织或感兴趣部位进行给药的手段是通过附接至一种装置或固相支撑体(如,一个支架或移植植物)。

[0436] 人类剂量最初可以通过从小鼠中使用的化合物的量进行推断来确定,正如本领域技术人员认识到的,与动物模型相比来修改对人类的剂量是本领域中的惯例。在一个实施方案中,本发明的试剂以50mg/kg经口地或全身性地给药。在某些其他实施方案中,可以想象到的是,剂量变化可以从大约1 $\mu$ g化合物/Kg体重之间至大约5000mg化合物/Kg体重;或从大约5mg/Kg体重至大约4000mg/Kg体重;或大约10mg/Kg体重至大约3000mg/Kg体重,或从大约50mg/Kg体重到大约2000mg/Kg体重;或从大约100mg/Kg体重到大约1000mg/Kg体重;或从大约150mg/Kg体重至大约500mg/Kg体重。在其他实施方案中,这个剂量可以是大约1、5、10、25、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350、1400、1450、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2500、3000、3500、4000、4500、或5000mg/Kg体重。在其他实施方案中,可以想到的是,剂量可以在大约5mg化合物/Kg体重至大约100mg化合物/Kg体重的范围内。在其他实施方案中,这些剂量可以是大约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100mg/Kg体重。当然,同在此类的治疗方案中常规做的一样,这个剂量可以往上或往下调节,这个调节取决于最初的临床试验和具体病人的需要。

[0437] 根据本发明的这些药用组合物可以配制成为在给药时基本上立刻释放出该活性化合物或者在给药后任何一个预定的时刻或时间段释放出该活性化合物。后一种类型的组合物一般被称为控制释放配制品,它包括(i)在身体内在较长的时间内产生一个基本上恒定的药物浓度的配制品;(ii)预定的滞后时间后,在身体内在较长的时间内产生一个基本上恒定的药物浓度的配制品;(iii)在一段预定的时间期间,通过维持身体内相对恒定有效的水平,同时相伴的与该活性物质的血浆水平波动(锯齿动力学模式)相关的不希望的副作用最小化,来维持作用的配制品;(iv)通过,例如,控释组合物与胸腺相邻或接触的空间放置来定位作用的配制品;(v)允许方便给药,使得,例如,每一个或两个星期给药一次的配制品;以及(vi)通过使用载体或化学衍生物靶向代谢性综合征、肥胖症、II型糖尿病、胰岛素耐受性以及相关的其特征为在代谢或脂肪累积方面发生不希望的改变的失调以递送该治疗剂至具体细胞类型(例如脂肪细胞)或组织(内脏脂肪、异位脂肪、脂肪肝)的配制品。对于某些应用而言,控释配制品排除了对在白天频繁给药以维持血浆水平于治疗水平的需要。

[0438] 可以遵循许多策略中的任何一个,以便获得其中释放速率大于所谈论的化合物的代谢速率的控释。在一个实例中,控释是通过对各种配方参数和成分的合适选择来获得,包括,例如,不同的控释组合物和包衣类型。因此,将该治疗剂与合适的赋形剂配入一种给药时以受控方式释放该治疗剂的药用组合物中。实例包括单或多单位片剂或胶囊组合物、油溶液、悬浮液、乳剂、微胶囊、微球、分子复合物、纳米颗粒、贴剂、以及脂质体。

[0439] 多种肠胃外组合物

[0440] 该药用组合物能以剂型、配制品通过注射、输注或植入(皮下、静脉内、肌内、腹膜内、等等)或经由合适的含有常规的、无毒的药学上可接受的载体和佐剂的递送装置或植入物进行肠胃外给药。此类组合物的配制和制备对药物配制领域的普通技术人员而言是众所周知的。配制能在雷明顿:《药学科学与实践》(Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 同上)中找到。

[0441] 可以用单位剂型(例如,在单剂量的安瓿中),或者用包括若干剂量的小瓶来提供肠胃外使用组合物,并且其中可以加入合适的防腐剂(见下文)。该组合物的形式可以是一种溶液、悬浮液、乳液、输注装置、或用于植入的递送装置,或者它可以是一种在使用前用水或其它合适的载体复原的干粉剂。除减少或改善代谢性综合征、肥胖症、II型糖尿病、胰岛素耐受性以及相关的其特征为在代谢或脂肪累积方面发生不希望的改变的失调的活性剂外,该组合物可以包含合适的肠胃外可接受的载体和/或赋形剂。。该(这些)活性治疗剂可以掺入到用于控释的微球、微胶囊、纳米颗粒、脂质体等中。此外,该组合物可以包含悬浮、增溶、稳定、pH调节剂,张度调节剂,和/或分散剂。

[0442] 如上文所述,根据本发明的这些药用组合物可以是适合于无菌注射的形式。为了制备这样的一种组合物,将该(这些)合适的活性抗代谢性综合征治疗剂溶解于或悬浮于一种肠胃外可接受的液体载体中。可接受的载体和溶剂是水,通过加入适量的盐酸、氢氧化钠或合适的缓冲液调整到合适的pH值的水,1,3-丁二醇,林格氏溶液(),以及等渗氯化钠溶液和葡萄糖溶液。该水性配制品还可以包含一种或 多种防腐剂(例如甲基、乙基或对羟基苯甲酸正丙酯)。在其中这些化合物之一仅少量或微溶于水的情况下,可以添加一种溶解增强剂或增溶剂,或该溶剂可包括10%–60%(w/w)的丙二醇等。

#### [0443] 控释的肠胃外组合物

[0444] 多种控释的肠胃外组合物可以是水悬浮液,微球,微胶囊,磁性微球,油溶液,油悬浮液,或乳液形式。可替代地,该活性药可以掺入到生物相容的载体、脂质体、纳米颗粒、埋植剂、或输注设备中。

[0445] 用于制备微球和/或微胶囊的材料是,例如可生物降解的/可生物蚀解的聚合物如:聚泌乳激素、聚氰基丙烯酸异丁酯、聚(2-羟基乙基-L-左旋谷氨酸)、以及聚(乳酸)。当配制一种控释的肠胃外配制品时,可以使用的生物相容载体是碳水化合物(例如葡聚糖)、蛋白质(例如清蛋白)、脂蛋白或抗体。在埋植剂中使用的材料可以是非可生物降解的(例如聚二甲基硅氧烷)或可生物降解的(例如聚己内酯、聚乳酸、聚乙醇酸或聚邻醚或其组合物)。

#### [0446] 用于口服的固体制剂形式

[0447] 口服的配制品包括含有与无毒的药学上可接受的赋形剂混合的该(这些)活性成分的片剂。此类配制品对熟练的业内人士而言是已知的。赋形剂可以是,例如,惰性稀释剂或填充剂(例如,蔗糖、山梨醇、糖、甘露醇、微晶纤维素、淀粉(包括马铃薯淀粉)、碳酸钙、氯化钠、乳糖、磷酸钙、硫酸钙、或磷酸钠);造粒剂和崩解剂(例如,纤维素衍生物(包括微晶纤维素)、淀粉(包括马铃薯淀粉)、交联羧甲基纤维素钠、藻酸盐、或藻酸);结合剂(例如,蔗糖、葡萄糖、山梨糖醇、阿拉伯胶、藻酸、藻酸钠、明胶、淀粉、预胶化淀粉、微晶纤维素、硅酸铝镁、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乙基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、或聚乙二醇);以及润滑剂,助流剂,和抗结合剂(例如,硬脂酸镁、硬脂酸锌、硬脂酸、硅酸盐、

氢化植物油、或滑石)。其他药学上可接受的赋形剂可以是着色剂、调味剂、增塑剂、湿润剂、缓冲剂,等。

[0448] 这些片剂可以是无包衣的或它们可以通过已知技术包衣,来可任选地延迟在胃肠道中的崩解和吸收并且从而提供在较长的时间内的持续作用该包衣可以调适于以一种预定的模式释放该活性药物(例如,为了获得一种控释配制品),或者它可以调适于不释放该活性药物,直到通过胃后(肠溶包衣)。该包衣可以是一种糖包衣、一种膜包衣(例如,基于羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素、甲基羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羧甲基纤维素、丙烯酸酯共聚物、聚乙二醇和/或聚乙烯吡咯烷酮),或一种肠溶包衣(例如,基于甲基丙烯酸共聚物、乙酸邻苯二甲酸纤维素、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、醋酸羟丙基甲基纤维素琥珀酸酯、聚醋酸乙烯酯邻苯二甲酸酯、虫胶、和/或乙基纤维素)。此外,可以使用一种延时材料,例如,单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。

[0449] 这些固体片剂组合物可以包含调适于使该组合物避免不需要的化学变化(例如,该活性治疗物质的释放前的化学降解)的一种包衣。该包衣可以是以与在《制药技术百科全书》()中表述的一种相似方式应用于该固体制剂形式。

[0450] 可以将至少两种治疗剂一起混合在该片剂中,或者可以分开。在一个实例中,该第一活性治疗剂包含在该片剂的内部,并且该第二活性治疗剂包含在该片剂的外部,使得该第二治疗剂的实质部分在该第一治疗剂释放前得以释放。

[0451] 口服用配制品还可以呈现为咀嚼片、或硬明胶胶囊,其中该活性成分与惰性固体稀释剂(例如,马铃薯淀粉、乳糖、微晶纤维素、碳酸钙、磷酸钙或高岭土)混合,或呈现为软明胶胶囊,其中该活性成分与水或一种油介质混合,例如,花生油,液体石蜡或橄榄油。可以用上述的按照片剂和胶囊剂的这些成分,以一种常规的使用例如混合器、流化床装置或喷雾干燥设备的方式来制备粉剂和颗粒剂。

#### [0452] 控释的口服制剂形式

[0453] 可以将多种用于口服的控释组合物,例如,构建成通过控制该活性物质的溶解和/或扩散来释放该活性治疗剂。通过化合物的片剂、胶囊、丸、或颗粒配制品的适当包衣,或通过将该化合物掺入到一种合适的基质中,从而可以够获得溶解或扩散的控释。一种控释包衣可以包含以上提到的这些包衣物质中的一种或多种和/或例如虫胶、蜂蜡、糖蜡、蓖麻蜡、巴西棕榈蜡、硬脂醇、单硬脂酸甘油酯、二硬脂酸甘油酯、棕榈酰硬脂酰甘油酯、乙基纤维素、丙烯酸树脂、d1-聚乳酸、醋酸丁酸纤维素、聚氯乙烯、聚乙酸乙烯酯、乙烯吡咯烷酮、聚乙烯、聚甲基丙烯酸酯、甲基丙烯酸甲酯、2-羟甲基丙烯酸酯、甲基丙烯酸酯水凝胶、1,3-丁二醇、乙二醇甲基丙烯酸酯,和/或聚乙烯醇。在一个控释基质配制品中,该基质材料还可以包括,例如,水合甲基纤维素、巴西棕榈蜡和硬脂醇,卡波姆934()、硅酮、甘油三硬脂酸酯、丙烯酸甲酯-甲基丙烯酸甲酯、聚氯乙烯、聚乙烯、和/或卤化氟烷。

[0454] 含有一种或多种治疗化合物的控释组合物还可以是一种胃飘浮片剂或胶囊形式(例如,在口服给药时,漂浮在胃内容物之上一定时间段的一种片剂或胶囊)。该(这些)化合物的胃飘浮片剂配制品可以通过将该(这些)化合物与赋形剂以及20-75%(w/w)的水状胶质(例如羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、或羟丙基纤维素)的混合物进行粒化来制备。然后将所得颗粒压制成片剂。在与胃液接触时,该片剂在它的表面周围形成了一个基本上不透水的凝胶屏障。这个凝胶屏障参与保持小于一的密度,从而使该片剂仍然漂浮在胃液中。

[0455] 联合治疗

[0456] 可任选的,一种用于代谢性综合征、肥胖症、II型糖尿病、胰岛素耐受性以及相关的其特征为在代谢或脂肪累积方面发生不希望的改变的失调的治疗的治疗剂可以与任何其他的标准的用于治疗代谢性综合征、胰岛素耐受性、II型糖尿病或肥胖症的治疗剂联合给药;此类方法对熟练的业内人士而言是已知的并且在E.W.Martin的《雷明顿氏药学全书》(Remington's Pharmaceutical Sciences)中给予描述。如果希望,将本发明的试剂(例如JQ1、具有在此描绘的化学式的化合物、及其衍生物)与任何常规的用于代谢性综合征、肥胖症、II型糖尿病、胰岛素耐受性以及相关的其特征为在代谢或脂肪累积方面发生不希望的改变的失调的治疗的治疗剂联合给药。这些试剂可以包括抗糖尿病的药物(如硫酰脲、口服降糖药、PPAR促效剂或拮抗剂)、心血管疾病药物(如抗高血压的、抗心绞痛的药物)以及抗炎药(如皮质激素、HDAC抑制剂、TNF- $\alpha$ 调节剂)。

[0457] 试剂盒或药物系统

[0458] 本发明的组合物可以被组装成用于改善代谢性综合征、肥胖症、II型糖尿病、胰岛素耐受性以及相关的其特征为在代谢或脂肪累积方面发生不希望的改变的失调的试剂盒或药物系统。根据本发明的这个方面的试剂盒或药物系统包括一个载体工具,如一个盒、纸盒、管等,该载体工具中严格限定地具有一个或多个容器工具,如:小瓶、管、安瓿、瓶子等。本发明的试剂盒或药物系统还可以包括用于使用本发明的这些试剂的相关使用说明书。

[0459] 除非另外指明,本发明的实施采用很好地处在熟练业内人士的见识范围之内的分子生物学(包含重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术。此类技术在文献中进行充分地说明,如:“分子克隆:实验指南”(),第二版,(Sambrook,1989);“寡核苷酸合成”((Gait,1984);“动物细胞培养”((Freshney,1987);“酶学方法”(“实验免疫学手册”((Weir,1996);“哺乳动物细胞的基因转移载体”((Miller and Calos,1987);“分子生物学现行规范”((Ausubel,1987);“PCR:聚合酶链式反应”((Mullis,1994);“免疫学现行规范”((Coligan,1991)。这些技术适用于本发明的多核苷酸和多肽的生产,并且按照这样,可以被考虑用于制备和实施本发明。对具体实施方案特别有用的技术将在下面的部分进行讨论。

[0460] 给出以下的实例是为了给本领域普通技术人员提供对如何进行和使用测试、对筛选和对本发明的治疗方法的一个完整的公开和说明,而不是旨在限定诸位发明人认为是自己的发明的范围。

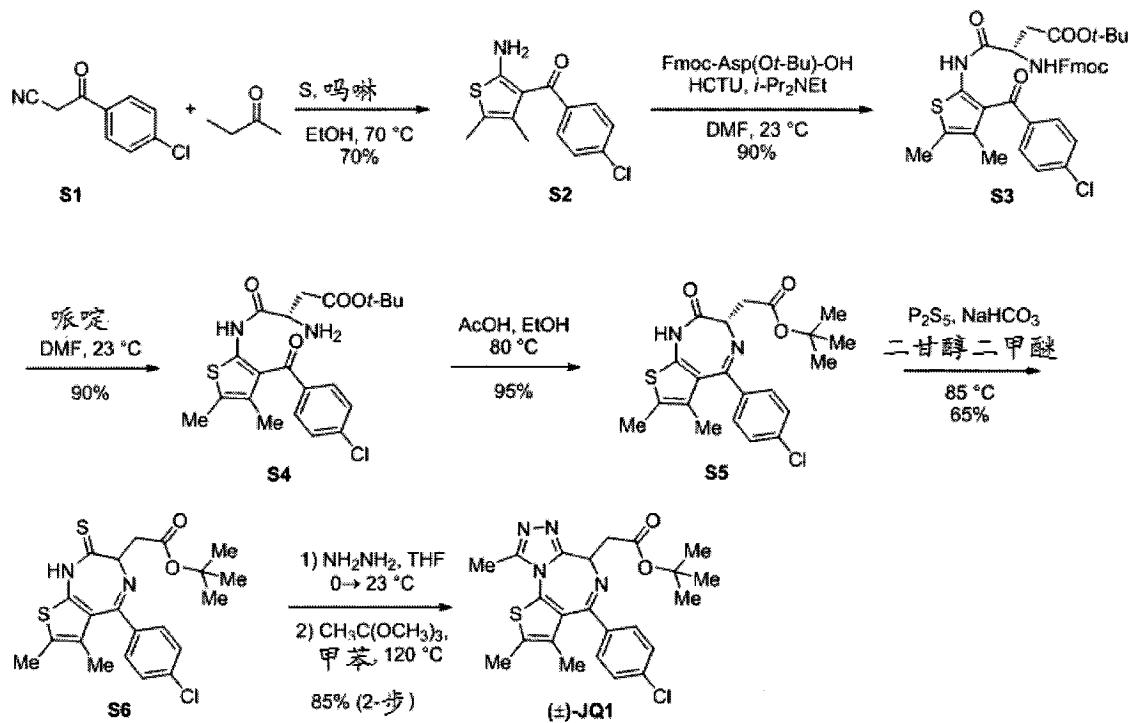
[0461] 实例

[0462] I. 化学实例-制剂的合成和方法

[0463] 本发明的化合物可以用此处描述的方法,和/或根据由此处描述的本领域的普通技术人员已知的方法进行合成。

[0464] 方案S1. 消旋溴基结构域抑制剂(±)-JQ1的合成

[0465]



[0466] 2-氨基-4,5-二甲基噻吩-3-基)(4-氯苯基)甲酮(S2)

[0467] 根据以上所示的方案制备该化合物JQ1。

[0468] 固体硫磺(220mg, 6.9mmol, 1.00当量)在23°C加入到4-氯苯甲酰基乙腈S1(1.24g, 6.9mmol, 1.00当量), 2-丁酮(0.62ml, 6.9mmol, 1当量), 以及吗啉(0.60ml, 6.9mmol, 1.00当量)的乙醇()溶液中。该然后将该混合物加热至70°C。12小时后, 将该反应混合物冷却至23°C并且倒入盐水(100ml)中。该将该水层用乙酸乙酯(3×50ml)进行萃取。将这些合并的有机层用盐水(50ml)洗涤, 用无水硫酸钠干燥, 过滤并且在减压下进行浓缩。残余物用快速柱色谱法(CombiFlash RF系统, 40克硅凝胶, 梯度0至100%的乙酸乙酯-己烷)纯化以获得黄色固体状的S2(1.28g, 70%)。

[0469] (S)-叔丁基-3-({[(9H-芴-9-基)甲氧基]羰基}氨基)-4-{[3-(4-氯苯甲酰基)-4,5-二甲基噻吩-2-基]氨基}-4-氧丁酸酯(S3)

[0470] 将(2-(6-氯-1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲铵六氟磷酸酯(HCTU)(827mg, 2.0mmol, 2.00当量), 和N,N-二异丙基乙胺(0.72ml, 4.0mmol, 4.00当量)依次加入到9-芴甲氧羰基-天冬氨酸β-叔丁基酯[Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH](864mg, 2.1mmol, 2.10当量)的N,N-二甲基甲酰胺溶液中(1.5ml, 1.0M)。然后将该混合物在23搅拌5分钟。再添加固体S2(266mg, 1.0mmol, 1当量)。将该反应混合物在23搅拌。16小时后, 添加乙酸乙酯(20ml)和盐水(20ml)。将这两个层分离, 并且将该水层用乙酸乙酯(2×20ml)萃取。这些合并的有机层用盐水(30ml)洗涤, 用无水硫酸钠干燥, 过滤而且在减压下进行浓缩。将残余物用快速柱色谱法(CombiFlash RF系统, 40克硅凝胶, 梯度0至100%的乙酸乙酯-己烷)纯化以获得棕色油状的S3(625mg, 90%)。

[0471] (S)-叔丁基-3-氨基-4-{(3-(4-氯苯甲酰基)-4,5-二甲基噻吩-2-基)氨基}-4-氧丁酸酯(S4)

[0472] 将化合物S3(560mg, 0.85mmol, 1当量)在23°C溶解于20%哌啶的DMF溶液中

(4.0ml, 0.22M)。30分钟后, 将乙酸乙酯(20ml)和盐水(20ml)加入到该反应混合物中。将这两个层分离, 并且将该水层用乙酸乙酯( $2 \times 20\text{ml}$ )萃取。这些合并的有机层用盐水( $3 \times 25\text{ml}$ )洗涤, 用无水硫酸钠干燥, 过滤并且在减压下进行浓缩。将残余物用快速柱色谱法(Combiflash RF系统, 24克硅凝胶, 梯度0至100%的乙酸乙酯-己烷)纯化以获得黄色固体状的游离胺S4(370mg, 90%)。对映异构体的纯度降至75%(用采用AS-H柱的Berger超临界流体色谱法(SFC)确定)。

[0473] (S)-叔丁基-2-(5-(4-氯苯基)-6,7-二甲基-2-氧-2,3-二氢-1H-噻吩并[2,3-e][1,4]二氮杂环庚-3-基)乙酸酯(S5)

[0474] 将氨基酮(S4)(280mg, 0.63mmol)溶解于10%乙酸乙醇溶液中(21ml, 0.03M)。该反应混合物被加热至85°C。30分钟后, 将所有的溶剂在减压下去除。将残余物用快速柱色谱法(Combiflash RF系统, 12克硅凝胶, 梯度0至100%的乙酸乙酯-己烷)纯化以获得白色固体状的化合物S5(241mg, 95%)。S5的对映异构体纯度为67%(用采用AS-H柱的Berger超临界流体色谱法(SFC)确定)。

[0475] 叔丁基-2-(5-(4-氯苯基)-6,7-二甲基-2-硫代-2,3-二氢-1H-噻吩并[2,3-e][1,4]二氮杂环庚-3-基)乙酸酯(S6)

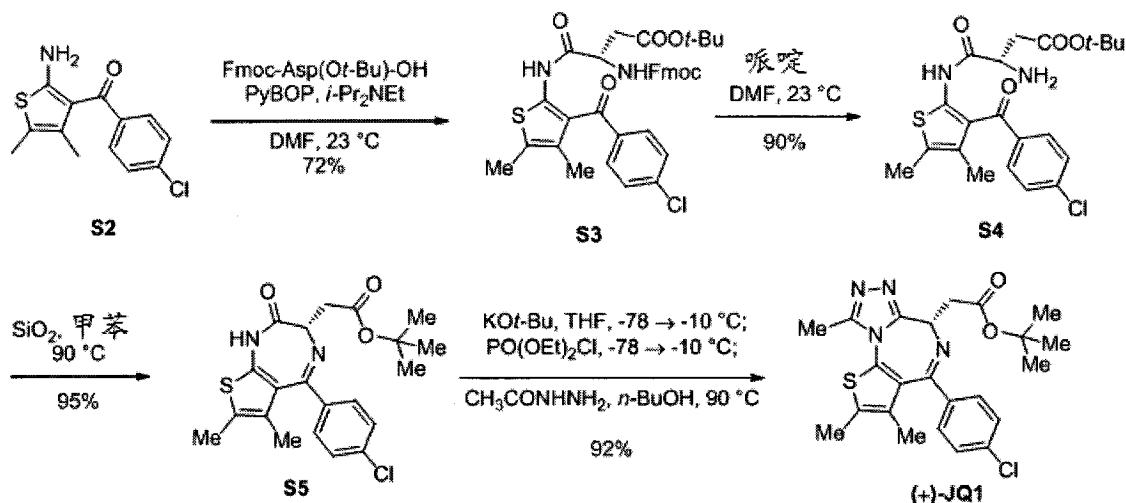
[0476] 将五硫化二磷(222mg, 1.0mmol, 2.00当量)、碳酸氢钠(168mg, 2.0mmol, 4.00当量)依次加到S5()的二甘醇二甲醚溶液(1.25ml, 0.4M)中。将该反应混合物加热至90°C。16h后, 添加盐水(20ml)和乙酸乙酯(35ml)。将这两个层分离, 并且将该水层用乙酸乙酯( $3 \times 30\text{ml}$ )萃取。将这些合并的有机层用盐水( $2 \times 15\text{ml}$ )洗涤, 用无水硫酸钠干燥, 过滤并且在减压下进行浓缩。将残余物用快速柱色谱法(Combiflash RF系统, 24克硅凝胶, 梯度0至100%的乙酸乙酯-己烷)纯化以获得棕色固体状的含有回收的S5(73mg, 34%)的S6(141mg, 65%)。

[0477] 叔丁基-2-(4-(4-氯苯基)-2,3,9-三甲基-6H-噻吩并[3,2-f][1,2,4]三唑并[4,3-a][1,4]二氮杂环庚-6-基)乙酸酯[(±)JQ1]

[0478] 在将肼(0.015ml, 0.45mmol, 1.25当量)加到S6(158mg, 0.36mmol, 1当量)的THF(2.6ml, 0.14M)溶液中。将该反应混合物加温至23°C, 并且在23°C搅拌1小时。将所有的溶剂在减压下去除。该得到的肼直接使用, 无需纯化。然后将该肼溶解于原乙酸三甲酯和甲苯(6ml, 0.06M)的混合物中。该反应混合物加热至120°C。2h后, 将所有的溶剂在减压下去除。将残余物用快速柱色谱法(Combiflash系统, 4克硅凝胶, 梯度0至100%的乙酸乙酯-己烷)纯化以获得白色固体状的JQ1(在两步中, 140mg, 85%)。这些反应条件进一步使该手性中心差向异构化, 产生消旋体, JQ1(用采用AS-H柱的Berger超临界流体色谱法(SFC)确定)。

[0479] 方案S2. 富含对映异构体的(+)-JQ1的合成

[0480]



[0481] (S)-叔丁基-3-({[(9H-芴-9-基)甲氧基]羧基}氨基)-4-{[3-(4-氯苯甲酰基)-4,5-二甲基噻吩-2-基]氨基}-4-氧丁酸酯(S3)

[0482] 将苯并三唑吡咯烷磷((494mg, 0.95mmol, 当量)、N,N-二异丙基乙胺(0.50ml, 2.8mmol, 2.75当量)依次加入到9-芴甲氧羰基-天冬氨酸β-叔丁基酯[Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH](411mg, 1.00mmol, 1.0当量)的N,N-二甲基甲酰胺溶液中(1.0ml, 1.0M)中。然后在23将该混合物搅拌5分钟。然后添加固体状S2(266mg, 1.0mmol, 1当量)。将该反应混合物在23搅拌。4h后, 添加乙酸乙酯(20ml)和盐水(20ml)。将这两个层分离, 并且将该水层用乙酸乙酯(2×20ml)萃取。将这些合并的有机层用盐水(30ml)洗涤, 用无水硫酸钠干燥, 过滤并且在减压下进行浓缩。将残余物用快速柱色谱法(CombiFlash RF系统, 40克硅凝胶, 梯度0至100%的乙酸乙酯-己烷)纯化以获得棕色油状的S3(452mg, 72%)。

[0483] (S)-叔丁基-3-氨基4-{(3-(4-氯苯甲酰基)-4,5-二甲基噻吩-2-基)氨基}-4-氧丁酸酯(S4)。

[0484] 将化合物S3(310mg, 0.47mmol, 1当量)在23°C下溶解于20%哌啶的DMF溶液中(2.2ml, 0.22M)。30分钟后, 将乙酸乙酯(20ml)和盐水(20ml)加入到该反应混合物中。将这两个层分离, 并且将该水层用乙酸乙酯(2×20ml)萃取。这些合并的有机层用盐水()洗涤, 用无水硫酸钠干燥, 过滤并且在减压下进行浓缩。将残余物用快速柱色谱法(CombiFlash RF系统, 24克硅凝胶, 梯度0至100%的乙酸乙酯-己烷)纯化以获得黄色固体状的游离胺S4(184mg, 90%)。该对映异构体的纯度是91%(用采用AS-H柱的Berger超临界流体色谱法(SFC)确定)。

[0485] (S)-叔丁基-2-(5-(4-氯苯基)-6,7-二甲基-2-氧-2,3-二氢-1H-噻吩并[2,3-e][1,4]二氮杂环庚-3-基)乙酸酯(S5)

[0486] 将氨基酮(S4)(184mg, 0.42mmol)溶解于甲苯(10ml, 0.04M)中。添加硅凝胶(300mg), 并且将该反应混合物加热至90°C。3h后, 将该混合物冷却至23°C。将该硅凝胶进行过滤并且用乙酸乙酯进行洗涤。将这些合并的滤液浓缩。将残余物用快速柱色谱法(CombiFlash RF系统, 12克硅胶, 梯度0至100%的乙酸乙酯-己烷)纯化以获得白色固体状的化合物S5(168mg, 95%)。S5的对映异构体纯度为90%(用采用AS-H柱的Berger超临界流体色谱法(SFC)确定)。

[0487] (S)-叔丁基-2-(4-(4-氯苯基)-2,3,9-三甲基-6H-噻吩并[3,2-f][1,2,4]三唑并

[4,3-a][1,4]二氮杂环庚-6-基)乙酸酯[(+)-JQ1]

[0488] 在-78℃将叔丁醇钾(1.0M THF溶液, 0.3ml, 0.30mmol, 1.10当量)加到S5(114mg, 0.27mmol, 1当量)的THF()溶液中。将该反应混合物加温至-10, 并且在23搅拌30min。将该反应混合物冷却至-78℃。将氯磷酸二乙酯(0.047ml, 0.32mmol, 1.20当量)加入反应混合物中<sup>22</sup>。将该获得的混合物经45min加温至-10℃。将乙酰肼(30mg, 0.40mmol, 1.50当量)加入反应混合物中。将该反应混合物在23搅拌。1h后, 将1-丁醇(2.25ml)加到反应混合物中, 将其加热至90℃。1h后, 将所有溶剂在减压下去除。将残余物用快速柱色谱法(Combiflash RF系统, 4克硅胶, 梯度0至100%的乙酸乙酯-己烷)纯化以获得对映异构体纯度(用采用AS-H柱的Berger超临界流体色谱法确定, 85%己烷-甲醇,  $t_R$ (R-对映异构体)=1.59 min,  $t_R$ (S-对映异构体)=3.67min)为90%的白色固体状的(+)-JQ1(114mg, 92%)。用制备型HPLC(采用OD-H柱的Agilent高压液相色谱)将该产物进一步纯化以获得大于99%ee的S-对映异构体。

[0489]  $^1\text{H}$  NMR(600MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25℃)δ7.39(d, J=8.4Hz, 2H), 7.31(d, J=8.4Hz, 2H), 4.54(t, J=6.6MHz, 1H), 3.54–3.52(m, 2H), 2.66(s, 3H), 2.39(s, 3H), 1.67(s, 3H), 1.48(s, 9H).

[0490]  $^{13}\text{C}$  NMR(150MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25℃)δ171.0, 163.8, 155.7, 150.0, 136.9, 131.1, 130.9, 130.6, 130.3, 128.9, 81.2, 54.1, 38.1, 28.4, 14.6, 13.5, 12.1.

[0491] 对C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>C<sub>1</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S[M+H]<sup>+</sup>的HRMS(ESI)计算值(calc'd): 457.1460, 实验值(found) 457.1451m/z.

[0492] TLC(EtOAc), Rf: 0.32(UV)

[0493] [α]<sup>22</sup><sub>D</sub>=+75(c 0.5, CHCl<sub>3</sub>)

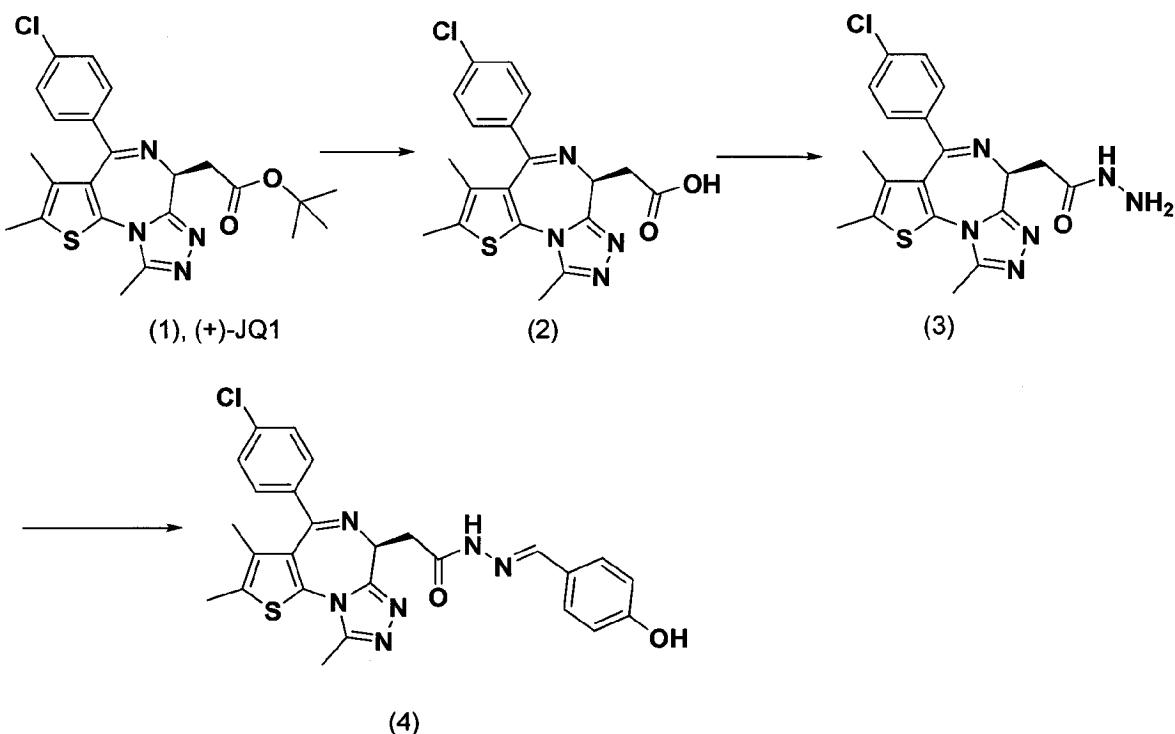
[0494] 采用Fmoc-D-Asp(Ot-Bu)-OH作为起始材料, 以相似的方式合成(-)-JQ1, 并且用制备型HPLC(采用OD-H柱的Agilent高压液相色谱)将该产品进一步纯化以获得大于99%ee的R-对映异构体。[α]<sup>22</sup><sub>D</sub>=+75(c 0.5, CHCl<sub>3</sub>)

[0495] 另外的化合物的合成

[0496] 如方案S3图示制备本发明的另外的化合物。

[0497] 方案S3. 肽衍生物的合成

[0498]



[0499] 如方案S3所示,将(+)-JQ1(1)的叔丁基醚进行裂解以生成自由酸(2),这种自由酸与肼偶联生成酰肼(3)。与4-羟基苯甲醛的反应生成腙(4)。

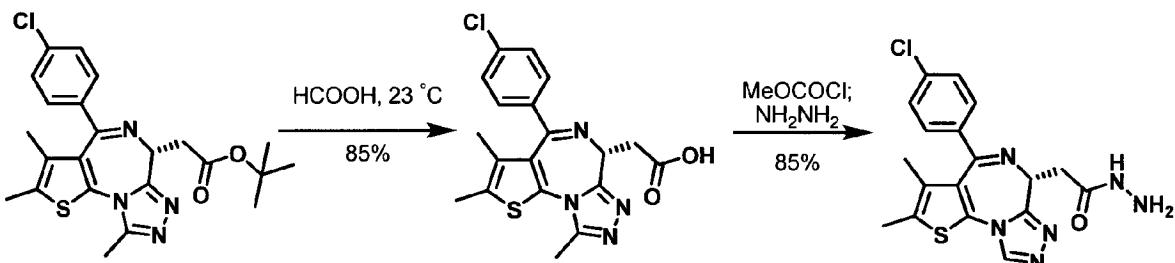
[0500] 酰肼(3)和腙(4)二者均在至少一个生物测定中显示出活性。

[0501] 通过酰肼(3)与多种含有羰基的化合物(见上表A)的反应制备一种化合物库。

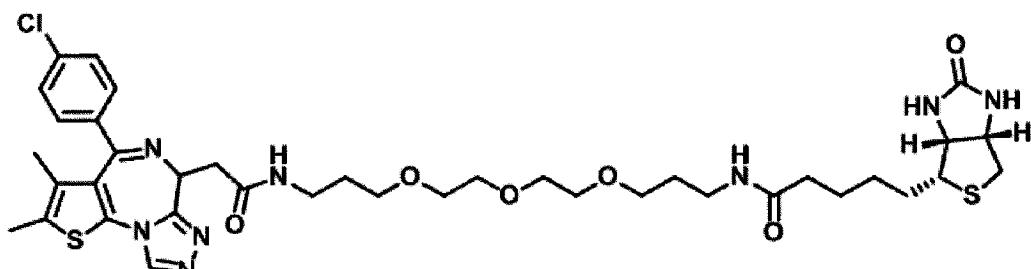
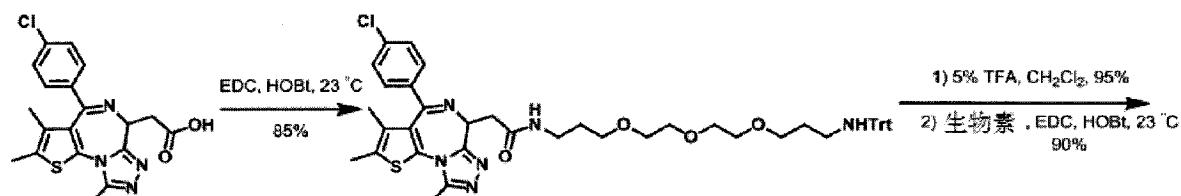
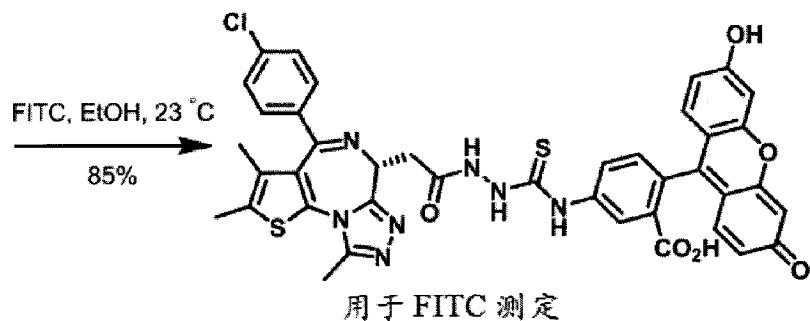
[0502] 制备另外化合物用作,如,测试开发的探针。在下面的方案S4中示出一个示例性的合成。

[0503] 方案S4.可用作探针的衍生物的合成。

[0504]



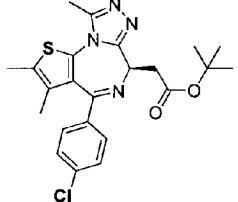
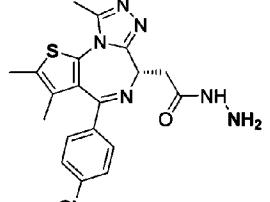
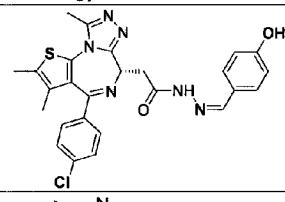
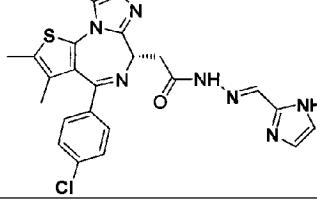
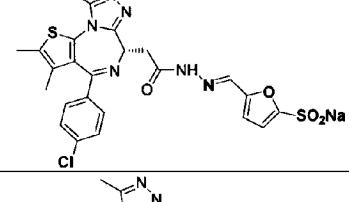
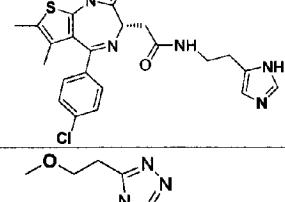
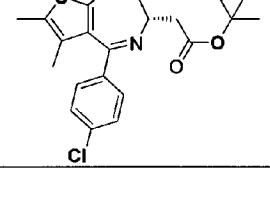
[0505]

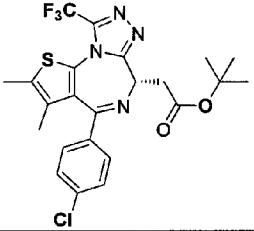
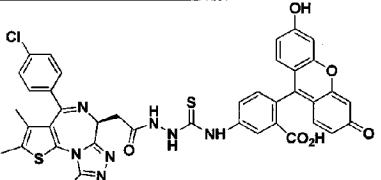
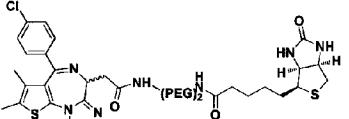
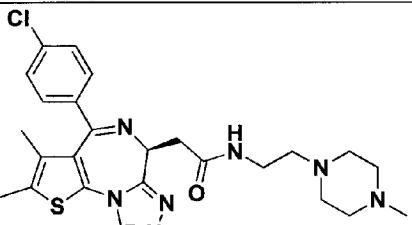
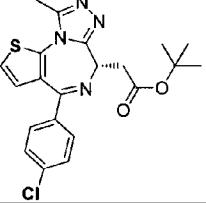
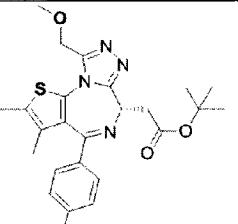
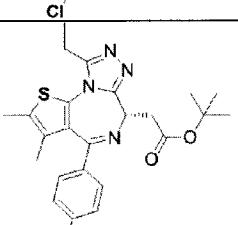


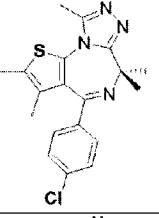
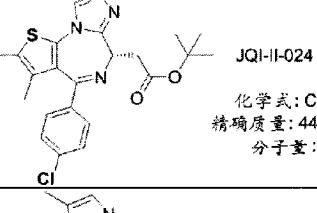
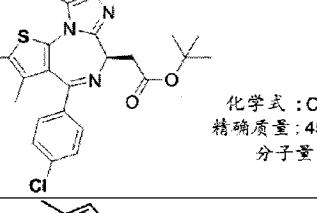
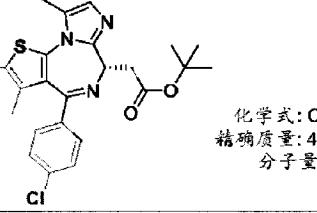
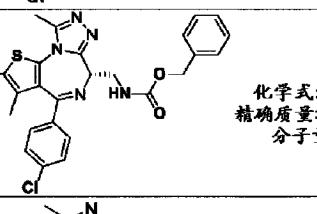
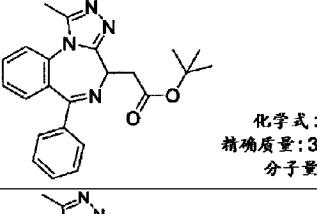
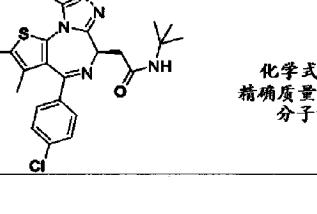
用于 Alpha 测定

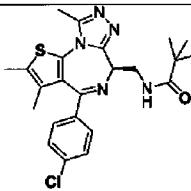
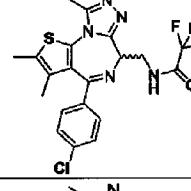
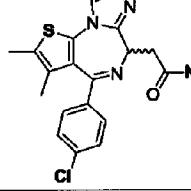
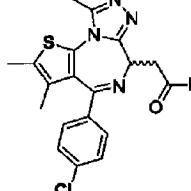
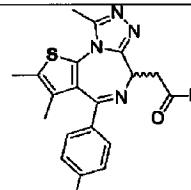
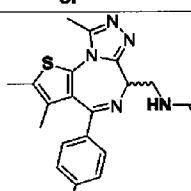
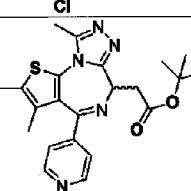
[0506] 制备如下表中所示的另外的化合物:

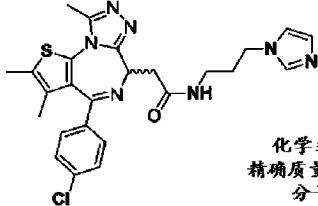
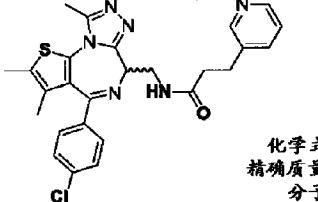
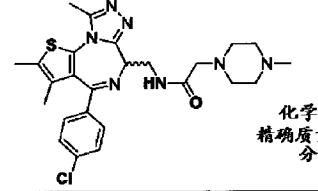
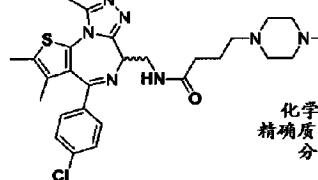
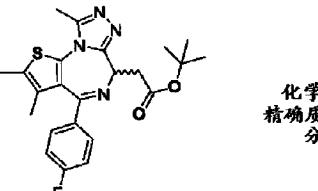
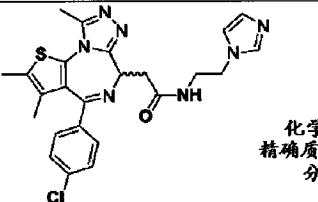
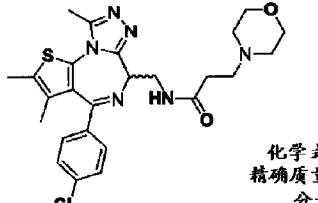
化合物名 称	结构	MS $[M+H]^+$ m/z (观察到 的)
[0507]	(S)-JQ1 	457.1

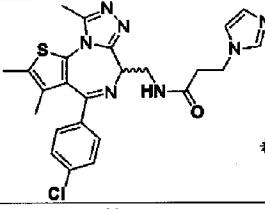
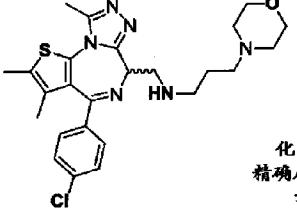
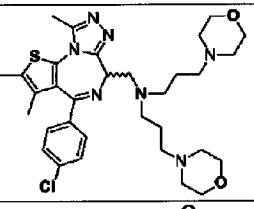
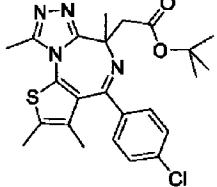
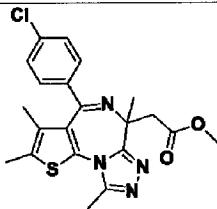
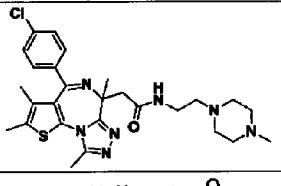
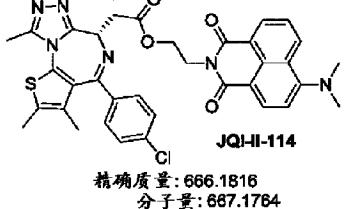
(R)-JQ1		457.1
JQ3		415.1
JQ4		519.1
JQ6		493.1
[0508]		
JQ7		579.0
JQ8		494.1
JQ10		501.1

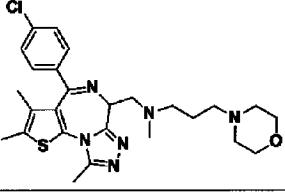
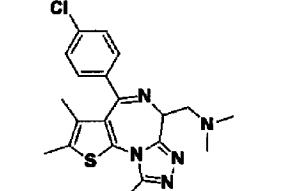
	JQ11		511.1
	JQ1-FITC		804.1
	JQ1-生物素		829.3
[0509]	JQ13		526.2
	KS1		429.1
	JQ18	 <p>化学式： C<sub>24</sub>H<sub>27</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S 精确质量: 486.14924 分子量: 487.01418</p>	487.1
	JQ19	 <p>化学式： C<sub>24</sub>H<sub>27</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S 精确质量: 470.15432 分子量: 471.01478</p>	471.1

JQ20	 <p>化学式: C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>CIN<sub>4</sub>S 精确质量: 370.10190 分子量: 370.89896 JQI-II-023</p>	370.1
JQ21	 <p>化学式: C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>CIN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S 精确质量: 442.12302 分子量: 442.96162 JQI-II-024</p>	443.1
JQ24A	 <p>化学式: C<sub>24</sub>H<sub>26</sub>CIN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S 精确质量: 455.1434 分子量: 456.0001</p>	456.1
JQ24B	 <p>化学式: C<sub>24</sub>H<sub>26</sub>CIN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S 精确质量: 455.1434 分子量: 456.0001</p>	456.1
[0510]		
JQ25	 <p>化学式: C<sub>28</sub>H<sub>24</sub>CIN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S 精确质量: 505.1339 分子量: 506.0191</p>	506.1
JQB	 <p>化学式: C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> 精确质量: 388.1899 分子量: 388.4623</p>	389.2
JQ30	 <p>化学式: C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>CIN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S 精确质量: 455.1547 分子量: 456.0034</p>	456.2

	JQ31	 <p>化学式: C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>5</sub>OS 精确质量: 455.1547 分子量: 456.0034</p>	456.2
	JQ32	 <p>化学式: C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>ClF<sub>3</sub>N<sub>5</sub>OS 精确质量: 467.0794 分子量: 467.8951</p>	468.1
[0511]	JQ33	 <p>化学式: C<sub>25</sub>H<sub>29</sub>ClN<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S 精确质量: 512.1761 分子量: 513.0548</p>	512.2
	JQ34	 <p>化学式: C<sub>26</sub>H<sub>25</sub>ClN<sub>6</sub>OS 精确质量: 504.1499 分子量: 505.0343</p>	505.1
	JQ35	 <p>化学式: C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>ClN<sub>7</sub>OS 精确质量: 539.2234 分子量: 540.1232</p>	540.2
	JQ36	 <p>化学式: C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>ClN<sub>7</sub>OS 精确质量: 539.2234 分子量: 540.1232</p>	540.2
	JQ37	 <p>化学式: C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>S 精确质量: 423.1729 分子量: 423.5312</p>	424.2

[0512]	JQ38	 <p>化学式: C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>CIN<sub>7</sub>OS 精确质量: 507.1608 分子量: 508.0382</p>	508.2
	JQ39	 <p>化学式: C<sub>26</sub>H<sub>25</sub>CIN<sub>6</sub>OS 精确质量: 504.1499 分子量: 505.0343</p>	505.1
	JQ40	 <p>化学式: C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>CIN<sub>7</sub>OS 精确质量: 511.1921 分子量: 512.0700</p>	512.2
	JQ41	 <p>化学式: C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>CIN<sub>7</sub>OS 精确质量: 539.2234 分子量: 540.1232</p>	540.2
	JQ42	 <p>化学式: C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S 精确质量: 440.1682 分子量: 440.5336</p>	441.2
	JQ43	 <p>化学式: C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>CIN<sub>7</sub>OS 精确质量: 493.1452 分子量: 494.0117</p>	494.1
	JQ44	 <p>化学式: C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>CIN<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S 精确质量: 512.1761 分子量: 513.0548</p>	513.2

[0513]	JQ45	 <p>化学式: C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>ClN<sub>7</sub>OS 精确质量: 493.1452 分子量: 494.0117</p>	494.1
	JQ46	 <p>化学式: C<sub>25</sub>H<sub>31</sub>ClN<sub>6</sub>OS 精确质量: 498.1969 分子量: 499.0712</p>	499.2
	JQ47	 <p>化学式: C<sub>32</sub>H<sub>44</sub>ClN<sub>7</sub>O<sub>2</sub>S 精确质量: 625.2968 分子量: 626.2555</p>	626.3
	JQ48	 <p>精确质量: 470.1543 分子量: 471.0148</p>	471.2
	JQ49	 <p>精确质量: 428.1074 分子量: 428.9350</p>	429.1
	JQ50	 <p>精确质量: 539.2234 分子量: 540.1232</p>	540.2
	JQ51	 <p>精确质量: 666.1816 分子量: 667.1764</p>	667.2

	JQ52		513.2 精确质量: 512.2125 分子量: 513.0978
[0514]	JQ53		400.1 精确质量: 399.1284 分子量: 399.9402

[0515] 每个化合物的光谱数据与指定结构相一致。

[0516] II. 生物学活性和治疗方法

[0517] 实例1:BET蛋白家族成员的抑制阻滞脂肪形成。

[0518] 3T3L1细胞是一种得以良好表征的细胞类型,可以分化成含有大量脂滴的脂肪细胞。在这个实验中,3T3L1细胞在BET家族蛋白JQ的化学抑制剂(附图1,上组)或该抑制剂的失活变体(附图1,下组)的渐增浓度存在下进行分化。这些细胞进行分化持续八天。在最后一天,将这些细胞用油红0进行染色,油红0用于细胞中累积脂类的染色。如在附图1中所示的,用JQ(S)对映异构体处理以剂量依赖的方式抑制脂肪形成,而失活的JQ(R)对映异构体对脂类的生成无影响。BET蛋白的抑制显著减少了脂类的累积,如通过细胞中红色染色的损失所测量的,并且这种效应是剂量依赖的。

[0519] 实例2:在脂肪细胞分化过程中,BET蛋白家族成员的抑制阻滞C/EBP $\alpha$ 和PPAR $\gamma$ 在3T3L1细胞中的表达

[0520] 将3T3L1细胞在BET蛋白家族的化学抑制剂(500nM的JQ)存在或不存在下进行分化。在分化的前四天过程中,测量在脂肪细胞分化中具有功能的两种关键 蛋白质(C/EBP $\alpha$ 和PPAR $\gamma$ )的基因表达水平。如在附图2A和2B中所示的,BET蛋白的抑制显著阻滞了C/EBP $\alpha$ 和PPAR $\gamma$ 表达的诱导。

[0521] 实例3:在肥胖症小鼠模型中,BET蛋白家族成员的抑制阻滞了体重增加。

[0522] Ob/ob小鼠是一个良好确立的鼠类肥胖症模型,该模型在正常的小鼠饲喂下会迅速增加体重。用载体(对照)或BET蛋白家族抑制剂(JQ)对五周龄的Ob/ob小鼠进行处理,持续14天。如在附图3A-3C中所示的,在Ob/ob小鼠中用50mg/kg的JQ进行处理阻滞了体重增加。如在附图3D和3E中分别所示的,JQ处理还轻度地抑制了食物摄取以及饲料效率。伴随BET蛋白家族抑制剂的饲料效率的降低表明食物摄取不能解释体重的差异。不希望受理论的约束,这种不一致可能是由于用JQ处理的Ob/ob小鼠对食物进行代谢的方式相对于未处理的Ob/ob小鼠不同所致的。

[0523] 实例4:BET蛋白家族成员的抑制降低ob/ob小鼠中肝脏以及脂肪组织的重量。

[0524] 用载体(对照)或BET蛋白家族的化学抑制剂(JQ)对五周龄的Ob/ob小鼠进行处理,持续大约两周。处理之后,对这些小鼠进行安乐死并且采集器官并称重。确定了肝脏和皮下脂肪的重量。如在附图4A和4B中所示的,用BET蛋白家族抑制剂处理的小鼠组显示肝脏(附图4A)和皮下脂肪(附图4B)的重量发生了具有统计显著性地减少。此外,采集器官之后,对肝脏进行切片并且用H&E染色。在经载体处理的小鼠中,如通过细胞内的大量的、大的白色

小滴所证明的,肝脏中存在着显著的脂滴。这个发现与肝脏脂肪变性或脂肪肝一致。相比之下,处理两周之后,用BET蛋白抑制剂处理的小鼠显示出完全的肝脏脂肪变性方面的阻滞。经JQ处理的小鼠的肝脏的组织学是形态学上正常的并且显示在肝脏中完全不存在脂类累积。这表明用JQ处理能够逆转肝脏脂肪变性。

[0525] 实例5:在肝脏中,BET蛋白家族成员的抑制减少了控制脂肪累积的基因的表达。

[0526] 用BET蛋白家族抑制剂对五周龄的Ob/ob小鼠进行处理,持续两周。处理之后,获取这些器官并且分离肝脏RNA,以便于测量基因表达谱。测量了在肝脏中的脂肪累积控制中具有功能的一组基因的表达水平。与组织学证明的肝脏中脂肪累积的减少一致,BET蛋白家族的抑制显著减少了甾醇调节结合蛋白(“SREBP”)(附图6A)、过氧化物酶体增殖因子激活型受体2(“PPAR $\gamma$ 2”)(附图6B)、脂肪酸合酶(“FAS”)(附图6C)、乙酰辅酶A羧化酶 $\beta$ (“ACC beta”)(附图6D)、硬脂酰辅酶A脱氢酶1(“SCD1”)(附图6E)以及二酰基甘油酰基转移酶1(“DGAT”)(附图6F)的表达。

[0527] 实例6:溴基结构域的抑制降低了正常饲料饲喂的小鼠中的内脏脂肪质量

[0528] 将8周龄的C57B1/6雄性小鼠饲以标准饲料饲喂8周。还开始用50mg/kg的溴基结构域抑制剂JQ1或载体对照通过每天一次的腹腔内注射给药对这些小鼠进行处理。如在附图7A-7C中所示的,处理8周之后,这些经JQ1处理的小鼠显示附睾脂肪组织质量的显著减少(附图7B),而总的体重(附图7A)和皮下脂肪组织(附图7C)与载体处理的动物类似。

[0529] 实例7:溴基结构域抑制阻滞响应于高脂肪饮食的体重增加。

[0530] 将8周龄的C57B1/6雄性小鼠开始用包含60%千卡脂肪的高脂肪饮食进行饲养。还开始用50mg/kg的溴基结构域抑制剂JQ1或载体对照通过每天一次的腹腔内注射给药对这些小鼠进行处理。每周测量体重。如在附图8中所示的,在这8周的饮食激发过程中,载体处理的小鼠增重了近10g;然而,用JQ1处理阻滞了体重的这种增加并且经JQ1处理的小鼠保持瘦态。处理3周之后,重量曲线以统计显著性(\*p<.05)的方式发生分离。

[0531] 实例8:溴基结构域的抑制保护对抗接受高脂肪饮食之后的胰岛素耐受性。

[0532] 将8周龄的C57B1/6雄性小鼠开始用包含60%千卡脂肪的高脂肪饮食进行饲养。还开始用50mg/kg的溴基结构域抑制剂JQ1或载体对照通过每天一次的腹腔内注射给药对这些小鼠进行处理。每周测量体重。然后通过胰岛素耐性测试对该小鼠的胰岛素耐受程度进行检查。高脂肪饮食并且同时JQ1或载体处理7周之后,使小鼠禁食4小时并且然后通过腹腔内注射给予单一快速灌注的胰岛素(0.5U/kg)。胰岛素注射之后,在标明的时间点测量血糖。如在附图9A中所示的,经载体处理的小鼠显示胰岛素耐受性,如通过血糖迅速返回至开始水平所显示的。相比之下,胰岛素注射之后,经JQ处理的小鼠显示达2小时的血糖的持续下降,证明了对胰岛素响应以及血糖清除的提高(附图9A)。如在附图9B中所示的,血糖变化曲线下面积显示了在这2小时的时间过程期间,葡萄糖的统计显著性地下降(p<.05)。

[0533] 其他实施方案

[0534] 从上述的描述中看出,很明显可以对在此描述的本发明进行变体和修改以使其适合于不同的用途和情况。这样的实施方案也在下述权利要求的范围内。

[0535] 在此的变量的任何定义中的一系列要素的详述包括作为所列出要素的任何单个要素或组合(或子组合)的那个变量的定义。在此的实施方案的详述包括作为任何单个实施方案或与任何其他实施方案或其部分结合的实施方案。

[0536] 通过引用将在这个说明书中提到的所有专利和出版物结合在此,其程度如同将每一个单独的专利和出版物具体并且个别地指明通过引用结合在此。在此所述的主题可以涉及美国临时专利申请61/334,991、61/370,745以及61/375,663的主题,它们各自通过本引用结合在此。

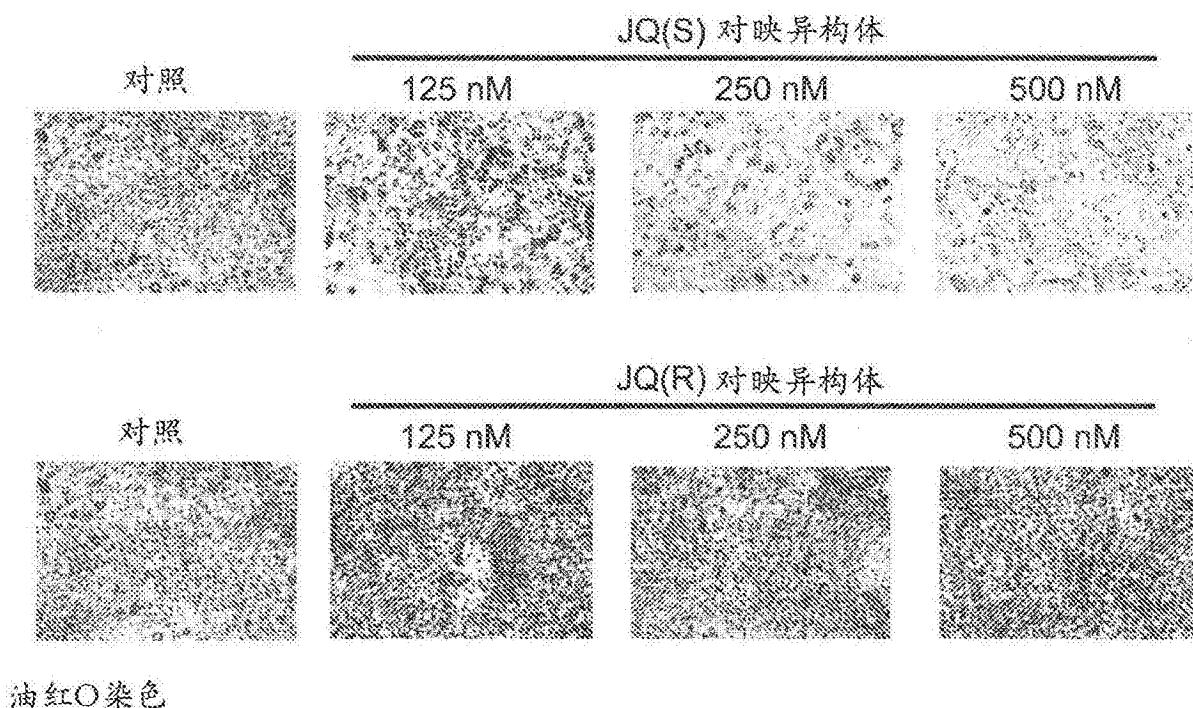
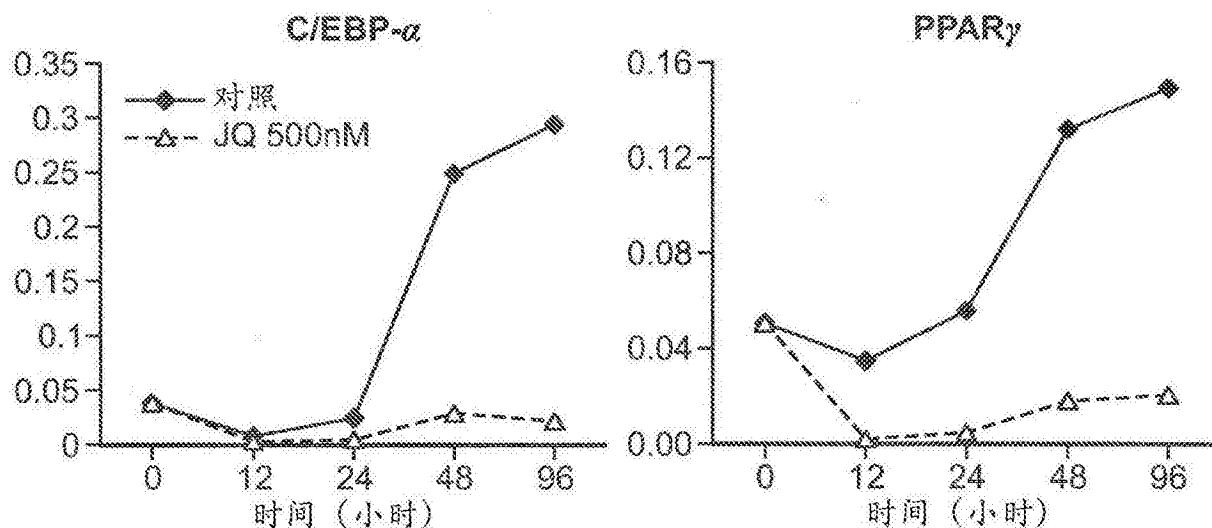


图1



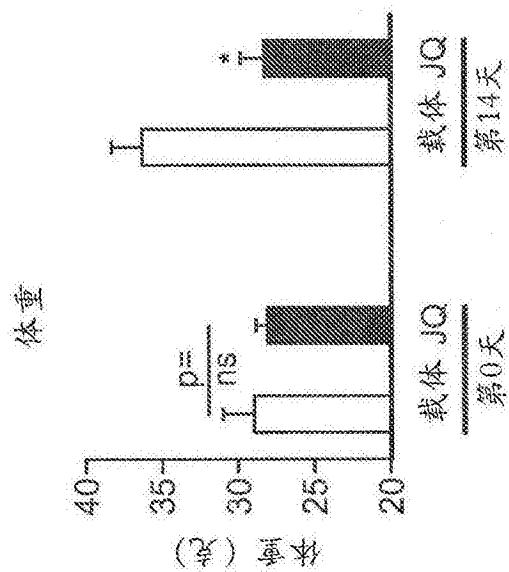


图3A

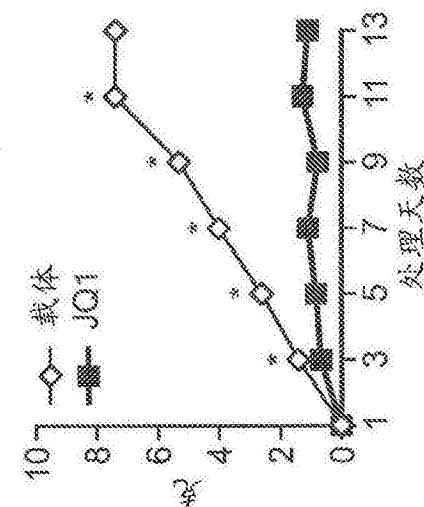


图3B

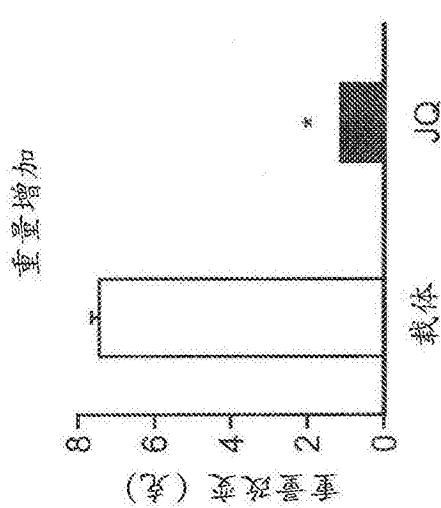


图3C

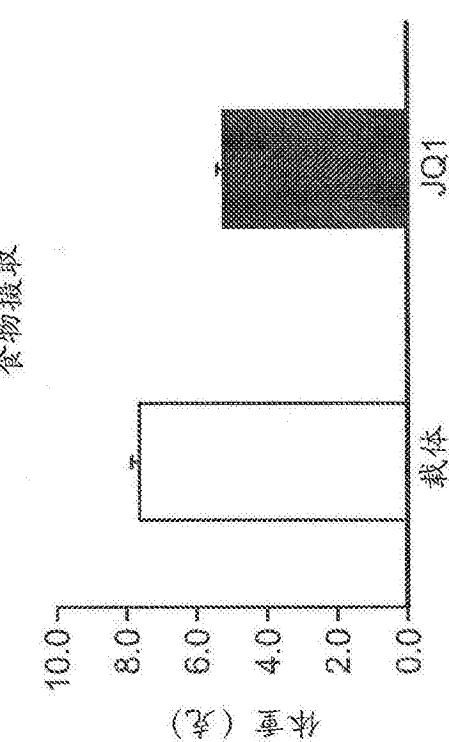


图3D

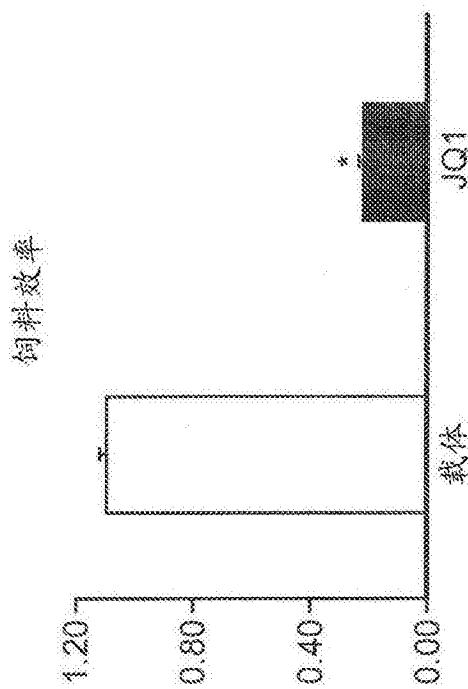


图3E

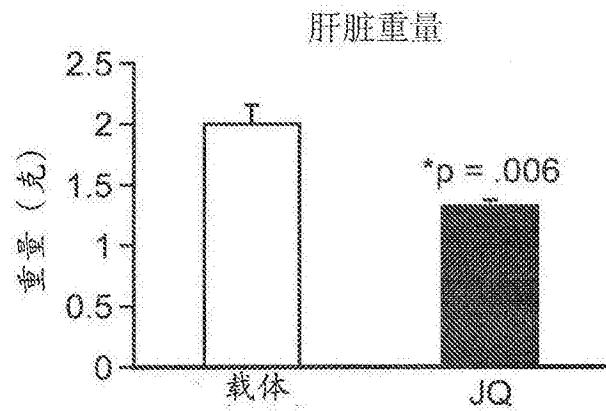


图4A

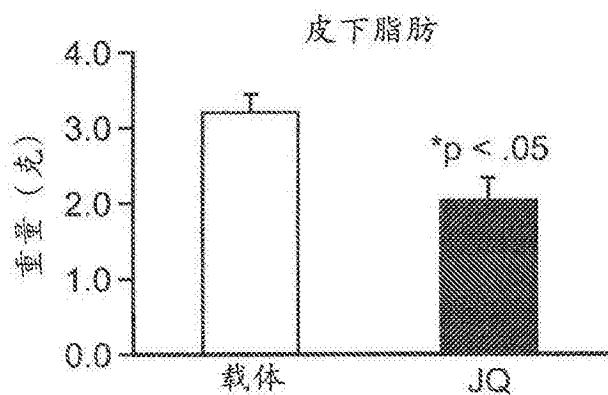


图4B

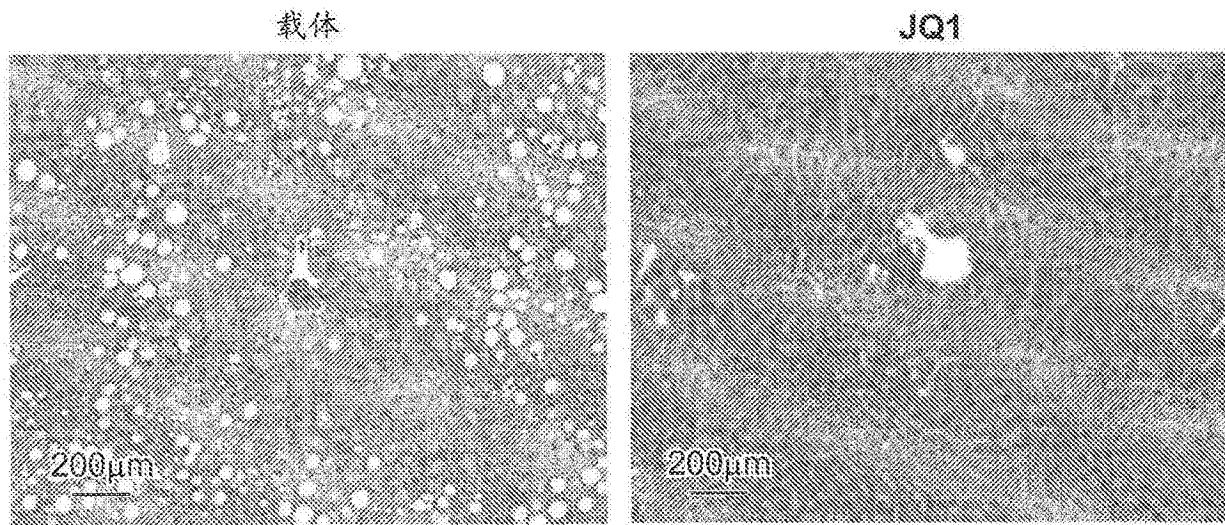


图5

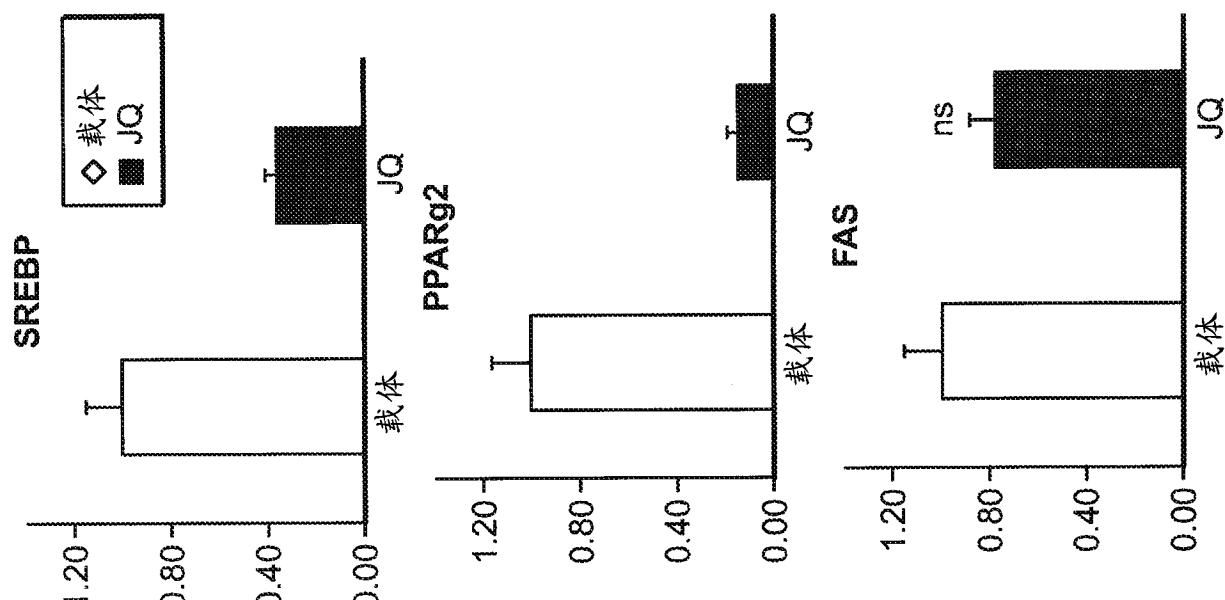


图6A

图6B

图6C

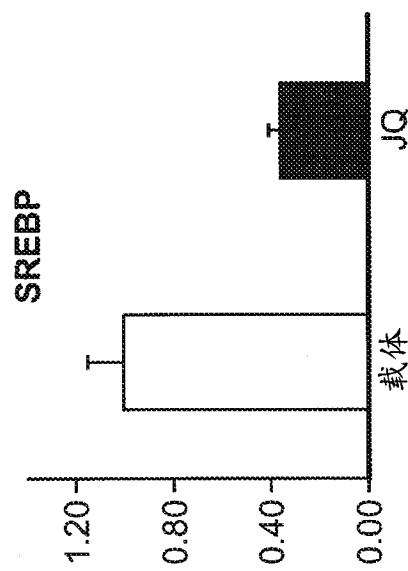


图6D

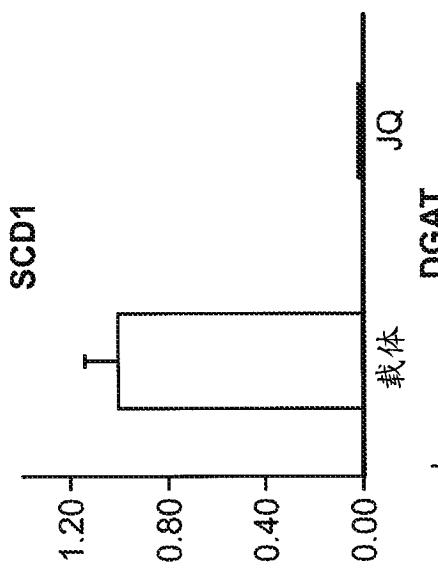


图6E

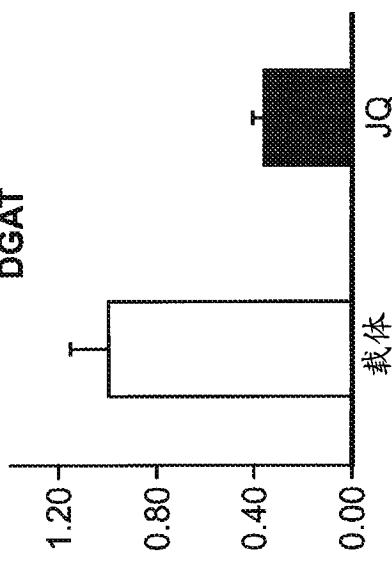


图6F

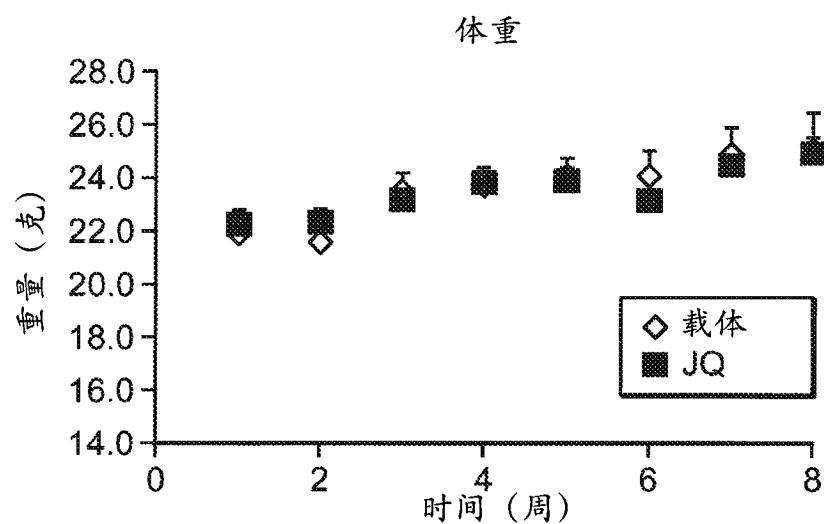


图7A

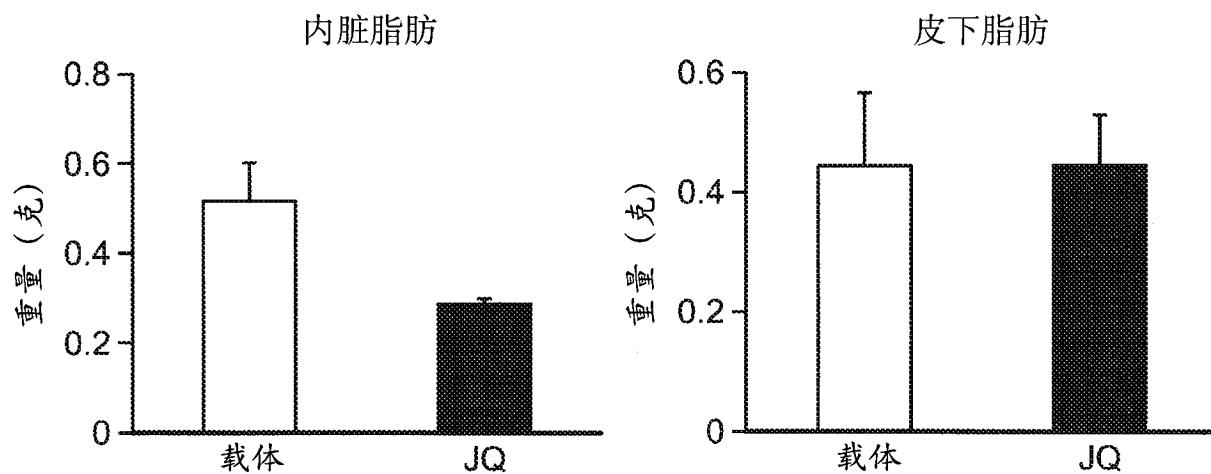


图7B

图7C

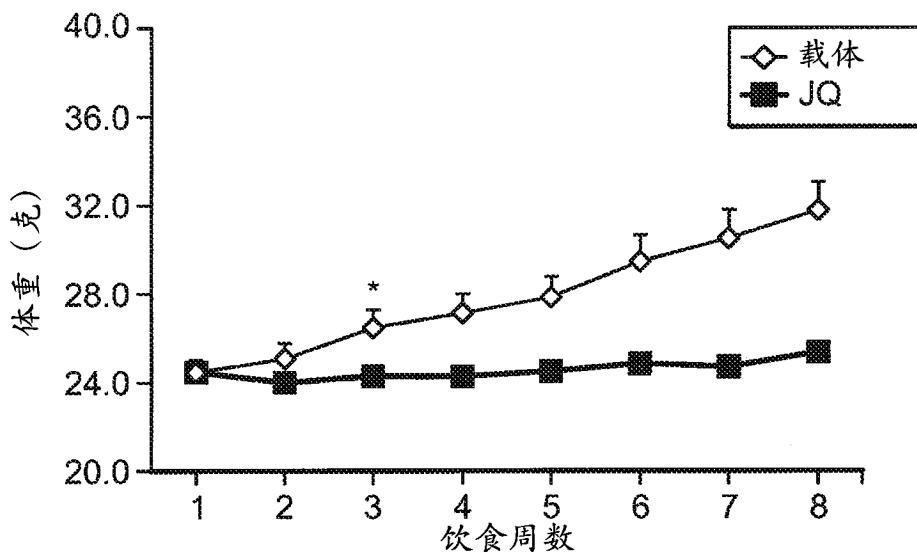


图8

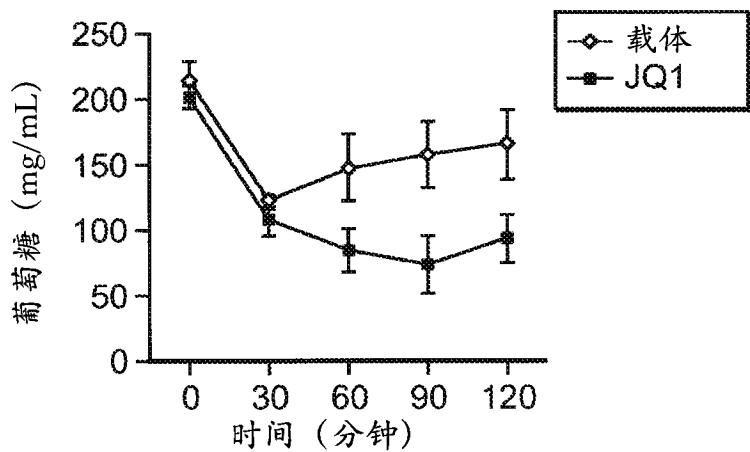


图9A

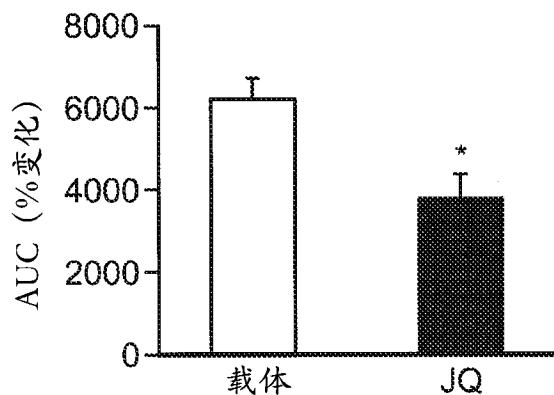


图9B