



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118791472 A

(43) 申请公布日 2024.10.18

(21) 申请号 202410878222.7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2020.12.08

G07D 405/12 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 31/517 (2006.01)

19214941.7 2019.12.10 EP

A61P 35/00 (2006.01)

G07D 207/48 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

202080084994.3 2020.12.08

(71) 申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 C·多伦特 D·S·休温斯

D·霍恩奇克 D·克鲁门纳赫

P·F·T·佩塔佐尼 J·维希曼

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

专利代理师 邵红 何茜

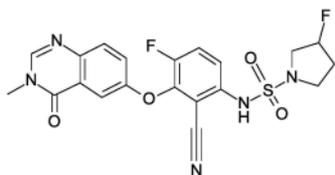
权利要求书2页 说明书19页 附图6页

(54) 发明名称

新颖甲基喹唑啉酮衍生物

(57) 摘要

本发明提供了具有通式(I)的新颖化合物,

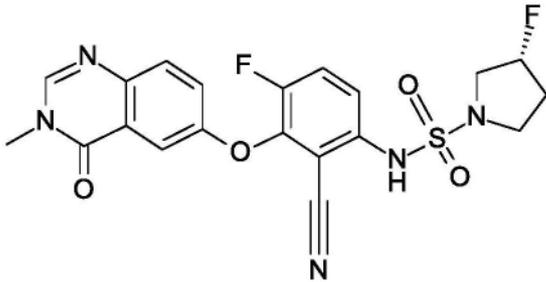


或其药用盐。式

(I).

(I) 化合物可用作药物。

1. 一种式 (Ia) 化合物



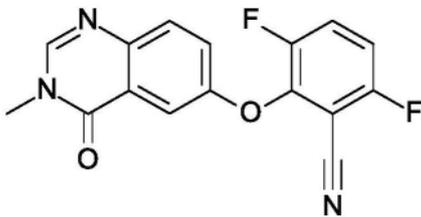
(Ia)

或其药用盐。

2. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为式 (Ia) 化合物。

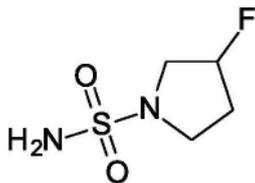
3. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物为式 (Ia) 化合物的药用盐。

4. 一种用于制备根据权利要求1至3中任一项所述的化合物的方法,其包括式 (B1) 化合物



(B1)

与式 (B2) 化合物



(B2)

在碱存在下的反应。

5. 根据权利要求1至3中任一项所述的化合物,其根据权利要求4所述的方法生产。

6. 根据权利要求1至3中任一项所述的化合物,其用作治疗活性物质。

7. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1至3中任一项所述的化合物以及治疗惰性载体。

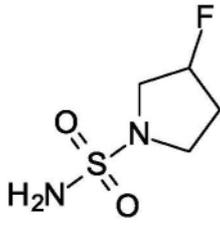
8. 根据权利要求1至3中任一项所述的化合物,其用于治疗或预防癌症。

9. 根据权利要求1至3中任一项所述的化合物,其用于治疗或预防甲状腺癌、结直肠癌、脑癌、黑色素瘤或NSCLC。

10. 根据权利要求1至3中任一项所述的化合物用于制备BRAF抑制剂药物的用途。

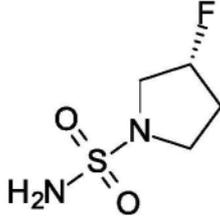
11. 根据权利要求10所述的用途,其中所述BRAF抑制剂药物用于治疗或预防甲状腺癌、结直肠癌、脑癌、黑色素瘤或NSCLC。

12. 一种式 (B2) 化合物

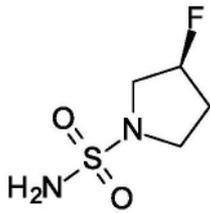


(B2)。

13. 根据权利要求12所述的化合物,其中所述化合物为



14. 根据权利要求12所述的化合物,其中所述化合物为

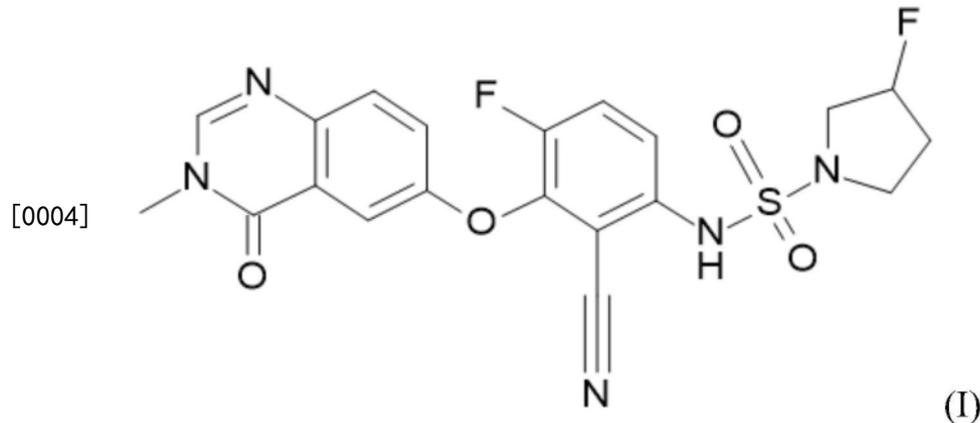


新颖甲基喹唑啉酮衍生物

[0001] 本发明是申请日为2020年12月08日、申请号为202080084994.3、发明名称为“新颖甲基喹唑啉酮衍生物”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 本发明提供了一种新颖化合物、其制备方法,包含其的药物组合物及其作为治疗活性物质的用途。本发明的化合物为BRAF抑制剂并具有反常阻断性质 (paradox breaking property)。

[0003] 本发明特别提供一种新颖的式(I)化合物



[0005] 或其药用盐。

[0006] 丝氨酸-苏氨酸激酶的迅速加速纤维肉瘤 (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma, RAF) 类包含三个成员 (ARAF、BRAF、RAF1), 其构成MAP激酶信号通路的第一节点。尽管经过MEK1及MEK2的磷酸化, 在信号传导中三种RAF同种型明显冗余, 但通常仅针对BRAF发现频繁的致癌激活突变。特别地, V600被谷氨酸或赖氨酸取代使该激酶高度激活, 而导致MAPK通路的过度刺激, 而与外部刺激无关 (Cell. 2015 Jun 18; 161 (7): 1681-1696)。

[0007] 突变型BRAF为一种可靶向的致癌驱动因子, 迄今为止, 三种BRAF抑制剂 (威罗非尼 (vemurafenib)、达拉非尼 (dabrafenib) 及康奈非尼 (encorafenib)) 已进入市场, 现已显示出对BRAFV600E阳性黑色素瘤的功效。然而, 快速获得耐药性是几乎普遍被观察到的, 且靶向治疗的治疗效益持续时间仍然有限。

[0008] 此外, 已开发的BRAF抑制剂在经BRAFV600E驱动的肿瘤中展现出抑制MAPK信号传导的不可预期的“反常”能力, 而相同的抑制剂在BRAF野生型 (WT) 模型中表现出MAPK刺激活性 (N Engl J Med 2012; 366: 271-273; and British Journal of Cancer volume 111, pages 640-645 (2014))。

[0009] 然后, 针对RAF反常进行机理研究证实了致癌性BRAFV600E以其单体细胞质形式磷酸化MEK 1/2, 而WT BRAF及RAF1激活需要复杂的事件步骤, 包括细胞膜易位及经激活的RAS (KRAS、NRAS、HRAS) 所促进的同源和/或异源二聚化作用 (Nature Reviews Cancer volume 14, pages 455-467 (2014))。

[0010] 如威罗非尼, 达拉非尼或康奈非尼的抑制剂与WT BRAF或RAF1原聚体 (protomer) 的结合迅速诱导RAF同源和/或异源二聚化作用以及新形成的RAF二聚体的膜缔合。在二聚体构象中, 一个RAF原聚体变构诱导的第二个的构象变化而导致激酶激活状态, 且重要的

是,形成不利于抑制剂结合的构象。结果,经药物治疗所诱导的二聚体通过被未结合的原聚体所操作的催化作用与通路的过度激活而促进MEK磷酸化。

[0011] RAF反常导致两个临床上相关的后果:1) BRAFi单一治疗后继发性肿瘤的生长加速(主要是角化性癌(keratochontoma)和鳞状细胞癌)(N Engl JMed 2012;366:271-273)和2)在BRAFi单一治疗及BRAFi+MEKi组合治疗中获得耐药性都是通过遗传驱动事件(包括RAS突变、BRAF扩增、二聚体作用的BRAF剪接变体的表达)而呈现激活二聚体调控的RAF信号传导(Nature Reviews Cancer volume 14,pages 455-467(2014))。因此,需要能够阻断该反常的RAF抑制剂。

[0012] 此外,目前批准的金典BRAF抑制剂威罗非尼(Mol.Pharmaceutics 2012,9,11,3236-3245)、达拉非尼(J Pharmacol Ex Ther2013,344(3)655-664)及康奈非尼(Pharmacol Res.2018;129:414-423)都具有很差的脑部渗透性。这是使用这些金典BRAF抑制剂治疗脑癌或脑部转移的主要限制。因此,需要具有改善的脑部渗透性的BRAF抑制剂。

[0013] 本发明涉及令人惊讶的发现,即式(I)的BRAF抑制剂是更有效力及选择性的BRAF抑制剂,其显示出明显更少的MAPK信号通路反常激活,同时保持高效力。对照于引起RAF反常的化合物(并可称为反常诱导剂或RAF反常诱导剂),此化合物因此可称为反常阻断剂或RAF反常阻断剂。该式(I)化合物除了是反常阻断剂之外,还具有非常强的脑部渗透特性,因此提供急需的替代疗法来治疗脑癌。

附图说明

[0014] 图1公开了在BRAF突变型细胞系A375中通过实例1所诱导的P-ERK抑制曲线。

[0015] 图2公开了在BRAF突变型细胞系A375中通过实例2所诱导的P-ERK抑制曲线。

[0016] 图3公开了在BRAF突变型细胞系A375中,通过参考化合物AR-25所诱导的P-ERK抑制曲线。

[0017] 图4公开了在WT BRAF细胞系HCT-116中,通过实例1所诱导的P-ERK激活曲线。为了进行比较,也显示以对照化合物达拉非尼(反常诱导剂)及PLX-8394(反常阻断剂)处理所产生的数据。

[0018] 图5公开了在WT BRAF细胞系HCT-116中,通过实例2所诱导的P-ERK激活曲线。为了进行比较,也显示以对照化合物达拉非尼(反常诱导剂)及PLX-8394(反常阻断剂)处理所产生的数据。

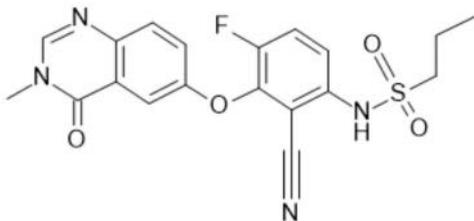
[0019] 图6公开了在WT BRAF细胞系HCT-116中,经参考化合物AR-25所诱导的P-ERK激活曲线。为了进行比较,也显示以对照化合物达拉非尼(反常诱导剂)及PLX-8394(反常阻断剂)处理所产生的数据。

[0020] 图7描绘由第一代BRAF抑制剂所诱导的MAP激酶通路的反常激活。BRAF是MAP激酶信号通路第一节点的一部分,而突变型BRAF是致癌驱动因子(左)。在BRAF V600E/K突变的肿瘤中,BRAF信号作为单体,这种情况是蛋白质被第一代BRAF抑制剂抑制(中)。第一代BRAF抑制剂促进BRAF WT同源和/或异源二聚化作用(上,右)。在这种情况下,未被BRAF抑制剂占据的原聚体获得了不利于抑制剂结合的构象(中,右)。在这种情况下,以第一代BRAF抑制剂治疗的结果是在BRAF WT细胞中反常地增加的MAPK激活和随之而来的肿瘤生长(底部,右)。

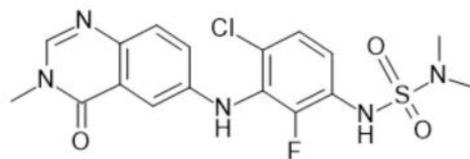
[0021] 图8公开了化合物实例1从每天1mg/kg开始的引发剂量依赖性抗肿瘤活性,证明有

效的脑部通透性介导的功效。

[0022] W02012/118492公开了参考化合物AR-25作为实例25,AR-30作为实例30及AR-31作为实例31。

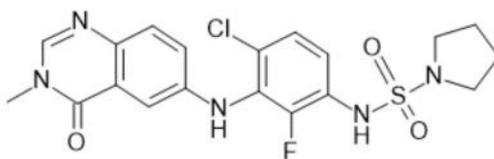


AR-25



AR-30

[0023]



AR-31

[0024] 术语“药用盐”意指保留游离碱或游离酸的生物有效性及特性,且并非在生物学上或在其他方面不期望的该式(I)化合物的那些盐。这盐是以无机酸形成,例如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等、特别是盐酸,以及以有机酸形成,例如乙酸、丙酸、乙醇酸、丙酮酸、草酸、马来酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸、水杨酸、N-乙酰半胱氨酸等。此外,这些盐可以通过向游离酸中添加无机碱或有机碱来制备。衍生自无机碱的盐包括但不限于钠、钾、锂、铵、钙、镁盐等。衍生自有机碱的盐包括但不限于伯胺、仲胺、和叔胺的盐、经取代的胺,包括天然存在的经取代的胺、环胺及碱性离子交换树脂,例如异丙胺、三甲胺、二乙胺、三乙胺、三丙胺、乙醇胺、赖氨酸、精氨酸、N-乙基哌啶、哌啶、聚亚胺树脂等。式(I)化合物的特定药用盐为盐酸盐、甲磺酸盐及柠檬酸盐。

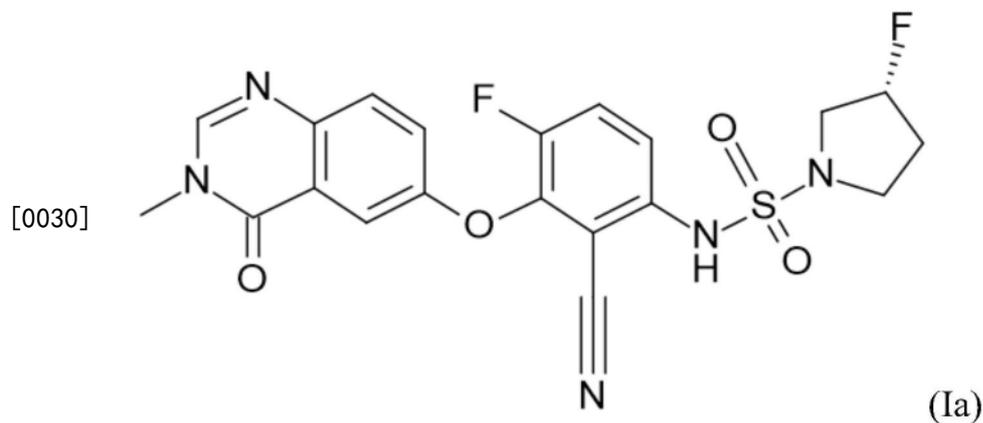
[0025] 该式(I)化合物含有一个不对称中心,且其可以光学纯对映异构体、对映异构体的混合物(例如外消旋体)的形式存在。

[0026] 依据嵌-英格-普洛(Cahn-Ingold-Prelog)序列法则,不对称碳原子可为“R”或“S”构型。

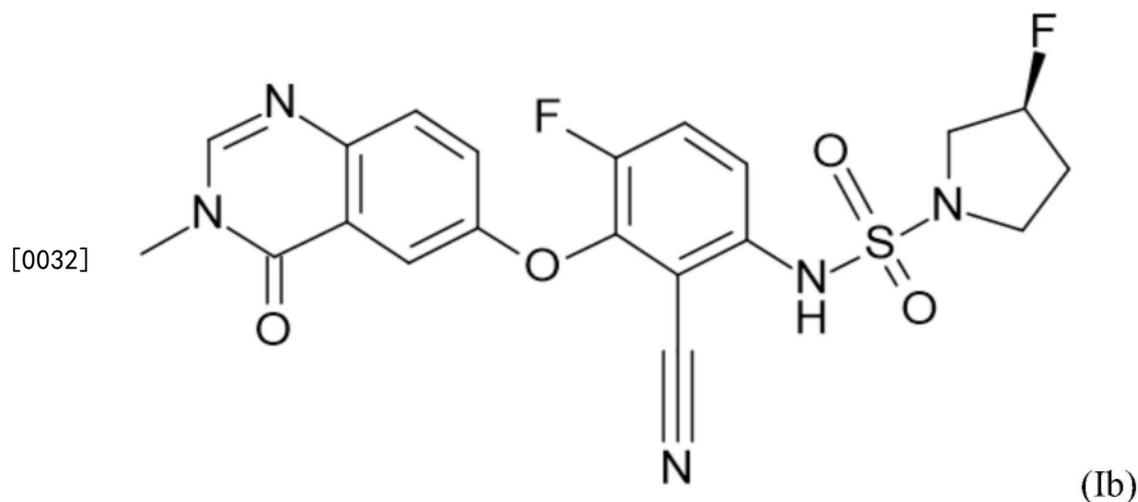
[0027] 另外,本发明的实施例为如本文所述的根据式(I)化合物或药用盐,特别是如本文所述的根据式(I)化合物,更特别是如本文所述的式(Ia)或(Ib)化合物。

[0028] 本发明也涉及该式(I)化合物的药用盐,其中该药用盐可选自盐酸盐、甲磺酸盐及柠檬酸盐。

[0029] 另外,本发明的一个实施例为式(Ia)化合物。



[0031] 另外,本发明的一个实施例为式 (Ib) 化合物。

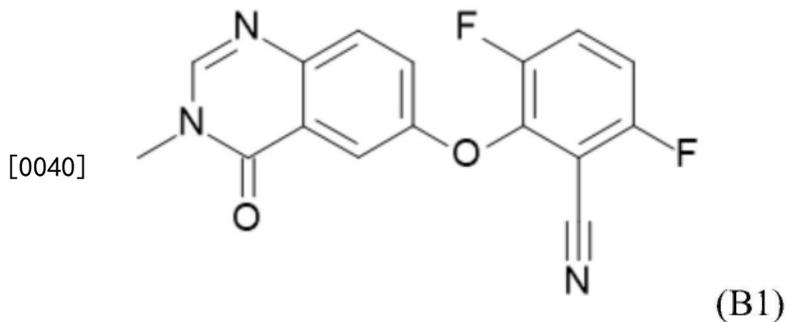
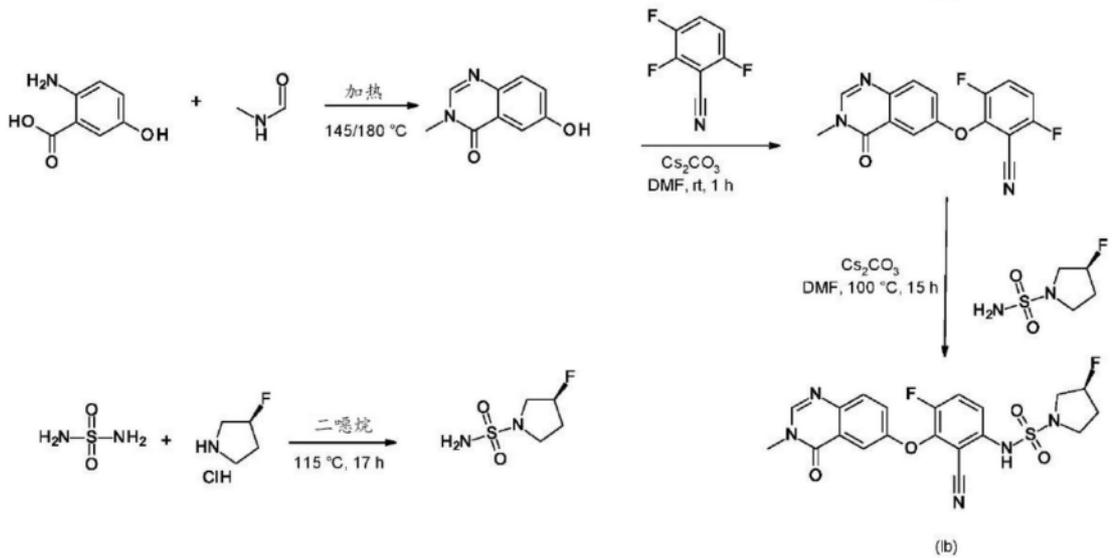
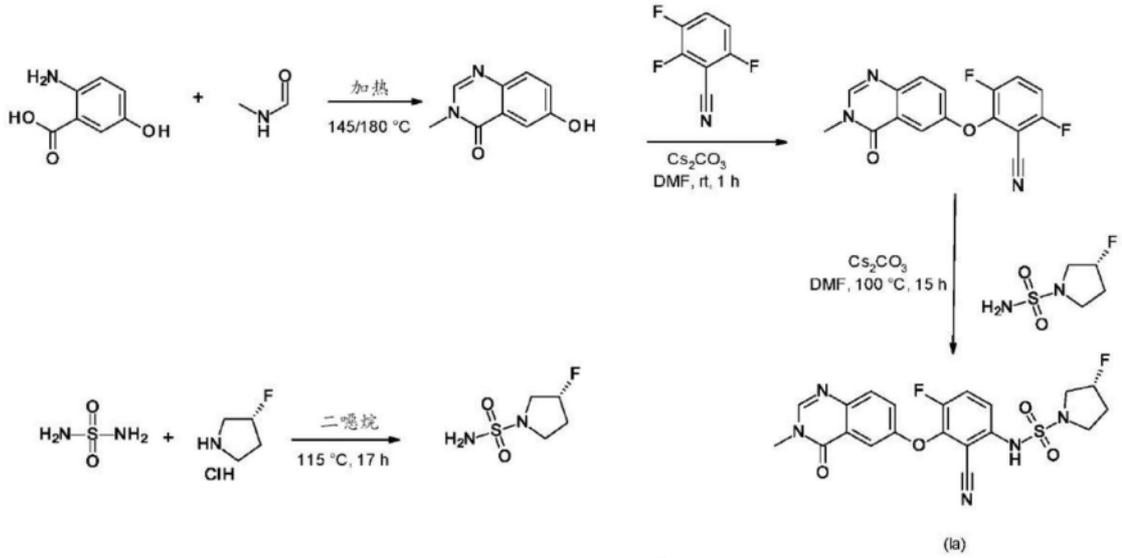


[0033] 如本文所述的式 (Ia) 及 (Ib) 化合物的生产程序也为本发明的目的。

[0034] 本发明的该式 (I) 化合物的制备可按顺序或会聚成路线进行。本发明的合成示出于以下通用方案中。进行所得产物的反应及纯化所需的技术为本领域技术人员已知的。

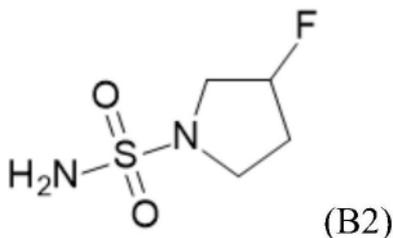
[0035] 更详细地,该式 (I) 化合物可通过以下给定的方法、通过实例中所给定的方法或通过类似方法来生产。各个反应步骤的适当的反应条件为本领域技术人员已知的。反应顺序不限于方案1中所示出的顺序,然而,视起始材料及其相应反应性而定,反应步骤的顺序可自由改变。起始材料是可商购的,或可通过类似于下列给定的方法的方法、通过说明书或实例中所引用的参考文献中描述的方法或通过本领域已知的方法制备。

[0036] 方案1



[0041] 与式 (B2) 化合物反应,

[0042]



[0043] 上述反应是在碱存在下进行。

[0044] 反应可在溶剂中方便地进行。溶剂可以为例如DMF。

[0045] 反应可在碱的存在下方便地进行,该碱可例如为碳酸铯。

[0046] 用于反应的方便条件可在约30°C至约150°C之间,特别是在约50°C至约130°C之间,更特别是在约70°C至约120°C之间。方便的条件为在约100°C下约1小时至约48小时之间,特别是约2小时至约20小时之间。

[0047] 当根据本发明的程序生产时,本发明还涉及根据本发明的化合物。

[0048] 本发明还特别涉及:

[0049] 如本文所公开的式(I)化合物或其药用盐,其用于治疗活性物质;

[0050] 药物组合物,其包含如本文中所述的式(I)化合物或其药用盐及治疗上的惰性载体;

[0051] 如本文所述的式(I)化合物或其药用盐,其用于治疗或预防癌症;

[0052] 如本文所述的式(I)化合物或其药用盐,其用于治疗或预防甲状腺癌、结直肠癌、脑癌、黑素瘤或非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC);

[0053] 如本文所述的式(I)化合物或其药用盐于治疗或预防甲状腺癌、结直肠癌、脑癌、黑素瘤或NSCLC的用途;

[0054] 如本文所述的式(I)化合物或其药用盐于制备用于治疗或预防甲状腺癌、结直肠癌、脑癌、黑素瘤或NSCLC的药物的用途;

[0055] 一种用于治疗癌症的方法,该方法包含将有效量的本文所述的式(I)化合物或其药用盐施用于有此需要的患者;和

[0056] 一种治疗或预防甲状腺癌、结直肠癌、脑癌、黑素瘤或NSCLC的方法,该方法包含将有效量的本文所述的式(I)化合物或其药用盐施用于有此需要的患者。

[0057] 本发明某些实施例涉及如本文所述的该式(I)化合物或其药用盐,用于治疗和/或预防性治疗癌症的用途,特别是BRAF突变型驱动癌症,更特别是甲状腺癌、结直肠癌、脑癌、黑素瘤或NSCLC。

[0058] 本发明某些实施例涉及如本文所述的该式(I)化合物或其药用盐,用于制备用于治疗性和/或预防性治疗癌症的药物,特别是用于BRAF突变型驱动癌症,更特别地为甲状腺癌、结直肠癌、脑癌、黑素瘤或NSCLC。

[0059] 本发明某些实施例涉及一种药物组合物,其包含如本文中所述的该式(I)化合物,或其药用盐,以及药用赋形剂。

[0060] 本发明某些实施例涉及用于治疗性和/或预防性治疗癌症的方法,特别是对于BRAF突变型驱动癌症,更特别地为甲状腺癌、结直肠癌、脑癌、黑素瘤或非小细胞肺癌(NSCLC),其通过将有效量的该式(I)化合物或其药用盐施用于有此需要的患者。

[0061] 本发明某些实施例涉及如本文所述的该式(I)化合物或其药用盐,其用于治疗性和/

或预防性治疗罹患BRAF突变型驱动的癌症病患的药物,特别是罹患甲状腺癌、结直肠癌、脑癌、黑素瘤或NSCLC,包含确定在该病患中的BRAF突变状态,然后向该病患施用如本文所述的式(I)化合物或其药用盐。

[0062] 本发明的某些实施例涉及如本文所述的该式(I)化合物,或其药用盐,其用作治疗和/或预防脑部转移的药物。

[0063] 此外,在适用的情况下,本发明包括该式(I)化合物在其对应的氙化形式下所有取代基。

[0064] 此外,在适用的情况下,本发明包括该式(I)化合物的其对应的氙化形式下所有取代基。

[0065] 本发明某些实施例关于本文所述的该式(I)化合物或其药用盐,其中至少一个取代基包含至少一个放射性同位素。放射性同位素的具体实例为²H、³H、¹³C、¹⁴C和¹⁸F。

[0066] 此外,本发明包括该式(I)化合物的所有光学异构体,即非对映异构体、非对映异构体混合物、外消旋混合物、所有其对应的对映异构体和/或互变异构体及其溶剂化物(如适用)。

[0067] 如果需要,可分离本发明化合物的外消旋混合物,从而分离出各个对映异构体。可通过本技术领域已知的方法进行分离,例如将化合物的外消旋混合物与对映异构性纯的化合物偶合以形成非对映异构体混合物,然后通过标准方法,例如分级结晶作用或色谱法分离各个的非对映异构体。

[0068] 在提供光学纯对映异构体的实施例中,光学纯对映异构体意指化合物包含>90%的所需异构体重量,特别是>95%的所需异构体重量,或更特别是>99%的所需异构体重量,该重量百分比基于化合物的异构体的总重量。手性纯化合物或手性富集化合物可以通过手性选择性合成或通过对映异构体的分离来制备。对映异构体分离可在最终产物上或在适当的中间体上进行。

[0069] 本发明的另一实施例提供含有本发明化合物及治疗惰性载体、稀释剂或赋形剂的药物组合物或药物,以及使用本发明化合物制备此类组合物及药物的方法。在一个实例中,可通过在周围温度下于适当pH及在所需的纯度,将该式(I)化合物与生理用载体(即在用于盖仑给药形式的剂量及浓度下对接受者无毒的载体)混合来配制。制剂的pH主要取决于化合物的具体的用途及浓度,但优选范围为约pH 3至约pH 8。在一个实例中,式(I)化合物在pH 5的乙酸盐缓冲液中配制。在另一实施例中,该式(I)化合物是无菌的。该化合物可例如以固体或无定形组合物、冻干制剂或水溶液形式存储。

[0070] 以与优良医学实践一致的方式配制、给药及施用组合物。在此情况下考虑的因素包括正在治疗的特定病症、正在治疗的特定哺乳动物、个体病患的临床症状、疾病的原因、药剂的给药部位、给药方法、给药时间表及其他医学从业人员已知的因素。

[0071] 此外,当根据所述的任何一种程序生产时,本发明的实施例为如本文所述的该式(I)化合物。

[0072] 测定程序

[0073] 材料

[0074] 补充有L-谷氨酰胺的DMEM无酚红培养基购自(Thermo Fisher Scientific)。胎牛血清(FBS)购自VWR。高级ERK磷酸-T202/Y204试剂盒-10,000测试购自Cisbio cat#

64AERPEH。A375及HCT116细胞最初是从ATCC获得,并由Roche寄库存存储。384-孔微量多孔盘购自Greiner Bio-One,384-孔(带有盖子,HiBase,低容量cat 784-080)。

[0075] 在A375或HCT116细胞中用于P-ERK确定的HTRF测定法

[0076] A375是表达V600E突变的BRAF的细胞癌模型,而HCT116是表达WT BRAF的细胞癌模型。第一代BRAF抑制剂,例如达拉非尼对肿瘤细胞诱导出反常作用,因为其抑制V600E突变的BRAF细胞(例如A375)的生长,而其却激活WT BRAF细胞(例如HCT 116)的生长。以下报导ERK 1,2磷酸化(MAPK通路的磷酸化级联的末端成员)作为MAPK通路激活状态的主要读数。在测定之前,将A375及HCT116细胞系维持在补充有10%胎牛血清(FBS)的DMEM无酚红培养基中。化合物处理后,通过测量FRET荧光信号来测定P-ERK水平,该信号是由上述试剂盒(Cisbio cat#64AERPEH)中提供的两种抗体在Thr202/Tyr204处磷酸化时选择性结合在ERK蛋白上所引起的。简而言之,将含8,000个细胞/孔的12 μ l培养基/孔接种于384孔板中,并置于培养箱(37 $^{\circ}$ C,5%的CO₂湿润的空气)中过夜,次日,将平板以一式两份的测试化合物、达拉非尼及PLX8394(后者作为对照)于下列最终药物浓度处理:10 μ M-3 μ M-1 μ M-0.3 μ M-0.1 μ M-0.03 μ M-0.01 μ M-0.003 μ M-0.001 μ M,所有孔均进行DMSO归一化,药物孵育1小时。然后,将试剂盒所附的4 μ l 4X溶解缓冲液添加至孔中,然后将平板离心30秒(300rcf),并在室温下于平板振荡器上孵育1小时。

[0077] 孵育结束时,添加4 μ L/孔的高级P-ERK抗体溶液(根据制造商的说明书制备),然后将4 μ L/孔的穴状化合物(cryptate)P-ERK抗体溶液(根据制造商的说明书制备)(Cisbio cat#64AERPEH)添加至测试孔中。

[0078] 为了获得适当的数据归一化对照,下表中所报告的未经药物处理的孔总是包含在每个平板中(根据制造商的说明书):

[0079] p-ERK HTRF孔组合物(μ l):

阴性对照	阳性对照	中性对照	cpd	空白试样	
-	-	12	12	12	细胞
12	-	-	-	-	培养基
-	-	-	<0.05	-	Cpd
-	16	-	-	-	对照溶解液(即用型)
4	-	4	4	4	4x 溶解缓冲液
4	4	4	4	-	高级 p-ERK 抗体溶液
-	-	-	-	4	高级 p-ERK1/2 穴状化合物 (Cryptate) 抗体溶液。
20	20	20	20	20	孔中总体积

[0080] 然后将平板在300rcf下离心30秒,密封以防止蒸发,并在黑暗中于室温下孵育过夜。

[0082] 然后分析平板,并通过Pherastast FSX (BMG Labtech) 仪器在665及620nm处收集荧光发射值。

[0083] 根据公式比率=信号(620nm)/信号(625nm)*10,000处理所获得的荧光值,然后将

空白试样的平均值减去所有数值。

[0084] 对于A375细胞(BRAF抑制),将仅通过DMSO处理的细胞所得出的比率(减去空白试样)平均值视为100%,并通过将10 μ M达拉非尼处理的细胞所得出的比率(减去空白试样)平均值视为0%,将数据归一化。将经归一化的点的平均值与S形曲线拟合并确定IC50。结果示出于表1-2及图1-3。

[0085] 对于HCT116细胞(BRAF激活),将仅通过DMSO处理的细胞所得出的比率(减去空白试样)平均值视为0%,并通过将达拉非尼处理的细胞在提供最高信号的浓度所得出的比率(减去空白试样)平均值视为100%,将数据归一化。将单独的点与S形或钟形曲线拟合,并确定相较于最大达拉非尼介导的激活的激活百分比。EC50为达到达拉非尼所获得的最大值激活的50%时的浓度。结果示出于表2及图4-6。

[0086] 若激活未到达达拉非尼所达到的最大值的50%,则EC50计算并不适用。

[0087] 通过评估测试化合物在测试剂量范围内诱导其最大P-ERK信号的百分比(以达拉非尼所产生的最高信号的百分比方式),确定达拉非尼产生最大反常诱导作用的百分比。

实施例	Kd (μ M)				
	BRAF	BRAF V600E	CRAF	CSK	LCK
1	0.0006	0.0012	0.0017	23.3	40
2	0.0013	0.0009	0.0012	9.16	20.12
AR-25	0.0001	0.0002	0.0003	>40	>40
AR-30	0.1740	0.5040	0.8220	8.007	10.352
AR-31	0.0459	0.1190	0.1903	1.208	11.975

[0088] 表1:当与AR-30及AR-31相比,实例1及实例2对RAF激酶具有高亲和力,且对C末端Src激酶(C-terminal Src kinase,CSK)及淋巴细胞特异性酪氨酸蛋白激酶(lymphocyte-specific tyrosine protein kinase,LCK)具有高选择性。

实施 例	pERK IC ₅₀ (nM)	p-ERK EC ₅₀ (nM) 化合物诱导 p-ERK 激活是达拉非 尼所诱导的激活的 50% 时的浓度 (nM) (达拉非尼为阳性对照反常 诱导剂)	达拉非尼的最 大反常诱导效 果的百分比
	A375	HCT-116	
1	6.9	不适用	43.65%
2	10.6	不适用	46.2%
AR-25	1.1	9.6	103%
AR-30	406	> 1000	59%
AR-31	311	> 1000	51.2%

[0091] 表2:实例1及实例2在表达WT BRAF的HCT-116癌细胞中阻断反常RAF激活。当与达拉非尼或AR-25相比,最大反常诱导效果降低到小于50%。CSF K_{p,uu}测量用于评估脑部渗透能力

[0092] CSF K_{p,uu}是脑脊液(CSF)中浓度:未结合血浆暴露的比率,而K_{p,uu}值≥1表示良好的脑部渗透。对于化合物实例1,小鼠及大鼠的单一口服剂量研究通过LC-MS/MS测量连续的血浆及CSF浓度(至给药后24小时),以计算CSF K_{p,uu}。对于大鼠及迷你猪的多次口服剂量研究,通过LC-MS/MS测量接近T_{max}(最后一次给药后3小时)的血浆及CSF浓度,并用于计算CSF K_{p,uu}。

	值	类
分子量/极性表面积	461 / 99	-
BCS (生物制药分类系统)	-	2
*P-gp 顶端外流率	1.5	低
血浆蛋白结合 (%) (小鼠、大鼠、迷你猪、猴、人类)	> 99	很高

[0094]	小鼠 CSF $K_{p,uu}$ 单次口服剂量 10 mg/kg	> 1	高
	大鼠 CSF $K_{p,uu}$ 单次口服剂量 20 mg/kg	> 1	高
	大鼠 CSF $K_{p,uu}$ 300 mg/kg/天 (2 周 DRF) 多次口服剂量	> 1	高
	迷你猪 CSF $K_{p,uu}$ 300 mg/kg/天 (2 周 DRF) 多次口服剂量	> 1	高

[0095] *以MDR1转染的LLC-PK1细胞系,在存在/不存在P-gp抑制剂的情况下进行评估

[0096] 表3:化合物实例1的物理化学及ADME性质。CSF $K_{p,uu}$ 值 ≥ 1 表示实例1的脑部渗透力优异。此外,在单一剂量大鼠药物动力学(PK)研究中,在给药后24小时内评估血浆与CSF的时间关系,并表明其在CSF中的快速且广泛的分布。

[0097] 颅内植入的A375-Luc

[0098] 将组成性表达荧光素酶的A375 BRAF V600E癌细胞颅内注射至免疫功能低下的小鼠内。从颅内注射的第7天开始以化合物实例1治疗,并持续2周。不同组别分别每日口服施用1mg/kg、5mg/kg及20mg/kg的实例1。结果示出于图8。

[0099] 该式(I)化合物及其药用盐可用作药物(例如以药物制剂的形式)。药物制剂可经内部施用,例如经口(例如以片剂、包衣片、糖衣丸、硬质及软质明胶胶囊、溶液、乳剂或悬浮液的形式)、经鼻(例如以鼻喷雾剂的形式)、经直肠(例如以栓剂的形式)或经眼部局部(例如以溶液、软膏、凝胶或水溶性聚合物插入物的形式)。然而,给药也可以通过肠胃外途径进行,例如肌内、静脉内或眼内(例如以无菌注射液的形式)。

[0100] 该式(I)化合物或其药用盐可与药学上惰性、无机或有机佐剂一起加工,用于制造片剂、包衣片、糖衣丸、硬质明胶胶囊、注射溶液或局部制剂,可将乳糖、玉米淀粉或其衍生物、滑石、硬脂酸或其盐等用作例如片剂、糖衣丸及硬质明胶胶囊的此类佐剂。

[0101] 软质明胶胶囊的适当佐剂为例如植物油、蜡、脂肪、半固体物质及液体多元醇等。

[0102] 用于生产溶液和糖浆的合适佐剂为例如水、多元醇、蔗糖、转化糖、葡萄糖等。

[0103] 注射溶液的适合佐剂为例如水、醇类、多元醇、甘油、植物油等。

[0104] 栓剂的合适佐剂为例如天然或硬化油、蜡、脂肪、半固体或液体多元醇等。

[0105] 用于局部眼用制剂的适当佐剂为例如环糊精、甘露醇或本领域已知的许多其他载体及赋形剂。

[0106] 此外,药物制剂可含有防腐剂、增溶剂、增黏物质、稳定剂、湿润剂、乳化剂、甜味剂、着色剂、调味剂、用于改变渗透压的盐、缓冲剂、掩蔽剂或抗氧化剂。其还可以含有其它有治疗价值的物质。

[0107] 剂量可以在较宽的范围内变化且当然在每个特定的情况下将适合于个人的需要。一般而言,在口服给药的情况下,每公斤体重约0.1mg至20mg,优选为每公斤体重约0.5mg至4mg(例如每人约300mg)的每日剂量优选分成1至3个单独剂量(其可由例如相同量组成)应该是适当的。在局部给药的情况下,制剂可包含按药物重量的0.001%至15%,且可在0.1至25mg之间的所需剂量可每天或每周单一剂量给药,或每天多剂量(2至4剂量)给药,或每周

多剂量给药,然而,显而易见的是,当表明有指示时,可以超过本文给定的上限或下限。

[0108] 药物组合物

[0109] 该式 (I) 化合物及其药用盐可用作治疗活性物质,例如,以药物制剂的形式。该药物制剂可以口服给药,例如以片剂、包衣片、糖衣丸、硬质明胶胶囊、溶液、乳液或悬浮液的形式给药。然而,也可以直肠给药,例如以栓剂的形式,或者肠胃外给药,例如以注射溶液的形式。

[0110] 该式 (I) 化合物及其药用盐可与医药上惰性、无机或有机载体一起加工用于制造药物制剂。可将乳糖、玉米淀粉或其衍生物、滑石、硬脂酸或其盐等用作例如片剂、包衣片、糖衣丸及硬质明胶胶囊的此类载体。软质明胶胶囊的适当载体为例如植物油、蜡、脂肪、半固体及液体多元醇等。然而,依据活性物质的性质,在软质明胶胶囊的情况下,通常不需要载体。用于产生溶液及糖浆的适当载体为例如水、多元醇、甘油、植物油等。用于栓剂的适当载体为例如天然或硬化油、蜡、脂肪、半液体或液体多元醇等。

[0111] 此外,药物制剂可包含药用佐剂物质,例如防腐剂、增溶剂、稳定剂、湿润剂、乳化剂、甜味剂、着色剂、调味剂、用于改变渗透压的盐、缓冲剂、掩蔽剂或抗氧化剂。其还可以含有其它有治疗价值的物质。

[0112] 本发明还提供包含该式 (I) 化合物或其药用盐及治疗惰性载体的药物,以及其等的制造程序,包括促使一种或多种式 (I) 化合物和/或其药用盐,如果需要的话,与一种或多种其他有治疗价值的物质和一种或多种治疗惰性载体一起形成盖仑 (galenical) 给药形式。

[0113] 剂量可在较宽界限内改变,且当然在各种情况下都必需根据个人需要调整。在口服给药的情况下,成人的剂量可在每天约0.01mg至约1,000mg的式 (I) 化合物或其对应量的药用盐之间改变。每日剂量可以单一剂量或均分剂量给药,且此外,当发现有指示时,也可超过上限。

[0114] 以下实例说明了本发明而并非限制本发明,而是仅作为其代表。药物制剂方便地含有约1-500mg,特别是1-100mg的式 (I) 化合物。根据本发明的组合物的实例为:

[0115] 实例A

[0116] 以下组合物的片剂以通常的方式制造:

成分	mg/片剂			
	5	25	100	500
一种式 (I) 化合物	5	25	100	500
无水乳糖 DTG	125	105	30	150
Sta-Rx 1500	6	6	6	60
微晶纤维素	30	30	30	450
硬脂酸镁	1	1	1	1
总计	167	167	167	831

[0117] 表4:可能的片剂组合物

[0118] 制造程序

[0119] 1. 混合成分1、成分2、成分3及成分4,并以纯水制粒。

- [0121] 2. 在50°C干燥颗粒。
 [0122] 3. 使颗粒通过适当的研磨设备。
 [0123] 4. 加入成分5并混合3分钟;在合适的加压机上压缩。

[0124] 实例B-1

[0125] 制造具有以下组合物的胶囊:

成分	mg/胶囊			
	5	25	100	500
[0126] 一种式 (I) 化合物	5	25	100	500
含水乳糖	159	123	148	-

[0127] 玉米淀粉	25	35	40	70
滑石	10	15	10	25
硬脂酸镁	1	2	2	5
总计	200	200	300	600

[0128] 表5:可能的胶囊成分组合物

[0129] 制造程序

[0130] 1. 在适当的混合器中将成分1、成分2及成分3混合30分钟。

[0131] 2. 添加成分4及成分5,并混合3分钟。

[0132] 3. 充填入适当胶囊中。

[0133] 将该式 (I) 化合物、乳糖及玉米淀粉首先在混合器中混合,然后在粉碎机中混合。将混合物返回混合器;向其中添加滑石并充分混合。将混合物通过机器填充至合适的胶囊中,例如硬质明胶胶囊。

[0134] 实例B-2

[0135] 制造具有以下组合物的软质明胶胶囊:

成分	mg/胶囊
[0136] 一种式 (I) 化合物	5
黄蜡	8
氢化大豆油	8
部分氢化的植物油	34
大豆油	110
总计	165

[0137] 表6:可能的软质明胶胶囊成分组合物

成分	mg/胶囊
[0138] 明胶	75
甘油85%	32
Karion 83	8(干物质)
二氧化钛	0.4

氧化铁黄	1.1
总计	116.5

[0139] 表7:可能的软质明胶胶囊组合物

[0140] 制造程序

[0141] 将该式 (I) 化合物溶于其他成分的温热熔融物中,并将混合物充填至适当大小的软质明胶胶囊中。根据通常程序处理经填充的软质明胶胶囊。

[0142] 实例C

[0143] 制造下列组合物的栓剂:

成分	mg/栓剂
一种式 (I) 化合物	15
栓剂质量	1285
总计	1300

[0145] 表8:可能的栓剂组合物

[0146] 制造程序

[0147] 将栓剂物质在玻璃或钢制容器中熔化,充分混合并冷却至45°C,随后,向其中加入经细粉化的式 (I) 化合物并搅拌直至其完全分散。将混合物倒入适当大小的栓剂模具中,待冷却,然后将栓剂从模具中取出并单独包装于蜡纸或金属箔中。

[0148] 实例D

[0149] 制造以下组合物的注射溶液:

成分	mg/注射溶液。
一种式 (I) 化合物	3
聚乙二醇400	150
乙酸	q.s.ad pH 5.0
注射溶液用水	ad 1.0ml

[0151] 表9:可能的注射溶液组合物

[0152] 制造程序

[0153] 将该式 (I) 化合物溶于聚乙二醇400及注射用水(部分)的混合物中。用乙酸将pH调整至5.0。通过添加剩余量的水将体积调节至1.0ml。过滤溶液,用适当的增量填充至小瓶中并灭菌。

[0154] 实例E

[0155] 制造具有以下组合物的小袋:

成分	mg/小袋
一种式 (I) 化合物	50
乳糖, 细粉	1015
微晶纤维素 (AVICEL PH 102)	1400
羧甲基纤维素钠	14
聚乙烯吡咯啉酮 K 30	10

[0157]	硬脂酸镁	10
	调味添加剂	1
	总计	2500

[0158] 表10:可能的小袋组合物

[0159] 制造程序

[0160] 将该式(I)化合物与乳糖、微晶纤维素及羧甲基纤维素钠混合,并与含聚乙烯吡咯酮的水的混合物制粒。将颗粒与硬脂酸镁和调味添加剂混合,并填充入小袋中。

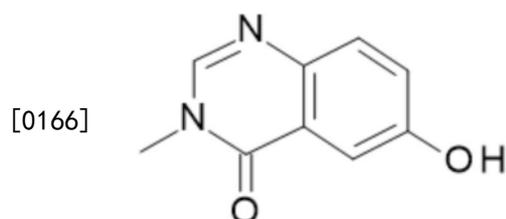
[0161] 实例

[0162] 缩写

[0163] DCM=二氯甲烷;DMF=二甲基甲酰胺;DMSO=二甲基亚砜;DRF=剂量范围寻找;ESI=电喷雾电离;EtOAc=乙酸乙酯;LC-MS/MS=液相色谱-MS/MS;MeOH=甲醇;MS=质谱;rt=室温;P-gp=P-糖蛋白;SFC=超临界流体色谱法。

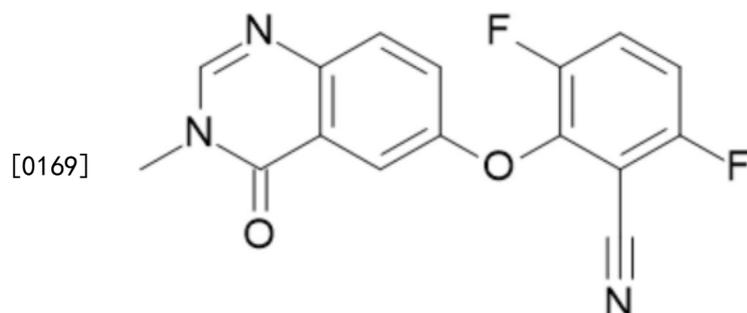
[0164] 参考化合物AR-25、AR-30及AR-31分别根据WO2012/118492中实例25、实例30及实例31中所公开的合成方法制备。

[0165] 6-羟基-3-甲基喹唑啉-4-酮



[0167] 2-氨基-5-羟基苯甲酸(10g,65.3mmol,Eq:1.0)及N-甲基甲酰胺(30g,29.9mL,503mmol,Eq:7.7)在145°C加热21小时45分钟,然后冷却至室温。将反应混合物以50mL H₂O稀释,并在室温搅拌20分钟,过滤收集所产生的沉淀物。将浅棕色固体以20mL水洗3次。将固体吸收于甲苯中并蒸发至干燥(3×)。将固体在高真空下于40°C真空干燥过夜,得到呈浅棕色固体的标题化合物(10.3g,89%产率)。MS(ESI)m/z:177.1[M+H]⁺。

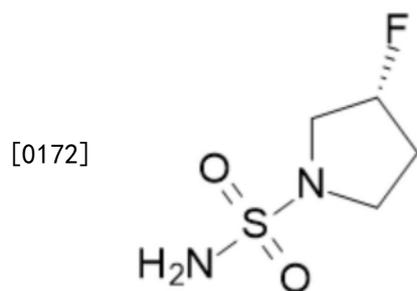
[0168] 3,6-二氟-2-(3-甲基-4-氧代-喹唑啉-6-基)氧基-苄腈



[0170] 将碳酸铯(3.22g,9.79mmol,Eq:1.15)在室温添加至含6-羟基-3-甲基喹唑啉-4-酮(1500mg,8.51mmol,Eq:1.0)的N,N-二甲基甲酰胺(35mL)溶液中。将混合物在室温搅拌30分钟,然后添加2,3,6-三氟苄腈(1.47g,1.08mL,9.37mmol,Eq:1.1)。1小时后,将反应在冰上冷却,并以水(120mL)稀释。过滤收集所产生的固体,以冰水(100mL)及庚烷(100mL)洗涤并真空干燥。将固体吸收于甲苯中,并蒸发至干燥(3×),然后真空干燥过夜,得到呈浅棕

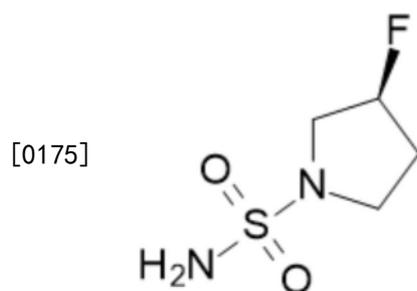
色固体的标题化合物 (2.58g, 97% 产率)。MS (ESI) m/z : 314.1 [M+H]⁺。

[0171] (3R)-3-氟吡咯烷-1-磺酰胺



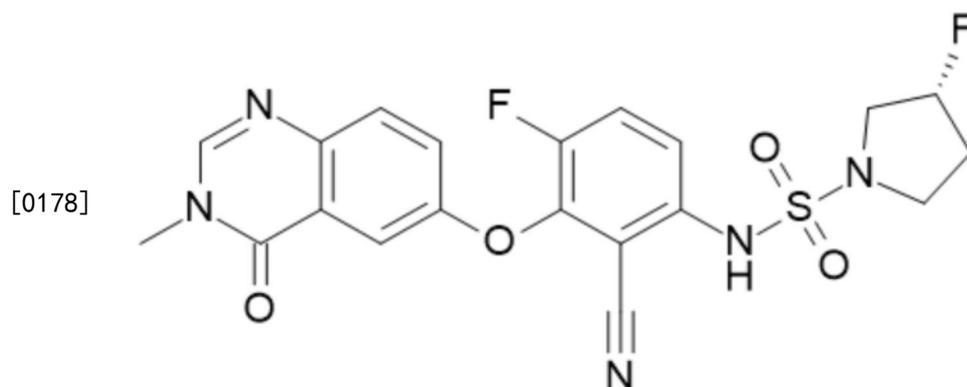
[0173] 将(R)-3-氟吡咯烷盐酸盐 (1.8g, 14.3mmol, Eq:1.2) 添加至含磺酰胺 (1.148g, 11.9mmol, Eq:1.0) 及三乙胺 (2.42g, 3.33mL, 23.9mmol, Eq:2) 的二噁烷 (10mL) 溶液中。将反应在密封管中于115°C搅拌15.5小时, 然后冷却至室温并在真空中浓缩。将残余物以DCM稀释, 以硅胶蒸发至干燥, 并转移至管柱中。通过快速色谱法纯化 (40g 二氧化硅, 80% EtOAc), 得到呈白色结晶固体的标题化合物 (1.82g, 91% 产率)。MS (ESI) m/z : 169.1 [M+H]⁺。

[0174] (3S)-3-氟吡咯烷-1-磺酰胺



[0176] 将三乙胺 (304mg, 419μl, 3.01mmol, Eq:2.0) 添加至含磺酰胺 (146mg, 1.5mmol, Eq:1.0) 及(S)-3-氟吡咯烷盐酸盐 (234mg, 1.8mmol, Eq:1.2) 的二噁烷 (1.3ml) 悬浮液中。将反应在密封管中于115°C下搅拌16小时35分钟, 然后于真空中浓缩。将残余物以MeOH稀释, 并用硅胶蒸发至干燥, 并转移至管柱中。通过快速色谱法纯化 (40g 二氧化硅, 0-8% MeOH/DCM), 得到呈浅黄色固体的标题化合物 (193mg, 75% 产率)。MS (ESI) m/z : 169.1 [M+H]⁺。

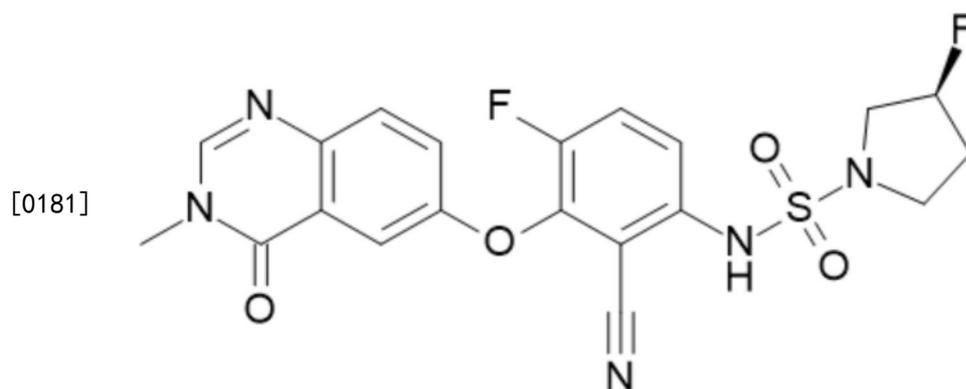
[0177] (3R)-N-[2-氰基-4-氟-3-(3-甲基-4-氧代-喹唑啉-6-基)氧基-苯基]-3-氟-吡咯烷-1-磺酰胺 (实例1)



[0179] 将(R)-3-氟吡咯烷-1-磺酰胺 (1.26g, 7.51mmol, Eq:2.1) 及碳酸铯 (2.56g, 7.87mmol, Eq:2.2) 在氩气压下悬浮于干DMF (10.2ml) 中。将反应在50°C搅拌30分钟, 将反应

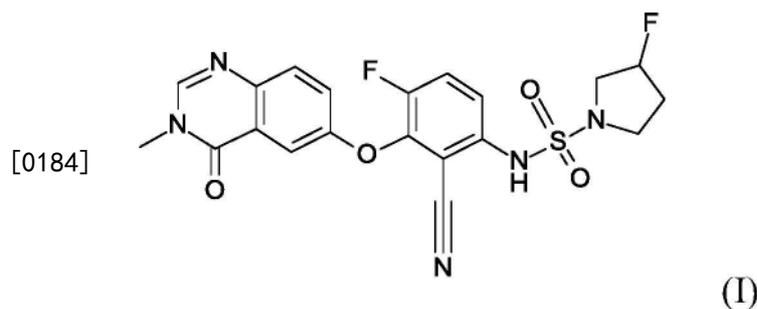
混合物冷却至室温并添加含3,6-二氟-2-((3-甲基-4-氧代-3,4-二氢喹唑啉-6-基)氧基)苄腈(1.12g,3.58mmol,Eq:1.0)的DMF(25.5ml)溶液。将反应混合物于100°C搅拌15小时,然后在真空中浓缩。将残余物吸收于饱和NH₄Cl水溶液(100mL)及EtOAc(100mL)中。分离各相,并将水层进一步以2×100mL EtOAc萃取。合并的有机层以水(200mL)及盐水(200mL)洗涤,干燥(Na₂SO₄),过滤并在真空中浓缩。以EtOAc(3×100mL)反萃取水层。合并的有机萃取物以盐水(200mL)洗涤,干燥(Na₂SO₄),过滤并在真空中浓缩。将残余物以DCM及MeOH稀释,并浓缩到二氧化硅上。通过快速色谱法纯化(120g,0.5-2%MeOH/DCM),得到灰白色固体,将其与1:1庚烷/DCM(20mL)在超音波震荡中研制,然后在真空中干燥,得到呈无色固体的标题化合物(1.087g,66%产率)。MS(ESI)m/z:426.2[M+H]⁺。手性SFC:RT=4.594分钟[Chiralpak IC管柱,4.6×250mm,粒径5μm(Daicel);在8分钟内含0.2% NHEt₂的20-40% MeOH的梯度;流速:2.5mL/min;140巴的背压]。

[0180] (3S)-N-[2-氰基-4-氟-3-(3-甲基-4-氧代-喹唑啉-6-基)氧基-苯基]-3-氟-吡咯烷-1-磺酰胺(实例2)



[0182] 将(S)-3-氟吡咯啉-1-磺酰胺(181mg,1.08mmol,Eq:2.1)溶于DMF(1.6ml)中。在室温下将碳酸铯(368mg,1.13mmol,Eq:2.2)加入,并将反应混合物在50°C搅拌30分钟。将反应混合物冷却至室温并将3,6-二氟-2-((3-甲基-4-氧代-3,4-二氢喹唑啉-6-基)氧基)苄腈溶液(160.8mg,513μmol,Eq:1.0)的DMF(4ml)溶液。将反应混合物在105°C搅拌2小时50分钟,然后在真空中浓缩。将残余物吸收于DCM中,并以饱和NH₄Cl水溶液洗涤。水溶液层以DCM反萃取两次。合并的有机层在Na₂SO₄上干燥,过滤并蒸发。将残余物(棕色油状物)以DCM稀释并转移至管柱中。通过快速色谱法纯化(80g,含0~100% EtOAc的DCM),得到固体,将其通过SFC进一步纯化,得到呈浅黄色固体的标题化合物(119mg,50%产率)。MS(ESI)m/z:426.2[M+H]⁺。手性SFC:RT=4.411分钟[Chiralpak IC管柱,4.6×250mm,粒径5μm(Daicel);在8分钟内含0.2% NHEt₂的20-40% MeOH的梯度;流速:2.5mL/min;140巴的背压]。

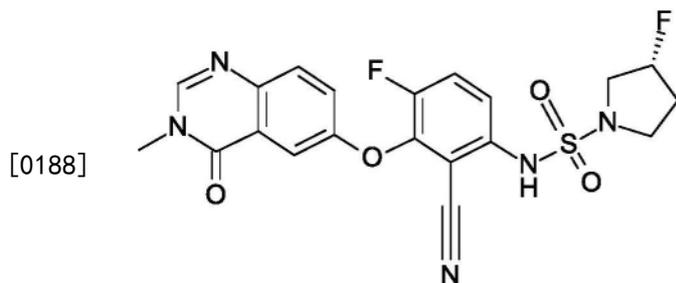
[0183] 实施方案1.一种式(I)化合物



[0185] 或其药用盐。

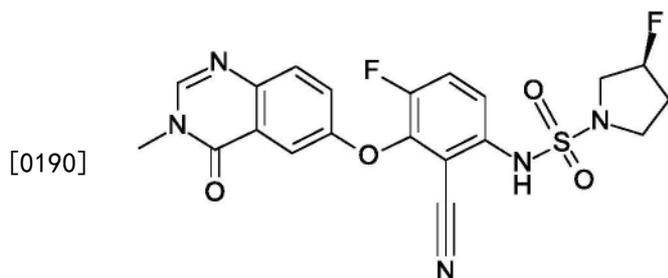
[0186] 实施方案2. 根据实施方案1前述的化合物, 其中化合物为式(I)化合物。

[0187] 实施方案3. 根据实施方案1或2前述的化合物, 其中化合物为式(Ia)化合物



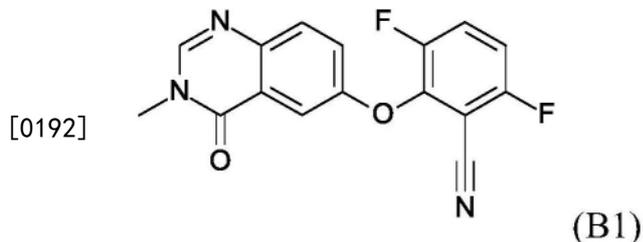
(Ia)。

[0189] 实施方案4. 根据实施方案1或2前述的化合物, 其中化合物为式(Ib)化合物

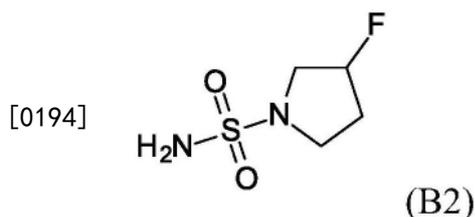


(Ib)。

[0191] 实施方案5. 一种用于制备根据实施方案1至4中任一项前述的化合物的方法, 其包括式(B1)化合物



[0193] 与式(B2)化合物



[0195] 在碱存在下的反应。

[0196] 实施方案6. 根据实施方案1至4中任一项前述的化合物, 其根据实施方案5前述的方法生产。

[0197] 实施方案7. 根据实施方案1至4中任一项前述的化合物, 其用作治疗活性物质。

[0198] 实施方案8. 一种药物组合物, 其包含根据实施方案1至4中任一项前述的化合物以及治疗惰性载体。

[0199] 实施方案9. 根据实施方案1至4中任一项前述的化合物, 其用于治疗或预防癌症。

[0200] 实施方案10. 根据实施方案1至4中任一项前述的化合物,其用于治疗或预防甲状腺癌、结直肠癌、脑癌、黑素瘤或NSCLC。

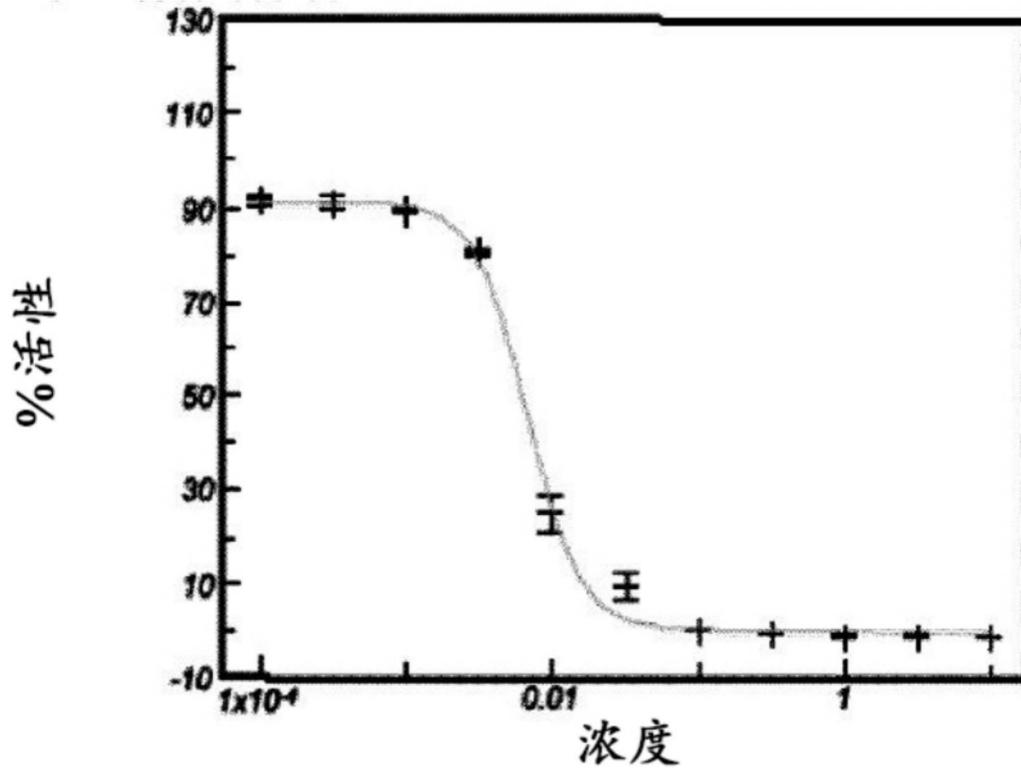
[0201] 实施方案11. 根据实施方案1至4中任一项前述的化合物用于治疗或预防甲状腺癌、结直肠癌、脑癌、黑素瘤或NSCLC的用途。

[0202] 实施方案12. 根据实施方案1至4中任一项前述的化合物用于制备药物的用途,药物用于治疗或预防甲状腺癌、结直肠癌、脑癌、黑素瘤或NSCLC。

[0203] 实施方案13. 一种用于治疗癌症的方法,方法包括向有此需要的患者施用有效量的如实施方案1至4中任一项所定义的化合物。

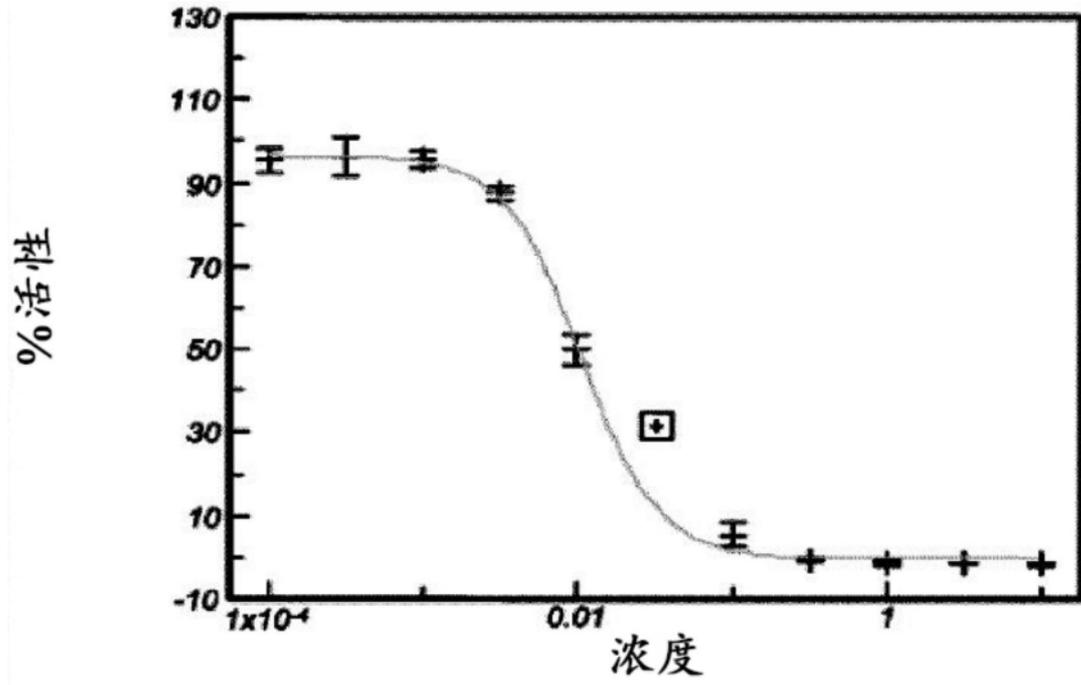
[0204] 实施方案14. 一种用于治疗甲状腺癌、结直肠癌、脑癌、黑素瘤或NSCLC的方法,方法包括向有此需要的患者施用有效量的如实施方案1至4中任一项所定义的化合物。

[0205] 实施方案15. 如前所述的本发明。



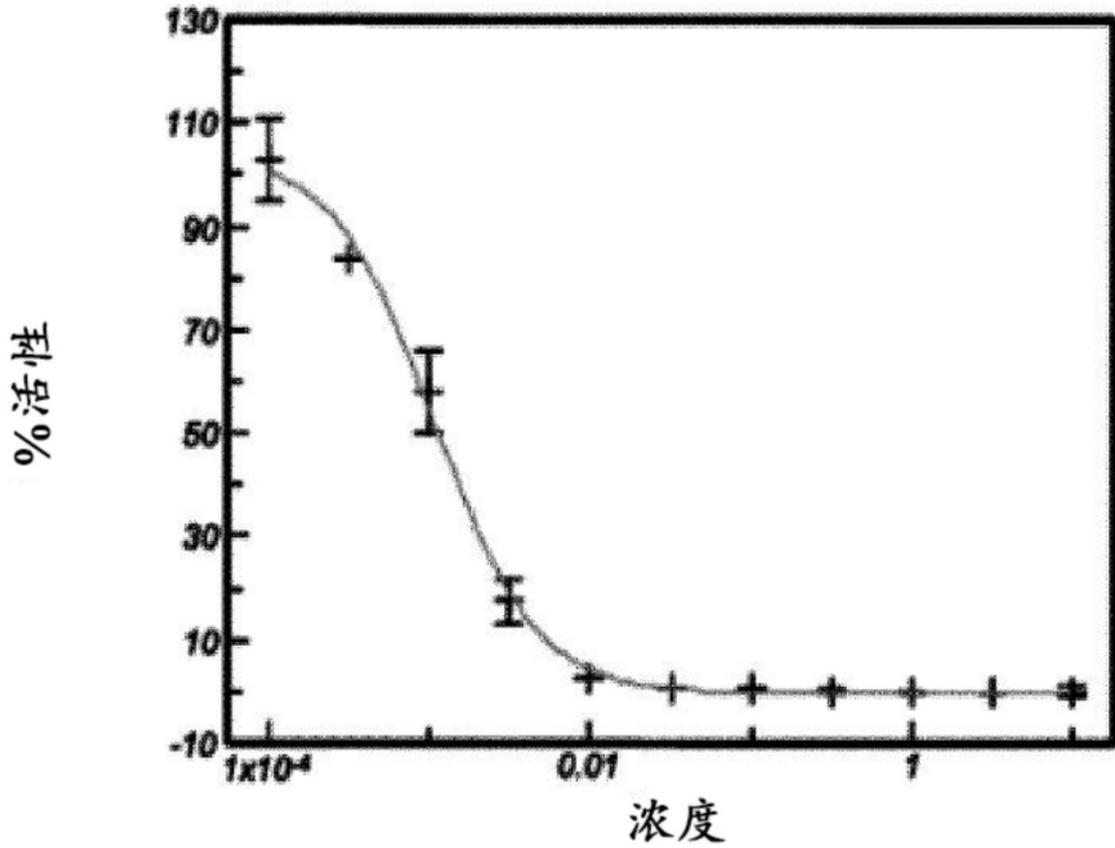
A375 抑制-实例1

图1



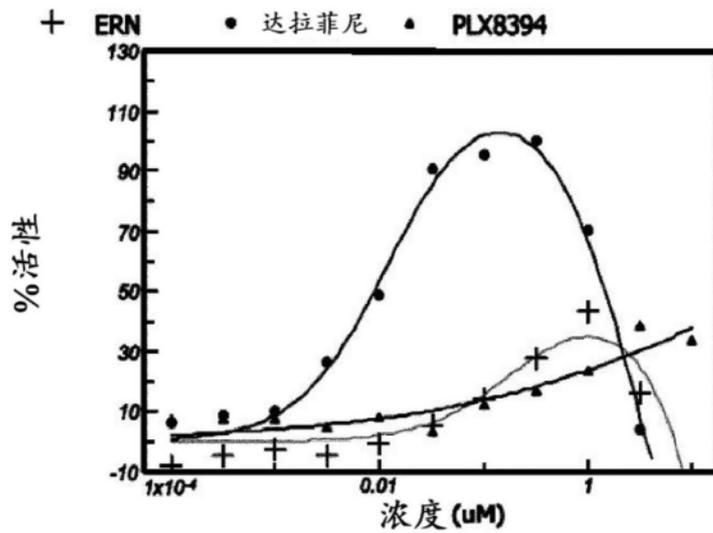
A375 抑制-实例 2

图2



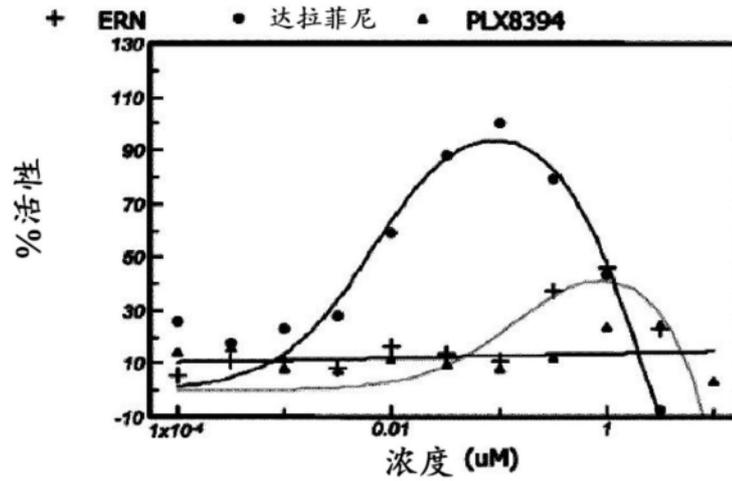
A375 抑制-实例 AR-25

图3



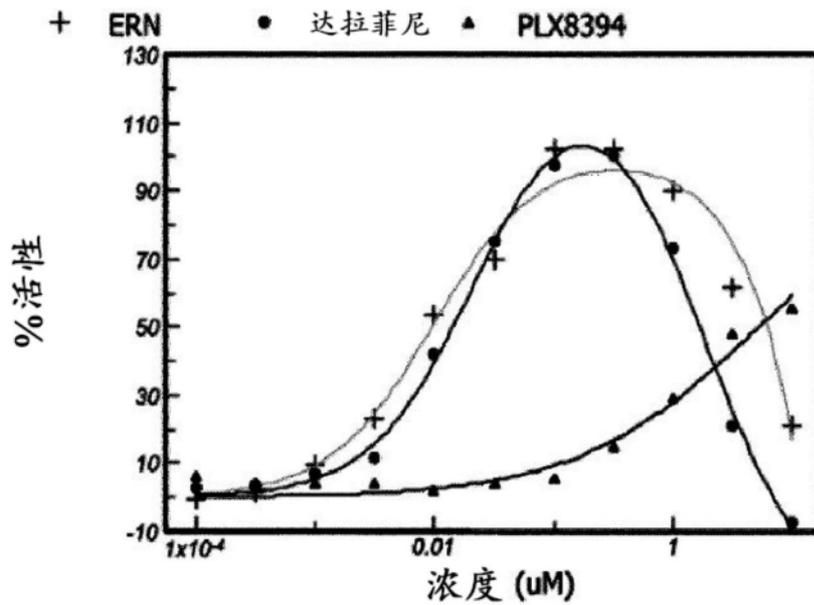
HCT-116 激活; 实例 1 = ERN; 反常诱导剂达拉菲尼的最大激活率设置为 100%; PLX8394 是反常破坏剂的阳性对照

图4



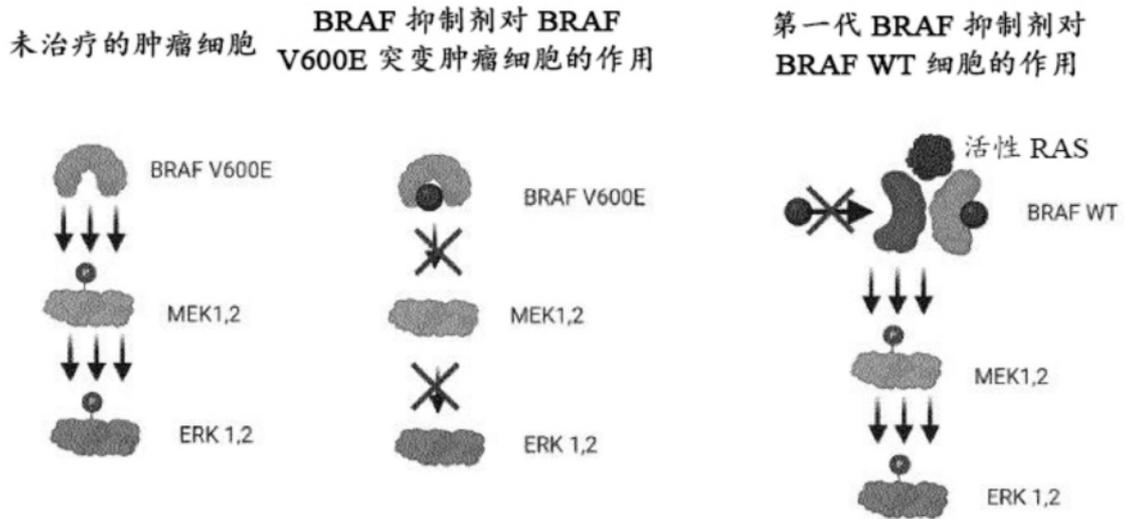
HCT-116 激活; 实例 2 = ERN; 反常诱导剂达拉菲尼的最大激活率设置为 100%; PLX8394 是反常破坏剂的阳性对照

图5



HCT-116 激活; AR-25 = ERN; 反常诱导剂达拉菲尼的最大激活率设置为 100%; PLX8394 是反常破坏剂的阳性对照

图6



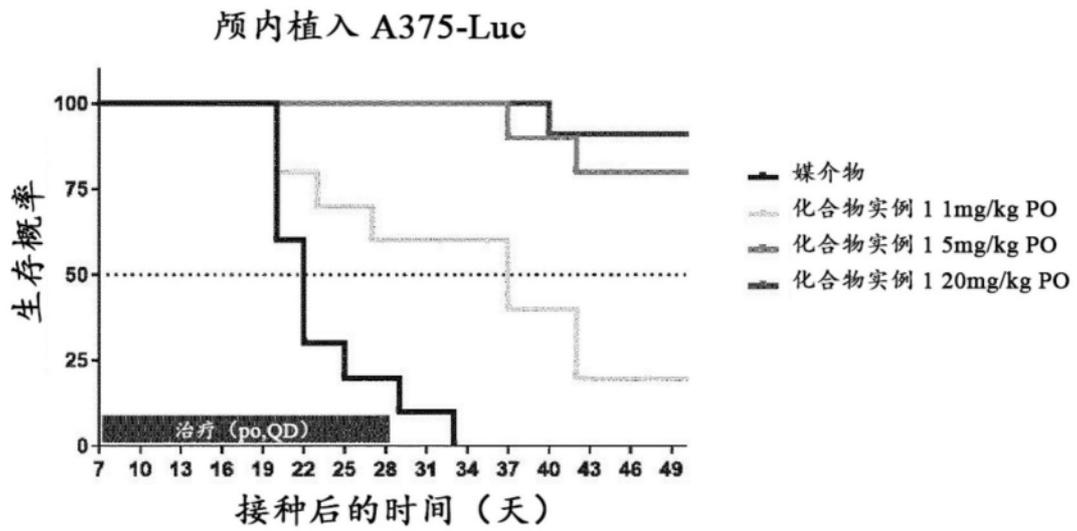
第一代 BRAF 抑制剂诱导 BRAF WT 细胞中 MAP 激酶信号通路的反常激活

左侧: BRAF 是 MAP 激酶信号通路第一节点的一部分，并且突变型 BRAF 是致癌驱动因子。

中心: 在 BRAF V600E/K 突变肿瘤中，BRAF 信号作为单体，在这种情况下，该蛋白被第一代 BRAF 抑制剂抑制。

右侧: 第一代 BRAF 抑制剂促进 BRAF WT 的同源和/或异源二聚化。在这种情况下，未被 BRAF 抑制剂占据的原聚体获得了不利于抑制剂结合的构象。在这种情况下，用第一代 BRAF 抑制剂治疗的结果是在 BRAF WT 细胞中反常增加的 MAPK 激活及随后的肿瘤生长。

图7



化合物实例 1 从每天 1 mg/kg 开始触发剂量依赖性抗肿瘤活性，证明了有效的脑渗透性介导的功效

图8