



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I569799 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 02 月 11 日

(21)申請案號：101135890

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 09 月 28 日

(51)Int. Cl. : A61K31/4709 (2006.01)

C07D405/14 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2012/09/21 美國

61/704,053

(71)申請人：安羅格製藥股份有限公司 (美國) AROG PHARMACEUTICALS, INC. (US)
美國

(72)發明人：柴恩 維納伊 K JAIN, VINAY K. (US)

(74)代理人：惲軼群；陳文郎

(56)參考文獻：

CN 1319966C

審查人員：徐永任

申請專利範圍項數：37 項 圖式數：7 共 51 頁

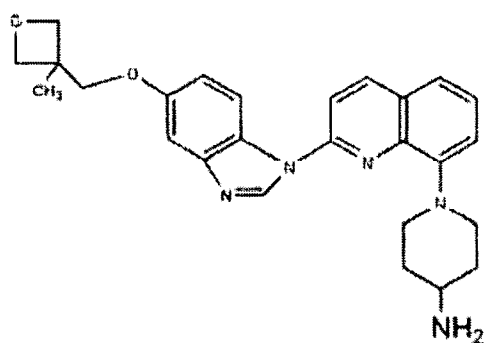
(54)名稱

抑制組成型活性磷酸化 F L T 3 激酶的方法

METHOD OF INHIBITING CONSTITUTIVELY ACTIVE PHOSPHORYLATED FLT3 KINASE

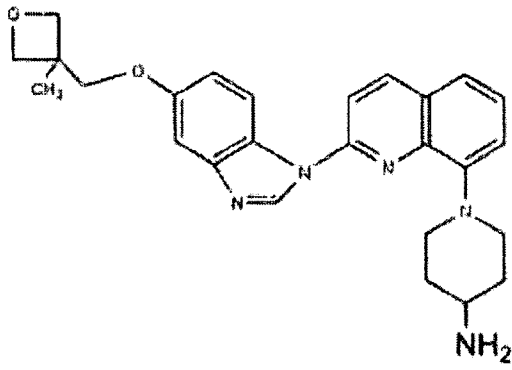
(57)摘要

本發明包括降低或抑制細胞或對象中正常和突變 FLT3 激酶活性的方法，以及與利用本發明化合物此類化合物在預防或治療對象中細胞增殖性疾病的用途：



或其藥學上可接受的鹽。

The present invention includes a method of reducing or inhibiting the kinase activity of normal and mutated FLT3 in a cell or a subject, and the use of such compound for preventing or treating cell proliferative disorder(s) in a subject related to using a compound of the present invention:



or pharmaceutically acceptable salt thereof.

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：101135890

※申請日：101.9.28

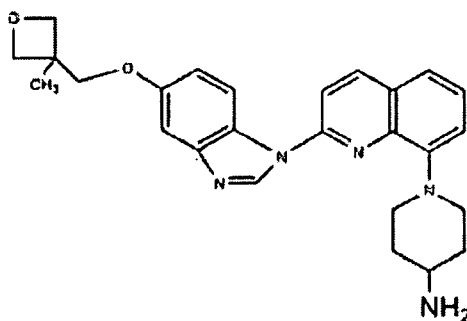
※IPC 分類：A61K31/4709 (2006.01)
C07D405/14 (2006.01)
A61P35/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

抑制組成型活性磷酸化FLT3激酶的方法/METHOD OF INHIBITING
CONSTITUTIVELY ACTIVE PHOSPHORYLATED FLT3 KINASE

二、中文發明摘要：

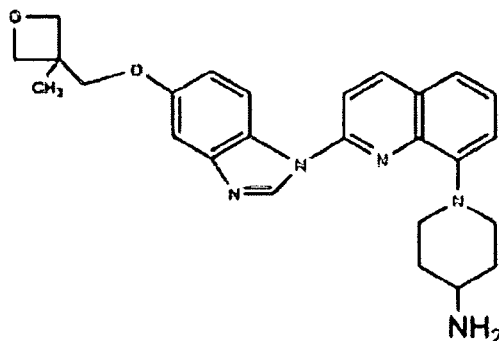
本發明包括降低或抑制細胞或對象中正常和突變FLT3激酶活性的方法，以及與利用本發明化合物此類化合物在預防或治療對象中細胞增殖性疾病的用途：



或其藥學上可接受的鹽。

三、英文發明摘要：

The present invention includes a method of reducing or inhibiting the kinase activity of normal and mutated FLT3 in a cell or a subject, and the use of such compound for preventing or treating cell proliferative disorder(s) in a subject related to using a compound of the present invention:



or pharmaceutically acceptable salt thereof.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 () 圖。(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

發明領域

本發明涉及降低或抑制細胞或對象中正常和突變FLT3的激酶活性的方法，以及此類方法對於預防或治療FLT3相關的細胞增殖性疾病的應用。

【先前技術】

發明背景

結合蛋白質激酶描述本發明的背景，但並不限制本發明的範圍。

蛋白質激酶是這樣一種酶，其通過催化 γ 磷酸根從三磷酸核苷酸，通常是三磷酸腺苷(ATP)的轉移，並將磷酸根共價結合於氨基酸殘基絲氨酸、蘇氨酸和酪氨酸的游離羥基來化學修飾其它蛋白質。

激酶活性可修飾全部人蛋白質中的約30%。蛋白質激酶指導酶活性、底物蛋白的細胞定位和基礎功能/結合，並調節細胞信號轉導和細胞功能協調。

研究顯示正常或突變蛋白質激酶的異常表達常與許多疾病的形成和蔓延相關。研究顯示蛋白質激酶的過表達或不適當表達與癌症、心血管疾病、類風濕性關節炎、糖尿病、眼科疾病、神經疾病和自身免疫疾相關。因此，研究強效抑制蛋白質激酶活性和功能的化合物能更深入地瞭解蛋白質激酶的生理學作用。

FMS-樣酪氨酸激酶3 (FLT3)基因編碼影響造血作用進

而導致血液學疾病和惡性腫瘤的膜結合受體酪氨酸激酶。參見Drexler, HG等. “白血病細胞的FLT3受體表達和對FLT3配體的反應”(Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells). *Leukemia*. 1996; 10:588-599; Gilliland, DG和JD Griffin. “FLT3在造血作用和白血病中的作用”(The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia). *Blood*. 2002;100:1532-1542; Stirewalt, DL和JP Radich. “FLT3在造血惡性腫瘤中的作用”(The role of FLT3 in hematopoietic malignancies). *Nat Rev Cancer*. 2003;3:650-665。FLT3配體(FLT3L)與FLT3受體結合活化FLT3受體酪氨酸激酶(也稱為幹細胞酪氨酸激酶-1(STK-1)和胎兒肝臟激酶-2(flk-2))的活化，所述受體在造血祖細胞和幹細胞上表達。

FLT3是造血惡性腫瘤中最常突變的基因之一，在約30%成人急性髓性白血病(AML)中存在。參見Nakao M, S Yokota和T Iwai. “在急性髓性白血病中發現FLT3基因的內部串聯重複”(Internal tandem duplication of the FLT3 gene found in acute myeloid leukemia). *Leukemia*. 1996; 10:1911-1918; H Kiyoi, M Towatari和S Yokota. “FLT3基因的內部串聯重複是導致產物的組成型活化的延伸突變新形態”(Internal Tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation, which causes constitutive activation of the product). *Leukemia*. 1998; 12:1333-1337; PD Kottaridis, RE Gale等, “急性髓性白血病(AML)患者中

存在FLT3內部串聯重複增加了細胞遺傳風險組的重要預後資訊和對第一輪化療的反應：英國醫學研究理事會AML 10和12次試驗中854位患者的分析”(The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials). Blood. 2001; 98:1742-1759; Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y. “人血液惡性腫瘤中FLT3的活化環內D835的活化突變”(Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies). Blood. 2001; 97:2434-2439; Thiede C, C Steudel, Mohr B. “979位急性髓性白血病患者中FLT3-活化突變的分析：結合FAB亞型和預後較差的亞群的鑑定”(Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis). Blood. 2002; 99:4326-4335。FLT3突變已在約2%診斷為中等和高風險骨髓增生異常綜合症(MDS)的患者中檢測到。參見，S Bains, Luthra R, Medeiros LJ和Zuo Z. “骨髓增生異常綜合症中的FLT3和NPM1突變：預測發展為急性髓性白血病的頻率和潛能值”(FLT3 and NPM1 mutations in myelodysplastic syndromes: Frequency and potential value for predicting

progression to acute myeloid leukemia). American Journal of Clinical Pathology. 2011年1月; 135:62-69; PK Bhamidipati, Daver NG, Kantarjian H等, “骨髓增生異常綜合症(MDS)和慢性骨髓單細胞性白血病(CMML)中的FLT3突變”(FLT3 mutations in myelodysplastic syndromes(MDS) and chronic myelomonocytic leukemia (CMML)). 2012. Journal of Clinical Oncology. 增刊; 摘要6597。與MDS類似, 急性早幼粒細胞性白血病(APL)患者中FLT3突變數量較少。最常見的FLT3突變是導致FLT3受體的近膜結構域(juxtamembrane domain)內的框內插入的內部串聯重複(ITD)。FLT3-ITD突變已在15-35%的成人AML患者中有報導。參見Nakao M, S Yokota和T Iwai. “急性髓性白血病中發現的FLT3基因內部串聯重複”(Internal tandem duplication of the FLT3 gene found in acute myeloid leukemia). Leukemia. 1996; 10:1911-1918; H Kiyoi, M Towatari和S Yokota “FLT3基因的內部串聯重複是導致產物的組成型活化的延伸突變新形態”(Internal Tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation, which causes constitutive activation of the product). Leukemia. 1998; 12:1333-1337; H Kiyoi, T Naoe和S Yokota. “急性早幼粒細胞性白血病中與白細胞增多相關的FLT3內部串聯重複”(Internal tandem duplication of FLT3 associated with leukocytosis in acute promyelocytic leukemia). 厚生省白血病研究組(Leukemia Study Group of the Ministry of Health and Welfare).

Leukemia. 1997; 11:1447-1452; S Schnittger, C Schoch和M Duga. “1003位急性髓性白血病患者中的FLT3長度突變分析：根據細胞遺傳學、FAB亞型以及在AML CG研究中的預後和用作檢測輕微後遺症的標記”(Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AML CG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease). Blood. 2002; 100:59-66。FLT3-ITD突變是患者預後不佳的獨立預測因子，其與升高的標準化療後復發風險及降低的無疾病和總存活率相關。參見FM Abu-Duhier, Goodeve AC, Wilson GA等，“成人急性髓性白血病患者中的FLT3內部串聯重複突變確定高風險組”(FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukemia define a high risk group). British Journal of Haematology. 2000; 111:190-195; H Kiyoi, T Naoe, Y Nakano等，“急性髓性白血病患者中FLT3和N-RAS基因突變的預後含義”(Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia). Blood. 1999; 93:3074-3080。FLT3受體的活化環中產生的FLT3點突變較少見。最常受影響的密碼子是天冬氨酸835 (D835)。約5-10%的成人急性髓性白血病患者中發生D835殘基的核苷酸取代。參見DL Stirewalt和JP Radich. “FLT3在造血惡性腫瘤中的作用”(The role of FLT3 in haematopoietic malignancies). Nature Reviews Cancer. 2003; 3:650-665; Y

Yamamoto, H Kiyoi和Y Nakano等, “人血液惡性腫瘤中FLT3活化環內的D835活化突變”(Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies). *Blood*. 2001; 97:2434-2439; C Thiede, Steudal C, Mohr B等, “979位急性髓性白血病患者中FLT3-活化突變的分析：結合FAB亞型和預後較差的亞群的鑑定”(Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis). *Blood*. 2002; 99:4326-4335; U Bacher, Haferlach C, W Kern等, “AML中FLT3-TKD突變的預後相關性：組合問題-3082位患者的分析”(Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters-an analysis of 3082 patients). *Blood*. 2008; 111:2527-2537。

成人AML中組成型活化突變FLT3的頻率增高使得FLT3基因成為該腫瘤類型中極有吸引力的藥物靶標。已經或正在AML患者中研究和檢測對該靶標的效力和選擇性程度不同的幾種FLT3抑制劑。參見T Kindler, Lipka DB和Fischer T. “FLT3作為AML中的治療靶標：這些年後仍是難點”(FLT3 as a therapeutic target in AML: still challenging after all these years). *Blood*. 2010; 116:5089-102。

本領域已知的FLT3激酶抑制劑包括來他替尼(Lestaurtinib, 也稱為CEP 701, 以前稱為KT-555, 協和發酵公司Kyowa Hakko, 許可給瑟法隆Cephalon); CHIR-258 (凱

龍公司(Chiron Corp.); EB10和IMC-EB10 (免疫克隆系統公司ImClone Systems Inc.); 米哌妥林Midostaurin (也稱為PKC412, 諾華公司(Novartis AG)); 坦度替尼Tandutinib (也稱為MLN-518, 以前稱為CT53518, COR治療公司COR Therapeutics Inc., 許可給千年製藥公司Millennium Pharmaceuticals Inc.); 蘇尼替尼(Sunitinib, 也稱為SU11248, 輝瑞公司(Pfizer) 美國); 奎扎替尼(Quizartinib, 也稱為AC220, AMBIT生物科技Ambit Biosciences); XL 999 (Exelixis, 美國, 許可給和諧演化公司Symphony Evolution, Inc.); GTP 14564 (默克生命科學Merck Biosciences 英國); AG1295和AG1296; CEP-5214和CEP-7055 (Cephalon)。以下PCT國際申請和美國專利申請公開了其它激酶調節劑, 包括FLT3的調節劑: WO 2002032861, WO 2002092599, WO 2003035009, WO 2003024931, WO 2003037347, WO 2003057690, WO 2003099771, WO 2004005281, WO 2004016597, WO 2004018419, WO 2004039782, WO 2004043389, WO 2004046120, WO 2004058749, WO 2004058749, WO 2003024969 和美國專利申請號20040049032。還可參見Levis M, KF Tse等, 2001 “FLT3酪氨酸激酶抑制劑對具有FLT3內部串聯重複突變的急性髓性白血病母細胞具有選擇性細胞毒性”(A FLT3 tyrosine kinase inhibitor is selectively cytotoxic to acute myeloid leukemia blasts harboring FLT3 internal tandem duplication mutations). Blood 98(3): 885-887; Tse K F等., “利用酪氨酸

激酶抑制劑抑制 FLT3- 介導的轉化”(Inhibition of FLT3-mediated transformation by use of a tyrosine kinase inhibitor). *Leukemia*. 2001年7月; 15 (7): 1001-1010; Smith, B. Douglas等., “單純試劑CEP-701, 一種新型FLT3抑制劑在復發或難治急性髓性白血病患者中顯示生物學和臨床活性”(Singlet agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia) *Blood*, 2004年5月; 103: 3669-3676; Griswold, Ian J等., “MLN518, 一種雙重FLT3和KIT抑制劑對正常和惡性造血作用的影響”(Effects of MLN518, A Dual FLT3 and KIT Inhibitor, on Normal and Malignant Hematopoiesis). *Blood*, 2004年11月; 104 (9): 2912-2918 [印刷前在7月8日電子出版]; Yee, Kevin W.H.等., “SU5416和SU5614抑制野生型和突變型FLT3受體酪氨酸激酶的激酶活性”(SU5416 and SU5614 inhibit kinase activity of wild-type and mutant FLT3 receptor tyrosine kinase). *Blood*, 2002年10月; 100(8): 2941-2949; O’Farrell, Anne-Marie等., “SU11248是具有強效體外和體內活性的新型FLT3酪氨酸激酶抑制劑”(SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity in vitro and in vivo). *Blood*, 2003年5月; 101(9): 3597-3605; Stone, R. M等., “AML中的PKC-412 FLT3抑制劑治療: II期實驗的結果”(PKC-412 FLT3 inhibitor therapy in AML: results of a phase II trials). *Ann. Hematol.* 2004; 83 增刊 1:S89-90; 和

Murata, K. 等., “GTP-14564, 一種新型酪氨酸激酶抑制劑在表達組成型活性Fms-樣酪氨酸激酶3(FLT3)的白血病細胞中的選擇性細胞毒性機制”(Selective cytotoxic mechanism of GTP-14564, a novel tyrosine kinase inhibitor in leukemia cells expressing a constitutively active Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3)). *J Biol Chem.* 2003年8月29日; 278 (35): 32892-32898 [2003年6月18日電子出版]; Levis, Mark 等., “小分子FLT3酪氨酸激酶抑制劑”(Small Molecule FLT3 Tyrosine Kinase Inhibitors). *Current Pharmaceutical Design*, 2004, 10, 1183-1193。

FLT3抑制劑分為I型或II型抑制劑。這兩種分類的區別在於它們的相對親和力和結合磷酸化及非磷酸化受體位點的機制。I型抑制劑識別激酶的活性構象。該構象有利於磷酸轉移。I型抑制劑通常由雜環系統構成。參見Liu, Y和N Gray. “結合無活性激酶構象的抑制劑的理性設計”(Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations). *Nature Chem. Biol.* 2006; 2:358-354。I型FLT3抑制劑的例子包括克萊拉尼(Crenolanib)和米哌妥林(Midostaurin)。參見A Ramachandran, Marshall H和Jain V “克萊拉尼, III類受體酪氨酸激酶的新I型突變體特異性抑制劑, 優先結合磷酸化激酶”(Crenolanib, a novel type I, mutant specific inhibitor of class III receptor tyrosine kinases, preferentially binds to phosphorylated kinases). *Cancer Res.* 2012; 72 (8增刊): 368; J Cools等, “對小分子

FLT3抑制劑耐受性的預測：急性白血病的分子靶向治療的含義”(Prediction of resistance to small molecule FLT3 inhibitors: implications for molecularly targeted therapy of acute leukemia). *Cancer Res.* 2004; 64:6385-6389。使得受體酪氨酸激酶的激酶成為組成型磷酸化的耐藥突變可能對磷酸化激酶的親和力較高的I型抑制劑敏感。

相比之下，II型抑制劑優先結合激酶的無活性構象。該構象通常因基序的重排而稱為“DFG-out”。參見J Zhang, Yang PL和Gray NS. “用小分子激酶抑制劑靶向癌症”(Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors). *Nature Reviews Cancer.* 2009; 9:28-39。抑制劑，例如伊馬替尼(imatinib)、索拉非尼(sorafenib)和尼羅替尼(nilotinib)結合II型構象。參見PW Manley, Cowan-Jacob SW, Mestan J. “用於治療慢性髓性白血病的Bcr-Abl激酶抑制劑的結構生物學、設計和臨床開發中的進展”(Advances in the structural biology, design and clinical development of Bcr-Abl kinase inhibitors for the treatment of chronic myeloid leukaemia). *Biochim. Biophys. Acta.* 2005; 1754:3-13; PT Wan等, “B-Raf的致癌突變活化RAF-ERK信號傳導途徑的機制”(Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-Raf). *Cell.* 2004; 116:855-867。

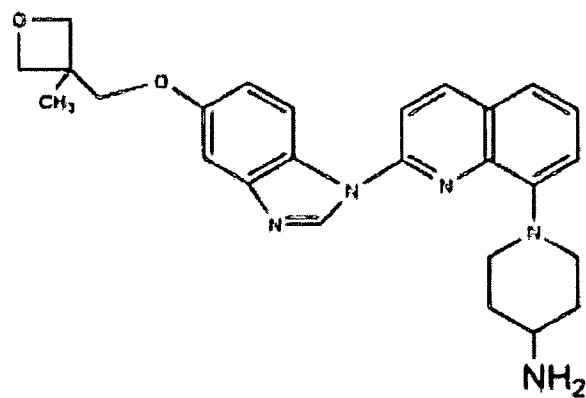
對II型抑制劑的耐藥突變是使得受體酪氨酸激酶的激酶結構域組成型磷酸化的突變。靶向磷酸化激酶的I型抑制

劑能克服使用II型抑制劑治療所致的耐藥性，因此可能用於治療具有這些耐藥性突變的疾病。

【發明內容】

發明概要

本發明包括抑制或降低失調FLT3酪氨酸激酶活性或其
在患有增殖性疾病的對象中表達的方法，包括給予具有或
懷疑具有增殖性疾病的對象治療或預防有效量的式I所示
化合物：



I,

或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物。在一方面，所述
增殖性疾病選自以下的至少一種：白血病、骨髓瘤、骨髓
增殖性疾病、骨髓增生異常綜合症、特發性高嗜酸性粒細
胞綜合症(HES)、膀胱癌、乳腺癌、宮頸癌、CNS癌症、結
腸癌、食道癌、頭頸癌、肝癌、肺癌、鼻咽癌、神經內分
泌癌症、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、腎癌、唾液腺癌症、
小細胞肺癌、皮膚癌、胃癌、睪丸癌、甲狀腺癌、子宮癌
症和血液學惡性腫瘤。在另一方面，治療和預防有效量是
每天約50-約500毫克。在另一方面，所述化合物的給藥是
連續、間歇、全身性或局部給藥中的至少一種。在另一方

面，失調的FLT3進一步限定為組成型活性的突變FLT3。在另一方面，所述化合物口服、靜脈內或腹膜內給予。在另一方面，克萊拉尼是苯磺酸克萊拉尼、磷酸克萊拉尼、乳酸克萊拉尼、鹽酸克萊拉尼、檸檬酸克萊拉尼、乙酸克萊拉尼、甲苯磺酸克萊拉尼或琥珀酸克萊拉尼。在另一方面，所述FLT3是以下的至少一種：FLT-ITD、FLT-TKD、FLT3-D835Y、FLT3-D835H、FLT3-K663Q或FLT-R834Q。在另一方面，治療或預防有效量的所述化合物每天最多給予三次或更多次，只要對象需要治療增殖性疾病。在另一方面，所述化合物與另一藥劑以順次或相伴方式中的至少一種用於新診斷的增殖性疾病患者或復發/難治的增殖性疾病患者以維持消退。在另一方面，所述化合物作為單一藥劑提供或與另一藥劑組合，用於新診斷的增殖性疾病患者或復發/難治的增殖性疾病患者以維持消退。在另一方面，所述化合物作為單一藥劑或與另一藥劑組合用於新診斷的增殖性疾病兒科患者或復發/難治的增殖性疾病兒科患者，以維持消退。在另一方面，所述患者是復發患者/II型酪氨酸激酶抑制劑難治的患者。

在另一實施方式中，本發明包括治療患有增殖性疾病的患者的方法，包括：給予需要此類治療的患者治療有效量的克萊拉尼或其鹽，其中細胞增殖性疾病的特徵在於失調的FLT3受體酪氨酸激酶活性，增殖性疾病選自以下的至少一種：白血病、骨髓瘤、骨髓增殖性疾病、骨髓增生異常綜合症、特發性高嗜酸性粒細胞綜合症(HES)、膀胱癌、

乳腺癌、宮頸癌、CNS癌症、結腸癌、食道癌、頭頸癌、肝癌、肺癌、鼻咽癌、神經內分泌癌症、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、腎癌、唾液腺癌症、小細胞肺癌、皮膚癌、胃癌、睪丸癌、甲狀腺癌、子宮癌症和血液學惡性腫瘤。在一方面，所述化合物經口服、靜脈內或腹膜內給予。在另一方面，克萊拉尼是苯磺酸克萊拉尼、磷酸克萊拉尼、乳酸克萊拉尼、鹽酸克萊拉尼、檸檬酸克萊拉尼、乙酸克萊拉尼、甲苯磺酸克萊拉尼或琥珀酸克萊拉尼。在另一方面，所述FLT3是以下的至少一種：FLT-ITD、FLT-TKD、FLT3-D835Y、FLT3-D835H、FLT3-K663Q或FLT-R834Q。在另一方面，克萊拉尼與化療、放療或外科手術以順次或相伴方式中的至少一種用於新診斷的增殖性疾病或復發/難治的增殖性疾病，以維持消退。在另一方面，克萊拉尼作為單一藥劑提供或與化療、放療或外科手術組合提供以治療患有增殖性疾病的兒科患者。在另一方面，克萊拉尼標準誘導治療或高劑量誘導治療中的至少一種之後作為單一藥劑提供給新診斷的增殖性疾病。在另一方面，克萊拉尼作為單一藥劑提供以治療標準或高劑量化療、放療或外科手術難治的或治療之後復發的增殖性疾病患者。在另一方面，所述患者是復發的/對至少一種其它酪氨酸激酶抑制劑難治的，所述其它酪氨酸激酶抑制劑包括索拉非尼、奎扎替尼、阿西替尼(axitinib)、蘇尼替尼、帕唑帕尼(pazopanib)、米哌妥林或來他替尼。

本發明還有另一實施方式包括治療白血病患者的方

法，包括：獲得懷疑患有白血病的患者的樣品；自患者樣品確定該患者具有失調的FLT3受體酪氨酸激酶；和給予需要此類治療的患者治療有效量的克萊拉尼或其鹽，其中所述白血病的特徵在於失調的FLT3受體酪氨酸激酶活性。

本發明的另一實施方式包括特異性抑制失調的受體酪氨酸激酶的方法，包括：獲得患者樣品並確定何種受體酪氨酸激酶失調；和給予需要此類治療的哺乳動物治療有效量的克萊拉尼或其鹽，其中所述失調受體酪氨酸激酶是FLT3受體酪氨酸激酶。在一方面，治療有效量的克萊拉尼或其鹽的提供量足以阻止FLT3受體酪氨酸激酶的生理活性，但不下調c-Kit活性。在另一方面，增殖性疾病選自以下的至少一種：白血病、骨髓瘤、骨髓增殖性疾病、骨髓增生異常綜合症、特發性高嗜酸性粒細胞綜合症(HES)、膀胱癌、乳腺癌、宮頸癌、CNS癌症、結腸癌、食道癌、頭頸癌、肝癌、肺癌、鼻咽癌、神經內分泌癌症、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、腎癌、唾液腺癌症、小細胞肺癌、皮膚癌、胃癌、睪丸癌、甲狀腺癌、子宮癌症和血液學惡性腫瘤。在另一方面，治療和預防有效量是每天約50-約500毫克。在另一方面，所述化合物的給藥是連續、間歇、全身性或局部給藥中的至少一種。在另一方面，失調的FLT3進一步限定為組成型活性的突變FLT3。在另一方面，所述化合物口服、靜脈內或腹膜內給予。在另一方面，克萊拉尼是苯磺酸克萊拉尼、磷酸克萊拉尼、乳酸克萊拉尼、鹽酸克萊拉尼、檸檬酸克萊拉尼、乙酸克萊拉尼、甲苯磺酸

克萊拉尼或琥珀酸克萊拉尼。在另一方面，所述FLT3是以下的至少一種：FLT-ITD、FLT-TKD、FLT3-D835Y、FLT3-D835H、FLT3-K663Q或FLT-R834Q。在另一方面，治療或預防有效量的所述化合物每天最多給予三次或更多次，只要對象需要治療增殖性疾病。在一方面，提供用於治療的患者，獲得一個或多個患者樣品以測定療效，持續治療直至增殖性疾病減輕或消除。在另一方面，所述化合物與另一藥劑以順次或相伴方式中的至少一種提供給新診斷的增殖性疾病患者或復發/難治的增殖性疾病患者，以維持現有患者的消退。在另一方面，本發明化合物作為單一藥劑提供或與另一藥劑組合提供給新診斷的增殖性疾病患者或復發/難治的增殖性疾病患者，以維持消退。在另一方面，本發明化合物作為單一藥劑或與另一藥劑組合提供給新診斷的增殖性疾病兒科患者或復發/難治的增殖性疾病兒科患者，以維持消退。在另一方面，所述患者是復發患者/II型酪氨酸激酶抑制劑難治的患者。

本發明還有另一實施方式包括治療癌症患者的方法，包括：從患者獲得懷疑有癌症的樣品；確定該患者是否對II型蛋白酪氨酸激酶抑制劑具有抗藥性；和給予治療有效量的克萊拉尼或其鹽以克服對II型蛋白酪氨酸激酶抑制劑的抗藥性。在另一方面，攝取藥物後，治療有效量的克萊拉尼或其鹽在生理水準不抑制c-Kit激酶。

本發明提供降低或抑制細胞或對象中FLT3的激酶活性的方法，以及此類方法在預防或治療FLT3相關的細胞增殖

性疾病中的應用。本發明的其它特徵和優點將從下文的本發明詳述和申請專利範圍中明白。

【圖式簡單說明】

為更完全地瞭解本發明的特徵和優點，可參考本發明詳述和附圖，其中：

圖1顯示本發明苯磺酸鹽對III類受體酪氨酸激酶的特異性，所述激酶包括FLT3、PDGFRA、PDGFRB、CSF1R和KIT；

圖2顯示本發明苯磺酸鹽對非自抑制和自抑制狀態的FLT3的親和力，左圖：非自抑制狀態的FLT3；右圖：自抑制狀態的FLT3；

圖3顯示相比於其它FLT3酪氨酸激酶抑制劑，本發明苯磺酸鹽對野生型FLT3的結合常數；

圖4顯示相比於其它FLT3酪氨酸激酶抑制劑，本發明苯磺酸鹽對組成型活性FLT3 ITD突變的結合常數；

圖5顯示相比於其它FLT3酪氨酸激酶抑制劑，本發明苯磺酸鹽對組成型活性FLT3 D835Y突變的結合常數；

圖6顯示相比於其它FLT3酪氨酸激酶抑制劑，本發明苯磺酸鹽對組成型活性FLT3 D835H突變的結合常數；

圖7顯示本發明苯磺酸鹽對磷酸化ABL1、非磷酸化ABL1、磷酸化ABL1 (T315I)和非-磷酸化ABL1 (T315I)的結合常數。

【實施方式】

具體實施方式

雖然下文詳細討論了作出和利用本發明的各種實施方式，但應該知道本發明提供了許多可適用的發明點，它們可以具體體現為各種特定的內容。本文討論的具體實施方式僅是作出和利用本發明的具體方式的說明，不限制本發明的範圍。

下文定義了許多術語以幫助理解本發明。本文定義的術語具有本發明相關領域的普通技術人員通常理解的含義。諸如“一”、“一個”和“該”不應僅指單數實體，還包括可用具體例子作說明的普通種類。本文的術語用於描述本發明的具體實施方式，但利用它們並不限制本發明，除非在申請專利範圍中描述的。

本發明包括本發明化合物在抑制細胞或對象中FLT3激酶活性，或治療對象中FLT3激酶活性或表達相關疾病中的應用。

在該方面的一個實施方式中，本發明提供降低或抑制細胞中FLT3的激酶活性的方法，包括將所述細胞與本發明化合物接觸的步驟。本發明還提供降低或抑制對象中FLT3激酶活性的方法，包括給予所述對象本發明化合物的步驟。本發明還提供抑制細胞增殖的方法，包括將所述細胞與本發明化合物接觸的步驟。

術語“對象”指作為治療、觀察或實驗客體的動物，例如哺乳動物或人。

術語“接觸”指將本發明化合物或其藥學上可接受的鹽加入細胞，從而所述細胞攝取所述化合物。

在該方面的其它實施方式中，本發明提供預防和治療方法以便治療具有產生細胞增殖性疾病風險或懷疑會產生細胞增殖性疾病的對象，所述疾病由FLT3的異常激酶活性驅動。在一個實例中，本發明提供預防FLT3相關細胞增殖性疾病的方法，包括將預防有效量的包含本發明化合物的藥物組合物給予對象。可在FLT3驅動細胞增殖性疾病的特徵性症狀顯現之前給予所述預防藥劑，從而可防止疾病或病症，或者延遲其發展。

術語“預防有效量”指研究人員、獸醫、醫生或其它臨床醫師所尋求的，抑制或延遲對象中疾病發作的活性化合物或藥物鹽的用量。

本文所用的術語“治療有效量”指研究人員、獸醫、醫生或其它臨床醫師所尋求的，引發對象中生物學或醫學反應的活性化合物或藥物鹽的用量，所述反應包括緩解所治療疾病或病症的症狀。

本領域知曉測定包含本發明化合物的藥物組合物的治療和預防有效劑量的方法。

本文所用的術語“組合物”應包括含有特定量的特定成分的產品以及從特定量的特定成分的組合直接或間接獲得的任何產品。

本文所用的術語“FLT3相關疾病”或“FLT3受體相關疾病”或“FLT3受體酪氨酸激酶相關疾病”或“FLT3驅動細胞增殖性疾病”包括與FLT3活性相關或涉及FLT3活性的疾病，例如導致FLT3組成型活化的突變。“FLT3相關疾病”的例子

包括FLT3中突變造成FLT3過度刺激所致的疾病，或者FLT3中異常大量的突變造成FLT3活性異常高所致疾病。已知FLT3的過度活性涉及許多疾病的致病原因，包括以下列出的細胞增殖性疾病、腫瘤疾病和癌症。

術語“細胞增殖性疾病”指多細胞生物中一個或多個細胞亞群的過度細胞增殖，從而對該多細胞生物致害(即，不適或預期壽命降低)。細胞增殖性疾病可在不同類型的動物和人中發生。本文所用的“細胞增殖性疾病”包括腫瘤疾病。

本文所用的術語“腫瘤疾病”指異常或不受控細胞生長所致腫瘤。腫瘤疾病的例子包括但不限於以下疾病，例如：骨髓增殖性疾病，如血小板減少症、原發性血小板增多症(ET)、特發性骨髓外化生、骨髓纖維化(MF)、骨髓纖維化伴有骨髓組織異生(MMM)、慢性特發性骨髓纖維化(UIMF)和真性紅細胞增多症(PV)、血細胞減少及癌變前骨髓增生異常綜合症；癌症，如神經膠質瘤癌症、肺癌、乳腺癌、結腸直腸癌、前列腺癌、胃癌、食道癌、結腸癌、胰腺癌、卵巢癌和血液學惡性腫瘤，包括骨髓增生異常、多發性骨髓瘤、白血病和淋巴瘤。血液學惡性腫瘤的例子包括，例如白血病、淋巴瘤、霍奇金病和骨髓瘤。還有急性淋巴細胞性白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)、急性早幼粒細胞性白血病(APL)、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、慢性髓性白血病(CML)、慢性中性粒細胞性白血病(CNL)、急性未分化性白血病(AUL)、間變性大細胞淋巴瘤(ALCL)、前淋巴細胞性白血病(PML)、青少年單核

細胞性白血病 (JMML)、成人T細胞性ALL、伴有骨髓三系增生異常的AML (AMLITMDS)、混合系白血病 (MLL)、骨髓增生異常綜合症 (MDS)、骨髓增殖性疾病 (MPD)和多發性骨髓瘤 (MM)。

在進一步的實施方式中，本發明可與另一療法組合為組合治療以便治療或抑制對象中FLT3相關的細胞增殖性疾病的發作。組合治療包括給予預防和治療有效量的本發明化合物與一種或多種其它抗細胞增殖療法，包括但不限於化療和放療。

在本發明的實施方式中，本發明化合物可與化療組合給予。本文所用的化療指涉及化療劑的療法。各種化療劑可與本發明聯用。僅是舉例，紫杉烷化合物，具體是多西他賽與本發明化合物以每平方米體表面積75毫克的劑量(mg/m^2)組合安全給藥。

化療是本領域技術人員已知的。化療的合適劑量和方案類似於臨床治療中已經採用的那些，其中所述化療與其它療法組合使用或單用。

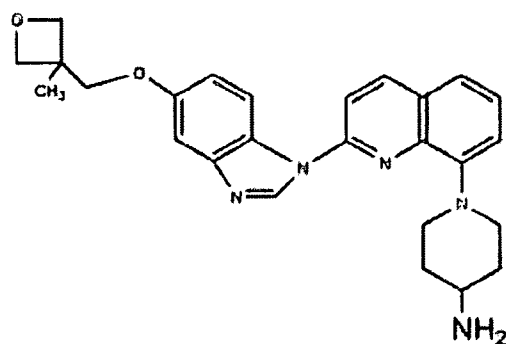
在本發明的另一實施方式中，本發明化合物可與放療組合給予。本文所用的“放療”指包括將有需要的對象暴露於射線的治療。放療是本領域技術人員已知的。放療的合適劑量和方案類似於臨床治療中已經採用的那些，其中所述放療與其它療法組合遞送或單用。

在本發明的另一實施方式中，本發明化合物與靶向治療組合給予。本文所用的“靶向治療”指靶向參與腫瘤產生

或致癌信號傳導的特定類型蛋白質的治療。例如，抗血管內皮生長因數的酪氨酸激酶抑制劑已用於治療癌症。

本發明還包括以下方法：除了本發明化合物，該方法還利用第二藥劑，二者同時或順次(依次)給藥。

在一個實施方式中，本發明利用治療或預防有效量的式I所示化合物或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物抵禦增殖性疾病：



I

所述增殖性疾病選自以下的至少一種：白血病、骨髓瘤、骨髓增殖性疾病、骨髓增生異常綜合症、特發性高嗜酸性粒細胞綜合症(HES)、膀胱癌、乳腺癌、宮頸癌、CNS癌症、結腸癌、食道癌、頭頸癌、肝癌、肺癌、鼻咽癌、神經內分泌癌症、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、腎癌、唾液腺癌症、小細胞肺癌、皮膚癌、胃癌、睪丸癌、甲狀腺癌、子宮癌症和血液學惡性腫瘤。藥學上可接受的鹽包括鹽酸鹽、磷酸鹽和乳酸鹽，它們的製備方式類似於苯磺酸鹽的製備方法且是本領域普通技術人員熟知的。

可將本發明化合物經全身，例如口服、靜脈內、皮下、肌肉內、真皮內或胃腸外給予對象。本發明化合物還可局部給予對象。

可將本發明化合物配製成緩釋或速釋製劑，其目的是在所需時間範圍上維持本發明化合物與靶向組織的接觸。

適合口服給藥的組合物包括固體形式，例如丸劑、片劑、囊片、膠囊、顆粒劑和粉末，液體形式，例如溶液、乳液和混懸液。可用於胃腸外給藥的形式包括無菌溶液、乳液和混懸液。

本發明化合物的每日劑量可以在每日每位成年人50-500毫克的寬範圍內變動。對於口服給藥，組合物宜採用含有20-100毫克的片劑形式提供。本發明的化合物可採用每日最多三次或更多次的服法給予。優選每日三次。待給予的最佳劑量可由本領域技術人員決定，可依據所用的本發明化合物、給藥方式、給藥時間、製品強度、疾病細節作出改變。劑量調節取決於患者特徵相關的因素，例如年齡、體重和飲食。

本發明化合物的製備

可用於製備式I所示化合物的通用合成方法見美國專利號5,990,146 (1999年11月23日授權) (華納-蘭伯特公司 Warner-Lambert Co.)和PCT申請公佈號WO 99/16755 (1999年4月8日公佈) (默克Merck & Co.)、WO 01/40217 (2001年7月7日公佈) (輝瑞公司Pfizer, Inc.)、美國專利申請號US 2005/0124599 (輝瑞公司)和美國專利申請號7,183,414 (輝瑞公司)，相關部分通過引用納入本文。

藥學上可接受的鹽，例如鹽酸鹽、磷酸鹽和乳酸鹽採用類似於製備苯磺酸鹽的方式製備，這些鹽是本領域普通

技術人員熟知的。以下代表性的本發明化合物僅是出於示範性目的，絕非意味著限制本發明，包括克萊拉尼，例如苯磺酸克萊拉尼、磷酸克萊拉尼、乳酸克萊拉尼、鹽酸克萊拉尼、檸檬酸克萊拉尼、乙酸克萊拉尼、甲苯磺酸克萊拉尼和琥珀酸克萊拉尼。

生物學活性

體外試驗

進行以下代表性的體外試驗以測定本發明化合物對FLT3的生物學活性。給予這些試驗是以非限制性方式說明本發明。

抑制野生型和突變FLT3酶活性以及特異性抑制FLT3的磷酸化形式證明FLT3酶和依賴於FLT3活性的細胞過程的特異性抑制作用。本文的所有實例顯示FLT3激酶和FLT3-依賴性細胞反應的顯著和特異性抑制作用。

競爭性結合試驗。

進行體外激酶試驗以測定本發明化合物的活性。採用KINOME掃描Kdelect試驗方案進行人FLT3受體的激酶結構域的抑制。KINOME掃描平臺採用高通量競爭結合技術。混合DNA-標記的激酶、固定化配體和本發明化合物進行該試驗。採用DNA標籤的定量PCR檢測本發明化合物與固定化配體競爭的能力。採用競爭結合試驗評估本發明化合物對一組96個人蛋白激酶的活性。

在24-孔板塊中，將激酶-標記的T7噬菌體菌株在源自BL21菌株的大腸桿菌宿主中進行平行培養。將大腸桿菌培

養至對數階段，用冷凍儲備物的T7噬菌體感染並在32℃振盪溫育直至裂解。然後離心並過濾裂解物。在HEK-293細胞中產生其餘激酶並用DNA標記以供定量PCR檢測。室溫下，用生物素化的小分子配體處理鏈黴親和素-包被的磁珠30分鐘來產生用於激酶試驗的親和樹脂。用過量生物素封閉配體珠，用封閉緩衝液洗滌以減少非特異性噬菌體結合，所述封閉緩衝液由Sea Block、1%牛血清白蛋白(BSA)、0.05%吐溫20、1 mM二硫蘇糖醇 (DTT)構成。在100%二甲基亞砷(DMSO)中，將本發明的11-點3-倍連續稀釋液製備成的40×儲備液，稀釋成1×直接加入試驗。

通過在1x結合緩衝液中混合配體親和珠、激酶和本發明化合物活化結合反應，所述結合緩衝液由20% Sea Block、0.17M磷酸緩衝鹽水 (PBS)、0.05%吐溫20、6 mM DTT構成。所有反應在聚丙稀384-孔平板中進行，最終體積為0.04 mL。平板在室溫下振盪溫育1小時。親和珠用1xPBS和0.05%吐溫20緩衝液洗滌，然後重懸在由1x PBS、0.05%吐溫20、0.5 uM非生物素化的親和配體構成的洗脫緩衝液中。重懸後，室溫下振盪溫育親和珠。然後通過定量PCR檢測洗脫液激酶濃度。

採用Hill方程，利用標準劑量-反應曲線計算結合常數(Kd)。利用非線性最小二乘擬合與Levenberg-Marquardt演算法擬合曲線。將本發明化合物的Kd與陰性DMSO對照和陽性對照化合物作比較。利用化合物概括目測相互作用圖，TREE點(TREEspot)目測觀察本發明化合物的結合親和力。

直接酶磷酸化試驗。

採用密理博激酶IC50分析試驗(Millipore Kinase IC50 Profiler assay)，對一組正常FLT3和突變的FLT3激酶篩選本發明化合物。對於兩種激酶的試驗，FLT3酶與pH 7.0的8 mM 3-(N-嗎啉基)丙磺酸 (MOPS)、0.2 mM 乙二胺四乙酸 (EDTA)、50 uM合成的Abl肽底物EAIYAAPFAKKK、10 mM 乙酸鎂和 $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}\text{-ATP}]$ 溫育。加入MgATp混合物活化反應。反應混合物在室溫溫育40分鐘，加入3%磷酸溶液停止反應。將10微升反應溶液點樣在P30濾墊上，用75 mM磷酸洗滌3次，5分鐘，然後用甲醇洗滌1次，隨後乾燥並作閃爍計數。利用5.1版的XLFit分析各複製品(包括陽性和陰性對照)的閃爍值，以測定本發明混合物對正常和突變FLT3的IC50值。

野生型FLT3的生物學資料。

本發明的苯磺酸鹽對野生型FLT3的活性示於圖3。所有結合常數以納摩爾濃度示出。在圖3中，比較了本發明化合物對野生型FLT3的活性與本領域已知的其它抑制劑。參見Davis MI, Hunt JP, Herrgard S等, “激酶抑制劑選擇性的綜合分析”(Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity.) Nat Biotechnol 2011; 29: 1046-51。本發明苯磺酸鹽的結合常數(Kd)是0.74 nM。比較本發明的苯磺酸鹽對野生型FLT3的Kd與本領域的另一抑制劑，AST-487的Kd時，本發明的苯磺酸鹽形式對FLT3野生型的親和力是AST-487 (Kd = 0.79 nM)的一倍。比較本發明的苯磺酸鹽對

野生型FLT3的Kd值與本領域的另一抑制劑，奎扎替尼的Kd時，本發明的苯磺酸鹽形式對FLT3野生型的親和力是奎扎替尼 (Kd = 1.3 nM)的兩倍。比較本發明的苯磺酸鹽對野生型FLT3的Kd值與本領域的另一抑制劑，MLN-518的Kd時，本發明的苯磺酸鹽形式對FLT3野生型的親和力是MLN-518 (Kd = 3 nM)的四倍。比較本發明的苯磺酸鹽對野生型FLT3的Kd與本領域的另一抑制劑，來他替尼的Kd時，本發明的苯磺酸鹽形式對FLT3野生型的親和力是來他替尼 (Kd = 8.5 nM)的約十一倍。比較本發明的苯磺酸鹽對野生型FLT3的Kd與本領域的另一抑制劑，米哌妥林的Kd時，本發明的苯磺酸鹽形式對FLT3野生型的親和力是米哌妥林 (Kd = 11 nM)的十五倍。比較本發明的苯磺酸鹽對野生型FLT3的Kd與本領域的另一抑制劑，索拉非尼的Kd時，本發明的苯磺酸鹽形式對FLT3野生型的親和力是索拉非尼 (Kd = 13 nM)的約十八倍。

採用直接酶促密理博激酶IC50分析試驗 (direct enzymatic Millipore IC50 profiler assay)測定本發明苯磺酸鹽的活性。所有IC50值以納摩爾濃度示出。在直接酶促檢測試驗中，本發明苯磺酸鹽對野生型FLT3的IC50值是3 nM。圖1顯示本發明苯磺酸鹽對III類受體酪氨酸激酶的特異性，所述激酶包括FLT3、PDGFRA、PDGFRB、CSF1R和KIT。

FLT3-ITD突變的生物學資料。

本發明的苯磺酸鹽對含有內部串聯重複突變(ITD)的

FLT3的活性示於圖4。所有結合常數以納摩爾濃度示出。在圖4中，比較了本發明化合物與本領域已知的其它抑制劑對FLT3-ITD突變的活性。參見Davis MI, Hunt JP, Herrgard S等，“激酶抑制劑選擇性的綜合分析”(Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity.) Nat Biotechnol 2011; 29: 1046-51。本發明苯磺酸鹽的Kd是0.43 nM。比較本發明的苯磺酸鹽對FLT3-ITD突變的Kd與本領域的另一抑制劑，蘇尼替尼的Kd時，本發明的苯磺酸鹽形式對FLT3-ITD突變的親和力是蘇尼替尼(Kd = 0.99 nM)的兩倍以上。比較本發明的苯磺酸鹽對FLT3-ITD突變的Kd與本領域的另一抑制劑，來他替尼的Kd時，本發明的苯磺酸鹽形式對FLT3-ITD突變的親和力是來他替尼(Kd = 1.5 nM)的三倍以上。比較本發明的苯磺酸鹽對FLT3-ITD突變的Kd與本領域的另一抑制劑，奎扎替尼的Kd時，本發明的苯磺酸鹽形式對FLT3-ITD突變的親和力是奎扎替尼(Kd = 8.8 nM)的二十倍以上。比較本發明的苯磺酸鹽對FLT3-ITD突變的Kd與本領域的另一抑制劑，MLN-518的Kd時，本發明的苯磺酸鹽形式對FLT3-ITD突變的親和力是MLN-518 (Kd = 9.1 nM)的二十三倍以上。比較本發明的苯磺酸鹽對FLT3-ITD突變的Kd與本領域的另一抑制劑，PKC-412的Kd時，本發明的苯磺酸鹽形式對FLT3-ITD突變的親和力是PKC-412 (Kd = 11 nM)的二十五倍以上。比較本發明的苯磺酸鹽對FLT3-ITD突變的Kd與本領域的另一抑制劑，AST-487的Kd時，本發明的苯磺酸鹽形式對FLT3-ITD突變的親和力是

AST-487 ($K_d = 11 \text{ nM}$)的二十五倍以上。比較本發明的苯磺酸鹽對FLT3-ITD突變的 K_d 與本領域的另一抑制劑，索拉非尼的 K_d 時，本發明的苯磺酸鹽形式對FLT3-ITD突變的親和力是索拉非尼 ($K_d = 79 \text{ nM}$)的一百八十三倍以上。

FLT3-D835突變的生物學資料。

本發明的苯磺酸鹽對FLT3酪氨酸激酶結構域突變D835Y和D835H的活性示於圖5和6。所有結合常數以納摩爾濃度示出。在圖5和6中，比較了本發明化合物與本領域已知的其它抑制劑對FLT3 D835突變的活性。參見Davis MI, Hunt JP, Herrgard S等, “激酶抑制劑選擇性的綜合分析”(Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity.) Nat Biotechnol 2011; 29: 1046-51。本發明苯磺酸鹽對FLT D835Y突變的結合常數(K_d)是 0.18 nM ，對FLT D835H突變的結合常數(K_d)是 0.4 nM 。比較本發明的苯磺酸鹽對FLT3 D835Y和D835H突變的 K_d 與本領域的另一抑制劑，來他替尼的 K_d 時，本發明的苯磺酸鹽形式對FLT3 D835Y突變的親和力是來他替尼($D835Y \text{ } K_d = 0.57 \text{ nM}$)的三倍，對FLT3 D835H突變的親和力是來他替尼($D835H \text{ } K_d = 0.66 \text{ nM}$)的一倍。比較本發明的苯磺酸鹽對FLT3 D835Y和D835H突變的 K_d 與本領域的另一抑制劑，蘇尼替尼的 K_d 時，本發明的苯磺酸鹽形式對FLT3 D835Y突變的親和力是蘇尼替尼($D835Y \text{ } K_d = 2.3 \text{ nM}$)的十二倍，對FLT3 D835H突變的親和力是蘇尼替尼($D835H \text{ } K_d = 4.3 \text{ nM}$)的十倍。比較本發明的苯磺酸鹽對FLT3 D835Y和D835H突變的 K_d 與本領域的另

一抑制劑，奎扎替尼的 K_d 時，本發明的苯磺酸鹽形式對FLT3 D835Y突變的親和力是奎扎替尼($D835Y K_d = 7.1 \text{ nM}$)的三十九倍，對FLT3 D835H突變的親和力是奎扎替尼($D835H K_d = 3.7 \text{ nM}$)的九倍。比較本發明的苯磺酸鹽對FLT3 D835Y和D835H突變的 K_d 與本領域的另一抑制劑，AST-487的 K_d 時，本發明的苯磺酸鹽形式對FLT3 D835Y突變的親和力是AST-487 ($D835Y K_d = 11 \text{ nM}$)的六十一倍，對FLT3 D835H突變的親和力是AST-487 ($D835H K_d = 4.9 \text{ nM}$)的十二倍。比較本發明的苯磺酸鹽對FLT3 D835Y和D835H突變的 K_d 與本領域的另一抑制劑，PKC-412的 K_d 時，本發明的苯磺酸鹽形式對FLT3 D835Y突變的親和力是PKC-412 ($D835Y K_d = 15 \text{ nM}$)的八十三倍，對FLT3 D835H突變的親和力是PKC-412 ($D835H K_d = 6.8 \text{ nM}$)的九倍。比較本發明的苯磺酸鹽對FLT3 D835Y和D835H突變的 K_d 與本領域的另一抑制劑，索拉非尼的 K_d 時，本發明的苯磺酸鹽形式對FLT3 D835Y突變的親和力是索拉非尼($D835Y K_d = 82 \text{ nM}$)的四百五十五倍，對FLT3 D835H突變的親和力是索拉非尼($D835H K_d = 30 \text{ nM}$)的七十五倍。

採用直接酶促密理博激酶 IC_{50} 分析試驗(direct enzymatic Millipore IC_{50} profiler assay)測定本發明苯磺酸鹽的活性。所有 IC_{50} 值以納摩爾濃度示出。在直接酶促檢測試驗中，本發明苯磺酸鹽對FLT3 TKD突變D835Y的 IC_{50} 值是 2 nM 。

磷酸化激酶親和力的生物學資料。

ABL1 A環磷酸化對本發明化合物親和力影響的結果示於圖7。本發明苯磺酸鹽對激酶ABL1和ABL (T315I)的親和力分析證明該分子表現出I型抑制劑的特徵性機制。本發明化合物對磷酸化ABL1 ($K_d = 88 \text{ nM}$)和ABL(T315I) ($K_d = 760 \text{ nM}$)的結合常數分別是對非磷酸化ABL1 ($K_d = 600 \text{ nM}$)和ABL(T315I) ($K_d = 12000 \text{ nM}$)的結合常數的七分之一和十五分之一。雖然本發明化合物對ABL無活性，但本發明苯磺酸鹽對磷酸化激酶具有顯著較高的親和力提示克萊拉尼是I型TKI。

本發明苯磺酸鹽對非自抑制和自抑制狀態的FLT3的不同結合親和力還表明該分子具有I型抑制劑的功能。如圖2所示，本發明苯磺酸鹽對非自抑制FLT3的 K_d 值是 0.61 nM ，對自抑制FLT3的 K_d 值是 6.7 nM 。因此，在非自抑制和自抑制狀態的FLT3之間，本發明苯磺酸鹽的親和力有約10倍的親和力變化。該值在報導的其它I型酪氨酸激酶抑制劑的親和力變化範圍內，但遠在報導的II型TKI的100到1000倍親和力變化範圍之外。Davis, MI等., “激酶抑制劑選擇性的綜合分析”(Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity). Nat Biotechnology. 2011; 29 (10): 1046-1051; Zhang, J等., “用小分子激酶抑制劑瞄準癌症打靶”(Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors). Nat Rev Cancer. 2009; 9(1): 28-39; Liu, Y等., “結合無活性激酶構象的抑制劑的理性設計”(Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations). Nat Chem Biol.

2006; 2(7): 358-364。

對於本發明的任何方法、試劑盒、試劑或組合物，可實施本說明書討論的任何實施方式是預期的，反之亦然。此外，可利用本發明的組合物實施本發明的方法。

應該理解，本文所述的特定實施方式是為說明目的顯示，不是對本發明的限制。本發明的主要特徵可用於各種實施方式中而不脫離本發明的範圍。僅採用常規實驗，本領域技術人員會知道或確定本文所述具體流程的許多等價方式。此類等價方式應視作落在本發明的範圍內並被申請專利範圍所覆蓋。

說明書述及的所有出版物和專利申請說明了本發明所屬領域的技術人員的技術水準。與各出版物或專利申請專門且單獨表示通過引用納入的程度一樣，所有出版物和專利申請通過引用納入本文。

當詞語“一”在申請專利範圍和/或說明書中與術語“包含”聯用時，可表示“一”，但還與“一個或多個”、“至少一個”和“一個或多於一個”的意義一致。在申請專利範圍中利用術語“或”表示“和/或”，除非明確表示指代唯一的備選方案或者備選方案相互排斥，但本發明支持指代唯一的備選方案和“和/或”的定義。本申請通篇利用術語“約”表明某數值包括、用於測定該數值的方法、裝置的固有誤差，或研究客體之間存在的偏差。

本說明書和申請專利範圍中使用的詞語“包含”(和任何形式的包含，例如“含有”和“包括”)、“具有”(和任何形式的

具有，例如“有”和“擁有”)、“包括”(和任何形式的包括，例如“包括有”和“包括了”)或“含有”(任何形式的含有，例如“含”和“包含”)是非排他性的或開放式的，不排除未述及的其它元素或方法步驟。

本文所用的術語“或它們的組合”指該術語之前所列專案的所有排列和組合。例如，“A、B、C或它們的組合”應包括以下的至少一種：A、B、C、AB、AC、BC或ABC，如果在特定情況中順序是至關重要的，還包括BA、CA、CB、CBA、BCA、ACB、BAC或CAB。繼續以此為例，明顯包括的組合含有一個或多個專案或術語的重複，例如BB、AAA、MB、BBC、AAABCCCC、CBBAAA、CABABB等等。技術人員應理解任何組合中專案或術語的數量通常不作限制，除非上下文中明顯有限制。

本文所用的近似詞語，例如但不限於“約”、“實質性”或“實質性地”指這樣一種條件：當如此修飾時，應理解為不必是絕對的或完美的，但認為足夠接近本領域普通技術人員的那些條件，從而保證能指明該條件，如其存在的那樣。說明書可變動的範圍取決於產生的改變有多大，但該改變仍使得本領域普通技術人員認識到修飾的特徵仍具有未修飾特徵的所需特徵和性能。根據前述討論，用近似詞語，例如“約”修飾的數值通常可自所述值改變至少 ± 1 、2、3、4、5、6、7、10、12或15%。

根據本發明，無需過度的實驗即可以作出和實施本文披露和要求保護的所有組合物和/或方法。雖然根據優選的

實施方式描述了本發明的組合物和方法，本領域技術人員應該明白可對本文所述的組合物和/或方法以及方法的步驟或步驟次序作出改變而不脫離本發明的概念、構思和範圍。對本領域技術人員是顯而易見的所有此類相似的替代方式和改進應視作落在隨附申請專利範圍限定的本發明構思、範圍和概念內。

參考文獻

其它出版物

Drexler, HG等. “白血病細胞的FLT3受體表達和對FLT3配體的反應”(Expression of FLT3 receptor and response to FLT3 ligand by leukemic cells). *Leukemia*. 1996; 10:588-599.

Gilliland, DG和JD Griffin. “FLT3在造血作用和白血病中的作用”(The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia). *Blood*. 2002;100:1532-1542.

Stirewalt, DL和JP Radich. “FLT3在造血惡性腫瘤中的作用”(The role of FLT3 in hematopoietic malignancies). *Nat Rev Cancer*. 2003;3:650-665.

Nakao M, S Yokota和T Iwai. “急性髓性白血病中發現的FLT3基因內部串聯重複”(Internal tandem duplication of the FLT3 gene found in acute myeloid leukemia). *Leukemia*. 1996; 10:1911-1918.

H Kiyoi, M Towatari和S Yokota “FLT3基因的內部串聯重複是導致產物的組成型活化的延伸突變新形態”(Internal

Tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation, which causes constitutive activation of the product). *Leukemia*. 1998; 12:1333-1337.

PD Kottaridis, RE Gale等, “急性髓性白血病(AML)患者中存在FLT3內部串聯重複增加了細胞遺傳風險組的重要預後資訊和對第一輪化療的反應：英國醫學研究理事會AML 10和12次試驗中854位患者的分析”(The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials). *Blood*. 2001; 98:1742-1759.

Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y. “人血液學惡性腫瘤中FLT3的活化環內D835的活化突變”(Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies). *Blood*. 2001; 97:2434-2439.

Thiede C, C Steudel, Mohr B. “979位急性髓性白血病患者中FLT3-活化突變的分析：與FAB亞型相關和鑑定預後較差的亞群”(Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis). *Blood*. 2002; 99:4326-4335.

S Bains, Luthra R, Medeiros LJ和Zuo Z. “骨髓增生異

常綜合症中的FLT3和NPM1突變：預測發展為急性髓性白血病的頻率和潛能值”(FLT3 and NPM1 mutations in myelodysplastic syndromes: Frequency and potential value for predicting progression to acute myeloid leukemia). American Journal of Clinical Pathology. January 2011; 135:62-69.

PK Bhamidipati, Daver NG, Kantarjian H等, “骨髓增生異常綜合症(MDS)和慢性骨髓單細胞性白血病(CMML)中的 FLT3 突變”(FLT3 mutations in myelodysplastic syndromes(MDS) and chronic myelomonocytic leukemia (CMML)). 2012. Journal of Clinical Oncology. 增刊; 摘要 6597.

Nakao M, S Yokota和T Iwai. “急性髓性白血病中發現的FLT3基因內部串聯重複”(Internal tandem duplication of the FLT3 gene found in acute myeloid leukemia). Leukemia. 1996; 10:1911-1918.

H Kiyoi, M Towatari和S Yokota “FLT3基因的內部串聯重複是導致產物的組成型活化的延伸突變新形態”(Internal Tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation, which causes constitutive activation of the product). Leukemia. 1998; 12:1333-1337.

H Kiyoi, T Naoe和S Yokota. “急性早幼粒細胞性白血病中與白細胞增多相關的FLT3內部串聯重複”(Internal tandem duplication of FLT3 associated with leukocytosis in

acute promyelocytic leukemia). 厚生省白血病研究組 (Leukemia Study Group of the Ministry of Health and Welfare). *Leukemia*. 1997; 11:1447-1452.

S Schnittger, C Schoch和M Duga. “1003位急性髓性白血病患者中的FLT3長度突變分析：根據細胞遺傳學、FAB亞型以及在AMLCG研究中的預後和用作檢測輕微後遺症的標記”(Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease). *Blood*. 2002; 100:59-66.

FM Abu-Duhier, Goodeve AC, Wilson GA等, “成人急性髓性白血病中的FLT3內部串聯重複突變確定高風險組”(FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukemia define a high risk group). *British Journal of Haematology*. 2000; 111:190-195.

H Kiyoi, T Naoe, Y Nakano等, “FLT3和N-RAS基因突變在急性髓性白血病中的預後含義”(Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia). *Blood*. 1999; 93:3074-3080.

DL Stirewalt和JP Radich. “FLT3在造血惡性腫瘤中的作用”(The role of FLT3 in haematopoietic malignancies). *Nature Reviews Cancer*. 2003; 3:650-665.

Y Yamamoto, H Kiyoi和Y Nakano等, “人血液學惡性腫

瘤中FLT3活化環內的D835活化突變”(Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies). *Blood*. 2001; 97:2434-2439.

C Thiede, Steudal C, Mohr B等, “979位急性髓性白血病患者中FLT3-活化突變的分析：與FAB亞型相關和鑑定預後較差的亞群”(Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis). *Blood*. 2002; 99:4326-4335.

U Bacher, Haferlach C, W Kern等, “AML中FLT3-TKD突變的預後相關性：組合問題-3082位患者的分析”(Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters-an analysis of 3082 patients). *Blood*. 2008; 111:2527-2537.

T Kindler, Lipka DB和Fischer T. “FLT3作為AML中的治療靶標：這些年後仍是難點”(FLT3 as a therapeutic target in AML: still challenging after all these years). *Blood*. 2010; 116:5089-102.

Liu, Y和N Gray. “結合無活性激酶構象的抑制劑的理性設計”(Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations). *Nature Chem. Biol.* 2006; 2:358-354.

A Ramachandran, Marshall H和Jain V. “克萊拉尼，III類受體酪氨酸激酶的新I型突變體特異性抑制劑，優先結合磷酸化激酶”(Crenolanib, a novel type I, mutant specific

inhibitor of class III receptor tyrosine kinases, preferentially binds to phosphorylated kinases). *Cancer Res.* 2012; 72 (8增刊): 3683.

J Zhang, Yang PL和Gray NS., “用小分子激酶抑制劑瞄準癌症打靶”(Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors). *Nat Rev Cancer.* 2009; 9: 28-39.

PW Manley, Cowan-Jacob SW, Mestan J. “用於治療慢性髓性白血病的Bcr-Abl激酶抑制劑的結構生物學、設計和臨床開發中的進展”(Advances in the structural biology, design and clinical development of Bcr-Abl kinase inhibitors for the treatment of chronic myeloid leukaemia). *Biochim. Biophys. Acta.* 2005; 1754:3-13.

PT Wan等, “B-RAF的致癌突變活化RAF-ERK信號傳導途徑的機制”(Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF). *Cell.* 2004; 116:855-867.

生物學過程參考文獻

MA Fabian等. “臨床激酶抑制劑的小分子激酶相互作用圖”(A small molecule-kinases interaction map for clinical kinase inhibitors). *Nat Biotechnol.* 2005; 23:329-336.

MW Karaman等. “激酶抑制劑選擇性的定量分析”(A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity). *Nat Biotechnol.* 2008; 26:127-132.

TA Carter等. “抑制ABL、KIT和EGF受體激酶的耐藥性

突變體”(Inhibition of drug-resistant mutants of ABL, KIT, and EGF receptor kinases). Proc. Natl. Acad. Sci.USA.2005; 102:11011-11016.

【主要元件符號說明】

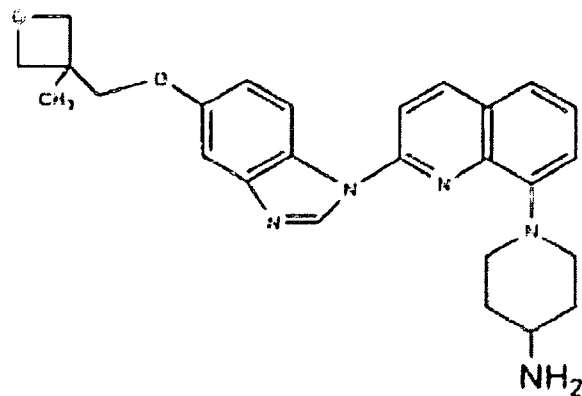
(無)

七、申請專利範圍：

公告本

105年11月23日修正頁

1. 一種治療或預防有效量的式I所示化合物



I

或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物於製造一藥劑之用途，該藥劑係用於抑制或降低一患有血液學惡性腫瘤的對象中失調的FLT3酪氨酸激酶活性或表達。

2. 如申請專利範圍第1項之用途，其中該血液學惡性腫瘤係選自以下的至少一者：白血病、骨髓瘤、骨髓增殖性疾病及骨髓增生異常綜合症。
3. 如申請專利範圍第1項之用途，其中該治療或預防有效量是每天約15-500、25-450、50-400、100-350、150-300、200-250、15、25、50、75、100、150、200、250、300、400、450或500毫克。
4. 如申請專利範圍第1項之用途，其中該化合物係擬以連續、間歇、全身性或局部給藥中的至少一者給藥。
5. 如申請專利範圍第1項之用途，其中失調的FLT3係進一步界定為組成型活化的突變FLT3。
6. 如申請專利範圍第1項之用途，其中該化合物係擬以口服、靜脈內或腹膜內給藥。

105年11月23日修正本

7. 如申請專利範圍第1項之用途，其中該式I所示化合物(克萊拉尼，Crenolanib)或其藥學上可接受的鹽或溶劑化物是以下的至少一者：苯磺酸克萊拉尼、磷酸克萊拉尼、乳酸克萊拉尼、鹽酸克萊拉尼、檸檬酸克萊拉尼、乙酸克萊拉尼、甲苯磺酸克萊拉尼和琥珀酸克萊拉尼。
8. 如申請專利範圍第1項之用途，其中該FLT3是FLT3-ITD或FLT3-TKD的至少一者。
9. 如申請專利範圍第1項之用途，其中該治療或預防有效量的化合物係擬以每天給藥，只要該對象需要治療血液學惡性腫瘤。
10. 如申請專利範圍第1項之用途，其中該化合物係擬與另一細胞毒性或靶定之藥劑以順次或相伴方式中的至少一者提供給新診斷的血液學惡性腫瘤對象或復發/難治的血液學惡性腫瘤對象以維持現有對象的緩解。
11. 如申請專利範圍第1項之用途，其中該化合物係擬作為單一藥劑或與另一細胞毒性或靶定之藥劑組合提供給新診斷的血液學惡性腫瘤對象或復發/難治的血液學惡性腫瘤對象以維持緩解。
12. 如申請專利範圍第1項之用途，其中該化合物係擬作為單一藥劑或與另一細胞毒性或靶定之藥劑組合提供給新診斷的血液學惡性腫瘤兒科對象或復發/難治的血液學惡性腫瘤兒科對象以維持緩解。
13. 如申請專利範圍第1項之用途，其中該對象係對一先前FLT3酪氨酸激酶抑制劑會復發/難治者。

21. 如申請專利範圍第14項之用途，其中該克萊拉尼係擬作為單一藥劑提供以治療標準或高劑量化療、放療或外科手術難治的或在標準或高劑量化療、放療或外科手術之後復發的血液學惡性腫瘤對象。
22. 如申請專利範圍第14項之用途，其中該對象是對至少一者其它酪氨酸激酶抑制劑難治者。
23. 如申請專利範圍第14項之用途，其中該對象係在治療前被識別為需要治療血液學惡性腫瘤者。
24. 一種治療有效量的克萊拉尼或其鹽於製造一藥劑之用途，該藥劑係用於給藥予需要特異性抑制FLT3受體酪氨酸激酶的哺乳動物，其中於給藥前一對象樣品係被獲取，以及失調的受體酪氨酸激酶係被確定。
25. 如申請專利範圍第24項之用途，其中該失調的受體酪氨酸激酶係存在於血液學惡性腫瘤，該血液學惡性腫瘤係選自以下的至少一者：白血病、骨髓瘤、骨髓增殖性疾病和骨髓增生異常綜合症。
26. 如申請專利範圍第24項之用途，其中該治療和預防有效量是每天約15-500毫克。
27. 如申請專利範圍第24項之用途，其中該化合物的給藥是擬以連續、間歇、全身性或局部給藥中的至少一者給藥。
28. 如申請專利範圍第24項之用途，其中失調的FLT3進一步界定為組成型活性的突變FLT3。
29. 如申請專利範圍第24項之用途，其中該化合物係擬經口服、靜脈內或腹膜內給藥。

公告本

105年6月17日修正

頁

30. 如申請專利範圍第24項之用途，其中該克萊拉尼是以下的至少一者：苯磺酸克萊拉尼、磷酸克萊拉尼、乳酸克萊拉尼、鹽酸克萊拉尼、檸檬酸克萊拉尼、乙酸克萊拉尼、甲苯磺酸克萊拉尼和琥珀酸克萊拉尼。
31. 如申請專利範圍第24項之用途，其中該FLT3是FLT3-ITD或FLT3-TKD的至少一者。
32. 如申請專利範圍第24項之用途，其中該治療或預防有效量的該化合物係擬每天給予，只要該對象需要治療血液學惡性腫瘤。
33. 如申請專利範圍第24項之用途，其中該對象係擬被提供治療且其後一個或多個對象樣品係擬被獲取以測定療效，以及該治療係擬持續直至血液學惡性腫瘤減輕或消除。
34. 如申請專利範圍第24項之用途，其中該化合物係擬與另一細胞毒性或靶定之藥劑以順次或相伴方式中的至少一者提供給新診斷的血液學惡性腫瘤對象或復發/難治的血液學惡性腫瘤對象以維持緩解。
35. 如申請專利範圍第24項之用途，其中該化合物係擬作為單一藥劑提供或與另一細胞毒性或靶定之藥劑組合提供給新診斷的血液學惡性腫瘤的對象或復發/難治的血液學惡性腫瘤對象以維持緩解。
36. 如申請專利範圍第24項之用途，其中該化合物係擬作為單一藥劑提供或與另一細胞毒性或靶定之藥劑組合提供給新診斷的血液學惡性腫瘤兒科對象或復發/難治的

血液學惡性腫瘤兒科對象以維持緩解。

37. 如申請專利範圍第24項之用途，其中該對象係對一先前之FLT3酪氨酸激酶抑制劑會復發/難治者。