



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201219393 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 05 月 16 日

(21)申請案號：100126076

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 07 月 22 日

(51)Int. Cl. : **C07D487/04 (2006.01)**

A61K31/5025(2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2010/07/30 美國

61/369,335

(71)申請人：美國禮來大藥廠(美國) ELI LILLY AND COMPANY (US)

美國

(72)發明人：吳齊佩 WU, ZHIPEI (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：6 項 圖式數：0 共 32 頁

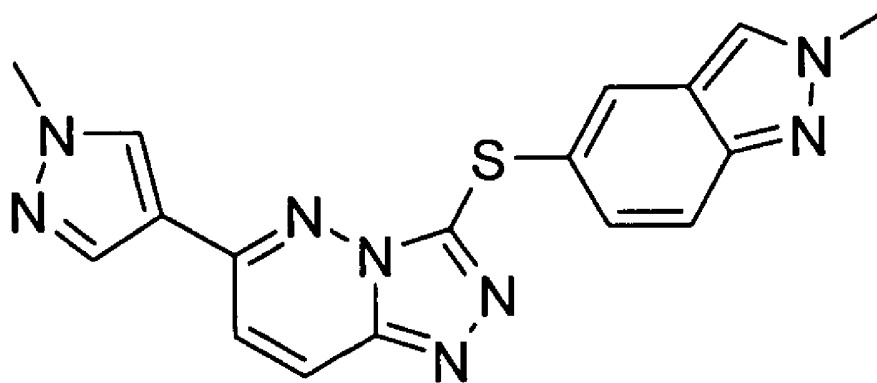
(54)名稱

可作為一種 c-MET 抑制劑之化合物

COMPOUND USEFUL AS A C-MET INHIBITOR

(57)摘要

本發明係關於一種 c-Met 抑制劑(本文所揭示)或其醫藥上可接受之鹽，其可用於治療由 c-Met 受體活性所介導之癌症。





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201219393 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 05 月 16 日

(21)申請案號：100126076

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 07 月 22 日

(51)Int. Cl. : **C07D487/04 (2006.01)**

A61K31/5025(2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2010/07/30 美國

61/369,335

(71)申請人：美國禮來大藥廠(美國) ELI LILLY AND COMPANY (US)

美國

(72)發明人：吳齊佩 WU, ZHIPEI (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：6 項 圖式數：0 共 32 頁

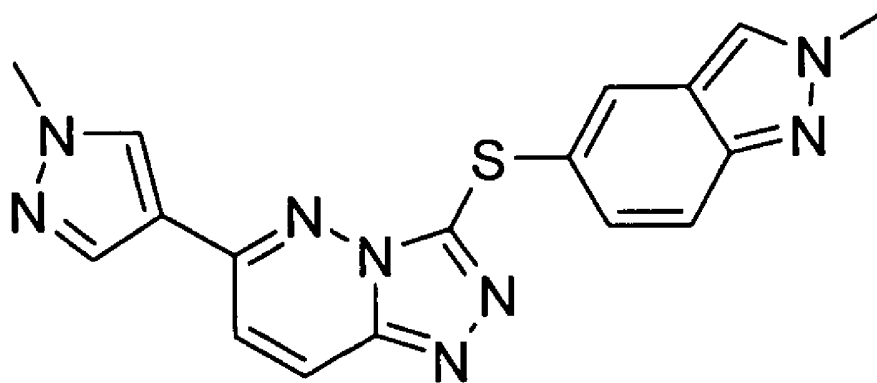
(54)名稱

可作為一種 c-MET 抑制劑之化合物

COMPOUND USEFUL AS A C-MET INHIBITOR

(57)摘要

本發明係關於一種 c-Met 抑制劑(本文所揭示)或其醫藥上可接受之鹽，其可用於治療由 c-Met 受體活性所介導之癌症。



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係屬於醫藥化學領域。本發明係關於癌症的治療。更特定言之，本發明係關於用於治療癌症 c-Met 受體訊號路徑之抑制劑。

【先前技術】

c-Met 表現係發生在內皮、上皮及間質細胞中。HGF/c-Met 傳遞訊號路徑的失調係與腫瘤的形成及發展有關。腫瘤細胞 c-Met 受體的失調會促進腫瘤細胞增殖、侵襲/轉移，及抗細胞凋亡 (Porter 等人，Small molecule c-Met kinase inhibitors: a review of recent patents, Expert Opinion on Therapeutic Patents, (2010), 20(2), 159-177)。

許多種 c-Met 受體抑制劑 (c-Met 抑制劑) 業經報導。例如，專利合作條約 (PCT) 國際公開案 WO 2008051808 A2、WO 2008/051805 A3、及 WO 2009/106577 A1 揭示可用於癌症治療之化合物。

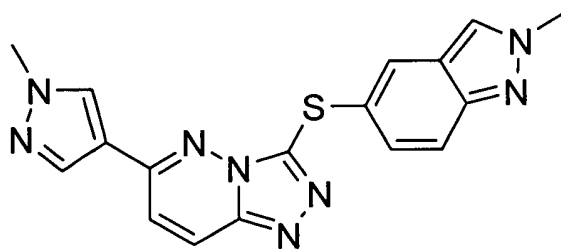
儘管可用於治療各種癌症之化合物 (包括 c-Met 抑制劑) 業經報導，但這些化合物中有些並不十分有效。有些化合物缺乏持續性的效力，有些沒有令人滿意的藥物動力/藥效 (PK/PD)，而有些則沒有令人滿意的代謝概況 (Xiangdong, 等人，Trends in Molecular Medicine (2010) 16(1), 41-42；參見：Diamond S. 等人，Species-specific metabolism of SGX523 by aldehyde oxidase 及 the toxicological implications, Drug Metab Dispos. 2010,

38(8):1277-85)。

因此，有需要可用以治療癌症之強效及有效之新穎性化合物。特定言之，有需要具有強效的化合物。另，有需要具有持久性效力之化合物。除此之外，有需要可用以治療癌症之具有可接受PK/PD概況的化合物。本發明係提供一種新穎性化合物，該化合物針對治療c-Met所介導之癌症呈現出高效力、持續性臨床前效力，及可接受PK/PD概況。

【發明內容】

本發明化合物為下式之化合物



或其醫藥上可接受鹽。

本發明提供一種醫藥組合物，其包括治療有效劑量之本發明化合物或其醫藥上可接受鹽及一或多種醫藥上可接受載劑、稀釋劑、或賦形劑。

本發明提供一種醫藥組合物，其包括本發明化合物併與一或多種醫藥上可接受載劑、稀釋劑、或賦形劑，及視情況一或多種其它治療劑之組合。

本發明提供一種治療癌症之方法，其包括投與有其需要病患治療有效量之本發明化合物或其醫藥上可接受鹽。

本發明提供一種治療癌症之方法，此癌症係選自結腸直腸癌、乳癌、頭部及頸部癌症、前列腺癌、胃癌、胰臟癌、肝癌、腎癌、肺癌、白血病、黑色素瘤、神經膠質母細胞瘤及肉瘤，該方法包括投與有其需要病患治療有效量之本發明化合物或其醫藥上可接受鹽。

本發明係關於治療癌症之方法，此癌症選自胃癌、神經膠質母細胞瘤及胰臟癌，此方法包括投與有其需要病患治療有效量之本發明化合物或其醫藥上可接受鹽。

本發明提供一種治療乳癌或結腸直腸癌之方法，其包括投與有其需要病患治療有效量之本發明化合物或其醫藥上可接受鹽。

本發明提供一種本發明化合物或其醫藥上可接受鹽，其係用於治療。

本發明提供一種本發明化合物，其係用於癌症治療。

本發明提供一種本發明化合物，其係用於胃癌、胰臟癌、神經膠質母細胞瘤、乳癌或結腸直腸癌治療。

本發明係關於本發明化合物或其醫藥上可接受鹽在製造治療癌症藥物方面上之用途。

本發明係關於本發明化合物或其醫藥上可接受鹽在製造治療癌症(選自胃癌、胰臟癌及神經膠質母細胞瘤)藥物方面上之用途。

如本文所用「Met」、「c-Met」、「cMet」或「c-Met受體」係指肝細胞生長因子(hepatocyte growth factor; HGF)受體及其表現形態。

片語「HGF/c-Met傳遞訊號路徑的失調」意指經由HGF/c-Met訊號路徑具有增高訊號或不適當訊號量。

本發明化合物之「治療有效量」係指該化合物之含量能夠以一或多劑量達到抑制c-Met受體活性以完成治療癌症。有效量可輕易地由如熟知此項技藝者之主治醫師或診斷醫生藉由下列熟知此項技藝者之一些因素決定，例如腫瘤大小、年齡，病患一般身體狀況、特定癌症或待治療之共存疾病、嚴重程度、投藥模式、劑量療法、合併用藥等。

如本文所用術語「治療」或「處理」意指腫瘤生長停滯、抑制腫瘤生長、阻止腫瘤生長發生或復發，及/或降低癌症嚴重性或效應。

如本文所用片語「持續性效力」係指本發明化合物在例如抑制腫瘤生長之藥物藥效學效應之持續性水平，或本發明化合物之血漿濃度之持續性含量達4小時以上。持續性效力之好處包括投藥頻率降低及/或劑量減少。

如本文所用片語「可接受PK/PD特性」係指藥物動力(PK)及藥效(PD)特性概況，該等特性針對預定目的(諸如癌症治療)允許一天一次(QD)或一天兩次(BID)投藥此化合物。此所預期的PK/PD特性包括諸如生物利用性、清除率及代謝安定性等參數。

本發明化合物亦可以一種酸加成鹽存在。醫藥上可接受鹽及製備該等之一般製備方法是熟習此項技藝者所熟知的。參見，例如P.Stahl,等人.Handbook of Pharmaceutical

Salts: Properties, Selections and Use (VCHA/Wiley-VCH, 200)；S. M. Berge等人，「Pharmaceutical Salts」Journal of Pharmaceutical Sciences, 66卷，No. 1, 1977年1月。本發明化合物較佳的鹽包括氫氯酸鹽、甲烷磺酸鹽及硫酸氫鹽。熟習此項技藝者清楚製備酸加成鹽的程序，特定言之，本發明較佳的酸加成鹽。

較佳地，本發明提供治療下列癌症之方法，包括乳癌、結腸直腸癌、頭部及頸部癌症、前列腺癌、胃癌、胰臟癌、肝癌、腎癌、肺癌、黑色素瘤、肉瘤、白血病或後期轉移性癌。更佳地，本發明提供治療選自由下列癌症組成之群之方法：乳癌、結腸直腸癌、胃癌、胰臟癌、及後期轉移性癌。另外較佳的是，本發明實施例包括投予有效量之本發明化合物以治療乳癌或結腸直腸癌。在一最佳實施例中，本發明提供治療胃癌或胰臟癌之方法，其包括投予有其需要病患治療有效量之本發明化合物或其醫藥上可接受鹽。

在一較佳實施例中，本發明亦提供醫藥組合物，該組合物包括本發明化合物併與一或多種醫藥上可接受載劑、稀釋劑或賦形劑之組合。在一特定實施例中，該組合物進一步包括一或多種其它治療劑。

【實施方式】

本發明化合物基本上如下例所描述製備之：

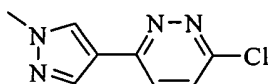
縮語

DCM 二氯甲烷

DMF	N,N-二甲基甲醯胺
EtOAc	乙酸乙酯
THF	四氫呋喃
DMSO	二甲基亞砜
RT	室溫
ACN	乙腈
IPA	異丙醇

製備 1

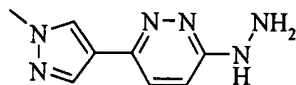
3-氯-6-(1-甲基-1-氫-4-吡唑)嘧啶



在裝有含有1-甲基-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼-2-基)-1-氫-吡唑(76 g, 365.3 mmol)、3,6-二氯嘧啶(68 g, 456.4 mmol)之1,4-二噁烷(1200 mL)溶液的3000 mL圓底燒瓶中加入 K_2CO_3 (127 g, 919 mmol)溶於水(480 mL)之水溶液。在加入[1,1'-雙(二苯基膦基)二茂鐵]氯化鈣(II)氯化物(7.5 g, 9.2 mmol)之後,用 N_2 淨化混合物20分鐘且在 $80^\circ C$ 攪拌16小時,將反應混合物倒至水(300 mL)及二氯甲烷(2000 mL)中,水層用DCM (3×800 mL)萃取。經合併有機層以無水 Na_2SO_4 乾燥且在真空下濃縮。初產物用矽膠管柱以DCM/甲醇(40:1)沖提進行純化,可獲得淡黃色固體之標題化合物(56 g, 63.1%)。MS (m/z): 195.1 (M+H)。

製備 2

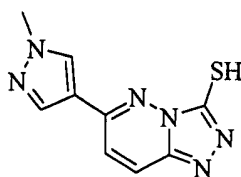
3-胍基-6-(1-甲基-1-氫-4-吡唑)-嘧啶



在 4℃，在裝有含單水合胍(280 mL，4.89 mol)之乙醇(300 mL)溶液的 1000 mL 圓底燒瓶中加入 3-氯-6-(1-甲基-1-氫-4-吡唑)嘧啶(60 g，308.3 mmol)。將所得透明溶液加熱回流 18 小時，然後冷卻至 10℃。藉由過濾及真空乾燥收集經沉澱的產物，可獲得白色固體之標題化合物(53 g，90.4%)，即可使用。

製備 3

6-(1-甲基-1-氫-4-吡唑)-[1,2,4]三唑酮[4,3-b]嘧啶-3-硫醇



在 3-胍基-6-(1-甲基-1-氫-4-吡唑)嘧啶(53 g，278.6 mmol)之乙醇(550 mL)溶液中加入 KOH(17.2 g，306.6 mmol)溶於水(130 mL)之水溶液，隨後加入 CS₂(36 mL，596.7 mmol)。混合物在 N₂ 氣下於 60-67℃ 攪拌 3 小時，並冷卻至室溫。溶劑在真空下移除，並將殘餘物溶解於 1 N NaOH 溶液(350 mL)中。過濾掉不溶物，濾液用 1 N HCl 溶液酸化至 pH 2~3。收集沉澱物，水洗，真空乾燥，以提供標題化合物(50 g，77.3%)。MS (m/z): 233.0 (M+H)。

製備 4

1 氫 - 吡 啶 - 5 - 胺

在配備有H₂進口、溫度計，及機械攪拌器之5000 mL高壓滅菌鍋中加入5-硝基-1 氫 - 吡 啶 (500 g, 3.06 mol) 之四氫呋喃 (THF, 3500 mL) 溶液，隨後加入碳載鈀 (10%，50 g, 141 mmol)。所得混合物在25℃，H₂氣 (5 kg壓力) 下隔夜攪拌。在用N₂淨化後，過濾混合物，濾液在真空下濃縮，可獲得棕色固體化合物 (420 g, 100%)。MS (m/z): 134.1 (M+H)。

製備 5

5-碘-1 氫 - 吡 啶

在濃縮HCl (1.3 L, 15.8 mol) 溶於水 (3.5 L) 之溶液中加入1 氫 - 吡 啶 - 5 - 胺 (500 g, 3.8 mol)，隨後在0-5℃下，逐量加入NaNO₂ (285 g, 4.1 mol) 溶於水 (1 L) 之溶液。所得紅色懸浮液在50℃下緩慢加至KI (3.1 kg, 18.7 mol) 溶於水 (3 L) 之溶液中，以保持氣體產生量在控制範圍內。所得混合物在50℃下攪拌1.5小時，冷卻至10℃，用Na₂CO₃飽和水溶液鹼化至pH 8。以過濾作用收集固體，並再溶解於EtOAc (20 L) 中。該溶液以飽和Na₂CO₃水溶液 (3×5 L) 沖洗，經無水Na₂SO₄乾燥且經短的矽膠管柱過濾，在真空下濃縮該濾液，可得標題化合物 (680 g, 74.2%)。MS (m/z): 244.9 (M+H)。

製備 6

5-碘-2-甲基-2 氫 - 吡 啶

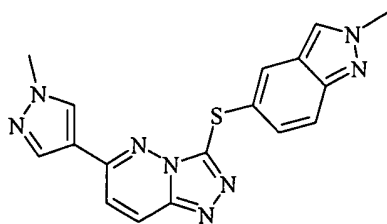
在5-碘-1 氫 - 吡 啶 (500 g, 2.05 mol) 溶於EtOAc (4 L) 之溶

液中加入三甲基氧鎢四氟硼酸(450 g, 3.04 mol)。所得白色懸浮液在室溫下攪拌2小時後，在真空下進行濃縮。在殘餘物中加入冰水(1 L)，用10% NaOH水溶液鹼化至pH 12，以過濾作用收集固體，並再溶解於DCM(5 L)中。過濾掉不溶物，濾液用10% NaOH水溶液(2×100 mL)沖洗。有機層經無水Na₂SO₄乾燥，經短的矽膠管柱過濾，並濃縮。將甲基第三-丁基醚加入殘餘物中產生泥狀物，並以過濾作用收集產物可得到標題化合物(360 g, 68.0%)。MS (m/z): 259.0 (M+H)。

實例 1

6-(1-甲基-1-氫-4-吡唑)-3-(2-甲基-2-氫-吡唑-5-基硫代)-

[1,2,4]三唑酮[4,3-b]噻嗪

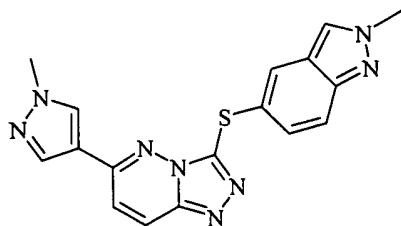


在 6-(1-甲基-1-氫-4-吡唑)-[1,2,4]三唑酮[4,3-b]噻嗪-3-硫醇(2.3 g, 10.0 mmol)溶於DMF(20 mL)之溶液中加入5-碘-2-甲基-2-氫-吡唑(2.6 g, 10.0 mmol)、三-二仲苄基丙酮二鈹(0)(460 mg, 502.7 μmol)、4,5-雙(二苯膦基)-9,9-二甲基二苯并呋喃(580 mg, 1.0 mmol)、二異丙基乙胺(4 ml, 22.9 mmol)。混合物用N₂淨化且在100℃攪拌18小時。在真空下移除DMF，殘餘物藉由快速管柱層析法(Combi-Flash, 矽膠)以DCM/乙醇(20:1)沖提可得到初產物。將該初產物懸浮在20 mL DCM中產生泥狀物，藉由過濾作用收

集純產物，可得黃色固體之標題產物(1.9 g，52.5%)。MS (m/z):363.1 (M+H)。

實例 1a

6-(1-甲基-1氫-4-吡唑)-3-(2-甲基-2氫-吡唑-5-基硫代)-
[1,2,4]三唑酮[4,3-b]噻嗪



在 6-(1-甲基-1氫-4-吡唑)-[1,2,4]三唑酮[4,3-b]噻嗪-3-硫醇(50 g，268 mmol)溶於DMF(750 mL)之溶液中加入5-碘-2-甲基-2氫-吡唑(55.5 g，215.1 mmol)、2-吡啶酸(5.5 g，44.7 mmols)、銅(I)碘化物(4 g，21.0 mmols)，及碳酸鉀(212.5 g，652.2 moles)。混合物置於N₂下且在100℃攪拌10小時。然後將反應混和物冷卻至室溫並倒至水中(2000 mL)。在室溫下攪拌30分鐘後，以混合溶劑(2 L×2，CHCl₃/IPA=3/1)萃取該混合物。而後該經合併有機層以混合溶液(25% NH₄OH_(aq)/鹽水=¼；800 mL)、飽和LiCl_(aq)(1 L)、飽和鹽水(1.5 L×2)沖洗4次，經Na₂SO₄乾燥。有機溶液在減壓條件下進行濃縮，可得到棕色初級固體產物。此初級產物和乙酸乙酯(800 mL)在室溫下研磨3小時，且藉由過濾作用收集純產物以提供白色固體之標題化合物(68 g，87.2%)。MS (m/z): 363.0 (M+H)。

本發明化合物經發現具有高效力、對於c-Met受體具有

高度選擇性、顯示具有可接受之PK/PD特性，且證明具有持續性效力。

基本上如本文所述之下列分析法可證明本發明化合物可有效地抑制細胞內c-Met磷酸化、有效地抑制活體內c-Met，且可證明在某些異種移植模式中劑量依賴性抗腫瘤活性。

c-Met均相時差式螢光(HTRF)之活體外分析法

此分析法係以HTRF技術為基礎，且其可用以偵測生物素標記酪胺酸肽被c-Met酵素進行之磷酸化作用。在此反應完成後，採用經XL665標記之鏈黴抗生物素蛋白來識別生物素單元及鎔(Eu^{3+})，採用經標記之抗磷酸化酪胺酸抗體來識別磷酸化之酪胺酸。此檢測過程係依賴經激發 Eu^{3+} 與經XL665標記之鏈黴抗生物素蛋白標記之間的能量轉移。此步驟流程目的在於計算該等待測化合物抑制此反應產物之磷酸化能力及計算該等的相關 IC_{50} 值。

若需要時，可將參考化合物溶於100% DMSO中，製成1 mM儲備溶液，而該等待測化合物則溶於100% DMSO中，製成10 mM儲備溶液。在96孔稀釋盤中將1 mM參考化合物及10 mM待測化合物預先稀釋至含有8 μM 及80 μM 之10% DMSO溶液。利用Tecan Freedom EVO 200將該等化合物連續稀釋(1:3)，且針對每一待測化合物產生10點稀釋曲線。利用Temo (Tecan)取10 μl 經連續稀釋化合物轉移至96孔分析盤中。每一分析盤含有酵素最大活性及酵素最小活性之對照組。最大活性對照組槽孔中含有10 μl 的10% DMSO而

最小活性對照組槽孔中含有10 μL 溶於10% DMSO中之500 mM乙二胺四乙酸(EDTA)。利用Multidrop (Thermo)將20 μl 受質溶液[於酵素緩衝液(EDB)中製備之Bio-PolyGT (CisBio)(0.576 μM)及 ATP (65.14 μM)，參(羥甲基)胺基甲烷，Trizma[®]基礎緩衝液，pH 7.5，50 mM；2 mM DL-二硫蘇糖醇(DTT)；0.0005% TX-100；10 mM MgCl_2 ；及250 μM EDTA)]加至分析盤中。利用Multidrop (Thermo)將10 μl 酵素混合物[於EDB中製備之cMET(12 nM)]加至分析盤中開始進行反應。分析盤板搖動30秒後，在室溫下培養90分鐘。培養90分鐘後，利用Multidrop (Thermo)將40 μl 偵測緩衝液加至分析盤中[於2.6*KF/EDTA 4-(2-羥乙基)哌嗪-1-乙磺酸中製備之鏈黴抗生物素-XL665 (SA-XL665)(Cisbio)(144 nM)及經 Eu^{3+} 標記之抗磷酸化酪胺酸抗體(EuK)(CisBio)(6 nM)；50 mM N-(2-羥乙基)哌嗪-N'-(2-乙磺酸(HEPES)緩衝液，pH 7.0；0.2% BSA；20 mM EDTA；800 mM KF)]。將分析盤在室溫下培養60分鐘後，以Victor3儀器(PerkinElmer公司)在發射波長620 nm及激發波長665 nm下讀取螢光信號。針對每個分析盤進行665/620比值標準化，並將抑制數值百分比與化合物濃度標繪作圖，以計算出相關 IC_{50} 值。對於實例1化合物之 IC_{50} 值係0.010 μM ，標準偏差是0.00071而樣本數是2。對於實例1甲磺酸鹽形式之 IC_{50} 值係0.025 μM ，標準偏差是0.0082而樣本數為2。此等數據證明本發明化合物為c-Met有效的抑制劑。

以 HGF 刺激 Met(pY1349)NCI-H460 細胞為基礎之 ELISA

NCI-H460 細胞 (購自 ATCC) 培養在補充有 10% 胎牛血清 (FBS) 之 RPMI 1640 培養基 (Invitrogen) 中，且在培養至匯合 70% 之前，依每個槽孔細胞密度為 20,000 個細胞，在 96 孔平底盤中以 80 μ l 體積塗覆細胞。在細胞培養箱中隔夜培養 (5% CO_2 ，95% 相對濕度 (RH) 及 37°C)，並讓細胞黏附於培養盤上。次日早上，將該等細胞用 2 倍體積的低血清培養基 (RSM，補充 0.5% FBS 之 RPMI 1640 培養基) 沖洗。移去最後沖洗物後，在細胞培養盤的每一槽孔中添加 80 μ L RSM。將此等細胞培養盤培養在細胞培養箱中 2.5 小時，且然後給予定量的化合物。此等化合物抑制劑首先溶解在 100% DMSO 中製成濃度 10 mM，然後用 2% DMSO RSM 稀釋至 100 μ M。繼而在超過 100 μ M 至 0.005 μ M 範圍內製備化合物連續稀釋液 (1:3)。在此等細胞中添加定量之 20 μ l 化合物儲備溶液，以使最終 DMSO 濃度為 0.4% 及最終化合物濃度劑量範圍介於 20 至 0.001 μ M 之間。在給與定量化合物之後，輕輕搖動細胞培養盤加以混合，而後讓培養盤在細胞培養箱中培養 30 分鐘。在給予定量化合物之後，每槽孔添加 20 μ l 肝細胞生長因子 (HGF) (溶於 RSM 中，最終濃度為 100 ng/ml) 刺激細胞 (除 MIN 槽孔之外，所有槽孔細胞均會被刺激，MIN 槽孔係給予 20 μ L RSM 的量)。在細胞培養箱中培養 10 分鐘後，移除細胞培養盤中的液體，藉由加入 50 μ l 冰冷 Meso Scale Discovery® (MSD, Gaithersburg, Maryland)，補充有磷酸酶 I 及 II 之 1X 裂解緩衝液 (150 mM

NaCl, 20 mM Tris, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM 乙二醇四乙酸, 及 1% TRITON® X-100) 及蛋白酶抑制劑 (Sigma, St. Louis, MO) 以裂解細胞。在室溫下裂解細胞 30 分鐘後, 將裂解產物轉移及鎖定在經 BSA 阻斷 (溶於 1X Tris 洗滌緩衝液中之 30 mg/ml 阻斷液) 之 MSD® 多點 96-孔 4-點 PhosphoMet 板中。然後培養盤用 Tris 洗滌緩衝液沖洗 1 次。(室溫下) 鎖定 2 小時後, 將細胞裂解產物從 MSD® 板移除, 並用 1X Tris 洗滌緩衝液沖洗。吸乾後, 將 25 μ L 之 5 nM Sulfo-Tag Anti-Total Met 抗體 (檢測抗體, MSD®, 於補充 10 mg/ml BSA 及 0.1% Blocker D-R (MSD®) 之 1X Tris 洗滌緩衝液中製備) 添加到 MSD® 培養盤槽孔中。經 1 小時鎖定後 (室溫下), 用 1X Tris 洗滌緩衝液沖洗 MSD® 培養盤, 然後添加 150 μ L 之 1X 讀取緩衝液 T (含有表面活性劑, MSD®)。在添加讀取緩衝液後, 立刻用 SECTOR 6000 MSD® 螢光成像讀取器分析培養盤。採用 MSD 活性單元, 相對於培養盤中之「MIN」及「MAX」對照組計算抑制百分比, 及隨後取抑制百分比值及 10 點劑量-反應數據擬合至 4 個參數邏輯方程式中, 決定相對 IC₅₀ 值。實例 1 之化合物顯示具有 0.036 μ M 之相對 IC₅₀ 值, n=1 (針對甲磺酸鹽形式為 0.038 μ M, n=1), 此表明實例 1 之化合物可有效抑制活體外細胞內 c-Met 磷酸化作用。

c-Met 在活體內標靶抑制 (IVTI) 之分析法

將 S114 細胞 (會過度表現人類 HGF 與人類 c-Met) 於補充 10% 胎牛血清之成長培養基中 (Dulbecco's Modified Eagle

Medium)培養並擴增。收集細胞並用磷酸鹽緩衝液沖洗兩次，並將 2×10^6 個細胞與等體積BD Matrigel™ 基質(BD Bioscience, Franklin, NJ)混合，以皮下方式注射到裸鼠(無胸腺裸小鼠，來自 Harlan, Indianapolis, IN)側邊脅腹。在植入後第8天，將50 mg/kg之化合物經胃管投予動物(於10%阿拉伯膠或1%羥甲基纖維素/0.5%月桂基硫酸鈉/0.05%消泡劑中調配成懸浮液)。動物在投予藥劑2小時後犧牲，取得腫瘤並且冷凍儲藏直至需要。

利用研鉢研磨冷凍腫瘤。將經研磨組織移轉至含有裂解基質D小珠(MP Biomedicals, Solon, OH)及600 µl 裂解緩衝液(RIPA 緩衝液，含50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5%去氧膽酸鈉, 0.1% SDS, 購自Boston Bioproducts, 磷酸酶抑制劑I及II及蛋白酶抑制劑(Sigma, St. Louis, MO))的試管中。採用FastPrep® Cell Disrupter細胞均質器 (MP Biomedicals公司)破壞組織及裂解細胞。讓裂解產物通過20號針頭轉移至乾淨試管中。藉由習知此項技藝者之已知Bradford方法測定蛋白質濃度。

將腫瘤裂解產物加入至MSD® phosphor-Met ELISA培養盤上，並且採用如H460細胞基礎之ELISA的同樣流程來測定螢光c-Met含量。實例1化合物之活體內S114抑制ED₅₀值為0.32 mg/kg，具有以0.23 mg/kg及0.41 mg/kg為限值之95%信賴區間。實例1之TEC₅₀為0.18 µM，具有以0.13 µM及0.23 µM為限值之95%信賴區間。此等結果表明，實例1是活體內有效的c-Met抑制劑。

異種移植腫瘤模型

培養人類神經膠質母細胞瘤U87MG、人類胃癌細胞MKN45，或人類胰臟KP4細胞，並以皮下方式植入至雌性CD-1 nu/nu裸鼠後側脅腹，該裸鼠從賣主處收到後即已在動物設施中適應一周。隨機性將小鼠分成每組為10隻小鼠的組別。在適當的媒劑中製備待測化合物，並當腫瘤經形成後(植入7-21天後，或當平均腫瘤體積達到約100 mm³)，以經口強行餵飼投藥。在治療的過程中，藉由一周兩次測定腫瘤體積來測量腫瘤的反應。體重波動亦可作為一般毒性測量的監測。實例1之化合物一天經口投用兩次持續達28天。

就統計分析而言，將個別主體腫瘤體積轉換成對數體積，且利用SAS軟體(8.2版)之MIXED程序，以時間及治療之重復量數二因子變異分析法進行分析。針對此重復量數之相關係數模型是為空間功率。在最後時間點比較治療組與對照組。該MIXED程序亦用來分別用於每一治療組，以計算出在每一時間點的經調整平均值與標準差。兩種分析說明在每一主體範圍內之自體相關性。

表 1：實例 1 在 U87MG 神經膠質母細胞瘤異種移植中之抗腫瘤效能

試驗組	平均腫瘤體積±標準差(mm ³)	第37天的P值
媒劑	479±175	-----
實例1，2 mg/kg	271±61	不顯著
實例1，4 mg/kg	137±29	<0.001
實例1，8 mg/kg	108±16	<0.001
實例1，16 mg/kg	116±19	<0.001
實例1，32 mg/kg	46±4	<0.001

表 2：實例 1 在 MKN45 胃異種移植中之抗腫瘤效能

試驗組	平均腫瘤體積±標準差(mm ³)	第37天的P值
媒劑	736±115	-----
實例1，4 mg/kg	329±54	<0.001
實例1，8 mg/kg	296±29	<0.001
實例1，16 mg/kg	166±10	<0.001
實例1，32 mg/kg	161±14	<0.001

表 3：實例 1 在 KP4 胰異種移植中之抗腫瘤效能

試驗組	平均腫瘤體積±標準差(mm ³)	第37天P值
媒劑	1123±125	-----
實例1，2 mg/kg	1229±83	不顯著
實例1，4 mg/kg	1085±256	不顯著
實例1，8 mg/kg	627±74	<0.01
實例1，16 mg/kg	554±47	<0.001
實例1，32 mg/kg	273±42	<0.001

此等數據證實本發明化合物可抑制活體內腫瘤的生長。

相對於結構上具有相關性的化合物而言(諸如 WO 2008051808 A2中的實例25, 下文稱為「參考化合物」), 本發明化合物業已發現在活體內是較優的。該參考化合物及本發明化合物具有相似分子量, 且在活體外是具有可比較的效能, 該效能係在最小有效比範圍內(MSR), 因此統計上並無不同(實例1化合物之c-Met IC₅₀為0.010 μM, 較之參考化合物則為0.015 μM)。H460分析顯示, 實例1化合物之IC₅₀為0.036 μM, 較之參考化合物則為0.065 μM。就H460分析而言, 效能數值係在MSR範圍內, 且彼此在統計上並無不同。

類似地, 實例1化合物及參考化合物對c-Met受體皆具有高度選擇性。在採用採用 Express Diversity Kinase Profile™之99激酶Cerep篩選中, 兩種化合物皆僅會抑制c-Met。該Express Diversity Kinase Profile™係由Cerep SA (Paris, France)所開發的一種篩選服務。其等分析條件詳情及/或完整信息可查詢其等網站(<http://www.cerep.fr/cerep/users/pages/catalog/profiles/catalog.asp>)。

然而, 在如下表4所顯示之活體內腫瘤抑制研究中, 實例1化合物與參考化合物經逐一直接比較發現, 8小時後, 相較於參考化合物, 實例1化合物在S114腫瘤之血漿暴露量及磷酸c-MET抑制作用上明顯具有優勢。

表 4

檢測	實例1 化合物	參考 化合物	P值
8小時後，8 mg/Kg之 血漿濃度(ng/mL)	141	14	<0.0001
8小時後，20 mg/Kg之 血漿濃度(ng/mL)	318	17	<0.0001
8小時後，8 mg/kg之 %磷酸-Met抑制	75	-5.45	<0.0001
8小時後，20 mg/kg之 %磷酸-Met抑制	93	0.57	<0.0001
2小時後，單一劑量 IVTI之%抑制	98 ^{***}	84 ^{****}	

**在個別逐一直接比較研究的實驗中進行

***投予劑量16 mg/Kg

****投予劑量20 mg/Kg

以上結果顯示，實例1化合物相較參考化合物可產生更持續性藥物動力效果(超過8小時)。以上數據推測，實例1化合物投予劑量頻率較低(例如，BID或日常療法)，而參考化合物劑量療法需要高出許多的頻率，此可能會引起照料者或病患順服性的問題。% phos-Met抑制數據分析顯示，實例1化合物之兩種劑量(8 mg/kg及20 mg/kg)的血漿濃度相較參考化合物的對應劑量具有統計學上<0.0001 P值的差異性。另外，實例1化合物兩種劑量與媒劑組在統計學上具有差異性($p < 0.0001$)，彼此之間亦具有統計學上的差異性($p = 0.0058$)。此等數據係採用單因子變異數分析法分析。對於所有成偶對比之總錯誤率係採用多重測試之

Tukey's方法嚴格控制在5%。

在IVTI研究中，每種化合物係經口投藥，且係調配於10% w/v阿拉伯樹膠中。利用心臟穿刺技術在投予藥物劑量後，以抗凝血劑(上部為紫色的EDTA真空採血管)收集該等小鼠血液樣品。試管倒置3-5次後，置於冰上直至於4℃下，以3000 RPM (1800×g)離心10分鐘以獲得血漿。用吸管將血漿等分試樣且儲存在乾淨的96孔培養盤中。該等血漿樣品迅速儲存在-80℃下。運送該等血漿樣品要包裝在乾冰中且冷凍於-80℃下直至用於分析。

製備每種藥品之0.1-mg/ml儲備溶液，且將之連續稀釋混入混合小鼠血漿中，以製備1至5000 ng/ml範圍內之標準品。藉由添加含內標之0.1-0.2 ml甲醇：乙腈(1/1，v/v)使蛋白質沉澱來處理96孔培養盤中血漿標準品或樣品(0.025 ml)。此等混合物在4℃下，以4000 rpm離心10分鐘，將所得該等上清液部分之等分試樣(0.05 ml)轉移至另一96孔培養盤中。此等樣品及標準品係採用Sciex API 4000 Triple Quadrupole 質譜儀(Sciex, Division of MDS公司，Toronto, Canada)耦合 Shimadzu HPLC 系統(LC-IOAD, Shimadzu Corporation)及 Gilson 215自動分樣器分析。將該等樣品(0.01 ml)注入至5- μ m Betasil C18 20×2.1 mm Javelin (Thermo Electron Corp. Cat#70105-022106)之HPLC管柱且用梯度沖提。色譜條件係由水/1 M NH_4HCO_3 (2000:10，v/v)之流動相A及MeOH/1 M NH_4HCO_3 (2000:10，v/v)之流動相B所組成，其以1.5 ml/分鐘之流動速率形成2.5-分

鐘梯度。具有渦輪噴射之正離子模式及740°C之離子源溫度係用於質譜光譜偵測。採用多反應檢測(MRM)在以下轉換中進行定量：實例1 (m/z 363.05至 m/z 163.10)及參考化合物(m/z 363.05至 m/z 163.10)。以內標波峰面積比對藥物濃度之化合物線性回歸分析衍生自 $1/x^2$ 二次方程。

本發明化合物相較參考化合物亦明顯更具有可溶性。

實例1及參考化合物('808公開案之實例25)的溶解度測定係將少量之每種化合物置於玻璃小瓶中、加蓋並且在環境條件下隔夜旋轉小瓶(18小時)。此介質包含模擬胃液(SGF)(其包括0.01 N HCl, 0.05%十二烷基硫酸鈉及0.2% NaCl)；空腹狀態模擬腸液(SIF-fasted)(其由29 mM NaH_2PO_4 、3 mM牛磺膽酸鈉、0.75 mM卵磷脂、103 mM NaCl、及將pH調至6.5之NaOH所組成)；飽食狀態模擬腸液(SIF-fed)(其包括144 mM乙酸、15 mM牛磺膽酸鈉、3.75 mM卵磷脂、204 mM NaCl、及將NaOH調至pH 5.0)；及pH 4.5、6、7.5之緩衝液(該等為28-56 mM磷酸鹽緩衝液)。此等化合物濃度係利用具有偵檢器之Agilent 1200 HPLC (LC5)測定。移動相係使用含0.1% TFA的水之A(85%)及ACN之B(15%)，其流動速率為1 mL/分鐘及流動時間10分鐘。在此等研究中使用Zorbax管柱，Bonus-RP (3.5 μm , 4.6×75 mm; SN: USTM002428)。

以下數據顯示，實例1化合物當與參考化合物比較時，其分別在空腹及飽腹狀態下溶於模擬腸液(SIF)大約是13及14倍。

表 5：動態溶解度

檢測	實例1化合物	參考化合物
SGF	0.052	0.057
空腹SIF	0.013	0.001
飽腹SIF	0.070	0.005
0.1 N HCl	0.033	1.894
0.01 N HCl	0.011	0.332
水	0.009	0.001
pH≥4緩衝液	~0.010	~0.002

溶解性 2：動力溶解度屏蔽

此分析法係用以測定其中事先溶於DMSO而濃度為10 mM之化合物會從溶液中沉澱的濃度範圍。在96孔培養盤之屏蔽格式中進行分析，並測定自磷酸緩衝液(50 mM；pH 7.4)中經沉澱化合物之濁度測定法(光散射)。此方法包括將溶於緩衝液中之10、20、40、60、80及100 μ M濃度的化合物在室溫下培養2小時(其中DMSO百分比保持不變)。事先以比濁計讀取該等培養盤測量是否存有刮痕或灰塵粒子，而此可做為背景值扣除之用。該等經報告的數值是為其中最後溶解濃度及第一個不溶解的濃度。此等分析法非最佳用來評估平衡溶解度或決定「真實」動態溶解度。

下列屏蔽數據顯示，實例1化合物相較於參考化合物時，其在pH 7.4緩衝液中的溶解度是高於至少3倍。

表 6

待測化合物	1 st 不溶解濃度 pH 7.4	最後溶解濃度 pH 7.4
實例1(μM)	未偵測	>100
參考(μM)	49	29

在大鼠生物利用性研究中，本發明化合物相較參考化合物在藥物動力學參數方面顯示有明顯的不同。以靜脈方式給予 1 mg/kg劑量之溶液調配物後，本發明化合物提供的血漿清除率低18倍而終端消除半衰期長4倍。經口給予 10 mg/kg溶於 10%阿拉伯膠懸浮調配物之後，本發明化合物可提供 57倍及 93倍高的暴露量，該暴露量分別是藉由測定波峰血漿濃度或血漿曲線下面積(AUC)而得的。本發明化合物之經口生物利用性為 65.8%，相較參考化合物的 14.6%，提高了 4.5倍。

在大鼠生物利用性研究中，每種化合物係以靜脈方式(IV)或經口方式(PO)投藥。靜脈投藥劑量係調配於溶液調配物中，而經口投藥劑量係調配於 10% w/v阿拉伯膠中。利用抗凝血劑(EDTA)收集管收集大鼠血液樣品，並進行離心作用以得到血漿樣品。以吸管將血漿等分試樣且迅速保存在 <-20℃。若需要運送血漿樣品，需將該等血漿樣品包裝在乾冰中，並冷凍在 <-20℃ 直至用於分析。

製備每種藥品儲備溶液，且將其稀釋混入混合大鼠血漿中，以製備標準品。藉由蛋白質沉澱作用或採用含內標之有機溶之液體-液體萃取法處理血漿標準品或樣品。將混

合物離心，且將所得上清液部分之等分試樣轉移。在蛋白質沉澱情況下，利用質譜儀耦合HPLC系統及自動分樣器稀釋及分析上清液。在液體-液體萃取法的情況下，將上清液在40℃，N₂中乾燥、復水，並利用質譜儀耦合HPLC系統及自動分樣器進行分析。利用多反應監測(MRM)及內標波峰面積比對藥物濃度之化合物線性回歸方法進行定量。

表 7

檢測 大鼠生物利用性	實例1 化合物*	參考 化合物	P值
IV劑量(mg/kg)	1	1	
T1/2 (hrs)	2.3	0.6	p=0.0027 (log T1/2)
Cl (ml/min/kg)	1.7	31	p=0.0003
Vdss (L/kg)	0.3	0.8	p=0.0001
PO劑量(mg/kg)	10	10	
Cmax (ng/ml)	9401	164	p=0.0006 (log Cmax)
Tmax (hrs)	3.33	0.917	p=0.0486
AUC (ng*hr/ml)	73753	794	p=0.0002 (log AUC)
F%	65.8	14.6	p=0.0002

*大鼠生物利用性係利用實例1化合物之甲烷磺酸鹽進行。

以上數據顯示實例1化合物之甲烷磺酸鹽相較參考化合物而言具有更高的生物利用性。另外，以經口投用劑量目的而言，所獲得的數據推測對於實例1化合物之基本形式及鹽形式具有相似的暴露量。

實例1化合物亦可以與適當抗癌劑或其他輔佐治療之結合療法加以調配及/或給藥。此種組合可以是雞尾酒的形態，其中不同療法之個別劑量可以一起投藥、依序或在合適間隔後投藥。

本發明化合物較佳係調配成一種醫藥組合物，該醫藥組合物可藉由多種路徑投藥，包括但不限於經口、經直腸、經皮、皮下、靜脈、肌肉、及經鼻。本發明化合物較佳為經口或靜脈投藥。該化合物較佳是在投藥前就先調配。由主治醫師或職業護理員決定選擇採取何種投藥途徑。最佳地，本發明化合物之組合物係調配成經口投藥形式。本發明化合物之特佳劑量形式為錠劑、片劑或膠囊。另一較佳形式為快速釋放固體調配物，其可依據病患年齡或偏好加以適當塗覆或調味，以增進治療順服性的容易度。在另一較佳實施例中，本發明醫藥組合物進一步包括一或多種額外治療劑。

醫藥組合物及製備該等組合物之方法是此項技藝中已為人所熟知者。參見，例如，REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (A. Gennaro，等人，eds., 19th ed., Mack Publishing Co., 1995)。因此，熟識技藝者無須過度實驗下即可將本發明化合物調配成固體、液體、靜脈、皮下儲存、經皮貼片或其他調配物形式。

本發明化合物通常在廣泛劑量範圍下是具有效果的。例如，每日劑量可落在總日常劑量約1 mg範圍至約1000 mg之範圍，較佳是總日常劑量10 mg至500 mg。更佳地，每

日劑量係約50至200 mg。最佳地，劑量為每日兩次50-80 mg (b.i.d)。在某些情況下，低於前述範圍下限之劑量就相當足量，而在其他情況下還可採用更大劑量。上述劑量範圍並非旨在以任何方式限制本發明範圍。應了解本發明化合物實際給藥量可藉由醫師考量相關情況加以決定，此相關情況包括治療條件、所選用的投藥途徑、以雞尾酒投用化合物或固定劑量組合療法、年齡、體重、個別病患反應、及病患症狀在其他因素之間的差異性。

c-Met相關腫瘤及異種移植模式

對於很多包括肺、乳、大腸、胃、腎、胰、頭及頸(1,2)之人類腫瘤而言，c-Met過度表現是個普遍的特徵。在激酶功能部位之c-Met激活突變是數種腫瘤的原因，諸如遺傳性乳頭狀腎細胞癌、兒童肝細胞癌、及胃癌(3-7)。輝瑞藥廠生產的c-Met抑制劑證明在人類許多異種移植腫瘤(包括U87MG、GTL16、H441、Caki-1、及PC3)中具有抗腫瘤效果(8)。

1. Christinsen, JG., Burrows, J., and Salgia, R. Cancer Letters 225: 1-26, 2005.
2. Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E., and Vande Woude, GF. Nat Rev Mol Cell Biol 4: 915-925, 2003.
3. Di Renzo, MF., Olivero, M., Martone, T.等人. Oncogene 19: 1547-1555, 2000.
4. Lee, JH., Han, SU, Cho, H.等人. Oncogene 19: 4947-

4953, 2000.

5. Ma, PC., Kijima, T., Maulik, G. 等人. Cancer Res 63 :
6272-6281, 2003.

6. Park, WS., Dong, SM., Kim, SY. 等人. Cancer Res 59 :
307-310, 1999.

7. Schmidt, L., Duh, FM., Chen, F. 等人. Nat Genet 16: 68-
73, 1997.

8. Zou, HY., Li, Qiuhua., Lee, JH. 等人. Cancer Res 67:
4408-4417, 2007.

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：100126076

※申請日：100.7.22

※IPC 分類：

C07D 487/04 (2006.01)

A61K 31/5025 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

可作為一種c-MET抑制劑之化合物

COMPOUND USEFUL AS A c-MET INHIBITOR

二、中文發明摘要：

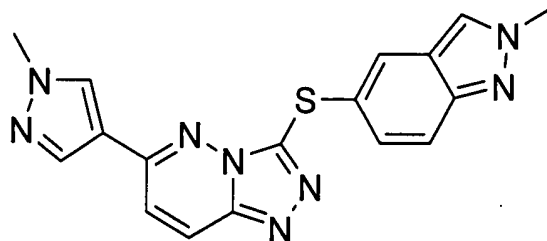
本發明係關於一種c-Met抑制劑(本文所揭示)或其醫藥上可接受之鹽，其可用於治療由c-Met受體活性所介導之癌症。

三、英文發明摘要：

The present invention relates to a c-Met inhibitor (disclosed herein) or a pharmaceutically acceptable salt thereof useful in treating cancer mediated by activity of c-Met receptors.

七、申請專利範圍：

1. 一種下式之化合物



或其醫藥上可接受鹽。

2. 如請求項1之化合物，其中該鹽為氫氯酸鹽、硫酸氫鹽或甲烷磺酸鹽。
3. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1之化合物或其醫藥上可接受鹽，及一或多種醫藥上可接受載劑或稀釋劑。
4. 如請求項1或2之化合物或鹽，其係用於治療。
5. 如請求項1或2之化合物或鹽，其係用於治療胃癌、胰臟癌、神經膠質母細胞瘤、乳癌或結腸直腸癌。
6. 一種如請求項1或2之化合物或鹽之用途，其係用以製造用於治療選自胃癌、胰臟癌及神經膠質母細胞瘤之癌症的藥物。

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：(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：

