I821174

(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 I821174 B**

(45)公告日： 中華民國 112 (2023) 年 11 月 11 日

(21)申請案號：107105790 (22)申請日： 中華民國 107 (2018) 年 02 月 21 日

(51)Int. Cl.： *A61K31/4178 (2006.01)* *A61P35/02 (2006.01)*

(30)優先權：2017/02/21 美國 62/461,584

2017/10/31 美國 62/578,948

(71)申請人：加拿大商艾普托斯生物科學公司 (加拿大) APTOSE BIOSCIENCES INC. (CA)
加拿大
南韓商晶體基因技術股份有限公司 (南韓) CRYSTALGENOMICS, INC. (KR)
南韓

(72)發明人：萊斯 威廉 RICE, WILLIAM G. (CA) ；曹重明 CHO, JOONG MYUNG (KR) ；洪庸萊 HONG, YONGRAE (KR)

(74)代理人：葉璟宗；卓俊傑

(56)參考文獻：

CN 104995184A

期刊 Pillinger, Genevra, et al. "Targeting BTK for the treatment of FLT3-ITD mutated acute myeloid leukemia." Scientific reports 5.1 (2015): 1-9.

期刊 Smith, Catherine C., et al. "FLT3 D835 mutations confer differential resistance to type II FLT3 inhibitors." Leukemia 29.12 (2015): 2390-2392.

網路文獻 4. Aptose Prioritizes Development of CG'806 First-in Class FLT3/BTK Inhibitor， 2017.1.23， 網址： https://www.globenewswire.com/news-release/2017/01/23/909938/35575/en/Aptose-Prioritizes-Development-of-CG-806-First-in-Class-FLT3-BTK-Inhibitor.html。

審查人員：官速貞

申請專利範圍項數：43 項 圖式數：31 共 145 頁

(54)名稱

治療血液惡性腫瘤患者的方法

(57)摘要

本發明包括投與 2,3-二氫-異吲哚-1-酮化合物或其醫藥學上可接受之鹽、酯、溶劑化物和/或前藥來治療血液學癌症諸如急性骨髓性白血病(AML)的方法。本發明進一步係關於減少或抑制由野生型或突變的 Fms 樣酪胺酸激酶-3 受體(FLT3)活化的細胞增殖。本發明進一步係關於抑制或減少有需要的受試者中的異常(例如，過度表現的)野生型或突變的 BTK 活性或表現的方法。

The present disclosure comprises a method for administering 2,3-dihydro-isoindole-1-one compound or a pharmaceutically acceptable salt, ester, solvate and/or prodrug thereof, for the treatment of hematological cancers such as acute myeloid leukemia (AML). The present disclosure further relates to

reducing or inhibiting cell-proliferation which is activated by wild-type or mutated Fms-like tyrosine kinase-3 receptor (FLT3). The present disclosure further relates to a method of inhibiting or reducing abnormal (e.g., overexpressed) wild-type or mutated BTK activity or expression in a subject in need thereof.

申請案號：
I821174

公告本

申請日：
IPC 分類：

【發明摘要】

【中文發明名稱】治療血液惡性腫瘤患者的方法

【英文發明名稱】METHODS FOR TREATING PATIENTS WITH HEMATOLGIC MALIGNANCIES

【中文】

本發明包括投與 2,3-二氫-異吲哚-1-酮化合物或其醫藥學上可接受之鹽、酯、溶劑化物和/或前藥來治療血液學癌症諸如急性骨髓性白血病(AML)的方法。本發明進一步係關於減少或抑制由野生型或突變的 Fms 樣酪胺酸激酶-3 受體(FLT3)活化的細胞增殖。本發明進一步係關於抑制或減少有需要的受試者中的異常(例如，過度表現的)野生型或突變的 BTK 活性或表現的方法。

【英文】

The present disclosure comprises a method for administering 2,3-dihydro-isoindole-1-one compound or a pharmaceutically acceptable salt, ester, solvate and/or prodrug thereof, for the treatment of hematological cancers such as acute myeloid leukemia (AML). The present disclosure further relates to reducing or inhibiting cell-proliferation which is activated by wild-type or mutated Fms-like tyrosine kinase-3 receptor (FLT3). The present disclosure further relates to a method of inhibiting or reducing abnormal (e.g., overexpressed) wild-type or mutated BTK activity or expression in a subject in need thereof.

【指定代表圖】無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】治療血液惡性腫瘤患者的方法

【英文發明名稱】METHODS FOR TREATING PATIENTS WITH HEMATOLGIC MALIGNANCIES

【技術領域】

【0001】 本發明係關於用於治療癌症例如血液學癌症的2,3-二氫-異吲哚-1-酮化合物或其醫藥學上可接受之鹽、酯、前藥、水合物、溶劑化物和異構體，其中患者表現出FLT3突變或野生型或突變形式的BTK。

【先前技術】

【0002】 許多酪胺酸激酶已被證明是促進許多癌症類型的細胞存活的調控途徑的一部分。Fms樣酪胺酸激酶3(FLT3)基因是編碼膜結合受體酪胺酸激酶的一個此類實例，其影響導致血液病和惡性腫瘤的血細胞生成。

【0003】 受體酪胺酸激酶FLT3可以發生一系列突變，包括近膜區內活化的內部縱排重複(ITD)和酪胺酸激酶結構域中的點突變，如活化環殘基 D835。FLT3是急性骨髓性白血病(AML)治療的靶標，因為 FLT3-ITD 突變存在於約 24%的AML患者中，並且與非常差的預後相關。參見 C. Thiede 等人, *Blood* **2002**, *99*, 4326；P. D. Kottaridis 等人, *Leukemia & lymphoma* **2003**, *44*, 905。然而，在表現出對 FLT3 抑制劑索拉非尼或奎紮替尼的抗性/復發性的臨床患者中識別的額外獲得性FLT3突變，包括D835或「看門基因」F691突變，可使大多數FLT3抑制劑無效。參見 C. H. Man 等人, *Blood* **2012**, *119*, 5133；C. C. Smith 等人, *Nature* **2012**, *485*, 260。另外報道的是，其他平行促存活信號傳導途徑的異常上調可能使得 AML 對 FLT3 靶向治療有抗性。參見 W. Zhang 等人, *Clin.Cancer Res.* **2014**, *20*, 2363。

【0004】 因此，需要一種能夠在獲得FLT3突變的血液惡性腫瘤患者中抑制突

變 FLT3 的治療。

【0005】 另一種酪胺酸激酶布魯頓氏酪胺酸激酶(BTK)在調節血液癌症的細胞增殖中也具有功能重要性。BTK 存在於 B 細胞和造血細胞中，而不是某些 T 細胞、自然殺傷細胞、漿細胞等。當由各種炎症反應或癌症引起的 B 細胞膜受體(BCR)信號來刺激 BTK 時，BTK 藉由啟動下游信號傳導如磷脂酶 Cγ2(PLCγ)在細胞介素如 TNF-αIL-6 等以及 NF-KB 的產生中發揮重要作用。

【0006】 在癌症治療中，已知 BTK 修飾產生抗自殺信號的 BCR 和 B 細胞表面蛋白。因此，抑制 BTK 可能對與 BCR 信號傳導相關的癌症如淋巴瘤產生抗癌作用。BTK 抑制劑作為抗炎劑以及抗癌劑的作用機制詳細描述於 *Nature Chemical Biology* **2011**, *7*, 4 中。

【0007】 這些信號途徑必須進行精確調節。編碼 BTK 的基因中的突變導致人體中遺傳性 B 細胞特異性免疫缺陷病，稱為 X 連鎖無γ球蛋白血症(XLA) (*Conley 等人, Annu. Rev. Immunol. 27: 199-227, 2009*)。異常的 BCR 介導的信號傳導可能導致 B 細胞活化失調，導致許多自身免疫性和炎性疾病。臨床前研究表明，BTK 缺陷小鼠對發生膠原誘導的關節炎具有抗性。此外，Rituxan(一種消除成熟 B 細胞的 CD20 抗體)的臨床研究揭示了 B 細胞在許多炎症性疾病例如類風濕性關節炎、全身性紅斑狼瘡和多發性硬化症中的關鍵作用(*Gurcan 等人, Int. Immunopharmacol. 9: 10-25, 2009*)。因此，BTK 抑制劑可用於治療自身免疫性和/或炎性疾病。

【0008】 另外，BTK 的異常活化或過度表現在 B 細胞淋巴瘤的發病機制中起重要作用，表明 BTK 的抑制可用於治療血液惡性腫瘤 (*Davis 等人, Nature 463: 88-92, 2010*)。初步臨床試驗結果表明，BTK 抑制劑依魯替尼(PCI-32765)可有效治療幾種類型的 B 細胞淋巴瘤 (例如，第 54 次美國血液病學會(ASH)年度會議摘要，2012 年 12 月: 686 The Bruton's Tyrosine Kinase (BTK) Inhibitor, ibrutinib (PCI-

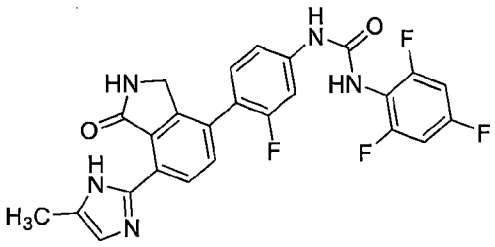
32765), Has Preferential Activity in the ABC Subtype of Relapsed/Refractory De Novo Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL): Interim Results of a Multicenter, Open-Label, Phase 1 Study)。因為 BTK 在多種信號轉導途徑中起著介質的中心作用，所以 BTK 抑制劑作為抗炎劑和/或抗癌劑非常有意義 (*Mohamed 等人, Immunol. Rev. 228: 58-73, 2009；Pan, Drug News perspect 21: 357-362, 2008；Rokosz 等人, Expert Opin. Ther. Targets 12: 883-903, 2008；Uckun 等人, Anti-cancer Agents Med. Chem. 7: 624-632, 2007；Lou 等人, J. Med. Chem. 55(10): 4539-4550, 2012*)。

【0009】 依魯替尼與 BTK 活性位點中的半胱胺酸 481 殘基化學相互作用並使 BTK 酶失活。然而，半胱胺酸 481 殘基突變成絲胺酸殘基(BTK-C481S)導致對依魯替尼的耐藥性，並且臨床上觀察到 BTK-C481S。這種特異性點突變有效地消除了依魯替尼的靶點，從而使得依魯替尼喪失作為有效藥物的能力。在用依魯替尼治療的 CLL 患者中，51%到第四年由於各種原因而停止使用。例如，由於不耐受、不良事件、感染或死亡，24%停用依魯替尼。27%的患者由於疾病進展而停止使用(例如 Richter's，BTK-C481S 突變，PLCγ2 突變)，約 1/3 的停用依魯替尼的患者有 C481S 突變。因此，需要確定用於治療難治性、不耐受性或耐藥性患者(包括具有突變形式的 BTK 的患者)的新治療劑，特別是藉由與依魯替尼不同的機制起作用的治療劑。

【0010】 現有的治療劑在顯示各種耐藥表型的靶標的情形下通常無效。結果，這些癌症的存活預後不佳。因此開發對多種激酶靶標具有親和力的新型藥物是重要的，特別是能夠雙重抑制 BTK 和 FLT3 的藥物。

【發明內容】

【0011】 本發明係關於化合物 7，其醫藥學上可接受之鹽、酯、前藥、水合物、溶劑化物和異構體。



化合物 7

【0012】 在一個實施例中，本發明提供了抑制或減少受試者野生型 Fms-相關激酶 3(FLT3)的活性或表現的方法，包括向該受試者投與化合物 7 或其醫藥學上可接受之鹽。在一個實施例中，本發明提供了抑制或減少受試者中的突變的 FLT3 活性或表現的方法，包括向受試者投與化合物 7 或其醫藥學上可接受之鹽。

【0013】 在一個實施例中，本發明提供了抑制或減少人細胞中的野生型 FLT3 活性或表現的方法，包括使化合物 7 或其醫藥學上可接受之鹽與人細胞接觸。在另一個實施例中，本發明提供了抑制或減少人細胞中突變的 FLT3 活性或表現的方法，包括使化合物 7 或其醫藥學上可接受之鹽與人細胞接觸。

【0014】 在另一個實施例中，本發明提供誘導有需要的受試者中表現野生型 FLT3 的細胞凋亡的方法，包括投與化合物 7 或其醫藥學上可接受之鹽。在一個實施例中，本發明提供了誘導有需要的受試者中表現突變的 FLT3 的細胞凋亡的方法，包括投與化合物 7 或其醫藥學上可接受之鹽。

【0015】 在一個實施例中，本發明提供了治療與野生型 FLT3 相關的血液惡性腫瘤的方法，其包括向有需要的受試者投與化合物 7 或其醫藥學上可接受之鹽。在一個實施例中，該方法抑制或減少野生型 FLT3 活性或表現。在另一個實施例中，本發明提供了治療與突變的 FLT3 相關聯的血液惡性腫瘤的方法，包括向需要其的受試者投與化合物 7 或醫藥學上可接受之鹽。在一個實施例中，該方法抑制或減少突變型 FLT3 活性或表現。

【0016】 在本文揭示的任何一種方法的一個實施例中，突變的 FLT3 包含至少

一個點突變。在一個實施例中，該至少一個點突變是在選自 D835，F691，K663，R834，，N841 和 Y842 組成之群中的一個或多個殘基。在另一個實施例中，突變的 FLT3 在 D835 處包含至少一個突變。在另一個實施例中，突變的 FLT3 在 F691 處包含至少一個突變。在一個實施例中，突變的 FLT3 在 K663 處包含至少一個突變。在另一個實施例中，突變的 FLT3 在 N841 處包含至少一個突變。在另一個實施例中，突變的 FLT3 在 R834 處包含至少一個突變。在另一個實施例中，突變的 FLT3 在 Y842 處包含至少一個突變。

【0017】 在本文揭示的任何一種方法的一個態樣，該至少一個點突變位於 FLT3 的酪胺酸激酶結構域中。在另一個實施例中，該至少一個點突變位於 FLT3 的活化環中。在一個實施例中，該至少一個點突變是在選自 686、687、688、689、690、691、692、693、694、695 和 696 組成之群的一個或多個胺基酸殘基位置處。在一個實施例中，突變的 FLT3 具有另外的 ITD 突變。在一個實施例中，突變 FLT3 具有選自由以下組成之群的一或多個突變：FLT3-D835H、FLT3-D835V、FLT3-D835Y、FLT3-ITD-D835V、FLT3-ITD-D835Y、FLT3-ITD-D835H、FLT3-F691L、FLT3-ITD-F691L、FLT3-K663Q、FLT3-ITD-K663Q FLT3-N841I、FLT3-ITD-N841I、FLT-3R834Q FLT3-ITD-834Q、FLT3-D835G、FLT3-ITD-D835G、FLT3-Y842C 及 FLT3-ITD-Y842C。

【0018】 在本文揭示的任何一種方法的一個實施例中，該至少一個點突變是存在於同一等位基因上的兩個或兩個以上點突變。在一個實施例中，該至少一個點突變是存在於不同等位基因上的兩個或兩個以上點突變。

【0019】 在本文揭示的任何一種方法的一個實施例中，該受試者是哺乳動物。在另一實施例中，受試者為人類。

【0020】 在本文揭示的用於抑制或減少人類細胞中野生型 FLT3 或突變的 FLT3 活性或表現的任何方法的一個實施例中，人類細胞是人類白血病細胞系。

一態樣，人白血病細胞系是急性淋巴球性白血病細胞系，急性骨髓性白血病細胞系，急性前髓細胞白血病細胞系，慢性淋巴球性白血病細胞系，慢性骨髓性白血病細胞系，慢性嗜中性白血病細胞系，急性未分化白血病細胞系，退行性大細胞淋巴瘤細胞系，前淋巴球性白血病細胞系，幼年型骨髓單核球性白血病細胞系，成人 T 細胞急性淋巴球性白血病細胞系，具有三系骨髓發育不良的急性骨髓性白血病細胞系，混合譜系白血病細胞系，嗜酸球性白血病細胞系，或套細胞淋巴瘤細胞系。一態樣，人白血病細胞系是嗜酸球性白血病細胞系。在一個實施例中，人白血病細胞系是急性骨髓性白血病細胞系。

【0021】 在本文揭示的用於治療與野生型 FLT3 或突變 FLT3 活性或表現相關的血液惡性腫瘤的任何方法的一個實施例中，血液學惡性腫瘤是白血病。在另一個實施例中，白血病是急性淋巴球性白血病，急性骨髓性白血病，急性前髓細胞白血病，慢性淋巴球性白血病，慢性骨髓性白血病，慢性嗜中性白血病，急性未分化白血病，退行性大細胞淋巴瘤，前淋巴球性白血病，幼年型骨髓單核球性白血病，成人 T 細胞急性淋巴球性白血病，伴有三系骨髓發育不良的急性骨髓性白血病，混合譜系白血病，嗜酸球性白血病或套細胞淋巴瘤。在另一個實施例中，白血病是嗜酸球性白血病。在另一個實施例中，白血病是急性骨髓性白血病。

【0022】 在一個實施例中，本發明提供了治療有需要的受試者的血液惡性腫瘤的方法，其包括投與化合物 7 或其醫藥學上可接受之鹽，其中該受試者對 FLT3 活性或表現抑制劑顯示出抗性或復發。在一個實施例中，該抑制劑是奎紮替尼，吉列替尼，舒尼替尼，索拉非尼，米哚妥林，來他替尼，克瑞拉尼布，PLX3397，PLX3623，克瑞拉尼布，普納替尼或普瑞替尼。在另一個實施例中，抑制劑是奎紮替尼或吉列替尼。

【0023】 在一個實施例中，血液惡性腫瘤是白血病。在其他實施例中，白血病是急性淋巴球性白血病，急性骨髓性白血病，急性前髓細胞白血病，慢性淋巴球

性白血病，慢性骨髓性白血病，慢性嗜中性白血病，急性未分化白血病，退行性大細胞淋巴瘤，前淋巴球性白血病，幼年型骨髓單核球性白血病，成人 T 細胞急性淋巴球性白血病，伴有三系骨髓發育不良的急性骨髓性白血病，混合譜系白血病，嗜酸球性白血病或套細胞淋巴瘤。在一個具體的實施例中，白血病是嗜酸球性白血病。在另一個具體實施例中，白血病是急性骨髓性白血病。

【0024】 在一個實施例中，本發明提供了抑制或減少有需要的受試者中的異常(例如，過度表現的)野生型或突變的 BTK 活性或表現的方法，其包括投與化合物 7 或其醫藥學上可接受之鹽。在某些實施例中，突變的 BTK 包含至少一個點突變。例如，該至少一個點突變可以位於半胱胺酸殘基上(例如，半胱胺酸殘基位於 BTK 的激酶結構域中)。受試者可以是哺乳動物，例如人。在某些實施例中，至少一個點突變是選自殘基 E41、P190 和 C481 組成之群中的一個或多個殘基。例如，點突變可以是從由 E41K、P190K 和 C481S 組成之群中選擇的一個或多個。在一個實施例中，殘基 C481 處的點突變選自 C481S、C481R、C481T 和/或 C481Y。

【0025】 在某些實施例中，BTK 突變體對共價 BTK 抑制劑(例如，依魯替尼和/或阿拉貝替尼或其他共價 BTK 抑制劑)的抑制具有抗性。在一個實施例中，與共價不可逆的 BTK 抑制劑對野生型 BTK 的活性的抑制相比，由共價不可逆的 BTK 抑制劑對突變的 BTK 的活性的抑制更少。例如，對於突變的 BTK，共價不可逆的 BTK 抑制劑具有比野生型 BTK 高至少 50%的 IC50。在某些實施例中，BTK 突變體對非共價 BTK 抑制劑的抑制具有抗性。在某些實施例中，BTK 突變體對非共價 BTK 抑制劑的抑制具有抗性。

【0026】 在一個實施例中，半胱胺酸上的點突變僅在 BTK 的一個等位基因上。在另一個實施例中，半胱胺酸上的點突變位於 BTK 的兩個等位基因上。

【0027】 在一個實施例中，本發明提供了用於治療有需要的受試者的癌症的

方法，其包括向有需要的受試者投與化合物 7 或其醫藥學上可接受之鹽，其中該患者具有野生型(例如過度表現的野生型)或突變形式的 BTK。

【0028】 在一個實施例中，本發明提供了治療有需要的受試者中的 B 細胞惡性腫瘤的方法，其包括向該受試者投與化合物 7 或其醫藥學上可接受之鹽。在一個實施例中，化合物 7 抑制 BTK，ERK，FLT3，AURK 或 AKT 的途徑活化。在一個實施例中，受試者具有突變形式的 BTK。例如，B 細胞惡性腫瘤選自由套細胞淋巴瘤(MCL)，B 細胞急性淋巴母細胞性白血病(B-ALL)，伯基特氏淋巴瘤，慢性淋巴球性白血病(CLL)和彌漫性大細胞淋巴瘤(DLBCL)組成之群中的一種或多種。在某些實施例中，化合物 7 抑制和/或減少任何形式(野生型或突變)的 Aurora 激酶的活性。在一個實施例中，Aurora 激酶是突變的 Aurora 激酶。在一個實施例中，化合物 7 的投與藉由機制如凋亡誘導細胞死亡。在另一個實施例中，化合物 7 的投與誘導多倍體，自噬，細胞週期停滯或其他非凋亡形式的細胞死亡。在一個實施例中，化合物 7 抑制和/或減少野生型和/或突變型 BTK 的活性或表現。突變的 BTK 包含至少一個點突變，例如在半胱胺酸殘基上(例如殘基 C481)。

【0029】 在一些實施例中，化合物 7 抑制和/或減少受試者中野生型 Fms 相關酪胺酸激酶 3(FLT3)活性或表現的活性。在其他實施例中，化合物 7 抑制和/或減少受試者中突變型 Fms 相關酪胺酸激酶 3(FLT3)活性或表現的活性。突變的 FLT3 可以包含至少一個點突變。例如，該至少一個點突變位於選自 D835、F691、K663、Y842 和 N841 組成之群的一個或多個殘基上。突變的 FLT3 可能在一個或兩個等位基因中具有額外的 ITD 突變。

【0030】 在一個實施例中，本發明提供了抑制或減少人細胞中的異常(例如，過度表現的)野生型或突變的 BTK 活性或表現的方法，其包括使化合物 7 或其醫藥學上可接受之鹽與人類細胞接觸。突變的 BTK 可以包含至少一個點突變。在

一個實施例中，該至少一個點突變位於半胱胺酸殘基上。在一個實施例中，半胱胺酸殘基位於 BTK 的激酶結構域中。該至少一個點突變是選自由殘基 E41、P190 和 C481 組成之群中的一個或多個。在一個實施例中，殘基半胱胺酸 481 處的點突變選自 C481S、C481R、C481T 和/或 C481Y。

【0031】 應理解，前述概念及以下更詳細論述的其他概念之所有組合(前提是此等概念不會互不一致)均被視為本文所揭示之發明主題的一部分。詳言之，本揭示內容結尾處出現的所請求標的之所有組合均被視為本文所揭示之發明主題的一部分。亦應理解，本文明確使用的、亦可在以引用方式併入的任何揭示內容中出現的術語應符合與本文所揭示之特定概念最為一致的含義。

【圖式簡單說明】

【0032】 **圖 1** 是蛋白質印跡影像，顯示化合物 7 以類似於奎紮替尼的方式和與依魯替尼相反的方式抑制 MV4-11 細胞中的 FLT3 途徑。

【0033】 **圖 2** 是顯示化合物 7 以 0.5、5.0 和 50 nM 處理量抑制 MV4-11 細胞中的 BTK 途徑的蛋白質印跡影像，並且結果與依魯替尼處理的觀察結果一致。

【0034】 **圖 3** 是顯示化合物 7 以 0.5、5.0 和 50 nM 處理量在 EOL-1 細胞中抑制 BTK 途徑的蛋白質印跡影像，並且結果與依魯替尼處理的觀察結果一致。

【0035】 **圖 4** 以劑量-反應曲線以及相應的 IC_{50} 值形式顯示化合物 7、依魯替尼和奎紮替尼對 FLT3-ITD(MV411 和 MOLM-13)和 FLT3-WT(NOMO-1 和 KG-1)細胞的細胞毒性作用的比較。

【0036】 **圖 5** 顯示藉由 IV、口服懸浮液或口服膠囊以多種給藥途徑以各種劑量供應的化合物 7 的平均血漿濃度的大鼠藥代動力學資料。

【0037】 **圖 6** 顯示了與在相同時間段內以單一劑量給予的對照和依魯替尼相比，在 22 天期間以幾種不同劑量給予化合物 7 的功效的小鼠-異種移植模型研究。圖 6 證明，與對照或依魯替尼治療相比，化合物 7 隨著劑量增加而減少腫瘤

體積。

【0038】 **圖 7** 顯示在化合物 7、依魯替尼和奎紮替尼 0.5、5.0 和 50 nM 處理中的早期凋亡細胞、總凋亡細胞和活細胞。

【0039】 **圖 8** 是蛋白質印跡影像(頂部)和膜聯蛋白 V 測定(底部)，其顯示與依魯替尼和奎紮替尼處理相比，化合物 7 誘導 MV4-11 細胞凋亡。

【0040】 **圖 9** 是顯示化合物 7 在 HEK293T 轉染的細胞中減少磷酸化形式的各種酶的蛋白質印跡影像。化合物 7 抑制野生型和 C481S 突變型 BTK 的濃度均為 0.5 和 1.0μM。

【0041】 **圖 10** 顯示證明化合物 7 抑制 BTK 的蛋白質印跡影像。顯示 1 小時和 24 小時的時間點。

【0042】 **圖 11** 顯示化合物 7 和依魯替尼針對各種細胞系的劑量-反應曲線。

【0043】 **圖 12** 顯示化合物 7 誘導 Mino 和 Ramos B 細胞惡性細胞系中的細胞凋亡。

【0044】 **圖 13** 顯示化合物 7 是高度有效的 Aurora 激酶抑制劑。從上到下的細胞系是：Mino，Ramos 和 SU-DHL6。

【0045】 **圖 14** 顯示化合物 7 誘導 Mino 和 Ramos B 細胞惡性細胞系中的多倍體。垂直線區分具有正常 DNA 含量和多倍體的細胞。在垂直線的左側，細胞含有正常的 DNA 含量(<= 4N)，並在細胞週期的 G0/G1、S 或 G2/M 期。在垂直線的右側，細胞沒有經過 M 期並且積累更高量的 DNA(> 4N)，這表明多倍體。

【0046】 **圖 15** 顯示化合物 7 在各種血紅素細胞系中的細胞毒性的劑量-反應曲線。

【0047】 **圖 16** 顯示化合物 7，奎紮替尼，吉列替尼和克瑞拉尼布針對用各種 FLT3 突變體(所示)轉染的同基因型 Ba/F3 細胞的劑量-反應曲線。

【0048】 **圖 17A-J** 顯示化合物 7 在 MV4-11 細胞中時間依賴性地誘導細胞凋

亡。圖 17A 僅表示 MV4-11 細胞的膜聯蛋白 V 測定。圖 17B 表示用媒介物處理 1 小時的 MV4-11 細胞的膜聯蛋白 V 測定。圖 17C 表示用媒介物處理 3 小時的 MV4-11 細胞的膜聯蛋白 V 測定。圖 17D 表示用媒介物處理 6 小時的 MV4-11 細胞的膜聯蛋白 V 測定。圖 17E 表示用媒介物處理 24 小時的 MV4-11 細胞的膜聯蛋白 V 測定。圖 17F 表示用化合物 7 處理 1 小時的 MV4-11 細胞的膜聯蛋白 V 測定。圖 17G 表示用化合物 7 處理 3 小時的 MV4-11 細胞的膜聯蛋白 V 測定。圖 17H 表示用化合物 7 處理 6 小時的 MV4-11 細胞的膜聯蛋白 V 測定圖 17I 表示用化合物 7 處理 24 小時的 MV4-11 細胞的膜聯蛋白 V 測定。圖 17J 表示在晚期凋亡、早期凋亡或活狀態中的細胞的百分比圖(CG =化合物 7)。

【0049】 **圖 18** 顯示化合物 7 以劑量依賴性方式在 MV411 細胞中誘導 G0/G1 細胞週期停滯。圖 18A 是在不同濃度下，處於 G0/G1 狀態、S 狀態或 G2/M 狀態下 MV4-11 細胞百分比的圖示。圖 18B 顯示了具有代表 5-乙炔基-2'-脫氧尿苷(EdU)螢光的 y 軸和代表碘化丙錠染色細胞的 x 軸的流式細胞圖。

【0050】 **圖 19** 顯示化合物 7 以劑量依賴性方式誘導 MOLM-13 細胞中的 G0/G1 細胞週期停滯。垂直線區分具有正常 DNA 含量和多倍體的細胞。在垂直線的左側，細胞含有正常的 DNA 含量(<= 4N)，並在細胞週期的 G0/G1、S 或 G2/M 期。在垂直線的右側，細胞沒有經過 M 期並且積累更高量的 DNA(> 4N)，這表明多倍體。

【0051】 **圖 20A** 顯示了具有代表 5-乙炔基-2'-脫氧尿苷(EdU)螢光的 y-軸和代表碘化丙錠染色細胞的 x-軸的流式細胞圖。**圖 20B** 顯示化合物 7 在各種血紅素細胞系中誘導多倍體(圖 20)。垂直線區分具有正常 DNA 含量和多倍體的細胞。在垂直線的左側，細胞含有正常的 DNA 含量(<= 4N)，並在細胞週期的 G0/G1、S 或 G2/M 期。在垂直線的右側，細胞沒有經過 M 期並且積累更高量的 DNA(> 4N)，這表明多倍體。

【0052】 **圖 21** 顯示發現化合物 7 以劑量依賴性方式誘導 KG-1 細胞中的細胞週期失調。垂直線區分具有正常 DNA 含量和多倍體的細胞。在垂直線的左側，細胞含有正常的 DNA 含量(<= 4N)，並在細胞週期的 G0/G1、S 或 G2/M 期。在垂直線的右側，細胞沒有經過 M 期並且積累更高量的 DNA(> 4N)，這表明多倍體。

【0053】 **圖 22** 顯示發現化合物 7 以劑量依賴性方式誘導 NOMO-1 細胞中的細胞週期失調。垂直線區分具有正常 DNA 含量和多倍體的細胞。在垂直線的左側，細胞含有正常的 DNA 含量(<= 4N)，並在細胞週期的 G0/G1、S 或 G2/M 期。在垂直線的右側，細胞沒有經過 M 期並且積累更高量的 DNA(> 4N)，這表明多倍體。

【0054】 **圖 23** 顯示發現化合物 7 以劑量依賴性方式誘導具有各種 FLT3 突變(所示)的同基因型 BA/F3 細胞中的細胞週期失調。

【0055】 **圖 24** 顯示如蛋白質印跡標籤中所示，相對於 Aurora 激酶抑制劑 AT928，化合物 7 抑制 MV4-11 細胞中的 Aurora 激酶活性和信號傳導。

【0056】 **圖 25** 顯示按照所示的蛋白質印跡標籤，相對於依魯替尼和奎紮替尼，化合物 7 抑制 Aurora 激酶活性(A)以及在 FLT-3WT 細胞(KG-1)中的信號傳導(B)。

【0057】 **圖 26** 顯示化合物 7 抑制 EOL-1 細胞中的 PDGFRA 和 FLT3(WT)信號傳導。

【0058】 **圖 27** 顯示化合物 7 干擾 RAMOS 細胞中的細胞週期進展。垂直線區分具有正常 DNA 含量和多倍體的細胞。在垂直線的左側，細胞含有正常的 DNA 含量(<= 4N)，並在細胞週期的 G0/G1、S 或 G2/M 期。在垂直線的右側，細胞沒有經過 M 期並且積累更高量的 DNA(> 4N)，這表明多倍體。

【0059】 **圖 28** 顯示化合物 7 干擾 Mino，RAMOS，GRANTA-519 和 SU-DHL-

6細胞中的細胞週期進展。垂直線區分具有正常 DNA 含量和多倍體的細胞。在垂直線的左側，細胞含有正常的 DNA 含量(<= 4N)，並在細胞週期的 G0/G1、S 或 G2/M 期。在垂直線的右側，細胞沒有經過 M 期並且積累更高量的 DNA(> 4N)，這表明多倍體。

【0060】 **圖 29** 顯示化合物 7 相對於依魯替尼抑制 Ramos 細胞中的 BTK 和 Aurora 激酶活性。

【0061】 **圖 30** 顯示，相對於依魯替尼，化合物 7 影響 Ramos 細胞中的 BCR 信號傳導。

【0062】 **圖 31** 顯示化合物 7 在高血清濃度下保持高活性。

【實施方式】

相關申請案之交互參照

【0063】 本申請案要求 2017 年 2 月 21 日申請之美國臨時申請案第 62/461,584 號及 2017 年 10 月 30 日申請之美國臨時申請案第 62/578,948 號之優先權，該等申請案各自以全文引用之方式併入本文中。

【0064】 在一個實施例中，本發明提供用 2,3-二氫-異吲哚-1-酮化合物或其醫藥學上可接受之鹽、酯、前藥、水合物、溶劑化物和異構體來抑制或減少野生型或突變的 Fms 相關酪胺酸激酶(FLT3)，以便治療癌症，例如由該激酶的異常活化驅動的血液癌症的方法。此外，鑒於與治療與 BTK，特別是突變的 BTK(例如 C481S BTK)相關的 B 細胞惡性腫瘤相關的上述挑戰，發現化合物 7 出乎意料地具有對抗 B 細胞惡性細胞系的細胞毒性；對於其中許多 B 細胞惡性細胞系，習知治療劑(例如依魯替尼)幾乎沒有作用。與其他習知治療劑(例如依魯替尼)不同，化合物 7 的作用機理被認為是藉由與 BTK 的非共價結合相互作用，其在防止對 BTK 蛋白質的抗性方面是有用的。因此，在一個實施例中，本發明提供了抑制或減少有需要的受試者中的異常(例如，過度表現的)野生型或突變的 BTK 活性

或表現的方法，其包括投與化合物 7 或其醫藥學上可接受之鹽。此外，化合物 7 抑制不受依魯替尼影響的在 B 細胞惡性腫瘤中起作用的額外激酶(AURK，c-Src 等)。

定義

【0065】 應該理解，在本文中使用的術語僅僅是為了描述特定實施例的目的，而不意欲是限制性的。

【0066】 除非另外定義，否則本文所用之所有技術及科學術語皆與本申請案所屬之技術中之一般技藝人士通常所理解具有相同含義。儘管與本文所述的彼等方法及材料類似或等效的任何方法及材料可用於本申請案之實踐或測試，但本文中描述的為代表性方法及材料。

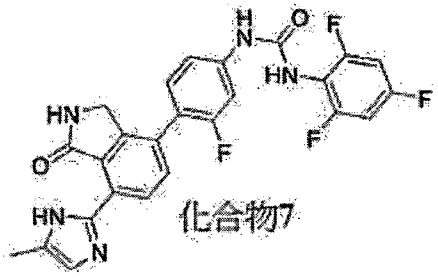
【0067】 在此說明書全篇中對「一個實施例」或「一實施例」之參考意味，結合該實施例所描述的特定特徵、結構或特性包括於至少一個實施例中。因此，片語「在一個實施例中」或「在一實施例中」在此說明書全篇中各個地方之出現未必全部涉及同一實施例。此外，可在一或多個實施例中以任何適合方式組合特定特徵、結構或特性。另外，如本說明書及隨附申請專利範圍中所使用，單數形式「一」及「該」包括複數提及物，除非文中內容另外清楚地指定。亦應注意，術語「或」通常在其包括「及/或」的意義上加以使用，除非內容另有明確指示。

【0068】 除非另有指示，否則本說明書及申請專利範圍中所用之表示成分之量、反應條件等的所有數字應理解為在所有情況下均由術語「約」修飾。因此，除非有相反指示，否則在本說明書和隨附申請專利範圍中提出的數值參數是近似值，其可以根據本申請案試圖獲得的期望性質而變化。

【0069】 在本說明書中，對某些量提供數值範圍。應理解，該等範圍包含其中之所有子範圍。因此，範圍「50 至 80」包括其中所有可能的範圍(例如 51-79、52-78、53-77、54-76、55-75、60-70 等)。此外，既定範圍內之所有值可為由此涵

蓋之範圍之終點(例如範圍 50-80 包括具各終點之範圍，諸如 55-80、50-75 等)。

【0070】 化合物 7 係指 1-{3-氟-4-[7-(5-甲基-1H-咪唑-2-基)-1-側氧基-2,3-二氫-1H-異吲哚-4-基]-苯基}-3-(2,4,6-三氟苯基)脲並且具有以下結構：



化合物7

【0071】 本發明還包括化合物 7 的醫藥學上可接受之鹽、酯、前藥、水合物、溶劑化物和異構體。

【0072】 「醫藥學上可接受之鹽」包括酸和鹼加成鹽。

【0073】 化合物 7 的醫藥學上可接受之鹽可以是衍生自無機或有機酸的「醫藥學上可接受之酸加成鹽」，並且此類鹽可以是包含陰離子的醫藥學上可接受之無毒酸加成鹽。例如，鹽可以包括由以下各項形成的酸加成鹽：無機酸如鹽酸，硫酸，硝酸，磷酸，氫溴酸，氫碘酸及其類似物；有機碳酸如酒石酸，甲酸，檸檬酸，乙酸，三氯乙酸，三氟乙酸，葡糖酸，苯甲酸，乳酸，反丁烯二酸，順丁烯二酸及其類似物；和磺酸如甲磺酸，苯磺酸，對甲苯磺酸，萘磺酸及其類似物。

【0074】 化合物 7 的醫藥學上可接受之鹽可以藉由此項技術公知的習知方法製備。具體而言，根據本發明的「醫藥學上可接受之鹽」可以藉由例如將化合物 7 溶解於可與水混合的有機溶劑諸如丙酮、甲醇、乙醇、乙腈及其類似物中，向其中加入過量的有機酸或無機酸的水溶液，使由此獲得的混合物沉澱或結晶來製備。此外，它可以藉由進一步蒸發溶劑或過量的酸，然後乾燥混合物或藉由使用例如吸濾器來過濾萃取物來製備。

【0075】 如本文所用的術語「酯」是指具有-$(R)_n$-COOR'化學結構的化學部分，其中 R 和 R'各自獨立地選自烷基、環烷基、芳基、雜芳基(藉由芳族環來連接到

氧原子)和雜脂環(藉由芳族環來連接)，並且 n 是 0 或 1，除非另有說明。

【0076】 如本文所用的術語「前藥」是指將在體內經歷代謝活化以產生母體藥物的前體化合物。前藥通常是有用的，因為在某些情況下，與其母體藥物相比，它們可以容易地被投與。例如，一些前藥藉由口服給藥是生物可利用的，不同於其母體藥物通常表現出較差的生物利用度。此外，與其母體藥物相比，前藥在藥物組合物中可表現出改善的溶解性。例如，化合物 7 可以以酯前藥的形式給藥以提高藥物遞送效率，因為藥物的溶解度可以不利地影響穿過細胞膜的滲透性。然後，一旦酯前體形式的化合物進入靶細胞，其可以被代謝水解成羧酸和活性實體。

【0077】 化合物 7 的水合物或溶劑化物包括在本發明的範圍內。如本文所用，「溶劑化物」是指藉由溶劑化(溶劑分子與本發明的活性劑的分子或離子的組合)來形成的複合物或由溶質離子或分子(本發明的活性劑)與一種或多種溶劑分子組成的聚集體。溶劑可以是水，在這種情況下，溶劑化物可以是水合物。水合物的實例包括但不限於半水合物，一水合物，二水合物，三水合物，六水合物等此項技術中之一般技藝人士應該理解，本發明化合物的醫藥學上可接受之鹽也可以以溶劑化物形式存在。溶劑化物通常藉由水合作用來形成，該水合作用是本發明化合物之製備過程的一部分或藉由本發明的無水化合物自然吸收水分來進行。包括水合物的溶劑化物可以例如每個溶劑化物或每個水合物分子由 2、3、4 個鹽分子以化學計量比來組成。另一種可能性是例如兩個鹽分子與三個、五個、七個溶劑或水合物分子化學計量相關。用於結晶的溶劑，如醇，特別是甲醇和乙醇；醛；酮類，特別是丙酮；酯，例如乙酸乙酯；可以嵌入晶體光柵中，特別是醫藥學上可接受之溶劑。

【0078】 本揭示案的化合物或其醫藥學上可接受之鹽可以含有一個或多個掌性軸，使得可以進行阻轉異構化。阻轉異構體是由於圍繞單鍵的受阻旋轉而產生

的立體異構體，其中由於立體應變或其他貢獻因素造成的能量差異造成足夠高以允許分離個別構型異構體的旋轉障壁。本發明意在包括所有這些可能的異構體，以及它們的外消旋和光學純的形式，無論它們是否在本文中具體描述。光學活性的異構體可使用對掌性合成組元或對掌性試劑來製備，或使用習知技術例如層析和分級結晶來進行拆分。用於製備/分離個別阻轉異構體的習知技術包括：由適合的光學純前驅體中進行對掌性合成或使用例如對掌性高效液相層析法(HPLC)對外消旋體(或鹽或衍生物之外消旋體)進行拆分。

【0079】 「立體異構體」是指由相同原子組成的化合物，該等原子藉由相同鍵來結合，但具有不可互換的不同三維結構。本發明考慮到各種立體異構體及其混合物，因為它涉及阻轉異構。

【0080】 如本文所用，蛋白激酶的異常活化意在包括導致疾病、病症或病狀的不同的、異常的、非典型的、反常的或不規則的激酶行為。該等疾病、病症及病狀可包括癌症，與類風濕性關節炎和骨關節炎相關的炎症，哮喘，變態反應，特應性皮炎或牛皮癬，但不限於此。在癌症的情況下，疾病、病症和病狀可以以不受控制的細胞增殖為特徵。

【0081】 由蛋白激酶異常活化引起的癌症的具體實例包括但不限於ABL(Abelson 酪胺酸激酶)，ACK(活化的 cdc42 相關激酶)，AXL，Aurora，BLK(B 淋巴酪胺酸激酶)，RMX(骨髓 X 連鎖激酶)，BTK(布魯頓酪胺酸激酶)，CDK(細胞週期蛋白依賴性激酶)，CSK(C-Src 激酶)，DDR(盤狀蛋白結構域受體)，EPHA(Ephrin A 型受體激酶)，FER(Fer(fps/Fes 相關的)酪胺酸激酶)，FES(貓肉瘤癌基因)，FGFR(纖維母細胞生長因子受體)，FGR，FLT(Fms 樣酪胺酸激酶)，FRK(Fyn 相關激酶)，FYN，HCK(造血細胞激酶) IRR(胰島素受體相關受體)，ITK(白細胞介素 2 誘導型 T 細胞激酶)，JAK(Janus 激酶)，KDR(激酶插入結構域受體)，KIT，LCK(淋巴球特異性蛋白酪胺酸激酶)，LYN，MAPK(絲裂原活化蛋

白激酶)，MER(c-Mer 原癌基因酪胺酸激酶)，MET，MINK(Misshapen 樣激酶)，MNK(MAPK 相互作用激酶)，MST(哺乳動物不育 20 樣激酶)，MUSK(肌肉特異性激酶)，PDGFR(血小板衍生的生長因子受體)，PLK(Polo 樣激酶)，RET(轉染過程中重排)，RON，SRC(類固醇受體共活化劑)，SRM(亞精胺合成酶)，TIE(具有免疫球蛋白和 EGF 重複的酪胺酸激酶)，SYK(脾酪胺酸激酶)，TNK1(酪胺酸激酶，非受體，1)，TRK(原肌球蛋白受體激酶)，TNIK(TRAF2 和 NCK 相互作用激酶)及其類似物。

【0082】 涉及特定疾病或病症的術語「治療(treat)」、「治療(treating)」或「治療(treatment)」包括預防疾病或病症，和/或減輕、改善、減輕或消除疾病或病症的症狀和/或病理。通常，本文使用的術語是指改善、緩解、減輕和消除疾病或病症的症狀。本文中的化合物 7 可以在調配物或藥物中具有治療有效量，該有效量是可以導致生物效應的量，例如某些細胞(例如癌細胞)的凋亡，某些細胞的增殖的減少或導致例如改善、緩解、減輕或消除疾病或病症的症狀。這些術語還可以指減少或停止細胞增殖速率(例如減緩或停止腫瘤生長)或減少增殖的癌細胞的數量(例如除去部分或全部腫瘤)。

【0083】 當如上所述的治療是指預防疾病、病症或病狀時，該治療被稱為預防性。該預防劑的投與可以在增殖性病症的症狀表現之前發生，從而預防疾病或病症，或者延遲其進展。

【0084】 如本文所用，術語「抑制」或「減少」細胞增殖是指如使用此項技術中之一般技藝人士已知的方法測量，例如與未進行過本申請案的方法、組合物和組合的增殖細胞相比，減慢、減少或例如停止細胞增殖的量達例如 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或 100%。

【0085】 如本文所用，術語「細胞凋亡」是指內在細胞自我毀滅或自殺程式。響應觸發刺激，細胞經歷一系列事件，包括細胞收縮、細胞膜起泡和染色質凝縮

和碎裂。這些事件最終導致細胞轉化為膜結合的粒子簇(凋亡小體)，其隨後被巨噬細胞吞噬。

【0086】 如本文所用，「多倍體(polyploidy)」或「多倍體(polyploidy)」是指其中細胞具有某種染色體數目的情況，該染色體數目是比通常的二倍體數(「2n」)更大的單倍體數(「n」)的某個倍數。術語「多倍體細胞(polyploid cells)」或「多倍體細胞(polyploidy cells)」是指多倍體狀況下的細胞。換句話說，多倍體細胞或生物體具有三倍或更多倍的單倍體染色體數目。在人類中，通常的單倍體染色體數目是23，通常的染色體二倍體數目是46。

【0087】 「哺乳動物」包括人類以及家養動物如實驗室動物和家庭寵物(例如，貓，狗，豬，牛，綿羊，山羊，馬，兔)和非家養動物如野生動物及其類似物。在本文中使用的術語「患者」或「受試者」包括人和動物。

【0088】 「非哺乳動物」包括非哺乳動物無脊椎動物和非哺乳動物脊椎動物，例如鳥(例如雞或鴨)或魚。

【0089】 「藥物組合物」是指本揭示案的化合物和此項技術通常接受的用於將生物活性化合物遞送至哺乳動物例如人類的媒質的調配物。這種媒質包括所有醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑。

【0090】 「有效量」是指治療有效量或預防有效量。「治療有效量」是指在必需的劑量和時間段內有效實現所需治療結果的量，例如減小的腫瘤大小，延長的壽命或增加的預期壽命。化合物的治療有效量可根據諸如受試者之疾病狀態、年齡、性別及體重、及化合物於受試者中引發所要反應之能力等因素變化。可調整劑量方案以提供最佳治療反應。治療有效量亦為治療有利作用超過化合物之任何毒性或有害作用的量。「預防有效量」係指在各種劑量下且持續必要時期，有效達成所要預防結果之量，諸如更小的腫瘤或更慢的細胞增殖。典型地，在疾病之前或疾病的較早階段在受試者中使用預防劑量，使得預防有效量可以小於治

療有效量。

【0091】 如本文所用，術語「布魯頓氏酪胺酸激酶」或 BTK 是指來自智人的布魯頓氏酪胺酸激酶，如在例如美國專利第 6,326,469 號(GenBank 登錄號 NP 000052)中揭示。

【0092】 如本文所用，術語「共價 BTK 抑制劑」是指與 BTK 反應形成共價複合物的抑制劑。在一些實施例中，共價 BTK 抑制劑是不可逆 BTK 抑制劑。

【0093】 如本文所用，術語「非共價 BTK 抑制劑」是指與 BTK 反應形成非共價複合物或相互作用的抑制劑。在一些實施例中，非共價 BTK 抑制劑是可逆的 BTK 抑制劑。

方法

【0094】 在一些實施例中，本發明提供了抑制或減少受試者中的野生型或突變的 Fms 相關酪胺酸激酶 3(FLT3)活性或表現的方法，其包括向有需要的受試者投與化合物 7 或其醫藥學上可接受之鹽。在一個實施例中，藉由投與化合物 7 在有此需要的受試者中抑制或減少 FLT3 活性或表現的方法。

【0095】 Fms 相關酪胺酸激酶 3(FLT3)是指由 FLT3 基因編碼的蛋白質。野生型 FLT3 是指非突變形式的蛋白質。FLT3 可以發生一系列突變，包括近膜區活化內部縱排重複(ITD)和酪胺酸激酶結構域或 FLT3 活化環中的點突變。當 DNA 序列中的單個鹼基對被修飾時會發生點突變。例如，F691L 意欲定義在位置 691 之胺基酸從苯丙胺酸到白胺酸的變化。

【0096】 在一個實施例中，突變的 FLT3 具有另外的 ITD 突變。在一個實施例中，ITD-突變與 FTD 驅動的血液學癌症例如 AML 中非常不良的預後相關。

【0097】 在本文揭示的任何方法的另一個實施例中，突變的 FLT3 包含至少一個點突變。在另一個實施例中，該至少一個點突變位於選自 686、687、688、689、690、691、692、693、694、695 和 696 組成之群的一個或多個胺基酸殘基位置

上。在另一實施例中，突變 FLT3 具有選自由以下組成之群的一或多個突變：FLT3-D835H、FLT3-D835V、FLT3-D835Y、FLT3-ITD-D835V、FLT3-ITD-D835Y、FLT3-ITD-D835H、FLT3-ITD-F691L、FLT3-K663Q、FLT3-N841I、FLT3-D835G、FLT3-Y842C 及 FLT3-ITD-Y842C。在其他實施例中，該至少一個點突變是同一等位基因上或不同等位基因上的兩個或兩個以上點突變。

【0098】 在本文揭示的任何方法的一個實施例中，至少一個點突變位於胺基酸殘基位置 686 上。在一個實施例中，至少一個點突變位於胺基酸殘基位置 687 上。在一個實施例中，至少一個點突變位於胺基酸殘基位置 688 上。在一個實施例中，至少一個點突變位於胺基酸殘基位置 689 上。在一個實施例中，至少一個點突變位於胺基酸殘基位置 690 上。在一個實施例中，至少一個點突變位於胺基酸殘基位置 691 上。在一個實施例中，至少一個點突變位於胺基酸殘基位置 692 上。在一個實施例中，至少一個點突變位於胺基酸殘基位置 693 上。在一個實施例中，至少一個點突變位於胺基酸殘基位置 694 上。在一個實施例中，至少一個點突變位於胺基酸殘基位置 695 上。在一個實施例中，至少一個點突變位於胺基酸殘基位置 696 上。在另一個實施例中，該至少一個點突變在對應於任何殘基 686-696 的位置的胺基殘基上。

【0099】 在另一個實施例中，突變的 FLT3 是 FLT3-D835H。在另一個實施例中，突變的 FLT3 是 FLT3-D835V。在另一個實施例中，突變的 FLT3 是 FLT3-D835Y。在另一個實施例中，突變的 FLT3 是 FLT3-ITD-D835V。在另一個實施例中，突變的 FLT3 是 FLT3-ITD-D835Y。在另一個實施例中，突變的 FLT3 是 FLT3-ITD-D835H。在另一個實施例中，突變的 FLT3 是 FLT3-ITD-F691L。在另一個實施例中，突變的 FLT3 是 FLT3-K663Q。在另一個實施例中，突變的 FLT3 是 FLT3-N841I。在另一個實施例中，突變的 FLT3 是 FLT3-D835G，FLT3-Y842C 和/或 FLT3-ITD-Y842C。

【0100】 FLT3 是癌症治療的目標之一。與 FLT3 異常活化相關的疾病、病症和病狀的實例包括由於 FLT3 中的突變而過度刺激 FLT3 引起的疾病，或由於異常高的 FLT3 突變量引起的異常高的 FLT3 活性量引起的疾病。不受任何理論的束縛，FLT3 的過度活性已經牽涉許多疾病的發病機理，包括癌症。與 FLT3 過度活性有關的癌症包括但不限於骨髓增殖性疾病如血小板減少症，原發性血小板增多症(ET)，原因不明的髓樣化生，骨髓纖維化(MF)，骨髓纖維化伴骨髓化生(MMM)，慢性特發性骨髓纖維化(UIMF)和真性紅細胞增多症(PV)，血細胞減少症和惡化前的骨髓發育不良症候群；癌症諸如神經膠質瘤，肺癌，乳腺癌，結直腸癌，前列腺癌，胃癌，食管癌，結腸癌，胰腺癌，卵巢癌和血液惡性腫瘤包括骨髓發育不良，多發性骨髓瘤，白血病和淋巴瘤。

【0101】 在一個實施例中，本發明提供了治療與野生型 FLT3 相關的血液惡性腫瘤的方法，其包括向有需要的受試者投與化合物 7 或其醫藥學上可接受之鹽。在另一個實施例中，本發明提供了治療與突變的 FLT3 相關聯的血液惡性腫瘤的方法，包括向需要其的受試者投與化合物 7 或醫藥學上可接受之鹽。

【0102】 在本文揭示的任何一種方法的一個實施例中，血液惡性腫瘤的實例包括但不限於白血病、淋巴瘤、霍奇金氏病和骨髓瘤。此外，急性淋巴球性白血病(ALL)，急性骨髓性白血病(AML)，急性前髓細胞白血病(APL)，慢性淋巴球性白血病(CLL)，慢性骨髓性白血病(CML)，慢性嗜中性白血病(CNL)，急性未分化白血病(AUL)，退行性大細胞淋巴瘤(ALCL)，前淋巴球性白血病(PML)，幼年型骨髓單核球性白血病(JMML)，成人 T 細胞 ALL，AML，三聯骨髓發育不良症候群(AMLITMDS)，混合譜系白血病(MLL)，骨髓發育不良症候群(MDS)，骨髓增殖性疾病(MPD)和多發性骨髓瘤(MM)。

【0103】 在一個實施例中，本發明提供了治療與野生型或突變 FLT3 相關的白血病的方法，包括向有需要的受試者投與化合物 7 或其醫藥學上可接受之鹽。在

一個實施例中，白血病是 AML。

【0104】 在一個實施例中，本發明提供了用化合物 7 或其醫藥學上可接受之鹽抑制或減少人細胞中的野生型或突變的 FLT3 活性或表現的方法。在另一個實施例中，本發明提供了藉由使化合物 7 與人細胞接觸來抑制或減少人細胞中的突變的 FLT3 活性或表現的方法。

【0105】 在一個實施例中，人類白血病細胞系中的人類細胞。在另一個實施例中，人白血病細胞系是急性淋巴球性白血病細胞系，急性骨髓性白血病細胞系，急性前髓細胞白血病細胞系，慢性淋巴球性白血病細胞系，慢性骨髓性白血病細胞系，慢性嗜中性白血病細胞系，急性未分化白血病細胞系，退行性大細胞淋巴瘤細胞系，前淋巴球性白血病細胞系，幼年型骨髓單核球性白血病細胞系，成人 T 細胞急性淋巴球性白血病細胞系，具有三系骨髓發育不良的急性骨髓性白血病細胞系，混合譜系白血病細胞系，嗜酸球性白血病細胞系，或套細胞淋巴瘤細胞系。

【0106】 在具體的實施例中，人白血病細胞系是嗜酸球性白血病。在另一個實施例中，人白血病細胞系是急性骨髓性白血病。已知這兩種血液癌症都是由 FLT3 驅動的。在一個實施例中，MV4-11、MUTZ-11、MOLM-13 和 PL-21 是攜帶 FLT3-ITD 突變的急性骨髓性白血病細胞系。

【0107】 治療方法提供了用於治療處於風險中的受試者或易受由 FLT3 的異常激酶活性驅動的細胞增殖性病症的受試者的預防性和治療性方法。在一個實例中，本發明提供了用於預防與 FLT3 有關的細胞增殖性病症的方法，其包括將預防有效量的化合物 7 或其醫藥學上可接受之鹽或包含化合物 7 的藥物組合物給予有需要的受試者。在一個實施例中，預防性治療可以在 FLT3 驅動的細胞增殖性病症的症狀特徵表現之前發生，從而預防疾病或病症，或者延遲其進展。

【0108】 在一個實施例中，本發明提供了治療有需要的受試者的血液惡性腫

瘤的方法，其包括投與化合物 7 或其醫藥學上可接受之鹽，其中該受試者對 FLT3 活性或表現抑制劑顯示出抗性或復發。在一個實施例中，該抑制劑是奎紮替尼，吉列替尼，舒尼替尼，索拉非尼，米哚妥林，來他替尼，克瑞拉尼布，PLX3397，PLX3623，克瑞拉尼布，普納替尼或普瑞替尼。在另一個實施例中，抑制劑是奎紮替尼或吉列替尼。

【0109】 在一個實施例中，血液惡性腫瘤是白血病。在其他實施例中，白血病是急性淋巴球性白血病，急性骨髓性白血病，急性前髓細胞白血病，慢性淋巴球性白血病，慢性骨髓性白血病，慢性嗜中性白血病，急性未分化白血病，退行性大細胞淋巴瘤，前淋巴球性白血病，幼年型骨髓單核球性白血病，成人 T 細胞急性淋巴球性白血病，伴有三系骨髓發育不良的急性骨髓性白血病，混合譜系白血病，嗜酸球性白血病或套細胞淋巴瘤。在一個具體的實施例中，白血病是嗜酸球性白血病。在另一個具體實施例中，白血病是急性骨髓性白血病。

【0110】 在一個實施例中，該方法誘導有需要的受試者中表現野生型 FLT3 的細胞凋亡，該方法包括向該受試者投與化合物 7 或其醫藥學上可接受之鹽。在一個實施例中，本發明提供了誘導有需要的受試者中表現突變的 FLT3 的細胞凋亡的方法，包括投與化合物 7 或其醫藥學上可接受之鹽。

【0111】 在另一個實施例中，該方法包括用於治療有需要的受試者的癌症的方法，其包括向有需要的受試者投與化合物 7 或其醫藥學上可接受之鹽，其中該受試者具有突變形式的 FLT3。在另一個實施例中，突變的 FLT3 包含至少一個點突變。在另一個實施例中，該至少一個點突變位於選自 D835、F691、K663、Y842 和 N841 組成之群的一個或多個殘基上。在另一個實施例中，突變的 FLT3 在 D835 處包含至少一個突變。在另一個實施例中，突變的 FLT3 在 F691 處包含至少一個突變。在另一個實施例中，突變的 FLT3 在 K663 處包含至少一個突變。在另一個實施例中，突變的 FLT3 在 N841 處包含至少一個突變。

【0112】 在另一個實施例中，該至少一個點突變位於 FLT3 的酪胺酸激酶結構域中。在另一個實施例中，該至少一個點突變位於 FLT3 的活化環中。在另一個實施例中，該至少一個點突變位於選自 686、687、688、689、690、691、692、693、694、695 和 696 組成之群的一個或多個胺基酸殘基位置上。在另一個實施例中，突變的 FLT3 是 ITD 突變。在另一個實施例中，突變的 FLT3 包含至少一個點突變和 ITD 突變。在另一實施例中，突變 FLT3 具有選自由以下組成之群的一或多個突變：FLT3-D835H、FLT3-D835V、FLT3-D835Y、FLT3-ITD-D835V、FLT3-ITD-D835Y、FLT3-ITD-D835H、FLT3-F691L、FLT3-ITD-F691L、FLT3-K663Q、FLT3-ITD-K663Q FLT3-N841I、FLT3-ITD-N841I、FLT-3R834Q FLT3-ITD-834Q、FLT3-D835G、FLT3-ITD-D835G、FLT3-Y842C 及 FLT3-ITD-Y842C。在另一個實施例中，該至少一個點突變是存在於同一等位基因上的兩個或兩個以上點突變。在另一個實施例中，該至少一個點突變是存在於不同等位基因上的兩個或兩個以上點突變。在另一個實施例中，受試者是哺乳動物。在另一個實施例中，受試者是人。在另一個實施例中，癌症是白血病。在另一個實施例中，白血病是急性淋巴球性白血病，急性骨髓性白血病，急性前髓細胞白血病，慢性淋巴球性白血病，慢性骨髓性白血病，慢性嗜中性白血病，急性未分化白血病，退行性大細胞淋巴瘤，前淋巴球性白血病，幼年型骨髓單核球性白血病，成人 T 細胞急性淋巴球性白血病，伴有三系骨髓發育不良的急性骨髓性白血病，混合譜系白血病，嗜酸球性白血病和/或套細胞淋巴瘤。在另一個具體實施例中，白血病是急性骨髓性白血病。

【0113】 在一個實施例中，本發明提供了藉由向受試者投與化合物 7 或其醫藥學上可接受之鹽來雙重抑制或減少有此需要的受試者中的激酶的活性或表現的方法。在另一個實施例中，雙重抑制或減少活性或表現的方法是在受試者中聯合用於突變的 Fms 相關酪胺酸激酶 3(FLT3)活性和抑制或減少布魯頓氏酪胺酸

激酶(BTK)活性或表現，包括投與化合物 7 或其醫藥學上可接受之鹽。在一個實施例中，化合物 7 抑制或減少 FLT3(包括野生型和突變的 FLT3)和 BTK 活性。靶向多激酶途徑是一種可以改善預後不良的癌症的結果的方法。

【0114】 在一些實施例中，本發明提供了抑制或減少有需要的受試者中的異常(例如，過度表現的)野生型或突變的 BTK 活性或表現的方法，其包括向受試者投與化合物 7 或其醫藥學上可接受之鹽。

【0115】 在某些實施例中，BTK 是野生型的。在一個實施例中，野生型 BTK 在受試者中異常(例如過度表現)。在另一個實施例中，野生型 BTK 在受試者中過度活躍或超活躍。

【0116】 在某些實施例中，BTK 是突變的 BTK。BTK 突變可能由許多對熟習此項技術者顯而易見的因素引起，例如插入突變，缺失突變和取代突變(例如點突變)。在一個實施例中，突變的 BTK 包含至少一個點突變。

【0117】 在本發明的範圍內考慮各種點突變。例如，該至少一個點突變可能是 BTK 上的任何殘基。在一些實施例中，BTK 基因內的突變包括胺基酸位置處的突變：L11、K12、S14、K19、F25、K27、R28、R33、Y39、Y40、E41、I61、V64、R82、Q103、V113、S115、T117、Q127、C154、C155、T184、P189、P190、Y223、W251、R288、L295、G302、R307、D308、V319、Y334、L358、Y361、H362、H364、N365、S366、L369、I370M、R372、L408、G414、Y418、I429、K430、E445、G462、Y476、M477、C481、C502、C506、A508、M509、L512、L518、R520、D521、A523、R525、N526、V535、L542、R544、Y551、F559、R562、W563、E567、5578、W581、A582、F583、M587、E589、S592、G594、Y598、A607、G613、Y617、P619、A622、V626、M630、C633、R641、F644、L647、L652、V1065 及/或 A1185。在一些實施例中，BTK 基因內的突變選自 L11P、K12R、S14F、K19E、F25S、K27R、R28H、R28C、R28P、T33P、Y3S9、

Y40C、Y40N、E41K、I61N、V64F、V64D、R82K、Q103Q5FSSVR、V113D、S115F、T117P、Q127H、C1545、C155G、T184P、P189A、Y223F、W251L、R288W、R288Q、L295P、G302E、R307K、R307G、R307T、D308E、V319A、Y334S、L358F、Y361C、H362Q、H364P、N365Y、S366F、L369F、I370M、R372G、L408P、G414R、Y418H、I429N、K430E、E445D、G462D、G462V、Y476D、M477R、C481S、C502F、C502W、C506Y、C506R、A508D、M5091、M509V、L512P、L512Q、L518R、R520Q、D521G、D521H、D521N、A523E、R525G、R525P、R525Q、N526K、V535F、L542P、R544G、R544K、Y551F、F559S、R562W、R562P、W563L、E567K、S578Y、W581R、A582V、F583S、M587L、E589D、E589K、E589G、S592P、G594E、Y598C、A607D、G613D、Y617E、P619A、P619S、A622P、V626G、M630I、M630K、M630T、C633Y、R641C、F644L、F644S、L647P、L652P、V10651 及 A1185V。在一個實施例中，該至少一個點突變位於半胱胺酸殘基上。在一個實施例中，半胱胺酸殘基位於 BTK 的激酶結構域中。在一些實施例中，該至少一個點突變是選自殘基 E41、P190 和 C481 組成之群中的一個或多個。在一些實施例中，BTK 中的突變位於胺基酸位置 481 處(即 C481)。C481 點突變可以被任何胺基酸部分取代。在一些實施例中，BTK 中的突變是 C481S。在一個實施例中，殘基 C481 處的點突變選自 C481S、C481R、C481T 和/或 C481Y。在一個實施例中，該至少一個點突變是選自 E41K、P190K 和 C481S 組成之群中的一個或多個。

【0118】 在一些實施例中，B 細胞淋巴瘤的特徵在於具有突變 BTK 多肽的多個細胞。在一些實施例中，突變型 BTK 多肽含有一個或多個胺基酸取代，其賦予對共價和/或不可逆 BTK 抑制劑的抑制的抗性。在一些實施例中，突變 BTK 多肽含有一個或多個胺基酸取代，其賦予對野生型 BTK 的胺基酸位置 481 處與半胱胺酸共價結合的共價和/或不可逆 BTK 抑制劑的抑制。在一些實施例中，突

變型 BTK 多肽含有一個或多個胺基酸取代，其賦予對共價和/或不可逆 BTK 抑制劑的抑制的抗性，該共價和/或不可逆 BTK 抑制劑選自 PCI-32765 (依魯替尼)、PCI-45292 、 PCI-45466 、 AVL-101/CC-101 (Avila Therapeutics/Celgene Corporation)、AVL-263/CC-263 (Avila Therapeutics/Celgene Corporation)、AVL-292/CC-292 (Avila Therapeutics/Celgene Corporation) 、 AVL-291/CC-291 (Avila Therapeutics/Celgene Corporation)、CNX 774 (Avila Therapeutics)、BMS-488516 (Bristol-Myers Squibb) 、 BMS-509744 (Bristol-Myers Squibb) 、 CGI-1746 (CGI Pharma/Gilead Sciences)、CGI-560 (CGI Pharma/Gilead Sciences)、CTA-056、GDC-0834 (Genentech)、HY-11066 (亦稱為 CTK4I7891、HMS3265G21、HMS3265G22、HMS3265H21 、 HMS3265H22 、 439574-61-5 、 AG-F-54930) 、 ONO-4059 (Ono Pharmaceutical Co., Ltd.)、ONO-WG37 (Ono Pharmaceutical Co., Ltd.)、PLS-123 (Peking University) 、 RN486 (Hoffmann-La Roche) 、 HM71224 (Hanmi Pharmaceutical Company Limited)、LFM-A13、BGB-3111 (Beigene)、KBP-7536 (KBP BioSciences)、ACP-196 (Acerta Pharma)或 JTE-051 (Japan Tobacco Inc)。在一些實施例中，突變型 BTK 多肽含有一個或多個賦予對依魯替尼抑制的抗性的胺基酸取代。在一些情況下，多個細胞包括至少兩個細胞。在某些實施例中，BTK 突變體含有一個或多個胺基酸取代，其賦予對非共價 BTK 抑制劑的抑制的抗性。在某些實施例中，BTK 突變體含有一個或多個賦予對可逆 BTK 抑制劑的抑制的抗性的胺基酸取代。

【0119】 如上文在一些實施例中所述，與野生型 BTK 相比，修飾包含胺基酸位置 481 處的胺基酸的取代或缺失。在一些實施例中，修飾包括與野生型 BTK 相比在位置 481 處的胺基酸的取代。在一些實施例中，該修飾是 BTK 多肽的胺基酸位置 481 處的半胱胺酸取代成選自白胺酸，異白胺酸，纈胺酸，丙胺酸，甘胺酸，甲硫胺酸，絲胺酸，蘇胺酸，苯丙胺酸，色胺酸，離胺酸，精胺酸，組胺

酸，脯胺酸，酪胺酸，天冬醯胺，麩醯胺，天冬胺酸和麩胺酸的胺基酸。在一些實施例中，修飾是在 BTK 多肽的胺基酸位置 481 處半胱胺酸被選自絲胺酸，甲硫胺酸或蘇胺酸的胺基酸取代。在一些實施例中，修飾是在 BTK 多肽的胺基酸位置 481 上半胱胺酸取代為絲胺酸(「C481S」)。

【0120】 在一些實施例中，BTK 中的突變賦予 B 細胞增殖性病症對 TEC 抑制劑(例如 ITK 抑制劑，BTK 抑制劑如依魯替尼)的抗性。在一些實施例中，BTK 中的 C481S 突變賦予 B 細胞增殖性病症對 TEC 抑制劑(例如 ITK 抑制劑，BTK 抑制劑如依魯替尼)的抗性。在一些實施例中，BTK 中的突變賦予 B 細胞增殖性病症對共價 BTK 抑制劑的抗性。在一些實施例中，BTK 中的突變賦予 B 細胞增殖性病症對依魯替尼和阿拉貝替尼的抗性。

【0121】 在一個實施例中，與共價不可逆的 BTK 抑制劑對野生型 BTK 的活性的抑制相比，由共價不可逆的 BTK 抑制劑對突變 BTK 的活性的抑制更少。共價不可逆的 BTK 抑制劑對於突變的 BTK 可具有比野生型 BTK 高至少約 1%至高至少約 1000%的 IC_{50}。舉例而言，共價不可逆的 BTK 抑制劑對於突變的 BTK 可具有比野生型 BTK 高至少約 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%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、210%、220%、230%、240%、250%、260%、270%、280%、290%、300%、310%、320%、

330%、340%、350%、360%、370%、380%、390%、400%、410%、420%、430%、440%、450%、460%、470%、480%、490%、500%、510%、520%、530%、540%、550%、560%、570%、580%、590%、600%、610%、620%、630%、640%、650%、660%、670%、680%、690%、700%、710%、720%、730%、740%、750%、760%、770%、780%、790%、800%、810%、820%、830%、840%、850%、860%、870%、880%、890%、900%、910%、920%、930%、940%、950%、960%、970%、980%、990%至高至少約 1000%的 IC_{50}。在一個實施例中，對於突變的 BTK，共價不可逆的 BTK 抑制劑具有比野生型 BTK 高至少 50%的 IC_{50}。在一個實施例中，不可逆共價 BTK 抑制劑是依魯替尼和/或阿拉貝替尼。例如，不可逆的共價 BTK 抑制劑是依魯替尼。

【0122】 在一個實施例中，點突變僅在 BTK 的一個等位基因上。在另一個實施例中，該點突變位於 BTK 的兩個等位基因上。在一個實施例中，半胱胺酸上的點突變僅在 BTK 的一個等位基因上。在另一個實施例中，半胱胺酸上的點突變位於 BTK 的兩個等位基因上。在一個實施例中，C481 上的點突變僅在 BTK 的一個等位基因上。在另一個實施例中，C481 上的點突變位於 BTK 的兩個等位基因上。在一個實施例中，C481S 點突變僅在 BTK 的一個等位基因上。在另一個實施例中，C481S 點突變位於 BTK 的兩個等位基因上。

【0123】 在一個實施例中，受試者是哺乳動物。在一實施例中，受試者為人類。

【0124】 本發明的另一態樣涉及用於治療有需要的受試者中的癌症的方法，其包括向有需要的受試者投與化合物 7 或其醫藥學上可接受之鹽，其中該受試者具有 BTK 的突變形式。

【0125】 本發明的另一個態樣涉及治療有需要的受試者的 B 細胞惡性腫瘤的方法，其包括向受試者投與化合物 7 或其醫藥學上可接受之鹽。在一個實施例

中，受試者具有突變形式的 BTK。

【0126】 在一些實施例中，B 細胞惡性腫瘤是慢性淋巴球性白血病(CLL)，小淋巴球性淋巴瘤(SLL)，高風險 CLL 或非 CLL/SLL 淋巴瘤。在一些實施例中，B 細胞增殖性病症為濾泡性淋巴瘤，彌漫性大 B 細胞淋巴瘤(DLBCL)，套細胞淋巴瘤，瓦爾登斯特倫氏巨球蛋白血症，多發性骨髓瘤，邊緣區淋巴瘤，伯基特氏淋巴瘤，非伯基特高級 B 細胞淋巴瘤或結外邊緣區 B 細胞淋巴瘤。在一些實施例中，B 細胞惡性腫瘤是急性或慢性骨髓性(或髓性)白血病，骨髓發育不良症候群或急性淋巴母細胞性白血病。在一些實施例中，B 細胞惡性腫瘤是復發性或難治性彌漫性大 B 細胞淋巴瘤(DLBCL)，復發或難治性套細胞淋巴瘤，復發或難治性濾泡性淋巴瘤，復發性或難治性 CLL；復發性或難治性 SLL；復發或難治性多發性骨髓瘤。在一些實施例中，B 細胞惡性腫瘤是被分類為高風險的 B 細胞增殖性病症。在一些實施例中，B 細胞惡性腫瘤是高風險 CLL 或高風險 SLL。

【0127】 因此，在一個實施例中，治療的 B 細胞惡性腫瘤選自套細胞淋巴瘤(MCL)，B 細胞急性淋巴母細胞性白血病(B-ALL)，伯基特淋巴瘤，慢性淋巴球性白血病(CLL)，和彌漫性大 B 細胞淋巴瘤(DLBCL)組成之群中的一種或多種。在一個實施例中，治療的 B 細胞惡性腫瘤是套細胞淋巴瘤(MCL)。在另一個實施例中，治療的 B 細胞惡性腫瘤是 B 細胞急性淋巴母細胞白血病(B-ALL)。在一個實施例中，治療的 B 細胞惡性腫瘤是伯基特淋巴瘤。在一個實施例中，治療的 B 細胞惡性腫瘤是慢性淋巴球性白血病(CLL)。在一個實施例中，治療的 B 細胞惡性腫瘤是套細胞淋巴瘤(MCL)。在一個實施例中，治療的 B 細胞惡性腫瘤是彌漫性大 B 細胞淋巴瘤(DLBCL)。

【0128】 B 細胞惡性腫瘤是血液的腫瘤，尤其包括非霍奇金淋巴瘤，多發性骨髓瘤和白血病。它們可以起源於淋巴組織(如淋巴瘤的情況下)或骨髓中(如白血病和骨髓瘤的情況)，並且它們都涉及淋巴球或白血球的不受控制的生長。有許

多 B 細胞增殖性疾病的亞型。B 細胞增殖性疾病的病程和治療取決於 B 細胞增殖性病症亞型；然而，即使在每種亞型中，臨床表現、形態學外觀和對治療的反應都是不均勻的。

【0129】 在另一個實施例中，該等方法還可以包括藉由向有需要的患者投與化合物 7 或其藥學上的鹽來治療血液惡性腫瘤。在另一個實施例中，血液惡性腫瘤是白血病。在另一個實施例中，白血病是急性淋巴球性白血病，急性骨髓性白血病，急性前髓細胞白血病，慢性淋巴球性白血病，慢性骨髓性白血病，慢性嗜中性白血病，急性未分化白血病，退行性大細胞淋巴瘤，前淋巴球性白血病，幼年型骨髓單核球性白血病，成人 T 細胞急性淋巴球性白血病，伴有三系骨髓發育不良的急性骨髓性白血病，混合譜系白血病，嗜酸球性白血病和/或套細胞淋巴瘤。在具體的實施例中，白血病是急性骨髓性白血病。

【0130】 惡性淋巴瘤是主要存在於淋巴組織內的細胞的腫瘤轉化。兩組惡性淋巴瘤是霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤(NHL)。兩種類型的淋巴瘤都浸潤了網狀內皮組織。然而，它們在起源的腫瘤細胞、疾病部位、全身症狀的存在和對治療的反應方面不同。

【0131】 在一個實施例中，化合物 7 抑制和/或減少 Aurora 激酶的活性。Aurora 激酶(Aurora-A，Aurora-B，Aurora-C)是絲胺酸/蘇胺酸蛋白激酶，其對於增殖細胞是必不可少的並且已經被鑒定為有絲分裂和減數分裂中不同步驟的關鍵調節物，該等不同步驟在從有絲分裂紡錘體的形成到胞質分裂的範圍內。Aurora 家族激酶對細胞分裂至關重要，並且與腫瘤發生和癌症易感性密切相關。在各種人類癌症中，已經觀察到 Aurora-A、Aurora-B 和/或 Aurora C 的過度表現和/或上調激酶活性。Aurora 激酶的過度表現在臨床上與癌症進展和預後不良有關。Aurora 激酶涉及調節細胞週期的磷酸化事件(例如組蛋白 H3 的磷酸化)。細胞週期失調可導致細胞增殖和其他異常。

【0132】 不受任何特定理論的束縛，BTK 和/或 Aurora 激酶的抑制可導致胞質分裂失敗和異常退出有絲分裂，這可導致多倍體細胞、細胞週期停滯並最終凋亡。

【0133】 因此，在一個實施例中，化合物 7 的投與誘導多倍體。在另一個實施例中，化合物 7 的投與誘導細胞凋亡。例如，在一個實施例中，細胞與有效量的化合物 7 接觸，從而引起細胞多倍體和/或細胞週期停滯和/或細胞凋亡。細胞可以是癌症或腫瘤細胞。因此，在一個實施例中，化合物 7 的投與誘導癌症和/或腫瘤細胞的細胞凋亡。在又一個實施例中，化合物 7 的投與在表現突變型 BTK(例如 C481S)的癌症和/或腫瘤細胞中誘導細胞凋亡。

【0134】 在本發明的任何實施例中，化合物 7 可抑制和/或減少野生型 BTK 和/或突變型 BTK 的活性或表現。因此，在一些實施例中，化合物 7 抑制和/或減少野生型 BTK 的活性或表現。在其他實施例中，化合物 7 抑制和/或減少突變型 BTK 的活性或表現。突變型 BTK 可以包含至少一個點突變。在一個實施例中，突變型 BTK 在半胱胺酸殘基上包含至少一個點突變。在一個實施例中，突變型 BTK 在殘基 C481 包含至少一個點突變。在一個實施例中，突變型 BTK 包含至少一個 C481S 突變。

【0135】 Fms 相關酪胺酸激酶 3(FLT3)是指由 FLT3 基因編碼的蛋白質。野生型 FLT3 是指非突變形式的蛋白質。FLT3 可以發生一系列突變，包括近膜區活化內部縱排重複(ITD)和酪胺酸激酶結構域或 FLT3 活化環中的點突變。在本發明的任何實施例中，化合物 7 抑制和/或減少受試者中野生型和/或突變型 Fms 相關酪胺酸激酶 3(FLT3)活性或表現的活性。在一個實施例中，化合物 7 抑制和/或減少受試者中野生型 Fms 相關酪胺酸激酶 3(FLT3)活性或表現的活性。在另一個實施例中，化合物 7 抑制和/或減少受試者中突變型 Fms 相關酪胺酸激酶 3(FLT3)活性或表現的活性。突變體 FLT3 可以包含至少一個點突變。在一個實

施例中，突變的 FLT3 在選自 D835、F691、K663、Y842 和 N841 組成之群的一個或多個殘基上包含至少一個點突變。突變的 FLT3 可能是 FLT3-ITD。突變的 FLT3 可以進一步包含另外的 ITD 突變。

【0136】 本發明的另一個態樣涉及抑制或減少人細胞中異常(例如，過度表現的)野生型或突變的 BTK 活性或表現的方法，包括使化合物 7 或其醫藥學上可接受之鹽與人細胞接觸。

【0137】 在一個實施例中，突變的 BTK 包含至少一個點突變。在本發明的範圍內考慮了多種點突變，並且如上所述。例如，該至少一個點突變可能是 BTK 上的任何殘基。在一個實施例中，該至少一個點突變位於半胱胺酸殘基上。在一個實施例中，半胱胺酸殘基位於 BTK 的激酶結構域中。在一些實施例中，該至少一個點突變是選自殘基 E41、P190 和 C481 組成之群中的一個或多個。在一些實施例中，BTK 中的突變位於胺基酸位置 481 處。C481 點突變可以被任何胺基酸部分取代。在一些實施例中，BTK 中的突變是 C481S。在一個實施例中，殘基 C481 處的點突變選自 C481S、C481R、C481T 和/或 C481Y。在一個實施例中，該至少一個點突變是選自 E41K、P190K 和 C481S 組成之群中的一個或多個。

調配物

【0138】 基於已知方法，熟習此項技術者可以確定化合物 7，其醫藥學上可接受之鹽、酯、前藥、水合物、溶劑化物和異構體或包含化合物 7 或其醫藥學上可接受之鹽的藥物組合物的有效量。

【0139】 在一個實施例中，本發明的藥物組合物或藥物調配物包含化合物 7 或其醫藥學上可接受之鹽和醫藥學上可接受之載劑。醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑包括但不限於任何佐劑、載劑、賦形劑、助流劑、甜味劑、稀釋劑、防腐劑、染料/著色劑、增味劑、表面活性劑、潤濕劑、分散劑、懸浮劑、穩定

劑、等滲劑、溶劑或乳化劑，其經美國食品和藥物管理局批准可用於人類或家畜。

【0140】 在一個實施例中，合適的醫藥學上可接受之載劑包括但不限於惰性固體填充劑或稀釋劑以及無菌水溶液或有機溶液。醫藥學上可接受之載劑為熟習此項技術者所熟知，並且包括但不限於約 0.01 至約 0.1 M，較佳 0.05 M 磷酸鹽緩衝液或 0.8%鹽水。這種醫藥學上可接受之載劑可以是水溶液或非水溶液、懸浮液和乳液。適用於本申請案的非水性溶劑的實例包括但不限於丙二醇，聚乙二醇，植物油如橄欖油，和可注射的有機酯如油酸乙酯。

【0141】 適用於本申請案的含水載劑包括但不限於水、乙醇、醇/水溶液、甘油、乳液或懸浮液，包括鹽水和緩衝媒質。口服載劑可以是酏劑、糖漿劑、膠囊劑、錠劑及其類似物。

【0142】 適用於本申請案的液體載劑可用於製備溶液劑、懸浮劑、乳劑、糖漿劑、酏劑和加壓化合物。活性成分可以溶解或懸浮在醫藥學上可接受之液體載劑中，例如水、有機溶劑、兩者的混合物或醫藥學上可接受之油或脂肪。液體載劑可以含有其它合適的藥物添加劑，如增溶劑、乳化劑、緩衝劑、防腐劑、甜味劑、調味劑、懸浮劑、增稠劑、著色劑、黏度調節劑、穩定劑或滲透調節劑。

【0143】 適用於本申請案的液體載劑包括但不限於水(部分含有上述添加劑，例如纖維素衍生物，較佳羧甲基纖維素鈉溶液)，醇(包括一元醇和多元醇，例如乙二醇)和它們的衍生物和油(例如分餾的椰子油和花生油)。對於非經腸投與，載劑亦可包含油性酯，諸如油酸乙酯及肉豆蔻酸異丙酯。無菌液體載劑適用於呈包含供非經腸投與之化合物的無菌液體形式。用於本文揭示之加壓化合物之液體載劑可為鹵素化烴或其他醫藥學上可接受之推進劑。

【0144】 適用於本申請案的固體載劑包括但不限於惰性物質，例如乳糖、澱粉、葡萄糖、甲基纖維素、硬脂酸鎂、磷酸二鈣、甘露糖醇及其類似物。固體載劑可進一步包括一種或多種充當調味劑、潤滑劑、增溶劑、懸浮劑、填充劑、助

流劑、壓縮助劑、黏合劑或錠劑崩解劑的物質；它也可以是封裝材料。在散劑中，載劑通常為呈與細粉狀活性化合物之混合物的細粉狀固體。在錠劑中，活性化合物與具有必需壓縮性質之載劑以適合比例混合且壓縮成所要形狀及大小。散劑和錠劑較佳含有高達 99%的活性化合物。合適的固體載劑包括例如磷酸鈣，硬脂酸鎂，滑石粉，糖，乳糖，糊精，澱粉，明膠，纖維素，聚乙烯吡咯啶酮，低熔點蠟和離子交換樹脂。錠劑可藉由視情況與一或多種附屬成分一起壓縮或模製而製得。壓製錠劑可藉由視情況地與黏合劑(例如聚維酮，明膠，羥丙基甲基纖維素)，潤滑劑，惰性稀釋劑，防腐劑，崩解劑(例如羥基乙酸澱粉鈉，交聯聚維酮，交聯羧甲基纖維素鈉)表面活性劑或分散劑混合，在合適的機器中壓製呈自由流動形式諸如粉末或顆粒的活性成分來製備。模製錠劑可藉由在合適機器中模製以惰性液體稀釋劑沾濕之粉末狀化合物的混合物來製成。錠劑可以視情況地被包衣或刻痕並且可以被配製以便提供其中活性成分的緩慢或受控釋放，例如使用不同比例的羥丙基甲基纖維素以提供期望的釋放特徵。錠劑可以視情況地具有腸溶包衣，以便在除胃以外的腸道部分中提供釋放。

【0145】 適用於本申請案的非經腸載劑包括但不限於氯化鈉溶液，林格氏右旋糖，葡萄糖和氯化鈉，乳酸林格氏液和固定油。靜脈內載劑包括流體及營養素補充劑、電解液補充劑，諸如基於林格氏右旋糖之物，及其類似物。亦可存在防腐劑及其他添加劑，諸如例如抗微生物劑、抗氧化劑、螯合劑及惰性氣體及類似者。

【0146】 適用於本申請案的載劑可以根據需要使用此項技術已知的習知技術與崩解劑，稀釋劑，成粒劑，潤滑劑，黏合劑及其類似物混合。如此項技術通常已知的，載劑也可以使用不與化合物有害反應的方法進行滅菌。

【0147】 稀釋劑可以加入到本發明的調配物中。稀釋劑增加固體藥物組合物和/或組合的體積，並且可以使包含組合物和/或組合的藥物劑型更易於患者和護

理人員處理。用於固體組合物和/或組合的稀釋劑包括例如微晶纖維素(例如AVICEL)，微細纖維素，乳糖，澱粉，預膠化澱粉，碳酸鈣，硫酸鈣，糖，葡萄糖結合劑，糊精，右旋糖，磷酸氫鈣二水合物，磷酸三鈣，高嶺土，碳酸鎂，氧化鎂，麥芽糖糊精，甘露醇，聚甲基丙烯酸酯(例如 EUDRAGIT(r))，氯化鉀，粉狀纖維素，氯化鈉，山梨糖醇和滑石。

【0148】 為了本發明的目的，可以將本發明的藥物組合物配製成含有醫藥學上可接受之載劑、佐劑和媒介物的調配物，用於藉由多種方式投與，包括口服，非經腸，藉由吸入噴霧，局部或直腸地。在本文中使用的術語非經腸包括藉由各種輸液技術來皮下、靜脈內、肌肉內和動脈內注射。本文所用的動脈內和靜脈內注射包括藉由導管給藥。

【0149】 本發明的藥物組合物可以藉由使用此項技術公知的任何習知方法製備成任何類型的調配物和藥物遞送系統。本發明的藥物組合物可以配製成可注射的調配物，其可以藉由包括鞘內，心室內，靜脈內，腹膜內，鼻內，眼內，肌內，皮下或骨內的途徑投與。而且，它也可以經口，或腸胃外經由直腸、腸或鼻腔中的黏膜來投與(參見 Gennaro, A. R.等人, (1995) Remington's Pharmaceutical Sciences)。較佳地，局部投與組合物，而不是腸內投與。例如，組合物可以被注射或藉由靶向藥物遞送系統如儲庫調配物或持續釋放調配物遞送。

【0150】 本發明的藥物調配物可以藉由此項技術中任何公知的方法製備，例如混合，溶解，製粒，糖衣丸製作，研磨，乳化，包封，包埋或凍乾過程。如上所述，本發明的組合物可以包括促進將活性分子加工成藥用製劑的一種或多種生理學上可接受的載劑，例如賦形劑和佐劑。

【0151】 適當調配物視所選投藥途徑而定。例如，對於注射，組合物可以配製在水溶液中，較佳在生理相容的緩衝液如 Hank 氏溶液，林格溶液或生理鹽水緩衝液中。關於經黏膜或鼻腔投與，適於欲滲透之障壁的滲透劑用於該調配物中。

這種滲透劑在此項技術中通常是已知的。在本發明的一個實施例中，本發明化合物可以製備成口服調配物。對於口服給藥，可以藉由將活性化合物與此項技術已知的醫藥學上可接受之載劑組合來容易地配製化合物。此類載劑使得所揭示的化合物能夠配製成用於受試者口服攝入的錠劑，丸劑，糖錠劑，膠囊劑，液體劑，凝膠劑，糖漿劑，漿劑，懸浮劑及類似者。化合物亦可調配成例如含有習知栓劑基質(諸如可可脂或其他甘油酯)之直腸組合物，諸如栓劑或滯留灌腸劑。

【0152】 口服使用的藥物製劑可作為固體賦形劑獲得，視情況研磨所得混合物，並且(如果需要)在加入合適的佐劑後加工顆粒混合物以獲得錠劑或糖衣丸核心。適合賦形劑可尤其為填充劑，諸如糖，包括乳糖、蔗糖、甘露糖醇或山梨糖醇；纖維素製劑，諸如玉米澱粉、小麥澱粉、稻米澱粉、馬鈴薯澱粉、明膠、黃芪膠、甲基纖維素、羥丙基甲基纖維素、羧甲基纖維素鈉及/或聚乙烯吡咯啶酮(PVP)製劑。另外，可添加崩解劑，諸如交聯聚乙烯基吡咯啶酮、瓊脂或海藻酸或其鹽如海藻酸鈉。另外，可以添加潤濕劑，例如十二烷基硫酸鈉等。

【0153】 糖衣錠芯具有合適包衣。為此目的，可使用濃的糖溶液，其可視情況含有阿拉伯樹膠、滑石粉、聚乙烯吡咯啶酮、卡波普(carbopol)凝膠、聚乙二醇及/或二氧化鈦、漆溶液，以及合適的有機溶劑或混合溶劑。染料或顏料可添加至錠劑或糖衣藥丸塗層中以便識別或表示活性化合物劑量的不同組合。

【0154】 可經口投與之醫藥製劑包括由明膠製成之推入配合型膠囊，以及由明膠及塑化劑(諸如甘油或山梨糖醇)製成之軟質密封膠囊。推入-配合型膠囊可含有活性成分與填充劑(諸如乳糖)、黏合劑(諸如澱粉)及/或潤滑劑(諸如滑石或硬脂酸鎂)及視情況選用之穩定劑之混合物。在軟質膠囊中，活性化合物可溶解或懸浮於合適液體，諸如脂肪油、液體蠟或液體聚乙二醇中。此外，可添加穩定劑。經口投與之所有調配物應呈合適於此投與之劑量。

【0155】 在一個實施例中，本發明的化合物可以透皮給藥，例如藉由皮膚貼

劑或局部給藥。在一個態樣，本發明的透皮或局部調配物可另外包含一種或多種滲透促進劑或其他效應物，包括增強遞送化合物遷移的試劑。較佳地，可以使用透皮或局部給藥，例如在需要特定位置遞送的情況下。

【0156】 對於藉由吸入來投與，本發明之化合物可方便地以氣溶膠噴霧形式自加壓包或霧化器傳遞，且藉助合適的推進劑，例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或任何其他合適的氣體。在加壓氣溶膠的情況下，合適劑量單位可藉由提供用於輸送計量之量的閥門來確定。可以配製用於吸入器或吹入器的例如明膠的膠囊和藥筒。它們通常含有化合物和合適的粉末基質如乳糖或澱粉的粉末混合物。經配製用於藉由注射(例如藉由快速濃注或連續輸注)來非經腸投與的組合物可以以單位劑量形式存在，例如在安瓿中或在多劑量容器中，加入防腐劑。組成物可採用諸如油性或水性媒介物中的懸浮液、溶液或乳液的形式，並且可含有調配劑例如懸浮、穩定和/或分散劑。用於非經腸給藥的調配物包括水溶液或水溶形式的其它組合物。

【0157】 活性化合物的懸浮液也可以製備成合適的油性注射懸浮劑。合適的親脂性溶劑或媒介物包括脂肪油(諸如芝麻油)或合成脂肪酸酯(諸如油酸乙酯或三甘油酯)或脂質體。水性注射懸浮液可含有增加懸浮液之黏度之物質，諸如羧甲基纖維素鈉、山梨糖醇或聚葡萄糖。視情況，懸浮液亦含有合適的穩定劑或增加化合物溶解度以允許製備高濃度溶液之試劑。或者，活性成分呈粉末形式，用於在使用之前以合適的媒劑例如無菌無熱原質水復原。

【0158】 如上所述，本發明的組合物也可以配製成儲庫調配物。該等長效調配物可藉由植入(例如皮下或肌肉內)或藉由肌肉內注射來投與。因此，例如，本發明化合物可與合適聚合物或疏水性材料(例如以可接受之油中的乳液形式)或離子交換樹脂一起配製，或呈微溶性衍生物形式，例如，呈微溶性鹽形式。

【0159】 對於本發明治療方法中使用的任何組合物，可以使用此項技術中眾

所周知的各種技術來初步估計治療有效劑量。例如，基於從細胞培養測定獲得的資訊，可以在動物模型中配製劑量以達到包括 IC_{50} 的循環濃度範圍。類似地，例如，可以使用從細胞培養測定和其他動物研究獲得的資料確定適用於人類受試者的劑量範圍。

【0160】 試劑的治療有效劑量是指導致受試者症狀改善或存活延長的試劑的量。該等分子之毒性及治療效能可藉由標準醫藥程序在細胞培養物或實驗動物中測定，例如測定 LD_{50}(50%群體致死劑量)及 ED_{50}(50%群體之治療有效劑量)。在毒性及治療作用之間之劑量比率為治療指數且表示為比率 LD_{50O}/ED_{50}。尋求具有高治療指數的藥劑。

【0161】 劑量較佳落入包括毒性很小或沒有毒性的 ED_{50} 在內的循環濃度範圍內。劑量可取決於使用之劑型及使用之投與途徑而在該範圍內變化。鑒於受試者病症的具體情況，應根據此項技術中眾所周知的方法來選擇確切的調配物、投與途徑和劑量。

【0162】 此外，投與的藥劑或組合物的量將取決於多種因素，包括受治療的受試者的年齡，體重，性別，健康狀況，疾病程度，病痛的嚴重程度，投與方式，和處方醫生的判斷。

【0163】 本發明的化合物或藥物組合物可以以單個或多個單位劑量形式製造和/或投與。

【0164】 現已大體描述本發明，藉由參考以下實例應更容易地理解本發明，該等實例以說明方式提供且不欲對於本發明具有限制性。除非另有明確說明，否則如在此項技術中通常已知來執行條件和程序。

實例

合成：材料及方法

【0165】 根據此項技術公知的習知合成方法可以製備各種原料。一些原料可

從試劑的製造商和供應商商購獲得，諸如 Aldrich、Sigma、TCI、Wako、Kanto、Fluorchem、Acros、Abocado、Alfa、Fluka 等，但不限於此。

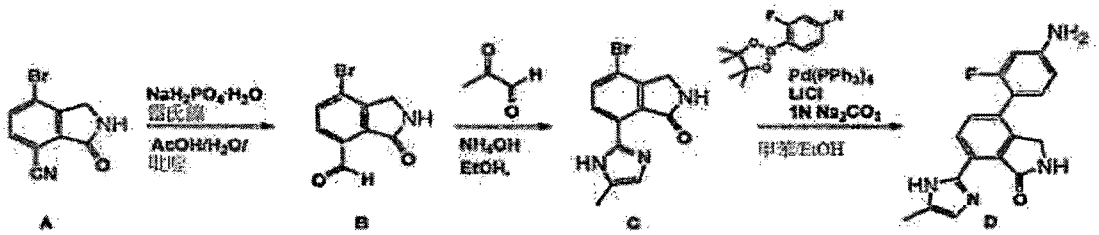
【0166】 本發明的化合物可以藉由以下習知方法和製程從容易獲得的原料製備。除非另外規定為典型或最佳製程條件(即反應溫度，時間，反應物的莫耳比，溶劑，壓力等)，否則不同的方法也可用於製造本發明的化合物。最佳反應條件可以根據所使用的具體反應物或溶劑而變化。然而，這種條件可以由熟習此項技術者藉由習知優化過程來確定。

【0167】 另外，此項技術中之一般技藝人士認識到，在發生某種反應之前，可以使用各種保護基團對一些官能基進行保護/脫保護。用於保護和/或脫保護特定官能基的合適條件以及保護基團的用途在此項技術中是公知的。

【0168】 例如，各種保護基團描述於 T.W. Greene 及 G.M. Wuts, Protecting Groups in Organic Synthesis, 第 2 版, Wiley, New York, 1991，及上述其他參考文獻中。

【0169】 在本發明的一個實施例中，本發明的化合物 7 可以藉由如下所示根據流程 1 合成中間體化合物 D，然後使化合物 D 經過反應流程 2 的程序來製備。然而，用於合成上述化合物 D 的方法不限於反應流程 1。

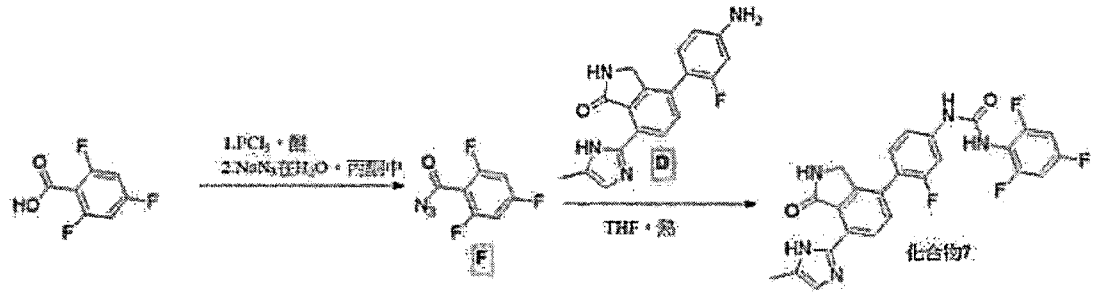
流程 1



【0170】 在國際專利公開案 WO2012/014017 中描述了用於製備反應流程 1 的原料即化合物 A 的方法，化合物 D 的製備描述於美國專利申請公開案 US2015/0336934

實例 1：合成 l-{3-氟基-4-[7-(5-甲基-1H-咪唑-2-基)-l-側氧基-2,3-二氫-1H-異吲哚

-4-基]-苯基}-3-(2,4,6-三氟-苯基)-脲(化合物 7)



【0171】 將 2,4,6-三氟苯甲酸(0.08 g，0.45 mmol)分散在乙醚(5.7 mL)中，緩慢添加五氯化磷(PCl_5，0.11 g，0.52 mmol)，然後攪拌 1 小時。在反應完成後，有機溶劑在減壓下在室溫以下濃縮，然後反應溶液藉由添加丙酮(3.8 mL)來稀釋。隨後，在 0°C下將溶解在水(0.28 mL)中之疊氮化鈉(NaN_3，0.035 g，0.545 mmol)慢慢地逐滴添加至反應溶液。在室溫下攪拌 2 小時之後，將由此形成的 2,4,6-三氟苯甲醯基疊氮化物用乙酸乙酯稀釋，然後用水洗滌。有機層經無水硫酸鎂乾燥，分散在 THF(2 mL)中，添加含有 4-(4-胺基-2-氟苯基)-7-(5-甲基-1H-咪唑-2-基)異吲哚-1-酮(化合物 D，0.073 g，0.23 mmol)的 THF(7.5 mL)，然後在 90°C下攪拌 3 小時。在反應完成後，將溶劑在減壓下濃縮，然後藉由矽膠管柱層析(溶析液:二氯甲烷:甲醇=20:1)純化以獲得化合物 7(0.026 g，產率：23%)。^{1}H-NMR (300 MHz, DMSO-d): 14.46-14.37 (m 1H), 9.47-9.45 (br m, 1H), 9.37 (s, 1H), 8.45 (d, J=l.8Hz, 1H), 8.30-8.27 (br m, 1H), 7.63-7.46 (m, 3H), 7.31-7.26 (m, 3H), 7.09-6.84 (m, 1H), 4.42 (s, 2H), 2.31-2.21 (m, 3H). LCMS [M+1]: 496.3。

實例 2：野生型和突變 FLT3 激酶的化合物 7 的結合常數

【0172】 該激酶活性的測量被稱為結合常數或 K_d 值。在本文中描述了用於獲得這些值的方案。對於大多數測定，激酶標記的 T7 噬菌體菌株在來源於 BL21 菌株的大腸桿菌宿主中製備。大腸桿菌生長至對數期並用 T7 噬菌體感染並在 32°C下振盪孵育直至裂解。將裂解物離心並過濾以除去細胞碎片。剩餘的激酶在 HEK-293 細胞中產生，隨後用 DNA 標記用於 qPCR 檢測。用生物素化的小分子

配位體在室溫下處理鏈黴親和素包被的磁珠 30 分鐘以產生用於激酶測定的親和樹脂。用過量的生物素來封閉帶有配位體的珠並用封閉緩衝液(SeaBlock(Pierce)，1%BSA，0.05%吐溫 20，1mM DTT)洗滌以去除未結合的配位體並減少非特異性結合。藉由在 1x 結合緩衝液(20%SeaBlock，0.17xPBS，0.05%吐溫 20，6mM DTT)中組合激酶、帶有配位體的親和珠和測試化合物來組裝結合反應。將試驗化合物製備成在 100%DMSO 中的 111X 原液。使用具有三個 DMSO 對照點的 11 點 3-倍化合物稀釋系列來確定 Kd。用於 K_d 測量的所有化合物藉由聲傳遞(非接觸式分配)在 100%DMSO 中分配。然後將化合物直接稀釋到測定中，使得 DMSO 的最終濃度為 0.9%。所有反應在聚丙烯 384 孔板中進行。每個最終體積為 0.02 ml。測定板在室溫振盪孵育 1 小時，親和珠用洗滌緩衝液(1xPBS，0.05%吐溫 20)洗滌。然後將珠再懸浮於溶析緩衝液(1x PBS，0.05%吐溫 20，0.5 μM 非生物素化的親和配位體)中，並在室溫下振盪孵育 30 分鐘。藉由 qPCR 測量溶析液中的激酶濃度。

【0173】　化合物 7 和奎紮替尼的結合常數如下表 1 所示。

表 1. 化合物 7 和奎紮替尼的結合常數(K_d)

	化合物 7	奎紮替尼
FLT3(D835H)	2.2	3.7
FLT3(D835V)	7.9	N/A
FLT3(D835Y)	4.2	7.1
FLT3(ITD)	3.1	8.8
FLT3(ITD-D835V)	1700	N/A
FLT3(ITD-F691L)	15	N/A
FLT3(K663Q)	0.55	2.2
FLT3(N841I)	0.76	4.1
FLT3(R834Q)	6.4	N/A
FLT3(WT)	0.24	1.3

實例 3：MV4-11 細胞中化合物 7 的蛋白質印跡分析

【0174】　圖 1 顯示了蛋白質印跡分析結果。不受任何理論的束縛，這表明化合物 7 抑制 MV4-11 細胞中的 FLT3 途徑。

實例 4：用化合物 7 抑制 FLT3 突變體

表 2. 化合物 7 在 FLT3 中的 IC_{50}

	IC_{50} (nM)
FLT3(D835Y)	166.5
FLT3(ITD)	0.8172
FLT3(WT)	8.746

實例 5：化合物 7 對血紅素細胞系的細胞毒性

表 3. 化合物 7 的細胞毒性

疾病類型	細胞系	ICSO (μM) 平均值
AML	EOL-1	0.00004495
AML	MV4-11	0.000238
AML	Molm-13	0.0003951
ALL	RS411	0.001508
MCL	Mino	0.005976
MCL	GRANTA-519	0.01359
伯基特氏	Ramos	0.01841
AML	NOM0-1	0.02052
AML	KG-1	0.02869
MCL	Jeko-1	0.07377
DLBCL	SU-DHL6	0.1216
伯基特氏	Daudi	0.1660
AML	HL60	0.2796
DLBCL	RL	0.4262
AML	SKM-1	0.8161
AML	MUTZ-8	0.793700
ALL	Jurkat	1.59
伯基特氏	Raji	2.03
AML	THP-1	2.97
CLL	MEC-1	3.80
AML	HEL92.1.7	4.69
CML	K562	12.94

【0175】 表 3 顯示化合物 7 在各種血紅素細胞系中的細胞毒性，其中相應的劑量-反應曲線如圖 15 所示。另外，圖 4 顯示了化合物 7，奎紮替尼和依魯替尼對 FLT3-ITD(MV411 和 MOLM-13)和 FLT3-WT(NOMO-1 和 KG-1)細胞的細胞毒性作用。此外，圖 16 顯示了化合物 7，奎紮替尼，吉列替尼和克瑞拉尼布針對用 FLT3 突變體轉染的同基因型 Ba/F3 細胞的劑量-反應曲線，其結果總結在

表 4 中。

表 4 化合物 7 針對用 FLT3 突變體轉染的同基因型 Ba/F3 細胞的 IC_{50}

FLT3抑制劑	在經轉染之Ba/F3細胞中的IC_{50} (nM, n=3)				
	FLT3 WT	FLT3 D835Y	FLT3 ITD	FLT3 ITD-D835Y	FLT3 ITD-F691L
化合物7	11.3	8.8	0.5	19.3	10.0
索拉替尼	1956.0	2089.0	2.2	246.4	115.3
吉列替尼	500.3	472.5	26.5	6.8	98.4
克唑替尼	2617.0	888.9	35.0	31.7	257.6

實例 6：MV4-11 細胞的細胞凋亡

【0176】 在一項研究中，將 MV411 細胞用或不用化合物 7，依魯替尼或奎紮替尼在各種濃度下處理 24 小時，並測量凋亡和活細胞計數。不受任何理論的束縛，圖 7 和 8 中的結果表明化合物 7 誘導 MV4-11 細胞凋亡。

【0177】 在另一項研究中，研究了化合物 7 對 MV4-11 細胞凋亡的時間依賴性，並且從圖 17 可以看出，化合物 7 以時間依賴性方式誘導細胞凋亡。圖 7、8 和 17 中呈現的資料是使用眾所周知的用於測量細胞凋亡的方案產生的，這對於熟習此項技術者是顯而易見的。不受任何理論的束縛，例如，程序的概述可以在 Rieger 等人, *Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death*, J VI. Exp. 2011; (50): 2597 中找到。

實例 7：大鼠中的藥代動力學研究

【0178】 圖 5 證明當化合物 7 口服給藥時 AUC 以劑量依賴性方式改善。對於 100 mg/kg 口服懸浮液獲得最佳結果。使用 i.v.給藥的低劑量 2 mg/kg 也達成了合理的暴露。

實例 8：異種移植物

【0179】 圖 6 證明，與對照或依魯替尼治療相比，化合物 7 隨著劑量增加而減少腫瘤體積。

實例 9：用化合物 7 抑制 BTK

表 5. 化合物 7 在 BTK 中的 IC_{50}

	IC_{50} (nM)
BTK	8.42
BTK (C481S)	2.52
BTK (E41K)	14.53
BTK (P190K)	6.59

【0180】 表 5 證明化合物 7 抑制一系列 BTK。

實例 10：MV4-11 細胞和 EOL-1 細胞中化合物 7 的蛋白質印跡分析

【0181】 圖 2 和 3 顯示了蛋白質印跡分析結果。不受任何理論的束縛，這證明化合物 7 抑制 MV4-11 細胞和 EOL-1 細胞中的 BTK 途徑。

實例 11：FLT3 WT 和 FLT 突變體的抗增殖活性的比較

表 6.

表：化合物7、奎紮替尼和吉列替尼在AML細胞系中的抗增殖活性的比較。

	細胞系	特性	IC_{50} (nM)* 化合物7	奎紮替尼	吉列替尼
鼠類細胞	Ba/F3-FLT3	FLT3-WT	9.49	794	79.52
	Ba/F3-ITD	FLT3-ITD	0.30	0.74	36.21
	Ba/F3-D835G	FLT3-D835G	0.12	1.27	28.08
	Ba/F3-D835Y	FLT3-D835Y	8.26	776.21	372.68
	Ba/F3-ITD+691	ITD+F691L	0.43	33.60	119.45
	Ba/F3-ITD+842	ITD+Y842C	0.73	6.73	44.74
	Ba/F3-ITD+D835Y	FLT3-ITD+D835Y	9.72	85.31	10.59
	Ba/F3-ITD+D835H	FLT3-ITD+D835H	6.74	9.02	10.43
人類細胞	MOLM13	FLT3-ITD, t(9;11)	0.82	5.21	35.79
	MOLM14	FLT3-ITD, t(9;11)	0.92	0.67	58.83
	MV4-11	FLT3-ITD, t(4;11)	0.17	1.39	175.66
	THP-1	FLT3-WT, t(9;11)	3.88	>10000	2301
	Kasumi-1	FLT3-WT	21.99	29.7	2233

*藉由72小時處理產生半數最大抑制劑濃度（IC_{50}）（吉列替尼是來自48小時的濃度）。

實例 12：患者對化合物 7 的敏感性的離體測定

【0182】 對 85 例診斷為急性髓系白血病(AML)的患者，15 例骨髓發育不良症候群/骨髓增生性腫瘤(MDS/MPN)的患者，18 例急性淋巴母細胞白血病(ALL)的患者和 56 例慢性淋巴球性白血病(CLL)的患者使用離體測定法來評估對多激酶抑制劑化合物 7 的敏感性。在 10 nM 至 10 μM 的濃度範圍內評估對化合物 7 的敏感性。在培養 3 天后使用比色四唑鎓基 MTS 測定來評估細胞活力，並計算 IC_{50}

值作為藥物敏感性的量度。

【0183】 在資料集中的血液惡性腫瘤的四種一般亞型中，對化合物 7 具有廣泛的敏感性。大多數 AML 病例表現出對化合物 7 的敏感性，其中 51/85(60%)病例表現出小於 0.1 μM 的 IC_{50}。其他亞型(MDS/MPN，ALL CLL)的敏感性表現出相當或稍低的敏感性水準(40-60%，見表 7)。對於資料集中的 38 個 AML 患者樣品，FLT3 突變狀態是已知的：30 個樣品是 WT，8 個樣品是 ITD+，0 個樣品具有點突變。該子集中化合物 7 敏感性的分析揭示了 FLT3-ITD+樣品中敏感度增加的趨勢；然而，更大的樣本量對於統計分析的充分發揮將是必要的。

表 7：患者中化合物 7 的敏感性

診斷類型	評估之數量	IC_{50} < 0.1 μM 的樣本%
AML	85	60 (51/85)
MDS/MPN	15	53 (8/15)
ALL	18	61 (11/18)
CLL	56	41 (23/56)

【0184】 化合物 7 對 AML 以及其他血液惡性腫瘤亞型展現出廣泛且有效的活性。初步分析顯示與 FLT3 野生型相比，FLT3 突變 AML 病例中化合物 7 敏感性更高的趨勢；然而，可能需要持續增加額外的患者樣品以充分提供化合物 7 敏感性與 FLT3 突變狀態的統計關聯。總之，不受任何理論束縛，化合物 7 針對原發性血液惡性腫瘤患者樣品的臨床前分析顯示在 AML 和其他疾病亞型中具有廣泛藥物活性的證據，並且支持該藥物用於血液惡性腫瘤的進一步發展。

實例 13. 化合物 7 對細胞週期失調的作用

【0185】 檢查化合物 7 對細胞週期各方面的作用。

【0186】 在一個實驗中，發現化合物 7 以劑量依賴性方式在 MV411 細胞中誘導 G0/G1 細胞週期停滯(圖 18a 和 18b)。在另一個實驗中，發現化合物 7 以劑量依賴性方式在 MOLM-13 細胞中誘導 G0/G1 細胞週期停滯(圖 19)。

【0187】 在另一個實驗中，發現化合物 7 在各種血紅素細胞系中誘導多倍體

(圖 20)。將 MV4-11、NOMO-1 和 KG-1 細胞以增加濃度的化合物 7 處理 24 小時，並且使用 EdU 和 PI 染色評估 DNA 含量或多倍性表型的增加，然後使用 BD Accuri C6 流進行 FACS 分析。

【0188】 在另一實驗中，發現化合物 7 以劑量依賴性方式在 KG-1 細胞(圖 21)，NOMO-1 細胞(圖 22)和具有 FLT3 突變的同基因型 BA/F3 細胞(圖 23)中誘導細胞週期失調。

實例 14. 化合物 7 對血紅素細胞中細胞信號傳導的抑制作用。

【0189】 圖 24 和 25 顯示化合物 7 分別在 MV4-11 和 FLT3 WT 細胞(KG-1)中抑制 Aurora 激酶活性和信號傳導。這與 Aurora 激酶抑制劑 AT9283(圖 24)和激酶抑制劑依魯替尼和奎紮替尼(圖 25)相比較。圖 26 顯示化合物 7 抑制 EOL-1 細胞中的 PDGFRA 和 FLT3(WT)信號傳導。不受任何理論束縛，這些圖顯示化合物 7 充當血紅素細胞系中各種細胞信號傳導途徑的強抑制劑。

實例 15：化合物 7 對 BTK 的比較效力

【0190】 如表 8 所示，除了化合物 7 對野生型 BTK 的效力外，它還表現出針對 BTK-C481S 突變體的 nM 效力。化合物 7 對野生型 BTK 具有 5.0 nM 的效力，這相當於阿拉貝替尼的效力。更令人驚訝的是，化合物 7 對 BTK-C481S 是最有效的，該 BTK-C481S 對依魯替尼和阿拉貝替尼耐藥。化合物 7 對 ITK 是非常有效的，該 ITK 是被認為有助於依魯替尼療效的關鍵靶標。此外，化合物 7 不抑制 EGFR，這表明皮疹和腹瀉等併發症的可能性降低。

表 8：各種化合物對 BTK 的抑制作用

					BTK IC50 (nM)		關鍵脫靶	
	公司	適應症	狀態	結合	WT	C481S	ITK	EGFR
化合物 7	Aptose	血紅素	PC	非共價	5.0	2.5	4.3	>1000
依魯替尼	Abbvie	CLL, MCL, WM	Mkt	共價	0.5	x	10.7	5.6
阿拉貝替尼	AZ/Acerta	腫瘤學-H/S	P3	共價	5.1	x	>1000	>1000

					BTK IC50 (nM)		關鍵脫靶	
BGB-3111	Beigene	血紅素	P1	共價	0.2	x	30.0	-
GS-4059	Gilead/Ono	血紅素	P1	共價	2.2	x	-	-
CC-292	Celgene	血紅素	P1	共價	<0.5	x	-	-
SNS-062	Sunesis	血紅素	P1	非共價	0.4	4.5	49.0	-

實例 16：化合物 7 抑制 BTK 的野生型和 C481S 突變形式

【0191】 用野生型 BTK 或 C481S BTK 瞬時轉染 HEK293T 細胞。用或不用化合物 7(0.5 和 1.0 μM)處理轉染的細胞 6 小時。這一式三份進行，並藉由蛋白質印跡分析分析結果。

【0192】 如藉由圖 9 中酶的磷酸化形式的減少所證明的，化合物 7 以 0.5 和 1.0 μM 的濃度抑制 BTK 的野生型和 C481S 突變形式。然而，與依魯替尼相比，觀察到化合物 7 抑制 BTK 的程度低於依魯替尼，表明有不同的機制途徑(圖 10)。

實例 17：化合物 7 對 B 細胞惡性腫瘤細胞系的細胞毒性。

【0193】 將細胞接種在 96 孔板中，並在 37°C和 5%CO_2 下用媒介物(DMSO)或 10 種不同濃度的化合物 7 處理 3 天。使用 CellTiter 96 AQ_{ueous} one solution(MTS Promega Cat # G3581)評估細胞活力，並使用 GraphPad Prism 7 軟體計算 IC_{50} 值。

【0194】 表 9 顯示化合物 7 在各種 B 細胞惡性腫瘤細胞系中的細胞毒性。另外，圖 11 顯示了化合物 7 和依魯替尼對表 9 細胞系的劑量-反應曲線。

表 9. 化合物 7 的細胞毒性

B細胞惡性腫瘤	細胞系	IC50 (μM) 平均值
B-ALL	RS411	0.001508
	MHH-Call4	0.027800
FL	DOHH2	0.002937
MCL	Mino	0.005976
	GRANTA-519	0.013590
	Jeko-1	0.073770
伯基特氏	Ramos	0.018410
	Daudi	0.166000
	Raji	2.031000
GCB-DLBCL	SU-DHL6	0.121600
	RL	0.426200
	BJAB	0.882000
ABC-DLBCL	U2932	0.632300
	SU-DHL2	0.744400
	OCI-LY3	0.830500
CLL	MEC-1	3.804000
HL	L1236	7.818
CML	K562	12.940000

實例 18：化合物 7 誘導 B 細胞惡性腫瘤中的細胞凋亡

【0195】 進行機械研究以確定化合物 7 的作用機制。藉由用膜聯蛋白 V 和碘化丙錠(PI)染色，然後用 BD Accuri C6 流式細胞儀分析，由此測定所處理細胞的凋亡狀態，其中活細胞是膜聯蛋白 V/PI 陰性，早期凋亡細胞是膜聯蛋白 V 陽性，並且晚期凋亡細胞是膜聯蛋白 V 和 PI 陽性的。此外，藉由用特異性抗體進行蛋白質印跡來測定經裂解的 PARP(經典凋亡標誌物)的產生。

【0196】 如圖 12 所示，化合物 7 誘導 B 細胞惡性腫瘤中的細胞凋亡。用增加濃度的化合物 7 和依魯替尼處理 Mino 和 Ramos 細胞系。在所有測試濃度下化合物 7 比依魯替尼更有效地誘導細胞凋亡。相應蛋白質印跡中的磷酸化模式證實了這種細胞凋亡的增加。

實例 19：化合物 7 抑制 B 細胞惡性腫瘤中的 Aurora 激酶和 BTK

【0197】 藉由蛋白質印跡法測定 Aurora 激酶或下游靶標的磷酸化水準以及藉

由細胞週期和 DNA 含量分析來測定 Aurora 激酶活性的抑制。藉由凝膠電泳來分離經化合物 7 處理的細胞的全細胞萃取物並轉移到硝酸纖維素膜上，用特異性抗體檢測 Aurora 激酶 A/B 和 H3S10 磷酸化的抑制。藉由用 5-乙炔基-2'-脫氧尿苷(Edu)Alexa Fluor 488 和 PI 來染色經化合物 7 或媒介物處理的細胞來評估 DNA 合成和細胞週期階段。

【0198】 雖然化合物 7 對 B 細胞癌細胞的細胞毒性比依魯替尼更高，但它是比依魯替尼的活性更低的 BTK 抑制劑(圖 10)。為了更好地理解化合物 7 的高效力，檢查了其對 Aurora 激酶的抑制作用，並且發現其作為 Aurora 激酶抑制劑是有效的(圖 13)，如藉由在化合物 7 濃度增加的情況下蛋白質印跡中的磷酸化模式所證實的。不受任何特定理論束縛，化合物 7 在 B 細胞癌細胞中的高細胞毒性被認為部分歸因於其多激酶途徑抑制譜。

實例 20：化合物 7 在 B 細胞惡性腫瘤中誘導多倍體，隨後凋亡

【0199】 進行進一步的機制研究以充分闡明化合物 7 的強效細胞毒性。用媒介物或化合物 7 處理 B 細胞系 24-72 小時，並使用 Edu 和 PI 染色，然後使用 BD Accuri C6 流式細胞儀進行 FACS 分析，評估 DNA 含量或多倍性表型的增加。

【0200】 用漸增濃度的化合物 7 或依魯替尼處理 Mino 和 Ramos 細胞系，以測量化合物 7 相對於依魯替尼對 B 細胞惡性細胞系誘導多倍性的比較效果。如圖 14 所示，化合物 7 以 0.1 nM 和 1.0 nM 的濃度對 Mino 細胞，並且以 5 nM 的濃度對 Ramos 有效地誘導多倍體(>4n)，接著誘導細胞凋亡，並且如蛋白質印跡所示，顯示了細胞死亡的標記。

實例 21：化合物 7 干擾 B 細胞惡性腫瘤中的細胞週期進展

【0201】 圖 27 和 28 顯示化合物 7 干擾細胞週期進展。不受任何理論束縛，這些圖顯示化合物 7 干擾 B 細胞惡性細胞系中的細胞信號傳導途徑。使用熟知的用於測量細胞週期進展的方案(例如，EdU 和/或 PI 染色，然後使用 BD Accuri

C6 流動進行 FACS 分析)產生圖 27 和 28 中呈現的資料，並且對於熟習此項技術者而言是顯而易見的。

實例 22. 化合物 7 對 B 細胞惡性細胞系中細胞信號傳導的抑制作用。

【0202】 圖 29 顯示化合物 7 相對於依魯替尼抑制 Ramos 細胞中的 BTK 和 Aurora 激酶活性。

【0203】 圖 30 顯示化合物 7 影響 Ramos 細胞中的 BCR 信號傳導。在這個實驗中，Ramos 細胞用或不用化合物 7 或依魯替尼以指定的濃度處理 1(6 個重複)或 6(3 個重複)小時，然後用 12μg/mL IgM 刺激 3 分鐘。

【0204】 不受任何理論束縛，這些圖顯示化合物 7 充當 B 細胞惡性細胞系中各種細胞信號傳導途徑的強抑制劑。

實例 23. 化合物 7 在高血清條件下具有細胞毒性。

【0205】 在不同血清濃度下以劑量依賴性方式測試化合物 7。圖 31 顯示化合物 7 在高血清濃度下保持高活性。在該實驗中，在含有正常(10%)或高血清(30%，50%，80%)FBS 的培養基中用或不用化合物 7 處理 MV4-11(n=6)和 EOL- 1(n=3~6)細胞 72 小時，以 MTS 測定作為終點。

實例 24. 一般實驗程序

【0206】 IC_{50}和 EC_{50}：使用台盼藍染料排除方法或 MTS 分析來評估本文所述的某些細胞活力研究。藉由 FACS 藉由膜聯蛋白 V 陽性確定本文描述的某些細胞凋亡研究和相關研究。使用 CalcuSyn(BioSoft，Cambridge，UK)計算細胞生長抑制的 50%抑制濃度(IC_{50})和凋亡誘導的 50%有效濃度(EC_{50})。

【0207】 免疫印跡測定：用各種濃度的化合物 7 處理細胞並收集細胞裂解物。藉由蛋白質印跡確定所示蛋白質的總量和磷酸化水準。

【0208】 動物研究：用人細胞(例如 FLT-ITD 突變的白血病細胞 MV4-11)注射(SQ)Balb/c 小鼠，並用指定劑量的化合物 7 口服(q.d.)處理 14 天。藉由測量腫瘤

負荷來評估效果(例如抗白血病)。例如藉由測量體重評估口服毒性。在第一天給藥後的指定時間點測量血漿中的化合物 7 濃度。

【0209】 基於抗增殖測定的 MTS 測定：進行 MTS 測定以評估抗增殖性細胞外信號調節激酶(Barltrop, J. A.等人, (1991) 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazoly)-3-(4-sulfophenyl) tetrazolium, inner salt (MTS) and related analog of3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5,-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water soluble activities of the inventive compounds via inhibition on formazans as cell-viability indicators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1, 611-4; Cory, A.H.等人, (1991); Use of an aqueous soluble tertrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Comm.* 3, 207-12)。根據以下所示的程序使用人淋巴瘤細胞系，例如 Jeko-1(ATCC)，Mino(ATCC)，H9(韓國細胞系庫)和 SR(ATCC)，以及人白血病細胞系，例如 MV4-11(ATCC)，Molm-13(DSMZ)和 Ku812(ATCC)進行測試。將每種細胞(例如，Jeko-1，Mino，H9，SR，MV4-11，Molm-13 和 Ku812 細胞)以 10,000 個細胞/孔的密度轉移到含有補充有 10%FBS 的 RPMI1640 培養基(GIBCO，Invitrogen)的 96 孔板中，然後在 37°C和 5%20 CO_2 的條件下孵育 24 小時。用各自 0.2、1、5、25 和 100 μM 的測試化合物處理孔。以用作對照的 DMSO 處理該孔，該 DMSO 的量為 0.08 重量%，與測試化合物中的量相同。將得到的細胞孵育 48 小時。MTS 測定可商購獲得，並包括 Promega CellTiter 96®水相非放射性細胞增殖測定。進行 MTS 測定以評估測試化合物的細胞活力。將 20 μL 的 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺基苯基)-2H-四唑，內鹽(「MTS」)和吩嗪硫酸甲酯(PMS)加入到每個孔中，然後在 37°C下孵育 2 小時。然後在 490 nm 讀取樣品的吸光度。基於試驗化合物相對於未處理對照組的吸光度計算抗增殖活性水準。計算 EC50(μM)值，其中測試化合物將癌細胞的生長減少 50%。藉由使用例如 Jeko-1，Mino，H9 和 SR 淋巴瘤細胞進行抗增殖活性測

定，以評價本發明化合物作為抗炎劑以及抗癌劑的有效性。

【0210】 RBC HotSpot 激酶分析方案：

使用的試劑：鹼性反應緩衝液；20 mM Hepes(pH 7.5)，10 mM $MgCl_2$，1 mM EGTA，0.02%Brij35，0.02 mg/ml BSA，0.1 mM Na_3VO_4，2 mM DTT，1% DMSO。所需輔助因子分別添加到每個激酶反應中。

【0211】 將化合物 7 溶於 100%DMSO 至特定濃度。系列稀釋藉由 epMotion 5070 在 DMSO 中進行。在反應緩衝液中新鮮製備受質，並向受質溶液添加任何所需的輔助因子。將激酶加入到溶液中並輕輕混合。藉由 Acoustic 技術(Echo550；納升範圍)將化合物 7 在 100%DMSO 中加入到激酶反應混合物中，並在室溫下孵育 20 分鐘。向反應混合物中加入 ^{33}P-ATP(比活性 10 μCi/μl)以引發反應，將反應孵育 2 小時，然後藉由過濾結合法檢測激酶活性。

【0212】 信號傳導分析。用特定劑量(例如 500 pM)的化合物 7 或比較藥物(例如奎紮替尼)或媒介物(例如 DMSO)處理細胞(例如 MV4-11)，然後針對 FLT3 和其下游信號來經受蛋白質印跡。

【0213】 細胞毒性程序：將細胞接種在 96 孔板中並用媒介物 DMSO 或化合物 7 以特定濃度處理並孵育 72 小時。在 72 小時孵育期結束時，進行基於 MTS 的測定，並藉由 GraphPad Prism7.0 測定 IC50。

【0214】 細胞週期分析：用媒介物、DMSO 或化合物 7 處理細胞，並用 PI 和 EdU 染色，然後藉由流式細胞術分析以確定細胞週期的階段。

【0215】 本文論述之出版物僅因其揭露內容在本申請案之申請日期之前而加以提供。本文中沒有內容應解釋為承認本發明由於先前發明而無權先於此出版物。

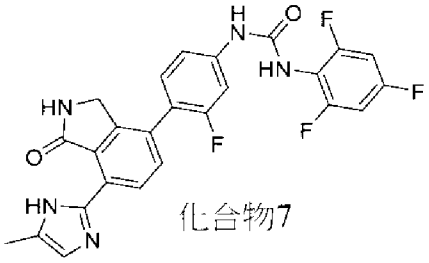
【0216】 所有公開案、專利及專利申請案，包括本文中之任何圖式及附錄皆出於所有目的以全文引用的方式併入本文中，該引用的程度就如同已特定地且

個別地將各個別公開案、專利或專利申請案、圖式或附錄出於所有目的以全文引用的方式併入一般。

【0217】 雖然本發明已結合其所提出之特定實施例予以描述，但是應理解其能夠進行進一步修改，並且希望本申請案涵蓋本發明的通常遵循本發明原則並且涉及與本申請案之偏差的任何變化形式、應用或改造，該等偏差在本發明所屬技術之已知或習慣實務範圍內，並且可適用於如上闡明並且在附加申請專利範圍內出現之基本特徵。

【發明申請專利範圍】

【第1項】一種化合物 7 或其醫藥學上可接受之鹽在製備治療有需要的受試者的癌症之藥物的用途：



化合物7

其中所述受試者具有突變形式的 BTK，其中所述突變形式的 BTK 至少包括一個位於殘基 C481 處的點突變。

【第2項】如請求項 1 所述的用途，其中所述癌症是 B 細胞惡性腫瘤。

【第3項】如請求項 2 所述的用途，其中所治療的 B 細胞惡性腫瘤選自由套細胞淋巴瘤(MCL)、B 細胞急性淋巴母細胞白血病(B-ALL)、伯基特氏淋巴瘤、慢性淋巴球性白血病(CLL)、彌漫性大 B 細胞淋巴瘤(DLBCL)和濾泡性淋巴瘤(FL)組成之群中的一種或多種。

【第4項】如請求項 3 所述的用途，其中所治療的 B 細胞惡性腫瘤是套細胞淋巴瘤(MCL)。

【第5項】如請求項 3 所述的用途，其中所治療的 B 細胞惡性腫瘤是 B 細胞急性淋巴母細胞白血病(B-ALL)。

【第6項】如請求項 3 所述的用途，其中所治療的 B 細胞惡性腫瘤是伯基特氏淋巴瘤。

【第7項】如請求項 3 所述的用途，其中所治療的 B 細胞惡性腫瘤是慢性淋巴球性白血病(CLL)。

【第8項】如請求項 3 所述的用途，其中所治療的 B 細胞惡性腫瘤是彌漫性大 B 細胞淋巴瘤(DLBCL)。

【第9項】如請求項 1 所述的用途，其中化合物 7 抑制和/或減少突變型 BTK 的活性或表現。

【第10項】如請求項 9 所述的用途，其中化合物 7 抑制和/或減少 Aurora 激酶的活性。

【第11項】如請求項 10 所述的用途，其中所述 Aurora 激酶是突變的 Aurora 激酶的活性。

【第12項】如請求項 9 所述的用途，其中所述突變的 BTK 包括至少一個點突變。

【第13項】如請求項 12 所述的用途，其中所述至少一個點突變位於殘基 C481 處是選自 C481S、C481R、C481T 以及 C481Y。

【第14項】如請求項 13 所述的用途，其中所述至少一個點突變位於殘基 C481 處是 C481S。

【第15項】如請求項 9 所述的用途，其中化合物 7 抑制和/或減少受試者中野生型或突變型 Fms 相關酪胺酸激酶 3(FLT3)活性或表現的活性。

【第16項】如請求項 15 所述的用途，其中所述突變的 FLT3 包含至少一個點突變。

【第17項】如請求項 16 所述的用途，其中所述至少一個點突變位於選自由 D835、F691、K663、Y842 和 N841 組成之群的一個或多個殘基上。

【第18項】如請求項 15 所述的用途，其中所述突變的 FLT3 是 FLT3-ITD。

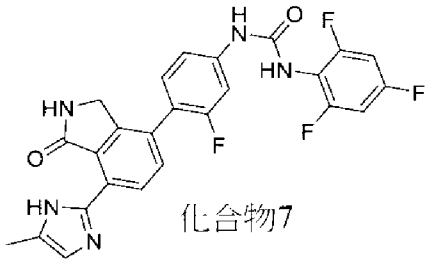
【第19項】如請求項 16 所述的用途，其中所述突變的 FLT3 具有另外的 ITD 突變。

【第20項】如請求項 1 所述的用途，其中所述癌症是白血病。

【第21項】如請求項 20 所述的用途，其中所述白血病是急性淋巴球性白血病、急性骨髓性白血病、急性前髓細胞白血病、慢性淋巴球性白血病、慢性骨髓性白

血病、慢性嗜中性白血病、急性未分化性白血病、退行性大細胞淋巴瘤、前淋巴球性白血病、幼年型骨髓單核球性白血病、成人 T 細胞急性淋巴球性白血病、伴有三系脊髓發育不良的急性骨髓性白血病、混合譜系白血病、嗜酸球性白血病，和/或套細胞淋巴瘤。

【第22項】一種化合物 7 或其醫藥學上可接受之鹽在製備抑制或減少受試者中突變的相關酪胺酸激酶 3(FLT3)的活性或表現之藥物的用途，其中所述受試者具有 FLT3 突變



化合物7

，

其中：

i) 所述 FLT3 突變包括至少一個點突變位於選自由 D835、R834、F691、K663、N841 和 Y842 組成之群的一個或多個殘基上，或

ii) 其中所述 FLT3 突變包括至少一個點突變和內部串联重复(ITD)突變，所述至少一個點突變位於選自由 D835、R834、F691、K663、N841 和 Y842 組成之群的一個或多個殘基上。

【第23項】如請求項 22 所述的用途，其中所述突變的 FLT3 包括選自 D835 的至少一個點突變。

【第24項】如請求項 22 所述的用途，其中所述突變的 FLT3 还包括至少一個點突變位於 FLT3 的酪胺酸激酶結構域中。

【第25項】如請求項 22 所述的用途，其中所述突變的 FLT3 还包括至少一個點突變位於 FLT3 的活化環中。

【第26項】如請求項 22 所述的用途，其中所述突變的 FLT3 具有選自由以下組

成之群的一或多個突變：FLT3-D835H、FLT3-D835V、FLT3-D835Y、FLT3-ITD-D835V、FLT3-ITD-D835Y、FLT3-ITD-D835H、FLT3-F691L、FLT3-ITD-F691L、FLT3-ITD-K663Q 、 FLT3-ITD-N841I 、 FLT-3R834Q FLT3-ITD-834Q 、 FLT3-D835G、FLT3-ITD-D835G、FLT3-Y842C 及 FLT3-ITD-Y842C。

【第27項】如請求項 22 所述的用途，其中所述抑制或減少受試者中突變的相關酪胺酸激酶 3(FLT3)的活性或表現導致癌症的治療。

【第28項】如請求項 27 所述的用途，其中所述癌症是 B 細胞惡性腫瘤。

【第29項】如請求項 28 所述的用途，其中所治療的 B 細胞惡性腫瘤選自由套細胞淋巴瘤(MCL)、B 細胞急性淋巴母細胞白血病(B-ALL)、伯基特氏淋巴瘤、慢性淋巴球性白血病(CLL)、彌漫性大 B 細胞淋巴瘤(DLBCL)和濾泡性淋巴瘤(FL)組成之群中的一種或多種。

【第30項】如請求項 29 所述的用途，其中所治療的 B 細胞惡性腫瘤是套細胞淋巴瘤 (MCL)。

【第31項】如請求項 29 所述的用途，其中所治療的 B 細胞惡性腫瘤是 B 細胞急性淋巴母細胞白血病(B-ALL)。

【第32項】如請求項 29 所述的用途，其中所治療的 B 細胞惡性腫瘤是伯基特氏淋巴瘤。

【第33項】如請求項 29 所述的用途，其中所治療的 B 細胞惡性腫瘤是慢性淋巴球性白血病(CLL)。

【第34項】如請求項 29 所述的用途，其中所治療的 B 細胞惡性腫瘤是彌漫性大 B 細胞淋巴瘤(DLBCL)。

【第35項】如請求項 27 所述的用途，其中化合物 7 抑制和/或減少突變型 BTK 的活性或表現。

【第36項】如請求項 27 所述的用途，其中所述癌症是白血病。

【第37項】如請求項36所述的用途，其中所述白血病是急性淋巴球性白血病、急性骨髓性白血病、急性前髓細胞白血病、慢性淋巴球性白血病、慢性骨髓性白血病、慢性嗜中性白血病、急性未分化性白血病、退行性大細胞淋巴瘤、前淋巴球性白血病、幼年型骨髓單核球性白血病、成人T細胞急性淋巴球性白血病、伴有三系脊髓發育不良的急性骨髓性白血病、混合譜系白血病、嗜酸球性白血病，和/或套細胞淋巴瘤。

【第38項】如請求項37所述的用途，其中所述白血病是急性骨髓性白血病。

【第39項】如請求項22所述的用途，其中所述受試者對FLT3活性或表現抑制劑顯示出抗性或復發。

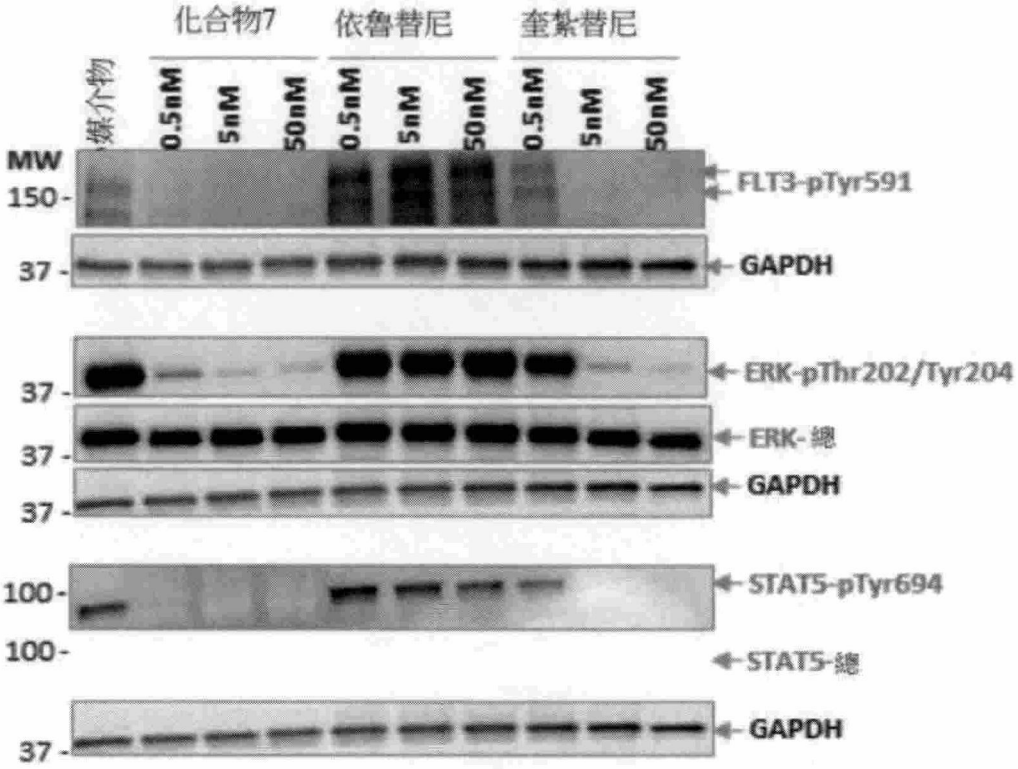
【第40項】如請求項39所述的用途，其中所述抑制劑是奎紮替尼、吉列替尼、舒尼替尼、索拉非尼、米哚妥林、來他替尼、克瑞拉尼布、PLX3397、PLX3623，克瑞拉尼布、普納替尼或普瑞替尼。

【第41項】如請求項3或29所述的用途，其中所述治療的B細胞惡性腫瘤是和濾泡性淋巴瘤(FL)。

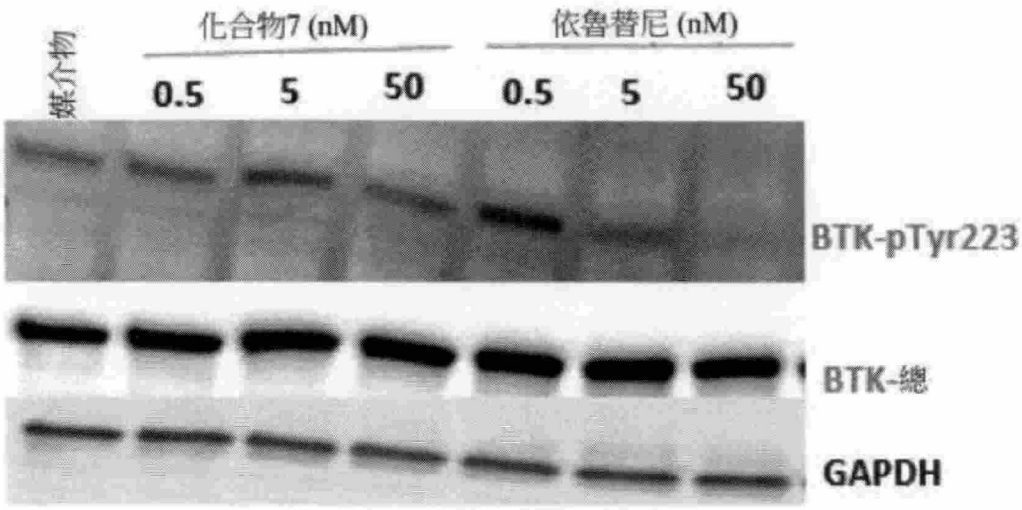
【第42項】如請求項1所述的用途，其中所述癌症是血液惡性腫瘤。

【第43項】如請求項27所述的用途，其中所述癌症是血液惡性腫瘤。

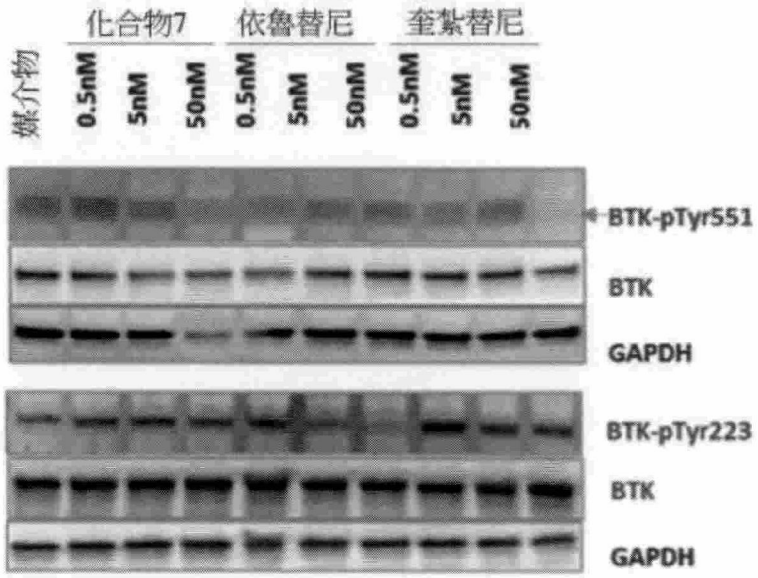
【發明圖式】


化合物7
依魯替尼
奎紮替尼
媒介物
0.5nM
5nM
50nM
0.5nM
5nM
50nM
0.5nM
5nM
50nM
MW
150-
37-
FLT3-pTyr591
GAPDH
37-
37-
37-
ERK-pThr202/Tyr204
ERK-總
GAPDH
100-
100-
STAT5-pTyr694
STAT5-總
37-
GAPDH

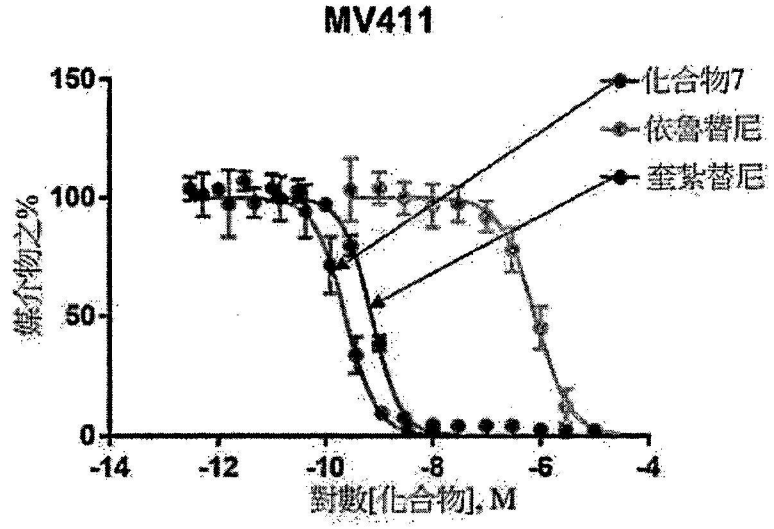
【圖 1】

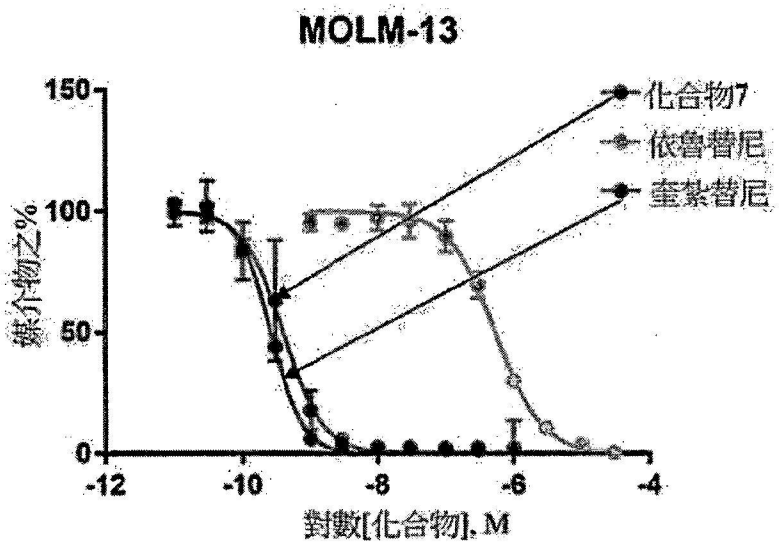

化合物7 (nM)
依魯替尼 (nM)
媒介物
0.5
5
50
0.5
5
50
BTK-pTyr223
BTK-總
GAPDH

【圖 2】

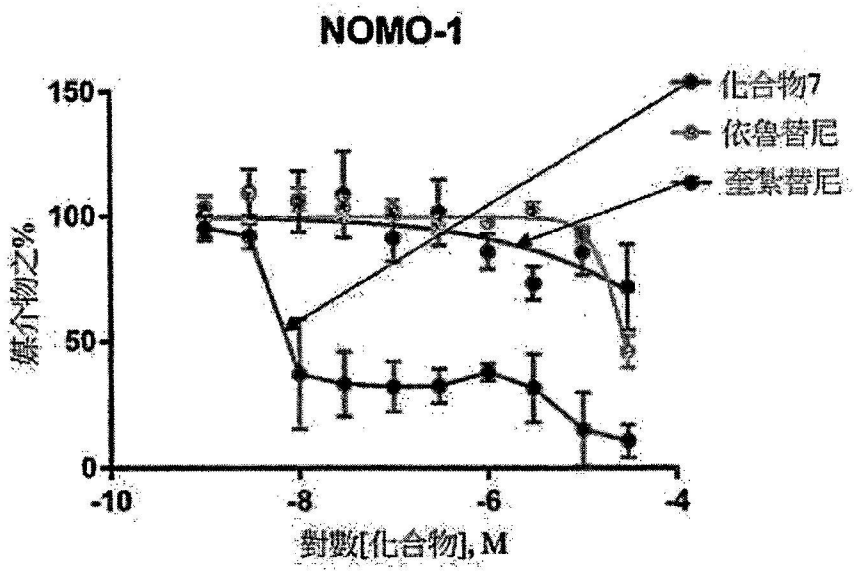

化合物7
依魯替尼
奎紮替尼
媒介物
0.5nM
5nM
50nM
0.5nM
5nM
50nM
0.5nM
5nM
50nM
BTK-pTyr551
BTK
GAPDH
BTK-pTyr223
BTK
GAPDH

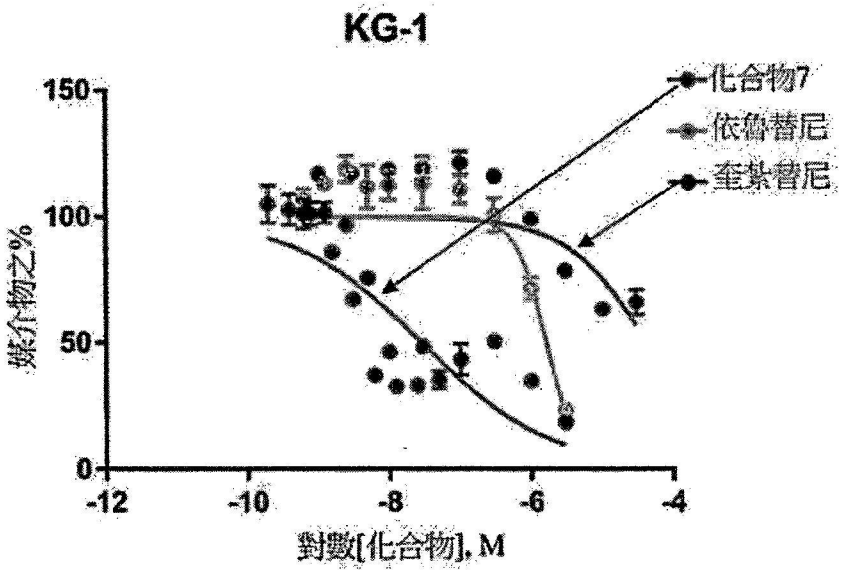
【圖 3】


MV411
150
100
50
0
-14
-12
-10
-8
-6
-4
媒介物之%
對數[化合物], M
化合物7
依魯替尼
奎紮替尼

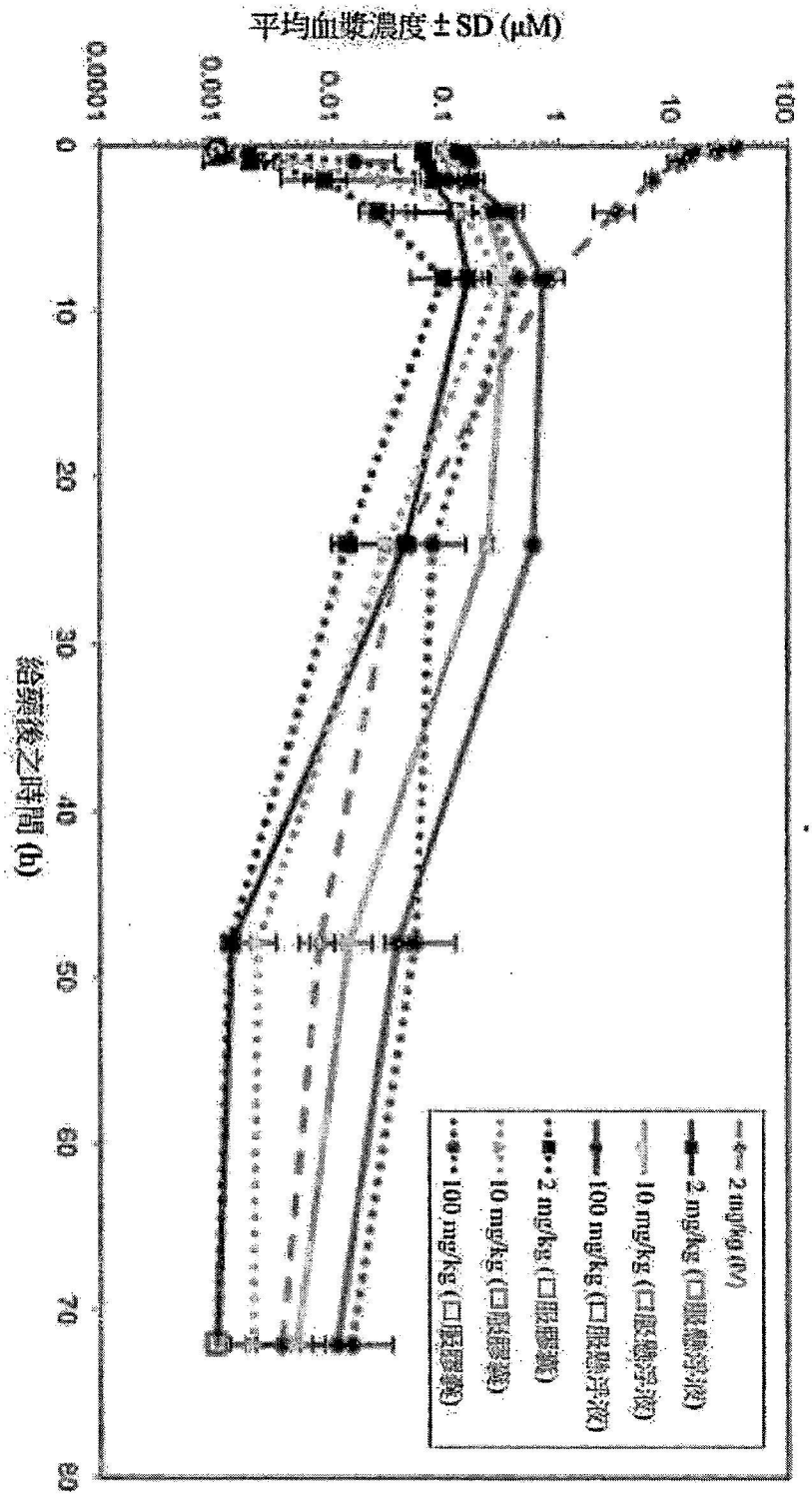

MOLM-13
150
100
50
0
-12
-10
-8
-6
-4
媒介物之%
對數[化合物], M
化合物7
依魯替尼
奎紮替尼

【圖 4】

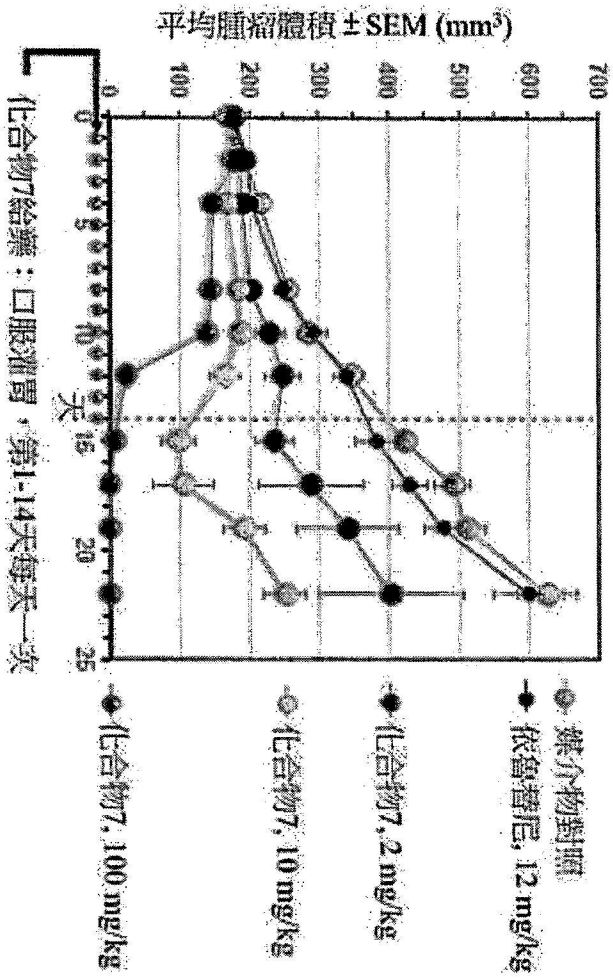

NOMO-1
化合物7
依魯替尼
奎紮替尼
媒介物之%
150
100
50
0
-10
-8
-6
-4
對數[化合物], M

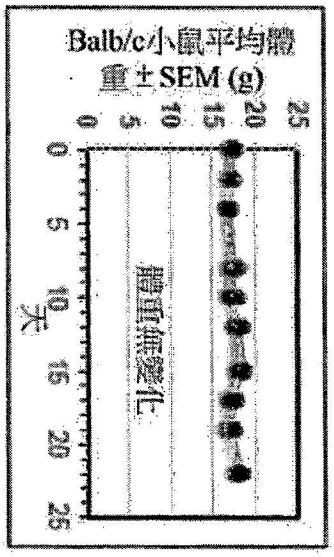

KG-1
化合物7
依魯替尼
奎紮替尼
媒介物之%
150
100
50
0
-12
-10
-8
-6
-4
對數[化合物], M

【圖 4(續)】

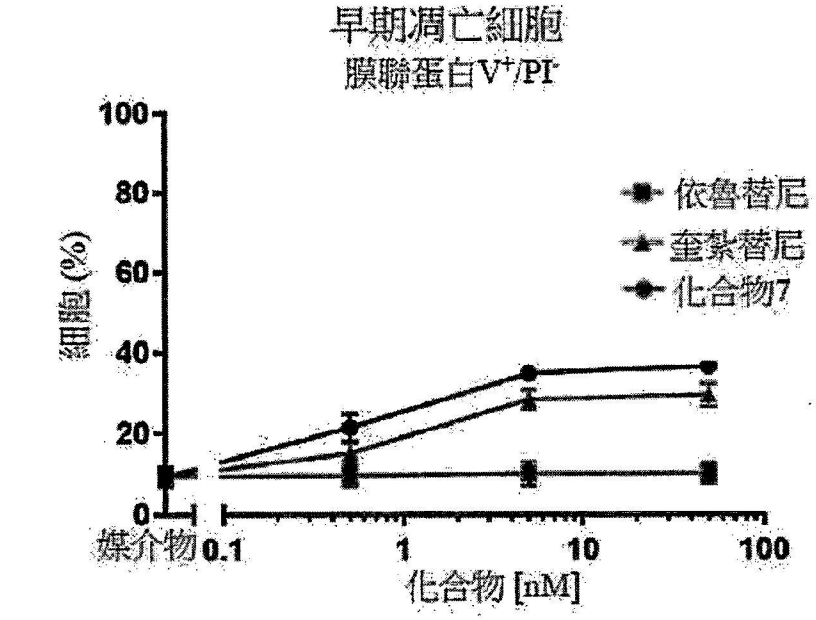

平均血漿濃度 ± SD (μM)
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
0
10
20
30
40
50
60
70
80
給藥後之時間 (h)
2 mg/kg (IV)
2 mg/kg (口服懸浮液)
10 mg/kg (口服懸浮液)
100 mg/kg (口服懸浮液)
2 mg/kg (口服膠囊)
10 mg/kg (口服膠囊)
100 mg/kg (口服膠囊)

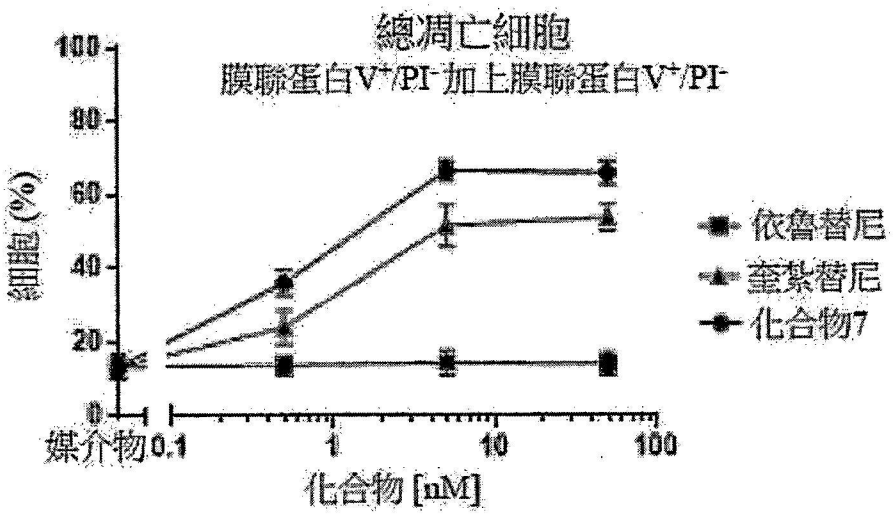
【圖 5】


平均腫瘤體積 ± SEM (mm³)
100
200
300
400
500
600
700
0
5
10
15
20
25
天
化合物7給藥：口服灌胃，第1-14天每天一次
媒介物對照
依魯替尼, 12 mg/kg
化合物7, 2 mg/kg
化合物7, 10 mg/kg
化合物7, 100 mg/kg

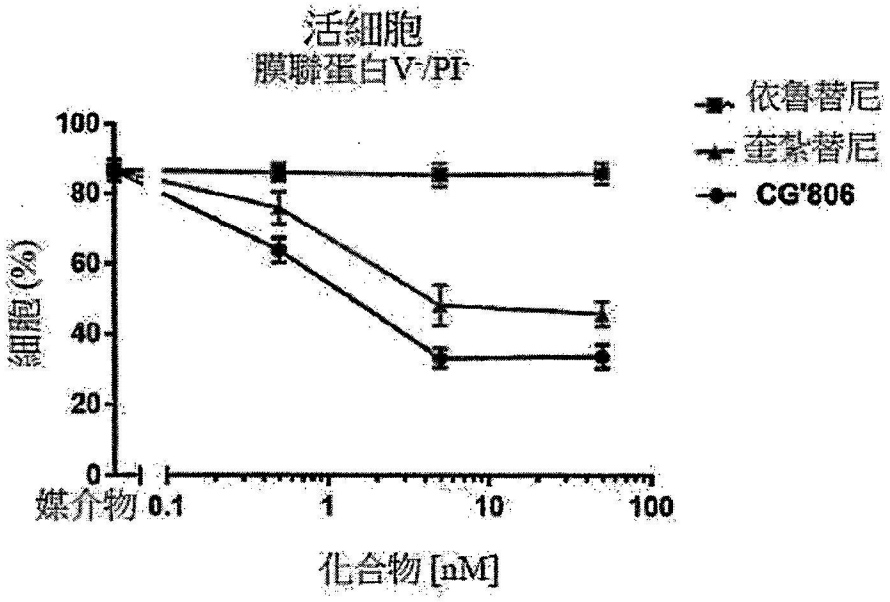

Balb/c小鼠平均體重 ± SEM (g)
0
5
10
15
20
25
天
體重無變化

【圖 6】

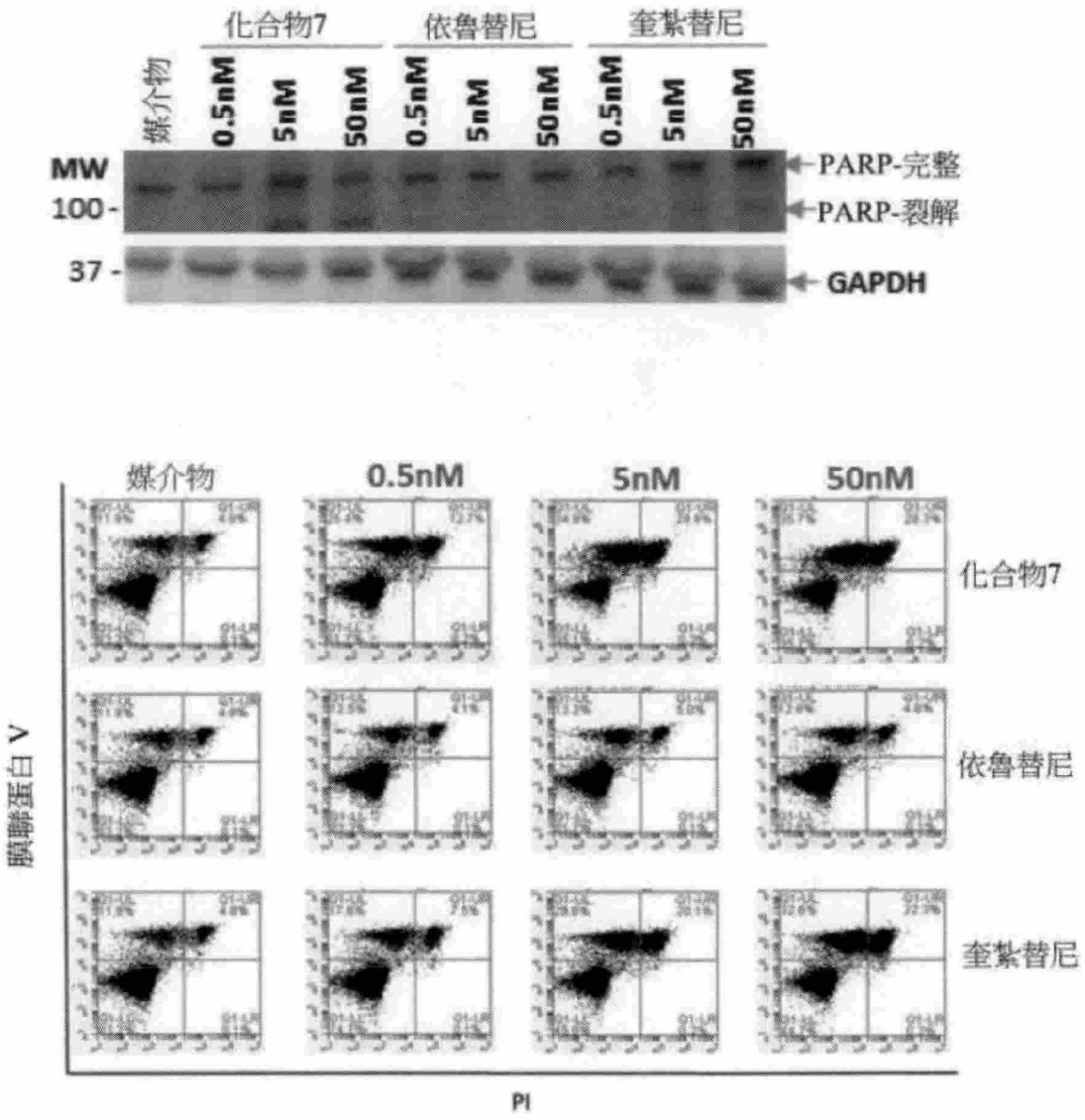

早期凋亡細胞
膜聯蛋白V+/PI-
細胞 (%)
100
80
60
40
20
0
媒介物
0.1
1
10
100
化合物 [nM]
依魯替尼
奎紮替尼
化合物7


總凋亡細胞
膜聯蛋白V+/PI-加上膜聯蛋白V+/PI-
細胞 (%)
100
80
60
40
20
0
媒介物
0.1
1
10
100
化合物 [nM]
依魯替尼
奎紮替尼
化合物7

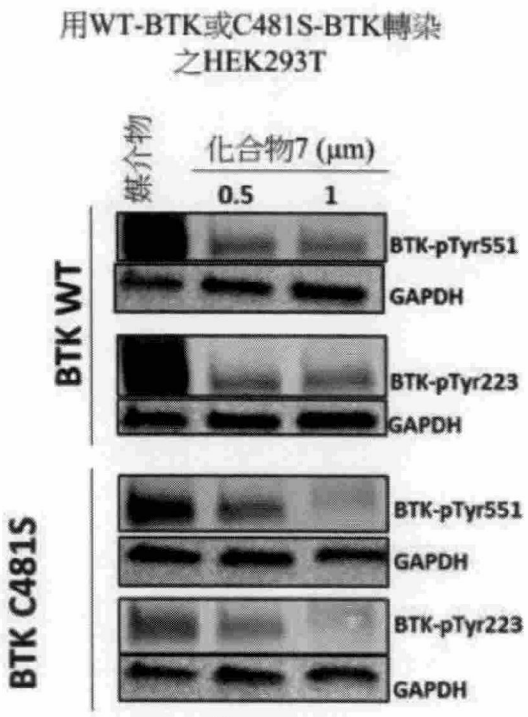
【圖 7】


活細胞
膜聯蛋白V-/PI-
依魯替尼
奎紮替尼
CG'806
細胞(%)
100
80
60
40
20
0
媒介物
0.1
1
10
100
化合物 [nM]

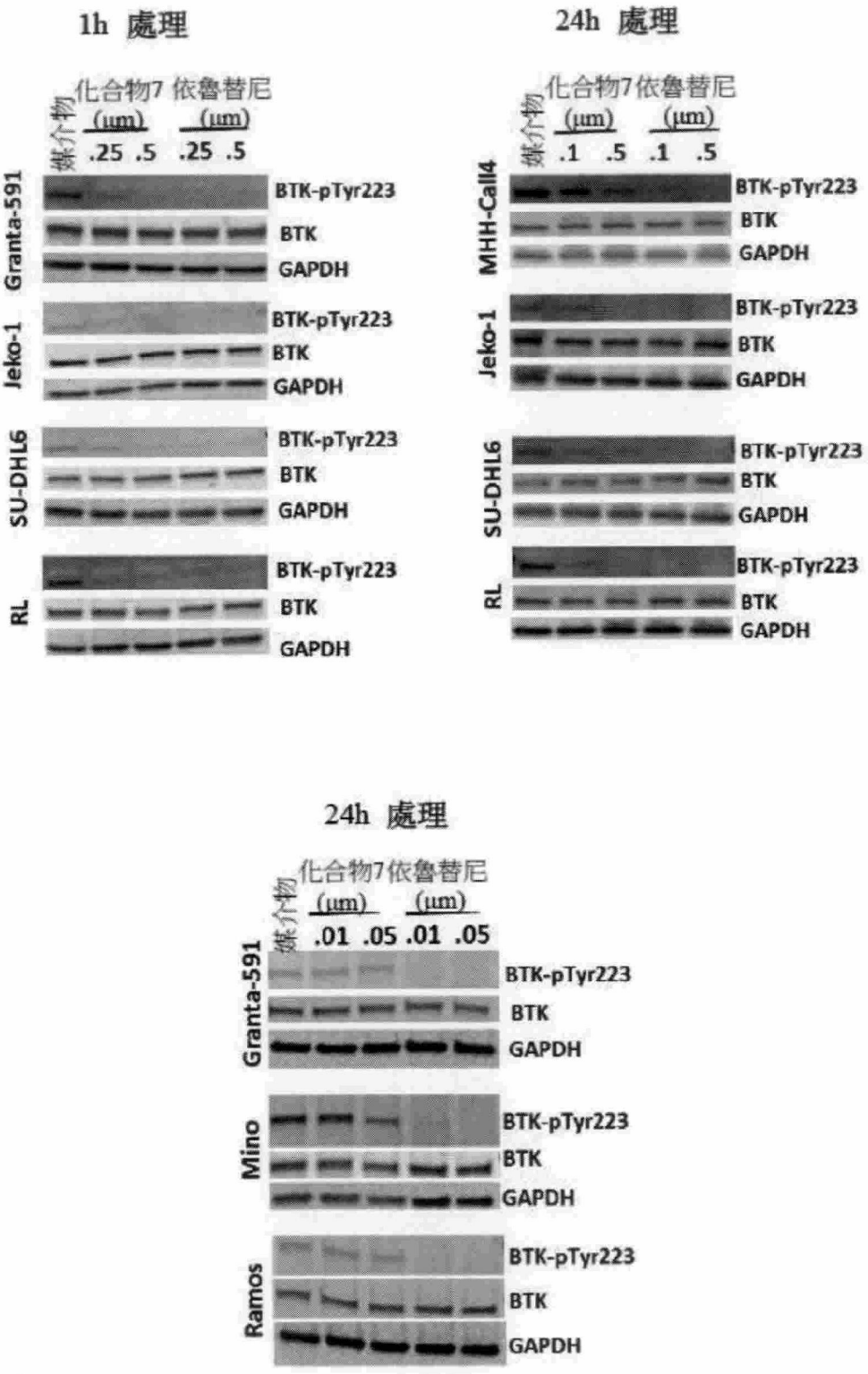
【圖 7(續)】


化合物7
依魯替尼
奎紮替尼
媒介物
0.5nM
5nM
50nM
0.5nM
5nM
50nM
0.5nM
5nM
50nM
MW
100-
37-
PARP-完整
PARP-裂解
GAPDH
媒介物
0.5nM
5nM
50nM
化合物7
依魯替尼
奎紮替尼
膜聯蛋白 V
PI

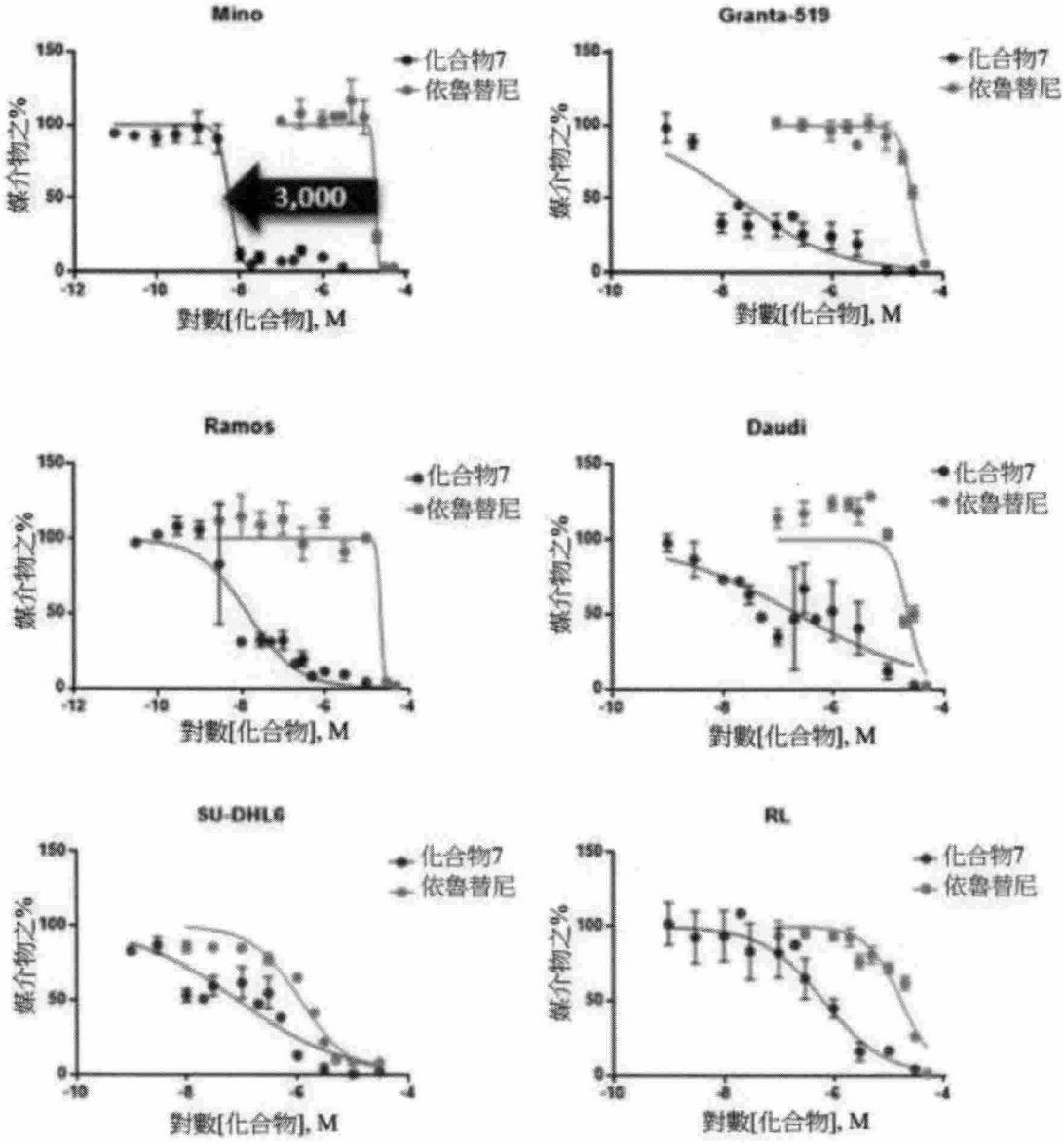
【圖 8】


用WT-BTK或C481S-BTK轉染
之HEK293T
媒介物
化合物7 (μm)
0.5
1
BTK WT
BTK-pTyr551
GAPDH
BTK-pTyr223
GAPDH
BTK C481S
BTK-pTyr551
GAPDH
BTK-pTyr223
GAPDH

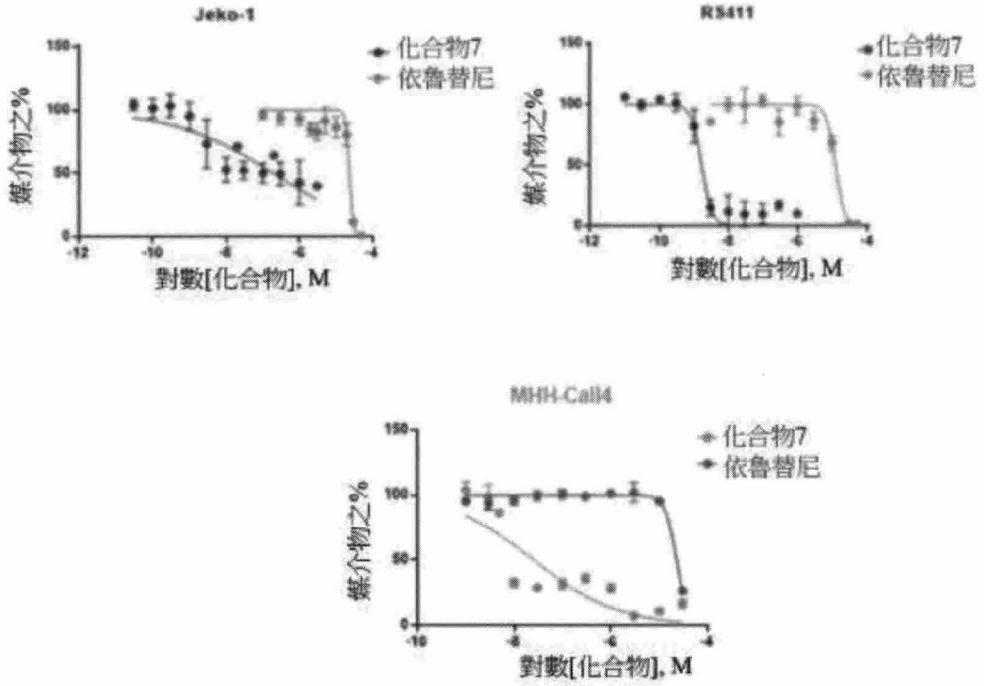
【圖 9】

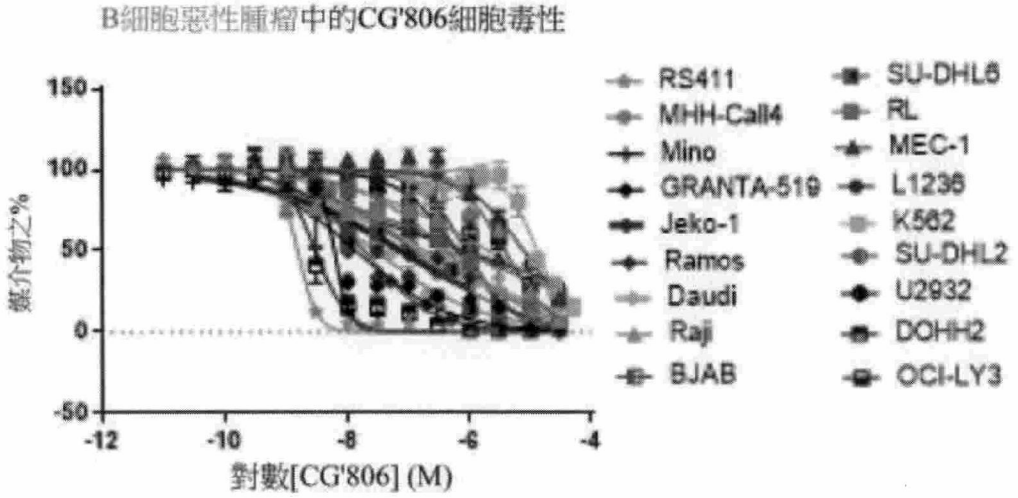

1h 處理
24h 處理
化合物7 依魯替尼
媒介物
(μm)
.25 .5 .25 .5
.1 .5 .1 .5
Granta-591
MHH-Call4
Jeko-1
SU-DHL6
RL
BTK-pTyr223
BTK
GAPDH
24h 處理
化合物7依魯替尼
媒介物
(μm)
.01 .05 .01 .05
Granta-591
Mino
Ramos
BTK-pTyr223
BTK
GAPDH

【圖 10】

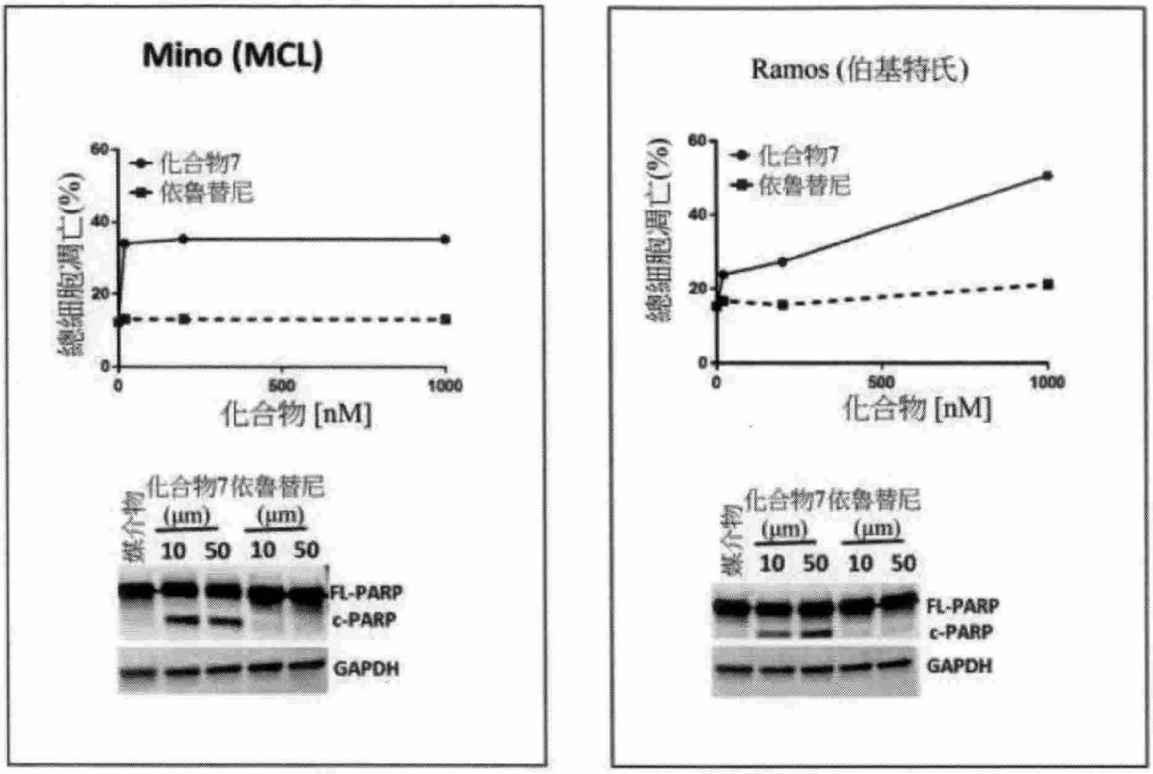

Mino
Granta-519
Ramos
Daudi
SU-DHL6
RL
化合物7
依魯替尼
媒介物之%
對數[化合物], M
3,000

【圖 11】

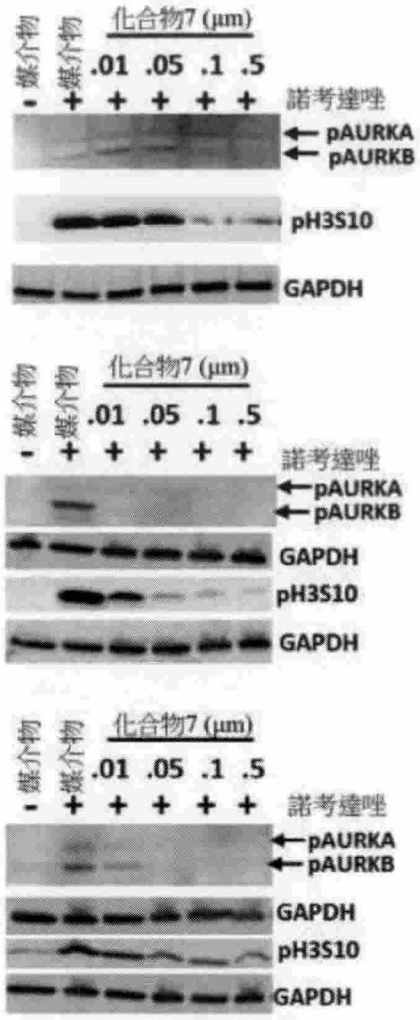

Jeko-1
化合物7
依魯替尼
媒介物之%
對數[化合物], M
RS411
化合物7
依魯替尼
媒介物之%
對數[化合物], M
MHH-Call4
化合物7
依魯替尼
媒介物之%
對數[化合物], M


B細胞惡性腫瘤中的CG'806細胞毒性
媒介物之%
對數[CG'806] (M)
RS411
MHH-Call4
Mino
GRANTA-519
Jeko-1
Ramos
Daudi
Raji
BJAB
SU-DHL6
RL
MEC-1
L1236
K562
SU-DHL2
U2932
DOHH2
OCI-LY3

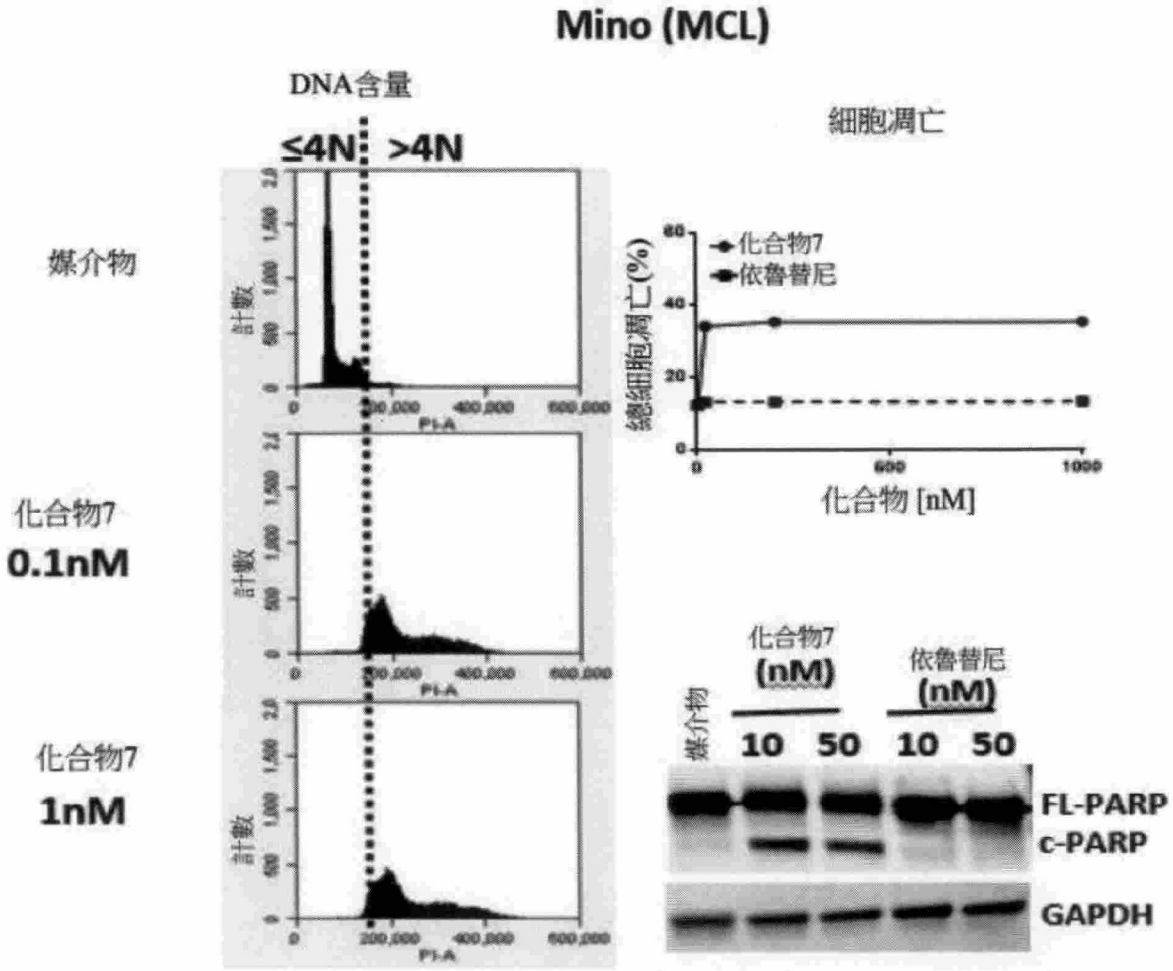
【圖 11(續)】


Mino (MCL)
總細胞凋亡(%)
化合物7
依魯替尼
化合物 [nM]
化合物7依魯替尼
媒介物
(μm)
10 50 10 50
FL-PARP
c-PARP
GAPDH
Ramos (伯基特氏)
總細胞凋亡(%)
化合物7
依魯替尼
化合物 [nM]
化合物7依魯替尼
媒介物
(μm)
10 50 10 50
FL-PARP
c-PARP
GAPDH

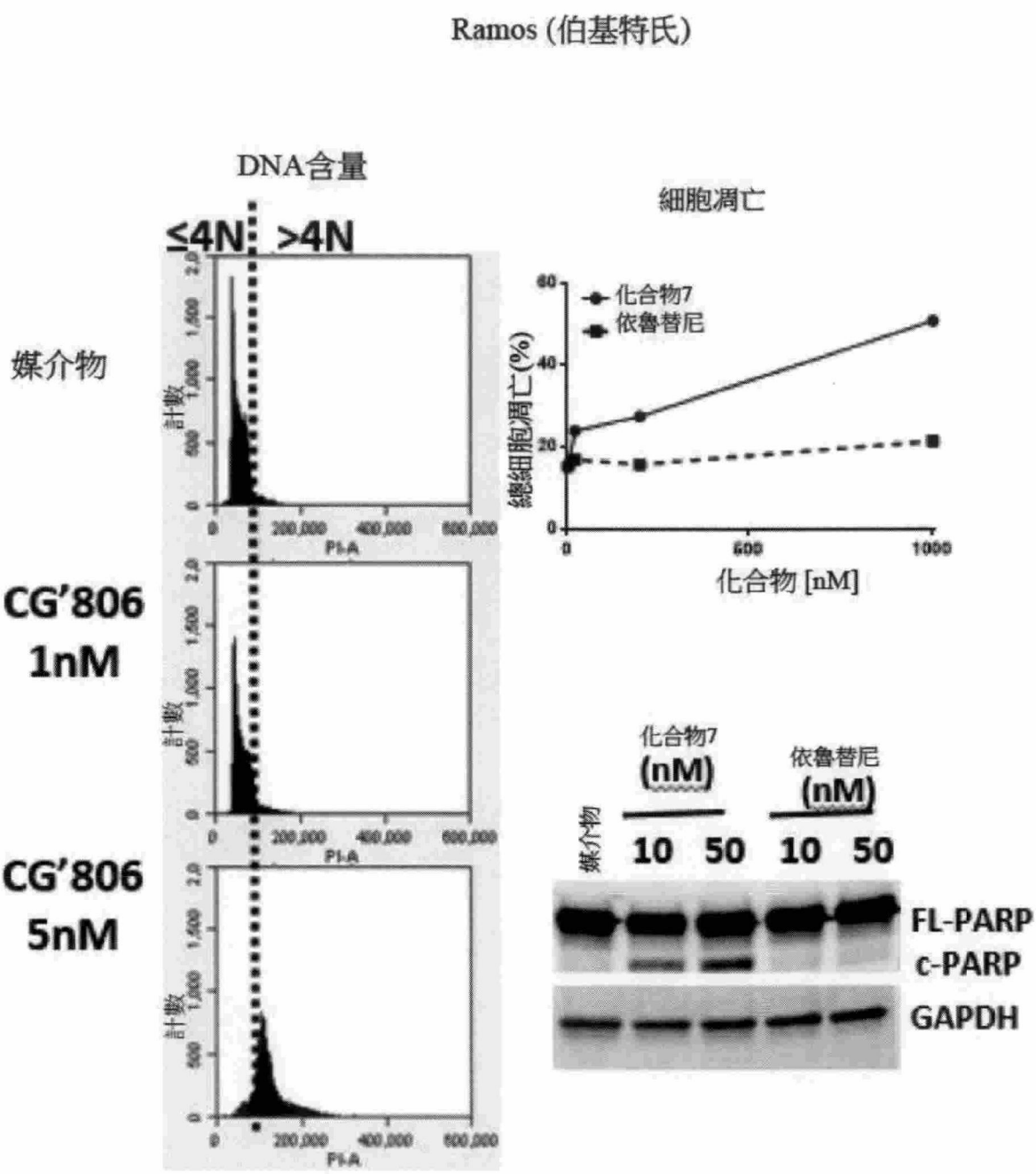
【圖 12】


化合物7 (μm)
媒介物
媒介物
.01 .05 .1 .5
- + + + + +
諾考達唑
pAURKA
pAURKB
pH3S10
GAPDH
化合物7 (μm)
媒介物
媒介物
.01 .05 .1 .5
- + + + + +
諾考達唑
pAURKA
pAURKB
GAPDH
pH3S10
GAPDH
化合物7 (μm)
媒介物
媒介物
.01 .05 .1 .5
- + + + + +
諾考達唑
pAURKA
pAURKB
GAPDH
pH3S10
GAPDH

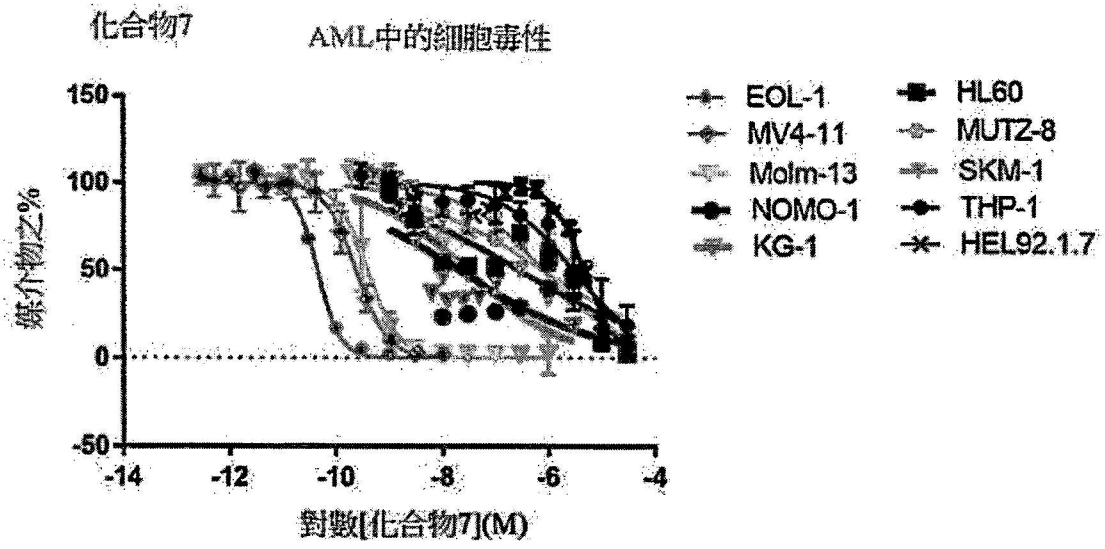
【圖 13】


Mino (MCL)
DNA含量
≤4N
>4N
媒介物
化合物7
0.1nM
化合物7
1nM
計數
FI-A
細胞凋亡
化合物7
依魯替尼
總細胞凋亡(%)
化合物 [nM]
媒介物
化合物7 (nM)
依魯替尼 (nM)
10
50
10
50
FL-PARP
c-PARP
GAPDH

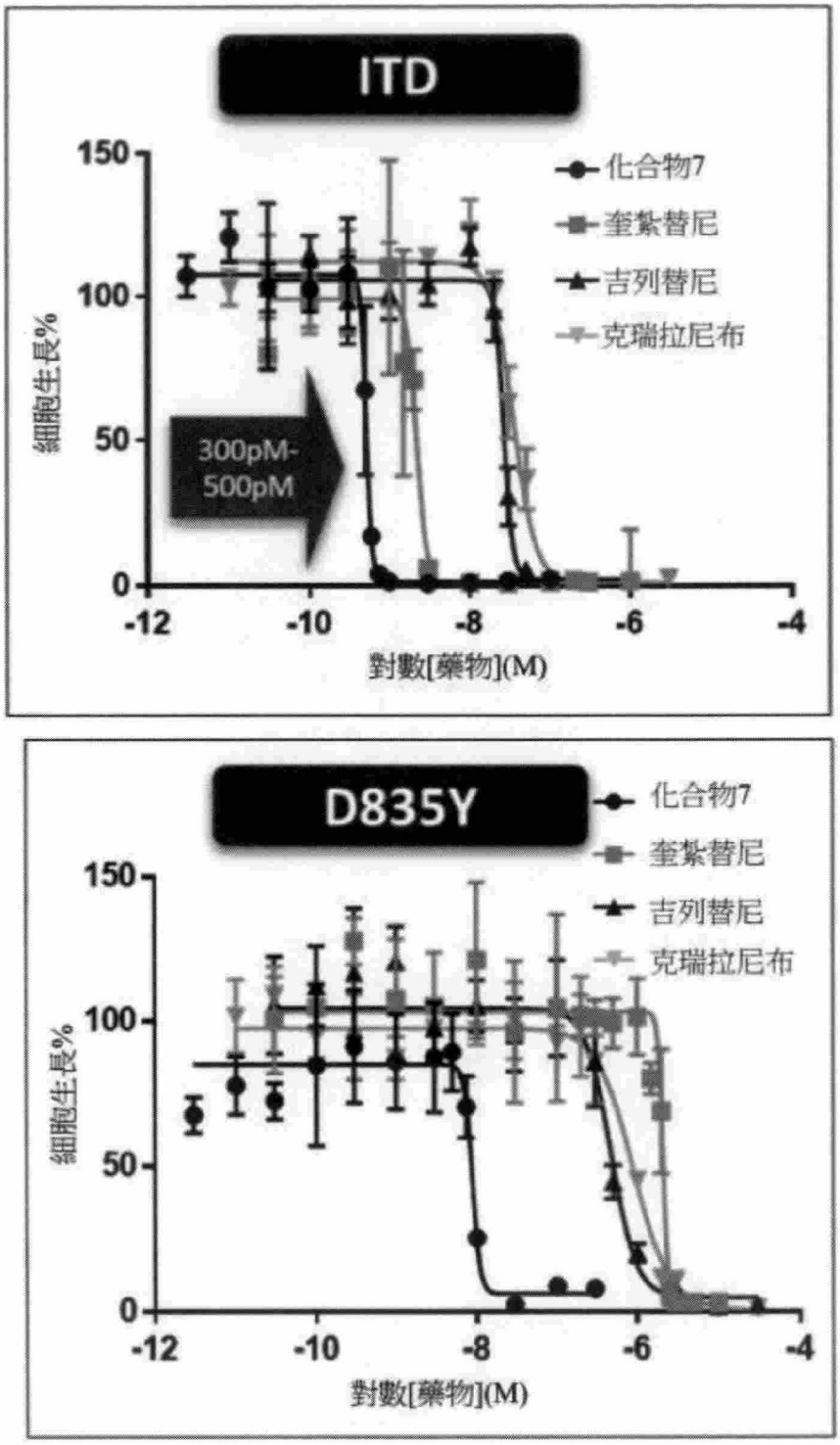
【圖 14】


Ramos (伯基特氏)
DNA含量
≤4N
>4N
媒介物
CG'806 1nM
CG'806 5nM
計數
P1-A
細胞凋亡
化合物7
依鲁替尼
總細胞凋亡(%)
化合物 [nM]
化合物7 (nM)
依鲁替尼 (nM)
媒介物
10
50
10
50
FL-PARP
c-PARP
GAPDH

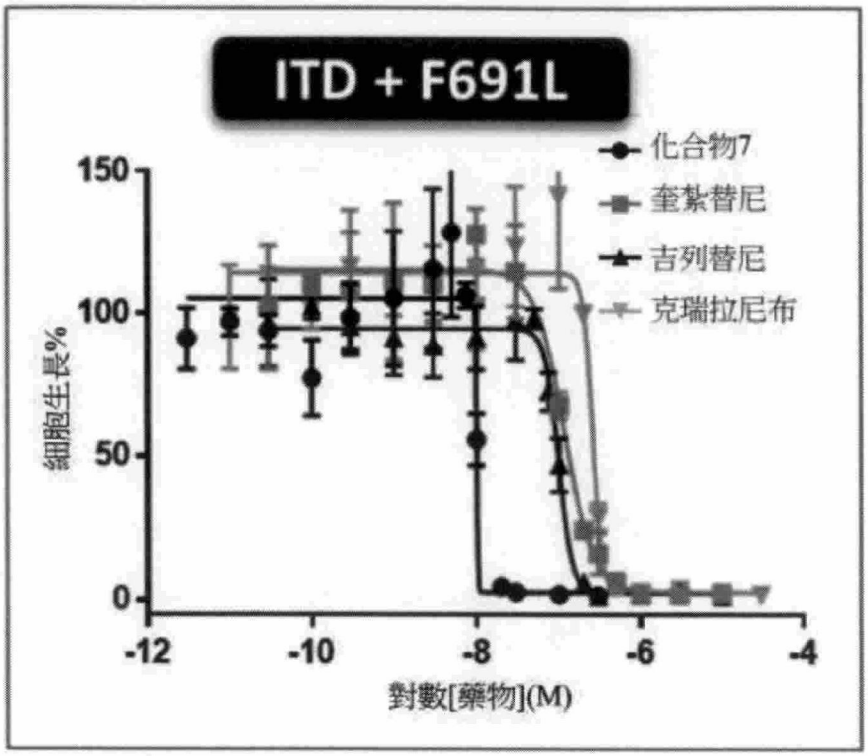
【圖 14(續)】

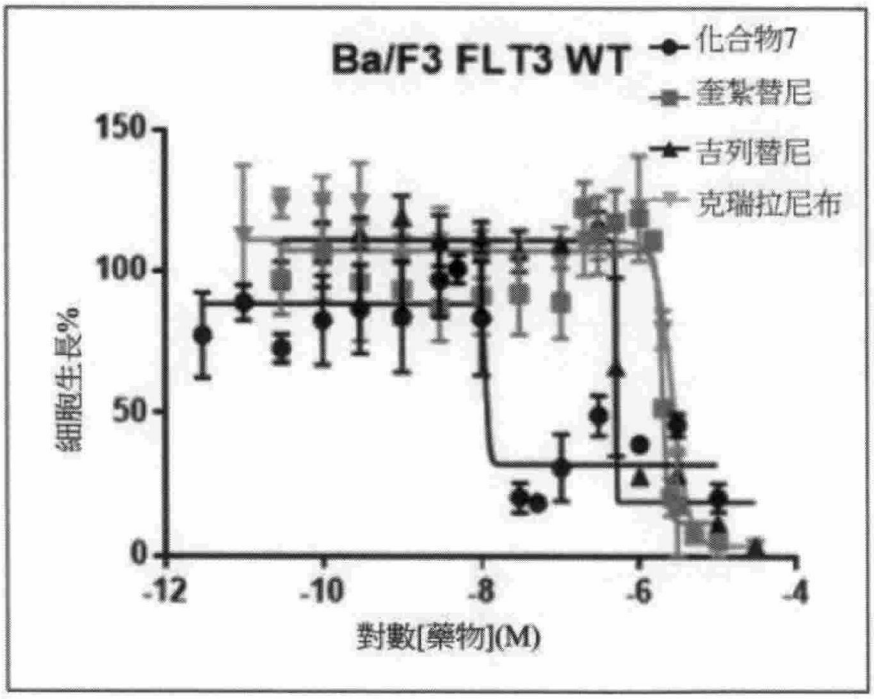

化合物7
AML中的細胞毒性
150
100
50
0
-50
媒介物之%
-14
-12
-10
-8
-6
-4
對數[化合物7](M)
EOL-1
MV4-11
Molm-13
NOMO-1
KG-1
HL60
MUTZ-8
SKM-1
THP-1
HEL92.1.7

【圖 15】

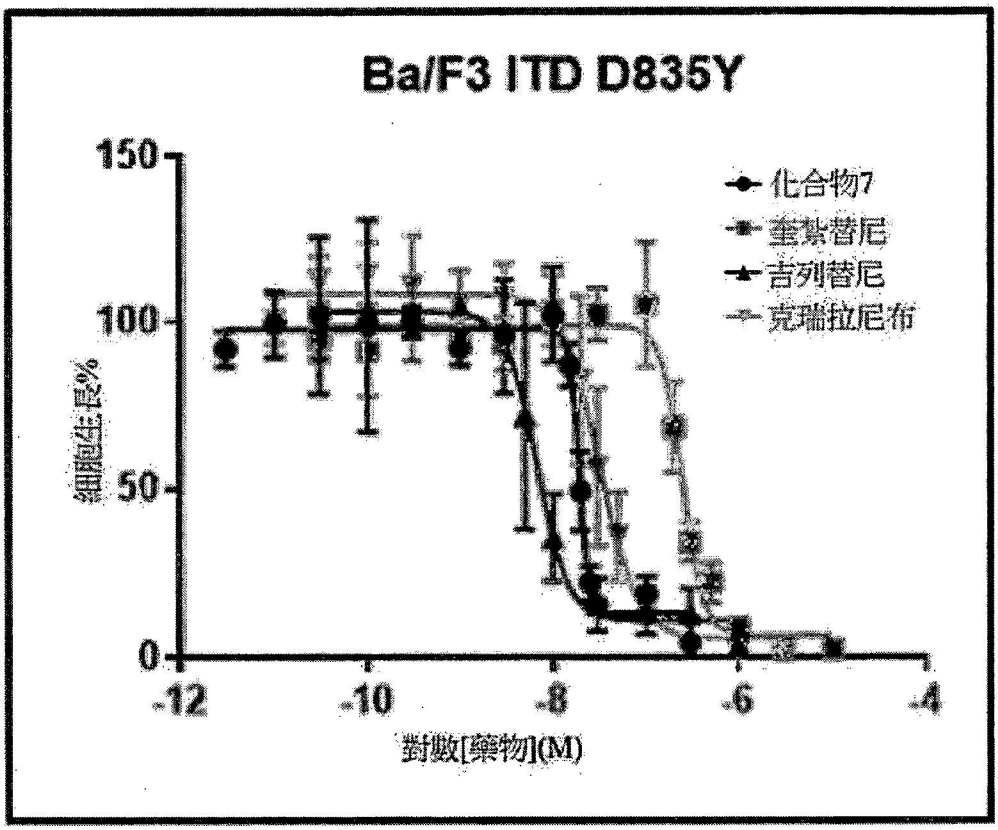

ITD
化合物7
奎紮替尼
吉列替尼
克瑞拉尼布
300pM-
500pM
細胞生長%
150
100
50
0
-12
-10
-8
-6
-4
對數[藥物](M)
D835Y
化合物7
奎紮替尼
吉列替尼
克瑞拉尼布
細胞生長%
150
100
50
0
-12
-10
-8
-6
-4
對數[藥物](M)

【圖 16】


ITD + F691L
化合物7
奎紮替尼
吉列替尼
克瑞拉尼布
細胞生長%
150
100
50
0
-12
-10
-8
-6
-4
對數[藥物](M)

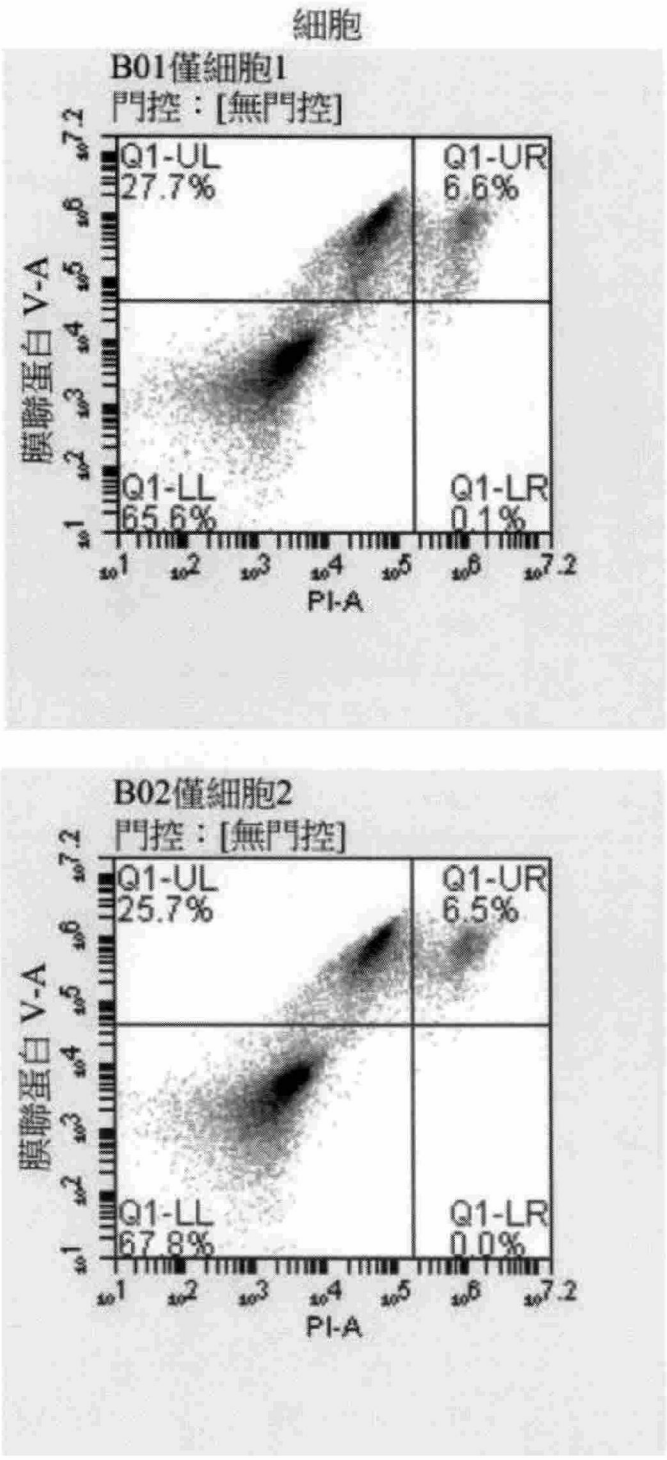

Ba/F3 FLT3 WT
化合物7
奎紮替尼
吉列替尼
克瑞拉尼布
細胞生長%
150
100
50
0
-12
-10
-8
-6
-4
對數[藥物](M)

【圖 16(續)】


Ba/F3 ITD D835Y
150
100
50
0
細胞生長%
-12
-10
-8
-6
-4
對數[藥物](M)
化合物7
奎紮替尼
吉列替尼
克瑞拉尼布

【圖 16(續)】

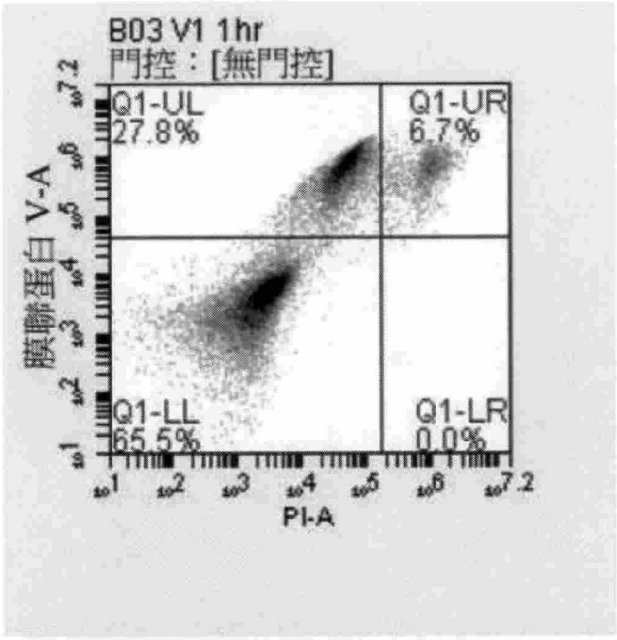
A.

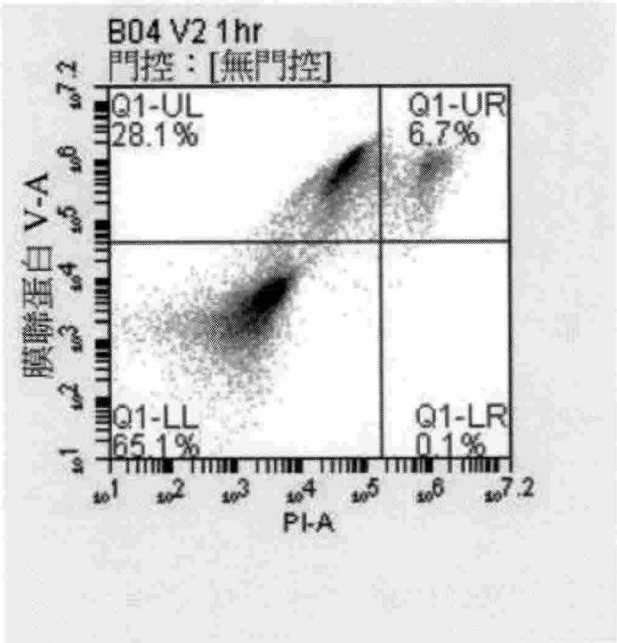

細胞
B01僅細胞1
門控：[無門控]
Q1-UL
27.7%
Q1-UR
6.6%
Q1-LL
65.6%
Q1-LR
0.1%
膜聯蛋白 V-A
PI-A
B02僅細胞2
門控：[無門控]
Q1-UL
25.7%
Q1-UR
6.5%
Q1-LL
67.8%
Q1-LR
0.0%
膜聯蛋白 V-A
PI-A

【圖 17】

媒介物 1hr

B

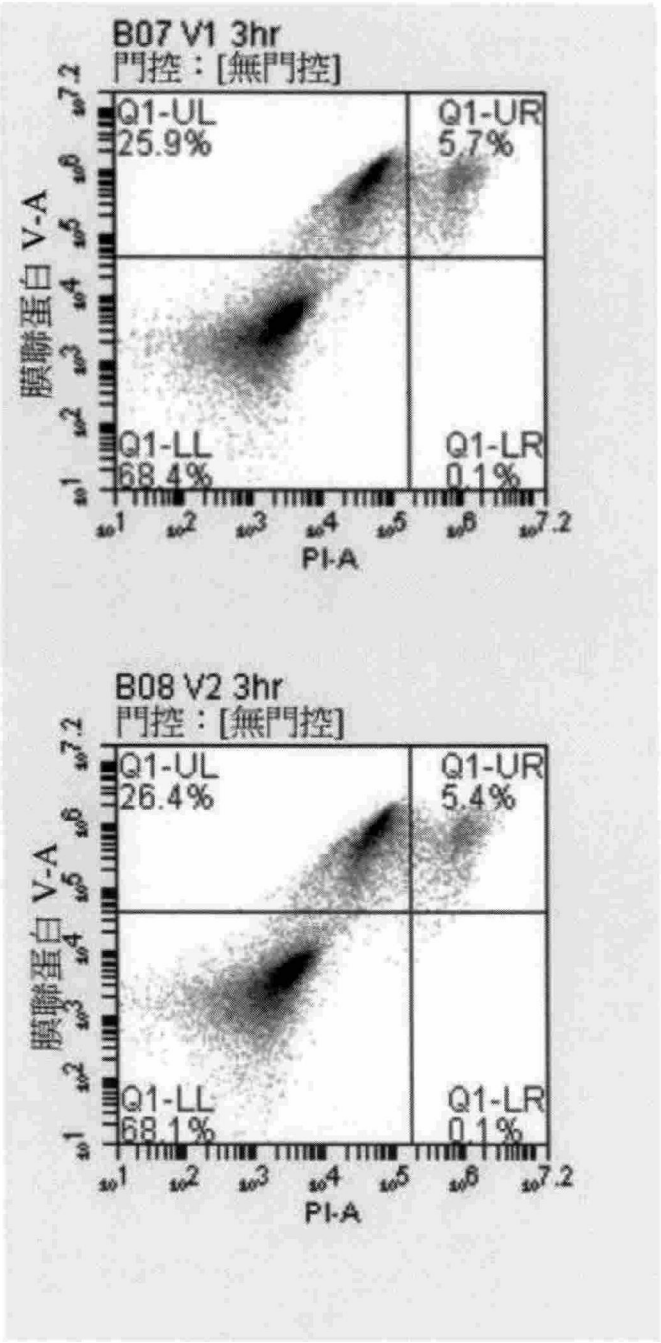




【圖 17(續)】

媒介物 3hr

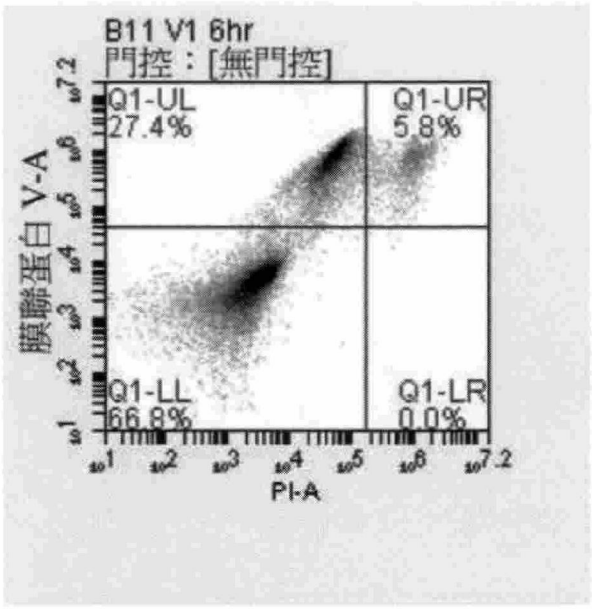
C

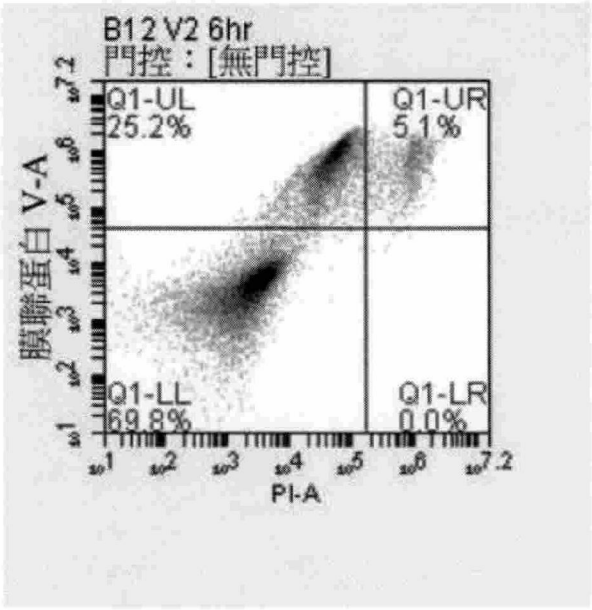


【圖 17(續)】

媒介物 6hr

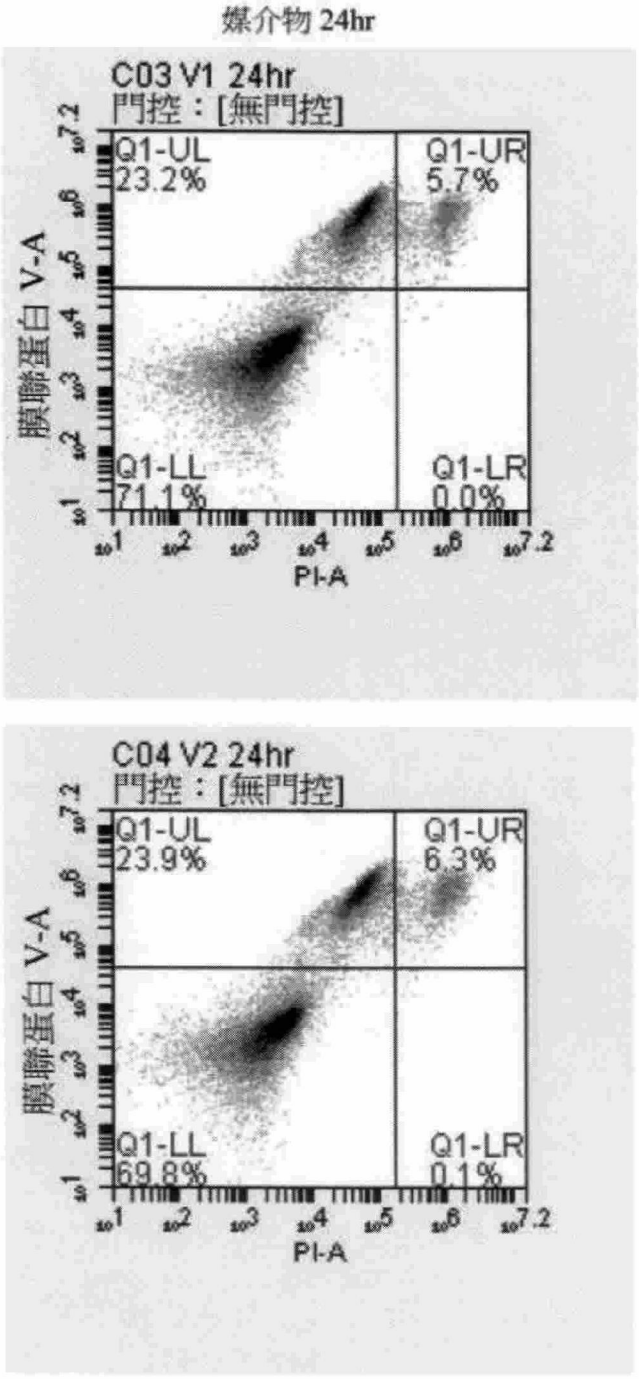
D





【圖 17(續)】

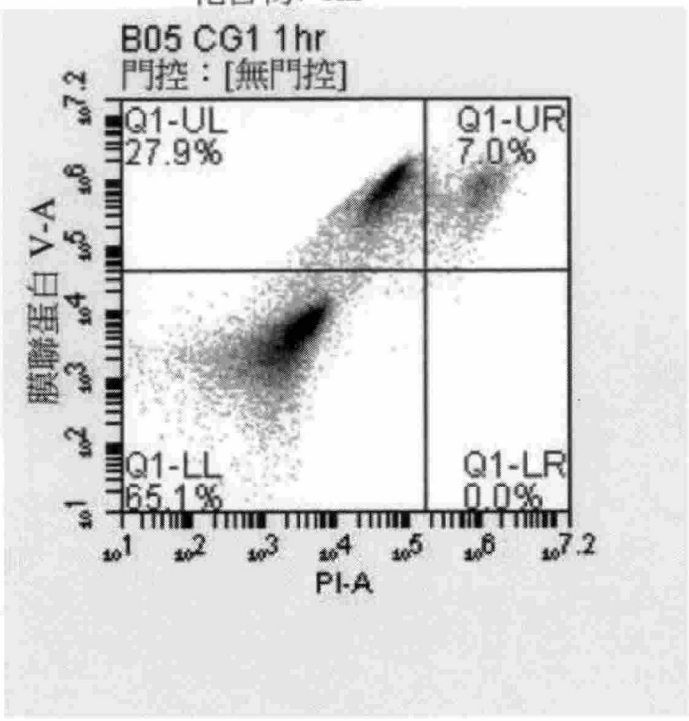
E

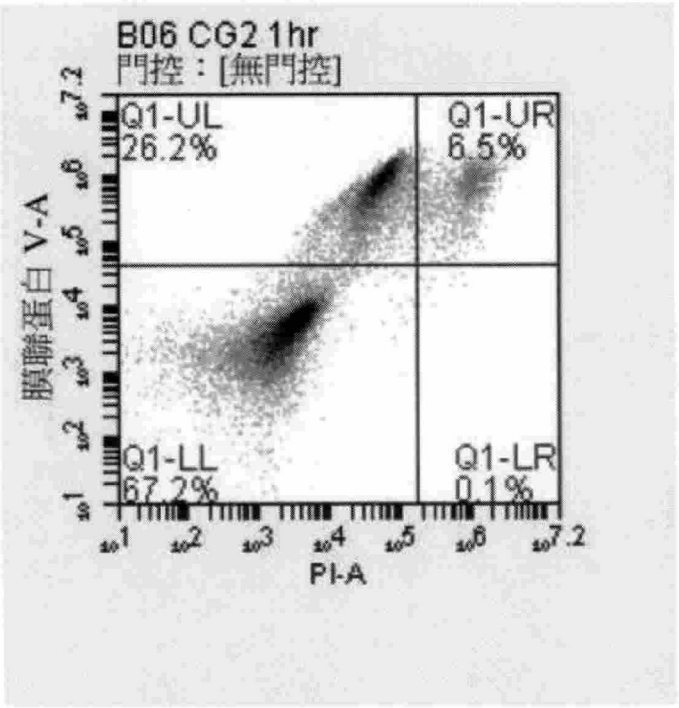

媒介物 24hr
C03 V1 24hr
門控：[無門控]
Q1-UL
23.2%
Q1-UR
5.7%
Q1-LL
71.1%
Q1-LR
0.0%
膜聯蛋白 V-A
PI-A
C04 V2 24hr
門控：[無門控]
Q1-UL
23.9%
Q1-UR
6.3%
Q1-LL
69.8%
Q1-LR
0.1%
膜聯蛋白 V-A
PI-A

【圖 17(續)】

F

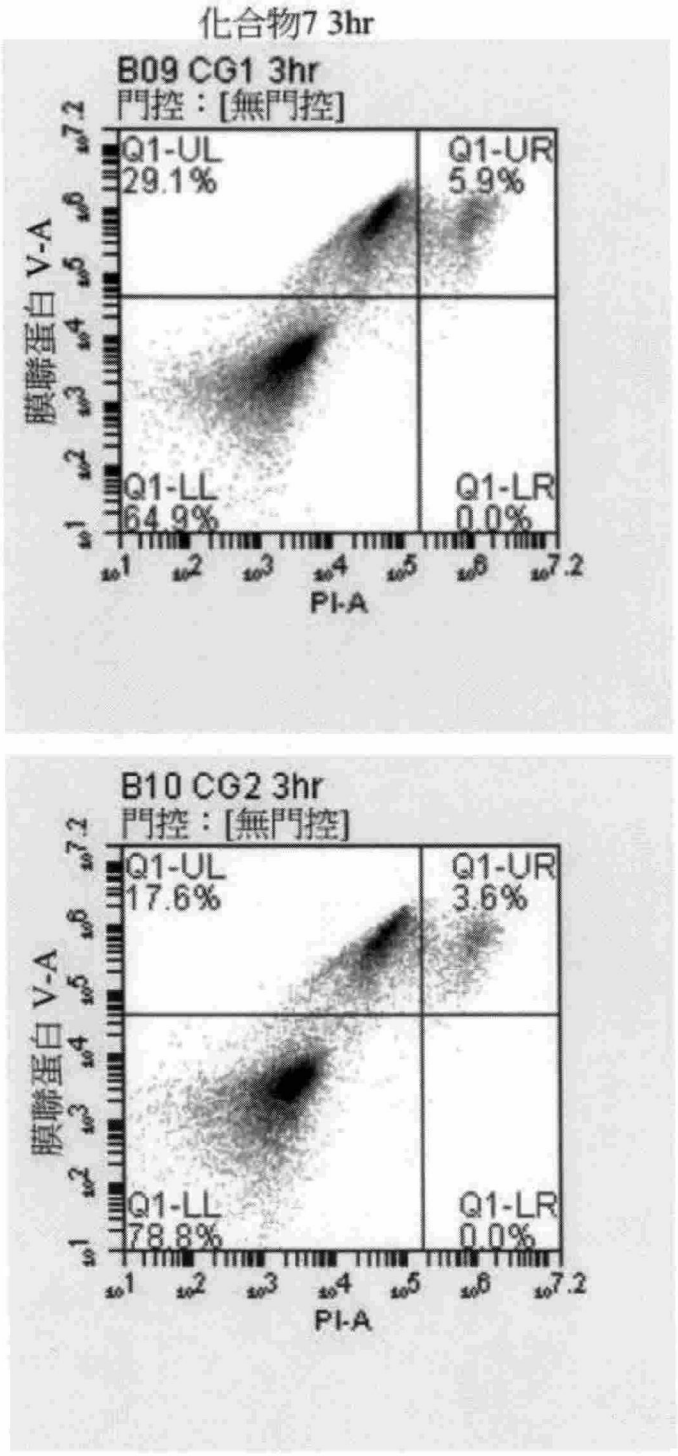
化合物7 1hr





【圖 17(續)】

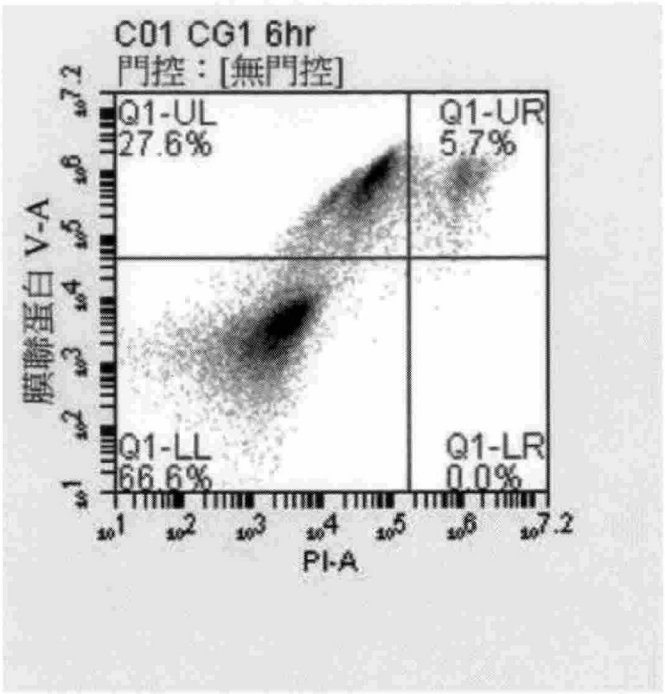
G

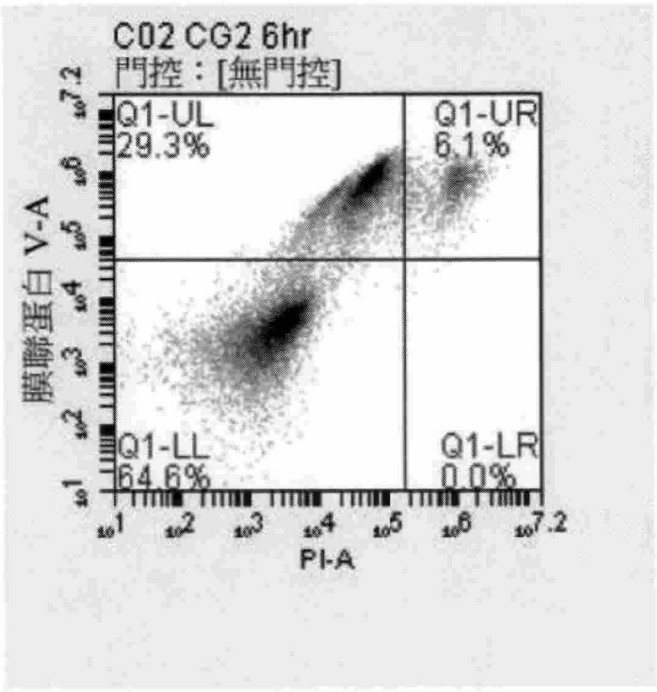

化合物7 3hr
B09 CG1 3hr
門控：[無門控]
Q1-UL
29.1%
Q1-UR
5.9%
Q1-LL
64.9%
Q1-LR
0.0%
膜聯蛋白 V-A
PI-A
B10 CG2 3hr
門控：[無門控]
Q1-UL
17.6%
Q1-UR
3.6%
Q1-LL
78.8%
Q1-LR
0.0%
膜聯蛋白 V-A
PI-A

【圖 17(續)】

H

化合物7 6hr

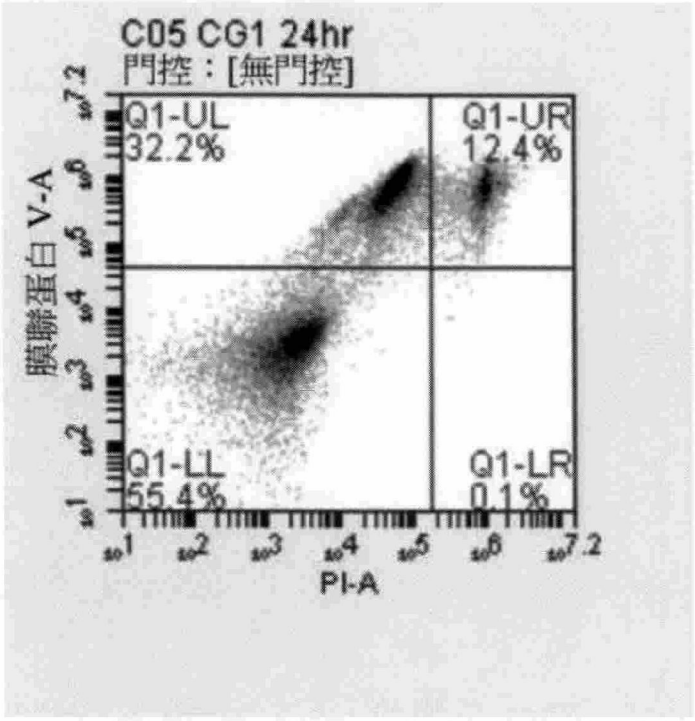


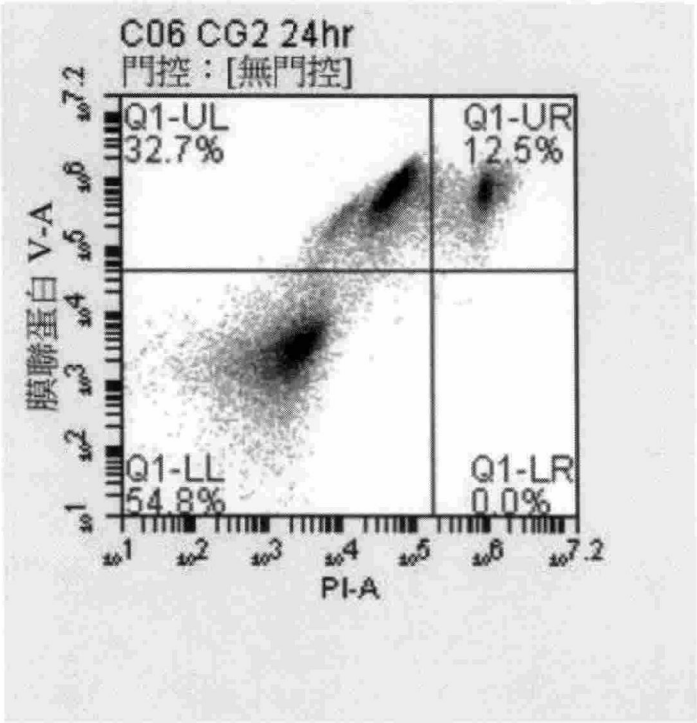


【圖 17(續)】

化合物7 24hr

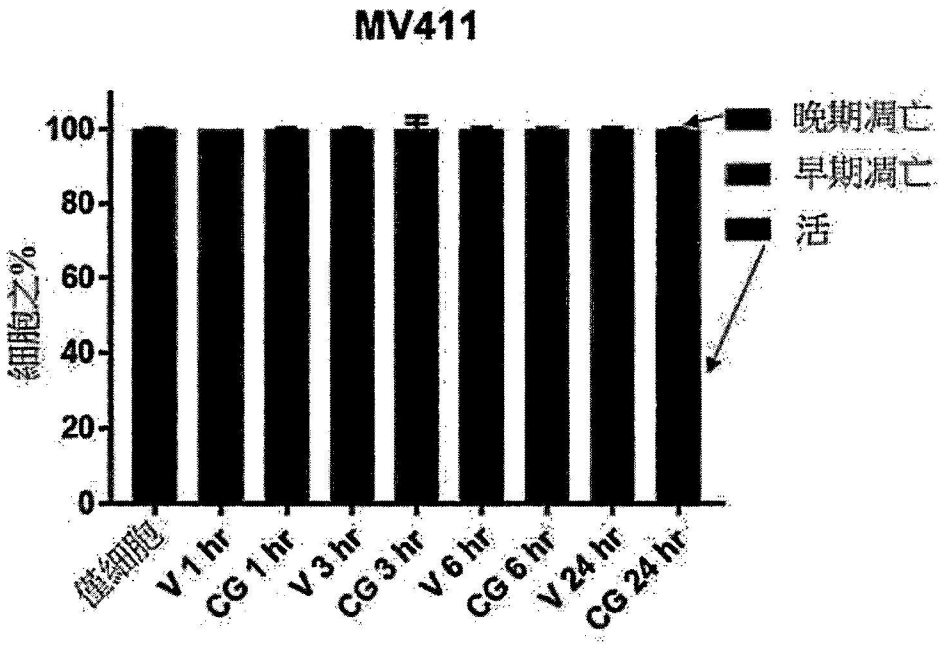
I



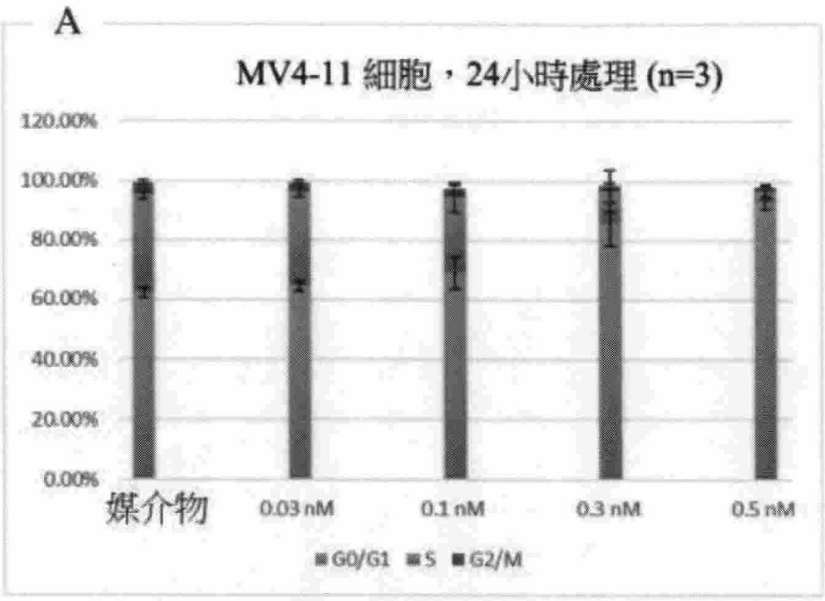


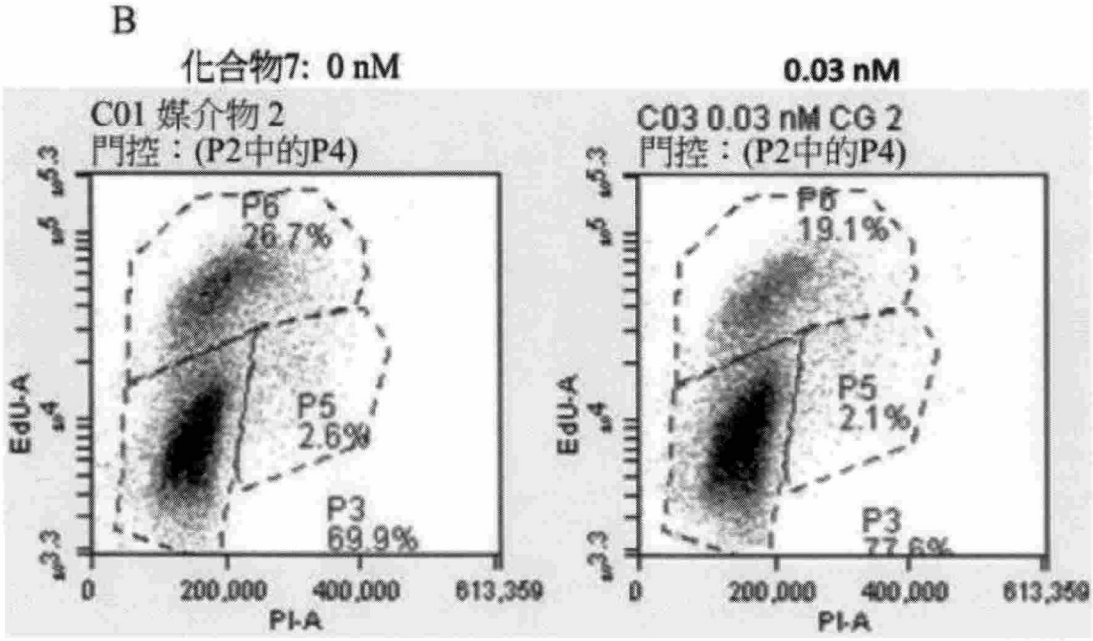
【圖 17(續)】

J

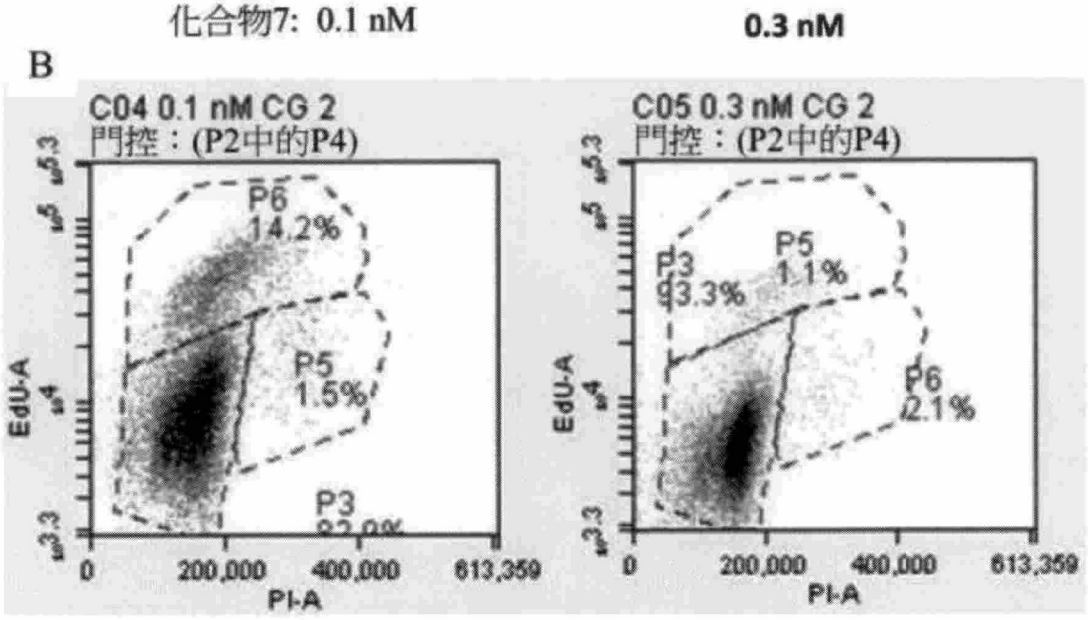

MV411
細胞之%
100
80
60
40
20
0
晚期凋亡
早期凋亡
活
僅細胞
V 1 hr
CG 1 hr
V 3 hr
CG 3 hr
V 6 hr
CG 6 hr
V 24 hr
CG 24 hr

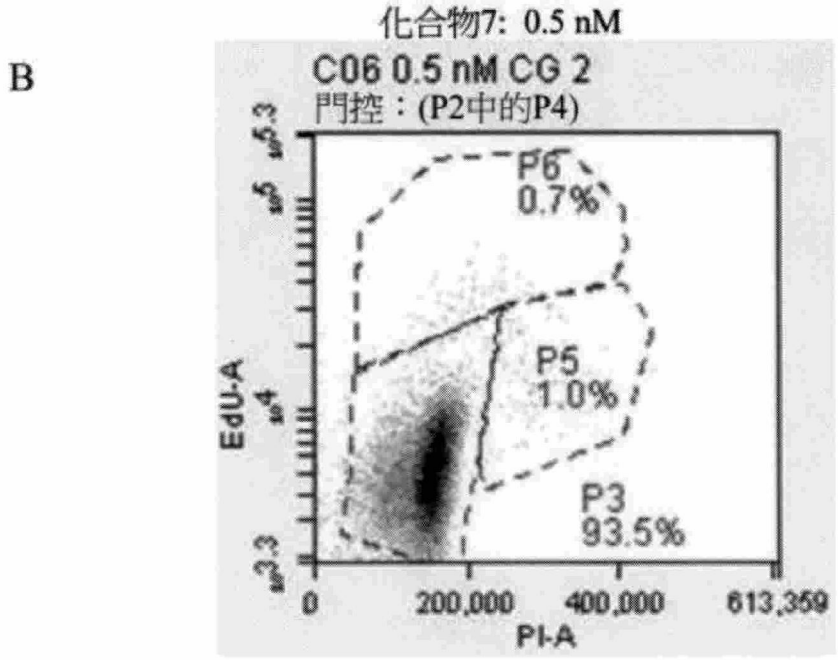
【圖 17(續)】


A
MV4-11 細胞，24小時處理 (n=3)
120.00%
100.00%
80.00%
60.00%
40.00%
20.00%
0.00%
媒介物
0.03 nM
0.1 nM
0.3 nM
0.5 nM
G0/G1
S
G2/M


B
化合物7: 0 nM
0.03 nM
C01 媒介物 2
門控：(P2中的P4)
P6
26.7%
P5
2.6%
P3
69.9%
C03 0.03 nM CG 2
門控：(P2中的P4)
P6
19.1%
P5
2.1%
P3
77.6%
EdU-A
PI-A
0
200,000
400,000
613,359

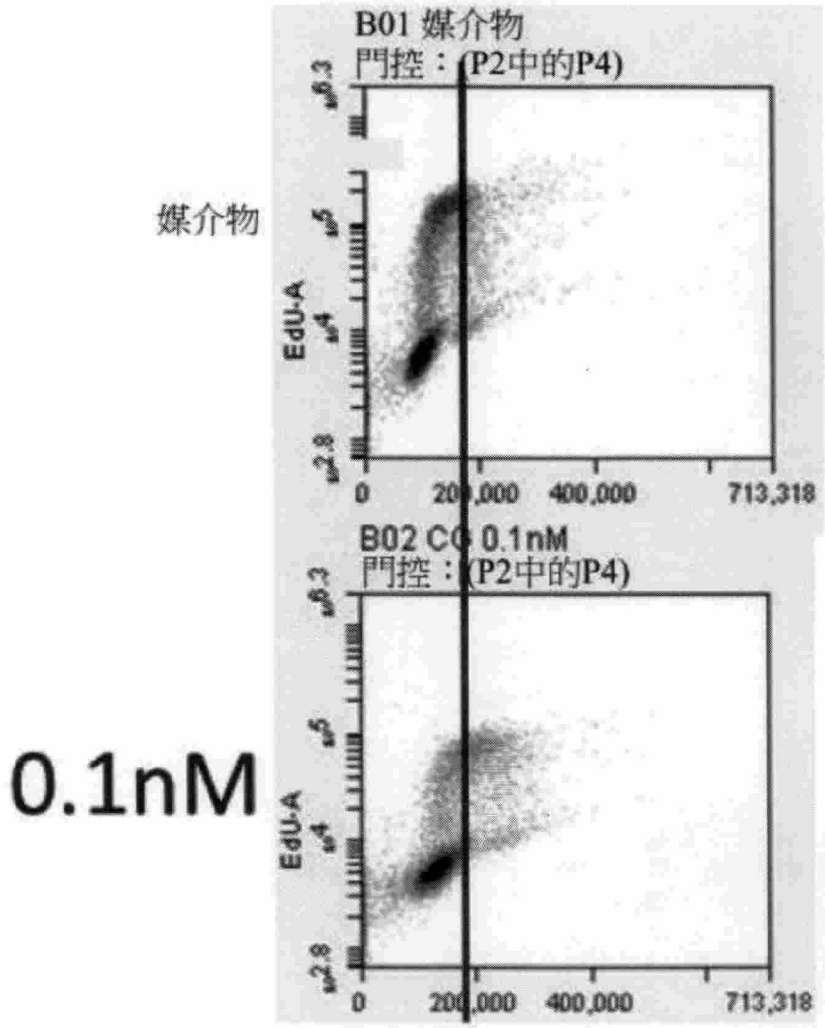
【圖 18】


化合物7: 0.1 nM
0.3 nM
B
C04 0.1 nM CG 2
門控：(P2中的P4)
C05 0.3 nM CG 2
門控：(P2中的P4)
P6
14.2%
P5
1.5%
P3
P5
1.1%
P3
93.3%
P6
2.1%
EdU-A
PI-A
0
200,000
400,000
613,359


化合物7: 0.5 nM
B
C06 0.5 nM CG 2
門控：(P2中的P4)
P6
0.7%
P5
1.0%
P3
93.5%
EdU-A
PI-A
0
200,000
400,000
613,359

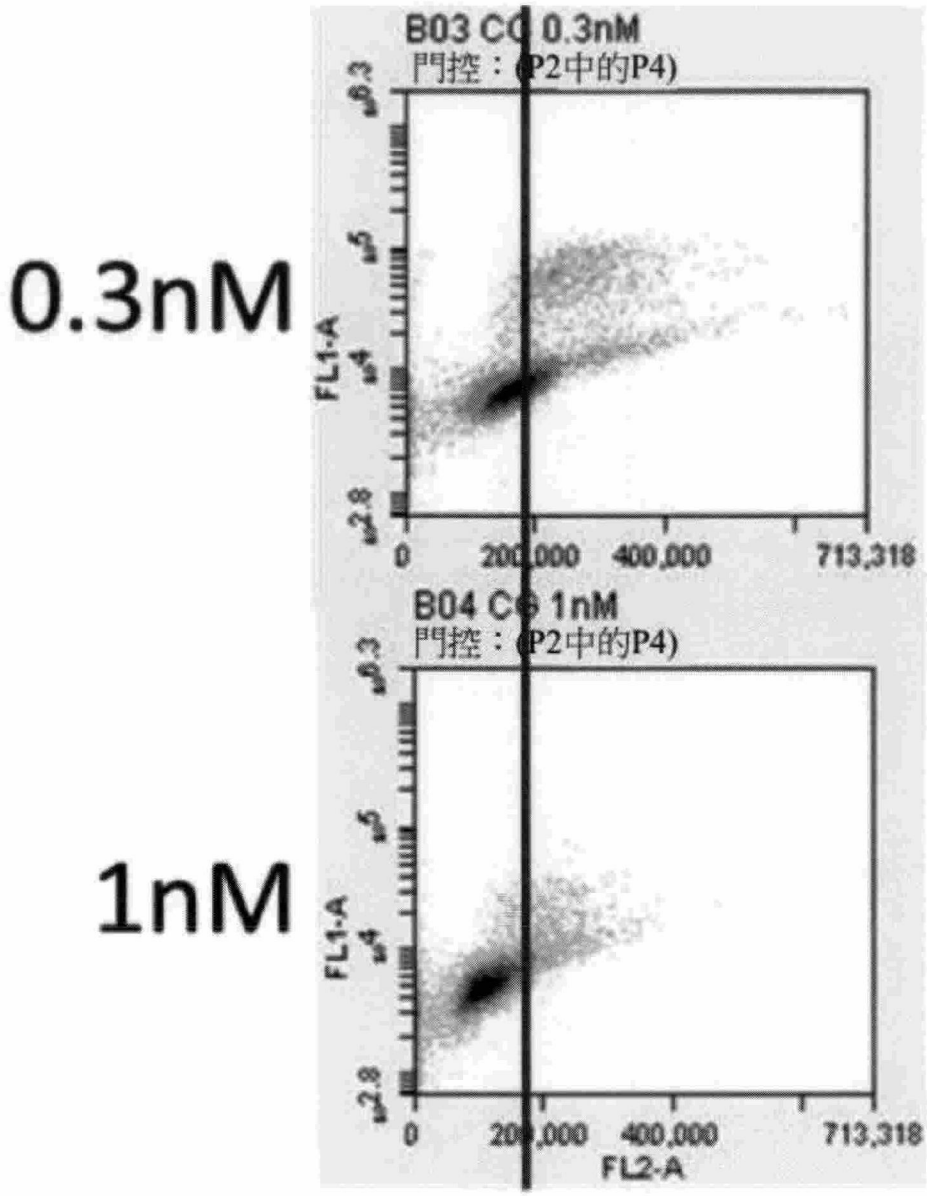
【圖 18(續)】

化合物7

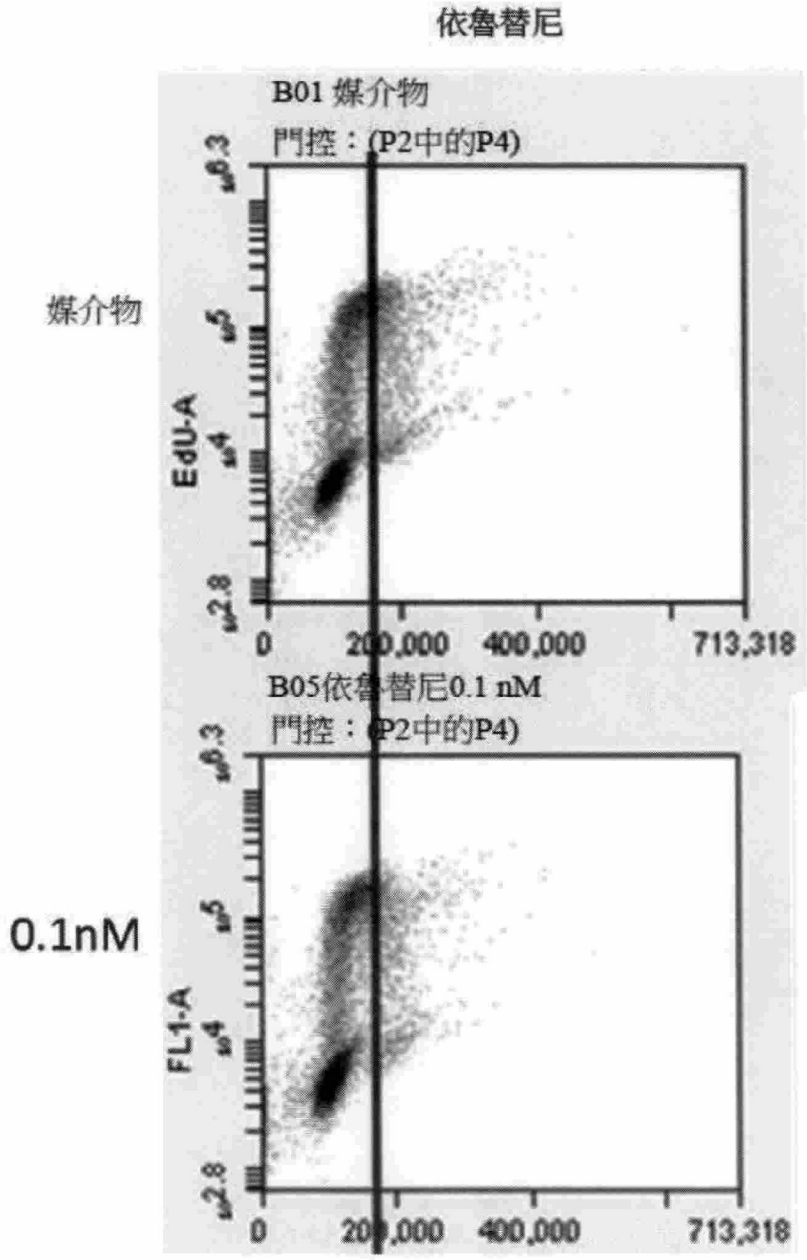

媒介物
B01 媒介物
門控：(P2中的P4)
EdU-A
0
200,000
400,000
713,318
0.1nM
B02 CG 0.1nM
門控：(P2中的P4)
EdU-A
0
200,000
400,000
713,318

【圖 19】

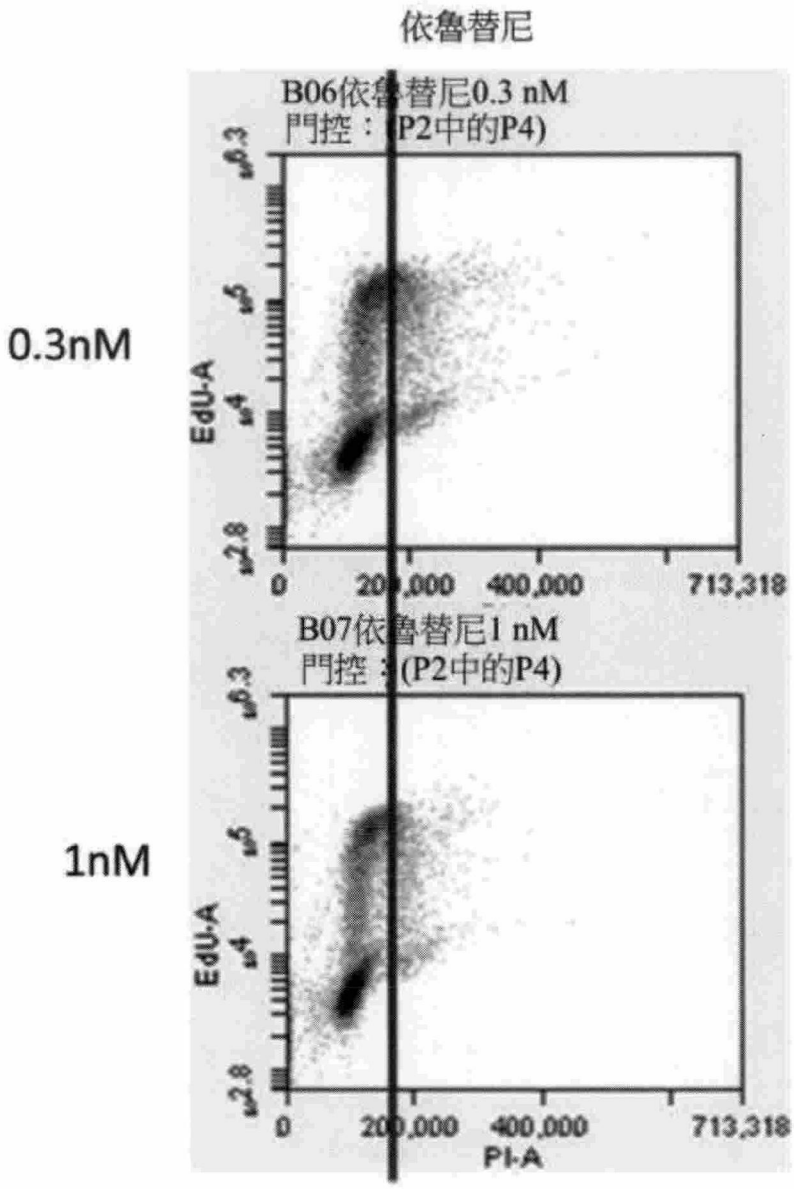
化合物7


0.3nM
B03 C6 0.3nM
門控：(P2中的P4)
FL1-A
0
200,000
400,000
713,318
1nM
B04 C6 1nM
門控：(P2中的P4)
FL1-A
0
400,000
713,318
FL2-A

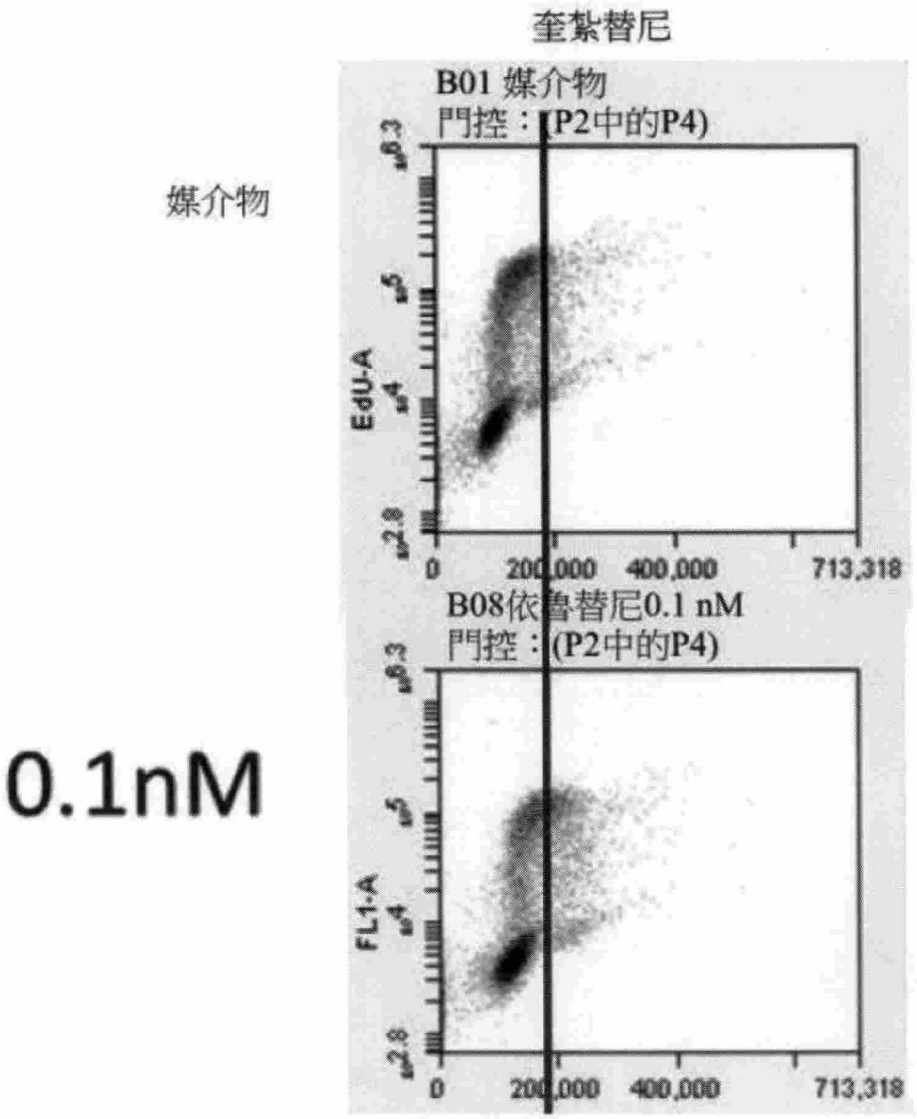
【圖 19(續)】


依魯替尼
媒介物
0.1nM
B01 媒介物
門控：(P2中的P4)
B05依魯替尼0.1 nM
門控：(P2中的P4)
EdU-A
FL1-A
0
200,000
400,000
713,318

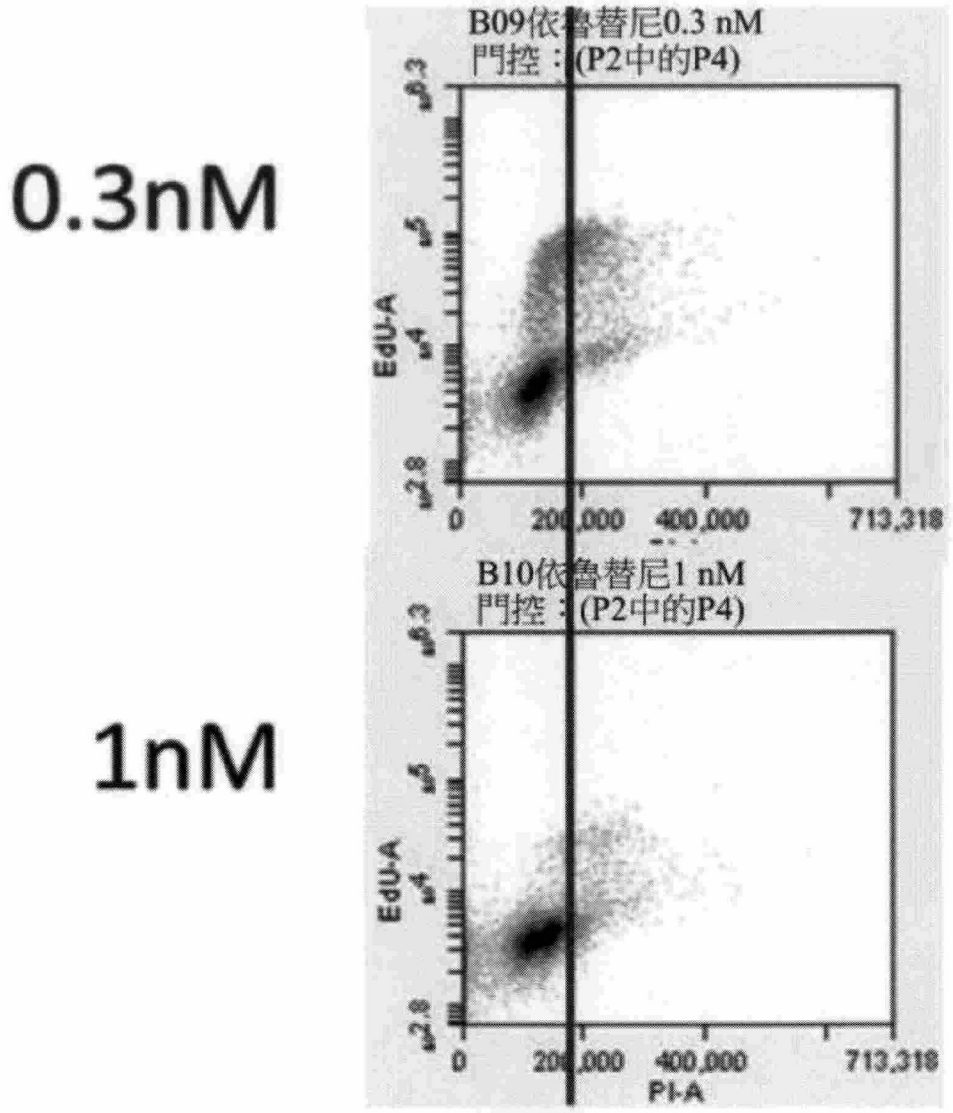
【圖 19(續)】


依魯替尼
0.3nM
1nM
B06依魯替尼0.3 nM
門控：(P2中的P4)
B07依魯替尼1 nM
門控：(P2中的P4)
EdU-A
PI-A
0
200,000
400,000
713,318

【圖 19(續)】

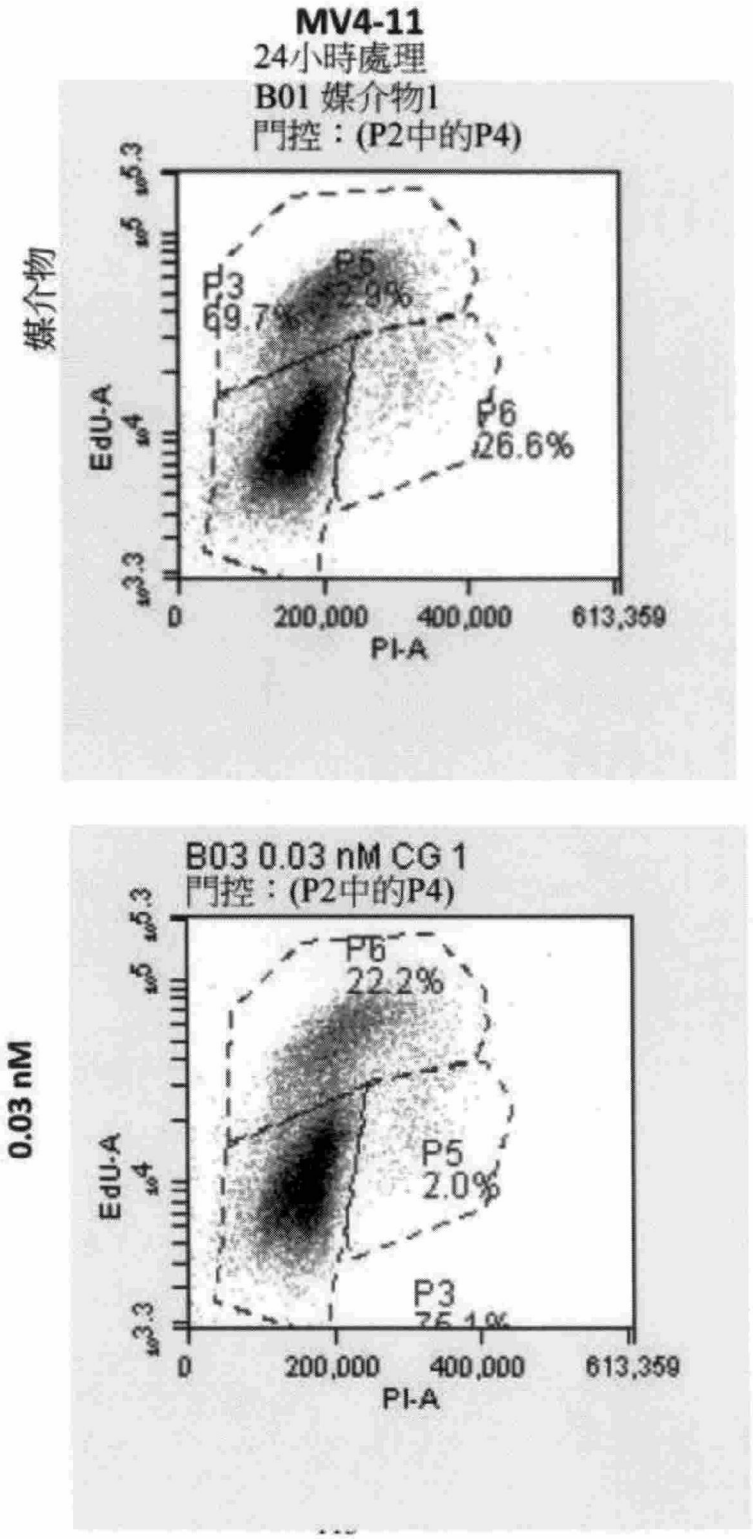

奎紮替尼
媒介物
0.1nM
B01 媒介物
門控：(P2中的P4)
EdU-A
0
200,000
400,000
713,318
B08依魯替尼0.1 nM
門控：(P2中的P4)
FL1-A
0
200,000
400,000
713,318

【圖 19(續)】


0.3nM
B09依魯替尼0.3 nM
門控：(P2中的P4)
EdU-A
PI-A
0
400,000
713,318
1nM
B10依魯替尼1 nM
門控：(P2中的P4)
EdU-A
PI-A
0
400,000
713,318

【圖 19(續)】

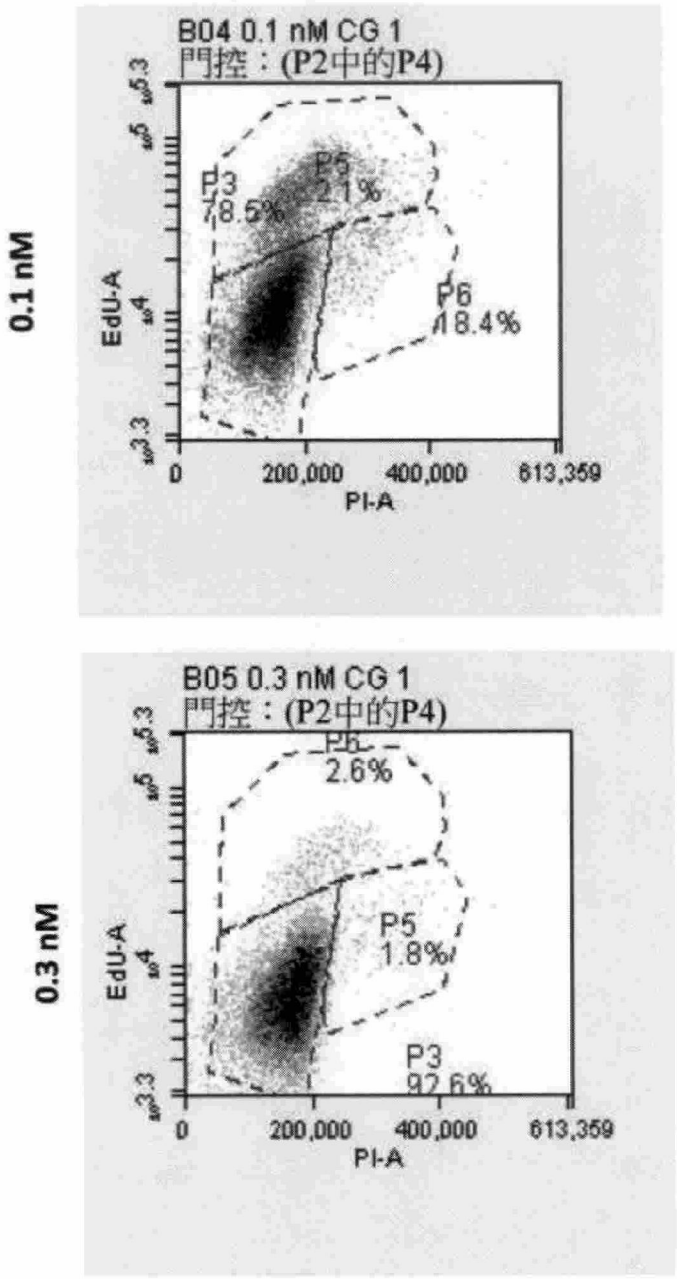
A


MV4-11
24小時處理
B01 媒介物1
門控：(P2中的P4)
媒介物
P3
69.7%
P5
2.9%
P6
26.6%
EdU-A
PI-A
0
200,000
400,000
613,359
B03 0.03 nM CG 1
門控：(P2中的P4)
0.03 nM
P6
22.2%
P5
2.0%
P3

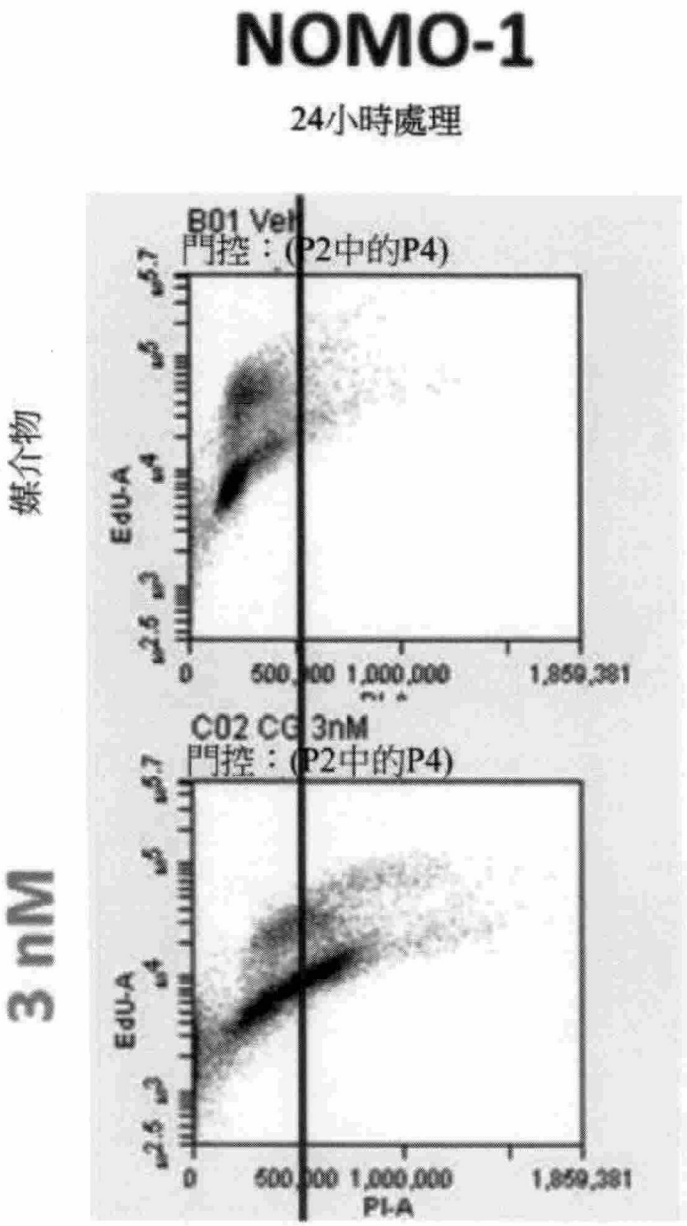
【圖 20】

MV4-11

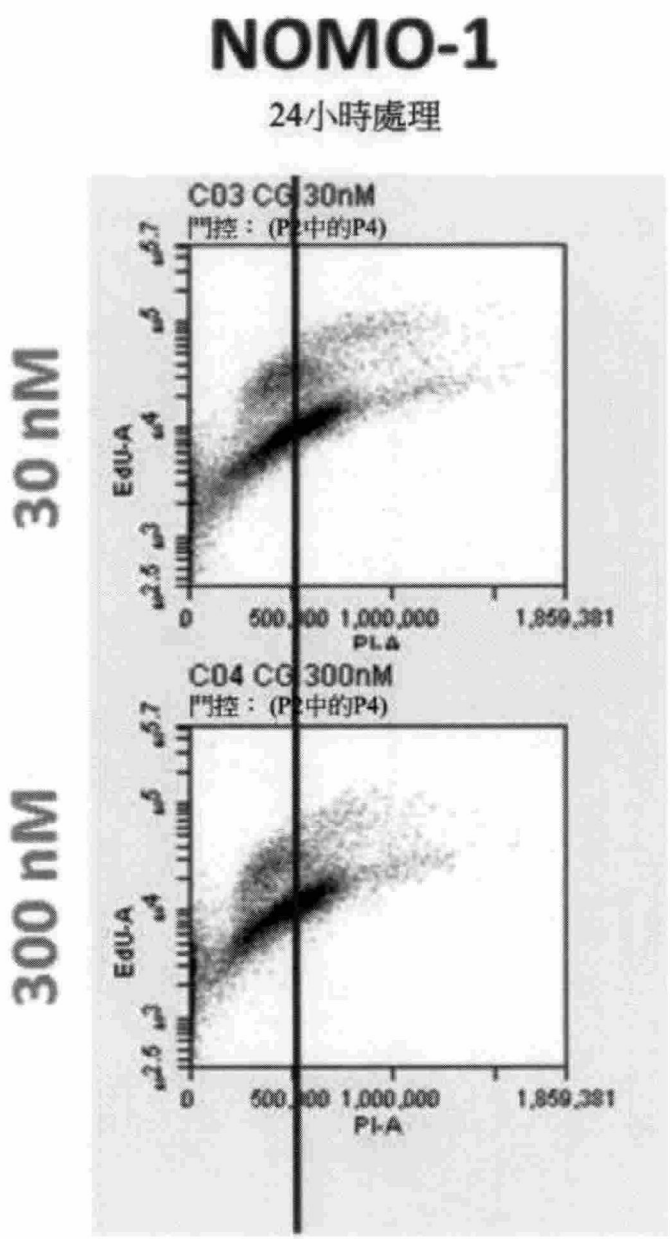
24小時處理



【圖 20(續)】


NOMO-1
24小時處理
B
媒介物
3 nM
B01 Veh
門控：(P2中的P4)
C02 CG 3nM
門控：(P2中的P4)
EdU-A
PI-A
0
500,000
1,000,000
1,859,381

【圖 20(續)】

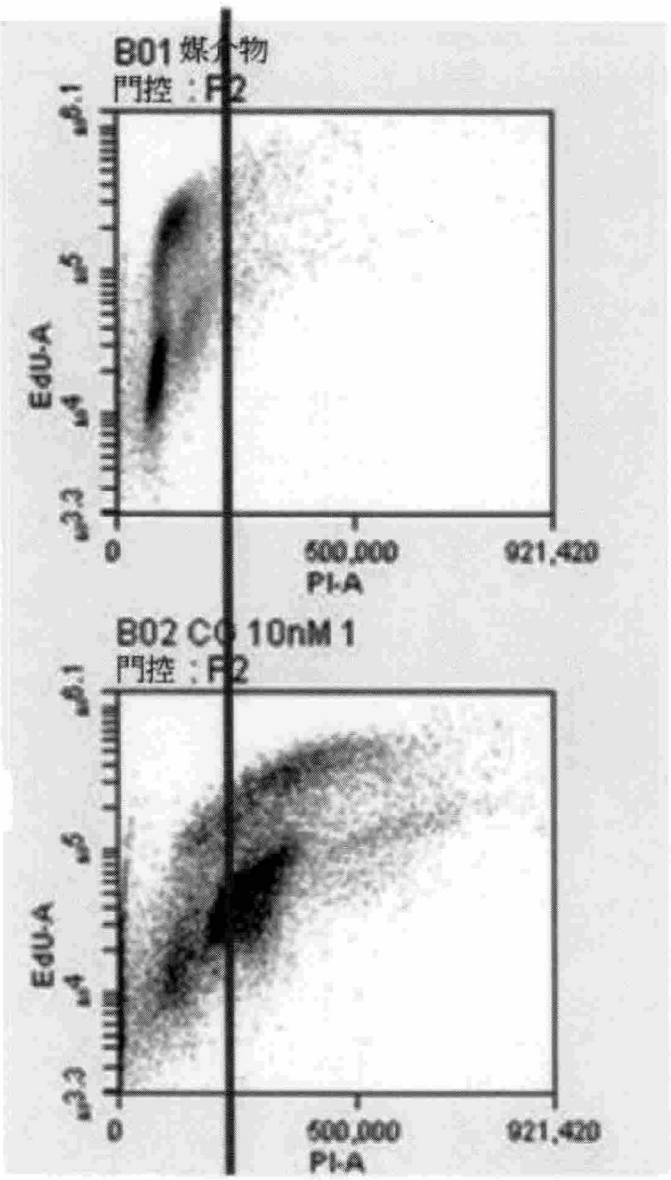

NOMO-1
24小時處理
30 nM
300 nM
C03 CG 30nM
門控： (P2中的P4)
C04 CG 300nM
門控： (P2中的P4)
EdU-A
PI-A
0
500,000
1,000,000
1,859,381

【圖 20(續)】

KG-1

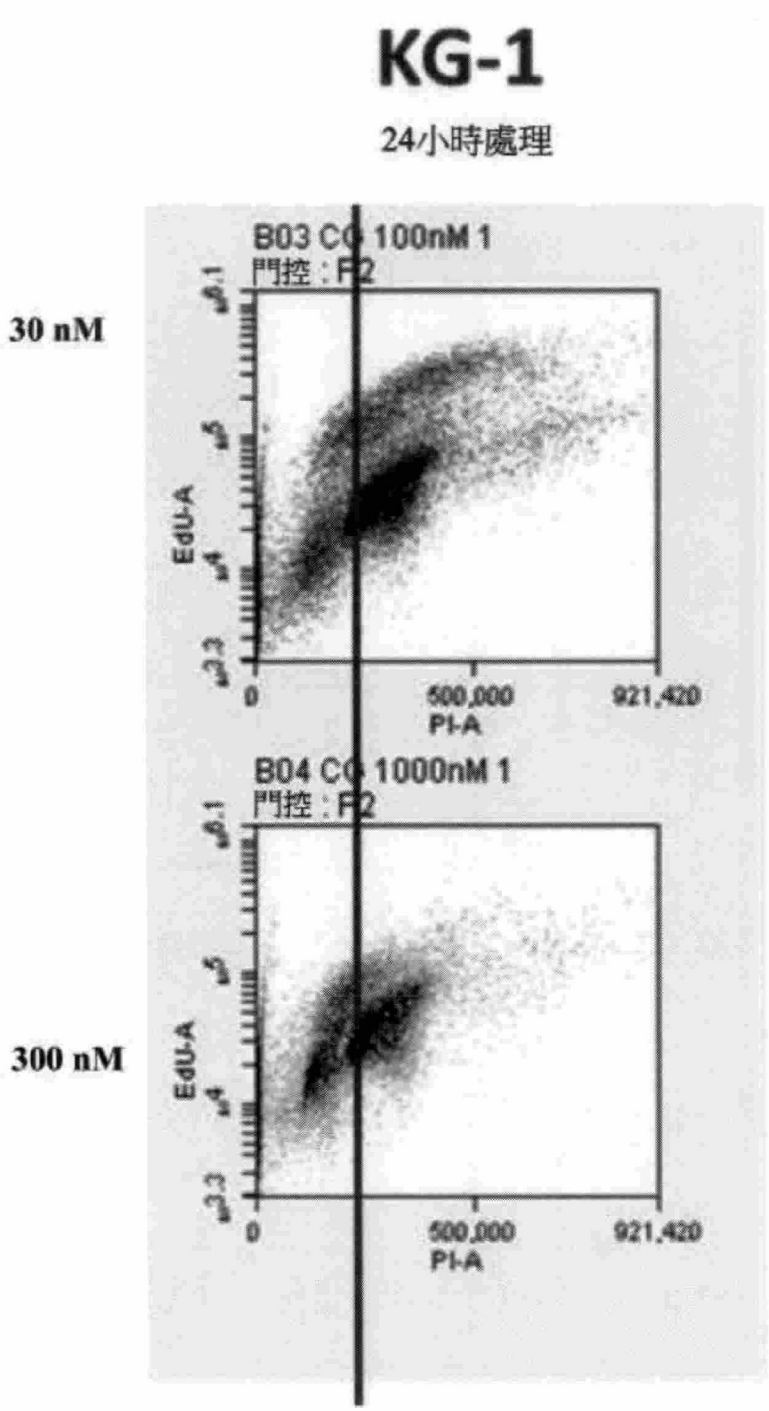
24小時處理

媒介物



3 nM

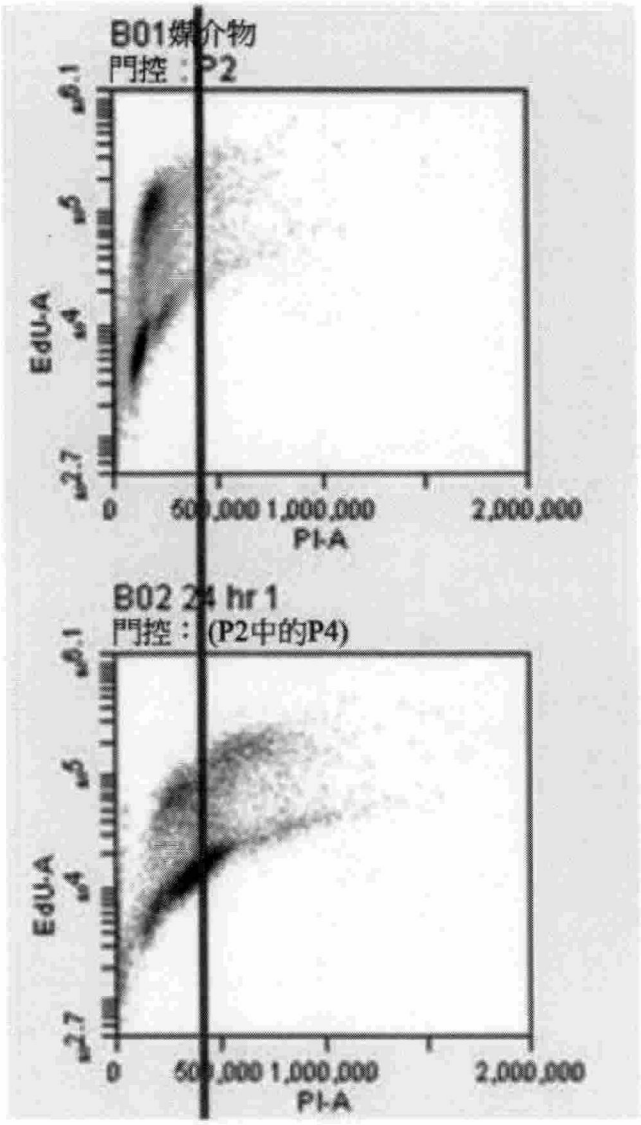
【圖 20(續)】


KG-1
24小時處理
30 nM
B03 CC 100nM 1
門控 : P2
EdU-A
PI-A
0
500,000
921,420
300 nM
B04 CC 1000nM 1
門控 : P2
EdU-A
PI-A
0
500,000
921,420

【圖 20(續)】

KG-1

100nM 處理



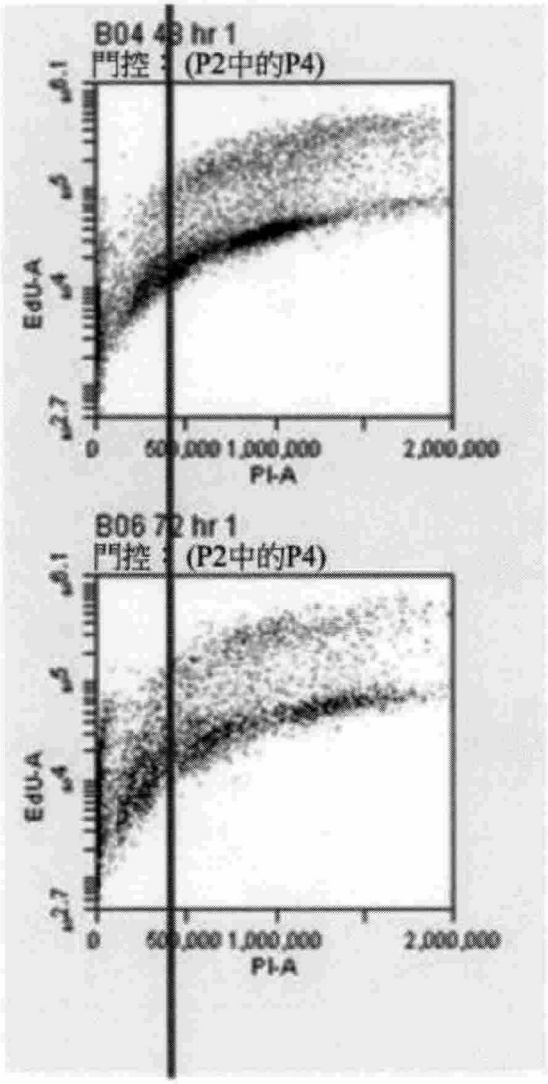
媒介物

24小時

【圖 20(續)】

KG-1

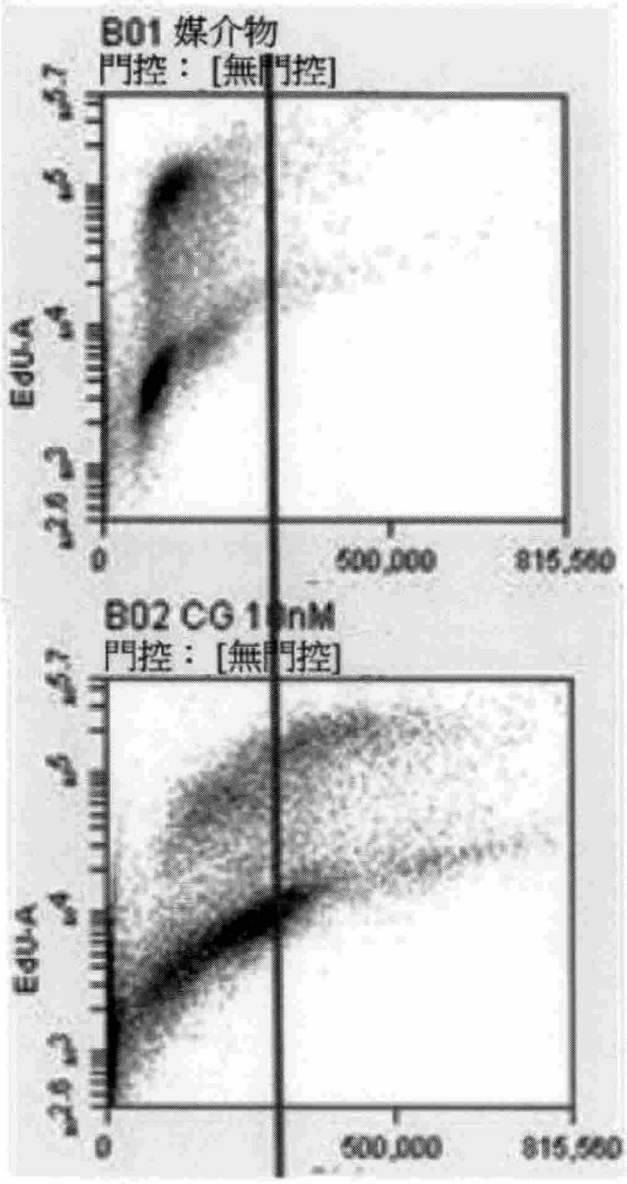
100nM 處理



【圖 20(續)】

化合物7

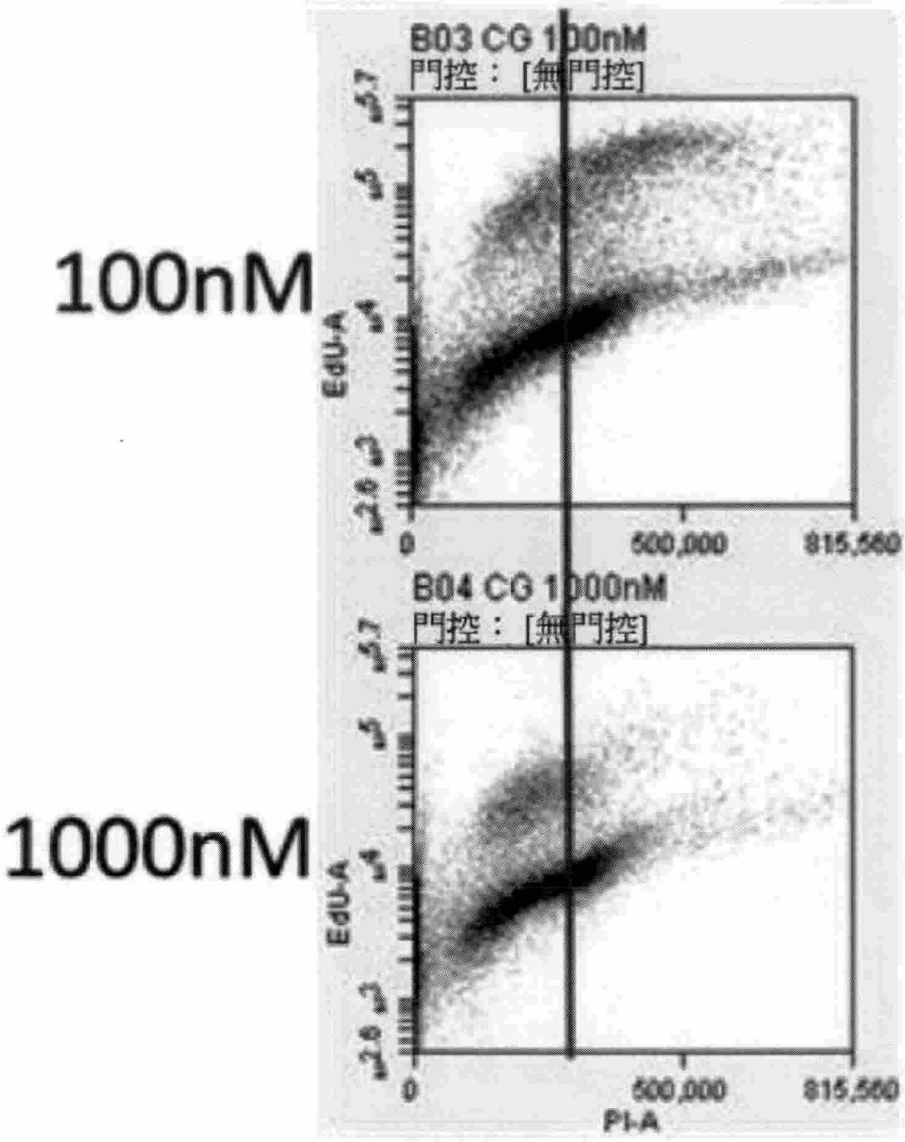
媒介物



10nM

【圖 21】

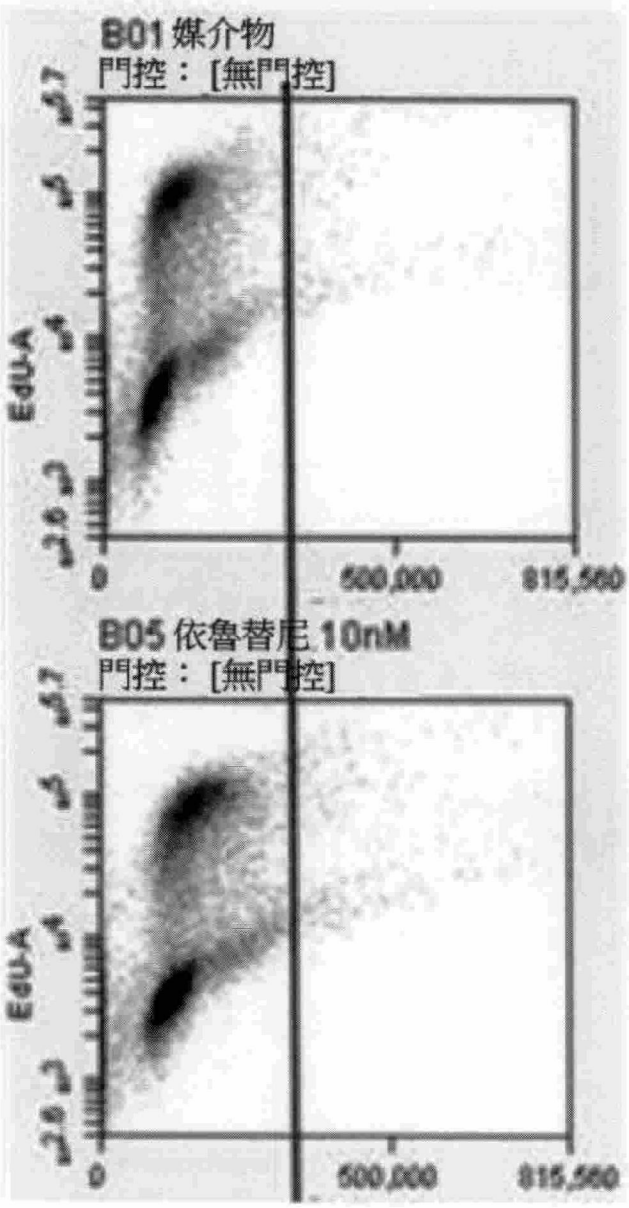
化合物7


100nM
B03 CG 100nM
門控：[無門控]
EdU-A
PI-A
0
500,000
815,560
1000nM
B04 CG 1000nM
門控：[無門控]
EdU-A
PI-A
0
500,000
815,560

【圖 21(續)】

依魯替尼

媒介物

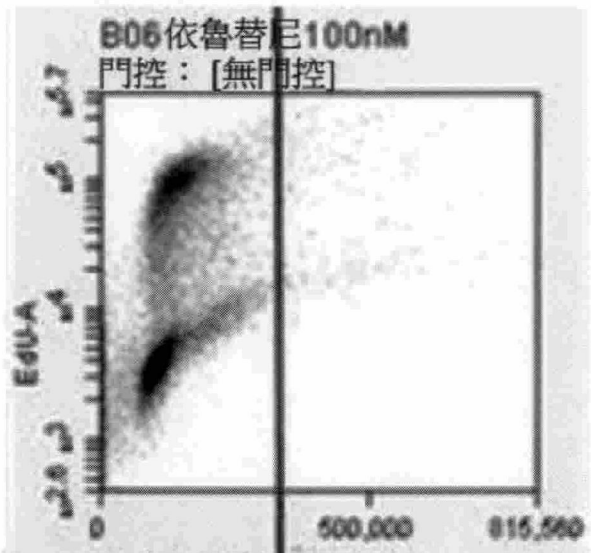


10nM

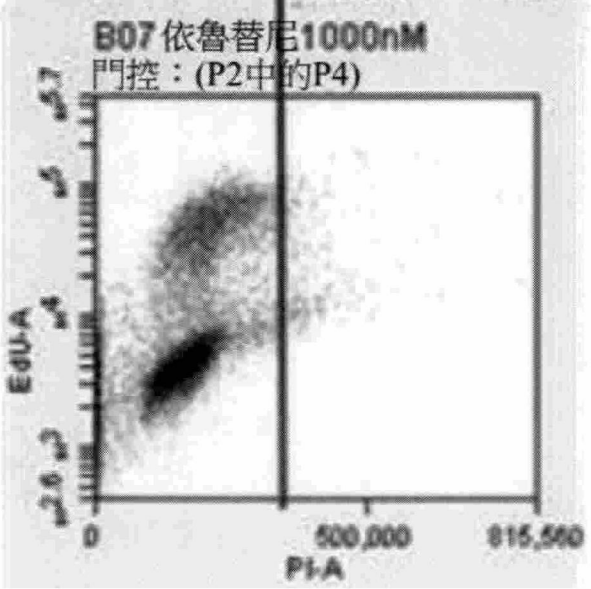
【圖 21(續)】

依魯替尼

100nM



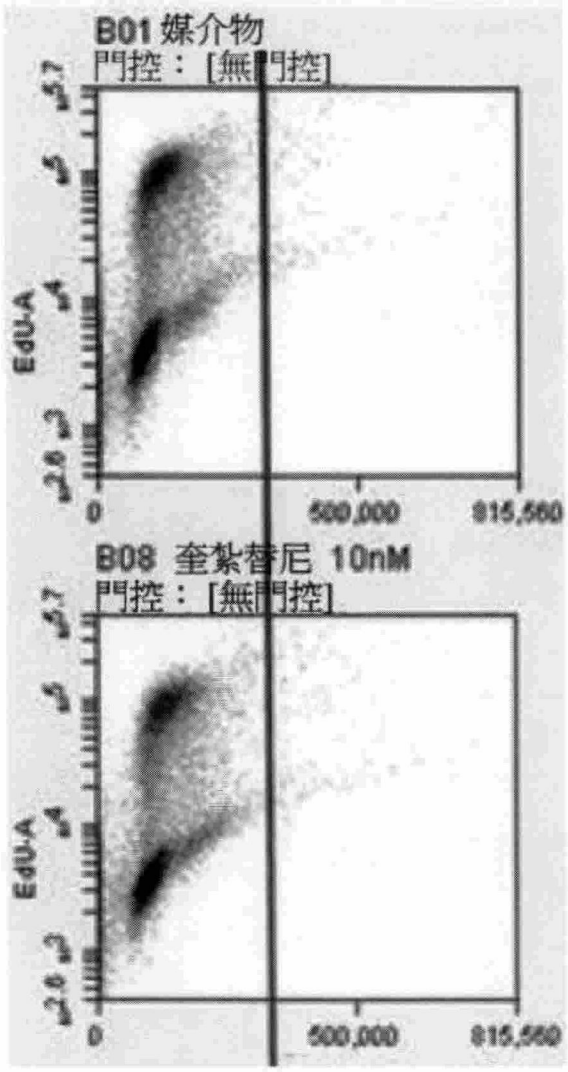
1000nM



【圖 21(續)】

奎紮替尼

媒介物



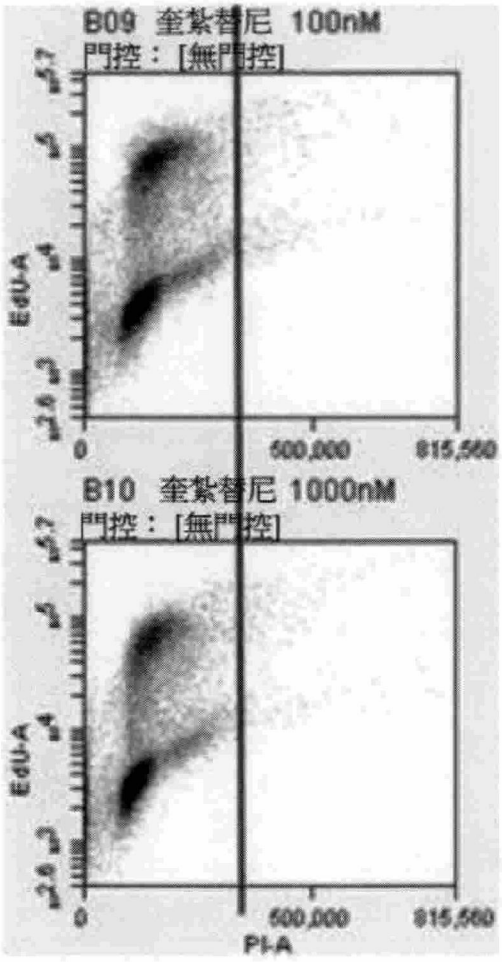
10nM

【圖 21(續)】

奎紮替尼

100nM

1000nM

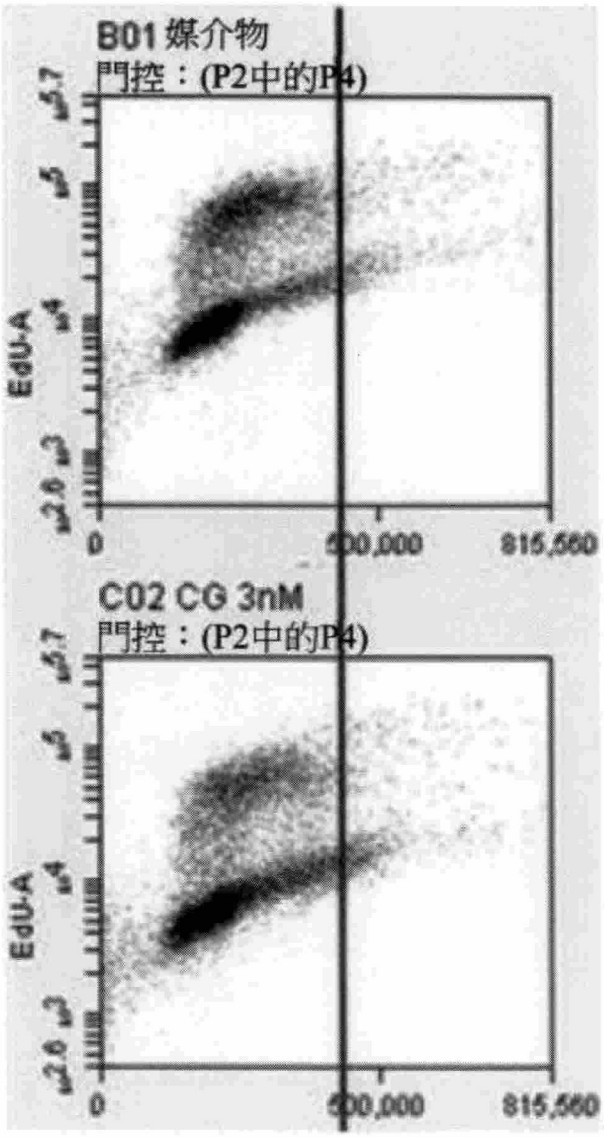


【圖 21(續)】

化合物7

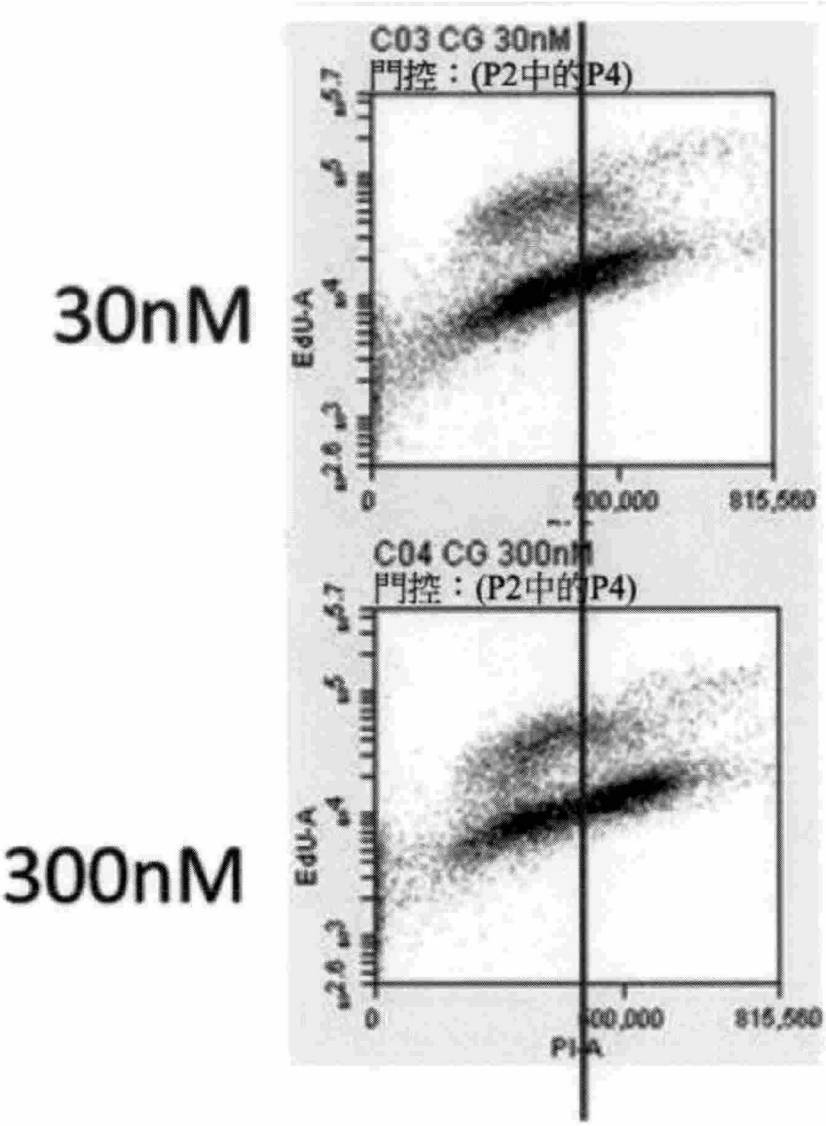
媒介物

3nM

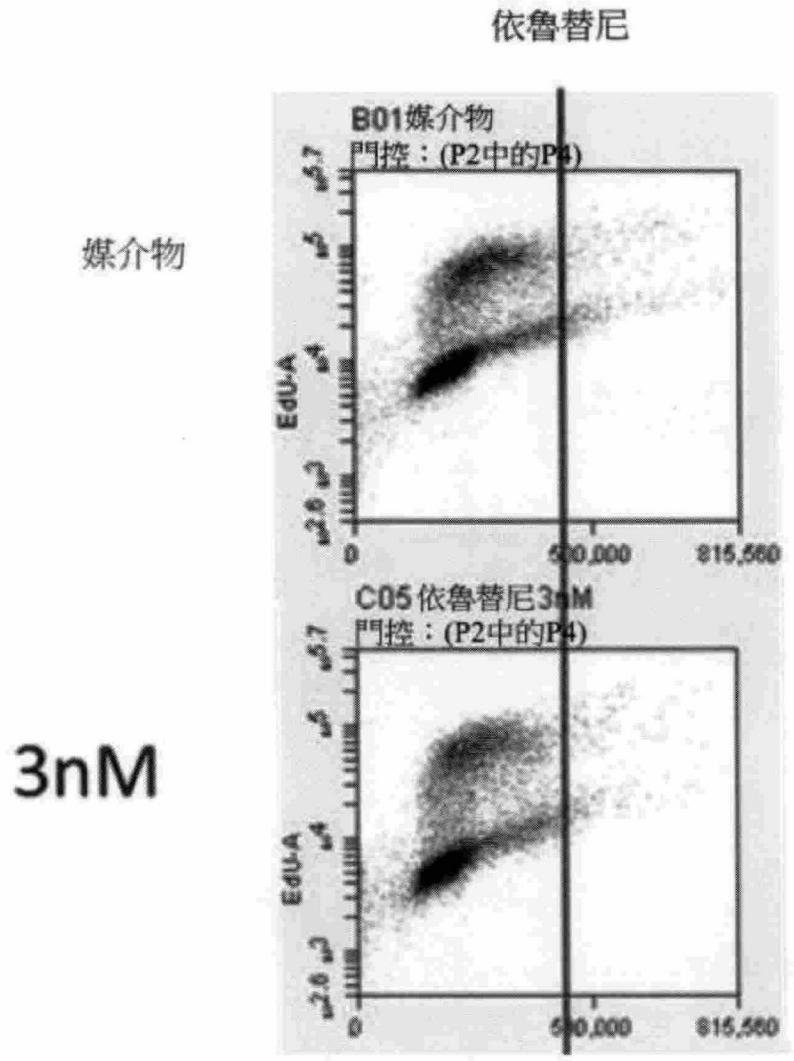


【圖 22】

化合物7


30nM
C03 CG 30nM
門控：(P2中的P4)
EdU-A
0
500,000
815,560
300nM
C04 CG 300nM
門控：(P2中的P4)
EdU-A
0
500,000
815,560
PI-A

【圖 22(續)】

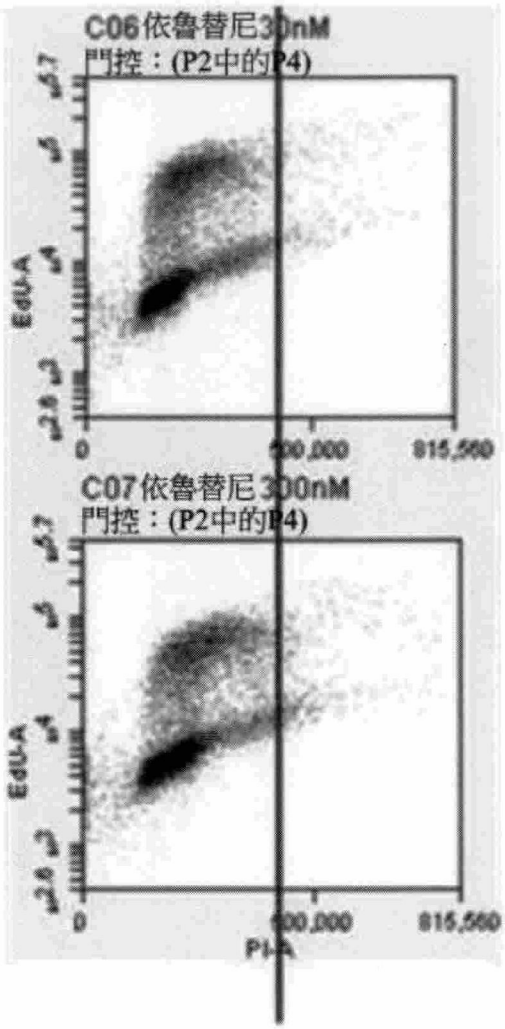

依魯替尼
媒介物
3nM
B01媒介物
門控：(P2中的P4)
C05依魯替尼3nM
門控：(P2中的P4)
EdU-A
0
500,000
815,560

【圖 22(續)】

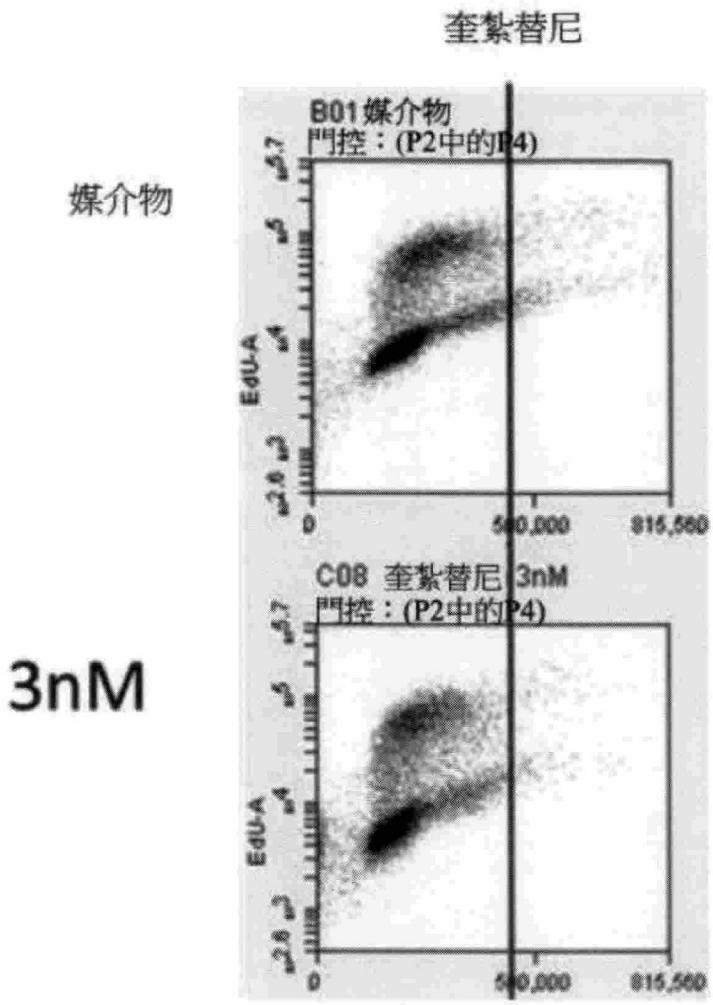
依魯替尼

30nM

300nM



【圖 22(續)】

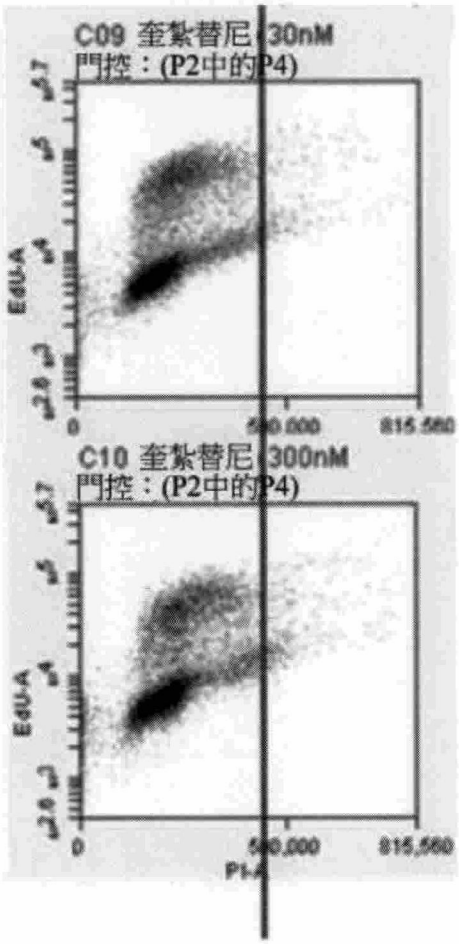

奎紮替尼
媒介物
3nM
B01 媒介物
門控：(P2中的P4)
C08 奎紮替尼 3nM
門控：(P2中的P4)
EdU-A
0
560,000
815,560

【圖 22(續)】

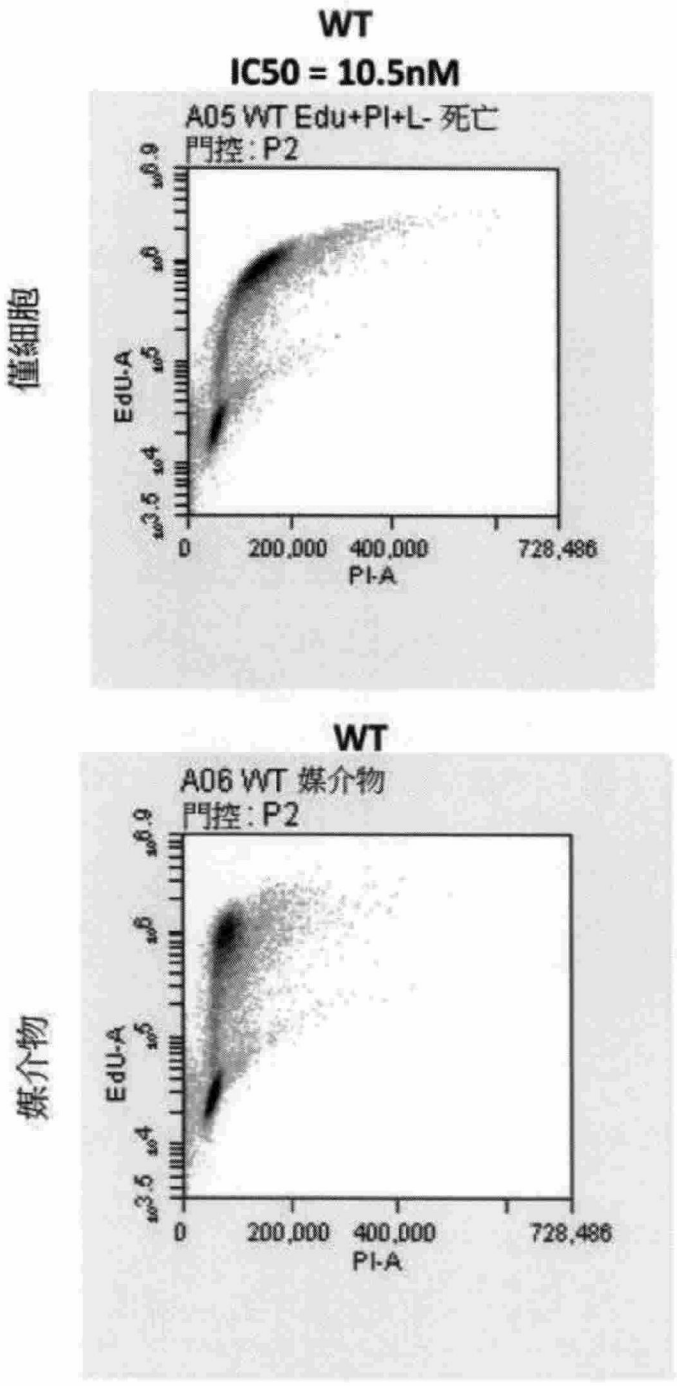
奎紮替尼

30nM

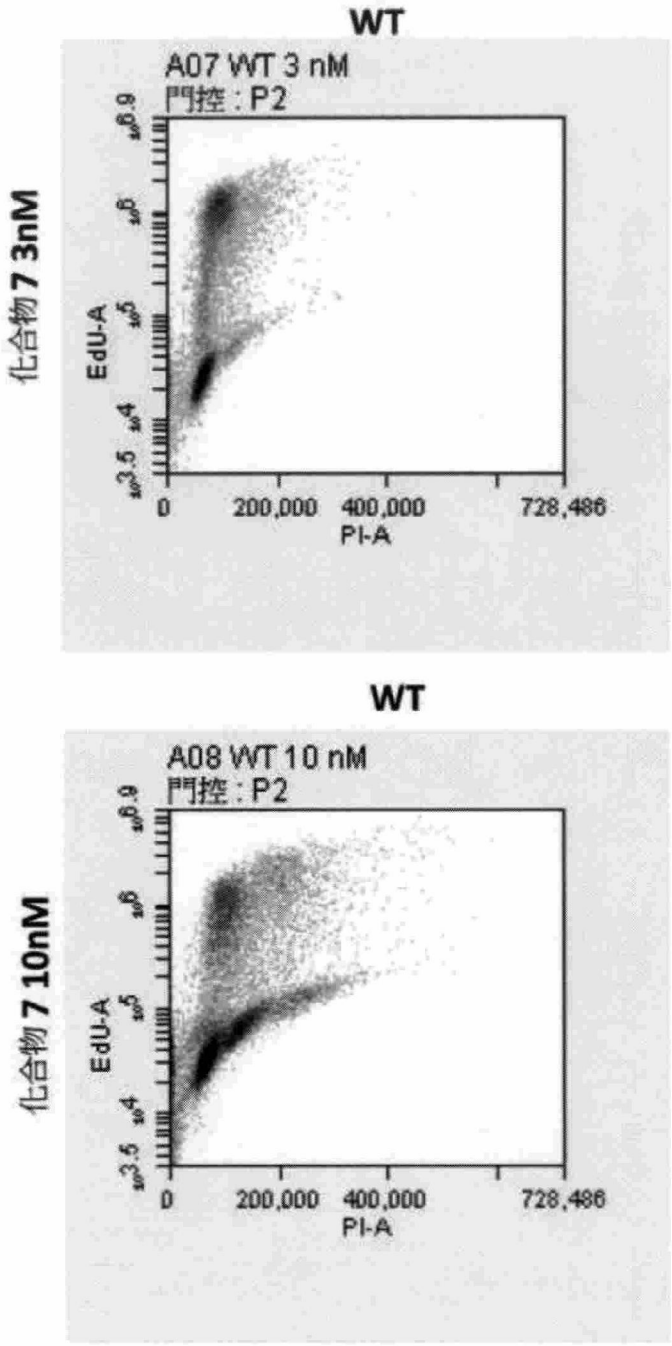
300nM



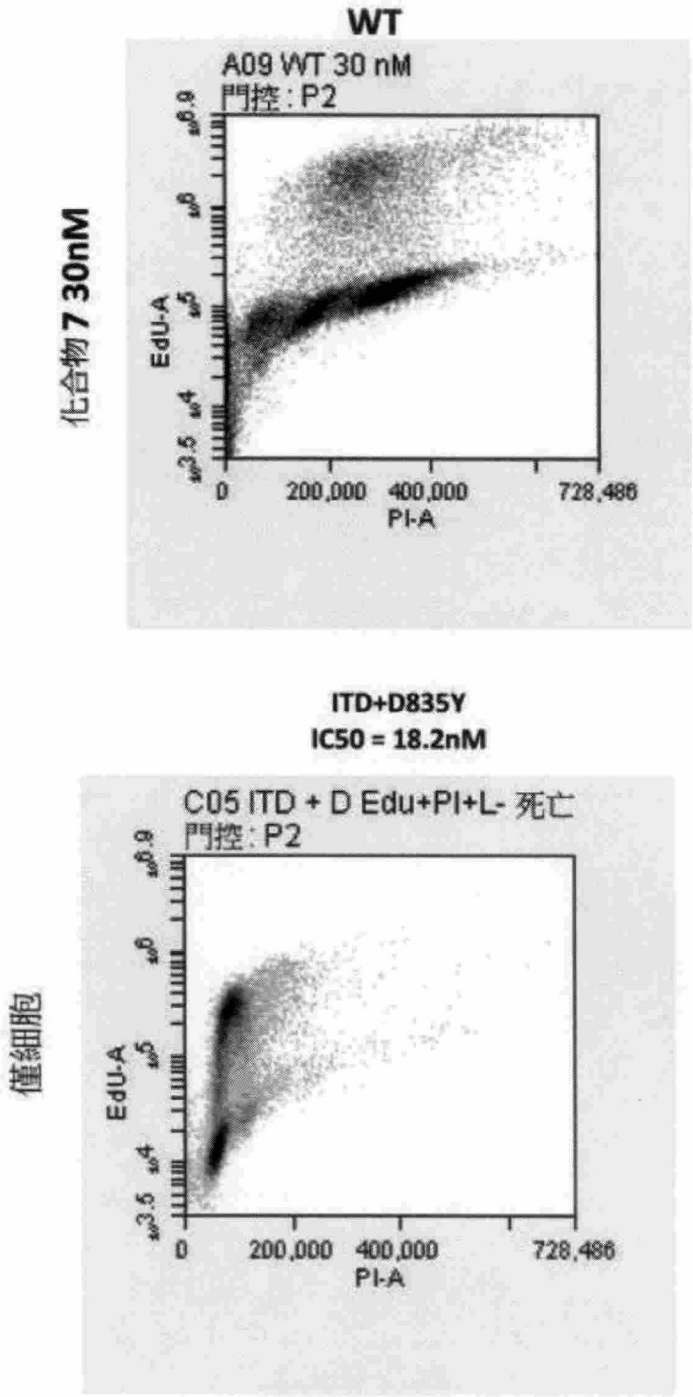
【圖 22(續)】


WT
IC50 = 10.5nM
A05 WT Edu+PI+L- 死亡
門控 : P2
僅細胞
EdU-A
PI-A
0
200,000
400,000
728,486
WT
A06 WT 媒介物
門控 : P2
媒介物
EdU-A
PI-A
0
200,000
400,000
728,486

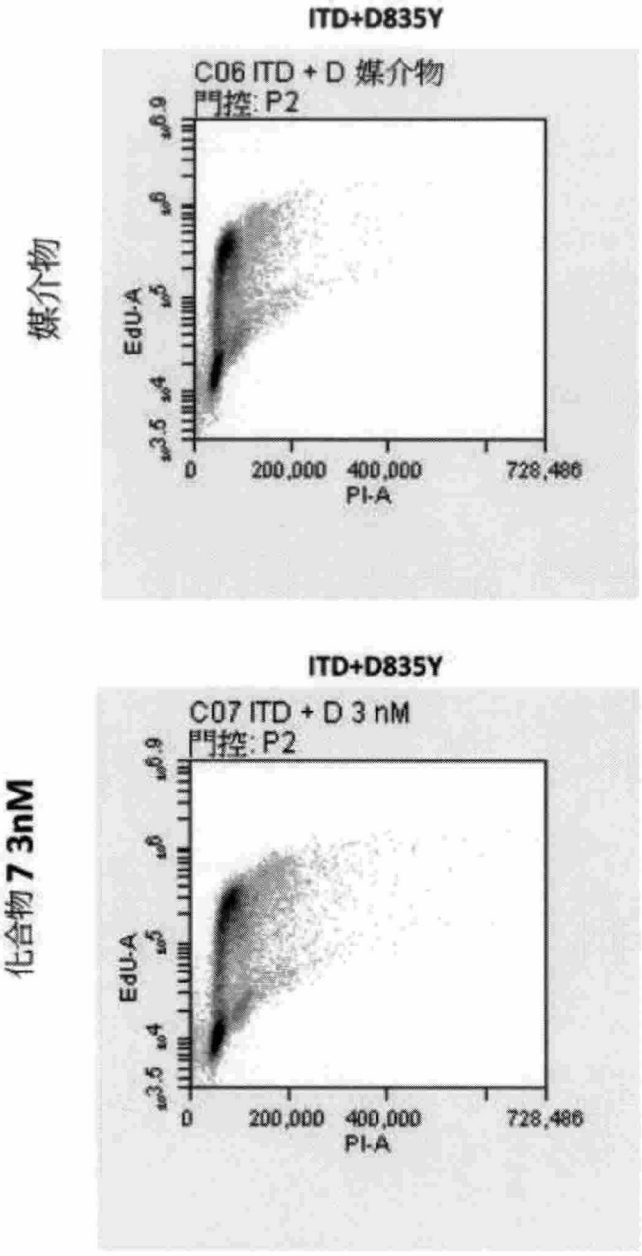
【圖 23】


WT
A07 WT 3 nM
門控 : P2
化合物 7 3nM
EdU-A
PI-A
0
200,000
400,000
728,486
WT
A08 WT 10 nM
門控 : P2
化合物 7 10nM
EdU-A
PI-A
0
200,000
400,000
728,486

【圖 23(續)】

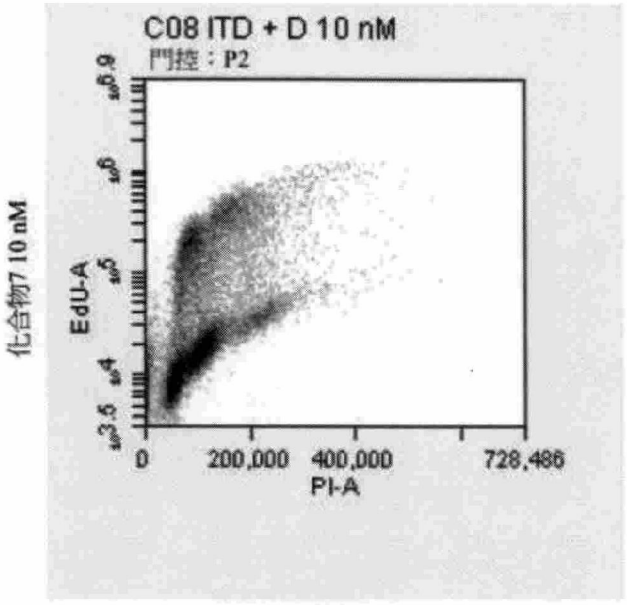

WT
A09 WT 30 nM
門控 : P2
化合物 7 30nM
EdU-A
PI-A
0
200,000
400,000
728,486
ITD+D835Y
IC50 = 18.2nM
C05 ITD + D Edu+PI+L- 死亡
門控 : P2
僅細胞
EdU-A
PI-A
0
200,000
400,000
728,486

【圖 23(續)】

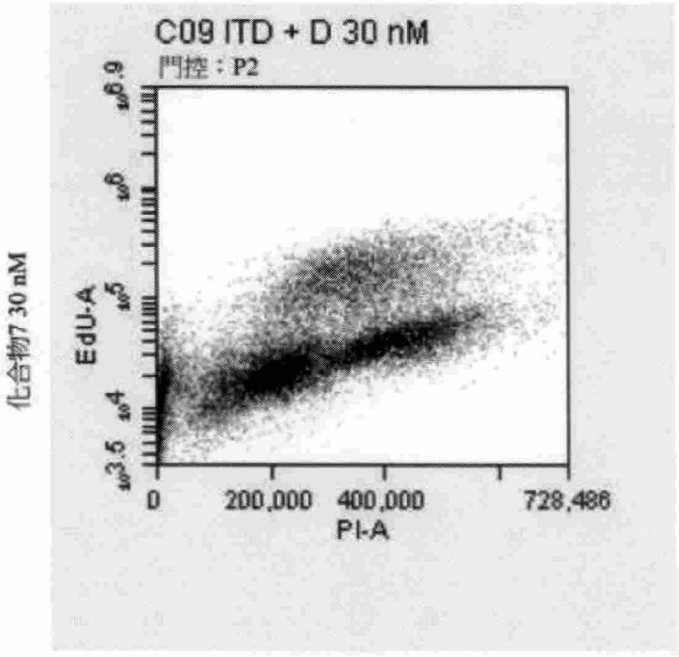

ITD+D835Y
C06 ITD + D 媒介物
門控: P2
媒介物
EdU-A
PI-A
0
200,000
400,000
728,486
ITD+D835Y
C07 ITD + D 3 nM
門控: P2
化合物 7 3nM
EdU-A
PI-A
0
200,000
400,000
728,486

【圖 23(續)】

ITD+D835Y

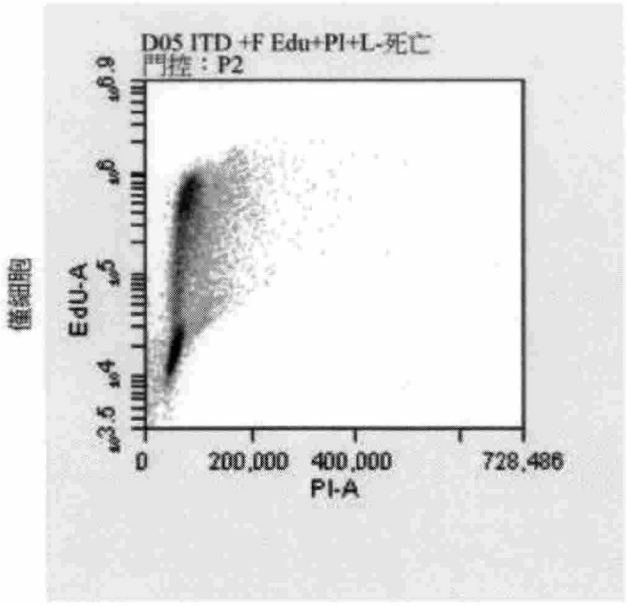


ITD+D835Y

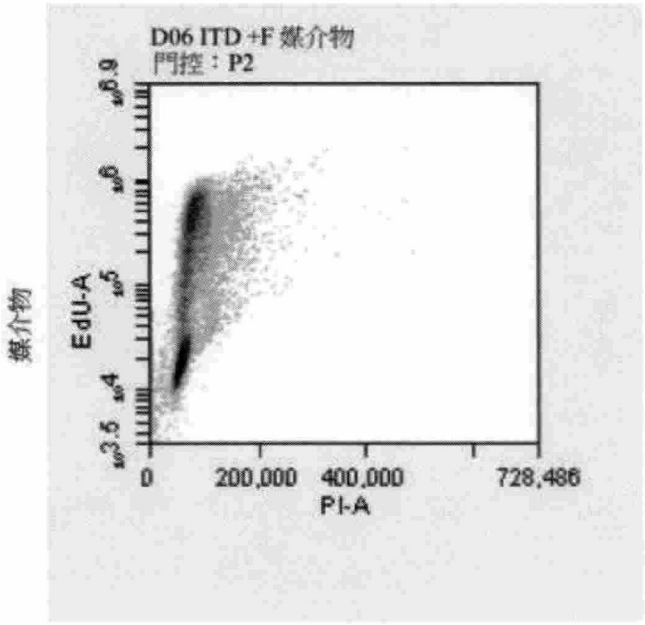


【圖 23(續)】

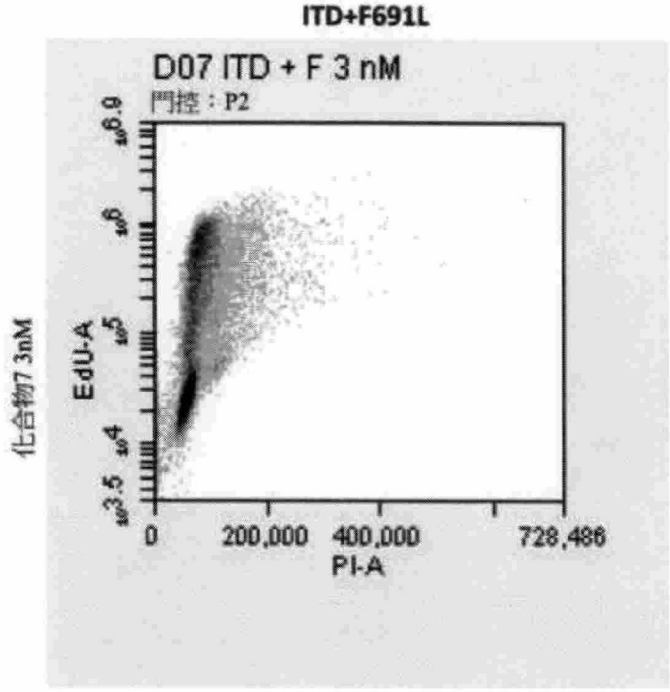
ITD+F691L
IC50 = 10nM

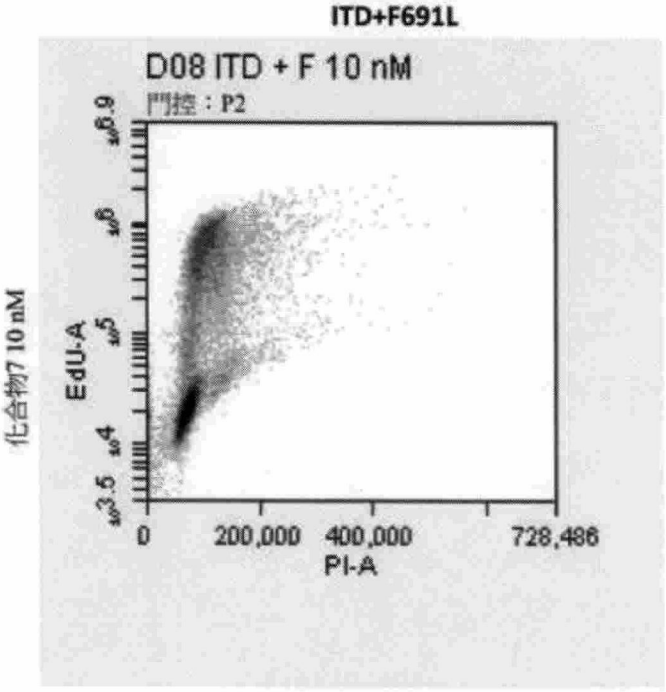


ITD+F691L

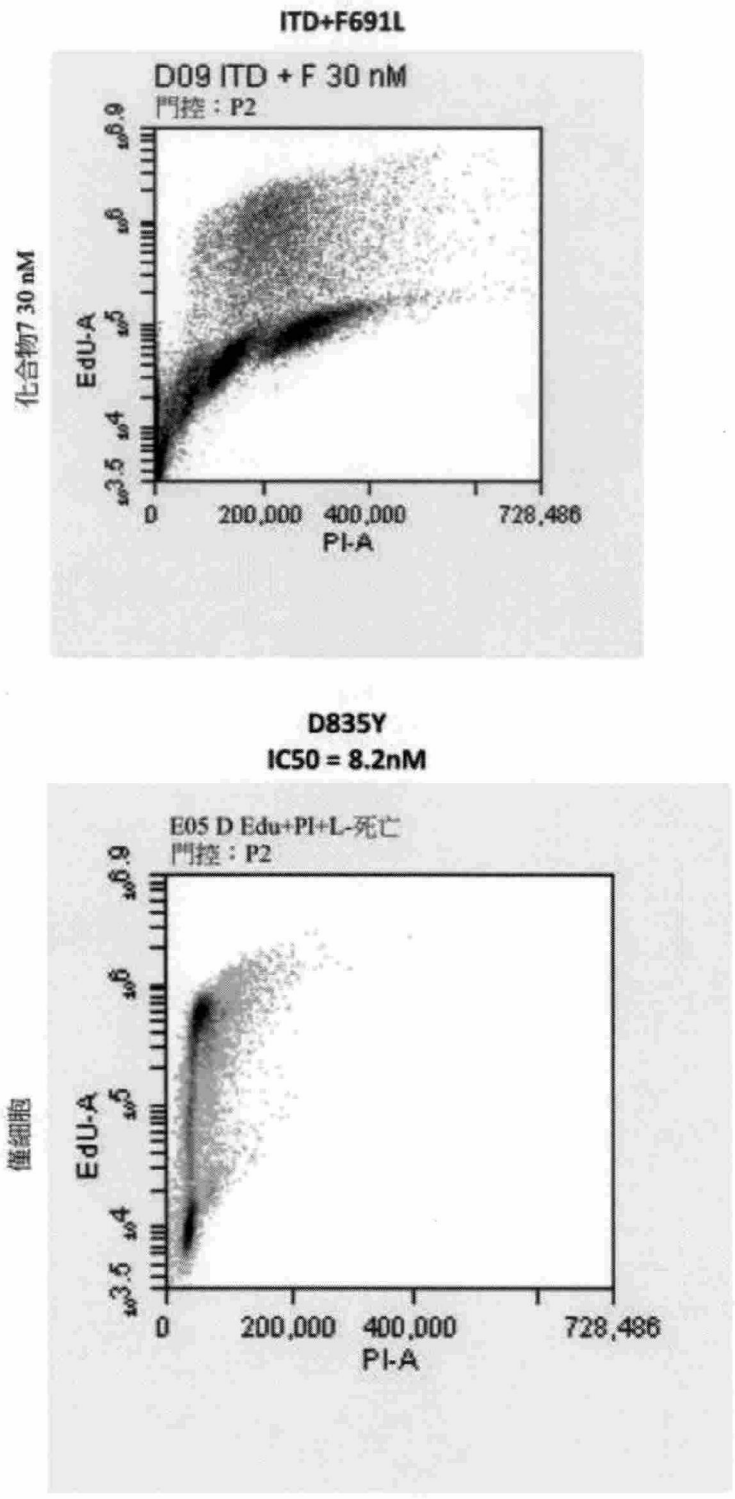


【圖 23(續)】

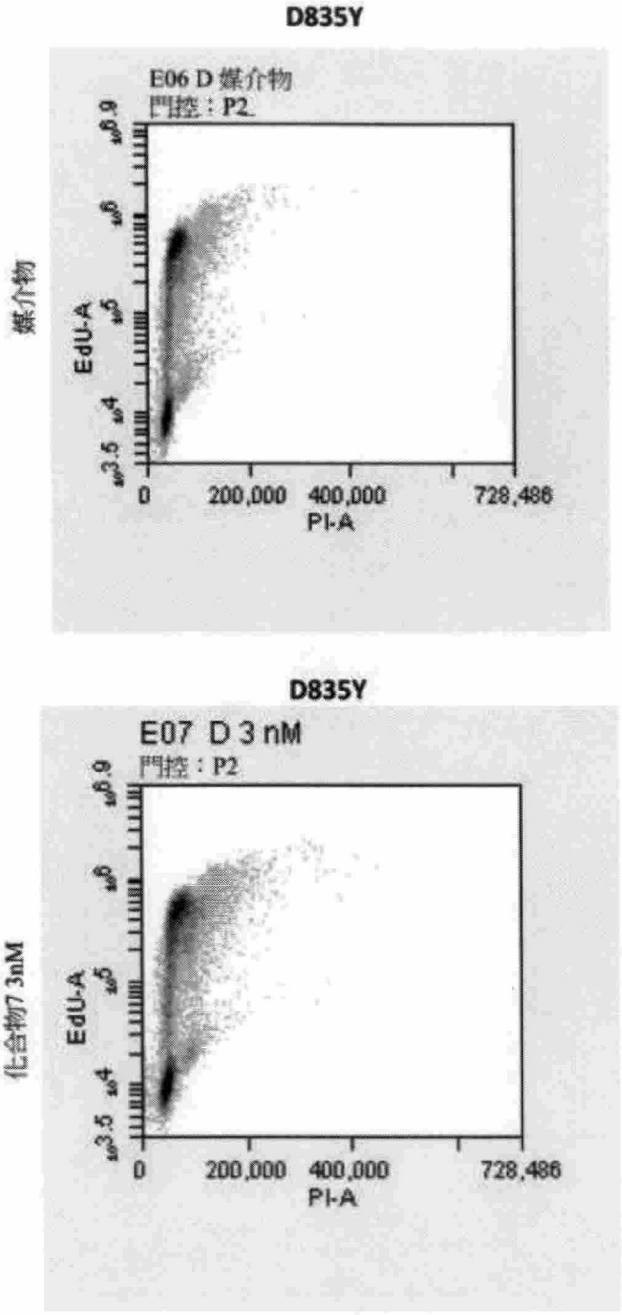

ITD+F691L
D07 ITD + F 3 nM
門控：P2
化合物7 3nM
EdU-A
PI-A
0
200,000
400,000
728,486


ITD+F691L
D08 ITD + F 10 nM
門控：P2
化合物7 10 nM
EdU-A
PI-A
0
200,000
400,000
728,486

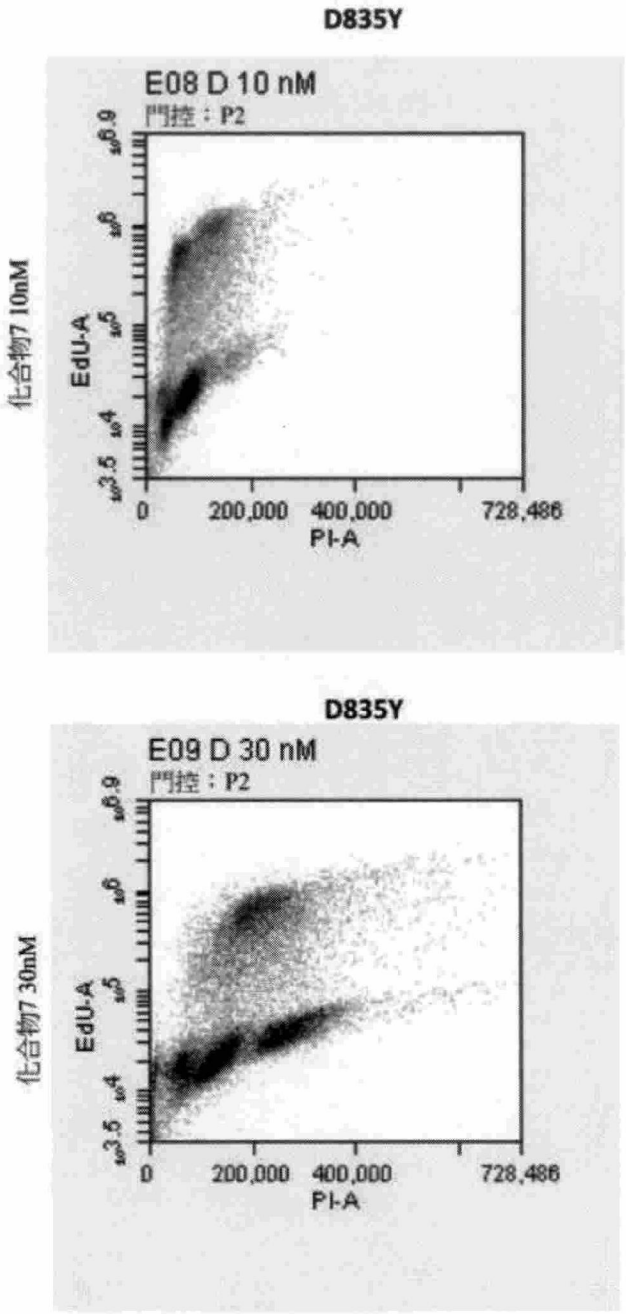
【圖 23(續)】


ITD+F691L
D09 ITD + F 30 nM
門控：P2
化合物7 30 nM
EdU-A
PI-A
0
200,000
400,000
728,486
D835Y
IC50 = 8.2nM
E05 D Edu+PI+L-死亡
門控：P2
僅細胞
EdU-A
PI-A
0
200,000
400,000
728,486

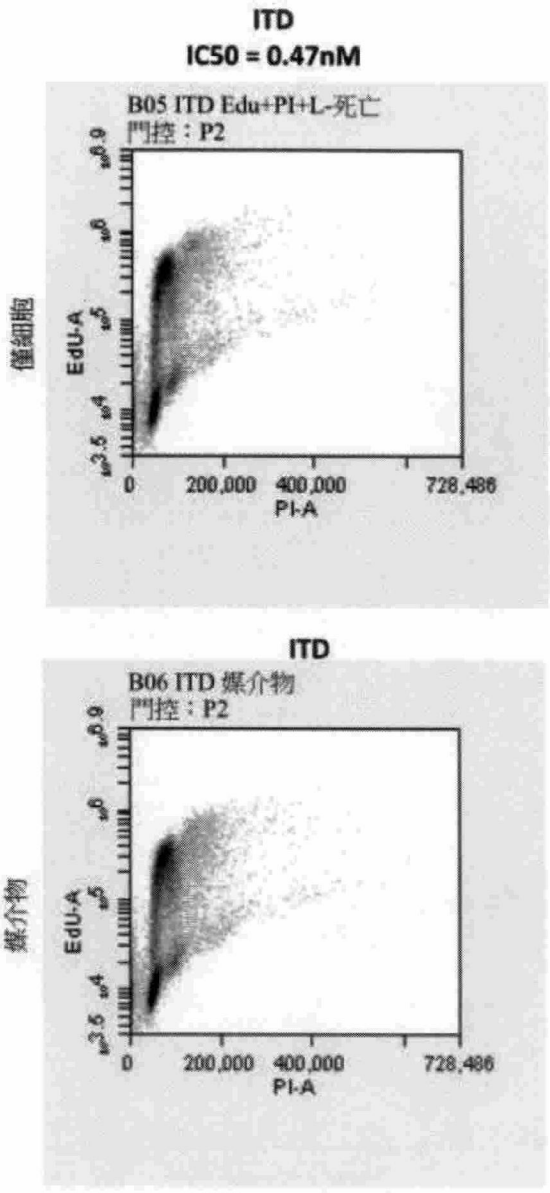
【圖 23(續)】


D835Y
E06 D 媒介物
閂控 : P2
媒介物
EdU-A
PI-A
0
200,000
400,000
728,486
D835Y
E07 D 3 nM
閂控 : P2
化合物7 3nM
EdU-A
PI-A
0
200,000
400,000
728,486

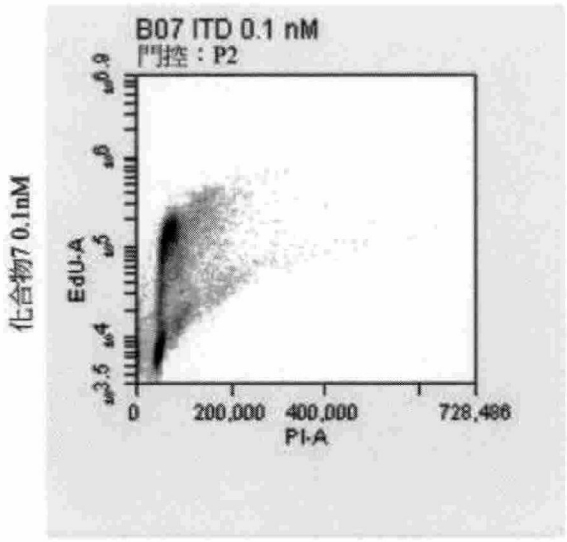
【圖 23(續)】

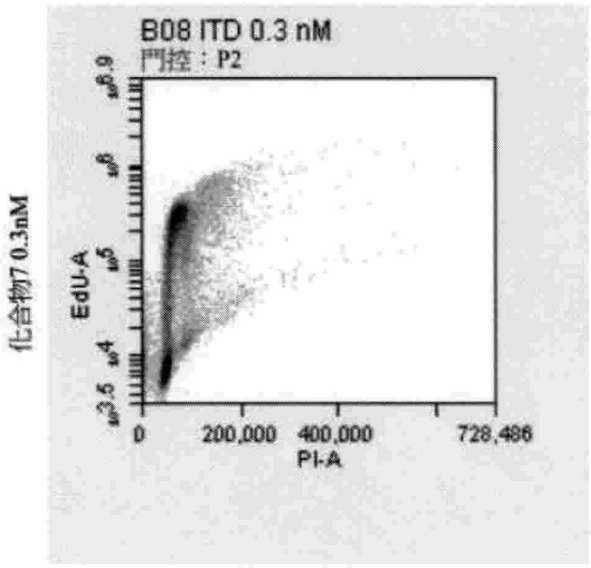

D835Y
E08 D 10 nM
門控：P2
化合物7 10nM
EdU-A
PI-A
0
200,000
400,000
728,486
D835Y
E09 D 30 nM
門控：P2
化合物7 30nM
EdU-A
PI-A
0
200,000
400,000
728,486

【圖 23(續)】

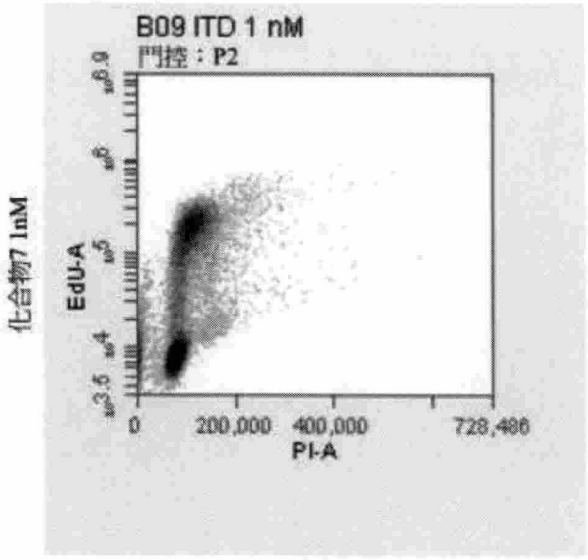

ITD
IC50 = 0.47nM
B05 ITD Edu+PI+L-死亡
門控：P2
僅細胞
EdU-A
PI-A
0
200,000
400,000
728,486
ITD
B06 ITD 媒介物
門控：P2
媒介物
EdU-A
PI-A
0
200,000
400,000
728,486

【圖 23(續)】

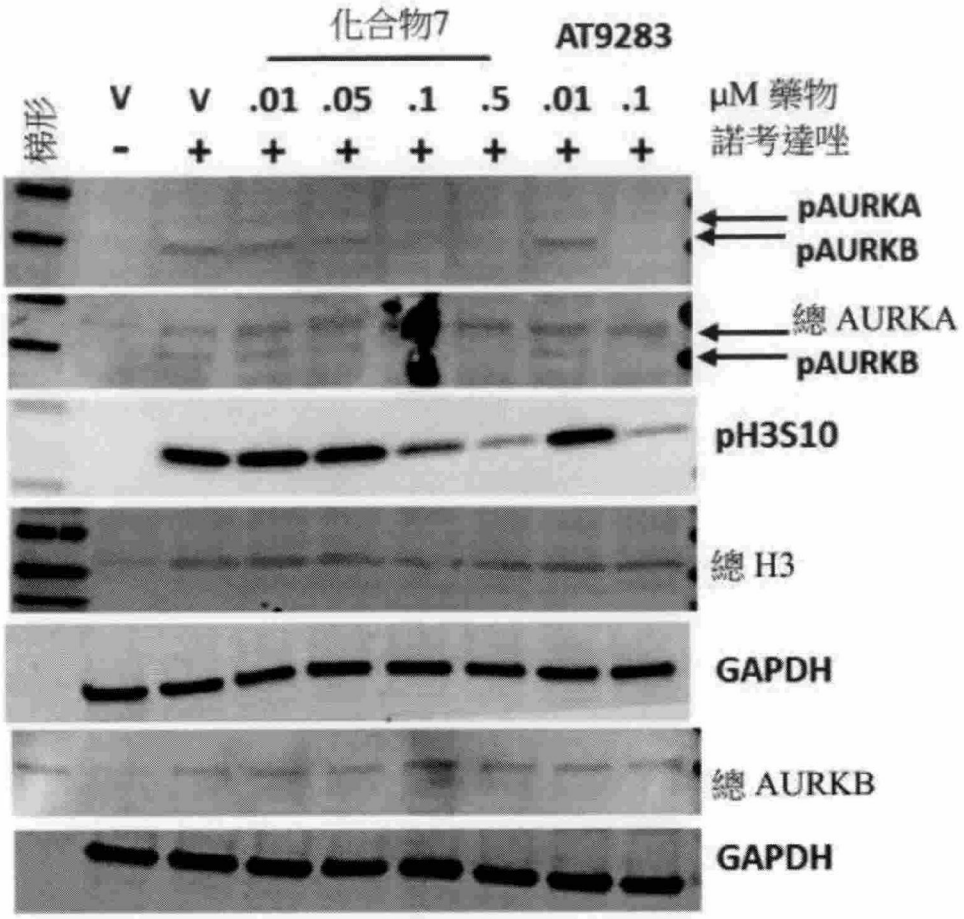

B07 ITD 0.1 nM
門控：P2
化合物7 0.1nM
EdU-A
PI-A
0
200,000
400,000
728,486


B08 ITD 0.3 nM
門控：P2
化合物7 0.3nM
EdU-A
PI-A
0
200,000
400,000
728,486

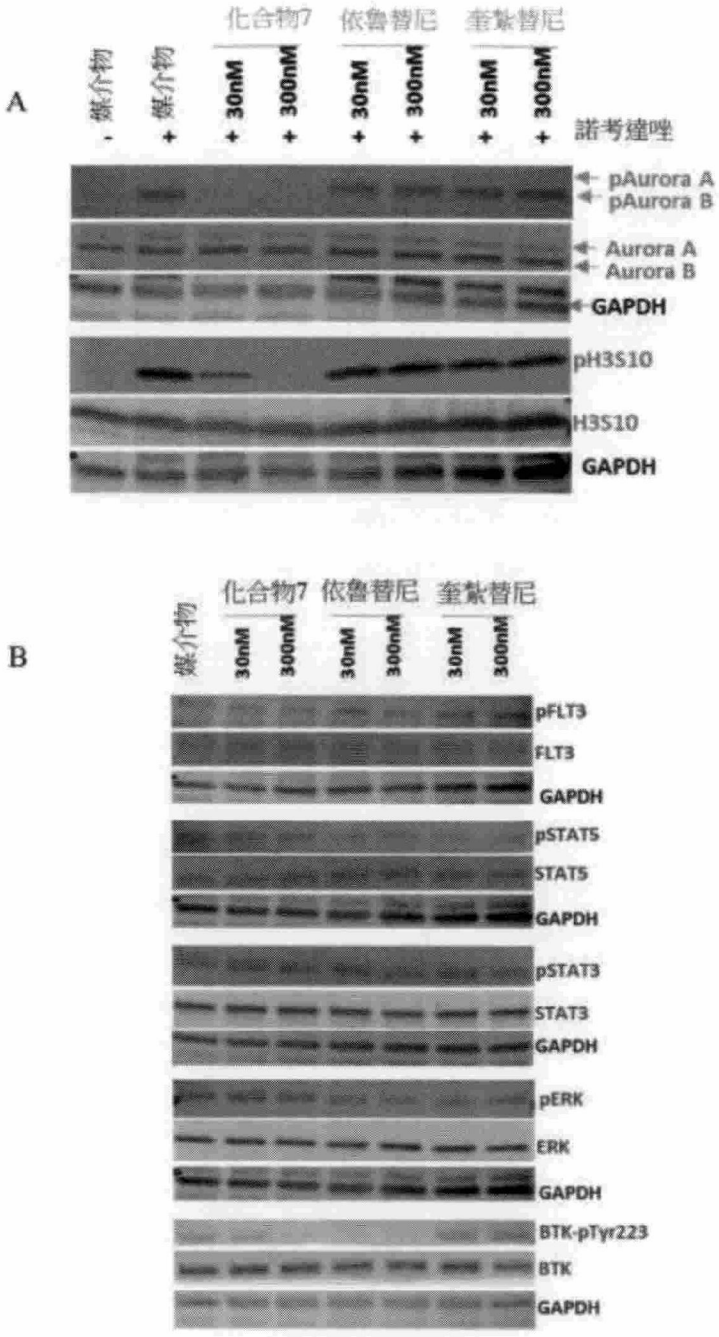
【圖 23(續)】



【圖 23(續)】

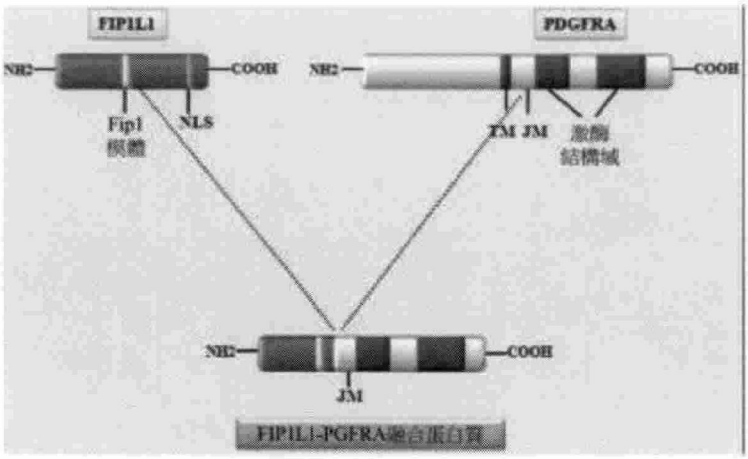

化合物7
AT9283
梯形
V V .01 .05 .1 .5 .01 .1
μM 藥物
- + + + + + + +
諾考達唑
pAURKA
pAURKB
總 AURKA
pAURKB
pH3S10
總 H3
GAPDH
總 AURKB
GAPDH

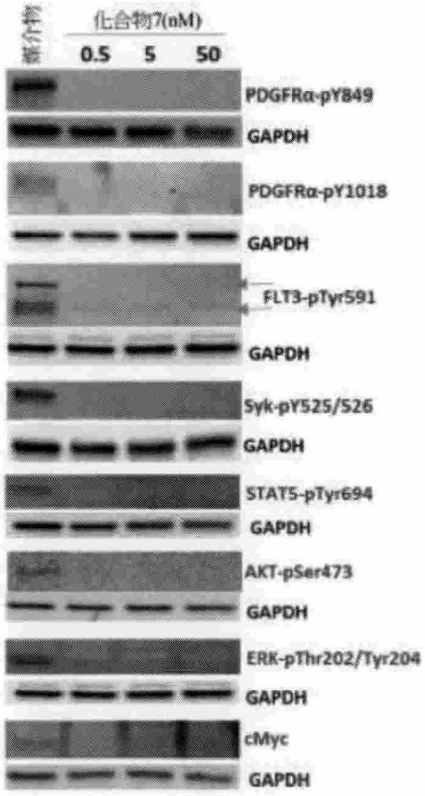
【圖 24】


A
化合物7
依魯替尼
奎紮替尼
媒介物
媒介物
30nM
300nM
30nM
300nM
30nM
300nM
-
+
+
+
+
+
+
+
諾考達唑
pAurora A
pAurora B
Aurora A
Aurora B
GAPDH
pH3S10
H3S10
GAPDH
B
化合物7
依魯替尼
奎紮替尼
媒介物
30nM
300nM
30nM
300nM
30nM
300nM
pFLT3
FLT3
GAPDH
pSTAT5
STAT5
GAPDH
pSTAT3
STAT3
GAPDH
pERK
ERK
GAPDH
BTK-pTyr223
BTK
GAPDH

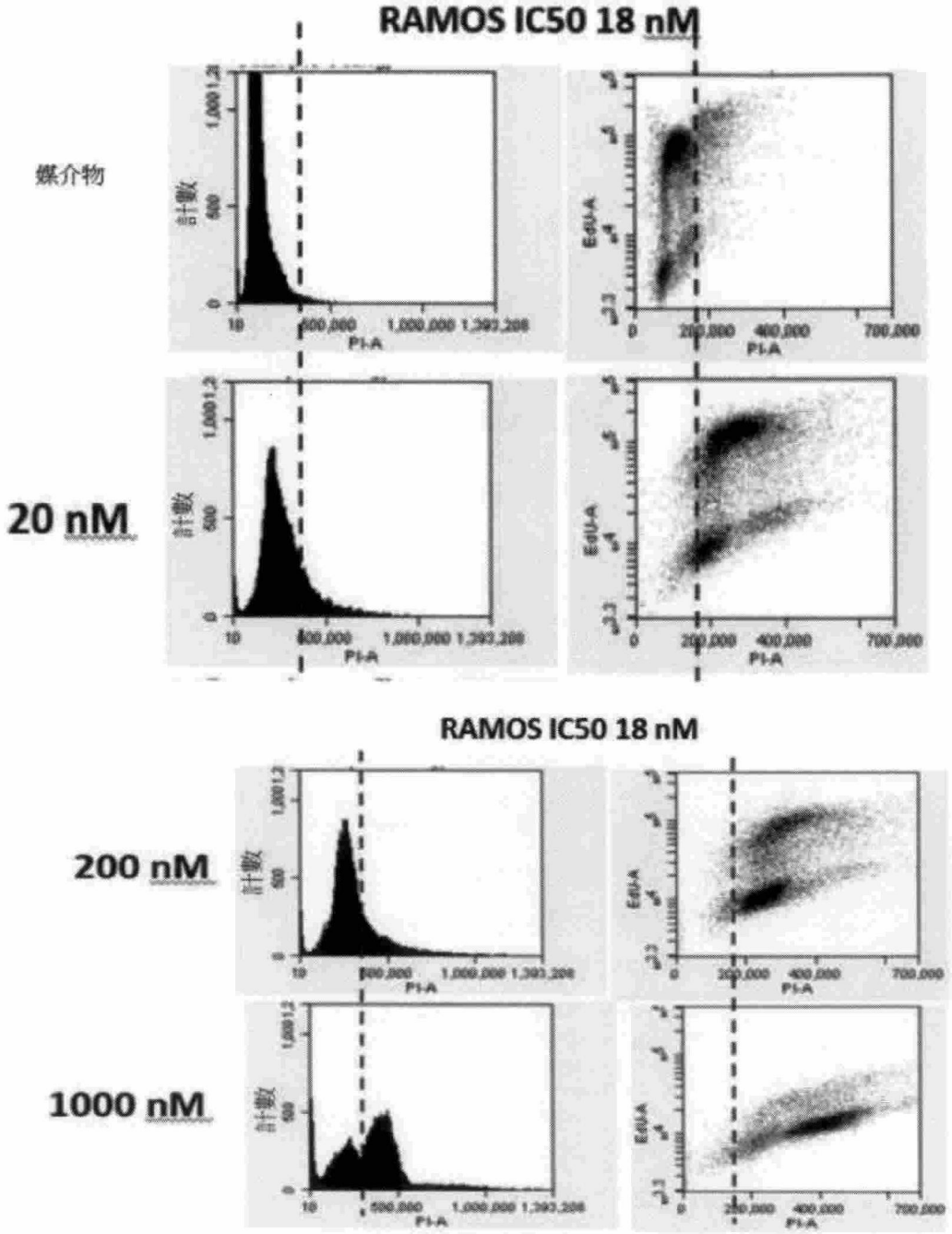
【圖 25】

EOL-1 細胞含有驅動增殖的FIP1L1-PDGFRA
融合基因

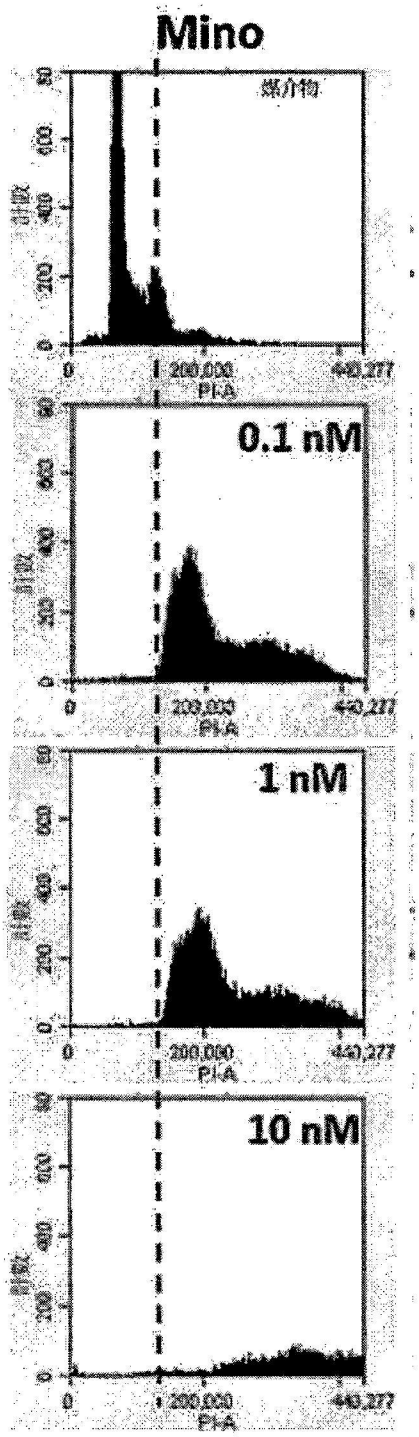




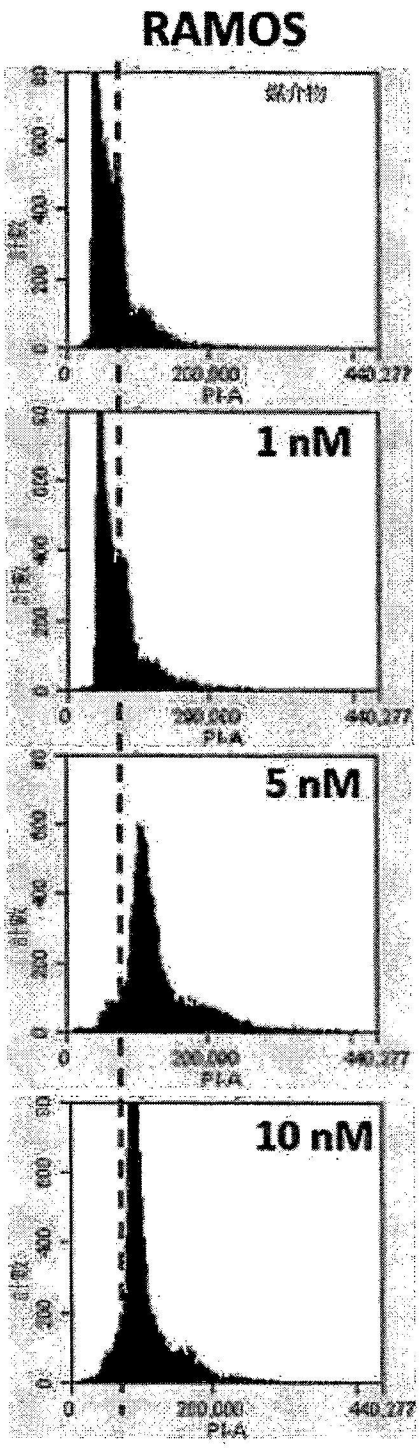
【圖 26】


RAMOS IC50 18 nM
媒介物
20 nM
計數
PI-A
EdU-A
RAMOS IC50 18 nM
200 nM
1000 nM

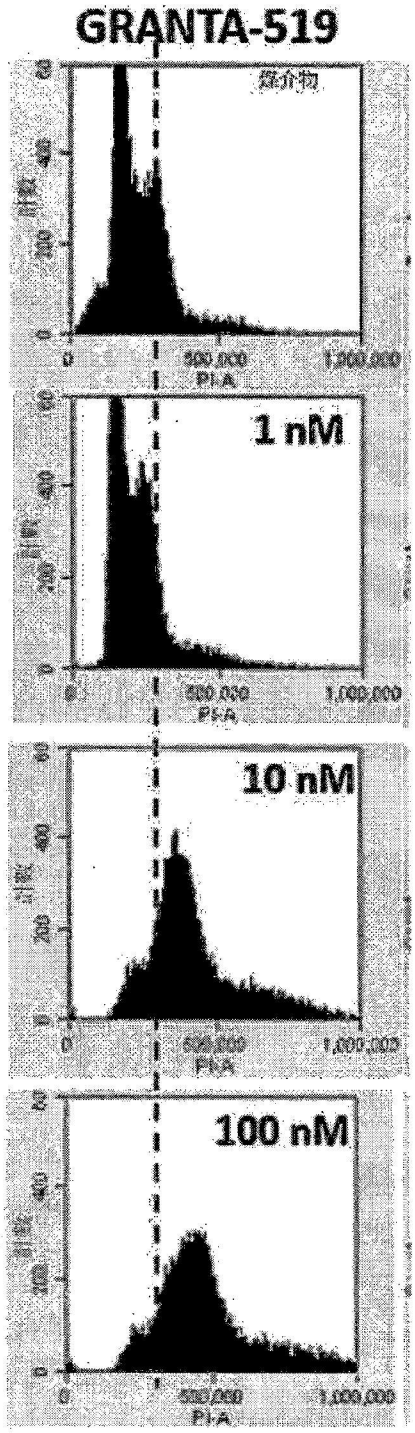
【圖 27】



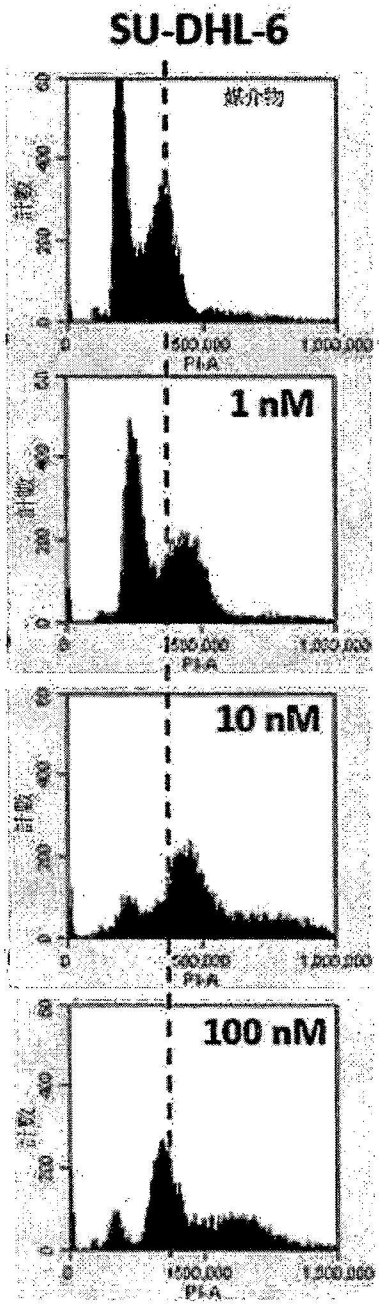
【圖 28】



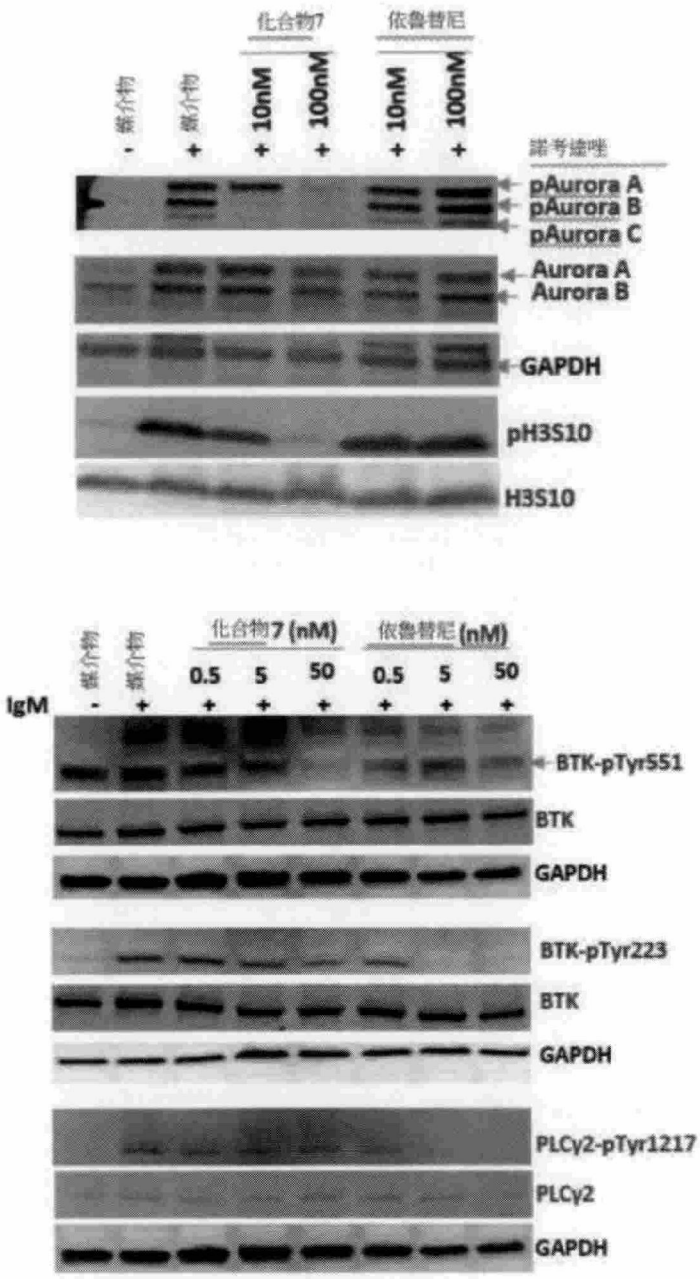
【圖 28(續)】



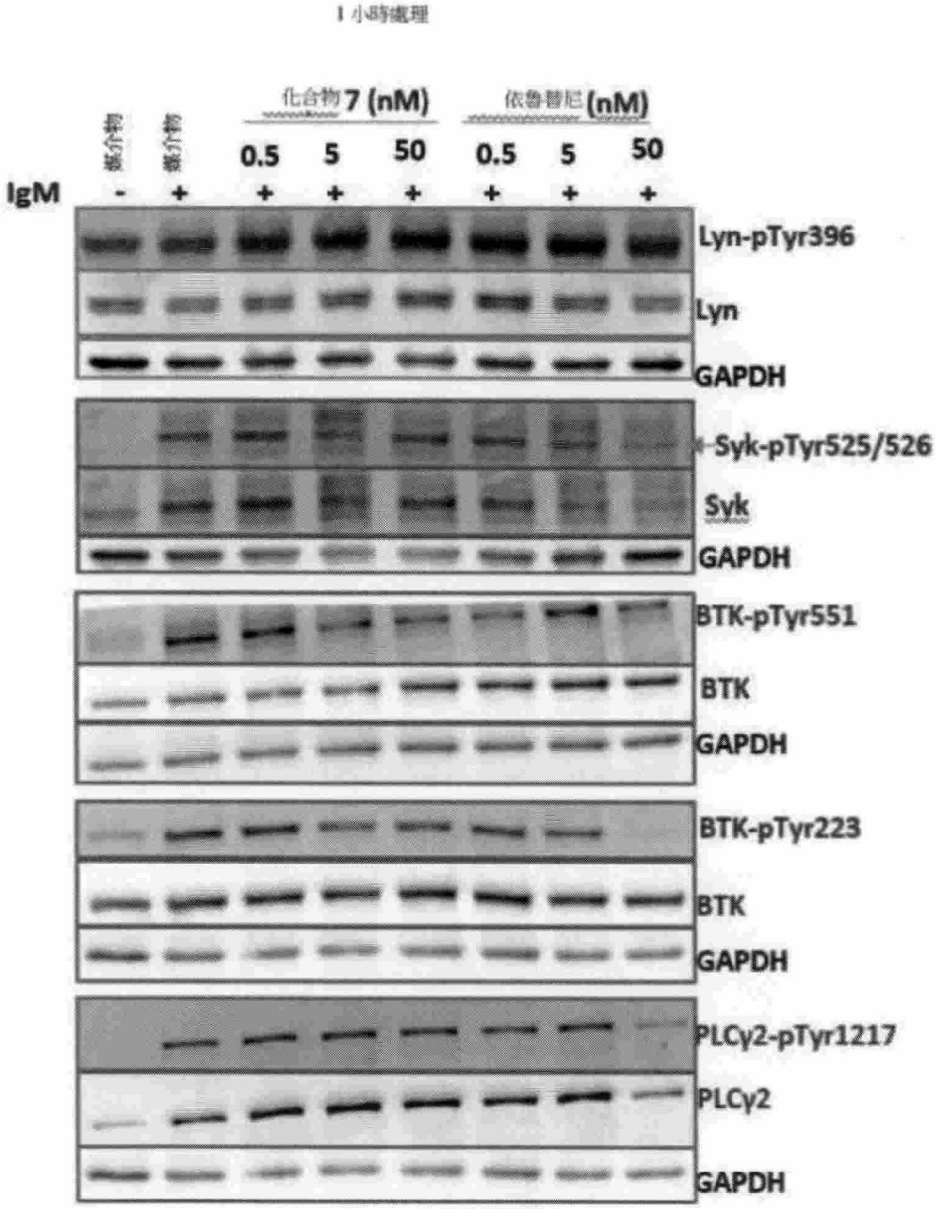
【圖 28(續)】



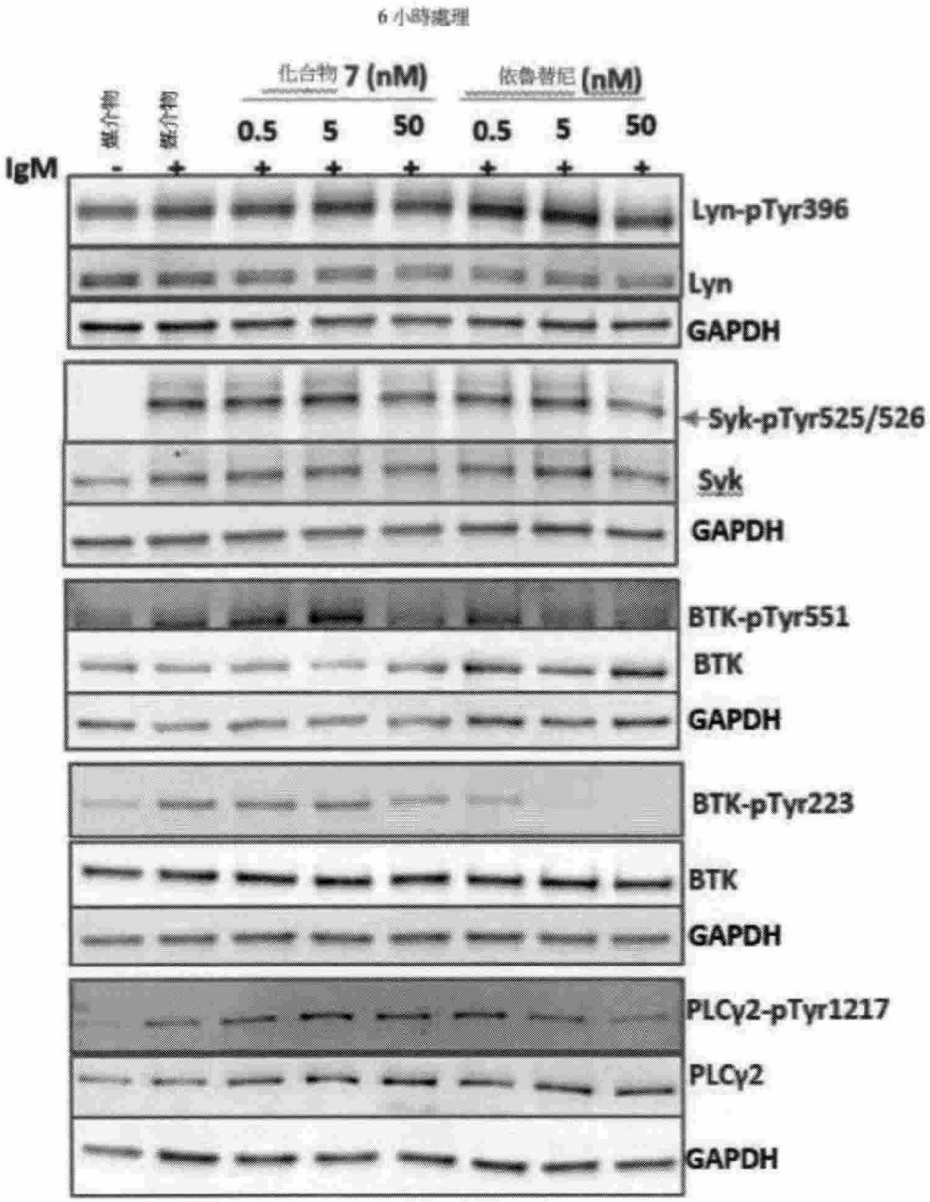
【圖 28(續)】


化合物7
依魯替尼
媒介物
媒介物
10nM
100nM
10nM
100nM
-
+
+
+
+
+
諾考達唑
pAurora A
pAurora B
pAurora C
Aurora A
Aurora B
GAPDH
pH3S10
H3S10
媒介物
媒介物
化合物7 (nM)
依魯替尼 (nM)
0.5
5
50
0.5
5
50
IgM
-
+
+
+
+
+
+
+
BTK-pTyr551
BTK
GAPDH
BTK-pTyr223
BTK
GAPDH
PLCγ2-pTyr1217
PLCγ2
GAPDH

【圖 29】

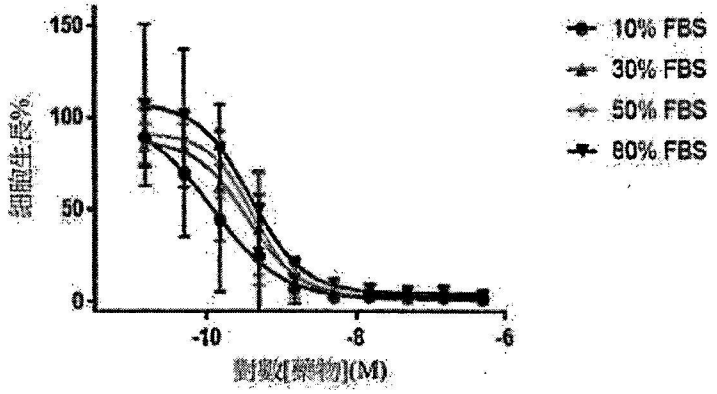

1小時處理
化合物7 (nM)
依魯替尼(nM)
媒介物
媒介物
0.5
5
50
0.5
5
50
IgM
-
+
+
+
+
+
+
+
Lyn-pTyr396
Lyn
GAPDH
Syk-pTyr525/526
Syk
GAPDH
BTK-pTyr551
BTK
GAPDH
BTK-pTyr223
BTK
GAPDH
PLCγ2-pTyr1217
PLCγ2
GAPDH

【圖 30】


6小時處理
化合物 7 (nM)
依魯替尼 (nM)
媒介物
媒介物
0.5
5
50
0.5
5
50
IgM
-
+
+
+
+
+
+
+
Lyn-pTyr396
Lyn
GAPDH
Syk-pTyr525/526
Syk
GAPDH
BTK-pTyr551
BTK
GAPDH
BTK-pTyr223
BTK
GAPDH
PLCγ2-pTyr1217
PLCγ2
GAPDH

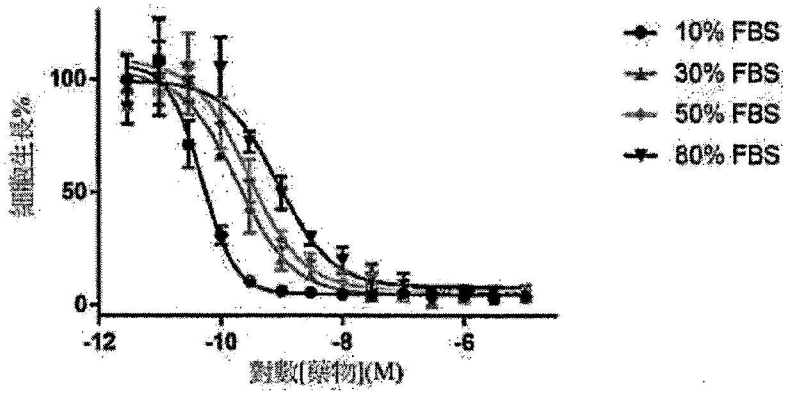
【圖 30(續)】

MV4-11 化合物7



	10% FBS	30% FBS	50% FBS	80% FBS
IC50	1.128e-010	3.527e-010	4.238e-010	3.924e-010

EOL1 化合物7



	10% FBS	30% FBS	50% FBS	80% FBS
IC50	4.915e-011	1.901e-010	2.867e-010	8.942e-010

【圖 31】