



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110831939 B

(45) 授权公告日 2025.05.09

(21) 申请号 201880024602.7

(72) 发明人 M·里德 N·E·威尔舍

(22) 申请日 2018.04.20

M·H·桑德斯 P·A·巴吉利

(65) 同一申请的已公布的文献号

C·T·林德利 R·C·梅林

申请公布号 CN 110831939 A

B·E·亚当奇克 M·斯卡拉蒂

(43) 申请公布日 2020.02.21

(74) 专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有
限公司 44205

(30) 优先权数据

专利代理人 江侧燕

1706327.2 2017.04.20 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.CI.

2019.10.11

C07D 405/14 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61K 31/506 (2006.01)

PCT/IB2018/052745 2018.04.20

A61P 35/00 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

(56) 对比文件

W02018/193410 EN 2018.10.25

CN 108617166 A, 2018.10.02

(73) 专利权人 大冢制药株式会社

审查员 李青翠

地址 日本东京

权利要求书6页 说明书60页 附图16页

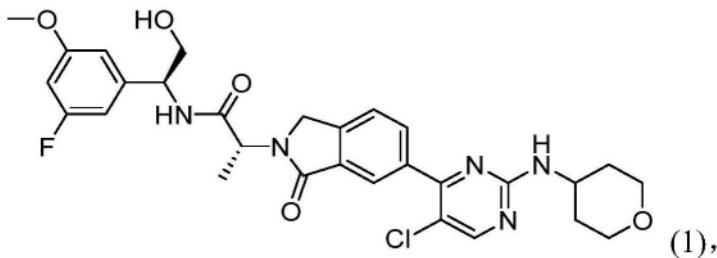
(54) 发明名称

作为ERK1/2抑制剂的6-嘧啶-异吲哚衍生物

(57) 摘要

本发明涉及化合物 (2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺,特别是涉及所述化合物新的物理形式、制备所述化合物的方法及用于所述方法的合成中间体、包含所述化合物的新制剂及所述化合物的治疗用途。

1. (2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺,其具有式(1):



或其互变异构形式,50%至100%呈结晶形式。

2. 根据权利要求1所述的(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺,其至少55%是结晶。

3. 根据权利要求1所述的(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺,其至少60%是结晶。

4. 根据权利要求1所述的(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺,其至少70%是结晶。

5. 根据权利要求1所述的(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺,其至少80%是结晶。

6. 根据权利要求1所述的(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺,其至少90%是结晶。

7. 根据权利要求1所述的(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺,其至少95%是结晶。

8. 根据权利要求1所述的(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺,其至少98%是结晶。

9. 根据权利要求1所述的(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺,其至少99%是结晶。

10. 根据权利要求1所述的(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺,其至少99.5%是结晶。

11. 根据权利要求1所述的(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺,其至少99.9%是结晶。

12. 根据权利要求1所述的(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺，其为水合物。

13. 根据权利要求1所述的(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺，其为一水合物。

14. 根据权利要求13所述的(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺，其X-射线粉末衍射花样的特征在于，在衍射角为 $14.0^{\circ} \pm 0.2^{\circ}$, $20.6^{\circ} \pm 0.2^{\circ}$, $24.0^{\circ} \pm 0.2^{\circ}$ 与 $24.2^{\circ} \pm 0.2^{\circ}$ 处出现主峰。

15. 根据权利要求13所述的(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺，其X射线粉末衍射花样的特征在于，主峰衍射角和相对强度如表A所示：

表 A	
衍射角 (°)	相对强度
14.0 ± 0.2	100
20.6 ± 0.2	85
24.0 ± 0.2	74
24.2 ± 0.2	71

16. 根据权利要求15所述的(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺，其中所述X射线粉末衍射花样进一步的特征在于，在表B给出的衍射角处存在一个或多个其它峰，以及表B给出的相对强度：

表 B	
衍射角 (°)	相对强度
8.8±0.2	23
13.0±0.2	23
13.8±0.2	39
14.4±0.2	20
17.3±0.2	22
19.3±0.2	36
21.3±0.2	45
28.7±0.2	22

。

17. 根据权利要求13所述的(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基) 氨基] 嘧啶-4-基} -1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺，其在与说明书附图图2所示X射线粉末衍射花样中的衍射角基本相同的衍射角处出现峰。

18. 根据权利要求13所述的(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基) 氨基] 嘧啶-4-基} -1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺，其X射线粉末衍射花样基本上如说明书附图图2所示。

19. 根据权利要求13所述的(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基) 氨基] 嘧啶-4-基} -1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺，其采用差示扫描量热分析时出现吸热现象，起始温度为100℃至110℃。

20. 根据权利要求19所述的(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基) 氨基] 嘧啶-4-基} -1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺，其采用差示扫描量热分析时出现吸热现象，起始温度为101℃至108℃。

21. 根据权利要求13所述的(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基) 氨基] 嘧啶-4-基} -1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺，其采用差示扫描量热分析时出现吸热现象，在温度为110℃至125℃之间具有一峰。

22. 根据权利要求21所述的(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基) 氨基] 嘧啶-4-基} -1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺，其采用差示扫描量热分析时出现吸热现象，在温度为111℃至113℃之间具有一峰。

23. 根据权利要求13所述的(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基) 氨基] 嘧啶-4-基} -1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺，其采用热重分析时在85℃至130℃出现失重。

24. 根据权利要求23所述的(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基) 氨基] 嘧啶-4-基} -1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺，其采用热重分析时在90℃-120℃出现失重。

25. 一种制备如权利要求1所述的(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基) 氨基] 嘧啶-

4-基}-1-氧化-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺的方法,所述方法包括:

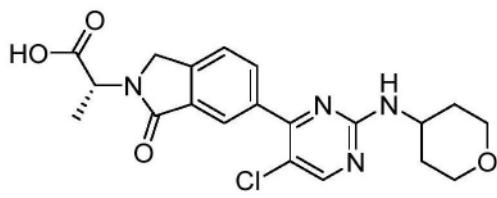
(i) 形成(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧化-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺酸加成盐的含水悬浮液,并在温度25℃-75℃搅拌所述悬浮液一段时间,所述时间足以使所述酸加成盐歧化,形成结晶形式的(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧化-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺,然后,分离所述结晶形式;或

(ii) 形成无定形形式的(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧化-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺的含水悬浮液,其中所述含水悬浮液未缓冲或缓冲到pH为1.75-7.25,并在温度25℃-55℃搅拌所述含水悬浮液一段时间,所述时间足以使所述无定形形式的(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧化-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺转化为结晶形式的(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧化-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺,然后,分离所述结晶形式。

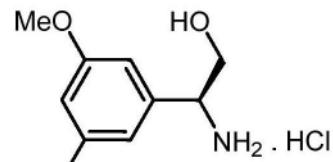
26.一种无定形的(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧化-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺的盐酸盐、硫酸盐、萘二磺酸盐、乙二磺酸盐、甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、萘磺酸盐、苯磺酸盐、羟乙磺酸盐、乙磺酸盐或氢溴酸盐。

27.一种无定形的(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧化-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺的盐酸盐、硫酸盐、氢溴酸盐或萘二磺酸盐。

28.一种制备(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧化-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺的方法,所述方法包括使式(2)化合物与式(3)化合物反应,



(2)

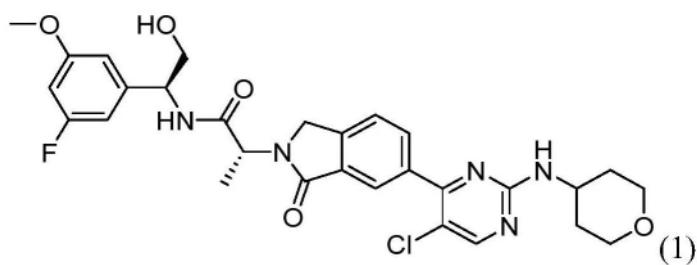


(3)

所述反应在非质子溶剂中,在叔胺碱和酰胺键促进剂存在下进行,其中所述酰胺键促进剂选自N,N,N',N'-四甲基-0-(7-氮杂苯并三氮唑-1-基)脲六氟磷酸酯(HATU)和1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺。

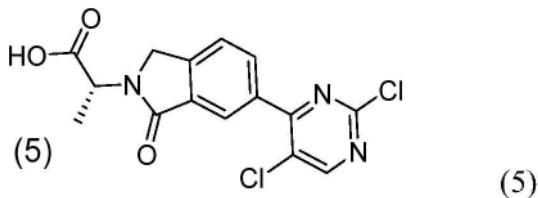
29.根据权利要求28所述的方法,其中所述叔胺碱是二异丙基乙胺(DIPEA)。

30.一种制备具有式(1)结构的(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧化-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺的方法,

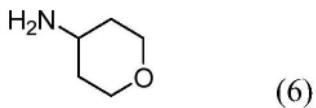


所述方法包括：

a) 使式(5)化合物



与式(6)化合物反应，

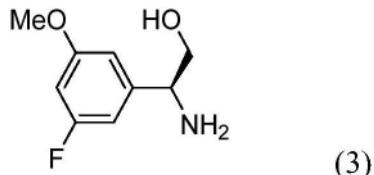


得到式(2)化合物，



及

b) 使式(2)化合物与式(3)化合物反应，



得到式(1)化合物，然后任选形成式(1)化合物的盐或结晶形式。

31. 一种药物组合物，其包含(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基) 氨基] 嘧啶-4-基}-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺及媒介，所述媒介选自：

-C₂₋₄醇；

-聚醚化合物；

-C₈-C₁₈长链脂肪酸与甘油或丙二醇的单酯；

-C₈-C₁₈长链脂肪酸的二甘油酯或三甘油酯；

及它们的混合物；及任选非离子表面活性剂。

32. 颗粒形式的(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基) 氨基] 嘧啶-4-基}-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺，其质量中位

直径是1μm至100μm。

33. 根据权利要求1至24中任一项所述的(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺、根据权利要求26或27的无定形盐、根据权利要求31所述的药物组合物或根据权利要求32所述的颗粒形式在制造用于预防或治疗需要或上调ERK1/2活性的疾病状态或状况的药物中的用途。

34. 根据权利要求33所述的用途,其中,所述需要或上调ERK1/2活性的疾病状态或状况选自癌症疾病状态。

35. 根据权利要求33所述的用途,其中,所述需要或上调ERK1/2活性的疾病状态或状况选自肝细胞癌、黑色素瘤、食管癌、肾癌、结肠直肠癌、肺癌、乳腺癌、膀胱癌、胃肠癌、卵巢癌、前列腺癌、输卵管癌、腹膜癌、阴道癌、外阴癌、宫颈癌、子宫肌层癌和子宫内膜癌的疾病状态或状况。

36. 根据权利要求35所述的用途,其中,所述结肠直肠癌选自结肠癌,和/或,所述肺癌选自间皮瘤和肺腺癌。

37. 根据权利要求34所述的用途,其中所述化合物或组合物与一种或多种其它化合物或治疗方法组合使用。

38. 根据权利要求33所述的用途,其中,所述需要或上调ERK1/2活性的疾病状态或状况选自血液学恶性肿瘤。

39. 根据权利要求33所述的用途,其中,所述需要或上调ERK1/2活性的疾病状态或状况选自白血病和淋巴瘤。

40. 根据权利要求33所述的用途,其中,所述需要或上调ERK1/2活性的疾病状态或状况选自血液学恶性肿瘤和淋巴系统疾病。

41. 根据权利要求33所述的用途,其中,所述需要或上调ERK1/2活性的疾病状态或状况选自急性淋巴细胞白血病[ALL]、慢性淋巴细胞白血病[CLL]、B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤和白血病、自然杀伤[NK]细胞淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、毛细胞白血病、意义未明单克隆丙种球蛋白病、浆细胞瘤、多发性骨髓瘤和移植后淋巴增生性疾病。

42. 根据权利要求41所述的用途,其中,所述B细胞淋巴瘤选自弥漫性大B细胞淋巴瘤[DLBCL]。

43. 根据权利要求33所述的用途,其中,所述需要或上调ERK1/2活性的疾病状态或状况选自血液学恶性肿瘤和髓系疾病。

44. 根据权利要求33所述的用途,其中,所述需要或上调ERK1/2活性的疾病状态或状况选自急性髓性白血病[AML]、慢性髓性白血病[CML]、慢性粒单核细胞白血病[CMML]、高嗜酸性粒细胞综合症、骨髓增生性疾病、骨髓增生性综合征、骨髓增生异常综合征和早幼粒细胞白血病。

45. 根据权利要求44所述的用途,其中,所述骨髓增生性疾病选自真性红细胞增多症、原发性血小板增多症和原发性骨髓纤维化。

46. 根据权利要求33所述的用途,其中,所述需要或上调ERK1/2活性的疾病状态或状况选自腺瘤和癌。

作为ERK1/2抑制剂的6-嘧啶-异吲哚衍生物

[0001] 本发明涉及化合物(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基) 氨基] 嘧啶-4-基} -1- 氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基) -N- [(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺,特别是涉及所述化合物新的物理形式、制备所述化合物的方法及用于所述方法的合成中间体、包含所述化合物的新制剂及所述化合物的治疗用途。

背景技术

[0002] MAPK信号传导和ERK1/2的作用

[0003] 细胞外信号调节激酶(ERK1/2)是广泛表达的蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶,包含丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路的关键组分。MAPK通路是进化保守的细胞信号通路,调节各种细胞过程,包括细胞周期进程、细胞迁移、细胞生存、分化、代谢、增殖和转录。ERK/MAPK信号通路对细胞表面受体酪氨酸激酶(RTK)的细胞外刺激做出响应。激活RTK时,RAS GTP酶(K-RAS、N-RAS和H-RAS)从未活化GDP-结合状态转化为活化的GTP-结合状态。活化的RAS磷酸化,从而激活RAF(A-RAF、B-RAF和C-RAF),它们转而又磷酸化,激活双特异性激酶MEK(MEK1/2)。然后,活化的MEK磷酸化,并激活ERK1/2。激活后,ERK1/2激活多种核底物(substrate)和细胞质底物。目前有>200种已知的ERK1/2底物,包括转录因子、激酶、磷酸酶和细胞骨架蛋白(Roskoski, Pharmacol. Res. 2012; 66:105-143)。

[0004] 人们已经鉴定了多种ERK同工酶(ERK1、ERK2、ERK3/4、ERK5、ERK7),但研究最广泛的两种同工酶是ERK1和ERK2:参见R. Roberts, J. Exp. Pharm., The extracellular signal-regulated kinase(ERK) pathway:a potential therapeutic target in hypertension, 2012;4, 77-83, and Cargnello et al., Microbiol.& Mol. Biol. Rev., Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases 2011, 50-83。

[0005] 癌症中ERK1/2信号传导的上调

[0006] 由于MAPK通路上游组分中发生活化突变,ERK1/2的活性在癌症中通常上调。大约30%的人类癌症包含活化RAS突变(Roberts and Der, Oncogene. 2007; 26:3291-3310)。K-RAS是最常见的突变亚型,在22%的肿瘤中突变。KRAS突变在胰腺癌(70-90%)、非小细胞癌(10-20%)和结肠直肠癌(25-35%)中尤其普遍(Neuzillet et al., 2014. Pharmacol. Ther. 141; 160-171)。分别在8%和3%的癌症中出现N-RAS突变和H-RAS突变(Prior et al., Cancer Res. 2012; 72(10); 2457-2467)。值得指出的是,据报道,15-20%的黑色素瘤病例存在活化N-RAS突变。此外,所有肿瘤中有8%出现活化B-RAF突变,这种突变在黑色素瘤(50-60%)、乳头状甲状腺癌(40-60%)、结肠直肠癌(5-10%)和非小细胞肺癌(3-5%)中尤其普遍存在(Neuzillet et al., 2014. Pharmacol. Ther. 141; 160-171)。除出现活化RAS突变和RAF突变外,MAPK信号通路还通过上游RTKs的过表达或突变激活而在癌症中上调,所述上游RTKs如EGFR(Lynch et al., N Engl J Med. 2004; 350:2129-2139)、HER2(Stephens et al., Nature. 2004; 431:525-526)和FGFR(Ahmed et al., Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res. 2012; 1823:850-860)。

[0007] 异常的ERK1/2信号传导促进癌症进程的机理有多种。激活时,ERK1/2磷酸化,并激活参与促进细胞增殖和分化的范围广泛的转录因子,如c-Fos (Murphy et al., Nat. Cell Biol. 2002; 4 (8) : 556-64) 和ELK-1 (Gille et al., EMBO J. 1995; 14 (5) : 951-62)。此外,众所周知的是,ERK1/2信号传导通过多种机理促进细胞周期进程,包括诱导D型细胞周期蛋白和抑制周期蛋白依赖性激酶抑制剂p27^{KIP1} (Kawada et al., Oncogene. 1997; 15: 629-637, Lavoie et al., J. Biol. Chem. 1996; 271: 20608-20616)。此外,ERK1/2信号传导可以通过调节一系列凋亡蛋白而促进细胞生存。此类机理的实例包括ERK1/2依赖性抑制促凋亡BCL-2家族蛋白质BIM1和BAD (She et al., J. Biol. Chem. 2002; 277: 24039-24048. Ley et al., J. Biol. Chem. 2003; 278: 18811-18816) 及ERK1/2依赖性稳定抗凋亡蛋白质,如MCL-1 (Domina et al., Oncogene. 2004; 23: 5301-5315)。

[0008] ERK1/2在MAPK抑制剂抗性中的作用

[0009] 广泛的临床前研究表明,抑制MAPK通路会抑制包含B-Raf或Ras突变的癌细胞系的生长 (Friday&Adjei, Clin. Cancer Res. 2008; 14: 342-346)。RAF抑制剂威罗菲尼 (vemurafenib) 和达拉菲尼 (dabrafenib),以及MEK抑制剂曲美替尼 (trametinib) 都在临幊上被批准用于治疗BRAF突变黑色素瘤。这些制剂在大多数患者中引发深远 (profound) 的抗肿瘤响应,尽管由于获得性耐药性的发生,响应持续时间短 (Chapman et al., N. Engl. J. Med. 2011; 364: 2507-2516. Hauschild et al., Lancet. 2012; 380: 358-365. Solit and Rosen, N Engl J Med. 2011; 364 (8) : 772-774. Flaherty et al., N. Engl. J. Med. 2012; 367: 1694-1703)。人们鉴定了多种获得性B-RAF抑制剂抗性的机理。这些机理包括替代的MEK激活剂如C-RAF或COT1的上调或激活 (Villanueva et al., Cancer Cell. 2010; 18: 683-95. Johannessen et al., Nature. 2010; 468: 968-72)、RTK或NRAS信号传导上调 (Nazarian et al., Nature. 2010; 468: 973-7) 及发生MEK活化突变 (Wagle et al., J Clin Oncol. 2011; 29: 3085-96)。MEK抑制剂抗性机理包括出现MEK突变,所述MEK突变减少药物结合或增强固有 (intrinsic) MEK活性 (Emery et al., Proc Natl. Acad. Sci. 2009; 106: 20411-20416. Wang et al., Cancer Res. 2011; 71: 5535-5545) ;及BRAF或KRAS扩增 (Little et al., Biochem Soc. Trans. 2012; 40 (1) : 73-8)。RAF或MEK抑制剂抗性机理的常见特征是重新激活ERK1/2信号传导,在抑制剂存在下驱动细胞增殖和存活。根据这一观察结果,已经表明,直接ERK1/2抑制可能是克服获得性RAF或MEK抑制剂抗性的有效治疗方法。临床前证据表明,抑制ERK1/2克服了获得性RAF或MEK抑制剂抗性 (Hatzivassiliou et al., Mol Cancer Ther. 2012; 11 (5) : 1143-54. Morris et al., Cancer Discov. 2013; 3 (7) : 742-50)。

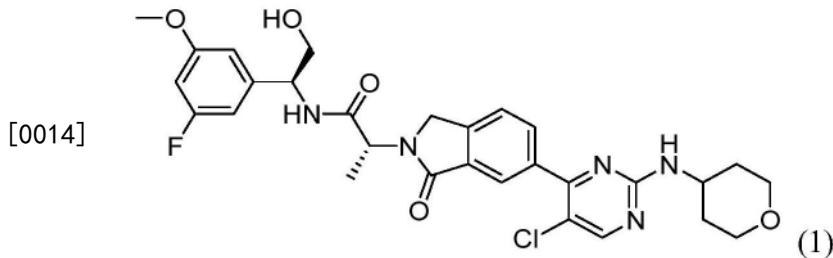
[0010] 其它疾病

[0011] 除肿瘤之外,据报道,在其它疾病中也出现异常的ERK1/2信号传导,所述其它疾病包括心血管疾病 (Muslin, Clin. Sci. 2008; 115: 203-218)、阿尔茨海默氏病 (Giovannini et al., Neuroscience. 2008; 153: 618-633)、多囊性肾病 (Omori et al., J Am Soc Nephrol. 2006; 17: 1604-1614)、哮喘 (Duan et al., J Immunol. 2004; 172: 7053-7059) 和肺气肿 (Mercer et al., J. Biol. Chem. 2004; 279: 17690-17696)。

[0012] (2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己基-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺

[0013] 我们早先的国际专利申请PCT/IB2016/001507 (通过引用,该申请的内容包括在本

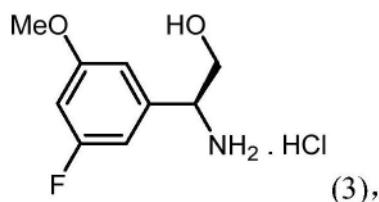
发明中)公开了作为ERK2抑制剂的苯并内酰胺类化合物。该申请特别公开的其中一种化合物是式(1)化合物(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺:



[0015] 该化合物的制备在PCT/IB2016/001507的实例685中进行了描述,并涉及式(2)化合物与式(3)化合物的反应:



[0016]



[0017] 该反应在酰胺键生成促进剂0-(苯并三氮唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸(TBTU)存在下,在二甲基甲酰胺(DMF)和三乙胺中进行。

[0018] 在实例685中,公开了在反应后处理(work-up)及硅胶色谱部分提纯后,将色谱柱洗脱液蒸发,得到一种玻璃状物质,然后,将该物质用乙醚磨碎,得到呈无定形固体状的化合物(1)。

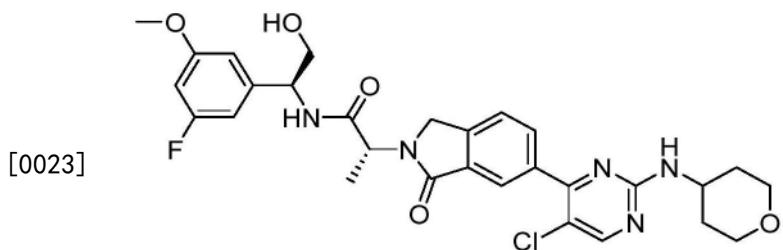
发明内容

[0019] 在PCT/IB2016/001507的实例685中,制备的化合物(1)呈无定形(amorphous)形式。但是,我们现在发现,可以制备式(1)化合物的结晶形式。因此,在第一方面,本发明提供基本上呈结晶形式的式(1)化合物。

[0020] 本发明还提供制备式(1)化合物及合成中间体的新方法,及包含所述式(1)化合物的新制剂。

式(1)化合物的结晶形式

[0022] 在第一方面,本发明提供基本上呈结晶形式的式(1)化合物(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺或其互变异构形式:



(1)

。

[0024] 虽然式(1)化合物可以形成盐,但是,结晶形式的化合物指的是游离碱(free base)。

[0025] 在上下文认可时,所述式(1)化合物的范围包括其所有溶剂化物、互变异构体和同位素变体。

[0026] 无定形固体中不存在结晶形式中通常存在的三维结构,而且,在无定形形式中,各分子的位置相对于彼此基本上是无规的,参见,例如Hancock et al. J. Pharm. Sci. (1997), 86, 1)。

[0027] 词语“基本上结晶”指的是式(1)化合物50%至100%是结晶的形式。在此范围内,式(1)化合物可能至少55%是晶体,或至少60%是晶体,或至少70%是晶体,或至少80%是晶体,或至少90%是晶体,或至少95%是晶体,或至少98%是晶体,或至少99%是晶体,或至少99.5%是晶体,或至少99.9%是晶体,例如,100%是晶体。

[0028] 在一具体实施例中,结晶形式是95%至100%结晶,例如,至少98%是晶体,或至少99%是晶体,或至少99.5%是晶体,或至少或至少99.6%是晶体,或至少99.7%是晶体,或至少99.8%是晶体,或至少99.9%是晶体,例如,100%是晶体。

[0029] 本发明化合物的结晶形式可以是溶剂化(例如,水合)形式或非溶剂化(例如,无水)形式。

[0030] 在一个实施例中,所述化合物是无水形式。

[0031] 此处使用的词语“无水”并不排除所述化合物(例如,化合物晶体)上面或里面存在一些水的可能性。例如,所述化合物(例如,化合物晶体)表面可能存在一些水,或者在化合物(例如,晶体)内存在少量水。通常,无水形式每分子化合物包含的水分子数小于0.4个,更优选每分子化合物包含的水分子数小于0.1个,例如,0分子水。

[0032] 在另一实施例中,所述化合物是溶剂化形式,例如,水合形式。当结晶形式是水合形式时,它们可以包含,例如,不超过3分子结晶水,更通常是包含不超过2分子水,例如,1分子水或2分子水。还可以形成非化学计量比水合物,其中存在的水分子数小于1,或者是非整数。例如,存在的水分子数小于1时,例如,每个化合物(1)分子中存在的水分子数可以是0.4或0.5或0.6或0.7或0.8或0.9。

[0033] 在一个实施例中,结晶形式的化合物(1)是一水合物(monohydrate),所述结晶形式包含1分子结晶水。

[0034] 其它溶剂化物包括醇化物,例如,乙醇化物和异丙醇化物。

[0035] 此处描述的结晶形式、其晶体及其晶体结构构成本发明的其它方面。

[0036] 晶体及其晶体结构可以采用多种技术表征,包括X射线粉末衍射法(XRPD)、单晶X射线衍射法、差示扫描量热法(DSC)和热重分析法(TGA)。不同湿度条件下的晶体行为可以

采用重力蒸汽吸附研究(例如,动态蒸汽吸附法)进行分析。

[0037] 化合物的晶体结构可以采用X射线粉末衍射法(XRPD)的固态技术进行分析。X射线粉末衍射法可以按照传统方法开展,例如,此处(参见实例4A)及《X射线粉末衍射法导论(Introduction to X-ray Powder Diffraction)》(Ron Jenkins and Robert L. Snyder(John Wiley&Sons, New York, 1996)中描述的方法。X射线粉末衍射法的衍射图中存在规定的峰(与随机背景噪声对照),表明所述化合物具有一定的结晶度。

[0038] 化合物的X射线粉末花样(pattern)采用X射线衍射光谱的衍射角(2θ)和晶面间距(d)参数表征。这些参数通过布拉格方程相关联: $n\lambda=2d \sin\theta$ (其中n=1; λ =X射线辐射的波长; d=晶面间距; 及 θ =衍射角)。在此处,由于晶面间距、衍射角及总体花样这些数据的特点,它们对于X射线粉末衍射的晶体鉴定非常重要。由于相对强度可能根据晶体生长的方向、晶粒尺寸及测定条件而变化,因此,相对强度不应进行严格的解释(interprete)。此外,衍射角通常指的是与 $2\theta \pm 0.2^\circ$ 范围一致的那些衍射角。

[0039] 到目前为止,已经鉴定了式(1)化合物游离碱的两种特定结晶形式,在此称为“形式A”和“形式B”。在这两种结晶形式中,形式B似乎是最稳定的形式。形式A和形式B的表征数据在下面的实例中给出。

[0040] 采用XRPD,对本发明(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己基-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺结晶的A和B形式都进行了表征(参见实例3和4及图1和图2)。

[0041] 在每种情况下,粉末X射线衍射花样都可以通过衍射图中的衍射角(2θ)、晶面间距(d)及峰的相对强度来表示。

[0042] 形式A

[0043] 正如下面的实例3A所描述,化合物(1)游离碱的第一结晶形式(形式A)可以在水-丙醇(3:1)溶剂混合物中通过化合物(1)的盐酸盐溶液的歧化(disproportionation)形成。形式A的XRPD衍射图如图1所示。在歧化期间,所述酸与游离碱分离,留在溶液中,得到化合物(1)游离碱的悬浮液。

[0044] 晶形A还可以通过将无定形的化合物(1)盐酸盐长时间(例如,96小时)悬浮在70°C水中,然后过滤出晶体材料而制备。

[0045] 形式B

[0046] 还可以通过在温度比上述晶形A制备中所用温度低的纯净水中长时间搅拌酸加成盐(例如,盐酸盐、硫酸盐或氢溴酸盐)的水悬浮液,通过这些盐的歧化作用而制备游离碱的第二结晶形式(形式B)。因此,形式B可以按照下文实例3B-3D描述的方法制备:将无定形的化合物(1)的无机酸盐(例如,盐酸盐、硫酸盐或氢溴酸盐)悬浮在18-23°C纯净水中,然后在45-50°C搅拌该混合物20小时,接着在30-35°C进一步搅拌96小时,然后滤出形式B的晶体。形式B的XRPD衍射图如图2所示。

[0047] 无定形的化合物(1)酸加成盐歧化形成晶形B的过程可以通过在反应混合物中加入醇类助溶剂(co-solvent)如异丙醇协助完成。

[0048] 在制备晶形B的另一种方法中,可以将无定形游离碱形式的化合物(1)悬浮在水中,水可以不缓冲或在pH大约2至pH7缓冲,然后,在稍高温度(例如,30°C)搅拌一段时间(例如,长达6天,例如,大约5天),所述时间足以让无定形化合物(1)转化为晶形B。

[0049] 化合物(1)的晶形B的X射线衍射花样在表A所列衍射角(即14.0°、20.6°、24.0°和24.2°(±0.2°))处出现最高强度的峰。

[0050]

表A	
衍射角(°)	相对强度
14.0	100
20.6	85
24.0	74
24.2	71

[0051] 因此,在另一个实施例中,本发明提供基本上呈结晶形式(形式B)的(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺,其X射线粉末衍射花样的特征在于在衍射角(2θ)为14.0°与/或20.6°与/或24.0°与/或24.2°(±0.2°)处出现主峰。

[0052] 在另一个实施例中,X射线衍射花样的特征在于至少一个峰出现在选自14.0°、20.6°、24.0°和24.2°(±0.2°)的衍射角处。

[0053] 因此,例如,在一个实施例中,本发明提供基本上呈结晶形式(形式B)的化合物(1),其X射线粉末衍射花样特征在于,在衍射角为14.0°(±0.2°)处出现主峰。

[0054] 在另一个实施例中,本发明提供基本上呈结晶形式(形式B)的化合物(1),其X射线衍射花样特征在于,在衍射角为20.6°(±0.2°)处出现主峰。

[0055] 在另一个实施例中,本发明提供基本上呈结晶形式(形式B)的化合物(1),其X射线粉末衍射花样的特征在于,在衍射角为24.0°(±0.2°)处出现主峰。

[0056] 在另一个实施例中,本发明提供基本上呈结晶形式(形式B)的化合物(1),其X射线粉末衍射花样的特征在于,在衍射角为24.2°(±0.2°)处出现主峰。

[0057] 在另一个实施例中,基本上呈结晶形式(形式B)的化合物(1)的X射线粉末衍射花样的特征在于,在两个或以上(例如,三个或以上)的衍射角处,特别是在选自14.0°、20.6°、24.0°和24.2°(±0.2°)的四个衍射角处,出现主峰。

[0058] 形式B的化合物(1)的X射线粉末衍射花样中,还可以在表B给出的衍射角(即8.8、13.0、13.8、14.4、17.3、19.3、21.3和28.7(±0.2°))处具有较少(lesser)的峰。

[0059]

表B	
衍射角 (°)	相对强度
8.8	23
13.0	23
13.8	39
14.4	20
17.3	22
19.3	36
21.3	45
28.7	22

[0060] 因此,本发明还提供基本上呈结晶形式(形式B)的化合物(1),其X射线粉末衍射花样的特征在于,在如上文规定的衍射角14.0°与/或20.6°与/或24.0°与/或24.2°($\pm 0.2^\circ$)处出现主峰,以及在选自8.8°、13.0°、13.8°、14.4°、17.3°、19.3°、21.3°与/或28.7°($\pm 0.2^\circ$)的衍射角处任选出现一个或多个其它峰。

[0061] 在一个实施例中,基本上呈结晶形式(形式B)的化合物(1)的X射线粉末衍射花样的特征在于,在衍射角为14.0°与/或20.6°与/或24.0°与/或24.2°($\pm 0.2^\circ$)处出现主峰;以及在衍射角为13.8°与/或19.3°与/或21.3°($\pm 0.2^\circ$)处任选出现一个或多个其它峰。

[0062] 在一个具体实施例中,基本上呈结晶形式(形式B)的化合物(1)的X射线粉末衍射花样的特征在于,在衍射角为14.0°、20.6°、24.0°、24.2°、13.8°、19.3°和21.3°($\pm 0.2^\circ$)处出现主峰。

[0063] 在另一个具体实施例中,基本上呈结晶形式(形式B)的化合物(1)的X射线粉末衍射花样的特征在于,在衍射角为14.0°、20.6°、24.0°、24.2°、8.8°、13.0°、13.8°、14.4°、17.3°、19.3°、21.3°和28.7°($\pm 0.2^\circ$)处出现主峰。

[0064] 所述X射线粉末衍射花样进一步的特征可在于,在表C给出的衍射角(2θ) ($\pm 0.2^\circ$)处出现额外的峰。

表C		
	衍射角 (°)	相对强度
[0065]	12.0	13
	16.9	12
	23.5	18
	26.2	18
	29.8	13

[0066] 本发明进一步提供基本上呈结晶形式(形式B)的化合物(1),其在与图2所示X射线粉末衍射花样相同的衍射角处出现峰。优选这些峰的相对强度与图2所示的峰相同。

[0067] 在优选的实施例中,本发明提供基本上呈结晶形式(形式B)的化合物(1),其X射线粉末衍射花样基本上如图2所示。

[0068] 本发明的晶形还可以采用差示扫描量热法(DSC)表征。

[0069] 采用DSC对化合物(1)的晶形B进行分析,结果发现其出现吸热现象,如附图图3所示,开始发生的温度为100°C至110°C(更特别是101°C至108°C),峰出现在110°C至125°C(更特别是111°C至114°C)。该现象是由于释放出水而导致。

[0070] 因此,本发明提供基本上呈结晶形式(形式B)的化合物(1),其在DSC分析中出现吸热现象,开始发生的温度为100°C至110°C(更特别是101°C至108°C)。本发明还提供基本上呈结晶形式(形式B)的化合物(1),其出现吸热现象,峰出现在110°C至125°C(更特别是111°C至113°C)。

[0071] 本发明的晶形(形式B)还可以采用热重分析(TGA)表征。

[0072] 采用TGA对基本上呈结晶形式B的化合物(1)进行分析,结果显示失重转变起始温度为85°C至95°C,例如,90.86°C,并在110°C至130°C(例如120°C)结束(参见图4)。失重与释放出水相对应。

[0073] 根据DSC和TGA数据,可以知道,上文所述基本上呈结晶形式B的化合物(1)为一水合物。单晶X射线衍射法研究也证实了这一点(参见下文实例4E)。

[0074] 在基本上呈结晶形式B的化合物(1)中,一种单晶形可能占主导地位,虽然可能存在少量(优选可忽略不计)的其它晶形。

[0075] 在一个优选实施例中,本发明提供基本上呈结晶形式(形式B)的化合物(1),其包含具有上文所述XRPD特性的单晶形及重量不超过5%的该化合物的任何其它晶形。

[0076] 优选单晶形(形式B)伴有4%以下,或3%以下,或2%以下的其它晶形,特别是包含重量小于或等于大约1%的其它晶形。更优选所述单晶形伴有小于0.9%,或小于0.8%,或小于0.7%,或小于0.6%,或小于0.5%,或小于0.4%,或小于0.3%,或小于0.2%,或小于0.1%,或小于0.05%,或小于0.01%重量的其它晶形,例如,包含0% (重量)的其它晶形。

[0077] 正如从上文显而易见的是,化合物(1)的结晶形式(形式B)可以采用多种不同的理化参数表征。因此,在一个具体实施例中,本发明提供基本上呈结晶形式(形式B)的化合物

(1), 其采用下述任何一个或多个(任何组合)或全部参数表征, 即:

[0078] (a) 其X射线粉末衍射花样的特征在于, 存在表A及任选表B给出的衍射角(2θ)和强度的主峰; 及进一步任选其X射线粉末衍射花样的特征在于, 存在表C给出的衍射角(2θ)和强度的主峰; 与/或

[0079] (b) 其在与图2所示X射线粉末衍射花样相同的衍射角处出现峰, 任选其中所述峰的相对强度与图2中的峰相同; 与/或

[0080] (c) 其X射线粉末衍射花样基本上如图2所示; 与/或

[0081] (d) 采用DSC分析时, 其在100°C至115°C出现吸热峰; 与/或

[0082] (e) 采用热重分析(TGA)时, 其在85°C至130°C(例如, 90-120°C)出现失重。

[0083] 制备结晶形式的化合物(1)游离碱的方法

[0084] 本发明还提供制备结晶形式的化合物(1)游离碱的方法。

[0085] 因此, 本发明的另一方面提供一种制备基本上呈结晶形式的化合物(1)游离碱的方法; 所述方法包括:

[0086] (i) 形成化合物(1)酸加成盐的含水悬浮液, 在温度25°C至75°C搅拌所述悬浮液一段时间, 所述时间足以使所述酸加成盐歧化, 形成结晶形式的化合物(1)游离碱, 然后分离所述结晶形式; 或

[0087] (ii) 形成无定形形式的化合物(1)游离碱的含水悬浮液, 其中所述含水悬浮液不缓冲或缓冲到pH为1.75至7.25, 在温度25°C至55°C搅拌含水悬浮液一段时间, 所述时间足以使无定形形式的化合物(1)游离碱转化为结晶形式的化合物(1)游离碱, 然后分离所述结晶形式。

[0088] 在方法变形(i)中, 温度和搅拌时间的选择将影响产生的是晶形A还是晶形B。因此, 例如, 为了得到形式A, 所述方法可以在较高温度进行, 例如, 65-75°C(更特别是大约70°C)。反之, 为了得到晶形B, 所述方法可以在较低温度进行, 例如, 25-55°C。晶形的形成可以通过向所述方法混合物中加入醇(例如, 异丙醇)来促进。

[0089] 方法变形(i)的起始材料是化合物(1)的酸加成盐。所述酸加成盐可以是无定形的。

[0090] 所述化合物(1)的酸加成盐可以是, 例如, 无机酸盐, 例如, 盐酸盐、氢溴酸盐或硫酸盐。制备所述盐的方法是本领域技术人员熟悉的。所述盐可以通过将游离碱化合物加到溶剂中的反离子溶液中而制备。所述溶剂可以是极性质子溶剂, 例如, 2-丙醇或甲醇, 可以包括极性非质子助溶剂, 例如, 二氯甲烷。

[0091] 方法变形(ii)通常形成形式B。

[0092] 在方法变形(ii)中, 含水悬浮液可以是缓冲或非缓冲的。例如, 其可以不缓冲或缓冲到pH为2.5或7。搅拌含水悬浮液, 温和加热, 例如, 温度大约25°C至大约35°C, 例如, 大约30°C。搅拌含水悬浮液一段时间, 所述时间足以使无定形形式的化合物(1)游离碱转化为结晶形式的化合物(1)游离碱。通常搅拌至少1天, 更通常至少2天或至少3天, 在一个实施例中, 搅拌5天。

[0093] 在方法变形(ii)的替代条件中, 所述方法可以在较高温度(例如, 45-55°C, 特别是大约50°C)开展较短的时间(例如, 至少12小时, 或至少15小时; 例如20小时)。为了有助于晶形B的形成, 可以加入晶种或晶形A或晶形B。

[0094] 无定形的式(1)化合物的盐

[0095] 制备了多种无定形的式(1)化合物的盐(参见实例2)。因此,本发明的另一个方面提供无定形形式的式(1)化合物的盐。

[0096] 所述盐可以是式(1)化合物的盐酸盐、硫酸盐、萘二磺酸盐(萘-1,5-二磺酸盐)、乙二磺酸盐(乙烷二磺酸盐)、甲苯磺酸盐(对甲苯磺酸盐)、甲磺酸盐(甲烷磺酸盐)、萘磺酸盐(2-萘磺酸盐)、苯磺酸盐(苯基磺酸盐)、羟乙磺酸盐(2-羟乙基磺酸盐)、乙磺酸盐(乙基磺酸盐)或氢溴酸盐。

[0097] 一组盐由无定形的式(1)化合物的盐酸盐、硫酸盐、氢溴酸盐或萘二磺酸盐组成。

[0098] 在其它实施例中,本发明提供:

[0099] • 无定形的式(1)化合物的盐酸盐;

[0100] • 无定形的式(1)化合物的硫酸盐;

[0101] • 无定形的式(1)化合物的氢溴酸盐;及

[0102] • 无定形的式(1)化合物的萘二磺酸盐。

[0103] 所述无定形的盐可以通过将游离碱形式的所述化合物与合适的酸在有机溶剂中反应制备,所述有机溶剂优选是极性非质子溶剂(例如,乙酸异丙酯),或极性非质子溶剂和极性质子溶剂的混合物(例如,乙酸异丙酯和2-丙醇的混合物)。

[0104] 本发明的无定形盐可以是质量中位直径为1 μm 至100 μm 的颗粒。

[0105] 所述颗粒的质量中位直径可以是2 μm 至50 μm ,例如,2 μm 至25 μm ,或2 μm 至10 μm 。所述颗粒可以口服(通常是口服制剂(orally administrable formulation),任选包含一种或多种药学上可以接受的赋形剂)或通过其它途径施用,例如,吸入。当颗粒用于通过吸入而施用时,颗粒的质量中位直径通常是1 μm 至10 μm ,或1 μm 至5 μm 。

[0106] 颗粒尺寸可以采用图像分析法、激光衍射法或筛分技术测定。

[0107] 所述颗粒可以采用机械微粉化法或基于溶液的相分离法制备。机械微粉化法的实例包括研磨技术。

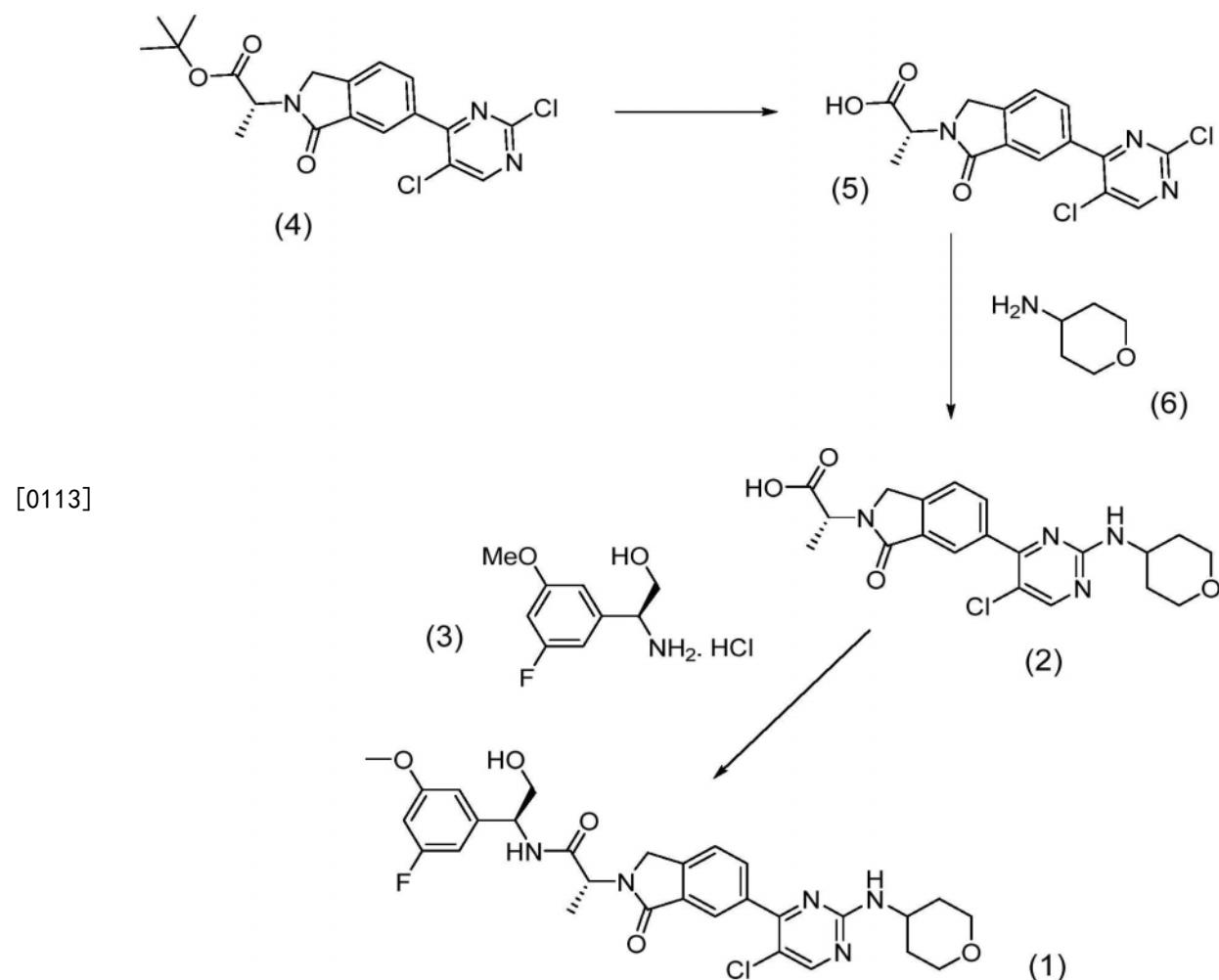
[0108] 基于溶液的技术通常涉及采用液体、压缩气体、近临界液体或超临界流体作为溶剂或低温介质用于快速冷冻。这些技术涉及采用蒸发、膨胀、冷冻或改变溶剂组成使溶剂与药物化合物进行相分离。

[0109] 颗粒可以采用冻干法制备。或者,所述颗粒可以采用喷雾干燥制备。因此,在一个实施例中,本发明的无定形盐是经喷雾干燥的。

[0110] 所述无定形盐可作为治疗剂或如上文所述,作为制备结晶形式的式(1)游离碱的中间体。

[0111] 式(1)化合物的制备方法

[0112] 化合物(1)可以采用下面方案1所示的系列步骤制备。



[0113] 方案1

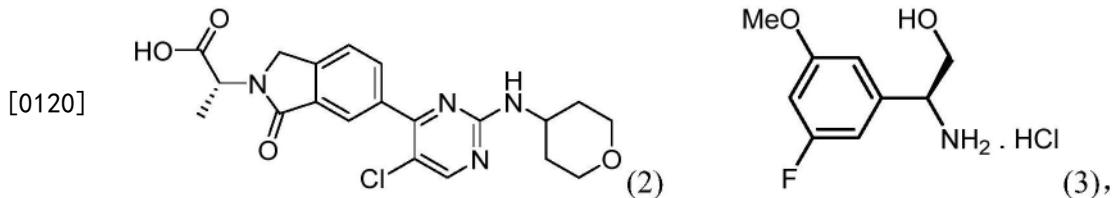
[0114] 中间体化合物(2)与中间体化合物(3)反应得到化合物(1)的反应在我们早先的申请PCT/IB2016/001507的实例685中进行了描述。所述反应在酰胺键形成促进剂0-(苯并三氮唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸(TBTU)存在下,在二甲基甲酰胺(DMF)和三甲胺中进行。在PCT/IB2016/001507中,中间体化合物(2)通过相应的叔丁酯水解制备,叔丁酯本身通过中间体化合物(4)与胺(6)反应制备。

[0115] 本发明对PCT/IB2016/001507描述的方法进行了多处改进。

[0116] 首先,对最后步骤中间体化合物(2)与(3)反应的工艺条件进行了改进。因此,不再使用偶联剂TBTU,而是使用偶联剂如N,N,N',N'-四甲基-0-(7-氮杂苯并三氮唑-1-基)脲六氟磷酸盐(HATU)和1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDCI)代替。此外,使用替代碱,如二异丙基乙胺(DIPEA)和4-二甲氨基吡啶(DMAP),以及三乙胺。

[0117] 其次,并非如PCT/IB2016/001507所述让中间体化合物(4)与胺(6)反应,然后将叔丁酯水解,得到化合物(2),而是先将中间体化合物(4)中的叔丁酯单元水解得到羧酸(5),然后再让羧酸(5)与胺(6)反应得到化合物(2)。

[0118] 本发明的另一个方面提供一种制备式(1)化合物的方法,所述方法包括将式(2)化合物与式(3)化合物反应:



[0121] 所述反应在非质子溶剂中,在叔胺碱和酰胺键促进剂存在下进行,其中所述酰胺键促进剂选自N,N,N',N'-四甲基-0-(7-氮杂苯并三氮唑-1-基)脲六氟磷酸盐(HATU)和1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDCI)。

[0122] 在一个具体实施例中,所述酰胺键促进剂是N,N,N',N'-四甲基-0-(7-氮杂苯并三氮唑-1-基)脲六氟磷酸盐(HATU)。

[0123] 所述方法中使用的叔胺碱的实例有二异丙基乙胺(DIPEA)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)和三乙胺及其混合物。

[0124] 在一个具体实施例中,所述叔胺碱是二异丙基乙胺(DIPEA)。

[0125] 非质子溶剂的实例有二氯甲烷、乙酸乙酯和二甲基甲酰胺。

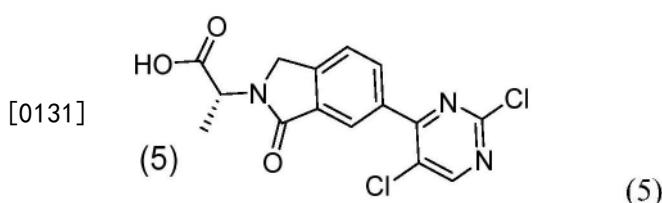
[0126] 在一个具体实施例中,所述非质子溶剂是二氯甲烷。

[0127] 在一个优选实施例中,提供一种制备式(1)化合物的方法,所述方法包括在非质子溶剂二氯甲烷中,在叔胺碱二异丙基乙胺(DIPEA)和酰胺键促进剂N,N,N',N'-四甲基-0-(7-氮杂苯并三氮唑-1-基)脲六氟磷酸盐(HATU)存在下,使式(2)化合物与式(3)化合物反应。

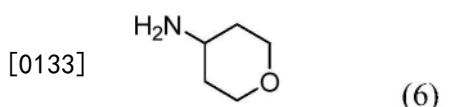
[0128] 化合物(2)和化合物(3)之间的反应通常在没有外部加热条件下进行,可以在例如温度不超过25℃条件下进行。因此,例如,一旦将反应物混合形成反应混合物,就可以在温度15-25℃搅拌反应混合物,直到反应完成。

[0129] 另一方面,本发明提供一种制备此处定义的式(1)化合物的方法,所述方法包括:

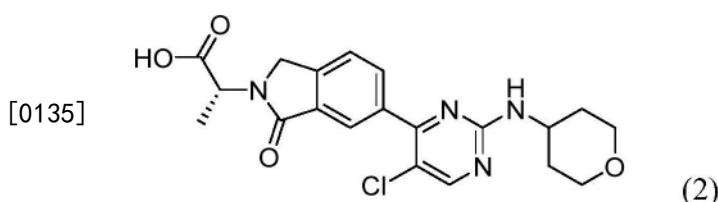
[0130] a) 使式(5)化合物:



[0132] 与式(6)化合物反应,



[0134] 得到式(2)化合物:



[0136] 及

[0137] b) 使式(2)化合物与式(3)化合物反应:



(3),

[0139] 得到式(1)化合物,然后任选形成其盐或结晶形式。

[0140] 步骤(a)通常在极性非质子溶剂如1-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)中进行。所述反应在高温条件下进行,例如,温度超过60℃,更通常超过70℃,特别是温度为75-95℃(例如,80-95℃)。

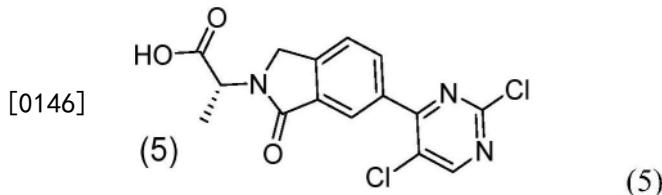
[0141] 步骤(a)在碱的存在下进行,碱可以是无机碱,如碱金属碳酸盐,例如,碳酸钾。

[0142] 可以对式(5)化合物和式(6)化合物之间的反应进程进行监测,从而确定反应的程度。例如,可以对反应进行监测,直到式(5)化合物的剩余含量低于期望的水平(例如,低于其原来的量的1mol%)。步骤(a)的反应时间通常是1至8小时,例如,2至7小时,通常是4至6小时。

[0143] 步骤(b)在上文所描述化合物(2)和化合物(3)反应生成化合物(1)的条件下进行。

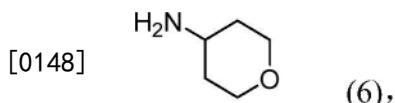
[0144] 本发明的另一个方面提供一种制备式(2)化合物的方法,所述方法包括:

[0145] a)使式(5)化合物:



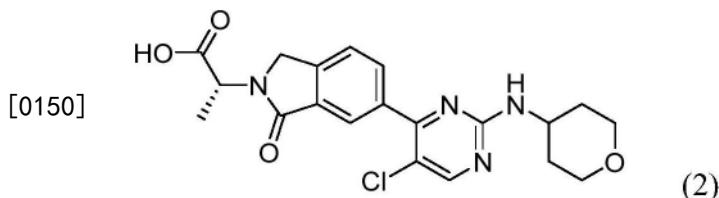
(5)

[0147] 与式(6)化合物反应,



(6),

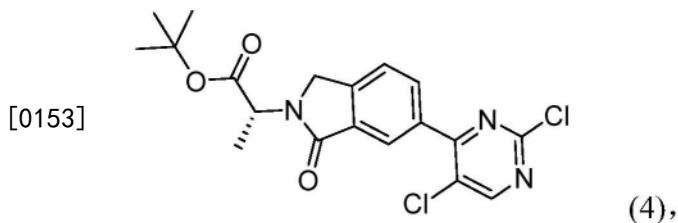
[0149] 得到式(2)化合物:



(2)

[0151] 所述反应在上文步骤(b)描述的条件下进行。

[0152] 化合物(5)可以通过式(4)的叔丁酯化合物水解制备:



(4),

[0154] 例如,采用无机酸,如浓盐酸。水解反应可通过温和加热协助完成,例如,温度30-45℃,更通常是35-40℃。可以采用烃类或氯代烃类助溶剂。其中一种助溶剂是甲苯。

[0155] 化合物(4)可以采用PCT/IB2016/001507描述的方法制备;参见例如其中的制备94。

[0156] 包含式(1)化合物的组合物

[0157] 式(1)化合物在水中的溶解性相对较差。因此,本发明提供化合物(1)的组合物,其包含不是水的主要媒介(vehicle)。所述组合物适合口服。

[0158] 我们已经发现,化合物(1)在许多非水溶剂中具有良好的溶解性。因此,本发明提供包含式(1)化合物和一媒介的药物组合物,所述媒介选自:

[0159] -C₂₋₄醇;

[0160] -聚醚化合物;

[0161] -C₈-C₁₈长链脂肪酸与甘油或丙二醇的单酯;

[0162] -C₈-C₁₀长链脂肪酸的二甘油酯或三甘油酯;

[0163] 及它们的混合物。

[0164] 所述药物组合物可以是化合物(1)在媒介中的溶液形式。

[0165] 本发明的另一方面提供一种制备含式(1)化合物的药物组合物的方法,所述方法包括将式(1)化合物分散在媒介中,所述媒介选自:

[0166] -C₂₋₄醇;

[0167] -聚醚化合物;

[0168] -C₈-C₁₈长链脂肪酸与甘油或丙二醇的单酯;

[0169] -C₈-C₁₀长链脂肪酸的二甘油酯或三甘油酯;

[0170] 及它们的混合物。

[0171] 通常,将式(1)化合物分散在媒介中,形成溶液或悬浮液。在一个实施例中,式(1)化合物悬浮在媒介中。在另一个实施例中,式(1)化合物溶解在媒介中形成悬浮液。

[0172] 所述媒介可包括单羟基或多羟基C₂₋₄醇,优选C₂₋₃醇,例如,乙醇或丙二醇。

[0173] 当所述媒介包含聚醚化合物时,所述聚醚化合物可以是聚乙二醇(PEG)。该聚乙二醇的平均分子量可以是200至10,000g/mol,例如,300至8,000g/mol。在一个实施例中,所述聚乙二醇的平均分子量是大约200至400g/mol,例如,300至450g/mol。

[0174] 根据媒介各组分的性质和相对量,所述组合物可能是液体、半固体或固体。例如,当采用较高分子量PEG时,所述组合物的粘度可增大至其被视为“半固体”或固体的程度,而采用较低分子量PEG时,可能得到液体组合物。在这样的组合物的背景下,提到溶液时,包括固体溶液及液体(或半固体)溶液。

[0175] 替代地或额外地,所述媒介可以包含辛酸或癸酸及辛酸或癸酸的单酯、二酯和三酯。这些酯的实例包括丙二醇单辛酸酯、单辛酸甘油酯、二辛酸甘油酯、三辛酸甘油酯、单癸酸甘油酯、二癸酸甘油酯、三癸酸甘油酯。辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯(caprylocaproyl macrogol-8glycerides) (Labrasol®ALF)是商业可购媒介,包含辛酸和癸酸的单甘油酯、二甘油酯和三甘油酯及平均分子量200至400g/mol的聚乙二醇的单酯和双酯。

[0176] 在另一个替代方案中,所述媒介可包括较长链的脂肪酸(如亚油酸或油酸)的单甘油酯。这些媒介的实例包括单亚油酸甘油酯(Maisine CCTM)和单油酸甘油酯(40型,PeceolTM)。

[0177] 在一个实施例中,所述媒介选自乙醇、丙二醇、聚乙二醇及它们的混合物。例如,所

述媒介可包括丙二醇和乙醇的组合,例如,丙二醇和乙醇的比率为50:50至90:10%w/w的组合(例如,丙二醇和乙醇的比率为75:25或85:15%w/w)。在一个实施例中,所述媒介包括比率为75:25至90:10%w/w的丙二醇和乙醇的组合。

[0178] 在另一个实施例中,所述媒介选自乙醇、聚乙二醇400(PEG 400)和丙二醇,及它们的混合物。

[0179] 所述组合物通常允许口服化合物(1)的每日总剂量不超过1.2g/天。在本发明的组合物中,媒介中化合物(1)的浓度可以是10mg/ml-130mg/ml,例如,40mg/ml-125mg/ml,更特别是110mg/ml-125mg/ml。浓度120mg/ml时,服用10ml组合物相当于服用1.2g化合物(1)。

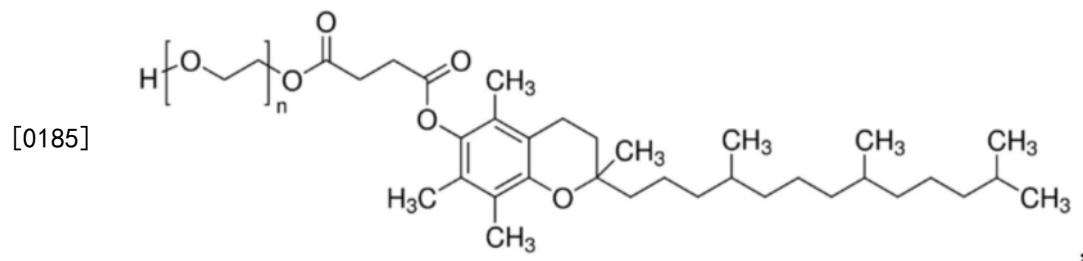
[0180] 或者,所述组合物可以包含在胶囊内。用于递送本文所述组合物的合适胶囊包括硬明胶胶囊或软明胶胶囊。在一个实施例中,所述组合物包含在软明胶胶囊内。此处使用的词语“明胶”不仅指由明胶制备的胶囊,而且还指由非明胶相当物(例如,普鲁兰多糖(pullulan)或改性纤维素,如羟丙基甲基纤维素)制备的胶囊。

[0181] 所述组合物还可包括对化合物(1)在所选媒介中溶解性有帮助的一种或多种表面活性剂。当所述组合物在胃肠道中被稀释时,所述表面活性剂还可以抑制式(1)化合物的沉淀。

[0182] 所述表面活性剂通常是非离子表面活性剂。

[0183] 所述非离子表面活性剂可以是,例如,多元醇酯、聚氧乙烯酯或泊洛沙姆。

[0184] 在一个实施例中,所述表面活性剂是具有下述结构式的生育酚聚乙二醇(tocopherol polyethylene glycol) (TPG),例如,D- α -生育酚聚乙二醇琥珀酸酯(TPGS):



[0186] 其中n平均值是大约10至大约30,更通常是大约15至大约27;例如,大约20至大约25。一个具体的TPGS是 α -生育酚聚乙二醇1000琥珀酸酯(近似平均分子量1513),其中聚氧乙烯基团[-O-CH₂-CH₂]_n的分子量是大约1000(例如,950至1050),n的平均值是大约22。多元醇酯的实例包括乙二醇酯和甘油酯和山梨糖醇酐(sorbitan)衍生物。

[0187] 山梨糖醇酐的脂肪酸酯(通常称为Span)及其乙氧基化衍生物(通常称为吐温(Tween))包括山梨糖醇酐单月桂酸酯(Span 20)、山梨糖醇酐单棕榈酸酯(Span 40)、山梨糖醇酐单硬脂酸酯(Span 60)、山梨糖醇酐单油酸酯(Span 80)、山梨糖醇酐三硬脂酸酯(Span 65)、山梨糖醇酐三油酸酯(Span 8)、聚氧乙烯(20)山梨糖醇酐单月桂酸酯(Tween 20)、聚氧乙烯(20)山梨糖醇酐单棕榈酸酯(Tween 40)、聚氧乙烯(20)山梨糖醇酐单硬脂酸酯(Tween 60)、聚氧乙烯(20)山梨糖醇酐单油酸酯(Tween 80)、聚氧乙烯(20)山梨糖醇酐三硬脂酸酯(Tween 65)和聚氧乙烯(20)山梨糖醇酐三油酸酯(Tween 85)。

[0188] 表面活性剂的其它具体实例包括聚氧乙烯40氢化蓖麻油(Cremophor RH 40、Kolliphor® RH40)、聚氧乙烯35蓖麻油(Cremophor EL、Kolliphor® EL)、聚山梨酯80(Tween 80)、Gelucire 44/14(月桂酰聚乙二醇-32甘油酸酯)、Solutol HS-15(聚乙二醇15羟基硬

脂酸酯) 和Labrasol®ALF (辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯)。在一个实施例中,所述表面活性剂是Cremophor RH 40。

[0189] 在一个实施例中,所述组合物包括式(1)化合物、乙醇和生育酚聚乙二醇(TPG),例如,D- α -生育酚聚乙二醇1000琥珀酸酯(TPGS)。乙醇和TPG可以以下面的比率存在:20:80的乙醇:TPG至60:40的乙醇:TPG,例如,30:70的乙醇:TPG至50:50的乙醇:TPG。

[0190] 在另一个实施例中,除式(1)化合物外,所述组合物还包含媒介,所述媒介包含:

[0191] (i)丙二醇;

[0192] (ii)非离子表面活性剂(如Cremophor RH40和生育酚聚乙二醇);及任选地

[0193] (iii)乙醇。

[0194] 在另一个实施例中,除式(1)化合物外,所述组合物还包含媒介,所述媒介包含:

[0195] (i)丙二醇;

[0196] (ii)聚氧乙烯酯非离子表面活性剂;及任选地

[0197] (iii)乙醇。

[0198] 聚氧乙烯酯非离子表面活性剂可以是例如前面定义的生育酚聚乙二醇(TPG),如D- α -生育酚聚乙二醇琥珀酸酯(TPGS)。

[0199] 在一个具体实施例中,所述组合物不含乙醇(iii)。

[0200] 在另一个具体实施例中,所述组合物包含乙醇(iii)。

[0201] 在另一个具体实施例中,所述媒介包含丙二醇和生育酚聚乙二醇(TPG)。在此实施例中,所述媒介可包含TPGS,其中丙二醇:TPGS(重量比)是1:2至10:1,并且可以任选进一步包含乙醇,其中乙醇:丙二醇(例如,D- α -生育酚聚乙二醇1000琥珀酸酯(TPGS))的重量比是1:10至2:1,丙二醇:生育酚聚乙二醇的重量比是1:2至5:1;及任选进一步包含乙醇,乙醇:丙二醇的重量比是1:10至2:1。

[0202] 包含式(1)化合物、丙二醇、聚氧乙烯酯非离子表面活性剂,及任选乙醇的组合物可以方便地包含在胶囊内,例如,硬明胶胶囊或软明胶胶囊内。

[0203] 步骤a)中式(1)化合物可以是结晶形式。在一个实施例中,步骤a)中式(1)化合物可以是此处所述的结晶形式。

[0204] 药物化合物的低水溶性可以通过降低所述化合物的固体粒径得到改善。通过降低所述药物化合物的粒径,增大了可溶剂化的表面积。

[0205] 因此,本发明的另一方面提供颗粒形式的质量中位直径1 μm 至100 μm 的式(1)化合物。

[0206] 所述颗粒的质量中位直径可以是2 μm 至50 μm ,例如,2 μm 至25 μm ,或2 μm 至10 μm 。所述颗粒可以口服(通常是可口服制剂,任选包含一种或多种药学上可以接受的赋形剂)或通过其它途径施用,例如,吸入。当颗粒用于通过吸入施用时,颗粒的质量中位直径通常是1 μm 至10 μm ,或1 μm 至5 μm 。

[0207] 颗粒尺寸可以采用图像分析法、激光衍射法或筛分法测定。

[0208] 所述颗粒可以采用机械微粉化法或基于溶液的相分离法制备。机械微粉化法的实例包括研磨技术。

[0209] 基于溶液的技术通常涉及采用液体、压缩气体、近临界液体或超临界流体作为溶剂或低温介质用于快速冷冻。这些技术涉及采用蒸发、膨胀、冷冻或改变溶剂组成使溶剂与

药物化合物进行相分离。

[0210] 颗粒可以采用冻干法制备。或者,所述颗粒可以采用喷雾干燥形成。

[0211] 定义

[0212] 式(1)化合物在本申请中可以以其化学名称指称,或者,为了方便起见,称为“所述化合物”、“所述式(1)化合物”、“化合物(1)”或“本发明的化合物”。这些代名词都指的是上文式(1)所示化合物,化学名称为(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己基-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺。

[0213] 此处定义粒径使用的词语“质量中位直径”定义为50% (质量)的颗粒的直径比其更大及50% (质量)的颗粒的直径比其更小的直径。该直径指的是等效球直径,对于非球形颗粒来说,等于与非球形颗粒体积相同的球形颗粒的直径。

[0214] ERK1/2指的是细胞外信号调节激酶(ERK)的ERK1和ERK2同工酶中的任一种酶或两种酶。

[0215] “效力”是以产生给定强度效果所需量表示的药物活性指标。效力高的药物在低浓度下引发较大响应。效力与亲和力和功效成比例。亲和力是药物与酶结合的能力。功效是靶标占有与引发分子、细胞、组织或系统水平响应的能力之间的关系。

[0216] 词语“抑制剂”指的是酶抑制剂,是阻断或阻碍ERK1/2介导的生物反应的配体或药物类型。抑制剂通过与酶上的活性位点或与别构位点(allosteric site)结合而调节其效果,或者,它们可以在通常不参与酶活性生物调节的独特结合位点相互作用。抑制可以是直接或间接引起的,可以通过任何机制介导和以任何生理水平介导。因此,配体或药物引起的抑制在不同情况下可能以功能上不同的方式表现出来。根据抑制剂-酶复合物的寿命,抑制活性可以是可逆的或不可逆的,而抑制剂-酶复合物的寿命取决于抑制剂-酶的结合性质。

[0217] 在治疗状况(condition)即状态、失调(disorder)或疾病的背景中,此处使用的词语“治疗(treatment)”通常涉及处理和治疗,不管针对的是人类或动物(例如,兽医应用),其中达到某些期望的治疗效果,例如,抑制状况的进程,包括减慢发展速度、停止(halt)发展速度、缓解状况、减轻或缓解与所治疗状况有关的或所治疗状况引发的至少一种症状及治愈状况。例如,治疗可以减轻失调的一种或几种症状或完全根治失调。

[0218] 在治疗状况即状态、失调或疾病的背景中,此处使用的词语“预防”(即使用化合物作为预防措施)通常涉及预防或防止,不管是针对人类或动物(例如兽医应用),其中达到某些期望的预防效果,例如,预防疾病的发生或防止疾病的发生。预防包括在一段不确定的时间内全面和总体阻断失调的所有症状、仅仅减慢疾病的一种或几种症状出现,或降低疾病的发生可能性,并不包括缓解状况、减轻或缓解与所治疗状况有关的或所治疗状况引发的至少一种症状及治愈状况。

[0219] 预防或治疗疾病状态或状况(如癌症)的范围包括减轻或减少例如癌症的发生率。

[0220] 此处使用的词语“介导”,如与此处所描述的ERK1/2一起使用时(以及用于,例如,各种生理过程、疾病、状态、状况、治疗、处理或介入),意在有限制地运作,从而使本词语应用的各种过程、疾病、状态、状况、治疗和介入是蛋白质在其中起生物作用的那些过程、疾病、状态、状况、治疗和介入。在该词语应用于疾病、状态或状况时,蛋白质起的生物作用可能是直接的或间接的,可能对于疾病、状态或状况(或其病原学或进程)表现出症状是必须

的与/或足够的。因此,蛋白质功能(尤其是异常水平的功能,例如,过表达或欠表达)不一定是疾病、状态或状况的近端原因(proximal cause):相反,我们设想被介导的疾病、状态或状况包括那些多因子病因和复杂进程的疾病、状态或状况,其中仅仅部分涉及有问题的蛋白质。在该词语用于治疗、预防或介入时,蛋白质起的作用可能是直接的或间接的,可能对于治疗操作、预防或介入结果是必须的与/或足够的。因此,蛋白质介导的疾病状态或状况包括形成针对任何特定癌症药物或治疗的抗性。

[0221] 与单独的化合物/制剂分别施用时的治疗效果相比,本发明的组合可产生治疗上有效的效果。

[0222] 词语“有效的”包括有益的效果,如加和性(additivity)、协同作用、减少副作用、降低毒性、延长疾病进程时间、延长生存时间、一种试剂对另一种试剂敏感或重新敏感,或改善反应率(response rate)。有利的是,有效的效果可能允许降低每种或任一组分的患者施用剂量,从而降低化疗的毒性,同时实现与/或维持相同的治疗效果。在本发明中,“协同”效应指的是组合所产生的治疗效果大于组合中的试剂单独施用时的治疗效果总和。在本发明中,“加和”效应指的是组合所产生的治疗效果大于组合中任一试剂单独施用时的治疗效果。在实体瘤的情况下,本发明中使用的词语“反应率”指的是在给定时间点(例如12周)时肿瘤尺寸的减小程度。因此,例如,50%的反应率指的是肿瘤尺寸减小50%。此处的“临床反应”指的是反应率等于50%或大于50%。“部分反应”在此处定义为反应率小于50%,条件是反应率大于0%。

[0223] 此处使用的词语“组合”,例如,应用于两种或以上化合物与/或试剂时,指的是其中联合了两种或以上试剂的材料。在本发明中,词语“组合的”和“组合”相应地解释。

[0224] 组合中两种或以上化合物/试剂的联合(association)可能是物理的或非物理的。物理联合组合化合物/试剂的实例包括:

[0225] • 在混合物(例如,在同一单位剂量(unit dose)中)中包含两种或以上化合物/试剂的组合物(例如,单一制剂(unitary formulation));

[0226] • 包含其中两种或以上化合物/试剂是化学/物理化学连接(例如,交联、分子聚集或与常用媒介部分(vehicle moiety)结合)的材料的组合物;

[0227] • 包含其中两种或以上化合物/试剂化学/物理化学共包装(例如,置于脂囊泡、颗粒(如微颗粒或纳米颗粒)或乳液液滴上或置于它们的内部)的材料的组合物;

[0228] • 药物试剂盒、药物包(pack)或患者包,其中两种或以上化合物/试剂共包装或共同呈现(例如,作为一系列单位剂量的一部分);

[0229] 非物理联合组合化合物/试剂的实例包括:

[0230] • 包含两种或以上化合物/试剂中的至少一种化合物/试剂的材料(例如,非单一制剂)及即时联合所述至少一种化合物以形成所述两种或以上化合物/试剂的物理组合的说明书;

[0231] • 包含两种或以上化合物/试剂中的至少一种化合物/试剂的材料(例如,非单一制剂)以及用所述两种或以上化合物/试剂组合治疗的说明书;

[0232] • 包含两种或以上化合物/试剂中的至少一种化合物/试剂的材料以及向已经施用(或正在施用)所述两种或以上化合物/试剂中的其它化合物/试剂的患者群施用的说明书;

[0233] • 材料,所述材料包含两种或以上化合物/试剂中的至少一种化合物/试剂,其量或形式是专门适于与所述两种或以上化合物/试剂中的其它化合物/试剂组合使用。

[0234] 此处使用的词语“组合治疗”指的是包括使用两种或以上化合物/试剂的组合(如上文定义)的治疗。因此,在本申请中,“组合治疗”、“组合”和使用“组合”的化合物/试剂可能指的是作为同一总治疗方案一部分而施用的化合物/试剂。因此,两种或以上化合物/试剂中的每种化合物/试剂的剂量可能不同:每种化合物/试剂可以同时施用或在不同的时间施用。因此,应该理解的是,组合中的化合物/试剂可以在同一药物制剂(如一起)中施用或在不同的药物制剂(即分开)中按顺序施用(例如,前或后)或同时施用。在同一制剂中同时施用是作为单一制剂施用,而在不同的药物制剂中同时施用是作为非单一制剂施用。组合治疗中两种或以上化合物/试剂中的每种化合物/试剂的剂量相对于施用途径也可能不同。

[0235] 此处使用的词语“药物试剂盒”定义的是药物组合物的一系列的一个或多个单位剂量及计量手段(如测量装置)与/或给药手段(如吸入器或注射器),任选所有的东西都包含在同一外包装内。在包含两种或以上化合物/试剂的组合的药物试剂盒中,单种化合物/试剂可以是单一或非单一制剂。单位剂量可能包含在泡罩包装中。药物试剂盒可任选进一步包括使用说明书。

[0236] 此处使用的词语“药物包”定义的是药物组合物的一系列的一个或多个单位剂量,任选包含在同一外包装内。在包含两种或以上化合物/试剂的组合的药物包中,单种化合物/试剂可能是单一或非单一制剂。单位剂量可包含在泡罩包装中。药物包可能任选进一步包括使用说明书。

[0237] 盐、溶剂化物、互变异构体和同位素

[0238] 除非上下文另外表明,否则提到式(1)化合物时包括其离子形式、盐、溶剂化物、互变异构体和同位素变体。

[0239] 盐

[0240] 所述式(1)化合物可以以盐形式存在,特别是以酸加成盐形式存在。除非上下文另外表明,否则,所有这些盐都属于本发明的范围,式(1)化合物包括这些化合物的盐形式。

[0241] 化合物(1)的盐可以采用传统化学方法,如Pharmaceutical Salts:Properties, Selection, and Use, P. Heinrich Stahl (Editor), Camille G. Wermuth (Editor), ISBN: 3-90639-026-8, Hardcover, 388 pages, August 2002中描述的方法由化合物(1)合成。通常,这些盐可以通过在水中或在有机溶剂中或在两者的混合物中,将所述化合物的游离碱形式与合适的酸反应而制备;通常,采用非水介质,如醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈。

[0242] 酸加成盐(单盐或二盐)可以采用范围广泛的各种酸(无机酸和有机酸)形成。酸加成盐的实例包括以下酸形成的单盐或二盐:乙酸、2,2-二氯乙酸、己二酸、藻朊酸、抗坏血酸(例如,L-抗坏血酸)、L-天冬氨酸、苯磺酸、苯甲酸、4-乙酰胺基苯甲酸、丁酸、(+)-樟脑酸、樟脑磺酸、(+)-(1S)-樟脑-10-磺酸、癸酸、己酸、辛酸、肉桂酸、柠檬酸、环己酸、十二烷基硫酸、乙烷-1,2-二磺酸、乙烷磺酸、2-羟基乙烷磺酸、甲酸、富马酸、半乳糖酸、龙胆酸、葡萄糖酸、D-葡萄糖酸、葡萄糖醛酸(例如D-葡萄糖醛酸)、谷氨酸(例如L-谷氨酸)、 α -羟基丙二酸、乙醇酸、马尿酸、氢溴酸(例如氢溴酸、盐酸、氢碘酸)、羟乙磺酸、乳酸(例如(+)-L-乳酸、(土)-DL-乳酸)、乳糖酸、马来酸、苹果酸、(-)-L-苹果酸、丙二酸、(土)-DL-扁桃酸、甲烷磺酸、萘-2-磺酸、萘-1,5-二磺酸、1-羟基-2-萘甲酸、烟酸、硝酸、油酸、乳清酸、草酸、棕榈酸、帕莫

酸、磷酸、丙酸、丙酮酸、L-焦谷氨酸、水杨酸、4-氨基-水杨酸、癸二酸、硬脂酸、琥珀酸、硫酸、鞣酸、(+) -L-酒石酸、硫氰酸、对甲苯磺酸、十一碳烯酸、戊酸,以及酰化氨基酸和阳离子交换树脂。

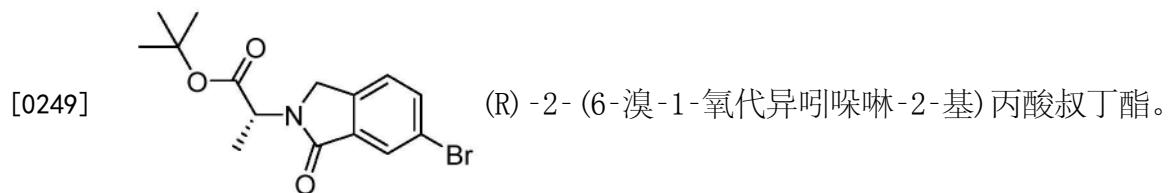
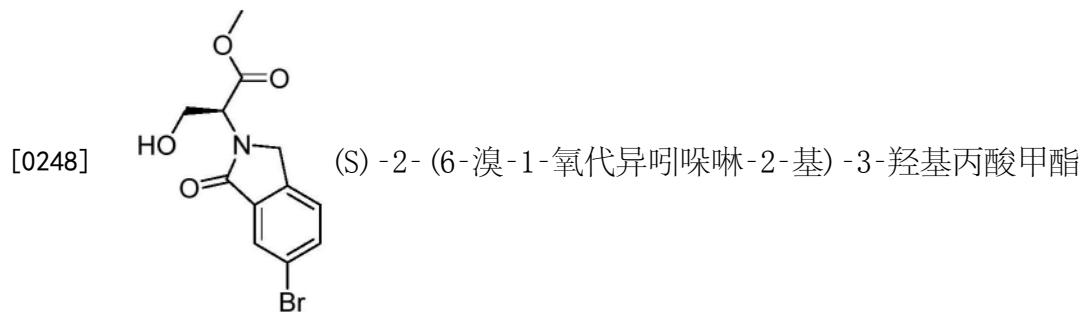
[0243] 一组具体的盐由以下酸形成的盐组成:乙酸、盐酸、氢碘酸、磷酸、硝酸、硫酸、柠檬酸、乳酸、琥珀酸、马来酸、苹果酸、羟乙磺酸、富马酸、苯磺酸、甲苯磺酸、甲烷磺酸(甲磺酸)、乙烷磺酸、萘磺酸、戊酸、乙酸、丙酸、丁酸、丙二酸、葡萄糖醛酸、乳糖酸。一种具体的盐是盐酸盐。

[0244] 本发明化合物的盐形式通常是药学上可接受的盐,药学上可接受的盐的实例在 Berge et al., 1977, "Pharmaceutically Acceptable Salts," J.Pharm.Sci., Vol.66, pp.1-19中进行了讨论。但是,也可以将非药学上可接受的盐制备为中间体形式,然后,将其转化为药学上可接受的盐。这类非药学上可接受的盐的形式,可用于例如本发明化合物的提纯或分离,也是本发明的一部分。

[0245] 几何异构体和互变异构体

[0246] 除非上下文另外表明,否则所述式(1)化合物可以以多种不同互变异构体形式存在,提及式(1)化合物时包括所有这些形式。为了消除疑问,所述化合物可能以其中一种或几种互变异构体的形式存在,且仅专门描述或说明了一种形式时,不管怎样,式(1)还包括所有其它形式。

[0247] 采用“散列线(hashed line)”或“楔形线”表示立体化学的惯用方法来表示特定的立体化学形式,例如,如以下两种分子所示。



[0250] 光学异构体可以通过其光学活性来表征和鉴定(即作为+和-异构体,或d和l异构体)或它们可以采用Cahn, Ingold and Prelog制定的“R和S”命名法,根据其绝对立体化学进行表征,参见Advanced Organic Chemistry by Jerry March, 4th Edition, John Wiley & Sons, New York, 1992, 第109-114页, 及参见Cahn, Ingold & Prelog, Angew.Chem.Int.Ed. Engl., 1966, 5, 385-415。

[0251] 光学异构体可以采用包括手性色谱法(手性载体色谱)在内的多种技术分离,这些技术是本领域技术人员熟悉的。

[0252] 作为手性色谱法的替代方法,光学异构体的分离可以通过用手性酸(如(+) -酒石酸、(-) -焦谷氨酸、(-) -二-甲苯甲酰-L-酒石酸、(+) -扁桃酸、(-) -苹果酸和(-) -樟脑磺酸)

形成非对映异构体盐,通过优先结晶分离出非对映异构体,然后使盐离解,得到游离碱的单独对映异构体。同样,酸性化合物的光学异构体可以通过采用手性胺(如番木鳖碱(Brucine)、辛可尼丁、奎宁等)形成非对映异构体盐而分离。

[0253] 此外,对映异构体的分离可以通过以下方法实现:将对映体纯的手性助剂共价连接到化合物上,然后,采用传统方法如色谱法开展非对映异构体分离。然后,使前面提到的共价连接断裂,得到合适的对映体纯产品。例如,含游离羟基的手性化合物的光学异构体可以这样分离:形成莫舍酸(Mosher's acid)酯,然后,采用色谱法分离所得到的非对映异构体,然后使酯裂解,重新得到游离羟基。

[0254] 当示出本申请化合物的特定立体化学构象时,这可指的是至少55% (例如,至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%) 的所述化合物是以与所述化合物其它异构体形式不同的那种立体化学形式存在。在一个普通实施例中,式(1)所示化合物总量的99%或以上(例如,基本上全部)是以所描绘的立体化学构象存在。

[0255] 同位素变化

[0256] 此处,化合物(1)包括其所有药学上可接受的同位素标记变化形式,其中一个或多个原子被原子数相同但原子量或原子质量数与自然界中通常发现的原子量或原子质量数不同的原子代替。

[0257] 适合包含在本发明化合物中的同位素实例包括氢的同位素如²H(D)和³H(T),碳的同位素如¹¹C、¹³C和¹⁴C,氯的同位素如³⁶Cl,氟的同位素如¹⁸F,氮的同位素如¹³N和¹⁵N,及氧的同位素如¹⁵O、¹⁷O和¹⁸O。

[0258] 式(1)的某些同位素标记化合物,例如,那些包含放射性同位素的化合物,在药物与/或底物(substrate)组织分布研究中非常有用。式(1)化合物还具有宝贵的诊断性能,它们可用于检测或鉴定标记化合物和其它分子、肽、蛋白质、酶或受体之间复合物的形成。检测或鉴定方法可以采用以标记试剂如放射性同位素、酶、荧光物质、发光物质(例如,鲁米诺、鲁米诺衍生物、荧光素、水母发光蛋白质(aequorin)和荧光素酶)等标记的化合物。放射性同位素氚(即³H(T))和碳-14(即¹⁴C),由于容易引入和检测,用于这种用途时尤其有用。

[0259] 以较重的同位素如氘(即²H(D))进行取代,因代谢更稳定,例如,延长体内半衰期或降低剂量要求而具有某些治疗优势,因此,在某些情况下可优先选用。特别是,不管是否对氢进行了明确定义,或为了满足相关原子(特别是碳原子)价数而隐含氢的存在,本申请中提到氢时都应解释为包括¹H和²H。

[0260] 采用正电子发射同位素如¹¹C、¹⁸F、¹⁵O和¹³N进行取代,在正电子发射断层成像(PET)研究中非常有用,可用于检测目标占有情况。

[0261] 式(1)的同位素标记化合物通常可以采用本领域技术人员熟悉的传统方法制备或采用所附实例和制备中描述的类似方法,采用合适的同位素标记试剂代替之前采用的非标记试剂来制备。

[0262] 复合物

[0263] 式(1)还在其范围内包括所述化合物的复合物(例如,具有化合物如环糊精的包含复合物(inclusion complex)或包合物,或与金属的络合物)。包含复合物、包合物和金属络合物可以采用本领域技术人员熟悉的方法形成。

[0264] 生物性质

[0265] 化合物(1)设想用于药物或治疗。

[0266] 本发明的化合物是ERK1/2的抑制剂,将用于预防或治疗ERK1/2在其中起作用的此处所述的疾病或状况,例如,下面讨论的疾病和状况及上文“背景技术”中描述的疾病和状况。此外,本发明的化合物将用于预防或治疗ERK1/2介导的疾病或状况,例如,需要ERK1/2活性或因MAPK通路上游组分(如RAS、K-RAS、NRAS和RAF)激活突变而上调ERK1/2活性的疾病或状况,如癌症。

[0267] 防止或预防或治疗疾病状态或状况(如癌症)包括降低或减少疾病或状况的发生率。因此,例如,本发明的化合物设想用于减少或降低癌症发生率。

[0268] 下面的式(1)化合物包括此处描述的式(1)化合物的结晶形式及按照此处所述方法制备的式(1)化合物。

[0269] 因此,在本发明的其它实施例中提供:

[0270] • 药物用式(1)化合物。

[0271] • 预防或治疗ERK1/2介导的疾病或状况的式(1)化合物。

[0272] • 式(1)化合物用于制备预防或治疗ERK1/2介导的疾病或状况的药物的用途。

[0273] • 一种预防或治疗受试者(subject)(例如,有此需要的哺乳动物受试者,如人类)ERK1/2介导的疾病或状况的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的式(1)化合物。

[0274] • 降低或减少ERK1/2介导的疾病或状况发生率的式(1)化合物。

[0275] • 式(1)化合物用于制备降低或减少ERK1/2介导的疾病或状况发生率的药物的用途。

[0276] • 一种降低或减少受试者(例如,有此需要的哺乳动物受试者,如人类)ERK1/2介导疾病或状况发生率的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的式(1)化合物。

[0277] 更特别的是,化合物(1)是ERK1/2抑制剂。例如,本发明的化合物对ERK1或ERK2以及特别是对ERK1/2具有抑制效力。

[0278] 所述ERK抑制剂式(1)化合物能够与ERK1/2结合,对ERK1/2显示出效力。在一个实施例中,所述抑制剂式(1)化合物对ERK1/2具有选择性(相对于其它激酶家族成员),且相对于其它激酶家族成员,它们优先与ERK1与/或ERK2结合与/或抑制ERK1与/或ERK2。

[0279] ERK1/2在控制细胞信号传导方面的功能还与许多疾病有关,包括与细胞聚积有关的疾病(如癌症、自身免疫性疾病、炎症和再狭窄)、过度凋亡导致细胞消亡的疾病(如中风、心力衰竭)、神经退行性病变(如阿尔茨海默症、帕金森氏症、亨廷顿氏舞蹈病、肌萎缩性脊髓侧索硬化症)、艾滋病、局部缺血(中风、心肌梗塞)和骨质疏松症或治疗自身免疫性疾病,如多发性硬化(MS)。

[0280] 前面任一实施例提到的ERK1/2介导的疾病或状况可以是上述任一种或多种疾病或状况。

[0281] 因此,此处定义的本发明化合物还设想可用于治疗其它疾病,如炎症、肝炎、溃疡性结肠炎、胃炎、自身免疫性疾病、炎症、再狭窄、中风、心力衰竭、神经退行性病变(如阿尔茨海默症、帕金森氏症、亨廷顿氏舞蹈病、肌强直性营养不良和肌萎缩性脊髓侧索硬化症)、艾滋病、局部缺血(如外伤性脑损伤、脊椎损伤、脑缺血、脑缺血/再灌注(I/R)损伤、急性和慢性CNS损伤局部缺血、中风或心肌梗塞)、肌肉骨骼系统退行性疾病(如骨质疏松症)、自身免疫性疾病,如多发性硬化(MS)和I型糖尿病,及眼睛疾病,如编程性细胞死亡失控导致的

视网膜变性。

[0282] 由于对ERK1/2具有亲和力,本发明化合物将用于提供控制细胞信号传导的手段。因此,可预期,可证明所述化合物在治疗或预防增生性疾病如癌症方面有用。

[0283] 因此,在其它实施例中,本发明提供:

[0284] • 用于预防或治疗增生性疾病(如癌症)的式(1)化合物。

[0285] • 式(1)化合物用于制备预防或治疗增生性疾病(如癌症)的药物的用途。

[0286] • 一种预防或治疗受试者(例如,有此需要的哺乳动物受试者,如人类)增生性疾病(如癌症)的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的式(1)化合物。

[0287] • 用于降低或减少增生性疾病(如癌症)发生率的式(1)化合物。

[0288] • 式(1)化合物用于制备降低或减少增生性疾病(如癌症)发生率的药物的用途。

[0289] • 一种降低或减少受试者(例如,有此需要的哺乳动物受试者,如人类)增生性疾病(如癌症)发生率的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的式(1)化合物。

[0290] 可以治疗(或抑制)的癌症(及其良性肿瘤)的实例包括但不限于上皮源肿瘤(各种类型的腺瘤和癌,包括腺癌、鳞癌、移行细胞癌和其它癌症),如膀胱癌和尿道癌、乳腺癌、胃肠道癌(包括食道癌、胃癌(胃的癌)、小肠癌、结肠癌、直肠癌和肛门癌)、肝癌(肝细胞癌)、胆囊癌和胆道系统癌、胰腺外分泌癌、肾癌、肺癌(例如,腺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、细支气管肺泡癌和间皮瘤)、脑癌和颈癌(例如,舌癌、口腔癌、喉癌、咽癌、鼻咽癌、扁桃体癌、唾腺癌、鼻腔癌和鼻窦癌)、卵巢癌、输卵管癌、腹膜癌、阴道癌、外阴癌、阴茎癌、宫颈癌、子宫肌层癌、子宫内膜癌、甲状腺癌(例如,甲状腺滤泡癌)、肾上腺癌、前列腺癌、皮肤癌和附件癌(例如,黑色素瘤、基底细胞癌、鳞状细胞癌、角化棘皮瘤、异常增生癌);血液学恶性肿瘤(即白血病、淋巴瘤)和癌前血液病和交界性恶性疾病,包括淋巴系统血液学恶性肿瘤和相关疾病(例如,急性淋巴细胞白血病[ALL]、慢性淋巴细胞白血病[CLL]、B细胞淋巴瘤(如弥漫性大B细胞淋巴瘤[DLBCL])、滤泡性淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤和白血病、自然杀伤[NK]细胞淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、毛细胞白血病、意义未明单克隆丙种球蛋白病、浆细胞瘤、多发性骨髓瘤和移植后淋巴增生性疾病),及髓系血液学恶性肿瘤和相关疾病(例如急性髓性白血病[AML]、慢性髓性白血病[CML]、慢性粒单核细胞白血病[CMML]、高嗜酸性粒细胞综合症、骨髓增生性疾病(如真性红细胞增多症、原发性血小板增多症和原发性骨髓纤维化)、骨髓增生性综合征、骨髓增生异常综合征和早幼粒细胞性白血病);间质源肿瘤,例如,软组织肉瘤、骨肉瘤或软骨的肉瘤(如骨肉瘤、纤维肉瘤、软骨肉瘤、横纹肌肉瘤、平滑肌肉瘤、脂肪肉瘤、血管肉瘤、卡波济氏肉瘤、尤因氏肉瘤、滑膜肉瘤、上皮样肉瘤)、胃肠间质瘤、良性和恶性组织细胞瘤,及隆突性皮肤纤维肉瘤;神经嵴细胞衍生肿瘤,包括黑素细胞肿瘤(例如恶性黑素瘤或葡萄膜黑色素瘤)、周围神经和颅神经肿瘤、周围成神经细胞肿瘤(例如成神经细胞瘤)、CNS胚胎性瘤、副神经节瘤;中枢神经系统或周围神经系统肿瘤(例如星形细胞瘤、神经胶质瘤和成胶质细胞瘤、脑膜瘤、室管膜瘤、松果体瘤和神经鞘瘤);内分泌肿瘤(例如垂体腺瘤、肾上腺瘤、胰岛细胞瘤、甲状旁腺瘤、类癌和甲状腺髓样癌);眼部肿瘤和附件肿瘤(例如成视网膜细胞瘤);生殖细胞和滋养细胞肿瘤(例如畸胎瘤、精原细胞瘤、无性细胞瘤、葡萄胎和绒毛膜癌);及儿科和胚胎肿瘤(例如,髓母细胞瘤、成神经细胞瘤、肾母细胞瘤和原始神经外胚层肿瘤);或各种综合症、先天性疾病或患者容易恶变的疾病(例如,着色性干皮病)。可以治疗(或抑制)的其它癌症实例(及其良性肿

瘤)包括但不限于睾丸肿瘤和脑肿瘤(例如神经瘤)。

[0291] 因此,本发明的药物组合物、用途或方法用于治疗出现异常细胞增长(即不受控与/或快速细胞增长)的疾病或状况,在一个实施例中,所述出现异常细胞增长的疾病或状况是癌症。

[0292] 在一个实施例中,血液学恶性肿瘤是白血病。在另一个实施例中,血液学恶性肿瘤是淋巴瘤。在一个实施例中,本发明的化合物用于预防或治疗白血病,例如,急性或慢性白血病,特别是急性髓性白血病(AML)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)或慢性髓性白血病(CML)。在一个实施例中,本发明的化合物用于预防或治疗淋巴瘤,例如,急性或慢性淋巴瘤,特别是伯基特淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤,或弥漫性大B细胞淋巴瘤。在一个实施例中,本发明的化合物用于预防或治疗急性髓性白血病(AML)或急性淋巴细胞白血病(ALL)。在一个实施例中,癌症是AML。在另一个实施例中,癌症是CLL。

[0293] 许多疾病的特征在于持续且不受调控的血管生成。慢性增生性疾病通常伴随深层(profound)血管生成,导致或维持炎症与/或增生状态,或通过血管侵入性增生而导致组织破坏。人们发现,肿瘤增长和转移是血管生成依赖性的。因此,本发明的化合物可用于预防和破坏肿瘤血管生成。特别是,本发明的化合物可用于治疗转移和转移癌。

[0294] 转移或转移性疾病是疾病从一个器官或部位扩散到另一个非邻近器官或部位。本发明化合物可以治疗的癌症包括原发性肿瘤(即起源点癌细胞)、局部侵袭肿瘤(渗透和浸润局部区域周围正常组织的癌细胞)和转移(或继发性)肿瘤(即由循环通过血流(血源性扩散)或通过淋巴或体腔(种植性转移)扩散到身体其它部位和组织的恶性肿瘤细胞形成的肿瘤)。

[0295] 在上文实施例中,具体的癌症包括肝细胞癌、黑色素瘤、食管癌、肾癌、结肠癌、结肠直肠癌、肺癌(例如间皮瘤或肺腺癌)、乳腺癌、膀胱癌、胃肠癌、卵巢癌和前列腺癌。

[0296] 另一子组(subset)癌症包括肾癌、黑色素瘤、结肠癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌和前列腺癌。

[0297] 另一子组癌症包括胰腺癌。

[0298] 另一子组癌症包括白血病,如急性和慢性白血病、急性髓性白血病(AML)和慢性淋巴细胞白血病(CLL)。

[0299] 另一子组癌症包括间皮瘤,包括恶性腹膜间皮瘤或恶性胸膜间皮瘤。

[0300] 某些癌症对特定药物的治疗具有抗性。这可以由于肿瘤类型(大多数常见的上皮性恶性肿瘤具有固有化学抵抗性(chemoresistant))导致,或随着疾病进展或治疗自发出抗性。在这方面,间皮瘤包括对拓扑异构酶毒物、烷基化试剂、抗微管蛋白、叶酸拮抗物、铂化合物和放射治疗具有抗性的间皮瘤,特别是耐顺铂的间皮瘤。同样,多发性骨髓瘤包括对硼替佐米敏感的多发性骨髓瘤或难治性多发性骨髓瘤,慢性髓性白血病包括对伊马替尼敏感的慢性髓性白血病和难治性慢性髓性白血病。在此方面,前列腺癌包括对于抗雄激素治疗具有抗性的前列腺癌,特别是对阿比特龙或恩杂鲁胺或切除睾丸具有抗性的前列腺癌。黑色素瘤包括对BRAF与/或MEK抑制剂治疗具有抗性的黑色素瘤。

[0301] 这些癌症可以是对ERK1或ERK2抑制或特别是对ERK1/2抑制敏感的癌症。

[0302] 进一步设想本发明化合物将在治疗或预防与Ras、BRAF与/或MEK信号传导升高有

关的或为特征的癌症类型方面特别有用。

[0303] Ras、BRAF或MEK信号传导水平升高在许多癌症中都存在,并与不良预后有关。此外,存在激活Ras、BRAF或MEK突变的癌症可能也对ERK1/2抑制剂敏感。Ras、BRAF或MEK信号传导水平升高及Ras、BRAF或MEK突变可以采用这里提出的技术进行鉴定。特定癌症对ERK1/2抑制是否敏感可以通过“诊断方法”一节提出的方法确定。

[0304] 另一子组癌症包括NRas黑色素瘤和NRas AML。

[0305] 另一子组癌症包括KRas肺癌、KRas胰腺癌和KRas结肠直肠癌 (CRC)。

[0306] 另一子组癌症包括BRAF结肠直肠癌 (CRC)、BRAF肺癌和BRAF黑色素瘤。

[0307] 在其它实施例中,本发明提供:

[0308] • 用于预防或治疗存在突变体Ras、突变体BRAF或突变体MEK的疾病或状况的式(1)化合物。

[0309] • 式(1)化合物用于制备预防或治疗存在突变体Ras、突变体BRAF或突变体MEK的疾病或状况的药物的用途。

[0310] • 一种预防或治疗受试者(例如,有此需要的哺乳动物受试者,如人类)存在突变体Ras、突变体BRAF或突变体MEK的疾病或状况的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的式(1)化合物。

[0311] • 用于降低或减少存在突变体Ras、突变体BRAF或突变体MEK的疾病或状况发生率的式(1)化合物。

[0312] • 式(1)化合物用于制备降低或减少存在突变体Ras、突变体BRAF或突变体MEK的疾病或状况发生率的药物的用途。

[0313] • 一种降低或减少受试者(例如,有此需要的哺乳动物受试者,如人类)存在突变体Ras、突变体BRAF或突变体MEK的疾病或状况发生率的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的式(1)化合物。

[0314] • 用于治疗选自NRas黑色素瘤和NRas AML的癌症(或降低这些癌症发生率)的式(1)化合物。

[0315] • 用于治疗选自KRas肺癌、KRas胰腺癌和KRas结肠直肠癌 (CRC) 的癌症(或降低这些癌症发生率)的式(1)化合物。

[0316] • 用于治疗选自BRAF结肠直肠癌 (CRC)、BRAF肺癌和BRAF黑色素瘤的癌症(或降低这些癌症发生率)的式(1)化合物。

[0317] • 用于治疗癌症BRAF黑色素瘤(或降低这种癌症发生率)的式(1)化合物。

[0318] • 式(1)化合物用于制备预防或治疗此处定义的癌症的药物的用途。

[0319] • 一种治疗受试者(例如,哺乳动物受试者,如人类)癌症(或降低癌症发生率)的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的式(1)化合物。

[0320] • 用于治疗此处所述疾病或状况特别是癌症的式(1)化合物。

[0321] • 式(1)化合物用于制备治疗此处所述疾病或状况特别是癌症的药物的用途。

[0322] • 一种预防或治疗受试者(例如,有此需要的哺乳动物受试者,如人类)此处所述疾病或状况特别是癌症的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的式(1)化合物。

[0323] • 用于降低或减少此处所述疾病或状况特别是癌症的发生率的式(1)化合物。

[0324] • 式(1)化合物用于制备降低或减少此处所述疾病或状况特别是癌症的发生率的

药物的用途。

[0325] • 一种降低或减少受试者(例如,有此需要的哺乳动物受试者,如人类)此处所述疾病或状况特别是癌症的发生率的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的式(1)化合物。

[0326] 式(1)化合物还可用于治疗肿瘤生长(growth)、发病,通过使细胞重新对化疗敏感而解决对化疗和放射治疗的抗性,以及作为抗转移剂。

[0327] 所有类型的治疗性抗癌干预都必须提高施加到靶肿瘤细胞上的压力(stress)。为了减轻这种压力的不良影响,ERK1/2直接参与对癌症药物和治疗方案作用的抵抗。因此,ERK1/2抑制剂代表了一类具有以下潜力的化学疗法:(i)使恶性肿瘤细胞对抗癌药物与/或治疗敏感;(ii)减少或降低对抗癌药物与/或治疗产生抵抗的发生率;(iii)逆转对抗癌药物与/或治疗的抗性;(iv)强化抗癌药物与/或治疗的活性;(v)延迟或阻止产生对抗癌药物与/或治疗的抗性。

[0328] 由于本发明化合物对ERK1/2的抑制性,它们将在控制细胞信号传导方面非常有用。因此,还设想本发明化合物可用于治疗其它疾病,如炎症(如肝炎、溃疡性结肠炎、胃炎);神经退行性病变(如阿尔茨海默症、帕金森氏症、亨廷顿氏舞蹈病、肌强直性营养不良和肌萎缩性脊髓侧索硬化症)、艾滋病、局部缺血(如再狭窄、外伤性脑损伤、脊椎损伤、脑缺血、脑缺血/再灌注(I/R)损伤、急性和慢性CNS损伤局部缺血、中风或心肌梗塞)、肌肉骨骼系统退行性疾病(如骨质疏松症)、自身免疫性疾病(如多发性硬化(MS)和I型糖尿病),及眼睛疾病,如视网膜变性。

[0329] 本发明化合物作为ERK1/2抑制剂的亲和力可采用此处实例中提出的生物试验和生物物理试验测定。

[0330] 诊断方法

[0331] 在施用式(1)化合物之前,需要对受试者(例如,患者)进行筛选,确定患者所患或可能患有的疾病或状况是否对采用抑制ERK1/2的化合物进行治疗敏感。词语“患者”包括人类患者和动物患者。

[0332] 例如,对采集的患者生物样品进行分析,确定患者所患或可能患有的疾病或状况例如癌症的特征是否在于基因异常或蛋白质表达异常,导致ERK1/2信号传导水平上调,或对正常ERK1/2功能通路敏感,或ERK1/2激活下游的生化通路上调。

[0333] 导致ERK1/2通路激活或对其敏感的这种异常的实例包括激活Ras亚型突变(例如, KRAS)或BRAF突变,正如背景部分所述。

[0334] 在细胞系和原发性肿瘤(包括但不限于黑色素瘤、结直肠癌、非小细胞肺癌及胰腺癌、前列腺癌、甲状腺癌、尿道癌和上呼吸道癌)中已经检测到Ras突变(Cancer Res. 2012; 72:2457-2467)。

[0335] 词语“上调”包括高表达或过表达,包括基因扩增(即多基因拷贝)、细胞遗传异常和转录效应引起的表达增加,或ERK1/2激活引起的信号传导增加。因此,患者可接受诊断测试,以检测ERK1/2上调的特征性标记。词语诊断包括筛选。至于标记,我们纳入了基因标记,包括,例如,测定DNA组成,从而鉴定Ras(例如KRAS)或BRAF突变的存在。词语标记还包括以ERK1/2上调为特点的标记,包括前述蛋白质的蛋白质水平、蛋白质状态和mRNA水平。基因扩增包括大于7个拷贝,以及2至7个拷贝增长。

[0336] 检测KRAS和BRAF突变的诊断分析在Castro et al. Br. J. Cancer. 2012 Jul 10; 107 (2): 345-51. doi: 10.1038/bjc.2012.259. Epub 2012 Jun 19, "A comparison of three methods for detecting KRAS mutations in formalin-fixed colorectal cancer specimens."; 和Gonzalez et al., Br J Dermatol. 2013, Apr; 168 (4): 700-7. doi: 10.1111/bjd.12248, "BRAF mutation testing algorithm for vemurafenib treatment in melanoma: recommendations from an expert panel"及其引用的文献中进行了描述。

[0337] BRAF突变的多种诊断试验已经得到FDA批准,这些试验的详细情况可在FDA的网站上找到。这些诊断试验的实例有cobas 4800BRAF V600突变试验、Roche's(罗氏)威罗非尼产品的伴随试验和THxID BRAF试验-Tafinlar(达拉菲尼)和Mekinist(曲美替尼)产品的伴随试验。

[0338] 诊断试验和筛选通常针对生物样品(即身体组织或体液)进行,这些生物样品选自肿瘤活检样品、血样(脱落肿瘤细胞分离和富集)、脑脊髓液、血浆、血清、唾液、粪便活检、痰、染色体分析、胸膜液、腹膜液、口腔粘膜涂片、皮肤活检或尿液。

[0339] 细胞遗传异常、基因扩增、突变和蛋白质上调的鉴定和分析方法是本领域技术人员熟悉的。大多数基因变异的临床试验包括但不限于标准方法,如等位基因特异性聚合酶链反应(PCR)、逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)、传统桑格(Sanger)DNA序列分析或新一代测序方法、桑格双脱氧测序法、焦磷酸测序法、多重连接依赖性探针扩增法(MLPA)或ARMS PCR。基因拷贝数和结构基因变异的临床试验包括但不限于标准方法,如RNA测序法(RNAseq)、Nanostring杂交接近RNA nCounter检测,或原位杂交,如荧光原位杂交(FISH)。更新的新一代测序(NGS)技术,如大规模平行测序技术允许开展全外显子组测序或全基因组测序。

[0340] 在RT-PCR筛选中,肿瘤的mRNA水平通过建立mRNA的cDNA拷贝,然后,采用PCR扩增cDNA进行评价。PCR扩增的方法、引物的选择和扩增条件是本领域技术人员熟悉的。核酸操作和PCR采用标准方法开展,正如例如Ausubel, F. M. et al., eds. (2004) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley& Sons Inc. 或Innis, M. A. et al., eds. (1990) PCR Protocols: a guide to methods and applications, Academic Press, San Diego所述。涉及核酸的反应和操作方法还在Sambrook et al., (2001), 3rd Ed, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press中进行了描述。或者,可以采用商业购买的RT-PCR试剂盒(例如, Roche Molecular Biochemicals),或采用美国专利4,666,828、4,683,202、4,801,531、5,192,659、5,272,057、5,882,864和6,218,529中提出的方法,这些专利通过引用而并入本申请中。评价mRNA表达的原位杂交技术实例有荧光原位杂交法(FISH) (参见Angerer (1987) Meth. Enzymol., 152:649)。

[0341] 通常,原位杂交包括下述主要步骤:(1)固定需要分析的组织;(2)对样品开展预杂交处理,以提高靶核酸的可接近性,降低非特异性结合;(3)核酸混合物与生物结构或组织中的核酸杂交;(4)杂交后洗涤,以脱除杂交中未结合的核酸片段;和(5)检测杂交的核酸片段。这种应用中的探针通常采用例如放射性同位素或荧光报告子进行标记。特定的探针足够长,例如,长度是大约50、100或200核苷酸至大约1000或更多核苷酸,从而在严格的条件下与靶核酸特异性杂交。开展FISH的标准方法在Ausubel, F. M. et al., eds. (2004) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley& Sons Inc和Fluorescence In Situ

Hybridization:Technical Overview by John M.S.Bartlett in Molecular Diagnosis of Cancer,Methods and Protocols,2nd ed.;ISBN:1-59259-760-2;March 2004,pps.077-088;Series:Methods in Molecular Medicine中进行了描述。

[0342] 在DePrimo et al. (2003),BMC Cancer,3:3中对基因表达谱分析方法进行了描述。简单地说,该方案如下:采用(dT) 24寡聚物,例如从多聚腺苷酸化mRNA引发第一链cDNA合成,然后采用随机六聚体引物开展第二链cDNA合成,从而从总RNA合成双链cDNA。双链cDNA作为采用生物素化核糖核苷酸开展体外cRNA转录的模板。按照Affymetrix (Santa Clara, CA, USA) 描述的方案,对cRNA开展化学碎片化,然后,在人类基因组微阵列上杂交过夜或与人类基因组微阵列上的基因特异性寡核苷酸探针杂交过夜。或者,可以采用单核苷酸多态性(SNP)阵列(一种DNA微阵列)检测群体内的多态性。

[0343] 或者,mRNA表达的蛋白质产物可以通过肿瘤样品的免疫组织化学或免疫荧光、微孔板固相免疫分析、蛋白质印迹法、毛细管电泳、2维SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法、ELISA法、流式细胞术和本领域技术人员熟悉的其它特定蛋白质检测方法进行检测。检测方法包括使用位点特异性抗体。本领域技术人员将认识到,所有这样的熟知的检测ERK1/2上调、检测ERK1/2变体或突变体,或检测11q22扩增的方法都可以适用于本发明。

[0344] 蛋白质(如ERK1/2)的异常水平可以采用标准蛋白质检测法测定,例如,此处描述的那些检测方法。通过采用例如Chemicon International提供的检测方法测定蛋白质的水平,还可以检测组织样品例如肿瘤组织中蛋白质的高水平或过表达情况。目标蛋白质将从样品裂解物中免疫沉淀出来,然后对其水平进行测定。检测方法还包括使用标记。

[0345] ERK过表达可以通过肿瘤活组织检查测定。评价基因拷贝变化的方法包括细胞遗传学实验室常用的方法,如MLPA(多重连接依赖性探针扩增法) -一种检测异常拷贝数的多重PCR方法,或其它可以检测基因扩增、获得和删除的PCR方法。

[0346] 若合适的话,还可以采用Ex-功能检测,例如,测定癌症患者体内的循环白血病细胞,从而评价对抑制剂的响应情况。

[0347] 因此,所有这些方法也可以用于鉴定特别适合采用本发明化合物治疗的肿瘤。

[0348] 因此,在其它实施例中,本发明提供:

[0349] • 式(1)化合物,其用于治疗或预防患者的疾病或状况(或用于减少或降低这些疾病或状况的发生率),所述患者已经筛选和已经确定患有对采用ERK1/2抑制化合物(即ERK1/2抑制剂)治疗敏感的疾病或状况,或存在患上这些疾病或状况的风险。

[0350] • 式(1)化合物的用途,其用于制备治疗或预防患者疾病或状况(或减少或降低这些疾病或状况的发生率)的药物,所述患者已经筛选和已经确定患有对ERK1/2抑制化合物(即ERK1/2抑制剂)治疗敏感的疾病或状况,或存在患上这些疾病或状况的风险。

[0351] • 一种用于治疗或预防患者疾病或状况(或减少或降低这些疾病或状况的发生率)的方法,所述患者已经筛选和已经确定患有对ERK1/2抑制化合物(即ERK1/2抑制剂)治疗敏感的疾病或状况,或存在患上这些疾病或状况的风险,所述方法包括向患者施用治疗有效量的式(1)化合物。

[0352] 本发明的另一个方面包括用于患者癌症预防或治疗的本发明化合物,所述患者选自具有ERK1/2信号传导通路(如Ras、BRAF或MEK)过表达或激活突变的亚群。因此,在其它实施例中,本发明提供:

[0353] • 式(1)化合物,其用于患者的癌症治疗或预防(或减少或降低癌症发生率),所述患者选自具有ERK1/2信号传导通路(如Ras(如KRAS)、BRAF或MEK)过表达或激活突变的亚群。

[0354] • 式(1)化合物的用途,其用于制备患者癌症治疗或预防(或减少或降低癌症发生率)的药物,所述患者选自具有ERK1/2信号传导通路(如Ras(如KRAS)、BRAF或MEK)过表达或激活突变的亚群。

[0355] • 一种治疗或预防患者癌症(或降低或减少癌症发生率)的方法,所述患者选自具有ERK1/2信号传导通路Ras(例如KRAS)、BRAF或MEK过表达或激活突变的亚群,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的式(1)化合物。

[0356] • 一种诊断和治疗ERK1/2介导的疾病或状况的方法,所述方法包括(i)筛选患者,以确定患者所患或可能患有的疾病或状况对采用对ERK1/2具有亲和力的化合物进行治疗是敏感的;及(ii)若表明患者的疾病或状况是属于对此敏感的,然后向患者施用式(1)化合物。

[0357] 药物制剂

[0358] 本发明新方法制备的化合物(1)及化合物(1)的新结晶形式可以独立向受试者施用,但更通常是以药物组合物(例如,制剂(formulation))的形式施用。

[0359] 因此,在另一个实施例中,本发明提供一种药物组合物,其包含所述式(1)化合物和至少一种药学上可接受的赋形剂及任选此处描述的其它治疗剂或预防剂。

[0360] 本发明进一步提供制备药物组合物的方法,包括组合(例如混合)所述式(1)化合物、至少一种药学上可接受的赋形剂和任选此处描述的其它治疗剂或预防剂。

[0361] 所述药学上可接受的赋形剂可以选自,例如,载体(例如,固体、液体或半固体载体)、佐剂、稀释剂、填料或填充剂、成粒剂、包衣剂、释放控制剂、粘结剂、崩解剂、润滑剂、防腐剂、抗氧剂、缓冲剂、悬浮剂、增稠剂、调味剂、甜味剂、遮味剂、稳定剂或药物组合物中常规使用的任何其它赋形剂。各类药物组合物的赋形剂实例在下文更详细地进行说明。

[0362] 此处使用的词语“药学上可接受的”指的是那些在合理的医学判断范围之内,适合用于与主体(例如,人类主体)组织接触、没有过量毒性、刺激性、过敏反应或其它问题或并发症且具有合理的益处/风险比的化合物、材料、组合物与/或剂型。每种赋形剂在与制剂其它成分的相容性方面也必须是“可接受的”。

[0363] 包含化合物(1)的药物组合物可以采用人们熟知的方法配制,参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA, USA。

[0364] 药物组合物可以是适合口服、肠胃外给药、局部给药、鼻内给药、支气管内给药、舌下给药、眼内给药、耳内给药、直肠给药、阴道内给药或透皮给药的任何形式。若所述组合物采用肠胃外给药,它们可以配制用于静脉内、肌肉内、腹膜内、皮下给药或通过注射、输液或其它递送手段直接递送到靶器官或组织内。递送可通过推注、短期输液或长期输液进行,可以通过被动递送或采用合适的输液泵或注射推进器实施。

[0365] 适合胃肠给药的药物制剂包括含水和不含水无菌注射液,所述注射液可包含抗氧剂、缓冲液、抑菌剂、助溶剂、表面活性剂、有机溶剂混合物、环糊精络合剂、乳化剂(用于形成和稳定乳液制剂)、用于形成脂质体的脂质体组分、用于形成聚合物凝胶的胶凝聚合物、冷冻干燥保护剂和各种试剂的组合,特别是用于稳定可溶形式活性成分及赋予制剂与指定

受体血液等渗性。胃肠外给药的药物制剂还可以采用含水和不含水无菌悬浮液的形式,其可包括悬浮剂和增稠剂(R.G.Strickly,Solubilizing Excipients in oral and injectable formulations,Pharmaceutical Research,Vol 21(2) 2004,p 201-230)。

[0366] 这些制剂可以是用单位剂量或多剂量容器提供,例如,密封安瓿瓶、小瓶和预装注射器,可以储存在冷冻干燥(冻干)条件下,在使用前,仅需加入无菌液体载体,例如,注射用水。在一个实施例中,制剂以装在瓶内的活性药物成分(例如,冻干或其它细分干燥形式)提供,之后可采用合适的稀释剂重建。

[0367] 所述药物制剂可以通过将式(1)化合物冻干制备。冻干指的是冷冻干燥组合物的方法。因此,冷冻干燥和冻干在这里是同义词。冻干是一种脱水方法,其中将含溶剂的基质冷冻,然后抽真空,从而通过升华脱除溶剂,即从固体冷冻状态直接转化为气态。冻干通常包括三步:冷冻步骤、一级干燥步骤和二级干燥步骤。在冷冻步骤期间,基质被冷冻到远低于其熔点的温度。在之后的一级干燥步骤中,冷冻的基质被抽真空,从而通过升华脱除溶剂。基质中的大多数溶剂在此步骤被脱除。但是,在一级干燥步骤结束后,可能仍有少量溶剂与基质结合或吸附到基质上。为了脱除这些残余溶剂,维持真空,但是,将部分干燥的基质加热到其不再冻住的温度。从而通过蒸发脱除残余溶剂。

[0368] 冻干程序可以在冻干设备中进行,所述冻干设备的结构可以是完全传统的结构。冻干设备通常拥有一室,在所述室内,可放置含溶液的冻干容器用于冷冻干燥。所述室通常与真空源(例如,真空泵)连接,从而降低所述室内的压力。所述设备可能还拥有冷冻或加热所述室内物质的装置。

[0369] 所述药物制剂还可以通过将式(1)化合物喷雾干燥制备。喷雾干燥是一种产生微米规格颗粒的方法,其中将溶于溶剂中的基质溶液或悬浮液呈细雾喷洒,形成所述溶液或悬浮液的液滴分散体,然后,加热与/或部分抽真空,从而通过蒸发脱除溶剂。所述基质首先溶解或悬浮在合适的溶剂中,然后使所述溶液通过雾化器或喷嘴到达干燥室内。还可以向干燥室内注入加热的气体(例如,空气或氮气)以与雾化进料接触,或者干燥室可以部分抽真空,从而引起溶剂蒸发。溶剂蒸发时,形成基质固体颗粒,回收这些颗粒。粉末中所得颗粒的规格可以通过选择合适的雾化器或喷嘴改变。

[0370] 喷雾干燥程序可以在喷雾干燥器中进行,所述喷雾干燥器的结构可以是完全传统的结构。所述喷雾干燥器通常配有将溶液分散成细喷雾(通常直径小于500μm)的雾化器或喷嘴。将细喷雾引到干燥室内。干燥室通常有一进口用于接收加热的气体(如空气或氮气),并且任选还与真空源(例如真空泵)连接,从而能够降低所述室内的压力。干燥室还可有一出口,通过该出口可收集喷雾液滴的溶剂蒸发而形成的固体颗粒。

[0371] 可以采用无菌粉末、颗粒和片剂配制即时注射液和悬浮液。

[0372] 本发明的胃肠外注射药物组合物还可以包括药学上可接受的无菌含水溶液或非水性溶液、分散体、悬浮液或乳液以及无菌粉末(在使用前,重建为无菌注射液或分散体)。合适的含水载体和非水性载体、稀释剂、溶剂或媒介的实例包括水、醇、多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)、羧甲基纤维素及它们合适的混合物、植物油(如橄榄油、葵花籽油、红花油或玉米油)及可注射的有机酯,如油酸乙酯。例如,可以通过采用包衣(或增稠)材料(如卵磷脂),在分散体的情况下,通过保持要求的粒径,及通过使用表面活性剂,来保持合适的流动性。

[0373] 本发明的组合物还可以包含防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂等佐剂。通过加入各种抗菌剂和抗真菌剂,如对羟苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等,可以确保预防微生物的作用。还可以包括调节渗透压的试剂,如糖、氯化钠等。通过加入延迟吸收的试剂,如单硬脂酸铝和明胶,可以延长可注射药物形式的吸收。

[0374] 在本发明的一个实施例中,所述药物组合物是适合静脉给药例如注射或输液的形式。采用静脉注射给药时,溶液可以直接使用,或可以在给药前注射到输液袋(包含药学上可接受的赋形剂,如0.9%盐水或5%葡萄糖)内。

[0375] 在另一个实施例中,所述药物组合物是适合皮下(s.c.)给药的形式。

[0376] 适合口服给药的药物剂型包括片剂(包衣或非包衣)、胶囊(硬胶囊或软胶囊)、囊片、丸剂、锭剂、糖浆、溶液、粉末、颗粒、酏剂和悬浮液、舌下片、圆片或贴剂,如口腔贴剂。

[0377] 因此,片剂组合物可以包含活性化合物与惰性稀释剂或载体的单位剂量,所述惰性稀释剂或载体如糖或糖醇,例如乳糖、蔗糖、山梨糖醇或甘露糖醇;与/或非糖稀释剂(如碳酸钠、磷酸钙、碳酸钙),或纤维素或其衍生物(如微晶纤维素(MCC)、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素)及淀粉(如玉米淀粉)。片剂还可以包含标准成分,如粘结剂和成粒剂,如聚乙烯吡咯烷酮、崩解剂(如可膨胀交联聚合物,如交联羧甲基纤维素)、润滑剂(如硬脂酸盐)、防腐剂(如对羟苯甲酸酯)、抗氧剂(如BHT)、缓冲剂(如磷酸盐或柠檬酸盐缓冲液),及泡腾剂,如柠檬酸盐/碳酸氢盐混合物。这些赋形剂是人们熟悉的,并不需要在此进行详细讨论。

[0378] 片剂可设计用于接触胃液时释放药物(速释片剂)或在较长一段时间内以受控方式释放药物(控释片剂)或在胃肠道的特定区域内释放药物。

[0379] 胶囊制剂可以是硬明胶或软明胶,可以包含固体、半固体或液体形式的活性成分。明胶胶囊可以采用动物明胶形成或采用其合成的或植物来源的相当产品形成。

[0380] 固体剂型(例如,片剂、胶囊等)可以有包衣或没有包衣。包衣可以作为保护膜(例如,聚合物、蜡或涂料)或作为药物释放控制手段或作为美观或鉴别目的。包衣(例如EudragitTM类聚合物)可以设计为在胃肠道内期望位置释放活性成分。因此,可以选择包衣,从而在胃肠道内某一pH条件下降解,从而在胃或回肠、十二指肠、结肠或空肠内选择性释放出化合物。

[0381] 替代包衣,或除包衣以外,药物可以以固体基质呈现,所述固体基质含控释剂(例如,适于以受控方式在胃肠道内释放出化合物的缓释剂)。或者,药物呈现在聚合物包衣中,例如,聚甲基丙烯酸酯聚合物包衣,其可适于在胃肠道内不同酸性或碱性条件下选择性释放化合物。或者,基质材料或阻释包衣可以采用易侵蚀聚合物的形式(例如,马来酸酐聚合物),当该剂型通过胃肠道时,其基本上被连续侵蚀。在另一个替代方法中,包衣可设计为在肠道内微生物作用下分解。作为另一个替代例,活性化合物可以配制到对化合物的释放提供渗透控制的递送系统中。渗透释放和其它延迟释放或持续释放制剂(例如,基于离子交换树脂的制剂)可以采用本领域技术人员熟悉的方法配制。

[0382] 式(1)化合物可以采用载体配制,以纳米颗粒的形式施用。纳米颗粒增大了表面积,有助于化合物吸收,提供直接渗透到细胞内的可能性。纳米颗粒递送系统在2006年3月13日出版的“Nanoparticle Technology for Drug Delivery”,edited by Ram B Gupta and Uday B.Kompella, Informa Healthcare, ISBN 9781574448573中进行了说明。用于药

物递送的纳米颗粒还在J.Control.Release,2003,91(1-2),167-172和Sinha et al., Mol.Cancer Ther.August 1,(2006)5,1909中进行了说明。

[0383] 所述药物组合物可以包含大约1% (w/w) 至大约95% 活性成分及99% (w/w) 至5% (w/w) 药学上可接受的赋形剂或赋形剂组合。特别是,所述组合物可以包含大约20% (w/w) 至大约90% (w/w) 活性成分及80% (w/w) 至10% 药学上可接受的赋形剂或赋形剂组合。

[0384] 本发明的药物组合物可以是,例如,单位剂型,如安瓿瓶、小瓶、栓剂、糖衣丸、片剂或胶囊,或预装注射器的形式。

[0385] 所述药学上可接受的赋形剂可以根据期望的制剂物理形式选择,并且可以选自,例如,稀释剂(如固体稀释剂,如填料或填充剂;液体稀释剂,如溶剂或助溶剂)、崩解剂、缓冲剂、润滑剂、助流剂、控释(例如阻释或延迟释放聚合物或蜡)剂、粘结剂、成粒剂、颜料、增塑剂、抗氧剂、防腐剂、调味剂、遮味剂、渗透压调节剂和包衣剂。

[0386] 本领域技术人员拥有选择用于制剂的成分的合适量的专业知识。例如,片剂和胶囊通常包含0-20% 崩解剂、0-5% 润滑剂、0-5% 助流剂与/或0-99% (w/w) 填料/或填充剂(取决于药物剂量)。它们还可包含0-10% (w/w) 聚合物粘结剂、0-5% (w/w) 抗氧剂、0-5% (w/w) 颜料。此外,缓释片剂还包含0-99% (w/w) 聚合物(取决于剂量)。片剂或胶囊的薄膜包衣通常包含0-10% (w/w) 控释(例如,延迟释放)聚合物、0-3% (w/w) 颜料与/或0-2% (w/w) 增塑剂。

[0387] 肠胃外制剂通常包含0-20% (w/w) 缓冲液、0-50% (w/w) 助溶剂,与/或0-99% (w/w) 注射用水(WFI)(取决于剂量和是否冻干)。肌内长效(intramuscular depot)制剂可能还包含0-99% (w/w) 的油。

[0388] 口服药物组合物可以这样制备:将活性成分与固体载体组合,若需要的话,将所得混合物制成颗粒,如果需要的话或必要的话,加入合适的赋形剂之后,将混合物加工为片剂、糖衣片心或胶囊。还可将其包含在聚合物或蜡状基质内,让活性成分以计量量扩散或释放。

[0389] 本发明的化合物还可以配制为固体分散体。固体分散体是两种或以上固体的均匀的极细分散相。固体溶液(分子分散体系)-固体分散体的一种类型,是药物技术领域熟悉的(参见(Chiou and Riegelman, J.Pharm.Sci.,60,1281-1300(1971)),可用于增加溶出率和提高水溶性差药物的生物利用率。

[0390] 本发明还提供包含上述固体溶液的固体剂型。固体剂型包括片剂、胶囊和可咀嚼片剂,或分散片或泡腾片。已知的赋形剂可与固体溶液混合,得到期望的剂型。例如,胶囊可以包含与(a)崩解剂和润滑剂,或(b)崩解剂、润滑剂和表面活性剂混合的固体溶液。此外,胶囊可以包含填充剂,如乳糖或微晶纤维素。片剂可以包含与至少一种崩解剂、润滑剂、表面活性剂、填充剂和助流剂混合的固体溶液。可咀嚼片剂可以包含与填充剂、润滑剂,及如果需要的话,额外的增甜剂(如人造增甜剂),和合适的调味剂混合的固体溶液。固体溶液还可以通过将药物溶液和合适的聚合物喷到惰性载体如糖珠(“糖球(non-pareils)”)表面上而形成。然后,这些糖珠可以装到胶囊内或压成片剂。

[0391] 药物制剂可以以单包装(通常是泡罩包装)中包含整个疗程的“患者包”提供给患者。与药剂师将患者的药品从整体供应中进行分装的传统处方相比,患者包的优点在于,患者总是能够获取患者包内包含的药品说明书,而这些在患者处方中通常没有。已经证明,药

品说明书的纳入改善了患者的医嘱遵循性。

[0392] 局部使用和鼻内递送的组合物包括软膏、霜、喷雾、贴剂、凝胶、液滴和插入物 (insert) (例如,眼内插入物)。这些组合物可以采用已知的方法配制。

[0393] 直肠或阴道内施用制剂的实例包括阴道栓 (pessary) 和栓剂,可以例如采用包含活性化合物的成形可模塑或蜡状材料制备。活性化合物的溶液也可用于直肠给药。

[0394] 吸入施用组合物可采用可吸入粉末组合物或液体或粉末喷雾的形式,可以采用粉末吸入器器械或气溶胶分配器械以标准形式施用。这些器械是人们熟悉的。对吸入施用来说,粉末制剂通常包括活性化合物与惰性固体粉末稀释剂(如乳糖)。

[0395] 式(1)化合物通常以单位剂型提供,因此,通常包含提供所需生物活性水平的足量化合物。例如,制剂可包含1纳克至2克活性成分,例如,1纳克至2毫克活性成分。在此范围内,化合物的具体子范围是0.1毫克至2克活性成分(更通常是10毫克至1克,例如50毫克至500毫克),或1微克至20毫克(例如,1微克至10毫克,例如0.1毫克至2毫克活性成分)。

[0396] 对于口服组合物,单位剂型可以包含1毫克至2克,更通常10毫克至1克,例如,50毫克至1克,例如,100毫克至1克活性化合物。

[0397] 本发明化合物将以足够实现期望治疗效果的量向有此需要的患者(例如,人类或动物患者)施用。

[0398] 治疗方法

[0399] 式(1)化合物可用于预防或治疗ERK1/2介导的一系列疾病或状况。这些疾病和状况的实例如上文所述。

[0400] 所述化合物通常向需要这种给药的受试者(例如,人类或动物患者,特别是人类患者)施用。

[0401] 所述化合物通常以治疗上或预防上有作用且通常无毒的量施用。但是,在某些情况下(例如,在疾病危及生命的情况下),施用式(1)化合物的好处可能大于任何毒性效应或副作用,在这种情况下,可考虑采用会带来一定程度毒性的化合物施用量。

[0402] 可以长期施用所述化合物以维持有益的治疗效果,或仅短时间施用。或者,可以连续施用,或以间歇方式施用(例如,脉冲方式)。

[0403] 式(1)化合物的典型每日剂量可以是100皮克至100毫克/公斤体重,更通常是5纳克至25毫克/公斤体重,更通常是10纳克至15毫克/公斤体重(例如,10纳克至10毫克,更通常是1微克/公斤至20毫克/公斤,例如,1微克至10毫克/公斤),不过,根据需要,可以施用更高或更低剂量。式(1)化合物及其子式 (subformulae) 化合物可以每日施用,或重复施用,例如,每2天、或3天、或4天、或5天、或6天、或7天、或10天、或14天、或21天、或28天施用。

[0404] 本发明的化合物可以在一定剂量范围内口服,例如,1至1500mg、2至800mg,或5至500mg,例如2至200mg或10至1000mg,具体的剂量实例包括10、20、50和80mg。为了达到要求的治疗效果,所述化合物可以每天施用一次或以上。所述化合物可以连续施用(即在治疗期间每天施用,不间断)。或者,所述化合物可以间歇施用(即在整个治疗期间,连续施用一段时间,如一周,然后停用一段时间,如一周,然后,连续施用另一段时间,如一周,等等)。涉及间歇服用的治疗方案实例包括其中施用一周、停用一周;或施用两周,停用一周;或施用三周,停用一周;或施用两周,停用两周;或施用四周,停用两周;或施用一周,停用三周的周期方案-可以采用一个或多个周期,例如,2、3、4、5、6、7、8、9或10个或更多个周期。这种不连续

的治疗还可以以天数而非一整周为基础。例如,治疗可以包括每日给药1至6天,停用1至6天,在整个治疗方案期间重复此模式。其中不施用本发明化合物的天数(或周数)并不一定要等于其中施用本发明化合物的天数(或周数)。

[0405] 在一个具体的施用时间表中,患者将每天输液施用式(1)化合物1个小时,施用不超过10天,特别是一周不超过5天,按照要求的间隔重复此治疗,所述间隔例如,两至四周,特别是每三周。

[0406] 本发明的化合物还可以通过推注或连续输液施用。本发明的化合物可以在治疗周期内每天施用至每周一次,或每两周一次,或每三周一次,或每四周一次施用。如果在治疗周期内每天施用,这种每日给药可以在几周的治疗周期内中断:例如,给药一周(或数天),停止给药一周(或数天),在治疗周期内按照该模式重复。

[0407] 在一个给药时间表中,患者可以输液施用式(1)化合物,输液时间为每天1小时,持续5天,每三周重复此治疗。

[0408] 在另一个具体给药时间表中,患者输液30分钟至1小时,然后改变输液维持时间,例如,1至5小时,例如,3小时。

[0409] 在另一个具体给药时间表中,患者连续输液12小时至5天,特别是连续输液24小时至72小时。

[0410] 但是,化合物的最终施用量及所用组合物的类型将与所治疗疾病的性质或生理状况相符,并且将由医生决定。

[0411] 已发现,ERK1/2抑制剂可作为单一试剂或与其它抗癌剂组合使用。例如,将抑制ERK信号传导的抑制剂与通过信号转导级联中不同点起作用或通过不同的调节细胞增长的机制起作用的另一试剂组合,从而治疗癌症发展的两种特征。组合试验可以按照,例如,如 Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regulat* 1984;22:27-55中所述开展。

[0412] 本发明化合物可以作为唯一的治疗剂施用,或可以与一种或多种其它化合物(或治疗)一起在组合治疗中施用,用于治疗特定的疾病状态,例如,肿瘤性疾病,如前文定义的癌症。为了治疗上述疾病,本发明的化合物可以有利地与一种或多种其它药剂组合使用,更具体地说,可以与其它抗癌剂或佐剂(治疗中的支持剂)一起用于癌症治疗。可以与式(1)化合物一起施用(不管是同时或以不同的时间间隔施用)的其它治疗剂或治疗的实例包括但不限于:

- [0413] • 拓扑异构酶I抑制剂
- [0414] • 抗代谢物
- [0415] • 微管蛋白靶向剂
- [0416] • DNA结合剂和拓扑异构酶II抑制剂
- [0417] • 烷基化剂
- [0418] • 单克隆抗体
- [0419] • 抗激素
- [0420] • 信号转导抑制剂
- [0421] • 泛素-蛋白酶体通路抑制剂

- [0422] • 免疫疗法
 - [0423] • 细胞死亡调节剂
 - [0424] • DNA甲基转移酶抑制剂
 - [0425] • 细胞因子和类维生素A
 - [0426] • 染色质靶向治疗
 - [0427] • 放射治疗,及
 - [0428] • 其它治疗剂或预防剂。
- [0429] 抗癌剂或佐剂(或其盐)的具体实例包括但不限于选自下面(i) - (xlviii)组,及任选(xlix)组与/或(I)组的任一种或多种试剂:
- [0430] (i) 铂化合物,例如,顺铂(任选与氨磷汀组合)、卡铂或奥沙利铂;
 - [0431] (ii) 紫杉烷化合物,例如,紫杉醇、紫杉醇蛋白质结合微粒(AbraxaneTM)、多烯紫杉醇(docetaxel)、卡巴他赛或拉洛他赛;
 - [0432] (iii) 拓扑异构酶I抑制剂,例如,喜树碱化合物,例如,喜树碱、伊立替康(CPT11)、SN-38或拓扑替康;
 - [0433] (iv) 拓扑异构酶II抑制剂,例如,抗肿瘤表鬼臼毒素或鬼臼毒素衍生物,例如,依托泊苷或替尼泊苷;
 - [0434] (v) 长春花生物碱,例如长春碱、长春新碱、脂质体长春新碱(Oncot-TCS)、长春瑞滨、长春地辛、长春氟宁或长春维索(vinvesir);
 - [0435] (vi) 核苷衍生物,例如,5-氟尿嘧啶(5-FU,任选与甲酰四氢叶酸组合)、吉西他滨、卡培他滨、替加氟、UFT、S1、克拉屈滨、阿糖胞苷(Ara-C、胞嘧啶阿拉伯糖苷)、氟达拉滨、氯法拉滨或奈拉滨;
 - [0436] (vii) 抗代谢物,例如,氯法拉滨、氨基蝶呤或氨甲蝶呤、阿扎胞苷、阿糖胞苷、氟尿苷、喷司他丁、硫鸟嘌呤、硫嘌呤、6-巯基嘌呤或巯基脲(巯基尿素)或曲氟尿苷(任选与替吡嘧啶(tipiracil)组合);
 - [0437] (viii) 烷基化剂,如氮芥(nitrogen mustard)或亚硝基脲,例如,环磷酰胺、苯丁酸氮芥、卡莫司汀(BCNU)、苯达莫司汀、噻替派、马法兰、苏消安、罗氮芥(CCNU)、六甲蜜胺、白消安、达卡巴嗪、雌莫司汀、福莫司汀、异环磷酰胺(任选与巯乙磺酸钠组合)、哌泊溴烷、丙卡巴肼、链佐星、替莫唑胺、尿嘧啶、二氯甲基二乙胺(mechlorethamine)、甲基环己基氯乙基亚硝基脲或尼莫司汀(ACNU);
 - [0438] (ix) 蔓环霉素、蔓二酮和相关药物,例如,柔红霉素、阿霉素(任选与右丙亚胺组合)、阿霉素的脂质体制剂(例如CaelyxTM、MyocetTM、DoxilTM)、伊达比星、米托蒽醌、表柔比星、安吖啶或戊柔比星;
 - [0439] (x) 埃博霉素,例如伊沙匹隆、帕土匹龙、BMS-310705、KOS-862和ZK-EP0、埃博霉素A、埃博霉素B、去氧埃博霉素B(亦称为埃博霉素D或KOS-862)、氮杂埃博霉素B(亦称为BMS-247550)、aulimalide、isolaulimalide或luetherobin;
 - [0440] (xi) DNA甲基转移酶抑制剂,例如,替莫唑胺、氮胞苷、地西他滨或瓜德希他滨(SGI-110);
 - [0441] (xii) 叶酸拮抗物,例如,氨甲蝶呤、培美曲塞二钠或雷替曲塞;
 - [0442] (xiii) 细胞毒素抗生素,例如抗霉素D(antinomycin D)、博来霉素、丝裂霉素C、更

生霉素、洋红霉素、道诺霉素、左旋咪唑、普卡霉素或光辉霉素；

[0443] (xiv) 微管蛋白结合剂,例如,康勒他丁(combrestatin)、秋水仙碱或诺考达唑；

[0444] (xv) 信号转导抑制剂,如激酶抑制剂,例如受体酪氨酸激酶抑制剂(例如EGFR(表皮生长因子受体)抑制剂、VEGFR(血管内皮生长因子受体)抑制剂、PDGFR(血小板衍生生长因子受体)抑制剂、Ax1抑制剂、MTKI(多靶点激酶抑制剂)、Raf抑制剂、ROCK抑制剂、mTOR抑制剂、MEK抑制剂或PI3K抑制剂),例如,甲磺酸伊马替尼、埃罗替尼、吉非替尼、达沙替尼、拉帕替尼、多韦替尼、阿西替尼、尼罗替尼、凡德他尼、瓦他拉尼、帕唑帕尼、索拉非尼、舒尼替尼、替西罗莫司、依维莫司(RAD 001)、威罗菲尼(PLX4032或RG7204)、达拉菲尼、因科拉菲尼(encorafenib)、司美替尼(AZD6244)、曲美替尼(GSK121120212)、dactolisib(BEZ235)、buparlisib(BKM-120;NVP-BKM-120)、BYL719、库潘尼西(BAY-80-6946)、ZSTK-474、CUDC-907、apitolisib(GDC-0980;RG-7422)、pictilisib(pictrelisib,GDC-0941;RG-7321)、GDC-0032、GDC-0068、GSK-2636771、艾代拉里斯(以前的CAL-101、GS 1101、GS-1101)、MLN1117(INK1117)、MLN0128(INK128)、IPI-145(INK1197)、LY-3023414、ipatasertib、afuresertib、MK-2206、MK-8156、LY-3023414、LY294002、SF1126或PI-103、sonolisib(PX-866)或AT13148。

[0445] (xvi) 极光激酶抑制剂,例如AT9283、barasertib(AZD1152)、TAK-901、MK0457(VX680)、cenisertib(R-763)、达鲁舍替(PHA-739358)、alisertib(MLN-8237)或MP-470；

[0446] (xvii) CDK抑制剂,例如AT7519、roscovitine、seliciclib、alvocidib(flavopiridol)、dinaciclib(SCH-727965)、7-羟基-星形孢菌素(UCN-01)、JNJ-7706621、BMS-387032(又称SNS-032)、PHA533533、ZK-304709或AZD-5438,和包括CDK4抑制剂,如帕布昔利布(PD332991)和瑞柏司可里布(ribociclib)(LEE-011)；

[0447] (xviii)PKA/B抑制剂和PKB(akt)通路抑制剂,例如AT13148、AZD5363、Semaphore、SF1126和MTOR抑制剂,如雷帕霉素类似物,AP23841和AP23573,钙调蛋白抑制剂(叉头易位抑制剂)、API-2/TCN(曲西立滨)、RX-0201、enzastaurin HCl(LY317615)、NL-71-101、SR-13668、PX-316或KRX-0401(哌立福辛/NSC 639966)；

[0448] (xix)Hsp90抑制剂,例如onalespib(AT13387)、除莠霉素、格尔德霉素(GA)、17-烯丙氨基-17-去甲氧基格尔德霉素(17-AAG),例如NSC-330507、Kos-953和CNF-1010、17-二甲氨基乙氨基-17-去甲氧基格尔德霉素盐酸盐(17-DMAG),例如NSC-707545和Kos-1022、NVP-AUY922(VER-52296)、NVP-BEP800、CNF-2024(BIIB-021,一种口服嘌呤)、ganetespib(STA-9090)、SNX-5422(SC-102112)或IPI-504或TAS-116；

[0449] (xx) 单克隆抗体(与放射性同位素、毒素或其它试剂未结合或结合)、抗体衍生物和相关试剂,如抗CD、抗VEGFR、抗HER2或抗EGFR抗体,例如,利妥昔单抗(CD20)、奥法木单抗(CD20)、替伊莫单抗(ibritumomab tiuxetan)(CD20)、GA101(CD20)、托西莫单抗(CD20)、依帕珠单抗(CD22)、林妥珠单抗(CD33)、吉妥单抗奥佐米星(CD33)、阿仑单抗(CD52)、加利昔单抗(CD80)、曲妥珠单抗(HER2抗体)、帕妥珠单抗(HER2)、曲妥珠单抗-DM1(HER2)、厄妥索单抗(HER2和CD3)、西妥昔单抗(EGFR)、帕尼单抗(EGFR)、耐昔妥珠单抗(EGFR)、尼妥珠单抗(EGFR)、贝伐单抗(VEGF)、卡妥索单抗(EpCAM和CD3)、阿巴伏单抗(CA125)、法勒珠单抗(叶酸受体)、埃罗妥珠单抗(CS1)、地诺单抗(RANK配体)、芬妥木单抗(IGF1R)、CP751,871(IGF1R)、马帕木单抗(TRAIL受体)、metMAB(met)、米妥莫单抗(GD3神经节苷脂)、他那莫单

抗(naptumomab estafenatox) (5T4) 或司妥昔单抗(IL6) 或免疫调节剂,如CTLA-4阻断抗体与/或抗PD-1和PD-L1与/或PD-L2抗体,例如,易普利单抗(CTLA4)、MK-3475(帕姆单抗,以前的兰利珠单抗,抗PD-1)、纳武单抗(抗PD-1)、BMS-936559(抗PD-L1)、MPDL320A、AMP-514或MEDI4736(抗PD-L1)或曲美木单抗(以前称替西木单抗、CP-675,206,抗CTLA-4)；

[0450] (xxi) 雌激素受体拮抗剂或选择性雌激素受体调节剂(SERM) 或雌激素合成抑制剂,例如,它莫西芬、氟维司群、托瑞米芬、屈洛昔芬、法洛德或雷洛昔芬；

[0451] (xxii) 芳香化酶抑制剂和相关药物,如依西美坦、阿那曲唑、来曲唑、睾内脂氨鲁米特、米托坦或伏氯唑；

[0452] (xxiii) 抗雄激素(即雄激素受体拮抗剂) 和相关试剂,例如比卡鲁胺、尼鲁米特、氟他米特、环丙孕酮或酮康唑；

[0453] (xxiv) 激素及其类似物,例如,甲羟基孕酮、二乙基己烯雌酚(又名己烯雌酚)或奥曲肽；

[0454] (xxv) 类固醇,例如,屈他雄酮丙酸酯、醋酸甲地孕酮、诺龙(癸酸盐、苯丙酸盐)、氟甲睾酮或棉子酚；

[0455] (xxvi) 胎体细胞色素P450 17 α -羟化酶-17,20-裂解酶抑制剂(CYP17),例如阿比特龙；

[0456] (xxvii) 促性腺激素释放激素激动剂或拮抗剂(GnRA),例如阿巴瑞克、醋酸戈舍瑞林、醋酸组氨瑞林、醋酸亮丙瑞林、曲普瑞林、布舍瑞林或德舍瑞林；

[0457] (xxviii) 糖皮质激素,例如,强的松、强的松龙、地塞米松；

[0458] (xxix) 分化剂,如类维生素A、维甲酸类、维生素D或视黄酸和视黄酸代谢阻断剂(RAMBA),例如,爱优痛(acutane)、阿利维A酸、葆萨罗丁或维甲酸；

[0459] (xxx) 法尼基转移酶抑制剂,例如,替吡法尼；

[0460] (xxxi) 染色质靶向治疗,例如组蛋白脱乙酰基酶(HDAC) 抑制剂,例如,丁酸钠、辛二酰苯胺异羟肟酸(suberoylanilide hydroxamide acid) (SAHA)、缩肽(FR 901228)、达西司特(NVP-LAQ824)、R306465/JNJ-16241199、JNJ-26481585、曲古抑菌素A、伏立诺他、chlamydocin、A-173、JNJ-MGCD-0103、PXD-101或apicidin；

[0461] (xxxii) 靶向泛素-蛋白酶体通路的药物,包括蛋白酶体抑制剂,例如,硼替佐米、卡非佐米、CEP-18770、MLN-9708或ONX-0912; NEDD8抑制剂; HDM2拮抗剂和去泛素化酶(DUB)；

[0462] (xxxiii) 光动力药物,例如,卟吩姆钠或替莫卟吩；

[0463] (xxxiv) 海洋生物来源抗癌剂,如曲贝替定；

[0464] (xxxv) 放射免疫疗法用放射标记药物,例如,β粒子发射同位素(例如,碘-131、钇-90)或α粒子发射同位素(例如,铋-213或锕-225),例如替伊莫单抗、r碘托西莫单抗或α镭；

[0465] (xxxvi) 端粒酶抑制剂,例如,端粒抑素(telomestatin)；

[0466] (xxxvii) 基质金属蛋白酶抑制剂,例如,巴马司他、马马司他、普马司他(prinostat)或美他司他；

[0467] (xxxviii) 重组干扰素(如干扰素-γ 和干扰素α) 和白介素(如白介素2),例如,阿地白介素、地尼白介素-毒素连接物(denileukin diftitox)、干扰素α2a、干扰素α2b或聚乙二醇干扰素α2b；

- [0468] (xxxix) 选择性免疫反应调节剂,例如,萨力多胺或来那度胺;
- [0469] (xl) 治疗疫苗,如sipuleucel-T(普罗文奇(Provenge))或Oncovex;
- [0470] (xli) 细胞因子活化剂包括溶链菌、罗莫肽、西佐喃、维如利金或胸腺素;
- [0471] (xlii) 三氧化二砷;
- [0472] (xliii) G蛋白偶联受体(GPCR)抑制剂,例如,阿曲生坦;
- [0473] (xliv) 酶,如L-天冬酰胺酶、培门冬酶、拉布立酶或培加酶;
- [0474] (xlv) DNA修复抑制剂,如PARP抑制剂,例如,奥拉帕尼、维拉帕尼(velaparib)、伊尼帕尼(iniparib)、INO-1001、AG-014699或ONO-2231;
- [0475] (xlivi) 死亡受体(例如TNF相关细胞凋亡诱导配体(TRAIL)受体)激动剂,如马帕木单抗(以前称为HGS-ETR1)、可那木单抗(以前称为AMG 655)、PRO95780、来沙木单抗、杜拉乐明、CS-1008、阿坡单抗(apomab)或重组TRAIL配体,如重组人TRAIL/Apo2配体;
- [0476] (xlvii) 免疫疗法,如免疫检查点抑制剂、癌症疫苗和CAR-T细胞疗法;
- [0477] (xlviii) 细胞死亡(凋亡)调节剂,包括Bcl-2(B细胞淋巴瘤2)拮抗剂,如维奈托克(ABT-199或GDC-0199)、ABT-737、ABT-263、TW-37、sabutoclax、奥巴克拉及MIM1和IAP拮抗剂,包括LCL-161(Novartis)、Debio-1143(Debiopharma/Ascenta)、AZD5582、Birinapant/TL-32711(TetraLogic)、CUDC-427/GDC-0917/RG-7459(Genentech)、JP1201(Joyant)、T-3256336(Takeda)、GDC-0152(Genentech)、HGS-1029/AEG-40826(HGS/Aegera)或ASTX-660;
- [0478] (xliix) 预防剂(辅助剂);即减轻或缓解化疗剂相关副作用的试剂,例如,
- [0479] -止吐剂;
- [0480] -预防或减少化疗相关嗜中性白细胞减少症的持续时间和防止血小板、红细胞或白细胞水平降低引起的并发症的试剂,例如白介素-11(例如,奥普瑞白介素)、促红细胞生成素(EPO)及其类似物(如阿法达贝泊汀)、集落刺激因子类似物,如粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)(如沙格司亭),和粒细胞集落刺激因子(G-CSF)及其类似物(如非格司亭、聚乙二醇非格司亭);
- [0481] -抑制骨吸收的试剂,如狄诺塞麦或双膦酸盐,如唑来膦酸盐、唑来膦酸、帕米膦酸二钠和伊班膦酸盐;
- [0482] -抑制炎症反应的试剂,如地塞米松、强的松和强的松龙;
- [0483] -用于降低肢端肥大症或其它罕见激素产生肿瘤患者生长激素和IGF-I(和其它激素)血液水平的试剂,如激素生长抑制素的合成形式,如醋酸奥曲肽;
- [0484] -降低叶酸如甲酰四氢叶酸(leucovorin)或亚叶酸水平的药物的解毒剂;
- [0485] -用于疼痛的试剂,例如,鸦片剂,如吗啡、二乙酰吗啡和芬太奴;
- [0486] -非甾体抗炎药(NSAID),如COX-2抑制剂,例如塞来昔布、依托考昔和罗美昔布;
- [0487] -粘膜炎试剂,如帕利夫明;
- [0488] -治疗副作用(包括食欲不振、恶病质、浮肿或血栓栓塞发作)的试剂,如醋酸甲地孕酮;及
- [0489] (I) 根治、治标或预防目的(或辅助或新辅助目的)的放射治疗。
- [0490] 本发明组合中的每种化合物可以按照独立的不同剂量安排施用和通过不同的途径施用。因此,在两种或以上试剂中,每种试剂的剂量可能不同:每种试剂可以同时施用或在不同的时间施用。熟悉本领域的技术人员通过自己的一般普通知识能够了解使用的剂量

方案和组合治疗。例如,本发明的化合物可与一种或多种其它试剂组合使用,这些其它试剂按照其现有组合方案施用。下面提供了标准组合方案的实例。

[0491] 每个疗程紫杉烷化合物的施用剂量有利地是每平方米身体表面积50-400mg (mg/m²) ,例如,75-250mg/m²,特别是紫杉醇的施用剂量是大约175-250mg/m²,多烯紫杉醇的施用剂量是大约75至150mg/m²。

[0492] 每个疗程喜树碱化合物的施用剂量有利地是每平方米身体表面积0.1-400mg (mg/m²) ,例如,1-300mg/m²,特别是伊立替康的施用剂量是大约100-350mg/m²,托泊替康的施用剂量是大约1至2mg/m²。

[0493] 每个疗程抗肿瘤鬼臼毒素衍生物的施用剂量有利地是每平方米身体表面积30-300mg (mg/m²) ,例如,50-250mg/m²,特别是依托泊苷的施用剂量是大约35-100mg/m²,替尼泊苷的施用剂量是大约50至250mg/m²。

[0494] 每个疗程抗肿瘤长春花生物碱的施用剂量有利地是每平方米身体表面积2-30mg (mg/m²) ,特别是长春碱的施用剂量是大约3-12mg/m²,长春新碱的施用剂量是大约1至2mg/m²,长春瑞滨的施用剂量是大约10至30mg/m²。

[0495] 每个疗程抗肿瘤核苷衍生物的施用剂量有利地是每平方米身体表面积200-2500mg (mg/m²) ,例如,700-1500mg/m²,特别是5-FU的施用剂量是大约200-500mg/m²,吉西他滨的施用剂量是大约800至1200mg/m²,卡培他滨的施用剂量是大约1000-2500mg/m²。

[0496] 每个疗程烷基化剂如氮芥或亚硝基脲的施用剂量有利地是每平方米身体表面积100-500mg (mg/m²) ,例如,120-200mg/m²,特别是环磷酰胺的施用剂量是大约100-500mg/m²,苯丁酸氮芥的施用剂量是大约0.1至0.2mg/kg,卡莫司汀的施用剂量是大约150-200mg/m²,罗氮芥的施用剂量是大约100-150mg/m²。

[0497] 每个疗程抗肿瘤蒽环霉素(anthracycline)衍生物的施用剂量有利地是每平方米身体表面积10-75mg (mg/m²) ,例如,15-60mg/m²,特别是阿霉素的施用剂量是大约40-75mg/m²,柔红霉素的施用剂量是大约25至45mg/m²,伊达比星的施用剂量是大约10-15mg/m²。

[0498] 抗雌激素制剂的施用剂量有利地是大约每天1至100mg,取决于具体的试剂和治疗的疾病。它莫西芬的口服剂量有利地是大约5至50mg,特别是10至20mg,一天两次,继续治疗足够长的时间,以实现和维持治疗效果。它莫西芬的口服剂量有利地是大约60mg,一天一次,继续治疗足够长的时间,从而实现和维持治疗效果。阿那曲唑的口服施用剂量有利地是大约1mg,一天一次。屈洛昔芬的口服施用剂量有利地是大约20-100mg,一天一次。雷洛昔芬的口服施用剂量有利地是大约60mg,一天一次。依西美坦的口服施用剂量有利地是大约25mg,一天一次。

[0499] 抗体的施用剂量有利地是每平方米身体表面积大约1-5mg (mg/m²) ,或者,如果不同的话,采用本领域熟知的剂量。每个疗程曲妥珠单抗的施用剂量有利地是每平方米身体表面积大约1-5mg (mg/m²) ,特别是2-4mg/m²。

[0500] 若式(1)化合物在组合治疗中与一种、二种、三种、四种或更多种其它治疗剂(特别是一种或二种,更特别是一种)组合施用,则所述化合物可以与它们同时施用或按顺序施用。在后一种情况时,两种或更多种化合物将在一段时间内施用,施用的量和施用方式足够确保实现有益的或协同的效应。当按顺序施用时,它们可以按非常近的间隔(例如,5-10分钟)或按较长的间隔(例如,分隔1、2、3、4或更多个小时,若需要时,或甚至间隔更长时间)施

用,精确的剂量方案与治疗剂的性质相匹配。这些剂量每个疗程可以,例如,施用一次、二次或更多次,可以例如,每7天、14天、21天或28天重复施用。

[0501] 应该理解的是,组合中每种成分的具体施用方法和顺序及各自的剂量和方案将取决于具体施用的其它药剂和本发明的化合物、它们的施用途径、治疗的具体肿瘤及治疗的具体宿主。熟悉本领域的技术人员采用传统的方法和考虑此处提供的信息,可很容易地确定最佳施用方法和顺序及施用剂量和方案。

[0502] 当作为组合使用时,本发明化合物与一种或多种其它抗癌剂的重量比可以由本领域的技术人员确定。施用的比率、准确的剂量和频次将取决于本发明的具体化合物和使用的其它抗癌剂、治疗的具体疾病、所治疗疾病的严重程度、特定患者的年龄、体重、性别、饮食、施用时间和一般身体状况、施用方式以及个体施用的其它药物,这些都是本领域技术人员熟悉的。此外,显然,根据所治疗患者的反应与/或根据开出本发明化合物处方的医生的评估,可以降低或加大有效的每日量。本发明式(1)化合物与另一抗癌剂的具体重量比可以是1/10-10/1,更特别是1/5-5/1,甚至更特别是1/3-3/1。

[0503] 本发明的化合物还可以与非化疗治疗如放射治疗、光动力治疗、基因治疗、手术和饮食控制一起施用。

[0504] 本发明化合物还具有使肿瘤细胞对放射治疗和化疗敏感的治疗应用。因此,本发明的化合物可以作为“放射增敏剂”与/或“化疗增敏剂”使用或可与另一“放射增敏剂”与/或“化疗增敏剂”组合使用。在一个实施例中,本发明的化合物用作化疗增敏剂。

[0505] 词语“放射增敏剂”定义为以治疗有效量向患者施用的分子,以增加细胞对电离辐射的敏感性与/或促进电离辐射可治疗疾病的治疗。

[0506] 词语“化疗增敏剂”定义为以治疗有效量向患者施用的分子,以增加细胞对化疗的敏感性与/或促进化疗可治疗疾病的治疗。

[0507] 许多癌症治疗方案目前采用放射增敏剂与x射线放射结合。x射线活化放射增敏剂的实例包括但不限于下述实例:甲硝哒唑、米索硝唑、去甲基米索硝唑、哌莫硝唑、依他硝唑、尼莫拉唑、丝裂霉素C、RSU 1069、SR 4233、E09、RB 6145、烟酰胺、5-溴脱氧尿苷(BUDR)、5-碘脱氧尿苷(1UDR)、溴脱氧胞苷、氟脱氧尿苷(FudR)、羟基脲、顺铂及治疗上有效的类似物及其衍生物。

[0508] 癌症的光动力治疗(PDT)采用可见光作为增敏剂的放射激活剂。光动力放射增敏剂的实例包括但不限于下述实例:血卟啉衍生物、光卟啉(Photofrin)、苯并卟啉衍生物、初卟啉锡、褐伯拜-a(pheoborbide-a)、菌叶绿素-a、萘酞菁、酞菁、酞菁锌和它们的治疗上有效的类似物及衍生物。

[0509] 放射增敏剂可以与治疗有效量的一种或多种其它化合物一起施用,这些化合物包括但不限于:促进放射增敏剂纳入到靶细胞内的化合物;控制治疗剂、营养物质与/或氧向靶细胞的流动的化合物;在施加或不施加其它放射时作用于肿瘤的化疗剂;或其它治疗癌症或其它疾病的治疗有效化合物。

[0510] 化疗增敏剂可以与治疗有效量的一种或多种其它化合物一起施用,这些化合物包括但不限于:促进化疗增敏剂纳入到靶细胞内的化合物;控制治疗剂、营养物质与/或氧向靶细胞的流动的化合物;作用于肿瘤的化疗剂或其它治疗癌症或其它疾病的治疗有效化合物。钙拮抗剂例如维拉帕米被发现可与抗肿瘤试剂一起使用,在对接受的化疗剂具有抗性

的肿瘤细胞中建立化疗敏感性,以及加强这些化合物在药物敏感恶性肿瘤中的效力。

[0511] 为了与另一化疗剂在组合治疗中一起使用,可以将式(1)化合物与一种、二种、三种、四种或更多种其它治疗剂例如一起配制到一剂型中,使该剂型包含两种、三种、四种或更多种治疗剂,即配制为包含所有组分的单元药物组合物。或者,各治疗剂可以分开配制,并以试剂盒的形式放在一起,任选包括其使用说明书。

[0512] 从前文所述应该理解的是,在其它实施例中,本发明提供式(1)化合物和另一治疗剂(例如,上文定义的另一治疗剂)的组合。

[0513] 在另一个实施例中,本发明提供一种包含式(1)化合物、药学上可接受的载体和上文定义的一种或多种治疗剂的药物组合物。

[0514] 在其它实施例中,本发明提供:

[0515] • 此处定义的组合,用于治疗此处所述疾病或状况,特别是癌症(或用于减少或降低所述疾病或状况特别是癌症的发生率)。

[0516] • 此处定义的组合用于制备治疗此处所述疾病或状况特别是癌症(用于制备减少或降低此处所述疾病或状况特别是癌症发生率)的药物的用途。

[0517] • 一种预防或治疗受试者(例如,有此需要的哺乳动物受试者,如人类)此处所述疾病或状况特别是癌症(用于减少或降低此处所述疾病或状况特别是癌症的发生率)的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的此处定义的组合。

[0518] • 一种此处定义的组合,用于抑制(例如,患者体内)肿瘤细胞的生长。

[0519] • 此处定义的组合用于制备抑制患者肿瘤细胞生长的药物的用途。

[0520] • 一种抑制(例如,患者体内)肿瘤细胞生长的方法,所述方法包括采用此处定义的式(1)化合物或组合接触肿瘤细胞。

[0521] 在前述每个实施例中,在治疗癌症患者时,式(1)化合物与一种或多种其它治疗剂(其中至少一种是抗癌剂)可以同时、分开或按顺序施用。

[0522] 在另一个实施例中,本发明提供一种预防或治疗癌症(或减少或降低癌症发生率)的方法,所述方法包括向患者施用放射治疗或化疗及式(1)化合物。

[0523] 在另一个实施例中,本发明提供式(1)化合物,用于与放射治疗或化疗联合使用,用于预防或治疗癌症(或者减少或降低癌症发生率)。

[0524] 实例

[0525] 现在,将对本发明进行说明,但是,本发明并不限于下述实例中描述的具体实施例。化合物采用自动命名包如AutoNom (MDL) 或ChemAxon Structure to Name命名,或按照化学供应商提供的名称命名。在这些实例中,采用下述缩略语。

[0526] 按照与下面一般方法类似与/或相似的方法,制备下述化合物。

[0527] 下述合成方法仅提供用于阐明这些方法;对于给定制备或步骤来说,采用的前体不必来源于按照所描述步骤合成的单批次产品。

[0528] 当化合物被描述为两种非对映异构体/差向异构体的混合物时,立体中心的构象不进行规定,并且以直线表示。

[0529] 正如本领域技术人员所了解的那样,采用所示方案合成的化合物可能以溶剂化物如水合物的形式存在,与/或包含残余溶剂或少量杂质。以盐形式分离的化合物,可能是整数化学计量的,即单盐或二盐,或是中间化学计量的。

[0530] 下面的一些化合物以盐的形式分离,例如,取决于提纯方法中使用的酸。一些化合物以游离碱的形式分离。

[0531] 缩略语

[0532]	ca.	大约
[0533]	conc.	浓缩的
[0534]	Corr.	校正的
[0535]	DCM	二氯甲烷
[0536]	DIPEA	N,N-二异丙基乙胺
[0537]	1,4-DMB	1,4-二甲氧苯
[0538]	DMF	N,N-二甲基甲酰胺
[0539]	d ₆ -DMSO	氘代二甲亚砜
[0540]	eq.	当量
[0541]	EtOAc	乙酸乙酯
[0542]	FaSSGF	空腹状态模拟胃液
[0543]	FaSSIF	空腹状态模拟肠液
[0544]	g	克
[0545]	GF/F	玻璃微纤维过滤级
[0546]	h	小时
[0547]	¹ H	质子
[0548]		1-[双(二甲氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑[4,5-b]
[0549]	HATU	吡啶盐3-氧化物六氟磷酸盐
[0550]	HPLC	高效液相色谱
[0551]	Kg	公斤
[0552]	L	升
[0553]	LC-MS	液相色谱-质谱
[0554]	M	摩尔
[0555]	MeCN	乙腈
[0556]	MeOH	甲醇
[0557]	2-MeTHF	2-甲基四氢呋喃
[0558]	mg	毫克
[0559]	Mins	分钟
[0560]	mL	毫升
[0561]	mol	摩尔
[0562]	MW	分子量
[0563]	NMP	1-甲基-2-吡咯烷酮
[0564]	NMR	核磁共振
[0565]	TFA	三氟乙酸
[0566]	th	理论
[0567]	TLC	薄层色谱

[0568]	TPGS	D- α -生育酚聚乙二醇1000琥珀酸酯
[0569]	Uncorr.	未校正的
[0570]	UV	紫外
[0571]	vol	体积
[0572]	w/v	重量/体积
[0573]	w/w	重量/重量
[0574]	wrt	相对于
[0575]	wt	重量
[0576]		BINAP:2,2'-双(二苯基膦)-1,1'-联萘;CDI:1,1'-羰基二咪唑;DCE:1,2-二氯乙烷;DCM:二氯甲烷;DIPEA:二异丙基乙胺;DMSO:二甲亚砜;DMF:N,N-二甲基甲酰胺;DMAP:-(二甲氨基)吡啶;EtOAc:乙酸乙酯;h:小时;HATU:N,N,N',N'-四甲基-0-(7-氮杂苯并三唑-1-基)脲六氟磷酸酯;HBTU:3-[双(二甲氨基)甲基嗡]-3H-苯并三唑-1-氧化六氟磷酸酯(3-[bis(dimethylamino)methyl]imyl)-3H-benzotriazol-1-oxide hexafluorophosphate);HCl:盐酸;HPLC:高压液相色谱;LC-MS:液相色谱-质谱;LiHMDS:双(三甲基硅基)氨基锂;mins.:分钟;MeCN:乙腈;MS:质谱;NBS:N-溴代琥珀酰亚胺;NMR:核磁共振谱;PdCl ₂ (dppf) ₂ :(1,1'-双(二苯基膦)-二茂铁)二氯化钯(II);Pd ₂ (dba) ₃ :三(二亚苄基丙酮)钯(0);汽油(Petrol):沸点40-60℃的石油醚馏分;PyBOP:六氟磷酸(苯并三唑-1-基-氧)三(二甲氨基)磷;RT:室温;Sat.:饱和;SCX:固相阳离子交换树脂;SPhos:2-二环己基磷-2',6'-二甲氧基联苯;S-Phos Pd G3:(2-二环己基磷-2',6'-二甲氧基联苯)[2-(2'-氨基-1,1'-联苯)]甲磺酸钯(II);TBDMSCl:叔丁基二甲基硅烷基氯;TBTU:0-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸酯;TFA:三氟乙酸;THF:四氢呋喃;XPhos:2-二环己基磷-2',4',6'-三异丙基联苯;XantPhos:4,5-双(联苯磷)-9,9-二甲基氧杂蒽。

[0577] 当用量以重量当量(wt)和体积当量(vol)给出时,1vol等于1毫升/克起始材料(定义为具有1wt的重量当量值)。例如,采用50mg(0.05g)起始材料(定义为具有1wt的重量当量)时,则20vol的量等于1mL(0.05×20=1)。

[0578] 合成方法

[0579] 所有起始材料和溶剂均为商业购买或按照文献制备。除非特别声明,否则所有反应都搅拌。有机溶液例行采用无水硫酸镁干燥。加氢在帕而氢化器上进行,该氢化器是一种Thales H-cube流动反应器,在声明的条件下或氢气球条件下进行加氢。微波反应在CEM Discover和Smithcreator微波反应器中进行,采用可变功率微波照射加热到恒定温度。采用自动快速色谱系统,如CombiFlash Companion或CombiFlash RF系统,并采用预填充硅胶(230-400目,40-63μm)滤芯常规开展正相柱色谱分析。SCX从Supelco公司购买,并在使用前用1M盐酸处理。除非特别声明,否则需提纯的反应混合物首先用MeOH稀释,并加几滴AcOH使其呈酸性。将此溶液直接加载到SCX上,并用MeOH洗涤。然后,采用MeOH中的1%NH₃冲洗,洗脱所需材料。

[0580] 当化合物被描述为两种非对映异构体/差向异构体的混合物时,并不对立体中心的构象进行规定,并且以直线表示。

[0581] NMR数据

[0582] 采用Bruker Avance III波谱仪在400MHz处获得¹H NMR谱图。采用氯仿-d、二甲基

亚砜- d_6 或四甲基硅烷内标的中心峰作为参考。对于NMR数据,当分配的质子数小于分子的理论质子数时,则假设明显丢失的信号被溶剂峰与/或水峰遮盖。此外,若采用质子NMR溶剂来获得图谱,会发生NH与/或OH质子与溶剂的交换,因此,这些信号通常无法观察到。

附图说明

[0583] 图1是(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺的一种结晶形式(“形式A”)的X射线粉末衍射图。

[0584] 图2是(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺的另一种结晶形式(“形式B”)的X射线粉末衍射图。

[0585] 图3是(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺的结晶形式B的差示扫描量热法(DSC)扫描图。

[0586] 图4是(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺的结晶形式B采用热重分析得到的失重图。

[0587] 图5是(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺的结晶形式B采用动态蒸气吸附分析得到的不同湿度条件下的重量曲线。

[0588] 图6是实例2得到的无定形的式(1)化合物的盐酸盐的 1H -NMR谱图。

[0589] 图7是实例2得到的无定形的式(1)化合物的硫酸盐的 1H -NMR谱图。

[0590] 图8是实例2得到的无定形的式(1)化合物的萘二磺酸盐(napadisilicate salt)的 1H -NMR谱图。

[0591] 图9是实例2得到的无定形的式(1)化合物的乙二磺酸盐的 1H -NMR谱图。

[0592] 图10是实例2得到的无定形的式(1)化合物的甲苯磺酸盐的 1H -NMR谱图。

[0593] 图11是实例2得到的无定形的式(1)化合物的甲磺酸盐的 1H -NMR谱图。

[0594] 图12是实例2得到的无定形的式(1)化合物的萘磺酸盐的 1H -NMR谱图。

[0595] 图13是实例2得到的无定形的式(1)化合物的苯磺酸盐的 1H -NMR谱图。

[0596] 图14是实例2得到的无定形的式(1)化合物的羟乙基磺酸盐的 1H -NMR谱图。

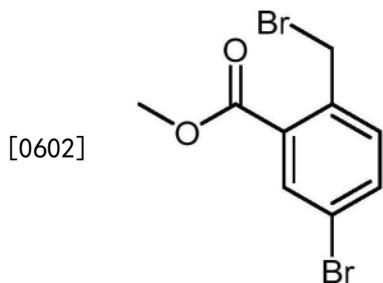
[0597] 图15是实例2得到的无定形的式(1)化合物的乙磺酸盐的 1H -NMR谱图。

[0598] 图16是实例2得到的无定形的式(1)化合物的氢溴酸盐的 1H -NMR谱图。

[0599] 实例1

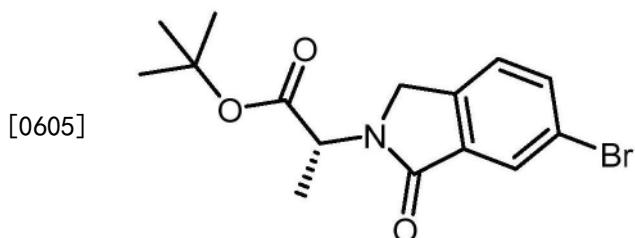
[0600] 无定形的(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺的合成

[0601] 步骤1:5-溴-2-(溴甲基)苯甲酸甲酯



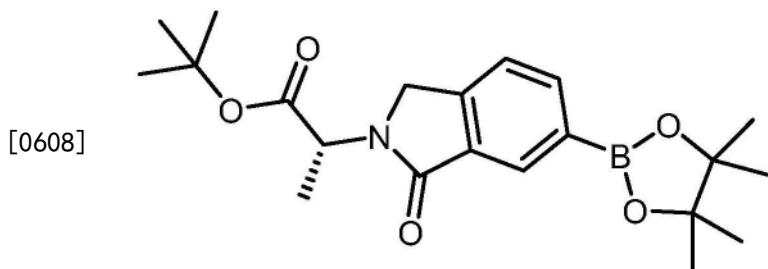
[0603] 向配备冷凝器、搅拌子、N₂进口和鼓泡器的10L五颈烧瓶内1,2-二氯乙烷(1.9L)的搅拌溶液中加入甲基-5-溴-2-甲基苯甲酸酯(500.0g, 2.18mol, 1.0eq.)和N-溴琥珀酰亚胺(Fluorochem, 388.5g, 2.18mol, 1.0eq.)。将混合物加热到90℃(油浴)。将偶氮二异丁腈(5.0g, 0.03mol, 0.014eq.)在DCE(100mL)中溶解, 并将20mL此溶液加入到滴液漏斗内。当反应混合物达到85℃时, 缓慢加入此溶液。当剧烈回流和泡沫停止时, 将剩余80mL一次性加入到反应混合物中, 并在90℃搅拌1hr。NMR结果表明反应结束时, 剩余大约11%初始材料。然后, 通过在油浴中加入干冰将反应混合物冷却到室温, 一旦内部温度下降到~30℃, 将反应混合物用水(2.0L)淬灭。5分钟后, 将两份相同的反应混合物汇合, 并转移到分液漏斗内, 收集有机层。采用DCM(2x 2.0L)再次萃取水层。汇合所有有机层, 并用水(2L)和盐水(2L)洗涤, 采用MgSO₄干燥, 过滤, 真空浓缩, 得到橙色液体(1.397kg, 104%, 从2x 500g操作得到)。

[0604] 步骤2- (2R) -2- (6-溴-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基) 丙酸叔丁酯



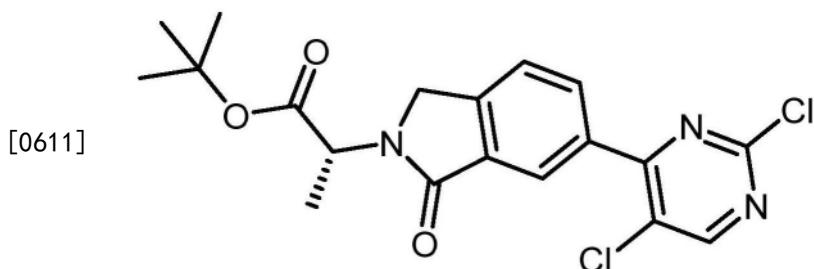
[0606] 向配备冷凝器、搅拌子、N₂进口和鼓泡器的10L五颈烧瓶内的THF搅拌溶液(5.0L)中加入5-溴-2-(溴甲基)苯甲酸甲酯(来自步骤1)(660g, 2.14mol, 1.0eq)、(2R)-2-氨基丙酸叔丁酯·HCl(467g, 2.57mol, 1.2eq)和二异丙基乙胺(1.0L, 6.42mol, 3.0eq., d=0.742)。将混合物加热至80℃(在油浴中加热过夜)。然后, 将反应混合物用干冰冷却到室温, 然后, 将两份相同的反应混合物倒到大分液漏斗内。加入NaHCO₃饱和水溶液(5.6L), 搅拌所得混合物5分钟。收集有机层, 用乙酸乙酯(2x 4L)萃取水相。汇集有机相, 用盐水(5.6L)洗涤, 并搅拌3分钟, 用MgSO₄干燥, 过滤, 并真空浓缩, 得到橙-棕色(orange-brown)残余粘稠状固体, 将该固体在40℃真空烘箱中放过夜。将该固体(1.4kg)在石油醚40-60(2.5L)中浆化, 并剧烈搅拌过夜, 然后过滤, 用石油醚洗涤(2x 300mL), 得到一种黄色固体(480g)。

[0607] 步骤3: (2R)-2-[1-氧代-6-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基]丙酸叔丁酯



[0609] 向配备顶部搅拌器、冷凝器、测温探头、 N_2 进口和鼓泡器的10L五颈烧瓶内的二恶烷搅拌溶液(4L)中加入(2R)-2-(6-溴-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)丙酸叔丁酯(来自步骤2)(500g, 1.469mol, 1.0eq)、双(频哪醇合)二硼(446.3g, 1.764mol, 1.2eq)和无水乙酸钾(433.9g, 4.409mol, 3eq)。然后,采用 N_2 脱气30分钟,之后加入Pd(dppf)Cl₂(21.5g, 0.029mol, 0.02eq),将反应混合物进一步脱气10分钟,然后在油浴中加热到90℃。将其搅拌过夜(注:在90℃搅拌2-3小时后,反应放热,从88℃升到104℃,出现大量回流,溶液从橙-红色溶液转为深棕色,维持~30min,然后降温到90℃)。采用干冰将反应冷却到室温,然后汇合,并通过硅藻土垫(4L砂芯漏斗(sinter),~2英寸厚的垫)过滤。采用二恶烷(1L)洗涤硅藻土垫,直到所有颜色被洗掉。

[0610] 步骤4: (2R)-2-[6-(2,5-二氯嘧啶-4-基)-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基]丙酸叔丁酯



[0612] 然后将步骤3得到的溶液分成两半,每一份加入到配置与前一步骤相同的五颈烧瓶内。向五颈烧瓶内加入2,4,5-三氯嘧啶(404.4g, 252.8mL, 2.205mol, 1.5eq, D=1.6)、碳酸钾(609.4g, 4.409mol, 3eq),然后采用 N_2 脱气30分钟,之后加入Pd(dppf)Cl₂(21.5g, 0.029mol, 0.02eq),进一步脱气10分钟。将反应混合物在油浴中加热到65℃,然后通过滴液漏斗在5分钟内加入水(500mL)(注:初始加水几分钟后,由于放热,温度从62℃升到72℃)。让其反应过夜。采用干冰将反应冷却到室温,并通过硅藻土垫(4L砂芯漏斗,~3英寸厚硅藻土垫)过滤,并用DCM(2L)洗涤硅藻土垫。然后,将滤液浓缩到差不多干燥,得到黑-棕色焦油粗材料(1909g)。

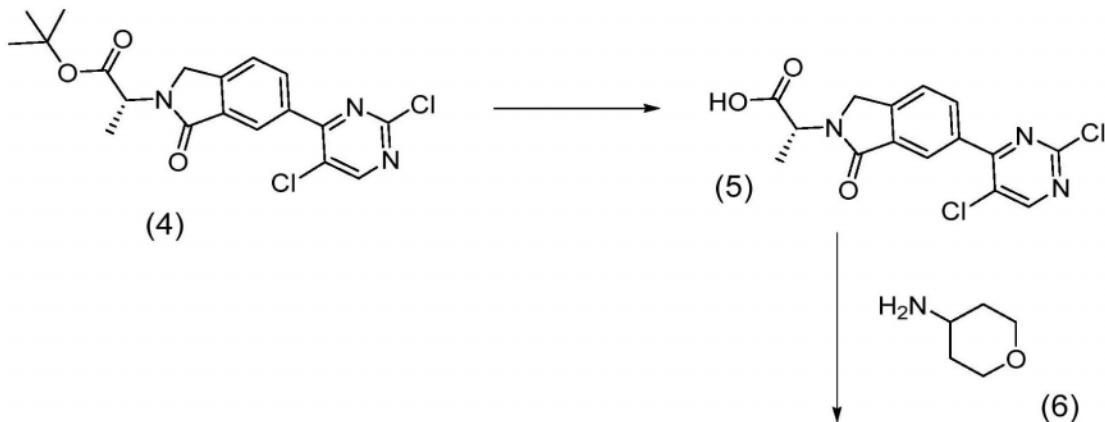
[0613] 将该粗材料分成两份,并干载到硅胶柱上,采用6x 4L 40%乙酸乙酯/汽油洗脱。(注:将所有馏分(fraction)混合,汇合,并浓缩到差不多干燥-采用30%乙酸乙酯/汽油Rf=~0.5薄层色谱法提纯产品)。将残余棕色混合物冷却到室温,加入汽油(4L),并旋转搅拌2小时,使产品结晶出来。过滤产品,并用汽油(2x2L)洗涤滤饼,得到一种白色固体(548g)。

[0614] 或者,可以按照PCT/IB2016/001507(国际公开号W02017/068412)——参见其中的制备76、89和94,制备(2R)-2-[6-(2,5-二氯嘧啶-4-基)-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基]丙酸叔丁酯(中间体化合物(4))。

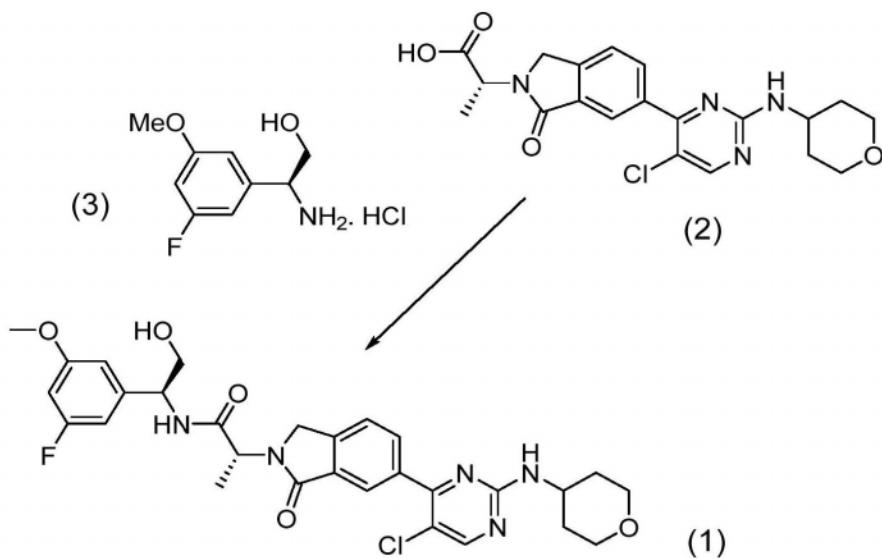
[0615] 采用(2R)-2-[6-(2,5-二氯嘧啶-4-基)-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基]丙酸

叔丁酯(来自步骤4),按照下面的合成方案,合成无定形的(2R)-2-(6-{5-氯-2-[¹⁸O]杂环己-4-基}氨基)嘧啶-4-基}-1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺(化合物1):

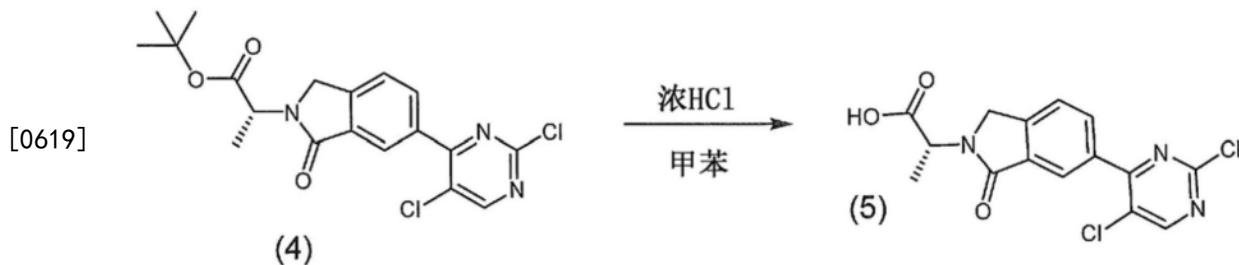
[0616] 步骤5: (2R)-2-[(6-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基)-1-氧化代-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基]-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺



[0617]



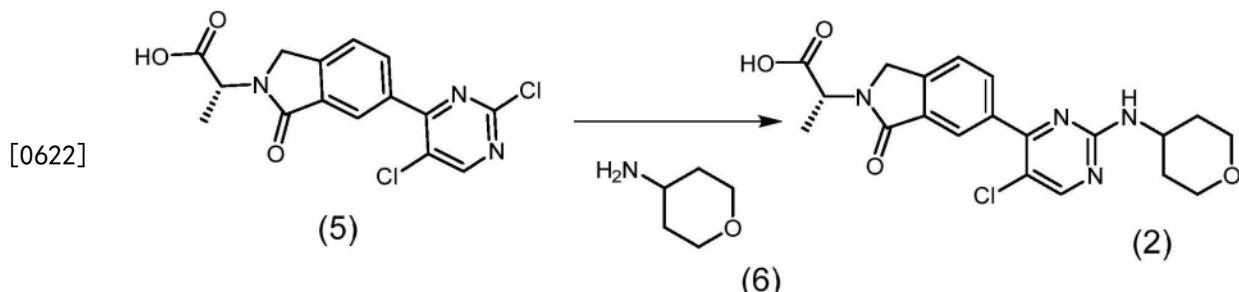
[0618] 阶段1: (4) 的Boc-去保护



[0620] 向15-25°C的(4)(由Manchester Organics提供)的甲苯(13vol)溶液中加入浓盐酸(1vol),然后用甲苯进行线冲洗(line rinse)(1vol)。将混合物加热到35-40°C,并在此温度搅拌,直到反应结束(合格标准: $\leq 2.0\%$ (4)的面积,预期反应时间16-24小时)。将悬浮液在不超过50°C减压浓缩,直到得到一种湿固体。加入(charge)甲苯(3x 10vol),在温度不超过50°C下,减压浓缩,每次连续加入后得到一种湿固体。加入甲苯(4vol),在常压(atmospheric pressure)、温度不超过50°C条件下在旋转蒸发器上转动悬浮液10至20分

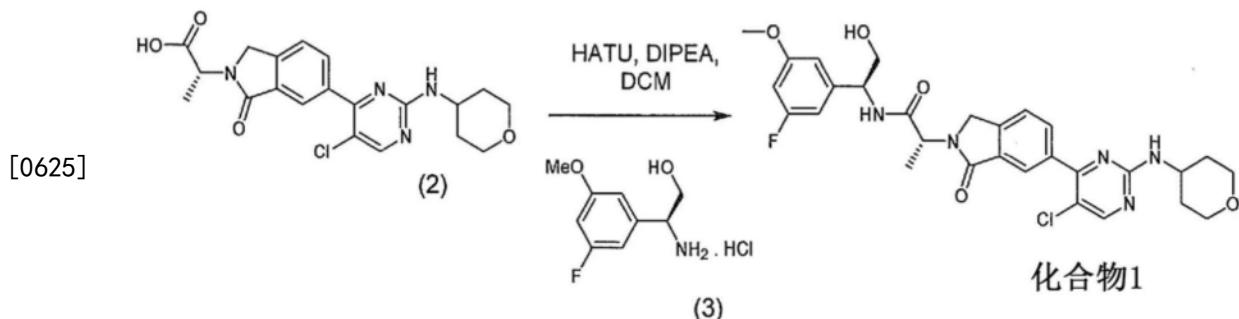
钟。从旋转蒸发器上取下烧瓶,让烧瓶内物质在15-25℃陈化(age)至少1小时。过滤收集固体,用甲苯(2x2vol)洗涤,并在氮气下抽干(pulled dry),直到甲苯含量≤6.0%w/w,水含量≤2.0%w/w。分离出呈米白至浅米色固体状的中间体(5)(74-95%th,64-82%w/w)。

[0621] 阶段2:中间体(5)与4-氨基四氢吡喃偶联



[0623] 向15-25℃的(5) (1.0wt校正,1.0mol eq)的1-甲基-2-吡咯烷酮(NMP) (9.5vol)溶液中加入碳酸钾(0.86wt,2.2mol eq),然后加入15-40℃的4-氨基四氢吡喃(6) (0.4vol,1.3mol eq)并用NMP进行线冲洗(0.5vol)。将混合物加热到80-95℃,并在此温度搅拌,直到反应结束(合格标准: $\leq 1.0\text{mol\%}$ 中间体(5),反应时间4-6小时)。将混合物冷却到15-25℃,加入3M盐酸(10vol),温度保持在15-30℃。加入二氯甲烷(DCM) (10vol),分离各相。采用DCM(5vol)反萃取酸性水相,汇合的有机相用纯净水(8x 10vol)洗涤,直到NMP含量控制到 $\leq 15.0\text{ \% w/w}$ 。有机相采用13%w/w NaCl溶液(10vol)洗涤,用活性炭(0.3wt)处理,并用硫酸镁(1.0wt)干燥。过滤混合物,以脱除干燥剂,采用DCM(2x 2vol)洗涤,在减压、不超过35℃条件下浓缩汇合的滤液,得到呈浅棕色泡沫状的(2) (74-90%th,88-107%w/w)。

[0624] 阶段3:化合物1的制备



[0626] 向(2)(1.0wt, 1.0mol eq)的DCM(12.5vol)溶液中加入胺(3)(0.68wt, 1.27mol eq)。将悬浮液冷却到10-15°C,加入DIPEA(1.67vol, 4.0mol eq)。将所得溶液搅拌5-10分钟,然后逐份(portion wise)加入HATU(1.15wt, 1.27mol eq),反应温度保持在<25°C。在15-25°C搅拌混合物,直到HPLC确认反应结束(<0.5%面积(2),通常1小时)。反应结束后,在减压、不超过38°C条件下浓缩反应,得到一种流动的橙色稠油。将残余物在EtOAc(10vol)中溶解,并用纯净水(10vol)、25%w/w氯化铵溶液(2x 10vol)、8%w/w NaHCO₃溶液(2x 10vol)和13%w/w NaCl溶液(6x 10vol)洗涤,然后用MgSO₄(1.0wt)干燥。过滤脱除固体,并用乙酸乙酯(2x 2vol)洗涤滤饼。在不超过40°C条件下在旋转蒸发器上浓缩滤液,得到呈浅黄色泡沫状的粗化合物1。粗化合物1采用干柱快速色谱法(dry flash chromatography)提纯。

[0627] 在上述条件下,但其中采用1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDCI)为偶联

剂来代替HATU,采用4-二甲氨基吡啶(4-DMAP)作为碱来代替DIPEA,采用二甲基甲酰胺(DMF)为溶剂来代替DCM,也观察到(2)全部转化为化合物1。

[0628] 色谱分析程序:

[0629] 在快速干柱中装入硅胶(20wts),并通过乙酸乙酯(通常2x 20vol)洗脱来洗涤和填充硅胶。将粗化合物1(1wt未校正)溶于DCM(4vol)中,并小心地加载到柱上。然后,按照下述方案洗脱色谱柱:

[0630] • 纯EtOAc 40x 20vol F1-240

[0631] • 1%MeOH的EtOAc溶液 10x 20vol F41-50

[0632] • 5-10%MeOH的EtOAc溶液 3x 20vol F51-53柱冲洗

[0633] 收集的所有馏分都采用HPLC分析,产品通常在馏分12至45中洗脱出来。在缺乏HPLC数据时,只将那些TLC表明似乎最干净和最强(intense)的馏分(例如,上面的产品洗脱实例范围的馏分15-25)汇合到一起。含各馏分的外部产品采用HPLC分析,从而确定这些馏分是否具有适当的纯度,适合与主产品馏分汇合。一旦将所有这些馏分汇合,并浓缩成泡沫或较低体积,就采用乙酸乙酯(例如,10vol)稀释产品,搅拌,得到一种溶液,然后通过玻纤过滤纸澄清。然后,将滤液浓缩,得到呈米白至浅黄泡沫状的无定形化合物1(65-85% th, 91-119% w/w)。

[0634] 实例2

[0635] 无定形的化合物1的盐的制备

[0636] 制备各种不同反离子的2-丙醇储备溶液。将相关储备溶液(500μl, 10vol)加到化合物1(按照实例1制备)的乙酸异丙酯(2.5ml, 50vol)溶液中,并搅拌。将未结晶或微沉淀的固体冷却,蒸发浓缩或进一步采用叔丁基甲基醚(TBME)处理。

[0637] 固体通过过滤分离,并用氮气流干燥96小时,取出,并开展¹H NMR和XRPD分析(参见下表)。

	酸反离子	反离子化学计量值	常用的盐名称	¹ H NMR测定的化合物1: 反离子的化学计量值(¹ H NMR谱)	XRPD图
[0638]	非离子化形式	N/A	游离碱	N/A	无定形
	4M盐酸(溶剂 1, 4-二恶烷, 99%)	1	盐酸盐	(参见图6)	无定形
	硫酸(95%)	2	硫酸盐	(参见图7)	无定形

萘-1, 5-二磺酸四水合物 (97%)	1	萘二磺酸盐	1:1 (参见图8)	无定形
乙烷-1, 2-二磺酸三水合物 (98%)	1	乙二磺酸盐	1:1 (参见图9)	无定形
4-甲苯磺酸一水合物	1	甲苯磺酸盐	1:1 (参见图10)	无定形
甲烷磺酸 (99.5%)	1	甲磺酸盐	1:1 (参见图11)	无定形
[0639]	萘-2-磺酸一水合物 (99%)	1	萘磺酸盐	1:1 (参见图12)
	苯磺酸 (90%)	1	苯磺酸盐	1:1 (参见图13)
	2-羟乙烷磺酸钠盐 (98%)	1	羟乙基磺酸盐	(参见图14)
	乙磺酸 (95%)	1	乙磺酸盐	1:1 (参见图15)
	氢溴酸 (99%)， (48%水溶液)	1	氢溴酸盐	(参见图16)

[0640] 实例3

[0641] 化合物1的结晶形式的制备

[0642] 实例3A-结晶形式A的制备

[0643] 将(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧化-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺的盐酸盐(如实例2制备)在70℃的纯净水(35体积)中悬浮96小时。固体通过过滤分离,并在氮气流下干燥96小时,取出,并开展XRPD分析(参见图1)。

[0644] 实例3B-结晶形式B的制备(方法I)

[0645] 将(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧化-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺的盐酸盐(如实例2制备)悬浮在18-23℃的纯净水(2ml,20vol)中。将该溶液在45-50℃搅拌20小时。然后,将温度降低到30-35℃,进一步搅拌该溶液96小时。所得固体的XRPD结果与图2的XRPD图一致。

[0646] 实例3C-结晶形式B的制备(方法II)

[0647] 将(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧化-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺的盐酸盐(如实例2制备)悬浮在纯净水(20vol)中,在40℃、氮气条件下搅拌该混合物20小时。加入2-丙醇(7.6vol),在40℃搅拌混合物20小时。通过XRPD对转化进程进行监测。所得固体的XRPD结果与图2的XRPD图一致。

[0648] 实例3D-结晶形式B的制备(方法III)

[0649] 将(2R)-2-(6-{5-氯-2-[(氧杂环己-4-基)氨基]嘧啶-4-基}-1-氧化-2,3-二氢-1H-异吲哚-2-基)-N-[(1S)-1-(3-氟-5-甲氧苯基)-2-羟乙基]丙酰胺(如实例1制备)(100mg,1.0wt.)加到容器内,然后加入乙酸乙酯或甲苯(15vol)和叔丁基甲基醚(15vol)。将悬浮液在30℃搅拌7天。然后,将产品过滤分离,用回收的成熟溶剂(maturation solvent)洗涤,并在18-23℃在氮气流下干燥,通过XRPD分析提供结晶证据。所得固体的XRPD图与图2的XRPD图一致。

[0650] 实例4

[0651] 化合物1的结晶形式B的进一步表征

[0652] 采用X射线粉末衍射法、差示扫描量热法、热重分析及动态蒸汽吸附法对实例3B、3C和3D得到的化合物1的结晶形式B进行研究。

[0653] 实例4A-X射线粉末衍射

[0654] 按照实例3的方法制备结晶形式B化合物1的晶体。采用配备LynxEye检测器的Bruker D2 Phaser粉末衍射仪开展X射线粉末衍射(XRPD)分析。对样品开展最少的处理,但是,如果必要的话,可以将样品用研钵和研杵稍做研磨,再获取样品。将样本(speciment)放在硅胶样品架中心5mm袋内(大约5-10mg)。样品在数据采集期间连续转动,扫描条件为:步长0.02°2θ,范围4°-40°2θ,步长时间34.5秒。采用Bruker Diffrac.Suite处理数据。化合物的结晶形式B的X射线粉末衍射图如图2所示,每个峰的2θ衍射角和强度在下表中给出。

[0655]

衍射角(°)	相对强度
8.75	23
12.00	13
13.03	23
13.82	39
14.05	100

14.43	20
16.89	12
17.31	22
19.34	36
20.56	85
21.25	45
23.52	18
23.97	74
24.15	71
26.18	18
28.74	22
29.84	13

[0656] 实例4B-差示扫描量热分析 (DSC)

[0657] 按照实例3的方法制备化合物1的结晶形式B的晶体。采用通过STAReTM软件操作的Mettler Toledo DSC 821开展热分析。分析在氮气条件下,在40 μ L敞口铝盘中开展,样品量为1-10mg。通常,分析的温度范围是20°至250°,温度梯度是10°C/分钟。结晶化合物的DSC扫描结果如图3所示。

[0658] 实例4C-热重分析 (TGA)

[0659] 按照实例3的方法制备结晶形式B化合物1的晶体。将大约7mg样品放到铂HT TGA盘内,该盘已经采用丁烷喷灯清洁,并已利用仪器的自动去皮功能去皮。将样品在氮气条件下以10°C/min从25°C加热到800°C。结晶化合物的失重曲线如图4所示。

[0660] 实例4D-动态蒸汽吸附分析

[0661] 按照实例3的方法制备结晶形式B化合物1的晶体。称取大约20mg样品到铝盘内,并放到温度保持在25°C的DVS Intrinsic仪器内。让样品在0%RH条件下平衡3小时,然后,按5%增量将湿度从0提高到30%RH。然后,按10%增量将湿度提高到90%RH。脱附阶段采用类似的降速。在每一步中,将0.002%/min质量/时间单位(dt)的变化率设为平衡参数。化合物的蒸汽吸附/脱附曲线如图5所示。

[0662] 实例4E-单晶体X射线衍射研究

[0663] 式(1)化合物的结晶形式B的单晶体X射线结构采用乙酸异丙酯慢蒸发得到的晶体在100K测定。

[0664] 采用配备Oxford Cryosystems Cobra冷却装置的Rigaku Oxford Diffraction Supernova Dual Source,Cu at Zero,Atlas CCD衍射仪采集数据。采用Cu K α 采集数据。采用Bruker AXS SHELXTL套装解析和精修结构。全部详细情况见下表。除非另外声明,否则与碳连接的氢原子都按几何排列,采用骑式各向同性位移参数精修。与杂原子连接的氢原子位于差值傅里叶合成内,并能够采用各向同性位移参数随意精修。采用Mercury (C.F.a.Macrae, "Mercury: visualization and analysis of crystal structures," J.Appl.Cryst., vol.39, pp.453-457, 2006)产生晶体结构的参考衍射图。

[0665] 数据采集和结构精修

衍射仪	SuperNova, Dual, Cu at zero, Atlas
-----	------------------------------------

辐射源	SuperNova (Cu) X-ray Source, CuK α
数据采集方法	扫描
数据采集的θ范围	3.460至66.589°
指标范围	-14≤h≤15, -10≤k≤9, -14≤l≤15
采集的衍射点	24752
独立的衍射点	4834 [R(int) = 0.0371]
独立衍射点的范围	97.4 %
吸收校正	来自等效值的半经验
最大和最小透射	1.00000和0.80872
结构解析方法	直接法
结构解析/精修程序	SHELXTL (Sheldrick, 2013)
精修方法	基于F2的全矩阵最小二乘法

[0667]

结晶数据

结晶溶剂	乙酸异丙酯
结晶方法	缓慢蒸发
经验分子式	C ₂₉ H ₃₃ ClFN ₅ O ₆
分子量	602.05
温度	100(2) K
波长	1.54178 Å
晶体尺寸	0.180 x 0.060 x 0.050 mm

[0668]

晶体习性	无色块
晶系	单斜晶
空间群	P2 ₁
单位晶胞大小	$a = 12.6616(2)$ Å $a = 90^\circ$ $b = 9.0139(2)$ Å $b = 103.2380(10)^\circ$ $c = 13.1214(2)$ Å $g = 90^\circ$
体积	1457.76(5) Å ³

[0669]

[0670] 结晶是单斜晶,空间群P21,最终R1=[I>2s(I)]=2.93%。

[0671] 化合物的绝对立体化学已采用衍射数据确定,并且已经证实了如此处式(1)所描绘,Flack参数=-0.004(7)。

[0672] 在不对称单元中,有一个式(1)化合物分子和一个水分子,两者都为完全有序,证实结晶形式B是式(1)化合物的一水合物。

[0673] 实例5

[0674] 化合物(1)的结晶形式B在含水溶剂中的溶解性测定

[0675] 对结晶形式B和无定形形式的式(1)化合物在纯净水和浓度相同的各种缓冲液中

的溶解性进行了测定,其中搅拌时间不超过24小时,温度18-23℃。监测溶液的pH和温度,从而确认到实验结束时pH未发生变化。

[0676] 一般程序

[0677] 将式(1)化合物的样品(50mg)悬浮在纯净水(2mL)或合适的缓冲溶液中,室温(18-23℃)搅拌20-24小时。然后,离心分离浆液,若合适的话,采用HPLC样品稀释剂(乙腈/水,1/1,v/v)稀释,并利用HPLC峰面积开展分析。将测定值与式(1)化合物的相关校正曲线进行比较。计算近似溶解度,并针对合适的稀释因子和%w/w分析应用补偿因子。稀释因子确保峰面积值落在期望的校正曲线范围内。

[0678] 将残留在离心管内的固体在真空烘箱内干燥,并采用XRPD进行分析。若样本存在任何证据表明其结晶性与结晶形式的化合物(1)的预期衍射图不同,则进一步开展¹H NMR分析来确认其化学性质。

[0679] 研究中所用缓冲液的制备说明如下:

[0680] pH 1.2-将50mL 0.2M氯化钾溶液与85mL 0.2M盐酸溶液混合。

[0681] pH 2-将50mL 0.2M氯化钾溶液与13mL 0.2M盐酸溶液混合。

[0682] pH 3-将100mL 0.1M邻苯二甲酸氢钾与44.6mL 0.1M盐酸溶液混合。

[0683] pH 4-将100mL 0.1M邻苯二甲酸氢钾与0.2mL 0.1M盐酸溶液混合。

[0684] pH 5-将100mL 0.1M邻苯二甲酸氢钾与45.2mL 0.1M氢氧化钠溶液混合。

[0685] pH 6-将100mL 0.1M正磷酸二氢钾与11.2mL 0.1M氢氧化钠溶液混合。

[0686] pH 7-将100mL 0.1M正磷酸二氢钾与58.2mL 0.1M氢氧化钠溶液混合。

[0687] pH 8-将100mL 0.1M正磷酸二氢钾与93.4mL 0.1M氢氧化钠溶液混合。

[0688] 结果

输入	输入的化学纯度(%面积)	缓冲液	平衡pH / T℃ 测定 (t=24h)	测定溶解度 (mg/ml),	描述性 术语
[0689]	97.48	纯净水	7.73 / 20.6	<0.1mg/ml (0.0234 mg/ml)	几乎不溶
		pH1.2缓冲液	1.12 / 20.2	≥0.1mg/ml (0.1249 mg/ml)	极微溶
		pH2缓冲液	2.00 / 19.2	<0.1mg/ml (0.0226 mg/ml)	几乎不溶
		pH3缓冲液	3.07 / 20.2	<0.1mg/ml (0.0257 mg/ml)	几乎不溶
		pH4缓冲液	3.98 / 19.1	<0.1mg/ml (0.0418 mg/ml)	几乎不溶

pH5缓冲液	4.99 / 19.4	<0.1mg/ml (0.0268 mg/ml)	几乎不溶
pH6缓冲液	6.01 / 19.4	<0.1mg/ml (0.0149 mg/ml)	几乎不溶
pH7缓冲液	6.97 / 21.0	<0.1mg/ml (0.0136 mg/ml)	几乎不溶
pH8缓冲液	8.16 / 19.8	<0.1mg/ml (0.0138 mg/ml)	几乎不溶

输入	输入的化学纯度 (%面积)	缓冲液	平衡pH / T°C 测定 (t=24h)	测定溶解度 (mg/ml)	描述性术语
[0690]	99.10	纯净水	7.88 / 22.1	<0.1mg/ml (0.0187 mg/ml)	几乎不溶
		pH1.2 缓冲液	1.11 / 20.8	<0.1mg/ml (0.0154 mg/ml)	几乎不溶
		pH2缓冲液	2.01 / 20.4	<0.1mg/ml (0.0034 mg/ml)	几乎不溶
		pH3缓冲液	3.08 / 20.7	<0.1mg/ml (0.0045 mg/ml)	几乎不溶
		pH4缓冲液	4.00 / 20.4	<0.1mg/ml (0.0049 mg/ml)	几乎不溶
		pH5缓冲液	5.00 / 20.7	<0.1mg/ml (0.0031 mg/ml)	几乎不溶
		pH6缓冲液	6.02 / 20.5	<0.1mg/ml (0.0027 mg/ml)	几乎不溶
		pH7缓冲液	6.98 / 20.5	<0.1mg/ml (0.0017 mg/ml)	几乎不溶
		pH8缓冲液	8.02 / 20.2	<0.1mg/ml (0.0020 mg/ml)	几乎不溶
		纯净水	7.71 / 20.4	<0.1mg/ml (0.0012 mg/ml)	几乎不溶
		pH1.2 缓冲液	1.19 / 19.5	<0.1mg/ml (0.0164mg/ml)	几乎不溶

[0691] 结论和观察

[0692] 式(1)化合物的结晶形式和无定形形式几乎不溶 (practically insoluble) 于pH 1.2-8.0的缓冲液中 (大约<0.1mg/ml)。

[0693] 化合物(1)的结晶形式B在非水性溶剂中的溶解性测定

[0694] 程序

[0695] 将按照实例3制备的化合物(1)的形式B以大约1小时的间隔加入到合适的溶剂(2ml)中。有目的地让溶液饱和,并在18-23°C搅拌72小时。然后,将悬浮液离心,对上清液进行采样,并相应地进行稀释,采用HPLC测定相应分析物的峰面积,并与标准校正物的峰面积进行对比。计算近似溶解度,并在无水溶剂的基础上对溶解度进行物理检查,以确认结果一致。

[0696] 观察和结果

	乙醇 (2ml)	甘油 (2ml)	PEG 400 (2ml)	丙二醇 (2ml)
[0697]	第一次加料/搅拌 1h @ 18至 23°C	198.74mg	200.30mg	198.96mg
	第二次加料/ 搅拌 +1h @ 18至 23°C	200.07mg	---	200.78mg
	第三次加料/搅拌 +1.5h @ 18至 23°C	200.94mg	---	200.27mg
	第四次加料/搅拌 +72h @ 18至 23°C	200.12mg	---	199.76mg
	第五次加料/搅拌 +2h @ 18至 23°C	200.34mg	---	---

[0698] 将饱和溶液离心, 将100μl澄清的上清液加入到250ml (乙醇) 或100ml (剩余物) 容量瓶中, 并用样品稀释剂稀释到刻度。然后, 通过HPLC峰面积对稀释样品进行分析, 计算预估(estimated)最大溶解度, 并在下表中报告。

[0699]	溶剂	预估最大溶解度 (mg/ml), 18-23°C
	乙醇	337
	甘油	5
	PEG 400	229
	丙二醇	289

[0700] 为了确认预估溶解度的数量级是正确的, 配制溶液, 使其浓度不超过预估最大测定浓度, 将混合物在相同条件下搅拌过夜, 确认其溶解。

[0701] 结论

[0702] 结果表明, 式(1)化合物在乙醇、PEG 400和丙二醇中的溶解度明显大于其在水中的溶解度。

[0703] 实例6液体制剂-I

[0704] 溶剂

[0705] a. 丙二醇-P4347SIGMA-ALDRICH (符合USP试验规范)

[0706] b. 乙醇-29221 SIGMA-ALDRICH (按照欧洲药典要求测试)

[0707] c. Super Refined™ PEG 400-Croda (JP, USP-NF, PhEur)

[0708] d. 丙二醇和乙醇75:25 (%w/w) 组合

[0709] e. 丙二醇和乙醇85:15 (%w/w) 组合

[0710] 方案

[0711] 在玻璃瓶中按500mg/mL将式(1)化合物在每种溶剂中温育(采用RS9000加热块, 25°C), 并保持连续搅拌。T=1、3、7、24和48小时。

[0712] 将得到的悬浮液在13,000rpm条件下超速离心(即500-1000μl样品量)15分钟, 肉眼检查确认澄清。如果澄清度不满意, 则重复离心程序, 将残余未溶解化合物沉淀下来。对上清液进行相关取样(例如, 100μl-1000μl), 适当稀释, 并采用HPLC-UV分析, 以确定实际浓度。

[0713] 实例7

[0714] 液体制剂-II

[0715] 制备以下液体制剂。

[0716] 7-1. 溶解在5g TPSG和5g丙二醇中的式(1)化合物。

[0717] 7-2. 溶解在6g TPSG和6g丙二醇中的式(1)化合物。

[0718] 7-3. 溶解在2.5g TPSG和7.5g丙二醇中的式(1)化合物。

[0719] 7-4. 溶解在TPGS(20% w/w)、乙醇(15% w/w)和丙二醇(65% w/w)中的式(1)化合物。

[0720] 7-5. 溶解在丙二醇(100% w/w)中的式(1)化合物。

[0721] 7-6. 溶解在TPGS(10% w/w)、乙醇(10% w/w)和丙二醇(80% w/w)中的式(1)化合物。

[0722] 每种制剂中式(1)化合物的浓度是100mg/mL。

[0723] 针对每种制剂,按照下述方法在模拟胃液和模拟肠液中开展稀释研究。在这些试验中,采用下述HPLC-UV方法测定式(1)化合物的浓度。

[0724] LC法参数

[0725] 柱子:Halo C18 150x 4.6mm; 2.7μm

[0726] 进样体积:5μL

[0727] 检测:UV@221nm

[0728] 流动相A:水/乙腈/TFA(5/95/0.05v/v/v)

[0729] 流动相B:水/乙腈/TFA(95/5/0.5v/v/v)

[0730]	时间(分钟)	%A	%B
0.0	100	0	
2.0	100	0	
24.0	60	40	
28.0	50	50	
33.0	0	100	
36.0	0	100	
36.1	100	0	
40.0	100	0	

[0731] 流速:1.0mL/min

[0732] 柱温:40°C

[0733] 运行时间:40分钟

[0734] 积分时间:36分钟

[0735] 洗瓶:样品稀释剂

[0736] 稀释研究

[0737] 将每种制剂加入到50mL FaSSGF(按照<http://biorelevant.com/fassif-fessif-fassgf/how-to-make/>描述的方法制备)内,在3个时间点(T=5分钟、15分钟和30分钟)取样,每个样品取至少2mL。

[0738] 然后,将混合物采用44mL空腹状态模拟肠液FaSSIF(按照<http://biorelevant.com/fassif-fessif-fassgf/how-to-make/>描述的方法制备)进一步稀释,并

在8个时间点($T=5$ 分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、3小时、5小时和7小时)取样。采用HPLC-UV分析样品中式(1)化合物的浓度。

[0739] 对制剂7-1和7-2来说,大约65%的式(1)化合物在FaSSGF内稀释30分钟后仍然保持溶解。在接下来的稀释步骤中,当转到FaSSIF内时,在达到3小时时,溶解的化合物的量仍有大约50%,然后逐渐下降。从这种稀释研究的结果外推到“人类稀释场景”,预期在制剂7-1或制剂7-2中,1000mg剂量的式(1)化合物中有>60% (即大约600mg) 将溶解,并在进入到胃部(stomach)时仍然留在溶液中。

[0740] 对制剂7-3来说,在FaSSGF中稀释30分钟后,大约33%的药物仍然保持溶解。在接下来的稀释步骤中,当转到FaSSIF中时,在达到3小时时,溶解药物的数量仍有大约27%,然后逐渐下降。从这种稀释研究的结果外推到“人类稀释场景”,预期在制剂7-3中,1000mg的剂量有>30% (即大约300mg) 将溶解,并在进入到胃部时仍然留在溶液中。

[0741] 对制剂7-4来说,在FaSSGF中稀释30分钟后,大约30%的药物仍然保持溶解。在接下来的稀释步骤中,当转到FaSSIF中时,在达到3小时时,溶解的药物的量仍有大约24%,然后逐渐下降。从这种稀释研究的结果外推到“人类稀释场景”,预期在制剂7-4中,1000mg的剂量有>30% (即大约300mg) 将溶解,并在进入到胃部时仍然留在溶液中。

[0742] 对制剂7-5来说,在FaSSGF中稀释30分钟后,大约2%的药物仍然保持溶解。在接下来的稀释步骤中,当转到FaSSIF中时,溶解药物的量仍有大约2%。

[0743] 对制剂7-6来说,在FaSSGF中稀释30分钟后,大约17%的药物仍然保持溶解。在接下来的稀释步骤中,当转到FaSSIF中时,溶解药物的量仍有大约11%。

[0744] 我们发现,制剂7-6尤其有利。该制剂的安慰剂溶液(即仅使用媒介,不加任何式(1)化合物)最初形成含一些沉淀的透明液体,但加热到50°C后这些沉淀重新溶解,24小时和96小时后,液体仍保持透明,没有任何沉淀或浑浊。制剂7-6含100mg/ml式(1)化合物的活性溶液形成透明溶液,室温放置24小时和192小时后,溶液仍然透明,没有任何沉淀或浑浊。

[0745] 实例8

[0746] 生物活性

[0747] 实例8A-ERK2体外抑制试验

[0748] 采用下面的方案测定本发明化合物的抑制活性。

[0749] 采用时间分辨荧光格式,测量绿色荧光蛋白(ATF2-GFP) (Life Technologies) 标记的截短型活化转录因子2的磷酸化,从而测定ERK2酶(Life Technologies) 的活性。在化合物存在下,开展包含50mM Tris pH 7.5、10mM MgCl₂、1mM EGTA、0.01% Triton X-100、1mM DTT、2.5% DMSO、0.4μM ATF2-GFP、20μM ATP和0.25nM ERK2的试验反应,并在室温开展30分钟。然后,采用TR-FRET稀释缓冲液(Life Technologies)、25mM EDTA和2nM Tb-Anti-pATF2(Thr71) (Life Technologies) 将反应停止。继续温育至少30分钟后,读取Pherastar酶标仪(Lanthascreen光学模块;激发340nm,发射520nm(通道A),495nm(通道B))的荧光读数。A和B的读数之比用于计算信号。采用S型剂量响应方程(Prism GraphPad software, La Jolla, CA, USA),计算IC₅₀值。

[0750] 在使用ERK2的试验中,式(1)化合物的IC₅₀值是0.0027μM。

[0751] 实例8B-抗增殖活性

[0752] 本发明化合物的抗增殖活性通过测量式(1)化合物抑制人黑色素瘤细胞系A375生

长的能力来测定。

[0753] 细胞增殖通过测量刃天青(阿尔玛蓝)对线粒体活性做出响应而转化为试卤灵(resorufin)来测定(Nociari, M.M, Shalev, A., Benias, P., Russo, C. *Journal of Immunological Methods* 1998, 213, 157-167)。在杜尔贝科改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium)+10% FBS中培养A375细胞(American Type Culture Collection, Teddington, UK)。在采用化合物处理前一天,将 2×10^3 个细胞接种在黑色96孔平底板上每个孔内的 $200\mu\text{l}$ 完全培养基中。将这些细胞用化合物的0.1% (v/v) 二甲亚砜(DMSO)溶液培养4天,然后加入 $20\mu\text{l}$ 阿尔玛蓝。在 37°C 继续培养6小时后,将平板放在Spectramax Gemini酶标仪(Molecular Devices; 激发535nm, 发射590nm)上读数。采用S型剂量响应方程(Prism GraphPad software, La Jolla, CA, USA)计算 GI_{50} 值。

[0754] 在采用A375细胞的试验中,式(1)化合物的 GI_{50} 值是 $0.0034\mu\text{M}$ 。

[0755] 用于细胞增殖的组合方案

[0756] 采用下面的技术,对式(1)化合物(化合物I)和抗癌剂(化合物II)组合使用的效果进行评估。按 2×10^3 - 4×10^3 个细胞/孔的浓度在96孔组织培养板上接种人癌细胞系(如A375)。让细胞恢复16-24小时,然后加入化合物或DMSO对照(0.1-0.5% DMSO)。将细胞用化合物的0.1%-0.5% (v/v) 二甲亚砜(DMSO)溶液培养72-96小时,然后加入 $20\mu\text{l}$ 阿尔玛蓝。在 37°C 继续培养6小时后,将平板放在Spectramax Gemini酶标仪(Molecular Devices; 激发535nm, 发射590nm)上读数。采用S型剂量响应方程(Prism GraphPad software, La Jolla, CA, USA)计算 GI_{50} 值。测定了不同剂量化合物I存在下化合物II的 GI_{50} 。当化合物I含量低于有效剂量时, GI_{50} 下降,则表明存在协同效应。当化合物II和化合物I组合使用的效果与这两种化合物单独使用的效果总和相当时,则表明它们具有加和性。拮抗效应定义为导致 GI_{50} 上升的效应,即两种化合物组合使用的效果不及两种化合物单独使用的效果总和。

[0757] 实例9

[0758] 药物制剂

[0759] (i) 片剂

[0760] 包含式(1)化合物的片剂组合物通过将合适量的化合物(例如50-250mg)与合适的稀释剂、崩解剂、压缩剂与/或助流剂混合而制备。一种可能的片剂包含50mg化合物、197mg乳糖(BP)稀释剂和3mg硬脂酸镁润滑剂,并按照人们熟悉的方式压制成片。这种压片任选使用薄膜包衣。

[0761] (ii) 胶囊剂

[0762] 胶囊剂通过将100-250mg(例如100mg)式(1)化合物与相当量的乳糖(例如100mg)混合,并将所得混合物装到标准不透明硬明胶胶囊内而制备。根据要求,可以包含适当量的合适崩解剂与/助流剂。

[0763] (iii) 可注射制剂I

[0764] 注射给药用肠胃外组合物可以这样制备:将式(1)化合物(例如,盐形式)溶于含10%丙二醇的水中,得到浓度为1.5%重量的活性化合物。然后,通过过滤将溶液灭菌,然后装到安瓿瓶内并密封。任选所述溶液在灭菌前先配制成等渗溶液。

[0765] (iv) 可注射制剂II

[0766] 注射用肠胃外组合物可以这样制备:将式(1)化合物(例如,盐形式)(2mg/ml)和甘

露醇(50mg/ml)溶于水中,将溶液过滤灭菌,并装到可密封的1ml小瓶或安瓿瓶或预装注射器内。

[0767] (v) 可注射制剂III

[0768] 静脉注射或输液用制剂可以这样制备:将式(1)化合物(例如,盐形式)溶于水中,浓度为20mg/ml,然后,任选调节等渗性。然后,将小瓶密封好,并通过高压灭菌。或者,可以装到安瓿瓶内或小瓶内或预装注射器内,通过过滤灭菌,并密封好。

[0769] (vi) 可注射制剂IV

[0770] 静脉注射或输液用制剂可以这样制备:将式(1)化合物(例如,盐形式)溶于包含缓冲液(例如,0.2M pH 4.6的醋酸盐溶液)的水中,浓度为20mg/ml。然后,将小瓶密封好,并通过高压灭菌。或者,然后,通过高压灭菌或通过过滤灭菌,并密封,而将预装注射器密封好。

[0771] (vii) 皮下或肌肉内注射制剂

[0772] 皮下(肌肉内)施用组合物这样制备:将式(1)化合物与药物级玉米油混合,使其浓度为5-50mg/ml(例如5mg/ml)。将组合物灭菌,并装到合适的容器内。

[0773] (viii) 冻干制剂

[0774] 将配制的式(1)化合物的等份装到50ml小瓶内并冻干。在冻干期间,组合物采用(-45°C)一步冷冻方案冷冻。将温度升高到-10°C用于退火,然后降低到-45°C冷冻,然后在+25°C一级干燥大约3400分钟,然后利用升温步骤,将温度升高到50°C开展二级干燥。一级干燥和二级干燥期间的压力设定为80毫托。

[0775] (ix) 冻干制剂II

[0776] 将配制的式(1)化合物或其盐的等份装到50mL小瓶内并冻干。在冻干期间,组合物采用(-45°C)一步冷冻方案冷冻。将温度升高到-10°C用于退火,然后降低到-45°C冷冻,然后在+25°C一级干燥大约3400分钟,然后利用升温步骤,将温度升高到50°C,开展二级干燥。一级干燥和二级干燥期间的压力设定为80毫托。

[0777] (x) 静脉给药用冻干制剂III

[0778] 将式(1)化合物溶解在缓冲液中,制备含水缓冲液。将经缓冲的溶液(过滤脱除颗粒物质)装到容器(例如1类玻璃瓶)内,然后将瓶子部分密封好(例如,盖上Fluorotec塞)。如果化合物和制剂足够稳定,则通过121°C高压杀菌合适的时间对制剂进行灭菌。如果制剂对高压灭菌不稳定,可以采用合适的过滤器灭菌,并在无菌条件下装到无菌瓶内。溶液采用合适的周期开展冷冻干燥。冷冻干燥周期完成后,向瓶内回充氮气到常压,盖好塞子并固定好(例如,铝质钳口)。静脉注射时,冻干固体可以采用药学上可接受的稀释剂(如0.9%盐水或5%葡萄糖)重建。该溶液可以直接使用,或进一步稀释到输液袋内(包含药学上可接受的稀释剂,如0.9%盐水或5%葡萄糖)以后再使用。

[0779] (xi) 装在瓶中的粉末

[0780] 口服组合物这样制备:将式(1)化合物装到瓶子(bottle)或小瓶(vial)内。然后,采用合适的稀释剂例如,水、果汁或商业可购买的媒介(如OraSweet或Syrspend)重建。重建的溶液可以分配到计量杯中或口腔注射器中供施用。

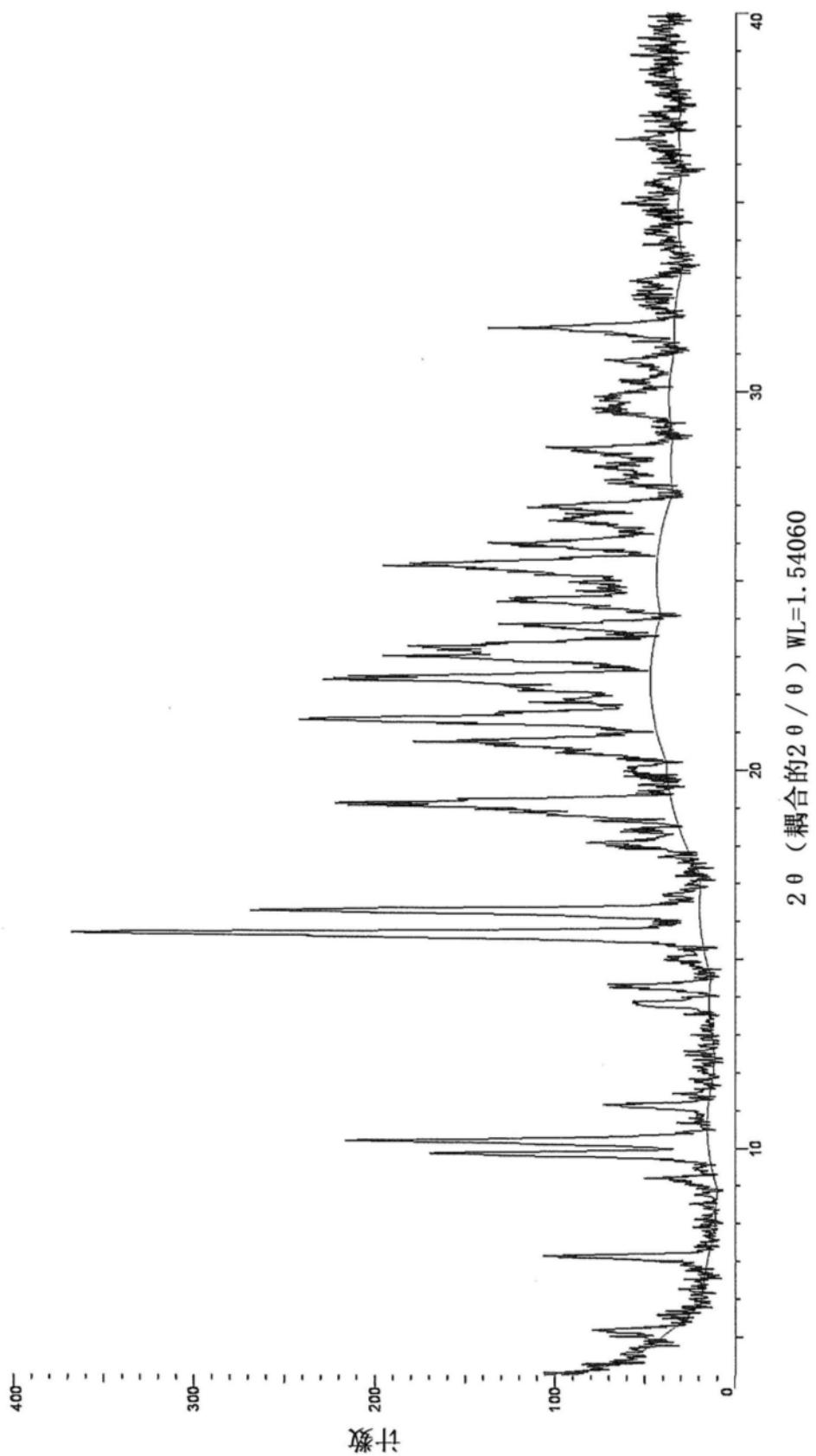


图1

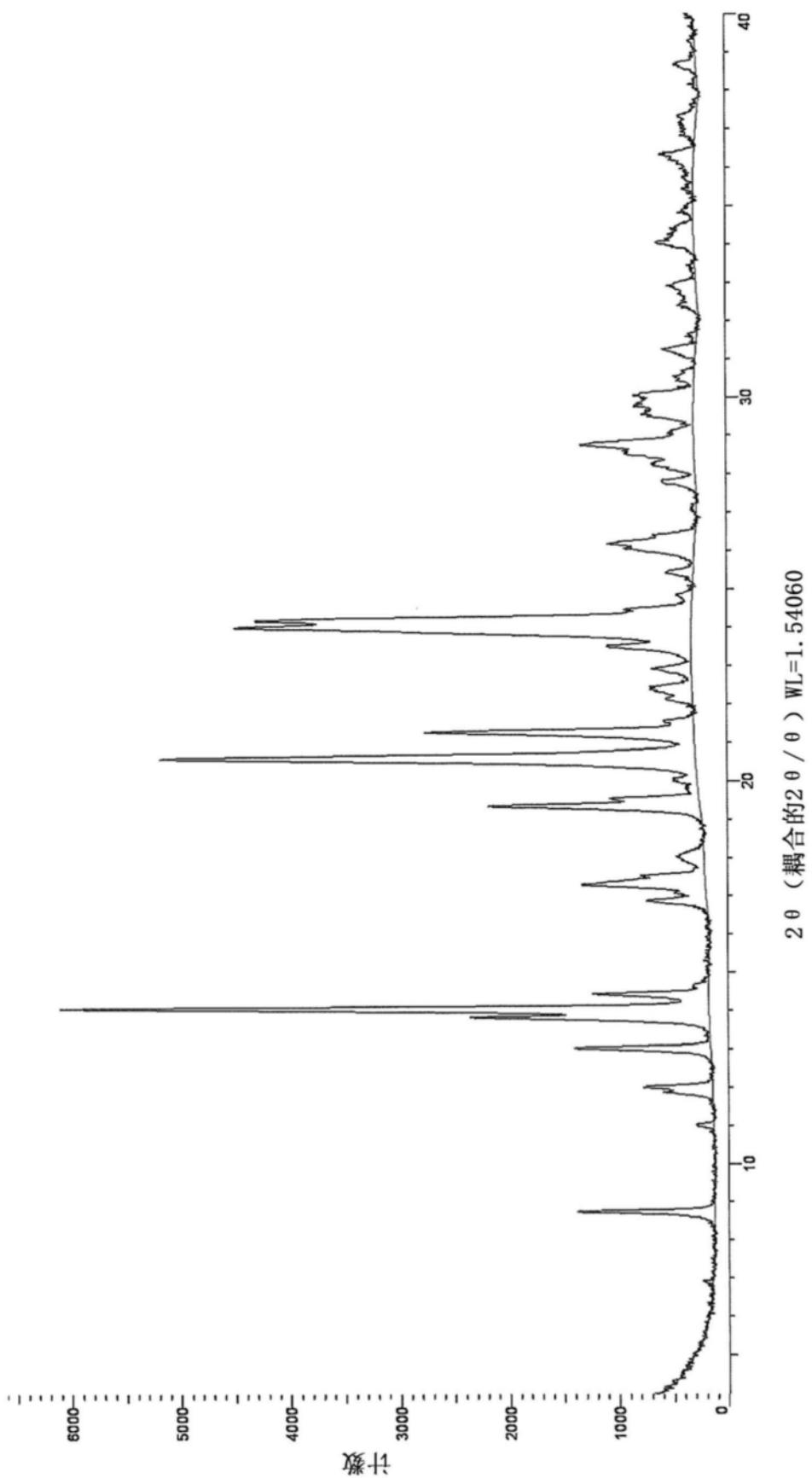


图2

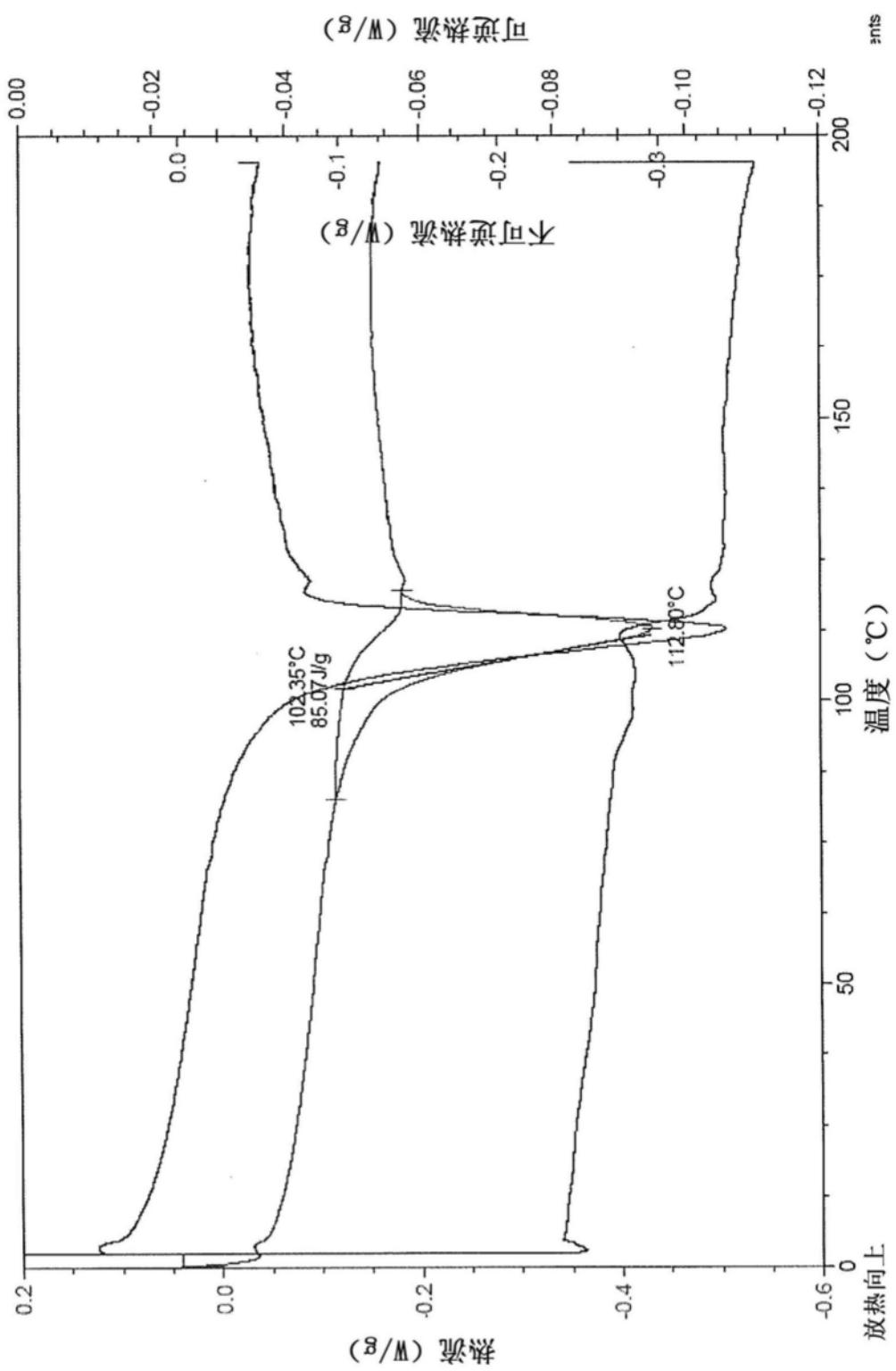


图3

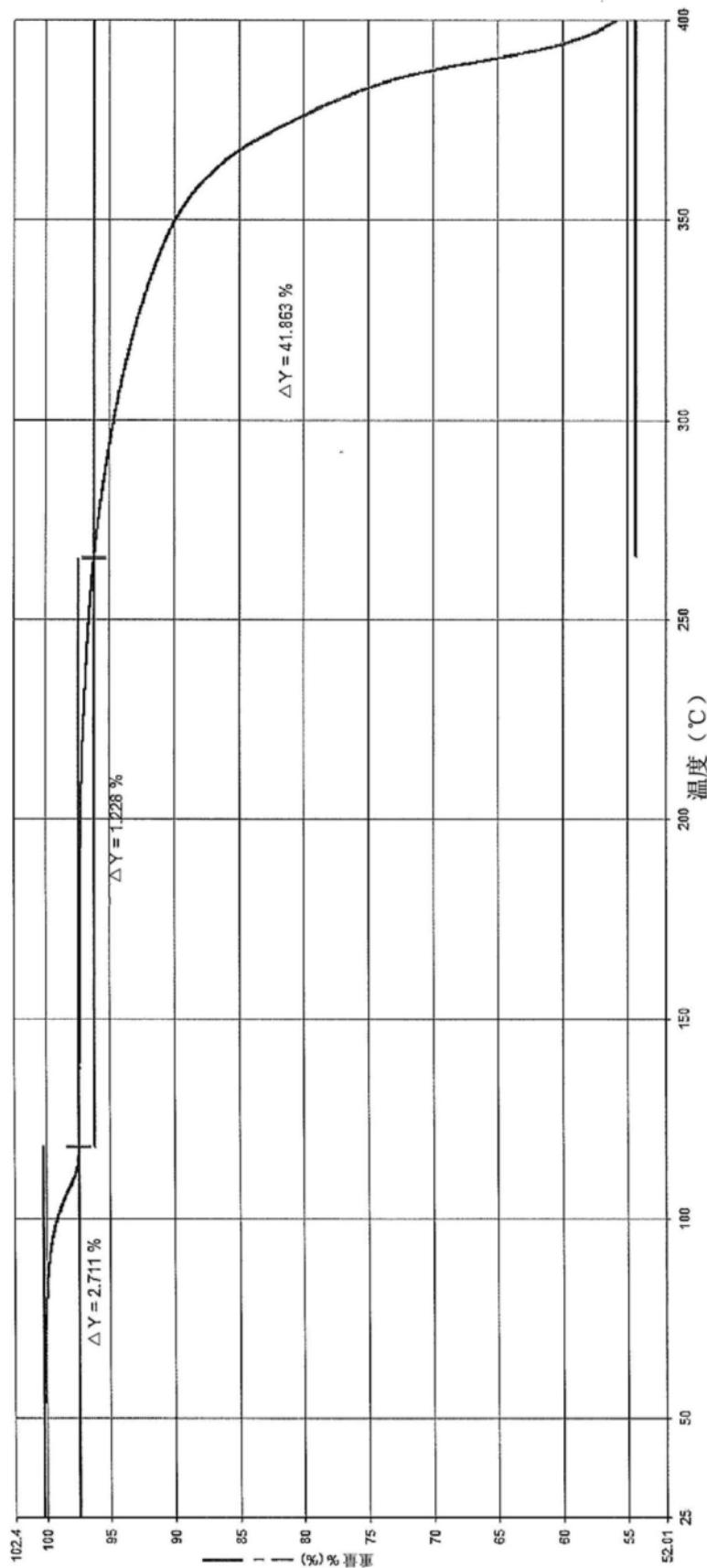


图4

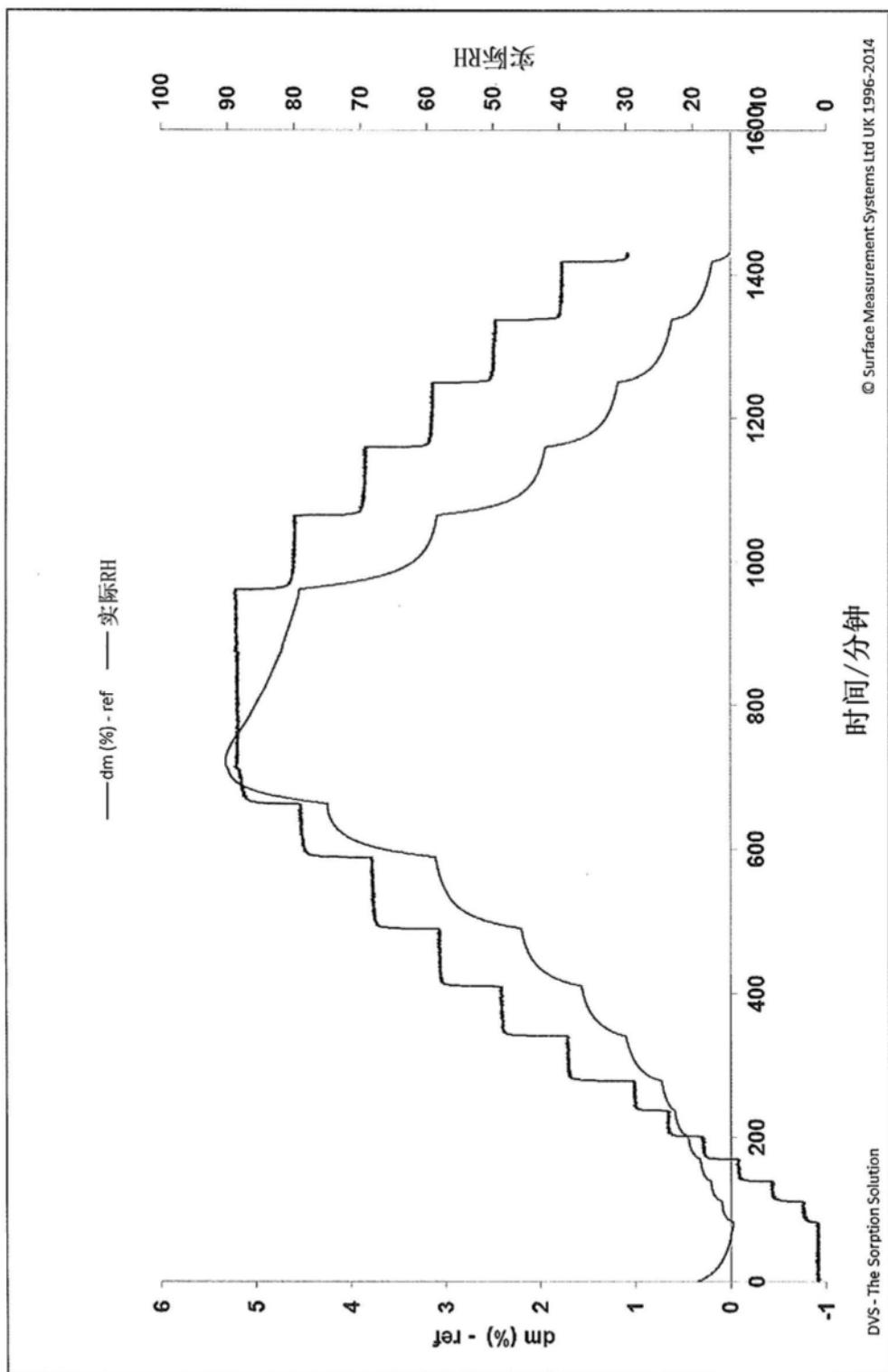


图5

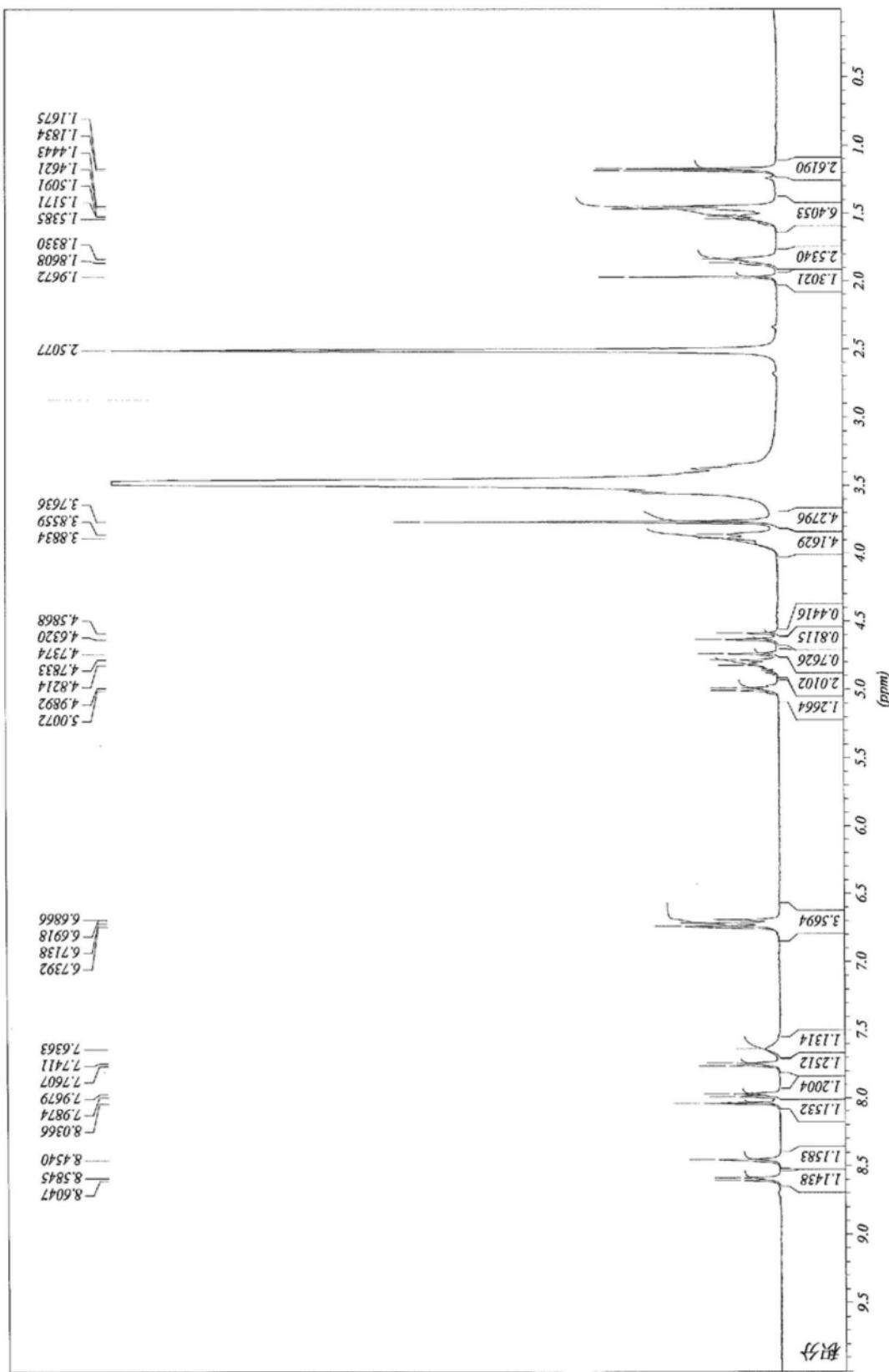
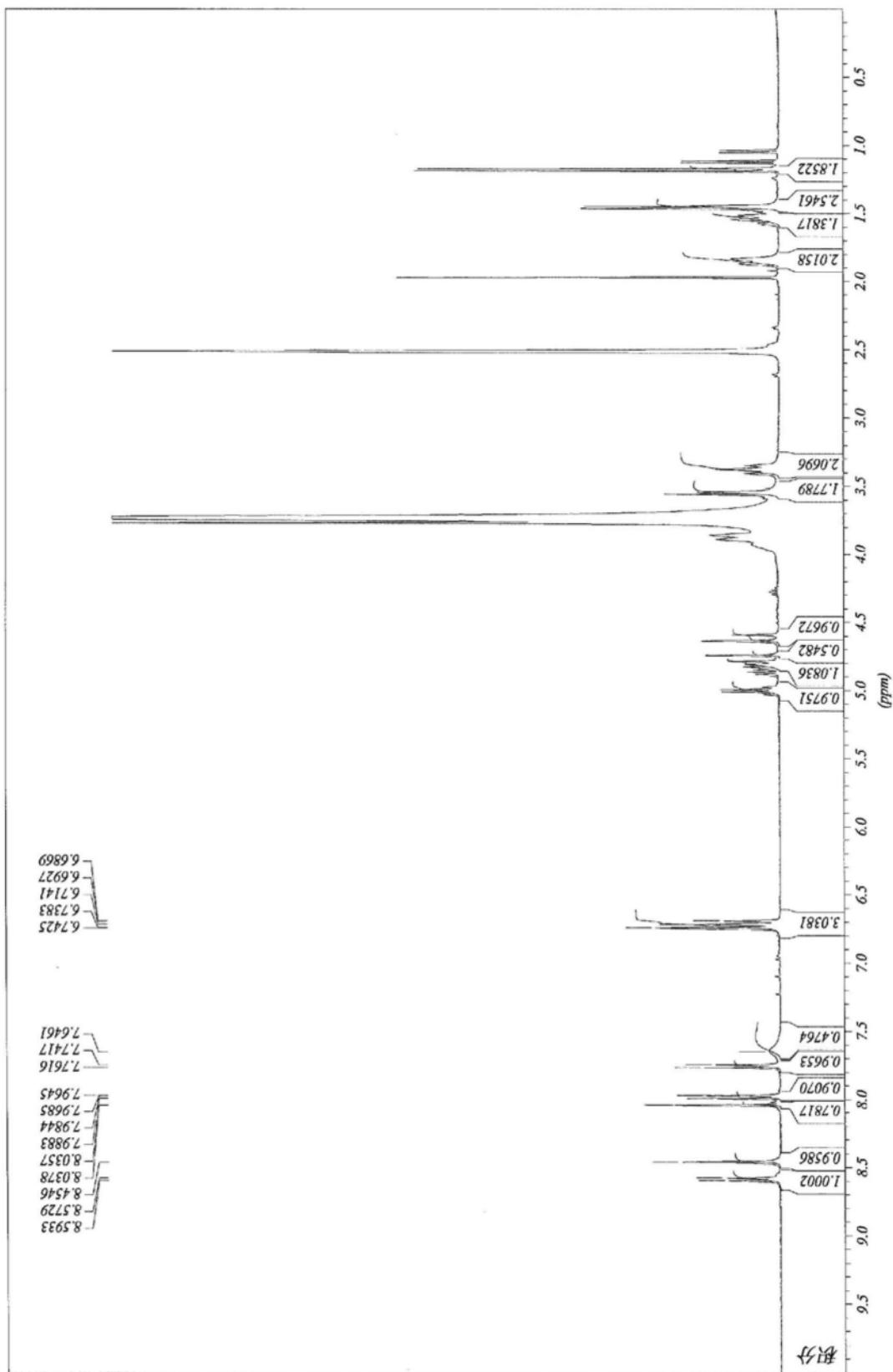


图6



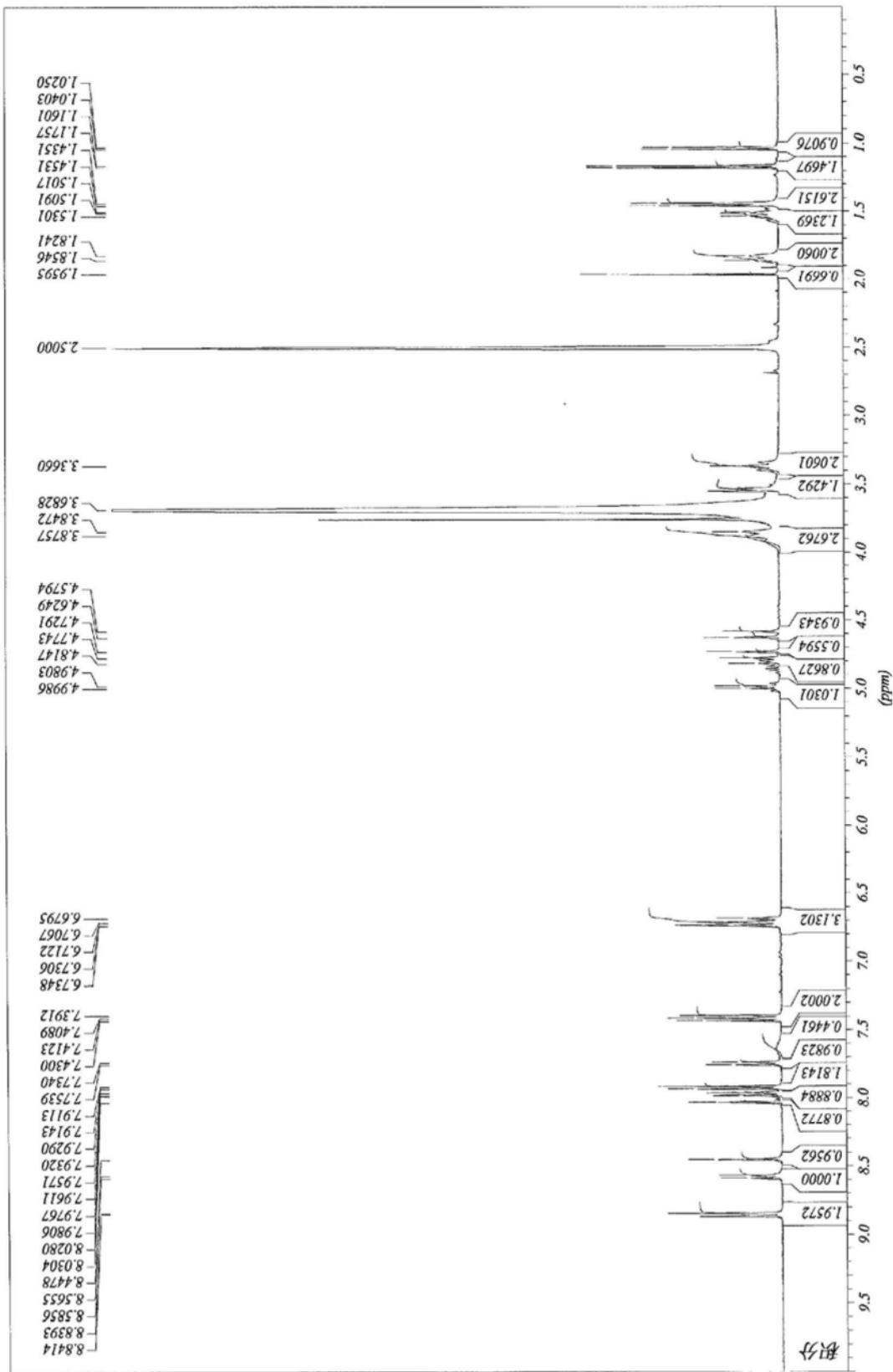


图8

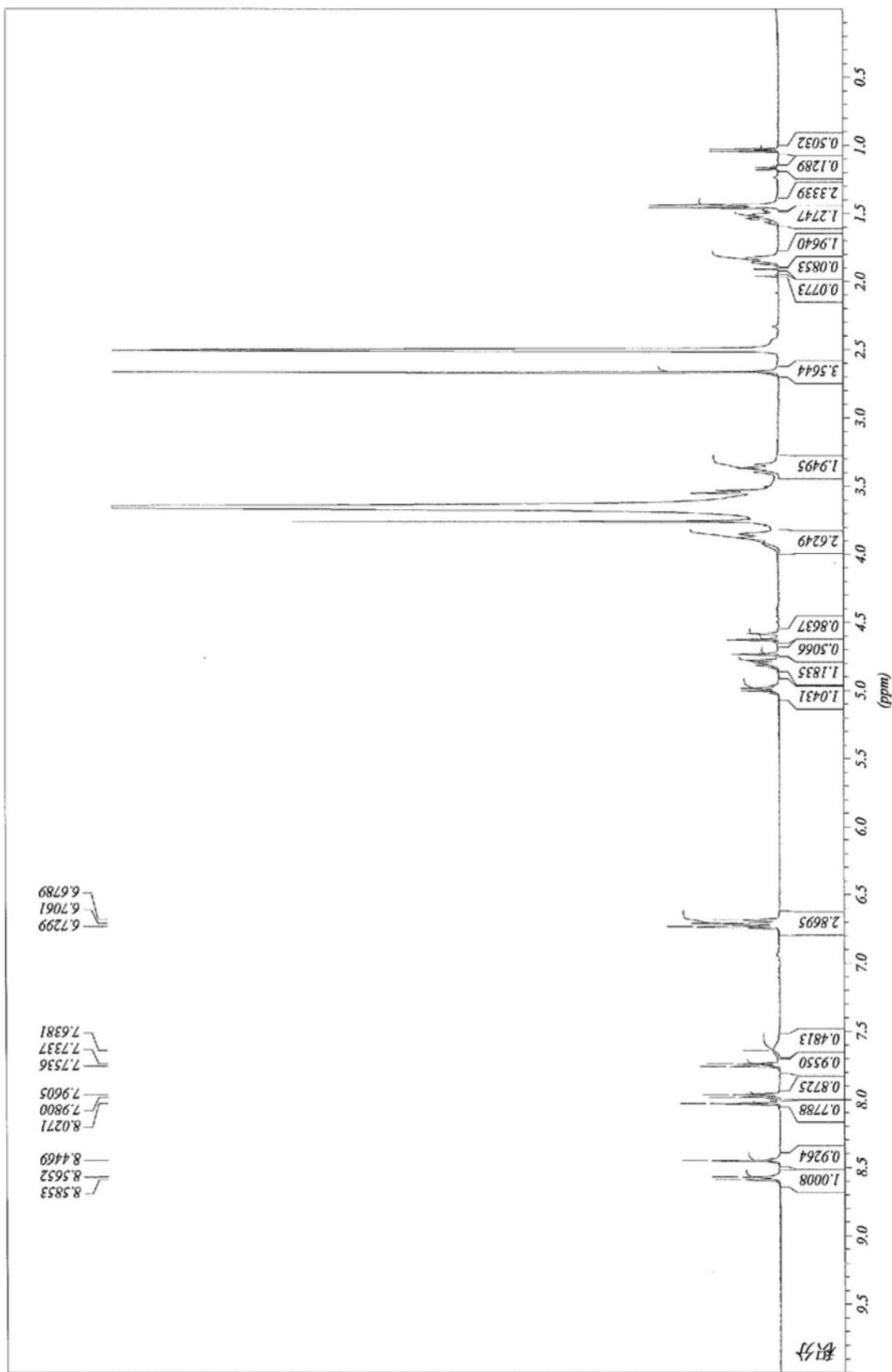


图9

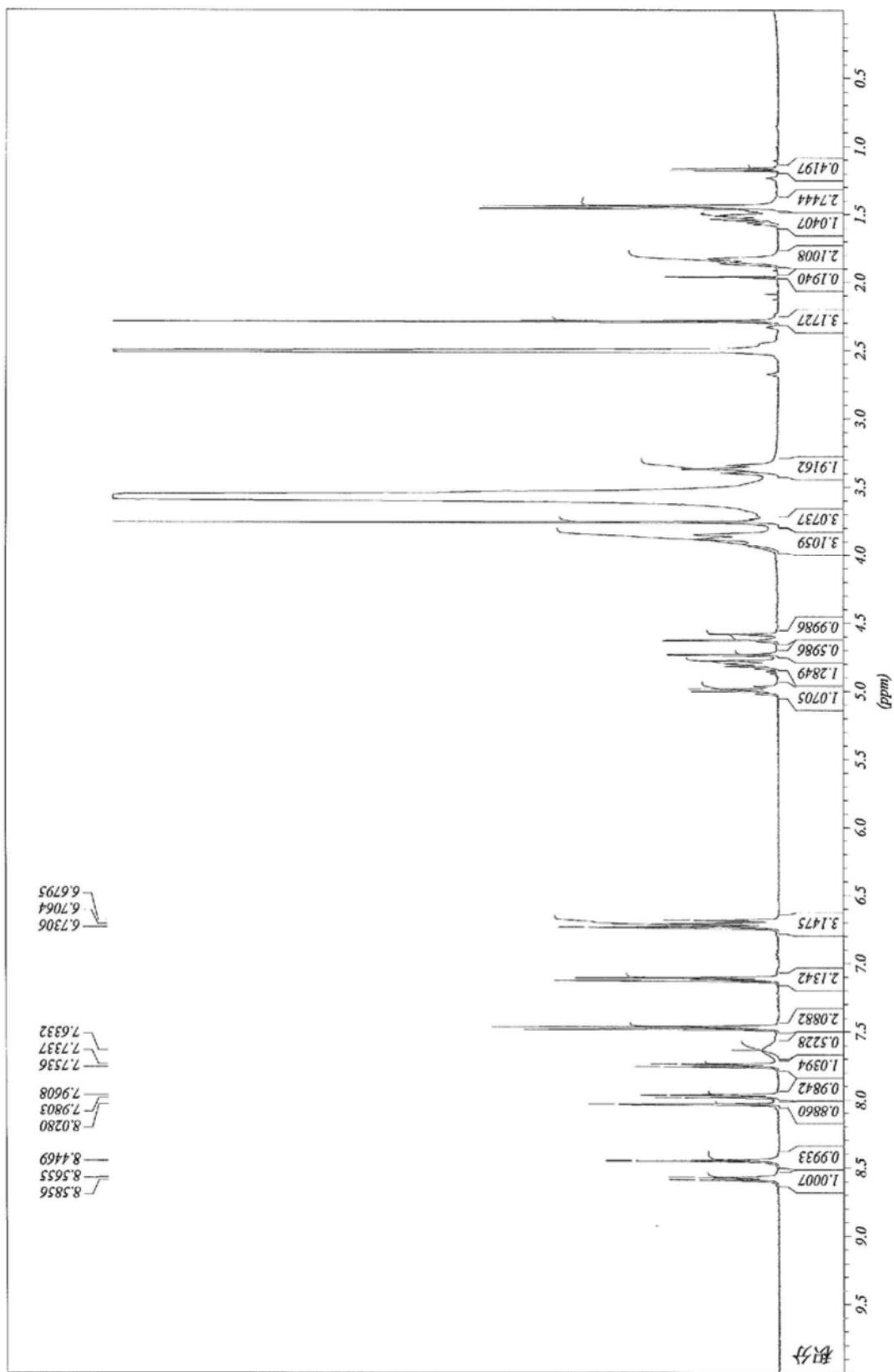


图10

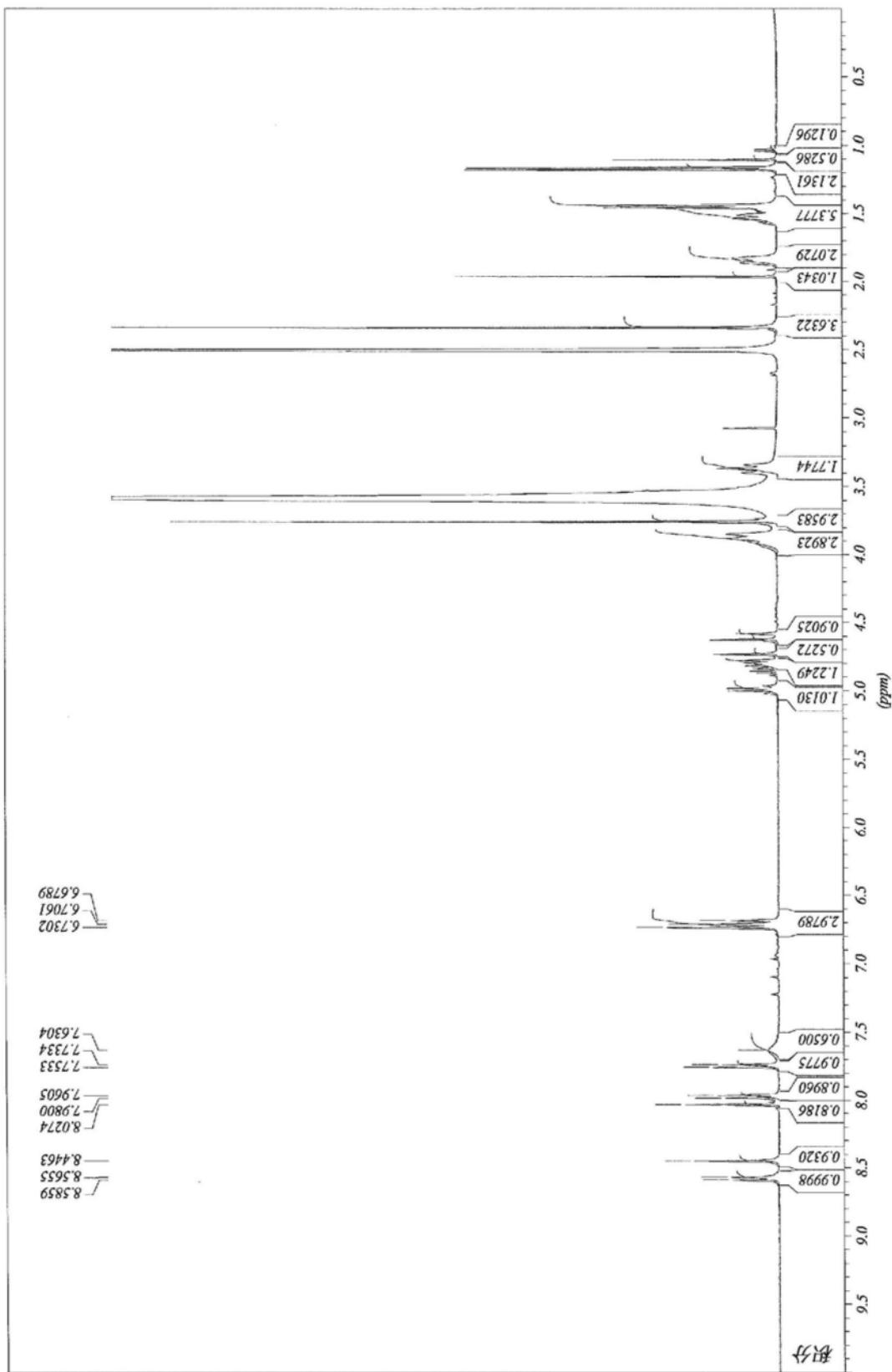


图11

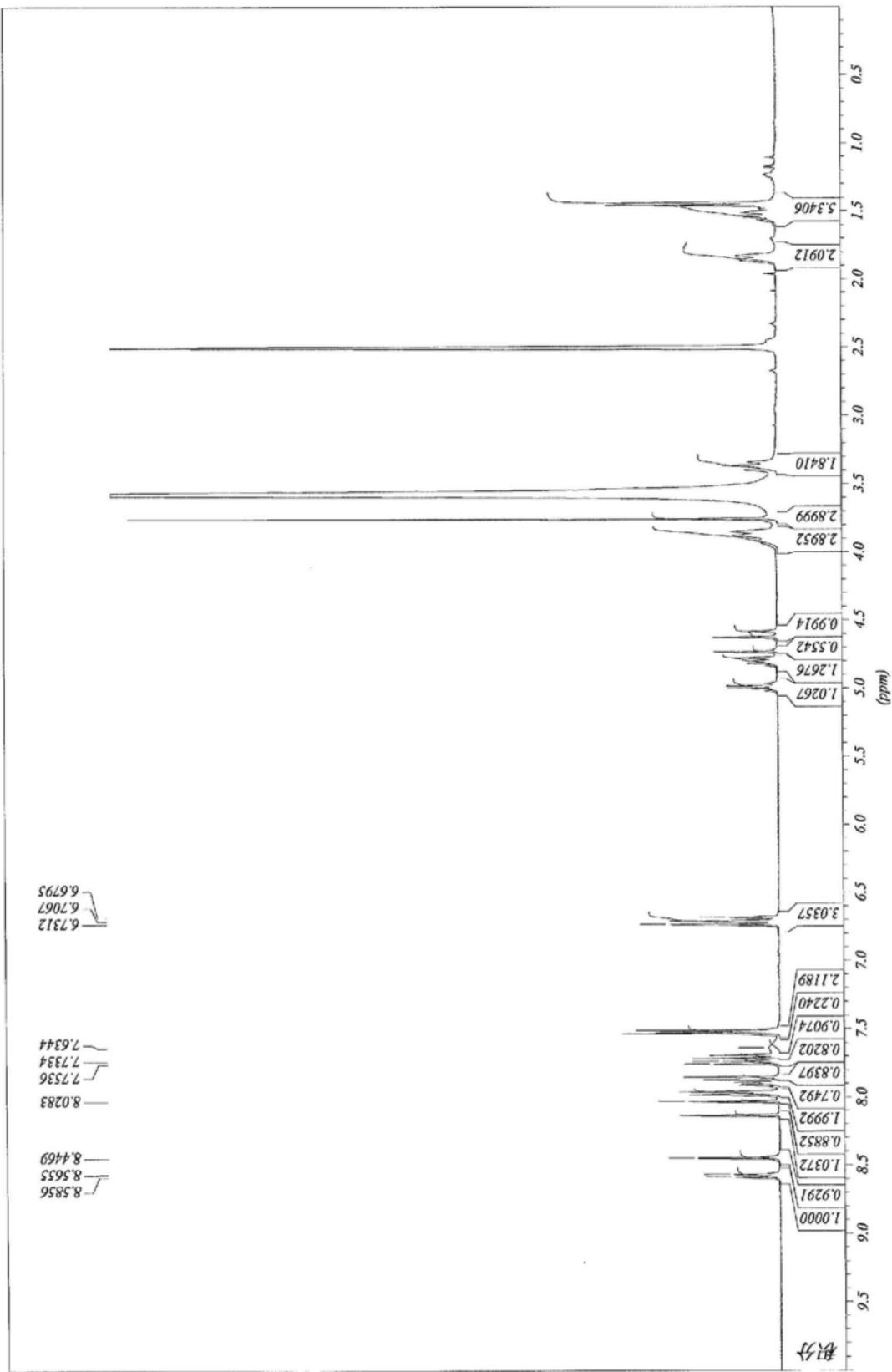


图12

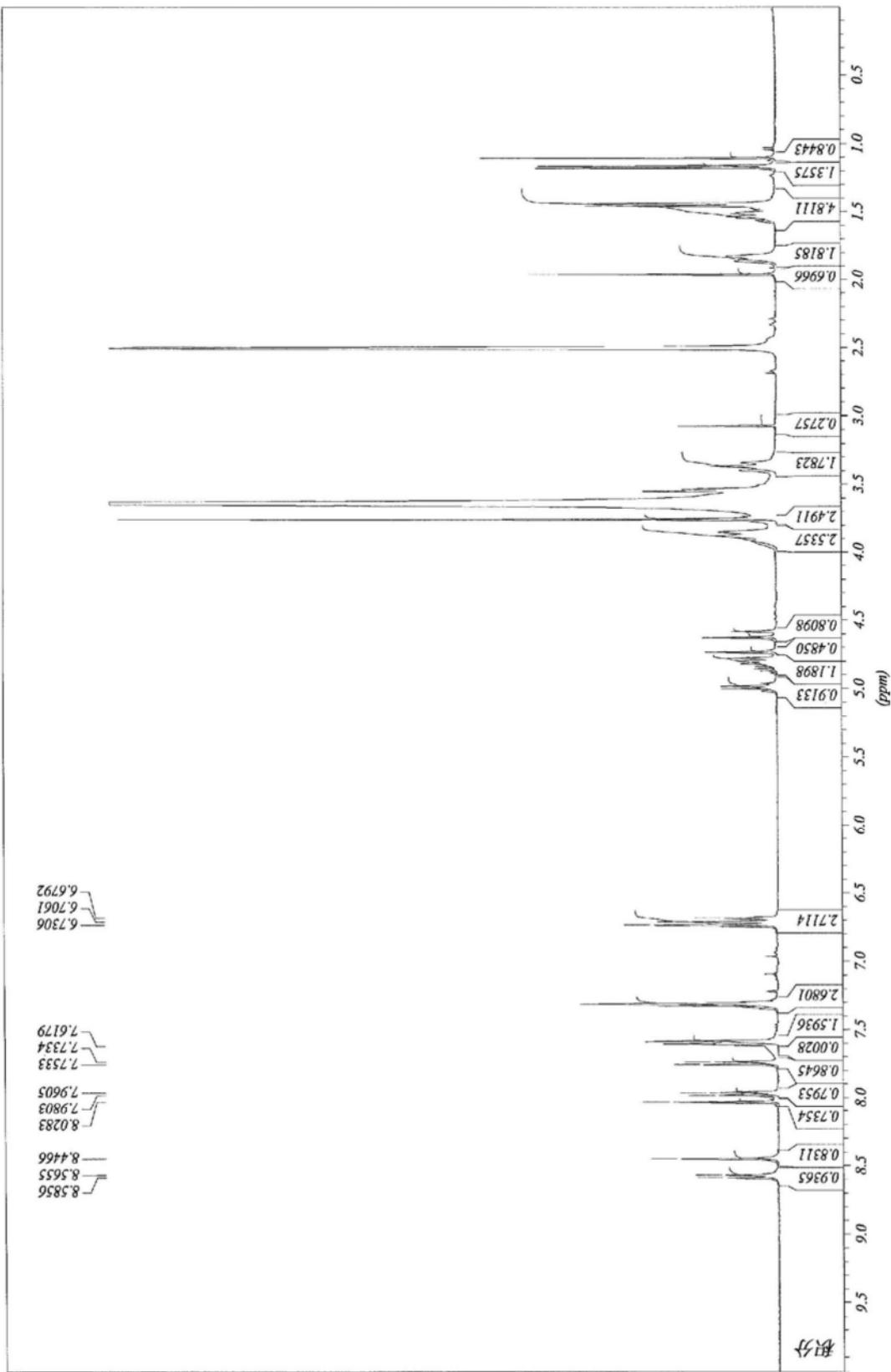


图13

