

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 97103229

※ 申請日期： 97.3.7

※IPC 分類：A61K^{31/4709} (2006.01),
A61K^{31/496} (2006.01),

一、發明名稱：(中文/英文)

黑色素瘤之治療

TREATMENT OF MELANOMA

G07D^{401/14} (2006.01),

G07D^{401/64}

A61P^{35/00} (2006.01),

(2006.01),

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

瑞士商諾華公司

NOVARTIS AG

代表人：(中文/英文)

1. 美樂蒂 K 戴斯

DICE, MELODI K.

2. 艾莉莎 A 哈賓

HARBIN, ALISA A.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

瑞士巴塞爾市利曲街35號

LICHTSTRASSE 35, 4056 BASEL, SWITZERLAND

國 籍：(中文/英文)

瑞士 SWITZERLAND

三、發明人：（共 6 人）

姓 名：（中文/英文）

1. 卡拉 C 海斯
HEISE, CARLA C.
2. 保羅 荷倫貝契
HOLLENBACH, PAUL
3. 丹尼爾 密那茲
MENEZES, DANIEL
4. 南茜 普萊爾
PRYER, NANCY
5. 凱瑟琳 倫達爾
REND AHL, KATHERINE
6. 馬利恩 威斯曼
WIESMANN, MARION

國 籍：（中文/英文）

1. 美國 U.S.A.
2. 美國 U.S.A.
3. 葡萄牙 PORTUGAL
4. 美國 U.S.A.
5. 美國 U.S.A.
6. 德國 GERMANY

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；2007年03月09日；60/894,046

2. 美國；2007年04月12日；60/911,406

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明大體而言係關於用於治療個體黑色素瘤之方法及組合物。更特定言之，本發明係關於諸如4-胺基-5-氟-3-[6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并咪唑-2-基]喹啉-2(1H)-酮之化合物及其互變異構體、鹽及混合物在治療黑色素瘤及製備用於治療黑色素瘤之藥劑中的用途。

【先前技術】

毛細管延伸至幾乎所有人體組織且為組織供應氧及養分以及移除廢物。在一般情況下，毛細管內層之內皮細胞不分裂且因此，在成年人中毛細管之數目或尺寸通常並不增加。然而，在某些正常情況下，諸如組織受損時或在月經週期之某些時期中，毛細管開始快速增生。自預先存在之血管形成新毛細管之此過程稱為血管生成或新血管生成。參見Folkman, J. Scientific American 275, 150-154 (1996)。創傷癒合期間之血管生成為成人生命期間病理生理性新血管生成之實例。創傷癒合期間，額外毛細管提供氧及養分的供應，促進肉芽組織且幫助移除廢物。癒合過程終止後，毛細管通常復原。Lymboussaki, A. "Vascular Endothelial Growth Factors and their Receptors in Embryos, Adults, and in Tumors" Academic Dissertation, University of Helsinki, Molecular/Cancer Biology Laboratory and Department of Pathology, Haartman Institute, (1999)。

血管生成在癌細胞生長中亦起重要作用。已知一旦癌細

胞巢達到一定尺寸，約1至2 mm之直徑，癌細胞必須擴大血液供應以在擴散不足以供應癌細胞以足夠氧及養分時使腫瘤長得更大。因此，期望血管生成之抑制使癌細胞生長停止。

受體酪胺酸激酶(RTK)為調節發育細胞生長及分化、成人組織之重塑及再生的跨膜多肽。Mustonen, T.等人, J. Cell Biology 129, 895-898 (1995); van der Geer, P.等人, Ann Rev. Cell Biol. 10, 251-337 (1994)。已知稱為生長因子或細胞激素之多肽配位體活化RTK。信號轉導RTK包含受體外域中之配位體結合及構形改變，從而引起其二聚化。Lymboussaki, A. "Vascular Endothelial Growth Factors and their Receptors in Embryos, Adults, and in Tumors" Academic Dissertation, University of Helsinki, Molecular/Cancer Biology Laboratory and Department of Pathology, Haartman Institute, (1999); Ullrich, A.等人, Cell 61, 203-212 (1990)。配位體與RTK之結合在特定酪胺酸殘基處引起受體轉磷酸化且隨後活化催化域以使細胞質基質磷酸化。同前。

兩個RTK亞族對血管內皮具特異性。此等亞族包括血管內皮生長因子(VEGF)亞族及Tie受體亞族。V類RTK包括VEGFR1(FLT-1)、VEGFR2(KDR(人類)、Flk-1(小鼠))及VEGFR3(FLT-4)。Shibuya, M.等人, Oncogene 5, 519-525 (1990); Terman, B.等人, Oncogene 6, 1677-1683 (1991); Aprelikova, O.等人, Cancer Res. 52, 746-748 (1992)。

癌症為包含許多驅動腫瘤細胞增殖之遺傳缺陷之疾病。因此，同時抑制多個細胞信號轉導路徑之策略可產生更有利之治療結果。RTK過度表現及/或活化突變常出現於腫瘤細胞中且涉及於腫瘤生長中。Blume-Jensen, P及Hunter, T., "Oncogenic Kinase Signaling," *Nature*, 411, 第355-65頁(2001); Carmeliet, P., "Manipulating Angiogenesis in Medicine," *J. Intern. Med.*, 255, 第538-61頁(2004)。大部分RTK包含與配位體結合有關之胞外域及介導自磷酸化、引發信號轉導事件級聯之下游信號轉導分子之募集的細胞內激酶域。存在超過30個涉及於癌症中之RTK，例如III型(PDGFR、CSF-1R、FLT3及c-KIT)、IV型(FGFR1-4)及V型(VEGFR1-3)RTK。

黑色素瘤為黑色素細胞之惡性腫瘤，該等細胞產生皮膚色素黑色素。黑色素瘤通常發生於皮膚中，但可能發生在黏膜表面上或在體內可發現黑色素細胞之任何部位。根據特徵外觀及行為，可將黑色素瘤分為：1)淺表擴展性黑色素瘤(SSM)、2)結節性惡性黑色素瘤(NM)、3)肢體末端雀斑性黑色素瘤(ALM)、4)雀斑性惡性黑色素瘤(LMM)及5)黏膜雀斑性黑色素瘤(MLM)。SSM為最常見類型之黑色素瘤且通常呈現為數種顏色之皮膚上暗色、平坦或略微高起之標記。在癌症早期徑向階段，癌症經由表皮擴展且治癒預後為良好的。一旦SSM進入垂直生長階段，其即擴展至真皮及下層結構中且變得更危險且難以治癒。NM為最具侵襲性之黑色素瘤類型，其快速產生且同時向上及向內生

長。其通常呈現為皮膚上均勻黑色小結，不過其他顏色為可能的。ALM為另一具侵襲性之黑色素瘤形式，其更常發生在暗色皮膚患者中。其可為褐色、黑色或顏色多樣化且可為平坦或結狀。LMM為最不常見之黑色素瘤且通常發生在老年人之鼻及頰上。病灶為平坦的，可為棕褐色、褐色、黑色或其他顏色，且可長得很大(3 cm-6 cm)。LMM擴展緩慢且不傾向於轉移。MLM在外觀上類似於ALM且存在於多個黏膜位點中，包括口腔、食道、肛門、陰道及結膜。當黑色素瘤保持在局部時，藉由外科手術將其切除且治癒率常為良好的。然而，一旦黑色素瘤轉移至原發性病灶以外，例如淋巴系統及諸如中樞神經系統、肝或肺之更遠位點，其極難治療。2006年在美國，估計超過62,000例新黑色素瘤發生且超過7,900名患者死於黑色素瘤。

近來已在WO 01/29025、WO 01/62251及WO 01/62252中揭示各種吡啶基取代化合物，且近來已在WO 01/28993中揭示各種苯并咪唑基化合物。據報導此等化合物能夠抑制、調控及/或調節受體類型及非受體酪胺酸激酶之信號轉導。所揭示之化合物中有一些含有與吡啶基或苯并咪唑基鍵結之喹啉酮片段。

4-羥基喹啉酮及4-羥基喹啉衍生物之合成揭示於大量參考文獻中，該等參考文獻如本文中完全闡述般以全文引用的方式併入以達成所有目的。舉例而言，Ukrainets等人揭示3-(苯并咪唑-2-基)-4-羥基-2-側氧基-1,2-二氫喹啉之合成。Ukrainets, I.等人，Tet. Lett. 42, 7747-7748 (1995)；

Ukrainets, I.等人，Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinii, 2, 239-241(1992)。Ukrainets亦揭示其他4-羥基喹啉酮及諸如1H-2-側氧基-3-(2-苯并咪唑基)-4-羥基喹啉之硫基類似物的合成、抗痙攣及抗甲狀腺活性。Ukrainets, I.等人，Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinii, 1, 105-108 (1993)；Ukrainets, I.等人，Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinii, 8, 1105-1108 (1993)；Ukrainets, I.等人，Chem. Heterocyclic Comp. 33, 600-604, (1997)。

各種喹啉衍生物之合成揭示於WO 97/48694中。揭示此等化合物能夠與核激素受體結合且可用於刺激骨母細胞增殖及骨生長。亦揭示該等化合物可用於治療或預防與核激素受體家族相關聯之疾病。

喹啉之苯環經硫基取代之各種喹啉衍生物揭示於WO 92/18483中。揭示此等化合物可用於醫藥調配物中且用作藥劑。

已揭示喹諾酮(Quinolone)及香豆素(coumarin)衍生物可用於與藥物及醫藥調配物無關之多種應用中。描述供光可聚合組合物中使用或用於發光性質之喹諾酮衍生物之製備的參考文獻包括：頒予Okamoto等人之美國專利第5,801,212號；JP 8-29973；JP 7-43896；JP 6-9952；JP 63-258903；EP 797376；及DE 23 63 459，該等參考文獻均如本文中完全闡述般以全文引用的方式併入本文以達成所有目的。

以下文獻中揭示可用於抑制血管生成及血管內皮生長因

子受體酪胺酸激酶且可用於抑制其他酪胺酸及絲胺酸/蘇胺酸激酶之各種喹啉酮苯并咪唑化合物，包括4-胺基-5-氟-3-[5-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并咪唑-2-基]喹啉-2(1H)-酮或其互變異構體：美國專利第6,605,617號；美國專利第6,756,383號；申請之美國專利申請案第10/116,117號(2003年2月6日以US 2003/0028018公開)；美國專利申請案第10/644,055號(2004年5月13日公開，美國專利申請公開案第2004/0092535號)；美國專利申請案第10/983,174號；美國專利申請案第10/706,328號(2004年11月4日以2004/0220196公開)；美國專利申請案第10/982,757號(2005年6月3日以2005/0137399公開)；及美國專利申請案第10/982,543號(2005年9月22日以2005/0209247公開)，該等文獻各自如本文中完全闡述般以全文引用的方式併入本文且達成所有目的。

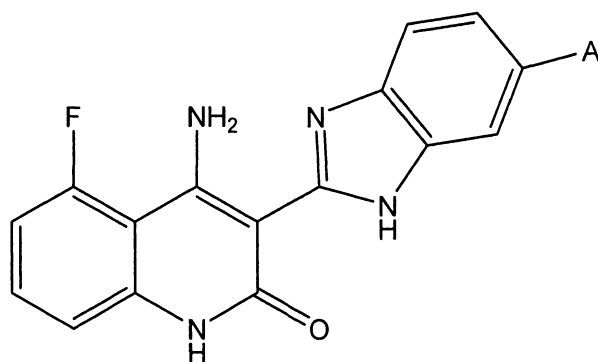
儘管治療腫瘤及癌症之方法近來已有所發展，但對治療癌症之新方法且尤其治療黑色素瘤之新方法及組合物仍存在顯著需要。

【發明內容】

本發明提供治療黑色素瘤且尤其轉移黑色素瘤之方法。本發明進一步提供化合物、其互變異構體、其鹽及其混合物在使用治療黑色素瘤之醫藥調配物及藥劑中的用途。

在一態樣中，本發明提供治療諸如人類黑色素瘤患者之個體黑色素瘤之方法。黑色素瘤可為皮膚黑色素瘤或真皮外黑色素瘤。在一些實施例中，提供一種治療轉移黑色素

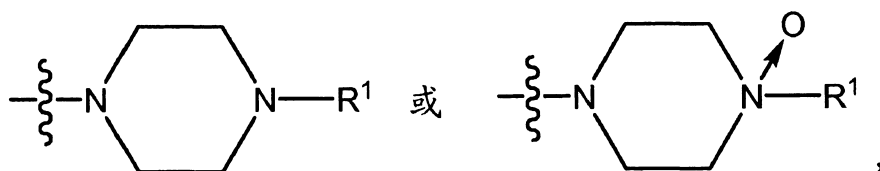
瘤之方法。該方法包括向個體投與有效量之結構I之化合物、該化合物之互變異構體、該化合物之醫藥學上可接受之鹽、該互變異構體之醫藥學上可接受之鹽，或其混合物。結構I具有下式：



I

其中，

A為具有以下結構之一的基團：

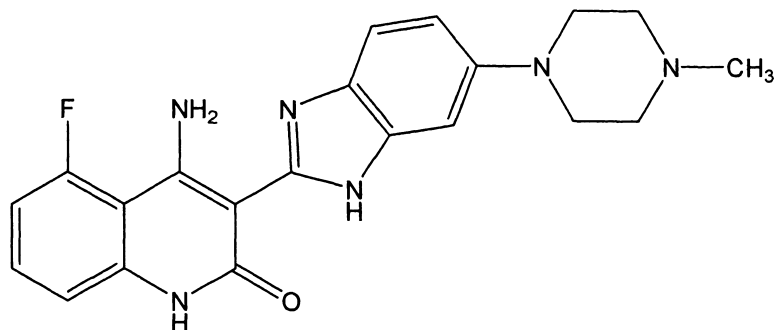


其中，

R¹係選自H或具有1至6個碳原子之直鏈或分支鏈烷基。

在本發明之方法之多個實施例中，在投與如本文所揭示之化合物後，個體黑色素瘤之生長受到抑制，疾病衰退或穩定，或者在投藥後個體黑色素瘤之尺寸及/或範圍減小。

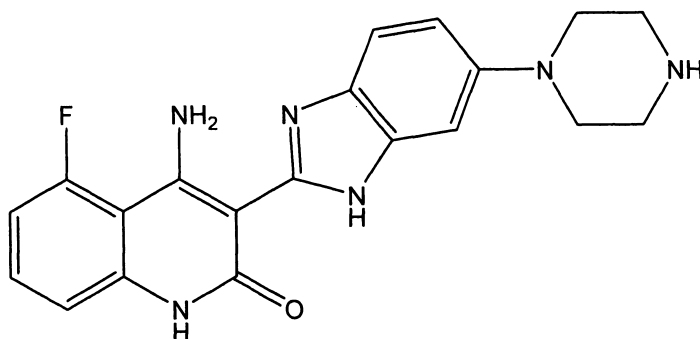
在一些實施例中，R¹為甲基，且結構I之化合物具有結構IA：



IA

本文中結構IA之化合物亦稱為"化合物1"、"TKI258"或4-胺基-5-氟-3-[6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并咪唑-2-基]-1H-喹啉-2-酮。

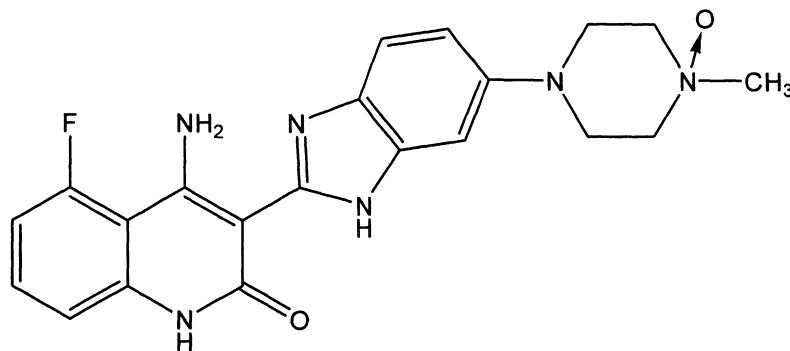
在一些實施例中， R^1 為氫，且結構I之化合物具有結構IB：



IB

結構IB之化合物在本文亦稱為"化合物2"或4-胺基-5-氟-3-[6-(哌嗪-1-基)-1H-苯并咪唑-2-基]-1H-喹啉-2-酮。

在一些實施例中， R^1 為甲基，且結構I之化合物具有結構IC：



IC

結構IC之化合物在本文亦稱為"化合物3"或4-胺基-5-氟-3-[6-(4-甲基-4-氧離子基哌嗪-1-基)-1H-苯并咪唑-2-基]-1H-喹啉-2-酮。

在一些實施例中，化合物為結構I、IA、IB或IC之化合物且向個體投與化合物或互變異構體之乳酸鹽。

在一些實施例中，黑色素瘤表現野生型或突變型纖維母細胞生長因子受體1、2、3及/或4。在其他實施例中，黑色素瘤表現野生型或突變型c-Kit。在其他實施例中，黑色素瘤表現纖維母細胞生長因子受體1及2、1及3、1及4、2及3、2及4、3及4或1、2及3或1、2、3及4。在可根據本文所揭示之方法治療之某些黑色素瘤中，表現野生型或突變型FGFR1、FGFR2、FGFR3或FGFR4中之一或多者。可藉由本文所揭示之方法治療之某些黑色素瘤表現野生型或突變型c-Kit。在其他實施例中，黑色素瘤表現野生型Raf、突變型Raf、野生型Ras、突變型Ras、野生型c-Kit及/或突變型c-Kit蛋白。

多種不同類型之黑色素瘤可根據本發明之方法來治療，該等黑色素瘤包括(例如)淺表擴展性黑色素瘤、結節性惡

性黑色素瘤、肢體末端雀斑性黑色素瘤、雀斑性惡性黑色素瘤及黏膜雀斑性黑色素瘤。原發性黑色素瘤亦可為皮膚黑色素瘤或真皮外黑色素瘤。真皮外原發性惡性黑色素瘤包括眼部黑色素瘤及軟組織之透明細胞肉瘤。其他適應症包括可涉及RTK標靶之相關性的罕見黑色素瘤或癌前病變。本發明之方法亦可用於治療已轉移之黑色素瘤。

治療黑色素瘤之方法進一步包括與如本文所定義之化合物一起投與一或多種用於治療黑色素瘤之抗癌藥物。舉例而言，用於治療黑色素瘤、尤其轉移性黑色素瘤之抗癌藥物可選自以下各物：烷基化抗癌藥物，諸如達卡巴嗪(dacarbazine)、替莫唑胺(temozolomide)、二氯甲二乙胺(mechlorethamine)及亞硝基脲(nitrosoureas)(諸如卡莫司汀(carmustine)、洛莫司汀(lomustine)及福莫司汀(fotemustine))；紫杉烷，諸如太平洋紫杉醇(paclitaxel)及多烯紫杉醇(docetaxel)；長春花(vinca)生物鹼，諸如長春鹼(vinblastine)；拓撲異構酶(topoisomerase)抑制劑，諸如伊立替康(irinotecan)；沙利度邁(thalidomide)；抗癌抗生素，諸如鏈脲黴素(streptozocin)及放線菌素D(dactinomycin)；或鉑抗癌藥物，諸如順鉑(cisplatin)及卡鉑(carboplatin)。本發明之化合物可添加至多化學治療方案中，該等方案諸如Dartmouth方案、CVD(順鉑、長春鹼及達卡巴嗪)及BOLD(博來黴素(bleomycin)、長春新鹼(vincristine)、洛莫司汀及達卡巴嗪)。在一些實施例中，抗癌藥物係選自干擾素，諸如(但不限於)干擾素 α -2a、干

擾素 α -2b、聚乙二醇化干擾素，諸如聚乙二醇化干擾素 α -2b。諸如介白素-2之介白素亦可與本文所揭示之化合物組合使用。

在本文所述之治療黑色素瘤之方法中，化合物之治療有效量可在每公斤個體體重約0.25 mg至約30 mg之範圍內。在一些實施例中，化合物之治療有效量可在約0.5 mg/kg至約30 mg/kg、約1 mg/kg至約30 mg/kg、約1 mg/kg至約25 mg/kg、約1 mg/kg至約15 mg/kg或約1 mg/kg或2 mg/kg至約10 mg/kg之範圍內。在其他實施例中，向個體投與之化合物之量在約25至約1500毫克/天且較佳約100或200毫克/天至約500或600毫克/天之範圍內。

在一些實施例中，本文所述之治療黑色素瘤之方法進一步包含投與式I、IA、IB或IC之化合物作為治療週期之部分。治療週期包括：投藥階段，在此期間定期向個體投與式I、IA、IB或IC之化合物；及休息日，在此期間不投與化合物。舉例而言，治療週期可包含歷時7天、14天、21天或28天每天投與一定量之式I化合物，接著7或14天不投與化合物。在一些實施例中，治療週期包含歷時7天每天投與一定量之化合物，接著7天不投與化合物。治療週期可重複一或多次，例如2、4或6次，以提供治療療程。更一般而言，治療療程係指藉由本發明之方法使個體進行黑色素瘤治療的時間段。因此，治療療程可指個體接受每天或間歇劑量之本文所揭示之化合物的時間段以及延續一或多個治療週期之時間段。此外，化合物可在治療週期之投

藥階段期間每天投與一次、兩次、三次或四次。在其他實施例中，該等方法進一步包含在治療療程期間每天或每隔一天投與一定量之化合物一次、兩次、三次或四次。

因此，本發明進一步提供用於治療黑色素瘤之方法，其包含向患有癌症之個體投與具有式I、IA、IB或IC之化合物、其醫藥學上可接受之鹽、其互變異構體或互變異構體之醫藥學上可接受之鹽，其中第一治療週期中投與之化合物之量為每天25 mg，且所投化合物之量隨各後續治療週期而增加直至每天向個體投與1500 mg化合物或在個體中觀測到劑量限制性毒性。通常在該等方法中，第一治療週期後所投化合物之量隨各後續治療週期而加倍。舉例而言，第一治療週期可包括向個體投與25毫克/天且後續治療週期可包含向個體投與50毫克/天。在一些實施例中，治療週期包含歷時7天每天投與相同量之化合物，接著7天不投與化合物。

在一態樣中，本發明提供結構I、IA、IB及/或IC之化合物、該化合物之互變異構體、該化合物之醫藥學上可接受之鹽、該互變異構體之醫藥學上可接受之鹽，或其混合物在製備用於本發明之任何方法之任何實施例中的藥劑或醫藥調配物中之用途。

在另一態樣中，本發明提供一種套組，其包括容器，該容器包含結構I、IA、IB及/或IC之化合物、該化合物之互變異構體、該化合物之醫藥學上可接受之鹽、該互變異構體之醫藥學上可接受之鹽，或其混合物。該套組可包括用

於治療黑色素瘤之另一化合物。該套組可進一步包括用於進行本發明之任何方法之書面指導說明。在一些實施例中，可包括呈紙質文件形式之書面說明，其與套組容器分開，而在其他實施例中，書面說明可寫於附著於套組容器之標籤上。

本發明之其他目標、特徵及優點將經由以下實施方式及圖式而變得顯而易見。

【實施方式】

本發明提供治療黑色素瘤、尤其轉移黑色素瘤之方法。本發明亦提供化合物(例如，結構I、IA、IB及IC之化合物)、其互變異構體、鹽及混合物在製備用於治療黑色素瘤之藥劑或醫藥調配物中之用途。雖然不希望受理論束縛，但咸信所揭示之化合物在黑色素瘤治療中之驚人有效作用係由化合物之雙重活性引起。認為本發明之化合物藉由阻斷VEGFR、FGFR及PDGFR β 抑制表現一或多個FGF受體之黑色素瘤細胞及抑制與黑色素瘤相關之血管生成來發揮對黑色素瘤之抗腫瘤作用。本文所揭示之化合物亦可有效對抗野生型或突變型Raf或Ras基因型之黑色素瘤。

在本申請案全文中使用以下縮寫及定義：

"bFGF"為代表基本纖維母細胞生長因子之縮寫。

"C-Kit"亦稱為幹細胞因子受體或肥大細胞生長因子受體。

"CSF-1R"為群落刺激因子1受體之縮寫。

"FGF"為與FGFR1、FGFR2、FGFR3及FGFR4相互作用

之纖維母細胞生長因子的縮寫。

亦稱為bFGFR之"FGFR1"為代表與纖維母細胞生長因子FGF相互作用之酪胺酸激酶的縮寫。相關受體酪胺酸激酶包括FGFR2、FGFR3及FGFR4。此等激酶中之一或多者常在黑色素瘤中表現(參見實例)。

"Flk-1"為代表胎肝酪胺酸激酶1之縮寫，亦稱為激酶插入域酪胺酸激酶或KDR(人類)，亦稱為血管內皮生長因子受體-2或VEGFR2(KDR(人類)，Flk-1(小鼠))。

"FLT-1"為代表fms樣酪胺酸激酶-1之縮寫，亦稱為血管內皮生長因子受體-1或VEGFR1。

"FLT-3"為代表fms樣酪胺酸激酶-3之縮寫，亦稱為幹細胞酪胺酸激酶I(STK I)。

"FLT-4"為代表fms樣酪胺酸激酶-4之縮寫，亦稱為VEGFR3。

"MIA"代表黑色素瘤抑制活性。如本文所用之MIA蛋白係指在GenBank資料庫中如以寄存編號NP_006524公開可得並由GenBank寄存編號NM_006533下所列之cDNA編碼的12 kDa可溶性蛋白及包含MIA蛋白之至少10個連續殘基的哺乳動物同系物或其片段。已顯示MIA蛋白藉由與纖維結合蛋白及昆布胺酸(laminin)分子結合藉此防止細胞-基質相互作用而涉及於黑色素瘤細胞自胞外基質之脫離中(Brockez L.等人，*Br. J. Dermatol.* 143:256268 (2000))。治療之前及之後所量測之MIA蛋白的存在或濃度可用以測定哺乳動物個體對用黑色素瘤抑制劑治療之反應。

"MEK1" 為代表在由 Raf-MEK1-ERK 形成之模組中 MAPK(有絲分裂原活化蛋白激酶)信號轉導路徑中絲胺酸蘇胺酸激酶的縮寫。MEK1使ERK(胞外調節激酶)磷酸化。

"PDGF"為代表血小板衍生生長因子之縮寫。PDGF與酪胺酸激酶PDGFR α 及PDGFR β 相互作用。

"Raf"為MAPK信號轉導路徑中絲胺酸/蘇胺酸激酶。

"RTK"為代表受體酪胺酸激酶之縮寫。

"Tie-2"為代表具有Ig及EGF同源域之酪胺酸激酶的縮寫。

"VEGF"為代表血管內皮生長因子之縮寫。

"VEGF-RTK"為代表血管內皮生長因子受體酪胺酸激酶之縮寫。

一般而言，對諸如氫或H之某一元素之提及意欲包括該元素之所有同位素。舉例而言，若結構I之化合物上之基團脫去或顯示為H，則確定此包括氫或H、氘及氚。

短語"具有1至6個碳原子之直鏈或分支鏈烷基"係指不含雜原子且包括1至6個碳原子之非環狀烷基。因此，該短語包括直鏈烷基，諸如甲基、乙基、丙基、丁基、戊基及己基。該短語亦包括直鏈烷基之分支鏈異構體，包括(但不限於)以下各基團： $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 及其類似基團。在一些實施例

中，烷基包括具有1至6個碳原子之直鏈及分支鏈烷基。在其他實施例中，烷基具有1至4個碳原子。在其他實施例中，烷基為具有1至2個碳原子之直鏈烷基(甲基或乙基)。在其他實施例中，烷基僅具有1個碳原子且為甲基(-CH₃)。

"醫藥學上可接受之鹽"包括與無機鹼、有機鹼、無機酸、有機酸或鹼性或酸性胺基酸形成之鹽。本發明包括(例如)諸如鈉鹽或鉀鹽之鹼金屬鹽，諸如鈣鹽、鎂鹽或鋁鹽之鹼土金屬鹽及銨鹽作為無機鹼之鹽。本發明包括(例如)與三甲胺、三乙胺、吡啶、甲基吡啶、乙醇胺、二乙醇胺或三乙醇胺形成之鹽作為有機鹼之鹽。無機酸之鹽包括(例如)鹽酸鹽、氫溴酸鹽、硝酸鹽、硫酸鹽及磷酸鹽。本發明包括(例如)甲酸鹽、乙酸鹽、三氟乙酸鹽、反丁烯二酸鹽、乙二酸鹽、酒石酸鹽、順丁烯二酸鹽、乳酸鹽、檸檬酸鹽、丁二酸鹽、蘋果酸鹽、甲烷磺酸鹽、苯磺酸鹽及對甲苯磺酸鹽作為有機酸之鹽。本發明包括(例如)精胺酸鹽、離胺酸鹽及鳥胺酸鹽作為鹼性胺基酸之鹽。酸性胺基酸鹽包括(例如)天冬胺酸鹽及麩胺酸鹽。

結構I之化合物易於使用以下實例部分所述及以下文獻所揭示之程序來合成，該等文獻如本文完全闡述般各以全文引用的方式併入本文且以達成所有目的：美國專利第6,605,617號、美國專利申請案第10/644,055號(以U.S. 2004/0092535公開)、美國專利申請案第10/983,174號(以U.S. 2005/0261307公開)、美國專利申請案第10/726,328號(以U.S. 2004/0220196公開)、美國專利申請案第10/982,757

號(以 U.S. 20050137399 公開)、美國專利申請案第 10/982,543 號(以 U.S. 2005/209247 公開)及 PCT 專利申請案第 PCT/US2006/019349 號(以 WO 2006/125130 公開)。

結構 I 之化合物、該化合物之互變異構體、該化合物之醫藥學上可接受之鹽、該互變異構體之醫藥學上可接受之鹽及其混合物可用以製備藥劑及醫藥調配物。該等藥劑及醫藥調配物可用於本文所述之治療方法中。

醫藥調配物可包括上述任何實施例中之任何化合物、互變異構體或鹽以及諸如本文所述之彼等載劑的醫藥學上可接受之載劑。

本發明亦提供可藉由將一或多種本發明之化合物或其醫藥學上可接受之鹽、其互變異構體或其混合物與醫藥學上可接受之載劑、賦形劑、黏合劑、稀釋劑或其類似試劑混合而製備之組合物以治療或改善與轉移腫瘤相關之病症。本發明之組合物可用以產生用以治療如本文所述之轉移腫瘤的調配物。該等組合物可呈(例如)顆粒、散劑、錠劑、膠囊、糖漿、栓劑、注射液、乳液、酏劑、懸浮液或溶液之形式。本發明之組合物可經調配以用於多種投藥途徑：例如經口投藥、經鼻投藥、經直腸投藥、皮下注射、靜脈內注射、肌肉內注射或腹膜內注射。以下劑型係以實例形式給出，且不應將其理解為限制本發明。

對於經口、經頰及舌下投藥而言，散劑、懸浮液、顆粒、錠劑、丸劑、膠囊、膠囊錠(gelcap)及囊片為可接受之固體劑型。此等劑型可(例如)藉由將一或多種本發明之

化合物、其醫藥學上可接受之鹽、互變異構體或混合物與至少一種添加劑(諸如，澱粉或其他添加劑)混合來製備。合適之添加劑為蔗糖、乳糖、纖維素糖、甘露糖醇、麥芽糖醇、葡聚糖、澱粉、瓊脂、海藻酸鹽、甲殼素、聚葡萄糖、果膠、黃耆膠、阿拉伯膠、明膠、膠原蛋白、酪蛋白、白蛋白、合成或半合成聚合物或甘油酯。視情況，口服劑型可含有其他有助於投藥之成份，諸如非活性稀釋劑或諸如硬脂酸鎂之潤滑劑，或諸如對羥基苯甲酸酯或山梨酸之防腐劑，或諸如抗壞血酸、生育酚(tocopherol)或半胱氨酸之抗氧化劑，崩解劑，黏合劑，增稠劑，緩衝劑，甜味劑，調味劑或芳香劑。錠劑及丸劑可經此項技術中已知之合適塗佈物質進一步處理。

用於經口投藥之液體劑型可呈醫藥學上可接受之乳液、糖漿、酏劑、懸浮液及溶液之形式，其可含有諸如水之非活性稀釋劑。醫藥調配物及藥劑可使用諸如(但不限於)油、水、醇及此等物質之組合之無菌液體製備成液體懸浮液或溶液。可添加醫藥學上合適之界面活性劑、懸浮劑、乳化劑以用於經口或非經腸投藥。

如上所述，懸浮液可包括油。該油包括(但不限於)花生油、芝麻油、棉籽油、玉米油及橄欖油。懸浮液製劑亦可含有脂肪酸之酯，諸如油酸乙酯、豆蔻酸異丙酯、脂肪酸甘油酯及乙醯化脂肪酸甘油酯。懸浮液調配物可包括醇，諸如(但不限於)乙醇、異丙醇、十六醇、甘油及丙二醇。諸如(但不限於)聚(乙二醇)之醚、諸如礦物油及石蠟脂之

石油烴及水亦可用於懸浮液調配物中。

對於經鼻投藥而言，醫藥調配物及藥劑可為含有適當溶劑及視情況其他化合物之噴霧劑或氣霧劑，該等其他化合物諸如(但不限於)穩定劑、抗微生物劑、抗氧化劑、pH值改質劑、界面活性劑、生物可用性改質劑及其組合。氣霧劑調配物之推進劑可包括壓縮空氣、氮、二氧化碳或基於烴之低沸點溶劑。

可注射劑型一般包括水性懸浮液或油性懸浮液，其可使用合適之分散劑或濕潤劑及懸浮劑來製備。可注射形式可呈溶液狀態或呈懸浮液形式，其用溶劑或稀釋劑來製備。可接受之溶劑或媒劑包括無菌水、林格氏溶液(Ringer's solution)或等張生理食鹽水溶液。或者可將無菌油用作溶劑或懸浮劑。較佳地，油或脂肪酸為非揮發性的，其包括天然或合成油、脂肪酸、單甘油酯、二甘油酯或三甘油酯。

對於注射而言，醫藥調配物及/或藥劑可為適於經如上所述之適合溶液復水之粉末。其實例包括(但不限於)經冷凍乾燥、旋轉乾燥或噴霧乾燥之粉末、非晶形粉末、顆粒、沈澱物或微粒。對於注射而言，該等調配物視情況可含有穩定劑、pH值改質劑、界面活性劑、生物可用性改質劑及其組合。

對於直腸投藥而言，醫藥調配物及藥劑可呈用於在腸、乙狀結腸及/或直腸中釋放化合物之栓劑、軟膏、灌腸劑、錠劑或乳膏的形式。直腸栓劑係藉由將一或多種本發

明之化合物或化合物之醫藥學上可接受之鹽或互變異構體與例如可可脂或聚乙二醇之可接受媒劑混合來製備，該媒劑在正常儲存溫度下以固態形式存在，且在體內、諸如在直腸中適於釋放藥物之彼等溫度下以液態形式存在。油亦可用於製備軟明膠類型調配物及栓劑。水、生理食鹽水、右旋糖及相關糖之水溶液及甘油可用於製備懸浮液調配物，其亦可含有諸如果膠、卡波姆(carbomer)、甲基纖維素、羥丙基纖維素或羧甲基纖維素之懸浮劑以及緩衝劑及防腐劑。

除上述彼等代表性劑型外，醫藥學上可接受之賦形劑及載劑一般為熟習此項技術者所知，且因此包括於本發明內。該等賦形劑及載劑描述於(例如)"Remingtons Pharmaceutical Sciences" Mack Pub. Co., New Jersey (1991)，其如本文中完全闡述般以全文引用的方式併入本文以達成所有目的。

如下所述，本發明之調配物可設計成短效、快速釋放、長效及持續釋放調配物。因此，醫藥調配物亦可經調配以達成控制釋放或緩慢釋放。

本發明之組合物亦可包含(例如)微胞或脂質體，或其他包埋形式，或可呈延長釋放形式投與，以提供長期儲存及/或遞送效果。因此，醫藥調配物及藥劑可壓縮成球粒或柱狀體且以儲槽式注射劑形式或以植入物(諸如，支架)形式植入肌肉內或皮下。該等植入物可採用已知之惰性材料，諸如聚矽氧及生物可降解聚合物。

特定劑量可根據疾病病狀、個體年齡、體重、整體健康狀況、性別及飲食、給藥時間間隔、投藥途徑、排泄速率及藥物組合來調節。含有有效量之以上任何劑型完全處於常規實驗之範圍內，且因此完全處於本發明之範疇內。

治療有效劑量可視投藥途徑及劑型而變。本發明之較佳化合物為展示高治療指數之調配物。治療指數為毒性效應與治療效應之間的劑量比，以LD₅₀與ED₅₀之間的比率表示。LD₅₀為使群體之50%死亡之劑量且ED₅₀為對群體之50%治療有效之劑量。LD₅₀及ED₅₀係藉由標準醫藥程序在動物細胞培養物或實驗動物中測定。

在本發明之上下文中"治療"意謂緩解與病症或疾病有關之症狀，或抑制、停止或反轉彼等症狀進一步進展或惡化，或預防疾病或病症。此外，在本發明之上下文中"治療"意謂皮膚、皮下或內臟黑色素瘤生長之抑制，皮膚、皮下或內臟黑色素瘤尺寸之減小，皮膚、皮下或內臟病灶數目之減少，或皮膚、皮下或內臟病灶尺寸之減小。此外，在本發明之上下文中"治療"意謂疾病反應之生物標記物的改變，例如黑色素瘤抑制活性蛋白之循環量減少。舉例而言，在治療患有黑色素瘤之患者之上下文中，成功治療可包括供給黑色素瘤或患病組織之毛細管增生減少，與因黑色素瘤之癌性生長、毛細管增生或患病組織相關之症狀緩解，毛細管增生抑制或停止，或黑色素瘤進展或黑色素瘤細胞生長或轉移抑制或停止，或黑色素瘤衰退或部分或完全減輕、疾病穩定或黑色素瘤患者之整體存活率增

加。

治療亦可包括與其他療法組合投與本發明之醫藥調配物。舉例而言，本發明之化合物及醫藥調配物可在外科手術程序及/或放射療法之前、期間或之後投與。本發明之化合物亦可與用於治療黑色素瘤之其他抗癌藥物結合投與。抗癌藥物意謂由諸如腫瘤學家或其他醫師之熟習此項技術者用於治療惡性腫瘤及癌性生長的彼等藥劑。因此，本文所揭示之抗癌藥物及化合物(例如，結構I、IA、IB及IC之化合物)可同時、分別或連續投與。合適之組合及投藥方案可由熟習腫瘤學及醫學技術者確定。

本發明之化合物及調配物尤其適用於組合療法，此係因為已顯示或期望其在與諸如以下各藥之抗癌藥物組合使用時展示累加或大於累加或協同效應：紫杉烷、亞硝基脲、鉑化合物、烷基化劑、拓撲異構酶I及II抑制劑、長春花生物鹼、抗癌抗生素；干擾素、介白素-2及放射治療。因此，在一態樣中，本發明提供包括結構I之化合物及其互變異構體、鹽及/或混合物以及抗癌藥物之醫藥調配物。該等組合可單獨或一起包裝於套組中以用於同時、單獨或連續投藥。本發明亦提供該等化合物、互變異構體、鹽及/或混合物在產生該等調配物及藥劑中之用途。

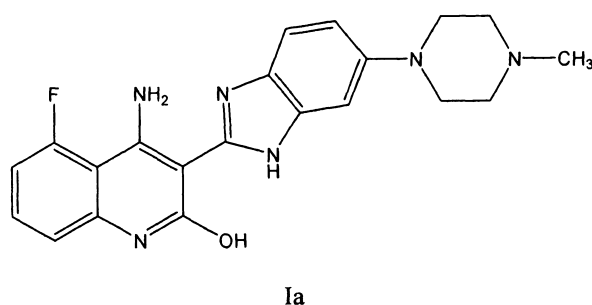
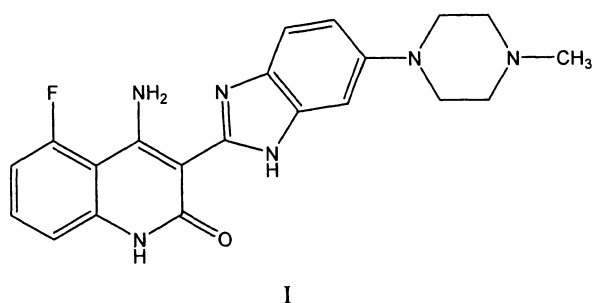
在另一態樣中，本發明提供一種治療轉移黑色素瘤之方法。該方法包括向有需要之個體投與一或多種選自以下各藥之抗癌藥物：達卡巴嗪(DITC-DOME)、替莫唑胺(TEMODAR)、卡莫司汀(BCNU, BICNU)、洛莫司汀

(CCNU, CEENU)、福莫司汀、太平洋紫杉醇(TAXOL)、多烯紫杉醇(TAXOTERE)、長春鹼(VELBAN)、伊立替康(CAMPTOSAR)；沙利度邁(THALIDOMID)；鏈脲黴素(ZANOSAR)；放線菌素D(COSMEGEN)；二氯甲二乙胺(MUSTARGEN)；順鉑(PLATINOL-AQ)、卡鉑(PARAPLATIN)、甲磺酸伊馬替尼(GLEEVEC)、索拉非尼(sorafenib)(BAY43-9006, NEXAVAR)、舒尼替尼(sutent)(SU1248, AVASTIN)或埃羅替尼(erlotinib)(TARCEVA)。本發明之化合物可添加至多化學治療方案中，該等方案諸如Dartmouth方案、CVD(順鉑、長春鹼及達卡巴嗪)及BOLD(博來黴素、長春新鹼、洛莫司汀及達卡巴嗪)。適合與本文所揭示之化合物組合使用之其他化學治療劑包括Lens及Eisen, *Expert Opin Pharmacother*, 2003 4(12): 2205-2211中所討論之彼等化學治療劑。在一些實施例中，抗癌藥物係選自干擾素，諸如(但不限於)干擾素 α -2a、干擾素 α -2b(INTRON-A)、聚乙二醇化干擾素，諸如聚乙二醇化干擾素 α -2b。諸如介白素-2(Proleukin)之介白素亦可與本文所揭示之化合物組合使用。

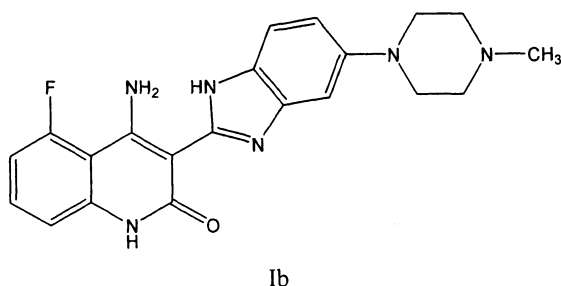
本發明之化合物可用以治療多種個體。合適之個體包括動物，諸如哺乳動物及人類。合適之哺乳動物包括(但不限於)靈長類動物，諸如(但不限於)狐猴、猿及猴；齧齒動物，諸如大鼠、小鼠及豚鼠；家兔及野兔；牛；馬；豬；山羊；綿羊；有袋類動物；及食肉動物，諸如貓科動物、犬科動物及熊科動物。在一些實施例中，個體或患者為人

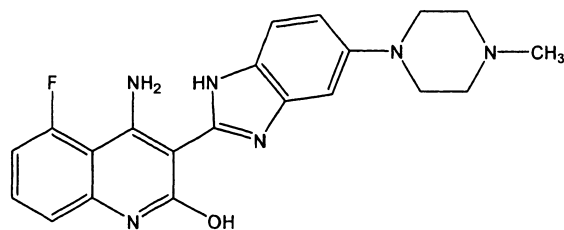
類。在其他實施例中，個體或患者為齧齒動物，諸如小鼠或大鼠。在一些實施例中，個體或患者為除人類以外之動物，且在一些此類實施例中，個體或患者為除人類以外之哺乳動物。

應瞭解用於本發明之有機化合物可展示互變異構現象。由於本說明書中之化學結構僅可表示可能互變異構形式之一，因此，應瞭解本發明涵蓋所繪結構之任何互變異構形式。舉例而言，下文以一種互變異構體互變異構體 Ia 顯示結構 IA：



結構 IA 之其他互變異構體互變異構體 Ib 及互變異構體 Ic 顯示如下：





Ic

參考以下實例將更易瞭解由此大體描述之本發明，該等實例係例示性提供且並不意欲限制本發明。

實例

在本申請案全文中關於化學術語使用以下縮寫：

ATP：三磷酸腺苷

Boc：N-第三丁氧羰基

BSA：牛血清白蛋白

DMSO：二甲亞砜

DTT：DL-二硫蘇糖醇

DMEM：達貝科氏改良之伊格爾氏培養基(Dulbecco's modification of Eagle's medium)

ED₅₀：有效治療群體之50%之劑量

EDTA：乙二胺四乙酸

EGTA：乙二醇四乙酸

EtOH：乙醇

FBS：胎牛血清

Hepes：4-(2-羥乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸

HPLC：高壓液相層析

IC₅₀值：引起所量測之活性減少50%之抑制劑濃度

KHMDS：雙(三甲基矽烷基)醯胺鉀

- LC/MS : 液相層析/質譜分析
- MOPS : 3-(N-嗎啉基)-丙烷磺酸
- PBS : 磷酸鹽緩衝生理食鹽水
- PMSF : 苯基甲烷磺醯氟
- RIPA : 含有(例如)50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、1 mM PMSF、1 mM EDTA、5 µg/ml抗蛋白酶、5 µg/ml亮抑蛋白酶肽、1% Triton x-100、1%脫氧膽酸鈉、0.1% SDS之細胞溶解緩衝液
- SDS : 十二烷基硫酸鈉
- TBME : 第三丁基甲基醚
- THF : 四氫呋喃
- Tris : 2-胺基-2-(羥甲基)丙烷-1,3-二醇

化合物之純化及特徵化

藉由高效液相層析(HPLC)使用具有2690分離模組之Waters Millenium層析系統(Milford, Massachusetts)表徵本發明之化合物。分析管柱為來自Alltech之4.6×250 mm的Alltima C-18逆相管柱(Deerfield, Illinois)。使用通常以5%乙腈/95%水開始且經40分鐘之時段進展至100%乙腈的梯度溶離。所有溶劑均含有0.1%三氟乙酸(TFA)。藉由在220或254 nm下紫外光(UV)吸收來偵測化合物。HPLC溶劑係來自Burdick and Jackson(Muskegan, Michigan)或Fisher Scientific(Pittsburg, Pennsylvania)。在某些情況下,純度係藉由薄層層析(TLC)使用玻璃或塑膠襯底之矽膠板(諸

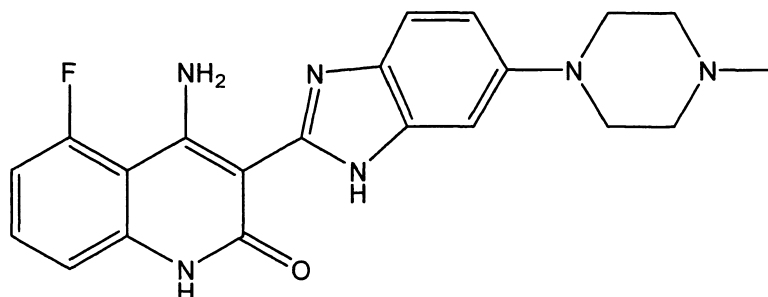
如，Baker-Flex矽膠1B2-F可撓性薄板)來評定。TLC結果易於在紫外光下或藉由採用熟知之碘蒸氣及其他各種染色技術在視覺上偵測。

在以下兩種LCMS儀器之一者上執行質譜分析：Waters系統(Alliance HT HPLC及Micromass ZQ質譜分析儀；管柱：Eclipse XDB-C18，2.1×50 mm；溶劑系統：於水中之5-95%乙腈(含有0.05% TFA)；流動速率：0.8毫升/分鐘；分子量範圍：150-850；進樣錐電壓：20 V；管柱溫度：40℃)或Hewlett Packard系統(1100系列HPLC；管柱：Eclipse XDB-C18，2.1×50 mm；溶劑系統：於水中之1-95%乙腈(含有0.05% TFA)；流動速率：0.4毫升/分鐘；分子量範圍：150-850；進樣錐電壓：50 V；管柱溫度：30℃)。全部質量均以質子化母離子之質量來報導。

在Hewlett Packard儀器上執行GCMS分析(使用質量選擇性偵測器5973之HP6890系列氣相層析儀；注射器體積：1 μL；初始管柱溫度：50℃；最終管柱溫度：250℃；勻變時間：20分鐘；氣體流動速率：1毫升/分鐘；管柱：5%苯基甲基矽氧烷，型號HP 190915-443，尺寸：30.0 m×25 μm×0.25 μm)。

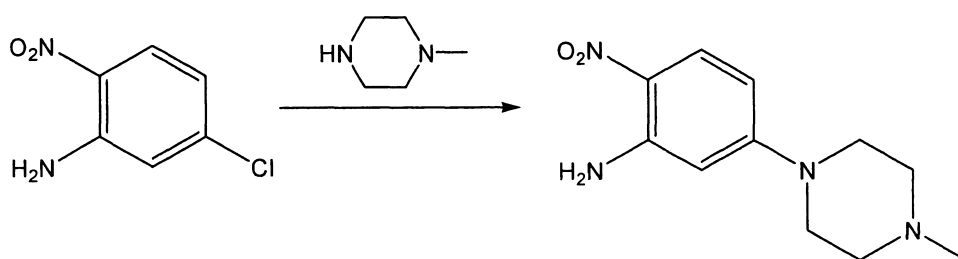
使用Flash 40層析系統及KP-Sil, 60A(Biotage, Charlottesville, Virginia)或藉由HPLC使用C-18逆相管柱來進行製備型分離。用於Flash 40 Biotage系統之典型溶劑為二氯甲烷、甲醇、乙酸乙酯、己烷及三乙胺。用於逆相HPLC之典型溶劑為不同濃度之乙腈及水(含有0.1%三氟乙酸)。

4-氨基-5-氟-3-[6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并咪唑-2-基]-
1H-喹啉-2-酮之合成



A. 5-(4-甲基-哌嗪-1-基)-2-硝基苯胺之合成

程序 A



將5-氯-2-硝基苯胺(500 g, 2.898 mol)及1-甲基哌嗪(871 g, 8.693 mol)置放於配備有冷凝器之2000 mL燒瓶中且經 N_2 淨化。將燒瓶置於 100°C 油浴中且加熱直至如藉由HPLC測定5-氯-2-硝基苯胺完全反應(通常隔夜)。在HPLC證實5-氯-2-硝基苯胺消失後，在機械攪拌下將反應混合物直接傾倒(仍為溫熱)至2500 mL室溫之水中。攪拌所得混合物直至其達到室溫且接著將其過濾。將因此所得之黃色固體添加至1000 mL水中且攪拌30分鐘。過濾所得混合物且將所得固體用TBME(500 mL, 2次)洗滌且接著使用橡膠壩在真空下乾燥1小時。將所得固體轉移至乾燥盤中且在真空烘箱中於 50°C 下乾燥至恆重以產生670 g(97.8%)呈黃色粉末狀之標題化合物。

程序 B

將 5-氯-2-硝基苯胺(308.2 g, 1.79 mol)添加至配備有頂置式攪拌器、冷凝器、進氣口、加料漏斗及溫度計探針之 5000 mL 四頸圓底燒瓶中。接著將燒瓶用 N_2 淨化。在攪拌下將 1-甲基哌嗪(758.1 g, 840 mL, 7.57 mol)及 200 標準強度之乙醇(508 mL)添加至反應燒瓶中。將燒瓶再次用 N_2 淨化且在 N_2 下維持反應。將燒瓶在加熱套中加熱至 97°C ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) 之內部溫度且維持在該溫度下直至如藉由 HPLC 測定反應完成(通常約 40 小時)。在反應完成後，停止加熱且在攪拌下使反應物冷卻至約 20°C 至 25°C 之內部溫度，且將反應物攪拌 2 至 3 小時。除非已發生沈澱，否則將 5-(4-甲基-哌嗪-1-基)-2-硝基苯胺之晶種(0.20 g, 0.85 mmol)添加至反應混合物中。經約 1 小時之時段將水(2,450 mL)添加至攪拌反應混合物中，同時將內部溫度維持在約 20°C 至 30°C 範圍內之溫度。水添加完成後，在 20°C 至 30°C 之溫度下將所得混合物攪拌約 1 小時。接著將所得混合物過濾且用水(3×2.56 L)洗滌燒瓶及濾餅。在真空下在約 50°C 下在真空烘箱中將金黃色固體產物乾燥至 416 g(98.6%產率)之恆重。

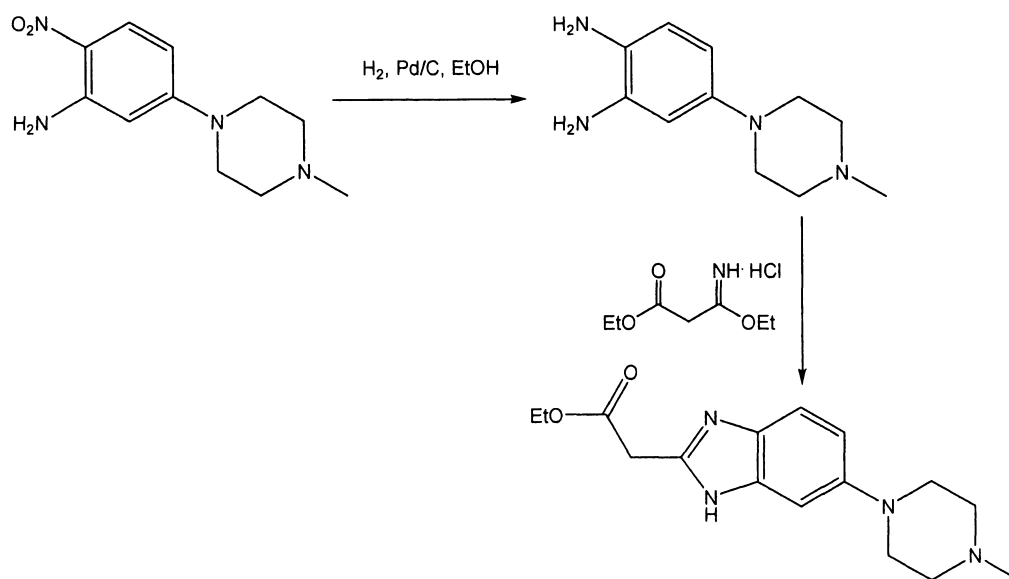
程序 C

將 5-氯-2-硝基苯胺(401 g, 2.32 mol)添加至配備有頂置式攪拌器、冷凝器、進氣口、加料漏斗及溫度計探針之 12 L 四頸圓底燒瓶中。接著將燒瓶用 N_2 淨化。在攪拌下將 1-甲基哌嗪(977 g, 1.08 L, 9.75 mol)及 100% 乙醇(650 mL)添加至反應燒瓶中。將燒瓶再次用 N_2 淨化且在 N_2 下維持反

應。將燒瓶在加熱套中加熱至 97°C ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) 之內部溫度且維持在該溫度下直至如藉由 HPLC 測定反應完成 (通常約 40 小時)。反應完成後，停止加熱且在攪拌下使反應物冷卻至約 80°C 之內部溫度，且經由加料漏斗經 1 小時之時段將水 (3.15 L) 添加至混合物中，同時將內部溫度維持在 82°C ($\pm 3^{\circ}\text{C}$)。水添加完成後，停止加熱且經不少於 4 小時之時段使反應混合物冷卻至 $20\text{--}25^{\circ}\text{C}$ 之內部溫度。接著在 $20\text{--}30^{\circ}\text{C}$ 之內部溫度下將反應混合物再攪拌一小時。接著將所得混合物過濾且用水 ($1\times 1\text{ L}$)、50% 乙醇 ($1\times 1\text{ L}$) 及 95% 乙醇 ($1\times 1\text{ L}$) 洗滌燒瓶及濾餅。將金黃色固體產物置放於乾燥盤中且在真空下在約 50°C 下在真空烘箱中乾燥至 546 g (99% 產率) 之恆重。

B. [6-(4-甲基-哌嗪-1-基)-1H-苯并咪唑-2-基]-乙酸乙酯之合成

程序 A



將 5000 mL 四頸燒瓶配備攪拌器、溫度計、冷凝器及進

氣口/出氣口。向經裝備之燒瓶中饋入 265.7 g (1.12 mol, 1.0 當量) 之 5-(4-甲基-哌嗪-1-基)-2-硝基苯胺及 2125 mL 200 標準強度之 EtOH。將所得溶液用 N₂ 淨化 15 分鐘。接著，添加 20.0 g 5% Pd/C (50% H₂O w/w)。將反應物在 40-50°C (內部溫度) 下劇烈攪拌，同時使 H₂ 鼓泡通過混合物。每小時藉由 HPLC 針對 5-(4-甲基-哌嗪-1-基)-2-硝基苯胺之消失來監測反應。典型反應時間為 6 小時。

在所有 5-(4-甲基-哌嗪-1-基)-2-硝基苯胺自反應物中消失後，將溶液用 N₂ 淨化 15 分鐘。接著，添加 440.0 g (2.25 mol) 呈固體狀之 3-乙氧基-3-亞胺基丙酸乙酯鹽酸鹽。將反應物在 40-50°C (內部溫度) 下攪拌直至反應完成。藉由以 HPLC 跟蹤二胺基化合物之消失來監測反應。典型反應時間為 1-2 小時。反應完成後，將其冷卻至室溫且經矽藻土過濾材料襯墊過濾。將矽藻土過濾材料用無水 EtOH (2×250 mL) 洗滌且將濾液在減壓下濃縮以提供稠厚褐色/橙色油狀物。將所得油狀物溶解於 850 mL 0.37% 之 HCl 溶液中。接著整份添加固體 NaOH (25 g) 且沈澱形成。將所得混合物攪拌 1 小時且接著過濾。將固體用 H₂O (2×400 mL) 洗滌且在 50°C 下在真空烘箱中乾燥以提供 251.7 g (74.1%) 呈淺黃色粉末狀之 [6-(4-甲基-哌嗪-1-基)-1H-苯并咪唑-2-基]-乙酸乙酯。

程序 B

將 5000 mL 之四頸夾套燒瓶配備機械攪拌器、冷凝器、溫度探針、進氣口及油鼓泡器。向所裝備之燒瓶中饋入

300 g (1.27 mol) 5-(4-甲基-哌嗪-1-基)-2-硝基苯胺及 2400 mL 200 標準強度之 EtOH (該反應可用 95% 乙醇進行或已用 95% 乙醇進行且對此反應而言無需使用 200 標準強度之乙醇)。將所得溶液攪拌且用 N₂ 淨化 15 分鐘。接著，將 22.7 g 5% Pd/C (50% H₂O w/w) 添加至反應燒瓶中。將反應容器用 N₂ 淨化 15 分鐘。用 N₂ 淨化之後，藉由維持通過燒瓶之緩慢但恆定之氫氣流來將反應容器用 H₂ 淨化。將反應物在 45-55°C (內部溫度) 下攪拌同時使 H₂ 鼓泡通過混合物直至如藉由 HPLC 測定 5-(4-甲基-哌嗪-1-基)-2-硝基苯胺完全耗盡。典型反應時間為 6 小時。

在所有 5-(4-甲基-哌嗪-1-基)-2-硝基苯胺自反應物中消失後，將溶液用 N₂ 淨化 15 分鐘。因為二胺中間物對空氣敏感，所以應小心以避免其曝露於空氣中。經約 30 分鐘之時段將 500 g (2.56 mol) 3-乙氧基-3-亞胺基丙酸乙酯鹽酸鹽添加至反應混合物中。在 45-55°C (內部溫度) 下在 N₂ 下攪拌反應物直至如藉由 HPLC 測定二胺完全耗盡。典型反應時間為約 2 小時。反應完成後，將反應物趁熱經由矽藻土襯墊過濾。接著將反應燒瓶及矽藻土用 200 標準強度之 EtOH (3×285 mL) 洗滌。將濾液組合於 5000 mL 燒瓶中，且在真空下將約 3300 mL 乙醇移除以產生橙色油狀物。將水 (530 mL) 添加至所得油狀物中且接著添加 1 M HCL (350 mL)，且攪拌所得混合物。將所得溶液劇烈攪拌同時經約 20 分鐘之時段添加 30% NaOH (200 mL)，保持內部溫度在約 25-30°C，同時使 pH 值在 9 與 10 之間。將所得懸浮液攪拌約 4 小

時同時保持內部溫度在約20-25℃。將所得混合物過濾且用H₂O(3×300 mL)洗滌濾餅。在50℃下在真空下在真空烘箱中將所收集之固體乾燥至恆重以提供345.9 g(90.1%)呈淺黃色粉末狀之[6-(4-甲基-哌嗪-1-基)-1H-苯并咪唑-2-基]-乙酸乙酯。在一替代處理程序中，將濾液組合且在真空下將乙醇移除直至移除至少約90%。接著將中性pH值之水添加至所得油狀物中，且使溶液冷卻至約0℃。接著在快速攪拌下緩慢添加20% NaOH水溶液以使pH值至9.2(用pH計讀取)。接著如上所述將所得混合物過濾且乾燥。該替代處理程序提供淡棕褐色至淡黃色產物，產率高達97%。

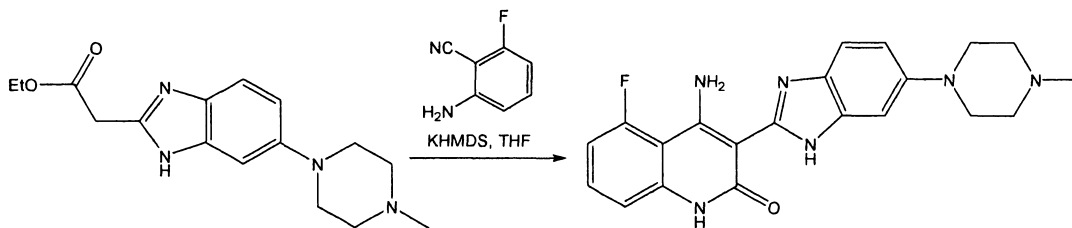
降低[6-(4-甲基-哌嗪-1-基)-1H-苯并咪唑-2-基]-乙酸乙酯之水含量之方法

將先前已處理且乾燥至約8-9% H₂O之水含量的[6-(4-甲基-哌嗪-1-基)-1H-苯并咪唑-2-基]-乙酸乙酯(120.7公克)置放於2000 mL圓底燒瓶中且溶解於純乙醇(500 mL)中。使用旋轉蒸發器在加熱下將琥珀色溶液濃縮為稠厚油狀物直至所有溶劑移除。將該程序重複兩次以上。將因此所得之稠厚油狀物留在燒瓶中且置放於真空烘箱中，於50℃下加熱隔夜。卡爾費休分析(Karl Fisher analysis)結果指示水含量為5.25%。在以下實例之程序中，藉由此方法獲得之降低之水含量提供增加之產率。對於此乾燥過程而言，可使用諸如甲苯及THF之其他溶劑替代乙醇。

C. 4-胺基-5-氟-3-[6-(4-甲基-哌嗪-1-基)-1H-苯并咪唑-2-

基]-1H-喹啉-2-酮之合成

程序 A



在配備有冷凝器、機械攪拌器、溫度探針之5000 mL燒瓶中將[6-(4-甲基-哌嗪-1-基)-1H-苯并咪唑-2-基]-乙酸乙酯(250 g, 820 mmol)(如上所述經乙醇乾燥)溶解於THF(3800 mL)中且用氫氣淨化。將2-胺基-6-氟-苯甲腈(95.3 g, 700 mmol)添加至溶液中，且使內部溫度升至40℃。當所有固體溶解且溶液溫度達到40℃時，經5分鐘之時段添加固體KHMDS(376.2 g, 1890 mmol)。當鉀鹼添加完成時，獲得不均勻之黃色溶液且內部溫度已升至62℃。60分鐘之時段後，內部溫度降回至40℃，且藉由HPLC測定反應完成(無起始物質或未環化之中間物存在)。接著藉由將稠厚反應混合物傾倒至H₂O(6000 mL)中來使其反應中止且攪拌所得混合物直至其達到室溫。接著，將混合物過濾且將濾墊用水(1000 mL, 2次)洗滌。將亮黃色固體置放於乾燥盤中且在真空烘箱中於50℃下乾燥隔夜以提供155.3 g (47.9%)所需之4-胺基-5-氟-3-[6-(4-甲基-哌嗪-1-基)-1H-苯并咪唑-2-基]-1H-喹啉-2-酮。

程序 B

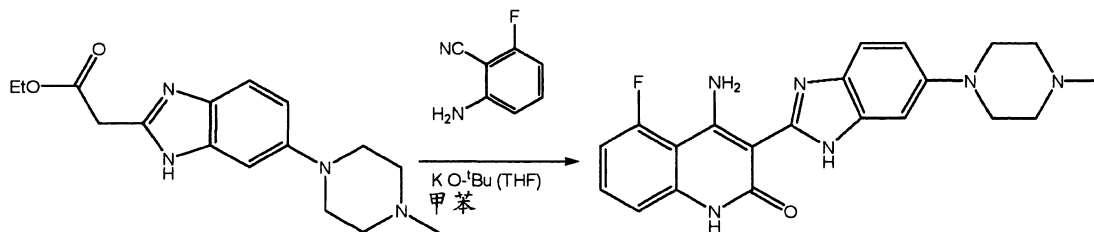
將5000 mL四頸夾套燒瓶裝備蒸餾設備、溫度探針、N₂

進氣口、加料漏斗及機械攪拌器。將[6-(4-甲基-哌嗪-1-基)-1H-苯并咪唑-2-基]-乙酸乙酯(173.0 g, 570 mmol)饋入反應器中，且將反應器用N₂淨化15分鐘。接著在攪拌下將無水THF(2600 mL)饋入燒瓶中。在所有固體已溶解後，必要時使用熱藉由蒸餾(真空或大氣壓)將溶劑移除(較高之溫度有助於移除水)。移除1000 mL溶劑後，停止蒸餾且將反應物用N₂淨化。接著將1000 mL無水THF添加至反應容器中，且當所有固體溶解時，再次進行蒸餾(真空或大氣壓)直至再移除1000 mL溶劑。將添加無水THF及移除溶劑之過程重複至少4次(第四次蒸餾時，移除溶劑之60%，而在前3次蒸餾中僅移除40%)，此後移出1 mL樣品用於卡爾費休分析以測定水含量。若分析顯示樣品含有小於0.20%之水，則如下一段落所述繼續反應。然而，若分析顯示大於0.20%之水，則繼續上述乾燥過程直至達成小於0.20%之水含量。

在使用先前段落描述之程序達成小於0.20%或約0.20%之水含量後，將蒸餾裝置替換為回流冷凝器，且向反應物中饋入2-胺基-6-氟-苯甲腈(66.2 g, 470 mmol)(在一些程序中使用0.95當量)。接著將反應物加熱至38-42°C之內部溫度。當內部溫度已達到38-42°C時，經由加料漏斗經5分鐘之時段將KHMDs溶液(1313 g, 1.32 mol, 20% KHMDs於THF中)添加至反應物中，在添加期間保持內部溫度在約38-50°C。當鉀鹼添加完成時，將反應物攪拌3.5至4.5小時(在一些實例中將其攪拌30至60分鐘且反應可在此時間內

完成)，同時保持內部溫度在38-42℃。接著將反應之樣品移出且藉由HPLC分析。若反應未完成，則經5分鐘之時段將額外KHMDs溶液添加至燒瓶中且將反應物在38-42℃下攪拌45-60分鐘(所添加之KHMDs溶液之量係由以下條件確定：若IPC比率<3.50，則添加125 mL；若 $10.0 \geq \text{IPC}$ 比率 ≥ 3.50 ，則添加56 mL；若 $20.0 \geq \text{IPC}$ 比率 ≥ 10 ，則添加30 mL。IPC比率等於4-胺基-5-氟-3-[6-(4-甲基-哌嗪-1-基)-1H-苯并咪唑-2-基]-1H-喹啉-2-酮所對應之面積除以未環化中間物所對應之面積)。一旦反應完成(IPC比率>20)，使反應器冷卻至25-30℃之內部溫度，且經15分鐘之時段將水(350 mL)饋入反應器，同時保持內部溫度在25-35℃(在一替代情形中，在40℃下進行反應且在5分鐘內添加水。更快之中止減少在此期間形成之雜質之量)。接著將回流冷凝器替換為蒸餾裝置且需要時使用熱藉由蒸餾(真空或大氣壓)將溶劑移除。移除1500 mL溶劑後，停止蒸餾且將反應物用N₂淨化。接著將水(1660 mL)添加至反應燒瓶中同時保持內部溫度在20-30℃。接著在20-30℃下將反應混合物攪拌30分鐘，接著使其冷卻至5-10℃之內部溫度且接著將其攪拌1小時。將所得懸浮液過濾，且將燒瓶及濾餅用水(3×650 mL)洗滌。在真空下在50℃下在真空烘箱中將因此所得之固體乾燥至恆重以提供103.9 g(42.6%產率)呈黃色粉末狀之4-胺基-5-氟-3-[6-(4-甲基-哌嗪-1-基)-1H-苯并咪唑-2-基]-1H-喹啉-2-酮。

程序 C



將 [6-(4-甲基-哌嗪-1-基)-1H-苯并咪唑-2-基]-乙酸乙酯 (608 g, 2.01 mol)(經乾燥)及 2-氨基-6-氟-苯甲腈 (274 g, 2.01 mol) 饋入位於加熱套上且配備有冷凝器、機械攪拌器、進氣口及溫度探針之 12 L 四頸燒瓶中。將反應容器用 N_2 淨化，且將甲苯 (7.7 L) 饋入反應混合物中同時將其攪拌。將反應容器再次用 N_2 淨化且維持在 N_2 下。將混合物內部溫度升高直至達到 $63^\circ\text{C} (+/-3^\circ\text{C})$ 之溫度。將混合物之內部溫度維持在 $63^\circ\text{C} (+/-3^\circ\text{C})$ 下，同時在減壓 (380 +/- 10 托，蒸餾頭 $t=40^\circ\text{C} (+/-10^\circ\text{C})$) 下自燒瓶蒸餾約 2.6 L 甲苯 (使用卡爾費休分析來檢查混合物中之水含量。若水含量大於 0.03%，則再添加 2.6 L 甲苯且重複蒸餾。重複此過程直至達成小於 0.03% 之水含量)。在達到小於 0.03% 之水含量後，停止加熱且在 N_2 下使反應物冷卻至 $17-19^\circ\text{C}$ 之內部溫度。接著在 N_2 下以一定速率將 THF 中之第三丁醇鉀 (20% 於 THF 中；3.39 kg、6.04 莫耳之第三丁醇鉀) 添加至反應物中以使反應物之內部溫度保持在 20°C 以下。在第三丁醇鉀添加完成後，在低於 20°C 之內部溫度下將反應物攪拌 30 分鐘。接著使溫度升至 25°C 且將反應物攪拌至少 1 小時。接著使溫度升至 30°C 且將反應物攪拌至少 30 分鐘。接著使用 HPLC 檢查起始物質之消耗情況來監測反應完成情況 (通常 2-3 小時內，兩種起始物質均已耗盡 (以 HPLC 面積 % 計小於

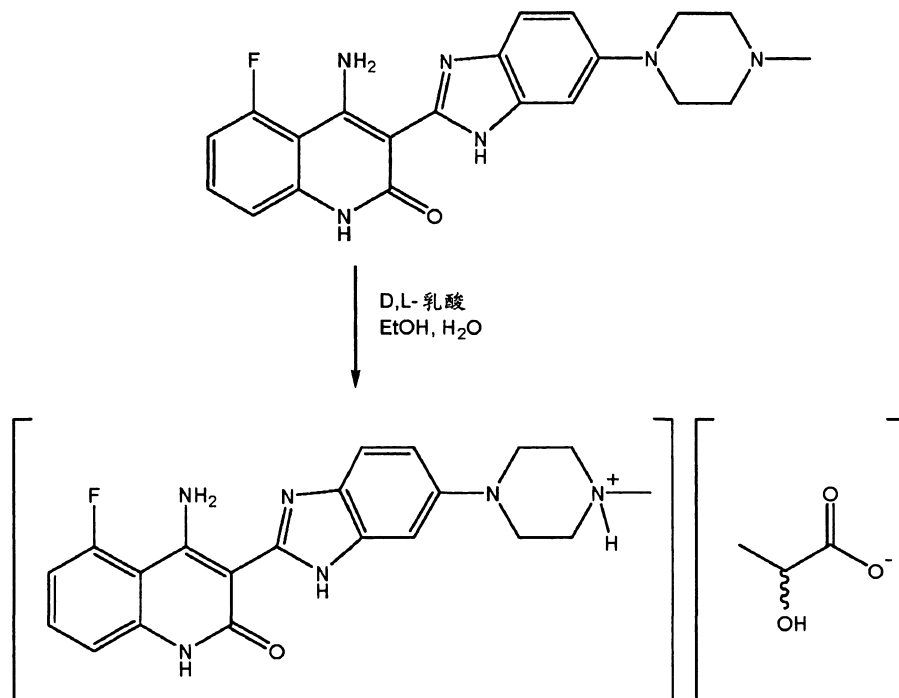
0.5%))。若2小時後反應未完成，則適時再添加0.05當量之第三丁醇鉀且直至HPLC顯示反應已完成才結束該過程。反應完成後，將650 mL水添加至經攪拌之反應混合物中。接著將反應物溫至50°C之內部溫度且在減壓下將THF自反應混合物中蒸餾除去(以體積計約3 L)。接著使用加料漏斗將水(2.6 L)逐滴添加至反應混合物中。接著將混合物冷卻至室溫且攪拌至少1小時。接著將混合物過濾且將濾餅用水(1.2 L)、70%乙醇(1.2 L)及95%乙醇(1.2 L)洗滌。將亮黃色固體置放於乾燥盤中且在真空烘箱中於50°C下乾燥直至獲得恆重以提供674 g(85.4%)所需之4-胺基-5-氟-3-[6-(4-甲基-哌嗪-1-基)-1H-苯并咪唑-2-基]-1H-喹啉-2-酮。

4-胺基-5-氟-3-[6-(4-甲基-哌嗪-1-基)-1H-苯并咪唑-2-基]-1H-喹啉-2-酮之純化

將裝備有冷凝器、溫度探針、N₂進氣口及機械攪拌器之3000 mL四頸燒瓶置放於加熱套中。接著向燒瓶中饋入4-胺基-5-氟-3-[6-(4-甲基-哌嗪-1-基)-1H-苯并咪唑-2-基]-1H-喹啉-2-酮(101.0 g, 0.26 mol)，且將黃色固體懸浮於95%乙醇(1000 mL)中且攪拌。在一些狀況下，使用8:1之溶劑比率。接著在攪拌下經約1小時之時段將懸浮液加熱至溫和回流(約76°C之溫度)。接著將反應物攪拌45-75分鐘，同時回流。此時，將熱自燒瓶移除且使懸浮液冷卻至25-30°C之溫度。接著將懸浮液過濾且將濾墊用水(2×500 mL)洗滌。接著將黃色固體置放於乾燥盤中且在真空烘箱中於50°C下乾燥直至獲得恆重(通常16小時)以獲得97.2

g(96.2%)呈黃色粉末狀之純化產物。

D. 4-胺基-5-氟-3-[6-(4-甲基-哌嗪-1-基)-1H-苯并咪唑-2-基]-1H-喹啉-2-酮之乳酸鹽之製備



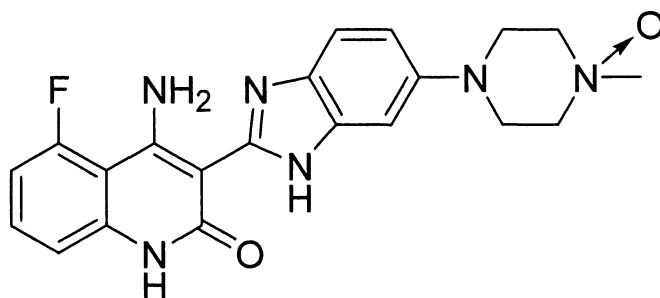
將3000 mL四頸夾套燒瓶配備冷凝器、溫度探針、N₂進氣口及機械攪拌器。將反應容器用N₂淨化至少15分鐘且接著向其中饋入4-胺基-5-氟-3-[6-(4-甲基-哌嗪-1-基)-1H-苯并咪唑-2-基]-1H-喹啉-2-酮(484 g, 1.23 mol)。製備D,L-乳酸(243.3 g、1.72 mol單體-參見以下段落)、水(339 mL)及乙醇(1211 mL)之溶液且接著將其饋入反應燒瓶中。以中等速率開始攪拌且將反應物加熱至68-72°C之內部溫度。將反應物之內部溫度維持在68-72°C下歷時15-45分鐘且接著停止加熱。經由10-20微米玻璃料過濾所得混合物，將濾液收集於12 L燒瓶中。將該12 L燒瓶裝備內部溫度探針、回流冷凝器、加料漏斗、進氣口、出氣口及頂置

式攪拌器。接著將濾液以中等速率攪拌且加熱至回流(約78°C之內部溫度)。在維持溫和回流的同時，經約20分鐘之時段將乙醇(3,596 mL)饋入燒瓶中。接著在15-25分鐘內使反應燒瓶冷卻至約64-70°C範圍內之內部溫度且維持此溫度約30分鐘之時段。針對晶體來檢查反應器。若不存在晶體，則將4-胺基-5-氟-3-[6-(4-甲基-哌嗪-1-基)-1H-苯并咪唑-2-基]-1H-喹啉-2-酮(484 mg, 0.1莫耳%)之乳酸鹽之晶體添加至燒瓶中，且在64-70°C下將反應物攪拌30分鐘，接著再次針對晶體來檢查燒瓶。一旦出現晶體，即將攪拌減小至較低速率且在64-70°C下將反應物再攪拌90分鐘。接著經約2小時之時段使反應物冷卻至約0°C，且經由25-50微米燒結過濾器過濾所得混合物。將反應器用乙醇(484 mL)洗滌且攪拌直至內部溫度為約0°C。使用冷乙醇來洗滌濾餅且再重複此程序2次。在真空下在50°C下在真空烘箱中將所收集之固體乾燥至恆重以產生510.7 g(85.7%)4-胺基-5-氟-3-[6-(4-甲基-哌嗪-1-基)-1H-苯并咪唑-2-基]-1H-喹啉-2-酮之黃色乳酸鹽晶體。在過濾過程中通常使用橡膠壩或惰性條件。雖然乾燥固體似乎並不極具吸濕性，但濕濾餅傾向於吸取水且變黏。多加防範以避免濕濾餅長時間曝露於大氣。

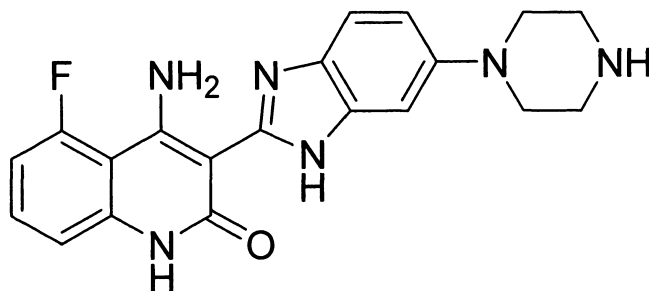
商業乳酸一般含有約8-12% w/w之水，且除單體乳酸外亦含有二聚體及三聚體。乳酸二聚體與單體之莫耳比率一般為約1.0:4.7。商業級乳酸可用於前段所述之過程中，此係因為單乳酸鹽優先自反應混合物中沈澱。

代謝物之鑑別

自如併入本文之參考文獻所述之2週毒物學研究在彙集之大鼠血漿中鑑別且表徵4-胺基-5-氟-3-[6-(4-甲基-哌嗪-1-基)-1H-苯并咪唑-2-基]-1H-喹啉-2-酮(化合物1)的兩種代謝物。所鑑別之兩種代謝物為下文所示之哌嗪N-氧化物化合物(化合物2)及N-脫甲基化合物(化合物3)。



化合物 2



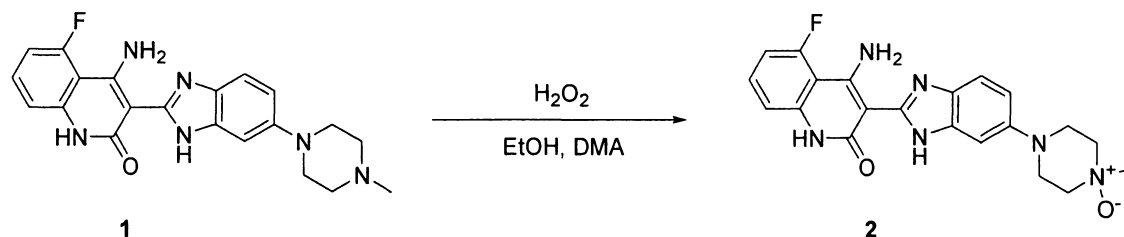
化合物 3

4-胺基-5-氟-3-[6-(4-甲基-4-氧離子基哌嗪-1-基)-1H-苯并咪唑-2-基]喹啉-2(1H)-酮(化合物2)及4-胺基-5-氟-3-(6-哌嗪-1-基-1H-苯并咪唑-2-基)喹啉-2(1H)-酮(化合物3)之合成

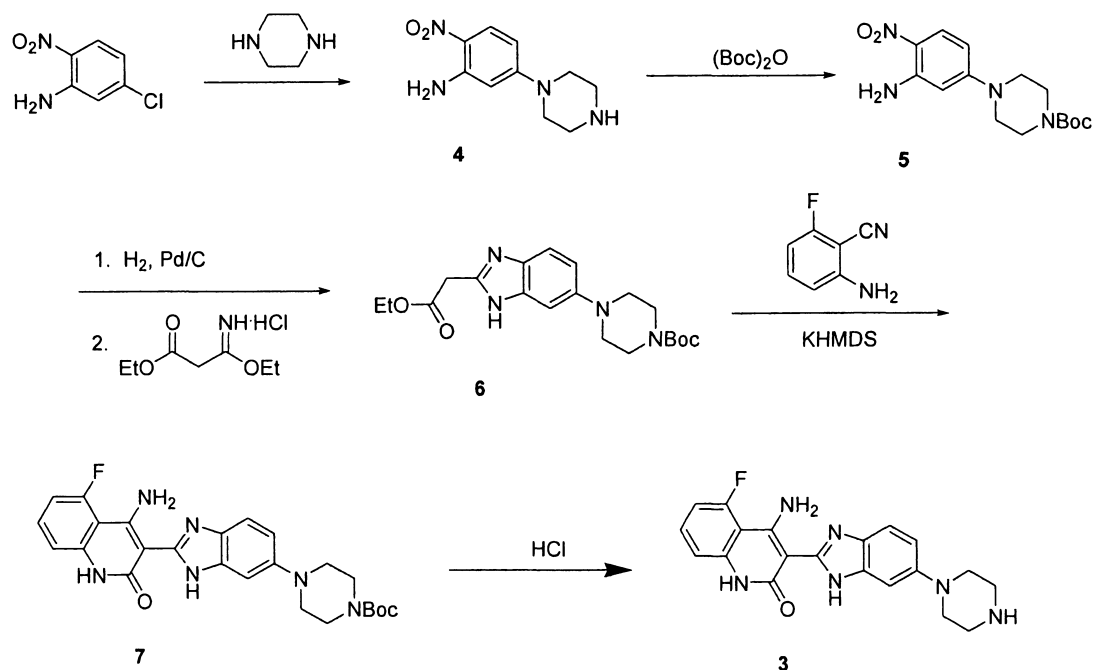
為證實所鑑別之化合物1代謝物之結構，獨立合成該等代謝物。

化合物1之N-氧化物代謝物化合物2係如以下流程所示來合成。將化合物1在乙醇、二甲基乙醯胺及過氧化氫之混

合物中加熱。反應完成後，將化合物**2**藉由過濾分離且用乙醇洗滌。必要時，產物可進一步藉由管柱層析法純化。



化合物**1**之N-脫甲基代謝物化合物**3**係如以下流程所示來合成。將5-氯-2-硝基苯胺用哌嗪處理以產生**4**，隨後將**4**用丁氧羰基(Boc)基團保護以產生**5**。還原硝基接著與3-乙氧基-3-亞胺基丙酸乙酯縮合產生**6**。使用雙(三甲基矽烷)胺基鉀作為鹼使**6**與6-氟鄰胺基苯甲腈縮合產生**7**。將粗**7**用HCl水溶液處理隨後純化以產生呈黃色/褐色固體狀之所需代謝物。



檢定程序

酪胺酸激酶

藉由提供ATP及含有用於磷酸化之酪胺酸胺基酸殘基之合適肽或蛋白質，且採用針對磷酸根部分基團轉移至酪胺酸殘基之檢定法來量測諸多蛋白酪胺酸激酶之激酶活性。使用桿狀病毒(Baculovirus)表現系統(InVitrogen)，在Sf9昆蟲細胞中表現對應於FLT-1(VEGFR1)、VEGFR2、VEGFR3、Tie-2、PDGFR α 、PDGFR β 及FGFR1受體之細胞質域的重組蛋白，且可經由Glu抗體相互作用(針對具有Glu抗原決定基標籤之構築體)或藉由金屬離子層析法(針對具有His₆(SEQ IDNO:1)標籤之構築體)來純化。各檢定法中，將測試化合物在DMSO中連續稀釋且接著與合適之激酶反應緩衝劑加ATP混合。添加激酶蛋白及合適之標記生物素之肽受質，產生50-100 μ L之最終體積，將反應物在室溫下培育1-3小時，且接著藉由添加25-50 μ L之45 mM EDTA、50 mM Hepes(pH 7.5)來中止反應。將經中止之反應混合物(75 μ L)轉移至塗佈抗生蛋白鏈菌素之微量滴定盤(Boehringer Mannheim)中且培育1小時。使用標記鎢之抗磷酸酪胺酸抗體PT66，採用DELFIAS隨時間解析之螢光系統(Wallac或PE Biosciences)量測磷酸化肽產物，但其中修改DELFIAS檢定緩衝劑為補充有1 mM MgCl₂以用於抗體稀釋。在Wallac 1232 DELFIA螢光計或PE Victor II多重信號讀出器上讀取隨時間解析之螢光。採用非線性迴歸法，使用XL Fit數據分析軟體計算達成50%抑制之各化合物濃度(IC₅₀)。

在50 mM Hepes pH 7.0、2 mM MgCl₂、10 mM MnCl₂、

1 mM NaF、1 mM DTT、1 mg/mL BSA、2 μ M ATP及0.20-0.50 μ M相應標記生物素之肽受質中檢定FLT-1、VEGFR2、VEGFR3、FGFR3、Tie-2及FGFR1激酶。FLT-1、VEGFR2、VEGFR3、Tie-2及FGFR1激酶分別以0.1 μ g/ml、0.5 μ g/ml或0.1 μ g/ml添加。對於PDGFR激酶檢定，使用120 μ g/ml酶以及與上文相同之緩衝條件，其中例外為將ATP及肽受質濃度改變成1.4 μ M ATP及0.25 μ M生物素-GGLFDDPSYVNVQNL-NH₂(SEQ ID NO:2)肽受質。

重組及活性酪胺酸激酶Fyn及Lck可購得且係自Upstate Biotechnology購得。用於各檢定之測試化合物係在DMSO中連續稀釋且接著與合適之激酶反應緩衝劑加10 nM ³³P γ 標記之ATP混合。添加激酶蛋白及合適之標記生物素之肽受質以產生150 μ L之最終體積。將反應物在室溫下培育3-4小時且接著藉由轉移至含有100 mM EDTA與50 μ M未標記之ATP之100 μ L中止反應緩衝劑的塗佈抗生蛋白鏈菌素之白色微量滴定盤(Thermo Labsystems)而中止反應。培育1小時後，將抗生蛋白鏈菌素培養盤用PBS洗滌且每孔添加200 μ L Microscint 20閃爍計數液體。將培養盤密封且使用TopCount計數。採用非線性迴歸法，使用XL Fit數據分析軟體計算達成50%抑制之各化合物濃度(IC₅₀)。

Fyn、Lck及c-ABL之激酶反應緩衝劑含有50 mM Tris-HCl pH 7.5、15 mM MgCl₂、30 mM MnCl₂、2 mM DTT、2 mM EDTA、25 mM β -磷酸甘油酯、0.01% BSA/PBS、0.5 μ M之合適肽受質(標記生物素之Src肽受質：針對Fyn及

Lck，使用生物素-GGGGKVEKIGEGTYGVVYK-NH₂(SEQ ID NO:3))、1 μM未經標記之ATP及1 nM激酶。

藉由提供ATP及含有用於磷酸化之酪胺酸胺基酸殘基之肽或蛋白質且採用針對磷酸根部分基團轉移至酪胺酸殘基之檢定法來量測c-Kit及FLT-3之激酶活性。購買對應於c-Kit及FLT-3受體之細胞質域的重組蛋白(Prokinase)。用於測試時，將例如4-胺基-5-氟-3-[6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并咪唑-2-基]喹啉-2(1H)-酮之例示性化合物在DMSO中稀釋且接著與下述激酶反應緩衝劑加ATP混合。添加激酶蛋白(c-Kit或FLT-3)及標記生物素之肽受質(生物素-GGLFDDPSYVNVQNL-NH₂(SEQ ID NO:2)))以產生100 μL之最終體積。將此等反應物在室溫下培育2小時且接著藉由添加50 μL 45 mM EDTA、50 mM HEPES(pH 7.5)來中止。將經中止之反應混合物(75 μL)轉移至抗生蛋白鏈菌素塗佈之微量滴定盤(Boehringer Mannheim)中且培育1小時。使用鎢標記之抗磷酸酪胺酸抗體PT66用DELPHIA隨時間解析之螢光系統(Wallac或PE Biosciences)量測磷酸化肽產物，其中修改為DELFLA檢定緩衝劑補充有1 mM MgCl₂以用於抗體稀釋。在Wallac 1232 DELFLA螢光計或PE Victor II多重信號讀出器上測定隨時間解析之螢光值。採用非線性迴歸使用XL Fit數據分析軟體計算達成50%抑制之各化合物濃度(IC₅₀)。

將FLT-3及c-Kit激酶在50 mM Hepes pH 7.5、1 mM NaF、2 mM MgCl₂、10 mM MnCl₂及1 mg/mL BSA、8 μM

ATP 及 1 μ M 相應標記生物素之肽受質 (生物素 - GGLFDDPSYVNVQNL-NH₂ (SEQ ID NO:2)) 中檢定。FLT-3 及 c-Kit 激酶之檢定濃度為 2 nM。將最終濃度為 1 μ M 之磷酸化肽受質與銷標記之抗磷酸酪胺酸抗體 (PT66) (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA) 一起培育。使用隨時間解析之螢光偵測銷。使用非線性迴歸計算 IC₅₀。

由第三方廠商使用以下方法之每一者檢定 FGFR2 及 FGFR4。

方法 A：如下採用 KinaseProfiler (Upstate/Millipore) 直接輻射測量檢定。在 25 μ L 最終反應體積中，將 FGFR2 或 FGFR4 (人類，5-10 mU) 與 8 mM MOPS pH 7.0、0.2 mM EDTA、2.5-10 mM MnCl₂、0.1 mg/mL 聚 (Glu, Tyr) 4:1、10 mM 乙酸鎂及約 500 cpm/pmol 比活度之 [γ ³²P-ATP] (濃度視需要而定) 一起培育。藉由添加 MgATP 混合物開始反應。在室溫下培育 40 分鐘後，藉由添加 5 μ L 3% 磷酸溶液來中止反應。接著將 10 μ L 反應物點樣於 Filtermat A 上且在 75 mM 磷酸中洗滌 3 次，歷時 5 分鐘，且在甲醇中洗滌 1 次，接著乾燥且閃爍計數。

方法 B：Millipore Z'-LYTE 激酶檢定 (Invitrogen) 係基於螢光共振能量傳遞法且如下加以採用。在 50 mM HEPES pH 7.5、0.01% BRIJ-35、10 mM MgCl₂、4 mM MnCl₂、1 mM EGTA、2 mM DTT 中製備 2X FGFR2 或 FGFR4/Tyr 04 肽混合物。最終 10 μ L 激酶反應物由 50 mM HEPES pH 7.5、0.01% BRIJ-35、10 mM MgCl₂、2 mM MnCl₂、1 mM

EGTA、1 mM DTT 中之 0.3-2.9 ng FGFR2 或 2.4-105 ng FGFR4 及 2 μ M Tyr 04 肽組成。激酶反應物培育1小時後，添加 5 μ L 1:32 稀釋之顯色試劑 B。

MIA 蛋白

西方墨點分析：針對如本文所述之 MIA 蛋白檢定 CHL-1 細胞或血漿。收集全血以在 BD microtainer^R 分離管 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) 中製備血漿。將 CHL-1 細胞在磷酸鹽緩衝生理食鹽水 (PBS, Mediatech, Inc., Herndon, VA) 中洗滌兩次且在冰上於含有新鮮 1 mM 苯甲基磺醯氟、完全小型蛋白酶抑制劑混合物錠劑 (2 錠劑/25 毫升溶解緩衝劑) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) 及 1X 磷酸酶抑制劑混合物 II (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 之 RIPA 緩衝劑 (50 mM Tris HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM EGTA、2 mM 原鈣酸鈉、20 mM 焦磷酸鹽、1% Triton X-100、1% 脫氧膽酸鈉及 0.1% SDS) 中溶解 20 分鐘。將溶解產物收集於離心管中，在 4°C 下以 14K RPM 旋轉 20 分鐘，且經由 QIAshredder 管 (QIAGEN, Inc., Valencia, CA) 過濾。使用 BCA 檢定根據廠商之方案 (Pierce, Rockford, IL) 來測定蛋白質濃度。藉由標準方法使用 Novex[®] 18% Tris-甘胺酸凝膠 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 加工樣品以用於西方墨點法。將 MIA 用羊多株抗體 (R & D Systems, Minneapolis, MN) 偵測，1:1000 稀釋於含有 5% 奶粉之 TBST (含有 0.1% Tween[®] 20 之 Tris 緩衝生理食鹽水，Fisher Scientific, Hampton, NH) 中且在 4°C 下培育隔夜。二

次抗體為1:5000稀釋之辣根過氧化物酶連接之抗羊抗體 (Vector Laboratories, Burlingame, CA)。使用增強化學發光 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) 觀測蛋白條帶。藉由 β 肌動蛋白偵測 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 證實同等負載及轉移。來自兩個商業來源之人類重組MIA蛋白 (MW 12-kDa) 用作陽性對照 (Axxora, LLC, San Diego, CA及ProSpec-Tany TechnoGene, LTD, Rehovot, Israel)。

MIA ELISA 檢定：將等量之人類黑色素瘤及結腸直腸癌細胞 (每一細胞株約250,000個細胞) 接種於組織培養盤上且48小時後收集各細胞株之培養基。藉由商業單步驟ELISA套組根據廠商之方案 (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN) 量測培養基或血漿中之MIA含量。使用在3-37 ng/mL範圍內之標準曲線計算測試樣品中之MIA濃度。當MIA濃度超過最高標準濃度時，將樣品1:5稀釋且再次檢定以具有在標準曲線線性範圍內之結果。使用司徒頓t檢驗 (Student t-test) (雙尾分布，兩樣品不等變異數) 評估數據，使用 $P \leq 0.05$ 作為顯著程度。

統計分析

使用Microsoft Excel (Redmond, WA) 執行線性迴歸。使用司徒頓t檢驗量測兩個治療組之間的統計顯著性。使用單向變方分析 (ANOVA) 進行多重比較且使用司徒頓-紐曼-柯爾檢驗 (Student-Newman Keul's test) (SigmaStat, San Rafael, CA) 進行比較不同治療方式之事後檢驗 (post-test)。對於存活研究而言，使用時序檢驗來測定各種治療

組與媒劑組之存活曲線之間的顯著性(Prism, San Diego, CA)。將在研究結束時處死之健康狀態正常之小鼠視為長期存活者且在此分析中檢查。將 $p < 0.05$ 之差異視為統計上顯著的。

黑色素瘤細胞株之西方分析。將黑色素瘤細胞株用冷PBS洗滌，自培養盤中收集且在 4°C 下於含有蛋白酶及磷酸酶抑制劑混合物(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)及1 mM PMSF(Sigma)之RIPA緩衝劑(20 mM Tris, pH 8; 135 mM NaCl; 2 mM EDTA pH 8; 10%甘油; 1% Triton X-100; 0.1% SDS; 0.1%脫氧膽酸鈉)中溶解1小時。將蛋白溶解產物以14000 rpm離心10分鐘且收集所得上清液。使用BCA檢定(Pierce Chemical Company, Rockford, IL)來測定蛋白含量。將總蛋白在Novex Tris-甘胺酸SDS-PAGE凝膠(Invitrogen)上進行電泳且將蛋白質轉移至0.45 μM 硝酸纖維素膜(Invitrogen)。為偵測FGFR-1、2、3及4之蛋白含量，將總蛋白(100 μg)在Novex Tris-甘胺酸SDS-PAGE凝膠(Invitrogen)上進行電泳且將蛋白質轉移至0.45 μM 硝酸纖維素膜(Invitrogen)。在 4°C 下將膜在含有5%脫脂奶粉之TBS-T(0.1% Tween 20)(阻斷緩衝劑)中阻斷最少1小時且接著與一次抗體一起在阻斷緩衝劑(總蛋白)或經過濾之含有5% BSA之TBS-T(磷酸基-蛋白)中培育3-4小時或隔夜。將二次抗小鼠或抗兔抗體在阻斷緩衝劑中在室溫下培育1小時。將膜用TBS-T(0.1% Tween20)洗滌 3×15 分鐘，接著在曝露於Kodak膠片後進行ECL西方偵測(Amersham

Biosciences)。使用對 FGFR-1 具特異性之抗體 (Novus Biologicals ab10646)、對 FGFR-2 具特異性之抗體 (Novus Biologicals ab5476)、對 FGFR3 具特異性之抗體 (Novus Biologicals ab10649) 及對 FGFR-4 具特異性之抗體 (Santa Cruz C-16) 進行西方分析。

細胞群落檢定 (Clonogenic assay)。使用改良之雙層軟瓊脂檢定以 24 孔盤格式執行細胞群落存活檢定。簡言之，底層由 0.2 毫升 / 孔之伊思考夫氏改良達貝科氏培養基 (Iscoves's Modified Dulbecco's Medium, Invitrogen) 組成，該培養基補充有 20% 胎牛血清、0.01% w/v 慶大黴素 (gentamicin) 及 0.75% 瓊脂。將人類黑色素瘤細胞株作為皮下生長於 NMRI nu/nu 小鼠中之實體人類腫瘤異種移植物以連續繼代繁殖。藉由機械分散及隨後在 37°C 下在 RPMI 1640 培養基 (Invitrogen) 中用由 IV 型膠原酶 (41 U/mL, Sigma)、DNase I (125 U/mL, Roche) 及 III 型玻尿酸酶 (100 U/mL, Sigma) 組成之酶消化培育 30 分鐘，產生單細胞懸浮液。將細胞通過 200 μm 及 50 μm 篩網尺寸之篩網且用無菌 PBS 洗滌兩次。將細胞 (1.5×10^4 至 6×10^4) 單獨接種於補充有 0.4% 瓊脂之培養基中且塗於基層上且曝露於各種濃度之化合物 1，接著在加濕氣氛中 37°C 及 7.5% 二氧化碳下培育 8-20 天。顯微鏡下監測細胞之群落生長 (直徑 $> 50 \mu\text{m}$)。在最大群落形成時，使用自動影像分析系統 (OMNICON 3600, Biosys GmbH) 執行計數。

藥物作用係根據藉由比較經處理之孔中平均群落數目與

未經處理之對照中平均群落數目所得之群落形成百分比來表示(將相對群落數目繪製為測試/對照T/C值[%]之曲線)。EC₅₀、EC₇₀及EC₉₀值分別為抑制群落形成50%、70%及90%所需之藥物濃度。作為各實驗之陽性對照，使用1000 µg/mL濃度之5-FU(Medac)實現小於對照之30%之群落存活率。

活體內FGF介導之基質膠血管生成檢定。簡言之，將0.5 mL基質膠(Becton Dickinson, Bedford, MA)與牛2 µg bFGF(Chiron Corporation; Emeryville, CA)之混合物皮下植入雌性BDF1小鼠(Charles River, Wilmington, MA)中。在基質膠植入後，每天經口給與媒劑或化合物1，歷時8天。在基質膠塞自動物移除之後，藉由量測基質膠塞中血紅蛋白含量來定量血管形成。藉由德氏程序(Drabkin's procedure)(Sigma Diagnostics, St. Louis, MO)根據廠商說明來量測血紅蛋白含量。

動物。將自Charles River Laboratories, Inc.(Wilmington, MA)獲得之免疫缺陷型Nu/Nu雌性小鼠(4-8週齡)置於無菌過濾器頂之籠子中之障壁設備中，歷經12小時照明/黑暗週期且隨意供應無菌齧齒動物食物及水。達成後，將皮下ID晶片植入小鼠且接著在研究開始之前進行至少7天之氣候適應過程。所有動物研究均係在由國際實驗動物評估和認可管理委員會(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International)授權之設備中且根據實驗動物管理與使用委員會(Institutional Animal Care

and Use Committee)及實驗動物護理和使用指南(*Guide for The Care and Use of Laboratory Animals*)(美國國家研究委員會(National Research Council))之全部準則來進行。

用於活體內功效研究之細胞培養物。將人類黑色素瘤細胞株 A375M 在具有 10% FBS、1% 維生素、非必需胺基酸 (NEAA) 及丙酮酸鈉之 EMEM 培養基中於 37°C 下具有 5% CO₂ 之加濕氣氛中培養 6 代。將人類黑色素瘤細胞株 CHL-1 在具有低麩醯胺酸 + 10% FBS 之 DMEM 培養基中於 37°C 下具有 5% CO₂ 之加濕氣氛中培養 6 代。

單藥劑化合物 1 在 A375 (突變型 B-Raf) 及 CHL-1 (野生型 B-Raf) 模型中之活體內功效。在腫瘤細胞植入之日，將腫瘤細胞收集且以 2.5×10^7 細胞/毫升再懸浮於 HBSS (A375 細胞) 或 50% HBSS + 50% 基質膠 (CHL-1 細胞；Becton Dickenson and Company, Franklin Lakes, NJ) 中。將細胞以 5×10^6 細胞/200 微升/小鼠皮下接種於右腰窩中。

當平均腫瘤體積達到約 200 mm³ (細胞接種後 12-15 天) 時，基於腫瘤體積將小鼠隨機化成具有 9 或 10 隻動物之組，且每天以 10、30、60 或 80 mg/kg 經口投與媒劑或化合物 1。組之尺寸為每組 9 隻動物 (A375 研究) 或每組 10 隻動物 (CHL-1 研究)。將化合物 1 (批次 41) 調配於 5 mM 檸檬酸鹽中。使用 Study Director 1.4 軟體 (Studylog Systems, Inc., So. San Francisco, CA) 每週評估腫瘤體積及體重 2-3 次。使用式 $\frac{1}{2}[\text{長度 (mm)} \times \text{寬度 (mm)}]^2$ 將腫瘤之測徑規量測結果轉變為平均腫瘤體積 (mm³)。腫瘤生長抑制 (TGI) 按 $[1 - T/C] \times$

100%計算，其中T=測試組之平均腫瘤體積，且C=對照組之平均腫瘤體積(單藥劑研究)。使用司徒頓雙尾t檢驗(Excel軟體)評估治療組與媒劑組之平均腫瘤體積之比較。

在CHL-1研究中，亦量測由黑色素瘤細胞分泌之黑色素瘤標記物黑色素瘤抑制活性(MIA)蛋白的血漿含量。

化合物1+卡鉑+太平洋紫杉醇組合之活體內功效研究：
將 3×10^6 A375M細胞或CHL-1細胞(具有50%基質膠/0.1毫升/小鼠之 5×10^6 細胞)皮下接種至雌性nu/nu小鼠(6-8週齡)之小鼠右腰窩中。在平均腫瘤體積為200-250 mm³時開始治療(研究第0天；n=10隻小鼠/組)。治療由以下各者組成：單獨藥物媒劑，每天1次；卡鉑(50 mg/kg)+太平洋紫杉醇(20或25 mg/kg；每週1次×4週)；化合物1(30或50 mg/kg)，每天1次，歷時4週；或化合物1及卡鉑+太平洋紫杉醇組合療法(以所指示之劑量；第1天)。

使用Study Director 1.4軟體(Studylog Systems, Inc., So. San Francisco, CA)每週評估腫瘤體積及體重2-3次。使用式 $\frac{1}{2}[\text{長度(mm)} \times \text{寬度(mm)}]^2$ 將腫瘤之測徑規量測結果轉變為平均腫瘤體積(mm³)。根據 $[1 - \{(\text{治療組之平均腫瘤體積} - \text{隨機選擇之腫瘤體積}) / (\text{對照組之平均腫瘤體積} - \text{隨機選擇之腫瘤體積})\}] \times 100$ 來計算腫瘤生長抑制(TGI)。當媒劑之平均腫瘤體積為約1500-2000 mm³時計算TGI。與治療開始時各動物之腫瘤體積相比，將反應定義為完全反應(CR，無可量測之腫瘤)或部分反應(PR，腫瘤體積減小50-99%)。

當預期之組合療法%腫瘤生長抑制($\%T/C_{\text{exp}} = \%T/C_{\text{治療}}$)

1×%T/C治療2)/觀測之組合治療% T/C(%T/C_{obs})之比率大於1時，確定為協同效應。當%T/C_{exp}/ %T/C_{obs}=1時，確定為累加效應，且當%T/C_{exp}/ %T/C_{obs}<1(39)時，確定為拮抗效應。

FGF-R細胞捕捉ELISA檢定。第1天：細胞接種：將HEK293細胞進行胰蛋白酶化，使用CASY計數器(Schärfe系統)計數且將10⁴細胞/孔塗於96孔盤(TPP # 92096)中100 μL DMEM 4.5 g/L葡萄糖、10% FBS、1% L-麩胺鹽胺中。將細胞在37°C 5% CO₂下培育24 h。

第1天：細胞轉染及塗佈測試盤：如下使用Fugene-6-試劑(Roche # 11814443001)將HEK293細胞用pcDNA3.1-FGF-R1、pcDNA3.1-FGF-R2、pcDNA3.1-FGF-R3、pcDNA3.1-FGF-R4或pcDNA3.1載體轉染。首先將Fugene-6-試劑(0.15微升/孔)與Optimem I(Gibco # 31985-047)(5微升/孔)混合，接著添加載體DNA(0.05微克/孔)。將此混合物在室溫下培育15 min。隨後將5.2 μL此混合物添加至細胞上。將細胞在37°C 5% CO₂下培育24 h。將FluoroNunc 96孔盤(Maxisorp black F96, Nunc # 437111A)用2 μg/mL α-FGF-R1 AB(R&D Systems # MAB766)、α-FGF-R2 AB(R&D Systems # MAB665)、α-FGF-R3 AB(R&D Systems # MAB766)或α-FGF-R4 AB(R&D Systems # MAB685)AB塗佈。將FluoroNunc培養盤在4°C下培育隔夜。

第3天：化合物稀釋、細胞處理及細胞加工：將FluoroNunc塗佈之培養盤用200 μL含有0.05% Tween[®]20

(Sigma # P-1379)之PBS/0洗滌3次，且在室溫下用200微升/孔含有0.05% Tween[®]20、3% Top Block(VWR-International # 232010)之PBS/0阻斷2 h。隨後將培養盤用200 μL含有0.05% Tween[®]20之PBS/0洗滌3次。首先在DMSO(Serva # 20385)中執行化合物之連續稀釋(10 mM之儲備溶液)。最終稀釋步驟在生長培養基中進行以達到細胞上0.2%之DMSO。將11.5 μL各稀釋液添加至細胞上，一式三份。在37°C下進行處理40 min。將細胞於100微升/孔之ELISA溶解緩衝劑(50 mM Tris pH 7.5、150 mM NaCl、1 mM EGTA、5 mM EDTA、1% Triton、2 mM 鈳酸鈉、1 mM PMSF及蛋白酶抑制劑混合物Roche # 11873580001)中溶解且將50 μL細胞溶解產物轉移至FluoroNunc塗佈之培養盤中。接著將經塗佈之培養盤在4°C下培育5 h。將培養盤用200微升/孔含有0.05% Tween[®]20之PBS/O洗滌3次。以50微升/孔添加α-pTyr-AP AB(Zymed PY20 # 03-7722)(1:10,000於0.3% TopBlock/PBS/0.05% Tween[®]20中)。將培養盤在4°C下培育隔夜，用Thermowell™密封物密封。

第4天 檢定結果顯示：將FluoroNunc培養盤用200 μL含有0.05% Tween[®]20之PBS/0洗滌3次，且用H₂O洗滌1次。將90 μL CDP-Star(Applied Biosystems # MS1000RY)添加至各孔上。將培養盤在黑暗中於室溫下培育45 min，且接著使用TOP Count NXT光度計(Packard Bioscience)量測發光性。

結果

化合物1證明有效抑制FGFR激酶活性

使用ATP-競爭性結合檢定用如上所述經純化之酶測試化合物1對抗一組不同RTK之特異性。發現化合物1高度有效對抗一系列激酶，包括FLT3(1 nM)，具有對抗c-KIT(2 nM)、VEGFR1/2/3(10 nM)、FGFR1/3(8 nM)、PDGFR β (27 nM)及CSF-1R(36 nM)之奈米莫耳活性(參見表1A)。為證實對抗類別III、IV及V RTK之選擇性，針對PI3K/Akt及MAPK(K)路徑中之其他激酶來測試化合物1且發現其具有可忽略之活性(IC₅₀>10 μ M)(參見表1A)。

表1A. 4-胺基-5-氟-3-[6-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并咪唑-2-基]噻啉-2(1H)-酮抗各種RTK之活性

RTK	IC ₅₀ (μ M)
FLT3	0.001
c-KIT	0.002
CSF-1R	0.036
FGFR1	0.008
FGFR2	0.05
FGFR3	0.009
FGFR4	3
VEGFR1/Flt1	0.01
VEGFR2/Flk1	0.013
VEGFR3/Flt4	0.008
PDGFR β	0.027
PDGFR α	0.21
TIE2	4

使用上文針對化合物2及3所述之程序量測諸多蛋白酪氨酸激酶之激酶活性以提供表1B中所示之IC₅₀值。

表 1B 化合物 2-3 之 IC₅₀

化合物	IC ₅₀ (μM)					
	VEGFR flt	VEGFR flk1	bFGFR	PDGFR	Flt3	c-kit
化合物2	0.004	0.009	0.005	0.010	0.0004	0.0002
化合物3	0.019	0.012	0.019	0.037	0.0001	0.0002

FGFR1-4在人類黑色素瘤細胞上之表現。檢查一組人類原發性黑色素瘤腫瘤外植體 (Oncotest 腫瘤：1341/3、1765/3、276/7、462/6、514/12、672/3、989/7) 及細胞株 (CHL-1、HMCB、SK-Mel-2、A375M、G361、SK-Mel-28、SK-Mel-31) 中 FGFR1-4 之蛋白含量以藉由西方分析概述 4 個 FGF 受體之相對表現 (圖 1)。使用來自表現各 FGFR 之瞬時表現之 FGFR⁺ 293T 細胞的蛋白溶解產物證實對各 FGFR 之抗體特異性 (未顯示數據)。

如圖 1 所示，所有黑色素瘤細胞在細胞上表現不同 FGFR 模式。在黑色素瘤細胞上發現可評估含量之 FGFR1 (除 SK-Mel-28 外)、FGFR2 (除 MEXF 462 外)、FGFR3 (除 G361 外)。FGFR4 表現略顯較不一致，其中 CHL-1、HMCB、A375M、G361 上表現高含量 FGFR4，276/7、514/12、672/3、989/7 上表現中等含量，SK-Mel-2、462/6、1765/3 上表現低含量，且 SK-Mel-28、SK-Mel-31 及 1341/3 上表現不可偵測之含量。

化合物 1 對抗黑色素瘤腫瘤細胞之活體外細胞群落評估。評估化合物 1 對抗以下七個離體原發性黑色素瘤外植體之軟瓊脂細胞群落活性：1341/3、1765/3、276/7、

462/6、514/12、672/3、989/7。在此等實驗中，將腫瘤細胞曝露於在0.001 nM至10 μ M之濃度範圍內之各種濃度化合物1。自相對EC₅₀值評估藥物反應(參見表2)。對化合物1之大體反應性為以下次序：1765/3(2.58 μ M)>989/7(2.54 μ M)>1341/3(2.24 μ M)>672/3(1.67 μ M)>276/7(1.14 μ M)>514/12(1.05 μ M)>462/6(0.70 μ M)。

表2 化合物1對抗黑色素瘤腫瘤細胞之細胞群落評估

MEXF	IC ₅₀
1765/3	2.58
989/7	2.54
1341/3	2.24
672/3	1.67
276/7	1.14
514/12	1.05
462/6	0.70

化合物1抑制FGF介導之活體內血管生成。為判定化合物1是否會抑制bFGF介導之活體內血管生成，在bFGF驅動之基質膠植入模型中評估其作用。在單獨基質膠(未補充bFGF)下觀測到邊緣新血管生成，然而，在皮下基質膠植入物中添加bFGF引起新血管生成之顯著誘發，此係藉由測定基質膠塞中血紅蛋白含量來測定(圖2)。歷時8天每天以3-100 mg/kg之劑量的化合物1治療引起bFGF驅動之新血管生成之劑量依賴性抑制(3 mg/kg之IC₅₀)。與媒劑相比，所有劑量均引起統計上顯著之減少($p<0.05$)。有趣地，大於10 mg/kg之所有劑量均小於在未補充之基質膠植入物下

所觀測之基本血紅蛋白含量，此清楚地表明化合物1有效抑制bFGF驅動之活體內血管生成。

化合物1抗腫瘤功效研究：在具有類似FGFR表現概況但B-Raf突變情形不同之兩個黑色素瘤腫瘤模型(A375M B-Raf突變型及CHL-1B-Raf野生型)中進行單藥劑化合物1活性或化合物1與卡鉑+太平洋紫杉醇組合之活性的標準檢查程序。

化合物1作為單藥劑在A375黑色素瘤模型中之活性：化合物1在Nu/Nu小鼠中之人類黑色素瘤A375M皮下異種移植模型中顯示顯著腫瘤生長抑制。原發性腫瘤生長之分析顯示於圖3中。在給藥之第3天、第5天、第21天及第25天，80 mg/kg組中平均腫瘤生長與媒劑組相比存在顯著差異。腫瘤生長抑制(TGI)之百分比係基於第25天之腫瘤體積。以10、30、60及80 mg/kg經口投與化合物1分別引起28%、45%、58%及69%之TGI。在任一組中未觀測到顯著體重減輕(體重減輕不大於約5%)或毒性之其他臨床徵象。

化合物1作為單藥劑在CHL-1黑色素瘤模型中之活性：化合物1在Nu/Nu小鼠中之人類黑色素瘤CHL-1皮下異種移植模型中顯示顯著腫瘤生長抑制。原發性腫瘤生長之分析顯示於圖4中。在給藥之第8天-第25天，30、60及80 mg/kg組中平均腫瘤生長與媒劑組相比存在顯著差異。TGI之百分比係基於第25天之腫瘤體積。以10、30、60及80 mpk經口投與化合物1分別引起64%、73%、89%及87%之TGI。在任一組中未觀測到顯著體重減輕(體重減輕不大於約5%)或

毒性之其他臨床徵象。

在第0天、第8天及第22天評估媒劑組、30 mg/kg組及80 mg/kg組中之血漿MIA含量(未顯示數據)。在第0天所有組中MIA含量均為偵測臨限值或在偵測臨限值以下。直至第8天，媒劑組中MIA含量上升至7.7 ng/mL，而治療組中MIA含量不可偵測。在第22天相對於媒劑組，腫瘤體積及MIA含量亦為較低的。總而言之，在第8天及第22天經治療之動物中血漿MIA含量為較低的(亦即，不可偵測)，而在媒劑對照中血漿MIA含量較高。

化合物1與卡鉑＋太平洋紫杉醇組合之活性：在A375M黑色素瘤模型中，每天單獨給與化合物1產生顯著腫瘤生長抑制，其在統計學上不同於媒劑治療(74% TGI, $p < 0.05$)。每週卡鉑(50 mg/kg)及太平洋紫杉醇(20 mg/kg)產生約45%之TGI；(圖5及表3)。根據在此治療群中觀測到之1/10部分反應，化合物1及卡鉑＋太平洋紫杉醇之組合治療擴大抗腫瘤活性(對媒劑之94% TGI, $p < 0.001$)且優於單藥療法。根據在單藥劑及組合組中所觀測到之<5%體重減輕(BWL)，化合物1(50 mg/kg)與卡鉑＋太平洋紫杉醇之組合療法一般具良好耐受性，且經分析為累加反應(參見表2/3，亦即預期/觀測(E/O)約1)。

表3 組合治療中化合物1在A375M黑色素瘤模型中之活性

治療， n=10隻/組	第25 天平 均TV	第25 天% TGI	第25天 與媒劑 比較之P 值	PR/CR	與初始 值比較 之%平 均BW 改變	臨床觀測 結果	觀測% T/C (O)	預期 T/C (E)	比率 (E/O)
媒劑	759				0%	BAR			
化合物1 50 mg/kg， 每日1次	315	75%	<.01		0%	BAR	0.42		
卡鉑 50 mg/kg + 太平洋紫 杉醇 20 mg/kg， 每週1次	494	45%	>.05		1%	BAR	0.65		
TK1258 50 mg/kg + 卡鉑 +太 平洋紫杉 醇	203	94%	<.001	1PR	-5%	1隻小鼠之 BWL>15% /第25天	0.27	0.27	1.01

腫瘤生長抑制(TGI)= $1 - \{(\text{治療組之平均腫瘤體積TV} - \text{隨機選擇之腫瘤體積}) / (\text{對照組之平均腫瘤體積} - \text{隨機選擇之腫瘤體積})\} \times 100$ ；BAR=歡快、敏捷、反應性；BWL=體重減輕；統計檢驗=克-瓦二氏單因子等級變異數分析/鄧氏法(Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks/Dunn's)；反應=CR(完全反應，無可量測之腫瘤)或PR(部分反應，與治療開始時各動物之腫瘤體積相比，腫瘤體積減小50-99%)；累加反應=1.0之E/O比率。

亦在CHL-1模型中評估與卡鉑+太平洋紫杉醇之組合療法。如圖6及表4中可見，與單藥劑相比，在每天給與化合物1(30 mg/kg)+每週給與卡鉑(50 mg/kg)+太平洋紫杉醇(25 mg/kg)下腫瘤抑制顯著擴大(84% TGI)。化合物1與卡鉑+太平洋紫杉醇之組合療法具良好耐受性且與卡鉑+太

平洋紫杉醇顯著不同($p < .05$, ANOVA/鄧氏法), 但單獨化合物1(30 mg / kg, 每天1次)並不如此($p < .05$, t檢驗)。然而, 在藥物反應之更詳細分析中, 觀測到化合物1+卡鉑+太平洋紫杉醇在CHL-1黑色素瘤模型中大於累加反應(暗示協同效應)($E/O > 1$)。

表4. 化合物1及/或卡鉑+太平洋紫杉醇組合對抗雌性Nu/Nu小鼠中BRaf WT CHL-1黑色素瘤腫瘤

治療 (n=10隻/組)	第14天 平均Tv	最大% TGI; 第 14天	與媒劑比 較之TGI p值; 第 14天	與初始值 比較BW 之%平均 改變	臨床觀 測結果	觀測 T/C(O)	預期 T/C(E)	比率 (E/O)
媒劑	1567			8.1%				
卡鉑 50 mg/kg + 太 平洋紫杉醇 25 mg/kg, 每週1次	1693	-9.65%	>.05	2.4%	BAR	1.08		
化合物1 30 mg/kg, 每天1次	884	52.51%	>.05	4.3%	BAR	0.56		
化合物1 30 mg/kg + 卡 鉑 + 太平洋 紫杉醇	476	83.79%	>.05	3.5%	1 BWL > 15%	.030	0.61	2.00

腫瘤生長抑制(TGI)=[1-{(治療組之平均腫瘤體積TV - 隨機選擇之腫瘤體積)/對照組之平均腫瘤體積 - 隨機選擇之腫瘤體積} × 100]; BAR=歡快、敏捷、反應性; BWL=體重減輕; 克-瓦二氏單因子等級變異數分析/鄧氏法; $E/O = 1$ (累加反應)。 $E/O > 1$ (協同效應)

FGF-R細胞捕捉ELISA檢定: 如下表5所示, 化合物1抑制FGF受體以及其他酪胺酸激酶之細胞磷酸化。

表5 化合物1抑制RTK標靶之細胞磷酸化

標靶	細胞株	TKI258 nM IC ₅₀
FGFR1	經轉染之HEK293	166
FGFR2	經轉染之HEK293	78
FGFR3K650E*	經轉染之HEK293	55
FGFR4	經轉染之HEK293	1915
FLT3	RS4;11 AML	500
FLT3-ITD	MV4;11 AML	1-5
VEGFR1	KM12L4a結腸	< 50
VEGFR2	HMVEC	<10
PDGFRb	KM12L4a結腸	< 50

*FGFR3K650E為在多發性骨髓瘤患者子集中可見之活化突變。

諸如結構IB化合物及結構IC化合物的其他結構I化合物係如上所述製備。可使用上文針對化合物1所述之方法進行使用此等化合物之研究。此等研究將顯示此等化合物亦適用於治療小鼠、人類及其他哺乳動物個體之黑色素瘤。

本說明書中所提及之所有公開案、專利申請案、頒予專利及其他文獻均以引用的方式併入本文，該引用程度就如同已特定地且個別地將各個公開案、專利申請案、頒予專利或其他文獻以全文引用的方式併入一般。在以引用的方式併入之正文中所含之定義若與本揭示案中之定義矛盾，則將其排除在外。

應瞭解本發明並不限於本文中為達成說明之目的所述之實施例，而涵蓋其處於本文件之範疇內的所有該等形式。

【圖式簡單說明】

圖1顯示藉由西方墨點法表徵FGFR1-4在黑色素瘤細胞上之表現。

圖2：化合物1在bFGF驅動之基質膠塞檢定中展示有效之抗血管生成活性。

圖3為顯示在A375M(B-Raf突變型)人類黑色素瘤異種移植模型中化合物1對平均腫瘤體積之顯著抗腫瘤作用之圖。

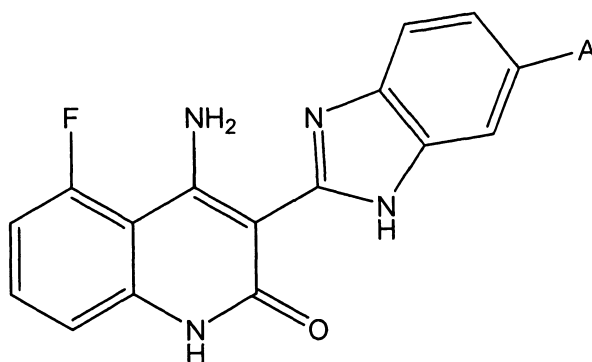
圖4為顯示在CHL-1(野生型B-Raf)人類黑色素瘤異種移植模型中化合物1對平均腫瘤體積之顯著抗腫瘤作用之圖。

圖5為顯示在nu/nu小鼠中黑色素瘤A375M(BRaf突變型)模型中化合物1、卡鉑及太平洋紫杉醇組合療法對平均腫瘤體積之顯著抗腫瘤作用之圖。

圖6為顯示針對雌性Nu/Nu小鼠中CHL-1黑色素瘤腫瘤每天投與化合物1及/或每週給與卡鉑及太平洋紫杉醇對平均腫瘤體積之顯著抗腫瘤作用之圖。

五、中文發明摘要：

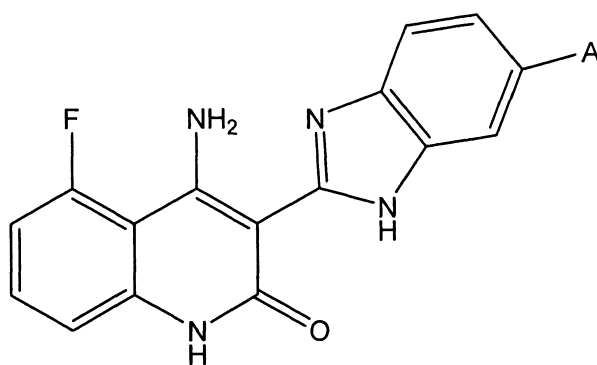
本發明係有關一種治療黑色素瘤之方法，其包括向個體投與結構I之化合物、該化合物之互變異構體、該化合物之醫藥學上可接受之鹽、該互變異構體之醫藥學上可接受之鹽，或其混合物。該化合物、互變異構體、化合物之鹽、互變異構體之鹽或其混合物可用於製備供治療轉移癌之藥劑。代號A係如本文之定義。



I

六、英文發明摘要：

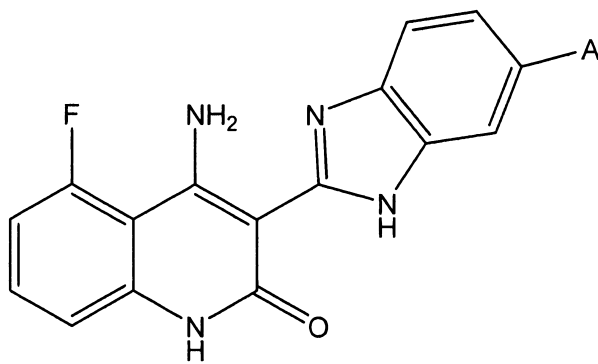
Methods of treating melanoma include administering a compound of Structure I, a tautomer of the compound, a pharmaceutically acceptable salt of the compound, a pharmaceutically acceptable salt or the tautomer, or a mixture thereof to a subject. The compound, tautomer, salt of the compound, salt of the tautomer, or mixture thereof may be used to prepare medicaments for treating metastatic cancer. The variable A has the values defined herein.



I

十、申請專利範圍：

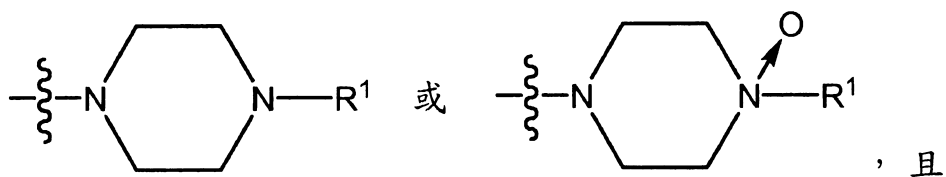
1. 一種治療黑色素瘤之方法，其包含向患有黑色素瘤之個體投與治療有效量之結構I化合物、該化合物之互變異構體、該化合物之醫藥學上可接受之鹽、該互變異構體之醫藥學上可接受之鹽或其混合物，其中該結構I化合物為



I

其中，

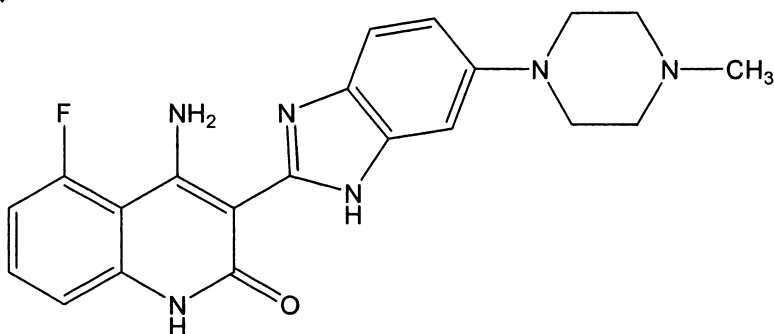
A為選自以下之基團：



，且

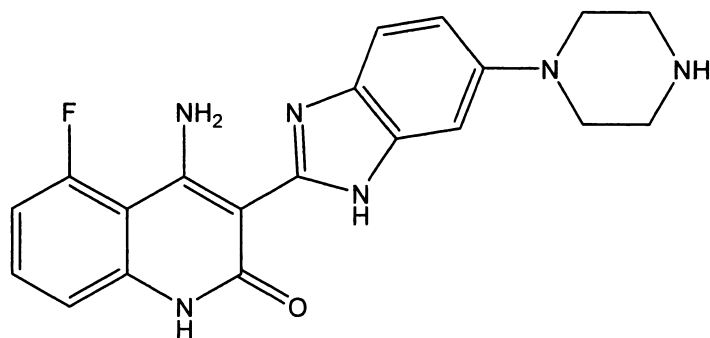
R¹係選自H或具有1至6個碳原子之直鏈或分支鏈烷基。

2. 如請求項1之方法，其中R¹為甲基，且該結構I化合物具有結構IA



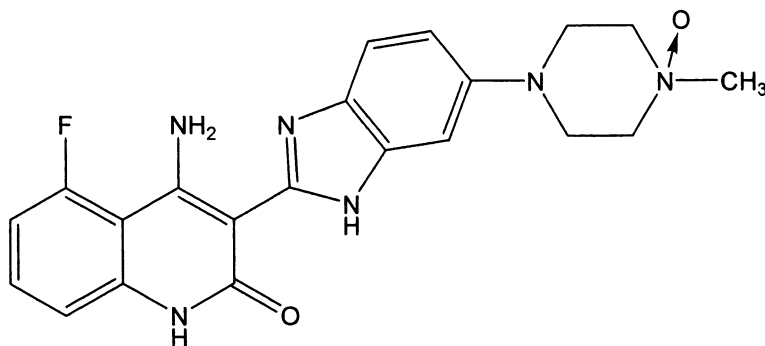
IA

3. 如請求項1之方法，其中 R^1 為氫，且該結構I化合物具有結構IB



IB

4. 如請求項1之方法，其中 R^1 為甲基，且該結構I化合物具有結構IC



IC

5. 如請求項1之方法，其中向該個體投與該結構I化合物或其互變異構體之乳酸鹽。
6. 如請求項1之方法，其中該個體為人類。
7. 如請求項1之方法，其中該黑色素瘤已轉移。
8. 如請求項1之方法，其中該黑色素瘤為淺表擴展性黑色素瘤、結節性黑色素瘤、肢體末端雀斑性黑色素瘤、雀斑性惡性黑色素瘤或黏膜雀斑性黑色素瘤。
9. 如請求項1之方法，其中該黑色素瘤為皮膚或真皮外黑

色素瘤。

10. 如請求項1之方法，其中該黑色素瘤為眼內黑色素瘤或軟組織透明細胞肉瘤。
11. 如請求項1之方法，其進一步包含投與一或多種用於治療黑色素瘤之抗癌藥物。
12. 如請求項11之方法，其中該一或多種抗癌藥物係選自由以下各物組成之群：烷基化抗癌藥物、亞硝基脲(nitrosoureas)、紫杉烷(taxanes)、長春花(vinca)生物鹼、拓撲異構酶(topoisomerase)抑制劑、抗癌抗生素及鉑抗癌藥物。
13. 如請求項11之方法，其中該一或多種抗癌藥物係選自由以下各物組成之群：達卡巴嗪(dacarbazine)、替莫唑胺(temozolomide)、卡莫司汀(carmustine)、洛莫司汀(lomustine)、福莫司汀(fotemustine)、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、多烯紫杉醇(docetaxel)、長春鹼(vinblastine)、伊立替康(irinotecan)、沙利度邁(thalidomide)、鏈脲黴素(streptozocin)、放線菌素D(dactinomycin)、二氯甲二乙胺(mechlorethamine)、順鉑(cisplatin)及卡鉑(carboplatin)、甲磺酸伊馬替尼(imatinib mesylate)、索拉非尼(sorafenib)、舒尼替尼(sutent)或埃羅替尼(erlotinib)。
14. 如請求項11之方法，其中該一或多種抗癌藥物係選自由干擾素及介白素-2組成之群。
15. 如請求項11之方法，其中該一或多種抗癌藥物係選自由

干擾素 α -2a、干擾素 α -2b、聚乙二醇化干擾素 α -2b及介白素-2組成之群。

16. 如請求項1之方法，其中該化合物之治療有效量在約0.25 mg/kg至約30 mg/kg之範圍內。
17. 如請求項1之方法，其中該化合物之治療有效量在約25毫克/天至約1500毫克/天之範圍內。
18. 如請求項1之方法，其中該化合物之治療有效量在約100毫克/天至約600毫克/天之範圍內。
19. 如請求項1之方法，其中該黑色素瘤表現纖維母細胞生長因子受體1、2、3及/或4。
20. 如請求項1之方法，其中該黑色素瘤表現野生型Raf、突變型Raf、野生型Ras、突變型Ras、野生型c-Kit或突變型c-Kit。

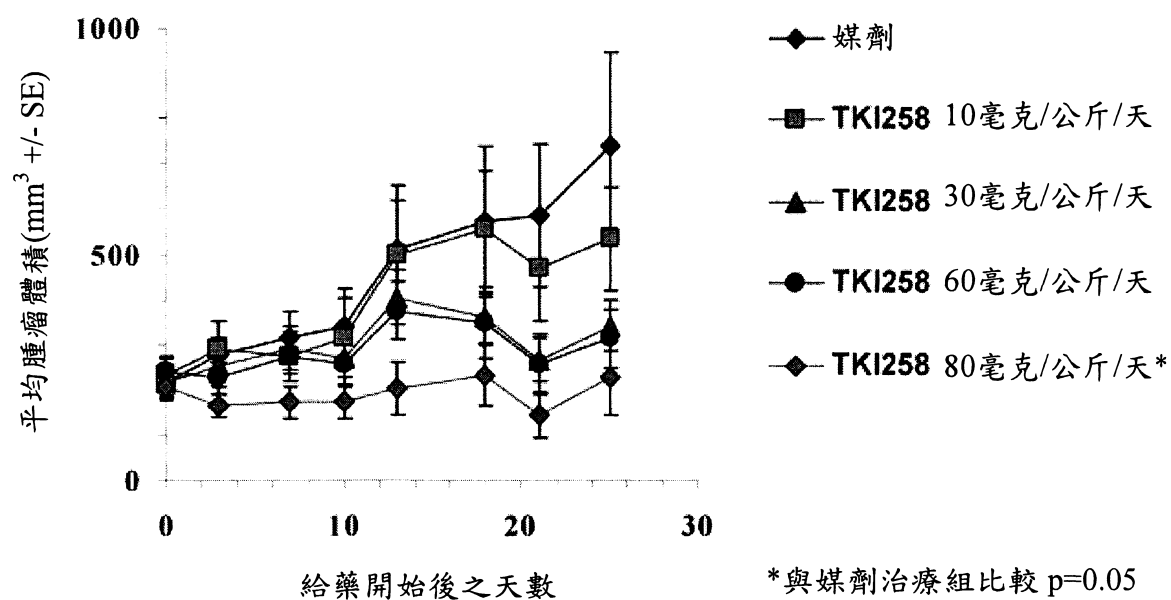


圖3

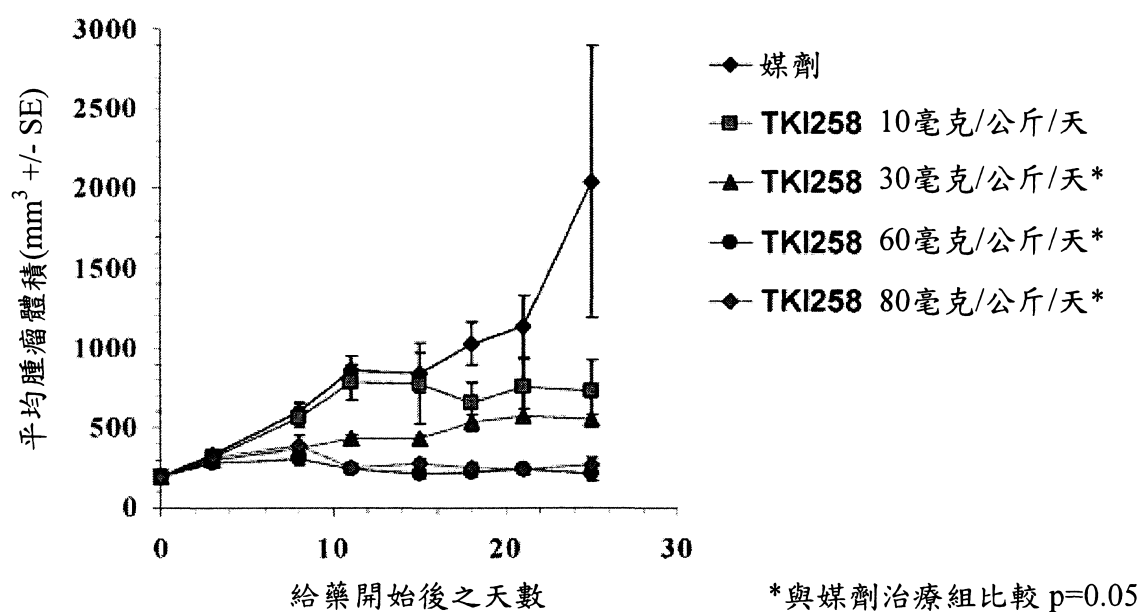


圖4

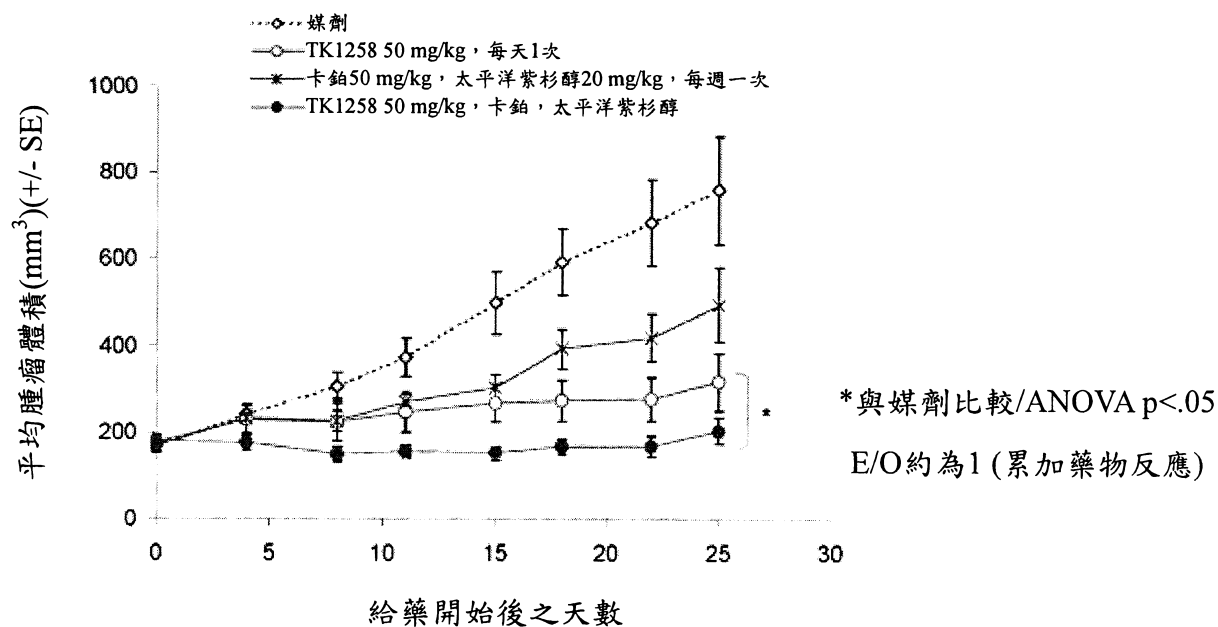


圖5

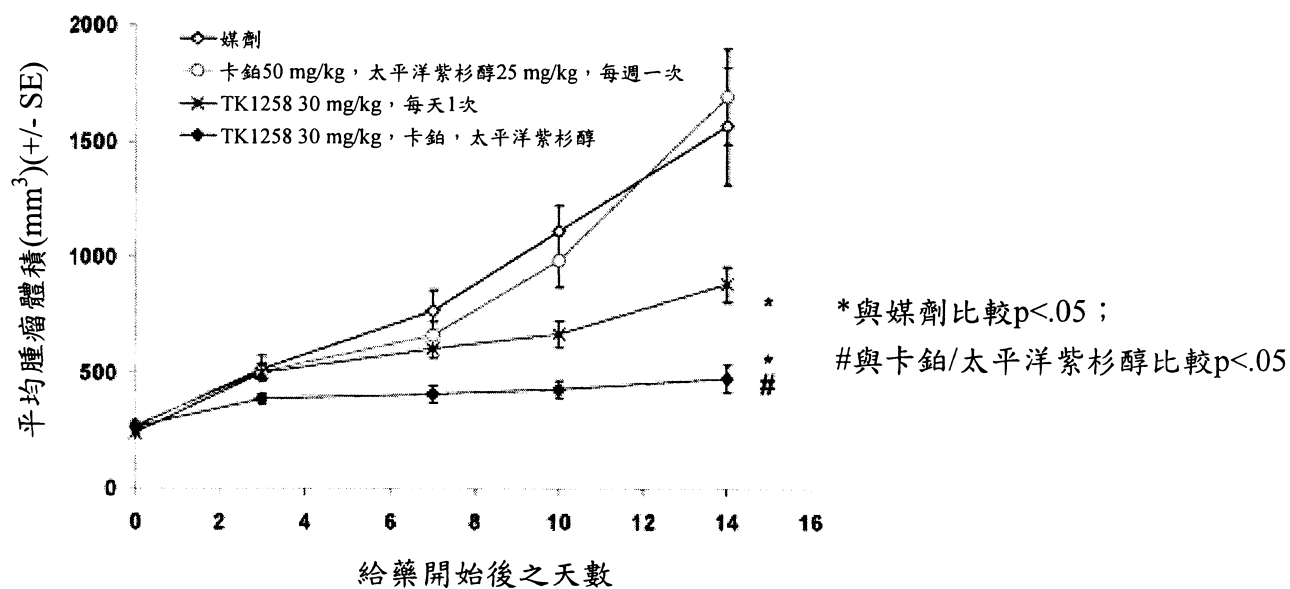


圖6

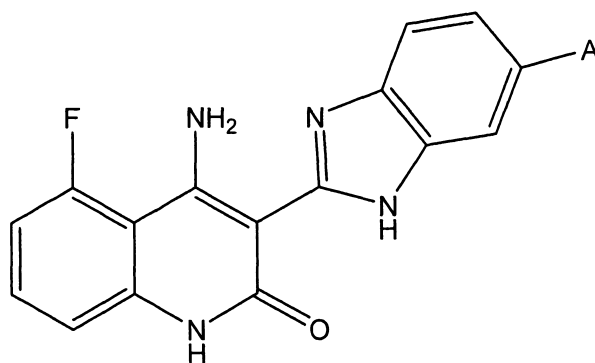
七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



I