(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 120208921 A
(43)申请公布日 2025.06.27

(21)申请号 202510275737.2

(22)申请日 2021.05.26

(30)优先权数据
202041023434 2020.06.04 IN

(62)分案原申请数据
202180049321.9 2021.05.26

(71)申请人 皮莱环球有限责任公司
地址 美国内华达州

(72)发明人 B·皮莱 迪内什·M·G·

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
专利代理师 何伟

(51)Int.Cl.
C07D 401/06(2006.01)
C07D 401/14(2006.01)
C07D 213/81(2006.01)
A61K 31/444(2006.01)
A61K 31/4439(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

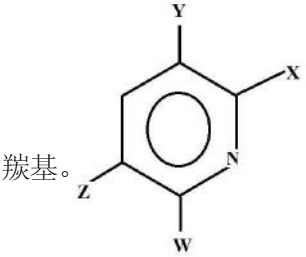
权利要求书2页 说明书24页 附图20页

(54)发明名称

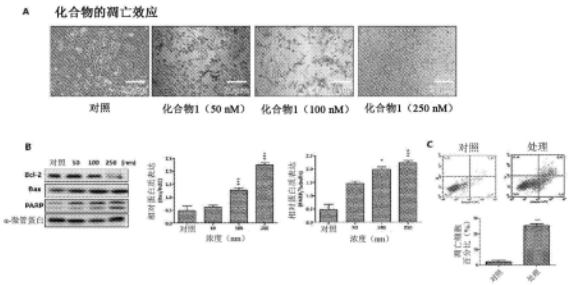
癌症疗法中用于靶向降解不可靶向的KRAS的新型小分子

(57)摘要

本发明公开了用于治疗患有慢性病症的受试者的表现出抗癌活性的新型化合物,所述化合物包括根据式1的结构或其任何衍生物或其立体异构体或互变异构体、其药学上可接受的盐或其组合,其中X为H或烷基;Y为通过至少一个双键与经取代/未取代的同素环/杂环连接的羰基或与烷基连接的羧基;Z为通过至少一个双键与经取代/未取代的同素环/杂环连接的羰基/羧基或烯烃或o-烷基取代的氨基甲酸酯或与支链烷基连接的羰基,并且W为H或酰胺基团或与支链烷基连接的羰基。

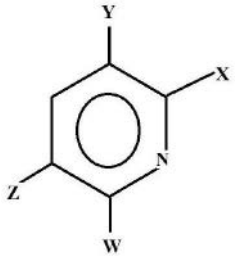


式1



CN 120208921 A

1.一种表现出抗癌活性的新型化合物,所述化合物用于治疗患有慢性病症的受试者,所述化合物包括根据式1的结构:



式1

或其任何衍生物或其立体异构体或互变异构体、其药学上可接受的盐或其组合,

其中:

X为H或烷基;

Y为通过至少一个双键与经取代/未取代的同素环/杂环连接的羰基或与烷基连接的羧基;

Z为通过至少一个双键与经取代/未取代的同素环/杂环连接的羰基/羧基或烯烃或o-烷基取代的氨基甲酸酯或与支链烷基连接的羰基;并且

W为H或酰胺基团或与支链烷基连接的羰基。

2.根据权利要求1所述的化合物,其中X选自包括以下的组:

H或C_1-C_5烷基。

3.根据权利要求1所述的化合物,其中Y选自包括以下的组:

i.与环戊-3-烯连接的羰基;

i.与C_1-C_5烷基连接的羧基;

ii.与5氨基甲酰基,4,5二氢1H吡咯连接的羰基;

iii.与4,5二氢1H吡咯2氨基甲酰基连接的羰基。

4.根据权利要求1所述的化合物,其中Z选自包括以下的组:

i.氨基甲酸o-C_1-C_5烷基酯;

i.与5氨基甲酰基,2,3,二氢1H吡咯连接的羰基;

ii.与吡啶连接的羧基;

iii.C_1-C_5烯烃;

iv.与C_1-C_6支链烷基连接的羰基。

5.根据权利要求1所述的化合物,其中W选自包括以下的组:酰胺基团或H或与C_1-C_5支链烷基连接的羰基。

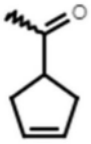
6.根据权利要求1至5所述的化合物,其中X为H;

Y为与环戊-3-烯连接的羰基;

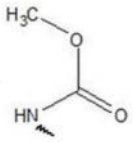
Z为氨基甲酸o-甲酯;

W为酰胺基团。

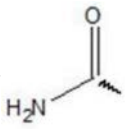
7.根据权利要求6所述的化合物,其中X为H;

Y为

;

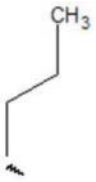
Z为

;

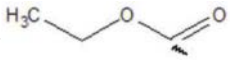
W为

。

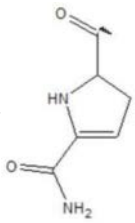
8.根据权利要求1至5所述的化合物,其中X为丁基;
Y为与乙基连接的羧基;
Z为与5氨基甲酰基,2,3,二氢1H吡咯连接的羰基;
W为H。

9.根据权利要求8所述的化合物,其中X为

;

Y为

;

Z为

;

W为H。

10.根据权利要求1至5所述的化合物,其中X为H;
Y为与5氨基甲酰基,4,5二氢1H吡咯连接的羰基;Z为与吡啶连接的羧基;
W为H。

癌症疗法中用于靶向降解不可靶向的KRAS的新型小分子

[0001] 本申请是中国发明专利申请(申请日:2021年5月26日;申请号:202180049321.9)的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及药物分子。更具体地,本发明涉及用于治疗患有慢性病症的受试者的表现出抗癌活性的新型化合物。

背景技术

[0003] 癌症是主要的健康问题并且是死亡的主要原因。癌症预后与疾病阶段密切相关。在最晚期阶段,当发生转移时,预后通常加重并且治疗最有可能失败。基因组的不稳定性和突变被指出是获得这些标记特征的主要机制。癌症中最常见的突变的致癌基因之一是KRAS。KRAS基因编码小GTP酶,所述小GTP酶由于某些细胞表面受体(如EGFR)的刺激而在GDP与GTP结合状态之间循环。最常见的KRAS突变包含G12C、G12D、G12R、G12S、G12V、G13D和Q61H[Meng等人,2013]。最常见的突变位点是密码子12(80%的肿瘤)、密码子13和密码子61[Friday等人,2015]。激活KRAS突变在胰腺癌(72%-90%)、结直肠癌(28%-57%)和肺癌(15%-50%)中最为常见。在肺癌中,KRAS突变在15%至20%的非小细胞肺癌(NSCLC)中检测到,在腺癌中最常见(30%-50%),在小细胞肺癌中罕见,并且在吸烟者中更常见。

[0004] KRAS(v-Ki-ras2 Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同源物)是致癌驱动子,在30%的非小细胞肺癌(NSCLC)中具有突变。然而,即使其已被鉴定为致癌基因30年,但不存在有效的临床药物。KRAS是癌症中最频繁突变的癌基因之一,是肿瘤发生的有效起始子,是恶性肿瘤的强诱导因子,并且是对疗法的应答的预测性生物标志物。除了保持这种区别之外,靶向此蛋白质的未成功的尝试还导致RAS表征为‘无成药性’。RAS信号传导网络构建在细胞的膜处,从而将细胞外线索桥接到如细胞生长、增殖、分化和存活等细胞事件中[Cox等人,2015],在健康细胞向癌症的转变中起决定性作用[Welsch ME等人,2017]。所有这些发现都促使科学界利用RAS或其下游效应子作为治疗靶点,希望损害肿瘤生长和生存[Affolter等人,2012]。然而,迄今为止,迄今为止,尚未成功实现有效的KRAS指导的信号传导抑制。使KRAS具有组成型活性的突变将导致不受控制的细胞生长和癌症。然而,尽管近年来做出了积极努力,但市场上没有直接靶向KRAS并抑制其异常功能的药物[Westcott等人,2015]。

[0005] 然而,临床前研究指示,间充质癌细胞中的“K-Ras成瘾”减少,这意味着直接抑制KRAS可能不是对所有患者都有效[Yin等人,2019]。可替代地,靶向KRAS的下游激酶的抑制剂,如BRAF和MEK,在转移性黑色素瘤中显示出有希望的活性,但与化疗组合对癌症中的KRAS突变很大程度上无效[Janne等人,2017]。除了例如由于间充质癌细胞分化而产生的固有耐药性[Peng等人,2019],MEK抑制剂的功效受到获得性耐药性发展的限制[Haigis等人,2017]。导致治疗癌细胞的困难的另一个因素是不同KRAS突变的异质性,其由相应的氨基酸取代限定。这些改变KRAS的蛋白质结构和GTP酶活性,并显著影响肿瘤生物学和对化疗的应答[Ambrogio等人,2018]。因此,尚未满足的需求仍然是为患有KRAS突变肺癌的患者开发更

有效的靶向治疗策略。

[0006] 参考文献

[0007] 1.Overmeyer JH,Maltese WA.癌细胞中由激活的Ras触发的死亡途径(Death pathways triggered by activated Ras in cancer cells).《生物科学前沿(Front Biosci)》(Landmark编辑).2011;16:1693-713。

[0008] 2.Welsch ME,Kaplan A,Chambers JM,Stokes ME,Bos PH,Zask A,Zhang Y,Sanchez-Martin M,Badgley MA,Huang CS等人多价小分子pan-RAS抑制剂(Multivalent small-molecule pan-RAS inhibitors).《细胞(Cell)》.2017;168:878-889e829

[0009] 3.Affolter A,Drigotas M,Fruth K,Schmidtmann I,Brochhausen C,Mann WJ,Brieger J.上皮癌中通过MAPK和PI3K途径的补偿性上调经由G12SK-Ras增加辐射抗性(Increased radioresistance via G12S K-Ras by compensatory upregulation of MAPK and PI3K pathways in epithelial cancer).《头颈(Head Neck)》.2012。

[0010] 4.Meng D,Yuan M,Li X,Chen L,Yang J,Zhao X,Ma W,Xin J.K-RAS突变对患有非小细胞肺癌的患者的预后价值:系统评价和荟萃分析(Prognostic value of K-RAS mutations in patients with non-small cell lung cancer:asystematic review with meta-analysis).《肺癌(Lung Cancer)》.2013;81:1-10。

[0011] 5.A.D.Cox,C.J.Der,M.R.Philips靶向RAS膜缔合:回溯未来抗RAS药物发现?(Targeting RAS membrane association:back to the future for anti-RAS drug discovery?)《临床癌症研究(Clin Cancer Res)》,21(2015),第1819-1827页

[0012] 6.P.M.Westcott,K.D.Halliwill,M.D.To,M.Rashid,A.G.Rust,T.M.Keane等人KRAS驱动的肺癌的基因模型和化学模型的突变态势(The mutational landscapes of genetic and chemical models of KRAS-driven lung cancer)《自然(Nature)》,517(2015),第489-492页

[0013] 7.Friday BB,Adjei AA.KRAS作为用于癌症疗法的靶标(KRAS as atarget for cancer therapy).《生物化学与生物物理学报(BiochimBiophysi Acta)》.2005;1756:127-144。

[0014] 8.P.A.Janne,M.M.van den Heuvel,F.Barlesi,M.Cobo,J.Mazieres,L.Crino等人司美替尼加多西他赛与单独多西他赛的比较以及患有KRAS突变晚期非小细胞肺癌的患者的无进展生存率:选择-1随机临床试验(Selumetinib plus docetaxel compared with docetaxel alone and progression-free survival in patients with KRAS-Mutant advanced non-small cell lung cancer:the SELECT-1randomized clinical trial)《美国医学会杂志(JAMA)》,317(18)(2017),第1844-1853页

[0015] 9.D.H.Peng,S.T.Kundu,J.J.Fradette,L.Diao,P.Tong,L.A.Byers等人ZEB1抑制通过IL17RD依赖性机制使kras突变癌症对mek抑制敏感(ZEB1suppression sensitizes kras mutant cancers to mek inhibition by an IL17RD-dependent mechanism)《科学转化医学杂志(Sci Transl Med)》,11(483)(2019)

[0016] 10.C.Ambrogio,J.Kohler,Z.W.Zhou,H.Wang,R.Paranal,J.Li等人KRAS二聚化影响突变kras的mek抑制剂敏感性和致癌活性(KRAS dimerization impacts mek inhibitor sensitivity and oncogenic activity of mutant kras)《细胞》,172(4)(2018)857-

68e15

[0017] 11.K.M.Haigis KRAS等位基因:细节决定成败(Haigis KRAS alleles:the devil is in the detail)《癌症趋势(Trends Cancer)》,3(10)(2017),第686-697页

[0018] 12.N.Yin,Y.Liu,A.Khoor,X.Wang,E.A.Thompson,M.Leitges等人蛋白激酶ciota和wnt/β-连环蛋白信号传导:kras/trp53驱动的肺腺癌的替代性途径(Protein kinase ciota and wnt/beta-catenin signaling:alternative pathways to kras/trp53-driven lung adenocarcinoma)《癌细胞(Cancer Cell)》,36(2)(2019)156-67.e7

[0019] 本发明的目的

[0020] 本发明的主要目的是开发用于治疗患有慢性病症的受试者的表现出抗癌活性的新型化合物。

[0021] 本发明的另一个目的是合成所述用于治疗患有慢性病症的受试者的表现出抗癌活性的新型化合物。

[0022] 本发明的又另一个目的是合成选择性地靶向癌症干细胞并且在KRAS蛋白降解中有效的抗癌活性表现型化合物。

[0023] 本发明的另外的目的是利用合成的用于治疗患有慢性病症的受试者的合成器表现出抗癌活性的新型化合物。

[0024] 本发明的另外的目的是提供包括有效量的本文所描述的化合物中的一种或多种化合物的药物组合物。

[0025] 本发明的又另一个目的是提供通过向细胞施用有效量的本文所描述的化合物或药物组合物中的一种或多种来调节、抑制或降解细胞中的KRAS的方法或其任何组合。

[0026] 本文提供的又另一个目标是治疗有需要的受试者的由KRAS介导的疾病、病症或病状的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文所描述的化合物或药物组合物中的一种或多种。

[0027] 本文提供的又另一个目的是一种制品(例如,试剂盒),其包括(i)有效量的本文所描述的化合物或药物组合物中的一种或多种,以及(ii)用于治疗由KRAS介导的疾病、病症或病状的说明书。

附图说明

[0028] 本公开的前述和以下信息以及其它特征将通过以下说明和所附权利要求结合附图而变得更加充分明显。应理解的是,这些附图仅描绘了根据本公开的若干实施例,并且因此不应被认为是对本公开范围的限制,将通过使用附图用另外的特征和细节来描述本公开。

[0029] 图1描绘了化合物I的光谱。

[0030] a.质谱

[0031] b.IR光谱

[0032] c.^{1}H NMR光谱

[0033] d.^{13}C NMR光谱

[0034] 图2描绘了化合物II的光谱。

[0035] a.质谱

[0036] b.IR光谱

[0037] c.^{1}H NMR光谱

[0038] d.^{13}C NMR光谱

[0039] 图3描绘了化合物III的光谱。

[0040] a.质谱

[0041] b.IR光谱

[0042] c.^{1}H NMR光谱

[0043] d.^{13}C NMR光谱

[0044] 图4描绘了化合物IV的光谱。

[0045] a.质谱

[0046] b.IR光谱

[0047] c.^{1}H NMR光谱

[0048] d.^{13}C NMR光谱

[0049] 图5描绘了化合物V的光谱。

[0050] a.质谱

[0051] b.IR光谱

[0052] c.^{1}H NMR光谱

[0053] d.^{13}C NMR光谱

[0054] 图6描绘了化合物I在KRAS依赖性癌细胞系中诱导凋亡。

[0055] 图6(A)-通过荧光显微镜捕获的暴露于化合物I 24小时后的形态学变化(0nm、50nm、100nm和250nm),其中放大倍数×100,比例尺:20μm。

[0056] 图6(B)-用250nm的化合物I处理细胞24小时并且在用膜联蛋白V/碘化丙啶(PI)对细胞进行染色之后用流式细胞术定量地测量凋亡水平,并且将一式三份的数据绘制成条形图。

[0057] 图6(C)-不同的凋亡相关蛋白质(PARP、Bcl-2和Bax)的代表性蛋白质印迹数据证实在治疗(0nm、50nm、100nm和250nm)24小时后细胞凋亡的诱导。Bax/Bc12与切割的PARP的比率的密度测量显示为条形图。

[0058] 所有数据表示至少三个独立实验,并且与对照组相比呈现为平均值±SD,*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001。

[0059] 图7描绘了化合物I抑制表达KRAS突变的癌细胞。

[0060] 图7A-通过不断增加的浓度的化合物,即化合物I进行处理后的KRAS表达性癌细胞的通过细胞活力测定监测的增殖曲线。

[0061] 图7B-用IC 50浓度的化合物,即化合物I处理后KRAS突变型和野生型癌细胞的相对生长。

[0062] 数据显示为平均值±SD;相对于SKLU-1的数据通过单向ANOVA估计显著性:*=P<0.02,**=P<0.005,***=P<0.0001。

[0063] 图8描绘了化合物I的结构建模。

[0064] 图9描绘了KRAS突变细胞中化合物,即化合物I阻断的GTP-KRAS形成。

[0065] 图10描绘了化合物I抑制异种移植物模型中的肿瘤生长,并且还描绘了在体内动

物模型中的KRAS突变蛋白的蛋白质印迹分析。

[0066] 图11描绘了化合物I靶向p53(化合物I处理后6小时时细胞中p53、Puma和Noxa的mRNA水平。通过qRT-PCR对mRNA水平进行定量。数据相对于GAPDH表达归一化,并且相对于作为对照的用DMSO处理的细胞绘制)。

[0067] 图12描绘了发现化合物1以剂量依赖性方式显著抑制所有测试的突变细胞中的癌细胞活力。

[0068] 图13描绘了发现化合物1选择性地抑制KRAS G12C、G12V、G12D和G13D突变细胞中GTP-KRAS(相对于KRAS的总量)的形成。

[0069] 图14描绘了化合物1阻断了KRAS突变细胞中RAS信号传导的下游效应子。

[0070] 图15描绘了发现化合物1降解RAS并抑制干性标志物表达。

[0071] 图16描绘了在用化合物1和两种已知的KRAS G12C抑制剂处理后,KRAS G12C突变细胞系中的RAS再激活的比较。

[0072] 图17描绘了在用化合物1和两种已知的KRAS G12C抑制剂处理后,KRAS G12C突变细胞系中的细胞活力的比较。

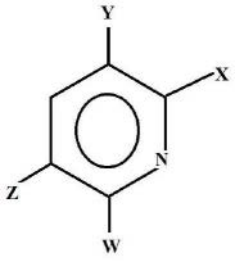
[0073] 图18描绘了PDTX动物模型中所有突变KRAS驱动的癌症的消退。用化合物1治疗示出在28天内肿瘤生长减少95%,并且6-8个月没有复发的证据。

[0074] 图19描绘了PDTX动物模型中所有突变KRAS驱动的癌症的消退。用化合物1治疗示出在28天内肿瘤生长减少95%,并且6-8个月没有复发的证据。

[0075] 图20描绘了化合物1的体内毒性研究的结果。发现与对照组相比,器官重量、体重、肝重量、血液学参数、血清电解质LFT、KFT、脂质参数为正常范围。采集的正常组织(心脏、肝脏、脾脏、骨骼肌、肾脏和肠)在用特定剂量的化合物1处理后的组织病理学未显示正常组织毒性的证据。

发明内容

[0076] 本发明公开了表现出抗癌活性的新型化合物,所述化合物用于治疗患有慢性病症的受试者,所述化合物包括根据式1的结构:

[0077] 

式1

[0078] 或其任何衍生物或其立体异构体或互变异构体、其药学上可接受的盐或其组合,其中

[0079] X为H或烷基;

[0080] Y为通过至少一个双键与经取代/未取代的同素环/杂环连接的羰基或与烷基连接的羧基;

[0081] Z为通过至少一个双键与经取代/未取代的同素环/杂环连接的羰基/羧基或烯烃

或o-烷基取代的氨基甲酸酯或与支链烷基连接的羰基;并且

[0082] W为H或酰胺基团或与支链烷基连接的羰基。

具体实施方式

[0083] 定义:

[0084] “烷基(alkyl/alkyl group)”是指具有一个至十五个碳原子并且通过单键与分子的其余部分连接的完全饱和的直链或支链烃链。除非在说明书中另有特别说明,否则烷基可以任选地经取代。

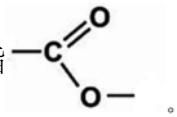
[0085] “烯烃”或“烯烃基团”是指具有二至十五个碳原子并且具有一个或多个碳-碳双键的直链或支链烃链。每个烯烃基团通过单键与分子的其余部分连接。除非在说明书中另有特别说明,否则烯烃链可以任选地经取代。

[0086] “同源环状环”是指环中具有仅一种元素(通常为碳)的至少三个原子的环状化合物。除非在说明书中另有特别说明,否则同源环状环可以任选地经取代。

[0087] “杂环状环”是指环中至少三元环状化合物具有至少两种不同元素,通常为碳,以及氮或硫或氧。除非在说明书中另有特别说明,否则杂环状环可以任选地经取代。

[0088] “杂烷基”是指具有一个至十五个碳原子并且通过单键与分子的其余部分连接的完全饱和的直链或支链烃链,其中至少一个碳由包括氮的杂原子取代。除非在说明书中另有特别说明,否则杂烷基可以任选地经取代。

[0089] “羰基”是指。

[0090] 羧基是指。

[0091] “o-烷基取代的氨基甲酸酯”是指具有在o位置处的一个至十五个碳原子取代的氨基甲酸酯基团的完全饱和的直链或支链烃链。

[0092] “氨基甲酸酯”基团是指-HNCOO-。

[0093] 本文所使用的术语“取代的”意指上述基团中的任一种,其中至少一个氢原子被与非氢原子的键取代。如本文所使用的,符号“”(以下可以称为“连接键的点”)表示作为两个化学实体之间的连接点的键,其中一个被描绘为与连接键的点连接,并且另一个未被描绘为与连接键的点连接。

[0094] 本文所提供的具有同一分子式但其原子的连接类型或顺序或其原子的空间布置有所不同的化合物被称为“同分异构体”。原子空间布置不同的同分异构体被称为“立体异构体”。本公开的化合物也可以以不同互变异构形式存在。术语“互变异构体”是指其结构同分异构体是可相互转化的。例如,在一个变型中,本文所提供的化合物可以表现出酮-烯醇互变异构性。在另一个变体中,本文所提供的化合物可以表现出亚胺-烯胺互变异构性。

[0095] “药学上可接受的盐”在适当时包含药学上可接受的碱添加盐和酸添加盐。如本文所使用的,术语“药学上可接受”推断盐不是生物学的或以其它方式不期望的;例如,材料可以添加到药物组合物中并施用于受试者,而不引起显著的不良作用。

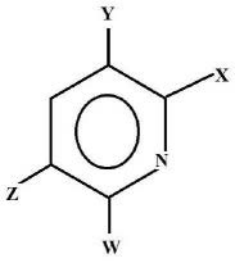
[0096] 应用于剂量或量的术语“治疗有效”是指足以在施用于有需要的患者之后产生期望的临床益处的化合物或药物调配物的量。应当理解,有效量可以是一个或多个剂量,例如,可能需要单剂量或多剂量才能达到期望的治疗终点。

[0097] 如本文所使用的,术语“治疗(treating/treatment)”是指用于获得有益或期望结果-例如,临床结果的方法或程序。有益或期望的结果可以包含:(1)减轻由疾病、病症或病状引起或与之相关的一种或多种症状;(2)降低疾病、病症或病状的程度;(3)减缓或停止由疾病、病症或病状引起或相关的一种或多种症状的发展或进展(例如,稳定疾病、病症或病状);以及(4)例如通过引起一种或多种临床症状的消退来缓解疾病(例如,改善疾病状态、增强另一种药物的作用、延迟或停止疾病的进展、提高生活质量和/或延长存活率)。

[0098] 在以下详细描述中,参考了附图,所述附图形成详细描述的一部分。在附图中,除非上下文另有说明,否则类似的符号通常标识类似的组件。在详细说明、附图以及权利要求中所描述的说明性实施例并不旨在是限制性的。在不脱离本文提出的主题的精神或范围的情况下,可以利用其它实施例,并且可做出其它改变。容易理解的是,如本文总体描述的和在附图中示出的,本公开的各方面可以按各种不同的配置来布置、替换、组合、分离和设计,在本文中明确设想了所有这些配置。

[0099] 本发明公开了用于治疗患有慢性病症的受试者的表现出抗癌活性的新型化合物。

[0100] 在优选实施例之一中,本发明公开了表现出抗癌活性的新型化合物,所述化合物用于治疗患有慢性病症的受试者,所述化合物包括根据式1的结构:

[0101] 

式1

[0102] 或其任何衍生物或其立体异构体或互变异构体、其药学上可接受的盐或其组合,

[0103] 其中

[0104] X为H或烷基;

[0105] Y为通过至少一个双键与经取代/未取代的同素环/杂环连接的羰基或与烷基连接的羧基;

[0106] Z为通过至少一个双键与经取代/未取代的同素环/杂环连接的羰基/羧基或烯烃或o-烷基取代的氨基甲酸酯或与支链烷基连接的羰基;并且

[0107] W为H或酰胺基团或与支链烷基连接的羰基。

[0108] 根据本发明,在式1化合物中,X选自包含H或C_1-C_5烷基的组。

[0109] 根据本发明,在式1化合物中,Y选自包括以下的组:

[0110] i.与环戊-3-烯连接的羰基;

[0111] ii.与C_1-C_5烷基连接的羧基;

[0112] iii.与5氨基甲酰基,4,5二氢1H吡咯连接的羰基;

[0113] iv.与4,5二氢1H吡咯2氨基甲酰基连接的羰基。

[0114] 根据本发明,在式1化合物中,Z选自包括以下的组:

[0115] i.氨基甲酸o-C_1-C_5烷基酯;

[0116] ii.与5氨基甲酰基,2,3,二氢1H吡咯连接的羰基;

[0117] iii.与吡啶连接的羧基;

[0118] iv.C_1-C_5烯烃;

[0119] v.与C_1-C_6支链烷基连接的羰基。

[0120] 根据本发明,在式1化合物中,W选自包括以下的组:H或与C_1-C_5支链烷基连接的羰基。

[0121] 根据本发明,在式1化合物中,

[0122] X为H;

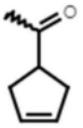
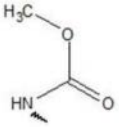
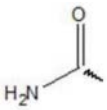
[0123] Y为与环戊-3-烯连接的羰基;

[0124] Z为氨基甲酸o-甲酯;

[0125] W为酰胺基团。

[0126] 根据本发明,在式1化合物中,

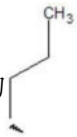
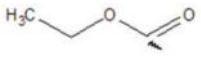
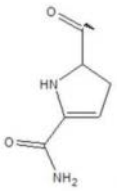
[0127] X为H;

[0128] Y为 Z为 W为 根据本发明,在式1化合物中,X为丁基;

[0129] Y为与乙基连接的羧基;

[0130] Z为与5氨基甲酰基,2,3,二氢1H吡咯连接的羰基;W为H。

[0131] 根据本发明,在式1化合物中,

[0132] X为 Y为 Z为 W为H。

[0133] 根据本发明,在式1化合物中,

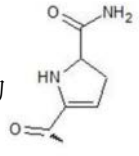
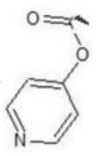
[0134] X为H;

[0135] Y为与5氨基甲酰基,4,5二氢1H吡咯连接的羰基;Z为与吡啶连接的羧基;

[0136] W为H。

[0137] 根据本发明,在式1化合物中,

[0138] X为H;

[0139] Y为 Z为 W为H。

[0140] 根据本发明,在式1化合物中,

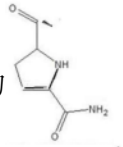
[0141] X为H;

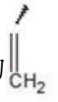
[0142] Y为与4,5二氢1H吡咯2氨基甲酰基连接的羰基;Z为亚乙基;

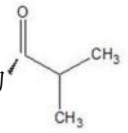
[0143] W为与仲丙基连接的羰基。

[0144] 根据本发明,在式1化合物中,

[0145] X为H;

[0146] Y为;

[0147] Z为;

[0148] W为。

[0149] 根据本发明,在式1化合物中,

[0150] X为H;

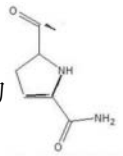
[0151] Y为与4,5二氢1H吡咯2氨基甲酰基连接的羰基;

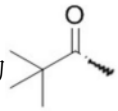
[0152] Z为与叔丁基连接的羰基;

[0153] W为H。

[0154] 根据本发明,在式1化合物中,

[0155] X为H;

[0156] Y为;

[0157] Z为;

[0158] W为H。

[0159] 在另外的优选实施例中,本发明公开了有效量的药物组合物,所述有效量的药物组合物包括上文所描述的化合物之一或其立体异构体或互变异构体以及其药学上可接受的载体。

[0160] 在另一个优选实施例中,本发明公开了一种制品,其包括:(i)有效量的上文所描述的化合物中的任一种或其立体异构体或互变异构体或上文所描述的药物组合物;以及(ii)用于治疗由KRAS介导的疾病、病症或病状的说明书。

[0161] 根据本发明,在所述制品中,KRAS包括G12C突变体、G12D突变体、G13D突变体或G12V突变体或其任何组合。

[0162] 根据本发明,在所述制品中,所述疾病、病症或病状是癌症。

[0163] 根据本发明,在所述制品中,所述癌症是非小细胞肺癌、结直肠癌、三阴性乳腺癌或胰腺癌或其任何组合。

[0164] 在又另一个实施例中,本发明公开了一种试剂盒,其包括:(i)有效量的上文所描述的化合物中的任一种或其立体异构体或互变异构体或上文所描述的药物组合物;以及(ii)用于治疗由KRAS介导的疾病、病症或病状的说明书。

[0165] 根据本发明,在所述试剂盒中,KRAS包括G12C突变体、G12D突变体、G13D突变体或G12V突变体或其任何组合。

[0166] 根据本发明,在所述试剂盒中,所述疾病、病症或病状是癌症。

[0167] 根据本发明,在所述试剂盒中,所述癌症是非小细胞肺癌、结直肠癌、三阴性乳腺癌或胰腺癌或其任何组合。

[0168] 在另一个优选实施例中,本发明公开了一种调节、抑制或降解细胞中的KRAS的方法,或前述的任何组合,所述方法包括使所述细胞暴露于(i)有效量的上文所描述的化合物中的化合物或其立体异构体或互变异构体,或上文所描述的药物组合物。

[0169] 根据本发明,在上文所描述的方法中,KRAS包括G12C突变体、G12D突变体、G13D突变体或G12V突变体或其任何组合。

[0170] 在另一个优选实施例中,本发明公开了一种治疗有需要的受试者的由KRAS介导的疾病、病症或病状的方法,所述方法包括向所述受试者施用:(i)有效量的上文所描述的化合物或其立体异构体或互变异构体或上文所描述的药物组合物。

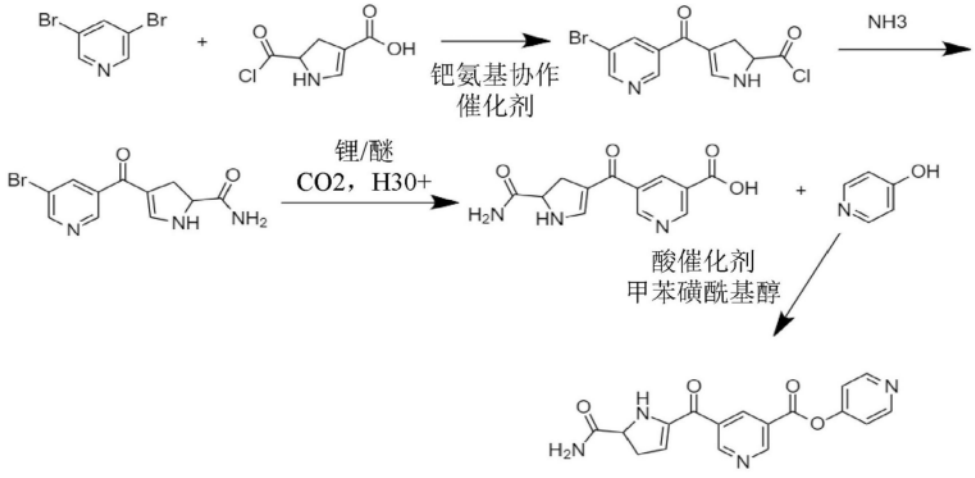
[0171] 根据本发明,在上文所讨论的方法中,KRAS包括G12C突变体、G12D突变体、G13D突变体或G12V突变体或其任何组合。

[0172] 根据本发明,在上文所讨论的方法中,所述疾病、病症或病状是癌症。

[0173] 根据本发明的,在上文所讨论的方法中,所述癌症是非小细胞肺癌、三阴性乳腺癌、结直肠癌或胰腺癌或其任何组合。

[0174] 式1化合物的化学结构可以基于本文所提供的示例结构通过常规化学制备。

[0175] 在一个实施例中,示例性化合物II可以通过下文提供的方案I制备:



[0176] 方案I

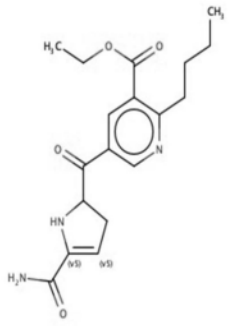
[0177] 合成的式1化合物接下来经受分子表征,以确定化合物的结构。

[0178] 分子表征:

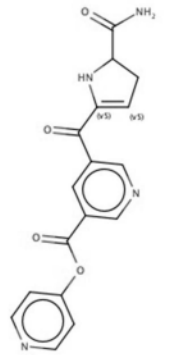
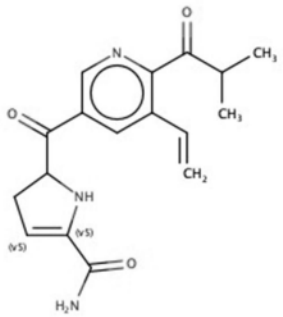
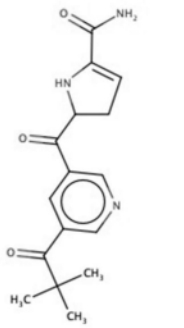
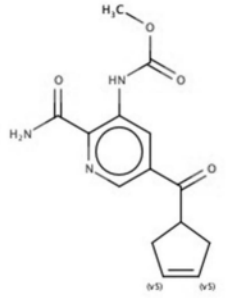
[0179] 通过熔点、薄层色谱法、HPLC、IR、^{13}C、质谱法和NMR分析验证合成产物的纯度。根据图1-5,合成的式1化合物的结构阐述为化合物I至V,如以下表1所示。

[0180] 表1:

[0181]

化合物	结构
1	

[0182]

2	
3	
4	
5	

[0183] 在一些实施例中,式1化合物和化合物I-V可以涵盖顺式和反式同分异构体。在一些实施例中,式1化合物和化合物I-V可以是顺式和反式同分异构体的混合物。在一些实施例中,式1化合物和化合物I-V可以是顺式同分异构体。在一些实施例中,式1化合物和化合物V可以是反式同分异构体。

[0184] 在一些实施例中,式1化合物和化合物I-V可以涵盖R或S立体异构体以及立体异构体的混合物。在一些实施例中,式(I)化合物可以涵盖外消旋同分异构体和对映体同分异构体两者。

[0185] 本发明的化合物可以用于执行或提供本文所描述的生物学功能中的任一种。

[0186] 药物组合物

[0187] 本公开还包含包括治疗有效量的本文所公开的一种或多种化合物的药物组合物。在一些实施例中,药物组合物包括治疗有效量的一种或多种式1化合物或其药学上可接受的盐。在其它实施例中,药物组合物包括治疗有效量的选自表1的一种或多种化合物或其药学上可接受的盐。在一些实施例中,前述药物组合物进一步包括一种或多种药学上可接受的赋形剂。

[0188] 在各个方面,式1化合物(包含表1中的化合物)或其药学上可接受的盐的量可以以约0.001mg/kg至约100mg/kg体重(例如,约0.01mg/kg至约10mg/kg或约0.1mg/kg至约5mg/kg)施用。在一些实施例中,本文的化合物以约200mg/kg至约2000mg/kg—例如,以约200mg/kg、约500mg/kg、约1000mg/kg或约2000mg/kg施用。在一些实施例中,本文的化合物以约100mg/kg至约600mg/kg—例如,以约100mg/kg、约200mg/kg、约300mg/kg、约450mg/kg或约600mg/kg施用。

[0189] 所公开的化合物在药学上可接受的混合物中的浓度将根据若干因素而变化,包含要施用的化合物的剂量、所采用的化合物的药代动力学特性和施用途径。药剂可以以单剂量或重复剂量施用。利用本发明的化合物的剂量方案是根据多种因素选择的,包含患者的类型、种类、年龄、体重、性别和医疗状况;要治疗病状的严重程度;施用途径;患者的肾和肝功能;以及所采用的特定化合物或其盐。治疗可以每天施用一次或根据许多因素更频繁地施用,包含患者的整体健康状况,以及所选化合物的调配物和施用途径。

[0190] 本公开的化合物或药物组合物可以以单个或多个单位剂量形式制造和/或施用。

[0191] 本公开的化合物或药物组合物可以以单个或多个单位剂量形式制造和/或施用。

[0192] 本公开的化合物或药物组合物可以通过各种方法施用,包含例如经口、直肠、颊、鼻内和透皮途径。在某些实施例中,药物组合物可以静脉内、腹膜内、肠胃外、肌肉内、皮下、口服、局部或作为吸入剂施用。

[0193] 本公开的化合物和药物组合物可以以一般接受的口服组合物的任何形式(例如,片剂、包衣片剂、软壳或软壳中的凝胶胶囊、乳液或悬浮液)施用于个体。

[0194] 治疗方法:

[0195] 本文还提供了治疗有需要的人的慢性病症的方法,所述方法包括向所述人施用式1、(I)、(II)、(III)、(IV)或(V)化合物,包含例如,化合物1-5或其药学上可接受的盐。在一些实施例中,本公开的化合物(式1化合物和表1中的化合物)施用于患有慢性病状的患者。

[0196] 在一些实施例中,本文提供了一种调节、抑制或降解细胞中的KRAS或其任何组合的方法,所述方法包括将所述细胞暴露于:(i)有效量的式1、(I)、(II)、(III)、(IV)或(V)化

合物,包含例如,化合物1-5或其立体异构体或互变异构体,或前述任一种的药学上可接受的盐;或(ii)药物组合物,其包括有效量的式1、(I)、(II)、(III)、(IV)或(V)化合物,包含例如,化合物1-5或其立体异构体或互变异构体,或前述任一种的药学上可接受的盐,以及一种或多种药学上可接受的赋形剂。在前述的一些实施例中,提供了调节细胞中的KRAS的方法。在一些实施例中,提供了抑制细胞中的KRAS的方法。在仍其它实施例中,本文提供了降解细胞中的KRAS的方法。在一些实施例中,本文提供了调节和降解细胞中的KRAS的方法。在一些实施例中,本文提供了抑制和降解细胞中的KRAS的方法。在前述的一些实施例中,KRAS包括G12C突变体、G12D突变体、G13D突变体或G12V突变体或其任何组合。在一些实施例中,KRAS包括G12C突变体。

[0197] 在一些实施例中,本文提供了一种治疗有需要的受试者的由KRAS介导的疾病、病症或病状的方法,所述方法包括向所述受试者施用:(i)有效量的式1、(I)、(II)、(III)、(IV)或(V)化合物,包含例如,化合物1-5或其立体异构体或互变异构体,或前述任一种的药学上可接受的盐;或(ii)药物组合物,其包括有效量的式1、(I)、(II)、(III)、(IV)或(V)化合物,包含例如,化合物1-5或其立体异构体或互变异构体,或前述任一种的药学上可接受的盐,以及一种或多种药学上可接受的赋形剂。

[0198] 在一些实施例中,本文所描述的治疗方法导致受试者的靶病灶的直径的总和的变化(%)。在一些实施例中,在治疗后第1天、第14天、第21天、第28天或6个月或前述的任何组合(至多6个周期)测量变化。在一些实施例中,在治疗的第21天测量变化(至多6个周期)。

[0199] 在一些实施例中,本文所描述的治疗方法导致受试者的循环肿瘤细胞数量减少。在一个变型中,在治疗后至多6个月,所述治疗方法导致患有乳腺癌、胰腺癌或非小细胞肺癌的受试者的循环肿瘤细胞数量减少。

[0200] 在一些实施例中,本文所描述的治疗方法导致受试者的一种或多种凋亡标志物的水平变化。在一些实施例中,本文所描述的治疗方法导致受试者的一种或多种炎症标志物的水平变化。在一些实施例中,本文所描述的治疗方法导致受试者的一种或多种途径标志物的水平变化(如通过免疫组织化学(IHC)测定的)。在一些实施例中,本文所描述的治疗方法导致受试者的免疫应答变化。例如,在一些实施例中,本文所描述的治疗方法导致产生干扰素γ(IFN)的T细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)应答、细胞因子(IFN、IL-4、IL-10)或激活标志物或其任何组合的水平变化。在前述的一些变型中,可以在治疗后第1天、第14天、第21天、第28天或6个月或前述的任何组合(至多6个周期)测量变化。

[0201] 在前述的一些实施例中,所述疾病、病症或病状由KRAS G12C突变体、KRAS G12D突变体、KRAS G13D突变体或KRAS G12V突变体或其任何组合介导。在一些实施例中,所述疾病、病症或病状由KRAS G12C突变体介导。在前述的一些实施例中,所述疾病、病症或病状是癌症。

[0202] 在本发明的一些实施例的上下文中,术语“慢性病症”或术语“疾病、病症或病状”是指但不限于急性成淋巴细胞性、急性成淋巴细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性髓细胞性白血病、急性髓性白血病、肾上腺皮质癌、AIDS相关淋巴瘤、肛门癌、阑尾癌、基底细胞癌、膀胱癌、脑癌、脑干胶质瘤、乳腺癌、支气管腺瘤/类癌、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、类癌瘤、小脑或脑星形细胞瘤、宫颈癌、胆管癌、软骨肉瘤、慢性成淋巴细胞性或慢性成淋巴细胞性白血病、慢性骨髓性或慢性髓性白血病、慢性骨髓增殖性病症、结肠癌、

皮肤t细胞淋巴瘤、促纤维增生性小圆细胞肿瘤、子宫内膜子宫癌、室管膜瘤、食管癌、尤文氏肉瘤(Ewing's sarcoma)、颅外生殖细胞瘤、性腺外生殖细胞瘤、肝外胆管癌、胆囊癌、胃癌、胃肠道类癌、胃肠道基质肿瘤(GIST)、妊娠滋养细胞肿瘤、脑干胶质瘤、毛细胞白血病、头颈癌、心脏癌、肝细胞性(肝)癌、霍奇金淋巴瘤(Hodgkin lymphoma)、下咽癌、下丘脑和视觉通路胶质瘤、眼内黑色素瘤、胰岛细胞癌、卡波西肉瘤(Kaposi sarcoma)、喉癌、白血病、唇部和口腔癌、脂肪肉瘤、淋巴瘤、男性乳腺癌、恶性间皮瘤、成神经管细胞瘤、黑色素瘤、默克尔细胞皮肤癌(Merkel cell skin carcinoma)、间皮瘤、转移性鳞状颈癌、口腔癌(mouth cancer)、多发性内分泌瘤变综合征、多发性骨髓瘤、多发性骨髓瘤/浆细胞肿瘤、蕈样肉芽肿病、骨髓增生异常/骨髓增生性疾病、鼻腔和副鼻窦癌、鼻咽癌、成神经细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma)、非黑瘤皮肤癌、非小细胞肺癌、少突胶质细胞瘤、口腔癌(oral cancer)、口咽癌、骨肉瘤和恶性纤维组织细胞瘤、卵巢癌、卵巢生殖细胞肿瘤、卵巢上皮癌(表面上皮-间质瘤)、卵巢低恶性潜在肿瘤、胰腺癌、副鼻窦和鼻腔癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、咽喉癌、嗜铬细胞瘤、松果体星形细胞瘤、松果体生殖细胞瘤、松果体母细胞瘤和幕上原始神经外胚层肿瘤、垂体腺瘤、浆细胞瘤、胸膜肺母细胞瘤、原发癌、原发性中枢神经系统淋巴瘤、原发性肝癌、前列腺癌、直肠癌、肾细胞癌、肾盂和输尿管癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、塞扎里综合征(Sezary syndrome)、小细胞肺癌、小肠癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃癌、幕上原始神经外胚层肿瘤、睾丸癌、喉癌、胸腺瘤和胸腺癌、甲状腺癌、肾盂和输尿管移行细胞癌、尿道癌、子宫肉瘤、阴道癌、视觉通路和下丘脑胶质瘤、会阴癌、华氏巨球蛋白血症(Waldenstrommacroglobulinemia)、威尔姆氏瘤(Wilms tumor)、帕金森氏病(Parkinson'sdisease)和帕金森病症(Parkinsonian disorder)、亨廷顿氏病(Huntington'sdisease)、阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease)、多发性硬化症、肌萎缩性脊髓侧索硬化症、希-德二氏综合征(Shy-Drager syndrome)、进行性核上性麻痹、路易体症(Lewy body disease)、脊髓缺血、脊髓损伤、缺血性卒中、脑梗死、脊髓损伤和癌症相关脑和脊髓损伤、多发脑梗死性痴呆、老年痴呆、其它认知障碍、抑郁、甲癣(指甲真菌感染)、牙龈炎以及牙周病(牙龈病)、肥胖和糖尿病。在一些实施例中,所述疾病、病症或病状是非小细胞肺癌、三阴性乳腺癌或胰腺癌或其任何组合。式1、(I)、(II)、(III)、(IV)或(V)化合物,包含化合物1-5中的任何一种或多种,或其药学上可接受的盐,也可以证明在治疗SARS和COVID-19以及治疗不同癌症(如上述列表中所描述的癌症)中的KRAS癌基因突变方面有用。

[0203] 在一些实施例中,慢性病状是癌症。在一些实施例中,癌症是结肠癌、前列腺癌、乳腺癌或白血病。在一些实施例中,癌症是4期癌症。在一些实施例中,结肠癌、前列腺癌、乳腺癌或白血病是4期。在一些实施例中,慢性病状是不同癌症中的KRAS癌基因突变。

[0204] 在某些实施例中,本文所描述的方法、化合物和组合物与以下中的一种或多种组合施用:其它抗体分子;化疗;其它抗癌疗法(例如,靶向抗癌疗法、基因疗法、病毒疗法、RNA疗法、骨髓移植、纳米疗法或溶瘤性药物);细胞毒性剂;基于免疫的疗法(例如,细胞因子或基于细胞的免疫疗法);外科手术(例如,乳房肿瘤切除术或乳房切除术)或放射手术;或前述任一项的组合。

[0205] 可替代地或与前述组合组合,本文所描述的方法和组合物可以与以下中的一种或多种组合施用:疫苗,例如,治疗性癌症疫苗;或其它形式的细胞免疫疗法。

[0206] 在一些实施例中,本文提供了如本文其它地方所描述的化合物或药物组合物在本文其它地方所描述的任何方法中的用途。在其它实施例中,本文提供了如本文其它地方所描述的化合物或药物组合物,其用于制造在本文其它地方所描述的任何方法中使用的药物。在其它实施例中,本文提供了如本文其它地方所描述的化合物或药物组合物,其用于本文所描述的任何方法。

[0207] 本发明旨在发明可以靶向活性位点上的突变KRAS的强大治疗性小分子。在此鉴定了结合KRAS的GTP/GDP结合袋的小分子化合物I。出于此目的,研究了表达KRAS突变的较大组肿瘤细胞系之间的测量强相关性,并分析了抑制肿瘤细胞生长激活的RAS的效力。如通过集落形成和凋亡测定所证明,化合物I的生长抑制作用是持续且不可逆的。化合物I在体外对KRAS具有良好的结合亲和力,并且在致癌的表达KRAS的细胞系中表现出选择性细胞毒性,并且对正常细胞系没有或具有最小的毒性作用。进一步的机制研究表明,化合物I可以在体外阻断鸟苷三磷酸(GTP)和KRAS的复合物的形成。此外,化合物I抑制KRAS下游信号传导途径RAF/MEK/ERK和RAF/PI3K/AKT。如通过DNA含量和磷酸组蛋白H3B免疫荧光的细胞周期分析测量的,化合物I诱导有丝分裂停滞。进一步分析揭示,化合物I干扰有丝分裂诱导蛋白PLK1到核糖核的定位,并且减少其底物Cdc25C的核定位,所述Cdc25C是有丝分裂进入和出口检查点两者都涉及的RAS-RAF信号传导的下游靶标。化合物I还抑制PD-L1表达并激活抗肿瘤免疫,这可以有助于其抗肿瘤活性,并且提示与免疫疗法组合的潜在益处。根据这些研究,鉴定了新型的RAS抑制剂,其通过破坏下游信号传导而有效且选择性地抑制RAS驱动的肿瘤生长,从而导致细胞周期停滞和凋亡。因此,化合物I可以被视为用于治疗携带KRAS癌基因的癌细胞的潜在KRAS抑制剂。

[0208] 制品

[0209] 本文还提供了制品,其中所述制品包括在合适的容器中的式1、(I)、(II)、(III)、(IV)或(V)化合物,或其任何变型或实施例,如本文其它地方所描述,包含例如,化合物1-5或其立体异构体或互变异构体,或前述中任一项的药学上可接受的盐。本文还提供了制品,其包括在合适的容器中的药物组合物,所述药物组合物包括式1、(I)、(II)、(III)、(IV)或(V)化合物,或其任何变型或实施例,如本文其它地方所描述,包含例如,化合物1-5或其立体异构体或互变异构体,或前述中任一项的药学上可接受的盐。容器可以是小瓶、罐、安瓿瓶、预装载注射器或静脉内袋。

[0210] 本公开进一步提供了用于执行本发明的方法的试剂盒。试剂盒可以包括如本文所描述的化合物或其药学上可接受的盐和合适的包装。试剂盒可以包括一个或多个包括本文所描述的任何化合物的容器。一方面,试剂盒包含本公开的化合物或其药学上可接受的盐,以及用于在治疗本文所描述的疾病或病症中使用化合物的标签和/或说明书。试剂盒可以包括化合物的单位剂型。

[0211] 本文提供了包括以下的制品(如试剂盒):(i)有效量的式1、(I)、(II)、(III)、(IV)或(V)化合物,包含例如,化合物1-5或其立体异构体或互变异构体,或前述中任一项的药学上可接受的盐;以及(ii)用于治疗由KRAS介导的疾病、病症或病状的说明书。本文还提供了包括以下的制品(如试剂盒):(i)药物组合物,其包括有效量的式1、(I)、(II)、(III)、(IV)或(V)化合物,包含例如,化合物1-5或其立体异构体或互变异构体,或前述中任一项的药学上可接受的盐,以及一种或多种药学上可接受的赋形剂;以及(ii)用于治疗由KRAS介导的

疾病、病症或病状的说明书。

[0212] 实例

[0213] 生物实例1

[0214] 化合物1诱导KRAS依赖性癌细胞系中的凋亡(图6)

[0215] 使化合物1经受癌症诱导模型,并确定观察到的生长抑制是由于细胞凋亡还是坏死。如图6a所示,在用化合物1处理之后,突变KRAS细胞系的细胞形态以浓度依赖性方式变化,一定比例的细胞从培养皿中分离并聚拢,这些都是预测性凋亡特征。接下来,应用标准Annexin V-FITC/PI染色,随后进行流式细胞术分析,定量测量凋亡和坏死细胞的百分比。结果显示,当与未经处理的细胞相比时,化合物1显著诱导突变癌细胞中的凋亡(图6C)。此外,为了检查KRAS突变细胞中的化合物诱导的凋亡,通过蛋白质印迹分析若干种充分表征的凋亡蛋白的表达水平。结果显示,在化合物1处理的细胞中观察到促凋亡蛋白Bax的表达增加和抗凋亡Bcl-2的表达减少。另外,化合物1处理实现PARP切割的诱导(图6B),这也与凋亡一致。Bax/Bcl2蛋白表达和PARP切割相对于GAPHD的比率的密度测定法定量在图6B中显示为条形图。总而言之,这些结果揭示化合物1诱导KRAS突变细胞系中的凋亡。

[0216] 生物实例2

[0217] 化合物1抑制表达KRAS突变体的癌细胞(图7和12)

[0218] 进一步研究表明,如果化合物1也可以诱导对表达KRAS突变的其它癌细胞的细胞毒性作用,则选择一组分别含有KRAS G12D、G12V和G12C点突变的癌细胞系,并与KRAS野生型(WT)对照一起使用。如图7所示,在用化合物1处理24小时后,化合物1以剂量依赖性方式显著抑制了所有突变细胞中的癌细胞和干细胞活力,并且发现IC50值为毫摩尔浓度。类似地,在正常细胞系中观察到最小毒性。总而言之,来自细胞系研究的数据表明,化合物化合物1更有效地抑制通过KRAS的信号传导,这与其与激活的KRAS的紧密结合以及对KRAS-Raf交互的影响一致。

[0219] 最初在具有野生型(WT)KRAS或已知KRAS突变的30+个细胞系的组中评估化合物1的细胞毒性。发现化合物1以剂量依赖性方式显著抑制所有突变细胞中的癌细胞活力。发现化合物1的IC50值为微摩尔至纳米摩尔浓度(参见图12)。

[0220] 生物实例3

[0221] KRAS蛋白的GTP/GDP结合袋中化合物1的结构建模。(图8)

[0222] 化合物1与具有高亲和力的WT和致癌的KRAS突变体结合。图8示出了化合物化合物1与KRAS的化学结构和预测复合物,表明配体可能与p1袋中的残基形成多重有利相互作用。

[0223] 生物实例4

[0224] 化合物化合物1阻断KRAS突变细胞中的GTP-KRAS形成(图9和13)

[0225] 实际上,突变KRAS会干扰GEF与GAP之间的平衡,产生活性GTP结合的KRAS状态锁定以及其下游信号传导的异常刺激。因此,KRAS抑制剂应减少GTP-KRAS的形成以破坏突变KRAS功能。为了了解化合物化合物1是否可以抑制KRAS的激活,进行了RAS激活测定以检查在24小时时用一系列浓度的化合物化合物1处理后,在k-RAS突变细胞细胞中GTP结合KRAS的形成,与KRAS的总量相比,化合物化合物1处理抑制了KRAS突变细胞中GTP-KRAS的形成,这表明此小分子可以部分挽救由突变KRAS引起的这种不平衡。

[0226] 发现化合物1抑制KRAS G12C、G12V、G12D和G13D突变细胞中GTP-KRAS(相对于KRAS

的总量)的形成。发现化合物1选择性地靶向KRAS的突变形式,并且在具有野生型(WT)KRAS的细胞中没有观察到任何作用(参见图13)。

[0227] 生物实例5

[0228] 化合物1抑制KRAS下游信号传导途径的激活(图9和14)

[0229] 活性KRAS刺激下游信号传导途径,特别是对于RAF/MEK/ERK和RAF/PI3K/AKT途径,并且然后诱导细胞增殖。因此,为了研究化合物1的作用,检测了细胞系中CRAF、AKT和ERK的磷酸化水平,以监测用此化合物处理48小时后KRAS信号传导的影响。如所预期的,分子在KRAS突变细胞系中以时间依赖性方式降低CRAF和AKT的磷酸化水平(图9和14),这指示分子可以通过抑制其下游信号传导途径来阻断致癌的KRAS功能。

[0230] 生物实例6

[0231] 化合物1抑制异种移植模型中的肿瘤生长(图10)

[0232] 接下来评估化合物1在突变KRAS上下文中的体内功效。将细胞注射到裸小鼠中,并且使肿瘤生长至约60mm^{3}大小,并且每天用化合物1处理,持续14-21天。图10示出了化合物1从第9天开始抑制肿瘤生长,并且当与经媒剂处理的对照相比时,在第10天至第14天表现出显著抑制。在采集当天,测定净肿瘤质量,并且化合物1治疗组的平均肿瘤重量比对照组的平均瘤重量低89%。用化合物1处理后,小鼠(n=6)没有表现出显著的体重减轻或明显的毒性。进一步检查了化合物1处理对来自经媒剂和化合物1处理的肿瘤的蛋白质提取物中KRAS介导的RAF、MEK/ERK和PI3K/AKT级联的影响。与体外数据一致,观察到CRAF、ERK和AKT磷酸化的显著抑制。免疫组织化学分析还显示,用化合物1处理降低了ERK和AKT磷酸化的水平,这指示化合物1诱导的生长抑制与KRAS介导的信号传导抑制相关。此外,对来自经化合物1处理的小鼠的肿瘤的免疫组织化学分析显示出如Ki-67染色所指示的细胞增殖显著减少,以及如切割的胱天蛋白酶-3染色所指示的凋亡细胞显著增加。总而言之,这些数据表明化合物1在抑制KRAS驱动的肺肿瘤生长方面有效。

[0233] 生物实例7

[0234] 化合物1靶向p53(图11)

[0235] 肿瘤抑制基因TP53(更广为人知的是p53)控制若干细胞应激,包含DNA损伤、缺氧和致癌基因激活。在功能上,p53蛋白充当转录因子,并且通过与特定DNA序列结合来调节基因表达。通常,p53涉及控制涉及凋亡、衰老、细胞周期停滞的基因,并且在坏死、自噬、代谢、活性氧物质(ROS)累积和干细胞维持中起作用。p53的突变和丢失常见于多种癌症中,包含肺癌、头颈癌、膀胱癌、乳腺癌和前列腺癌。

[0236] 已表明,在雄激素依赖性和非依赖性癌细胞中,化合物1通过上调p53、Bax、Bak、PUMA、Noxa和Bim的表达并且下调Bcl-2和Bcl-XL来诱导凋亡,然而其对正常成纤维细胞、上皮细胞没有作用。另外,化合物1诱导p53易位至线粒体,并且Smac释放至细胞质,这强烈表明其癌症化学预防性质。通过改变p53及其下游蛋白(p21、细胞周期蛋白B1、CDK1、Cdc25C)和一些凋亡相关蛋白(Bcl-2、Bax、Bid、Bad、Apaf1、AIF和Cyt c),化合物1还下调了氧化应激诱导的热休克蛋白(HSP)和组蛋白脱乙酰酶6(HDAC6),这进一步导致细胞凋亡。化合物1显示出对p53突变或过度表达的体外和体内临床前模型的抑制活性。

[0237] 生物实例8

[0238] 化合物1靶向EGFR和HER2

[0239] 检查化合物1对各种突变EGFR、HER2和HER4的活性。使用MTT测定、流式细胞术和蛋白质印迹检查化合物1对不同遗传特性和相关分子机制的影响。使用具有细胞的裸小鼠异种移植模型来评估化合物1的体内抗肿瘤活性。结果表明,化合物1有效地抑制了EGFR家族成员的酶活性,包含药物敏感性EGFR突变以及EGFR C797S突变和野生型(WT)HER2。化合物1阻断EGFR磷酸化,由此下调下游PI3K/AKT和MAPK/ERK信号传导,并在不同细胞中诱导G0/G1阻滞。化合物1抑制小鼠异种移植模型中的肿瘤生长。总而言之,本研究结果表明,化合物1具有成为口服抗肿瘤药物用于治疗的潜力,并且值得进一步开发。

[0240] 由于受损的同源重组(HR)修复,BRCA1和BRCA2突变肿瘤累积DNA损伤和有利于肿瘤进展的基因组重排。为了鉴定特异性靶向BRCA2缺陷细胞的药物,已确定化合物1对BRCA1/2缺陷细胞(顺铂耐药细胞)具有特异性毒性,这表明化合物1对已对这些药物产生耐药性的疾病具有潜在的临床用途。

[0241] 表2:如通过蛋白质印迹测量的化合物1对各种乳腺细胞的IC50和对应的EGFR和HER2表达水平

[0242]

细胞系	EGFR	HER2	IC 50(μM)
MDA-MB-468	++++	-	4.21±0.30
BT-549	++	-	3.24±0.08
MDA-MB-231	+	-	4.89±0.37
HCC1937	+	-	7.52±1.26
T-47D	+	+	5.19±0.28
BT-474	-	++++	4.45±0.10
MDA-MB-453	-	++	3.65±0.44
ZR-75-1	-	+	1.69±0.14
MCF-7	-	-	2.98±0.60
MCF-10A	+++	+	105.56±3.14

[0243] ++++意指EGFR或HER2的表达非常强;+++意指EGFR或HER2的表达较强;++意指EGFR或HER2的表达为中度;+意指EGFR或HER2的表达较低;-意指无EGFR或HER2的表达。

[0244] 生物实例9

[0245] 化合物1与KRAS GTP的相互作用

[0246] 基于这些发现,新型小分子化合物1在开关I区以高亲和力与K-Ras的GTP结合袋竞争性结合,并且抑制KRAS与其下游效应子(如涉及癌细胞进展的RAF/PI3K)的结合。基于其与和KRas结合的GTP竞争的能力,阻断K-Ras信号传导,并且抑制若干KRAS肿瘤衍生人细胞系中的细胞增殖,并且还显示出与标准药物相比,28天内体内动物模型中肿瘤生长抑制降低95%,并且6-8个月的时间没有复发的证据。

[0247] 表3:化合物1与KRAS GTP的相互作用

[0248]

模式	亲和力（kcal/mol）	距 rmsd 1.b 的距离：	最佳模式 rmsdu.b
1	-7.0	0.000	0.000
2	-6.2	14.114	174.406
3	-6.1	3.631	6.019
4	-6.0	4.361	8.614
5	-5.8	12.687	17.397
6	-5.8	13.8963	17.013
7	-5.8	1.346	2.159

[0249]

8	-5.6	17.986	2.667
9	-5.6	14.986	19.948

[0250] 生物实例10

[0251] 化合物1下游信号传导野生型的影响

[0252] 在野生型KRAS中,化合物1对GTP结合亲和力没有影响,并且分子没有改变KRAS下游信号传导蛋白(如MEK、RAF和PI3K)的表达,效应子蛋白是完整的,其具有高度调节的GEF和GAP水平,这已经通过蛋白质和基因表达分析观察到。在化合物1处理中观察到免疫细胞的表达显著增加。

[0253] 表4:化合物1的影响-下游影响-野生型

[0254]

蛋白质	对照	化合物1
pCRAF	1.52±0.025	1.42±0.25
pERK	1.42±0.069	1.46±0.23
pAKt	1.89±0.63	1.72±0.14
pMEK	1.96±0.22	1.85±0.32
pP13K	1.85±0.32	1.62±0.63

[0255] 生物实例11

[0256] 图3:化合物1对RAS降解的影响

[0257] 有趣的是,化合物1通过与Wnt/β-连环蛋白途径的交叉对话机制,通过其负调节因子(如APC、轴蛋白和糖原合成酶激酶3β(GSK3))通过GSK3β磷酸化降解RAS。(图15和表5)

[0258] 表5:化合物1对RAS降解的影响

[0259]

蛋白质	对照	化合物1
GSk3β	0.69±0.02	1.89±0.23
APC	0.63±0.03	0.96±0.44
轴蛋白	0.25±0.05	1.96±0.02
β连环蛋白	1.32±0.09	0.66±0.09
RAS	1.96±0.06	0.25±0.03

[0260] 生物实例12

[0261] miR-30c和miR-21在RAS降解和癌干细胞中的作用。

[0262] 突变KRAS诱导miR-30c和miR-21的显著上调。miR-30c和miR-21被两个KRAS同种型显著上调,并且通过抑制关键肿瘤抑制基因,如NF1、RASA1、BID和RASSF8诱导药物抗性并增强细胞迁移/入侵。观察到化合物1对KRAS和野生型的突变形式的miR 30c和miR-21的表达的影响。微阵列分析显示,在化合物1的处理中,这些miR的表达显著减少,并且以突变形式

以剂量依赖性水平显著增加肿瘤抑制基因的表达,并且在野生型中没有观察到显著的表达。基于这些观察,分子靶向KRAS突变模型中的miRNA,所述模型在癌症医学中充当有吸引力的治疗工具,因为这些miRNA可以是多个基因沉默,并且因此同时关闭不同途径,这在基于蛋白质的药物和其它不同KRAS突变体形式的共价抑制剂中是不可能的,并且最终与其它标准药物相比,化合物1没有毒性或脱靶效应。

[0263] 表6:化合物1在miRNA上调中的影响

[0264]

蛋白质	对照	化合物1
miR30c	0.96±0.025	1.89±0.25
miR21	0.72±0.02	1.58±0.32
NF1	1.56±0.06	1.21±0.033
RASA1	1.69±0.36	0.32±0.031
BID	1.56±0.36	0.32±0.012

[0265] 生物实例13

[0266] 化合物1的口服生物利用度数据/交叉血脑屏障数据

[0267] 表7:化合物1的药代动力学数据

[0268]

药代动力学	Cmax = 2.6 μg/mL（10 mg/kg 小鼠体重） Cmax = 1.9 μg/mL（10 mg/kg 大鼠体重） T max = 2 小时（小鼠，10 mg/kg 体重;） T max = 2 小时（大鼠，10 mg/kg 体重;） $T_{1/2}$ = 5.8 小时（小鼠） $T_{1/2}$ = 9.8 小时（大鼠） F-92%（生物利用度）

[0269] 表8:化合物1的交叉血脑屏障数据

[0270]

生物样品	*T*1/2（小时）	*C*max（ng/g，ng/mL）	*T*max（小时）	*AUC*0-*t*_D（小时×纳克/克/毫克，小时×纳克/毫升/毫克）	*MRT*0-*t*（小时）
脑干	1.81±0.23	185.74±3.46	1.35±0.33	85.63±17.43	5.89±0.34
下丘脑	1.18±0.26	203.88±42.33	0.54±0.24	59.10±5.06	5.25±0.60
海马体	1.19±0.22	223.48±34.72	1.25±1.08	58.20±15.36	5.18±0.51
皮质	5.86±2.91	276.52±48.17	1.14±0.09	152.08±5.25	6.23±0.65
纹状体	3.45±0.93	200.02±30.90	0.14±0.09	123.81±4.90	6.75±0.68

[0271] 生物实例14

[0272] 化合物1与已知KRAS抑制剂的比较

[0273] 针对化合物1和两种已知KRAS抑制剂(AMG510和MRTX849)的施用比较RAS信号传导的再激活。在所有KRAS G12C突变细胞系中,化合物1、AMG510和MRTX849抑制作为KRAS的关键下游效应子途径的MAPK途径信号传导,如通过在4小时时抑制磷-MEK、磷-ERK和磷-AKT所测量。到24-48小时,RAS-MAPK途径信号传导在用AMG510和MRTX849处理的细胞中开始反弹,导致途径再激活以及到72小时时的pMEK、pERK、pAKT和MYC的不完全抑制。在KRAS G12C抑制后观察到的信号传导的快速和一致再激活表面适应性反馈可能具有限制这些抑制剂的功效的潜力。相反,化合物1的施用导致磷酸化形式显著减少,并且到72小没有观察到反弹活性(参见图16)。将磷-ERK、MEK、AKT和MYC的密度测量相对于GAPDH归一化。结果表示跨8个细

胞系的平均值。

[0274] 还比较了化合物1、AMG510和MRTX849对10个KRAS G12C突变细胞系的NCI板的细胞毒性作用。与AMG510和MRTX849相比,化合物1以剂量依赖性方式诱导细胞凋亡,并显示出癌细胞数量显著减少(参见图17)。

[0275] 生物实例15

[0276] 化合物1:体内肿瘤模型

[0277] 发现化合物1使免疫活性小鼠中的所有突变ARAS驱动的癌症消退。化合物1抑制的肿瘤生长从第9天开始,并且从第10-14天在所有突变KRAS表达动物模型中显示出显著抑制。还发现化合物1抑制下游信号传导。用化合物1治疗示出在28天内肿瘤生长减少95%,并且6-8个月没有复发的证据。参见图18和图19。

[0278] 生物实例16

[0279] 化合物1:毒性研究

[0280] 采集的正常组织(脑、心脏、肺、肝脏、脾脏、肾脏和肠)的组织病理学没有揭示在用特定剂量的化合物1处理后的正常组织毒性的证据。对骨髓的血细胞(WBC、RBC和PLT)、肾脏的RFT和肝脏功能的ALT/AST的测试所提供的结果均在正常范围。参见图20。

[0281] 生物实例17

[0282] 化合物1:临床试验方案

[0283] 此研究是一项开放标签、两部分、首次人体(FIH)剂量探索性研究,其旨在确定化合物1在患有晚期或转移性实体瘤的患者中的安全性、耐受性、药代动力学(PK)、药效学(PD)和概念验证(POC)。本研究由两种组份组成:

[0284] 第1部分:患有晚期或转移性实体瘤的患者的剂量递增,包含化合物1剂量水平。此研究计划从50mg开始递增剂量,随后为100mg、200mg、300mg、450mg和600mg,作为暂时指定的递增剂量组。第1部分总共招募了大约11至24名患者,涵盖5个剂量水平。

[0285] 主要目的是确定化合物1的安全性和耐受性,并定义适当的剂量,用于第2部分中的进一步评估。

[0286] 本研究从加速滴定剂量递增方案开始,前2个剂量水平的每个队列招募一名可评估患者;等待安全信号,随后是经典的3+3设计。

[0287] 第2部分:剂量扩展,其中至少3个平行的患有晚期非小细胞肺癌(NSCLC)、三阴性乳腺癌(TNBC)和胰腺癌(PANC)的患者组以推荐的化合物1的2期剂量(RP2D)治疗,以进一步表征化合物1的安全性、耐受性、PK、PD和抗肿瘤活性。

[0288] 第2部分中的3个平行的患者组(NSCLC、TNBC、PANC)中的每个组招募大约18名(15名可评估)患者。

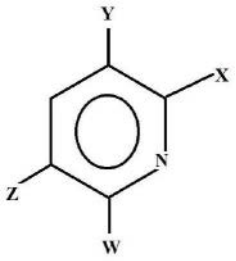
[0289] 通过每天一次连续给药施用化合物1,其中剂量递增至最大耐受剂量(MTD),直到进展或停止。本研究的每个周期持续28天。本研究可以延长至多6个周期,以确认安全性和有效性。

[0290] 从以上生物实例可以清楚地推断,化合物1作为一类新的KRAS,选择性地靶向GTP/GDP结合袋。化合物1至5与KRAS的结合可能通过防止从GTP裂解成GDP来促进GTP-KRAS的累积。化合物1至5诱导的突变KRAS的超激活促进突变KRAS癌细胞中的凋亡细胞死亡。将结果与详细的结构分析相结合,能够描述与活性相关的关键配体-受体相互作用。因此,表明筛

选技术在产生对细胞中的信号传导具有影响的KRAS结合剂方面非常成功。据知,化合物化合物1是KRAS的第一个已知的纳摩尔结合剂,其破坏与CRaf的相互作用,使p-ERK水平降低并且细胞增殖。因此,化合物,即化合物1对于开发新型非共价KRAS抑制剂来说是很有前景的苗头化合物(hit)。这种新型抗癌药物的开发为治疗具有KRAS突变的癌症和/或突变KRAS驱动的癌症提供了潜在有效的策略。此外,化合物1抑制KRAS GTP,并且通过泛素介导的途径通过导致程序性细胞死亡的miR 30c和miR 21调节激活通过GSK3β的降解。

[0291] 本申请涉及如下技术方案:

[0292] 方案1.一种表现出抗癌活性的新型化合物,所述化合物用于治疗患有慢性病症的受试者,所述化合物包括根据式1的结构:

[0293] 

式1

[0294] 或其任何衍生物或其立体异构体或互变异构体、其药学上可接受的盐或其组合,

[0295] 其中:

[0296] X为H或烷基;

[0297] Y为通过至少一个双键与经取代/未取代的同素环/杂环连接的羰基或与烷基连接的羧基;

[0298] Z为通过至少一个双键与经取代/未取代的同素环/杂环连接的羰基/羧基或烯烃或o-烷基取代的氨基甲酸酯或与支链烷基连接的羰基;并且

[0299] W为H或酰胺基团或与支链烷基连接的羰基。

[0300] 2.根据方案1所述的化合物,其中X选自包括以下的组:

[0301] H或C_1-C_5烷基。

[0302] 3.根据方案1所述的化合物,其中Y选自包括以下的组:

[0303] i.与环戊-3-烯连接的羰基;

[0304] i.与C_1-C_5烷基连接的羧基;

[0305] ii.与5氨基甲酰基,4,5二氢1H吡咯连接的羰基;

[0306] iii.与4,5二氢1H吡咯2氨基甲酰基连接的羰基。

[0307] 4.根据方案1所述的化合物,其中Z选自包括以下的组:

[0308] i.氨基甲酸o-C_1-C_5烷基酯;

[0309] i.与5氨基甲酰基,2,3,二氢1H吡咯连接的羰基;

[0310] ii.与吡啶连接的羧基;

[0311] iii.C_1-C_5烯烃;

[0312] iv.与C_1-C_6支链烷基连接的羰基。

[0313] 5.根据方案1所述的化合物,其中W选自包括以下的组:酰胺基团或H或与C_1-C_5支链烷基连接的羰基。

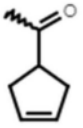
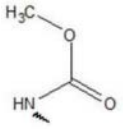
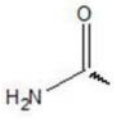
[0314] 6.根据方案1至5所述的化合物,其中X为H;

[0315] Y为与环戊-3-烯连接的羰基;

[0316] Z为氨基甲酸o-甲酯;

[0317] W为酰胺基团。

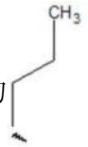
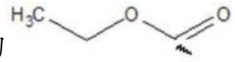
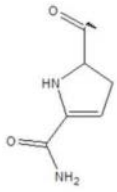
[0318] 7.根据方案6所述的化合物,其中X为H;

[0319] Y为 Z为 W为 ; ; 。

[0320] 8.根据方案1至5所述的化合物,其中X为丁基;

[0321] Y为与乙基连接的羧基;

[0322] Z为与5氨基甲酰基,2,3,二氢1H吡咯连接的羰基;W为H。

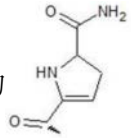
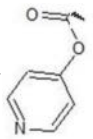
[0323] 9.根据方案8所述的化合物,其中X为 Y为 ; Z为 ; W为H。

[0324] 10.根据方案1至5所述的化合物,其中X为H;

[0325] Y为与5氨基甲酰基,4,5二氢1H吡咯连接的羰基;Z为与吡啶连接的羧基;

[0326] W为H。

[0327] 11.根据方案10所述的化合物,其中X为H;

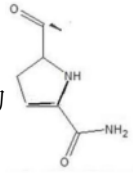
[0328] Y为 ; Z为 ; W为H。

[0329] 12.根据方案1至5所述的化合物,其中X为H;

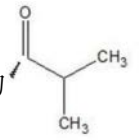
[0330] Y为与4,5二氢1H吡咯2氨基甲酰基连接的羰基;Z为亚乙基;

[0331] W为与仲丙基连接的羰基。

[0332] 13.根据方案12所述的化合物,其中X为H;

[0333] Y为 ;

[0334] Z为 ;

[0335] W为。

[0336] 14.根据方案1至5所述的化合物,其中

[0337] X为H;

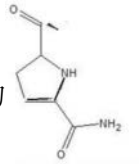
[0338] Y为与4,5二氢1H吡咯2氨基甲酰基连接的羰基;

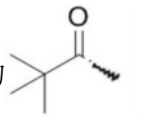
[0339] Z为与叔丁基连接的羰基;

[0340] W为H。

[0341] 15.根据方案14所述的化合物,其中

[0342] X为H;

[0343] Y为;

[0344] Z为;

[0345] W为H。

[0346] 16.一种药物组合物,其包括有效量的根据方案1至15中任一项所述的化合物或其立体异构体或互变异构体以及其药学上可接受的载体。

[0347] 17.一种制品,其包括:(i)有效量的根据方案1至15中任一项所述的化合物或其立体异构体或互变异构体或根据方案16所述的药物组合物;以及(ii)用于治疗由KRAS介导的疾病、病症或病状的说明书。

[0348] 18.一种试剂盒,其包括:(i)有效量的根据方案1至15中任一项所述的化合物或其立体异构体或互变异构体或根据方案16所述的药物组合物;以及(ii)用于治疗由KRAS介导的疾病、病症或病状的说明书。

[0349] 根据上文,应当理解,在本文中已经出于说明的目的描述了本公开的各个实施例,并且可以在不偏离本公开的范围和精神的情况下进行各种修改。因此,本文所公开的各个实施例并不旨在进行限制,并且真实的范围和精神由所附权利要求书指示。

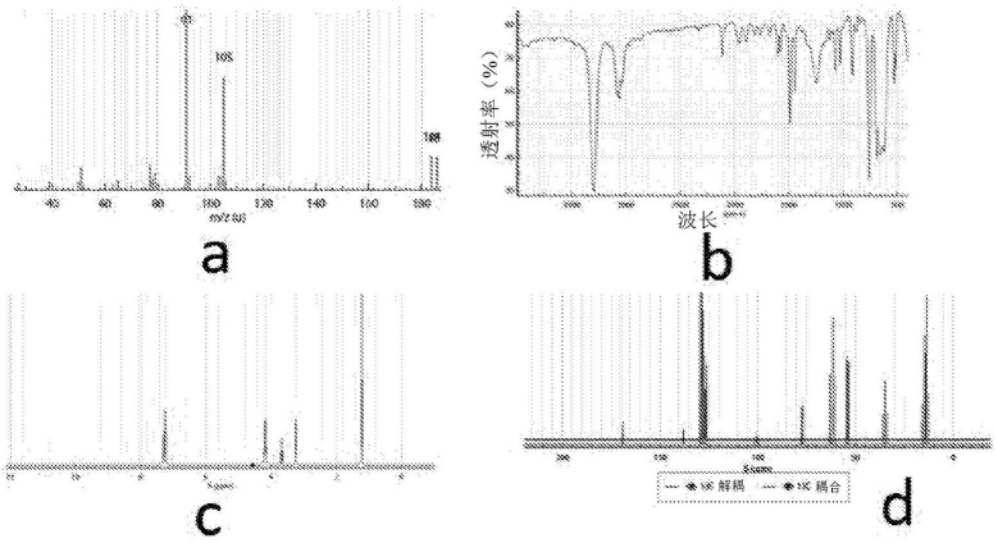


图1

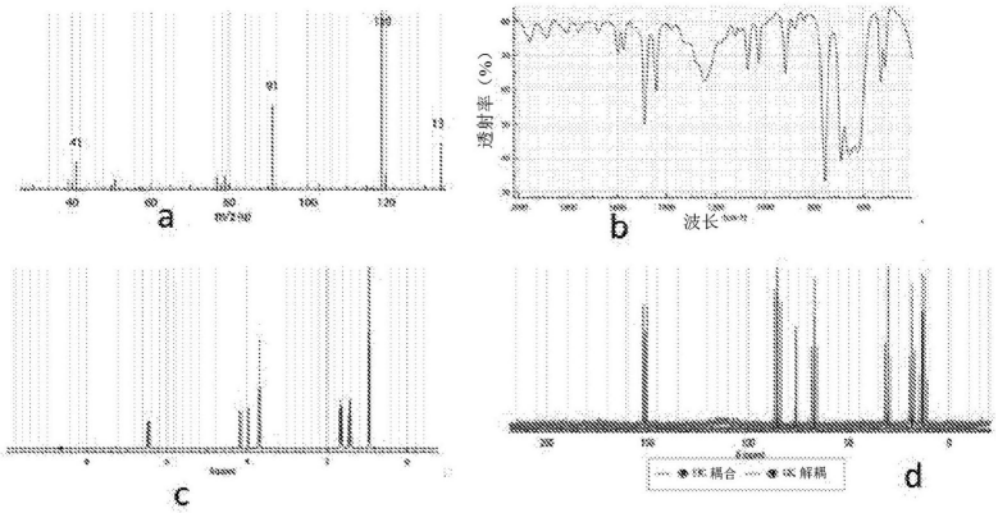


图2

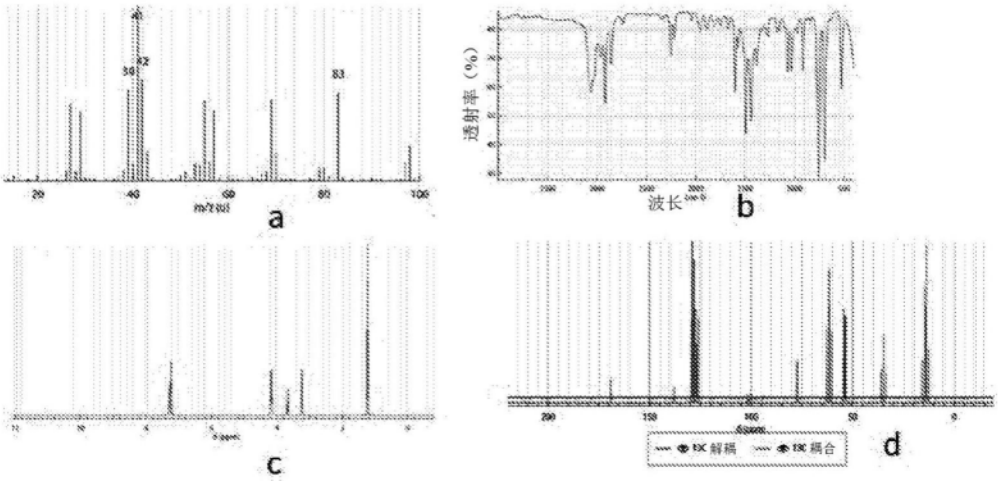


图3

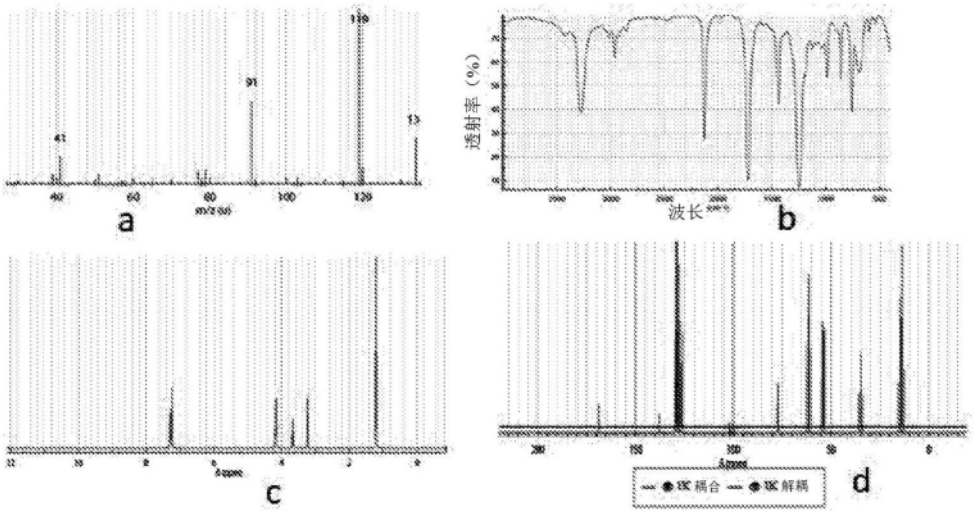


图4

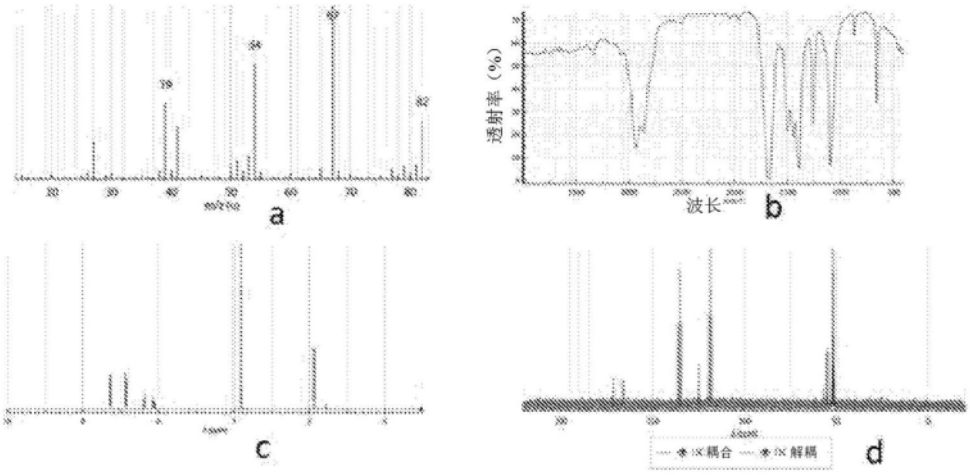

透射率（%）
波长
a
b
c
d

图5

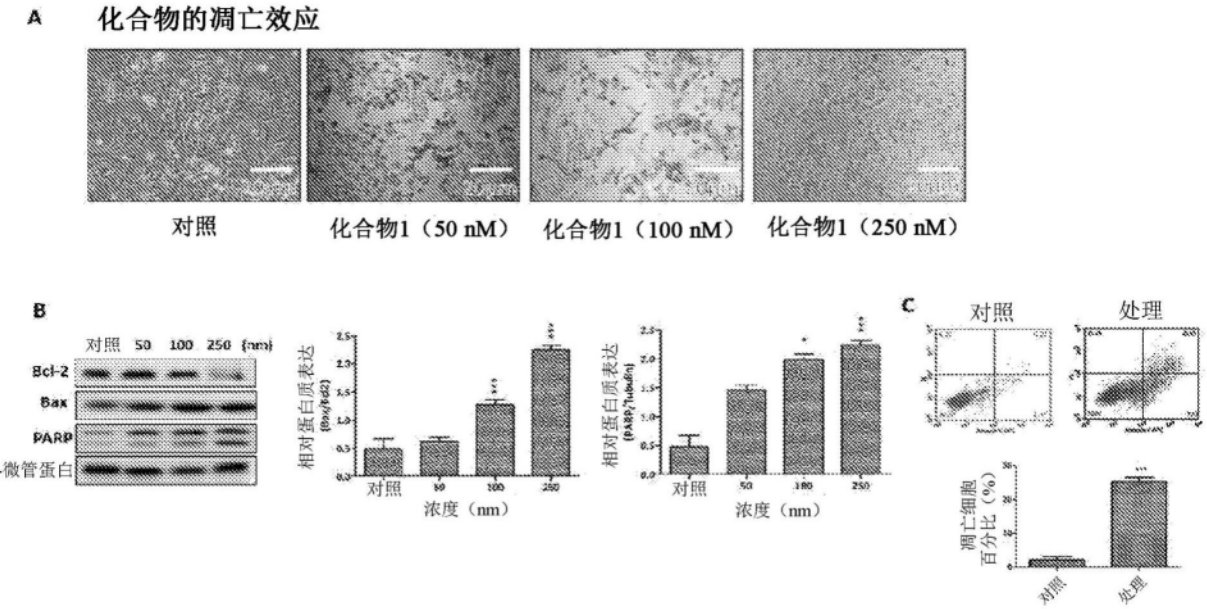

A
化合物的凋亡效应
对照
化合物1（50 nM）
化合物1（100 nM）
化合物1（250 nM）
B
对照 50 100 250 (nm)
Bcl-2
Bax
PARP
α-微管蛋白
相对蛋白质表达
浓度（nm）
C
对照
处理
凋亡细胞百分比（%）

图6

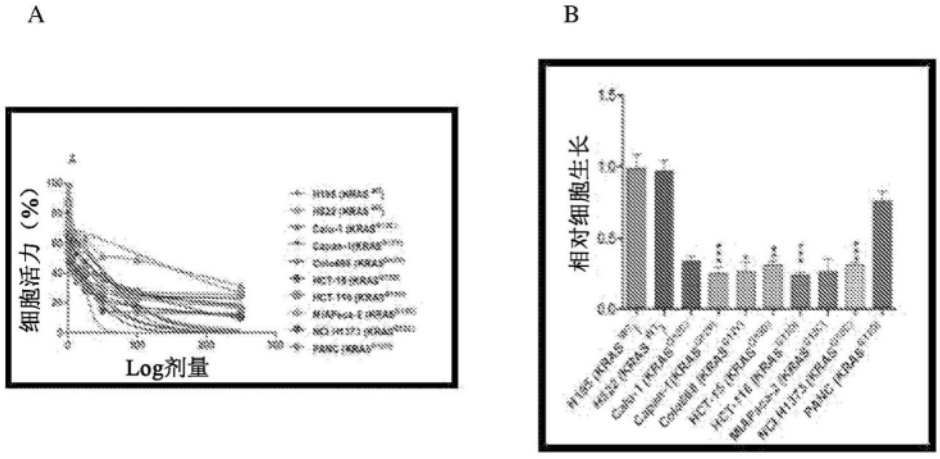

A
B
细胞活力（%）
Log剂量
相对细胞生长

图7

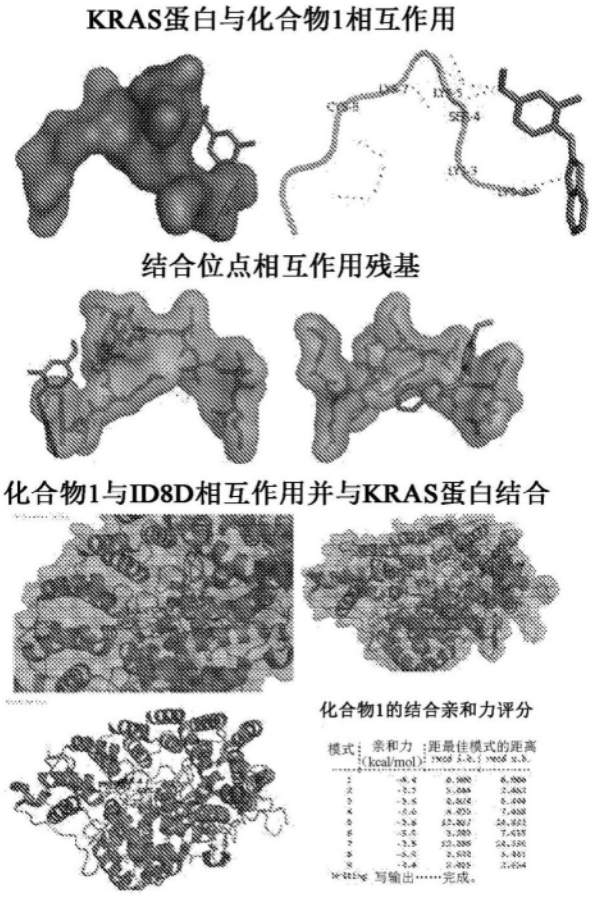

KRAS蛋白与化合物1相互作用
结合位点相互作用残基
化合物1与ID8D相互作用并与KRAS蛋白结合
化合物1的结合亲和力评分
模式
亲和力 (kcal/mol)
距最佳模式的距离
写输出……完成。

图8

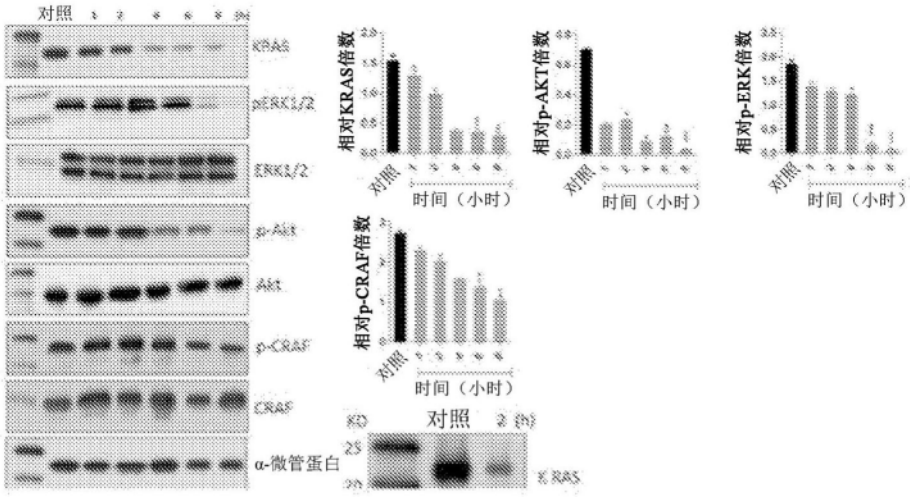
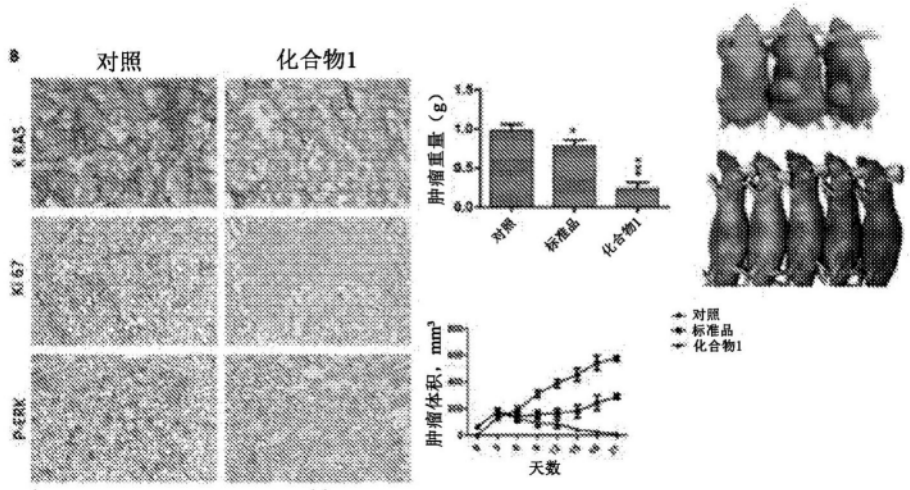
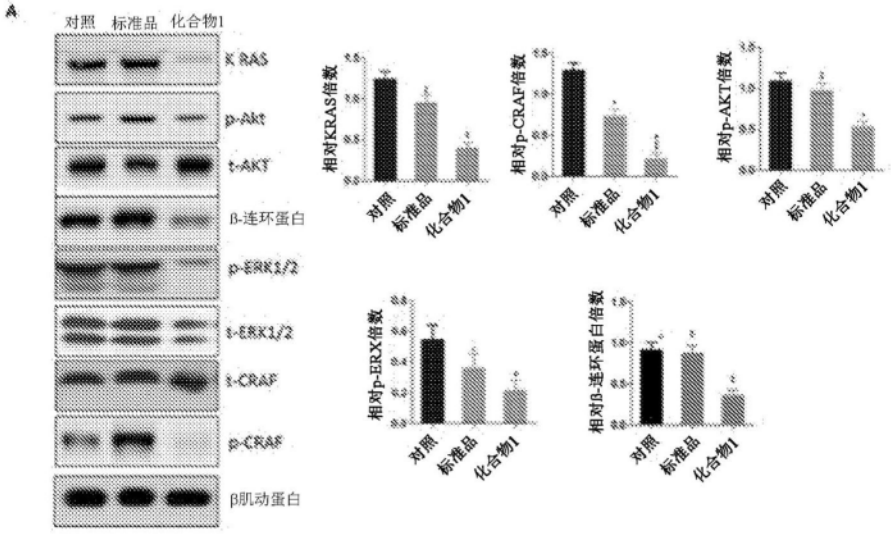

对照
KRAS
pERK1/2
ERK1/2
p-Akt
Akt
p-CRAF
CRAF
α-微管蛋白
相对KRAS倍数
相对p-AKT倍数
相对p-ERK倍数
相对p-CRAF倍数
时间（小时）
KD
对照
KRAS

图9


对照
化合物1
K RAS
Ki 67
p-ERK
肿瘤重量（g）
对照
标准品
化合物1
肿瘤体积，mm³
天数
对照
标准品
化合物1

a


对照
标准品
化合物1
K RAS
p-Akt
t-AKT
β-连环蛋白
p-ERK1/2
t-ERK1/2
t-CRAF
p-CRAF
β肌动蛋白
相对KRAS倍数
相对p-CRAF倍数
相对p-AKT倍数
相对p-ERX倍数
相对β-连环蛋白倍数

b

图10

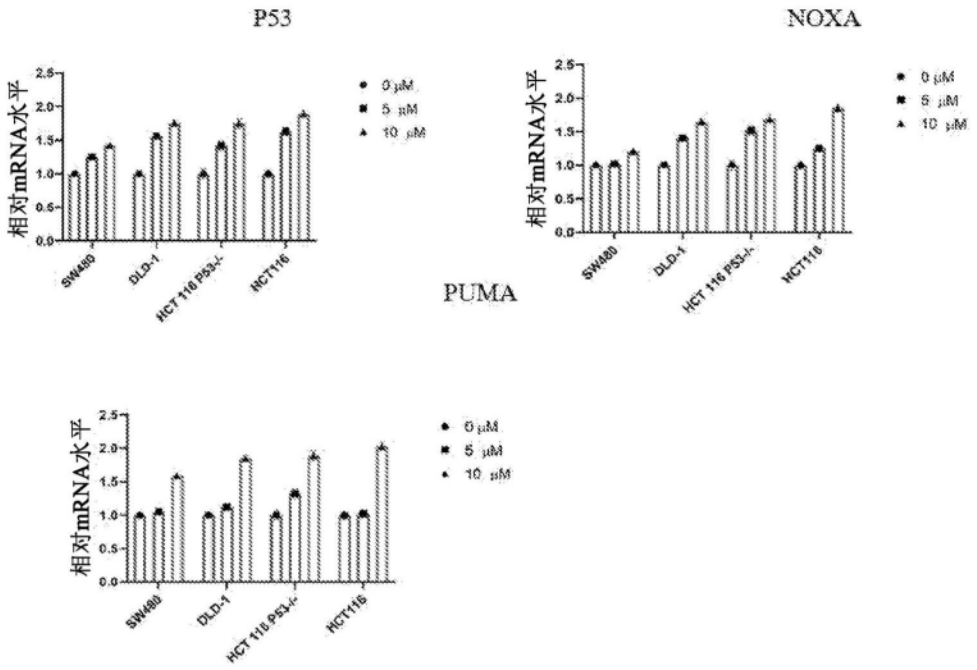

P53
NOXA
PUMA
相对mRNA水平
0 μM
5 μM
10 μM
SW480
DLD-1
HCT 116 P53-/-
HCT116

图11

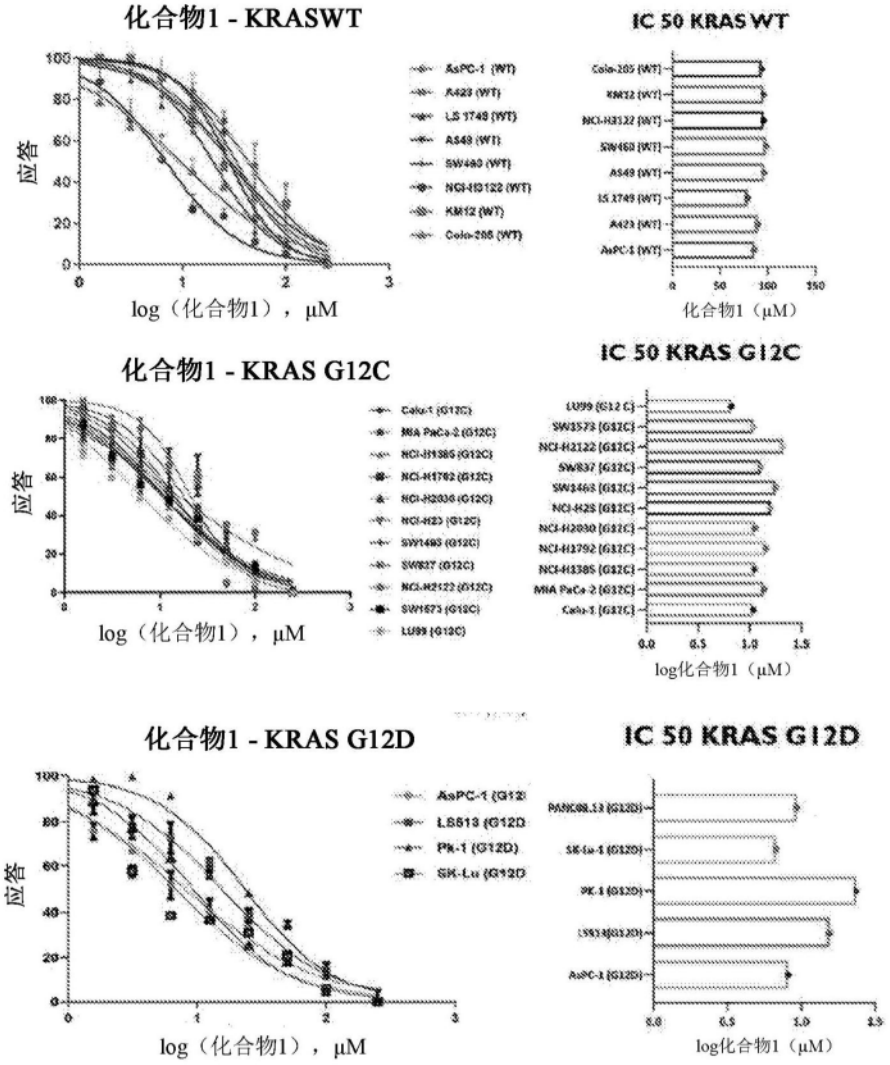

化合物1 - KRASWT
应答
log（化合物1），μM
AsPC-1 (WT)
A423 (WT)
LS 1748 (WT)
A549 (WT)
SW480 (WT)
NCI-H3122 (WT)
KM12 (WT)
Colo-205 (WT)
IC 50 KRAS WT
化合物1（μM）
化合物1 - KRAS G12C
log（化合物1），μM
IC 50 KRAS G12C
log化合物1（μM）
化合物1 - KRAS G12D
AsPC-1 (G12D)
LS513 (G12D)
PK-1 (G12D)
SK-Lu (G12D)
log（化合物1），μM
IC 50 KRAS G12D
log化合物1（μM）

图12

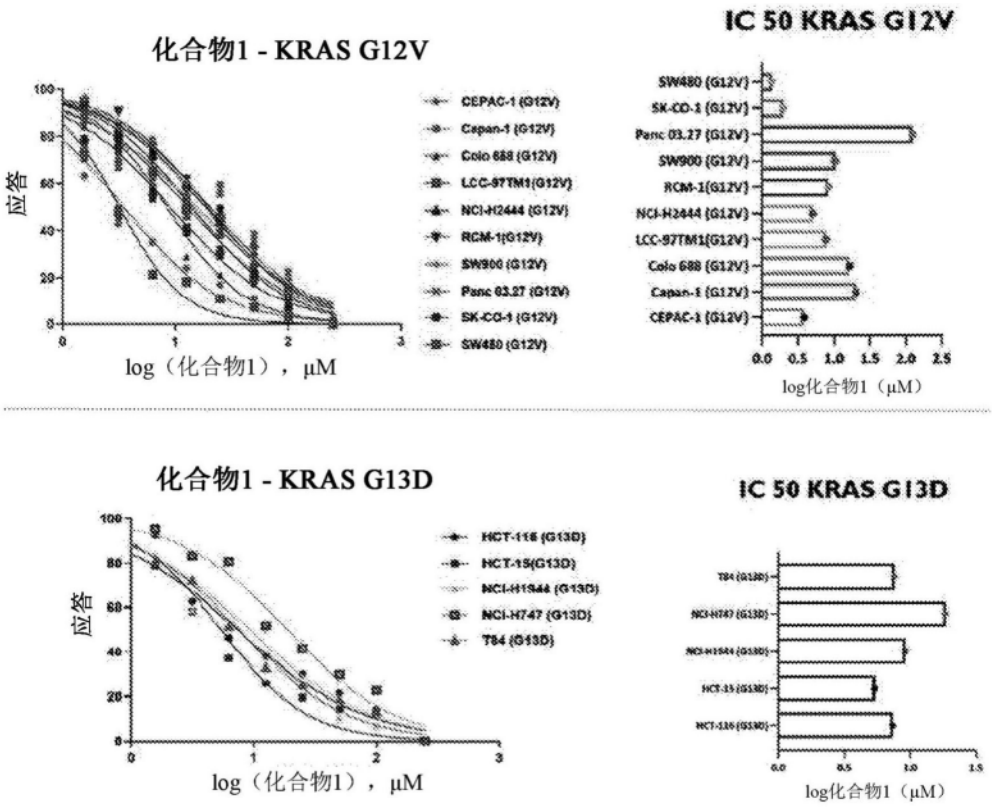

化合物1 - KRAS G12V
应答
log（化合物1），μM
CEPAC-1 (G12V)
Capan-1 (G12V)
Colo 688 (G12V)
LCC-97TM1(G12V)
NCI-H2444 (G12V)
RCM-1(G12V)
SW900 (G12V)
Panc 03.27 (G12V)
SK-CO-1 (G12V)
SW480 (G12V)
IC 50 KRAS G12V
log化合物1（μM）
化合物1 - KRAS G13D
应答
log（化合物1），μM
HCT-116 (G13D)
NCI-H1944 (G13D)
NCI-H747 (G13D)
T84 (G13D)
IC 50 KRAS G13D
log化合物1（μM）

图12(续)

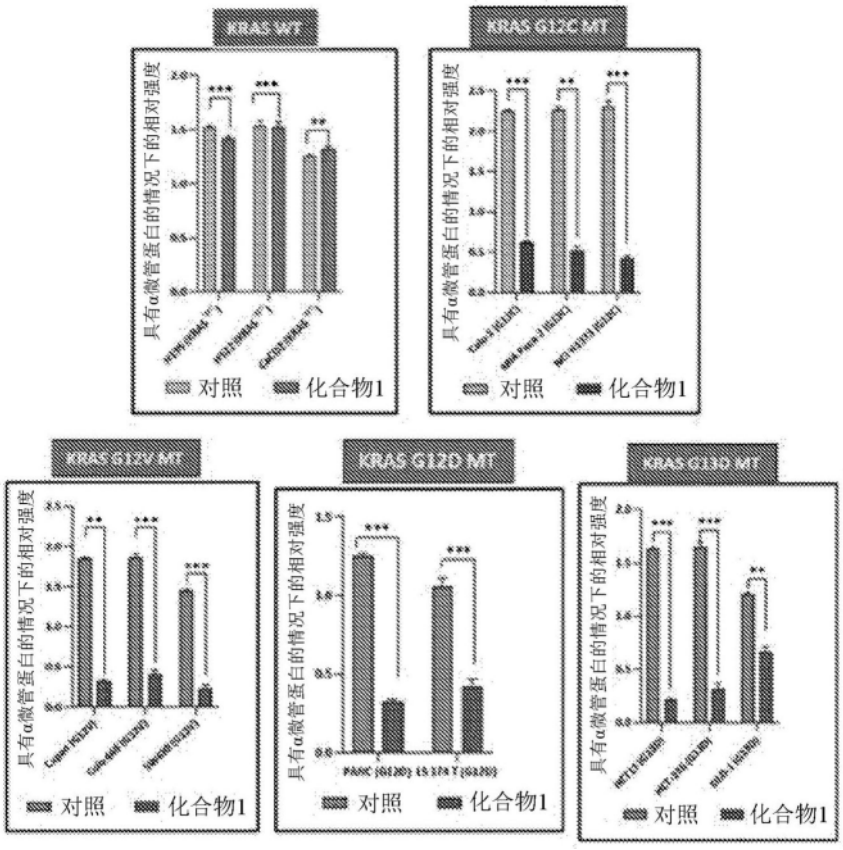

KRAS WT
KRAS G12C MT
KRAS G12V MT
KRAS G12D MT
KRAS G13D MT
具有α微管蛋白的情况下的相对强度
对照
化合物1

图13

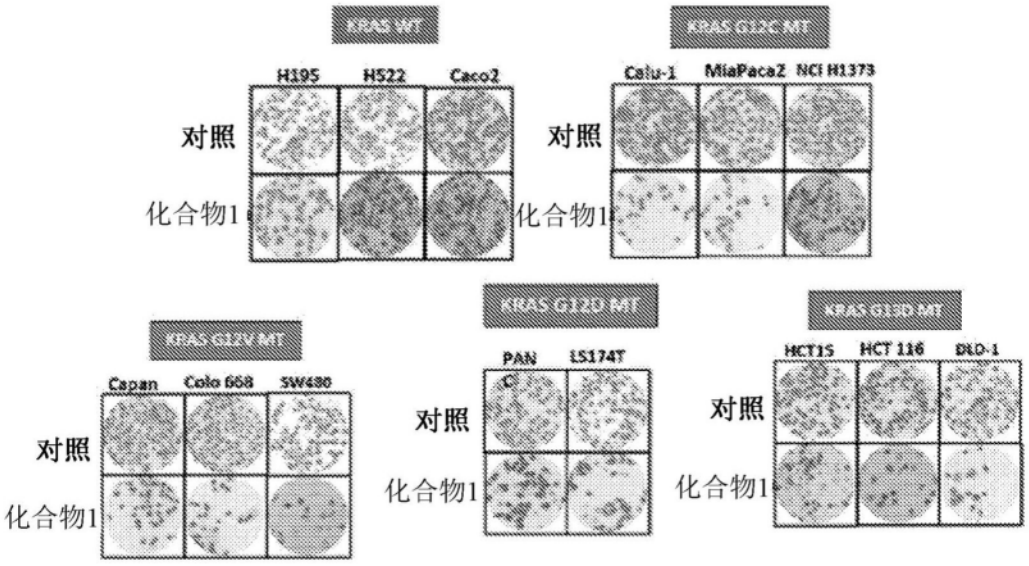

KRAS WT
H195
H522
Caco2
KRAS G12C MT
Calu-1
MiaPacaZ
NCI H1373
KRAS G12V MT
Capan
Colo 668
SW480
KRAS G12D MT
PAN
LS174T
KRAS G13D MT
HCT15
HCT 116
DLD-1
对照
化合物1

图13(续)

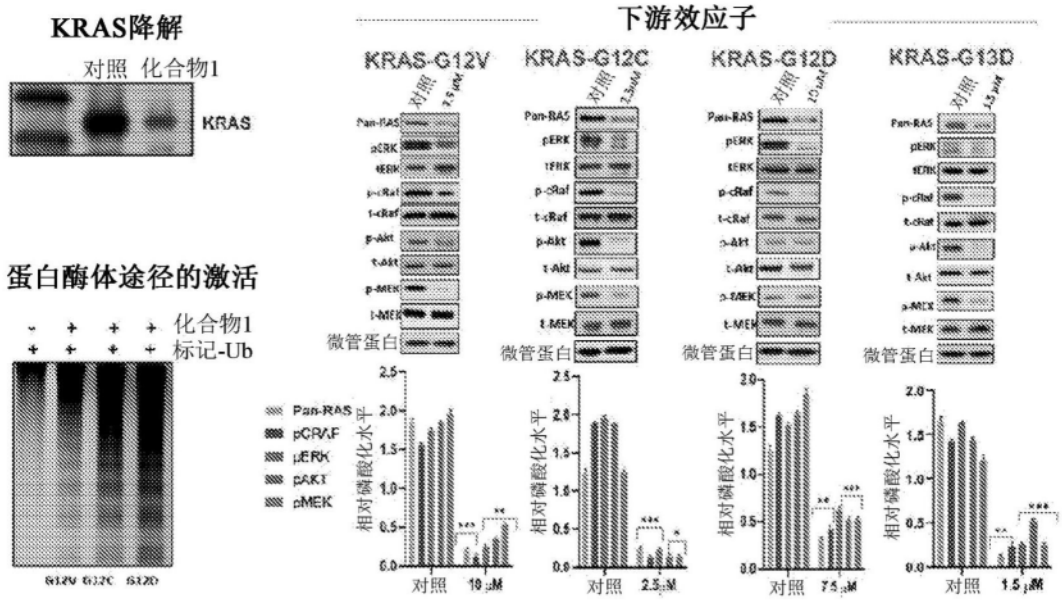

KRAS降解
对照 化合物1
KRAS
蛋白酶体途径的激活
化合物1
标记-Ub
下游效应子
KRAS-G12V
KRAS-G12C
KRAS-G12D
KRAS-G13D
微管蛋白
Pan-RAS
pCRAF
pERK
pAKT
pMEK
相对磷酸化水平
对照

图14

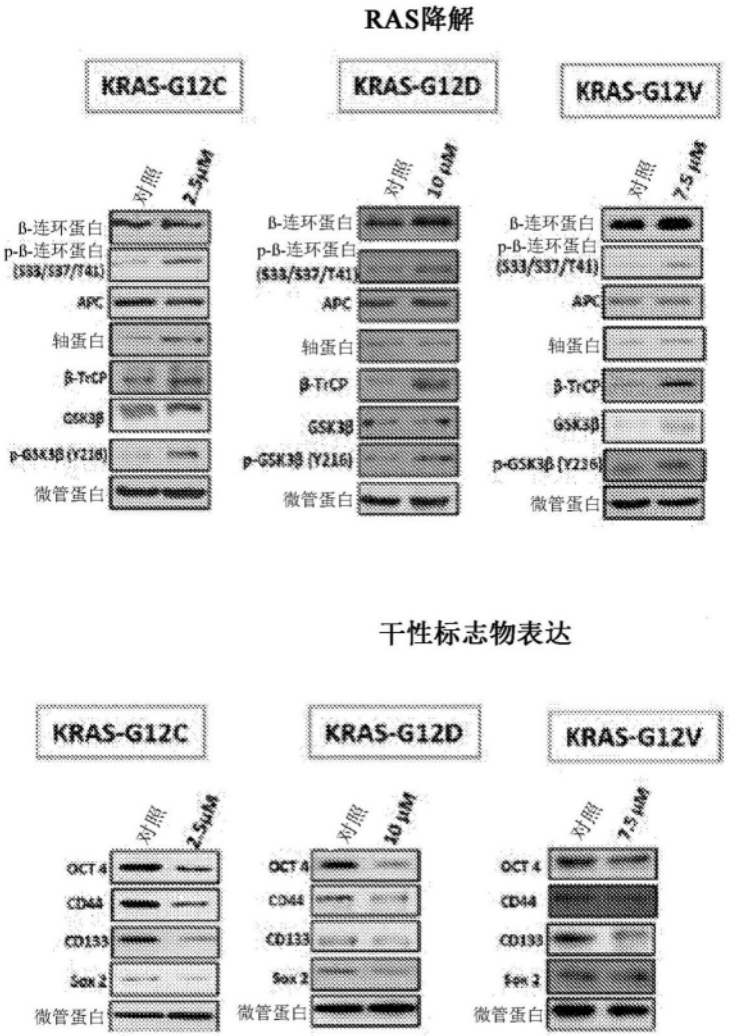

RAS降解
KRAS-G12C
KRAS-G12D
KRAS-G12V
对照
2.5μM
10 μM
7.5 μM
β-连环蛋白
p-β-连环蛋白
(S33/S37/T41)
APC
轴蛋白
β-TrCP
GSK3β
p-GSK3β (Y216)
微管蛋白
干性标志物表达
KRAS-G12C
KRAS-G12D
KRAS-G12V
对照
2.5μM
10 μM
7.5 μM
OCT 4
CD44
CD133
Sox 2
微管蛋白

图15

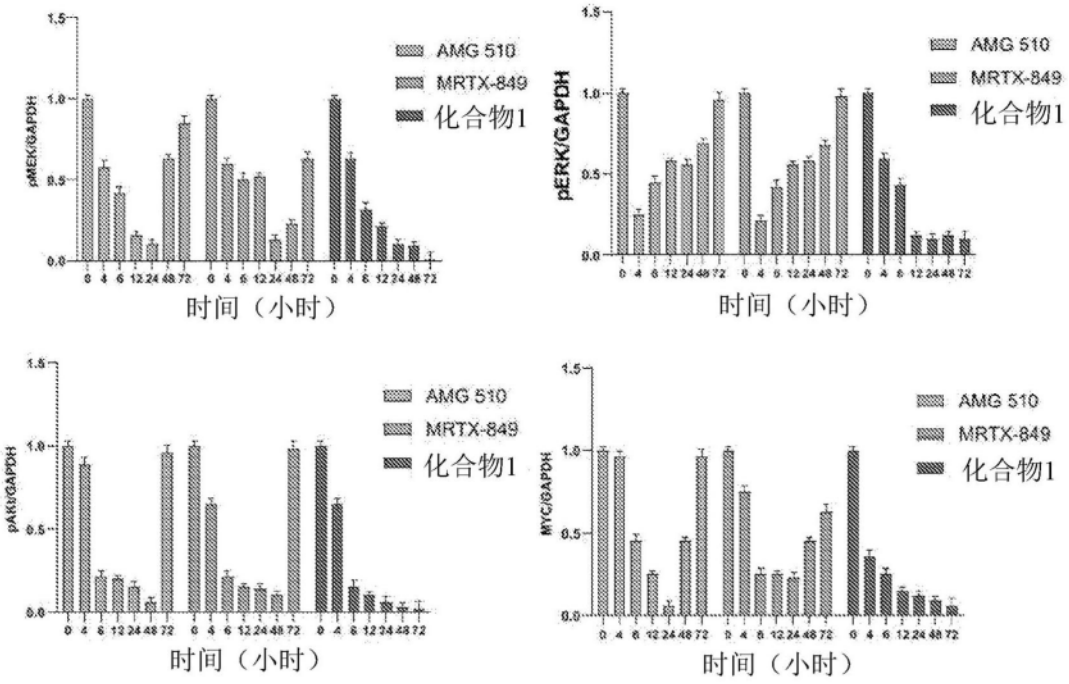

pMEK/GAPDH
pERK/GAPDH
pAKt/GAPDH
MYC/GAPDH
AMG 510
MRTX-849
化合物1
时间（小时）

图16

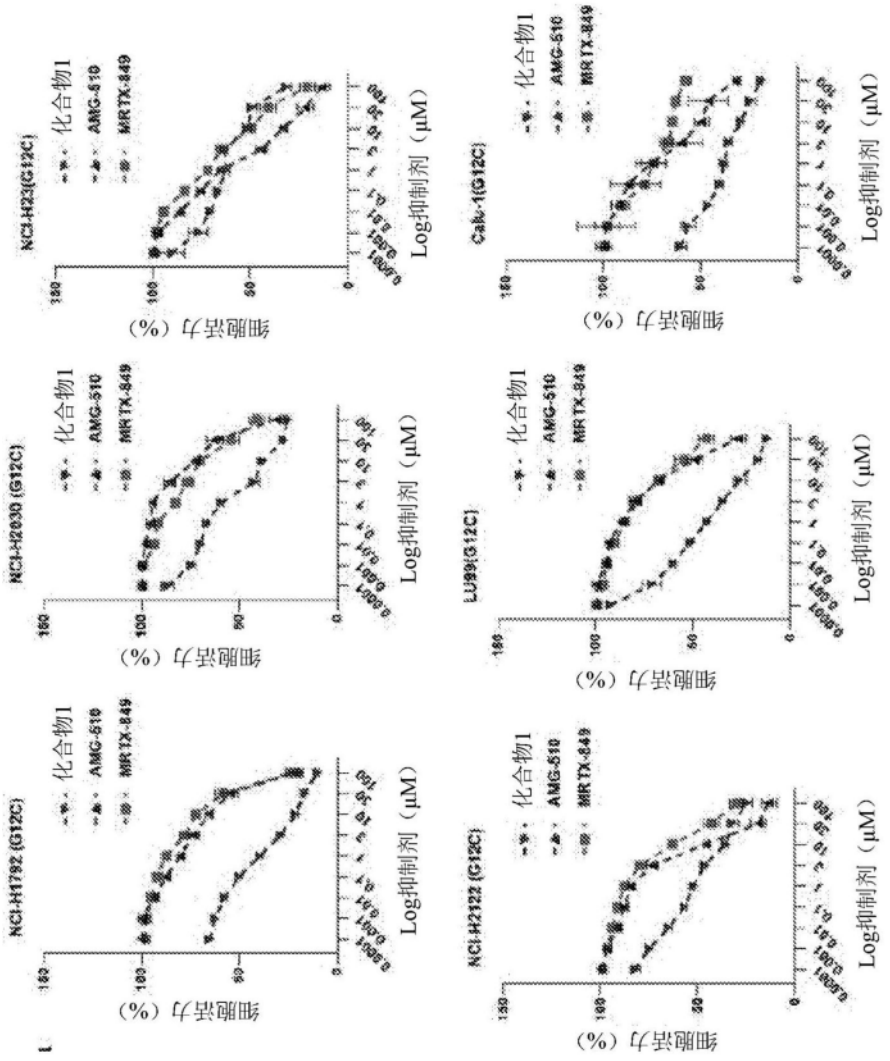

NCI-H23(G12C)
Calu-1(G12C)
NCI-H2030 (G12C)
LU99(G12C)
NCI-H1792 (G12C)
NCI-H2122 (G12C)
化合物1
AMG-510
MRTX-849
细胞活力（%）
Log抑制剂（μM）

图17

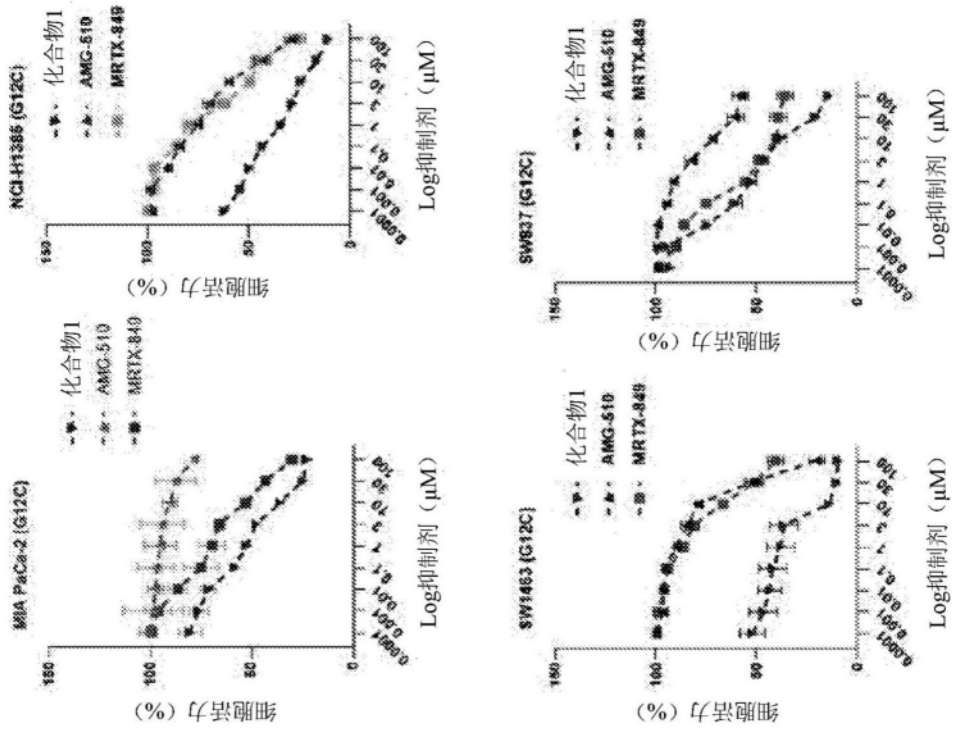

NCI-H1355 (G12C)
SW837 (G12C)
MIA PaCa-2 (G12C)
SW1463 (G12C)
化合物1
AMG-510
MRTX-849
Log抑制剂（μM）
细胞活力（%）

图17(续)

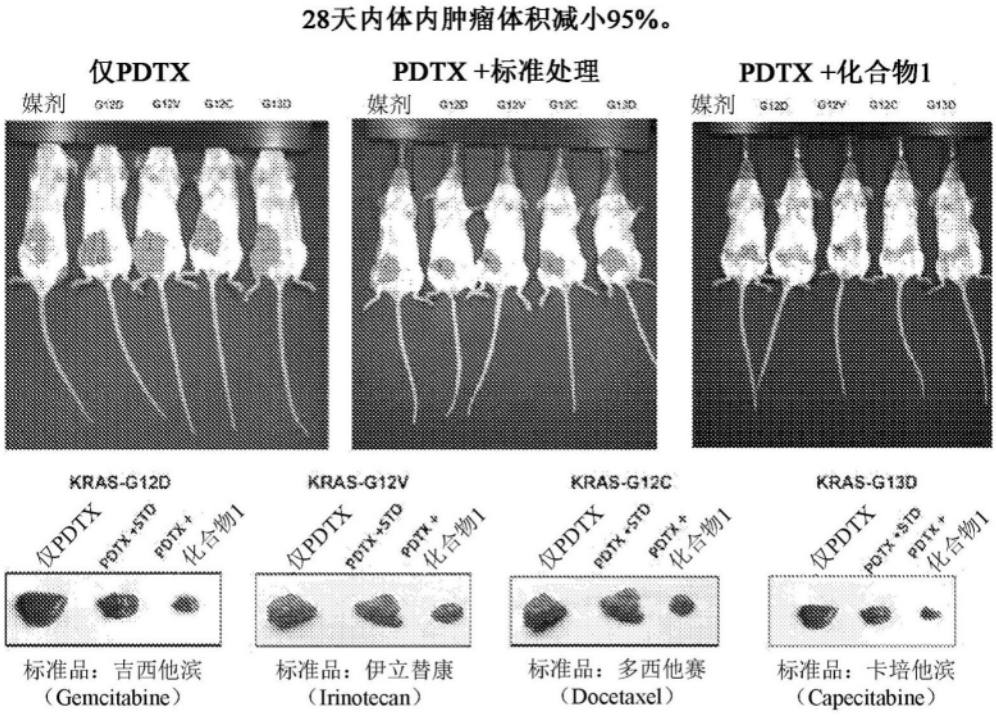

28天内体内肿瘤体积减小95%。
仅PDTX
PDTX +标准处理
PDTX +化合物1
媒剂
G12D
G12V
G12C
G13D
KRAS-G12D
KRAS-G12V
KRAS-G12C
KRAS-G13D
仅PDTX
PDTX +STD
PDTX +化合物1
标准品：吉西他滨
（Gemcitabine）
标准品：伊立替康
（Irinotecan）
标准品：多西他赛
（Docetaxel）
标准品：卡培他滨
（Capecitabine）

图18

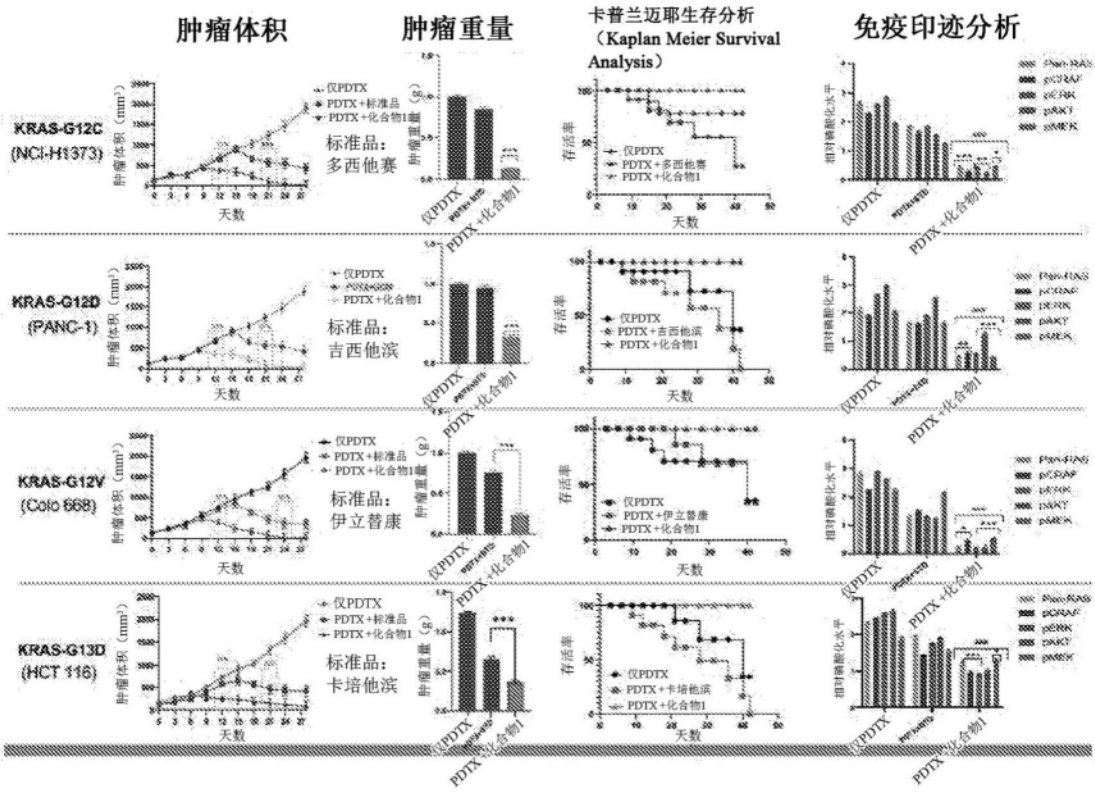

肿瘤体积
肿瘤重量
卡普兰迈耶生存分析
（Kaplan Meier Survival Analysis）
免疫印迹分析
KRAS-G12C
(NCI-H1373)
KRAS-G12D
(PANC-1)
KRAS-G13D
(HCT 116)
仅PDTX
PDTX+标准品
PDTX+化合物1
标准品：
多西他赛
标准品：
吉西他滨
标准品：
伊立替康
标准品：
卡培他滨
天数
存活率

图19

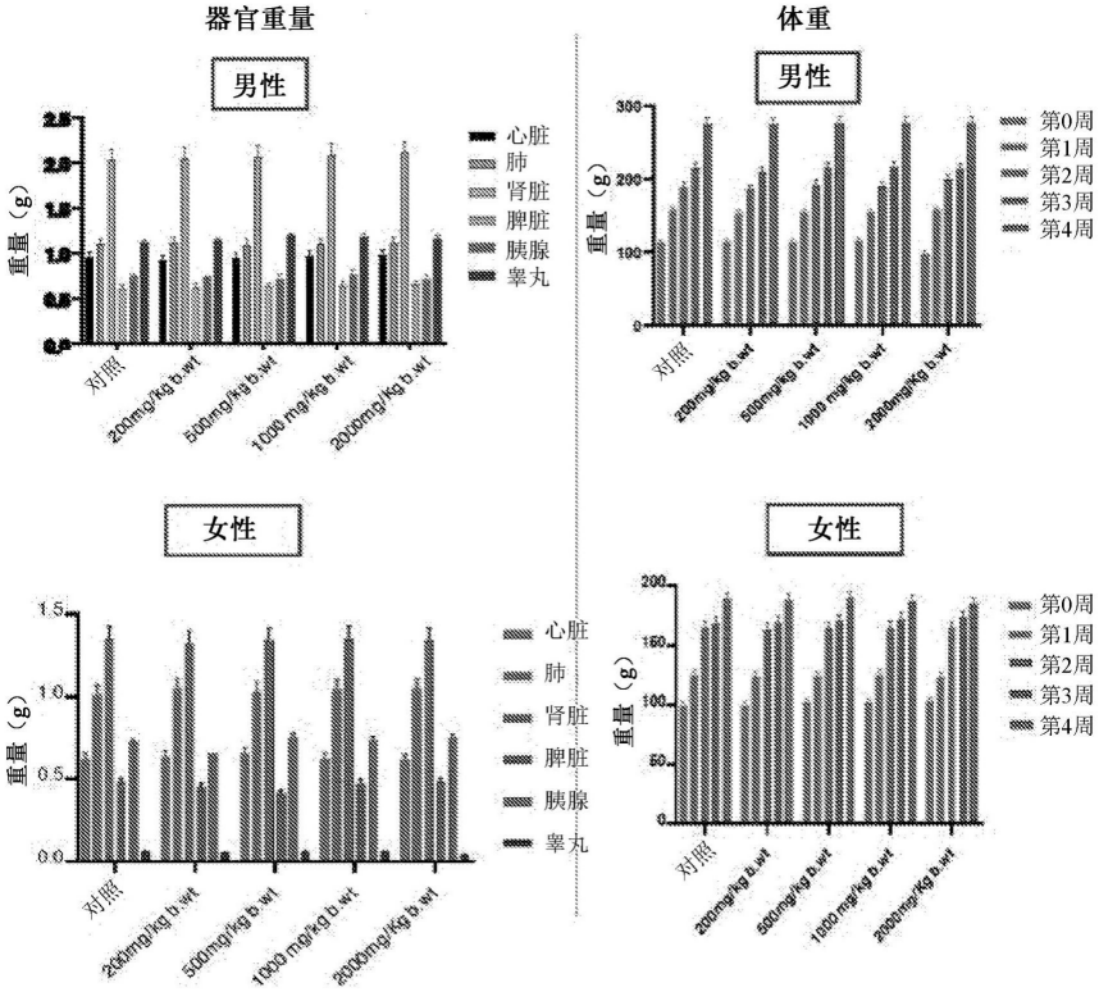

器官重量
男性
重量（g）
心脏
肺
肾脏
脾脏
胰腺
睾丸
对照
200mg/kg b.wt
500mg/kg b.wt
1000 mg/kg b.wt
2000mg/kg b.wt
体重
男性
重量（g）
第0周
第1周
第2周
第3周
第4周
对照
200mg/kg b.wt
500mg/kg b.wt
1000 mg/kg b.wt
2000mg/kg b.wt
女性
重量（g）
心脏
肺
肾脏
脾脏
胰腺
睾丸
对照
200mg/kg b.wt
500mg/kg b.wt
1000 mg/kg b.wt
2000mg/kg b.wt
女性
重量（g）
第0周
第1周
第2周
第3周
第4周
对照
200mg/kg b.wt
500mg/kg b.wt
1000 mg/kg b.wt
2000mg/kg b.wt

图20

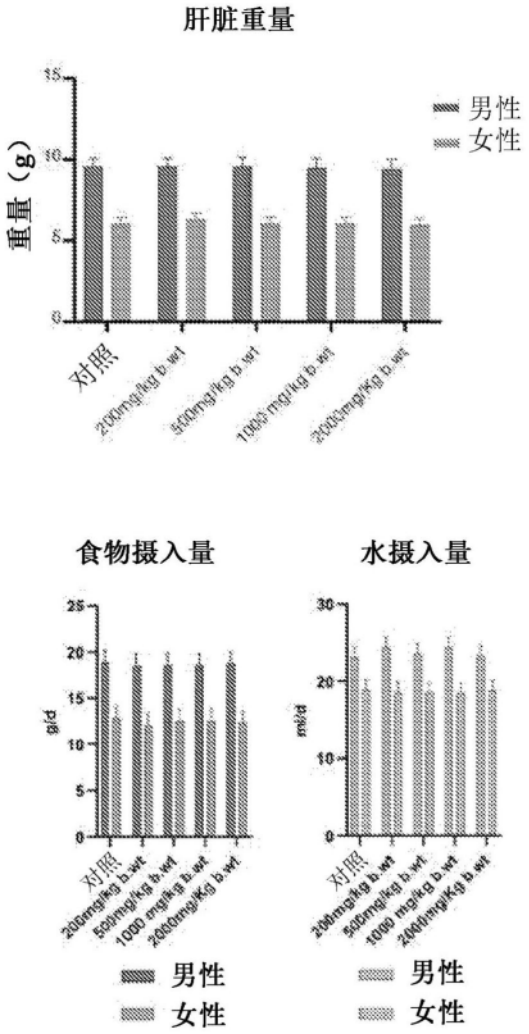

肝脏重量
重量（g）
男性
女性
对照
200mg/kg b.wt
500mg/kg b.wt
1000 mg/kg b.wt
2000mg/Kg b.wt
食物摄入量
水摄入量
g/d
ml/d
对照
200mg/kg b.wt
500mg/kg b.wt
1000 mg/kg b.wt
2000mg/Kg b.wt
男性
女性
男性
女性

图20(续)

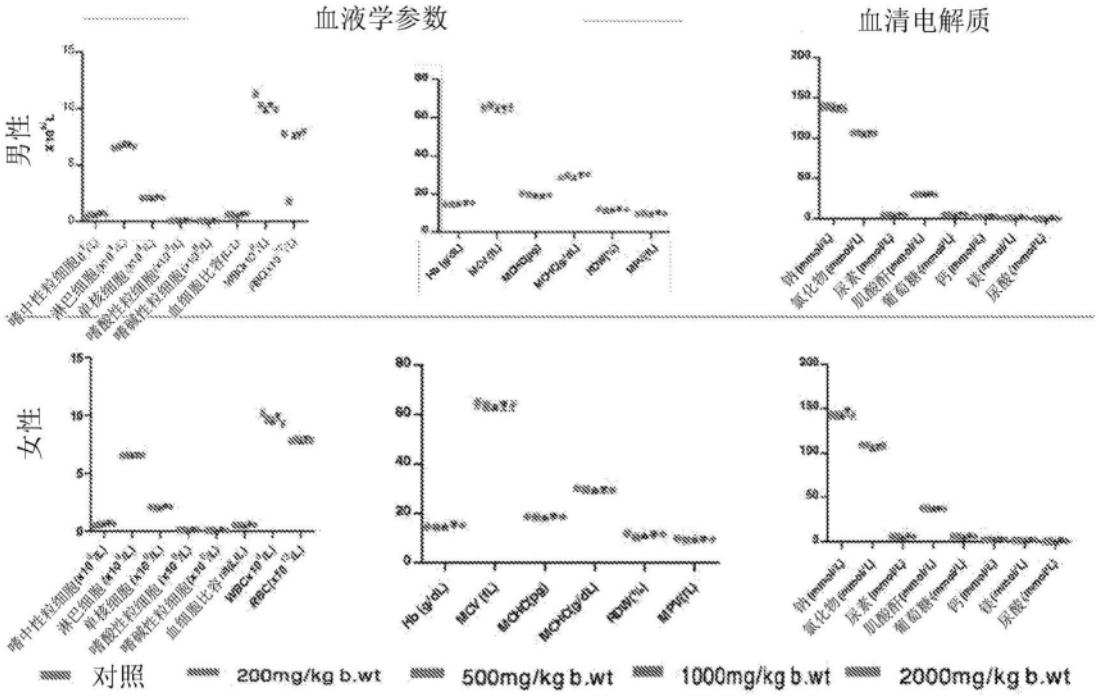

血液学参数
血清电解质
男性
女性
对照
200mg/kg b.wt
500mg/kg b.wt
1000mg/kg b.wt
2000mg/kg b.wt

图20(续)

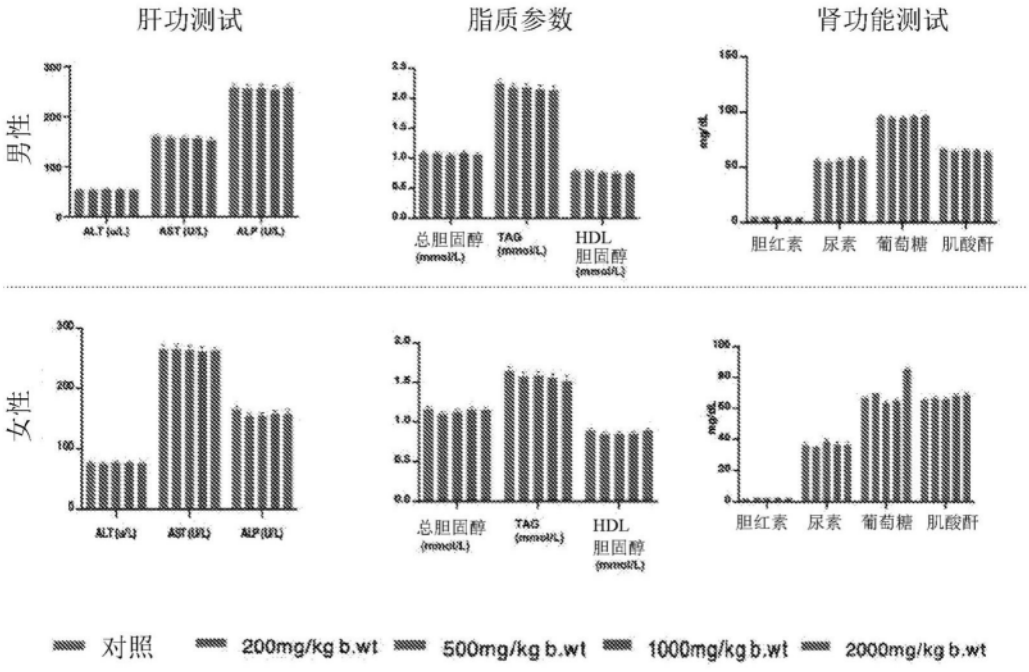

肝功测试
脂质参数
肾功能测试
男性
女性
ALT (u/L)
AST (U/L)
ALP (U/L)
总胆固醇 (mmol/L)
TAG (mmol/L)
HDL 胆固醇 (mmol/L)
胆红素
尿素
葡萄糖
肌酸酐
对照
200mg/kg b.wt
500mg/kg b.wt
1000mg/kg b.wt
2000mg/kg b.wt

图20(续)

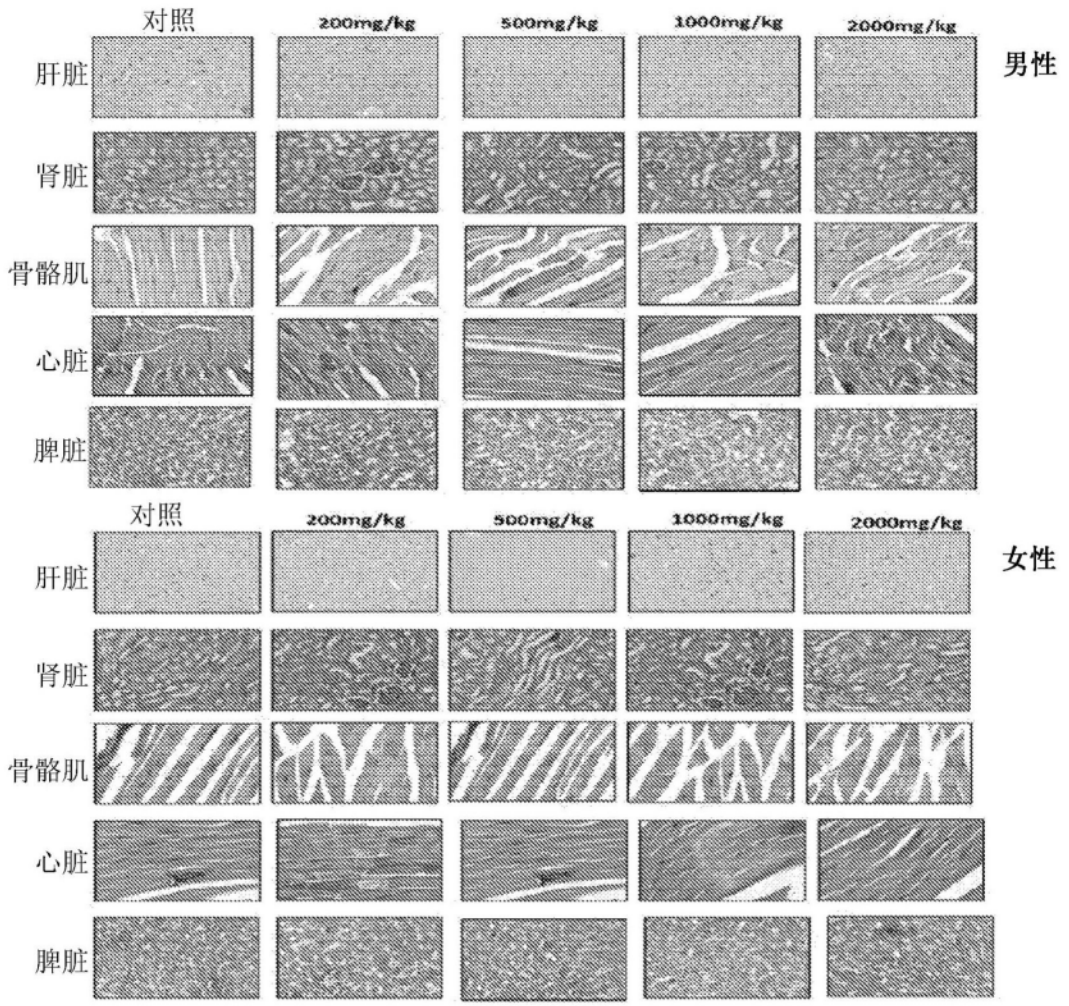

对照
200mg/kg
500mg/kg
1000mg/kg
2000mg/kg
肝脏
肾脏
骨骼肌
心脏
脾脏
男性
对照
200mg/kg
500mg/kg
1000mg/kg
2000mg/kg
肝脏
肾脏
骨骼肌
心脏
脾脏
女性

图20(续)