

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680051955.3

[51] Int. Cl.

C07D 401/04 (2006.01)

C07D 413/10 (2006.01)

C07D 239/32 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 12 月 31 日

[11] 公开号 CN 101336237A

[22] 申请日 2006.12.20

[21] 申请号 200680051955.3

[30] 优先权

[32] 2005.12.21 [33] US [31] 60/752,711

[86] 国际申请 PCT/EP2006/070046 2006.12.20

[87] 国际公布 WO2007/071752 英 2007.6.28

[85] 进入国家阶段日期 2008.7.29

[71] 申请人 诺瓦提斯公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 G·博尔德 P·菲雷

V·瓜格纳诺

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 凌立

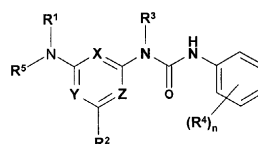
权利要求书 9 页 说明书 89 页

[54] 发明名称

作为 FGF 抑制剂的嘧啶基芳基脲衍生物

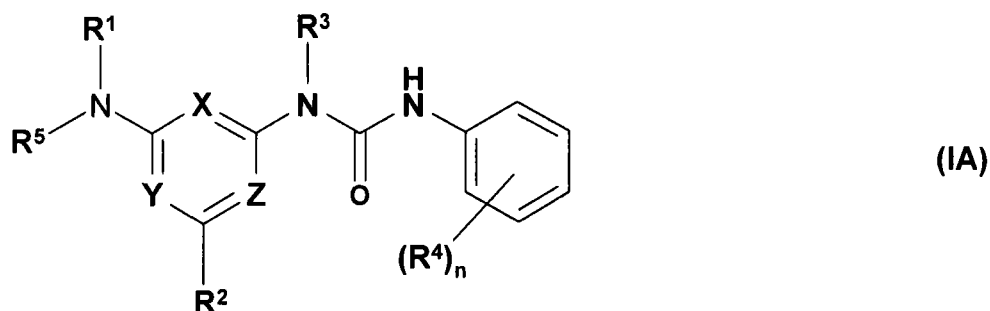
[57] 摘要

本发明涉及式 (IA) 的杂芳基芳基脲类化合物，其中的基团和符号具有本文所给出的含义；涉及此类化合物在治疗蛋白激酶依赖性疾病中的用途；涉及包含所述杂芳基芳基脲类化合物的药物制剂；涉及此类新化合物的制备方法以及包含使用此类杂芳基芳基脲类化合物的治疗方法。



(IA)

1. 式 IA 的化合物,



其中

X、Y 和 Z 中的两个是 N(氮), 第三个是 CH 或 N(优选地, Y 和 Z 是 N, 且 Z 是 CH); 并且

或者其中,

R¹ 是被羟基、苯基-C₁-C₇-烷氧基、哌嗪-1-基或 4-(苯基-C₁-C₇-烷基)-哌嗪-1-基所取代的苯基; 或者被(i)卤素或 C₁-C₇-烷氧基以及除此之外被(ii)羟基、苯基-C₁-C₇-烷氧基、N-单-或 N,N-二-(C₁-C₇-烷基)-氨基-C₁-C₇-烷基、吡咯烷子基-C₁-C₇-烷氧基、1-(C₁-C₇-烷基)-哌啶-4-基、吗啉代-C₁-C₇-烷氧基、硫吗啉代-C₁-C₇-烷氧基、哌嗪-1-基、4-(苯基-C₁-C₇-烷基)-哌嗪-1-基、4-(C₁-C₇-烷基)-哌嗪-1-基、[4-(C₁-C₇-烷基)-哌嗪-1-基]-C₁-C₇-烷基、N-单-或 N,N-二-(C₁-C₇-烷基)-氨基-C₁-C₇-烷基、N-单-或 N,N-二-(C₁-C₇-烷基)-氨基-C₁-C₇-烷氧基、[4-(C₁-C₇-烷基)-哌嗪-1-基]-C₁-C₇-烷氧基、[4-(C₁-C₇-烷基)-哌嗪-1-基]-羰基所取代的苯基;

R² 是氢、C₁-C₇-烷基、C₁-C₇-烷氧基或卤素;

R³ 是氢、C₁-C₇-烷基或苯基-C₁-C₇-烷基,

R⁴ 各自独立地是 C₁-C₇-烷基、卤素-C₁-C₇-烷基、卤素或 C₁-C₇-烷氧基, 且 n 是 0、1、2、3、4 或 5;

或者

R¹ 是被羟基、苯基-C₁-C₇-烷氧基、哌嗪-1-基、4-(苯基-C₁-C₇-烷基)-

哌嗪-1-基; N-单-或 N,N-二-(C₁-C₇-烷基)-氨基-C₁-C₇-烷基、吡咯烷子基-C₁-C₇-烷氧基、1-(C₁-C₇-烷基)-哌啶-4-基、吗啉代-C₁-C₇-烷氧基、硫吗啉代-C₁-C₇-烷氧基、4-(C₁-C₇-烷基)-哌嗪-1-基、[4-(C₁-C₇-烷基)-哌嗪-1-基]-C₁-C₇-烷基、N-单-或 N,N-二-(C₁-C₇-烷基)-氨基-C₁-C₇-烷基、N-单-或 N,N-二-(C₁-C₇-烷基)-氨基-C₁-C₇-烷氧基、[4-(C₁-C₇-烷基)-哌嗪-1-基]-C₁-C₇-烷氧基、[4-(C₁-C₇-烷基)-哌嗪-1-基]-羰基所取代的苯基; 或者带有一个本段中提到的取代基, 和除此之外选自卤素以及 C₁-C₇-烷氧基的取代基的苯基;

R² 是氢、C₁-C₇-烷基、C₁-C₇-烷氧基或卤素;

R³ 是氢、C₁-C₇-烷基或苯基-C₁-C₇-烷基,

R⁵ 是氢(优选)、C₁-C₇-烷基或苯基-C₁-C₇-烷基,

并且

或者 n 是 3、4 或 5 且 R⁴ 选自 C₁-C₇-烷基、C₁-C₇-烷氧基和卤素, 条件是 C₁-C₇-烷基、C₁-C₇-烷氧基和卤素中各自至少存在一个;

或者 n 是 2 且一个 R⁴ 是卤素-C₁-C₇-烷基, 另一个 R⁴ 是 C₁-C₇-烷氧基;

或者 n 是 3、4 或 5 且 R⁴ 选自卤素、碘代和 C₁-C₇-烷氧基, 条件是卤素、碘代和 C₁-C₇-烷氧基中各自至少存在一个;

或者 n 是 3、4 或 5 且 R⁴ 选自卤素、卤素-C₁-C₇-烷基和 C₁-C₇-烷氧基, 条件是卤素、卤素-C₁-C₇-烷基和 C₁-C₇-烷氧基中各自至少存在一个;

或者

Y 是 Z 是 N(氮)且 X 是 CH,

或者其中

R¹ 是被 N-C₁-C₇-烷基-哌嗪-1-基单取代的 3-吡啶基,

R² 是氢,

R³ 是氢,

R⁴ 各自独立地是 C₁-C₇-烷基、卤素-C₁-C₇-烷基、卤素或 C₁-C₇-烷氧基,

R⁵ 是氢

且 n 是 1、2、3、4 或 5;

或者

式 IA 的化合物, 其中 R^1 是 4-(2-吗啉-4-基-乙氧基)-苯基氨基, R^2 是氢, R^3 是氢, R^4 是 2-和 6-氯及 3-和 5-甲氧基, n 是 4, R^5 是氢, Y 和 Z 是 N 且 X 是 CH;

或者

式 IA 的化合物, 其中 R^1 是 3-(4-甲基-哌嗪-1-基甲基)-苯基氨基, R^2 是氢, R^3 是甲基, R^4 是 2-和 6-氯及 3-和 5-甲氧基, n 是 4, R^5 是氢, Y 和 Z 是 N 且 X 是 CH,

或者

式 IA 的化合物, 其中 R^1 是 3-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基, R^2 是氢, R^3 是甲基, R^4 是 2-和 6-氯及 3-和 5-甲氧基, n 是 4, R^5 是氢, Y 和 Z 是 N 且 X 是 CH,

或者

式 IA 的化合物, 其中 R^1 是 4-(2-吗啉-4-基-乙氧基)-苯基氨基, R^2 是氢, R^3 是甲基, R^4 是 2-和 6-氯及 3-和 5-甲氧基, n 是 4, R^5 是氢, Y 和 Z 是 N 且 X 是 CH,

或者

式 IA 的化合物, 其中 R^1 是 4-(1-乙基-哌啶-4-基)-苯基氨基, R^2 是氢, R^3 是甲基, R^4 是 2-和 6-氯及 3-和 5-甲氧基, n 是 4, R^5 是氢, Y 和 Z 是 N 且 X 是 CH,

或者

式 IA 的化合物, 其中 R^1 是 4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基, R^2 是氢, R^3 是乙基, R^4 是 2-和 6-氯及 3-和 5-甲氧基, n 是 4, R^5 是氢, Y 和 Z 是 N 且 X 是 CH, 和/或

或者

式 IA 的化合物, 其中 R^1 是 4-(4-乙基-哌嗪-1-羰基)-苯基氨基, R^2 是氢, R^3 是甲基, R^4 是 2-和 6-氯及 3-和 5-甲氧基, n 是 4, R^5 是氢, Y 和 Z 是 N 且 X 是 CH;

或者两个或多个式 IA 化合物的混合物;

或其盐、前药、N-氧化物和/或酯。

2. 如权利要求 1 所述的式 IA 化合物, 其中

X、Y 和 Z 中的两个是 N(氮), 第三个是 CH 或 N(优选地, Y 和 Z 是 N, 且 Z 是 CH); 并且

或者其中,

R^1 是被羟基、苯基- C_1 - C_7 -烷基氧基、哌嗪-1-基或 4-(苯基- C_1 - C_7 -烷基)-哌嗪-1-基所取代的苯基; 或者被(i)卤素或 C_1 - C_7 -烷基氧基以及除此之外被(ii)羟基、苯基- C_1 - C_7 -烷基氧基、N-单-或 N,N-二-(C_1 - C_7 -烷基)-氨基- C_1 - C_7 -烷基、吡咯烷子基- C_1 - C_7 -烷基氧基、1-(C_1 - C_7 -烷基)-哌啶-4-基、吗啉代- C_1 - C_7 -烷基氧基、硫吗啉代- C_1 - C_7 -烷基氧基、哌嗪-1-基、4-(苯基- C_1 - C_7 -烷基)-哌嗪-1-基、4-(C_1 - C_7 -烷基)-哌嗪-1-基、[4-(C_1 - C_7 -烷基)-哌嗪-1-基]- C_1 - C_7 -烷基、N-单-或 N,N-二-(C_1 - C_7 -烷基)-氨基- C_1 - C_7 -烷基、N-单-或 N,N-二-(C_1 - C_7 -烷基)-氨基- C_1 - C_7 -烷基氧基、[4-(C_1 - C_7 -烷基)-哌嗪-1-基]- C_1 - C_7 -烷基氧基、[4-(C_1 - C_7 -烷基)-哌嗪-1-基]-羰基所取代的苯基;

R^2 是氢、 C_1 - C_7 -烷基、 C_1 - C_7 -烷基氧基或卤素;

R^3 是氢、 C_1 - C_7 -烷基或苯基- C_1 - C_7 -烷基,

R^4 各自独立地是 C_1 - C_7 -烷基、卤素- C_1 - C_7 -烷基、卤素或 C_1 - C_7 -烷基氧基,

R^5 是氢(优选)、 C_1 - C_7 -烷基或苯基- C_1 - C_7 -烷基,

且 n 是 0、1、2、3、4 或 5;

或者

R^1 是被羟基、苯基- C_1 - C_7 -烷基氧基、哌嗪-1-基、4-(苯基- C_1 - C_7 -烷基)-哌嗪-1-基; N-单-或 N,N-二-(C_1 - C_7 -烷基)-氨基- C_1 - C_7 -烷基、吡咯烷子基- C_1 - C_7 -烷基氧基、1-(C_1 - C_7 -烷基)-哌啶-4-基、吗啉代- C_1 - C_7 -烷基氧基、硫吗啉代- C_1 - C_7 -烷基氧基、4-(C_1 - C_7 -烷基)-哌嗪-1-基、[4-(C_1 - C_7 -烷基)-哌嗪-1-基]- C_1 - C_7 -烷基、N-单-或 N,N-二-(C_1 - C_7 -烷基)-氨基- C_1 - C_7 -烷基、N-单-或 N,N-二-(C_1 - C_7 -烷基)-氨基- C_1 - C_7 -烷基氧基、[4-(C_1 - C_7 -烷基)-哌嗪-1-基]- C_1 - C_7 -烷基氧基、[4-(C_1 - C_7 -烷基)-哌嗪-1-基]-羰基所取代的苯基; 或者带

有一个本段中提到的取代基, 以及除此之外选自卤素和 C_1-C_7 -烷氧基的取代基的苯基;

R^2 是氢、 C_1-C_7 -烷基、 C_1-C_7 -烷氧基或卤素;

R^3 是氢、 C_1-C_7 -烷基或苯基- C_1-C_7 -烷基,

R^5 是氢(优选)、 C_1-C_7 -烷基或苯基- C_1-C_7 -烷基,

并且

或者 n 是 3、4 或 5 且 R^4 选自 C_1-C_7 -烷基、 C_1-C_7 -烷氧基和卤素, 条件是 C_1-C_7 -烷基、 C_1-C_7 -烷氧基和卤素中各自至少存在一个;

或者 n 是 2 且一个 R^4 是卤素- C_1-C_7 -烷基, 另一个 R^4 是 C_1-C_7 -烷氧基;

或者 n 是 3、4 或 5 且 R^4 选自卤素、碘代和 C_1-C_7 -烷氧基, 条件是卤素、碘代和 C_1-C_7 -烷氧基中各自至少存在一个;

或者 n 是 3、4 或 5 且 R^4 选自卤素、卤素- C_1-C_7 -烷基和 C_1-C_7 -烷氧基, 条件是卤素、卤素- C_1-C_7 -烷基和 C_1-C_7 -烷氧基中各自至少存在一个;

或者

式 IA 的化合物, 其中 R^1 是 4-(2-吗啉-4-基-乙氧基)-苯基氨基, R^2 是氢, R^3 是氢, R^4 是 2-和 6-氯及 3-和 5-甲氧基, n 是 4, R^5 是氢, Y 和 Z 是 N 且 X 是 CH;

或者

式 IA 的化合物, 其中 R^1 是 3-(4-甲基-哌嗪-1-基甲基)-苯基氨基, R^2 是氢, R^3 是甲基, R^4 是 2-和 6-氯及 3-和 5-甲氧基, n 是 4, R^5 是氢, Y 和 Z 是 N 且 X 是 CH,

或者

式 IA 的化合物, 其中 R^1 是 3-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基, R^2 是氢, R^3 是甲基, R^4 是 2-和 6-氯及 3-和 5-甲氧基, n 是 4, R^5 是氢, Y 和 Z 是 N 且 X 是 CH,

或者

式 IA 的化合物, 其中 R^1 是 4-(2-吗啉-4-基-乙氧基)-苯基氨基, R^2 是氢, R^3 是甲基, R^4 是 2-和 6-氯及 3-和 5-甲氧基, n 是 4, R^5 是氢, Y 和 Z

是 N 且 X 是 CH,

或者

式 IA 的化合物, 其中 R^1 是 4-(1-乙基-哌啶-4-基)-苯基氨基, R^2 是氢, R^3 是甲基, R^4 是 2-和 6-氯及 3-和 5-甲氧基, n 是 4, R^5 是氢, Y 和 Z 是 N 且 X 是 CH,

或者

式 IA 的化合物, 其中 R^1 是 4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基, R^2 是氢, R^3 是乙基, R^4 是 2-和 6-氯及 3-和 5-甲氧基, n 是 4, R^5 是氢, Y 和 Z 是 N 且 X 是 CH, 和/或

或者

式 IA 的化合物, 其中 R^1 是 4-(4-乙基-哌嗪-1-羰基)-苯基氨基, R^2 是氢, R^3 是甲基, R^4 是 2-和 6-氯及 3-和 5-甲氧基, n 是 4, R^5 是氢, Y 和 Z 是 N 且 X 是 CH;

或者两个或多个式 IA 化合物的混合物;

或其盐、前药、N-氧化物和/或酯。

3. 如权利要求 1 所述的式 IA 化合物, 其选自以下化合物:

1-[6-(4-苄氧基-苯基氨基)-嘧啶-4-基]-3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-甲基-脲,

3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-[6-(4-羟基-苯基氨基)-嘧啶-4-基]-1-甲基-脲,

1-{6-[4-(4-苄基-哌嗪-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-甲基-脲,

3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-甲基-1-[6-(4-哌嗪-1-基-苯基氨基)-嘧啶-4-基]-脲,

3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[2-氟-4-(2-吡咯烷-1-基-乙氧基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲,

3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-2-甲氧基-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲,

3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-3-氟-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲,

3-(5-甲氧基-3-三氟甲基-苯基)-1-{6-[3-氯-4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲,

1-{6-[2-氯-4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-甲基-脲, 和

3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-2-氟-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲;

或其盐、前药、N-氧化物和/或酯。

4. 如权利要求1所述的式IA化合物, 其选自以下化合物:

1-(2-氯-3,5-二甲氧基-6-甲基-苯基)-3-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-脲,

3-(2-氯-3,5-二甲氧基-6-甲基-苯基)-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲,

3-(2-氯-3,5-二甲氧基-6-甲基-苯基)-1-{6-[4-(2-二甲基氨基-乙氧基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲,

3-(2-氯-3,5-二甲氧基-6-甲基-苯基)-1-甲基-(6-{4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-乙氧基]-苯基氨基}-嘧啶-4-基)-脲,

3-(2-氯-6-碘-3,5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲,

3-(2-氯-3,5-二甲氧基-6-甲基-苯基)-1-{6-[4-(4-异丙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲,

3-(2-氯-3,5-二甲氧基-6-甲基-苯基)-1-[6-(3-二甲基氨基甲基-苯基氨基)-嘧啶-4-基]-1-甲基-脲,

3-(2-氯-3,5-二甲氧基-6-甲基-苯基)-1-{6-[3-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲,

3-(2-氯-3,5-二甲氧基-6-甲基-苯基)-1-甲基-1-{6-[4-(2-吡咯烷-1-基-乙氧基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲,

3-(2-氯-3,5-二甲氧基-6-甲基-苯基)-1-甲基-1-{6-[3-氟-4-(2-吡咯烷-1-基-乙氧基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲,

3-(2,4-二氯-5-甲氧基-3-三氟甲基-苯基)-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲, 和

3-(5-甲氧基-3-三氟甲基-苯基)-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲;

或其盐、前药、N-氧化物和/或酯。

5. 如权利要求 1 所述的式 IA 化合物, 其选自以下化合物:

1-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-3-{6-[4-(2-吗啉-4-基-乙氧基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-脲,

3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-甲基-1-{6-[3-(4-甲基-哌嗪-1-基甲基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-脲,

3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[3-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲,

3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-甲基-1-{6-[4-(2-吗啉-4-基-乙氧基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-脲,

3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[4-(1-乙基-哌啶-4-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲,

3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-乙基-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-脲; 和

3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-羰基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲;

或其盐、前药、N-氧化物和/或酯。

6. 如权利要求 1 所述的式 IA 化合物, 其选自以下化合物:

3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[6-(4-乙基-哌嗪-1-基)-吡啶-3-基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲; 和

3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[6-(4-异丙基-哌嗪-1-基)-吡啶-3-基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲,

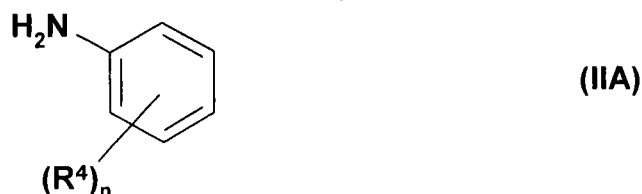
或其盐、前药、N-氧化物和/或酯。

7. 药物制剂，其包含如权利要求 1-6 中任一项所述的式 IA 化合物，或其可药用盐、前药、N-氧化物或酯，以及至少一种可药用载体。

8. 如权利要求 1-6 中任一项所述的式 IA 的化合物，或其可药用盐、前药、N-氧化物或酯用于动物或人体治疗中的用途，特别是用于对 FGFR 抑制有响应的疾病的治疗中的用途。

9. 如权利要求 1 所述的式 IA 的化合物，或其可药用盐、前药、N-氧化物或酯在制备用于治疗蛋白激酶，特别是 FGFR 依赖性疾病的药物制剂中的用途。

10. 制备如权利要求 1-6 中任一项所述的式 IA 化合物的方法，其包括在双反应性碳酸衍生物的存在下，将式 IIA 的苯胺化合物，



其中 R^4 和 n 如式 IA 的化合物所定义，与式 IIIA 的胺反应，



其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、X、Y 和 Z 如式 IA 化合物所定义；

并且，如果需要，将式 IA 化合物转化为不同的式 IA 化合物，将可获得的式 IA 化合物的盐转化为游离化合物或不同的盐，将可获得的游离式 IA 化合物转化为其盐，和/或将可获得的式 IA 化合物的异构体混合物分离成单个异构体。

11. 一种治疗酪氨酸激酶（特别是 FGFR）依赖性疾病的方法，其包含对需要此种治疗的人施用有效量的如权利要求 1-6 中任一项所述的式 IA 的化合物、其 N-氧化物、盐、酯或前药。

作为 FGF 抑制剂的嘧啶基芳基脲衍生物

发明概述

本发明涉及新的化合物、制剂、方法和用途。具体地，本发明涉及新的杂芳基芳基脲类化合物，和/或使用可以被定义为杂芳基芳基脲类化合物的化合物在治疗蛋白激酶依赖性疾病中的用途或方法，或在制备治疗蛋白激酶依赖性疾病的药物制剂中的用途或方法。本发明还涉及使用这类化合物治疗所述疾病的方法、包含杂芳基芳基脲类化合物的药物制剂以及制备所述的新杂芳基芳基脲类化合物的方法。本发明涉及如下所公开的其他主题。

技术背景

蛋白激酶(PK)是催化细胞蛋白质中特定的丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸残基磷酸化的酶。这些底物蛋白质的翻译后修饰充当了调控细胞增殖、活化和/或分化的分子开关。在许多疾病阶段、包括良性和恶性增殖病症中，已经观察到了异常或过度的 PK 活性。通过利用 PK 抑制剂，已经可以在许多情况下体外和体内治疗疾病，例如增生性病症。

这些激酶大致分为两类，特异性磷酸化丝氨酸和苏氨酸的激酶以及特异性磷酸化酪氨酸的激酶。此外，一些称为“双特异性”的激酶能够磷酸化酪氨酸和丝氨酸/苏氨酸残基。

蛋白激酶还可以通过其在细胞内的位置来进行表征。一些激酶是能够连接细胞外配基的跨膜受体蛋白质。与配基的连接改变了受体蛋白激酶的催化活性。其他激酶是没有跨膜结构域的非受体蛋白质，其他另一些激酶是具有位于跨膜蛋白质细胞外部分的催化结构域的外激酶或者是作为可溶性细胞外蛋白质分泌的外激酶。

许多激酶涉及调控性级联反应，其中它们的底物可以包含活性通过其

磷酸化状态进行调节的其他激酶。因此，下游区效应子的活性通过由通道激活所引致的磷酸化来进行调控。

受体蛋白酪氨酸激酶（RPTK）是跨膜受体的一个亚类，其具有内在的配体刺激的酪氨酸激酶活性。RPTK 活性受到严密的控制。当其实变或结构改变时，RPTK 可以变成有效的癌蛋白，造成细胞转化或至少是失控。大体而言，对于所有涉及癌症的 RPTK 来说，致癌性的失控源于一种或多种确保催化结构域正常抑制的自动控制机制的解除或混乱。数次发现超过一半的已知 RPTK 的人类恶性肿瘤(包括一些散发病例；Blume-Jensen 等人, *Nature* 411: 355-365(2001))相关的突变或超表达形式。

RPTK 的超表达通过增加二聚体浓度导致组成型激酶活化。例如 Neu/ErbB2 和表皮生长因子受体(EGFR)，其通常在乳腺癌和肺癌中增加，以及骨骼疾病和增生性病症相关的成纤维细胞生长因子(Blume-Jensen 等人, 2001)。

血管发生是一种从现有血管形成新毛细血管的机制。在需要时，血管系统有能力产生新的毛细血管网络，以维持组织和器官的正常功能。但是，在成人中血管发生受到适当的限制，仅在伤口愈合和月经期间子宫内膜的新血管形成中才出现。参见 Merenmies 等人, *Cell Growth & Differentiation*, 8, 3-10(1997)。另一方面，不期望的血管生成是一些疾病如视网膜病变、银屑病、类风湿性关节炎、年龄相关性黄斑变性(AMD)和癌症(实体瘤)的标志。Folkman, *Nature Med.*, 1, 27-31(1995)。已经表明参与血管发生过程的蛋白激酶包括生长因子受体酪氨酸激酶家族的三个成员：VEGF-R2(血管内皮生长因子受体 2，也称为 KDR(激酶插入结构域受体)和 FLK-1；FGF-R(成纤维细胞生长因子受体)；和 TEK(也称为 Tie-2)。

TEK(也称为 Tie-2)是仅在内皮细胞上表达的受体酪氨酸激酶，已表明其在血管发生中具有作用。与血管生成素-1 因子的结合导致 TEK 激酶结构域的自身磷酸化，引起信号转导过程，其表现为介导内皮细胞与内皮周围的支持细胞间的相互作用，由此促进新形成的血管成熟。另一方面，血管生成素-2 因子表现为拮抗血管生成素-1 对 TEK 的作用并且中断血管生

成。Maisonpierre 等人, *Science*, 277, 55-60(1997).

在外科手术切除原发肿瘤的同时, 将 Ad-ExTek(一种可溶的、腺病毒表达的 Tie-2 细胞外结构域)递送施用给瘤转移的临床相关的小鼠模型, 可抑制瘤转移(Lin 等人, *Proc Natl Acad Sci 美国* 95, 8829-8834(1998)). ExTek 抑制 Tie-2 的功能可能是隔离血管生成素配体和/或阻止天然 Tie-2 受体异二聚化的结果。该研究证明, 首先, 阻断 Tie-2 信号通路在健康有机体中是耐受良好的, 其次, 可以提供治疗益处。

费城染色体是慢性骨髓性白血病(CML)的标志且携带包含 bcr 基因 N-端外显子和 c-abl 基因主要的 C-端部分(外显子 2-11)的杂合基因。该基因产物是 210 kD 的蛋白质(p210 Bcr-Abl)。Bcr-Abl 蛋白质的 Abl 部分包含 abl-酪氨酸激酶, 其受到野生型 c-abl 的严格调控, 但是在 Bcr-Abl 融合蛋白质中组成型激活。该失控的酪氨酸激酶与多个细胞信号通路相互作用, 导致细胞的转化与增殖失控(Lugo 等人, *Science* 247, 1079 [1990])。

Bcr-Abl 蛋白质的突变型也已被鉴定。Bcr-Abl 突变型的详细综述已经发表(Cowan-Jones 等人, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 2004, 4 285-299)。

EphB4(也称为 HTK)及其配体, 肝配蛋白 B2(HTKL)在构建和决定血管网络中具有重要作用。EphB4 特异性表达在静脉上皮细胞上, 而在血管发育早期阶段, 肝配蛋白 B2 特异性地并相反地表达在动脉内皮细胞上。在肝配蛋白 B2 或 EphB4 缺陷的情况下, 功能失调的基因引起小鼠胚胎致死, 并且这些胚胎在形成毛细血管连接时显示出相同的缺陷。它们都是胚胎发育期间在血细胞生成和血管发育的最初位点表达。确定了其对于正常的造血发育、内皮发育、成血管细胞发育和原始中胚层发育的重要作用。EphB4 缺陷导致胚胎干细胞的中胚层分化结果的改变。在乳房组织中 EphB4 的异位表达造成结构紊乱、组织功能异常和恶性肿瘤的易感性(参见, 例如 N. Munarini 等人, *J. Cell. Sci.* 115, 25-37(2002))。从这些数据和其他数据可以得出结论, 不恰当的 EphB4 表达可以涉及恶性肿瘤的形成, 因此预期 EphB4 的抑制可以成为对抗恶性肿瘤如癌症等的手段。

c-Src(也称为 p60 c-Src)是胞质非受体酪氨酸激酶。c-Src 参与了许多多肽生长因子如表皮生长因子(EGF)和血小板衍生生长因子(PDGF)的促有丝分裂信号的转导。c-Src 在乳房癌、胰腺癌、或成神经细胞瘤和其他癌症中超表达。在人类结肠癌中已经鉴定了突变的 c-Src。c-Src 磷酸化多种参与调控细胞外基质和胞质肌动蛋白细胞骨架间相互作用的蛋白质。调节 cSrc 活性可以涉及与细胞增殖、分化和死亡相关的疾病。参见 Bjorge, J. D. 等人(2000) *Oncogene* 19(49): 5620-5635; Halpern, M. S. 等人(1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93(2), 824-7; Belsches, A. P. 等人(1997) *Frontiers in Bioscience* [电子出版物] 2: D501-D518; Zhan, X. 等人(2001) *Chemical Reviews* 101: 2477-2496; Haskell, M. D. 等人(2001) *Chemical Reviews* 101: 2425-2440。

现在, fms-样酪氨酸激酶 3(FLT3)受体酪氨酸激酶被视为骨髓样白血病和一些淋巴样白血病发病机制的重要介质。FLT3 配体激活白血病细胞上的 FLT3, 导致受体二聚化和促进细胞生长并抑制凋亡的途径中的信号转导(*Blood*, 第 98 卷, 第 3 期, 885-887 页(2001))。

酪氨酸激酶抑制剂在 AML 治疗中的用途由于在激酶催化结构域中获得突变而受到阻碍, 在 BCR-ABL 的情况下, 这些突变导致了对伊马替尼的抗性。

FLT3 在 AML 和某些急性淋巴性白血病的病例中广泛表达。FLT3 中的激活突变导致了 AML 病人的中度危险。因此, FLT3 是用于治疗干预的有希望的靶点。

血小板衍生生长因子受体(PDGFR)酪氨酸激酶在多种肿瘤中表达, 所述肿瘤例如小细胞肺癌、前列腺癌和成胶质细胞瘤以及许多在基质肿瘤和血管间隙肿瘤。在胰腺癌中已经观察到 PDGF 和 PDGF 受体(PDGFR)的表达(Ebert M 等人, *Int J Cancer*, 62: 529-535(1995))。

Raf 丝氨酸/苏氨酸激酶是 Ras/促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号模块 (signaling module) 的主要成分, 该模块响应细胞外刺激而调控复杂的转录程序。Raf 基因编码了已知与 ras 癌基因结合的高度保守的丝氨酸/苏

氨酸特异性蛋白激酶。它们是信号转导通路的一部分，所述信号转导通路被认为包括受体酪氨酸激酶、p21 ras、Raf 蛋白激酶、Mek1(ERK 活化剂或 MAPKK)激酶和 ERK(MAPK)激酶，其最终将转录因子磷酸化。在该通路中，Raf 激酶被 Ras 激活，并且磷酸化和激活了促分裂原活化蛋白激酶的两个同种型(称作 Mek1 和 Mek2)，其属于双特异性丝氨酸/苏氨酸激酶。Mek 的两个同种型激活了促分裂原活化蛋白激酶 1 和 2(MAPK，也称作细胞外信号配体激酶 1 和 2，或 Erk1 和 Erk2)。MAPK 磷酸化了包括转录因子在内的多种底物并且由此启动它们的转录程序。参与 Ras/MAPK 通路的 Raf 激酶影响和调节许多细胞功能，例如增殖、分化、存活、致癌性转化和凋亡。

利用哺乳动物细胞中失调和显性抑制的 Raf 突变体的研究以及利用模式生物的生化 and 遗传技术的研究，证实了 Raf 在多个信号通路中的重要作用和位置。在很多情况下，通过刺激细胞酪氨酸磷酸化的受体来活化 Raf 取决于 Ras 的活性，表明 Ras 在 Raf 的上游起作用。Raf-1 被激活后接着磷酸化和激活 Mek1，导致信号传导至下游的效应子，例如 MAPK(促分裂原活化蛋白激酶)(Crews 等人，(1993) *Cell* 74: 215)。Raf 丝氨酸/苏氨酸激酶被认为是参与动物细胞增殖的主要的 Ras 效应子(Avruch 等人，(1994) *Trends Biochem. Sci.* 19: 279)。

Raf 激酶有三种不同的同种型，Raf-1(c-Raf)、A-Raf 和 B-Raf，通过与 Ras 相互作用而激活 MAPK 激酶通路的能力、组织分布和亚细胞定位来区分它们(Marias 等人，*Biochem. J.* 351: 289-305, 2000; Weber 等人，*Oncogene* 19: 169-176, 2000; Pritchard 等人，*Mol. Cell. Biol.* 15: 6430-6442, 1995)。

最近的研究已表明在皮肤痣中 B-Raf 突变是黑色素瘤形成的关键步骤(Pollock 等人，*Nature Genetics* 25: 1-2, 2002)。此外，最新研究已显示 B-Raf 激酶结构域的激活突变发生在约 66% 的黑素瘤、12% 的结肠癌和 14% 的肝癌中(Davies 等人，*Nature* 417: 949-954, 2002)(Yuen 等人，*Cancer Research* 62: 6451-6455, 2002)(Brose 等人，*Cancer Research* 62: 6997-7000, 2002)。

在 Raf 激酶水平上的 Raf/MEK/ERK 通路的抑制剂可作为有效的肿瘤治疗剂，对抗具有超表达的或突变的受体酪氨酸激酶、被激活的胞内酪氨酸激酶的肿瘤、具有 Grb2(经 Sos 交换因子刺激 Ras 的衔接蛋白)异常表达的肿瘤以及含有 Raf 自身活化突变的肿瘤。在早期临床诊断中，Raf-1 激酶抑制剂（其也抑制 B-Raf）已预示在癌症治疗中作为治疗剂(Crump, *Current Pharmaceutical Design* 8: 2243-2248, 2002; Sebastien 等人, *Current Pharmaceutical Design* 8: 2249-2253, 2002)。

通过应用 RNA 反义技术在细胞系中中断 Raf 的表达已显示出抑制由 Ras 和 Raf 介导的致肿瘤性(Kolch 等人, *Nature* 349: 416-428, 1991; Monia 等人, *Nature Medicine* 2(6): 668-675, 1996)。

成纤维细胞生长因子

正常的生长以及组织修复和重构需要对于激活生长因子及其受体的特异和精巧的控制。成纤维细胞生长因子(FGFs)包括超过 20 种结构上相关的多肽的家族，其受到发育的调控并且在多种组织中广泛表达。FGF 刺激增殖、细胞迁移和分化在骨骼和四肢发育、伤口愈合、组织修复、血细胞生成、血管发生和肿瘤形成中起到重要的作用（综述于 Ornitz, *Novartis Found Symp* 232: 63-76; 讨论 76-80, 272-82(2001))。

FGF 的生物学作用通过属于 RPTK 蛋白激酶家族的特异性细胞表面受体来介导。这些蛋白质包括胞外配体结合结构域、单跨膜结构域和在结合 FGF 后发生磷酸化胞内酪氨酸激酶结构域。迄今已经鉴定了四种 FGFR: FGFR1(也称为 Flg、fms-样基因、flt-2、bFGFR、N-bFGFR 或 Cek1), FGFR2(也称为 Bek-细菌表达的激酶-、KGFR、Ksam、Ksaml 和 Cek3), FGFR3(也称为 Cek2)和 FGFR4。所有成熟的 FGFR 均具有包括氨基端信号肽、三个胞外免疫球蛋白样结构域 (Ig 结构域 I、Ig 结构域 II、Ig 结构域 III)以及在 Ig 结构域之间的酸性区域(“酸性盒”结构域)、跨膜结构域和胞内激酶结构域的共同结构(Ullrich 和 Schlessinger, *Cell* 61: 203, 1990; Johnson 和 Williams(1992) *Adv. Cancer Res.* 60: 1-41)。不同的 FGFR 同种型具有对于不同的 FGF 配体的不同结合亲和性,因此,FGF8(雄

激素诱导的生长因子)和 FGF9(神经胶质活化因子)表现为具有对 FGFR3 更强的选择性(Chellaiah 等人 *J Biol. Chem* 1994; 269: 11620)。

另一大类细胞表面结合位点包括硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(HSPG)的结合位点,需要其高亲和性的相互作用和激活 FGF 家族的所有成员。硫酸乙酰肝素结构变体的组织特异性表达赋予配体-受体特异性和 FGF 的活性。

FGFR-相关的疾病

近来的发现表明,由 FGFR 突变造成的骨骼畸形的数量增加,包括软骨发育不全,这是人类侏儒症的最常见形式。

在 FGF-R1、FGF-R2 和 FGFR3 不同结构域中特定的点突变与被划分为颅缝骨结合综合征和侏儒综合征的常染色体显性人类骨骼发育不良相关(Coumoul 和 Deng, *Birth Defects Research* 69: 286-304(2003))。FGF-R3 突变相关的骨骼发育不良包括软骨发育不良、与发育延迟相关的重度软骨发育不全以及黑棘皮症(SADDAN)和致死性发育不良(TD)(Webster 等人, *Trends Genetics* 13(5): 178-182(1997); Tavormina 等人, *Am. J. Hum. Genet.*, 64: 722-731(1999))。FGFR3 突变也被描述于两种颅缝早闭症的表型中: Muenke 冠状颅缝早闭症(Bellus 等人, *Nature Genetics*, 14: 174-176(1996); Muenke 等人, *Am. J. Hum. Genet.*, 60: 555-564(1997))和伴有黑棘皮症的克鲁宗综合征 (Meyers 等人, *Nature Genetics*, 11: 462-464(1995))。克鲁宗综合征与 FGFR2 特定的点突变相关,而且家族型的和散发型的斐弗综合征都与 FGFR1 和 FGFR2 的突变相关(Galvin 等人, *PNAS 美国*, 93: 7894-7899(1996); Schell 等人, *Hum Mol Gen*, 4: 323-328(1995))。FGFR 的突变导致了突变受体的组成型激活并增加受体蛋白酪氨酸激酶活性,引起细胞与组织无法分化。

特别是,软骨发育不全突变导致了突变受体的稳定性增强,抑制受体激活而阻止下调,引起软骨细胞成熟受限并且抑制骨生长(综述于 Vajo 等人, *Endocrine Reviews*, 21(1) : 23-39(2000))。

有不断增加的证据表明在多种类型的癌症中存在突变激活的 FGFR3。在两种常见的上皮癌即膀胱癌和宫颈癌以及多发性骨髓瘤中,组成性

激活的 FGFR3 是 FGFR3 在癌症中致癌作用的首要证据。此外,最近的研究报道了在大部分的良性皮肤肿瘤中存在 FGFR3 激活突变(Logie 等人, *Hum Mol Genet* 2005)。FGFR3 目前在膀胱癌中是最常突变的癌基因,其在大约 50%的全部膀胱癌病例中和大约 70%的具有表皮膀胱肿瘤的病例中发生了突变 (Cappellen 等人, *Nature Genetics* 1999, 23: 19-20; van Rhijn 等人, *Cancer Research* 2001, 61: 1265-1268; Billerey 等人, *Am. J. Pathol.* 2001, 158: 1955-1959, WO 2004/085676)。在膀胱癌中也报道了 FGFR3 的超表达(表皮的和侵入性的) (Gomez-Roman 等人, *Clinical Cancer Research* 2005)。

由于染色体易位 t(4,14)造成的 FGFR3 异常超表达在 10-25%的多发性骨髓瘤病例中均有报道(Chesi 等人, *Nature Genetics* 1997, 16: 260-264; Richelda 等人, *Blood* 1997, 90: 4061-4070; Sibley 等人, *BJH* 2002, 118: 514-520; Santra 等人, *Blood* 2003, 101: 2374-2476)。FGFR3 激活突变在 5-10%的具有 t(4,14)的多发性骨髓瘤中可以见到,并且与进行性肿瘤进展相关(Chesi 等人, *Nature Genetics* 1997, 16: 260-264; Chesi 等人, *Blood*, 97(3): 729-736(2001); Intini, et al, *BJH* 2001, 114: 362-364)。

在本文中, FGFR3 信号传递的后果通常表现为细胞类型特异性的。在软骨细胞中, FGFR3 的高活性导致生长抑制(综述于 Omitz, 2001),而在骨髓瘤细胞中,其促进肿瘤进展(Chesi 等人, 2001)。

现已发现,抑制 FGFR3 活性代表了一种治疗 T 细胞介导的炎症或自身免疫性疾病的方法,例如用于治疗 T 细胞介导的炎症或自身免疫性疾病包括但不限于类风湿关节炎(RA)、II 型胶原关节炎、多发性硬化症(MS)、系统性红斑狼疮(SLE)、银屑病、幼年型糖尿病、舍格伦病、甲状腺病、结节病、自身免疫性葡萄膜炎、炎性肠病(克罗恩病和溃疡性结肠炎)、乳糜泻和重症肌无力。参见 WO 2004/110487。

FGFR3 突变导致的病症还描述于 WO 03/023004 和 WO 02/102972。

在由 FGFR3 和其他 FGFR 引起的疾病中(特别是与例如异常的 FGF23 血清水平相关的),还提及了常染色体显性的血磷酸盐过少的佝偻病

(ADHR)、X-染色体连锁的血磷酸盐过少的佝偻病(XLH)、肿瘤诱导的骨软化病(TIO)、骨纤维异样增生症(FH)(也参见 X. Yu 等人, *Cytokine & Growth Factor Reviews* 16, 221-232(2005), 和 X. Yu 等人, *Therapeutic Apheresis and Dialysis* 9(4), 308-312(2005))。

在乳腺癌中涉及 FGFR1、FGFR2 和 FGFR4 的基因扩增和/或超表达 (Penault-Llorca 等人, *Int J Cancer* 1995; Theillet 等人, *Genes Chrom. Cancer* 1993; Adnane 等人, *Oncogene* 1991; Jaakola 等人, *Int J Cancer* 1993; Yamada 等人, *Neuro Res* 2002)。FGFR1 和 FGFR4 的超表达也与胰腺癌和星形细胞瘤相关(Kobrin 等人, *Cancer Research* 1993; Yamanaka 等人, *Cancer Research* 1993; Shah 等人, *Oncogene* 2002; Yamaguchi 等人, *PNAS* 1994; Yamada 等人, *Neuro Res* 2002)。前列腺癌也与 FGFR1 的超表达相关(Giri 等人, *Clin Cancer Res* 1999)。

FGFs/FGFR 还参与血管发生。因此, 靶向 FGFR 系统也被预测为治疗原发性肿瘤和瘤转移的抗血管生成疗法(参见, 例如 Presta 等人, *Cytokine & Growth Factors Reviews* 16, 159-178(2005))。

特别是 FGFR3 的突变(如 FGFR3b)还被描述为在口腔扁平细胞癌病例中造成这类受体组成型激活的原因(参见, 例如 Y. Zhang 等人, *Int. J. Cancer* 117, 166-168(2005))。

FGFR 的表达增强, 特别是 FGFR1 的表达增强, 已被报道为与慢性梗阻性肺疾病(COPD) (尤其是支气管) 相关(参见, 例如 A. Kranenburg 等人, *J. Pathol.* 206, 28-38(2005))。

涉及 FGF-R1 基因座并造成 FGR-R1 的激活形式的染色体易位已被报道为造成 8p11 骨髓增生综合征=嗜酸性骨髓增生综合征(EMS)的原因(参见 D. Macdonald 等人, *Cross NCP(2002) Acta Haematologica* 107: 101-107)。

拮抗 FGFR、特别是 FGFR1 或 FGFR4 的方法也被描述用于治疗肥胖症、糖尿病和/或其相关疾病, 例如代谢综合征、心血管疾病、高血压、异常的胆固醇和甘油三酯水平、皮肤病(如皮肤感染)、静脉曲张、黑棘皮症、湿疹、运动不耐受、2 型糖尿病、胰岛素耐受、高胆固醇血症、胆石病、

矫形外科损伤、血栓栓塞疾病、冠脉或血管狭窄(如动脉粥样硬化)、日间嗜睡、睡眠呼吸暂停、晚期肾病、胆囊疾病、痛风、心脏病、免疫应答受损、呼吸功能受损、受伤后感染、不育症、肝病、下腰痛、产科与妇科并发症、胰腺炎、中风、手术并发症、压迫性尿失禁和/或胃肠道病症(参见, 例如 WO 2005/037235 A2)。

酸性成纤维细胞生长因子(特别是 FGF-1)和 FGFR1 也被描述为参与成视网膜细胞瘤的异常信号传递, 导致结合 FGF-1 后增生(参见, 例如 S. Siffroi-Fernandez 等人, Arch. Ophthalmology 123, 368-376(2005))。

已表明通过阻断成纤维细胞生长因子信号通路可以抑制滑膜肉瘤的生长(参见, 例如 T. Ishibe 等人, Clin. Cancer Res. 11(7), 2702-2712(2005))。

还可以证明 FGFR 参与了甲状腺癌。

表皮生长因子家族和相关疾病

表皮生长因子受体(EGF-R)和 ErbB-2 激酶是蛋白质酪氨酸激酶受体, 其与它们的家族成员 ErbB-3 和 ErbB-4 一起在大量的哺乳动物细胞包括人类细胞、特别是上皮细胞、免疫系统的细胞, 以及中枢与外周神经系统的细胞的信号转导中起到关键作用。例如, 在多种细胞类型中, 受体相关的蛋白质酪氨酸激酶的 EGF 诱导的激活是细胞分裂的必要条件, 因此对于细胞群体的增殖是必要的。最重要的是, 在许多人类肿瘤的基本组分中观察到了 EGF-R(HER-1)和/或 ErbB-2(HER-2)的超表达。例如, 发现 EGF-R 在非小细胞肺癌、鳞状细胞癌(头和颈部)、乳腺癌、胃癌、卵巢癌、结肠癌和前列腺癌以及神经胶质瘤中超表达。发现 ErbB-2 在鳞状细胞癌(头和颈部)、乳腺癌、胃癌和卵巢癌以及神经胶质瘤中超表达。

在所有上述情况中, 涉及蛋白激酶异常活性的调节(特别是抑制这类激酶的活性)的那些, 可以合理地预期对所述疾病有效。

因此, 需要能够阻断异常的组成型受体蛋白酪氨酸激酶活性、特别是 FGFR 活性, 从而治疗与上述突变相关的临床表现并调节多种生物学功能的高亲和性和/或选择性的分子。

考虑到大量的蛋白激酶抑制剂，众多的增生性疾病和其他 PK-相关疾病，现在有必要提供用作 PK 抑制剂的新型化合物，并由此用于治疗这些蛋白质酪氨酸激酶(PTK)相关疾病。所需要的是新型的具有药学优点的 PK 抑制性化合物。

本发明的一般性描述：

现在已经发现在下文中更加详细给出的定义为属于杂芳基芳基脲类的化合物显示对许多蛋白质酪氨酸激酶的抑制作用，特别是对本文提到的任意此类激酶（更加特别是 FGFR）的抑制作用。

可以提到的本文的化合物抑制的激酶的实例具体是 FGFR1、FGFR2、FGFR3 和 FGFR4。其他被抑制的激酶是受体酪氨酸激酶 VEGF-R，具体而言是 VEGF 受体 KDR(VEGF-R2)。公开的化合物适用于抑制一种或多种这些和/或其他蛋白质酪氨酸激酶和/或抑制这些酶的变体。考虑到这些活性，所述化合物特别可用于治疗涉及此类型激酶（特别是提到的那些激酶）错乱或过度活性的疾病。

本文公开的化合物可以以不同的形式，例如游离酸、游离碱、酯类和例如其他前药、盐和互变异构体的形式存在，且本文包含所有不同形式的所述化合物。

保护范围包括赝品或欺诈品，其包含或声称包含本发明化合物，不考虑其是否实际上确实包含此类化合物且不考虑是否包含任何此类化合物的治疗有效量。因此保护范围包括包装，包含表明其包含了本发明的种类或药物制剂或组合物的描述和说明书，以及作为或包含或声称包含此类制剂、组合物或种类的产品。

本说明书和权利要求书全文，除非上下文另有需要，单数形式都包含复数。具体而言，除非上下文另有需要，任何所使用的不确定的冠词在本说明书中都理解为考虑了复数和单数。

除非与本文所述的内容不相容，与本发明的具体方面、实施方案或实施例相关的特征、整数、特性、化合物、化学部分或基团应当理解为可用

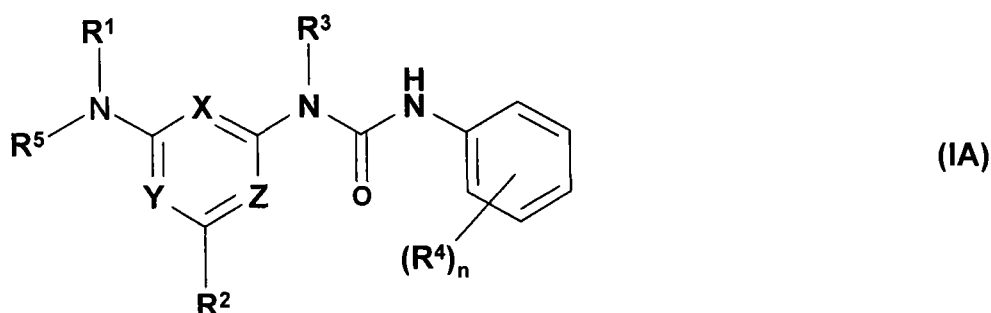
于本文描述的任何其他的方面、实施方案或实施例。

本说明书和权利要求书中，词语“包含”和“包括”及其不同的变体是指“包含但不限于”，其不意味着（并且不）排除其他部分、添加物、成分、整体或步骤。

本文的其他方面和实施方案将在以下的描述和权利要求中进行说明。

发明详述

现在已经发现式 IA 的新化合物，



其中

X、Y 和 Z 中的两个是 N(氮)，第三个是 CH 或 N(优选地，Y 和 Z 是 N，且 Z 是 CH)；并且

或者其中，

R¹ 是被羟基、苯基-C₁-C₇-烷氧基、哌嗪-1-基或 4-(苯基-C₁-C₇-烷基)-哌嗪-1-基所取代的苯基；或者被(i)卤素或 C₁-C₇-烷氧基以及除此之外被(ii)羟基、苯基-C₁-C₇-烷氧基、N-单-或 N,N-二-(C₁-C₇-烷基)-氨基-C₁-C₇-烷基、吡咯烷子基(pyrrolidino)-C₁-C₇-烷氧基、1-(C₁-C₇-烷基)-哌啶-4-基、吗啉代-C₁-C₇-烷氧基、硫吗啉代-C₁-C₇-烷氧基、哌嗪-1-基、4-(苯基-C₁-C₇-烷基)-哌嗪-1-基、4-(C₁-C₇-烷基)-哌嗪-1-基、[4-(C₁-C₇-烷基)-哌嗪-1-基]-C₁-C₇-烷基、N-单-或 N,N-二-(C₁-C₇-烷基)-氨基-C₁-C₇-烷基、N-单-或 N,N-二-(C₁-C₇-烷基)-氨基-C₁-C₇-烷氧基、[4-(C₁-C₇-烷基)-哌嗪-1-基]-C₁-C₇-烷氧基、[4-(C₁-C₇-烷基)-哌嗪-1-基]-羰基所取代的苯基；

R² 是氢、C₁-C₇-烷基、C₁-C₇-烷氧基或卤素；

R^3 是氢、 C_1-C_7 烷基或苯基- C_1-C_7 烷基,

R^4 各自独立地是 C_1-C_7 烷基、卤素- C_1-C_7 烷基、卤素或 C_1-C_7 烷氧基,
且 n 是 0、1、2、3、4 或 5;

或者

R^1 是被羟基、苯基- C_1-C_7 烷氧基、哌嗪-1-基、4-(苯基- C_1-C_7 烷基)-哌嗪-1-基所取代的苯基; N-单-或 N,N-二-(C_1-C_7 烷基)-氨基- C_1-C_7 烷基、吡咯烷子基- C_1-C_7 烷氧基、1-(C_1-C_7 烷基)-哌啶-4-基、吗啉代- C_1-C_7 烷氧基、硫吗啉代- C_1-C_7 烷氧基、4-(C_1-C_7 烷基)-哌嗪-1-基、[4-(C_1-C_7 烷基)-哌嗪-1-基]- C_1-C_7 烷基、N-单-或 N,N-二-(C_1-C_7 烷基)-氨基- C_1-C_7 烷基、N-单-或 N,N-二-(C_1-C_7 烷基)-氨基- C_1-C_7 烷氧基、[4-(C_1-C_7 烷基)-哌嗪-1-基]- C_1-C_7 烷氧基、[4-(C_1-C_7 烷基)-哌嗪-1-基]-羰基所取代的苯基; 或者带有一个本段中提到的取代基和除此之外的选自卤素和 C_1-C_7 烷氧基的取代基的苯基;

R^2 是氢、 C_1-C_7 烷基、 C_1-C_7 烷氧基或卤素;

R^3 是氢、 C_1-C_7 烷基或苯基- C_1-C_7 烷基,

R^5 是氢(优选)、 C_1-C_7 烷基或苯基- C_1-C_7 烷基,

并且

或者 n 是 3、4 或 5 且 R^4 选自 C_1-C_7 烷基、 C_1-C_7 烷氧基和卤素, 条件是 C_1-C_7 烷基、 C_1-C_7 烷氧基和卤素中各自至少存在一个;

或者 n 是 2 且一个 R^4 是卤素- C_1-C_7 烷基, 另一个 R^4 是 C_1-C_7 烷氧基;

或者 n 是 3、4 或 5 且 R^4 选自卤素、碘代和 C_1-C_7 烷氧基, 条件是卤素、碘代和 C_1-C_7 烷氧基中各自至少存在一个;

或者 n 是 3、4 或 5 且 R^4 选自卤素、卤素- C_1-C_7 烷基和 C_1-C_7 烷氧基, 条件是卤素、卤素- C_1-C_7 烷基和 C_1-C_7 烷氧基中各自至少存在一个;

或者

Y 和 Z 是 N(氮)且 X 是 CH,

或者其中

R^1 是被 N- C_1-C_7 烷基-哌嗪-1-基单取代的 3-吡啶基,

R^2 是氢,

R^3 是氢,

R^4 各自独立地是 C_1 - C_7 -烷基、卤素- C_1 - C_7 -烷基、卤素或 C_1 - C_7 -烷氧基,

R^5 是氢

且 n 是 1、2、3、4 或 5;

或者

式 IA 的化合物, 其中 R^1 是 4-(2-吗啉-4-基-乙氧基)-苯基氨基, R^2 是氢, R^3 是氢, R^4 是 2-和 6-氯及 3-和 5-甲氧基, n 是 4, R^5 是氢, Y 和 Z 是 N 且 X 是 CH;

或者

式 IA 的化合物, 其中 R^1 是 3-(4-甲基-哌嗪-1-基甲基)-苯基氨基, R^2 是氢, R^3 是甲基, R^4 是 2-和 6-氯及 3-和 5-甲氧基, n 是 4, R^5 是氢, Y 和 Z 是 N 且 X 是 CH,

或者

式 IA 的化合物, 其中 R^1 是 3-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基, R^2 是氢, R^3 是甲基, R^4 是 2-和 6-氯及 3-和 5-甲氧基, n 是 4, R^5 是氢, Y 和 Z 是 N 且 X 是 CH,

或者

式 IA 的化合物, 其中 R^1 是 4-(2-吗啉-4-基-乙氧基)-苯基氨基, R^2 是氢, R^3 是甲基, R^4 是 2-和 6-氯及 3-和 5-甲氧基, n 是 4, R^5 是氢, Y 和 Z 是 N 且 X 是 CH,

或者

式 IA 的化合物, 其中 R^1 是 4-(1-乙基-哌啶-4-基)-苯基氨基, R^2 是氢, R^3 是甲基, R^4 是 2-和 6-氯及 3-和 5-甲氧基, n 是 4, R^5 是氢, Y 和 Z 是 N 且 X 是 CH,

或者

式 IA 的化合物, 其中 R^1 是 4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基, R^2 是氢, R^3 是乙基, R^4 是 2-和 6-氯及 3-和 5-甲氧基, n 是 4, R^5 是氢, Y 和 Z 是 N

且 X 是 CH, 和/或

或者

式 IA 的化合物, 其中 R^1 是 4-(4-乙基-哌嗪-1-羰基)-苯基氨基, R^2 是氢, R^3 是甲基, R^4 是 2-和 6-氯及 3-和 5-甲氧基, n 是 4, R^5 是氢, Y 和 Z 是 N 且 X 是 CH;

或者两个或多个式 IA 化合物的混合物;

或者各种情况的式 IA 化合物(如上下文提到的)的盐、其前药、N-氧化物或酯,

其对于治疗与蛋白激酶活性相关的病症, 特别是与可以通过蛋白质酪氨酸激酶调节化合物进行治疗的疾病相关的病症, 更加特别地是 FGFR 调节化合物进行治疗的疾病相关的病症是有用的。

因此, 本发明涉及一种或多种此类的式 IA 化合物、其盐、前药、N-氧化物或酯, 以及上文提到的用途、方法和药物制剂。

具体而言, 本发明涉及式 IA 的化合物, 其中

X、Y 和 Z 中的两个是 N(氮), 第三个是 CH 或 N(优选地, Y 和 Z 是 N 且 Z 是 CH); 并且

或者

(A) R^1 是被羟基、被苯基- C_1 - C_7 -烷氧基(特别是苄氧基)、被哌嗪-1-基或被 4-(苯基- C_1 - C_7 -烷基)-哌嗪-1-基(特别是 4-苄基-哌嗪-1-基)所取代的苯基; 或者(i)(一次)被卤素(特别是氟或氯)或 C_1 - C_7 -烷氧基(特别是甲氧基)以及另外(ii)(一次)被羟基、苯基- C_1 - C_7 -烷氧基(特别是苄氧基)、N-单-或 N,N-二-(C_1 - C_7 -烷基)-氨基- C_1 - C_7 -烷基(特别是二甲基氨基甲基)、吡咯烷子基- C_1 - C_7 -烷氧基(特别是 2-吡咯烷子基-乙氧基)、1-(C_1 - C_7 -烷基)-哌啶-4-基(特别是 1-乙基-哌啶-4-基)、吗啉代- C_1 - C_7 -烷氧基(特别是 2-吗啉代-乙氧基)、硫吗啉代- C_1 - C_7 -烷氧基(特别是 2-硫吗啉代-乙氧基)、哌嗪-1-基、4-(苯基- C_1 - C_7 -烷基)-哌嗪-1-基(特别是 4-苄基哌嗪-1-基)、4-(C_1 - C_7 -烷基)-哌嗪-1-基(特别是 4-(甲基、乙基或异丙基)-哌嗪-1-基)、[4-(C_1 - C_7 -烷基)-哌嗪-1-基]- C_1 - C_7 -烷基(特别是 2-[4-(甲基或乙基)-哌嗪-1-基]-乙基)、N-单-或 N,N-

二-(C₁-C₇-烷基)-氨基-C₁-C₇-烷基(特别是二甲基氨基甲基)、N-单-或 N,N-二-(C₁-C₇-烷基)-氨基-C₁-C₇-烷氧基(特别是 2-(二甲基氨基)-乙氧基)、[4-(C₁-C₇-烷基)-哌嗪-1-基]-C₁-C₇-烷氧基(特别是 2-(4-甲基哌嗪-1-基)-乙氧基)或[4-(C₁-C₇-烷基)-哌嗪-1-基]-羰基(特别是 4-乙基哌嗪-1-羰基)所取代的苯基;

R² 是氢(优选)、C₁-C₇-烷基、C₁-C₇-烷氧基或(较不优选)卤素;

R³ 是氢(优选)、C₁-C₇-烷基(优选)或苯基-C₁-C₇-烷基,

R⁴ 各自独立地是 C₁-C₇-烷基、卤素-C₁-C₇-烷基、卤素或 C₁-C₇-烷氧基,

R⁵ 是氢(优选)、C₁-C₇-烷基或苯基-C₁-C₇-烷基,

且 n 是 0、1、2、3、4 或 5;

或者

(B) 其中 R¹ 是被以下基团所取代的苯基, 所述基团包括: 羟基、苯基-C₁-C₇-烷氧基(特别是苄氧基)、哌嗪-1-基、4-(苯基-C₁-C₇-烷基)-哌嗪-1-基(特别是 4-苄基-哌嗪-1-基)、N-单-或 N,N-二-(C₁-C₇-烷基)-氨基-C₁-C₇-烷基(特别是二甲基氨基甲基)、吡咯烷子基-C₁-C₇-烷氧基(特别是 2-吡咯烷子基-乙氧基)、1-(C₁-C₇-烷基)-哌啶-4-基(特别是 1-乙基-哌啶-4-基)、吗啉代-C₁-C₇-烷氧基(特别是 2-吗啉代-乙氧基)、硫吗啉代-C₁-C₇-烷氧基(特别是 2-硫吗啉代-乙氧基)、4-(C₁-C₇-烷基)-哌嗪-1-基(特别是 4-(甲基、乙基或异丙基)-哌嗪-1-基)、[4-(C₁-C₇-烷基)-哌嗪-1-基]-C₁-C₇-烷基(特别是 2-[4-(甲基或乙基)-哌嗪-1-基]-乙基)、N-单-或 N,N-二-(C₁-C₇-烷基)-氨基-C₁-C₇-烷氧基(特别是二甲基氨基甲基)、N-单-或 N,N-二-(C₁-C₇-烷基)-氨基-C₁-C₇-烷氧基(特别是 2-(二甲基氨基)-乙氧基)、[4-(C₁-C₇-烷基)-哌嗪-1-基]-C₁-C₇-烷氧基(特别是 2-(4-甲基哌嗪-1-基)-乙氧基)或[4-(C₁-C₇-烷基)-哌嗪-1-基]-羰基(特别是 4-乙基哌嗪-1-羰基); 或者带有一个本段中提到的 R¹ 的取代基和除此之外选自卤素和 C₁-C₇-烷氧基的取代基的苯基;

R² 是氢(优选)、C₁-C₇-烷基、C₁-C₇-烷氧基或(较不优选)卤素;

R³ 是氢(优选)、C₁-C₇-烷基(优选)或苯基-C₁-C₇-烷基,

R⁵ 是氢(优选)、C₁-C₇-烷基或苯基-C₁-C₇-烷基,

且

或者 n 是 3、4 或 5 且 R^4 选自 C_1-C_7 -烷基、 C_1-C_7 -烷氧基和卤素，条件是 C_1-C_7 -烷基、 C_1-C_7 -烷氧基和卤素中各自至少存在一个；

或者 n 是 2 且一个 R^4 是卤素- C_1-C_7 -烷基，另一个 R^4 是 C_1-C_7 -烷氧基；

或者 n 是 3、4 或 5 且 R^4 选自卤素、碘代和 C_1-C_7 -烷氧基，条件是卤素、碘代和 C_1-C_7 -烷氧基中各自至少存在一个；

或者 n 是 3、4 或 5 且 R^4 选自卤素、卤素- C_1-C_7 -烷基和 C_1-C_7 -烷氧基，条件是卤素、卤素- C_1-C_7 -烷基和 C_1-C_7 -烷氧基中各自至少存在一个；

(C)或者式 IA 的化合物，其命名为

1-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-3-{6-[4-(2-吗啉-4-基-乙氧基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-脲(其中，对于式 IA， R^1 是 4-(2-吗啉-4-基-乙氧基)-苯基氨基， R^2 是氢， R^3 是氢， R^4 是 2-和 6-氯及 3-和 5-甲氧基，且 n 是 4 且 R^5 是氢)，

3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-甲基-1-{6-[3-(4-甲基-哌嗪-1-基甲基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-脲(其中，对于式 IA， R^1 是 3-(4-甲基-哌嗪-1-基甲基)-苯基氨基， R^2 是氢， R^3 是甲基， R^4 是 2-和 6-氯及 3-和 5-甲氧基，且 n 是 4，且 R^5 是氢)，

3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[3-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲(其中，对于式 IA， R^1 是 3-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基， R^2 是氢， R^3 是甲基， R^4 是 2-和 6-氯及 3-和 5-甲氧基，且 n 是 4，且 R^5 是氢)，

3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-甲基-1-{6-[4-(2-吗啉-4-基-乙氧基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-脲(其中，对于式 IA， R^1 是 4-(2-吗啉-4-基-乙氧基)-苯基氨基， R^2 是氢， R^3 是甲基， R^4 是 2-和 6-氯及 3-和 5-甲氧基，且 n 是 4，且 R^5 是氢)，

3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[4-(1-乙基-哌啶-4-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲(其中，对于式 IA， R^1 是 4-(1-乙基-哌啶-4-基)-苯基氨基， R^2 是氢， R^3 是甲基， R^4 是 2-和 6-氯及 3-和 5-甲氧基且 n 是 4，且 R^5

是氢),

3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-乙基-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-脲(其中,对于式 IA, R^1 是 4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基, R^2 是氢, R^3 是乙基, R^4 是 2-和 6-氯及 3-和 5-甲氧基且 n 是 4, 且 R^5 是氢)或者

3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-羰基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲(其中,对于式 IA, R^1 是 4-(4-乙基-哌嗪-1-羰基)-苯基氨基, R^2 是氢, R^3 是甲基, R^4 是 2-和 6-氯及 3-和 5-甲氧基, 且 n 是 4, 且 R^5 是氢), (其中这些化合物中对应于式 IA 中的 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、X、Y 和 Z 的部分以及 n 是通过给出的这些化合物各自的含义来分别进行定义);

其中这些化合物中各自的 Y 和 Z 是氮且 X 是 CH;

以及各种情况的式 IA 的化合物(如上下文所述)的盐、前药、N-氧化物或其酯。

在一个实施方案中本发明提供了式 IA 化合物, 其中

Y 和 Z 是 N(氮)且 X 是 CH,

或者其中

R^1 是被 N- C_1 - C_7 -烷基-哌嗪-1-基单取代的 3-吡啶基,

R^2 是氢,

R^3 是氢,

R^4 各自独立地是 C_1 - C_7 -烷基、卤素- C_1 - C_7 -烷基、卤素或 C_1 - C_7 -烷氧基,

R^5 是氢, 且 n 是 1、2、3、4 或 5。

在该实施方案中, 优选 R^4 各自独立地是卤素或 C_1 - C_7 -烷氧基, 且 n 优选地是 3、4 或 5, 最优选 4。

优选的定义

除非另外指明, 本文中所用的一般术语优选地具有本文中所公开的下列含义:

字首“低级”或“ C_1 - C_7 ”是指具有直至 7 (含最大值 7) 个链原子、特别

是直至 4 (含最大值 4) 个链原子的基团。烷基和脂肪族的具体类别包含 1、2、3 或 4 个碳原子。所讨论的基团是直链或者具有单个或多个分支的支链。

低级烷基或 C_1 - C_7 -烷基优选地是包含 1-7 (含 1 和 7) 个碳原子的烷基, 优选 1、2、3 或 4 个碳原子, 并且是直链或支链; 例如, 低级烷基是丁基, 如正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基; 丙基, 如正丙基或异丙基; 乙基或甲基。举例的烷基是甲基、乙基或异丙基。

当化合物、盐等使用复数形式时, 其也用来表示单个化合物、盐等。

当苯基在式 IA 中作为连接 R^1 和 NR^5 的环存在于 R^1 中时, 取代基羟基、苯基- C_1 - C_7 -烷氧基、哌嗪-1-基、4-(苯基- C_1 - C_7 -烷基)-哌嗪-1-基; N-单-或 N,N-二-(C_1 - C_7 -烷基)-氨基- C_1 - C_7 -烷基、吡咯烷子基- C_1 - C_7 -烷氧基、1-(C_1 - C_7 -烷基)-哌啶-4-基、吗啉代- C_1 - C_7 -烷氧基、硫吗啉代- C_1 - C_7 -烷氧基、4-(C_1 - C_7 -烷基)-哌嗪-1-基、[4-(C_1 - C_7 -烷基)-哌嗪-1-基]- C_1 - C_7 -烷基、N-单-或 N,N-二-(C_1 - C_7 -烷基)-氨基- C_1 - C_7 -烷基、N-单-或 N,N-二-(C_1 - C_7 -烷基)-氨基- C_1 - C_7 -烷氧基、[4-(C_1 - C_7 -烷基)-哌嗪-1-基]- C_1 - C_7 -烷氧基、[4-(C_1 - C_7 -烷基)-哌嗪-1-基]-羰基优选位于相对于连接 NR^3 的苯环的 3-或 4-位。

任何不对称碳原子都可以以 (R)-、(S)-或 (R,S)-构型存在, 优选以 (R)-或 (S)-构型存在。任何不饱和基团都以顺-、反-或 (顺,反) 形式存在。因此这些化合物可以以异构体混合物或纯异构体的形式存在, 优选以对映异构体-纯非对映异构体形式存在。

本发明还涉及所公开化合物的可能的互变异构体。

如果没有另外指明, 游离形式及其盐形式的式 IA 化合物, 包括那些例如在纯化或鉴定新化合物中可以用作中间体的盐, 考虑到其与互变异构体或互变异构混合物及其盐的亲密关系, 本文中任何这些化合物适当且便利地都将理解为也涉及这些化合物所对应的互变异构体或任何这些化合物的盐。

例如, 在各自连有至少一个氢的氨基或羟基与通过双键与相邻原子相连的碳原子连接的情况中, 可以存在互变异构体 (如酮-烯醇或亚胺-烯胺互变异构体)。

当提到“化合物……，其互变异构体；或其盐”或类似的话时，其含义是“化合物……，其互变异构体；或该化合物和/或该互变异构体的盐”。

卤素具体而言是指氟、氯、溴或碘，特别是（优选在式 I 化合物中）氟、氯或碘。

卤素- C_1 - C_7 -烷基的含义是 C_1 - C_7 -烷基，其中一个或多个氢原子被卤素原子取代，如三氟甲基。

[4-(C_1 - C_7 -烷基)-哌嗪-1-基]-羰基的含义是 [4-(C_1 - C_7 -烷基)-哌嗪-1-基]-C(=O)-。

本发明涉及如上文所述的式 IA 化合物及其盐、酯、N-氧化物或前药。因此，在一方面本发明提供了作为式 IA 化合物和/或盐、酯、N-氧化物或前药的产物。

盐具体是式 IA（或其例举的式）化合物的可药用盐，特别是当其形成成盐基团时如此。

成盐基团是具有碱性或酸性特性的基团。具有至少一个碱性基团或至少一个碱性原子团的化合物，例如碱性氮，如氨基、没有形成肽键的仲氨基或叔氨基，可以例如与无机酸（如盐酸、硫酸或磷酸）或合适的有机羧酸或磺酸，例如脂肪族单-或二羧酸（如三氟乙酸、乙酸、丙酸、羟基乙酸（glycolic acid）、琥珀酸、马来酸、富马酸、羟基马来酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸或草酸）或氨基酸（如精氨酸或赖氨酸）、芳香羧酸（如苯甲酸、2-苯氧基-苯甲酸、2-乙氧基苯甲酸、水杨酸、4-氨基水杨酸）、芳香-脂肪族羧酸（如扁桃酸或肉桂酸）、杂芳香族羧酸（如烟酸或异烟酸）、脂肪族磺酸（如甲-、乙-或 2-羟基乙磺酸）或芳香族磺酸（如苯-、对甲苯-或萘-2-磺酸）形成酸加成盐。当存在几个碱性基团时，可以形成单-或多-酸加成盐。

具有酸性基团、羧基或酚羟基的化合物可以形成金属或铵盐，例如碱金属或碱土金属盐，如钠、钾、镁或钙盐，或者与氨或合适的有机胺如叔单胺（如三乙胺或三-(2-羟基乙基)-胺），或者杂环碱，如 N-乙基-哌啶或 N,N'-二甲基哌嗪所形成的铵盐。同时可能形成盐的混合物。

同时具有酸性和碱性基团的化合物可以形成内盐。

出于分离或纯化的目的，以及进一步用作中间体的化合物，也可能使用非可药用盐，例如苦味酸盐。然而，仅可药用的、无毒的盐才可用于治疗目的，因此优选使用这些盐。

考虑到新化合物或其 N-氧化物的游离形式及其盐形式，包括那些例如在纯化或鉴定新化合物中可以用作中间体的盐的亲密关系，本文中任何游离化合物（包括式 IA 化合物、中间体和原料）适当且便利地都将理解为也涉及其所对应的 N-氧化物和/或盐、水合物、溶剂合物和/或此类化合物或其 N-氧化物的结晶形式。

式 IA 化合物（或其例举的式）如上下文所述具有有价值的药理特性。

生物学

作为 Bcr-Abl、c-KIT、EphB4、EGF-R、VEGF-R2(KDR)、FGF-R、Tie-2(Tek)、Ret、PDGFR、raf、FLT3、c-src 和/或 FGFR3 受体酪氨酸激酶活性抑制剂的本发明化合物的功效可以证明如下：

在下文中，“抑制剂”、“活性化合物”等是指式 IA 的化合物。

抗 Bcr-Abl 活性的试验：

p210 Bcr-Abl 表达载体 pGDp210Bcr/Abl(32D-bcr/abl)转染的鼠骨髓祖细胞系 32Dcl3 获自 J Griffin(Dana Faber 癌症研究所, Boston, MA, 美国)。该细胞表达具有组成型激活的 abl 激酶的融合 bcr-Abl 蛋白质并且进行非生长因子依赖性的增殖。该细胞在 RPMI 1640(AMIMED)、10%胎牛血清、2 mM 谷氨酰胺(Gibco)(“完全培养基”)中扩增，并通过在冷冻培养基(95%胎牛血清、5%DMSO (SIGMA))中冷冻的每小瓶 2×10^6 个细胞的整分试样来制备工作储备液。解冻后，在最多 10-12 代内采用该细胞进行实验。使用来自 Upstate Biotechnology 的抗 abl SH3 结构域的抗体（目录号 06-466）进行 ELISA。采用标记了来自 ZYMED(目录号 03-7722)的碱性磷酸酶(PY10(AP))的抗-磷酸酪氨酸的抗体 Ab PY20 测定 bcr-abl 的磷酸化。使用(N-{5-[4-(4-甲基-哌嗪子基-甲基)-苯甲酰氨基]-2-甲基苯基}-4-(3-

吡啶基)-2-嘧啶-胺的甲磺酸盐(单甲磺酸盐)(STI571)(市售为 Gleevec®或 Glivec®, Novartis)作为对比和参考化合物。在 DMSO 中制备 10 mM 的储备液并将其存放于-20℃。对于细胞试验,将储备液在完全培养基中进行两步稀释(1:100 和 1:10)得到 10μM 的初始浓度,然后在完全培养基中制备系列的 3 倍稀释液。应用该方法没有遇到溶解度的问题。对待测的化合物进行类似的处理。将 200,000 32D-bcr/abl 细胞以每孔 50 μL 的量接种于 96 孔的圆底组织培养板中进行分析。将每孔 50 μL 测试化合物的系列 3 倍稀释液加入细胞中,一式三份。测试化合物的终浓度范围例如 5 μM 至 0.01 μM。未处理的细胞用作对照。将化合物与细胞一起于 37℃、5% CO₂ 中温育 90 分钟,随后以 1300 转/分钟离心组织培养板(Beckman GPR 离心机),并小心抽吸除去上清液,注意不要移出任何沉淀的细胞。加入 150 μL 裂解缓冲液(50mM Tris/HCl pH 7.4、150 mM 氯化钠、5mM EDTA、1mM EGTA、1% NP-40(非离子型去污剂, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 德国)、2 mM 原钒酸钠、1 mM 苯甲基磺酰氟、50 μg/mL 抑肽酶和 80 μg/mL 亮抑酶肽)使细胞沉淀裂解,或者将其直接用于 ELISA 或者冻存于-20℃备用。将抗-abl SH3 结构域的抗体以每孔 50 μL PBS 中 200 ng 的量包被黑色 ELISA 板(Packard HTRF-96 黑色板, 6005207),于 4℃ 过夜。用含有 0.05% Tween20(PBST)和 0.5 % TopBlock(Juro, 目录号 TB 232010)的 200 μL/孔 PBS 洗涤三次后,将剩余的蛋白质结合位点用 200 μL/孔的 PBST、3% TopBlock 于室温下封闭 4 小时,随后与 50 μL 未处理的或测试化合物处理的细胞的裂解物(每孔总蛋白质 20 μg)一起于 4℃温育 3-4 小时。洗涤三次后,以 50 μL/孔的量。加入在封闭缓冲液中稀释至 0.5 μg/mL 的 PY20(AP)(Zymed)并培养过夜(4℃)。对于所有的培养步骤,均采用平板密封器(Costar, 目录号 3095)将平板密封。最后,用洗涤缓冲液将平板再洗涤三次,并在以 90 μL/孔的量加入含有 Emerald II 的 AP 底物 CPDStar RTU 前用去离子水洗涤一次。现在将采用 Packard Top Seal™-一种平板密封器(目录号 6005185)密封的平板在黑暗中于室温下温育 45 分钟,用 Packard Top Count 微孔板闪烁计数器(Top Count)测定每秒计数

(CPS)来对发光进行定量。对于最终的优化形式的 ELISA, 将 50 μL 在 96 孔组织培养板中生长、处理和裂解的细胞的裂解物直接从这些平板转移到预先用来自 Upstate 的兔抗-abl-SH3 结构域的多克隆抗体 AB 06-466 包被的 ELISA 板上。抗-磷酸酪氨酸的抗体 AB PY20(AP)的浓度可以降低到 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 。如上所述洗涤、封闭以及与发光底物一起温育。采用如下的方法完成定量: 计算从未处理的 32D-bcr/abl 细胞的裂解物得到的 ELISA 读数 (CPS)与试验背景(含有所有成分, 但没有细胞裂解物)的读数之间的差异并以此作为 100%, 以反映这些细胞中存在的组成型磷酸化的 bcr-abl 蛋白质。化合物在 bcr-abl 激酶活性中的活性以 bcr-abl 磷酸化降低的百分率来表示。通过图解的内插法或外推法从剂量效应曲线测定 IC_{50} 的值。本发明的化合物优选 IC_{50} 值范围是从 15nM 至 500 μM 之间, 最优选是从 15nM 至 200 μM 之间。

在细胞试验中, 在 DMSO 中溶解化合物并用完全培养基稀释以获得 10 μM 的起始浓度, 然后在完全培养基中制备系列的 3 倍稀释液。将表达 'wt'-Bcr-Abl 或 Bcr-Abl 突变体的 32D 或 Ba/F3 细胞 (例如 T-315-I)以 50 μL 完全培养基中 200000 个细胞/孔的量接种于 96 孔的圆底组织培养板中。将每孔 50 μL 的测试化合物的系列 3 倍稀释液加入细胞中, 一式三份。未处理的细胞用作对照。将化合物与细胞一起于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 中温育 90 分钟, 随后以 1300 转/分钟离心组织培养板(Beckman GPR 离心机), 并小心抽吸除去上清液, 注意不要移出任何沉淀的细胞。加入 150 μL 裂解缓冲液(50mM Tris/HCl pH 7.4、150mM 氯化钠、5mM EDTA、1mM EGTA、1% NP-40、2 mM 原钒酸钠、1mM PMSF、50 $\mu\text{g/mL}$ 抑肽酶和 80 $\mu\text{g/mL}$ 亮抑酶肽)使细胞沉淀裂解, 或者将其直接用于 ELISA 或者冻存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

将来自 Upstate 的兔抗-abl-SH3 结构域的多克隆抗体 06-466 以每孔 50 μL PBS 中 50ng 的量包被黑色 ELISA 板(Packard HTRF-96 黑色板, 6005207), 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。用含有 0.05% Tween20(PBST)和 0.5% TopBlock(Juro)的 200 μL /孔 PBS 洗涤三次后, 将剩余的蛋白质结合位点

用 200 μL /孔的 PBST、3% TopBlock 于室温封闭 4 小时,随后与 50L 未处理的或测试化合物处理的细胞的裂解物(每孔总蛋白质 20 μg)一起于 4 $^{\circ}\text{C}$ 温育 3-4 小时。洗涤三次后,以 50 μL /孔的量加入在封闭缓冲液中稀释至 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的用碱性磷酸酶(Zymed)标记的抗-磷酸酪氨酸的抗体 PY20(AP)并温育过夜(4 $^{\circ}\text{C}$)。对于所有的培养步骤,均采用平板密封器(Costar)将平板密封。最后,用洗涤缓冲液将平板再洗涤三次,并在以 90 μL /孔的量加入含有 Emerald II 的 AP 底物 CPDStar RTU 前用去离子水洗涤一次。现在将采用 Packard Top SealTM-一种平板密封器密封的平板在黑暗中于室温下温育 45 分钟,用 Packard Top Count 微孔板闪烁计数器(Top Count)测定每秒计数(CPS)来对发光进行定量。

计算未处理的 32D-Bcr/Abl 细胞的裂解物得到的 ELISA 读数(CPS)与试验背景(含有所有成分,但没有细胞裂解物)的读数之间的差异并以此作为 100%,以反映这些细胞中存在的组成型磷酸化的 Bcr-Abl 蛋白质。化合物在 Bcr-Abl 激酶活性中的活性以 Bcr-Abl 磷酸化降低的百分率来表示。通过图解外推法从剂量效应曲线测定 IC_{50} (和 IC_{90}) 的值。

在抑制自身磷酸化作用和抑制在 Ba/F3 转染的细胞、特别是 T3151 中 Bcr-Abl 突变体的 IL-3 非依赖的增殖方面,本发明的化合物优选 IC_{50} 值范围是从 50nM 至 500 μM 之间。

32D cl3 细胞可以从美国典型培养物保藏中心(ATCC CRL11346)获得, Ba/F3 细胞从德国微生物和细胞培养物收藏中心(German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)(DSMZ, Braunschweig 和 DSMZ No. ACC 300)获得。

Palacio 等人, Nature, 309: 1984, 126, PubMed ID 6201749.

Palacios 等人, Cell, 41: 1985, 727, PubMed ID 3924409.

Ba/F3.p210 细胞和鼠造血 32D cl3 细胞(32D p210 cells)通过用包含 p210BCR-ABL(B2A2) cDNA 的 pGD 载体转染 IL-3 依赖的鼠造血 Ba/F3 细胞系而获得。

Daley 和 Baltimore, 1988; Sattler 等人, 1996; Okuda 等人, 1996.

Daley, GQ., Baltimore, D.(1988) Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myeloid leukemia-specific p210 BCR-ABL protein. PNAS 85, 9312-9316.

Sattler M, Salgia R, Okuda K, Uemura N, Durstin MA, Pisick E 等人 (1996) The proto-oncogene product p120CBL and the adaptor proteins CRKL and c-CRK link c-ABL, p190BCR-ABL and p210BCR-ABL to the phosphatidylinositol-3' kinase pathway. Oncogene 12, 839-46.

Okuda K, Golub TR, Gilliland DG, Griffin JD.(1996) p210BCR-ABL, p190BCR-ABL, and TEL/ABL activate similar signal transduction pathways in hematopoietic cell lines. Oncogene 13, 1147-52.

抗 c-KIT 活性的试验

使用杆状病毒供体载体 pFbacG01(GIBCO)产生表达人 c-Kit 胞质激酶结构域的第 544-976 位氨基酸的氨基酸区域的重组杆状病毒。通过 PCR 从人子宫 c-DNA 文库(Clontech)中扩增 C-Kit 胞质结构域的编码序列。通过用 BamH I 和 EcoR I 消化使扩增的 DNA 片段和 pFbacG01 载体相容连接。这些 DNA 片段的连接产生杆状病毒供体质粒 c-Kit。病毒的产生、sf9 细胞中蛋白质的表达和 GST 融合蛋白质的纯化如下进行:

病毒的产生: 将含 c-Kit 激酶结构域的转移载体 pFbacG01-c-Kit 转染 DH10Bac 细胞系(GIBCO)并将转染的细胞涂布选择性琼脂平板。没有在病毒基因组中插入融合序列(由细菌携带)的菌落为蓝色。挑取单个白色菌落并通过标准的质粒纯化程序从细菌中分离病毒 DNA(杆状病毒穿梭载体)。然后在 25cm² 摇瓶中使用 Cellfectin 试剂将病毒 DNA 转染 Sf9 或 Sf21 细胞(美国典型培养物保藏中心)。

Sf9 细胞中小规模蛋白质表达的测定: 从转染的细胞培养物中收集含病毒的培养基并用于感染以增加其滴度。两轮感染之后获得的含病毒的培养基用于大规模的蛋白质表达。为大规模的蛋白质表达, 用 5x10⁷ 个细胞/平板接种 100cm² 的圆形组织培养板并用 1 mL 含病毒的培养基(大约 5

MOI)感染。3天后从平板上刮下细胞并500转/分离心5分钟。将来自10-20个100cm²平板的细胞沉淀重悬于50 mL冰冷的裂解缓冲液(25mM Tris-HCl, pH7.5, 2mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM DTT, 1 mM PMSF)中。冰上搅拌细胞15分钟然后5000转/分离心20分钟。

GST 标记的蛋白质的纯化: 将经离心的细胞裂解物上样到2 mL 谷胱甘肽-琼脂糖柱 (Pharmacia) 上并用10mL 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 200 mM NaCl 洗涤3次。然后通过25mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM 还原型谷胱甘肽, 100mM NaCl, 1 mM DTT, 10%甘油洗脱GST标记的蛋白质10次(每次1 mL)并存于-70℃。

酶活性的测量: 在30μl 终体积中进行纯化 GST-c-Kit 的酪氨酸蛋白激酶测定, 其中所述的30μl 终体积中含200-1800ng 酶蛋白质(取决于比活性), 20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 3 mM MnCl₂, 3 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 10μM Na₃VO₄, 5 μg/mL 聚(Glu, Tyr) 4: 1, 1 % DMSO, 1.0 μM ATP 和 0.1μCi[γ³³P] ATP。在存在或不存在抑制剂条件下通过测量[γ³³P]ATP 的³³P 至聚(Glu, Tyr)4: 1 底物的掺入来测定活性。在如下所述的条件下在96孔板中室温20分钟进行测定(30μL)并通过加入20μl 的125 mM EDTA 终止。随后将40μL 反应混合物转移到预先用甲醇浸泡5分钟的 Immobilon-PVDF 膜上(Millipore, Bedford, MA, 美国), 用水漂洗, 然后用0.5% H₃PO₄ 浸泡5分钟并且将其置于断开真空源的多头真空抽吸装置上。点上所有的样品后, 连接真空并用200μL 0.5% H₃PO₄ 漂洗每一个孔。移出膜并在摇床上用1.0% H₃PO₄ 洗涤4次, 用乙醇洗涤一次。在环境温度下干燥并置于 Packard TopCount 96 孔架上, 加入10 μL/孔的 Microscint TM(Packard)后, 对膜进行计数。通过一式两份的每一种化合物的四个浓度(通常为0.01、0.1、1和10 μM)的抑制百分比的线性回归分析计算IC₅₀ 值。一个蛋白激酶活性单位定义为37℃下每分钟1纳摩尔³³P ATP 从[γ³³P] ATP 转移到每毫克底物蛋白质。本发明式 IA 化合物的 IC₅₀ 值优选为50nM-500μM。

抗 EphB4 活性的试验

式 IA 的化合物作为肝配蛋白 B4 受体(EphB4)激酶抑制剂的功效证明如下:

Bac-to-Bac™ (Invitrogen Life Technologies, 巴塞尔, 瑞士) GST-融合表达载体的生成: 借助 PCR 从来自人胎盘或脑的 cDNA 文库扩增 EphB 类的完整胞质编码区。产生重组杆状病毒, 它们表达人 EphB4 受体 (SwissProt 数据库, 登记号 P54760) 的第 566 - 987 位氨基酸区域。将 GST 序列克隆入 pFastBac1® 载体 (Invitrogen Life Technologies, 巴塞尔, 瑞士) 并进行 PCR 扩增。将可读框 3' 端连有 GST 序列的编码 EphB4 受体结构域的 cDNA 分别克隆到这种经修饰的 FastBac1 载体, 生成 pBac-to-Bac™ 供体载体。接种转化产生的单一菌落, 得到过夜培养物, 用于小规模的质量制备。质粒 DNA 的限制酶分析揭示了若干菌落含有预期大小的插入片段。借助自动测序, 在两条链上都证实有插入片段和约 50bp 的侧翼载体序列。

病毒的产生: 除非另行说明, 按照由 GIBCO 提供的方案制备用于各激酶的病毒。简言之, 将含有激酶结构域的转移载体转染 DH10Bac 细胞系 (GIBCO), 涂布选择性琼脂平板。融合序列未插入病毒基因组 (由细菌携带) 的菌落是蓝色的。挑取单一的白色菌落, 借助标准质粒纯化程序从细菌中分离病毒 DNA (杆状病毒穿梭载体)。然后按照该方案, 使用 Cellfectin 试剂, 用有病毒 DNA 的 25cm² 培养瓶中转染 Sf9 细胞或 Sf21 细胞。

GST 标记的激酶的纯化: 将经离心的细胞裂解物上样到 2 mL 谷胱甘肽-琼脂糖柱 (Pharmacia) 上并用 10mL 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 200 mM NaCl 洗涤 3 次。然后通过 25mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM 还原型谷胱甘肽, 100mM NaCl, 1 mM DTT, 10% 甘油洗脱 GST 标记的蛋白质 10 次 (每次 1 mL) 并存于 -70℃。

蛋白激酶测定: 通过测定 ³³P 从 [γ ³³P]ATP 向谷氨酸与酪氨酸的聚合物 (poly(Glu,Tyr)) 底物的掺入, 在有或没有抑制剂的存在下测定蛋白激酶的活性。环境温度下在最终体积 30μL 中用纯化 GST-EphB (30ng) 进行激酶

测定达 15 - 30min, 所述最终体积 30 μ L 含有 20mM Tris·HCl, pH 7.5, 10mM MgCl₂, 3-50mM MnCl₂, 0.01mM Na₃VO₄, 1% DMSO, 1mM DTT, 3 μ g/mL 聚(Glu,Tyr) 4:1 (Sigma; St. Louis, Mo., 美国)和 2.0-3.0 μ M ATP (γ -[³³P]-ATP 0.1 μ Ci)。加入 20 μ L 125mM EDTA 终止测定。随后将 40 μ L 反应混合物转移到预先用甲醇浸泡 5 分钟的 Immobilon-PVDF 膜上(Millipore, Bedford, MA, 美国), 用水漂洗, 然后用 0.5% H₃PO₄ 浸泡 5 分钟并且将其置于断开真空源的多头真空抽吸装置上。点上所有的样品后, 连接真空并用 200 μ L 0.5% H₃PO₄ 漂洗每一个孔。移出膜并在摇床上用 1.0% H₃PO₄ 洗涤 4 次, 用乙醇洗涤一次。室温干燥后对膜计数并置于 Packard Top Count 96 孔支架中, 加入 10 μ L/孔的 Microscint TM (Packard)。通过一式两份的每一种化合物的四个浓度(通常为 0.01、0.1、1 和 10 μ M)的抑制百分比的线性回归分析计算 IC₅₀ 值。一个蛋白激酶活性单位定义为 37℃ 下每分钟 1 纳摩尔 ³³P ATP 从 [γ -³³P] ATP 转移到每毫克底物蛋白质。本发明式 IA 化合物的 IC₅₀ 值优选为 50nM-500 μ M。

抗 EGF-R 活性的试验:

可以使用已知方法证明 EGF-R 酪氨酸激酶活性的抑制, 例如使用 EGF-受体的重组细胞内结构域 [EGF-R ICD; 参见, 例如 E. McGlynn 等人, Europ. J. Biochem. 207, 265-275(1992)]。与没有抑制剂的对照相比, 式 IA 化合物抑制酶活性达到 50%(IC₅₀)的浓度为例如 0.05-500 μ M。

除了抑制 EGF-R 酪氨酸激酶活性外, 式 IA 化合物还抑制该受体家族的其他成员, 如 ErbB-2。抑制活性(IC₅₀)约为 0.01-500 μ M。可以测定 ErbB-2 酪氨酸激酶(HER-2)的抑制, 例如类似用于 EGF-R 蛋白质酪氨酸激酶的方法[参见 C. House 等人, Europ. J. Biochem. 140, 363-367(1984)]。ErbB-2 激酶可以通过本身已知的方法被分离并测定其活性, 例如按照 T. Akiyama 等人的方法: Science 232, 1644(1986)。

抗 VEGF-R2(KDR)活性的试验:

VEGF-诱导的受体自身磷酸化的抑制可以采用另一细胞中的体外试

验证实,例如将转染的 CHO 细胞(其永久性表达人 VEGF-R2 受体(KDR))接种于 6-孔细胞培养板中的完全培养基(含有 10%胎牛血清=FCS)中,于 37°C 在 5% CO₂ 中培养直到它们显示约 80%汇合。然后将待测化合物在培养基(不含 FCS,含有 0.1%牛血清白蛋白)中稀释并加入细胞中。(对照含有培养基但不含受试化合物)。在 37°C 下培养 2 小时后,加入重组 VEGF,使 VEGF 的终浓度为 20 ng/mL。再于 37°C 温育 5 分钟后,将细胞用冰冷的 PBS(磷酸盐缓冲液)洗涤两次,立即在每孔 100 μ L 的裂解缓冲液中裂解。然后将裂解物离心除去细胞核,上清液中蛋白质的浓度采用商业化的蛋白质分析法(BIORAD)进行测定。然后,裂解物可以立即使用,或者如果需要的话,存放于-20°C。

进行夹心 ELISA 以测定 VEGF-R2 的磷酸化作用:将 VEGF-R2 的单克隆抗体(例如 Mab 1495.12.14,由 H. Towbin, Novartis 制备,或类似的单克隆抗体)固定在黑色的 ELISA 板(OptiPlate™ HTRF-96,得自 Packard)上。然后洗涤平板,剩余的游离蛋白质结合位点在含有 Tween 20®(聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单月桂酸酯,ICI/Uniquema)(PBST)的磷酸盐缓冲液中使用 3% TopBlock®(Juro,目录号 TB232010)进行饱和。然后将细胞裂解物(每孔 20 μ g 蛋白质)和与碱性磷酸酶偶联的抗磷酸酪氨酸抗体(PY20:AP,得自 Zymed)一起在这些板中于 4°C 温育过夜。将平板再次洗涤后,采用发光 AP 底物(CDP-Star,即开即用型,含有 Emerald II, Applied Biosystems)证明抗磷酸酪氨酸抗体与捕获的磷酸化受体的结合。在 Packard Top Count Microplate 闪烁计数器中测定发光。阳性对照(采用 VEGF 刺激)的信号和阴性对照(没有采用 VEGF 刺激)的信号差异对应于 VEGF-诱导的 VEGF-R2 磷酸化(=100%)。受试物质的活性以 VEGF-诱导的 VEGF-R2 磷酸化的抑制百分率进行计算,其中诱导产生最大抑制的一半的物质浓度定义为 IC₅₀(达到 50%抑制的抑制剂量)。可以发现本发明的式 IA 化合物优选的 IC₅₀ 值的范围为 20 μ M 至 500 μ M 之间。

抗重组蛋白激酶 Ret(Ret-Men2A)、Tie-2(Tek)和 FGFR3-K650E 活性的试验:

重组蛋白激酶的克隆和表达: (Ret); 采用杆状病毒供体载体 pFB-GSTX3 产生重组杆状病毒, 其表达人 RET-Men2A 的胞质激酶结构域的第 658-1072 位氨基酸区域, 该激酶结构域对应 Ret 的野生型激酶结构域。使用获自 Dr. James Fagin, College of Medicine, University of Cincinnati(Novartis 公司)的质粒 pBABEpuro RET-Men2A 经 PCR 扩增 Ret 胞质结构域的编码序列。使所扩增的 DNA 片段和 pFB-GSTX3 载体适于通过 *SaII* 和 *KpnI* 消化的连接。这些 DNA 片段的连接产生杆状病毒供体质粒 pFB-GX3-Ret(-Men2A)。

(Tie-2/Tek): 使用杆状病毒供体载体 pFbacG01 产生表达人 Tek 胞质激酶结构域第 773-1124 位氨基酸的氨基酸区域、N-末端融合了 GST 的重组杆状病毒(由 Marmé 博士根据研究协作提供, Institute of Molecular Medicine, Freiburg, 德国)。将 Tek 通过 *EcoRI* 切割并与被 *EcoRI* 消化的 pFbacG01(FBG-Tie2/Tek)连接, 重新克隆到 pFbacG01 转移载体中。

(FGFR-3-K650E): 使用杆状病毒供体载体 pFastBacGST2 产生表达人 FGFR-3 胞质激酶结构域第 411-806 位氨基酸的氨基酸区域、N-端融合了 GST 的重组杆状病毒(由 Jim Griffin 博士根据研究协作提供, Dana Farber Cancer Institute, Boston, 美国)。通过 PCR 扩增编码第 411-806 位氨基酸的 DNA, 插入 pFastBac-GT2 载体, 得到 pFB-GT2-FGFR3-wt。随后通过使用 Stratagene XL-Site 定点突变试剂盒, 用该质粒产生在 K650 有突变, 编码 FGFR3(411-806)的载体, 即 pFB-GT2-FGFR3-K650E。病毒的生产、sf9 细胞中蛋白质的表达和 GST 融合蛋白的纯化按照下述部分进行。

病毒的制备: 将含有激酶结构域的转移载体转染 DH10Bac 细胞系 (GIBCO), 并将转染的细胞涂布选择性的琼脂平板。病毒基因组(由细菌携带)中未插入融合序列的菌落为蓝色。挑取白色的单菌落, 通过标准的质粒纯化方法从细菌中分离病毒 DNA(杆状病毒穿梭载体)。然后在 25cm² 培养瓶中, 使用 Cellfectin 试剂以病毒 DNA 转染 Sf9 细胞或 Sf21 细胞。

Sf9 细胞中小规模蛋白质表达的测定: 从转染的细胞培养物中收集含病毒的培养基并用于感染以增加其滴度。两轮感染之后获得的含病毒的培

培养基用于大规模的蛋白质表达。为大规模的蛋白质表达,用 5×10^7 个细胞/平板接种 100cm^2 的圆形组织培养板并用 1 mL 含病毒的培养基(大约 5 MOI)感染。3 天后从平板上刮下细胞并 500 转/分离心 5 分钟。将来自 10-20 个 100cm^2 平板的细胞沉淀重悬于 50 mL 冰冷的裂解缓冲液(25mM Tris-HCl, pH7.5, 2mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM DTT, 1 mM PMSF)中。冰上搅拌细胞 15 分钟然后 5000 转/分离心 20 分钟。

GST 标记的蛋白质的纯化: 将经离心的细胞裂解物上样到 2 mL 谷胱甘肽-琼脂糖柱 (Pharmacia) 上并用 10mL 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 200 mM NaCl 洗涤 3 次。然后通过 25mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM 还原型谷胱甘肽, 100mM NaCl, 1 mM DTT, 10%甘油洗脱 GST 标记的蛋白质 10 次(每次 1 mL)并存于 -70°C 。

酶活性的测量: 在 30 μL 终体积中进行用纯化的 GST-Ret、GST-Tek 或 GST-FGFR-3-K650E 的酪氨酸蛋白激酶测定,其中所述的 30 μL 终体积中含有 15ng GST-Ret 的 Ret、20mM Tris-HCl pH 7.5、1mM MnCl_2 、10 mM MgCl_2 、1mM DTT、3 $\mu\text{g/mL}$ 聚(Glu,Tyr) 4:1、1% DMSO 和 2.0 μM ATP(0.1 μCi 的 γ - ^{33}P -ATP)的终浓度。Tek 包含 150 ng GST-Tek、20mM Tris-HCl pH 7.5、3mM MnCl_2 、3 mM MgCl_2 、1mM DTT、0.01mM Na_3VO_4 、250 $\mu\text{g/mL}$ PEG 20'000、10 $\mu\text{g/mL}$ 聚(Glu,Tyr) 4: 1、1% DMSO 和 4.0 μM ATP(0.1 μCi 的 γ - ^{33}P -ATP)。FGFR-3-K650E 包含 10 ng GST-FGFR-3-K650E、20mM Tris-HCl pH 7.5、3mM MnCl_2 、3 mM MgCl_2 、1mM DTT、0.01mM PEG 20'000、10 $\mu\text{g/mL}$ 多聚(Glu,Tyr) 4: 1、1% DMSO 和 4.0 μM ATP(0.1 μCi 的 γ - ^{33}P -ATP)。在存在或不存在抑制剂条件下通过测量 $[\gamma^{33}\text{P}]\text{ATP}$ 的 ^{33}P 至聚(Glu, Tyr)4: 1 底物的掺入来测定活性。试验在环境温度下按下述条件于 96 孔板中进行 30 分钟,通过加入 50 μL 的 125mM EDTA 终止试验。随后将 60 μL 反应混合物转移到预先用甲醇浸泡 5 分钟的 Immobilon-PVDF 膜上(Millipore, Bedford, MA, 美国),用水漂洗,然后用 0.5% H_3PO_4 浸泡 5 分钟并且将其置于断开真空源的多头真空抽吸装置上。点上所有的样品后,连接真空并用 200 μL 0.5% H_3PO_4 漂洗

每一个孔。移出膜并在摇床上用 1.0% H_3PO_4 洗涤 4 次，用乙醇洗涤一次。在环境温度下干燥并置于 Packard TopCount 96 孔架上，加入 10 μL /孔的 Microscint TM(Packard)后，对膜进行计数。通过一式两份的每一种化合物的四个浓度（通常为 0.01、0.1、1 和 10 μM ）的抑制百分比的线性回归分析计算 IC_{50} 值。一个蛋白激酶活性单位定义为 37℃ 下每分钟 1 纳摩尔 ^{33}P ATP 从 $[\gamma^{33}\text{P}]$ ATP 转移到每毫克底物蛋白质。本发明式 IA 化合物的 IC_{50} 值优选为 50nM-500 μM 。

FGFR3(酶试验)

在终体积为 10 μL 的含有 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 酶的激酶缓冲液(30mM Tris-HCl pH7.5、15mM MgCl_2 、4.5mM MnCl_2 、15 μM Na_3VO_4 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA)和底物(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 生物素-聚-EY(Glu,Tyr)(CIS-US, Inc.)和 3 μM ATP)的溶液中，使用纯化的 FGFR3(Upstate)进行激酶分析。制备两种溶液：首先将含有在激酶缓冲液中的 FGFR3 酶的 5 μL 的第一种溶液加入 384-型 ProxiPlate[®](Perkin-Elmer)板，随后加入溶于 DMSO 的 50nL 的化合物，然后，将含有在激酶缓冲液中的底物(聚-EY)和 ATP 的 5 μL 的第二种溶液加入每一孔中。反应于室温下温育 1 小时，加入 10 μL 的 HTRF 测试混合物终止，所述 HTRF 测试混合物含有 30mM Tris-HCl pH7.5、0.5M KF、50mM ETDA、0.2mg/mL BSA、15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉抗生物素-XL665(CIS-US, Inc.)和 150ng/mL 缀合穴合物的抗磷酸酪氨酸抗体 (CIS-US, Inc.)。于室温下温育 1 小时后，使链霉抗生物素-生物素相互作用，在 Analyst GT(Molecular Devices Corp.)上读取随时间改变的荧光信号。根据每一化合物在 12 个浓度下(从 50 μM 到 0.28nM 的 1:3 稀释)的抑制百分率的线性回归分析计算 IC_{50} 值。在该分析中，例如本发明化合物优选的 IC_{50} 的范围是 2nM 至 400 μM 之间，更加优选的范围是 5 nM 至 100 μM 之间。

FGFR3(细胞试验)

测试本发明化合物（=式 IA 化合物）抑制转化的 Ba/F3-TEL-FGFR3 细胞增殖(取决于 FGFR3 细胞激酶的活性)的能力。Ba/F3-TEL-FGFR3 在悬浮液中培养至多达 800,000 细胞/mL,用补充 10%胎牛血清的 RPMI1640

作为培养基。将 50 μ L 培养基中的细胞以每孔 5000 个细胞的密度分别加入 384-孔板中。本发明化合物在二甲基亚砜(DMSO)中溶解和稀释。用 DMSO 制备 12 个 1:3 的系列稀释液以产生范围通常在 10mM 到 0.05 μ M 的浓度梯度。将 50nL 的稀释化合物加到细胞中, 在细胞培养箱中培养 48 小时。将 AlamarBlue[®](TREK Diagnostic Systems)(可用于监测由增殖细胞产生的还原性环境)加入细胞, 终浓度达到 10%。在 37 $^{\circ}$ C 的细胞培养器中再培养 4 小时后, 在 Analyst GT(Molecular Devices Corp.)上定量测定被还原的 Alamar Blue[®]的荧光信号(于 530nm 激发, 于 580nm 发射)。根据每个化合物 12 个浓度的抑制百分率的线性回归分析来计算 IC₅₀ 值。可以发现本发明的式 IA 化合物优选的 IC₅₀ 的范围是 2nM 至 400 μ M 之间。

Upstate KinaseProfileTM-放射-酶促滤膜 (filter) 结合测定法

对本发明化合物抑制一组激酶的各成员 (部分的非限定性的激酶名单包括: Abl、BCR-Abl、BMX、FGFR3、Lck、JNK1、JNK2、CSK、RAF、MKK6 和 P38) 的能力进行评价。按照常规方法两次测定终浓度为 10 μ M 的化合物。需要注意的是激酶缓冲液成分和底物随 “Upstate KinaseProfilerTM” 组中包含的激酶的不同而变化。在置于冰上的 eppendorf 管中混合激酶缓冲液(2.5 μ L, 10x, 必要时可含有 MnCl₂)、活化的激酶 (0.001-0.01 单位; 2.5 μ L)、在激酶缓冲液中的特异性或聚(Glu4-Tyr)的肽 (5-500 μ M 或 0.01mg/ml), 以及激酶缓冲液(50 μ M; 5 μ l)。加入 Mg/ATP 混合物(10 μ L; 67.5(或 33.75) mM MgCl₂, 450(或 225) μ M ATP 和 1 μ Ci/ μ l [γ -³²P]-ATP(3000Ci/mmol))并在约 30 $^{\circ}$ C 下温育反应物约 10 分钟。将反应混合物(20 μ l)点在 2cm $\times$ 2cm P81(磷酸纤维素, 用于带正电的肽底物)或 Whatman No.1(用于聚(Glu4-Tyr)肽底物)方形纸上。用 0.75%磷酸洗涤该方形纸 4 次, 每次 5 分钟, 并用丙酮洗涤一次, 洗涤 5 分钟。将该方形纸转移到闪烁管中, 加入 5ml 闪烁混合液并用 Beckman 闪烁计数器定量掺入肽底物中的 ³²P(cpm)。计算每个反应的抑制百分率。

式 IA 化合物也可以抑制其他酪氨酸蛋白激酶, 例如特别是 c-Src 激酶, 其在动物、特别是哺乳动物细胞 (包括人类细胞) 的生长调控和转化中起

到一定作用。适宜的试验描述于 Andrejauskas-Buchdunger 等人, *Cancer Res.* 52, 5353-8(1992)。使用该检测体系, 式 IA 化合物可以显示出抑制 c-Src 的 IC_{50} 值的范围为例如 0.05-500 μ M。

另外, 式 IA 化合物还可以用于抑制 b-raf(V599E)。B-Raf-V599E 的活性通过测量 ^{33}P 从 $[\gamma^{33}P]$ ATP 向(His)-I κ B 的掺入, 在有或没有抑制剂的存在下进行测定。将待测化合物溶于 DMSO(10mm)并储存于-20 $^{\circ}C$ 。新鲜制备在 DMSO 中的系列稀释液, 用纯水进一步稀释以获得在 3% DMSO 中的 3 倍浓缩的测试溶液。试验的终体积(30 μ l)包括 10 μ L 的待测溶液(1% DMSO)、10 μ l 测试混合物(20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 3 mM $MnCl_2$, 3 mM $MgCl_2$, 1 nM DTT, 3 μ g/ml 的(His)-I κ B、1% DMSO 和 3.5 μ M ATP $[\gamma^{33}P]$ -ATP 0.1 μ Ci)以及 10 μ l 酶稀释液(600ng 的 GST-B-Raf-V599E)。在 96-孔形式的 MultiPROBE Iix、MultiPROBE IILx 或 HamiltonSTAR 自动装置上进行程序性的移取步骤。按照文献所述进行试验(参见 C. Garcia-Echeverria 等人, *Cancer Cel.* 5, 231-9(2004)), 通过加入 20 μ l 125 mM EDTA 来终止。通过如下的滤膜结合方法进行磷酸化的肽的捕获: 将 40 μ L 反应混合物转移到预先用甲醇浸泡 5 分钟的 Immobilon-PVDF 膜上, 用水漂洗, 然后用 0.5% H_3PO_4 浸泡 5 分钟并且将其置于断开真空源的多头真空抽吸装置上。点上所有的样品后, 连接真空并用 200 μ L 0.5% H_3PO_4 漂洗每一个孔。移出膜并在摇床上用 1.0% H_3PO_4 洗涤 4 次, 用乙醇洗涤一次。在环境温度下干燥并置于 Packard TopCount 96 孔架上, 加入 10 μ L/孔的 Microscint TM(Packard)后, 对膜进行计数。最后密封平板并在微孔板闪烁计数器(TopCount NXT, TopCount NXT HTS)中进行计数。在闪板方法(flash plate method)的情况下, 首先在聚苯乙烯基质的塑料平板上进行激酶反应, 随后于 60 分钟后加入 20 μ l 的 125mM EDTA 终止。为了捕获(60 分钟, RT), 将生物素化的底物转移至 Nickel-包被的闪板上。将测试平板用 PBS 洗涤三次, 并在室温下干燥。随后, 将平板密封, 在微孔板闪烁计数器(TopCount NXT, TopCount NXT HTS)中进行计数。通过每个化合物四种浓度(通常为 0.01、0.1、1 和 10 μ M)下(一式两份)的抑制百分率

或按照从 10 μ M 开始、随后 1: 3 稀释度的 8 个单一点的抑制百分率的线性回归分析来计算 IC₅₀ 值。对于 b-raf 抑制, 式 IA 化合物优选显示范围从 0.05 到 500 μ M 的 IC₅₀ 值。

FLT3 受体激酶

为了寻找靶向于 FLT3 的化合物, 可以采用两种不同类型的试验:

Flt3 激酶活性测定如下: 使用杆状病毒供体载体 pFbacG01(GIBCO) 产生重组杆状病毒, 其表达人 Flt3 的细胞质激酶结构域的第 563-993 位氨基酸的氨基酸区域。从人 cDNA 文库(Clontech)中通过 PCR 扩增 Flt3 胞质结构域的编码序列。使所扩增的 DNA 片断和 pFbacG01 载体适于通过 BamH1 和 HindIII 消化的连接。这些 DNA 片断的连接产生杆状病毒供体质粒 Flt-3(1.1)。按照如下描述进行病毒的制备、在 Sf9 细胞中表达蛋白质和纯化 GST-融合蛋白:

病毒的制备: 将含有 Flt-3 激酶结构域的转染载体(pFbacG01-Flt-3)转入 DH10Bac 细胞系(GIBCO)并将转染的细胞涂布于选择性的琼脂平板。病毒基因组(由细菌携带)中未插入融合序列的菌落为蓝色。挑取单个白色菌落并通过标准的质粒纯化程序从细菌中分离病毒 DNA(杆状病毒穿梭载体)。然后在 25cm² 摇瓶中使用 Cellfectin 试剂将病毒 DNA 转染 Sf9 或 Sf21 细胞(美国典型培养物保藏中心)。

Sf9 细胞中小规模蛋白质表达的测定: 从转染的细胞培养物中收集含病毒的培养基并用于感染以增加其滴度。两轮感染之后获得的含病毒的培养基用于大规模的蛋白质表达。为大规模的蛋白质表达, 用 5 $\times 10^7$ 个细胞/平板接种 100cm² 的圆形组织培养板并用 1 mL 含病毒的培养基(大约 5 MOI)感染。3 天后从平板上刮下细胞并 500 转/分离心 5 分钟。将来自 10-20 个 100cm² 平板的细胞沉淀重悬于 50 mL 冰冷的裂解缓冲液(25mM Tris-HCl, pH7.5, 2mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM DTT, 1 mM PMSF)中。冰上搅拌细胞 15 分钟然后 5000 转/分离心 20 分钟。

GST 标记的蛋白质的纯化: 将经离心的细胞裂解物上样到 2 mL 谷胱

甘肽-琼脂糖柱 (Pharmacia) 上并用 10mL 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 200 mM NaCl 洗涤 3 次。然后通过 25mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM 还原型谷胱甘肽, 100mM NaCl, 1 mM DTT, 10%甘油洗脱 GST 标记的蛋白质 10 次(每次 1 mL)并存于-70℃。

酶活性的测量: 在 30μl 终体积中进行纯化 GST-Flt2 的酪氨酸蛋白激酶测定, 其中所述的 30μl 终体积中含 200-1800ng 酶蛋白质(取决于比活性), 20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 3 mM MnCl_2 , 3 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 10μM Na_3VO_4 , 3 μg/mL 聚(Glu, Tyr) 4: 1, 1 % DMSO, 6.0 μM ATP 和 0.1μCi $[\gamma^{33}\text{P}]$ ATP。在存在或不存在抑制剂条件下通过测量 $[\gamma^{33}\text{P}]$ ATP 的 ^{33}P 至聚(Glu, Tyr)4: 1 底物的掺入来测定活性。在如下所述的条件下在 96 孔板中室温 20 分钟进行测定(30μL)并通过加入 20μl 的 125 mM EDTA 终止。随后将 40μL 反应混合物转移到预先用甲醇浸泡 5 分钟的 Immobilon-PVDF 膜上(Millipore, Bedford, MA, 美国), 用水漂洗, 然后用 0.5% H_3PO_4 浸泡 5 分钟并且将其置于断开真空源的多头真空抽吸装置上。点上所有的样品后, 连接真空并用 200μL 0.5% H_3PO_4 漂洗每一个孔。移出膜并在摇床上用 1.0% H_3PO_4 洗涤 4 次, 用乙醇洗涤一次。在环境温度下干燥并置于 Packard TopCount 96 孔架上, 加入 10 μL/孔的 MicroscintTM(Packard)后, 对膜进行计数。通过一式两份的每一种化合物的四个浓度(通常为 0.01、0.1、1 和 10 μM)的抑制百分比的线性回归分析计算 IC_{50} 值。一个蛋白激酶活性单位定义为 37℃下每分钟 1 纳摩尔 ^{33}P ATP 从 $[\gamma^{33}\text{P}]$ ATP 转移到每毫克底物蛋白质。式 IA 化合物在此优选地显示 IC_{50} 值范围从 0.05 到 500 μM 之间。

替代地或另外地, 基于细胞的试验可用于鉴定突变的 FLT3 酪氨酸激酶受体的抑制剂。常规方法包括对依赖突变的 FLT3 进行增殖的细胞系与不依赖突变的 FLT3 进行增殖的细胞系, 将可能的抑制剂的作用进行比较。使用表达两种不同类型突变的、激活的 FLT3 的细胞系:

在受体近膜结构域内表达具有“内部串联重复”(ITD)的 FLT3 突变体的 Ba/F3-FLT3-ITD 细胞。

表达含有第 835 位的天冬酰胺转变成酪氨酸突变的 FLT3 受体的 Ba/F3-FLT3-D835Y 细胞。

IC₅₀ 值在 50nM 至 500μM 的式 IA 化合物优选显示出抑制 Ba/F3-FLT3-ITD 和 Ba/F3-D835Y 细胞的增殖, 另一方面, 它们在高达 500nM 的浓度下通常不抑制未转化的 Ba/F3 细胞的生长, 且式 IA 化合物对 Ba/F3-FLT3-ITD 细胞的生长抑制作用可通过加入高浓度的 IL-3 以提供替代的生存信号而逆转。在抑制 FLT3-依赖性细胞系增殖所需的浓度下, 式 IA 的化合物显示出对于一些不具有突变的 FLT3 受体(过度活化的激酶)的人类白血病与淋巴瘤细胞系没有细胞毒性, 提示该药物作为细胞毒的药物具有意料不到的高度特异性。总体而言, 这些结果说明式 IA 化合物可以成为突变的 FLT3 受体酪氨酸激酶活性的有效抑制剂, 是用于治疗具有突变的 FLT3 受体的患者的有希望的候选物。具体而言, 式 IA 化合物可以在 0.05 到 500μM 的浓度范围内显示出抑制 FLT3 受体酪氨酸激酶的活性。

根据上文所述的抑制性研究, 本发明的式 IA(或其列举的式)化合物表现出特别是对依赖(尤其是对蛋白激酶的调节有响应、更特别是抑制)蛋白激酶的疾病的治疗功效, 所述疾病尤其是增生性疾病, 如上文在“发明背景”中所述的疾病。

还有一些试验证明式 I 化合物的体内抗肿瘤活性。例如, 为了检测式 IA 的化合物是否抑制膀胱癌的生长, 可以采用以下检测系统:

使用 RT-112 人膀胱移行细胞癌细胞系作为检测本发明所述化合物体内活性的体内模型。该细胞系源自 1973 年具有未治疗的原发性膀胱癌的女性患者(年龄未知)。该细胞系表达高水平的 FGF-R3。

将 5×10^6 细胞与基质胶同时接种在雌性裸鼠的胁部(n=8), 并使肿瘤发育。每 2 或 3 天使用卡尺手工测量肿瘤尺寸。将动物重量作为动物健康的量度进行监测。

当肿瘤体积达到约 100mm³(约 7 天)时, 开始用抑制剂治疗。将小鼠根据肿瘤体积随机分配, 用介质(NMP/PEG300)或待测化合物(n=8)处理 14 天。给药途径为口腔管饲, 时间表为每天 1 次/每周 7 次。将抗肿瘤活性计

算为 $T/C \%((\text{处理组动物肿瘤体积的平均改变}/\text{对照动物肿瘤体积的平均改变}) \times 100)$ 。

用卡尺手工测量异种移植物肿瘤的尺寸，并采用式 $(W \times H \times L) \times \pi/6$ 估计肿瘤的体积，其中宽度(W)、高度(H)和长度(L)是三个最大直径。

使用 SigmaStat 2.03 进行统计学评价。如果一项试验中包括了超过两组动物，则在评价当天采用单因素方差分析检验，进行肿瘤绝对体积和体重的统计学评价。当对照组与所有其他处理组比较时，使用 Dunnett 事后检验法(Dunnett's ad hoc post test)。当所有组相互之间进行评价时，使用 Tukey 和 SNK(Student-Newman-Keuls)事后检验法。

肿瘤样品被切碎并迅速在液氮中冷冻。在保持冷冻的同时将肿瘤粉末化。将一小份冻干粉在包含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 1%Triton 提取缓冲液中裂解。通过离心使裂解液澄清，测定蛋白质浓度。使用蛋白质裂解物测定肿瘤中的 FGFR 受体和通路的抑制程度。

本发明所述的式 IA 化合物可以在等于和大于 10mg/kg 的剂量上抑制肿瘤生长和诱导消退。

作为被公开的式 IA 化合物抑制的激酶例子可以是 c-Abl 和 Bcr-Abl，特别是 Bcr-Abl。另一种被抑制的激酶是受体酪氨酸激酶 VEGF-R，特别是 VEGF 受体 KDR(VEGF-R2)。本发明的化合物还抑制 Bcr-Abl 激酶的突变形式。所公开的化合物适宜用于抑制一种或多种这类蛋白质酪氨酸激酶和/或其他蛋白质酪氨酸激酶和/或非受体酪氨酸激酶 Raf，和/或用于抑制这些酶的突变体。考虑到这些活性，所述化合物可以用于治疗涉及这些类型的激酶、特别是所述激酶的异常或过度的活性的疾病（特别是所提及的那些疾病）。

调节这类蛋白激酶活性的能力优选涉及抑制这类蛋白激酶的活性。

例如，作为 VEGF-受体酪氨酸激酶活性抑制剂，本发明的化合物能基本抑制血管的生长，并因此对于大量与血管发生失控相关的疾病有效，所述疾病特别是由眼部新生血管生成造成的疾病，特别是视网膜病变，例如糖尿病视网膜病或年龄相关的黄斑变性、银屑病、成血管细胞瘤，例如血

管瘤、肾小球膜细胞增生性病症，如慢性或急性肾病，例如糖尿病肾病，恶性肾硬化、血栓性微血管病综合征或移植排斥，或特别是炎性肾病如肾小球肾炎，特别是肾小球膜增生性肾小球肾炎，溶血性尿毒症综合征、糖尿病肾病、高血压肾硬化、粥样斑、动脉再狭窄、自身免疫性疾病、糖尿病、子宫内膜异位症、慢性哮喘以及特别是肿瘤疾病（实体瘤，还有白血病和其他“液体肿瘤”，特别是那些表达 c-kit、KDR、Flt-1 或 Flt-3 的肿瘤），例如特别是乳腺癌、结肠癌、肺癌（特别是小细胞肺癌）、前列腺癌或卡波西肉瘤。式 IA(或其例举的式)的化合物 (或其 N-氧化物)抑制肿瘤的生长并特别适于预防肿瘤的转移性传播和微转移灶的生长。

本发明化合物的一类激酶靶点是 Bcr-Abl 的突变体。特别是突变体 Glu255→亮氨酸、Glu255→缬氨酸或 Thr315→异亮氨酸，更特别的是 Thr315→异亮氨酸突变体。

其他 Bcr-Abl 突变体包括 Met244→Val、Phe317→Leu、Leu248→Val、Met343→Thr、Gly250→Ala、Met351→Thr、Gly250→Glu、Glu355→Gly、Gln252→His、Phe358→Ala、Gln252→Arg、Phe359→Val、Tyr253→His、Val379→Ile、Tyr253→Phe、Phe382→Leu、Glu255→Lys、Leu387→Met、Glu255→Val、His396→Pro、Phe311→Ile、His396→Arg、Phe311→Leu、Ser417→Tyr、Thr315→Ile、Glu459→Lys 和 Phe486→Ser。

式 IA 化合物特别用于通过抑制 Flt-3 的酪氨酸激酶结构域来治疗 AML。本发明的另一个实施方案是治疗急性骨髓性白血病（AML）的方法，其包括施用治疗有效量的所述化合物。

式 IA 化合物(或其特别是可药用盐)，由于它们抑制 FGFR 的活性，尤其可用于治疗（尤其是异常的）生长、组织修复、重构；细胞迁移、细胞分化、骨骼肌和/或四肢发育、伤口愈合、信号转导、血细胞生成和/或血管发生以及肿瘤发生，或者肿瘤或癌症，包括转移灶和转移灶的形成，特别是用于治疗人类肿瘤，如非小细胞肺癌、鳞状细胞癌（头和颈部）、乳腺癌、胃癌，例如胰腺癌、卵巢癌、结肠癌和/或前列腺癌以及星形细胞瘤、神经胶质瘤、膀胱癌、上皮癌，例如膀胱或子宫内膜上皮癌，多发性骨髓

瘤、鳞状细胞癌（头和颈部），例如口腔鳞状细胞癌，成视网膜母细胞瘤，肉瘤，例如滑膜瘤和/或皮肤肿瘤；8p11 骨髓增生综合征=嗜酸性骨髓增生综合征(EMS)；骨骼畸形、人类侏儒症，包括软骨发育不全、颅缝早闭综合征和侏儒综合征、骨骼发育不良，包括软骨发育不良、伴有发育延迟的重度软骨发育不全、黑棘皮症、致死性骨发育不全、颅缝早闭表型，例如 Muenke 冠状颅缝早闭或伴有黑棘皮症的克鲁宗综合征，斐弗综合征、软骨细胞成熟受限、骨生长抑制；炎性或自身免疫疾病，例如类风湿关节炎(RA)、II 型胶原关节炎、多发性硬化症(MS)、系统性红斑狼疮(SLE)、银屑病、幼年型糖尿病、舍格伦病、甲状腺疾病、肉瘤病、自身免疫性眼葡萄膜炎、炎性肠病(克罗恩病或和溃疡性结肠炎)、乳糜泻和/或重症肌无力；常染色体显性的血磷酸盐过少的佝偻病(ADHR)、X-染色体连锁的血磷酸盐过少的佝偻病(XLH)、肿瘤诱导的骨软化症(TIO)、骨纤维性结构不良(FH)；慢性梗阻性肺疾病(COPD)；肥胖症、糖尿病和/或与其相关的疾病，例如代谢综合征、心血管疾病、高血压、异常的胆固醇和甘油三酯水平、皮肤病(例如感染)、静脉曲张、黑棘皮症、湿疹、运动不耐受、2 型糖尿病、胰岛素抗性、高胆固醇血症、胆石病、矫形外科损伤、血栓栓塞性疾病、冠脉或血管狭窄（例如动脉粥样硬化）、日间嗜睡、睡眠呼吸暂停、晚期肾病、胆囊疾病、痛风、心脏病、免疫应答受损、呼吸功能受损、创伤后感染、不育症、肝病、下腰痛、产科和妇科并发症、胰腺炎、中风、手术并发症、压迫性尿失禁和/或胃肠疾病。

在哺乳动物软骨中促进局部新生软骨生成的方法包括向软骨局部施用某些激酶抑制剂，这种方法描述于 WO2006/038112。令人惊奇地是，发现本文所定义的式 IA 化合物可以以同样方式使用。因此，本发明还涉及促进哺乳动物软骨中局部新生软骨生成的方法，其包括以有效促进局部新生软骨生成的量向软骨局部施用如上文所定义的式 IA 的脲衍生物或其可药用盐、水合物、溶剂合物、酯、N-氧化物保护的衍生物、单一异构体和异构体的混合物或其前药。式 IA 的化合物还用于治疗在新生软骨生成背景下的骨关节炎。

术语“治疗”也包括预防，其包括例如在发现有突变或改变的病人中预防性的治疗，所述突变或改变说明它们易于或可能易于发展为疾病，或者优选对所述疾病、尤其是上述的一种或多种疾病治疗性的(包括但不限于缓和性的、治愈性的、减轻症状的、减缓症状的、抑制疾病或症状的、延迟进展的、调控激酶或抑制激酶的)治疗。

优选治疗动物。动物优选温血动物，更优选哺乳动物。人(其通常也涵盖于通用术语“动物”中)特别是指患者或(例如由于某些突变或其他特征)易患上下文所定义的疾病风险的人。

药物制剂、方法和用途

本发明还涉及包含式 IA(或其例举的式)的化合物或其 N-氧化物作为活性成分并且可以特别用于治疗上述疾病的药物组合物。

本发明的可药用化合物可以用于，例如制备包含作为有效成分的药物有效量的式 IA(或其例举的式)化合物或其可药用盐，与一种或多种无机或有机、固体或液体的可药用载体一起或混合的药物组合物。

本发明还涉及适于对温血动物，特别是人(或者源自温血动物，特别是人的细胞或细胞系，例如淋巴细胞)进行给药，以用于治疗(在本发明的广义的方面还包括预防)对抑制蛋白激酶活性有响应的疾病的药物组合物，特别是上文提到的疾病之一优选使用式 IA(或其例举的式)化合物，其包含所述抑制有效量的新的式 IA(或其例举的式)化合物或其可药用的盐(其对所述抑制有效)和至少一种可药用的载体。

特别优选经肠给药例如鼻、口腔、直肠或特别是口服给药，胃肠外给药，例如静脉内、肌内或皮下给药，对温血动物(特别是人)给药的药物组合物。该组合物仅包含活性成分或者还优选地包含可药用的载体。活性成分的剂量取决于所治疗的疾病及对象的种类、年龄、体重和个体情况、个体的药代动力学数据和给药方式。

本发明尤其涉及包含式 IA(或其例举的式)化合物、互变异构体、N-氧化物或其可药用盐或水合物或溶剂合物以及至少一种可药用载体的药物组

合物。

本发明还涉及人类或动物体的预防或特别是治疗方法中的药物组合物的用途、其制备方法（特别是以肿瘤治疗的组合物形式）和治疗（特别是肿瘤）疾病、特别是那些上文所提到的疾病的方法。

本发明还涉及式 IA(或其例举的式)化合物或其 N-氧化物在制备包含作为活性成分的式 IA(或其例举的式)化合物或其 N-氧化物的药物制剂的方法和用途。

该药物组合物包含约 1%至约 95%的活性成分，在优选的实施方案中单剂量给药形式包含约 20%至约 90%的活性成分，在优选的实施方案中非单剂量型给药形式包含约 5%至约 20%的活性成分。单位剂量形式是例如包衣和非包衣的片剂、安瓿剂、小瓶、栓剂或胶囊。其他剂型是例如软膏剂、乳剂、贴剂、泡沫剂、酏剂、喷雾剂等。胶囊的实例包含约 0.05g 至约 1.0g 的活性成分。

本发明的药物组合物采用自身已知的方法来制备，例如通过常规的混合、制粒、包衣、溶解或冷干方法来进行制备。

优选使用活性成分的溶液，还可以使用其混悬液或分散液，特别是等渗的水性溶液、分散液或混悬液，在例如仅包含活性成分或者包含活性成分和载体的冷冻干燥组合物的情况中，可以在使用前进行配制。该药物组合物可进行灭菌和/或可包含赋形剂，例如防腐剂、稳定剂、润湿剂和/或乳化剂、增溶剂、用于调节渗透压的盐和/或缓冲剂，并且可以用本身已知的方式进行制备，例如可以通过常规溶解和冷冻干燥方法制备。所述溶液或混悬液可包含增加粘度的试剂或增溶剂，如羧甲基纤维素钠、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯吡咯烷酮或明胶。

油中的混悬液包含作为油性组分的植物油、常用于注射目的的合成或半合成油类。可提及的特别是液体脂肪酸酯，其包含具有 8-22 个，特别是 12-22 个碳原子的长链脂肪酸（作为酸组分），例如月桂酸、十三烷酸、肉豆蔻酸、十五烷酸、棕榈酸、十七烷酸、硬脂酸、花生酸、正二十二烷酸或相应的不饱和酸，例如油酸、反油酸、芥酸、brassic acid 或亚油酸，

如果需要的话,可加入抗氧化剂,例如维生素 E、 β -胡萝卜素或 3,5-二-叔-丁基-4-羟基甲苯。这些脂肪酸酯的醇组分具有最多 6 个碳原子并且是单-或多-羟基例如单-、二-或三-羟基醇,例如甲醇、乙醇、丙醇、丁醇或戊醇或其异构体,但特别是乙二醇和甘油。因此,可提及的脂肪酸酯的实例如下:油酸乙酯、肉豆蔻酸异丙酯、棕榈酸异丙酯、“Labrafil M 2375”(聚氧乙烯甘油三油酸酯, Gattefossé, 巴黎)、“Miglyol 812”(具有 C₈ 至 C₁₂ 的链长度的饱和脂肪酸的甘油三酯, Hüls AG, 德国),但是特别是植物油,如棉籽油、杏仁油、橄榄油、蓖麻油、芝麻油、豆油且特别是花生油。

注射组合物是以常规方式在无菌条件下制备的;也同样适用于无菌条件下将该组合物引入安瓿或管形瓶中并将该容器密封。

用于口服给药的药物组合物可以通过将活性成分与固体载体组合来获得,如果需要的话,将所得的混合物制粒并且如果需要或必需的话,在加入适宜的赋形剂后将该混合物加工成片剂、糖锭剂核或胶囊。还可以将其混入到可以使得活性成分以可检测的量扩散或释放的塑性载体中。

适宜的载体特别是填充剂,例如糖类,例如乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇、纤维素制剂和/或磷酸钙类,例如磷酸三钙或磷酸氢钙;和粘合剂,例如淀粉糊,例如使用玉米、小麦、水稻或马铃薯淀粉的淀粉糊、明胶、西黄蓍胶、甲基纤维素、羟丙甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和/或聚乙烯吡咯烷酮;和/或如果需要的话,崩解剂,如上述淀粉类、和/或羧甲基淀粉、交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂、海藻酸或其盐,例如海藻酸钠。赋形剂特别是流动调节剂和润滑剂,例如硅酸、滑石粉、硬脂酸或其盐,如硬脂酸镁或硬脂酸钙、和/或聚乙二醇。为糖锭剂核提供适宜的、任选为肠溶的包衣,特别是,可采用可包含阿拉伯胶、滑石粉、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇和/或二氧化钛的浓缩的糖溶液,或者在适宜有机溶剂中的包衣溶液,或者,为了制备肠溶包衣,可采用适宜的纤维素制剂溶液,例如邻苯二甲酸乙基纤维素或邻苯二甲酸羟丙甲基纤维素溶液。胶囊有由明胶制得的干填充的胶囊和由明胶和增塑剂例如甘油或山梨醇制成的密封的软胶囊。该干填充的胶囊可包含颗粒形式的活性成分,所说的颗粒形式例如可以具有填充剂

如乳糖、粘合剂如淀粉类，和/或助流剂如滑石粉或硬脂酸镁，并且如果需要的话还可以具有稳定剂。在软胶囊的情况下，优选将活性成分溶解或混悬于适宜的油性赋形剂，如脂肪油、石蜡油或液体聚乙二醇中，还可以向其中加入稳定剂和/或抗菌剂。可以向片剂或糖锭剂包衣或胶囊壳中加入染料或颜料，例如为了识别目的或表明活性成分的不同剂量。

为片剂核提供适宜的、任选为肠溶的包衣，特别是，可采用可包含阿拉伯胶、滑石粉、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇和/或二氧化钛的浓缩的糖溶液，或者在适宜有机溶剂或溶剂混合物中的包衣溶液，或者，为了制备肠溶包衣，可采用适宜的纤维素制剂溶液。

用于口服给药的药物组合物还包括由明胶构成的硬胶囊和由明胶和增塑剂构成的密封的软胶囊。硬胶囊可包含颗粒形式的活性成分，所说的颗粒形式例如可以具混有填充剂、粘合剂和/或助流剂，并任选地具有稳定剂。在软胶囊中，优选将活性成分溶解或混悬于适宜的液体赋形剂中，还可以向其中加入稳定剂和去垢剂。

适于直肠给药的药物组合物例如是由活性成分和栓剂基质组合构成的栓剂。

特别适宜用于胃肠外给药的是水溶形式的活性成分（例如水溶性盐）的水溶液，或者包含增加粘度的物质（例如羧甲基纤维素钠、山梨醇和/或葡聚糖），以及如果需要的话还包含稳定剂的水性注射混悬液。任选地具有赋形剂的活性成分还可以以冷干的形式，并可以在胃肠外给药前通过加入适宜的溶剂来将其配制成溶液。

所用的溶液，例如用于胃肠外给药的溶液还可以用作输注液。

本发明同样涉及对本文提到的疾病（药理学病症）之一，特别是对酪氨酸激酶抑制有响应的疾病，更加特别是如上文提到的疾病，更加特别是EGFR，特别是对应的肿瘤性疾病的治理的过程和方法。式IA(或其例举的式)的化合物或其N-氧化物(其还包括盐、酯或类似化合物)可以以所述形式或特别是以药物组合物的形式，优选以对所述疾病有效的量来向动物、优选是向温血动物，例如人类，优选需要此类治疗的人类来进行预防性或

治疗性给药。对于具有约 70kg 体重的个体而言，每日给药剂量例如约 0.001g 至约 12g，优选例如约 0.1g 至约 3g 的本发明化合物。“大约”优选地表示最多 10% 的偏差，更加优选分别少于所给数据 1% 的偏差。

“有响应的”疾病是指能够显示可发现的一些有益效果的疾病。

本发明还提供了治疗蛋白激酶依赖性疾病的方法，其包括同时或分别向温血动物（例如人类）联合施用一种或多种细胞生长抑制的或细胞毒的化合物如 Glivec® 和本发明的化合物。术语“同时”的含义是快速连续地或在一次给药后立即再次给药。

本发明还特别涉及式 IA(或其例举的式)的化合物或其 N-氧化物、或其可药用盐，特别是所述优选的式 IA(或其例举的式)的化合物或其可药用盐以所述形式或以与至少一种可药用载体形成的药物制剂形式，用于一种或多种上文提到的疾病，优选对蛋白激酶抑制有响应的疾病、特别是肿瘤性疾病、更特别是对 Abl 酪氨酸激酶抑制有响应的白血病的治疗和预防性处理的用途。

所用的药物制剂（药物）的优选的剂量、组合及其制备方法分别在上文中描述。

式 IA(或其例举的式)的化合物还可以与 advantage p49 其他抗增殖药物组合。这些抗增殖药物包括但不限于芳香酶抑制剂、抗雌激素药物、拓扑异构酶 I 抑制剂、拓扑异构酶 II 抑制剂、微管活性药物、烷化剂、组蛋白去乙酰酶抑制剂、法尼基转移酶抑制剂、COX-2 抑制剂、MMP 抑制剂、mTOR 抑制剂、抗肿瘤的抗代谢物、铂化合物、降低蛋白激酶活性和 ATP 酶活性的化合物、进而抗血管生成的化合物、戈那瑞林激动剂、抗雄激素药物、bengamides、二膦酸盐、抗增殖的抗体、替莫唑胺(TEMODAL®)、甾类药物（如地塞米松）、蛋白酶体抑制剂（如万珂和/或反应停）。

本文中所用的术语“芳香酶抑制剂”涉及抑制雌激素生成，即抑制底物雄甾烯二酮和睾酮各自转化为雌素酮和雌二醇的化合物。该术语包括但不限于甾类，特别是依西美坦和福美坦；以及特别是非甾类，特别是氨鲁米特、氟氯唑、法屈唑、阿纳托唑；且非常特别的是来曲唑。依西美坦可以

例如以市售的形式(如商标名为 AROMASIN™)来给药。福美坦可以例如以市售的形式(如商标名为 LENTARON™)来给药。法倔唑可以例如以市售的形式(如商标名为 AFEMA™)来给药。阿纳托唑可以例如以市售的形式(如商标名为 ARIMIDEX™)来给药。来曲唑可以例如以市售的形式(如商标名为 FEMARA™ 或 FEMAR™)来给药。来曲唑可以例如以市售的形式(如商标名为 FEMARA™ 或 FEMAR™)来给药。氨鲁米特可以例如以市售的形式(如商标名为 ORIMETEN™)来给药。

本发明的包含为芳香酶抑制剂的抗肿瘤药的组合对于激素受体阳性乳腺肿瘤治疗特别有用。

如本文所用的术语“抗雌激素药物”涉及在雌激素受体水平对抗雌激素作用的化合物。该术语包括但不限于它莫西芬、氟维司群、雷洛昔芬和雷洛昔芬盐酸化物。它莫西芬可以例如以市售的形式(如商标名为 NOLVADEX™)来给药。雷洛昔芬盐酸化物可以例如以市售的形式(如商标名为 EVISTA™)来给药。氟维司群可以如 US 4,659,516 中所公开的方法来配制或者可以例如以市售的形式(如商标名为 FASLODEX™)来给药。

如本文所用的术语“拓扑异构酶 I 抑制剂”包括但不限于托泊替康、依立替康、9-硝基喜树碱和大分子喜树碱偶联物 PNU-166148 (WO99/17804 中的化合物 A1)。依立替康可以例如以市售的形式(如商标名为 CAMPTOSAR™)来给药。托泊替康可以例如以市售的形式(如商标名为 HYCAMTIN™)来给药。

如本文所用的术语“拓扑异构酶 II 抑制剂”包括但不限于安曲非宁亚得里亚霉素(包括脂质体制剂,例如 CAELYX™)、表柔比星、去甲氧正定霉素和奈莫柔比星、蒽醌类(米托蒽醌和洛索蒽醌)以及鬼臼毒素类(鬼臼乙叉甙和鬼臼乙叉甙)。鬼臼乙叉甙可以例如以市售的形式(如商标名为 ETOPOPHOS™)来给药。鬼臼噻吩甙可以例如以市售的形式(如商标名为 VM 26-BRISTOL™)来给药。亚得里亚霉素可以例如以市售的形式(如商标名为 ADRIBLASTIN™)来给药。表柔比星可以例如以市售的形式(如商标名为 FARMORUBICIN™)来给药。去甲氧正定霉素可以例如以市售

的形式（如商标名为 ZAVEDOS™）来给药。米托蒽醌可以例如以市售的形式（如商标名为 NOVANTRON™）来给药。

术语“微管活性药物”涉及微管稳定及微管去稳定药物，包括但不限于紫杉烷类（紫杉醇和紫杉萜）、长春花碱类（例如长春碱、特别是硫酸长春碱；长春新碱、特别是硫酸长春新碱；以及长春瑞滨）、discodermolide 和埃坡霉素类（例如埃坡霉素 B 和 D）。紫杉萜可以例如以市售的形式（如商标名为 TAXOTERE™）来给药。硫酸长春碱可以例如以市售的形式（如商标名为 VINBLASTIN R.P.™）来给药。硫酸长春新碱可以例如以市售的形式（如商标名为 FARMISTIN™）来给药。

如本文所用的术语“烷化剂”包括但不限于环磷酰胺、异磷酰胺和美法仑。环磷酰胺可以例如以市售的形式（如商标名为 CYCLOSTIN™）来给药。异磷酰胺可以例如以市售的形式（如商标名为 HOLOXAN™）来给药。

术语“组蛋白去乙酰酶抑制剂”涉及抑制组蛋白去乙酰酶且具有抗增殖活性的化合物。

术语“法尼基转移酶抑制剂”涉及抑制法尼基转移酶且具有抗增殖活性的化合物。

术语“COX-2 抑制剂”涉及抑制环氧化酶 2 型(COX-2)且具有抗增殖活性的化合物，例如塞来考昔(Celebrex®)、罗非考西(Vioxx®)和芦米考昔(COX189)。

术语“MMP 抑制剂”涉及抑制基质金属蛋白酶(MMP)且具有抗增殖活性的化合物。

术语“mTOR 抑制剂”涉及抑制雷帕霉素的哺乳动物靶点(mTOR)且具有抗增殖活性的化合物，例如西罗莫司(Rapamune®)、依维莫司(Certican™)、CCI-779 和 ABT578。

术语“抗肿瘤的抗代谢物”包括但不限于 5-氟尿嘧啶、喃氟啶、卡培他滨、克拉屈滨、阿糖胞苷、磷酸氟达拉滨、氟尿嘧啶、吉西他滨、6-巯基嘌呤、羟基脲、甲氧喋呤、依达曲沙以及这些化合物的盐，还有 ZD 1694 (RALTITREXED™)、LY231514 (ALIMTA™)、LY264618

(LOMOTREXOLTM)和 OGT719。

如本文所用的术语“铂化合物”包括但不限于碳铂、顺铂和奥沙利铂。碳铂可以例如以市售的形式（如商标名为 CARBOPLATTM）来给药。奥沙利铂可以例如以市售的形式（如商标名为 ELOXATINTM）来给药。

如本文所用的术语“降低蛋白激酶活性并进而抗血管生成的化合物”包括但不限于降低蛋白激酶（例如血管内皮生长因子(VEGF)、表皮生长因子(EGF)、c-Src、蛋白激酶 C、血小板衍生的生长因子(PDGF)、Bcr-Abl、c-Kit、Flt-3、胰岛素样生长因子 I 受体(IGF-IR)和细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶(CDK)、磷脂酰肌醇 3 激酶抑制剂(PI3K)和蛋白激酶 B(PKB)抑制剂（例如在 WO 2005/054238 和 WO 2005/054237 中所提到的）、热休克蛋白 90(HSP90)抑制剂（一种 ATP 酶））和具有其他不同于降低蛋白激酶活性的作用机制的抗血管生成的化合物。

降低 VEGF 活性的化合物具体而言是抑制 VEGF 受体，特别是 VEGF 受体的酪氨酸激酶活性的化合物，与 VEGF 连接的化合物、以及具体而言是那些在 WO 98/35958、WO 00/09495、WO 00/27820、WO 00/59509、WO 98/11223、WO 00/27819、WO 01/55114、WO 01/58899 和 EP 0 769 947 中概括和具体公开的化合物、蛋白质和单克隆抗体；那些如 M. Prewett 等人在 *Cancer Research* 59(1999) 5209-5218 中、F. Yuan 等人在 *Proc. Natl. Acad. Sci. 美国*, 93 卷, 14765-14770 页, 1996 年 12 月中、Z. Zhu 等人在 *Cancer Res.* 58, 1998, 3209-3214 中以及 J. Mordenti 等人在 *Toxicologic Pathology*, 27 卷, 第 1 期, 14-21 页, 1999 中；在 WO 00/37502 和 WO 94/10202 中；AngiostatinTM, M. S. O'Reilly 等人在 *Cell* 79, 1994, 315-328 中；以及 EndostatinTM, M. S. O'Reilly 等人在 *Cell* 88, 1997, 277-285 中所描述的化合物、蛋白质和单克隆抗体；

降低 EGF 活性的化合物具体而言是抑制 EGF 受体，特别是 EGF 受体的酪氨酸激酶活性的化合物，与 EGF 连接的化合物、以及具体而言是那些在 WO 97/02266、EP 0 564 409、WO 99/03854、EP 0520722、EP 0 566 226、EP 0 787 722、EP 0 837 063、WO 98/10767、WO 97/30034、WO

97/49688、WO 97/38983 以及特别是在 WO 96/33980 中概括和具体公开的化合物；

降低 c-Src 活性的化合物包括但不限于如下文所定义的抑制 c-Src 蛋白质酪氨酸激酶活性的化合物，以及 SH2 相互作用抑制剂例如那些在 WO97/07131 和 WO97/08193 中所公开的那些；

抑制 c-Src 蛋白质酪氨酸激酶活性的化合物包括但不限于属于吡咯并嘧啶类（特别是吡咯并[2,3-d]嘧啶类）、嘌呤类、吡唑并嘧啶类（特别是吡唑并[3,4-d]嘧啶类）、吡啶并嘧啶类（特别是吡啶并[2,3-d]嘧啶类）的结构类型的化合物。优选地，该术语涉及那些在 WO 96/10028、WO 97/28161、WO97/32879 和 WO97/49706 中所公开的化合物；

降低蛋白激酶 C 活性的化合物具体而言是那些在 EP 0 296 110(在 WO 00/48571 中所述的药物制剂)中所公开的作为蛋白激酶 C 抑制剂的星形孢菌素衍生物；

其他降低蛋白激酶活性且还可以与本发明化合物合并使用的特定化合物是伊马替尼(Gleevec®/Glivec®)、PKC412、IressaTM(ZD1839)、PKI166、PTK787、ZD6474、GW2016、CHIR-200131、CEP-7055/CEP-5214、CP-547632、KRN-633 和 SU5416；

具有其他不同于降低蛋白激酶活性的作用机制的抗血管生成的化合物包括但不限于例如反应停(THALOMID)、塞来考昔(Celebrex)和 ZD6126。

如本文所用的术语“戈那瑞林激动剂”包括但不限于阿巴瑞克、戈舍瑞林和醋酸高锡林。戈舍瑞林是在 US 4,100,274 中公开且可以例如以市售的形式（如商标名为 ZOLADEXTM）来给药。

阿巴瑞克可以如 US 5,843,901 中所公开的方法来配制。

如本文所用的术语“抗雄激素药物”包括但不限于比卡鲁胺(CASODEXTM)，其可以如 US 4,636,505 中所公开的方法来配制。

术语“bengamides”涉及具有抗增殖特性的 bengamides 及其衍生物

如本文所用的术语“二膦酸盐”包括但不限于 etridonic acid、氯甲双磷酸、替鲁膦酸、帕米膦酸、阿仑棒酸、伊班膦酸、利塞膦酸和唑来膦酸。

“Etridonic acid”可以例如以市售的形式（如商标名为 DIDRONEL™）来给药。“氯甲双磷酸”可以例如以市售的形式（如商标名为 BONEFOS™）来给药。“替鲁膦酸”可以例如以市售的形式（如商标名为 SKELID™）来给药。“帕米膦酸”可以例如以市售的形式（如商标名为 ARELIA™）来给药。“阿仑棒酸”可以例如以市售的形式（如商标名为 FOSAMAX™）来给药。“伊班膦酸”可以例如以市售的形式（如商标名为 BONDRANAT™）来给药。“利塞膦酸”可以例如以市售的形式（如商标名为 ACTONEL™）来给药。“唑来膦酸”可以例如以市售的形式（如商标名为 ZOMETA™）来给药。

如本文所用的“抗增殖的抗体”包括但不限于曲妥珠单抗(Herceptin™)、曲妥珠单抗-DM1、埃罗替尼(Tarceva™)、贝伐单抗(Avastin™)、利妥昔单抗(Rituxan®)、PRO64553(抗-CD40)和 2C4 抗体。

为了治疗急性骨髓性白血病 (AML)，式 IA(或其例举的式)化合物可以与标准的白血病疗法联合使用，特别是与用作 AML 治疗的疗法联合使用。具体而言，式 IA(或其例举的式)化合物可以与例如法尼基转移酶抑制剂和/或其他对 AML 治疗有用的药物（例如柔红霉素、阿霉素、阿糖胞苷、VP-16、鬼臼噻吩甙、米托蒽醌、去甲氧正定霉素、碳铂和 PKC412）联合给药。

通过代号、通用名或商品名来识别表征的活性药物的结构可以从“Merck 索引”的标准摘要的现行版本、或者从数据库如国际专利（如 IMS 世界出版物）获得。

可以与式 IA(或其例举的式)的化合物联合使用的上文提到的化合物，可以如本领域（例如上文引用的文献）中所描述的方法来制备和给药。

如本文所用的术语“联合给药”的含义是包括向单个患者施用所选择的治疗药物，并期望包括不必要按照相同途径给药或同时给药的治疗用药方法。

由于适当且便利，如没有另外说明，随后或上文所提到（作为动词或名词）的术语“用途”（涉及式 IA 的化合物或其（特别是可药用的）盐的

用途), 其(如果上下文没有不同地指明或不同地建议)分别(如果没有另外说明)包括下述任何一个或多个本发明的实施方案: 在治疗蛋白(特别是酪氨酸)激酶调控(特别是抑制)响应性疾病中的用途、制备用于治疗蛋白激酶调控(特别是抑制)响应性疾病的药物组合物的用途、在治疗蛋白激酶调控(特别是抑制)响应性和/或增生性疾病中使用一种或多种式 IA 化合物的方法、包含一种或多种用于治疗所述蛋白激酶调控(特别是抑制)响应性疾病的式 IA 化合物的药物制剂、以及一种或多种用于治疗所述蛋白激酶调控(特别是抑制)响应性疾病的式 IA 化合物。具体而言, 治疗的疾病及因此优选用于“用途”的式 IA 化合物选自上文提到的蛋白(特别是酪氨酸)激酶调控(特别是抑制)响应性(含义是不仅“依赖”, 而且“支持”, 包括疾病对蛋白激酶调控(特别是抑制)响应的情况, 因此蛋白激酶的活性支持或甚至引发疾病显现)疾病, 或者特别是上文或下文提到的增生性疾病。优选地, 蛋白激酶调控(特别是抑制)响应性疾病是对上文和下文提到的一种或多种激酶(更加优选 FGFR)的抑制响应的疾病。

制备方法

式 IA 化合物采用类似于本领域公知的用于其他化合物的方法来制备, 因此对于式 IA 的新化合物的制备作为类似方法而言是新方法, 优选地通过在双反应性的碳酸衍生物的存在下将 IIA 化合物(苯胺)



其中 R^4 和 n 如式 IA 的化合物所定义, 与式 IIIA (胺) 反应,



其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^5 、X、Y 和 Z 如式 IA 化合物所定义。

并且, 如果需要, 将式 IA 化合物转化为不同的式 IA 化合物, 将可获得的式 IA 化合物的盐转化为游离化合物或不同的盐, 将可获得的游离式 IA 化合物转化为其盐, 和/或将可获得的式 IA 化合物的异构体混合物分离成单个异构体。

在该反应中, 双反应性的碳酸衍生物优选碳酸酐或更加优选碳酸二卤化物, 特别是碳酰氯(光气)。该反应可以优选通过首先将式 IIA 化合物(优选)或式 IIIA 化合物与双反应性碳酸衍生物反应生成对应的异氰酸盐来进行, 随后向其加入其他化合物(分别为式 IIIA 或 IIA 化合物)。首个反应优选在合适的溶剂, 例如醚(如二噁烷), 在升高的温度下(如从 20℃ 至反应混合物的回流温度)进行, 并可以优选随后通过浓缩所得的异氰酸盐溶液以提供优选为固体或油形式的异氰酸盐。随后异氰酸盐的第二个反应在加入合适的溶剂(特别是 N-甲基吡咯烷酮(NMP)和/或甲苯)后, 在升高的温度下(如从 20℃ 至反应混合物的回流温度)分别加入补充的式 IIIA 或 IIA 的胺来进行。

两个反应都优选在保护性气体、特别是氮气或氩气下进行。

任选的反应和转化

式 IA 的化合物可以转化为不同的式 I 化合物。

例如, 式 IA 化合物中, 其中 R^1 是苄氧基苄基氨基或 4-苄基-哌嗪-1-基-苄基氨基, 苄基部分可以通过氢化作用去除, 例如在贵金属催化剂(例如钯碳)的存在下, 在合适的溶剂(例如醇类, 如甲醇)中, 在合适的温度下(例如从 0 至 50℃), 在额外的酸(如 HCl)的存在下从哌嗪的氮上

去除以获得对应的化合物，其中的苄基部分被氢代替。

式 IA 化合物可以转化为对应的 N-氧化物。该反应通过与合适的氧化剂（优选过氧化物，例如间氯过氧苯甲酸），在合适的溶剂（例如卤代烃，通常为氯仿或二氯甲烷，或者低级烷羧酸，通常为乙酸）中，优选在 0℃ 和反应混合物沸点之间的温度下，特别是在大约室温下进行。

非氧化形式的本发明化合物可以从本发明化合物的 N-氧化物来制备，通过将其用还原剂（例如硫、二氧化硫、三苯基膦、硼氢化锂、硼氢化钠、三氯化磷、三溴化物等）在合适的惰性有机溶剂（例如乙腈、乙醇、水性二噁烷等）中在 0-80℃ 下进行处理。

具有至少一个成盐基团的式 IA 化合物的盐可以以其自身已知的方式来制备。例如，具有碱性基团（如碱性氮）的式 IA 化合物的酸加成盐可以以常规方式获得，例如通过用酸或合适的阳离子交换剂处理式 IA 化合物。具有酸性基团的式 IA 化合物的盐可以通过用金属化合物，例如合适的有机羧酸的碱金属盐（如 2-乙基己酸的钠盐），用有机碱金属或碱土金属化合物，例如对应的氢氧化物、碳酸盐或碳酸氢盐（如钠或钾的氢氧化物、碳酸盐或碳酸氢盐），用对应的钙化合物或用氨或合适的有机胺处理该化合物，所用的化学计算量优选仅相对成盐试剂少量过量。例如通过盐（例如酸加成盐）的中和作用，例如用弱碱或通过用离子交换剂处理使之到达等电点，可以形成包含酸性和碱性成盐基团（例如游离羧基和游离氨基）的式 IA 化合物的内盐。

式 IA 化合物（=本发明化合物）的盐可以以常规方式转化为游离化合物；金属或铵盐例如通过用合适的酸和酸加成盐处理，例如通过用合适的碱性试剂处理可以转化为不同的盐。在两种情况下，都可以使用合适的离子交换剂。

立体异构体混合物（例如非对映异构体混合物）可以通过合适的分离方法以自身已知的方式分离成它们对应的异构体。例如非对映异构体混合物可以通过分步结晶法、色谱法、溶剂分配法以及类似的方法来分离成它们的单一非对映异构体。该分离可以在一种原料化合物水平上或在式 IA

化合物自身的水平上进行。对映异构体可以通过形成非对映异构体的盐,例如通过与对映异构体纯的手性酸成盐来进行分离,或者通过色谱法(例如 HPLC),使用具有手性配基的色谱基质。将化合物的立体异构体从它们的外消旋混合物中分离的适用技术的更加详细的描述可以在 Jean Jacques, Andre Collet, Samuel H. Wilen, "Enantiomers, Racemates and Resolutions", John Wiley And Sons, Inc., 1981 中找到。

本发明化合物的前药衍生物可以通过本领域一般技术人员已知的方法(例如进一步详见 Saulnier 等人, (1994), Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 4 卷, 1985 页)来制备。例如,合适的前药可以通过将非衍生的本发明化合物与合适的氨甲酰化试剂(例如 1,1-酰氧基烷基氨基碳酰氯(1,1-acyloxyalkylcarbanochloridate)、对硝基苯基碳酸盐等)反应来制备。

本发明化合物被保护的衍生物可以通过本领域那些一般技术人员已知的方法来制备。保护基团的建立及其去除的适用技术的详细描述可以在 T. W. Greene, "Protecting Groups in Organic Chemistry", 第 3 版, John Wiley and Sons, Inc., 1999 中找到。

作为本发明化合物的溶剂合物(例如水合物)可以在本发明的方法中方便地制备或形成。本发明化合物的水合物可以通过从水/有机溶剂混合物中用有机溶剂(例如二噁英、四氢呋喃或甲醇)重结晶来方便地制备。

中间体和终产物可以根据标准方法,例如使用色谱方法、分配方法、(重)结晶法等来进行后处理和/或纯化。

原料

原料和中间体(两者均各自包含其盐),特别是式 IIA 和 IIIA 的原料和中间体可以按照与实施例中所描述的类似的方法,根据或类似于本领域已知的方法来制备,和/或其作为商品获得。

例如,原料可以优选地按照以下方法来制备:

如果没有另外指明,在原料和中间体中所用的 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、

X、Y、Z 和 n，这些符号优选地具有式 IA 的化合物所提供的含义。

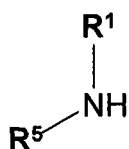
例如，带有一个或多个卤素基团的式 IIA 的化合物可以通过卤化作用，例如与无机酸卤化物（如磺酰氯），在合适的溶剂（如乙腈、二氯甲烷和/或四氢呋喃）中，优选地在-40 至 25℃范围内的温度下制备，对于式 IIA 对应的化合物，其中存在至多 4 个其他基团 R^4 （选自 C_1 - C_7 -烷基、卤素- C_1 - C_7 -烷基、卤素和 C_1 - C_7 -烷氧基），且氨基被保护，例如通过乙酰基或叔丁氧基羰基（保护基团的引入参见例如实施例或下文的一般加工条件），随后去除保护基团（例如乙酰基通过在合适的溶剂（如乙醇）中，在升高的温度（如从 30℃至所述混合物的回流温度）下，用碱金属氢氧化物（如氢氧化钾）处理来去除；叔丁氧基羰基通过在合适的溶剂（如二噁烷）中，在温度如-20 至 30℃下与酸（如 HCl）反应来去除）。

$R^4 = C_1$ - C_7 -烷基，特别是甲基，可以通过用 C_1 - C_7 -烷基卤化物（如碘化物）在合适的溶剂（如四氢呋喃）中，在优选从-50℃至 25℃的温度下对也为式 IIA（具有如前一段所述的氨基的保护和去保护）的对应的前体化合物中的苯环（特别是已经存在 C_1 - C_7 -烷氧基部分 R^4 ）进行烷基化来引入。以上反应在式 IIA 的化合物前体与强碱（如丁基或叔丁基锂）在合适的溶剂（如戊烷和四氢呋喃）中，在优选的从-80℃至 0℃范围的温度下反应之后进行。

例如，式 IIIA 化合物可以如下文通过将式 IVA 化合物

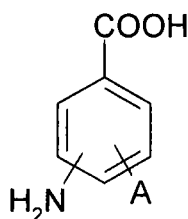


其中 Hal 是卤素，特别是氯或溴，在酸（如乙酸或盐酸）的存在下，在合适的溶剂（如水或二噁烷）中，在升高的温度（如在 50-160℃的范围内）下（必要时在试管中）与式 VA 的胺反应。



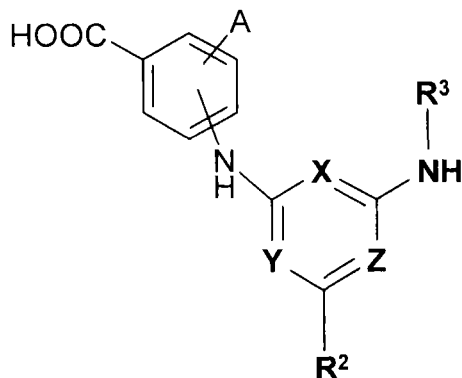
(VA)

或者, 其中的 R^1 是被[4-(C_1 - C_7 -烷基)-哌嗪-1-基]-羰基取代的苯基的式 IIIA 化合物可以通过将如上文定义的式 IVA 化合物与式 VIA 化合物反应来获得,



(VIA)

其中 A 是氢、 C_1 - C_7 -烷氧基或卤素, 优选在酸(如盐酸)的存在下, 在合适的溶剂(如二噁烷)中, 在升高的温度(如在 50 - 170°C)下(例如在微波炉中)进行反应, 随后所得的式 VIIA 化合物,



(VIIA)

其中各部分如式 IVA 和 VIA 所定义, 将其在偶合试剂(如丙基磷酸酐)的存在下, 在合适的溶剂(如 DMF)中, 在氮碱(如三乙胺和/或 4-二甲基氨基-吡啶)的存在下, 优选在 0 - 50°C 范围的温度下进行反应生成对应的式 IIIA 化合物。

例如, 其中 R^5 是氢的式 VA 化合物可以通过还原其中氨基(NR^3)被硝基替代的对应的化合物来获得, 例如将其用铁粉在乙醇、水和乙酸中, 在升高的温度(如 30 - 100°C)下, 或者用氢气在催化剂(如拉尼镍)的存在下, 在甲醇中, 在温度如 0 - 50°C 下进行反应。在两种情况下都可使用其他

惯常的溶剂。其中 R^5 是 C_1 - C_7 -烷基所对应的式 VA 化合物可以通过例如用对应的 C_1 - C_7 -烷基卤化物的烷基化作用来获得。

对应的原料和其他式 VA 化合物可以按照实施例中所描述的或与其类似的方法，根据本领域已知的方法来制备或其作为商品获得。

一般方法条件

一般情况下，下文的内容适用于上下文所提到的所有方法，而上下文所特别提到的反应条件是优选的反应条件：

在上下文所提到的任意反应中，尽管没有特别提到，如果适宜或需要的话可以使用保护基团来保护不期望参加所给出反应的功能基团，并且它们可以在适宜或需要的阶段引入和/或去除。因此在本说明书中任何可能没有特别提到保护和去保护的反应都包括那些包含使用保护基团的反应。

除非在上下文中另外指明，在本文公开范围之内仅作为容易离去的基团，其不是具体所需的式 IA 的终产物的组成部分的基团命名为“保护基团”。通过此保护基团对功能基团的保护，该保护基团自身以及适宜于它们离去的反应例如在标准参考著作中有描述，例如 J. F. W. McOmie, "Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, London and New York 1973、T. W. Greene 和 P. G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", 第三版, Wiley, New York 1999、"The Peptides"; 第 3 卷(编辑: E. Gross 和 J. Meienhofer), Academic Press, London and New York 1981、"Methoden der organischen Chemie", Houben Weyl, 第四版, 15/I 卷, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974、H.-D. Jakubke 和 H. Jeschkeit, "Aminosäuren, Peptide, Proteine", Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach 和 Basel 1982、以及 Jochen Lehmann, "Chemie der Kohlenhydrate: Monosaccharide und Derivate", Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974。特征性的保护基团可以例如通过溶剂解、还原、光解或可选择地在生理条件（如通过酶裂解）下容易地离去（即不发生不需要的二次反应）。

所有上述方法步骤都可以在其自身已知的反应条件下进行，优选那些

特别提到的反应条件，在没有或者惯常地有溶剂或稀释剂的存在下，优选地是对所用和溶解它们的试剂呈现惰性的溶剂或稀释剂；没有或存在催化剂、浓缩或中和试剂，例如离子交换剂（例如阳离子交换剂，如以 H^+ 形式），取决于反应和/或反应物的性质；在降低的、正常的或升高的温度下，例如在约 $-100^{\circ}C$ 至约 $190^{\circ}C$ 范围的温度下，优选在从约 $-80^{\circ}C$ 至约 $150^{\circ}C$ 下，例如在从 -80 至 $-60^{\circ}C$ 下，室温下、在从 -20 至 $40^{\circ}C$ 下或者在回流温度下；在大气压下或在封闭的容器中，酌情在压力下，和/或在惰性气体中，例如在氩气或氮气中。

除非在所述方法的描述中另外指明，来自那些适用于任何特殊反应的溶剂可所选自包括那些特别提到的溶剂，或例如水、酯类（例如低级烷基-低级链烷基酯，如乙酸乙酯）、醚类（例如脂肪醚，如二乙基醚；或环醚，例如四氢呋喃或二噁烷）、液态芳香烃（例如苯或甲苯）、醇类（例如甲醇、乙醇或 1-或 2-丙醇）、腈类（例如乙腈）、卤代烃类（例如二氯甲烷或氯仿）、酰胺类（例如二甲基甲酰胺或二甲基乙酰胺）、碱类（例如杂环氮碱，如吡啶或 N-甲基吡咯烷-2-酮）、羧酸酐（例如低级链烷酸酐，如乙酸酐）、环、直链或支链烃（例如环己烷、己烷或异戊烷）、或者这些溶剂的混合物（例如水溶液）。该溶剂混合物还可以用于后处理，例如通过色谱法或分配法来进行。

本发明还涉及所述方法的那些形式，其中在该方法的任何阶段中作为中间体可获得的化合物用作原料并进行剩余的方法步骤，或者其中的原料在反应条件下形成或以衍生物的形式（例如已被保护的形式或盐形式）使用，或者通过根据本发明的方法可获得的化合物是在方法条件下产生并进一步就地进行反应。在本发明的方法中优选那些可获得所述优选的式 IA 化合物的原料。本发明还涉及新的中间体和/或原料。特别优选的反应条件和新中间体与实施例中所提到的那些一致或类似。

本发明优选的实施方案

在优选的实施方案以及更广泛范围的之前和之后的实施方案中，同样

也在权利要求中，任何一种或多种或者所有的一般表达或符号，各自独立地可以被对应的上下文提供的更加特异的定义所代替，因此产生本发明更加优选的实施方案。

优选的是权利要求中给出的实施方案，其因此引入本文作为参考。特别优选的是上文中 A、B 或 C 任何一组所给出的式 IA 的化合物。非常优选的是在实施例中给出的一种或多种式 IA 的化合物及其（特别是可药用的）盐。

实施例：

以下实施例是为了阐述本发明而不限其范围。温度按照摄氏度计量。除非另外指明，所述反应在室温下进行。表示各个物质移动的距离与洗脱剂前沿移动的距离的比值的 R_f 值是在硅胶薄层板 5 x 10cm 的 TLC 板、硅胶 F₂₅₄(Merck, Darmstadt, 德国)上使用下文指定的溶剂系统通过薄层色谱法来确定。

分析性 HPLC 条件：

系统 1

线性梯度 20-100% CH₃CN 在 5 分钟 + 1.5 分钟 100% CH₃CN(0.1%TFA)；215 nm 下检测，流速在 30℃下 1mL/分钟。Column: Nucleosil 100-3 C18(70 x 4.0mm)。

缩写与首字母缩写：

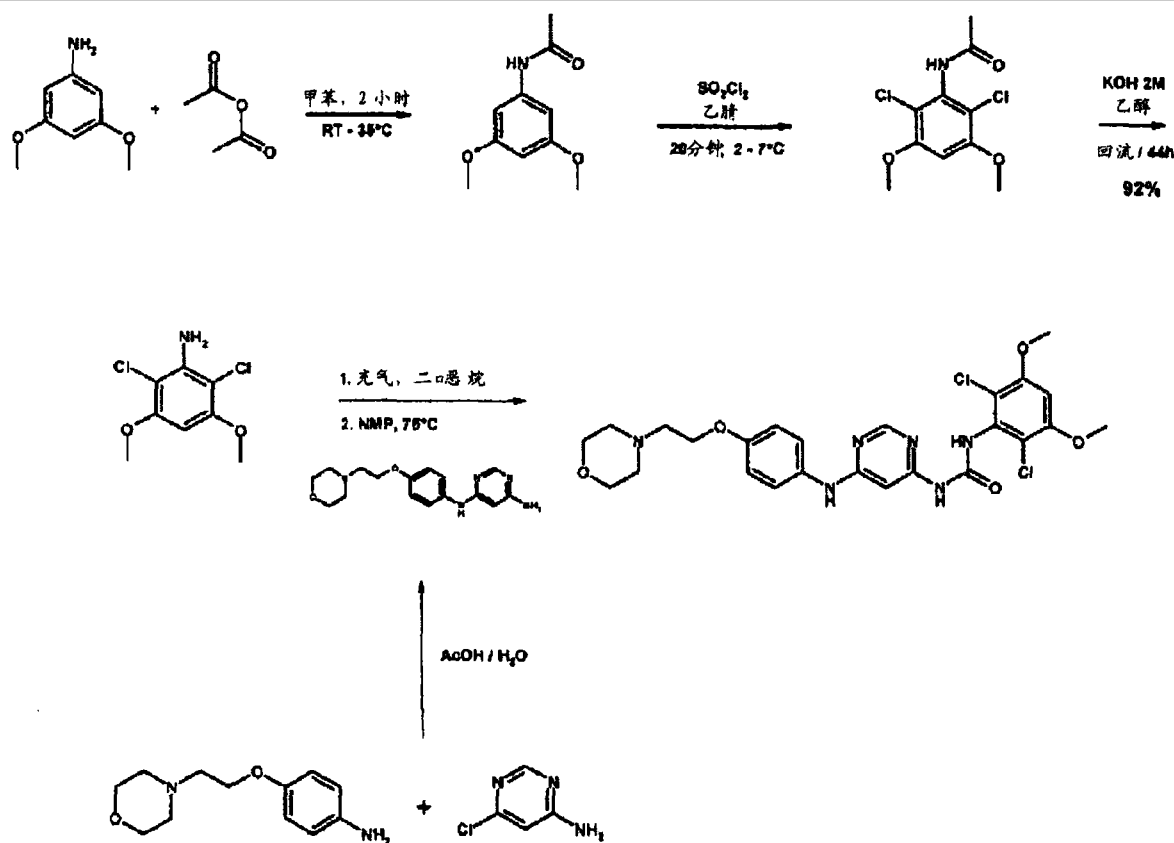
AcOH	乙酸
API-MS	大气压电离质谱
盐水	饱和 NaCl 水溶液
硅藻土	Celite®(西莱特公司) = 基于硅藻土的助滤剂
CH ₃ CN	乙腈

DCM	二氯甲烷
conc.	浓缩的
DIEA	二异丙基乙基胺
DMAP	4-二甲基氨基-吡啶
DMF	二甲基甲酰胺
DMP	1,3-二甲基-3,4,5,6-四氢-2-(1H)-嘧啶酮
DMSO	二甲基亚砷
equiv	当量
ESI-MS	电喷射离子化质谱
Et ₂ O	乙醚
Et ₃ N	三乙胺
EtOAc	乙酸乙酯
EtOH	乙醇
HNO ₃	硝酸
H ₂ SO ₄	硫酸
h	小时
Hex	己烷
HCl	盐酸
H ₂ O	水
HPLC	高压液相色谱
L	升
LiOH	氢氧化锂
Me	甲基
MeOH	甲醇
mL	毫升
min	分钟
m.p.	熔点
MPLC	中压液相色谱

MS	质谱
NaH	氢化钠
Na ₂ CO ₃	碳酸钠
NaHCO ₃	碳酸氢钠
Na ₂ SO ₄	硫酸钠
NH ₃ ^{aq}	氨水
NMP	1-甲基-2-吡咯烷酮
NMR	核磁共振
PdCl ₂ (dppf)	[1,1'-联(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钯(II)
Pd(PPh ₃) ₄	四(三苯基膦)钯(0)
Pd(PhCN) ₂ Cl ₂	二(苄腈)氯化钯(II)
Ph	苯基
R _f	比移值(TLC)
RT	室温
TBTU	O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓四氟硼酸盐
TFA	CF ₃ COOH (三氟乙酸)
THF	四氢呋喃
TLC	薄层色谱
T _R	保留时间
wt.	S 重量

微波装置: Emrys 优化器(Biotage)

反应方案实施例



实施例 1: 1-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-3-{6-[4-(2-吗啉-4-基-乙氧基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-脲

将光气（在甲苯中 20%，0.8mL，1.58mmol，2.4 当量）在氩气中加入 2,6-二氯-3,5-二甲氧基苯胺(175mg, 0.79mmol, 1.2 当量)在二噁烷(2.5mL)的溶液中。将该混合物加热至回流，搅拌 1 小时，冷却至室温，并在真空下浓缩。在 75°C 下在氩气中将所得异氰酸盐加入 N-[4-(2-吗啉-4-基-乙氧基)-苯基]-嘧啶-4,6-二胺(208.5mg, 0.66mmol)在 NMP(2mL)的溶液。该反应混合物在 75°C 搅拌 2 小时，冷却至室温，并随后将其用 DCM 和饱和 NaHCO₃ 水溶液稀释。分离水层并用 DCM 萃取。有机相用盐水洗涤，干燥(Na₂SO₄)，过滤并浓缩。粗产物经硅胶柱色谱(DCM/MeOH + 1 % NH₃^{aq}, 96: 4)纯化，随后将所得材料在 MeOH 中研磨，提供为白色固体的标题化合物: ESI-MS: 562.9 / 564.9 [MH]⁺; t_R = 2.99 分钟(纯度: 100%, 系统 1); TLC: R_f = 0.36(DCM/MeOH + 1 % NH₃^{aq}, 93: 7)。

步骤 1.1: N-[4-(2-吗啉-4-基-乙氧基)-苯基]-嘧啶-4,6-二胺

将 6-氯-嘧啶-4-基胺(194mg, 1.5mmol, 1.3 当量)、4-(2-吗啉-4-基-乙氧基)-苯基胺(256mg, 1.15mmol)在 H₂O(1mL)和冰醋酸(5mL)的混合物在 100℃下搅拌 16 小时。蒸干溶剂后, 将残余物溶于 DCM 中并用饱和 NaHCO₃ 水溶液稀释。分离水层并用 DCM 萃取。有机相用盐水洗涤, 干燥 (Na₂SO₄), 过滤并浓缩。残余物用 EtOAc 研磨以提供为灰色固体的标题化合物: ESI-MS: 316.2 [MH]⁺; t_R = 1.00 分钟(纯度: 95%, 系统 1); TLC: R_f = 0.22(DCM/MeOH + 1 % NH₃^{aq}, 93: 7)。

步骤 1.2: 4-(2-吗啉-4-基-乙氧基)-苯基胺

在氩气中将 4-(2-氯-乙基)-吗啉盐酸化物(4.2g, 22mmol, 1.2 当量)一次加入 4-氨基苯酚(2g, 18.3mmol)和氢氧化钠细粉(1.87g, 45.8mmol, 2.5 当量)在 DMF(32mL)的混合物中。在室温下搅拌该反应混合物 23.5 小时。过滤所得黑色混悬液。滤液用 DCM(200mL)稀释并用盐水(2 x 60mL)洗涤。干燥有机相 (硫酸钠), 过滤并浓缩。残余物经硅胶柱色谱(DCM/EtOH, 95: 5 → 7: 3)纯化以提供为黄褐色固体的标题化合物: API-MS: 223.2 [MH]⁺; TLC: R_f = 0.31(DCM/EtOH, 9: 1)。

步骤 1.3: 2,6-二氯-3,5-二甲氧基苯胺

向 N-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-乙酰胺(34.5g, 264mmol)在乙醇(1.3 L)的溶液中加入 2M 的 KOH(0.72 L)。然后, 将该反应混合物加热至回流, 在回流下搅拌 44 小时, 然后冷却至室温。将所得混悬液冷却至 0℃搅拌 1 小时并过滤。残余物用一小部分冷 EtOH/ H₂O(1: 1)洗涤, 并用冷 H₂O 洗涤直至中和, 干燥以提供为白色固体的标题化合物: ESI-MS: 222.0 / 224.0 [MH]⁺, TLC: R_f = 0.52(己烷/EtOAc, 1: 1)。

步骤 1.4: N-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-乙酰胺

在氩气中将磺酰氯(26.9mL, 325mmol, 1.93 当量)加入(在 7 分钟内)冷却的(0℃) *N*-(3,5-二甲氧基苯基)-乙酰胺(32.9g, 169mmol)在CH₃CN(500mL)的混悬液中。将所得黄色混合物搅拌 30 分钟并通过逐滴加入饱和碳酸氢钠水溶液(250mL)来淬灭反应。经真空过滤收集所得沉淀, 用 H₂O(300mL)洗涤并干燥以提供 20g 所需产物(第 1 批)。用饱和 NaHCO₃ 水溶液(300mL)稀释并用 EtOAc(2 x 300mL)萃取。用 H₂O 和盐水洗涤有机相, 干燥(Na₂SO₄), 过滤并浓缩。残余物经硅胶粗色谱(EtOAc/己烷, 1: 1 → 2: 1)纯化以提供 8.8g 产物(第 2 批)。将第 1 和 2 批合并并在己烷中搅拌。通过过滤收集固体, 用己烷洗涤并干燥以提供为白色固体的标题化合物。ESI-MS: 264.0 / 266.0 [MH]⁺, TLC: R_f = 0.15(己烷/EtOAc, 1: 1)。

步骤 1.5: *N*-(3,5-二甲氧基-苯基)-乙酰胺

将乙酸酐(13mL, 137mmol, 1.05 当量)加入(在 15 分钟内)3,5-二甲氧基苯胺(20g, 131mmol)在甲苯(110mL)的混悬液中, 保持内部温度在 35-45℃ 范围内。将该反应混合物在室温下搅拌 20 小时。用己烷(55mL)稀释所得粘稠、灰色混悬液并过滤。将过滤器中的残余物用甲苯/己烷(2: 1, 70mL)和己烷洗涤, 干燥以提供为白色固体的标题化合物。API-ES-MS: 196.1 [MH]⁺, t_R = 3.03 分钟(纯度: 100%, 系统 1)。

实施例 2: 3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-甲基-1-{6-[3-(4-甲基-哌嗪-1-基甲基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-脲

在氩气中将光气(在甲苯中 20%, 1mL, 2.0mmol, 2.4 当量)加入 2,6-二氯-3,5-二甲氧基苯胺(221mg, 1.0mmol, 1.2 当量)在二噁烷(2.5mL)的溶液中。将该混合物加热至回流, 搅拌 1 小时, 冷却至室温, 并在真空中浓缩。在回流下在氩气中, 将所得异氰酸盐加入 *N*-甲基-*N'*-[3-(4-甲基-哌嗪-1-基甲基)-苯基]-嘧啶-4,6-二胺(步骤 2.1)(259mg, 0.83mmol)在甲苯(5mL)的溶液中。将该反应混合物在回流下搅拌 3 小时, 冷却至室温, 并用 DCM 和饱和 NaHCO₃ 水溶液稀释。分离水层并用 DCM 萃取。有机相用盐水洗

涂,干燥(Na_2SO_4),过滤并浓缩。粗产物经硅胶柱色谱(DCM/MeOH + 1 % NH_3^{aq} , 95: 5)纯化以提供为黄色固体的标题化合物: ESI-MS: 560.0 / 562.0 $[\text{MH}]^+$; t_{R} = 3.26 分钟(纯度: 99%, 系统 1); TLC: R_{f} = 0.37(DCM/MeOH + 1 % NH_3^{aq} , 9: 1)。

步骤 2.1: N-甲基-N'-[3-(4-甲基-哌嗪-1-基甲基)-苯基]-嘧啶-4,6-二胺

将(6-氯-嘧啶-4-基)-甲基-胺(385mg, 2.68mmol, 1.1 当量)、3-(4-甲基-哌嗪-1-基甲基)-苯基胺(500mg, 2.44mmol)和 4N 的 HCl 在二噁烷(7mL)中的混合物在封闭的试管中加热至 150°C 历经 17.5 小时。去除溶剂并将残余物用 DCM 和饱和 NaHCO_3 水溶液稀释。分离水层并用 DCM 和 DCM/MeOH(95: 5)萃取。有机相用盐水洗涤,干燥(Na_2SO_4),过滤并浓缩。残余物经硅胶 MPLC(DCM/MeOH + 1 % NH_3^{aq} , 95: 5)纯化以提供为棕色固体的标题化合物: ESI-MS: 313.2 $[\text{MH}]^+$; t_{R} = 1.00 分钟(纯度: 100%, 系统 1); TLC: R_{f} = 0.05(DCM/MeOH + 1 % NH_3^{aq} , 9: 1)。

步骤 2.2: 3-(4-甲基-哌嗪-1-基甲基)-苯基胺

在氢气中将 1-甲基-4-(3-硝基-苄基)-哌嗪(6.9g, 29.14mmol)和拉尼镍(2g)在 MeOH(150mL)的混悬液在室温下搅拌 5 小时。反应混合物经硅藻土垫过滤并浓缩以提供为黄色固体的标题化合物: ESI-MS: 206.1 $[\text{MH}]^+$ 。

步骤 2.3: 1-甲基-4-(3-硝基-苄基)-哌嗪

将 3-硝基苄基氯化物(5g, 29.14mmol)、N-甲基哌嗪(3.9mL, 34.97mmol, 1.2 当量)、碳酸钾(8g, 58.28, 2 当量)和丙酮(100mL)的混合物在回流下搅拌 15 小时。反应混合物冷却至室温,过滤并浓缩。残余物经硅胶 MPLC(DCM/MeOH + 1 % NH_3^{aq} , 95: 5)纯化以提供为棕色油的标题化合物: ESI-MS: 236.0 $[\text{MH}]^+$; t_{R} = 1.40 分钟(纯度: 100%, 系统 1); TLC: R_{f} = 0.31(DCM/MeOH + 1 % NH_3^{aq} , 9: 1)。

实施例 3: 3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[3-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲

标题化合物以类似于实施例 2 所述的方法来制备: ESI-MS: 559.9 / 561.9 $[MH]^+$; t_R = 3.75 分钟(纯度: 100%, 系统 1); TLC: R_f = 0.37(DCM/MeOH + 1 % NH_3^{aq} , 92: 8)。

步骤 3.1: N-[3-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基]-N'-甲基-嘧啶-4,6-二胺

标题化合物以类似于步骤 2.1 所述的方法来制备: ESI-MS: 313.2 $[MH]^+$; t_R = 1.20 分钟(纯度: 100%, 系统 1); TLC: R_f = 0.10(DCM/MeOH + 1 % NH_3^{aq} , 9: 1)。

步骤 3.2: 3-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基胺

标题化合物以类似于步骤 2.2 所述的方法来制备: API-MS: 206.2 $[MH]^+$; TLC: R_f = 0.31(DCM/EtOH, 9: 1)。

步骤 3.3: 1-乙基-4-(3-硝基-苯基)-哌嗪

将 1-氟-3-硝基苯(3.2mL, 29.7mmol)和 N-乙基-哌嗪(7.6mL, 59.4mmol, 2 当量) 的混合物加热至回流并搅拌 117 小时。将该反应混合物冷却至室温并用 H_2O (40mL) 和 DCM/MeOH(9: 1, 80mL) 稀释。分离水层并用 DCM/MeOH(9: 1) 萃取。有机相用盐水洗涤, 干燥 (Na_2SO_4), 过滤并浓缩。粗产物经硅胶柱色谱(DCM/MeOH, 1: 0 $\rightarrow$ 95: 5) 纯化以提供为棕色油的标题化合物: ESI-MS: 236.0 $[MH]^+$; t_R = 2.49 分钟(纯度: 99%, 系统 1); TLC: R_f = 0.26(DCM/MeOH, 95: 5)。

实施例 4: 3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-甲基-1-{6-[4-(2-吗啉-4-基-乙氧基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-脲

标题化合物以类似于实施例 1 所述的方法来制备: ESI-MS: 577.0 / 579.0 $[MH]^+$; t_R = 3.53 分钟(纯度: 95%, 系统 1); TLC: R_f =

0.40(DCM/MeOH + 1 % NH₃^{aq}, 93: 7)。

步骤 4.1: N-甲基-N'-[4-(2-吗啉-4-基-乙氧基)-苯基]-嘧啶-4,6-二胺

标题化合物以类似于步骤 1.1 所述的方法来制备: ESI-MS: 330.2 [MH]⁺; t_R = 1.10 分钟(纯度: 100%, 系统 1); TLC: R_f = 0.16(DCM/MeOH + 1 % NH₃^{aq}, 93: 7)。

实施例 5: 1-[6-(4-苄氧基-苯基氨基)-嘧啶-4-基]-3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-甲基-脲

标题化合物以类似于实施例 2 所述的方法来制备: ESI-MS: 553.9 / 555.9 [MH]⁺; t_R = 5.16 分钟(纯度: 100%, 系统 1)。

步骤 5.1: N-(4-苄氧基-苯基)-N'-甲基-嘧啶-4,6-二胺

标题化合物以类似于步骤 1.1 所述的方法来制备: ESI-MS: 307.2 [MH]⁺; t_R = 3.72 分钟(纯度: 100%, 系统 1)。

实施例 6: 3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-[6-(4-羟基-苯基氨基)-嘧啶-4-基]-1-甲基-脲

在氢气中将 1-[6-(4-苄氧基-苯基氨基)-嘧啶-4-基]-3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-甲基-脲(实施例 5)(67mg, 0.121mmol)、钯碳(20mg)和 MeOH(3.5mL)的混悬液在室温下搅拌 3 小时。将反应混合物经硅藻土垫过滤并浓缩。残余物经硅胶柱色谱纯化以提供为棕色固体的标题化合物: ESI-MS: 464.2 / 466.2 [MH]⁺; t_R = 3.91 分钟(纯度: 100%, 系统 1)。

实施例 7: 1-(2-氯-3,5-二甲氧基-6-甲基-苯基)-3-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-脲

标题化合物以类似于实施例 2 所述的方法来制备: ESI-MS: 526.1 / 528.1 [MH]⁺; t_R = 3.12 分钟(纯度: 100%, 系统 1); TLC: R_f =

0.13(DCM/MeOH + 1 % NH₃^{aq}, 93: 7)。

步骤 7.1: N-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基]-嘧啶-4,6-二胺

标题化合物以类似于步骤 1.1 所述的方法来制备: ESI-MS: 299.1 [MH]⁺; t_R = 1.00 分钟(纯度: >95%, 系统 1)。

步骤 7.2: 4-(4-乙基哌嗪-1-基)-苯胺

在氢气中将 1-乙基-4-(4-硝基-苯基)-哌嗪(6.2g, 26.35mmol)和拉尼镍(2g)在 MeOH(120mL)的混悬液在室温下搅拌 7 小时。将反应混合物经硅藻土垫过滤并浓缩以提供为紫色固体的标题化合物: ESI-MS: 206.1 [MH]⁺; TLC: R_f = 0.15(DCM/MeOH + 1 % NH₃^{aq}, 9: 1)。

步骤 7.3: 1-乙基-4-(4-硝基-苯基)-哌嗪

将 1-溴-4-硝基苯(6g, 29.7mmol)和 1-乙基哌嗪(7.6mL, 59.4mmol, 2 当量)的混合物加热至 80°C 历经 15 小时。冷却至室温后, 将该反应混合物用水和 DCM/MeOH, 9: 1 稀释。分离水层并用 DCM/MeOH, 9: 1 萃取。有机相用盐水洗涤, 干燥(硫酸钠), 过滤并浓缩。残余物经硅胶柱色谱(DCM/MeOH + 1 % NH₃^{aq}, 9: 1)纯化以提供为黄色固体的标题化合物: ESI-MS: 236.0 [MH]⁺; t_R = 2.35 分钟(纯度: 100%, 系统 1); TLC: R_f = 0.50(DCM/MeOH + 1 % NH₃^{aq}, 9: 1)。

步骤 7.4: 2-氯-3,5-二甲氧基-6-甲基-苯基-胺

在氢气中将 HCl(91mL, 360mmol, 8 当量, 4N 在二噁烷中)逐滴加入冷却的(10°C)(2-氯-3,5-二甲氧基-6-甲基-苯基)-氨基甲酸叔丁基酯(13.8g, 45.7mmol)在二噁烷(150mL)的溶液中。将该反应混合物温至室温, 搅拌 24 小时并浓缩。残余物用 EtOAc 稀释, 用饱和 NaHCO₃ 水溶液和盐水洗涤, 干燥(Na₂SO₄), 过滤并浓缩。残余物经从 DCM/己烷中结晶纯化以提供标题化合物。ESI-MS: 202.0 [MH]⁺, TLC: R_f = 0.37(DCM)。

步骤 7.5: (2-氯-3,5-二甲氧基-6-甲基-苯基)-氨基甲酸叔丁基酯

在氩气中将磺酰基氯化物(6.7mL, 79.8mmol, 1.05 当量)在DCM(140mL)的溶液逐滴(75 分钟)加入冷却的(-15℃)(3,5-二甲氧基-2-甲基-苯基)-氨基甲酸叔丁基酯(20.4g, 76.3mmol)在 THF(330mL)的溶液中。反应混合物在-15℃搅拌 3 小时并随后倒在冰/H₂O(400mL)、饱和 NaHCO₃水溶液(400mL)和 EtOAc(400mL)的混合物上。分离各层并用 EtOAc(2 x 200mL)萃取水相。用 H₂O(3 x 200mL)和盐水(200mL)洗涤合并的有机相,干燥(Na₂SO₄),过滤并浓缩。残余物在乙醚中研磨并随后经硅胶柱色谱(己烷/丙酮, 95: 5)纯化以提供标题化合物。ESI-MS: 302.2 [MH]⁺, TLC: R_f = 0.13(己烷/丙酮, 9: 1)。

步骤 7.6: (3,5-二甲氧基-2-甲基-苯基)-氨基甲酸叔丁基酯

在氩气中将叔丁基锂(200mL, 340mmol, 2.4 当量, 在戊烷中 1.7M)溶液逐滴加入冷却的(-65℃)(3,5-二甲氧基-苯基)-氨基甲酸叔丁基酯(36.1g, 142mmol)在 THF(250mL)的溶液中。在-65℃下搅拌该混合物 15 分钟并随后温至-25℃。随后加入碘甲烷(10.7mL, 171mmol, 1.2 当量)在 THF(140mL)的溶液。将反应混合物在-25℃搅拌 1 小时后倒在冰/H₂O(300mL)和 EtOAc(300mL)的混合物上。分离各层并用 EtOAc(2 x 150mL)萃取水相。用 H₂O(3 x 150mL)和盐水(200mL)洗涤合并的有机相,干燥(Na₂SO₄),过滤并浓缩。残余物经硅胶柱色谱(己烷/丙酮, 95: 5 → 9: 1 → 4: 1)纯化以提供标题化合物。ESI-MS: 268.1 [MH]⁺, TLC: R_f = 0.25(己烷/丙酮, 9: 1)。

步骤 7.7: (3,5-二甲氧基-苯基)-氨基甲酸叔丁基酯

在氩气中将二叔丁基二碳酸酯(145g, 651mmol, 1.3 当量)在 THF(200mL)的溶液在室温下逐滴加入 3,5-二甲氧基苯胺(78.2g, 500mmol)在 THF(1.5L)的溶液。加热该反应混合物至回流历经 4.5 小时(加热时观察

到大量的气体放出), 冷却至室温并浓缩。用 EtOAc(800mL)和 H₂O(800mL) 稀释残余物。分离各层并用 EtOAc(2 x 200mL)萃取水相。用 0.1N 的 HCl(200mL)、H₂O 和盐水洗涤合并的有机相, 干燥(Na₂SO₄), 过滤并浓缩。残余物经 DCM/己烷结晶以提供标题化合物。ESI-MS: 252.1 [M-H]⁻, TLC: R_f = 0.34(己烷/EtOAc, 3: 1)。

实施例 8: 3-(2-氯-3,5-二甲氧基-6-甲基-苯基)-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲

标题化合物以类似于实施例 1 所述的方法来制备: ESI-MS: 540.1 / 542.1 [MH]⁺; t_R = 3.56 分钟(纯度: 100%, 系统 1); TLC: R_f = 0.13(DCM/MeOH + 1 % NH₃^{aq}, 93: 7)。

实施例 9: 3-(2-氯-3,5-二甲氧基-6-甲基-苯基)-1-{6-[4-(2-二甲基氨基-乙氧基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲

标题化合物以类似于实施例 1 所述的方法来制备: ESI-MS: 515.2 / 517.2 [MH]⁺; t_R = 3.47 分钟(纯度: >95%, 系统 1)。

步骤 9.1: N-[4-(2-二甲基氨基-乙氧基)-苯基]-N'-甲基-嘧啶-4,6-二胺

标题化合物以类似于步骤 1.1 所述的方法来制备: ESI-MS: 288.2 [MH]⁺; t_R = 0.95 分钟(纯度: 95%, 系统 1)。

步骤 9.2: 4-(2-二甲基氨基-乙氧基)-苯基胺

标题化合物以类似于步骤 1.2 所述的方法来制备: ESI-MS: 181.2 [MH]⁺; TLC: R_f = 0.18(DCM/MeOH, 7: 3)。

实施例 10: 3-(2-氯-3,5-二甲氧基-6-甲基-苯基)-1-甲基-(6-{4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-乙氧基]-苯基氨基}-嘧啶-4-基)-脲

标题化合物以类似于实施例 2 所述的方法来制备: ESI-MS: 570.0

[MH]⁺; t_R = 3.20 分钟(纯度: 90%, 系统 1), TLC: R_f = 0.13(DCM/MeOH + 1 % NH₃^{aq}, 93: 7)。

步骤 10.1: N-甲基-N'-{4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-乙氧基]-苯基}-嘧啶-4,6-二胺

标题化合物以类似于步骤 1.1 所述的方法来制备: ESI-MS: 343.2 [MH]⁺; t_R = 1.00 分钟(纯度: 95%, 系统 1), TLC: R_f = 0.23(DCM/MeOH + 1 % NH₃^{aq}, 9: 1)。

实施例 11: 3-(2-氯-6-碘-3,5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲

标题化合物以类似于实施例 1 所述的方法来制备: ESI-MS: 651.8 / 653.7 [MH]⁺; t_R = 3.20 分钟(纯度: 95%, 系统 1), TLC: R_f = 0.18(DCM/MeOH + 1 % NH₃^{aq}, 93: 7)。

步骤 11.1 N-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基]-N'-甲基-嘧啶-4,6-二胺

标题化合物以类似于步骤 1.1 所述的方法来制备: ESI-MS: 313.2 [MH]⁺; t_R = 1.10 分钟(系统 1); TLC: R_f = 0.21(DCM/MeOH, 93: 7)。

步骤 11.2: 2-氯-6-碘-3,5-二甲氧基-苯基-胺

在氩气中将 HCl(6.46mL, 26mmol, 9.1 当量, 在二噁烷中 4N)加入冷却的(10°C)(2-氯-3,5-二甲氧基-6-甲基-苯基)-氨基甲酸叔丁基酯(1.28g, 2.85mmol, 92% 纯度)在二噁烷(10mL)的溶液中。将该反应混合物温至室温并随后搅拌 1.5 小时。用 EtOAc 和冰/水稀释该残余物, 并通过加入饱和 NaHCO₃ 水溶液将其调至碱性。分离各层。水层用 EtOAc 萃取。有机相用盐水洗涤, 干燥 (Na₂SO₄), 过滤并浓缩。残余物经硅胶柱色谱 (DCM) 纯化以提供标题化合物。API-ES-MS: 314.0 [MH]⁺, TLC: R_f = 0.53(DCM)。

步骤 11.3: (2-氯-6-碘-3,5-二甲氧基-苯基)-氨基甲酸叔丁基酯

在氩气中将磺酰基氯化物(0.92mL, 11.0mmol, 1.16 当量)在 DCM(20mL)的溶液逐滴(30 分钟)加入冷却的(-15℃)(2-碘-3,5-二甲氧基-苯基)-氨基甲酸叔丁基酯(3.6g, 9.49mmol)在 THF(48mL)的溶液中。在-15℃搅拌该反应混合物 1 小时并随后将其倒在冰/H₂O(100mL)、饱和 NaHCO₃ 水溶液(80mL)和 EtOAc(100mL)的混合物上。分离各层并用 EtOAc(2 x 100mL)萃取水相。用 H₂O(3 x 60mL)和盐水(60mL)洗涤合并的有机相, 干燥(Na₂SO₄), 过滤并浓缩。残余物经硅胶柱色谱 (DCM)纯化后经 DCM/己烷结晶以提供标题化合物。ESI-MS: 411.9, 413.9 [M-H]⁻, TLC: R_f = 0.18(DCM/己烷, 7: 3)。

步骤 11.4: (2-碘-3,5-二甲氧基-苯基)-氨基甲酸叔丁基酯

在氩气中将叔丁基锂(14.1mL, 24mmol, 2.4 当量, 在戊烷中 1.7M)溶液逐滴(15 分钟)加入冷却的(-65℃)(3,5-二甲氧基-苯基)-氨基甲酸叔丁基酯(2.53g, 10mmol)在 THF(18mL)的溶液中。在-65℃下搅拌该混合物 15 分钟后将其升温至-25℃。将过量的三氟碘甲烷通入该黄色反应混合物。将所得黑色混合物倒在冰/H₂O(60mL)和 EtOAc(60mL)的混合物上。分离各层并用 EtOAc(2 x 30mL)萃取水相。用 H₂O(3 x 40mL)和盐水(60mL)洗涤合并的有机相, 干燥(Na₂SO₄), 过滤并浓缩。残余物经硅胶柱色谱(DCM/己烷, 2: 1)纯化以提供标题化合物。ESI-MS: 380.1 [MH]⁺, TLC: R_f = 0.27(DCM/己烷, 2: 1)。

步骤 11.5: (3,5-二甲氧基-苯基)-氨基甲酸叔丁基酯

将二叔丁基二碳酸酯(69.5g, 312mmol, 1.3 当量)在 THF(100mL)的溶液加入 3,5-二甲氧基苯胺(37.5g, 240mmol)在 THF(600mL)的溶液中。加热该反应混合物至回流历经 3 小时, 将其冷却至室温, 搅拌过夜并浓缩。将残余物在 EtOAc(500mL)和 H₂O(500mL)之间分配。分离各层并用

EtOAc(2 x 100mL)萃取水相。用 0.1N HCl(2 x 100mL)、H₂O 和盐水洗涤合并的有机相,干燥(Na₂SO₄),过滤并浓缩。残余物用己烷研磨纯化以提供标题化合物。ESI-MS: 254.1 [MH]⁺, TLC: R_f = 0.42(己烷/EtOAc, 3: 1)。

实施例 12: 3-(2-氯-3,5-二甲氧基-6-甲基-苯基)-1-{6-[4-(4-异丙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲

标题化合物以类似于实施例 1 所述的方法来制备: ESI-MS: 554.0 / 555.0 [MH]⁺; t_R = 3.49 分钟(纯度: >95%, 系统 1), TLC: R_f = 0.13(DCM/MeOH + 1 % NH₃^{aq}, 93: 7)。

步骤 12.1: N-[4-(4-异丙基-哌嗪-1-基)-苯基]-N'-甲基-嘧啶-4,6-二胺

标题化合物以类似于步骤 1.1 所述的方法来制备: ESI-MS: 288.2 [MH]⁺; t_R = 0.95 分钟(纯度: 95%, 系统 1)。

步骤 12.2: 4-(4-异丙基哌嗪-1-基)-苯胺

在氢气中将 1-异丙基-4-(4-硝基-苯基)-哌嗪(5.18g, 20.80mmol)和 5% 钯碳(0.5 g)在 MeOH(100mL)的混悬液在室温下搅拌 2.7 小时。将反应混合物经硅藻土垫过滤并浓缩以提供为紫色固体的标题化合物: ESI-MS: 220.1 [MH]⁺; t_R = 0.95 分钟(系统 1)。

步骤 12.3: 1-异丙基-4-(4-硝基-苯基)-哌嗪

将 1-溴-4-硝基苯(6g, 29.7mmol)和 1-乙基哌嗪(7.6mL, 59.4mmol, 2 当量)的混合物加热至 80°C 历经 15 小时。冷却至室温后,浓缩该反应混合物。残余物经硅胶柱色谱 (DCM/MeOH, 95: 5)纯化以提供为黄色固体的标题化合物: ESI-MS: 250.1 [MH]⁺; t_R = 2.57 分钟(纯度: 100%, 系统 1); TLC: R_f = 0.16(DCM/MeOH, 95: 5)。

实施例 13: 1-{6-[4-(4-苄基-哌嗪-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-甲基-脲

标题化合物以类似于实施例 2 所述的方法来制备: ESI-MS: 621.9 / 623.9 [MH]⁺; t_R = 4.04 分钟(纯度: 100%, 系统 1)。

步骤 13.1: N-[4-(4-苄基-哌嗪-1-基)-苯基]-N'-甲基-嘧啶-4,6-二胺

标题化合物以类似于步骤 1.1 所述的方法来制备: ESI-MS: 375.1 [MH]⁺; t_R = 2.36 分钟(纯度: 95%, 系统 1)。

步骤 13.2: 4-(4-苄基-哌嗪-1-基)-苯基胺

将铁粉(5.4g, 97mmol, 4 当量)分成几部分加入 80℃的 1-苄基-4-(4-硝基-苯基)-哌嗪(7.2g, 24.2mmol)、EtOH(150mL)、H₂O(40mL)和 AcOH(20mL)的混合物中。将该反应混合物在 80℃下搅拌 1.75 小时, 冷却至室温并浓缩。用 EtOAc 和饱和 Na₂CO₃ 水溶液稀释该残余物。分离各层并用 EtOAc 萃取水相。用盐水洗涤合并的有机相, 干燥(Na₂SO₄), 过滤并浓缩以提供标题化合物: ES-MS: 268.3 [MH]⁺; 在 t_R = 1.30 分钟时单峰(系统 1)。

步骤 13.3: 1-苄基-4-(4-硝基-苯基)-哌嗪

将 1-溴-4-硝基苯(5g, 24.8mmol)和 1-苄基哌嗪(8.6mL, 49.5mmol, 2 当量)的混合物加热至 80℃历经 17 小时。将该反应混合物冷却至室温, 并用 DCM/H₂O 稀释。分离各层并用 DCM 萃取水相。用盐水洗涤合并的有机相, 干燥(Na₂SO₄), 过滤并浓缩。残余物经硅胶柱色谱(己烷/EtOAc, 1:1)纯化以提供为黄色固体的标题化合物: ESI-MS: 298.3 [MH]⁺; t_R = 3.25 分钟(纯度: 100%, 系统 1)。

实施例 14: 3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-甲基-1-[6-(4-哌嗪-1-基-苯基氨基)-嘧啶-4-基]-脲

在氢气中将 1-{6-[4-(4-苄基-哌嗪-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-3-(2,6-二

氯-3,5-二甲氧基-6-甲基-苯基)-1-甲基-脲(100mg, 0.161mmol)(实施例 13)、钯碳(30mg)、MeOH(6mL)和 HCl(37%, 16L)的混悬液在室温下搅拌 5 天。过滤并浓缩该反应混合物。残余物经硅胶柱色谱(DCM/2N NH₃ 在 MeOH 中, 95: 5)纯化以提供为白色固体的标题化合物: ESI-MS: 532.0 / 534.0 [MH]⁺; t_R = 3.39 分钟(纯度: 100%, 系统 1)。

实施例 15: 3-(2-氯-3,5-二甲氧基-6-甲基-苯基)-1-[6-(3-二甲基氨基甲基-苯基氨基)-嘧啶-4-基]-1-甲基-脲

标题化合物以类似于实施例 2 所述的方法来制备: ESI-MS: 485.0 / 487.0 [MH]⁺; t_R = 3.69 分钟(纯度: 100%, 系统 1)。

实施例 16: 3-(2-氯-3,5-二甲氧基-6-甲基-苯基)-1-{6-[3-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲

标题化合物以类似于实施例 2 所述的方法来制备: ESI-MS: 540.0 / 542.0 [MH]⁺; t_R = 3.74 分钟(纯度: 100%, 系统 1)。

实施例 17: 3-(2-氯-3,5-二甲氧基-6-甲基-苯基)-1-甲基-1-{6-[4-(2-吡咯烷-1-基-乙氧基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲

标题化合物以类似于实施例 2 所述的方法来制备: ESI-MS: 541.0 / 543.0 [MH]⁺; t_R = 3.66 分钟(纯度: 100%, 系统 1)。

步骤 17.1: N-甲基-N'-[4-(2-吡咯烷-1-基-乙氧基)-苯基]-嘧啶-4,6-二胺

标题化合物以类似于步骤 2.1 所述的方法来制备: ESI-MS: 314.1 [MH]⁺; t_R = 1.15 分钟(系统 1); TLC: R_f = 0.15(DCM/MeOH + 1 % NH₃^{aq}, 9: 1)。

步骤 17.2: 4-(2-吡咯烷-1-基-乙氧基)-苯基胺

标题化合物以类似于步骤 1.2 所述的方法来制备: ESI-MS: 207.1

[MH]⁺; TLC: $R_f = 0.22$ (DCM/MeOH, 1: 1)。

实施例 18: 3-(2-氯-3,5-二甲氧基-6-甲基-苯基)-1-甲基-1-{6-[3-氟-4-(2-吡咯烷-1-基-乙氧基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲

标题化合物以类似于实施例 2 所述的方法来制备: ESI-MS: 578.9 / 580.9 [MH]⁺; $t_R = 3.96$ 分钟(纯度: 100%, 系统 1); TLC: $R_f = 0.38$ (DCM/MeOH + 1 % NH₃^{aq}, 92: 8)。

步骤 18.1: N-[3-氟-4-(2-吡咯烷-1-基-乙氧基)-苯基]-N'-甲基-嘧啶-4,6-二胺

标题化合物以类似于步骤 1.1 所述的方法来制备: ESI-MS: 332.2 [MH]⁺; $t_R = 1.30$ 分钟(系统 1); TLC: $R_f = 0.37$ (DCM/MeOH + 1 % NH₃^{aq}, 99: 1)。

步骤 18.2: 3-氟-4-(2-吡咯烷-1-基-乙氧基)-苯基胺

在氢气中将 1-[2-(2-氟-4-硝基-苯氧基)-乙基]-吡咯烷(1.25g, 4.92mmol)和 10% 钯碳(0.2 g)在 EtOH(20mL)的混悬液在室温下搅拌 1 小时。将反应混合物经硅藻土垫过滤并浓缩以提供为棕色油的标题化合物: ESI-MS: 225.1 [MH]⁺; $t_R = 0.80$ 分钟(系统 1)。

步骤 18.3: 1-[2-(2-氟-4-硝基-苯氧基)-乙基]-吡咯烷

将 1-(2-氯-乙基)-吡咯烷盐酸化物(1.2g, 7.0mmol, 1.1 当量)加入 2-氟-4-硝基苯酚(1g, 6.4mmol)和碳酸铯(5.2g, 15.9mmol, 2.5 当量)在 DMF(20mL)的混悬液中。将所得混合物加热至 80℃并搅拌 18 小时。加入额外的 1-(2-氯-乙基)-吡咯烷盐酸化物(1g)并在 80℃下搅拌该混合物 3 小时。将反应混合物冷却至室温, 用 EtOAc 和 H₂O 稀释。分离各层并用 EtOAc 萃取水层。用 H₂O 洗涤有机相, 干燥(Na₂SO₄), 过滤并浓缩。残余物经硅胶柱色谱(DCM/MeOH + 1 % NH₃^{aq}, 95: 5)纯化以提供为黄色固体的标题化合物。

ESI-MS: 255.1 $[\text{MH}]^+$; t_{R} = 2.57 分钟(系统 1); TLC: R_{f} = 0.55(DCM/MeOH + 1 % NH_3^{aq} , 95: 5)。

实施例 19: 3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[4-(1-乙基-哌啶-4-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脒

标题化合物以类似于实施例 2 所述的方法来制备: ESI-MS: 558.9 / 560.9 $[\text{MH}]^+$; t_{R} = 3.85 分钟(纯度: 100%, 系统 1); TLC: R_{f} = 0.14(DCM/MeOH + 1 % NH_3^{aq} , 95: 5)。

步骤 19.1: N-[4-(1-乙基-哌啶-4-基)-苯基-N'-甲基-嘧啶-4,6-二胺

标题化合物以类似于步骤 1.1 所述的方法来制备: ESI-MS: 312.2 $[\text{MH}]^+$; t_{R} = 1.3 分钟(系统 1); TLC: R_{f} = 0.27(DCM/MeOH + 1 % NH_3^{aq} , 92: 8)。

步骤 19.2: 4-(1-乙基-哌啶-4-基)-苯基胺

在氢气中将 1-乙基-4-(4-硝基-苯基)-哌啶(0.8g, 4.92mmol)和 10% 钯碳(0.1 g)在 EtOH(10mL)中的混悬液在室温下搅拌 3 小时。将反应混合物经硅藻土垫过滤并浓缩。残余物经硅胶柱色谱(DCM/MeOH + 1 % NH_3^{aq} , 95: 5)纯化以提供标题化合物。ESI-MS: 205.1 $[\text{MH}]^+$; TLC: R_{f} = 0.29(DCM/MeOH + 1 % NH_3^{aq} , 95: 5)。

步骤 19.3: 1-乙基-4-(4-硝基-苯基)-哌啶

将三乙酰氧基硼氢化钠(3.1g, 14.6mmol, 3 当量)加入冷却的(5°C)4-(4-硝基-苯基)-哌啶(1g, 4.9mmol)和乙醛(0.82mL, 14.6mmol, 3 当量)在 DCM(20mL)的溶液中。将该反应混合物在 5°C 下搅拌 1 小时后用 DCM 和 NaHCO_3 饱和水溶液稀释。分离各层并用 DCM 萃取水层。有机相用盐水洗涤, 干燥(Na_2SO_4), 过滤并浓缩。残余物经硅胶柱色谱(DCM/MeOH + 1 % NH_3^{aq} , 98: 2)纯化以提供为黄色油的标题化合物。ESI-MS: 235.1

$[MH]^+$; t_R = 2.64 分钟(纯度: 85%, 系统 1); TLC: R_f = 0.14(DCM/MeOH + 1 % NH_3^{aq} , 98: 2)。

步骤 19.4: 4-(4-硝基-苯基)-哌啶

将浓 H_2SO_4 (2.65mL)在 $AcOH$ (40mL)的溶液和浓 HNO_3 (2.1mL)在 $AcOH$ (20mL)的溶液依此逐滴加入 4-苯基哌啶在 $AcOH$ (40mL)的溶液中, 保持温度低于 $20^\circ C$ 。然后, 加入浓 H_2SO_4 (40mL)(不进行冷却; 内部温度达到 $60^\circ C$)。将反应混合物冷却至室温, 将其倒在冰/水(100 g)上, 通过加入固体 $NaHCO_3$ (150 g)中和, 并用 DCM 萃取。有机相用盐水洗涤, 干燥 (Na_2SO_4), 过滤并浓缩。残余物在 Et_2O 中研磨纯化以提供为黄色固体的标题化合物。ESI-MS: 207.1 $[MH]^+$; t_R = 2.42 分钟(系统 1)。

实施例 20: 3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-乙基-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-脲

标题化合物以类似于实施例 2 所述的方法来制备: ESI-MS: 573.9 / 575.9 $[MH]^+$; t_R = 3.69 分钟(纯度: 100%, 系统 1)。

步骤 20.1: N-乙基-N'-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基]-嘧啶-4,6-二胺

标题化合物以类似于步骤 1.1 所述的方法来制备: ESI-MS: 327.2 $[MH]^+$; t_R = 1.5 分钟(系统 1)。

实施例 21: 3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[2-氯-4-(2-吡咯烷-1-基-乙氧基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲

标题化合物以类似于实施例 2 所述的方法来制备: ESI-MS: 578.9 / 580.9 $[MH]^+$; t_R = 3.79 分钟(纯度: 100%, 系统 1)。

步骤 21.1: N-[2-氯-4-(2-吡咯烷-1-基-乙氧基)-苯基]-N'-甲基-嘧啶-4,6-二胺

标题化合物以类似于步骤 2.1 所述的方法来制备: ESI-MS: 332.2 [MH]⁺.

步骤 21.2: 2-氟-4-(2-吡咯烷-1-基-乙氧基)-苯基胺

在氢气中将 1-[2-(3-氟-4-硝基-苯氧基)-乙基]-吡咯烷(1.96g, 7.7mmol) 和 10% 钯碳(0.2 g)在 MeOH(40mL)中的混悬液在室温下搅拌 0.5 小时。将反应混合物经硅藻土垫过滤并浓缩以提供标题化合物。ESI-MS: 225.1 [MH]⁺; t_R= 0.95 分钟(系统 1)。

步骤 21.3: 1-[2-(3-氟-4-硝基-苯氧基)-乙基]-吡咯烷

将 1-(2-氟-乙基)-吡咯烷盐酸化物(2.6g, 15.4mmol, 1.3 当量)加入 2-氟-4-硝基苯酚(1.84g, 11.7mmol)和碳酸铯(9.1g, 27.9mmol, 2.5 当量)在 DMF(40mL)的混合物中。将所得混合物加热至 80℃并搅拌 3 小时。将反应混合物冷却至室温后, 用 DCM 和 H₂O 稀释。分离各层并用 DCM 萃取水层。有机相用盐水洗涤, 干燥 (Na₂SO₄), 过滤并浓缩。残余物经硅胶柱色谱(DCM/MeOH + 1 % NH₃^{aq}, 97: 3)纯化以提供 1.96g 为暗黄的固体的标题化合物。ESI-MS: 255.1 [MH]⁺; t_R= 2.55 分钟(纯度: 93%, 系统 1); TLC: R_f= 0.40(DCM/MeOH + 1 % NH₃^{aq}, 93: 7)。

实施例 22: 3-(2,6-二氟-3,5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-2-甲氧基-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲

标题化合物以类似于实施例 2 所述的方法来制备: API-MS: 589.9 / 591.8 [MH]⁺; t_R= 3.59 分钟(系统 1); TLC: R_f= 0.13(DCM/MeOH + 0.5 % NH₃^{aq}, 95: 5)。

步骤 22.1: N-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-2-甲氧基-苯基]-N'-甲基-嘧啶-4,6-二胺

标题化合物以类似于步骤 1.1 所述的方法来制备: ESI-MS: 343.2

[MH]⁺; t_R = 1.30 分钟(系统 1)。

步骤 22.2: 4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-2-甲氧基-苯基胺

在氢气中将 1-乙基-4-(3-甲氧基-4-硝基-苯基)-哌嗪(4g, 15.1mmol)和拉尼镍(1 g)在 MeOH(80mL)中的混悬液在室温下搅拌 10.5 小时。将反应混合物经硅藻土垫过滤并浓缩以提供为棕色油的标题化合物: ESI-MS: 236.2 [MH]⁺; t_R = 0.95 分钟(系统 1)。

步骤 22.3: 1-乙基-4-(3-甲氧基-4-硝基-苯基)-哌嗪

标题化合物以类似于在步骤 248.3 中所述的方法来制备: ESI-MS: 266.1 [MH]⁺。

实施例 23: 3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲

标题化合物以类似于实施例 233 所述的方法来制备: API-MS: 587.8 / 589.8 [MH]⁺; t_R = 3.58 分钟(纯度: 94.8%, 系统 1); TLC: R_f = 0.47(DCM/2N NH₃ 在 MeOH 中, 9: 1)。

步骤 23.1: (4-乙基-哌嗪-1-基)-[4-(6-甲基氨基-嘧啶-4-基氨基)-苯基]-甲酮

在氢气中在室温下将丙基磷酸酐(50% in DMF, 2.72mL, 4.7mmol, 2 当量)加入 4-(6-甲基氨基-嘧啶-4-基氨基)-苯甲酸(0.570g, 2.33mmol)、N-乙基-哌嗪(0.33mL, 2.57mmol, 1.1 当量)、DMAP(7mg)和 Et₃N(3.3mL, 23.3mmol, 10 当量)在 DMF(25mL)的溶液中。将反应混合物在室温下搅拌 1 小时, 用 EtOAc 稀释并用 H₂O 洗涤。用 EtOAc 萃取水层。用盐水洗涤合并的有机相, 干燥(Na₂SO₄), 过滤并浓缩。残余物经硅胶柱色谱(DCM → DCM/2 N NH₃ 在 MeOH 中, 86: 14)纯化以提供为黄的泡沫的标题化合物: ES-MS: 341.2 [MH]⁺; t_R = 1.00 分钟(系统 1); R_f = 0.33(CH₂Cl₂/2 N NH₃ 在 MeOH

中, 9: 1)。

步骤 23.2: 4-(6-甲基氨基-嘧啶-4-基氨基)-苯甲酸

标题化合物以类似于步骤 2.1 所述的方法来制备: ESI-MS: 245.0 [MH]⁺; t_R = 1.58 分钟(系统 1)。

实施例 24: 3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-3-氟-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲

标题化合物以类似于实施例 2 所述的方法来制备: API-MS: 577.9 / 579.9 [MH]⁺; t_R = 3.87 分钟(纯度: 90%, 系统 1); TLC: R_f = 0.20(DCM/MeOH + 1 % NH₃^{aq}, 95: 5)。

步骤 24.1: N-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-3-氟-苯基]-N'-甲基-嘧啶-4,6-二胺

标题化合物以类似于步骤 2.1 所述的方法来制备, 但在微波装置中在 160°C 搅拌该反应混合物 15 分钟。粗产物经在 EtOAc 中研磨纯化以提供标题化合物: ESI-MS: 331.2 [MH]⁺。

步骤 24.2: 4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-3-氟-苯基胺

在氢气中将 1-乙基-4-(2-氟-4-硝基-苯基)-哌嗪(1.24g, 15.1mmol)和拉尼镍(13mg)在 MeOH(6mL)中的混悬液在室温下搅拌 17 小时。将反应混合物经硅藻土垫过滤并浓缩以提供为紫红色油的标题化合物: ESI-MS: 224.1 [MH]⁺; t_R = 0.90 分钟(系统 1)。

步骤 24.3: 1-乙基-4-(2-氟-4-硝基-苯基)-哌嗪

将 N-乙基哌嗪(0.96mL, 7.6mmol, 1.2 当量)加入 3,4-二氟硝基苯(0.7mL, 6.32mmol)和碳酸钾(1.74g, 12.6mmol, 2 当量)在 DMF(10mL)的混合物中。将该反应混合物在 90°C 搅拌 17 小时, 冷却至室温, 用 H₂O 稀释并用 DCM 萃取。有机相用盐水洗涤, 干燥 (Na₂SO₄), 过滤并浓缩。残余物经硅胶

柱色谱(DCM/MeOH + 1 % NH₃^{aq}, 97: 3)纯化以提供为黄色固体的标题化合物: ES-MS: 254.1 [MH]⁺; t_R = 2.65 分钟(系统 1); R_f = 0.30(DCM/MeOH + 1 % NH₃^{aq}, 93: 7)。

实施例 25: 3-(2,4-二氯-5-甲氧基-3-三氟甲基-苯基)-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲

在氮气中将光气(在甲苯中 20%, 0.54mL, 1.0mmol, 2.0 当量)加入 2,4-二氯-5-甲氧基-3-三氟甲基苯胺(156mg, 0.60mmol, 1.2 当量)在二噁烷(2mL)的溶液中。将该混合物加热至回流, 搅拌 75 分钟, 冷却至室温, 并在真空中浓缩。在氮气中将所得的固体 2,4-二氯-5-甲氧基-3-三氟甲基-苯基异氰酸酯分几部分加入沸腾的 N-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基]-N'-甲基-嘧啶-4,6-二胺(156mg, 0.50mmol; 制备方法参见步骤 25.5)在 6mL 甲苯的溶液中。将该反应混合物在 110°C 搅拌 3.3 小时, 冷却至室温, 并用 DCM 和饱和 NaHCO₃ 水溶液稀释。分离水层并用 DCM 萃取两次。有机相用盐水洗涤, 干燥 (Na₂SO₄), 过滤并浓缩。用两部分 MeOH 研磨所得固体以获得标题化合物: ESI-MS: 598/600 [MH]⁺; t_R = 5.1 分钟(纯度: 97%, 系统 1)。

步骤 25.1: 2,4-二氯-5-甲氧基-3-三氟甲基苯胺

将 2M 的 KOH 水(1.87mL)溶液加入 N-(2,4-二氯-5-甲氧基-3-三氟甲基-苯基)-乙酰胺(104mg, 0.344mmol)在 EtOH(3mL)的溶液中。在 80°C 搅拌 3.5 小时后冷却至室温, 蒸干溶剂并将残余物溶于 EtOAc 和饱和 NaHCO₃ 水溶液中。分离的水层用 EtOAc 萃取两次。有机相用盐水洗涤, 干燥 (Na₂SO₄), 过滤并浓缩, 以提供标题化合物: ESI-MS: 258/260 [M-H]⁻; t_R = 4.8 分钟(系统 1); TLC: R_f = 0.54(EtOAc)。

步骤 25.2: N-(2,4-二氯-5-甲氧基-3-三氟甲基-苯基)-乙酰胺

在氮气中将 N-(5-甲氧基-3-三氟甲基-苯基)-乙酰胺(233mg, 1.0mmol)溶液在冰浴中冷却(沉淀)。然后加入 1M 的 SO₂Cl₂ 在 DCM 中的溶液

1.93mL。2 小时后, 再加入 1.93mL 的 SO_2Cl_2 溶液并在 0°C 连续搅拌共 4 小时。用 DCM 和饱和 NaHCO_3 水溶液稀释该混悬液。用 DCM 萃取分离的无机相两次。用水和盐水洗涤有机相, 干燥(Na_2SO_4), 过滤并浓缩。柱色谱(己烷/EtOAc, 7: 3)以提供标题化合物: mp: $143-144^\circ\text{C}$; API-MS: 300 / 302 $[\text{M}-\text{H}]^-$; TLC: $R_f = 0.23$ (己烷/EtOAc, 1: 1); $^1\text{H-NMR}(\text{DMSO}-d_6)$ δ 2.13(s, H_3C), 3.88(s, H_3C), 7.84(s, H 苯基), 9.81(s, HN)。

步骤 25.3: N-(5-甲氧基-3-三氟甲基-苯基)-乙酰胺

在 $25-33^\circ\text{C}$ 的温度下将乙酸酐(1.22mL, 12.8mmol)历经 10 分钟加入 5-甲氧基-3-三氟甲基-苯胺(2.29g, 12.0mmol)在甲苯(10mL)的溶液中。在室温下 90 分钟后, 加入己烷(10mL)并将该混悬液搅拌 20 分钟。过滤, 用甲苯/己烷 2: 1 和己烷洗涤以提供标题化合物: mp: $123-124^\circ\text{C}$; API-MS: 234 $[\text{MH}]^+$; TLC: $R_f = 0.27$ (己烷/EtOAc, 1: 1)。

步骤 25.4: 5-甲氧基-3-三氟甲基-苯胺

在 Pd-C(0.62g, 10%)的存在下将 3-甲氧基-5-硝基三氟甲基苯(6.19g, 28mmol)在 MeOH(140mL)的溶液进行氢化, 经过滤除去催化剂并在真空下浓缩所得滤液以提供标题化合物: API-MS: 190 $[\text{M}-\text{H}]^-$; TLC: $R_f = 0.7$ (EtOAc)。

步骤 25.5: N-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基]-N'-甲基-嘧啶-4,6-二胺

将 4-(4-乙基哌嗪-1-基)-苯胺(1g, 4.88mmol) (类似于实施例 238 的方法制备, 步骤 238.1)、(6-氯-嘧啶-4-基)-甲基-胺(1.81g, 12.68mmol, 1.3 当量)和 4N 的 HCl 在二噁烷(15mL)的混合物在封闭的试管中加热至 150°C 历经 5 小时。浓缩该反应混合物, 用 DCM 和饱和碳酸氢钠水溶液稀释。分离水层并用 DCM 萃取。用盐水洗涤有机相, 干燥(硫酸钠), 过滤并浓缩。残余物经硅胶柱色谱 (DCM/MeOH, 93: 7)纯化后经在乙醚中研磨以提供为白色固体的标题化合物: ESI-MS: 313.2 $[\text{MH}]^+$; $t_R = 1.10$ 分钟(系统

1); TLC: $R_f = 0.21$ (DCM/MeOH, 93: 7)。

实施例 26: 3-(5-甲氧基-3-三氟甲基-苯基)-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲

在氮气中将光气(在甲苯中 20%, 1.62mL, 3.0mmol, 2.0 当量)加入 5-甲氧基-3-三氟甲基苯胺(344mg, 1.8mmol, 1.2 当量)在二噁烷(6mL)的溶液中。将该混合物加热至回流, 搅拌 80 分钟, 冷却至室温, 并在真空中浓缩。45 分钟内, 在氮气中将浓缩的所得油状 5-甲氧基-3-三氟甲基-苯基异氰酸酯在甲苯中的溶液分几部分加入沸腾的 N-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基]-N'-甲基-嘧啶-4,6-二胺(468mg, 1.50mmol; 步骤 242.1)在 18mL 甲苯的溶液中。将反应混合物在 110℃ 搅拌 4 小时, 冷却至室温, 并用 DCM 和饱和 NaHCO_3 水溶液稀释。分离水层并用 DCM 萃取两次。用盐水洗涤有机相, 干燥(Na_2SO_4), 过滤并浓缩。柱色谱(DCM/MeOH, 49: 1 $\rightarrow$ 24: 1)以提供标题化合物: API-MS: 530 / 532 $[\text{MH}]^+$; TLC: $R_f = 0.4$ (DCM/MeOH, 9: 1); $t_R = 4.3$ 分钟(纯度: 100 %, 系统 1)。

实施例 27: 3-(5-甲氧基-3-三氟甲基-苯基)-1-{6-[3-氯-4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲

历经 27 小时, 将 0.4mL 的 1M 的 SO_2Cl_2 在 DCM 的溶液分几部分重复加入冰冷却的 3-(5-甲氧基-3-三氟甲基-苯基)-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲(105mg, 0.20mmol)(实施例 26)在乙腈(6mL)的混悬液中。随后该反应经 HPLC 分析。用 DCM 和饱和 NaHCO_3 水溶液稀释反应混合物(仍包含原料)。分离水层并用 DCM 萃取两次。用盐水洗涤有机相, 干燥(Na_2SO_4), 过滤并浓缩。反相 MPLC($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN} + 0.1\%$ TFA), 用 NaHCO_3 中和包含产物的流份后, 部分浓缩并用 DCM 萃取以提供标题化合物: API-MS: 564 / 566 $[\text{MH}]^+$; TLC: $R_f = 0.28$ (DCM/MeOH + 1 % NH_3^{aq} , 95: 5); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 1.02 (t, H_3C), 2.37 (q, H_2C), 2.51(m, 4H), 2.92(m, 4H), 3.33(s, H_3C), 3.82(s, H_3C), 6.48(s, 1H), 6.90(s, 1H),

7.12(d, 1H), 7.43(m, 2H), 7.59(s, 1H), 7.82(s, 1H), 8.55(s, 1H), 9.66(s, HN), 12.33(s, HN)。

实施例 28: 1-{6-[2-氯-4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-甲基-脲

标题化合物以类似于实施例2所述的方法来制备(在回流下搅拌1小时20分钟): ESI-MS: 593.8 / 595.8 [MH]⁺; t_R = 3.80 分钟(纯度: 95%, 系统 1); TLC: R_f = 0.45(DCM/MeOH + 1 % NH₃^{aq}, 95: 5)。

步骤 28.1: N-[2-氯-4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基]-N'-甲基-嘧啶-4,6-二胺

标题化合物以类似于步骤 1.1 所述的方法来制备: ESI-MS: 347.1 / 349.1 [MH]⁺; TLC: R_f = 0.15(DCM/MeOH + 1 % NH₃^{aq}, 95: 5)。

步骤 28.2: 2-氯-4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基胺

在氢气中将 1-(3-氯-4-硝基-苯基)-4-乙基-哌嗪(1g, 3.7mmol)和拉尼镍(0.1 g)在 MeOH(20mL)中的混悬液在室温下搅拌 8 小时。将反应混合物经硅藻土垫过滤并浓缩。残余物经硅胶柱色谱(DCM/MeOH + 1 % NH₃^{aq}, 95: 5)纯化以提供为米色固体的标题化合物: ESI-MS: 240.1 / 242.1 [MH]⁺; t_R = 0.90 分钟(系统 1); TLC: R_f = 0.46(DCM/MeOH + 1 % NH₃^{aq}, 95: 5)。

步骤 28.3: 1-(3-氯-4-硝基-苯基)-4-乙基-哌嗪

将 N-乙基哌嗪(4.3mL, 34.3mmol, 1.2 当量)加入 2-氯-4-氟硝基苯(5g, 28.6mmol)和碳酸钾(7.9g, 57.1mmol, 2 当量)在 DMF(50mL)的混合物中。在 100℃下搅拌该反应混合物 6 小时,冷却至室温,用 H₂O 稀释并用 EtOAc 萃取。有机相用盐水洗涤,干燥 (Na₂SO₄), 过滤并浓缩。残余物经在乙醚中研磨纯化以提供 5.6g 为黄色固体的标题化合物: ES-MS: 270.0 [MH]⁺; t_R = 2.90 分钟(系统 1)。

实施例 29: 3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-2-氟-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲

标题化合物以类似于实施例 2 所述的方法来制备 (在回流下搅拌 1 小时, 并用 EtOAc 代替 DCM 萃取产物): ESI-MS: 577.9 / 579.9 [MH]⁺; t_R = 4.00 分钟(纯度: >95%, 系统 1); TLC: R_f = 0.35(DCM/MeOH + 1 % NH₃^{aq}, 97: 3)。

步骤 29.1: N-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-2-氟-苯基]-N'-甲基-嘧啶-4,6-二胺

标题化合物以类似于步骤 2.1 所述的方法来制备, 但在微波装置中在 160°C 搅拌该反应混合物 1 小时, 并用 EtOAc 代替 DCM 萃取产物。标题化合物: ESI-MS: 331.1 [MH]⁺; TLC: R_f = 0.10(DCM/MeOH + 1 % NH₃^{aq}, 95: 5)。

步骤 29.2: 4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-2-氟-苯基胺

在氢气下将 1-乙基-4-(3-氟-4-硝基-苯基)-哌嗪(7g, 27.7mmol)和 Pd(10%)碳(0.35 g)在 MeOH(140mL)中的混悬液在室温下搅拌 3 小时。将反应混合物经硅藻土垫过滤并浓缩。残余物经硅胶柱色谱(DCM/MeOH + 1 % NH₃^{aq}, 95: 5)纯化以提供为白色固体的标题化合物: ESI-MS: 224.1 [MH]⁺; TLC: R_f = 0.54(DCM/MeOH + 1 % NH₃^{aq}, 95: 5)。

步骤 29.3: 1-乙基-4-(3-氟-4-硝基-苯基)-哌嗪

将 N-乙基哌嗪(4.8mL, 37.7mmol, 1.2 当量)加入 2,4-二氟硝基苯(5g, 31.4mmol)和碳酸钾(8.7g, 62.9mmol, 2 当量)在 DMF(50mL)的混合物中。将反应混合物在 100°C 下搅拌 6 小时, 冷却至室温, 用 H₂O 稀释并用 EtOAc 萃取。有机相用盐水洗涤, 干燥 (Na₂SO₄), 过滤并浓缩。残余物经硅胶柱色谱(DCM/MeOH + 1 % NH₃^{aq}, 95: 5)纯化以提供为黄色油的标题化合物: ES-MS: 254.1 [MH]⁺; TLC: R_f = 0.67(DCM/MeOH + 1 % NH₃^{aq}, 95: 5)。

实施例 30: 3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[6-(4-异丙基-哌嗪-1-基)-吡啶-3-基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲

标题化合物以类似于实施例 1 所述的方法来制备(2 当量光气用于形成异氰酸酯, 在随后的步骤中在 70℃搅拌 16 小时, 并用 EtOAc 代替 DCM 萃取产物): ESI-MS: 574.8 / 576.8 $[MH]^+$; t_R = 3.32 分钟(系统 1); TLC: R_f = 0.10(DCM/MeOH/NH₃^{aq}, 94: 5: 1)。

步骤 30.1: N-[6-(4-异丙基-哌嗪-1-基)-吡啶-3-基]-N'-甲基-嘧啶-4,6-二胺

标题化合物以类似于步骤 1.1 所述的方法来制备。标题化合物: ESI-MS: 328.2 $[MH]^+$ 。

步骤 30.2: 6-(4-异丙基-哌嗪-1-基)-吡啶-3-基胺

将铁粉(1.4g, 25.3mmol, 4 当量)、1-异丙基-4-(5-硝基-吡啶-2-基)-哌嗪(1.58g, 6.32mmol)、EtOH(20mL)、H₂O(5mL)和 AcOH(2.5mL)的混合物在 90℃下搅拌 2 小时, 冷却至室温, 通过加入氨水调至碱性, 经硅藻土垫过滤并部分的浓缩除去 EtOH。残余物水溶液用氯化钠饱和并用 EtOAc 和 DCM 萃取。用盐水洗涤合并的有机相, 干燥(Na₂SO₄), 过滤并浓缩。残余物经硅胶柱色谱(DCM/MeOH/NH₃^{aq}, 91: 8: 1)纯化以提供为紫红色固体的标题化合物: ESI-MS: 221.1 $[MH]^+$; TLC: R_f = 0.20(DCM/MeOH/NH₃^{aq}, 91: 8: 1)。

步骤 30.3: 1-异丙基-4-(5-硝基-吡啶-2-基)-哌嗪(NVP-BKT293)

将 N-异丙基哌嗪(1.8mL, 12.7mmol, 2 当量)加入冷却的(5℃)2-氯-5-硝基吡啶(1g, 6.3mmol)在 DCM(5mL)的混合物中。将反应混合物温至室温, 搅拌 16 小时, 用 DCM/H₂O 稀释并用 DCM 萃取。用盐水洗涤有机相, 干燥(Na₂SO₄), 过滤并浓缩以提供为黄色固体的标题化合物: ES-MS: 251.2

$[\text{MH}]^+$; $t_{\text{R}} = 2.20$ 分钟(系统 1)。

实施例 31: 3-(2,6-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[6-(4-乙基-哌嗪-1-基)-吡啶-3-基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基-脲

标题化合物以类似于实施例 1 所述的方法来制备(2 当量光气用于形成异氰酸酯, 在随后的步骤中在回流下搅拌 4 小时, 并用 EtOAc 代替 DCM 萃取产物): ESI-MS: 560.8 / 562.8 $[\text{MH}]^+$; $t_{\text{R}} = 3.20$ 分钟(系统 1); TLC: $R_{\text{f}} = 0.35$ (DCM/MeOH/NH₃^{aq}, 94: 5: 1)。

步骤 31.1: N-[6-(4-乙基-哌嗪-1-基)-吡啶-3-基]-N'-甲基-嘧啶-4,6-二胺

标题化合物以类似于步骤 1.1 所述的方法来制备。标题化合物: ESI-MS: 314.2 $[\text{MH}]^+$; TLC: $R_{\text{f}} = 0.20$ (DCM/MeOH/NH₃^{aq}, 91: 8: 1)。

步骤 31.2: 6-(4-乙基-哌嗪-1-基)-吡啶-3-基胺

在氢气下将 1-乙基-4-(5-硝基-吡啶-2-基)-哌嗪(1.4 g)和拉尼镍(140mg)在 MeOH(30mL)的混悬液在室温下搅拌 10 小时。将反应混合物经硅藻土垫过滤并浓缩。残余物经硅胶柱色谱(DCM/MeOH/NH₃^{aq}, 94: 5: 1)纯化以提供为紫红色油的标题化合物: ESI-MS: 207.1 $[\text{MH}]^+$; TLC: $R_{\text{f}} = 0.26$ (DCM/MeOH/NH₃^{aq}, 94: 5: 1)。

步骤 31.3: 1-乙基-4-(5-硝基-吡啶-2-基)-哌嗪

标题化合物以类似于步骤 30.3 所述的方法来制备, 但使用 N-乙基哌嗪。标题化合物: ES-MS: 237.1 $[\text{MH}]^+$; TLC: $R_{\text{f}} = 0.25$ (DCM/MeOH/NH₃^{aq}, 96: 3: 1)。

实施例 32: 软胶囊

5000 个软胶囊, 各自包含作为活性成分的在之前实施例 1-29 中任何一个提到的任何一个式 IA 化合物 0.05g, 或者其按照下述内容来制备:

组成**活性成分** 250 g**Lauroglycol** 2 升

制备方法： 将粉化的活性成分悬浮在 Lauroglykol*(丙烯乙二醇月桂酸酯, Gattefossé S.A., Saint Priest, 法国)中并在湿润的粉碎机内研磨以生产大小约 1-3 μ m 的颗粒。然后用装胶囊机将每部分 0.419g 的混合物装入软胶囊中。

实施例 33: 包含式 IA 化合物的片剂

片剂包含作为活性成分的在之前实施例 1-29 中任何一个的任何一个式 IA 化合物 100mg, 其按照下述组成、下述标准方法来制备:

组成**活性成分** 100mg**结晶性乳糖** 240mg**Avicel** 80mg**PVPPXL** 20mg**Aerosil** 2mg**硬脂酸镁** 5mg

447mg

制备： 将活性成分与载体材料混合并通过压片机压制(Korsch EKO, 压模直径 10 mm)。

Avicel®是微晶纤维素(FMC,美国费城)。PVPPXL 是聚乙烯聚吡咯烷酮, 交叉相连(BASF, 德国)。Aerosil®是二氧化硅(Degussa,德国)。