



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102666525 B

(45) 授权公告日 2015. 01. 28

(21) 申请号 201080050319. 5

C07D 401/14 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 11. 08

C07D 413/14 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 31/4439 (2006. 01)

09175642. 9 2009. 11. 11 EP

A61P 35/00 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2012. 05. 07

W0 2008/071451 A1, 2008. 06. 19, 说明书第
1-127 页.

(86) PCT国际申请的申请数据

审查员 邱晓伟

PCT/EP2010/066983 2010. 11. 08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/069761 EN 2011. 06. 16

(73) 专利权人 拜耳知识产权有限责任公司

地址 德国蒙海姆

(72) 发明人 A. 瓦卡洛波洛斯 M. 米歇尔斯

K. 齐默曼 N. 托伊施 M. 洛贝尔

K. 恩格尔

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 赵苏林 林森

(51) Int. Cl.

C07D 401/04 (2006. 01)

权利要求书4页 说明书38页

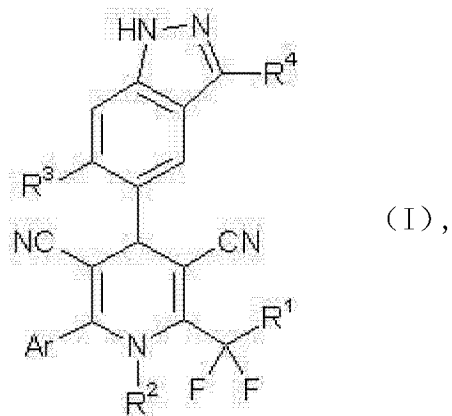
(54) 发明名称

氟取代的 2- 芳基 -3, 5- 二氰基 -4- 吡啶
基 -6- 甲基 -1, 4- 二氢吡啶和其用途

(57) 摘要

本发明涉及具有蛋白质酪氨酸激酶抑制活性的新的氟取代的 2- 芳基 -3, 5- 二氰基 -4- (1H- 吡啶 -5- 基) -6- 甲基 -1, 4- 二氢吡啶衍生物、其制备方法和其用于治疗 c-Met- 介导的疾病或 c-Met- 介导的病症的用途, 尤其是癌症及其它增殖病症。

1. 式 (I) 的化合物或其可药用盐：



其中

Ar 是苯基或吡啶基,其各自可以被一或两个独立地选自下列的取代基取代:氟,氯,溴,和 (C₁-C₄)-烷氧基,

R¹ 是氢或氟,

R² 是氢或甲基,

R³ 是氢或氟,

和

R⁴ 是氢或 (C₁-C₄)-烷基。

2. 按照权利要求 1 的式 (I) 的化合物或其可药用盐,其中

Ar 是苯基或吡啶基,其各自可以被一或两个独立地选自下列的取代基取代:氟,氯,甲氧基,和乙氧基,

R¹ 是氢或氟,

R² 是氢,

R³ 是氢或氟,

和

R⁴ 是氢,甲基或乙基。

3. 按照权利要求 1 或 2 的式 (I) 的化合物或其可药用盐,其中

Ar 是苯基或吡啶基,其各自可以被一或两个独立地选自下列的取代基取代:氟,氯,和甲氧基,

R¹ 是氢或氟,

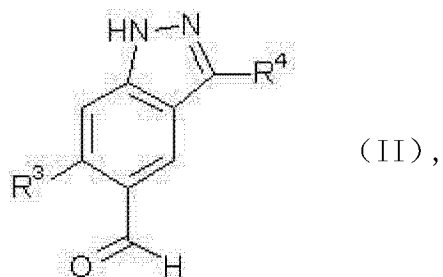
R² 是氢,

R³ 是氢或氟,

和

R⁴ 是甲基。

4. 制备权利要求 1 至 3 的任一项所定义的式 (I) 化合物的方法,其特征在于:使式 (II) 的吡唑基醛

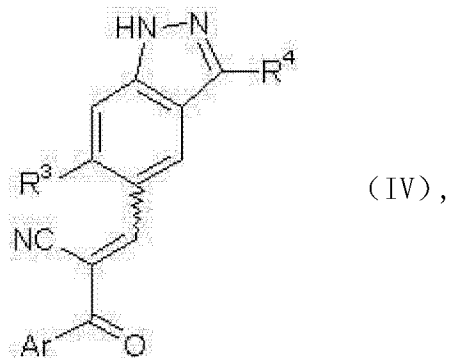


其中 R^3 和 R^4 具有权利要求 1 至 3 的任一项中所指明的含义,

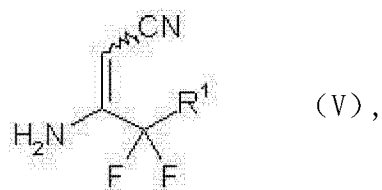
[A] 在酸、酸/碱组合和/或脱水剂的存在下,与式 (III) 的酮腈反应,得到式 (IV) 的化合物



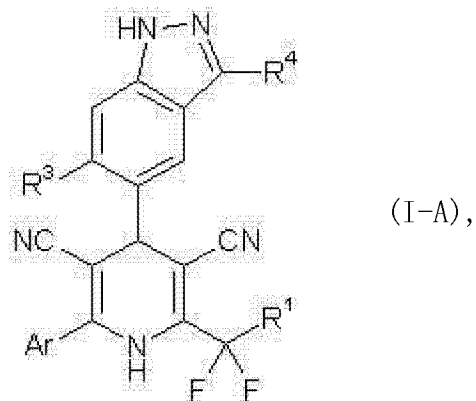
其中 Ar 具有权利要求 1 至 3 的任一项中所指明的含义,



其中 Ar、 R^3 和 R^4 具有权利要求 1 至 3 的任一项中所指明的含义,
然后,使后者与式 (V) 的烯胺腈缩合



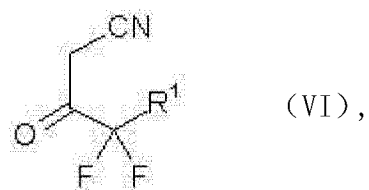
其中 R^1 具有权利要求 1 至 3 的任一项中所指明的含义,
得到式 (I-A) 的化合物



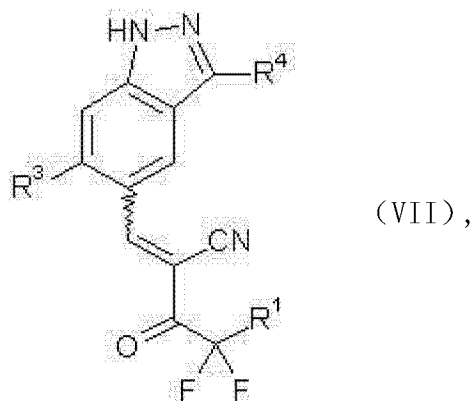
其中 Ar、 R^1 、 R^3 和 R^4 具有权利要求 1 至 3 的任一项中所指明的含义,

或

[B] 任选地在碱和 / 或脱水剂的存在下与式(VI)的酮腈反应,得到式(VII)的化合物



其中 R¹ 具有权利要求 1 至 3 的任一项中所指明的含义,

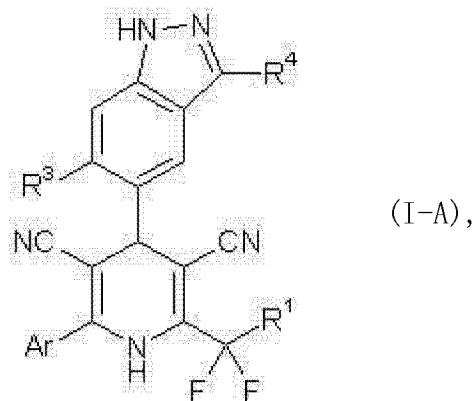


其中 R¹、R³ 和 R⁴ 具有权利要求 1 至 3 的任一项中所指明的含义,

然后,在酸的存在下,使后者与式(VIII)的烯胺腈缩合,也得到式(I-A)的化合物



其中 Ar 具有权利要求 1 至 3 的任一项中所指明的含义,



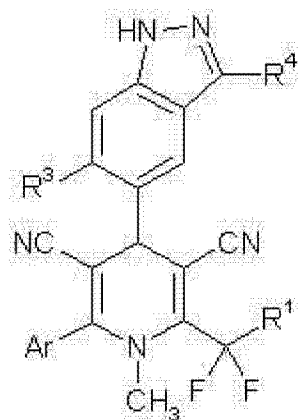
其中 Ar、R¹、R³ 和 R⁴ 具有权利要求 1 至 3 的任一项中所指明的含义,

而后任选地,在碱的存在下,使用式(IX)的化合物进行二氢吡啶 N-甲基化,得到式(I-B)的化合物



其中

X 表示离去基团,



(I-B),

其中 Ar、R¹、R³ 和 R⁴ 具有权利要求 1 至 3 的任一项中所指明的含义。

5. 权利要求 1 至 3 的任一项所定义的化合物用于制备药物组合物的用途, 该药物组合物用于治疗或预防细胞增殖病症。

6. 权利要求 5 的用途, 其中细胞增殖病症是癌症。

7. 权利要求 6 的用途, 其中癌症是乳癌, 呼吸道癌, 生殖器官癌, 消化道癌, 尿路癌, 眼癌, 肝癌, 皮肤癌, 头或颈癌, 或实质固态瘤的远端转移病变。

8. 权利要求 6 的用途, 其中癌症是脑癌, 甲状腺癌, 或甲状旁腺癌。

9. 药物组合物, 其包含权利要求 1 至 3 的任一项所定义的化合物和可药用赋形剂。

10. 权利要求 9 的药物组合物, 进一步包含一或多种其它治疗剂。

11. 权利要求 10 的药物组合物, 其中其它治疗剂是抗肿瘤药剂。

12. 权利要求 9 至 11 的任一项所定义的药物组合物, 用于治疗或预防细胞增殖病症。

氟取代的 2- 芳基 -3, 5- 二氰基 -4- 吡唑基 -6- 甲基 -1, 4- 二氢吡啶和 its 用途

[0001] 本发明涉及具有蛋白质酪氨酸激酶抑制活性的新的氟取代的 2- 芳基 -3, 5- 二氰基 -4-(1H- 吡唑 -5- 基) -6- 甲基 -1, 4- 二氢吡啶衍生物、其制备方法和其用于治疗 c-Met- 介导的疾病或 c-Met- 介导的病症的用途, 尤其是癌症及其它增殖病症。

[0002] 癌症是最普遍的疾病之一。在世界范围内, 在 2002 年, 超过四百四十万人诊断患有乳房、结肠、卵巢、肺或前列腺癌, 超过二百五十万人死于这些破坏性疾病 (Globocan 2002 Report, <http://www-dep.iarc.fr/globocan/downloads.htm>)。单独在美国, 在 2005 年, 预计有一百二十五万以上新的病例, 并且超过五十万人因癌症而死去。预计这些新的病例的大部分是结肠癌 (~ 100000)、肺癌 (~ 170000)、乳房癌 (~ 210000) 和前列腺癌 (~ 230000)。在下一个十年, 预计癌症的发病率和流行率增加大约 15% 以上, 反映了 1.4% 的平均增长率 (American Cancer Society, Cancer Facts and Figures 2005; http://www.cancer.org/docroot/STT/content/STT_1x_Cancer_Facts_Figures_2007.asp)。

[0003] 癌症的产生有许多途径, 这也是它们难以治疗的理由之一。一个途径是由癌蛋白将细胞转化, 这种癌蛋白是通过基因突变由正常细胞蛋白产生的, 基因突变导致这些蛋白的非生理性激活。能够衍生许多癌蛋白的一个蛋白家族是酪氨酸激酶 (例如 src 激酶), 尤其是受体酪氨酸激酶 (RTKs)。在过去的二十年, 许多研究方法已经说明了受体酪氨酸激酶 (RTK) 介导的信号在调节哺乳动物细胞生长方面的重要性。近来, 临床上使用酪氨酸激酶的选择性小分子抑制剂作为抗肿瘤发生药剂已经取得了效果。

[0004] c-Met 受体还是受体酪氨酸激酶。在 80 年代初, 当从化学诱导的人骨肉瘤细胞系 (其含有 Met 基因的激酶域, 其中 Met 基因在它的 N- 末端与二聚域融合) 中分离出突变 Met 时, 确定了它的致癌潜力 [C. S. Cooper et al., *Nature* 311: 29-33(1984)]。

[0005] 细胞 Met 蛋白是以单链 190 kd 前体物形式合成的异二聚体跨膜蛋白 [G. A. Rodrigues 等人, *Mol. Cell Biol.* 11: 2962-70(1991)]。该前体物在氨基酸残基 307 之后进行细胞内裂解, 形成通过二硫桥连接的 50 kd α -链和 145 kd α -链。 α -链完全存在于胞外, 而 β -链横跨质膜。 β -链由 N 端 sema 域组成, 其与 α -链一起介导配体结合。 β -链的胞外域的其余部分由半胱氨酸富集域和四个免疫球蛋白域组成, 并且继之以横跨膜域和胞内域。胞内域包括近膜域、激酶域和 C 端域, 其介导下游信号。配体结合时, 诱导受体的二聚化, 并且激酶域在近膜域 (Y1003)、激酶的激活环 (Y1234 和 Y1235) 和羧基终端域 (Y1349 和 Y1356) 被酪氨酸自磷酸化步骤的级联激活。磷酸化的 Y1349 和 Y1356 包含多个底物引入位点, 用于结合下游 c-Met 信号所必需的衔接蛋白 [C. Ponzetto 等人, *Cell* 77: 261-71(1994)]。c-Met 信号的一种最重要的底物是衔接蛋白 (scaffolding adaptor protein) Gab1, 其通过特殊的磷酸酪氨酸结合位点 (称为 mbs : met 结合位点) 与 Y1349 或 Y1356 结合, 导致独特延长的胞内信号。另一个重要的底物是衔接蛋白 Grb2。根据细胞环境, 这些衔接子介导各种胞内信号途径的激活, 如通过 ERK/MAPK、PI3K/Akt、Ras、JNK、STAT、NF κ B 和 β -连环蛋白的信号途径。

[0006] c-Met 唯一地被肝细胞生长因子 (HGF) (亦称扩散因子) 和它的剪接变体 (它是

其唯一已知的生物学活性配体) 激活 [L. Naldini 等人, *Oncogene* 6: 501-4(1991)]。HGF 具有独特的结构, 其显示了与纤溶酶原家族的蛋白酶的相似性。它由氨基-终端域、继之以四个 kringle 域和丝氨酸蛋白酶同源域组成, 其没有酶催活性。与 c-Met 相似, HGF 是以非活性的单链前体物 (pro-HGF) 形式合成的, 其在细胞外被丝氨酸蛋白酶 (例如纤溶酶原激活物和凝血因子) 分解, 并且转变为二硫化物连接的活性 α -和 β -链杂二聚体。HGF 高度亲合性地结合硫酸乙酰肝素粘蛋白, 这会使它保持主要与胞外基质结合, 并限制它的扩散。晶体结构分析表明, HGF 形成二聚体, 当它其与 c-Met 结合时, 可以诱导受体的二聚化。

[0007] HGF 被间质细胞表达, 并且它与 c-Met 的结合 (这种结合尤其是在上皮细胞中广泛地表达) 在各种组织 (包括上皮、内皮、神经元和造血细胞) 中导致多向性 (pleiotropic) 效应。这种效应一般包括一种或所有下列现象: i) 促有丝分裂的刺激作用; 通过 HGF 对肝细胞的促有丝分裂活性来鉴定 HGF; ii) 侵入和迁移的刺激作用; 在独立的实验方法中, 基于 HGF 对细胞运动性 (“扩散”) 的诱导, 将 HGF 确定为扩散因子; 和 iii) 形态发生 (小管发生) 的刺激作用。在胶原基质中, HGF 诱导犬肾脏细胞的支管的形成。此外, 源自于遗传改变的小鼠和细胞培养实验的证据表明, c-Met 起存活受体的作用, 并且保护细胞免于细胞凋亡 [N. Tomita 等人, *Circulation* 107: 1411-1417(2003); S. Ding 等人, *Blood* 101: 4816-4822(2003); Q. Zeng 等人, *J. Biol. Chem.* 277: 25203-25208(2002); N. Horiguchi 等人, *Oncogene* 21: 1791-1799(2002); A. Bardelli 等人, *Embo J.* 15: 6205-6212(1996); P. Longati 等人, *Cell Death Differ.* 3: 23-28(1996); E.M. Rosen, *Symp. Soc. Exp. Biol.* 47: 227-234(1993)]。由于 HGF 协调这些生物过程的实施, 导致特异性遗传程序, 被称为 “侵入性生长”。

[0008] 在正常情况下, c-Met 和 HGF 对小鼠的胚胎发育是不可缺少的, 尤其是胎盘和肝的形成和四肢体节的成肌细胞的方向性迁移。c-Met 或 HGF 基因的遗传性破坏产生相同的表型, 这显示了它们的独特相互作用。还没有充分了解 c-Met/HGF 在成年有机体中的生理作用, 但实验证据说明, 它们与创伤愈合、组织再生、红细胞生成和组织动态平衡有关。

[0009] 癌蛋白 TPR-MET 的鉴别首先表明了 c-Met 可以在致肿瘤性中起一定作用。其它确实证据源自于许多不同的实验方法。在人和鼠的细胞系中, c-Met 或 HGF 的超表达诱导致肿瘤性和转移性的表型 (当在裸鼠中表达时)。在小鼠中, c-Met 或 HGF 的转基因超表达诱导致肿瘤性。

[0010] 最使人感兴趣的是, 已经在偶发和遗传性乳头状肾癌 (HPRC) 以及在其它癌症类型 (例如肺、胃、肝、头和颈、卵巢和脑癌) 中确定了 c-Met 的歧义突变或激活受体的突变。显著的是, HPRC 家族中的特异性 c-Met 突变与疾病分离, 在 c-Met 激活和人癌症之间形成因果联系 [L. Schmidt 等人, *Nat. Genet.* 16: 68-73(1997); B. Zbar 等人, *Adv. Cancer Res.* 75: 163-201(1998)]。具有最强转变活性的激活突变位于激活环 (D1228N/H 和 Y1230H/D/C) 和相邻的 P+1 环 (M1250T) 中。在催化环附近和在激酶域的 A 叶 (lobe) 之内已经发现了其它的较弱的突变。此外, 在肺肿瘤中, 已经在 c-Met 的近膜域观察到一些突变, 其不直接激活激酶, 而是通过使蛋白抵抗遍在泛素化作用 (ubiquitination) 和随后的降解而使蛋白稳定 [M. Kong-Beltran 等人, *Cancer Res.* 66: 283-9(2006); T.E. Taher 等人, *J. Immunol.* 169: 3793-800(2002); P. Peschard 等人, *Mol. Cell* 8: 995-1004(2001)]。有趣的是, 在各种癌症中, c-Met 的体细胞突变与侵入性提高和大范围的转移病变有关。尽

管种系和体细胞突变的频率很低（低于 5%），但在没有突变的情况下，已经观察到通过旁分泌或自分泌机理导致 c-Met 信号失调的其它主要机理。在源自于间质细胞的肿瘤中，例如骨肉瘤或横纹肌肉瘤，已经观察到旁分泌激活，其生理性地产生 HGF，并且在恶性胶质瘤和乳房癌中，其是外胚层起源的（of ectodermal origin）。

[0011] 然而，最常见的病例是 c-Met 过度表达的癌，这种过度表达在结肠、胰腺、胃、乳房、前列腺、卵巢和肝癌中可以观察到。正如在胃和肺肿瘤细胞系中所观察到的那样，超表达可以例如通过基因增殖产生。最近，在对 EGF 受体抑制获得抗性的肺肿瘤细胞系中检测到了 c-Met 的超表达 [J. A. Engelmann 等人, *Science* 316: 1039-1043 (2007)]。超表达 c-Met 的一些上皮肿瘤还共同表达 HGF，产生自分泌 c-Met/HGF 刺激环，并由此防止对基质细胞衍生的 HGF 的需要。

[0012] 总之，已经发现 c-Met 在人癌症中的异常激活典型地与预后差有关，而与特定机理无关 [J. G. Christensen 等人, *Cancer Lett.* 225: 1-26 (2005)]。

[0013] 总之，已经进行了许多体外和体内试验，验证 c-Met 作为重要的癌症靶向，详细一览表可以在 <http://www.vai.org/met> 中看到 [C. Birchmeier 等人, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 915-25 (2003)]。为了衰减人肿瘤中的异常 Met 信号，已经采取了一些策略，包括 HGF 拮抗剂和小分子抑制剂，还有其它的策略。目前临床上开发了许多小分子抑制剂，例如 ARQ-197 (Arqule), foretinib (XL-880, Exelixis/GSK) 和 PH-2341066 (Pfizer)；近来已经对它们进行了评述 [J. J. Cui, *Expert Opin. Ther. Patents* 17: 1035-45 (2007)]。

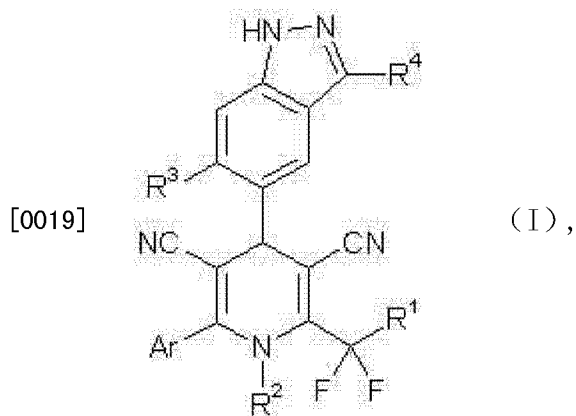
[0014] 在 WO 2006/066011-A2 中，已经描述了卤代烷基取代的 3-氰基-1,4-二氢吡啶衍生物（在 4 位具有芳基或杂芳基）作为甾体受体和钙通道活性的调节剂，由此特别可用于治疗心血管疾病。在 WO 2006/074419-A2 中，已经主张了使用 4-苯基-1,4-二氢吡啶衍生物来治疗阿尔茨海默氏病的方法。

[0015] 近来已经在 WO 2008/071451-A1 中公开了具有 c-Met 激酶抑制活性的各种取代的 3-氰基-4-杂芳基-1,4-二氢吡啶。然而，在这种新结构类别的 c-Met 抑制剂的进一步调查期间，候选化合物常常受到不能令人满意的口服生物利用率的连累，由大鼠中的血液清除率测定数据可知，这种口服生物利用率显著地低于最初期望的口服生物利用率。因为口服生物利用率还取决于化合物吸收的程度，和这些化合物的药物动力学和物理化学特性，因此假定低溶解度和 / 或经胃肠道的不充分的渗透性可能导致在吸收方面的这种限制。

[0016] 因此，按照本发明所要解决的技术问题可以在对 c-Met 激酶具有有效抑制活性的另一种化合物的鉴定过程中看到，这些化合物显示了溶解度和 / 或渗透性提高，随后导致口服给予这些化合物之后所吸收的部分增加。

[0017] 意外地，现在发现，在大家公认的肠细胞试验中，在 6 位的甲基处具有二氟-或三氟-取代的 2-芳基-3,5-二氰基-4-(1H-吡啶-5-基)-6-甲基-1,4-二氢吡啶衍生物显示出显著提高的体外渗透性能。

[0018] 由此，在一方面，本发明涉及通式 (I) 的氟取代的 2-芳基-3,5-二氰基-4-(1H-吡啶-5-基)-6-甲基-1,4-二氢吡啶衍生物



[0020] 其中

[0021] Ar 是苯基或 5- 或 6- 元杂芳基,各自可以被一或两个独立地选自下列的取代基取代:氟,氯,溴,氰基,硝基, (C₁-C₄)-烷基, (C₁-C₄)-烷氧基,氨基和单 (C₁-C₄)-烷基氨基,

[0022] 其中所述 (C₁-C₄)-烷基和 (C₁-C₄)-烷氧基取代基可以进一步被至多三个氟原子取代,

[0023] R¹ 是氢或氟,

[0024] R² 是氢或甲基,

[0025] R³ 是氢或氟,

[0026] 和

[0027] R⁴ 是氢或 (C₁-C₄)-烷基。

[0028] 按照本发明的化合物还可以以它们的盐、水合物和 / 或溶剂化物形式存在。

[0029] 本发明目的盐优选按照本发明化合物的可药用盐 (例如,参见 S. M. Berge 等人, "Pharmaceutical Salts", *J. Pharm. Sci.* 1977, 66, 1-19)。

[0030] 本发明化合物或它们的盐的水合物是该化合物或盐与水的化学计量组合物,例如,半、一或二水合物。

[0031] 本发明化合物或它们的盐的溶剂化物是该化合物或盐与溶剂的化学计量组合物。

[0032] 本发明的化合物可以由于不对称中心的性质或阻旋作用而存在异构体形式 (对映体,非对映体)。可以存在任何异构体,其中不对称中心是 (R)-、(S)- 或 (R, S)- 构型。

[0033] 还应该理解,当两个或多个不对称中心存在于本发明的化合物中时,一些示范性结构的非对映体和对映体通常是可能的,并且纯的非对映体和纯的对映体代表优选实施方案。

[0034] 本发明化合物的所有异构体 (无论是否分离、纯化、部分纯化或非对映体或外消旋混合物形式) 包括在本发明范围内。所述异构体的纯化和所述异构混合物的分离可以利用本领域已知的标准技术来实现。例如,可以利用色谱方法或结晶方法将非对映体混合物分离为单一异构体,并且可以利用色谱方法 (在手性相上) 或拆分方法将外消旋体分离为相应的对映体。

[0035] 另外,按照本发明,包括上述化合物的所有可能的互变异构形式。

[0036] 除非另作说明,否则,下列定义适用于全部该说明书和权利要求所使用的取代基和残基:

[0037] 通常,烷基表示具有 1 至 4 个碳原子的直链或支链饱和烃原子团。非限制性实例

包括甲基,乙基,正丙基,异丙基,正丁基,异丁基,仲丁基和叔丁基。上述情况也适用于原子团例如烷氧基、烷基氨基等等。

[0038] 烷氧基说明性地和优选表示甲氧基,乙氧基,正丙氧基,异丙氧基,正丁氧基和叔丁氧基。

[0039] 单烷基氨基通常表示具有一个与氮原子连接的烷基残基的氨基原子团。非限制性实例包括甲基氨基,乙基氨基,正丙基氨基,异丙基氨基,正丁基氨基和叔丁基氨基。

[0040] 杂芳基通常表示具有总数 5 或 6 个环原子的单环芳族杂环基,包括 3 至 5 个碳原子和至多 2 个杂原子,杂原子独立地选自 N、O 和 S,该环系统通过环碳原子键合。非限制性实例包括呋喃基,吡咯基,噻吩基,吡啶基,咪唑基,噁唑基,噻唑基,异噁唑基,异噻唑基,吡啶基,嘧啶基,哒嗪基和吡嗪基。优选 6- 元杂芳基原子团,例如吡啶基和嘧啶基,和 5- 元杂芳基原子团,例如噻吩基,吡唑基,咪唑基,噁唑基,噻唑基,异噁唑基和异噻唑基。

[0041] 在优选实施方案中,本发明涉及式 (I) 的化合物,其中

[0042] Ar 是苯基,吡啶基,嘧啶基,噻吩基,吡唑基,咪唑基,噁唑基,噻唑基,异噁唑基或异噻唑基,各自可以被一或两个独立地选自下列的取代基取代:氟,氯,氰基,甲基,二氟甲基,三氟甲基,乙基,甲氧基,三氟甲氧基和乙氧基,

[0043] R^1 是氢或氟,

[0044] R^2 是氢,

[0045] R^3 是氢或氟,

[0046] 和

[0047] R^4 是氢,甲基或乙基。

[0048] 在尤其优选的实施方案中,本发明涉及式 (I) 的化合物,其中

[0049] Ar 是苯基,吡啶基或噁唑基,各自可以被一或两个独立地选自下列的取代基取代:氟,氯,甲基,三氟甲基和甲氧基,

[0050] R^1 是氢或氟,

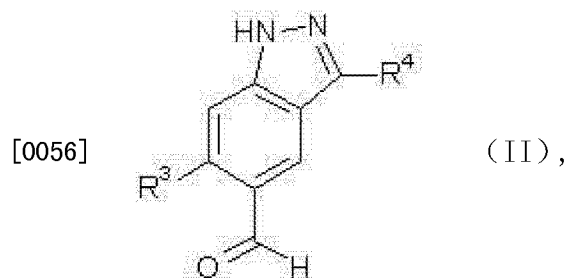
[0051] R^2 是氢,

[0052] R^3 是氢或氟,

[0053] 和

[0054] R^4 是甲基。

[0055] 在另一个实施方案中,本发明涉及制备通式 (I) 化合物的方法,其特征在于:式 (II) 的吲唑基醛

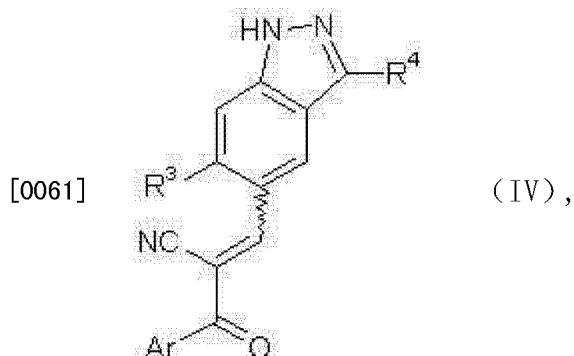


[0057] 其中 R^3 和 R^4 具有上述含义,

[0058] [A] 在酸、酸 / 碱结合和 / 或脱水剂的存在下,与式 (III) 的酮腈反应,得到式 (IV) 的化合物

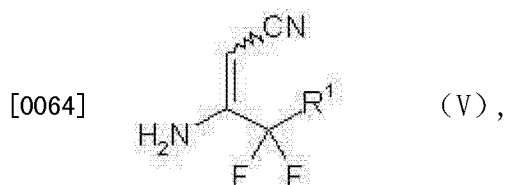


[0060] 其中 Ar 具有上述含义,



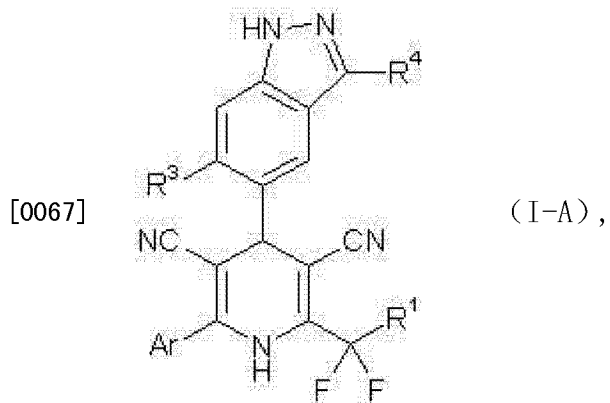
[0062] 其中 Ar、R³ 和 R⁴ 具有上述含义,

[0063] 然后,后者与式 (V) 的烯胺腈缩合



[0065] 其中 R¹ 具有上述含义,

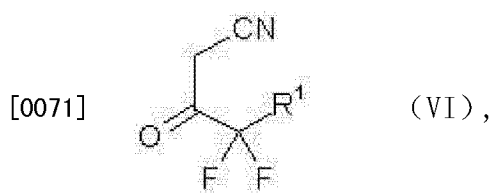
[0066] 得到式 (I-A) 的化合物



[0068] 其中 Ar、R¹、R³ 和 R⁴ 具有上述含义,

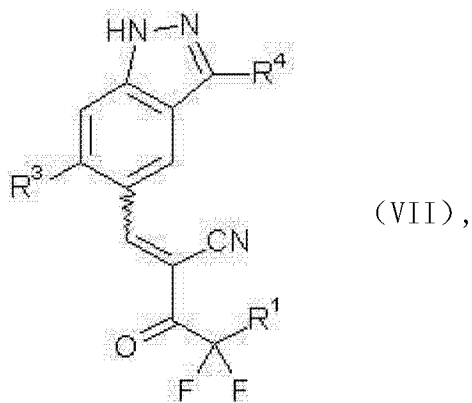
[0069] 或

[0070] [B] 任选在碱和 / 或脱水剂的存在下与式 (VI) 的酮腈反应,得到式 (VII) 的化合物



[0072] 其中 R¹ 具有上述含义,

[0073]

[0074] 其中 R^1 、 R^3 和 R^4 具有上述含义，

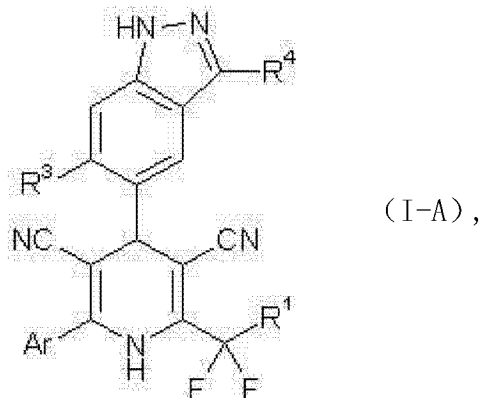
[0075] 然后，在酸的存在下，后者与式(VIII)的烯胺腈缩合，也得到式(I-A)的化合物

[0076]



[0077] 其中 Ar 具有上述含义，

[0078]

[0079] 其中 Ar、 R^1 、 R^3 和 R^4 具有上述含义，

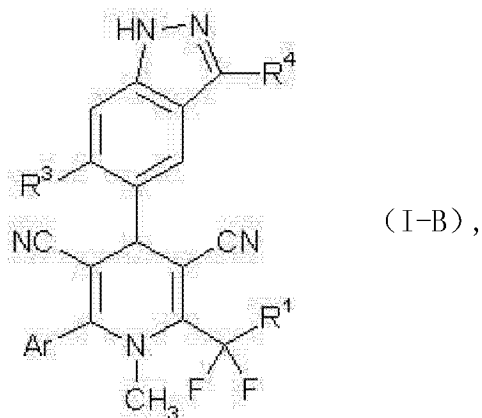
[0080] 而后任选，在碱的存在下，使用式(IX)的化合物进行二氢吡啶 N-甲基化，得到式(I-B)的化合物

[0081] $\text{CH}_3\text{-X}$ (IX),

[0082] 其中

[0083] X 表示离去基团，例如卤素，甲磺酸基，三氟甲磺酸基，甲苯磺酸基或硫酸基，

[0084]



[0085] 其中 Ar、R¹、R³ 和 R⁴ 具有上述含义，

[0086] 如果合适的话，随后任选：(i) 将化合物 (I-A) 和 (I-B) 分离为它们的相应的对映体和 / 或非对映体，优选使用色谱方法，和 / 或 (ii) 通过用相应的溶剂处理，将化合物 (I-A) 和 (I-B) 转化为它们的相应的水合物或溶剂化物。

[0087] 该方法的变体 [A] (II)+(III) → (IV)、(IV)+(V) → (I-A) 和 [B] (II)+(VI) → (VII)、(VII)+(VIII) → (I-A) 都可以在上述两个独立步骤中进行，或使用一锅方法，即不用明确分离相应的中间体化合物 (IV) 和 (VII)。在某些情况下，根据各个反应物的反应性，也可以进行化合物 (II)、(III) 和 (V) [A] 或 (II)、(VI) 和 (VIII) [B] 的一个烧瓶 / 三个组分的缩合反应，制备式 (I-A) 的化合物 [通常用于合成 1, 4- 二氢吡啶，参见，例如，D. M. Stout, A. I. Meyers, *Chem. Rev.* 1982, 82, 223-243; H. Meier 等人, *Liebigs Ann. Chem.* 1977, 1888; H. Meier 等人, *ibid.* 1977, 1895; H. Meier 等人, *ibid.* 1976, 1762; F. Bossert 等人, *Angew. Chem.* 1981, 93, 755]。

[0088] 方法步骤 (II)+(III) → (IV)、(IV)+(V) → (I-A)、(II)+(VI) → (VII) 和 (VII) + (VIII) → (I-A) 通常在惰性溶剂中、在 +20℃ 至该溶剂的沸点的温度范围内、在常压下进行。

[0089] 适合于该目的的溶剂是，例如，醇，例如甲醇，乙醇，正丙醇，异丙醇，正丁醇，叔丁醇或正戊醇，烃，例如己烷，环己烷，苯，甲苯或二甲苯，卤代烃，例如二氯甲烷，三氯甲烷，四氯甲烷，三氯乙烷，1, 2- 二氯乙烷，氯苯或氯甲苯，醚，例如四氢呋喃，1, 4- 二噁烷或 1, 2- 二甲氧基乙烷，或其它溶剂，例如乙腈或乙酸。使用这些溶剂的混合物同样是可能的。反应 (II)+(III) → (IV) 和 (II)+(VI) → (VII) 优选在二氯甲烷、甲苯、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇或正戊醇中、在相应的回流温度下、在常压下进行，反应 (IV)+(V) → (I-A) 和 (VII) + (VIII) → (I-A) 优选在正丙醇、异丙醇、正丁醇、正戊醇、二甲苯、乙酸或其混合物中、在回流温度下、在常压下进行。

[0090] 反应 (II)+(III) → (IV) 可以优选在酸、酸 / 碱组合和 / 或脱水剂（例如分子筛）的存在下进行。合适的酸催化剂的例子是乙酸，三氟乙酸，甲磺酸或对甲苯磺酸；合适的碱尤其是哌啶或吡啶。根据组分的反应性，转化 (II)+(VI) → (VII) 可以不用其它辅助试剂就可以进行，或可以利用常规胺碱（例如哌啶）和 / 或脱水剂（例如分子筛）来促进。反应 (IV)+(V) → (I-A) 和 (VII)+(VIII) → (I-A) 通常在酸的存在下进行；优选，使用乙酸同时作为酸催化剂和溶剂或共溶剂。

[0091] 甲基化反应 (I-A)+(IX) → (I-B) 所使用的惰性溶剂是，例如，醚，例如二乙醚，甲基叔丁基醚，四氢呋喃，1, 4- 二噁烷或 1, 2- 二甲氧基乙烷，烃，例如苯，甲苯，二甲苯，己烷或环己烷，卤代烃，例如二氯甲烷，三氯甲烷，四氯甲烷，1, 2- 二氯乙烷，三氯乙烷，四氯乙烷，氯苯或氯甲苯，或其它溶剂，例如乙腈，N, N- 二甲基甲酰胺 (DMF)，二甲亚砜 (DMSO)，N, N'- 二甲基丙烯基脲 (DMPU)，N- 甲基吡咯烷酮 (NMP) 或吡啶。使用这些溶剂的混合物也是可行的。优选，使用二氯甲烷，四氢呋喃，N, N- 二甲基甲酰胺或其混合物。

[0092] 适合于方法步骤 (I-A)+(IX) → (I-B) 的碱尤其是碱金属或碱土金属碳酸盐，例如碳酸锂、碳酸钠、碳酸钾、碳酸钙或碳酸铯，碱金属氢化物，例如氢化钠或氢化钾，空间位阻的碱金属醇化物，例如叔丁醇钠或叔丁醇钾，空间位阻的碱金属氨基化物，例如双（三甲基甲硅烷基）氨基锂、双（三甲基甲硅烷基）氨基钠或双（三甲基甲硅烷基）氨基钾或二异

丙基氨基锂,或有机胺,例如三乙胺、N-甲基吗啉、N-甲基哌啶、N,N-二异丙基乙胺或吡啶。优选使用碳酸钾、碳酸铯或氢化钠。

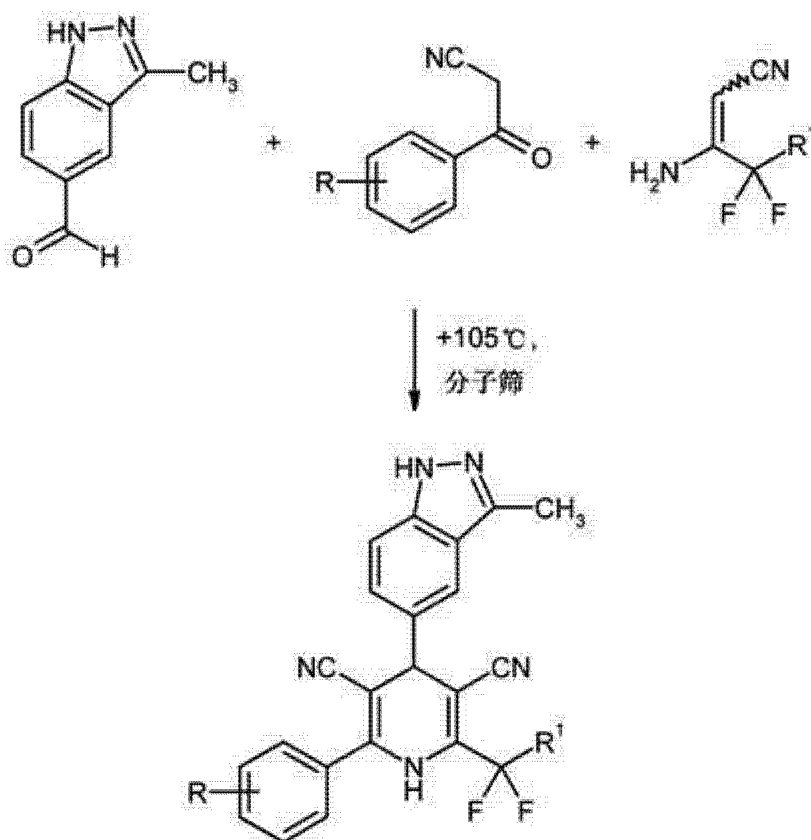
[0093] 反应 (I-A)+(IX) $\rightarrow$ (I-B) 通常在常压下、在 -20°C 至 $+100^{\circ}\text{C}$ 的温度范围内进行,优选 0°C 至 $+50^{\circ}\text{C}$ 。

[0094] 式 (II)、(III)、(V)、(VI)、(VIII) 和 (IX) 的化合物是商购的化合物、文献已知的化合物或可以利用文献中所描述标准方法的修改方法、由容易获得的起始原料来制备(对于其它参考,参见下面的实验部分)。

[0095] 本发明化合物的制备可以利用下列合成反应路线来举例说明。更详细方法提供于下面描述实施例的实验部分中。

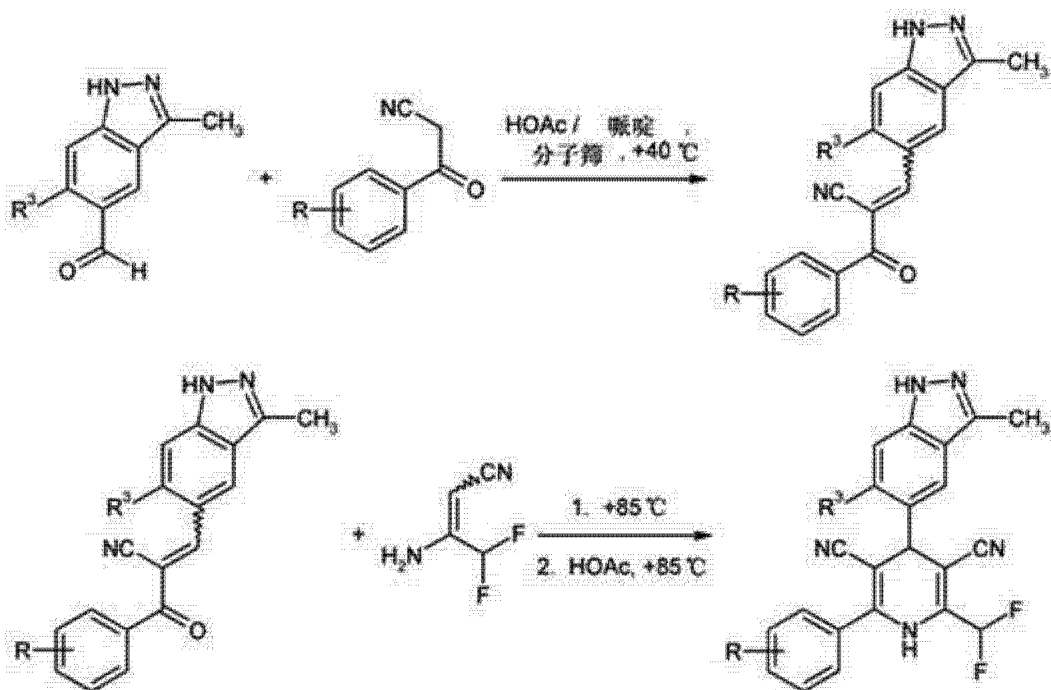
[0096] 反应路线 1

[0097]



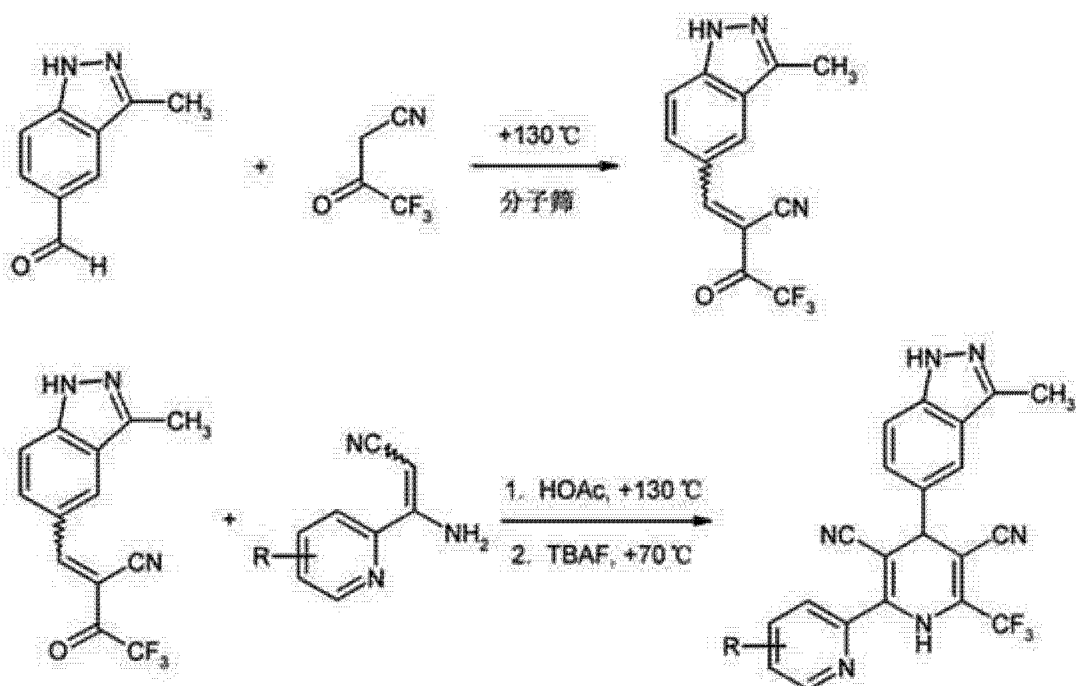
[0098] 反应路线 2

[0099]



[0100] 反应路线 3

[0101]



[0102] 使用方法

[0103] 本发明的化合物是受体酪氨酸激酶（特别是 c-Met 受体酪氨酸激酶）的活性或表达的有效抑制剂。此外，本发明化合物的特点在于：口服给予之后，这些化合物在肠内上皮细胞中提高渗透率，促进胃肠道吸收这些化合物。因此，预计式 (I) 的化合物可作为有价值的治疗剂。

[0104] 相应地，在另一个实施方案中，本发明提供了在需要这种治疗的患者中治疗与 c-Met 激酶活性有关或由其介导的病症的方法，该方法包括：给予患者有效量的上述式 (I) 的化合物。在某些实施方案中，与 c-Met 激酶活性有关的病症是细胞增殖病症，尤其是癌

症。

[0105] 贯穿本文件陈述的术语“治疗”是通常使用的术语,例如,为了抵御、减轻、降低、解除、改善疾病或病症(例如癌)的症状的目的而管理或照料患者。

[0106] 术语“患者”或“病员”包括能够患有细胞增殖病症或可以另外受益于给予本发明化合物的有机体,例如人和非人动物。优选的人包括:患有或倾向于患有本文所描述的细胞增殖病症或相关状态的人患者。术语“非人动物”包括脊椎动物,例如哺乳动物,例如非人灵长类,羊,牛,狗,猫和啮齿类,例如,小鼠,和非哺乳动物,例如鸡,两栖动物,爬行动物,等等。

[0107] 术语“与 c-Met 有关或由其介导的病症”包括与 c-Met 活性相关或涉及 c-Met 活性(例如,c-Met 的活性过强)的疾病和伴有这些疾病的病症。“与 c-Met 有关或由其介导的病症”的例子包括:由 c-Met 的过度兴奋(由于异常高数量的 c-Met 或 c-Met 的突变造成)引起的病症或由异常高数量的 c-Met 活性(由于异常高数量的 c-Met 或 c-Met 的突变造成)引起的病症。

[0108] 术语“c-Met 的活性过强”是指 c-Met 在通常不表达 c-Met 的细胞中的表达或在正常不具有活性 c-Met 的细胞中的 c-Met 活性,或 c-Met 表达提高,导致不希望有的细胞增殖或突变,造成 c-Met 的组成性激活。

[0109] 术语“细胞增殖病症”包括涉及不希望的或无控的细胞增殖的病症。可以使用本发明的化合物来预防、抑制、阻滞、减少、降低、控制等等细胞增殖和/或细胞分裂,和/或产生细胞凋亡。该方法包括:给予需要其的患者(包括哺乳动物,包括人)有效治疗或预防病症数量的本发明的化合物或其可药用盐、异构体、多晶型物、代谢物、水合物或溶剂化物。

[0110] 在本发明的背景下,细胞增殖或高增殖病症包括但不限于:例如,牛皮癣,瘢痕瘤及影响皮肤的其它增生,骨骼病症,生成血管或血管增殖性病症,肺高血压症,纤维化病症,系膜细胞增殖病症,结肠息肉,多囊肾疾病,良性前列腺增生(BPH)和实质固态瘤,例如乳房、呼吸道、脑、生殖器官、消化道、尿路、眼睛、肝、皮肤、头和颈、甲状腺、甲状旁腺的癌症和它们的远端转移病变。那些病症还包括淋巴瘤、肉瘤和白血病。

[0111] 乳腺癌的例子包括但不限于:侵入性导管癌,侵入性小叶癌,导管原位癌和小叶原位癌。

[0112] 呼吸道癌症的例子包括但不限于:小细胞和非小细胞肺癌,以及支气管腺瘤和胸膜肺的胚细胞瘤。

[0113] 脑癌的例子包括但不限于:脑干和下丘脑胶质瘤,小脑和大脑星形细胞瘤,恶性胶质瘤,成髓细胞瘤,室管膜瘤,以及神经外胚层和松果状瘤。

[0114] 男性生殖器官肿瘤包括但不限于前列腺和睾丸癌症。女性生殖器官肿瘤包括但不限于:子宫内膜、子宫颈、卵巢、阴道和外阴癌症,以及子宫的肉瘤。

[0115] 消化道肿瘤包括但不限于:肛门、结肠、结肠直肠、食道、胆囊、胃、胰腺、直肠、小肠和唾腺癌。

[0116] 尿路肿瘤包括但不限于:膀胱、阴茎、肾脏、肾盂、输尿管、尿道和遗传性和偶发性乳突状的肾癌。

[0117] 眼癌包括但不限于眼内黑素瘤和成视网膜细胞瘤。

[0118] 肝癌的例子包括但不限于:肝细胞癌(有或者没有纤维板层变体的肝细胞癌),

胆管细胞癌（肝内胆管癌）和混合的肝细胞胆管细胞癌。

[0119] 皮肤癌包括但不限于：鳞状细胞癌，皮肤多发性出血性肉瘤，恶性黑色素瘤，Merkel 细胞皮肤癌和非黑素瘤皮肤癌。

[0120] 头和颈癌包括但不限于：喉、下咽、鼻咽、口咽癌、唇和口腔癌和鳞状细胞癌。

[0121] 淋巴瘤包括但不限于：AIDS 相关的淋巴瘤，非 Hodgkin's 淋巴瘤，皮肤 T 细胞淋巴瘤，伯基特淋巴瘤，淋巴肉芽肿病和中枢神经系统的淋巴瘤。

[0122] 肉瘤包括但不限于：软组织的肉瘤，骨肉瘤，恶性纤维组织细胞瘤，淋巴肉瘤和横纹肌肉瘤。

[0123] 白血病包括但不限于：急性骨髓性白血病，急性淋巴母细胞性白血病，慢性淋巴细胞性白血病，慢性粒性白血病和毛细胞白血病。

[0124] 可以用本发明的化合物和方法治疗的纤维化增殖病症（即胞外基质的异常形成）包括：肺纤维化，动脉粥样硬化，再狭窄，肝硬化和系膜细胞增殖病症，包括肾疾病，例如肾小球肾炎，糖尿病性肾病，恶性肾硬变，血栓性微血管病综合症，移植物排斥和肾小球病。

[0125] 可以通过给予本发明的化合物来治疗的人或其它哺乳动物的其它病症包括：肿瘤生长，视网膜病（包括糖尿病性视网膜病，缺血性视网膜静脉堵塞，早期视网膜病和年龄相关的黄斑变性），类风湿性关节炎，牛皮癣和与表皮下起泡相关的大疱病症，包括大疱类天疱疮，多形性红斑和疱疹样皮炎。

[0126] 本发明的化合物还可以用于预防和治疗呼吸道和肺疾病、胃肠道疾病以及膀胱和胆管疾病。

[0127] 已经在人中较好地表征了上述病症，在其它动物（包括哺乳动物）中也存在类似的病源，并且可以通过给予本发明的药物组合物来治疗。

[0128] 可以以单一药物试剂形式给予式 (I) 的化合物，或在联用药不会导致无法接受的副作用的情况下，与一或多种其它治疗剂联用。这种联合治疗包括：给予含有式 (I) 化合物和一或多种其它治疗剂的单一药物剂量制剂，以及以本身单独的药物剂量制剂形式给予式 (I) 的化合物和每个其它治疗剂。例如，可以在单一口服剂量组合物（例如片剂或胶囊剂）中一起给予患者式 (I) 的化合物和治疗剂，或可以以单独的剂量制剂形式给予每个药剂。

[0129] 如果使用单独的剂量制剂，可以基本上同时（例如，并行）或在分开交错的时间给予式 (I) 的化合物和一或多种其它治疗剂。

[0130] 尤其是，本发明的化合物可以在与其它下列药物的固定或分开的联用药中使用：抗肿瘤药剂，例如烷基化剂，抗代谢物，植物衍生的抗肿瘤药剂，激素治疗药剂，拓扑异构酶抑制剂，喜树碱衍生物，激酶抑制剂，靶向药物，抗体，干扰素和 / 或生物反应调节剂，抗生成血管的化合物及其它抗肿瘤药物。在这方面，下列是可以在与本发明化合物的联用药中使用的第二药剂的例子而非限制性列表：

[0131] • 烷基化剂包括但不限于：氮芥 N- 氧化物，环磷酰胺，异环磷酰胺，硫替派，雷莫司汀 (ranimustine)，噻啉亚硝脒，替莫唑胺，六甲蜜胺，apaziquone, brostallicin, 苯达莫司汀，卡莫司汀，雌莫司汀，福莫司汀，葡磷酰胺，马磷酰胺 (mafوسفamide)，苯达莫司汀 (bendamustine) 和二溴卫矛醇；铂配位的烷基化化合物，包括但不限于：顺铂，卡铂，依他铂，乐铂，奈达铂，奥沙利铂和沙铂 (satraplatin)；

[0132] • 抗代谢物包括但不限于：氨甲喋呤，6- 巯基嘌呤核糖核苷，巯基嘌呤，5- 氟

尿嘧啶（单独或与亚叶酸组合），替加氟，去氧氟尿苷，卡莫氟，阿糖胞苷，阿糖胞苷十八烷基磷酸钠，依诺他滨，吉西他滨，氟达拉滨，5-阿扎胞苷，卡培他滨，克拉屈滨，氯法拉滨（clofarabine），地西他滨，依氟鸟氨酸，乙炔基胞嘧啶核苷，阿糖胞苷，羟基脲，苯丙氨酸氮芥，奈拉滨（nelarabine），诺拉曲特（nolatrexed），ocfosfite，培美曲塞二钠，喷司他丁，吡利曲索（pelitrexol），雷替曲塞（raltitrexed），triapine，三甲曲沙，阿糖腺苷，长春花新碱和长春瑞宾；

[0133] • 激素治疗药剂包括但不限于：依西美坦，Lupron，阿那曲唑，度骨化醇（doxercalciferol），法屈唑，福美坦，11- β 羟甾醇脱氢酶 1 抑制剂，17- α 羟化酶 /17, 20 裂解酶抑制剂，例如乙酸阿比特龙，5- α 还原酶抑制剂，例如非那雄胺和依立雄胺，抗雌激素，例如枸橼酸它莫西芬和氟维司群，Trelstar，枸橼酸托瑞米芬，雷诺昔酚，拉索昔芬，来曲唑，抗雄激素例如比卡鲁胺，氟他胺，美服培酮，尼鲁米特，Casodex 和抗黄体酮和其联用药；

[0134] • 植物衍生的抗肿瘤物质，包括，例如，选自有丝分裂抑制剂的那些抗肿瘤物质，例如埃坡霉素，例如沙戈匹隆（sagopilone），伊沙匹隆（ixabepilone）和埃坡霉素 B，长春花碱，长春氟宁，多西他赛和太平洋紫杉醇；

[0135] • 细胞毒素拓扑异构酶抑制剂包括但不限于：阿柔比星，多柔比星，氨茶非特，贝洛替康（belotecan），喜树碱，10-羟基喜树碱，9-氨基喜树碱，二氟替康（diflomotecan），依立替康，托泊替康，伊朵堤卡林（edotecarin），表柔吡星（epimibicin），依托泊苷，依沙替康（exatecan），吉马替康，勒托替康，米托蒽醌，吡柔比星（pirambicin），匹杉琼（pixantrone），鲁比替康，索布佐生，tafluposide 和其联用药；

[0136] • 免疫药品包括干扰素，例如干扰素 α ，干扰素 α -2a，干扰素 α -2b，干扰素 β ，干扰素 γ -1a 和干扰素 γ -n1，及其它免疫提高药剂，例如 L19-IL2 及其它 IL2 衍生物，非格司亭，蘑菇多糖，sizofilan，TheraCys，乌苯美司，阿地白介素，阿仑单抗（alemtuzumab），BAM-002，达卡巴嗪，达（克）珠单抗，地尼白介素（denileukin），吉妥单抗（gemtuzumab），奥佐米星，替伊莫单抗（ibritumomab），咪喹莫特，来格司亭，蘑菇多糖，黑素瘤疫苗（Corixa），莫拉司亭，沙格司亭，他索纳明（tasonermin），tecleukin，thymalasin，托西莫单抗，Vimlizin，依帕珠单抗，米妥莫单抗（mitumomab），oregovomab，pentumomab 和 Provenge；

[0137] • 生物反应调节剂是调节生物机体的防卫机制或生物反应（例如，组织细胞的存活、生长或分化）、从而使它们具有抗肿瘤活性的药剂；这种药剂包括，例如云芝多糖 K(krestin)，蘑菇多糖，西佐喃，溶链菌制剂（picibanil），ProMune 和乌苯美司；

[0138] • 抗生成血管的化合物包括但不限于：阿维 A，阿柏西普（aflibercept），血管抑素，aplidine，asentar，阿西替尼（axitinib），贝伐单抗，brivanib alaninat，cilengtide，康普瑞汀，血管内皮抑素，芬维 A 胺（fenretinide），卤夫酮（halofuginone），帕唑帕尼（pazopanib），ranibizumab，瑞马司他（rebimastat），recentin，regorafenib，removab，revlimid，索拉非尼（sorafenib），角鲨胺（squalamine），舒尼替尼（Sunitinib），telatinib，反应停，ukrain，瓦他拉尼（vatalanib）和 vitaxin；

[0139] • 抗体包括但不限于：曲妥珠单抗，西妥昔单抗，贝伐单抗，美罗华，ticilimumab，ipilimumab，lumiliximab，catumaxomab，atacicept，oregovomab 和阿仑单抗

抗 (alemtuzumab) ;

[0140] • VEGF 抑制剂例如, 索拉非尼 (sorafenib), regorafenib, 贝伐单抗, 舒尼替尼 (Sunitinib), recentin, 阿西替尼 (axitinib), 阿柏西普 (aflibercept), telatinib, brivanib alaninate, 瓦他拉尼 (vatalanib), 帕唑帕尼 (pazopanib) 和 ranibizumab ;

[0141] • EGFR (HER1) 抑制剂, 例如, 西妥昔单抗, 帕尼单抗 (panitumumab), vectibix, 吉非替尼, 埃洛替尼和 zactima ;

[0142] • HER2 抑制剂, 例如, 拉帕替尼 (lapatinib), 物曲妥珠单抗 (trastuzumab) 和帕妥珠单抗 (Pertuzumab) ;

[0143] • mTOR 抑制剂, 例如, 西罗莫司 (temsirolimus), 西罗莫司 (Sirolimus) / 雷帕霉素和依维莫司 ;

[0144] • c-Met 抑制剂 ;

[0145] • PI3K 和 AKT 抑制剂 ;

[0146] • CDK 抑制剂, 例如, roscovitine 和夫拉平度 (flavopiridol) ;

[0147] • 纺锤体组装检测点抑制剂和靶向的抗有丝分裂药剂, 例如, PLK 抑制剂, 极光抑制剂 (例如 Hesperadin), 检测点激酶抑制剂和 KSP 抑制剂 ;

[0148] • HDAC 抑制剂, 例如, 帕比司他 (panobinostat), 伏立诺他 (vorinostat), MS275, belinostat 和 LBH589 ;

[0149] • HSP90 和 HSP70 抑制剂 ;

[0150] • 蛋白酶体抑制剂, 例如硼替佐米 (Bortezomib) 和 carfilzomib ;

[0151] • 丝氨酸 / 苏氨酸激酶抑制剂, 包括 MEK 抑制剂和 Raf 抑制剂, 例如索拉非尼 (sorafenib) ;

[0152] • 法尼基转移酶抑制剂, 例如, 替吡法尼 (tipifarnib) ;

[0153] • 酪氨酸激酶抑制剂, 包括, 例如, 达沙替尼, nilotinib, regorafenib, 博舒替尼 (bosutinib), sorafenib, 贝伐单抗, 舒尼替尼 (Sunitinib), cediranib, 阿西替尼 (axitinib), 阿柏西普 (aflibercept), telatinib, 甲磺酸伊马替尼, brivanib alaninate, 帕唑帕尼 (pazopanib), ranibizumab, 瓦他拉尼 (vatalanib), 西妥昔单抗, 帕尼单抗 (panitumumab), vectibix, 吉非替尼, 埃洛替尼, 拉帕替尼 (lapatinib), 物曲妥珠单抗 (trastuzumab), 帕妥珠单抗 (Pertuzumab) 和 c-Kit 抑制剂 ;

[0154] • 维生素 D 受体激动剂 ;

[0155] • Bcl-2 蛋白抑制剂, 例如 obatoclax, 奥利默森 (oblimersen) 钠和棉子酚 ;

[0156] • 分化抗原簇 20 受体拮抗剂, 例如, 美罗华 ;

[0157] • 核糖核苷酸还原酶抑制剂, 例如, 吉西他滨 ;

[0158] • 肿瘤坏死细胞凋亡诱导配体受体 1 激动剂, 例如, mapatumumab ;

[0159] • 5-羟色胺受体拮抗剂, 例如, rEV598, xaliprode, 盐酸帕洛诺司琼 (Palonosetron), 格拉司琼, Zindol 和 AB-1001 ;

[0160] • 整联蛋白抑制剂, 包括 alpha5-beta1 整联蛋白抑制剂, 例如, E7820, JSM 6425, volociximab 和血管内皮抑素 ;

[0161] • 雄激素受体拮抗剂, 包括, 例如, 癸酸诺龙, 氟甲睾酮, Android, Prost-aid, andromustine, 比卡鲁胺, 氟他胺, apo- 环丙孕酮, apo- 氟他胺, 氯地孕酮, 环丙氯地孕酮,

Tabi, 乙酸赛普龙和尼鲁米特;

[0162] • 芳香酶抑制剂, 例如, 阿那曲唑, 来曲唑, 睾内酯, 依西美坦, 氨鲁米特和福美坦;

[0163] • 基质金属蛋白酶抑制剂;

[0164] • 其它抗癌药剂, 包括, 例如, alitretinoin, ampligen, 阿曲生坦 (atrasentan), 贝沙罗汀 (bexarotene), bortezomib, 波生坦, 骨化三醇, 依昔舒林 (exisulind), 福莫司汀, 依班膦酸, 米特福辛, 米托蒽醌, I 门冬酰胺酶, 普鲁苳肼, 达卡巴嗪, 羟基脲, 培加帕酶, 喷司他丁, tazaroten, velcade, 硝酸镓, canfosfamide, darinaparsin 和维甲酸。

[0165] 在一个优选实施方案中, 本发明的化合物可以与化学疗法 (即细胞毒素药剂)、抗激素疗法和 / 或靶向治疗 (例如, 其它激酶抑制剂 (例如, EGFR 抑制剂), mTOR 抑制剂和血管生成抑制剂) 联用。

[0166] 本发明的化合物与放射治疗和 / 或外科手术结合, 也可以用于癌症治疗。

[0167] 此外, 式 (I) 的化合物可以原样或在组合物中用于研究和诊断, 或作为分析比照标准, 等等, 这在本领域是众所周知的。

[0168] 药物组合物和治疗方法

[0169] 在另一个方面, 本发明提供了药物组合物, 其包含上述式 (I) 的化合物以及可药用载体。

[0170] 在又另一个方面, 本发明提供了制备药物组合物的方法。该方法包括下列步骤: 将至少一种上述式 (I) 的化合物与至少一种可药用载体组合, 并将所得到的组合物变成合适的给药形式。

[0171] 式 (I) 的活性组分可以系统地和 / 或局部地起作用。为了这种目的, 可以使用合适的方式, 例如口服, 胃肠外, 肺部, 鼻部, 舌下, 向舌, 口腔内, 直肠, 透皮, 结膜, 耳部或植入物或支架形式。

[0172] 对于这些使用途径, 可以以合适的使用形式来给予式 (I) 的活性组分。

[0173] 可使用的口服形式包括: 快速释放活性组分的应用形式和 / 或改良型, 例如, 片剂 (非包衣和包衣片剂, 例如, 用肠溶衣包衣), 胶囊剂, 糖衣片剂, 颗粒剂, 小药丸, 粉剂, 乳剂, 混悬剂, 溶液剂和气雾剂。

[0174] 肠胃外给药可以在避免吸收步骤下进行 (静脉内, 动脉内, 心内, 脊柱内或管腔内), 或同时包括吸收步骤 (肌肉注射, 皮下, 皮内, 经皮或腹膜内)。使用的肠胃外给药形式包括: 溶液剂、混悬剂、乳剂、冷冻干燥剂和无菌粉剂形式的注射剂和输液剂。

[0175] 适合于其它给药途径的形式包括, 例如, 吸入药物形式 (包括粉剂吸入器、雾化器), 滴鼻剂, 溶液剂或喷雾剂, 向舌、舌下或口腔内给药的片剂或胶囊剂, 栓剂, 耳用和眼用制剂, 阴道胶囊剂, 水悬剂 (洗剂, 摇动混合物), 亲脂性的混悬剂, 软膏剂, 乳膏剂, 乳剂, 膏剂, 扑粉, 植入物或支架。

[0176] 在一个优选实施方案中, 提供了适合于口服形式的包含上述式 (I) 化合物的药物组合物。在另一个优选实施方案中, 提供了适合于静脉内给药形式的包含上述式 (I) 化合物的药物组合物。

[0177] 用本身已知的方式, 式 (I) 的活性组分可以转变为所列举的用药形式。这使用惰性无毒的、药学合适的赋形剂来进行。这些尤其包括载体 (例如微晶纤维素), 溶剂 (例如液体聚乙二醇), 乳化剂 (例如十二烷基硫酸钠), 分散剂 (例如聚乙烯吡咯烷酮), 合成和

天然生物聚合物（例如白蛋白），稳定剂（例如抗氧化剂，例如抗坏血酸），着色剂（例如无机颜料，例如铁氧化物或味道和 / 或气味矫正剂）。

[0178] 在另一个实施方案中，本发明提供了在需要这种治疗的患者中治疗细胞增殖病症的方法，该方法包括：给予患者有效量的上述式 (I) 的化合物。在某些实施方案中，细胞增殖病症是癌症。

[0179] 在又另一个方面，本发明提供了上述式 (I) 化合物用于制备药物组合物的用途，该药物组合物用于治疗或预防细胞增殖病症。在某些实施方案中，细胞增殖病症是癌症。

[0180] 当作为药物给予人和动物本发明的化合物时，可以给予本发明化合物本身或以药物组合物形式给予，药物组合物含有例如 0.1 至 99.5%（更优选，0.5 至 90%）活性组分与可药用载体组合。

[0181] 无论所选择的给药途径如何，利用本领域技术人员已知的常规方法，将本发明的化合物（可以使用合适的水合物形式）和 / 或本发明的药物组合物配制为可药用剂型。

[0182] 给予活性组分（在本发明的药物组合物中）的实际剂量水平和时程可以变化，以便获得可有效实现对具体患者、组合物和给药模式的目标治疗响应的活性组分数量，同时对患者不产生毒性。示范性的剂量范围是每天 0.01 至 100 mg/kg，或每天 0.1 至 150 mg/kg。

[0183] 在某些实施方案中，本发明的化合物可以在与常规癌症化疗药物的组合治疗中使用。白血病和其它肿瘤的常规治疗方案包括辐射、药物或两者相结合的方法。

[0184] 作为本领域技术人员，医生或兽医（“护理临床医师”）通过利用已知的技术和通过在类似情况下观察到的效果，可以容易地确定本发明化合物的治疗有效抗增殖数量或预防有效抗增殖数量。根据在护理临床医师的判断下的患者的要求、所治疗病症的严重程度和所使用的具体化合物，剂量可以变化。在确定治疗有效抗增殖数量或剂量和预防有效抗增殖数量或剂量的过程中，护理临床医师会考虑许多因素，包括但不限于：所涉及的具体细胞增殖病症；具体药剂的药效特征和其给药模式和给药途径；治疗的目标时程；哺乳动物的种类；其大小、年龄和常规健康情况；所涉及的具体疾病；疾病的程度或复杂情况或严重程度；个体患者的响应；给予的具体化合物；给药模式；所给予制剂的生物利用率特性；选择的剂量方案；并行治疗的类型（即，本发明化合物与其它共同给予的治疗的相互作用）；及其它相关的情况。

[0185] 可以用较小剂量开始治疗，这种剂量小于化合物的最佳剂量。而后，可以通过少量增加来提高剂量，直到在这种情况下达到最佳效果为止。如果需要的话，为方便起见，可以将总的日剂量分开，并在一天期间内分为几份给予。可以预计，本发明化合物的治疗有效抗增殖数量和预防有效抗增殖数量在大约每天每公斤体重 0.01 毫克 (mg/kg/天) 至大约 100 mg/kg/天之间变化。

[0186] 对于本发明来说，本发明化合物的优选剂量是患者能够忍受并且不会形成严重副作用的最大剂量。举例说明，本发明化合物的给药剂量为大约 0.01 mg/kg 至大约 100 mg/kg 体重，大约 0.01 mg/kg 至大约 10 mg/kg 体重，或大约 0.1 mg/kg 至大约 10 mg/kg 体重。上面所列举数值的中间范围也是本发明的一部分。

[0187] 在后面的试验和实施例中，百分比按重量计算，除非另作说明；份数按重量计算。报道液体 / 液体溶液的溶剂比例、稀释率和浓度各自基于体积计算。

[0188]	A.	实施例
[0189]		缩写和简称：
[0190]	Ac	乙酰基
[0191]	aq.	水（溶液）
[0192]	br. s	宽单峰（NMR）
[0193]	cat.	催化剂量
[0194]	conc.	浓缩的
[0195]	d	双峰（NMR）
[0196]	DCI	直接化学电离（MS）
[0197]	dd	双二重峰（NMR）
[0198]	DMF	<i>N,N</i> -二甲基甲酰胺
[0199]	DMSO	二甲亚砜
[0200]	DMSO-d ₆	二甲亚砜 -d ₆
[0201]	ee	对映体过量
[0202]	EI	电子碰撞电离（MS）
[0203]	equiv.	当量
[0204]	ESI	电喷雾电离（MS）
[0205]	Et	乙基
[0206]	GC-MS	气相色谱连接的质谱
[0207]	h	小时
[0208]	¹ H-NMR	质子核磁共振波谱
[0209]	HOAc	乙酸
[0210]	HPLC	高效 / 高压液相色谱
[0211]	LC-MS	液相色谱连接的质谱
[0212]	m	多重峰（NMR）
[0213]	Me	甲基
[0214]	min	分钟
[0215]	MS	质谱
[0216]	m/z	质荷比
[0217]	NMP	<i>N</i> -甲基吡咯烷-2-酮
[0218]	of th.	理论产率（化学产率）
[0219]	q	四重峰（NMR）
[0220]	quin	五重峰（NMR）
[0221]	R _f	TLC 保持系数
[0222]	RP	反相（HPLC）
[0223]	rt	室温
[0224]	R _t	保留时间（HPLC）
[0225]	s	单峰（NMR）
[0226]	TBAF	四正丁基氟化铵

[0227]	tBu	叔丁基
[0228]	TFA	三氟乙酸
[0229]	THF	四氢呋喃
[0230]	TLC	薄层色谱
[0231]	t	三重峰 (NMR)
[0232]	v/v	体积 - 体积比例
[0233]	w/v	重量体积比
[0234]	w/w	重量 - 重量比。

[0235] LC-MS 和 GC-MS 方法：

[0236] 方法 1 (LC-MS)：

[0237] 仪器：Micromass ZQ-HPLC Waters Alliance 2795；柱：Phenomenex Synergi 2.5 μ MAX-RP 100A Mercury, 20 mm x 4 mm；洗脱液 A：1 L 水 + 0.5 mL 50% 甲酸，洗脱液 B：1 L 乙腈 + 0.5 mL 50% 甲酸；梯度：0.0 min, 90% A $\rightarrow$ 0.1 min 90% A $\rightarrow$ 3.0 min 5% A $\rightarrow$ 4.0 min 5% A $\rightarrow$ 4.01 min 90% A；流速：2 mL/min；炉温：50 $^{\circ}$ C；UV 检测：210 nm。

[0238] 方法 2 (LC-MS)：

[0239] 仪器：Micromass Quattro Premier-HPLC Waters UPLC Acquity；柱：Thermo Hypersil GOLD 1.9 μ , 50 mm x 1 mm；洗脱液 A：1 L 水 + 0.5 mL 50% 甲酸，洗脱液 B：1 L 乙腈 + 0.5 mL 50% 甲酸；梯度：0.0 min 90% A $\rightarrow$ 0.1 min 90% A $\rightarrow$ 1.5 min 10% A $\rightarrow$ 2.2 min 10% A；炉温：50 $^{\circ}$ C；流速：0.33 mL/min；UV 检测：210 nm。

[0240] 方法 3 (LC-MS)：

[0241] 仪器：Micromass Quattro Micro-HPLC Agilent 1100 Series；柱：Thermo Hypersil GOLD 3 μ , 20 mm x 4 mm；洗脱液 A：1 L 水 + 0.5 mL 50% 甲酸，洗脱液 B：1 L 乙腈 + 0.5 mL 50% 甲酸；梯度：0.0 min 100% A $\rightarrow$ 3.0 min 10% A $\rightarrow$ 4.0 min 10% A $\rightarrow$ 4.01 min 100% A (流速 2.5 mL/min) $\rightarrow$ 5.00 min 100% A；炉温：50 $^{\circ}$ C；流速：2 mL/min；UV 检测：210 nm。

[0242] 方法 4 (LC-MS)：

[0243] 仪器：Waters Acquity SQD UPLC 系统；柱：Waters Acquity UPLC HSS T3 1.8 μ , 50 mm x 1 mm；洗脱液 A：1 L 水 + 0.25 mL 99% 甲酸，洗脱液 B：1 L 乙腈 + 0.25 mL 99% 甲酸；梯度：0.0 min 90% A $\rightarrow$ 1.2 min 5% A $\rightarrow$ 2.0 min 5% A；炉温：50 $^{\circ}$ C；流速：0.40 mL/min；UV 检测：210-400 nm。

[0244] 方法 5 (GC-MS)：

[0245] 仪器：Micromass GCT, GC 6890；柱：Restek RTX-35, 15 m x 200 μ m x 0.33 μ m；氦气恒定流速：0.88 mL/min；炉温：70 $^{\circ}$ C；入口：250 $^{\circ}$ C；梯度：70 $^{\circ}$ C, 30 $^{\circ}$ C / min $\rightarrow$ 310 $^{\circ}$ C (保持 3 min)。

[0246] 方法 6 (LC-MS)：

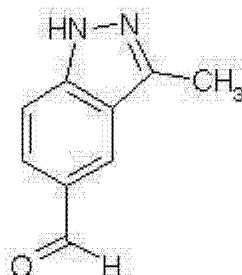
[0247] 仪器：Waters ZQ-HPLC Agilent 1100 Series；UV DAD；柱：Thermo Hypersil GOLD 3 μ , 20mmx4mm；洗脱液 A：1L 水 + 0.5mL 50% 甲酸，洗脱液 B：1 L 乙腈 + 0.5mL 50% 甲酸；梯度：0.0 min 100% A $\rightarrow$ 3.0min 10% A $\rightarrow$ 4.0min 10% A $\rightarrow$ 4.1min 100% A (流速 2.5mL/min)；炉温：55 $^{\circ}$ C；流速：2mL/min；UV 检测：210nm。

[0248] 起始原料和中间体：

[0249] 实施例 1A

[0250] 3- 甲基 -1H- 吡唑 -5- 甲醛

[0251]



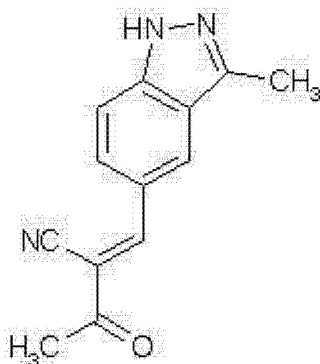
[0252] 在氩气氛中,将四氢呋喃 (600 mL) 冷却至 -78°C 。在此温度下,逐滴加入 1.7 M 叔丁基锂的正戊烷溶液 (200 mL)。在 -78°C 经过 15 分钟之后,逐滴加入 22.4 g (106.1 mmol) 5- 溴 -3- 甲基 -1H- 吡唑的 THF (300 mL) 溶液,加入速率应该使溶液的温度不超过 -70°C 。搅拌该混合物 30 分钟,而后逐滴加入 N, N- 二甲基甲酰胺 (24.5 mL)。20 分钟之后,除去冷却浴,继续搅拌 1 小时,而后小心地加入水 (250 mL)。将该混合物用乙酸乙酯 (500 mL) 提取若干次。将合并的有机层用饱和氯化钠水溶液洗涤,用硫酸钠干燥,减压浓缩,得到 18.5 g 粗品 3- 甲基 -1H- 吡唑 -5- 甲醛,其不用进一步纯化就在下一步中使用。

[0253] $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$): δ = 13.13 (br. s, 1H), 10.01 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 7.81 (d, 1H), 7.58 (d, 1H), 2.56 (s, 3H) ppm。

[0254] 实施例 2A

[0255] (2E)-2-[(3- 甲基 -1H- 吡唑 -5- 基) 亚甲基]-3- 氧代丁腈

[0256]



[0257] 将 5.0 g (31.2 mmol) 3- 甲基 -1H- 吡唑 -5- 甲醛 (实施例 1A)、3.61 g (34.3 mmol) (1Z)-1- 氰基丙 -1- 烯 -2- 醇化钠、2.23 mL (39 mmol) 乙酸和 0.31 mL (3.12 mmol) 哌啶在含有 4Å 分子筛的无水二氯甲烷 (250 mL) 中的混合物回流搅拌 12 小时。冷却时,形成沉淀,过滤收集沉淀,并用饱和碳酸氢钠水溶液和水洗涤。将固体溶于乙醇中,并将分子筛滤出。减压浓缩滤液,并将残余物用乙酸乙酯和饱和碳酸钠水溶液处理。用水洗涤有机层,干燥,减压浓缩,得到标题化合物 (3.5 g, 理论值的 50%) 浅黄色固体,其不用进一步纯化就在下一步中使用。

[0258] LC-MS (方法 1): R_t = 1.32 min; MS (ESIpos): m/z = 226 ($M+H$) $^{+}$

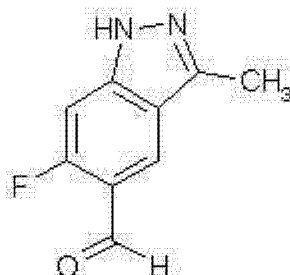
[0259] $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 13.18 (br. s, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.49 (s,

1H), 8.19(d, 1H), 7.69(d, 1H), 2.55(br. m, 6H)ppm。

[0260] 实施例 3A

[0261] 6- 氟 -3- 甲基 -1H- 吡唑 -5- 甲醛

[0262]



[0263] 将 30 g(131 mmol)5- 溴 -6- 氟 -3- 甲基 -1H- 吡唑 [W0 2005/085227-A1 中的实施例 104 c 所描述的制剂);也可商购 CAS Reg.-No.864773-66-0] 的 THF(525 ml) 溶液冷却至 -45℃。在 -45℃,逐滴加入甲基氯化镁的 THF 溶液(3 M;50.2 ml,151 mmol),并将得到的溶液在此温度下搅拌 40 分钟。使用计量泵,加入 253 ml(354 mmol)2- 丁基锂溶液(1.4 M,在环己烷中),使得温度不超过 -40℃。将得到的混合物在 -40℃搅拌 30 分钟,而后逐滴加入 30.2 ml(393 mmol)N,N-二甲基甲酰胺,并使温度保持在 -40℃。将得到的混合物在 -40℃搅拌 30 分钟,然后升至室温,并慢慢地倒入冷却至 5℃(冰-水浴)的 2.8L 体积的 2N 盐酸中。将该混合物用乙酸乙酯提取若干次。将合并的有机层用盐水洗涤,用硫酸钠干燥,过滤,减压浓缩。将残余物溶于二氯甲烷中,用硅胶色谱纯化(洗脱液:戊烷/乙酸乙酯 6:4 v/v),得到 19.6 g(理论值的 78%)标题化合物浅黄色固体。

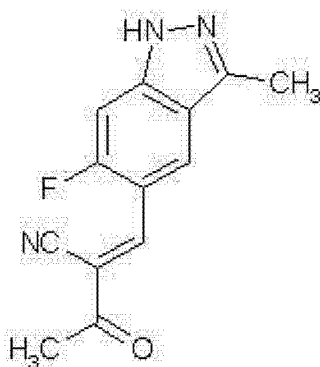
[0264] MS(ESIpos): m/z=179(M+H)⁺

[0265] ¹H-NMR(400 MHz, DMSO-d₆): δ=13.14(s, 1H), 10.17(s, 1H), 8.33(d, 1H), 7.37(d, 1H), 2.54(s, 3H)ppm。

[0266] 实施例 4A

[0267] (2E)-2-[(6- 氟 -3- 甲基 -1H- 吡唑 -5- 基)亚甲基]-3- 氧代丁腈

[0268]

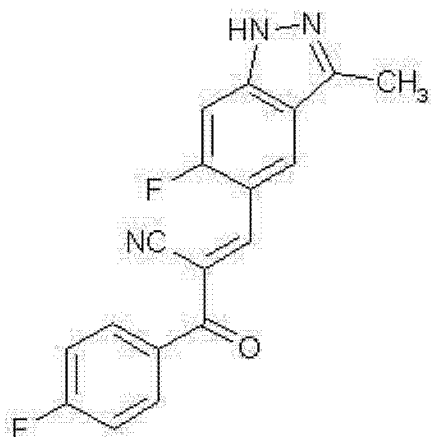


[0269] 按照实施例 2A 所描述的方法,使用 2.74 g(15.5 mmol)6- 氟 -3- 甲基 -1H- 吡唑 -5- 甲醛(实施例 3A)和 2.6 g(24.8 mmol)(1Z)-1- 氰基丙 -1- 烯 -2- 醇化钠,得到 1.6 g(理论值的 42%)粗品,其不用进一步纯化就在下一步中使用。

[0270] LC-MS(方法 4): R_t=0.83 min; MS(ESIpos): m/z=244(M+H)⁺。

[0271] 实施例 5A

[0272] (2E)-3-(6-氟-3-甲基-1H-吡唑-5-基)-2-[(4-氟苯基)羰基]丙-2-烯腈
[0273]

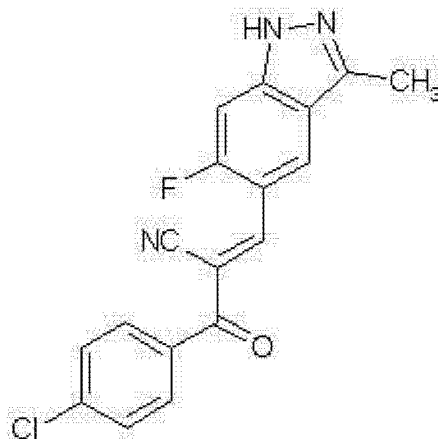


[0274] 按照实施例 2A 所描述的方法,使用 500 mg (2.81 mmol) 6-氟-3-甲基-1H-吡唑-5-甲醛 (实施例 3A) 和 504 mg (3.09 mmol) 3-(4-氟苯基)-3-氧代丙腈,得到 768 mg (理论值的 69%) 粗品 (纯度 81%),其不用进一步纯化就在下一步中使用。

[0275] LC-MS (方法 6): $R_t=2.24$ min; MS (ESIpos): $m/z=324$ (M+H)⁺。

[0276] 实施例 6A

[0277] (2E)-2-[(4-氯苯基)羰基]-3-(6-氟-3-甲基-1H-吡唑-5-基)丙-2-烯腈
[0278]



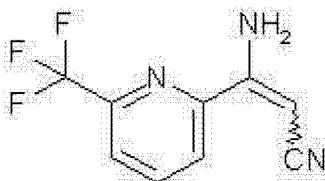
[0279] 按照实施例 2A 所描述的方法,使用 500 mg (2.81 mmol) 6-氟-3-甲基-1H-吡唑-5-甲醛 (实施例 3A) 和 566 mg (3.09 mmol) 3-(4-氯苯基)-3-氧代丙腈,得到 830 mg (理论值的 66%) 粗品 (纯度 76%),其不用进一步纯化就在下一步中使用。

[0280] LC-MS (方法 6): $R_t=2.39$ min; MS (ESIpos): $m/z=340$ (M+H)⁺。

[0281] 实施例 7A

[0282] 3-氨基-3-[6-(三氟甲基)吡啶-2-基]丙-2-烯腈

[0283]



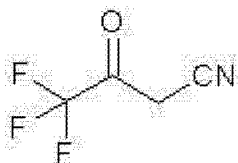
[0284] 在惰性气氛中,将 2.08 mL (13.07 mmol) 二异丙胺的无水 THF (12 mL) 溶液冷却至 -70°C ,并逐滴加入 9.26 mL (14.8 mmol) 正丁基锂溶液 (1.6M, 在己烷中)。然后,用 10 min 慢慢地加入 688 μl (13.07 mmol) 乙腈的无水 THF (10 mL) 溶液。将得到的溶液在 -70°C 进一步搅拌 30 min,而后加入 1.50 g (8.72 mmol) 6-(三氟甲基)吡啶-2-腈的无水 THF (10 mL) 溶液。将该混合物升至室温,搅拌 12 小时,而后慢慢地加入水 (200 mL)。将该混合物用二氯甲烷 (100 mL) 提取若干次。用硫酸钠干燥合并的有机层,减压浓缩,得到 1.2 g (理论值的 57%) 粗品标题化合物 (纯度 89%),其不用进一步纯化就在下一步中使用。

[0285] LC-MS (方法 4): $R_t=0.88$ min; MS(EIpos): $m/z=214$ (M+H)⁺。

[0286] 实施例 8A

[0287] 4,4,4-三氟-3-氧代丁腈

[0288]



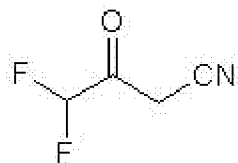
[0289] 向直火烘干的烧瓶中,在惰性气氛下,加入 20 mL (32 mmol) 正丁基锂溶液 (1.6 M, 在己烷中) (在无水 THF (100 mL) 中),并冷却至 -78°C 。紧接着,慢慢地加入 1.47 mL (28 mmol) 乙腈,并将得到的混合物在 -74°C 搅拌 1 小时。然后,用 5 分钟慢慢地加入 2.28 mL (20 mmol) 三氟乙酸乙酯,并保持温度低于 -69°C 。在 -45°C 搅拌该反应混合物 2 小时,而后通过加入盐酸 (2M, 9.6 mL) 来猝灭,同时保持温度低于 -20°C 。将得到的澄清溶液升温至室温,而后减压浓缩。将残留的水浆液用二乙醚 (100 mL 份额) 提取若干次,并将合并的有机层用硫酸钠干燥,减压浓缩,得到 4.25 g (理论值的 84%) 粗品标题化合物 (纯度 54%),其不用进一步纯化就在下一步中使用。

[0290] GC-MS (方法 5): $R_t=1.05$ min; MS(EIpos): $m/z=137$ (M)⁺。

[0291] 实施例 9A

[0292] 4,4-二氟-3-氧代丁腈

[0293]



[0294] 向直火烘干的烧瓶中,在惰性气氛下,加入 3.8 mL (6.1 mmol) 正丁基锂溶液 (1.6M, 在己烷中) (在无水 THF (19 mL) 中),并冷却至 -78°C 。紧接着,慢慢地加入 0.28 mL (5.3 mmol) 乙腈,并将得到的混合物在 -70°C 搅拌 1 小时。然后,用 5 分钟慢慢地加入 0.40 mL (3.8 mmol) 二氟乙酸乙酯,并保持温度低于 -69°C 。在 -45°C 搅拌该反应混合物 2 小时,而后通过加入盐酸 (2M, 4.8 mL) 来猝灭,同时保持温度低于 -20°C 。将得到的澄清溶液升至室温,而后减压浓缩。将由此获得的粗品 (1.0 g, 46% 纯度, 理论值的 99%) 在 -21°C 储存,并且不用进一步纯化就可在下一步中使用。

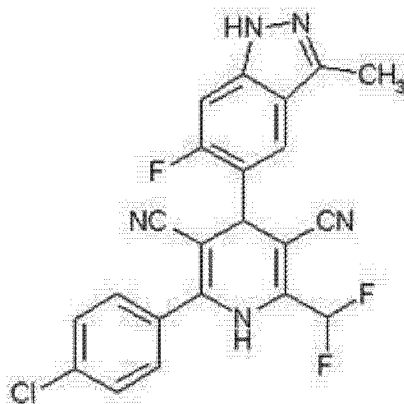
[0295] GC-MS (方法 5): $R_t=1.49$ min; MS(EIpos): $m/z=119$ (M)⁺。

[0296] 制备实施例:

[0297] 实施例 1

[0298] 2-(4-氯苯基)-6-(二氟甲基)-4-(6-氟-3-甲基-1H-吡唑-5-基)-1,4-二氢吡啶-3,5-二腈

[0299]



[0300] 将 200 mg (0.542 mmol) (2E)-2-(4-氯苯甲酰基)-3-(6-氟-3-甲基-1H-吡唑-5-基)丙-2-烯腈 (实施例 6A) 和 66 mg (0.542 mmol) 3-氨基-4,4-二氟丁-2-烯腈 [可通过乙腈与 2,2-二氟乙腈的 Thorpe 反应获得, 参见 *Org. React.* 15,1(1967), *ibid.* 31, 1(1984)] 的混合物在 2-丙醇 (1 mL) 中回流搅拌 12 小时。然后, 加入乙酸 (1.5 mL), 并继续回流搅拌 6 小时。一旦冷却, 减压浓缩该混合物, 用制备 RP-HPLC 直接纯化残余物 (甲醇 / 水 +0.1% TFA 梯度, 最终混合物 80:20 v/v), 得到 33 mg (理论值的 14%) 外消旋的标题化合物。

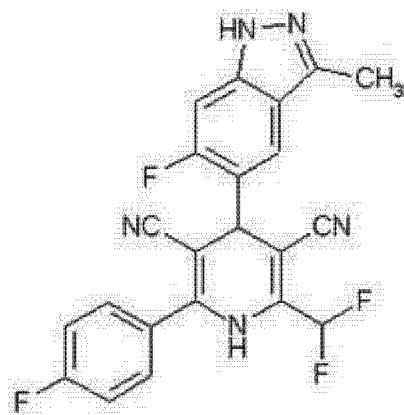
[0301] LC-MS (方法 2): $R_t=1.14$ min; MS(ESIpos): $m/z=440$ (M+H)⁺

[0302] ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): $\delta=12.86$ (br. s, 1H), 10.46 (s, 1H), 7.79 (d, 1H), 7.63-7.55 (m, 4H), 7.38 (d, 1H), 6.79 (t, 1H, ²J_{H,F}=51.8 Hz), 5.09 (s, 1H), 2.54 (s, 3H) ppm。

[0303] 实施例 2

[0304] 2-(二氟甲基)-4-(6-氟-3-甲基-1H-吡唑-5-基)-6-(4-氟苯基)-1,4-二氢吡啶-3,5-二腈

[0305]



[0306] 将 200 mg (0.569 mmol) (2E)-2-(4-氟苯甲酰基)-3-(6-氟-3-甲基-1H-吡唑-5-基)丙-2-烯腈 (实施例 5A) 和 69 mg (0.569 mmol) 3-氨基-4,4-二氟丁-2-烯腈

[可通过乙腈与 2,2-二氟乙腈的 Thorpe 反应获得,参见 *Org. React.* 15,1(1967), *ibid.* 31,1(1984)] 的混合物在 2-丙醇 (1 mL) 中回流搅拌 12 小时。然后,加入乙酸 (1.5 mL),并继续回流搅拌 6 小时。一旦冷却,减压浓缩该混合物,用制备 RP-HPLC 直接纯化残余物 (甲醇/水 +0.1% TFA 梯度,最终混合物 80:20 v/v),得到 36 mg (理论值的 15%) 外消旋的标题化合物。

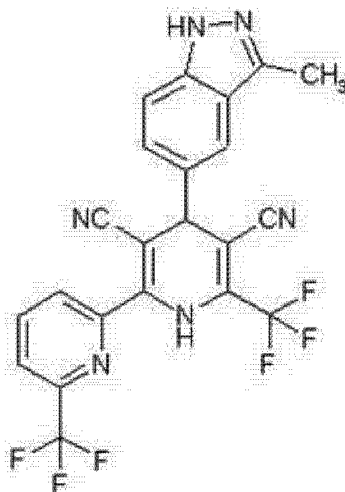
[0307] LC-MS (方法 4): $R_t=0.97$ min; MS(ESIpos): $m/z=424$ (M+H)⁺

[0308] ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): $\delta=12.87$ (br. s, 1H), 10.44 (s, 1H), 7.78 (d, 1H), 7.61 (m, 2H), 7.41-7.35 (m, 3H), 6.79 (t, 1H, ²J_{H,F}=51.8 Hz), 5.08 (s, 1H), 2.54 (s, 3H) ppm。

[0309] 实施例 3

[0310] 4-(3-甲基-1H-吡唑-5-基)-6,6'-二(三氟甲基)-1,4-二氢-2,2'-联吡啶-3,5-二腈

[0311]



[0312] 将含有粉末 4Å 分子筛的 150 mg (0.936 mmol) 3-甲基-1H-吡唑-5-甲醛 (实施例 1A) 的正戊醇 (4 mL) 溶液用 128 mg (0.936 mmol) 4,4,4-三氟-3-氧代丁腈 (实施例 8A) 处理,并在 130°C 下搅拌 1 小时。然后,加入 94 mg (0.44 mmol) 3-氨基-3-[6-(三氟甲基)吡啶-2-基]丙-2-烯腈 (实施例 7A) 和乙酸 (1.2 mL),并将该混合物在 130°C 下进一步搅拌 15 min。一旦冷却,加入水 (6 mL),过滤该混合物,并将滤液减压浓缩。将残余物溶于乙酸乙酯 (30 mL) 中,并将溶液用盐水洗涤若干次,然后用水洗涤,用硫酸钠干燥,减压浓缩。将残余物溶于含有 4Å 分子筛的 THF (1 mL) 中。加入四正丁基氟化铵 (TBAF, 1N, 在 THF 中, 1.5 mL),并将该混合物在 70°C 下搅拌 5 小时。一旦冷却,减压浓缩该混合物,最后用制备 RP-HPLC 纯化粗品 (甲醇/水 +0.1% TFA 梯度),得到 15 mg (理论值的 7%) 外消旋的标题化合物。

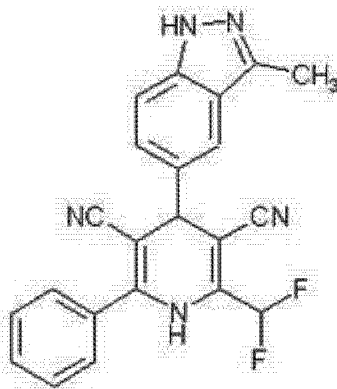
[0313] LC-MS (方法 2): $R_t=1.23$ min; MS(ESIpos): $m/z=475$ (M+H)⁺

[0314] ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): $\delta=12.80$ (br. s, 1H), 10.70 (s, 1H), 8.32 (t, 1H), 8.10 (m, 2H), 7.74 (s, 1H), 7.61 (d, 1H), 7.44 (dd, 1H), 5.03 (s, 1H), 2.50 (s, 3H) ppm。

[0315] 实施例 4

[0316] 2-(二氟甲基)-4-(3-甲基-1H-吡唑-5-基)-6-苯基-1,4-二氢吡啶-3,5-二腈

[0317]



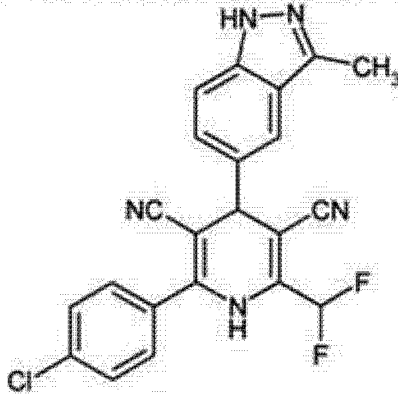
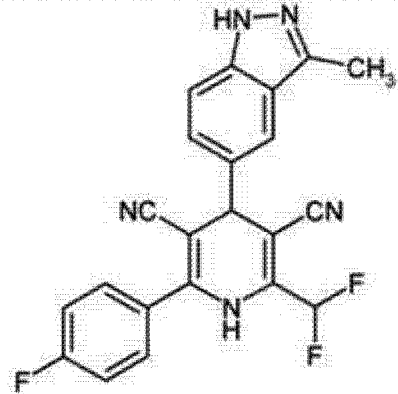
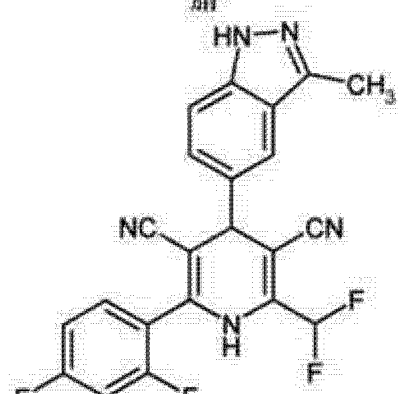
[0318] 将 200 mg (1.25 mmol) 3-甲基-1H-吡唑-5-甲醛 (实施例 1A)、217 mg (1.50 mmol) 3-氧代-3-苯基丙腈和 147 mg (1.25 mmol) 3-氨基-4,4-二氟丁-2-烯腈 [可通过乙腈与 2,2-二氟乙腈的 Thorpe 反应获得, 参见 *Org. React.* 15,1(1967), *ibid.* 31,1(1984)] 的混合物在含有粉末 4Å 分子筛的 1-戊醇 (1.2 ml) 中加热至 105°C 过夜。冷却后, 用乙腈稀释该反应混合物, 用制备 RP-HPLC 直接纯化 (乙腈 / 水 +0.1% TFA 梯度), 而后用硅胶色谱纯化 (洗脱液: 甲苯 / 二氯甲烷 / 甲醇, 10:5:1, v/v) 得到 93 mg (理论值的 19%) 外消旋的标题化合物。

[0319] LC-MS (方法 4): $R_t=0.93$ min; MS (ESIpos): $m/z=388$ (M+H)⁺

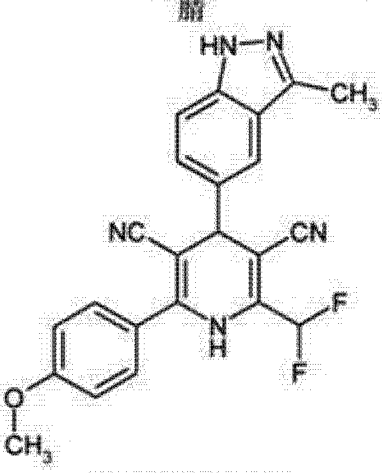
[0320] ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): $\delta=12.78$ (s, 1H), 10.38 (s, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.60-7.49 (m, 6H), 7.40 (d, 1H), 6.78 (t, 1H, ²J_{H,F}=52 Hz), 4.83 (s, 1H), 2.48 (s, 3H) ppm。

[0321] 按照类似于实施例 4 所描述的方法制备下列化合物; 通过制备 RP-HPLC 进行纯化, 使用甲醇 / 水 +0.1% TFA 梯度, 而后用硅胶色谱纯化 (洗脱液: 甲苯 / 二氯甲烷 / 甲醇, 10:10:1, v/v) :

[0322]

实施例	名称/结构(产率)	分析数据
5	2-(4-氯苯基)-6-(二氟甲基)-4-(3-甲基-1H-吡唑-5-基)-1,4-二氢吡啶-3,5-二腈  (理论值的 17%)	LC-MS (方法 4): $R_t=1.01$ min; $m/z=422(M+H)^+$ 1H-NMR(400 MHz, DMSO-d_6): $\delta=12.78$(s, 1H), 10.41(s, 1H), 7.68(s, 1H), 7.65-7.56(m, 5H), 7.40(d, 1H), 6.79(t, 1H, $^2J_{H,F}=52$ Hz), 4.86(s, 1H), 2.49(s, 3H)ppm.
6	2-(二氟甲基)-6-(4-氟苯基)-4-(3-甲基-1H-吡唑-5-基)-1,4-二氢吡啶-3,5-二腈  (理论值的 13%)	LC-MS (方法 4): $R_t=0.94$ min; $m/z=406(M+H)^+$ 1H-NMR(400 MHz, DMSO-d_6): $\delta=12.76$(s, 1H), 10.38(s, 1H), 7.69-7.56(m, 4H), 7.43-7.34(m, 3H), 6.79(t, 1H, $^2J_{H,F}=52$ Hz), 4.85(s, 1H), 2.49(s, 3H)ppm.
7	2-(二氟甲基)-6-(2,4-二氟苯基)-4-(3-甲基-1H-吡唑-5-基)-1,4-二氢吡啶-3,5-二腈  (理论值的 8%)¹	LC-MS (方法 4): $R_t=0.96$ min; $m/z=424(M+H)^+$ 1H-NMR(400 MHz, DMSO-d_6): $\delta=12.79$(s, 1H), 10.43(s, 1H), 7.69(s, 1H), 7.58(d, 1H), 7.56-7.36(m, 4H), 6.79(t, 1H, $^2J_{H,F}=52$ Hz), 4.88(s, 1H), 2.49(s, 3H)ppm.

[0323]

8	2-(二氟甲基)-6-(4-甲氧基苯基)-4-(3-甲基-1H-吲唑-5-基)-1,4-二氢吡啶-3,5-二腈  (理论值的 8%)²	LC-MS (方法 4): $R_t=0.96$ min; $m/z=418(M+H)^+$ 1H-NMR(400 MHz, DMSO-d_6): $\delta=12.76(s, 1H), 10.28(s, 1H), 7.64(s, 1H), 7.58(d, 1H), 7.50(d, 2H), 7.39(d, 1H), 7.08(d, 2H), 6.78(t, 1H, {}^2J_{H,F}=52$ Hz), 4.80(s, 1H), 3.81(s, 3H), 2.49(s, 3H)ppm.
---	---	---

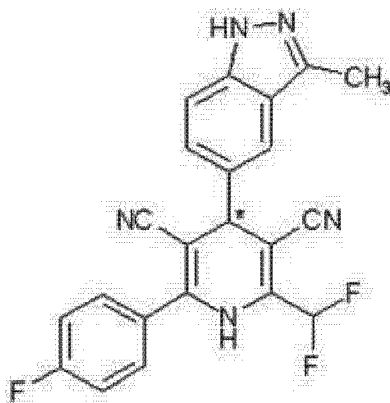
[0324] ¹⁾ 进行硅胶色谱,使用甲苯 / 二氯甲烷 / 甲醇 (10:10:0.5, v/v) 作为洗脱液;

[0325] ²⁾ 用制备 RP-HPLC 进行初始纯化,使用甲醇 / 水 +0.1% TFA 梯度,而后首先用硅胶色谱进一步纯化 (洗脱液: 甲苯 / 二氯甲烷 / 甲醇, 10:10:0.5, v/v), 其次用制备 Rp-HPLC 纯化 [柱: Sunfire C18 OBD, 5 μ m, 19 mm x 150 mm; 洗脱液: 水 / 甲醇 (60:40 $\rightarrow$ 0:100, v/v) 梯度; 流速: 25 ml/min; 温度: 40 $^{\circ}$ C; UV 检测: 254 nm]。

[0326] 实施例 9 和实施例 10

[0327] 2-(二氟甲基)-6-(4-氟苯基)-4-(3-甲基-1H-吲唑-5-基)-1,4-二氢吡啶-3,5-二腈 (对映体 1 和 2)

[0328]



[0329] 用手性相 HPLC 色谱 [柱: Daicel Chiralpak AD-H, 5 μ m, 250 mm x 20 mm; 洗脱液: 异己烷 / 乙醇, 80:20, v/v; 流速: 15 ml/min; 温度: 30 $^{\circ}$ C; UV 检测: 220 nm] 将实施例 6 的外消旋化合物 (60 mg) 分离为对映体:

[0330] 实施例 9 (对映体 1):

[0331] 产率: 25 mg (>99% ee)

[0332] $R_t=4.88$ min [柱: Daicel Chiralcel AD-H, 5 μ m, 250 mm x 4.6 mm; 洗脱液: 异己烷 / 乙醇 (80:20) + 0.2% 二乙胺; 流速: 1 ml/min; 温度: 30 $^{\circ}$ C; UV 检测: 235 nm]。

[0333] 实施例 10 (对映体 2):

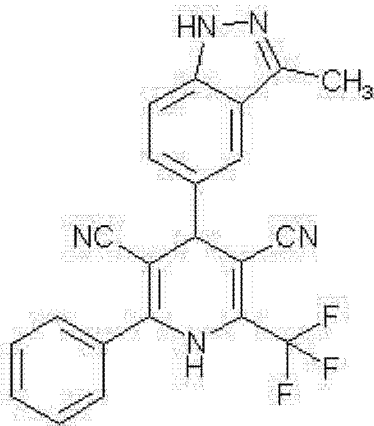
[0334] 产率：26 mg(>99% ee)

[0335] $R_t=6.03$ min[柱：Daicel Chiralcel AD-H, 5 μ m, 250 mm x 4.6 mm;洗脱液：异己烷/乙醇(80:20)+0.2%二乙胺;流速：1 ml/min;温度：30℃;UV检测：235 nm]。

[0336] 实施例 11

[0337] 4-(3-甲基-1H-吡唑-5-基)-2-苯基-6-(三氟甲基)-1,4-二氢吡啶-3,5-二腈

[0338]



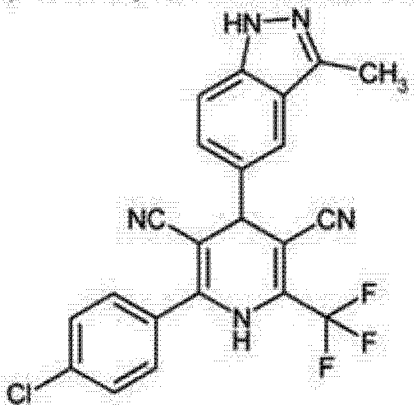
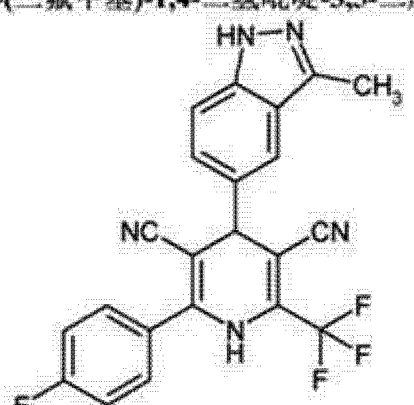
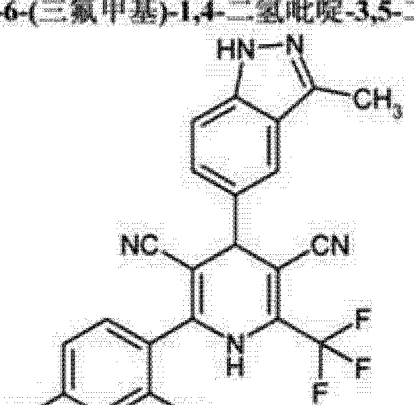
[0339] 将 300 mg(1.87 mmol)3-甲基-1H-吡唑-5-甲醛(实施例 1A)、272 mg(1.87 mmol)3-氧代-3-苯基丙腈和 1019 mg(7.49 mmol)3-氨基-4,4,4-三氟丁-2-烯腈[制备：A. W. Lutz, 美国专利 3,635,977;C. G. Krespan, *J. Org. Chem.* **34**,42(1969)]在含有粉末 4Å 分子筛的 1-戊醇(1.9 ml)中的混合物加热至 105℃过夜。冷却后,用乙腈稀释该反应混合物,用制备 RP-HPLC 直接纯化(乙腈/水+0.1% TFA 梯度),得到 285 mg(理论值的 37%)外消旋的标题化合物。

[0340] LC-MS(方法 4): $R_t=0.99$ min; MS(ESIpos): $m/z=406$ (M+H)⁺

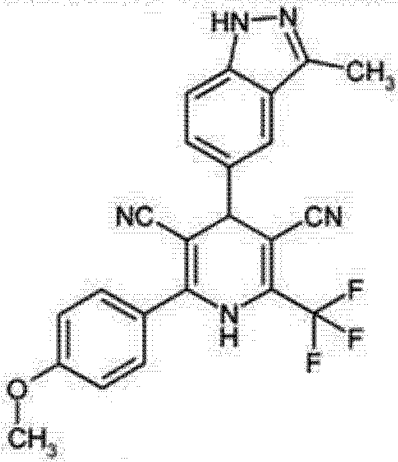
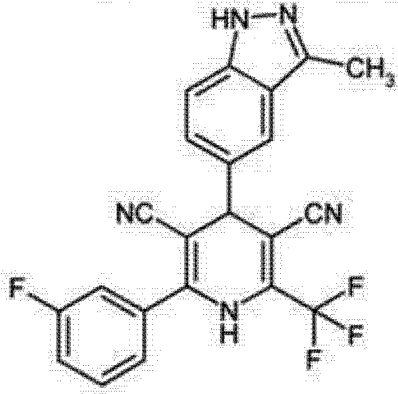
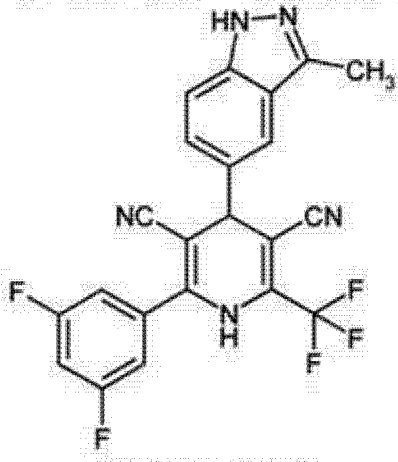
[0341] ¹H-NMR(400 MHz, DMSO-d₆): $\delta=12.80$ (br. s, 1H), 10.68(s, 1H), 7.70(s, 1H), 7.62-7.50(m, 6H), 7.42(d, 1H), 4.92(s, 1H), 2.54(s, 3H)ppm。

[0342] 按照类似于实施例 11 所描述的方法制备下列化合物;通过制备 RP-HPLC 进行纯化,使用甲醇/水+0.1% TFA 梯度,而后用硅胶色谱纯化(洗脱液:甲苯/二氯甲烷/甲醇, 10:10:1, v/v):

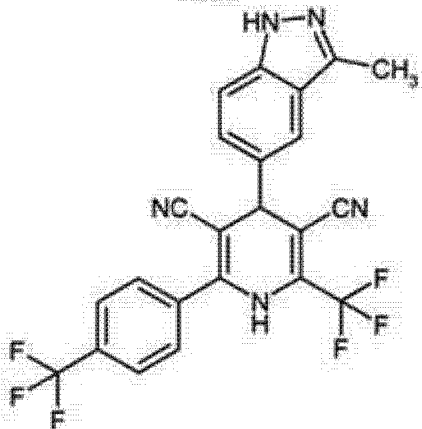
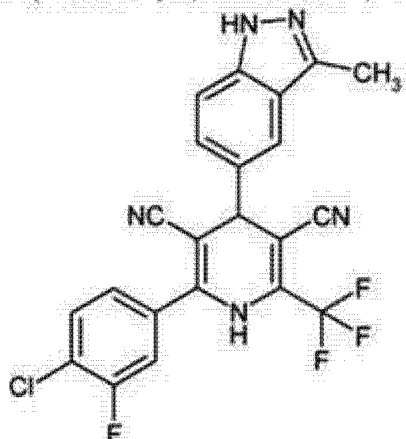
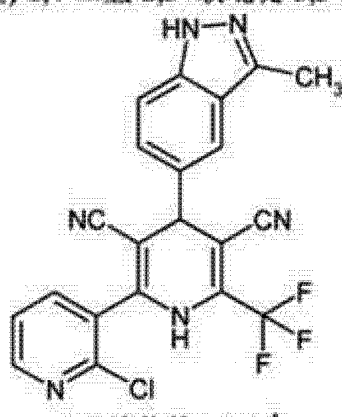
[0343]

实施例	名称/结构(产率)	分析数据
12	2-(4-氯苯基)-4-(3-甲基-1H-吡唑-5-基)-6-(三氟甲基)-1,4-二氢吡啶-3,5-二腈  (理论值的 40%)	LC-MS (方法 4): $R_t=1.03$ min; $m/z=440(M+H)^+$ 1H-NMR(400 MHz, DMSO-d_6): $\delta=12.80$(s, 1H), 10.68(s, 1H), 7.71(s, 1H), 7.66-7.57(m, 5H), 7.42(d, 1H), 4.94(s, 1H), 2.54(s, 3H)ppm.
13	2-(4-氟苯基)-4-(3-甲基-1H-吡唑-5-基)-6-(三氟甲基)-1,4-二氢吡啶-3,5-二腈  (理论值的 40%)	LC-MS (方法 2): $R_t=1.12$ min; $m/z=424(M+H)^+$ 1H-NMR(400 MHz, DMSO-d_6): $\delta=12.80$(s, 1H), 10.68(s, 1H), 7.70(s, 1H), 7.68-7.57(m, 3H), 7.48-7.36(m, 3H), 4.93(s, 1H), 2.54(s, 3H)ppm.
14	2-(2,4-二氟苯基)-4-(3-甲基-1H-吡唑-5-基)-6-(三氟甲基)-1,4-二氢吡啶-3,5-二腈  (理论值的 50%)¹	LC-MS (方法 4): $R_t=0.99$ min; $m/z=442(M+H)^+$ 1H-NMR(400 MHz, DMSO-d_6): $\delta=12.80$(br. s, 1H), 10.82(s, 1H), 7.71-7.67(m, 2H), 7.61(d, 1H), 7.51(m, 1H), 7.43(d, 1H), 7.29(m, 1H), 4.99(s, 1H), 2.54(s, 3H)ppm.

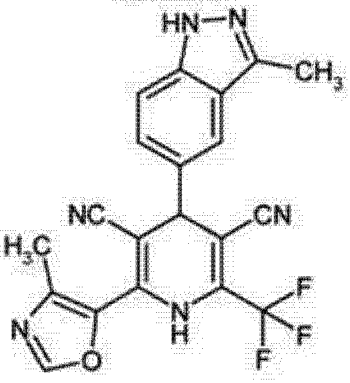
[0344]

实施例	名称/结构(产率)	分析数据
15	2-(4-甲氧基苯基)-4-(3-甲基-1H-吡唑-5-基)-6-(三氟甲基)-1,4-二氢吡啶-3,5-二腈  (理论值的 31%)	LC-MS (方法 3): $R_t=2.13$ min; $m/z=436(M+H)^+$ 1H-NMR(400 MHz, DMSO-d_6): $\delta=12.78$(s, 1H), 10.59(s, 1H), 7.68(s, 1H), 7.59(d, 1H), 7.51(d, 2H), 7.39(d, 1H), 7.08(d, 2H), 4.88(s, 1H), 3.81(s, 3H), 2.54(s, 3H)ppm.
16	2-(3-氟苯基)-4-(3-甲基-1H-吡唑-5-基)-6-(三氟甲基)-1,4-二氢吡啶-3,5-二腈  (理论值的 32%)	LC-MS (方法 4): $R_t=1.00$ min; $m/z=424(M+H)^+$ 1H-NMR(400 MHz, DMSO-d_6): $\delta=12.79$(s, 1H), 10.70(s, 1H), 7.71(s, 1H), 7.62-7.55(m, 2H), 7.52-7.38(m, 4H), 4.96(s, 1H), 2.54(s, 3H)ppm.
17	2-(3,5-二氟苯基)-4-(3-甲基-1H-吡唑-5-基)-6-(三氟甲基)-1,4-二氢吡啶-3,5-二腈  (理论值的 29%)¹	LC-MS (方法 3): $R_t=2.17$ min; $m/z=442(M+H)^+$ 1H-NMR(400 MHz, DMSO-d_6): $\delta=12.80$(br. s, 1H), 10.70(s, 1H), 7.72(s, 1H), 7.59(d, 1H), 7.54-7.38(m, 4H), 4.96(s, 1H), 2.54(s, 3H)ppm.

[0345]

实施例	名称/结构(产率)	分析数据
18	4-(3-甲基-1H-吡唑-5-基)-2-(三氟甲基)-6-[4-(三氟甲基)苯基]-1,4-二氢吡啶-3,5-二腈  (理论值的 29%)	LC-MS (方法 3) : $R_t=2.31$ min; $m/z=474(M+H)^+$ 1H-NMR(400 MHz, DMSO-d_6): $\delta=12.80$(s, 1H), 10.73(s, 1H), 7.92(d, 2H), 7.81(d, 2H), 7.72(s, 1H), 7.60(d, 1H), 7.47(d, 1H), 4.99(s, 1H), 2.54(s, 3H)ppm.
19	2-(4-氯-3-氟苯基)-4-(3-甲基-1H-吡唑-5-基)-6-(三氟甲基)-1,4-二氢吡啶-3,5-二腈  (理论值的 31%)	LC-MS (方法 4) : $R_t=1.04$ min; $m/z=458(M+H)^+$ 1H-NMR(400 MHz, DMSO-d_6): $\delta=12.80$(s, 1H), 10.65(s, 1H), 7.90(dd, 1H), 7.72(s, 1H), 7.68-7.55(m, 3H), 7.48(d, 1H), 4.97(s, 1H), 2.54(s, 3H)ppm.
20	2'-氯-4-(3-甲基-1H-吡唑-5-基)-6-(三氟甲基)-1,4-二氢-2,3'-联吡啶-3,5-二腈  (理论值的 16%)[†]	LC-MS (方法 4) : $R_t=0.90$ min; $m/z=441(M+H)^+$ 1H-NMR(400 MHz, DMSO-d_6): $\delta=12.80$(br. s, 1H), 10.92(s, 1H), 8.62-8.58(m, 1H), 8.20-8.09(m, 1H), 7.78(s, 1H), 7.68-7.56(m, 2H), 7.53-7.46(m, 1H), 5.10-4.98(m, 1H), 2.54(s, 3H)ppm.

[0346]

实施例	名称/结构(产率)	分析数据
21	4-(3-甲基-1H-吡唑-5-基)-2-(4-甲基-1,3-噁唑-5-基)-6-(三氟甲基)-1,4-二氢吡啶-3,5-二腈  (理论值的 6%)²	LC-MS (方法 3): $R_t=1.85$ min; $m/z=411(M+H)^+$ ¹H-NMR(400 MHz, DMSO-d₆): $\delta=12.79$(s, 1H), 10.81(s, 1H), 8.59(s, 1H), 7.69(s, 1H), 7.59(d, 1H), 7.36(d, 1H), 4.99(s, 1H), 2.54(s, 3H), 2.15(s, 3H)ppm.

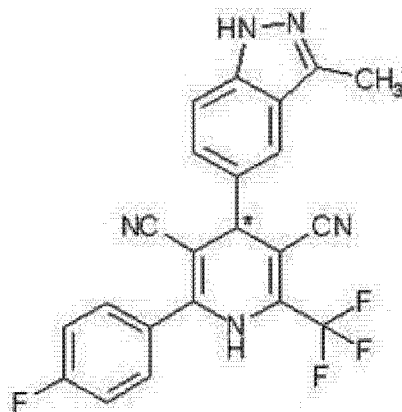
[0347] ¹⁾ 不用硅胶色谱进一步纯化；

[0348] ²⁾ 在微波炉中、在 150℃进行该反应 (30 min)；通过制备 RP-HPLC 进行纯化,使用甲醇/水+0.1% TFA 梯度,而后用硅胶色谱纯化(洗脱液:甲苯/二氯甲烷/甲醇,5:5:1, v/v)。

[0349] 实施例 22 和实施例 23

[0350] 2-(4-氟苯基)-4-(3-甲基-1H-吡唑-5-基)-6-(三氟甲基)-1,4-二氢吡啶-3,5-二腈(对映体 1 和 2)

[0351]



[0352] 用手性相 HPLC 色谱[柱: Daicel Chiralpak AD-H, 5 μ m, 250 mm x 20 mm;洗脱液: 异己烷/乙醇, 85:15, v/v;流速: 15 ml/min;温度: 30℃;UV 检测: 220 nm] 将实施例 13 的外消旋化合物 (200 mg) 分离为对映体:

[0353] 实施例 22(对映体 1):

[0354] 产率: 87 mg(>99% ee)

[0355] $R_t=4.01$ min[柱: Daicel Chiralcel AD-H, 5 μ m, 250 mm x 4.6 mm;洗脱液: 异己烷/乙醇 (80:20)+ 0.2% 二乙胺;流速: 1 ml/min;温度: 30℃;UV 检测: 235 nm]。

[0356] 实施例 23(对映体 2):

[0357] 产率: 92 mg(>99% ee)

[0358] $R_t=4.45$ min[柱: Daicel Chiralcel AD-H, 5 μ m, 250 mm x 4.6 mm;洗脱液: 异

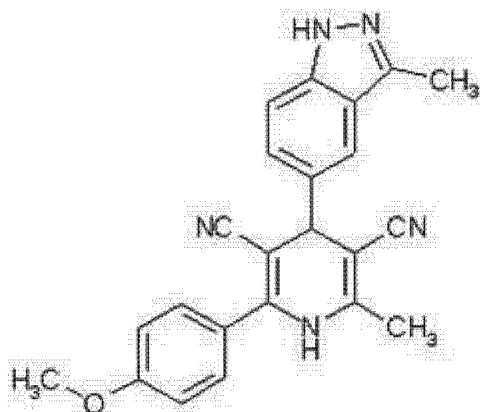
己烷 / 乙醇 (80:20) + 0.2% 二乙胺 ; 流速 : 1 ml/min ; 温度 : 30℃ ; UV 检测 : 235 nm]。

[0359] 如下所述的实施例 A 和 B 是本发明化合物的结构接近的类似物,其特征是:在 1,4-二氢吡啶环的 6 位是没有氟-取代的(即未取代的)甲基。这种类型的 c-Met 激酶抑制化合物先前已经在 WO 2008/071451-A1 中进行了描述。在本发明的背景下,实施例 A 和 B 列举的化合物选自 WO 2008/071451-A1 的一般公开内容,用于结构-活性和结构-渗透性关系的对比分析(参见下面生物部分)。这些化合物的制备是通过上述方法的改型来实现的。

[0360] 对比例 A

[0361] 2-(4-甲氧基苯基)-6-甲基-4-(3-甲基-1H-吡唑-5-基)-1,4-二氢吡啶-3,5-二腈

[0362]



[0363] 将 250 mg (1.56 mmol) 3-甲基-1H-吡唑-5-甲醛(实施例 1A)、328 mg (1.88 mmol) 3-(4-甲氧基苯基)-3-氧代丙腈和 128 mg (1.56 mmol) 3-氨基丁-2-烯腈的混合物在含有粉末 4Å 分子筛的 1-戊醇 (1.55 ml) 中加热至 105℃ 过夜。冷却后,用乙腈稀释该反应混合物,用制备 RP-HPLC 直接纯化(乙腈 / 水 +0.1% TFA 梯度),得到 180 mg (理论值的 30%) 外消旋的标题化合物。

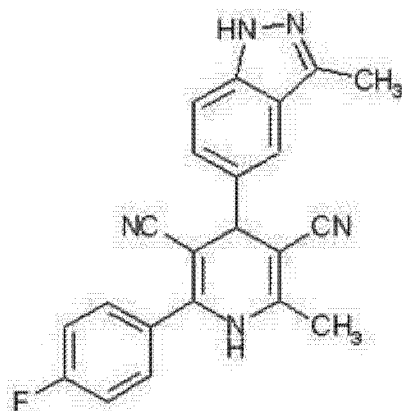
[0364] LC-MS (方法 4): $R_t=0.91$ min; MS(ESIpos): $m/z=382$ (M+H)⁺

[0365] ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 12.70 (br. s, 1H), 9.64 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.57-7.48 (m, 3H), 7.38 (d, 1H), 7.08 (d, 2H), 4.62 (s, 1H), 3.80 (s, 3H), 2.48 (s, 3H), 2.11 (s, 3H) ppm。

[0366] 对比例 B

[0367] 2-(4-氟苯基)-6-甲基-4-(3-甲基-1H-吡唑-5-基)-1,4-二氢吡啶-3,5-二腈

[0368]



[0369] 将 200 mg (0.89 mmol) (2E)-2-[(3-甲基-1H-吡唑-5-基)亚甲基]-3-氧代丁腈(实施例 2A)、159 mg (0.98 mmol) 3-(4-氟苯基)-3-氧代丙腈和 205 mg (2.66 mmol) 乙酸铵的混合物在乙醇/乙酸 (4:1, v/v, 11 ml) 中加热至回流过夜。冷却后, 用制备 RP-HPLC 直接纯化该反应混合物 (乙腈/水 +0.1% TFA 梯度), 得到 136 mg (理论值的 41%) 外消旋的标题化合物。

[0370] LC-MS (方法 2): $R_t=1.04$ min; MS (ESIpos): $m/z=370$ (M+H)⁺

[0371] ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): $\delta=12.70$ (br. s, 1H), 9.74 (s, 1H), 7.64-7.59 (m, 3H), 7.53 (d, 1H), 7.40-7.33 (m, 3H), 4.68 (s, 1H), 2.48 (s, 3H), 2.11 (s, 3H) ppm。

[0372] B. 生物活性评价

[0373] 证明本发明化合物的活性可以通过本领域众所周知的体外、体表外和体内试验来完成。例如, 为了说明本发明化合物的活性, 可以使用下列试验:

[0374] c-Met 受体酪氨酸激酶活性试验 (NADH 读数):

[0375] 使用重组体人 c-Met 蛋白 (Invitrogen, Carlsbad, California, USA)。使用肽 KKKSPGEYVNIEFG (JPT, Germany) 作为激酶反应的底物。对于该试验, 将 1 μ L 试验化合物的 51 倍浓缩溶液 (在 DMSO 中) 吸到白色 384 孔微孔板 (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) 中。加入 25 μ L c-Met (最后浓度 30 nM) 和丙酮酸激酶/乳酸脱氢酶 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany; 最后浓度 8 mg/L) 在试验缓冲液 [3-(N-吗啉基) 丙磺酸 (MOPS), 50 mM, pH7; MgCl₂, 10 mM; 牛血清白蛋白 (BSA), 0.01%; Triton X 100, 0.01%; DTT, 2 mM] 中的溶液, 并在室温下培养混合物 5 分钟。然后, 通过加入 25 μ L 三磷酸腺苷 (ATP, 最后浓度 30 μ M)、底物 (最后浓度 100 μ M)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH, 最后浓度 50 μ M) 和二硫苏糖醇 (DTT, 最后浓度 2 mM) 在试验缓冲液中的溶液来起始激酶反应, 并将得到的混合物在 32°C 培养 100 分钟的反应时间。

[0376] 随后, 通过测定 NADH 荧光的降低来评价磷酸化底物的量。为此, 用荧光读数器 (例如 Tecan Ultra (Tecan, Männedorf, Switzerland)) 测定在 340 nm 激发之后的荧光发射 (465 nm)。使数据标准化 (没有抑制剂的酶反应 =0% 抑制; 所有其它试验组分 (但没有酶) =100% 抑制)。通常, 对 9 个不同浓度 (在 10 μ M 至 1 nM 范围内 (10 μ M, 3.1 μ M, 1.0 μ M, 0.3 μ M, 0.1 μ M, 0.03 μ M, 0.01 μ M, 0.003 μ M, 0.001 μ M; 在试验之前, 用 51 倍水平的浓缩储备溶液通过连续 1:3 稀释来制备稀释系列)) 的试验化合物在相同微滴定板上进行试验, 每个浓度试验两次, 使用内部软件来计算 IC₅₀ 值。

[0377] 一些代表性的 IC_{50} 值以及两个结构类似物的相应数据列于下面表 1 中, 其中两个结构类似物在 1, 4- 二氢吡啶环的 6 位具有未取代的甲基 (对比实施例 A 和 B, 参见上面实验部分; 一般公开在 WO 2008/071451-A1 中) :

[0378] 表 1

实施例编号	IC_{50} [μ M]
4	0.023
6	0.021
8	0.018
10	0.013
13	0.028
20	0.031
A	0.025
B	0.015

[0379] c-Met 受体酪氨酸激酶均相时间分辨 (time-resolved) 荧光试验 (替代形式) :

[0380] 使用人 c-Met (氨基酸 960-1390) (用昆虫细胞 (SF21) 表达, 并用 Ni-NTA 亲和色谱和连续筛析 (consecutive size exclusion) 色谱 (Superdex 200) 纯化) 的 N- 末端 His6- 标记的重组体激酶域。或者, 可以使用商购的 c-Met (Millipore)。使用生物素化的聚 Glu, Tyr (4:1) 共聚物 (# 61GT0BLC, Cis Biointernational, Marcoule, France) 作为该激酶反应的底物。

[0381] 对于该试验, 将 50 nL 试验化合物的 100 倍浓缩溶液 (在 DMSO 中) 吸到黑色小体积 384 孔微滴定板 (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) 中。加入 2 μ L c-Met 在试验缓冲液 [25 mM Hepes/NaOH, pH7.5; 5 mM $MgCl_2$; 5 mM $MnCl_2$; 2 mM 二硫苏糖醇; 0.1%(v/v) Tween 20 (Sigma); 0.1%(w/v) 牛血清白蛋白] 中的溶液, 并将该混合物在 22°C 培养 15 分钟, 使得试验化合物与酶预先结合, 而后开始激酶反应。然后, 通过加入 3 μ L 三磷酸腺苷 (ATP, 16.7 μ M; 在 5 μ L 试验体积中的最后浓度是 10 μ M) 和底物 (2.27 μ g/mL, 在 5 μ L 试验体积中的最后浓度是 1.36 μ g/mL ~ 30 nM) 在试验缓冲液中的溶液来起始激酶反应, 并将得到的混合物在 22°C 培养 30 分钟的反应时间。根据酶批量的活性来调节 c-Met 在该试验中的浓度, 并且恰当地选择, 使该试验在线性范围内; 典型的酶浓度在大约 0.03 nM 范围之内 (在 5 μ L 试验体积中的最后浓度)。通过加入 5 μ L HTRF 检测试剂 [40 nM 链霉亲和素 (streptavidine)-XLent 和 2.4 nM PT66-Eu- 螯合物, 铈-螯合物示踪的抗磷酸酪氨酸抗体 (Perkin-Elmer)] 在 EDTA 水溶液 [100 mM EDTA, 0.2%(w/v) 牛血清白蛋白 (在 50 mM HEPES/NaOH 中, pH7.5) 中] 中的溶液来终止该反应。

[0382] 将得到的混合物在 22°C 培养 1 小时, 使生物素化的磷酸化肽与链霉亲和素 (streptavidine)-XLent 和 PT66-Eu- 螯合物结合。随后, 通过测定从 PT66-Eu- 螯合物至链霉亲和素 (streptavidine)-XLent 的共振能量转移, 评估磷酸化底物的量。为此, 用 HTRF 读数器 (例如, Rubystar (BMG Labtechnologies, Offenburg, Germany) 或 Viewlux (Perkin-Elmer)) 测定在 350 nm 激发之后的荧光发射 (620 nm 和 665 nm)。使用在 665 nm 和 622 nm 处的发射的比例来作为磷酸化底物的量度。使数据标准化 (没有抑制剂的酶反应 = 0% 抑制; 所有其它试验组分 (但没有酶) = 100% 抑制)。通常, 对 10 个不同浓度 (在 20 μ M 至 1 nM 范围内 (20 μ M, 6.7 μ M, 2.2 μ M, 0.74 μ M, 0.25 μ M, 82 nM, 27 nM, 9.2 nM, 3.1 nM 和 1 nM; 在试验之前, 用 100 倍水平的浓缩储备溶液通过连续 1:3 稀释来制备稀释系列))

的试验化合物在相同微滴定板上进行试验,每个浓度试验两次,使用内部软件、通过 4 参数拟合来计算 IC_{50} 值。

[0383] 磷酸 -c-Met 试验:

[0384] 这是没有生长因子刺激作用的、使用 MKN-45 肿瘤细胞 (胃癌,购买于 ATCC) 的基于细胞的 ELISA 类试验 [Meso Scale Discovery (MSD), Gaithersburg, MD, USA]。在第一天,在 96 孔板中,将细胞涂覆在完全生长培养基中 (10000 个细胞 / 孔)。第二天,在无血清培养基中用药物处理两小时之后,将细胞洗涤,而后溶解 (60 μ l / 孔,使用 MSD 推荐的溶解缓冲液),并在 -80°C 冷冻。还在第二天,在 4°C,将 MSD 磷酸 -Met 板上的非特异性抗体结合位点用 MSD 封闭液 A 封闭过夜。在第 3 天,用 Tris- 缓冲盐水 + 0.05% Tween 20 (TBST) 洗涤一次之后,将冷冻的溶胞产物在冰上解冻,将 25 μ l 溶胞产物转入 MSD 磷酸 -Met 板中,摇动 1 小时。除去未结合的蛋白之后,向板中加入 Sulfa-TAG 抗 Met 抗体 (得自于 MSD,最后浓度为 5 nM,在抗体稀释缓冲液中) (按照 MSD 的方案),摇动 1 小时。然后用 TBST 缓冲液洗涤该板三次,而后加入 1xMSD 读数缓冲液。然后在 MSD Discovery Workstation 仪器上将该板读数。将原始数据 (包括含有 10 μ M 参考化合物的孔 (最小信号) 和没有任何药物处理的 DMSO 孔 (最大信号)) 输入 Analyze 5 程序,进行 IC_{50} 值测定。

[0385] 细胞磷酸 -c-Met 试验:

[0386] 在 37°C,在 5% CO_2 存在下,将播种在 384 孔微滴定板上的人胃腺癌细胞 (MKN45,购买于 ATCC) (9000 个细胞 / 孔) 在 25 μ l 完全生长培养基中培养 24 小时。在第 2 天,在含有 0.1% FCS 的低血清培养基中用药物处理两小时之后,将细胞洗涤并溶解。用 Tris- 缓冲盐水 + 0.05% Tween 20 (TBST) 洗涤一次之后,将溶胞产物转入 BSA 封闭板中,板中含有预先结合的 c-Met 捕获抗体 [购买于 Mesoscale Discovery (MSD), Gaithersburg, MD, USA], 摇动 1 小时。按照 MSD 方案,在室温,向板中加入 Sulfa-TAG 抗磷酸 -c-Met 检测抗体 (最后浓度为 5 nM,在抗体稀释缓冲液中),摇动 1 小时。用 Tris 缓冲液洗涤孔之后,加入 1x 读数缓冲液,并在 Sector Imager 6000 (购买于 Mesoscale) 上测定该板。使用 Marquardt-Levenberg- 拟合法,由剂量反应曲线来计算 IC_{50} 值。

[0387] 体外肿瘤细胞增殖试验:

[0388] 用于测试本发明化合物的粘附肿瘤细胞增生 (adherent tumor cell proliferation) 试验涉及由 Promega 开发的、称为 Cell Titre-Glo 的数字显示装置 (read-out) [B. A. Cunningham, "A Growing Issue: Cell Proliferation Assays. Modern kits ease quantification of cell growth", *The Scientist* 2001, 15(13), 26; S. P. Crouch 等人, "The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity", *Journal of Immunological Methods* 1993, 160, 81-88]。产生的荧光信号与所存在的 ATP 数量对应,其与代谢活性 (增殖) 细胞的数目成正比。

[0389] 将 H460 细胞 (肺癌,购买于 ATCC) 涂覆在 96 孔板 (3000 个细胞 / 孔) 中的完全培养基 (含有 10% 胎牛血清) 中,并在 37°C 培养 24 小时。涂覆之后二十四小时,加入试验化合物,最后浓度范围是 10 nM 至 20 μ M (系列稀释,DMSO 的最终浓度为 0.2%)。加入试验化合物之后,在 37°C,将细胞在完全生长培养基中培养 72 小时。第 4 天,使用 Promega Cell Titre-Glo Luminescent® 试验试剂盒,将细胞溶解,并将 100 μ l 底物 / 缓冲液混合物加入到每个孔中,混合,在室温下培养 8 分钟。在光度计上将样品读数,测定每个孔的细胞溶胞产

物之中所存在的ATP数量,其与该孔中的活细胞数目对应。将24小时培养的读数值作为第0天的数值减去。为了测定 IC_{50} 值,可使用线性回归分析来测定使用该试验形式能够抑制50%细胞增殖时的药物浓度。该方案可用于使人感兴趣的各種细胞系,包括但不限于:CAKI-1, MNK-45, GTL-16, HCC2998, K562, H441, K812, MEG01, SUP15 和 HCT116。

[0390] Caco-2 渗透性试验:

[0391] 试验化合物经 Caco-2 细胞单层的体外渗透作用是大家公认的预测胃肠道渗透性的试验系统 [参照 P. Artursson and J. Karlsson: Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial(Caco-2)cells, *Biochem. Biophys.* 175(3), 880-885(1991)]。如下所述,测定本发明化合物在这种 Caco-2 细胞中的渗透性:

[0392] 将人 caco-2 细胞 (ACC No. 169, DSMZ, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany) 播种在 24 孔嵌入板上,并使其生长 14-16 天。为了渗透性研究,将试验化合物溶于 DMSO 中,并用转移缓冲液 [Hanks' 缓冲盐溶液, Gibco/Invitrogen, 进一步补充有葡萄糖 (最后浓度 19.9 mM) 和 HEPES (最后浓度 9.8 mM)] 稀释至 2 μ M 的最后试验浓度。为了测定顶端至基底外侧的渗透性 (P_{appA-B}),将试验化合物溶液加入到细胞单层的顶面,转移缓冲液加入到单层的基底外侧面;为了测定基底外侧至顶端的渗透性 (P_{appB-A}),将试验化合物溶液加入到细胞单层的基底外侧面,转移缓冲液加入到单层的顶面。在实验开始时,从供体部分获取样品,以便证明质量平衡。在 37 $^{\circ}$ C 培养 2 小时之后,从两个部分获取样品。通过 LC-MS/MS 分析样品,并计算表观渗透系数。试验每个细胞单层的荧光黄渗透性,以便保证细胞单层的完整性,作为质量控制,测定每个批量的阿替洛尔 (低渗透标志物) 和柳氮磺吡啶 (活性分泌标志物) 的渗透性。

[0393] 该试验的代表性结果以及两个结构类似物的相应数据列于下面表 2 中,其中两个结构类似物在 1,4-二氢吡啶环的 6 位具有未取代的甲基 (对比实施例 A 和 B,参见上面实验部分;一般公开在 WO 2008/071451-A1 中):

[0394] 表 2

[0395]

实施例编号	Caco-2 渗透性 P_{appA-B} [nm/s]
6	150
8	170
13	158
A	99
B	62

[0396] 虽然已经参考具体实施方案公开了本发明,但很明显,在不背离本发明的正确精神和范围的条件下,本领域其它技术人员可以设计本发明的其它实施方案和变体。应该将权利要求视为包括所有这种实施方案和等效变体。

[0397] C. 与药物组合物有关的实施例

[0398] 按照本发明的药物组合物可以举例说明如下:

[0399] 无菌 i. v. 溶液剂:

[0400] 可以使用无菌的注射用水来制备本发明目标化合物的 5 mg/ml 溶液,如有必要,调

节 pH 值。用无菌 5% 葡萄糖稀释该溶液,达到给药浓度 1-2 mg/ml,并用大约 60 分钟进行 i. v. 输液给药。

[0401] 用于 i. v. 给药的冷冻干燥粉剂:

[0402] 可以用下列来制备无菌制剂:(i)100-1000 mg 冷冻干燥粉剂形式的本发明的目标化合物,(ii)32-327 mg/ml 枸橼酸钠,和 (iii)300-3000 mg 葡聚糖 40。用无菌注射用盐水或 5% 葡萄糖将该制剂重组至 10 至 20 mg/ml 的浓度,将其用盐水或 5% 葡萄糖进一步稀释至 0.2 至 0.4 mg/ml,以 i. v. 推注或 i. v. 输液(15-60 分钟)形式给药。

[0403] 肌肉混悬剂:

[0404] 可以制备下列肌肉注射用的溶液剂或混悬剂:

[0405] 50 mg/ml 不溶于水的本发明目标化合物;5 mg/ml 羧甲基纤维素钠;4 mg/ml TWEEN 80;9 mg/ml 氯化钠;9 mg/ml 苯甲醇。

[0406] 硬壳胶囊剂:

[0407] 如下制备大量单位胶囊剂:装填标准两段硬肉冻(galantine)胶囊,每个胶囊装填 100 mg 粉末活性组分、150 mg 乳糖、50 mg 纤维素和 6 mg 硬脂酸镁。

[0408] 软胶囊:

[0409] 在可消化的油例如大豆油、棉籽油或橄榄油中制备活性组分的混合物,并利用正排量泵注射到熔融明胶中,形成含有 100 mg 活性组分的软明胶胶囊。将胶囊洗涤并干燥。可以将活性组分溶于聚乙二醇、丙三醇和山梨糖醇的混合物中,制备水可互溶的药物混合物。

[0410] 片剂:

[0411] 利用常规方法制备大量片剂,使得剂量单位是 100 mg 活性组分、0.2 mg 胶体二氧化硅、5 mg 硬脂酸镁、275 mg 微晶纤维素、11 mg 淀粉和 98.8 mg 乳糖。为了提高适口性、提高精致性和稳定性或延迟吸收,可以使用合适的水和非水包衣。