



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104169277 B

(45)授权公告日 2016.10.12

(21)申请号 201380013544.5

(22)申请日 2013.02.04

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104169277 A

(43)申请公布日 2014.11.26

(30)优先权数据

1202027.7 2012.02.06 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.09.11

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2013/052182 2013.02.04

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/117522 EN 2013.08.15

(73)专利权人 赛勒姆公司

地址 英国,剑桥郡

(72)发明人 J·C·瑞德尔

(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所

11313

代理人 孟锐

(51)Int.Cl.

C07D 413/14(2006.01)

A61K 31/496(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 101796038 A,2010.08.04,

WO 2010055304 A2,2010.05.20,

CN 1784386 A,2006.06.07,

审查员 王茜

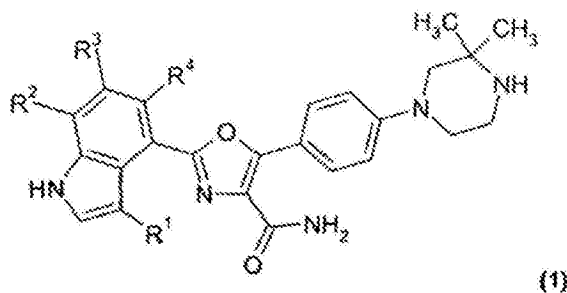
权利要求书3页 说明书45页 附图3页

(54)发明名称

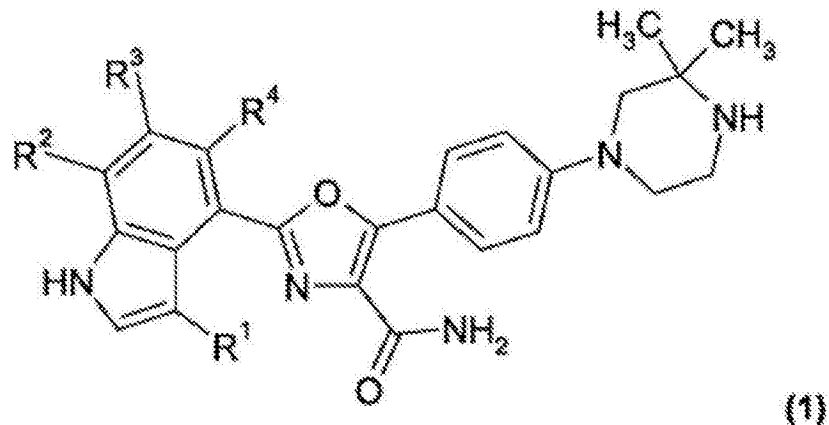
极光激酶和FLT3激酶调节剂

(57)摘要

本发明提供一种具有式(1)的化合物以及其盐,所述化合物可用作极光激酶和FLT3激酶活性的调节剂;其中: R^1 为氢或 C_{1-2} 烷基;并且 R^2 、 R^3 和 R^4 为相同或不同的,并且各自选自氢、 C_{1-2} 烷基、氟、氯、 C_{1-2} 烷氧基以及三氟甲基,条件是 R^2 、 R^3 和 R^4 中的至多两个不为氢。还提供含有所述化合物的药物组合物以及其在医学中的用途,尤其是在癌症治疗中的用途。



1. 一种具有式(1)的化合物:



以及其盐;其中:

R^1 为氢或 C_{1-2} 烷基;并且

R^2 、 R^3 和 R^4 为相同或不同的,并且各自选自氢、 C_{1-2} 烷基、氟、氯、 C_{1-2} 烷氧基以及三氟甲基,条件是 R^2 、 R^3 和 R^4 中的至多两个不为氢。

2. 根据权利要求1所述的化合物,其中 R^1 选自氢和甲基。

3. 根据权利要求1所述的化合物,其中 R^2 选自氢、氟、氯、甲基、乙基以及甲氧基。

4. 根据权利要求1所述的化合物,其中 R^3 为氢。

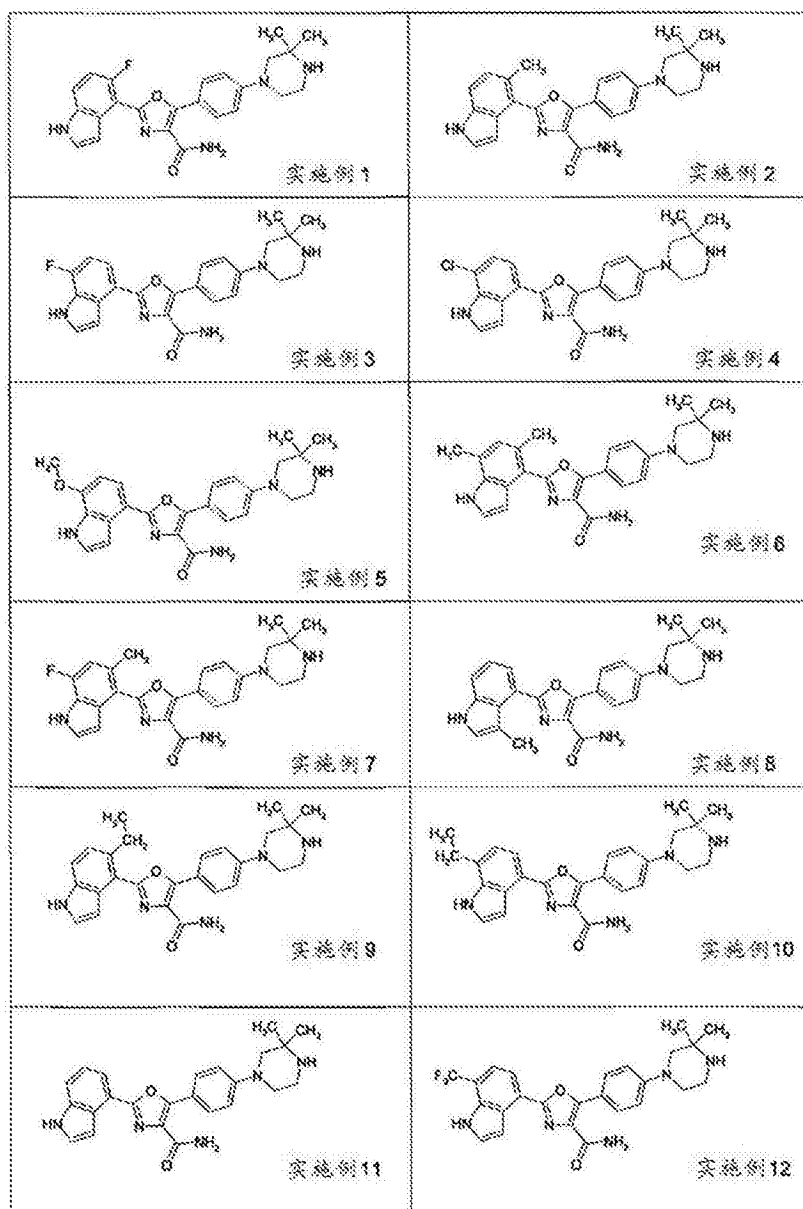
5. 根据权利要求1所述的化合物,其中 R^4 选自氢、氟、甲基以及乙基。

6. 根据权利要求1所述的化合物,其中(i) R^1 为氢; R^2 选自甲基、乙基、氟、氯以及甲氧基; R^3 为氢;并且 R^4 为氢;或(ii) R^1 为氢; R^2 为氢; R^3 为氢;并且 R^4 为甲基;或(iii) R^1 为氢; R^2 为氟; R^3 为氢;并且 R^4 为甲基。

7. 根据权利要求1所述的化合物,其中 R^1 为氢; R^2 选自氢和氟; R^3 为氢;并且 R^4 为甲基。

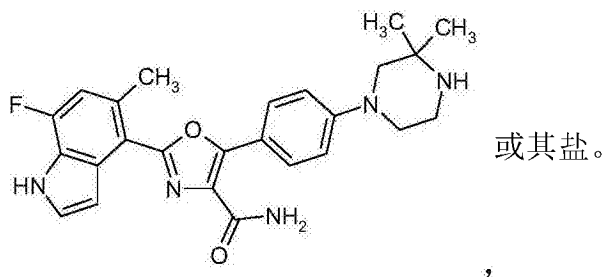
8. 根据权利要求7所述的化合物,其中 R^2 为氟。

9. 根据权利要求1所述的化合物,其选自下表中的化合物实施例1至实施例12以及其盐:



10. 根据权利要求9所述的化合物,其选自实施例2、实施例3、实施例5和实施例7以及其盐。

11. 根据权利要求9所述的化合物,其是:



12. 一种药物组合物,其包含如权利要求1至11中任一项所定义的化合物以及药学上可接受的赋形剂。

13. 根据权利要求1至11中任一项所述的化合物在制造适用于增生性疾病治疗的药物中的用途。

14. 根据权利要求1至11中任一项所述的化合物在制造适用于癌症治疗的药物中的用途。

15. 根据权利要求1至11中任一项所述的化合物在制造适用于增生性疾病治疗的药物中的用途, 其中所述增生性疾病是造血系统肿瘤, 其选自: 急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、急性髓细胞性白血病(AML), 慢性髓细胞性白血病(CML)、霍奇金淋巴瘤(HL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)以及多发性骨髓瘤(MM)。

16. 根据权利要求14所述的用途, 其中所述癌症为易受FLT3激酶抑制的癌症, 并且为急性髓细胞性白血病(AML)。

17. 根据权利要求14所述的用途, 其中所述化合物连同另一种化疗剂一起使用。

极光激酶和FLT3激酶调节剂

[0001] 本发明涉及抑制或调节激酶(尤其是极光激酶和FLT3激酶)活性的化合物,涉及所述化合物在由激酶介导的疾病状态或病状的治疗或预防中的用途。还提供含有所述化合物的药物组合物、用于其制备的方法以及新型化学中间体。

[0002] 发明背景

[0003] 蛋白激酶构成结构相关性酶的大家族,所述酶负责细胞内广泛多种信号转导过程的控制(Hardie和Hanks(1995)The Protein Kinase Facts Book.I and II,Academic Press,San Diego,CA)。激酶可通过其所磷酸化的底物分类为家族(例如,蛋白质-酪氨酸、蛋白质-丝氨酸/苏氨酸、脂质等)。已鉴定了通常对应于这些激酶家族中的每一个的序列基序(例如,Hanks和Hunter,FASEB J.,(1995)9,576-596;Knighton等,Science,(1991)253,407-414;Hiles等,Cell,(1992)70,419-429;Kunz等,Cell,(1993)73,585-596;Garcia-Bustos等,EMBO J.,(1994)13,2352-2361)。

[0004] 蛋白激酶可通过其调控机制进行表征。这些机制包括例如自磷酸化、通过其它激酶的转移磷酸化、蛋白质-蛋白质相互作用、蛋白质-脂质相互作用,以及蛋白质-多核苷酸相互作用。个别蛋白激酶可通过一种以上机制进行调控。

[0005] 激酶通过添加磷酸基至靶蛋白来调控许多不同的细胞过程,包括但不限于增生、分化、细胞凋亡、运动性、转录、翻译以及其它信号传导过程。这些磷酸化事件充当分子打开/关闭开关,其可调节或调控靶蛋白生物学功能。靶蛋白的磷酸化响应于多种胞外信号(激素、神经递质、生长和分化因子等)、细胞周期事件、环境或营养应激等而发生。适当的蛋白激酶在信号传导途径中起到使例如代谢酶、调控蛋白、受体、细胞骨架蛋白、离子通道或离子泵或转录因子(直接或间接)活化或失活的作用。由于蛋白磷酸化的控制缺陷造成的信号失控已被认为与许多疾病相关,包括例如炎症、癌症、过敏/哮喘、免疫系统疾病和病状、中枢神经系统疾病和病状,以及血管发生。

[0006] 极光激酶

[0007] 迄今已在哺乳动物中发现极光激酶家族的三个成员(Nigg,Nat.Rev.Mol.Cell Biol.(2001)2,21-32)。极光A激酶(在文献中也称为极光2)为涉及细胞周期的G2和M期的丝氨酸/苏氨酸激酶,并且是有丝分裂的重要调控剂。据信极光激酶A在有丝分裂关卡控制、染色体动力学和胞质分裂中起到一定作用(Adams等,Trends Cell Biol.,(2001)11,49-54)。激酶位于分裂间期细胞的中心体上、双极性纺锤体的极上或有丝分裂器的中间体中。

[0008] 其它两种目前已知的极光激酶为极光B(在文献中也称为极光1)和极光C(在文献中也称为极光3)。极光激酶具有高度同源的催化结构域,但是其N端部分有很大差异(Katayama等,Cancer Metastasis Rev.(2003)22(4),451-64)。

[0009] 极光激酶A和B的底物已鉴定为包括驱动蛋白样运动蛋白、纺锤体器蛋白、组蛋白H3蛋白、着丝粒蛋白以及肿瘤抑制蛋白p53。

[0010] 据信极光A激酶涉及纺锤体形成并且在早期G2期期间变得局部化于中心体上,在所述中心体处,所述极光A激酶使纺锤体相关蛋白磷酸化(Prigent等,Cell(2003)114,531-535)。Hirota等(Cell,(2003)114,585-598)发现耗尽极光A蛋白激酶的细胞不能进入有丝

分裂。此外,已发现(Adams,2001)在不同物种中极光A基因的突变或破坏导致有丝分裂异常,包括中心体分开和成熟缺陷、纺锤体畸变以及染色体分离缺陷。

[0011] 极光激酶A在大多数正常组织中通常以低水平表达,例外的是具有高比例的分裂细胞的组织,如胸腺和睾丸。然而,已在许多人类癌症中发现升高水平的极光激酶(Giet等,J.Cell.Sci.(1999)112,3591和Katayama(2003))。此外,极光A激酶作图于染色体20q13区域,在许多人类癌症中常常发现所述区域扩增。

[0012] 因此,例如,已在人类乳房、卵巢和胰腺癌症中检测到显著的极光A过表达(参见Zhou等,Nat.Genet.(1998)20,189-193;Tanaka等,Cancer Res.(1999)59,2041-2044以及Han等,Cancer Res.(2002)62,2890-2896)。

[0013] 此外,Isola(American Journal of Pathology(1995)147,905-911)已报道极光A基因座(20q13)的扩增与患有淋巴结阴性乳腺癌的患者的不良预后相关。

[0014] 在人类膀胱癌中观察到极光A的扩增和/或过表达,并且极光A的扩增与非整倍性和攻击性临床表现相关(参见Sen等,J.Natl.Cancer Inst.(2002)94,1320-1329)。

[0015] 在超过50%的结肠直肠癌(参见Bischoff等,EMBO J.(1998)17,3052-3065和Takahashi等,Jpn.J.Cancer Res.(2000)91,1007-1014)、卵巢癌(参见Gritsko等,Clin.Cancer Res.(2003)9,1420-1426)以及胃肿瘤(参见Sakakura等,British Journal of Cancer(2001)84,824-831)中检测到极光A的表达升高。

[0016] Tanaka等,(Cancer Research(1999)59,2041-2044)发现极光A在94%的乳房的扩散性管腺癌中过表达的证据。

[0017] 已在肾、子宫颈、成神经细胞瘤、黑色素瘤、淋巴瘤、胰腺和前列腺肿瘤细胞系中发现高水平的极光A激酶(Bischoff等,(1998),EMBO J.(1998)17,3052-3065;Kimura等,J.Biol.Chem.(1999)274,7334-7340;Zhou等,Nature Genetics,20:189-193(1998);Li等,Clin Cancer Res.9(3):991-7(2003)。

[0018] Royce等(Cancer.(2004)100(1),12-19)报道已在大约四分之一的原发性乳腺肿瘤中注意到极光2基因(已知为STK15或BTAK)的表达。

[0019] Reichardt等(Oncol Rep.(2003)10(5),1275-9)已报道,通过PCR的定量DNA分析以搜索神经胶质瘤中的极光扩增揭示具有不同WHO级别(1 x II级、1 x III级、3 x IV级)的5/16的肿瘤(31%)显示出极光2基因的DNA扩增。假设极光2基因的扩增可能是在人类神经胶质瘤中在肿瘤发生的遗传途径中起到一定作用的非随机遗传改变。

[0020] Hamada等的结果(Br.J.Haematol.(2003)121(3),439-47)也提示极光2是不仅指示疾病活性,还指示非霍奇金氏淋巴瘤的肿瘤发生的有效候选者。由限制此基因的功能造成肿瘤细胞生长迟缓可为非霍奇金氏淋巴瘤的治疗方法。

[0021] 在Gritsko等(Clin Cancer Res.(2003)9(4),1420-6)的研究中,在患有原发性卵巢肿瘤的92个患者中检验极光A的激酶活性和蛋白水平。体外激酶分析揭示了44例(48%)中的极光A激酶活性升高。在52(57%)个样本中检测到增加的极光A蛋白水平。极光A的高蛋白水平与升高的激酶活性良好相关。

[0022] Li等(Clin.Cancer Res.2003 Mar;9(3):991-7)获得的结果显示极光A基因在胰腺肿瘤和癌细胞系中过表达,并且提示极光A的过表达在胰腺癌症发生中可能起到一定作用。

[0023] 类似地,已显示,极光A基因扩增以及相关的其编码的有丝分裂激酶的表达增加与人类膀胱癌中的非整倍性和攻击性临床表现相关。(J.Natl.Cancer Inst.(2002)94(17), 1320-9)。

[0024] 若干组的研究(Dutertre和Prigent,Mol.Interv.(2003)3(3),127-30以及Anand等,Cancer Cell.(2003)3(1),51-62)提示极光激酶活性的过表达与对一些目前癌症疗法的抗性相关。例如,极光A在小鼠胚胎成纤维细胞中的过表达可减小这些细胞对紫杉烷衍生物的毒性作用的敏感性。因此,极光激酶抑制剂可在已发展出对现有疗法的抗性的患者中存在特定用途。

[0025] 在迄今所做工作的基础上,设想极光A激酶的抑制将证明是阻止肿瘤发展的有效手段。

[0026] 还已显示,与正常细胞相比,极光B在肿瘤细胞中的表达增加(Adams等,Chromasoma.(2001)110,65-74)。一个报道提示极光B的过表达通过组蛋白H3在丝氨酸10处的增加的磷酸化诱导非整倍性,并且提示过表达极光B的细胞形成攻击性更强的肿瘤并且具有较高的形成转移性肿瘤的趋势(Ota等,Cancer Res.(2002)62,5168-5177)。

[0027] 在人类细胞中,极光B为纺锤体关卡功能以及中期染色体配对所需要(Adams等J.Cell Biol.(2001)153,865-880;Kallio等,Curr.Biol.(2002)12,900-905以及Murata-Hori和Wang Curr.Biol.(2002)12,894-899)。已证明,极光B激酶活性的抑制包括染色体配对、纺锤体关卡功能以及胞质分裂(Ditchfield等,J.Cell Biol.(2003)161,267-280以及Hauf等,J.Cell Biol.(2003),161,281-294)。因此,在短暂延迟之后,细胞在没有分裂的情况下离开有丝分裂并且具有4N DNA含量,因此所述细胞迅速丧失其增生潜能。

[0028] Harrington等(Nat Med.(2004)10(3),262-7)已证明,极光激酶的抑制剂在体内抑制肿瘤生长并且诱导肿瘤消退。在研究中,极光激酶抑制剂阻滞癌细胞增生,并且还在一个范围的癌细胞系(包括白血病细胞系、结肠直肠细胞系和乳房细胞系)中触发细胞死亡。此外,已显示出用于通过诱导白血病细胞的细胞凋亡来治疗白血病的潜能。VX-680有效杀死来自患者的治疗顽固性原发性急性髓性白血病(AML)细胞(Andrews,Oncogene(2005)24, 5005-5015)。

[0029] Manfredi等(PNAS(2007)104,4106-4111)已证明小分子的极光A抑制剂抑制体内肿瘤生长。在研究中,在HCT-116肿瘤携带小鼠和PC-3肿瘤携带瘤小鼠相对于媒介物治疗的小鼠中证明了剂量依赖性肿瘤生长抑制。针对HCT-116细胞异种移植观察到达84%的肿瘤生长抑制,并且针对PC-3细胞异种移植观察到达93%的肿瘤生长抑制。

[0030] Mortlock等(Clin Cancer Res.(2007)13(12),3682-3688)已证明小分子的极光B抑制剂抑制体内肿瘤生长。携带建立的SW620、HCT-116、Colo205、A549、Calu-6或HL-60肿瘤异种移植物的免疫缺陷小鼠经由皮下微泵输注经48h给予小分子抑制剂AZD1152。所有病例中肿瘤生长的抑制在55%至100%范围内,并且在携带HL-60异种移植物的11只动物中的8只中观察到完全肿瘤消退。

[0031] 在迄今获得的证据的基础上,很可能认为极光激酶抑制剂应该在阻止肿瘤发展以及治疗癌症上尤其有用,所述癌症如乳房癌、膀胱癌、结肠直肠癌、胰腺癌和卵巢癌、非霍奇金氏淋巴瘤、神经胶质瘤、非子宫内膜状子宫内膜癌、急性髓性白血病(AML)、慢性髓性白血病(CML)、B-细胞淋巴瘤(套细胞)以及急性成淋巴细胞性白血病(ALL)。

[0032] FLT3

[0033] FMS样酪氨酸激酶3(FLT3)是涉及造血细胞和非造血细胞的增生、分化和细胞凋亡的受体酪氨酸激酶(Scheijen和Griffin,Oncogene(2002)21,3314-3333以及Reilly,British Journal of Haematology(2002)116,744-757)。作为天然配体(FL)结合的结果,FLT3受体由于其酪氨酸激酶结构域的活化、受体自磷酸化以及下游信号传导分子的募集而二聚化,所述信号传导分子如PI3K(磷脂酰肌醇3激酶)的p85亚基、PLC- γ (磷脂酶-C γ)、STAT5a(转录的信号转导剂和激活剂5a),以及SRC家族酪氨酸激酶(Gilliland和Griffin,Blood(2002)100(5),1532-42;Drexler,Leukemia(1996)10(4),588-99以及Ravandi等,Clin Cancer Res.(2003)9(2),535-50)。

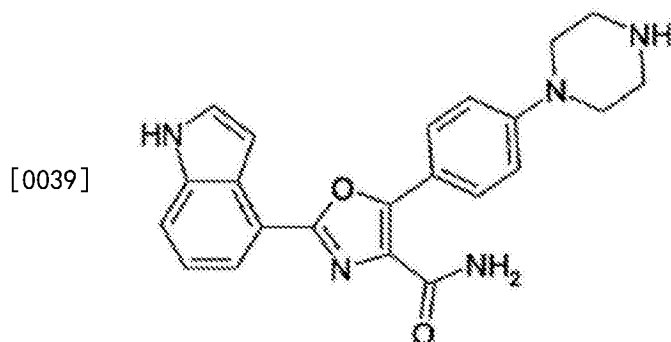
[0034] 通过磷酸化活化这些下游信号传导分子导致FLT3的增生和促存活作用(Gilliland和Griffin(2002)以及Levis和Small,Leukemia(2003)17(9),1738-52)。

[0035] 在大约30%的患有急性髓细胞性白血病(AML)(通过未成熟的骨髓白血细胞的过量产生导致的白血细胞癌)的患者中已证明了涉及受体的近膜区域中的内部串联重复或通过活化环中D835的点突变造成的FLT3的体细胞突变(Nakao等,Leukemia(1996)10(12),1911-8;Thiede等,Blood(2002)99(12),4326-35;Yamamoto等,Blood(2001)97(8),2434-9;Abu-Duhier等,Br.J.Haematol.(2000)111(1),190-5以及Abu-Duhier等,Br.J.Haematol.(2001)113(4),983-8)。

[0036] 近来描述了独立激活FLT3的突变的其它配体,有助于AML的白血病转化。在诊断上所述突变的存在与一些患者的较差预后相关(Jiang等,Blood(2004)104(6),1855-8和Kindler等,Blood(2005)105(1),335-40)。

[0037] 我们的较早国际专利申请W02008/139161公开了一类取代的噁唑羧酰胺作为多种激酶(尤其是极光激酶、FLT3激酶和FLT4激酶)的抑制剂。

[0038] W02008/139161的第132页上的实施例M-12描述了化合物2-(1H-吡啶-4-基)-5-(4-哌嗪-1-基-苯基)-噁唑-4-羧酸酰胺的制备,所述化合物具有以下列出的结构式。

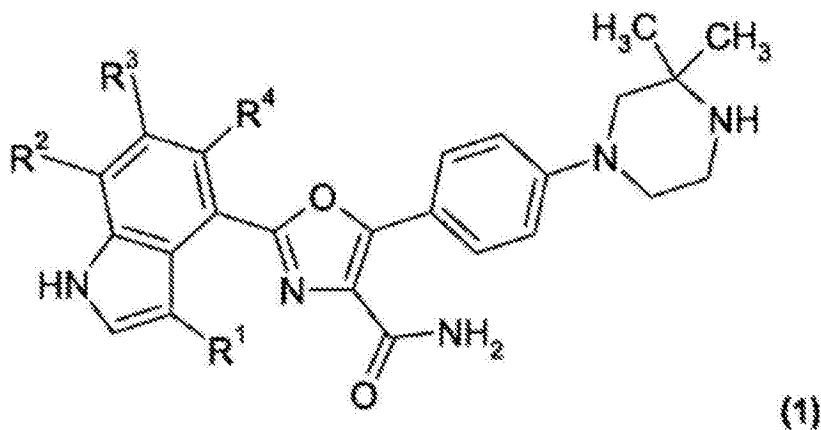


[0040] 发明概述

[0041] 现在已发现,与W0的实施例M-12的化合物相比,以上所示化合物的类似物(但是其中哌嗪环的3-位上的CH₂部分由C(CH₃)₂部分代替)实质增强了抵抗选自极光A激酶和极光B激酶以及FLT3激酶中的一种或多种激酶的效能,并且减小了流出倾向。还已发现,化合物抵抗极光激酶的效能通过在吡啶基上存在取代基而进一步实质增强。

[0042] 因此,在第一实施方案(实施方案1.1)中,本发明提供一种具有式(1)的化合物:

[0043]



[0044] 以及其盐;其中:

[0045] R^1 为氢或 C_{1-2} 烷基;并且[0046] R^2 、 R^3 和 R^4 为相同或不同的,并且各自选自氢、 C_{1-2} 烷基、氟、氯、 C_{1-2} 烷氧基以及三氟甲基,条件是 R^2 、 R^3 和 R^4 中的至多两个不为氢。

[0047] 本发明的特定并且优选的化合物如在以下实施方案1.2至1.33中所定义。

[0048] 1.2根据实施方案1.1所述的化合物,其中 R^1 选自氢和甲基。[0049] 1.3根据实施方案1.2所述的化合物,其中 R^1 为氢。[0050] 1.4根据实施方案1.2所述的化合物,其中 R^1 为甲基。[0051] 1.5根据实施方案1.1至1.4中任一项所述的化合物,其中 R^2 选自氢、氟、氯、甲基、乙基、三氟甲基以及甲氧基。[0052] 1.6根据实施方案1.1至1.4中任一项所述的化合物,其中 R^2 选自氢、氟、氯、甲基、乙基以及甲氧基。[0053] 1.6A根据实施方案1.6所述的化合物,其中 R^2 选自氢、氟、氯、甲基以及甲氧基[0054] 1.7根据实施方案1.5所述的化合物,其中 R^2 为氢。[0055] 1.8根据实施方案1.5所述的化合物,其中 R^2 为氟。[0056] 1.9根据实施方案1.5所述的化合物,其中 R^2 为氯。[0057] 1.10根据实施方案1.5所述的化合物,其中 R^2 为甲基。[0058] 1.11根据实施方案1.5所述的化合物,其中 R^2 为乙基。[0059] 1.12根据实施方案1.5所述的化合物,其中 R^2 为甲氧基。[0060] 1.13根据实施方案1.5所述的化合物,其中 R^2 为三氟甲基。[0061] 1.14根据实施方案1.1至1.13中任一项所述的化合物,其中 R^3 选自氢和氟。[0062] 1.15根据实施方案1.14所述的化合物,其中 R^3 为氢。[0063] 1.16根据实施方案1.1至1.15中任一项所述的化合物,其中 R^4 选自氢、氟、甲基以及乙基。[0064] 1.17根据实施方案1.16所述的化合物,其中 R^4 为氢。[0065] 1.18根据实施方案1.16所述的化合物,其中 R^4 选自氟、甲基和乙基,并且 R^2 和 R^3 中的一个为氢。[0066] 1.19根据实施方案1.18所述的化合物,其中 R^3 为氢。[0067] 1.20根据实施方案1.18或实施方案1.19所述的化合物,其中 R^4 为氟。[0068] 1.21根据实施方案1.18或实施方案1.19所述的化合物,其中 R^4 为甲基。

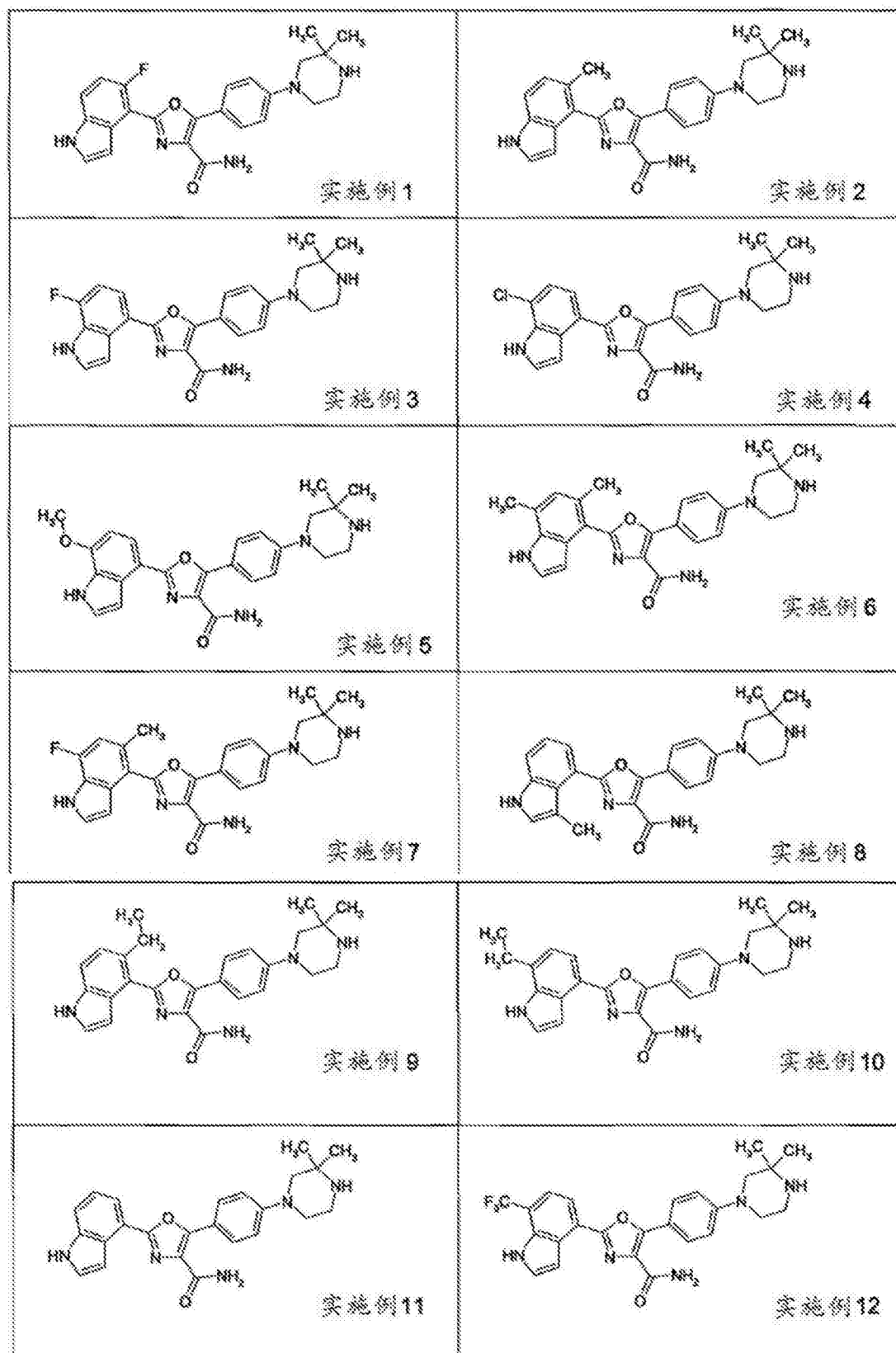
[0069] 1.22根据实施方案1.18或实施方案1.19所述的化合物,其中R⁴为乙基。

[0070] 1.22A根据实施方案1.1所述的化合物,其中R¹为氢;R²选自氢、甲基、乙基、氟代基、氯代基以及甲氧基;R³为氢;并且R⁴选自氢、氟代基和甲基。

[0071] 1.23根据实施方案1.22A所述的化合物,其中(i)R¹为氢;R²选自甲基、乙基、氟代基、氯代基以及甲氧基;R³为氢;并且R⁴为氢;或(ii)R¹为氢;R²为氢;R³为氢;并且R⁴为甲基;或(iii)R¹为氢;R²为氟代基;R³为氢;并且R⁴为甲基。

[0072] 1.24根据实施方案1.1所述的化合物,其选自以下表1中的化合物实施例1至实施例12以及其盐。

[0073]



[0074] 表1

[0075] 1.25根据实施方案1.24所述的化合物,其选自表1中的化合物实施例2、实施例3、实施例5和实施例7以及其盐。

[0076] 1.26根据实施方案1.25所述的化合物,其为化合物实施例2或其盐。

- [0077] 1.27根据实施方案1.25所述的化合物,其为化合物实施例3或其盐。
- [0078] 1.28根据实施方案1.25所述的化合物,其为化合物实施例5或其盐。
- [0079] 1.29根据实施方案1.25所述的化合物,其为化合物实施例7或其盐。
- [0080] 1.30根据实施方案1.1至1.29中任一项所述的化合物,其呈游离碱的形式。
- [0081] 1.31根据实施方案1.1至1.29中任一项所述的化合物,其呈盐的形式。
- [0082] 1.32根据实施方案1.31所述的化合物,其中所述盐为酸加成盐。
- [0083] 1.33根据实施方案1.31或实施方案1.32所述的化合物,其中所述盐为药学上可接受的盐。

[0084] 通用优选项和定义

[0085] 本文提到的激酶不仅包括所讨论的激酶的正常功能形式,而且还包括其突变形式。

[0086] 如本文所使用,如应用至激酶活性的术语“调节”旨在定义一种或多种激酶的生物活性水平的变化。因此,调节涵盖影响相关激酶活性的提高或降低的生理学变化。在后一种情况下,调节可描述为“抑制”。

[0087] 如本文关于激酶所使用的术语“上调”定义为包括激酶的升高的表达或过表达,包括基因扩增(即,多基因拷贝)和通过转录作用的增加的表达,以及激酶的活性过强和活化,包括通过突变活化。

[0088] 本文提到的通过特定的激酶“介导”的疾病状态或病状旨在限制性地操作,以使得术语应用在其上的多种疾病状态或病状为所讨论的激酶(或其突变形式)在其中起到一定的生物学作用的那些。激酶所起到的生物学作用可为直接的或间接的,并且对于疾病、状态或病状(或其病因或进展)的症状的表现是必需的和/或足够的。

[0089] 盐

[0090] 本发明的化合物可以盐的形式呈现。

[0091] 盐(如实施方案1.31至1.33中所定义的)通常为酸加成盐。

[0092] 可以通过常规化学方法由母化合物合成盐,所述方法如Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, P. Heinrich Stahl(编辑), Camille G. Wermuth(编辑), ISBN: 3-90639-026-8, 精装版, 388页, 2002年8月中所描述的方法。一般来说,可通过使游离碱形式的化合物与酸在水中或在有机溶剂中,或在两者的混合物中反应来制备所述盐;通常使用非水性介质,如醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈。

[0093] 可用广泛多种酸(无机和有机)形成酸加成盐(如实施方案1.32中所定义的)。酸加成盐的实例包括用选自由以下组成的组的酸形成的盐:乙酸、2,2-二氯乙酸、己二酸、褐藻酸、抗坏血酸(例如L-抗坏血酸)、L-天冬氨酸、苯磺酸、苯甲酸、4-乙酰氨基苯甲酸、丁酸、(+)-樟脑酸、樟脑磺酸、(+)-(1S)-樟脑-10-磺酸、癸酸、己酸、辛酸、肉桂酸、柠檬酸、环己烷氨基磺酸、十二烷基硫酸、乙烷-1,2-二磺酸、乙磺酸、2-羟基乙磺酸、蚁酸、富马酸、半乳糖二酸、龙胆酸、葡庚糖酸、D-葡萄糖酸、葡萄糖醛酸(例如D-葡萄糖醛酸)、谷氨酸(例如L-谷氨酸)、 α -氧代戊二酸、乙醇酸、马尿酸、氢溴酸、盐酸、氢碘酸、羟乙磺酸、(+)-L-乳酸、(±)-DL-乳酸、乳糖酸、马来酸、苹果酸、(-)-L-苹果酸、丙二酸、(±)-DL-扁桃酸、甲磺酸、萘-2-磺酸、萘-1,5-二磺酸、1-羟基-2-萘甲酸、烟酸、硝酸、油酸、乳清酸、草酸、棕榈酸、双羟萘酸、磷酸、丙酸、L-焦谷氨酸、水杨酸、4-氨基-水杨酸、癸二酸、硬脂酸、琥珀酸、硫酸、鞣酸、(+)-L-

酒石酸、硫氰酸、对甲苯磺酸、十一碳烯酸以及戊酸,以及酰化氨基酸和阳离子交换树脂。

[0094] 本发明化合物的盐形式典型地为药学上可接受的盐,并且药学上可接受的盐的实例在Berge等,1977,"Pharmaceutically Acceptable Salts,"J.Pharm.Sci.,第66卷,第1-19页中讨论。然而,也可将非药学上可接受的盐制备为中间体形式,所述中间体形式可然后转化为药学上可接受的盐。可能例如在本发明化合物的纯化或分离中有用的所述非药学上可接受的盐形式也形成本发明的部分。

[0095] 同位素

[0096] 如在实施方案1.1至1.33中任一项所定义的本发明化合物可含有一个或多个同位素取代,并且提到的具体元素将所述元素的所有同位素包括在其范围内。例如,提到的氢将 ^1H 、 $^2\text{H}(\text{D})$ 以及 $^3\text{H}(\text{T})$ 包括在其范围内。类似地,提到的碳和氧分别将 ^{12}C 、 ^{13}C 和 ^{14}C 以及 ^{16}O 和 ^{18}O 包括在其范围内。

[0097] 以类似的方式,除非上下文另外指示,否则提到的具体官能团也将同位素变型包括在其范围内。

[0098] 例如,提到的烷基(如乙基)还包括其中基团中的一个或多个氢原子呈氘或氚同位素形式的变型,例如,如在其中全部五个氢原子均呈氘同位素形式的乙基中(全氘化乙基)。

[0099] 同位素可为放射性或非放射性的。在本发明的一个实施方案(实施方案1.34)中,实施方案1.1至1.33中任一项所述的化合物均不含有放射性同位素。所述化合物优选用于治疗性用途。然而,在另一个实施方案(实施方案1.35)中,实施方案1.1至1.33中任一项所述的化合物可含有一个或多个放射性同位素。含有所述放射性同位素的化合物在诊断背景中可为有用的。

[0100] 溶剂合物

[0101] 如在实施方案1.1至1.35中任一项所定义的式(1)化合物可形成溶剂合物。

[0102] 优选的溶剂合物为通过将非毒性药学上可接受的溶剂(下文称为溶剂化溶剂)分子并入本发明化合物的固态结构(例如,晶体结构)中形成的溶剂合物。所述溶剂的实例包括水、醇(如乙醇、异丙醇和丁醇)和二甲基亚砜。可通过将本发明化合物与溶剂或含有溶剂化溶剂的溶剂混合物重结晶来制备溶剂合物。在任何给定情况下是否已形成溶剂合物可通过使用公知和标准技术使化合物的晶体经受分析来确定,所述技术如热重分析(TGE)、差示扫描量热法(DSC)和X-射线结晶法。

[0103] 溶剂合物可为化学计量或非化学计量的溶剂合物。

[0104] 特别优选的溶剂合物为水合物,并且水合物的实例包括半水合物、一水合物和二水合物。

[0105] 因此,在另外的实施方案1.36和1.37中,本发明提供:

[0106] 1.36根据实施方案1.1至1.35中任一项所述的呈溶剂合物形式的化合物。

[0107] 1.37根据实施方案1.36所述的化合物,其中所述溶剂合物为水合物。

[0108] 对于溶剂合物和用于制备和表征所述溶剂合物的方法的更详细的论述,参见Bryn等,Solid-State Chemistry of Drugs,第二版,West Lafayette,IN,USA的SSCI,Inc出版,1999,ISBN 0-967-06710-3。

[0109] 或者,本发明化合物可为无水的,而不是作为水合物存在。因此,在另一个实施方案(实施方案1.38)中,本发明提供一种如实施方案1.1至1.35中任一项所定义的呈无水形

式的化合物。

[0110] 晶体和无定形形式

[0111] 实施方案1.1至1.38中任一项所述的化合物可以晶体或非晶体(例如,无定形)状态存在。

[0112] 化合物是否以晶体状态存在可通过如X-射线粉末衍射(XRPD)的标准技术容易地确定。

[0113] 可使用多种技术表征晶体以及其晶体结构,所述技术包括单晶X射线晶体照相术、X射线粉末衍射(XRPD)、差示扫描量热法(DSC)和红外光谱法,例如傅里叶变换红外光谱法(FTIR)。在不同湿度条件下晶体的行为可通过重力蒸汽吸附研究并还可通过XRPD进行分析。

[0114] 化合物晶体结构的测定可通过可根据常规方法进行的X-射线晶体照相术来执行,所述常规方法如本文描述的以及在Fundamentals of Crystallography, C. Giacovazzo, H. L. Monaco, D. Viterbo, F. Sordani, G. Gilli, G. Zanotti和M. Catti, (International Union of Crystallography/Oxford University Press, 1992 ISBN 0-19-855578-4(p/b), 0-19-85579-2(h/b))中描述的那些。这种技术涉及单晶的X-射线衍射的分析和解释。

[0115] 在无定形固体中,不存在晶体形式中正常存在的三维结构,并且在无定形形式中分子相对于彼此的位置基本上是随机的,参见例如Hancock等J. Pharm. Sci. (1997), 86, 1)。

[0116] 因此,在另外的实施方案中,本发明提供:

[0117] 1.39根据实施方案1.1至1.38中任一项所述的呈晶体形式的化合物。

[0118] 1.40根据实施方案1.1至1.38中任一项所述的化合物,其:

[0119] (a)为50%至100%结晶,并且更尤其为至少50%结晶,或至少60%结晶,或至少70%结晶,或至少80%结晶,或至少90%结晶,或至少95%结晶,或至少98%结晶,或至少99%结晶,或至少99.5%结晶,或至少99.9%结晶,例如100%结晶。

[0120] 1.41根据实施方案1.1至1.38中任一项所述的化合物,其呈无定形形式。

[0121] 前药

[0122] 如实施方案1.1至1.41中任一项所定义的式(1)化合物可以前药的形式呈现。所谓的“前药”意指例如在体内转化为如实施方案1.1至1.41中任一项所定义的生物活性的式(1)化合物的任何化合物。

[0123] 例如,一些前药为活性化合物(例如,生理上可接受的代谢不稳定的酯)的酯。在代谢期间,酯基($-C(=O)OR$)裂解以得到活性前药。所述酯可通过例如母化合物中存在的任何羟基在适当时候与保护之前母化合物中存在的任何其它反应性基团的酯化,接着根据需要脱保护而形成。

[0124] 同样,一些前药酶催化激活以产生活性化合物,或在进一步的化学反应之后产生活性化合物的化合物(例如,如在ADEPT、GDEPT、LIDEPT等中)。例如,前药可为糖衍生物或其它糖苷共轭物,或可为氨基酸酯衍生物。

[0125] 因此,在另一个实施方案(实施方案1.42)中,本发明提供一种如实施方案1.1至1.41中任一项所定义的化合物的前药,其中所述化合物含有在生理条件下可转化以形成羟基或氨基的官能团。

[0126] 配合物和包合物

[0127] 实施方案1.1至1.42的式(1)还涵盖的是实施方案1.1至1.42的化合物的配合物(例如,具有如环糊精的化合物的包含配合物或包合物,或具有金属的配合物)。

[0128] 因此,在另一个实施方案(实施方案1.43)中,本发明提供一种根据实施方案1.1至1.42中任一项所述的呈配合物或包合物形式的化合物。

[0129] 生物活性

[0130] 本发明的化合物具有多种治疗用途。

[0131] 因此,在另一个实施方案(实施方案2.1)中,本发明提供一种适用于医学的如实施方案1.1至1.43中任一项所定义的式(1)化合物。

[0132] 更具体地,本发明的化合物为激酶的抑制剂,例如,FLT3激酶和极光激酶,如极光激酶A和极光激酶B。

[0133] 因此,在另外的实施方案(2.2至2.14)中,本发明提供:

[0134] 2.2如实施方案1.1至1.43中任一项所定义的式(1)化合物或其任何子群或实例,其适用于由FLT3激酶或极光激酶(如极光激酶A或极光激酶B)介导的疾病状态或病状的预防或治疗。

[0135] 2.3如实施方案1.1至1.43中任一项所定义的式(1)化合物或其任何子群或实例,其适用于由FLT3激酶或极光激酶(如极光激酶A或极光激酶B)的异常表达(例如过表达)所表征的疾病状态或病状的预防或治疗。

[0136] 2.4如实施方案1.1至1.43中任一项所定义的式(1)化合物或其任何子群或实例用于制造药剂的用途,所述药剂用于由FLT3激酶或极光激酶(如极光激酶A或极光激酶B)介导的疾病状态或病状的预防或治疗。

[0137] 2.5如实施方案1.1至1.43中任一项所定义的式(1)化合物或其任何子群或实例用于制造药剂的用途,所述药剂用于由FLT3激酶或极光激酶(如极光激酶A或极光激酶B)的异常表达(例如过表达)所表征的疾病状态或病状的预防或治疗。

[0138] 2.6一种用于预防或治疗由FLT3激酶或极光激酶(如极光激酶A或极光激酶B)介导的疾病状态或病状的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用如实施方案1.1至1.43中任一项所定义的式(1)化合物或其任何子群或实例。

[0139] 2.7一种用于预防或治疗由FLT3激酶或极光激酶(如极光激酶A或极光激酶B)的异常表达(例如过表达)所表征的疾病状态或病状的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用如实施方案1.1至1.43中任一项所定义的式(1)化合物或其任何子群或实例。

[0140] 2.8一种用于减轻或降低由FLT3激酶或极光激酶(如极光激酶A或极光激酶B)介导的疾病状态或病状的发病率的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用如实施方案1.1至1.43中任一项所定义的式(1)化合物或其任何子群或实例。

[0141] 2.9根据实施方案2.1至2.8中任一项所述的用于使用的化合物、用途或方法,其中所述疾病状态或病状为由FLT3激酶介导或由FLT3激酶的异常表达(例如过表达)所表征的疾病状态或病状。

[0142] 2.10根据实施方案2.1至2.8中任一项所述的用于使用的化合物、用途或方法,其中所述疾病状态或病状为由极光激酶(例如,极光A激酶或极光B激酶)介导或由极光激酶(例如,极光A激酶或极光B激酶)的异常表达(例如过表达)所表征的疾病状态或病状。

[0143] 2.11一种抑制FLT3激酶的方法,所述方法包括使所述激酶与如实施方案1.1至

1.43中任一项所定义的激酶抑制性式(1)化合物或其任何亚群或实例接触。

[0144] 2.12一种抑制极光激酶(如极光激酶A或极光激酶B)的方法,所述方法包括使所述激酶与如实施方案1.1至1.43中任一项所定义的激酶抑制性式(1)化合物或其任何子群或实例接触。

[0145] 2.13一种通过使用如实施方案1.1至1.43中任一项所定义的式(1)化合物或其任何子群或实例抑制FLT3激酶的活性来调节细胞过程(例如细胞分裂)的方法。

[0146] 2.14一种通过使用如实施方案1.1至1.43中任一项所定义的式(1)化合物或其任何子群或实例抑制极光激酶(如极光激酶A或极光激酶B)的活性来调节细胞过程(例如细胞分裂)的方法。

[0147] 由于它们在调节和尤其抑制FLT3和极光激酶上的活性,期望它们在治疗或预防如癌症的增生性病症中是有用的。

[0148] 因此,在另外的实施方案(实施方案2.15至2.28)中,本发明进一步提供:

[0149] 2.15如实施方案1.1至1.43中任一项所定义的式(1)化合物或其任何子群或实例,其适用于如癌症的增生性疾病的预防或治疗。

[0150] 2.16如实施方案1.1至1.43中任一项所定义的式(1)化合物或其任何子群或实例用于制造药剂的用途,所述药剂适用于如癌症的增生性疾病的预防或治疗。

[0151] 2.17一种用于在受试者中治疗如癌症的增生性疾病的方法,所述方法包括向所述受试者(例如,哺乳动物,如人)施用如实施方案1.1至1.43中任一项所定义的式(1)化合物或其任何子群或实例。

[0152] 2.18如实施方案1.1至1.43中任一项所定义的式(1)化合物或其任何子群或实例,其适用于包括异常细胞生长或由其引起的疾病或病状的预防或治疗。

[0153] 2.19如实施方案1.1至1.43中任一项所定义的式(1)化合物或其任何子群或实例用于制造药剂的用途,所述药剂适用于包括异常细胞生长或由其引起的疾病或病状的预防或治疗。

[0154] 2.20一种用于在哺乳动物中治疗包括异常细胞生长或由其引起的疾病或病状的方法,所述方法包括以有效抑制异常细胞生长的量向所述哺乳动物施用如实施方案1.1至1.43中任一项所定义的式(1)化合物或其任何子群或实例。

[0155] 2.21一种用于在哺乳动物中减轻或降低包括异常细胞生长或由其引起的疾病或病状的发病率的方法,所述方法包括以有效抑制异常细胞生长的量向所述哺乳动物施用如实施方案1.1至1.43中任一项所定义的式(1)化合物或其任何子群或实例。

[0156] 2.22如实施方案2.15至2.17中任一项所定义的用于使用的化合物、用途或方法,其中所述增生性疾病为选自以下的癌症:癌,例如膀胱癌,乳房癌,结肠癌(例如结肠直肠癌,如结肠腺癌和结肠腺瘤)、肾癌、表皮癌、肝癌、肺癌,例如腺癌,小细胞肺癌和非小细胞肺癌、食管癌、胆囊癌、卵巢癌、胰腺癌(例如外分泌性胰腺癌)、胃癌、宫颈癌、甲状腺癌、前列腺癌或皮肤癌(例如鳞状细胞癌);淋巴系造血肿瘤,例如白血病、急性淋巴细胞性白血病、B细胞性淋巴瘤、T细胞性淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、毛细胞性淋巴瘤,或伯克特氏淋巴瘤;骨髓系造血肿瘤,例如急性和慢性髓细胞性白血病、骨髓增生异常综合征或早幼粒细胞性白血病;甲状腺滤泡性癌;间充质来源肿瘤(例如纤维肉瘤或横纹肌肉瘤)、中央或外周神经系统肿瘤(例如星形细胞瘤、成神经细胞瘤、神经胶质瘤或神经鞘

瘤);黑色素瘤;精原细胞瘤;畸胎瘤;骨肉瘤;着色性干皮病;角化棘皮瘤;甲状腺滤泡性癌;或卡波西肉瘤。

[0157] 2.23如实施方案2.22所定义的用于使用的化合物、用途或方法,其中所述癌症为易受极光A激酶抑制的癌症,并且选自:乳房癌、膀胱癌、结肠直肠癌、胰腺癌和卵巢癌、非霍奇金氏淋巴瘤、神经胶质瘤、非子宫内膜状子宫内膜癌、急性髓性白血病(AML)、慢性髓性白血病(CML)、B-细胞性淋巴瘤(套细胞)以及急性成淋巴细胞性白血病(ALL)。

[0158] 2.24如实施方案2.22中所定义的用于使用的化合物、用途或方法,其中所述癌症为易受极光B激酶抑制的癌症,并且选自:结肠直肠癌、肺癌、急性髓细胞性白血病、急性成淋巴细胞性白血病以及急性嗜酸性粒细胞白血病。

[0159] 2.25如实施方案2.22所定义的用于使用的化合物、用途或方法,其中所述癌症为易受FLT3激酶抑制的癌症,并且为急性髓细胞性白血病(AML)。

[0160] 2.26如实施方案2.25所定义的用于使用的化合物、用途或方法,其中所述AML在患者中与FLT3的体细胞突变或点突变相关。

[0161] 2.27如实施方案2.26所定义的用于使用的化合物、用途或方法,其中所述AML在患者中与FLT3的体细胞突变相关,所述体细胞突变涉及FLT3受体的近膜区域的内部串联重复。

[0162] 2.28如实施方案2.26所定义的用于使用的化合物、用途或方法,其中所述AML在患者中与FLT3活化环中D835的点突变相关。

[0163] 2.29如实施方案2.22所定义的用于使用的化合物、用途或方法,其中所述增生性疾病为造血系统肿瘤。

[0164] 2.30如实施方案2.29所定义的用于使用的化合物、用途或方法,其中所述造血系统肿瘤选自:急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、急性髓细胞性白血病(AML),慢性髓细胞性白血病(CML)、霍奇金淋巴瘤(HL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)以及多发性骨髓瘤(MM)。

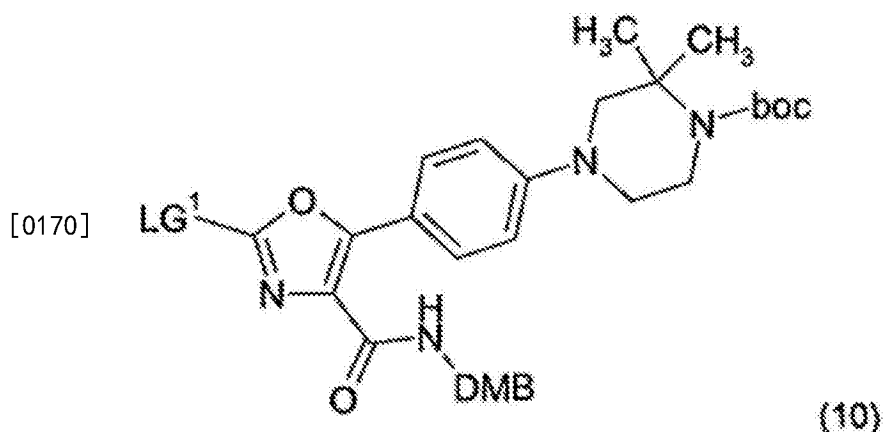
[0165] 特定癌症是否是对通过极光激酶或FLT3激酶的抑制敏感的癌症可借助于细胞生长测定(例如以下实施例中所描述的测定)或通过标题为“诊断方法”的部分中所阐述的方法来确定。

[0166] 作为激酶抑制剂的本发明化合物的活性可使用以下实施例中所列出的测定进行测量,并且给定化合物所展现出的活性水平可以IC₅₀值来定义。本发明的优选化合物为具有小于0.01μM,更优选小于0.005μM的IC₅₀值的化合物。

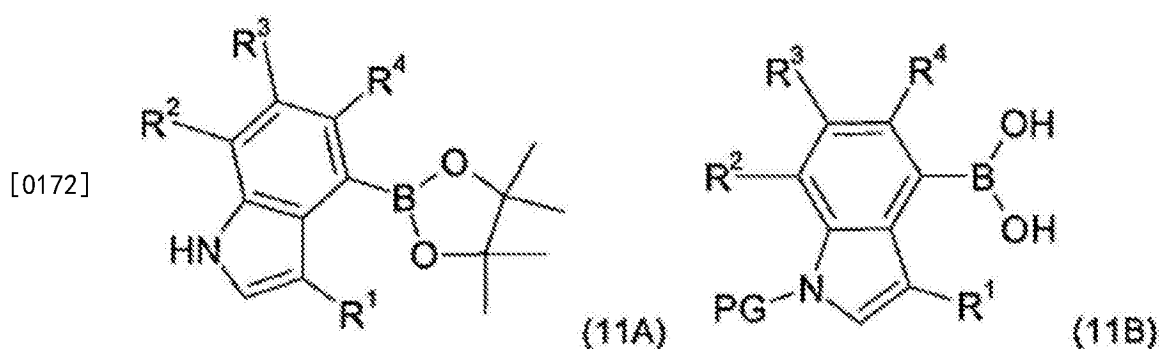
[0167] 用于制备本发明化合物的方法

[0168] 在另一个方面(实施方案3.1),本发明提供一种用于制备如实施方案1.1至1.35中任一项所定义的化合物的方法,所述方法包括:

[0169] (i)式(10)化合物:

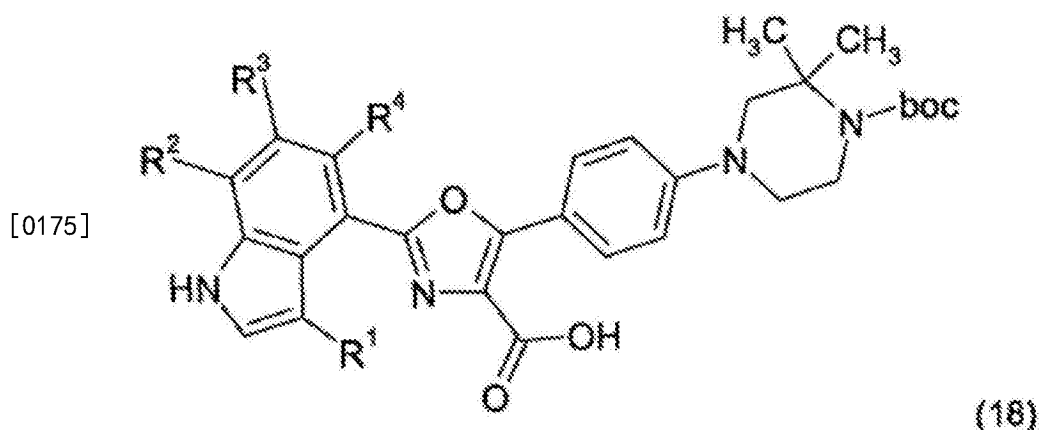


[0171] 其中LG¹为碘或溴(更通常为碘),DMB为2,4-二甲氧苄基保护基并且boc为叔丁氧羰基保护基;与式(11A)或(11B)化合物或对应的硼酸二酯:



[0173] 其中PG为保护基,如叔丁基二甲基甲硅烷基,在铃木偶联反应条件下的反应,并且其后去除保护基DMB和boc;或

[0174] (ii)式(18)化合物:



[0176] 其中boc为叔丁氧羰基,与氨在酰胺形成条件下的反应,并且其后去除boc基团。

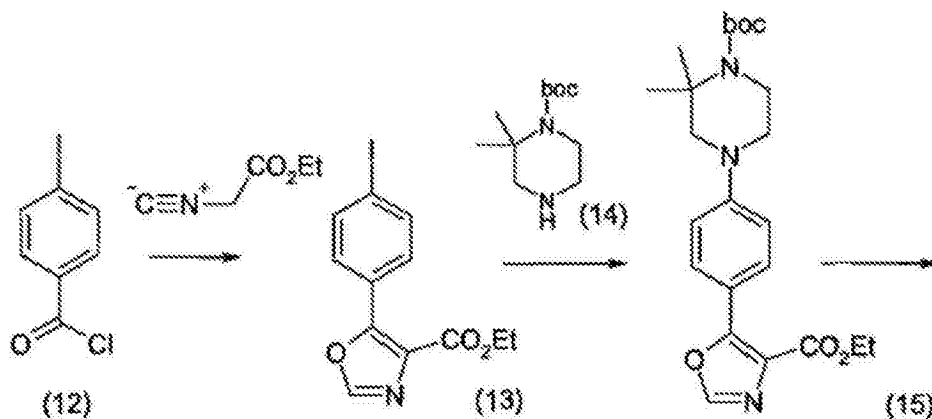
[0177] 在方法变体(i)中,铃木偶联反应条件典型地涉及钯催化剂和碱(例如碳酸盐,如碳酸钾)的存在,所述钯催化剂如四(三苯基膦)钯或双(1,1'-二(二苯基-膦基)-二茂铁)二氯化钯(Pd(dppf)₂Cl₂)。可在极性溶剂(例如乙腈或二噁烷以及其混合物)或水性溶剂(如水性乙醇,或如二甲氧基乙烷的醚)中执行反应,并且反应混合物通常经受加热,例如至80℃或更高的温度,例如在80℃至100℃范围内的温度。

[0178] 在化合物(10)和化合物(11A)或化合物(11B)中的任一个之间的偶联反应发生之

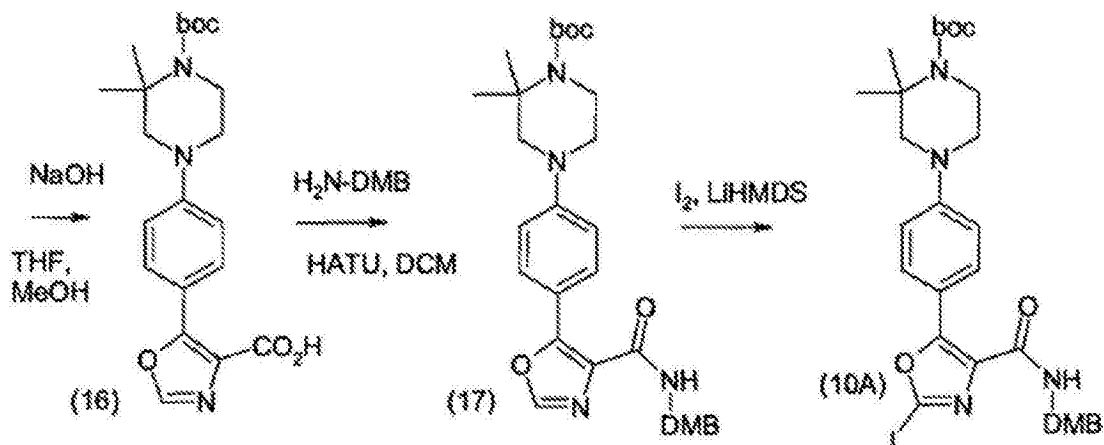
后,可通常在室温或大约室温下使用酸(如三氟甲磺酸)在溶剂(如二氯甲烷)中方便地去除保护基。

[0179] 其中LG¹为碘原子的式(10)化合物可通过以下方案1中所示出的一系列反应进行制备。

[0180] 在方案1中,使碘苯甲酰氯与2-异氰基乙酸乙酯在极性质子惰性溶剂(如四氢呋喃)中在例如室温下反应,以得到碘代苯基噁唑酯(13)。然后使酯(13)与受保护的哌嗪(14)在钡化合物(如醋酸钡)和膦配体(如联苯基-2-基二环己基膦)的存在下反应,以得到取代的哌嗪基苯基-噁唑酯(15)。通常在质子惰性溶剂(如甲苯)中,在碱(如碳酸铯)的存在下,通常在温和加热例如至约70℃-90℃的温度的情况下执行反应。



[0181]



[0182] 方案1

[0183] 在极性溶剂(如甲醇和/或THF)中使用碱金属氢氧化物(如氢氧化钠)将酯(15)水解,以得到羧酸(16),其然后通过酰胺形成条件下,例如在通常用于酰胺键的形成的类型的试剂存在下与二甲氧苄基胺反应而转化为二甲氧苄基酰胺(17)。所述试剂的实例包括基于碳二亚胺的偶联试剂,如1,3-二环己基碳二亚胺(DCC)(Sheehan等,J.Amer.Chem.Soc.1955,77,1067)和1-乙基-3-(3'-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺(本文称为EDC或EDC1)(Sheehan等,J.Org.Chem.,1961,26,2525),其通常与1-羟基-7-氮杂苯并三唑(HOAt)(L.A.Carpino,J.Amer.Chem.Soc.,1993,115,4397)或1-羟基苯并三唑(HOBt)(Konig等,Chem.Ber.,103,708,2024-2034)组合使用。所述试剂的另外实例为基于脒的偶联剂,如O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸盐(HATU)。一种优选的酰胺偶联剂为HATU。

[0184] 偶联反应通常在非水性、非质子溶剂(如二甲基甲酰胺)中在室温下在非干扰性碱(例如叔胺,如三乙胺或N,N-二异丙基乙胺)的存在下执行。

[0185] 二甲氧基苯甲酰胺(17)使用六甲基二硅氮烷锂(LiHMDS)在THF中在降低的温度下锂化之后与碘反应得到2-碘-噁唑(10)。然后可通过上述方法将化合物(10)转化为式(1)化合物。

[0186] 在方法变体(ii)中,使式(18)的羧酸与氨(或氨基前体,如二甲氧基苄胺)在上述类型的酰胺形成条件(例如与HOBt组合使用EDC)下反应。

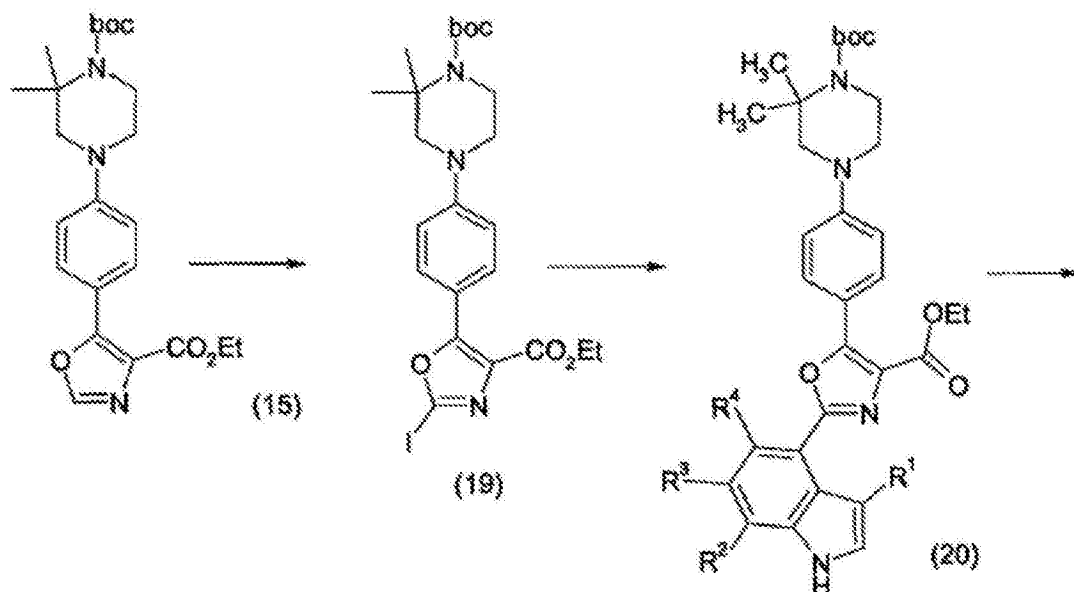
[0187] 可通过以下方案2中所示的一系列反应来制备式(18)化合物。

[0188] 在方案2中,通过在THF中在降低的温度下与六甲基二硅氮烷锂(LiHMDS)反应,之后与碘反应,将酯(15)(参见以上方案1)碘化,以得到碘代化合物(19)。然后使碘代化合物(19)在铃木偶联条件(参见上文)下与式(11)硼酸酯化合物反应,以得到中间体(20),使用氢氧化钠将所述中间体(20)水解,以得到式(18)的羧酸。

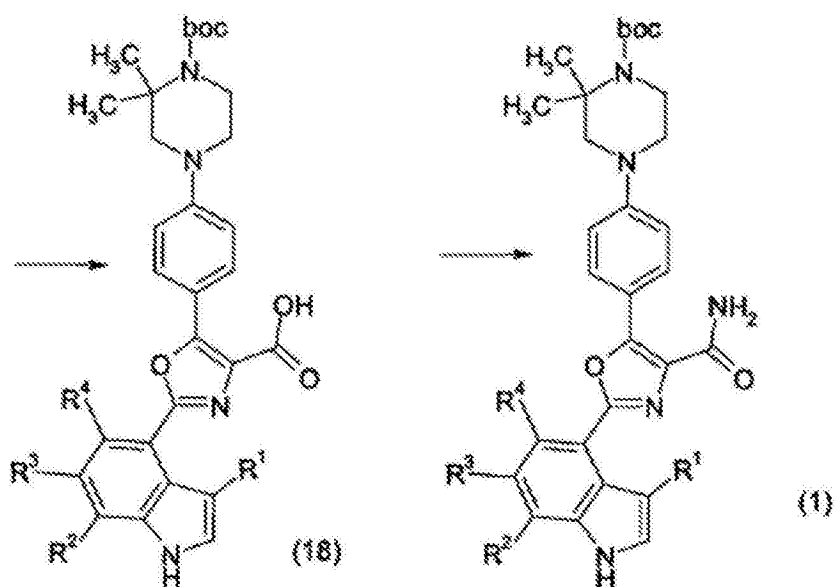
[0189] 一旦形成,就可使用标准官能团相互转化将许多式(1)化合物转化为其它式(1)化合物。

[0190] 官能团相互转化以及用于执行所述转化的试剂和条件的实例可见于例如Jerry March的Advanced Organic Chemistry,第4版,119,Wiley Interscience,New York; Fiesers'Reagents for Organic Synthesis,第1-17卷,John Wiley,Mary Fieser编辑(ISBN:0-471-58283-2)以及Organic Syntheses,第1-8卷,John Wiley,Jeremiah P.Freeman编辑(ISBN:0-471-31192-8)。

[0191] 在许多上述反应中,可能需要对一个或多个基团进行保护,以防止在分子上不希望的位置处发生反应。保护基以及保护和去保护官能团的方法的实例可见于Protective Groups in Organic Synthesis(T.Green和P.Wuts;第3版;John Wiley and Sons,1999)。



[0192]



[0193] 方案2

[0194] 可根据本领域技术人员公知的标准技术分离和纯化本发明的化合物。在纯化化合物中特别有用的一种技术为使用质谱作为检测从色谱柱中排出的纯化化合物的手段的制备型液相色谱。

[0195] 制备型LC-MS为用于纯化小的有机分子(如本文描述的化合物)的标准和有效的方法。用于液相色谱(LC)和质谱(MS)的方法可变化,以通过MS提供粗材料的更好分离以及样品的改善的检测。制备型梯度LC方法的优化将涉及不同的柱、挥发性洗脱剂和改性剂,以及梯度。用于优化制备型LC-MS方法并且然后使用其来纯化化合物的方法是本领域公知的。所述方法描述于Rosentreter U, Huber U.; Optimal fraction collecting in preparative LC/MS; J Comb Chem.; 2004; 6(2), 159-64和Leister W, Strauss K, Wisnoski D, Zhao Z, Lindsley C., Development of a custom high-throughput preparative liquid chromatography/mass spectrometer platform for the preparative purification and analytical analysis of compound libraries; J Comb Chem.; 2003; 5(3); 322-9。

[0196] 中间化合物(10)、(10A)以及(15)至(20)也形成本发明的部分。因此,在另一个实

施方案(实施方案3.2)中,本发明提供一种选自如上所述的式(10)、(10A)、(15)、(16)、(17)、(18)、(19)和(20)中间化合物的化合物。

[0197] 药物制剂

[0198] 虽然单独施用活性化合物是可能的,但是优选将其作为一种药物组合物(例如制剂)来提供,所述药物组合物包含本发明的至少一种活性化合物,连同一种或多种药学上可接受的载体、佐剂、赋形剂、稀释剂、填充剂、缓冲剂、稳定剂、防腐剂、润滑剂,或本领域技术人员公知的其它材料,以及任选其它治疗或预防剂。

[0199] 因此,在另一个方面(实施方案4.1),本发明提供一种药物组合物,其包含如实施方案1.1至1.43中任一项所定义的化合物和药学上可接受的载体。

[0200] 如本文使用的术语“药学上可接受的”指的是在合理的医学判断范围内适用于与受试者(例如人)的组织接触而没有过度的毒性、刺激、过敏反应,或其它问题或并发症,并具有合理的利益/风险比的化合物、材料、组合物,和/或剂型。各载体、赋形剂等在与制剂的其它成分相容的意义上也必须为“可接受的”。

[0201] 药物组合物可呈适于经口、胃肠外、局部、鼻内、经眼、经耳、经直肠、阴道内或经皮施用的任何形式。在组合物旨在用于胃肠外施用的情况下,所述组合物可配制用于静脉内、肌肉内、腹腔内、皮下施用或用于通过注射、输注或其它输送手段直接输送至目标器官或组织中。

[0202] 在一个实施方案(实施方案4.2)中,药物组合物呈适于静脉内(i.v.)施用(例如通过注射或输注)的形式。

[0203] 在另一个实施方案(实施方案4.3)中,药物组合物呈适于皮下(s.c.)施用的形式。

[0204] 在另一个实施方案(实施方案4.4)中,药物组合物呈适于经口施用的形式。

[0205] 适于经口施用的药物剂型包括片剂、胶囊、囊片、丸剂、锭剂、糖浆剂、溶液、粉剂、粒剂、酏剂和混悬剂、舌下片剂、糯米纸囊剂或贴剂以及口腔贴剂

[0206] 含有式(1)化合物的药物组合物可根据已知技术进行配制,参见例如,Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA, USA。

[0207] 因此,片剂组合物可含有单位剂量的活性化合物连同惰性稀释剂或载体,如糖或糖醇,例如乳糖、蔗糖、山梨醇或甘露醇;和/或非糖衍生的稀释剂,如碳酸钠、磷酸钙、碳酸钙,或纤维素或其衍生物,如甲基纤维素,乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素,以及淀粉,如玉米淀粉。片剂还可含有所述标准成分作为粘合剂和成粒剂(如聚乙烯吡咯烷酮)、崩解剂(例如可溶胀的交联聚合物,如交联羧甲基纤维素),润滑剂(例如硬脂酸酯)、防腐剂(例如对羟基苯甲酸酯)、抗氧化剂(例如BHT)、缓冲剂(例如磷酸盐或柠檬酸盐缓冲液),以及泡腾剂(如柠檬酸盐/碳酸氢盐混合物)。所述赋形剂是公知的并且不需要在此详细论述。

[0208] 胶囊制剂的种类可为硬明胶或软明胶并且可含有呈固体、半固体或液体形式的活性组分。明胶胶囊可由动物明胶或合成的或其植物衍生的等效物形成。

[0209] 固体剂型(例如片剂、胶囊等)可包衣或不包衣,但通常具有包衣,例如保护膜包衣(例如蜡或涂剂)或控释包衣。包衣(例如Eudragit™型聚合物)可设计成在胃肠道内的所需位置处释放活性组分。因此,可选择包衣,以便在某些pH条件下在胃肠道内降解,从而选择性地胃或在回肠或十二指肠中释放化合物。

[0210] 代替包衣或除包衣之外,药物可以固体基质呈现,所述固体基质包含控释剂,例如

释放延迟剂,其可适于在胃肠道中在不同的酸度或碱度条件下选择性地释放化合物。或者,基质材料或释放延缓包衣可采取易蚀聚合物(例如,马来酸酐聚合物)的形式,当剂型通过胃肠道时,所述易蚀聚合物实质上连续地被侵蚀。作为另一个替代,活性化合物可配制在提供化合物释放的渗透控制的输送系统中。渗透释放和其它延迟释放或持续释放制剂可根据本领域技术人员公知的方法来制备。

[0211] 用于局部使用的组合物包括软膏剂、乳剂、喷雾剂、贴剂、凝胶剂、液体滴剂和插入物(例如眼内插入物)。所述组合物可根据已知方法来配制。

[0212] 用于胃肠外施用的组合物通常呈现为无菌水性或油性溶液或精细混悬液,或可以微细的无菌粉末形式来提供,用于在临用前用注射用无菌水制备。

[0213] 用于胃肠外施用的组合物可配制来作为离散剂量单位施用或可配制来通过输注施用。

[0214] 用于直肠或阴道内施用的制剂的实例包括阴道栓剂和栓剂,其可例如由含有活性化合物的成形可模制或蜡状材料形成。

[0215] 用于通过吸入施用的组合物可采取可吸入粉末组合物或液体或粉末喷雾剂的形式,并且可使用粉末吸入器装置或气雾剂分配装置以标准形式施用。所述装置是公知的。对于通过吸入施用,粉末状制剂通常包含活性化合物连同惰性固体粉末状稀释剂(如乳糖)。

[0216] 本发明的化合物将通常以单位剂型呈现,因此将通常含有足够的化合物以提供所需水平的生物活性。例如,旨在用于经口施用的制剂可含有从0.1毫克至2克的活性成分,更通常从10毫克至1克,例如50毫克至500毫克。

[0217] 将以足以达到所希望的治疗效果的量向有需要的患者(例如人或动物患者)施用活性化合物。

[0218] 治疗方法

[0219] 设想本文所定义的式(1)化合物以及其子群将适用于预防或治疗由极光激酶(例如极光A激酶或极光B激酶)介导的一个范围的疾病状态或病状。所述疾病状态或病状的实例在上文列出。

[0220] 具体地说,设想式(1)化合物将适用于预防和/或治疗增生性疾病(如癌症)和骨髓增生性病症。

[0221] 化合物通常施用至需要所述施用的受试者,例如人或动物患者,优选人。

[0222] 通常将以为治疗或预防有用的并且通常为无毒性的量施用化合物。然而,在某些情形(例如,在威胁生命的疾病的情况)中,施用式(1)化合物的益处可超过任何毒性作用或副作用的缺点,在所述情况下,可认为希望以与一定程度的毒性相关的量施用化合物。

[0223] 可长期施用化合物以保持有益的治疗作用或可仅短期施用。或者,可以脉动或连续方式施用所述化合物。

[0224] 化合物的典型每日剂量的范围可在从100皮克/千克体重至100毫克/千克体重,更典型地5纳克/千克体重至25毫克/千克体重,并且更通常10纳克/千克体重至15毫克(例如10纳克至10毫克)/千克体重,但是如果需要,可施用更高或更低剂量。最终,所施用化合物的量和所用组合物的类型将与正在治疗的疾病或生理状况的性质相称并将由医师来决定。

[0225] 式(1)化合物可作为单独的治疗剂施用或其可在组合疗法中与一种或多种其它化合物一起施用来治疗特定的疾病状态,例如肿瘤性疾病,如如上所定义的癌症。可与式(1)

化合物一起(同时或在不同的时间间隔)施用的其他治疗剂的实例包括但不限于:拓扑异构酶抑制剂、烷化剂、抗代谢物、DNA粘合剂以及微管抑制剂(微管蛋白靶向剂),如顺铂、环磷酰胺、阿霉素、依立替康、氟达拉滨、5FU、紫杉烷、丝裂霉素C,或放射疗法。或者,式(1)化合物可在组合疗法中与单克隆抗体或信号转导抑制剂一起施用。

[0226] 在式(1)化合物在组合疗法中与一种、两种、三种、四种或更多种其它治疗剂(优选一种或两种,更优选一种)一起施用的情况下,可同时或顺次施用化合物。当顺次施用时,它们可以紧密相间的间隔(例如经过5-10分钟的时间段)或以较长的间隔(例如间隔1、2、3、4或更多小时,或甚至更长的时间段间隔,如果需要)施用,并且精确的剂量方案与一种或多种治疗剂的特性相称。

[0227] 本发明的化合物还可以与非化疗性治疗、外科手术和饮食控制结合施用,所述非化疗性治疗如放疗、光动力疗法、基因疗法。

[0228] 对于在组合疗法中与另一种化疗剂一起使用,式(1)化合物和一种、两种、三种、四种或更多种其它治疗剂可例如一起配制,呈含有两种、三种、四种或更多种治疗剂的剂型。在替代方案中,单独的治疗剂可分开配制,并任选与其使用说明书一起以试剂盒的形式呈现。

[0229] 诊断方法

[0230] 在施用式(1)化合物之前,可对患者进行筛选,以确定患者所患的或可能罹患的疾病或病状是否是将易于用具有抗FLT3激酶或极光激酶(例如极光A激酶或极光B激酶)的活性的化合物治疗的疾病或病状。

[0231] 因此,在另外的实施方案(5.1至5.6)中,本发明提供:

[0232] 5.1:如本文实施方案1.1至1.43中任一项所定义的化合物或如本文所定义的其任何子群或实例,其适用于治疗或预防患者的疾病状态或病状,所述患者已被筛选并已被确定为罹患疾病或病状或处于罹患其的风险,所述疾病或病状将易于用具有抗极光激酶(例如,极光A激酶或极光B激酶)的活性的化合物治疗。

[0233] 5.2如本文实施方案1.1至1.43中任一项所定义的化合物或如本文所定义的其任何子群或实例用于制造药剂的用途,所述药剂用于在患者中治疗或预防疾病状态或病状,所述患者已被筛选并已被确定为罹患疾病或病状或处于罹患其的风险,所述疾病或病状将易于用具有抗极光激酶(例如,极光A激酶或极光B激酶)的活性的化合物治疗。

[0234] 5.3一种用于诊断和治疗由极光激酶(例如,极光A激酶或极光B激酶)介导的疾病状态或病状的方法,所述方法包括(i)筛选患者以确定患者所患或可能罹患的疾病或病状是否是将易于用具有抗所述激酶的活性的化合物治疗的疾病或病状;以及(ii)如果指示所述患者因此易患所述疾病或病状,那么其后向所述患者施用如本文实施方案1.1至1.43中任一项所定义的化合物或如本文所定义的其任何子群或实例。

[0235] 5.4如本文实施方案1.1至1.43中任一项所定义的化合物或如本文所定义的其任何子群或实例,其适用于患者的疾病状态或病状的治疗或预防,所述患者已被筛选并已被确定为罹患疾病或病状或处于罹患其的风险,所述疾病或病状将易于用具有抗FLT3激酶的活性的化合物治疗。

[0236] 5.5如本文实施方案1.1至1.43中任一项所定义的化合物或如本文所定义的其任何子群或实例用于制造药剂的用途,所述药剂用于在患者中治疗或预防疾病状态或病状,

所述患者已被筛选并已被确定为罹患疾病或病状或处于罹患其的风险,所述疾病或病状将易于用具有抗FLT3激酶的活性的化合物治疗。

[0237] 5.6一种用于诊断和治疗由FLT3激酶介导的疾病状态或病状的方法,所述方法包括(i)筛选患者以确定患者所患或可能罹患的疾病或病状是否是将易于用具有抗所述激酶的活性的化合物治疗的疾病或病状;以及(ii)如果指示所述患者因此易患所述疾病或病状,那么其后向所述患者施用如本文实施方案1.1至1.43中任一项所定义的化合物或如本文所定义的其任何子群或实例。

[0238] 取自患者的生物样品可经受诊断测试,以确定患者所患或可能罹患的病状或疾病(如癌症)是否是通过遗传异常(例如突变激酶)或异常蛋白质表达(如极光激酶或FLT3激酶的上调或上调)来表征的病状或疾病。患者可经受诊断测试,以检测极光激酶或FLT3激酶的上调的标志特征或突变的极光激酶或FLT3激酶的存在。具有极光激酶或FLT3激酶的上调的肿瘤可对激酶的抑制剂特别敏感。因此,可针对极光激酶或FLT3激酶优选筛选肿瘤。通常在选自以下的生物样品上进行诊断测试:肿瘤活检样品、血液样品(脱落肿瘤细胞的分离和富集)、粪便活检、唾液、染色体分析、胸膜液、腹膜液或尿。

[0239] 携带极光激酶或FLT3激酶的突变的个体的鉴定可意味着患者将尤其适用于用激酶抑制剂进行的治疗。可在治疗之前针对变体的存在优选筛选肿瘤。筛选过程将通常涉及直接测序、寡核苷酸微阵列分析,或突变特异性抗体。

[0240] 鉴定和分析蛋白质突变和上调的方法是本领域技术人员已知的。筛选方法可包括但不限于如逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)或原位杂交的标准方法。

[0241] 在通过RT-PCR筛选时,肿瘤中mRNA的水平通过产生mRNA的cDNA拷贝,之后通过PCR扩增cDNA来评价。PCR扩增的方法、引物的选择以及扩增的条件是本领域技术人员已知的。核酸操作和PCR通过标准方法来执行,如例如在Ausubel等编辑Current Protocols in Molecular Biology(2004)John Wiley&Sons Inc.,或Innis,M.A.等编辑PCR Protocols:a guide to methods and applications(1990)Academic Press,San Diego中所描述的。涉及核酸技术的反应和操作还描述于Sambrook等,第3版,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(2001)Cold Spring Harbor Laboratory Press。或者,可使用用于RT-PCR的可商购获得的试剂盒(例如Roche Molecular Biochemicals),或如美国专利4,666,828、4,683,202、4,801,531、5,192,659、5,272,057、5,882,864和6,218,529中所阐述的方法,所述专利通过引用并入本文。

[0242] 用于评价mRNA表达的原位杂交技术的实例将为荧光原位杂交(FISH)(参见Angerer,1987 Meth.Enzymol.,152:649)。

[0243] 一般来说,原位杂交包括以下主要步骤:(1)待分析组织的固定;(2)样品的预杂交处理,以增加靶核酸的可接近性并且减少非特异性结合;(3)核酸混合物与生物结构或组织中核酸的杂交;(4)杂交后洗涤,以去除在杂交中未结合的核酸片段;以及(5)杂交核酸片段的检测。在所述应用中使用的探针通常例如用放射性同位素或荧光报告物进行标记。优选探针为足够长的,例如,从约50、100或200个核苷酸至约1000或更多个核苷酸,以使得能够在严格条件下与一个或多个靶核酸特异性杂交。用于执行FISH的标准方法描述于Ausubel等编辑Current Protocols in Molecular Biology(2004)John Wiley&Sons Inc和John M.S.Bartlett在Molecular Diagnosis of Cancer,Methods and Protocols,第2版;ISBN:

1-59259-760-2; (2004)第077-088页; Series: Methods in Molecular Medicine中的Fluorescence In Situ Hybridization: Technical Overview。

[0244] 或者, 由mRNA表达的蛋白质产物可通过以下进行测定: 肿瘤样品的免疫组织化学、使用微量滴定板的固相免疫测定、蛋白质印迹、双向SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、ELISA、流式细胞术以及本领域已知的用于检测特定蛋白质的其它方法。检测方法将包括位点特异性抗体的使用。

[0245] 附图简述

[0246] 图1示出在实施例17中所述的MV4-11异种移植小鼠模型中, 与阿糖胞苷相比, 实施例2和7的化合物的抗肿瘤作用。

[0247] 图2示出在MV4-11异种移植小鼠模型中, 与阿糖胞苷相比, 实施例2的化合物的抗肿瘤作用。

[0248] 图3示出在MV4-11异种移植小鼠模型中, 与阿糖胞苷相比, 实施例7的化合物的抗肿瘤作用。

[0249] 图4示出在施用媒介物、实施例2和7的化合物以及阿糖胞苷之后, 携带MV4-11异种移植物的裸鼠在第29天(终点)的肿瘤重量。

[0250] 图5示出在施用媒介物、实施例2和7的化合物以及阿糖胞苷之后, 携带MV4-11异种移植物的裸鼠在实施例17所述研究的整个研究期期间的体重变化。

实施例

[0251] 现在将通过参照以下实施例中所述的具体实施方案说明(但不限制)本发明。

[0252] 在实施例中, 使用了以下缩写。

[0253] TEA: 三乙胺

[0254] PE: 石油醚

[0255] EtOAc: 乙酸乙酯

[0256] STM: 起始材料

[0257] DMF: N,N-二甲基甲酰胺

[0258] DMSO: 二甲亚砜

[0259] DCM: 二氯甲烷

[0260] LCMS: 液相色谱-质谱

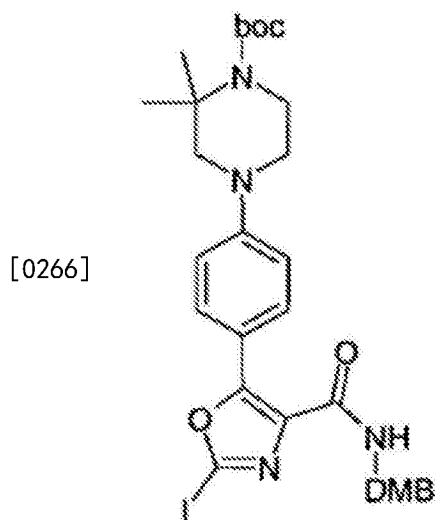
[0261] THF: 四氢呋喃

[0262] prep.HPLC: 制备型HPLC

[0263] 中间体的制备

[0264] A. 中间化合物(10A)的制备

[0265] 4-{4-[4-(2,4-二甲氧基-苄基氨基甲酰基)-2-碘-噁唑-5-基]-苯基}-2,2-二甲基-哌嗪-1-羧酸叔丁酯



[0267] 可通过以上方案1中所示的一系列反应来制备中间化合物(10A)。

[0268] 步骤1

[0269] 5-(4-碘-苯基)-噁唑-4-羧酸乙酯(方案1中的化合物(13))

[0270] 向4-碘苯甲酰氯(14.0g, 0.052mol)在100ml THF中的溶液中以逐滴的方式添加TEA(15.6g, 0.156mol)并且将混合物搅拌10分钟,之后缓慢添加2-异氰基乙酸乙酯(6.5g, 0.058mol)。在室温下搅拌反应混合物16小时,去除溶剂并且用EtOAc和水处理残余物。将有机层分离、经Na₂SO₄干燥,并去除溶剂。通过柱纯化粗产物,以得到呈橙色固体的标题化合物(11.0g, 61.7%)。

[0271] ¹H NMR: CDCl₃ 400 MHz- δ 7.92(s, 1H), 7.80-7.90(m, 4H), 4.43(q, J=7.2 Hz, 2H), 1.42(t, J=7.2 Hz, 3H)。

[0272] 步骤2

[0273] 4-[4-(4-乙氧羰基-噁唑-5-基)-苯基]-2,2-二甲基-哌嗪-1-羧酸叔丁酯(方案1中的化合物(15))

[0274] 在氮气气氛、室温下,向5-(4-碘-苯基)-噁唑-4-羧酸乙酯(11.0g, 32mmol)在无水甲苯(300mL)的经过搅拌的溶液中添加2,2-二甲基-哌嗪-1-羧酸叔丁酯(7.53g, 35.2mmol)、Pd(AcO)₂(580mg, 2.56mmol)、联苯基-2-基二环己基膦(0.9g, 2.56mmol)和Cs₂CO₃(20.7g, 64mmol)。将混合物加热至80℃并且搅拌24小时。允许溶液冷却至室温并且然后在水与EtOAc之间分配。经Na₂SO₄干燥有机相,并且去除溶剂,得到粗产物。通过硅胶柱色谱纯化所述粗产物(PE/EtOAc=40/1~10/1,以回收未反应的起始材料;PE/EtOAc=8/1~5/1,以得到呈黄色固体的标题化合物(6.0g, 43%))。

[0275] ¹H NMR: DMSO 400 MHz- δ 8.06(d, J=8.8 Hz, 2H), 7.81(s, 1H), 6.75(d, J=9.2 Hz, 2H), 4.42(q, 2H), 3.86(m, 2H), 3.50(m, 2H), 3.46(s, 2H), 1.56(s, 9H), 1.43(s, 6H)。

[0276] 步骤3

[0277] 4-{4-[4-(2,4-二甲氧基-苄基氨基甲酰基)-噁唑-5-基]-苯基}-2,2-二甲基-哌嗪-1-羧酸叔丁酯(方案1中的化合物(17))

[0278] 向4-[4-(4-乙氧羰基-噁唑-5-基)-苯基]-2,2-二甲基-哌嗪-1-羧酸叔丁酯(2.4g, 5.6mmol)在20mL THF和20mL甲醇的溶液中添加2N氢氧化钠水溶液(11.2mL, 22.4mmol)。将混合物在室温下搅拌16小时,然后在真空中去除有机溶剂。通过添加1N氯化

氢水溶液将其余水性混合物调节至pH4~5。将混合物冷冻干燥,以得到3g呈类黄色粉末的4-[4-(4-羧基-噁唑-5-基)-苄基]-2,2-二甲基-哌嗪-1-羧酸叔丁酯,其直接用于下一步骤。

[0279] 将4-[4-(4-羧基-噁唑-5-基)-苄基]-2,2-二甲基-哌嗪-1-羧酸叔丁酯溶解于30mL DMF中。向溶液中添加2,4-二甲氧基-苄基胺(1.26g,7.6mmol)、HATU(2.8g,7.4mmol)和TEA(1g,10mmol)。将混合物在室温下搅拌过夜,并在真空中去除溶剂。通过硅胶柱色谱(PE:EtOAc=5:1至DCM:MeOH=200:1)纯化残余物,以得到标题化合物(1.6g,3mmol,产率:54%,经两个步骤)。

[0280] $^1\text{H NMR}$:(400 MHz MeOD) δ 8.10(d, $J=9.2$ Hz, 2H), 8.00(s, 1H), 7.20(d, $J=8.0$ Hz, 1H), 6.82(d, $J=9.2$ Hz, 2H), 6.48-6.58(m, 2H), 4.49(s, 2H), 3.84-3.90(m, 5H), 3.80(s, 3H), 3.71(t, 2H), 3.56(s, 2H), 1.51(s, 9H), 1.45(s, 6H)。

[0281] 步骤4

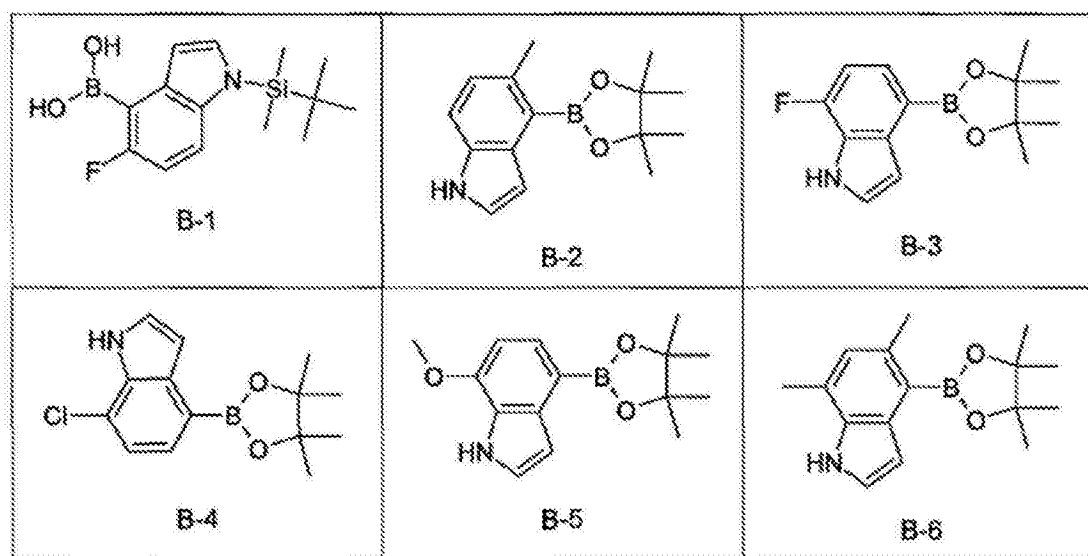
[0282] 4-{4-[4-(2,4-二甲氧基-苄基氨基甲酰基)-2-碘-噁唑-5-基]-苄基}-2,2-二甲基-哌嗪-1-羧酸叔丁酯(方案1中的化合物(10A))

[0283] 向处于-78℃的4-{4-[4-(2,4-二甲氧基-苄基氨基甲酰基)-噁唑-5-基]-苄基}-2,2-二甲基-哌嗪-1-羧酸叔丁酯(2.6g,4.7mmol)在20mL THF的溶液中添加LiHMDS(44mL,44mmol)在THF中的1M溶液。将混合物搅拌0.5h,然后分批添加 I_2 (9g,35mmol)。将混合物在室温下搅拌1h。将混合物用15% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 水溶液淬灭,并且用EtOAc萃取并用水洗涤。将有机相经 Na_2SO_4 干燥。将溶剂在真空中去除,以得到粗产物,将所述粗产物通过硅胶柱色谱(PE/EtOAc=2/1至PE/EtOAc/DCM=1/1/2)纯化,以得到标题化合物(2.4g,产率:75%)。

[0284] $^1\text{H NMR}$:CDCl₃400 MHz- δ 8.16(d, $J=9.2$ Hz, 2H), 7.22-7.47(m, 3H), 6.70(d, $J=9.2$ Hz, 2H), 6.41-6.46(m, 3H), 4.52(d, $J=5.6$ Hz, 2H), 3.82-3.88(m, 5H), 3.80(s, 3H), 3.46(t, 2H), 3.43(s, 2H), 1.49(s, 9H), 1.41(s, 6H)。

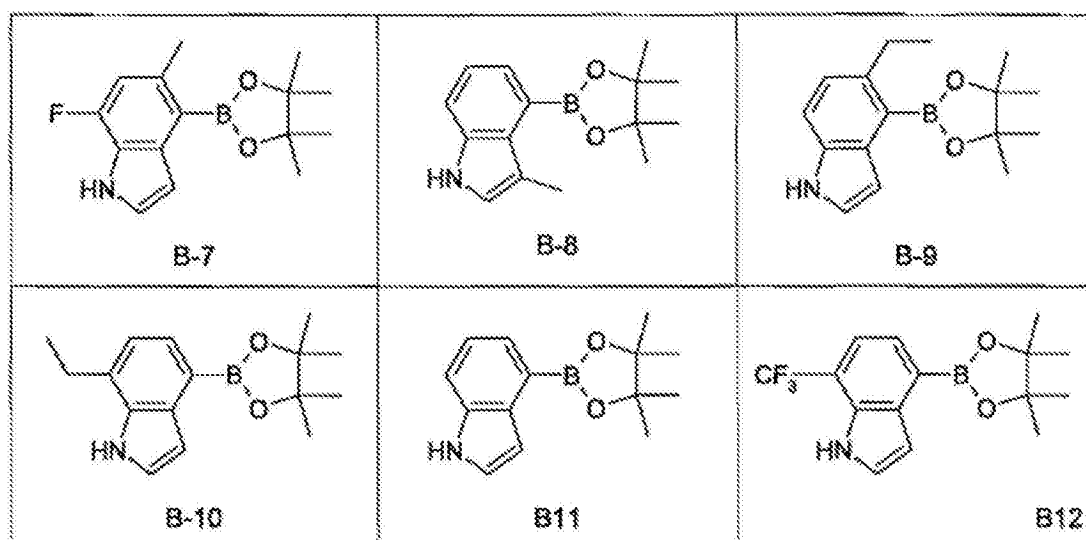
[0285] B. 硼酸中间体的制备

[0286] 通过遵循以下所述的方法,制备了以下硼酸/硼酸酯中间体B-1至B-12。



[0287]

[0288]



[0289] 中间体B-1

[0290] 1-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-氟-1H-吲哚-4-基硼酸

[0291] 步骤1

[0292] 1-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-氟-1H-吲哚的制备

[0293] 在0℃下,将NaH(1.88g,46.2mmol)添加到5-氟-1H-吲哚(5.2g,38.5mmol)在40mL DMF中的溶液中。10分钟之后,在0℃下添加叔丁基二甲基氯化甲硅烷(6.96g,46.2mmol),并且允许混合物在0℃下再搅拌1h。将混合物升温至室温,并且搅拌过夜,然后通过添加水进行稀释并且用EtOAc进行萃取。将有机层经Na₂SO₄干燥、浓缩并通过硅胶柱色谱纯化以得到标题化合物(6.5g,67.7%)

[0294] ¹H NMR CDCl₃400 MHz δ7.41(s,1H),7.28-7.25(dd,1H,J=2.4和J=8.8),7.22(d,1H,J=3.2),6.89(d,1H,J=2.8),6.58-6.57(dd,1H,J=0.8和J=3.2),0.93(t,9H),0.60(t,6H)

[0295] 步骤2

[0296] 1-(叔丁基二甲基甲硅烷基)-5-氟-1H-吲哚-4-基硼酸的制备

[0297] 向处于-78℃下的步骤1的产物(4.98g,20mmol)和TMEDA(2.32g,20mmol)在THF中的混合物中缓慢添加仲丁基锂(15.4mL,20mmol)在环己烷中的1.3M溶液,并且将混合物在-78℃下搅拌2h。在-78℃下将硼酸三异丙酯(3.76g,20mmol)添加到混合物中并且再搅拌1h,然后升温至-20℃。添加水并且用EtOAc萃取混合物,并且将有机层经Na₂SO₄干燥并蒸发。将残余物重结晶(EtOAc和正己烷),以得到标题化合物(1.2g,20.7%)。

[0298] ¹H NMR DMSO 400 MHz δ7.48-7.45(m,1H),7.35(d,1H,J=3.2),6.83(t,1H),6.50(s,2H),6.62(dd,1H,J=0.8和J=3.2),0.84(s,9H),0.56(s,6H)。

[0299] 中间体B-2

[0300] 5-甲基-4-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧杂硼戊烷-2-基)-1H-吲哚

[0301] 步骤1

[0302] 3-溴-2,4-二甲基-硝基苯

[0303] 向在冰浴中冷却的2,6-二甲基-溴苯(10g,54mmol)在AcOH(75mL)中的溶液中缓慢添加发烟硝酸(32.5mL)。允许所得混合物升温至室温、搅拌1h,并且在80℃下加热2h。将反

应混合物冷却至室温并且在搅拌下倾倒进冰水中。通过抽滤收集所得沉淀,以得到标题化合物(10g),其不经进一步纯化即使用。

[0304] 步骤2

[0305] [2-(2-溴-3-甲基-6-硝基-苯基)-乙烯基]-二甲基-胺

[0306] 将3-溴-2,4-二甲基-硝基苯(12g,52mmol)和吡咯烷(2.12mL)在DMF/DMA(180mL)中的混合物在120℃下在密封管中加热过夜。将混合物用水稀释并且用EtOAc萃取。将有机层经Na₂SO₄干燥并且浓缩,以得到粗标题化合物(10g)。

[0307] 步骤3

[0308] 4-溴-5-甲基吡啶

[0309] 将[2-(2-溴-3-甲基-6-硝基-苯基)-乙烯基]-二甲基-胺(10g)溶解于AcOH/H₂O(100mL:25mL)中,冷却至0℃并且用分批缓慢添加的Zn(30g)进行处理。在完成添加之后,将反应混合物在110℃下加热过夜。将混合物用水稀释并且用EtOAc萃取。将有机层经Na₂SO₄干燥并且浓缩,以得到粗产物。通过硅胶柱色谱纯化粗产物,以得到标题化合物(1.4g,20%)

[0310] ¹H NMR CDCl₃400 MHz δ2.47(m,3H),6.50-6.51(m,1H),6.97-6.99(m,1H),7.12-7.18(m,2H),8.12(s,1H)

[0311] 步骤4

[0312] 5-甲基-4-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧杂硼戊烷-2-基)-1H-吡啶的制备:

[0313] 在两个40mL玻璃管中将4-溴-5-甲基吡啶(0.7g,3.35mmol)、双(频哪醇)二硼(1.7g,6.7mmol)、KOAc(1g,10mmol)和Pd(dppf)Cl₂(73mg,3mol%)悬浮于无水DMSO(20mL)中,所述玻璃管用铝/聚四氟乙烯夹紧紧密封。将样品在CEM-Discover单模式微波反应器中在250 W、180℃下照射40分钟。在反应完成之后,将容器冷却至60℃、合并并且通过薄硅藻土塞过滤粗混合物。将硅藻土塞用EtOAc(50mL)洗涤,将有机级分合并,并且在减压下去除溶剂。通过硅胶柱色谱并且然后通过制备型HPLC纯化粗产物,以得到5(280mg,33%)。

[0314] ¹H NMR CDCl₃400 MHz δ1.41(s,12H),2.63(s,3H),6.96-6.97(m,1H),7.01-7.03(m,1H),7.18-7.20(m,1H),7.32-7.34(m,1H),8.13(s,1H)

[0315] 中间体B-3

[0316] 7-氟-4-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧杂硼戊烷-2-基)-1H-吡啶

[0317] 步骤1

[0318] 4-溴-7-氟-1H-吡啶的制备

[0319] 在-40℃下,将乙烯基溴化镁(300mL在THF中的1.0 M溶液,300mmol)逐滴添加到3-硝基-4-氟-溴苯(22g,100mmol)在THF(700mL)中的溶液中。在1h之后,在-40℃下,将混合物通过NH₄Cl水溶液淬灭并且通过EtOAc萃取。将有机层经Na₂SO₄干燥并且浓缩以得到粗产物,将所述粗产物通过硅胶柱色谱进行纯化,从而得到4-溴-7-氟-1H-吡啶(5g,23.3%)。

[0320] ¹H NMR CDCl₃400 MHz δ6.56-6.58(m,1H),6.72-6.79(m,1H),7.06-7.17(m,1H),7.20-7.24(m,1H),8.45(s,1H)。

[0321] 步骤2

[0322] 7-氟-4-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧杂硼戊烷-2-基)-1H-吡啶

[0323] 在五个40mL玻璃管中将4-溴-7-氟-1H-吡啶(5g,23.3mmol)、双(频哪醇)二硼(9.5g,37.4mmol)、KOAc(6.85g,69.9mmol)和Pd(dppf)Cl₂(0.51g,3mol%)悬浮于无水DME

(60mL)中,所述玻璃管用铝/聚四氟乙烯夹紧紧密封。将样品在CEM-Discover单模式微波反应器中在250 W、150℃下照射25分钟。在反应完成之后,将容器冷却至60℃、合并并且通过薄硅藻土层过滤粗混合物。将硅藻土用EtOAc(50mL)洗涤,将有机级分合并,并且在真空中去除溶剂。通过硅胶柱色谱并且然后通过制备型HPLC纯化粗产物,以得到标题化合物(2g, 32.9%)。

[0324] ^1H NMR CDCl_3 400 MHz δ 1.40(s, 12H), 6.86–6.96(m, 1H), 7.02–7.14(m, 1H), 7.20–7.24(m, 1H), 7.51–7.62(m, 1H), 8.43(s, 1H)

[0325] 中间体B-4

[0326] 7-氯-4-(4,4,5,5-四甲基-[1.3.2]二氧杂硼戊烷-2-基)-1H-吡啶

[0327] 步骤1

[0328] 4-溴-1-氯-2-硝基-苯的制备:

[0329] 向处于0℃下的4-氯-3-硝基-苯胺(17.2g, 0.1mol)在260mL HBr(48%)中的溶液中逐滴添加水中的 NaNO_2 (13.8g, 0.2mol)。将反应混合物在0℃下搅拌1h,然后将CuBr(24g, 0.17mol)分批添加到混合物中并且再搅拌1h。添加水,允许混合物升温至室温,然后用EtOAc进行萃取。通过硅胶柱色谱纯化粗产物,以得到标题化合物(13g, 55%)。

[0330] ^1H NMR CDCl_3 400 MHz δ 8.03–8.02(m, 1H), 7.66–7.63(m, 1H), 7.45–7.42(m, 1H)。

[0331] 步骤2

[0332] 4-溴-7-氯吡啶的制备:

[0333] 向处于-40℃下的4-溴-1-氯-2-硝基-苯(14g, 0.059mol)在400mL THF中的溶液中逐滴添加溴化乙烯镁(177mL在THF中的1.0M溶液, 0.177mol)。将反应混合物在-40℃下搅拌2小时。添加 NH_4Cl 水溶液并且用醚萃取混合物。将有机相经 Na_2SO_4 干燥、浓缩,并通过硅胶柱色谱纯化残余物,以得到标题化合物(6g, 44%)。

[0334] ^1H NMR CDCl_3 400 MHz δ 8.5(s, 1H), 7.31–7.29(m, 1H), 7.26–7.22(m, 1H), 7.07–7.05(m, 1H), 6.65–6.63(m, 1H)。

[0335] 步骤3

[0336] 7-氯-4-(4,4,5,5-四甲基-[1.3.2]二氧杂硼戊烷-2-基)-1H-吡啶的制备:

[0337] 将4-溴-7-氯吡啶(0.6g, 2.6mmol)、双(频哪醇)二硼(0.728g, 2.86mmol)、KOAc(0.76g, 7.8mmol)和Pd(dppf) Cl_2 (57mg, 3mol%)悬浮于DME(15mL)中,并且在CEM-Discover单模式微波反应器中在250W、130℃下照射35分钟。通过过滤去除固体,添加水并且用EtOAc萃取所得混合物。将有机相经 Na_2SO_4 干燥、浓缩,并通过硅胶柱色谱纯化残余物,以得到标题化合物(0.3g, 39%)。

[0338] ^1H NMR CDCl_3 400 MHz δ 8.5(s, 1H), 7.57–7.55(d, 1H, $J=7.6\text{Hz}$), 7.3(s, 1H), 7.21–7.19(d, 1H, $J=7.6\text{Hz}$), 7.08–7.07, 1.396–1.385(m, 12H)。

[0339] 中间体B-5

[0340] 7-甲氧基-4-(4,4,5,5-四甲基-[1.3.2]二氧杂硼戊烷-2-基)-1H-吡啶

[0341] 步骤1

[0342] 4-溴-3-甲基-2-硝基-苯酚的制备:

[0343] 在0℃下向3-甲基-2-硝基-苯酚(20g, 0.13mol)在 CHCl_3 (20mL)中的溶液中逐滴添加 Br_2 (6.4mL)在HOAc(15mL)中的溶液,并且将混合物在0℃下搅拌3h。添加冰,并且用 CHCl_3

萃取混合物。在经Na₂SO₄干燥之后,将CHCl₃去除,以得到4-溴-3-甲基-2-硝基-苯酚(30g),其不经进一步纯化即使用。

[0344] 步骤2

[0345] 1-溴-4-甲氧基-2-甲基-3-硝基-苯的制备:

[0346] 向4-溴-3-甲基-2-硝基-苯酚(30g,0.13mol)在丙酮(200mL)中的溶液中添加K₂CO₃(39g,0.28mol)和碘甲烷(17.6mL,0.28mol)。将混合物搅拌18小时,然后将其浓缩、用水稀释并且用CH₂Cl₂进行萃取。将有机相经Na₂SO₄干燥、过滤并浓缩,以得到1-溴-4-甲氧基-2-甲基-3-硝基-苯(31g,96%),其不经进一步纯化即使用。

[0347] 步骤3

[0348] 4-溴-7-甲氧吡啶的制备:

[0349] 向1-溴-4-甲氧基-2-甲基-3-硝基-苯(31g,0.126mol)在DMF(150mL)中的溶液中添加二甲基甲酰胺二甲基缩醛(27mL)和吡咯烷(10.5mL,0.127mol)。将混合物在90℃下加热18h,并且冷却至室温。将混合物用水稀释并且用CH₂Cl₂萃取。将有机相经Na₂SO₄干燥、过滤并浓缩。将残余物溶解于HOAc(50mL)中并逐滴添加至Fe(20.5g,0.37mol)在沸腾的HOAc(150mL)中的溶液中。将混合物回流1h并冷却至室温,添加水并且将混合物用Na₂CO₃中和,并用CH₂Cl₂进行萃取。将有机相经Na₂SO₄干燥、过滤并浓缩。将残余物通过制备型TLC(PE/EtOAc=5/1)进行纯化,以得到标题化合物(13g,44%)。

[0350] ¹H NMR CDCl₃400 MHzδ:8.41(brs,1H),7.18-7.08(m,2H),6.49-6.43(m,2H),3.86(s,3H)。

[0351] 步骤4

[0352] 7-甲氧基-4-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧杂硼戊烷-2-基)-1H-吡啶的制备:

[0353] 向4-溴-7-甲氧吡啶(5g,22.2mmol)在1,4-二噁烷(170mL)中的溶液中添加双(频哪醇)二硼(6.2g,24.4mmol)、KOAc(6.5g,66.3mmol)和Pd(dppf)Cl₂(1.2g,1.7mmol),并且将混合物加热至回流,持续15小时。在冷却之后,将混合物浓缩,并且通过制备型TLC(PE/EtOAc=20/1)纯化残余物,以得到标题化合物(2.6g,43%)。

[0354] ¹H NMR CDCl₃400 MHzδ:8.38(brs,1H),7.60(d,1H),7.21(d,1H),7.01(d,1H),6.66(d,1H),3.98(s,3H),1.39(s,12H)。

[0355] 中间体B-6

[0356] 5,7-二甲基-4-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧杂硼戊烷-2-基)-1H-吡啶

[0357] 步骤1

[0358] 1-溴-2,4-二甲基-5-硝基-苯的制备:

[0359] 在室温下将1-溴-2,4-二甲基-苯(9g,48.6mmol)添加到HNO₃(100mL,60%)中。将混合物在室温下搅拌过夜。将混合物倾倒进冰水中并且用EtOAc萃取。然后将有机相经Na₂SO₄干燥并浓缩,以得到1-溴-2,4-二甲基-5-硝基-苯(6.5g),其不经纯化即用于随后步骤。

[0360] 4-溴-5,7-二甲基吡啶的制备:

[0361] 向处于-78℃下的1-溴-2,4-二甲基-5-硝基-苯(7.5g,32.6mmol)在THF(100mL)中的溶液中逐滴添加溴化乙烯镁(110mL在THF中的1.0M溶液,1.1mol)。允许反应物缓慢升温至-40℃,然后搅拌4h。添加水,并且允许反应混合物缓慢升温至室温并用EtOAc进行萃取。

然后将有机相经 Na_2SO_4 干燥并浓缩,以得到4-溴-5,7-二甲基吡啶(2.3g),其不经纯化即用于随后步骤。

[0362] 5,7-二甲基-4-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧杂硼戊烷-2-基)-1H-吡啶的制备:

[0363] 在五个50mL玻璃管中将4-溴-5,7-二甲基吡啶(2.3g粗品,7mmol)、双(频哪醇)二硼(2.54g,10mmol)、KOAc(2g,20mmol)和 $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (150mg,3mol%)悬浮于无水DME(30mL)中,所述玻璃管用铝/聚四氟乙烯夹紧紧密封。将样品在微波反应器中在250 W、130℃下照射50分钟。反应完成之后,将混合物合并、用水稀释并用EtOAc进行萃取。将有机相经 Na_2SO_4 干燥并通过蒸发去除溶剂。制备型HPLC得到标题化合物(0.37g,15%)。

[0364] ^1H NMR:(400 MHz, CDCl_3): δ 7.97(s,1H),7.19(s,1H),7.00(s,1H),6.85(s,1H),2.61(s,3H),2.46(s,3H),1.40(s,12H)

[0365] 中间体B-7

[0366] 7-氟-5-甲基-4-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧杂硼戊烷-2-基)-1H-吡啶

[0367] 步骤1

[0368] 1-溴-4-氟-2-甲基-5-硝基-苯的制备:

[0369] 在0℃下向1-溴-4-氟-2-甲基-苯(20g,0.11mol)在160mL H_2SO_4 中的溶液中一次性添加 KNO_3 (116g,0.11mol)。允许混合物升温至室温并且搅拌过夜。将混合物倾倒进冰水中、用EtOAc萃取、经 Na_2SO_4 干燥并浓缩,以得到1-溴-4-氟-2-甲基-5-硝基-苯(20g),其不经纯化即用于随后反应。

[0370] 步骤2

[0371] 4-溴-7-氟-5-甲基吡啶的制备:

[0372] 向处于-78℃下的1-溴-4-氟-2-甲基-5-硝基-苯(20g,0.086mol)在THF(250mL)中的溶液中逐滴添加溴化乙烯镁(300mL,0.3mol),然后将混合物在-78℃下搅拌2h。添加水并且允许反应物缓慢升温至室温。将混合物用EtOAc萃取、经 Na_2SO_4 干燥并且浓缩。通过硅胶柱色谱纯化粗产物,以得到4-溴-7-氟-5-甲基吡啶(3.2g,16.4%)。

[0373] 步骤3

[0374] 7-氟-5-甲基-4-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧杂硼戊烷-2-基)-1H-吡啶的制备:

[0375] 在十个50mL玻璃管中将4-溴-7-氟-5-甲基吡啶(3.2g,0.014mol)、双(频哪醇)二硼(5.08g,0.02mol)、 $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (0.1g)和KOAc(4.1g,0.042mol)悬浮于无水DME(60mL)中,所述玻璃管用铝/聚四氟乙烯夹紧紧密封。将样品在微波反应器中在250W、135℃下照射2h。将样品冷却、合并、用水稀释并用EtOAc萃取。将有机相经 Na_2SO_4 干燥并通过蒸发去除溶剂。制备型HPLC得到标题化合物(0.43g,11%)。

[0376] ^1H NMR(MDOH 400 MHz)

[0377] δ :7.22-7.21(d,1H),6.87-6.85(m,1H),6.68-6.65(d,1H),2.56(s,3H),1.39(s,12H)。

[0378] 中间体B-8

[0379] 3-甲基-4-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧杂硼戊烷-2-基)-1H-吡啶

[0380] 将3-甲基-4-溴吡啶(0.79g,3.8mmol)、双(频哪醇)二硼(1.1g,4.5mmol)、 $\text{PdCl}_2(\text{dppf})_2$ (83mg,0.11mmol)和KOAc(1.1g,11.3mmol)在DMF(10mL)中的混合物在 N_2 气氛下吹扫

10分钟,之后在80℃下加热过夜。将反应混合物用水稀释。将水层用EtOAc萃取并用盐水洗涤,并且经无水Na₂SO₄干燥。通过硅胶柱色谱纯化粗产物,以得到标题化合物(0.7g,72%)。

[0381] ¹H NMR(400 MHz,CDCl₃):δ7.93(brs,1H),7.57(d,1H,J=6.8Hz),7.42(d,1H,J=8 Hz),7.17(t,1H,J=7.2 Hz),7.01(s,1H),2.48(s,3H),1.40(s,12H)。

[0382] 中间体B-9

[0383] 5-乙基-4-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧杂硼戊烷-2-基)-1H-吡啶

[0384] 步骤1

[0385] 6-乙基-2-甲基-3-硝基-苯胺的制备

[0386] 将2-乙基-6-甲基-苯胺(21g,156mmol)在冰浴上在0℃下溶解于175mL浓H₂SO₄中。添加9mL(171mmol,1.1eq.)浓HNO₃,并且将反应混合物在0℃下搅拌1h。将反应混合物倾倒在1 L的冰上并且将所得溶液用EtOAc萃取5次。将合并的有机层经Na₂SO₄干燥,并且在减压下去除溶剂以得到19g(产率68%)的6-乙基-2-甲基-3-硝基-苯胺和副产物6-甲基-2-乙基-3-硝基-苯胺的混合物。混合物不经进一步纯化即用于随后反应。

[0387] 步骤2

[0388] 2-溴-1-乙基-3-甲基-4-硝基-苯的制备

[0389] 在0℃下将在15mL水中的NaNO₂(7.7g,110mmol)缓慢添加到步骤1的产物(19g,106mmol)在48% HBr水溶液(35mL)中的经过搅拌的溶液中。逐滴添加在48% HBr水溶液(10mL)中的CuBr(1.4g,10mmol)。在搅拌15分钟之后,将混合物在90℃下加热2小时。冷却之后,将混合物用水稀释并且用EtOAc萃取5次。将合并的有机相浓缩并通过硅胶柱色谱(PE/EtOAc=50:1)进行纯化,以得到2-溴-1-乙基-3-甲基-4-硝基-苯和2-溴-3-乙基-1-甲基-4-硝基-苯的混合物(23g,产率95%)。

[0390] 步骤3

[0391] 1-[2-(2-溴-3-乙基-6-硝基-苯基)-乙烯基]-吡咯烷的制备

[0392] 将在DMF/DMA(150mL)中的步骤2的产物(13g,53mmol)和吡咯烷(2.3mL)在回流下加热过夜。将混合物冷却,然后浓缩,以得到粗标题化合物,其直接用于下一步骤。

[0393] 步骤4

[0394] 4-溴-5-乙基-1H-吡啶的制备

[0395] 将来自步骤3的粗1-[2-(2-溴-3-乙基-6-硝基-苯基)-乙烯基]-吡咯烷在80mL的AcOH中的溶液一次性添加到铁(13g)在50mL的AcOH中的回流悬浮液中。将所得混合物回流2小时。冷却之后,将混合物用水稀释并且用Na₂CO₃中和,并用EtOAc萃取3次。将合并的有机相浓缩并且通过硅胶柱色谱和制备型HPLC进行纯化,以得到标题化合物(1.5g,来自6-乙基-2-甲基-3-硝基-苯胺的12%)。

[0396] 步骤5

[0397] 5-乙基-4-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧杂硼戊烷-2-基)-1H-吡啶的制备

[0398] 将4-溴-5-乙基-1H-吡啶(1.0g,4.48mmol)、双(频哪醇)二硼(2.4g,9mmol)、KOAc(1.5g,15mmol)和Pd(dppf)Cl₂(210mg,6mol%)悬浮于无水二噁烷(50mL)中并且在80℃下加热过夜。将混合物冷却并过滤,并且将滤液浓缩并通过制备型HPLC纯化,以得到标题化合物(300mg,25%)。

[0399] ¹H NMR(CDCl₃,400 MHz):δ7.90(brs,1H),7.31-7.25(m,1H),7.15-7.08(m,1H),

6.98(d, 1H, J=8.4 Hz), 6.90-9.85(m, 1H) 2.92(q, 2H, J=7.6 Hz), 1.34(s, 12H), 1.16(t, 3H, J=7.6 Hz)。

[0400] 中间体B-10

[0401] 7-乙基-4-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧杂硼戊烷-2-基)-1H-吡啶

[0402] 步骤1

[0403] 4-溴-1-乙基-2-硝基-苯的制备

[0404] 向处于-20℃下的1-溴-4-乙苯(7g, 37.8mmol)在9mL浓H₂SO₄中的溶液中添加H₂SO₄(3.74g, 41.9mmol)和HNO₃(2.64g, 41.9mmol)的混合物。将混合物在-20℃下搅拌2h。添加水,并且用EtOAc萃取混合物。将有机相用NaHCO₃水溶液和盐水洗涤、经Na₂SO₄干燥并且浓缩。通过硅胶柱色谱纯化残余物,以得到标题化合物(3g, 34%)。

[0405] ¹H NMR(CDCl₃ 400 MHz)

[0406] δ: 8.04-8.035(d, 1H), 7.68-7.65(m, 1H), 7.29-7.27(d, 1H), 2.92-2.87(m, 2H), 1.31-1.28(t, 3H)。

[0407] 步骤2

[0408] 4-溴-7-乙基-1H-吡啶的制备

[0409] 向处于-40℃下的4-溴-1-乙基-2-硝基-苯(8.7g, 0.037mol)在THF中的溶液中逐滴添加溴化乙烯镁(132mL, 0.132mol),然后将混合物在-40℃下再搅拌2h。将反应混合物用水稀释、用EtOAc萃取、经Na₂SO₄干燥并且浓缩。通过硅胶柱色谱纯化粗产物,以得到标题化合物(1.35g, 16%)。

[0410] 步骤3

[0411] 7-乙基-4-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧杂硼戊烷-2-基)-1H-吡啶的制备

[0412] 将4-溴-7-乙基-1H-吡啶(1.35g, 6.02mmol)、双(频哪醇)二硼(3.05g, 12mmol)、KOAc(1.8g, 18mmol)和Pd(dppf)Cl₂(128mg)悬浮于无水DME(100mL)中并且在135℃下加热过夜。将混合物冷却并过滤,并且将滤液浓缩并通过制备型HPLC纯化,以得到标题化合物(300mg, 25%)。

[0413] ¹H NMR(CDCl₃ 400 MHz)

[0414] δ: 8.14(s, 1H), 7.61-7.60(d, 1H), 7.28-7.25(d, 1H), 7.08-7.05(m, 2H), 2.92-2.86(m, 2H), 1.38-1.35(m, 15H)。

[0415] 中间体B-11

[0416] 可商购获得。

[0417] 中间体B-12

[0418] 7-三氟甲基-4-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧杂硼戊烷-2-基)-1H-吡啶

[0419] 步骤1

[0420] 4-溴-7-三氟甲基吡啶

[0421] 在-78℃下向4-溴-2-硝基-1-三氟甲基-苯(11.4g, 0.04mol)在200mL THF中的溶液中添加溴化乙烯镁(160mL, 0.16mol),并且将混合物搅拌1.5小时,之后用饱和的NH₄Cl溶液淬灭并用EtOAc萃取。将有机相经Na₂SO₄干燥并在真空中去除溶剂。通过硅胶柱色谱纯化粗产物,以得到标题化合物(2g, 25%)。¹H NMR(CDCl₃ 400 MHz), δ8.6(br, 1H), 7.28-7.38(m, 3H), 6.70(m, 1H)。

[0422] 步骤2

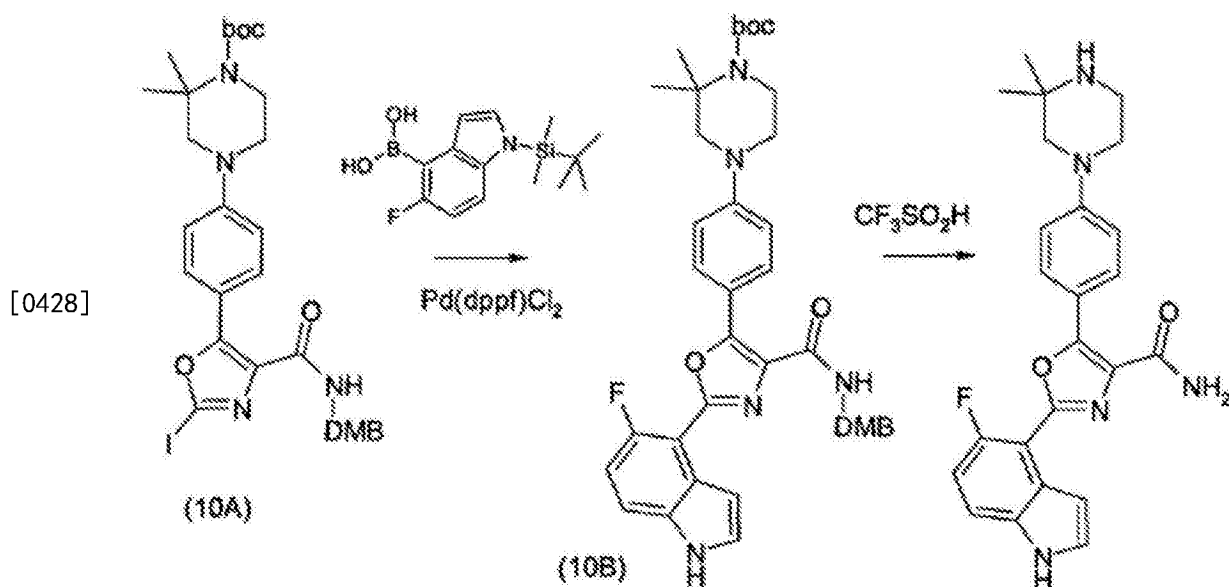
[0423] 7-三氟甲基-4-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧杂硼戊烷-2-基)-1H-吡啶

[0424] 将4-溴-7-三氟甲基吡啶(2g, 7.6mmol)、双(频哪醇)二硼(2.5g, 9mmol)、KOAc(1g, 0.01mol)和Pd(dppf)Cl₂(0.2g)在30mL的DMSO中的混合物在90℃下在N₂下加热过夜。使残余物在水与EtOAc之间分配。将有机相经Na₂SO₄干燥并且将溶剂在真空中去除,以得到粗产物,将所述粗产物通过硅胶柱色谱纯化,以得到标题化合物(1g, 41%)。¹H NMR(CDCl₃ 400 MHz), δ8.6(br, 1H), 7.71(d, J=7.6Hz, 1H), 7.47(d, J=7.6Hz, 1H), 7.37(m, 1H), 7.17(m, 1H), 1.42(s, 12H)

[0425] 式(1)化合物的制备

[0426] 实施例1

[0427] 2-(5-氟-1H-吡啶-4-基)-5-[4-(3,3-二甲基-哌嗪-1-基)-苯基]-噁唑-4-羧酸酰胺



[0429] 步骤1

[0430] 向中间体(10A)(200mg, 0.3mmol)在4mL二噁烷、1mL乙腈和1mL水中的混合物中添加中间体B1(161mg, 0.55mmol)、K₂CO₃(80mg, 0.6mmol)和Pd(dppf)Cl₂(36.5mg, 0.05mmol)。将混合物在90℃在N₂下加热16小时。将溶剂在真空中去除并且将残余物通过制备型TLC(PE:EtOAc=1:1)纯化,以得到期望产物13(120mg, 60%)。

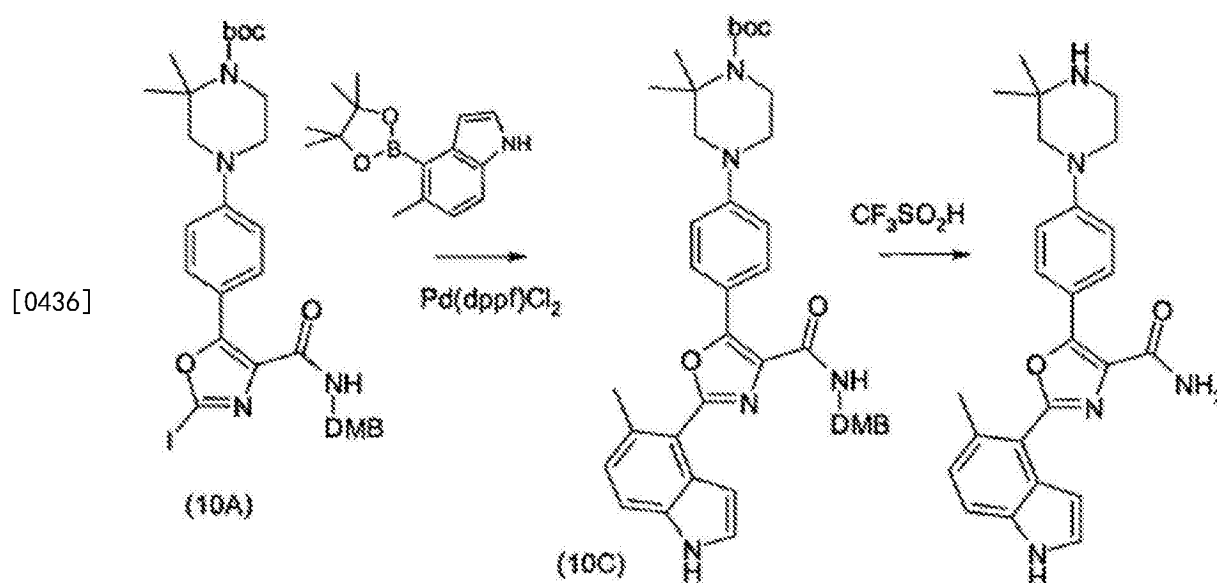
[0431] 步骤2

[0432] 向13(120mg, 0.18mmol)在3mL CH₂Cl₂中的溶液中添加1mL三氟甲磺酸,并且将混合物在室温下搅拌4小时。然后在搅拌下将混合物缓慢添加至饱和NaHCO₃水溶液中,并且用EtOAc萃取两次。将合并的有机相在真空中浓缩。通过制备型HPLC纯化残余物,以得到呈灰白色固体的标题化合物(18mg, 23%)。

[0433] (18mg, 来自10的产率:14%, M+1:434)¹HNMR(400MHzDMSO-d₆)δ11.55(s, 1H), 8.19(m, 2H), 7.51-7.67(m, 4H), 7.32(s, 2H), 7.11(t, 1H), 6.98(d, J=8 Hz, 2H), 3.15(m, 2H), 3.01(s, 2H), 2.83(m, 2H), 1.08(s, 6H)。

[0434] 实施例2

[0435] 2-(5-甲基-1H-吡啶-4-基)-5-[4-(3,3-二甲基-哌嗪-1-基)-苯基]-噁唑-4-羧酸酰胺



[0437] 步骤1

[0438] 向中间体(10A)(1.9g, 2.8mmol)在40mL二噁烷、10mL乙腈和10mL水中的溶液中添加硼酸酯中间体B2(1g, 3.9mmol)、K₂CO₃(0.7g, 5.1mmol)和Pd(dppf)Cl₂(0.5g, 0.68mmol)。将混合物在90℃在N₂下加热6小时。去除溶剂并且通过硅胶柱色谱纯化残余物,以得到化合物11(1.32g, 产率:70%)。

[0439] 步骤2

[0440] 向化合物11(1.32g, 0.2mmol)在20mL CH₂Cl₂中的溶液中添加5mL三氟甲磺酸。将混合物在25℃下搅拌6小时。将混合物在搅拌下缓慢添加至NaHCO₃水溶液,并且用EtOAc萃取两次。将合并的有机相在真空中浓缩。使用以下所述的系统通过制备型HPLC纯化粗产物,以得到呈类黄色固体的标题化合物(360mg, 42%)。

[0441] (22mg, 来自10的产率:17%, M+1:430)¹HNMR: (400MHz DMSO-d₆) δ 11.3(s, 1H), 8.22(d, J=8.8 Hz, 2H), 7.46-7.60(m, 4H), 7.1(d, J=8.0 Hz, 1H), 7.00-7.04(m, 3H), 3.15(m, 2H), 3.01(s, 2H), 2.85(m, 2H), 2.74(s, 3H), 1.09(s, 6H)。

[0442] 用于SRUM-3的制备型HPLC分离方法:

[0443] 仪器:Shimadzu LC-8A制备型HPLC

[0444] 柱:Gemini 250*50mm i.d.10u

[0445] 流动相:A:H₂O(0.04% NH₃H₂O)B:CH₃CN

[0446] 梯度:25%-50%(B相)在23分钟内

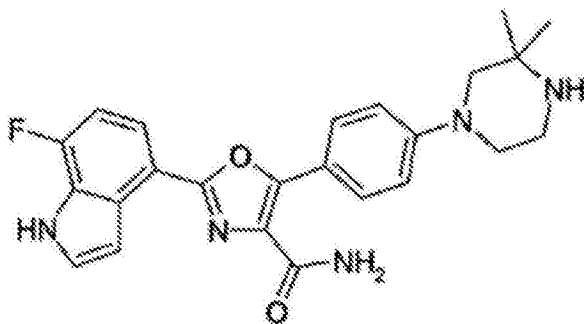
[0447] 流速:80mL/min

[0448] 波长:220nm和254nm

[0449] 实施例3

[0450] 2-(7-氟-1H-吡啶-4-基)-5-[4-(3,3-二甲基-哌嗪-1-基)-苯基]-噁唑-4-羧酸酰胺

[0451]



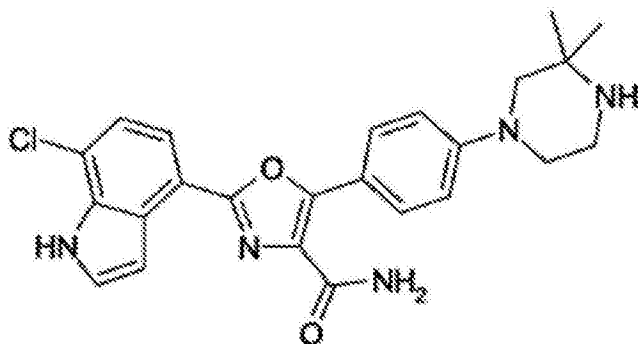
[0452] 使用硼酸酯中间体B3通过实施例2的方法进行制备。

[0453] (20mg, 来自10的产率:15%, $M+1:434$) ^1H NMR:(400MHzDMSO- d_6) δ 11.90(s,1H), 8.19(m,2H), 7.70-7.78(m,2H), 7.57(s,1H), 7.45(s,1H), 7.37(s,1H), 7.06(q,1H), 6.96(d, $J=8$ Hz, 2H), 3.15(t, 2H), 3.01(s, 2H), 2.83(t, 2H), 1.07(s, 6H)。

[0454] 实施例4

[0455] 2-(7-氯-1H-吡咯-4-基)-5-[4-(3,3-二甲基-哌嗪-1-基)-苯基]-噁唑-4-羧酸酰胺

[0456]



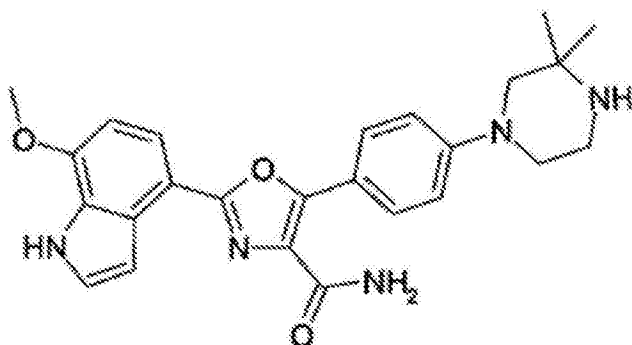
[0457] 使用硼酸酯中间体B4通过实施例2的方法进行制备。

[0458] (24mg, 来自10的产率:18%, $M+1:450$) ^1H NMR:(400MHzDMSO- d_6) δ 11.85(s,1H), 8.24(d, $J=9.2$ Hz, 2H), 7.82(d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.77(s, 1H), 7.62(m, 1H), 7.51(s, 1H), 7.44(m, 1H), 7.34(m, 1H), 7.00(d, $J=9.2$ Hz, 2H), 3.16(t, 2H), 3.01(s, 2H), 2.85(t, 2H), 1.08(s, 6H)。

[0459] 实施例5

[0460] 2-(7-甲氧基-1H-吡咯-4-基)-5-[4-(3,3-二甲基-哌嗪-1-基)-苯基]-噁唑-4-羧酸酰胺

[0461]



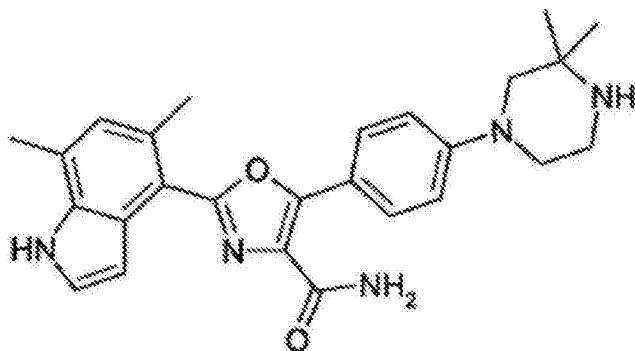
[0462] 使用硼酸酯中间体B5通过实施例2的方法进行制备。

[0463] (19mg, 来自10的产率:14%, $M+1:446$) ^1H NMR: (400MHzDMSO- d_6) δ 11.58(s, 1H), 8.23(d, $J=9.2$ Hz, 2H), 7.79(d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.68(s, 1H), 7.47(s, 1H), 7.42(t, 1H), 7.28(t, 1H), 7.00(d, $J=9.2$ Hz, 2H), 6.84(d, $J=8.0$ Hz, 2H), 3.17-3.14(m, 2H), 3.01(s, 2H), 2.87(t, 2H), 2.65(s, 3H), 1.09(s, 6H)。

[0464] 实施例6

[0465] 2-(5,7-二甲基-1H-吡啶-4-基)-5-[4-(3,3-二甲基-哌嗪-1-基)-苯基]-噁唑-4-羧酸酰胺

[0466]



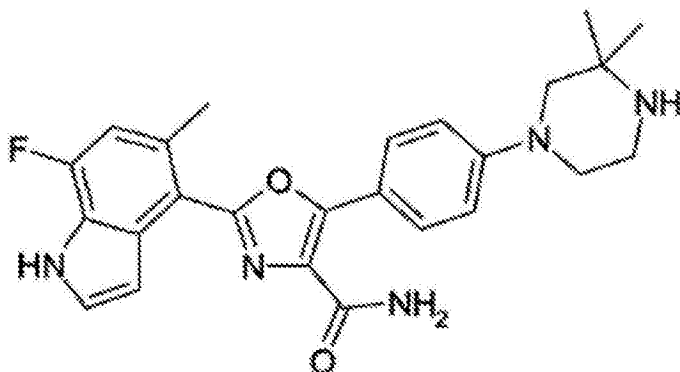
[0467] 使用硼酸酯中间体B6通过实施例2的方法进行制备。

[0468] (33mg, 来自10的产率:25%, $M+1:444$) ^1H NMR: (400MHzDMSO- d_6) δ 11.3(s, 1H), 8.21(d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.44-7.56(m, 3H), 6.91-7.05(m, 4H), 3.15(m, 2H), 3.01(s, 2H), 2.85(m, 2H), 2.70(s, 3H), 1.08(s, 6H)。

[0469] 实施例7

[0470] 2-(5-甲基-7-氟-1H-吡啶-4-基)-5-[4-(3,3-二甲基-哌嗪-1-基)-苯基]-噁唑-4-羧酸酰胺

[0471]



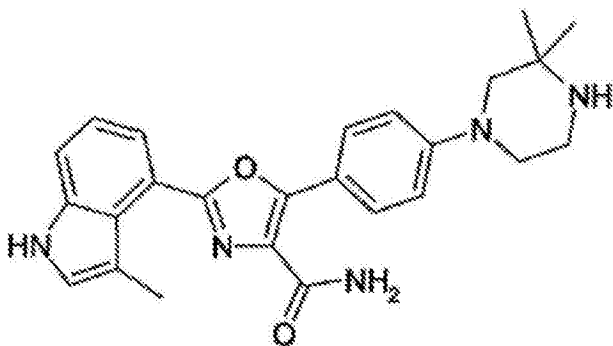
[0472] 使用硼酸酯中间体B7通过实施例2的方法进行制备。

[0473] (16mg, 来自10的产率:12%, $M+1:448$) ^1H NMR: (400MHzDMSO- d_6) δ 8.21(d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.46-7.60(m, 3H), 6.9-7.1(m, 3H), 3.15(m, 2H), 3.01(s, 2H), 2.85(m, 2H), 2.72(s, 3H), 1.09(s, 6H)。

[0474] 实施例8

[0475] 2-(3-甲基-1H-吡啶-4-基)-5-[4-(3,3-二甲基-哌嗪-1-基)-苯基]-噁唑-4-羧酸酰胺

[0476]



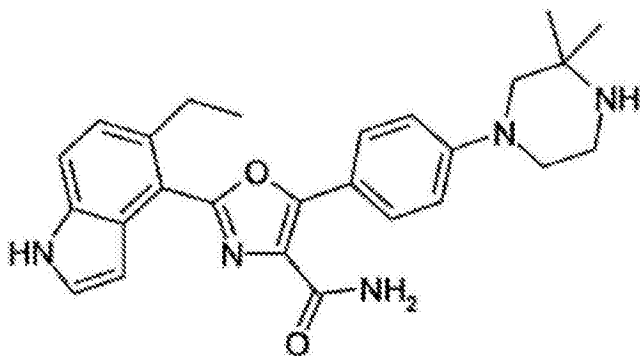
[0477] 使用硼酸酯中间体B8通过实施例2的方法进行制备。

[0478] (9.4mg, 来自10的产率:7%, $M+1:430$) ^1H NMR:(400MHzDMSO- d_6) δ 11.17(br, 1H), 8.15(d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.46-7.60(m, 4H), 7.29(s, 1H), 7.16(t, 1H), 6.97(d, $J=8.8$ Hz, 2H), 3.15(m, 2H), 2.99(s, 2H), 2.85(m, 2H), 2.25(s, 3H), 1.08(s, 6H)。

[0479] 实施例9

[0480] 2-(5-乙基-1H-吡啶-4-基)-5-[4-(3,3-二甲基-哌嗪-1-基)-苯基]-噁唑-4-羧酸酰胺

[0481]



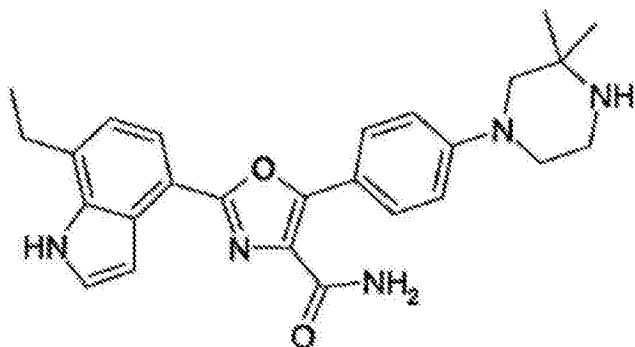
[0482] 使用硼酸酯中间体B9通过实施例2的方法进行制备。

[0483] (28mg, 来自10的产率:21%, $M+1:444$) ^1H NMR:(400MHzDMSO- d_6) δ 11.3(br, 1H), 8.19(d, $J=8.6$ Hz, 2H), 7.46-7.51(m, 4H), 6.92-7.12(m, 4H), 3.15(m, 2H), 3.08(q, 2H), 3.01(s, 2H), 2.85(m, 2H), 1.23(t, 3H), 1.09(s, 6H)。

[0484] 实施例10

[0485] 2-(7-乙基-1H-吡啶-4-基)-5-[4-(3,3-二甲基-哌嗪-1-基)-苯基]-噁唑-4-羧酸酰胺

[0486]



[0487] 使用硼酸酯中间体B10通过实施例2的方法进行制备。

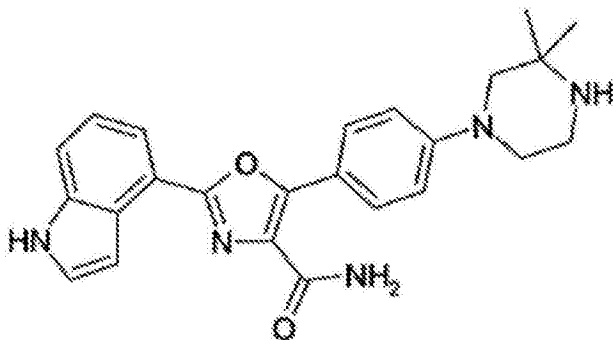
[0488] (32mg, 来自10的产率:24%, $M+1:443$) ^1H NMR:(400MHzDMSO- d_6) δ 11.4(br, 1H),

8.23(d, J=8.6 Hz, 2H), 6.99–7.79(m, 8H), 3.15(m, 2H), 3.01(s, 2H), 2.94(q, 2H), 2.85(m, 2H), 1.29(t, 3H), 1.09(s, 6H)。

[0489] 实施例11

[0490] 2-(1H-吡啶-4-基)-5-[4-(3,3-二甲基-哌嗪-1-基)-苯基]-噁唑-4-羧酸酰胺

[0491]



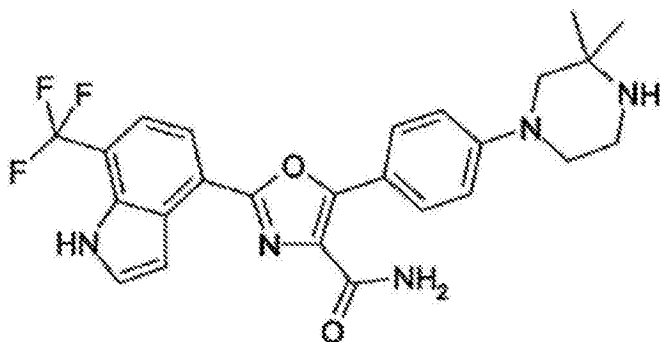
[0492] 使用硼酸酯中间体B11通过实施例2的方法进行制备。

[0493] (466mg, 来自中间体10A的产率38%, M+1:416)¹HNMR:(400MHz DMSO-d₆)δ11.48(s, 1H), 8.27(d, 2H), 7.85(d, 1H), 7.74(s, 1H), 7.61–7.53(m, 3H), 7.33(s, 1H), 7.26(t, 1H), 7.02(d, 2H), 3.19–3.17(m, 2H), 3.03(s, 2H), 2.89–2.86(m, 2H), 1.11(s, 6H)。

[0494] 实施例12

[0495] 2-(7-三氟甲基-1H-吡啶-4-基)-5-[4-(3,3-二甲基-哌嗪-1-基)-苯基]-噁唑-4-羧酸酰胺

[0496]



[0497] 通过以上通用方案2中所示的一系列反应来制备标题化合物。

[0498] 步骤1

[0499] 5-(4-(4-(叔丁氧羰基)-3,3-二甲基哌嗪-1-基)苯基)-2-碘代噁唑-4-羧酸乙酯

[0500] 使用相同制备的步骤4中所述的锂化/碘化方法,由中间体乙酯化合物(15)(参见以上中间体化合物(10A)的制备中的步骤2)制备标题化合物。

[0501] 步骤2

[0502] 4-(4-[4-乙氧羰基-2-(7-三氟甲基-1H-吡啶-4-基)-噁唑-5-基]-苯基)-2,2-二甲基-哌嗪-1-羧酸叔丁酯

[0503] 使5-(4-(4-(叔丁氧羰基)-3,3-二甲基哌嗪-1-基)苯基)-2-碘代噁唑-4-羧酸乙酯与硼酸酯中间体B-12在与以上实施例2中所述的类似的条件类似下反应,以得到标题化合物。

[0504] 步骤3

[0505] 4-{4-[4-羧基-2-(7-三氟甲基-1H-吡啶-4-基)-噁唑-5-基]-苯基}-2,2-二甲基-

哌嗪-1-羧酸叔丁酯

[0506] 将在5mL的甲醇、水和THF中的4-{4-[4-乙氧羰基-2-(7-三氟甲基-1H-吡啶-4-基)-噁唑-5-基]-苯基}-2,2-二甲基-哌嗪-1-羧酸叔丁酯(0.2g,0.3mmol)和NaOH(0.024g,0.6mmol)在50℃下搅拌过夜。将有机相在真空中去除,将其余溶液调节至pH 5,并且通过过滤以及在减压下干燥来收集呈白色固体的所得的标题化合物。

步骤44-{4-[4-氨基甲酰基-2-(7-三氟甲基-1H-吡啶-4-基)-噁唑-5-基]-苯基}-2,2-二甲基-哌嗪-1-羧酸叔丁酯

[0509] 将4-{4-[4-羧基-2-(7-三氟甲基-1H-吡啶-4-基)-噁唑-5-基]-苯基}-2,2-二甲基-哌嗪-1-羧酸叔丁酯、EDC1 HCl(0.36g,0.002mol)和HOBt(0.3g,0.002mol)在15mL的DMF和15mL的二噁烷中的NH₃中的混合物搅拌2小时。将溶剂在真空中去除。使残余物在水与EtOAc之间分配,将有机相经Na₂SO₄干燥并且将溶剂在真空中去除,以得到粗标题化合物产物(0.18g粗品)。

步骤52-(7-三氟甲基-1H-吡啶-4-基)-5-[4-(3,3-二甲基-哌嗪-1-基)-苯基]-噁唑-4-羧酸酰胺

[0512] 将4-{4-[4-氨基甲酰基-2-(7-三氟甲基-1H-吡啶-4-基)-噁唑-5-基]-苯基}-2,2-二甲基-哌嗪-1-羧酸叔丁酯(0.18g粗品)溶解于DCM与TFA的混合物(30mL 2:1)中,并且当在真空中去除溶剂时,将溶液在室温下搅拌2小时。使残余物在水与EtOAc之间分配。将有机相经Na₂SO₄干燥,并且将溶剂在真空中去除,以得到粗产物,将所述粗产物通过制备型HPLC纯化,以得到标题化合物(60mg,来自5-(4-(4-(叔丁氧羰基)-3,3-二甲基哌嗪-1-基)苯基)-2-碘代噁唑-4-羧酸乙酯的41%)。

[0513] M+1:484)¹HNMR:(400MHz DMSO-d₆) δ 11.85(s,1H),8.27-8.25(d,2H,J=8 Hz),7.97-7.95(d,1H,J=8Hz),7.85(s,1H),7.66-7.56(m,3H),7.02-7.00(d,2H J=0.8 Hz),3.19-3.17(m,2H),3.04(s,2H),2.87-2.86(m,2H),1.09(s,6H)。

生物活性实施例13FLT3激酶和极光激酶抑制活性

[0517] 本发明的化合物抑制FLT3激酶以及极光A激酶和极光B激酶的能力使用以下所述的测定来测定。

[0518] 使用以下通用程序,在Reaction Biology Corp.,Malvern,Pennsylvania,USA上执行激酶测定:

[0519] 1)在新鲜制备的碱性反应缓冲液(20mM Hepes pH 7.5、10mM MgCl₂、1mM EGTA、0.02%Brij35、0.02mg/ml BSA、0.1mM Na₃VO₄、2mM DTT、1%DMSO)中制备指示的底物。

[0520] 2)向上述底物溶液输送辅因子(1.5mM CaCl₂、16 ug/mL钙调蛋白、2mM MnCl₂)。

[0521] 3)将所指示的激酶输送至底物溶液并且轻柔混合

[0522] 4)将不同浓度的DMSO中的测试化合物输送至激酶反应混合物。

[0523] 5)将³³P-ATP(比活性0.01 $\square$ Ci/ $\square$ L最终)输送至反应混合物中,以起始反应。

[0524] 6)将激酶反应物在室温下孵育120分钟。

[0525] 7)将反应物在P81离子交换滤纸(Whatman#3698-915)上进行印迹。

[0526] 8)通过在0.75%磷酸中充分洗涤过滤器去除未结合的磷酸盐。

[0527] 9)使用Typhoon phosphorimagers(GE Healthcare)测定³³P信号。将源自含有失活的酶的对照反应物的背景减去之后,在Prism(Graphpad软件)中使用非线性回归函数测定IC₅₀值。

蛋白质名称	HUGO符号	底物	基因库登录号	蛋白质登录号	克隆	表达	标签
[0528]	极光A	AURKA	肯普肽	NP_940839	O14965	全长	Sf21昆虫细胞中的杆状病毒N端 His6标签
	极光B	AURKB	肯普肽	NP_004208.2	Q96GD4	全长	Sf21昆虫细胞中的杆状病毒N端 His6标签
	FLT3	FLT3	Abltide	NP_004110	P36888	aa564-958	Sf21昆虫细胞中的杆状病毒C端 His6标签

[0529] 底物:肯普肽=[H-LRRASLG]Abltide=[EAIYAAPFAKKK]

[0530] 抑制三种激酶中的每一种的50%酶活性(IC₅₀)所需的测试化合物的浓度在下表中列出。出于比较目的,还示出W02008/139161的实施例M-12中所公开的化合物2-(1H-吡啶-4-基)-5-(4-哌嗪-1-基-苯基)-噁唑-4-羧酸酰胺的IC₅₀值。

实施例的化合物	极光A激酶IC ₅₀ (μM)	极光B激酶IC ₅₀ (μM)	FLT3激酶IC ₅₀ (μM)
M-12	0.075	0.013	0.0016
1	0.01462	0.02433	0.00192
2	0.01357	0.0059	0.00077
3	0.01936	0.00936	0.000821
4	0.03404	0.01387	0.00097
[0531]	5	0.02053	0.00878
	6	0.0884	0.01962
	7	0.04254	0.00593
	8	0.271	0.0142
	9	-	-
	10	0.0743	0.012
	11	0.04625	0.01521
	12	0.016	0.014
			0.0028

[0532] 实施例14

[0533] 抗增生活性

[0534] 本发明化合物的抗增生活性通过测量化合物抑制源自结肠直肠癌的细胞系HCT-116的生长的能力来测定。细胞生长的抑制使用阿拉玛蓝(Alamar Blue)测定(Nociari等, Journal of Immunological Methods(1998)213,157-167)来测量。所述方法基于活细胞将刃天青还原为其荧光产物试卤灵的能力。对于各增生测定,将细胞铺在96孔平板上并且允

许回收16小时,之后添加抑制剂化合物,再持续96小时。在孵育期的最后,添加10%(v/v)阿拉玛蓝并且再孵育6小时,之后在激发535nm和发射590nm下测定荧光产物。所有细胞系获自ECACC(欧洲细胞培养物保藏中心(European Collection of cell Cultures))。

[0535] 本发明的化合物抗人结肠直肠癌细胞系HCT-116的活性在下表中示出。标题为HCT-11696小时的列是指在96h时间段的暴露之后,将HCT-116细胞的增生减少50%所需的化合物浓度。标题为[多倍性]的列是指产生不同的多倍体表型所需的最低化合物浓度,所述不同的多倍体表型据信由极光B抑制造成。

[0536]

实施例的化合物	HCT11696小时IC ₅₀ (μM)	[多倍性](μM)
M-12	0.68	1.0
1	0.24	0.3
2	0.074	0.03
3	0.12	0.1
4	0.26	0.3
5	0.087	0.1
6	0.16	0.1
7	0.12	0.1
8	—	—
9	—	—
10	0.22	0.3
11	0.17(n=5)	0.1
12	—	—

[0537] 实施例15

[0538] 使用Caco-2细胞的渗透性研究

[0539] 细胞摄取并保留化合物的能力可通过使用Caco-2细胞执行渗透性研究来测量。尽管Caco-2细胞通常用于预测化合物的口服生物利用度,但是所获得的测量结果也指示化合物的细胞渗透能力。

[0540] 因此在标准Caco-2测定中测试本发明的化合物,并且测定化物流进或流出细胞的流动速率。从结果中,将流出比计算为化合物离开细胞的速率与化合物进入细胞的速率的比。

[0541] 结果在下表中示出。在表中,标题为“Caco-2 A2B”的列指示化物流进细胞的速率,并且列Caco-2 B2A指示化物流出细胞的速率。“流出比”为Caco-2 B2A:Caco-2 A2B的比。

[0542] 结果证明所测试的所有化合物具有比W02008/139161的实施例M-12的化合物更有利的流出比。在实施例2至11的化合物的情况下,流出比比现有技术化合物M-12的流出比好五倍以上。

[0543] 化合物M-12和实施例11的化合物的数据的比较指示在哌嗪环中用C(CH₃)₂基团代替CH₂基团大大改善流出比。

[0544]

实施例的化合物	Caco2 A2B P_{app} ($\times 10^{-6} \text{ cms}^{-1}$)	Caco2 B2A P_{app} ($\times 10^{-6} \text{ cms}^{-1}$)	Caco2流出比
M-12	1.13	58.3	51.7
1	0.707	22.8	32.2
2	1.98	9.91	4.99
3	1.17	7.76	6.62
4	0.64	2.76	4.32
5	1.36	11	8.05
6	0.514	2.08	4.04
7	0.683	2.26	3.32
8	2.07	9.19	4.45
9	0.519	3.59	6.91
10	0.37	2.35	6.35
11	2.47	12.6	5.09
12	0.036	1.21	33.5

[0545] 实施例16

[0546] 抗人造血肿瘤细胞系的活性

[0547] 使用 **CellTiter-Blue®** 测定 (#G8081, Promega), 根据制造商的说明书, 针对一个范围的人造血细胞系对实施例2和7的化合物进行测试。从指数期培养物中收获细胞、计数并且以20,000-90,000细胞/孔的细胞密度接种在96孔平底微量滴定板上。在24h的回收期之后, 为了允许细胞重新开始指数生长, 添加10 μ l的培养基(四个对照孔/板)或具有测试化合物的培养基。在十个浓度下一式两份应用化合物, 并且继续处理四天。在细胞的处理之后, 添加10 μ l/孔 **CellTiter-Blue®** 试剂。在达四个小时的孵育期之后, 通过使用EnVision Xcite多标记读取器(激发 λ =531nm, 发射 λ =615nm)测量荧光(FU)。对于每个细胞系, 在两个至四个独立的实验中对化合物进行测试。针对每个细胞系的IC₅₀(微摩尔)值在下表中给出。

[0548]

细胞系	血液学 亚型	实施例2	实施例7
CCRF-CEM	ALL	0.050	0.046
CCRF-CEM/VCR	ALL	0.458	0.239
JURKAT	ALL	0.091	0.093
MOLT-4	ALL	0.048	0.045

[0549]	HL-60	AML	0.064	0.052
	KG-1	AML	0.076	0.137
	MV4-11	AML	0.009	0.009
	NOMO-1	AML	0.095	0.061
	OCI-AML2	AML	0.103	0.091
	PL-21	AML	0.099	0.091
	EM-2	CML	0.604	0.493
	JURL-MK1	CML	0.141	0.098
	K-562	CML	0.326	0.219
	KCI-22	CML	0.417	0.366
	MEG-01	CML	0.633	0.468
	KM-H2	HL	0.189	0.137
	HUT-78	NHL	0.138	0.123
	RAJI	NHL	2.852	1.801
	U-937	NHL	0.094	0.155
	IM-9	MM	0.07	0.070
	L-363	MM	0.121	0.104
	LP-1	MM	1.070	1.009
	NCI-H929	MM	0.852	1.399
	RPMI8226	MM	2.136	1.299

[0550] 关键字

[0551] ALL=急性成淋巴细胞性白血病

[0552] AML=急性髓细胞性白血病

[0553] CML=慢性髓细胞性白血病

[0554] HL=霍奇金淋巴瘤

[0555] NHL=非霍奇金淋巴瘤

[0556] MM=多发性骨髓瘤

[0557] 实施例17

[0558] 异种移植研究

[0559] 通过检验实施例2和7的化合物对MV4-11癌细胞系的裸鼠异种移植模型中肿瘤生长的作用来研究本发明化合物的体内抗肿瘤活性。

[0560] 材料和方法

[0561] 2.1.动物和试剂

[0562] MV4-11细胞系(ATCC,USA);RPMI 1640培养基(Invitrogen,USA);FBS(Invitrogen,澳大利亚);Balb/c裸鼠(Slac Laboratory Animal Co.,Ltd.,上海,中国):雌性,18-22g;HP-β-CD(Sigma,USA)。

[0563] 2.2.程序

[0564] 共使用了52只雌性裸鼠。在开始实验之前,允许小鼠3天的适应期。在研究开始时,在右侧腹部给小鼠皮下(s.c.)植入200μl的在50%基质胶中的 1×10^7 MV4-11肿瘤细胞。当肿瘤达到100-150mm³的平均体积时,基于肿瘤体积在52只小鼠中选择32只,并且在给药之前随机分配至4组。每个治疗组由8只带瘤动物组成(n=8/组)。

[0565] 用实施例2的化合物、实施例7的化合物或媒介物BID(每天两次)治疗带瘤小鼠,5

天有、2天无,持续4个循环。用阿糖胞苷每天一次治疗小鼠的比较组,5天有、2天无,持续4个循环。

[0566] 在每次给药时对小鼠进行称重,并且每周两次记录肿瘤大小。密切观察小鼠的不利的治疗相关性副作用的任何明显体征,并且如果观察到所述体征,那么在观察到时将这些记录下来。

[0567] 使用游标卡尺在两个维度上测量肿瘤大小,每周两次,并且使用下式以 mm^3 表示体积: $V=0.5 \times a \times b^2$,其中a和b分别为肿瘤的长直径和短直径。

[0568] 通过向小瓶中称取适当量的测试化合物、添加适当体积的20%HP- β -CD,以达到2mg/mL(对于实施例2)和3mg/mL(对于实施例7)的最终浓度(游离碱),调节pH至pH 5,将小瓶涡旋5分钟并且然后将小瓶放置在超声浴中以确保测试化合物是澄清的,来每周一次制备测试制剂。

[0569] 实验设计在下表中进行总结。

测试组	小鼠的编号/性别	治疗					
		测试化合物	剂量(mg/kg)	浓度(mg/mL)	给药体积(mL/kg)	媒介物	途径
[0570]	1	10只雌性	无	不适用	不适用	10	20% HP- β -CD IV
	2	10只雌性	实施例2	20	2	10	20% HP- β -CD IV
	3	10只雌性	实施例7	30	3	10	20% HP- β -CD IV
	4	10只雌性	阿糖胞苷	100	10	10	盐水 IP
测试化合物储存: 干燥4℃				注释: 不适用			
动物禁食过夜: 无				返回的食物: 不限制			

[0571] 2.3.实验终点:

[0572] 在4循环给药后,通过CO₂暴露使小鼠安乐死。测量并记录肿瘤体积、切割肿瘤的重量以及小鼠体重。肿瘤抑制速率(IR)通过式 $IR=(W_v-W_T)/W_v \times 100\%$ 来计算。

[0573] 使用不成对的双尾学生t检验针对显著性,对组之间肿瘤大小的差异进行分析。 $P<0.05$ 视为统计学上显著的。

[0574] 3.结果和讨论

[0575] 3.1.带MV4-11的裸鼠的肿瘤体积

[0576] 图1至图3示出实施例2和7的化合物在裸鼠中对MV4-11异种移植肿瘤的生长抑制。从第一次施用化合物后第4天(第一次测量)开始,在接受测试化合物的小鼠与仅接受媒介物的小鼠的肿瘤之间观察到肿瘤体积的显著差异,并且持续到最后。从第一次施用后第11天开始,还在接受测试化合物(实施例2和7)的小鼠的肿瘤与阿糖胞苷治疗组的肿瘤之间观察到肿瘤体积的显著差异,并且其后持续。图1还示出实施例2和实施例7均完全抑制了肿瘤生长,而阿糖胞苷减缓但不完全阻滞肿瘤生长。

[0577] 3.2.携带MV4-11的裸鼠的肿瘤重量

[0578] 通过处死带瘤裸鼠而在终点获得的治疗组与媒介物组之间的肿瘤重量的显著差

异(图4)进一步证实了实施例2和7的化合物对MV4-11异种移植肿瘤生长的肿瘤抑制作用。

[0579] 3.3.携带MV4-11的裸鼠的体重变化(%)

[0580] 图5示出整个研究期期间的体重变化(%)。所有经过治疗的小鼠在最初几天损失其体重的大约5%并且然后恢复,指示在当前的剂量和给药途径下,测试化合物在裸鼠中被良好耐受。

[0581] 3.4.肿瘤抑制速率(IR)计算

[0582] 实施例2的化合物-20mg/kg组:IR=98.13%

[0583] 实施例7的化合物-30mg/kg组:IR=98.24%

[0584] 阿糖胞苷-100mg/kg组:IR=66.72%

[0585] 4.结论

[0586] 在此研究中研究了实施例2和实施例7的化合物对来自MV4-11癌细胞系的裸鼠异种移植模型的肿瘤生长的作用。对携带MV4-11的裸鼠的体重进行监测,作为反映体内毒性的指标。测试化合物(实施例2和7)治疗组与媒介物对照组以及阿糖胞苷比较组之间的肿瘤体积的差异是显著的。在此研究中,实施例2和实施例7均完全抑制肿瘤生长,而阿糖胞苷仅减缓但不完全阻滞肿瘤生长。治疗组与媒介物组之间的肿瘤重量的显著差异进一步证实抗肿瘤作用。实施例2组、实施例7组以及阿糖胞苷组的IR值分别为98.13%、98.24%和66.72%。

[0587] 体重波动曲线揭示了接受测试化合物的小鼠在最初的几天损失体重,但是接着其重量在之后恢复,从而指示在当前的剂量和给药途径下,测试化合物在裸鼠中被良好耐受。总之,IV、BID的在20mg/kg的剂量下的实施例2的化合物和在30mg/kg的剂量下的实施例7的化合物均为没有明显毒性的MV4-11异种移植肿瘤生长的有效抑制剂。

[0588] 药物制剂

[0589] 实施例18

[0590] (i)片剂制剂

[0591] 通过将50mg的化合物与197mg的作为稀释剂的乳糖(BP)以及3mg的作为润滑剂的硬脂酸镁相混合,并且以已知的方式压缩以形成片剂来制备含有式(1)化合物的片剂组合物。

[0592] (ii)胶囊制剂

[0593] 通过将100mg的式(1)化合物与100mg的乳糖混合并且将所得到的混合物装到标准的不透明的硬明胶胶囊中来制备胶囊制剂。

[0594] (iii)可注射制剂I

[0595] 可通过将式(1)化合物(例如,呈盐形式)溶解于含有10%丙二醇的水中,以得到1.5重量%的活性化合物的浓度进行制备用于通过注射施用的胃肠外组合物。然后通过过滤将溶液灭菌、装到安瓿中并且密封。

[0596] (iv)可注射制剂II

[0597] 通过将式(1)化合物(例如,呈盐形式)(2mg/mL)和甘露醇(50mg/mL)溶解于水中,将溶液无菌过滤并装到可密封的1mL小瓶或安瓿中进行制备用于注射的胃肠外组合物。

[0598] (iv)皮下注射制剂

[0599] 通过将式(1)化合物与药用级玉米油混合以得到5mg/mL的浓度进行制备用于皮下

施用的组合物。将组合物灭菌并装到适合的容器中。

[0600] 等效方案

[0601] 以上实施例是出于说明本发明的目的而呈现,并且不应解释为对本发明的范围进行任何限制。将易于显而易见的是,可对以上描述的和实施例中说明的本发明的具体实施方案做出许多修改和改变,而不脱离本发明的原理。所有所述修改和改变旨在由本申请所涵盖。

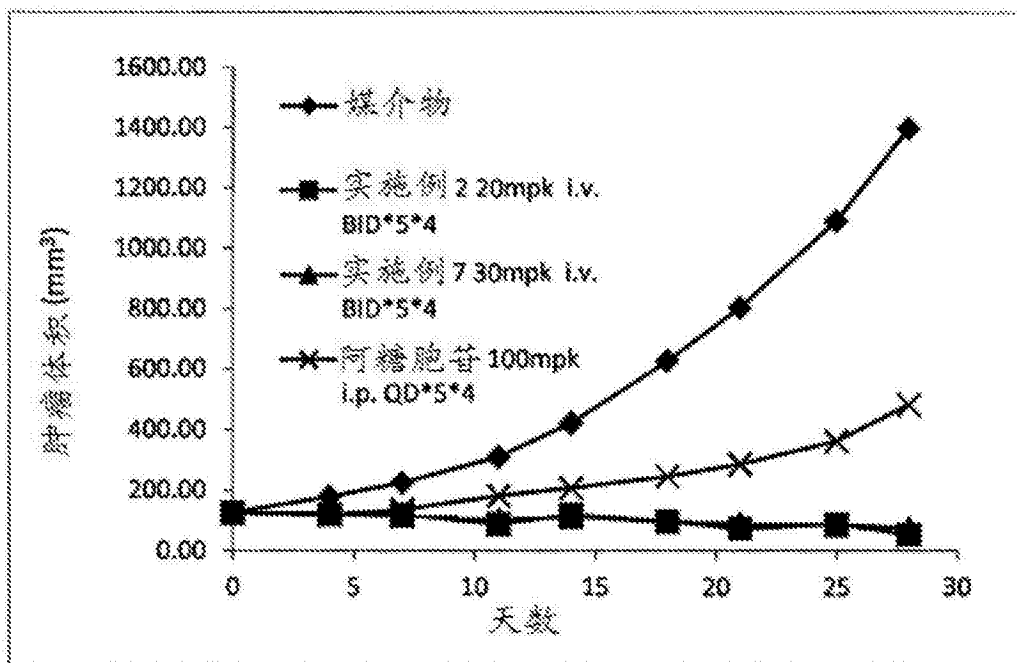


图1

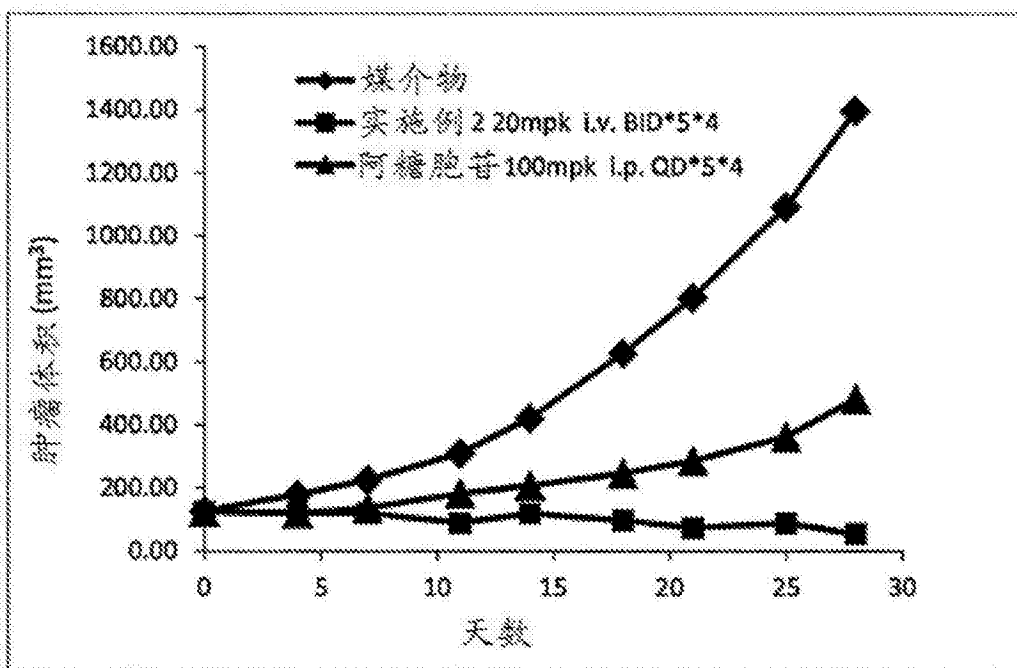


图2

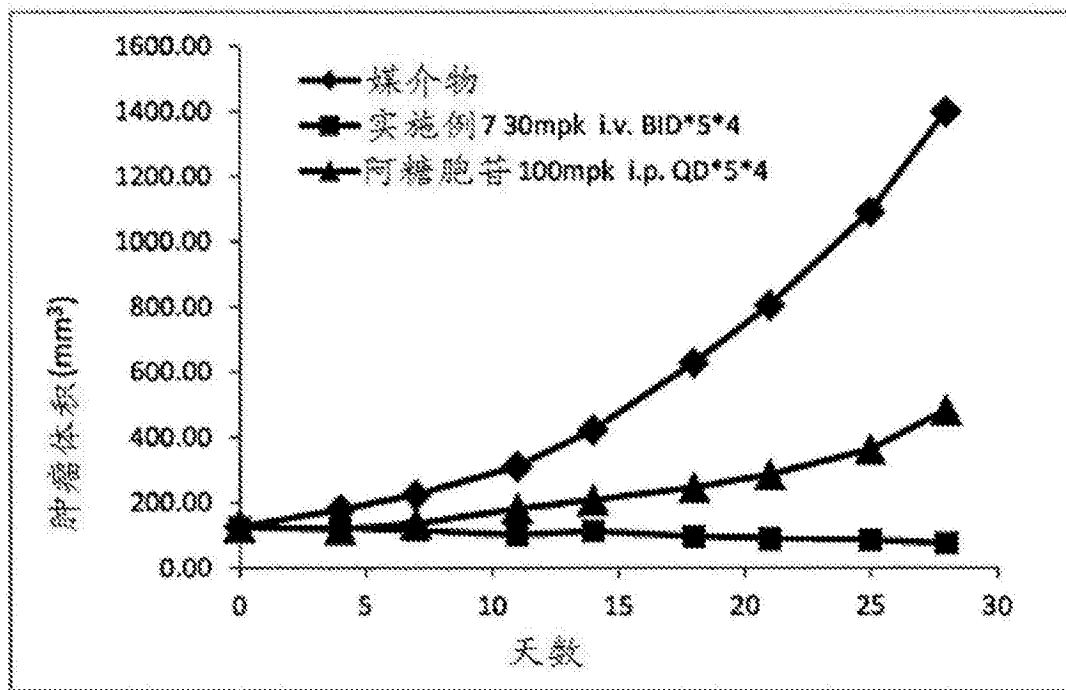


图3

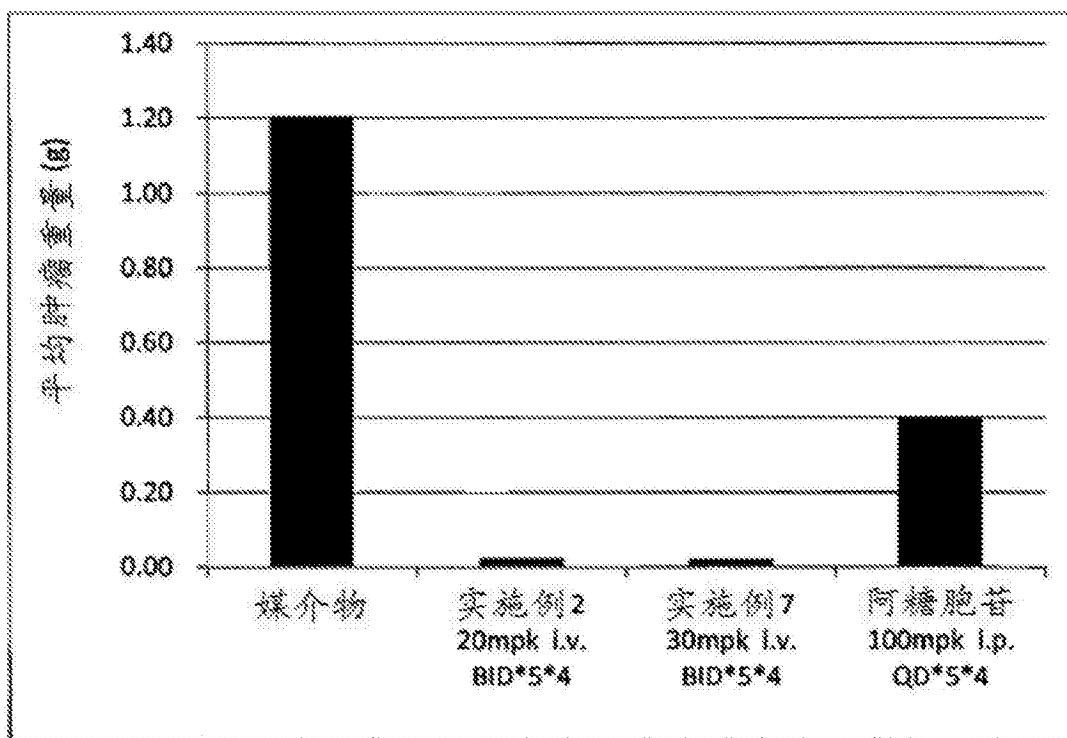


图4

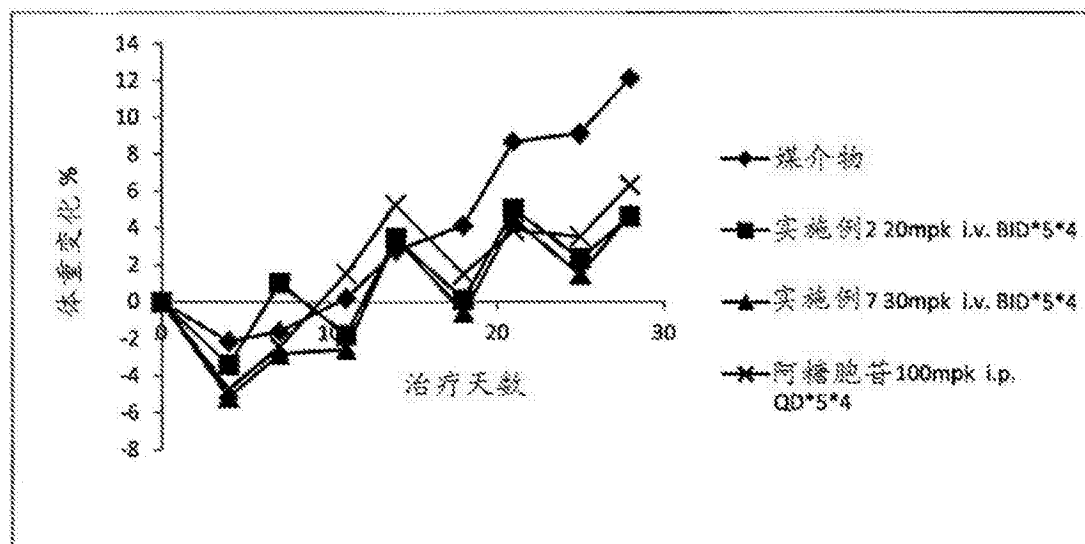


图5