



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109563088 B

(45) 授权公告日 2022.10.11

(21) 申请号 201780049835.8

(22) 申请日 2017.07.06

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109563088 A

(43) 申请公布日 2019.04.02

(30) 优先权数据
62/359,001 2016.07.06 US
62/454,163 2017.02.03 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.02.14

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2017/040866 2017.07.06

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/009638 EN 2018.01.11

(73) 专利权人 密歇根大学董事会
地址 美国密歇根州

(72) 发明人 布莱恩·D·罗斯
马尔奇安·范·杜特

(74) 专利代理机构 北京德琦知识产权代理有限公司 11018
专利代理师 潘怀仁 王珍仙

(51) Int. Cl.
C07D 413/14 (2006.01)
C07D 403/14 (2006.01)
A61K 31/553 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 105358156 A,2016.02.24

CN 105283454 A,2016.01.27

WO 2009/155121 A2,2009.12.23

CN 103748099 A,2014.04.23

Marcian E. Van Dort, et al.. "Discovery of bifunctional oncogenic target inhibitors against allosteric mitogen-activated protein kinase (MEK1) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)". 《Journal of medicinal chemistry》.2016,第59卷(第6期),第2512-2623页.

Marcian E. Van Dort, et al.. "Discovery of bifunctional oncogenic target inhibitors against allosteric mitogen-activated protein kinase (MEK1) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)". 《Journal of medicinal chemistry》.2016,第59卷(第6期),第2512-2623页.

Nobuko Nishimura, et al.. "Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K)/Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Dual Inhibitors: Discovery and Structure Activity Relationships of a Series of Quinoline and Quinoxaline Derivatives". 《Journal of medicinal chemistry》.2011,第54卷第4735-4751页.

审查员 邱李

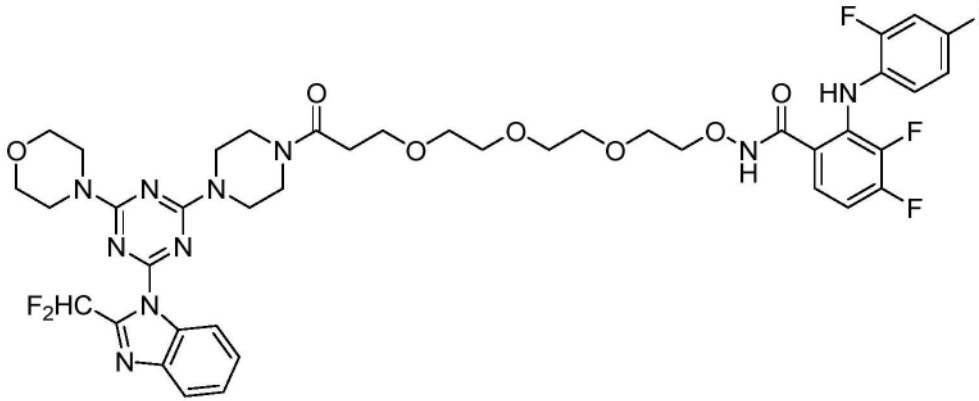
权利要求书2页 说明书68页 附图6页

(54) 发明名称
MEK/PI3K和mTOR/MEK/PI3K的多功能抑制剂
和治疗用途

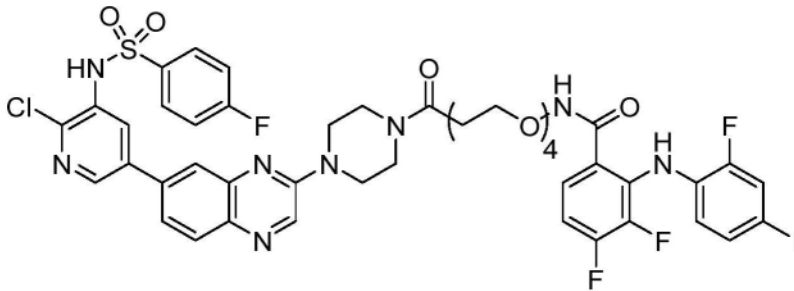
(57) 摘要
公开了mTOR、MEK和PI3K的多功能抑制剂和包含该多功能抑制剂的组合物。也公开了使用多功能抑制剂治疗其中抑制mTOR、MEK和PI3K中的一种或多种提供益处的疾病和病症,如癌症的方法。

CN 109563088 B

1. 一种具有下述结构的化合物：



2. 一种具有下述结构的化合物：



3. 一种药物组合物，其包括如权利要求1或2所述的化合物和药学上可接受的载体或载剂。

4. 如权利要求1或2所述的化合物在制备用于治疗抑制mTOR、MEK和PI3K中的至少一种提供益处的疾病或病症的药物中的用途。

5. 如权利要求4所述的用途，其中所述疾病或病症选自下述：

癌、白塞病综合征、牛皮癣、哮喘、自身免疫性疾病、移植物排斥、发热、心血管疾病、脑血管疾病、纤维化、结缔组织病、结节病、生殖器和生殖障碍、神经系统疾病、睡眠障碍、疼痛、肾脏疾病和感染性疾病。

6. 如权利要求4所述的用途，其中所述疾病或病症选自下述：

膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、肝癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、直肠癌、喉癌、胰腺癌、食道癌、胃癌、胆囊癌、宫颈癌、淋巴系的造血肿瘤、骨髓系的造血肿瘤、中枢和外周神经系统肿瘤、间充质来源的肿瘤、黑素瘤、色素性干皮症、角化棘皮瘤、精原细胞瘤、甲状腺滤泡癌、畸胎瘤、肾细胞癌、骨髓和淋巴母细胞白血病、胶质母细胞瘤、粘液样和圆细胞癌、人类软组织肉瘤、积液淋巴瘤、脑癌、骨癌、视网膜母细胞瘤、腹腔积液、恶性胸腔积液、间皮瘤、肾母细胞瘤、滋养细胞肿瘤、血管外皮细胞瘤、骨髓纤维化和结肠直肠癌。

7. 如权利要求4所述的用途，其中所述疾病或病症选自下述：

加速膀胱癌、转移性膀胱癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、外分泌胰腺癌、急性淋巴细胞白血病、急性成淋巴细胞白血病、B细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、毛细胞淋巴瘤、组织细胞性淋巴瘤、伯克特淋巴瘤、慢性髓性白血病、早幼粒细胞白血病、神经胶质瘤、神经鞘瘤、纤维肉瘤、横纹肌肉瘤、尤文氏肉瘤、淋巴转移、头颈部鳞状细胞癌、食管鳞状细胞癌、急性非淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、慢性粒细胞白血病、毛细胞

白血病、体腔基淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、肾上腺皮质癌、产ACTH肿瘤、与结直肠肿瘤相关的息肉、原发性腹膜上皮肿瘤、子宫内膜癌、阴道癌、外阴癌、子宫癌、卵巢卵泡实体瘤、阴茎癌、内源性脑肿瘤、星形细胞脑肿瘤、中枢神经系统转移性肿瘤细胞浸润、恶性黑素瘤、人皮肤角质形成细胞的肿瘤进展、急性髓性白血病、卡波西氏肉瘤、炎症性疾病、HIV和慢性疼痛。

8. 如权利要求4所述的用途,其中所述疾病或病症选自下述:

导管癌、原发性浅表性膀胱肿瘤、膀胱浸润性移行细胞癌、肌肉浸润性膀胱癌、神经性疼痛、伤害性疼痛和与临床诊断相关的慢性疼痛。

9. 如权利要求4所述的用途,其中所述疾病或病症选自下述:

神经损伤或神经本身失常引起的疼痛和肿瘤转移性疾病。

10. 如权利要求4所述的用途,其中所述疾病或病症选自下述:

纤维肌痛、炎症和肌肉骨骼功能障碍。

11. 如权利要求4所述的用途,其中所述疾病或病症选自下述:

炎症性皮肤病、呼吸道过敏性疾病、胃肠道疾病、泌尿系统癌、白血病、淋巴系统癌、皮肤癌、女性生殖道恶性肿瘤和口腔癌。

12. 如权利要求4所述的用途,其中所述疾病或病症选自下述:

血细胞恶性肿瘤、男性生殖道恶性肿瘤、神经母细胞瘤、甲状腺癌、胃肠道癌、肾癌和胸腺淋巴瘤肺癌。

13. 如权利要求4所述的用途,其中所述疾病或病症选自下述:

鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤、骨髓增生异常综合征、星形细胞瘤、过敏性疾病和血管炎。

14. 如权利要求4所述的用途,其中所述疾病或病症选自下述:

炎症性肠病、骨瘤、小细胞癌和泌尿生殖道癌。

15. 如权利要求4所述的用途,其中所述疾病或病症选自恶性肿瘤的生长。

16. 如权利要求4所述的用途,其中所述疾病或病症选自下述:

骨髓恶性肿瘤、骨肉瘤和非小细胞癌。

17. 如权利要求4所述的用途,其中所述疾病或病症选自成人和儿科肿瘤。

18. 如权利要求4所述的用途,其中所述疾病或病症选自局部晚期肿瘤。

19. 如权利要求4所述的用途,其中所述疾病或病症选自转移性癌和睾丸癌。

20. 如权利要求4所述的用途,其中所述疾病或病症选自骨髓瘤。

21. 如权利要求4所述的用途,其中所述疾病或病症选自多发性骨髓瘤。

22. 如权利要求4所述的用途,其中所述疾病或病症选自实体瘤的生长。

23. 如权利要求4所述的用途,其中所述疾病或病症选自髓状白血病和癌转移。

MEK/PI3K和mTOR/MEK/PI3K的多功能抑制剂和治疗用途

[0001] 政府利益声明

[0002] 本发明是根据美国国立卫生研究院授予的津贴CA085878和CA197701,在政府资助下完成的。政府拥有本发明的某些权利。

[0003] 相关申请的交叉引用

[0004] 本申请要求2017年2月3日提交的美国临时专利申请号62/452,163和2016年7月6日提交的美国临时专利申请号62/359,001的权益,每篇通过引用整体并入本文。

技术领域

[0005] 本发明涉及mTOR、MEK和PI3K的多功能抑制剂,包括双功能抑制剂、三功能抑制剂和四功能抑制剂,并且涉及治疗其中抑制mTOR、MEK和PI3K中的一种或多种提供益处的病症和疾病的治疗方法。本发明的多功能抑制剂可单独或与放射和/或化学治疗组合作作癌症治疗剂。

背景技术

[0006] KRAS的异常过度活化在广泛的人类癌症的肿瘤起始和进展中起着重要作用。KRAS突变占有RAS突变的86%,并且与最高频率(约22%)的所有人类恶性肿瘤相关(1)。KRAS突变的发生率在胰腺和结肠直肠癌恶性肿瘤中特别高,其中KRAS突变出现的频率分别大于90%和大于40%。胰腺癌和结肠直肠癌是所有癌症中最致命的癌症之一,并且是美国癌症死亡的第四和第三大原因(2)。所有胰腺癌病例中约80%存在局部晚期或转移性疾病,这妨碍了外科手术。目前,没有治疗KRAS活化癌症的治疗选择方案。具有用氟嘧啶和奥沙利铂的一线化疗失败的转移性结直肠癌KRAS突变患者的治疗选择方案也是有限的。

[0007] 肿瘤细胞浸润、运动和转移是癌症患者死亡的重要原因。由于一系列复杂的过程导致肿瘤转移的过程(36)。研究报告,PI3K/Akt途径与肿瘤进展和转移密切相关(37)。此外,据报道,MEK以及PI3K抑制剂可有效下调肿瘤细胞中的转移前表型(38)。抑制剂介导MAPK激酶(MEK)的阻断,MEK是MAPK途径中BRAF的下游,并且与BRAF V600黑素瘤患者(包括V600E和V600K突变)的改善的无进展和总体存活率相关(39,40)。已经确定了共同抑制丝裂原活化蛋白激酶(Ras/Raf/MEK/ERK)和磷酸肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/AKT)途径具有减少的运动和浸润(转移)能力(41,42)。因此,针对Ras/Raf/MEK/ERK和PI3K/Akt信号传导途径的分子靶向剂对于抑制肿瘤细胞的生长和转移是重要的。预期通过双重抑制Ras/Raf/MEK/ERK和PI3K/Akt途径抑制肿瘤细胞迁移、浸润和转移,在改善癌症治疗方案中起关键作用。同时靶向Ras/Raf/MEK/ERK和PI3K/Akt途径的化合物应当提供对浸润性表型和转移性过程的改善的抑制,用于治疗原发性和转移性疾病,从而使患者死亡率降低。

[0008] 开发直接针对突变型KRAS的药物的努力仍然具有挑战性,因为特异性问题是有问题的。因此,近年来KRAS信号传导的药理学干预的努力集中在两个中心RAS效应途径的下游靶标,RAF/MEK/ERK和PI3K/AKT/mTOR(3,4)。RAF和MEK已经产生了许多药物发现计划,这些计划已经产生了具有吸引力的临床候选物(5-7)。BRAF抑制剂的临床活性可能仅限于BRAF

突变肿瘤患者,因为缺乏BRAF突变与MAPK信号传导的诱导而非抑制相关,以响应这种靶向方法(8-10)。相反,已显示MEK抑制剂对大约一半的被测试的KRAS突变体肿瘤起到抗增殖作用(11)。令人鼓舞的是,MEK抑制剂CI-1040以及曲美替尼在第1阶段测试中都引发了客观反应(12,13)。因此,MEK抑制是用于治疗KRAS活化的癌症的可行方法,但是在单一疗法设置中,MEK抑制不可能产生显著影响该难治性患者群体的结果所需的活性程度。

[0009] 改善MEK抑制剂单一药剂活性的一种策略是PI3K信号传导的额外靶向。该组合策略基于体外和体内证据,表明KRAS突变体肿瘤需要MAPK和PI3K途径的双重抑制以实现肿瘤生长的最大抑制(11,14-16)。已经证明,当任何一个被抑制时,负反馈回路的释放导致备用途径的激活(16,17)。PI3K途径的激活,通常由PI3KCA突变或PTEN缺失引起,代表了KRAS突变癌症中MEK抑制剂治疗的主要抗性机制。两种途径的联合抑制导致细胞凋亡和肿瘤缩小的显著增加(18)。

[0010] 由于RAS/RAF/MEK/ERK信号转导途径在相当大百分比的最具攻击性和致命形式的人类癌症中被激活,因此靶向该途径的几种小分子抑制剂已被FDA批准或正在积极的临床开发中。不幸的是,尽管商业上可获得的BRAF抑制剂(即PLX4032或威罗菲尼(Vemurafenib))在治疗同时具有BRAF和KRAS活化突变的肿瘤中具有临床功效,但由于ERK信号传导的反常诱导,该药物对具有天然BRAF的肿瘤无效。

[0011] 因此,mTOR、MEK和PI3K抑制剂是本领域已知的。例如,likura等人,美国专利号7,897,792公开了一类基于香豆素的MEK抑制剂。例如美国专利号2010/0249099; 2011/0009405;和2011/0053907中公开了PI3K抑制剂。例如Engelman等人,Nature Medicine, Vol.14,Number 14,1351-56页(2008)中公开了PI3K和MEK抑制剂联合用于治疗肺癌。

[0012] mTOR抑制剂也是本领域已知的,例如在WO 2006/122806、WO 2010/003816、美国专利号9,284,315和WO2012/068106中。在一些实施方式中,现有技术的抑制剂是双重mTOR和PI3K抑制剂。

[0013] PI3K途径的远端组分的调节也涉及多种其他疾病过程,包括以组织破坏为特征的感染和免疫/炎性疾病(27)。例如,结核分枝杆菌(Mtb)是世界范围内的主要健康问题。已知细胞内信号级联,包括例如p38和ERK丝裂原活化蛋白激酶在基质金属蛋白酶(MMP)调节中是重要的(28)。磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)越来越多地被认为是一种关键的信号级联,其涉及多种炎症反应的调节(29,30,31)。PI3K信号传导对于单核细胞分泌TNF- α 和IL-10至关重要,而PI3K抑制剂可抑制Mtb诱导的趋化因子上调(32)。PIP3是PI3K活性的下游产物,也是分枝杆菌吞噬体成熟所必需的(33)。AKT抑制可对MMP的分泌和基因表达产生全面的抑制作用,并且通过抑制AKT来阻止Mtb的细胞内生长(34),并且已发现AKT的药理学抑制降低了分枝杆菌感染水平(35)。靶向与这些信号传导过程相关的信号传导途径的化合物可有效中断分枝杆菌感染中的信号转导机制,同时提供炎症组织损伤的减少。

[0014] 细胞信号传导途径mTOR是磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)细胞存活途径的组分,其在细胞生长和增殖的调节中起重要作用。异常的PI3K途径激活被认为涉及许多类型的癌症,导致相关的治疗抗性。PI3K/AKT/mTOR途径参与调节代谢、细胞生长和存活、细胞周期进展以及转录和翻译。AKT位于磷酸肌醇3-激酶(PI3K)信号传导的下游,其在配体(比如胰岛素或其他生长因子)与细胞表面上的受体酪氨酸激酶(RTK)结合后被激活。激活的AKT使一系列底物,包括PRAS40、BAD和FOXO3磷酸化。细胞信号传导途径mTOR作用于Akt的上游和下游,并

因此充当PI3K途径中的关键信号传导连接。激酶mTOR在细胞内组装成两个不同复合物(mTORC1和mTORC2),并位于 AKT信号传导中枢的两侧。具有raptor(mTORC1)的雷帕霉素(rapamycin)敏感复合物位于AKT的下游,而具有rictor的雷帕霉素不敏感复合物(mTORC2)可通过Ser473处的直接磷酸化完全激活AKT。因此,已充分确定mTOR能够形成称为mTORC1和mTORC2的两种主要多蛋白复合物。这些复合物用于调节细胞蛋白质合成,这是细胞稳态的关键要求,包括生长和增殖。因此,mTOR是表面受体下游非常相关的癌症信号传导途径,并且存在对能够靶向mTOR的改良药物的显著需求。

[0015] 跨膜受体的配体结合激活导致PI3K的激活,随后使被PTEN去磷酸化的Akt磷酸化。由于PI3K/Akt/mTOR途径的下游信号传导增强,癌症以及包括炎症过程在内的自身免疫性疾病是造成这些疾病的部分原因并发挥着许多下游生物学效应,包括通过磷酸化下游靶标(比如4E-BP1和p70S6激酶)翻译mRNA,通过Atg13和ULK1抑制自噬,核糖体生物发生,和转录激活,其导致线粒体活性或脂肪生成增加。因此,mTOR是EGFR/PI3K/Akt和MET信号传导的下游靶标以及与MEK信号传导的显著串扰,并因此被认为是治疗各种类型疾病的关键靶标。

[0016] PI3K/AKT/mTOR和MEK途径的失调导致细胞生长和增殖不受抑制。然而,本领域仍然需要通过抑制mTOR、MEK和PI3K来治疗癌症和其他疾病和病症的化合物和方法。尽管发现了mTOR、MEK和PI3K的小分子抑制剂,但mTOR、MEK和PI3K的有效抑制剂的设计仍然是现代药物发现中的重大挑战。因此,本领域仍然需要具有物理和药理学性质的多功能mTOR、MEK和PI3K抑制剂,其允许在治疗应用中使用多功能抑制剂。本发明提供单剂多功能化合物,其被设计用于结合mTOR、MEK和PI3K,并抑制mTOR、MEK和PI3K活性。

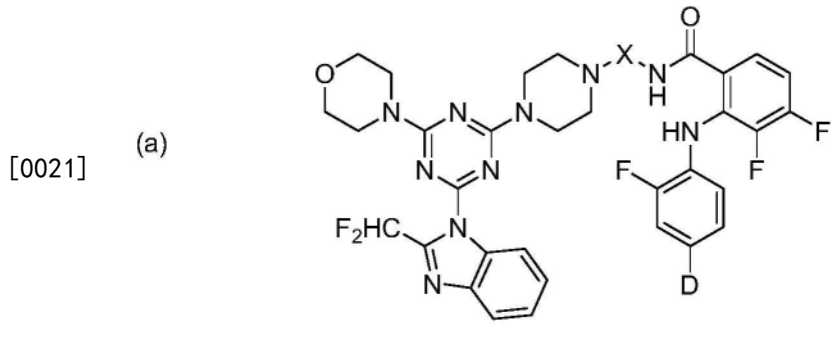
发明内容

[0017] 本发明涉及共同靶向MAP激酶和PI3K途径的单一化合物,以及通过向有需要的个体施用这种化合物来治疗癌症的方法。已经开发了本发明的化合物以共同靶向这些重要的信号传导途径,从而对抗与其途径失调相关的疾病。

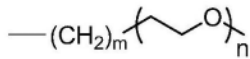
[0018] 更具体地,本发明涉及新型多功能化合物,其能够抑制参与肿瘤生长、进展和转移的两种或三种关键信号转导途径(即mTOR、MEK和PI3K)。已经缀合了经化学修饰以适应接头,同时保持对其各自酶靶的高结合亲和力的单个mTOR、PI3K和MEK抑制剂,从而提供本发明的双功能、三功能和四功能mTOR/MEK/PI3K抑制剂。本发明的化合物通过同时靶向两个或三个关键调节节点mTOR、MEK和PI3K来抑制KRAS驱动的肿瘤进展,并且这样做拦截在它们各自的途径之间发生的串扰(cross-talk)。

[0019] 因此,本发明涉及mTOR、MEK和PI3K酶的多功能抑制剂;包括该抑制剂的组合物;以及在治疗其中抑制mTOR、MEK和PI3K活性提供益处的病症和疾病中使用该抑制剂的方法。本发明的化合物是mTOR活化、MEK活化和PI3K活化的有效抑制剂,并且可用于治疗癌症,尤其是KRAS突变肿瘤。

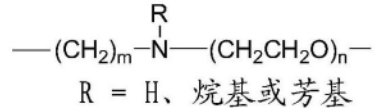
[0020] 本发明涉及能够抑制MEK和PI3K活性的多功能化合物,该多功能化合物具有下述结构式:



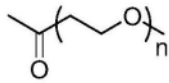
[0022] D为I、-C≡CH或-C≡C-R, R为烷基或芳基, 并且X选自由下列组成的组中:



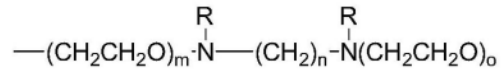
其中, m为0、1、2、3、4或5,
且n为1、2、3、4或5,
或m和n的任意组合



m、n独立地为1、2、3、4或5



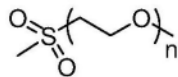
n为1、2、3、4或5



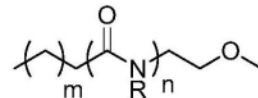
R 独立地为H、烷基或芳基

m、n、o独立地为1、2、3、4或5

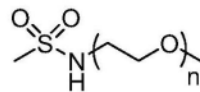
[0023]



n为1、2、3、4或5

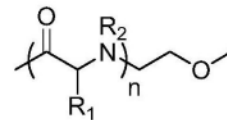


R为H、烷基或芳基



n为1、2、3、4或5

其中, m为0、1、2、3、4或5,
且n为1、2、3、4或5,
或m和n的任意组合

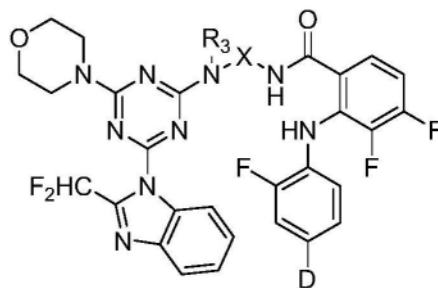


R₁、R₂ 独立地为H、烷基或芳基

n为1、2、3、4或5;

(b)

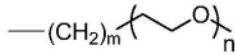
[0024]



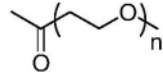
D = I、-C≡CH、-C≡C-R, 其中R=烷基或芳基

[0025] R₃为H、烷基、芳基、-(CH₂)_p-OH或-(CH₂)_p-NR₄, 其中p=1-6, 且R₄=H、烷基、芳基, 并

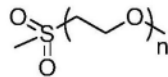
且X选自下列组成的组中



m为0、1、2或3, 且n为1、2、3、4或5
或m和n的任意组合

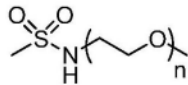


n为1、2、3、4或5

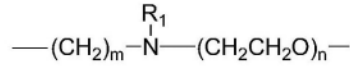


n为1、2、3、4或5

[0026]

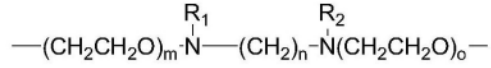


n为1、2、3、4或5



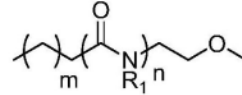
R₁ = H、烷基或芳基

m、n独立地为1、2、3、4或5



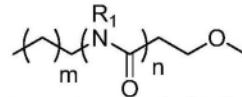
R₁ = H、烷基或芳基

m、n、o独立地为1、2或3



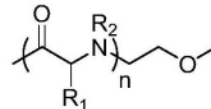
R₁ = H、烷基或芳基

m为0、1、2、3、4或5, 且n为1、2、3、4或5
或m和n的任意组合



R₁ = H、烷基或芳基

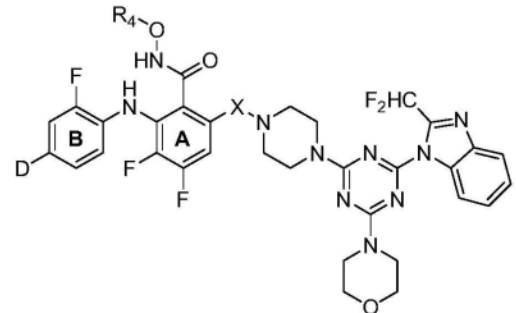
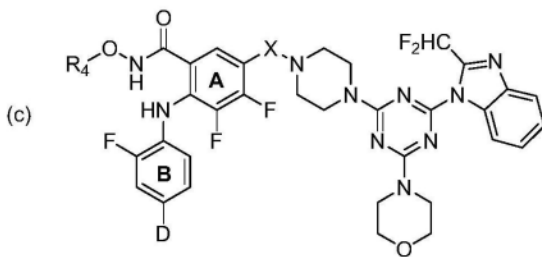
m为0、1、2、3、4或5, 且n为1、2、3、4或5
或m和n的任意组合



R₁、R₂ 独立地为H、烷基或芳基

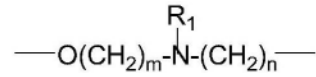
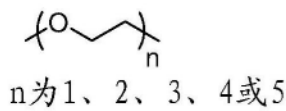
n为1、2、3、4或5

[0027]



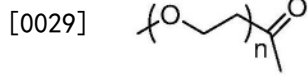
其中R₄ = *R*-(*-*)-CH₂CHOH(CH₂OH); -CH₂CH₂OH; 或-CH₂CH₂-NH₂;

[0028] D为I、-C≡CH或-C≡C-R, R为烷基或芳基, 并且X选自下列组成的组中

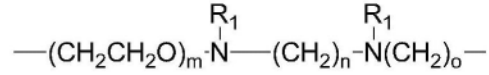


R₁ 为H、烷基或芳基

m和n独立地为1、2、3、4或5

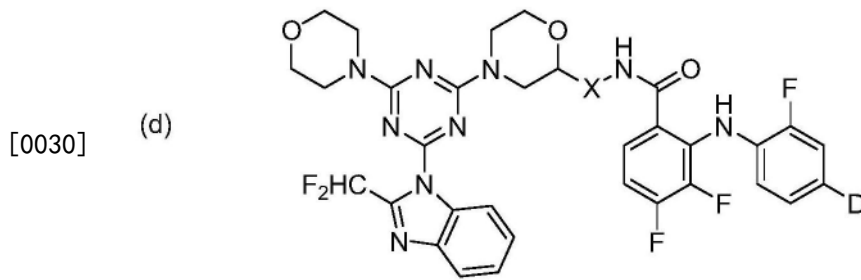


n为1、2、3、4或5

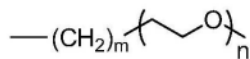


R₁ 独立地为H、烷基或芳基

m、n和o独立地为1、2、3、4或5;



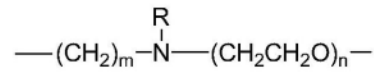
[0031] D为I、-C≡CH或-C≡C-R,R为烷基或芳基,并且X选自由下列组成的组中



其中 m为0、1、2、3、4或5

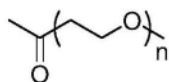
且n为1、2、3、4或5

或m和n的任意组合

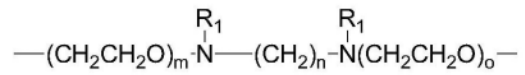


R = H、烷基或芳基

m、n独立地为1、2、3、4或5

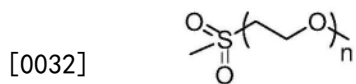


n为1、2、3、4或5

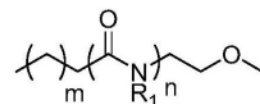


R₁ 独立地为H、烷基或芳基

m、n、o独立地为1、2、3、4或5



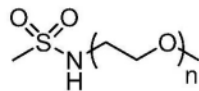
n为1、2、3、4或5



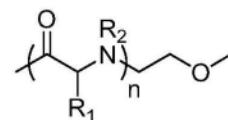
R₁ 为H、烷基或芳基

其中, m为0、1、2、3、4或5

且n为1、2、3、4或5



n为1、2、3、4或5

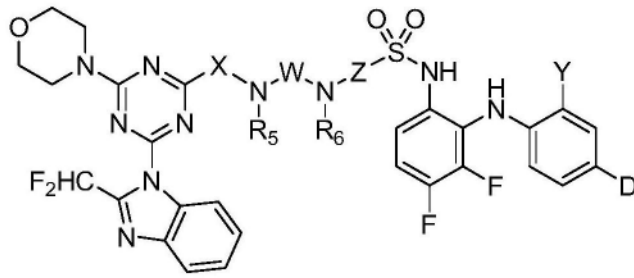


R₁、R₂ 独立地为H、烷基或芳基

n为1、2、3、4或5;

(e)

[0033]

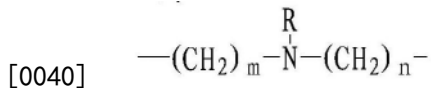


[0034] Y为F、Cl

[0035] D为I或-C≡CR,其中R=H、烷基或芳基

[0036] R₅、R₆独立地为H、烷基或芳基,或者一起形成五元环或六元环;[0037] X、W和Z独立地为羰基或(CR₁R₂)_n[0038] 其中R₅、R₆独立地为H、烷基或芳基,且n为0、1、2、3、4或5;

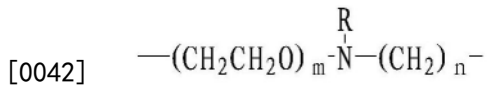
[0039] x为



[0040]

R= H、烷基、芳基

[0041] 其中m、n独立地为1、2、3、4或5



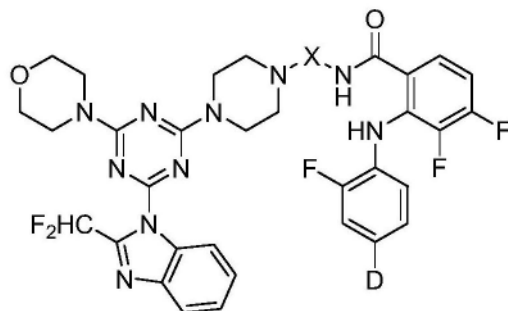
[0042]

R= H、烷基、芳基

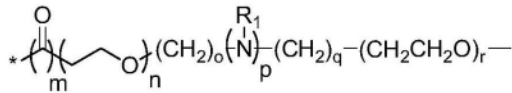
[0043] 其中m、n独立地为1、2、3、4或5;和

(f)

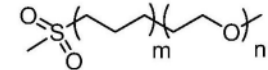
[0044]



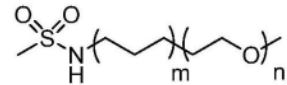
[0045] 其中D为I、-C≡CH或-C≡C-R,R为烷基或芳基,并且X选自由下列组成的组中:



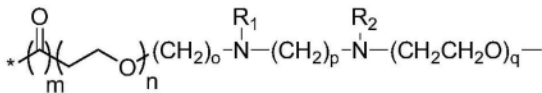
R₁独立地为H、烷基或芳基，其中，独立地，
m = 0, 1; n = 0 - 6; o = 0 - 6;
p = 0, 1; q = 0 - 6; r = 2 - 6,



其中，独立地，
m = 0 - 6; n = 2 - 6,

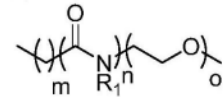


其中，独立地，m = 0 - 6;
n = 2 - 6,

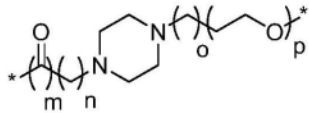


[0046]

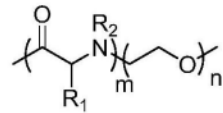
其中，独立地，m = 0, 1; n = 0 - 6;
o = 0 - 6; p = 1 - 6; q = 2 - 6,
且R₁、R₂独立地为H、烷基或芳基，



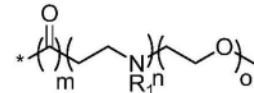
R₁独立地为H、烷基或芳基，
其中，独立地，m = 0 - 6;
n = 1 - 6; o = 2 - 6,



其中，独立地，m = 0, 1; n = 0 - 6;
o = 0 - 6; p = 2 - 6,



R₁、R₂独立地为H、烷基或芳基，
其中，独立地，m = 1 - 6;
n = 2 - 6, 和



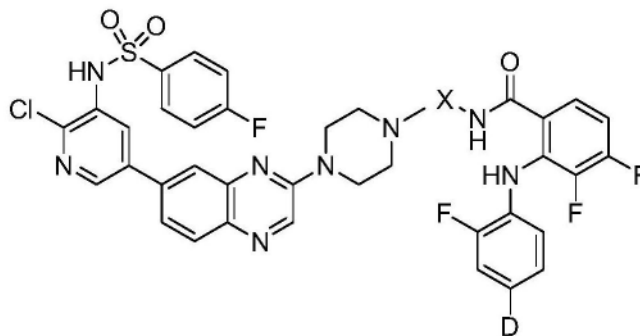
其中，独立地，m = 0, 1;
n = 1 - 6; o = 2 - 6,

[0047] 或其药学上可接受的盐。

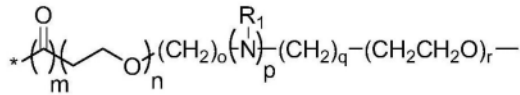
[0048] 在另一个实施方式中，本发明涉及能够抑制mTOR、MEK和PI3K活性的三功能化合物，其具有下述结构式：

(a)

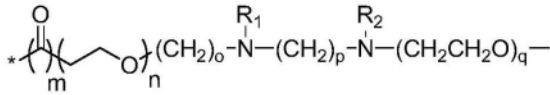
[0049]



[0050] 其中D为I、-C≡CH或-C≡C-R, R=烷基或芳基，并且X选自由下列组成的组中：

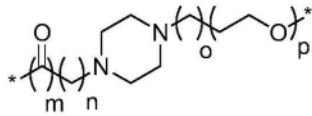


R₁独立地为H、烷基或芳基，其中，独立地，
m = 0、1； n = 0 - 6； o = 0 - 6；
p = 0、1； q = 0 - 6； r = 2 - 6，



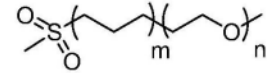
其中，独立地， m = 0、1； n = 0 - 6；
o = 0 - 6； p = 1 - 6； q = 2 - 6
且 R₁、R₂独立地为H、烷基或芳基，

[0051]

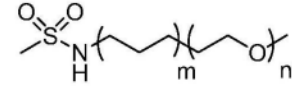


其中，独立地， m = 0、1； n = 0 - 6；
o = 0 - 6； p = 2 - 6，

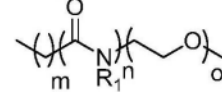
和



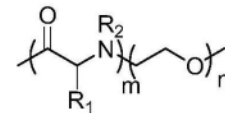
其中，独立地， m = 0 - 6；
n = 2 - 6，



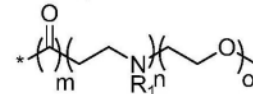
其中，独立地， m = 0 - 6；
n = 2 - 6，



R₁独立地为H、烷基或芳基，
其中，独立地， m = 0 - 6；
n = 1 - 6； o = 2 - 6，



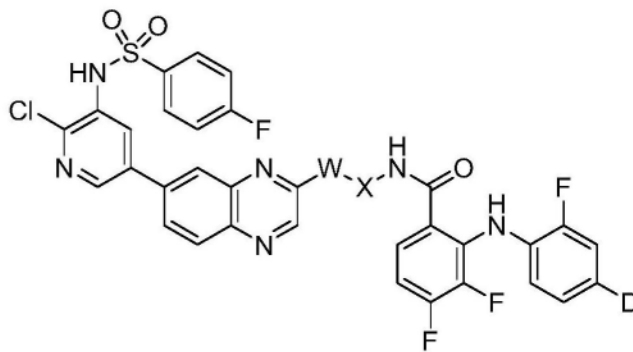
R₁、R₂独立地为H、烷基或芳基，
其中，独立地， m = 1 - 6；
n = 2 - 6，



R₁，独立地为H、烷基或芳基，
其中，独立地， m = 0、1；
n = 1 - 6； o = 2 - 6；

(b)

[0052]



[0053]

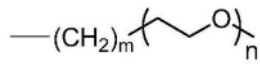
其中W为 $\left(-\text{N} \left(\text{C}_m \right) \right)$ 或 $\text{N}(\text{R})_m$

[0054]

并且R为H、烷基或芳基，且m=0、1-6；

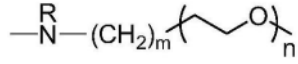
[0055]

D=I、-C≡CH、-C≡C-R其中R=烷基或芳基，其中X选自由下列组成的组中：

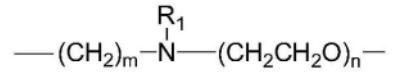


其中 $m = 0, 1 - 6$; $n = 1 - 6$; 或 m 和 n 的任意组合

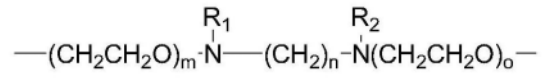
[0056]



其中 R 为 H 、烷基或芳基，
且 $m = 0, 1 - 6$; $n = 1 - 6$;
或 m 和 n 的任意组合



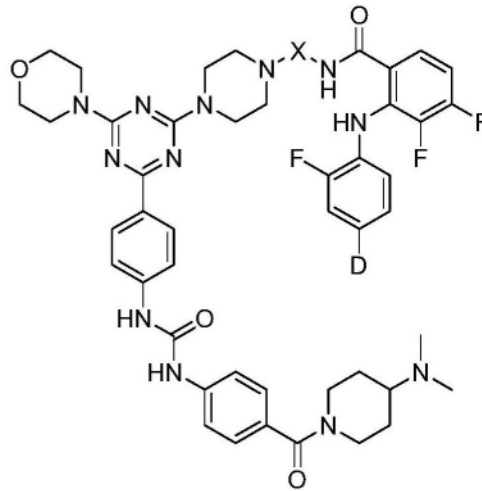
$\text{R}_1 = \text{H}$ 、烷基或芳基，其中
 m, n 独立地为 $1 - 6$



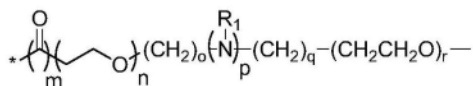
R_1, R_2 独立地为 H 、烷基或芳基
且 m, n, o 独立地为 $1 - 6$

(c)

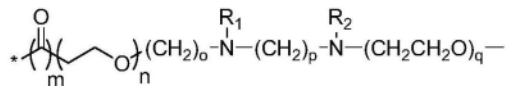
[0057]



[0058] 其中 D 为 I 、 $-\text{C}\equiv\text{CH}$ 或 $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{R}$, R = 烷基或芳基, 并且 X 选自由下列组成的组中:

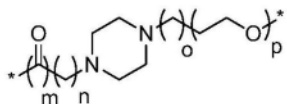


R₁独立地为H、烷基或芳基，其中，独立地，
m = 0, 1; n = 0 - 6; o = 1 - 6;
p = 0, 1; q = 0 - 6; r = 2 - 6,

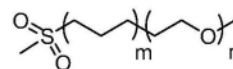


其中，独立地，m = 0, 1; n = 0 - 6;
o = 1 - 6; p = 1 - 6; q = 2 - 6,
且R₁、R₂独立地为H、烷基或芳基，

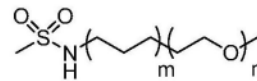
[0059]



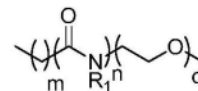
其中，独立地，m = 0, 1; n = 0 - 6;
o = 0 - 6; p = 2 - 6;



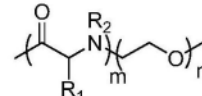
其中，独立地，m = 0 - 6; n = 2 - 6,



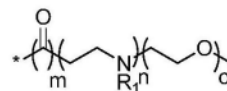
其中，独立地，m = 0 - 6; n = 2 - 6,



R₁独立地为H、烷基或芳基，其中，
独立地，m = 0 - 6; n = 1 - 6;
o = 2 - 6



R₁、R₂独立地为H、烷基或芳基，
其中，独立地，m = 1 - 6; n = 2 - 6,

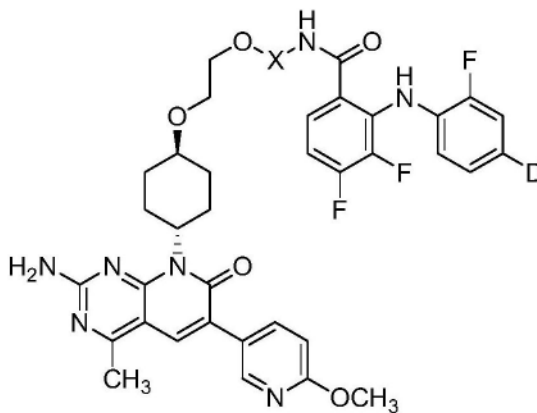


其中，独立地，m = 0, 1;
n = 1 - 6; o = 2 - 6;

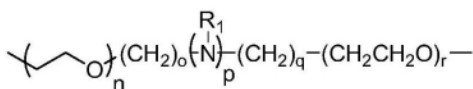
和

(d)

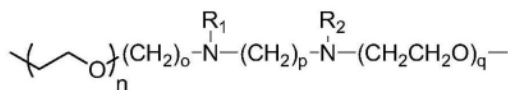
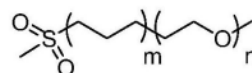
[0060]



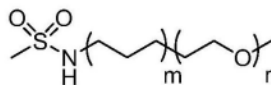
[0061] 其中D为I、-C≡CH或-C≡C-R,R=烷基或芳基，并且X选自由下列组成的组中：



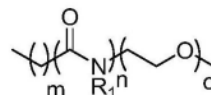
R_1 独立地为H、烷基或芳基，其中，独立地，其中，独立地，其中，独立地， $m = 0 - 6$ ； $n = 2 - 6$ ， $n = 0 - 6$ ； $o = 1 - 6$ ； $p = 0, 1$ ； $q = 0 - 6$ ； $r = 2 - 6$ ，



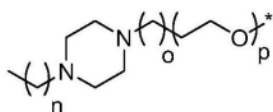
其中，独立地， $m = 0 - 6$ ； $n = 2 - 6$ ，



[0062] 其中，独立地， $n = 0 - 6$ ； $o = 1 - 6$ ； $p = 1 - 6$ ； $q = 2 - 6$ ；且 R_1, R_2 ，独立地为H、烷基或芳基

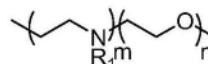


R_1 独立地为H、烷基或芳基，其中，独立地， $m = 1 - 6$ ； $n = 1 - 6$ ； $o = 2 - 6$



其中，独立地， $n = 1 - 6$ ； $o = 0 - 6$ ； $p = 2 - 6$ ；

和



R_1 独立地为H、烷基或芳基，其中，独立地， $m = 1 - 6$ ； $n = 2 - 6$ ；

[0063] 或其药学上可接受的盐。

[0064] 在一个实施方式中，本发明提供了通过向有需要的个体施用治疗有效量的本发明的多功能化合物来治疗病症或疾病的方法。感兴趣的疾病或病症可通过抑制mTOR和/或MEK和/或PI3K来治疗，例如癌症。

[0065] 本发明的另一个实施方式提供了一种用于治疗其中抑制mTOR、MEK和PI3K中的一种或多种提供益处的疾病或病症的组合物，所述组合物包含 (a) 本发明的多功能抑制剂和 (b) 赋形剂和/或药学上可接受的载体。

[0066] 本发明的另一个实施方式在治疗个体的其中抑制mTOR、MEK和PI3K中的至少一种提供益处的疾病或病症的方法中使用包含本发明的多功能化合物和第二治疗活性剂的组合物。

[0067] 在另一个实施方式中，本发明提供了包含本发明的多功能抑制剂和任选的第二治疗剂的组合物在制备用于治疗感兴趣的疾病或病症，例如癌症的药物中的用途。

[0068] 本发明的又一个实施方式提供了用于人类药物用途的试剂盒，所述试剂盒包括 (a) 容器；(b1) 包含本发明的多功能抑制剂的包装组合物；和任选地，(b2) 包含用于治疗感兴趣的疾病或病症的第二治疗剂的包装组合物；和 (c) 包含同时或相继施用，用于治疗疾病或病症的所述一种或多种组合物的使用说明书的包装插页说明书。

[0069] 从下述优选实施方式的详细描述中，本发明的这些和其他实施方式和特征将变得显而易见。

附图说明

[0070] 图1显示了化合物14在MEK1变构袋(A)和PI3K α (B)处的对接结构；

[0071] 图2显示了化合物7、9、11和14靶向来自培养的A-549肺肿瘤(图2A)和D54胶质瘤细胞(图2B)的MAPK/ERK和PI3K/AKT途径的体外活性；

- [0072] 图3A 和 3B 显示了化合物7、9、11和14的体外活性的定量；
- [0073] 图4A 和 4 B 显示了化合物14对荷瘤小鼠的体外MEK1和PI3K抑制活性；
- [0074] 图5显示了MV4-162 (化合物14) 或MB4-168在携带脑内D54神经胶质瘤小鼠中的体内MEK1和PI3K抑制活性；
- [0075] 图6显示了小鼠皮下生长的黑素瘤肿瘤系A357和A2058中的体内MEK1和PI3K 抑制活性；
- [0076] 图7显示了小鼠皮下生长的结肠癌肿瘤系CT26中的体内MEK1和PI3K抑制活性；
- [0077] 图8为显示用MV4-162 (化合物14) 处理的动物的存活率对经过的天数的图；
- [0078] 图9包含了显示MV-162 (化合物14) 和载剂(vehicle) 对照处理的动物的黑素瘤肿瘤 A2058和A357的肿瘤体积的图；
- [0079] 图10包含了显示用载剂对照和MV4-162 (化合物14) 处理的动物的肿瘤体积百分比变化对天数的图；
- [0080] 图11说明和图示了用化合物14 (MV4-162) 和载剂对照处理的小鼠的肿瘤质量。

具体实施方式

[0081] 结合优选实施方式描述了本发明。然而,应该理解,本发明不限于所公开的实施方式。应理解,鉴于本文中对本发明实施方式的描述,本领域技术人员可以进行各种修改。这些修改包含在下面的权利要求中。

[0082] 如本文所用的术语“PI3K”意指I类(包括1a类和1b类)、II类或III类磷酸肌醇-3-激酶,如美国专利公开号2011/0009405中所定义,其通过引用整体并入本文。

[0083] 如本文所用的术语“MEK”意指丝裂原活化的蛋白激酶。

[0084] 本文所用的术语“mTOR”意指雷帕霉素的机制靶标。

[0085] 术语“其中抑制mTOR和/或PI3K和/或MEK提供益处的疾病或病症”指mTOR、PI3K和MEK中的至少一种和/或mTOR、PI3K和MEK中的至少一种的作用,例如,对于该疾病或病症的发作、进展、表达是重要的或必需的病症,或已知由mTOR、PI3K或MEK抑制剂治疗的疾病或病症。这种病症的例子包括但不限于癌症。本领域普通技术人员能够容易地确定化合物是否治疗由mTOR、PI3K和MEK中的一种或多种介导的疾病或病症用于任何特定细胞类型,例如,通过可方便地用于评估特定化合物的活性的试验。

[0086] 术语“第二治疗剂”是指与本发明的多功能抑制剂不同并且已知治疗感兴趣的疾病或病症的治疗剂。例如,当癌症是感兴趣的疾病或病症时,第二治疗剂可以是已知的化学治疗药物,例如紫杉醇,或放射。

[0087] 术语“疾病”或“病症”表示通常被认为是病理状况或功能的干扰和/或异常,并且可以以特定体征、症状和/或功能障碍的形式表现出来。如下所示,本发明的化合物是MEK和PI3K或mTOR、MEK和PI3K的有效抑制剂,并且可用于治疗其中抑制mTOR和/或MEK和/或PI3K提供益处的疾病和病症。

[0088] 如本文所用,术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”、“治疗(treatment)”等是指消除、减少或减轻疾病或病症,和/或与其相关的症状。尽管不排除,但治疗疾病或病症不需要完全消除与其相关的疾病、病症或症状。如本文所用,术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”、“治疗(treatment)”等可包括降低在没有罹患、但有风险或易于重新发展疾

病或病症或疾病或病症的复发的受试者中,重新发展疾病或病症或先前控制的疾病或病症的复发的可能性。术语“治疗”和同义词考虑向需要这种治疗的个体施用治疗有效量的本发明的化合物。

[0089] 在本发明的含义内,“治疗”还包括复发预防或阶段预防,以及急性或慢性体征、症状和/或功能障碍的治疗。可以对症治疗,例如,以抑制症状。它可以在短时间内实现,可以在中期内定向,或者可以是长期治疗,例如在维持治疗的背景下。

[0090] 如本文所用的术语“治疗有效量”或“有效剂量”是指当通过本发明的方法施用时,足以向有此需要的个体有效递送活性成分用于治疗感兴趣的病症或疾病的活性成分的量。在癌症或其他增殖病症的情况下,治疗有效量的药剂可以减少(即,在某种程度上延迟并且优选地阻止)有害的细胞增殖;减少癌细胞数量;减小肿瘤大小;抑制(即,在某种程度上延迟并优选地阻止)癌细胞浸润到外周器官中;抑制(即,在某种程度上延迟并优选地阻止)肿瘤转移;在一定程度上抑制肿瘤生长;减少靶细胞中的mTOR、MEK和PI3K信号转导;和/或在一定程度上缓解与癌症相关的一种或多种症状。在施用的化合物或组合物阻止生长和/或杀死现有癌细胞的程度上,其可为细胞抑制性的和/或细胞毒性的。

[0091] 术语“容器(container)”意指适用于储存、运输、分配和/或处理药品的任何容器(receptacle)和封盖(closure)。

[0092] 术语“插页说明书”是指伴随药物产品的信息,其提供如何施用产品的描述,以及允许医师、药剂师和患者就产品的使用做出明智决定所需的安全性和有效性数据。包装插页说明书通常被认为是药品的“标签”。

[0093] “并行施用”、“组合施用”、“同时施用”和类似短语意指两种或更多种药剂并行地施用于所治疗的受试者。“并行地”是指每种药剂在不同时间点以任何顺序同时或依次施用。然而,如果不同时施用,则意味着它们按顺序给个人施用并且时间足够接近,以便提供所期望的治疗效果,并能协调一致地发挥作用。例如,本发明的多功能抑制剂可以作为第二治疗剂同时或在不同时间点以任何顺序依次施用。本发明的多功能抑制剂和第二治疗剂可以以任何适当的形式和通过任何合适的途径分别施用。当本发明的多功能抑制剂和第二治疗剂不同时施用时,应理解它们可以以任何顺序施用于需要其的受试者。例如,可以在施用第二治疗剂治疗方式(例如,放射疗法)之前(例如,5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周或12周前)、同时或之后(例如,5分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、4小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周或12周后)向有需要的个体施用本发明的多功能抑制剂。在各种实施方式中,本发明的多功能抑制剂和第二治疗剂间隔1分钟、间隔10分钟、间隔30分钟、间隔小于1小时、间隔1小时、间隔1小时至2小时、间隔2小时至3小时、间隔3小时至4小时、间隔4小时至5小时、间隔5小时至6小时、间隔6小时至7小时、间隔7小时至8小时、间隔8小时至9小时、间隔9小时至10小时、间隔10小时至11小时、间隔11小时至12小时、间隔不超过24小时或间隔不超过48小时施用。在一个实施方式中,组合疗法的组分间隔1分钟至24小时施用。

[0094] 除非另有说明,否则在描述本发明的上下文中(特别是在权利要求的上下文中)使用术语“一个(a)”、“一个(an)”、“所述(the)”和类似的指代语应被解释为涵盖单数和复数。除非本文另有说明,否则本文中对数值范围的叙述仅旨在用作单独提及落入该范围内

的每个单独值的简写法,并且每个单独的值并入本说明书中,如同其在本文中单独叙述一样。除非另外声明,否则本文提供的任何和所有实例或示例性语言(例如,“比如”)的使用旨在更好地说明本发明,而不是对本发明范围的限制。说明书中的任何语言都不应被解释为表明任何未要求保护的要素对于本发明的实践是必不可少的。

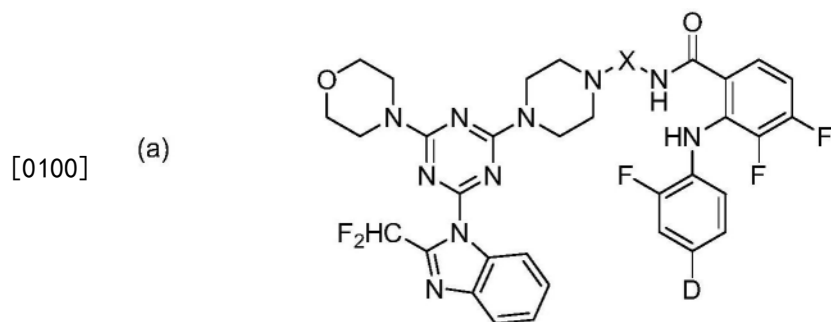
[0095] 研究表明,使用小分子抑制剂靶向mTOR、MEK和PI3K是一种可行的癌症治疗策略。然而,已知具有KRAS突变的癌症是组成性激活的,对标准治疗无效,并且是差的预后的标志物。两种KRAS效应途径MAPK和PI3K分别是增殖和存活的重要先兆,并且是彼此抗性的机制。癌症的临床前研究已经表明效应途径的多重抑制具有协同效应,这为临床环境中的联合治疗提供了理论基础。

[0096] 目前正在施用PI3K或AKT抑制剂与MEK抑制剂的联合试验中研究这些发现的临床相关性(19)。然而,与合理设计的鸡尾酒方法相比,非混杂的“单一药剂组合”药物提供了许多预想的优点。首先,当组合两个单独的药剂时,无论各个组分的选择性如何,脱靶效应都是复杂的。一些脱靶活动已被证明有利于治疗非预期的患者群体。例如,“选择性”abl激酶抑制剂伊马替尼已证明对治疗c-kit驱动的古IST以及某些PDGFR驱动的恶性肿瘤有效(20)。然而,在更多的情况下,当非预期的激酶靶标被抑制时,发生以非机械为基础的毒性形式的附带损害。其次,当在临床中将它们组合时,各个药剂之间的不同药代动力学特征可能是有问题的,这可能通过不同的药物-药物相互作用负担而进一步复杂化。患者依从性和药物成本的问题进一步支持单个化学实体的设计以损害通过多个节点的信号传导。当与两个未经批准的药剂进行组合试验时,也会遇到后勤障碍。虽然使用MEK抑制剂曲美替尼的临床数据看起来令人鼓舞(21,22),但在可预见的未来,PI3K或AKT抑制剂被批准的可能性较小。当用PI3K抑制剂攻击时,肿瘤细胞显示出通过PI3K/AKT/mTOR途径恢复通量的一系列机制,从而限制了它们的单一药剂有效性并阻碍了它们的监管批准途径(23)。与单步靶向相比,PI3K/AKT和MEK/ERK信号传导的水平(即平行)抑制剂产生的有利功效已在早期临床数据中得到证实(19)。

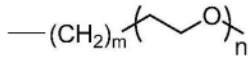
[0097] 本发明的化合物是化学连接的多功能抑制剂,以特异性靶向MAPK和PI3K途径。具有这种组合途径抑制能力的单一分子相对于单个单个靶向抑制剂增加了功效和安全性。与两种药物相反,施用单一药物也增加了患者对规定治疗方案的依从性。

[0098] 本发明涉及MEK和PI3K或mTOR、MEK和PI3K的新型多功能抑制剂。因此,本发明的多功能MEK/PI3K抑制剂可用于治疗需要这种治疗的受试者的癌症和癌前病变。还提供了治疗受试者的方法,包括向需要这种治疗的受试者施用治疗有效量的本发明的化合物。

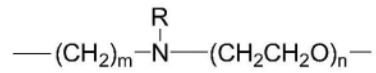
[0099] 在一个实施方式中,本发明涉及针对MEK和PI3K具有下述双功能抑制活性的化合物:



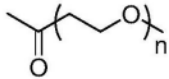
[0101] D为I、-C≡CH或-C≡C-R,R为烷基或芳基,并且X选自由下列组成的组中:



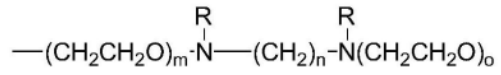
其中, m为0、1、2、3、4或5,
且n为1、2、3、4或5,
或m和n的任意组合



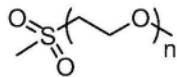
R = H、烷基或芳基
m、n独立地为1、2、3、4或5



n为1、2、3、4或5

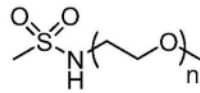


R 独立地为H、烷基或芳基
m、n、o独立地为1、2、3、4或5

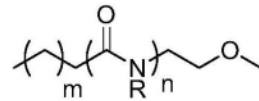


n为1、2、3、4或5

[0102]

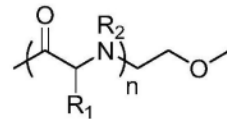


n为1、2、3、4或5



R为H、烷基或芳基

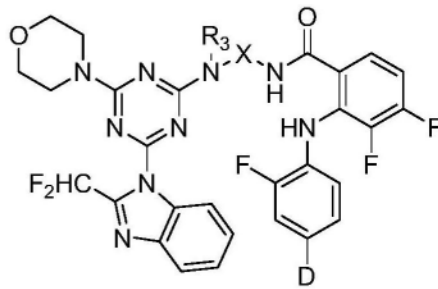
其中, m为0、1、2、3、4或5,
且n为1、2、3、4或5,
或m和n的任意组合



R₁、R₂ 独立地为H、烷基或芳基
n为1、2、3、4或5;

(b)

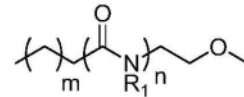
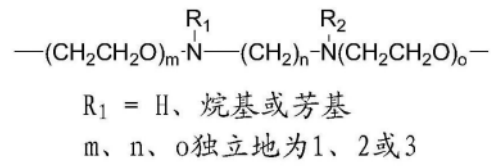
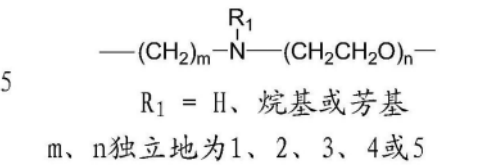
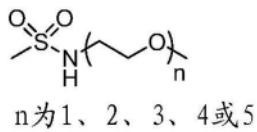
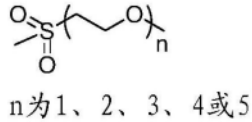
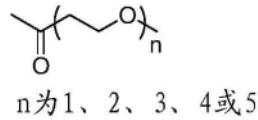
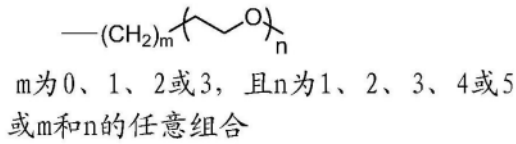
[0103]



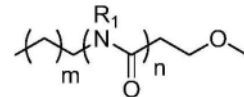
[0104] D=I、-C≡CH、-C≡C-R,其中R=烷基或芳基

[0105] R₃为H、烷基、芳基、-(CH₂)_p-OH或-(CH₂)_p-NR₄,其中p=1-6,且R₄=H、烷基、芳基,并且X选自由下列组成的组中

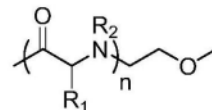
[0106]



m为0、1、2、3、4或5, 且n为1、2、3、4或5
或m和n的任意组合

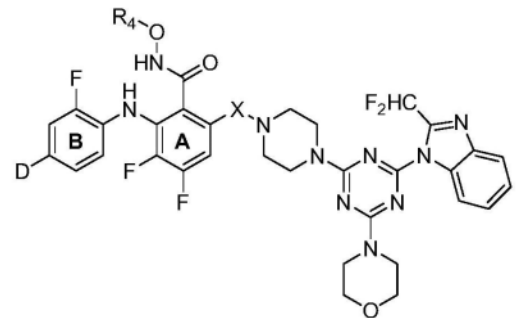
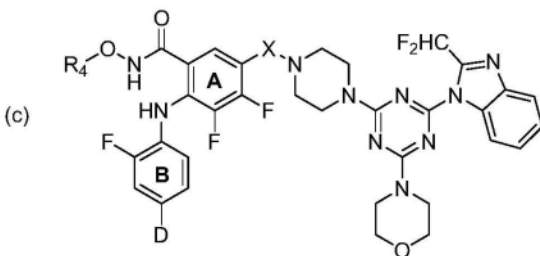


m为0、1、2、3、4或5, 且n为1、2、3、4或5
或m和n的任意组合



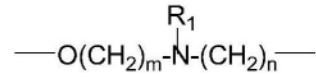
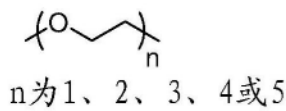
R₁、R₂ 独立地为H、烷基或芳基
n为1、2、3、4或5

[0107]



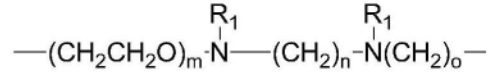
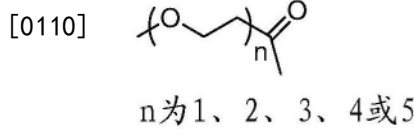
[0108] 其中R₄ = R- (-) -CH₂CHOH (CH₂OH) ; -CH₂CH₂OH; 或 -CH₂CH₂-NH₂;

[0109] D为I、-C≡CH或-C≡C-R, R为烷基或芳基, 并且X选自由下列组成的组中



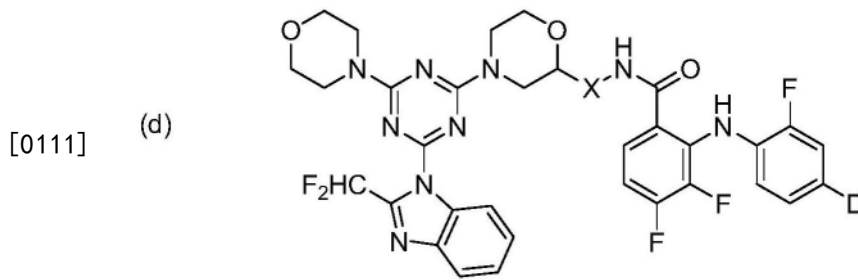
R₁ 为H、烷基或芳基

m和n独立地为1、2、3、4或5

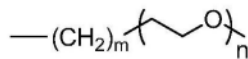


R₁ 独立地为H、烷基或芳基

m、n和o独立地为1、2、3、4或5;



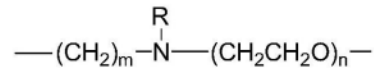
[0112] D为I、-C≡CH或-C≡C-R,R为烷基或芳基,并且X选自由下列组成的组中



其中 m为0、1、2、3、4或5

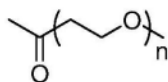
且n为1、2、3、4或5

或m和n的任意组合

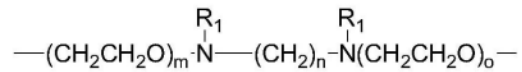


R = H、烷基或芳基

m、n独立地为1、2、3、4或5

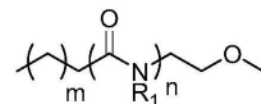
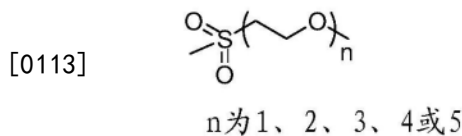


n为1、2、3、4或5



R₁ 独立地为H、烷基或芳基

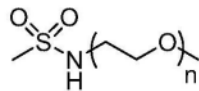
m、n、o独立地为1、2、3、4或5



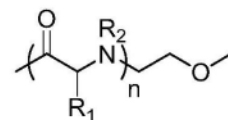
R₁ 为H、烷基或芳基

其中, m为0、1、2、3、4或5

且n为1、2、3、4或5



n为1、2、3、4或5

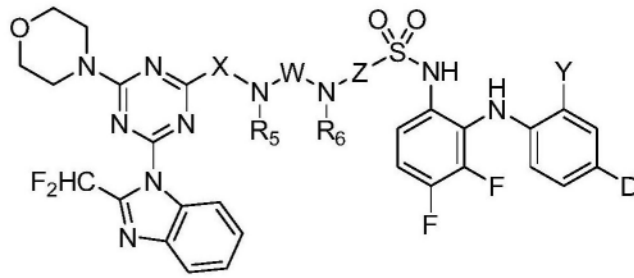


R₁、R₂ 独立地为H、烷基或芳基

n为1、2、3、4或5;

(e)

[0114]

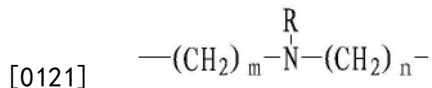


[0115] Y为F、Cl

[0116] D为I或-C≡CR,其中R=H、烷基或芳基

[0117] R₅、R₆独立地为H、烷基或芳基,或者一起形成五元环或六元环;[0118] X、W和Z独立地为羰基或(CR₁R₂)_n[0119] 其中R₅、R₆,独立地为H、烷基或芳基,且n为1、2、3、4或5;

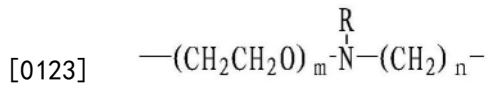
[0120] x为



[0121]

R= H、烷基、芳基

[0122] 其中m、n独立地为1、2、3、4或5



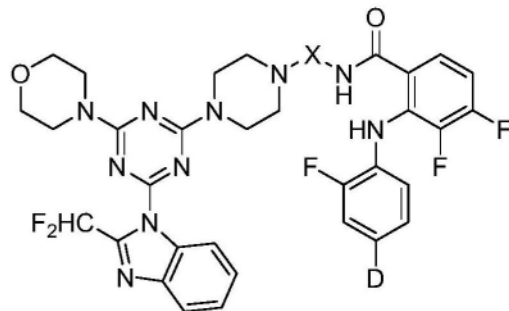
[0123]

R= H、烷基、芳基

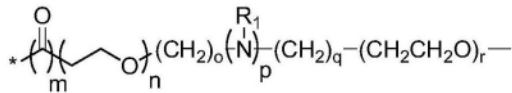
[0124] 其中m、n独立地为1、2、3、4或5;和

(f)

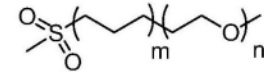
[0125]



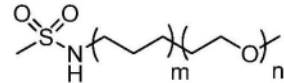
[0126] 其中D为H、-C≡CH或-C≡C-R,R为烷基或芳基,并且X选自由下列组成的组中:



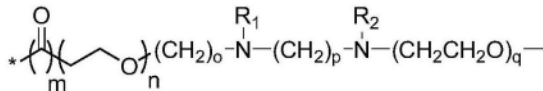
R_1 独立地为H、烷基或芳基,其中,独立地,
 $m = 0, 1$; $n = 0 - 6$; $o = 0 - 6$; $p = 0, 1$;
 $q = 0 - 6$; $r = 2 - 6$,



其中,独立地,
 $m = 0 - 6$; $n = 2 - 6$,

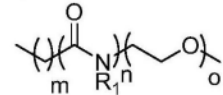


其中,独立地, $m = 0 - 6$;
 $n = 2 - 6$,

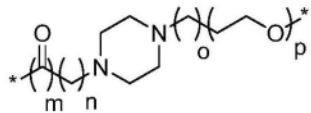


[0127]

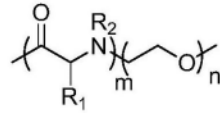
其中,独立地, $m = 0, 1$; $n = 0 - 6$;
 $o = 0 - 6$; $p = 1 - 6$; $q = 2 - 6$,
 且 R_1 、 R_2 独立地为H、烷基或芳基,



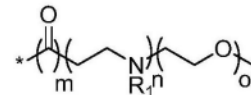
R_1 独立地为H、烷基或芳基,
 其中,独立地, $m = 0 - 6$;
 $n = 1 - 6$; $o = 2 - 6$,



其中,独立地, $m = 0, 1$; $n = 0 - 6$;
 $o = 0 - 6$; $p = 2 - 6$,



R_1 、 R_2 独立地为H、烷基或芳基,
 其中,独立地, $m = 1 - 6$;
 $n = 2 - 6$, 和



其中,独立地, $m = 0, 1$;
 $n = 1 - 6$; $o = 2 - 6$,

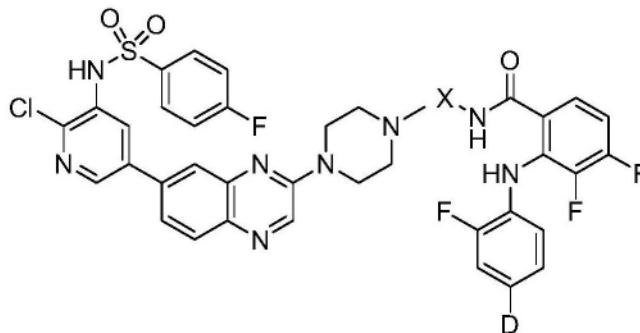
[0128] 或其药学上可接受的盐。

[0129] 在上述结构中,公开了变量 m 、 n 、 o 、 p 、 q 和 r 的最优选范围。在另外的实施方式中, m 为0-20,优选为1-10; n 为0-20,优选1-10; o 为0-20,优选1-15或2-10; p 为1-20,优选为2-15或1-10;且 q 为0-20,优选1-15或2-10。上述范围包括所述范围内的每个单独值和所公开范围内的所有子范围。

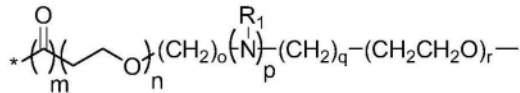
[0130] 在另一个实施方式中,本发明涉及能够抑制mTOR、MEK和PI3K活性的三功能化合物,其具有下述结构式:

(a)

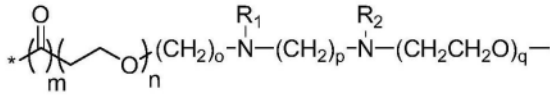
[0131]



[0132] 其中D为I、 $-\text{C}\equiv\text{CH}$ 或 $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{R}$, R =烷基或芳基,并且X选自由下列组成的组中:

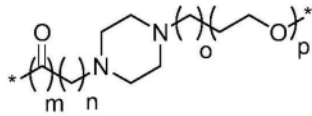


R₁独立地为H、烷基或芳基，其中，独立地，
m = 0、1； n = 0 - 6； o = 0 - 6；
p = 0、1； q = 0 - 6； r = 2 - 6，



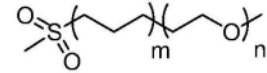
其中，独立地， m = 0、1； n = 0 - 6；
o = 0 - 6； p = 1 - 6； q = 2 - 6
且 R₁、R₂独立地为H、烷基或芳基，

[0133]

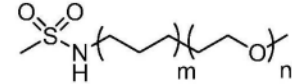


其中，独立地， m = 0、1； n = 0 - 6；
o = 0 - 6； p = 2 - 6，

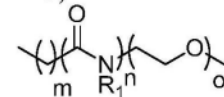
和



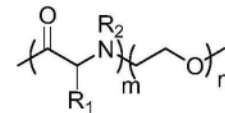
其中，独立地， m = 0 - 6；
n = 2 - 6，



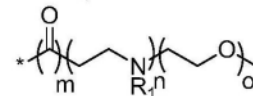
其中，独立地， m = 0 - 6；
n = 2 - 6，



R₁独立地为H、烷基或芳基，
其中，独立地， m = 0 - 6；
n = 1 - 6； o = 2 - 6，



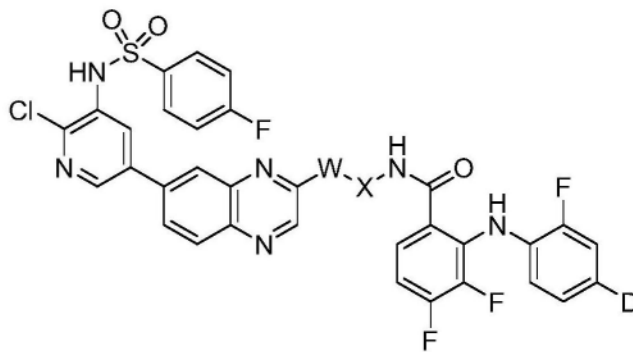
R₁、R₂独立地为H、烷基或芳基，
其中，独立地， m = 1 - 6；
n = 2 - 6，



R₁，独立地为H、烷基或芳基，
其中，独立地， m = 0、1；
n = 1 - 6； o = 2 - 6；

(b)

[0134]



[0135]

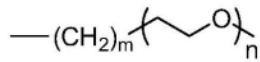
其中W为 $\left(-\text{N} \left(\text{C}_6\text{H}_{10} \right) - \right)$ 或 $\left(-\text{N}(\text{R})_m - \right)$

[0136]

并且R为H、烷基或芳基，且m=0、1-6；

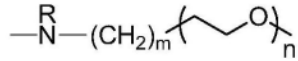
[0137]

D=I、-C≡CH、-C≡C-R其中R=烷基或芳基，其中X选自由下列组成的组成：

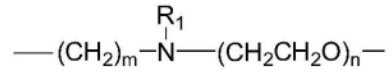


其中 $m = 0, 1 - 6$; $n = 1 - 6$; 或 m 和 n 的任意组合

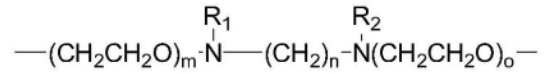
[0138]



其中 R 为 H 、烷基或芳基，
且 $m = 0, 1 - 6$; $n = 1 - 6$;
或 m 和 n 的任意组合



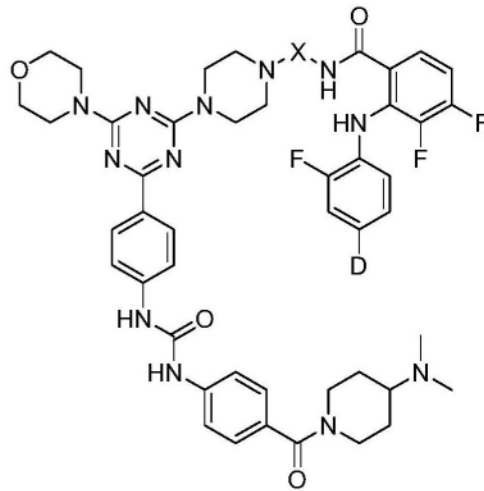
$\text{R}_1 = \text{H}$ 、烷基或芳基，其中
 m, n 独立地为 $1 - 6$



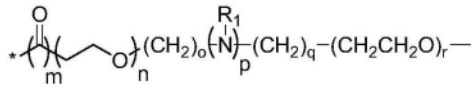
R_1, R_2 独立地为 H 、烷基或芳基
且 m, n, o 独立地为 $1 - 6$

(c)

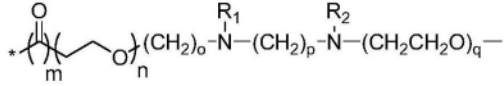
[0139]



[0140] 其中 D 为 I 、 $-\text{C}\equiv\text{CH}$ 或 $-\text{C}\equiv\text{C}-\text{R}$, R = 烷基或芳基, 并且 X 选自由下列组成的组中:

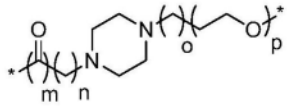


R₁独立地为H、烷基或芳基，其中，独立地，
m = 0、1；n = 0 - 6；o = 1 - 6；
p = 0、1；q = 0 - 6；r = 2 - 6，

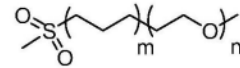


其中，独立地，m = 0、1；n = 0 - 6；
o = 1 - 6；p = 1 - 6；q = 2 - 6，
且R₁、R₂独立地为H、烷基或芳基，

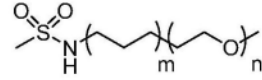
[0141]



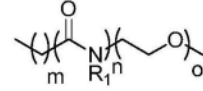
其中，独立地，m = 0、1；n = 0 - 6；
o = 0 - 6；p = 2 - 6；



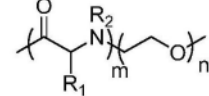
其中，独立地，m = 0 - 6；n = 2 - 6，



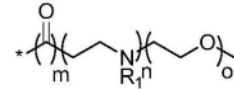
其中，独立地，m = 0 - 6；n = 2 - 6，



R₁独立地为H、烷基或芳基，其中，
独立地，m = 0 - 6；n = 1 - 6；
o = 2 - 6



R₁、R₂独立地为H、烷基或芳基，
其中，独立地，m = 1 - 6；n = 2 - 6，

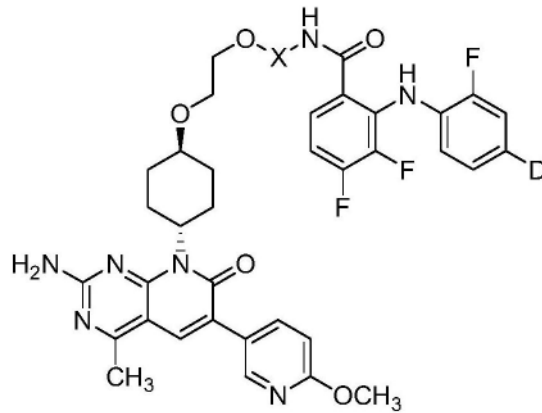


其中，独立地，m = 0、1；
n = 1 - 6；o = 2 - 6；

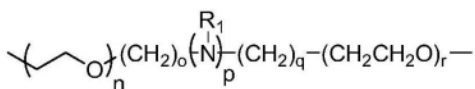
和

(d)

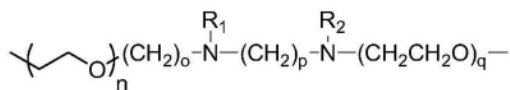
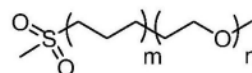
[0142]



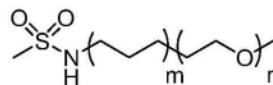
[0143] 其中D为I、-C≡CH或-C≡C-R，R=烷基或芳基，并且X选自由下列组成的组中：



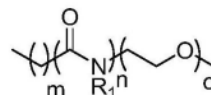
R_1 独立地为H、烷基或芳基，其中，独立地，其中，独立地，其中，独立地， $m = 0 - 6$; $n = 2 - 6$,
 $n = 0 - 6$; $o = 1 - 6$; $p = 0, 1$;
 $q = 0 - 6$; $r = 2 - 6$,



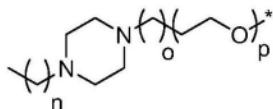
其中，独立地， $m = 0 - 6$; $n = 2 - 6$,



[0144] 其中，独立地， $n = 0 - 6$; $o = 1 - 6$;
 $p = 1 - 6$; $q = 2 - 6$;
 且 R_1, R_2 , 独立地为H、烷基或芳基

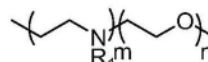


R_1 独立地为H、烷基或芳基，其中，
 独立地， $m = 1 - 6$; $n = 1 - 6$;
 $o = 2 - 6$



其中，独立地， $n = 1 - 6$;
 $o = 0 - 6$; $p = 2 - 6$;

和



R_1 独立地为H、烷基或芳基，
 其中，独立地， $m = 1 - 6$; $n = 2 - 6$;

[0145] 或其药学上可接受的盐。

[0146] 本发明包括双功能化合物、三功能化合物和四功能化合物，其抑制mTOR、MEK和PI3K中的至少两种，并且可用于治疗多种疾病和病症。具体地，本发明的多功能化合物用于治疗其中抑制mTOR和/或MEK和/或PI3K提供益处的疾病或病症(例如癌症)的方法。该方法包括向有需要的个体施用治疗有效量的本发明的多功能化合物。除了本发明的多功能化合物之外，本发明的方法还包括向个体施用第二治疗剂。第二治疗剂选自已知可用于治疗有需要的个体所患的疾病或病症的药物，例如化学治疗剂，和/或已知可用于治疗特定癌症的放射。

[0147] 如本文所用，术语“烷基”是指直链和支链饱和 C_{1-10} 烃基，包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、2,2-二甲基丙基、正己基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2,2-二甲基丁基、2,3-二甲基丁基、3,3-二甲基丁基和2-乙基丁基。术语 C_n 意指烷基具有“n”个碳原子。术语 C_{n-m} 意指烷基可具有“n”至“m”个碳原子。术语“亚烷基”是指具有取代基的烷基。例如，烷基(例如甲基)或亚烷基(例如 $-\text{CH}_2-$ 基)可被卤素、三氟甲基、三氟甲氧基、羟基、烷氧基、硝基、氰基、烷基氨基或氨基取代。

[0148] 如本文所用，术语“卤素”定义为氟、氯、溴和碘。

[0149] 术语“羟基”定义为 $-\text{OH}$ 。

[0150] 术语“烷氧基”定义为 $-\text{OR}$ ，其中R为烷基。

[0151] 术语“氨基”定义为 $-\text{NH}_2$ ，并且术语“烷基氨基”定义为 $-\text{R}_2$ ，其中至少一个R为烷基，并且第二个R为烷基或氢。

[0152] 术语“硝基”定义为 $-\text{NO}_2$ 。

[0153] 术语“氰基”定义为 $-\text{CN}$ 。

[0154] 术语“氨基甲酰基”定义为 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}_2$ 。

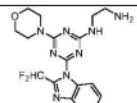
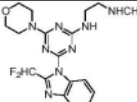
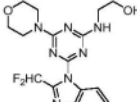
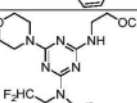
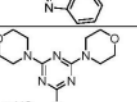
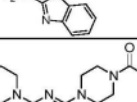
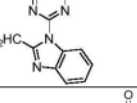
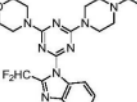
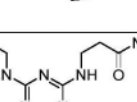
此外,存在于本发明的化合物中的可用氨基可用下述季铵化:甲基、乙基、丙基和丁基氯化物、溴化物和碘化物;二甲基、二乙基、二丁基和二甲基硫酸盐;癸基、月桂基、肉豆蔻基和甾醇氯化物、溴化物和碘化物;和苄基和苯乙基溴化物。鉴于前述内容,本文出现的对本发明化合物的任何提及旨在包括本发明的多功能化合物以及其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物。

[0163] 如本文所用,术语“前药”是指母体“药物”分子的药理学上无活性的衍生物,其需要在目标生理系统内生物转化(例如,或者自发或酶促)以释放,或将前药转化(例如,酶促、生理学、机械地、电磁地)成活性药物。前药旨在克服与稳定性、毒性、缺乏特异性或有限的生物利用度相关的问题。

[0164] 前药通常在哺乳动物生物体中提供溶解性、组织相容性或延迟释放的优点。(参见例如Bundgard,“Design of Prodrugs”,pp.7-9,21-24,Elsevier,Amsterdam(1985);和Silverman,“The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action”,pp.352-401,Academic Press,San Diego,Calif.(1992))。示例性前药包含活性药物分子本身和化学掩蔽基团(例如,可逆地抑制药物活性的基团)。一些优选的前药是具有在代谢条件下可裂解的基团的化合物的变体或衍生物。当示例性前药在生理条件下进行溶剂分解或经历酶促降解或其他生化转化(例如,磷酸化、氢化、脱氢、糖基化)时,其在体内或体外变得具有药学活性。常见的前药包括酸衍生物,比如通过母体酸与合适的醇(例如低级链烷醇)反应制备的酯,通过母体酸化合物与胺反应制备的酰胺,或反应形成酰化碱衍生物(例如,低级烷基酰胺)的碱性基团。

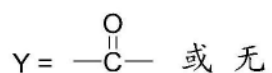
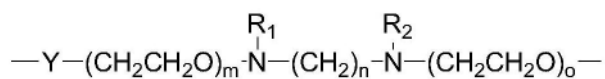
[0165] 可与MEK抑制剂和/或mTOR抑制剂相连的其他PI3K抑制剂包括

[0166] IC_{50} (nM)

化合物	结构	PI3K α	PI3K β	PI3K γ	PI3K δ
ST-177		292 ± 31	2117 ± 444	771 ± 63	291 ± 32
ST-5-02		248 ± 24	2900 ± 375	681 ± 90	135 ± 19
ST-187		9.9 ± 1.2	71 ± 8	54 ± 1	8.1 ± 1.7
ST-178		20 ± 3	208 ± 15	64 ± 5	17 ± 1
ZSTK474		5.0 ± 0.8	15.2 ± 1.4	20.8 ± 0.6	3.9 ± 0.6
ST-5-03		8.2 ± 0.7	14.3 ± 2.5	21 ± 1	2.9 ± 0.6
ST-167		11.5 ± 0.1	214 ± 49	140 ± 6.6	1.3 ± 0.2
ST-5-21		20 ± 0.4	431 ± 83	67 ± 2.8	26 ± 4.9
ST-5-25		12.4 ± 0.7	787 ± 106	22.3 ± 0.7	60 ± 3.4

[0167]

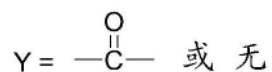
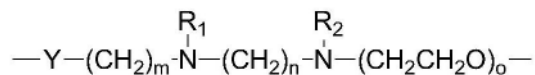
[0168] 用于衔接mTOR、MEK和PI3K抑制剂以制备盐的优选接头为：



R_1 、 R_2 独立地为H、烷基或芳基；

m 和 n 独立地为1、2、3、4或5

且 o 为1、2、3、4或5；

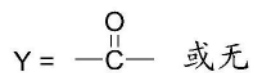
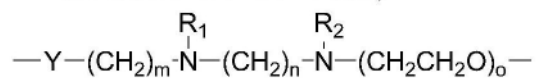


[0169]

R_1 、 R_2 独立地为H、烷基或芳基

m 和 n 独立地为1、2、3、4或5

且 o 为1、2、3、4或5；

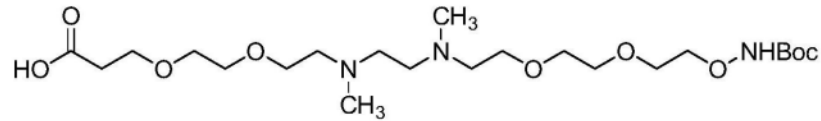


R_1 、 R_2 独立地为H、烷基或芳基

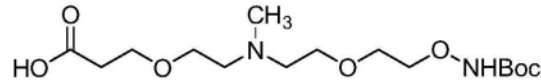
m 和 n 独立地为1、2、3、4或5；

且 o 为1、2、3、4或5。

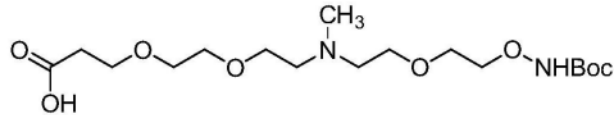
[0170] 在其他优选的实施方式中,适用于制备盐的接头为



t-Boc-氨基氧基-PEG2-N', N''-二甲基乙烷-1, 2-二胺-PEG2酸 (ST-179) (ST-179)

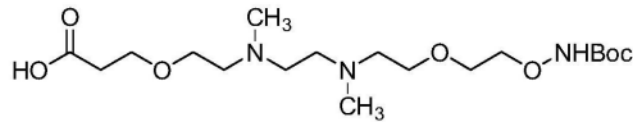


t-氨基氧基-PEG1-N-甲胺-PEG1酸 (ST-5-09)

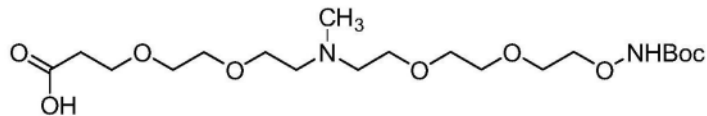


[0171]

t-Boc-氨基氧基-PEG1-N-甲胺-PEG2酸 (ST-5-10)

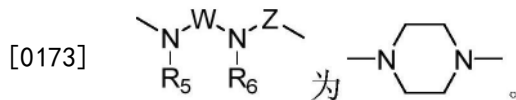


t-Boc-氨基氧基-PEG1-N', N''-二甲基乙烷-1, 2-二胺-PEG1酸 (ST-188)



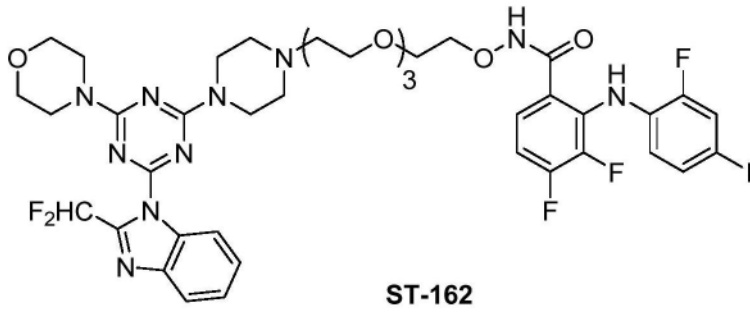
t-Boc-氨基氧基-PEG2-N-甲胺-PEG2酸 (ST-5-11)

[0172] 在化合物(e)的一个实施方式中,接头

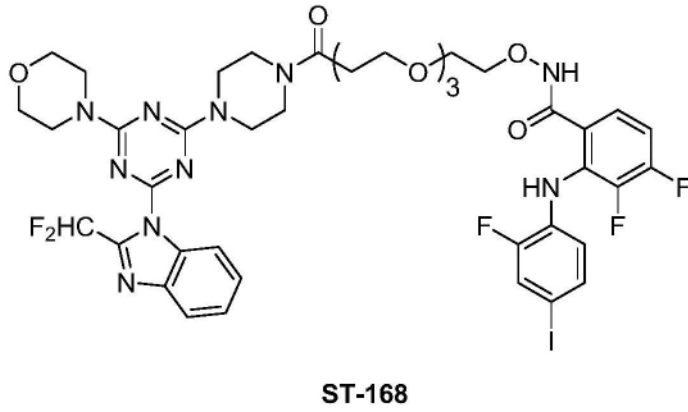


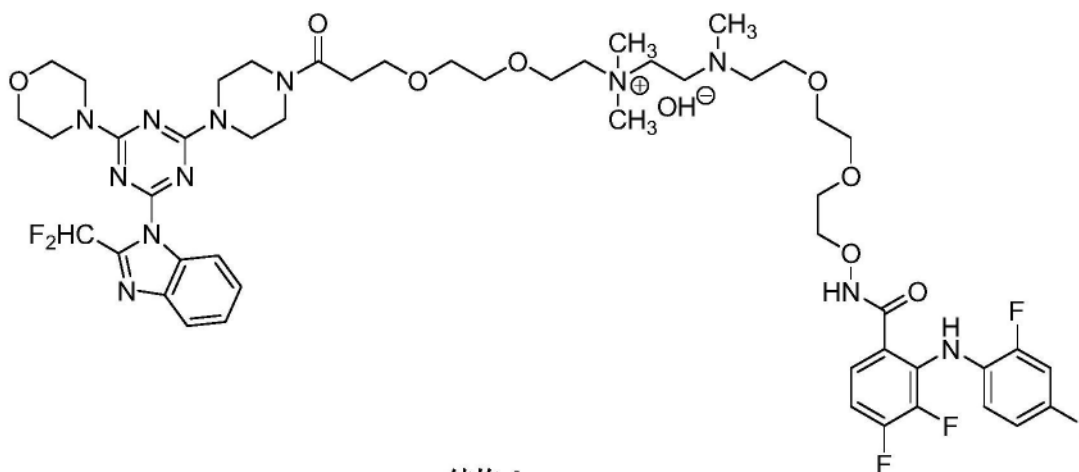
[0174] 为了进一步提高药物的生物利用度,接头可为2-[2,3-双(2-羟基乙氧基)丙氧基]乙醇,一种三元接头,或季戊四醇,一种四元接头,用于通过酯键连接MEK、PI3K 和mTOR抑制剂。

[0175] 能够抑制mTOR、PI3K和MEK的本发明的具体化合物包括但不限于具有下述结构的化合物。



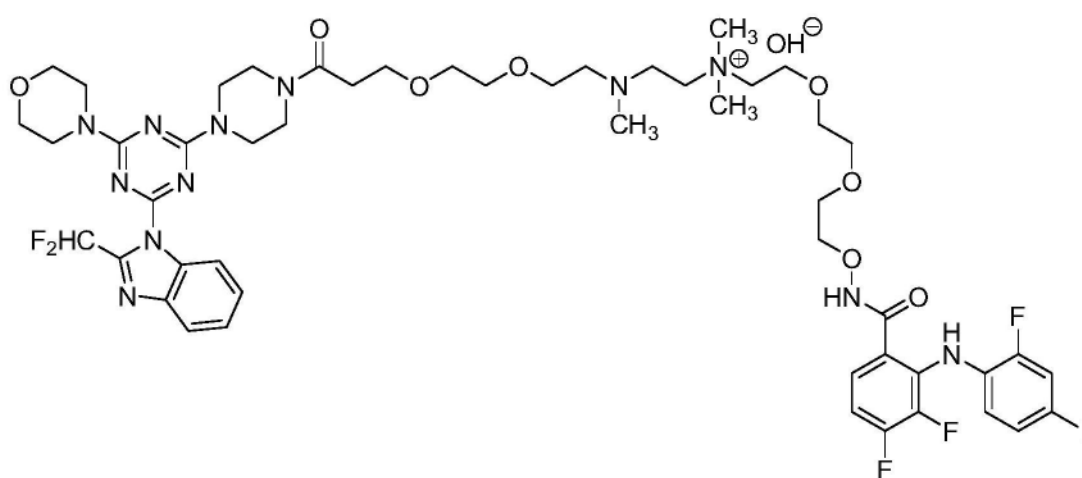
[0176]





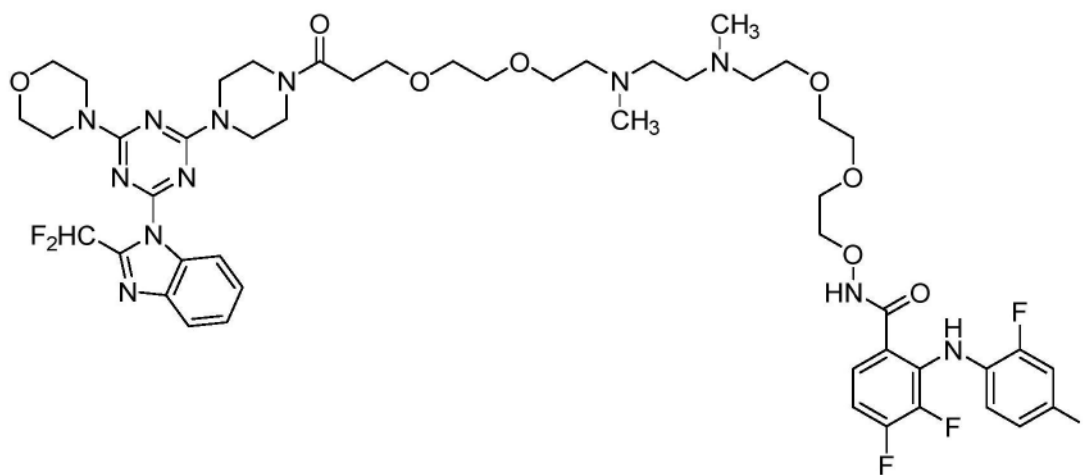
结构 A

[0177]

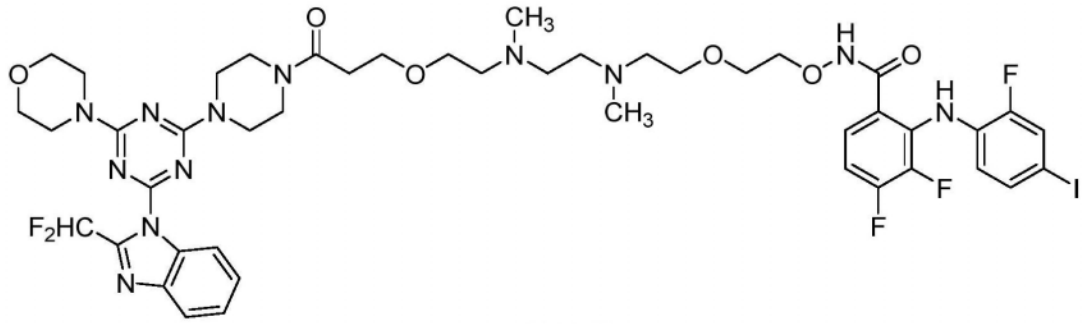


结构 B

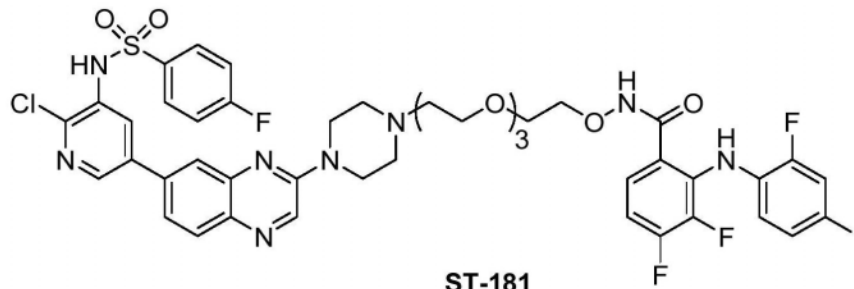
ST5-05



ST-180

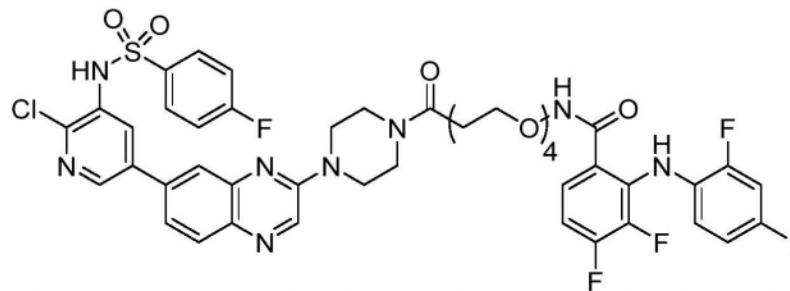


ST-189

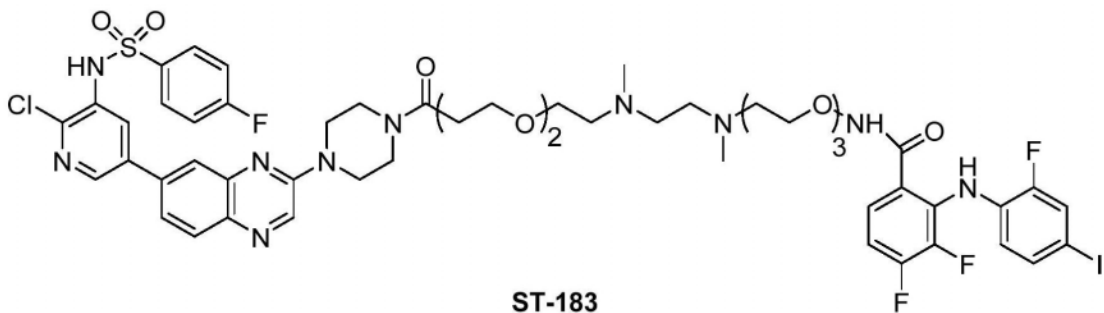


ST-181

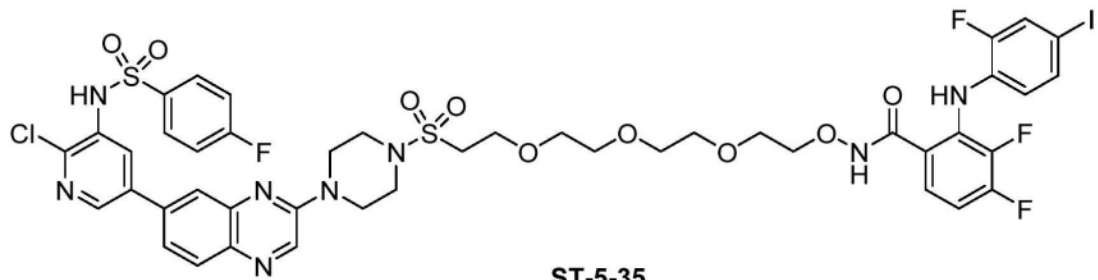
[0178]



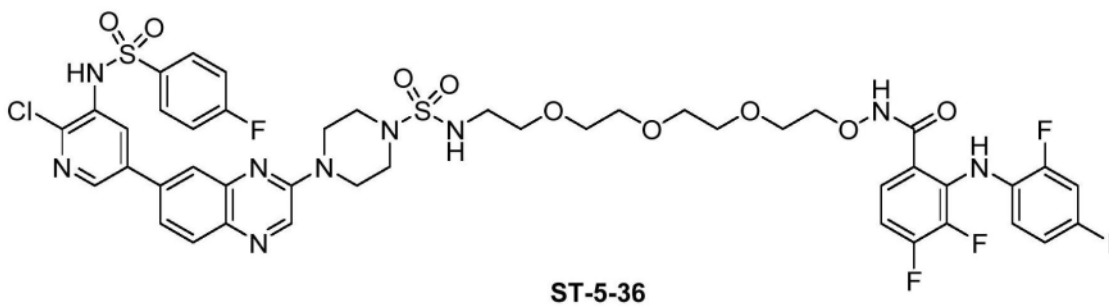
ST-182



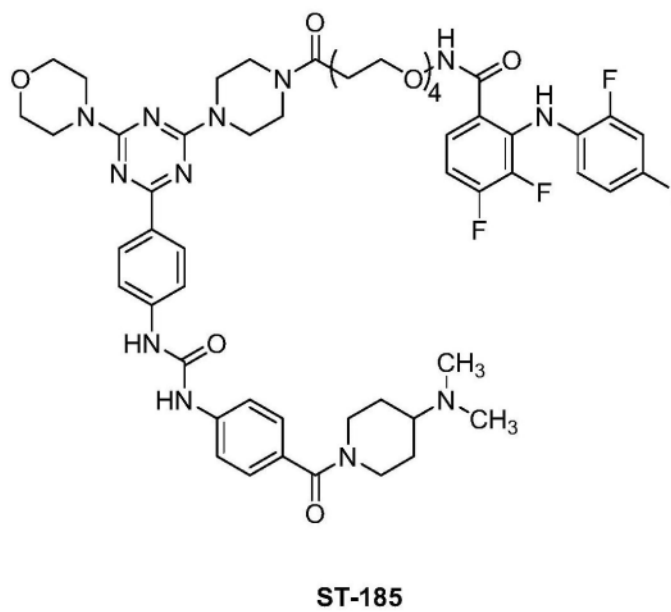
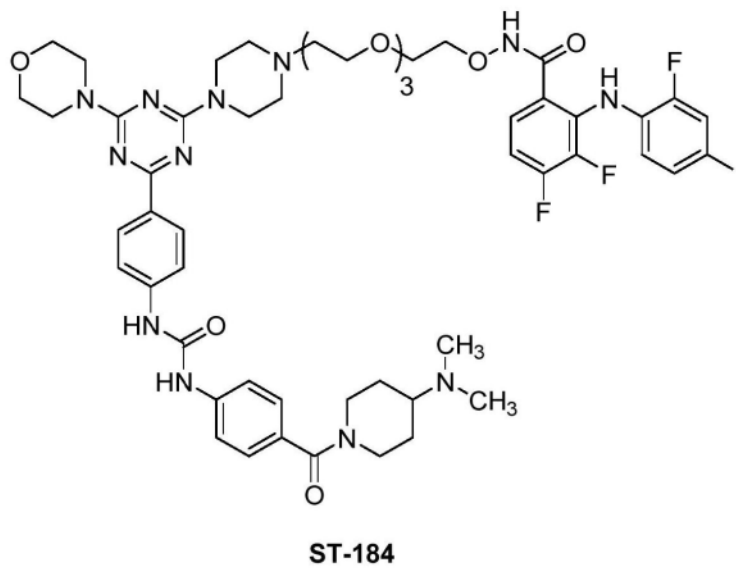
ST-183

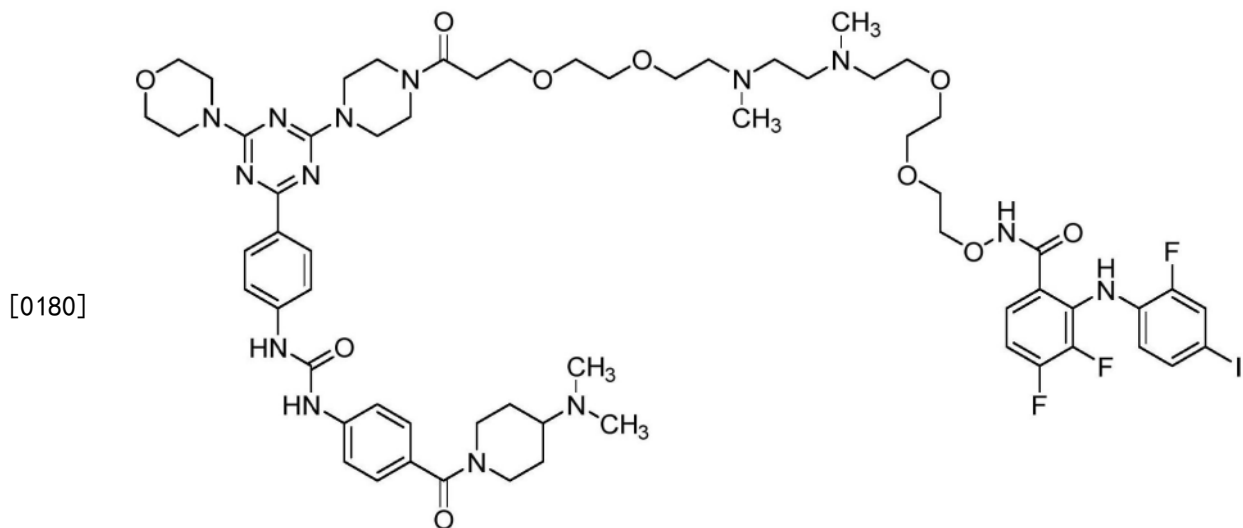


ST-5-35



[0179]





ST-186

[0181] 本发明包括 (a) 开发单个mTOR、PI3K和MEK抑制剂, 其用缀合接头进行化学修饰以维持对其各自酶靶的高结合亲和力; 和 (b) 在最终合成步骤中缀合这些化学实体, 以提供原型单一化学实体多功能抑制剂化合物ST-180至ST-186、ST-189 和ST5-05。例如, 该策略也可用于连接替代的MEK抑制剂, 比如曲美替尼 (Trametinib)、司美替尼 (Selumetinib)、Pimersertib、SMK-17。其他MEK抑制剂公开于如下中: Sebolt-Leopold等人 (2009), Road to PD0325901 and Beyond: The MEK Inhibitor Quest, in Kinase Inhibitor Drugs (Eds. R. Li and J. A. Stafford), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA 的第8章、图8.10和8.11。

[0182] 可选的PI3K抑制剂包括, 例如, GDC 0941、GDC 0980、BKM-120、BEZ235、PIK-90和杜维利斯 (Duvelisib)。

[0183] 可选的mTOR抑制剂包括, 例如, 雷帕霉素、AZD8055、KU0063794、拓克尼布 (Torkinib) (PP242) 和沃塔里昔布 (Voxtalib)。

[0184] 因此, 本发明提供了多功能mTOR和/或MEK和/或PI3K抑制剂, 如本发明的化合物所示例的, 用于治疗其中抑制mTOR、MEK和PI3K中的至少一种、优选至少两种具有有益效果的疾病和病症。在一个实施方式中, 本发明涉及治疗患有其中抑制mTOR或MEK或PI3K (并且优选全部) 提供益处的疾病或病症的个体的方法, 该方法包括向有此需要的个体施用治疗有效量的本发明的多功能化合物。预期本发明的多功能化合物比mTOR、MEK或PI3K抑制剂单一疗法对KRAS突变体肿瘤表现出更高的活性。

[0185] 本发明的方法可以通过施用本发明的多功能化合物作为纯化合物或作为药物来实现。施用药物组合物或纯净存在的多功能化合物, 可在感兴趣的疾病或病症发作期间或之后进行。通常, 药物组合物是无菌的, 并且不含有毒性、致癌性或致突变性化合物, 这些化合物在施用时会引起不良反应。还提供了试剂盒, 其包含: 本发明的多功能化合物和任选的第二治疗剂, 其可用于治疗其中抑制mTOR 和/或MEK和/或PI3K提供益处的疾病和病症, 单独或一起包装; 和具有用于使用这些活性剂的说明书的插页。

[0186] 在许多实施方式中, 本发明的多功能化合物与可用于治疗其中抑制mTOR、MEK和PI3K中的一种或多种提供益处的疾病或病症的第二治疗剂联合施用。第二种治疗剂与本发

明的多功能化合物不同。可以同时或依次施用本发明的多功能化合物和第二治疗剂以达到所需效果。此外,本发明的多功能化合物和第二治疗剂可从单一组合物或两种单独的组合物施用。

[0187] 第二治疗剂以提供其所需的治疗效果的量施用。每种第二治疗剂的有效剂量范围是本领域已知的,并且在这样确定的范围内向有需要的个体施用第二治疗剂。

[0188] 本发明的多功能化合物和第二治疗剂可以作为单一单位剂量一起施用或作为多单位剂量单独施用,其中本发明的多功能化合物在第二治疗剂之前施用,或反之亦然。可以施用一种或多种剂量的本发明的多功能化合物和/或一种或多种剂量的第二治疗剂。因此,本发明的多功能化合物可以与一种或多种第二治疗剂(例如但不限于抗癌剂)联合使用。

[0189] 可根据本发明治疗的疾病和病症包括例如癌症。可以治疗多种癌症,包括但不限于:癌,包括膀胱癌(包括加速和转移性膀胱癌)、乳腺癌、结肠癌(包括结肠直肠癌)、肾癌、肝癌、肺癌(包括小细胞和非小细胞肺癌和肺腺癌)、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、泌尿生殖道癌、淋巴系统癌、直肠癌、喉癌、胰腺癌(包括外分泌胰腺癌)、食道癌、胃癌、胆囊癌、宫颈癌、甲状腺癌、肾癌和皮肤癌(包括鳞状细胞癌);淋巴系的造血肿瘤,包括白血病、急性淋巴细胞白血病、急性成淋巴细胞白血病、B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、毛细胞淋巴瘤、组织细胞性淋巴瘤和伯克特(Burkett's)淋巴瘤;骨髓系的造血肿瘤,包括急性和慢性髓性白血病、骨髓增生异常综合征、髓状白血病和早幼粒细胞白血病;中枢和外周神经系统肿瘤,包括星形细胞瘤、神经母细胞瘤、神经胶质瘤和神经鞘瘤;间充质来源的肿瘤,包括纤维肉瘤、横纹肌肉瘤和骨肉瘤;和其他肿瘤,包括黑素瘤、色素性干皮症(xeroderma pigmentosum)、角化棘皮瘤、精原细胞瘤、甲状腺滤泡癌、畸胎瘤、肾细胞癌(RCC)、胰腺癌、骨髓瘤、骨髓和淋巴母细胞白血病、神经母细胞瘤和胶质母细胞瘤。

[0190] 可通过本发明的双重MEK/PI3K抑制剂治疗的其他形式的癌症包括,例如,成人和儿科肿瘤,实体瘤/恶性肿瘤的生长、粘液样和圆细胞癌、局部晚期肿瘤、转移性癌、人类软组织肉瘤(包括尤文氏肉瘤)、癌转移(包括淋巴转移)、鳞状细胞癌(特别是头颈部食管鳞状细胞癌)、口腔癌、血细胞恶性肿瘤(包括多发性骨髓瘤)、白血病(包括急性淋巴细胞白血病、急性非淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、慢性粒细胞白血病和毛细胞白血病)、积液淋巴瘤(体腔基淋巴瘤)、胸腺淋巴瘤肺癌(包括小细胞癌、皮肤T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、肾上腺皮质癌、产ACTH肿瘤、非小细胞癌、乳腺癌,包括小细胞癌和导管癌)、胃肠道癌(包括胃癌、结肠癌、结肠直肠癌和与结直肠癌肿瘤相关的息肉)、胰腺癌、肝癌、泌尿系统癌(包括膀胱癌,比如原发性浅表性膀胱肿瘤、膀胱浸润性移行细胞癌和肌肉浸润性膀胱癌)、前列腺癌、女性生殖道恶性肿瘤(包括卵巢癌、原发性腹膜上皮肿瘤、宫颈癌、子宫内膜癌、阴道癌、外阴癌、子宫癌和卵巢卵泡实体瘤)、男性生殖道恶性肿瘤(包括睾丸癌和阴茎癌)、肾癌(包括肾细胞癌)、脑癌(包括内源性脑肿瘤、神经母细胞瘤、星形细胞脑肿瘤、神经胶质瘤和中枢神经系统转移性肿瘤细胞浸润)、骨癌(包括骨瘤和骨肉瘤)、皮肤癌(包括恶性黑素瘤、人皮肤角质形成细胞的肿瘤进展和鳞状细胞癌)、甲状腺癌、视网膜母细胞瘤、神经母细胞瘤、腹腔积液、恶性胸腔积液、间皮瘤、肾母细胞瘤(Wilms's tumor)、胆囊癌、滋养细胞肿瘤、血管外皮细胞瘤、骨髓纤维化、骨髓恶性肿瘤(包括急性髓性白血病(AML)、骨髓增生异常综合征(MDS)、慢性粒细胞白血病(CML)和卡波西氏肉瘤。

[0191] 本发明的多功能化合物尤其用于治疗胰腺癌和结肠直肠癌以及肿瘤转移性疾病。

[0192] 施用途径也可以通过直接眼内注射用于眼睛肿瘤治疗的化合物,例如包括葡萄膜黑素瘤和视网膜母细胞瘤。本发明的多功能抑制剂还可以局部、口服或静脉内递送,或通过眼内植入,以改善眼部药物的生物利用度。由于细胞信号传导途径可能具有显著的“串扰”,并因此与其他生物途径有许多不同的分子相互作用,从而靶向PI3K/Akt/mTOR和Raf/MEK/ERK途径可能对眼病有益,包括青光眼、白内障、年龄相关性黄斑变性、弱视和糖尿病视网膜病变。

[0193] 可通过施用本发明的mTOR和/或MEK和/或PI3K抑制剂治疗其他疾病和病症,包括癌症、炎症性疾病、过敏性疾病、炎症性肠病、血管炎、白塞病综合征、牛皮癣、炎症性皮肤病、哮喘、呼吸道过敏性疾病、自身免疫性疾病、移植物排斥、发热、心血管疾病、脑血管疾病、纤维化、结缔组织病、结节病、生殖器和生殖障碍、胃肠道疾病、神经系统疾病、睡眠障碍、疼痛、肾脏疾病和感染性疾病,包括HIV、慢性疼痛,包括神经性疼痛(神经损伤或神经本身失常引起的疼痛)和伤害性疼痛(伤害感受器是在受伤期间激活的神经系统中的受体)和与临床诊断相关的慢性疼痛,例如纤维肌痛、炎症、肌肉骨骼功能障碍,公开于美国专利公开号2011/0053907;美国专利号7,897,792;美国专利公开号2011/0009405和美国专利公开号2010/0249099中,各自通过引用整体并入本文。

[0194] 在本发明的方法中,将治疗有效量的一种或多种本发明的多功能抑制剂(通常根据药学实践配制)施用给有需要的人。是否指示这种治疗取决于个体病例,并且需要进行医学评估(诊断),其中考虑到存在的体征、症状和/或功能障碍,发生特定体征、症状和/或功能障碍的风险,以及其他因素。

[0195] 本发明的多功能化合物可以通过任何合适的途径施用,例如通过口、口腔、吸入、舌下、直肠、阴道、脑池内或鞘内通过腰椎穿刺、经尿道、经鼻、经皮,即透皮,或肠胃外(包括静脉注射、肌内、皮下、冠状动脉内、皮内、乳房内、腹膜内、关节内、鞘内、眼球后、肺内注射和/或特定部位的手术植入)施用。肠胃外施用可以使用针头和注射器或使用高压技术完成。

[0196] 药物组合物包括其中以有效量施用本发明的多功能化合物以实现其预期目的的那些。准确的制剂、施用途径和剂量由个体医师根据诊断的病症或疾病确定。剂量和间隔可以单独调节,以提供足以维持治疗效果的本发明的多功能化合物的水平。

[0197] 本发明的多功能化合物的毒性和治疗功效可通过细胞培养物或实验动物中的标准药学方法测定,例如,用于测定化合物的最大耐受剂量(MTD),其定义为在动物中不引起毒性的最高剂量。最大耐受剂量和治疗效果(例如,抑制肿瘤生长)之间的剂量比为治疗指数。剂量可根据所用的剂型和所用的施用途径在此范围内变化。治疗有效量的确定完全在本领域技术人员的能力范围内,特别是根据本文提供的详细公开内容。

[0198] 治疗中需要使用的治疗有效量的本发明的多功能化合物随治疗条件的性质、所需活动的时间长短、患者的年龄和状况而变化,并最终由主治医师确定。可以单独调整剂量和间隔以提供足以维持所需治疗效果的多功能抑制剂的血浆水平。所需剂量可方便地以单剂量施用,或以适当间隔施用的多剂量施用,例如每天一次、两次、三次、四次或更多次亚剂量。通常需要或需要多剂量。例如,本发明的多功能抑制剂可以下述频率给药:每隔4天以每天一剂递送四剂(q4d × 4);每隔三天以每天一剂递送四剂(q3d × 4);每隔5天每天递送一剂(qd × 5);每周一剂,持续三周(qwk3);每日五剂,休息两天,再每日五剂(5/2/5);或者,

任何确定适合该情况的剂量方案。

[0199] 用于本发明方法的本发明多功能化合物可以施用的量为每剂约0.005毫克至约500毫克,每剂约0.05毫克至约250毫克,或每剂约0.5毫克至约100毫克。例如,本发明的多功能化合物可以每剂量施用的量为约0.005、0.05、0.5、5、10、20、30、40、50、100、150、200、250、300、350、400、450或500毫克,包括0.005毫克与500毫克之间的所有剂量。

[0200] 含有本发明多功能抑制剂的组合物或含有其的组合物的剂量可为约1ng/kg至约200mg/kg,约1 μ g/kg至约100mg/kg,或约1mg/kg至约50mg/kg。组合物的剂量可以是任何剂量,包括但不限于,约1 μ g/kg。组合物的剂量可为任何剂量,包括但不限于约1 μ g/kg、10 μ g/kg、25 μ g/kg、50 μ g/kg、75 μ g/kg、100 μ g/kg、125 μ g/kg、150 μ g/kg、175 μ g/kg、200 μ g/kg、225 μ g/kg、250 μ g/kg、275 μ g/kg、300 μ g/kg、325 μ g/kg、350 μ g/kg、375 μ g/kg、400 μ g/kg、425 μ g/kg、450 μ g/kg、475 μ g/kg、500 μ g/kg、525 μ g/kg、550 μ g/kg、575 μ g/kg、600 μ g/kg、625 μ g/kg、650 μ g/kg、675 μ g/kg、700 μ g/kg、725 μ g/kg、750 μ g/kg、775 μ g/kg、800 μ g/kg、825 μ g/kg、850 μ g/kg、875 μ g/kg、900 μ g/kg、925 μ g/kg、950 μ g/kg、975 μ g/kg、1mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、35mg/kg、40mg/kg、45mg/kg、50mg/kg、60mg/kg、70mg/kg、80mg/kg、90mg/kg、100mg/kg、125mg/kg、150mg/kg、175mg/kg或200mg/kg。上述剂量是一般情况的示例,但可以存在其中更高或更低剂量的个别情况,并且这些都在本发明的范围内。在实践中,医生确定最适合于个体患者的实际给药方案,其可以随着特定患者的年龄、体重和反应而变化。

[0201] 在癌症的治疗中,本发明的多功能化合物可以与化学治疗剂和/或放射一起施用。

[0202] 本发明的实施方式采用下述电磁辐射: γ -射线(10^{-20} 至 10^{-13} m)、X射线辐射(10^{-12} 至 10^{-9} m)、紫外线(10nm至400nm)、可见光(400nm至700nm)、红外辐射(700nm至1mm)和微波辐射(1mm至30cm)。

[0203] 许多癌症治疗方案目前使用由电磁辐射(例如X射线)激活的放射增敏剂。X射线激活的放射增敏剂的例子包括但不限于甲硝唑、米索硝唑(misonidazole)、去甲基米索硝唑、哌莫硝唑(pimonidazole)、依他硝唑(etanidazole)、尼莫唑、丝裂霉素C、RSU 1069、SR 4233、E09、RB 6145、烟酰胺、5-溴脱氧尿苷(BUdR)、5-碘脱氧尿苷(1UdR)、溴脱氧胞苷、氟脱氧尿苷(FUdR)、羟基脲、顺铂,和其治疗有效的类似物和衍生物。

[0204] 癌症的光动力疗法(PDT)使用可见光作为敏化剂的辐射活化剂。光动力放射增敏剂的例子包括但不限于下述:血卟啉衍生物、PHOTOFRIN[®]、苯并卟啉衍生物、NPe6、初卟啉锡(SnET2)、脱镁叶绿酸盐-a(pheoborbide-a)、细菌叶绿素-a、萘酞菁、酞菁、锌酞菁和其治疗上有效的类似物和衍生物。

[0205] 除了本发明的多功能抑制剂之外,放射增敏剂可以与治疗有效量的一种或多种化合物一起施用,这样的化合物包括但不限于促进放射增敏剂掺入靶细胞的化合物,控制治疗药物、营养素和/或氧流向靶细胞的化合物,在有或没有额外辐射的情况下作用于肿瘤的化学治疗剂,或用于治疗癌症或其他疾病的其他治疗有效化合物。可与放射增敏剂联合使用的其他治疗剂的例子包括但不限于5-氟尿嘧啶(5-FU)、甲酰四氢叶酸、氧气、碳水化合物、红细胞输注、全氟碳(例如,FLUOSOLW[®]-DA)、2,3-DPG、BW12C、钙通道阻滞剂、己酮可可碱、抗血管生成化合物、胍屈嗪和L-BSO。

[0206] 化学治疗剂可为诱导细胞凋亡的任何药理学试剂或化合物。药理学试剂或化合物可为例如小的有机分子、肽、多肽、核酸或抗体。可使用的化学治疗剂包括但不限于烷化剂、抗代谢物、激素及其拮抗剂、天然产物及其衍生物、放射性同位素、抗体，以及天然产物，和它们的组合。例如，本发明的多功能抑制剂可与下述一起施用：抗生素，比如多柔比星和其他蒽环类似物、氮芥，比如环磷酰胺、嘧啶类似物，比如5-氟尿嘧啶、顺铂、羟基脲、紫杉醇(taxol)及其天然和合成衍生物等。作为另一个例子，在混合肿瘤的情况下，比如乳腺的腺癌，其中肿瘤包括促性腺激素依赖性和促性腺激素非依赖性细胞，该化合物可以与亮丙瑞林或戈舍瑞林(LH-RH的合成肽类似物)联合施用。其他抗肿瘤方案包括使用抑制剂化合物与另一种治疗方式，例如手术或放射，在本文中也称为“辅助抗肿瘤形式”。用于本发明的其他化学治疗剂包括其激素和拮抗剂、放射性同位素、抗体、天然产物及其组合。

[0207] 用于本发明方法的化学治疗剂的例子列于下表中。

[0208] 表1

	<u>烷化剂</u>	<u>天然产物</u>
	<u>氮芥</u>	<u>抗有丝分裂药</u>
	二氯甲基二乙胺	
	环磷酰胺	<u>紫杉烷类</u>
[0209]	异环磷酰胺	紫杉醇(paclitaxel)
	美法仑	长春花生物碱
	苯丁酸氮芥	长春碱(VLB)
	尿嘧啶氮芥	长春新碱
		长春瑞滨

替莫唑胺

亚硝基脲

卡莫司汀(BCNU)

洛莫司汀(CCNU)

司莫司汀(甲基-CCNU)

盐酸氮芥(chlormethine)

链佐星

乙撑亚胺/甲基-三聚氰胺

三乙撑三聚氰胺(TEM)

三乙撑硫代磷酸酰胺(噻替派)

六甲三聚氰胺

(HMM, 六甲蜜胺)

烷基磺酸盐

白消安

哌泊溴烷

三嗪

达卡巴嗪(DTIC)

[0210]

抗代谢物叶酸类似物

甲氨蝶呤

曲麦克特(trimetrexate)

培美曲塞

(多靶抗叶酸剂)

嘧啶类似物

5-氟尿嘧啶

氟脱氧尿苷

吉西他滨

胞嘧啶阿拉伯糖苷

(AraC, 阿糖胞苷)

5-氮杂胞苷

2,2'-双氟脱氧-胞苷

氟脲苷

喷司他汀

嘌呤类似物

6-巯基嘌呤

6-硫鸟嘌呤

长春地辛

泰索帝®(多西他赛)

雌莫司汀

磷酸雌莫司汀

表鬼臼毒素

依托泊苷

替尼泊苷

抗生素

放线菌素D

道诺霉素(红比霉素)

多柔比星(阿霉素)

米托蒽醌伊达比星

博莱霉素

普卡霉素(splicamycin)(光辉霉素)

丝裂霉素(mitromycin)-C

更生霉素

阿非迪霉素

表柔比星

伊达比星

柔红霉素

光辉霉素

脱氧助间型霉素

酶

L-天冬酰胺酶

L-精氨酸酶

放射增敏剂

甲硝唑

米索硝唑

去甲基米索硝唑

哌莫硝唑

依他硝唑

尼莫唑

RSU 1069

EO9

RB 6145

非类固醇抗雄激素类

SR4233

硫唑嘌呤
2'-脱氧助间型霉素
(喷司他丁)
赤羟基壬烷基-腺嘌呤(EHNA)
磷酸氟达拉滨
2-氯脱氧腺苷
(克拉屈滨, 2-CdA)

I 型拓扑异构酶抑制剂

喜树碱
托泊替康
依立替康

生物应答调节剂

G-CSF
GM-CSF

分化剂

视黄酸盐生物

激素和拮抗剂

[0211]

肾上腺皮质类固醇类/拮抗剂
泼尼松和等效物
地塞米松
氨鲁米特(ainoglutethimide)

孕激素

己酸羟孕酮
醋酸甲羟孕酮
醋酸甲地孕酮

雌激素

己烯雌酚
乙炔基雌二醇/等效物

抗雌激素类

他莫昔芬

雄激素

丙酸睾酮
氟甲睾酮/等效物

抗雄激素类

氟他胺

氟他胺
烟酰胺
5-溴脱氧尿苷
5-碘脱氧尿苷
溴脱氧胞苷

其他药剂

铂配位复合物

顺铂
卡铂
奥沙利铂
蒽二酮
米托蒽醌

取代的脲

羟基脲

甲基胍衍生物

N-甲基胍(MIH)
甲基苄胍

肾上腺皮质抑制剂

米托坦(*o,p'*-DDD)
氨鲁米特

细胞活素

干扰素(α , β , γ)
白细胞介素-2

光敏剂

血卟啉衍生物
PHOTOFRIN®
苯并卟啉衍生物
Npe6
初卟啉锡(SnET2)
脱镁叶绿酸盐(pheoboride)-a
细菌叶绿素-a
茶酞菁
酞菁
锌酞菁

放射

X-射线
紫外线

	释放促性腺激素的	γ 辐射
[0212]	激素类似物	可见光
	亮丙瑞林	红外辐射
		微波辐射

[0213] 微管影响剂干扰细胞有丝分裂,并且其细胞毒性活性方面是本领域公知的。可用于本发明的微管影响剂包括但不限于秋水仙碱 (NSC 406042)、软海绵素 B (NSC 609395)、秋水仙碱 (colchicines) (NSC 757)、秋水仙碱衍生物 (例如 NSC 33410)、多拉司他汀 10 (NSC 376128)、美登素 (NSC 153858)、根霉素 (NSC 332598)、紫杉醇 (NSC 125973)、TAXOL[®] 衍生物 (例如, NSC 608832)、硫代秋水仙碱 NSC 361792)、三苯甲基半胱氨酸 (NSC 83265)、硫酸长春碱 (NSC 49842)、硫酸长春新碱 (NSC 67574)、天然和合成的埃博霉素,包括不限于埃博霉素 A、埃博霉素 B 和圆皮海绵内酯 (参见 Service, (1996) Science, 274: 2009)、雌莫司汀、诺考达唑、MAP4 等。这些药剂的例子也描述在 Bulinski (1997) J. Cell Sci. 110:3055-3064; Panda (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:10560-10564; Muhlradt (1997) Cancer Res. 57:3344-3346; Nicolaou (1997) Nature 397:268-272; Vasquez (1997) Mol. Biol. Cell. 8:973-985; 和 Panda (1996) J. Biol. Chem. 271:29807-29812 中。

[0214] 可使用的细胞抑制剂包括但不限于激素和类固醇 (包括合成类似物): 17- α -乙炔基二醇、己烯雌酚、睾酮、泼尼松、氟甲睾酮、丙酸屈他雄酮、睾内酯、醋酸甲地孕酮、甲基泼尼松龙、甲基睾酮、泼尼松龙、氟羟泼尼松龙、氯烯雌醚 (hlorotrianisene)、羟孕酮、氨基鲁米特 (aminogluthimide)、雌莫司汀、醋酸甲羟孕酮、亮丙瑞林、氟他胺、托瑞米芬、诺雷德。

[0215] 其他细胞抑制剂是抗血管生成剂,比如基质金属蛋白酶抑制剂,和其他 VEGF 抑制剂,比如抗 VEGF 抗体和小分子比如 ZD6474 和 SU668。也可使用抗 Her2 抗体。EGFR 抑制剂是 EKB-569 (不可逆抑制剂)。还包括对 EGFR 和 Src 抑制剂有免疫特异性的抗体 C225。

[0216] 同样适合用作细胞抑制剂的是 CASODEX[®] (比卡鲁胺, Astra Zeneca), 其使得雄激素依赖性癌不增殖。细胞抑制剂的另一个例子是抗雌激素 TAMOXIFEN[®], 其抑制雌激素依赖性乳腺癌的增殖或生长。细胞增殖信号转导的抑制剂是细胞抑制剂。代表性例子包括表皮生长因子抑制剂、Her-2 抑制剂、PI3 抑制剂、Src 激酶抑制剂和 PDGF 抑制剂。

[0217] 化合物也可与阿片或大麻素、NSAIDS、类固醇联合施用,用于缓解慢性疼痛。可与本发明的多功能抑制剂一起施用的另外的第二治疗剂是本领域熟知的,例如美国专利公开 2011/0053907; 美国专利公开号 2011/0009405 和美国专利公开号 2010/0249099 中所公开的,每一篇都通过引用整体并入本文。

[0218] 本发明的化合物通常与药物载体混合施用,所述药物载体是根据预期的施用途径和标准药理学实践选择的。使用一种或多种药物组合物生理学上可接受的载体 (包括有助于加工本发明的多功能化合物的赋形剂和助剂) 以常规方式配制根据本发明使用的药物组合物。

[0219] 这些药物组合物可以通过例如常规的混合、溶解、制粒、制糖衣、乳化、包封、包埋或冻干方法制备。适当的配方取决于所选择的施用途径。当口服施用治疗有效量的本发明的多功能化合物时,组合物通常为片剂、胶囊、粉末、溶液或酏剂的形式。当以片剂形式施用时,组合物另外可含有固体载体,比如明胶或佐剂。片剂、胶囊和粉末含有约 0.01% 至约

95%、并且优选约1%至约50%的本发明的多功能化合物。当以液体形式施用，可以加入液体载体，比如水、石油或动物或植物来源的油。液体形式的组合物可进一步含有生理盐水溶液、葡萄糖或其他糖溶液或二醇。当以液体形式施用，该组合物含有按重量计约0.1%至约90%，并且优选约1%至约50%的本发明的多功能化合物。

[0220] 当通过静脉内、皮肤或皮下注射施用治疗有效量的本发明的多功能化合物时，该组合物是无热原的、肠胃外可接受的水溶液形式。在适当考虑pH、等渗性、稳定性等的情况下制备这种肠胃外可接受的溶液在本领域技术范围内。用于静脉内、皮肤或皮下注射的优选组合物通常含有等渗载剂。

[0221] 本发明的多功能化合物可以容易地与本领域熟知的药学上可接受的载体结合。这些载体使得活性剂能够配制成片剂、丸剂、糖衣丸、胶囊、液体、凝胶、糖浆、浆液、悬浮液等，用于待治疗患者的口服摄入。口服使用的药物制剂可以通过向固体赋形剂中加入本发明的多功能抑制剂，任选研磨所得混合物，并在需要时加入合适的助剂后加工颗粒混合物，以得到片剂或糖衣丸芯来获得。合适的赋形剂包括，例如，填料和纤维素制剂。如果需要，可加入崩解剂。

[0222] 本发明的多功能抑制剂可配制用于通过注射，例如通过推注或连续输注，来进行肠胃外施用。用于注射的制剂可以以单位剂量形式存在，例如在安瓿或多剂量容器中，具有添加的防腐剂。组合物可以采取诸如油性或水性载体中的悬浮液、溶液或乳液的形式，并且可以含有配制剂，比如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。

[0223] 用于肠胃外施用的药物组合物包括水溶形式的活性剂的水溶液。另外，本发明的多功能抑制剂的悬浮液可以制备成适当的油性注射悬浮液。合适的亲脂性溶剂或载剂包括脂肪油或合成脂肪酸酯。水性注射悬浮液可含有增加悬浮液粘度的物质。任选地，悬浮液还可含有合适的稳定剂或增加化合物溶解度的试剂，并允许制备高浓度溶液。可选地，本发明的组合物可为粉末形式，用于在使用前用合适的载剂（例如无菌无热原水）构成。

[0224] 本发明的多功能抑制剂也可配制成直肠组合物，比如栓剂或保留灌肠剂，例如含有常规栓剂基质。除了先前描述的制剂之外，本发明的多功能抑制剂还可以配制成药性持久的制剂。这种长效配方可以通过植入（例如，皮下或肌肉内）或通过肌内注射施用。因此，例如，本发明的多功能抑制剂可以用合适的聚合物材料或疏水材料（例如，作为可接受油中的乳液）或离子交换树脂配制。

[0225] 具体地，本发明的多功能抑制剂可以以含有赋形剂（比如淀粉或乳糖）的片剂的形式口服、含服或舌下施用，或者以胶囊或胚珠的形式单独或与赋形剂混合施用，或以酞剂或含有调味剂或着色剂的悬浮液的形式施用。这种液体制剂可以用药学上可接受的添加剂比如悬浮剂制备。本发明的多功能化合物还可以胃肠外注射，例如静脉内、肌肉内、皮下或冠状动脉内注射。对于肠胃外施用，多功能抑制剂最好以无菌水溶液的形式使用，所述无菌水溶液可含有其他物质，例如盐或单糖，比如甘露醇或葡萄糖，以使溶液与血液等渗。化合物也可以使用吸入器作为喷雾剂到达肺组织或通过鼻腔喷雾施用。

[0226] 本发明的多功能抑制剂和第二治疗剂可以作为单一单位剂量一起施用或作为多单位剂量分别施用，其中多功能抑制剂在第二治疗剂之前施用，或反之亦然。预想可以施用一种或多种剂量的本发明的多功能抑制剂和/或一种或多种剂量的第二治疗剂。

[0227] 在一个实施方式中，同时施用本发明的多功能抑制剂和第二治疗剂。在相关的实

施方式中,本发明的多功能抑制剂和第二治疗剂从单一组合物或从单独的组合物施用。在进一步的实施方式中,依次施用本发明的多功能抑制剂和第二治疗剂。

[0228] 作为另外的实施方式,本发明包括试剂盒,所述试剂盒包含一种或多种化合物或组合物,其以便于其用于实施本发明方法的方式包装。在一个简单的实施方式中,试剂盒包括本文所述的化合物或组合物,其可用于实施方法(例如,包含本发明的多功能化合物和任选的第二治疗剂的组合物),包装在容器中,比如密封瓶或容器,具有贴在容器上或包含在试剂盒中的标签,其描述了使用化合物或组合物来实施本发明的方法。优选地,化合物或组合物以单位剂型包装。该试剂盒还可包括适于根据预期施用途施用组合物的装置。

[0229] 先前的mTOR、MEK和PI3K抑制剂作为治疗剂具有阻碍其发展的性质。根据本发明的一个重要特征,合成本发明的多功能化合物并评价其为mTOR和/或 MEK和/或PI3K的双重抑制剂。预期本发明的多功能化合物比使用MEK抑制剂、PI3K抑制剂和mTOR抑制剂的联合疗法更有效且毒性更小。

[0230] 化合物的合成

[0231] 本发明的化合物是MEK抑制剂与mTOR/PI3K抑制剂或PI3K抑制剂结合或连接的结果,以得到本发明的多功能抑制剂。苯氧肟酸酯(benzhydroxamate)型MEK抑制剂例如如WO 2002/006213中所公开的那样合成,其通过引用并入本文。SMK-17型MEK抑制剂例如如WO 2004/083167中所公开的那样合成,其通过引用并入本文。基于三嗪的PI3K抑制剂如美国专利公开号2011/0053907、2011/0009405和2010/0249099中所公开的那样合成,其各自通过引用整体并入本文。mTOR抑制剂如AM Venketasan等人,J. Med. Chem. 53:2636, 2010; N. Nishimur 等人,J. Med. Chem. 54:4735-51, 2011;和WO 2008/032162中所公开的那样合成,其各自通过引用并入本文。

[0232] 材料和方法

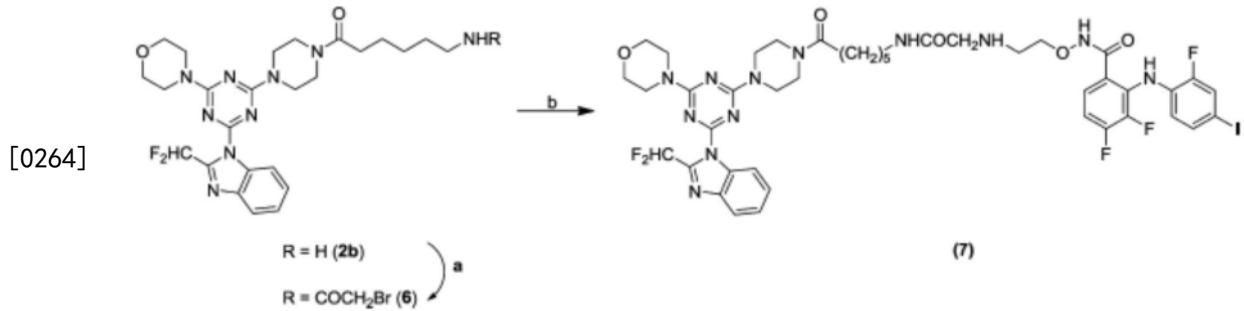
[0233] 涉及空气或湿气敏感试剂和溶剂的化学合成在氮气的正压力下在烘干的玻璃器皿中进行。所有其他化学试剂和无水溶剂均获自Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, 并且无需另外纯化即可使用。如先前报道那样合成关键化合物中间体1,3,5-三嗪类似物(2a,2b) (7)和3,4-二氟-2-(2-氟-4-碘苯基氨基)苯甲酸五氟苯酯(21)(化合物3)。16,16-二甲基-15-氧代-3,6,9,12,14-五氧杂-13-氮杂十七烷基-4-甲基苯磺酸盐(t-Boc-氨基氧基PEG4甲苯磺酸盐)和4-氯丁烷-1-磺酰氯分别购自 Broadpharm, San Diego, CA和Enamine Ltd., Monmouth Jct., NJ。所有其他化学试剂和无水溶剂均获自Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, 并且无需另外纯化即可使用。

[0234] 柱色谱法在购自EMD Millipore, Billerica, MA的硅胶60(230-400目ASTM)上进行。使用Analtech硅胶GF Uniplates(250 μ m)进行薄层色谱法(TLC)。在用紫外(UV)光显影后或通过用磷钼酸试剂喷雾随后加热使TLC板可视化。¹H NMR光谱分别在400MHz和700MHz下在Varian仪器上记录,以CDCl₃或CD₃OD作为溶剂,并以四甲基硅烷(TMS)作为内标。化学位移(δ)和偶合常数(J)分别以百万分率(ppm)和赫兹(Hz)报告。使用如下进行高分辨率质谱分析:用于电子轰击(EI)和化学电离(DCI)模式的VG-70-250-S质谱仪,具有用于电喷雾电离(ESI)模式的电喷雾接口的Waters Autospec Ultima仪器,或者以反射模式运行的Waters Tofspec-2E。使用配备有Waters 2487双波长吸光度检测器的Waters Breeze HPLC系统(Waters Corporation, Milford, MA)进行HPLC。如下进行HPLC分析:在环境温度下,在

Waters XSELECT CSH C-18柱(4.6mm×250mm), 5 μ m颗粒, 含有0.1%的H₂O中 TFA (A) 和 0.1%的CH₃CN中TFA (B) 溶剂混合物中, 流速为1mL/分钟, 在254nm 和280nm处监测UV吸光度。使用30%B至90%B(方法I)、60%B至90%B(方法 II) 或10%B至90%B(方法III) 的25分钟溶剂梯度进行HPLC运行。通过反相梯度 HPLC分析证明所有生物测试的化合物具有>95%的化学纯度。

[0235] 所用的缩写

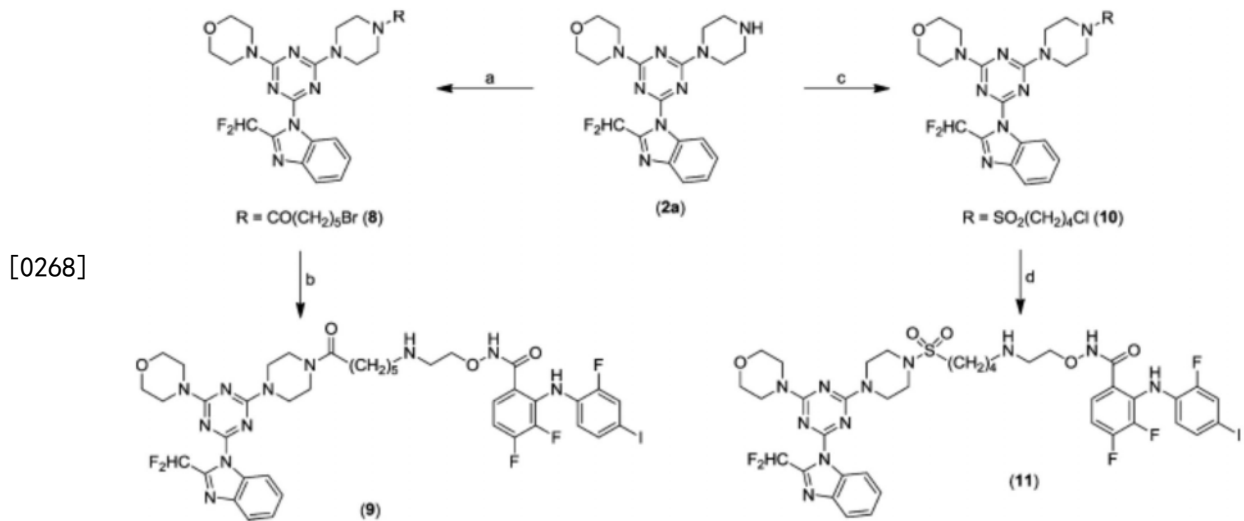
- [0236] Akt..... 蛋白激酶B
- [0237] MEK..... 变构丝裂原活化的蛋白激酶
- [0238] PI3K..... 磷脂酰肌醇3-激酶
- [0239] mTor..... 雷帕霉素的哺乳动物靶
- [0240] br s..... 宽频信号 (broad signal)
- [0241] cLogP..... 计算的log P
- [0242] CH₃CN..... 乙腈
- [0243] DCM..... 二氯甲烷
- [0244] DMF..... N,N-二甲基甲酰胺
- [0245] DIEA..... N,N-二异丙基乙胺
- [0246] DMSO..... 二甲亚砜
- [0247] Et₃N..... 三甲胺
- [0248] HPBCD..... (2-羟丙基)- β -环糊精
- [0249] MEK..... 甲乙酮
- [0250] rt..... 室温
- [0251] TFA..... 三氟乙酸
- [0252] THF..... 四氢呋喃
- [0253] PdCl₂dppf..... [1,1'-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯(II)
- [0254] HAc..... 乙酸
- [0255] EDCI..... 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺
- [0256] HOBT..... 1-羟基苯并三唑
- [0257] P(Ph)₃..... 三苯基膦
- [0258] DEAD..... 偶氮二羧酸二乙酯
- [0259] LHMDS..... 六甲基二硅基胺基锂
- [0260] TBAF..... 四正丁基氟化铵
- [0261] PyBOP..... (六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基膦)
- [0262] 可使用方案1至方案4中阐述的非限制性方法缀合MEK和PI3K抑制剂。
- [0263] 方案1^a



[0265] ^a试剂和条件: (a) BrCH₂COBr, Et₃N, CH₂Cl₂, 0°C至室温, 3小时, 80%;

[0266] (b) 5, NaI, K₂CO₃, DMF, 室温, 4小时, 24%。

[0267] 方案2^a



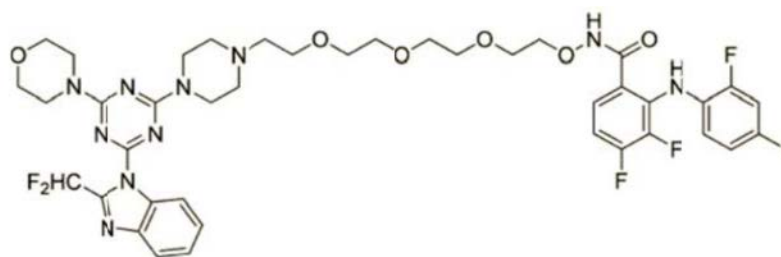
[0269] ^a试剂和条件: (a) Br(CH₂)₅COCl, K₂CO₃, MEK, 0°C至室温, 3小时, 96%;

[0270] (b) 5, NaI, K₂CO₃, CH₃CN, 回流, 4小时, 37%;

[0271] (c) Cl(CH₂)₄SO₂Cl, Et₃N, CH₂Cl₂, 0°C至室温, 18小时, 92%;

[0272] (d) 5, NaI, K₂CO₃, CH₃CN, 回流, 18小时, 30%。

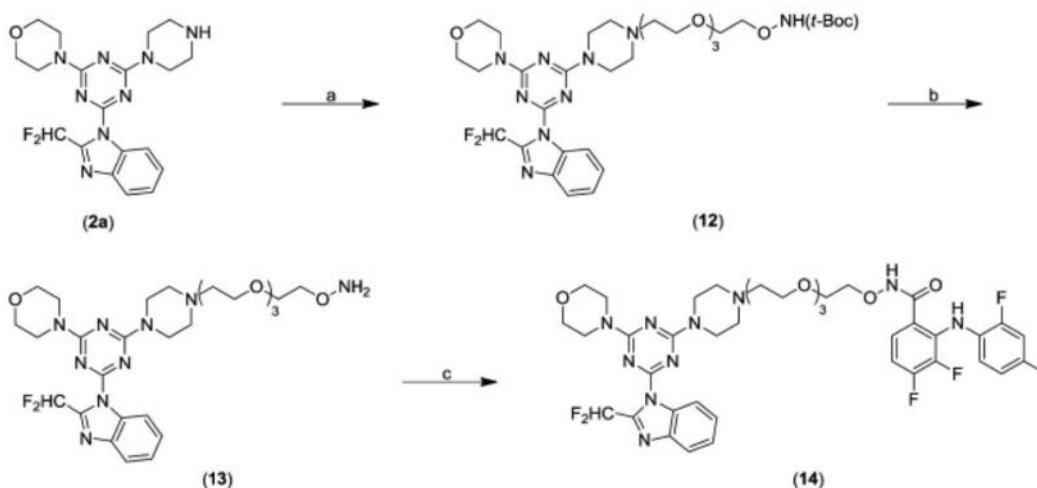
[0273] 方案3: 合成14 (ST-162)



14

MEK1 IC₅₀: 0.015 nMPI3K IC₅₀: 191 nM

[0274]

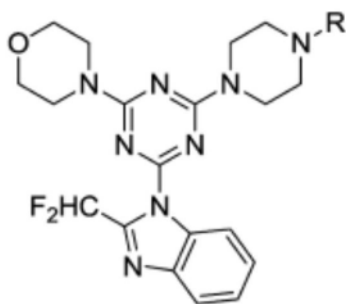


[0275] ^a试剂和条件: (a) TosO-(CH₂CH₂O)₄NH(t-Boc), K₂CO₃, 甲苯, 回流, 24小时, 71%;

[0276] (b) TFA, CH₂Cl₂, 0-5°C, 2小时, 82%;

[0277] (c) 3, DIEA, DMF, 室温, 18小时, 55%。

[0278] 合成化学。如先前报道的那样合成用于制备靶双功能抑制剂化合物的关键中间体2a、2b和3(图3)(7,21)。MEK1抑制剂5通过如下合成:在DIEA存在下,用DMF中的(2-氨基氧基乙基)氨基甲酸叔丁酯²²处理3,得到中间体4,然后用三氟乙酸催化裂解Boc保护基团(图3)。如方案1所示进行抑制剂衍生物7的合成。首先,在三乙胺存在下用溴乙酰溴处理2b,得到相应的2-溴乙酰胺衍生物6,其与5反应得到抑制剂类似物7,总收率18.5%。如方案2中所示,从常见的哌嗪取代的1,3,5-三嗪中间体2a获得抑制剂类似物9和11。首先在碳酸钾存在下用6-溴己酰氯处理三嗪2a,得到相应的6-溴己酰胺类似物8,其在与MEK抑制剂5在回流乙腈中反应后提供37%收率的抑制剂类似物9。通过类似方法,通过4-氯丁烷磺酰胺中间体10,从2a制备抑制剂类似物11,总收率为27.5%。如方案3中所示进行聚乙二醇化连接的双功能抑制剂14(ST-162)的制备。首先,将哌嗪取代的1,3,5-三嗪中间体2a与氨基保护的PEG4甲苯磺酸酯衍生物和碳酸钾在甲苯中回流加热,得到中间体12,然后用TFA催化除去Boc基团,得到氨基衍生物13。随后如前所述使13与活化的酯衍生物3反应,得到14,收率为55%。



[0279]

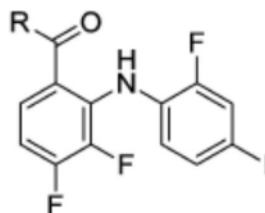
R = H; (**2a**)R = $-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$ (**2b**)R = C₆F₅O- (**3**)R = (*t*-Boc)NHCH₂CH₂ONH- (**4**)R = NH₂CH₂CH₂ONH- (**5**)

图 3.MEK/PI3K 双功能抑制剂合成中使用的关键中间体。

[0280] 3,4-二氟-2-(2-氟-4-碘苯基氨基)-N-{2-(叔丁氧基羰基氨基)乙氧基}苯甲酰胺 (4)。

[0281] 将(2-氨基氧基乙基)氨基甲酸叔丁酯²² (0.945g, 5.36mmol) 的DMF (6mL) 溶液分批加入到3,4-二氟-2-(2-氟-4-碘苯基氨基)苯甲酸五氟苯酯²¹ (3) (3.0g, 5.36mmol) 的DMF (6mL) 的溶液中, 然后加入DIEA (1.38g, 1.87mL, 10.7mmol) 并在室温下搅拌18小时。将反应混合物在减压下浓缩至干燥, 用EtOAc (100mL) 稀释, 并用盐水 (2×50mL)、H₂O (50mL) 萃取, 干燥 (MgSO₄) 并减压浓缩。通过硅胶快速色谱法纯化粗物质, 梯度为己烷中30-55%的EtOAc, 从而得到2.77g (94%) 标题化合物 4, 为白色泡沫。¹H NMR (CDCl₃): δ 10.31 (br s, 1H), 8.59 (br s, 1H), 7.41-7.38 (m, 2H), 7.31 (d, 1H, J=8.5Hz), 6.91-6.84 (m, 1H), 6.61-6.55 (m, 1H), 5.05 (br s, 1H), 3.93 (m, 2H), 3.43-3.39 (m, 2H), 1.45 (s, 9H)。HRMS (ESI⁺): 为 C₂₀H₂₂N₃F₃IO₄ [M+H⁺]^{m/z} 计算的, 552.0602。出现的: 552.0594。

[0282] 3,4-二氟-2-(2-氟-4-碘苯基氨基)-N-(2-氨基乙氧基)苯甲酰胺 (5)。在氮气气氛下, 将三氟乙酸 (17.1g, 11.5mL, 150mmol) 加入到4 (2.77g, 5.0mmol) 的CH₂Cl₂ (50mL) 冷溶液 (0-5°C) 中, 并在该温度下搅拌3小时。反应完成后, 将混合物用Et₂O (250mL) 和碎冰 (100g) 稀释。通过缓慢加入饱和NaHCO₃水溶液将水溶液的pH调节至pH 8, 并且分离有机层, 干燥 (Na₂SO₄), 并减压浓缩。将粗产物在硅胶上进行快速色谱分离, 梯度为含有1%的NH₄OH的CH₂Cl₂中5-30%的CH₃OH, 从而得到1.72g (76%) 标题化合物5, 为白色固体。¹H NMR (CD₃OD): δ 7.55-7.51 (m, 1H), 7.41 (dd, 1H, J=10.9, 1.9Hz), 7.32 (dd, 1H, J=8.6, 1.0Hz), 6.99-6.92 (m, 1H), 6.57-6.51 (m, 1H), 4.05 (t, 2H, J=5.0Hz), 3.10 (t, 2H, J=5.0Hz)。HRMS (ESI⁺): 为 C₁₅H₁₄N₃F₃IO₂ [M+H⁺]^{m/z} 计算的, 452.0077。出现的: 452.0079。HPLC (方法I): t_R=9.72 分钟。

[0283] 2-(二氟甲基)-1-[4-(4-吗啉基)-6-{4-(6-(N-溴乙酰基氨基)己酰基)}哌嗪基]-1,3,5-三嗪-2-基]-1H-苯并咪唑 (6)。使用冰浴将1,3,5-三嗪类似物2b (0.265g, 0.50mmol) 和Et₃N (0.102g, 142μl, 1.0mmol) 的CH₂Cl₂ (3mL) 溶液冷却至0°C, 并在氮气气氛下用溴乙酰溴 (0.122g, 53μl, 0.60mmol) 在CH₂Cl₂ (2mL) 的溶液逐滴处理。移除冰浴, 并且将反应混合物温热至室温并再搅拌3小时。将混合物用EtOAc (100mL) 稀释, 将有机层用1N HCl

水溶液 (50mL)、饱和NaHCO₃水溶液 (50mL)、盐水 (2×50mL) 洗涤并干燥 (Na₂SO₄)。通过在硅胶上进行快速色谱法纯化粗产物, 梯度为CH₂Cl₂中2-8%的CH₃OH, 从而得到0.26g (80%) 标题化合物6, 为米色非晶固体。¹H NMR (CDCl₃): δ8.33 (d, 1H, J=8.0Hz), 7.90 (d, 1H, J=8.0Hz), 7.55 (t, 1H, J=53.5Hz), 7.47-7.39 (m, 2H), 6.62 (br s, 1H), 3.88-3.74 (m, 16H), 3.60 (m, 2H), 3.35-3.30 (m, 2H), 2.42-2.39 (m, 2H), 1.75-1.68 (m, 2H), 1.62-1.57 (m, 2H), 1.46-1.38 (m, 2H)。HRMS (ESI+): 为C₂₇H₃₅N₉BrF₂O₃ [M+H]⁺m/z计算的, 650.2009。出现的: 650.1985。

[0284] N-(2-((2-((6-(4-(4-(2-(二氟甲基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)-6-吗啉代-1,3,5-三嗪-2-基)哌嗪-1-基)-6-氧代己基)氨基)-2-氧代乙基)氨基)乙氧基)-3,4-二氟-2-((2-氟-4-碘苯基)氨基)苯甲酰胺(化合物7)。将苯氧肟酸酯类似物5 (0.18g, 0.40mmol)、无水K₂CO₃ (0.061g, 0.44mmol) 和碘化钠 (0.066g, 0.44mmol) 在DMF (3mL) 中的溶液用6 (0.26g, 0.40mmol) 的DMF (2mL) 溶液逐滴处理, 并在室温下搅拌18小时。将混合物用EtOAc (50mL) 稀释, 将有机层用盐水 (2×25mL) 洗涤并干燥 (Na₂SO₄)。通过在硅胶上进行快速色谱法纯化粗产物, 梯度为含有1%NH₄OH的CH₂Cl₂中5-20%的CH₃OH, 从而得到0.098g (24%) 标题化合物7, 为乳膏状非晶固体。¹H NMR (CDCl₃ +1滴CD₃OD): δ8.33 (d, 1H, J=7.9Hz), 7.88 (d, 1H, J=7.8Hz), 7.55 (t, 1H, J=53.5Hz), 7.47-7.40 (m, 3H), 7.35-7.25 (m, 2H), 6.79-6.76 (m, 1H), 6.52-6.50 (m, 1H), 4.09 (m, 2H), 3.90-3.71 (m, 16H), 3.58 (m, 2H), 3.34 (s, 2H), 3.20 (m, 2H), 2.93 (m, 2H), 2.37-2.16 (m, 4H), 1.61 (m, 2H), 1.49 (m, 2H), 1.33-1.26 (m, 2H)。HRMS (ESI+): 为C₄₂H₄₇N₁₂F₅IO₅ [M+H]⁺m/z计算的, 1021.2752。出现的: 1021.2754。HPLC (方法I): t_R=15.34分钟 (95.3%化学纯度)。

[0285] 2-(二氟甲基)-1-[4-(4-吗啉基)-6-{4-(6-溴己酰基)}哌嗪基]-1,3,5-三嗪-2-基]-1H-苯并咪唑(8)。将1,3,5-三嗪类似物2a (0.208g, 0.5mmol) 和无水K₂CO₃ (0.208g, 1.5mmol) 在甲乙酮 (3.5mL) 中的搅拌悬浮液利用冰浴冷却至0-5℃, 并在氮气气氛下, 用6-溴己酰氯 (0.112g, 81μL, 0.525mmol) 的MEK (1.5mL) 溶液逐滴处理。移除冰浴, 并将反应混合物在室温下再搅拌3小时。减压浓缩后得到的残余物在饱和NaHCO₃水溶液 (100mL) 和EtOAc (100mL) 之间分配。除去有机层, 用盐水 (50mL)、H₂O (50mL) 依次洗涤并干燥 (Na₂SO₄)。通过在硅胶上进行快速色谱法纯化粗产物, 梯度为CH₂Cl₂中3-10%的丙酮, 从而得到0.28g (96%) 标题化合物8, 为无色油状物。¹H NMR (CDCl₃): δ8.33 (d, 1H, J=7.8Hz), 7.90 (d, 1H, J=7.8Hz), 7.55 (t, 1H, J=53.5Hz), 7.47-7.39 (m, 2H), 3.89-3.60 (m, 16H), 3.44 (t, 2H, J=6.6Hz), 2.41 (m, 2H), 1.95-1.88 (m, 2H), 1.76-1.68 (m, 2H), 1.57-1.49 (m, 2H)。HRMS (ESI+): 为C₂₅H₃₂N₈BrF₂O₂ [M+H]⁺m/z计算的, 593.1794。出现的: 593.1795。HPLC (方法I): t_R=20.38分钟。

[0286] N-(2-((6-(4-(4-(2-(二氟甲基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)-6-吗啉代-1,3,5-三嗪-2-基)哌嗪-1-基)-6-氧代己基)氨基)乙氧基)-3,4-二氟-2-((2-氟-4-碘苯基)氨基)苯甲酰胺(化合物9)。将8 (0.158g, 0.27mmol)、苯氧肟酸酯类似物5 (0.24g, 0.53mmol)、无水K₂CO₃ (0.042g, 0.30mmol) 和NaI (0.045g, 0.30mmol) 在CH₃CN (5mL) 中的混合物在回流下搅拌4小时。将反应混合物用EtOAc (100mL) 稀释, 用盐水 (100mL) 萃取, 并干燥 (Na₂SO₄)。通过在硅胶上进行快速色谱法纯化粗产物, 梯度为含有1%NH₄OH的CH₂Cl₂中3-20%的CH₃OH, 从而得到0.096g (37%) 标题化合物9, 为白色非晶粉末。¹H NMR (CDCl₃): δ8.32 (d, 1H, J=7.6Hz),

7.90 (d, 1H, J=8.4Hz), 7.63 (m, 1H), 7.54 (t, 1H, J=53.5Hz), 7.46-7.38 (m, 2H), 7.33-7.25 (m, 2H), 6.78 (m, 1H), 6.51 (m, 1H), 4.27 (m, 2H), 3.88-3.41 (m, 16H), 3.14 (m, 2H), 2.88 (m, 2H), 2.24 (m, 2H), 1.66 (m, 2H), 1.54 (m, 2H), 1.31 (m, 2H)。HRMS (ESI+): 为 $C_{40}H_{44}N_{11}F_5IO_4$ [M+H]⁺m/z计算的, 964.2537。出现的: 964.2550。HPLC (方法I): $t_R=15.71$ 分钟 (96.7%化学纯度)。

[0287] 2-(二氟甲基)-1-[4-(4-吗啉基)-6-{4-(4-氯丁烷-1-磺酰基)}哌嗪基]-1,3,5-三嗪-2-基]-1H-苯并咪唑 (10)。将1,3,5-三嗪类似物2a (0.208g, 0.5mmol) 和 Et_3N (0.061g, 84 μ l, 0.6mmol) 的 CH_2Cl_2 (5mL) 溶液在氮气气氛下用冰浴冷却至0-5 $^{\circ}C$ 。逐滴添加4-氯丁烷-1-磺酰氯 (0.096g, 70 μ L, 0.5mmol) 的 CH_2Cl_2 (2mL) 溶液, 移除冰浴, 将反应混合物在室温下搅拌18小时。将反应混合物用 CH_2Cl_2 (50mL) 处理, 并依次用盐水 (2 \times 50mL)、 H_2O (50mL) 洗涤并干燥 (Na_2SO_4)。通过在硅胶上进行快速色谱法纯化粗产物, 梯度为含1% NH_4OH 的 CH_2Cl_2 中1-5%的 CH_3OH , 从而得到0.264g (92%) 标题化合物10, 为白色泡沫。¹H NMR ($CDCl_3$): δ 8.31 (d, 1H, J=7.6Hz), 7.90 (d, 1H, J=8.2Hz), 7.53 (t, 1H, J=53.3Hz), 7.47-7.39 (m, 2H), 4.00 (m, 4H), 3.89 (m, 4H), 3.80 (m, 4H), 3.58 (t, 2H, J=6.0Hz), 3.40 (m, 4H), 3.00-2.96 (m, 2H), 2.05-1.93 (重叠m, 4H)。HRMS (ESI+): 为 $C_{23}H_{30}N_8ClF_2O_3S$ [M+H]⁺m/z计算的, 571.1812。出现的: 571.1812。

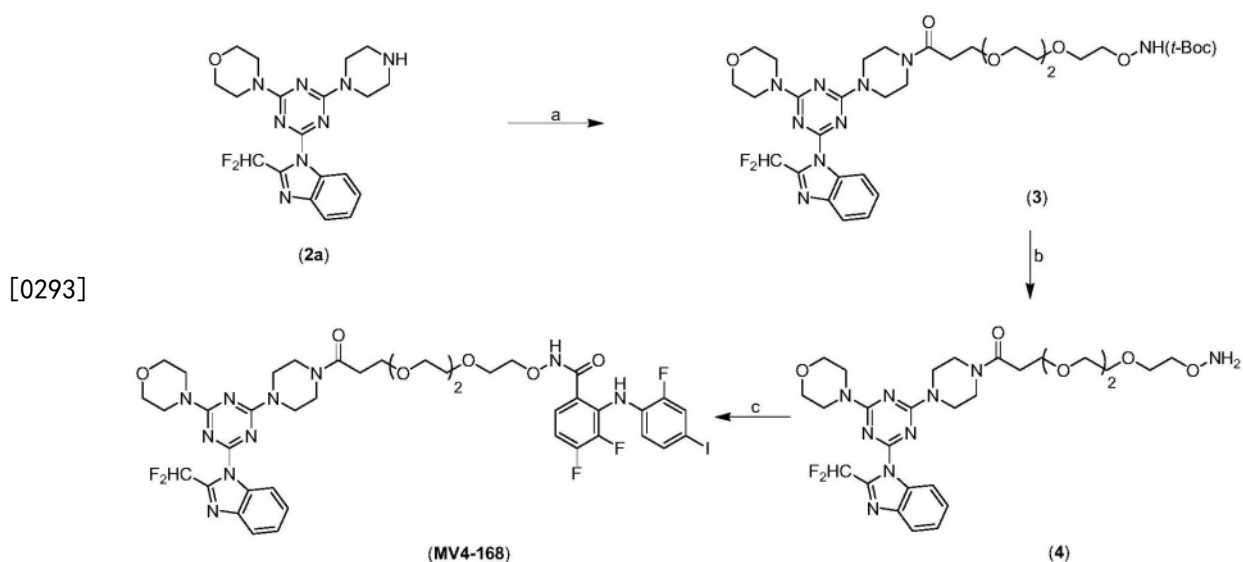
[0288] N-(2-((4-((4-(4-(2-(二氟甲基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)-6-吗啉代-1,3,5-三嗪-2-基)哌嗪-1-基)磺酰基)-丁基)氨基)乙氧基)-3,4-二氟-2-((2-氟-4-碘苯基)-氨基)苯甲酰胺 (化合物11)。将4-氯丁基磺酰胺类似物10 (0.156g, 0.273mmol)、苯氧肟酸酯类似物5 (0.248g, 0.55mmol)、无水 K_2CO_3 (0.042g, 0.30mmol) 和NaI (0.045g, 0.30mmol) 在 CH_3CN (5mL) 中的混合物在回流下搅拌18小时。将混合物用 $CHCl_3$ (100mL) 稀释, 用盐水 (2 \times 50mL) 萃取, 并干燥 (Na_2SO_4)。通过在硅胶上进行快速色谱法纯化粗产物, 梯度为含1% NH_4OH 的 CH_2Cl_2 中5-15%的 CH_3OH , 从而得到0.080g (30%) 标题化合物11, 为白色非晶粉末。¹H NMR ($CDCl_3$ +1滴 CD_3OD): δ 8.30 (d, 1H, J=7.6Hz), 7.89 (d, 1H, J=7.4Hz), 7.53 (t, 1H, J=53.3Hz), 7.47-7.26 (m, 5H), 6.81-6.79 (m, 1H), 6.52-6.51 (m, 1H), 4.15 (m, 2H), 3.96-3.79 (m, 12H), 3.32 (m, 4H), 3.00 (m, 2H), 2.88 (m, 2H), 2.77 (m, 2H), 1.86 (m, 2H), 1.72 (m, 2H)。HRMS (ESI+): 为 $C_{38}H_{42}N_{11}F_5IO_5S$ [M+H]⁺m/z计算的, 986.2050。出现的: 986.2043。HPLC (方法III): $t_R=20.09$ 分钟 (97.9%化学纯度)。

[0289] 2-(二氟甲基)-1-[4-(4-吗啉基)-6-{4-(2-(2-(2-(叔丁基羰基氨基氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基}-哌嗪基]-1,3,5-三嗪-2-基]-1H-苯并咪唑 (12)。将1,3,5-三嗪类似物2a (0.52g, 1.25mmol)、t-Boc-氨基氧基PEG4甲苯磺酸酯 (0.58g, 1.25mmol) 和无水 K_2CO_3 (0.345g, 2.5mmol) 在甲苯 (8mL) 中的混合物在回流下搅拌24小时。将混合物用 CH_2Cl_2 (100mL) 稀释, 用盐水 (100mL) H_2O (100mL) 萃取, 并干燥 (Na_2SO_4)。通过在硅胶上进行快速色谱法纯化粗产物, 梯度为含1% NH_4OH 的2-5%在 $CHCl_3$ 中的 CH_3OH , 从而得到0.63g (71%) 标题化合物12, 为浅黄色粘性胶状物。¹H NMR ($CDCl_3$): δ 8.34 (d, 1H, J=7.8Hz), 7.99 (s, 1H), 7.88 (d, 1H, J=7.8Hz), 7.58 (t, 1H, J=53.5Hz), 7.43-7.37 (m, 2H), 4.03-4.01 (m, 2H), 3.91-3.86 (m, 8H), 3.80-3.78 (m, 4H), 3.73-3.63 (m, 12H), 2.66 (t, 2H, J=5.6Hz), 2.61 (m, 4H), 1.47-1.48 (m, 9H)。HRMS (ESI+): 为 $C_{32}H_{48}N_9F_2O_7$ m/z计算的: 708.3639。出现的: 708.3636。HPLC (方法I): $t_R=9.76$ 分钟。

[0290] 2-(二氟甲基)-1-[4-(4-吗啉基)-6-{4-(2-(2-(2-(2-氨基氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基}哌嗪基)-1,3,5-三嗪-2-基]-1H-苯并咪唑(13)。将12(0.255g,0.36mmol)在 CH_2Cl_2 (5mL)中的搅拌溶液用冰浴冷却至 0°C ,并用TFA(2.5mL)在 CH_2Cl_2 (5mL)中的溶液逐滴处理。将反应在 $0-5^\circ\text{C}$ 下再搅拌2小时,然后用冰冷的水(100mL)处理,并用饱和 NaHCO_3 水溶液将水层的pH调节至pH8。将混合物用EtOAc(100mL)萃取两次,并将有机萃取物依次用盐水(100mL)、 H_2O (100mL)洗涤并干燥(Na_2SO_4)。通过在硅胶上进行快速色谱法纯化粗产物,梯度为含有1% NH_4OH 的 CH_2Cl_2 中2-4%的 CH_3OH ,从而得到0.18g(82%)标题化合物13,为无色粘性油状物。 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 8.34(d,1H, $J=7.8\text{Hz}$),7.89(d,1H, $J=8.0\text{Hz}$),7.58(t,1H, $J=53.5\text{Hz}$),7.45-7.37(m,2H),5.52(br s,2H),3.89-3.69(m,14H),3.67(m,12H),2.66(t,2H, $J=5.5\text{Hz}$),2.60(m,4H)。HRMS(ESI+):为 $\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{N}_9\text{F}_2\text{O}_5$ [M+H] $^+$ m/z计算的,608.3115。出现的:608.3114。HPLC(方法III): $t_R=10.75$ 分钟。

[0291] N-(2-(2-(2-(2-(4-(4-(2-(二氟甲基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)-6-吗啉代-1,3,5-三嗪-2-基)哌嗪-1-基)乙氧基)-乙氧基)乙氧基)乙氧基)-3,4-二氟-2-((2-氟-4-碘苯基)氨基)苯甲酰胺(ST-162;14)。将13(0.10g,1.64mmol)、五氟苯基酯类似物3(0.092g,1.64mmol)和DIEA(0.042g,0.58 μl ,0.33mmol)在DMF(1mL)中的混合物在室温下搅拌24小时。将混合物用 CH_2Cl_2 (100mL)稀释,用盐水($2\times 100\text{mL}$)萃取,并干燥(Na_2SO_4)。通过在硅胶上进行快速色谱法纯化粗产物,梯度为含有1% NH_4OH 的2-5%在 CHCl_3 中的 CH_3OH ,从而得到0.088g(55%)标题化合物14,为淡粉红色结晶固体。 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3+1 滴 CD_3OD): δ 8.33(dd,1H, $J=7.8,1.4\text{Hz}$),7.86(dd,1H, $J=7.0,1.5\text{Hz}$),7.58(t,1H, $J=53.6\text{Hz}$),7.46-7.26(m,5H),6.86-6.79(m,1H),6.58-6.52(m,1H),4.13-4.11(m,2H),3.87-3.74(m,14H),3.67-3.60(m,10H),2.86(br s,1H),2.64(t,2H, $J=5.5\text{Hz}$),2.59-2.52(m,4H)。HRMS(ESI+):为 $\text{C}_{40}\text{H}_{45}\text{N}_{10}\text{F}_5\text{IO}_6$ [M+H] $^+$ m/z计算的,983.2483。出现的:983.2477。HPLC(方法I): $t_R=14.56$ 分钟。

[0292] 方案4合成MV4-168(ST-168)



[0294] 试剂和条件:(a) (t-Boc)NH-($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) $_3$ $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$,PyBoP,DIEA,THF:DCM,4小时,73%;(b) TFA,DCM, $0-5^\circ\text{C}$,2小时,82%;(c) 2,4,6-三氟-5-碘苯胺,DIEA,PyBop,THF:DCM,18小时,54%。

[0295] 注意:W02002/006213A2中报道了化合物中间体2的合成

[0296] 合成MV4-168 (ST-168) 的实验细节

[0297] 如前所述合成化合物中间体1,3,5-三嗪类似物(2a)(2)和3,4-二氟-2-(2-氟-4-碘苯基氨基)-苯甲酸(2)(3)。2,2-二甲基-4-氧代-3,6,9,12,15-五氧杂-5-氮杂十八烷-18-油酸(t-Boc-氨基氧基-PEG3-酸)购自Broadpharm, San Diego, CA。通过反相梯度HPLC分析证明所有生物学测试的化合物具有>98%的化学纯度。

[0298] 2-(2-(2-(3-(4-(4-(2-(二氟甲基)-1H-苯并[d])咪唑-1-基)-6-吗啉代-1,3,5-三嗪-2-基)哌嗪-1-基)-3-氧丙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基氨基甲酸酯(3)

[0299] 用1,3,5-三嗪类似物2a(208mg, 0.50mmol)、DIEA(142mg, 192 μ L, 1.1mmol)和PyBop(261mg, 0.50mmol)处理t-Boc-氨基氧基PEG3酸类似物(170mg, 0.50mmol)在12mL THF:DCM(1:1)中的溶液,并在室温(rt)下搅拌4小时。HPLC分析(方法1)和TLC分析(Analtech硅胶板;DCM:CH₃OH:NH₄OH(95:5:1))此时显示反应完成。将混合物减压浓缩,用DCM(50mL)稀释,用盐水(25mL)、H₂O(25mL)萃取并干燥(Na₂SO₄)。通过在硅胶上进行快速色谱法纯化粗产物,梯度为含1%NH₄OH的1%-4%在DCM中的CH₃OH的溶液,从而得到269mg(73%)标题化合物3,为粘性油状物。¹H NMR(CDCl₃): δ 8.33(d, 1H, J=7.8Hz), 7.90(d, 1H, J=8.0Hz), 7.72(br s, 1H), 7.56(t, 1H, J=53.6Hz), 7.47-7.39(m, 2H), 4.00-3.65(m, 30H), 2.71(t, 2H, J=6.5 Hz), 1.47(s, 9H)。HRMS(ESI⁺):为C₃₃H₄₈N₉F₂O₈[M+H⁺]m/z计算的:736.3588。出现的:736.3588;为[M+Na⁺]计算的:758.3408。出现的:758.3407(100%)。HPLC(方法I):t_R=15.8分钟。

[0300] 3-(2-(2-(2-(氨基氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-1-(4-(4-(2-(二氟甲基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)-6-吗啉代-1,3,5-三嗪-2-基)哌嗪-1-基)丙烷-1-酮(4)将3(0.184g, 0.25mmol)在DCM(4mL)中的搅拌溶液用冰浴冷却至0 $^{\circ}$ C,并用TFA(2mL)在DCM(2mL)中的溶液处理。将反应在0-5 $^{\circ}$ C下再搅拌2小时,然后用冰冷的水(25mL)处理,并用饱和NaHCO₃水溶液将水层的pH调节至pH 8。将混合物用EtOAc(25mL)萃取两次,并将有机萃取物依次用盐水和H₂O洗涤,然后干燥(Na₂SO₄)。减压浓缩,得到产物4(130mg;82%),为浅黄色油状物,将其直接用于下一步骤。¹H NMR(CDCl₃): δ 8.33(d, 1H, J=7.8Hz), 7.90(d, 1H, J=8.4Hz), 7.56(t, 1H, J=53.6Hz), 7.47-7.39(m, 2H), 3.52(br s, 1H), 3.93-3.65(m, 30H), 2.70(t, 2H, J=6.4Hz), 1.68(br s, 2H)。HRMS(ESI⁺):为C₂₈H₄₀N₉F₂O₆[M+H⁺]m/z计算的:636.3064。出现的:636.3068(100%)。为[M+Na⁺]计算的:658.2884。出现的:658.2885。HPLC(方法I):t_R=7.7分钟。

[0301] N-(2-(2-(2-(3-(4-(4-(2-(二氟甲基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)-6-吗啉代-1,3,5-三嗪-2-基)哌嗪-1-基)-3-氧代丙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)-3,4-二氟-2-((2-氟-4-碘苯基)氨基)苯甲酰胺(ST-168)将4(127mg, 0.20mmol)、3,4-二氟-2-(2-氟-4-碘苯基氨基)-苯甲酸2(79mg, 0.20mmol)和DIEA(57mg, 77 μ L, 0.44mmol)在4mL的THF:DCM(1:1)的混合物中的混合物用PyBop(105mg, 0.20mmol)处理,并在室温下搅拌18小时。HPLC分析(方法1)和TLC分析(Analtech二氧化硅;DCM:CH₃OH:NH₄OH;95:5:1;产物ST-168的R_f=0.20)显示反应完成。将混合物减压浓缩,将残余物溶于EtOAc(50mL)中,用0.1N HCl水溶液、饱和NaHCO₃水溶液、盐水洗涤并干燥(Na₂SO₄)。通过在硅胶上进行快速色谱法纯化粗产物,梯度为含1%NH₄OH的1%-6%在DCM中的CH₃OH,从而得到110mg(54%)标题化合物,为白色非晶固体。¹H NMR(CDCl₃): δ 8.90(br s, 1H), 8.32(d, 1H, J=7.8Hz), 7.88(d, 1H, J=7.6Hz), 7.55

(t, 1H, J=53.5Hz), 7.44-7.28 (m, 5H), 6.83-6.77 (m, 1H), 6.58-6.52 (m, 1H), 4.13 (m, 2H), 3.88-3.50 (m, 28H), 2.62 (m, 2H), 1.89 (br s, 2H). HRMS (ESI+): m/z 计算 $C_{41}H_{45}N_{10}F_5IO_7$ [M+H⁺]: 1011.2432. 出现的: 1011.2431. 计算 [M+Na⁺]: 1033.2251. 出现的: 1033.2247 (100%). HPLC (方法II): t_R = 17.7 分钟。

[0302] HPLC分析方法I. 如下进行HPLC分析: 在环境温度下, 在Waters XSELECT CSH C-18柱 (4.6×250mm), 5 μ 颗粒, H₂O中含有0.1%的TFA (A) 和CH₃CN中0.1%的TFA (B) 溶剂混合物, 流速为1mL/分钟。在25分钟的运行时间内用30%B (初始) 至90%B的溶剂梯度进行分析, 在254和280nm处监测UV吸光度。

[0303] HPLC分析方法II: 如上所述进行HPLC分析, 使用50%B (初始) 至90%B的溶剂梯度, 运行时间为25分钟。

[0304] 生物学数据

[0305] 描述了通过共价连接ATP竞争性PI3K抑制剂ZSTK474和ATP-非竞争性MEK 抑制剂PD0325901的结构类似物来实现的一系列单实体双功能MEK1/PI3K抑制剂的合成。在酶抑制测定中, 生物功能抑制剂显示出对MEK1 (0.015 < IC₅₀ (nM) < 500) 和PI3K (54 < IC₅₀ (nM) < 341) 的有效体外抑制。在两种肿瘤细胞系 (A549、D54) 中用化合物14证明了同时的MEK1和PI3K抑制。抑制剂产生剂量依赖性降低的细胞活力, 类似于等效剂量的ZSTK474和PD0325901的联合施用。口服施用后化合物 14的体内功效在D54神经胶质瘤和携带A549肺肿瘤的小鼠中得到证实。在通过蛋白质印迹分析施用后2小时, 化合物14分别显示出对肿瘤ERK1/2和Akt磷酸化的95%和67%的抑制, 证实了该双功能抑制剂策略对组合的MEK1/PI3K抑制的生物利用度和功效。

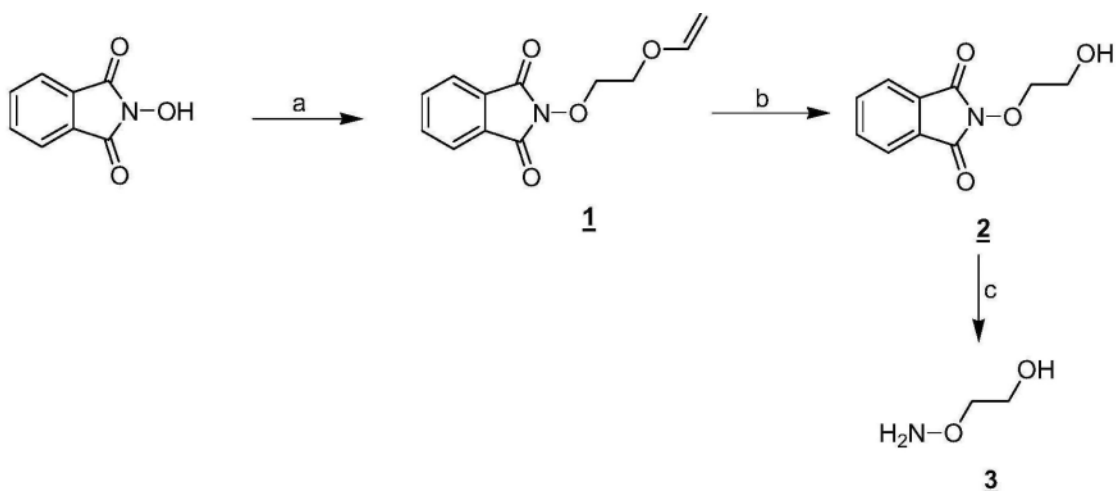
[0306] 化合物14在MEK1和PI3K结合口袋处的虚拟对接。预测ST-162将保留 MEK1抑制剂PD318088在MEK1变构结合区内显示的许多结合相互作用, 包括氧肟酸氧与Lys97的关键相互作用, A环上的4-氟原子与Val21和Ser212的主链NH, 以及疏水口袋内的含碘B环 (图4A)。类似地, 预测ST-162也可作为PI3K抑制剂, 因为它保留了吗啉基团氧与缬氨酸主链酰胺NH基团 (Val828) 的氢键相互作用和咪唑氮与Lys779侧链胺基团的相互作用 (图4B)。

[0307] PD0316684的脂肪酸酯类似物的合成

[0308] 下述方案中的化合物4和9在文献中是已知的, 并且在Nishimura, N. 等人 J. Med Chem. 54, 4735-4751, 2011的报道中合成。

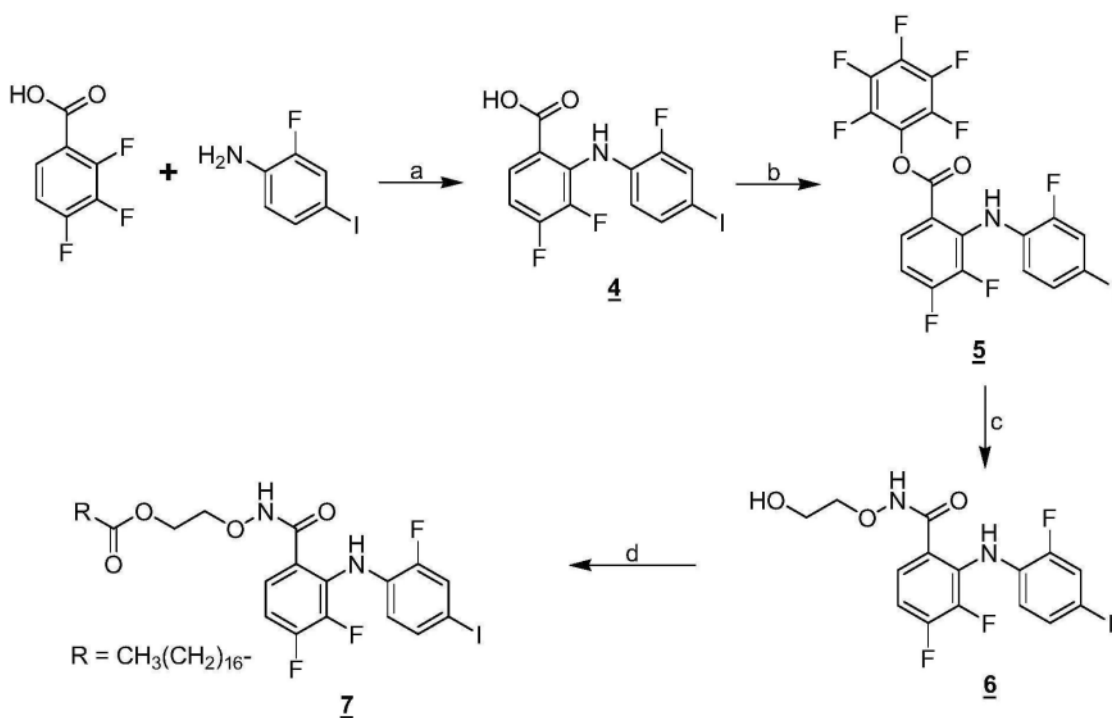
[0309] 使用Venkatesan, AM. 等 J. Med Chem. 53, 2636-2645, 2010中报道的一般步骤合成下述方案中的化合物中间体25。

[0310] 步骤1



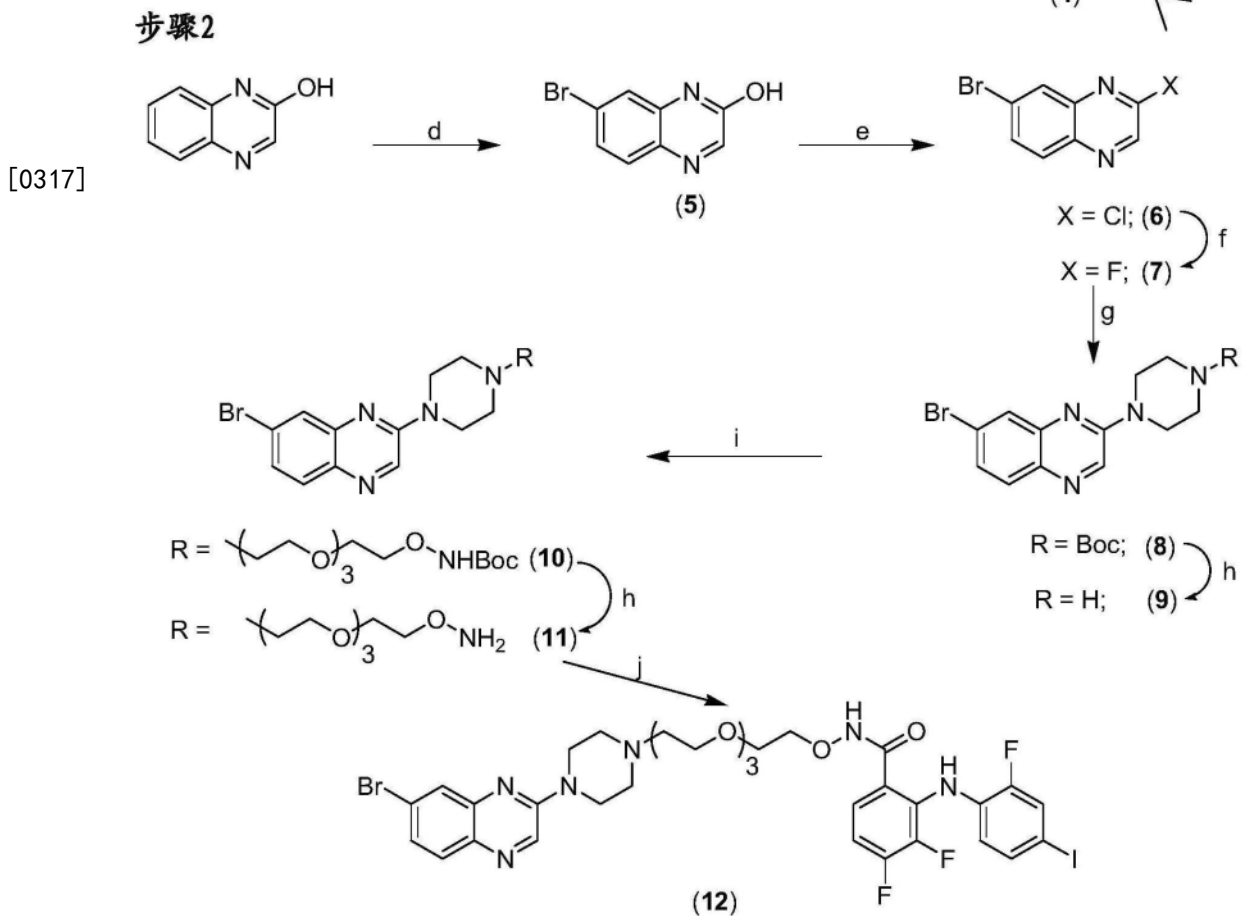
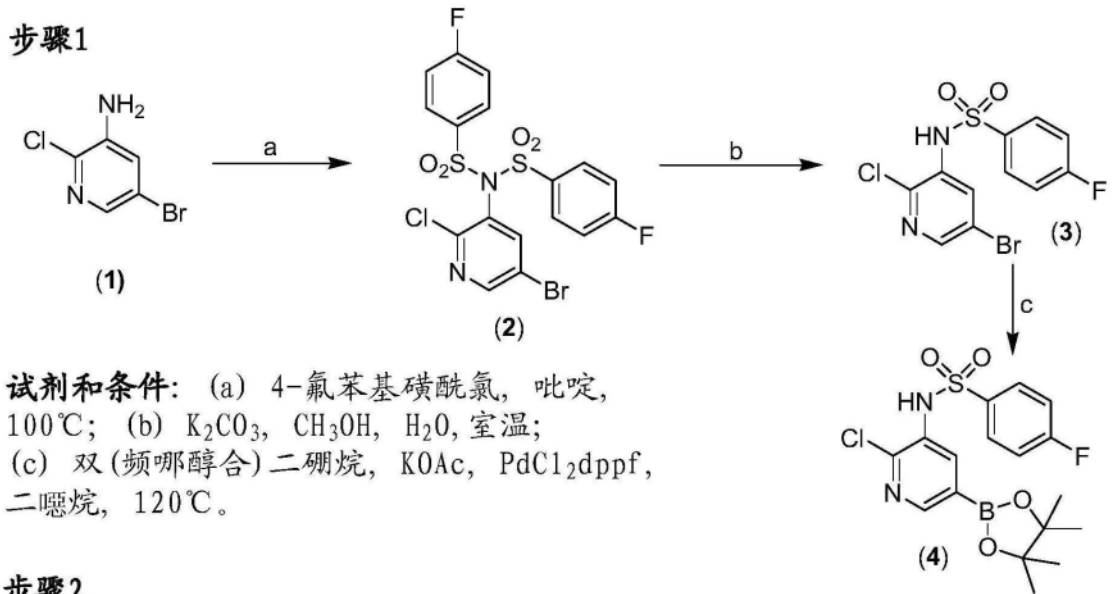
[0312] 试剂和条件: (a) 乙二醇乙烯基醚, $P(Ph)_3$, DEAD, THF, $0^\circ C$; (b) 0.3 N HCl, 二噁烷, 室温; (c) $CH_3NH_2NH_2$, DCM。

[0313] 步骤2



[0315] 试剂和条件: (a) LHMDs, THF, $-65^\circ C$; (b) 五氟苯基三氟乙酸酯, 吡啶, DMF; (c) 3, DIEA, DMF, 室温; (d) 酸性氯, Et_3N , DMF。

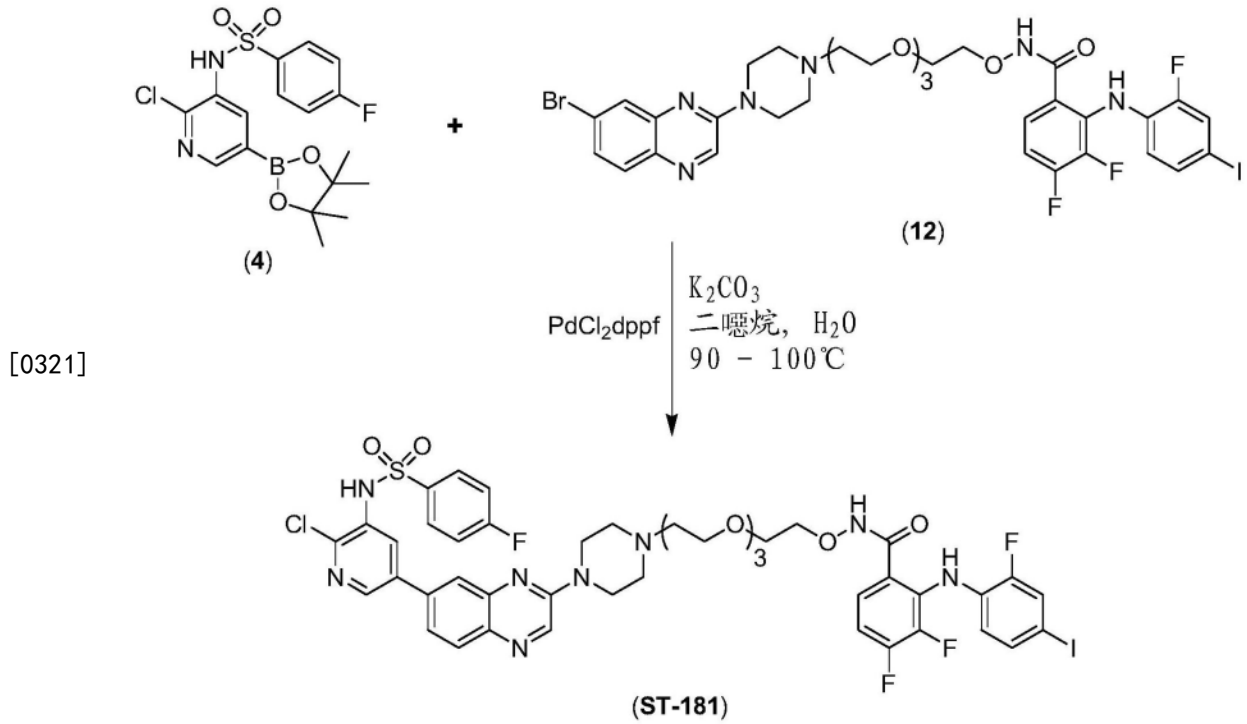
[0316] 合成ST-181



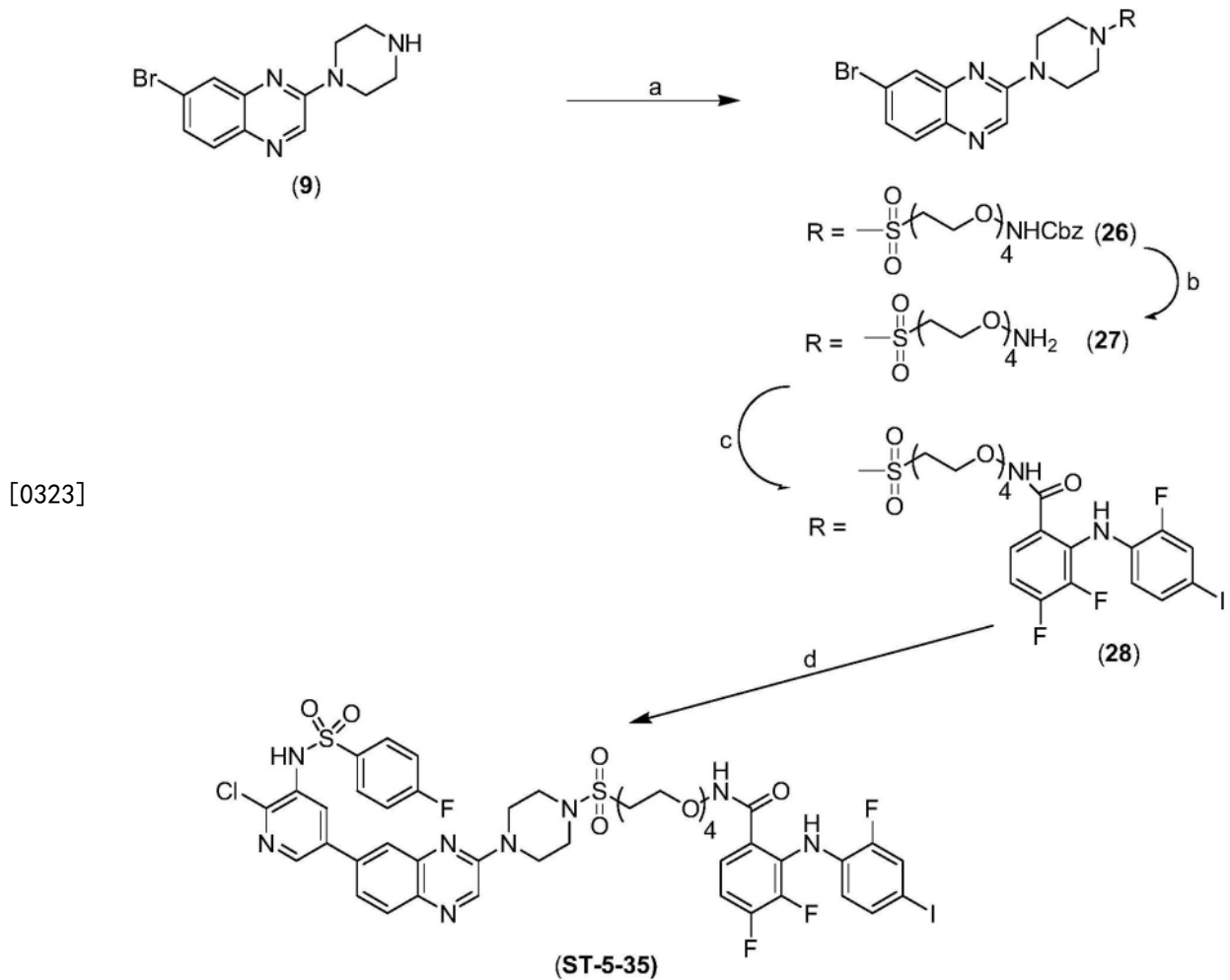
[0318] 试剂和条件: (d) Br_2 , HAc , 室温; (e) $POCl_3$, 甲苯, 室温; (f) TBAF, $DMSO$, 室温; (g) NBoc-哌嗪; (h) TFA, DCM , 0-5°C; (i) $TosO-(CH_2CH_2O)_4NH(Boc)$, K_2CO_3 , 甲苯, 回流; (j) 3,4-二氟-2-(2-氟-4-碘苯基氨基)苯甲酸, $DIEA$, $PyBop$, $THF:DCM$ 。

[0319] 合成ST-181(续)

[0320] 步骤3



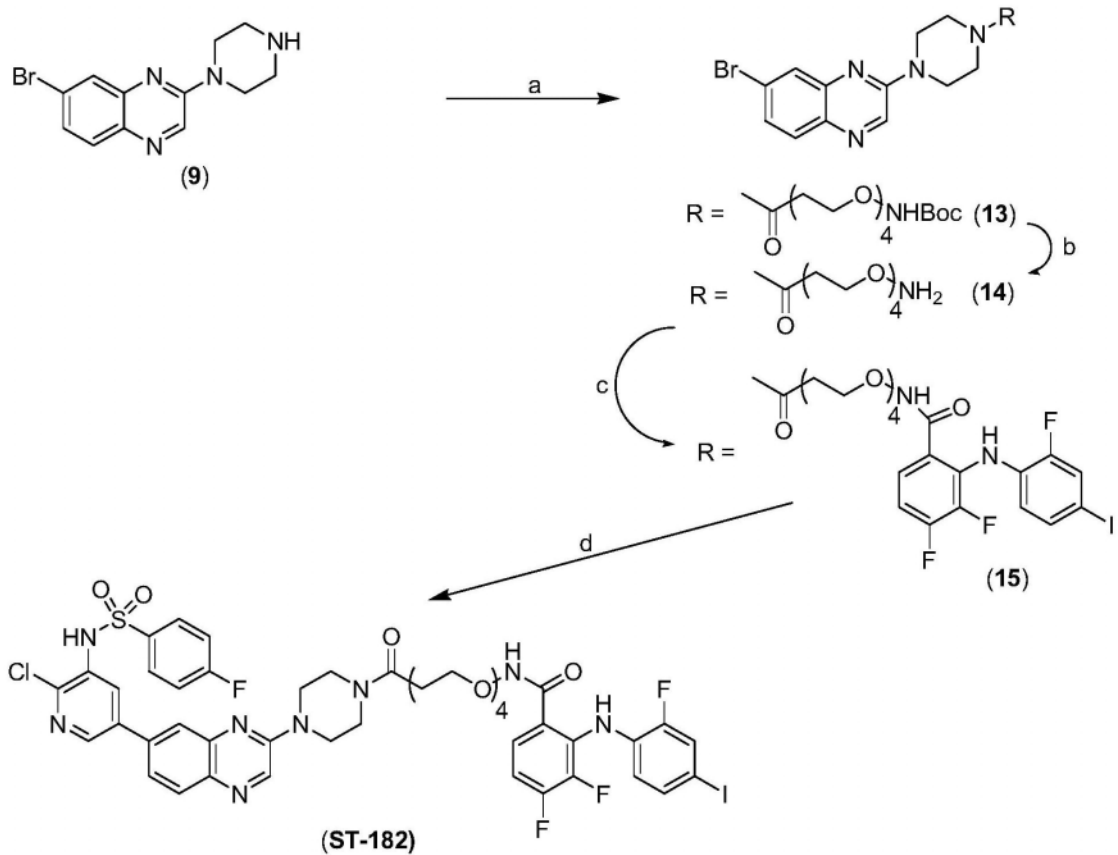
[0322] 合成ST-5-35



[0324] 试剂和条件: (a) $\text{CbzNH}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_4\text{SO}_2\text{Cl}$, DIEA, DCM; (b) $(\text{CH}_3)_3\text{Si I}$, CH_3CN , 25°C ;

(c) 3,4-二氟-2-(2-氟-4-碘苯基氨基)苯甲酸, DIEA, PyBop, THF:DCM; (d) 4, PdCl₂dppf, K₂CO₃, 二噁烷, H₂O, 90-100°C。

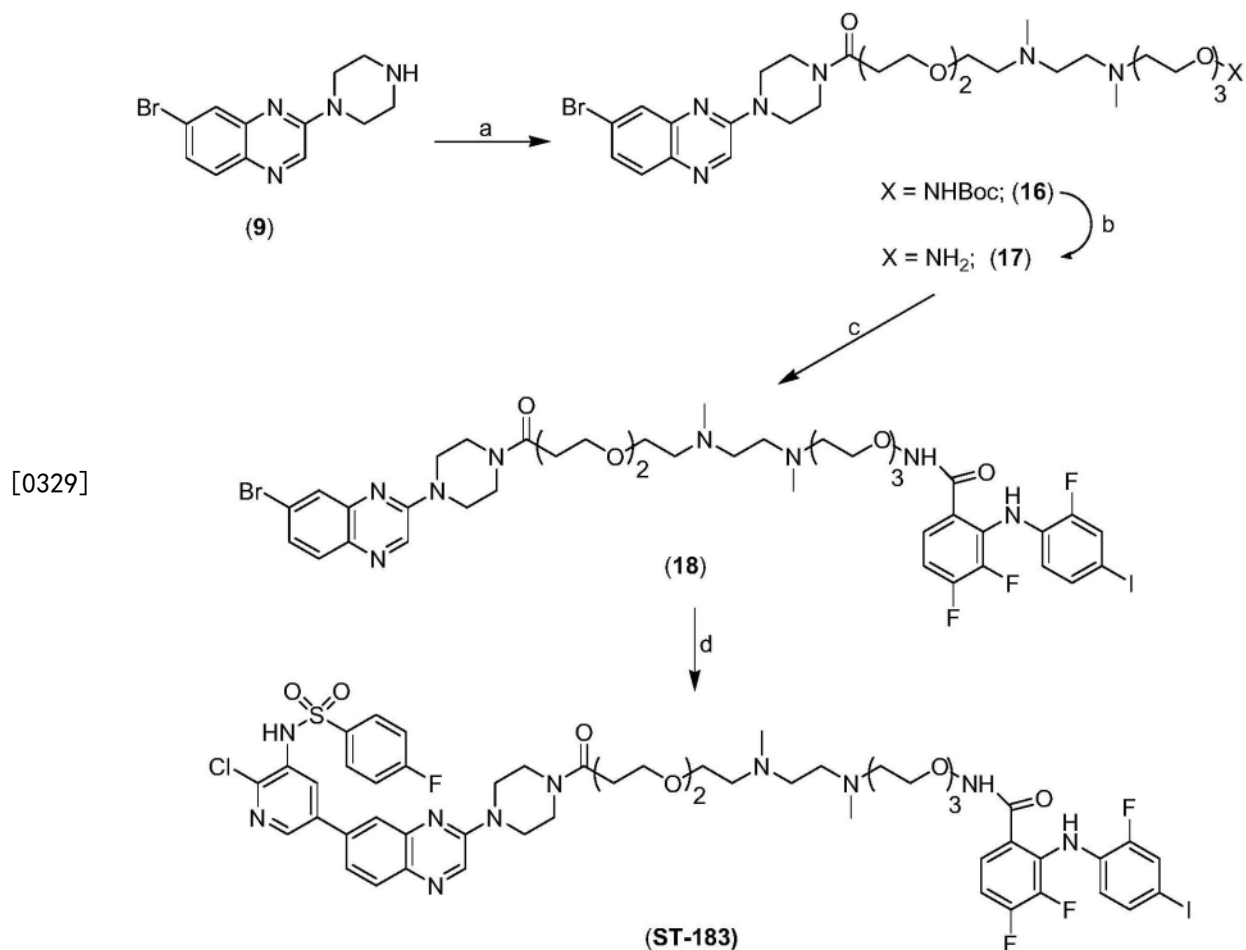
[0325] 合成ST-182



[0326]

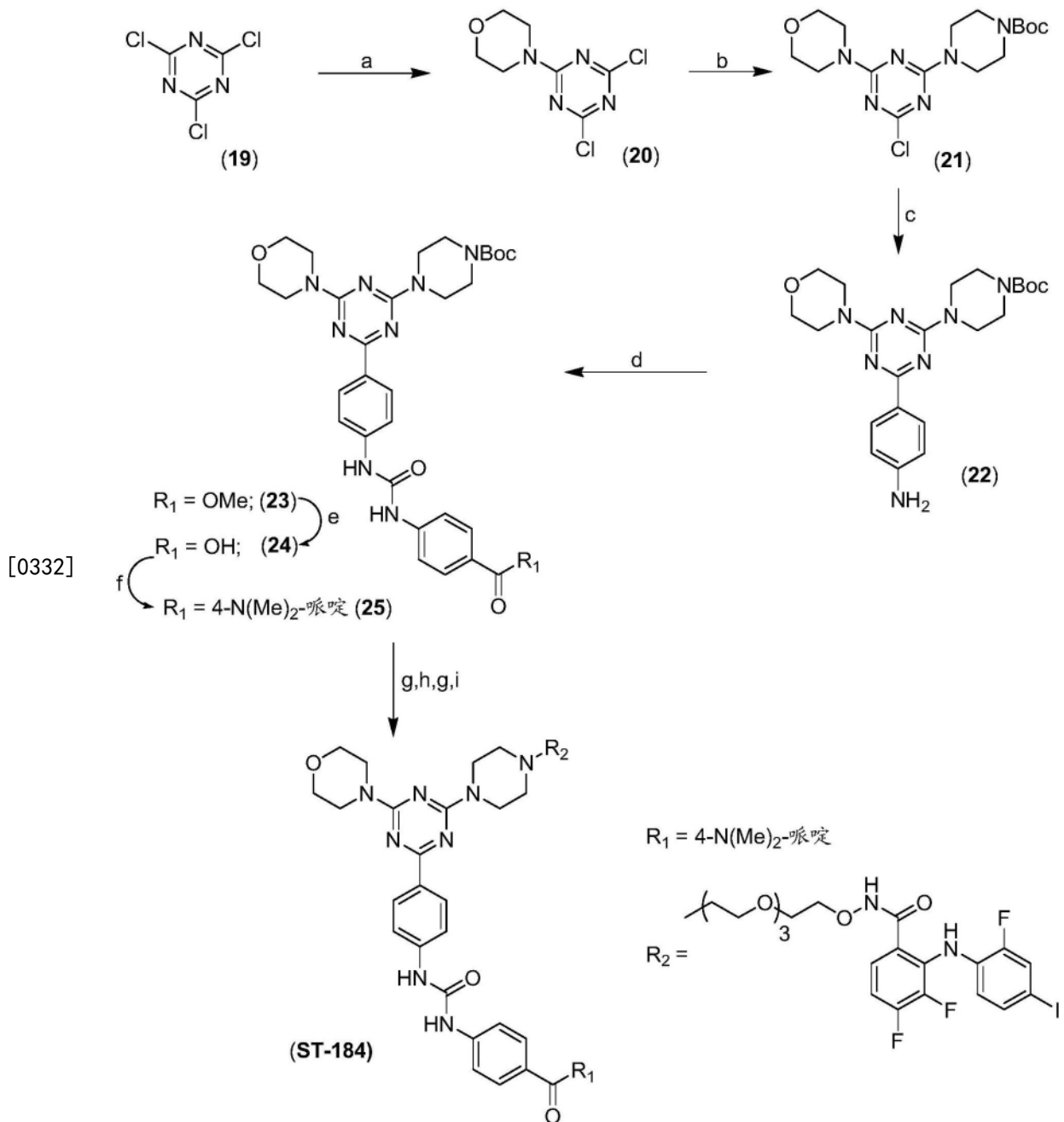
[0327] 试剂和条件: (a) BocNH(OCH₂CH₂)₄COOH, DIEA, PyBop, THF:DCM; (b) TFA, DCM, 0-5°C; (c) 3,4-二氟-2-(2-氟-4-碘苯基氨基)苯甲酸, DIEA, PyBop, THF:DCM; (d) 4, PdCl₂dppf, K₂CO₃, 二噁烷, H₂O, 90-100°C。

[0328] 合成ST-183



[0330] 试剂和条件: (a) BocNH(OCH₂CH₂)₃N(CH₃)CH₂CH₂N(CH₃)(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂COOH, PyBop, DIEA, THF:DCM; (b) TFA, DCM, 0-5 °C; (c) 3,4-二氟-2-(2-氟-4-碘苯基氨基)苯甲酸, DIEA, PyBop, THF:DCM; (d) 4, PdCl₂dppf, K₂CO₃, 二噁烷:H₂O, 90-100 °C。

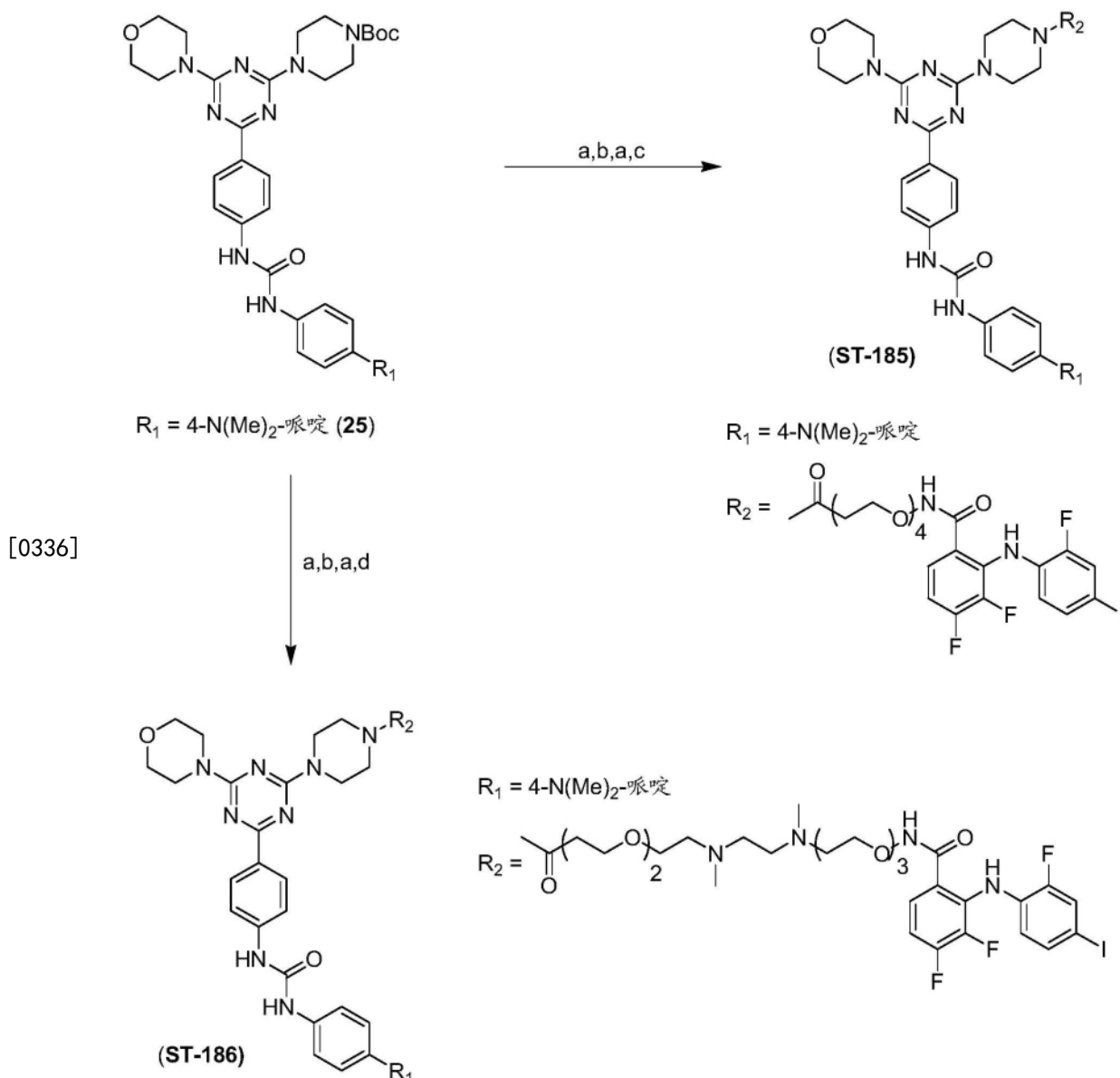
[0331] 合成ST-184



[0333] 试剂和条件: (a) 吗啉, DIEA, DCM, -78°C ; (b) N-Boc哌嗪, K_2CO_3 , DMF, 室温; (c) 4-氨基苯硼酸频哪醇酯, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, DME, $2\text{N Na}_2\text{CO}_3$, 回流; (d) 甲基-4-异氰酸基苯甲酸酯, DCM, 室温; (e) 5N NaOH , MeOH:THF, 70°C ; (f) 4-(N,N-二甲基氨基)哌啶, HOBT, EDCI, Et_3N , THF, 室温; (g) TFA, DCM, $0\text{-}5^\circ\text{C}$; (h) Tos-PEG₄NH(t-Boc), K_2CO_3 , 甲苯, 回流;

[0334] (i) 3,4-二氟-2-(2-氟-4-碘苯基氨基)苯甲酸, DIEA, PyBop, THF:DCM.

[0335] 合成ST-185和ST-186



[0337] 试剂和条件: (a) TFA, DCM, 0-5 °C; (b) BocNH(OCH₂CH₂)₄COOH, DIEA, PyBop, THF:DCM; (c) 3,4-二氟-2-(2-氟-4-碘苯基氨基)苯甲酸, DIEA, PyBop, THF:DCM; (d) BocNH(OCH₂CH₂)₃N(CH₃)CH₂CH₂N(CH₃)(CH₂CH₂O)₂CH₂CH₂COOH, DIEA, PyBop, THF:DCM.

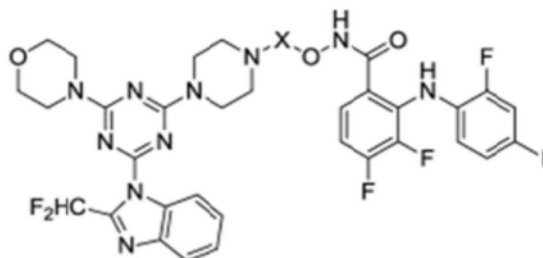
[0338] 生物学数据

[0339] 图1显示了化合物14在MEK1变构袋和PI3Ka处的对接结构。图1A显示了化合物14在MEK1 (PDB编码3WIG) 变构催化位点内的结合模式。化合物14的 PI3K部分脱出至溶剂(左)。图1B显示了化合物14与PI3K (PDB编码2WXK) 催化位点的结合模式。MEK1结合部分脱出至溶剂(左)。π-轨道堆叠相互作用显示为散列线 (hashed line), 氢键也显示为散列线。

[0340] MEK1和PI3K的SAR对双功能抑制剂类似物的抑制作用。抑制剂类似物的体外MEK1和PI3K抑制数据列于表1中。该系列中的所有类似物在低纳摩尔至亚纳摩尔范围内显示出显著高的MEK1抑制(0.015nM < IC₅₀ < 56.7nM)。由类似物9和14例示的高度观察到的MEK抑制可能是由于在抑制剂结构的接头部分中保留了有效的MEK1抑制剂PDO316684和5的关键氧脲酯侧链结构元素。这些系列抑制剂的相应PI3K抑制活性不太明显(54nM < IC₅₀ < 341nM),

化合物7在该系列中显示出最高的PI3K抑制 ($IC_{50}=54\text{nM}$)。与9相比,7的改善的PI3K抑制可能是由于其延长的接头链长度,尽管由于接头中的酰胺键引起的额外电子相互作用也可能起作用。由类似物9、11和14显示的相似的PI3K效力 ($191\text{nM}<IC_{50}<341\text{nM}$) 也表明哌嗪氮上的接头连接的性质在影响PI3K抑制中起次要作用。计算出的双功能抑制剂的亲脂性 (cLogP) 在4.84-5.71的范围内 (表1), 接近口服生物利用度的可接受阈值 (cLogP<5)。

[0341] 表1. 体外MEK1和PI3K酶抑制数据^a



[0342]

化合物	接头 (X)	cLogP	IC ₅₀ (nM) [#]	
			MEK1	PI3K
7	$-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_5\text{NHCOCH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$	4.84	0.50 ± 1.2	54 ± 25
9	$-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-(\text{CH}_2)_5\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$	5.58	0.019 ± 3.09	341 ± 56
11	$-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{S}}(\text{O})_2-(\text{CH}_2)_4\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$	5.48	56.7 ± 1.3	285 ± 36
14	$-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{CH}_2-$	5.71	0.015 ± 1.57	191 ± 64
5	n.a.	3.75	0.00715 ± 1.40	n.d.
PD0316684	n.a.	3.68	13.0 ± 1.6	n.d.
PD0325901	n.a.	2.85	15.0 ± 1.3	n.d.

[0343] ^a脚注如下。#结合数据是三个实验的平均值,每个实验重复两次。†cLogP数据是使用ChemDraw Professional (版本15.0.0.106) 获得的。

[0344] 细胞功效和活力研究。还在培养的肿瘤细胞 (D54、A549) 中评估了这些系列化合物的体外MEK1和PI3K抑制活性。通过pErk1/2和pAkt的磷酸化的变化分别测量抑制剂化合物对MEK1和PI3K抑制的细胞功效。图2显示化合物7、9、11 和14的体外活性,即通过蛋白质印迹分析从培养的A549肺肿瘤 (图2A) 和D54神经胶质瘤细胞 (图2B) 获得的蛋白质裂解物的体外靶向MAPK/ERK和PI3K/AKT途径的化合物的活性。将细胞在指定化合物存在下孵育1小时,并用针对pAKT和 pERK1/2的特异性抗体探测裂解物,并且与载剂对照 (DMSO) 比较。用指定浓度的抑制剂处理A549 (图2A) 和D54 (图2B) 细胞1小时,并进行蛋白质印迹分析。如图2A所示,在培养的A549细胞中,该系列中的所有化合物都显示出pERK1/2的磷酸化降低,证

明了这些化合物在抑制MEK1激酶的酶活性方面的有效功效。类似地,化合物7、9和14还显示出抑制PI3K活性的高效力,如处理的细胞样品中低水平的pAKT所示。值得注意的是,所有抑制剂类似物也显示出对两种细胞系中 MEK活性的显著抑制,这与体外抑制数据有很好的相关性(表1)。与化合物7和 11相比,用化合物9和14处理的细胞系中MEK和PI3K抑制最明显。

[0345] 使用AlamarBlue试验测定一系列新化合物对细胞活力的影响。在测定分析前 48 小时,用双功能抑制剂类似物(化合物7、9、11和14)、MEK1抑制剂(PD0325901)、PI3K抑制剂(ZSTK474),以及ZSTK474和PD0325901的组合处理A549和D54肿瘤细胞。图3显示了在(A) A549肺肿瘤细胞和(B) D54神经胶质瘤细胞中,由暴露于指定浓度的化合物7、9、11、14和PI3K抑制剂ZSTK474和MEK抑制剂 PD0325901后细胞活力的剂量依赖性定量化合物7、9、11和14的体外活性。在暴露后24小时测定存活肿瘤细胞的百分比。

[0346] 如图3A和图3B所示,所有抑制剂在A549(图3A)和D54(图3B)肿瘤细胞系中均产生剂量依赖性的细胞活力降低。具体地,在两种细胞系中,通过受损的细胞活力,化合物9和14类似于或在某些情况下超过单个单一疗法(例如PD0325901)的治疗效果。有趣的是,就两种细胞系(图3A,图3B)中细胞活力的丧失而言,发现化合物9和14与ZSTK474和PD0325901的组合同样有效。值得注意的是,发现化合物9和14具有显著的抗肿瘤活性,其与由与ZSTK474和PD0325901共孵育组成的组合疗法相似(图3A,图3B)。

[0347] 荷瘤小鼠中的体内MEK1和PI3K抑制活性。在体外抑制数据和细胞功效/活力研究的组合的基础上,使用化合物14用于进一步的体内评估。使用四只无胸腺裸Foxn1nu小鼠来评估体内致癌靶标调节活性。将携带侧腹D54(n=2)和A549(n=2)肿瘤的小鼠在处死前2小时通过口服管饲法用载剂或375Mg/kg化合物14处理。图4A和图4B显示荷瘤小鼠中的体内MEK1和PI3K抑制活性。将携带D54和A549皮下肿瘤的小鼠在处死前2小时通过口服管饲法用载剂或375Mg/kg化合物14处理。在图4A中,切除的肿瘤组织的蛋白质印迹分析显示化合物14相对于载剂对照成功调节了D54肿瘤中的MEK1和PI3K活性。在图4B中,切除的A549肿瘤组织的蛋白质印迹分析显示化合物14相对于载剂对照成功调节了A549肿瘤中的MEK1和PI3K活性。这些数据证明了化合物14在体内抑制实体瘤中 MEK1/PI3K激酶活性的体内生物利用度和功效,从而证实了可以实现使用单一化学实体双功能抑制剂(化合物14)同时体内抑制Ras/MEK/ERK和PI3K/Akt/mTor途径。切除的肿瘤组织的蛋白质印迹分析显示化合物14抑制两种肿瘤类型(图4A和图4B)中ERK1/2和Akt的磷酸化。此外,在使用化合物9的另一个初步实验中,对于A549和D54肿瘤,在小鼠肿瘤中也实现了ERK1/2和pAkt水平的调节(数据未显示)。总之,这些数据清楚地表明,通过双功能抑制剂化合物9和14,可以在体外和体内同时实现MEK1/PI3K活性的抑制。

[0348] 已经在许多人类癌症中证实了响应于生长因子刺激的Ras/MEK/ERK和 PI3K/Akt/mTor信号级联的上调。研究还表明,MEK抑制促进PI3K/Akt激酶活性的代偿性激活。因此,这两种信号传导途径的共靶向已被认为是有效癌症治疗中有前景的化学治疗策略。为了实现这一目标,通过ATP竞争性抑制剂ZSTK474的结构类似物与使用多种间隔基团的PD0325901所代表的ATP非竞争性类的 MEK抑制剂的共价连接,开发了一系列原型双功能MEK/PI3K抑制剂。所有抑制剂均表现出MEK1的纳摩尔至亚微摩尔抑制,以及体外酶抑制试验中的PI3K激酶活性,和A549肺腺癌和D54神经胶质瘤细胞系中的细胞活力的剂量依赖性降低。另外,所有抑制剂都证明在这两种细胞系中MEK1活性的显著抑制与证明体外抗癌活性相关。在口

服施用后化合物14在D54和A549荷瘤小鼠中进行的初步体内研究显示,在施用后2小时显著抑制MEK1和PI3K活性,从而证实体内对靶标调节的功效。据我们所知,这项工作首次证明了使用单一化学实体双功能抑制剂同时体内抑制Ras/MEK/ERK和PI3K/Akt/mTor途径。

[0349] 图5显示了在携带脑内D54神经胶质瘤小鼠中的体内MEK1和PI3K抑制活性。将携带脑内D54肿瘤的小鼠在处死前2小时通过口服管饲法用载剂或400Mg/kg的ST-162或ST-168处理。切除的肿瘤组织的蛋白质印迹分析显示,相对于载剂对照,两种化合物成功调节了脑内D54肿瘤中的MEK1和PI3K活性。这些数据证明了ST-162和ST-168在体内抑制实体瘤中MEK1/PI3K激酶活性的体内生物利用度和功效,从而证实了可以实现使用单一化学实体双功能抑制剂(化合物ST-162和ST-168)同时体内抑制Ras/MEK/ERK和PI3K/Akt/mTor途径。

[0350] 图6显示了小鼠皮下生长的黑素瘤肿瘤系A357和A2058中的体内MEK1和PI3K抑制活性。将携带皮下黑素瘤肿瘤的小鼠在处死前2小时通过口服管饲法用载剂或400Mg/kg的ST-162或ST-168处理。切除的肿瘤组织的蛋白质印迹分析显示,相对于载剂对照,两种化合物成功地调节了这些人黑素瘤肿瘤中的MEK1和PI3K活性。这些数据证明了ST-162和ST-168在体内抑制实体瘤中MEK1/PI3K激酶活性的体内生物利用度和功效,从而证实了可以使用单一化学实体双功能抑制剂(化合物ST-162和ST-168)实现同时体内抑制Ras/MEK/ERK和PI3K/Akt/mTor途径。

[0351] 图7显示了小鼠皮下生长的结肠癌肿瘤系CT26中的体内MEK1和PI3K抑制活性。将携带皮下结肠肿瘤的小鼠在处死前2小时通过口服管饲法用载剂或400Mg/kg的ST-162或ST-168处理。在该研究中还评估了已知的MEK抑制剂901和PI3K抑制剂。切除的肿瘤组织的蛋白质印迹分析显示,相对于载剂对照,ST-162和ST-168成功调节了该人结肠肿瘤模型中的MEK1和PI3K活性。这些数据证明了ST-162和ST-168在体内抑制实体结肠肿瘤中MEK1/PI3K激酶活性的体内生物利用度和功效,从而证实了可以使用单一化学实体双功能抑制剂(ST-162和ST-168)实现同时体内抑制Ras/MEK/ERK和PI3K/Akt/mTor途径。

[0352] 在初步研究中,使用口服施用ST-162测试了几种小鼠模型的治疗功效。无胸腺裸Foxn1nu小鼠用于评估体内致癌靶标调节活性。将携带脑内D54肿瘤、皮下结肠肿瘤(CT26)和皮下黑素瘤(A375和A2058)肿瘤的小鼠通过口服管饲法用载剂对照或400Mg/kg的化合物ST-162处理14-30天以上。所有研究均显示,可以实现显著的肿瘤生长延迟(CT26、A375和A2058)或改善动物存活(D54)。

[0353] 图8是使用化合物ST-162的研究,当脑内肿瘤达到约20微升的体积(通过MRI测量)时开始施用,与载剂对照动物相比,发现总体存活率显著改善($P=.0054$)。该数据清楚地证明,在脑内人D54神经胶质瘤肿瘤中,双功能抑制剂ST-162可在体内同时抑制MEK1/PI3K活性。

[0354] 在图9中,当皮下黑素瘤肿瘤A2058和A357可通过卡尺和MRI测量时,开始施用化合物ST-162,14天,并且随时间流逝测量肿瘤体积并与载剂对照进行比较。与载剂对照动物相比,在ST-162处理的动物中观察到两种黑素瘤肿瘤模型的肿瘤生长显著减少。该数据清楚地证明,由于在人黑素瘤肿瘤中用双功能抑制剂ST-162的处理,同时抑制MEK1/PI3K活性可影响体内生长速率。

[0355] 在图10中,当皮下结肠肿瘤CT-26可通过卡尺和MRI测量时,开始施用化合物ST-162,14天,并且随时间流逝测量肿瘤体积并与载剂对照进行比较。与载剂对照动物相比,在

MV4-162 (化合物14) 处理的动物中观察到CT-26肿瘤的肿瘤生长显著减少。该数据清楚地证明, 由于在人结肠肿瘤中用双功能抑制剂ST-162 的处理, 同时抑制MEK1/PI3K活性可影响体内生长速率。

[0356] 在图11中, 在皮下结肠肿瘤CT-26可通过卡尺和MRI测量时, 开始施用ST-162, 14天, 并且随时间流逝测量肿瘤体积并与载剂对照进行比较。在第14天, 取出两个肿瘤并比较大小和重量。如图所示, 载剂对照肿瘤显著大于从用ST-162处理14天的小鼠获得的肿瘤。该数据表明, 由于用人结肠肿瘤中的双功能抑制剂ST-162 的处理, 同时抑制MEK1/PI3K活性可影响体内肿瘤体积, 因为处理过的肿瘤体积小于载剂对照处理的肿瘤。

[0357] 体外MEK1抑制试验。使用来自Promega (WI, USA) 的Kinase-Glo发光激酶测定试剂盒, 按照制造商的说明书测定抑制剂类似物的体外MEK1抑制活性。纯化的MEK1和无活性的Erk2分别购自Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 和Carna Biosciences (Kobe, Japan)。简言之, 将一系列化合物稀释液加入96孔板中, 然后加入MEK1、Erk2和ATP溶液。激酶反应在30°C下进行30分钟。然后加入等体积的Kinase-Glo溶液, 并将反应物在室温下再孵育30分钟。用PerkinElmer的 Envision多标签读取器获得生物发光信号。重复三次进行测定, 各种抑制剂浓度各自重复两次进行。使用Graph Pad Prism软件 (版本5.0, La Jolla, CA) 计算IC₅₀数据。

[0358] 体外PI3K抑制试验。使用基于荧光的Adapta TR-FRET测定方案, 通过Life Technologies (Madison, WI) 和纯化酶进行PI3K脂质激酶活性的定量。用各种抑制剂浓度 (0.1nM至10μM) 重复三次进行测定。

[0359] 双功能抑制剂类似物的虚拟对接模型。使用来自Schrodinger Inc. 的软件获得双功能抑制剂类似物的对接模型。使用Maestro (Protein Preparation Wizard, Schrodinger, LLC, New York, NY) 中的蛋白质制备Wizard制备MEK1 (PDB编码 3WIG) 和PI3K (PDB编码2WXK) 的X射线晶体结构。然后使用OPLS2005将蛋白质结构用于产生用于对接的受体网格, 其中结合位点由天然配体限定。使用LigPrep 3.4 (LigPrep, Schrodinger, LLC, New York, NY) 构建并制备双功能抑制剂配体, 用于在Maestro中对接。使用Glide 6.7在标准精度模式下在默认参数并且没有约束的情况下执行对接程序 (23)。

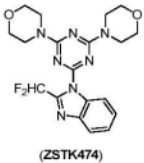
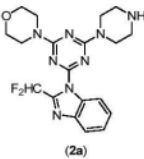
[0360] 细胞培养和细胞死亡检测。人肺腺癌上皮细胞系A549和神经胶质瘤细胞系 D54在补充有10%热灭活的胎牛血清 (FBS) 和1%青霉素/链霉素/谷氨酰胺 (Gibco, Carlsbad, CA) 的RPMI中生长。细胞在37°C的潮湿培养箱中生长, 供应5%的CO₂。使用细胞活力测定完成抑制剂化合物的治疗效果的初始测试。在DMSO中制备抑制剂化合物 (10mM)、ZSTK474 (代表性PI3K抑制剂)、PD0325901 (代表性MEK抑制剂) 的储备溶液, 并通过在RPMI培养基中连续稀释用于制备最终溶液。向对照孔中加入含有1%的DMSO载体溶剂的培养基。48小时后根据制造商的说明书使用AlamarBlue试验 (Life Technologies, Carlsbad, CA) 测定细胞活力。用PerkinElmer EnVision Xcite多标记读取器 (PerkinElmer, Waltham, MA) 测定荧光信号。

[0361] 蛋白质印迹分析。在处理前24小时将细胞接种在六孔培养皿中, 并与各自的抑制剂化合物溶液一起孵育1小时。用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤细胞, 并用补充有蛋白酶抑制剂 (完全蛋白酶抑制剂混合物, Roche, Basel, Switzerland) 和磷酸酶抑制剂 (PhosSTOP, Roche, Basel, Switzerland) 的NP-40裂解缓冲液 (1%NP₄₀, 150 mM NaCl, 和25mM Tris, pH 8.0) 裂解。使用Lowry试验 (Bio-Rad, Hercules, CA) 测定蛋白质浓度, 并在每个泳道中加载

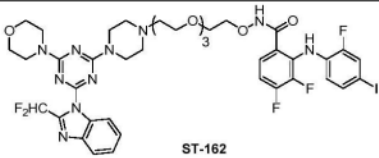
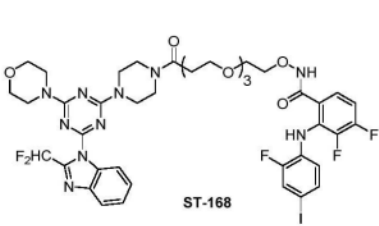
等量的全细胞蛋白质裂解物,并使用4-12%梯度Bis-Tris凝胶(Invitrogen,CA)拆分。将蛋白质转移至0.2 μ m硝酸纤维素膜(Invitrogen,CA)。在封闭后,将膜在4 $^{\circ}$ C下与一抗孵育过夜,然后在室温下与合适的辣根过氧化物酶(HRP)偶联的二抗一起温育1小时。根据制造商的方案(Amersham Pharmacia,Uppsala,Sweden),使用ECL-加检测过氧化物酶的活性。针对磷酸化p44/42MAPK(Erk1/2)(Thr202/Tyr204)、pAKT(S473)、磷酸化p70S6K*和总ERK、AKT抗体产生的抗体购自Cell Signaling Technology(Beverly,MA,USA)。抗- β 肌动蛋白(与HRP缀合)购自Abeam(Cambridge,MA,USA)。二级HRP抗体购自Jackson ImmunoResearch(St.Louis,MO,USA)。

[0362] 体内评估抑制剂功效。所有动物实验均由密歇根大学动物使用和护理大学委员会(UCUCA)批准。将5周龄的无胸腺裸Foxn1nu小鼠皮下接种,将 1×10^6 个完全悬浮的D54细胞注入两只小鼠的侧腹,并且同样地,将另外两只小鼠在侧腹接种A549细胞。每个注射液含有总体积为200 μ L的细胞悬浮液,在50%RPMI培养基中与50%BD Matrigel基底膜基质(Becton,Dickinson and Company,East Rutherford,NJ)混合。当通过卡尺测量肿瘤体积达到约150mm³时,将小鼠剥夺食物2-4小时,然后在处死前2小时口服施用载剂(200 μ L的DMSO:HPBCD(3:2))或抑制剂类似物ST-162(375mg/kg于200 μ L DMSO/HPBCD(3:2)中)。从载剂和药物处理组收集肿瘤组织,并如前所述进行蛋白质印迹分析。

[0363] PI3K亚型抑制活性(nM)⁺

抑制剂	PI3K α	PI3K β	PI3K γ	PI3K δ
 <p>(ZSTK474)</p>	5.0 \pm 0.8	15.2 \pm 1.4	20.8 \pm 0.6	3.9 \pm 0.6
 <p>(2a)</p>	180 \pm 25	1093 \pm 168	1873 \pm 283	142 \pm 7.5

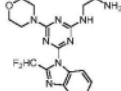
[0364]

	 <p>ST-162</p>	467 ± 9.0	4073 ± 290	5803 ± 511	942 ± 120
[0365]	 <p>ST-168</p>	69.2 ± 2.2	1482 ± 377	2293 ± 241	41.7 ± 2.1

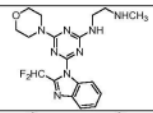
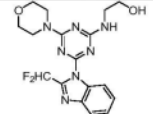
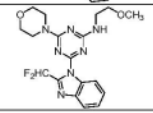

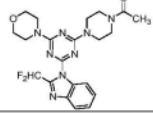
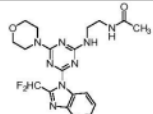
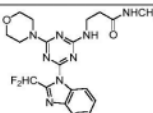
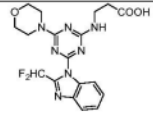
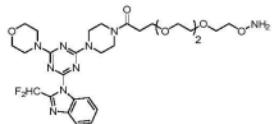
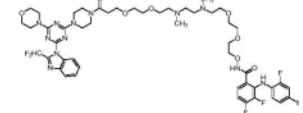
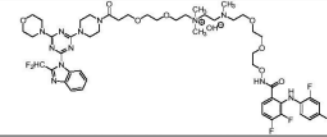
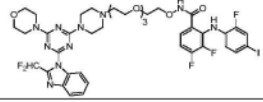
[0366] ⁺数据报告为平均值±平均值的标准误差 (SEM)

[0367] 也公开了通过PI3K抑制剂mTOR抑制剂和MEK抑制剂的结构类似物的共价连接实现的另一系列单一实体多功能抑制剂的合成。在酶抑制试验中,多功能抑制剂显示出对MEK1 (182<IC₅₀ (nM) <398)、PI3K (39<IC₅₀ (nM) <191和mTOR (50.4<IC₅₀ (nM) <53.1) 的有效体外抑制。化合物ST-162、ST-168和ST-180在肿瘤细胞系 (A375 (黑素瘤)、D54 (神经胶质瘤)、CT26 结肠直肠癌)、A2058 (黑素瘤)) 中证实了同时抑制作用。抑制剂产生剂量依赖性降低的细胞活力,类似于ZSTK474 (PI3K抑制) 和PD0325901 (MEK抑制剂) 的联合施用。通过蛋白质印迹分析,从在侧翼中携带实体瘤的小鼠收集的A375肿瘤组织获得的数据表明,在口服施用ST-168后2小时,实现了mTOR/MEK1/PI3K的联合抑制,从而证实了ST-168多功能抑制剂策略的生物利用度和功效。在携带A375黑素瘤肿瘤的小鼠中,在每日 40次口服剂量的ST-168 (400Mg/kg) 后,化合物ST-168的体内功效得到证实。在该研究中,在治疗开始后35天,ST-168显示肿瘤大小比载剂对照给药动物显著降低> 6倍。在用ST-168处理的这些携带A375肿瘤的小鼠中也观察到显著增加的寿命,由于长期药物剂量,没有可检测的副作用 (比如体重减轻)。

[0368] PI3K亚型酶抑制数据

IC ₅₀ (nM)					
[0369] 化合物	结构	PI3K α	PI3K β	PI3K γ	PI3K δ
ST-177		292 ± 31	2117 ± 444	771 ± 63	291 ± 32

[0370]

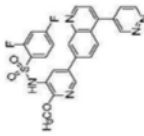
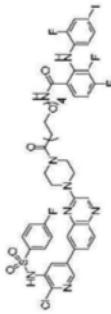
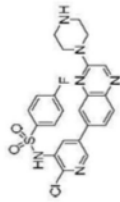
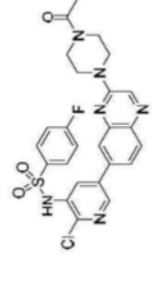
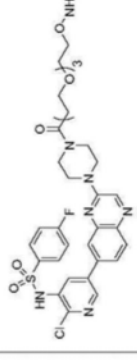
ST-5-02		248 ± 24	2900 ± 375	681 ± 90	135 ± 19
ST-187		9.9 ± 1.2	71 ± 8	54 ± 1	8.1 ± 1.7
ST-178		20 ± 3	208 ± 15	64 ± 5	17 ± 1
ZSTK474		5.0 ± 0.8	15.2 ± 1.4	20.8 ± 0.6	3.9 ± 0.6
ST-5-03		8.2 ± 0.7	14.3 ± 2.5	21 ± 1	2.9 ± 0.6
ST-5-22		16.6 ± 1.4	199 ± 12	54 ± 1.5	9.5 ± 2.4
ST-5-21		20 ± 0.4	431 ± 83	67 ± 2.8	26 ± 4.9
ST-5-25		12.4 ± 0.7	787 ± 106	22.3 ± 0.7	60 ± 3.4
ST-167		11.5 ± 0.1	214 ± 49	140 ± 6.6	1.3 ± 0.2
ST-180		39 ± 9	2215 ± 425	717 ± 136	52 ± 1.4
ST-5-05		39 ± 2	2517 ± 557	2590 ± 660	56 ± 13
ST-162		191 ± 64	4073 ± 290	5803 ± 511	942 ± 120

[0371]

ST-168		69.2 ± 2.2	1482 ± 377	2293 ± 241	41.7 ± 2.1
---------------	--	------------	------------	------------	------------

[0372]

ST-182和中间体的mTOR和PI3K亚型抑制数据
IC50 (nM)

化合物	结构	mTOR	PI3K α	PI3K β	PI3K γ	PI3K δ
GSK 458		4.2 ± 0.1 (0.18/0.3)	< 0.495 (0.02)	1.2 ± 0.2 (0.13)	0.83 ± 0.1 (0.06)	< 0.495 (0.02)
ST-182		53.1 ± 2.5	2.0 ± 0.3	467 ± 44	34.1 ± 3.0	4.22 ± 0.64
ST-5-27		5.97 ± 0.27	< 0.495	4.77 ± 0.92	5.14 ± 0.23	0.83 ± 0.06
ST-5-28		3.13 ± 0.14	< 0.495	5.36 ± 1.10	0.71 ± 0.20	< 0.495
ST-5-29		6.77 ± 0.43	< 0.495	30.2 ± 0.59	1.33 ± 0.14	< 0.495

[0373] 体内评估抑制剂功效。将5周龄的无胸腺裸Foxn1nu小鼠皮下接种,将 1×10^6 个完全悬浮的D54细胞注入两只小鼠的侧腹中,并且类似地,另外两只小鼠在侧腹接种A549细胞。每个注射液含有总体积为200 μ L的细胞悬浮液,在50%的RPMI 培养基中与50%的BD Matrigel基底膜基质 (Becton,Dickinson and Company,East Rutherford,NJ) 混合。当通过卡尺测量肿瘤体积达到约150mm³时,将小鼠剥夺食物2-4小时,然后在处死前2小时口服施用载剂 (200 μ L的DMSO:HPBCD (3:2)) 或抑制剂类似物 (14) (375mg/kg于200 μ L的DMSO/HPBCD (3:2) 中)。从载剂和药物处理组收集肿瘤组织,并如前所述进行蛋白质印迹分析。

[0374] 参考文献

[0375] 1.AT Baines et al.,Future Med Chem.2011;3(14):1787-808.

[0376] 2.A Jemal et al.,CA Cancer J Clin.2010;60(5):277-300.

[0377] 3.JS Sebolt-Leopold et al.,Nat Rev Cancer.2004;4(12):937-47.

[0378] 4.E Castellano et al.,Genes Cancer.2011;2(3):261-74.

[0379] 5.JS Sebolt-Leopold Clin Cancer Res.2008;14(12):3651-6.

- [0380] 6.C Montagut et al.,Cancer Lett.2009;283 (2) :125-34.
- [0381] 7.JA McCubrey et al.,Expert Opin Emerg Drugs.2009;14 (4) :633-48.
- [0382] 8.FA Karreth et al.Mol Cell.2009;36 (3) :477-86.
- [0383] 9.PI Poulikakos et al.Nature.2010;464 (7287) :427-30.
- [0384] 10.G Hatzivassiliou et al.,Nature.2010;464 (7287) :431-5.
- [0385] 11.S Wee et al.,Cancer Res.2009;69 (10) :4286-93.
- [0386] 12.PM Lorusso et al.,J Clin Oncol.2005;23 (23) :5281-93.
- [0387] 13.JR Infante et al.,Lancet Oncol.2012;13 (8) :773-81.
- [0388] 14.JA Engelman et al.,Nat Med.2008;14 (12) :1351-6.
- [0389] 15.K Yu et al.,Cancer Biol Ther.2008;7 (2) :307-15.
- [0390] 16.OK Mirzoeva et al.,Cancer Res.2009;69 (2) :565-72.
- [0391] 17.A Carracedo et al.,J Clin Invest.2008;118 (9) :3065-74.
- [0392] 18.ML Sos et al.,Proc Natl Acad Sci U S A.2009;106 (43) :18351-6.
- [0393] 19.T Shimizu et al.,Clin Cancer Res.2012;18 (8) :2316-25.
- [0394] 20.CL Sawyers,J Clin Oncol.2002;20 (17) :3568-9.
- [0395] 21.KB Kim et al.,2013.J Clin Oncol.2012;31 (4) :482-9.
- [0396] 22.GS Falchook,et al.,Lancet Oncol.2012;13 (8) :782-9.
- [0397] 23.S Bagrodia et al.,Pigment Cell Melanoma Res.2012;25 (6) :819-31.
- [0398] 24.ME Van Dort et al.,Bioorg.Med.Chem.2015;23:1386-1394.
- [0399] 25.WO 2002/006213A2.
- [0400] 26.EP0629617A1.
- [0401] 27.S Singh et al.,FASEB J.2014;28 (1) :85-93.
- [0402] 28.L Rand et al.,J.Immunol.2009;182:5865-5872.
- [0403] 29.JA Engelman et al.,Nat.Rev.Genet.2006;7:606-619.
- [0404] 30.P Liu et al.,Nat.Rev.Drug Discov.2009;8:627-644.
- [0405] 31.Y Liu et al.,Cell Mol Immunol.2015;58.
- [0406] 32.JE Cho et al.,Mol.Cells 2010;29,35-39.
- [0407] 33.RA Fratti et al.,J.Cell Biol.2001;154,631-644.
- [0408] 34.C Kuijl et al.,Nature 2007;450,725-730.
- [0409] 35.G Huang et al.,J.Biol.Chem.2012;287,23196-2202.
- [0410] 36.H Matsuoka et al.,Exp Cell Res.2009;315 (12) :2022-32.
- [0411] 37.SS Liao et al.,Cancer Res.,2006;66:1613-11622.
- [0412] 38.GW Cole Jr et al.,Anticancer Res.,2006;26:809-821.
- [0413] 39.MR Girotti et al.,Cancer Discov 2013;3:158-67.
- [0414] 40.Y Shao et al.,Cell Death Differ 2012;19:2029-39.
- [0415] 41.EB Pasquale et al.,Nat Rev Cancer 2010;10:165-80.
- [0416] 42.KS Smalley,Mol Cell Oncol.2015;2 (4) :e1008291.

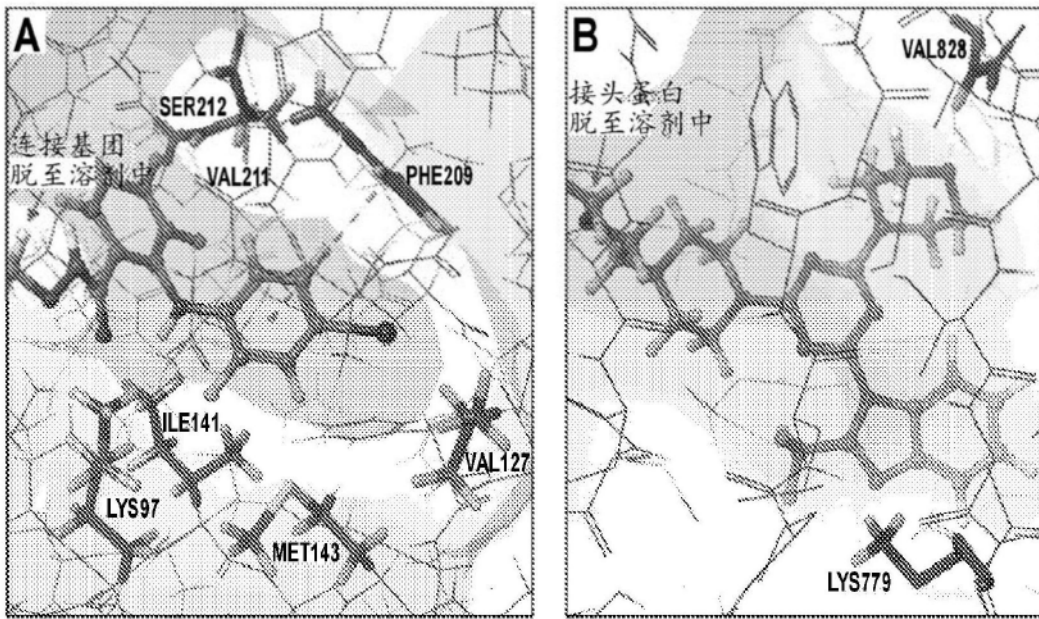


图1

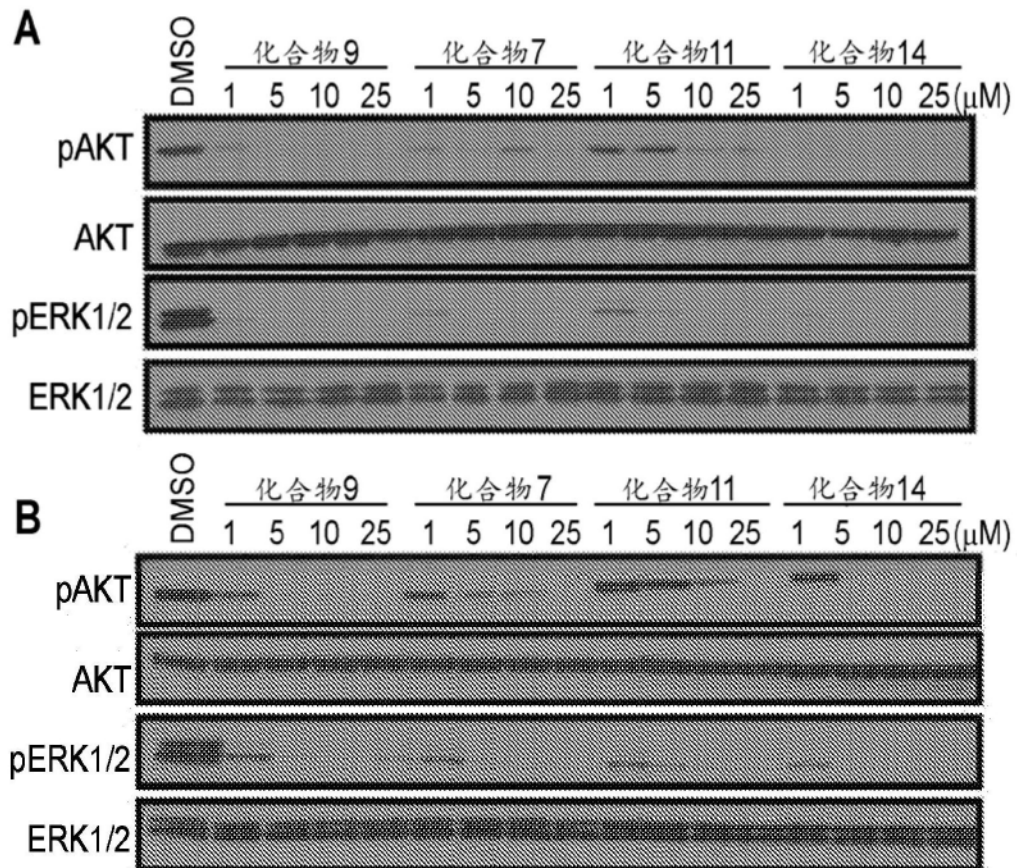


图2

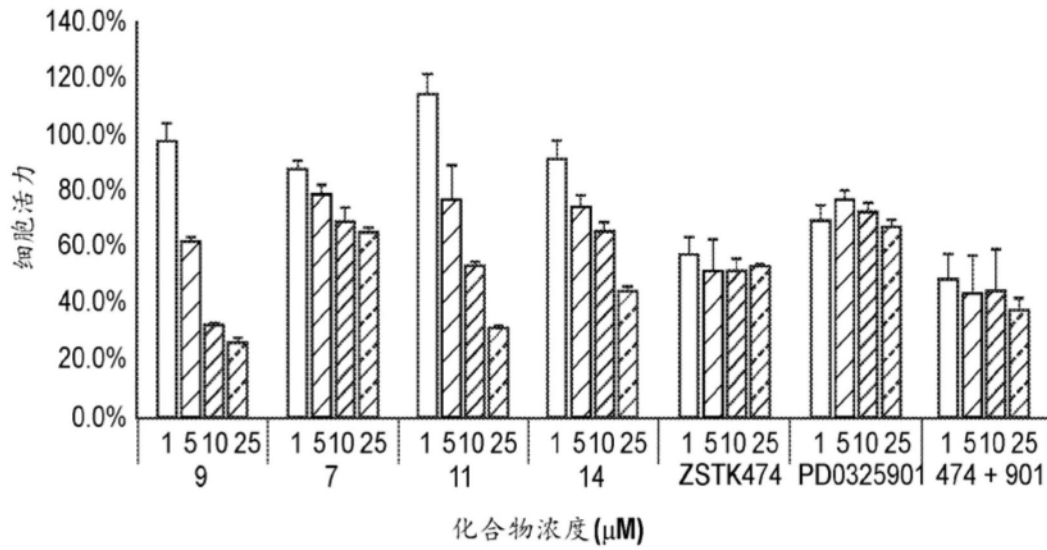


图3A

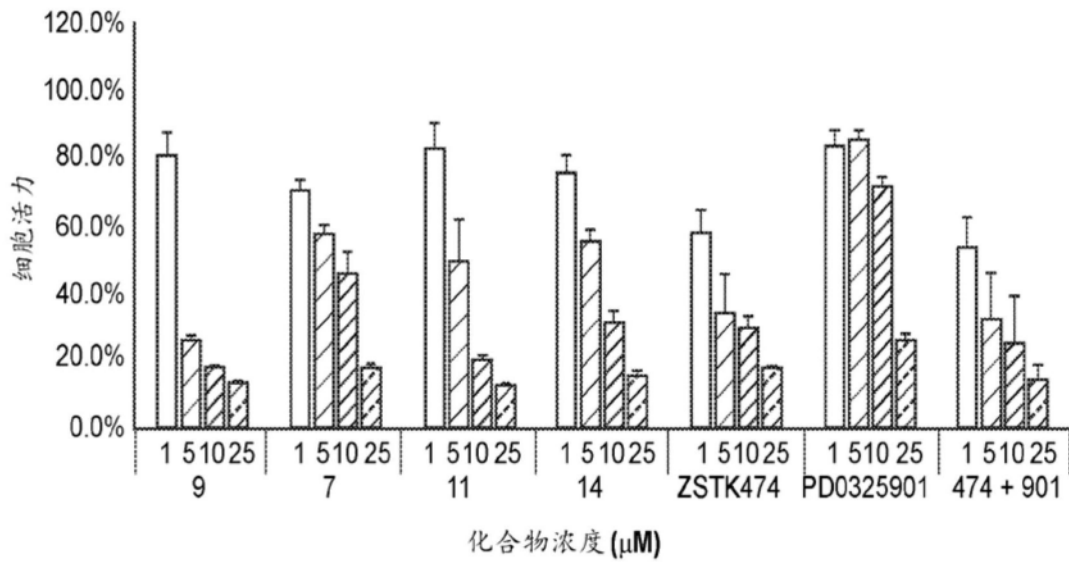


图3B

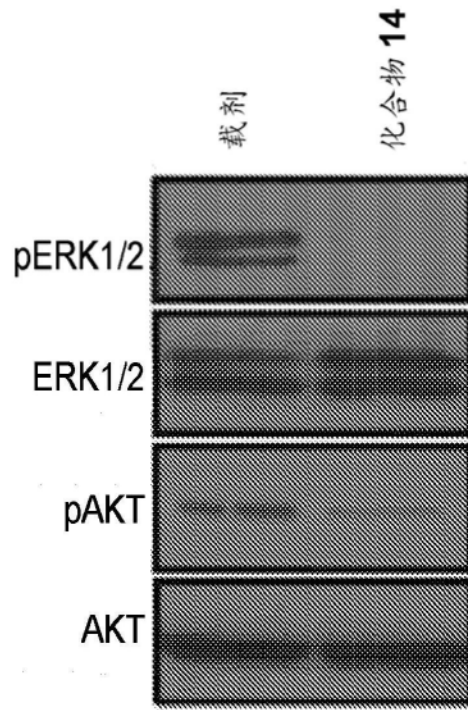


图4A

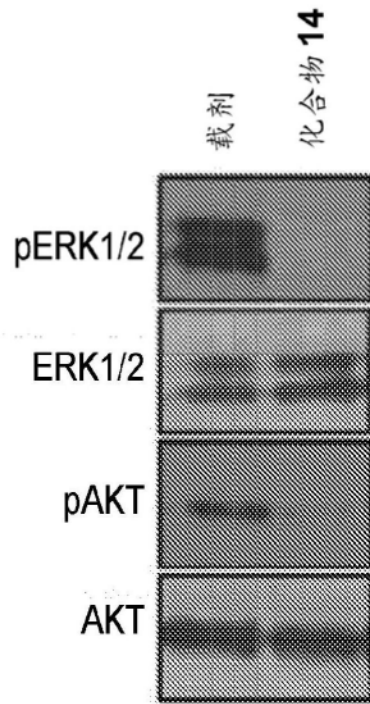


图4B

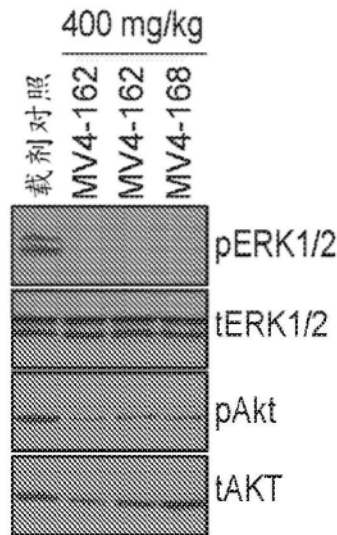


图5

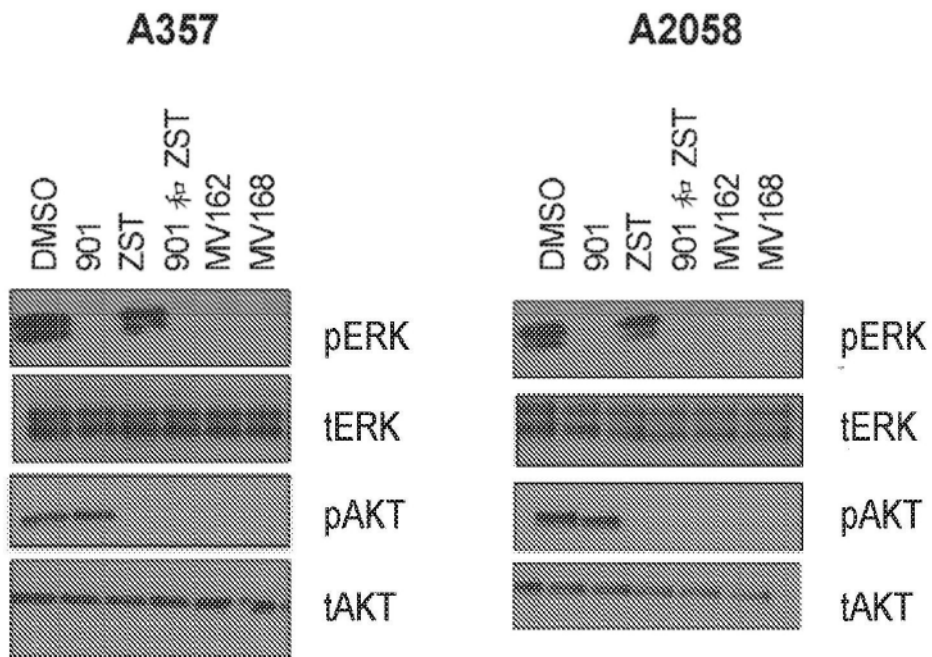


图6

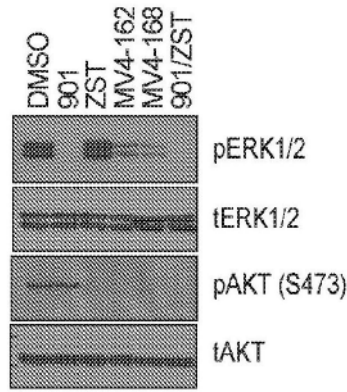


图7

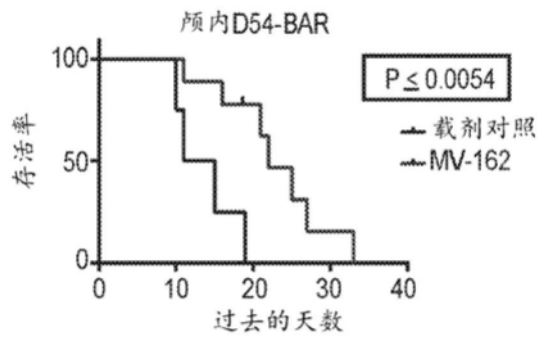


图8

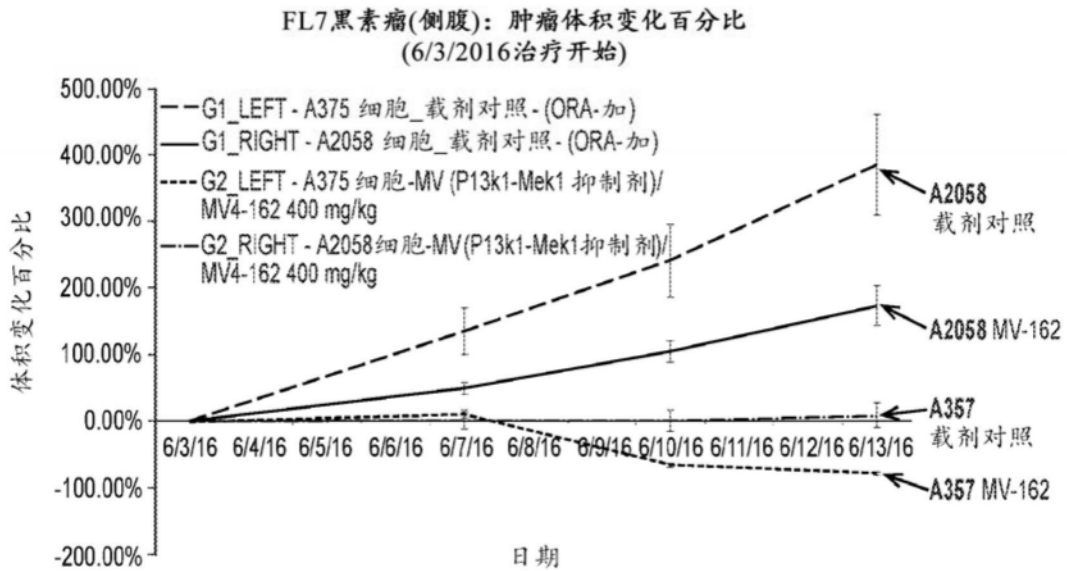


图9

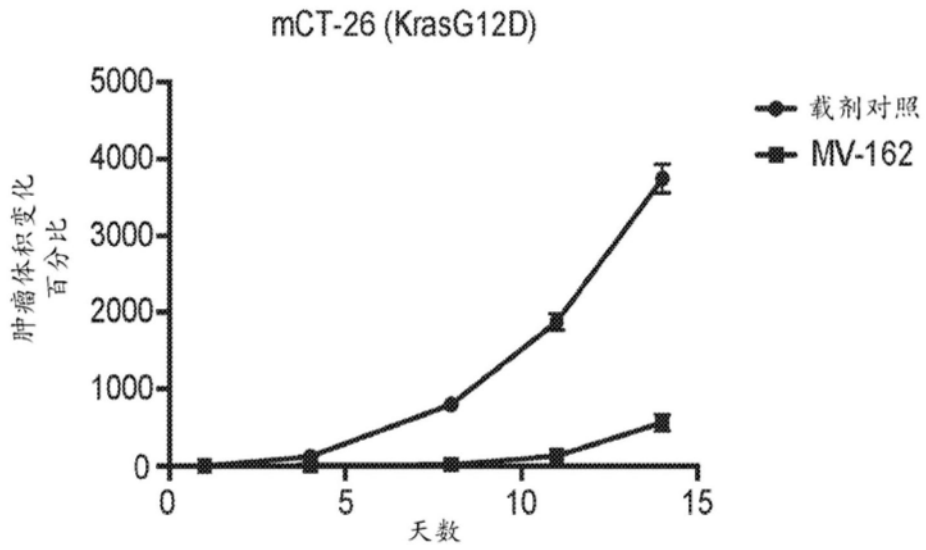


图10

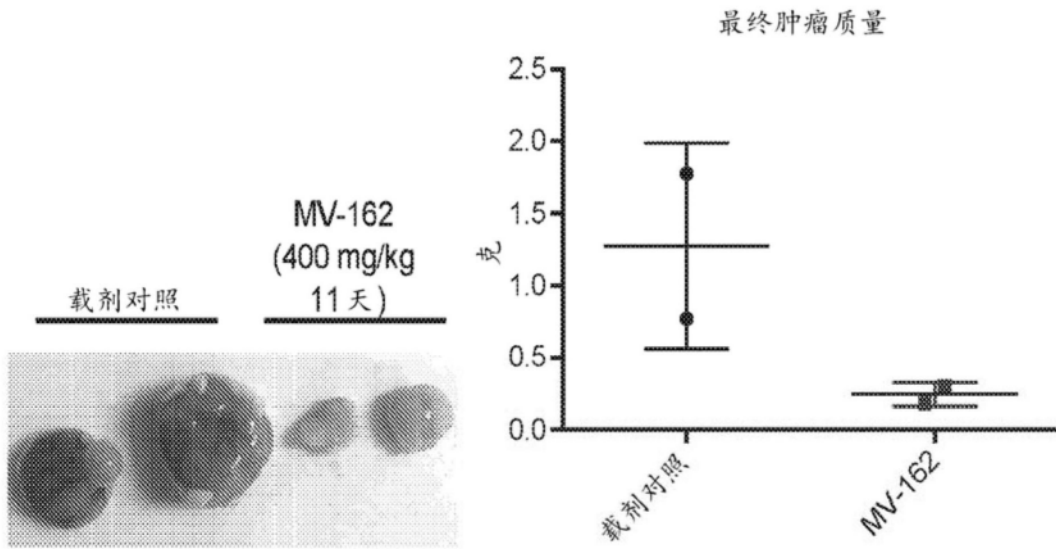


图11