



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107074778 B

(45)授权公告日 2019.12.13

(21)申请号 201580030300.7

(72)发明人 李红雨 B·弗莱特 M·桑托罗

(22)申请日 2015.06.03

F·卡尔罗马格诺

(65)同一申请的已公布的文献号

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

申请公布号 CN 107074778 A

利商标事务所 11038

(43)申请公布日 2017.08.18

代理人 李华英

(30)优先权数据

(51)Int.Cl.

62/007,321 2014.06.03 US

C07D 235/06(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

(56)对比文件

2016.12.02

CN 101198607 A, 2008.06.11,

(86)PCT国际申请的申请数据

CN 101128461 A, 2008.02.20,

PCT/US2015/033962 2015.06.03

US 2012/0135953 A1, 2012.05.31,

(87)PCT国际申请的公布数据

CN 102741241 A, 2012.10.17,

W02015/187818 EN 2015.12.10

Dionisios Vourloumis et al.. Solid-phase synthesis of benzimidazole libraries biased for RNA targets.
《Tetrahedron Letters》.2003, 第44卷第2807-2811页.

(73)专利权人 代表亚利桑那大学的亚利桑那校董会

审查员 徐永幸

地址 美国亚利桑那

权利要求书1页 说明书43页 附图9页

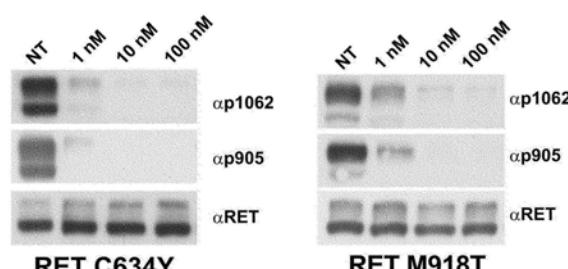
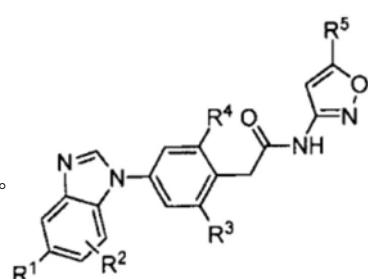
专利权人 菲德里柯二世大学

(54)发明名称

苯并咪唑类似物和相关方法

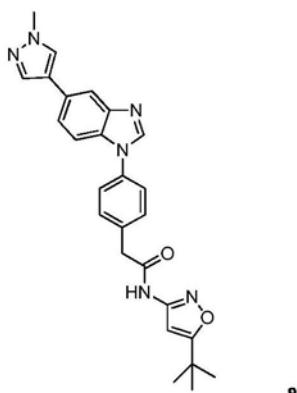
(57)摘要

本发明涉及式(VIII)的化合物及其盐,其中基团R₁、R₂、R₃、R₄和R₅如本说明书中所定义,本发明还涉及所述化合物的用途、其使用方法、其合成方法等。所述化合物为蛋白质酪氨酸激酶抑制剂并且可以用于治疗各种癌症疾病和与癌症相关的疼痛。



式 VIII

1. 下列化合物或其药学上可接受的盐,所述化合物为N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺,其结构如下所示:



2. 药物组合物,包含:

权利要求1的化合物或其药学上可接受的盐;和
药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

3. 权利要求1的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于治疗癌症的药物中的用途。
4. 权利要求3的用途,其中所述药物用于与任意另一种抗癌药组合施用。
5. 权利要求3的用途,其中所述癌症选自甲状腺癌、肺癌或乳腺癌。
6. 权利要求1的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于抑制RET磷酸化的制剂中的用途,其中所述制剂用于处理表达RET基因的细胞。
7. 权利要求1的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于抑制VEGFR2/KDR磷酸化的制剂中的用途,其中所述制剂用于处理表达VEGFR蛋白质的细胞。
8. 权利要求1的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于抑制甲状腺癌细胞增殖的制剂中的用途,其中所述制剂用于处理甲状腺癌细胞。
9. 权利要求8的用途,其中甲状腺癌细胞包含MTC。
10. 权利要求1的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于抑制酪氨酸激酶活性的制剂中的用途,其中所述制剂用于处理细胞。
11. 权利要求10的用途,其中所述酪氨酸激酶选自RET、Trk-A、Trk-B、Trk-C、FLT3-ITD、c-Kit、VEGFR和PDGFR。
12. 权利要求10的用途,其中所述化合物显示出具有IC₅₀值<1μM的对激酶结构域的抑制活性。
13. 权利要求1的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于治疗与癌症相关的疼痛的药物中的用途。

14. 用于制备药物组合物的药盒,包含:

包含权利要求1的化合物的第一个容器;和
包含药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂的第二个容器。

苯并咪唑类似物和相关方法

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本发明要求2014年6月3日提交的美国临时专利申请号US62/007,321的优先权,将该文献的公开内容并入本文参考。

[0003] 发明背景

[0004] 蛋白激酶(PKs)是催化细胞蛋白质中特定丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸磷酸化的酶。这些底物蛋白质的翻译后修饰作为分子开关起作用,所述分子开关在各种生物过程中起关键作用,例如控制细胞生长、代谢、肿瘤微环境(例如VEGFR)、分化和凋亡。已经在几种疾病状态中观察到异常、过度或更一般地是不适合的PK活性,包括恶性增殖性疾患,例如髓质甲状腺癌(MTC)和其它人体恶性肿瘤的功能突变、急性髓性白血病(AML)的F1t3中的ITD(内衔接重复)-突变、胃肠道间质肿瘤(GIST)的c-Kit突变和慢性髓性白血病(CML)的Bcr-abl重排的RET获得。此外,酪氨酸激酶(例如Trk-A、Trk-B、Trk-C和RET)的活化和/或超表达与癌症患者、尤其是胰腺癌患者中的严重性疼痛相关。许多酪氨酸激酶彼此同源;抑制一种酪氨酸激酶还能够产生对其它酪氨酸激酶的一定抑制活性。例如,伊马替尼已经用作治疗剂,其不仅用于CML患者(基于抑制Bcr-abl激酶),而且用于GIST癌症患者(基于抑制c-Kit激酶)。近期有关酪氨酸激酶的基础和临床研究进展已经证实,许多酪氨酸激酶可以被药物靶向。例如,在最近十年以来已经批准了超过十二种新药,其靶向VEGFR2、Bcr-abl、F1t3、血小板衍生生长因子受体(PDGFR)和c-Kit。简要地描述了用于癌症疗法的几种靶标及其牵涉的问题。

[0005] RET

[0006] 在1985年,RET(转染过程中的重排)基因被鉴定为通过DNA重排被活化的新的癌基因(Takahashi, M. Cell, 1985, 42, 581-588)。

[0007] MTC(甲状腺髓样癌)是甲状腺中C细胞的恶性肿瘤。MTC作为多发性内分泌瘤病2型综合征MEN2A和MEN2B可以是散发的或家族性的。家族性的(约95%)和散发的(约50%)MTC展示出RET原癌基因中功能获得点突变,导致促存活信号传导和细胞生长增加。RET信号传导维持肿瘤发生。作为结果,阻断这种RET信号传导提供用于MTC患者的“阿基利斯(Achilles)’足跟”治疗途径。多内分泌性腺瘤形成2B是主要因RET受体激酶结构域中的M918T突变导致的遗传性综合征,而多发性内分泌恶性肿瘤2A主要因C634突变导致(Santoro, M. 等人Science, 1995, 267, 381)。无一突变位于ATP结合位点。分离型家族性MTC因RET胞外或胞内结构域中的不同突变导致,包括突变V804M和V804L,其靶向激酶ATP结合位点中的看门残基。对于MTC的系统性治疗通常难以有效,其中56%的患者经历术后复发,这归因于早期转移(Wells, Jr. S. A. 等人,Clin. Cancer Res. 2009, 15, 7119-7123)。

[0008] PTC(乳头状甲状腺癌)来源于滤泡甲状腺细胞。在PTC中,RET被染色体重排靶向,导致异源基因的其5'-端的胞内结构域的组成部分发生框内融合。据估计在2012年美国大约有60,000个新病例。观察到5%以下的分化型甲状腺癌症患者中出现远端转移,且复发性疾病的发生率为10-15%。治疗复发性疾病主要包括手术和放射碘。然而。治疗放射性顽固性PTC疾病仍然是未得到满足的医疗需求(Schlumberger, M. Thyroid, 2009, 19, 1393-

1400)。

[0009] 肺癌是与癌症相关的死亡率的主要原因。治疗占全部肺癌主要部分的非小细胞肺癌(NSCLC)的范例已经从组织学诊断转移至使用分子亚型诊断。一些“分子驱动突变”可以产生组成型活性突变体信号传导蛋白质,例如EGFR和ALK。近来,一些研究鉴定了约1%具有腺癌型NSCLC的患者中的RET激酶融合体(KIF5B-RET和更罕见的RET/PTC变体)。在肺癌中鉴定ALK融合体后快至4年,FDA批准了一种用于NSCLC的ALK抑制剂。因此,RET-阳性NSCLC患者可以类似地得益于特异性靶向疗法(Hutchinson,K.E.Nat.Med.2012,18,349-351)。

[0010] CML是呈现单核白细胞增多症的骨髓增生病。骨髓组织增殖性肿瘤通常与因嵌合型融合基因或点突变导致的异常组成型酪氨酸激酶相关。已经报道了CML、BCR-RET和FGFR10P-RET中的两种新的融合基因。阻断CML中的RET活性对于重建信号传导动态平衡、再生适合的定向造血干细胞分化和控制异常致癌信号传导具有重要性(Ballerini,P.等人,Leukemia 2012,1-6)。

[0011] 近期还鉴定了ER-阳性乳腺癌小组中的RET超表达。245个乳腺浸润性癌的组的原位杂交(用于测定组织中遗传序列存在或不存在的技术)分别在29.7%和59.4%的肿瘤中检测到RET和GFR α 1 mRNA。这些肿瘤的大部分是ER-阳性。在乳腺癌细胞系的观察中报道了类似的发现。此外,对于一小组乳腺肿瘤初级细胞的qPCR分析检测到ER-阳性样品中RET mRNA的优先表达。最后,这些研究通过微阵列研究被强化,即在一组36个乳腺癌样品中,RET表达与ER表达正相关。RET在他莫昔芬抗性乳腺癌中的作用在Dr. Isacke及其同仁的基于细胞的测定方式中被进一步验证。在ER α -阳性乳腺癌细胞中,受体酪氨酸激酶RET被其配体GDNF活化导致Ser118和Ser167上的ER α 磷酸化增加,以及ER α 转录活性的雌激素非依赖性活化。体外RET减量调节导致MCF7细胞对他莫昔芬的抗增殖作用的敏感性增加6.2-倍,而GDNF刺激对该药物具有保护效应。在他莫昔芬抗性MCF7细胞中,靶向RET恢复了他莫昔芬的敏感性。最终,主要人乳腺癌的两个独立的组织微阵列的检查揭示出,RET蛋白质表达明显与ER α -阳性肿瘤相关,并且在辅助剂他莫昔芬治疗后随即发生侵害性复发的患者中RET-阳性肿瘤的数量增加2-倍(Morandi,A.Trends in Mol.Med.2011,17,149-157)。

[0012] VEGFR

[0013] 血管内皮生长因子(VEGF)是牵涉血管生成(vasculogenesis)和血管发生(angiogenesis)的重要信号传导蛋白。作为其名称的暗示,VEGF活性主要限于血管内皮细胞,尽管它对于有限数量的其它细胞类型具有作用。在体外,已经证实VEGF刺激内皮细胞有丝分裂发生和细胞迁移。VEGF还促进微血管通透性,且有时称作血管渗透因子。VEGFR激酶已经用作实体瘤的靶标,例如高度血管化的恶性肿瘤,如肾癌、胶质母细胞瘤和肝癌(Bhargava,P.Curr Oncol Rep,2011,103-111)。

[0014] FLT3

[0015] 尽管急性髓性白血病(AML)的治愈率在过去四十年已经改善,但是存活率仍然欠佳。60岁患者的5年存活率仅为40%。对于最新诊断的具有AML的患者的护理标准由诱导化疗与输注阿糖胞苷和蒽环类抗生素组成。

[0016] FMS-样酪氨酸激酶3(FLT3)基因中的突变以30%的AML病例为特征。FLT3内衔接重复(ITD)突变(占约23%的AML病例)与特别差的预后相关。在诊断时在包含约7%的病例中发现的FLT3/D835点突变的预后牵涉问题尚未得到确立。抑制FLT3及其突变可能是有利的。

[0017] c-KIT

[0018] c-Kit是通常控制原始造血细胞、黑素细胞和生殖细胞功能的受体酪氨酸激酶。显而易见的是c-Kit的不受控制的活性促使形成大量人肿瘤。c-Kit的不受调节的活性可能归因于超表达、自分泌环或突变活化。这使得c-Kit成为这些肿瘤中癌症疗法的极佳靶标,尤其是GIST和AML (Von Mehren, M. Clin. Colorectal Cancer, 2006, S30-40)。

[0019] TRK

[0020] 原肌球蛋白-相关激酶(Trks)是通常在神经元组织中表达的受体酪氨酸激酶,其中它们在发育和功能方面起重要作用。Trk受体家族由被称作神经营养蛋白的特异性配体活化的3个成员(A、B和C)组成。每种Trk受体包含胞外结构域、跨膜区和胞内结构域,其在结合它们相应的配体(TrkA的神经生长因子(NGF)、脑衍生的生长因子(BDNF)和TrkB的NT-4/5和TrkC的NT3)时触发所述受体寡聚化、所述激酶结构域中的特异性酪氨酸残基磷酸化和下游信号转导途径,包括正常和肿瘤神经元细胞中的存活、增殖和分化。已经在大量类型的癌症中描述了TrkA和TrkB及其关连配体失调,包括前列腺癌、乳腺癌、结肠直肠癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌、黑素瘤、甲状腺癌和神经母细胞瘤,且主要通过野生型受体超表达、活化、扩增和/或突变发生。重要地,肿瘤组织中增加的Trks活化与攻击性表型和临床效果差相关。另外,Trks和RET在周围神经侵害和相关癌症疼痛中起作用。

[0021] PDGFR

[0022] 血小板衍生生长因子作为各种细胞的有效的促分裂原和趋化因子起作用,所述细胞例如成纤维细胞、平滑肌细胞、间充质细胞和脑胶质细胞。已经提出异常PDGF-诱导的细胞增殖导致增殖性疾患。对于PDGFR抑制剂存在需求,其提供对增殖性疾患例如胃肠道间质肿瘤(GIST)、神经胶质瘤和黑素瘤的治疗有益性。

[0023] 附图简述

[0024] 本专利或申请文件包含用彩色完成的至少一个附图。具有彩色附图的本专利或专利申请出版物的复印件将在需要和必需支付费用时由专利局提供。

[0025] 图1:显示用Pz-1或媒介物(NT:未处理)抑制完整细胞中RET/C634Y和RET/M918T磷酸化的印迹照片。用所示浓度的Pz-1将表达RET/C634Y或RET/M918T突变体的血清饥饿的NIH3T3细胞处理2hr。将50μg总细胞裂解物用抗-磷酸-Y1062(αp1062)或抗-磷酸-Y905(αp905)RET抗体进行免疫印迹。使用抗-RET(αRET)抗体使印迹标准化。

[0026] 图2:显示用Pz-1或媒介物(NT:未处理)抑制看门RET点突变和重排的RET癌基因蛋白质磷酸化的印迹照片。用表达RET/C634R-V804M突变体(V804是看门RET残基)或RET/PTC1(CCDC6-RET,在乳头状甲状腺癌和肺腺癌中发现)、RET/PTC3(NCOA4-RET,在乳头状甲状腺癌和肺腺癌中发现)或KIF5B-RET(在肺腺癌中发现)的载体瞬时转染细胞HEK293。转染后36hr,使细胞血清饥饿12hr且然后用所示浓度的Pz-1处理2hr。50μg总细胞裂解物进行使用抗-磷酸-Y1062(αp1062)和抗-磷酸-Y905(αp905)RET抗体的免疫印迹。使用抗-RET(αRET)抗体使印迹标准化。

[0027] 图3:显示用所示浓度的Pz-1或媒介物(NT:未处理)抑制在TT细胞(表达RET/C634W的人MTC细胞系)中内源性表达的RET蛋白和甲状腺未转化的Nthy-ori-3-1细胞中减少的作用的印迹照片。用所示浓度的Pz-1将血清饥饿的人TT和甲状腺未转化的Nthy-ori-3-1细胞系处理2hr。将50μg总细胞裂解物用抗-磷酸-Y1062(αp1062)和抗-磷酸-Y905(αpY905)RET抗

体、抗-磷酸-MAPK (apMAPK, T302/Y304) 和抗-磷酸-SHC (apSHC, Y317) 抗体进行免疫印迹。使用抗-RET (αRET) 和抗-SHC (αSHC) 使印迹标准化。

[0028] 图4:显示用所示剂量的Pz-1或媒介物 (NT:未处理) 抑制在HEK293细胞中表达的VEGFR2异常磷酸化的印迹照片。用表达VEGFR2的载体瞬时转染HEK293细胞。转染后36hr,使细胞血清饥饿12hr,用所示浓度的Pz-1处理2hr,且最终用VEGF-A (100ng/ml) 处理15min。50 μg总细胞裂解物进行使用抗-磷酸-Y1175 (αpVEGFR2) VEGFR2抗体的免疫印迹。使用抗-VEGFR2 (αVEGFR2) 使印迹标准化。

[0029] 图5:所示浓度的Pz-1或媒介物 (NT:未处理) 对TT (表达RET/C634W的人MTC细胞系)、Lc-2/ad (表达CCDC6-RET的人NSCLC) 和Nthy-ori-3-1 (甲状腺未转化的) 细胞系增殖发挥的作用。数据为一式三份进行的一次实验的平均值±SD (标准偏差)。底部,右侧) Pz-1对不同细胞系的生长抑制IC₅₀:95%CI (置信区间) 如括号中所示。将细胞一式三份接种在60-mm平皿中并且保持在5% (Nthy-ori-3-1) 或10% (TT和Lc-2/ad) 胎牛血清中。铺板后的当天,向培养基中加入不同浓度的Pz-1或媒介物并且每隔2-3天换一次。每隔2-3天计数一次细胞并且将细胞数量报道为±SD (标准偏差)。通过对来自生长曲线的最后1天的曲线拟合分析、使用PRIZM软件程序 (Graphpad Software Inc) 计算IC₅₀剂量 (与置信区间)。

[0030] 图6:Pz-1对鼠Ba/F3细胞的NCOA4-RET癌基因驱动的IL-3-非依赖性增殖的活性。细胞生长曲线显示Pz-1对Ba/F3-NCOA4-RET、而不对亲代Ba/F3的抑制作用。将Ba/F3和Ba/F3NCOA4-RET细胞与媒介物 (NT) 或所示浓度的Pz-1在完全培养基中一起温育并且在不同时间点计数。数据为一式三份进行的一次实验的平均值±SD。鼠白细胞介素-3 (IL-3) 依赖性原-B Ba/F3细胞来自ATCC。通过用电穿孔传染NCOA4-RET的长同种型 (RET-51) 生成稳定表达NCOA4-RET (RET/PTC3) 的蛋白质的Ba/F3细胞。将亲代和Ba/F3-NCOA4-RET细胞在具有10%FBS的RPMI 1640中培养;亲代细胞还需要10ng/ml IL-3。显示了IC₅₀剂量 (与置信区间)。

[0031] 图7:Pz-1对异种移植入SCID小鼠的TT细胞的抗-肿瘤发生活性。附图显示Pz-1对植入TT细胞并且通过口腔管饲法每日用媒介物 (n.10只小鼠,18个肿瘤) 或用0.3、1.0或3.0mg/kg Pz-1 (n.29只小鼠,52个肿瘤) 处理的SCID小鼠的皮下肿瘤的作用。报道肿瘤体积的平均值±SD (标准偏差)。将TT细胞 (7.5x 10⁶/小鼠) 皮下接种入39只雌性SCID小鼠 (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine) 的背侧部分 (双侧)。5周后,每只小鼠中存在至少一个肿瘤,且总计可见70个肿瘤:56个肿瘤为40-150mm³,且14个肿瘤为<40mm³。肿瘤在31只小鼠的2个注射部位明显;在其余8只小鼠中仅1个部位展示出肿瘤形成。将携带肿瘤的动物随机分组以便通过口腔管饲法接受Pz-1 (0.3、1.0或3.0mg/kg,每日) (29只小鼠,52个肿瘤) 或媒介物 (10只小鼠,18个肿瘤)。将治疗施用连续28天。每周使用测径器测量肿瘤直径。通过旋椭圆体公式计算肿瘤体积 (V):V=A x B²/2 (A=轴直径;B=旋转直径) 并且报道为平均体积±标准偏差。为了比较肿瘤生长,使用克-瓦二氏检验 (非参数ANOVA) 和Dunn氏多重比较检验 (InStat program, GraphPad软件)。P值在P<0.05时具有统计学显著性。

[0032] 图8:Pz-1对植入RET/C634Y或HRAS (G12V) 转化的NIH3T3成纤维细胞的裸鼠的抗-肿瘤发生活性。附图显示Pz-1对使用Pz-1 (1.0、3.0或10mg/kg,每日) 或媒介物通过口腔管饲法处理所示时间期限的小鼠的皮下肿瘤的作用。报道平均肿瘤体积 (±SD:标准偏差)。将NIH3T3RET/C634Y (200,000细胞) 或NIH3T3HRAS/G12V (50,000细胞) 皮下接种入6周龄雌性

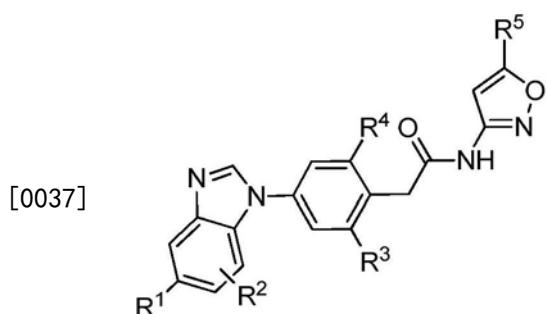
BALB/c nu/nu小鼠(n.31只小鼠/细胞系)(Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine)的背侧部分(双侧)。4天后,在肿瘤出现前,将动物随机分组以便通过口腔管饲法接受Pz-1(1.0、3.0或10mg/kg,每日)(23只小鼠/细胞系:8只小鼠/组,1.0和3.0mg/kg每日剂量;和7只小鼠,10dose mg/kg每日)或媒介物对照(8只小鼠)。每隔1-2天使用测径器测量肿瘤直径。通过旋椭圆体公式计算肿瘤体积(V)并且报道为平均体积±标准偏差。为了比较肿瘤生长,使用克-瓦二氏检验(非参数ANOVA)和Dunn氏多重比较检验(InStat program, GraphPad软件)。P值在P<0.05时具有统计学显著性。

[0033] 图9:显示Pz-1对通过注射被RET/C634Y或HRAS/G12V转化的NIH3T3成纤维细胞在裸鼠中诱导的肿瘤中的细胞磷酸化事件(来自图8)的作用的印迹的照片。显示Pz-1处理对RET/C634Y-和HRAS/G12V-诱导的肿瘤中的pVEGFR2的抑制作用和对仅在RET/C634Y-诱导的肿瘤中RET磷酸化和胞内信号传导(SHC、MAPK、p70S6K和S6RP)的抑制作用的印迹。用不同剂量的Pz-1(TR)将在图8中所述肿瘤生长实验结束时媒介物处理的肿瘤中的一部分处理48hr或保持不做处理(NT)。在处理结束时,将50μg肿瘤蛋白质裂解物用抗-磷酸-Y1062(αp1062)和抗-磷酸-905(αpY905)RET抗体、抗-磷酸-MAPK(αpMAPK, T302/Y304)、抗-磷酸-SHC(αpSHC, Y317)、抗-磷酸-p70S6K(αp70S6K, T389)、抗-磷酸-S6RP(αpS6RP, S235/S236)和抗-磷酸-VEGFR2(αpVEGFR2pY1175)抗体进行免疫印迹。使用抗-RET(αRET)、抗-SHC(αSHC)、抗-MAPK(αMAPK)、抗-p70S6K(αp70S6K)、抗-S6RP(αpS6RP)或抗-VEGFR2(αVEGFR2)抗体使印迹标准化。

[0034] 图10:Pz-1(N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺)与红色的RET激酶和绿色的VEGFR2激酶的对接模型。RET与VEGFR2之间有4个氨基酸不同,这可以用于设计选择性RET抑制剂。得到VEGFR-2DFG外晶体结构(PDB#20H4)和RET的氨基酸序列(PDB#2IVU)。使用SWISS-MODEL Automatic Modeling Mode (swissmodel.expasy.org),RET序列用于使用VEGFR2 DFG外结构作为模板构建RET DFG外同源性模型。使用AutoDock Tools:1)将全部氢作为‘唯一极性’加入;2)生成ATP结合位点的栅盒(中心x=-25.881,中心y=9.55,中心z=-10.927/大小x=16,大小y=44,大小z=18)。使用AutoDock Tools指定计算机模型化的化合物的适合的可旋转的键。然后,AutoDock Vina用于使所述化合物模型化。模型化结果可见且采用Discovery Studio 3.5进行分析。

[0035] 发明概述

[0036] 在第一个方面,本文提供式VIII的化合物:



式VIII

[0038] 其中R¹是未取代或(被R⁶)取代的芳基或杂芳基;R²选自H、(C₁-C₃)烷基、卤素、-CN、-

0-(C₁-C₃)烷基、-0-(CH₂)_nX、-N(R⁷)(R⁸)、-CONH(CH₂)_nX、-SO₂NH(CH₂)_nX和-SO₂(C₁-C₃)烷基;R³和R⁴各自独立地是H、(C₁-C₆)烷基或CN;R⁵是-(C₁-C₃)烷基或被1-3个氟取代的-(C₁-C₃)烷基;R⁶是H、OH、NH₂、(C₁-C₃)烷基、卤素、-CN、-O(C₁-C₃)烷基、-O(CH₂)_nX、-N(R⁷)(R⁸)、-CONH₂、-CONH(CH₂)_nX、-SO₂NH(CH₂)_nX或-SO₂(C₁-C₃)烷基;X是OR⁹、N(R⁷)(R⁸);R⁷和R⁸各自独立地是氢或(C₁-C₄)烷基或(C₁-C₄)烷氧基,并且可以彼此之间形成环;n是2或3;且R⁹是H或(C₁-C₃)烷基。还提供式VIII的盐、异构体、立体异构体、对映体、外消旋体、溶剂合物、水合物、多晶型物和前药。

[0039] 在一些实施方案中,式VIII的化合物选自:N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺(Pz-1);2-(4-(5-(1H-吡唑-4-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)-N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)乙酰胺;N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(2,3-二甲基苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺;N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(2-氟吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺;N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(2,4-二甲氧基苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺;N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(2,4-二氟苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺;N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(2,4-二氯苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺;N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(4-(甲硫基)苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺;N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(2-甲氧基苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺;N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(6-氟吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺;N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(2-甲氧基吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺;N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺;N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(6-吗啉代吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺;N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(吡啶-4-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺;N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(4-(甲基磺酰基)苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺;N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(嘧啶-5-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺;N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(吡啶-2-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺;N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺;和N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-苯基-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺。

[0040] 在一个具体的实施方案中,式VIII的化合物是N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺(Pz-1)。

[0041] 在第二个宽泛的方面,本文提供制备酪氨酸激酶抑制剂的方法。第一种方法包括使取代的苯胺与活化的氟化物化合物在亲核加成反应中反应,产生加成产物;选择性地还原所述加成产物,产生第一种还原产物;环化还原的产物,产生环化的中间体;使环化的中间体与硼酸(boronic acid)或锡衍生物偶合,产生酯;和还原所述酯,产生第二种还原产物;和使第二种还原产物氨基化,产生酪氨酸激酶抑制剂。

[0042] 在一些实施方案中,取代的苯胺包含在对位上的溴。在一些实施方案中,选择性还原包含将NO₂基团还原成NH₂,而不还原溴。在一些实施方案中,所述环化包含用酸活化还原

的产物。在具体的实施方案中,所述酸包含pTSA。在一些实施方案中,所述环化的中间体包含2-(4-(5-溴-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯。

[0043] 在一些实施方案中,所述偶合是钯催化的。在一些实施方案中,溴是偶合步骤中的离去基。在一些实施方案中,偶合步骤包含Suzuki偶合。在一些实施方案中,所述酯选自:2-(4-(5-(1H-吡唑-4-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯;2-(4-(5-(2,3-二甲基苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯;2-(4-(5-(2-氟吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯;2-(4-(5-(2,4-二甲氧基苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯;2-(4-(5-(噻吩-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯;2-(4-(5-(2,4-二氟苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯;2-(4-(5-(2,4-二氯苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯;2-(4-(5-(4-(甲硫基)苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯;2-(4-(5-(2-甲氧基苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯;2-(4-(5-(6-氟吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯;2-(4-(5-(2-甲氧基吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯;2-(4-(5-(吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯;2-(4-(5-(6-吗啉代吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯;2-(4-(5-(吡啶-4-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯;2-(4-(5-(4-(甲基磺酰基)苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯;2-(4-(5-(嘧啶-5-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯;2-(4-(5-(吡啶-2-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯;2-(4-(5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯;和2-(4-(5-苯基-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯。在一些实施方案中,所述酯主要由2-(4-(5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯组成。

[0044] 在一些实施方案中,所述第二种还原产物包含选自如下的化合物:2-(4-(5-(1H-吡唑-4-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂;2-(4-(5-(2,3-二甲基苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂;2-(4-(5-(2-氟吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂;2-(4-(5-(2,4-二甲氧基苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂;2-(4-(5-(噻吩-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂;2-(4-(5-(2,4-二氟苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂;2-(4-(5-(2,4-二氯苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂;2-(4-(5-(4-(甲硫基)苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂;2-(4-(5-(2-甲氧基苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂;2-(4-(5-(6-氟吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂;2-(4-(5-(2-甲氧基吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂;2-(4-(5-(吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂;2-(4-(5-(6-吗啉代吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂;2-(4-(5-(吡啶-4-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂;2-(4-(5-(4-(甲基磺酰基)苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂;2-(4-(5-(嘧啶-5-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂;2-(4-(5-(吡啶-2-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂;2-(4-(5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂;和2-(4-(5-苯基-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂。在一些实施方案中,所述第二种还原产物主要由2-(4-(5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂组成。

[0045] 第二种方法包括使溴硼酸酯 (boronic ester) 与卤代-芳基或杂芳基化合物在催化剂和碱的存在下反应, 产生中间体; 使所述中间体与硼酸或锡衍生物偶合, 产生酪氨酸激

酶抑制剂前体；以及还原所述酪氨酸激酶抑制剂前体并且使其氨基化，产生酪氨酸激酶抑制剂。在一些实施方案中，所述碱包含乙酸钾。

[0046] 在一些实施方案中，所述卤代-芳基或杂芳基包含吡咯基、吡唑基、吡喃基、噻喃基、呋喃基、咪唑基、吡啶基、噻唑基、三嗪基、邻苯二甲酰亚胺基、吲哚基、嘌呤基、苯并噻唑基或其组合。在一些实施方案中，所述卤代-芳基或杂芳基包含选自如下的杂环残基：环氧乙烷基、氮杂环丙烯基(azirinyl)、氮丙啶基(aziridinyl)、1,2-氧杂硫杂环戊基、噻吩基、呋喃基、四氢呋喃基、吡喃基、噻吩基、异苯并呋喃基、苯并呋喃基、色烯基、2H-吡咯基、吡咯基、吡咯啉基、吡咯烷基、咪唑基、咪唑烷基、苯并咪唑基、吡唑基、吡嗪基、吡唑烷基、噻唑基、异噻唑基、二噻唑基、噁唑基、异噁唑基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、哌啶基、哌嗪基、哒嗪基、吗啉基、硫代吗啉基、(S-氧化或S,S-二氧化)-硫代吗啉基、吲哚基、异吲哚基、3H-吲哚基、吲哚基、苯并咪唑基、香豆基、吲唑基、三唑基、四唑基、嘌呤基、4H-喹啉基、异喹啉基、喹啉基、四氢喹啉基、四氢异喹啉基、十氢喹啉基、八氢异喹啉基、苯并呋喃基、二苯并呋喃基、苯并噻吩基、二苯并噻吩基、酞嗪基、萘啶基、喹喔啉基、喹唑啉基、喹唑啉基、噌啉基、蝶啶基、咔唑基、β-咔啉基、菲啶基、吖啶基、萘嵌间二氮苯基、菲咯啉基、呋咱基、吩嗪基、吩噻嗪基、吩噁嗪基、色烯基、异色满基和色满基。

[0047] 在一些实施方案中，所述中间体包含2-(4-(5-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯。

[0048] 在一些实施方案中，所述酪氨酸激酶抑制剂前体选自：2-(4-(5-(1H-吡唑-4-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯；2-(4-(5-(2,3-二甲基苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯；2-(4-(5-(2-氟吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯；2-(4-(5-(2,4-二甲氧基苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯；2-(4-(5-(2,4-二氟苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯；2-(4-(5-(2,4-二氯苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯；2-(4-(5-(4-(甲硫基)苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯；2-(4-(5-(2-甲氧基苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯；2-(4-(5-(6-氟吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯；2-(4-(5-(2-甲氧基吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯；2-(4-(5-(6-吗啉代吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯；2-(4-(5-(吡啶-4-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯；2-(4-(5-(4-(甲基磺酰基)苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯；2-(4-(5-(嘧啶-5-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯；2-(4-(5-(吡啶-2-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯；2-(4-(5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯；和2-(4-(5-苯基-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯。在一些实施方案中，所述酪氨酸激酶抑制剂前体主要由2-(4-(5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯组成。

[0049] 在一些实施方案中，所述酪氨酸激酶抑制剂前体被还原成还原产物，其包含选自如下的化合物：2-(4-(5-(1H-吡唑-4-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂；2-(4-(5-(2,3-二甲基苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂；2-(4-(5-(2-氟吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂；2-(4-(5-(2,4-二甲氧基苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂；2-(4-(5-(噻吩-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂；2-(4-(5-(2,4-二

二氟苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂;2-(4-(5-(2,4-二氯苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂;2-(4-(5-(4-(甲硫基)苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂;2-(4-(5-(2-甲氧基苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂;2-(4-(5-(6-氟吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂;2-(4-(5-(2-甲氧基吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂;2-(4-(5-(6-吗啉代吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂;2-(4-(5-(吡啶-4-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂;2-(4-(5-(4-(甲基磺酰基)苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂;2-(4-(5-(嘧啶-5-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂;2-(4-(5-(吡啶-2-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂;2-(4-(5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂;和2-(4-(5-苯基-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂。在一些实施方案中,所述酪氨酸激酶抑制剂前体被还原成还原产物,其主要由2-(4-(5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸盐组成。

[0050] 在另一个宽泛的方面,本文提供药物组合物。该药物组合物包含式VIII的化合物和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0051] 还提供治疗具有癌症的受试者、抑制磷酸化和抑制包括甲状腺癌细胞在内的细胞增殖的方法。在一些实施方案中,该方法包含对受试者或细胞施用有效量的式VIII的化合物。在一些实施方案中,所述化合物包含N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺(Pz-1)。在一些实施方案中,甲状腺癌细胞包含MTC。

[0052] 还提供抑制酪氨酸激酶的方法,包含用有效量的式VIII的化合物处理细胞。在一些实施方案中,所述酪氨酸激酶选自RET、FLT3、c-Kit、VEGFR、Trk-A、Trk-B、Trk-C和PDGFR。在一些实施方案中,所述化合物显示出具有小于1μM的IC₅₀值的激酶结构域。

[0053] 还提供治疗与癌症相关的疼痛的方法。该方法包括对有此需要的受试者施用有效量的药物组合物,该药物组合物包含式VIII的化合物和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0054] 还提供药盒。在第一个实施方案中,用于制备酪氨酸激酶抑制剂的药盒包含容纳取代苯胺的第一个容器和容纳活化的氟化物化合物的第二个容器。在一些实施方案中,所述药盒还包含一种或多种还原剂硼酸或锡衍生物。在第二个实施方案中,用于制备酪氨酸激酶抑制剂的药盒包括容纳硼酸酯的第一个容器、容纳卤代-芳基或杂芳基化合物和催化剂的第二个容器。在一些实施方案中,所述药盒还包含一种或多种还原剂。在第三个实施方案中,用于制备药物组合物的药盒包含容纳式VIII的化合物的第一个容器和容纳药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂的第二个容器。

[0055] 详细描述

[0056] 本文公开的化合物、制备化合物的方法和使用化合物的方法中描述了不同的实施方案。本领域技术人员能够认识到,下列实施方案的详细描述仅是示例性的,且不预期以任何方式起限定作用。另外的实施方案自身易于启示本领域技术人员具有本文公开的益处。本文公开中所涉及的“实施方案”、“方面”或“实例”表示如此描述的本发明的实施方案可以包括具体的特性、结构或特征,但并非每个实施方案必须包括所述具体的特性、结构或特征。此外,术语“在一个实施方案中”的反复应用不一定是指同一实施方案,尽管可能如此。

[0057] 定义

[0058] 本文所用的通用化学术语具有其在本领域中通常的含义。例如，本文所用的术语“C₁–C₄烷基”单独地或以组合方式表示由碳和氢原子组成的直链或支链C₁–C₄烷基基团，其实例为甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、仲丁基、叔丁基等。

[0059] 本文所用的术语“卤代”或“卤素”表示氟、氯、溴或碘。本文所用的术语“C₁–C₆烷基”是指1–6个碳原子的直链或支链一价饱和脂族链，并且包括、但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、戊基、异戊基和己基。术语“C₁–C₆烷基”在其定义范围内包括术语“C₁–C₄烷基”和“C₁–C₃烷基”。术语“羧基 (carboxy)”或“羧基 (carboxyl)”是指羧酸。术语“羧酰胺”是指被NH₂部分取代的羧基。术语“氧代”是指羧基基团。

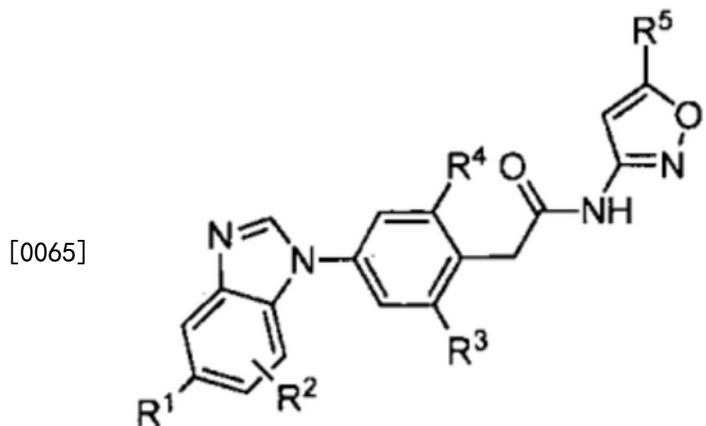
[0060] 本文所用的术语“杂芳基”是指包含1–5个选自O、S和N的杂原子的芳基部分。杂芳基基团的实例包括吡咯基、吡唑基、吡喃基、噻喃基、呋喃基、咪唑基、吡啶基、噻唑基、三嗪基、邻苯二甲酰亚胺基、吲哚基、嘌呤基和苯并噻唑基。杂芳基特别地是杂环基残基，其选自环氧乙烷基、氮杂环丙烯基、氮丙啶基、1,2-氧杂硫杂环戊基、噻吩基、呋喃基、四氢呋喃基、吡喃基、噻喃基、噻蒽基、异苯并呋喃基、苯并呋喃基、色烯基、2H-吡咯基、吡咯基、吡咯啉基、吡咯烷基、咪唑基、咪唑烷基、苯并咪唑基、吡唑基、吡嗪基、吡唑烷基、噻唑基、异噻唑基、二噻唑基、噁唑基、异噁唑基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、哌啶基、哌嗪基、哒嗪基、吗啉基、硫代吗啉基、(S-氧代或S,S-二氧代)-硫代吗啉基、吲哚基、吲哚基、异吲哚基、3H-吲哚基、吲哚基、苯并咪唑基、香豆基 (cumaryl)、吲唑基、三唑基、四唑基、嘌呤基、4H-喹啉基、异喹啉基、喹啉基、四氢喹啉基、四氢异喹啉基、十氢喹啉基、八氢异喹啉基、苯并呋喃基、二苯并呋喃基、苯并噻吩基、二苯并噻吩基、酞嗪基、萘啶基、喹喔啉基、喹唑啉基、噌啉基、蝶啶基、咔唑基、β-咔啉基、菲啶基、吖啶基、萘嵌间二氮苯基、菲咯啉基、呋咱基、吩嗪基、吩噻嗪基、吩噁嗪基、色烯基、异色满基和色满基。

[0061] 本文使用各种缩写。术语DCM是指二氯甲烷。术语DIPEA是指N,N-二异丙基乙胺。术语Pd₂(dba)₃是指三(二亚苄基丙酮)二钯。术语dppf是指1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁。术语DMA是指N,N-二甲基乙酰胺。术语DMF是指N,N-二甲基甲酰胺。术语DMSO是指二甲亚砜。术语EDC是指1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺。术语EtOAc是指乙酸乙酯。术语EtOH是指乙醇。术语ES是指电喷雾。术语h是指小时。术语HOAc是指乙酸。术语HOAt是指1-羟基-7-氮杂苯并三唑。术语IPA是指异丙醇。术语KOAc是指乙酸钾。术语LC是指液相色谱法。术语LiOH是指氢氧化锂。术语MgSO₄是指硫酸镁。术语min是指分钟。术语mL是指毫升。术语mmol是指毫摩尔。术语MS是指质谱。术语NaHCO₃是指碳酸氢钠。术语pTSA是指对-甲苯磺酸。术语P(CY)₃是指三环己膦。术语RT是指室温。术语THF是指四氢呋喃。术语TLC是指薄层色谱法。术语TMOF是指原甲酸三甲酯。

[0062] 如果复数形式用于化合物、盐、药物制剂、疾病、疾患等，则预期其还指单一化合物、盐、药物制剂、疾病等。如果使用“一种(a)”或“一种(an)”，则其是指不确定的制品或优选“一种”。

[0063] 一般描述

[0064] 本文提供式VIII的化合物及其盐、异构体、立体异构体、对映体、外消旋体、溶剂合物、水合物、多晶型物和前药：



式 VIII

[0066] 其中R¹是未取代或(被R⁶)取代的芳基或杂芳基;R²选自H、(C₁-C₃)烷基、卤素、-CN、-O-(C₁-C₃)烷基、-O-(CH₂)_nX、-N(R⁷)(R⁸)、-CONH(CH₂)_nX、-SO₂NH(CH₂)_nX和-SO₂(C₁-C₃)烷基;R³和R⁴各自独立地是H、(C₁-C₆)烷基或CN;R⁵是-(C₁-C₃)烷基或被1-3个氟取代的-(C₁-C₃)烷基;R⁶是H、OH、NH₂、(C₁-C₃)烷基、卤素、-CN、-O(C₁-C₃)烷基、-O(CH₂)_nX、-N(R⁷)(R⁸)、-CONH₂、-CONH(CH₂)_nX、-SO₂NH(CH₂)_nX或-SO₂(C₁-C₃)烷基;X是OR⁹、N(R⁷)(R⁸);R⁷和R⁸各自独立地是氢或(C₁-C₄)烷基或(C₁-C₄)烷氧基,并且可以彼此之间形成环;

[0067] n是2或3;且R⁹是H或(C₁-C₃)烷基。本文还提供式VIII的化合物的代谢前体,例如酯类或酰胺类。

[0068] 作为非限制性实例,式VIII的化合物具体地包括、但不限于如下列出的化合物:

[0069] 1) N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺;

[0070] 2) 2-(4-(5-(1H-吡唑-4-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)-N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)乙酰胺;

[0071] 3) N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(2,3-二甲基苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺;

[0072] 4) N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(2-氟吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺;

[0073] 5) N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(2,4-二甲氧基苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺;

[0074] 6) N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(噻吩-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺;

[0075] 7) N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(2,4-二氟苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺;

[0076] 8) N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(2,4-二氯苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺;

[0077] 9) N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(4-(甲硫基)苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺;

[0078] 10) N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(2-甲氧基苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-

基)苯基)乙酰胺；

[0079] 11) N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(6-氟吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺；

[0080] 12) N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(2-甲氧基吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺；

[0081] 13) N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺；

[0082] 14) N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(6-吗啉代吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺；

[0083] 15) N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(吡啶-4-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺；

[0084] 16) N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(4-(甲基磺酰基)苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺；

[0085] 17) N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(嘧啶-5-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺；

[0086] 18) N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(吡啶-2-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺；

[0087] 19) N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺；

[0088] 20) N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-苯基-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺；

[0089] 及其药学上可接受的盐。应当理解，上述清单中化合物名称前的序号在本文中可以用于鉴定它所相当的具体化合物。还应当理解，上述清单中示例性的化合物仅为本发明的代表，且不以任何方式起限定作用。本公开的任意化合物用作酪氨酸激酶抑制剂。

[0090] 在本说明书的上下文中，式VIII的化合物的实例可以称作化合物1(即N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺)、Pz-1、Pz-01或这些术语的任意组合。

[0091] 本领域技术人员可以认识到，本文所述的任意化合物能够成盐。作为非限制性实例，所述化合物与任意数量的有机酸或无机酸反应，形成药学上可接受的酸加成盐。

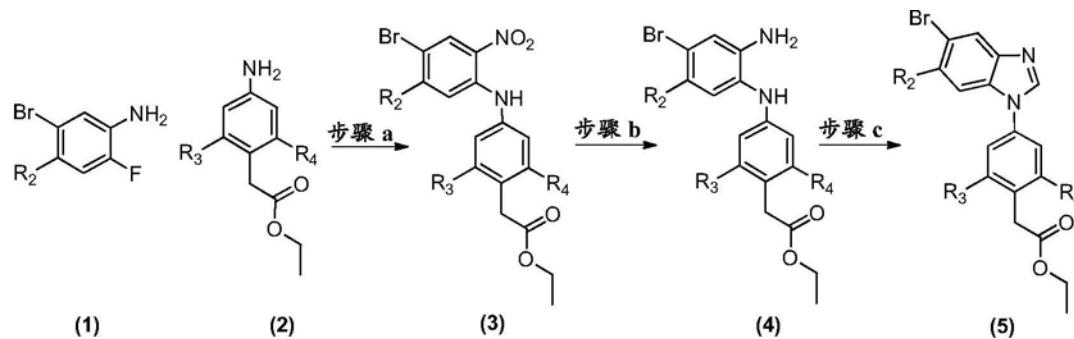
[0092] 制备方法

[0093] 在一些实施方案中，本文公开的化合物可以根据如下方案和实施例制备。应当理解，制备所述化合物的许多另外的方法是可能的。例如，本领域技术人员可以理解，引入一些取代基可以在式VIII的化合物中生成不对称性。本发明涵盖所有的对映体和对映体混合物，包括外消旋体。优选包含手性中心的本发明的化合物为单一对映体，但并不要求。

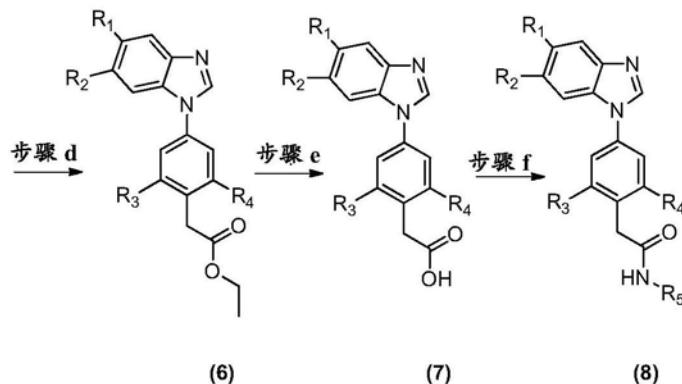
[0094] 可以通过各种方法制备本公开的化合物，所述方法的一些示例在如下所示的方案中。本领域技术人员将要认识到，下列方案中的各个步骤可以改变，以便得到式VIII的化合物。生产式VIII的化合物所需的特定步骤次序依赖于所合成的具体化合物、起始化合物和取代基团的相对不稳定性。

[0095] 在一些实施方案中，式VIII的化合物通过方案I合成，如下所示。

[0096] 方案I



[0097]



[0098] 方案I的步骤a描述适当取代的苯胺(2)的亲核加成反应至活化的氟化物化合物(1)。对位-溴取代对于该反应而言是重要的；它不仅加速氟NH₂取代，而且溴原子还能够通过得到的中间体(5)中的Suzuki反应使碳-碳键形成。可以分离产物并且通过本领域公知的技术纯化，例如沉淀、过滤、萃取、蒸发、色谱和重结晶。

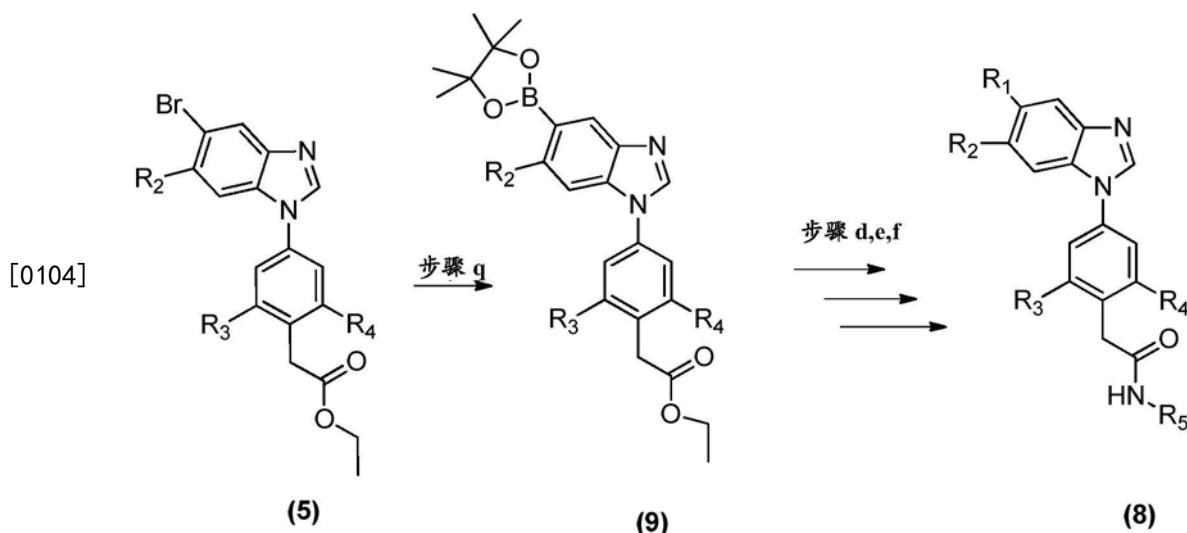
[0099] 在方案I的步骤b中，一些条件适用于中间体3，得到中间体4。典型地，该反应在适合的溶剂例如MeOH、EtOH或酸中进行，以便选择性地将NO₂基团还原成NH₂，而不还原溴，但另外的方法是可能的。该反应在低于室温(例如冰浴中)至环境温度下进行4-8h。可以分离产物并且通过上述技术纯化。

[0100] 方案I的步骤c描述中间体4的环化，得到任选取代的中间体5。典型地，用适合的酸(优选pTSA)在适合的溶剂或净TMOf中、在100℃和以上的温度下活化适合的中间体4。可以分离产物并且通过上述技术纯化。

[0101] 方案I的步骤d描述钯催化的中间体5与硼酸或锡衍生物的偶合，得到中间体6。典型地，中间体5的卤化物(尤其是溴)在适合的催化剂(优选Pd₂(dba)₃)和适合的碱(例如乙酸钾)的存在下用作硼酸或锡类似物组合中的离去基，以便进一步合成式VIII的化合物(Suzuki反应：参见，例如Miyaura, N. 等人Synth. Commun., 1981, 513-518)。

[0102] 在一些实施方案中，式VIII的化合物可以通过如下所示的方案II合成。

[0103] 方案II



[0105] 方案II的步骤e描述通过本领域公知的方法合成中间体9的硼酸酯(Li等人, J.Org.Chem., 2002, 5394-5397)。按照步骤d相同的方式,卤代-芳基或杂芳基化合物可以与中间体9在适合的催化剂(例如Pd₂(dba)₃)和适合的碱(例如乙酸钾)的存在下反应,以便进一步合成式VIII的化合物(Suzuki反应:参见,例如Miyaura, N.等人Synth.Commun., 1981, 513-518)。化合物17-20(其IUPAC名称在上述清单中指定)可以通过方案II、使用与方案I相同的2个其余步骤-步骤e和f合成。

[0106] 药物组合物

[0107] 本文公开的化合物可以并入药物组合物,用于治疗各种疾病。在一些实施方案中,式VIII的盐尤其用于药物组合物。

[0108] 可以用任意式VIII的化合物(为酪氨酸激酶抑制剂)+任意常用的赋形剂、稀释剂或载体配制药物组合物。可以将组合物压制片剂或配制成酏剂或溶液,以便便利地用于口服施用或通过肌内或静脉内途径施用。可以经皮施用所述化合物且可以将其配制成缓释剂型等。

[0109] 本文的化合物、组合物和制剂用于治疗动物(例如人类)的各种疾病。本文公开的治疗人体患者的方法包括施用有效量的酪氨酸激酶抑制剂或包含酪氨酸激酶抑制剂的药物组合物。可以将所述酪氨酸激酶抑制剂配制成可以通过口服和直肠途径施用的组合物,通过局部、胃肠外(例如通过注射和通过连续或不连续动脉内输注)施用,施用形式为,例如片剂、锭剂、舌下片、小药囊、扁囊剂、酏剂、凝胶、混悬液、气雾剂、软膏剂(例如它们在适合的基质中包含1-10%重量的活性化合物)、软和硬胶囊、栓剂、在生理学可接受的介质中的可注射溶液和混悬液,以及吸附在支持材料上的用于制备可注射溶液的无菌包装的粉末。为了该目的,有利地,可以将组合物制成单位剂型形式,优选每个剂量单位包含约5-约500mg(在胃肠外或吸入施用的情况下约5-约50mg;和在口服或直肠施用的情况下约25-约500mg)所述化合物。可以施用每日约0.5-约300mg/kg、优选0.5-20mg/kg剂量的活性成分,不过,当然易于理解的是,实际施用的化合物的量由临床医师根据所有的相关情况决定,包括待治疗的病症、所施用的化合物的选择和施用途径的选择。因此,并不预期本文讨论的剂量范围以任何方式限定本发明的范围。

[0110] 用于单独施用酪氨酸激酶抑制剂的制剂通常包含混合了载体或被载体稀释或包

封或被胶囊、小药囊、扁囊剂、纸张或其它容器形式的可摄入载体或被一次性容器(例如安瓿)包裹的至少一种选自式VIII的化合物的化合物(在本文中可以称作活性成分或活性物质)。载体或稀释剂可以是固体、半固体或液体材料,其用作用于活性治疗物质的媒介物、赋形剂或介质。可以用于本发明药物组合物中的稀释剂或载体的一些实例是乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨醇、甘露糖醇、丙二醇、液体石蜡、白软石蜡、高岭土、烟雾二氧化硅、微晶纤维素、硅酸钙、二氧化硅、聚乙烯吡咯烷酮、十八醇十六醇混合物、淀粉、改性淀粉、阿拉伯树胶、磷酸钙、可可脂、乙氧基化酯类、可可属的油、花生油、藻酸盐、黄蓍胶。明胶、糖浆、甲基纤维素、聚氧乙烯月桂山梨坦、乳酸乙酯、羟基苯甲酸甲酯和羟基苯甲酸丙酯、三油酸山梨坦、倍半油酸山梨坦和油醇和抛射剂,例如三氯一氟甲烷、二氯二氟甲烷以及二氯四氟乙烷。在片剂的情况下,可以将润滑剂掺入以防止粉状成分粘结和粘合模头和压片机的冲头。为了这类目的,例如,可以使用硬脂酸铝、硬脂酸镁或硬脂酸钙、滑石粉或矿物油。

[0111] 在一些实施方案中,本公开的药物组合物包含有效量的式VIII的化合物和/或另外的溶于或分散于药学上可接受的载体的试剂。术语“药物”或“药学上可接受的”是指在施用于动物(例如人)时不产生不良、过敏性或另外不需要的反应的分子实体和组合物。包含至少一种化合物或另外的活性成分的药物组合物的制备方法是本领域技术人员根据本公开的内容已知的,以Remington's Pharmaceutical Sciences, 2003为示例,将其并入本文参考。此外,对于动物(例如人)施用,应当理解,制剂应当满足作为FDA Office of Biological Standards所要求的无菌性、热原质性和一般的安全性和纯度标准。

[0112] 本文公开的组合物可以包含不同类型的载体,根据以固体、液体还是气雾剂形式施用以及对于作为注射施用这类途径是否是无菌的的情况而定。本文公开的组合物可以通过静脉内、经皮、透皮、向鞘内、动脉内、腹膜内、鼻内、阴道内、直肠内、骨内、假体周围、局部、肌内、皮下通过粘膜、子宫内、口服、局部、局部地、通过吸入(例如气雾剂吸入)、通过注射、通过输注、通过连续输注、通过直接浸浴靶细胞的局限性灌注、通过导管、通过灌洗、用乳剂、用液体组合物(例如脂质体)或通过其它方法或上述任意的组合来施用,正如本领域技术人员知晓的(参见,例如Remington's Pharmaceutical Sciences, 2003,并入本文参考)。

[0113] 施用于动物或人体患者的本文公开的组合物的实际剂量可以根据身体和生理学因素确定,例如体重、病情的严重性、待治疗的疾病类型、预先或同时的治疗干预、患者的特发症和施用途径。根据施用剂量和途径的不同,优选的剂量和/或有效量的施用次数根据受试者的响应的不同而改变。本公开的化合物通常在宽剂量范围内是有效的。在任何情况下,负责施用的医务人员可以决定组合物中活性成分的浓度和用于个体受试者的适合的剂量。

[0114] 在一些实施方案中,药物组合物可以包含,例如至少约0.1%的活性化合物。在另外的实施方案中,例如,活性化合物可以占单位重量的约2%—约75%或约25%—约60%和其中衍生的任意范围。自然地,每种治疗有用组合物中的活性化合物的量可以按照这样的方式制备,使得适合的剂量在任意化合物的指定单位剂量中得到。例如溶解度、生物利用度、生物半衰期、施用途径、产品寿命以及其它药理学考量这样的因素应当是制备这类药物制剂的普通技术人员所关注的,且照此各种剂量和治疗方案是可期望的。

[0115] 在另外的非限制性实例中,剂量还可以包含每次施用约1微克/kg/体重、约5微克/kg/体重、约10微克/kg/体重、约50微克/kg/体重、约100微克/kg/体重、约200微克/kg/体

重、约350微克/kg/体重、约500微克/kg/体重、约1毫克/kg/体重、约5毫克/kg/体重、约10毫克/kg/体重、约50毫克/kg/体重、约100毫克/kg/体重、约200毫克/kg/体重、约350毫克/kg/体重、约500毫克/kg/体重—约1000mg/kg/体重或以上和其中衍生的任意范围。在来自本文举出的可衍生范围的非限制性实例中,基于上述数值,可以施用约5mg/kg/体重—约100mg/kg/体重、约5微克/kg/体重—约500毫克/kg/体重等。

[0116] 在一些实施方案中,可以配制通过消化途径施用的组合物和/或另外的试剂。消化途径包括所有可能的施用途径,其中组合物直接接触消化道。特别地,本文公开的药物组合物可以通过口服、口含、直肠或舌下施用。照此,可以用惰性稀释剂或可熔化的可摄入的载体配制这些组合物,或可以将它们包封在硬胶囊或软胶囊或可以将它们压制成片剂或可以将它们直接掺入膳食食物。

[0117] 在另外的实施方案中,本文所述的组合物可以通过胃肠外途径施用。本文所用的术语“胃肠外”包括绕过消化道的途径。特别地,可以施用本文公开的药物组合物,例如、但不限于通过静脉内、经皮、肌内、动脉内、向鞘内、皮下或腹膜内(美国专利US 6,753,514、US 6,613,308、US 5,466,468、US 5,543,158、US 5,641,515和US 5,399,363各自特别地以其完整的形式并入本文参考)。

[0118] 可以用适当混合表面活性剂(例如羟丙基纤维素)的水制备本文公开的作为游离碱或药学上可接受的盐的组合物的溶液。可以用甘油、液体聚乙二醇及其混合物和用油制备分散液。在常规的储存和使用条件下,这些制剂包含防腐剂以便防止微生物生长。适合于注射应用的药物剂型包括无菌水溶液或分散液或有意临时制备无菌注射溶液或分散液的无菌粉末(美国专利US 5,466,468特别地以其完整的形式并入本文参考)。在所有情况下,剂型应当是无菌的且应当是流动的以达到方便注射性能的程度。它在制备和储存条件下应当是稳定的且应当防止微生物例如细菌和真菌的污染作用。载体可以是溶剂或分散介质,包含,例如水、乙醇、多元醇(即甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其适合的混合物和/或植物油。例如,可以通过使用包衣衣料例如卵磷脂、通过维持分散液情况中所需的粒径和通过使用表面活性剂维持适当的流动性。可以用各种抗菌剂和抗真菌剂例如对羟基苯甲酸酯类、三氯叔丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等防止微生物的作用。在许多情况下,优选包括等渗剂,例如、但不限于糖类或氯化钠。可以通过在组合物中使用延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸铝或明胶)延长可注射组合物的吸收。

[0119] 对于用水溶液胃肠外施用,例如,如果必要,应当适当缓冲该溶液,且液体稀释剂首先与足量的盐水或葡萄糖等渗。这些特定的水溶液尤其适合于静脉内、肌内、皮下和腹膜内施用。例如,将1个剂量溶于1mL等渗NaCl溶液并且加入到1000mL皮下输注流体中或在建议的输注部位注射(参见,例如“Remington’s Pharmaceutical Sciences”第15版,第1035-1038和1570-1580页)。剂量中的一些改变必要地根据待治疗的受试者病情的不同而发生。负责施用的人员在任何情况下都可以决定用于个体受试者的适合的剂量。

[0120] 通过将所述组合物以所需量与各种另外上述举出的成分(如果需要)一起掺入适合的溶剂、然后无菌过滤制备无菌注射溶液。通常,通过将各种无菌的组合物掺入无菌媒介物制备分散液,所述无菌媒介物包含基础分散介质和所需的来自上述举出的那些的另外的成分。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉末的情况下,一些制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,其从预先无菌过滤的溶液中得到活性成分+任意另外的期望的成分的粉末。将粉状

组合物与液体载体合并,例如水或盐水溶液,其中使用或不使用稳定剂。

[0121] 在另外的实施方案中,为通过不同的多种途径施用配制所述组合物,例如局部(即透皮)施用、粘膜施用(鼻内、阴道等)和/或吸入。

[0122] 用于局部施用的药物组合物可以包括为医疗应用配制的组合物,例如软膏剂、糊剂、霜剂或粉末。软膏剂包括所有油性吸收性乳剂和基于水溶性的用于局部施用的组合物,而霜剂和洗剂是仅包括乳剂基质的那些组合物。局部施用的药物可以包含渗透促进剂以有利于活性成分通过皮肤吸收。适合的渗透促进剂包括甘油、醇类、烷基甲基亚砜类、吡咯烷酮类和月桂氮卓酮(luarocapram)。用于局部施用的组合物的可能的基质包括聚乙二醇、羊毛脂、冷霜和凡士林油以及其他适合的吸收乳剂或水溶性软膏剂基质。局部制剂还可以包括乳化剂、胶凝剂和抗微生物防腐剂(如果必要)以对组合物防腐并且提供均匀的混合物。所述组合物的透皮施用还可以包含使用“贴剂”。例如,贴剂可以以预定速率和连续方式在固定时间期限内提供一种或多种组合物。

[0123] 在一些实施方案中,可以提供滴眼液、喷鼻剂、吸入剂和/或其它气雾剂递送媒介物递送所述组合物。用于将组合物通过鼻部喷雾剂直接递送至肺的方法描述在美国专利US 5,756,353和US5,804,212中(各自特别地以其完整的形势并入本文参考)。同样,使用鼻内微粒树脂(Takenaga等人,1998)和溶血磷脂酰基甘油化合物(美国专利US 5,725,871,特别地以其完整的形式并入本文参考)递送药物也是制药领域众所周知的且可以用于递送本文所述的组合物。同样,聚四氟乙烯支持物基质形式的跨粘膜递药描述在美国专利US 5,780,045中(特别地以其完整的形式并入本文参考)并且可以用于递送本文所述的组合物。

[0124] 还关注本文公开的组合物可以通过气雾剂递送。术语气雾剂是指固体细粉或液体颗粒分散于液化或加压气体抛射剂中的胶体系统。用于吸入的典型气雾剂由活性成分在液体抛射剂或液体抛射剂和适合的溶剂的混合物中的混悬液组成。适合的抛射剂包括烃类和烃醚类。适合的容器根据抛射剂的压力要求的不同而改变。施用气雾剂可以根据受试者的年龄、体重和症状的严重性和响应的不同而改变。

[0125] 本发明的优选的药物剂型是胶囊、片剂、栓剂、注射溶液、霜剂和软膏剂、特别优选的是吸入用制剂,例如气雾剂;用于注射的和用于口服摄入的制剂。

[0126] 药盒

[0127] 还预期可以将本文公开的化合物或组合物包装在包含多个容器的药盒的形式中。这类药盒的许多实施方案是可能的。在一些实施方案中,药盒包含用于制备酪氨酸激酶抑制剂化合物的方法的多种成分。在具体的实施方案中,药盒包含取代的苯胺、活化的氟化物化合物、一种或多种还原剂和硼酸或锡衍生物。在另外的实施方胺中,药盒包含硼酸酯、卤代-芳基或杂芳基化合物、催化剂和任选的一种或多种还原剂。在另外的实施方案中,用于制备药物组合物的药盒包含酪氨酸激酶抑制剂(例如式VIII的化合物)和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。涵盖药盒的许多另外的变化形式和实施方案。

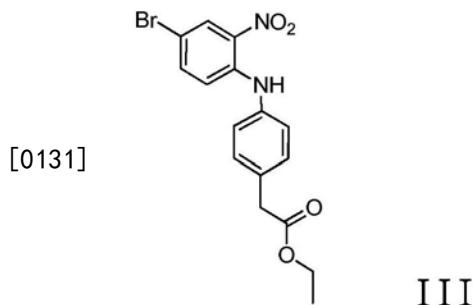
[0128] 所述药盒典型地还包括用于使用该药盒的成分的说明书,以便实施主题方法,但不一定需要包括这类说明书。用于实施主题方法的说明书通常被记录在适合的记录介质上。例如,说明书可以作为包装插页存在于药盒中或在药盒或其组成部分的容器的标签上。在另外的实施方案中,说明书作为电子储存数据文件存在,其可以在适当的计算机可读储存介质上呈现,例如CD-ROM、软磁盘或闪存驱动器。在另外的实施方案中,确切的说明书并

不存在于药盒中,而是提供用于从远端来源(例如通过因特网)得到该说明书的方式。该实施方案的实例是包括网址的药盒,其中说明书可以是可视的和/或从其中下载该说明书。与说明书一样,这种用于得到说明书的方式被记录在适合的底物上。

实施例

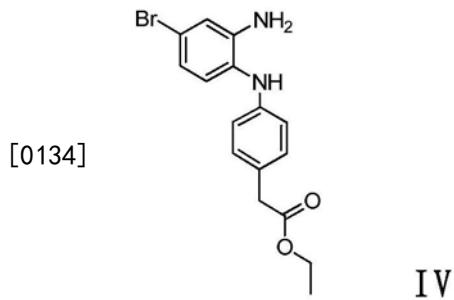
[0129] 实施例1.制备1-式III的制备

[0130] 将4-氨基苯基乙酸乙酯(3.67g,20.45mmol)与4-溴-1-氟-2-硝基苯(3.00g,13.64mmol)和DMA(10mL)一起加入到20mL微波小瓶中。密封该反应混合物,在160°C下置于微波照射中30分钟。向粗反应混合物中加入水,用EtOAc萃取产物。用盐水1x、酸化水(pH~4)2x和盐水2x洗涤有机萃取物。采集有机层,然后用MgSO₄干燥。使用快速色谱法与己烷/EtOAc纯化浓缩的粗产物,得到2-((4-((4-溴-2-硝基苯基)氨基)苯基)乙酸乙酯3,为血红色油状物(4.2g,81%)。ESMS m/z 379 (M+H)⁺。2-((4-((4-溴-2-硝基苯基)氨基)苯基)乙酸乙酯(式III)的结构如下所示:



[0132] 实施例2.制备2-式IV的制备.

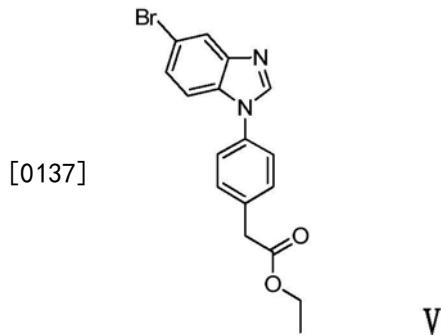
[0133] 将2-((4-((4-溴-2-硝基苯基)氨基)苯基)乙酸乙酯(2.026g,5.34mmol)放入100mL圆底烧瓶。向烧瓶中加入EtOH(20mL)和锌(3.49g,53.4mmol),然后用冰浴冷却该反应混合物。用EtOH(10mL)稀释乙酸(2.246g,37.4mmol),然后滴加入反应混合物,历时1h。将该反应混合物在0°C搅拌5h,然后过滤,蒸发EtOH。用NaHCO₃水溶液碱化该反应混合物,用乙醚萃取产物。用NaHCO₃水溶液将该反应混合物洗涤3次,采集有机层。用MgSO₄干燥有机层,蒸发溶剂,得到2-((2-氨基-4-溴苯基)氨基)苯基乙酸乙酯4,为淡紫色固体(1.834g,98%)。ESMS m/z 349 (M+H)⁺。2-((2-氨基-4-溴苯基)氨基)苯基乙酸乙酯的结构(式IV)如下所示:



[0135] 实施例3.制备3-式V的制备.

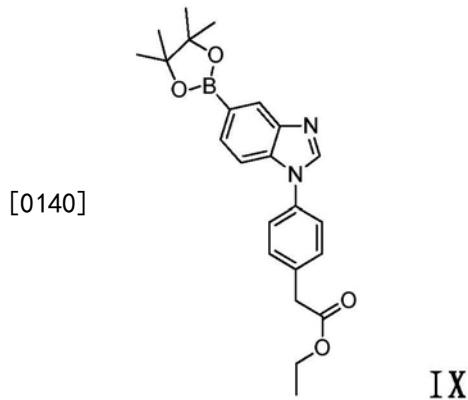
[0136] 将如上所述制备的2-((2-氨基-4-溴苯基)氨基)苯基乙酸乙酯(2g,5.73mmol)放入50mL圆底烧瓶。将TMOF(15mL)加入烧瓶,然后加入pTSA(0.109g,0.573mmol)。将该反应混合物在RT搅拌3h。蒸发过量的溶剂,用NaHCO₃水溶液洗涤该反应混

合物。用乙醚萃取产物,用NaHCO₃水溶液2x和1x盐水洗涤有机层。采集有机层,干燥,浓缩,得到2-(4-(5-溴-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯5,为棕色固体(2.04g,99%)。ESMS m/z 359 (M+H)⁺。2-(4-(5-溴-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯(式V)的结构如下所示:



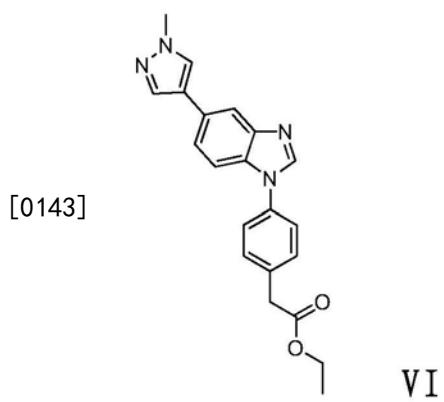
[0138] 实施例4.制备4-式IX的制备.

[0139] 将2-(4-(5-溴-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯(4g,11.14mmol)、双(频哪醇酸)二硼(8.48g,33.4mmol)和KOAc(3.28g,33.4mmol)溶于二噁烷(100mL)。用N₂给该反应混合物脱气10min,加入Pd₂(dba)₃(0.102g,0.111mmol)和P(Cy)₃(0.094g,334mmol)。密封试管,在正N₂压力下加热至85℃12h或直到基于TLC和LC-MS测定全部原料耗尽。蒸发溶剂,使产物吸附的硅胶上。用快速色谱法纯化该化合物,得到化合物2-(4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯9(4.09g,86%)。ESMS m/z 407 (M+H)⁺。2-(4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯的结构(式IX)如下所示:



[0141] 实施例5.制备5-式VI的制备.

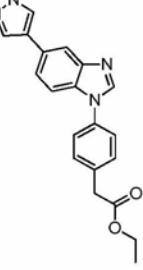
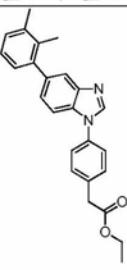
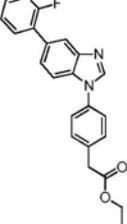
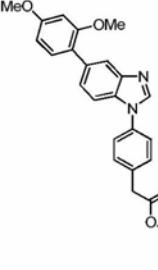
[0142] 将2-(4-((2-氨基-4-溴苯基)氨基)苯基)乙酸乙酯(800mg,2.227mmol)与4:1DMF/水(20mL)一起放入30mL CEM微波小瓶。向小瓶中加入1-甲基吡唑-4-硼酸频哪醇酯(556mg,2.67mmol)与Na₂CO₃(1,168mg,11.14mmol)。用N₂给反应容器脱气10min,然后添加Pd(dppf)Cl₂(91mg,0.111mmol)。用微波反应器在130℃将该反应混合物加热20min,蒸发溶剂。使反应残余物吸附在硅胶上,通过快速色谱法纯化产物,得到2-(4-(5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯6(365mg,45.5%)。ESMS m/z 361 (M+H)⁺。2-(4-(5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯的结构(式VI)如下所示:



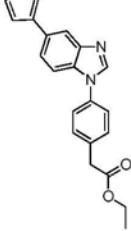
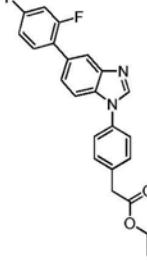
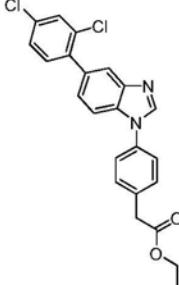
[0144] 使用如上述制备5中所述的Suzuki偶合方法,得到下表1中所述的中间体:

[0145] 表1.

[0146]

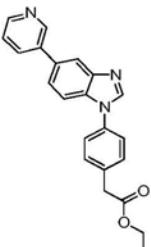
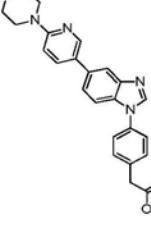
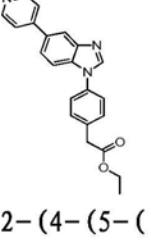
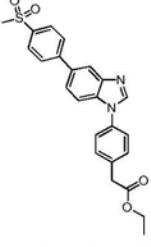
制备	产物	原料 A	原料 B	物理数据
5a	 2-(4-(5-(1H-吡唑-4-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯	制备 3	(1H-吡唑-4-基)硼酸	MS ES ⁺ m/z 347 (M+1)
5b	 2-(4-(5-(2,3-二甲基苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯	制备 3	(2, 3-二甲基苯基)硼酸	MS ES ⁺ m/z 385 (M+1)
5c	 2-(4-(5-(2-氟吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯	制备 3	2-氟-3-(4, 4, 5, 5-四甲基-1, 3, 2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)吡啶	MS ES ⁺ m/z 376 (M+1)
5d	 2-(4-(5-(2,4-二甲氧基苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯	制备 3	(2, 4-二甲氧基苯基)硼酸	MS ES ⁺ m/z 417 (M+1)

[0147]

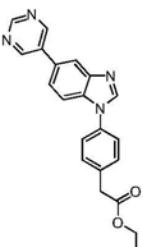
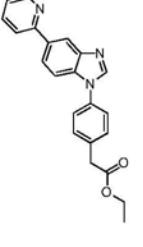
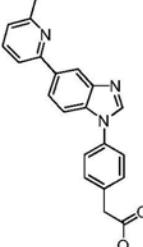
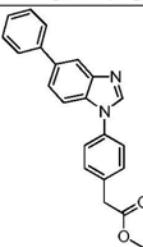
	苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯			
5e	 2-(4-(5-(2-methyl-1H-benzimidazol-1-yl)phenyl)ethyl)acetyl ethyl ester	制备 3	塞吩-3-基硼酸	MS ES ⁺ m/z 363 (M+1)
5f	 2-(4-(5-(2,4-二氟苯基)phenyl)ethyl)acetyl ethyl ester	制备 3	(2,4-二氟苯基)硼酸	MS ES ⁺ m/z 393 (M+1)
5g	 2-(4-(5-(2,4-二氯苯基)phenyl)ethyl)acetyl ethyl ester	制备 3	(2,4-二氯苯基)硼酸	MS ES ⁺ m/z 426 (M+1)

[0148]

[0149]

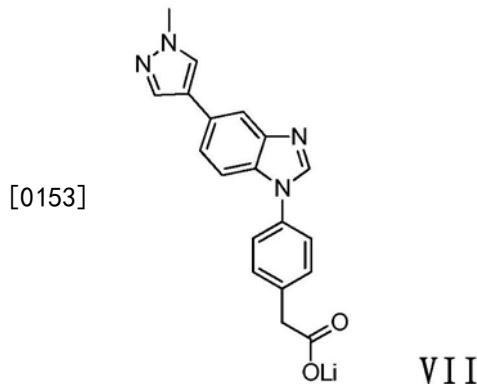
51	 <p>2-(4-(5-(吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯</p>	制备 3	吡啶-3-基硼酸	MS ES ⁺ m/z 358 (M+1)
5m	 <p>2-(4-(5-(6-吗啉代吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯</p>	制备 3	(6-吗啉代吡啶-3-基)硼酸	MS ES ⁺ m/z 443 (M+1)
5n	 <p>2-(4-(5-(吡啶-4-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯</p>	制备 3	吡啶-4-基硼酸	MS ES ⁺ m/z 358 (M+1)
5o	 <p>2-(4-(5-(4-(甲基磺酰基)苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯</p>	制备 3	(4-(甲基磺酰基)苯基)硼酸	MS ES ⁺ m/z 435 (M+1)

[0150]

5p		制备 3	嘧啶-5-基硼酸	MS ES ⁺ m/z 359 (M+1)
2-(4-(5-(imidazole-5-yl)-1H-benzimidazol-1-yl)phenyl)乙酸乙酯				
5q		制备 4	2-溴吡啶	MS ES ⁺ m/z 358 (M+1)
2-(4-(5-(imidazole-2-yl)-1H-benzimidazol-1-yl)phenyl)乙酸乙酯				
5r		制备 4	2-溴-6-甲基吡啶	MS ES ⁺ m/z 372 (M+1)
2-(4-(5-(6-甲基吡啶-2-yl)-1H-benzimidazol-1-yl)phenyl)乙酸乙酯				
5s		制备 4	碘苯	MS ES ⁺ m/z 357 (M+1)
2-(4-(5-苯基-1H-benzimidazol-1-yl)phenyl)乙酸乙酯				

[0151] 实施例6.制备6-式VII的制备.

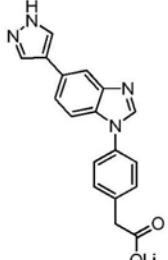
[0152] 将LiOH (72.5mg, 3.03mmol) 与H₂O (4mL) 一起加入到30mL CEM微波小瓶中, 将2-(4-(5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸乙酯 (365.3mg, 1.014mmol) 溶于THF (4mL), 转入微波小瓶。在100℃下在微波中将该反应混合物加热10min, 通过TLC和LC-MS验证水解完成, 蒸发全部溶剂。用H₂O再溶解该反应混合物, 用DCM洗涤1次。然后浓缩水层, 得到化合物2-(4-(5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂7 (302mg, 90%)。ESMS m/z 331 (M-Li)⁻¹。2-(4-(5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂的结构(式VII)如下所示:



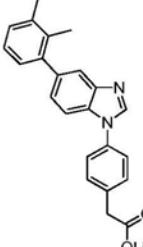
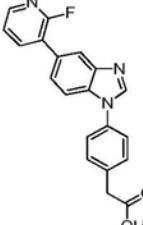
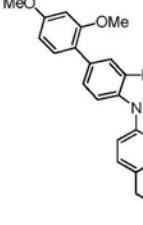
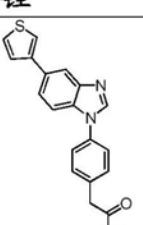
[0154] 使用与如上述制备6中所述的水解方法, 得到下表2中列出的中间体:

[0155] 表2

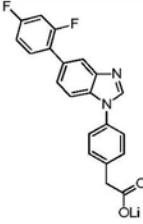
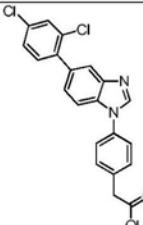
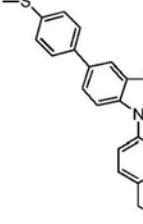
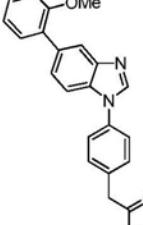
[0156]

制备	产物	原料 A	反应条件	物理数据
6a	 2-(4-(5-(1H-吡唑-4-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂	制备 5a		MS ES ⁻ m/z 317 (M-Li)

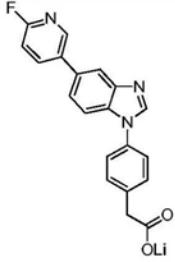
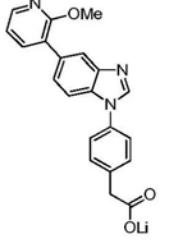
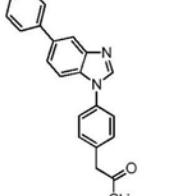
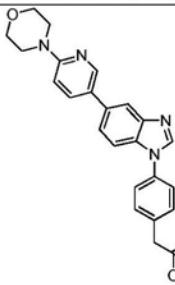
[0157]

6b	 <p>2-(4-(5-(2,3-二甲基苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂</p>	制备 5b	MS ES ⁻ m/z 355 (M-Li)
6c	 <p>2-(4-(5-(2-氟吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂</p>	制备 5c	MS ES ⁻ m/z 346 (M-Li)
6d	 <p>2-(4-(5-(2,4-二甲氧基苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂</p>	制备 5d	MS ES ⁻ m/z 387 (M-Li)
6e	 <p>2-(4-(5-(噻吩-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂</p>	制备 5e	MS ES ⁻ m/z 333 (M-Li)

[0158]

6f	 <p>2-(4-(5-(2,4-二氟苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂</p>	制备 5f	MS ES ⁻ m/z 363 (M-Li)
6g	 <p>2-(4-(5-(2,4-二氯苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂</p>	制备 5g	MS ES ⁻ m/z 395 (M-Li)
6h	 <p>2-(4-(5-(4-(甲硫基)苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂</p>	制备 5h	MS ES ⁻ m/z 373 (M-Li)
6i	 <p>2-(4-(5-(2-甲氧基苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂</p>	制备 5i	MS ES ⁻ m/z 357 (M-Li)

[0159]

6j	 <p>2-(4-(5-(6-氟吡啶-2-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂</p>	制备 5j		MS ES ⁻ m/z 346 (M-Li)
6k	 <p>2-(4-(5-(2-甲氧基吡啶-2-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂</p>	制备 5k		MS ES ⁻ m/z 358 (M-Li)
6l	 <p>2-(4-(5-(吡啶-2-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂</p>	制备 5l		MS ES ⁻ m/z 328 (M-Li)
6m	 <p>2-(4-(5-(6-吗啉代吡啶-2-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂</p>	制备 5m		MS ES ⁻ m/z 413 (M-Li)

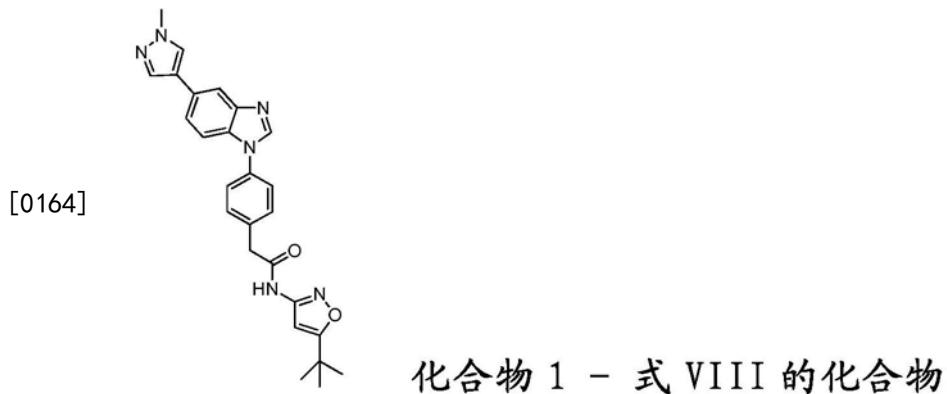
[0160]

[0161]

6r	<p>2-(4-(5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂</p>	制备 5r	MS ES ⁻ m/z 342 (M-Li)
6s	<p>2-(4-(5-苯基-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂</p>	制备 5s	MS ES ⁻ m/z 327 (M-Li)

[0162] 实施例7-式VIII的制备。

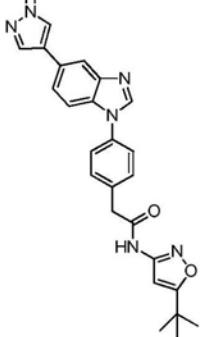
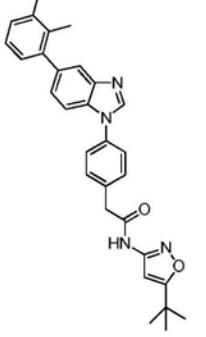
[0163] 向100mL圆底烧瓶中加入2-(4-(5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酸锂(600mg, 1.805mmol)、EDC(700mg, 4.51mmol)、HOAt(246mg, 1.805mmol)、DIPEA(0.377mL, 2.166mmol)和5-(叔丁基)异噁唑-3-胺(380mg, 2.71mmol)。然后向该反应混合物中加入DMF(15mL), 在正氮气压力下密封烧瓶。在RT(~20~25℃)搅拌12h。在12h时间点时, 通过TLC和LC-MS验证已经耗尽全部原料, 使用快速色谱法纯化该反应混合物。采集产物峰, 缩合, 得到N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺8(589.2mg, 71.8%)。ESMS m/z 455 (M+H)⁺¹。N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺的结构(化合物1:式VIII的化合物)如下所示:



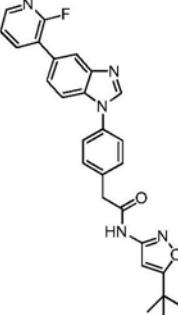
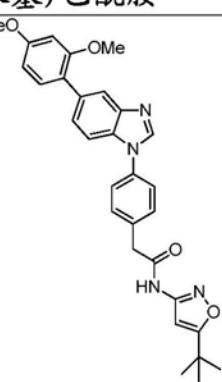
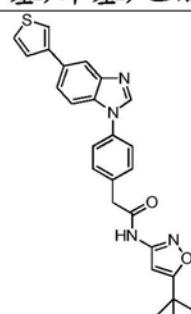
[0165] 使用如上述实施例1中所述的缩合方法, 得到下表3中列出的中间体:

[0166] 表3

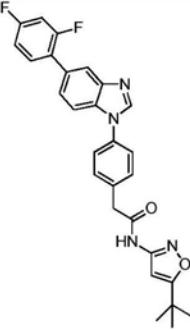
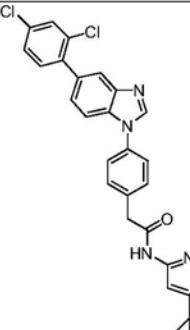
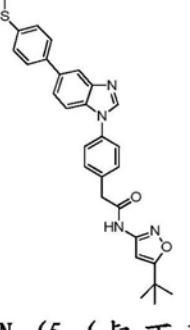
[0167]

制备	产物	原料 A	反应条件	物理数据
2	 <p>2-(4-(5-(1H-吡唑-4-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)-苯基)-N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)乙酰胺</p>	制备 6a		MS ES ⁺ m/z 441 (M+1)
3	 <p>N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(2,3-二甲基苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)-苯基)乙酰胺</p>	制备 6b		MS ES ⁺ m/z 479 (M+1)

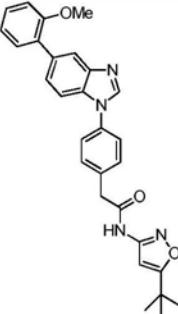
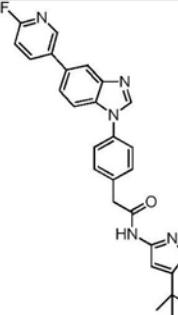
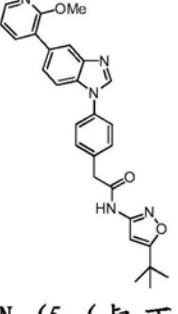
[0168]

4	 <p>N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(2-氟吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺</p>	制备 6c	MS ES ⁺ m/z 470 (M+1)
5	 <p>N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(2,4-二甲氧基苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺</p>	制备 6d	MS ES ⁺ m/z 511 (M+1)
6	 <p>N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(噻吩-2-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺</p>	制备 6e	MS ES ⁺ m/z 457 (M+1)

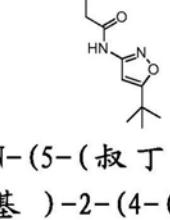
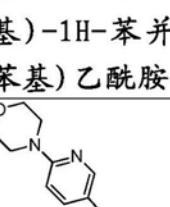
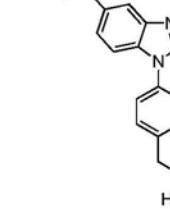
[0169]

7	 <p>N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(2,4-二氟苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺</p>	制备 6f	MS ES ⁺ m/z 487 (M+1)
8	 <p>N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(2,4-二氯苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺</p>	制备 6g	MS ES ⁺ m/z 517 (M+1)
9	 <p>N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(4-(甲硫基)苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺</p>	制备 6h	MS ES ⁺ m/z 497 (M+1)

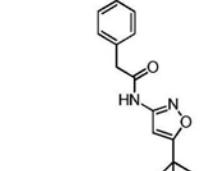
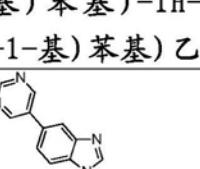
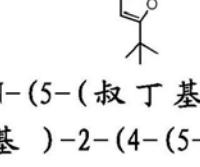
[0170]

10	 <p>N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(4-甲氧基苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺</p>	制备 6i		MS ES ⁺ m/z 481 (M+1)
11	 <p>N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(6-氟吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺</p>	制备 6j		MS ES ⁺ m/z 470 (M+1)
12	 <p>N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(2-甲氧基吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺</p>	制备 6k		MS ES ⁺ m/z 482 (M+1)

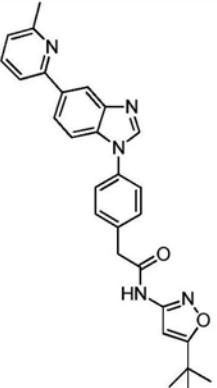
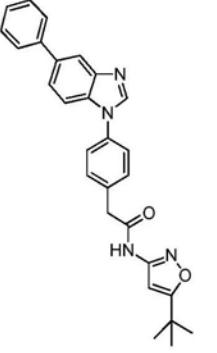
[0171]

13	 <p>N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺</p>	制备 61		MS ES ⁺ m/z 452 (M+1)
14	 <p>N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(6-(吗啉代吡啶-3-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺</p>	制备 6m		MS ES ⁺ m/z 537 (M+1)
15	 <p>N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(吡啶-4-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺</p>	制备 6n		MS ES ⁺ m/z 452 (M+1)

[0172]

16	 <p>N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(4-(甲基磺酰基)苯基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺</p>	制备 6o	MS ES ⁺ m/z 529 (M+1)
17	 <p>N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(4-(4-(4-pyridin-2-yl)phenyl)phenyl)乙酰胺</p>	制备 6p	MS ES ⁺ m/z 453 (M+1)
18	 <p>N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(4-(4-(4-pyridin-2-yl)phenyl)phenyl)乙酰胺</p>	制备 6q	MS ES ⁺ m/z 454 (M+1)

[0173]

19	 <p>N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(6-甲基吡啶-2-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺</p>	制备 6r	MS ES ⁺ m/z 468 (M+1)
20	 <p>N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-苯基-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺</p>	制备 6s	MS ES ⁺ m/z 451 (M+1)

[0174] 实施例8-双向RET和VEGFR2激酶抑制剂的发现。

[0175] RET和VEGFR2计算机结合模型的建立

[0176] 用吡唑并嘧啶PP1和4-苯胺喹唑啉ZD6474(凡他尼布)使RET原癌基因酪氨酸激酶结构域结晶。这些化合物是蛋白激酶的I型抑制剂,并且已经证实其结合DFG内构象中的RET激酶。通过基于温育的研究经过动力学方式测定该骨架结合DFG外构象中的RET激酶(II型)。通过从ZD6474/RET的晶体结构的变构袋的背面上除去残基SER774-GLN781生成用于DFG外的RET激酶的模型。这种精修的DFG外RET激酶模型用于分子对接。Discovery Studio 3.5Visualizer、AutoDock Vina和AutoDock Tools用于潜在小分子抑制剂的分子模型化。经证实DFG外模型精确地预测II型抑制剂的结合模式。

[0177] 药物发现和研发

[0178] 建立用于RET和VEGFR2小分子激酶抑制剂(来自激酶定向的片段(KDF)文库)的适合的筛选试验。RET激酶试验使用EZ Reader Electrophoresis Mobility Chip Instrument(Caliper Life Science)。在本试验中,将2nM重组RET酶(Invitrogen)于小分子抑制剂或对照缓冲液一起温育30min,以使II型激酶抑制剂俘获DFG外该抑制剂结合的构象。这类抑制剂间接地与ATP竞争,且缓慢结合动力学(低k_d)能够使得所述抑制剂实质上显

示出非竞争性和实质上假拟的不可逆性。因为这些抑制剂的非竞争性,所以在本试验中并入更具有生物相关性浓度的ATP底物(200 μ M)。30min预温育后,加入包含200 μ M ATP、20mM MgCl₂和1.5 μ M荧光标记的RET底物肽(Caliper LS,肽22;Perkin Elmer,USA)的底物混合物。然后使用EZ Reader仪器测定RET底物肽的转化水平。类似地,还使用相同的肽底物建立VEGFR2和RET/V804M激酶试验。

[0179] 由于RET和VEGFR2的ATP活性位点高度同源,所以筛选和优化主要集中于RET。仅用有效RET抑制剂测定VEGFR2活性,以便测定选择性、通过片段(和/或特别处理的结构,分子量:小于300)筛选鉴定咪唑类似物,所述片段筛选使用200 μ M的ATP浓度以避免非特异性结合和假阳性。具有已知测定RET激酶DFG袋的VEGFR-2晶体结构的RET激酶的同源性模型化易于进行亲脂性基团(例如间-三氟甲基苯基基团)的添加。结构-活性相关性(SAR)信息与DFG袋和苯并咪唑5位上取代的进一步优化的组合得到了临床候选物Pz-1(N-(5-(叔丁基)异噁唑-3-基)-2-(4-(5-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-1H-苯并[d]咪唑-1-基)苯基)乙酰胺,其在生化试验中具有活性且RET野生型、gatekeeper突变体RET/V804M和VEGFR2的IC₅₀小于1nM。Pz-1的实际效能超过生化试验的可测定限。

[0180] 在基于细胞的试验中测定pRET和pVEGFR2的活性,并且Pz-1等效地抑制两种磷酸生物标记。分别如图3和图4中所示的自-RET磷酸化(TT细胞系中)和自-VEGFR2磷酸化(HEK293细胞系中)的抑制活性显示与RET和VEGFR2生化试验的强烈相关性。临床候选物Pz-1在测试的全部细胞系和突变中在纳摩尔浓度下抑制90%RET和VEGFR2自磷酸化(图1-4)。

[0181] 作用机制和总体激酶选择性

[0182] Pz-1在低于1nM下对RET和全部测试的RET突变它特别有效,包括gatekeeper突变体RET/V804M(图1-3)。本文所述的RET生化试验不适合于测定基于低于1nM的IC₅₀的抑制剂的活性,因为RET酶在本试验中的浓度为2nM。因此,中间体化合物用于动力学研究。将温育时间从5min延长至20min或60min导致IC₅₀增加3-倍(100nM到30nM),这表明DFG内到DFG外的构象改变,即II型激酶抑制剂的标准特征。用Pz-1在50nM浓度下对KINOMEscan中的91种激酶进行筛选,这代表了每个Kinome簇的多样性。KINOMEscan中的激酶试验比上述生化试验更为敏感。尽管对5种激酶(TRKB、TRKC、GKA、FYN和SRC)具有~90%的抑制率,但是基于有效的细胞数据,Pz-1仍然对这些激酶具有显著的选择性(在1nM下对pRET强烈抑制),表明良好的总体Kinome选择性。

[0183] 基于细胞的试验中Pz-1对pRET和pVEGFR2活性的抑制

[0184] 在几种不同的细胞系中测定Pz-1对RET自-磷酸化的抑制,包括表达RET/C634Y或RET/M918T的NIH3T3成纤维细胞、表达RET/C634W(MTC)的TT、Nthy-ory-3-1(甲状腺,用RET不转化;阴性对照)、HEK293/RET/PTC1(可以在PTC&肺癌中发现的CCDC6-RET)、HEK293/RET-KIF5B(可以在肺癌中发现的)、HEK293/RET/PTC3(NCOA4-RET,可以在PTC&肺癌中发现的)和用RET/C634R-V804M转染的HEK293(图1-3),用包含期望突变体的表达载体瞬时转染HEK293细胞。转染后36hrs,使细胞血清饥饿12hrs,且然后用所示浓度的Pz-1处理2hrs,使总细胞裂解物进行试验抗-磷酸-Y1062(α p1062)和抗-磷酸-Y905(α p905)RET抗体的免疫印迹。使用抗-RET(α RET)抗体使印迹标准化。在1nM下,Pz-1在全部细胞系中强烈地抑制剂pRET(图1-3),包括表达RET/C634R-V804M的细胞。Pz-1在1nM下还强烈地抑制用VEGFR2瞬时转染和用VEGF刺激的HEK 293细胞中的VEGFR2自磷酸化(图4)。pMAPK是许多激酶途径通过RAS/

MEK/ERK途经的信号的下游标记。在包含RET突变体的TT细胞中(图3),pMAPK和pRET类似地在1nM下被强烈地抑制。相反,在甲状腺细胞系中(Nthy-ory-3-1,用致癌基因RET不转化)中,pMAPK仅在100nM下被抑制(图3),证实Pz-1的总体kinome选择性。

[0185] RET-驱动的癌细胞系中Pz-1的抗增殖作用

[0186] 将Nthy-ory-3-1和TT细胞接种在60-mm平皿中。将细胞保持在2% (Nthy-ori-3-1)或10% (TT) 胎牛血清中。在铺板后1天,将不同浓度的Pz-1或媒介物加入到培养基中并且每隔2-3天改变一次。每隔2-3天计数一次细胞。Ba/F3细胞增殖依赖于IL3,并且在表达组成型活性激酶例如RET时失去这种依赖性。将表达亲代和RET/PTC的Ba/F3保持在6-多孔板中的10% 胎牛血清中,并且连续4天隔天计数一次,每隔2天改变一次培养基。为了比较细胞生长,使用Instat软件程序(Graphpad Software Inc)进行未配对斯氏t检验。全部p值是双面的。通过曲线拟合分析、PRISM软件程序(Graphpad Software Inc)计算IC₅₀剂量。Pz-1抑制RET驱动的癌细胞增殖,其中对TT细胞的IC₅₀为1.86nM(图5)、对LC-2/ad细胞的为907pM(图5)且对RET/PTC3转染的Ba/F3细胞为340pM(图6)。当使用3天时,直到1000nM Pz-1也未显著地减少亲代NIH3T3成纤维细胞生长,这证实了其选择性。

[0187] pRET和pVEGFR2的体内靶标抑制(IVTI)测定和效能模型

[0188] 将TT细胞(7.5x 10⁶/小鼠)皮下接种入39只SCID小鼠(Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine)的背侧部分(双侧)。5周后,每只小鼠中存在至少一个肿瘤;将带有肿瘤的小鼠随机分组以便通过口腔管饲法接受Pz-1(0.3、1.0或3.0mg/kg,每日)(29只小鼠,52个肿瘤)或媒介物(10只小鼠,18个肿瘤)。施用处理连续28天。每周使用测径器测量肿瘤直径。通过旋转椭圆体公式计算肿瘤体积(V):V=A x B²/2(A=轴直径;B=旋转直径)并且报道为平均体积±标准偏差。Pz-1在全部测试剂量下均强烈地抑制肿瘤生长(图7)。还在植入RET/C634Y或HRAS(G12V)转化的NIH3T3成纤维细胞的裸鼠中评价了Pz-1的抗肿瘤活性。在这种情况下,将NIH3T3 RET/C634Y或NIH3T3 HRAS/G12V细胞皮下接种入BALB/c nu/nu小鼠(n.31只小鼠/细胞系)(Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine)的背侧部分(双侧)。4天后,在肿瘤出现前,将动物随机分组以便通过口腔管饲法接受Pz-1(1.0、3.0或10mg/kg,每日)(23只小鼠/细胞系:8只小鼠/组,1.0和3.0mg/kg,每日剂量,和7只小鼠10剂量mg/kg,每日)或媒介物对照组(8只小鼠)。每隔1-2天使用测径器测量肿瘤直径。通过旋转椭圆体公式计算肿瘤体积(V):V=A x B²/2(A=轴直径;B=旋转直径)并且报道为平均体积±标准偏差。尽管所述处理总体上预防了RET细胞诱导的肿瘤形成,其仅是减少、而不是根除HRAS癌基因驱动的肿瘤形成(图8)。

[0189] 在图8中报道的肿瘤生长实验结束时,用不同剂量的Pz-1(1.0或3.0mg/kg每日)将媒介物处理的肿瘤中的一些测试48hr或保持不处理。在处理结束时,将蛋白质裂解物使用抗-磷酸-Y1062(αp1062)和抗-磷酸-905(αp905)RET抗体、抗-磷酸-MAPK(αpMAPK, T302/Y304)、抗-磷酸-SHC(αpSHC, Y317)、抗-磷酸-p70S6K(αp70S6K, T389)、抗-磷酸-S6RP(αpS6RP, S235/S236)和抗-磷酸-VEGFR2(αpVEGFR2, pY1175)抗体进行免疫印迹。Pz-1处理在RET/C634Y-和HRAS/G12V-诱导的肿瘤中抑制pVEGFR2,并且仅在RET/C634Y-诱导的肿瘤中抑制RET磷酸化和胞内信号传导(SHC、MAPK、p70S6K和S6RP)(图9)。

[0190] Pz-1的临床前期配制、PK、PD和毒理学

[0191] 为了进行Pz-1在动物中的PK研究,生成用于口服施用的在500μL聚山梨醇酯80、

500 μ L EtOH和1.0mL pH 2缓冲液中的溶液制剂。为了进行毒性研究,生成在吐温20(20%)和黄原胶(0.125%)中的混悬液制剂。

[0192] Pz-1具有6.5 μ g/hr/mL的AUC(溶液制剂)和在小鼠中在2mg/kg下3.8h的消除半衰期。在大鼠中的口服PK研究中,Pz-1在10mg/kg(口服)时显示出97%的高生物利用度与19 μ g/hr/mL的AUC和在1mg/kg(IV)时1.9 μ g/hr/mL的AUC。口服研究中的消除半衰期为4.2h,清除率为9mL/min/kg,且容量分布为2.02L/kg。大鼠中的T_{1/2}(3-4hrs)与小鼠中的T_{1/2}一致(4.2hrs)。

[0193] 在体外,Pz-1在包含RET^{C634W}的MTC TT细胞系中是抗增殖的,IC₅₀为1.86nM,并且对用癌基因RET(RET/PTC3)转染的Ba/F3细胞具有抗增殖作用,IC₅₀为0.34nM。Pz-1在膜片钳hERG试验中具有最小的活性,其中hERG试验的IC₅₀为10 μ M(GenScript)。对RET的选择性超过对hERG 10,000-倍,这表明清楚的心血管毒性特性。Pz-1对CYP2D6(IC₅₀为13.8 μ M)和CYP3A4(IC₅₀为7.4 μ M)都具有最小的活性,表明使用两种主要的CYP同种型不存在药物-药物相互作用问题。

[0194] 在使用10mg/kg-100mg/kg混悬液制剂的每日剂量递增的小鼠中的1周-长毒理学研究中,不存在显著的毒性。心脏、肾和肝脏中的器官病理学分析在100mg/kg剂量下未显示不良反应。类似地,在任何剂量下都未影响毒性标记,包括磷、肌酸酐、总胆红素、GGT、ALP、葡萄糖、总蛋白、白蛋白、球蛋白、钙、胆固醇和BUN。肝毒性标记ALT在10mg/kg下在血清(blood serum)中成比例地从22U/L增加至在30mg/kg下的51U/L和在100mg/kg下的96U/L。在最高剂量下,ALT的浓度稍高于正常的80U/L ALT水平,但低于200U/L的毒性阈值。ALT水平易于监测且可以用作临床环境中的可逆毒性标记。

[0195] 实施例9-方法。

[0196] RET生物化学测定

[0197] RET激酶试验使用基于微流体的用于直接激酶活性读出的仪器(Caliper Life Science)。在本试验中,将1-2nM重组RET酶(Invitrogen)与小分子抑制剂或对照组缓冲液一起预温育30min,以使所述抑制剂俘获DFG外构象。这类抑制剂间接地与ATP竞争,且缓慢的结合动力学(极为缓慢的k_{off})能够使得所述抑制剂实质上显示出非竞争性和实质上假拟的不可逆性。因为这些抑制剂的非竞争性,所以在本试验中并入更具有生物相关性浓度的ATP底物。30min预温育后,加入包含180-200 μ M ATP和1.0-1.5 μ M荧光标记的RET底物肽(Caliper LS,肽22;Perkin Elmer,USA)的底物混合物。然后使用EZ Reader仪器测定RET底物肽的转化水平。缓冲成分的最终试验浓度如下:50mM HEPES,0.075% (v/v) Brij-35,0.10% (v/v) 聚山梨醇酯20,0.02% (w/v) NaN₃,10mM MgCl₂和2mM DDT。全部示例性的化合物显示出具有IC₅₀值<1 μ M的RET激酶结构域。

[0198] VEGFR2生物化学测定

[0199] VEGFR-2试验与RET试验相同,但是用1-2nM重组VEGFR-2替代RET。全部示例性的化合物显示出具有IC₅₀值<1 μ M值的VEGFR2激酶结构域。

[0200] FLT3生物化学测定

[0201] FLT3试验与RET试验相同,但是用1-2nM重组FLT3替代RET。此外,用1.0-1.5 μ M荧光标记的FLT3底物肽(Caliper LS,肽2;Perkin Elmer,USA)替代肽22。全部示例性的化合物显示出具有IC₅₀值<1 μ M值的FLT3激酶结构域。

[0202] 细胞培养试验

[0203] 在具有5%小牛血清(NIH3T3)或10%胎牛血清(RAT1)、2mM L-谷氨酰胺和100单位/ml青霉素-链霉素的DMEM培养基(GIBCO,Paisley,PA)中培养RET癌基因转化的成纤维细胞。使HEK 293细胞生长在补充了10%胎牛血清、2mM L-谷氨酰胺和100单位/ml青霉素-链霉素(GIBCO,Paisley,PA)的DMEM中。使用lipofectamine试剂,根据制造商的说明(GIBCO)用pcDNA-RET/C634R-V804M、pBABE-RET/PTC1(CCDC6-RET)、-RET/PTC3(NCOA4-RET)或-KIF5B/RET载体进行瞬时转染。用于转染成纤维细胞和HEK 293的RET构建体编码RET蛋白质的短同种型(RET-9)。在补充了10%胎牛血清、2mM L-谷氨酰胺和100单位/ml青霉素-链霉素的RPMI(GIBCO,Paisley,PA)中培养稳定表达RET/PTC3的亲代Ba/F3和Ba/F3细胞。通过用电穿孔转染长同种型RET/PTC3(RET-51)生成稳定表达RET/PTC3蛋白质的Ba/F3细胞。使亲代细胞在10ng/mL IL3的存在下生长。使来源于正常甲状腺滤泡组织并且用SV40Large T无限增殖的Nthy-ori-3-1(NTHY-ORI)细胞系生长在补充了10%胎牛血清、2mM L-谷氨酰胺和100单位/ml青霉素-链霉素的RPMI中。在具有20%小牛血清、2mM L-谷氨酰胺和100单位/ml青霉素-链霉素的RPMI(GIBCO,Paisley,PA)中培养来源于包含RET/C634W突变的人MTC(Carlonagno,1995)的TT细胞系。

[0204] 免疫印迹和生长曲线试验

[0205] 根据标准方法制备蛋白质裂解物。简言之,用包含50mM N-2-羟基乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸(HEPES;pH 7.5)、1% (vol/vol) Triton X-100、150mM NaCl、5mM EGTA、50mM NaF、20mM焦磷酸钠、1mM正钒酸钠、2mM苯基甲基磺酰氟(PMSF)和1μg/mL抑肽酶的缓冲液裂解细胞。通过以10,000Xg离心15min净化裂解物。通过改进的Bradford试验(Bio-Rad,Munich,Germany)评价的包含相差无几量的蛋白质的裂解物进行直接蛋白质印迹。用增强的化学发光试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK)检测免疫复合物。当在Y317上磷酸化时识别SHC蛋白质的抗-磷酸-Shc (#Y317)来自Upstate Biotechnology Inc. (Lake Placid, NY)。抗-Shc (H-108)来自Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)。对在Thr202/Tyr204上磷酸化的p44/42MAPK(ERK1/2)具有特异性的抗-MAPK (#9101)和抗-磷酸-MAPK (#9102)来自Cell Signaling Technologies (Danvers, MA, USA)。对在Tyr1175上磷酸化的VEGFR2/KDR具有特异性的抗-磷酸-VEGFR-2/KDR (#2479)和抗-VEGFR-2/KDR (#2478)来自Cell Signaling Technologies (Danvers, MA, USA)。对在Ser235-236上磷酸化的S6核糖体蛋白具有特异性的抗-磷酸-S6核糖体蛋白 (#2211)、抗-S6核糖体蛋白 (#2217)、抗-p70S6激酶(p70S6K) (#2708)和抗-磷酸p70S6激酶(T389) (#9234)来自Cell Signaling Technologies (Danvers, MA, USA)。抗-RET是针对人RET的酪氨酸激酶蛋白质片段(Santoro, 1995)的多克隆抗体。抗-磷酸905是识别在Y905上磷酸化的RET蛋白质的磷酸-特异性多克隆抗体。抗-磷酸1062是识别在Y1062上磷酸化的RET蛋白质的磷酸-特异性多克隆抗体。与辣根过氧化物酶偶合的二次抗体来自Santa Cruz Biotechnology。

[0206] IC₅₀值

[0207] 对于这些实施例,使用曲线拟合PRISM软件(GraphPad Software)将剂量响应曲线和IC₅₀剂量制图。未配对学生-t检验(InStat program, GraphPad软件)用于比较肿瘤生长。P值在p<.05时具有统计学显著性。

[0208] 上述实施例中定义了本文公开的化合物和方法的一些实施方案。应当理解,这些

实施例在显示本发明具体实施方案的同时仅作为示例给出。从上述讨论和这些实施例中，本领域技术人员可以确定本公开的主要特征，并且在不脱离其精神和范围的情况下，可以进行各种改变和变型，以使本文所述的组合物和方法适应不同的用途和条件。可以进行各种改变，且在不脱离本公开主要范围的情况下用等效方案替代其要素。此外，可以进行许多变型以使特定情形或材料适应于本公开的教导，而不脱离其主要范围。

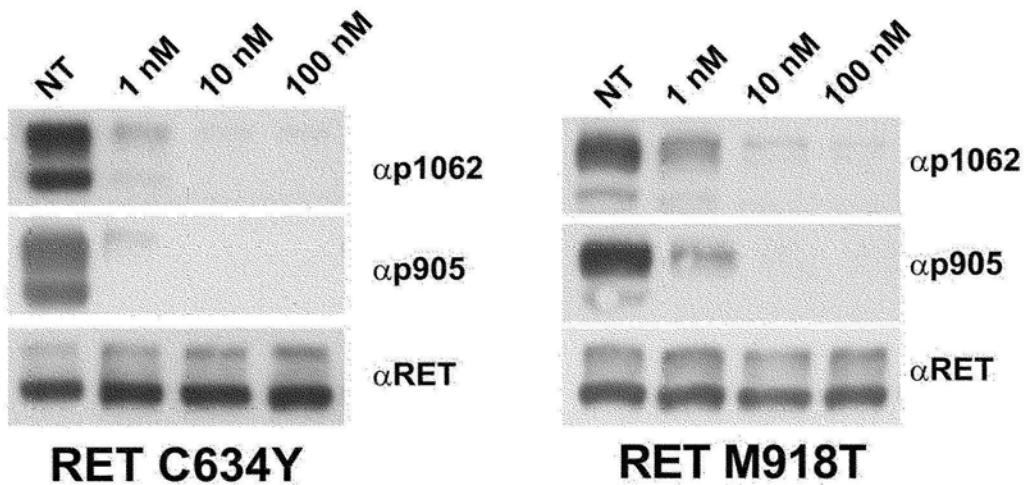


图1

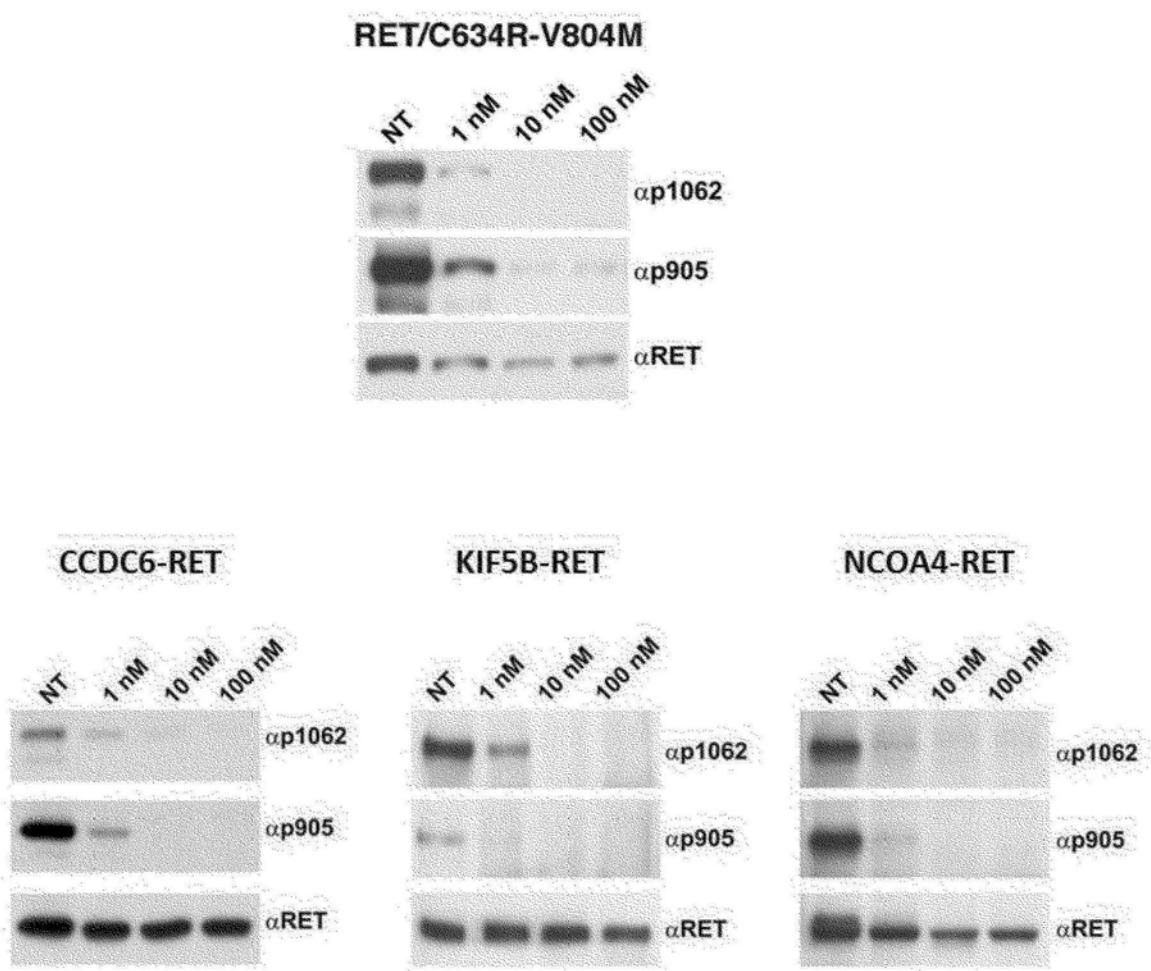


图2

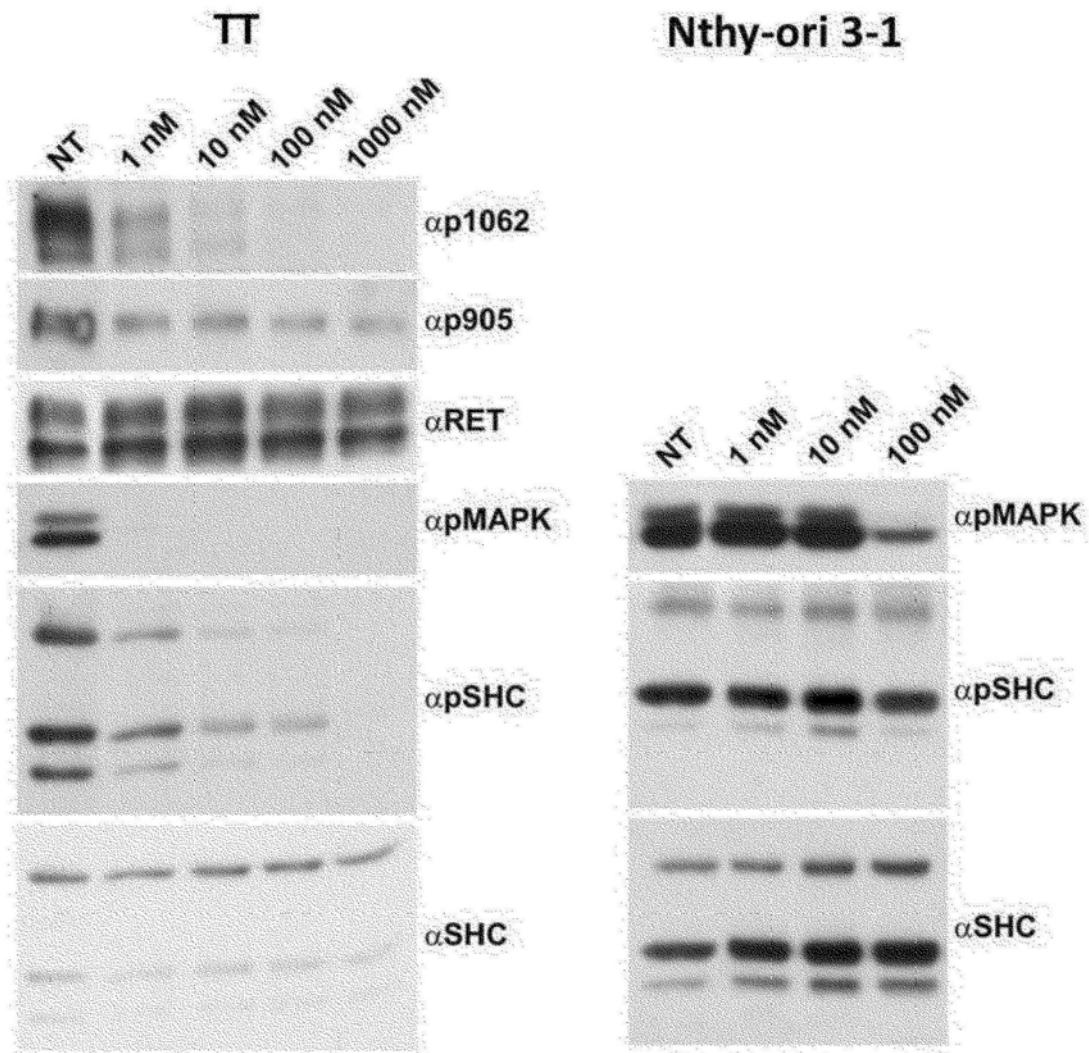


图3

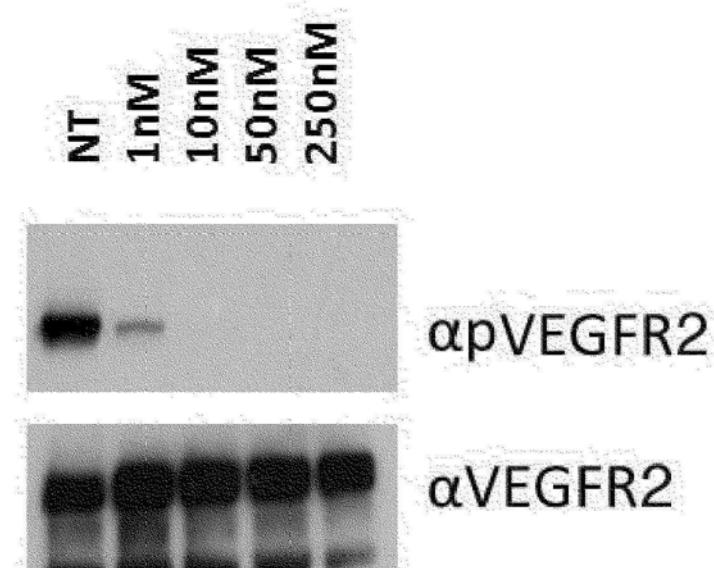


图4

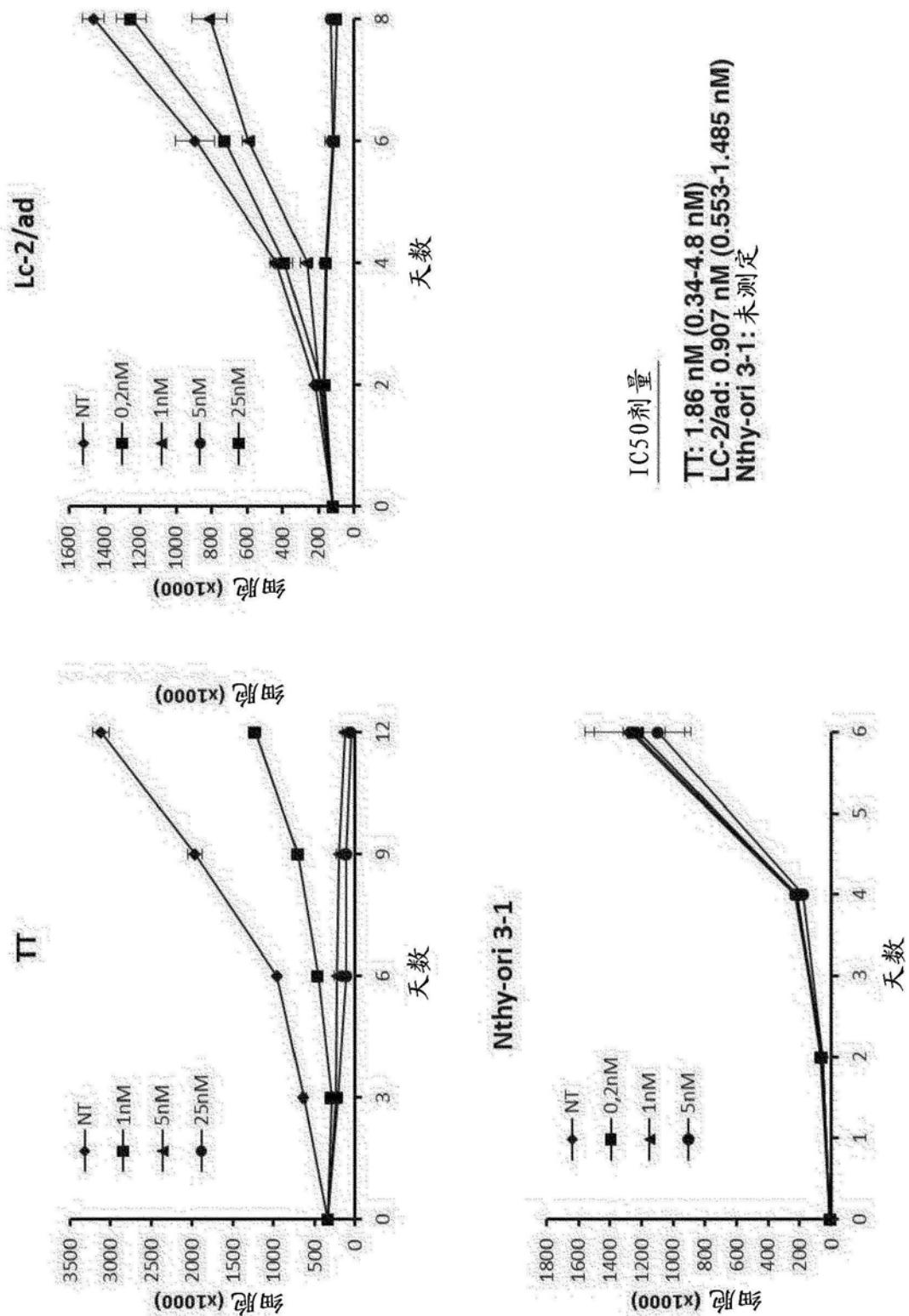


图5

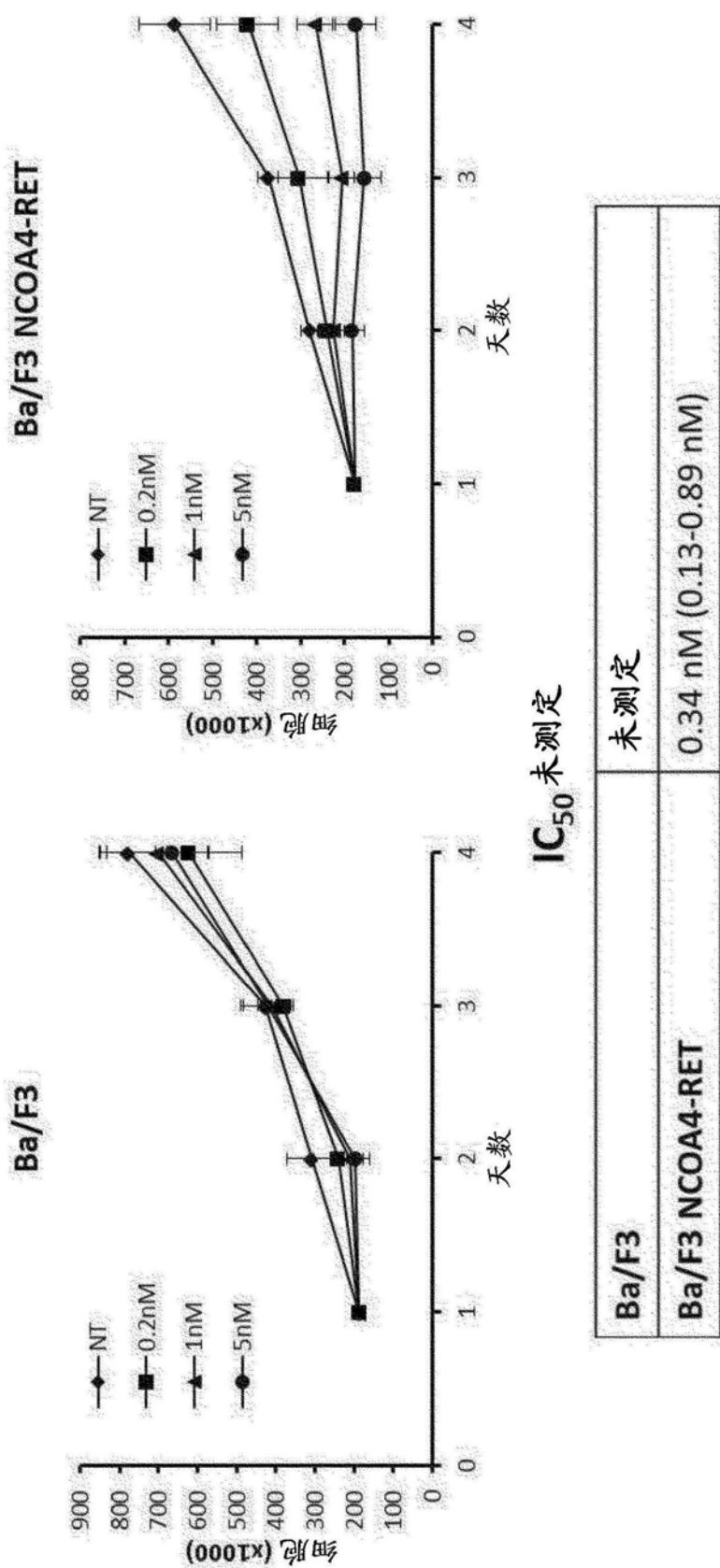


图6

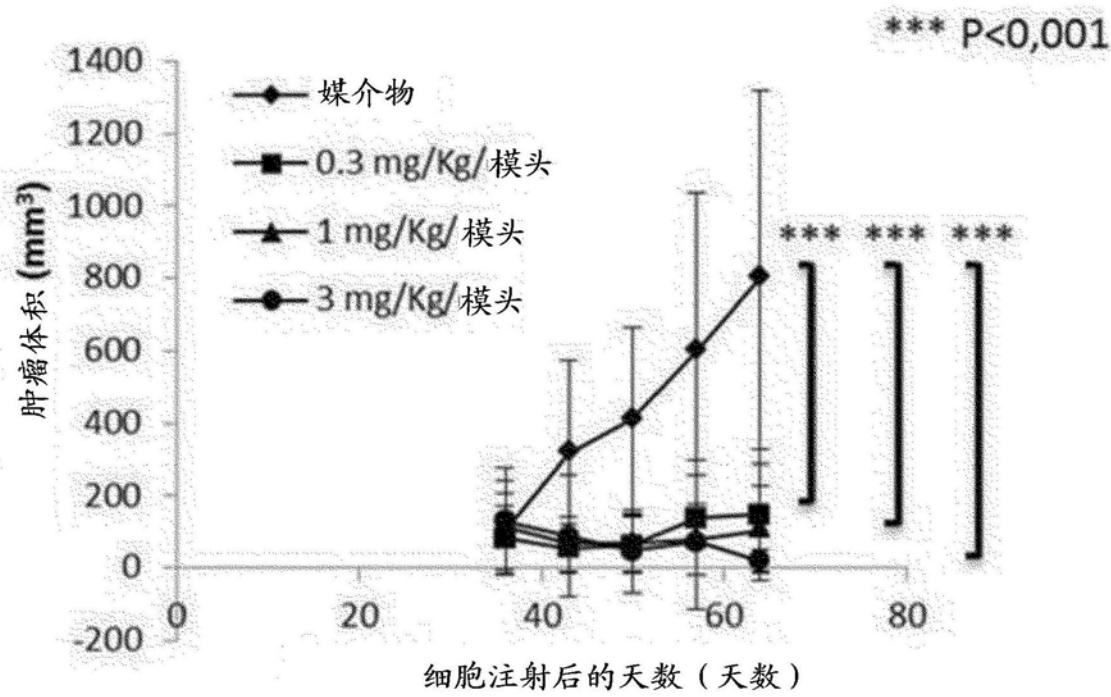


图7

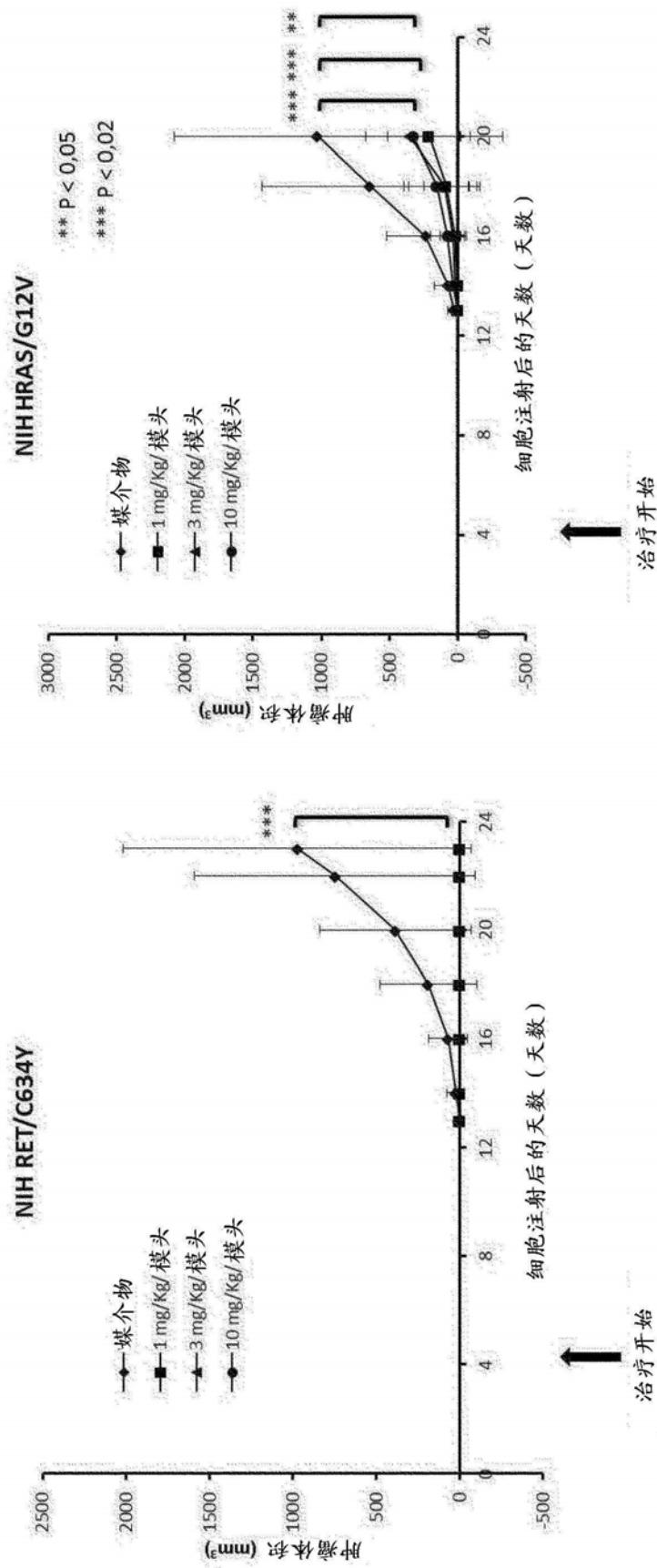
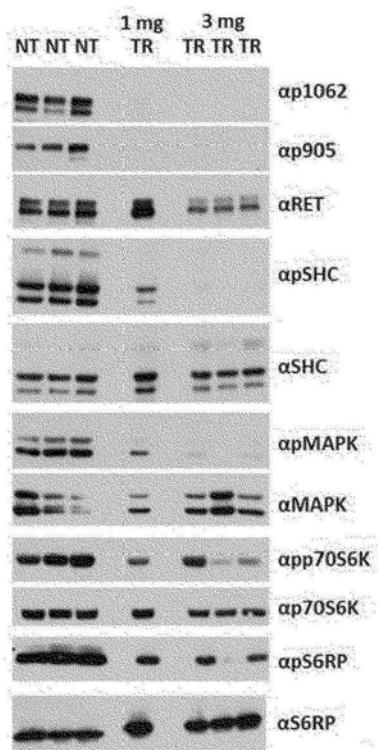
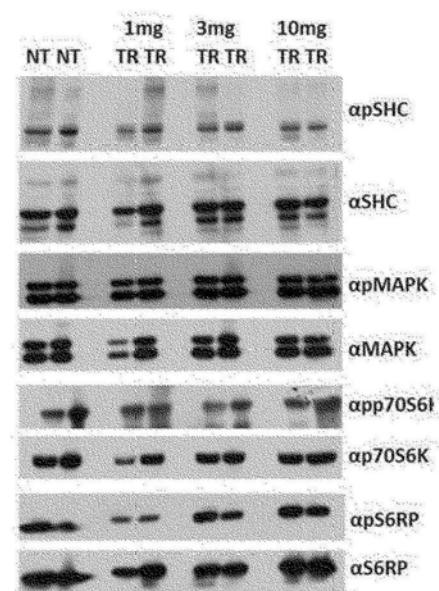


图8

NIH RET/C634Y



NIH HRAS/G12V



2015

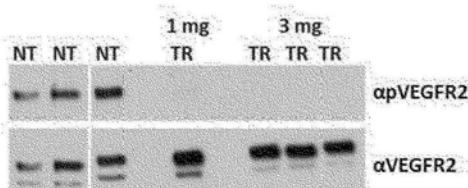


图9

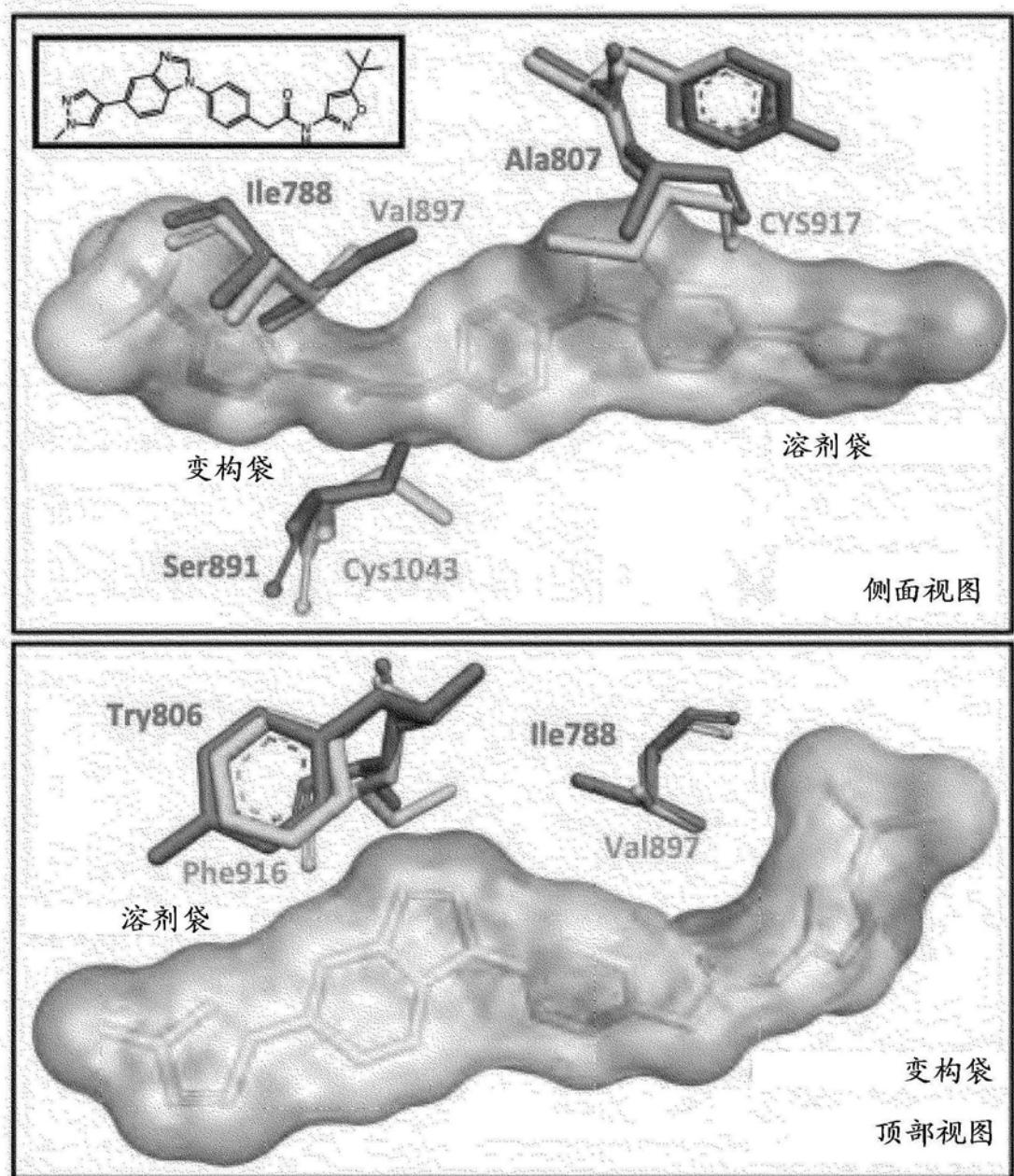


图10