



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104140418 B

(45)授权公告日 2016.08.24

(21)申请号 201410401604.7

(22)申请日 2014.08.15

(73)专利权人 常州润诺生物科技有限公司

地址 213100 江苏省常州市新北区河海西路106号

专利权人 广州博济医药生物技术股份有限公司

(72)发明人 朱孝云 唐春雷

(51)Int.Cl.

C07D 403/04(2006.01)

A61K 31/506(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 35/02(2006.01)

A61P 11/00(2006.01)

审查员 郝小燕

权利要求书1页 说明书10页

(54)发明名称

2-(2,4,5-取代苯胺)嘧啶衍生物及其用途

(57)摘要

本发明涉及某些2-(2,4,5-取代苯氨基)嘧啶化合物及其药学上可接受的盐,这些化合物或其盐特别在作用于某些突变形式的表皮生长因子受体(例如L858R激活突变体、Exon19缺失激活突变体、和T790M抗性突变体)的功能方面是有用的抗癌剂。本发明还涉及包含所述化合物及其盐特别是有用的这些化合物和盐的多晶型的药物组合物、可用于制造所述化合物的中间体、以及利用所述化合物及其盐治疗过度增生性疾病或症状如各种癌症和良性前列腺增生的方法。

1. 化合物或者其药学上可接受的盐, 其中所述化合物是:

N-(2-{2-二甲氨基乙基-甲氨基}-4-甲氧基-5-{[4-(1-(D₃-甲基)吡啶-3-基)嘧啶-2-基]氨基}苯基)丙-2-烯酰胺;

N-(2-{2-二甲氨基乙基-甲氨基}-4-(D₃-甲氧基)-5-{[4-(1-甲基吡啶-3-基)嘧啶-2-基]氨基}苯基)丙-2-烯酰胺;

N-(2-{2-二甲氨基乙基-(D₃-甲基)氨基}-4-甲氧基-5-{[4-(1-甲基吡啶-3-基)嘧啶-2-基]氨基}苯基)丙-2-烯酰胺;

N-(2-{2-(D₃-甲基)氨基乙基-甲氨基}-4-甲氧基-5-{[4-(1-甲基吡啶-3-基)嘧啶-2-基]氨基}苯基)丙-2-烯酰胺;

N-(2-{2-[甲基(D₃-甲基)氨基]乙基-甲氨基}-4-甲氧基-5-{[4-(1-甲基吡啶-3-基)嘧啶-2-基]氨基}苯基)丙-2-烯酰胺。

2. 如权利要求1中所述的化合物或者其药学上可接受的盐, 其中所述药学上可接受的盐是甲磺酸盐。

3. 如权利要求1至2中任一项所述的化合物或者其药学上可接受的盐用于治疗癌症的药物生产的用途。

4. 如权利要求3所述的化合物或者其药学上可接受的盐的用途, 其中所述癌症是非小细胞肺癌。

2-(2,4,5-取代苯胺)嘧啶衍生物及其用途

技术领域

[0001] 2-(2,4,5-取代苯氨基)嘧啶化合物及其药学上可接受的盐,属于医药领域。

背景技术

[0002] 本发明涉及某些2-(2,4,5-取代苯氨基)嘧啶化合物及其药学上可接受的盐,这些化合物或其盐特别在作用于某些突变形式的表皮生长因子受体(例如L858R激活突变体、Exon19缺失激活突变体、和T790M抗性突变体)的功能方面是有用的抗癌剂。本发明还涉及包含所述化合物及其盐特别是有用的这些化合物和盐的多晶型的药物组合物、可用于制造所述化合物的中间体、以及利用所述化合物及其盐治疗过度增生性疾病或症状如各种癌症和良性前列腺增生的方法。

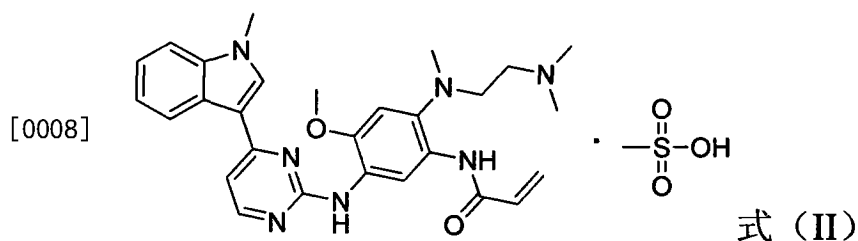
[0003] EGFR是erbB受体家族的跨膜蛋白酶氨酸激酶成员。当与生长因子配体(例如表皮生长因子(EGF))结合时,受体可以与附加的EGFR分子发生同源二聚,或者与另一家族成员(例如erbB2(HER2)、erbB3(HER3)、或者erbB4(HER4))发生异源二聚。

[0004] erbB家族信号传导的失调促进增殖、侵入、转移、血管生成、和肿瘤细胞生存,并且已在许多(包括肺癌、头颈部癌和乳腺癌的那些)人类癌症中得到描述。因此,erbB家族代表抗癌药物开发的合理靶点,靶向EGFR或erbB2的许多药剂现在是临床上可用的,包括吉非替尼、厄洛替尼、拉帕替尼。

[0005] 2004年有报道(Science[2004J第304期,1497-500和New England Journal of medicine[2004J第350期,2129-39)在非小细胞肺癌(NSCLC)中EGFR的激活突变与对吉非替尼治疗的反应有关。最普遍的EGFR激活突变(L858R和delE746_A750)导致相对于野生型(WT)EGFR而言,对小分子酪氨酸激酶抑制剂(例如吉非替尼和厄洛替尼)的亲合力增加、以及对三磷酸腺苷(ATP)亲合力下降。最后,产生对吉非替尼或厄洛替尼治疗的获得性抗性,例如由于看门残基T790M的突变,据报道在50%的临床耐药性患者中检测到该突变。该突变不被认为是在空间上阻碍吉非替尼或厄洛替尼与EGFR的结合,仅将对ATP的亲合力改变到相当于WTEGFR的水平。

[0006] 鉴于这种突变在靶向EGFR的现有疗法的抗性中的重要性,认为可以抑制包含看门基因突变的EGFR的药物在癌症的治疗中特别有用。相对于激活突变体形式的EGFR(例如L858R EGFR突变体、或者delE746A750突变体或Exon19缺失EGFR突变体)和/或抗性突变体形式的EGFR(例如T790M EGFR突变体),对于可表现出对WT EGFR的有利效能特性、和/或相对其它酶受体的选择性的化合物仍然存在着需求,所述选择性使得这些化合物特别有希望被开发成治疗剂。

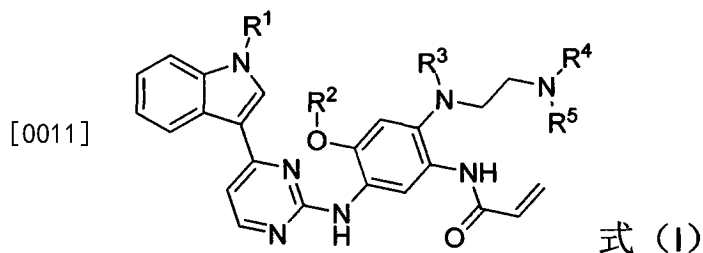
[0007] 中国专利201280033773公开了式(II)化合物AZD9291,对T790M EGFR突变体肿瘤有效,但其在体内容易被代谢脱甲基,增加了增加肝脏代谢负担,引起肝毒性,且造成体内药代性质半衰期较短,并最终影响药物抗癌活性。



[0009] 与其它已知的EGFR/EGFR突变体抑制剂相比,本发明的化合物也可显示有利的物理性质(例如,较高的水溶解度、较高的渗透性、和/或较低的血浆蛋白结合)和较低的毒性特征。

发明内容

[0010] 本发明提供的化学式(I)的化合物或者其药学上可接受的盐:



[0012] 其中:

[0013] R^1 是选自甲基和1至3个氘代原子的甲基;

[0014] R^2 是选自甲基和1至3个氘代原子的甲基;

[0015] R^3 是选自甲基和1至3个氘代原子的甲基;

[0016] R^4 是选自甲基和1至3个氘代原子的甲基;

[0017] R^5 是选自甲基和1至3个氘代原子的甲基;

[0018] R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 基团中至少有一个选自1至3个氘代原子的甲基。

[0019] 所述的化学式(I)的化合物或者其药学上可接受的盐或者溶剂化物,其中所述化合物是:

[0020] N-(2-{2-二甲氨基乙基-甲氨基}-4-甲氧基-5-{[4-(1-(D₃-甲基)吡啶-3-基)嘧啶-2-基]氨基}苯基)丙-2-烯酰胺;

[0021] N-(2-{2-二甲氨基乙基-甲氨基}-4-(D₃-甲氧基)-5-{[4-(1-甲基吡啶-3-基)嘧啶-2-基]氨基}苯基)丙-2-烯酰胺;

[0022] N-(2-{2-二甲氨基乙基-(D₃-甲基)氨基}-4-甲氧基-5-{[4-(1-甲基吡啶-3-基)嘧啶-2-基]氨基}苯基)丙-2-烯酰胺;

[0023] N-(2-{2-二(D₃-甲基)氨基乙基-甲氨基}-4-甲氧基-5-{[4-(1-甲基吡啶-3-基)嘧啶-2-基]氨基}苯基)丙-2-烯酰胺;

[0024] N-(2-{2-[甲基(D₃-甲基)氨基]乙基-甲氨基}-4-甲氧基-5-{[4-(1-甲基吡啶-3-基)嘧啶-2-基]氨基}苯基)丙-2-烯酰胺;

[0025] 所述的化学式(I)的化合物的药学上可接受的盐或者溶剂化物,其中所述药学上可接受的盐,酸根包括无机酸如盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、磷酸、二硫化氢,以及有机酸如对甲苯磺酸、水杨酸、酒石酸、酒石氢酸、抗坏血酸、马来酸、苯磺酸、富马酸、葡萄糖酸、葡萄

糖醛酸、甲酸、谷氨酸、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、乳酸、草酸、对溴苯磺酸、碳酸、柠檬酸、苯甲酸、苹果酸、乙酸和相关的无机与有机酸；优选甲磺酸。

[0026] 所述的化学式(I)的化合物或者其药学上可接受的盐用于治疗癌症的药物生产的用途,所述癌症可以选自卵巢癌、宫颈癌、结肠直肠癌、乳腺癌、膜腺癌、胶质瘤、胶质母细胞瘤、黑色素瘤、前列腺癌、白血病、淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、胃癌、肺癌、肝细胞癌、胃癌、胃肠道间质瘤(GIST)、甲状腺癌、胆管癌、子宫内膜癌、肾癌、间变性大细胞淋巴瘤、急性髓细胞白血病(AML)、多发性骨髓瘤、黑色素瘤、间皮瘤；优选肺癌,进一步优选非小细胞肺癌。

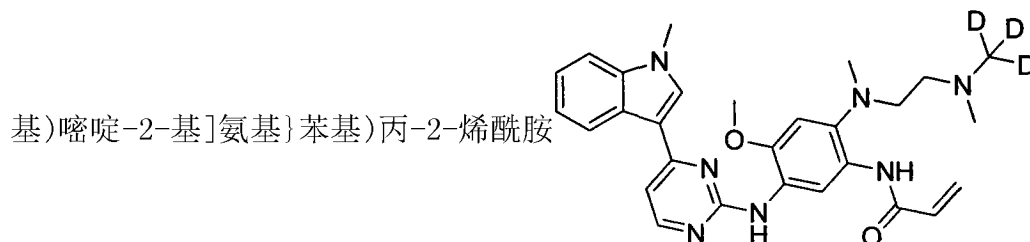
具体实施方式

[0027] 实施例

[0028] 本发明中的某些优选实施例方案在以下非限制性实施例中说明性示出。

[0029] 实施例1A

[0030] N-(2-{2-[甲基(D₃-甲基)氨基]乙基-甲氨基}-4-甲氧基-5-{[4-(1-甲基吡啶-3-



[0031] 于冰浴条件下向N¹-(2-[甲基(D₃-甲基)氨基]乙基)-5-甲氧基-N¹-甲基-N⁴-[4-(1-甲基吡啶-3-基)嘧啶-2-基]苯-1,2,4-三胺(中间体1,20g)在THF(200mL)和水(20mL)中加入6.9g氢氧化钠。经搅拌溶液中添加丙烯酰氯4.05g,室温搅拌30min,将该混合物于室温下搅拌1小时。TLC检测反应结束后,反应液加入200mL水和20mL氨水,固体析出,过滤。收集所得固体,用水清洗,于50℃下干燥8小时,得标题化合物(收率86%)。

[0032] ¹H-NMR: 2.70(3H,s), 2.84(3H,s), 3.37(4H,s), 3.86(3H,s), 3.92(3H,s), 5.76(1H,d), 6.28(1H,d), 6.66(1H,dd), 7.04-7.25(2H,m), 7.29(1H,t), 7.44(1H,d), 7.59(1H,d), 8.25(2H,s), 8.83(1H,s), 9.45(1H,s), 9.54(1H,s)。

[0033] ESI+: [M+H⁺] 503.29

[0034] 实施例1B

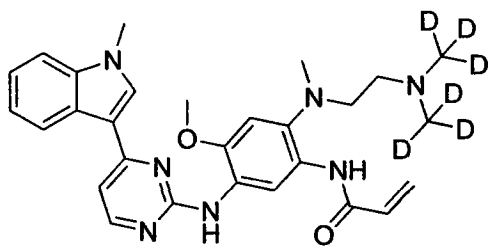
[0035] N-(2-{2-[甲基(D₃-甲基)氨基]乙基-甲氨基}-4-甲氧基-5-{[4-(1-甲基吡啶-3-基)嘧啶-2-基]氨基}苯基)丙-2-烯酰胺甲磺酸盐

[0036] 将上步得到的N-(2-{2-[甲基(D₃-甲基)氨基]乙基-甲氨基}-4-甲氧基-5-{[4-(1-甲基吡啶-3-基)嘧啶-2-基]氨基}苯基)丙-2-烯酰胺20.5g(1.0eq)加入到500ml三口瓶中,溶于120ml乙醇和80ml乙酸乙酯,室温下滴加4.1g甲磺酸(1.05eq)+40ml乙酸乙酯,约1小时滴完,滴完后于该温度保温1.5~2小时,然后缓慢冷却至室温,过滤,滤饼用乙酸乙酯/乙醇溶液(2:1,v/v)洗涤1次后,过滤,烘干,得到18.0g产品,收率83%。

[0037] 实施例2A

[0038] N-(2-{2-二(D₃-甲基)氨基乙基-甲氨基}-4-甲氧基-5-{[4-(1-甲基吡啶-3-基)嘧啶-2-基]氨基}苯基)丙-2-烯酰胺

[0039]



[0040] 于冰浴条件下向 N^1 -(2-[二(D_3 -甲基)氨基]乙基)-5-甲氧基- N^1 -甲基- N^4 -[4-(1-甲基咪唑-3-基)嘧啶-2-基]苯-1,2,4-三胺(中间体2,20g)在THF(200mL)和水(20mL)中加入6.9g氢氧化钠。经搅拌溶液中添加丙烯酰氯4.05g,室温搅拌30min,将该混合物于室温下搅拌1小时。TLC检测反应结束后,反应液加入200mL水和20mL氨水,固体析出,过滤。收集所得固体,用水清洗,于50℃下干燥8小时,得标题化合物(收率88%)。

[0041] ^1H -NMR: 2.72(3H,s), 3.35(4H,s), 3.88(3H,s), 3.921(3H,s), 5.78(1H,d), 6.26(1H,d), 6.67(1H,dd), 7.04-7.24(2H,m), 7.30(1H,t), 7.43(1H,d), 7.58(1H,d), 8.24(2H,s), 8.84(1H,s), 9.44(1H,s), 9.55(1H,s)。

[0042] ESI+: $[M+H]^+$ 506.30

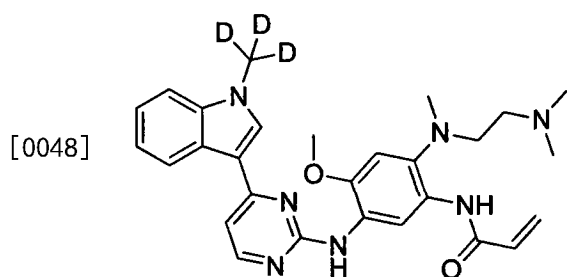
[0043] 实施例2B

[0044] N -(2-{2-二(D_3 -甲基)氨基乙基-甲氨基}-4-甲氧基-5-{[4-(1-甲基咪唑-3-基)嘧啶-2-基]氨基}苯基)丙-2-烯酰胺甲磺酸盐

[0045] 将上步得到的 N -(2-{2-二(D_3 -甲基)氨基乙基-甲氨基}-4-甲氧基-5-{[4-(1-甲基咪唑-3-基)嘧啶-2-基]氨基}苯基)丙-2-烯酰胺20.5g(1.0eq)加入到500ml三口瓶中,溶于120ml乙醇和80ml乙酸乙酯,室温下滴加4.1g甲磺酸(1.05eq)+40ml乙酸乙酯,约1小时滴完,滴完后于该温度保温1.5~2小时,然后缓慢冷却至室温,过滤,滤饼用乙酸乙酯/乙醇溶液(2:1,v/v)洗涤1次后,过滤,烘干,得到黄色固体,收率85%。

[0046] 实施例3A

[0047] N -(2-{2-二甲氨基乙基-甲氨基}-4-甲氧基-5-{[4-(1-(D_3 -甲基)咪唑-3-基)嘧啶-2-基]氨基}苯基)丙-2-烯酰胺



[0049] 于冰浴条件下向 N^1 -(2-二甲氨基乙基)-5-甲氧基- N^1 -甲基- N^4 -[4-(1-[D_3 -甲基咪唑]-3-基)嘧啶-2-基]苯-1,2,4-三胺(中间体3,20g)在THF(200mL)和水(20mL)中加入6.9g氢氧化钠。经搅拌溶液中添加丙烯酰氯4.05g,室温搅拌30min,将该混合物于室温下搅拌1小时。TLC检测反应结束后,反应液加入200mL水和20mL氨水,固体析出,过滤。收集所得固体,用水清洗,于50℃下干燥8小时,得标题化合物(收率87%)。

[0050] ^1H -NMR: 2.70(3H,s), 2.88(6H,d), 3.35(4H,s), 3.92(3H,s), 5.77(1H,d), 6.27(1H,d), 6.67(1H,dd), 7.04-7.25(2H,m), 7.28(1H,t), 7.46(1H,d), 7.59(1H,d), 8.23(2H,s), 8.85(1H,s), 9.45(1H,s), 9.55(1H,s)。

[0051] ESI+: $[M+H]^+$ 503.29

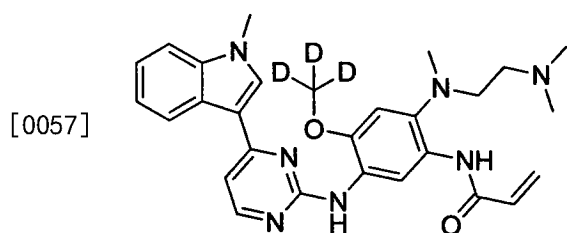
[0052] 实施例3B

[0053] N-(2-{2-二甲氨基乙基-甲氨基}-4-甲氧基-5-{[4-(1-(D₃-甲基)吡啶-3-基)嘧啶-2-基]氨基}苯基)丙-2-烯酰胺

[0054] 将上步得到的N-(2-{2-二甲氨基乙基-甲氨基}-4-甲氧基-5-{[4-(1-(D₃-甲基)吡啶-3-基)嘧啶-2-基]氨基}苯基)丙-2-烯酰胺20.5g(1.0eq)加入到500ml三口瓶中,溶于120ml乙醇和80ml乙酸乙酯,室温下滴加4.1g甲磺酸(1.05eq)+40ml乙酸乙酯,约1小时滴完,滴完后于该温度保温1.5~2小时,然后缓慢冷却至室温,过滤,滤饼用乙酸乙酯/乙醇溶液(2:1,v/v)洗涤1次后,过滤,烘干,得到黄色固体,收率81%。

[0055] 实施例4A

[0056] N-(2-{2-二甲氨基乙基-甲氨基}-4-(D₃-甲氧基)-5-{[4-(1-甲基吡啶-3-基)嘧啶-2-基]氨基}苯基)丙-2-烯酰胺



[0058] 于冰浴条件下向N¹-(2-二甲基氨基乙基)-5-(D₃-甲氧基)-N¹-甲基-N⁴-[4-(1-甲基吡啶-3-基)嘧啶-2-基]苯-1,2,4-三胺(中间体4,20g)在THF(200mL)和水(20mL)中加入6.9g氢氧化钠。经搅拌溶液中添加丙烯酰氯4.05g,室温搅拌30min,将该混合物于室温下搅拌1小时。TLC检测反应结束后,反应液加入200mL水和20mL氨水,固体析出,过滤。收集所得固体,用水清洗,于50℃下干燥8小时,得标题化合物(收率85%)。

[0059] ¹H-NMR:2.70(3H,s),2.88(6H,d),3.35(4H,s),3.86(3H,s),5.77(1H,d),6.27(1H,d),6.67(1H,dd),7.04-7.25(2H,m),7.28(1H,t),7.46(1H,d),7.59(1H,d),8.23(2H,s),8.85(1H,s),9.45(1H,s),9.55(1H,s)。

[0060] ESI+: $[M+H]^+$ 503.29

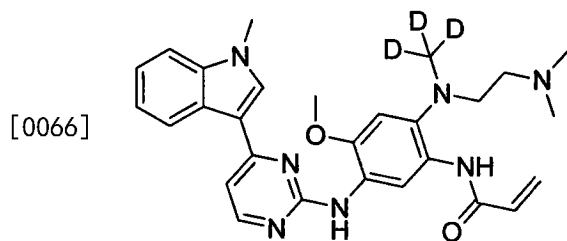
[0061] 实施例4B

[0062] N-(2-{2-二甲氨基乙基-甲氨基}-4-(D₃-甲氧基)-5-{[4-(1-甲基吡啶-3-基)嘧啶-2-基]氨基}苯基)丙-2-烯酰胺甲磺酸盐

[0063] 将上步得到的N-(2-{2-二甲氨基乙基-甲氨基}-4-(D₃-甲氧基)-5-{[4-(1-甲基吡啶-3-基)嘧啶-2-基]氨基}苯基)丙-2-烯酰胺20.5g(1.0eq)加入到500ml三口瓶中,溶于120ml乙醇和80ml乙酸乙酯,室温下滴加4.1g甲磺酸(1.05eq)+40ml乙酸乙酯,约1小时滴完,滴完后于该温度保温1.5~2小时,然后缓慢冷却至室温,过滤,滤饼用乙酸乙酯/乙醇溶液(2:1,v/v)洗涤1次后,过滤,烘干,得到黄色固体,收率88%。

[0064] 实施例5A

[0065] N-(2-{2-二甲氨基乙基-(D₃-甲基)氨基}-4-甲氧基-5-{[4-(1-甲基吡啶-3-基)嘧啶-2-基]氨基}苯基)丙-2-烯酰胺



[0067] 制备方法与N-(2-{2-二甲氨基乙基-甲氨基}-4-(D₃-甲氧基)-5-{[4-(1-甲基吡啶-3-基)嘧啶-2-基]氨基}苯基)丙-2-烯酰胺相同,收率70%。

[0068] ESI+: [M+H]⁺503.29

[0069] 实施例5B

[0070] N-(2-{2-二甲氨基乙基-(D₃-甲基)氨基}-4-甲氧基-5-{[4-(1-甲基吡啶-3-基)嘧啶-2-基]氨基}苯基)丙-2-烯酰胺甲磺酸盐

[0071] 制备方法与N-(2-{2-二甲氨基乙基-甲氨基}-4-(D₃-甲氧基)-5-{[4-(1-甲基吡啶-3-基)嘧啶-2-基]氨基}苯基)丙-2-烯酰胺甲磺酸盐相同,黄色固体,收率79%。

[0072] 中间体1:N¹-(2-[甲基(D₃-甲基)氨基]乙基)-5-甲氧基-N¹-甲基-N⁴-[4-(1-甲基吡啶-3-基)嘧啶-2-基]苯-1,2,4-三胺(中间体1)

[0073] 将N'-(2-[甲基(D₃-甲基)氨基]乙基)-2-甲氧基-N'-甲基-N-[4-(1-甲基吡啶-3-基)嘧啶-2-基]-5-硝基苯-1,4-二胺(中间体5,44g)、铁(31g)和NH₄Cl(1.9g)在乙醇(120mL)和水(40mL)中的混合物加热回流3.5小时。通过使用SCX柱的离子交换层析法对该粗混合物进行纯化。用甲醇-氨从柱中洗脱,进行真空浓缩,得米黄色标题化合物(90%)。

[0074] 中间体2:N¹-(2-[二(D₃-甲基)氨基]乙基)-5-甲氧基-N¹-甲基-N⁴-[4-(1-甲基吡啶-3-基)嘧啶-2-基]苯-1,2,4-三胺

[0075] 中间体3:N¹-(2-二甲氨基乙基)-5-甲氧基-N¹-甲基-N⁴-[4-(1-[D₃-甲基吡啶]-3-基)嘧啶-2-基]苯-1,2,4-三胺

[0076] 中间体4:N¹-(2-二甲氨基乙基)-5-(D₃-甲氧基)-N¹-甲基-N⁴-[4-(1-甲基吡啶-3-基)嘧啶-2-基]苯-1,2,4-三胺

[0077] 制备方法与中间体1相同。

[0078] 中间体5:N'-(2-[甲基(D₃-甲基)氨基]乙基)-2-甲氧基-N'-甲基-N-[4-(1-甲基吡啶-3-基)嘧啶-2-基]-5-硝基苯-1,4-二胺

[0079] 500ml三口瓶中,加入190ml DMA,16.9gN,N'-二甲基-N'-(D₃-甲基)-乙烷,23.1gDIPEA,于室温搅拌30分钟后,加入47gN-(4-氟-2-甲氧基-5-硝基苯基)-4-(1-甲基吡啶-3-基)嘧啶-2-胺(中间体6),然后将此固液悬浮物升温至85℃反应2-3小时,TLC和质谱监控反应完全后,趁热过滤。滤液中加入300ml乙腈(包括洗涤滤饼的乙腈量),降温至5℃左右后,此时会有大量红色产品析出,过滤,在50℃减压烘干,得到51g产品,收率90%,无需纯化,直接用于下步反应。

[0080] 中间体6:N-(4-氟-2-甲氧基-5-硝基苯基)-4-(1-甲基吡啶-3-基)嘧啶-2-胺

[0081] 在装好机械搅拌的1L三口瓶中,加入500ml1,4-二氧六环,30g3-(2-氯嘧啶-4-基)-1-甲基吡啶(中间体7),搅拌下加入30g对甲苯磺酸和4694-氟-2-甲氧基-5-硝基苯胺,然后将此固液混悬物升温至95-102℃反应3小时,TLC监控反应完全,然后降温至60℃,滴加稀释过的浓氨水,调节pH,然后再降温至10~15℃搅拌30分钟后过滤,滤饼用5%碳酸氢钠

溶液洗涤一次,再用冷的乙醇洗涤1次,过滤后于50℃烘干,得到47g产品,收率74%,无需纯化,直接用于下步反应。

[0082] 中间体7:3-(2-氯嘧啶-4-基)-1-甲基吡啶

[0083] 在1L三口瓶中加入40g 2,4-二氯嘧啶,200mL DME,搅拌溶解后,降温至10~15℃,分批迅速加入45g无水三氯化铁,保持温度不超过35℃,每批加完保持.搅拌15分钟。52.8g 1-甲基吡啶滴加到上述反应体系中,然后再缓慢升温至50℃,搅拌过夜,TLC监控基本反应完全。降温至5~10℃,缓慢滴加甲醇水溶液(1:2,v/v)约300mL,此时会有大量粘稠固体析出,过滤,滤饼用甲醇洗涤2次,过滤后于50℃减压烘干,收率85%。

[0084] 中间体8:1-(D₃-甲基)吡啶

[0085] 5g吡啶溶于20mL二氯甲烷,加入0.5g碳酸钾,冰浴下滴加2mL氘代碘甲烷二氯甲烷溶液,室温反应3小时,TLC检测反应结束。加入亚硫酸钠溶液,萃取旋干,得到产品,收率95%。

[0086] 测试1:Exon19缺失EGFR(激活单突变体)细胞磷酸化测试

[0087] 将人肺细胞系PC9(Exon19缺失EGFR)维持在含有10%胎牛血清和2mM谷氨酰胺的RPMI1640中。使细胞在有5%CO₂的加湿培养箱中于37度生长。将40uL细胞播种(10000细胞/孔)于Corning黑色透明底384孔板中的生长培养基中,于37度下在5%CO₂中培养过夜。使用Echo555声波定剂量(Cacoustically dosed),将100%DMSO中连续稀释的化合物加至细胞。将培养板再培养2小时,轻柔混合培养基之后,将40uL裂解缓冲液添加到各孔中。将Greiner黑色高结合力384孔板用捕捉抗体覆盖,然后用3%BSA进行封闭。接着去除封闭液,将15uL裂解液转移到Greiner黑色高结合力384孔板中,培养2小时。轻柔混合和用PBS清洗培养板之后,添加20uL检测抗体,培养2小时。轻柔混合和用PBS清洗培养板之后,添加20uL QuantaBlu荧光过氧化物酶底物,培养1小时。将20uL QuantaBlu终止溶液添加到培养板中,在采用352nm激发波长和460nm发射波长的Envision微孔板检测仪读出荧光。将各化合物获得的数据输入合适的软件包以执行曲线拟合分析。基于此数据并通过计算获得50%效果所需的化合物浓度来确定IC₅₀值。

[0088] 测试2:L858R/T790M EGFR(双突变体)细胞磷酸化测试

[0089] 将人肺细胞系NCI-H1975维持在含有10%胎牛血清和2mM谷氨酰胺的RPMI1640中。使细胞在有5%CO₂的加湿培养箱中于37度生长。将40uL细胞播种(10000细胞/孔)于Corning黑色透明底384孔板中的生长培养基中,于37度下在5%CO₂中培养过夜。使用Echo555声波定剂量(Cacoustically dosed),将100%DMSO中连续稀释的化合物加至细胞。将培养板再培养2小时,轻柔混合培养基之后,将40uL裂解缓冲液添加到各孔中。将Greiner黑色高结合力384孔板用捕捉抗体覆盖,然后用3%BSA进行封闭。接着去除封闭液,将15uL裂解液转移到Greiner黑色高结合力384孔板中,培养2小时。轻柔混合和用PBS清洗培养板之后,添加20uL检测抗体,培养2小时。轻柔混合和用PBS清洗培养板之后,添加20uL QuantaBlu荧光过氧化物酶底物,培养1小时。将20uL QuantaBlu终止溶液添加到培养板中,在采用352nm激发波长和460nm发射波长的Envision微孔板检测仪读出荧光。将各化合物获得的数据输入合适的软件包以执行曲线拟合分析。基于此数据并通过计算获得50%效果所需的化合物浓度来确定IC₅₀值。

[0090] 测试3:野生型EGFR细胞磷酸化试验

[0091] 将人结肠细胞系LoVo保存在含有3%剥离的Cstripped)胎牛血清和2mM谷氨酰胺的RPMI1640中。使细胞在有5%CO₂的加湿培养箱中于37度生长。将40uL细胞播种(10000细胞/孔)于Corning黑色透明底384孔板中的生长培养基中,于37度下在5%CO₂中培养过夜。使用Echo555声波定剂量Cacoustically dosed),将100%DMSO中连续稀释的化合物加至细胞。将培养板再培养2小时,轻柔混合培养基之后,将40uL裂解缓冲液添加到各孔中。将Greiner黑色高结合力384孔板用捕捉抗体覆盖,然后用3%BSA进行封闭。接着去除封闭液,将15uL裂解液转移到Greiner黑色高结合力384孔板中,培养2小时。轻柔混合和用PBS清洗培养板之后,添加20uL检测抗体,培养2小时。轻柔混合和用PBS清洗培养板之后,添加20uL QuantaBlu荧光过氧化物酶底物,培养1小时。将20uL QuantaBlu终止溶液添加到培养板中,在采用352nm激发波长和460nm发射波长的Envision微孔板检测仪读出荧光。将各化合物获得的数据输入合适的软件包以执行曲线拟合分析。基于此数据并通过计算获得50%效果所需的化合物浓度来确定IC₅₀值。

[0092] 将本专利申请实施例中的检测数据(μ M)显示于下表中,虽然用一定数量的有效数字来陈述检测数据,但不应该认为表示数据已确定精确为有效数字的数。

[0093]

实施例编号	测试1	测试2	测试3
1B	0.01973	0.01270	1.533
2B	0.01974	0.01269	1.500
3B	0.01961	0.01175	1.532

[0094]

4B	0.01988	0.01299	1.498
5B	0.01971	0.01271	1.535
AZD9291	0.01975	0.01271	1.443

[0095] 结果显示,所有实施例化合物与对照药AZD9291针对于单突变和双突变体细胞有相当的活性;对野生型EGF细胞具有更好的选择性。

[0096] 测试4:在人体肝脏微粒体中化合物稳定性的评价

[0097] 将实施例1-5化合物的肝脏微粒体稳定性和AZD9291进行比较。

[0098] 测定系统:本发明化合物的代谢稳定性利用由男女混合的肝脏微粒体用1mM NADPH进行试验。样品使用质谱仪进行分析。将HRMS用于确定峰面积响应比率(对应于试验化合物或对照物的峰面积除以分析内标的峰面积)而不运行标准曲线。为了检测到所有的可能代谢物,在适当的m/z范围内进行HRMS扫描。

[0099] 测定条件:该测定用一次孵育(N=1)进行。将试验化合物在37度下在含有0.5毫克/毫升肝脏微粒体蛋白的缓冲液中孵育。通过加入辅因子引发反应,并于0、8、16、24、32、48小时取样,平行孵育阳性对照物(5 μ M辜丸素)并于0、8、16、24、32、48小时取样。

[0100] 测定质量控制:平行进行对照化合物辜丸素以证实(肝脏)微粒体的酶活性。最终时间点后,利用荧光测定法来确认NADPH添加到反应混合物中。对照物的T_{1/2}满足可接受的内标。

[0101] 分析方法:

[0102] 液相色谱柱:Thermo BDS Hypersil C1830X2.0mm,3 μ m,具有保护柱M.P.,缓冲液:

25mM甲酸接缓冲液,pH3.5;

[0103] 水相(A):90%水,10%缓冲液;

[0104] 有机相(B):90%乙晴,10%缓冲液;

[0105] 流速:300微升/分钟

[0106] 自动进样器:注射体积10微升

[0107] 梯度程序:

[0108]

时间(分钟)	%A	%B
0.0	100	0
1.5	0	100
2.0	0	100
2.1	100	0
3.5	100	0

[0109] 人体肝脏微粒体中的稳定性结果如下:

[0110]

化合物	剩余百分比(%)						半衰期
	0h	8h	16h	24h	32h	48h	
实施例 1	100	93	86	77	70	67	>48h
实施例 2	100	97	90	82	75	81	>48h
实施例 3	100	90	82	73	64	55	>48h
实施例 4	100	89	81	72	63	51	>48h
实施例 5	100	91	84	75	69	66	>48h
AZD9291	100	82	61	48	34	14	24h

[0111] 结果显示,与参照化合物AZD9291比较,半衰期在48小时以上(AZD9291半衰期24hr),它们具有降低医疗剂量和扩大给药时间间隔的潜能。

[0112] 测试5:在NCI-H1975种植的裸鼠体内的效果评价

[0113] 对NCI-H1975种植的裸鼠,一组每天一次给药3.6ug/g;和另一组每天一次 给药7.2ug/g,连续给药10天后观察肿瘤尺寸变化。

[0114]

实施例编号	剂量 7.2ug/g		剂量 3.6ug/g	
	肿瘤尺寸		肿瘤尺寸	
	第 0 天	第 11 天	第 0 天	第 11 天
1B	13mm	5 mm	12 mm	6 mm
2B	12 mm	4 mm	12 mm	5 mm
3B	13 mm	7mm	14 mm	9mm
4B	11 mm	6 mm	13 mm	8 mm
5B	14 mm	8 mm	11 mm	10 mm
AZD9291	12 mm	8 mm	13 mm	13 mm

[0115] 实验结果显示,高剂量下实施例化合物比AZD9291均具有更优的抑制肿瘤生长的作用。低剂量下AZD9291抑制肿瘤增长的活性很低,但实施例化合物低剂量下抑制肿瘤增长的活性较AZD9291具有明显的优势。

[0116] 本发明化合物用于各种癌症的治疗,所述各种癌症包括且不局限于非小细胞肺癌、乳腺癌、脑瘤、膜腺癌、肝癌、结肠直肠癌、甲状腺髓样癌、成神经胶质瘤、成神经细胞瘤、肾脏肿瘤、卵巢癌和前列腺癌。

[0117] 本发明公开的化合物能单独使用或者与其它药剂组合用于各种癌症的治疗,所述各种癌症包括且不局限于肺癌、膜腺癌、星细胞瘤、肾癌、头颈癌、乳腺癌、膀胱癌、卵巢癌、结肠直肠癌、前列腺癌、子宫颈癌、胸腺癌、肝癌和胃癌。

[0118] 对于本领域技术人员将明显的是,本公开不只局限于前述说明性实施例,在不脱离其必要属性的情况下能以其它特定形式体现。因此期望认为,所有方面均作为说明性而不是限制性、对所附权利要求进行参考的实施例而不是前述实施例,引用文献只是针对附加的权利要求而不是上述的实例,以及落入权利要求等效性的含义和范围之内所有变化因此预期包含于此。

[0119] 本说明书中列举的所有专利、专利申请和文献参考均在此以其全部内容引入作为参考。在不一致的情况下,包括定义的本公开将是有说服力的。