

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03803705. X

[51] Int. Cl.

C07D 213/79 (2006.01)

C07D 213/81 (2006.01)

C07D 213/89 (2006.01)

A61K 31/44 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 5 月 30 日

[11] 授权公告号 CN 1318404C

[51] Int. Cl. (续)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

[22] 申请日 2003.2.11 [21] 申请号 03803705. X

[30] 优先权

[32] 2002. 2. 11 [33] US [31] 60/354,937

[86] 国际申请 PCT/US2003/004109 2003.2.11

[87] 国际公布 WO2003/068746 英 2003.8.21

[85] 进入国家阶段日期 2004.8.11

[73] 专利权人 拜耳制药公司

地址 美国康涅狄格

[72] 发明人 雅克·迪马 威廉·J·斯科特

杜-施伊恩·简 温迪·李

苏珊·比约格 拉斯洛·L·穆绍

阿拉·纳萨尔 贝恩德·里德尔

[56] 参考文献

WO0041698A 2000.7.20

WO0042012A 2000.7.20

审查员 田丁丁

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 过晓东

权利要求书 5 页 说明书 42 页

[54] 发明名称

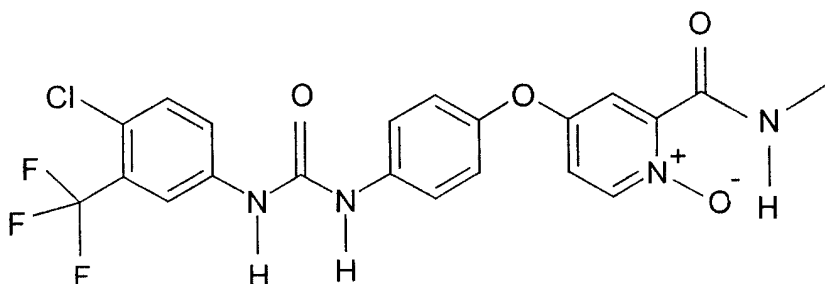
作为激酶抑制剂的芳基脲类化合物

[57] 摘要

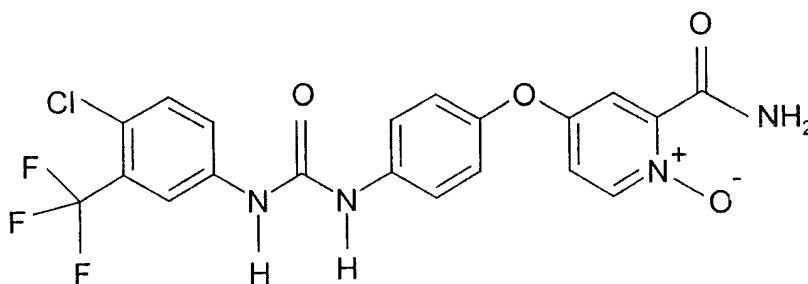
本发明涉及式(I)的新的芳基脲类化合物及其合成方法。该化合物可用于治疗以下疾病：(i) raf 介导的疾病如癌，(ii) p38 介导的疾病如炎症和骨质疏松症，以及 (iii) VEGF 介导的疾病如血管生成性疾病。

1、选自于以下组中的化合物及其盐：

4-{4-[(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基]苯氧基}-N-甲基-2-吡啶甲酰胺 1-氧化物，

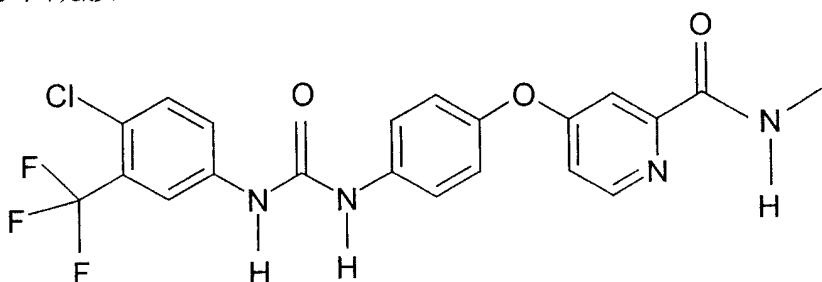


4-{4-[(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基]苯氧基}-2-吡啶甲酰胺 1-氧化物，



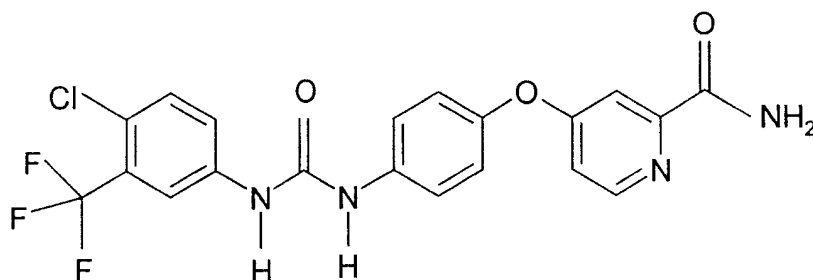
2、制备如权利要求1所述的化合物的方法，其包括：

氧化 4-{4-[(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基]苯氧基}-N-甲基-2-吡啶甲酰胺，



以得到 4-{4-[(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基]苯氧基}-N-甲基-2-吡啶甲酰胺 1-氧化物，

或者氧化 4-{4-[(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基]苯氧基}-2-吡啶甲酰胺,



以得到 4-{4-[(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基]苯氧基}-2-吡啶甲酰胺 1-氧化物。

3、如权利要求 2 所述的方法,其中将吡啶基环的氮氧化为相应的吡啶-1-氧化物。

4、一种药物组合物,其包含至少一种如权利要求 1 所述的化合物以及生理上可接受的载体。

5、如权利要求 4 所述的药物组合物,其还包含抗增殖剂。

6、如权利要求 5 所述的药物组合物,其中所述抗增殖剂选自于以下组中:天冬酰胺酶、博来霉素、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、左旋天冬酰胺酶、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪、放线菌素 D、柔红霉素、多柔比星、表阿霉素、依托泊甙、5-氟尿嘧啶、六甲基蜜胺、羟基脲、异环磷酰胺、依立替康、甲酰四氢叶酸、洛莫司汀、氮芥、6-巯基嘌呤、美司钠、氨甲蝶呤、丝裂霉素 C、米托蒽醌、泼尼松龙、泼尼松、丙卡巴肼、雷洛昔芬、链佐星、他莫昔芬、硫鸟嘌呤、托泊替康、长春碱、长春新碱、长春地辛、氨基格鲁米特、L-天冬酰胺酶、硫唑嘌呤、5-氮胞苷、克拉屈滨、白消安、己烯雌酚、2',2'-二氟脱氧胞苷、多西他奇、赤藓壬基腺嘌呤、炔雌醇、5-氟脱氧尿苷、5-氟脱氧尿苷单磷酸

盐、氟阿腺苷磷酸盐、氟甲睾酮、氟他氨、庚酸羟基孕酮、伊达比星、干扰素、甲羟孕酮醋酸酯、醋酸甲地孕酮、美法仑、米托坦、紫杉醇、奥沙利铂、吉西他滨、吉非替尼、泰索帝、BCNU、CCNU、DTIC、阿糖腺苷、阿糖胞苷、曲妥单抗、放线菌素 D、喷司他丁、N-磷酸基乙酰基-L-天冬氨酸、普卡霉素、司莫司汀、替尼泊忒、丙酸睾酮、噻替哌、三甲基蜜胺、尿苷、和长春瑞宾。

7、如权利要求 4 所述的药物组合物，其还包含抗细胞毒性剂或细胞增殖抑制化疗剂。

8、如权利要求 7 所述的药物组合物，其中所述细胞毒性剂或细胞增殖抑制化疗剂选自于以下组中：DNA 拓扑异构体酶 I 和 II 抑制剂、DNA 插入剂、烷基化剂、微管破裂剂、激素和生长因子受体激动剂或拮抗剂、其他的激酶抑制剂和抗代谢药。

9、至少一种如权利要求 1 所述的化合物在制备用于治疗或预防哺乳动物中骨质疏松症、炎症和血管生成性疾病的药物中的应用，但所述疾病不包括癌症。

10、如权利要求 4 所述的组合物在制备用于治疗或预防哺乳动物中骨质疏松症、炎症和血管生成性疾病的药物中的应用，但所述疾病不包括癌症。

11、至少一种如权利要求 1 所述的化合物在制备用于治疗或预防哺乳动物中过度增殖性疾病的药物中的应用。

12、如权利要求 5 所述的药物组合物在制备用于治疗或预防哺乳动

物中过度增殖性疾病的药物中的应用。

13、如权利要求 5 所述的药物组合物在制备用于治疗哺乳动物中过度增殖性疾病的药物中的应用，其中所述抗增殖处于单独的药物组合物中。

14、如权利要求 7 所述的药物组合物在制备用于治疗或预防癌症的药物中的应用。

15、如权利要求 7 所述的药物组合物在制备用于治疗癌症的药物中的应用，其中所述抗细胞毒性剂或细胞增殖抑制化疗剂处于单独的药物组合物中。

16、至少一种如权利要求 1 所述的化合物在制备用于治疗或预防哺乳动物中骨质疏松症、炎症和血管生成性疾病的药物中的应用，但所述疾病不包括 raf 介导的癌症。

17、一种药盒，其包括单独剂量的细胞毒性剂或细胞增殖抑制剂和单独剂量的如权利要求 1 所述的化合物。

18、一种药物组合物，其包含至少一种如权利要求 1 所述的化合物以及抗增殖剂。

19、一种药物组合物，其包含至少一种如权利要求 1 所述的化合物以及抗细胞毒性剂或细胞增殖抑制化疗剂。

20、如权利要求 18 的药物组合物在制备用于治疗或预防哺乳动物中

过度增殖性疾病的药物中的应用。

21、如权利要求 19 所述的药物组合物在制备用于治疗或预防癌症的药物中的应用。

作为激酶抑制剂的芳基脲类化合物

技术领域

本发明涉及芳基脲类化合物及其合成方法。本发明的化合物可用于治疗以下疾病：

- (i) raf 介导的疾病如癌，
- (ii) p38 介导的疾病如炎症和骨质疏松症，以及
- (iii) VEGF 介导的疾病如血管生成性疾病。

背景技术

Ras 信号传导途径的激活表示对细胞增殖、分化和变形具有重大影响的一连串事件。Raf 激酶，作为 Ras 的下游效应器，是这些信号由细胞表面受体向细胞核传导的关键传递器 (Lowy, D. R.; Willumsen, B. M. *Ann. Rev. Biochem.* 1993, 62, 851; Bos, J. L. *Cancer Res.* 1989, 49, 4682)。已经表明，给药 raf 激酶的去活抗体抑制 raf 激酶信号传递途径或者共同表达主要的阴性 raf 激酶或主要的阴性 MEK (raf 激酶的底物)，由此可抑制活性 ras 的作用，并进而导致已变形细胞向正常生长表型反转 (参见：Daum 等人，*Trends Biochem. Sci.* 1994, 19, 474-80; Fridman 等人，*J. Biol. Chem.* 1994, 269, 30105-8)。Kolch 等人 (*Nature* 1991, 349, 426-28) 以及进一步证实，通过反义 RNA 抑制 raf 的表达可阻断细胞膜相关癌基因中的细胞增殖。类似地，抑制 raf 激酶 (通过反义寡脱氧核糖核酸) 在体外和体内已与抑制各种人肿瘤类型的生长相关 (Monia 等人，*Nat. Med.* 1996, 2, 668-75)。因此，Raf 激酶活性的小分子抑制剂对于治疗癌症是重要的药物 (Naumann, U.; Eisenmann-Tappe, I.; Rapp, U. R. *Recent Results Cancer Res.* 1997, 143, 237; Monia, B. P.; Johnston, J. F.; Geiger, T.;

Muller, M.; Fabbro, D. *Nature Medicine* 1996, 2, 668)。

已表明抑制 p38 可在体外和/或体内抑制细胞因子(如 TNF α 、IL-1、IL-6、IL-8)和蛋白水解酶(例如 MMP-1、MMP-3)的产生。有丝分裂原活化蛋白(MAP)激酶 p38 参与 IL-1 和 TNF 信号传递途径(Lee, J. C.; Laydon, J. T.; McDonnell, P. C.; Gallagher, T. F.; Kumar, S.; Green, D.; McNulty, D.; Blumenthal, M. J.; Heys, J. R.; Landvatter, S. W.; Stricker, J. E.; McLaughlin, M. M.; Siemens, I. R.; Fisher, S. M.; Livi, G. P.; White, J. R.; Adams, J. L.; Yound, P. R. *Nature* 1994, 372, 739)。

临床研究已将 TNF α 的产生和/或信号传递与多种包括类风湿关节炎的疾病联系在一起(Maini. J. *Royal Coll. Physicians London* 1996, 30, 344)。另外, 过度水平的 TNF α 涉及多种炎性和/或免疫调节性疾病, 包括急性风湿热(Yegin 等人, *Lancet* 1997, 349, 170)、骨吸收(Pacifici 等人, *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 1997, 82, 29)、绝经后骨硬化病(Pacifici 等人, *J. Bone Mineral Res.* 1996, 11, 1043)、败血病(Blackwell 等人, *Br. J. Anaesth.* 1996, 77, 110)、格兰氏阴性败血病(Debets 等人, *Prog. Clin. Biol. Res.* 1989, 308, 463)、感染性休克(Tracey 等人, *Nature* 1987, 330, 662; Girardin 等人, *New England J. Med.* 1988, 319, 397)、内毒素性休克(Beutler 等人, *Science* 1985, 229, 869; Ashkenasi 等人, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 1991, 88, 10535)、中毒性休克综合症(Saha 等人, *J. Immunol.* 1996, 157, 3869; Lina 等人, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1996, 13, 81)、全身炎症反应综合症(Anon. *Crit. Care Med.* 1992, 20, 864)、炎症肠疾病(Stokkers 等人, *J. Inflamm.* 1995-6, 47, 97)包括局限性回肠炎(van Deventer 等人, *Aliment. Pharmacol. Therapeu.* 1996, 10 (Suppl. 2), 107; van Dullemen 等人, *Gastroenterology* 1995, 109, 129)和溃疡性结肠炎(Masuda 等人, *J. Clin. Lab. Immunol.* 1995, 46, 111)、雅一赫反应(Fekade 等人, *New England J. Med.* 1996, 335, 311)、气喘(Amrani 等人, *Rev. Malad. Respir.* 1996, 13, 539)、成人呼吸窘迫综合症(Roten 等人, *Am. Rev. Respir.*

Dis. 1991, 143, 590; Suter 等人, Am. Rev. Respir. Dis. 1992, 145, 1016)、急性肺纤维化疾病(Pan 等人, Pathol. Int. 1996, 46, 91)、肺结节病(Ishioka 等人, Sarcoidosis Vasculitis Diffuse Lung Dis. 1996, 13, 139)、过敏性呼吸疾病(Casale 等人, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1996, 15, 35)、石末沉着病(Gossart 等人, J. Immunol. 1996, 156, 1540; Vanhee 等人, Eur. Respir. J. 1995, 8, 834)、煤矿工肺尘埃沉着病(Borm 等人, Am. Rev. Respir. Dis. 1988, 138, 1589)、肺泡损伤(Horinouchi 等人, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1996, 14, 1044)、肝衰竭(Gantner 等人, J. Pharmacol. Exp. Therap. 1997, 280, 53)、急性炎症期间的肝疾病(Kim 等人, J. Biol. Chem. 1997, 272, 1402)、严重的酒精性肝炎(Bird 等人, Ann. Intern. Med. 1990, 112, 917)、疟疾(Grau 等人, Immunol. Rev. 1989, 112, 49; Taverne 等人, Parasitol. Today 1996, 12, 290)包括恶性疟原虫疟疾(Perlmann 等人, Infect. Immun. 1997, 65, 116)和脑型疟疾(Rudin 等人, Am. J. Pathol. 1997, 150, 257)、非胰岛素依赖性糖尿病(NIDDM; Stephens 等人, J. Biol. Chem. 1997, 272, 971; Ofei 等人, Diabetes 1996, 45, 881)、充血性心力衰竭(Doyama 等人, Int. J. Cardiol. 1996, 54, 217; McMurray 等人, Br. Heart J. 1991, 66, 356)、心脏疾病后的损伤(Malkiel 等人, Mol. Med. Today 1996, 2, 336)、动脉粥样硬化(Parums 等人, J. Pathol. 1996, 179, A46)、Alzheimer 氏病(Fagarasan 等人, Brain Res. 1996, 723, 231; Aisen 等人, Gerontology 1997, 43, 143)、急性脑炎(Ichiyama 等人, J. Neurol. 1996, 243, 457)、脑损伤(Cannon 等人, Crit. Care Med. 1992, 20, 1414; Hansbrough 等人, Surg. Clin. N. Am. 1987, 67, 69; Marano 等人, Surg. Gynecol. Obstetr. 1990, 170, 32)、多发性硬化(M. S.; Coyle. Adv. Neuroimmunol. 1996, 6, 143; Matusevicius 等人, J. Neuroimmunol. 1996, 66, 115)包括多发性硬化期间的脱髓鞘作用和 oligodendrocyte 丢失(Brosnan 等人, Brain Pathol. 1996, 6, 243)、晚期癌症(MucWierzgon 等人, J. Biol. Regulators Homeostatic Agents 1996, 10, 25)、淋巴样恶性肿瘤(Levy 等人, Crit. Rev. Immunol.

1996, 16, 31)、胰腺炎 (Exley 等人, Gut 1992, 33, 1126) 包括急性胰腺炎中的全身并发症 (McKay 等人, Br. J. Surg. 1996, 83, 919)、感染炎症和癌症中的伤口治愈不良 (Buck 等人, Am. J. Pathol. 1996, 149, 195)、脊髓发育不良综合症 (Raza 等人, Int. J. Hematol. 1996, 63, 265)、系统性红斑狼疮 (Maury 等人, Arthritis Rheum. 1989, 32, 146)、胆汁性肝硬化 (Miller 等人, Am. J. Gastroenterolog. 1992, 87, 465)、肠坏死 (Sun 等人, J. Clin. Invest. 1988, 81, 1328)、牛皮癣 (Christophers. Austr. J. Dermatol. 1996, 37, S4)、放射性损伤 (Redlich 等人, J. Immunol. 1996, 157, 1705)、以及 给药单克隆抗体如 OKT3 后的毒性 (Brod 等人, Neurology 1996, 46, 1633)。TNF α 水平还与以下病症有关: 宿主抗移植物反应 (Piguet 等人, Immunol. Ser. 1992, 56, 409) 包括缺血性再灌注损伤 (Colletti 等人, J. Clin. Invest. 1989, 85, 1333) 和同种异体移植排异反应包括肾 (Maury 等人, J. Exp. Med. 1987, 166, 1132)、肝 (Imagawa 等人, Transplantation 1990, 50, 219)、心脏 (Bolling 等人, Transplantation 1992, 53, 283)、和皮肤 (Stevens 等人, Transplant. Proc. 1990, 22, 1924)、肺同种异体移植排异反应 (Grossman 等人, Immunol. Allergy Clin. N. Am. 1989, 9, 153) 包括慢性肺同种异体移植排异反应 (obliterative bronchitis; LoCicero 等人, J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 1990, 99, 1059)、以及由于全部髋关节置换术导致的并发症 (Cirino 等人, Life Sci. 1996, 59, 86)。TNF α 还与感染性疾病有关 (综述: Beutler 等人, Crit. Care Me. 1993, 21, 5423; Degre. Biotherapy 1996, 8, 219) 包括结核杆菌 (Rook 等人, Med. Malad. Infect. 1996, 26, 904)、胃溃疡疾病期间的幽门螺旋杆菌感染 (Beales 等人, Gastroenterology 1997, 112, 136)、克氏锥虫感染导致的查加斯病 (Chandrasekar 等人, Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996, 223, 365)、由大肠杆菌感染导致的志贺样毒素作用 (Harel 等人, J. Clin. Invest. 1992, 56, 40)、由葡萄球菌感染导致的肠毒素 A 作用 (Fischer 等人, J. Immunol. 1990, 144, 4663)、脑膜炎球菌感染 (Waage 等人, Lancet 1987, 355; Ossege

等人, J. Neurolog. Sci. 1996, 144, 1)、以及博氏疏螺旋体 (Brandt 等人, Infect. Immunol. 1990, 58, 983)、苍白密螺旋体 (Chamberlin 等人, Infect. Immunol. 1989, 57, 2872)、巨细胞病毒 (CMV; Geist 等人, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1997, 16, 31)、流感病毒 (Beutler 等人, Clin. Res. 1986, 34, 491a)、仙台病毒 (Goldfield 等人, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 1989, 87, 1490)、Theiler 氏脑脊髓炎病毒 (Sierra 等人, Immunology 1993, 78, 399)、以及人免疫缺陷病毒 (HIV; Poli. Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 1990, 87, 782; Vyakarnam 等人, AIDS 1990, 4, 21; Badley 等人, J. Exp. Med. 1997, 185, 55) 导致的感染。

有许多疾病被认为是通过过度或者非所希望的基质破坏型金属蛋白酶 (MMP) 活性或者由于 MMP 与金属蛋白酶的抑制组织抑制剂 (TIMP) 的比例不平衡所介导的。这些疾病包括骨关节炎 (Woessner 等人, J. Biol. Chem. 1984, 259, 3633)、类风湿关节炎 (Mullins 等人, Biochim. Biophys. Acta 1983, 695, 117; Woolley 等人, Arthritis Rheum. 1977, 20, 1231; Gravallesse 等人, Arthritis Rheum. 1991, 34, 1076)、脓毒性关节炎 (Williams 等人, Arthritis Rheum. 1990, 33, 533)、肿瘤转移 (Reich 等人, Cancer Res. 1988, 48, 3307; Matrisian 等人, Proc. Nat'l. Acad. Sci., USA 1986, 83, 9413)、牙周疾病 (Overall 等人, J. Periodontal Res. 1987, 22, 81)、角膜溃疡形成 (Burns 等人, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1989, 30, 1569)、蛋白尿 (Baricos 等人, Biochem. J. 1988, 254, 609)、由于动脉粥样硬化性斑块破裂导致的冠状动脉血栓形成 (Henney 等人, Proc. Nat'l. Acad. Sci., USA 1991, 88, 8154)、主动脉瘤疾病 (Vine 等人, Clin. Sci. 1991, 81, 233)、生育控制 (Woessner 等人, Steroids 1989, 54, 491)、dystrophic 大疱性表皮松解症 (Kronberger 等人, J. Invest. Dermatol. 1982, 79, 208)、创伤性关节损伤后的变性软骨丢失、MMP 活性介导的骨质减少、颞下颌关节病、以及神经系统的脱髓鞘性疾病 (Chantry 等人, J. Neurochem. 1988, 50, 688)。

因为对 p38 的抑制导致对 $\text{TNF}\alpha$ 形成和 MMP 形成的抑制，所以抑制有丝分裂原活化蛋白 (MAP) 激酶 p38 酶为治疗上述疾病包括骨质疏松症和炎性疾病如类风湿关节炎和 COPD 提供了方法 (Badger, A. M.; Bradbeer, J. N.; Votta, B.; Lee, J. C.; Adams, J. L.; Griswold, D. E. J. Pharm. Exper. Ther. 1996, 279, 1453)。

血管生成涉及由内皮细胞前体或者成血管细胞形成新的血管。胚胎中的第一个血管结构是通过血管生成而形成的。血管生成涉及由已存在的血管发展出毛细血管，而且是器官如脑和肾形成血管的主要机理。虽然血管生成限制在胚胎发育期间，但在成年人中也可有血管生成现象，例如在怀孕、妇女周期或者伤口愈合期间。

在胚胎发育以及一些血管生成依赖性疾病中血管形成和血管生成的一个主要调节剂是血管内皮生长因子 (VEGF; 也称为血管渗透性因子, VPF)。VEGF 代表了一类由于可替代的 RNA 剪接以同型二聚体形式存在的有丝分裂原同工酶。VEGF 同工酶对于血管内皮细胞是高度特异性的 (综述参见: Farrara 等人, Endocr. Rev. 1992, 13, 18; Neufeld 等人, FASEB J. 1999, 13, 9)。低氧 (Shweiki 等人, Nature 1992, 359, 843) 以及各种细胞因子和生长因子如白介素-1、白介素-6、表皮生长因子和转化生长因子都可诱发 VEGF 表达。

目前, 已有报道称 VEGF 和 VEGF 家族成员可结合三种跨膜受体酪氨酸激酶 (Mustonen 等人, J. Cell Biol., 1995, 129, 895)、VEGF 受体-1 (也称为 flt-1 (fms 样酪氨酸激酶-1))、VEGFR-2 (也称为包含激酶插入域的受体 (KDR); KDR 的鼠类似物称为胎肝激酶-1 (flk-1))、和 VEGFR-3 (也称为 flt-4) 中的一种或多种。已表明 KDR 和 flt-1 具有不同的信号转导性质 (Waltenberger 等人, J. Biol. Chem. 1994, 269, 26988); Park 等人, Oncogene 1995, 10, 135)。因此, KDR 在完整的细胞中经历强的配体依赖性酪氨酸磷酸化作用, 而 flt-1 则表现出弱的反应。在此情况下, 与 KDR 结合对于诱发完整的 VEGF 介导的生物反应谱是关键性的要求。

在体内, VEGF 在血管形成中扮演着重要的角色, 并且诱发血管生成和血管透化。失调的 VEGF 表达有助于许多以异常血管生成和/或高渗透性过程为特征的疾病的发展。因此, 调节 VEGF 介导的信号转导级联可为控制异常血管生成和/或高渗透性过程提供有用的模式。

血管生成被认为是 1—2 mm 以上肿瘤生长的绝对必要条件。供给肿瘤细胞中的氧和营养低于该扩散阈。但是, 每个肿瘤在其达到一定的尺寸后都依赖于血管生成以便继续生长。肿瘤低氧区域中的致肿瘤性细胞对 VEGF 的形成的刺激产生应答, 而 VEGF 形成引发休眠内皮细胞的活化, 刺激新血管形成(Shweiki 等人, *Proc. Nat'l. Acad. Sci.*, 1995, 92, 768)。另外, 其中没有血管生成的肿瘤区域中 VEGF 的产生有可能通过 ras 信号传导途径进行(Grugel 等人, *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 25915; Rak 等人, *Cancer Res.* 1995, 55, 4575)。原位杂交研究已证实 VEGF mRNA 在各种人肿瘤中被强烈地上调, 包括肺 (Mattern 等人, *Br. J. Cancer* 1996, 73, 931)、甲状腺 (Viglietto 等人, *Oncogene* 1995, 11, 1569)、乳腺 (Brown 等人, *Human Pathol.* 1995, 26, 86)、胃肠道 (Brown 等人, *Cancer Res.* 1993, 53, 4727; Suzuki 等人, *Cancer Res.* 1996, 56, 3004)、肾和膀胱 (Brown 等人, *Am. J. Pathol.* 1993, 143I, 1255)、卵巢 (Olson 等人, *Cancer Res.* 1994, 54, 1255)、和子宫颈 (Guidi 等人, *J. Nat'l Cancer Inst.* 1995, 87, 12137) 癌、以及血管肉瘤 (Hashimoto 等人, *Lab. Invest.* 1995, 73, 859) 和数种颅内肿瘤 (Plate 等人, *Nature* 1992, 359, 845; Phillips 等人, *Int. J. Oncol.* 1993, 2, 913; Berkman 等人, *J. Clin. Invest.*, 1993, 91, 153)。已表明 KDR 的中和单克隆抗体对于阻断肿瘤的血管生成是有效的 (Kim 等人, *Nature* 1993, 362, 841; Rockwell 等人, *Mol. Cell. Differ.* 1995, 3, 315)。

例如极度氧不足情况下, VEGF 的高度表达可导致眼内血管生成, 导致血管的高度增殖, 并最终导致失明。已在多种视网膜病中观察到此等一连串事件, 包括糖尿病性视网膜病、缺血性视网膜静脉阻塞、早熟视网膜病 (Aiello 等人, *New Engl. J. Med.* 1994, 331, 1480; Peer 等人, *Lab.*

Invest. 1995, 72, 638)、以及与年龄有关的肌肉退化 (AMD; 见: Lopez 等人, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1996, 37, 855)。

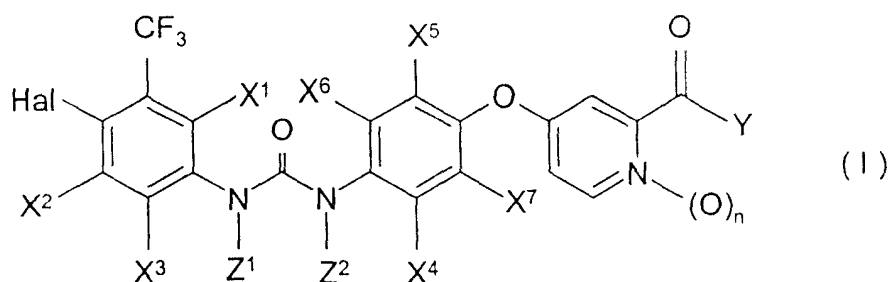
在类风湿性关节炎 (RA) 中, 血管翳的向内生长有可能是由血管生成因子介导的。免疫反应性 VEGF 的水平在 RA 患者的滑液中是高的, 而 VEGF 水平在其他形式的关节炎患者或者具有变性关节疾病的患者中是低的 (Koch 等人, J. Immunol. 1994, 152, 4149)。已表明血管生成抑制剂 AGM-170 可在鼠胶原关节炎模型中抑制关节的新血管形成 (Peacock 等人, J. Exper. Med. 1992, 175, 1135)。

在牛皮癣性皮肤、以及与表皮下水疱形成有关的大疱疾病中也证实了 VEGF 表达增加, 所述大疱疾病例如是大疱性类天疱疮、多形红斑和疱疹样皮炎 (Brown 等人, J. Invest. Dermatol. 1995, 104, 744)。

因为抑制 KDR 可导致对 VEGF 介导的血管生成和渗透作用的抑制, 所以 KDR 抑制剂可用于治疗以异常血管生成和/或渗透性过高过程为特征的疾病, 包括上述所列的疾病。

发明内容

本发明涉及式 (I) 的化合物:



其中:

Y 是 OR^1 或 NHR^2 ,

Hal 是氯或溴,

R^1 是 H 或 C_1 - C_6 烷基,

R^2 是 H、OH、 CH_3 或 CH_2OH ,

Z^1 和 Z^2 分别是 H 或 OH, 其中 Z^1 或 Z^2 中仅有一个可以是 OH,

X^1-X^7 分别独立地是 H、OH 或 $O(CO)C_{1-4}$ 烷基, 以及

n 是 0 或 1,

条件是: 满足以下条件 a-c 中的至少一个,

a) Z^1 或 Z^2 是 OH,

b) R^2 是 OH,

c) n 是 1,

或其盐, 如其药物学上可接受的盐, 或者其分离的立体异构体 (以下统称为本发明的化合物)。术语立体异构体应理解为包括非对映异构体、对映体、几何异构体等。

本领域技术人员将认识到, 一些式 (I) 化合物可以不同的几何异构体形式存在。另外, 一些本发明的化合物具有 1 个或者多个不对称碳原子, 而且因此可以旋光体以及外消旋体或非外消旋混合物的形式存在, 还可以上非对映异构体和非对映异构体混合物的形式。所有这些化合物, 包括 cis-异构体、trans-异构体、非对映体混合物、外消旋体、对映体的非外消旋混合物、基本上纯和纯的对映体, 都包括在本发明的范围内。在此, 基本上纯的对映体是指不存在超过 5 重量%的相应的相反对映异构体。

旋光异构体可通过常规方法拆分外消旋混合物来制得, 所述常规方法例如是使用旋光性酸或碱形成非对映异构体盐。合适酸的例子是酒石酸、二乙酰基酒石酸、二苯甲酰基酒石酸、二甲苯酰基酒石酸和樟脑磺酸。非对映异构体的混合物可通过本领域技术人员已知的方法例如色谱法和分级结晶法根据它们物理化学性质的差异分离为单个的非对映异构体。旋光性碱或酸在分离出的非对映异构体盐中游离出来。另一不同分离旋光异构体的方法涉及手性色谱柱 (例如手性 HPLC 柱) 的使用, 应最佳地进行选择以使对映体的分离最大化。合适的手性 HPLC 柱是由 Diacel 等制造的, 例如 Chiracel OD 和 Chiracel OJ。式 (I) 的旋光性化

合物也可通过使用旋光性起始物来制备。

本发明还包括本发明化合物的类似物。

优选的是其中 n 为 1 的本发明化合物。这些化合物特别包括其中式 (I) 中 n 是 1、 Y 是 NHR^2 以及 R^2 是 H 或 CH_3 的本发明化合物，其中式 (I) 中 n 是 1 以及 X^1-X^7 分别是 H 的本发明化合物，其中 (I) 中 n 是 1 以及 Z^1 和 Z^2 分别是 H 的本发明化合物式，其中式 (I) 中 n 是 1 以及 Z^1 是 H 而 Z^2 是 OH 或 Z^1 是 OH 而 Z^2 是 H 的本发明化合物，其中式 (I) 中 n 是 1 而且 X^1-X^7 中至少一个是 OH 或 $O(CO)C_{1-4}$ 烷基的本发明化合物，其中式 (I) 中 n 是 1、 Y 是 NHR^2 以及 R^2 是 CH_2OH 的本发明化合物，其中式 (I) 中 n 是 1、 Y 是 NHR^2 以及 R^2 是 OH 的本发明化合物，以及其中式 (I) 中 n 是 1 而 Y 是 OH 的本发明化合物。

其他优选的本发明化合物是其中式 (I) 中 Z^1 是 H 而 Z^2 是 OH 或 Z^1 是 OH 而 Z^2 是 H 者。这些化合物具体地包括，其中式 (I) 中 Z^1 是 H 而 Z^2 是 OH 或 Z^1 是 OH 而 Z^2 是 H、以及 n 是 0 的本发明化合物，其中式 (I) 中 Z^1 是 H 而 Z^2 是 OH 或 Z^1 是 OH 而 Z^2 是 H、 n 是 0、 Y 是 NHR^2 以及 R^2 是 H 或 CH_3 的本发明化合物，其中式 (I) 中 Z^1 是 H 而 Z^2 是 OH 或 Z^1 是 OH 而 Z^2 是 H、 n 是 0 以及 X^1-X^7 分别是 H 的本发明化合物，其中式 (I) 中 Z^1 是 H 而 Z^2 是 OH 或 Z^1 是 OH 而 Z^2 是 H、 n 是 0 以及 X^1-X^7 中至少一个是 OH 或 $O(CO)C_{1-4}$ 烷基的本发明化合物，其中式 (I) 中 Z^1 是 H 而 Z^2 是 OH 或 Z^1 是 OH 而 Z^2 是 H、 n 是 0、 Y 是 NHR^2 而 R^2 是 CH_2OH 的本发明化合物，其中式 (I) 中 Z^1 是 H 而 Z^2 是 OH 或 Z^1 是 OH 而 Z^2 是 H、 n 是 0、 Y 是 NHR^2 而 R^2 是 OH 的本发明化合物，以及其中在式 (I) 中 Z^1 是 H 而 Z^2 是 OH 或 Z^1 是 OH 而 Z^2 是 H、 n 是 0 以及 Y 是 OH 的本发明化合物。

本发明进一步优选的化合物是其中式 (I) 中 Y 是 NHR^2 而 R^2 是 OH 者。这些化合物具体地包括，其中式 (I) 中 Y 是 NHR^2 而 R^2 是 OH 以及 n 是 0 的本发明化合物，其中式 (I) 中 Y 是 NHR^2 而 R^2 是 OH、 n 是

0 以及 X^1-X^7 分别是 H 的本发明化合物, 其中式 (I) 中 Y 是 NHR^2 而 R^2 是 OH、n 是 0 以及 Z^1 和 Z^2 分别是 H 的本发明化合物, 其中式 (I) 中 Y 是 NHR^2 而 R^2 是 OH、n 是 0、以及 Z^1 是 H 而 Z^2 是 OH 或 Z^1 是 OH 而 Z^2 是 H 的本发明化合物, 以及其中式 (I) 中 Y 是 NHR^2 而 R^2 是 OH、n 是 0 以及 X^1-X^7 中至少一个是 OH 或 $O(CO)C_{1-4}$ 烷基的本发明化合物。

本发明还优选的化合物是那些其中式 (I) 中 Y 是 OH 者。这些化合物具体地包括, 其中式 (I) 中 Y 是 OH 而 n 是 0 的本发明化合物, 其中式 (I) 中 Y 是 OH 而 n 是 0 以及 X^1-X^7 分别是 H 的本发明化合物, 其中式 (I) 中 Y 是 OH 而 n 是 0 以及 Z^1 和 Z^2 分别是 H 的本发明化合物, 其中式 (I) 中 Y 是 OH 而 n 是 0 以及 Z^1 是 H 而 Z^2 是 OH 或 Z^1 是 OH 而 Z^2 是 H 的本发明化合物, 以及其中式 (I) 中 Y 是 OH 而 n 是 0 以及 X^1-X^7 中至少一个是 OH 或 $O(CO)C_{1-4}$ 烷基的本发明化合物。

特别优选的化合物包括:

4-{4-[(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基}苯氧基}-N-甲基-2-吡啶甲酰胺 1-氧化物,

4-{4-[(4-溴-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基}苯氧基}-N-甲基-2-吡啶甲酰胺 1-氧化物,

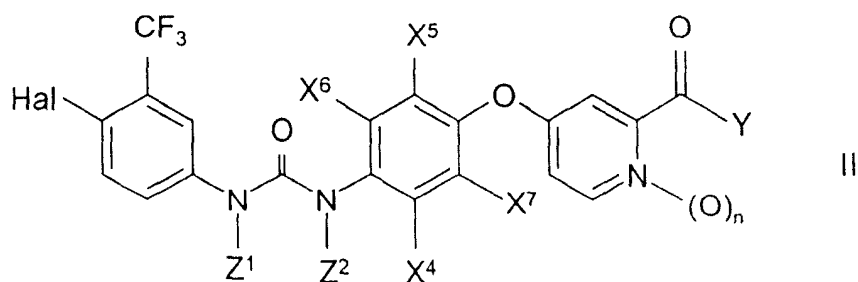
4-{4-[(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基}苯氧基}-2-吡啶甲酰胺 1-氧化物,

4-{4-[(4-溴-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基}苯氧基}-2-吡啶甲酰胺 1-氧化物,

4-{4-[(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基}苯氧基}-N-羟基甲基-2-吡啶甲酰胺 1-氧化物,

4-{4-[(4-溴-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基}苯氧基}-N-羟基甲基-2-吡啶甲酰胺 1-氧化物, 及其盐、立体异构体和前药。

本发明优选的亚组化合物包括式(II)的化合物或其盐或立体异构体,



其中：

Y 是 OR^1 或 NHR^2 ,

Hal 是氯或溴,

R^1 是 H 或 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基,

R^2 是 H、OH、 CH_3 或 CH_2OH ,

Z^1 和 Z^2 分别是 H 或 OH, 其中 Z^1 或 Z^2 中仅有一个可以是 OH,

$\text{X}^4\text{-X}^7$ 分别独立地是 H、OH 或 $\text{O}(\text{CO})\text{C}_{1-4}$ 烷基, 以及

n 是 0 或 1,

条件是: 满足以下条件 a-c 中的至少一个,

a) Z^1 或 Z^2 是 OH,

b) R^2 是 OH,

c) n 是 1。

这些化合物包括其中式 (II) 中 n 是 1 的本发明化合物, 其中式 (II) 中 n 是 1 而 Z^1 和 Z^2 分别是 H 的本发明化合物, 其中式 (II) 中 n 是 1、 Z^1 和 Z^2 分别是 H 以及 $\text{X}^4\text{-X}^7$ 中至少一个是 OH 的本发明化合物, 其中式 (II) 中 n 是 1、 Z^1 和 Z^2 分别是 H 以及 Y 是 NHR^2 而 R^2 是 H 或 CH_3 的本发明化合物, 其中式 (II) 中 n 是 0 的本发明化合物, 其中式 (II) 中 n 是 0 以及 Z^1 是 H 而 Z^2 是 OH 或 Z^1 是 OH 而 Z^2 是 H 的本发明化合物, 其中式 (II) 中 n 是 0、 Z^1 和 Z^2 分别是 H、以及 $\text{X}^4\text{-X}^7$ 中至少一个是 OH 的本发明化合物, 其中式 (II) 中 n 是 0、 Z^1 是 H 而 Z^2 是 OH 或 Z^1 是 OH 而 Z^2 是 H、以及 $\text{X}^4\text{-X}^7$ 中至少一个是 OH 的本发明化合物, 其中式 (II) 中 n 是 0、 Z^1 是 H 而 Z^2 是 OH 或 Z^1 是 OH 而 Z^2 是 H、以及

的本发明化合物，以及其中式（III）中 Y 是 OH 的本发明化合物。

本发明进一步涉及制备本发明新化合物的工艺和方法。这些工艺和方法包括但不限于将 4-{4-[(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基]苯氧基}-N-甲基-2-吡啶甲酰胺和 4-{4-[(4-溴-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基]苯氧基}-N-甲基-2-吡啶甲酰胺的吡啶环氧化为它们相应的吡啶-1-氧化物，将本发明化合物的任意脲氮进行甲醛氧化为 N-羟基脲，对本发明的化合物中 X^1-X^7 所代表的任意位置进行氧化由此用羟基置换氢原子，对 4-{4-[(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基]苯氧基}-N-甲基-2-吡啶甲酰胺和 4-{4-[(4-溴-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基]苯氧基}-N-甲基-2-吡啶甲酰胺中的 N-甲基酰胺进行羟基化形成相应的羟甲基酰胺，将所述 N-甲基酰胺羟基化为异羟肟酸，使所述 N-甲基酰胺脱甲基形成未取代的酰胺，使所述 N-甲基酰胺水解为羧酸以及它们的混合物。另外，本发明涉及对 X^1-X^7 位置中的羟基进行酯化，例如形成乙酸酯。

本发明的优选方法包括制备 4-{4-[(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基]苯氧基}-N-甲基-2-吡啶甲酰胺 1-氧化物、或 4-{4-[(4-溴-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基]苯氧基}-N-甲基-2-吡啶甲酰胺 1-氧化物、或其药物学上可接受的盐、或分离的立体异构体的方法，该方法包括将 4-{4-[(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基]苯氧基}-N-甲基-2-吡啶甲酰胺或 4-{4-[(4-溴-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基]苯氧基}-N-甲基-2-吡啶甲酰胺氧化为相应的吡啶-1-氧化物，还包括制备 4-{4-[(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基]苯氧基}-2-吡啶甲酰胺 1-氧化物、或 4-{4-[(4-溴-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基]苯氧基}-2-吡啶甲酰胺 1-氧化物或其药物学上可接受的盐、或分离的立体异构体的方法，该方法包括将 4-{4-[(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基]苯氧基}-2-吡啶甲酰胺或 4-{4-[(4-溴-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基]苯氧基}-2-吡啶甲酰胺氧化为相应的吡啶-1-氧化物。

通过这些方法制得的化合物包括在本发明的范围内。本发明还包括通过以下化合物的转化、包括代谢转化而得到的化合物，将 4-{4-[(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)-氨基]羰基)氨基]苯氧基}-N-甲基-2-吡啶甲酰胺或 4-{4-[(4-溴-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基]苯氧基}-N-甲基-2-吡啶甲酰胺：

- a) 用羟基取代一个或多个苯基氢，
- b) 将 N-甲基酰胺羟基化为羟甲基酰胺或异羟肟酸，
- c) 使 N-甲基酰胺脱甲基成为未取代的酰胺，
- d) 将脒氮中的一个或多个由=NH 氧化为=NOH，
- e) 使 N-甲基酰胺水解为羧酸，
- f) 将吡啶氮氧化为吡啶-1-氧化物，或者
- g) a-f 的组合，

条件是：进行步骤 b)、d)和 f)的至少一个。

特别优选的是通过转化、包括代谢转化以下化合物而制得的化合物，将 4-{4-[(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基]苯氧基}-N-甲基-2-吡啶甲酰胺或 4-{4-[(4-溴-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基]苯氧基}-N-甲基-2-吡啶甲酰胺：

- a) 将 N-甲基酰胺羟基化为羟甲基酰胺或异羟肟酸，
- b) 使 N-甲基酰胺脱甲基成为未取代的酰胺，
- c) 将脒氮中的一个或多个由=NH 氧化为=NOH，
- d) 使 N-甲基酰胺水解为羧酸，
- e) 将吡啶氮氧化为吡啶-1-氧化物，或者
- f) a-f 的组合，

条件是：进行步骤 a)、c)和 e)的至少一个。

应理解的是，在本发明专利中所用的术语“吡啶-1-氧化物”包括 1-

氧代-吡啶和 1-羟基-吡啶，而且在本发明中这三个术语相互之间是可以互换的。例如，ChemInnovation Software, Inc. Nomenclator™ v. 3.01 在 ChemDraw 中画出的其中 $Y = \text{NHCH}_3$ 、 $\text{Hal} = \text{Cl}$ 、 Z^1 和 $Z^7 = \text{H}$ 、以及 $n = 1$ 的式 III 化合物，鉴定为 N-[4-氯-3-(三氟甲基)苯基]({4-[1-羟基-2-(N-甲基氨基甲酰基)(4-吡啶基氧基)]苯基}氨基)甲酰胺。

本发明进一步涉及包含一种或多种本发明化合物的药物组合物。

这些组合物包括含有有效量的至少一种本发明化合物以及生理学上可接受的载体的药物组合物。优选的药物组合物包括有效量的以下化合物：4-{4-[(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基}氨基]苯氧基}-N-甲基-2-吡啶甲酰胺 1-氧化物、4-{4-[(4-溴-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基}氨基]苯氧基}-N-甲基-2-吡啶甲酰胺 1-氧化物、4-{4-[(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基}氨基]苯氧基}2-吡啶甲酰胺 1-氧化物、或 4-{4-[(4-溴-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基}氨基]苯氧基}2-吡啶甲酰胺 1-氧化物或药学上可接受的盐、分离的立体异构体或它们的混合物以及生理学可接受的载体。

这些化合物的药学上可接受的盐也在本发明的范围内。

本发明的盐特别是式 (I) 化合物的药学上可接受的盐，例如式 (I) 化合物的有机酸或无机酸加成盐。合适的无机酸包括但不限于卤酸（如盐酸）、硫酸、或磷酸。合适的有机酸包括但不限于羧酸、膦酸、磺酸、氨基磺酸，具体的例子包括乙酸、丙酸、辛酸、癸酸、十二烷酸、乙醇酸、乳酸、2-或 3-羟基丁酸、 γ -氨基丁酸（GABA）、葡萄糖酸、葡庚糖酸、富马酸、琥珀酸、己二酸、庚二酸、辛二酸、壬二酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、葡糖二酸、半乳糖二酸、氨基酸（如谷氨酸、天冬氨酸、N-甲基甘氨酸、乙酰基氨基乙酸、N-乙酰基天冬酰胺或 N-乙酰基半胱氨酸）、丙酮酸、乙酰乙酸、甲磺酸、4-甲苯磺酸、苯磺酸、磷丝氨酸、以及 2-或 3-甘油磷酸。

为增强母体化合物的性质而形成前药在本领域中是众所周知的，所

述性质包括溶解度、吸收作用、生物稳定性和释放时间（参见：“Pharmaceutical Dosage Form and Drug Delivery Systems”（第六版），Ansel 等人编辑，Williams & Wilkins 出版，第 27-29 页(1995)，其内容在此并入作为参考）。已公开的噁唑基-苯基-2,4-二氨基-嘧啶化合物的常规前药主要是利用主要的药物生物转化反应，而且也可认为是在本发明的范围内。主要的药物生物转化反应包括 N-脱烷基化、O-脱烷基化、脂族羟基化、芳香羟基化、N-氧化、S-氧化、脱氨基化、水解反应、葡糖醛酸化、硫酸化和乙酰化（参见：Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (第九版)，编辑：Molinoff 等人，McGraw-Hill 出版，第 11-13 页(1996)，其内容在此并入作为参考）。

本发明还涉及通过给药本发明的化合物或者包含本发明的化合物的药物组合物治疗和预防哺乳动物中的疾病例如炎症性疾病和血管生成性疾病以及骨质疏松症的方法。

这些方法包括通过向哺乳动物中给药有效量的本发明化合物治疗或预防所述哺乳动物之骨质疏松症、炎症、血管生成性疾病（不包括癌症）的方法。优选的是通过向哺乳动物给药有效量的以下化合物治疗或预防哺乳动物之骨质疏松症、炎症和血管生成性疾病（不包括癌症）的方法：4-{4-[(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基]苯氧基}-N-甲基-2-吡啶甲酰胺 1-氧化物、4-{4-[(4-溴-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基]苯氧基}-N-甲基-2-吡啶甲酰胺 1-氧化物、4-{4-[(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基]苯氧基}2-吡啶甲酰胺 1-氧化物、或 4-{4-[(4-溴-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基]苯氧基}2-吡啶甲酰胺 1-氧化物或其药物学上可接受的盐、分离的立体异构体或它们的混合物。

本发明还涉及通过给药本发明的化合物或者包含一种或者多种本发明的化合物以及细胞毒性剂的药物组合物来治疗或预防癌症以及其他过度增殖性疾病的方法。

这些方法包括通过向哺乳动物中给药有效量的本发明化合物治疗或

预防所述哺乳动物之过度增殖性疾病的方法。优选的是通过向哺乳动物给药有效量的以下化合物治疗或预防哺乳动物之过度增殖性疾病的方法：4-{4-[(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基]苯氧基}-N-甲基-2-吡啶甲酰胺 1-氧化物、4-{4-[(4-溴-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基]苯氧基}-N-甲基-2-吡啶甲酰胺 1-氧化物、4-{4-[(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基]苯氧基}-2-吡啶甲酰胺 1-氧化物、或 4-{4-[(4-溴-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基]苯氧基}2-吡啶甲酰胺 1-氧化物或其药物学上可接受的盐、或分离的立体异构体或它们的混合物。

在通过给药有效量的本发明化合物来治疗或预防哺乳动物中过度增殖性疾病的方法中，可向所述哺乳动物给药一种或者多种额外的化合物或组合物，例如抗癌化合物或组合物，但它们不是根据本发明的化合物或组合物，优选是细胞毒性化合物或组合物。治疗或预防哺乳动物中过度增殖性疾病的方法包括向所述哺乳动物给药有效量的 4-{4-[(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基]苯氧基}-N-甲基-2-吡啶甲酰胺 1-氧化物、4-{4-[(4-溴-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基]苯氧基}-N-甲基-2-吡啶甲酰胺 1-氧化物、4-{4-[(4-氯-3-(三氟甲基)苯基)氨基]羰基)氨基]苯氧基}2-吡啶甲酰胺 1-氧化物、或 4-{4-[(4-溴-3-(三氟乙基)苯基)氨基]羰基)氨基]苯氧基}2-吡啶甲酰胺 1-氧化物或其药物学上可接受的盐或分离的立体异构体或它们的混合物以及细胞毒性化合物或组合物。

可添加在本发明组合物中的任选抗增殖剂包括但不限于在第 11 版的 Merck Index (1996) 中列在癌症化疗药物方案中的化合物，该文献在此并入作为参考，例如天冬酰胺酶、博来霉素、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、左旋天冬酰胺酶、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪、放线菌素 D、柔红霉素、多柔比星（阿霉素）、表阿霉素、依托泊甙、5-氟尿嘧啶、六甲基蜜胺、羟基脲、异环磷酰胺、依立替康、甲酰四氢叶酸、洛莫司汀、氮芥、6-巯基嘌呤、美司钠、氨甲蝶呤、丝裂霉素 C、米托蒽醌、泼尼松龙、泼尼松、丙卡巴肼、雷洛昔芬、链佐星、他莫昔

芬、硫鸟嘌呤、托泊替康、长春碱、长春新碱、和长春地辛。

适合用于本发明组合物中的其他抗增殖剂包括但不限于在 Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (第九版), 编辑: Molinoff 等人, McGraw-Hill 出版, 第 1225-1287 页(1996) (其内容在此并入作为参考) 中已知用于治疗肿瘤疾病的那些化合物, 例如氨基格鲁米特、L-天冬酰胺酶、硫唑嘌呤、5-氮胞苷、克拉屈滨、白消安、己烯雌酚、2',2'-二氟脱氧胞苷、多西他奇、赤羟壬基腺嘌呤 (erythrohydroxynonyladenine)、炔雌醇、5-氟脱氧尿苷、5-氟脱氧尿苷单磷酸盐、氟阿腺苷磷酸盐、氟甲睾酮、氟他氨、庚酸羟基孕酮、伊达比星、干扰素、甲羟孕酮醋酸酯、醋酸甲地孕酮、美法仑、米托坦、紫杉醇、喷司他丁、N-磷酸基乙酰基-L-天冬氨酸 (PALA)、普卡霉素、司莫司汀、替尼泊忒、丙酸睾酮、噻替哌、三甲基蜜胺、尿苷、和长春瑞宾。

适合用于本发明组合物中的其他抗增殖剂包括但不限于抗癌药, 例如奥沙利铂、吉西他滨、吉非替尼、泰索帝、BCNU、CCNU、DTIC、阿糖腺苷、阿糖胞苷、曲妥单抗、放线菌素 D、埃坡霉素、依立替康、雷洛昔芬和托泊替康。

过度增殖性疾病的治理

癌症和过度增殖性疾病如下所定义。这些疾病包括但不限于实体瘤如乳腺、呼吸道、脑、生殖器官、消化道、尿道、眼、肝、皮肤、头和颈、甲状腺、甲状旁腺的癌症以及它们的远距离转移瘤。这些疾病还包括淋巴瘤、肉瘤和白血病。

乳腺癌的例子包括但不限于浸润性管癌、浸润性小叶癌、原位性管癌、和原位性小叶癌。

呼吸道癌的例子包括但不限于小细胞和非小细胞肺癌、以及支气管瘤和胸膜肺母细胞瘤。

脑癌的例子包括但不限于脑干和 hypophthalmic 神经胶质瘤、小脑和大脑星形细胞瘤、髓母细胞瘤、室管膜细胞瘤、以及神经外胚层和松果体瘤。

雄性生殖器官的肿瘤包括但不限于前列腺和睾丸癌。

雌性生殖器官的肿瘤包括但不限于子宫内膜、子宫颈、卵巢、阴道外阴癌、以及子宫肉瘤。

消化道的肿瘤包括但不限于肛门、结肠、结直肠、食道、胆囊、胃、胰腺、直肠、小肠和唾液腺癌。

尿道的肿瘤包括但不限于膀胱、阴茎、肾、肾盂、输尿管、和尿道癌。

眼癌的例子包括但不限于眼内黑色素瘤和视网膜母细胞瘤。

肝癌的例子包括但不限于肝细胞癌（具有或者不具有纤维板变化的肝细胞癌）、胆管癌（肝内胆管癌）、以及混合肝细胞胆管癌。

皮肤癌包括但不限于鳞状细胞癌、卡波济肉瘤、恶性黑素瘤、默克尔细胞皮肤癌、以及非黑素瘤皮肤癌。

头和颈癌包括但不限于喉/咽下/鼻咽/口咽癌、以及唇和口腔癌。淋巴瘤包括但不限于与 AIDS 有关的淋巴瘤、非 Hodgkin 氏淋巴瘤、皮肤 T 细胞淋巴瘤、Hodgkin 氏病和中枢神经系统的淋巴瘤。

肉瘤包括但不限于软组织的肉瘤、骨肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、淋巴肉瘤和横纹肌瘤肉瘤。白血病包括但不限于急性髓样白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、慢性骨髓性白血病、以及毛细胞白血病。

这些疾病已在人中表征，而且在其他哺乳动物中也存在类似的病因，而且因此可用本发明的药物组合物治疗。

通常情况下，与芳基脲化合物 raf 激酶抑制剂一起组合使用细胞毒性和/或细胞增殖抑制剂可实现以下目的：（1）在降低肿瘤生长或者甚至消除肿瘤方面与单独给药相比产生更好的效力，（2）可以给药更少量的

化疗药，(3) 使化疗更容易被患者耐受，与单独药物的化疗和某些其他组合治疗相比具有更少的损害性药物并发症，(4) 能够在哺乳动物、特别是人类中治疗更宽范围的不同癌症类型，(5) 在所治疗的患者中产生更高的应答率，(6) 与标准的化疗方法相比在所治疗的患者中提供更长的存活时间，(7) 使肿瘤发展需要更长的时间，和/或(8) 与抗癌药联合用药产生拮抗作用的已知情况相比，所产生的效力和耐受性至少与单独给药时一样好。

本发明涉及包括以下组分的组合：(a) 根据本发明的化合物，(b) 至少一种其他的化疗细胞毒性或细胞增殖抑制剂；或任意组分 (a) 或 (b) 的药物学上可接受的盐。

本发明还涉及包含以下组分的药物组合物：(1) 定量的 (a) 本发明化合物以及 (b) 至少一种其他的细胞毒性或细胞增殖抑制剂，它们的量在组合是能够有效地用于治疗癌症，如果存在至少一个成盐基团，组分 (a) 或 (b) 中的任意一个也可以是药物学上可接受的盐的形式，以及 (2) 一种或多种药物学上可接受的载体分子。

本发明还涉及通过给药根据本发明的化合物和至少一种为细胞毒性或细胞增殖抑制剂的其他化疗药来治疗癌症的方法。向哺乳动物给药根据本发明的化合物和细胞毒性或细胞增殖抑制剂的量应一起对于如上所述的过度增殖性疾病产生有效治疗效果。因此，根据本发明的化合物对于 raf 激酶介导的癌症是有效的。但是，这些化合物对于不是通过 raf 激酶介导的癌症也是有效的。

在优选的实施方案中，本发明提供用于治疗哺乳动物、特别是人患者中的癌症的方法，其包括任选与细胞毒性或细胞增殖抑制剂一起给药根据本发明的化合物，所述细胞毒性或细胞增殖抑制剂包括但不限于 DNA 拓扑异构体酶 I 和 II 抑制剂、DNA 插入剂、烷基化剂、微管破裂剂、激素和生长因子受体激动剂或拮抗剂、其他的激酶抑制剂和抗代谢药。

在另一个实施方案中，所公开的方法是通过口服或者静脉注射或输注给药包括本发明化合物以及细胞毒性和细胞增殖抑制剂的化疗药物。

在另一个实施方案中，包括本发明化合物或者细胞毒性或细胞增殖抑制剂的组合物可以片剂、液体、局部凝胶、吸入剂或者缓释组合物的形式给药。

在本发明的一个实施方案中，根据本发明的化合物可与细胞毒性或细胞增殖抑制剂在相同的制剂中同时给药于罹患癌症的患者，或者更典型地通过不同的制剂给药，并且经常使用不同的给药途径。也可顺序地以任何次序给药。

在另一个实施方案中，根据本发明的化合物与细胞毒性或细胞增殖抑制剂一前一后地给药，其中根据本发明的化合物可每日一次或者多次地给药于或者，最多连续 28 天，并且在相同的时间段中同时或者间歇地给药细胞毒性或细胞增殖抑制剂。

在本发明的另一个实施方案中，根据本发明的化合物可以口服、静脉、肌肉、皮下或者非胃肠道的剂量给药于患者，该剂量的范围在约 0.1—200 mg/kg 总体重之间。

在另一个实施方案中，细胞毒性或细胞增殖抑制剂可以静脉、肌肉、皮下或者非胃肠道的剂量给药于患者，该剂量的范围在约 0.1 mg—200 mg/kg 患者体重之间。

另外，本发明涉及抑制癌细胞增殖的方法，其包括使癌细胞与本发明的药物制剂或产物相接触。本发明还特别地涉及治疗增殖性疾病的方法，其包括使怀疑患有癌症的患者、所述患者的细胞、组织或体液与本发明的药物组合物或制剂相接触。

本发明还涉及包含根据本发明量的本发明化合物以及其他细胞毒性或细胞增殖抑制剂的组合物。

本发明进一步涉及药盒，其包括在单独容器中的单独剂量的上述两种化疗药。本发明的组合也可在体内、例如在患者体内形成。

术语“细胞毒性剂”是指给药后可杀死或消除癌细胞的药物。术语“细胞增殖抑制剂”是指给药后可限制肿瘤增殖，而不是诱发细胞毒性的细胞减少作用，后者将癌细胞由患者的总存活细胞群中消除。在此所述的化疗药例如依立替康、长春瑞宾、吉西他滨、和紫杉醇被认为是细胞毒性剂。这些细胞毒性剂和细胞增殖抑制剂作为化疗药物在治疗各种癌症类型中具有广泛的应用而且都是众所周知的。

这些以及其他细胞毒性/细胞增殖抑制剂可按照单独给药时已知的常规制剂和给药方案进行给药。

总的制备方法

本发明的化合物可用已知的化学反应和方法来制备。然而以下的总制备方法是用于根据以下实验部分中详细描述的具体实施例帮助读者合成本发明的化合物。

如果以下未具体定义，这些方法中的所有各种基团都如普通描述所定义。当在给定的结构中多次使用用给定的符号表示的可变基团或取代基时，应理解为这些基团或取代基分别可以独立地在该符合所表示的定义范围内变化。应认识到，分别具有任选官能团的本发明化合物不能用以下所列方法之一制备。在每个方法的范围内，使用对于反应条件稳定的任选取代基，或者如果需要，可参与反应的官能团以保护形式存在，并可通过本领域技术人员已知的方法在合适的阶段脱除此等保护基。

本发明的化合物可根据常规化学方法和/或如下所述的方法从可市售得到的起始物或者可根据常规化学方法制得的起始物进行制备。以下给出制备本发明化合物的总制备方法，而且在实施例 1 和 2 中具体说明了代表性化合物的制备。

式 (I) 的脲和羟基脲可通过本领域已知的各种简单方法制备。用于形成这些化合物的通用方法可参见：“Advanced Organic Chemistry”, J. March, John Wiley and Sons, 1985, 以及 “Comprehensive Organic

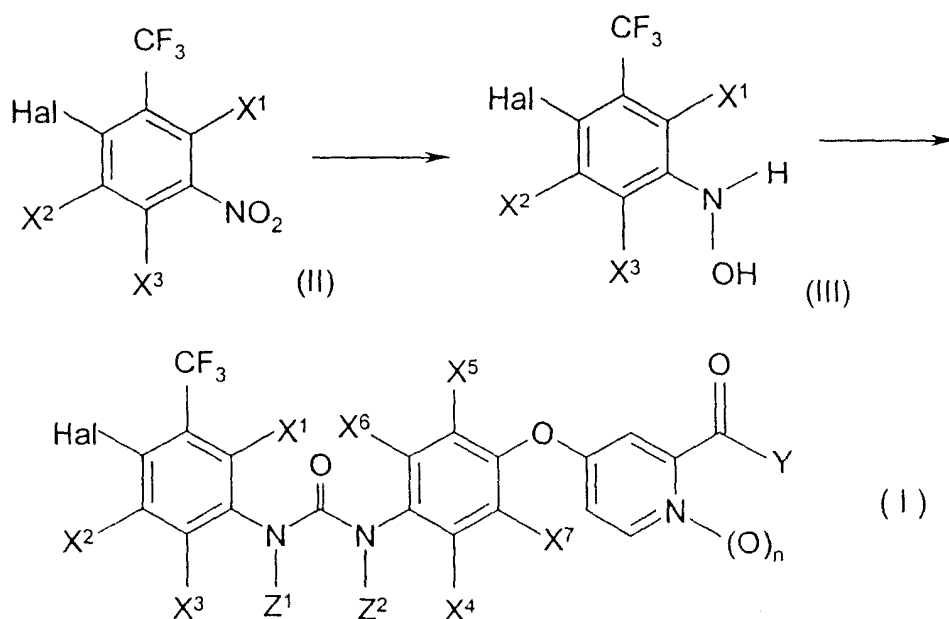
Transformations”, R. C. Larock, VCH Publishers, 1989。这些文献的内容在此并入作为参考。

更具体而言，本发明的吡啶-1-氧化物（式（I）中 $n=1$ ）可由相应的吡啶类化合物用本领域已知的氧化条件来制备。一些例子如下：

- 在氯化溶剂中用过酸如间氯过苯甲酸，所述溶剂例如是二氯甲烷、二氯乙烷或氯仿（Markgraf 等人, Tetrahedron 1991, 47, 183）
- 在氯化溶剂如二氯甲烷中存在催化量的酸时用 $(\text{Me}_3\text{SiO})_2$ （Coperet 等人, Tetrahedron Lett. 1998, 39, 761）
- 在卤化溶剂的数种组合中用全氟-cis-2-丁基-3-丙基 oxaziridine（Amone 等人, Tetrahedron 1998, 54, 7831）
- 在氯仿中使用次氟酸-乙腈复合物（Dayan 等人, Synthesis 1999, 1427）
- 在水中诸如 KOH 的碱存在时使用过硫酸氢钾制剂（Robker 等人, J. Chem. Res., Synop. 1993, 10, 412）
- 在冰乙酸存在时使用单过氧基邻苯二甲酸镁（Klemm 等人, J. Heterocyclic Chem. 1990, 6, 1537）
- 在水和乙酸存在时使用过氧化氢（Lin A. J., Org. Prep. Proced. Int. 1991, 23(1), 114）
- 在丙酮中使用二甲基双环氧乙烷（Boyd 等人, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1991, 9, 2189）

用于上述氧化反应的起始物是二芳基脲，其在侧链中包含 2-酰基-吡啶。这些脲化合物的具体制备方法已描述在专利文献中，而且也可适用于本发明的化合物，例如参见：Riedl, B.等人的名称为“作为 raf 激酶抑制剂的 O-羧基芳基取代的二苯基脲”的 PCT 国际申请 WO 00 42012，以及 Riedl, B.等人的名称为“作为 p38 激酶抑制剂的 O-羧基芳基取代的二苯基脲”的 PCT 国际申请 WO 00 41698。

其中 Z^1 是 OH 而 Z^2 是 H 的式（I）羟基脲可如下制备：



使用本领域技术人员已知的各种条件，例如在过渡金属催化剂存在下使用硼氢化钠（Yanada 等人, Chem. Lett. 1989, 951, 及其所引用的文献），或者在过氯酸存在下使用 N-甲基二氢吡啶（Fukuzumi 等人, J. Chem. Soc., Perkin Trans. II 1991, 9, 1393, 及其所引用的文献），将本领域中已知的式（II）取代硝基苯转化为式（III）的羟基苯胺。

在第二步中，式（III）的羟基苯胺可按照与制备脲相同的方式通过与异氰酸酯或等价物的反应转化为相应的羟基脲。此等反应的例子可在现有技术中找到（Hoffman 等人, J. Med. Chem. 1964, 7, 665, 以及 Stoffel 等人, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 1972, 105, 3115）。

类似地，其中 Z^1 是 H 而 Z^2 是 OH 的式（I）羟基脲可根据相同的方法通过合适地替换试剂来制备。

在这两种情况中，芳基胺片段的制备已详细描述在专利文献中，例如参见 Miller S.等人的名称为“使用对称和不对称的二苯基脲抑制 p38 激酶”的 PCT 国际申请 WO 99 32463；Miller, S 等人的名称为“使用对称和不对称取代的二苯基脲抑制 raf 激酶”的 PCT 国际申请 WO 99 32436；Dumas, J.等人的名称为“使用取代的杂环脲抑制 p38 激酶活性”的 PCT 国际申请 WO 99 32111；Dumas, J.等人的名称为“通过使用 N-

杂芳基-N'-(杂)芳基脲抑制 raf 激酶而治疗肿瘤的方法”的 PCT 国际申请 WO 99 32106; Dumas, J.等人的名称为“使用芳基和杂芳基取代的杂环脲抑制 p38 激酶活性”的 PCT 国际申请 WO 99 32110; Dumas, J.等人的名称为“使用芳基和杂芳基取代的杂环脲抑制抑制 raf 激酶”的 PCT 国际申请 WO 99 32455; Riedl, B.等人的名称为“作为 raf 激酶抑制剂的 O-羧基芳基取代的二苯基脲”的 PCT 国际申请 WO 00 42012; Riedl, B.等人的名称为“作为 p38 激酶抑制剂的 O-羧基芳基取代的二苯基脲”的 PCT 国际申请 WO 00 41698。

其中 Y 是 NHCH_2OH 的式 (I) 羟甲基酰胺可根据本领域已知的多种方法通过对相应未取代的酰胺 ($\text{Y}=\text{NH}_2$) 进行羟基化来制备, 例如在乙醇和氢氧化钠存在下 (Weaver 等人, J. Org. Chem. 1951, 16, 1111) 或者在碳酸钾存在下 (Haworth 等人, J. Chem. Soc. 1946, 1003) 使用含水甲醛。

其中 Y 是 NHOH 的式 (I) 异羟肟酸可根据本领域已知的多种方法通过对相应酯 ($\text{Y}=\text{O}$ 烷基) 进行酰胺化来制备, 例如在乙酸和水存在下使用羟胺 (Boshagen, H., Ber. Dtsch. Chem. Ges. 1967, 100, 954)。用氯甲酸乙酯对相应的酸 ($\text{Y}=\text{OH}$) 进行一锅活化、然后在甲醇中与羟胺反应 (Reddy 等人, Tetrahedron Lett. 2000, 41(33), 6285), 或者将酸活化为 1-酰基咪唑、然后与盐酸羟胺反应 (Staab 等人, Angewandte Chem., 1962, 74, 407), 由此可由所述酸制备相同的化合物。

最后, 通过使用本领域技术人员熟知的方法可以进一步处理脲化合物。

本发明还涉及包括本发明的化合物以及生理上可接受的载体的药物组合物。

本发明的化合物可以单位剂量剂型通过口服、局部、非胃肠道、注射、吸入或者喷雾或者直肠途径给药。通过注射给药包括静脉、肌肉、皮下和非胃肠道注射, 以及使用输注技术。一种或多种化合物可与一种或多种非毒性的药物学上可接受的载体缔合, 如果需要还可包括其他的

活性成分。

可根据本领域已知的任何适合于制造药物组合物的方法来制备用于口服给药的组合物。此等组合物可包含一种或多种选自于以下组中的物质：稀释剂、甜味剂、调味剂、着色剂和防腐剂，以提供适口的制剂。片剂包含与适合于制造片剂的药物学上可接受的赋形剂混合的活性成分。这些赋形剂可例如是惰性稀释剂如碳酸钙、碳酸钠、乳糖、磷酸钙或磷酸钠，制粒和崩解剂如玉米淀粉或藻酸，粘合剂如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石。片剂可未包衣或者也可根据已知的方法进行包衣，以延迟在胃肠道中的崩解和吸收，并由此在更长的时间内提供持续的作用。例如，可以使用延时材料如甘油单硬脂酸酯或甘油二硬脂酸酯。这些化合物也可制备成固体的快速释放剂型。

口服制剂还可以为硬明胶胶囊的形式，其中活性成分与惰性固体稀释剂如碳酸钙、磷酸钙或高岭土混合，或是软明胶胶囊的形式，其中活性成分与水或油性介质如花生油、液体石蜡或橄榄油混合。

含水混悬液包含与适合于制备含水混悬液的赋形剂混合的活性成分。此等赋形剂是混悬剂如羧基甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄蓍胶和阿拉伯胶；分散或湿润剂可以是天然磷脂如卵磷脂，或者烯化氧与脂肪酸的缩合产物如聚氧乙烯硬脂酸酯，或者环氧乙烷与长链脂族醇的缩合产物如十七亚乙基氧基十六烷醇（heptadecaethylene oxycetanol），或者环氧乙烷与衍生于脂肪酸和己糖醇的部分酯的缩合产物如聚氧乙烯山梨醇单油酸酯，或者环氧乙烷或与衍生于脂肪酸和己糖醇酐的部分酯的缩合产物如聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯。含水混悬液还可包含一种或多种防腐剂如 p-羟基苯甲酸乙酯或正丙酯、一种或多种着色剂、一种或多种调味剂、以及一种或多种甜味剂如蔗糖或糖精。

适合于通过添加水制备含水混悬液的分散粉末和颗粒提供与分散或湿润剂、悬浮剂和一种或多种防腐剂混合的活性成分。合适的分散或湿

润剂如上所述。其他的赋形剂例如甜味剂、调味剂和着色剂也可存在。

本发明的化合物也可以是非水液体制剂，如油性混悬液，其可通过将活性成分悬浮在植物油如花生油、橄榄油或芝麻油或者悬浮在矿物油如液体石蜡中来配制。油性混悬液可包含增稠剂如蜂蜡、硬石蜡或十六烷醇。还可添加如上所述的甜味剂和调味剂，以提供适口的口服制剂。这些组合物可通过添加抗氧剂如抗坏血酸来保存。

本发明的药物组合物还可以是水包油型乳剂。油相可以是植物油如橄榄油或花生油，或者是矿物油如液体石蜡，或者它们的混合物。合适的乳化剂是天然树胶如阿拉伯胶或黄蓍胶，天然磷脂如大豆磷脂、卵磷脂，衍生于脂肪酸和己糖醇酐的酯或部分酯如脱水山梨醇单油酸酯，以及所述部分酯与环氧乙烷的缩合产物如聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯。该乳剂也可包含甜味剂和调味剂。

可以用甜味剂如甘油、丙二醇、山梨醇或蔗糖配制成糖浆剂和酏剂。此等制剂还可包含保湿剂、防腐剂、调味剂和着色剂。

本发明的化合物还可以栓剂的形式给药，用于直肠给药。这些组合物可以通过使药物与合适的在常规温度下为固体但在直肠温度下为液体的非刺激性赋形剂混合来制备，并由此在直肠中熔融以释放药物。此等材料包括可可脂和聚乙二醇。

对于在此公开的本发明化合物的所有应用方案，口服日剂量方案优选为 0.01–200 mg/kg 体重。注射（包括静脉、肌肉、皮下和非胃肠道注射）给药以及使用输注技术时的日剂量优选为 0.01–200 mg/kg 体重。直肠给药的日剂量方案为 0.01–200 mg/kg 体重。局部给药的日剂量方案优选为 0.1–200 mg，并且每日给药 1–4 次。吸入给药时的日剂量方案优选为 0.01–10 mg/kg 体重。用于提供这些剂量方案的剂量单位可以每日给药 1 次或者多次，或者可在更长的时间基础上给药，如每周或者每月的基础上。

本领域技术人员可以理解的是，具体的给药方法将取决于在给药治

疗时通常考虑的各种因素。本领域技术人员还应认识到，对于具体患者的具体剂量水平取决于多种因素，包括给药化合物的具体活性、患者的年龄、体重、健康状况、性别、饮食、给药时间和途径、排泄速率等。本领域技术人员进一步应认识到，通过使用常规的治疗实验本领域技术人员可确定最佳的治疗方案，即、治疗模式和本发明化合物的日剂量以及持续时间。

本发明的化合物可由已知化合物（或者由可从已知化合物制得的起始物）例如通过在此描述的总制备方法来制备。给定化合物抑制 raf、p38、或 KDR（VEGFR2）激酶的活性可例如根据在此描述的方法常规地进行分析。

以上和以下引用的所有申请、专利以及出版物的整个内容在此并入作为参考，包括 1999 年 10 月 22 日递交的非临时申请第 09/425,228 号、以及 2001 年 1 月 12 日递交的非临时申请第 09/458,548 号。

无需进一步说明，相信本领域的普通技术人员通过使用上述描述将可以最大程度地利用本发明。因此，以下实施例仅是用于说明本发明，而绝不是对其进行限制。

实施例

除非另有说明，所有反应都是在经过火焰干燥或者烘炉干燥的玻璃器皿中于干燥氩气或干燥氮气的正压下进行的，而且进行磁力搅拌。敏感的液体和溶液通过注射器或者导管进行转移，然后通过橡胶隔片引入至反应中。除非另有说明，术语“减压浓缩”是使用约 15 mmHg 的 Buchi 旋转蒸发器。除非另有说明，术语“在高真空下”是指 0.4–1.0 mmHg 的真空。

所有温度都是未经校正的摄氏度（℃）。除非另有说明，所有份和百分比都是以重量计。市售级别的试剂和溶剂都未经纯制直接使用。

薄层色谱（TLC）是通过使用 Whatman® 预涂覆的玻璃支持的硅胶

60A F-254 250 μ m 板进行的。板的显色是通过一种或多种以下技术实现的：(a) 紫外照射，(b) 暴露于碘蒸汽，(c) 将所述板浸没在 10% 磷钼酸乙醇溶液中、然后加热，(d) 将所述板浸没在硫酸铈溶液中、然后加热，和/或 (e) 将所述板浸没在 2,4-二硝基苯基肼的酸性乙醇溶液中、然后加热。柱色谱（快速色谱）是通过使用 230-400 目 EM Science[®] 硅胶来进行的。

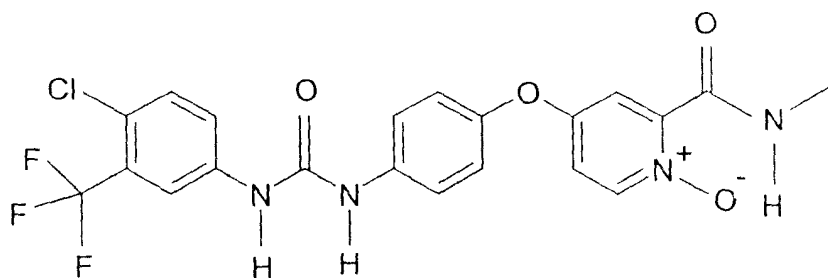
熔点(mp)是用 Thomas-Hoover 熔点仪或 Mettler FP66 自动熔点仪测定的，而且未经校正。Fourier 转化红外光谱是用 Mattson 4020 Galaxy Series 分光光度计得到的。质子 (¹H) 核磁共振 (NMR) 光谱是用 General Electric GN-Omega 300 (300 MHz) 光谱仪以 Me₄Si (δ 0.00) 或残留质子溶剂 (CHCl₃ δ 7.26; MeOH δ 3.30; DMSO δ 2.49) 作为标准进行测定的。碳 (¹³C) NMR 光谱是用 General Electric GN-Omega 300 (75 MHz) 光谱仪以溶剂 (CDCl₃ δ 77.0; MeOD-d₃ δ 49.0; DMSO-d₆ δ 39.5) 作为标准进行测定的。以电子轰击 (EI) 质谱或者快速原子轰击 (FAB) 质谱得到低分辨质谱 (MS) 和高分辨质谱 (HRMS)。电子轰击质谱 (EI-MS) 是用 Hewlett Packard 5989A 质谱仪得到，该仪器上装配有用于样品引入的 Vacuumetrics Desorption Chemical Ionization Probe。离子源维持在 250°C。电子轰击电离是在 70 eV 的电子能和 300 μ A 的捕获电流下进行的。液体铯辅助离子质谱 (FAB-MS) —— 快速原子轰击的最新版本，是通过使用 Kratos Concept 1-H 光谱仪得到的。化学电离质谱 (CI-MS) 是通过使用 Hewlett Packard MS-Engine (5989A) 以甲烷或氨作为试剂气体 (1×10^{-4} torr — 2.5×10^{-4} torr) 得到的。直接插入解吸化学电离 (DCI) 探测器 (Vacuumetrics, Inc.) 在 10 秒内从 0—1.5 amps 斜坡升高，并保持在 10 amps 直至所有样品痕消失 (约 1—2 分钟)。从 50-800 amu 开始扫描光谱，每次扫描 2 秒钟。HPLC-电喷雾质谱 (HPLC ES-MS) 是通过使用 Hewlett-Packard 1100 HPLC 得到的，该仪器装配有四元泵、可变波长的检测器、C-18 柱以及具有电喷雾电离的 Finnigan LCQ 离子捕获质谱仪。

根据离子源中的离子数量,使用可变离子时间在 120-800 amu 扫描光谱。气相色谱-离子选择性质谱 (GC-MS) 是用装配有 HP-1 甲基硅氧烷柱 (0.33 mM 涂层; 25 m×0.2 mm) 和 Hewlett Packard 5971 质量选择性检测器 (电离能 70 eV) 的 Hewlett Packard 5890 气相色谱得到的。元素分析是用 Robertson Microlit Labs (Madison N.J.) 来进行的。

所有化合物都显示了与其结构一致的 NMR 光谱、LRMS 和元素分析或 HRMS。

实施例 1

制备 N-[4-氯-3-(三氟甲基)苯基]-N'-{4-[2-(N-甲基氨甲酰基)-1-氧代-(4-吡啶基氧基)]苯基}脲



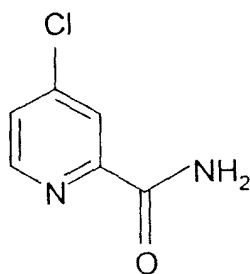
在搅拌下向 N-[4-氯-3-(三氟甲基)苯基]-N'-{4-[2-(N-甲基氨甲酰基)(4-吡啶基氧基)]苯基}脲(500 mg, 1.08 mmol)在无水 CH_2Cl_2 (2.2 mL)和无水 THF (2.2 mL)的混合物中的混合物内添加 3-氯过苯甲酸 (纯度为 77 %, 1.09 g, 4.86 mmol, 4.5 当量), 然后在 40°C 下加热所得混合物共 33 小时。减压浓缩所得的混合物, 而粗产物通过 MPLC (Biotage[®]; 梯度由 20 % 丙酮/己烷至 50 % 丙酮/己烷) 进行纯制。在 EtOAc 中重结晶, 得到白色固体状的 N-[4-氯-3-(三氟甲基)苯基]-N'-{4-[2-(N-甲基氨甲酰基)-1-氧代-(4-吡啶基氧基)]苯基}脲 (293 mg, 57 %): mp (未经校正) 232-234°C; TLC (50 % 丙酮/己烷) R_f 0.13; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ 11.48 (br s, 1H), 9.19 (s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.38 (d, $J=5.8$ Hz, 1H), 8.10 (d, $J=2.5$ Hz, 1H), 7.64 (dd, $J=8.2$ Hz, 2.6 Hz, 1H), 7.61 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.57 (d, $J=8.7$ Hz,

2H), 7.54 (d, $J=2.6$ Hz, 1H), 7.28 (dd, $J=5.7$ Hz, 2.5 Hz, 1H), 7.18 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 2.86 (d, $J=5.0$ Hz, 3H); HPLC EI-MS m/z 481 ((M+H)⁺)。C₂₁H₁₆ClFN₄O₄ 的计算值: C, 52.46%; H, 3.33%; N, 11.65%, 实测值: C, 52.22%; H, 3.39%; N, 11.49%。

实施例 2

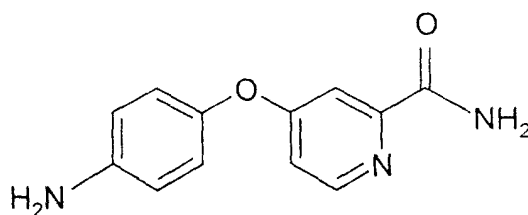
制备 N-[4-氯-3-(三氟甲基)苯基]-N'-{4-[2-氨甲酰基-1-氧代-(4-吡啶基氧基)]苯基}脲

步骤 1: 制备 4-氯-2-吡啶甲酰胺



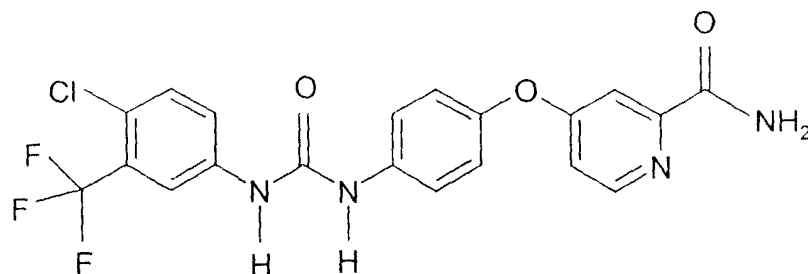
在搅拌下向 4-氯-2-吡啶甲酸甲酯盐酸盐 (1.0 g, 4.81 mmol) 在浓氨水(32 mL) 中的混合物内添加氯化铵 (96.2 mg, 1.8 mmol, 0.37 当量), 然后在室温下搅拌该多相反应混合物共 16 小时。将反应混合物倾倒在 EtOAc (500 mL) 和水 (300 mL) 中。有机层用水 (2×300 mL) 以及饱和 NaCl 溶液 (1×300 mL)洗涤, 干燥 (MgSO₄), 然后真空浓缩, 得到米黄色固体状的 4-氯-2-吡啶甲酰胺 (604.3 mg, 80.3%): TLC (50% EtOAc/己烷) R_f 0.20; ¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.61 (d, $J=5.4$ Hz, 1H), 8.20 (br s, 1H), 8.02 (d, $J=1.8$ Hz, 1H), 7.81 (br s, 1H), 7.76 to 7.73 (m, 1H)。

步骤 2: 制备 4-(4-氨基苯氧基)-2-吡啶甲酰胺



向 4-氨基苯酚 (418 mg, 3.83 mmol) 在无水 DMF (7.7 mL) 中的溶液内一次性添加叔丁氧基钾 (447 mg, 3.98 mmol, 1.04 当量)。反应混合物在室温下搅拌 2 小时, 然后添加 4-氯-2-吡啶甲酰胺 (600 mg, 3.83 mmol, 1.0 当量) 在无水 DMF (4 mL) 中的溶液。反应混合物在 80℃ 下搅拌 3 天, 然后倾倒在 EtOAc 以及饱和 NaCl 溶液的混合物中。有机层顺序地用饱和 NH₄Cl 溶液、饱和 NaCl 溶液洗涤, 干燥 (MgSO₄), 然后减压浓缩。粗产物用 MPLC 色谱 (Biotage®; 梯度由 100% EtOAc 直至 10% MeOH/50% EtOAc/40% 己烷) 纯制, 得到棕色固体状的 4-氯-5-三氟甲基苯胺 (510 mg, 58%)。¹H-NMR (DMSO-d₆) δ 8.43 (d, J=5.7 Hz, 1H), 8.07 (br s, 1H), 7.66 (br s, 1H), 7.31 (d, J=2.7 Hz, 1H), 7.07 (dd, J=5.7 Hz, 2.7 Hz, 1H), 6.85 (d, J=9.0 Hz, 2 H), 6.62 (d, J=8.7 Hz, 2H), 5.17 (br s, 2H); HPLC EI-MS m/z 230 ((M+H)⁺).

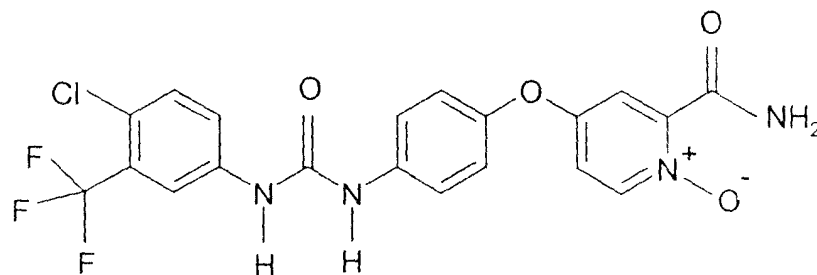
步骤 3: 制备 N-[4-氯-3-(三氟甲基)苯基]-N'-{4-[2-氨甲酰基-(4-吡啶基氧基)]苯基}脲



在氩气中于 65℃ 下搅拌 4-氯-5-三氟甲基苯胺 (451 mg, 2.31 mmol, 1.1 当量) 和 1,1'-羰基二咪唑 (419 mg, 2.54 mmol, 1.2 当量) 在无水二氯乙烷 (5.5 mL) 中的混合物共 16 小时。冷却至室温后, 添加 4-(4-氨基苯氧基)-2-吡啶甲酰胺 (480 mg, 2.09 mmol) 在无水 THF (4.0 mL) 中的溶液。并在 60℃ 下搅拌反应混合物 4 小时。将反应混合物倾倒在 EtOAc 中, 有机层用水 (2×) 以及饱和 NaCl 反应 (1×) 洗涤, 干燥 (MgSO₄)、过滤, 然后真空蒸发。用 MPLC 色谱 (Biotage®; 梯度由 100% EtOAc 至

2% MeOH/EtOAc) 纯制, 得到白色固体状的 N-[4-氯-3-(三氟甲基)苯基]-N'-{4-[2-氨甲酰基-(4-吡啶基氧基)]苯基}脲 (770 mg, 82%): TLC (EtOAc) R_f 0.11, 100% 乙酸乙酯; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 9.21 (s, 1H), 8.99 (s, 1H), 8.50 (d, $J=5.6$ Hz, 1H), 8.11 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.69 (br s, 1H), 7.64 (dd, $J=8.2$ Hz, 2.1 Hz, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.59 (d, $J=8.8$ Hz, 2H), 7.39 (d, $J=2.5$ Hz, 1H), 7.15 (d, $J=8.9$ Hz, 2H), 7.14 (m, 1H); MS LC-MS ($\text{MH}^+=451$). $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{ClF}_3\text{N}_4\text{O}_3$ 的计算值: C, 53.29%; H, 3.13%; N, 12.43%, 实测值: C, 53.33%; H, 3.21%; N, 12.60%。

步骤 4: 制备 N-[4-氯-3-(三氟甲基)苯基]-N'-{4-[2-氨甲酰基-1-氧代-(4-吡啶基氧基)]苯基}脲



按照与 N-[4-氯-3-(三氟甲基)苯基]-N'-{4-[2-(N-甲基氨甲酰基)-1-氧代-(4-吡啶基氧基)]苯基}脲相同的方式, 由 N-[4-氯-3-(三氟甲基)苯基]-N'-{4-[2-氨甲酰基-(4-吡啶基氧基)]苯基}脲(240.0 mg, 0.53 mmol)制得白色固体状的 N-[4-氯-3-(三氟甲基)苯基]-N'-{4-[2-氨甲酰基-1-氧代-(4-吡啶基氧基)]苯基}脲(125.6 mg, 51%): TLC (5% MeOH/ CH_2Cl_2) R_f 0.17; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ 10.72 (d, $J=4.3$ Hz, 1H), 9.21 (s, 1H), 8.99 (s, 1H), 8.36 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 8.31 (d, $J=4.1$ Hz, 1H), 8.10 (d, $J=2.3$ Hz, 1H), 7.65 (dd, $J=8.7$ Hz, 2.3 Hz, 1H), 7.60 (d, $J=8.9$ Hz, 1H), 7.57 (d, $J=9.0$ Hz, 2H), 7.54 (d, $J=3.8$ Hz, 1H), 7.28 (dd, $J=7.2$ Hz, 3.8 Hz, 1H), 7.18 (d, $J=9.0$ Hz, 2H); HPLC EI-MS m/z 467 ($(\text{M}+\text{H})^+$); $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{ClF}_3\text{N}_4\text{O}_4 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ 的计算值: C, 50.49%; H, 3.18%; N, 11.78%, 实测值: C, 50.69%; H, 2.86%; N,

11.47%。

生物学实施例

P38 激酶体外实验

使用 p38 激酶抑制作用实验此等化合物的体外抑制性质。在 96 孔微滴定板中进行体外激酶实验，由此测定 p38 活性。重组人 p38 (0.5 μ g/mL) 与底物（髓磷脂碱性蛋白，5 μ g/mL）在激酶缓冲液（25 mM Hepes, 20 mM MgCl₂ 和 150 mM NaCl）和化合物混合。添加每孔 1 μ Ci 的 ³³P 标记的 ATP (10 μ M) 至最终体积为 100 μ L。反应在 32 $^{\circ}$ C 下进行 30 分钟，然后用 1M HCl 溶液使其停止。插入至底物中的放射活性的量通过用 1% 磷酸溶液将底物捕获在带负电荷的玻璃纤维滤纸上而进行测定，然后用闪烁计数器进行读数。阴性对照包括底物 + 单独 ATP。

在小鼠中 LPS 诱发的 TNF α 形成

使用鼠 LPS 诱发的 TNF α 形成的体内模型测定所选化合物的体内抑制性质。每组十只 BALB/c 小鼠（Charles River Breeding Laboratories; Kingston, N.Y.）用载体或化合物通过所述的途径进行治疗。1 小时后，腹膜（i.p.）给药内毒素（E. coli 脂多糖 (LPS) 100 μ g）。90 分钟后，通过二氧化碳窒息对动物进行无痛致死，然后通过心脏针刺从每个动物中得到血浆并放入经肝素化的管中。在 12500 $\times$ g 和 4 $^{\circ}$ C 下离心 5 分钟，由此使样品澄清。将上清液倾入新的管中，其根据需要储存在 -20 $^{\circ}$ C 下。血清中的 TNF α 水平用市售的鼠 TNF ELISA 试剂盒（Genzyme）进行测定。

以上两个生物学实施例可以用于证实本发明的化合物在体外和体内抑制 p38 激酶，而且因此确定它们在治疗 p38 介导的疾病如炎症和骨质疏松症中的应用。

raf 激酶体外实验

在体外激酶实验中, raf 与 MEK 在包含 2 mM 2-巯基乙醇和 100 mM NaCl 的 20 mM Tris-HCl, pH 8.2 中温育。该蛋白溶液 (20 μ L) 与水 (5 μ L) 或与化合物混合, 后者是用蒸馏水稀释 10 mM 化合物 DMSO 原料溶液得到的。添加 25 μ L [γ -³³P]ATP (1000-3000 dpm/pmol) 在 80 mM Tris-HCl, pH 7.5、120 mM NaCl、1.6 mM DTT、16 mM MgCl₂ 中的溶液, 由此引发激酶反应。反应化合物在 32 $^{\circ}$ C 下温育, 通常为 22 分钟。将反应物收集在磷酸纤维素垫上, 用 1% 磷酸溶液冲洗掉游离物, 然后通过液体闪烁计数对磷酸化作用进行定量, 由此分析 ³³P 在蛋白中的掺入。对于高通量筛选, 使用 10 μ M ATP 和 0.4 μ M MEK。在某些实验中, 添加等量的 Laemmli 样品缓冲液, 由此使激酶反应停止。样品煮沸 3 分钟, 在 7.5% Laemmli 凝胶上进行电泳, 由此解析蛋白。固定凝胶, 干燥, 然后暴露与显像板 (Fuji)。使用 Fujix Bio-Imaging Analyzer System 对磷酸化作用进行分析。在该实验中, 实施例 1 和 2 的化合物在 10 微摩尔浓度时显示出 > 50% 的抑制作用, 这是对 raf 激酶具有显著的体外抑制作用。

肿瘤细胞增殖实验

对于体外生长实验, 在用于在塑料上依赖贴壁细胞生长或者在软琼脂中不依赖贴壁细胞生长的标准增殖实验中使用人肿瘤细胞系, 包括但不限于 HCT 116 和 DLD-1。人肿瘤细胞系是由 ATCC (Rockville MD.) 得到的, 并保存在包含 10% 热灭活胎牛血清和 200 mM 谷氨酰胺的 RPMI 中。细胞培养基和添加剂是从 Gibco/BRL (Gaithersburg, MD.) 得到的, 但不包括胎牛血清 (JRH Biosciences, Lenexa, Kans.)。在用于贴壁依赖性生长的标准增殖实验中, 3 $\times$ 10³ 个细胞接种在 96 孔组织培养板上, 并使它们在 5% CO₂ 的培养箱中于 37 $^{\circ}$ C 下过夜连接。化合物滴定在一系列稀释度的培养基中, 并添加在 96 孔培养板上。使细胞生长 5 天, 其中典型地在第 3 天时添加包含化合物的新培养基。测量代谢活性, 其中在

OD490/560 处用标准的 ELISA 板读数器测量标准 XTT 比色分析 (Boehringer Mannheim), 使用细胞收集器将细胞收集在玻璃纤维垫上, 然后通过闪烁计数测量 ^3H -胸苷的掺入量, 由此监测增殖作用。

对于不依赖贴壁细胞生长, 在 24 孔组织培养板中, 以 $1 \times 10^3 - 3 \times 10^3$ 的量将细胞铺板于 0.4% 在 RPMI 完全培养基中的 Seaplaque 琼脂糖内, 叠放一个仅包含在 RPMI 完全培养基中的 0.64% 琼脂的底层。将完全培养基加上一系列稀释度的化合物添加在各孔中, 然后在 5% CO_2 培养箱中于 37°C 下温育 10–14 天, 其中以 3–4 天的间隔添加包含化合物的新培养基。监测菌落形成, 并用 图像捕获技术和图像分析软件 (Image Pro Plus, media Cybernetics) 对总的细胞质量、平均菌落尺寸和菌落数量进行定量。

以上两个实验确定式 I 的化合物对于抑制 raf 激酶活性以及抑制癌细胞生长是有效的。

KDR (VEGFR2) 实验

在 Sf9 昆虫细胞中, KDR 激酶的胞质激酶域表达为 6His 融合蛋白。该 KDR 激酶域融合蛋白在 Ni^{++} 螯合柱上进行纯制。在 4°C 下用在 100 μl HEPES 缓冲液 (20 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.02% 硫柳汞) 中的 5 μg poly(Glu4; Tyr1) (Sigma Chemical Co., St Louis, Mo.) 涂覆 96 孔 ELISA 板过夜。在使用前, 该板用 HEPES、NaCl 缓冲液冲洗, 然后用 1% BSA、在 HEPES 中的 0.1% Tween 20、NaCl 缓冲液封闭该板。

测试化合物按照半对数稀释在 100% DMSO 中进行一系列的稀释, 从 4 mM 直至 0.12 μM 。这些稀释液进一步在水中稀释 20 倍, 得到在 5% DMSO 中的化合物溶液。在分析板上装填 85 μl 的分析缓冲液 (20 mM HEPES, pH 7.5, 100 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 3 mM MnCl_2 , 0.05% 甘油, 0.005% Triton X-100, 1 mM -巯基乙醇, 有或没有 3.3 μM ATP) 后, 添加 5 μl 的稀释化合物至最终体积为 100 μl 。在 0.25% DMSO 中的最终浓度在

10 μ M 和 0.3 nM 之间。添加 10 μ l (30 ng) 的 KDR 激酶域，由此开始进行分析。

分析物与测试化合物或单独的载体在室温下温育 60 分钟，同时轻柔地进行搅拌。洗涤各孔，并用抗磷酸酪氨酸 (PY) —mAb 克隆 4G10 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, N.Y.) 探测磷酸酪氨酸 (PY)。用抗鼠 IgG/HRP 结合物 (Amersham International plc, Buckinghamshire, 英国) 检测 PY/抗 PY 复合物。与 100 μ l 的 3,3',5,5'-四甲基联苯胺溶液 (Kirkegaard and Perry, TMB Microwell 单组分过氧化物酶底物) 温育，由此对磷酸酪氨酸进行定量。添加 100 μ l 的 1% HCl 基停止溶液 (Kirkegaard and Perry, TMB 单组分停止溶液)，由此使显色停止。

在 96 孔板读数器 SpectraMax 250 (Molecular Devices) 中于 450 nm 处分光光度测定光密度。从所有的 OD 值中减去背景 (在分析中没有 ATP) OD 值，并根据以下等式 1 计算百分抑制率：

$$\% \text{抑制} = \frac{(\text{OD}(\text{载体对照}) - \text{OD}(\text{含有化合物})) \times 100}{(\text{OD}(\text{载体对照}) - \text{OD}(\text{不添加 ATP}))}$$

使用化合物浓度对百分抑制率通过最小平方分析程序测定 IC₅₀ 值。

细胞机械分析—对 3T3 KDR 磷酸化的抑制

表达全长 KDR 受体的 NIH3T3 细胞在 DMEM (Life Technologies, Inc., Grand Island, N.Y.) 中生长，该培养基中补充有 10% 新生牛血清、低葡萄糖、25 mM /L 丙酮酸钠、盐酸吡哆醇、和 0.2 mg/ml 的 G418 (Life Technologies Inc., Grand Island, N.Y.)。细胞保存在加湿的 5% CO₂ 气氛和 37°C 下存在胶原 I 涂布的 T75 烧瓶 (Becton Dickinson Labware, Bedford, Mass.) 中。

在 DMEM 生长培养基中，将 15000 个细胞铺板在涂布有胶原 I 的

96 孔板的各个孔中。6 小时后，洗涤细胞，并用不含血清的 DMEM 替换培养基。在过夜培养至使细胞休眠后，用含有 0.1% 牛白蛋白（Sigma Chemical Co., St Louis, Mo.）的 Dulbecco 磷酸盐缓冲盐水（Life Technologies Inc., Grand Island, N.Y.）替换上述培养基。在 1% 最终浓度的 DMSO 中，向细胞中添加各种浓度（0—300 nM）的测试化合物，然后细胞在室温下温育 30 分钟。细胞接着在室温下用 VEGF (30 ng/ml) 处理 10 分钟。用 VEGF 刺激后，除去缓冲液，并通过在 4℃ 下添加 150 μ l 的抽提缓冲液（50 mM Tris, pH 7.8, 补充有 10% 甘油、50 mM BGP、2 mM EDTA、10 mM NaF、0.5 mM NaVO₄ 和 0.3% TX-100）使细胞溶解 30 分钟。

为评估受体磷酸化作用，向预先涂布 300 ng 抗体 C20（Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, Calif.）的 ELISA 板的每个孔中添加 100 微升的各细胞溶解产物。培养 60 分钟后，洗涤所述板，并使用抗磷酸酪氨酸 mAb 克隆 4G10（Upstate Biotechnology, Lake Placid, N.Y.）探测对于磷酸酪氨酸的结合 KDR。洗涤所述板，而每个孔与抗鼠 IgG/HRP 结合物（Amersham International plc, Buckinghamshire, 英国）温育 60 分钟。洗涤各个孔，并通过在每个孔中添加 100 μ l 的 3,3',5,5'-四甲基联苯胺（Kirkegaard and Perry, TMB Microwell 单组分过氧化物酶底物）溶液对磷酸酪氨酸进行定量。添加 100 μ l 的 1% HCl 基停止溶液（Kirkegaard and Perry, TMB 单组分停止溶液），由此使显色停止。

在 96 孔板读数器（SpectraMax 250, Molecular Devices）中于 450 nm 处分光光度测定光密度（OD）。从所有的 OD 值中减去背景（在分析中没有 VEGF）OD 值，并根据以下等式 2 计算百分抑制率：

$$\% \text{抑制} = \frac{(\text{OD}(\text{VEGF 对照}) - \text{OD}(\text{含有化合物})) \times 100}{(\text{OD}(\text{VEGF 对照}) - \text{OD}(\text{不添加 VEGF}))}$$

使用化合物浓度对百分抑制率通过最小平方分析程序测定一些示例性物质的 IC₅₀ 值。

VEGFR 抑制作用的体内分析：Matrigel®血管生成模型

制备 Matrigel Plugs 和体内相：Matrigel®（Collaborative Biomedical Products, Bedford, Mass.）是鼠肿瘤的基膜提取物，主要由 laminin、胶原 IV 和 heparan sulfate proteoglycan 组成。其在 4℃ 下为无菌液体形式，但在 37℃ 时快速形成固体凝胶。

4℃ 下液体 Matrigel 与用带有可选择的标记物并包含鼠 VEGF 基因的质粒转染的 SK-MEL2 人肿瘤细胞混合。肿瘤细胞在体外选择性地生长，然后按照 2×10^6 每 0.5 ml 的比例使细胞与冷的液体 Matrigel 混合。使用 25 号针将 0.5 ml 皮下植入在腹部中线附近。在植入当天开始每日 1 次 po 给药在乙醇/Cremaphor EL/盐水（12.5%：12.5%：75%）中的溶液形式的测试化合物，剂量分别是 30、100 和 300 mg/kg。在植入后 12 天将小鼠无痛致死，并收集 Matrigel 沉淀用于分析血红蛋白含量。

血红蛋白分析：Matrigel 沉淀放置在 4 体积（w/v）的 4℃ 溶解缓冲液（20 mM Tris pH 7.5, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100 [EM Science, Gibbstown, N.J.], 和完整的无 EDTA 的蛋白酶抑制剂鸡尾酒 [Mannheim, Germany]）中，然后在 4℃ 下均化。匀浆在冰上温育 30 分钟，同时振摇并在 $14K \times g$ 和 4℃ 下离心 30 分钟。上清液转移到冷冻的微量离心管中，并在 4℃ 下储存用于血红蛋白分析。

鼠血红蛋白（Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.）以 5 mg/ml 的量悬浮在经过高压灭菌的水（BioWhittaker, Inc, Walkersville, Md.）中。在溶解缓冲液（同上）中产生 500 微克/ml—30 微克/ml 的标准曲线。在聚苯乙烯 96 孔板上以 5 微升/孔的量添加双份的标准曲线和细胞溶解样品。使用 Sigma 血浆血红蛋白试剂盒（Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.），TMB 底物在 50 ml 室温下的乙酸溶液中复原。在每个孔中添加 100 微升

的底物，然后在室温下添加 100 微升/孔的过氧化氢溶液。所述板在室温下温育 10 分钟。

在 96 孔板读数器 SpectraMax 250 微量板分光光度计系统(Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 中于 600 nm 处分光光度测定光密度。从所有的孔中减去背景溶解缓冲液的读数。总样品血红蛋白含量根据以下等式来计算：

$$\text{总血红蛋白} = (\text{样品细胞溶解物体积}) \times (\text{血红蛋白浓度})$$

从每个含有细胞的总血红蛋白 Matrigel 样品减去不含细胞的 Matrigel 样品的平均总血红蛋白。根据以下等式计算百分抑制率。

$$\% \text{抑制} = \frac{(\text{经药物处理的肿瘤细胞溶解物的平均总血红蛋白}) \times 100}{(\text{未经药物处理的肿瘤细胞溶解物的平均总血红蛋白})}$$

上述三个实验证实式 I 的化合物对于抑制 VEGF 受体激酶活性和抑制血管生成是具有活性的。

抗肿瘤活性的体内实验

如下进行化合物对 raf 激酶介导的肿瘤（如实体癌）的抑制作用的体内实验：以 1×10^6 细胞的量将 CDI nu/nu 小鼠（6—8 周龄）皮下注射入肋腹，其中含有人结肠腺癌细胞系。当肿瘤尺寸在 50—100 mg 之间时，在大约第 10 天开始向小鼠 i.p.、i.v.或 p.o.给药 10、30、100、或 300 mg/Kg 的剂量。动物连续给药 14 天，每周用卡尺监测肿瘤尺寸 2 次。根据 Monia 等人的技术(Nat. Med. 1996, 2, 668-75)可进一步体内证实化合物对 p38、raf 和 VEGFR 激酶以及因此对肿瘤生长（如实体癌）的抑制作用。

通过替换概况或者具体描述的用于上述实施例的本发明反应剂和/或操作条件，可以类似成功地重复上述实施例。

本领域技术人员从以上描述可以容易地确定本发明的本质特征，而且在不偏离其精神和范围的情况下，可对本发明进行各种改变和改进以适用于各种病症和应用。