



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106279142 B

(45)授权公告日 2019.05.03

(21)申请号 201610652725.8

(22)申请日 2013.05.14

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106279142 A

(43)申请公布日 2017.01.04

(30)优先权数据

61/647,200 2012.05.15 US

(62)分案原申请数据

201380025541.3 2013.05.14

(73)专利权人 癌症研究技术有限公司

地址 英国伦敦

(72)发明人 艾安·柯林斯

托马斯·彼得·马修斯

塔蒂亚娜·法里亚 达 丰塞卡 麦

克哈迪

詹姆斯·奥斯本

迈克尔·莱恩什伯里

迈克尔·艾安·沃尔顿

米歇尔·道恩·加勒特

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

代理人 张英 宫传芝

(51)Int.Cl.

C07D 413/14(2006.01)

A61K 31/5377(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件

WO 03093297 A2,2003.11.13,

WO 03101444 A1,2003.12.11,

WO 2008115369 A2,2008.09.25,

WO 2009044162 A1,2009.04.09,

审查员 黄凯

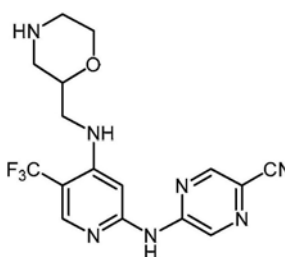
权利要求书2页 说明书41页

(54)发明名称

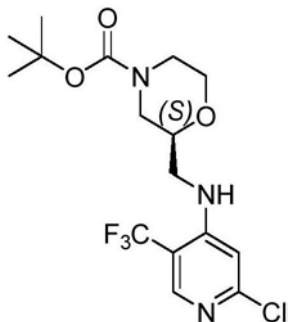
5-[[4-[[吗啉-2-基]甲基氨基]-5-(三氟甲基)-2-吡啶基]氨基]吡嗪-2-腈及其治疗应用

(57)摘要

本发明涉及5-[[4-[[吗啉-2-基]甲基氨基]-5-(三氟甲基)-2-吡啶基]氨基]吡嗪-2-腈及其治疗应用。本发明还涉及包含该化合物的药物组合物,该化合物与组合物在体外和体内抑制CHK1激酶功能的应用,以及在由CHK1介导的、通过抑制CHK1激酶功能改善等的疾病和病况的治疗中的应用,包括增殖性病况如癌症等,可选地与其他药剂组合,例如(a)DNA拓扑异构酶I或II抑制剂;(b)DNA损伤剂;(c)抗代谢物或胸苷酸合成酶(TS)抑制剂;(d)微管靶向剂;(e)电离辐射;(f)有丝分裂调节剂或有丝分裂检测点调节剂的抑制剂;(g)DNA损伤信号转导剂的抑制剂;和(h)DNA损伤修复酶的抑制剂。

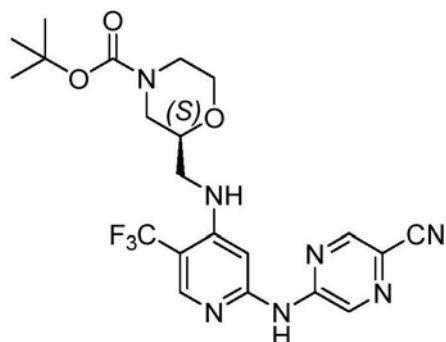


1. 一种式I的化合物,或其药学上可接受的盐:



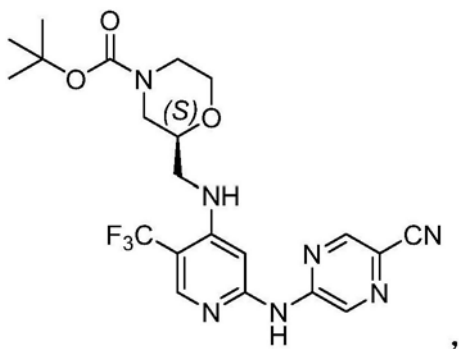
I。

2. 一种式II的化合物,或其药学上可接受的盐:



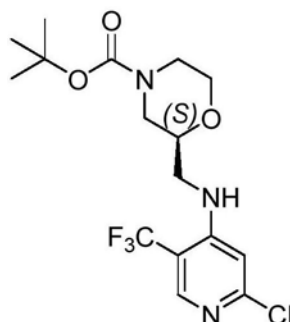
II。

3. 用于制备根据以下结构的化合物或其药学上可接受的盐的方法:

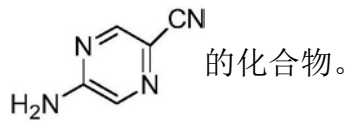


所述方法包括:

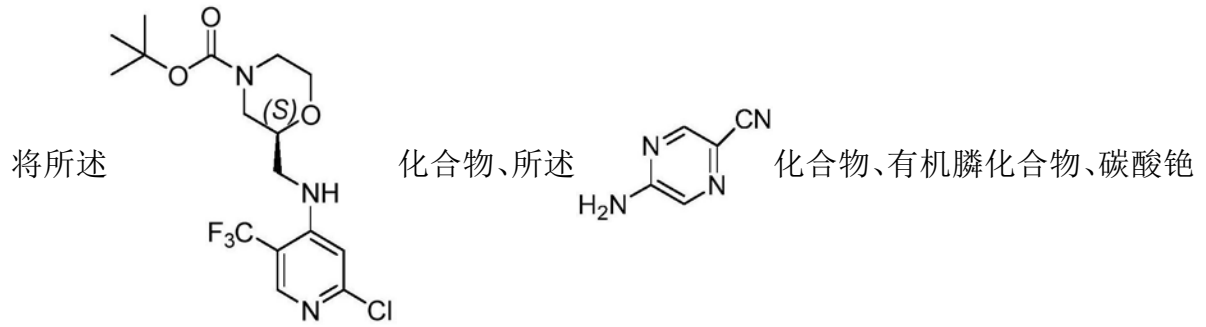
使用交叉偶联反应条件以将结构



的化合物偶联至结构



4. 根据权利要求3所述的方法,其中,所述方法进一步包括:



和钯(0)化合物悬浮在质子惰性的有机溶剂中;

将悬浮液加热至100°C持续29小时。

5-[[4-[[吗啉-2-基]甲基氨基]-5-(三氟甲基)-2-吡啶基]氨基]吡嗪-2-腈及其治疗应用

[0001] 本申请是申请日为2013年05月14日的题为“5-[[4-[[吗啉-2-基]甲基氨基]-5-(三氟甲基)-2-吡啶基]氨基]吡嗪-2-腈及其治疗应用”的中国专利申请号201380025541.3的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请涉及在2012年5月15日提交的美国专利申请号US61/647,200,其全部内容通过引用结合于此。

技术领域

[0004] 本发明总体上涉及治疗化合物的领域。更特别地本发明涉及5-[[4-[[吗啉-2-基]甲基氨基]-5-(三氟甲基)-2-吡啶基]氨基]吡嗪-2-腈化合物(在此称为“TMF化合物”),其,除其他外(inter alia),抑制细胞周期检测点激酶(Checkpoint Kinase)1(CHK1)激酶功能。本发明还涉及包含这样的化合物的药物组合物,和这样的化合物和组合物在体外和体内以抑制CHK1激酶功能的应用,以及在由CHK1介导的、由CHK1激酶功能的抑制改善的等的疾病和病况(包括增殖性(proliferative,增生性)病况如癌症等)的治疗中的应用,可选择地与其他药剂组合,例如,(a) DNA拓扑异构酶I或II抑制剂;(b) DNA损伤剂;(c) 抗代谢物或胸苷酸合成酶(TS)抑制剂;(d) 微管靶向剂;(e) 电离辐射;(f) 有丝分裂调节剂或有丝分裂检测点调节剂的抑制剂;(g) DNA损伤信号转导剂的抑制剂;或(h) DNA损伤修复酶的抑制剂。

背景技术

[0005] 在此引用了许多出版物以更全面地描述和公开本发明以及本发明涉及的现有技术状况。这些参考文献的每一个都以其全部内容包括在本公开中在此引用以供参考,如同各个参考文献以相同程度明确地且单独地指明通过引用被并入。

[0006] 贯穿本说明书,包括随附的权利要求,除非上下文另外要求,单词“包含”、和变体如“包含了”和“包含有”,将理解为表明包括所述的整数或步骤或者整数或步骤的组但不排除任何其他整数或步骤或者整数或步骤的组。

[0007] 必须注意的是,如在该说明书和附属的权利要求中使用的,除非上下文另外明确地陈述,否则单数形式“一种”、“一个”以及“该”包括复数形式。因此,例如,参考“药物载体”包括两种或更多种这样的载体等的混合物。

[0008] 在此经常以从“约”一个特定的值,和/或至“约”另一个特定值来表达范围。当表达这样的范围时,另一个实施方式包括从一个特定数值和/或至其他特定值。类似地,当以近似值表达数值时,通过使用先行词“约”,应理解,该特定值形成另一个实施方式。

[0009] 本公开包括对理解本发明可为有用的信息。并不是承认在此提供的任何信息为现有技术或与当前要求的发明相关,或者明确地或暗示地引用的任何出版物为现有技术。

[0010] 细胞周期检测点激酶1(CHK1)

[0011] 通过细胞分裂周期的进程(progression)是严格调节的过程,且在称为细胞周期

检测点的数个位点处进行监控(参见,例如,Weinert和Hartwell,1989;Bartek和Lukas,2003)。在细胞周期的四个阶段(G1、S(DNA复制)、G2和M(有丝分裂))中发现了这些检测点并且它们确保控制DNA复制和细胞分裂的保真度的关键事件正确地完成。通过许多刺激激活细胞周期检测点,许多刺激包括DNA损伤和由缺陷复制造成的DNA错误。当此发生时,细胞周期将停滞(arrest),允许用于发生DNA修复的时间,或者如果损伤太严重,允许用于激活导致受控的细胞死亡的细胞过程的时间。

[0012] 根据限定,所有的癌症具有异常的细胞分裂周期的一些形式。经常地,癌症细胞具有一个或更多有缺陷的细胞周期检测点,或在特定DNA修复通路内的港口缺陷(harbour defect)。与非癌性的细胞(其中所有的检测点和DNA修复通路为完整无缺的)相比,这些细胞因此常更依赖于其余的细胞周期检测点和修复通路。癌细胞对DNA损伤的响应常常为它们是否继续增殖或激活细胞死亡过程并死亡的关键决定因素。例如,包含肿瘤抑制子p53的一种或多种突变形式的肿瘤细胞在G1DNA损伤检测点中是有缺陷的。因此G2或S-阶段(S-phase)检测点的抑制剂有望进一步削弱肿瘤细胞修复受损的DNA的能力。

[0013] 许多已知癌症治疗通过物理修饰细胞的DNA或者扰乱可以影响DNA复制和细胞分裂的保真度的至关重要的细胞过程(如DNA代谢、DNA合成、DNA转录和微管纺锤体形成)引起DNA损伤。这样的治疗包括例如,引起DNA链断裂的放射治疗,和各种化学治疗剂包括拓扑异构酶抑制剂、抗代谢物、DNA烷化剂和含铂的细胞毒性药物。对这些基因毒性治疗的重要的限制为药物抗性。导致该抗性的最重要的机制之一归因于激活细胞周期检测点,其给予肿瘤细胞修复受损的DNA发时间。通过去除特定的细胞周期检测点,或抑制DNA修复的特定形式,其有可能因此绕过肿瘤细胞对基因毒性药剂的抗性并增大DNA损伤引起的肿瘤细胞死亡,从而增强这些癌症治疗的治疗指数。

[0014] CHK1为参与调节细胞周期检测点信号的丝氨酸/苏氨酸激酶,细胞周期检测点信号响应于DNA损伤和由缺陷的复制造成的DNA中的错误而被激活(参见,例如,Bartek和Lukas,2003)。CHK1通过底物的磷酸化转导这些信号,底物参与许多细胞活动,其包括细胞周期停滞和DNA修复。CHK1的两个关键底物为Cdc25A和Cdc25C磷酸酶,其去磷酸化CDK1导致其激活,这是离开G2进入有丝分裂(M期)的要求(参见,例如, Sanchez等人,1997)。通过CHK1磷酸化Cdc25C和相关的Cdc25A阻断了它们激活CDK1的能力,从而阻止了细胞离开G2进入M期。已在其中CHK1功能已被敲出(knock out)的许多研究中证明了CHK1在DNA损伤诱导的G2细胞周期检测点中的作用(参见,例如,Liu等人,2000;Zhao等人,2002;Zachos等人,2003)。

[0015] DNA损伤诱导的G2检测点对CHK1的依赖提供了对癌症治疗的治疗策略的一个实例,包括CHK1的靶向抑制。经DNA损伤后,p53肿瘤抑制蛋白被稳定且激活以产生p53-依赖的G1停滞,引起细胞凋亡或DNA修复(Balaint和Vousden,2001)。超过一半的所有癌症是p53功能性缺陷的,其可使得它们对基因毒性癌症治疗有抵抗力,这些治疗如电离辐射(IR)和某些形式的化疗(参见,例如,Greenblatt等人,1994;Carson和Lois,1995)。这些p53缺陷性细胞不能在G1检测点停滞或经历细胞凋亡或DNA修复,并且因此对于生存力和复制保真度可能更依赖于G2检测点。因此通过抑制CHK1激酶功能去除(abrogation)G2检测点可以选择性地使p53缺陷性癌细胞对基因毒性癌症治疗敏感,并且这已被证明(参见,例如,Wang等人,1996;Dixon和Norbury,2002)。

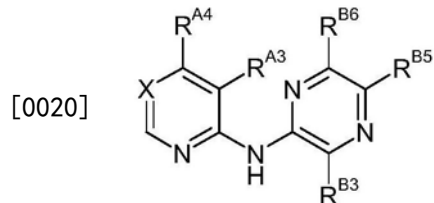
[0016] 另外,还表明,通过同源重组,CHK1参与到S期细胞周期检测点和DNA修复中。因此,

在那些DNA损伤后依赖于这些过程的癌症中,CHK1激酶的抑制可以提供采用CHK1抑制剂的用于治疗癌症的另外的治疗策略(参见,例如,Sorensen等人,2005)。此外,由于高水平的内源性DNA损伤(参见,例如,Cavalier等人,2009;Brooks等人,2012)或通过原癌基因驱动的升高的复制,例如扩增或过表达的MYC基因(参见,例如,Di Micco等人,2006;Cole等人,2011;Murga等人,2011),某些癌症可以呈现出复制应激(replicative stress)。通过CHK1激酶,这样的癌症可以呈现出升高的信号(参见,例如,Höglund等人,2011)。在那些依赖于这些过程的癌症中抑制CHK1激酶,可以提供采用CHK1抑制剂的用于治疗癌症的另外的治疗策略(参见,例如,Cole等人,2011;Davies等人,2011;Ferrao等人,2011)。

[0017] 采用CHK1选择性siRNA的最近的数据支持CHK1选择性的抑制作为相关的治疗方法,并建议与某些其他检测点激酶的组合抑制提供不了任何另外的益处并且可能是非生产性的(参见,例如,Xiao等人,2006;Guzi等人,2011)。来自各种化学类别的CHK1激酶功能的小分子选择性的抑制剂已被描述(参见,例如,Tao等人,2006)。

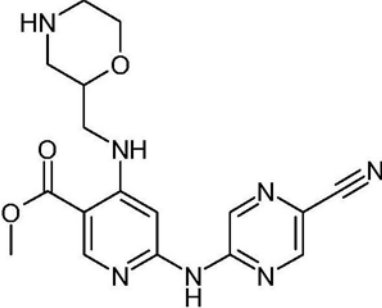
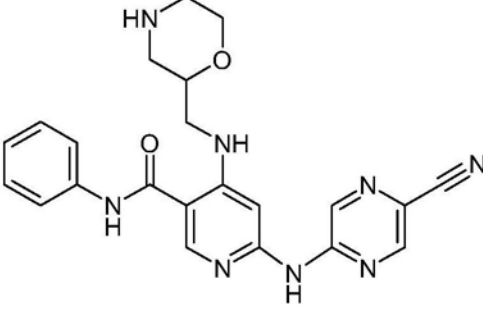
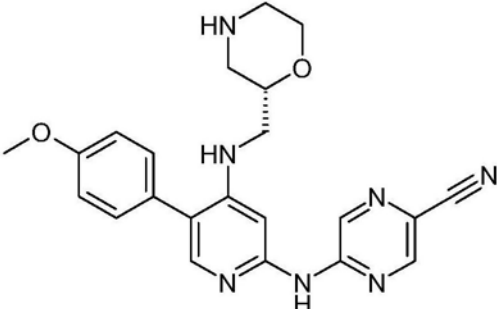
[0018] 已知化合物

[0019] Collins等人,2009a(WO 2009/044162 A1)描述了具有下列式的某些化合物,其抑制细胞周期检测点激酶1(CHK1)激酶功能,并且其在例如癌症的治疗中是有用的:

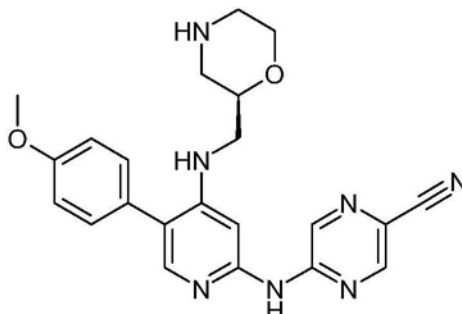
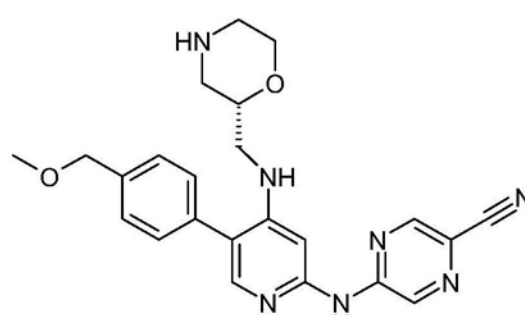
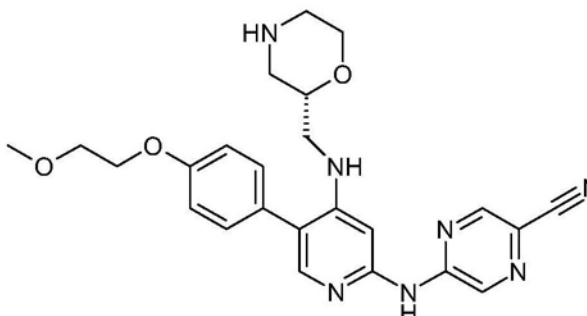


[0021] 在Collins等人,2009a的实例中为下列的化合物:

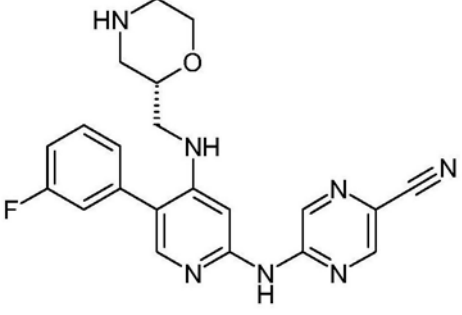
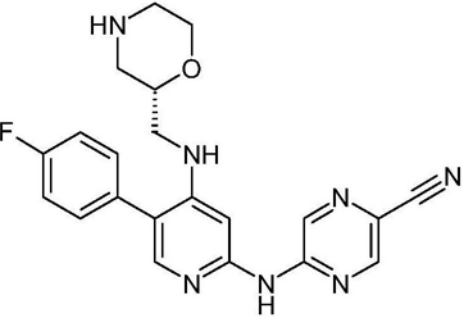
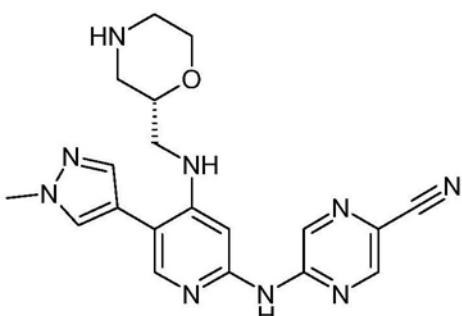
[0022]

表 1			
#	注册号	代码	化学结构
1	1137477-07-6	Y-081	
2	1137477-35-0	Y-102	
3	1168103-91-0	Y-146	

[0023]

表 1			
#	注册号	代码	化学结构
4	1137478-38-6	Y-147	
5	1137478-39-7	Y-148	
6	1137478-40-0	Y-149	

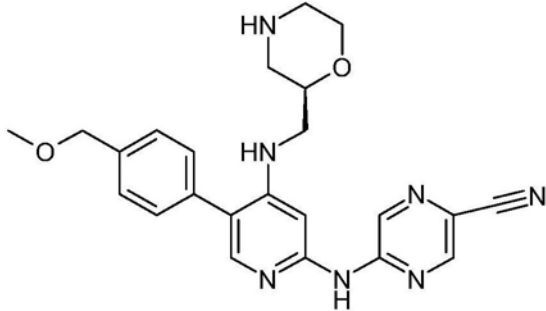
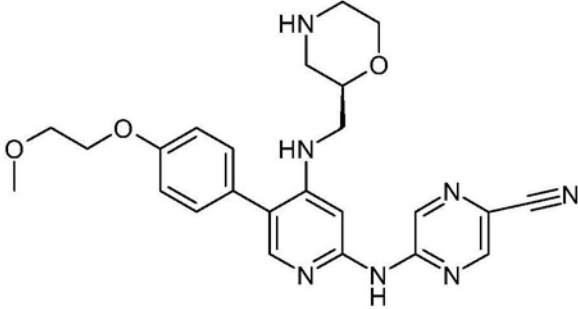
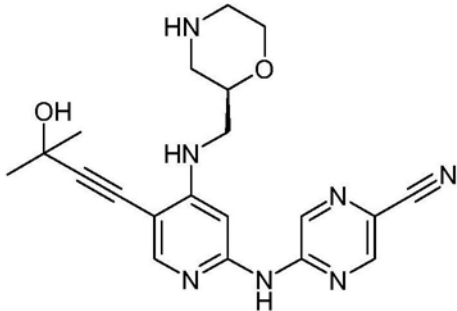
[0024]

表 1			
#	注册号	代码	化学结构
7	1137478-41-1	Y-150	
8	1137478-44-4	Y-151	
9	1137478-45-5	Y-152	

[0025]

表 1			
#	注册号	代码	化学结构
10	1137478-46-6	Y-153	<chem>CN1CCOC1[C@@H](N)C#CC2=CC=NC=C2N[C@@H](C#CC3=CC=NC=C3C#N)C#CC4=CC=NC=C4</chem>
11	1137478-47-7	Y-154	<chem>CN1CCOC1[C@@H](N)C#CCOC2=CC=NC=C2N[C@@H](C#CC3=CC=NC=C3C#N)C#CC4=CC=NC=C4</chem>
12	1137478-48-8	Y-155	<chem>CN1CCOC1[C@@H](N)C#CCOC2=CC=NC=C2N[C@@H](C#CC3=CC=NC=C3C#N)C#CC4=CC=NC=C4</chem>

[0026]

表 1			
#	注册号	代码	化学结构
13	1137478-50-2	Y-156	
14	1137478-51-3	Y-157	
15	1137478-52-4	Y-158	

[0027]

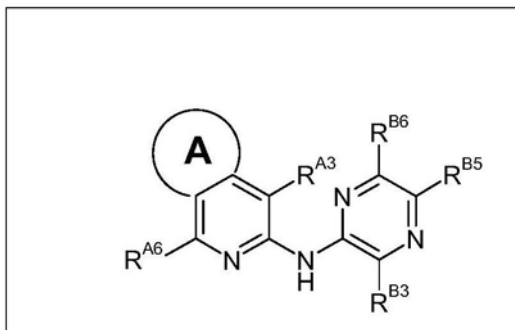
表 1			
#	注册号	代码	化学结构
16	1137478-54-6	Y-159	

[0028] 在Collins等人,2009a限定的属中,X可以为 $-CR^{A5}$ - (参见,例如,其中第8页,第27行)以及 $-R^{A5}$ -可以为 $-Q^{A5}$ (参见,例如,其中第9页,第1行)。基团 $-Q^{A5}$ 被广泛地限定(参见,例如,其中第31页,第27行至第38页,第13行),并且可以为,例如, $-CF_3$ (参见,例如,第31页,第1行和第33页,第21行)。

[0029] 然而,在Collins等人,2009a的实例中没有一个实例的X为 $-CR^{A5}$ -其中 $-R^{A5}$ 为 $-CF_3$ 。

[0030] Collins等人,2009b,描述了具有下列式的某些化合物,其抑制细胞周期检测点激酶1 (CHK1) 激酶功能,并且其在例如癌症的治疗中是有用的:

[0031]



[0032] Walton等人,2010,描述了称为SAR-020106的CHK1抑制剂的临床前研究。

[0033] Almeida等人,2008,描述了某些吡啶基-氨基-取代的吡嗪,据称其在治疗癌症中是有用的。

[0034] Ioannidis等人,2009,描述了某些化合物,其抑制Janus-相关激酶 (JAK, 两面神激酶)。参见,例如,其中第6526页方案5。

[0035] Lin等人,2005,描述了某些大环脲化合物,据称其作为蛋白激酶抑制剂为有用的。参见,例如,其中第1页[0004]段。

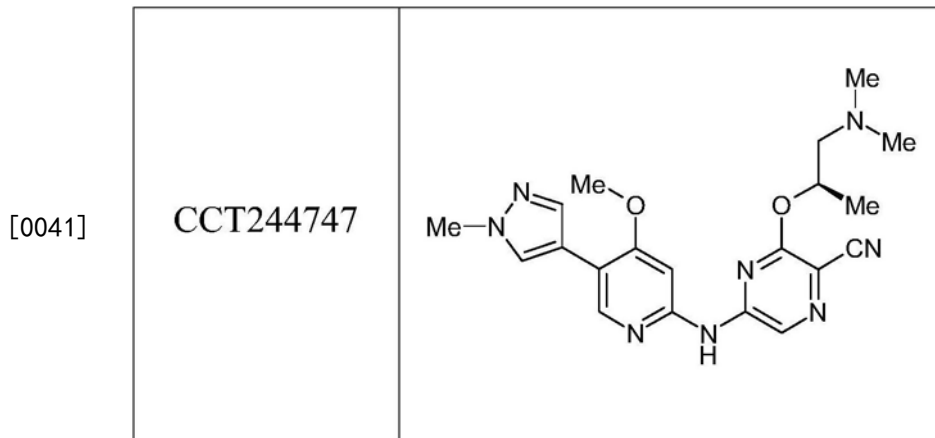
[0036] Tao等人,2005,描述了某些大环脲化合物,据称其作为蛋白激酶抑制剂为有用的。参见,例如,其中第2页。

[0037] Li等人,2007,描述了某些大环脲CHK1抑制剂的制备和测试。参见,其中第6502页表1。

[0038] Tao等人,2007a,描述了某些大环脲CHK1抑制剂的制备和测试。参见,其中第6596页表2。

[0039] Tao等人,2007b,描述了某些大环脲CHK1抑制剂的制备和测试。参见,其中第1517页表3。

[0040] 发明人中的一个或更多个已经贡献于本出版物,其中描述了许多CHK1抑制剂,包括称作CCT244747的下列化合物。参见,Lainchbury等人,2012(显然于2012年10月19日在线公开)和Walton等人,2012(显然于2012年10月15日公开)。



发明内容

[0042] 如在此描述的,本发明的一个方面涉及5-[[4-[[吗啉-2-基]甲基氨基]-5-(三氟甲基)-2-吡啶基]氨基]吡嗪-2-腈化合物(在此称作“TFM化合物”)。

[0043] 本发明的另一个方面涉及包含如在此描述的TFM化合物以及药学上可接受的载体或稀释剂的组合物(例如,药物组合物)。

[0044] 在一个实施方式中,组合物(例如,药物组合物)适合于口服给予至受试者。

[0045] 在一个实施方式中,组合物为以下的形式:口服片剂、口服颗粒剂、口服粉末剂、口服胶囊剂、口服扁囊剂或口服丸剂。

[0046] 本发明的另一方面涉及制备组合物(例如,药物组合物)的方法,包括使如在此描述的TFM化合物和药学上可接受的载体或稀释剂混合的步骤。

[0047] 本发明的另一方面涉及在细胞中体外或体内抑制CHK1激酶功能的方法,包括使细胞与有效量的如在此描述的TFM化合物接触。

[0048] 在一个实施方式中,该方法进一步包括使细胞与一种或更多种选自以下的其他药剂接触:(a) DNA拓扑异构酶I或II抑制剂;(b) DNA损伤剂;(c) 抗代谢物或胸苷酸合成酶(TS)抑制剂;(d) 微管靶向剂;(e) 电离辐射;(f) 有丝分裂调节剂或有丝分裂检测点调节剂的抑制剂;(g) DNA损伤信号转导剂的抑制剂;和(h) DNA损伤修复酶的抑制剂。

[0049] 本发明的另一方面涉及以下的方法:在体外或体内调节(例如,抑制)细胞增殖(例如,细胞的增殖)、抑制细胞周期进程、促进细胞凋亡或这些中的一种或更多种的组合,包括使细胞与有效量的如在此描述的TFM化合物接触。

[0050] 在一个实施方式中,该方法进一步包括使细胞与一种或更多种选自以下的其他药剂接触:(a) DNA拓扑异构酶I或II抑制剂;(b) DNA损伤剂;(c) 抗代谢物或胸苷酸合成酶(TS)

抑制剂; (d) 微管靶向剂; (e) 电离辐射; (f) 有丝分裂调节剂或有丝分裂检测点调节剂的抑制剂; (g) DNA损伤信号转导剂的抑制剂; 和 (h) DNA损伤修复酶的抑制剂。

[0051] 本发明的另一方面涉及治疗的方法, 包括给予需要治疗的受试者治疗有效量的如在此描述的TFM化合物, 优选以药物组合物的形式。

[0052] 在一个实施方式中, 所述给予为口服给予。

[0053] 在一个实施方式中, 该方法进一步包括给予受试者一种或更多种选自以下的其他药剂: (a) DNA拓扑异构酶I或II抑制剂; (b) DNA损伤剂; (c) 抗代谢物或胸苷酸合成酶(TS)抑制剂; (d) 微管靶向剂; (e) 电离辐射; (f) 有丝分裂调节剂或有丝分裂检测点调节剂的抑制剂; (g) DNA损伤信号转导剂的抑制剂; 和 (h) DNA损伤修复酶的抑制剂。

[0054] 本发明的另一方面涉及如在此描述的TFM化合物用于在通过疗法治疗人或动物体的方法中使用。

[0055] 在一个实施方式中, 化合物用于通过口服给予在通过疗法治疗人或动物体的方法中使用。

[0056] 在一个实施方式中, 治疗的方法进一步包括用(i) TFM化合物和(ii)一种或更多种的选自以下的其他药剂治疗: (a) DNA拓扑异构酶I或II抑制剂; (b) DNA损伤剂; (c) 抗代谢物或胸苷酸合成酶(TS)抑制剂; (d) 微管靶向剂; (e) 电离辐射; (f) 有丝分裂调节剂或有丝分裂检测点调节剂的抑制剂; (g) DNA损伤信号转导剂的抑制剂; 和 (h) DNA损伤修复酶的抑制剂。

[0057] 本发明的另一方面涉及如在此描述的TFM化合物在制备用于在治疗中使用的药物中的应用。

[0058] 在一个实施方式中, 药物为用于口服给予的药物。

[0059] 在一个实施方式中, 治疗包括用(i) 包含TFM化合物的药物和(ii)一种或更多种选自以下的其他药剂治疗: (a) DNA拓扑异构酶I或II抑制剂; (b) DNA损伤剂; (c) 抗代谢物或胸苷酸合成酶(TS)抑制剂; (d) 微管靶向剂; (e) 电离辐射; (f) 有丝分裂调节剂或有丝分裂检测点调节剂的抑制剂; (g) DNA损伤信号转导剂的抑制剂; 和 (h) DNA损伤修复酶的抑制剂。

[0060] 在一个实施方式中, 治疗为由CHK1介导的疾病或病况的治疗。

[0061] 在一个实施方式中, 治疗为通过抑制CHK1激酶功能改善的疾病或病况的治疗。

[0062] 在一个实施方式中, 治疗为增殖性病况的治疗。

[0063] 在一个实施方式中, 治疗为癌症的治疗。

[0064] 在一个实施方式中, 治疗为以下的治疗: 头癌; 颈癌; 神经系统癌症; 脑癌; 成神经细胞瘤; 肺/纵隔癌; 乳癌; 食道癌; 胃癌; 肝癌; 胆道癌; 胰腺癌; 小肠癌; 大肠癌; 结肠直肠癌; 妇科癌症; 泌尿生殖系统癌症; 卵巢癌; 甲状腺癌; 肾上腺癌; 皮肤癌; 黑色素瘤; 骨肉瘤; 软组织肉瘤; 小儿恶性肿瘤; 霍奇金氏(Hodgkin's)病; 非霍奇金氏(Hodgkin's)淋巴瘤; 骨髓瘤; 白血病; 或从未知原发部位转移。

[0065] 在一个实施方式中, 治疗为以下的治疗: 肺癌、乳癌、卵巢癌、胰腺癌、结肠直肠癌、淋巴瘤、黑色素瘤、神经胶质瘤(glioma)或成神经细胞瘤。

[0066] 在一个实施方式中, 治疗为p53缺陷性癌症(p53deficient cancer)的治疗。

[0067] 在一个实施方式中, 治疗为MYC-扩增的癌症(MYC amplified cancer)的治疗。

[0068] 在一个实施方式中, 治疗为c-MYC-扩增的癌症的治疗。

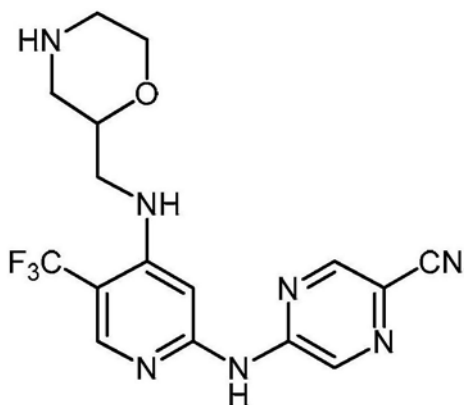
- [0069] 在一个实施方式中,治疗为MYCN-扩增的癌症的治疗。
- [0070] 在一个实施方式中,治疗为以MYC的过表达为特征的癌症的治疗。
- [0071] 在一个实施方式中,治疗为以MYCN的过表达为特征的癌症的治疗。
- [0072] 在一个实施方式中,治疗为以c-MYC的过表达为特征的癌症的治疗。
- [0073] 在一个实施方式中,治疗为MYCN-扩增的成神经细胞瘤的治疗。
- [0074] 在一个实施方式中,治疗为c-MYC-扩增的B细胞淋巴瘤的治疗。
- [0075] 在一个实施方式中,治疗为以增强的内源性复制应激为特征的癌症的治疗。
- [0076] 在一个实施方式中,治疗为以CHK1信号的增强的内源性激活为特征的癌症的治疗。
- [0077] 本发明的另一方面涉及试剂盒,包含(a)如在此描述的TFM化合物,优选以药物组合物提供并且在合适的容器和/或具有合适的包装;和(b)使用说明,例如,如何服用化合物的书面说明。
- [0078] 在一个实施方式中,试剂盒进一步包含一种或更多选自以下的其他药剂:(a) DNA拓扑异构酶I或II抑制剂;(b) DNA损伤剂;(c) 抗代谢物或胸苷酸合成酶(TS)抑制剂;(d) 微管靶向剂;(e) 全身放射性药物;(f) 有丝分裂调节剂或有丝分裂检测点调节剂的抑制剂;(g) DNA损伤信号转导剂的抑制剂;和(h) DNA损伤修复酶的抑制剂。
- [0079] 本发明的另一方面涉及通过在此描述的合成方法或包含如在此描述的合成方法的方法可获得的TFM化合物。
- [0080] 本发明的另一方面涉及通过在此描述的合成方法或包含如在此描述的合成方法的方法获得的TFM化合物。
- [0081] 本发明的另一方面涉及新的中间体,如在此描述,其适用于在在此描述的合成方法中使用。
- [0082] 本发明的另一方面涉及如在此描述的这样的新的中间体在在此描述的合成方法中的应用。
- [0083] 如本领域技术人员将理解,本发明的一个方面的特征和优选的实施方式还将涉及本发明的其他方面。

具体实施方式

[0084] 化合物

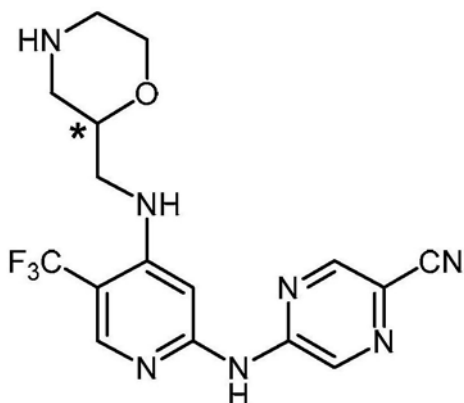
[0085] 本发明的一个方面涉及下列式的化合物和其药学上可接受的盐、水合物和溶剂化物(为了方便,在此全体称为“5-[[4-[[吗啉-2-基]甲基氨基]-5-(三氟甲基)-2-吡啶基]氨基]吡嗪-2-腈化合物”或“TFA化合物”):

[0086]



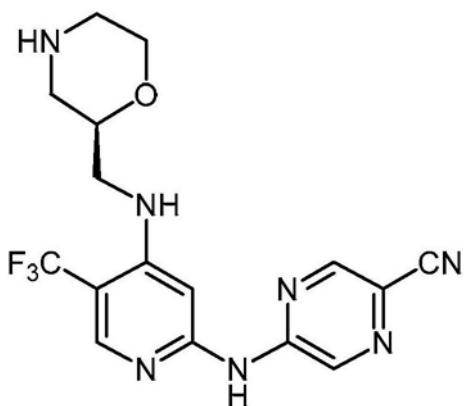
[0087] 吗啉基团的连接点为手性中心(在下式中用星号标记),其可以独立地为(R)或(S)构型。除非另外说明,否则意在两种构型都包括在内。

[0088]



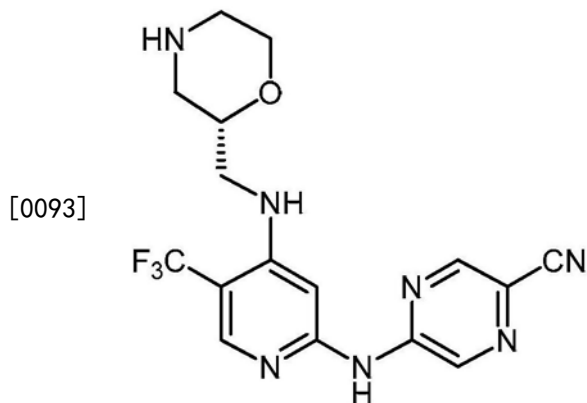
[0089] 在一个实施方式中,化合物为下式的化合物或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物:

[0090]



[0091] 上述化合物还被称为5-[[4-[[(2R)-吗啉-2-基]甲基氨基]-5-(三氟甲基)-2-吡啶基]氨基]吡嗪2-腈。

[0092] 在一个实施方式中,化合物为下式的化合物或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物:



[0094] 上述化合物还被称为5-[[4-[[(2S)-吗啉-2-基]甲基氨基]-5-(三氟甲基)-2-吡啶基]氨基]吡啶2-腈。

[0095] 基本纯的形式

[0096] 本发明的一个方面涉及纯的形式的TFM化合物。

[0097] 在一个实施方式中,化合物为基本纯的形式和/或基本无污染物的形式。

[0098] 在一个实施方式中,化合物为具有以下纯度的基本纯的形式:按重量计至少50% (至少50wt%),例如至少60wt%、例如至少70wt%、例如至少80wt%、例如至少90wt%、例如至少95wt%、例如至少97wt%、例如至少98wt%、例如至少99wt%。

[0099] 除非规定,否则基本纯的形式指为任何立体异构体形式或对映异构体形式的化合物。例如,在一个实施方式中,基本纯的形式指对映异构体的混合物,即,相对于其他化合物纯化的。在一个实施方式中,基本纯的形式指对映异构体的等摩尔混合物(即,外消旋混合物,外消旋体)。在一个实施方式中,基本纯的形式指一种对映异构体,例如,光学纯对映异构体。

[0100] 在一个实施方式中,化合物为基本无污染物的形式,其中污染物存在不多于50wt%、例如不多于40wt%、例如不多于30wt%、例如不多于20wt%、例如不多于10wt%、例如不多于5wt%、例如不多于3wt%、例如不多于2wt%、例如不多于1wt%。

[0101] 除非规定,否则污染物指其他化合物,即,除了对映异构体外的。在一个实施方式中,污染物指其他化合物和其他对映异构体。

[0102] 在一个实施方式中,化合物为具有以下光学纯度的基本纯的形式:至少60% (即,基于摩尔,60%的化合物为所需的对映异构体,而40%为非所需的对映异构体),例如至少70%、例如至少80%、例如至少90%、例如至少95%、例如至少97%、例如至少98%、例如至少99%。

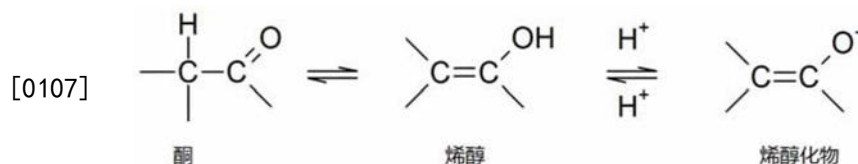
[0103] 同分异构体

[0104] 某些化合物可存在为一种或更多的特定的几何的、光学的、对映异构体的、非对映的、差向异构体的、阻转的(atropic)、立体异构的、互变异构的、构象异构的或异头物的形式,其包括但不限于,顺式和反式(cis-and trans-forms);E型和Z型(E-and Z-forms);c型、t型和r型(c-,t-,and r-forms);内型和外型(endo-and exo-forms);R型、S型和内消旋型(R-,S-,and meso-forms);D型和L型(D-and L-forms);d型和l型(d-and l-forms);(+型)型和(-型)((+) and (-) forms);酮形式、烯醇形式和烯醇化物形式;顺式和反式(syn-and anti-forms);向斜式和背斜式(synclinal-and anticlinal-forms); α 型和 β 型(α -and β -

forms);轴向形式和赤道向形式(axial and equatorial forms);船式、椅式、扭曲式、信封式和半椅式;以及它们的组合,下文中全体称为“同分异构体”(或“同分异构体形式”)。

[0105] 需要注意的是,除了以下面讨论的互变异构形式,从术语“同分异构体”中特别排除,如在此使用,为结构(或构造的)同分异构体(即,同分异构体差异在于原子之间的连接,而不是仅仅由原子在空间中的位置)。

[0106] 上述排除与互变异构形式无关,例如,酮形式、烯醇形式和烯醇化物形式,例如,如在下列互变异构对中:酮/烯醇(以下所示)、亚胺/烯胺、酰胺/亚氨基醇,脘/脘,亚硝基/脞、硫酮/烯硫醇、N-亚硝基/羟基偶氮、和硝基/酸式硝基。



[0108] 需要注意的是,具有一个或多个同位素取代的化合物特别包括在术语“同分异构体”中。例如,H可为任何同位素形式,包括¹H、²H(D)、和³H(T);C可为任何同位素形式,包括¹²C、¹³C和¹⁴C;O可为任何同位素形式,包括¹⁶O和¹⁸O;等。

[0109] 除非另外规定,否则,对特定化合物的引用包括所有的这样同分异构体形式,包括其混合物(例如,外消旋混合物)。

[0110] 用于制备(例如,不对称合成)和分离(例如,分步结晶和色谱手段)这样同分异构体形式的方法已为本领域所知,或者是以已知的方式通过改变在此教导的方法或已知的方法而容易地获得的。

[0111] 盐

[0112] 制备、纯化和/或处理化合物对应的盐,例如,药学上可接受的盐,可以是方便的或令人满意的。Berge等人,1977,“Pharmaceutically Acceptable Salts,”*J.Pharm.Sci.*, Vol.66,pp.1-19中讨论了药学上可接受的盐的实例。

[0113] 例如,如果化合物为阴离子的,或具有其可以为阴离子的官能团(例如,-COOH可以为-COO⁻),那么可以合适的阳离子形成盐。合适的无机阳离子的实例包括,但不限于,碱金属离子如Na⁺和K⁺、碱土金属阳离子如Ca²⁺和Mg²⁺、以及其他阳离子如Al³⁺。合适的有机阳离子的实例包括,但不限于,铵离子(即NH₄⁺)和取代的铵离子(例如,NH₃R⁺、NH₂R₂⁺、NHR₃⁺、NR₄⁺)。一些合适的取代铵离子的实例为由以下衍生的那些:乙胺、二乙胺、二环己胺、三乙胺、丁胺、乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、哌嗪、苄胺、苯基苄胺、胆碱、葡甲胺和氨丁三醇,以及氨基酸,如赖氨酸和精氨酸。常见的季铵离子的实例为N(CH₃)₄⁺。

[0114] 如果化合物为阳离子的,或具有可为阳离子的官能团(例如,-NH₂可以为-NH₃⁺),那么可用合适的阴离子形成盐。合适的无机阴离子的实例包括,但不限于,由下列无机酸衍生的那些:盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、亚硫酸(磺酸)、硝酸、亚硝酸、磷酸和亚磷酸。

[0115] 合适的有机阴离子的实例包括,但不限于,由下列有机酸衍生的那些:2-乙酰氧基苯甲酸、乙酸、抗坏血酸、天冬氨酸、苯甲酸、樟脑磺酸、肉桂酸、柠檬酸、依地酸、乙二磺酸、乙磺酸、甲酸、富马酸、葡庚糖酸(glucelonic acid)、葡糖酸、谷氨酸、乙醇酸、羟基马来酸、羟基萘甲酸、羟乙磺酸、乳酸、乳糖酸、月桂酸、马来酸、苹果酸、甲磺酸、粘酸、油酸、草酸、棕榈酸、双羟基萘酸(帕莫酸,pamoic)、泛酸、苯乙酸、苯磺酸、丙酸、丙酮酸、水杨酸、硬脂

酸、琥珀酸、对氨基苯磺酸(sulfanilic)、酒石酸、甲苯磺酸和戊酸。合适的聚合酸有机阳离子的实例包括,但不限于,由下列聚合酸衍生的那些:单宁酸、羧甲基纤维素。

[0116] 除非另外规定,否则对特定的化合物的引用还包括其盐形式。

[0117] 水合物和溶剂化物

[0118] 制备、纯化和/或处理化合物对应的溶剂化物可以是方便的或令人满意的。在此使用的术语“溶剂化物”的常规含义是指溶质(例如,化合物、化合物的盐)和溶剂的复合物。如果溶剂为水,溶剂化物可简单地理解为水合物,例如,半水合物、单水合物、倍半水合物、二水合物、三水合物等。

[0119] 除非另外规定,否则对特定化合物的引用还包括其溶剂化物的水合物形式。

[0120] 化学受保护形式

[0121] 制备、纯化、和/或处理化学保护形式的化合物可以是方便的或令人满意的。在此以常规化学含义使用术语“化学受保护形式”,且其涉及在规定的条件下(例如,pH、温度、辐射、溶剂等)其中一个或更多个活性的官能团受到保护免于不期望的化学反应的化合物。在实践中,利用熟知的化学方法以可逆地呈现(render)惰性的官能团,其否则在规定的条件下为活性的。在化学受保护形式中,一个或更多个活性的官能团以受保护的或保护的基团的形式存在(也称为受掩蔽的或掩蔽的基团或者被阻止的或阻止的基团)。通过保护活性的官能团,可以进行包含其他不受保护的反应官能团的反应,而不会影响受保护的基团;保护基团可被去除,通常在后续步骤中,而基本上不影响余下的分子。参见,例如,《有机合成中的保护基团》(Protective Groups in Organic Synthesis,T.Greene与P.Wuts;第四版;John Wiley与Sons,2006)。

[0122] 各种各样的这样的“保护的”、“阻断的”或“掩蔽的”方法被广泛地使用且在有机合成中熟知。例如,化合物其具有两个不等价的活性的官能团,在规定条件下两个都可为活性的,在规定的条件下,可以被衍生以使一个官能团成为“受保护的”,并且因此是惰性的;这样受保护,化合物可用作实际上只有一个活性的官能团的反应物。完成所需的反应(包含其他官能团)后,受保护的基团可“去保护”以返还其原来的功能性官能度。

[0123] 例如,氨基可被保护,例如,为酰胺(-NRCO-R)或氨基甲酸酯(-NRCO-OR),例如,为:甲基酰胺(-NHCO-CH₃);苄氧基酰胺(-NHCO-OCH₂C₆H₅, -NH-Cbz);为叔丁氧基酰胺(-NHCO-OC(CH₃)₃, -NH-Boc);2-联苯基-2-丙氧基酰胺(-NHCO-OC(CH₃)₂C₆H₄C₆H₅, -NH-Bpoc),为9-芴基甲氧基酰胺(-NH-Fmoc),为6-硝基苄基氧基酰胺(-NH-Nvoc),为2-三甲基甲硅烷基乙氧基酰胺(-NH-Teoc),为2,2,2-三氯乙氧基酰胺(-NH-Troc),为烯丙基氧基酰胺(-NH-Alloc),为2-(苯基磺酰基)乙氧基酰胺(-NH-Psec);或,在合适的情况下(例如,环状胺),为氮氧自由基(>N-O●)。

[0124] 前药

[0125] 制备、纯化和/或处理前药形式的化合物可为方便或令人满意的。如在此使用的,术语“前药”,涉及当被代谢时(例如,在体内),产生所需的反应活性的化合物的化合物。典型地,前药为惰性的,或比所需的活性化合物反应活性更低,但可提供有利的处理、给予或代谢特性。

[0126] 组合物

[0127] 本发明的一个方面涉及组合物(例如,药物组合物),包含如在此描述的TFM化合

物,和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0128] 本发明的另一方面涉及制备组合物(例如,药物组合物)的方法,包括使如在此描述的TFM化合物和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂混合。

[0129] 在一个优选的实施方式中,组合物(例如,药物组合物)适合于口服给予受试者。

[0130] 在一个优选的实施方式中,组合物为口服片剂、口服颗粒剂、口服粉末剂、口服胶囊剂、口服扁囊剂或口服丸剂的形式。

[0131] 应用

[0132] 如在此描述的,TFM化合物在例如通过抑制CHK1激酶功能而改善的病症(disorder)(例如,疾病)的治疗中为有用的,如在此描述的。

[0133] 在抑制CHK1方法中的应用

[0134] 本发明的一个方面涉及在体外或体内抑制CHK1激酶功能的方法,包括使细胞与如在此描述的有效量的TFM化合物接触。

[0135] 本发明的另一方面涉及在体外或体内,在细胞中抑制CHK1激酶功能的方法,包括使细胞与如在此描述的有效量的TFM化合物接触。

[0136] 在一个实施方式中,方法进一步包含使细胞与一种或更多种选自以下的其他的药剂接触:(a) DNA拓扑异构酶I或II抑制剂;(b) DNA损伤剂;(c) 抗代谢物或胸苷酸合成酶(TS)抑制剂;(d) 微管靶向剂;(e) 电离辐射;(f) 有丝分裂调节剂或有丝分裂检测点调节剂的抑制剂;(g) DNA损伤信号转导剂的抑制剂;和(h) DNA损伤修复酶的抑制剂。

[0137] 用于测定CHK1激酶功能抑制的合适的分析在此描述和/或是本领域已知的。

[0138] 在一个实施方式中,方法在体外进行。

[0139] 在一个实施方式中,方法在体内进行。

[0140] 在一个实施方式中,以药学上可接受的组合物的形式提供TFM化合物。

[0141] 可以治疗任何类型的细胞,包括但不限于,脂肪、肺、胃肠道(包括,例如,肠、结肠)、胸部(乳房)、卵巢、前列腺、肝脏(肝)、肾脏(肾)、膀胱、胰腺、脑和皮肤。

[0142] 本领域普通技术人员能够很容易地确定候选化合物是否抑制CHK1激酶功能。例如,在此描述了合适的分析。

[0143] 在抑制细胞增殖等的方法中的应用

[0144] 在此描述的TFM化合物,例如,(a) 调节(例如,抑制)细胞增殖;(b) 抑制细胞周期进程;(c) 促进细胞凋亡;或(d) 这些中的一种或更多种的组合。

[0145] 本发明的一个方面涉及在体外或体内,调节(例如,抑制)细胞增殖(例如,细胞的增殖)、抑制细胞周期进程、促进细胞凋亡或这些中的一种或更多种的组合的方法,包括使细胞与如在此描述的有效量的TFM化合物接触。

[0146] 在一个实施方式中,方法是在体外或体内调节(例如,抑制)细胞增殖(例如,细胞的增殖)的方法,包括使细胞与如在此描述的有效量的TFM化合物接触。

[0147] 在一个实施方式中,方法进一步包含使细胞与一种或更多种选自以下的其他药剂接触:(a) DNA拓扑异构酶I或II抑制剂;(b) DNA损伤剂;(c) 抗代谢物或胸苷酸合成酶(TS)抑制剂;(d) 微管靶向剂;(e) 电离辐射;(f) 有丝分裂调节剂或有丝分裂检测点调节剂的抑制剂;(g) DNA损伤信号转导剂的抑制剂;和(h) DNA损伤修复酶的抑制剂。

[0148] 在一个实施方式中,方法在体外进行。

[0149] 在一个实施方式中,方法在体内进行。

[0150] 在一个实施方式中,以药学上可接受的组合物的形式提供TFM化合物。

[0151] 可以治疗任何类型的细胞,包括但不限于,肺、胃肠道(包括,例如,肠、结肠)、胸部(乳房)、卵巢、前列腺、肝脏(肝)、肾脏(肾)、膀胱、胰腺、脑和皮肤。

[0152] 本领域技术人员很容易能够确定候选化合物是否调节(例如,抑制)细胞增殖等。例如,在此描述了可以方便地用于评估由特定化合物提供的活性的分析。

[0153] 例如,细胞的样品(例如,来源于肿瘤)可在体外生长并且将化合物与所述的细胞接触,并观察化合物对那些细胞的影响。作为“影响”的实例,可以确定细胞的形态学状态(例如,存活或死亡,等)。其中发现化合物对细胞产生影响,在治疗携带相同细胞类型的细胞患者的方法中,这可用作化合物的效力的预测标志物或诊断标志物。

[0154] 在疗法中的应用

[0155] 本发明的另一方面涉及如在此描述的TFM化合物用于在通过疗法治疗人或动物体的方法中使用。

[0156] 本发明的另一方面涉及如在此描述的TFM化合物用于在通过疗法通过口服给予治疗人或动物体的方法中使用。

[0157] 在一个实施方式中,治疗的方法包括用(i)如在此描述的TFM化合物和(ii)一种或更多种选自以下的其他药剂治疗:(a) DNA拓扑异构酶I或II抑制剂;(b) DNA损伤剂;(c) 抗代谢物或胸苷酸合成酶(TS)抑制剂;(d) 微管靶向剂;(e) 电离辐射;(f) 有丝分裂调节剂或有丝分裂检测点调节剂的抑制剂;(g) DNA损伤信号转导剂的抑制剂;和(h) DNA损伤修复酶的抑制剂。

[0158] 本发明的另一方面涉及(a) DNA拓扑异构酶I或II抑制剂;(b) DNA损伤剂;(c) 抗代谢物或胸苷酸合成酶(TS)抑制剂;(d) 微管靶向剂;(e) 全身放射性药物;(f) 有丝分裂调节剂或有丝分裂检测点调节剂的抑制剂;(g) DNA损伤信号转导剂的抑制剂;和(h) DNA损伤修复酶的抑制剂,如在此描述的,用于在通过疗法治疗人或动物体的方法中使用,其中,治疗的方法包括用(i)如在此描述的TFM化合物和以下治疗:(a) DNA拓扑异构酶I或II抑制剂;(b) DNA损伤剂;(c) 抗代谢物或胸苷酸合成酶(TS)抑制剂;(d) 微管靶向剂;(e) 全身放射性药物;(f) 有丝分裂调节剂或有丝分裂检测点调节剂的抑制剂;(g) DNA损伤信号转导剂的抑制剂;和(h) DNA损伤修复酶的抑制剂。

[0159] 在制备药物中的应用

[0160] 本发明的另一方面涉及如在此描述的TFM化合物在制备用于在治疗中使用的药物中的应用。

[0161] 本发明的另一方面涉及如在此描述的TFM化合物在制备通过口服给予用于在治疗中使用的药物中的应用。

[0162] 在一个实施方式中,药物包含TFM化合物。

[0163] 在一个实施方式中,治疗包括用(i)含有如在此描述的TFM化合物的药物和(ii)一种或更多种选自以下的其他药剂治疗:(a) DNA拓扑异构酶I或II抑制剂;(b) DNA损伤剂;(c) 抗代谢物或胸苷酸合成酶(TS)抑制剂;(d) 微管靶向剂;(e) 电离辐射;(f) 有丝分裂调节剂或有丝分裂检测点调节剂的抑制剂;(g) DNA损伤信号转导剂的抑制剂;和(h) DNA损伤修复酶的抑制剂。

[0164] 本发明的另一方面涉及如在此描述的以下各项在制备用于在治疗中使用的药物中的应用：(a) DNA拓扑异构酶I或II抑制剂；(b) DNA损伤剂；(c) 抗代谢物或胸苷酸合成酶(TS)抑制剂；(d) 微管靶向剂；(e) 电离辐射；(f) 有丝分裂调节剂或有丝分裂检测点调节剂的抑制剂；(g) DNA损伤信号转导剂的抑制剂；和(h) DNA损伤修复酶的抑制剂，其中治疗包括用(i) 如在此描述的TFM化合物和以下治疗：(a) DNA拓扑异构酶I或II抑制剂；(b) DNA损伤剂；(c) 抗代谢物或胸苷酸合成酶(TS)抑制剂；(d) 微管靶向剂；(e) 电离辐射；(f) 有丝分裂调节剂或有丝分裂检测点调节剂的抑制剂；(g) DNA损伤信号转导剂的抑制剂；和(h) DNA损伤修复酶的抑制剂。

[0165] 治疗的方法

[0166] 本发明的另一方面涉及治疗的方法，包括将治疗有效量的如在此描述的TFM化合物、优选以药物组合物的形式给予至需要治疗的受试者。

[0167] 本发明的另一方面涉及治疗的方法，包括将治疗有效量的如在此描述的TFM化合物、优选以药物组合物的形式口服给予至需要治疗的受试者。

[0168] 在一个实施方式中，方法进一步包括将一种或更多中选自以下的其他药剂给予至受试者：(a) DNA拓扑异构酶I或II抑制剂；(b) DNA损伤剂；(c) 抗代谢物或胸苷酸合成酶(TS)抑制剂；(d) 微管靶向剂；(e) 电离辐射；(f) 有丝分裂调节剂或有丝分裂检测点调节剂的抑制剂；(g) DNA损伤信号转导剂的抑制剂；和(h) DNA损伤修复酶的抑制剂。

[0169] 治疗的病况-由CHK1介导的病况

[0170] 在一个实施方式中(例如在疗法中的应用的实施方式、在制备药物中的应用的实施方式、治疗的方法的实施方式)，治疗是由CHK1介导的疾病或病况的治疗。

[0171] 治疗的病况-通过抑制CHK1激酶功能改善的病况

[0172] 在一个实施方式中(例如，在疗法中的应用的实施方式、在制备药物中的应用的实施方式、治疗的方法的实施方式)，治疗为：通过抑制CHK1激酶功能改善的疾病或病况的治疗。

[0173] 治疗的病症-增殖性病况

[0174] 在一个实施方式中(例如疗法中的应用的实施方式、在制备药物中的应用的实施方式、治疗的方法的实施方式)，治疗为：增殖性(增生性, proliferative)病况的治疗。

[0175] 如在此使用的术语“增殖性病况”，涉及过度的或不正常的细胞的不需要的或不受控制的细胞的增殖，如肿瘤的(neoplastic)或增生的(hyperplastic)生长，这是非期望的。

[0176] 在一个实施方式中，治疗为以良性、恶性前期或恶性细胞增殖为特征的增殖性病况的治疗，包括例如：肿瘤，增生，和瘤(tumour)(例如，组织细胞瘤、神经胶质瘤、星形细胞瘤、骨瘤)、癌症(cancer)(见下文)、银屑病、骨疾病，纤维增殖性病况(例如，结缔组织的)、肺纤维化、动脉粥样硬化、血管平滑肌细胞增殖，如血管成形术后狭窄或再狭窄。

[0177] 治疗的病症-癌症

[0178] 在一个实施方式中(例如疗法中的应用的实施方式、在制备药物中的应用的实施方式、治疗的方法的实施方式)，治疗为癌症的治疗。

[0179] 在一个实施方式中，治疗为增殖性病况的治疗。

[0180] 在一个实施方式中，治疗为癌症的治疗。

[0181] 在一个实施方式中，治疗为下列的治疗：肺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胃肠

癌、胃癌、肠癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、甲状腺癌、乳癌、卵巢癌、子宫内膜癌、前列腺癌、睾丸癌、肝癌、肾癌、肾细胞癌、膀胱癌、胰腺癌、脑癌、成神经细胞瘤、神经胶质瘤、肉瘤、骨肉瘤、骨癌、鼻咽癌(例如,头癌、颈癌)、皮肤癌、鳞状细胞癌、卡波济氏肉瘤、黑色素瘤、恶性黑色素瘤、淋巴瘤或白血病。

[0182] 在一个实施方式中,治疗为下列的治疗:

[0183] 癌(carcinoma),例如下列的癌:膀胱、胸部、结肠(例如,结肠直肠癌如结肠腺癌(adenocarcinoma)和结肠腺瘤(adenoma))、肾、表皮、肝、肺(例如,腺癌、小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、食管、胆囊、卵巢、胰腺(例如,外分泌胰腺癌)、胃、宫颈、甲状腺、前列腺、皮肤(例如,鳞状细胞癌);

[0184] 淋巴系的造血肿瘤,例如白血病、急性淋巴细胞性白血病、B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、毛细胞淋巴瘤或伯克特氏(Burkett's)淋巴瘤;

[0185] 骨髓系的造血肿瘤,例如急性和慢性髓细胞性白血病、骨髓增生异常综合征或早幼粒细胞性白血病;

[0186] 间充质来源的肿瘤,例如纤维肉瘤或横纹肌肉瘤;

[0187] 中枢或外周神经系统的肿瘤,例如星形细胞瘤、成神经细胞瘤、神经胶质瘤或神经鞘瘤;

[0188] 黑色素瘤;精原细胞瘤;畸胎瘤;骨肉瘤;着色性干皮病(xenoderoma pigmentoum);角化棘皮瘤(keratocanthoma);甲状腺滤泡癌;或卡波西氏(Kaposi's)肉瘤。

[0189] 在一个实施方式中,治疗为下列的治疗:头癌;颈癌;神经系统癌症;脑癌;成神经细胞瘤;肺/纵隔癌;乳癌;食道癌;胃癌;肝癌;胆道癌;胰腺癌;小肠癌;大肠癌;结肠直肠癌;妇科癌症;泌尿生殖系统癌症;卵巢癌;甲状腺癌;肾上腺癌;皮肤癌;黑色素瘤;骨肉瘤;软组织肉瘤;小儿恶性肿瘤;霍奇金氏病;非霍奇金氏淋巴瘤;骨髓瘤;白血病;或从未知原发部位转移。

[0190] 在一个实施方式中,治疗为下列的治疗:肺癌、乳癌、卵巢癌、胰腺癌、结肠直肠癌、淋巴瘤、黑色素瘤、神经胶质瘤或成神经细胞瘤。

[0191] 在一个实施方式中,癌症以或进一步以为p53缺陷性癌症为特征。在一个实施方式中,癌症为p53缺陷性癌症。

[0192] 在一个实施方式中,癌症以或进一步以为MYC-扩增的癌症为特征。在一个实施方式中,癌症为MYC-扩增的癌症。

[0193] 在一个实施方式中,癌症以或进一步以为c-MYC-扩增的癌症为特征。在一个实施方式中,癌症为c-MYC-扩增的癌症。

[0194] 在一个实施方式中,癌症以或进一步以为MYCN-扩增的癌症为特征。在一个实施方式中,癌症为MYCN-扩增的癌症。

[0195] 在一个实施方式中,癌症以或进一步以MYC的过表达为特征。在一个实施方式中,癌症为以MYC的过表达为特征的癌症。

[0196] 在一个实施方式中,癌症以或进一步以MYCN的过表达为特征。在一个实施方式中,癌症为以MYCN的过表达为特征的癌症。

[0197] 在一个实施方式中,癌症以或进一步以c-MYC的过表达为特征。在一个实施方式

中,癌症为以c-MYC的过表达为特征的癌症。

[0198] 一个实施方式中,癌症为MYCN-扩增的成神经细胞瘤。

[0199] 在一个实施方式中,癌症为c-MYC-扩增的B细胞淋巴瘤。

[0200] 在一个实施方式中,癌症以或进一步以增加的内源性复制应激为特征。在一个实施方式中,癌症为以增加的内源性复制应激为特征的癌症。

[0201] 在一个实施方式中,癌症以或进一步以增加CHK1信号的内源性激活为特征。在一个实施方式中,癌症为以增加CHK1信号的内源性激活为特征的癌症。

[0202] 在一个实施方式中,治疗为癌症转移的治疗。

[0203] 在一个实施方式中,癌症以或进一步以癌症干细胞为特征。

[0204] 通过一种或更多机制可提高抗癌效果,包括但不限于:细胞增殖的调节、细胞周期进程的抑制、血管生成(新血管的形成)的抑制、转移(肿瘤从其原位的扩散)的抑制、细胞迁移(癌细胞扩散到身体的其他部分)的抑制、侵袭(肿瘤细胞扩散至相邻的正常结构)的抑制或细胞凋亡(程序性细胞死亡)的促进。本发明化合物可用于在此描述的癌症的治疗,而独立于在此讨论的机制。

[0205] 治疗

[0206] 如在此使用的在治疗病症的背景下使用的术语“治疗”,总体上涉及人或动物(例如,在兽医应用中)的治疗,其中实现一些所需的治疗效果,例如,病症的发展的抑制,并且“治疗”包括进展速度的降低、进展速度的停止、病症症状的减轻、病症的改善和病症的治愈。作为预防措施的治疗(即,预防)也包括在内。例如,对尚未发展该病症、但处于发展该病症的风险中的患者的使用也包括在术语“治疗”内。

[0207] 例如,治疗包括癌症的预防、降低癌症的发病率、减轻癌症的症状等。

[0208] 如在此使用的术语“治疗有效量”,涉及化合物或物质、包含化合物的组合物或剂型的量,当按照所需的治疗方案给予时,其有效产生一些期望的治疗效果,与合理的效益/风险比相称。

[0209] 组合法(Combination Therapies)

[0210] 术语“治疗”包括组合治疗和疗法,其中,例如,顺序或同时组合两种或更多种治疗或疗法。例如,在此描述的化合物也可用于组合法中,例如,与其他药剂一起。治疗和疗法的实例包括,但不限于,化疗(给予活性剂,包括,例如,药物、抗体(例如,如在免疫疗法中)、前药(例如,如在光动力疗法、GDEPT、ADEPT等中);手术;放射疗法;光动力疗法;基因治疗;和控制饮食。

[0211] 本发明的一个方面涉及如在此描述的化合物与一种或更多种(例如,1、2、3、4等)另外的治疗药剂组合,例如,通过不同的机制调节细胞生长或存活或分化的药剂或疗法,从而治疗癌症发展的数个特征。

[0212] 特定的组合将按照医生的判断,其将利用他的常见一般知识和熟练的医生熟知的给药方案选用给药。

[0213] 药剂(即,在此描述的化合物,加上一种或更多种其他药剂)可以同时或顺序给予,并且可单独改变剂量方案和经由不同的途径给予。例如,当顺序给予时,可以在紧密间隔的时间间隔(例如,越过(over)5-10分钟的时间段)或在较长的时间间隔(例如,1、2、3、4或更多小时的间隔,或当需要时甚至更长的时间段)给予药剂,精确的给药方案与一种或多种治

疗药剂的性质相称。

[0214] 药剂(即,在此描述的化合物,加上一种或更多其他药剂)可以以单独剂型配制在一起,或者可选择地,单独的药剂可各自配制并一起存在于试剂盒的形式中,可选地与它们的使用说明一起。

[0215] 用于组合疗法的另外的药剂

[0216] 如在此讨论的,在一些实施方式中,TFM化合物与一种或更多种选自以下的其他药剂组合(例如,结合)使用:(a) DNA拓扑异构酶I或II抑制剂;(b) DNA损伤剂;(c) 抗代谢物或胸苷酸合成酶(TS)抑制剂;(d) 微管靶向剂;(e) 电离辐射;(f) 有丝分裂调节剂或有丝分裂检测点调节剂的抑制剂;(g) DNA损伤信号转导剂的抑制剂;和(h) DNA损伤修复酶的抑制剂。

[0217] 当TFM化合物和一种或更多种的其他药剂都使用时,可以任何顺序使用(例如,接触、给予等)它们。而且,它们可一起(例如,接触、给予等)、作为单一制剂的部分、或分别地作为单独的制剂使用。

[0218] 例如,关于使用TFM化合物和一种或更多种其他药剂的治疗的方法,用TFM化合物的治疗(例如,给予)可以先于、同时、或可以后于用一种或更多种其他药剂的治疗,或它们的组合。

[0219] 在一个实施方式中,用TFM化合物的治疗(例如,给予)同时、或后于用一种或更多种其他药剂的治疗。

[0220] 在一个实施方式中,一种或更多种其他药剂为DNA拓扑异构酶I或II抑制剂;例如,依托泊苷、拓扑替康、喜树碱、伊立替康、SN-38、阿霉素、道诺霉素、表柔比星和米托蒽醌。

[0221] 在一个实施方式中,一种或更多种其他药剂为DNA损伤剂;例如,烷基化剂,例如,替莫唑胺、达卡巴嗪、丝裂霉素C、环磷酰胺、乐果(fosfamid)、BCNU、CCNU、美法仑、白消安和苯丁酸氮芥;铂酸盐(platinating)药剂,例如,顺铂、卡铂和奥沙利铂;或产生自由基的化合物,例如,博莱霉素。

[0222] 在一个实施方式中,一种或更多种其他药剂为抗代谢物或胸苷酸合成酶(TS)抑制剂;例如,5-氟尿嘧啶、羟基脲、吉西他滨、阿糖胞苷、氟达拉滨、卡培他滨、奈拉滨、雷替曲塞、培美曲塞和ZD9331。

[0223] 在一个实施方式中,一种或更多种其他药剂为微管靶向剂;例如,紫杉醇、多西紫杉醇、卡巴他赛、艾日布林、长春新碱、长春碱和长春瑞滨。

[0224] 在一个实施方式中,一种或更多种其他药剂为例如,通过外部波束照射递送的或通过给予全身放射性药物递送的电离辐射(例如,作为辐射疗法的一部分),例如,¹³¹I-间碘苯甲胍(Metaiodobenzylguanidine)、¹³¹I碘化钠、碘(¹³¹I)Tositumab、和(⁹⁰Y)替坦异贝莫单抗(Ibritumomab (⁹⁰Y) Tiuxetan)。

[0225] 在一个实施方式中,一种或更多种其他药剂为有丝分裂调节剂或有丝分裂检测点调节剂的抑制剂,例如,Wee1激酶的抑制剂、极光激酶的抑制剂或马球样激酶1(polo-like kinase 1)的抑制剂。

[0226] 在一个实施方式中,一种或更多种其他药剂为DNA损伤信号转导剂的抑制剂,例如,ATR激酶的抑制剂、ATM激酶的抑制剂、CHK2的抑制剂或MK2的抑制剂。

[0227] 在一个实施方式中,一种或更多种其他药剂为DNA损伤修复酶的抑制剂,例如,聚ADP核糖聚合酶(PARP)的抑制剂,例如,奥拉帕尼。

[0228] 其他应用

[0229] 在此描述的TFM化合物还可以用作细胞培养添加剂以抑制CHK1激酶功能,例如,以抑制细胞增殖,等。

[0230] 在此描述的TFM化合物还可用作体外分析的部分,例如,为了确定候选宿主是否有可能从用所讨论的化合物治疗中获益。

[0231] 在此描述的TFM化合物还可用作标准,例如,在分析中,以识别其他化合物、其他CHK1激酶功能抑制剂、其他抗增殖性药剂、其他抗癌药剂,等。

[0232] 试剂盒

[0233] 本发明的一个方面涉及试剂盒,包括(a)如在此描述的TFM化合物,或包含如在此描述的TFM化合物的组合物,例如,优选以在合适的容器中和/有合适的包装提供;和(b)使用说明,例如,如何给予化合物或组合物的书面说明。

[0234] 在一个实施方式中,试剂盒进一步包含一种或更多种选自以下的其他药剂:(a) DNA拓扑异构酶I或II抑制剂;(b) DNA损伤剂;(c) 抗代谢物或胸苷酸合成酶(TS)抑制剂;(d) 微管靶向剂;(e) 全身放射性药物;(f) 有丝分裂调节剂或有丝分裂检测点调节剂的抑制剂;(g) DNA损伤信号转导剂的抑制剂;和(h) DNA损伤修复酶的抑制剂。

[0235] 书面说明还可以包括活性成分适用治疗的适用症状列表。

[0236] 给予的途径

[0237] 可通过任何方便的给予途径给受试者给予TFM化合物或含有TFM化合物的药物组合物,不论是全身性/外周或局部地(即,在所需作用部位)。

[0238] 给予的途径包括,但不限于:口服(例如,通过摄入);含服;舌下;透皮(包括,例如,通过贴剂(patch)、膏剂(plaster)等);透粘膜(transmucosal)(包括,例如,通过贴剂、膏剂等);鼻内(例如通过鼻喷雾剂);眼部(例如,通过滴眼剂);肺部(例如,通过吸入或吹入疗法,其使用,例如,凭借气溶胶,例如,经由口腔或鼻部);直肠(例如,通过栓剂或灌肠剂);阴道(例如,通过阴道栓);肠胃外,例如,通过注射,包括皮下、皮内、肌内、静脉内、动脉内、心脏内、鞘内、脊柱内、囊内、囊下、眼眶内、腹膜内、气管内、表皮下、关节内、蛛网膜下和胸骨内;通过植入补给器(depot)或储器,例如,皮下或肌内地。

[0239] 优选地,给予的途径为口服,并且TFM化合物或包含TFM化合物的药物组合物口服地给予至受试者。

[0240] 受试者/患者

[0241] 受试者/患者可为脊索动物、脊椎动物、哺乳动物、胎盘哺乳动物、有袋动物(例如,袋鼠、袋熊)、啮齿类动物(例如,豚鼠、仓鼠、大鼠、小鼠)、鼠科动物(例如,小鼠)、兔形动物(例如,兔子)、禽类(例如,鸟)、犬科动物(例如,家犬)、猫科动物(例如,家猫)、马科动物(例如,马)、猪(例如,家猪)、羊(例如,绵羊)、牛科动物(例如,家牛)、灵长类、猿(例如,猴子或类人猿)、猴(例如,狨猴、狒狒)、类人猿(例如,大猩猩、黑猩猩、猩猩、长臂猿)或人。

[0242] 此外,受试者/患者可为其发育形式中的任一种,例如,胎儿。

[0243] 在一个优选的实施方式中,受试者/患者为人。

[0244] 制剂

[0245] 尽管可能单独给予TFM化合物,但优选以包含至少一种如在此描述的TFM化合物、连同一种或更多种本领域技术人员熟知的其他药学上可接受的成分的药物的制剂(例如,组

合物、配制物、药物)存在,所述成分包括,但不限于,药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂、佐剂、填充剂、缓冲剂、防腐剂、抗氧化剂、润滑剂、稳定剂、增溶剂、表面活性剂(例如,润湿剂)、掩蔽剂、着色剂、调味剂和甜味剂。制剂可以进一步包含其他活性药剂,例如,其他治疗药剂或预防药剂。

[0246] 因此,本发明进一步提供如上限定的药物组合物,和制备药物组合物的方法,包括使至少一种如在此描述的TFM化合物,连同一种或更多种本领域技术人员熟知的其他药学上可接受的成分例如载体、稀释剂、赋形剂等混合。如果作为分离的(discrete)单元(例如,片剂等)配制,各单元含有预定量(剂量)的化合物。

[0247] 如在此使用的术语“药学上可接受的(药用的)”,涉及化合物、成分、材料、组合物、剂型等,在合理的医药判断范围内,它们适用于与讨论的受试者(例如,人)的组织接触而没有过度的毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症,与合理的效益/风险比相称。每种载体、稀释剂、赋形剂等也必须在与制剂中的其他成分相容的意义上为“可接受的”。

[0248] 可在标准药理学文本中找到合适的载体、稀释剂、赋形剂等,例如,《Remington's Pharmaceutical Sciences》,第18版,Mack出版公司,Easton,Pa.,1990;和《Handbook of Pharmaceutical Excipients》,第5版,2005。

[0249] 可以通过药学领域熟知的任何方法制备制剂。这样的方法包括使化合物与由一种或更多辅助成分构成的载体结合的步骤。通常,通过均匀地并且紧密地将化合物和载体(例如,液态载体、细分的固体载体等)结合,并且如有必要,则随后使产品成形而制备制剂。

[0250] 可以制备制剂以提供快速或缓慢的释放;立即、延迟、定时或持续释放;或它们的组合。

[0251] 制剂可以适宜地为以下的形式:液体、溶液(例如,水性、非水性)、悬浮液(例如,水性、非水性)、乳剂(例如,水包油、油包水)、酏剂、糖浆剂、干药糖剂、漱口剂、滴剂、片剂(包括,例如,包衣片剂)、颗粒剂、粉剂、含片(losenges)、锭剂、胶囊剂(包括,例如,硬和软明胶胶囊剂)、扁囊剂、丸剂、安瓿剂、大丸剂、栓剂、阴道栓剂、酏剂、凝胶剂、糊剂、软膏剂、霜剂、洗剂、油剂、泡沫剂、喷雾剂、液体喷雾或气雾剂。

[0252] 制剂可适宜地以贴剂、粘附性膏剂、绷带、敷料等提供,其浸有一种或更多种化合物和可选地一种或多种其他药学上可接受的成分的,包括,例如,穿透、渗透和吸收增强剂。制剂还可适宜地以补给器或储器形式提供。

[0253] 化合物可以溶解于、悬浮于或混合一种或更多其他药学上可接受的成分。化合物可以脂质体或其他微粒存在,其被设计以靶向化合物,例如,到血液成分或者一种或更多种器官。

[0254] 适合口服给予(例如,通过摄取)的制剂包括:液体、溶液、(例如,水性、非水性)、悬浮液(例如,水性、非水性)、乳剂(例如,水包油、油包水)、酏剂、糖浆剂、干药糖剂、片剂、颗粒剂、粉剂、胶囊剂、扁囊剂、丸剂、安瓿剂、大丸剂。

[0255] 适合含服给予的制剂包括:漱口剂、含片、锭剂,以及贴剂、粘附性膏剂、补给器和储器。含片一般在调味基质(通常为蔗糖和阿拉伯胶或黄芪胶)中包含化合物。锭剂一般在惰性基质(如明胶和甘油,或蔗糖和阿拉伯胶)中包含化合物。漱口剂一般在合适的液态载体中包含化合物。

[0256] 适合舌下给予的制剂包括片剂、含片、锭剂、胶囊和丸剂。

[0257] 适合口腔透黏膜给予的制剂包括：液体、溶液、(例如，水性、非水性)、悬浮液(例如，水性、非水性)、乳剂(例如，水包油、油包水)、漱口剂、含片、锭剂，以及贴剂、粘附性膏剂、补给器和储器。

[0258] 适合非口腔透黏膜给予的制剂包括：液体、溶液、(例如，水性、非水性)、悬浮液(例如，水性、非水性)、乳剂(例如，水包油、油包水)、栓剂、阴道栓剂、酞剂、凝胶剂、糊剂、软膏剂、霜剂、洗剂、油剂，以及贴剂、粘附性膏剂、补给器和储器。

[0259] 适合透皮给予的制剂包括：凝胶剂、糊剂、软膏剂、霜剂、洗剂、油剂，以及贴剂、粘附性膏剂、绷带、敷料、补给器和储器

[0260] 可以通过方便的方式制作片剂，例如，压制或模制，可选地与一种或更多种辅助成分。可以通过在合适的机器中压缩自由流动形式如粉末或颗粒的化合物，可选地与一种或更多以下各项混合来制备压缩的片剂：粘合剂(例如，聚维酮、明胶、阿拉伯胶、山梨糖醇、黄芪胶、羟丙基甲基纤维素)；填充剂或稀释剂(例如，乳糖、微晶纤维素、磷酸氢钙)；润滑剂(例如，硬脂酸镁、滑石粉、二氧化硅)；崩解剂(例如，羟乙基淀粉钠、交联聚维酮、交联羧甲基纤维素钠)；表面活性剂或分散剂或润湿剂(例如，月桂基硫酸钠)；防腐剂(例如，对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、山梨酸)；矫味剂、增香剂和增甜剂。可以通过在合适的机器中模制用惰性液体稀释剂润湿的粉末状的混合物制作模制的片剂。片剂可以可选地被包覆或刻痕，并且可以被配制来提供其中使用的化合物(例如，不同的比例的羟丙基甲基纤维素的缓慢或受控释放以提供所需的释放曲线。片剂可以可选地提供有涂层，例如，以影响释放，例如肠溶包衣，以提供在肠部而不是胃释放。

[0261] 一般由化合物和石蜡或水溶性的软膏基质制备软膏。

[0262] 一般由化合物和水包油的霜基质制备霜剂。如果需要，霜基质的水溶相可包括，例如，至少约30%w/w的多元醇，即，具有两个或更多个羟基的醇，如丙二醇、丁烷-1,3-二醇、甘露醇、山梨醇、甘油和聚乙二醇及它们的混合物。局部制剂可以期望地包括通过皮肤或其他受影响区域增强化合物的吸收或渗透的化合物。这样的真皮渗透增强剂的实例包括二甲亚砜和相关类似物。

[0263] 一般由化合物和油相制备乳剂，其可以可选地仅包含乳化剂(emulsifier)(或者称为乳化剂(emulgent))，或者其可以包含至少一种乳化剂与脂肪或油或者与脂肪和油两者的混合物。优选地，亲水性乳化剂与作为稳定剂的亲油乳化剂包括在一起。还优选包括油和脂肪。一起，一种或多种乳化剂与或不与一种或多种稳定剂组成所谓的乳化蜡，并且乳化蜡与油和/或脂肪一起组成所谓的乳化软膏基质，其形成霜剂制剂的油性分散相。

[0264] 合适的乳化剂和乳液稳定剂包括吐温(Tween) 60、司盘(Span) 80、鲸蜡硬脂醇、肉豆蔻醇、单硬脂酸甘油酯和月桂基硫酸钠。由于化合物在大多可用于药物乳剂制剂的油中的溶解度可能非常低，所以用于制剂的合适的油或脂肪的选择基于实现所需的化妆品的特性。因此霜剂应优选为具有合适的稠度(consistency)以避免从管或其他容器中渗漏的非油腻、不染色和可洗的产品。可以使用直链或支链、单或双盐基(dibasic)烷基酯如二异己二酸酯、硬脂酸异鲸蜡醇酯、椰油酸的丙二醇二酯、肉豆蔻酸异丙酯、油酸癸酯、棕榈酸异丙酯、硬脂酸丁酯、棕榈酸2-乙基己基酯或称为Crodamol CAP的支链酯的共混物，后三者为优选的酯。根据要求的特性，这些可单独或组合使用。可选择地，可以使用高熔点的脂质如白软石蜡和/或液体石蜡或其他矿物油。

[0265] 其中载体为液体的适合鼻内给予的制剂,包括,例如,鼻喷雾剂、滴鼻剂,或者通过雾化器的气溶胶给予,包括化合物的水性或油性溶液。

[0266] 其中载体为固体的适合鼻内给予的制剂,包括,例如,表现为具有例如,在约20至约500微米范围内的粒径的粗糙粉末,其以其中采用鼻吸药(snuff)的方式,即,通过从持握靠近鼻子的粉末容器中经由鼻道迅速吸入的方式给予的那些。

[0267] 适合肺部给予(例如,通过吸入或吹入疗法)的制剂包括那些以从加压包中的气溶胶喷雾存在的那些,伴随着合适的推进剂如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他合适的气体的使用。

[0268] 适合眼部给予的制剂包括滴眼剂,其中化合物溶解于或悬浮于合适的载体中,特别是化合物的水性溶剂。

[0269] 适合直肠给予的制剂可以以带有合适基质的栓剂存在,基质包括,例如,天然的或硬化的油、蜡、脂肪、半液体或液体多元醇,例如,可可脂或水杨酸酯;或作为用于通过灌肠剂治疗的溶液或悬浮液。

[0270] 适合阴道给予的制剂可以以除了化合物外含有如本领域已知的合适的载体的阴道栓剂、棉塞、霜剂、凝胶剂、糊剂、泡沫剂或喷雾制剂。

[0271] 适合肠胃外给予(例如,通过注射)的制剂,包括水性或非水性的、等渗的、无热原的、无菌液体(例如,溶液、悬浮液),其中,化合物是溶解的、悬浮的或以其他方式提供(例如,在脂质体或其他微粒中)。这样的液体可以另外地含有其他药学上可接受的成分,如抗氧化剂、缓冲剂、防腐剂、稳定剂、抑菌剂、助悬剂、增稠剂和使制剂与预期接受者的血液(或其他相关体液)等渗的溶质。赋形剂的实例包括,例如,水、醇、多元醇、甘油、植物油等。用于在这样制剂中使用的合适的等渗载体的实例包括氯化钠注射液、林格氏(Ringer's)液,或乳酸林格氏注射液。一般而言,液体中化合物的浓度为从约1ng/mL至约10 μ g/mL,例如从约10ng/mL至约1 μ g/mL。制剂可存在于单剂量或多剂量密封容器例如安瓿和小瓶中,并且可以存储于冷冻干燥的(冻干的)条件下,在即将使用前仅需要加入无菌液体载体例如注射用水。可由无菌粉末、颗粒和片剂制备即用的注射溶液和悬浮液。

[0272] 剂量

[0273] 本领域技术人员将理解,TFM化合物和包含TFM化合物的组合物的适当剂量可以因患者而改变。确定最优剂量将通常涉及治疗效益水平与任何风险或有害副作用的平衡。选择的剂量水平将取决于各种因素,包括,但不限于,特定TFM化合物的活性、给予途径、给予时间、TFM化合物排泄速度、治疗的持久度、其他药物、组合中使用的化合物和/或材料、病症的严重程度,以及物种、性别、年龄、体重、条件、一般健康和患者的前药物史。TFM化合物的量和给予的途径将最终由医生、兽医或临床医师确定,尽管通常选择剂量,以在作用部位达到实现所需效果而不引起相当程度的伤害或有害副作用的局部浓度。

[0274] 贯穿治疗的过程,可以以一个剂量、连续或间歇地(例如,在合适的时间间隔分开的剂量)完成给予。本领域技术人员已熟知确定给予最有效的方式和剂量的方法,并且其随用于治疗制剂、治疗的目的、待治疗的一个或多个靶细胞和待治疗的受试者而变化。可以根据由治疗医生、兽医或临床医师选择的剂量水平和模式进行单一或多次给予。

[0275] 通常,TFM化合物合适的剂量在约10 μ g至约250mg(更典型地约100 μ g至约25mg)每千克受试者体重每天的范围。当其中化合物为盐、酯、酰胺、前药等时,给予的量基于母体

化合物计算,并且因此使用的实际重量按比例地增加。

[0276] 实例

[0277] 化学合成

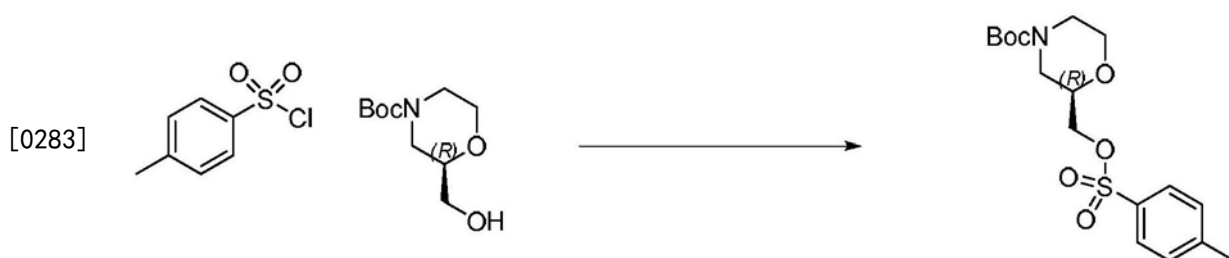
[0278] 如在此描述的,提供下列实例仅为阐述本发明且并不意在限制本发明的范围。

[0279] 合成1

[0280] 5-[[4-[[(2R) 吗啉-2-基] 甲基氨基]-5-(三氟甲基)-2-吡啶基]氨基]吡嗪-2-腈
(化合物1)

[0281] 合成1A

[0282] 2-(甲苯磺酰氧基甲基)吗啉-4-羧酸(R)-叔丁基酯((R)-tert-Butyl 2-(tosyloxymethyl)morpholine-4-carboxylate)

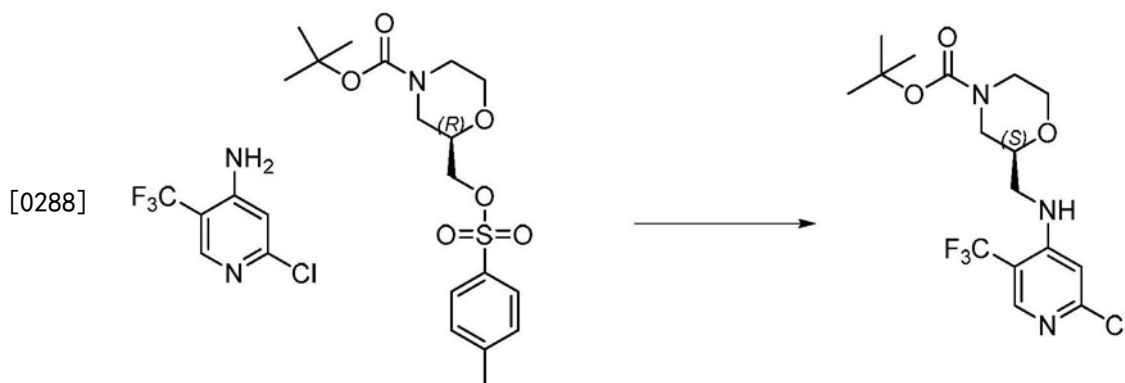


[0284] 将三乙胺((15.46mL,110mmol)加入到在二氯甲烷(50.0mL)中的2-(羟甲基)-吗啉-4-羧酸(R)-叔丁基酯((R)-tert-butyl 2-(hydroxymethyl)-morpholine-4-carboxylate)(21.73g,100mmol)中以得到无色溶液,其用冰浴冷却。在保持低于3°C的内部温度下,将4-甲苯磺酰氯(20.02g,105mmol)分小部分地加入。在真空浓缩前,浆料在室温下搅拌21小时。将粗物质溶解于乙酸乙酯(750mL),用水(450mL)、盐水(200mL)洗涤并用硫酸镁干燥。过滤和在真空中去除挥发物后,加入己烷(150mL)并将得到的白色沉淀过滤、用己烷(300mL)洗涤、并干燥以得到标题化合物,为白色粉末(35.66g,96%)。

[0285] $^1\text{H NMR}$ (500MHz, CDCl_3) δ 1.46 (9H, s), 2.46 (3H, s), 2.62-2.73 (1H, m), 2.85-2.94 (1H, m), 3.44-3.49 (1H, m), 3.58-3.63 (1H, m), 3.77-3.94 (3H, m), 3.99-4.06 (2H, m), 7.36 (2H, d, $J=8.5\text{Hz}$), 7.80 (2H, d, $J=8.5\text{Hz}$). LC-MS (Agilent 4min) R_t 2.90min; m/z (ESI) 372 $[\text{M}+\text{H}^+]$ 。

[0286] 合成1B

[0287] 2-((2-氯-5(三氟甲基)吡啶-4-基氨基)甲基)吗啉-4-羧酸(S)-叔丁基酯((S)-tert-Butyl 2-((2-chloro-5-(trifluoromethyl)pyridin-4-ylamino)methyl)morpholine-4-carboxylate)

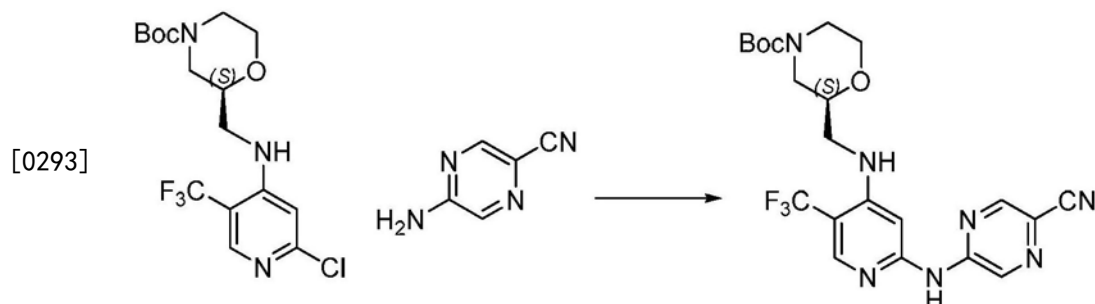


[0289] 在室温下向2-氯-5-(三氟甲基)吡啶-4-胺(2.9g, 14.75mmol)在二甲基甲酰胺(95mL)中的溶液中分批加入氢化钠(在油中60wt%; 1.180g, 29.5mmol), 并且在80℃搅拌混合物10分钟。分批加入2-(甲苯磺酰氧基甲基)吗啉-4-羧酸(R)-叔丁基酯并且在80℃搅拌反应混合物2.5小时。将反应混合物冷却并倒入饱和碳酸氢钠水溶液(100mL), 用水(250mL)稀释并用乙酸乙酯(100mL)萃取。分成两层后, 进一步用乙酸乙酯(2x100mL)萃取水层。合并的有机层用盐水(4x 100mL)洗涤、硫酸镁干燥、过滤、浓缩并在真空下完全地干燥。用柱色谱法纯化粗物质, 首先用在二氯甲烷中的2.5%乙醚/2.5%乙酸乙酯洗脱, 然后用二氯甲烷中的20%乙醚洗脱, 同时所需产物从柱中洗脱出来。合并并浓缩适当的级分以得到标题化合物, 为灰白色粉末(4.51g, 77%)。

[0290] ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ 1.49 (9H, s), 2.70-2.84 (1H, m), 2.92-3.05 (1H, m), 3.18-3.23 (1H, m), 3.33-3.37 (1H, m), 3.55-3.61 (1H, m), 3.66-3.71 (1H, m), 3.80-4.07 (3H, m), 5.32 (1H, 宽s), 6.61 (1H, s), 8.24 (1H, s). LC-MS (Agilent 4min) R_t 3.04min; m/z (ESI) 396 $[\text{MH}^+]$ 。

[0291] 合成1C

[0292] 2-((2-(5-氰基吡嗪-2-基氨基)-5-(三氟甲基)吡啶-4-基氨基)甲基)吗啉-4-羧酸(S)-叔丁基酯((S)-tert-Butyl 2-((2-(5-cyanopyrazin-2-ylamino)-5-(trifluoromethyl)pyridin-4-ylamino)methyl)morpholine-4-carboxylate)



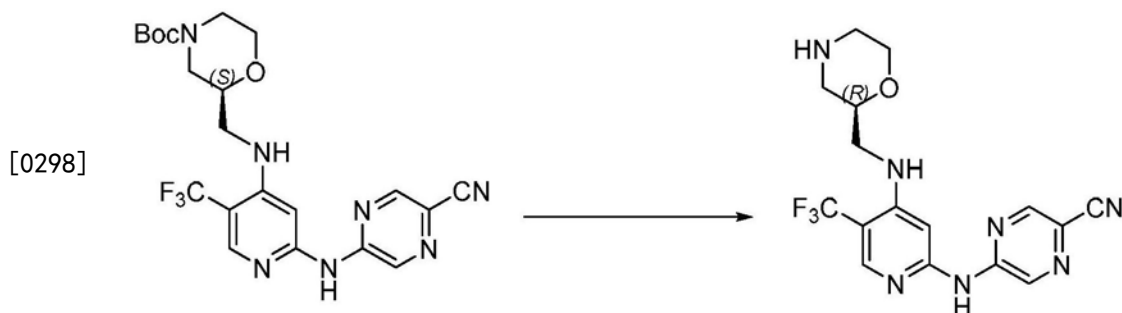
[0294] 2-((2-氯-5-(三氟甲基)吡啶-4-基氨基)甲基)吗啉-4-羧酸(S)-叔丁基酯(4.67g, 11.8mmol), 2-氨基-5-氰基吡嗪(1.98g, 16.5mmol), 三(二亚苄基丙酮)二钯(0) (tris(dibenzylideneacetone)dipalladium(0)) (0.86g, 0.94mmol), 外消旋-2,2'-双(二苯基膦)-1,1'-联萘(0.54g, 0.87mmol)和碳酸铯(7.69g, 23.6mmol), 在氩气下悬浮于无水二噁烷(108mL)中。氩气鼓泡通过混合物30分钟, 之后悬浮液加热至100℃持续29小时。冷却反应混合物并用二氯甲烷稀释, 然后吸收到硅胶上。将预吸收的硅胶加入到用在己烷中的20%乙酸乙酯平衡过的340g KP-Si1 SNAP柱中。柱色谱法, 用在己烷中的20-35%乙酸乙酯梯度洗脱, 得到部分纯化的物质, 为橙色胶状物。进一步用柱色谱法纯化, 用在二氯甲烷中的20%乙酸乙酯洗脱, 以得到标题化合物, 为淡褐色粉末(3.28g, 58%)。

[0295] ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ 1.49 (9H, s), 2.73-2.86 (1H, m), 2.94-3.07 (1H, m), 3.26-3.31 (1H, m), 3.38-3.43 (1H, m), 3.57-3.61 (1H, m), 3.70-3.75 (1H, m), 3.83-4.08 (3H, m), 5.31 (1H, 宽s), 7.12 (1H, s), 8.13 (1H, s), 8.23 (1H, s), 8.57 (1H, s), 8.87 (1H, s). LC-MS (Agilent 4min) R_t 2.90min; m/z (ESI) 480 $[\text{MH}^+]$ 。

[0296] 合成1D

[0297] 5-[[4-[[(2R)-吗啉-2-基]甲基氨基]-5-(三氟甲基)-2-吡啶基]氨基]吡嗪-2-腈

(化合物1)



[0299] 二氯甲烷(8mL)中的2-((2-(5-氰基吡啶-2-基氨基)-5-(三氟甲基)吡啶-4-基氨基)甲基)吗啉-4-羧酸(S)-叔丁基酯(1.09g,2.273mmol)溶液在室温下超过10分钟逐滴地加入到在干燥的二氯甲烷(227mL)中的三氟乙酸(52.7mL,709mmol)和三异丙基硅烷(2.61mL,12.73mmol)的溶液中。搅拌30分钟后,在真空中浓缩混合物。浓缩物重悬浮于二氯甲烷(200mL)中并在真空中浓缩,然后重悬浮于甲苯(100mL)中并浓缩。

[0300] 上述程序一式三份进行,每次以1.09g 2-((2-(5-氰基吡啶-2-基氨基)-5-(三氟甲基)吡啶-4-基氨基)甲基)吗啉-4-羧酸(S)-叔丁基酯开始)并且合并这样产生的三部分粗产物用于通过离子交换色谱法、在2x 20g Biotage NH2Isolute柱上、用甲醇洗脱纯化。将洗脱液浓缩,并加入在乙醚(25mL)中的10%甲醇。将得到的固体过滤、用乙醚(30mL)洗涤,并在真空中干燥,以得到标题化合物,为浅稻草色粉末(2.30g,89%)。

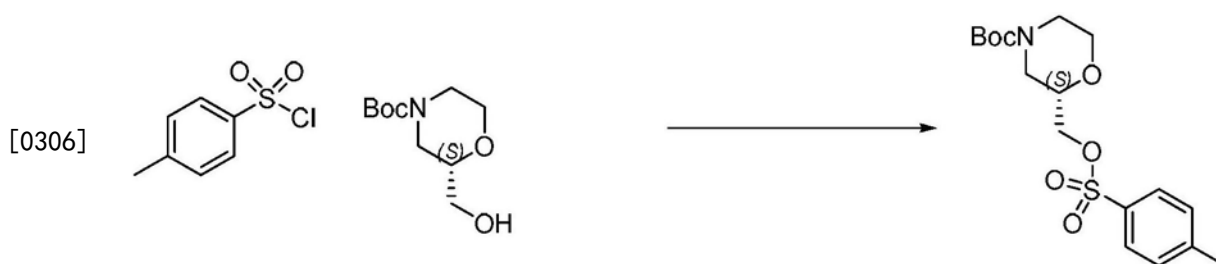
[0301] ^1H NMR(500MHz, CD_3OD) δ 2.62(1H, $J=12, 10\text{Hz}$), 2.78-2.84(2H, m), 2.95(1H, dd, $J=12, 2\text{Hz}$), 3.27-3.38(2H, m), 3.63(1H, ddd, $J=14, 9.5, 3\text{Hz}$), 3.73-3.78(1H, m), 3.91(1H, ddd, $J=11, 4, 2\text{Hz}$), 7.26(1H, s), 8.18(1H, s), 8.63(1H, s), 9.01(1H, s). LC-MS(Agilent 4min) R_t 1.22min; m/z (ESI) 380 $[\text{M}+\text{H}^+]$. 旋光度 $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +7.0$ (c 1.0, DMF)。

[0302] 合成2

[0303] 5-[[4-[[(2S)-吗啉-2-基]甲基氨基]-5-(三氟甲基)-2-吡啶基]氨基]吡啶-2-腈(化合物2)

[0304] 合成2A

[0305] 2-(甲苯磺酰氧基甲基)吗啉-4-羧酸(S)-叔丁基酯

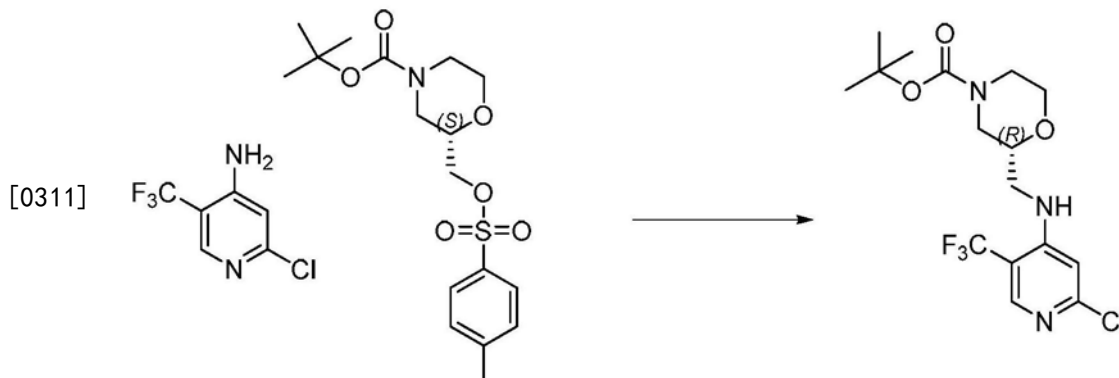


[0307] 将三乙胺(6.05mL,43.0mmol)加入在二氯甲烷(19.56mL)中的2-(羟甲基)-吗啉-4-羧酸(S)-叔丁基酯(8.5g,39.1mmol)中,以得到无色溶液。在0℃下4-甲苯磺酰氯(7.83g,41.1mmol)分成小份地加入。反应在室温下搅拌18小时,之后在减压下蒸发浓缩。浓缩物溶解于乙酸乙酯(300mL),并且得到的溶液用水(150mL)、盐水(150mL)洗涤、硫酸镁干燥、过滤并在减压下蒸发浓缩。向浓缩物中加入己烷,并且在真空下除去挥发物,以得到标题化合物,为白色粉末(14.46g,99%)。

[0308] ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ 1.46 (9H, s), 2.46 (3H, s), 2.61-2.75 (1H, m), 2.85-2.94 (1H, m), 3.43-3.49 (1H, m), 3.58-3.63 (1H, m), 3.76-3.93 (3H, m), 3.99-4.06 (2H, m), 7.35 (2H, d, $J=8.5\text{Hz}$), 7.80 (2H, d, $J=8.5\text{Hz}$). LC-MS (Agilent 4min) R_t 2.94min; m/z (ESI) 394 $[\text{M}+\text{Na}^+]$.

[0309] 合成2B

[0310] 2-((2-氯-5(三氟甲基)吡啶-4-基氨基)甲基)吗啉-4-羧酸(R)-叔丁基酯

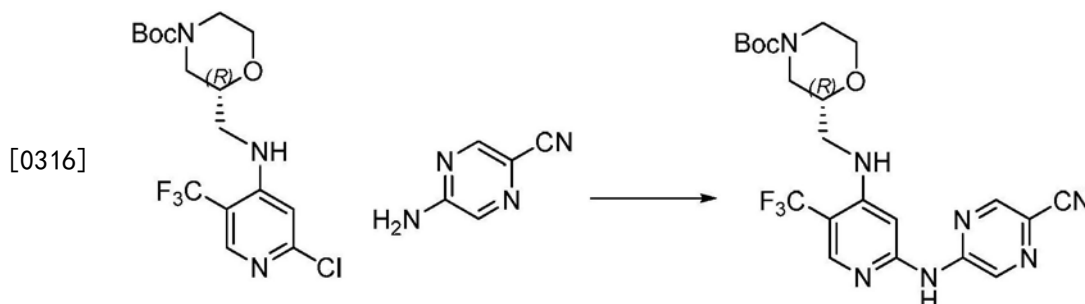


[0312] 在室温下向在二甲基甲酰胺 (32.6mL) 中的 2-氯-5(三氟甲基)吡啶-4-胺 (1g, 5.09mmol) 溶液中分批加入氢化钠 (在油中 60wt%; 0.407g, 10.18mmol), 随后在 80°C 搅拌 10 分钟。然后分批加入 2-(甲苯磺酰氧基甲基)吗啉-4-羧酸(S)-叔丁基酯 (2.268g, 6.11mmol), 且反应混合物在 80°C 搅拌 2.5 小时。冷却后, 混合物分段于饱和碳酸氢钠水溶液 (30mL)、水 (100mL) 和乙酸乙酯 (30mL)。分离有机层, 且水层进一步用乙酸乙酯 (2x 30mL) 萃取。合并的有机层用盐水 (2x 70mL) 洗涤、硫酸镁干燥、过滤、浓缩并在真空下完全地干燥。粗物质在 90g Thomson SingleStep 柱上用柱色谱法纯化, 以在二氯甲烷中的 2.5% 乙醚/2.5% 乙酸乙酯的等度 (isocratic) 混合物洗脱, 以得到标题化合物, 为清澈的胶状物, 重结晶后, 以得到白色粉末 (1.47g, 73%)。

[0313] ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ 1.48 (9H, s), 2.71-2.83 (1H, m), 2.92-3.05 (1H, m), 3.18-3.23 (1H, m), 3.33-3.37 (1H, m), 3.56-3.61 (1H, m), 3.66-3.71 (1H, m), 3.80-4.07 (3H, m), 5.32 (1H, 宽s), 6.61 (1H, s), 8.24 (1H, s). LC-MS (Agilent 4min) R_t 3.04min; m/z (ESI) 396 $[\text{MH}^+]$.

[0314] 合成2C

[0315] 2-((2-(5-氰基吡嗪-2-基氨基)-5-(三氟甲基)吡啶-4-基氨基)甲基)吗啉-4-羧酸(R)-叔丁基酯



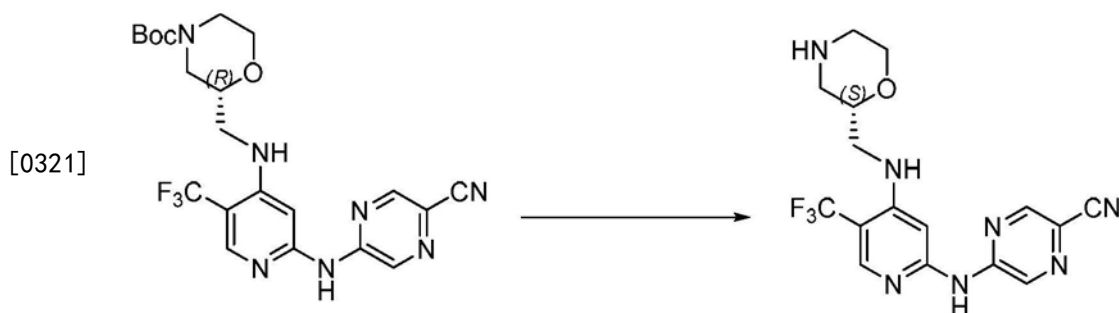
[0317] 2-((2-氯-5(三氟甲基)吡啶-4-基氨基)甲基)吗啉-4-羧酸(R)-叔丁基酯 (1.44g, 3.64mmol), 2-氨基-5-氰基吡嗪 (0.612g, 5.09mmol, 1.4eq.), 三(二亚苄基丙酮)二钯 (0)

(0.267g, 0.291mmol, 0.08eq.), 外消旋-2, 2'-双(二苯基膦)-1, 1'-联萘(0.362g, 0.582mmol, 0.16eq.) 和碳酸铯(2.37g, 7.28mmol) 在氩气下悬浮于无水二噁烷(33mL) 中。氩气鼓泡通过混合物30分钟, 之后悬浮液加热至100℃持续22小时。冷却反应混合物并用二氯甲烷稀释, 然后吸收到硅胶上。预吸收的硅胶加入到用在己烷中的20-50%乙酸乙酯洗脱的100g KP-Si1 SNAP柱中, 以得到部分纯化产物, 为橙色胶状物。粗产物溶解于二氯甲烷并通过柱色谱法、在90g SingleStep Thomson柱上、用在二氯甲烷中的20%乙酸乙酯洗脱纯化, 以得到标题化合物(1.19g, 68%)。

[0318] ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ 1.50 (9H, s), 2.71-2.88 (1H, m), 2.93-3.08 (1H, m), 3.27-3.32 (1H, m), 3.40-3.44 (1H, m), 3.55-3.64 (1H, m), 3.71-3.77 (1H, m), 3.82-4.11 (3H, m), 5.33 (1H, 宽s), 7.19 (1H, s), 8.23 (1H, s), 8.58 (1H, s), 8.84 (1H, s). LC-MS (Agilent 4min) R_t 2.93min; m/z (ESI) 480 [MH^+].

[0319] 合成2D

[0320] 5-[[4-[[(2S)-吗啉-2-基] 甲基氨基]-5-(三氟甲基)-2-吡啶基] 氨基] 吡嗪-2-腈 (化合物2)



[0322] 二氯甲烷(8mL) 中的2-((2-(5-氰基吡嗪-2-基氨基)-5-(三氟甲基)吡啶-4-基氨基) 甲基) 吗啉-4-羧酸(R)-叔丁基酯(1.19g, 2.48mmol) 溶液在室温下超过10分钟逐滴地加入到在干燥的二氯甲烷(248mL) 中的三氟乙酸(57.5mL, 774mmol) 和三异丙基硅烷(2.85mL, 13.90mmol) 溶液中。搅拌30分钟后, 在真空中浓缩混合物。浓缩物重悬浮于二氯甲烷(200mL) 中并在真空中浓缩, 然后重悬浮于甲苯(100mL) 中并在真空中浓缩。粗物质通过离子交换色谱法、在20g Biotage NH2Isolute柱上、用甲醇洗脱纯化。将洗脱液浓缩, 并加入在乙醚(8mL) 中的10%甲醇。将固体过滤、用乙醚(20mL) 洗涤, 并在真空中干燥, 以得到标题化合物, 为浅稻草色粉末(0.604g, 64%产率)。

[0323] ^1H NMR (500MHz, CD_3OD) δ 2.62 (1H, $J=12, 10\text{Hz}$), 2.78-2.84 (2H, m), 2.95 (1H, dd, $J=12, 2\text{Hz}$), 3.27-3.38 (2H, m), 3.63 (1H, ddd, $J=14, 9.5, 3\text{Hz}$), 3.73-3.78 (1H, m), 3.91 (1H, ddd, $J=11, 4, 2\text{Hz}$), 7.26 (1H, s), 8.18 (1H, s), 8.63 (1H, s), 9.01 (1H, s). LC-MS (Agilent 4min) R_t 1.26min; m/z (ESI) 380 [$\text{M}+\text{H}^+$]. 旋光度 $[\alpha]_D^{24} = -6.9$ (c 1.0, DMF)。

[0324] 生物学方法

[0325] 分析1: 在Caliper分析形式中测定抑制剂药效与CHK1

[0326] 在微流体分析中测定CHK1激酶活性, 该分析监控磷酸化产物与其底物的分离。该分析在EZ Reader II (Caliper Life Sciences有限公司, Runcorn, 英国) 上运行, 其采用含有CR-8 (500nM, #760278, Caliper LS) 的分离缓冲液(#760367Caliper LS)。使用ECHO® 550 (Labcyte公司™) 声学分配器以直接在384聚丙烯分析板(Greiner Bio-One,

Gloucestershire,英国)里产生重复的8pt稀释曲线。对每个试验化合物,采用在100%DMSO中的50 μ M储备液(stock)浓度。每孔分配的DMSO总量为250nL,以得到2.5%DMSO的最终分析浓度和在0.5-1000nM范围内的测试化合物浓度。将均稀释在激酶缓冲液(HEPES 50mM, Na₃PO₄ 30.02%, BSA 0.01%, 原钒酸钠0.1mM, DTT 1mM, MgCl₂ 2mM, Tween 20 0.1%)中的以下物质加入到该分析板上:6 μ L CHK1 (2nM最终浓度,内部(in-house)蛋白质制备), 2 μ L肽10 (5-FAM-KKKVSRSGLYRSPSPENLNRP-COOH, 1.5 μ M最终浓度, #760354 Caliper LS) 和2 μ L ATP (90 μ M最终浓度)。在室温下温育一个小时前,密封并离心测试板(1分钟,1000rpm)。通过加入分离缓冲液(90 μ L)停止反应。在EZ Reader II上读取该测试板,采用带有1.5psi和1750 Δ V的仪器设置的12-吸管芯片(760137-0372R, Caliper LS)。自动产生从底物的产物的百分浓度且相对于空白孔(不含酶和2.5%DMSO)和总孔(含全部试剂和2.5%DMSO)计算百分抑制。在GraphPad Prism5中采用对数(抑制剂浓度)对关于可变斜率公式的响应的非线性回归拟合计算CHK1 IC₅₀值。

[0327] 分析2:在有丝分裂抑制分析(MIA)中的细胞的药效

[0328] 通过CHK1激酶功能抑制剂与基因毒性剂结合评估检测点去除,其采用基于钬的ELISA分析,该分析被设计用以量化用基因毒性剂治疗(以诱发G2停滞)后,随后CHK1抑制剂测试化合物与诺考达唑组合以去除该停滞,截留在有丝分裂中的细胞数量。以每孔10⁴细胞以160 μ L的体积将HT29细胞接种于96-孔板并使其附着36小时。依托泊苷(在DMSO中的10mM储备液)在培养基中稀释至250 μ M,然后取40 μ L加入到适当的孔中,以得到50 μ M的最终浓度并温育1小时。该治疗之前已进行最优化以诱导在治疗后16小时80%细胞的G2停滞。在基因毒性药物暴露后,去除培养基,并用新培养基替换(160 μ L)。细胞未处理(未处理对照组或依托泊苷单独预处理),依托泊苷预处理后暴露于诺考达唑或仅诺考达唑(100ng/mL最终浓度),或者暴露于与诺考达唑(100ng/mL最终浓度)组合的升高浓度的测试化合物(从0.01nM至200 μ M最终浓度)。每个浓度采用一式四份孔,CHK1抑制剂测试化合物加入在40 μ L等分试样中。21小时暴露后,除去培养基,并且将细胞在4%甲醛的磷酸盐缓冲盐水中(PBS, pH 7.4,预冷却至4 $^{\circ}$ C)在4 $^{\circ}$ C固定30分钟,随后在环境温度下,100%甲醇(预冷却至-20 $^{\circ}$ C)固定10分钟。孔用PBS洗涤并用在三元缓冲盐水(TBS, pH 7.4)中的5%干奶粉(Marvel)在37 $^{\circ}$ C下封闭30分钟。每孔用含有0.1% Tween 20的水洗涤三遍。将初级抗体(MPM-2, Upstate cat# 05-368, TBS中的5%奶粉中的1 μ g/mL)加入到每孔,并在4 $^{\circ}$ C下震荡温育过夜。除去初级抗体,且孔用含0.1% Tween 20的水洗涤。将二级抗体(钬标记的抗小鼠, Perkin-Elmer cat# AD0124, 在分析缓冲液Perkin-Elmer cat#1244-111中, 333ng/mL)加入到每孔,并在37 $^{\circ}$ C下温育1小时。每孔用含0.1% Tween 20的水洗涤,并用增强溶液(Perkin-Elmer cat#1244-105)处理。在Wallac, Victor2计数器(Perkin-Elmer, Bucks UK)上计数钬发射。适当的对照组包括在内,且结果表达为允许50%的细胞进入有丝分裂需要的CHK1抑制剂测试化合物的浓度(MIA IC₅₀)。

[0329] 分析3:CHK1依赖的细胞周期检测点去除对细胞毒性在细胞中选择性的评估

[0330] 采用96小时磺基罗丹明B分析(SRB, Sigma目录号S9012)评估化合物细胞毒性。以1.6至3.2x 10³细胞每孔以160 μ L培养基的体积将HT29或SW620细胞接种于96孔板中,并在处理前允许附着36小时。对于CHK1抑制剂(DMSO中的10mM储备液)的细胞毒性分析,化合物从250 μ M的起始浓度连续地稀释在培养基中,然后将40 μ L加入到适当的孔中,一式四份,以

得到50至0.1 μ M的最终浓度范围(10个浓度)。对于基因毒性药剂,化合物(SN38,LKT实验室目录号C0154和吉西他滨,Lilly“Gemzar”,在DMSO中的10mM储备液)从2 μ M的起始浓度连续地稀释在培养基中,并且40 μ L加入到适当的孔中,一式四份,以得到200至0.39 μ M的最终浓度(10个浓度)。在加湿的5%CO₂环境中,细胞在37 $^{\circ}$ C下温育96小时(四倍),然后固定,并用SRB染色。适当的对照组包括在内且结果表达为相对于未处理的对照组抑制细胞生长50%需要的测试化合物的浓度(SRB IC₅₀)。

[0331] 活性指数(AI),影响CHK1依赖的细胞周期检测点去除对细胞毒性的CHK1抑制剂测试化合物的选择性的测量结果是从CHK1抑制剂毒性IC₅₀对MIA IC₅₀的比值计算(即,AI=CHK1抑制剂SRB IC₅₀/MIA IC₅₀)的,都在HT29细胞中测量。

[0332] 分析4:在HT29或SW620结肠癌细胞与SN38或吉西他滨组合中细胞的效力

[0333] 采用96小时磺基罗丹明B分析法(SRB,Sigma cat#S9012)评估CHK1抑制剂化合物增强SN38(拓扑异构酶I抑制剂伊立替康的活性代谢物)和吉西他滨(抗代谢物)细胞毒性的能力。HT29或SW620细胞以1.6至3.2 $\times 10^3$ 细胞每孔接种于在160 μ L体积的培养基中的96孔板中,并在处理前允许附着36小时。增强分析涉及将在20 μ L体积的培养基中的吉西他滨或SN38(采用上述分析3中的方法确定的)的固定的SRB IC₅₀浓度添加到每孔(10 \times 最终浓度),一式四份,和混合1分钟。CHK1抑制剂测试化合物(10mM储备液)从50 μ M的起始浓度连续稀释在培养基中,并且取20 μ L加入到每孔,一式四份,以得到5至0.39 μ M的范围(8个浓度)的最终浓度,并在固定和SRB染色之前,在37 $^{\circ}$ C的加湿处理环境中在37 $^{\circ}$ C温育96小时(四倍)之前,混合1分钟。未处理的和仅基因毒性处理对照组包括在内,且结果表达为抑制细胞生长50%需要的CHK1抑制剂的浓度(增强IC₅₀)。

[0334] 增强指数(PI)计算为CHK1抑制剂增强SN38或吉西他滨细胞毒性的能力的测定结果,并且限定为仅CHK1抑制剂的细胞毒性IC₅₀与结合了基因毒性的CHK1抑制剂的增强IC₅₀的比值(即,PI=CHK1抑制剂SRB IC₅₀/增强IC₅₀)。

[0335] 分析5:小鼠中的口服生物利用度和药代动力学

[0336] 按照动物(科学程序)法案1986下的内政部法规(the Home Office regulations under the Animals(Scientific Procedures)Act 1986),并根据用于动物实验的UKCCCR准则进行所有的工作。

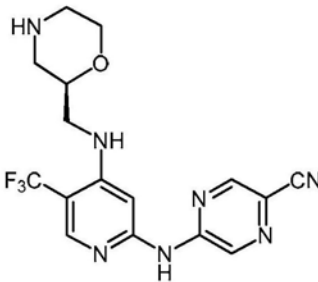
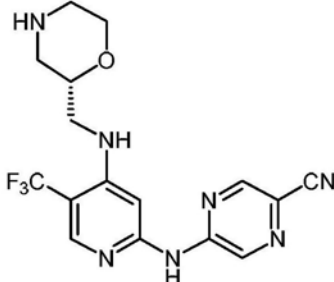
[0337] CHK1抑制剂化合物配制于10%DMSO、1%Tween 20和89%无菌生理盐水中。雌性BALB/c小鼠(Charles River UK Ltd,Margate,英国)静脉内(iv)和口服(po)给予10mg/kg的CHK1抑制剂化合物。对照组动物仅接受赋形剂(媒介物,vehicle)。每个时间点注射3只小鼠的组。在给药后5、15和30分钟以及1、2、4、6和24小时,用肝素化注射器通过心脏刺穿从麻醉状态下(氟烷/氧气混合)的小鼠收集血液。离心(9000 $\times g$,2分钟,4 $^{\circ}$ C)后,血浆在干冰上冷冻并贮存在-80 $^{\circ}$ C下。切下组织,迅速冷冻于液氮中,并贮存在-80 $^{\circ}$ C下。解冻后的血浆样品用3倍体积的含有内标甲醇通过蛋白沉淀萃取。通过扣除空白血浆基质与CHK1抑制剂化合物并按每测试样品提取制备校准标准(血浆中2至10000nM)和QC。离心后,转移上清液用于分析。在耦合到Agilent 6410三重四极质谱的Agilent 1200或1290LC上通过LC-MS-MS分析提取的血浆样品用于CHK1抑制剂化合物和内标物的定量。化合物在维持在55 $^{\circ}$ C的Phenomenex Kinetex C18分析柱(50 \times 2.1mm,2.6 μ m)上分离。采用7分钟梯度分离分析物。采用在阳离子模式下电喷雾电离,且化合物通过MRM检测,MRM带有适当的过渡监控的(例如

对化合物为380.2至320.3),与碰撞电压154V和碰撞能量20V。

[0338] 用Pharsight WinNonlin软件(版本5.2.1)进行非房室药代动力学分析(模式200和201)。

[0339] 生物学数据

[0340] 采用上述描述的分析获得的化合物1和化合物2的数据,概括于下列的表中。

表 2		
化合物	化合物 1	化合物 2
结构		
分析 1: CHK1 IC ₅₀ (nM)	1.4 (± 0.3, n = 3)	2.1 (± 0.5)
分析 2: CHK1 细胞药效 MIA IC ₅₀ (nM)	30 (± 12, n = 6)	18 (± 7.5, n = 3)
[0341] 分析 3: 细胞选择性(活性指 数; 倍)	26.4 (± 8.6, n = 6)	150 (± 85, n = 3)
分析 4: 在 HT29 细胞中的细 胞效力+ SN38 (增强指数; 倍)	1.8 (± 0.3, n = 3)	-
分析 4: 在 SW620 细胞中的 细胞效力+吉西他滨 (增强指数; 倍)	16.9 (± 3.4, n = 7)	8.1 (± 3.6, n = 3)
分析 5: 小鼠中口服生物利 用度 (%)	105	-

[0342] 化合物1和2的CHK1IC₅₀数据(通过上述分析1获得)与在Collins等人,2009a中示出的16种类似的化合物获得的对应的数据(采用如Collins等人,2009a中描述的DELFI分析获得)的比较提供于下表。

#	化合物	CHK1 IC ₅₀ (nM)
	化合物 1	1.4
	化合物 2	2.1
1	Y-154	1
2	Y-081	2
3	Y-152	2
4	Y-158	2
5	Y-147	4
6	Y-153	4
7	Y-155	5
8	Y-149	10
9	Y-156	10
10	Y-146	11
11	Y-148	13
12	Y-157	15
13	Y-150	17
14	Y-102	20
15	Y-159	23
16	Y-151	24

[0343]

[0344] 对化合物1和2的CHK1细胞药效MIA数据(通过上述分析2获得)与在Collins等人,2009a中示出的16种类似的化合物获得的对应的数据的比较提供于下表。

[0345]

#	化合物	CHK1 细胞药效 MIA IC ₅₀ (nM)	(更优倍数) 化合物 1	(更优倍数) 化合物 2
	化合物 1	30	-	-
	化合物 2	18	-	-
1	Y-154	90	~ 3	~ 5
2	Y-155	120	~ 4	~ 7
3	Y-153	180	~ 6	~ 10
4	Y-158	280	~ 9	~ 15
5	Y-081	310	~ 10	~ 17
6	Y-150	390	~ 13	~ 22
7	Y-152	400	~ 13	~ 22
8	Y-156	560	~ 19	~ 31
9	Y-157	600	~ 20	~ 33
10	Y-159	700	~ 23	~ 39
11	Y-151	800	~ 27	~ 44
12	Y-102	800	~ 27	~ 44
13	Y-147	900	~ 30	~ 50
14	Y-148	900	~ 30	~ 50
15	Y-149	1100	~ 34	~ 61
16	Y-146	1500	~ 50	~ 83

[0346] 很清楚,化合物1和2具有突出的CHK1细胞药效(MIA分析)。对于抑制CHK1的高的细胞药效对于CHK1抑制剂的开发至关重要。对于CHK1介导的效果,化合物1和2比所有的16种化合物具有相当更高的细胞药效,并且分别比其次最有效的化合物(Y-154)更有效约为3倍和5倍。

[0347] 对化合物1和2的细胞选择性数据(通过上述分析3获得)与在Collins等人,2009a中示出的16种类似的化合物获得的对应数据的比较提供于下表。

表 5

#	化合物	细胞选择性(倍)	(更优倍数) 化合物 1	(更优倍数) 化合物 2
	化合物 1	26	-	-
	化合物 2	150	-	-
1	Y-155	11	~ 2.4	~ 13
2	Y-150	10	~ 2.6	~ 15
3	Y-159	9.9	~ 2.6	~ 15
4	Y-153	9.2	~ 2.8	~ 16
5	Y-154	9.0	~ 2.9	~ 17
6	Y-157	6.3	~ 4.1	~ 24
7	Y-151	6.0	~ 4.3	~ 25
8	Y-156	5.4	~ 4.8	~ 28
9	Y-102	4.6	~ 5.6	~ 33
10	Y-146	4.5	~ 5.8	~ 33
11	Y-148	4.4	~ 5.9	~ 34
12	Y-147	4.3	~ 6.0	~ 35
13	Y-158	4.3	~ 6.0	~ 35
14	Y-149	3.5	~ 7.4	~ 43
15	Y-152	3.5	~ 7.4	~ 43
16	Y-081	3.5	~ 7.4	~ 43

[0348]

[0349] 很清楚,化合物1和2具有突出的细胞选择性,测定为在生长抑制分析中CHK1细胞药效(MIA分析)与非特异性的细胞毒性的之间的比率。与非特异性的细胞毒性相对,对于CHK1介导的效果的细胞的选择性对于CHK1抑制剂的开发是重要的,以使治疗窗口最大化。化合物1和2分别约为26倍选择性的和150倍选择性的,而其次最具选择性的化合物仅约为11倍选择性的(Y-155)。

[0350] 对化合物1和2的细胞效力数据(通过上述分析4获得)与在Collins等人,2009a中示出的16种类似的化合物获得的对应数据的比较提供于下表。

[0351]

#	化合物	细胞效力 + SN38 HT29 (倍)
	化合物 1	1.8
	化合物 2	n/a
1	Y-157	2
2	Y-150	2
3	Y-156	1.6
4	Y-151	1.5
5	Y-159	1.3
6	Y-081	1.2
7	Y-153	1
8	Y-155	0.9
9	Y-154	0.8
10	Y-152	0.7
11	Y-147	n/a
12	Y-158	n/a
13	Y-146	n/a
14	Y-148	n/a
15	Y-149	n/a
16	Y-102	n/a

#	化合物	细胞效力+ 吉西他滨 SW620 (倍)
	化合物 1	17
	化合物 2	8.1
1	Y-157	n/a
2	Y-150	4.8
3	Y-156	n/a
4	Y-151	n/a
5	Y-159	n/a
6	Y-081	n/a
7	Y-153	8.6
8	Y-155	n/a
9	Y-154	n/a
10	Y-152	8
11	Y-147	n/a
12	Y-158	n/a
13	Y-146	n/a
14	Y-148	n/a
15	Y-149	n/a
16	Y-102	n/a

[0352] 很明显,化合物1和2具有突出的细胞效力,测定为使细胞对两种代表性的基因毒性治疗药剂:SN38和吉西他滨敏感的能力。>1的值对可开发的化合物是必不可少的(否则化合物对降低基因毒性疗法的效果起作用)。

[0353] 化合物1具有对SN38几乎最高的增强(大约1.8倍)和对吉西他滨最高的增强(大约17倍),表明了强大的疗效。对SN38最增强的化合物为Y-150(大约2倍),其对吉西他滨具有仅约4.8倍增强。对于吉西他滨,其次最增强的化合物为Y-153(大约8.6倍),其对SN38没有增强(即,大约1倍)。

[0354] 此外,在小鼠中化合物1具有突出的口服生物利用度:100%(在上表中报道为105%)。

[0355]

[0356] 上述描述了原理、优选的实施方式和操作本发明的模式。但是,本发明不应解释为局限于讨论的特定的实施方式。反而,上述描述的实施方式应被视为用作说明的,而不是限制的,并且应理解,本领域技术人员可不偏离本发明的范围在那些实施方式中做变体。

[0357] 参考文献

[0358] 在此引用了许多出版物以更全面地描述和公开本发明以及本发明涉及的现有技术状况。对这些出版物的全引用提供于下。这些出版物的每一个都以其全部内容包括在此本公开内以供参考,如同各个出版物以相同程度明确且单独地指明通过引用被并入。

[0359] Almeida et al.,2008,“Pyrazolyl-amino-substituted pyrazines and their use for the treatment of cancer”,international (PCT) patent publication number WO 2008/117050A1published 02October 2008.

[0360] Balaint and Vousden,2001,“Activation and activities of the p53tumour suppressor protein,”Br.J.Cancer,Vol.85,pp.1813-1823.

[0361] Bartek and Lukas,2003,“Chk1and Chk2kinases in checkpoint control and cancer,”Cancer Cell,Vol.3,pp.421-429.

[0362] Brooks et al.,2012,“A potent chk1inhibitor is selectively toxic in melanomas with high levels of replicative stress,”Oncogene,doi:10.1038/onc.2012.72.

[0363] Carson and Lois,1995,“Cancer progression and p53,”Lancet,Vol.346,pp.1009-1011.

[0364] Cavelier et al.,2009,“Constitutive activation of the DNA damage signaling pathway in acute myeloid leukemia with complex karyotype:Potential importance for checkpoint targeting therapy,”Cancer Res.,Vol.69,pp.8652-8661.

[0365] Cole et al.,2011“RNAi screen of the protein kinome identifies checkpoint kinase 1(chk1)as a therapeutic target in neuroblastoma,”Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,Vol.108,pp.3336-3341.

[0366] Collins et al.,2009a,“Pyrazin-2-yl-2-yl-amine and pyrazin-2-yl-pyrimidin-4-yl-amine compounds and their use”,international (PCT) patent publication number WO 2009/044162 A1 published 09 April2009.

[0367] Collins et al.,2009b,“Bicycylaryl-aryl-amine compounds and their use”,international (PCT) patent publication number WO 2009/103966 A1 published27 August 2009.

[0368] Davies et al.,2011,“Single-agent inhibition of chk1 is antiproliferative in human cancer cell lines in vitro and inhibits tumor xenograft growth in vivo,”Oncol.Res.,Vol.19,pp.349-363.

[0369] Di Micco et al.,2006,“Oncogene-induced senescence is a DNAdamage response triggered by DNA hyper-replication,”Nature,Vol.444,pp.638-642.

[0370] Dixon and Norbury,2002,“Therapeutic exploitation of checkpoint defects in cancer cells lacking p53 function,”Cell Cycle,Vol.1,pp.362-368.

[0371] Ferrao et al.,2011,“Efficacy of chk inhibitors as single agents in

myc-driven lymphoma cells,”*Oncogene*,doi:10.1038/onc.2011.358.

[0372] Greenblatt et al.,1994,“Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis,”*Cancer Res.*,Vol.54, pp.4855-4878.

[0373] Guzi et al.,2011,“Targeting the replication checkpoint using SCH900776,a potent and functionally selective CHK1 inhibitor identified via high content screening,”*Mol.Cancer Ther.*,Vol.10,pp.591-602.

[0374] Höglund et al.,2011,“Therapeutic Implications for the Induced Levels of Chk1 in Myc-Expressing Cancer Cells,”*Clin.Cancer Res.*,Vol.17,pp.7067-7079.

[0375] Ioannidis et al.,2009,“Discovery of pyrazol-3-ylamino pyrazines as novel JAK2 inhibitors”,*Bioorg.Med.Chem.Lett.*,Vol.19,pp.6524-6528.

[0376] Lainchbury et al.,2012,“Discovery of 3-alkoxyamino-5-(pyridin-2-ylamino)pyrazine-2-carbonitriles as selective,orally bioavailable CHK1 inhibitors”,*J.Med.Chem.*,Vol.55,No.22,pp.10229-10240.

[0377] Li et al.,2007,“Synthesis and in-vitro biological activity of macrocyclic urea CHK1 inhibitors”,*Bioorg.Med.Chem.Lett.*,Vol.17,pp.6499-6504.

[0378] Lin et al.,2005,“Macrocyclic kinase inhibitors”,US patent publication number US 2005/0215556 A1 published 29 September 2005.

[0379] Liu et al.,2000,“Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint,”*Genes Dev.*,Vol.14,pp.1448-1459.

[0380] Murga et al.,2011,“Exploiting oncogene-induced replicative stress for the selective killing of Myc-driven tumors,”*Nat.Struct.Mol.Biol.*,Vol.18, pp.1331-1335.

[0381] Sanchez et al.,1997,“Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals:linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25,”*Science*, Vol.277,pp.1497-1501.

[0382] Sorensen et al.,2005,“Cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair,”*Nat.Cell Biol.*,Vol 7,pp.195-201.

[0383] Tao et al.,2005,“Macrocyclic kinase inhibitors”,international (PCT) patent publication number WO 2005/047294 A1 published 26 May 2005.

[0384] Tao et al.,2006,“Chk1 inhibitors for novel cancer treatment,”*Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*,Vol.6,pp.377-388.

[0385] Tao et al.,2007a,“Macrocyclic ureas as potent and selective CHK1 inhibitors:an improved synthesis,kinome profiling,Structure-activity relationships,and preliminary pharmacokinetics,”*Bioorg.Med.Chem.Lett.*,Vol.17, pp.6593-6601.

[0386] Tao et al.,2007b,“Structure-based design,synthesis,and biological

evaluation of potent and selective macrocyclic checkpoint kinase 1 inhibitors,”*J.Med.Chem.*,Vol.50,pp.1514-1527.

[0387] Walton et al.,2010,“The preclinical pharmacology and therapeutic activity of the novel CHK1 inhibitor SAR-020106,”*Mol.Cancer Ther.*,Vol.9,No.1, pp.89-100.

[0388] Walton et al.,2012,“CCT244747 is a novel potent and selective CHK1inhibitor with oral efficacy alone and in combination with genotoxic anticancer drugs”,*Clin.Cancer Res.*,Vol.18,No.20,pp.5650-5661.

[0389] Wang et al.,1996,“UCN-01:a potent abrogator of G2 checkpoint function in cancer cells with disrupted p53,”*J.Natl.Cancer Inst.*,Vol.8,pp.956-965.

[0390] Weinert and Hartwell,1989,“Control of G2 delay by the rad9 gene of *Saccharomyces cerevisiae*,”*J.Cell Sci.Suppl.*,Vol.12,pp.145-148.

[0391] Xiao et al.,2006,“Differential roles of checkpoint kinase 1, checkpoint kinase 2,and mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in mediating DNA damage-induced cell cycle arrest:implications for cancer therapy,”*Mol.Cancer Ther.*,Vol.5,pp.1935-1943.

[0392] Zachos et al.,2003,“Chk1-deficient tumour cells are viable but exhibit multiple checkpoint and survival defects,”*EMBO J.*,Vol.22,pp.713-723.

[0393] Zhao et al.,2002,“Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2checkpoints,”*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,Vol.99,pp.14795-14800.