

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780050587.5

[51] Int. Cl.

C07C 327/44 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/165 (2006.01)

[43] 公开日 2010年2月17日

[11] 公开号 CN 101652345A

[22] 申请日 2007.12.4

[21] 申请号 200780050587.5

[30] 优先权

[32] 2006.12.4 [33] US [31] 60/872,511

[86] 国际申请 PCT/IL2007/001494 2007.12.4

[87] 国际公布 WO2008/068751 英 2008.6.12

[85] 进入国家阶段日期 2009.7.28

[71] 申请人 诺沃泰尔医疗有限公司

地址 以色列基亚特·希姆纳镇

[72] 发明人 哈达斯·路维尼

亚历山大·利维斯兹奇

利拉奇·斯泰纳 莉薇特丽·萨森

艾里斯·本-大卫 阿维·魏斯伯格

[74] 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司

代理人 陶贻丰 郑霞

权利要求书 12 页 说明书 47 页 附图 22 页

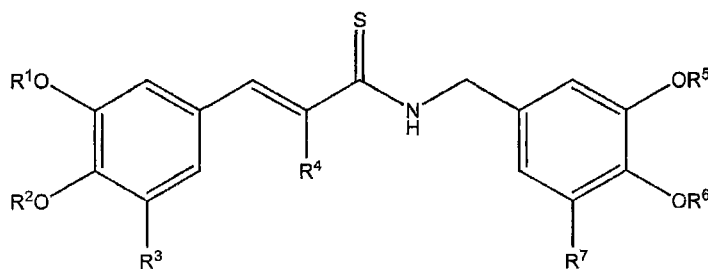
[54] 发明名称

新型蛋白激酶调节剂和其治疗应用

[57] 摘要

本发明提供用作底物竞争性蛋白酪氨酸激酶 (PTK) 抑制剂和受体酪氨酸激酶 (RTK) 抑制剂的新型酪氨酸磷酸化抑制剂衍生物, 其制备方法, 包含所述化合物的药物组合物, 和使用这些化合物和组合物的方法, 尤其是用作预防和治疗 PTK 和 RTK 相关疾患诸如代谢疾患、纤维变性疾患和细胞增殖疾患尤其是银屑病和癌症的化疗剂。

1. 一种由下式 1 结构表示的化合物:



其中

$R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$  和  $R^6$  独立地选自 H、 $C_1$ - $C_4$  烷基、酰基和水解时产生羟基的官能团;

$R^3$  和  $R^7$  独立地选自 H、卤素、卤烷基和  $OR^8$ , 其中  $R^8$  是 H、 $C_1$ - $C_4$  烷基、酰基或水解时产生羟基的官能团;

$R^4$  是 H 或 CN,

包括其盐、水合物、溶剂合物、多晶型物、光学异构体、几何异构体、对映体、非对映体和混合物。

2. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中  $R^4$  是 CN。

3. 根据权利要求 2 所述的化合物, 其中  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$  和  $R^6$  各为氢。

4. 根据权利要求 2 所述的化合物, 其中  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$  和  $R^6$  各为  $CH_3$ 。

5. 根据权利要求 2 所述的化合物, 其中  $R^3$  和  $R^7$  各为氢、卤素、卤甲基、OH 或  $OCH_3$ 。

6. 根据权利要求 2 所述的化合物, 其中  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$  和  $R^6$  各为 H,  $R^3$  是卤素且  $R^7$  是 OH。

7. 根据权利要求 2 所述的化合物, 其中  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$  和  $R^6$  各为 H, 且  $R^3$  和  $R^7$  各为卤素。

8. 根据权利要求 2 所述的化合物, 其中  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$  和  $R^6$  各为 H,  $R^3$  为卤甲基且  $R^7$  为 OH。

9. 根据权利要求 2 所述的化合物, 其中  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$  和  $R^6$  各为 H,  $R^3$  为卤素且  $R^7$  为 H。

10. 根据权利要求 2 所述的化合物, 其中  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$  和  $R^6$  各为 H,  $R^3$  为 OH 且  $R^7$  为卤素。

11. 根据权利要求 2 所述的化合物, 其中  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$  和  $R^6$  各为  $CH_3$ ,  $R^3$  为卤素且  $R^7$  为  $OCH_3$ 。

12. 根据权利要求 2 所述的化合物, 其中  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$  和  $R^6$  各为  $CH_3$ , 且  $R^3$  和  $R^7$  各为卤素。

13. 根据权利要求 1 所述的化合物, 其中  $R^4$  是氢。

14. 根据权利要求 13 所述的化合物, 其中  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$  和  $R^6$  各为氢。

15. 根据权利要求 13 所述的化合物, 其中  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$  和  $R^6$  各为  $CH_3$ 。

16. 根据权利要求 13 所述的化合物, 其中  $R^3$  和  $R^7$  各为氢、卤素、卤甲基、OH 或  $OCH_3$ 。

17. 根据权利要求 13 所述的化合物, 其中  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$  和  $R^6$  各为 H,  $R^3$  是卤素且  $R^7$  是 OH。

18. 根据权利要求 13 所述的化合物, 其中  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$  和  $R^6$  各为 H, 且  $R^3$  和  $R^7$  各为卤素。

19. 根据权利要求 13 所述的化合物, 其中  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$  和  $R^6$  各为 H,  $R^3$  为卤甲基且  $R^7$  为 OH。

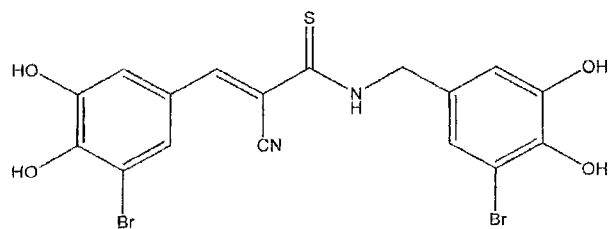
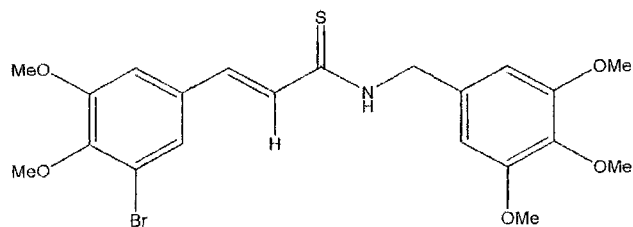
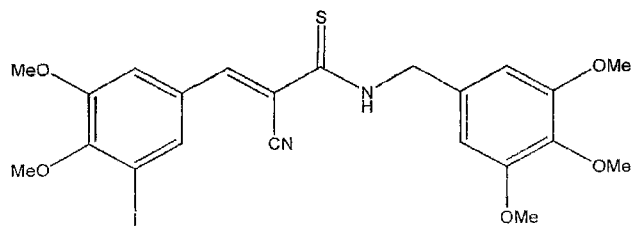
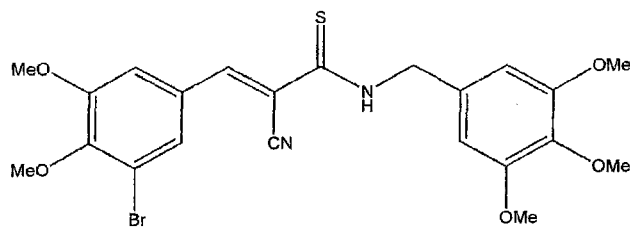
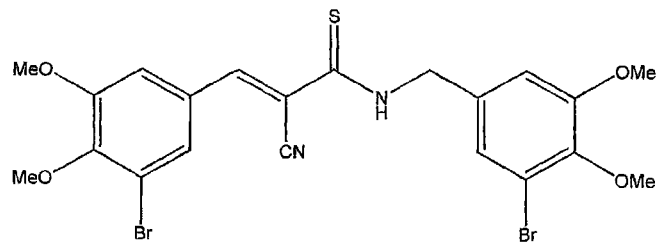
20. 根据权利要求 13 所述的化合物, 其中  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$  和  $R^6$  各为 H,  $R^3$  为卤素且  $R^7$  为 H。

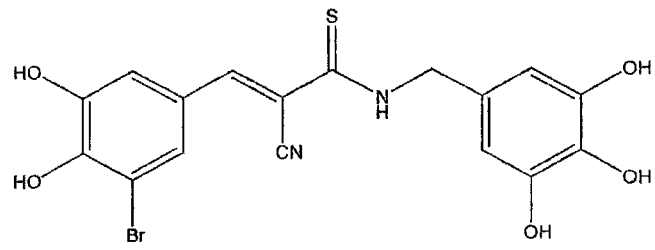
21. 根据权利要求 13 所述的化合物, 其中  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$  和  $R^6$  各为 H,  $R^3$  为 OH 且  $R^7$  为卤素。

22. 根据权利要求 13 所述的化合物, 其中  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$  和  $R^6$  各为  $CH_3$ ,  $R^3$  为卤素且  $R^7$  为  $OCH_3$ 。

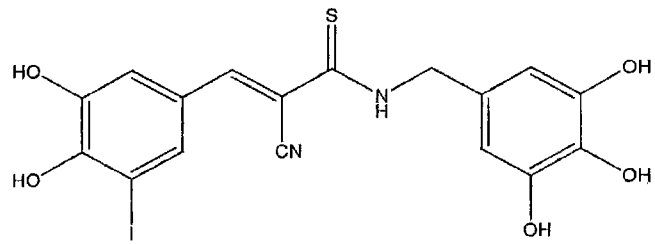
23. 根据权利要求 13 所述的化合物, 其中  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$  和  $R^6$  各为  $CH_3$ , 且  $R^3$  和  $R^7$  各为卤素。

24. 一种化合物，其选自由以下组成的组：

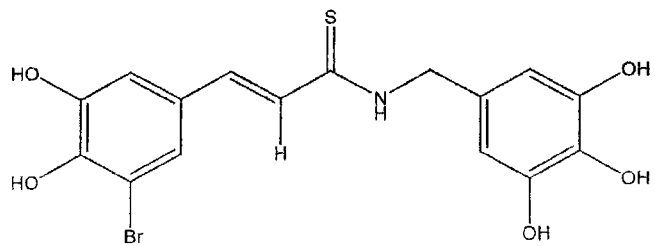




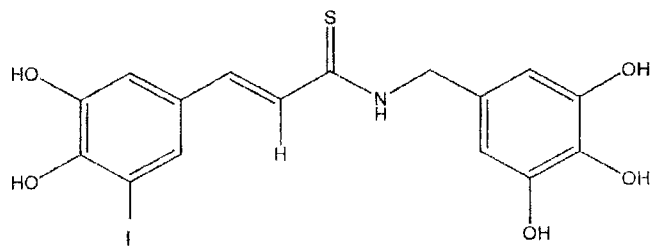
7



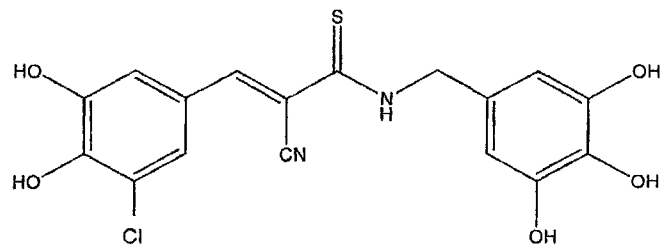
8



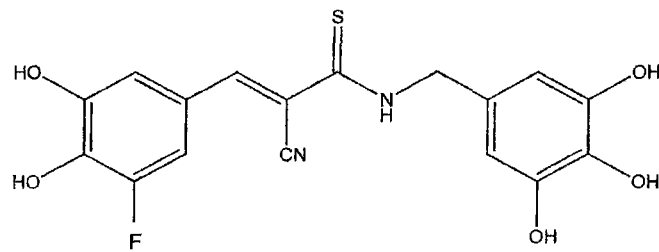
9



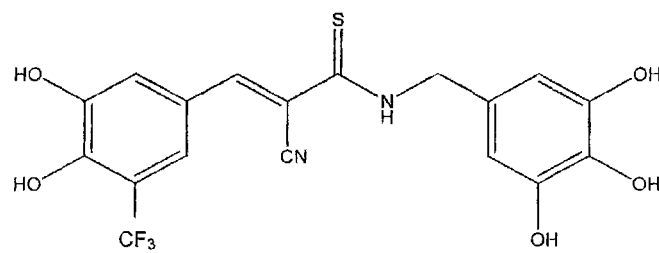
10



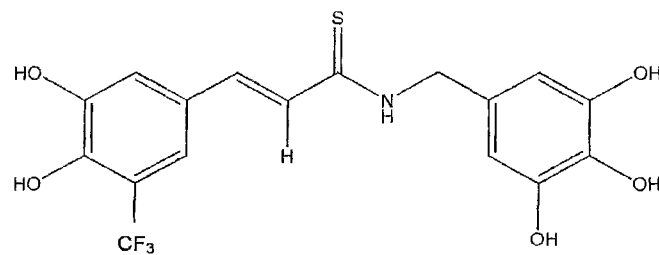
11



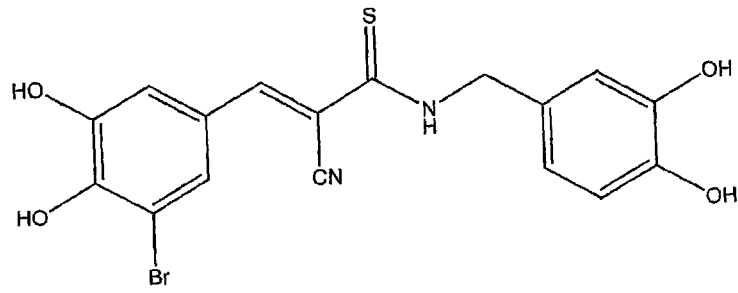
12



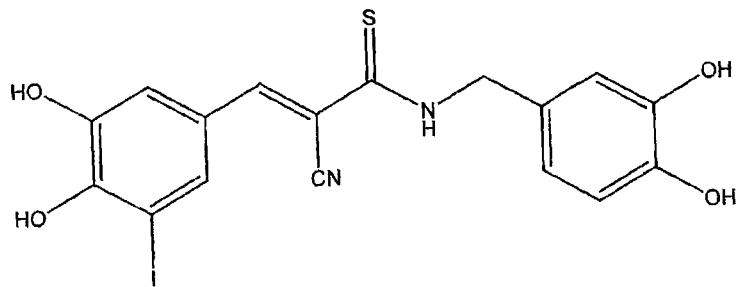
13



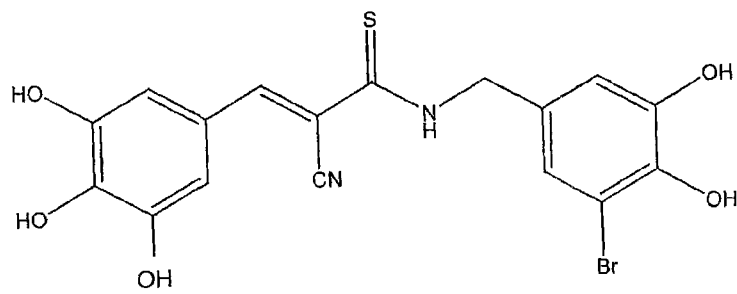
14



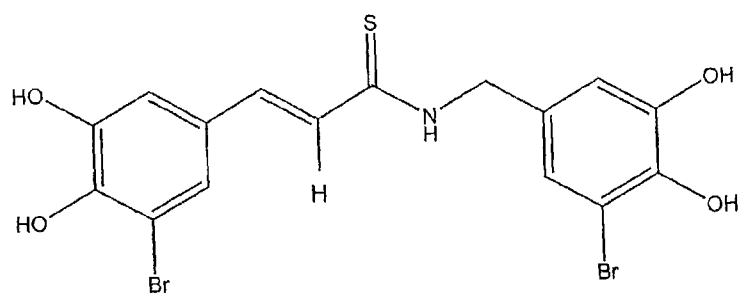
15



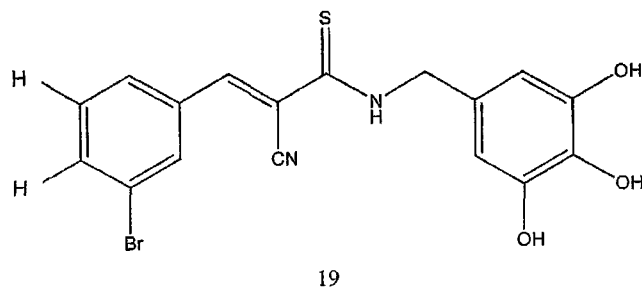
16



17



18; 和



25. 一种药物组合物，其包含治疗上有效量的根据权利要求 1 或 24 所述的化合物和药学上可接受的载体或赋形剂。

26. 一种抑制蛋白酪氨酸激酶(PTK)的方法，其包括使所述 PTK 与有效抑制量的根据权利要求 1 或 24 所述的化合物接触的步骤。

27. 一种治疗或预防受治疗者的蛋白酪氨酸激酶(PTK)相关疾患的方法，其包括向所述受治疗者施用治疗上有效量的根据权利要求 1 或 24 所述的化合物的步骤。

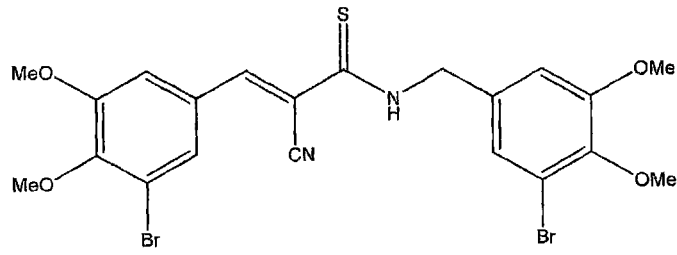
28. 根据权利要求 27 所述的方法，其中所述 PTK 相关疾患是细胞增殖疾患、纤维变性疾患或代谢疾患。

29. 根据权利要求 27 所述的方法，其中所述 PTK 相关疾患是癌症。

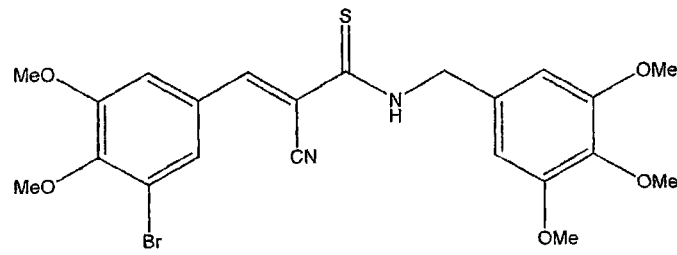
30. 根据权利要求 26-29 中任一项所述的方法，其中所述蛋白激酶是受体蛋白酪氨酸激酶(RTK)。

31. 根据权利要求 30 所述的方法，其中所述受体蛋白激酶选自由以下组成的组：血小板源性生长因子受体(PDGFR)、成纤维细胞生长因子受体(FGFR)、肝细胞生长因子受体(HGFR)、胰岛素受体、胰岛素样生长因子-1受体(IGF-1R)、表皮生长因子受体(EDFR)、神经生长因子受体(NGFR)、血管内皮生长因子受体(VEGFR)和巨噬细胞集落刺激因子(M-CSFR)。

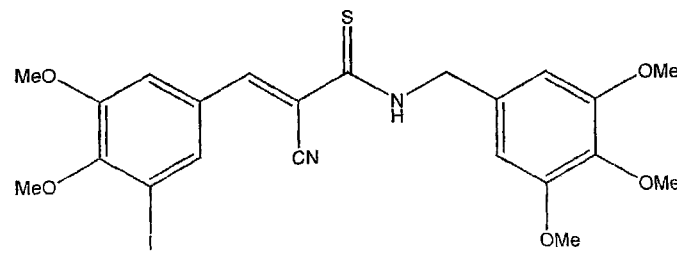
32. 根据权利要求 26-31 中任一项所述的方法，其中所述化合物选自由以下组成的组：



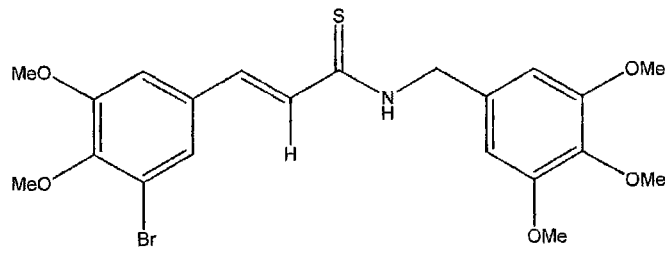
2



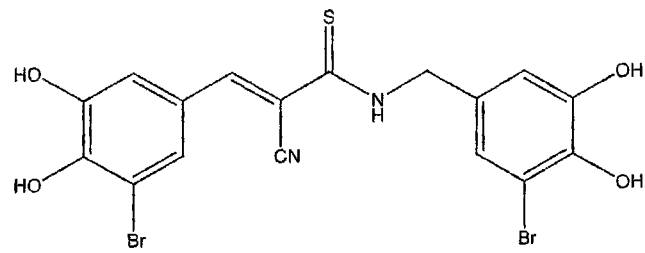
3



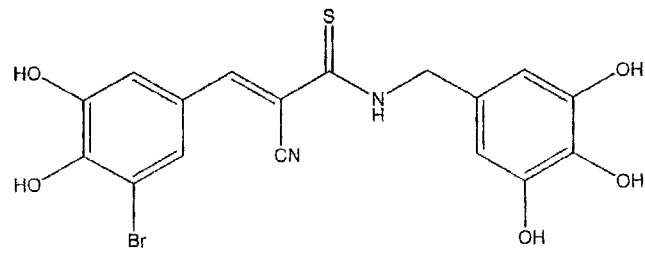
4



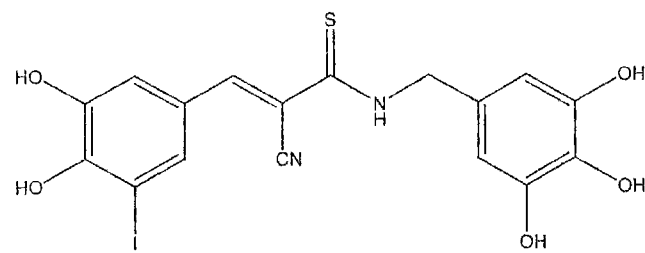
5



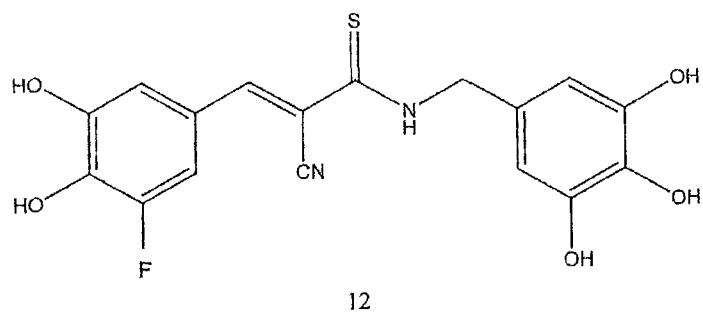
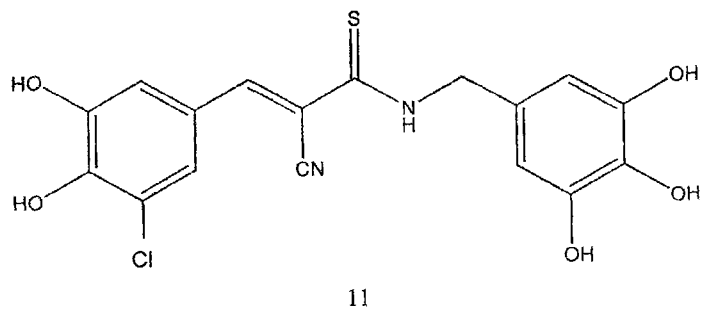
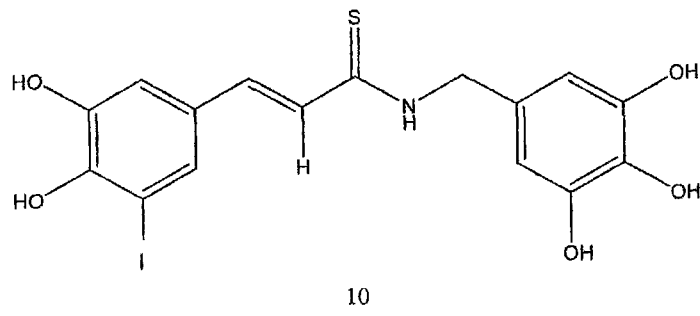
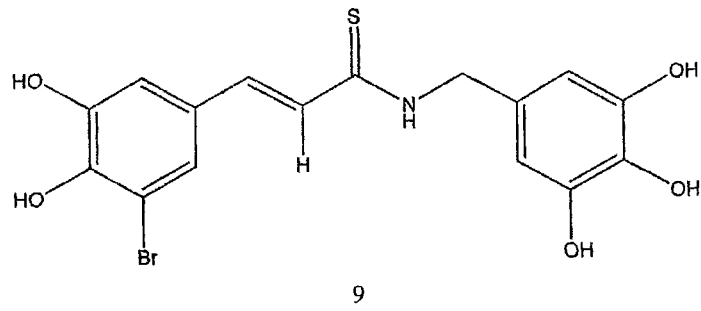
6

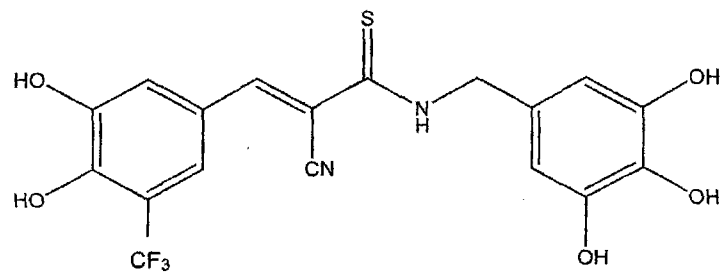


7

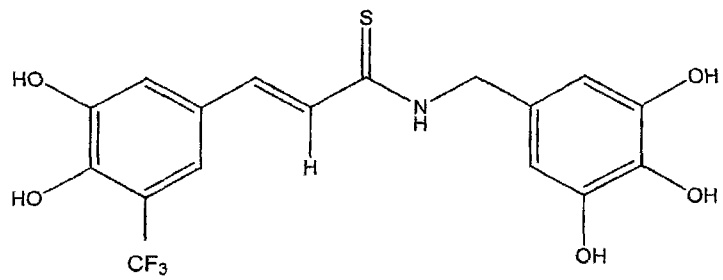


8

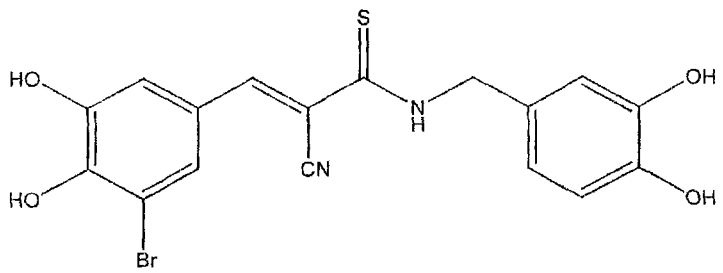




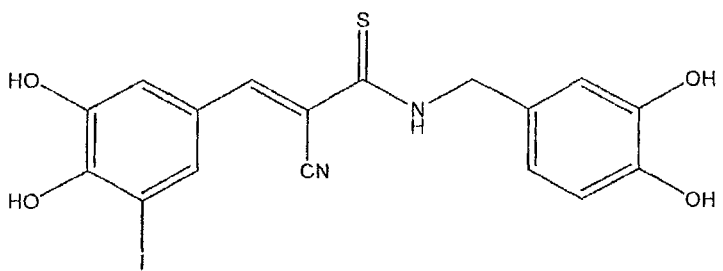
13



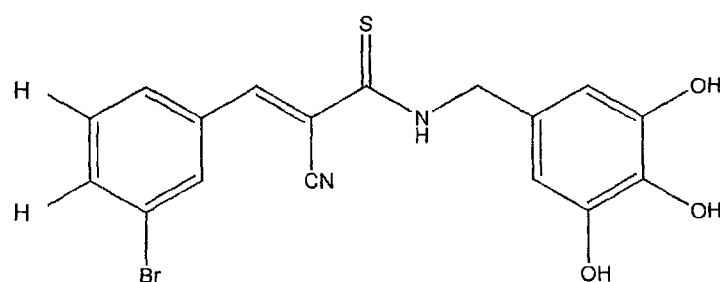
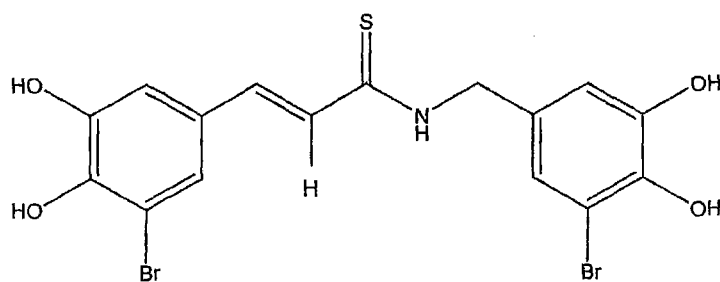
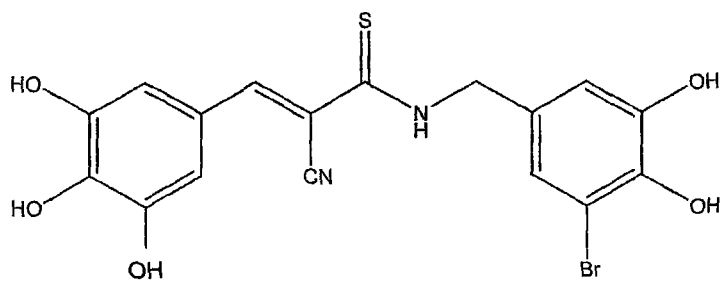
14



15



16



33. 根据权利要求 26-32 中任一项所述的方法, 其进一步包括施用包含所述化合物和药学上可接受的载体的药物组合物。

34. 根据权利要求 1 或 24 所述的化合物在制备用于治疗或预防蛋白酪氨酸激酶(PTK)相关疾患的药物中的应用。

35. 根据权利要求 34 所述的应用, 其中所述化合物选自由化合物 6、7、8、9、10 和 13 组成的组。

## 新型蛋白激酶调节剂和其治疗应用

### 发明领域

本发明涉及新型酪氨酸磷酸化抑制剂衍生物、其制备、包含其的药物组合物、和其在治疗蛋白激酶相关疾患中的应用。

### 发明背景

蛋白酪氨酸激酶(PTK)是酶的一个家族, 其将 ATP 的  $\gamma$ -磷酸基 ( $\gamma$ -phosphate) 转移到底物蛋白上酪氨酸残基的侧链。PTK 牵涉多种细胞过程, 包括信号传导和生长调节。PTK 对底物的磷酸化是细胞信号转导中的关键事件。

一类 PTK 是受体酪氨酸激酶(RTK)。这些激酶属于跨膜蛋白的家族并已牵涉在细胞信号转导途径中。一些受体激酶的主要生物活性是刺激细胞生长和增殖, 而另一些受体酪氨酸激酶参与抑制生长和促进分化。在一些情况中, 单个酪氨酸激酶可抑制或刺激细胞增殖, 这取决于表达其的细胞环境(Schlessinger 和 Ullrich, *Neuron* (1992), 9(3): 383-391)。RTK 包括血小板源性生长因子(PDGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、肝细胞生长因子(HGF)、胰岛素、胰岛素样生长因子 1(IGF-1)、神经生长因子(NGF)、血管内皮生长因子(VEGF)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)的受体以及其它的受体。

受体酪氨酸激酶包含至少三个结构域: 胞外糖基化配体结合结构域、跨膜结构域和可使酪氨酸残基磷酸化的细胞质催化结构域。配体与膜结合受体的结合诱导形成受体二聚体和变构变化, 从而活化细胞间的激酶结构域, 这进一步导致酪氨酸残基上的受体自身磷酸化(自磷酸化和/或转磷酸化)。受体磷酸化刺激活化的受体与靶分子的物理缔合。一些靶分子转而被

磷酸化, 这是将信号传递到细胞质的过程。由活化的受体产生的第二信号转导物分子, 导致调节细胞功能诸如细胞分裂或分化的信号级联。胞内信号传导综述于 Aaronson, *Science* (1991), **254**: 1146-1153; Schlessinger, *J. Trends Biochem. Sci.* (1988), **13**: 443-447; Ullrich 和 Schlessinger, *Cell* (1990), **61**: 203-212。

已将多种细胞增殖疾患与 PTK 介导的途径中的缺陷相关联。正常激酶过表达、受体酪氨酸激酶的配体上调或活化突变造成的 PTK 活性增强是牵涉细胞增殖的许多疾病(包括癌症)的特点。与细胞增殖疾患有关的具体受体酪氨酸激酶的例子包括血小板源性生长因子受体(PDGFR)、胰岛素样生长因子 1 受体(IGF-1R)、表皮生长因子受体(EGFR)和相关的 HER2。

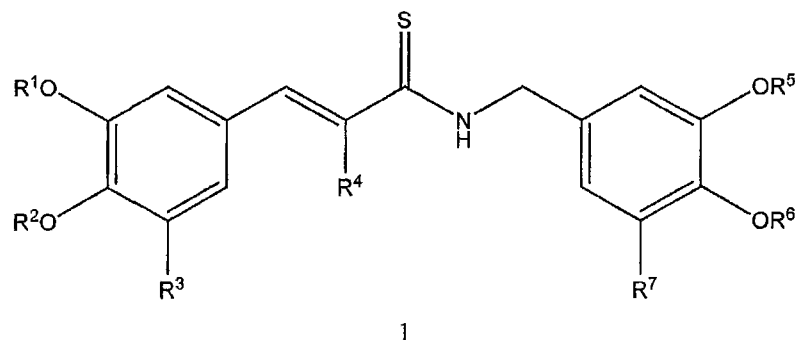
PTK 牵涉在多种疾病中, 使得 PTK 被鉴定为抗增殖药物的靶。事实上, 许多 PTK 阻滞剂已描述于文献中, 包括提议的作用机理(Levitzki 等人, *Science* (1995), **267**:1782-88; Posner 等人, *Mol. Pharmacol.* (1994), **45**:673-683)。申请人已开发了称为酪氨酸磷酸化抑制剂的一族 PTK 抑制剂, 设计为模拟酪氨酸底物(Levitzki 等人, *Science* (1995), **267**:1782-88; Levitzki 等人, *Biochem. Pharm.* (1990), **40**:913-920; Levitzki 等人, *EASEB J.* (1992), **6**:3275-3282; 美国专利第 5,217,999 和 5,773,476 号)。这些酪氨酸磷酸化抑制剂尤其是苯亚甲基丙二腈(malonitril)型酪氨酸磷酸化抑制剂的药效团是亲水儿茶酚环和更亲脂的取代的氰基-乙烯基基团。动力学研究已显示, 一些酪氨酸磷酸化抑制剂化合物是对于 (vis-à-vis) 酪氨酸底物的纯的竞争性抑制剂, 而对 ATP 结合位点它们作用为非竞争性抑制剂(Yaish 等人, *Science* (1988), **242**:933-935; Gazit 等人, *J. Med. Chem.* (1989), **32**:2344-2352)。尽管如此, 许多酪氨酸磷酸化抑制剂已经显示了对底物和 ATP 结合位点两者的竞争性抑制(Posner 等人, *Mol. Pharmacol.* (1994), **45**:673-683)。

在酪氨酸磷酸化抑制剂的相关组中, 亲水儿茶酚环被亲脂二氯-或二甲氧基-苯基基团交换以产生在低的微摩尔范围有效的 EGFR 激酶抑制剂。(Yoneda 等人, *Cancer Res.* (1991), **51**: 4430-4435)。然而, 对具有增强的抑制性能的酪氨酸磷酸化抑制剂仍有未满足的需求。

## 发明概述

本发明涉及可用作细胞中蛋白酪氨酸激酶(PTK)的抑制剂的新型酪氨酸磷酸化抑制剂化合物。这些新型酪氨酸磷酸化抑制剂化合物对以下受体(但不限于以下受体)显示出增强的抑制性: 胰岛素样生长因子 1 受体(IGF1R)、血小板源性生长因子受体(PDGFR)、表皮生长因子受体(EGFR)和 IGF1R-相关的胰岛素受体(IR)。本发明进一步涉及触发 IGF1R 直接底物 IRS1 的丝氨酸磷酸化的化合物, 从而提供增强这些新型酪氨酸磷酸化抑制剂的抑制活性的持久效应。

根据一方面, 本发明提供由式 1 结构表示的化合物:



其中

$R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$ 和 $R^6$ 独立地选自 H、 $C_1$ - $C_4$ 烷基、酰基和水解时产生羟基的官能团;

$R^3$ 和 $R^7$ 独立地选自 H、卤素、卤烷基和 $OR^8$ , 其中 $R^8$ 是 H、 $C_1$ - $C_4$ 烷基、酰基或水解时产生羟基的官能团;

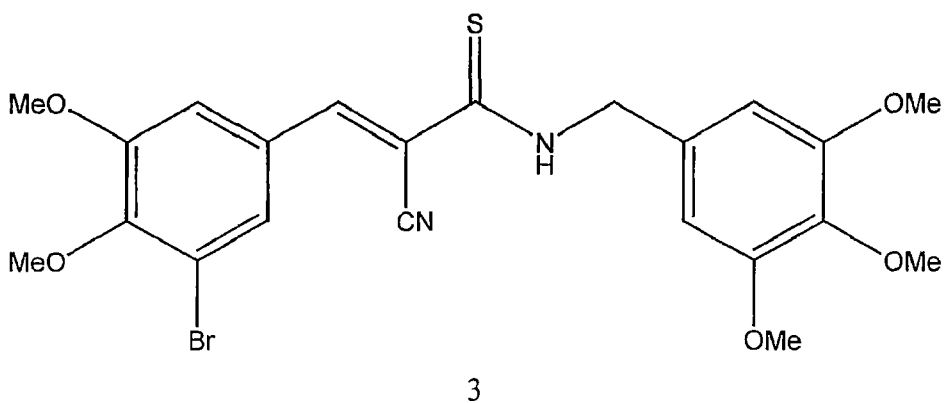
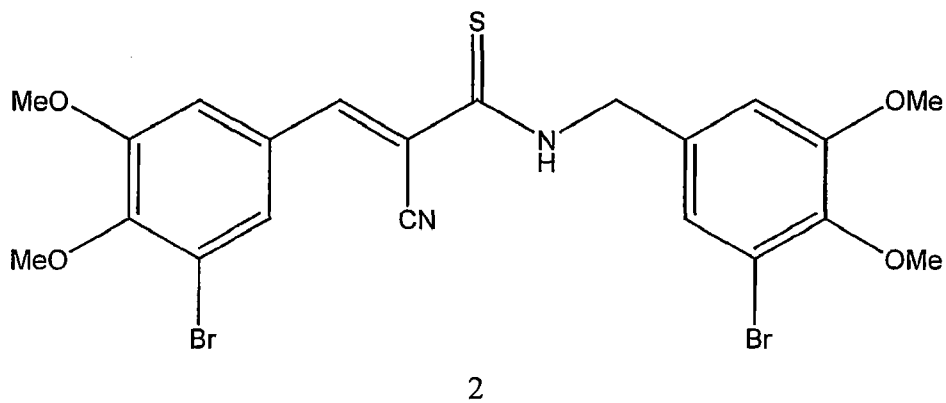
$R^4$ 是 H 或 CN,

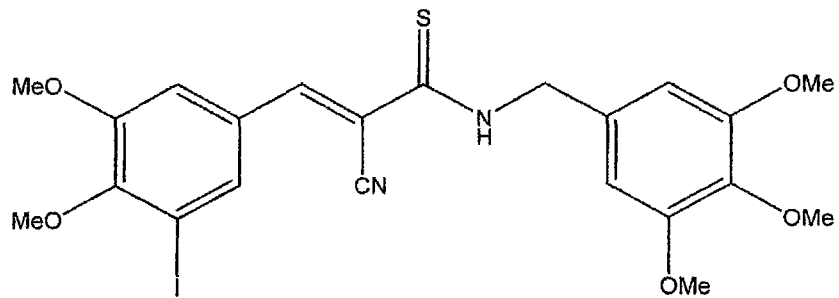
包括其盐、水合物、溶剂合物、多晶型物、光学异构体、几何异构体、对映体、非对映体和混合物。

在一个实施方式中, 本发明提供由式 1 结构表示的化合物, 其中 $R^3$ 是卤素(如 F、Cl、Br 或 I)或卤烷基(如 $CF_3$ )。在另一个实施方式中, 本发明提供由式 1 结构表示的化合物, 其中 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$ 和 $R^6$ 各为 H。在另一个实施方式中, 本发明提供由式 1 结构表示的化合物, 其中 $R^7$ 是氢、卤素或 $OR^8$ ,  $R^8$ 为 H 或甲基。在一个实施方式中, 本发明进一步提供式 1 的化

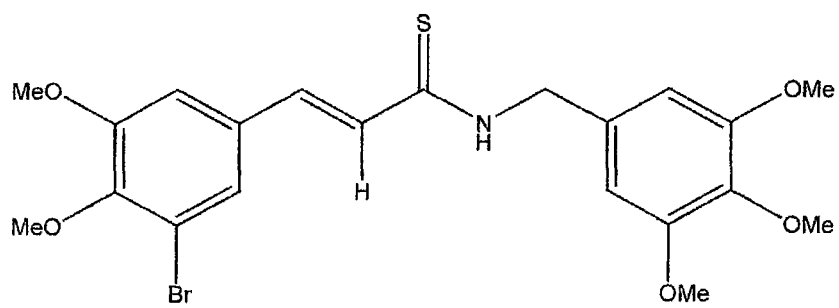
合物，其中  $R^4$  是 H。在另一个实施方式中，本发明提供式 1 的化合物，其中  $R^4$  是 CN。

这种结构的代表性和非限制性实例是选自由化合物 2-18 组成的组的化合物：

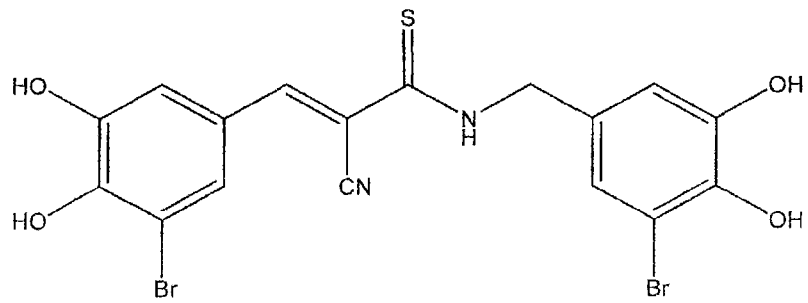




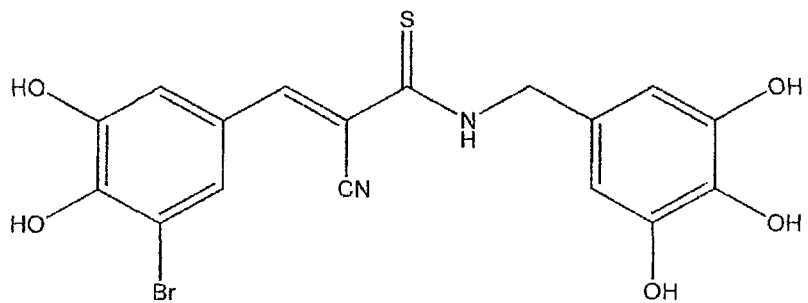
4



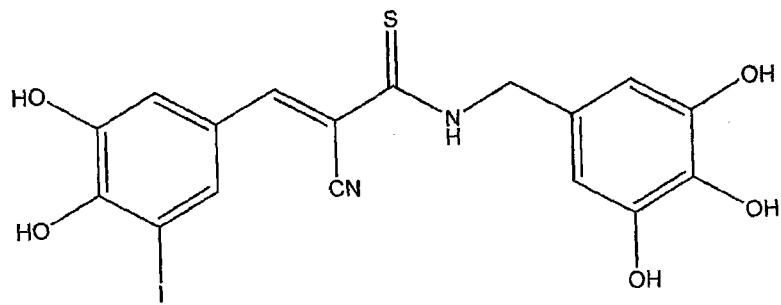
5



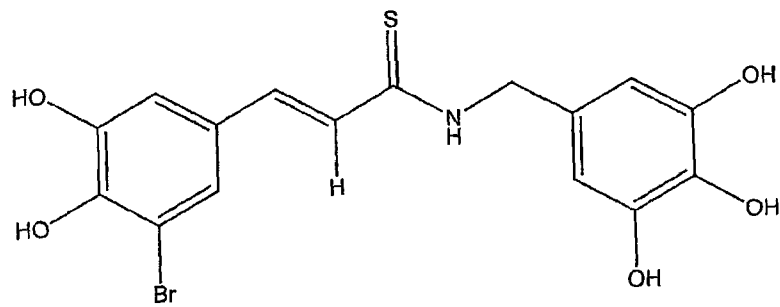
6



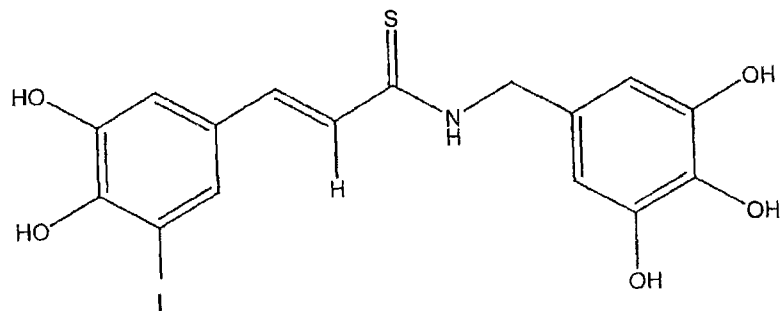
7



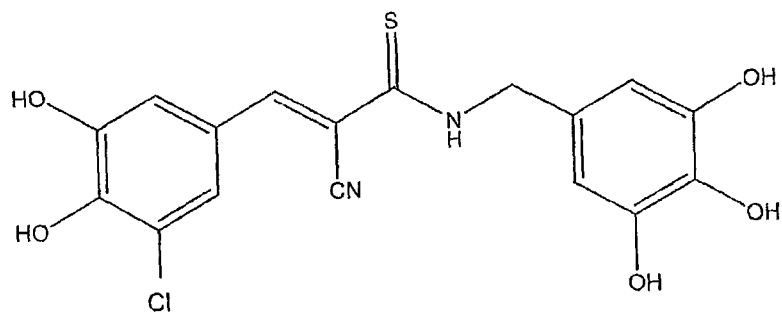
8



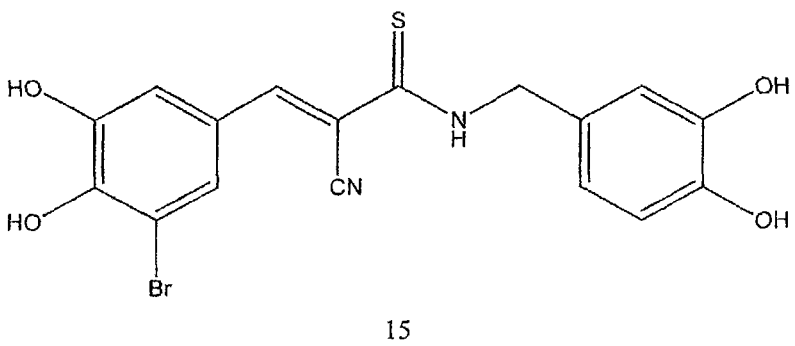
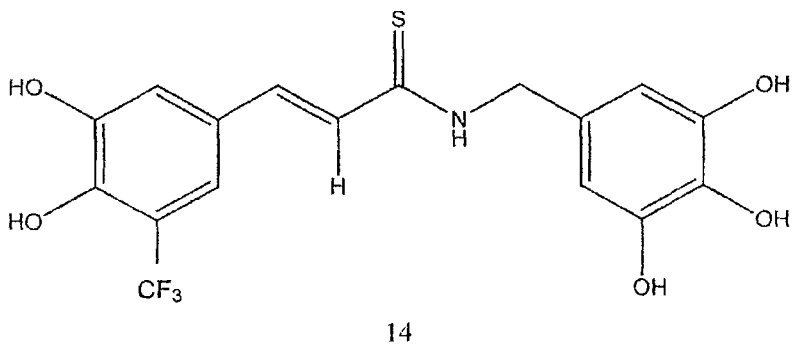
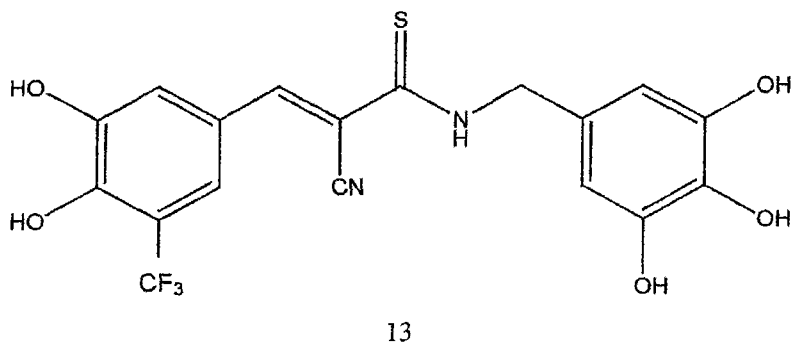
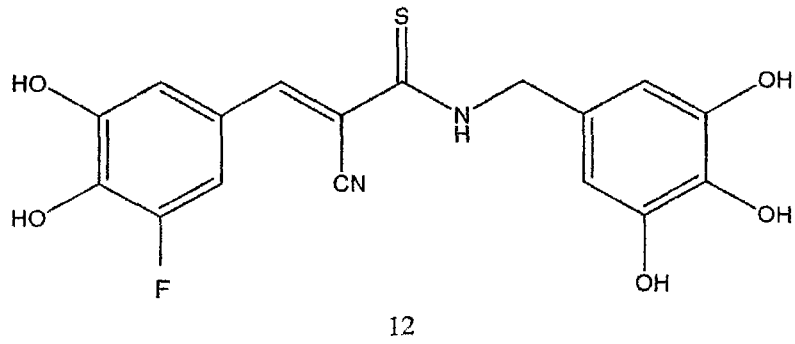
9

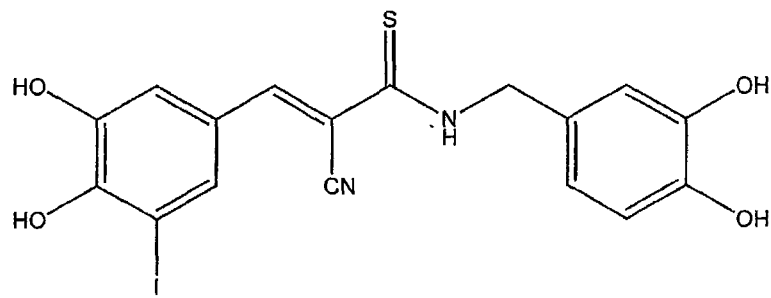


10

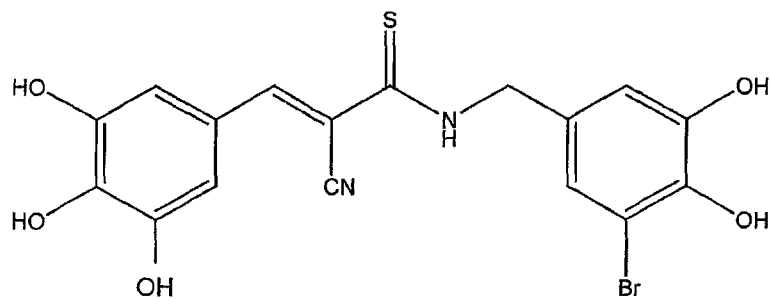


11

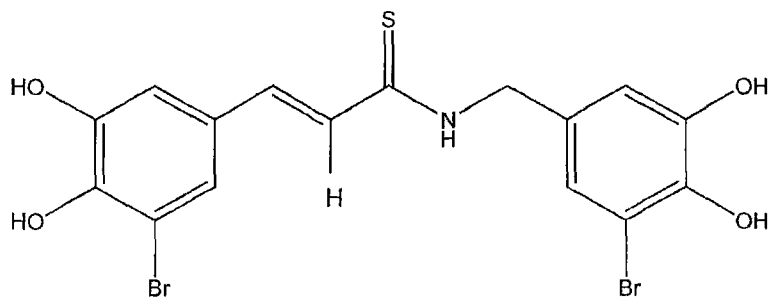




16

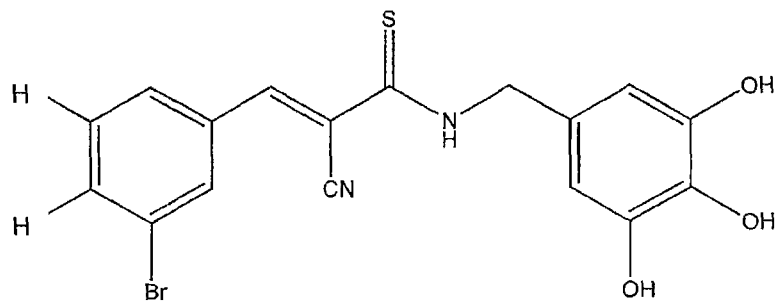


17; 和



18

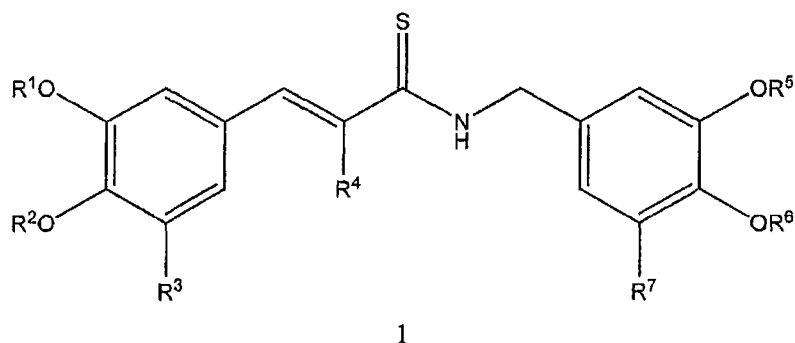
另一种类似的衍生物是第 19 号化合物:



19

本发明进一步提供药物组合物, 其包含由下式 1 结构表示的任何化合

物:



其中

$R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$ 和 $R^6$ 独立地选自H、 $C_1$ - $C_4$ 烷基、酰基和水解时产生羟基的官能团;

$R^3$ 和 $R^7$ 独立地选自H、卤素、卤烷基和 $OR^8$ ,其中 $R^8$ 是H、 $C_1$ - $C_4$ 烷基、酰基或水解时产生羟基的官能团;

$R^4$ 是H或CN,

包括其盐、水合物、溶剂合物、多晶型物、光学异构体、几何异构体、对映体、非对映体和混合物。

本发明进一步提供抑制蛋白酪氨酸激酶(PTK)的方法,其包括使PTK与有效抑制量的式1化合物接触。

本发明进一步提供抑制受治疗者的蛋白酪氨酸激酶(PTK)的方法,其包括向受治疗者施用治疗上有效量的式1化合物的步骤以抑制受治疗者的蛋白酪氨酸激酶(PTK)。在另一实施方式中,所述方法包括向受治疗者施用包含治疗上有效量的式1任何化合物和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

本发明进一步提供治疗或预防受治疗者的蛋白酪氨酸激酶(PTK)相关疾患的方法,其包括向受治疗者施用治疗上有效量的式1任何化合物的步骤。在另一实施方式中,所述方法包括向受治疗者施用包含治疗上有效量的式1化合物和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。在一个实施方式中,所述PTK相关疾患是细胞增殖疾患、代谢疾患或纤维变性疾患。在优选实施方式中,所述PTK相关疾患是癌症。在另一实施方式中所述PTK相关

疾患是糖尿病性肾病。

本发明的可用性的进一步实施方式和全部范围将由以下给出的详细描述而变得明显。然而应理解的是，尽管详细描述和具体实施例指出了本发明的优选实施方式，但只是以示例方式提供，因为根据这些详细描述，在本发明主旨和范围内的各种变化和修改对本领域技术人员将变得明显。

## 附图简述

**图 1** 以图解形式显示本发明示例性新型酪氨酸磷酸化抑制剂的合成过程。X 和 Y 独立地选自氢、卤素、卤烷基和  $OR^8$ ，其中  $R^8$  是 H、 $C_1$ - $C_4$  烷基、酰基或水解时产生羟基的官能团。

**图 2** 以图解形式显示本发明示例性新型酪氨酸磷酸化抑制剂的合成过程。X 和 Y 独立地选自氢、卤素、卤烷基和  $OR^8$ ，其中  $R^8$  是 H、 $C_1$ - $C_4$  烷基、酰基或水解时产生羟基的官能团。

**图 3** 以图解形式显示本发明新型酪氨酸磷酸化抑制剂的合成中使用的中间产物的合成过程。

**图 4A 和 4B** 显示化合物 7 诱导完整癌细胞中的 IGF1R 和其信号转导的抑制。图 4A 显示与对照(化合物#20)比较，接触化合物 7 后癌细胞中 IGF1R 活化和信号转导的抑制。化合物 7 诱导 IGF1R 的直接底物 IRS1 的酪氨酸-磷酸化的减少，和 IGF1-诱导的 PKB 和 ERK 途径活化的抑制。图 4B 表示癌细胞中 IGF1-诱导的信号转导的剂量依赖性抑制。

**图 5A、5B 和 5C** 显示化合物 7 诱导乳腺癌 MCF7 细胞中 IRS1 上的丝氨酸-磷酸化和 IRS1 的细胞水平降低。图 5A 显示以化合物 7 处理 4 小时诱导的 IRS1 的细胞水平降低。图 5B 显示以化合物 7 处理 4 小时后诱导的 IRS1 上的丝氨酸-磷酸化。图 5C 显示癌细胞中 IRS1 水平持久(接触后 24 小时)减少。

**图 6** 显示以化合物 7、8、9、10、11 和 13 处理乳腺癌 MCF7 细胞后 IRS1 上的 Ser-磷酸化。还证实了抑制 IGF1R 下游信号转导途径即 ERK 和 PKB 的活化。

图 7A 和 7B 显示与化合物 6 相比,以化合物 7、8 和 9 处理卵巢癌 A2780 细胞。图 7A 显示以化合物 6、7、8 和 9 处理的细胞在孵育后经历凋亡(检测裂解的 PARP),以化合物 6 处理的细胞经历的凋亡略微地较弱。图 7B 显示不同于化合物 6,化合物 7、8 和 9 诱导的 IRS1 上的 Ser-磷酸化(由 IRS1 条带向上移而检测)以及 IRS1 水平下降。

图 8 显示与化合物 11 和 19 相比,以化合物 7、8、9、10 和 13 处理的转移的黑素瘤 YUMAC 细胞中检测到 IRS1 上的 Ser-磷酸化以及 PARP 的裂解(凋亡)。

图 9A、9B 和 9C 显示化合物 7 抑制完整细胞中 PDGFR、EGFR 和 IR 酪氨酸激酶的活化和下游信号转导。图 9A 显示化合物 7 抑制激素难治性前列腺癌 PC3 细胞中 EGFR 活化和 EGF 诱导的 PKB 和 STAT3 (EGFR 的直接底物)的磷酸化。图 9B 显示化合物 7 在过表达 PDGFR 的 NIH3T3 细胞中抑制配体诱导的 PDGFR 活化和下游信号转导。图 9C 显示化合物 7 在过表达 IR 的 NIH3T3 细胞中抑制配体诱导的胰岛素受体(IR)活化和下游调节。

图 10 显示以化合物 7(IP, 1 次/天, 50 mg/kg)处理裸小鼠导致激素难治性前列腺癌(HRPC)PC3 肿瘤 82%的生长抑制。

图 11 显示以化合物 7(IP, 1 次/天, 50 mg/kg)处理裸小鼠经过 4 周对小鼠体重无显著影响(UT=未处理的、Veh=媒介物(vehicle))。

图 12 显示以化合物 7 或 8 (IP, 1 次/天, 20 mg/kg)处理裸小鼠导致卵巢癌 A2780 肿瘤 87%的生长抑制。

图 13 显示与化合物 6 相比,化合物 7、8 和 9 对裸小鼠模型中卵巢癌 A2780 肿瘤的生长抑制的高效力。

图 14 显示以化合物 8 (IP, 1 次/天, 50 mg/kg)处理具有大于 50 mm<sup>3</sup> 的卵巢 A2780 肿瘤的裸小鼠导致肿瘤 82%的生长抑制。

图 15 显示以化合物 8 (IP, 1 次/天, 50 mg/kg)处理具有大于 470 mm<sup>3</sup> 的卵巢 A2780 肿瘤的裸小鼠导致肿瘤大约 85%的生长抑制。

图 16 显示以化合物 7 (肿瘤内, 1 次/天, 125 μg/天)处理裸小鼠导致胰腺

癌 Panc1 肿瘤 50%的生长抑制。

图 17 显示与化合物 6 相比, 化合物 7 对裸小鼠模型中黑素瘤 B16 肿瘤的生长抑制的效力。该抑制剂以 20 mg/kg, 1 次/天的剂量 IP 施用。

图 18 显示化合物 8 对裸小鼠模型中人类黑素瘤 YUMAC 肿瘤的生长抑制的效力。化合物 8 以 20 mg/kg, 1 次/天的剂量 IP 施用。

图 19A 和 19B 显示化合物 6 对 MCF7 细胞的作用。图 19A 显示化合物 6 抑制 IGF1 诱导的 IGF1R 活化和信号转导(IGF1R 的自磷酸化、IGF1-诱导的 IRS1 酪氨酸磷酸化和 IGF1 诱导的 Akt/PKB 活化)。图 19B 显示化合物 6 对 IRS1 水平无作用。

图 20A 和 20B 显示化合物 6 对 HRPC PC3 细胞中 EGFR 活性的作用。图 20A 显示化合物 6 抑制 EGF 诱导的 EGFR 和其下游元件 STAT3 和 PKB 的磷酸化。图 20B 显示以化合物 6 处理 PC3 细胞后, 蛋白水平相等, 且未检测到对 STAT3、PKB 或 ERK 的作用。

图 21 显示在生长因子富集的培养基存在下, 化合物 7 (IC<sub>50</sub>=2.3 μM) 剂量依赖性地抑制原代角质形成细胞的生长。

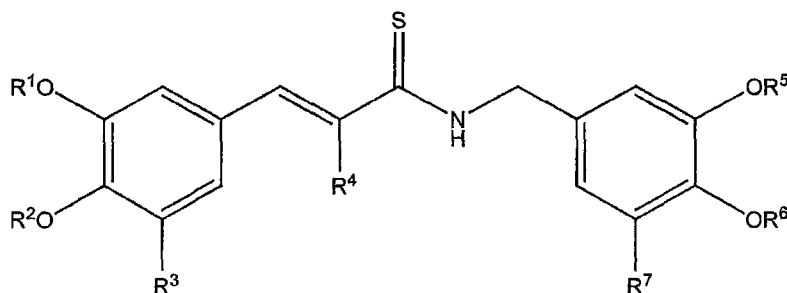
## 发明详述

本发明涉及新型酪氨酸磷酸化抑制剂衍生物, 其为强效的 PTK 抑制剂。本发明进一步提供抑制 PTK 如 IGF-1 受体(IGF1R)的方法。该化合物可用于治疗或预防 PTK 相关的疾病状态, 尤其是与 PTK 介导的信号转导途径中的缺陷相关联的 PTK 相关疾患。牵涉细胞增殖的疾病的例子是癌症和银屑病。

本发明的化合物与此前公开的酪氨酸磷酸化抑制剂衍生物(Blum 等人, *Biochem.* (2000), **39**:15705-15712; 美国专利第 5,773,476 和 5,217,999 号)相比, 被设计为对于蛋白酪氨酸激酶(PTK)具有增强的抑制效力。申请人令人惊讶地发现, 在儿茶酚药效团上引入其它取代基大大地增强了抑制效力。而且, 还发现在第二芳环上引入其它取代基显著地增强了新化合物的抑制效力。此外, 显示所描述分子的亚家族触发了用作 IGF-1R 的直接底

物的 IRS1 的丝氨酸磷酸化。不希望受限于任何理论或作用机理，该磷酸化可导致 IRS1 与 IGF-1R 的解偶，从而阻滞 IGF-1R 信号转导。而且，IRS1 的这种 Ser-磷酸化通常伴有 IRS1 水平下降。显示这些过程增强这些酪氨酸激酶抑制剂的抑制潜力，从而引起持久效应。

本发明提供的化合物由如下通式 1 表示：



其中

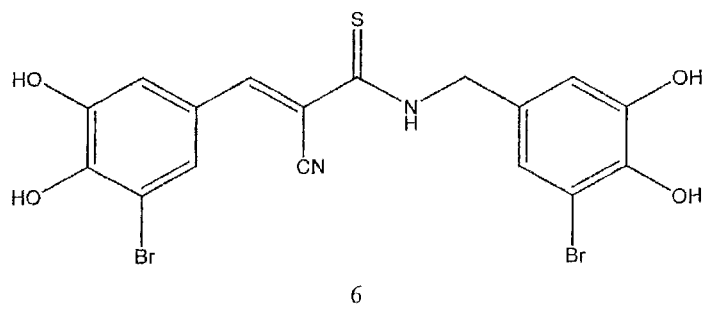
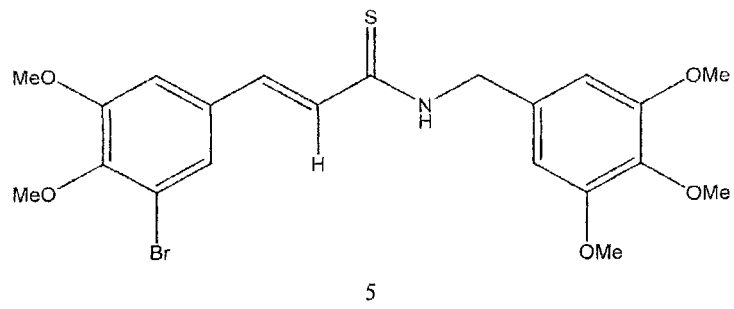
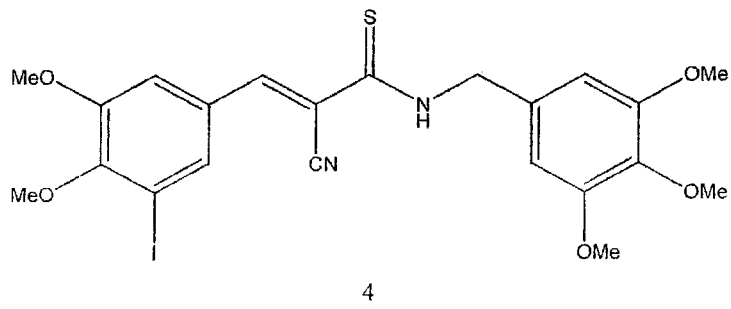
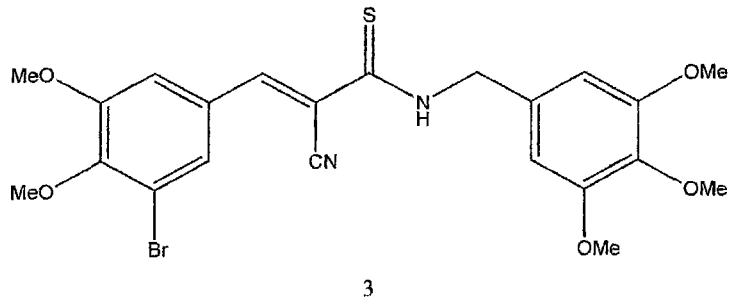
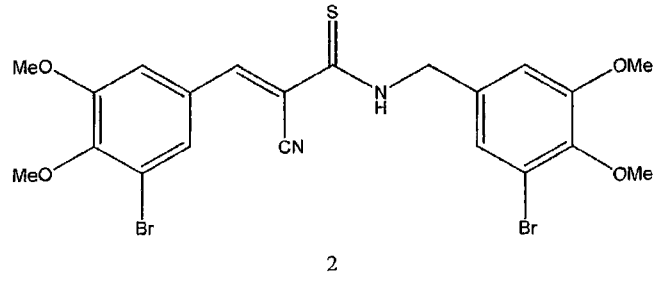
$R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$  和  $R^6$  独立地选自 H、 $C_1$ - $C_4$  烷基、酰基和水解时产生羟基的官能团；

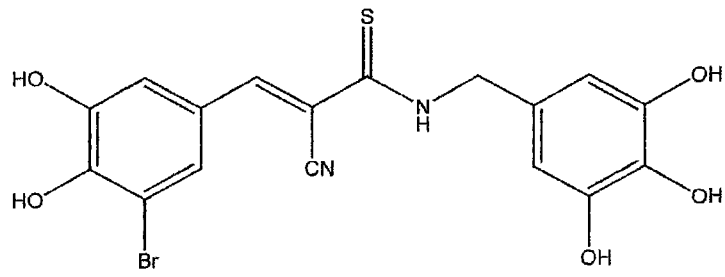
$R^3$  和  $R^7$  独立地选自 H、卤素、卤烷基和  $OR^8$ ，其中  $R^8$  是 H、 $C_1$ - $C_4$  烷基、酰基或水解时产生羟基的官能团；

$R^4$  是 H 或 CN，

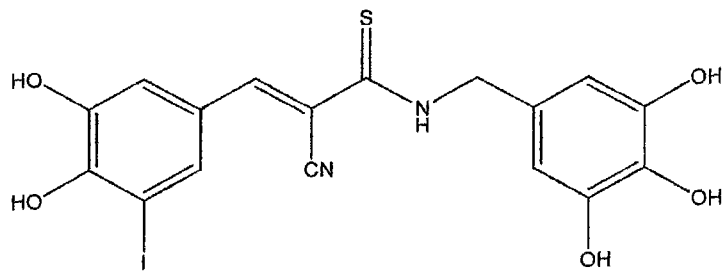
包括其盐、水合物、溶剂合物、多晶型物、光学异构体、几何异构体、对映体、非对映体和混合物。

在一个实施方式中，本发明提供由式 1 结构表示的化合物，其中  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$  和  $R^6$  各独立地为 H 或甲基。在另一个实施方式中，本发明提供由式 1 结构表示的化合物，其中  $R^3$  是卤素(如 F、Cl、Br、I)、羟基或卤烷基(如  $CF_3$ )。在另一个实施方式中，本发明提供由式 1 结构表示的化合物，其中  $R^4$  是 CN。在另一个实施方式中，本发明提供由式 1 结构表示的化合物，其中  $R^7$  是 H、卤素或  $OR^8$ ， $R^8$  为 H 或甲基。在一个实施方式中，本发明进一步提供式 1 的化合物，其中  $R^4$  是 H。这种结构的代表性和非限制性实例是选自由化合物 2-18 组成的组的化合物：

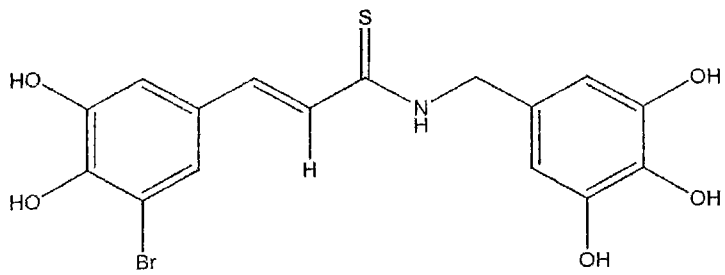




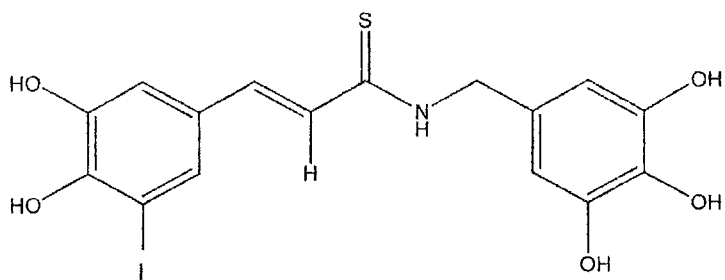
7



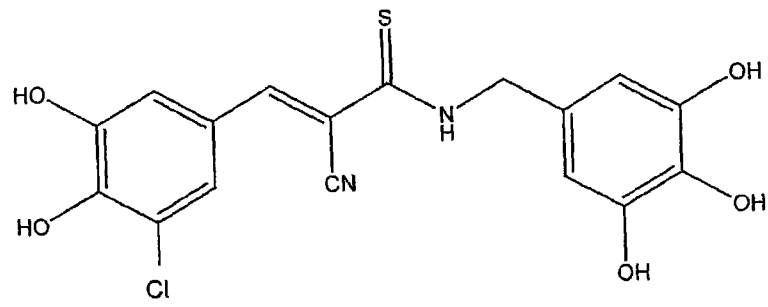
8



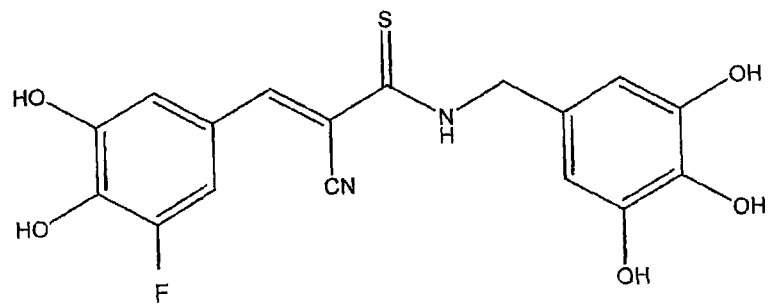
9



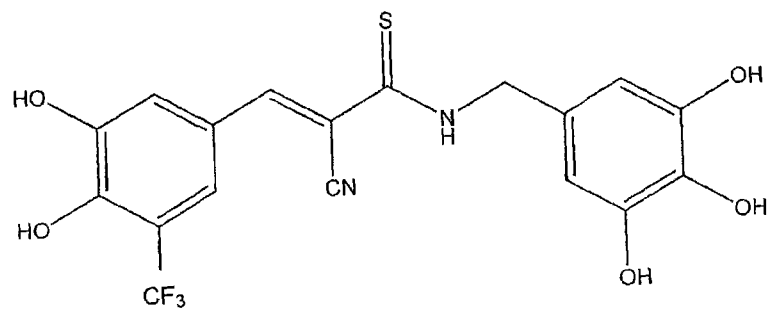
10



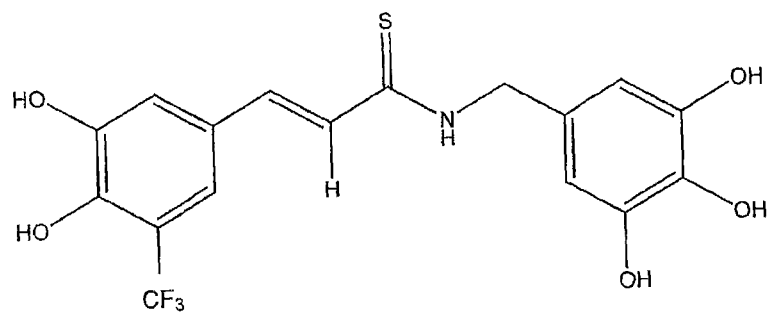
11



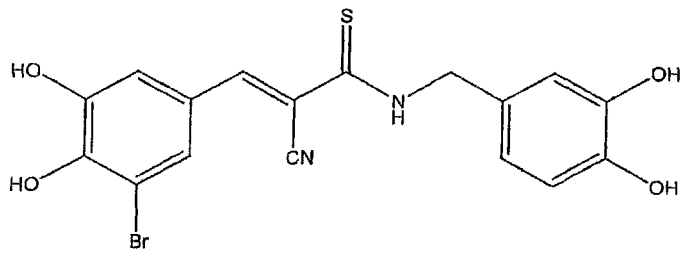
12



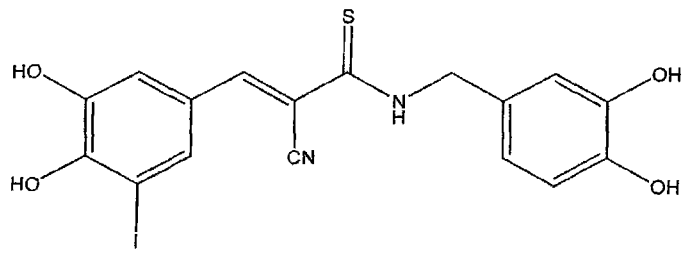
13



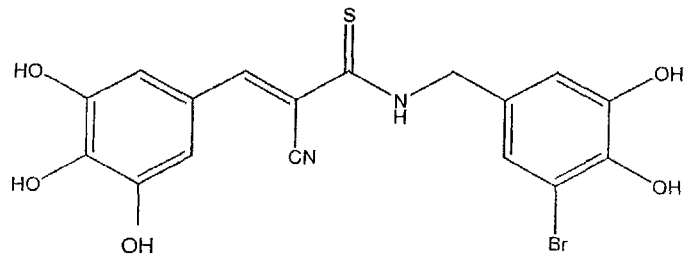
14



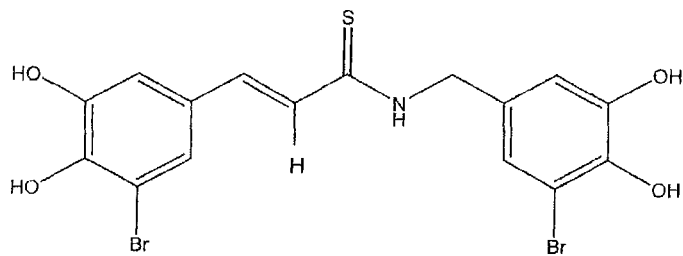
15



16

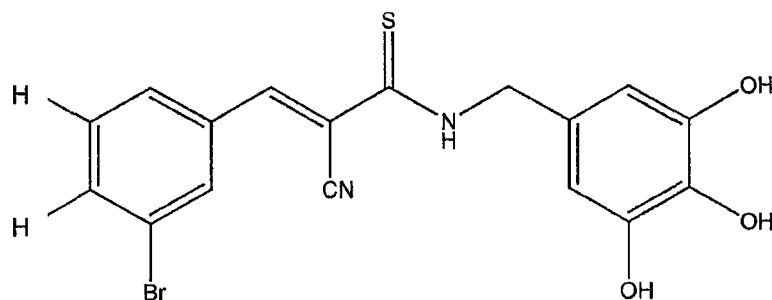


17



18

另一种类似的衍生物是第 19 号化合物:



19

不希望受限于任何理论或作用机理，当羟基由甲基基团封闭时，即该化合物由第 1、2、5 & 6 位的甲氧基基团组成时，与在等同位置具有羟基基团的化合物相比，该化合物的活性显著下降。因此化合物 2-5 与化合物 6-19 和类似化合物相比活性较低。

### 化学定义

“烷基”基团指饱和的脂肪族烃，包括直链、支链和环状烷基基团。在一个实施方式中，烷基基团具有 1-12 个碳，在此称为 C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-烷基。在另一个实施方式中，烷基基团具有 1-6 个碳，在此称为 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-烷基。在另一个实施方式中，烷基基团具有 1-4 个碳，在此称为 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-烷基。烷基基团可为未取代的，或由选自卤素、羟基、烷氧基羰基、酰氨基、烷基酰氨基、二烷基酰氨基、硝基、氨基、烷基氨基、二烷基氨基、羧基、硫基 (thio) 和硫代烷基的一个或多个基团取代。

“羟基”基团指 OH 基团。“烷氧基”基团指 -O-烷基基团，其中 R 是如上定义的烷基。“硫基”基团指 -SH 基团。“烷硫基”基团指 -SR 基团，其中 R 是如上定义的烷基。

“氨基”基团指 NH<sub>2</sub> 基团。烷基氨基基团指 -NHR 基团，其中 R 是如上定义的烷基。二烷基氨基基团指 -NRR' 基团，其中 R 和 R' 是如上定义的烷基。

“酰氨基”基团指 -C(O)NH<sub>2</sub> 基团。烷基酰氨基基团指 -C(O)NHR 基团，其中 R 是如上定义的烷基。二烷基酰氨基基团指 -C(O)NRR' 基团，其中 R 和 R' 是如上定义的烷基。

“硫代酰胺”基团指 C(S)NHR，其中 R 是烷基、芳基、烷基芳基或氢。

本文单独或作为另一基团的部分使用的术语“卤素”或“卤”指氯、溴、氟和碘。术语“卤烷基”指有一些或全部的氢独立地被卤素基团代替的烷基基团，包括但不限于三氯甲基、三溴甲基、三氟甲基、三碘甲基、二氟甲基、氯二氟甲基、五氟乙基、1,1-二氟乙基溴甲基、氯甲基、氟甲基、碘甲基和类似基团。

水解时产生羟基的官能团的例子包括但不限于酯、酸酐、氨基甲酸酯、碳酸酯及类似官能团。例如，当  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$  或  $R^6$  中的任一是酰基基团(COR)时，所得的官能团是酯(OCOR)。当  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$  或  $R^6$  中的任一是酰胺基团(CONHR)时，所得的官能团是氨基甲酸酯(OCONHR)。当  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^5$  或  $R^6$  中的任一是羧基(carboxylate group) (COOR)时，所得的官能团是碳酸酯(OCOOR)。

包括本发明化合物的所有立体异构体，无论以混合物或纯的或大致纯的形式。这些化合物可在任何原子具有不对称中心。因此，化合物可以对映体或非对映体形式或其混合物存在。本发明包括任何外消旋物(即含有等量的各种对映体的混合物)、对映体富集的混合物(即对一种对映体富集的混合物)、绝对对映体或非对映体、或其任何混合物的应用。手性中心可命名为 R 或 S 或 R,S 或 d,D、l,L 或 d,l、D,L。包含氨基酸残基的化合物包括 D-氨基酸、L-氨基酸、或氨基酸的外消旋衍生物的残基。此外，本发明的数种化合物包含一个或多个双键。本发明意为包括所有结构和几何异构体，包括每次出现时独立地顺式、反式、E 和 Z 异构体。

本发明的一种或多种化合物可以盐存在。术语“盐”包括碱加成盐和酸加成盐，包括但不限于羧酸盐或与胺的氮形成的盐，且包括与以下讨论的有机和无机的阴离子和阳离子形成的盐。该术语进一步包括碱性基团(诸如氨基基团)与有机或无机酸的标准酸碱反应形成的盐。这种酸包括盐酸、氢氟酸、三氟乙酸、硫酸、磷酸、乙酸、琥珀酸、柠檬酸、乳酸、马来酸、富马酸、棕榈酸、胆酸、扑酸、粘酸、D-谷氨酸、D-樟脑酸、戊二酸、邻苯二甲酸、酒石酸、月桂酸、硬脂酸、水杨酸(salicylic)、甲磺酸、苯磺酸、山梨酸、苦味酸、苯甲酸、肉桂酸及类似酸。

术语“有机或无机阳离子”指羧酸盐的羧酸根阴离子的抗衡离子。抗

衡离子选自碱金属和碱土金属(诸如锂、钠、钾、钡、铝和钙); 铵和单-、二-和三-烷基胺诸如三甲胺、环己胺; 和有机阳离子, 诸如二苄基铵、苄基铵、2-羟基乙基铵、双(2-羟基乙基)铵、苄基乙基苄基铵、二苄基乙二铵(dibenzylethylenediammonium)和类似阳离子。见于例如, Berge 等人, *J. Pharm. Sci.* (1977), 66:1-19, 其通过引用并入本文。上述术语包括的其它阳离子包括普鲁卡因、奎宁和 N-甲基葡糖胺的质子化形式, 和诸如甘氨酸、鸟氨酸、组氨酸、苄基甘氨酸、赖氨酸和精氨酸等碱性氨基酸的质子化形式。而且, 还包括羧酸与氨基基团形成的本化合物的任何两性离子形式。

本发明还包括式 1 化合物或化合物 2-19 中任一种的溶剂合物及其盐。

“溶剂合物”指本发明化合物与一种或多种溶剂分子的物理缔合。该物理缔合包括不同程度的离子和共价键合, 包括氢键合。在某些情形中该溶剂合物能够分离。“溶剂合物”包括溶液相的和可分离的溶剂合物。合适的溶剂合物的非限制性例子包括乙醇盐、甲醇盐及类似物。“水合物”是一种溶剂合物, 其中溶剂分子是水。

本发明还包括式 1 化合物或化合物 2-19 中任一种的多晶型物及其盐。术语“多晶型物”指物质的特定晶态, 可由特定物理性质诸如 X-射线衍射、IR 光谱、熔点及类似性质来表征。

### 治疗应用

本发明提供有效抑制蛋白酪氨酸激酶的化合物和组合物。这些化合物和组合物可潜在地用于治疗与蛋白酪氨酸激酶改变的或异常的活性诸如蛋白酪氨酸激酶活性增强相关联的疾病。

因此, 在一个实施方式中, 本发明提供抑制蛋白酪氨酸激酶(PTK)的方法, 其包括使 PTK 与有效抑制量的式 1-19 任一表示的化合物接触。

本发明进一步提供治疗或预防受治疗者的蛋白酪氨酸激酶(PTK)的方法, 其包括向受治疗者施用治疗上有效量的式 1-19 表示的任何化合物的步骤。在另一个实施方式中, 该方法包括向受治疗者施用包含治疗上有效量的式 1-19 表示的任何化合物和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

本发明进一步提供抑制受治疗者的蛋白酪氨酸激酶(PTK)相关疾患的

方法,其包括向受治疗者施用治疗上有效量的式 1-19 表示的任何化合物的步骤。在另一个实施方式中,该方法包括向受治疗者施用包含治疗上有效量的式 1-19 表示的任何化合物和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

“蛋白酪氨酸激酶”(PTK)是一种蛋白,属于将 ATP 的  $\gamma$ -磷酸基转移到底物蛋白上酪氨酸残基的侧链的一个酶家族。PTK 牵涉多种关键的细胞过程,包括信号传导和生长调节。本文所用的蛋白酪氨酸激酶指受体酪氨酸激酶(RTK)以及细胞酪氨酸激酶(CTK 或非受体酪氨酸激酶)。因此本发明的化合物有效抑制受体和非受体蛋白酪氨酸激酶。

细胞酪氨酸激酶(CTK 或非受体酪氨酸激酶)是一种细胞内蛋白,其参与细胞中的信号传导,包括向核的信号传导。CTK 的例子是癌蛋白质的 Src 家族。受体酪氨酸激酶(RTK)是参与跨膜信号转导途径的跨膜蛋白。一些受体酪氨酸激酶的主要生物活性是刺激细胞生长和增殖,而另一些受体酪氨酸激酶参与阻止生长和促进分化。RTK 包括血小板源性生长因子(PDGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、肝细胞生长因子(HGF)、胰岛素、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、神经生长因子(NGF)、血管内皮生长因子(VEGF)和巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)的受体。

本文所用的术语“蛋白酪氨酸激酶相关疾患”指特征为 PTK 活性异常或改变的疾患。活性异常或改变进一步指(i)在通常不表达 PTK 的细胞中 PTK 过表达;(ii)PTK 表达增加导致不必要的细胞增殖、分化和/或生长;或(iii)PTK 表达减少导致不必要的细胞增殖、分化和/或生长下降。PTK 的过度活性指编码特定 PTK 的基因的扩增或产生可与细胞增殖、分化和/或生长相关的 PTK 活性水平。过度活性也可由作为突变诸如 PTK 负责配体结合的片段缺失的结果的配体独立性或组成型活化造成。

因此,在一个实施方式中,本发明涉及含有式 1-19 表示的任何化合物的制剂,其通过影响蛋白酪氨酸激酶的酶促活性,从而干涉这种蛋白介导的信号传导途径来调节 PTK 活性信号传导。

蛋白酪氨酸激酶相关疾患的例子是细胞增殖疾患、代谢疾患或纤维变性疾患和炎症。

蛋白酪氨酸激酶介导的细胞增殖疾患的例子是癌症、银屑病、糖尿病性肾病、血管增生疾患和肾小球膜(mesangia)细胞增殖疾患。

癌症是一种疾患，其中细胞群体已经以不同程度变得对通常管理增殖和分化的控制机制不响应。癌症指各种类型的恶性肿瘤和肿瘤，包括向不同位置的转移(metastasis)。可由式 1-19 表示的任何化合物治疗的癌症的非限制性例子是表现 PTK 活性改变的脑癌、卵巢癌、结肠癌、前列腺癌、肾癌、膀胱癌、乳腺癌、肺癌、口和皮肤癌。本发明化合物可有效治疗或预防的癌症的具体例子是：腺癌、肾上腺肿瘤、成釉细胞瘤、退行发育性肿瘤、甲状腺细胞的退行发育性癌、血管纤维瘤、血管瘤、血管肉瘤、胺前体摄取脱羧化细胞瘤、嗜银细胞瘤、男性细胞瘤、腹水瘤细胞、腹水瘤、成星形细胞瘤、星形细胞瘤、共济失调性毛细血管扩张、心房粘液瘤、基底细胞癌、良性瘤、骨癌、骨瘤、脑干神经胶质瘤、脑瘤、乳腺癌、伯基特淋巴瘤、癌瘤、小脑星形细胞瘤、子宫颈癌、樱桃状血管瘤、胆管癌、胆管瘤、成软骨细胞瘤、软骨瘤、软骨肉瘤、成绒毛膜细胞瘤、绒毛膜癌、结肠癌、常见急性淋巴母细胞性白血病、颅咽管瘤、囊性癌、囊性纤维瘤、囊瘤、细胞瘤、原位导管癌、导管乳头状瘤、无性细胞瘤、脑瘤、子宫内膜癌、内皮瘤、室管膜瘤、上皮癌、红白血病、尤因肉瘤、结外淋巴瘤、猫肉瘤、纤维腺瘤、纤维肉瘤、甲状腺滤泡癌、神经节神经胶质瘤、胃泌素瘤、多形性成胶质细胞瘤、神经胶质瘤、成性腺细胞瘤、成血管细胞瘤、成血管内皮细胞瘤、血管内皮瘤、血管外皮细胞瘤、血淋巴管瘤(haematolymphangioma)、成血细胞瘤(haemocytoblastoma)、血细胞瘤(haemocytoma)、毛细胞性白血病、错构瘤、肝癌、肝细胞癌、肝细胞瘤、组织瘤、霍奇金病、肾上腺样瘤、浸润癌、浸润导管细胞瘤、胰岛素瘤、幼年血管纤维瘤、卡波西肉瘤、肾瘤、大细胞淋巴瘤、白血病、慢性白血病、急性白血病、脂肪瘤、肝癌、肝转移、吕克癌、淋巴腺瘤、淋巴管瘤、淋巴细胞性白血病、淋巴细胞性淋巴瘤、淋巴细胞瘤、淋巴管性水肿、淋巴瘤、肺癌、恶性间皮瘤、恶性畸胎瘤、肥大细胞瘤、成神经管细胞瘤、黑素瘤、脑脊膜瘤、间皮瘤、转移癌、Morton 神经瘤、多发性骨髓瘤、成髓细胞瘤、髓细胞性白血病、髓脂肪瘤、骨髓瘤、成肌细胞瘤、粘液瘤、鼻咽癌、肾胚细胞瘤、成神经细胞瘤、神经纤维瘤、神经纤维瘤病、神经

胶质瘤、神经瘤、非霍奇金淋巴瘤、少突神经胶质瘤、视神经胶质瘤、骨软骨瘤、成骨肉瘤、骨肉瘤、卵巢癌、乳头佩吉特氏病、肺上沟瘤(pancoast tumor)、胰腺癌、嗜铬细胞瘤(phaeochromocytoma)、嗜铬细胞瘤(pheochromocytoma)、浆细胞瘤、原发性脑瘤、突变瘤、泌乳素瘤、肾细胞癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤(rhabdomyosarcoma)、横纹肌肉瘤(rhabdosarcoma)、实体瘤、肉瘤、继发性瘤、精原细胞瘤、皮肤癌、小细胞癌、鳞状细胞癌、草莓样血管瘤、T-细胞淋巴瘤、畸胎瘤、睾丸癌、胸腺瘤、滋养层瘤、致肿瘤性(tumorigenic)、前庭神经鞘瘤、肾母细胞瘤(Wilm's tumor)或其组合。

血管增生疾患指通常导致血管异常增殖的血管生成(angiogenic)和血管发生疾患。血管的形成和扩展或者血管发生和血管生成分别地在多种生理过程诸如胚胎发育、黄体形成、创伤愈合和器官再生中起重要作用,以及在癌症发展中起关键作用。血管增生疾患的其它例子包括关节炎和眼部疾病,诸如糖尿病性视网膜病、再狭窄、视网膜病和动脉粥样硬化。

肾小球膜细胞增殖疾患指由肾小球膜细胞异常增殖引起的疾患。肾小球膜增殖疾患包括各种人类肾病,诸如肾小球肾炎、糖尿病性肾病、恶性肾硬化、血栓形成性(thrombotic)微血管病综合征、移植排斥和肾小球病。在这方面,PDGFR已经牵涉在肾小球膜细胞增殖的维持中。

牵涉异常PTK活性的代谢疾患包括银屑病、糖尿病、创伤愈合、炎症和神经变性疾病。例如,角膜和真皮创伤愈合中已经指示EGFR。II型糖尿病中指示胰岛素-R和IGF-1R受体的缺陷。

纤维变性疾患指细胞外基质的异常形成。纤维变性疾患的例子包括肝硬化和肾小球膜细胞增殖疾患。肝硬化的特征是细胞外基质组分增加,导致形成肝的疤痕。

本文所用的术语“治疗”指消除、抑制、减缓或逆转疾病进程、改善疾病的临床症状或阻止疾病的临床症状出现。术语“预防”本文定义为阻止受治疗者获得疾患或疾病。

本文所用的术语“施用”指以一种方式使本发明化合物与靶蛋白酪氨

酸激酶在一起的方法，以该方式酪氨酸磷酸化抑制剂可直接（即通过与激酶本身相互作用）或间接地（即通过与酶的催化活性所依赖的另一分子相互作用）影响酪氨酸激酶的催化活性。如本文所用的，施用可在体外实现，即在试管中，或在体内实现，即在活体有机体例如人类的细胞或组织中。在一个实施方式中，本发明包括向受治疗者施用本发明化合物。

本文所用的术语“接触”指在如上定义的体内条件或体外条件下使蛋白酪氨酸激酶与本文定义的化合物接触。

术语“治疗上有效量”指被施用以缓解被治疗疾患的一种或多种症状到某一程度的化合物的量。本文描述的式 1-19 表示的任何化合物的治疗有效剂量最初可从细胞培养物和/或动物模型估计。可在动物模型配制剂量，且该剂量可用于更准确地确定对人类的有用剂量。

术语“有效抑制量”指被施用以抑制所接触的蛋白酪氨酸激酶到某一程度的化合物的量。

#### **药物组合物：**

本发明进一步提供包含式 1-19 结构表示的任何化合物和药学上可接受的载体或赋形剂的药物组合物。

如本文所用，“药物组合物”指治疗上有效量的本发明化合物连同适合的稀释剂、防腐剂、增溶剂、乳化剂、佐剂和/或载体。本文所用的“治疗上有效量”指对于给定病状和施用计划提供治疗效果的量。这种组合物是液态或冻干的或以其它方式干燥的制剂，并包括各种缓冲剂成分(例如 Tris-HCl、乙酸盐、磷酸盐)、pH 和离子强度的稀释液；添加剂诸如白蛋白或明胶以防止吸附到表面；洗涤剂(例如 Tween 20、Tween 80、Pluronic F68、胆汁酸盐)、增溶剂(例如甘油、聚乙烯甘油)、抗氧化剂(例如抗坏血酸、焦亚硫酸钠)、防腐剂(例如乙基汞硫代水杨酸钠 (Thimerosal)、苯甲醇、对羟基苯甲酸酯类)、填充物质或张力调节剂(例如乳糖、甘露醇)；共价连接聚合物诸如聚乙二醇于蛋白、与金属离子络合、或将材料并入聚合化合物(诸如聚乳酸、聚乙醇酸(polglycolic acid)、水凝胶等)微粒制剂之内或之上，或并入脂质体、微乳、胶束、单层或多层囊泡、红细胞血影或球

状体之上。这种组合物将会影响物理状态、溶解度、稳定性、体内释放速率和体内清除速率。控释或持续释放组合物包括亲脂贮库(depot) (例如脂肪酸、蜡、油)中的制剂。

本发明进一步包括以聚合物(例如泊洛沙姆或泊洛沙胺(poloxamine))包衣的微粒组合物。本发明的组合物的其它实施方式包括微粒形式、保护性包衣、蛋白酶抑制剂或用于各种施用途径(包括肠胃外、肺、鼻和口)的渗透增强剂。在一个实施方式中药物组合物被肠胃外、癌旁(paracancerally)、跨粘膜、经皮、肌内、静脉内、皮内、皮下、腹膜内、心室内、颅内或肿瘤内地施用。

而且,本文所用的“药学上可接受的载体”对本领域技术人员是熟知的,且包括但不限于0.01-0.1 M和优选地0.05 M的磷酸盐缓冲液或0.8%盐水。此外,这种药学上可接受的载体可为水溶液或非水溶液、悬浮液和乳液。非水溶剂的例子是丙二醇、聚乙二醇、诸如橄榄油的植物油、和诸如油酸乙酯的可注射有机酯。水性载体包括水、醇/水溶液、乳液或悬浮液,包括盐水和缓冲介质。

肠胃外媒介物包括氯化钠溶液、葡萄糖林格氏液(Ringer's dextrose)、葡萄糖和氯化钠、乳酸林格氏液(lactated Ringer's)或不挥发油。静脉内媒介物包括液体和营养补充剂、电解质补充剂,诸如基于葡萄糖林格氏液的补充剂,及类似物。还可存在防腐剂和其它添加剂,诸如例如,抗微生物剂、抗氧化剂、调整剂(collating agent)、惰性气体及类似物。

控释或持续释放组合物包括亲脂贮库(例如脂肪酸、蜡、油)中的制剂。本发明还包括以聚合物(例如泊洛沙姆或泊洛沙胺)包衣的微粒组合物且化合物偶合于针对组织特异性受体、配体或抗原的抗体或偶合于组织特异性受体的配体。

本发明的组合物的其它实施方式包括微粒形式、保护性包衣、蛋白酶抑制剂或用于各种施用途径(包括肠胃外、肺、鼻和口)的渗透增强剂。

已知通过共价连接于水溶性聚合物(诸如聚乙二醇、聚乙二醇与聚丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮或聚脯

氨酸)而修饰的化合物在静脉内注射后表现出比相应的未修饰化合物实质上更长的血液半衰期。这种修饰还可增加化合物在水溶液中的溶解度、消除聚集、增强化合物的物理和化学稳定性、并大大减少化合物的免疫原性和反应性。因此,可通过以与未修饰的化合物相比更低的频率或更低的剂量施用这种聚合物-化合物加合物(abduct)而实现期望的体内生物活性。

在又另一实施方式中,可以控释系统递送药物组合物。例如,可使用静脉内输注、可植入的渗透泵、经皮贴片、脂质体或其它施用方式施用药剂。在一个实施方式中,可使用泵(参见例如 Saudek 等人, *N. Engl. J. Med.* (1989), **321**:574-579。在另一实施方式中,可使用聚合物材料。在又另一实施方式中,可将控释系统置于靠近治疗目标(即脑),从而只需要系统剂量的一部分(参见例如, Goodson, *Medical Applications of Controlled Release(控释的医疗应用)*, 上述(1984), **2**:115-138。优选地,将控释装置引入受治疗者中靠近不适当的免疫活化位置或肿瘤处。其它控释系统讨论于 Langer, *Science* (1990), **249**: 1527-1533 的综述)。

药物制剂可仅包含式 1-19 的一种或多种化合物,或可进一步包含药学上可接受的载体,且可为固态或液态形式,诸如片剂、粉末、胶囊、小丸 (pellet)、溶液、悬浮液、酞剂、乳剂、凝胶、乳霜或栓剂(包括直肠和尿道栓剂)。药学上可接受的载体包括树胶、淀粉、糖、纤维素材料和其混合物。含有选择性雄激素受体调节剂的药物制剂可通过例如,皮下植入小丸来施用于受治疗者;在进一步实施方式中,该小丸提供选择性雄激素受体调节剂在一段时间内的控释。该制剂还可由静脉内、动脉内或肌肉内注射液态制剂,口服施用液态或固态制剂,或由局部应用而施用。还可通过使用直肠栓剂或尿道栓剂实现施用。

本发明的药物制剂可通过已知的溶解、混合、粒化或形成片剂的工艺而制备。对于口服施用,将选择性雄激素受体调节剂或其生理上耐受的衍生物诸如盐、酯、N-氧化物及类似物与惯用于该目的的添加剂(诸如媒介物、稳定剂或惰性稀释剂)混合,并由惯用方法转变为适合施用的形式,诸如片剂、包衣片剂、硬或软明胶胶囊、水性、醇性或油性溶液。适合的惰性媒介物的例子是诸如乳糖、蔗糖或玉米淀粉的常规片剂基质联合粘合剂诸如

阿拉伯胶、玉米淀粉、明胶，或联合崩解剂诸如玉米淀粉、马铃薯淀粉、海藻酸，或联合润滑剂诸如硬脂酸或硬脂酸镁。

适合的油性媒介物或溶剂的例子是植物油或动物油诸如葵花油或鱼肝油。制剂可实现为干的和湿的颗粒。对于肠胃外施用(皮下、静脉内、动脉内或肌肉注射)，将本发明化合物或其生理上耐受的衍生物诸如盐、水合物及类似物转化为溶液、悬浮液或乳液，如果需要则使用为此目的惯用和适合的物质，例如增溶剂或其它助剂。例子是无菌液体诸如水和油，加入或不加入表面活性剂和其它药学上可接受的佐剂。示例性油是石油、动物、植物或合成来源的油，例如花生油、大豆油或矿物油。总之，水、盐水、葡萄糖水溶液和相关的糖溶液、和二醇类诸如丙二醇或聚乙二醇是优选的液态载体，尤其是用于可注射的溶液。

含有活性组分的药物组合物的制备是本领域充分了解的。通常，这种组合物制备为递送于鼻咽的多肽气溶胶或为液态溶液或悬浮液的注射液，然而还可制备为适于在注射前溶解或悬浮于液体中的固态形式。制剂还可为乳化的。活性治疗成分通常与药学上可接受的和与活性成分相容的赋形剂混合。适合的赋形剂是例如，水、盐水、葡萄糖、甘油、乙醇或类似物及其组合。

此外，如果期望，组合物可含有微量辅助物质，诸如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂，其增强活性成分的效力。

活性组分可以中和的药学上可接受的盐形式配制为组合物。药学上可接受的盐包括酸加成盐(与多肽或抗体分子的自由氨基基团形成)，其与无机酸诸如例如，盐酸或磷酸，或有机酸如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸及类似物形成。从自由羧基基团形成的盐还可衍生自无机碱诸如例如，氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁，和有机碱如异丙胺、三甲胺、2-乙基氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因及类似物。

对于局部施用于体表，使用例如乳霜、凝胶、滴剂及类似物，制备本发明化合物或其生理上耐受的衍生物诸如盐、水合物及类似物，并以在生理上可接受的稀释剂中的溶液、悬浮液或乳液施用，带有或不带有药物载体。

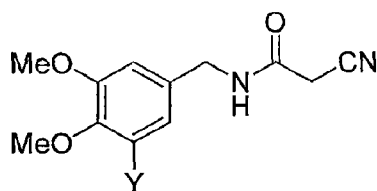
在另一实施方式中，活性化合物可以囊泡递送，尤其是脂质体(参见例如 Langer, *Science* (1990), **249**:1527-1533; Treat 等人, *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*(感染性疾病和癌症疗法中的脂质体) (1989), Lopez-Berestein 和 Fidler (编辑), Liss, NY, 353-365。

展示以下实施例以便更完全地说明本发明的某些实施方式。然而，它们决不应被解释为对本发明宽范围的限制。本领域技术人员可易于设想本文公开的原理的许多变化和修改而不偏离本发明的范围。

### 实施例 1: 合成

合成化合物 6-8、11-13 和 15-17 的一般程序图解性地绘于图 1，并在下文公开：

合成如下标号的中间化合物的一般程序：(i) 其中 Y=H，(ii) 其中 Y=OMe 以及(iii) 其中 Y=Br：



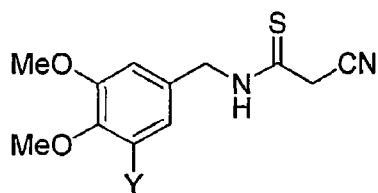
在室温搅拌胺(1.2 当量)和氰基乙酸甲酯(1 当量)直到观察到产物沉淀。过滤收集产物，以乙醇洗涤两次，并在减压下干燥。获得为白色固体的产物，产率 70-80%。

对于化合物(i)： $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$  中)： $\delta$  6.85 (m, 3H), 6.3 (bs, 1H), 4.41 (d,  $J=6.0$  Hz, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.40 (s, 2H). MS (ESI): 测量值 (m/z) 235.67; 对  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$  计算 [请核实] ( $\text{MH}^+$ ) 235.25.

对于化合物(ii)： $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$  中)： $\delta$  6.49 (s, 2H), 6.37 (bs, 1H), 4.40 (d,  $J=4.4$  Hz, 2H), 3.86 (s, 6H), 3.84 (s, 3H), 3.43 (s, 2H). MS (ESI): 测量值 (m/z) 265.60; 对  $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_4$  计算 ( $\text{MH}^+$ ) 265.11.

对于化合物(iii)： $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$  中)： $\delta$  7.04 (s, 1H), 6.79 (s, 1H), 4.39 (d,  $J=6.0$  Hz, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.45 (s, 2H).

合成如下标号的中间化合物的一般程序: (iv) 其中 Y=H, (v) 其中 Y=OMe 以及(vi) 其中 Y=Br:



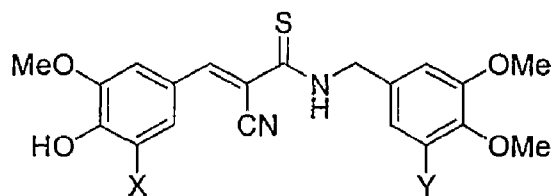
在回流下加热无水甲苯(大约 2 mL/mmol 化合物(i-iii))中的酰胺(1 当量)和拉韦松试剂(Lawesson's reagent) (0.55 当量)3 小时(直到 TLC 指示酰胺消失)。冷却反应混合物并在减压下蒸发。以快速色谱法纯化残余物以产生浅黄色固体, 产率 50-60%。

对于化合物(iv):  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ +丙酮- $\text{d}_6$  中):  $\delta$  9.20 (bs, 1H), 6.84 (m, 2H), 6.78 (d,  $J=8$  Hz, 1H) 4.71 (d,  $J=5.1$  Hz, 2H), 3.89 (s, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.80 (s, 3H). MS (CI): 测量值 (m/z) 251.43; 对  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$  计算 ( $\text{MH}^+$ ) 250.32.

对于化合物(v):  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz, 丙酮- $\text{d}_6$  中):  $\delta$  9.20 (bs, 1H), 6.72 (s, 2H), 4.77 (d,  $J=5.2$  Hz, 2H), 4.06 (s, 2H), 3.80 (s, 6H), 3.71 (s, 3H). MS (CI): 测量值 (m/z) 281.51; 对  $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$  计算 ( $\text{MH}^+$ ) 281.34.

对于化合物(vi):  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$  中):  $\delta$  7.08 (s, 1H), 6.82 (s, 1H), 4.78 (d,  $J=5.2$  Hz, 2H), 3.98 (s, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.87 (s, 3H).

合成如下标号的中间化合物的一般程序: (vii) 其中 X=Br 和 Y=H, (viii) 其中 X=I 和 Y=H, (ix) 其中 X=F 和 Y=OMe, (x) 其中 X=Cl 和 Y=OMe, (xi) 其中 X=Br 和 Y=OMe, (xii) 其中 X=I 和 Y=OMe, (xiii) 其中 X= $\text{CF}_3$  和 Y=OMe, (xiv) 其中 X=Br 和 Y=Br, 以及(xv) 其中 X=OMe 和 Y=Br:



将催化量的  $\beta$ -丙氨酸(0.2 当量)加至  $\beta$ -氰基硫代酰胺(1 当量)和醛((1.2

当量)为商业可得的,除了 3,4-二甲氧基-5-(三氟甲基)苯甲醛,其根据 Backstrom 等人, *J. Med. Chem.* (1989), **32**:841-846 制备)的乙醇(大约 20 mL/mmol 化合物(iv-vi))溶液。将溶液加热至 60℃持续 0.5 小时至过夜。沉淀、过滤收集产物,以 H<sub>2</sub>O、EtOH 和醚洗涤,随后在减压下干燥以产生纯的黄色固体,以 70%至定量的产率。

**对于化合物(vii):** <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub> 中): δ 8.69 (s, 1H), 7.95 (bt, 1H), 7.70 (d, *J*= 2.0 Hz, 1H), 7.67 (d, *J*= 2.0 Hz, 1H), 6.91 (m, 3H), 4.94 (d, *J*= 5.0 Hz, 2H), 3.98 (s, 3H), 3.90 (s, 6H).

**对于化合物(viii):** <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub> 中): δ 8.67 (s, 1H), 7.95 (bt, 1H), 7.86 (d, *J*= 2.0 Hz, 1H), 7.72 (d, *J*= 2.0 Hz, 1H), 6.92 (m, 3H), 4.94 (d, *J*= 5.2 Hz, 2H), 3.98 (s, 3H), 3.90 (s, 6H).

**对于化合物(ix):** <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 丙酮-d<sub>6</sub> 中): δ 9.60 (bs, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.55 (m, 3H), 6.81 (s, 1H), 4.98 (s, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.83 (s, 6H), 3.73 (s, 3H).

**对于化合物(x):** <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub> 中): δ 8.69 (s, 1H), 7.99 (bt, 1H), 7.58 (d, *J*= 2.0 Hz, 1H), 7.55 (d, *J*= 2.0 Hz, 1H), 6.60 (s, 1H), 4.92 (d, *J*= 5.2 Hz, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.87 (s, 6H), 3.84 (s, 3H).

**对于化合物(xi):** <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, 丙酮-d<sub>6</sub> 中): δ 9.62 (bt, 1H), 8.21 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 6.79 (s, 2H), 4.96 (m, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.81 (s, 6H), 3.71 (s, 3H). MS (CI): 测量值 (*m/z*) 494.73; 对 C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S 计算 (MH<sup>+</sup>) 494.37.

**对于化合物(xii):** <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub> 中): δ 8.66 (s, 1H), 7.99 (bt, 1H), 7.86 (d, *J*= 2.0 Hz, 1H), 7.72 (d, *J*= 2.0 Hz, 1H), 6.60 (s, 2H), 4.93 (d, *J*= 5.0 Hz, 2H), 3.97 (s, 3H), 3.88 (s, 6H), 3.86 (s, 3H). MS (CI): 测量值 (*m/z*) 540.67; 对 C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>IN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S 计算 (M<sup>+</sup>) 540.37.

**对于化合物(xiii):** <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub> 中): δ 8.75 (s, 1H), δ 8.22 (bt, 1H), 7.91 (d, *J*= 2.0 Hz, 1H), 7.69 (d, *J*= 2.0 Hz, 1H), 6.61 (s, 2H), 4.94 (d, *J*= 5.0 Hz, 2H), 4.03 (s, 3H), 3.88 (s, 6H), 3.86 (s, 3H).

对于化合物(xiv):  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 丙酮- $\text{d}_6$ + $\text{CDCl}_3$  中):  $\delta$  9.30 (bt, 1H), 8.43 (s, 1H), 7.72 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 7.17 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 7.07 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 5.01 (d,  $J=4.4$  Hz, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.81 (s, 3H).

对于化合物(xv):  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$  中):  $\delta$  8.74 (s, 1H), 8.00 (bt, 1H), 7.34 (s, 2H), 7.14 (s, 1H), 6.90 (s, 1H), 4.96 (d,  $J=4.5$  Hz, 2H), 3.96 (s, 6H), 3.88 (s, 3H), 3.86 (s, 3H).

#### 合成化合物 6-8、11-13、15-17 的一般程序:

将三溴化硼(对各羟基基团 1.5 当量过量)加至受保护产物在无水  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (大约 20 mL/mmol 化合物(vii-xv))中的冷溶液。使反应混合物升温至室温并搅拌 2-4 小时(直到 HPLC 指示形成期望的脱保护产物)。冷却溶液, 随后以稀盐酸处理。以乙酸乙酯萃取溶液三次, 有机层经  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥, 过滤并蒸发溶剂。从水/乙醇重结晶粗产物以获得黄色固体, 产率 60-70%。

对于化合物 6:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 丙酮- $\text{d}_6$  中):  $\delta$  9.45 (bs, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.69 (d,  $J=2.1$  Hz, 1H), 7.66 (d,  $J=2.1$  Hz, 1H), 7.11 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 6.97 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 4.90 (d,  $J=5.4$  Hz, 2H). MS (ESI): 测量值 (m/z) 498.73; 对  $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{Br}_2\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$  计算 ( $\text{MH}^+$ ) 498.88.

对于化合物 7:  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, 丙酮- $\text{d}_6$  中): 9.48 (bs, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.66 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 7.63 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 6.46 (s, 2H), 4.79 (d,  $J=5.7$  Hz, 2H). MS (ESI): 测量值 (m/z) 438.40; 对  $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{BrN}_2\text{O}_5\text{S}$  计算 ( $\text{MH}^+$ ) 438.26.

对于化合物 8:  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, 丙酮- $\text{d}_6$  中):  $\delta$  9.42 (bs, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.91 (d,  $J=2.1$  Hz, 1H), 7.64 (d,  $J=2.1$  Hz, 1H), 6.47 (s, 2H), 4.79 (d,  $J=5.5$  Hz, 2H). MS (ESI): 测量值 (m/z) 484.80; 对  $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{IN}_2\text{O}_5\text{S}$  计算 ( $\text{M}^+$ ) 484.96.

对于化合物 11:  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, 丙酮- $\text{d}_6$  中):  $\delta$  9.42 (bs, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.61 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 7.49 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 6.47 (s, 2H), 4.80 (d,  $J=4.6$  Hz, 2H). MS (ESI): 测量值 (m/z) 393.07; 对  $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{ClN}_2\text{O}_5\text{S}$  计算 ( $\text{MH}^+$ )

393.81.

对于化合物 12:  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, 丙酮- $\text{d}_6$  中):  $\delta$  9.47 (bs, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.88 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 7.45 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 6.47 (s, 2H), 4.81 (d,  $J=5.4$  Hz, 2H).

对于化合物 13:  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, 丙酮- $\text{d}_6$  中):  $\delta$  9.47 (bs, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.80 (d,  $J=2.1$  Hz, 1H), 7.71 (d,  $J=2.1$  Hz, 1H), 6.48 (s, 2H), 4.79 (d,  $J=5.4$  Hz, 2H). MS (ESI): 测量值 ( $m/z$ ) 427.33; 对  $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$  计算 ( $\text{MH}^+$ ) 427.37.

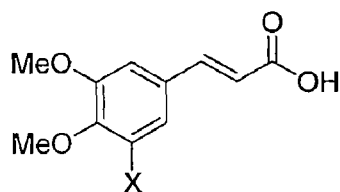
对于化合物 15:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 丙酮- $\text{d}_6$  中):  $\delta$  9.40 (bs, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.82 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 7.72 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 6.93 (m, 1H), 6.79 (m, 2H), 4.86 (d,  $J=5.4$  Hz, 2H). MS (ESI): 测量值 ( $m/z$ ) 422.80; 对  $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{BrN}_2\text{O}_4\text{S}$  计算 ( $\text{MH}^+$ ) 422.27.

对于化合物 16:  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, 丙酮- $\text{d}_6$  中):  $\delta$  9.40 (bs, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.82 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 7.68 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.78 (s, 2H), 4.86 (d,  $J=5.7$  Hz, 2H). MS (ESI): 测量值 ( $m/z$ ) 468.67; 对  $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{IN}_2\text{O}_4\text{S}$  计算 ( $\text{M}^+$ ) 468.27.

对于化合物 17:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 丙酮- $\text{d}_6$  中):  $\delta$  9.45 (bs, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.15 (s, 2H), 7.08 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 6.94 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 4.90 (d,  $J=5.0$  Hz, 2H). MS (ESI): 测量值 ( $m/z$ ) 437.67; 对  $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{BrN}_2\text{O}_5\text{S}$  计算 ( $\text{M}^+$ ) 437.26.

合成化合物 5、9-10、14 和 18 的一般程序图解性地绘于图 2, 并在下文公开:

合成如下标号的中间化合物的一般程序: (xvi) 其中  $\text{X}=\text{Br}$ , (xvii) 其中  $\text{X}=\text{I}$ , 以及(xviii) 其中  $\text{X}=\text{CF}_3$ :



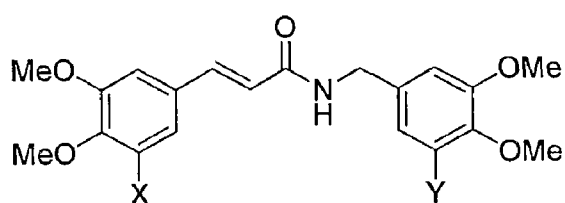
将催化量的哌啶(0.2 当量)加至醛((1 当量) 为商业可得的, 除了 3,4-二甲氧基-5-(三氟甲基)苯甲醛, 其根据 Backstrom 等人, *J. Med. Chem.* (1989), 32:841-846 制备)和丙二酸(1.5 当量)的吡啶溶液。将反应混合物加热至 120℃持续 6 小时。将溶液冷却至室温并逐滴加入浓 HCl 至 pH<3。过滤收集白色固体, 以水洗涤并在减压下干燥。

对于化合物(xvi):  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$  中):  $\delta$  7.65 (d,  $J=15.9$  Hz), 7.35 (d,  $J=2.1$  Hz, 1H), 7.01 (d,  $J=2.1$  Hz, 1H), 6.35 (d,  $J=15.9$  Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.88 (s, 3H).

对于化合物(xvii):  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$  中):  $\delta$  7.64 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 7.56 (d,  $J=2.0$  Hz), 7.04 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 6.35 (d,  $J=16.0$  Hz, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.88 (s, 3H).

对于化合物(xviii):  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$  中):  $\delta$  7.63 (d,  $J=16$  Hz), 7.61 (s, 1H), 7.43 (s, 1H), 6.50 (d,  $J=16$  Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.88 (s, 3H).

合成如下标号的中间化合物的一般程序: (xix) 其中 X=Br 和 Y=OMe, (xx) 其中 X=I 和 Y=OMe, (xxi) 其中 X=CF<sub>3</sub> 和 Y=OMe 以及(xxii) 其中 X=Br 和 Y=Br:



在室温搅拌化合物(xvi-xviii, 1 当量)的草酰氯(4 当量)溶液 1-2 小时。蒸馏出过量的草酰氯并将混合物蒸发至干燥。将残余物溶解于  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  中并逐滴加至胺(0.85 当量)和  $\text{Et}_3\text{N}$ (4 当量)的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  溶液。在室温搅拌反应混合物 0.5-1 小时(直到 TLC 指示胺消失)。在减压下蒸发溶剂并以快速色谱法纯化剩余的油。

对于化合物(xix):  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$  中):  $\delta$  7.52 (d,  $J=15.8$  Hz, 1H), 7.29 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.50 (s, 2H), 6.37 (d,  $J=15.8$  Hz, 1H), 6.23 (bt, 1H), 4.46 (d,  $J=5.7$  Hz, 2H), 3.81-3.85 (s, 15H). MS (ESI): 测量值 (m/z)

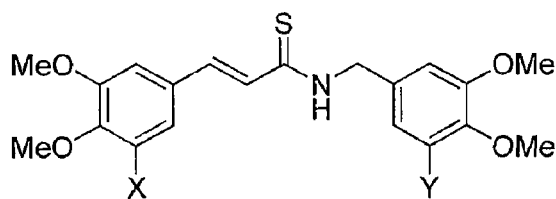
467.87; 对  $C_{21}H_{25}BrNO_6$  计算 ( $MH^+$ ) 466.32.

对于化合物(xx):  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$  中):  $\delta$  7.51 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 7.50 (d,  $J=15.6$  Hz), 6.96 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 6.51 (s, 2H), 6.35 (d,  $J=15.6$  Hz, 1H), 6.10 (bt,  $J=5.2$  Hz, 1H), 4.47 (d,  $J=5.2$  Hz, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.84 (s, 3H) 3.82 (s, 6H), 3.81 (s, 3H).

对于化合物(xxi):  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$  中):  $\delta$  7.52 (d,  $J=15.8$  Hz, 1H), 7.29 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.50 (s, 2H), 6.37 (d,  $J=15.8$  Hz, 1H), 6.23 (bt, 1H), 4.46 (d,  $J=5.7$  Hz, 2H), 3.81-3.85 (s, 15H). MS (ESI): 测量值 ( $m/z$ ) 467.87; 对  $C_{21}H_{25}BrNO_6$  计算 ( $MH^+$ ) 466.32.

对于化合物(xxii):  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ +丙酮- $d_6$  中): 8.56 (bt,  $J=6.0$  Hz, 1H), 7.39 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H),  $\delta$  7.38 (d,  $J=15.6$  Hz, 1H), 7.28 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 7.09 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 7.05 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 6.68 (d,  $J=15.6$  Hz, 1H), 4.32 (d,  $J=6.0$  Hz, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.67 (s, 3H). MS (ESI): 测量值 ( $m/z$ ) 467.87; 对  $C_{21}H_{25}BrNO_6$  计算 ( $MH^+$ ) 466.32.

合成如下标号的化合物的一般程序: 5 其中  $X=Br$  和  $Y=OMe$ , (xxiii) 其中  $X=I$  和  $Y=OMe$ , (xxiv) 其中  $X=CF_3$  和  $Y=OMe$ , 以及(xxv) 其中  $X=Br$  和  $Y=Br$ :



将酰胺(1当量)和拉韦松试剂(0.55当量)在甲苯中回流3小时(直到TLC指示酰胺消失)。冷却反应混合物并在减压下蒸发。以快速色谱法纯化残余物以产生浅黄色固体, 产率 50-60%。

对于化合物 5:  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$  中):  $\delta$  7.75 (d,  $J=15.3$  Hz, 1H), 7.41 (d,  $J=2.1$  Hz, 1H), 7.29 (d,  $J=2.1$  Hz, 1H), 7.16 (d,  $J=15.3$  Hz, 1H), 6.76 (s, 2H), 4.90 (m, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.77 (s, 6H), 3.70 (s, 3H). MS (ESI): 测量值 ( $m/z$ ) 483.87; 对  $C_{21}H_{25}BrNO_5S$  计算 ( $MH^+$ ) 483.38.

对于化合物(xxiii):  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$  中):  $\delta$  7.71 (d,  $J=15.2$  Hz, 1H), 7.6 (bt, 1H), 7.56 (d,  $J=1.8$  Hz, 1H), 7.01 (d,  $J=1.8$  Hz, 1H), 6.78 (d,  $J=15.2$  Hz, 1H), 6.55 (s, 2H), 4.86 (d,  $J=5.0$  Hz, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.83 (s, 6H), 3.82 (s, 3H).

对于化合物(xxiv):  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$  中):  $\delta$  7.75 (d,  $J=15.3$  Hz, 1H), 7.41 (d,  $J=2.1$  Hz, 1H), 7.29 (d,  $J=2.1$  Hz, 1H), 7.16 (d,  $J=15.3$  Hz, 1H), 6.76 (s, 2H), 4.90 (m, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.77 (s, 6H), 3.70 (s, 3H). MS (ESI): 测量值 ( $m/z$ ) 483.87; 对  $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{BrNO}_5\text{S}$  计算 ( $\text{MH}^+$ ) 483.38.

对于化合物(xxv):  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$  中):  $\delta$  7.74 (d,  $J=15.2$  Hz, 1H), 7.52 (bt, 1H), 7.37 (d,  $J=1.9$  Hz, 1H), 7.15 (d,  $J=1.9$  Hz, 1H), 7.01 (d,  $J=1.9$  Hz, 1H), 6.89 (d,  $J=1.9$  Hz, 1H), 6.78 (d,  $J=15.2$  Hz, 1H), 4.92 (d,  $J=5.3$ , 2H), 3.91 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.87 (s, 3H).

#### 合成化合物 9-10、14 和 18 的一般程序:

将三溴化硼(对各羟基基团 1.5 当量过量)加入受保护产物在无水  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (大约 20 mL/mmol 化合物 5 和(xxiii-xxv))中的冷溶液。使反应混合物升温至室温并搅拌 2-4 小时(直到 HPLC 指示形成了期望的脱保护产物)。冷却溶液随后用稀盐酸处理。用乙酸乙酯萃取溶液三次, 合并的有机层经  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥并在减压下蒸发。从水/乙醇重结晶粗产物以获得期望产物, 产率 60-70%。

对于化合物 9:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 丙酮- $\text{d}_6$  中):  $\delta$  9.16 (bs, 1H), 7.69 (d,  $J=15.4$  Hz, 1H), 7.31 (d,  $J=1.9$  Hz, 1H), 7.09 (d,  $J=1.9$  Hz, 1H), 7.06 (d,  $J=15.4$  Hz, 1H), 6.44 (s, 2H), 4.76 (d,  $J=5.7$  Hz, 2H). MS (ESI): 测量值 ( $m/z$ ) 411.93; 对  $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{BrNO}_5\text{S}$  计算 ( $\text{MH}^+$ ) 411.97.

对于化合物 10:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 丙酮- $\text{d}_6$  中):  $\delta$  9.2 (bs, 1H), 7.67 (d,  $J=15.2$  Hz, 1H), 7.51 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 7.12 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 7.02 (d,  $J=15.2$  Hz, 1H), 6.44 (s, 2H), 4.76 (d,  $J=5.2$  Hz, 2H). MS (ESI): 测量值 ( $m/z$ ) 460.13; 对  $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{INO}_5\text{S}$  计算( $\text{MH}^+$ ) 460.26.

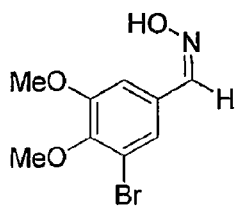
对于化合物 14:  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, 丙酮- $\text{d}_6$  中):  $\delta$  9.16 (bd, 1H), 7.69 (d,

$J=15.4$  Hz, 1H), 7.31 (d,  $J=1.9$  Hz, 1H), 7.09 (d,  $J=1.9$  Hz, 1H), 7.06 (d,  $J=15.4$  Hz, 1H), 6.44 (s, 2H), 4.76 (d,  $J=5.7$  Hz, 2H). MS (ESI): 测量值 ( $m/z$ ) 411.93; 对  $C_{16}H_{15}BrNO_5S$  计算 ( $MH^+$ ) 411.97.

对于化合物 18:  $^1H$  NMR (300 MHz, 丙酮- $d_6$  中):  $\delta$  9.23 (bt, 1H), 7.68 (d,  $J=15.2$  Hz, 1H), 7.31 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 7.09 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 7.09 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 6.99 (d,  $J=15.2$  Hz, 1H), 6.91 (d,  $J=2.0$  Hz, 1H), 4.85 (d,  $J=5.6$  Hz, 2H). MS (ESI): 测量值 ( $m/z$ ) 476.27; 对  $C_{16}H_{14}Br_2NO_4S$  计算 ( $MH^+$ ) 476.15.

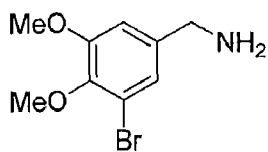
合成用于合成本发明新型酪氨酸磷酸化抑制剂的中间产物的一般程序显示于图 3 并在下文描述:

合成如下的在此标号为(xxvi)的化合物的一般程序:



将 5-溴代藜芦醛(5.00 g, 20.5 mmol, 1 当量)溶解于最少量的热乙醇, 并加入盐酸羟胺(1.71 g, 24.6 mmol, 1.2 当量)的水(30 mL)溶液。随后加入 10% 氢氧化钠(1.09 g, 27.3 mmol, 1.33 当量)水溶液, 在室温搅拌混合物(直到 TLC 指示醛消失)。蒸发乙醇后, 沉淀、过滤收集产物, 以水洗涤并在减压下干燥以便以定量产率产生纯的白色固体。 $^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$  中):  $\delta$  8.01 (s, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.27 (d,  $J=1.8$  Hz, 1H), 7.15 (d,  $J=1.8$  Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.88 (s, 3H).

合成如下的在此标号为(xxvii)的化合物的一般程序:



向(xxvi)(5.00 g, 19.2 mmol, 1 当量)的 20 mL 乙酸溶液加入锌(3.77 gr,

57.6 mmol, 3 当量)。回流溶液直到 TLC 显示脘消失。过滤锌盐并用乙酸乙酯洗涤。蒸发滤液并加入氢氧化钠水溶液。用乙酸乙酯萃取水层三次。以盐水洗涤有机层, 经  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥并在减压下蒸发以产生微黄色油, 产率 55%。 $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$  中):  $\delta$  7.09 (d,  $J=2.1$  Hz, 1H), 6.85 (d,  $J=2.1$  Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.82 (s, 2H)。

## 实施例 2: 生物活性

### 试剂和抗体

用于化学合成的所有化学品, 即牛血清白蛋白、聚(Glu, Tyr) 4:1 (pGT)、2,2'-叠氮基-双-3-乙基苯并噻唑啉(ethylbenzithiazoline)-6-磺酸、IGF1、亚甲基蓝、溴化 3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基-2H-四唑(MTT)、HRP-耦合的抗-磷酸酪氨酸 PT-66 和二磷酸化促分裂原活化蛋白激酶抗体(pERK)购自 Sigma。抗-磷酸-IRS1 抗体从 Oncogene Research Products, Germany 获得; 抗-IRS1 从 Upstate Biotechnology, Inc 获得。抗-Akt1/2(PKB)、抗-ERK2 和抗-IGF1R $\beta$  抗体从 Santa Cruz Biotechnology 获得。抗-磷酸(T308)Akt、抗-磷酸(Ser636/Ser639)IRS1 和抗-PARP 抗体从 Cell Signaling Technology 获得。Dulbecco 改良的 Eagle 培养基(DMEM)和胎牛血清(FCS)从 Biological Industries, Bet-Haemek, Israel 获得。DMSO 从 BDH 获得。

### IGF1R-催化的底物磷酸化的抑制

通过向各孔加入 125  $\mu\text{l}$  的 PBS 中的 0.1 mg/ml pGT 而将普通的蛋白-酪氨酸激酶底物聚(Glu, Tyr) 4:1 (pGT) 包被在 96-孔 Maxisorp 板(Nunc)上。密封板并在 37 $^\circ\text{C}$  孵育 16 小时, 以 TBST (10 mM Tris-HCl, pH 7.5、50 mM NaCl 和 0.1% Triton X-100) 洗涤一次, 以 DDW 洗涤一次, 干燥 2-3 小时, 并保存在 4 $^\circ\text{C}$ 。在 30 $^\circ\text{C}$  在 20  $\mu\text{M}$  ATP、10 mM  $\text{MgCl}_2$ 、5 mM  $\text{MnAc}_2$  和 20 mM Tris-HCl, pH 7.4 (含有或不含有抑制剂) 中孵育受体(10 ng/孔) 20 min。随后以含有 0.2% Tween 20 的 TBS (TBST) 洗涤板并用溶于 TBST 中的 0.5% BSA 封闭板。将耦合于辣根过氧化物酶(PT-66, 1:50000)的小鼠单克隆抗-磷酸酪氨酸抗体加至板。在室温孵育 45 min 后, 以 TBST 反复洗涤板。在

含有 0.004% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液, pH 4.0 中以显色试剂 2,2'-叠氮基-双-3-乙基苯并噻唑啉(ethylbenzothiazoline)-6-磺酸进行检测 10 min 并在 405 nm 监控, 都在室温进行。使用 REGRESSION 程序计算抑制剂的 IC<sub>50</sub> 值。关于 IGF-1R(从过表达 IGF1R 的细胞部分地纯化)的量、反应时间和 ATP 浓度优化测定。在 IGF1R 蛋白浓度最高达到 35 ng/孔的范围内信号为线性, 持续 30 min。

### **在完整细胞中 IGF1 诱导的信号转导和其它信号转导途径(例如 EGF、PDGF 和胰岛素-诱导的信号转导)的抑制**

在乳腺癌 MCF7 细胞中测定 IGF1R 的  $\beta$ -亚基的酪氨酸自磷酸化以及 IGF1R 诱导的下游信号转导。在前列腺癌 PC3 细胞中测定 EGFR 的酪氨酸自磷酸化和 EGFR 信号转导。在过表达 PDGFR 的成纤维细胞中测定 PDGFR 的酪氨酸自磷酸化和其信号转导。在过表达 IR 的成纤维细胞中测定 IR 的酪氨酸自磷酸化和其信号转导。将细胞接种在 6-孔板中 (MCF7-250,000 细胞/孔、PC3-150,000 细胞/孔、成纤维细胞-140,000 细胞/孔), 24 小时后培养基以无血清培养基(补充 100 单位/ml 青霉素和 100  $\mu$ g/ml 链霉素的 DMEM)代替。20 小时的血清-饥饿后, 将培养基以含有 0.1% DMSO 中各种浓度抑制剂的培养基代替, 持续另外 4 小时。随后用 50 ng/ml IGF-1 (MCF7 细胞)、20 ng/ml EGF(PC3 细胞)、50 ng/ml PDGF (过表达 PDGFR 的成纤维细胞)或 100 nM 胰岛素(过表达 IR 的成纤维细胞)刺激细胞 5 min, 用 PBS 洗涤两次, 并用沸腾的样品缓冲液(10%甘油、50 mM Tris-HCl、pH 6.8、3% SDS 和 5%  $\beta$ -巯基乙醇)溶解。以 8% SDS-PAGE 分离每条泳道等量的蛋白并转移到硝酸纤维素膜(Sartorius AG)。将磷酸化蛋白以抗-磷酸-IGF1R (磷酸-IGF1R(phosphor-IGF1R))、抗-磷酸酪氨酸-IRS1(磷酸-IRS1)、抗-磷酸(T308)Akt (磷酸-PKB)、抗-磷酸-Erk (磷酸-ERK)、抗-磷酸酪氨酸 4G10&PY20 (pY-EGFR 或 pY-PDGFR)、抗-磷酸-Ser<sup>636/639</sup>-IRS1(pS<sup>636/639</sup>-IRS1)和抗-磷酸-STAT3 (磷酸-STAT3)抗体进行免疫印迹。使用 ECL 系统, 以辣根过氧化物酶-耦联的第二抗体进行检测。随后将印迹的抗体剥落, 以 TBST 和 5%低脂乳封闭并用检测磷酸化和非-磷酸化相应蛋白(例如 IGF1R $\beta$ 、IRS1、PKB、ERK、IR $\beta$ 、PDGFR 和 Stat3)

的抗体再次探测。

此外，在 FCS 存在或不存在时，无刺激的情况下，从接触不同浓度抑制剂 24 小时的细胞制备溶解产物。溶解产物的制备和蛋白质印迹与上述相同。通过用兔抗-PARP 抗体进行免疫印迹来检测凋亡。

### 增殖测定

以 1000-5000 细胞/孔的密度将 90  $\mu\text{l}$  含有 10% FCS、100 单位/ml 青霉素和 100  $\mu\text{g/ml}$  链霉素的生长培养基中的各种癌细胞系(列于表 1)铺板于 96-孔板。一天后加入溶于 10  $\mu\text{l}$  的含有 1% DMSO 的 DDW 中的抑制剂以获得终浓度 0、0.1、0.3、1、3 和 10  $\mu\text{M}$ 。所有样品中 DMSO 的终浓度(0.1% DMSO)保持恒定。一天后和两天后更新含有抑制剂的培养基。在 37 $^{\circ}\text{C}$  将细胞接触抑制剂 72 小时后，将细胞在培养基中于 0.5%戊二醛(gluteraldehyde)中固定 10 min，以 DDW 洗涤三次，以 0.1 M 硼酸钠缓冲液 pH 8.5 洗涤一次，并以溶解于 0.1 M 硼酸盐缓冲溶液的 1%亚甲蓝染色 60 min。洗去过量的染料，将细胞结合的染料以 200  $\mu\text{l}$ /孔的 0.1 M HCl 洗脱。在 ELISA 板读数器中以 620 nm 读取光密度值。使用媒介物对照作为 100%增殖，以 Microsoft Excel 分析数据。以三份进行测定。表 1 中的值表示从获得的剂量依赖性生长曲线衍生的  $\text{IC}_{50}$  值。

### 克隆形成(Clonogenic)测定

将各种癌细胞(列于表 1)以非常低浓度(96-孔板中 19 细胞/孔或 24-孔板中 63 细胞/孔)接种于生长培养基。一天后以生长培养基代替培养基，所述生长培养基含有在终浓度为 0.1%的 DMSO 中的不同浓度抑制剂。每周更新三次含有抑制剂的培养基。大约两周后，通过加入戊二醛(Gluteraldehyde) (0.5%终浓度)将细胞固定 10 min，以 DDW 洗涤三次，以硼酸盐缓冲液 0.1 M 洗涤一次，并以硼酸盐缓冲液 0.1M 中的 1%亚甲蓝染色 1 小时。用水洗去多余染料，干燥后计数集落。可选地，以 0.1 N HCl 萃取染料 1 小时并以 ELISA 读数器测量 620 nm 处的吸光度。以三份进行测定。表 1 中的值表示从获得的剂量依赖性生长曲线衍生的  $\text{IC}_{50}$  值。

### 对异种移植模型中前列腺、卵巢、黑素瘤和胰腺肿瘤生长的体内作用

将人类激素难治性前列腺癌 PC3 细胞(ATCC, 每只小鼠  $1.5 \times 10^6$  细胞)皮下注射到 Nude:Hsd 小鼠(购自 Harlan)的右腿。十天后, 当已发展明显肿瘤时, 将小鼠分为具有类似平均肿瘤尺寸的 3 组。未处理组(UT)不接受任何处理。对以化合物 7 处理组的小鼠每天注射溶解于以下所述媒介物中的化合物 7, 对媒介物处理组(veh)每天仅注射媒介物。媒介物包括 DDW 中的 4.4% DMSO、1.2% 乙醇和 50% PEG400; 每组包括 3 只小鼠。IP 施用剂量为 50 mg/Kg (4 ml/Kg), 每天一次持续一个月。每天测量肿瘤的长度(l)和宽度(w), 如下计算肿瘤体积:  $v=lw^2/2$ 。图表示了肿瘤平均体积对以天数表示的时间。其它描述的体内研究遵循该程序并有以下修改:

将人类卵巢癌 A2780 细胞(来自 ECACC, 每只小鼠  $2 \times 10^6$  细胞)皮下注射到雌性 Nude:Hsd 小鼠(购自 Harlan)的右腿。以溶解于含有 4.4% DMSO、0.12% EtOH、50% PEG-400 的 DDW 中的 20 mg/kg (Exp. 2&3)或 50 mg/kg (Exp. 4)剂量以 4 ml/kg 的体积每天 IP 注射抑制剂。Veh 组以 4 ml/kg 的体积接受 DDW 中的 4.4% DMSO、0.12% EtOH、50% PEG-400。

将小鼠 B16 黑素瘤细胞(每只小鼠  $1.5 \times 10^6$  细胞)皮下注射到雄性 Nude:Hsd 小鼠(购自 Harlan)的右腿。以溶解于含有 4.4% DMSO、1.2% EtOH、33% PEG-400 的 DDW 中的 20 mg/kg 剂量以 4 ml/kg 的体积每天 IP 注射抑制剂。

将 Dr. Ruth Halaban (Yale University)提供的人类 YUMAC 转移的黑素瘤细胞(每只小鼠  $2 \times 10^6$  细胞)皮下注射到雄性 Nude:Hsd 小鼠(购自 Harlan)的右腿。以溶解于含有 8% EtOH、2% Tween-80、20% PEG-400 和 20% solutol 的 DDW 中的 20 mg/kg 剂量以 4 ml/kg 的体积每天 IP 注射抑制剂。

将人类胰腺癌 Panc1 细胞(每只小鼠  $2 \times 10^6$  细胞)皮下注射到雄性 Nude:Hsd 小鼠(购自 Harlan)的右腿。每天以在含有 0.06% DMSO 和 2.16% 的 PEG400 的盐水中的 125  $\mu$ g/小鼠的剂量将化合物 7 肿瘤内(IT)注射。

#### 角质形成细胞生长的体外抑制

将生长因子富集的培养基中的原代角质形成细胞接种到 96-孔板中。48 小时后更新培养基, 以指示浓度(0 是 0.1% DMSO, 其在所有孔中保持

恒定)加入化合物 7。每 24 小时更新培养基和化合物 7，且接种细胞 5 天后以 0.5%戊二醛(gluteraldehyde)固定 10 min，以亚甲蓝染色。洗去多余染料，并以 0.1N HCl 萃取结合的染料。在 ELISA 阅读器读取 620 nm 波长的吸光度。

## 结果

### 本发明化合物的生化表征：无细胞测定中 IGF1R 活性的抑制

如表 1 和表 2 中所示的，化合物 6-18 以剂量依赖性方式抑制部分纯化的 IGF1R 的激酶活性，显示 IC<sub>50</sub> 值为 30-200 nM。如通过比较化合物 19 和 7 证实的，消除羟基基团增加 IC<sub>50</sub> 值(表 1)。动力学研究显示，化合物 7 以及化合物 6 和 8 不与 ATP 竞争，因为 ATP 浓度升高不诱导在 IGF1R 的无细胞激酶测定中确定的 IC<sub>50</sub> 值增加(表 2)。

表 1: 无细胞激酶测定中 IGF1R 活性的 IC<sub>50</sub> 值

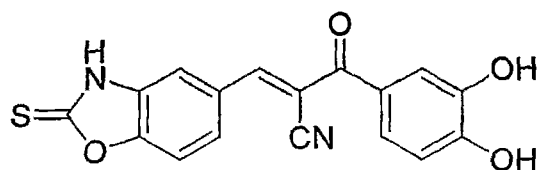
化合物编号	IC <sub>50</sub> (nM)
6	98
7	116
8	76
9	78
10	33
11	不可测
12	169
13	68
15	115
16	193
17	49
18	196
19	700

表 2: 在 IGF1R 的无细胞激酶测定中测试抑制剂与 ATP 竞争的动力学研究

[ATP] $\mu\text{M}$	IC <sub>50</sub> nM		
	#7	#8	#6
2.5	190	190	74
5	163	110	56
10	124	100	92
20	90	80	55
50	80	100	98

### 细胞中 IGF1R 的抑制

乳腺癌 MCF7 细胞接触化合物 7 产生 IGF1-诱导的信号转导的显著抑制。图 4A 显示尽管对照分子 20(见以下结构)对信号转导无作用,但是化合物 7 显著地抑制 IGF1R 的自磷酸化、IGF1-诱导的 IRS1(IGF1R 的直接底物)的酪氨酸磷酸化和 IGF1-诱导的 IGF1R 下游两种主要抗-凋亡和增殖途径(Akt/PKB 和 MAPK/ERK 途径)的活化。



化合物 20

图 4B 例示化合物 7 在 MCF7 细胞中的剂量依赖性活性,显示在 IGF1R 下游的关键抗-凋亡途径 Akt/PKB 途径的抑制中 IC<sub>50</sub> 值为 1-2  $\mu\text{M}$ 。在甚至更低浓度检测到 MAPK/ERK 途径活化的抑制。

出人意料地发现化合物 7 诱导乳腺癌 MCF7 细胞中 IGF1R-直接底物 IRS1 在细胞水平的减少(图 5)。显示该作用是持久的(图 5B)。甚至将细胞接触化合物 7 后 24 小时检测到 IRS1 水平减少,伴有其下游信号转导途径-抗凋亡 PKB/Akt 途径的抑制且随后 PARP 裂解,已知 PARP 的裂解是细胞凋亡的标志。

不希望受任何特定机理或理论所束缚,预期化合物 7 诱导的 IRS1 水平减少是诱导次级负调节的结果,在次级负调节中 IRS1 经历对丝氨酸残基磷酸化的抑制和随后的降解。认为该作用在源于 PTK 信号传导的抑制机理的抗癌活性中有高度重要性。进一步预期,化合物 7 以及本发明由三

羟基苄基硫代酰胺和第二儿茶酚环中卤素或卤甲基部分组成的其它化合物诱导 IRS1 的 Ser-磷酸化和/或 IRS1 水平减少。这些结构显示与对细胞中 IRS1 水平或 Ser-磷酸化显示无作用的相关分子(如化合物 6)相比, 更高的体外(癌细胞增殖的抑制)和体内(肿瘤生长的抑制)活性。

以化合物 7 处理细胞诱导的 IRS1 Ser-磷酸化的增加通过使用抗 Ser 残基 636 & 639 上磷酸化的 IRS1 的特异性抗体的免疫印迹(图 5B)和图 5A 中 IRS1 条带的移动而证实。已知 IRS1 的 Ser-磷酸化诱导 IRS1 从 IGF1R 解偶, 从而抑制 IGF1R 信号转导。进一步显示该亚家族中其它相关抑制剂(例如化合物 8、9、10、11 和 13)也在乳腺癌 MCF7 细胞(图 6)以及转移的黑素瘤 YUMAC 细胞(图 8)中触发 IRS1-ser 磷酸化。在卵巢癌 A2780 细胞中, 化合物 7 以及化合物 8 和 9 诱导 Ser-磷酸化(SDS-PAGE 中 IRS1 条带上移)和细胞 IRS1 水平减少(图 7)。对 IRS1 的这种长期作用伴有癌细胞的凋亡, 如卵巢癌细胞在接触新型抑制剂 21 小时后(图 7)和黑素瘤细胞在接触新型抑制剂 24 小时后(图 8; 3  $\mu$ M)所证实的。

化合物 7 除了对 IGF1R 途径的抑制作用, 化合物 7 还抑制完整细胞中其它酪氨酸激酶诸如 EGFR、PDGFR 和 IR(图 9)。这些激酶在有丝分裂发生中具有关键作用。以化合物 7 孵育后, 将表达这些激酶受体的细胞(例如表达 EGFR 的前列腺癌 PC3 细胞、过表达 PDGFR 的成纤维细胞和过表达 IR 的成纤维细胞)分别以 EGF、PDGF 或胰岛素刺激(图 9A、9B 和 9C), 并将溶解产物与抗-磷酸酪氨酸抗体进行免疫印迹以检测受体的自磷酸化。还测量了这些受体的下游信号转导。

Ser/Thr-激酶诸如 MEK 或 PDK 不被化合物 7 抑制, 如同通过在化合物 7 对上游调节子无抑制作用的细胞中它们底物(分别是 ERK 和 PKB(Thr308))的磷酸化水平所检测的那样。

### 生长抑制

在细胞增殖测定中测试化合物 6、7、8 和 9 的抑制潜能。在该测定中, 接种一天后将细胞接触增加浓度的分子(以所有孔中 0.1% DMSO)。每天更新培养基和抑制剂, 处理三天后, 固定细胞并以亚甲蓝染色。从光密度对化合物浓度的曲线确定 IC50 值。以三份进行测定。

测试来自不同适应症的一组癌细胞系对分子的敏感性(表3)。化合物7、8和9显示抗癌活性而化合物6具有较低活性。该活性与这些分子诱导细胞中Ser-磷酸化 & IRS1水平减少的能力相关联。与化合物6不同(图19A & B), 化合物7、8和9诱导IRS1-ser-磷酸化增加(图5-8)和IRS1水平减少(图5和7)。24小时的处理触发这些细胞凋亡, 如通过PARP的裂解所检测到的(图5C、7A和8)。

**表3:** 化合物6、7、8和9在不同癌细胞系的细胞增殖和克隆形成测定中的抑制活性(以 $\mu\text{M}$ 表示的 $\text{IC}_{50}$ 值)。以三份进行测定。

适应症	细胞系	克隆形成测定				增殖测定			
		IC50 ( $\mu\text{M}$ )				IC50 ( $\mu\text{M}$ )			
		#6	#7	#8	#9	#6	#7	#8	#9
前列腺癌	PC3	0.7	4.2	1.0	1.2	>10	2.8	4.6	2.7
						>10	3.9	3.6	2.0
	DU145					>10	6.6	6.5	1.8
	LNCaP					>10	>10	7.7	4.7
	PC3-MM2					>10	2.6	2.1	6.9
卵巢癌	A2780	0.1	0.4	0.4	0.3	6.8	0.6	0.6	0.4
	OVCAR3					>10	2.0	1.9	0.9
	SKOV-3					>10	5.3	3.5	4.3
结肠癌	Colo-205					>10	5.4	2.5	1.7
	LIM 1215					>10	6.5	6.4	3.3
	LIM 1899					>10	7.6	7.1	2.0
	HT29	9.5	2.8	5.6	1.6	>10	6.8	6.1	1.5
肺癌	QG56	2.4	1.7	1.4	0.5	>10	5.2	4.4	2.0
	NCI-H1975					>10	2.5	2.3	2.7
	PC-10					>10	5.2	5.8	3.8
	NCI-H526					>10	>10	>10	>10
神经胶质瘤	U138MG	2.2	1.8	1.6	0.5	2.0	0.8	0.8	0.2
	U87MG					>10	6.9	2.4	6.6
	MO59K					6.8	0.7	0.9	1.4
	MO59J					8.3	2.1	1.6	0.9
乳腺癌	MDA MB 468					>10	>10	5.8	7.2
	MDA MB 231					>10	6.3	7.4	>10
	MDA MB 435					>10	2.7	2.1	1.5
	SKBR-3					>10	9.9	9.0	6.0
	MCF-7					2.1	4.8	2.8	2.5
	T47D					>10	2.1	2.5	1.6
黑素瘤	B16	0.8	0.4	0.4		7.9	1.9	1.7	1.4
	YUMAC					8.5	1.2	1.2	0.6
	YURIF					>10	1.4	1.6	0.7
膀胱癌	T24P					>10	1.2	0.9	1.4
	1376					2.5	0.9	0.8	1.4
胰腺癌	PANC1					>10	>10	>10	>10
	AsPC1					>10	>10	9.5	>10
Pro B	BAF3 Bcr-Abl					7.7	8.2	>10	6.1
白血病	K562					>10	~10	~10	>10
骨髓瘤	U266					9.8	0.8	0.8	0.9

测试人类转移的黑素瘤细胞对更宽范围化合物的敏感性(表4),并显示与对化合物6、17和19不同,对诱导 IRS1 Ser-磷酸化的分子例如化合物7、8、9、10和13的高敏感性(图6&8)。

**表 4:** 一系列新型分子对人类转移的黑素瘤细胞的抑制。将细胞与分子孵育 72 小时后, 结果以 IC<sub>50</sub> 值表示。

YUMAC		YURIF	
化合物	IC <sub>50</sub> (μM)	化合物	IC <sub>50</sub> (μM)
6	8.5	6	>10
7	1.2	7	1.4
8	1.2	8	1.6
9	0.6	9	0.65
10	0.3	10	0.47
11	1.2	11	1.2
13	1	13	0.87
17	>10	17	>>10
19	~10	19	>10

### 体内研究

测试化合物 7 在动物模型中对肿瘤生长的抑制作用。在小鼠侧腹向裸小鼠皮下注射癌细胞, 且当肿瘤可测量时, 开始施用本发明的各种化合物。图中呈现的肿瘤尺寸是第一次施用后测量的肿瘤尺寸。首先检查人类激素难治性前列腺癌(HRPC)PC3 模型。图 10 显示, 与对照(媒介物处理的和未处理的)相比, 每天一次以 50 mg/kg 的剂量系统施用(IP)化合物 7 导致肿瘤生长的 82%抑制。而且, 施用一个月后, 未检测到对裸小鼠体重的显著作用(图 11)。此外, 使用肿瘤内施用测试时, 发现化合物 7 对 HRPC 和胰腺癌 PANC1 模型都有效(图 16)。

由于报道 IGF1R 参与许多类型的癌症, 在体外筛选一组癌细胞系以及若干种其它类似细胞系对化合物 7 的敏感性(表 3)。基于该筛选, 检查化合物 7 & 8 在卵巢癌 A2780 模型中的效力。图 12 显示, 每天一次 IP 施用 20 mg/kg 的化合物 7 或 8 导致肿瘤生长的 87%抑制。化合物 6、7、8 和 9(每天一次 IP 施用, 20 mg/kg)的比较性研究显示, 化合物 7、8 和 9 抑制卵巢肿瘤生长约 90%, 甚至诱导小肿瘤消退, 而施用化合物 6(同样条件下)仅导致肿瘤生长的 33%抑制(图 13)。

还对黑素瘤 B16 体内模型测试化合物 6 和 7 的效力。两种分子都具有

显著抑制作用，而化合物 7 更为有效(图 17)。本发明化合物对黑素瘤肿瘤的效力还通过化合物 8 对裸小鼠中人类转移的(metasatic)黑素瘤 YUMAC 肿瘤的抑制而证实(图 18)。

随后，检查化合物 8 对抑制卵巢癌 A2780 肿瘤生长的效力。当肿瘤尺寸大于  $50 \text{ mm}^3$  或可选地当肿瘤尺寸大于  $470 \text{ mm}^3$  时开始施用。图 14 & 15 显示，每天一次 IP 施用  $50 \text{ mg/kg}$  的化合物 8 导致显著和引人注目的肿瘤生长抑制。因此证实本发明的化合物为体外和体内对不同癌症的有效抗癌剂。

### 对银屑病的体外研究

证实生长于富集的培养基的原代角质形成细胞可用作银屑病的体外模型。化合物 7 抑制原代角质形成细胞的体外生长( $\text{IC}_{50}=2.3 \mu\text{M}$ )，因此是抗银屑病药物的候选物(图 21)。

## 化合物 6 的生化表征

### 细胞中 IGF1R 和 EGFR 的酪氨酸激酶活性的抑制

乳腺癌 MCF7 细胞与化合物 6 接触产生 IGF1-诱导的信号转导的显著抑制。图 19A 显示，化合物 6 抑制 IGF1R 的自磷酸化、IGF1-诱导的 IRS1(IGF1R 的直接底物)的酪氨酸磷酸化和 IGF1-诱导的 Akt/PKB 活化。与化合物 7 不同，化合物 6 对 IGF1R 或 IRS1 水平无影响(图 19B)。化合物 6 还抑制 EGFR 和 EGF-诱导的 STAT3 (EGFR 的直接底物)的酪氨酸磷酸化和 EGF-诱导的 PKB 途径活化(图 20A & 20B)。

### 生长抑制

不同癌细胞接触化合物 6 导致软琼脂和板上集落形成的显著抑制(表 3, 克隆形成测定)。

尽管已阐释和描述了本发明的某些实施方式，应清楚的是，本发明不限于本文描述的实施方式。许多修改、改变、变化、代替和等价物对本领域技术人员是明显的而不偏离本发明的主旨和范围，本发明的主旨和范围由随后的权利要求书描述。

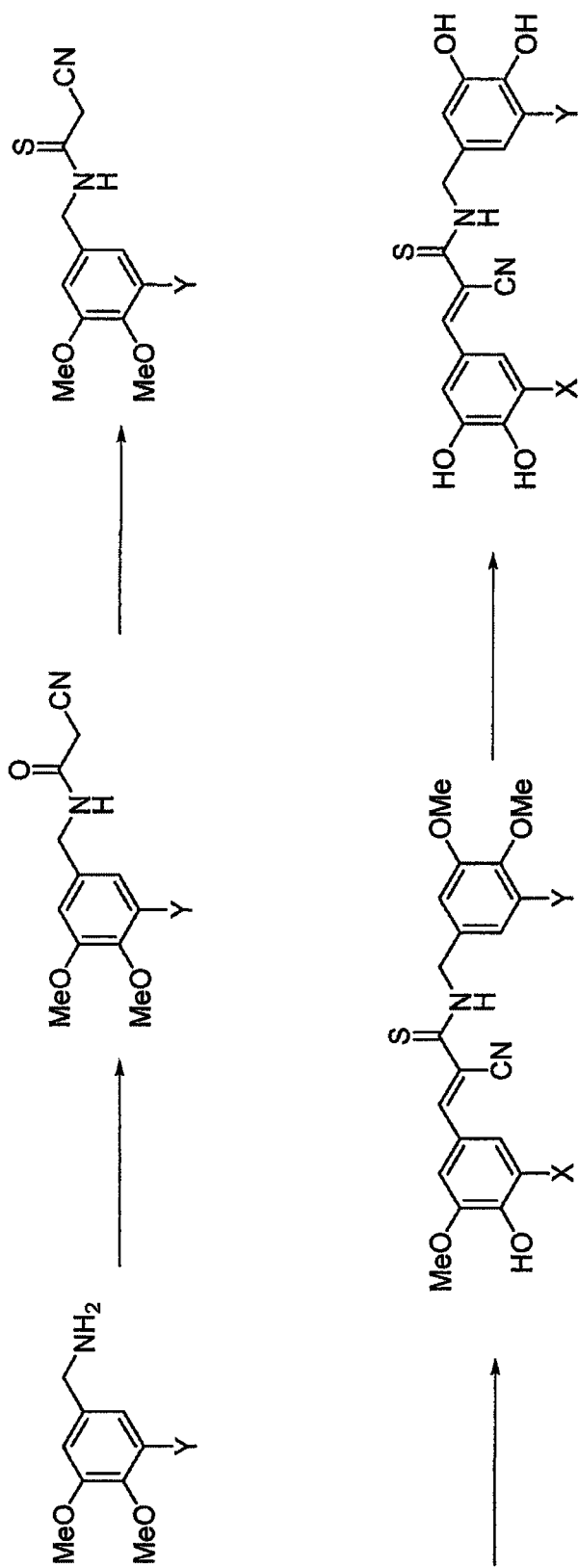


图1

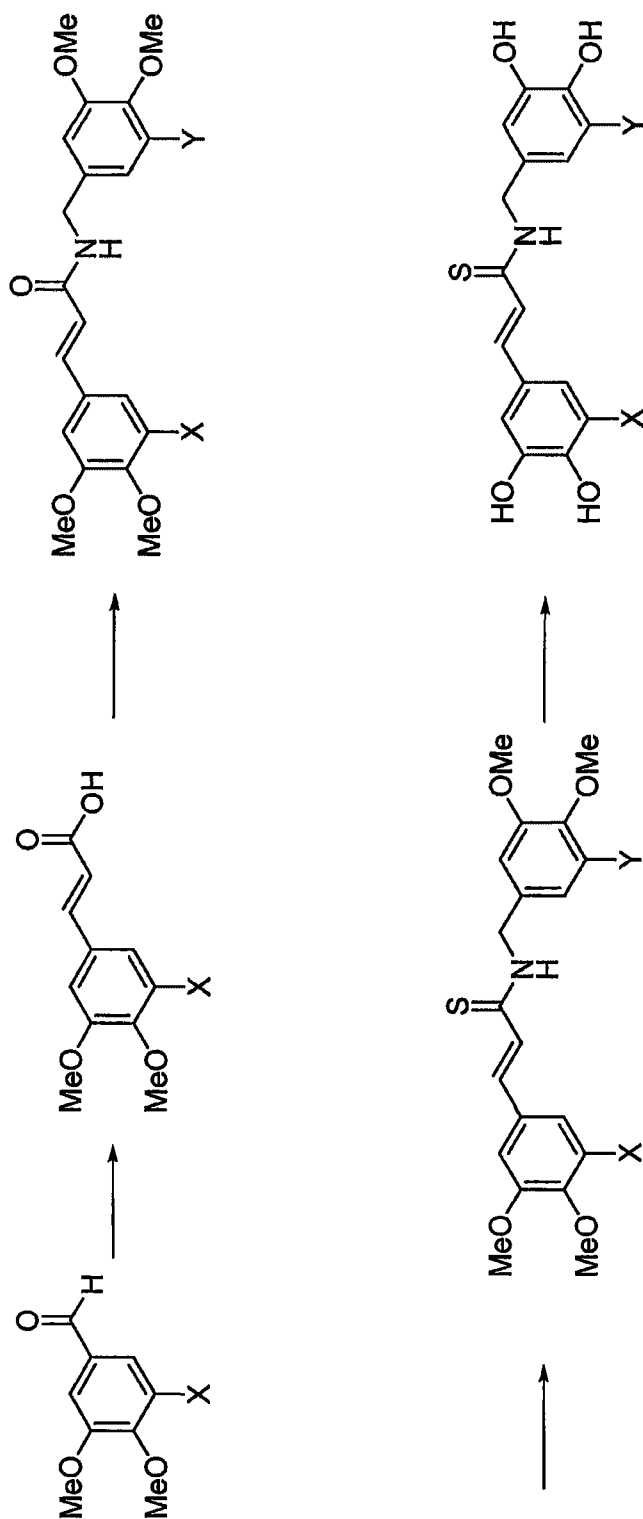


图2

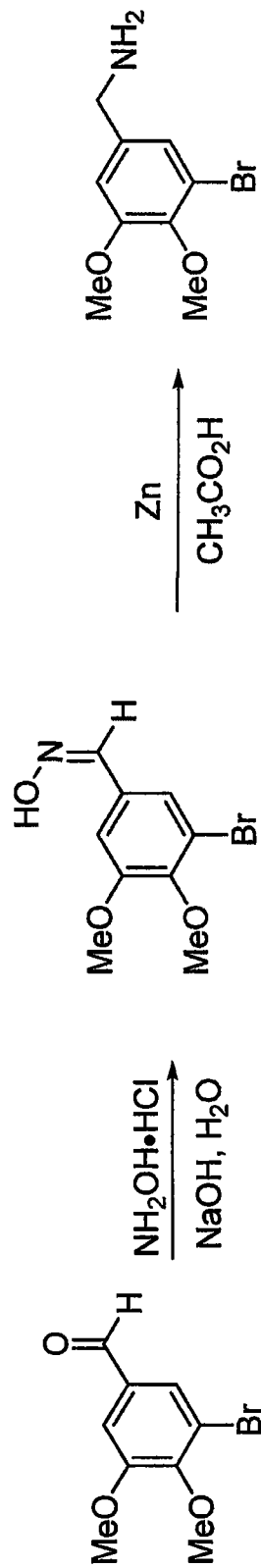


图3

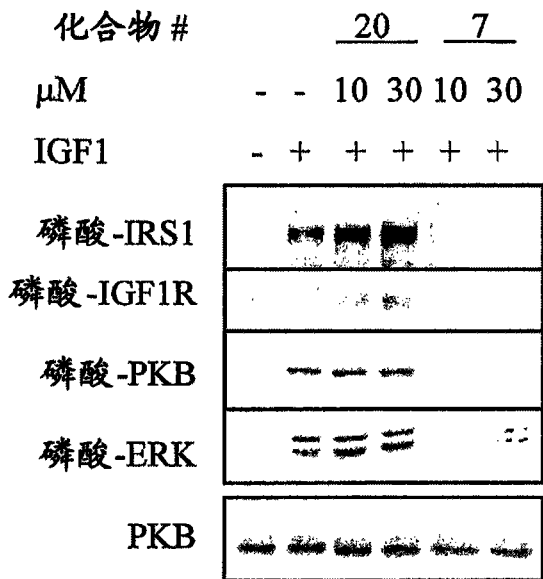


图 4A

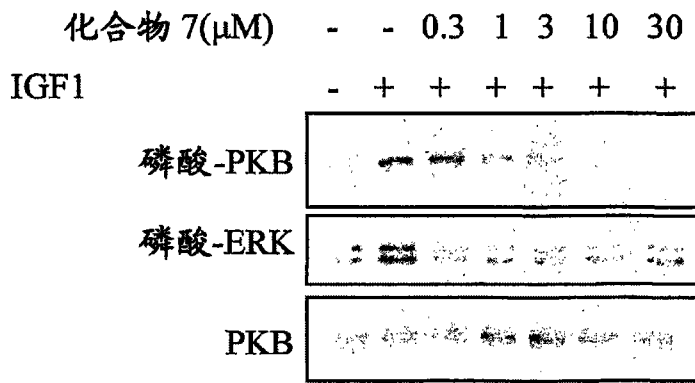


图 4B

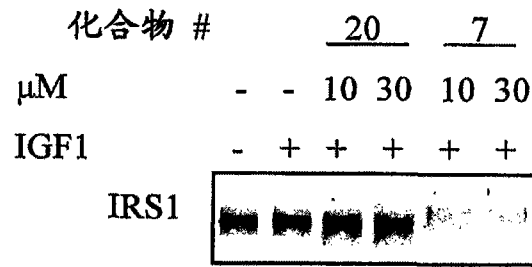


图 5A

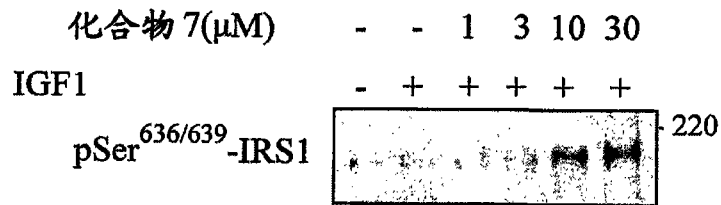


图 5B

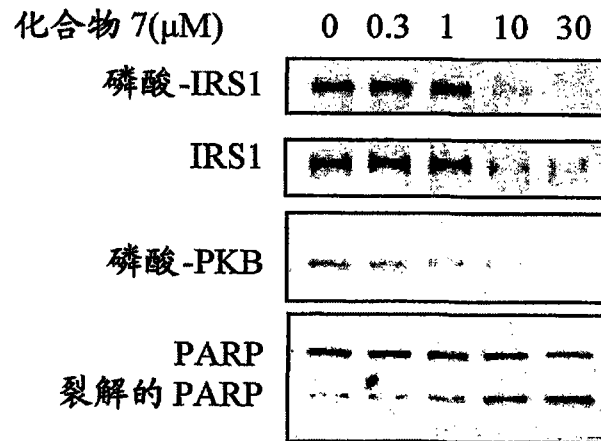


图 5C

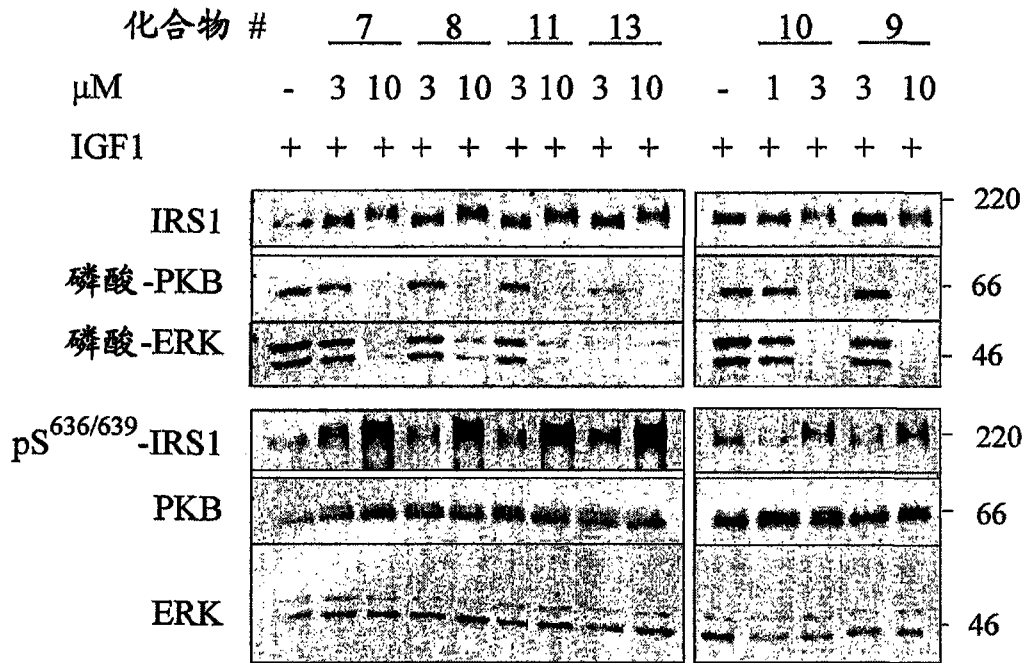


图6

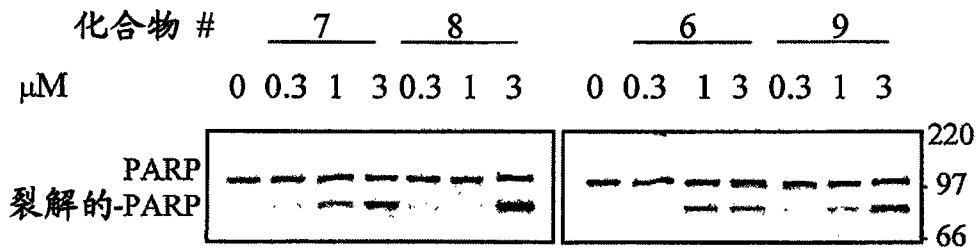


图7A

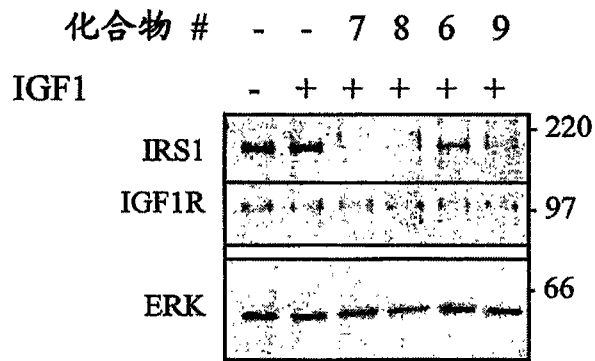


图7B

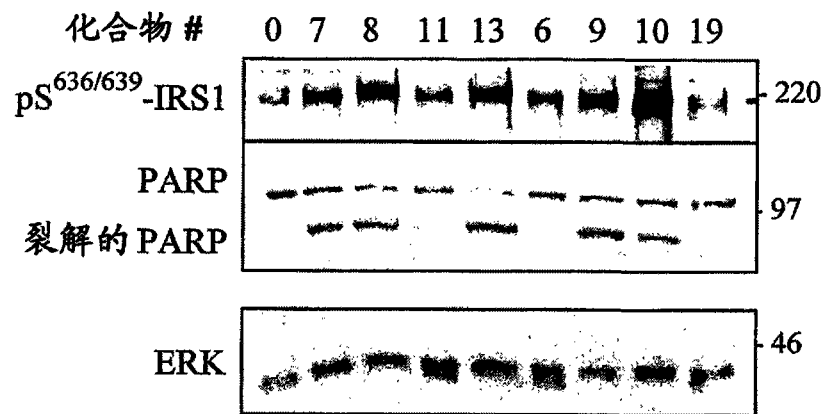


图 8

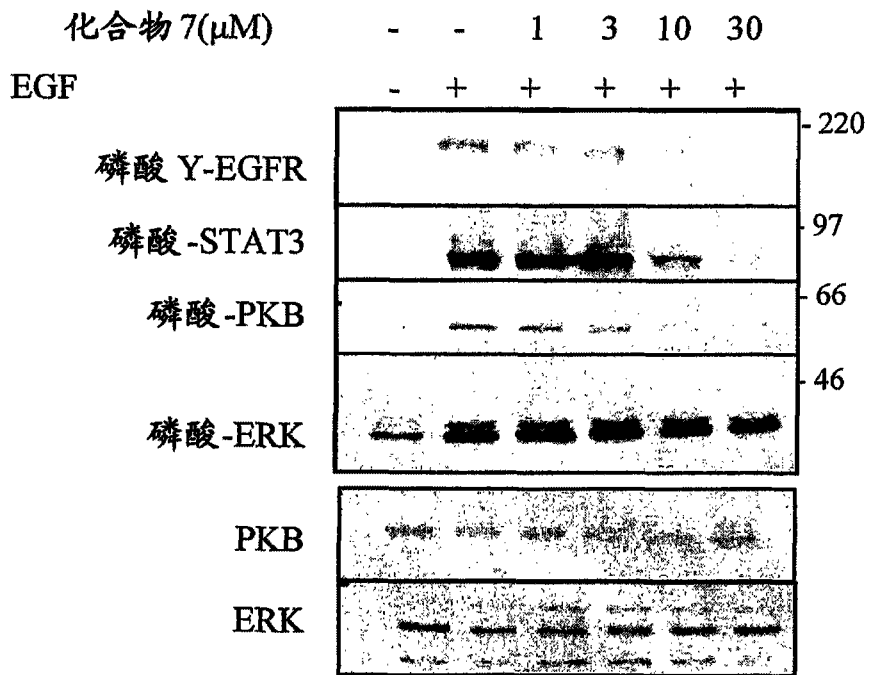


图 9A

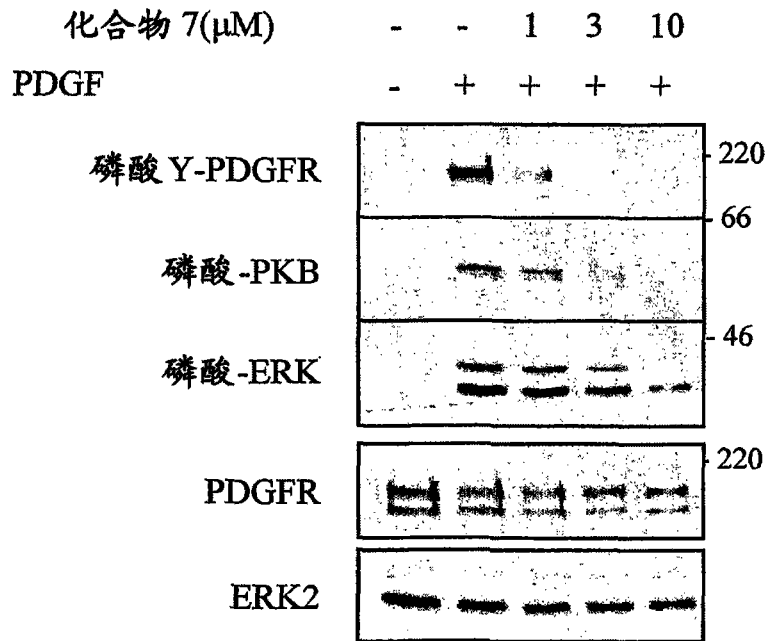


图 9B

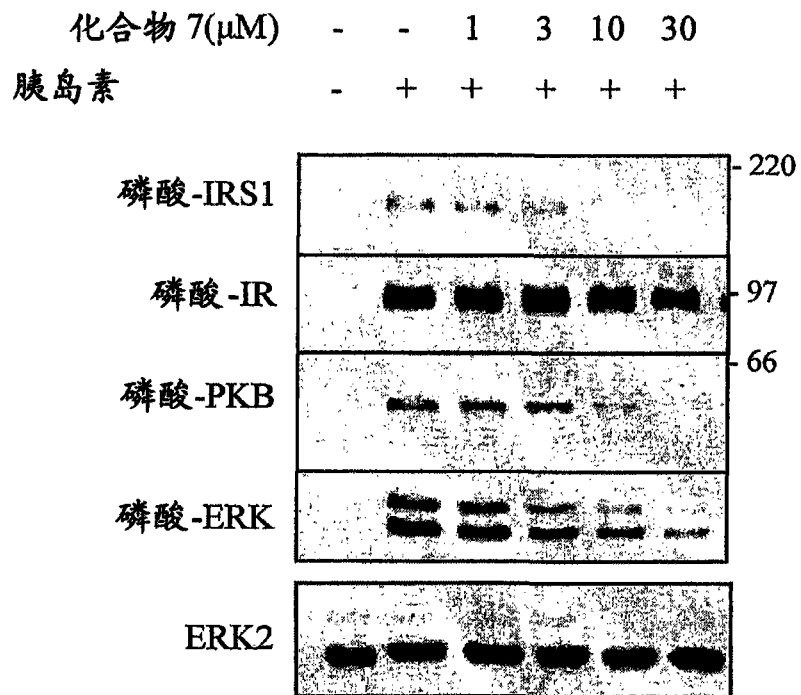


图9C

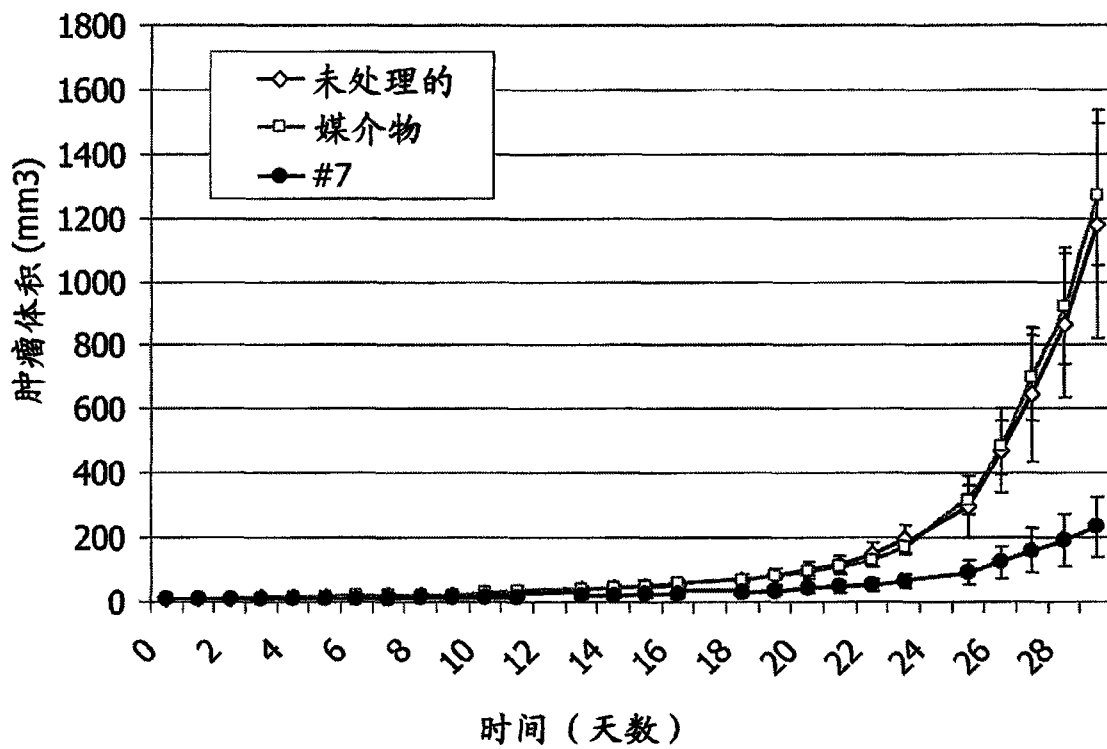


图10

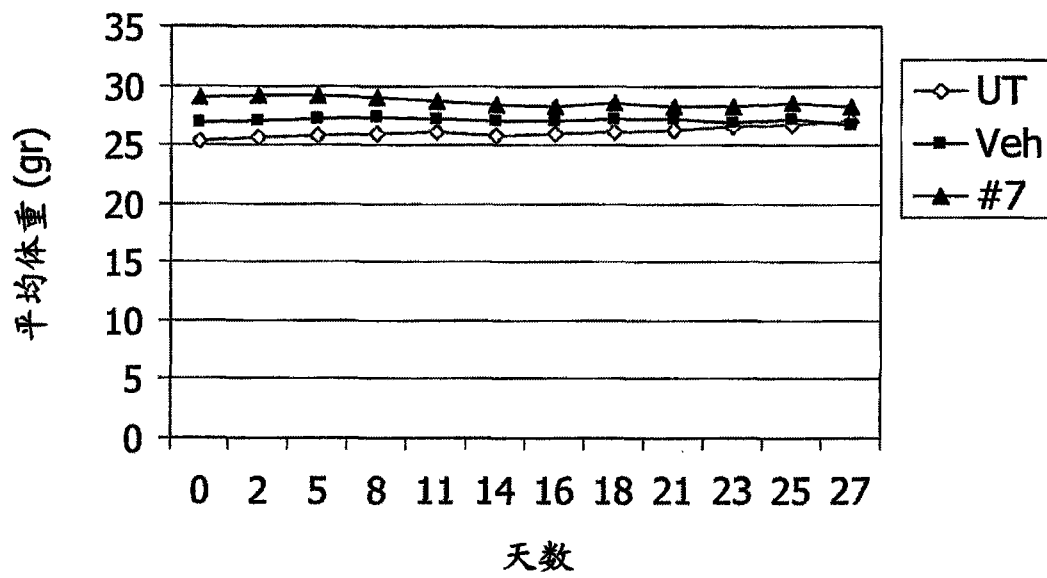


图11

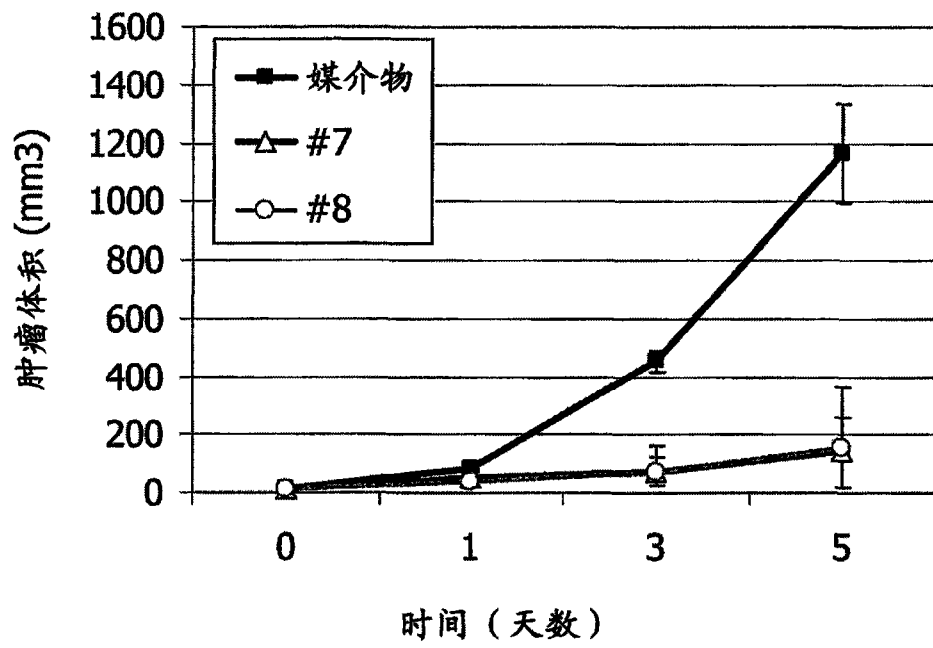


图12

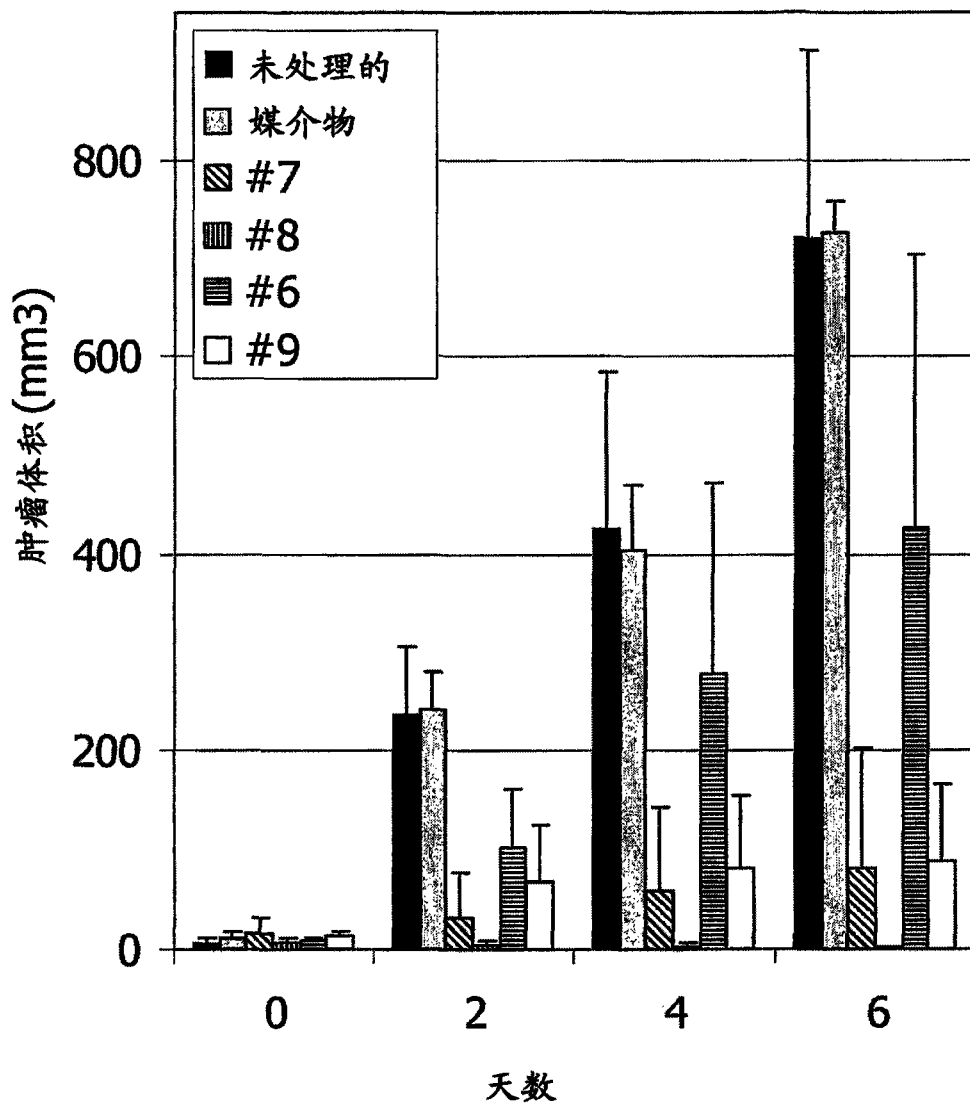


图13

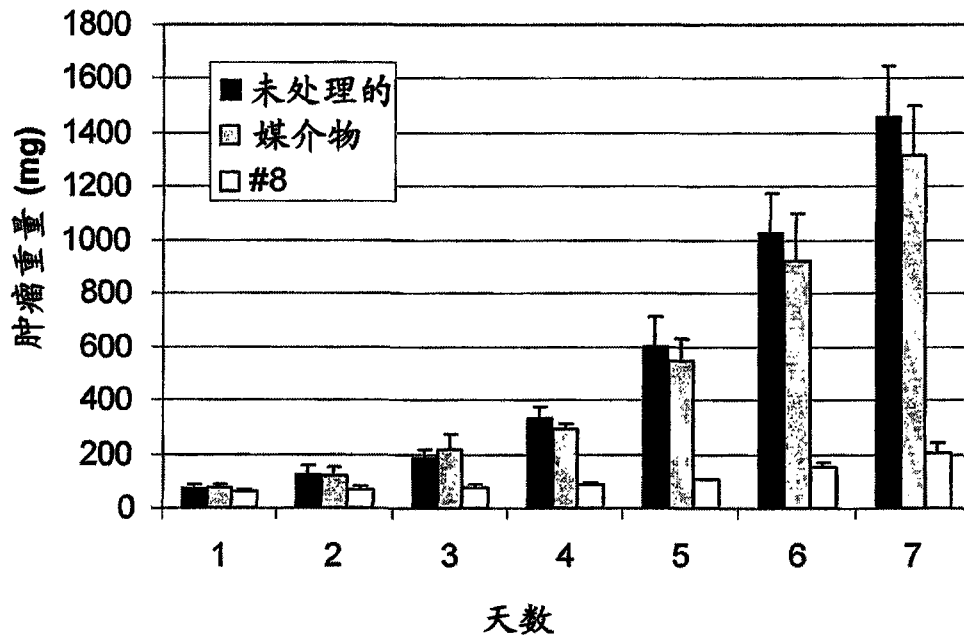


图14

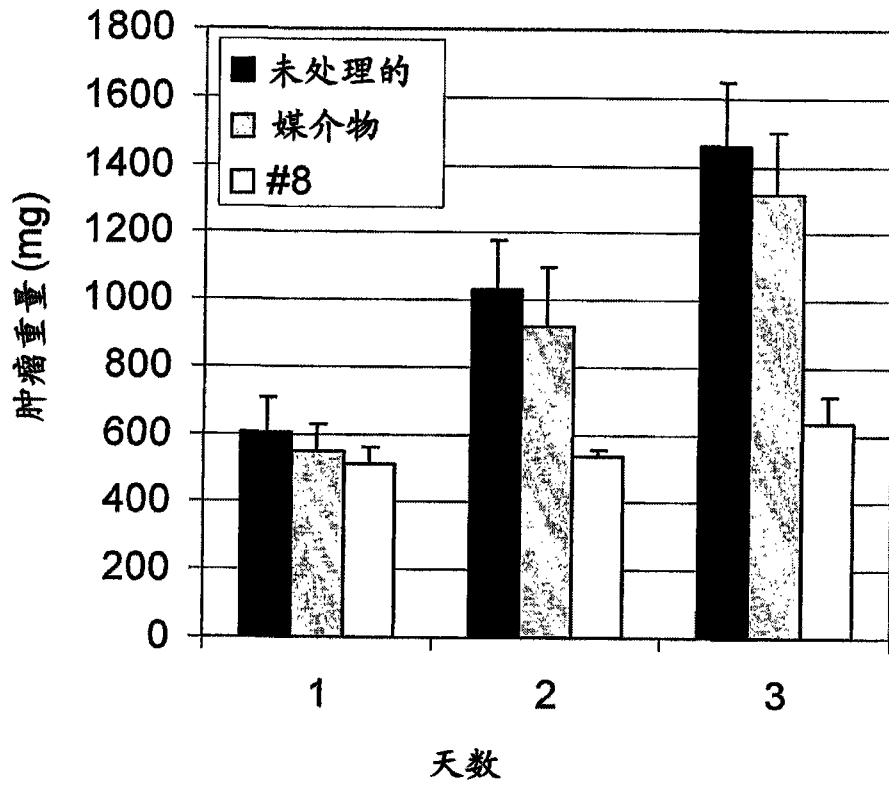


图15

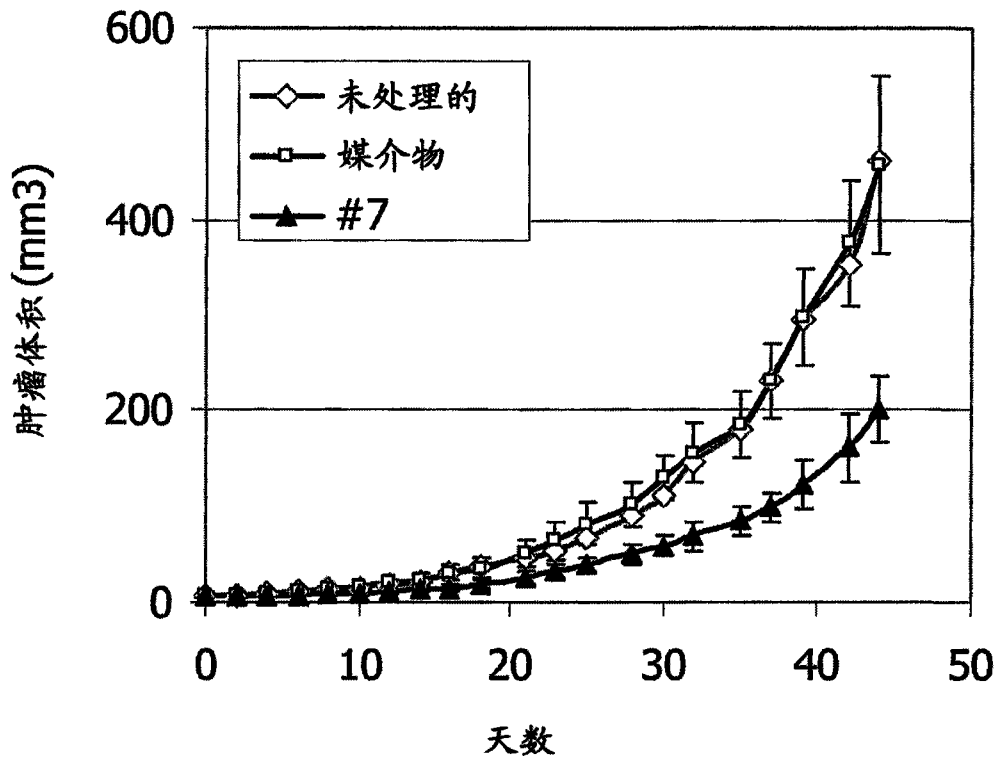


图16

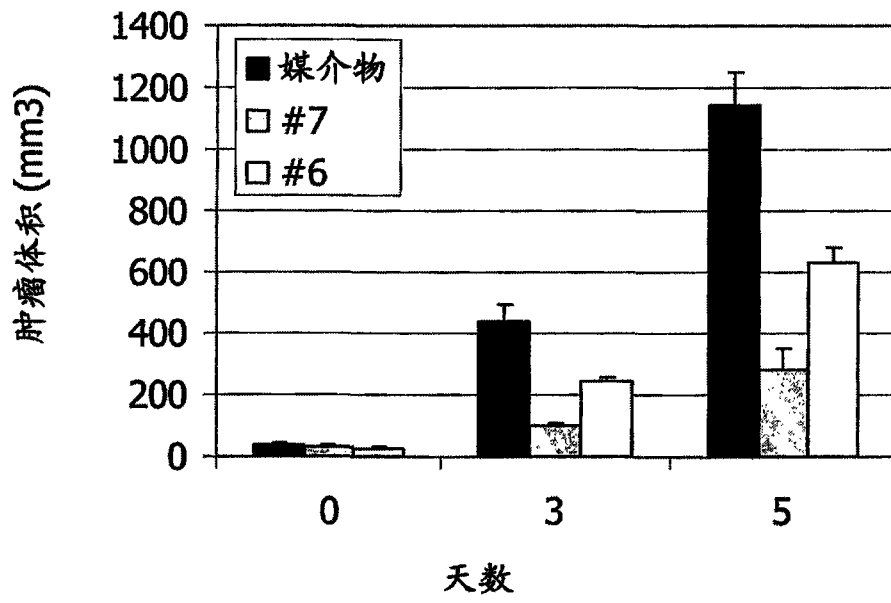


图17

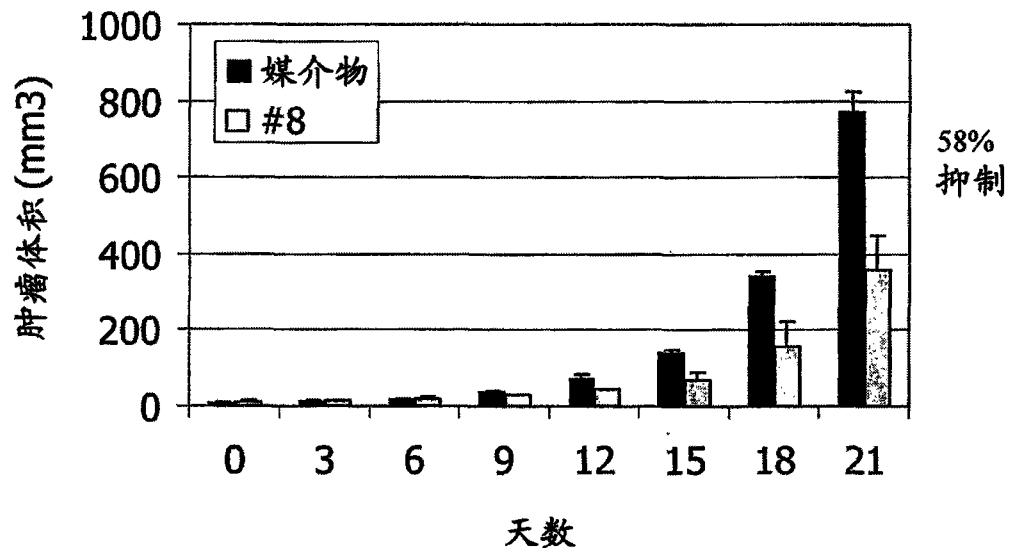


图18

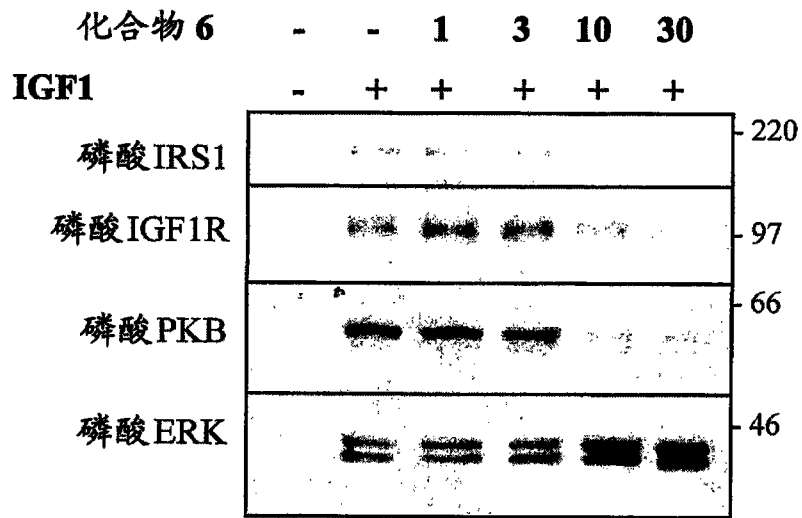


图19A

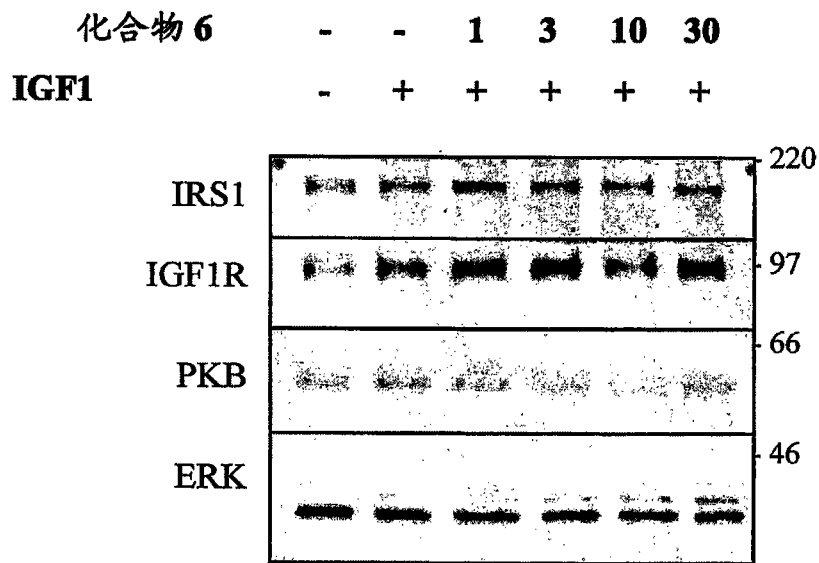


图19B

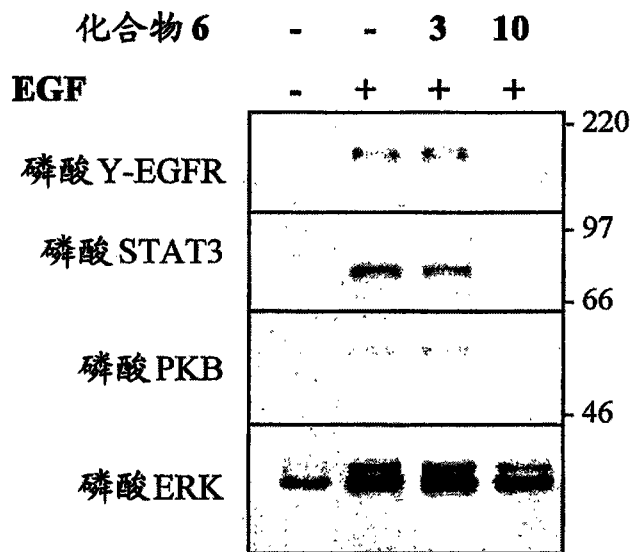


图 20A

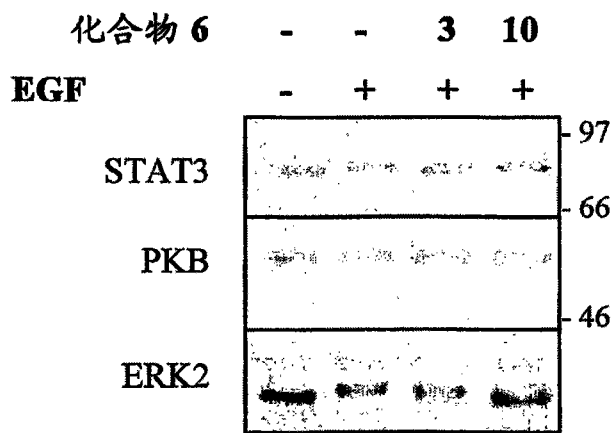


图 20B

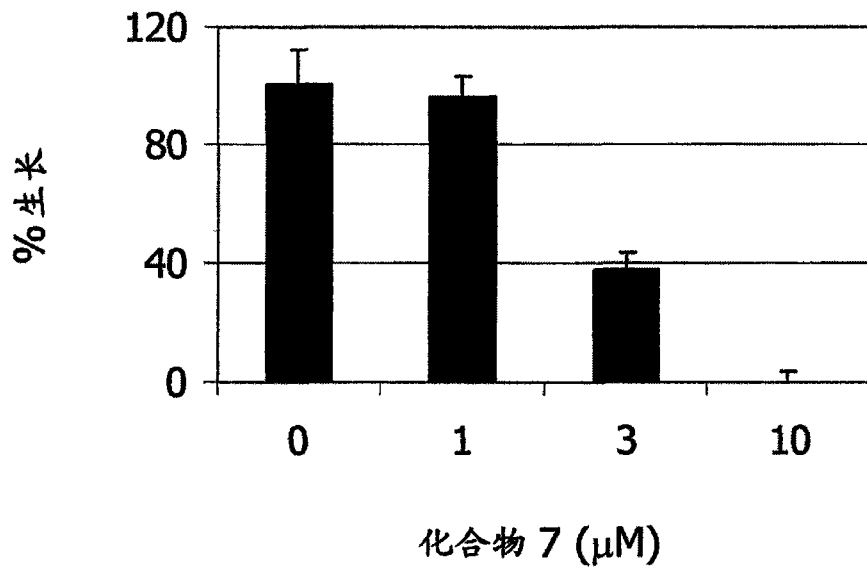


图 21