



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102471280 B

(45) 授权公告日 2014. 08. 06

(21) 申请号 201080036552. 8

A61P 35/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 07. 02

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

0903270 2009. 07. 03 FR

CN 1826323 A, 2006. 08. 30, 权利要求

1-115.

CN 101146533 A, 2008. 03. 19, 权利要求

1-60.

WO 2008/065282 A2, 2008. 06. 05, 权利要求

1-28, 实施例 19, 55.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 02. 17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/FR2010/051394 2010. 07. 02

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/001122 FR 2011. 01. 06

(73) 专利权人 赛诺菲

地址 法国巴黎

(72) 发明人 P-Y. 阿贝卡西斯 P. 德斯梅泽奥

M. 塔巴特

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 封新琴

审查员 张茹

(51) Int. Cl.

C07D 231/38 (2006. 01)

C07C 275/30 (2006. 01)

A61K 31/415 (2006. 01)

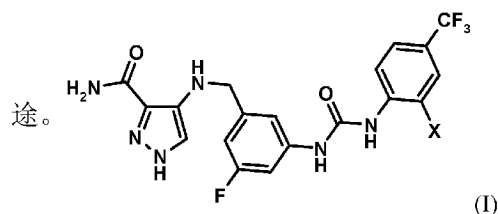
权利要求书2页 说明书19页

(54) 发明名称

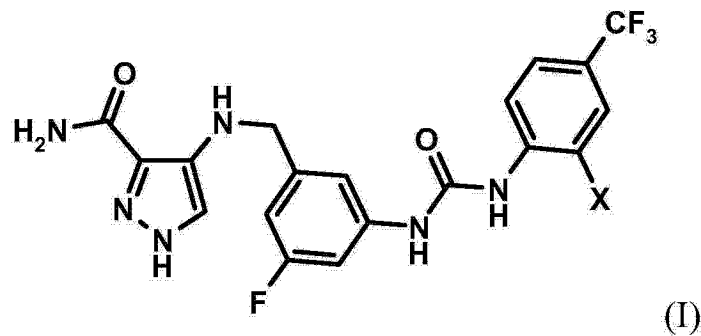
吡唑衍生物、其制备及其治疗用途

(57) 摘要

本发明涉及通式 (I) 的吡唑衍生物, 其中 X 为氯或氟。本发明还涉及其制备方法以及其治疗用



1. 式 (I) 化合物：



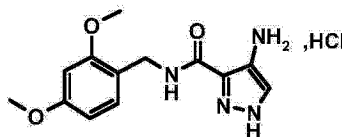
其中：

X 表示氯或氟，

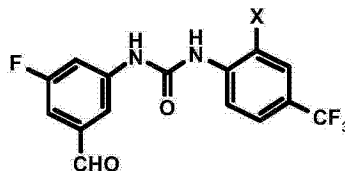
其为碱的形式或酸加成盐的形式。

2. 权利要求 1 的式 (I) 化合物，其特征在于 X 表示氯，其为碱的形式或酸加成盐的形式。

3. 制备权利要求 1 和 2 中任一项的式 (I) 化合物的方法，其特征在于在惰性介质中，在二异丙基乙胺的存在下，将以下化合物



与以下化合物反应，

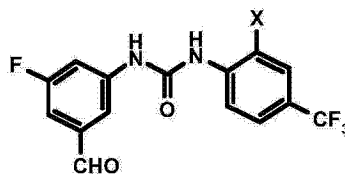


然后在第二步中，通过对甲苯磺酸将所述胺脱保护；

所述惰性介质是非极性非质子介质。

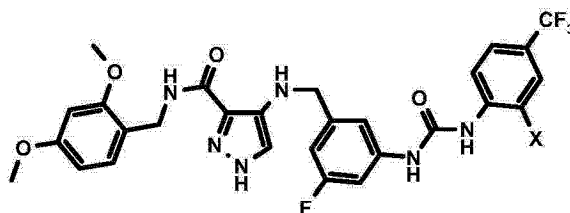
4. 权利要求 3 的方法，其特征在于所述惰性介质为四氢呋喃。

5. 下式化合物：



其中 X 表示氯或氟。

6. 下式化合物：



其中 X 表示氯或氟。

7. 药物,其特征不在于其包含权利要求 1 和 2 中任一项的式 (I) 化合物,或所述化合物与药学上可接受的酸形成的加成盐。

8. 药物组合物,其特征不在于其包含权利要求 1 和 2 中任一项的式 (I) 化合物或所述化合物药学上可接受的盐,以及至少一种药学上可接受的赋形剂。

9. 权利要求 1 和 2 中任一项的式 (I) 化合物在制备用作治疗癌症的药物中的用途。

吡唑衍生物、其制备及其治疗用途

[0001] 本发明涉及吡唑衍生物,涉及其制备以及涉及其治疗用途。

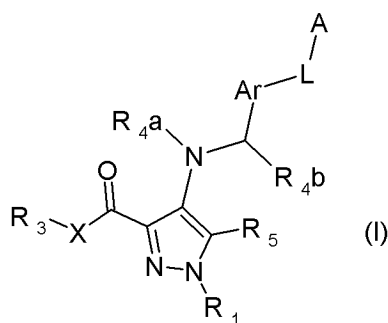
[0002] 更具体地,根据第一个方面,本发明涉及新的具体取代的吡唑,其具有抗癌活性(通过调节蛋白(特别是激酶)的活性)。

[0003] 蛋白激酶是一个酶家族,其催化蛋白特定残基(例如酪氨酸、丝氨酸或苏氨酸残基)的羟基基团的磷酸化。所述磷酸化可以在很大程度上修饰蛋白的功能;因此,蛋白激酶在调节多种细胞过程都起到重要作用,尤其包括代谢、细胞增殖、细胞分化、细胞迁移或细胞存活。在所述多种涉及蛋白激酶活性的细胞功能中,一些过程代表了治疗癌症以及其它疾病的引人注目的靶点。

[0004] 因此,本发明的一个目的在于提出具有抗癌活性的组合物(尤其是通过激酶作用)。在需要调节活性的激酶中,可提及 KDR、Tie2、VEGFR-1 (FLT1)、VEGFR-3 (FLT4)、PDGFR 和 FGFR。优选激酶 KDR 和 / 或 Tie2。

[0005] 下面的通式 (I) 化合物已知于 WO 08/065282 的专利申请:

[0006]



[0007] 式 (I)

[0008] 其中:

[0009] 1) A 和 Ar 独立地选自:芳基,杂芳基,取代的芳基,取代的杂芳基;

[0010] 2) L 选自:NH-CO-NH 和 O-CO-NH;

[0011] 3) R₁ 选自:H、R₆、COR₆、SO₂R₆, 其中 R₆ 选自 H、OR₇、NR₈R₉、烷基、环烷基、杂环基、取代的杂环基、芳基、取代的芳基、杂芳基和取代的杂芳基, 其中 R₇ 选自 H、苯基和烷基, 且其中 R₈ 和 R₉ 独立地选自 H、烷基、环烷基、杂环基、取代的杂环基、芳基、取代的芳基、杂芳基和取代的杂芳基, 或者 R₈ 和 R₉ 连接在一起形成含 0 至 3 个选自 O、S 和 N 的杂原子的饱和的 5- 至 8- 元环;

[0012] 4) X 选自:O 和 NH;

[0013] 5) R₃ 选自:H、烷基、取代的烷基、环烷基、取代的环烷基;

[0014] 6) R_{4a} 选自:H 和 (C₁-C₄) 烷基;

[0015] 7) R_{4b} 选自:H 和 (C₁-C₄) 烷基;

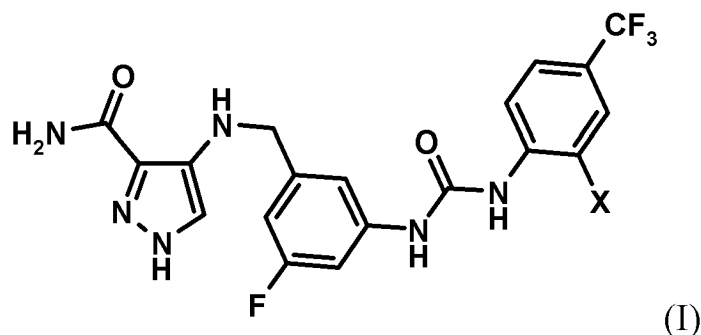
[0016] 8) R₅ 选自:H、卤素、R₁₀、CN、O(R₁₀)、OC(O)(R₁₀)、OC(O)N(R₁₀)(R₁₁)、OS(O₂)(R₁₀)、N(R₁₀)(R₁₁)、N=C(R₁₀)(R₁₁)、N(R₁₀)C(O)(R₁₁)、N(R₁₀)C(O)O(R₁₁)、N(R₁₂)C(O)N(R₁₀)(R₁₁)、N(R₁₂)C(S)N(R₁₀)(R₁₁)、N(R₁₀)S(O₂)(R₁₁)、C(O)(R₁₀)、C(O)O(R₁₀)、C(O)N(R₁₀)(R₁₁)、C(=

$N(R_{11})$ (R_{10})、 $C(=N(OR_{11}))$ (R_{10})、 $S(R_{10})$ 、 $S(O)$ (R_{10})、 $S(O_2)$ (R_{10})、 $S(O_2)O$ (R_{10})、 $S(O_2)N$ (R_{10}) (R_{11}) ;其中各个 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 独立地选自 H、烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、环烷基、杂环基、取代的烷基、取代的烯基、取代的炔基、取代的芳基、取代的杂芳基、取代的环烷基、取代的杂环基。

[0017] 在该专利中,优选地 X 为 O, R_3 为甲基, R_{4a} 和 R_{4b} 为 H;L 为 $NHCONH$;A 为苯基;Ar 为苯基;但在该申请中,没有实施例描述 Ar 的取代以及其药代动力学的效果。

[0018] 本发明的一个主题是两个包括在前述申请中的化合物,其对应于式 (I) :

[0019]



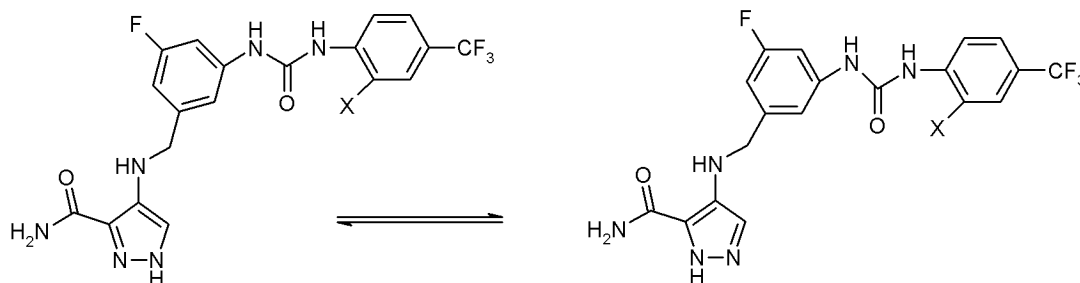
[0020] 其中 :

[0021] X 表示 Cl 或 F。

[0022] 式 (I) 化合物可以以碱的形式或酸加成盐的形式存在。这些加成盐是本发明的一部分。

[0023] 下面所示的呈其两个互变异构形式的化合物包括于本发明 :

[0024]



[0025] 这些盐可用药学上可接受的酸制备,但其它酸的盐 (例如有用于式 (I) 化合物的纯化和分离的盐) 也是本发明的一部分。在这些可用的盐中,可尤其提及盐酸盐。

[0026] 式 (I) 化合物可以以水合物或溶剂合物的形式存在,即以与一个或多个水分子或溶剂分子联合或结合的形式存在。所述水合物和溶剂合物也是本发明的一部分。

[0027] 在本发明主题的式 (I) 化合物中,尤其可提及下列化合物 :

[0028] -4-{3-[3-(2-氯-4-三氟甲基苯基)脲基]-5-氟苄基氨基}-1H-吡唑-3-甲酰胺及其盐酸盐 ;

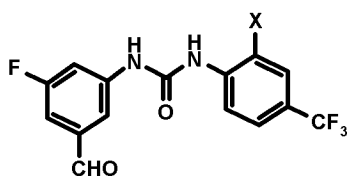
[0029] -4-{3-[3-(2-氟-4-三氟甲基苯基)脲基]-5-氟苄基氨基}-1H-吡唑-3-甲酰胺及其盐酸盐。

[0030] 根据本发明,可能根据下列方法制备通式 (I) 化合物。

[0031] 在下列方案中,若未阐述初始化合物和反应物的制备方法,则它们是市售可得或记载于文献中,或者可根据本文描述的方法或本领域技术人员公知的方法制备。

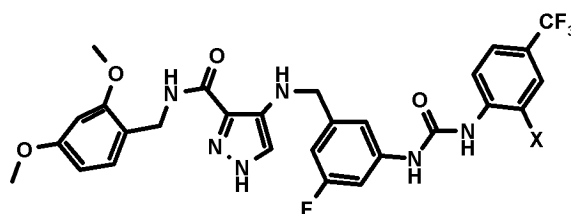
[0032] 根据其另一方面,本发明的另一主题是下式的化合物:

[0033]



[0034] 和

[0035]



[0036] 其中 X 表示 F 或 Cl。

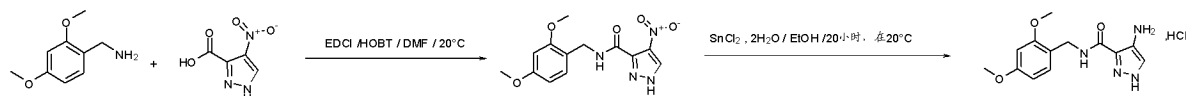
[0037] 这些化合物作为式 (I) 化合物的合成中间体使用。

[0038] 下列实施例公开了符合本发明的化合物的制备。这些实施例并非限制性,且仅用于例示本发明。

[0039] 实施例的合成方法

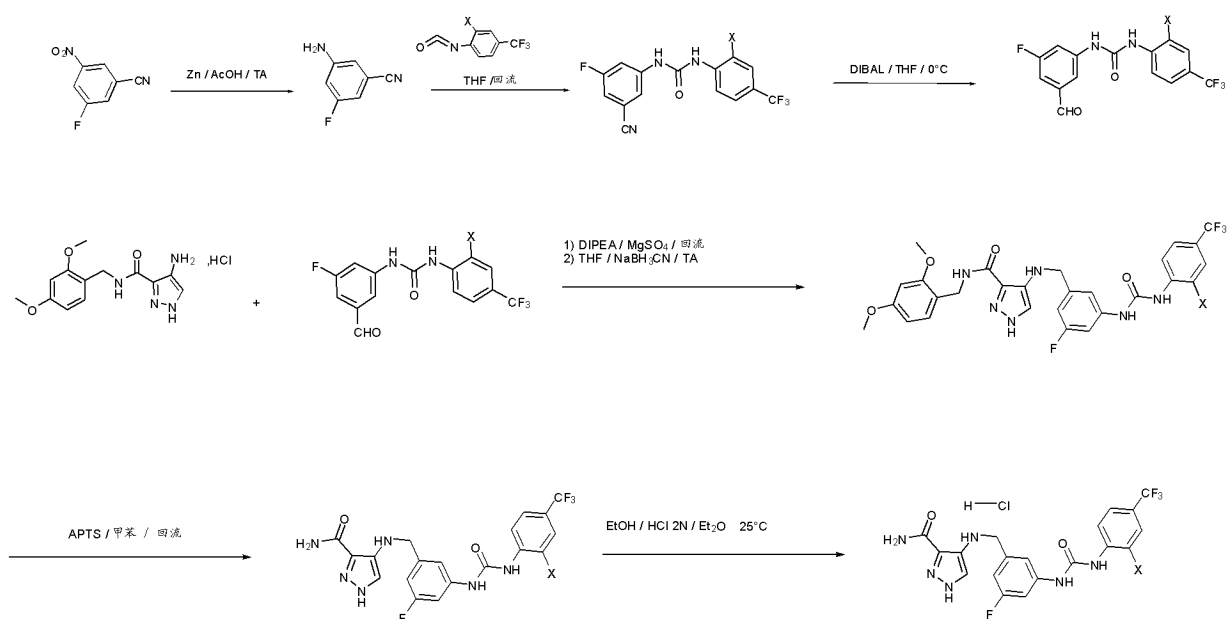
[0040] 氨基-吡唑部分的合成

[0041]



[0042] 二芳基-脲部分的合成

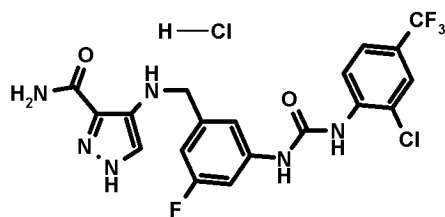
[0043]



[0044] 实施例 1

[0045] 4-[3-[3-(2-氯-4-三氟甲基苯基)脲基]-5-氟苄基氨基]-1H-吡唑-3-甲酰胺盐酸盐

[0046]



[0047] 在氩气氛下,将 1.64g (3.48mmol) 的 4-{3-[3-(2-氯-4-三氟甲基苯基)脲基]-5-氟苄基氨基}-1H-吡唑-3-甲酰胺在 50ml 乙醇中的混悬液在环境温度搅拌。然后滴加 35ml (35mmol) 氯化氢的乙醚溶液 (1N)。该反应介质变为澄清溶液。在环境温度搅拌 10 小时后,使用旋转蒸发仪减压下蒸发溶剂。所得残余物在 50ml 乙醚中搅拌 30 分钟。

[0048] 过滤,并在烘箱中干燥后,得到 1.8g 的 4-{3-[3-(2-氯-4-三氟甲基苯基)脲基]-5-氟苄基氨基}-1H-吡唑-3-甲酰胺盐酸盐,其为淡黄色晶体的形式。

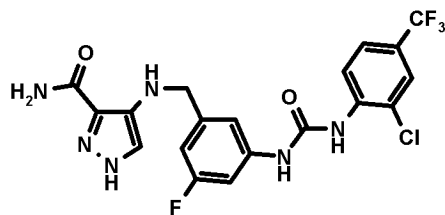
[0049] MS:保留时间 Tr(分钟) = 1.01; $[M+H]^+ m/z = 471$; $[M-H]^- m/z = 469$ 。

[0050] 1H NMR (400MHz, DMSO-d) δ ppm: 4.32 (s, 2H), 6.89 (宽 d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 7.16 (宽 s, 1H), 7.18-7.61 (m, 4H), 7.68 (宽 d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.86 (宽 s, 1H), 8.44 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 8.81 (宽 m, 1H), 10.17 (宽 m, 1H)。

[0051] 熔点 (Kofler) = 177°C。

[0052] 4-{3-[3-(2-氯-4-三氟甲基苯基)脲基]-5-氟苄基氨基}-1H-吡唑-3-甲酰胺

[0053]



[0054] 将 5.9g (9.5mmol) 的 4-{3-[3-(2-氯-4-三氟甲基苯基)脲基]-5-氟苄基氨基}-1H-吡唑-3-(2,4-二甲氧苄基酰胺)和 4.5g (24mmol) 对甲苯磺酸在 400ml 甲苯中的溶液在回流下加热 2 小时。静置后,从黄色胶质分离甲苯溶液。胶质在 150ml 甲醇和 500ml 乙酸乙酯中稀释。然后加入 500ml 水。接着冷却溶液,然后用 100ml 氢氧化钾的水溶液 (10N) 碱化。静置后,水相用 400ml 乙酸乙酯和 100ml 甲醇的溶液萃取。再次合并有机相,并用 100ml 饱和氯化钠溶液洗涤,用硫酸镁干燥,并减压下浓缩得到淡黄色固体,其经 200g 硅胶纯化,用二氯甲烷/甲醇/乙腈 80/10/10 (体积比) 的溶液洗脱:得到 1.77g 的 4-{3-[3-(2-氯-4-三氟甲基苯基)脲基]-5-氟苄基氨基}-1H-吡唑-3-甲酰胺,其为白色固体的形式。

[0055] MS:保留时间 Tr(分钟) = 4.29; $[M+H]^+ m/z = 471$; $[M-H]^- m/z = 469$ 。

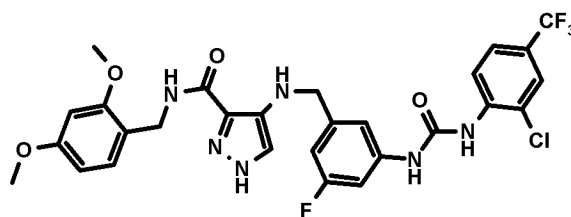
[0056] 1H NMR (400MHz, DMSO-d) δ ppm: 4.19 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H), 5.74 (宽 m, 1H), 6.80 (宽 d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 6.95-7.11 (m, 3H), 7.24 (不能解析的宽 m, 1H), 7.42 (dt, $J = 11.3$, 2.3Hz, 1H), 7.67 (宽 d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.86 (宽 s, 1H), 8.44 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 8.70 (宽 s, 1H), 9.92 (宽 s, 1H), 12.57 (宽 s, 1H)。

[0057] 熔点 (Kofler): 220°C。

[0058] 4-{3-[3-(2-氯-4-三氟甲基苯基)脲基]-5-氟苄基氨基}-1H-吡唑-3-(2,4-二

甲氧基苄基酰胺)

[0059]



[0060] 在氩气氛下,将 10g(32mmol) 的 4-氨基-1H-吡唑-3-(2,4-二甲氧基苄基酰胺)盐酸盐和 5.9ml(35.2mmol) 二异丙基乙胺在 300ml 四氢呋喃中的溶液在环境温度搅拌。加入 3.85g(35mmol) 硫酸镁和 12.70g(35.2mmol) 的 1-(2-氯-4-三氟甲基苯基)-3-(3-氟-5-甲酰基苯基)脲。然后将该反应混合物加热回流 14 小时。然后将该混合物冷却至 25℃,然后缓慢加入 10.08g(160mmol) 氰基硼氢化钠。在环境温度搅拌 12 小时后,该混合物使用旋转蒸发仪浓缩至干。所得胶质在 300ml 水和 500ml 氢氧化钠的水溶液(1N)中搅拌。该混悬液在 1L 二氯甲烷中搅拌 30 分钟。通过 3 号玻璃砂芯过滤后,所得固体用 2×500ml 水冲洗,然后在 40℃在真空烘箱中干燥。然后在高温在 800ml 甲醇中重结晶该固体,得到 8.3g 的 4-{3-[3-(2-氯-4-三氟甲基苯基)脲基]-5-氟苄基氨基}-1H-吡唑-3-(2,4-二甲氧基苄基酰胺),其为白色粉末的形式。

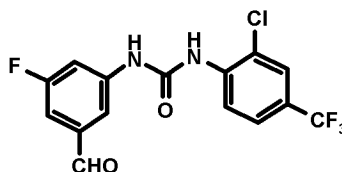
[0061] MS:保留时间 Tr(分钟)=4.97;[M+H]⁺m/z=621;[M-H]⁻m/z=619。

[0062] ¹H NMR(400MHz,DMSO-d) δ ppm:3.73(s,3H),3.81(s,3H),4.19(d,J=6.7Hz,2H),4.33(d,J=6.7Hz,2H),5.71(宽 t,J=6.7Hz,1H),6.46(dd,J=8.3,2.3Hz,1H),6.55(d,J=2.3Hz,1H),6.80(宽 d,J=9.6Hz,1H),7.04(宽 s,1H),7.08(s,1H),7.10(d,J=8.9Hz,1H),7.43(dt,J=11.4,2.3Hz,1H),7.67(宽 d,J=8.9Hz,1H),7.86(宽 s,1H),7.94(宽 t,J=6.7Hz,1H),8.45(d,J=8.9Hz,1H),8.62(不能解析的宽 m,1H),9.79(不能解析的宽 m,1H),12.60(不能解析的宽 m,1H)。

[0063] 熔点(Kofler):168℃。

[0064] 1-(2-氯-4-三氟甲基苯基)-3-(3-氟-5-甲酰基苯基)脲

[0065]



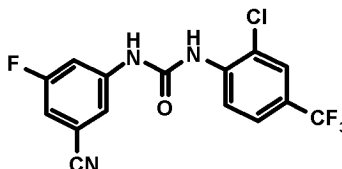
[0066] 在氩气氛下,在 -10℃ 搅拌 33.15g(92.68mmol) 的 1-(2-氯-4-三氟甲基苯基)-3-(3-氟-5-甲酰基苯基)脲在 600ml 四氢呋喃中的溶液。接着,用常规的“滴加”操作滴加 230ml 二异丁基氢化铝在甲苯中浓度为 20% 的溶液。该反应混合物在环境温度搅拌 12 小时。接着,在 -10℃ 加入另外的 80ml 二异丁基氢化铝。在环境温度搅拌 14 小时后,该反应介质使用旋转蒸发仪浓缩至干,得到粘稠油状物,向其中伴随搅拌缓慢加入 500g 冰和 100ml 的 100% 乙酸。过滤所得混悬液。然后在 2×800ml 乙酸乙酯中稀释该固体,并用 600ml 饱和氯化钠溶液洗涤该有机溶液,用硫酸镁干燥,,过滤,使用旋转蒸发仪浓缩至干并在 40℃在真空烘箱中干燥,得到 29.57g 的 1-(2-氯-4-三氟甲基苯基)-3-(3-氟-5-甲酰基苯基)脲,其为淡黄色粉末的形式。

[0067] MS:保留时间 Tr(分钟) = 4.86; $[M+H]^+ m/z = 361$; $[M-H]^- m/z = 359$ 。

[0068] 1H NMR(400MHz, DMSO-d) δ ppm: 7.35(ddd, $J = 8.4, 2.3, 1.8$ Hz, 1H), 7.67-7.75(m, 2H), 7.78(t, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.88(d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 8.45(d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.72(宽 s, 1H), 9.98(d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 10.07(宽 s, 1H)

[0069] 1-(2-氯-4-三氟甲基苯基)-3-(3-氰基-5-氟苯基)脲

[0070]



[0071] 在氩气氛下,在环境温度搅拌 15g(110.2mmol)的 5-氟-3-氰基苯胺在 150ml 四氢呋喃中的溶液。接着,加入 17.5ml(121.22mmol)的 2-氯-4-三氟甲基苯基异氰酸酯。将该反应介质在回流加热 3 小时,然后使用旋转蒸发仪浓缩至干。所得固体残余物在高温在 60ml 乙酸乙酯中重结晶,得到 33.25g 的 1-(2-氯-4-三氟甲基苯基)-3-(3-氰基-5-氟苯基)脲,其形式为白色固体。

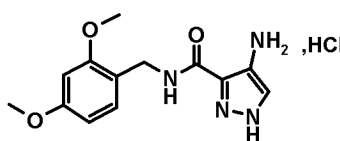
[0072] MS:保留时间 Tr(分钟) = 4.97; $[M+H]^+ m/z = 356$ 。

[0073] 熔点(Kofler):286°C。

[0074] 5-氟-3-氰基苯胺是市售产品。

[0075] 4-氨基-1H-吡唑-3-(2,4-二甲氧基苄基酰胺)盐酸盐

[0076]



[0077] 在环境温度搅拌 6.12g(20mmol)的 4-硝基-1H-吡唑-3-(2,4-二甲氧基苄基酰胺)在 340ml 乙醇中的混悬液。接着,经 5 分钟加入 15.8g(70mmol)氯化锡二水合物。在环境温度搅拌该反应混合物 14 小时,然后使用旋转蒸发仪浓缩至干。所得残余物在 330ml 饱和的碳酸氢钠水溶液和 300ml 二氯甲烷中搅拌。沉降后,有机相用 2×150ml 二氯甲烷萃取。再次合并有机相,用 150ml 饱和氯化钠溶液洗涤并用硫酸镁干燥。使用旋转蒸发仪浓缩后,得到 4.57g 的 4-氨基-1H-吡唑-3-(2,4-二甲氧基苄基酰胺)盐酸盐,其为紫色固体的形式。

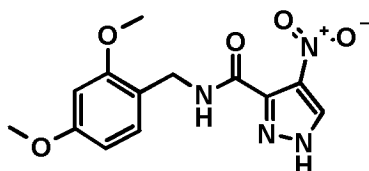
[0078] MS:EI: $[M]^+ m/z = 276$;基峰 $m/z = 151$ 。

[0079] 1H NMR(400MHz, DMSO-d) δ ppm: 3.73(s, 3H), 3.81(s, 3H), 4.31(d, $J = 6.2$ Hz, 2H), 4.56(不能解析的宽 m, 2H), 6.46(dd, $J = 8.3, 2.9$ Hz, 1H), 6.55(d, $J = 2.9$ Hz, 1H), 7.06-7.13(m, 2H), 7.84(t, $J = 6.2$ Hz, 1H), 12.50(不能解析的宽 m, 1H)。

[0080] 熔点(Buchi):186°C。

[0081] 4-硝基-1H-吡唑-3-(2,4-二甲氧基苄基酰胺)

[0082]



[0083] 在环境温度搅拌 14.65g (76.4mmol) 的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺二水合物和 10.32g (76.4mmol) 的 1-羟基苯并三唑在 50ml 二甲基甲酰胺中的溶液。加入 11.7g (70.03mmol) 的 2,4-二甲氧基苄基胺, 然后分小份加入 10.2g 的 4-硝基-3-吡唑甲酸。在环境温度搅拌 16 小时后, 将该反应介质倾倒入 500ml 水中。过滤该混悬液, 然后用 2×250ml 水洗涤。所得固体在 40℃ 在真空烘箱中干燥, 得到 18.58g 的 4-硝基-1H-吡唑-3-(2,4-二甲氧基苄基酰胺), 其为白色固体的形式。

[0084] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d) δ ppm : 3.75 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 4.35 (d, J = 5.9Hz, 2H), 6.50 (dd, J = 8.3, 2.4Hz, 1H), 6.56 (d, J = 2.4Hz, 1H), 7.21 (d, J = 8.3Hz, 1H), 8.71 (宽 s, 1H), 8.88 (宽 t, J = 5.9Hz, 1H), 14.13 (不能解析的宽 m, 1H)。

[0085] MS (ES+/-) 保留时间 Tr (分钟) = 3.23 ; $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 307$; $[\text{M}-\text{H}]^- m/z = 305$ 。

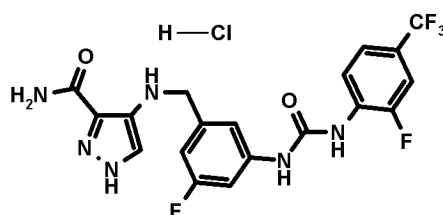
[0086] 熔点 (Kofler) : 192℃。

[0087] 4-硝基-3-吡唑甲酸是市售产品。

[0088] 实施例 2

[0089] 4-{3-[3-(2-氟-4-三氟甲基苯基)脲基]-5-氟苄基氨基}-1H-吡唑-3-甲酰胺盐酸盐

[0090]



[0091] 在氩气氛下, 在环境温度搅拌 1.85g (0.40mmol) 的 4-{3-[3-(2-氟-4-三氟甲基苯基)脲基]-5-氟苄基氨基}-1H-吡唑-3-甲酰胺在 40ml 乙醇中的混悬液。然后滴加 20ml (40mmol) 氯化氢的乙醚溶液 (1N)。该反应介质变为澄清溶液。在环境温度搅拌 12 小时后, 使用旋转蒸发仪减压下蒸发溶剂。所得残余物在 200ml 乙醚中搅拌 30 分钟。

[0092] 过滤并在烘箱中干燥后, 得到 1.75g 的 4-{3-[3-(2-氟-4-三氟甲基苯基)脲基]-5-氟苄基氨基}-1H-吡唑-3-甲酰胺盐酸盐, 其为淡黄色晶体的形式。

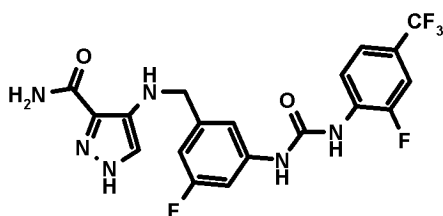
[0093] ^1H NMR (400MHz, DMSO-d6) δ ppm : 4.24 (s, 2H), 6.83 (d, J = 9.0Hz, 1H), 7.08 (s, 1H), 7.18 (宽 s, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.35 (宽 s, 2H), 7.42 (dt, J = 11.3, 2.0Hz, 1H), 7.54 (d, J = 8.8Hz, 1H), 7.69 (dd, J = 11.2, 1.5Hz, 1H), 8.41 (t, J = 8.2Hz, 1H), 8.99 (s, 1H), 9.54 (s, 1H)。

[0094] MS : 保留时间 Tr (分钟) = 0.97 ; $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 455$ 。

[0095] 熔点 (Kofler) : 184℃ (分解)。

[0096] 4-{3-[3-(2-氟-4-三氟甲基苯基)脲基]-5-氟苄基氨基}-1H-吡唑-3-甲酰胺

[0097]



[0098] 将 22.3g (36.89mmol) 的 4-{3-[3-(2-氟-4-三氟甲基苯基)脲基]-5-氟苄基氨基}-1H-吡啶-3-(2,4-二甲氧基苄基酰胺) 和 17.54g (92.22mmol) 对甲苯磺酸在 600ml 甲苯中的溶液在回流下加热 14 小时。静置后, 该甲苯溶液从黄色胶质分离。胶质在 280ml 水和 100ml 氢氧化钠 (10N) 中搅拌 2 小时。过滤该混悬液。所得固体用 3×350ml 水冲洗然后干燥, 得到膏状固体, 其经 350g 硅胶纯化, 用二氯甲烷/甲醇/乙腈的 95/2.5/2.5 (体积比) 溶液洗脱: 得到 3.85g 的 4-{3-[3-(2-氟-4-三氟甲基苯基)脲基]-5-氟苄基氨基}-1H-吡啶-3-甲酰胺, 其形式为白色固体。

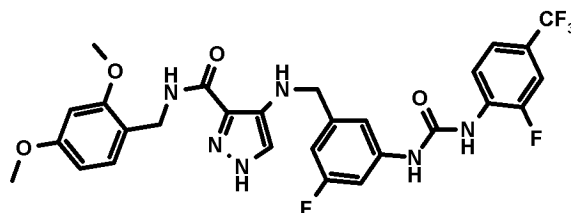
[0099] ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 4.18 (d, $J = 5.9\text{Hz}$, 2H), 5.68-5.77 (m, 1H), 6.80 (d, $J = 8.8\text{Hz}$, 1H), 7.01-7.08 (宽 s, 1H), 7.04 (s, 1H), 7.06 (s, 1H), 7.24 (宽 s, 1H), 7.40 (dt, $J = 11.4, 2.0\text{Hz}$, 1H), 7.54 (d, $J = 8.3\text{Hz}$, 1H), 7.69 (d, $J = 11.5\text{Hz}$, 1H), 8.41 (t, $J = 8.4\text{Hz}$, 1H), 8.92 (宽 s, 1H), 9.40 (宽 s, 1H), 12.55 (宽 s, 1H)。

[0100] MS: 保留时间 Tr (分钟) = 4.09; $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z = 455$; $[\text{M}-\text{H}]^- m/z = 453$ 。

[0101] 熔点 (Kofler): 233°C。

[0102] 4-{3-[3-(2-氟-4-三氟甲基苯基)脲基]-5-氟苄基氨基}-1H-吡啶-3-(2,4-二甲氧基苄基酰胺)

[0103]



[0104] 在氩气氛下, 在环境温度搅拌 11.40g (36.45mmol) 的 4-氨基-1H-吡啶-3-(2,4-二甲氧基苄基酰胺) 盐酸盐和 6.65ml (40.09mmol) 二异丙基乙胺在 360ml 四氢呋喃中的溶液。加入 4.35g (36.45mmol) 硫酸镁和 13.80g (35.2mmol) 的 1-(2-氟-4-三氟甲基苯基)-3-(3-氟-5-甲酰基苯基)脲。然后在回流加热该反应混合物 14 小时。然后冷却该混合物至 25°C, 之后缓慢加入 11.46g (182.25mmol) 氰基硼氢化钠。在环境温度搅拌 72 小时后, 该混合物使用旋转蒸发仪浓缩至干。所得胶质在 400ml 水和 500ml 氢氧化钠溶液 (1N) 中搅拌。该混悬液搅拌 1 小时, 然后通过 3 号玻璃砂芯过滤, 所得固体用 3×500ml 水冲洗, 然后在 40°C 在真空烘箱中干燥, 得到 22.45g 的 4-{3-[3-(2-氟-4-三氟甲基苯基)脲基]-5-氟苄基氨基}-1H-吡啶-3-(2,4-二甲氧基苄基酰胺), 其为粉色固体的形式。

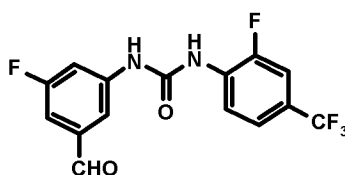
[0105] ^1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 3.73 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 4.18 (d, $J = 6.3\text{Hz}$, 2H), 4.33 (s, 2H)-5.70 (t, $J = 6.2\text{Hz}$, 1H), 6.47 (d, $J = 8.2\text{Hz}$, 1H), 6.55 (s, 1H), 6.79 (d, $J = 9.1\text{Hz}$, 1H), 7.05 (s, 1H), 7.07-7.12 (m, 2H), 7.41 (d, $J = 11.3\text{Hz}$, 1H), 7.53 (d, $J = 8.2\text{Hz}$, 1H), 7.68 (d, $J = 11.3\text{Hz}$, 1H), 7.95 (宽 s, 1H)-8.40 (t, $J = 8.2\text{Hz}$, 1H), 9.25 (宽 s, 2H), 12.52 (宽 s, 1H)。

[0106] MS:保留时间 Tr(分钟) = 4.79; $[M+H]^+ m/z = 605$; $[M-H]^- m/z = 603$ 。

[0107] 熔点 (Kofler): 152°C。

[0108] 1-(2-氟-4-三氟甲基苯基)-3-(3-氟-5-甲酰基苯基)脲

[0109]



[0110] 在氩气氛下,在-2°C搅拌 11.90g(34.87mmol)的 1-(2-氟-4-三氟甲基苯基)-3-(3-氟-5-甲酰基苯基)脲在 150ml 四氢呋喃中的溶液。接着,用常规的“滴加”操作滴加浓度为 20%的二异丁基氢化铝的己烷溶液(86ml)。该反应混合物在环境温度搅拌 12 小时。接着,在-2°C加入另外的 60ml 二异丁基氢化铝。在环境温度搅拌 3 小时后,使用旋转蒸发仪将该反应介质浓缩至干,得到粘稠油状物,伴随搅拌向其中缓慢加入 500g 冰和 300ml 的 100%乙酸。过滤所得混悬液。所得固体用 4×150ml 水洗涤,离心并在 40°C 在真空烘箱中干燥,得到 13.95g 的 1-(2-氟-4-三氟甲基苯基)-3-(3-氟-5-甲酰基苯基)脲,其为淡黄色固体的形式。

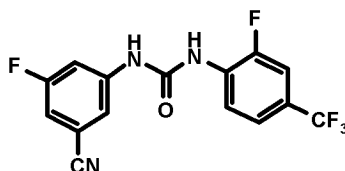
[0111] 1H NMR(400MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 7.33-7.38(m, 1H), 7.57(d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.69-7.75(m, 2H), 7.79(s, 1H), 8.41(t, $J = 8.3$ Hz, 1H), 9.05(宽 s, 1H), 9.65(s, 1H), 9.98(d, $J = 1.7$ Hz, 1H)。

[0112] MS:保留时间 Tr(分钟) = 4.62; $[M+H]^+ m/z = 345$; $[M-H]^- m/z = 343$ 。

[0113] 熔点 (Kofler): 247°C。

[0114] 1-(2-氟-4-三氟甲基苯基)-3-(3-氟-5-甲酰基苯基)脲

[0115]



[0116] 在氩气氛下,在环境温度搅拌 6.15g(45.18mmol)的 5-氟-3-氰基苯胺在 90ml 四氢呋喃中的溶液。先后滴加 4.3ml(36.14mmol)双光气和 30ml(135.54mmol)三乙胺。在该反应混合物中回流 3 小时后,缓慢加入 7.10g(39.64mmol)的 4-氨基-3-氟三氟甲基苯在 10ml 四氢呋喃中的溶液。回流保持另外的 2 小时。搅拌下将该介质加入 100ml 水中,然后用 100ml 乙酸乙酯萃取。有机相用 100ml 饱和氯化钠溶液洗涤,用硫酸镁干燥,并使用旋转蒸发仪浓缩至干。所得固体残余物在高温在 90ml 乙腈中重结晶,得到 10.35g 的 1-(2-氟-4-三氟甲基苯基)-3-(3-氟-5-甲酰基苯基)脲,其为膏状固体的形式。

[0117] 1H NMR(400MHz, DMSO- d_6) δ ppm: 7.47(d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.57(d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.69(s, 1H), 7.70-7.75(m, 2H), 8.37(t, $J = 8.4$ Hz, 1H), 9.17(宽 s, 1H), 9.63(宽 s, 1H)。

[0118] MS:保留时间 Tr(分钟) = 1.1; $[M+H]^+ m/z = 341$ 。

[0119] 熔点 (Kofler): 253°C。

[0120] 本发明的产物可用作一种或多种激酶催化的反应的抑制剂。KDR 和 / 或 Tie2 是本发明的产物尤其可用作抑制剂的激酶。

[0121] 选择这些激酶的原因如下：

[0122] KDR

[0123] KDR(激酶插入区域受体),也已知为 VEGF-R2(血管内皮生长因子 2),主要在内皮细胞中表达。这一受体连接促血管生成因子 VEGF,且因此通过其细胞内激酶区域的活化起转导信号媒介的作用。直接抑制 VEGF-R2 的激酶活性使得在外源性 VEGF(血管内皮生长因子)的存在下减少血管生成现象成为可能(Strawn 等人, Cancer Research, 1996, vol. 56, p. 3540-3545)。这一过程尤其使用 VEGF-R2 突变体而证实(Millauer 等人, Cancer Research, 1996, vol. 56, p. 1615-1620)。除了与 VEGF 的血管生成活性有关, VEGF-R2 受体似乎在成年人中没有其它功能。除了动态血管生成过程中的这一核心作用,近期研究结果表明 VEGF 的表达促进化疗和放疗后肿瘤细胞的存活,表明了 KDR 抑制剂与其它药物的可能协同作用(Lee 等人, Cancer Research, 2000, vol. 60, p. 5565-5570)。

[0124] Tie2

[0125] Tie-2(TEK) 是酪氨酸激酶受体家族的成员,其对内皮细胞具有特异性。Tie2 是酪氨酸激酶活性的第一个受体,其激动剂和拮抗剂都是已知的:激动剂(血管生成素 1 或 Ang1)刺激受体和细胞信号的自磷酸化作用[S. Davis 等人, (1996) Cell 87, 1161-1169],拮抗剂为血管生成素 2 或 Ang2[P. C. Maisonpierre 等人, (1997) Science 277, 55-60]。在血管新生的最后阶段,血管生成素 1 与 VEGF 可具有协同效应[Asahara T., Circ. Res. (1998) 233-240]。Tie2 或 of Ang1 的敲除实验和转基因操作导致动物出现血管化作用缺陷[D. J. Dumont 等人, (1994) Genes Dev. 8, 1897-1909 和 C. Suri (1996) Cell 87, 1171-1180]。Ang1 与其受体的结合引起 Tie2 激酶区域的自磷酸化作用,其对于新血管化作用以及血管与周皮细胞和平滑肌细胞的补充和相互作用是必要的;这些现象促进新形成的血管的成熟和稳定[P. C. Maisonpierre 等人, (1997) Science 277, 55-60]。Lin 等人, (1997) J. Clin. Invest. 100, 8:2072-2078 和 Lin P. (1998) PNAS 95, 8829-8834 已显示在腺病毒感染中或将 Tie-2(Tek) 的细胞外区域注射入黑素瘤和乳腺癌异种移植物模型中,肿瘤生长和血管化作用得以抑制以及肺转移酶得以减少。

[0126] 由于以下原因, Tie2 抑制剂可在异常的新血管化作用或血管生成的情况下使用,即通常为癌症(特别是例如卡波西肉瘤或婴幼儿血管瘤)、类风湿性关节炎、骨关节炎和/或其相关的疼痛、肠道炎性疾病(例如出血性直肠结肠炎或克罗恩病)、眼病(例如与年龄相关的黄斑变性)、糖尿病性视网膜病、慢性炎症和银屑病。

[0127] 血管生成是从已有血管产生新的毛细血管的过程。对于肿瘤生长所必要的肿瘤血管生成(生成新血管)也是转移性扩散的一个重要因素(Oncogene. 2003 May 19; 22(20): 3172-9; Nat. Med. 1995 Jan; 1(1): 27-31)。

[0128] 这一新血管化作用是由于在由癌细胞和基质细胞分泌的血管生成因子影响下内皮细胞的迁移然后增殖分化(Recent Prog. Horm. Res. 2000; 55: 15-35; 35-6)。

[0129] 血管生成素 1/Tie2 受体系统通过补充内皮周围细胞在血管的成熟中起着主要作用,从而稳定血管(Cell. 1996 Dec. 27; 87(7): 1161-9, Recent Prog. Horm. Res. 2004; 59: 51-71)。因此,已经显示将 Tie-2 受体(exTek) 细胞外区域的可溶解重组形式给予鼠科动物肿瘤模型中,可抑制肿瘤血管生成和转移生长(Pengnian Lin, Jake A. Buxton, Ann Acheson, Czeslaw Radziejewski, Peter C. Maisonpierre, George D. Yancopoulos,

Keith M. Channon, Laura P. Hale, Mark W. Dewhirst, Samuel E. George 和 Kevin G. Peters, *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1998 Jul 21 ;95(15) :8829-34 ; Cecilia Melani, Antonella Stoppacciaro, Chiara Foroni, Federica Felicetti, Alessandra Caré 和 Mario P. Colombo, *Cancer Immunol Immunother.* 2004 Jul ;53(7) :600-8)。在培养的内皮细胞中, Tie-2 的刺激激活了 PI3 激酶途径、p42/p44 途径 (细胞增殖和迁移中涉及)、PAF 的合成 (*Cell. Signal.* 2006 Apr 14 ;ahead of print, 促炎性活性中涉及的途径)。Tie2 的刺激激活了 Akt 途径并抑制细胞凋亡 (Laura M DeBusk, Dennis E Hallahan, Pengnian Charles Lin, *Exp. Cell Res.* 2004 Aug. 1 ;298(1) :167-77), 这是一种由其在细胞存活中的重要性而已知的转导途径。

[0130] 加入 exTek (Tie2 的可溶性受体) 抑制 Matrigel 的内皮细胞的拟管 (pseudotubules) 的形成 (Cecilia Melani, Antonella Stoppacciaro, Chiara Foroni, Federica Felicetti, Alessandra Caré 和 Mario P. Colombo, *Cancer Immunol Immunother.* 2004 Jul ;53(7) :600-8)。这些研究表明, Tie-2/ 血管生成素系统在成熟组织中的血管芽形成的第一阶段期间是必需的, 且 Tie-2 受体的功能之一是在血管形成的过程中增加内皮细胞的存活。并且, 血管生成素-1 刺激淋巴内皮细胞增殖以及淋巴血管生成 (新淋巴血管的发育), 这是有利于转移生长的途径 (Tohru Morisada, Yuichi Oike, Yoshihiro Yamada, Takashi Urano, Masaki Akao, Yoshiaki, Kubota, Hiromitsu Maekawa, Yoshishige Kimura, Masako Ohmura, Takeshi Miyamoto, Shiro Nozawa, Gou Young Koh, Kari Alitalo 和 Toshio Suda, *Blood.* 2005 Jun 15 ;105(12) :4649-56)。

[0131] 在对血管生成起作用的酶之中, 还可提及 PDGFR β (Guzman 和 Laurence H. Hurley, Univ. of Arizona, *Molecular Cloning of the Human PDGFR-beta Promoter and Targeting the G-Quadruplex-Forming Region to Control Gene Expression*; Biomedical Drug Discovery, Genomics/Gentics, Therapeutic)、FGFR1 (Somaia Elbauomy Elsheikh, Andrew R Green, ¹Maryou BK Lambros, Nicholas C Turner, Matthew J Grainge, ³Des Powe, ¹Ian O Ellis, 和 Jorge S Reis-Filho, *FGFR1 amplification in breast carcinomas: chromogenic in situ hybridization analysis*)、FLT1 (Shibuya M (2007), " Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1) : dual regulator for angiogenesis ", *Angiogenesis*, 9(4) :225-30 ; discussion 231) 和 VEGFR3 (Tamela, T. 等人, *Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation*, *Nature* 454, 656-660 (2005))。

[0132] 血管生成过程也对许多实体瘤的进展起主要作用。另外, 已显示随着原发肿瘤的血管生成的增加, 转移酶起效的可能性极大地提高 (*Br. J. Cancer.* 2002 May 20 ;86(10) :1566-77)。

[0133] 促血管生成药物对于白血病和淋巴瘤的潜在作用最近已有记载。具体地, 已经概括地报道在这些疾病中的细胞系可以通过免疫系统被天然破坏, 或恢复为有利于其存活和增殖的血管生成表现型。这一表现型的变化是由于血管生成因子的过度表达 (特别是通过巨噬细胞) 和 / 或这些因子从细胞外基质的动员所引起的 (Thomas DA, Giles FJ, Cortes J, Albitar M, Kantarjian HM, *Acta Haematol.*, (2001), vol. 207, pp. 106-190)。

[0134] 在 CML (慢性单核细胞白血病) 中骨髓的血管生成过程和 " 髓外疾病

(extramedullar disease) ” 有关。很多研究表明抑制血管生成可代表在这种疾病中所选的治疗 (Leuk. Res. 2006Jan ;30(1) :54-9 ;Histol. Histopathol. 2004Oct. ;19(4) :1245-60)。另外在此强调, Tie2/ 血管生成素系统的激活在患者患有多发性骨髓瘤的情况下与骨髓血管生成的发展有关 (Blood, 2003Jul 15 ;102(2) :638-45)。

[0135] 化合物活性的测定 - 实验方案

[0136] 1. KDR

[0137] 所述化合物的抑制作用在底物磷酸化的体外实验中通过闪烁技术 (96 孔 basic Flash Plate 型板) 测定。

[0138] 将人 KDR 酶的细胞质区域 (残基 790 至 1356) 以 GST 融合形式克隆至 pFastBac 杆状病毒表达载体中。将蛋白表达于 SF21 细胞中, 纯化并通过自磷酸化活化。底物由以 GST 融合蛋白形式表达和纯化的 PLC γ 的残基 658 至 850 组成。

[0139] KDR 激酶活性在缓冲液 20mM MOPS、10mM MgCl_2 、10mM MnCl_2 、1mM DTT, pH = 7.4 中测量。开始将化合物稀释于 100% DMSO 中, 然后在 30% DMSO/70% 缓冲液中制成 10X 溶液。在 4°C 先后加入 10 μl 10X 溶液和 70 μl 含 150ng (1.6pmol) KDR 酶的缓冲液。通过加入 20 μl 含 2 μg (41pmol) 的 PLC γ 底物、0.5 μCi 的 γ ^{33}P [ATP] 和 2 μM 冷的 ATP 的溶液而启动该反应。振摇所述板。在 37°C 培养 30 分钟后, 除去培养缓冲液, 且该孔用 300 μl 的 PBS 洗涤 3 次。各孔的放射性使用 Trilux- β Wallac 放射性计数器测定。

[0140] 背景噪音通过测量在四个不同的孔 (含 ATP (放射标记的和冷的) 和底物, 无酶和化合物) 中的放射性而确定。对照活性在四个含所有试剂而不含化合物的不同孔中测定。

[0141] 以不存在化合物时测得的对照活性的抑制百分比表示本发明的化合物对 KDR 活性的抑制。

[0142] 2. Tie2

[0143] 所述化合物的抑制作用在底物磷酸化的体外实验中通过闪烁技术 (96 孔 basic Flash Plate 型板) 测定。

[0144] 将对应于细胞内区域氨基酸 774-1124 的人的 Tie2 编码序列以 GST 融合蛋白形式引入 pFastBacGT 杆状病毒表达载体中。将 GST-Tie2 纯化并通过自磷酸化活化。底物由以 GST 融合蛋白形式表达和纯化的 PLC γ 的残基 658 至 850 组成。

[0145] Tie2 的激酶活性在 MOPS 20mM pH 7.4 缓冲液中测定, 该缓冲液含 10mM MgCl_2 、10mM MnCl_2 和 1mM DTT。开始将化合物稀释于 100% DMSO 中, 然后在 30% DMSO/70% 缓冲液中制成 10X 溶液。在 4°C 先后加入 10 μl 10X 溶液和 70 μl 含 100ng (1.5pmol) 的 Tie2 酶的缓冲液。通过加入 20 μl 含 2 μg (41pmol) 的 PLC γ 底物、0.5 μCi 的 γ ^{33}P [ATP] 和 2 μM 冷的 ATP 的溶液而启动该反应。振摇所述板。在 37°C 培养 30 分钟后, 除去培养缓冲液, 且该孔用 300 μl 的 PBS 洗涤 3 次。各孔的放射性使用 Trilux- β Wallac 放射性计数器测定。

[0146] 背景噪音通过测量在四个不同的孔 (含 ATP (放射标记的和冷的) 和底物, 无酶和化合物) 中的放射性而确定。对照活性在四个含所有试剂而不含化合物的不同孔中测定。

[0147] 以使没有化合物时测得的对照活性的抑制百分比计算和表示本发明的化合物对 Tie2 活性的抑制。

[0148] 3. 在 PLC γ 底物的存在下, 借助放射标记通过测量 FLT1 激酶磷酸化活性筛选分子

[0149] FLT1 的激酶活性与 Tie2 抑制的测定方法相同, 使用 70 μl 每孔含 13nM 的 FLT1 酶

的激酶缓冲液所组成的反应混合物。

[0150] 以不存在化合物时测得的对照活性的抑制百分比计算和表示本发明的化合物对 FLT1 活性的抑制。

[0151] 对应于各浓度的分子的抑制百分比如下计算：

[0152] $\%抑制 = (\text{所处理孔的平均 CPM} - \text{对照孔的平均 CPM}) / (\text{未处理孔的平均 CPM} - \text{对照的平均 CPM}) \times 100$ 。

[0153] 4. 在 PLC γ 底物的存在下,借助放射标记通过测量 PDGFR 激酶磷酸化活性筛选分子

[0154] 本试验以与 FLT1 酶类似的方式进行,其使用 16nM 的 PDGFR 酶代替 13nM 的 Flt1,并且将 18 μ l 的 GST-PDGFR 酶 (批次 VLT802) 以 4mg/ml (纯度 80%) 混合于 96 孔板中。

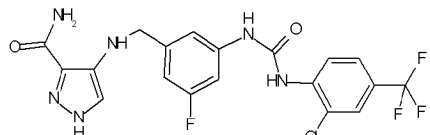
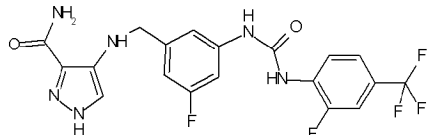
[0155] 5. 在 PLC γ 底物的存在下,借助放射标记通过测量 FGFR 激酶磷酸化活性筛选分子

[0156] 本试验以与 FLT1 酶类似的方式进行,其使用 27nM 的 FGFR 酶代替 13nM 的 Flt1,并且将 18 μ l 的 GST-FGFR 酶以 1.1mg/ml (纯度 100%) 混合于 96 孔板中:(批次 JCE3666)。

[0157] 结果:

[0158] 本发明实施例的化合物对 KDR 和 / 或 TIE2 抑制 50% 的激酶活性的浓度通常为 0.1nM 至 2 μ M,优选为 0.1nM 至 500nM,且更优选为 0.1nM 至 50nM。下面表 1 中的数值通过例示给出。

[0159]

化合物	KDR nM	Tie2 nM	PDGFR β nM	FGFR1 nM	FLT1 nM	VEGFR3 nM
	3	36	11	54	3	3
	2	39	20	92	1.3	

[0160] 将本发明的化合物进行药理学试验,所述试验能够测定其肝清除率。

[0161] 利用人肝细胞化合物的固有清除率的评估:试验方案。

[0162] NB:下述人肝细胞的体外试验用于预测重要的药代动力学参数:给予人时给定化合物的肝代谢。

[0163] 培养条件:

[0164] 冷藏保存的人肝细胞制品 (来自 IVT(In Vitro Technologies, inc. Baltimore, Maryland, USA):IVT-TLN-180608) 和人肝细胞的新鲜制品 (来自 Biopredic:HEP200239) 的培养在胶原-包被的 48 孔板中进行。

[0165] 实验条件:

[0166] 在不存在酮康唑 (CYP3A4 抑制剂) 或存在 10 μ M 酮康唑的情况下,通过加入终浓度为 5 μ M 的化合物而启动其动力学。培养体积为 100 μ l,培养时间 0-24 小时 (标准动力学点:0-0.5-1-2-4-6-8-24 小时)。

[0167] 通过加入乙腈 / 水与作为内标的皮质甾酮终止动力学。分离并溶解细胞。再次合并细胞内外的基质并冷冻 (-20°C), 以保存直至用于 LC-MS/MS 分析。

[0168] LC-MS/MS 分析方法 :

[0169] 将合并的细胞内外基质解冻, 进行超声, 涡旋振荡并在 3000g 离心 20 分钟。将上清液进样 LC-MS/MS 并分析。

[0170] 数据处理和“分类”

[0171] • 对细胞色素 P450 的具体代谢计算最大初始体外速率, 并以 $\text{nmol}/\text{小时}/\text{百万细胞}$ 表示。

[0172] $V = [\text{在 } T(n) \text{ 的浓度} - \text{在 } T(n-1) \text{ 的浓度}] / [T(n) - T(n-1)]$

[0173] 测定固有清除率并以 $\text{ml}/\text{小时}/\text{百万细胞}$ 表示

[0174] $Cl_{\text{int}} = \text{剂量} / AU_{0-24\text{h}}$

[0175] 剂量 = 在 $T(0)$ 的量 ($\text{nmol}/\text{百万细胞}$)

[0176] $AUC_{0-24\text{h}}$: 用 WinNonlin 计算, 使用非房室分析模型推注型静脉注射固有清除率如下分类:

[0177] $Cl_{\text{int}} < 0.040\text{ml} \cdot \text{h}^{-1} \cdot 10^{-6} \text{ 细胞}$: 中等固有清除率

[0178] $0.040 < Cl_{\text{int}} < 0.120\text{ml} \cdot \text{h}^{-1} \cdot 10^{-6} \text{ 细胞}$: 低固有清除率

[0179] $Cl_{\text{int}} > 0.040\text{ml} \cdot \text{h}^{-1} \cdot 10^{-6} \text{ 细胞}$: 高固有清除率

[0180] 供体的人口统计学信息:

[0181] 冷藏保存的人肝细胞的制备:

[0182] 来自 IVT: • IVT, TLN 组: 男性, 高加索人种, 年龄 25 岁

[0183] 新鲜人肝细胞的制备:

[0184] 来自 Biopredic: • HEP200239: 女性, 未知人种, 年龄 58 岁。

[0185] 在该试验中, 实施例 1 所述化合物的固有清除率值为 $0.057\text{ml}/\text{小时}/\text{百万细胞}$ (该值归类为中等, 其个体间差异小)。

[0186] 实施例 2 所述化合物的固有清除率值为 $0.055\text{ml}/\text{小时}/\text{百万细胞}$ (该值归类为中等, 其个体间差异小)。

[0187] 进行了测定本发明的化合物对结肠肿瘤的体内活性的其它试验。

[0188] 所述本发明的化合物对结肠肿瘤的活性在 B16 黑素瘤上研究。作为对比, 测试了专利申请 WO 08/065282 中实施例 19 的产品。

[0189] 可通过多个标准在体内确定产品的效果, 其可以通过肿瘤抑制 % T/C 的百分比来确定, 该百分比表示处理的第 12 或 13 天治疗组 (T) 和对照组 (C) 肿瘤平均重量比。当 T/C 比小于 42% 时产品视为有活性, 且当 T/C 比小于 10% 时产品视为具有高的抗肿瘤活性 (Corbett TH 等人, Cancer Research, 42, 1707-1715 (1982))。

[0190] 为了证明化合物的效果, 也可以确定 “ $\log_{10}$ 细胞杀灭 (cell kill)”, 其根据以下等式确定:

[0191] $\log_{10} \text{ 细胞杀灭} = T - C(\text{天}) / 3.32 \times T_d$

[0192] 其中 $T - C$ 表示达到预定值 (例如 750mg) 时治疗组 (T) 的肿瘤细胞和对照组 (C) 的肿瘤细胞生长的延迟, 其为以天表示的平均时间, 且 T_d 表示对照动物中肿瘤体积翻倍需要的时间, 以天表示 [T. H. Corbett 等人, Cancer, 40, 2660. 2680 (1977); F. M. Schabel 等人,

Cancer Drug Development, Part B, methods in Cancer Research, 17, 3-51, New York, Academic Press Inc. (1979)]。若 $\log_{10}$ 细胞杀灭为大于或等于 0.7 则产品视为有活性。若 $\log_{10}$ 细胞杀灭为大于 2.8 则产品视为非常有活性。

[0193] 化合物对于实体瘤的效果可通过以下方法经实验确定：

[0194] 进行实验的动物通常为 C57BL/6 雌性小鼠，第 0 天在其两侧皮下植入 30 至 60mg 的 B16 (参考肿瘤) 人肿瘤碎片。进行实验前将肿瘤动物随机分为治疗组和对照组。本发明的治疗肿瘤的情形下，在早期阶段开始治疗，即植入后的 3 至 4 天。经历化合物治疗的动物体重约为 20g。肿瘤动物也单独使用赋形剂进行同样的治疗，以能够确定赋形剂的毒性作用与对肿瘤事实上的化疗作用无关。化合物按表中所示的剂量并与表中所示的赋形剂通过口服每日两次给药。根据该研究，所述给药在植入肿瘤后持续 8 至 11 天。

[0195] 每周测定肿瘤两次或三次，直至肿瘤达到约 2g 或直至动物在肿瘤达到 2g 之前死亡。处死动物时进行尸体解剖。

[0196] 抗肿瘤活性根据所记录的不同参数确定。

[0197] 例如，下面的表给出本发明的化合物在其最优剂量得到的结果。

[0198] 因此，本发明的一个主题是含式 (I) 化合物或其与药学上可接受的酸形成的加成的盐的药物。

[0199] 根据其另一方面，本发明涉及式 (I) 化合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途。本发明的化合物可用于制备药物，特别是抑制血管生成的药物。

[0200] 这些药物的治疗用途尤其用于癌性肿瘤 (特别是实体瘤) 的治疗。

[0201] 根据其另一方面，本发明涉及药物组合物，其含有至少一种本发明的化合物作为活性成分。这些药物化合物含有有效剂量的至少一种本发明的化合物，或所述化合物的药学上可接受的盐，以及至少一种药学上可接受的赋形剂。

[0202] 根据药学形式和所需的给药形式，所述赋形剂选自本领域技术人员已知的常用赋形剂。

[0203] 在用于口服、舌下、皮下、肌内、静脉内、局部 (topical)、表面 (local)、鞘内、鼻内、经皮或直肠给药的本发明的药物组合物中，上述式 (I) 的有效成分或其盐可以以单位给药形式，以与标准药学赋形剂的混合物，给予人或动物用于治疗上述病症或疾病。

[0204] 合适的单位给药形式包括口服形式，例如片剂、软或硬凝胶胶囊、粉剂、颗粒剂和口服溶液或悬浮液，舌下或含服给药形式，和经皮、皮下、肌内或静脉内给药形式。

[0205] 作为实例，以片剂形式的根据本发明的化合物单位给药形式可包含以下成分：

[0206]

根据本发明的化合物	50.0 mg
甘露醇	223.75 mg
交联羧甲基纤维素钠	6.0 mg
玉米淀粉	15.0 mg
羟丙基甲基纤维素	2.25 mg
硬脂酸镁	3.0 mg

[0207] 口服给药时，每天给药 (可一次或多次给药) 的活性成分剂量可达到 1200mg/kg。

[0208] 可以存在特殊情况,其中更高或更低剂量是合适的,这些剂量不偏离本发明的范围。根据通常实践,适合各患者的剂量通过医师根据给药方法和所述患者的体重和反应而确定。

[0209] 根据其另一方面,本发明还涉及用于治疗上述病理的方法,其包括向患者给药有效量的根据本发明的化合物或其药学可接受的盐。

[0210]

实施例 1 对 B16 早熟鼠类黑素瘤的作用评价

化合物 p.o. (给药天数)	剂量 mg/kg/给药	总剂量 mg/kg	产品导致的死亡 (死亡的天数)	%BWC (低点的天数)	第 13 天肿瘤的平 均重量(范围), mg	T/C, % 第 13 天	T-C, 天 750 mg	总 log 细胞杀死	注释
实施例 1	160.0	3178 ^b	0/5	-2.3 (6)	23 (0-89)	2	6.8	2.6	HDT 活性
第 4-14 天(2x/d) ^a	99	1966 ^b	0/5	-1.0 (5)	72 (0-75)	5	6.2	2.3	活性
	62	1232 ^b	0/5	+1.8 (5)	128 (75-273)	10	6.2	2.3	活性
第 4-14 天	44	481 ^b	0/5	+10.6 (15)	686 (243-1418)	51	-	-	无活性
赋形剂 PO 4-14 (2x/d)			0/10	+11.9 (15)	1334 (496-1650 ^c)				

BCM-1948。肿瘤翻倍的时间 = 0.8 天。制剂：实施例 1 = 98% PEG200, 2% PS80。所用缩写：BWC= 体重变化，HNTD= 最高无毒剂量，HDT = 最高测试剂量。^a 第 9 和 10 天每日一次。^b 剂量于第 7 天意外地减少 7%。^c 由于第 8 日一只小鼠意外死亡，仅计算 9 只小鼠。

p.o.= 口服。

[0211]

实施例 2 对 B16 早熟鼠类黑色素瘤的作用评价

化合物 p.o. (给药天数)	剂量 mg/kg/给药	总剂量 mg/kg	产品导致的死亡 (死亡的天数)	%BWC (低点的天数)	第 11 天肿瘤的平均 重量(范围), mg	T/C, % 第 11 天	T-C, 天 750 mg	总 log 细胞 杀死	注释
实施例 2	160.0	2560.0	6/6(10, 2d11, 13, 2d14)	-26.5(13)	-	-	-	-	毒性
第 3-10 天	99.2	1587.2	0/6	-8.1(11)	0 (0-14)	0	5.4	1.8	HNTD 活性
(2x/d)	61.5	984	0/6	+3.9 (11)	46 (0-95)	6	5.0	1.7	活性
第 3-10 天	44.0	352.0	0/6	+6.6(11)	201 (23-822)	27	3.0	1.0	活性
赋形剂 PO 3-10 (2x/d)			0/10	+9.3(11)	736 (222-1328)				

BCM-1979。肿瘤翻倍的时间=0.9 天。赋形剂组肿瘤达到 740 mg 的时间 = 11.9 天。制剂：实施例 2 = 20% Labrasol, 5% Solutol, 75%葡萄糖, 5%水。所用缩写：BWC= 体重变化, HNTD= 最高无毒剂量, HDT = 最高测试剂量。

p.o.= 口服

[0212]

WO 08/065282 的实施例 19 对 B16 早熟鼠类黑素瘤的作用评价

化合物 (给药天数)	剂量 mg/kg/给药	总剂量 mg/kg	产品导致的 死亡 (死亡的天 数)	%BWC (低点的天数)	第 12 天肿瘤的平均 重量(范围), mg	T/C, % 第 12 天	T-C, 天 750 mg	总 log 细 胞杀死	注释
WO 08/065282 的 实施例 18 p.o.3-13 (2x/d) ^a	120.0	2554.3 ^b	0/7 ^c	+8.3 (14)	441 (270-594)	29	4.2	1.2	HDT 活性
	74.4	1588.3 ^b	0/7 ^c	+10.6 (14)	459 (394-949)	30	3.6	1.0	活性
	46.1	984.0 ^b	0/7	-0.0 (4)	849 (576-1093)	56	-	-	无活性
赋形剂 p.o. 3-13 (2x/d) ^a	-		0/10	+18.3 (14)	1522 (1000-1762)				

BCM-1755. 肿瘤翻倍的时间 = 1.1 天。制剂: 实施例 3 = 40% Captisol 水溶液, pH = 3。治疗时间: 实施例 3 = 11 天。所用缩写: HDT = 最高测试剂量。^a 在第 3 天, 小鼠以每日一次治疗。^b 将母溶液进行 HPLC 测定后, 在第 3、4、11 至 13 天重新评价总剂量。^c 一只动物意外死亡, 计算 6 只动物的效果。