



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105980377 B

(45)授权公告日 2018.07.03

(21)申请号 201580007044.X

(72)发明人 张大为

(22)申请日 2015.02.03

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105980377 A

代理人 牛利民 郑霞

(43)申请公布日 2016.09.28

(51)Int.Cl.

(30)优先权数据

61/965,584 2014.02.04 US

C07D 403/12(2006.01)

A61K 31/16(2006.01)

A61P 35/04(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.08.03

(56)对比文件

CN 103269704 A,2013.08.28,

WO 2013/138502 A1,2013.09.19,

WO 2013138495 A1,2013.09.19,

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2015/072179 2015.02.03

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/117547 EN 2015.08.13

审查员 马晓婧

(73)专利权人 江苏迈度药物研发有限公司

地址 225300 江苏省泰州市中国医药城药
城大道一号国家新药创制基地双子楼
1610室

权利要求书2页 说明书20页

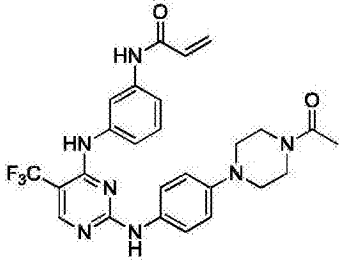
(54)发明名称

作为EGFR-T790M激酶抑制剂的取代的嘧啶
类化合物

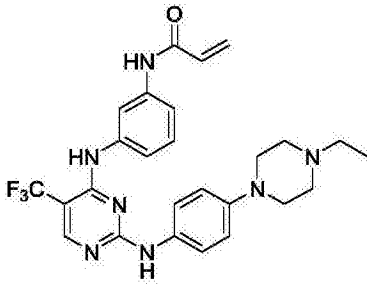
(57)摘要

本发明公开了一种新型的嘧啶类化合物及其衍生物、药学上可接受的盐、前药和水合物。本发明的这些化合物及其组合物具有蛋白激酶抑制活性并且将有益于蛋白激酶介导的疾病或者病症的治疗。

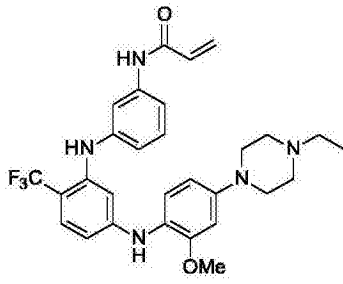
1. 一种化合物或者其药学上可接受的盐或者立体异构体或者互变异构体, 该化合物为:



2. 一种化合物或者其药学上可接受的盐或者立体异构体或者互变异构体, 该化合物为:



3. 一种化合物或者其药学上可接受的盐或者立体异构体或者互变异构体, 该化合物为:



4. 一种药物组合物, 该药物组合物包括上述权利要求1至3中的任一项所述一种化合物或者其药学上可接受的盐和一种药学上可接受的载体。

5. 权利要求1至3中的任一项所述一种化合物或者其药学上可接受的盐或者权利要求4所述药物组合物在制备治疗或预防高度增殖性病症药物中的应用。

6. 权利要求1至3中的任一项所述一种化合物或者其药学上可接受的盐或者权利要求4所述药物组合物在制备治疗或预防EGFR激酶和/或其突变体介导的病症药物中的应用。

7. 权利要求1至3中的任一项所述一种化合物或者其药学上可接受的盐或者权利要求4所述药物组合物在制备治疗或预防EGFR-T790M激酶介导的病症药物中的应用。

8. 权利要求1至3中的任一项所述一种化合物或者其药学上可接受的盐或者权利要求4所述药物组合物在制备治疗或预防EGFR-T790M/L858R激酶介导的病症药物中的应用。

9. 权利要求1至3中的任一项所述一种化合物或者其药学上可接受的盐或者权利要求4所述药物组合物在制备治疗肿瘤药物中的应用。

10. 权利要求1至3中的任一项所述一种化合物或者其药学上可接受的盐或者权利要求4所述药物组合物在制备治疗非小细胞肺癌药物中的应用。

11. 权利要求1至3中的任一项所述一种化合物或者其药学上可接受的盐或者权利要求4所述药物组合物联合一种或多种抗癌制剂在制备治疗肿瘤药物中的应用。

作为EGFR-T790M激酶抑制剂的取代的嘧啶类化合物

[0001] 交叉引用

[0002] 本发明要求2014年2月4日申请的美国临时专利申请申请号为61/965,584的权益，并全文引入作为参考。

技术领域

[0003] 本发明针对激酶抑制剂及其药学上可接受的盐、溶剂化物、水合物、前药和代谢物，其制备方法，以及这些化合物在治疗激酶介导的诸如癌症的疾病和病症上的用途。

背景技术

[0004] 蛋白激酶代表了催化靶蛋白质底物的磷酸化的一个大家族酶。磷酸化通常是指磷酸基团从ATP转移到蛋白质底物的转移反应。由于它们在许多细胞过程中都有活性，蛋白激酶已经成为重要的治疗靶点。

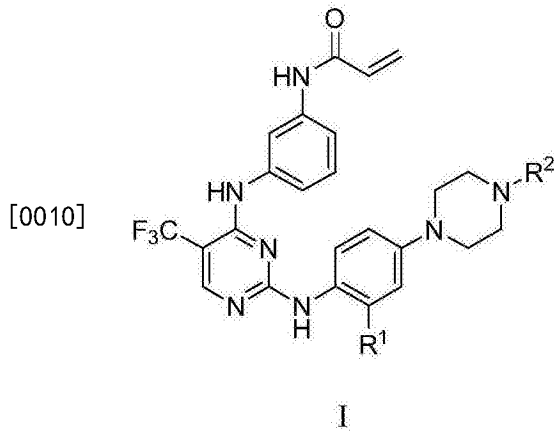
[0005] 表皮细胞生长因子(EGF)是在肿瘤中广泛分布的一类生长因子，能够刺激癌细胞增生、阻断细胞凋亡、激活侵袭和转移以及刺激血管生成(Citri等，Nat.Rev.Mol.Cell.Biol.7:505,2006;Hynes等，Nat.Rev.Cancer 5:341,2005)。EGF受体(EGFR或ErbB)是属于四种相关受体家族的一种跨膜的酪氨酸激酶受体。大多数的人类上皮性肿瘤通过这类家族的生长因子和受体的功能性激活来标记(Ciardiello等，New Eng.J.Med.358:1160,2008)，因此EGF和EGFR是癌症治疗的天然靶体。人类表皮生长因子受体(HER)酪氨酸激酶家族是由四种结构相关的细胞受体：表皮生长因子受体(EGFR;HER1)、HER2(ErbB2)、HER3(ErbB3)和HER4。

[0006] EGFR抑制剂埃罗替尼和吉非替尼以及双重EGFR/HER2抑制剂拉帕替尼是FDA批准的对于多重实体瘤癌症有效的癌症药物。然而，它们的疗效同时受药物抗性的限制，这些药物抗性随着治疗过程频繁出现。EGFR的激酶区域的点突变以及旁路信号途径的上调是在用吉非替尼和埃罗替尼治疗的患者中经常观察到抗性机制。守门基因位置的一个点突变，在EGFR激酶区域的T790M，占获得抗药性的将近50%。

[0007] 因此，能够对抑制蛋白激酶(如EGFR T790M活性)具有提高的疗效或克服药物抗性的化合物是极其渴望的。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明提供了具有通式I的化合物：



[0011] 或者其药学上可接受的盐、溶剂化物或者前药或者立体异构体或者互变异构体或者代谢物,其中:

[0012] R^1 为氢基、 C_1 - C_6 烷氧基、F、Cl或 CF_3 ;

[0013] R^2 为 C_1 - C_6 烷基或 $-C(O)R^3$;

[0014] R^3 为 C_1 - C_6 烷基;

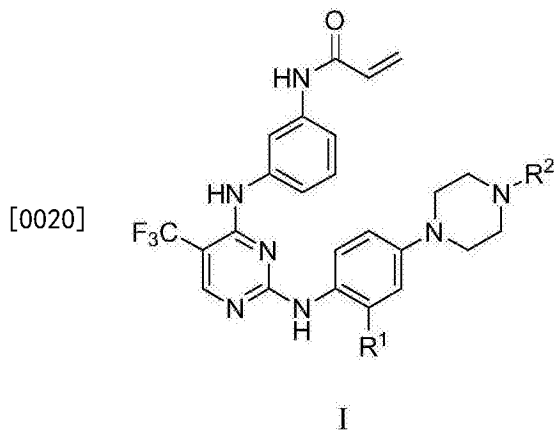
[0015] 条件是当 R^1 为 C_1 - C_6 烷氧基时, R^2 不是 $-C(O)R^3$ 。

[0016] 本发明进一步提供了包含上述通式I的化合物和一种药学上可接受的载体的药物组合物。

[0017] 本发明更进一步地提供了用于调节激酶信号传导的方法,包括向一个哺乳动物受试者施用治疗有效量的具有上述通式I的任意一种化合物。

[0018] 本发明的具体描述

[0019] 在本发明的一些实施方式中提供了具有通式I的化合物:



[0021] 或者其药学上可接受的盐、溶剂化物或者前药或者立体异构体或者互变异构体或者代谢物,其中:

[0022] R^1 为氢基、 C_1 - C_6 烷氧基、F、Cl或 CF_3 ;

[0023] R^2 为 C_1 - C_6 烷基或 $-C(O)R^3$;

[0024] R^3 为 C_1 - C_6 烷基;

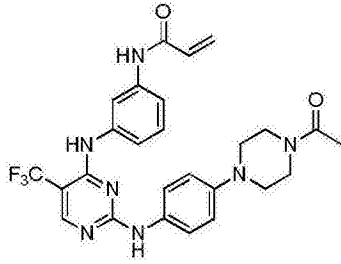
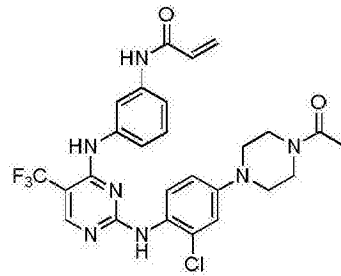
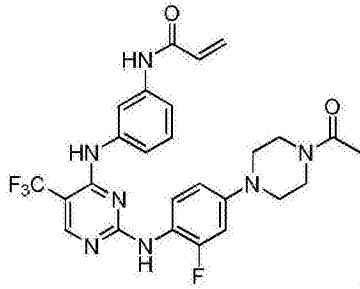
[0025] 条件是当 R^1 为 C_1 - C_6 烷氧基时, R^2 不是 $-C(O)R^3$ 。

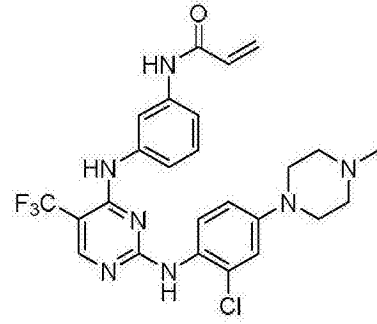
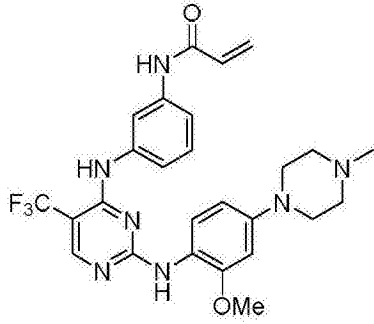
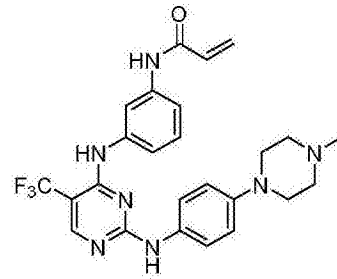
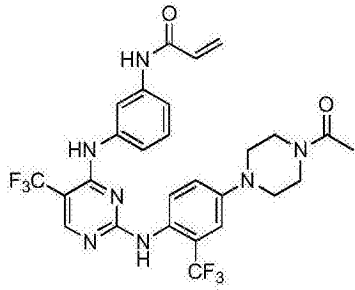
[0026] 在某些实施方式中, R^1 为氢基。在另外的实施方式中, R^2 为甲基或乙基。在其他的实施方式中, R^3 为甲基。在一些实施方式中, R^1 为甲氧基且 R^2 为甲基或乙基。在另外的实施方式

中,通式I的化合物的氘丰度大约为1%。在另外的实施方式中,一些选定的化合物的氘丰度至少1%。

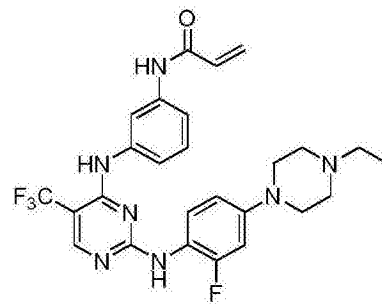
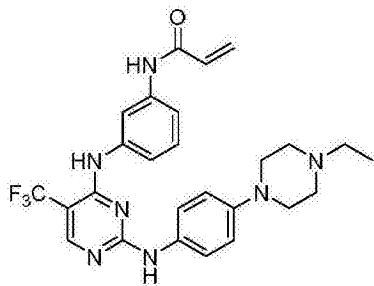
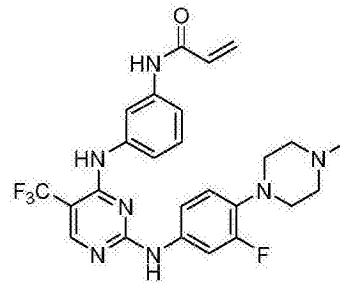
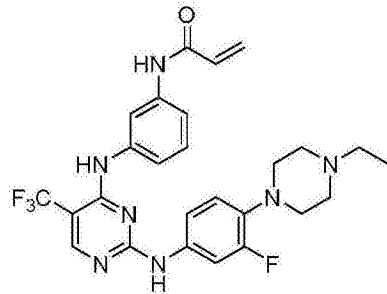
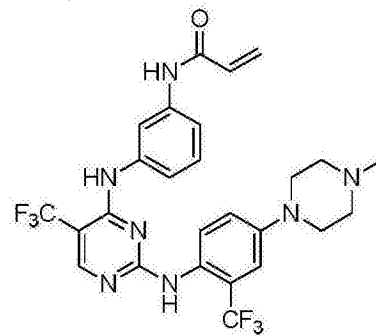
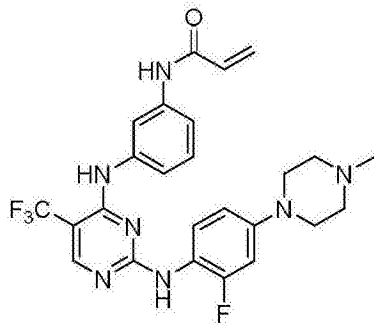
[0027] 在某些实施方式中,本发明提供了选自下组但不限制于下组的化合物:

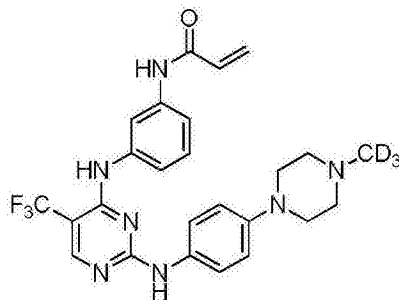
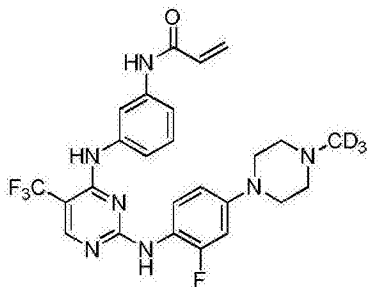
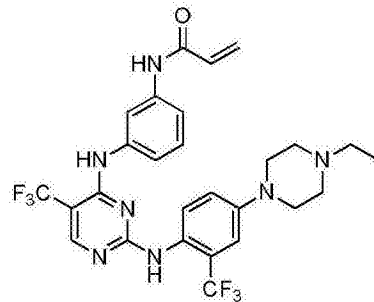
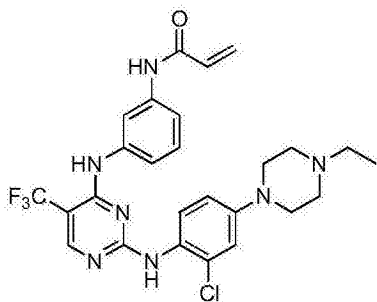
[0028]



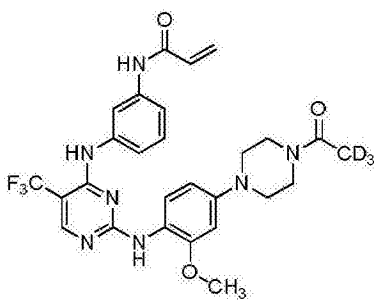
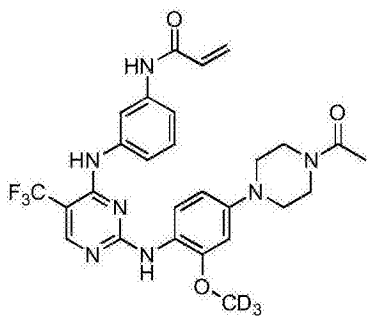
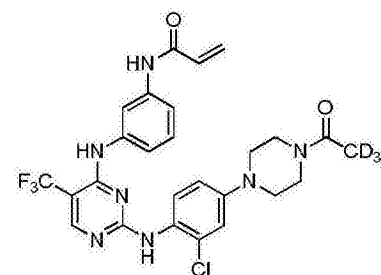
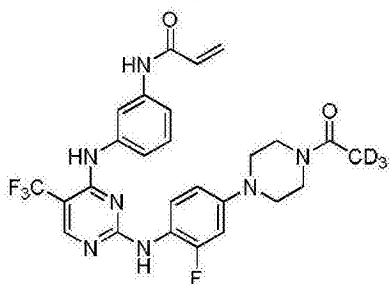
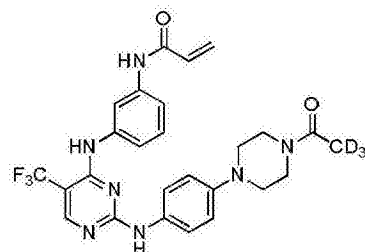
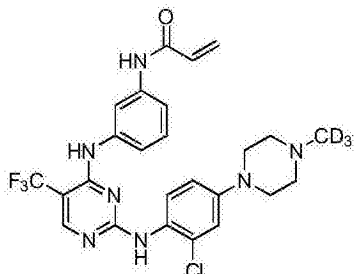


[0029]

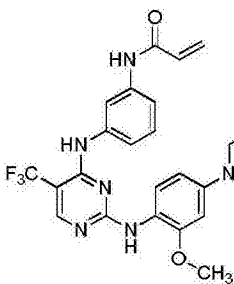




[0030]



[0031]



等,或者他们的药学上可接受的盐、溶剂化物或者前药或

者代谢物。在一些实施方式中,这些选定的化合物以药学上可接受的盐的形式存在。在一些实施方式中,这些选定的化合物以溶剂的形式存在。在其他的实施方式中,这些选定的化合物以代谢物的形式存在。在一些实施方式中,这些选定的化合物以立体异构体的形式存在。在另外的实施方式中,这些选定的化合物以互变异构体的形式存在。在其他的实施方式中,这些选定的化合物以前药的形式存在。在另外的实施方式中,这些选定的化合物的氘丰度大约为1%。在另外的实施方式中,这些选定的化合物的氘丰度至少1%。

[0032] 在一些实施方案中,本发明提供了一种药物组合物,该药物组合物包括本发明的具有通式I的化合物和一种药学上可接受的载体。在某些实施方案中,这些组合物用于治疗由蛋白激酶调控的一类疾病。在某些实施方案中,这些组合物用于治疗一种高度增殖性的病症。在另外的实施方案中,所述的药物组合物适于口服给药、肠胃外给药或静脉给药。

[0033] 在一些实施方式中,具有通式I的化合物通过将该化合物作为药物组合物用于治疗受试者。为了这个目的,在一个实施方式中,这些化合物与一种或多种药学上可接受的赋形剂结合来形成一种合适的组合物,包括载体、稀释剂或助剂,这些将在此详细描述。

[0034] 在一些实施方式中,本发明提供了用于调节激酶信号传导的方法,包括向哺乳动物受试者施用治疗有效量的具有通式I的化合物。

[0035] 在其他的实施方式中,本发明提供了一种用于治疗或预防一种HER激酶(包括所有的突变激酶)街道的病症,所述的方法包括向哺乳动物受试者施用治疗有效量的具有通式I的化合物。

[0036] 在另外一个方面,本发明在此提供了一种抑制EGFR激酶的方法,所述的方法包括向哺乳动物受试者施用治疗有效量的具有通式I的化合物。

[0037] 在另外的实施方式中,本发明提供了用于治疗肿瘤的方法,包括向需要治疗的哺乳动物受试者施用治疗有效量的具有通式I的化合物。在某些实施方案中,所述的肿瘤选自肝癌、皮肤癌、白血病、结肠癌、肾细胞癌、胃肠道间质癌、实体瘤癌、骨髓瘤、乳腺癌、胰腺癌、非小细胞肺癌、非霍奇金淋巴瘤、肝细胞癌、甲状腺癌、膀胱癌、结肠直肠癌和前列腺癌。在某些实施方案中,所述的癌症为非小细胞肺癌。在某些实施方式中,该方法进一步包括施用一种或多种抗肿瘤制剂。

[0038] 在其他的实施方式中,本发明提供了用于治疗或预防一种高度增殖性的病症,该方法包括向哺乳动物受试者施用治疗有效量的具有通式I的化合物。

[0039] 下述的定义将有助于理解描述在此的本发明。

[0040] 术语“烷基”旨在包括线性的、分支的以及环状的碳氢基团,它们仅仅包含单一的碳-碳键且可以是未被取代的或者任选地被一个或多个官能团所取代。烷基基团优选的链长为1到6个碳原子。C₁-C₆烷基旨在包括C₁、C₂、C₃、C₄、C₅和C₆烷基基团。烷基可以是取代的或者未被取代的。典型的取代烷基基团包括环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、羟基、烷氧基、芳氧基、巯基、烷硫基、芳硫基、氰基、卤素、羰基、硫代羰基、O-氨甲酰基、N-氨甲酰基、O-硫代氨甲酰基、N-硫代氨甲酰基、C-酰氨基、N-酰氨基、C-羧基、O-羧基、硝基、硅烷基、氨基和-NR^xR^y,其中,R^x和R^y各自独立地选自氢基、烷基、环烷基、芳基、羰基、乙酰基、磺酰基、三氟甲磺酰基以及结合的五元或六元杂脂环。说明性的取代烷基基团包括但不限于氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、氨甲基、氨乙基、羟甲基、甲氧基甲基、2-氟乙基和2-甲氧基乙基等。

[0041] 术语“烷氧基”指的是一个-O-(烷基)和一个-O-(未取代的环烷基)基团。C₁-C₆烷

氧基旨在包括C₁-C₆烷基基团,其中,C₁-C₆烷基的定义如上所述。代表性的实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、环丙氧基、环丁氧基、环戊氧基、环己氧基等等。

[0042] 卤素指氟、氯、溴和碘。

[0043] 本发明还包括本发明的化合物的同位素标记化合物,其中,一个或多个原子被具有相同原子序数、但原子质量或质量数与自然界中普遍发现的原子质量或质量数不同的原子取代。适于包含在本发明的化合物中的同位素的实例包括氢(如氘)和碳(如¹³C)的同位素。本发明的某些同位素标记的化合物,例如,那些包含一种放射性同位素的化合物在药物和/或基体组织分布研究中是非常有用的。用较重同位素(如氘)置换可能提供一定的治疗优势,这是由更大的代谢稳定性引起的;例如,体内半衰期的增加或者是剂量要求的降低,因此在一些情况下会更加优选。本发明中的同位素标记的化合物一般可以用本领域技术人员熟知的传统方法或者和表述在此的方法类似的过程进行制备,使用一种适当的同位素标记的试剂代替所用的非标记的试剂。

[0044] 术语“包括”是指开放性的,包括指出的组分,但是不排除其他的元素。

[0045] 当用于具有通式I的一种化合物时,术语“药学上可接受的”是指该化合物的这样一种形式,该形式对于受试者的给药是安全的。例如,本发明化合物的游离碱、盐形式、溶剂化物、水合物、前药或者是衍生物的形式是药学上可接受的,它们已经被政府机构或者监管机构(如美国食品和药物管理局FDA)批准通过口服给药或者其他给药路径用于哺乳动物。

[0046] 术语“衍生物”在此被广泛地解释,且旨在包含本发明的化合物的盐形式、本发明的化合物的酯形式、或者是任何其他化合物,当向患者施用该其他的化合物时能够提供(直接或间接)本发明的化合物、或者本发明化合物的代谢物或残留物,利用调控某激酶活性的能力进行表征。

[0047] 在此使用的术语“代谢物”指当将一种新型的化合物给药于哺乳动物受试者时由该化合物的代谢产生的生理活性化合物。可以使用本领域常规的技术对化合物的代谢物进行鉴定。

[0048] 在此使用的术语“前药”指示一种化合物,当将该化合物给药于受试者时能够提供(直接或者间接)本发明的化合物。药物前体的实例包括酯化的或者羟基化的化合物,其中,所述的酯基或者羟基基团能够在体内断裂,如在肠道内,从而产生一种依据通式I的化合物。在此使用的一种“药学上可接受的药物前体”指的是一种在药学上是可接受的药物前体。

[0049] 在此使用的术语“赋形剂”指除了活性药物成分(API)外的任何药学上可接受的添加剂、载体、助剂或其他合适的辅料,通常出于制成制剂和/或给药的目的将其包括在内。“稀释剂”和“助剂”描述在下文中。

[0050] 在此使用的术语“治疗(treat)”、“用于治疗(treating)”、“治疗(treatment)”和“治疗(therapy)”指的是治疗,包括但不限于治愈性治疗、预防性治疗和防止性治疗。预防性治疗一般包括预防患者中疾病的一起发生或者延迟病症的临床前明显阶段的发作。

[0051] 词语“治疗有效量”是指量化每种药剂的用量,经过该用量的治疗在疾病严重性和发生频次方面能够达到改善的目标,同时避免典型的与替代疗法相关的副作用。在一种实施方案中,所述的有效量是以单剂量的形式给药或者是多剂量的形式给药。

[0052] 在标准参考书中描述了通过保护基团保护功能基团、保护基团本身以及保护基团

的去除反应(通常称作“去保护”),例如,J.F.W.McOmie的《有机化学中的保护基团》,纳姆出版社,伦敦和纽约(1973);T.W.Green的《有机合成中的保护基团》,威利,纽约(1981);以及《多肽》,第三卷,E.Gross和J.Meienhofer编辑,学术出版社,伦敦和纽约(1981)。

[0053] 所有在此描述的合成步骤都可以在已知的反应条件下进行,优选地在描述在此的步骤下进行,在不存在或者存在(通常情况下)溶剂或者稀释剂的条件下进行。

[0054] 本发明进一步包括“中间体”化合物,包括在得到最终希望的化合物前通过所描述的合成步骤产生的结构,无论是否被分离出来。从执行瞬态起始原料的步骤中产生的结构、在所描述的方法中的任何阶段的分支产生的结构、以及在反应条件下形成初始原料的结构均包含在本发明的“中间体”中。更进一步地,使用以活性衍生物或盐形式的起始原料产生的结构、或者依据本发明的方法可以获得的化合物产生的结构、以及在原位处理本发明的化合物产生的结构都在本发明保护的范围内。

[0055] 新的起始原料和/或中间体,以及他们的制备方法同样是本发明的主题。在选择的实施方案中,使用这些起始原料和选择的反应条件来得到希望的化合物。

[0056] 本发明的起始原料是已知的,或市场上可以买到的,或者是可以用类似于本领域熟知的方法进行合成的。许多起始原料可以根据已知的方法进行制备,尤其可以使用描述在实例中的方法进行制备。在合成起始原料中,在某些情况下功能基团在必要时用合适的保护基团保护。前面描述了保护基团的介绍和去除。

[0057] 在一些实施例中,本发明的化合物还以多个互变异构体的形式表示。本发明明确包括所有描述在此的互变异构体的形式。

[0058] 在一种实施方案中的化合物还以顺式-或反式-、E-或Z-双键异构体形式存在。所有这种化合物的所述异构体的形式均明确包含在本发明的保护范围内。

[0059] 适应症

[0060] 本发明提供了可以调控一种或多种信号传导途径的化合物,包括但不限于EGFR和/或其所有的突变体,如EGFR-T790M。

[0061] 术语“调控”是指所述途径(或者途径的一部分)的功能活性在具有通式I的化合物与没有所述化合物时其正常的活性相比发生了变化。这种作用包括调控的任何特性或程度的改变,包括:增加、激动、加强、增强、促进、刺激、降低、阻断、抑制、减少、减弱、拮抗等。

[0062] 本发明的化合物还可以调控一种或多种下述过程,包括但不限于:例如,细胞生长(包括,例如分化、细胞成活、和/或增殖)、肿瘤细胞生长(包括,例如,分化、细胞成活、和/或增殖)、肿瘤退化、内皮细胞生长(包括,例如分化、细胞成活、和/或增殖)、血管生成(血管生长)、淋巴血管生成(淋巴血管生长)、和/或血细胞生成(例如,T-或B-细胞发育、树突状细胞的发育等)

[0063] 尽管不希望被任何理论或作用机理束缚,已经发现本发明的化合物具有调控激酶活性的能力。然而,本发明的方法不限于任何具体的机理或者这些化合物是如何实现他们的治疗效果的。术语“激酶活性”是指在 γ -磷酸基从三磷酸腺苷(ATP)转移到蛋白质底物中的一种氨基酸残基(例如,丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸)上的催化活性。化合物可以调控激酶活性,例如,通过直接与ATP竞争所述激酶的ATP结合口袋来抑制激酶活性,通过在酶的结构上产生一个构象变化从而影响它的活性(例如,通过破坏具有生物活性的三维结构),通过结合并封锁所述激酶处于非活性构象。

[0064] 如以上所述,在本发明中定义的化合物具有生物活性。可以对这些特性进行评估,例如可以通过下文所列的一种或多种步骤进行评估。

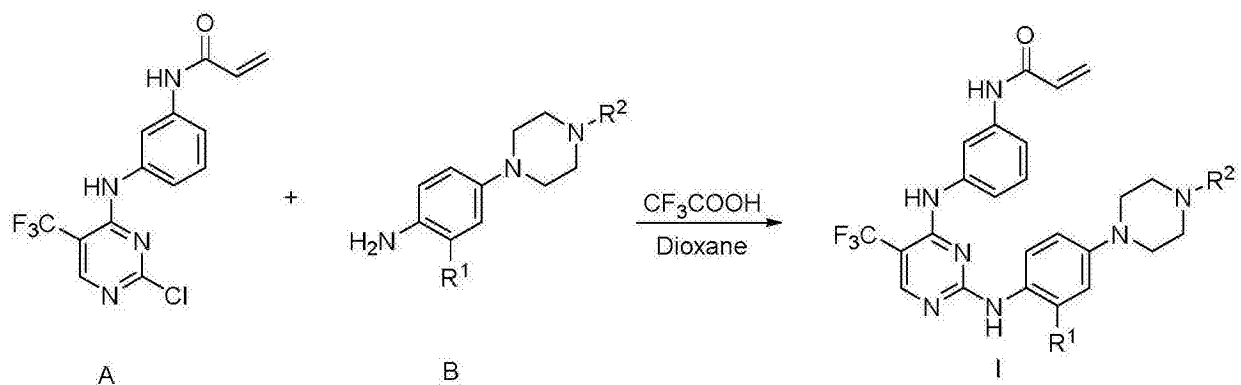
[0065] 化合物的合成

[0066] 对于本领域技术人员,具有通式I的化合物可以根据下面描述的方案中的步骤进行合成,其中,除非进一步指明,取代基如上述通式I中所定义的。下述的合成方法仅是示例性的,并且本发明的化合物还可以根据本领域的技术人员的理解通过替换路线来合成。

[0067] 在本发明中,具有通式I的化合物的合成描述于方案1中。化合物A的合成已经被报道用与描述于文献(W02012061299)中类似的方法进行制备。化合物B为商用的或按照文献的方法直接制备。化合物A和B在溶剂中如二恶烷中与酸反应如HCl或三氟乙酸反应生成具有通式I的化合物。

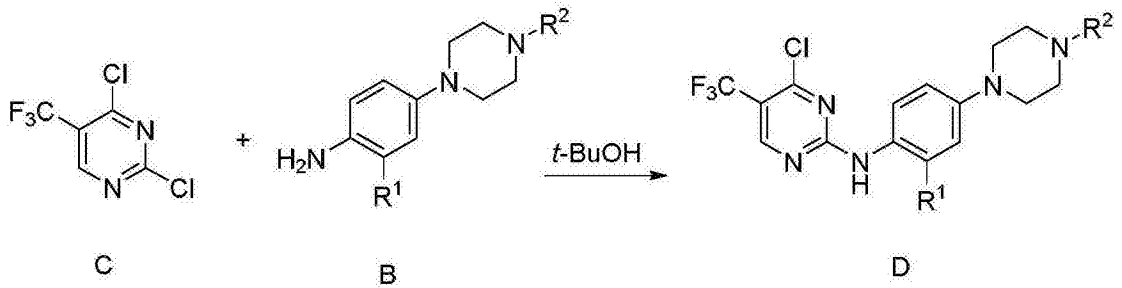
[0068] 方案1

[0069]

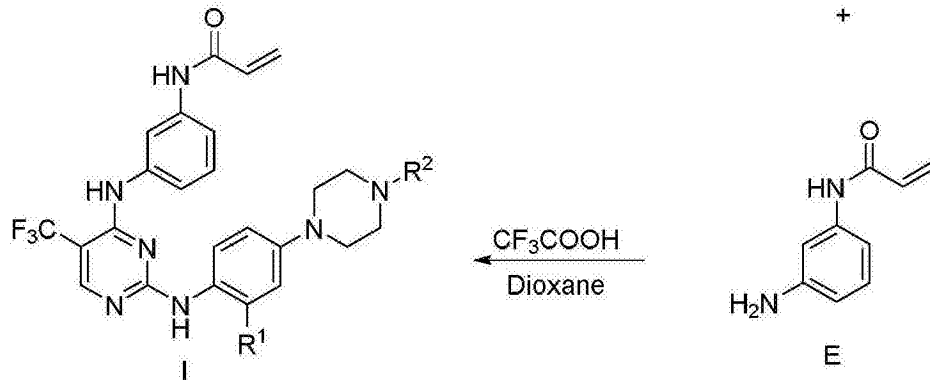


[0070] 一种合成具有通式I的替代的方法可以通过描述于方案2中的反应得到。商用的起始原料C和D在醇类溶剂如叔丁醇中的反应得到化合物D。用化合物E取代化合物D中的氯将得到具有通式I的化合物。

[0071] 方案2

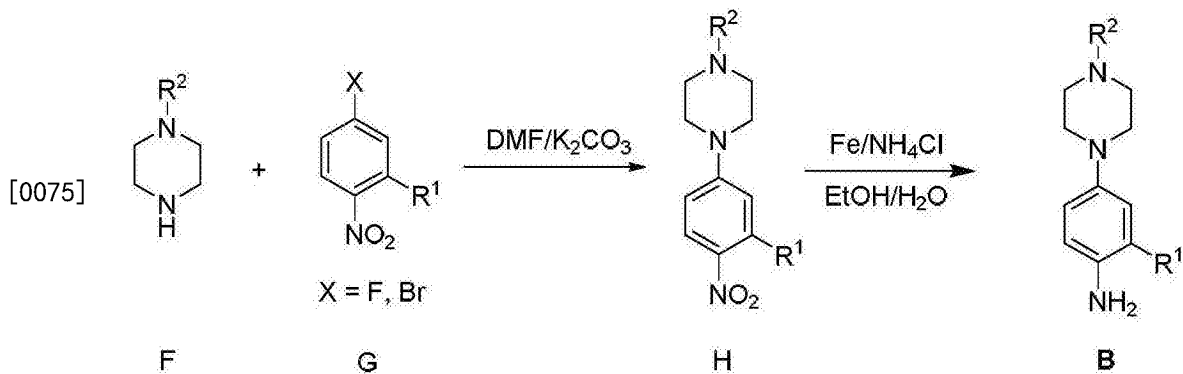


[0072]



[0073] 化合物B的合成表述于方案3中。利用化合物4将化合物G的氟取代掉得到化合物H。化合物H的硝基通过金属如铁的还原得到化合物B。

[0074] 方案3



[0076] 具体实施方式说明

[0077] 这些具体的描述仅以说明性的目的提出,并非旨在作为对本发明保护范围的限制。

[0078] 质子NMR谱

[0079] 除非另外指明,所有的¹H NMR光谱在瓦里安系列(Varian series)的Mercury 300和400的仪器上或是布鲁克系列400MHz的仪器上操作。鉴别如下,在所示的适宜溶剂中,所有观测的质子都从四甲基硅烷(TMS)或其他内标至低场、以百万分之一(ppm)形式记录的。

[0080] 缩写

[0081] DMF是指N,N-二甲基甲酰胺。

[0082] DCM是指二氯甲烷。

[0083] DCE是指二氯乙烷。

[0084] DIPEA是指二异丙基乙胺。

[0085] THF指四氢呋喃。

[0086] TEA指三乙胺。

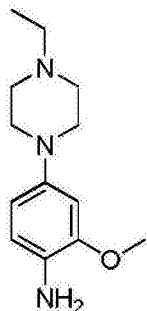
[0087] TFA指三氟乙酸。

[0088] EA指乙酸乙酯。

[0089] RT代表室温。

[0090] 实施例1:4-(4-乙基哌嗪-1-基)-2-甲氧基苯胺(化合物1)的制备。

[0091]

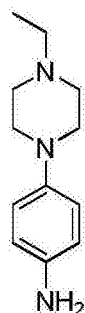


[0092] 步骤1、向1-乙基哌嗪(1.6g, 14.0mmol)和碳酸钾(3.2g, 23.4mmol)的DMF(10mL)的溶液中加入4-氟-2-甲氧基-1-硝基苯(2.0g, 11.7mmol)。反应混合物在100℃下搅拌3天,然后冷却至室温,用H₂O稀释并用乙酸乙酯萃取。有机相用无水硫酸钠干燥,然后过滤和浓缩。粗产物1-乙基-4-(3-甲氧基-4-硝基苯基)哌嗪不用进一步纯化直接用于下一步骤。

[0093] 步骤2、将1-乙基-4-(3-甲氧基-4-硝基苯基)哌嗪和NH₄Cl(1.3g, 23.4mmol)溶解于乙醇(20mL)和水(20mL)中。将反应混合物加热至50℃,然后加入铁(2.6g, 46.8mmol)。得到的反应混合物加热回流4小时,冷却至50℃,过滤,然后用乙醇清洗残留物。收集的滤液在真空下蒸发,从而去除一些溶剂(至少一半)。将得到的溶液的pH调节至8-9并用乙酸乙酯萃取(6x30mL)。合并有机层,用无水硫酸钠干燥,然后浓缩。用快速柱色谱法在硅胶柱上纯化得到4-(4-乙基哌嗪-1-基)-2-甲氧基苯胺(720mg)。

[0094] 实施例2:4-(4-乙基哌嗪-1-基)苯胺(化合物2)的制备。

[0095]

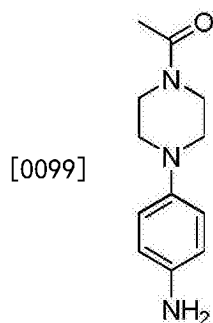


[0096] 向1-乙基哌嗪(2.1g, 18.0mmol, 1.2eq)和碳酸钾(2.1g, 18.0mmol, 1.2eq)的DMF(10mL)的溶液中加入1-溴-4-硝基苯(3.0g, 15.0mmol, 1.0eq)反应混合物在100℃下搅拌3天,然后冷却至室温,用H₂O稀释并用乙酸乙酯萃取。有机相用无水硫酸钠干燥,然后过滤和浓缩。得到的残留物用快速柱色谱法在硅胶柱上纯化得到黄色油状的1-乙基-4-(4-硝基苯基)哌嗪(3.2g)。

[0097] 将1-乙基-4-(4-硝基苯基)哌嗪(3.2g, 11.9mmol, 1.0eq)和NH₄Cl(1.3g, 23.8mmol, 2.0eq)溶于乙醇(30mL)和水(30mL)。将反应混合物加热至50℃,然后加入铁(2.7g, 47.6mmol, 4.0eq)。得到的反应混合物加热回流3小时,冷却至50℃,过滤,然后用乙

醇清洗残留物。收集的溶液的溶剂大部分在真空下蒸发,然后将得到的溶液的pH调节至8-9。得到的溶液用乙酸乙酯萃取(3x100mL)。合并有机层,用无水硫酸钠干燥,过滤并浓缩。用快速柱色谱法在硅胶柱上纯化得到4-(4-乙基哌嗪-1-基)苯胺(1.2g)。

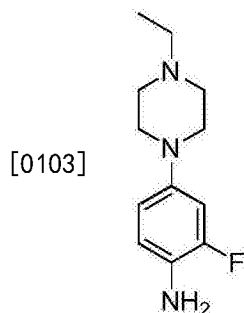
[0098] 实施例3:1-(4-(4-氨基苯基)哌嗪-1-基)乙酮(化合物3)的制备方法。



[0100] 向1-(哌嗪-1-基)乙酮(2.3g,18.0mmol,1.2eq)和碳酸钾(4.2g,30.0mmol,2.0eq)的DMF(10mL)的溶液中加入1-溴-4-硝基苯(3.0g,15.0mmol,1.0eq)。反应混合物在100℃下搅拌3天,然后冷却至室温,用H₂O稀释并用乙酸乙酯萃取。有机相用无水硫酸钠干燥,然后过滤和浓缩。得到的残留物用快速柱色谱在硅胶柱上纯化得到黄色油状的1-(4-(4-硝基苯基)哌嗪-1-基)乙酮(1.8g)。收集的溶液的溶剂大部分在真空下蒸发,然后将得到的溶液的pH调节至8-9。得到的溶液用乙酸乙酯萃取(3x100mL)。

[0101] 将1-(4-(4-硝基苯基)哌嗪-1-基)乙酮(1.8g,7.2mmol,1.0eq)和NH₄Cl(770mg,14.4mmol,2.0eq)溶解于乙醇(35mL)和水(35mL)中。将反应混合物加热至50℃,然后加入铁(1.6g,28.8mmol,4.0eq)。得到的反应混合物加热回流4小时,冷却至50℃,过滤,然后用乙醇清洗残留物。合并有机层,用无水硫酸钠干燥,过滤并浓缩。用快速柱色谱法在硅胶柱上纯化得到1-(4-(4-氨基苯基)哌嗪-1-基)乙酮(1.2g)。

[0102] 实施例4:4-(4-乙基哌嗪-1-基)-2-氟苯胺(化合物4)的制备。

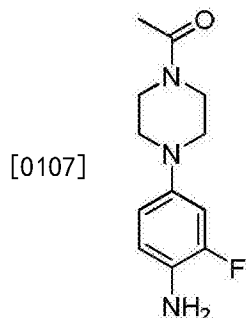


[0104] 将2,4-二氯-1-硝基苯(2.0g,12.6mmol,1.0eq)加入到1-乙基哌嗪(1.7g,15.1mmol,1.2eq)和碳酸钾(3.5g,25.2mmol,2.0eq)的DMF(10mL)溶液中。反应混合物在100℃下搅拌3天,然后冷却至室温,用H₂O稀释并用乙酸乙酯萃取。有机相用无水硫酸钠干燥,然后过滤和浓缩。得到的残留物用快速柱色谱法在硅胶柱上纯化得到黄色油状的1-乙基-4-(3-氟-4-硝基苯基)哌嗪(2.9g)。

[0105] 将1-乙基-4-(3-氟-4-硝基苯基)哌嗪(2.9g,11.5mmol,1.0eq)和NH₄Cl(1.2g,23.0mmol,2.0eq)溶解于乙醇(15mL)和水(15mL)中。将反应混合物加热至50℃,然后加入铁(2.6g,45.8mmol,4.0)。得到的反应混合物加热回流3小时,冷却至50℃,过滤,然后用乙醇清洗残留物。收集的溶液的溶剂大部分在真空下蒸发,然后将得到的溶液的pH调节至8-9。

得到的溶液用乙酸乙酯萃取 (3x100mL)。合并有机层,用无水硫酸钠干燥,过滤并浓缩。用快速柱色谱法在硅胶柱上纯化得到4-(4-乙基哌嗪-1-基)-2-氟苯胺 (1.3g)。

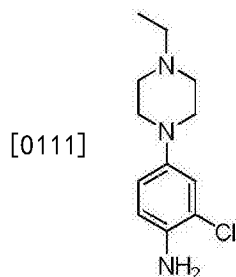
[0106] 实施例5:1-(4-(4-氨基-3-氟苯基)哌嗪-1-基)乙酮(化合物5)的制备。



[0108] 将2,4-二氯-1-硝基苯 (2.0g, 12.5mmol, 1.0eq) 加入到1-(哌嗪-1-基)乙酮 (1.6g, 12.5mmol, 1.0eq) 和碳酸钾 (3.5g, 25.0mmol, 2.0eq) 的DMF (20mL) 溶液中。反应混合物在100℃下搅拌过夜,然后冷却至室温,用H₂O稀释并用乙酸乙酯萃取。有机相用无水硫酸钠干燥,然后过滤和浓缩。得到的残留物用快速柱色谱法在硅胶柱上纯化得到黄色油状的1-(4-(3-氟-4-硝基苯基)哌嗪-1-基)乙酮 (2.4g)。

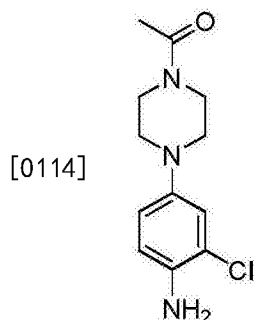
[0109] 将1-(4-(3-氟-4-硝基苯基)哌嗪-1-基)乙酮 (2.4g, 8.96mmol, 1.0eq) 和NH₄Cl (961mg, 17.9mmol, 2.0eq) 溶解于乙醇 (35mL) 和水 (35mL) 中。将反应混合物加热至50℃,然后加入铁 (2.0g, 35.8mmol, 4.0eq)。得到的反应混合物加热回流4小时,冷却至50℃然后用硅藻土过滤。滤饼用乙醇清洗。得到的溶液的溶剂大部分在真空下去除。随后将溶液的pH调节至8-9并用乙酸乙酯萃取 (3x100mL)。合并有机层,用无水硫酸钠干燥,过滤并浓缩。得到的粗产品用快速柱色谱法在硅胶柱上纯化得到1-(4-(4-氨基-3-氟苯基)哌嗪-1-基)乙酮 (1.0g)。

[0110] 实施例6:2-氯-4-(4-乙基哌嗪-1-基)苯胺(化合物6)的制备。



[0112] 标题化合物利用类似于实施例4的方法制备,起始原料用1-(3-氯-4-硝基苯基)-4-乙基哌嗪和1-乙基哌嗪替代。

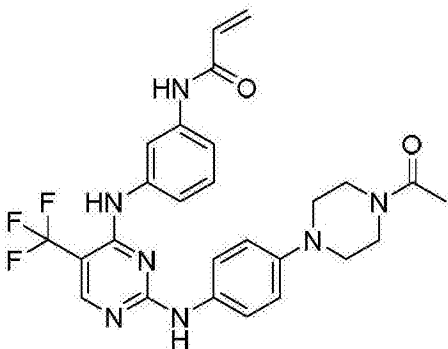
[0113] 实施例7:1-(4-(4-氨基-3-氯苯基)哌嗪-1-基)乙酮(化合物7)的制备。



[0115] 标题化合物利用类似于实施例5的方法制备,起始原料使用2-氯-4-氟-1-硝基苯和1-(哌嗪-1-基)乙酮。

[0116] 实施例8:N-[3-[[2-[4-(4-乙酰基哌嗪-1-基)苯胺]-5-(三氟甲基)嘧啶-4-基]氨基]苯基]丙-2-烯酰胺(化合物8)的制备。

[0117]

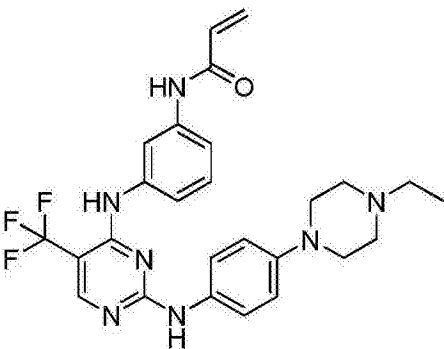


[0118] 在0℃下向2,4-二氯-5-(三氟甲基)嘧啶(325.5mg,1.5mmol,1.0eq)的DCE/t-BuOH(8mL/1mL)溶液中加入ZnCl₂的乙醚(1.0M,3.3mL,3.3mmol,2.2eq)溶液。反应混合液在0℃下搅拌1小时,然后加入1-(4-(4-氨基苯基)哌嗪-1-基)乙酮(400mg,1.84mmol,1.2eq)的DCE/t-BuOH(2mL/2mL)溶液,随后逐滴加入DIPEA(213mg,1.65mmol,1.1eq)。将反应物在室温下搅拌两天并用TLC监控。在减压条件下去除溶剂,然后将残留物溶解于水/乙醇(26mL,25%)并加热到90℃。将溶液冷却至室温两小时以上,过滤并干燥得到1-[4-[4-[[4-氯-5-(三氟甲基)嘧啶-2-基]氨基]苯基]哌嗪-1-基]乙酮(560mg)。

[0119] 在0℃下向1-[4-[4-[[4-氯-5-(三氟甲基)嘧啶-2-基]氨基]苯基]哌嗪-1-基]乙酮(400mg,1.0mmol,1.0eq)和N-(3-甲甲基苯基)丙-2-烯酰胺(192mg,1.0mmol,1.0eq)的1,4-二恶烷(10mL)溶液中加入TFA(催化剂量)。反应混合物加热至室温并搅拌过夜。用水猝灭反应。反应混合物的pH调节至8-9,然后用乙酸乙酯(3x50mL)萃取混合物。合并有机层,用无水硫酸钠干燥,过滤并浓缩。用快速柱色谱法在硅胶柱上用EA纯化粗产品得到粗产品240mg。粗产品用乙醇(20mL)清洗得到N-[3-[[2-[4-(4-乙酰基哌嗪-1-基)苯胺]-5-(三氟甲基)嘧啶-4-基]氨基]苯基]丙-2-烯酰胺(160mg)。¹H-NMR(400MHz,DMSO-d₆):δ10.20ppm(s,1H),9.51(s,1H),8.73(s,1H),8.32(s,1H),7.74(s,1H),7.63-7.65(d,J=8.4Hz,1H),7.33-7.40(m,3H),7.13(s,1H),6.68(s,1H),6.44-6.48(m,1H),6.25-6.29(d,J=16.4Hz,1H),5.76-5.78(d,J=10.0Hz,1H),3.55-3.56(m,4H),2.92-2.99(m,4H),2.04(s,3H)。MS m/z 526[M+1]。

[0120] 实施例9:N-[3-[[2-[4-(4-乙基哌嗪-1-基)苯胺]-5-(三氟甲基)嘧啶-4-基]氨基]苯基]丙-2-烯酰胺(化合物9)的制备。

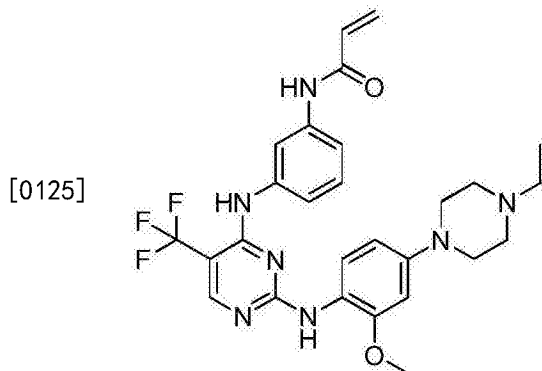
[0121]



[0122] 在0℃下,向2,4-二氯-5-(三氟甲基)嘧啶(434mg,2.0mmol,1.0eq)的DCE/t-BuOH(8mL/1mL)溶液中加入ZnCl₂的乙醚(4.4mL,4.4mmol,2.2eq)溶液。在0℃下将反应溶液搅拌1小时并加入4-(4-乙基哌嗪-1-基)苯胺(410mg,2.0mmol,1.0eq)的DCE/t-BuOH(2mL/2mL)溶液,随后逐滴加入三乙胺(222mg,2.2mmol,1.1eq)。将反应物在室温下搅拌过夜并用TLC监测。用水(30mL)猝灭反应,然后用乙酸乙酯(3x50mL)萃取混合物。合并有机层,用无水硫酸钠干燥,过滤并浓缩。用快速柱色谱法在硅胶柱上纯化粗产品得到4-氯-N-[4-(4-乙基哌嗪-1-基)苯基]-5-(三氟甲基)嘧啶-2-胺(200mg)。

[0123] 在0℃下,向4-氯-N-[4-(4-乙基哌嗪-1-基)苯基]-5-(三氟甲基)嘧啶-2-胺(184mg,0.48mmol,1.0eq)和N-(3-氨基苯基)丙-2-稀酰胺(91.5mg,0.48mmol,1.0eq)的1,4-二恶烷(10mL)溶液中加入TFA(催化剂量)。反应混合物加热至室温并搅拌过夜。用水猝灭反应并将反应混合物的pH调节至8-9。得到的溶液用乙酸乙酯(3x30mL)萃取。合并有机层,用无水硫酸钠干燥,过滤并浓缩。用快速柱色谱法在硅胶柱上用EA纯化粗产品得到N-[3-[[2-[4-(4-乙基哌嗪-1-基)苯胺]-5-(三氟甲基)嘧啶-4-基]氨基]苯基]丙-2-稀酰胺(160mg)。
¹H-NMR(400MHz,DMSO-d₆):δ10.02ppm(s,1H),9.61(s,1H),8.49(s,1H),8.31(s,1H),7.67(s,1H),7.37-7.29(m,4H),7.04-7.00(m,1H),6.90(d,J=8Hz,2H),6.50-6.43(m,1H),6.28-6.23(m,1H),5.76(d,J=2Hz,1H),4.12-4.08(m,1H),3.19-3.11(m,7H),2.41-2.36(m,2H),1.05(t,J=7.2Hz,3H)。MS m/z 512[M+1]。

[0124] 实施例10:N-[3-[[2-[4-(4-乙基哌嗪-1-基)-2-甲氧基-苯胺]-5-(三氟甲基)嘧啶-4-基]氨基]苯基]丙-2-稀酰胺(化合物10)的制备。

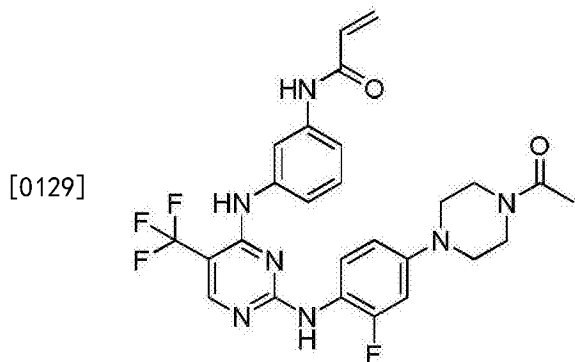


[0126] 在0℃下向2,4-二氯-5-(三氟甲基)嘧啶(434mg,2.0mmol,1.0eq)的DCE/t-BuOH(8mL/1mL)的溶液中加入ZnCl₂的乙醚(4.4mL,4.4mmol,2.2eq)溶液。反应混合液在0℃下搅拌1小时,然后加入4-(4-乙基哌嗪-1-基)-2-甲氧基-苯胺(470mg,2.0mmol,1.0eq)的DCE/t-BuOH(2mL/2mL)溶液,随后逐滴加入三乙胺(222mg,2.2mmol,1.1eq)。将反应物在室温下搅拌过夜并用TLC监控。用水(30mL)猝灭反应并用乙酸乙酯(3x30mL)萃取。合并有机层,用无水硫酸钠干燥,过滤并浓缩。用快速柱色谱法在硅胶柱上纯化粗产品得到4-氯-N-[4-(4-乙基哌嗪-1-基)-2-甲氧基-苯基]-5-(三氟甲基)嘧啶-2-胺(200mg)。

[0127] 在0℃下向4-氯-N-[4-(4-乙基哌嗪-1-基)-2-甲氧基-苯基]-5-(三氟甲基)嘧啶-2-胺(184mg,0.48mmol,1.0eq)和N-(3-氨基苯基)丙-2-稀酰胺(91.5mg,0.48mmol,1.0eq)的1,4-二恶烷(10mL)溶液中加入TFA(催化剂量)。反应混合物加热至室温并搅拌过夜。用水猝灭反应。反应混合物的pH调节至8-9。得到的混合物用乙酸乙酯(3x30mL)萃取。合并有机层,用无水硫酸钠干燥,过滤并浓缩。用快速柱色谱法在硅胶柱上用EA纯化粗产品得到N-

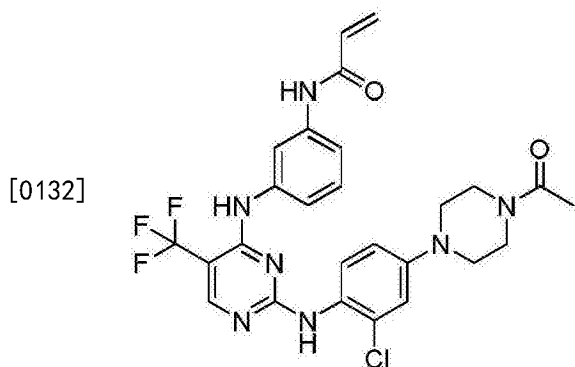
[3-[[2-[4-(4-乙基哌嗪-1-基)-2-甲氧基-苯胺]-5-(三氟甲基)嘧啶-4-基]氨基]苯基]丙-2-稀酰胺 (160mg)。¹H-NMR (400MHz, CDCl₃): δ8.32ppm (s, 1H), 7.99-8.02 (d, J=7.2, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.33-7.37 (t, J=8.0, 1H), 7.22 (s, 2H), 6.88 (s, 1H), 6.55 (d, J=2.4, 1H), 6.45-6.50 (m, 2H), 6.23-6.30 (m, 1H), 5.79-5.82 (m, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.19-3.22 (t, J=5.0, 4H), 2.64-2.66 (t, J=5.0, 4H), 2.51-2.53 (m, 2H), 2.04 (s, 3H), 1.15-1.18 (t, J=7.2, 3H)。MSm/z 542[M+1]。

[0128] 实施例11:N-[3-[[2-[4-(4-乙基哌嗪-1-基)-2-氟-苯胺]-5-(三氟甲基)嘧啶-4-基]氨基]苯基]丙-2-稀酰胺(化合物11)的制备。



[0130] 标题化合物用类似描述于实施例8中的步骤进行合成。起始原料使用2,4-二氯-5-(三氟甲基)嘧啶和1-(4-(4-氨基-3-氟-苯基)哌嗪-1-基)乙酮。

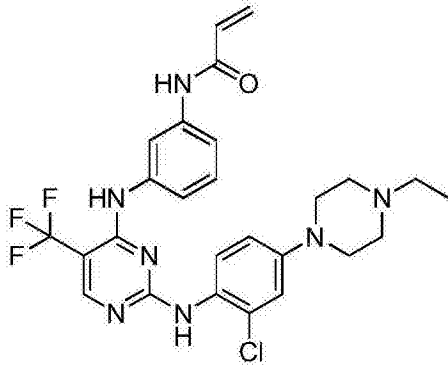
[0131] 实施例12:N-[3-[[2-[4-(4-乙基哌嗪-1-基)-2-氯-苯胺]-5-(三氟甲基)嘧啶-4-基]氨基]苯基]丙-2-稀酰胺(化合物12)的制备。



[0133] 标题化合物用类似描述于实施例8中的步骤进行合成。起始原料使用2,4-二氯-5-(三氟甲基)嘧啶和1-[4-(4-氨基-3-氯-苯基)哌嗪-1-基]乙酮。

[0134] 实施例13:N-[3-[[2-[2-氯-4-(4-乙基哌嗪-1-基)苯胺]-5-(三氟甲基)嘧啶-4-基]氨基]苯基]丙-2-稀酰胺(化合物13)的制备。

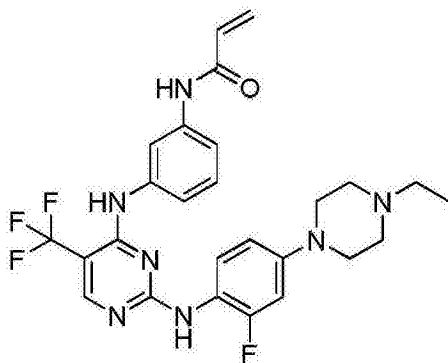
[0135]



[0136] 标题化合物用类似描述于实施例9中的步骤进行合成。起始原料使用2,4-二氯-5-(三氟甲基)嘧啶和2-氯-4-(4-乙基哌嗪-1-基)苯胺。

[0137] 实施例14:N-[3-[[2-[4-(4-乙基哌嗪-1-基)-2-氟-苯胺]-5-(三氟甲基)嘧啶-4-基]氨基]苯基]丙-2-稀酰胺(化合物14)的制备。

[0138]



[0139] 标题化合物用类似描述于实施例9中的步骤进行合成。起始原料使用2,4-二氯-5-(三氟甲基)嘧啶和4-(4-乙基哌嗪-1-基)-4-氟-苯胺。

[0140] 生物学测试:

[0141] 如以上所述,在本发明中定义的化合物具有抗增殖活性。可以对这些特性进行评估,例如可以通过下文所列的一种或多种步骤进行评估:

[0142] 测定受试化合物抑制EGFR(T790M/L858R)激酶活性的能力的体外试验:

[0143] 在衍生自BL21菌株的E.coli宿主中制备激酶标记的T7噬菌体菌株。使E.coli生长至对数期并用T7噬菌体感染,然后在32°C下振动培养直至裂解。离心得到的裂解物并过滤去除细胞碎片。剩下的激酶在HEK-293细胞中生产并随后用DNA标记用于qPCR检测。链霉亲和素包裹的磁珠用生物素化的小分子配体在室温下处理30min,从而生成用于激酶检测的亲树脂。用过量的生物素封闭配体磁珠然后用封闭液(SeaBlock(Pierce),1%BSA,0.05%Tween20,1mM DTT)清洗以去除未结合的配体并减少非特异性结合。通过在1x结合缓冲液(20%SeaBlock,0.17x PBS,0.05%Tween 20,6mM DTT)中结合激酶、配体亲和磁珠和测试化合物来评价结合反应。所有的反应均在聚苯乙烯96孔板中进行,终体积为0.135ml。测试板在室温下震荡培养1h,然后用清洗缓冲液(1x PBS,0.05%Tween 20)清洗亲和磁珠。然后将磁珠重新分散于洗脱缓冲液(1x PBS,0.05%Tween 20,0.5μM非生物素化的亲和配体),然后在室温下震荡培养30min。洗出液中的激酶浓度用qPCR进行测量。

[0144] 每个测试化合物的11个点3倍连续稀释液用100%DMSO以100倍终测试浓度进行配制,然后在测试时稀释到1×(终DMSO浓度=1%)。K_d值使用化合物的最高浓度=10,000nM

来测定。如果初始的 K_d 测量值 $<0.5\text{nM}$ (测试的最低浓度), 则用一系列稀释液从一个较低的最高浓度开始重新测量。当 K_d 值为 $40,000\text{nM}$ 时表明 K_d 的测量值 $>30,000\text{nM}$ 。

[0145] 结合常数(K_d s)使用希尔方程用一个标准剂量反应曲线进行测定: 响应值 = 背景值 + (信号值 - 背景值) / (1 + ($K_d^{\text{希尔斜率}} / \text{剂量}^{\text{希尔斜率}}$))。希尔斜率设定为-1。使用非线性最小二乘法结合Levenberg-Marquardt算法进行曲线拟合。

[0146] 下面的表A列出了本发明代表性的化合物其在EGFR (T790M/L858R) 测试中的活性。

[0147] 表A: EGFR (T790M/L858R) 测试结果

[0148]

化合物	EGFR(T790M/L858R) Kd
CO-1686	1.4 nM
8	0.54 nM
9	0.037 nM
10	0.28 nM

[0149] 用于测定待测化合物抑制EGFR或EGFR (E746-A750del) 激酶活性的能力的体外测试在同上文描述的用于测定待测化合物抑制EGFR (E746-A750del) 激酶活性的能力的体外测试相似的条件下进行。

[0150] 下面的表格B列出了本发明代表性的化合物和它们在EGFR和EGFR (E746-A750del) 激酶测试的活性。

[0151] 表B: EGFR (E746-A750del) 测试结果

[0152]

化合物	EGFR Kd	EGFR(E746-A750del) Kd
WZ4002	46 nM	12 nM
8	84 nM	26 nM
9	15 nM	4 nM

[0153] 使用细胞增殖试验测定代表数量的化合物对于癌症细胞系NCI-H1975的作用:

[0154] 1、在96孔板的每个孔中接种 $100\mu\text{l}$ 含有 5×10^3 个细胞的培养基, 这里所述培养基含有5%的FBS。

[0155] 2、24小时后, 向每个孔中加入含有不同浓度的化合物的 $100\mu\text{l}$ 新鲜培养基, 其中, 在此加入的培养基不含FBS。

[0156] 3、当用这些化合物处理细胞72小时后, 向每个孔中加入 $20\mu\text{l}$ MTT (5mg/ml), 然后将所述分析板在 37°C 下再培养4小时。

[0157] 4、在800g下离心所述分析板10min。吸去培养基, 向每个孔中加入 $150\mu\text{l}$ DMSO。轻轻地摇晃分析板10分钟。

[0158] 5、在酶标仪中测量在570nm下的吸光度。

[0159] 6、 $\text{IR}\% = (\text{WC} - \text{WT}) / \text{WC} * 100\%$ 。

[0160] 下面的表C中列出了代表本发明的化合物和它们在细胞试验中的活性。

[0161] 表C:细胞实验结果

[0162]

	CO-1686	WZ400 2	化合物 9	化合物 10
NCI-H19 75	910 nM	67 nM	< 10 nM	150 nM

[0163] 体内异种移植试验:

[0164] 用于体外试验的一个典型的方法如下所示,用于建立皮下A549 NCI-H1975细胞系异种移植模型从而用来评价所述化合物的体内治疗效果:将NCI-H1975细胞在含有10%胎牛血清、1%L-谷氨酸、100U/mL盘尼西林G和100 μ g/mL链霉素的RPMI 1640中培养。收获处于对数生长期的细胞然后重分散于1 \times PBS用于移植。

[0165] 在无菌条件下通过皮下注射按 5×10^6 /每只小鼠将肿瘤细胞注射到小鼠的右侧腹来进行肿瘤移植。当肿瘤到达合适的尺寸(100-200 mm^3)时,随机将小鼠按每6只分成一组(对照组为8只)。用卡尺在两个维度上测量肿瘤,即长度(a)和宽度(b)。肿瘤体积按照如下公式根据单个肿瘤的二维尺寸的测量结果来计算:

[0166] 肿瘤体积(mm^3) = $(a \times b^2) / 2$

[0167] 肿瘤的尺寸和动物的体重每周测量两次。每天观察小鼠的临床症状。在最后治疗后的2小时后采集血液样品,准备血浆样品并在-80 $^{\circ}$ C下储存。分离肿瘤组织,称重,拍照然后在-80 $^{\circ}$ C下储存用于后续分析。所有的动物实验均按照中医大学的动物使用和保护规章进行操作。体内效力评价的参数根据SFDA的规程进行计算。百分比T/C(%)用下述公式进行计算: $T/C(\%) = (T_{RTV}/C_{RTV}) \times 100\%$,其中, T_{RTV} 和 C_{RTV} 分别代表治疗组和溶剂对照组的相对肿瘤体积。相对肿瘤体积(RTV)用如下公式计算: $RTV = V_t/V_0$,其中, V_t 代表测试日的体积, V_0 代表治疗第一天的体积。肿瘤生长抑制率(TGI,%)按照 $TGI(\%) = 100\% - T/C(\%)$ 来计算。

[0168] 在研究终点,采集血液后,通过颈椎脱臼法对小鼠实行安乐死,首先收集肿瘤组织,然后打开腹腔,切除肝脏和脾脏,然后在移除胆囊后分别对各个器官称重。比较治疗组和对照组的器官重量。在第14天,化合物8和化合物9在NCI-H1975异体移植研究中表现出了好的疗效。且与CO-1686相比,化合物9表现出了好的肿瘤生长抑制性。

[0169] 下面的表D列出了本发明代表性的化合物以及它们在上述的裸鼠皮下NCI-H1975细胞系异体移植中的活性。表D:在NCI-H1975异体移植模型中的肿瘤生长抑制率(TGI,%)

[0170]

天 \ 化合物	CO-1686 (30 mg/kg)	8 (30 mg/kg)	9 (6 mg/kg)
14	TGI = 83%	TGI = 49%	TGI = 76%

[0171] 用于建立在裸鼠中皮下A431细胞系异体移植模型的体内试验的代表性协议以及

评价这些化合物的体内治疗效果与上文描述的用于评价裸鼠皮下NCI-H1975细胞系异体移植模型的协议类似。在第7天,化合物9在20mg/kg (TGI=48.2%)的剂量下表现出比CO-1686在100mg/kg (TGI=38.7%)的剂量下较好的肿瘤抑制率。

[0172] 下面的表E列出了本发明代表性的化合物和它们在皮下A431细胞系异种移植模型的活性。

[0173] 表E: 在A431异种移植模型肿瘤生长抑制 (TGI, %)

[0174]

天 \ 化合物	CO-1686 (100 mg/kg)	9 (20 mg/kg)
7	TGI = 38.7%	TGI = 48.2%