



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102209538 B

(45) 授权公告日 2013. 06. 12

(21) 申请号 200980144877. 5

A61K 45/06 (2006. 01)

(22) 申请日 2009. 11. 04

A61P 35/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/113, 276 2008. 11. 11 US

(56) 对比文件

CN 101679439 A, 2010. 03. 24, 权利要求书.
Doherty L.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 05. 11

et al. egfr 和 mtor 抑制剂联合应用治疗复
发性恶性胶质瘤的先导性研究.《世界核心医学期
刊文摘(神经病学分册)》. 2006, (第 12 期), 21
页.

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/063189 2009. 11. 04

(87) PCT申请的公布数据

W02010/056575 EN 2010. 05. 20

审查员 张婷

(73) 专利权人 伊莱利公司

地址 美国印第安纳州

(72) 发明人 S. 吉加纳奇

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 万雪松 李炳爱

(51) Int. Cl.

A61K 31/436 (2006. 01)

A61K 31/519 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书9页

(54) 发明名称

P70 S6 激酶抑制剂和 EGFR 抑制剂的组合治
疗剂

(57) 摘要

本 发 明 提 供 一 种 包 含 化 合 物
4-[4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲
基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基]-1H-吡唑并
[3, 4-d] 嘧啶或其可药用盐和 EGFR 抑制剂的组合
治疗, 用于治疗多形性成胶质细胞瘤、结肠腺癌、
非小细胞肺癌、小细胞肺癌、顺铂-耐受性小细胞
肺癌、卵巢癌、白血病、胰腺癌、前列腺癌、乳腺癌、
肾细胞癌、多发性骨髓瘤、卡波济氏肉瘤、霍杰金
淋巴瘤、淋巴管肌瘤、非霍杰金淋巴瘤或肉瘤。

1. 产品, 其包含化合物 4-[4-[4-(4- 氟 -3- 三氟甲基 - 苯基)-1- 甲基 -1H- 咪唑 -2- 基]- 哌啶 -1- 基]-1H- 吡唑并 [3, 4-d] 嘧啶或其可药用盐和 EGFR 抑制剂, 作为在治疗非小细胞肺癌中同时、分别或顺序使用的组合制剂, 其中所述 EGFR 抑制剂是埃罗替尼盐酸盐。

2. 根据权利要求 1 的产品, 其中所述化合物 4-[4-[4-(4- 氟 -3- 三氟甲基 - 苯基)-1- 甲基 -1H- 咪唑 -2- 基]- 哌啶 -1- 基]-1H- 吡唑并 [3, 4-d] 嘧啶或其可药用盐是 4-[4-[4-(4- 氟 -3- 三氟甲基 - 苯基)-1- 甲基 -1H- 咪唑 -2- 基]- 哌啶 -1- 基]-1H- 吡唑并 [3, 4-d] 嘧啶对 - 甲苯磺酸盐。

3. 根据权利要求 1 至 2 中任一项的产品, 其中所述化合物 4-[4-[4-(4- 氟 -3- 三氟甲基 - 苯基)-1- 甲基 -1H- 咪唑 -2- 基]- 哌啶 -1- 基]-1H- 吡唑并 [3, 4-d] 嘧啶或其可药用盐和 EGFR 抑制剂将被口服给药。

4. 组合有效量的化合物 4-[4-[4-(4- 氟 -3- 三氟甲基 - 苯基)-1- 甲基 -1H- 咪唑 -2- 基]- 哌啶 -1- 基]-1H- 吡唑并 [3, 4-d] 嘧啶或其可药用盐和 EGFR 抑制剂在制备用于治疗有此需要的患者中非小细胞肺癌的药物中的用途, 其中所述 EGFR 抑制剂是埃罗替尼盐酸盐。

5. 根据权利要求 4 的用途, 其中所述化合物 4-[4-[4-(4- 氟 -3- 三氟甲基 - 苯基)-1- 甲基 -1H- 咪唑 -2- 基]- 哌啶 -1- 基]-1H- 吡唑并 [3, 4-d] 嘧啶或其可药用盐是 4-[4-[4-(4- 氟 -3- 三氟甲基 - 苯基)-1- 甲基 -1H- 咪唑 -2- 基]- 哌啶 -1- 基]-1H- 吡唑并 [3, 4-d] 嘧啶对 - 甲苯磺酸盐。

6. 根据权利要求 4 至 5 中任一项的用途, 其中所述化合物 4-[4-[4-(4- 氟 -3- 三氟甲基 - 苯基)-1- 甲基 -1H- 咪唑 -2- 基]- 哌啶 -1- 基]-1H- 吡唑并 [3, 4-d] 嘧啶或其可药用盐和 EGFR 抑制剂被口服给药。

P70 S6 激酶抑制剂和 EGFR 抑制剂的组合治疗剂

[0001] 发明背景

[0002] 磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K)/AKT/哺乳动物雷帕霉素靶 (mTOR) 途径涵盖大量在控制细胞生长和存活中关键的信号点。P70 S6 激酶是一种丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶, 其为 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的下游效应物。P70 S6 激酶磷酸化细胞内的核糖体蛋白 S6, 并调节核糖体生物合成、细胞生长和细胞周期进程 (响应于促有丝分裂刺激)。P70 S6 激酶通常在很多固体肿瘤中被活化。用于治疗这样的肿瘤的 p70 S6 激酶的抑制剂公开在 WO 2006/046024 和 WO 2008/075109 中。

[0003] 表皮生长因子受体 (EGFR) 是一种属于结构相关受体酪氨酸激酶家族的跨膜糖蛋白。EGFR 以细胞表面水平供给 PI3K/AKT/mTOR 途径。EGFR 被认为在多种信号转导途径中很重要, 看上去在肿瘤发生和肿瘤生长中都起关键性作用。EGFR 及其配体在许多肿瘤类型的自分泌生长循环 (growth loops) 中过表达或参与该自分泌生长循环。EP 0 817 775 公开了一系列 4-(取代的苯基氨基) 喹唑啉衍生物, 其具有 EGFR 抑制活性, 并且在治疗癌症中 useful。

[0004] 存在用于治疗癌症的改善治疗剂的需要。而且, 存在具有比现有治疗更大功效的治疗剂的需要。本发明的优选的组合治疗显示出比用任何单独治疗剂的治疗更大的功效。当给药次最优剂量的每种治疗剂时, 本发明的更优选的组合治疗剂显示出更大的功效。

[0005] 发明简述

[0006] 本发明提供一种产品, 其包含化合物 4-[4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基]-1H-吡唑并 [3, 4-d] 嘧啶或其可药用盐和 EGFR 抑制剂, 作为在治疗中同时、分别或顺序使用的组合制剂。

[0007] 本发明进一步提供一种产品, 其包含化合物 4-[4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基]-1H-吡唑并 [3, 4-d] 嘧啶或其可药用盐和 EGFR 抑制剂, 作为在治疗下述疾病中同时、分别或顺序使用的组合制剂: 多形性成胶质细胞瘤、结肠腺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、顺铂-耐受性小细胞肺癌、卵巢癌、白血病、胰腺癌、前列腺癌、乳腺癌、肾细胞癌、多发性骨髓瘤、卡波济氏肉瘤、霍杰金淋巴瘤、淋巴管肌瘤、非霍杰金淋巴瘤或肉瘤。

[0008] 本发明进一步提供化合物 4-[4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基]-1H-吡唑并 [3, 4-d] 嘧啶或其可药用盐, 其与 EGFR 抑制剂同时、分别或顺序组合用于治疗下述疾病: 多形性成胶质细胞瘤、结肠腺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、顺铂-耐受性小细胞肺癌、卵巢癌、白血病、胰腺癌、前列腺癌、乳腺癌、肾细胞癌、多发性骨髓瘤、卡波济氏肉瘤、霍杰金淋巴瘤、淋巴管肌瘤、非霍杰金淋巴瘤或肉瘤。

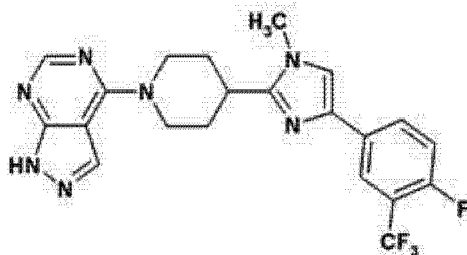
[0009] 本发明进一步提供一种治疗选自下述癌症的方法: 多形性成胶质细胞瘤、结肠腺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、顺铂-耐受性小细胞肺癌、卵巢癌、白血病、胰腺癌、前列腺癌、乳腺癌、肾细胞癌、多发性骨髓瘤、卡波济氏肉瘤、霍杰金淋巴瘤、淋巴管肌瘤、非霍杰金淋巴瘤和肉瘤, 该方法包括向有此需要的患者给药组合有效量的化合物 4-[4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基]-1H-吡唑

并 [3, 4-d] 嘧啶或其可药用盐和 EGFR 抑制剂。

[0010] 发明详述

[0011] 化合物 4-[4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基]-1H-吡唑并 [3, 4-d] 嘧啶

[0012]



[0013] 是一种 p70 S6 激酶抑制剂。

[0014] 化合物 4-[4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基]-1H-吡唑并 [3, 4-d] 嘧啶是一种碱,因此将与大量有机酸和无机酸中任一种反应,形成可药用盐。如本文使用的术语“可药用盐”指对活生物基本上无毒的化合物 4-[4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基]-1H-吡唑并 [3, 4-d] 嘧啶的盐。这样的盐包括在 Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2-19 (1977) 中列出的可药用盐,其是本领域技术人员已知的。甲苯磺酸盐 (也称为对-甲苯磺酸盐) 和盐酸盐是优选的。甲苯磺酸盐是特别优选的。

[0015] “EGFR 抑制剂”指其为 EGFR 的抑制剂的任何化合物、肽或抗体。优选的 EGFR 抑制剂包括埃罗替尼(Erlotinib)、西妥昔单抗 (Erbix[®];公开在 EP 0 359 282 中)、panitumumab (Vectibix[®];公开在 EP 0 359 282 中) 和 gefinitib (Iressa[®];公开在 EP 0 566 226 中)。一种特别优选的 EGFR 抑制剂是埃罗替尼,N-(3-乙炔基苯基)-6,7-二(2-甲氧基乙氧基)-4-喹唑啉胺,特别是埃罗替尼盐酸盐 (Tarceva[®])。EGFR 抑制剂埃罗替尼及其制备方法公开在 EP 0 817 775 中。

[0016] 术语“组合治疗”指包括给药化合物 4-[4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基]-1H-吡唑并 [3, 4-d] 嘧啶或其可药用盐和 EGFR 抑制剂 (所述“治疗剂”) 的组的治疗。治疗剂可以同时、分别或顺序给药。

[0017] 术语“治疗”包括减缓、中止、阻止、控制、终止、减少或逆转症状、紊乱、病症或疾病的进展或严重性。

[0018] 术语“组合有效量”指当组合给药时能够有效地治疗本文描述的病症的化合物 4-[4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基]-1H-吡唑并 [3, 4-d] 嘧啶或其可药用盐的量和 EGFR 抑制剂的量。组合有效的每种治疗剂的量可以等于当给药单独治疗剂时有有效的量,或者可以少于当给药单独治疗剂时有有效的量 (即,可以是次最佳剂量)。

[0019] 本文描述的组合治疗可以用于治疗增殖性疾病比如癌症和抑制哺乳动物的血管生成。在本发明的所有实施方案中,优选地待治疗的癌症选自多形性成胶质细胞瘤、结肠腺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、顺铂-耐受性小细胞肺癌、卵巢癌、白血病、胰腺癌、前列腺癌、乳腺癌、肾细胞癌、多发性骨髓瘤、卡波济氏肉瘤、霍杰金淋巴瘤、淋巴管肌瘤、非霍杰金

淋巴瘤和肉瘤。特别优选地,待治疗的癌症为非小细胞肺癌。优选地,待治疗的哺乳动物是人类。

[0020] 在本发明的另一个实施方案中,EGFR 抑制剂可以与化合物 4-[4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基]-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶或其可药用盐同时、分别或顺序组合使用,以治疗癌症,特别是上述癌症。

[0021] 化合物 4-[4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基]-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶或其可药用盐可以用于制备用于治疗癌症,特别是上述癌症的组合治疗的药物,其中所述药物将与 EGFR 抑制剂组合给药。

[0022] 在本发明的一个进一步可选的实施方案中,EGFR 抑制剂可以用于制备用于治疗癌症,特别是上述癌症的组合治疗的药物,其中所述药物将与化合物 4-[4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基]-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶或其可药用盐组合给药。

[0023] 在一个进一步可选的实施方案中,提供药物制剂,其包含化合物 4-[4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基]-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶或其可药用盐和 EGFR 抑制剂,与可药用载体、稀释剂或赋形剂组合。

[0024] 化合物 4-[4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基]-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶或其可药用盐和 EGFR 抑制剂可以通过各种途径给药。其可以通过相同的途径或不同的途径给药。优选地,口服给药化合物 4-[4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基]-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶或其可药用盐或 EGFR 抑制剂。更优选地,两者都是口服给药。

[0025] 在本发明的组合治疗中使用的每种治疗剂的最佳剂量方案可以根据例如给药途径、被治疗的疾病和使用的 EGFR 抑制剂而变化。例如,化合物 4-[4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基]-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶或其可药用盐的剂量可以在每天 100 mg 至 2000 mg 的范围内。优选的剂量为每天 600 mg 至 1600 mg。在一个优选的实施方案中,给药所述化合物每天两次,每次剂量为 300 mg 至 800 mg。EGFR 抑制剂埃罗替尼盐酸盐的剂量可以为每天 10 mg 至 450 mg。埃罗替尼盐酸盐的优选的剂量为每天 150 mg 或 100 mg。

[0026] 可以给药组合治疗单个固定时期,例如 6 个月。可以根据周期时间表给药组合治疗,其中存在交替治疗和非治疗时期。可选地,可以连续给药组合治疗。优选地,连续给药组合治疗(直到出现疾病进展或不可接受的毒性)。

[0027] 在一个实施方案中,化合物 4-[4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基]-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶或其可药用盐和 EGFR 抑制剂是分别给药的。当分别给药时,化合物 4-[4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基]-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶或其可药用盐和 EGFR 抑制剂可以根据不同的剂量给药方案和不同的给药途径给药。

[0028] 在另一个实施方案中,化合物 4-[4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基]-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶或其可药用盐和 EGFR 抑制剂是顺序给药的。在该实施方案中,可以首先给药任一种治疗剂。优选地,首先给药 EGFR 抑制剂,接着给药化合物 4-[4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌

啶-1-基]-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶或其可药用盐。优选地,一种治疗剂的剂量给药和另一种治疗剂的剂量给药之间的时间少于8小时。更优选地,少于4小时,甚至更优选地,少于1小时。

[0029] 在仍然另一个实施方案中,化合物4-[4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基]-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶或其可药用盐和EGFR抑制剂是同时给药的。在该实施方案中,所述试剂可以以同一制剂给药,或者经由不同给药途径同时给药。

[0030] 治疗剂4-[4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基]-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶甲苯磺酸盐优选地口服给药。进一步优选的是,在治疗期间,每日给药两个剂量的4-[4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基]-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶甲苯磺酸盐,且各剂量均为300 mg至800 mg。

[0031] 在一个实施方案中,在组合治疗中使用的治疗剂是4-[4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基]-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶甲苯磺酸盐和埃罗替尼盐酸盐。优选地是根据上述优选的剂量给药方案,口服给药4-[4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基]-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶甲苯磺酸盐。在该实施方案中,优选地也口服给药埃罗替尼盐酸盐。进一步优选的是每日给药一剂量的埃罗替尼,各剂量为100 mg或150 mg。在该实施方案中,优选地连续地给药组合治疗。

[0032] 可以根据如下所述方法制备化合物4-[4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基]-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶和其可药用盐。

[0033] 中间体4-氯-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶的制备

[0034] 向别嘌醇(20 g;146.94 毫摩尔)在甲苯(205.71 mL)中的溶液中加入磷酰氯(68.27 mL;734.68 毫摩尔)和二异丙基乙胺(56.38 mL;323.26 毫摩尔),并在80℃下加热该混合物2小时。真空除去溶剂至一半,并将该混合物倾倒入在4℃下的2 M磷酸氢二钾(734.68 mL;1.47 摩尔)水溶液中。在室温(RT)下,搅拌该混合物过夜。通过Celite®垫料过滤出沉淀物,并接着用EtOAc洗涤。分离滤液,再次用EtOAc洗涤水层,结合有机层,经MgSO₄干燥,过滤并真空浓缩,得到呈黄色固体的标题化合物(16 g;产率70.45%)。MS (APCI): $m/z = 155.1$ [M + H]。

[0035] 4-{4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基]-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶盐酸盐的制备

[0036] 将乌洛托品(1.10 当量;231.55 毫摩尔;32.46 g)加入到4-氟-3-(三氟甲基)苯甲酰甲基溴(60.00 g;1.00 当量;210.50 毫摩尔)在乙酸乙酯(450 mL;4.60 摩尔)中的溶液中。在室温下,搅拌该混合物过夜。真空除去溶剂,并在甲基叔丁基醚(MTBE)中研磨该固体。过滤,并在减压下干燥。加入乙醇(450 mL;7.73 摩尔),接着加入氯化氢(150 mL;8.30 当量;1.75 摩尔),并在RT下搅拌该混合物过夜。真空除去溶剂,并在50℃下真空干燥固体一周,得到呈白色固体的2-氨基-1-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-乙酮盐酸盐(54.23 g;产率100%)。

[0037] 将N-甲基吗啉(3 当量;631.52 毫摩尔;69.66 mL)加入到哌啶-1,4-二羧酸

单-叔丁基酯 (1.20 当量 ;252.61 毫摩尔 ;57.92 g) 在四氢呋喃 (THF) (400 mL) 中的溶液中。用干冰-丙酮浴将该混合物冷却至 -10°C 。滴加氯甲酸异丁酯 (1.1 当量 ;231.56 毫摩尔 ;30.26 mL), 同时保持温度低于 -5°C 。在 -5 至 -10°C 下 30 分钟之后, 加入悬浮在 THF (300 mL) 中的 2-氨基-1-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-乙酮盐酸盐 (54.23 g ;1.00 当量 ;210.51 毫摩尔), 并在 -5°C 下的浴中搅拌该混合物 20 分钟。在 RT 下搅拌 1 小时。加入水和 EtOAc, 接着用水和饱和的氯化钠水溶液洗涤有机层。经 MgSO_4 干燥, 过滤和真空除去溶剂。将粗品悬浮在 MTBE 中, 并搅拌 2 小时。过滤固体, 并真空干燥, 得到 1-[2-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-2-氧代-乙基氨基甲酰基]-哌啶-4-羧酸叔丁基酯 (64.44 g ;产率 70.79%)。

[0038] 将乙酸铵 (15 当量 ; 1.02 摩尔 ;78.61 g) 加入到 1-[2-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-2-氧代-乙基氨基甲酰基]-哌啶-4-羧酸叔丁基酯 (29.4 g ;1.00 当量 ;67.99 毫摩尔) 在 1-丁醇 (150 mL ;1.64 摩尔) 中的溶液中, 然后, 加入三乙胺 (1 当量 ;67.99 毫摩尔 ;9.48 mL)。在 160°C 在密封管中搅拌该混合物 3 小时。加入 EtOAc 和水, 接着再次用水和饱和的氯化钠水溶液洗涤有机层, 并真空浓缩。在 MTBE 中研磨该粗产物, 过滤并在减压下干燥, 得到呈白色固体的 4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-羧酸叔丁基酯 (18.23 g ;44.10 毫摩尔, 产率 64.86%)。

[0039] 将在 40 mL 二甲亚砜 (DMSO) 中的 4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-羧酸叔丁基酯 (16.03 g ;1.00 当量 ; 38.77 毫摩尔) 加入到氢氧化钾 (1.5 当量 ; 58.16 毫摩尔 ;3.26 g) 在 200 mL 的 DMSO 中的溶液中。在 RT 下 5 分钟之后, 一次性加入碘代甲烷 (1.1 当量 ;42.65 毫摩尔 ;2.66 mL)。在 RT 下搅拌两小时, 接着将该混合物倾倒入冰水中。过滤固体, 用水洗涤, 并在减压下干燥。在热庚烷中研磨该固体, 过滤并在减压下干燥, 得到呈白色固体的 4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-羧酸叔丁基酯 (8.7 g ;产率 52.49%)。

[0040] 在 RT 下, 将氯化氢 (4.00 当量 ;81.41 毫摩尔 ;20.35 mL) 加入到 4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-羧酸叔丁基酯 (8.7 g ;1.00 当量 ;20.35 毫摩尔) 在二氯甲烷 (101.77 mL) 中的溶液中。在 RT 下, 搅拌该溶液 1 小时。在减压下除去溶剂, 并将粗产物溶解在异丙醇 (101.77 mL) 中。加入 4-氯-1H-吡唑并 [3,4-d] 嘧啶 (1.65 当量 ;33.58 毫摩尔 ;5.19 g) 和三乙胺 (10 当量 ;203.54 毫摩尔 ;28.37 mL)。回流搅拌该混合物 1 小时。在减压下除去溶剂, 并将粗品在水中研磨过夜。过滤固体, 并在热乙腈中研磨, 过滤并真空干燥, 得到呈浅黄色固体的 4-{4-[5-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-3-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基}-1H-吡唑并 [3,4-d] 嘧啶 (8.42 g ;18.86 毫摩尔 ;产率 92.66%)。

[0041] 在 RT 下, 将氯化氢 (1.1 当量 ;18.52 毫摩尔 ;4.63 mL) 加入到 4-{4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基}-1H-吡唑并 [3,4-d] 嘧啶 (7.5 g ;1.00 当量 ;16.84 毫摩尔) 在二氯甲烷 (50 mL) 中的溶液中, 在 RT 下, 搅拌该混合物 1 小时。真空除去溶剂, 并在 MTBE 中研磨粗品 1 小时。过滤固体, 并真空干燥过夜, 得到呈白色固体的 4-{4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-3-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基}-1H-吡唑并 [3,4-d] 嘧啶盐酸盐 (7.99 g ;16.58 毫摩尔 ;产率 98.47%)。 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO): δ 14.01-13.99 (m, 1H), 8.57-8.54 (m, 2H), 8.26-8.19 (m, 3H), 7.72-7.63 (m, 1H), 5.23-5.20 (m, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.41

(m, 2H), 2.15–2.07 (m, 3H), 1.10 (s, 2H)。

[0042] 4-{4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基}-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶对-甲苯磺酸盐的制备

[0043] 在冰浴中,将4-氟-3-(三氟甲基)苯甲酰甲基溴(通过HPLC测定纯度93%, 1000 g;3.51 摩尔)和THF (5 L)的溶液冷却至<5℃。在<5℃经1小时滴加叠氮化钠(239 g;3.68 摩尔,1.05 eq)在水(800 mL)中的溶液。在<5℃下搅拌1小时之后,分离并弃去水层。当尚冷却时,经3小时慢慢地将有机层加入到三苯基膦(920.2g,3.51 摩尔,1.0 eq)、对甲苯磺酸一水合物(1335g,7.02 摩尔,2.0 eq)和THF (5L)的溶液中。在整个加入过程中,保持温度<15℃,在加入期间,固体沉淀。

[0044] 在<20℃搅拌该反应混合物2小时,然后过滤出固体,用THF (3×2 L)洗涤,并在50℃下真空干燥,得到1167.4g (85%,对起始原料的纯度做校正后为92%)呈白色结晶固体的2-氨基-1-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-乙酮对-甲苯磺酸盐。

[0045] 混合2-氨基-1-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-乙酮对-甲苯磺酸盐(1133 g;2.88 摩尔)、1-(叔-丁氧基羰基)哌啶-4-羧酸(795 g;3.47 摩尔;1.20 eq)、THF (3450 mL)和乙酸乙酯(7500 mL),形成薄白色浆液。在冰浴中,将该浆液冷却至<5℃,加入2-丙烷膦酸酐(T₃P)(在EtOAc中50%的溶液)(2385 g;3.75 摩尔,1.3 eq)。然后,经1小时加入N-甲基吗啉(795 mL;7.21 摩尔;2.5 eq),保持温度<10℃。将得到的浆液加温至环境温度,并搅拌2小时。

[0046] 通过加入水淬灭反应。分离有机相,接着用NaHCO₃水溶液、NaCl水溶液洗涤。在旋转蒸发器上,将该有机相加温至50℃,并加入正庚烷。在真空下蒸馏溶剂,直到最终浆液体积为约5 L。将该浆液冷却至RT,并过滤固体,用正庚烷(2×1L)洗涤,接着在真空箱中,在50℃下干燥过夜,得到呈白色固体的1-[2-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-2-氧代-乙基氨基甲酰基]-哌啶-4-羧酸叔丁基酯(1124.8g,90%)。

[0047] 混合1-[2-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-2-氧代-乙基氨基甲酰基]-哌啶-4-羧酸叔丁基酯(100 g;231 毫摩尔)、乙酸铵(178.3 g;2.31 摩尔;10 eq)和甲醇(1000 mL)。用于该转化的反应器是1/16”I.D. 不锈钢盘管(在烘箱中管道的全部内体积为541 mL)。在烘箱中加热该反应器至140℃。通过调节器在250 psig控制该管中的回压,以使上述溶液过热高于其正常沸点。在压力下,使上述制备的溶液以6.01 mL/min连续地泵入热管(使得在热管中的总停留时间为90分钟)。当该溶液离开烘箱时,在套管式热交换器将其冷却回20℃。一旦全部溶液处理通过反应器(总处理时间8小时),在30℃在真空下浓缩得到的橙色溶液至总体积600 mL。加入乙腈(200 mL),并加热该溶液至50℃。经2小时滴加水(700 mL)并播种以结晶产物。将得到的浆液冷却至20℃,并过滤固体,接着用在水中的20% MeOH (2×200 mL)洗涤。在50℃真空干燥得到的固体。在50℃,将该固体在乙腈(200 mL)中再浆液化。将该浆液冷却至环境温度,过滤固体,并用乙腈(100 mL)洗涤,得到呈灰白色固体的4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-羧酸叔丁基酯(54.43g;132 毫摩尔;57%)。

[0048] 将4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-羧酸叔丁基酯(80.02 g;183.69 毫摩尔)溶解在DMSO (1060 mL)中。一次性加入KOH (18.47 g;279.82 毫摩尔;1.5 eq)。在25℃经30分钟加入碘代甲烷(27.74 g;193.48 毫摩尔;1.05 eq)。

在 25℃ 搅拌该溶液 1 小时。经 5 分钟将 4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-羧酸叔丁基酯品种 (0.17 g) 和水 (80 mL) 的混合物加入所述溶液中。在 25℃ 搅拌得到的稀浆液 30 分钟。在 25℃ 经 30 分钟加入额外的水 (240.73 mL)。过滤该固体,并先在水中的 20% DMSO (2×120 mL) 洗涤,再用水 (120 mL) 洗涤。在 60℃ 真空干燥固体。在 50℃ 将得到的干燥固体溶解在乙醇 (480 mL) 中。经 5 分钟加入水 (240 mL)。然后,经 30 分钟加入 4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-羧酸叔丁基酯品种 (0.038 g),并再次加入水 (240 mL)。经 2 小时将得到的浆液冷却至 25℃。过滤固体,在水中的 20% EtOH 洗涤滤饼。在 60℃ 真空干燥固体,得到呈白色固体的 4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-羧酸叔丁基酯 (72.36 g,92%)。

[0049] 在 < 5℃ 经 45 分钟,通过向甲醇 (1160 mL) 中缓慢加入乙酰氯 (193.14 mL; 2.71 摩尔;4.00 eq) 制备无水 HCl 溶液。在 20℃ 经 90 分钟,将得到的溶液加入到包含 4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-羧酸叔丁基酯 (290 g;678.46 毫摩尔) 在甲醇 (2320 mL) 中的溶液的独立烧瓶中。在 20℃ 搅拌该反应混合物过夜。在 30℃ 真空浓缩该反应混合物。加入 DMSO (1080 mL;15.20 摩尔;1.08 L;1.19 kg),继续蒸馏直到在 20 mm Hg 的压力下,内部温度达到 50℃。加入 DMSO,直到总体积为 2030 mL。然后,经 30 分钟,经由加料漏斗加入三乙胺 (473 mL;3.39 摩尔;5 eq)。经 30 分钟,等间隔,等份地装入固体 4-氯-1H-吡唑并 [3,4-d] 嘧啶 (110.29 g;713.58 毫摩尔;1.05 eq)。在 20℃ 搅拌得到的浆液过夜。将该浆液加热至 80℃。加入水 (229 mL),得到澄清溶液。给该反应引入品种,经 4 小时慢慢地再次加入水 (1273 mL),使产物完全地结晶。将该浆液冷却至 50℃,并过滤固体。先用在 DMSO 中 30% 的水 (2×290mL),接着用水 (290 mL) 洗涤滤饼。在 60℃ 真空干燥固体,得到呈灰白色固体的 4-{4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基}-1H-吡唑并 [3,4-d] 嘧啶 (301g,99%)。

[0050] 将 4-{4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基}-1H-吡唑并 [3,4-d] 嘧啶 (20g,44.9 毫摩尔) 溶解在 20:1 的 H₂O:丙酮混合物 (360 mL) 中。在 20℃ 经 20 分钟,将对甲苯磺酸一水合物 (10.25g;53.9 毫摩尔;1.2 eq) 在 20:1 的 H₂O:丙酮混合物 (40 mL) 中的溶液加入到该反应中。将该反应混合物加热至 55℃,保持 1 小时,然后经 1 小时冷却至 25℃。过滤固体,用水 (40 mL) 洗涤滤饼。在 50℃ 真空干燥,得到呈白色固体的 4-{4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基}-1H-吡唑并 [3,4-d] 嘧啶对-甲苯磺酸盐 (23.9g;86%)。

[0051] 晶体 4-{4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基}-1H-吡唑并 [3,4-d] 嘧啶对-甲苯磺酸盐的制备

[0052] 向具有顶部搅拌器的 1-L 圆底烧瓶中装入 60.12g 的 4-{4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基}-1H-吡唑并 [3,4-d] 嘧啶 (根据任一个上述制备方法制备,不含最后的盐形成步骤),接着装入 250 mL 的 5% MeOH 水溶液。搅拌得到的浆液,并加入对甲苯磺酸一水合物 (26.88g),然后用剩余 50 mL 的 5% MeOH 水溶液接着洗涤。搅拌得到的浆液,并将晶体冷却至 5℃。在 5℃ 下 1 小时之后,停止搅拌,并在布氏漏斗上过滤浆液。用 75mL 的冷 5% MeOH 水溶液清洗出烧瓶,并使用该清洗液洗涤滤饼。

将固体转移到称皿,并在 50℃真空干燥整天整夜,具有缓慢的放气。最终重量为 71.44 g。

[0053] 用 D4 Endeavor 衍射计进行 X 射线粉末衍射分析,所述 D4 Endeavor 衍射计装有 CuK α 源 ($\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$),在 40 kV 和 50 mA 下操作。以 2θ 的 4° 到 40° 扫描样品,步长为 0.009 的 2θ ,扫描速率为 ≥ 1.5 秒/每步。

$2-\theta$ 角 ($\pm 0.1^\circ$)	强度 %	$2-\theta$ 角 ($\pm 0.1^\circ$)	强度 %
6.826	12	23.485	14
10.256	24	23.615	17
12.984	24	23.866	22
13.131	61	24.024	20
13.431	25	24.667	11
13.688	100	24.795	11
14.062	24	25.029	8
15.745	6	25.552	9
17.121	15	26.234	5
18.599	5	26.556	10
18.919	21	27.031	6
19.38	29	27.693	11
20.603	14	27.97	5
21.661	6	28.352	6
21.962	14	28.428	5
22.108	9	38.232	5

[0054] 体内功效的测定

[0055] 将 A549 人非小细胞肺癌细胞 (5×10^6) 皮下植入在 0.2 mL 的基质胶中的雌性 C.B-17 (Fox Chase SCID) Model #CB17SC-M 小鼠侧腹中。当植入后约 1 周肿瘤尺寸为约 100 mg 时,将小鼠随机化分成 10 组,每日一次口服剂量 2.5 mg/kg 的 4-{4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基}-1H-吡唑并 [3,4-d] 嘧啶 (p70 S6 激酶抑制剂;配制在 H₂O 中的 35% PEG300/10%HPBCD/10%PS80 中;抑制剂的浓度为 0.31 mg/mL) 或 20 mg/kg 的埃罗替尼盐酸盐 (配制在 NaCMC 吐温 80 中;埃罗替尼盐酸盐的浓度 2.5 mg/mL) 或组合 (2.5 mg/kg 的 p70 S6 激酶抑制剂和 20 mg/kg 的埃罗替尼盐酸盐)。赋形剂组给予 2 种赋形剂 (NaCMC 吐温 80 和在水中的 35% 的 PEG300/10%HPBCD/10%PS80) 的组合 (各 0.1 mL)。继续治疗 38 天。使用标准技术测量肿瘤体积,每周两次,并记录。记录肿瘤尺寸和体重,并每两周分析。使用式: $v = \frac{1}{6} \pi \times l \times w^2 \times 0.536$ 计算肿瘤体积,其中 l = 较大的测量直径, w = 较小的垂直直径。分析使用 SAS 软件版本 8.2 (SAS Institutes Inc, Cary, NC),分析 log 肿瘤体积数据,使用具有空间幂 (spatial power) 协方差结构的重复测量 ANOVA 模型。对于每个采集的时间点,将治疗组与赋形剂对照组进行比较。对于每个治疗组,肿瘤体积以由每个组的重复测量 ANOVA 测定的平均值 $\pm$ 标准误差给出。(SAS for Mixed Models, 2nd Ed., Littell 等人, 2006, SAS Institutes Inc, Cary, NC)。

[0056] 化合物相互作用的统计分析

[0057] 使用梯形规则,使用每只动物的肿瘤体积 vs. 时间数据计算曲线下面积 (AUC)。通过使用补偿各组间变化的对数变换的 2 因素 ANOVA 分析这些 AUC。两个因素是 4-{4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基}-1H-吡唑并 [3,4-d] 嘧啶的剂量和埃罗替尼盐酸盐的剂量。使用因素之间的相互作用试验加和性的偏差。(An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis, R. Lyman Ott,

1993, Duxbury Press, Belmont, CA)。

[0058] 将该研究的结果显示在下表中。对于所有数据, n (小鼠数量) 为 9, 除了来自赋形剂组第 17 天以后的数据和来自埃罗替尼盐酸盐组第 38 天以后的数据, 此时 n 为 8。标题为显著性的那一栏的数据表明相对于赋形剂组的差异是否是统计学显著的: NS = 非显著的 ($p > 0.05$); * = $0.01 < p \leq 0.05$; ** = $0.001 < p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$ 。

[0059]

天	赋形剂		仅仅 p70 S6 激酶抑制剂			仅仅埃罗替尼盐酸盐			P70 S6 激酶抑制剂和埃罗替尼盐酸盐的组合		
	平均值	SE	平均值	SE	显著性	平均值	SE	显著性	平均值	SE	显著性
7	40.3	4.5	33.8	4.8	NS	39.5	3.6	NS	35.8	5.9	NS
9	52.7	5.1	51.9	6.2	NS	51.5	4.7	NS	52.6	6.6	NS
14	67.7	6.7	56.2	6.5	NS	61.8	7.6	NS	48.3	7.5	NS
17	86.6	10.2	75.9	11	NS	74.8	11.1	NS	54.4	6.5	*
21	110.1	16.9	94.1	15.2	NS	91.1	13.4	NS	75.1	10.6	NS
24	139.3	18.9	113.5	23.2	NS	101.6	13.9	NS	74.2	8.6	**
28	208.2	22.9	196.6	22.6	NS	139.9	21.7	NS	89.8	9.9	***
31	279.1	27.2	231.3	24.9	NS	141.8	17.4	**	118.4	13	***
35	347.6	38.2	302.4	41	NS	196.7	29.3	**	127.6	14	***
38	426.2	47.5	353.3	46.1	NS	259.4	35.9	*	157	24.6	***
42	500	64.8	425.5	66.2	NS	260.1	42.1	**	198.3	27.8	***
44	576.2	74.3	530.9	71	NS	373.8	39.7	*	253.7	34.2	***

[0060] 所述组合 (3.58) 的 log 肿瘤体积 AUC 与赋形剂 (3.91) 在统计学是不同的 ($p < 0.0008$), 而仅仅该 p70 S6 激酶抑制剂 (3.85) 和仅仅埃罗替尼盐酸盐 (3.76) 治疗组的 log 肿瘤体积 AUC 值与赋形剂没有显著性不同。在 log 肿瘤体积 AUC 值的成对比较中, 仅仅该 p70 S6 激酶抑制剂和仅仅埃罗替尼盐酸盐治疗组也与组合组显著不同。

[0061] 当与 EGFR 抑制剂埃罗替尼盐酸盐组合时, 4-[4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基]-1H-吡唑并 [3, 4-d] 嘧啶显示出抑制 A549 非小细胞肺癌肿瘤生长的能力。在该研究中, 4-[4-[4-(4-氟-3-三氟甲基-苯基)-1-甲基-1H-咪唑-2-基]-哌啶-1-基]-1H-吡唑并 [3, 4-d] 嘧啶的服药剂量为 2.5 mg/kg QD x35, 埃罗替尼盐酸盐的为 20 mg/kg QD x35。这些剂量是每种试剂的次最佳剂量, 与仅仅该 p70 S6 激酶抑制剂和仅仅埃罗替尼盐酸盐组相比, 所述组合显示出增强的功效。组合治疗没有引起任何明显的毒性。

[0062] 这些结果显示调节 PI3K 途径上游和下游将得到更大的功效。