

[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 200880015813.0

[51] Int. Cl.

*A61K 31/415 (2006.01)*

*C07D 231/12 (2006.01)*

*C07D 301/00 (2006.01)*

*A61P 35/00 (2006.01)*

[43] 公开日 2010年3月31日

[11] 公开号 CN 101686965A

[22] 申请日 2008.3.14

[21] 申请号 200880015813.0

[30] 优先权

[32] 2007.3.14 [33] GB [31] 0704932.3

[32] 2007.3.14 [33] US [31] 60/894,752

[86] 国际申请 PCT/GB2008/050180 2008.3.14

[87] 国际公布 WO2008/110846 英 2008.9.18

[85] 进入国家阶段日期 2009.11.12

[71] 申请人 阿斯特克斯治疗有限公司

地址 英国剑桥

共同申请人 癌症研究所：皇家癌症医院

癌症研究科技有限公司

[72] 发明人 S·J·伍德赫德 D·C·里斯

M·弗里德里克森 K·M·格林肖

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 梁 谋 林 森

权利要求书 7 页 说明书 83 页

[54] 发明名称

包含(S)-2-氨基-1-(4-氯苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇作为蛋白激酶调节剂的组合物

[57] 摘要

本发明提供包含(S)-2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇的组合物，其中该组合物基本不含(R)-2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇，或者该组合物含有(S)和(R)对映异构体的混合物，其中(S)对映异构体占优势。本发明还提供(S)-2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇的制备方法、新的加工中间体和新的加工中间体的制备方法。

1. 一种组合物，所述组合物包含(S)-2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇，其中所述组合物基本不含(R)-2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇，或者所述组合物含有(S)和(R)对映异构体的混合物，其中(S)对映异构体占优势。

2. 权利要求1的组合物，所述组合物包含2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇或其盐、溶剂化物、互变异构体或N-氧化物，其至少75%为S-对映异构体的形式。

3. 权利要求2的组合物，其中(S)-2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇的对映异构体纯度至少为80%。

4. 权利要求3的组合物，其中(S)-2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇的对映异构体纯度为至少85%，或至少90%，或至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%。

5. 权利要求4的组合物，其中(S)-2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇的对映异构体纯度大于98%。

6. 权利要求5的组合物，其中至少99.9%的2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇为S-对映异构体的形式。

7. 权利要求6的组合物，其中基本上没有(R)-2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇存在于组合物中。

8. 上述权利要求中任一项的组合物，其为含有(S)-2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇及药学上可接受的载体的药物组合物。

9. 权利要求1的组合物，所述组合物由(S)-2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇的基本纯的形式组成，即所含有的杂质小于0.5%，更优选小于0.1%，最优选小于0.01%。

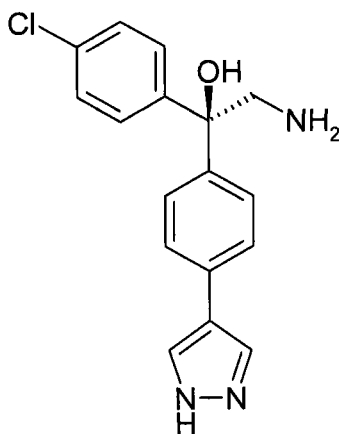
10. 权利要求9的组合物，其中没有一种杂质存在的量大于0.2%，更优选没有一种杂质存在的量大于0.1%。

11. 权利要求 10 的组合物, 其中如果已知, 则没有一种已知杂质存在的量大于 0.5%, 或大于 0.4%, 或大于 0.3%, 或大于 0.2%, 或大于 0.1%, 或大于 0.05%, 或大于 0.01%。

12. 上述权利要求中任一项的组合物, 其中(S)-2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇为游离碱的形式。

13. 权利要求 1-11 中任一项的组合物, 其中(S)-2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇为酸加成盐的形式。

14. 一种下式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物:



其中所述化合物为基本纯的形式。

15. 权利要求 14 的式(I)化合物, 所述化合物为游离碱或其盐、溶剂化物或互变异构体的形式。

16. 用于医学的上述权利要求中任一项的组合物或化合物。

17. 权利要求 1-15 中任一项限定的组合物或化合物, 所述组合物或化合物用于预防或治疗由蛋白激酶 B 介导的疾病或病症。

18. 权利要求 1-15 中任一项限定的组合物或化合物在制备用于预防或治疗由蛋白激酶 B 介导的疾病或病症的药物中的用途。

19. 一种用于预防或治疗由蛋白激酶 B 介导的疾病或病症的方法, 该方法包括给予有需要的受治疗者权利要求 1-15 中任一项限定的组合物或化合物。

20. 权利要求 1-15 中任一项限定的组合物或化合物, 所述组合物

或化合物用于治疗哺乳动物的包括细胞生长异常或细胞死亡异常停滞或者由细胞生长异常或细胞死亡异常停滞引起的疾病或病症。

21. 权利要求 1-15 中任一项限定的组合物或化合物在制备用于治疗哺乳动物的包括细胞生长异常或细胞死亡异常停滞或者由细胞生长异常或细胞死亡异常停滞引起的疾病或病症的药物中的用途。

22. 一种用于治疗哺乳动物的包括细胞生长异常或者由细胞生长异常引起的疾病或病症的方法，该方法包括以有效抑制细胞异常生长或细胞死亡异常停滞的量给予哺乳动物权利要求 1-15 中任一项限定的组合物或化合物。

23. 一种用于减轻或降低哺乳动物的包括细胞生长异常或细胞死亡异常停滞或者由细胞生长异常或细胞死亡异常停滞引起的疾病或病症的发病率的方法，该方法包括以有效抑制细胞异常生长的量给予哺乳动物权利要求 1-15 中任一项限定的组合物或化合物。

24. 一种用于治疗哺乳动物的包括细胞生长异常或细胞死亡异常停滞或者由细胞生长异常或细胞死亡异常停滞引起的疾病或病症的方法，该方法包括以有效抑制蛋白激酶 B 活性的量给予哺乳动物权利要求 1-15 中任一项限定的组合物或化合物。

25. 用于抑制蛋白激酶 B 的权利要求 1-15 中任一项限定的组合物。

26. 一种抑制蛋白激酶 B 的方法，该方法包括使激酶与抑制激酶的权利要求 1-15 中任一项限定的组合物或化合物接触。

27. 权利要求 1-15 中任一项限定的组合物或化合物，所述组合物或化合物通过抑制蛋白激酶 B 和/或蛋白激酶 A 的活性用于调节细胞过程(例如细胞分裂)。

28. 权利要求 1-15 中任一项限定的组合物或化合物在制备用于通过抑制蛋白激酶 B 和/或蛋白激酶 A 活性来调节细胞过程(例如细胞分裂)的药物中的用途。

29. 一种调节细胞过程(例如细胞分裂)的方法，该方法通过使用

权利要求 1-15 中任一项限定的组合物或化合物来抑制蛋白激酶 B 和/或蛋白激酶 A 的活性。

30. 权利要求 1-15 中任一项限定的组合物或化合物, 所述组合物或化合物用于预防或治疗由蛋白激酶 A 介导的疾病或病症。

31. 权利要求 1-15 中任一项限定的组合物或化合物在制备用于预防或治疗由蛋白激酶 A 介导的疾病或病症的药物中的用途。

32. 一种用于预防或治疗由蛋白激酶 A 介导的疾病或病症的方法, 该方法包括给予有需要的受治疗者权利要求 1-15 中任一项限定的组合物或化合物。

33. 一种用于治疗哺乳动物的包括细胞生长异常或细胞死亡异常停滞或者由细胞生长异常或细胞死亡异常停滞引起的疾病或病症的方法, 该方法包括以有效抑制蛋白激酶 A 活性的量给予哺乳动物权利要求 1-15 中任一项限定的组合物或化合物。

34. 用于抑制蛋白激酶 A 的权利要求 1-15 中任一项限定的组合物或化合物。

35. 一种抑制蛋白激酶 A 的方法, 该方法包括使激酶与抑制激酶的权利要求 1-15 中任一项限定的组合物或化合物接触。

36. 一种调节细胞过程(例如细胞分裂)的方法, 该方法使用权利要求 1-15 中任一项限定的组合物或化合物来抑制蛋白激酶 A 的活性。

37. 权利要求 1-15 中任一项限定的组合物或化合物在制备用于预防或治疗包括细胞生长异常或细胞死亡异常停滞或者由细胞生长异常或细胞死亡异常停滞引起的疾病或病症的药物中的用途。

38. 一种药物组合物, 所述药物组合物包含权利要求 1-15 中任一项限定的组合物及药学上可接受的载体。

39. 用于医学的权利要求 1-15 中任一项限定的组合物或化合物。

40. 权利要求 1-15 中任一项限定的组合物或化合物在制备用于预防或治疗权利要求 1-15 中任一项所述的任一种疾病或病症的药物中的用途。

41. 一种用于治疗或预防权利要求 1-15 中任一项所述的任一种疾病或病症的方法，该方法包括给予患者(例如有需要的患者)权利要求 1-15 中任一项限定的组合物或化合物的化合物(例如治疗有效量)。

42. 一种减轻或降低权利要求 1-15 中任一项所述的任一种疾病或病症的发病率的方法，该方法包括给予患者(例如有需要的患者)权利要求 1-15 中任一项限定的组合物或化合物的化合物(例如治疗有效量)。

43. 一种用于诊断和治疗由蛋白激酶 B 介导的疾病或病症的方法，该方法包括(i)筛选患者以确定患者所患或可能患上的疾病或病症是否是对用具有针对蛋白激酶 B 活性的化合物治疗敏感的疾病或病症；和(ii)如果表明患者所患疾病或病症对此敏感，则随后给予患者权利要求 1-15 中任一项限定的组合物或化合物。

44. 权利要求 1-15 中任一项限定的组合物或化合物在制备用于治疗或预防患者的疾病或病症的药物中的用途，所述患者已经过筛选并确定为患有有可能对用具有针对蛋白激酶 B 活性的化合物治疗敏感的疾病或病症或者有患该疾病或病症的风险。

45. 用于治疗或预防患者的疾病或病症的权利要求 1-15 中任一项限定的组合物或化合物，所述患者已经过筛选并确定为患有有可能对用具有针对蛋白激酶 B 活性的化合物治疗敏感的疾病或病症或者有患该疾病或病症的风险。

46. 一种诊断和治疗由蛋白激酶 A 介导的疾病或病症的方法，该方法包括(i)筛选患者以确定患者所患或可能患上的疾病或病症是否有可能对用具有针对蛋白激酶 A 活性的化合物治疗敏感的疾病或病症；和(ii)如果表明患者所患疾病或病症对此敏感，则随后给予患者权利要求 1-15 中任一项限定的组合物或化合物。

47. 用于治疗或预防患者的疾病或病症的权利要求 1-15 中任一项限定的组合物或化合物，所述患者已经过筛选并确定为患有有可能对用具有针对蛋白激酶 A 活性的化合物治疗敏感的疾病或病症或者有

患该疾病或病症的风险。

48. 权利要求 1-15 中任一项限定的组合物或化合物在制备用于治疗或预防患者的疾病或病症的药物中的用途, 该患者已经过筛选并确定为患有可能对用具有针对蛋白激酶 A 活性的化合物治疗敏感的疾病或病症或者有患该疾病或病症的风险。

49. 用作蛋白激酶 B 和/或蛋白激酶 A 调节剂(例如抑制剂)的权利要求 1-15 中任一项限定的组合物或化合物。

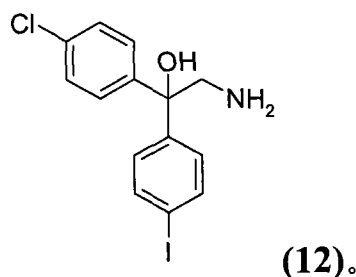
50. 权利要求 1-15 中任一项限定的组合物或化合物在制备用于调节(例如抑制)蛋白激酶 B 和/或蛋白激酶 A 的药物中的用途。

51. 一种调节(例如抑制)蛋白激酶 B 和/或蛋白激酶 A 的方法; 该方法包括使蛋白激酶 B 和/或蛋白激酶 A (例如在细胞环境中 - 例如在体内)与权利要求 1-15 中任一项限定的组合物或化合物接触。

52. 一种用于制备权利要求 1-15 中任一项限定的组合物或化合物的方法, 该方法包括部分或完全拆分 2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇的(S)和(R)对映异构体的混合物。

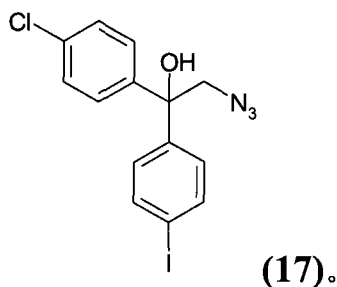
53. 权利要求 52 的方法, 其中(S)和(R)对映异构体采用手性色谱法拆分。

54. 一种下式(12)化合物或其酸加成盐:



55. 权利要求 54 的酸加成盐, 所述酸加成盐是 4-甲苯磺酸盐。

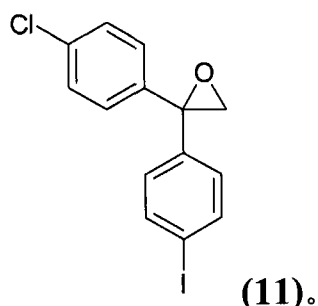
56. 一种下式(17)化合物:



57. 一种制备权利要求 54 中限定的式(12)化合物的方法, 该方法包括使权利要求 56 限定的式(17)化合物与叔磷例如三苯基磷在极性非质子溶剂中反应后用含水酸溶液处理。

58. 权利要求 57 的方法, 其中所述含水酸溶液包括选自甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、甲苯磺酸和樟脑磺酸的烷基磺酸或芳基磺酸, 最优选为 4-甲苯磺酸。

59. 一种制备权利要求 56 中限定的式(17)化合物的方法; 该方法包括在极性溶剂中, 优选在加热时, 使下式(11)的环氧化物与选自碱金属叠氮化物和三甲基·叠氮基甲硅烷的叠氮化物反应:



60. 权利要求 59 的方法, 其中叠氮化物是碱金属叠氮化物。

61. 权利要求 60 的方法, 其中所述碱金属叠氮化物是叠氮化钠。

62. 一种用于制备权利要求 54 中限定的式(12)化合物的方法; 该方法包括权利要求 59-61 中任一项的方法及其后的权利要求 57 或权利要求 58 的方法。



## 包含(S)-2-氨基-1-(4-氯苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇作为蛋白激酶调节剂的组合物

本发明涉及抑制或调节蛋白激酶 B (PKB)、蛋白激酶 A (PKA)、ROCK 激酶或 p70S6K 激酶活性的含有吡唑的芳基-烷基胺化合物、所述化合物在治疗或预防由所述激酶介导的疾病或病症中的用途以及含有所述化合物的药物组合物。更具体地讲,本发明涉及 2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇的单一对映异构体、含有该对映异构体的药物组合物及其治疗用途及其制备方法和新的加工中间体。

### 发明背景

蛋白激酶构成在结构上相关的酶的大家族,这些酶在细胞内负责控制多个信号转导过程(Hardie, G.和 Hanks, S. (1995) *The Protein Kinase Facts Book. I and II*, Academic Press, San Diego, CA)。可将这些激酶按它们使之磷酸化的底物的类型归类到各个家族(例如蛋白-酪氨酸、蛋白-丝氨酸/苏氨酸、脂类等)。已经鉴定出通常与这些激酶家族的每一个相对应的序列模体(例如 Hanks, S. K., Hunter, T., *FASEB J.*, 9: 576-596 (1995); Knighton 等, *Science*, 253: 407-414 (1991); Hiles 等, *Cell*, 70: 419-429 (1992); Kunz 等, *Cell*, 73: 585-596 (1993); Garcia-Bustos 等, *EMBO J.*, 13: 2352-2361 (1994))。

蛋白激酶可由它们的调节机理表征。这些机理包括例如自身磷酸化、其它激酶导致的转磷酸化作用、蛋白-蛋白相互作用、蛋白-脂质相互作用和蛋白-多核苷酸相互作用。单个蛋白激酶可受到一种以上机制的调节。

激酶通过将磷酸基团加到靶蛋白上而调节许多不同的细胞过程,

包括但不限于增殖、分化、细胞凋亡、活动、转录、翻译和其它信号转导过程。这些磷酸化事件起分子开/关的作用，可调理或调节靶蛋白的生物功能。靶蛋白的磷酸化响应多种细胞外信号(激素、神经递质、生长和分化因子等)、细胞周期事件、环境或营养应激等而发生。合适的蛋白激酶在信号转导途径中的作用是激活或钝化(直接或间接)例如代谢酶、调节蛋白、受体、细胞骨架蛋白、离子通道或离子泵或转录因子。由于蛋白磷酸化缺乏控制所致的信号转导不受控制涉及多种疾病，包括如炎症、癌症、变态反应/哮喘、免疫系统疾病和病症、中枢神经系统疾病和病症以及血管生成。

细胞凋亡或程序性细胞死亡是重要的生理过程，它除去生物不再需要的细胞。该过程在胚胎生长发育初期十分重要，使得细胞组分能够进行受控制的非坏死性分解、清除和回收。在维持生长细胞群体染色体和基因组完整性方面，通过凋亡清除细胞也非常重要。在细胞生长周期中，存在若干已知的关卡，DNA 损伤和基因组完整性在此受到严密监控。对在这类关卡检出的异常的反应是抑制这些细胞的生长并开始修复过程。如果损伤或异常不能得到修复，则由损伤细胞引起细胞凋亡，从而避免缺陷和错误延续。癌细胞在其染色体 DNA 中总是包含许多突变、错误或重排。普遍认为这种情况部分是由于大多数肿瘤在负责引发细胞凋亡过程的一个或多个过程中存在缺陷所引起的。正常控制机制不能杀死癌细胞，并且编码错误的染色体或 DNA 继续复制。因此，恢复这些促凋亡信号或者抑制不受调节的存活信号是治疗癌症的颇具吸引力的方法。

## **PKB**

长期以来已经清楚了解到，包含酶即磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)、PDK1 和 PKB 等的信号转导途径，在许多细胞中介导提高的抗细胞凋亡抗性或存活反应。有大量数据表明，该途径是许多生长因子用来抑制细胞凋亡的重要存活途径。PI3K 家族的酶由各种生长和存活因子(例如 EGF、PDGF)激活，并通过产生聚磷脂酰肌醇引起下游信号转导

事件被激活，包括激酶 PDK1 和蛋白激酶 B (PKB) (亦称 Akt) 的活化。这在宿主组织中也是成立的，例如在血管内皮细胞以及肿瘤形成中。PKB 是由激酶结构域与 N 端 PH 结构域和 C 端调节域一起构成的蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶。酶 PKB<sub>α</sub> (akt1) 本身在 Thr 308 被 PDK1 磷酸化，在 Ser 473 被 'PDK2' 磷酸化，目前一般认为 PDK2 由雷帕霉素 (rapamycin) 靶 (TOR) 激酶及其相关蛋白 rictor 组成。完全激活作用需要同时在两个位点进行磷酸化，同时 PIP3 与 PH 结构域之间需要缔合以将酶锚定在脂质膜胞质面上使酶以最优的方式接近底物。

研究表明至少 10 种激酶起 Ser 473 激酶的作用，其中包括促分裂原活化蛋白激酶 (MAP) 激酶活化蛋白激酶-2 (MK2)、整联蛋白关联性激酶 (ILK)、p38 MAP 激酶、蛋白激酶 C $\alpha$  (PKC $\alpha$ )、PKC $\beta$ 、NIMA 相关激酶-6 (NEK6)、哺乳动物雷帕霉素靶 (mTOR)、依赖双链 DNA 的蛋白激酶 (DNK-PK) 和共济失调-毛细血管扩张突变 (ATM) 基因产物。可获得的数据表明，细胞中可以使用多个系统调节 PKB 的活化。PKB 的完全活化需要同时在两个位点进行磷酸化，同时 PIP3 与 PH 结构域之间需要缔合以将酶锚定在脂质膜胞质面上使酶以最优的方式接近底物。最近已有研究报道了 PH 结构域突变。作者通过结构、生物化学和生物学研究，提供了 AKT1 参与人类癌症的直接证据，并证实了 Akt1 的 E17K 突变的致癌潜力。在以下癌症中鉴定出该突变：61 例乳腺癌中 5 例 (8%)、51 例结肠直肠癌中 3 例 (6%) 和 50 例卵巢癌 (2%) 中 1 例 (*Nature* **448**, 439-444 (2007 年 7 月 26 日) | doi:10.1038/nature05933; 2007 年 3 月 8 日收稿; 2007 年 5 月 11 日采纳; 2007 年 7 月 4 日在线发表, A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer (癌症中 AKT1 血小板白细胞 C 激酶底物同系结构域的转化突变))。

最近，有研究报道 PI3K 催化亚基即 PIK3CA 内的体细胞突变在结肠直肠癌、胃癌、乳腺癌、卵巢癌和高级别脑肿瘤中常见 (25-40%)。PIK3CA 突变是普通事件，可能发生在膀胱癌发生早期。在侵袭性乳

腺癌中，PIK3CA 变异主要存在于小叶癌和腺管癌中。在子宫内膜癌中 PI3K 途径被广泛激活，PIK3CA/PTEN 变异的组合可在这些肿瘤的发生中起重要作用。被 PI3 激酶突变和 PTEN 丧失激活的肿瘤可维持 PKB 的活化作用，因此可能对 PKA/PKB 抑制剂抑制作用的敏感性不成比例。

活化 PKB 进而使促成整体存活反应的一系列底物磷酸化。虽然我们无法确定我们了解所有负责介导 PKB 依赖性存活反应的因子，但是我们认为一些重要作用是促凋亡因子 BAD 和胱天蛋白酶 9 的磷酸化和钝化、导致其从细胞核中排除的 FKHR 等分叉头转录因子 (Forkhead transcription factor) 的磷酸化以及通过级联中的上游激酶磷酸化使 NfκB 途径活化。

除 PKB 途径的抗凋亡和促存活作用以外，该酶还在促进细胞增殖中发挥重要作用。这种作用可能再次是通过若干作用介导的，一般认为其中一些是 p21<sup>Cip1/WAF1</sup> 的细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂的磷酸化和钝化以及 mTOR 的磷酸化和活化，该 mTOR 是一种控制细胞大小、生长和蛋白质翻译若干方面的的激酶。

使磷脂酰肌醇去磷酸化和钝化的磷酸酶 PTEN 是关键的肿瘤抑制蛋白，它通常起调节 PI3K/PKB 存活途径的作用。可以从 PTEN 是人类肿瘤突变最普遍的靶标之一的观察结果判断 PI3K/PKB 途径在肿瘤发生中的重要性，已在~50%或以上的黑素瘤(Guldberg 等, 1997, Cancer Research 57, 3660-3663)以及在晚期前列腺癌(Cairns 等, 1997 Cancer Research 57, 4997)中发现了这种磷酸酶的突变。这些观察结果和其它观察结果表明许多肿瘤类型依赖于适于生长和存活的 PKB 活性的提高，并可对合适的 PKB 抑制剂作出治疗性反应。

有 3 种密切相关的 PKB 同等型，称为 α、β 和 γ (AKT1、AKT2 和 AKT3)，遗传学研究表明它们具有截然不同但重叠的功能。有证据表明它们所有都可以独立地在癌症中起作用。例如发现在 10-40%卵巢癌和胰腺癌中 PKB β 过量表达或被激活(Bellacosa 等, 1995, Int. J.

Cancer 64, 280-285; Cheng 等, 1996, PNAS 93, 3636-3641; Yuan 等, 2000, Oncogene 19, 2324-2330); 在人类胃癌、前列腺和乳腺癌中, PKB  $\alpha$  扩增(Staal 1987, PNAS 84, 5034-5037; Sun 等, 2001, Am. J. Pathol. 159, 431-437); 以及在类固醇不依赖性乳腺和前列腺细胞系中观察到 PKB  $\gamma$  活性增加(Nakatani 等, 1999, J. Biol. Chem. 274, 21528-21532)。

PKB 途径还在正常组织的生长和存活中起作用, 并可在控制细胞和组织功能的正常生理过程中受到调节。因此, 与正常细胞和组织不良增殖和存活有关的障碍可从用 PKB 抑制剂的治疗中获得治疗益处。这类障碍的实例是与导致免疫应答延长或上调的细胞群增殖和存活延长有关的免疫细胞障碍。例如, 在免疫应答期间响应关联抗原或生长因子(例如干扰素  $\gamma$ ) 的 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞应答激活 PI3K/PKB 途径, 并负责维持抗原特异性淋巴细胞克隆的存活。在其中淋巴细胞和其它免疫细胞响应不当的自身抗原或外源抗原的条件下, 或者在其中其它异常情况导致活化作用延长的情况下, PKB 途径促使重要存活信号阻止通过活化细胞群的细胞凋亡使免疫应答终止的正常机制。有相当多的证据表明, 在自身免疫病(例如多发性硬化和关节炎)中响应自身抗原的淋巴细胞群增殖。不当响应外源抗原的淋巴细胞群的增殖是另一类疾病(例如变态反应和哮喘)的特征。总的来说, 抑制 PKB 可为免疫障碍提供有益的治疗。

其中 PKB 可起作用的正常细胞的不当扩展、生长、增殖、增生和存活的其它实例包括但不限于动脉粥样硬化、心肌病和肾小球性肾炎。

除了在细胞生长和存活中的作用外, PKB 途径在通过胰岛素控制葡萄糖代谢中起作用。可从 PKB 同等型 PKB $\alpha$  和 PKB $\beta$  缺陷型小鼠中获取的证据表明, 该作用主要由  $\beta$  同等型介导。因此, PKB 活性的调节剂还可用于其中存在葡萄糖代谢和能量贮存功能障碍的疾病中, 例如糖尿病、代谢疾病和肥胖症。

## PKA

依赖 cAMP 的蛋白激酶(PKA)是使许多底物磷酸化的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,参与调节许多细胞过程,包括细胞生长、细胞分化、离子通道传导性、基因转录和神经递质的突触释放。在其钝化形式中,PKA 全酶是包含两个调节亚基和两个催化亚基的四聚体。

PKA 在介导信号转导事件的 G 蛋白与它们调节的细胞过程之间起连接作用。激素配体(例如胰高血糖素)与跨膜受体的结合激活 G 蛋白偶联受体(GTP 结合与水解蛋白)。G 蛋白的  $\alpha$  亚基被激活时解离,结合并激活腺苷酸环化酶,腺苷酸环化酶进而将 ATP 转化成环状 AMP (cAMP)。如此产生的 cAMP 然后与 PKA 的调节亚基结合,导致缔合的催化亚基解离。当与调节亚基缔合时是无活性的 PKA 的催化亚基在解离时变得具有活性,并参与其它调节蛋白的磷酸化作用。

例如,PKA 的催化亚基使激酶即磷酸化酶激酶磷酸化,该激酶参与磷酸化酶的磷酸化,而磷酸化酶负责分解糖原释放出葡萄糖。PKA 还通过使糖原合酶磷酸化并失活来参与调节葡萄糖水平。因此,PKA 活性调节剂(该调节剂可提高或降低 PKA 活性)可用于治疗或控制其中存在葡萄糖代谢和能量贮存功能障碍的疾病,例如糖尿病、代谢疾病和肥胖症。

研究还证实 PKA 是 T 细胞活化灵敏的抑制剂。Anndahl 等人在得自感染 HIV 患者的 T 细胞使 cAMP 水平增加且对受 cAMP 类似物抑制比正常 T 细胞的更敏感的基础上,研究了 PKA I 型在 HIV 诱导的 T 细胞功能障碍中的可能作用。他们从研究中得出结论,PKA I 型活化作用增加可能是 HIV 感染中进行性 T 细胞功能障碍的原因之一,因此 PKA I 型可能是免疫调节疗法的潜在靶标(Aandahl, E. M., Aukrust, P., Skålhegg, B. S., Müller, F., Frøland, S. S., Hansson, V., Taskén, K. *Protein kinase A type I antagonist restores immune responses of T cells from HIV-infected patients* (蛋白激酶 A I 型拮抗剂使受 HIV 感染患者的 T 细胞恢复免疫应答)。FASEB J. 12, 855-862 (1998))。

现还清楚认识到 PKA 调节亚基的突变可导致内分泌组织过度活化。

因为 PKA 作为信使在细胞调节中的多样性和重要性,所以 cAMP 的异常反应可能导致由此(例如细胞生长和增殖异常)而引起的各种人类疾病(Stratakis, C.A.; Cho-Chung, Y.S.; Protein Kinase A and human diseases (蛋白激酶 A 与人类疾病)。 *Trends Endrocri. Metab.* 2002, 13, 50-52)。在多种人类癌细胞中,包括在得自卵巢癌、乳腺癌和结肠癌患者的细胞中观察到 PKA 过量表达。因此抑制 PKA 可成为治疗癌症的方法(Li, Q.; Zhu, G-D.; *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2002, 2, 939-971)。

有关人类疾病中 PKA 作用的综述可参见例如 *Protein Kinase A and Human Disease*, Constantine A. Stratakis 编著, Annals of the New York Academy of Sciences, 第 968 卷, 2002, ISBN 1-57331-412-9。

## **ROCK 激酶**

ROCK 激酶家族包括两个已知成员: ROCK1 和 ROCK2:

**ROCK1.** 同义词: Rho 相关蛋白激酶 1、p160 ROCK、P160 ROK、p160 ROCK-1、含有蛋白激酶 1 的 Rho 相关卷曲螺旋、Rho 激酶 1、ROK  $\beta$ 。

**ROCK2.** 同义词: Rho 相关蛋白激酶 2、p164 ROCK、p164 ROK、p164 ROCK-2、含有蛋白激酶 2 的 Rho 相关卷曲螺旋、Rho 激酶 2、ROK  $\alpha$ 。

转移过程包括细胞骨架以及细胞之间和细胞-基质之间粘附的重构,使细胞能够从肿瘤块上脱离,侵入局部组织并最终在躯体内扩散。对细胞形态和粘附的这些作用由 Rho GTP 酶家族成员调节。

RhoA 被激活后能够与若干效应蛋白相互作用,效应蛋白包括 ROCK 激酶 ROCK1 和 ROCK2。可由 RhoA-GTP 复合物通过物理缔合激活 ROCK1 和 ROCK2。ROCK 被激活后使多种底物磷酸化,并在关

键的细胞功能中起着重要作用。ROCK 的底物包括肌球蛋白轻链磷酸酶的肌球蛋白结合亚基(MBS, 亦称 MYPT1)、内收蛋白、膜突蛋白、肌球蛋白轻链(MLC)、LIM 激酶和转录因子 FHL。这些底物的磷酸化调节所述蛋白质的生物活性, 并为改变细胞对外部刺激的反应提供了手段。

在人类癌症中, 包括在睾丸生殖细胞肿瘤、具有转移能力的小乳腺癌、膀胱癌的侵袭和转移、卵巢癌的肿瘤进程中, 普遍观察到 RhoA 和 RhoC 以及 Rho 效应蛋白 ROCK1 和 ROCK2 的表达升高。

肿瘤转向侵袭和转移形式的进程要求肿瘤细胞经历明显的形态变化, 这是受 Rho GTP 酶调节的过程。肌动球蛋白收缩性是细胞向它们的环境施加运动力的机制。小 GTP 酶 Rho 的信号转导下游通过 ROCK 介导的对肌球蛋白-II 轻链(MLC2)磷酸化的调节, 来增加收缩性。

一般认为 ROCK 激酶参与诱导黏着斑和应力纤维, 通过提高肌球蛋白调节轻链的磷酸化来介导平滑肌收缩的钙敏感性。

体内研究还表明, ROCK 抑制降低了数个肿瘤细胞系的侵袭。ROCK 抑制剂, 例如 Y-27632 或 WF-536, 曾被用于证实这些性质的一些研究中。

研究指出 ROCK 抑制剂用于治疗多种疾病。这些疾病包括心血管疾病例如高血压、慢性和充血性心力衰竭、心脏肥大、再狭窄、慢性肾衰竭和动脉粥样硬化。同样, 由于其肌肉松弛性质, 抑制剂还可适用于哮喘、男性勃起功能障碍、女性性功能障碍和膀胱过度活动综合征。

研究表明, ROCK 抑制剂具有抗炎性质。因此, 它们可用作治疗神经炎症性疾病例如中风、多发性硬化、阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)、帕金森病(Parkinson's disease)、肌萎缩性侧索硬化和炎症性疼痛以及其它炎症性疾病, 例如类风湿性关节炎、过敏性肠综合征和炎性肠病。根据其神经突长出诱导作用, ROCK 抑制剂可能是神经元



再生的有益药物，能诱导新的轴突生长和穿过 CNS 内病变的轴突再接。因此，ROCK 抑制剂很可能用于 CNS 疾病的再生治疗，所述 CNS 疾病例如脊髓损伤、急性神经元损伤(中风、创伤性脑损伤)、帕金森病、阿尔茨海默病和其它神经变性疾病。因为 ROCK 抑制剂降低细胞增殖和细胞迁移，因此它们可用于治疗癌症和肿瘤转移。最后，有证据表明，在病毒侵袭时，ROCK 抑制剂抑制细胞骨架重排，因此，它们在抗病毒和抗菌应用中也具有潜在的治疗价值。ROCK 抑制剂还用于治疗胰岛素抵抗和糖尿病。

### **ROCK 抑制剂 Y-27632**

肿瘤细胞粘附到宿主细胞层及随后的跨细胞迁移是癌侵袭和转移的关键步骤。小 GTP 酶 Rho 通过重构肌动蛋白细胞骨架和调节肌球蛋白收缩性来控制细胞粘附和运动。培养的大鼠 MM1 肝细胞瘤细胞以血清依赖性 Rho 介导的方式，通过体外间皮单层细胞迁移。一般认为在若干作为 Rho 的推定靶分子而分离的蛋白质中，ROCK 激酶在培养细胞中参与诱导黏着斑和应力纤维，并通过提高肌球蛋白调节轻链的磷酸化介导平滑肌收缩的钙敏感性。用编码 ROCK 的显性活性突变体的 cDNA 转染 MM1 细胞，赋予了不依赖于血清和 Rho 的侵袭活性。相比之下，显性阴性、激酶缺陷的 ROCK 突变型的表达基本上削弱了侵袭表型。

一种特异性 ROCK 抑制剂(Y-27632)阻断了 Rho 介导的肌球蛋白活化和这些细胞的侵袭活性。此外，用渗透泵连续递送这一抑制剂明显降低植入同系大鼠腹膜腔内的 MM1 细胞的扩散。这些结果表明 ROCK 在肿瘤细胞侵袭中起着必不可少的作用，并且证实其作为预防癌侵袭和转移的治疗靶的可能性。

VEGF 诱导 RhoA 的活化，并将 RhoA 募集到人 EC 的细胞膜上。这种 RhoA 活性的提高是 VEGF 诱导的 F-肌动蛋白细胞骨架重构所必需的，正如腺病毒转染的显性阴性 RhoA 所证实的一样。Rho 激酶介

导的这种 RhoA 效应,通过使用 Rho 激酶特异性抑制剂 Y-27632 而得到证实。抑制 Rho 激酶防止了在响应机械创伤时 VEGF 提高的 EC 迁移(VEGF-enhanced EC migration),但是对基础 EC 迁移没有作用。此外,在血管生成的体外模型中,抑制 RhoA 或 Rho 激酶的任一个均削弱 VEGF 介导的 EC 在三维血纤蛋白基质中的向内生长。结论: VEGF 诱导的细胞骨架在 EC 中的变化需要 RhoA 和 Rho 激酶, RhoA/Rho 激酶信号转导的活化参与了体外 VEGF 诱导的 EC 迁移和血管生成。

Y-27632 可使平滑肌松弛并增加血管的血流量。Y-27632 是可以进入细胞的小分子,在大鼠中口服给予 30mg/kg 达 10 天后无毒性。使用这一化合物的有效剂量大约为 30 $\mu$ M。它降低高血压大鼠的血压,但不影响正常大鼠的血压。这就使得可鉴定出治疗高血压的 Rho 信号转导拮抗剂(Somlyo, 1997 Nature 389:908; Uehata 等, 1997 Nature 389:990)。

使用 ROCK 特异性抑制剂 Y-27632 (Uehata 等, Nature, 389, 990-994, 1997; Davies 等, Biochemical Journal., 351, 95-105, 2000 和 Ishizaki 等, Molecular Pharmacology., 57, 976-983, 2000),证实了该酶在不依赖  $Ca^{2+}$  的多个组织收缩调节中的作用,这些组织包括血管平滑肌(Uehata 等, Nature., 389, 990-994, 1997)、气道平滑肌(Ilikuka 等, European Journal of Pharmacology., 406, 273-279, 2000)和生殖器平滑肌(Chitale 等, Nature Medicine., 7(1), 119-122, 2001)。另外, Jezior 等人 (Jezior 等, British Journal of Pharmacology., 134, 78-87, 2001)证实, Y-27632 在分离的兔泌尿 35 膀胱平滑肌中削弱氯贝胆碱(bethanechol)引起的收缩。

已对 Rho 激酶抑制剂 Y-27632 在下列疾病中的应用进行了测试:

- 高血压 (Uehata 等, 1997 IBID; Chitale 等, 2001a IBID; Chrissobolis 和 Sobey, 2001 C. Circ. Res 88:774)
- 哮喘 (Iizuka 等, 2000 Eur. J. Pharmacol 406:273; Nakahara 等, Eur. J. Pharmacol 389:103, 2000)

- 肺血管收缩(Takamura 等, 2001 Hepatology 33:577)
- 血管疾病(Miyata 等, 2000 Thromb Vasc Biol 20:2351; Robertson 等, 2000 Br. J. Pharmacol 131:5)
- 阴茎勃起功能障碍(Chitale 等, 2001b Nature Medicine 7:119; Mills 等, 2001 J. Appl. Physiol. 91: 1269; Rees 等, Br. J. Pharmacol 133:455 2001)
- 青光眼(Honjo 等, 2001 Methods Enzymol 42:137; Rao 等, 2001 Invest. Ophthalmol. Urs. Sci. 42:1029)
- 细胞转化(Sahai 等, 1999 Curr. Biol. 9:136-5)
- 前列腺癌转移(Somlyo 等, 2000 BBRC 269:652)
- 肝细胞癌和转移(Imamura 等, 2000; Takamura 等, 2001)
- 肝纤维变性(Tada 等, 2001 J. Hepatol 34:529; Wang 等, 2001 Am. J. Respir. Cell Mol Biol. 25:628)
- 肾纤维变性(Ohlci 等, J. Heart Lung Transplant 20:956 2001)
- 心脏保护和同种异体移植物存活(Ohlci 等, 2001 IBID)
- 脑血管痉挛(Sato 等, 2000 Circ. Res 87: 195)。

### ROCK 激酶和心血管疾病

越来越多的证据表明, 紧接小乌苷三磷酸结合蛋白 Rho 的下游靶 ROCK, 可能是心血管疾病的原因之一。ROCK 在不同的细胞功能(例如平滑肌收缩、应力纤维形成和细胞迁移和增殖)中起着重要作用。在脑缺血、冠状动脉痉挛、高血压、血管炎症、动脉硬化和动脉粥样硬化中观察到 ROCK 过度活化。因此, ROCK 可能十分重要, 而且还可能是心血管疾病中相对未广泛深入研究的治疗靶。采用 ROCK 抑制剂(例如 Y-27632 和法舒地尔(fasudil))的最新实验和临床研究表明, ROCK 在胚胎发育、炎症和肿瘤发生中的关键作用。该综述将集中在 ROCK 在细胞功能中的可能作用, 并论述了 ROCK 抑制剂作为新出现的心血管疾病疗法的前景。

平滑肌收缩性异常可能是高血压等疾病的主要原因, 调节这一过

程的平滑肌松弛剂可能是治疗上有利的。平滑肌收缩由胞质  $\text{Ca}^{2+}$  浓度和肌丝  $\text{Ca}^{2+}$  敏感性调节：前者激活肌球蛋白轻链激酶，后者通过抑制肌球蛋白磷酸酶而部分获得。

高血压是一种与包括再狭窄损伤和动脉粥样硬化在内的多种血管疾病相关的疾病，在高血压中，血管平滑肌细胞的 Rho 信号转导途径被高度激活。

高血压是以外周血管阻力和/或血管结构重建增加为特征的心血管疾病。最近，来自高血压动物模型的快速增多的证据表明，小 GTP 酶 Rho 及其下游效应物 Rho 激酶在高血压发病机制中起着重要作用。Rho/Rho 激酶途径的活化对于高血压的平滑肌收缩性是必不可少的。在高血压大鼠(例如遗传自发性高血压大鼠和 N( $\omega$ )-硝基-L-精氨酸甲酯诱导的高血压)主动脉中观察到 RhoA 表达增加，RhoA 活性升高。

### **ROCK 激酶和神经疾病**

在各种中枢神经系统疾病中观察到 Rho/ROCK 途径活化异常。成年脊椎动物脑和脊髓的损伤激活 ROCK，从而抑制神经突生长和萌发。在哺乳动物脊髓损伤之后，抑制 ROCK 导致再生加速，功能恢复加快，已经证实抑制 Rho/ROCK 途径在中风、炎症性疾病和脱髓鞘疾病、阿尔茨海默病及神经病性疼痛的动物模型中具有功效。因此，ROCK 抑制剂在各种神经疾病中具有预防神经变性和刺激神经再生的潜力。

神经元的发育需要一系列步骤，首先从其发生地迁移和突起长出的引发开始，最终导致能够使之与合适靶标沟通的连接点的形成和分化。在过去的几年里变得越来越清楚的是，GTP 酶 Rho 家族和相关分子在神经元发育的不同方面发挥重要作用，其中包括神经突长出和分化、轴突寻路(axon pathfinding)和树突棘形成和维持。

神经突长出抑制和神经突排斥两者的一个共同特性是生长锥内的肌动蛋白重排。神经元细胞和非神经元细胞两者中调节肌动蛋白细胞骨架的关键是小 GTP 酶的 Rho 家族。Rho 家族成员在无活性的 GDP

结合形式和有活性的 GTP 结合形式之间循环。若干证据表明，操控 Rho GTP 酶的活性状态可以调节生长锥瓦解和神经突长出抑制。

最近，在行为方面，Rho 途径的失活可引起运动的快速恢复和前肢-后肢协调的逐渐恢复。这些发现为 Rho 信号转导途径是脊髓损伤后治疗性干预的潜在靶标提供了证据。

### **p70S6K 激酶**

70kDa 核糖体蛋白激酶 p70S6K (亦称 SK6、p70/p85 S6 激酶、p70/p85 核糖体 S6 激酶和 pp70s6k)是蛋白激酶 AGC 亚家族的一个成员。p70S6K 是丝氨酸-苏氨酸激酶，是磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/AKT 途径的组分。p70S6K 是 PI3K 的下游，在响应多种促分裂原、激素和生长因子时在多个位点通过磷酸化作用而被激活。这一反应可在 mTOR 控制之下，因为雷帕霉素起抑制 p70S6K 活性的作用，并阻断蛋白质合成，尤其因此下调这些编码核糖体蛋白的 mRNA 的翻译。p70S6K 还受 PI3K 及其下游靶 AKT 的调节。渥曼青霉素(Wortmannin)和雷帕霉素引起在 PI3K 途径依赖性位点上 p70S6K 的磷酸化降低。突变型 p70S6K 受渥曼青霉素抑制，但却不受雷帕霉素抑制，这就表明 PI3K 途径可能对不依赖于 mTOR 活性调节的 p70S6K 具有作用。

酶 p70S6K 通过 S6 核糖体蛋白的磷酸化来调节蛋白质的合成。S6 磷酸化与翻译器(translational apparatus)组分编码 mRNA 翻译的增加有关，这些组分包括核糖体蛋白和翻译延伸因子，其表达的增加对细胞生长和增殖是必不可少的。这些 mRNA 在其 5'转录起始位点(称为 5'TOP)含有寡嘧啶束(oligopyrimidine tract)，已经证实这对于它们在翻译水平上的调节是必不可少的。

除了参与翻译以外，p70S6K 活化还涉及细胞周期控制、神经元细胞分化、调节在肿瘤转移中是十分重要的细胞运动和细胞反应、免疫应答和组织修复。抗 p70S6K 抗体完全破坏了促有丝分裂应答所驱动的大鼠成纤维细胞进入 S 期，这就表明了 p70S6K 功能在细胞周期

G1 期至 S 期的进程中是必不可少的。此外，已经鉴定出在细胞周期 G1 期至 S 期通过雷帕霉素抑制细胞周期增殖是抑制产生过度磷酸化的 p70S6K 激活形式的结果。

肿瘤抑制剂 LKB1 激活 AMPK，AMPK 在 mTOR/p70S6K 途径中使 TSC1/2 复合物磷酸化，因此通过不依赖 PKB 的途径提供 p70S6K。LKB1 的突变引发佩 - 吉综合征 (Peutz-Jeghers syndrome, PJS)，而 PJS 患者更可能发展出癌症，其可能性比普通人群高出 15 倍。另外，1/3 的肺腺癌带有失活 LKB1 突变。

p70S6K 在肿瘤细胞增殖和保护细胞免于凋亡中的作用得到支持，所根据的是其在肿瘤组织中参与生长因子受体信号转导、过量表达和活化。例如，RNA 印迹分析和蛋白质印迹分析表明，PS6K 基因的扩增分别伴有 mRNA 和蛋白质表达的相应增加 (Cancer Res. (1999) 59: 1408-11 - Localization of PS6K to Chromosomal Region 17q23 and Determination of Its Amplification in Breast Cancer (PS6K 在乳腺癌中定位于染色体区 17q23 及其扩增的测定))。

染色体 17q23 在以下肿瘤和癌症中扩增：高达 20% 的原发性乳腺肿瘤、87% 含有 BRCA2 突变的乳腺肿瘤和 50% 含有 BRCA1 突变的肿瘤以及其它癌症类型，例如胰腺癌、膀胱癌和成神经细胞瘤 (参见 M Barlund, O Monni, J Kononen, R Cornelison, J Torhorst, G Sauter, O-P Kallioniemi 和 Kallioniemi A, *Cancer Res.*, 2000, 60:5340-5346)。研究表明，17q23 在乳腺癌中的扩增包括 PAT1、RAD51C、PS6K 和 SIGMA1B 基因 (Cancer Res. (2000): 60, 第 5371-5375 页)。

p70S6K 基因已被鉴定为这些部位扩增和过量表达的靶标，并且观察到扩增和预后不良之间在统计上显著相关。

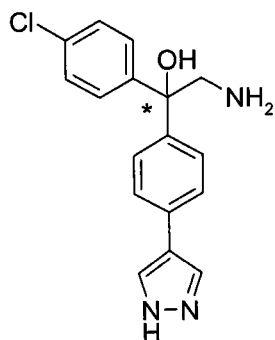
在用上游激酶 mTOR 的抑制剂 CCI-779 (雷帕霉素酯) 治疗的肾癌患者中，观察到 p70S6K 活化的临床抑制。据报道，疾病进程和 p70S6K 活性抑制之间有显著的线性相关性。

p70S6K 涉及代谢疾病和障碍。据报道，缺乏 p70S6 避免患年龄

和饮食诱发的肥胖症并同时提高胰岛素敏感性。根据这些发现，p70S6K 在肥胖症、糖尿病、代谢综合征、胰岛素抵抗、高血糖症、高氨基酸血症和高脂血症等代谢疾病和障碍中的作用得到支持。

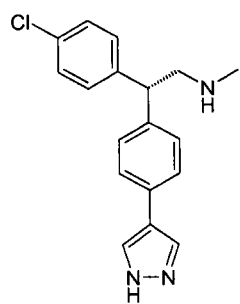
### 具有 PKB 和 PKA 抑制活性的吡唑化合物

已经公开了具有 PKA 和 PKB 抑制活性的若干类化合物。例如，WO 2005/061463 (Astex) 公开了具有 PKB 和 PKA 抑制活性的吡唑化合物，所列举的一种具体化合物是 2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇。其结构如下的这种化合物在标有星号的碳原子上具有手性中心。

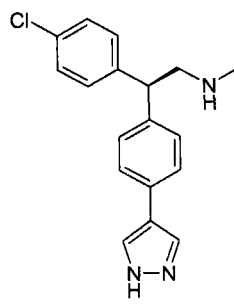


在 WO 2005/061463 实施例 84 中所述的该化合物是两种可能的对映异构体的外消旋混合物。按照实施例 106 和实施例 107，实施例 84 的这种化合物在体外 PKA 和 PKB 实验中的  $IC_{50}$  值在各实例中分别小于 1 微摩尔浓度( $\mu\text{mol}$ )。

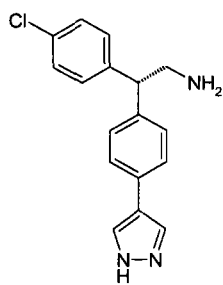
WO 2005/061463 还公开和例举了多个单一对映异构体如下：



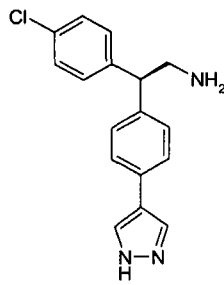
WO 2005/061463-实施例 22



WO 2005/061463-实施例 23



异构体 C



异构体 D

WO 2005/061463-实施例 30

WO 2005/061463-实施例 31

异构体 A 和 B 构成一对对映异构体，异构体 C 和 D 构成另一对对映异构体。

由本发明申请人进行的试验证实，在结合实验中，异构体 A 针对 PKB 的活性比其对映异构体 B 的大 10 倍。同样在结合实验中，异构体 C 比其对映异构体 D 的大约 10 倍。然而，在机械性细胞 ELISA 实验中(mechanistic cellular ELISA assay)中，异构体 C 和异构体 D 基本上是等效的。

### 发明概述

根据上述异构体 A、B、C 和 D 的活性，可预期 WO 2005/061463 中实施例 84 化合物的单一对映异构体在活性方面也可能具有相对小的差异。

然而，非常料想不到的是发现 2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇的 *S*-对映异构体针对 PKB 的活性(用放射性结合实验测定)比相应的 *R*-对映异构体大 100 倍。此外，虽然上述异构体 C 和异构体 D 在机械性细胞实验中是基本等效的，但是 2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇的 *S*-对映异构体在本实验中具有良好的活性，*R*-对映异构体却无可测量的活性。当对已知的上述单一对映异构体 A、B、C 和 D 的性质进行比较时，2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇的 *S*-对映异构体与 *R*-对映异构体之间活性的差异是非常料想不到的，而且也未曾预测过。

由上述情况得出 2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-



乙醇的 *S*-对映异构体显著优于其对映体即 *R*-异构体。

因此，在第一个方面，本发明提供包含(*S*) 2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1*H*-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇的组合物，其中该组合物基本不含(*R*) 2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1*H*-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇，或者该组合物含有(*S*)和(*R*)对映异构体的混合物，其中(*S*)对映异构体占优势。

本发明还提供包含 2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1*H*-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇或其盐、溶剂化物、互变异构体或 *N*-氧化物的组合物，其中至少 75%为 *S*-对映异构体的形式。

本文所用术语“组合物”是指物质的组合物，包括仅由 2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1*H*-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇组成的组合物以及含有额外组分的组合物。按照本发明，组合物中存在的所有 2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1*H*-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇的至少 75%必须是 *S*-对映异构体的形式。出于方便可将该组合物称为“本发明的组合物”或“本文定义的组合物”或“(该)组合物”。

在给定组合物中存在的(*S*)-2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1*H*-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇的量相对于该组合物中存在的 2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1*H*-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇两种对映异构体形式的总量可表示为“对映异构体纯度(enantiomeric purity)”。例如，如果存在于组合物中总的 2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1*H*-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇的 75%以 *S*-对映异构体的形式存在，则对映异构体纯度为 75%。

(*S*)-2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1*H*-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇的对映异构体纯度优选为至少 80%，更优选至少 85%，或至少 90%，或至少 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 99.5%。

在一个优选的实施方案中，98%以上的 2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1*H*-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇为 *S*-对映异构体的形式。

在另一个实施方案中，至少 99.9%的 2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1*H*-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇为 *S*-对映异构体的形式。

优选基本上无(*R*)-2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1*H*-吡唑-4-基)-苯

基]-乙醇存在于组合物中。本申请所使用的术语“基本上无(*R*)-2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1*H*-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇存在于组合物中”是指采用本文所述分析方法无法检测到 *R*-对映异构体。

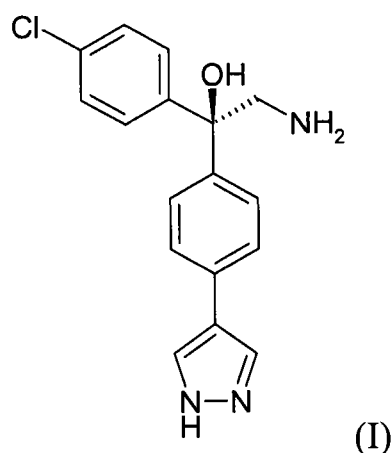
在一个实施方案中，组合物是含有 (*S*)-2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1*H*-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇或其盐、溶剂化物、互变异构体或 *N*-氧化物及药学上可接受的载体的药物组合物。

在另一个实施方案中，组合物由 (*S*)-2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1*H*-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇或其盐、溶剂化物、互变异构体或 *N*-氧化物以基本纯的形式组成，即含有的杂质小于 0.5%，更优选小于 0.1%，最优选小于 0.01%。

在一个优选的实施方案中，没有一种杂质存在于组合物中的量相当于 0.2% (重量) 以上，优选不超过 0.1% (重量)。

在另一个实施方案中，其中杂质的性质是已知的，优选杂质存在于组合物中的量不大于 0.5%，或不大于 0.4%，或不大于 0.3%，或不大于 0.2%，或不大于 0.1%，或不大于 0.05%，或不大于 0.01%。

(*S*)-2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1*H*-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇由下式(I)表示，本文亦可称为“式(I)化合物”或“*S*-对映异构体”。



出于方便，本文亦可将 (*R*)-2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1*H*-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇称为“*R*-对映异构体”。

本文所用术语“*R*”和“*S*”是指由 Cahn、Ingold 和 Prelog 开发的“*R*和 *S*”命名法，参见 Jerry March, *Advanced Organic Chemistry*, 第 4 版，

John Wiley & Sons, New York, 1992, 第 109-114 页; 也可参见 Cahn, Ingold 和 Prelog, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1966, 5, 385-415.

可以通过部分或完全拆分 2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇的(S)和(R)对映异构体的混合物, 来制备本发明的组合物, 例如采用下述的手性色谱法。

(S)-2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇(即式(I)化合物)具有蛋白激酶 B (PKB)和/或蛋白激酶 A (PKA)抑制或调节活性, 因此可用于预防或治疗由 PKB 和/或 PKA 介导的疾病或病症。

另一方面, 本发明提供基本纯形式的式(I)化合物即(S)-2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物, 基本纯的形式也就是说含有的杂质小于 0.5%, 更优选小于 0.1%, 最优选小于 0.01%。

在一个实施方案中, 化合物不是 N-氧化物, 而选自游离碱或其盐、溶剂化物或互变异构体。

在另一个实施方案中, 式(I)化合物或其互变异构体为游离碱的形式。

在进一步的实施方案中, 式(I)化合物或其互变异构体为盐的形式。按照本发明制备的一种具体的盐是与盐酸形成的盐。

在更多方面, 本发明提供:

- 本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物, 用于预防或治疗由蛋白激酶 B 介导的疾病或病症。

- 本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物在制备用于预防或治疗由蛋白激酶 B 介导的疾病或病症的药物中的用途。

- 一种预防或治疗由蛋白激酶 B 介导的疾病或病症的方法, 该方法包括给予有需要的受治疗者本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物。

- 本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构

体或 N-氧化物, 用于治疗哺乳动物的包括细胞生长异常或细胞死亡异常停滞或者由细胞生长异常或细胞死亡异常停滞引起的疾病或病症。

- 本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物在制备用于治疗哺乳动物的包括细胞生长异常或细胞死亡异常停滞或者由细胞生长异常或细胞死亡异常停滞引起的疾病或病症的药物中的用途。

- 一种用于治疗哺乳动物的包括细胞生长异常或者由细胞生长异常引起的疾病或病症的方法, 该方法包括以有效抑制细胞异常生长或细胞死亡异常停滞的量给予哺乳动物本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物。

- 一种用于减轻或降低哺乳动物的包括细胞生长异常或细胞死亡异常停滞或者由细胞生长异常或细胞死亡异常停滞引起的疾病或病症的发病率的方法, 该方法包括以有效抑制细胞异常生长的量给予哺乳动物本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物。

- 一种用于治疗哺乳动物的包括细胞生长异常或细胞死亡异常停滞或者由细胞生长异常或细胞死亡异常停滞引起的疾病或病症的方法, 该方法包括以有效抑制蛋白激酶 B 活性的量给予哺乳动物本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物。

- 一种用于抑制蛋白激酶 B 的本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物。

- 一种抑制蛋白激酶 B 的方法, 该方法包括使激酶与抑制激酶的本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物接触。

- 一种通过抑制蛋白激酶 B 和/或蛋白激酶 A 的活性用于调节细胞过程(例如细胞分裂)的本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物。

- 本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物在制备用于通过抑制蛋白激酶 B 和/或蛋白激酶 A 的活性调节细胞过程(例如细胞分裂)的药物中的用途。

- 一种使用本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物, 通过抑制蛋白激酶 B 和/或蛋白激酶 A 的活性来调节细胞过程(例如细胞分裂)的方法。

- 一种用于预防或治疗由蛋白激酶 A 介导的疾病或病症的本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物。

- 本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物在制备用于预防或治疗由蛋白激酶 A 介导的疾病或病症的药物中的用途。

- 一种用于预防或治疗由蛋白激酶 A 介导的疾病或病症的方法, 该方法包括给予有需要的受治疗者本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物。

- 一种用于治疗哺乳动物的包括细胞生长异常或细胞死亡异常停滞或者由细胞生长异常或细胞死亡异常停滞引起的疾病或病症的方法, 该方法包括以有效抑制蛋白激酶 A 活性的量给予哺乳动物本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物。

- 一种用于抑制蛋白激酶 A 的本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物。

- 一种抑制蛋白激酶 A 的方法, 该方法包括使激酶与抑制激酶的本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物接触。

- 一种使用本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物, 通过抑制蛋白激酶 A 的活性来调节细胞过程(例如细胞分裂)的方法。

- 本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物在制备用于预防或治疗包括细胞生长异常或细胞死亡异常停滞或者由细胞生长异常或细胞死亡异常停滞引起的疾病或病症的药物中的用途。

- 一种药物组合物，该药物组合物包含本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物及药学上可接受的载体。

- 用于医学的本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物。

- 本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物在制备用于预防或治疗本文所述的任一种疾病或病症的药物中的用途。

- 一种用于治疗或预防本文所述的任一种疾病或病症的方法，该方法包括给予患者(例如有需要的患者)本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物的化合物(例如治疗有效量)。

- 一种减轻或降低本文所述疾病或病症的发病率的方法，该方法包括给予患者(例如有需要的患者)本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物的化合物(例如治疗有效量)。

- 一种用于诊断和治疗由蛋白激酶 B 介导的疾病或病症的方法，该方法包括(i)筛选患者以确定患者所患或可能患上的疾病或病症是否是对用具有针对蛋白激酶 B 活性的化合物治疗敏感的疾病或病症；(ii)如果表明患者所患疾病或病症对此敏感，则随后给予患者本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物。

- 本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物在制备用于治疗或预防患者的疾病或病症的药物中的用途，该患者已经过筛选并确定为患有有可能对用具有针对蛋白激酶 B 活性的化合物治疗敏感的疾病或病症或者有患该疾病或病症的风险。

- 一种用于治疗或预防患者的疾病或病症的本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物, 该患者已经过筛选并确定为患有可能对用具有针对蛋白激酶 B 活性的化合物治疗敏感的疾病或病症或者有患该疾病或病症的风险。

- 一种诊断和治疗由蛋白激酶 A 介导的疾病或病症的方法, 该方法包括(i)筛选患者以确定患者所患或可能患上的疾病或病症是否是对用具有针对蛋白激酶 A 活性的化合物治疗敏感的疾病或病症; (ii) 如果表明患者所患疾病或病症对此敏感, 则随后给予患者本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物。

- 一种用于治疗或预防患者的疾病或病症的本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物, 该患者已经过筛选并确定为患有可能对用具有针对蛋白激酶 A 活性的化合物治疗敏感的疾病或病症或者有患该疾病或病症的风险。

- 本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物在制备用于治疗或预防患者的疾病或病症的药物中的用途, 该患者已经过筛选并确定为患有可能对用具有针对蛋白激酶 A 活性的化合物治疗敏感的疾病或病症或者有患该疾病或病症的风险。

- 一种用作蛋白激酶 B 和/或蛋白激酶 A 调节剂(例如抑制剂)的本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物。

- 本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物在制备用于调节(例如抑制)蛋白激酶 B 和/或蛋白激酶 A 的药物中的用途。

- 一种调节(例如抑制)蛋白激酶 B 和/或蛋白激酶 A 的方法; 该方法包括使蛋白激酶 B 和/或蛋白激酶 A (例如在细胞环境中 - 例如在体内)与本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物接触。

- 一种用于以下方面的本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、

溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物: (a)治疗或预防其中需要调节(例如抑制) ROCK 激酶的疾病或病症; 和/或(b)治疗其中需要调节(例如抑制) ROCK 激酶的受治疗者或患者群。

- 本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物在制备用于以下方面的药物中的用途: (a)治疗或预防其中需要调节(例如抑制) ROCK 激酶的疾病或病症; 和/或(b)治疗其中需要调节(例如抑制) ROCK 激酶的受治疗者或患者群。

- 一种预防或治疗由 ROCK 激酶介导的疾病或病症的方法, 该方法包括给予有需要的受治疗者本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物。

- 一种用于治疗哺乳动物的包括细胞生长异常或细胞死亡异常停滞或者由细胞生长异常或细胞死亡异常停滞引起的疾病或病症的方法, 该方法包括以有效抑制 ROCK 激酶活性的量给予哺乳动物本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物。

- 一种抑制 ROCK 激酶的方法, 该方法包括使激酶与抑制激酶的本文定义的组合物或化合物接触。

- 一种使用本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物, 通过抑制 ROCK 激酶的活性来调节细胞过程(例如细胞分裂)的方法。

- 一种用于预防或治疗由 ROCK 激酶介导的疾病或病症的本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物。

- 本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物在制备用于预防或治疗由 ROCK 激酶介导的疾病或病症的药物中的用途。

- 本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物在制备用于预防或治疗由 ROCK 激酶介导的细胞生长



异常或细胞死亡异常停滞引起的疾病或病症的药物中的用途。

- 一种用于减轻或降低哺乳动物的包括由 ROCK 激酶介导的细胞生长异常或细胞死亡异常停滞或者由 ROCK 激酶介导的细胞生长异常或细胞死亡异常停滞引起的疾病或病症的发病率的方法，该方法包括以有效抑制细胞异常生长的量给予哺乳动物本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物。

- 本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物在制备用于预防或治疗本文所述的任一种疾病或病症的药物中的用途。

- 一种用于治疗或预防本文所述的任一种疾病或病症的方法，该方法包括给予患者(例如有需要的患者)本文定义的组合物或式(I)化合物(例如治疗有效量)。

- 一种减轻或降低本文所述疾病或病症的发病率的方法，该方法包括给予患者(例如有需要的患者)本文定义的组合物或式(I)化合物(例如治疗有效量)。

- 一种用于诊断和治疗由 ROCK 激酶介导的疾病或病症的方法，该方法包括(i)筛选患者以确定患者所患或可能患上的疾病或病症是否是可能对用具有针对 ROCK 激酶活性的化合物治疗敏感的疾病或病症；(ii)如果表明患者所患疾病或病症对此敏感，则随后给予患者本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物。

- 本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物在制备用于治疗或预防患者的疾病或病症的药物中的用途，该患者已经过筛选并确定为患有可能对用具有针对 ROCK 激酶活性的化合物治疗敏感的疾病或病症或者有患该疾病或病症的风险。

- 用于以下方面的本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物：(a)治疗或预防其中需要调节(例如抑制)蛋白激酶 p70S6K 的疾病或病症；和/或(b)治疗其中需要调节(例如

抑制)蛋白激酶 p70S6K 的受治疗者或患者群。

- 本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物在制备用于以下方面的药物中的用途: (a)治疗或预防其中需要调节(例如抑制)蛋白激酶 p70S6K 的疾病或病症; 和/或(b)治疗其中需要调节(例如抑制)蛋白激酶 p70S6K 的受治疗者或患者群。

- 一种用于预防或治疗由蛋白激酶 p70S6K 介导的疾病或病症的方法, 该方法包括给予有需要的受治疗者本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物。

- 一种用于治疗哺乳动物的包括细胞生长异常或细胞死亡异常停滞或者由细胞生长异常或细胞死亡异常停滞引起的疾病或病症的方法, 该方法包括以有效抑制蛋白激酶 p70S6K 活性的量给予哺乳动物本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物。

- 一种抑制蛋白激酶 p70S6K 的方法, 该方法包括使激酶与抑制激酶的本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物接触。

- 一种使用本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物, 通过抑制蛋白激酶 p70S6K 活性来调节细胞过程(例如细胞分裂)的方法。

- 用于预防或治疗由蛋白激酶 p70S6K 介导的疾病或病症的本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物。

- 本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物在制备用于预防或治疗由蛋白激酶 p70S6K 介导的疾病或病症的药物中的用途。

- 本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物在制备用于预防或治疗由蛋白激酶 p70S6K 介导的细胞生长异常或细胞死亡异常停滞引起的疾病或病症的药物中的用途。

• 一种用于减轻或降低哺乳动物的包括由蛋白激酶 p70S6K 介导的细胞生长异常或细胞死亡异常停滞或者由蛋白激酶 p70S6K 介导的细胞生长异常或细胞死亡异常停滞引起的疾病或病症的发病率的方法，该方法包括以有效抑制细胞异常生长的量给予哺乳动物本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物。

• 本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物在制备用于预防或治疗本文所述的任一种疾病或病症的药物中的用途。

• 一种用于治疗或预防本文所述的任一种疾病或病症的方法，该方法包括给予患者(例如有需要的患者)本文定义的组合物或式(I)化合物(例如治疗有效量)。

• 一种减轻或降低本文所述疾病或病症的发病率的方法，该方法包括给予患者(例如有需要的患者)本文定义的组合物或式(I)化合物(例如治疗有效量)。

• 一种用于诊断和治疗由蛋白激酶 p70S6K 介导的疾病或病症的方法，该方法包括(i)筛选患者以确定患者所患或可能患上的疾病或病症是否是对用具有针对蛋白激酶 p70S6K 活性的化合物治疗敏感的疾病或病症；(ii)如果表明患者所患疾病或病症对此敏感，则随后给予患者本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物。

• 本文定义的组合物或式(I)化合物或其盐、溶剂化物、互变异构体或 N-氧化物在制备用于治疗或预防患者的疾病或病症的药物中的用途，该患者已经过筛选并确定为患有有可能对用具有针对蛋白激酶 p70S6K 活性的化合物治疗敏感的疾病或病症或者有患该疾病或病症的风险。

本发明还提供随附权利要求书中所述的更多的组合、用途、方法、化合物和步骤。

## 一般的优先选择和定义

应用于激酶活性中的本文所用术语“调节”，是指蛋白激酶生物活性水平的变化。因此，调节包括引起有关蛋白激酶活性增加或减少的生理变化。在后一种情况下，调节可称为“抑制”。调节可以直接或间接发生，可在任何生理水平上由任何机制介导，生理水平包括例如基因表达水平(包括例如转录、翻译和/或翻译后修饰)、直接或间接对激酶活性水平起作用的调节元件编码基因的表达水平。因此，调节可能意味着激酶的表达升高/抑制或者过量表达或表达不足，包括基因扩增(即多个基因拷贝)和/或由转录作用引起的表达增加或降低，以及活性过高(或不足)和激酶活化(钝化)(包括由突变引起的活化(钝化))。术语“调节的”和“调节”也照此解释。

与本文所述激酶例如联用(并且用于例如各种生理过程、疾病、状况、病症、疗法、治疗或干预)的本文所用术语“介导(的)”，是指有限的操控使得该术语适用的各种过程、疾病、状况、病症、治疗或干预是其中所述激酶发挥生物学作用的过程、疾病、状况、病症、治疗或干预。在该术语适用的疾病、状况或病症的情况下，激酶所起的作用可以是直接或间接的，并且对于疾病、状况或病症(或其病因或进程)的症状表现应是必需和/或足够的。因此，激酶活性(特别是激酶活性水平异常，例如激酶过量表达)不必是该疾病、状况或病症的近因：相反，预期激酶介导的疾病、状况或病症包括具有多因素病因并且其中所述激酶仅是部分参与的复杂进程的疾病、状况或病症。在该术语适用的治疗、预防或干预的情况下，激酶所起的作用可以是直接或间接的，并且对于治疗、预防的实施或干预的结果应是必需和/或足够的。因此，由激酶介导的疾病或病症包括对任何具体的癌症药物或治疗产生抗性。

本文所用术语“ROCK 激酶”和“ROCK”是同义的通用术语，包括 ROCK 激酶家族的所有成员，因此包括 ROCK1 和 ROCK2 作为该上位概念中的下位概念。此外还提及的 ROCK 激酶抑制剂、ROCK 激酶

调节和 ROCK 激酶活性也照此解释。

术语“Rho 蛋白”用来定义参与调节肌动蛋白组构的 GTP 结合蛋白大家族的专门术语，包括 RhoA 和 RhoC。

本文所用术语“Rho 信号转导途径”是指涉及 Rho 蛋白一个或多个成员的任何细胞信号转导途径。与本发明特别有关的是 Rho 信号转导途径，其中 ROCK 激酶(例如 ROCK1 和/或 ROCK2)是一种或多种 Rho 蛋白的邻近效应物(proximate effector) (例如结合配偶体)，当特别提及 Rho 信号转导途径时，本发明所限定的实施方案优选这类 Rho 信号转导途径。

应用于本文所述 ROCK 中的本文所用术语“调节”，是指 ROCK 生物活性水平的变化。因此，调节包括引起 ROCK 活性增加或减少的生理变化。在后一种情况下，调节可称为“抑制”。调节可以直接或间接发生，可在任何生理水平上由任何机制介导，生理水平包括例如基因表达水平(包括例如转录、翻译和/或翻译后修饰)、直接或间接对 ROCK 活性水平起作用的调节元件编码基因的表达水平、或酶(例如 ROCK)活性(例如变构机制、竞争抑制、活性部位失活、反馈抑制途径干扰等)的水平。因此，调节可能意味着 ROCK 的表达升高/抑制或者过量表达或表达不足，包括基因扩增(即多个基因拷贝)和/或由转录作用引起的表达增加或降低，以及活性过高(或不足)和 ROCK 活化(钝化)(包括由突变引起的活化(钝化))。术语“调节的”和“调节”也照此解释。

与本文所述 ROCK 联用(并且用于例如各种生理过程、疾病、状况、病症、疗法、治疗或干预)的本文所用术语“介导(的)”，是指有限制的操控使得该术语适用的各种过程、疾病、状况、病症、治疗或干预是其中 ROCK 发挥生物学作用的过程、疾病、状况、病症、治疗或干预。在该术语适用的疾病、状况或病症的情况下，ROCK 所起的作用可以是直接或间接的，并且对于疾病、状况或病症(或其病因或进程)的症状表现应是必需和/或足够的。因此，ROCK 活性(特别是 ROCK 活性水平异常，例如 ROCK 过量表达)不必是该疾病、状况或病症的

近因：相反，预期 ROCK 介导的疾病、状况或病症包括具有多因素病因并且其中 ROCK 仅是部分参与的复杂进程的疾病、状况或病症。在该术语适用的治疗、预防或干预(例如本发明的“ROCK 介导的治疗”、“ROCK 介导的预防”)的情况下，ROCK 所起的作用可以是直接或间接的，并且对于治疗、预防的实施或干预的结果应是必需和/或足够的。本发明的多种 ROCK 介导的生理过程、疾病、状况、病症、疗法、治疗或干预包括 Rho 信号转导途径(如本文中定义)，因此，通过延伸可称为“Rho 介导的”生理过程、疾病、状况、病症、疗法、治疗或干预。

本文所用与疾病、病症、受治疗者或患者群体有关的术语“需要(的)”是指与该疾病、病症、受治疗者或患者群体有关的特别干预的临床需求或需要的专门术语。因此，本文提及“其中需要调节(例如抑制) ROCK 激酶的”疾病、病症、受治疗者或患者群体是指其中调节 ROCK 激酶是临床上需要的或必需的这类疾病等。可能出现这样的情况，例如其中 ROCK 激酶的调节可能是治标性的、预防性的或(至少部分)治疗性的。

应用于本文所述蛋白激酶 p70S6K 中的本文所用术语“调节”，是指 P70S6K 生物活性水平的变化。因此，调节包括引起 P70S6K 活性增加或减少的生理变化。在后一种情况下，调节可称为“抑制”。调节可以直接或间接发生，可在任何生理水平上由任何机制介导，生理水平包括例如基因表达水平(包括例如转录、翻译和/或翻译后修饰)、直接或间接对 P70S6K 活性水平起作用的调节元件编码基因的表达水平、或酶(例如 p70S6K)活性(例如变构机制、竞争抑制、活性部位失活、反馈抑制途径干扰等)的水平。因此，调节可能意味着 P70S6K 的表达升高/抑制或者过量表达或表达不足，包括基因扩增(即多个基因拷贝)和/或由转录作用引起的表达增加或降低，以及活性过高(或不足)和 P70S6K 活化(钝化)(包括由突变引起的活化(钝化))。术语“调节的”和“调节”也照此解释。

与本文所述 p70S6K 联用(并且用于例如各种生理过程、疾病、状

况、病症、疗法、治疗或干预)的本文所用术语“介导(的)”，是指有限制的操控使得该术语适用的各种过程、疾病、状况、病症、治疗或干预是其中 P70S6K 发挥生物学作用的过程、疾病、状况、病症、治疗或干预。在该术语适用的疾病、状况或病症的情况下，P70S6K 所起的作用可以是直接或间接的，并且对于疾病、状况或病症(或其病因或进程)的症状表现应是必需和/或足够的。因此，P70S6K 活性(特别是 P70S6K 活性水平异常，例如 P70S6K 过量表达)不必是该疾病、状况或病症的近因：相反，预期 P70S6K 介导的疾病、状况或病症包括具有多因素病因并且其中 P70S6K 仅是部分参与的复杂进程的疾病、状况或病症。在该术语适用的治疗、预防或干预(例如本发明的“p70S6K 介导的治疗”和“p70S6K 介导的预防”)的情况下，p70S6K 所起的作用可以是直接或间接的，并且对于治疗、预防的实施或干预的结果应是必需和/或足够的。

术语“干预”是指本文所用的在任何水平上实现生理变化的任何手段的专门术语。因此，干预可包括诱导或抑制任何生理过程、事件、生化途径或细胞/生化事件。本发明的干预通常促进(或有助于)疾病或病症的疗法、治疗或预防。

除非文中另外指明，否则本文提及(S)-2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇或式(I)化合物或 S-对映异构体时，包括游离碱及其离子形式、盐、溶剂化物、N-氧化物、互变异构体形式和保护形式，例如正如下面论述的一样。

该化合物可以不是 N-氧化物。例如，在一个实施方案中，式(I)化合物不是 N-氧化物，而是游离碱形式。

在另一个实施方案中，式(I)化合物不是 N-氧化物，而是盐形式。

可根据下述文献选择和制备盐形式：*Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P. Heinrich Stahl (主编), Camille G. Wermuth (主编), ISBN: 3-90639-026-8, Hardcover, 第 388 页, 2002 年 8 月。例如，可如下制备酸加成盐：将游离碱溶于给定的盐形式在其中

不溶解或难溶解的有机溶剂中，然后加入合适溶剂中的所需酸以使盐从溶液中沉淀出来。

可与各种各样的酸(无酸机和有机酸两者)形成酸加成盐。酸加成盐的实例包括与选自以下的酸形成的盐：乙酸、2,2-二氯乙酸、己二酸、海藻酸、抗坏血酸(例如 L-抗坏血酸)、L-天冬氨酸、苯磺酸、苯甲酸、4-乙酰氨基苯甲酸、丁酸、(+)-樟脑酸、樟脑磺酸、(+)-(1S)-樟脑-10-磺酸、癸酸、己酸、辛酸、肉桂酸、柠檬酸、环拉酸、十二烷基硫酸、乙烷-1,2-二磺酸、乙磺酸、2-羟基乙烷磺酸、甲酸、富马酸、半乳糖二酸、龙胆酸、葡庚糖酸、D-葡萄糖酸、葡萄糖醛酸(例如 D-葡萄糖醛酸)、谷氨酸(例如 L-谷氨酸)、 $\alpha$ -氧代戊二酸、乙醇酸、马尿酸、氢溴酸、盐酸、氢碘酸、羟乙磺酸、乳酸(例如(+)-L-乳酸和(±)-DL-乳酸)、乳糖酸、马来酸、苹果酸、(-)-L-苹果酸、丙二酸、(±)-DL-扁桃酸、甲磺酸、萘磺酸(例如萘-2-磺酸)、萘-1,5-二磺酸、1-羟基-2-萘甲酸、烟酸、硝酸、油酸、乳清酸、草酸、棕榈酸、双羟萘酸、磷酸、丙酸、L-焦谷氨酸、水杨酸、4-氨基-水杨酸、癸二酸、硬脂酸、琥珀酸、硫酸、鞣酸、(+)-L-酒石酸、硫氰酸、甲苯磺酸(例如对甲苯磺酸)、十一碳烯酸和戊酸，以及酰化氨基酸和阳离子交换树脂。

一组具体的酸加成盐包括与下列酸形成的盐：盐酸、氢碘酸、磷酸、硝酸、硫酸、柠檬酸、乳酸、琥珀酸、马来酸、苹果酸、羟乙磺酸、富马酸、苯磺酸、甲苯磺酸、甲磺酸、乙磺酸、萘磺酸、戊酸、乙酸、丙酸、丁酸、丙二酸、葡萄糖醛酸和乳糖酸。在这组盐内，一个分组的盐由与盐酸或乙酸形成的盐组成。

另一组酸加成盐包括与下列酸形成的盐：乙酸、己二酸、抗坏血酸、天冬氨酸、柠檬酸、DL-乳酸、富马酸、葡萄糖酸、葡萄糖醛酸、马尿酸、盐酸、谷氨酸、DL-苹果酸、甲磺酸、癸二酸、硬脂酸、琥珀酸和酒石酸。

式(I)化合物可以单盐或或二盐存在，这取决于与其形成盐的酸的pKa。在较强的酸中，碱性的吡唑氮以及氨基上的氮原子，可参与盐



形成。例如，如果 pKa 小于约 3 的酸(例如盐酸、硫酸或三氟乙酸等酸)，则式(I)化合物通常可与 2 摩尔当量的酸形成盐。

式(I)化合物的盐形式通常是药学上可接受的盐，药学上可接受的盐的实例的有关论述参见 Berge 等, 1977, "Pharmaceutically Acceptable Salts", *J. Pharm. Sci.*, 第 66 卷, 第 1-19 页。但是，也可将非药学上可接受的盐制成中间体形式，然后将其转化为药学上可接受的盐。这些可用于例如纯化或分离式(I)化合物的非药学上可接受的盐形式也构成本发明的组成部分。

式(I)化合物还可形成 N-氧化物，这类 N-氧化物也落入式(I)化合物的定义范围内。

在一个通用的实施方案中，式(I)化合物不是 N-氧化物。

可用氧化剂例如过氧化氢或过酸(例如过氧羧酸)处理相应的母体胺形成 N-氧化物，参见例如 Jerry March, *Advanced Organic Chemistry*, 第 4 版, Wiley Interscience, pages. 更特别地, N-氧化物可用 L. W. Deady 的方法(*Syn. Comm.* 1977, 7, 509-514)制备，其中在例如二氯甲烷等惰性溶剂中，使胺化合物与间氯过氧苯甲酸(MCPBA)反应。

可以采用合适的分离技术例如手性色谱法(手性载体上的色谱法)，由 *S*-对映异构体和 *R*-对映异构体的外消旋混合物制备式(I)化合物，这类技术为本领域技术人员所熟知。

作为手性色谱法的替代方案，对映异构体可如下分离：与手性酸例如 (+)-酒石酸、(-)-焦谷氨酸、(-)-二-甲苯甲酰基-L-酒石酸((-)-di-toluloyl-L-tartaric acid)、(+)-扁桃酸、(-)-苹果酸和(-)-樟脑磺酸形成非对映异构的盐，通过优先结晶分离非对映异构体，然后将盐解离，得到游离碱的单一对映异构体。

式(I)化合物包括具有一个或多个同位素取代的化合物变体，提及具体元素时将该元素所有同位素都包括在内。例如提及氢时将  $^1\text{H}$ 、 $^2\text{H}$  (D)和  $^3\text{H}$  (T)都包括在内。同样，提及碳和氧时分别将  $^{12}\text{C}$ 、 $^{13}\text{C}$  和  $^{14}\text{C}$  及  $^{16}\text{O}$  和  $^{18}\text{O}$  都包括在内。

同位素可以是放射性或非放射性的。在本发明的一个实施方案中，这些化合物不含放射性同位素。此类化合物优选用于治疗用途。然而，在另一个实施方案中，化合物可含有一种或多种放射性同位素。含有这类放射性同位素的化合物可用于诊断方面。

式(I)还包括化合物的任何多晶型物、溶剂化物(例如水合物)、化合物的络合物(例如与化合物(例如环糊精)的包合配合物或笼形包合物，或与金属的络合物)和化合物的前药。术语“前药”是指例如可在体内转化为本文定义的生物活性成分的任何化合物。

例如，某些前药是活性化合物的酯(例如生理上可接受的易代谢的酯)。在代谢期间，酯基(-C(=O)OR)裂解，得到活性药物。可通过例如使母体化合物中的任何羟基(-C(=O)OH)酯化来形成这类酯，适当时，先将母体化合物中存在的任何其它反应基团保护起来，随后在需要时脱去保护。

这类易代谢酯的实例包括其中 R 为以下基团的式-C(=O)OR 的酯：

C<sub>1-7</sub>烷基

(例如-Me、-Et、-nPr、-iPr、-nBu、-sBu、-iBu、-tBu)；

C<sub>1-7</sub>氨基烷基

(例如氨基乙基、2-(N,N-二乙基氨基)乙基、2-(4-吗啉代)乙基)；

酰氧基-C<sub>1-7</sub>烷基

(例如酰氧基甲基；

酰氧基乙基；

新戊酰氧基甲基；

乙酰氧基甲基；

1-乙酰氧基乙基；

1-(1-甲氧基-1-甲基)乙基-羰基氧基乙基；

1-(苯甲酰氧基)乙基；异丙氧基-羰基氧基甲基；

1-异丙氧基-羰基氧基乙基；环己基-羰基氧基甲基；

1-环己基-羰基氧基乙基;  
环己基氧基-羰基氧基甲基;  
1-环己基氧基-羰基氧基乙基;  
(4-四氢吡喃基氧基)羰基氧基甲基;  
1-(4-四氢吡喃基氧基)羰基氧基乙基;  
(4-四氢吡喃基)羰基氧基甲基; 和  
1-(4-四氢吡喃基)羰基氧基乙基)。

同样,一些前药被酶激活得到活性化合物,或者化合物当进一步进行化学反应时得到活性化合物(例如抗体导向酶—前药疗法(Antibody-directed Enzyme Prodrug Therapy, ADEPT)、基因导向酶—前药疗法(Gene-directed Enzyme Prodrug Therapy, GDEPT)、聚合物导向酶—前药疗法(Polymer-directed Enzyme Prodrug Therapy, PDEPT)、配体导向酶—前药疗法(Ligand-directed Enzyme Prodrug Therapy, LIDEPT),等等)。例如,所述的前药可以是糖衍生物或其它糖苷缀合物,或可以是氨基酸酯衍生物。

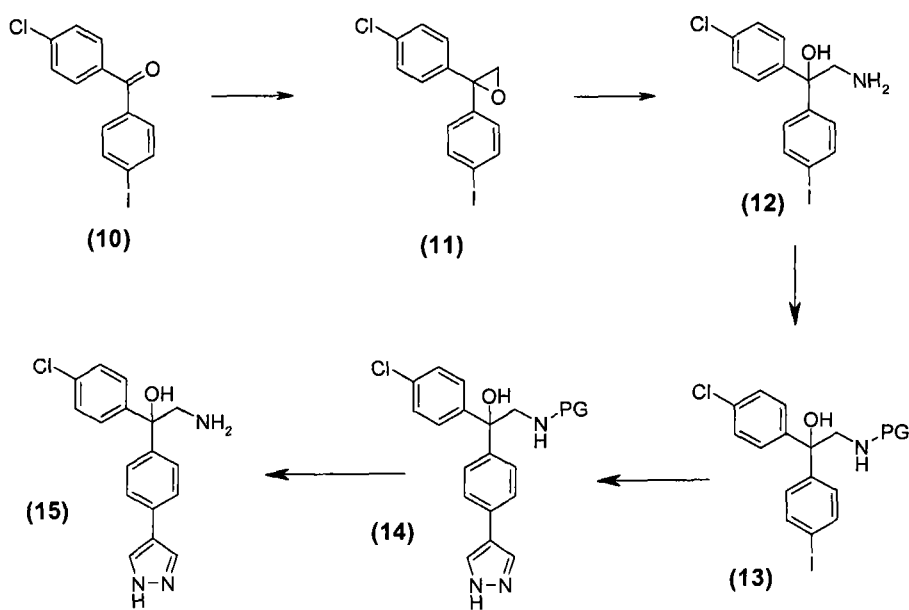
### 合成方法

式(I)化合物及其*R*-对映异构体及其混合物可通过流程1所示方法制备。

流程1中,在碱(例如氢氧化钠等氢氧化物碱)存在下,在二甲亚砜溶液中,通过与三甲基碘化铈反应,使取代的二苯甲酮(10)转化为环氧化物(11)。然后环氧化物(11)通常在加热时与氨的醇(例如甲醇)溶液反应,得到胺(12),为*R*-对映异构体和*S*-对映异构体的外消旋混合物。

可在Suzuki偶合条件下,在钯催化剂(例如四(三苯基膦)合钯(0))存在时,使胺(12)直接与吡唑硼酸酯(例如4-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧杂硼杂环戊烷-2-基)-1H-吡唑)反应,得到外消旋化合物(15)。然而,现已发现使未保护的胺在Suzuki偶合条件下反应,得到相对较差的产物收率,且产物由于其溶解度低而相对难以纯化。克服这一问题的方

法是，首先将氨基保护起来(例如用 Boc 基团，其中 PG = Boc)，得到被保护的中间体(13)，然后使中间体(13)进行 Suzuki 偶合得到被保护的化合物(14)。被保护的化合物(14)然后用众所周知的方法脱保护(例如当 PG = Boc 时，使用 HCl 的乙醚/甲醇溶液)，得到产物(15)，为外消旋混合物。

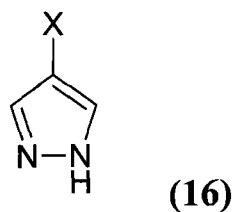


流程 1

可通过本领域技术人员熟知的方法，例如采用手性色谱方法和本文所述的其它方法，拆分外消旋混合物(15)。

另一方面，本发明提供式(15)化合物的制备方法，该方法包括从化合物(14)的化合物上脱去保护基 PG，之后任选对化合物(15)的旋光异构体进行分离，分离出其 S-对映异构体。本发明还提供可通过前述方法制备的化合物，以及不论何时通过所述方法制备的式(15)化合物。

又一方面，本发明提供式(15)化合物的制备方法，该方法包括(i)在 Suzuki 偶合条件下，在钯催化剂(例如四(三苯基膦)合钯(0))存在时，使式(13)化合物与下式(16)的吡唑衍生物反应，得到式(14)化合物：



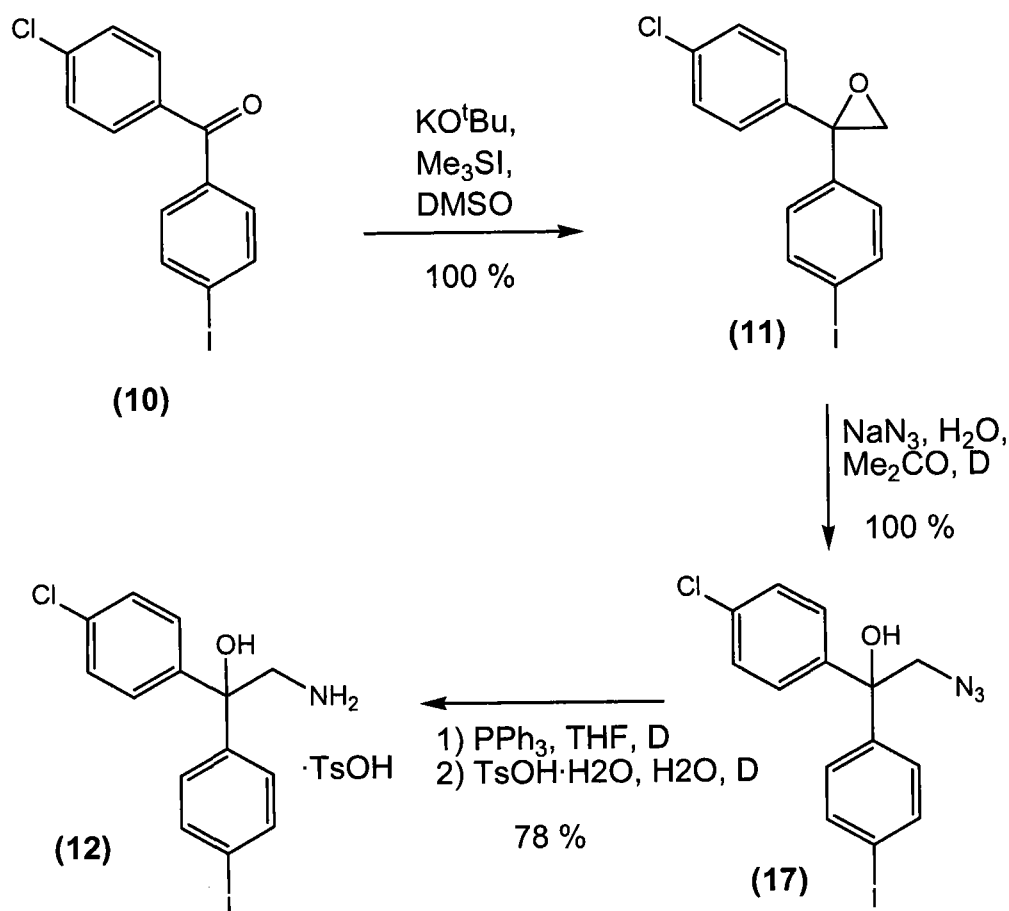
其中 X 为基团  $B(OH)_2$  或硼酸酯基团(例如 4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧杂硼杂环戊烷-2-基); (ii)从化合物(14)的化合物上脱去保护基 PG, 之后 (iii)任选对化合物(15)的旋光异构体进行分离, 分离出其 *S*-对映异构体。

式(13)的中间体, 特别是其中 PG 为 Boc 基团的式(13)的中间体, 构成本发明的又一个方面。

其中 PG 不是 2-羧基-苯甲酰基的式(14)的新的中间体, 同样构成本发明的又一个方面。优选的中间体(14)是其中 PG 为 Boc 基团的化合物。

作为上述方法和流程 1 所示方法的替代方法, 式(I)化合物可以根据 WO 2005/061463 (Astex) 实施例 84 中所述方法制备, 然后采用上述和本文其它部分所述的分离方法分离出 *S*-对映异构体。

制备中间体化合物(12)的一种改进方法如流程 2 中所示。



## 流程 2

在流程 2 中，如上文流程 1 中所述，在碱存在下，在二甲亚砜溶液中，通过与三甲基碘化铊反应，使取代的二苯甲酮(10)转化为环氧化物(11)，只是氯化钠碱用叔丁醇钾替换。通常在室温下，将叔丁醇钾加到二苯甲酮(10)和三甲基碘化铊快速搅拌的混合物中。使用叔丁醇钾而不是氯化钠作为碱提供了重要的优势。首先，碱与 DMSO 反应不形成甲基亚磺酰负碳离子(dimethyl anion)，然后加入其它反应物，正如当使用氯化钠作为碱时的情况，可将叔丁醇盐加到预制成的二苯甲酮(10)、三甲基碘化铊和二甲亚砜混合物中。这就意味着甲基亚磺酰负碳离子在形成后很快被消耗掉，因此在任何指定时间只有少量甲基亚磺酰负碳离子存在于反应混合物中。因此使用叔丁醇钾避免了形成高浓度的相对粘滞并稍有危险的甲基亚磺酰钠(dimethyl sodium)。除了改善该方法的安全性以外，缺少高浓度粘滞的甲基亚磺酰钠意味着反应混合物更易搅拌，使得反应物的混合更有效，避免了未反应或不完全反应原料的局部空穴(pocket)，这是一种由在反应期间形成的叔丁醇对于反应物和产物均是良好溶剂的事实而放大的优势。当大规模进行反应时，这些益处尤其明显(例如制备 50 克以上量的环氧化物(11)，其中已经发现使用叔丁醇钾产生基本上更好的环氧化物(11)收率和更好的纯度(与使用氯化钠为碱的反应相比))。

在流程 1 所示反应顺序中，在加热时使环氧化物(11)与氨的醇(例如甲醇)溶液反应，得到胺(12)。这一类型的反应可在微波反应器中进行，通常减压进行，在相对较小规模的反应中得到良好收率和纯度。

然而，对于较大规模的反应(例如生产 50 克以上量的胺(12))，则发现使环氧化物(11)与叠氮化钠反应，然后使叠氮化物中间体(17)还原成胺(12)，得到更好的收率和更高的纯度。环氧化物(11)与叠氮化钠的反应通常在极性溶剂中进行，例如包含水的水性溶剂和水混溶性溶剂，例如丙酮。反应通常在加热时进行，例如加热至溶剂系统的回流温度。

叠氮基醇(17)向氨基醇(12)的转化可通过与三苯基磷反应后用含水酸溶液处理来实现,含水酸溶液特别是取代磺酸的水溶液,优选烷基磺酸或芳基磺酸,例如甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、甲苯磺酸或樟脑磺酸。特别优选使用4-甲苯磺酸。虽然不希望受任何理论的束缚,但是我们认为该反应如下进行:最初环化形成氮杂环丙烷后,在酸存在下通过开环作用,得到氨基醇。通过使用酸(特别是4-甲苯磺酸),可将氨基-醇分离成稳定易处理的盐,并易于纯化。如果使用樟脑磺酸(例如*d*-樟脑磺酸)的旋光形式,则可以进行盐的分步结晶以将氨基醇(12)的两个对映异构体分成单独的盐。然后盐用碱处理,得到氨基醇(12)的单一对映异构体。

我们认为叠氮化物化合物(17)、氨基-醇(12)及其单一对映异构体和氨基-醇(12)的酸加成盐及其对映异构体是新的,因此,构成本发明进一步的方面。

因此,在一个实施方案中,本发明提供本文定义的2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-碘-苯基]-乙醇及其酸加成盐。

在另一个实施方案中,本发明提供本文定义的(*R*) 2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-碘-苯基]-乙醇及其酸加成盐。

在进一步的实施方案中,本发明提供本文定义的(*S*) 2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-碘-苯基]-乙醇及其酸加成盐。

在前述三个实施方案的每一个中,优选的酸加成盐是与甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、甲苯磺酸或樟脑磺酸(例如*d*-樟脑磺酸)形成的盐。特别优选的盐是与4-甲苯磺酸形成的盐。

除了可用作合成中间体以外,式(12)化合物及其酸加成盐具有针对激酶PKB的活性,因此可用于治疗,特别是本文所述的式(I)化合物的用途(例如抗癌用途)。含有本文定义的式(12)化合物或其酸加成盐的药物组合物及药学上可接受的载体、式(12)化合物或其酸加成盐的治疗用途构成本发明的又一方面。

另一方面,本发明提供式(12)化合物旋光形式的制备方法,该方

法包括式(12)化合物酸加成盐的分步结晶,其中所述盐衍生自旋光酸(例如*d*-樟脑磺酸)。

另一方面,本发明提供本文定义的式(12)化合物的制备方法,该方法包括在室温以上的温度(例如溶剂的回流温度)下,在极性非质子溶剂(例如四氢呋喃)中,使式(17)化合物与叔膦(例如三苯基膦)反应后,用含水酸溶液(例如4-甲苯磺酸等取代磺酸)处理。

作为三苯基膦的替代物,可以使用其它叔膦,这些包括其它三芳基膦(例如三甲苯基膦)、三烷基膦(例如三丁基膦)、三环烷基膦(例如三环己基膦)和含有芳基和/或烷基和/或环烷基的混合物的叔膦。然而,优选三苯基膦。

作为4-甲苯磺酸的替代物,可以使用其它取代磺酸;例如上文所述的烷基磺酸和芳基磺酸,例如甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸和樟脑磺酸。

另一方面,本发明提供式(17)化合物的制备方法,该方法包括在极性溶剂(例如含水丙酮等含水有机溶剂)中,优选加热(例如加热到溶剂的回流温度)时,使式(11)环氧化物与碱金属叠氮化物(例如叠氮化钠)或三甲基·叠氮基甲硅烷(TMS-叠氮化物)反应。

又一方面,本发明提供式(12)化合物的制备方法,该方法包括下列步骤:

(a) 使本文定义的式(11)化合物与碱金属叠氮化物(例如叠氮化钠)或三甲基·叠氮基甲硅烷反应,得到式(17)化合物;

(b) 使式(17)化合物与(i)叔膦(例如三苯基膦)反应,接着与(ii)酸反应,例如取代磺酸,优选烷基磺酸或芳基磺酸,例如甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸或甲苯磺酸,最优选4-甲苯磺酸。

在涉及使用叠氮化物的每一上述方法中,优选碱金属叠氮化物(例如叠氮化锂、叠氮化钾和叠氮化钠),最优选叠氮化钠。

另一方面,本发明提供式(15)化合物即2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇的制备方法;该方法包括:

(1) 通过本文规定的方法制备式(12)化合物;



(2) 通过本文规定的方法, 将式(12)化合物的氨基保护起来, 得到式(13)化合物;

(3) 在 Suzuki 偶合条件下, 在钯催化剂(例如四(三苯基膦)合钯(0))存在时, 使式(13)化合物与本文定义的式(16)吡啶衍生物反应, 得到式(14)化合物;

(4) 脱去式(14)化合物的保护基 PG; 任选之后

(5) 对化合物(15)的旋光异构体进行分离, 分离出其 S-对映异构体。

### 药物制剂

虽然可以单独给予式(I)化合物, 但是优选本发明的组合物是药物组合物(例如制剂), 所述药物组合物包含至少一种本发明的活性化合物以及一种或多种药学上可接受的载体、辅料、赋形剂、稀释剂、填充剂、缓冲剂、稳定剂、防腐剂、润滑剂或本领域技术人员熟知的其它物质和任选其它治疗药或预防药。

因此, 本发明还提供如上定义的药物组合物和药物组合物的制备方法, 该方法包括将式(I)化合物与一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂、缓冲剂、辅料、稳定剂或本文所述的其它物质相混合。

本文所用术语“药学上可接受的”涉及化合物、物质、组合物和/或剂型, 这些都在合理医学判断的范围内, 适用于与受治疗者(例如人)的组织接触, 而无过度的毒性、刺激性、变态反应或其它问题或复杂情况, 与合理的利益/风险比率相称。各种载体、赋形剂等在与制剂其它成分相配伍的意义上也必须是“可接受的”。

可按照已知技术配制含有本文定义的组合物的药物组合物, 参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA, USA。

因此, 又一方面, 本发明以药物组合物的形式提供本文定义的组合物。

药物组合物可以是适合于口服、胃肠外、局部、鼻内、眼、耳、直肠、阴道内或经皮给药的任何形式。当组合物欲用于胃肠外给药时，可将其配制成静脉内、肌内、腹膜内、皮下给药形式，或通过注射、输注或其它递药方式直接递送到靶器官或靶组织。可以通过推注、短期输注或长期输注来递药，并且可通过被动递药或通过使用合适的输注泵递药。

适于胃肠外给药的药物制剂包括水性无菌注射溶液剂和非水性无菌注射溶液剂，其中可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、助溶剂、有机溶剂混合物、环糊精络合剂、乳化剂(用于形成和稳定乳剂)、用于形成脂质体的脂质体组分、用于形成聚合凝胶的可胶凝聚合物、冷冻干燥防护剂及与特别用于稳定可溶形式的活性组分并使制剂与既定接受治疗者的血液等渗的成分的组合。用于胃肠外给药的药物制剂还可呈水性无菌混悬剂和非水性无菌混悬剂的形式，其中可以含有悬浮剂和增稠剂(R. G. Strickly, Solubilizing Excipients in oral and injectable formulations (口服制剂和注射制剂中的增溶赋形剂), *Pharmaceutical Research*, 第 21(2)卷, 2004, 第 201-230 页)。

脂质体是封闭的球形小泡，由外部脂双层膜和内部水性核组成，其总体直径 $<100\mu\text{M}$ 。根据疏水性程度，如果将适度疏水的药物封装或置入脂质体内，该药物则可以通过脂质体增溶。如果药物分子变成脂双层膜的组成部分，那么疏水药物也可通过脂质体增溶，在这种情况下，疏水药物溶于脂双层的脂质部分。

制剂可以单位剂量或多剂量容器提供，例如密封的安瓿和小瓶，并且可以保存在冷冻干燥(冻干)条件下，仅需要在临用前加入无菌液体载体，例如注射用水。

可以通过将式(I)化合物冻干来制备药物制剂。冻干是指将组合物冷冻干燥的方法。因此，冷冻干燥和冻干在本文中用作同义词。

可以由无菌粉针剂、颗粒剂和片剂制备临用时配制的注射溶液剂和混悬剂。

用于胃肠外注射的本发明的药物组合物还可包含药学上可接受的无菌水性或非水性溶液剂、分散体、混悬剂或乳剂以及在临用前复溶成无菌注射溶液剂或分散体的无菌粉针剂。合适的水性和非水性载体、稀释剂、溶剂或溶媒的实例包括水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)、羧甲基纤维素及其合适的混合物、植物油(例如橄榄油)和注射用有机酯例如油酸乙酯。可通过例如使用包衣材料(例如卵磷脂),在分散体的情况下通过维持所需粒径以及通过使用表面活性剂,来维持适当的流动性。

本发明的组合物还可含有辅料,例如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。可通过加入各种抗细菌药和抗真菌药,例如对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、山梨酸等,来确保防止微生物的作用。还可能需要包括等渗剂,例如糖、氯化钠等。可通过加入延缓吸收的成分例如单硬脂酸铝和明胶,来延长注射用药物形式的吸收。

在本发明的一个优选实施方案中,药物组合物为适于静脉内给药的形式,例如通过注射或输注。对于静脉内给药,可以照原样给予溶液剂,或者可在给药前注入输注袋(含有药学上可接受的赋形剂,例如0.9%盐水或5%右旋糖)。

在另一个优选的实施方案中,药物组合物为适于皮下(s.c.)给药的形式。

适于口服给药的药物剂型包括片剂、胶囊剂、囊片剂、丸剂、糖锭剂、糖浆剂、溶液剂、散剂、颗粒剂、酏剂和混悬剂、舌下片剂、糯米纸囊剂或贴剂和口腔贴剂。

因此,片剂组合物可以含有单位剂量的活性化合物以及惰性稀释剂或载体例如乳糖、蔗糖、山梨糖醇或甘露醇等糖或糖醇;和/或如碳酸钠、磷酸钙、碳酸钙等非糖衍生的稀释剂,或者如甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素等纤维素或其衍生物及淀粉如玉米淀粉。片剂还可以含有标准成分例如粘合剂和制粒剂(例如聚乙烯吡咯烷酮)、崩解剂(例如可溶胀的交联聚合物,例如交联羧甲基纤维素)、润

滑剂(例如硬脂酸酯)、防腐剂(例如对羟基苯甲酸酯)、抗氧化剂(例如BHT)、缓冲剂(例如磷酸盐或柠檬酸盐缓冲剂)和泡腾剂(例如柠檬酸盐/碳酸氢盐混合物)。这些赋形剂是众所周知的,无需在此详加论述。

胶囊剂可以是硬明胶或软明胶类并且可以含有固体、半固体或液体形式的活性组分。明胶胶囊剂可以由动物明胶或其合成或植物衍生的等同物进行制备。

固体剂型(例如片剂、胶囊剂等)可以是包衣的或未包衣的,但是通常是包衣的,例如保护性薄膜包衣(例如石蜡或清漆)或控释包衣。可以对包衣材料(例如 Eudragit™型聚合物)进行设计,以便在胃肠道所需部位释放活性组分。因此,可以选择包衣材料以便在胃肠道内特定的 pH 条件下降解,从而在胃或回肠或十二指肠中选择性地释放出化合物。

代替包衣或除包衣以外,药物可以存在于固体基质中,固体基质包含控释剂,例如在胃肠道酸性或碱性发生改变的条件下适于选择性地释放化合物的迟释剂。或者,骨架材料或迟释包衣材料可以呈易蚀聚合物(例如马来酞聚合物)的形式,当剂型通过胃肠道时受到基本上连续的侵蚀。作为又一个替代品,所述的活性化合物可以配制成提供化合物渗透控释的递药系统。可以按照本领域技术人员熟知的方法制备渗透释放制剂和其它迟释或缓释制剂。

药物组合物包含约 1%至约 95%、优选约 20%至约 90%的活性成分。本发明的药物组合物可为例如单位剂量形式,例如安瓿剂、小瓶剂、栓剂、锭剂、片剂或胶囊剂的形式。

可通过将活性成分与固体载体相混合,如有需要,将所得混合物制成粒,并且如有需要或必需,在加入合适的赋形剂后,将混合物加工成片剂、锭剂芯(dragee cores)或胶囊剂,从而得到用于口服给药的药物组合物。还可以将其掺入塑性载体(plastics carrier)中,该塑性载体供活性成分以精确的量扩散或释放。

本发明的化合物还可配制成固体分散体。固体分散体是两种或更

多种固体极微细的均匀分散相。固体分散体的一种类型即固溶体(分子分散系统)是众所周知的制药技术(参见 Chiou 和 Riegelman, *J. Pharm. Sci.*, 60, 1281-1300 (1971)), 可用于提高溶出速率, 并且提高水溶性差的药物的生物利用度。

本发明还提供包含上述固溶体的固体剂型。固体剂型包括片剂、胶囊剂和咀嚼片。可将已知的赋形剂与固溶体混合以提供所需剂型。例如, 胶囊剂可含有与以下成分混合的固溶体: (a)崩解剂和润滑剂, 或(b)崩解剂、润滑剂和表面活性剂。片剂可含有与崩解剂、润滑剂、表面活性剂和助流剂的至少一种相混合的固溶体。咀嚼片可含有与填充剂、润滑剂相混合, 如有需要还与额外的甜味剂(例如人造甜味剂)和合适的矫味剂相混合的固溶体。

可以单个包装(一般为泡罩包装)中包括整个疗程的“患者包装(patient pack)”, 向患者提供药物制剂。患者包装具有优于药剂师从批量供应中分出患者药物供应量的传统处方药的优点, 因为患者总能利用装在患者包装中的包装说明书, 在患者处方药中通常没有包装说明书。已经证实装入包装说明书改善了患者对医师医嘱的顺应性。

局部使用的组合物包括软膏剂、乳膏剂、喷雾剂、贴剂、凝胶剂、液体滴剂和插入物(例如眼内插入物(intraocular insert))。这些组合物可以按照已知方法配制。

用于直肠或阴道内给药的剂型的实例包括阴道栓剂和栓剂, 这类剂型可以由例如含有活性化合物的可模压成形材料或蜡状材料制备。

通过吸入给药的组合物可呈可吸入粉末组合物或者液体或粉末喷雾剂的形式, 可用粉末吸入装置或气雾剂分散装置, 按标准形式给药。这类装置是众所周知的。对于吸入给药, 粉末剂通常含有活性化合物与惰性固体粉末稀释剂, 例如乳糖。

组合物一般呈单位剂型, 因此, 通常含有足够的化合物以提供所需要的生物活性水平。例如, 制剂可含有 1 纳克至 2 克的活性成分, 例如 1 纳克至 2 毫克的活性成分。在这个范围内, 具体细分的化合物

为 0.1 毫克至 2 克的活性成分(更通常 10 毫克至 1 克, 例如 50 毫克至 500 毫克), 或 1 微克至 20 毫克(例如 1 微克至 10 毫克, 例如 0.1 毫克至 2 毫克的活性成分)。

对于口服组合物, 单位剂型可含有 1 毫克至 2 克, 更通常 10 毫克至 1 克, 例如 50 毫克至 1 克, 例如 100 毫克至 1 克的活性化合物。

可以足以达到所需治疗效果的量给予有需要的患者(例如人或动物患者)活性化合物。

### 蛋白激酶抑制活性

可以采用下面实施例中所述实验测定作为蛋白激酶 A 和蛋白激酶 B 抑制剂的式(I)化合物的活性, 给定化合物所具有的活性水平可由  $IC_{50}$  值确定。

### 治疗用途

#### 增殖性病症的预防或治疗

式(I)化合物是蛋白激酶 A 和蛋白激酶 B 的抑制剂。因此, 可用于提供防止肿瘤生长或诱导肿瘤细胞凋亡的手段。因此, 可以证实本发明的组合物可用于治疗或预防增殖性病症, 例如癌症。特别是具有 PTEN 缺失或失活突变或者在(T-细胞淋巴细胞) TCL-1 基因中丧失 PTEN 表达或重排的肿瘤可能对 PKB 抑制剂尤其敏感。具有导致 PKB 途径信号上调的其它异常情况的肿瘤也可能对 PKB 抑制剂尤其敏感。这类异常情况的实例包括但不限于一个或多个 PI3K 亚基过量表达、一种或多种 PKB 同等型过量表达、或导致所述酶基础活性增加的 PI3K、PDK1 或 PKB 突变、或生长因子受体上调过量表达或突变活化, 所述生长因子受体例如选自以下的生长因子受体: 表皮生长因子受体(EGFR)、成纤维细胞生长因子受体(FGFR)、血小板衍生生长因子受体(PDGFR)、胰岛素样生长因子 1 受体(IGF-1R)和血管内皮生长因子受体(VEGFR)家族。

本发明的组合物还可用于治疗由增殖或存活障碍(例如病毒感染)以及例如神经变性性疾病所引起的其它病症。PKB 在免疫应答期间在维持免疫细胞的存活中起重要作用,因此 PKB 抑制剂可能特别有益于免疫障碍,包括自身免疫病。

因此,PKB 抑制剂可用于治疗其中存在增殖、细胞凋亡或分化障碍的疾病。

PKB 抑制剂还可用于由胰岛素抵抗和胰岛素不敏感以及葡萄糖、能量和脂肪贮存遭破坏引起的疾病,例如代谢疾病和肥胖症。

可被抑制的癌症的实例包括但不限于癌,例如膀胱癌、乳腺癌、结肠癌(例如结肠直肠癌,例如结肠腺癌和结肠腺瘤)、肾癌、表皮癌、肝癌、肺癌(例如腺癌、小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、食道癌、胆囊癌、卵巢癌、胰腺癌(例如外分泌源性胰腺癌)、胃癌、宫颈癌、子宫内膜癌、甲状腺癌、前列腺癌或皮肤癌(例如鳞状细胞癌)、淋巴造血系统肿瘤(例如白血病、急性淋巴细胞白血病、B 细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、T 细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)、非霍奇金淋巴瘤、毛细胞淋巴瘤或伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma))、髓系造血系统肿瘤(例如急性和慢性髓细胞白血病、骨髓增生性异常综合征或前髓细胞白血病)、骨髓增生综合征、甲状腺滤泡性癌、间充质起因的肿瘤(例如纤维肉瘤或横纹肌肉瘤)、中枢神经系统 and 外周神经系统肿瘤(例如星形细胞瘤、成神经细胞瘤、神经胶质瘤或神经鞘瘤)、黑素瘤、精原细胞瘤、畸胎瘤、骨肉瘤、着色性干皮病(xeroderma pigmentosum)、角化棘皮瘤(keratocanthoma)、甲状腺滤泡性癌或卡波西肉瘤(Kaposi's sarcoma)。

因此,在用于治疗包括细胞生长异常的疾病或病症的本发明的药物组合物、用途或方法中,在一个实施方案中包括细胞生长异常的疾病或病症是癌症。

癌症的具体分组包括乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、前列腺癌、食道癌、鳞状细胞癌和非小细胞肺癌。

癌症的又一分组包括乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、子宫内膜癌和神经胶质瘤。

本发明的组合物还可与其它抗癌药组合使用。这类组合的实例如下。

### 免疫障碍

本发明的组合物可对其有益的免疫障碍包括但不限于自身免疫疾病和慢性炎症性疾病，例如系统性红斑狼疮、自身免疫介导的肾小球性肾炎、类风湿性关节炎、牛皮癣、炎性肠病和自身免疫糖尿病、湿疹过敏反应(Eczema hypersensitivity reaction)、哮喘、COPD、鼻炎和上呼吸道疾病。

### 其它治疗用途

PKB 在细胞凋亡、增殖、分化中起作用，因此式(I)化合物还可用于治疗癌症以外的下列疾病和与免疫功能障碍有关的疾病；病毒感染，例如疱疹病毒、痘病毒、埃巴病毒、新培斯病毒、腺病毒、HIV、HPV、HCV 和 HCMV；防止 HIV 感染个体的 AIDS 发展；心血管疾病，例如心脏肥大、再狭窄、动脉粥样硬化；神经变性性疾病，例如阿尔茨海默病、AIDS 相关性痴呆、帕金森病、肌萎缩性侧索硬化、色素性视网膜炎、脊髓性肌萎缩和小脑变性；肾小球性肾炎；骨髓增生性异常综合征；与心肌梗死、中风和再灌注损伤有关的缺血性损伤；肌肉骨骼系统变性疾病，例如骨质疏松症和关节炎；阿司匹林敏感性鼻窦炎；囊性纤维变性；多发性硬化；肾病。

### 与 ROCK 激酶抑制活性有关或由其产生的用途

式(I)化合物调节(例如抑制) ROCK 激酶的活性。因此，该化合物可用于：(a)治疗或预防其中需要调节(例如抑制) ROCK 激酶的疾病或病症；和/或(b)治疗其中需要调节(例如抑制) ROCK 激酶的治疗者或患者群；和/或(c)治疗或预防其中需要调节(例如抑制) Rho 信号转导途



径的疾病或病症；和/或(d)治疗受治疗者或患者群的其中需要调节(例如抑制) Rho 信号转导途径的疾病或病症。

因此,本发明可用于与选自以下的有关疾病和病症:(a)肿瘤转移;(b)肿瘤侵袭;(c)肿瘤进程;(d)肿瘤粘附(例如肿瘤细胞粘附);(e)依赖放线菌素收缩性的肿瘤转移(actinomycin contractility-dependent tumour metastasis)、侵袭或进程;(f)细胞转化;(g) ROCK 介导的肿瘤转移、侵袭、进程或粘附;(h) ROCK 介导的依赖放线菌素收缩性的肿瘤转移、侵袭或进程;(i) ROCK 介导的细胞转化。

本发明还用于有关癌症(例如 ROCK 介导的癌),尤其是选自以下的癌症(例如为 ROCK 介导的癌症):(a)睾丸生殖细胞肿瘤;(b)具有转移能力的小乳腺癌;(c)膀胱癌;(d)卵巢癌;(e)前列腺癌和(f)肝细胞癌。

其它适用的疾病和病症包括本文所界定的任何癌症的侵袭、转移和肿瘤进程。

本发明还用于有关心血管疾病或病症,特别是选自以下的疾病或病症:(a)高血压;(b)心脏功能障碍(例如慢性和充血性心力衰竭);(c)心脏肥大;(d)再狭窄;(e)肾功能障碍(例如慢性肾衰竭);(f)动脉粥样硬化(动脉硬化);(g)心脏保护;(h)同种异体移植物存活;(i)脑缺血;(j)冠状血管痉挛;(k)血管炎症。

其它适用的疾病和病症包括肌肉(例如平滑肌)功能障碍,例如选自:(a)哮喘;(b)阴茎勃起功能障碍;(c)女性性功能障碍;(d)膀胱过度活动综合征;(e)平滑肌异常(例如与高血压相关的异常)。

其它适用的疾病和病症包括炎症,其中例如炎症包括或表现为:(a)类风湿性关节炎;(b)过敏性肠综合征;(c)炎性肠病;(d)血管炎症;(e)神经炎症性疾病或病症。

在有关神经炎症性疾病或病症的实施方案中,这些可以选自:(a)中风;(b)多发性硬化;(c)阿尔茨海默病;(d)帕金森病;(e)肌萎缩性侧索硬化;(f)炎症性疼痛。

其它适用的疾病和病症包括 CNS 疾病或病症,包括选自以下的

疾病或病症：(a)脊髓损伤或创伤；(b)脑损伤或创伤；(c)急性神经元损伤(例如中风或创伤性脑损伤)；(d)帕金森病；(e)阿尔茨海默病；(f)神经变性性病症或疾病；(g)中风(例如与高血压相关的中风)；(h)脑血管痉挛；(i)神经突生长和萌发受抑制；(j)神经突再生受抑制；(k)创伤后功能恢复受损；(l)脱髓鞘疾病或病症；(m)炎症性 CNS 疾病或病症；(n)神经病性疼痛；(o)神经变性。

其它适用的 CNS 疾病或病症包括选自以下的疾病或病症：唐氏综合征(Downs syndrome)和 $\beta$ -淀粉样血管病，例如但不限于脑淀粉样血管病、遗传性脑出血、认知减退相关性疾病，例如但不限于 MCI (“轻度认知减退”)、阿尔茨海默病、记忆丧失、与阿尔茨海默病相关的注意力缺陷症状、与以下疾病相关的神经变性：例如阿尔茨海默病或痴呆，包括血管性和退变性起因混合型痴呆、早老性痴呆、老年性痴呆和帕金森病相关性痴呆、进行性核上性麻痹或皮质基底节变性(cortical basal degeneration)、帕金森病、额颞痴呆帕金森型、关岛型帕金森痴呆复征、HIV 痴呆、神经原纤维缠结病理相关性疾病、拳击运动员痴呆、肌萎缩性侧索硬化、皮质基底节变性、唐氏综合征、亨廷顿舞蹈病、脑炎后帕金森病、进行性核上性麻痹、皮克病(Pick's Disease)、尼曼-皮克病(Niemann-Pick's Disease)、中风、头部创伤和其它慢性神经变性性疾病、双相性神经疾病(Bipolar Disease)、情感障碍、抑郁症、焦虑症、精神分裂症、认知障碍、脱发、避孕疗法、痴呆前期(predemented state)、年龄相关性记忆缺损(Age-Associated Memory Impairment)、年龄相关性认知减退、非痴呆型认知缺损(Cognitive Impairment No Dementia)、轻度认知减退、轻度神经认知减退、晚年健忘、记忆缺陷和认知减退、血管性痴呆、具有路易体的痴呆、额颞痴呆和雄激素性脱发。

仍有其它适用的疾病和病症包括：(a)胰岛素抵抗；(b)移植物保护(例如心血管或炎症性移植物保护(inflammatory graft protection))；(c)糖尿病；(d)哮喘；(e)肺血管收缩；(f)青光眼；(g)纤维变性(例如肝纤

维变性和肾纤维变性)。

其它适用的疾病和病症包括感染性疾病或病症,包括后生动物、原生动物、真菌、朊病毒、病毒或细菌侵染、疾病或感染。

在这类实施方案中,感染性疾病或病症可包括病原体介导的细胞骨架重排。

**增殖性病症(包括癌症):** 本发明还用作防止肿瘤生长或诱导肿瘤细胞凋亡的手段。因此预期本发明将证实可用于治疗或预防增殖性病症,例如癌症。这类异常情况的实例包括但不限于一个或多个 Rho 信号转导途径成员过量表达,或导致 ROCK 激酶或 Rho 信号转导途径基础活性增加的所述成员的突变(Rho 信号转导途径或可能与例如选自以下的生长因子受体上调或过量表达或突变活化有关:表皮生长因子受体(EGFR)、成纤维细胞生长因子受体(FGFR)、血小板衍生生长因子受体(PDGFR)、胰岛素样生长因子 1 受体(IGF-1R)和血管内皮生长因子受体(VEGFR)家族)。

另预期本发明可用于治疗由增殖或存活障碍(例如病毒感染)和例如神经变性疾病引起的其它病症。

因此,本发明广泛用于治疗其中存在增殖、细胞凋亡或分化障碍的疾病。

可被抑制的癌症的实例包括但不限于癌,例如膀胱癌、乳腺癌、结肠癌(例如结肠直肠癌,例如结肠腺癌和结肠腺瘤)、肾癌、表皮癌、肝癌、肺癌(例如腺癌、小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、食道癌、胆囊癌、卵巢癌、胰腺癌(例如外分泌源性胰腺癌)、胃癌、宫颈癌、子宫内膜癌、甲状腺癌、前列腺癌或皮肤癌(例如鳞状细胞癌)、淋巴系造血系统肿瘤(例如白血病、急性淋巴细胞白血病、B 细胞淋巴瘤、T 细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、毛细胞淋巴瘤或伯基特淋巴瘤)、髓系造血系统肿瘤(例如急性和慢性髓细胞白血病、骨髓增生性异常综合征或前髓细胞白血病)、甲状腺滤泡性癌、间充质起因的肿瘤(例如纤维肉瘤或横纹肌肉瘤)、中枢神经系统 and 外周神经系统肿

瘤(例如星形细胞瘤、成神经细胞瘤、神经胶质瘤或神经鞘瘤)、黑色素瘤、精原细胞瘤、畸胎瘤、骨肉瘤、着色性干皮病、角化棘皮瘤、甲状腺滤泡性癌或卡波西肉瘤。

淋巴系造血系统肿瘤的又一个实例是多发性骨髓瘤。

癌症的具体分组包括乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、前列腺癌、食道癌、鳞状细胞癌和非小细胞肺癌。癌症的又一分组包括乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、子宫内膜癌和神经胶质瘤。

增殖障碍的另一个实例是骨髓增生综合征。

**免疫障碍:** 本发明可对其有益的免疫障碍包括但不限于自身免疫疾病和慢性炎症性疾病, 例如系统性红斑狼疮、自身免疫介导的肾小球性肾炎、类风湿性关节炎、牛皮癣、炎性肠病、自身免疫糖尿病、湿疹过敏反应、哮喘、COPD、鼻炎和上呼吸道疾病。

**其它治疗用途:** ROCK 介导的生理过程在细胞凋亡、增殖、分化中起作用, 因此, 本发明还可用于治疗癌症以外的下列疾病和与免疫功能障碍有关的疾病; 病毒感染, 例如疱疹病毒、痘病毒、埃巴病毒、新培斯病毒、腺病毒、HIV、HPV、HCV 和 HCMV; 防止 HIV 感染个体的 AIDS 发展; 心血管疾病, 例如心脏肥大、再狭窄、动脉粥样硬化; 神经变性性疾病, 例如阿尔茨海默病、AIDS 相关性痴呆、帕金森病、肌萎缩性侧索硬化、色素性视网膜炎、脊髓性肌萎缩和小脑变性; 肾小球性肾炎; 骨髓增生性异常综合征; 与心肌梗死、中风和再灌注损伤有关的缺血性损伤; 肌肉骨骼系统变性疾病, 例如骨质疏松症和关节炎; 阿司匹林敏感性鼻窦炎; 囊性纤维变性; 多发性硬化; 肾病。

本发明还可用于由胰岛素抵抗和胰岛素不敏感以及葡萄糖、能量和脂肪贮存遭破坏引起的疾病, 例如代谢疾病和肥胖症。

本发明包括 ROCK 介导的任何类型疾病的干预、治疗或预防。因此, 本发明可用于有关治疗或预防, 包括: (a)调节(例如抑制) ROCK 激酶; 或(b)在 ROCK 激酶活性水平进行干预; 或(c)在 Rho 信号转导

途径水平(例如 RhoA 和/或 RhoC 水平)上进行干预。

其它适用的方法包括达到以下效果的干预法: (a)肌肉(例如平滑肌)松弛; (b)血管肌肉松弛(例如以增加血管的血流量); (c)神经细胞调节; (d)减少细胞增殖; (e)减少细胞迁移; (f)在病原体侵袭或感染时抑制细胞骨架重排; (g)加快组织再生; (h)加快创伤后功能恢复。

在这类实施方案中, 神经细胞调节可包括: (a)神经元再生; (b)新轴突生长诱导; (c)穿过 CNS 内病变的轴突再接; (d)神经突长出; (e)神经突分化; (f)轴突寻路; (g)树突棘形成; (h)树突棘维持; (i)神经突生长锥瓦解的调节; (j)神经突长出抑制的调节。

其它适用的治疗包括移植疗法(例如包含移植物保护)。

另外其它适用的方法包括疾病或病症的诊断和治疗方法, 该方法包括: (i)筛选患者以确定患者所患或可能患上的疾病或病症是否是对用具有针对 ROCK 激酶活性的化合物治疗敏感的疾病或病症; (ii)如果表明患者所患疾病或病症对此敏感, 则随后给予患者本发明的化合物。

受治疗者或患者群可以选自: (a)其中 ROCK 激酶发生功能障碍(例如活性过高)的受治疗者或患者群; (b)已进行 ROCK 功能障碍(例如 ROCK 活性过高)诊断试验的受治疗者或患者群; (c)其中 Rho 信号转导途径发生功能障碍的受治疗者或患者群; (d)已进行 Rho 信号转导途径功能障碍诊断试验的受治疗者或患者群。

### **与 p70S6K 激酶抑制活性有关或由其产生的用途**

式(I)化合物调节(例如抑制)蛋白激酶 p70S6K 活性。因此化合物可用于: (a)治疗或预防其中需要调节(例如抑制)蛋白激酶 p70S6K 的疾病或病症; 和/或(b)治疗其中需要调节(例如抑制)蛋白激酶 p70S6K 的受治疗者或患者群。

因此本发明用于选自以下的有关病症: (a)癌症(例如 p70S6K 介导的癌症); (b)肿瘤转移; (c)免疫功能障碍; (d)组织损伤(例如由炎症引

起的组织损伤);(e)染色体 17q23 扩增(或由其引起或与之有关的病症);(f)佩-吉综合征(或由其引起或与之有关的病症);(g) LKB1 突变(或由其引起或与之有关的病症);(h) BRCA1 突变(或由其引起或与之有关的病症);(i) BRCA2 突变(或由其引起或与之有关的病症);(j)细胞凋亡程序功能障碍;(k)肿瘤组织中的生长因子受体信号转导、过量表达和活化;(l)代谢疾病或障碍;(m)与细胞增殖和/或代谢异常有关的病症;(n)神经元病症。

在这类实施方案中,由染色体 17q23 扩增引起或与之有关的疾病或病症可以选自:(a)原发性乳腺肿瘤;(b)含有 BRCA2 突变的肿瘤(例如乳腺肿瘤);(c)含有 BRCA1 突变的肿瘤(例如乳腺肿瘤);(d)胰腺肿瘤;(e)膀胱肿瘤;(f)成神经细胞瘤。

由 LKB1 突变引起或与之有关的疾病或病症可为含有 LKB1 突变(例如失活 LKB1 突变)的肺腺癌。

由 BRCA1/2 突变引起或与之有关的疾病或病症可为乳腺癌。

代谢疾病或障碍可以选自:(a)肥胖症(例如年龄诱发的肥胖症或饮食诱发的肥胖症);(b)糖尿病;(c)代谢综合征;(d)胰岛素抵抗;(e)高血糖症;(f)高氨基酸血症;(g)高脂血症。

**增殖性病症(包括癌症):** 本发明还用作防止肿瘤生长或诱导肿瘤细胞凋亡的方法。因此预期本发明将证实可用于治疗或预防增殖性病症,例如癌症。这类异常情况的实例包括但不限于 p70S6K 过量表达(或本文所述的其它综合征)。

另还预期本发明可用于治疗由增殖或存活障碍(例如病毒感染)和例如神经变性疾病引起的其它病症。

因此本发明广泛用于治疗其中存在增殖、细胞凋亡或分化障碍的疾病。

可被抑制的癌症的实例包括但不限于癌,例如膀胱癌、乳腺癌、结肠癌(例如结肠直肠癌,例如结肠腺癌和结肠腺瘤)、肾癌、表皮癌、肝癌、肺癌(例如腺癌、小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、食道癌、胆囊

癌、卵巢癌、胰腺癌(例如外分泌源性胰腺癌)、胃癌、宫颈癌、子宫内膜癌、甲状腺癌、前列腺癌或皮肤癌(例如鳞状细胞癌)、淋巴系造血系统肿瘤(例如白血病、急性淋巴细胞白血病、B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、毛细胞淋巴瘤或伯基特淋巴瘤)、髓系造血系统肿瘤(例如急性和慢性髓细胞白血病、骨髓增生性异常综合征或前髓细胞白血病)、甲状腺滤泡性癌、间充质起因的肿瘤(例如纤维肉瘤或横纹肌肉瘤)、中枢神经系统和外周神经系统肿瘤(例如星形细胞瘤、成神经细胞瘤、神经胶质瘤或神经鞘瘤)、黑色素瘤、精原细胞瘤、畸胎瘤、骨肉瘤、着色性干皮病、角化棘皮瘤、甲状腺滤泡性癌或卡波西肉瘤。

淋巴系造血系统肿瘤的又一个实例是多发性骨髓瘤。

癌症的具体分组包括乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、前列腺癌、食道癌、鳞状细胞癌和非小细胞肺癌。癌症的又一分组包括乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、子宫内膜癌和神经胶质瘤。

增殖障碍的另一个实例是骨髓增生综合征。

**免疫障碍:** 本发明对其可能是有益的免疫障碍包括但不限于自身免疫疾病和慢性炎症性疾病, 例如系统性红斑狼疮、自身免疫介导的肾小球性肾炎、类风湿性关节炎、牛皮癣、炎性肠病、自身免疫糖尿病、湿疹过敏反应、哮喘、COPD、鼻炎和上呼吸道疾病。

**其它治疗用途:** p70S6K 介导的生理过程在细胞凋亡、增殖、分化中起作用, 因此本发明还可用于治疗癌症以外的下列疾病和与免疫功能障碍有关的疾病: 病毒感染, 例如疱疹病毒、痘病毒、埃巴病毒、新培斯病毒、腺病毒、HIV、HPV、HCV 和 HCMV; 防止 HIV 感染个体的 AIDS 发展; 心血管疾病, 例如心脏肥大、再狭窄、动脉粥样硬化; 神经变性性疾病, 例如阿尔茨海默病、AIDS 相关性痴呆、帕金森病、肌萎缩性侧索硬化、色素性视网膜炎、脊髓性肌萎缩和小脑变性; 肾小球性肾炎; 骨髓增生性异常综合征, 与心肌梗死、中风和再灌注损伤有关的缺血性损伤; 肌肉骨骼系统变性疾病, 例如骨质疏

松症和关节炎；阿司匹林敏感性鼻窦炎；囊性纤维变性；多发性硬化；肾病。

本发明还可用于由胰岛素抵抗和胰岛素不敏感以及葡萄糖、能量和脂肪贮存遭破坏引起的疾病，例如代谢疾病和肥胖症。

本发明包括蛋白激酶 p70S6K 介导的任何类型疾病的干预、治疗或预防方法。因此，本发明用于有关治疗或预防，包括：(a)调节(例如抑制)蛋白激酶 p70S6K；(b)在蛋白激酶 p70S6K 活性水平上进行干预；(b)体内抑制细胞周期 G1 期至 S 期的进程；(c)抑制细胞周期 G1 期至 S 期的细胞周期增殖；(d)将式(I)化合物用作雷帕霉素替代品；(e)将式(I)化合物用作渥曼青霉素替代品；(f)重建合适的细胞凋亡程序；(g)抑制肿瘤组织中生长因子受体信号转导、过量表达和活化；(h)调节神经元细胞分化；(i)调节细胞运动；(j)调节细胞反应；和(k)提高胰岛素敏感性。

治疗或预防还可包括疾病或病症的诊断和治疗方法，该方法包括：(i)筛选患者以确定患者所患或可能患上的疾病或病症是否是对用具有针对蛋白激酶 p70S6K 活性的化合物治疗敏感的疾病或病症；(ii)如果表明患者所患疾病或病症对此敏感，则随后给予患者本文定义的式(I)化合物。

受治疗者或患者群可以选自：(a)其中蛋白激酶 p70S6K 发生功能障碍(例如过度活化)的受治疗者或患者群；(b)已进行 p70S6K 发生功能障碍(例如对于 p70S6K 活性过高)诊断试验的受治疗者或患者群；(c)其中染色体 17q23 扩增的受治疗者或患者群；(d)已进行染色体 17q23 扩增诊断试验的受治疗者或患者群；(e)其中存在 BRCA1 突变的受治疗者或患者群；(f)已进行 BRCA1 突变诊断试验的受治疗者或患者群；(g)其中存在 BRCA2 突变的受治疗者或患者群；(h)已进行 BRCA2 突变诊断试验的受治疗者或患者群(s)；(i)其中存在 LKB1 突变的受治疗者或患者群；(j)已进行 LKB1 突变诊断试验的受治疗者或患者群；(k)已按照本文规定进行筛选的受治疗者或患者群。



## 本发明组合物的优势

本发明的组合物可能具有适于口服暴露的生理化学性质。

相对于现有技术的化合物，本文定义的组合物可具有改进的口服生物利用度。口服生物利用度可定义为当通过口服途径给药时化合物的血浆暴露量与当通过静脉内(i.v.)途径给药时化合物的血浆暴露量的比率(F)，用百分比表示。

口服生物利用度(F值)大于30%、更优选大于40%的组合物特别有利，因为它们可以口服给药而不是胃肠外给药，或者也可通过胃肠外给药。

此外，式(I)化合物在其针对不同激酶的活性方面更有效也更有选择性，并且特别是针对PKB时，显示出选择性和功效提高。

在体外和在细胞内，式(I)化合物在抑制PKB时比其R-对映异构体明显更有效。在体外放射性实验中，式(I)化合物针对分离PKB酶的IC<sub>50</sub>为0.01μM，与R-对映异构体的0.96μM形成对照。在基于细胞的机械性实验中也观察到这种在功效上接近100倍的差异，该实验测量的是PKB的直接下游底物GSK3β的磷酸化。式(I)化合物的IC<sub>50</sub>为1.1μM，与R-对映异构体>50μM的值形成对照。

两个对映异构体之间的其它差异是它们针对密切相关的激酶PKA的功效，其中式(I)化合物在0.03μM下抑制分离酶达44%，与在0.25μM下抑制PKA的R-对映异构体形成对照。

式(I)化合物优于现有技术化合物，因为它对P450酶具有不同的敏感性，并且因为有关药物代谢和药代动力学性质得到改进。例如，式(I)化合物针对细胞色素P450酶1A2、2C9、2C19、3A4和2D6中每一个的IC<sub>50</sub>值均大于10μM。

此外，式(I)化合物将降低剂量需求。

式(I)化合物可能比现有技术的化合物具有较小的毒性。

## hERG

在 1990 年代末期, 经美国 FDA 批准的多种药物在发现涉及由心脏机能障碍引起的死亡时, 不得不在美国退出销售。随后发现, 这些药物的副作用是发生心律失常, 这是通过阻断心脏细胞内的 hERG 通道所引起的。hERG 通道是钾离子通道家族之一, 在 1980 年代末期在突变型果蝇(*Drosophila melanogaster*)中鉴定出它的第一个成员(参见 Jan, L.Y.和 Jan, Y.N. (1990), A Superfamily of Ion Channels (离子通道超家族), *Nature*, 345(6277): 672)。hERG 钾离子通道的生物生理性质参见 Sanguinetti, M.C., Jiang, C., Curran, M.E.和 Keating, M.T. (1995), A Mechanistic Link Between an Inherited and an Acquired Cardiac Arrhythmia: HERG encodes the Ikr potassium channel (遗传性与获得性心源性心律失常之间的机械性连接: HERG 编码 Ikr 钾通道), *Cell*, 81:299-307, 以及 Trudeau, M.C., Warmke, J.W., Ganetzky, B.和 Robertson, G.A. (1995), HERG, a Human Inward Rectifier in the Voltage-Gated Potassium Channel Family (HERG, 人类电压门控钾通道家族中的内向整流器)。 *Science*, 269: 92-95。

hERG 阻断活性的消除在任何新药物的开发中依然都是重要的考虑事项。

式(I)化合物的 hERG 离子通道阻断活性可忽略不计。

### 治疗方法

本文定义的组合物可用于预防或治疗一系列由蛋白激酶 A 和/或蛋白激酶 B 和/或 ROCK 激酶和/或 p70S6K 激酶介导的疾病或病症。这类疾病和病症的实例如上所述。

一般可将组合物给予需要这类给药的受治疗者, 例如人或动物患者, 优选为人。

通常按治疗或预防有益且一般是无毒的量给予组合物。然而, 在某些情况下(例如在危及生命的疾病的情况下), 给予本文定义的组合物的益处可超过任何毒性作用或副作用的劣势, 在这种情况下, 可考

虑按与毒性程度相关的量适当给予化合物。

可以长期给予组合物以维持有益的治疗效果，或者仅短期内给予。或者，它们可以间断方式或连续方式给予。

通常的式(I)化合物日剂量的范围可为每千克体重 100 皮克至 100 毫克，更通常为每千克体重 5 纳克至 25 毫克，更常常每千克体重 10 纳克至 15 毫克(例如 10 纳克/千克至 10 毫克/千克，更通常 1 微克/千克至 20 毫克/千克，例如 1 微克/千克至 10 毫克/千克)，尽管需要时，可以给予较高或较低的剂量。可按每日基础或在重复基础上给予本文定义的组合物，例如每 2 天、或每 3 天、或每 4 天、或每 5 天、或每 6 天、或每 7 天、或每 10、或每 14 天、或每 21 天或每 28 天。

可以在剂量范围内口服给予式(I)化合物，例如 1-1500mg，2-800mg，或 5-500mg，例如 2-200mg 或 10-1000mg，剂量的具体实例包括 10mg、20mg、50mg 和 80mg。可以每天一次或每天一次以上给予化合物。化合物可以连续给予(即在治疗方案期间每天无间断给予)。或者，可以间歇给予化合物，即连续服药一定时间(例如一周)，然后中断一定时间(例如一周)，然后再连续服药一定时期(例如一周)，在治疗方案期间如此进行。涉及间歇性给药的治疗方案的实例包括其中是给药一周停药一周的周期；或给药两周，停药一周；或给药三周，停药一周；或给药两周，停药两周；或给药四周停药两周；或给药一周停药三周——达一个或多个周期，例如 2、3、4、5、6、7、8、9 个或 10 个以上周期。

在一个具体的剂量方案中，可以给患者输注本文定义的组合物每天 1 小时的时间长达 10 天，特别是一周内多达 5 天，按所需要的间隔(例如二周至四周，特别是每三周)重复治疗。

更具体的是，可以给患者输注本文定义的组合物每天 1 小时的时间达 5 天，每三周重复治疗。

在另一个具体的剂量方案中，给患者输注 30 分钟至 1 小时后，在可变时间内维持输注，例如 1-5 小时，例如 3 小时。

在又一个具体的剂量方案中，给患者连续输注 12 小时至 5 天的时间，特别是连续输注 24 小时至 72 小时。

然而，最终所给予的化合物的量和所使用的组合物的类型应与待治疗的疾病性质或生理状况相称，并由医师做出决定。

式(I)化合物可作为单独的治疗药给予，或者与一种或多种治疗特定疾病(例如肿瘤性疾病，例如前述界定的癌症)的化合物的疗法联用。可与式(I)化合物一起(不论同时还是按不同的时间间隔)给予的其它治疗药或治疗的实例包括但不限于：

- 拓扑异构酶 I 抑制剂
- 抗代谢药
- 微管蛋白靶向药
- DNA 结合剂和拓扑异构酶 II 抑制剂
- 烷化剂
- 单克隆抗体
- 抗激素
- 信号转导抑制剂
- 蛋白酶体抑制剂
- DNA 甲基转移酶
- 细胞因子和类视色素
- 染色质导向疗法
- 放射疗法，和

• 其它治疗药或预防药；例如减轻或缓解与化学疗法相关的某些副作用的药物。这些药物的具体实例包括止吐药和防止或减少与化疗期相关的中性粒细胞减少以及防止由红细胞或白细胞水平降低引起的并发症的药物，例如促红细胞生成素(EPO)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和粒细胞集落刺激因子(G-CSF)。还包括抑制骨吸收的药物，例如二膦酸盐药物例如唑来膦酸盐(zoledronate)、帕米膦酸盐(pamidronate)和伊班膦酸盐(ibandronate)；抑制炎症反应的药物(例如

地塞米松 (dexamethazone)、泼尼松 (prednisone) 和泼尼松龙 (prednisolone) 以及用于降低肢端肥大症患者的生长激素和 IGF-I 血液水平的药物, 例如合成形式的脑激素促生长素抑制素, 包括醋酸奥曲肽 (octreotide acetate), 这是一种长效八肽, 具有模拟天然激素促生长素抑制素特性的药理特性。还包括亚叶酸 (leucovorin) 等药物, 其用作降低叶酸水平药物的解毒药, 或亚叶酸 (folinic acid) 本身及可用于治疗副作用 (包括水肿和血栓栓塞性发作 (thromboembolic episode)) 的醋酸甲地孕酮等药物。

本发明组合中存在的每种化合物可以单独不同的剂量方案和通过不同的途径给予。

如果式(I)化合物与一种、两种、三种、四种以上(优选一种或两种, 更优选一种)其它治疗药按联合疗法给予时, 化合物可同时或序贯给予。当序贯给予时, 可按密集的时间间隔(例如 5-10 分钟时间内)或较长的间隔(例如间隔 1 小时、2 小时、3 小时、4 小时以上或需要时甚至更长时间)给予, 精确的剂量方案应与治疗药的性质相称。

式(I)化合物还可与例如放射疗法、光动力疗法、基因疗法等非化疗治疗、手术和饮食控制联用。

对于与其它化疗药物的联合疗法, 可将式(I)化合物与一种、两种、三种、四种以上的其它治疗药配制成例如含有两种、三种或四种以上的治疗药的剂型。在一个替代方法中, 各治疗药可单独配制并以药盒的形式提供, 任选附有药物使用说明书。

本领域技术人员可根据常识清楚地了解将要使用的给药方案和联合疗法。

### 诊断方法

给予本文定义的组合物之前, 可对患者进行筛选, 以确定患者所患或可能患上的疾病或病症是否是对治疗敏感的疾病或病症, 所述治疗用具有针对特定靶激酶(例如蛋白激酶 A 和/或蛋白激酶 B 和/或

ROCK 激酶和/或 P70S6K 激酶)活性的化合物进行。

例如,可以对采自患者的生物样品进行分析以确定患者所患或可能患上的病症或疾病(例如癌症)是否是以遗传异常或蛋白质表达异常为特征的病症或疾病,其中所述异常导致 PKA 和/或 PKB 上调,或者使通向正常 PKA 和/或 PKB 活性的途径敏化,或者 PKA 和/或 PKB 上游的信号转导组分上调,例如在 PKB、P13K、GF 受体、PDK 1 和 PDK 2 的情况下。

或者,可以分析采自患者的生物样品的 PKB 途径(例如 PTEN)负调节因子或抑制剂的丧失。在本文中,术语“丧失”包括调节因子或抑制剂编码基因的缺失、基因的截短(例如通过突变)、基因转录产物的截短、或转录产物的钝化(例如通过点突变)或通过其它基因产物的整合。

又或者,可筛选出 ROCK 活性功能障碍(例如 ROCK 表达升高或上调、ROCK 基因或 ROCK 基因调节元件突变)或 Rho 信号转导功能障碍(如本文界定)的患者。

术语上调包括表达升高或过量表达,包括基因扩增(即多个基因拷贝)和通过转录作用使表达增加以及过度活性和活化,包括通过突变的活化。因此,可以对患者进行诊断试验以检测激酶(例如 PKA 和/或 PKB 和/或 ROCK 激酶和/或 P70S6K 激酶)上调的标记特征。术语诊断包括筛选。所谓标记包括遗传标记,包括例如测定 DNA 组成以鉴定激酶(例如 PKA 和/或 PKB 和/或 ROCK 激酶和/或 P70S6K 激酶)的突变。术语标记还包括以激酶(例如 PKA 和/或 PKB 和/或 ROCK 激酶和/或 P70S6K 激酶)上调和/或导致相关途径上调的其它因子为特征的标记,相关途径包括酶活性、酶水平、酶状态(例如磷酸化与否)和前述蛋白质的 mRNA 水平。

上述诊断试验和筛选通常用生物样品进行,生物样品选自肿瘤活检样品、血样(分离和富集的脱落肿瘤细胞)、粪便活检样品、痰液、染色体分析、胸膜液、腹膜液、骨髓或尿液。

鉴定出在 PKA 和/或 PKB 中携带突变或 TCL-1 重排或 PTEN 表达丧失的个体,可能意味着该患者特别适于用 PKA 和/或 PKB 抑制剂治疗。可在治疗前优先筛选出存在 PKA 和/或 PKB 变体的肿瘤。筛选方法通常可包括直接测序、寡核苷酸微阵列分析或突变体特异性抗体。

蛋白质突变和上调的鉴定和分析方法为本领域技术人员所知。筛选方法可包括但不限于标准方法例如反转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)或原位杂交。

在 RT-PCR 筛选中,通过建立 mRNA 的 cDNA 拷贝,随后通过 PCR 扩增 cDNA 来评价肿瘤中 mRNA 的水平。PCR 扩增的方法、引物的选择和扩增的条件为本领域技术人员所知。通过标准方法进行核酸操作和 PCR,参见例如 Ausubel, F. M.等编辑, *Current Protocols in Molecular Biology*, 2004, John Wiley & Sons Inc.或 Innis, M. A.等编辑, *PCR Protocols: a guide to methods and applications*, 1990, Academic Press, San Diego。涉及核酸技术的反应和操作还可参见 Sambrook 等, 2001, 第 3 版, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press。或者,可以使用市售 RT-PCR 试剂盒(例如 Roche Molecular Biochemicals), 或者有关方法参见美国专利 4,666,828、4,683,202、4,801,531、5,192,659、5,272,057、5,882,864 和 6,218,529, 这些专利均通过引用结合到本文中。

评价 mRNA 表达的原位杂交技术的一个实例是荧光原位杂交(FISH)(参见 Angerer, 1987 *Meth. Enzymol.*, 152: 649)。

通常,原位杂交包括以下主要步骤:(1)将待分析的组织进行固定;(2)对样品进行预杂交处理以增加靶核酸的可接近性并减少非特异性结合;(3)使核酸混合物与生物结构或组织中的核酸杂交;(4)杂交后洗涤以除去在杂交中未结合的核酸片段,(5)检测杂交的核酸片段。用于此类应用中的探针通常用例如放射性同位素或荧光报道分子标记。优选的探针足够长,例如约 50、100 或 200 个核苷酸至约 1000 个以上

的核苷酸，以便在严格条件下与靶核酸进行特异性杂交。进行 FISH 的标准方法参见 Ausubel, F. M.等编辑, Current Protocols in Molecular Biology, 2004, John Wiley & Sons Inc 和 John M. S. Bartlett 的技术综述, Fluorescence In Situ Hybridization: Technical Overview (荧光原位杂交技术综述), 载于 Molecular Diagnosis of Cancer, Methods and Protocols, 第 2 版; ISBN: 1-59259-760-2; 2004 年 3 月, 第 077-088 页; 系列丛书: Methods in Molecular Medicine.

或者, 由 mRNA 表达的蛋白产物可通过以下方法评价: 肿瘤样本的免疫组织化学法、使用微量滴定板的固相免疫测定法、蛋白质印迹法、二维 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、ELISA、流式细胞术和其它本领域中已知的特异性蛋白质的检测方法。检测方法包括使用位点特异性抗体(site specific antibodies)。技术人员应当了解的是, 所有这些用于检测激酶(例如 PKB 和/或 PKA 和/或 ROCK 激酶和/或 P70S6K 激酶)上调或者检测激酶变体的众所周知的技术都可适用于本发明情况。

因此, 所有的这些技术还可用来鉴定特别适于用 PKA 和/或 PKB 和/或 ROCK 激酶和/或 P70S6K 激酶抑制剂治疗的肿瘤。

例如, 如上所述, 研究发现 PKB  $\beta$  在 10-40%的卵巢癌和胰腺癌中上调(Bellacosa 等, 1995, Int. J. Cancer 64, 280-285; Cheng 等, 1996, PNAS 93, 3636-3641; Yuan 等, 2000, Oncogene 19, 2324-2330)。因此预期 PKB 抑制剂, 特别是 PKB  $\beta$  抑制剂可用于治疗卵巢癌和胰腺癌。

PKB  $\alpha$  在人类胃癌、前列腺癌和乳腺癌中扩增(Staal 1987, PNAS 84, 5034-5037; Sun 等, 2001, Am. J. Pathol. 159, 431-437)。因此预期 PKB 抑制剂, 特别是 PKB  $\alpha$  抑制剂可用于治疗人的胃癌、前列腺癌和乳腺癌。

在类固醇非依赖性乳腺癌和前列腺癌细胞系中发现 PKB  $\gamma$  活性增加(Nakatani 等, 1999, J. Biol. Chem. 274, 21528-21532)。因此预期 PKB 抑制剂, 特别是 PKB $\gamma$  抑制剂可用于治疗类固醇非依赖性乳腺癌



和前列腺癌。

可在 mRNA 水平或蛋白质水平进行 ROCK 的检测。临床样品中测定出 Rho 和 ROCK 水平的方法的具体实例包括:

- American Journal of Pathology. 2002; 160:579-584。该论文描述了对福尔马林固定的组织进行免疫组织化学法以表征 RhoC 在人乳腺组织中的表达。

- Clinical Cancer Research 第 9 卷, 2632-2641, 2003 年 7 月。该论文描述了在得自连续 107 名日本膀胱癌患者的成对肿瘤和非肿瘤手术样品中, 应用蛋白质印迹法定量测定 Rho 和 ROCK 蛋白的表达。

- Pancreas. 24(3):251-257, 2002 年 4 月。该论文描述了通过免疫印迹法和免疫组织化学法测定人胰腺组织中 ROCK-1 的表达。

- World J Gastroenterol 2003 年 9 月; 9(9):1950-1953。该论文描述了通过反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)测定肝细胞癌(HCC)中 RhoC 基因的 mRNA 表达水平。

包括在上述出版物中的有关定量测定 Rho 和/或 ROCK 活性水平或表达水平的方法内容通过引用结合到本文中。

可以在 mRNA 或蛋白质水平上进行 p70S6K 的检测。示例性的方法参见例如 J Natl Cancer Inst (2000): 92, 第 1252-9 页(它描述了应用鉴定基因扩增和过量表达的比较基因组杂交(CGH)及 cDNA 和组织微阵列分析, 通过互补 DNA 和组织微阵列分析来检测核糖体蛋白 S6 激酶的活化)。

p70S6K 过量表达的检测参见 Int J Oncol (2004): 24 (4), 第 893-900 页。该论文应用免疫组织化学法描述了普通人肿瘤中的 PI3K/PTEN-Akt-mTOR 途径的药物基因组谱, 以比较 p70S6K、AKT 高表达与肿瘤敏感性。

## 实验

现在参照以下方法和实施例中所述具体实施方案对本发明进行

说明，但并不局限于参照以下方法和实施例。

下述各种方法中的原料是市售产品，除非另有说明。

用在 27°C、400.13 MHz 下，在 Me-*d*<sub>3</sub>-OD 中操作的 Bruker AV400 仪记录质子磁共振(<sup>1</sup>H NMR)谱，除非另有说明，否则如下报告：化学位移 δ/ppm (质子数，多重性中 s=单峰，d=双峰，t=三重峰，q=四重峰，m=多重峰，br=宽峰)。残余的质子溶剂 MeOH (δ<sub>H</sub> = 3.31 ppm)用作内标。

实施例中，所制备的化合物应用下述系统和操作条件，通过液相色谱法和质谱法表征。如果存在氯，所引用的化合物质量为 <sup>35</sup>Cl。所用操作条件如下。

### 平台系统

HPLC 系统:	Waters 2795
质谱检测器:	Micromass Platform LC
PDA 检测器:	Waters 2996 PDA

### 酸性分析条件 2:

洗脱剂 A:	H <sub>2</sub> O (0.1%甲酸)
洗脱剂 B:	CH <sub>3</sub> CN (0.1%甲酸)
梯度:	5-95%洗脱剂 B, 3.5 分钟内
流速:	0.8ml/分钟
柱:	Phenomenex Synergi 4μ Max-RP 80A, 50x2.0mm

### 碱性分析条件 5:

洗脱剂 A:	H <sub>2</sub> O (10mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> 缓冲液, 用 NH <sub>4</sub> OH 调节至 pH=9.2)
洗脱剂 B:	CH <sub>3</sub> CN
梯度:	05-95%洗脱剂 B, 3.5 分钟内
流速:	0.8ml/分钟
柱:	Phenomenex Gemini 5μ 2.0 x 50mm

### MS 条件:

毛细管电压: 3.5 kV 或 3.6 kV

锥电压: 30 V

源温度: 120°C

扫描范围: 165-700 amu

电离方式: -, +或+/-电喷雾

在以下实施例中, 使用下列关键词识别所用的 LCMS 条件:

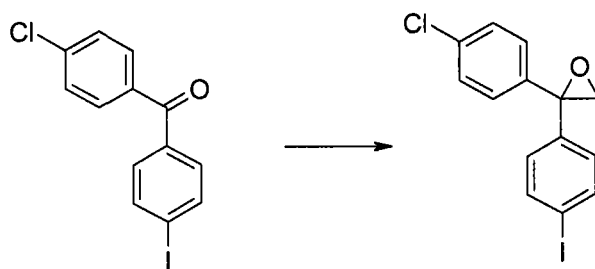
PS-A2 平台系统 - 酸性分析条件 2

PS-B5 平台系统 - 碱性分析条件 5

## 实施例 1

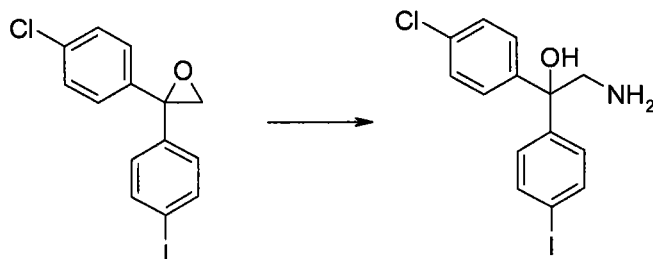
### (S)-2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇的制备

#### 1A. 2-(4-氯-苯基)-2-(4-碘-苯基)-氧杂环丙烷



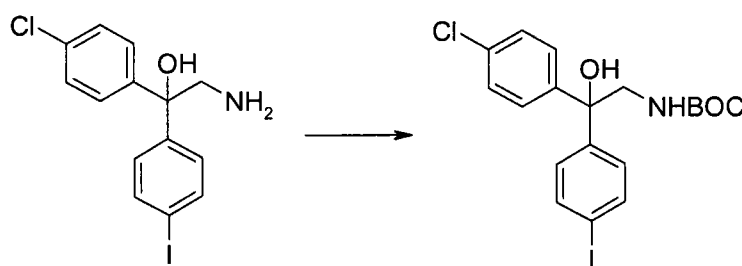
将氢氧化钠(60%的油分散体, 128mg, 3.2mmol)置于氮气气氛下, 然后加入 DMSO (5ml)。15 分钟后, 加入三甲基碘化铊(0.66g, 3.2mmol)固体, 30 分钟后再加入(4-氯-苯基)-(4-碘-苯基)-甲酮(1g, 2.9mmol)。将混合物在室温下搅拌 24 小时后, 用乙酸乙酯稀释, 用 1:2 水/盐水、水和盐水洗涤(2 次)。有机相经干燥(MgSO<sub>4</sub>), 过滤后浓缩, 得到标题化合物(1.01g, 97%), 无需进一步纯化便可使用。LCMS (PS-A2) R<sub>t</sub> 4.07 分钟, [M-H]<sup>-</sup>355。

#### 1B. 2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-碘-苯基]-乙醇(环氧化物开环反应)



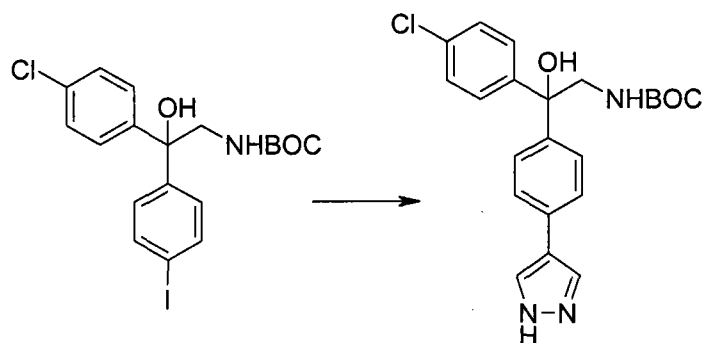
将 2-(4-氯-苯基)-2-(4-碘-苯基)-氧杂环丙烷(500mg, 1.40mmol)溶于 2M NH<sub>3</sub> 的甲醇(5ml, 10.0mmol)溶液中, 将溶液在 130℃ 下用微波加热 60 分钟。冷却后, 真空除去溶剂, 得到所需产物。进行三次同一反应, 得到 1.55g (98%)的产物 2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-碘-苯基]-乙醇。粗产物是纯的, 无需步纯化便可用于下一步骤。

### 1C. [2-(4-氯-苯基)-2-羟基-2-(4-碘-苯基)-乙基]-氨基甲酸叔丁酯(BOC 保护)



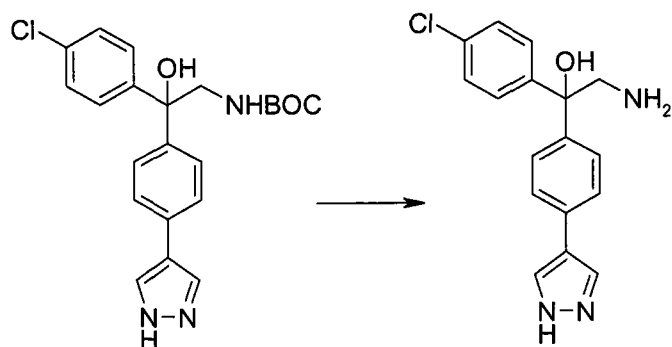
将步骤 1B 的氨基醇产物(9.55g, 25.56mmol)悬浮于 1,4-二氧六环(220ml), 加入 2M NaOH (16.6ml, 33.24mmol)。将混合物剧烈搅拌直到均匀。加入二碳酸二叔丁酯(6.14g, 28.11mmol), 将反应混合物在 45℃ 下搅拌 20 小时。冷却后, 使反应混合物浓缩, 在 EtOAc (150ml) 和水(150ml)之间分配。分离出有机层, 用盐水(150ml)洗涤, 干燥 (MgSO<sub>4</sub>)后浓缩, 得到黄色油状物(14.08g)。粗产物用快速色谱法纯化 (采用 Biotage SP4 (65i 柱), 用乙酸乙酯-石油溶剂油(petrol)(梯度 5%-40% EtOAc)洗脱), 得到标题化合物(10.0g, 83%, 白色固体)。R<sub>t</sub> 3.73 分钟, [M+H] 473.96。

### 1D. [2-(4-氯-苯基)-2-羟基-2-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙基]-氨基甲酸

**叔丁酯(Suzuki 偶合反应)**

将[2-(4-氯-苯基)-2-羟基-2-(4-碘-苯基)-乙基]-氨基甲酸叔丁酯(5g, 10.6mmol)与 4-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧杂硼杂环戊烷-2-基)-1H-吡唑(4.1g, 21.11mmol)和磷酸钾(三碱价, 7.88g, 37.10mmol)在圆底烧瓶中混合。然后将这些固体溶于乙醇、甲醇、甲苯和水的1:1:1:1 溶剂混合物(每种溶剂 33ml)中。该溶液用氮气脱气, 加入四(三苯基膦)合钯(0) (0.612g, 0.53mmol)。混合物用氮气脱气, 然后在氮气氛、85℃下加热 2 小时。然后使反应混合物冷却至室温。然后再加入一批试剂: 磷酸钾(7.88g, 37.10mmol)和硼酸吡唑(4.1g, 21.11mmol)。反应混合物用氮气脱气后, 加入又一批四(三苯基膦)合钯(0) (0.101g, 0.087mmol)。使反应混合物脱气, 然后在氮气氛、85℃下加热 17 小时。再次加入另一批试剂(参照上述用量)后, 再在氮气氛、85℃下继续加热 6.5 小时。然后使反应混合物冷却至室温, 真空蒸发除去有机溶剂。残余水层用 2N NaOH 水溶液(150ml)稀释后, 用乙酸乙酯(150ml)萃取。分离出有机层, 依次用 2N NaOH 水溶液(150ml)和盐水(150ml)洗涤。分离出有机层, 干燥(MgSO<sub>4</sub>)后真空浓缩。残余物用乙醚研磨。真空过滤固体后干燥, 得到标题化合物(2.55g, 58%, 白色固体)。LC/MS: (PS-B5) R<sub>t</sub> 3.05, [M+H]<sup>+</sup> 414.18。<sup>1</sup>H NMR (Me-d<sub>3</sub>-OD) 7.95 (2H, br s), 7.55 (2H, d), 7.48-7.41 (4H, m), 7.31 (2H, d), 3.87 (2H, q), 1.35 (9H, s)。

**1E. 2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇(BOC 脱保护步骤)**



将 BOC 胺(2.55g, 6.16mmol)的含饱和 HCl 的 Et<sub>2</sub>O (50ml)和甲醇 (50ml)的悬浮液在室温下搅拌 20 小时。反应混合物经真空浓缩后,用 2M NaOH (150ml)稀释,用 EtOAc (200ml)萃取(注意(NB): 需要长时间振荡以完全溶解固体物质)。有机层用 1N HCl (100ml)洗涤。然后分离水层后,用 2M NaOH 碱化至 pH 12。所需产物从溶液中沉淀出来后,经真空过滤收集,干燥数天(1.89g, 98%)。<sup>1</sup>H NMR (Me-d<sub>3</sub>-OD) δ 3.29-3.38 (2H, m), 7.32 (2H, d), 7.41-7.46 (4H, m), 7.55 (2H, d), 7.94 (2H, s)。

### 1F. 单一对映异构体的手性分离

采用下述手性 LC 方法,将化合物 (*S*)-2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇与 *R*-对映异构体分离开来。

#### 手性分析条件:

洗脱剂:	MeOH + 0.1% DEA, 室温下
流速:	0.7ml/分钟
总时间:	25 分钟
注射体积:	5μl
样品浓度:	1mg/ml (流动相中)
柱:	DAICEL Chiralpak AD-H; 250x4.6mm
波长:	230nm 或 257nm

#### 手性制备条件:

洗脱剂:	MeOH + 0.1% DEA, 室温下
流速:	13ml/分钟

总时间: 29 分钟  
注射体积: 250 $\mu$ l  
样品浓度: 100mg/ml (流动相中)  
柱: DAICEL Chiralpak AD-H; 250x20mm  
波长: 230 或 257nm

所得到的(*S*)-2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1*H*-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇用旋光测定法、手性色谱法和晶体学表征。

### 旋光测定法

*S*对映异构体和 *R*对映异构体两者的旋光性用 AA-10 自动旋光仪 (Optical Activity Limited)测定。

### ***S*-对映异构体**

22.42mg 化合物溶于 2ml MeOH, 测定池长度 = 20 cm, 读数 = +0.31,

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +13.8^{\circ}$$

### ***R*-对映异构体**

20.14mg 溶于 10ml MeOH (较大稀释度由旋光仪测定池气泡问题所致), 读数 = -0.03, 测定池长度 = 10cm

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -14.8^{\circ}$$

### 手性色谱法

采用上述手性分析条件和 5 $\mu$ l 注射体积, *S*-对映异构体的保留时间为 15.283 分钟。

### 晶体学

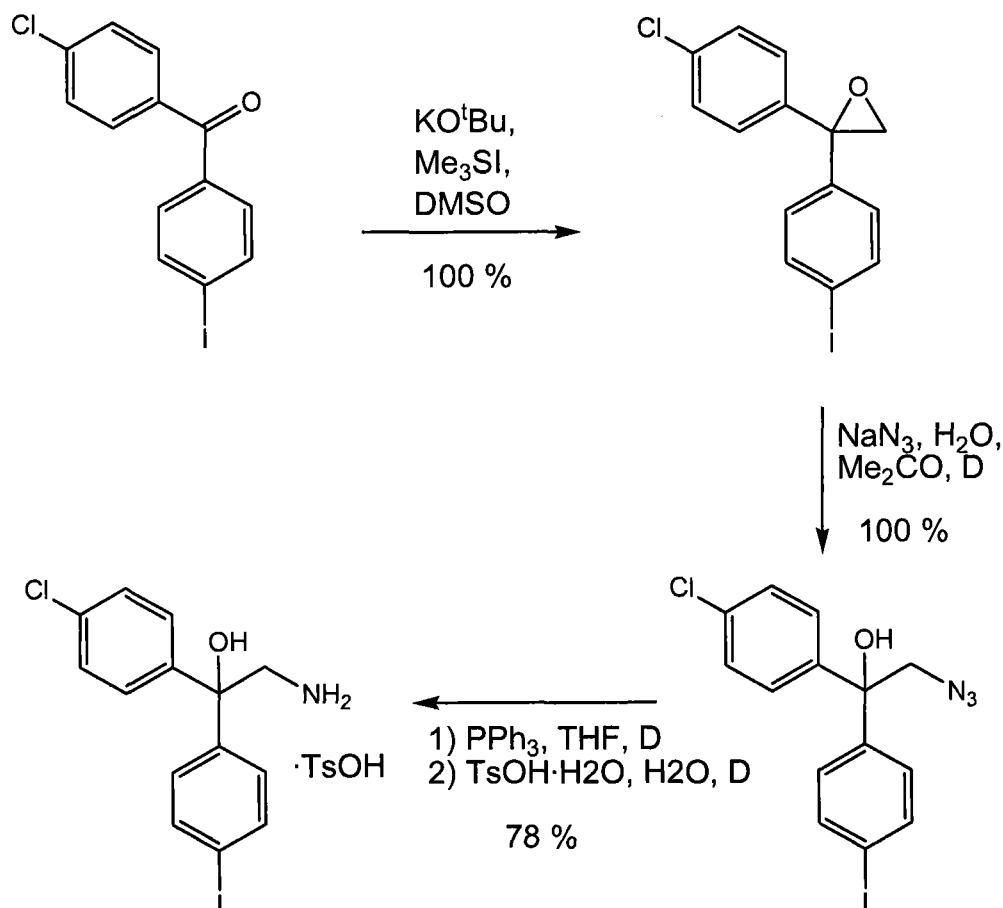
采用文献所述方法, 采用文献方法, 在 *S*-对映异构体的 bPKA-PKB 溶液中进行晶体学分析(Thomas G. Davies 等, "A Structural

Comparison of Inhibitor Binding to PKB, PKA and PKA-PKB Chimera (结合 PKB、PKA 和 PKA-PKB 嵌合体的抑制剂的结构比较)” *J. Mol. Biol.* 2007 年 1 月: 17275837。分析表明存在与蛋白质结合的 S-对映异构体。

## 实施例 2

### 2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-碘-苯基]-乙醇的替代合成法

本实施例描述了实施例 1 中的中间体化合物 1B 即 2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-碘-苯基]-乙醇的制备。



### 2A. (RS)-2-(4-氯苯基)-2-(4-碘苯基)氧杂环丙烷

将叔丁醇钾(18.48g, 165.0mmol)加到快速搅拌的 4-氯-4'-碘二苯甲酮(51.38g, 150.0mmol)和三甲基碘化铈(33.66g, 165.0mmol)的二甲亚砜(200ml)悬浮液中, 将所得混合物在室温下搅拌 3 小时。混合物用乙酸乙酯(500ml)稀释, 依次用水(3 × 500ml)和盐水(500ml)洗涤。分离



出有机层，真空除去溶剂，得到(*RS*)-2-(4-氯苯基)-2-(4-碘苯基)氧杂环丙烷(53.48g, 100%)，为浅黄色油状物，静置时固化，得到类白色固体。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) 7.76 (2H, d), 7.45 (2H, d), 7.34 (2H, d), 7.12 (2H, d), 3.32 (2H, m)。MS: [M-H]<sup>-</sup>355。

### **2B. (*RS*)-2-叠氮基-1-(4-氯苯基)-1-(4-碘苯基)乙醇**

将叠氮化钠(13.86g, 213.2mmol)加到(*RS*)-2-(4-氯苯基)-2-(4-碘苯基)氧杂环丙烷(50.66g, 142.1mmol)与丙酮(400ml)和水(40ml)的混合物中，搅拌混合物并在回流下保持4天。冷却至室温，真空除去丙酮，将残余物溶于乙酸乙酯(500ml)，依次用水(250ml)和盐水(250ml)洗涤，分离出有机层，真空除去溶剂，得到(*RS*)-2-叠氮基-1-(4-氯苯基)-1-(4-碘苯基)乙醇(56.77g, 100%)，为浅黄色油状物，静置时慢慢固化，得到类白色固体。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) 7.68 (2H, d), 7.44 (2H, d), 7.38 (2H, d), 7.24 (2H, d), 6.38 (1H, br s), 3.99 (2H, s)。MS: [M-H]<sup>-</sup>398。

### **2C. (*RS*)-2-铵基-1-(4-氯苯基)-1-(4-碘苯基)乙醇甲苯-4-磺酸盐**

将三苯基膦(31.44g, 120.0mmol)加到(*RS*)-2-叠氮基-1-(4-氯苯基)-1-(4-碘苯基)乙醇(47.94g, 120.0mmol)的四氢呋喃(400ml)溶液中，搅拌混合物并在回流下保持5小时后，加入甲苯-4-磺酸一水合物(22.8g, 120.0mmol)和水(40ml)，搅拌混合物并在回流下再保持16小时。冷却至室温，混合物经真空蒸发至干。加入乙酸乙酯(600ml)，将混合物在室温下快速搅拌30分钟以使固体重新悬浮。通过吸滤收集固体，用乙酸乙酯(3 × 250ml)漂洗，减压吸干后，在真空炉中于50℃干燥过夜，得到(*RS*)-2-铵基-1-(4-氯苯基)-1-(4-碘苯基)乙醇甲苯-4-磺酸盐(51.37g, 78%)，为无色固体。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) 7.73 (2H, d), 7.68 (3H, br s), 7.47 (4H, m), 7.43 (2H, d), 7.28 (2H, d), 7.12 (2H, d), 6.60 (1H, br s), 3.67 (2H, s), 2.30 (3H, s)。MS: [M+H]<sup>+</sup> 374。

可通过实施例1C方法(但使用多一当量的氢氧化钠以将甲苯磺酸盐考虑在内)，将实施例2C的产物转化为N-Boc衍生物，然后如实施

例 1D 和实施例 1E 中所述, 进行 Suzuki 偶合反应后脱去 Boc 保护基, 所得到的对映异构体的混合物通过实施例 1F 的方法拆分, 得到(S)-2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇。

### 生物活性

以下实施例中描述了式(I)化合物的生物活性。另外, 式(I)化合物的生物学性质可参见 John F. Lyons 等人的海报, 第 3512 页, 海报 B 部分, 摘要 B251, AACR-NCI-EORTC International Conference: Molecular Targets and Cancer Therapeutics (AACR-NCI-EORTC 国际会议: 分子靶标和癌症治疗药), 2007 年 10 月 22-26 日, San Francisco, CA (可由 Astex Therapeutics 网站获取拷贝: [www.astex-therapeutics.com](http://www.astex-therapeutics.com) 或 [www.astex-therapeutics.com/investorsandmedia/publications](http://www.astex-therapeutics.com/investorsandmedia/publications))。

### 实施例 3

#### PKA 激酶抑制活性(IC<sub>50</sub>)的测量

可以采用得自 Upstate Biotechnology 的 PKA 催化域(#14-440)来测定式(I)化合物的 PK 抑制活性, 同样得自 Upstate Biotechnology (#12-257) 9 个残基的 PKA 特异性肽(GRTGRRNSI)作为底物。使用在缓冲液中终浓度为 1nM 的酶, 缓冲液包括 20mM MOPS (pH 7.2)、40 $\mu$ M ATP/ $\gamma$ <sup>33</sup>P-ATP 和 50mM 底物。在二甲亚砜(DMSO)溶液中加入化合物至 DMSO 终浓度为 2.5%。使反应继续 20 分钟后, 加入过量的正磷酸猝灭活性。然后在 Millipore MAPH 滤板上将未掺入的  $\gamma$ <sup>33</sup>P-ATP 从磷酸化蛋白中分离出来。洗涤各板, 加入闪烁液后, 将滤板在 Packard Topcount 上进行计数。

计算出 PKA 活性的%抑制并绘制曲线以确定抑制 50% PKA 活性所需的试验化合物的浓度(IC<sub>50</sub>)。

根据下述方案, 发现提供 PKA 的 44%抑制的(S)-2-氨基-1-(4-氯-

苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇的浓度为  $0.03\mu\text{M}$ ，而(*R*)-2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇的  $\text{IC}_{50}$  值  $0.25\mu\text{M}$ 。结果表明在 PKA 实验中，*S*-对映异构体比 *R*-对映异构体明显更有效。

#### **实施例 4**

##### **PKB 激酶抑制活性( $\text{IC}_{50}$ )的测量**

可基本按 Andjelkovic 等人所述方法测定化合物对蛋白激酶 B (PKB)活性的抑制(Mol. Cell. Biol. 19, 5061-5072 (1999))，但使用被称为 PKB-PIF 的融合蛋白，参见 Yang 等人的全文(Nature Structural Biology 9, 940-944 (2002))。蛋白质按 Yang 等人所述进行纯化用 PDK1 激活。获自 Calbiochem (#123900) 的肽 AKTide-2T (H-A-R-K-R-E-R-T-Y-S-F-G-H-H-A-OH)用作底物。使用在缓冲液中终浓度为  $0.6\text{nM}$  的酶，缓冲液包括  $20\text{mM}$  MOPS (pH 7.2)、 $30\mu\text{M}$  ATP/ $\gamma^{33}\text{P}$ -ATP 和  $25\mu\text{M}$  底物。在 DMSO 溶液中加入化合物至 DMSO 终浓度为 2.5%。使反应进行 20 分钟后，加入过量的正磷酸猝灭活性。将反应混合物转移到磷酸纤维素滤板上，肽在该板上结合，洗去未利用的 ATP。洗涤后，加入闪烁液，通过闪烁计数法测定掺入的活性。

计算出 PKB 活性的%抑制并绘制曲线以确定抑制 PKB 活性 50% 所需要的试验化合物的浓度( $\text{IC}_{50}$ )。

根据上述方案，发现(*S*)-2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇的  $\text{IC}_{50}$  值为  $0.01\mu\text{M}$ ，而(*R*)-2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇的  $\text{IC}_{50}$  值为  $0.96\mu\text{M}$ 。结果表明在 PKB 实验中，*S*-对映异构体的功效大约为 *R*-对映异构体的 100 倍。

#### **实施例 5**

##### **hERG 活性**

可按照 M. H. Bridgland-Taylor 等人文章中所述的实验法，测定式 (I)化合物针对 hERG  $\text{K}^+$ 离子通道的活性(*Journal of Pharmacological*

*and Toxicological Methods*, 54 (2006), 189-199)。

## **实施例 6**

### **测定针对细胞色素 P450 的功效**

采用可获自 Invitrogen (Paisley, UK)的 Pan Vera Vivid Cyp450 筛选盒, 来测定实施例 1 的化合物针对细胞色素 P450 (CYP450)酶 1A2、2C9、2C19、3A4 和 2D6 的功效。CYP450 以含有 CYP450 和 NADPH 还原酶的 baculosomes 形式供应, 所使用的底物为荧光 Vivid 底物。最终的反应混合物如下:

#### **1A2**

100mM 磷酸钾(pH 8)、1%乙腈、2 $\mu$ M 1A2 Blue vivid 底物、100 $\mu$ M NADP<sup>+</sup>、4nM CYP450 1A2、2.66mM 葡糖-6-磷酸、0.32U/ml 葡糖-6-磷酸脱氢酶。

#### **2C9**

50mM 磷酸钾(pH 8)、1%乙腈、2 $\mu$ M Green vivid 底物、100 $\mu$ M NADP<sup>+</sup>、8nM CYP450 2C9、2.66mM 葡糖-6-磷酸、0.32U/ml 葡糖-6-磷酸脱氢酶。

#### **2C19**

50mM 磷酸钾(pH 8)、1%乙腈、8 $\mu$ M Blue vivid 底物、100 $\mu$ M NADP<sup>+</sup>、4nM CYP450 2C19、2.66mM 葡糖-6-磷酸、0.32U/ml 葡糖-6-磷酸脱氢酶。

#### **3A4**

100mM 磷酸钾(pH 8)、1%乙腈、10 $\mu$ M 3A4 Blue vivid 底物、100 $\mu$ M NADP<sup>+</sup>、2.5nM CYP450 3A4、2.66mM 葡糖-6-磷酸、0.32U/ml 葡糖-6-磷酸脱氢酶。

## 2D6

100mM 磷酸钾(pH 8)、1%乙腈、5 $\mu$ M 2D6 Blue vivid 底物、100 $\mu$ M NADP<sup>+</sup>、16nM CYP450 2D6、2.66mM 葡萄糖-6-磷酸、0.32U/ml 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶。

在 Fluoroskan 荧光读板仪上以 30 秒钟的间隔监测荧光 20 分钟。激发波长和发射波长对于 1A2、2C19 和 3A4 为 390nm 和 460nm, 对于 2D6 为 390nm 和 485nm, 对于 2C9 为 485nm 和 530nm。由发展曲线确定初速度。

将试验化合物溶于乙腈, 并以 10 $\mu$ M 的浓度针对 CYP450 进行测定。

实施例 1 化合物针对 1A2、2C9、2C19、3A4 和 2D6 的 IC<sub>50</sub> 大于 10 $\mu$ M。

## 实施例 7

### 针对 pSer9 GSK3 $\beta$ 的基于细胞的磷酸-Ser9 Gsk3 $\beta$ ELISA 实验

通过化合物抑制直接下游底物 GSK3 $\beta$  丝氨酸 9 磷酸化的能力, 测定了抑制 U87MG 细胞中 PKB 的作用。将细胞接种到 96 孔板上, 使之复原过夜后加入抑制剂化合物 1 小时。1 小时后, 细胞用 3%低聚甲醛、0.25%戊二醛、0.25%曲通(Triton) X100 和 5% Marvel/TBS-T 固定并封闭。在此之后, 使细胞与针对磷酸化形式的 GSK3 $\beta$  (细胞信号转导)的第一抗体在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。洗涤后, 使用 DELFIA 试剂(Eu-N1 抗兔 IgG 抗体), 使细胞与第二抗体孵育 1 小时, 在激发 340nm 和发射 640nm 下, 在时间分辨荧光读数器上对下列增强板进行读数。所有细胞均获自 ECACC (欧洲细胞培养物保藏中心(European Collection of Cell Cultures))。

## 方案

1. U87MG 细胞以 12,500 细胞/孔接种在 96 孔板上 160 $\mu$ l 培养基/

## 孔中

2. 在 37°C 下孵育 24 小时
3. 细胞用抑制剂和 DMSO 对照处理
4. 在 37°C 下孵育 1 小时
5. 从板中轻弹出培养基, 并用纸吸干
6. 将 100 $\mu$ l 固定溶液加到各孔中(3%低聚甲醛、0.25%戊二醛、0.25%曲通 X100)
7. 在 37°C 下孵育 30 分钟
8. 用水/0.1%吐温(Tween) 20 洗涤 1 次
9. 用 100 $\mu$ l 5%牛奶/TBS-T 封闭
10. 在 37°C 下孵育 30 分钟
11. 将稀释于 5%牛奶/TBS-T 的 100 $\mu$ l 第一抗体加到各孔中(CST #9336 磷酸-Ser9 GSK3 $\beta$ 抗体, 按 1:250 使用)
  - 包括无一抗-仅 5%牛奶/TBS-T 的柱对照
  - 如有需要, 还可包括稀释于 5%牛奶/TBS-T 至与磷酸-Ser9 GSK3 $\beta$ 相同浓度的 Zymed 兔 IgG (02-6102-5mg/ml)对照的柱
12. 在 4°C 下孵育过夜
13. 用水/0.1%吐温 20 洗涤 3 次
14. 将稀释于 Delfia 实验缓冲液中的 100 $\mu$ l 第二抗体加到各孔中(Delfia Eu-N1 抗兔 IgG 抗体, 按 0.30  $\mu$ g/ml 终浓度使用)
15. 在 37°C 下孵育 1 小时
16. 用水/0.1%吐温 20 洗涤 3 次
17. 将 100 $\mu$ l Delfia 增强溶液加到各孔中
18. 在板振荡器上振荡 15 分钟
19. 用 Delfia 程序读数(激发 340nm-发射 640nm) = 萤计数
20. 用水/0.1%吐温 20 洗涤 1 次
21. 将 200 $\mu$ l BCA 溶液加到每孔中(含 1:50 硫酸铜 II 的 BCA)
22. 在 37°C 下孵育 30 分钟

### 23. 在 562nm 下读取吸光度=蛋白质浓度

在上述机械性实验中，发现化合物(S)-2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇的  $IC_{50}$  为  $1.1\mu M$ ，而(R)-2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇的  $IC_{50}$  值  $>50\mu M$ ，即 R-对映异构体基本上无活性。

## 实施例 8

### ROCK-II (h) 实验方案

在下述 ROCK-II 实验中，对化合物(S)-2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇进行了测定。

在  $25\mu l$  最终反应体积中，ROCK-II (h) ( $5-10$  mU)与  $50$  mM Tris (pH 7.5)、 $0.1$  mM EGTA、 $30\mu M$  KEAKEKRQEIQAKRRRLSSLRASTSKSGGSQK、 $10$  mM 乙酸镁和  $[\gamma-^{33}P-ATP]$  (比活约  $500$  cpm/pmol，浓度按需要)一起孵育。通过添加 MgATP 混合物启动反应。在室温下孵育  $40$  分钟后，加入  $5\mu l$   $3\%$  磷酸溶液终止反应。然后将  $10\mu l$  反应物点到 P30 滤膜(filtermat)上，在  $75$  mM 磷酸中洗涤三次达  $5$  分钟，在甲醇中洗涤一次后，干燥，进行闪烁计数。

在本实验中，发现(S)-2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇的  $IC_{50}$  小于上述实验中的  $10$  nM，即低于该实验的极限值。

## 实施例 9

### p70S6K 放射性实验

在下述 p70S6K 放射性实验中，对化合物(S)-2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇进行了测定。

## 概况

P70S6 酶购自 Upstate，在本实验中按  $2$  nM 使用。

底物 S6 混合物(AKRRRLSSLRA)按  $25\mu M$  使用(未测定  $K_m$ )。在

磷酸基转移反应中，ATP 的  $^{33}\text{P}$ - $\gamma$  磷酸被转移到丝氨酸残基上。将反应混合物转移到肽结合的磷酸纤维素滤板上，洗去未利用的 ATP。洗涤后，加入闪烁液，通过闪烁计数测定掺入的活性。

### 试剂

P70S6 激酶(T412E)活性物质得自 Upstate (#14-486)

S6 激酶底物混合物得自 Upstate (#20-122)

实验缓冲液 10mM MOPS (pH 7.0)

0.1mg/ml BSA

0.001% 苜泽(Brij)-35

0.5% 甘油

0.2mM EDTA

10mM  $\text{MgCl}_2$

0.01%  $\beta$ -巯基乙醇

制成 10X 母液，按 2ml 等分量贮存于 20°C 下

15 $\mu\text{M}$  ATP

浓母液中新鲜加入 ATP (10mM 母液)。ATP 随时间分解，尽可能保持在冰上，使用小的等分量以确保母液新鲜。

$\gamma^{33}\text{P}$ -ATP APBiotech (BF1000)

12.5% 正磷酸

0.5% 正磷酸

Microscint 20 (Packard)

### 实验准备

酶混合物(每 1ml - 100 实验点):

743.75 $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$

250 $\mu\text{l}$  10x 实验缓冲液

3.75 $\mu\text{l}$  10mM ATP

2.5 $\mu\text{l}$  酶

底物混合物(每 1ml - 100 实验点):



250 $\mu$ l S6 混合物底物

750 $\mu$ l H<sub>2</sub>O

3.5 $\mu$ l <sup>33</sup>P-ATP (BF1000, 得自 APBiotech)

加入 <sup>33</sup>P-ATP 的量假定是在参考日期的量。确切量需要随时间调节。

化合物 - 在聚丙烯 96 孔板上, 在 DMSO 中制备稀释曲线至 40x 最终实验浓度(最终 DMSO 2.5%)。

1:8 稀释于水中(将 5 $\mu$ l 化合物加到 35 $\mu$ l 水中便足够)。

### 实验设置

在聚丙烯 96 孔板按下列顺序添加:

5 $\mu$ l 化合物

10 $\mu$ l 底物混合物

10 $\mu$ l 酶混合物

ATP 终浓度约为 15 $\mu$ M。计算出放射性 ATP 的 KM 为 47 $\mu$ M。对照是“无化合物”(仅 DMSO)和“无酶”(使用 10 $\mu$ l 酶混合物后加入酶)。用板密封器(plate seal) (TopSeal A-Packard)或滤板塑料盖(中等辐射屏障)覆盖。轻轻振荡混合。在室温下孵育 50 分钟。通过加入 20 $\mu$ l 2% 正磷酸终止反应。

### 过滤步骤

Millipore MAPH NOB 板各孔用 50 $\mu$ l 0.5%正磷酸洗涤缓冲液预湿润。使液体通过 Millipore 真空过滤装置过滤。将停止反应的整个反应物转移到各孔。过滤。用 200 $\mu$ l 0.5%正磷酸洗涤缓冲液洗涤两次。抽真空至近干。移开板支架, 使滤器在纸巾上进一步干燥。将板扣到 Packard TopCount 的托板架上。加入 20 $\mu$ l Microscint 20 闪烁液, 用一张 Topseal A 密封, 在 TopCount 中计数 30 秒钟。

在本实验中, 发现(S)-2-氨基-1-(4-氯-苯基)-1-[4-(1H-吡唑-4-基)-苯基]-乙醇的 IC<sub>50</sub> 为 12nM。

## 药物制剂

### 实施例 10

#### (i) 片剂

将 50mg 化合物与作为稀释剂的 197mg 乳糖(BP)、作为润滑剂的 3mg 硬脂酸镁混合，按已知方式压制成片，来制备含有本文定义的组合物的片剂组合物。

#### (ii) 胶囊剂

将 100mg 本文定义的组合物与 100mg 乳糖混合，将所得到的混合物装填到标准不透明的硬明胶胶囊中，来制备胶囊剂。

#### (iii) 注射剂 I

将本文定义的组合物(例如盐形式)溶于含有 10%丙二醇的水中，来制备通过注射给药的胃肠外组合物，得到 1.5% (重量)的活性化合物浓度。然后将溶液过滤除菌，装入安瓿中后密封。

#### (iv) 注射剂 II

将本文定义的组合物(例如盐形式) (2mg/ml)和甘露醇(50mg/ml)溶于水，将溶液过滤除菌，装入可密封的 1ml 小瓶或安瓿中，来制备注射用胃肠外组合物。

#### v) 注射剂 III

将 20mg/ml 式(I)化合物(例如盐形式)溶于水来制备通过注射或输注用于静脉内递送的制剂。然后将小瓶密封，用压热器灭菌。

#### vi) 注射剂 IV

将 20mg/ml 式(I)化合物(例如盐形式)溶于含有缓冲液(例如 0.2M 乙酸 pH 4.6)的水中，来制备通过注射或输注用于静脉内递送的制剂。然后将小瓶密封，用压热器灭菌。

#### (vii) 皮下注射剂

通过将本文定义的组合物与药用级玉米油混合，来制备用于皮下给药的组合物，得到的浓度为 5mg/ml。将组合物灭菌后装入合适的容

器中。

### **viii) 冻干制剂**

将配好的等量式(I)化合物装入 50ml 小瓶中后冻干。在冻干期间，采用一步冻干方案在-45℃下将组合物冷冻。把温度升到-10℃用于退火，然后降低至-45℃冷冻，接着在+25℃进行初步干燥约 3400 分钟，随后如果温度升到 50℃，则随升温步骤进行二期干燥。初步干燥和二期干燥的压力设为 80 毫托。

### **等同实施方案**

本文所提供的上述实施例用于说明本发明的目的，不得解释为对本发明的范围构成任何限制。显而易见的是，在不偏离本发明的基本原则的情况下，可以对上述本发明和实施例中所列举的具体实施方案进行各种各样的修改和变动。所有这样的修改和变动均包括在本申请内。