



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116348115 A

(43) 申请公布日 2023. 06. 27

(21) 申请号 202180068558.1

Y · 瓦莱兹

(22) 申请日 2021.10.08

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

(30) 优先权数据

司 72001

63/089859 2020.10.09 US

专利代理师 李唐 梅黎

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.Cl.

2023.04.06

A61K 31/498 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2021/059232 2021.10.08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/074617 EN 2022.04.14

(71) 申请人 阿斯利康(英国)有限公司

地址 英国剑桥

申请人 第一三共株式会社

(72) 发明人 J · T · 梅特塔尔二世

权利要求书5页 说明书81页

A · C · B · 阿斯塔内 E · 李奥

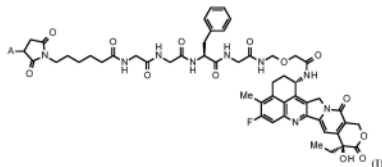
序列表7页 附图18页

(54) 发明名称

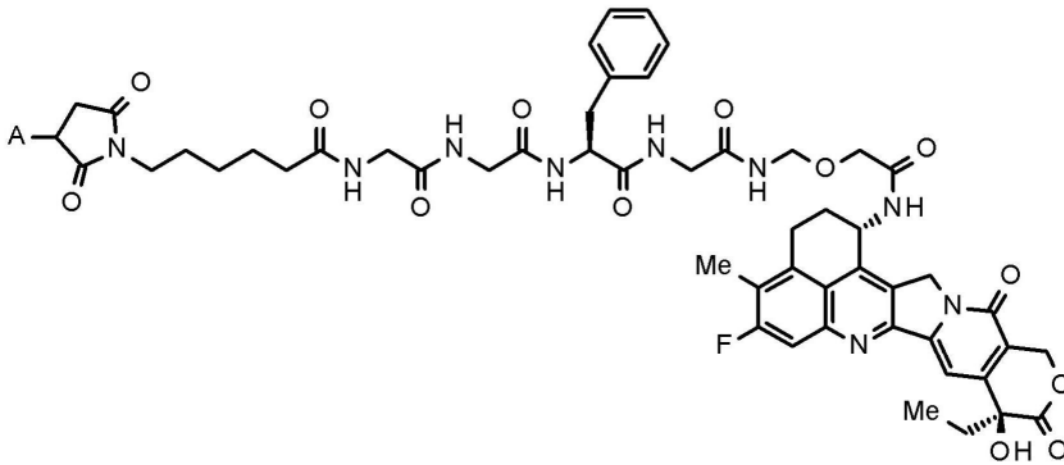
抗体-药物缀合物和PARP1选择性抑制剂的组合

(57) 摘要

提供了用于组合施用抗HER2抗体-药物缀合物与PARP1选择性抑制剂的药物产品。该抗HER2抗体-药物缀合物为其中由下式(其中A表示与抗体的连接位置)表示的药物接头经由硫醚键与抗HER2抗体缀合的抗体-药物缀合物。还提供了治疗用途和方法,其中该抗体-药物缀合物和该PARP1选择性抑制剂被组合施用于受试者:式(I)

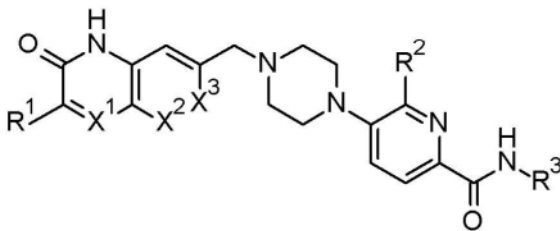


1. 一种药物产品, 该药物产品包含用于组合施用的抗HER2抗体-药物缀合物和PARP1选择性抑制剂, 其中该抗HER2抗体-药物缀合物为其中由下式表示的药物-接头经由硫醚键与抗HER2抗体缀合的抗体-药物缀合物:



其中A表示与抗体的连接位置。

2. 如权利要求1所述的药物产品, 其中该PARP1选择性抑制剂为由下式 (I) 表示的化合物:



(I)

其中:

X^1 和 X^2 各自独立地选自N和C(H),

X^3 独立地选自N和C(R^4), 其中 R^4 是H或氟,

R^1 是 C_{1-4} 烷基或 C_{1-4} 氟烷基,

R^2 独立地选自H、卤代、 C_{1-4} 烷基、和 C_{1-4} 氟烷基, 并且

R^3 是H或 C_{1-4} 烷基,

或其药学上可接受的盐

条件是:

当 X^1 是N时, 则 X^2 是C(H), 并且 X^3 是C(R^4),

当 X^2 是N时, 则 $X^1=C(H)$, 并且 X^3 是C(R^4), 并且

当 X^3 是N时, 则 X^1 和 X^2 均为C(H)。

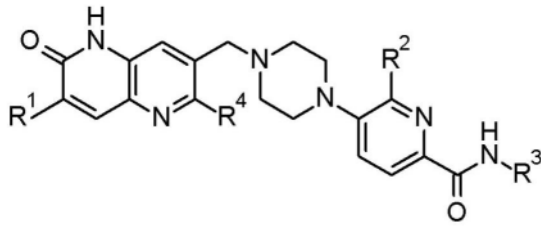
3. 如权利要求2所述的药物产品, 其中, 在式(I)中, R^3 是 C_{1-4} 烷基。

4. 如权利要求2所述的药物产品, 其中, 在式(I)中, R^3 是甲基。

5. 如权利要求2至4中任一项所述的药物产品, 其中, 在式(I)中, R^1 是乙基。

6. 如权利要求1所述的药物产品, 其中该PARP1选择性抑制剂为由下式 (Ia) 表示的化合

物:



(Ia)

其中

R¹是C₁₋₄烷基,

R²选自H、卤代、C₁₋₄烷基、和C₁₋₄氟烷基,

R³是H或C₁₋₄烷基,并且

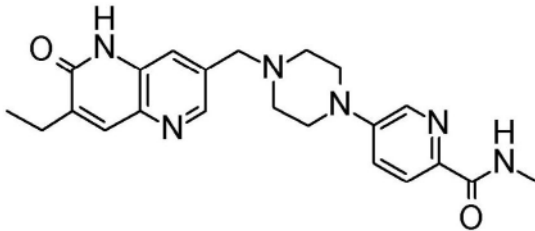
R⁴是H,

或其药学上可接受的盐。

7. 如权利要求6所述的药物产品,其中,在式(Ia)中,R²是H或卤代。

8. 如权利要求6所述的药物产品,其中,在式(Ia)中,R¹是乙基,R²选自H、氯和氟,并且R³是甲基。

9. 如权利要求1所述的药物产品,其中该PARP1选择性抑制剂为由下式表示的AZD5305:



或其药学上可接受的盐。

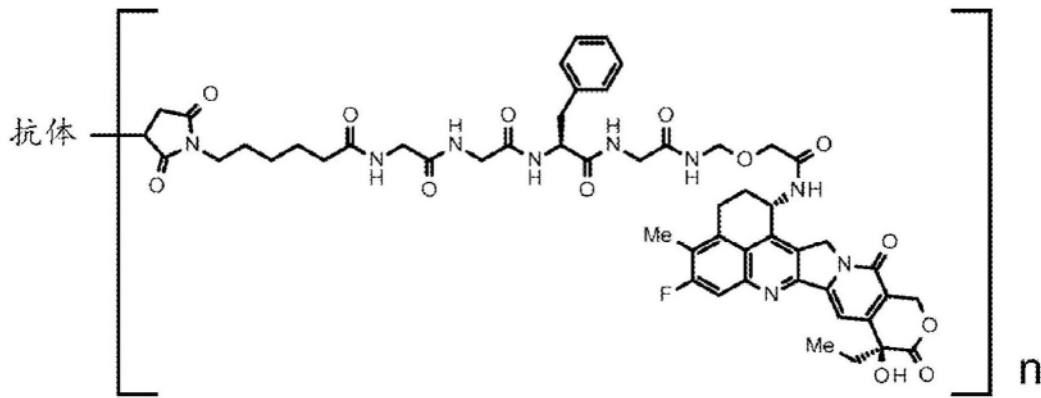
10. 如权利要求1至9中任一项所述的药物产品,其中该抗HER2抗体是包含重链和轻链的抗体,该重链包含:由SEQ ID NO:3表示的氨基酸序列组成的CDRH1、由SEQ ID NO:4表示的氨基酸序列组成的CDRH2和由SEQ ID NO:5表示的氨基酸序列组成的CDRH3,该轻链包含:由SEQ ID NO:6表示的氨基酸序列组成的CDRL1、由SEQ ID NO:7的氨基酸残基1至3所组成的氨基酸序列组成的CDRL2和由SEQ ID NO:8表示的氨基酸序列组成的CDRL3。

11. 如权利要求1至9中任一项所述的药物产品,其中该抗HER2抗体是包含重链和轻链的抗体,该重链包含由SEQ ID NO:9表示的氨基酸序列组成的重链可变区,该轻链包含由SEQ ID NO:10表示的氨基酸序列组成的轻链可变区。

12. 如权利要求1至9中任一项所述的药物产品,其中该抗HER2抗体是包含重链和轻链的抗体,该重链由SEQ ID NO:1表示的氨基酸序列组成,该轻链由SEQ ID NO:2表示的氨基酸序列组成。

13. 如权利要求1至9中任一项所述的药物产品,其中该抗HER2抗体是包含重链和轻链的抗体,该重链由SEQ ID NO:11表示的氨基酸序列组成,该轻链由SEQ ID NO:2表示的氨基酸序列组成。

14. 如权利要求1至13中任一项所述的药物产品,其中该抗HER2抗体-药物缀合物由下式表示:



其中‘抗体’指示经由硫醚键与药物-接头缀合的抗HER2抗体，并且n指示抗体-药物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数，其中n在7至8的范围内。

15. 如权利要求1至14中任一项所述的药物产品，其中该抗HER2抗体-药物缀合物为德卢替康-曲妥珠单抗(DS-8201)。

16. 如权利要求1至15中任一项所述的药物产品，其中该产品是包含该抗HER2抗体-药物缀合物和该PARP1选择性抑制剂的组合物，用于同时施用。

17. 如权利要求1至15中任一项所述的药物产品，其中该产品是组合制剂，该组合制剂包含该抗HER2抗体-药物缀合物和该PARP1选择性抑制剂，用于顺序或同时施用。

18. 如权利要求1至17中任一项所述的药物产品，其中该产品用于治疗癌症。

19. 如权利要求18所述的药物产品，其中该癌症为选自由以下组成的组中的至少一种：乳腺癌、胃癌、结直肠癌、肺癌、食管癌、头颈癌、食管胃连接部腺癌、胆道癌、佩吉特病、胰腺癌、卵巢癌、子宫癌肉瘤、尿路上皮癌、前列腺癌、膀胱癌、胃肠间质瘤、消化道间质瘤、子宫颈癌、鳞状细胞癌、腹膜癌、肝癌、肝细胞癌、子宫体癌、肾癌、外阴癌、甲状腺癌、阴茎癌、白血病、恶性淋巴瘤、浆细胞瘤、骨髓瘤、多形性胶质母细胞瘤、骨肉瘤、肉瘤和黑色素瘤。

20. 如权利要求19所述的药物产品，其中该癌症为乳腺癌。

21. 如权利要求20所述的药物产品，其中该乳腺癌具有IHC 3+的HER2状态评分。

22. 如权利要求20所述的药物产品，其中该乳腺癌为HER2低表达乳腺癌。

23. 如权利要求20所述的药物产品，其中该乳腺癌具有IHC 2+的HER2状态评分。

24. 如权利要求20所述的药物产品，其中该乳腺癌具有IHC 1+的HER2状态评分。

25. 如权利要求20所述的药物产品，其中该乳腺癌具有IHC>0且<1+的HER2状态评分。

26. 如权利要求20所述的药物产品，其中该乳腺癌为三阴性乳腺癌。

27. 如权利要求18所述的药物产品，其中该癌症为胃癌。

28. 如权利要求18所述的药物产品，其中该癌症为结直肠癌。

29. 如权利要求18所述的药物产品，其中该癌症为肺癌。

30. 如权利要求29所述的药物产品，其中该肺癌为非小细胞肺癌。

31. 如权利要求18所述的药物产品，其中该癌症为胰腺癌。

32. 如权利要求18所述的药物产品，其中该癌症为卵巢癌。

33. 如权利要求18所述的药物产品，其中该癌症为前列腺癌。

34. 如权利要求18所述的药物产品，其中该癌症为肾癌。

35. 如权利要求1至17中任一项所定义的药物产品，该药物产品用于治疗癌症。

36. 用于如权利要求35所述使用的药物产品,其中该癌症为选自由以下组成的组中的至少一种:乳腺癌、胃癌、结直肠癌、肺癌、食管癌、头颈癌、食管胃连接部腺癌、胆道癌、佩吉特病、胰腺癌、卵巢癌、子宫癌肉瘤、尿路上皮癌、前列腺癌、膀胱癌、胃肠间质瘤、消化道间质瘤、子宫颈癌、鳞状细胞癌、腹膜癌、肝癌、肝细胞癌、子宫体癌、肾癌、外阴癌、甲状腺癌、阴茎癌、白血病、恶性淋巴瘤、浆细胞瘤、骨髓瘤、多形性胶质母细胞瘤、骨肉瘤、肉瘤和黑色素瘤。

37. 用于如权利要求35所述使用的药物产品,其中该癌症为乳腺癌。

38. 用于如权利要求37所述使用的药物产品,其中该乳腺癌具有IHC 3+的HER2状态评分。

39. 用于如权利要求37所述使用的药物产品,其中该乳腺癌为HER2低表达乳腺癌。

40. 用于如权利要求37所述使用的药物产品,其中该乳腺癌具有IHC 2+的HER2状态评分。

41. 用于如权利要求37所述使用的药物产品,其中该乳腺癌具有IHC 1+的HER2状态评分。

42. 用于如权利要求37所述使用的药物产品,其中该乳腺癌具有IHC >0且<1+的HER2状态评分。

43. 用于如权利要求37所述使用的药物产品,其中该乳腺癌为三阴性乳腺癌。

44. 用于如权利要求35所述使用的药物产品,其中该癌症为胃癌。

45. 用于如权利要求35所述使用的药物产品,其中该癌症为结直肠癌。

46. 用于如权利要求35所述使用的药物产品,其中该癌症为肺癌。

47. 用于如权利要求46所述使用的药物产品,其中该肺癌为非小细胞肺癌。

48. 用于如权利要求35所述使用的药物产品,其中该癌症为胰腺癌。

49. 用于如权利要求35所述使用的药物产品,其中该癌症为卵巢癌。

50. 用于如权利要求35所述使用的药物产品,其中该癌症为前列腺癌。

51. 用于如权利要求35所述使用的药物产品,其中该癌症为肾癌。

52. 抗HER2抗体-药物缀合物或PARP1选择性抑制剂在制备药物中的用途,该药物用于组合施用该抗HER2抗体-药物缀合物和该PARP1选择性抑制剂以治疗癌症,其中该抗HER2抗体-药物缀合物和该PARP1选择性抑制剂如权利要求1至15中任一项所定义。

53. 如权利要求52所述的用途,其中该癌症为选自由以下组成的组中的至少一种:乳腺癌、胃癌、结直肠癌、肺癌、食管癌、头颈癌、食管胃连接部腺癌、胆道癌、佩吉特病、胰腺癌、卵巢癌、子宫癌肉瘤、尿路上皮癌、前列腺癌、膀胱癌、胃肠间质瘤、消化道间质瘤、子宫颈癌、鳞状细胞癌、腹膜癌、肝癌、肝细胞癌、子宫体癌、肾癌、外阴癌、甲状腺癌、阴茎癌、白血病、恶性淋巴瘤、浆细胞瘤、骨髓瘤、多形性胶质母细胞瘤、骨肉瘤、肉瘤和黑色素瘤。

54. 如权利要求52所述的用途,其中该癌症为乳腺癌。

55. 如权利要求54所述的用途,其中该乳腺癌具有IHC 3+的HER2状态评分。

56. 如权利要求54所述的用途,其中该乳腺癌为HER2低表达乳腺癌。

57. 如权利要求54所述的用途,其中该乳腺癌具有IHC 2+的HER2状态评分。

58. 如权利要求54所述的用途,其中该乳腺癌具有IHC 1+的HER2状态评分。

59. 如权利要求54所述的用途,其中该乳腺癌具有IHC >0且<1+的HER2状态评分。

60. 如权利要求54所述的用途,其中该乳腺癌为三阴性乳腺癌。
61. 如权利要求52所述的用途,其中该癌症为胃癌。
62. 如权利要求52所述的用途,其中该癌症为结直肠癌。
63. 如权利要求52所述的用途,其中该癌症为肺癌。
64. 如权利要求63所述的用途,其中该肺癌为非小细胞肺癌。
65. 如权利要求52所述的用途,其中该癌症为胰腺癌。
66. 如权利要求52所述的用途,其中该癌症为卵巢癌。
67. 如权利要求52所述的用途,其中该癌症为前列腺癌。
68. 如权利要求52所述的用途,其中该癌症为肾癌。
69. 如权利要求52至68中任一项所述的用途,其中该药物是包含该抗HER2抗体-药物缀合物和该PARP1选择性抑制剂的组合物,用于同时施用。
70. 如权利要求52至68中任一项所述的用途,其中该药物是组合制剂,该组合制剂包含该抗HER2抗体-药物缀合物和该PARP1选择性抑制剂,用于顺序或同时施用。
71. 一种治疗癌症的方法,该方法包括向有需要的受试者组合施用如权利要求1至15中任一项所定义的抗HER2抗体-药物缀合物和PARP1选择性抑制剂。
72. 如权利要求71所述的方法,其中该癌症为选自由以下组成的组中的至少一种:乳腺癌、胃癌、结直肠癌、肺癌、食管癌、头颈癌、食管胃连接部腺癌、胆道癌、佩吉特病、胰腺癌、卵巢癌、子宫癌肉瘤、尿路上皮癌、前列腺癌、膀胱癌、胃肠间质瘤、消化道间质瘤、子宫颈癌、鳞状细胞癌、腹膜癌、肝癌、肝细胞癌、子宫体癌、肾癌、外阴癌、甲状腺癌、阴茎癌、白血病、恶性淋巴瘤、浆细胞瘤、骨髓瘤、多形性胶质母细胞瘤、骨肉瘤、肉瘤和黑色素瘤。
73. 如权利要求71所述的方法,其中该癌症为乳腺癌。
74. 如权利要求73所述的方法,其中该乳腺癌具有IHC 3+的HER2状态评分。
75. 如权利要求73所述的方法,其中该乳腺癌为HER2低表达乳腺癌。
76. 如权利要求73所述的方法,其中该乳腺癌具有IHC 2+的HER2状态评分。
77. 如权利要求73所述的方法,其中该乳腺癌具有IHC 1+的HER2状态评分。
78. 如权利要求73所述的方法,其中该乳腺癌具有IHC >0且<1+的HER2状态评分。
79. 如权利要求73所述的方法,其中该乳腺癌为三阴性乳腺癌。
80. 如权利要求71所述的方法,其中该癌症为胃癌。
81. 如权利要求71所述的方法,其中该癌症为结直肠癌。
82. 如权利要求71所述的方法,其中该癌症为肺癌。
83. 如权利要求82所述的方法,其中该肺癌为非小细胞肺癌。
84. 如权利要求71所述的方法,其中该癌症为胰腺癌。
85. 如权利要求71所述的方法,其中该癌症为卵巢癌。
86. 如权利要求71所述的方法,其中该癌症为前列腺癌。
87. 如权利要求71所述的方法,其中该癌症为肾癌。
88. 如权利要求71至87中任一项所述的方法,其中该方法包括按顺序施用该抗HER2抗体-药物缀合物和该PARP1选择性抑制剂。
89. 如权利要求71至87中任一项所述的方法,其中该方法包括同时施用该抗HER2抗体-药物缀合物和该PARP1选择性抑制剂。

抗体-药物缀合物和PARP1选择性抑制剂的组合

【技术领域】

[0001] 本披露涉及用于将特异性抗体-药物缀合物与PARP1选择性抑制剂组合施用的药物产品,该特异性抗体-药物缀合物具有经由接头结构与抗HER2抗体缀合的抗肿瘤药物,本披露还涉及治疗用途和方法,其中该特异性抗体-药物缀合物和PARP1选择性抑制剂被组合施用于受试者。

【背景技术】

[0002] 酶的聚(ADP核糖)聚合酶(PARP)家族在许多细胞过程(如复制、重组、染色质重塑和DNA损伤修复)中发挥重要作用(O'Connor MJ, Mol Cell [分子细胞] (2015) 60 (4) :547-60)。在例如WO 2004/080976中教导了PARP抑制剂的实例及其作用机理。

[0003] PARP1和PARP2因其在DNA损伤修复中的作用而是被广泛研究的PARP。PARP1被DNA损伤断裂激活,并起着催化聚(ADP-核糖)(PAR)链添加至靶蛋白的作用。这种翻译后修饰(称为PAR基化(PARylation))介导了另外的DNA修复因子募集到DNA损伤中。完成该募集任务后,PARP自动PAR基化触发结合的PARP从DNA释放,从而允许使用其他DNA修复蛋白以完成修复。因此,PARP与受损位点的结合、其催化活性以及最终从DNA释放都是癌细胞应对化学治疗剂和放射疗法引起的DNA损伤的重要步骤(Bai P. Biology of poly(ADP-ribose) polymerases: the factotums of cell maintenance [聚(ADP-核糖)聚合酶的生物学: 细胞维持的总管]. Mol Cell [分子细胞] 2013; 38: 947-58)。

[0004] PARP家族酶的抑制已被用作通过使互补DNA修复途径失活而选择性杀死癌细胞的策略。许多临床前和临床研究已经表明, 荷BRCA1或BRCA2(参与通过同源重组(HR)而修复双链DNA断裂(DSB)的关键肿瘤抑制蛋白)的有害改变的肿瘤细胞对DNA修复酶的PARP家族的小分子抑制剂选择性敏感。此类肿瘤的同源重组修复(HRR)途径有缺陷, 并且其存活取决于PARP酶的功能。尽管PARP抑制剂疗法主要靶向BRCA突变的癌症, 但是PARP抑制剂已在非BRCA突变型肿瘤中进行了临床测试, 这些肿瘤表现出同源重组缺陷(HRD) (Turner N, Tutt A, Ashworth A. Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers [散发性癌症中 'BRCAness' 的标志]. Nat Rev Cancer [癌症自然评论] 2004; 4: 8149)。

[0005] 据信, 与非选择性PARP抑制剂相比, 对PARP1选择性提高的PARP抑制剂可具有提高的功效和降低的毒性。还据信对PARP1的选择性强抑制将导致PARP1捕获在DNA上, 这通过使S期中的复制叉坍塌而导致DNA双链断裂(DSB)。还据信PARP1-DNA捕获是选择性杀死具有HRD的肿瘤细胞的有效机制。

[0006] 由与抗体缀合的细胞毒性药物组成的抗体-药物缀合物(ADC)可以选择性地将药物递送至癌细胞, 并且因此预期会引起药物在癌细胞内累积并杀死癌细胞(Ducry, L. 等人, Bioconjugate Chem. [生物共轭化学] (2010) 21, 5-13; Alley, S.C. 等人, Current Opinion in Chemical Biology [当代化学生物学观点] (2010) 14, 529-537; Damle N.K. Expert Opin. Biol. Ther. [生物治疗专家观点] (2004) 4, 1445-1452; Senter P.D. 等人, Nature Biotechnology [自然-生物技术] (2012) 30, 631-637; Burris HA. 等人, J. Clin. Oncol. [临

床肿瘤学杂志] (2011) 29(4):398-405)。

[0007] 一种此类抗体-药物缀合物为德卢替康-曲妥珠单抗(trastuzumab deruxtecan), 其由靶向HER2的抗体和依喜替康的衍生物组成(Ogitani Y.等人,Clinical Cancer Research[临床癌症研究] (2016) 22(20), 5097-5108; Ogitani Y.等人,Cancer Science[癌症科学] (2016) 107, 1039-1046)。德卢替康-曲妥珠单抗(Enhertu[®], DS-8201)已经在表达HER2的实体瘤(包括乳腺癌、胃癌、结直肠癌和非小细胞肺癌)中显示出显著的临床功效。显著地,在上述适应症中,DS-8201已经在HER2低肿瘤中显示出有希望的活性。需要识别DS-8201的组合配偶体以增强功效、增加治疗响应的持久性、改善对患者的耐受性和/或降低剂量依赖性毒性。

[0008] 尽管抗体-药物缀合物(如德卢替康-曲妥珠单抗)和PARP1抑制剂有治疗潜力,但尚未发表任何文献描述证明组合使用抗体-药物缀合物和PARP1选择性抑制剂的优异效果的测试结果。

[0009] 因此,仍然需要改进的治疗组合物和方法,其可以增强现有癌症治疗剂的功效、增加治疗响应的持久性、改善对患者的耐受性和/或降低剂量依赖性毒性。

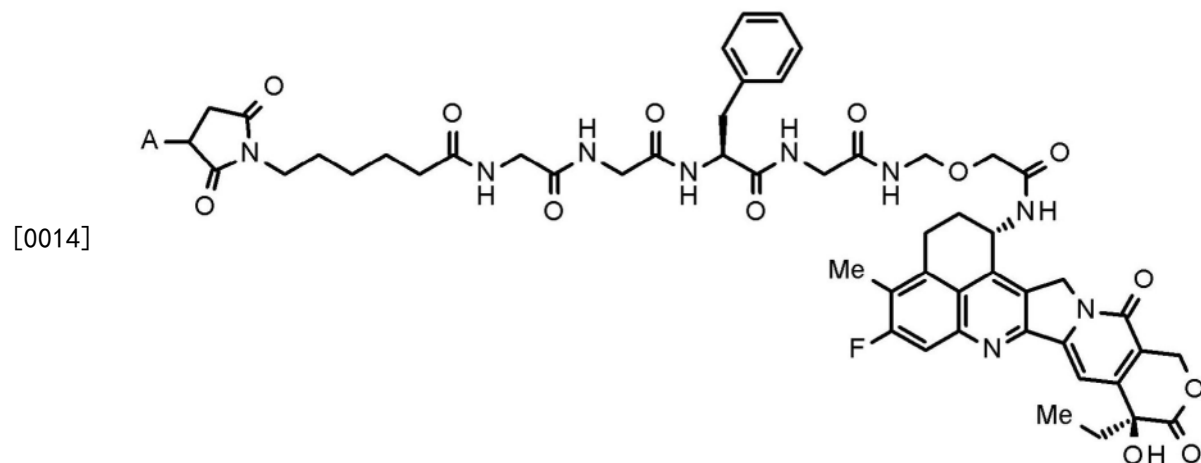
【发明内容】

[0010] 本披露中使用的抗体-药物缀合物(包括拓扑异构酶I抑制剂依喜替康的衍生物的抗HER2抗体-药物缀合物,作为成分)已被证实当单独施用,在治疗某些癌症诸如乳腺癌和胃癌时表现出优异的抗肿瘤效果。此外,已经证实PARP1抑制剂在某些癌症的治疗中表现出抗肿瘤作用。然而,需要提供药物和治疗,其可以在癌症治疗中获得优异的抗肿瘤效果,例如增强的功效、增加的治疗响应持久性和/或降低的剂量依赖性毒性。

[0011] 本披露提供了药物产品,其通过将抗HER2抗体-药物缀合物与PARP1选择性抑制剂组合施用,在癌症治疗中表现出优异的抗肿瘤效果。本披露还提供了治疗用途和方法,其中将抗HER2抗体-药物缀合物和PARP1选择性抑制剂组合施用于受试者。

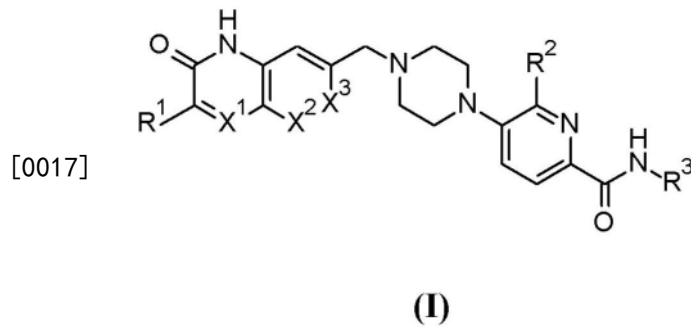
[0012] 具体地,本披露涉及以下[1]至[54]:

[0013] [1]一种药物产品,该药物产品包含用于组合施用的抗HER2抗体-药物缀合物和PARP1选择性抑制剂,其中该抗HER2抗体-药物缀合物为其中由下式表示的药物-接头经由硫醚键与抗HER2抗体缀合的抗体-药物缀合物:



[0015] 其中A表示与抗体的连接位置;

[0016] [2]如[1]所述的药物产品,其中该PARP1选择性抑制剂为由下式(I)表示的化合物:



[0018] 其中:

[0019] X^1 和 X^2 各自独立地选自N和C(H),

[0020] X^3 独立地选自N和C(R^4),其中 R^4 是H或氟,

[0021] R^1 是 C_{1-4} 烷基或 C_{1-4} 氟烷基,

[0022] R^2 独立地选自H、卤代、 C_{1-4} 烷基、和 C_{1-4} 氟烷基,并且

[0023] R^3 是H或 C_{1-4} 烷基,

[0024] 或其药学上可接受的盐

[0025] 条件是:

[0026] 当 X^1 是N时,则 X^2 是C(H),并且 X^3 是C(R^4),

[0027] 当 X^2 是N时,则 $X^1=C(H)$,并且 X^3 是C(R^4),并且

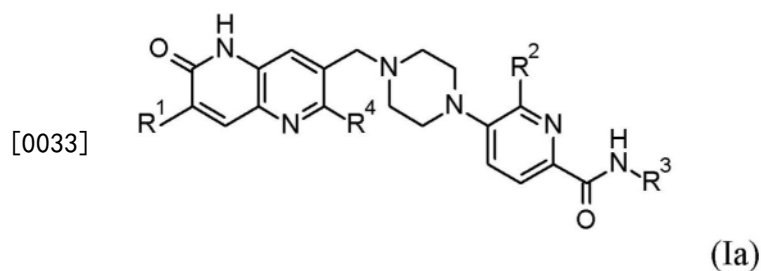
[0028] 当 X^3 是N时,则 X^1 和 X^2 均为C(H):

[0029] [3]如[2]所述的药物产品,其中,在式(I)中, R^3 是 C_{1-4} 烷基;

[0030] [4]如[3]所述的药物产品,其中,在式(I)中, R^3 是甲基;

[0031] [5]如[2]至[4]中任一项所述的药物产品,其中,在式(I)中, R^1 是乙基;

[0032] [6]如[1]所述的药物产品,其中该PARP1选择性抑制剂为由下式(Ia)表示的化合物:



[0034] 其中

[0035] R^1 是 C_{1-4} 烷基,

[0036] R^2 选自H、卤代、 C_{1-4} 烷基、和 C_{1-4} 氟烷基,

[0037] R^3 是H或 C_{1-4} 烷基,并且

[0038] R^4 是H,

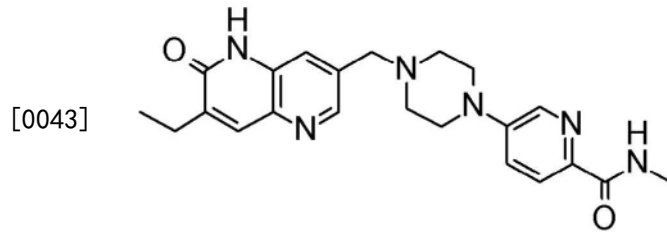
[0039] 或其药学上可接受的盐;

[0040] [7]如[6]所述的药物产品,其中,在式(Ia)中, R^2 是H或卤代;

[0041] [8]如[6]所述的药物产品,其中,在式(Ia)中, R^1 是乙基, R^2 选自H、氯和氟,并且 R^3

是甲基；

[0042] [9]如[1]所述的药物产品，其中PARP1选择性抑制剂为AZD5305，也称为AZ14170049，由下式表示：



[0044] 或其药学上可接受的盐；

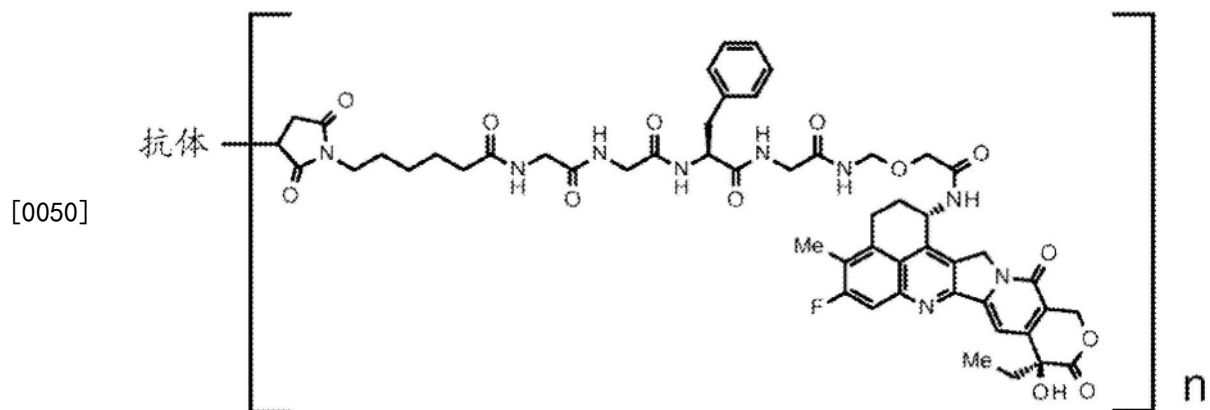
[0045] [10]如[1]至[9]中任一项所述的药物产品，其中该抗HER2抗体是包含重链和轻链的抗体，该重链包含：由SEQ ID NO:3[=SEQ ID NO:1的氨基酸残基26至33]表示的氨基酸序列组成的CDRH1、由SEQ ID NO:4[=SEQ ID NO:1的氨基酸残基51至58]表示的氨基酸序列组成的CDRH2和由SEQ ID NO:5[=SEQ ID NO:1的氨基酸残基97至109]表示的氨基酸序列组成的CDRH3，该轻链包含：由SEQ ID NO:6[=SEQ ID NO:2的氨基酸残基27至32]表示的氨基酸序列组成的CDRL1、由SEQ ID NO:7[=SEQ ID NO:2的氨基酸残基50至52]的氨基酸残基1至3所组成的氨基酸序列组成的CDRL2和由SEQ ID NO:8[=SEQ ID NO:2的氨基酸残基89至97]表示的氨基酸序列组成的CDRL3；

[0046] [11]如[1]至[9]中任一项所述的药物产品，其中抗HER2抗体是包含重链和轻链的抗体，该重链包含由SEQ ID NO:9[=SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至120]表示的氨基酸序列组成的重链可变区，该轻链包含由SEQ ID NO:10[=SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至107]表示的氨基酸序列组成的轻链可变区；

[0047] [12]如[1]至[9]中任一项所述的药物产品，其中抗HER2抗体为包含重链和轻链的抗体，该重链由SEQ ID NO:1表示的氨基酸序列组成，该轻链由SEQ ID NO:2表示的氨基酸序列组成；

[0048] [13]如[1]至[9]中任一项所述的药物产品，其中抗HER2抗体为包含重链和轻链的抗体，该重链由SEQ ID NO:11[=SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至449]表示的氨基酸序列组成，该轻链由SEQ ID NO:2表示的氨基酸序列组成；

[0049] [14]如[1]至[13]中任一项所述的药物产品，其中抗HER2抗体-药物缀合物由下式表示：



[0051] 其中‘抗体’指示经由硫醚键与药物-接头缀合的抗HER2抗体，并且n指示抗体-药

物缀合物中每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数,其中n在7至8的范围内;

[0052] [15]如[1]至[14]中任一项所述的药物产品,其中抗HER2抗体-药物缀合物为德卢替康-曲妥珠单抗(DS-8201);

[0053] [16]如[1]至[15]中任一项所述的药物产品,其中该产品是包含抗HER2抗体-药物缀合物和PARP1选择性抑制剂的组合物,用于同时施用;

[0054] [17]如[1]至[15]中任一项所述的药物产品,其中该产品是组合制剂,该组合制剂包含抗HER2抗体-药物缀合物和PARP1选择性抑制剂,用于顺序或同时施用;

[0055] [18]如[1]至[17]中任一项所述的药物产品,其中该产品用于治疗癌症;

[0056] [19]如[18]所述的药物产品,其中该癌症为选自由以下组成的组中的至少一种:乳腺癌、胃癌、结直肠癌、肺癌、食管癌、头颈癌、食管胃连接部腺癌、胆道癌、佩吉特病、胰腺癌、卵巢癌、子宫癌肉瘤、尿路上皮癌、前列腺癌、膀胱癌、胃肠间质瘤、消化道间质瘤、子宫颈癌、鳞状细胞癌、腹膜癌、肝癌、肝细胞癌、子宫体癌、肾癌、外阴癌、甲状腺癌、阴茎癌、白血病、恶性淋巴瘤、浆细胞瘤、骨髓瘤、多形性胶质母细胞瘤、骨肉瘤、肉瘤和黑色素瘤;

[0057] [20]如[19]所述的药物产品,其中该癌症为乳腺癌;

[0058] [21]如[20]所述的药物产品,其中该乳腺癌具有IHC 3+的HER2状态评分;

[0059] [22]如[20]所述的药物产品,其中该乳腺癌为HER2低表达乳腺癌;

[0060] [23]如[20]所述的药物产品,其中该乳腺癌具有IHC 2+的HER2状态评分;

[0061] [24]如[20]所述的药物产品,其中该乳腺癌具有IHC 1+的HER2状态评分;

[0062] [25]如[20]所述的药物产品,其中该乳腺癌具有IHC>0且<1+的HER2状态评分;

[0063] [26]如[20]所述的药物产品,其中该乳腺癌为三阴性乳腺癌;

[0064] [27]如[18]所述的药物产品,其中该癌症为胃癌;

[0065] [28]如[18]所述的药物产品,其中该癌症为结直肠癌;

[0066] [29]如[18]所述的药物产品,其中该癌症为肺癌;

[0067] [30]如[29]所述的药物产品,其中该肺癌为非小细胞肺癌;

[0068] [31]如[18]所述的药物产品,其中该癌症为胰腺癌;

[0069] [32]如[18]所述的药物产品,其中该癌症为卵巢癌;

[0070] [33]如[18]所述的药物产品,其中该癌症为前列腺癌;

[0071] [34]如[18]所述的药物产品,其中该癌症为肾癌;

[0072] [35]如[1]至[17]中任一项所定义的药物产品,该药物产品用于治疗癌症;

[0073] [36]用于如[25]所述使用的药物产品,其中该癌症如[19]至[34]中任一项所定义;

[0074] [37]抗HER2抗体-药物缀合物或PARP1选择性抑制剂在制备药物中的用途,该药物用于组合施用该抗HER2抗体-药物缀合物和该PARP1选择性抑制剂以治疗癌症,其中该抗HER2抗体-药物缀合物和该PARP1选择性抑制剂如[1]至[15]中任一项所定义;

[0075] [38]如[37]所述的用途,其中该癌症如[19]至[34]中任一项所定义;

[0076] [39]如[37]或[38]所述的用途,其中该药物是包含抗HER2抗体-药物缀合物和PARP1选择性抑制剂的组合物,用于同时施用;

[0077] [40]如[37]或[38]所述的用途,其中该药物是组合制剂,该组合制剂包含抗HER2抗体-药物缀合物和PARP1选择性抑制剂,用于顺序或同时施用;

[0078] [41]一种与PARP1选择性抑制剂组合用于治疗癌症的抗HER2抗体-药物缀合物,其中抗HER2抗体-药物缀合物和PARP1选择性抑制剂如[1]至[15]中任一项所定义;

[0079] [42]用于如[41]所述使用的抗HER2抗体-药物缀合物,其中该癌症如[19]至[34]中任一项所定义;

[0080] [43]用于如[41]或[42]所述使用的抗HER2抗体-药物缀合物,其中该使用包括按顺序施用抗HER2抗体-药物缀合物和PARP1选择性抑制剂;

[0081] [44]用于如[41]或[42]所述使用的抗HER2抗体-药物缀合物,其中该使用包括同时施用抗HER2抗体-药物缀合物和PARP1选择性抑制剂;

[0082] [45]一种用于受试者的癌症治疗的抗HER2抗体-药物缀合物,其中所述治疗包括向所述受试者分开、顺序或同时施用i)所述抗HER2抗体-药物缀合物,和ii)PARP1选择性抑制剂,其中所述抗HER2抗体-药物缀合物和所述PARP1选择性抑制剂如[1]至[15]中任一项所定义;

[0083] [46]一种与抗HER2抗体-药物缀合物组合用于癌症治疗的PARP1选择性抑制剂,其中该抗HER2抗体-药物缀合物和该PARP1选择性抑制剂如[1]至[15]中任一项所定义;

[0084] [47]用于如[46]所述使用的PARP1选择性抑制剂,其中该癌症如[19]至[34]中任一项所定义;

[0085] [48]用于如[46]或[47]所述使用的PARP1选择性抑制剂,其中该使用包括按顺序施用抗HER2抗体-药物缀合物和PARP1选择性抑制剂;

[0086] [49]用于如[46]或[47]所述使用的PARP1选择性抑制剂,其中该使用包括同时施用抗HER2抗体-药物缀合物和PARP1选择性抑制剂;

[0087] [50]一种用于受试者的癌症治疗的PARP1选择性抑制剂,其中所述治疗包括向所述受试者分开、顺序或同时施用i)所述PARP1选择性抑制剂,和ii)抗HER2抗体-药物缀合物,其中所述PARP1选择性抑制剂和所述抗HER2抗体-药物缀合物如[1]至[15]中任一项所定义;

[0088] [51]一种治疗癌症的方法,该方法包括向有需要的受试者组合施用如[1]至[15]中任一项所定义的抗HER2抗体-药物缀合物和PARP1选择性抑制剂;

[0089] [52]如[51]所述的方法,其中该癌症如[19]至[34]中任一项所定义;

[0090] [53]如[51]或[52]所述的方法,其中该方法包括按顺序施用抗HER2抗体-药物缀合物和PARP1选择性抑制剂;以及

[0091] [54]如[51]或[52]所述的方法,其中该方法包括同时施用抗HER2抗体-药物缀合物和PARP1选择性抑制剂。

[0092] [披露的有利效果]

[0093] 本披露提供了药物产品,其中将抗HER2抗体-药物缀合物和PARP1选择性抑制剂组合施用,该抗HER2抗体-药物缀合物具有经由接头结构与抗HER2抗体缀合的抗肿瘤药物,并且本披露还提供了治疗用途和方法,其中将特异性抗体-药物缀合物和PARP1选择性抑制剂组合施用于受试者。因此,本披露可以提供在癌症治疗中可以获得优异抗肿瘤效果的药物和治疗。

【附图说明】

- [0094] [图1]图1是显示抗HER2抗体的重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)的图。
- [0095] [图2]图2是显示抗HER2抗体的轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)的图。
- [0096] [图3]图3是显示重链CDRH1的氨基酸序列(SEQ ID NO:3[=SEQ ID NO:1的氨基酸残基26至33])的图。
- [0097] [图4]图4是显示重链CDRH2的氨基酸序列(SEQ ID NO:4[=SEQ ID NO:1的氨基酸残基51至58])的图。
- [0098] [图5]图5是显示重链CDRH3的氨基酸序列(SEQ ID NO:5[=SEQ ID NO:1的氨基酸残基97至109])的图。
- [0099] [图6]图6是显示轻链CDRL1的氨基酸序列(SEQ ID NO:6[=SEQ ID NO:2的氨基酸残基27至32])的图。
- [0100] [图7]图7是显示包含轻链CDRL2(SAS)的氨基酸序列的氨基酸序列(SEQ ID NO:7[=SEQ ID NO:2的氨基酸残基50至56])的图。
- [0101] [图8]图8是显示轻链CDRL3的氨基酸序列(SEQ ID NO:8[=SEQ ID NO:2的氨基酸残基89至97])的图。
- [0102] [图9]图9是显示重链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:9[=SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至120])的图。
- [0103] [图10]图10是显示轻链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO:10[=SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至107])的图。
- [0104] [图11]图11是显示重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:11[=SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至449])的图。
- [0105] [图12A和12B]图12A和12B是显示在具有高HER2表达的细胞系中,通过将DS-8201与AZD5305(AZ14170049;PARP1选择性抑制剂)组合的高通量筛选而获得的组合矩阵的图。
- [0106] [图13A和13B]图13A和13B是显示在具有低HER2表达的细胞系中,通过将DS-8201与AZD5305组合的高通量筛选而获得的组合矩阵的图。
- [0107] [图14]图14是显示在用DS-8201与AZD5305组合处理的细胞系中,组合E_{max}和Loewe协同评分的图。
- [0108] [图15A和15B]图15A和15B是显示在具有低或高HER2表达的细胞系中,用于将DS-8201与AZD5305组合的组合矩阵的图。
- [0109] [图16A和16B]图16A和16B分别显示合成实例4形式A的X-射线衍射图和代表性DSC迹线。
- [0110] [图17]图17是显示单独使用DS-8201或AZD5305或者组合使用DS-8201与AZD5305进行体内治疗的肿瘤体积的图。虚线表示AZD5305给药期的结束。
- [0111] [图18A、18B和18C]图18A、18B和18C是显示在具有低或高HER2表达的NSCLC细胞系中,通过将DS-8201与AZD5305组合的高通量筛选而获得的组合矩阵的图。
- [0112] [图19A、19B和19C]图19A、19B和19C是显示在具有HER2突变型表达的泌尿道癌细胞系中,通过将DS-8201与AZD5305组合的高通量筛选而获得的组合矩阵的图。
- [0113] 为了更好地理解本披露,首先定义某些术语。另外的定义贯穿详细说明列出。
- [0114] 在详细描述本披露之前,应理解的是本披露不限于特定的组合物或方法步骤,因

为这些组合物或方法步骤可以变化。如在本说明书和随附权利要求书中所使用,除非上下文另外明确说明,否则单数形式“一个/种(a/an)”和“该(the)”包括复数参考对象。术语“一个”(或“一种”)以及术语“一个或多个”和“至少一个”在本文可以互换使用。

[0115] 此外,“和/或”在本文使用时被认为是两个所指定的特征或组分中每一者与或不与另一者一起的具体披露。因此,术语“和/或”如在词组如“A和/或B”中使用时在此旨在包括“A和B”、“A或B”、“A”(单独)、以及“B”(单独)。同样,如在诸如“A、B和/或C”等短语中所用的术语“和/或”意图涵盖以下方面中的每一个:A、B、和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);和C(单独)。

[0116] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有如本披露所属领域的普通技术人员通常理解的含义。例如,Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology[简明生物医学和分子生物学词典],Juo,Pei-Show,第2版,2002,CRC出版社(CRC Press);Dictionary of Cell and Molecular Biology[细胞和分子生物学词典],第3版,1999,Academic Press[学术出版社];以及Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology[生物化学和分子生物学牛津词典],修订版,2000,Oxford University Press[牛津大学出版社]为技术人员提供在本披露中使用的术语中的许多术语的通用词典注释。

[0117] 单位、前缀和符号是以它们的国际单位系统(Système International de Unites)(SI)接受的形式表示。数值范围包括限定该范围的数字。

[0118] 应当理解,无论在什么情况下本文用语言“包含”描述各个方面时,也提供了用“由.....组成”和/或“主要由.....组成”描述的其他类似方面。

[0119] 术语“抑制”、“阻止”、以及“阻遏”在此可互换地使用,并且指生物活性的任何统计学显著的降低,包括活性的完全阻止。例如,“抑制”可以指生物活性的约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的降低。细胞增殖可以使用本领域公认的技术测定,这些技术测量细胞分裂速率、和/或经历细胞分裂的细胞在细胞群中的分数、和/或由于终末分化或细胞死亡(例如,胸苷掺入)自细胞群的细胞损失的速率。

[0120] 术语“受试者”是指有待成为特定治疗的接受者的任何动物(例如,哺乳动物),包括但不限于人类、非人类灵长动物、啮齿类等。典型地,术语“受试者”和“患者”在本文关于人类受试者可互换地使用。

[0121] 术语“药物产品”是指此类制剂,其形式允许活性成分的生物活性,其作为含有所有活性成分的组合物(用于同时施用),或者作为各自含有至少一种但不是所有活性成分的单组合物的组合(组合制剂)(用于顺序或同时施用),并且其不含有对将施用该产品的受试者具有不可接受的毒性的额外组分。此类产品可以是无菌的。“同时施用”是指活性成分同时施用。“顺序施用”是指活性成分按任一顺序、以各次施用之间的时间间隔相继地施用。时间间隔可以是例如小于24小时,优选小于6小时,更优选小于2小时。

[0122] 术语如“治疗(treating或treatment或to treat)”或“减轻(alleviating或to alleviate)”是指(1)使得诊断的病理性病症或障碍被治愈、减缓、减轻症状、和/或停止进展的治疗措施以及(2)防止和/或减缓所靶向的病理学病症或障碍的发展的预防性或防止性措施。因此,需要治疗的那些包括已患有障碍的那些;倾向于患有障碍的那些;以及在他们中需要预防障碍的那些。在某些方面中,如果患者示出例如,总的、部分的、或瞬时的某一

类型癌症的缓解,则根据本披露的方法成功“治疗”了该受试者的癌症。

[0123] 术语“癌症”、“肿瘤”、“癌性”、和“恶性”指或描述在哺乳动物中典型特征为不受控制的细胞生长的生理病症。癌症的实例包括但不限于乳腺癌、胃癌、结直肠癌、肺癌、食管癌、头颈癌、食管胃连接部腺癌、胆道癌、佩吉特病、胰腺癌、卵巢癌、子宫癌肉瘤、尿路上皮癌、前列腺癌、膀胱癌、胃肠间质瘤、消化道间质瘤、子宫颈癌、鳞状细胞癌、腹膜癌、肝癌、肝细胞癌、子宫体癌、肾癌、外阴癌、甲状腺癌、阴茎癌、白血病、恶性淋巴瘤、浆细胞瘤、骨髓瘤、多形性胶质母细胞瘤、骨肉瘤、肉瘤和黑色素瘤。癌症包括血液系统恶性肿瘤,如急性髓系白血病、多发性骨髓瘤、慢性淋巴细胞白血病、弥漫大B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤以及实体瘤如乳腺癌、肺癌、成神经细胞瘤和结肠癌。

[0124] 如本文使用的术语“细胞毒剂”是广泛定义的并且是指抑制或阻止细胞的功能和/或造成细胞破坏(细胞死亡)、和/或施加抗肿瘤/抗增殖作用的一种物质。例如,细胞毒性试剂直接或间接阻止赘生性肿瘤细胞的发育、成熟、或扩散。该术语还包括仅引起抑制细胞生长效应并且不仅仅是细胞毒性效应的此类试剂。该术语包括如下指定的化疗剂,连同其他HER2拮抗剂、抗血管生成剂、酪氨酸激酶抑制剂、蛋白激酶A抑制剂,细胞因子家族的成员、放射性同位素、以及毒素如细菌、真菌、植物或动物来源的酶促活性毒素。

[0125] 术语“化疗剂”是包括天然或合成的化学化合物的术语“细胞毒剂”的子集。

[0126] 根据本披露的方法或用途,本披露的化合物可以施用于患者,以促进对于癌症的积极治疗响应。术语对于癌症治疗的“积极治疗响应”是指与该疾病相关的症状的改进。例如,疾病的改进可以表征为完全响应。术语“完全响应”是指没有临床上可检测的疾病,并且任何先前的测试结果都正常。可替代地,疾病的改善可以被归类为部分响应。“积极治疗响应”涵盖从本披露的化合物的施用得到的癌症的进展和/或持续时间的减少或抑制,癌症的严重性的减少或改进、和/或其一种或多种症状的改进。在特定的方面,此类术语是指施用本披露的化合物之后以下一种、两种或三种或更多种结果:

[0127] (1) 癌细胞群的稳定化、减少或消除;

[0128] (2) 癌症生长的稳定或减少;

[0129] (3) 癌症形成受损;

[0130] (4) 原发性、区域性和/或转移性癌症的根除、去除,或控制;

[0131] (5) 死亡率降低;

[0132] (6) 无疾病、无复发、无进展、和/或总的存活、持续时间或比率的增加;

[0133] (7) 响应率、响应的持久性或响应或处于缓解的患者数量的增加;

[0134] (8) 住院率的降低,

[0135] (9) 住院时间的减少,

[0136] (10) 癌症的尺寸维持并且不增加或增加少于10%、优选小于5%、优选小于4%、优选小于2%,以及

[0137] (11) 处于缓解的患者数量的增加。

[0138] (12) 否则治疗癌症要求的辅助治疗(如,化疗或激素治疗)的数目的减少。

[0139] 临床响应可以使用筛选技术评定,如PET、磁共振成像(MRI)扫描、x-射线照相成像、计算机断层成像(CT)扫描、流式细胞计量术或荧光活化细胞分选仪(FACS)分析、组织学、宏观病理学、和血液化学,包括但不限于可通过ELISA、RIA、色谱法等检测的变化。除了

这些积极治疗响应之外,正经受治疗的受试者可以经历与该疾病相关的症状的改进的有益效果。

[0140] 烷基基团和部分是直链的或支链的,例如 C_{1-8} 烷基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-4} 烷基或 C_{5-6} 烷基。烷基基团的实例是甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、正戊基、正己基、正庚基以及正辛基,如甲基或正己基。

[0141] 氟烷基基团是其中一个或多个H原子被一个或多个氟原子替换的烷基基团,例如 C_{1-8} 氟烷基、 C_{1-6} 氟烷基、 C_{1-4} 氟烷基或 C_{5-6} 氟烷基。实例包括氟甲基(CH_2F -)、二氟甲基(CHF_2 -)、三氟甲基(CF_3 -)、2,2,2-三氟乙基(CF_3CH_2 -)、1,1-二氟乙基(CH_3CHF_2 -)、2,2-二氟乙基(CHF_2CH_2 -)、和2-氟乙基(CH_2FCH_2 -)。

[0142] 卤代意指氟、氯、溴、和碘。在一个实施例中,卤代是氟或氯。

[0143] 如本文使用的,短语“有效量”意指一种化合物或组合物的足以显著和积极改变有待治疗的症状和/或病症(例如,提供积极临床响应)的量。用于药物产品中的活性成分的有效量将随所治疗的特定病症、病症的严重程度、治疗的持续时间、同步治疗的性质、所采用的一种或多种特定活性成分、所利用的一种或多种特定药学上可接受的赋形剂/载剂、以及处于主治医师的知识和专业知识范围内的类似因素而变化。特别地,与抗体-药物缀合物组合用于治疗癌症的化合物的有效量是以下量,其使得该组合足以对症缓解温血动物如人的癌症症状,以减缓癌症进展,或降低具有癌症症状的患者恶化的风险。

[0144] 在本说明书中,除非另外说明,否则如本文使用的术语“药学上可接受的”是指在合理医学判断范围内,适合用于与人类和动物组织接触使用而没有过多的毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症(与合理的益处/风险比相称)的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0145] 应当理解,具有式(I)的化合物可以形成稳定的药学上可接受的酸盐或碱盐,并且在此类情况下施用作为盐的化合物可能是合适的。酸加成盐的实例包括乙酸盐、己二酸盐、抗坏血酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、碳酸氢盐、硫酸氢盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、胆碱、柠檬酸盐、环己基氨基磺酸盐、二亚乙基二胺、乙磺酸盐、延胡索酸盐、谷氨酸盐、乙醇酸盐、半硫酸盐、2-羟乙基磺酸盐、庚酸盐、己酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、羟基马来酸盐、乳酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、甲磺酸盐、葡甲胺、2-萘磺酸盐、硝酸盐、草酸盐、双羟萘酸盐、过硫酸盐、苯乙酸盐、磷酸盐、磷酸氢盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、奎尼酸盐、水杨酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、氨基磺酸盐、氨基苯磺酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、甲苯磺酸盐(对甲苯磺酸盐)、三氟乙酸盐、以及十一烷酸盐。尽管其他的盐可以用于如分离或纯化产物中,但是无毒的生理学上可接受的盐是优选的。

[0146] 这些盐可以通过常规手段来形成,例如通过在溶剂或介质中(这种盐在该溶剂或介质中不溶)或在一种溶剂(例如在真空中除去水的溶剂)中使该产物的游离碱形式与一种或多种适当的酸的等效物反应,或通过冷冻干燥,或在适合的离子交换树脂上通过将一种现存的盐的阴离子交换为另一种阴离子。

[0147] 具有式(I)的化合物可以具有超过一个手性中心,并且应理解该申请涵盖所有个体立体异构体、对映异构体和非对映异构体及其混合物。因而,应当理解,在具有式(I)的化合物可凭借一个或多个不对称碳原子而以光学活性形式或外消旋形式存在的情况下,本申请包括在其定义中任何此类具有上述活性的光学活性形式或外消旋形式。本申请涵盖了所

有这类具有此处定义的活性的立体异构体。

[0148] 因此,贯穿本说明书,提及具有式(I)的化合物时,应理解该术语化合物包括作为PARP1抑制剂的非对映异构体、非对映异构体的混合物以及对映异构体。

[0149] 还应理解的是某些具有式(I)的化合物及其药用盐能以溶剂化连同非溶剂化形式(例如像,水合形式和无水形式)存在。应当理解的是,在此的化合物涵盖了所有这类溶剂化的形式。为了清楚起见,这包括化合物游离形式的溶剂化(例如,含水的)的形式以及化合物的盐的溶剂化(例如,含水的)的形式二者。

[0150] 一些具有式(I)的化合物可以是结晶的并且可以具有多于一种的结晶形式。应当理解,本披露涵盖任何结晶或无定形式或其混合物,其具有PARP1选择性抑制活性。通常已知可以使用常规技术分析结晶材料,例如X-射线粉末衍射(下文称为XRPD)分析和差示扫描量热法(DSC)。

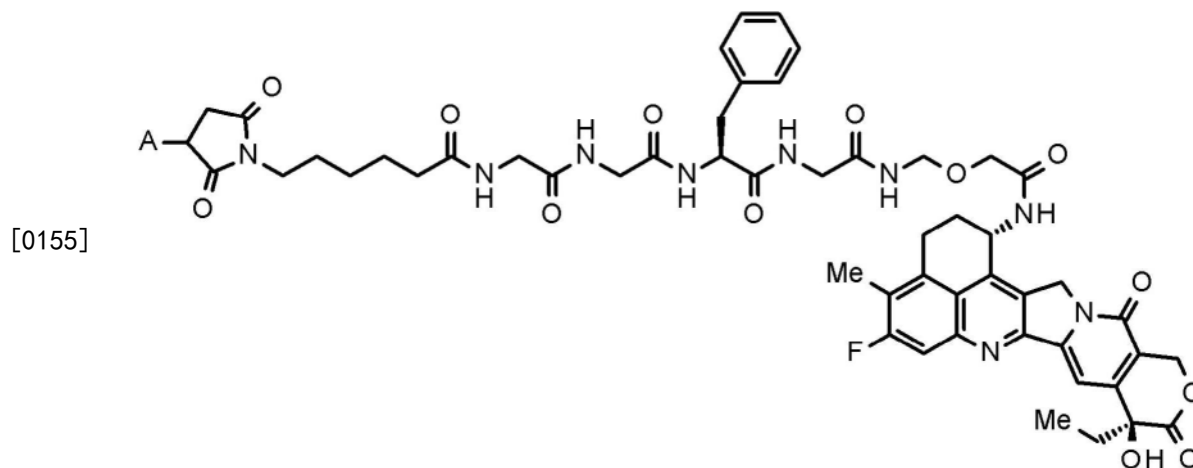
[0151] 如本文所述的式(I)旨在涵盖其组成原子的所有同位素。例如,H(或氢)包括氢的任何同位素形式,包括 ^1H 、 ^2H (D)、以及 ^3H (T);C包括碳的任何同位素形式,包括 ^{12}C 、 ^{13}C 、以及 ^{14}C ;O包括氧的任何同位素形式,包括 ^{16}O 、 ^{17}O 、以及 ^{18}O ;N包括氮的任何同位素形式,包括 ^{13}N 、 ^{14}N 、以及 ^{15}N ;F包括氟的任何同位素形式,包括 ^{19}F 以及 ^{18}F ;等等。在一方面,具有式(I)的化合物包括本文中涵盖的原子的同位素,这些同位素的量对应于其天然存在的丰度。然而,在某些情况下,可能希望的是富集处于一种正常情况下会以较低丰度存在的具体同位素中的一种或多种原子。例如,正常情况下 ^1H 以大于99.98%的丰度存在;然而,在一方面,具有在此提出的任何化学式的化合物可以在H存在的一个或多个位置处富集 ^2H 或 ^3H 。在另一个方面,当具有在此提出的任何化学式的化合物富集一种放射性同位素(例如, ^3H 以及 ^{14}C)时,该化合物可以用于药物和/或底物组织分布测定。应当理解的是,本申请涵盖了所有这类同位素形式。

【具体实施方式】

[0152] 在下文中,描述了用于实施本披露的优选方式。给出下面描述的实施例仅仅是为了说明本披露的典型实施例的一个实例,而不是为了限制本披露的范围。

[0153] 1. 抗体-药物缀合物

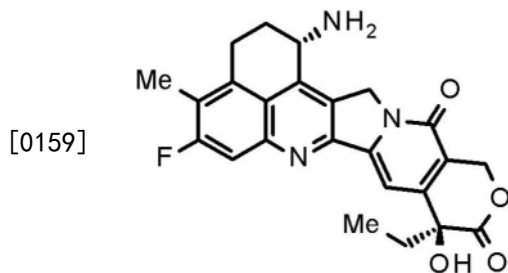
[0154] 本披露中使用的抗体-药物缀合物为其中由下式表示的药物-接头经由硫醚键与抗HER2抗体缀合的抗体-药物缀合物,



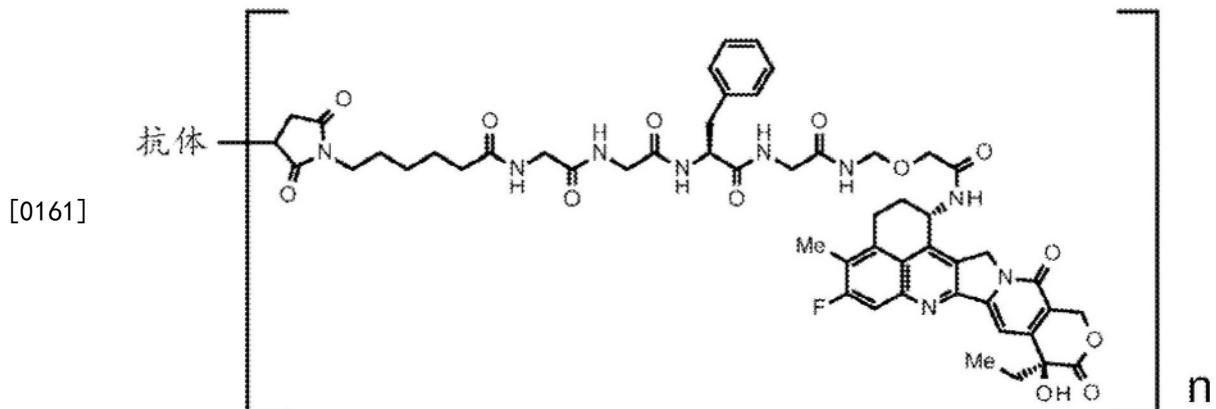
[0156] 其中A表示与抗体的连接位置。

[0157] 在本披露中,抗体-药物缀合物中由接头和药物组成的部分结构被称为“药物-接头”。药物-接头与抗体中链间二硫键位点(重链之间的两个位点,以及重链和轻链之间的两个位点)形成的硫醇基(换句话说,半胱氨酸残基的硫原子)相连。

[0158] 本披露的药物-接头包括依喜替康(IUPAC名称:(1S,9S)-1-氨基-9-乙基-5-氟-1,2,3,9,12,15-六氢-9-羟基-4-甲基-10H,13H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-10,13-二酮,(也表示为化学名:(1S,9S)-1-氨基-9-乙基-5-氟-2,3-二氢-9-羟基-4-甲基-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吡啶并[1,2-b]喹啉-10,13(9H,15H)-二酮)),其为拓扑异构酶I抑制剂,作为成分。依喜替康是具有抗肿瘤作用的喜树碱衍生物,由下式表示:

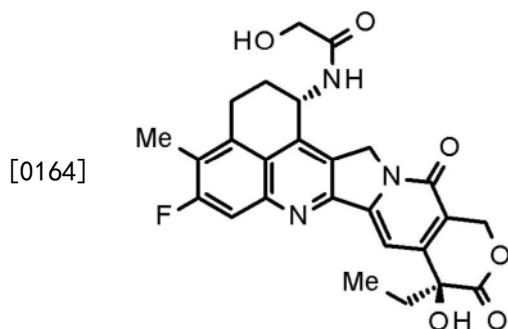


[0160] 本披露中使用的抗HER2抗体-药物缀合物也可以由下式表示:



[0162] 在此,药物-接头经由硫醚键与抗HER2抗体(“抗体-”)缀合。 n 的含义与所谓的缀合药物分子的平均数(DAR;药物与抗体比率)的含义相同,并指示每个抗体分子所缀合的药物-接头的平均单元数。

[0163] 在迁移到癌细胞中后,本披露中使用的抗HER2抗体-药物缀合物在接头部分被切割,以释放由下式表示的化合物:



[0165] 推测该化合物是本披露中使用的抗体-药物缀合物的抗肿瘤活性的原始来源,并

且已经证实其具有拓扑异构酶I抑制作用(Ogitani Y.等人,Clinical Cancer Research [临床癌症研究],2016年10月,15;22(20):5097-5108,Epub 2016年3月29日)。

[0166] 已知本披露中使用的抗HER2抗体-药物缀合物具有旁观者效应(Ogitani Y.等人,Cancer Science [癌症科学] (2016)107,1039-1046)。旁观者效应通过以下过程发挥作用,即本披露中使用的抗体-药物缀合物在表达靶标的癌细胞中被内化,然后释放的化合物也对存在于其周围且不表达靶标的癌细胞发挥抗肿瘤作用。即使当抗HER2抗体-药物缀合物与根据本披露的PARP1选择性抑制剂组合使用时,这种旁观者效应也表现出优异的抗肿瘤效果。

[0167] 2. 抗体-药物缀合物中的抗体

[0168] 本披露中使用的抗体-药物缀合物中的抗HER2抗体可以来自任何物种,并且优选为来自人、大鼠、小鼠或兔的抗HER2抗体。在抗体为来自除人类物种以外的其他物种的情况下,优选使用众所周知的技术将其嵌合化或人源化。抗HER2抗体可以为多克隆抗体或单克隆抗体,并且优选为单克隆抗体。

[0169] 本披露中使用的抗体-药物缀合物中的抗体是优选具有能够靶向癌细胞的特性的抗HER2抗体,并且优选是具有例如识别癌细胞的特性、与癌细胞结合的特性、在癌细胞中内化的特性和/或针对癌细胞的杀细胞活性的抗体。

[0170] 抗HER2抗体对癌细胞的结合活性可以使用流式细胞术来证实。抗体到癌细胞中的内化可以使用以下来证实:(1)使用与治疗性抗体结合的二级抗体(荧光标记的)在荧光显微镜下观察掺入细胞中的抗体的测定(Cell Death and Differentiation [细胞死亡与差异] (2008)15,751-761), (2)使用与治疗性抗体结合的二级抗体(荧光标记的)测量掺入细胞中的荧光强度的测定(Molecular Biology of the Cell [细胞分子生物学],第15卷,5268-5282,2004年12月),或(3)使用与治疗性抗体结合的免疫毒素的Mab-ZAP测定,其中该毒素在掺入细胞后释放以抑制细胞生长(Bio Techniques [生物技术]28:162-165,2000年1月)。作为免疫毒素,可以使用白喉毒素催化结构域和蛋白G的重组复合蛋白。

[0171] 通过测定对抗细胞生长的抑制活性,可以在体外证实抗HER2抗体的抗肿瘤活性。例如,培养过表达作为抗体的靶蛋白的HER2的癌细胞系,并将抗体以不同浓度加入培养系统中,以测定对抗病灶形成、集落形成和球状体生长的抑制活性。可以在体内证实抗肿瘤活性,例如,通过将抗体施用于具有移植的高表达靶蛋白的癌细胞系的裸鼠,并测定癌细胞的变化。

[0172] 由于在抗HER2抗体-药物缀合物中缀合的化合物发挥抗肿瘤作用,优选但非必须的是抗HER2抗体本身应该具有抗肿瘤作用。为了特异性和选择性地发挥抗肿瘤化合物对癌细胞的细胞毒活性,重要且也是优选的是,抗HER2抗体应该具有内化以迁移到癌细胞中的特性。

[0173] 本披露中使用的抗体-药物缀合物中的抗HER2抗体可以通过本领域已知的方法获得。例如,可以使用本领域通常实施的方法获得本披露的抗体,该方法涉及用抗原多肽对动物进行免疫,并收集和纯化体内产生的抗体。抗原的来源不限于人类,并且动物可以用来源于非人类动物如小鼠、大鼠等的抗原进行免疫。在这种情况下,可以测试与获得的异源抗原结合的抗体与人类抗原的交叉反应性,以筛选适用于人类疾病的抗体。

[0174] 或者,根据本领域已知的方法,将产生针对该抗原的抗体的抗体产生细胞与骨髓

瘤细胞融合(例如,Kohler和Milstein,Nature[自然](1975)256,第495-497页;和Kennet,R.编辑,Monoclonal Antibodies[单克隆抗体],第365-367页,Plenum Press[普莱纽姆出版社],纽约(1980))以建立杂交瘤,从杂交瘤中可以继而获得单克隆抗体。

[0175] 可以通过基因工程改造宿主细胞以产生编码抗原蛋白的基因来获得抗原。具体而言,制备允许抗原基因表达的载体,并将其转移至宿主细胞,从而表达该基因。如此表达的抗原可以被纯化。也可以通过用上述基因工程改造的抗原表达细胞或表达抗原的细胞系对动物进行免疫的方法来获得抗体。

[0176] 本披露使用的抗体-药物缀合物中的抗HER2抗体优选为通过人工修饰以降低对人的异源抗原性而获得的重组抗体,例如嵌合抗体或人源化抗体,或者优选为仅具有来源于人的抗体的基因序列的抗体,即人抗体。这些抗体可以用已知的方法生产。

[0177] 作为嵌合抗体,可以例举其中抗体可变区和恒定区来自不同物种的抗体,例如其中小鼠或大鼠来源的抗体可变区与人源性抗体恒定区连接的嵌合抗体(Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊],81,6851-6855,(1984))。

[0178] 作为人源化抗体,可以例举通过仅将异源抗体的互补决定区(CDR)整合到人源性抗体中获得的抗体(Nature[自然](1986)321,第522-525页),和通过CDR移植方法将异源抗体框架的一部分氨基酸残基以及异源抗体的CDR序列移植到人抗体中获得的抗体(WO 90/07861),和使用基因转化诱变策略(美国专利号5821337)进行人源化的抗体。

[0179] 作为人抗体,可以例举通过使用产生人抗体的小鼠产生的抗体,该小鼠具有包含人抗体的重链和轻链的基因的人染色体片段(参见Tomizuka,K.等人,Nature Genetics[自然遗传学](1997)16,第133-143页;Kuroiwa,Y.等人,Nucl.Acids Res.[核酸研究](1998)26,第3447-3448页;Yoshida,H.等人,Animal Cell Technology:Basic and Applied Aspects[动物细胞技术:基础和应用方面]第10卷,第69-73页(Kitagawa,Y.,Matsuda,T.和Iijima,S.编辑),Kluwer Academic Publishers[克吕韦尔学术出版社],1999;Tomizuka,K.等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊](2000)97,第722-727页,等等)。作为替代,可以例举通过噬菌体展示获得的抗体,该抗体选自人抗体库(参见Wormstone,I.M.等人,Investigative Ophthalmology&Visual Science[调查性眼科与视觉科学](2002)43(7),第2301-2308页;Carmen,S.等人,Briefings in Functional Genomics and Proteomics[功能基因组学和蛋白质组学简介](2002),1(2),第189-203页;Siriwardena,D.等人,Ophthalmology[眼科学](2002)109(3),第427-431页,等等)。

[0180] 在本披露中,还包括在本披露中使用的抗体-药物缀合物中的抗HER2抗体的修饰变体。修饰变体是指通过对根据本披露的抗体进行化学或生物修饰而获得的变体。化学修饰变体的实例包括包含化学部分与氨基酸骨架连接的变体、包含化学部分与N连接或O连接的碳水化合物链连接的变体等。生物修饰变体的实例包括通过翻译后修饰(如N连接或O连接的糖基化、N或C末端加工、脱酰胺、天冬氨酸异构化或甲硫氨酸氧化)获得的变体,以及通过原核宿主细胞中表达而在N末端添加甲硫氨酸残基的变体。此外,经标记以使得能够检测或分离根据本披露的抗体或抗原的抗体,例如酶标记的抗体、荧光标记的抗体和亲和标记的抗体也包括在修饰变体的含义中。根据本披露的抗体的这种修饰变体可用于提高抗体的稳定性和血液滞留性、降低其抗原性、检测或分离抗体或抗原,等等。

[0181] 此外,通过调节与根据本披露的抗体连接的聚糖的修饰(糖基化、去糖基化等),有

可能增强抗体依赖性细胞毒活性。作为调节抗体的聚糖修饰的技术,在WO 99/54342、WO 00/61739、WO 02/31140、WO 2007/133855、WO 2013/120066等中披露的技术是已知的。然而,该技术不限于此。在根据本披露的抗HER2抗体中,还包括其中聚糖的修饰受到调节的抗体。

[0182] 已知在培养的哺乳动物细胞中产生的抗体的重链的羧基末端处的赖氨酸残基缺失(Journal of Chromatography A[色谱法杂志A辑],705:129-134(1995)),并且还已知在培养的哺乳动物细胞中产生的抗体的重链的羧基末端处两个氨基酸残基(甘氨酸和赖氨酸)缺失,并且以新的反式位于羧基末端处的脯氨酸残基被酰胺化(Analytical Biochemistry[分析生物化学],360:75-83(2007))。然而,重链序列的这种缺失和修饰不影响抗体的抗原结合亲和力和效应子功能(补体的激活、抗体依赖性细胞毒性等)。因此,在根据本披露的抗HER2抗体中,也包括经过这种修饰的抗体和抗体的功能片段,并且还包括其中在重链的羧基末端处缺失了一个或两个氨基酸的缺失变体、通过缺失变体的酰胺化获得的变体(例如,其中羧基末端脯氨酸残基已经酰胺化的重链)等。根据本披露的在抗HER2抗体的重链的羧基末端处具有缺失的缺失变体的类型不限于上述变体,只要抗原结合亲和力和效应子功能是保全的。构成根据本披露的抗体的两条重链可以是选自由全长重链和上述缺失变体组成的组中的一种类型,或者可以是从中选择的两种类型的组合。每种缺失变体的量的比率可以受产生根据本披露的抗HER2抗体的培养的哺乳动物细胞的类型和培养条件影响;然而,作为优选可以例举其中在根据本披露的抗体的两条重链中,羧基末端处的一个氨基酸残基已经缺失的抗体。

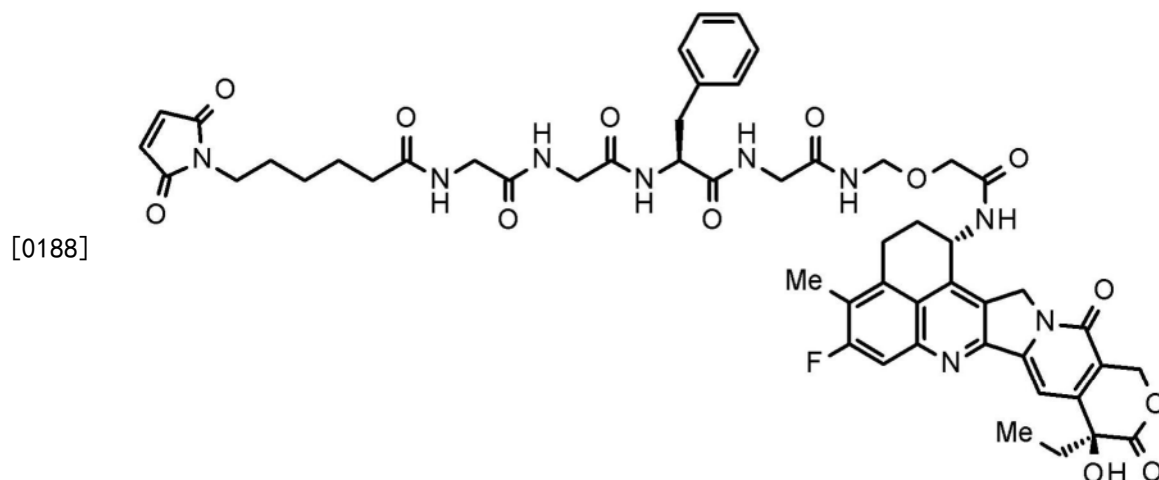
[0183] 作为根据本披露的抗HER2抗体的同种型,例如,可以例举IgG(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4),并且作为优选可以例举IgG1或IgG2。

[0184] 在本披露中,术语“抗HER2抗体”是指与HER2(人表皮生长因子受体2型;ErbB-2)特异性结合的抗体,并且优选具有通过与HER2结合而在表达HER2的细胞中内化的活性。

[0185] 抗HER2抗体的实例包括曲妥珠单抗(美国专利号5821337)和帕妥珠单抗(WO 01/00245),并且作为优选可以例举曲妥珠单抗。

[0186] 3. 抗体-药物缀合物的生产

[0187] 用于生产根据本披露的抗HER2抗体-药物缀合物的药物-接头中间体由下式表示:



[0189] 药物-接头中间体可以表示为化学名称为N-[6-(2,5-二氧化-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰基]甘氨酸-甘氨酸-L-苯基丙氨酸基-N-[(2-[(1S,9S)-9-乙基-5-氟-9-羟基-

4-甲基-10,13-二氧化-2,3,9,10,13,15-六氢-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]咪唑嗪并[1,2-b]喹啉-1-基]氨基)-2-氧代乙氧基)甲基)甘氨酸酰胺,并且可以参照WO 2014/057687、WO 2015/098099、WO 2015/115091、WO 2015/155998、WO 2019/044947中的描述来生产。

[0190] 本披露中使用的抗HER2抗体-药物缀合物可以通过使上述药物-接头中间体和具有硫醇基(也称为巯基)的抗HER2抗体反应来生产。

[0191] 具有巯基的抗HER2抗体可以通过本领域公知的方法获得(Hermanson, G.T., Bioconjugate Techniques[生物缀合技术],第56-136页,第456-493页,Academic Press[学术出版社](1996))。例如,通过对抗体中的每个链间二硫化物使用0.3至3摩尔当量的还原剂如三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP),并在含有螯合剂如乙二胺四乙酸(EDTA)的缓冲溶液中与抗体反应,可以获得抗体中链间二硫化物部分或完全还原的具有巯基的抗HER2抗体。

[0192] 此外,通过对每个具有巯基的抗HER2抗体使用2至20摩尔当量的药物-接头中间体,可以生产其中每个抗体分子缀合2至8个药物分子的抗HER2抗体-药物缀合物。

[0193] 生产的抗体-药物缀合物的每个抗HER2抗体分子的缀合药物分子平均数可例如通过以下测定:基于抗体-药物缀合物及其缀合前体在280nm和370nm两个波长下的UV吸光度测量的计算方法(UV方法)或基于通过用还原剂处理抗体-药物缀合物获得的片段的HPLC测量的定量的计算方法(HPLC方法)。

[0194] 可以参考WO 2014/057687、WO 2015/098099、WO 2015/115091、WO 2015/155998、WO 2017/002776、WO 2018/212136等中的描述来进行抗HER2抗体和药物-接头中间体之间的缀合以及抗体-药物缀合物的每个抗体分子的缀合药物分子平均数的计算。

[0195] 在本披露中,术语“抗HER2抗体-药物缀合物”是指以下抗体-药物缀合物,其使得根据本披露的抗体-药物缀合物中的抗体是抗HER2抗体。

[0196] 抗HER2抗体优选为包含以下重链和轻链的抗体,该重链包含:由SEQ ID NO:1的氨基酸残基26至33所组成的氨基酸序列组成的CDRH1、由SEQ ID NO:1的氨基酸残基51至58所组成的氨基酸序列组成的CDRH2和由SEQ ID NO:1的氨基酸残基97至109所组成的氨基酸序列组成的CDRH3,该轻链包含:由SEQ ID NO:2的氨基酸残基27至32所组成的氨基酸序列组成的CDRL1、由SEQ ID NO:2的氨基酸残基50至52所组成的氨基酸序列组成的CDRL2和由SEQ ID NO:2的氨基酸残基89至97所组成的氨基酸序列组成的CDRL3,并且更优选为包含以下重链和轻链的抗体,该重链包含:由SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至120所组成的氨基酸序列组成的重链可变区,该轻链包含由SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至107所组成的氨基酸序列组成的轻链可变区,并且甚至更优选为包含由SEQ ID NO:1表示的氨基酸序列组成的重链和由SEQ ID NO:2表示的氨基酸序列组成的轻链的抗体,或者为包含由SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至449组成的重链和由SEQ ID NO:2的所有氨基酸残基1至214组成的轻链的抗体。

[0197] 在抗HER2抗体-药物缀合物中,每个抗体分子缀合的药物-接头的平均单元数优选为2至8,更优选为3至8,甚至更优选为7至8,甚至更优选为7.5至8,并且甚至更优选为约8。

[0198] 本披露中使用的抗HER2抗体-药物缀合物可以参考WO 2015/115091等中的描述来生产。

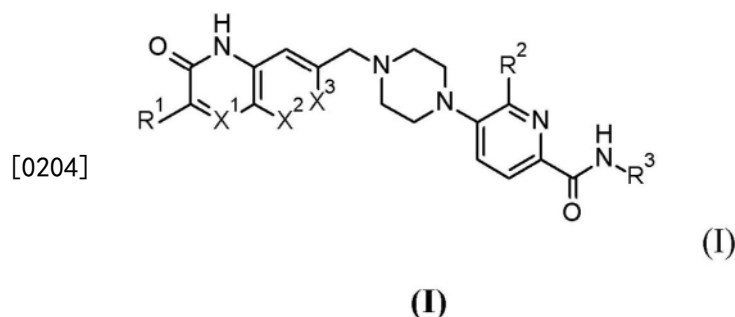
[0199] 在优选的实施例中,抗HER2抗体-药物缀合物为德卢替康-曲妥珠单抗(DS-8201)。

[0200] 4. PARP1选择性抑制剂

[0201] 在本披露中,术语“PARP1选择性抑制剂”是指PARP抑制剂,其表现出相对于其他PARP家族成员(如PARP2、PARP3、PARP5a、和PARP6)对PARP1的选择性,有利地相对于PARP2对PARP1的选择性,优选地相对于PARP2对PARP1至少10倍的选择性,并且更优选地相对于PARP2对PARP1至少100倍的选择性。优选的PARP1选择性抑制剂的实例可包括本文披露的那些。

[0202] 可根据本披露使用的PARP1选择性抑制剂的实例包括具有式(I)的氮杂喹诺酮化合物。本文所述的具有式(I)的氮杂喹诺酮化合物对PARP1的选择性比其他PARP家族成员(如PARP2、PARP3、PARP5a、和PARP6)出人意料地高。有利地,本文所述的具有式(I)的化合物具有低hERG活性。众所周知,由人类ether-à-gogo相关基因(hERG)编码的心脏离子通道的阻断是药物发现和开发的风险因素,并且hERG的阻断可导致安全问题,如心律失常。

[0203] 因此,在本披露中使用的PARP1选择性抑制剂的优选实施例中,PARP1选择性抑制剂为由下式(I)表示的化合物:



[0205] 其中:

[0206] X^1 和 X^2 各自独立地选自N和C(H),

[0207] X^3 独立地选自N和C(R^4),其中 R^4 是H或氟,

[0208] R^1 是 C_{1-4} 烷基或 C_{1-4} 氟烷基(优选是乙基),

[0209] R^2 独立地选自H、卤代、 C_{1-4} 烷基、和 C_{1-4} 氟烷基,并且

[0210] R^3 是H或 C_{1-4} 烷基(优选地是 C_{1-4} 烷基,更优选地是甲基),

[0211] 或其药学上可接受的盐

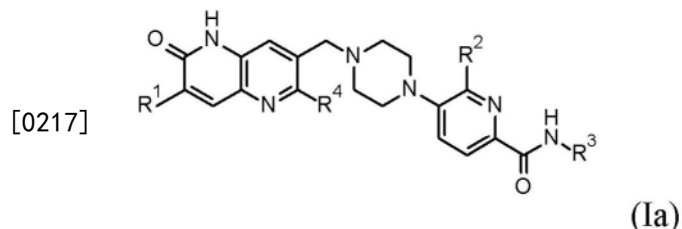
[0212] 条件是:

[0213] 当 X^1 是N时,则 X^2 是C(H),并且 X^3 是C(R^4),

[0214] 当 X^2 是N时,则 X^1 =C(H),并且 X^3 是C(R^4),并且

[0215] 当 X^3 是N时,则 X^1 和 X^2 均为C(H)。

[0216] 在一个实施例中,本披露中使用的PARP1选择性抑制剂是具有式(Ia)的化合物:

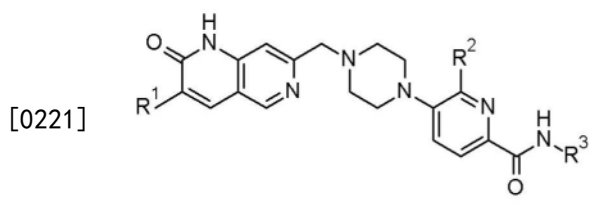


[0218] 其中

[0219] R^1 是 C_{1-4} 烷基, R^2 选自H、卤代、 C_{1-4} 烷基、和 C_{1-4} 氟烷基(优选地选自二氟甲基、三氟甲基、和甲基,或者是H或卤代), R^3 是H或 C_{1-4} 烷基,并且 R^4 是H。在具有式(Ia)的化合物中,优选

地R¹是乙基,R²选自H、氯和氟,R³是甲基,并且R⁴是H。

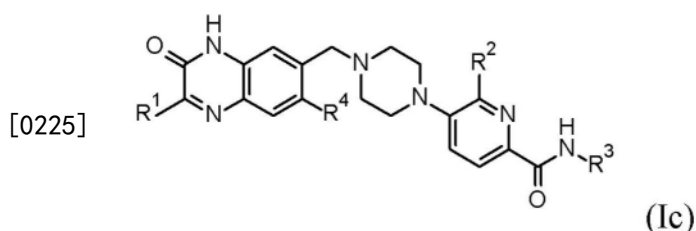
[0220] 在另一个实施例中,本披露中使用的PARP1选择性抑制剂是具有式(Ib)的化合物:



[0222] 其中

[0223] R¹是C₁₋₄烷基,R²是H或卤代,并且R³是H或C₁₋₄烷基。在具有式(Ib)的化合物中,优选地R¹是乙基,R²选自H、氯和氟,并且R³是甲基。

[0224] 在另一个实施例中,本披露中使用的PARP1选择性抑制剂是具有式(Ic)的化合物:



[0226] 其中

[0227] R¹是C₁₋₄烷基或C₁₋₄氟烷基,R²独立地选自H、卤代、C₁₋₄烷基、和C₁₋₄氟烷基,

[0228] R³是H或C₁₋₄烷基,并且R⁴是H或氟。

[0229] 在另一个实施例中,PARP1选择性抑制剂是具有式(Ic)的化合物,其中:

[0230] R¹独立地选自乙基、正丙基、三氟甲基、1,1-二氟乙基、2,2-二氟乙基、2-氟乙基、和2,2,2-三氟乙基;R²独立地选自H、甲基、乙基、三氟甲基、二氟甲基、氟甲基、氟、和氯;R³是H或甲基,并且R⁴是H。

[0231] 在另一个实施例中,PARP1选择性抑制剂是具有式(I)或具有式(Ia)、(Ib)或(Ic)的化合物,其相对于PARP2具有对PARP1的选择性,优选地相对于PARP2具有对PARP1至少10倍的选择性,并且更优选地相对于PARP2具有对PARP1至少100倍的选择性。

[0232] 在其他实施例中,本披露中使用的PARP1选择性抑制剂为选自以下的化合物:

[0233] 5-[4-[(3-乙基-2-氧代-1H-1,6-萘啶-7-基)甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺、

[0234] 5-[4-[(3-乙基-2-氧代-1H-1,6-萘啶-7-基)甲基]哌嗪-1-基]-6-氟-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺、

[0235] 6-氯-5-[4-[(3-乙基-2-氧代-1H-1,6-萘啶-7-基)甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺、

[0236] 5-[4-[(7-乙基-6-氧代-5H-1,5-萘啶-3-基)甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺、

[0237] 5-[4-[(7-乙基-6-氧代-5H-1,5-萘啶-3-基)甲基]哌嗪-1-基]-6-氟-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺、

[0238] 6-氯-5-[4-[(7-乙基-6-氧代-5H-1,5-萘啶-3-基)甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺、

- [0239] 5-[4-[(7-乙基-6-氧代-5H-1,5-萘啶-3-基)甲基]哌嗪-1-基]吡啶-2-甲酰胺
- [0240] 6-乙基-5-[4-[(2-乙基-3-氧代-4H-喹喔啉-6-基)甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺、
- [0241] 5-[4-[(2-乙基-3-氧代-4H-喹喔啉-6-基)甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-6-(三氟甲基)吡啶-2-甲酰胺、
- [0242] 6-(二氟甲基)-5-[4-[(2-乙基-3-氧代-4H-喹喔啉-6-基)甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺、
- [0243] 5-[4-[(2-乙基-3-氧代-4H-喹喔啉-6-基)甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺、
- [0244] 5-[4-[(2-乙基-3-氧代-4H-喹喔啉-6-基)甲基]哌嗪-1-基]-6-氟-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺、
- [0245] 5-[4-[(2-乙基-3-氧代-4H-喹喔啉-6-基)甲基]哌嗪-1-基]-N,6-二甲基-吡啶-2-甲酰胺、
- [0246] 6-氯-5-[4-[(2-乙基-3-氧代-4H-喹喔啉-6-基)甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺、
- [0247] N-甲基-5-[4-[[3-氧代-2-(三氟甲基)-4H-喹喔啉-6-基]甲基]哌嗪-1-基]吡啶-2-甲酰胺、
- [0248] 6-氯-N-甲基-5-[4-[[3-氧代-2-(三氟甲基)-4H-喹喔啉-6-基]甲基]哌嗪-1-基]吡啶-2-甲酰胺、
- [0249] 6-氟-N-甲基-5-[4-[[3-氧代-2-(三氟甲基)-4H-喹喔啉-6-基]甲基]哌嗪-1-基]吡啶-2-甲酰胺、
- [0250] N-甲基-5-[4-[(3-氧代-2-丙基-4H-喹喔啉-6-基)甲基]哌嗪-1-基]吡啶-2-甲酰胺、
- [0251] 6-氯-N-甲基-5-[4-[(3-氧代-2-丙基-4H-喹喔啉-6-基)甲基]哌嗪-1-基]吡啶-2-甲酰胺、
- [0252] 6-氟-N-甲基-5-[4-[(3-氧代-2-丙基-4H-喹喔啉-6-基)甲基]哌嗪-1-基]吡啶-2-甲酰胺、
- [0253] 5-[4-[(2-乙基-7-氟-3-氧代-4H-喹喔啉-6-基)甲基]哌嗪-1-基]-6-氟-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺、
- [0254] 5-[4-[[2-(1,1-二氟乙基)-3-氧代-4H-喹喔啉-6-基]甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺、
- [0255] 5-[4-[[2-(2,2-二氟乙基)-3-氧代-4H-喹喔啉-6-基]甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺、
- [0256] 5-[4-[[2-(2,2-二氟乙基)-3-氧代-4H-喹喔啉-6-基]甲基]哌嗪-1-基]-6-氟-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺、
- [0257] 5-[4-[[2-(2-氟乙基)-3-氧代-4H-喹喔啉-6-基]甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺、
- [0258] 6-氟-5-[4-[[2-(2-氟乙基)-3-氧代-4H-喹喔啉-6-基]甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺、

[0259] N-甲基-5-[4-[[3-氧代-2-(2,2,2-三氟乙基)-4H-喹啶啉-6-基]甲基]哌嗪-1-基]吡啶-2-甲酰胺、和

[0260] 6-氟-N-甲基-5-(4-((3-氧代-2-(2,2,2-三氟乙基)-3,4-二氢喹啶啉-6-基)甲基)哌嗪-1-基)吡啶酰胺、

[0261] 或其药学上可接受的盐

[0262] 在另一个实施例中,本披露中使用的PARP1选择性抑制剂为选自以下的化合物:

[0263] 6-(二氟甲基)-5-[4-[(7-乙基-6-氧代-5H-1,5-萘啶-3-基)甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺、

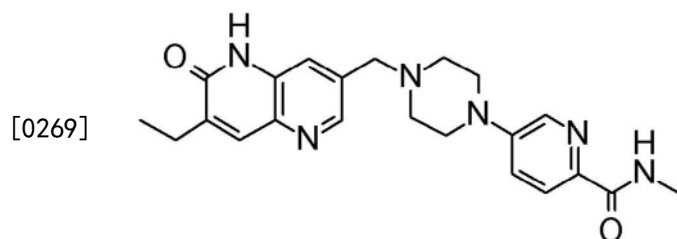
[0264] 5-[4-[(7-乙基-6-氧代-5H-1,5-萘啶-3-基)甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-6(三氟甲基)吡啶-2-甲酰胺、

[0265] 5-[4-[(7-乙基-6-氧代-5H-1,5-萘啶-3-基)甲基]哌嗪-1-基]-N,6-二甲基-吡啶-2-甲酰胺、和

[0266] N-乙基-5-[4-[(7-乙基-6-氧代-5H-1,5-萘啶-3-基)甲基]哌嗪-1-基]吡啶-2-甲酰胺、

[0267] 或其药学上可接受的盐。

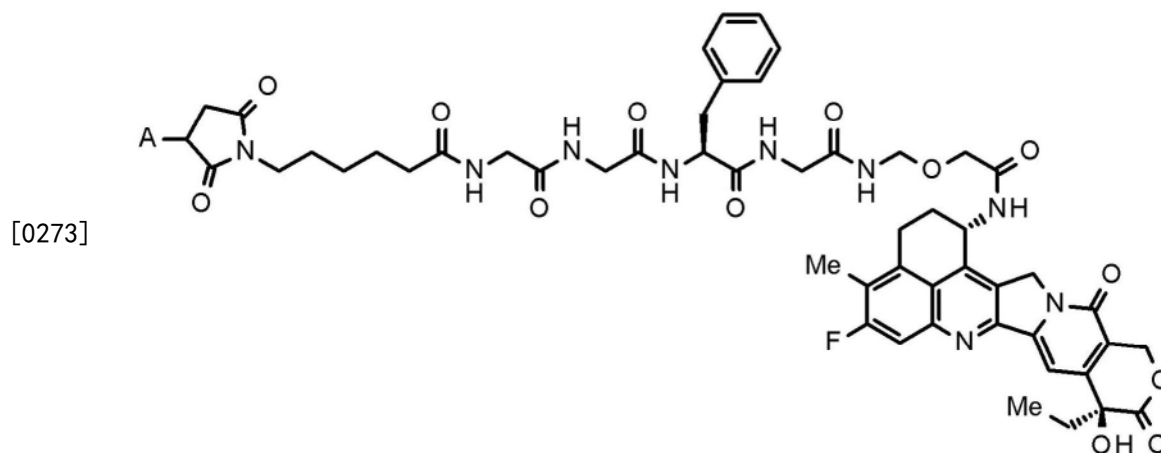
[0268] 在优选的实施例中,本披露中使用的PARP1选择性抑制剂是由下式表示的化合物AZD5305(5-[4-[(7-乙基-6-氧代-5H-1,5-萘啶-3-基)甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺):



[0270] 或其药学上可接受的盐。

[0271] 5. 抗体-药物缀合物和PARP1选择性抑制剂的组合

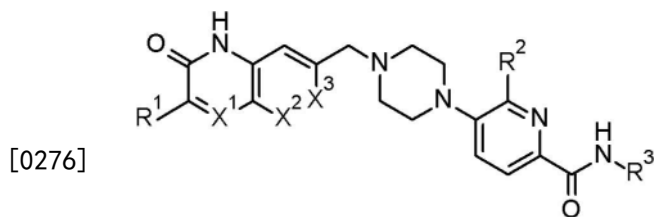
[0272] 在本披露的第一组合实施例中,与PARP1选择性抑制剂组合的抗HER2抗体-药物缀合物为其中由下式表示的药物-接头经由硫醚键与抗HER2抗体缀合的抗体-药物缀合物:



[0274] 其中A表示与抗体的连接位置。

[0275] 在另一个组合实施例中,将如上文针对第一组合实施例所定义的抗HER2抗体-药

物缀合物与PARP1选择性抑制剂组合,该PARP1选择性抑制剂为由下式(I)表示的化合物:



(I)

[0277] 其中:

[0278] X^1 和 X^2 各自独立地选自N和C(H),

[0279] X^3 独立地选自N和C(R^4),其中 R^4 是H或氟,

[0280] R^1 是 C_{1-4} 烷基或 C_{1-4} 氟烷基,

[0281] R^2 独立地选自H、卤代、 C_{1-4} 烷基、和 C_{1-4} 氟烷基,并且

[0282] R^3 是H或 C_{1-4} 烷基,

[0283] 或其药学上可接受的盐

[0284] 条件是:

[0285] 当 X^1 是N时,则 X^2 是C(H),并且 X^3 是C(R^4),

[0286] 当 X^2 是N时,则 $X^1=C(H)$,并且 X^3 是C(R^4),并且

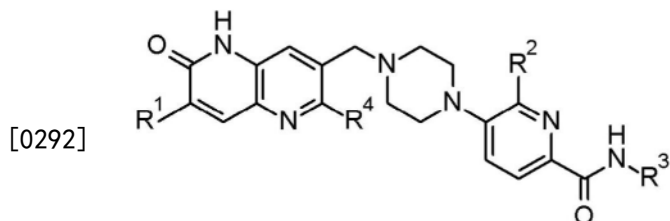
[0287] 当 X^3 是N时,则 X^1 和 X^2 均为C(H)。

[0288] 在另一个组合实施例中,将如上定义的抗HER2抗体-药物缀合物与如上定义的PARP1选择性抑制剂组合,其中在式(I)中, R^3 是 C_{1-4} 烷基。

[0289] 在另一个组合实施例中,将如上文所定义的抗HER2抗体-药物缀合物与如上文所定义的PARP1选择性抑制剂组合,其中,在式(I)中, R^3 是甲基。

[0290] 在另一个组合实施例中,将如上文所定义的抗HER2抗体-药物缀合物与如上文所定义的PARP1选择性抑制剂组合,其中,在式(I)中, R^1 是乙基。

[0291] 在另一个组合实施例中,将如上文所定义的抗HER2抗体-药物缀合物与PARP1选择性抑制剂组合,该PARP1选择性抑制剂为由下式(Ia)表示的化合物:



(Ia)

[0293] 其中

[0294] R^1 是 C_{1-4} 烷基,

[0295] R^2 选自H、卤代、 C_{1-4} 烷基、和 C_{1-4} 氟烷基,

[0296] R^3 是H或 C_{1-4} 烷基,并且

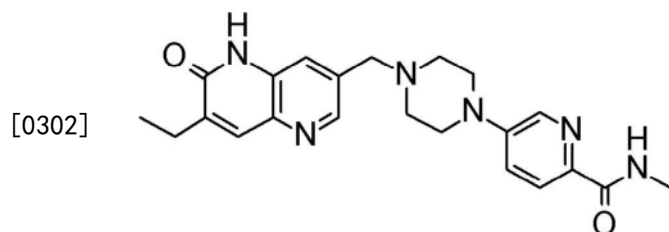
[0297] R^4 是H,

[0298] 或其药学上可接受的盐。

[0299] 在另一个组合实施例中,将如上文所定义的抗HER2抗体-药物缀合物与如上文所定义的PARP1选择性抑制剂组合,其中,在式(Ia)中, R^2 是H或卤代。

[0300] 在另一个组合实施例中,将如上文所定义的抗HER2抗体-药物缀合物与如上文所定义的PARP1选择性抑制剂组合,其中,在式(Ia)中, R^1 是乙基, R^2 选自H、氯和氟,并且 R^3 是甲基。

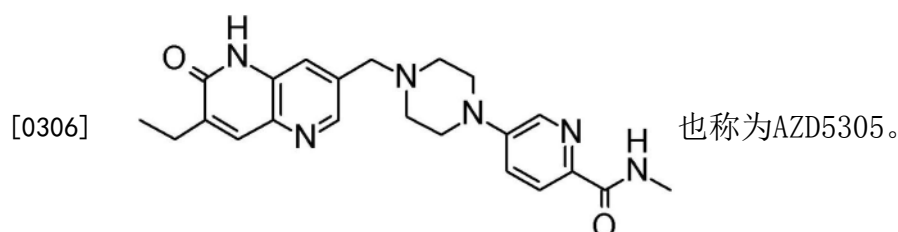
[0301] 在另一个组合实施例中,将如上文所定义的抗HER2抗体-药物缀合物与PARP1选择性抑制剂组合,其中该PARP1选择性抑制剂为由下式表示的AZD5305:



[0303] 或其药学上可接受的盐。

[0304] 在上述每个组合实施例的实施例中,抗HER2抗体包含重链和轻链,该重链包含:由SEQ ID NO:3表示的氨基酸序列组成的CDRH1、由SEQ ID NO:4表示的氨基酸序列组成的CDRH2和由SEQ ID NO:5表示的氨基酸序列组成的CDRH3,该轻链包含:由SEQ ID NO:6表示的氨基酸序列组成的CDRL1、由SEQ ID NO:7的氨基酸残基1至3所组成的氨基酸序列组成的CDRL2和由SEQ ID NO:8表示的氨基酸序列组成的CDRL3。在上述每个组合实施例的另一个实施例中,抗HER2抗体包含重链和轻链,该重链包含由SEQ ID NO:9表示的氨基酸序列组成的重链可变区,该轻链包含由SEQ ID NO:10表示的氨基酸序列组成的轻链可变区。在上述每个组合实施例的另一个实施例中,抗HER2抗体包含重链和轻链,该重链由SEQ ID NO:1表示的氨基酸序列组成,该轻链由SEQ ID NO:2表示的氨基酸序列组成。在上述每个组合实施例的另一个实施例中,抗HER2抗体包含重链和轻链,该重链由SEQ ID NO:11表示的氨基酸序列组成,该轻链由SEQ ID NO:2表示的氨基酸序列组成。

[0305] 在本披露的特别优选的组合实施例中,抗HER2抗体-药物缀合物为德卢替康-曲妥珠单抗(DS-8201),并且PARP1选择性抑制剂为由下式表示的化合物:



[0307] 6. 治疗组合用途和方法

[0308] 下文描述了药物产品和治疗用途及方法,其中组合施用根据本披露的抗HER2抗体-药物缀合物和PARP1选择性抑制剂。

[0309] 本披露的药物产品和治疗用途和方法的特征可能在于抗HER2抗体-药物缀合物和PARP1选择性抑制剂作为活性成分分别包含在不同的配制品中,并且同时或在不同的时间施用,或其特征在于抗体-药物缀合物和PARP1选择性抑制剂作为活性成分包含在单一配制品中并进行施用。

[0310] 在本披露的药物产品和治疗方法中,本披露中使用的单一PARP1选择性抑制剂可

以与抗HER2抗体-药物缀合物组合施用,或者两种或更多种不同的PARP1选择性抑制剂可以与抗体-药物缀合物组合施用。

[0311] 本披露的药物产品和治疗方法可用于治疗癌症,并且可优选用于治疗至少一种选自以下组成的组中的癌症:乳腺癌(包括三阴性乳腺癌和腔内乳腺癌)、胃癌(也称为胃腺癌)、结直肠癌(又称结肠癌,并且包括结肠癌和直肠癌)、肺癌(包括小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、食管癌、头颈癌(包括唾液腺癌和咽喉癌)、食管胃连接部腺癌、胆道癌(包括胆管癌)、佩吉特病、胰腺癌、卵巢癌、子宫癌肉瘤、尿路上皮癌、前列腺癌、膀胱癌、胃肠间质瘤、子宫颈癌、鳞状细胞癌、腹膜癌、肝癌、肝细胞癌、子宫体癌、肾癌、外阴癌、甲状腺癌、阴茎癌、白血病、恶性淋巴瘤、浆细胞瘤、骨髓瘤、多形性胶质母细胞瘤、骨肉瘤、肉瘤和黑色素瘤,并且可以更优选地用于治疗至少一种选自以下组成的组中的癌症:乳腺癌、胃癌、结直肠癌、肺癌(优选非小细胞肺癌)、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌和肾癌。

[0312] HER2肿瘤标记物的存在或不存在可以通过以下确定:例如,通过从癌症患者收集肿瘤组织以制备福尔马林固定的石蜡包埋的(FFPE)标本,并对该标本进行基因产物(蛋白质)测试,例如,用免疫组织化学(IHC)法、流式细胞仪或蛋白质印迹法,或进行基因转录测试,例如,用原位杂交(ISH)法、定量PCR法(q-PCR)或微阵列分析,或者通过从癌症患者收集无细胞循环肿瘤DNA(ctDNA)并用下一代测序(NGS)等方法对ctDNA进行测试。

[0313] 本披露的药物产品和治疗方法可用于表达HER2的癌症,其可以为过表达HER2的癌症(高或中度)或者可以为低表达HER2的癌症。

[0314] 在本披露中,术语“过表达HER2的癌症”没有特别限制,只要它被本领域技术人员认为是过表达HER2的癌症。过表达HER2的癌症的优选实例可包括在IHC法中HER2表达评分为3+的癌症,和在IHC法中HER2表达评分为2+并在原位杂交法(ISH)中HER2表达被确定为阳性的癌症。本披露的原位杂交方法包括荧光原位杂交方法(FISH)和双色原位杂交方法(DISH)。

[0315] 在本披露中,术语“低表达HER2的癌症”没有特别限制,只要它被本领域技术人员认为是低表达HER2的癌症。低表达HER2的癌症的优选实例可包括在IHC法中HER2表达评分为2+且在原位杂交法中HER2表达被确定为阴性的癌症,以及在IHC法中HER2表达评分为1+的癌症。

[0316] 通过IHC法对HER2表达程度评分的方法,或通过原位杂交法确定HER2表达为阳性或阴性的方法没有特别限制,只要其是本领域技术人员所认可的。该方法的实例可以包括在第4版乳腺癌HER2检测指南(由日本病理学委员会(Japanese Pathology Board)开发,用于HER2在乳腺癌中的最佳应用)中描述的方法。

[0317] 该癌症(特别是关于乳腺癌的治疗)可以为过表达HER2(高或中等)或低表达HER2的乳腺癌,或三阴性乳腺癌,和/或可以具有IHC 3+、IHC 2+、IHC 1+或IHC >0且<1+的HER2状态评分。

[0318] 本披露的药物产品和治疗方法可优选用于哺乳动物,但更优选用于人类。

[0319] 本披露的药物产品和治疗方法的抗肿瘤效果可以通过以下来证实:将癌细胞移植到受试动物以制备模型并通过应用本披露的药物产品和治疗方法测量肿瘤体积的减小或生命延长效果。然后,通过比较本披露中使用的抗体-药物缀合物与PARP1选择性抑制剂的单一施用的抗肿瘤效果,可以证实本披露中使用的抗体-药物缀合物与PARP1选择性抑制剂

组合使用的效果。

[0320] 本披露的药物产品和治疗方法的抗肿瘤效果可以在临床试验中使用实体瘤反应评估标准(RECIST)、WHO评估方法、Macdonald评估方法、体重测量和其他方法中的任何一种评估方法来确认,并且可以基于完全响应(CR)、部分响应(PR);疾病进展(PD)、客观响应率(ORR)、响应持续时间(DoR)、无进展存活(PFS)、总存活(OS)等的指数来确定。

[0321] 通过使用上述方法,可以证实本披露的药物产品和治疗方法在抗肿瘤效果上优于现有的用于癌症治疗的药物产品和治疗方法。

[0322] 本披露的药物产品和治疗方法可以延迟癌细胞的发展,抑制其生长,并进一步杀死癌细胞。这些作用可以使癌症患者摆脱由癌症引起的症状,或者改善癌症患者的生活质量(QOL),并通过维持癌症患者的生命而达到治疗效果。即使本披露的药物产品和治疗方法不能实现杀死癌细胞,它们也可以通过抑制或控制癌细胞的生长来实现癌症患者的更高QOL,同时实现更长期的存活。

[0323] 可以预期本披露的药物产品通过作为全身疗法应用于患者以及另外通过局部应用于癌组织来发挥治疗效果。

[0324] 在另一个方面,本披露的药物产品和治疗方法提供了在用电离辐射或其他化学治疗剂的癌症治疗中作为辅助剂的用途。例如,在癌症的治疗中,该治疗可以包括向需要治疗的受试者施用治疗有效量的药物产品,其同时或顺序地与电离辐射或其他化学治疗剂一起施用。

[0325] 本披露的药物产品和治疗方法可用作与外科手术结合的辅助化疗。本披露的药物产品可以在外科手术之前为了减小肿瘤大小的目的而施用(称为术前辅助化疗或新辅助治疗),或者可以在外科手术之后为了防止肿瘤复发的目的而施用(称为术后辅助化疗或辅助治疗)。

[0326] 在另外的方面,本披露的药物产品可以用于治疗缺乏同源重组(HR)依赖性DNA DSB修复活性的癌症。HR依赖性DNA DSB修复途径经由同源机制修复DNA中的双链断裂(DSB),以重建连续的DNA螺旋(K.K.Khanna和S.P.Jackson,Nat.Genet.[自然遗传学]27(3):247-254(2001))。HR依赖性DNA DSB修复途径的组分包括但不限于ATM(NM_000051)、RAD51(NM_002875)、RAD51L1(NM_002877)、RAD51C(NM_002876)、RAD51L3(NM_002878)、DMC1(NM_007068)、XRCC2(NM_005431)、XRCC3(NM_005432)、RAD52(NM_002879)、RAD54L(NM_003579)、RAD54B(NM_012415)、BRCA1(NM_007295)、BRCA2(NM_000059)、RAD50(NM_005732)、MRE11A(NM_005590)和NBS1(NM_002485)。HR依赖性DNA DSB修复途径中涉及的其他蛋白质包括调节因子例如EMSY(Hughes-Davies等人,Cell[细胞],115,第523-535页)。HR组分也描述于Wood等人,Science[科学],291,1284-1289(2001)中。缺乏HR依赖性DNA DSB修复的癌症可以包含一种或多种癌细胞、或由其组成,这些癌细胞相对于正常细胞具有降低的或消除的通过该途径修复DNA DSB的能力,即HR依赖性DNA DSB修复途径的活性可在一种或多种癌细胞中降低或消除。HR依赖性DNA DSB修复途径的一种或多种组分的活性可以在患有缺乏HR依赖性DNA DSB修复的癌症的个体的一种或多种癌细胞中消除。HR依赖性DNA DSB修复途径的组分在本领域中是充分表征的(参见例如,Wood等人,Science[科学],291,1284-1289(2001))并且包括以上列出的组分。

[0327] 在一些实施例中,癌细胞可具有BRCA1和/或BRCA2缺陷表型,即在癌细胞中BRCA1

和/或BRCA2活性被降低或消除。具有这种表型的癌细胞的BRCA1和/或BRCA2有缺陷,即BRCA1和/或BRCA2的表达和/或活性可以在癌细胞中降低或消除,例如通过编码核酸中的突变或多态性的方式,或通过编码调节因子的基因(例如编码BRCA2调节因子的EMSY基因)中的扩增、突变或多态性的方式(Hughes-Davies等人,Cell[细胞],115,523-535)。BRCA1和BRCA2是已知的肿瘤抑制因子,其野生型等位基因在杂合子携带者的肿瘤中经常丢失(Jasin M.,Oncogene[癌基因],21(58),8981-93(2002);Tutt等人,Trends Mol Med.[分子医学趋势],8(12),571-6,(2002))。BRCA1和/或BRCA2突变与乳腺癌的关联在本领域中是充分表征的(Radice,P.J.,Exp Clin Cancer Res.[实验与临床癌症研究],21(3增刊),9-12(2002))。还已知编码BRCA2结合因子的EMSY基因的扩增与乳腺癌和卵巢癌有关。BRCA1和/或BRCA2中突变的携带者罹患某些癌症(包括乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、血液癌、胃肠道癌和肺癌)的风险也较高。在一些实施例中,个体对于BRCA1和/或BRCA2或其调节剂中的一个或多个变异(例如突变和多态性)是杂合的。对BRCA1和BRCA2的变异的检测是本领域众所周知的,并且例如描述于EP 699754,EP 705903,Neuhausen,S.L.和Ostrander,E.A.,Genet.Test[基因检测],1,75-83(1992);Chappnis,P.O.和Foulkes,W.O.,Cancer Treat Res[癌症治疗研究],107,29-59(2002);Janatova M.等人,Neoplasma[赘生物],50(4),246-505(2003);Jancarkova,N.,Ceska Gynekol.,68(1),11-6(2003)中。BRCA2结合因子EMSY的扩增的确定描述于Hughes-Davies等人,Cell[细胞],115,523-535中。

[0328] 与癌症相关的突变和多态性可以通过检测变体核酸序列的存在而在核酸水平上检测,或者通过检测变体(即突变体或等位基因变体)多肽的存在而在蛋白质水平上检测。

[0329] 可以施用本披露的药物产品,其含有至少一种药学上合适的成分。根据本披露中使用的抗体-药物缀合物和PARP1选择性抑制剂的剂量、施用浓度等,可以从本领域通常使用的配制品添加剂等中适当选择和应用药学上合适的成分。本披露中使用的抗HER2抗体-药物缀合物可以例如作为包含缓冲剂如组氨酸缓冲剂、媒介物如蔗糖和海藻糖以及表面活性剂如聚山梨醇酯80和20的药物产品进行施用。本披露中使用的包含抗体-药物缀合物的药物产品可以优选用作注射剂,可以更优选用作含水注射剂或冻干注射剂,并且可以甚至更优选用作冻干注射剂。在本披露中使用的含有抗HER2抗体-药物缀合物的药物产品是含水注射剂的情况下,该含水注射剂可以优选用合适的稀释剂稀释,然后作为静脉输注液给予。稀释剂的实例可以包括右旋糖溶液和生理盐水,可以优选例举右旋糖溶液,并且可以更优选例举5%的右旋糖溶液。在本披露的药物产品是冻干注射剂的情况下,预先溶解在注射用水中的所需量的冻干注射剂可以优选用合适的稀释剂稀释,然后作为静脉输注液给予。稀释剂的实例可以包括右旋糖溶液和生理盐水,可以优选例举右旋糖溶液,并且可以更优选例举5%的右旋糖溶液。

[0330] 适用于施用本披露的药物产品的施用途径的实例可包括静脉内、皮内、皮下、肌内和腹膜内途径,并且优选静脉内途径。

[0331] 本披露中使用的抗HER2抗体-药物缀合物可以以1天至180天的间隔施用于人,可以优选以一周、两周、三周或四周的间隔施用,并且可以更优选以三周的间隔施用。本披露中使用的抗HER2抗体-药物缀合物可以以每次施用约0.001mg/kg至100mg/kg的剂量施用,并且可以优选以每次施用0.8mg/kg至12.4mg/kg的剂量施用。例如,抗HER2抗体-药物缀合物可以以0.8mg/kg、1.6mg/kg、3.2mg/kg、5.4mg/kg、6.4mg/kg、7.4mg/kg或8mg/kg的剂量每

三周施用一次,并且可以优选以5.4mg/kg或6.4mg/kg的剂量每三周施用一次。

[0332] PARP1选择性抑制剂可以通过任何合适的施用途径以合适的剂量施用。特定疾病状态的治疗性治疗所需的剂量大小将必然改变,这取决于所治疗的受试者、施用途径和正在治疗的疾病的严重性。有关施用途径和剂量方案的进一步信息,可参阅Comprehensive Medicinal Chemistry[综合药物化学]第5卷第25.3章(编委会主席Corwin Hansch), Pergamon Press[培格曼出版社]1990。

[0333] 具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐通常会经由口服途径以如下药物制剂形式施用,这些药物制剂包含活性成分或其药学上可接受的盐或溶剂化物、或这样的盐的溶剂化物,呈药学上可接受的剂型。取决于待治疗的障碍和患者,组合物可以按不同剂量施用。

[0334] 以上所述的具有式(I)的化合物的药物配制品可被制备用于口服施用,特别地呈片剂或胶囊形式,并且尤其涉及目的在于提供靶向结肠的药物释放的技术(Patel, M.M.Expert Opin.Drug Deliv[关于药物递送的专家意见]2011,8(10),1247-1258)。

[0335] 以上所述的具有式(I)的化合物的药物配制品可以方便地以单位剂型施用,并且可以通过制药领域中熟知的任何方法,例如如Remington's Pharmaceutical Sciences[雷明顿药物科学],第17版,Mack Publishing Company,Easton,PA.[马克出版公司,伊斯顿,宾夕法尼亚州],(1985)中所述的制备。

[0336] 适于口服施用的具有式(I)的化合物的药物配制品可以包含一种或多种生理上可相容的载体和/或赋形剂,并且可以呈固体或液体的形式。片剂和胶囊可以用粘合剂、填充剂、润滑剂和/或表面活性剂(如十二烷基硫酸钠)制备。液体组合物可以含有常规添加剂,如悬浮剂、乳化剂和/或防腐剂。液体组合物可以包封在例如明胶中以提供单位剂型。固体口服剂型包括片剂、两件式硬壳胶囊和软弹性明胶(SEG)胶囊。此类两件式硬壳胶囊可以例如通过将具有式(I)的化合物填充到明胶或羟丙基甲基纤维素(HPMC)壳中来制备。

[0337] 具有式(I)的化合物的干壳配制品典型地包含约40%至60%w/w浓度的明胶、约20%至30%浓度的增塑剂(诸如甘油、山梨糖醇或丙二醇)和约30%至40%浓度的水。也可以存在其他材料,如防腐剂、染料、遮光剂和调味剂。液体填充材料包括已经溶解、增溶或分散(使用悬浮剂进行,如蜂蜡、氢化蓖麻油或聚乙二醇4000)的固体药物或在一种媒介物或多种媒介物(如矿物油、植物油、甘油三酯、二醇、多元醇和表面活性试剂)的组合中的液体药物。

[0338] 在治疗性治疗人类时,具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐的合适的每日剂量是约0.0001-100mg/kg体重。口服配制品是优选的,特别是片剂或胶囊,其可以通过本领域技术人员已知的方法配制,以提供0.1mg至1000mg范围内的活性化合物的剂量。

[0339] [实例]

[0340] 鉴于下面示出的实例具体描述本披露。然而,本披露不限于这些。此外,决不能以限制的方式对其进行解释。

[0341] PARP1选择性抑制剂的合成实例

[0342] 如下所述的PARP1选择性抑制剂的合成实例1至32如WO 2021/013735的实例1至32所述。

[0343] 一般实验条件

[0344] 除非另有说明,否则使用Bruker 300MHz、400MHz或500MHz光谱仪,在27°C下获得¹H NMR光谱;化学位移以百万分率(ppm, δ单位)表示,并参考溶剂的残留单¹H同位素体(CHCl₃:7.24ppm;CH₂Cl₂:5.32ppm;CD₃S(=O)CD₂H:2.49ppm)。耦合常数是以赫兹(Hz)为单位给出。分裂模式描述了明显的多重性,并被指定为s(单峰)、d(双峰)、t(三重峰)、q(四重奏)、m(多峰)和brs(宽峰)。LC-MS使用装有Waters SQD质谱仪的Waters UPLC或装有Shimadzu 2020质谱仪的Shimadzu LC-20AD LC-20XR LC-30AD进行。除非另有说明,否则报告的分子离子对应于[M+H]⁺;对于具有多个同位素模式的分子(Br、Cl等),除非另有说明,否则报告的值是对于最低同位素质量获得的值。

[0345] 使用以下进行快速色谱法:在来自Biotage™的SP1™纯化系统上、来自ISCO的CombiFlash®Rf或在来自赛默飞世尔公司(Thermo Fisher)的Gilson上,使用正相二氧化硅FLASH+™(40M、25M或12M)或SNAp™KP-Sil筒柱(340、100、50或10)、来自Agela的快速柱硅胶-CS柱,使用C18-快速柱的直相快速色谱法,或使用标准快速色谱法。通常,所有使用的溶剂都是可商购的并且是分析级的。无水溶剂常规用于反应。在这些实例中使用的相分离器是ISOLUTE®相分离柱。使用来自先进化学发展股份有限公司(Advanced Chemistry Development, Inc.) (ACD/实验室)的ACD/名称12.01来命名以下命名的中间体和实例。起始材料是从商业来源获得的或通过文献路线制备的。

[0346] X射线粉末衍射(XRPD)分析

[0347] XRPD分析使用Bruker D8衍射仪进行,该衍射仪可商购自布鲁克AXS公司(Bruker AXS Inc™)(麦迪逊,威斯康星州)。该XRPD光谱通过将用于分析的材料样品(约10mg)安装在单硅晶体晶片支架上(例如,布鲁克硅零背景X射线衍射样品架)并且借助于显微镜载片将该样品铺展成薄层获得。将该样品以30转/分钟旋转(以改善计数统计)并且用由在40kV和40mA下操作的铜制长细聚焦管产生的具有1.5406埃(即,约1.54埃)的波长的X射线来照射。以θ-θ模式中在从5°至40°的2-θ的范围内,使样品每0.02°的2-θ增量(连续扫描模式)暴露1秒。D8的运行时间为15min。

[0348] XRPD 2θ值可在合理的范围内变化,例如在±0.2°的范围内变化,并且当由于各种各样的原因(包括例如优选的方向)对基本上相同的晶体形式进行测量时XRPD强度可能变化。XRPD的原理被描述于出版物中,例如Giacovazzo, C.等人(1995), Fundamentals of Crystallography[晶体的基本原理], Oxford University Press[牛津大学出版社]; Jenkins, R.和Snyder, R.L. (1996), Introduction to X-Ray Powder Diffractometry[对X-射线粉末衍射的介绍], John Wiley&Sons[约翰威利父子出版公司], 纽约;和Klug, H.P. & Alexander, L.E. (1974), X-ray Diffraction Procedures[X-射线衍射程序], John Wiley and Sons[约翰威利父子出版公司], 纽约。

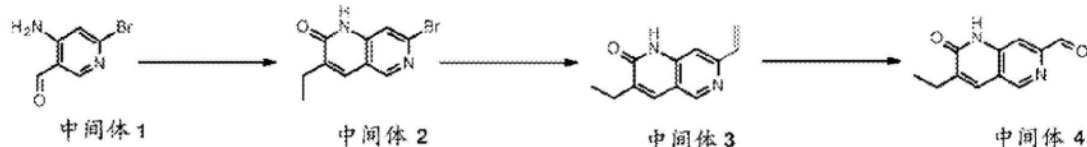
[0349] DSC分析

[0350] 对于根据标准方法制备的样品,使用可获得自TAINSTRUMENTS®(纽卡斯尔,特拉华州)的Q SERIES™ Q1000 DSC热量计进行DSC分析。将样品(大约2mg)称量到铝样品盘中并且转移到该DSC中。将该仪器用氮气以50mL/min吹扫并且使用10°C/分钟的动态加热速率收集在22°C与300°C之间的数据。将热数据使用标准软件(例如,来自TAINSTRUMENTS®的通用v.4.5A)进行分析。

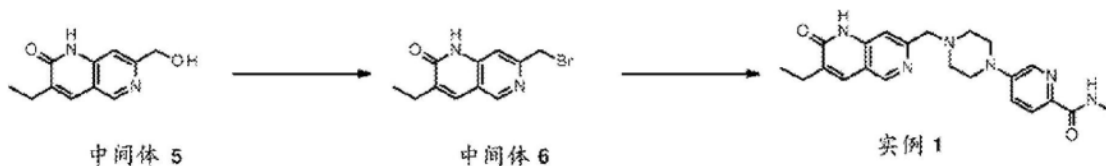
[0351] 使用了以下缩写:AcOH=乙酸;aq=水性;BAST=双(2-甲氧基乙基)氨基三氟化

硫： Boc_2O = 二碳酸二叔丁酯； Boc = 叔丁氧基羰基； CDCl_3 = 氘代氯仿； CD_3OD = 氘代甲醇； CH_3NO_2 = 硝基甲烷； DCE = 1,2-二氯乙烷； DCM = 二氯甲烷； DEA = 二乙胺； DEAD = 偶氮二甲酸二乙酯；戴斯-马丁高碘烷 = 1,1,1-三(乙酰基氧基)-1,1-二氢-1,2-苯碘酰-3-(1H)-酮； DIPEA = N,N-二异丙基乙胺； DMAP = 2,6-二甲基氨基吡啶； DMF = N,N-二甲基甲酰胺； DMSO = 二甲基亚砷； DMSO-d_6 = 氘代二甲亚砷； DPPA = 叠氮磷酸二苯酯； dppf = 1,1'-双(联苯基膦)二茂铁； DIAD = 二-异丙基(E)-二氮烯-1,2-二甲酸酯； DSC = 差示扫描量热法； DTAD = 二-叔丁基(E)-二氮烯-1,2-二甲酸酯； ee = 对映异构体过量； eq. = 当量； ESI = 电喷雾电离； Et_2O = 二乙醚； EtOAc 或 EA = 乙酸乙酯； EtOH = 乙醇； FA = 甲酸；格拉布斯(Grubbs)催化剂(1,3-二茈基咪唑啉-2-亚基)(三环己基膦)二氯化钨； h = 小时； HATU = (二甲基氨基)-N,N-二甲基(3-氧化-1H-[1,2,3]三唑并[4,5-b]吡啶基)甲亚胺鎓六氟磷酸盐； HCl = 盐酸； H_2O_2 = 过氧化氢； HP = 高压； IPA = 异丙醇； LC = 液相色谱； LiClO_4 = 高氯酸锂； mmol = 毫摩尔； mCPBA = 间氯过氧苯甲酸； MeOH = 甲醇； min = 分钟； MeCN 或 CH_3CN = 乙腈； MeNO_2 = 硝基甲烷； MS = 质谱； NMP = N-甲基-2-吡咯烷酮； NMR = 核磁共振； Pd/C = 钯碳； Pd_2dba_3 = 三(二苯亚甲基丙酮)二钯(0)； $\text{PdCl}_2(\text{dppf})$ = 1,1'-双(二-叔丁基膦基)二茂铁二氯化钯； PE = 石油醚； PPh_3 = 三苯基膦； rt = 室温； Rt 或 RT = 保留时间； Ruphos Pd G3 = (2-二环己基膦基-2',6'-二异丙氧基-1,1'-联苯基)[2-(2'-氨基-1,1'-联苯基)]钯(II)甲磺酸酯； sat = 饱和的； SFC = 超临界流体色谱法； T3P = 2,4,6-三丙基-1,3,5,2,4,6-三氧杂三磷杂环己烷2,4,6-三氧化物； TBTU = 2-(1H-苯并[d][1,2,3]三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基异脲鎓四氟硼酸盐； TFA = 三氟乙酸； THF = 四氢呋喃； TLC = 薄层色谱法； TMS = 三甲基甲硅烷基； Xantphos = 4,5-双(联苯基膦基)-9,9-二甲基咕吨； CBr_4 = 四溴化碳； HCl = 盐酸； HBr = 氢溴酸； Cs_2CO_3 = 碳酸铯； MgSO_4 = 硫酸镁； NaHCO_3 = 碳酸氢钠； DDQ = 2,3-二氯-5,6-二氧基-1,4-苯醌； SOCl_2 = 亚硫酰氯； DIBAL-H = 氢化二异丁基铝； NH_4HCO_3 = 碳酸氢铵； BINAP = 2,2'-双(联苯基膦基)-1,1'-联萘基。

[0352] 起始材料和中间体的合成



[0353]



[0354] 中间体2:7-溴-3-乙基-1H-1,6-萘啶-2-酮

[0355] 在 0°C 下,将丁酰氯(0.143mL,1.37mmol)滴加至4-氨基-6-溴-吡啶-3-甲醛(中间体1250mg,1.24mmol)、 DIPEA (1.086mL,6.22mmol)和 DMAP (30.4mg,0.25mmol)在 CH_2Cl_2 (5mL)中的搅拌溶液中。将所得溶液在 rt 下搅拌4h。添加超过2eq的丁酰氯并将反应继续另外的24h。将反应用水稀释并用乙酸乙酯萃取。将有机层经硫酸钠干燥并浓缩以给出粗产物。添加1.5mL MeOH 并将固体(产物)过滤出,用1mL MeOH 洗涤以给出呈白色固体的7-溴-3-乙基-1H-1,6-萘啶-2-酮(中间体2,167mg,53.1%)。

[0356] ^1H NMR (DMSO- d_6) 1.17 (3H, t), 2.45-2.50 (2H, m, 与溶剂DMSO峰重叠), 7.35 (1H, s), 7.82 (1H, s), 8.63 (1H, s), 12.09 (1H, br s); m/z (ES^+) [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ = 252。

[0357] 中间体3:3-乙基-7-乙烯基-1H-1,6-萘啶-2-酮

[0358] 将 $\text{PdCl}_2(\text{dppf})$ (37.6mg, 0.05mmol) 添加至7-溴-3-乙基-1H-1,6-萘啶-2-酮(中间体2, 130mg, 0.51mmol)、4,4,5,5-四甲基-2-乙烯基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷 (0.105mL, 0.62mmol) 和 K_2CO_3 (213mg, 1.54mmol) 在1,4-二噁烷(4mL)/水(1.333mL)中的搅拌混合物中, 并将所得混合物在90°C下搅拌1h。将该反应混合物用水稀释, 并且用乙酸乙酯萃取。将有机层合并, 经硫酸钠干燥并浓缩以给出粗产物。将所得残余物通过快速二氧化硅色谱法(洗脱梯度为DCM中的0%至20%MeOH)进行纯化。将产物级分在减压下浓缩至干燥以得到呈黄色固体的3-乙基-7-乙烯基-1H-1,6-萘啶-2-酮(中间体3, 93mg, 90%)。

[0359] ^1H NMR (DMSO- d_6) 1.18 (3H, t), 2.53 (2H, m, 与溶剂DMSO峰重叠), 5.49 (1H, dd), 6.27 (1H, dd), 6.84 (1H, dd), 7.15 (1H, s), 7.81 (1H, s), 8.78 (1H, s), 12.00 (1H, br s); m/z (ES^+) [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ = 201。

[0360] 中间体4:3-乙基-2-氧代-1H-1,6-萘啶-7-甲醛

[0361] 将在 H_2O 中的四氧化锇 (0.024mL, 3.00 μmol) 添加至3-乙基-7-乙烯基-1H-1,6-萘啶-2-酮(中间体3, 30mg, 0.15mmol)、2,6-二甲基吡啶 (0.035mL, 0.30mmol) 和高碘酸钠 (128mg, 0.60mmol) 在THF (1mL)/水 (0.200mL) 中的溶液中并在rt下搅拌过夜。将反应用水稀释并用乙酸乙酯萃取并将滤液浓缩至干燥。将所得残余物通过快速二氧化硅色谱法(洗脱梯度为DCM中的0%至15%MeOH)进行纯化。将产物级分在减压下浓缩以得到呈淡黄色泡沫的3-乙基-2-氧代-1H-1,6-萘啶-7-甲醛(中间体4, 24.00mg, 79%)。

[0362] ^1H NMR (DMSO- d_6) 1.20 (3H, t), 2.55-2.62 (2H, m, 与溶剂DMSO峰重叠), 7.73 (1H, s), 7.95 (1H, s), 9.03 (1H, s), 10.00 (1H, s), 12.32 (1H, br s); m/z (ES^+) [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ = 203。

[0363] 中间体5:3-乙基-7-(羟基甲基)-1H-1,6-萘啶-2-酮

[0364] 在0°C下, 将硼氢化钠 (61.4mg, 1.62mmol) 缓慢添加至3-乙基-2-氧代-1H-1,6-萘啶-7-甲醛(中间体4, 82mg, 0.41mmol) 在甲醇 (2mL) 中的搅拌溶液中, 并将所得混合物在室温下搅拌1h。在真空下除去甲醇并将所得残余物通过快速二氧化硅色谱法(洗脱梯度为DCM中的0%至35%MeOH)进行纯化。将产物级分在减压下浓缩以得到呈浅黄色固体的3-乙基-7-(羟基甲基)-1H-1,6-萘啶-2-酮(中间体5, 68.0mg, 82%)。

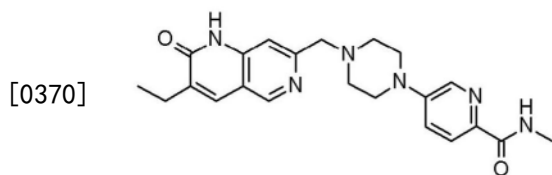
[0365] ^1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) 1.18 (3H, t), 2.52-2.55 (2H, m, 与溶剂DMSO峰重叠), 4.59 (2H, br s), 5.52 (1H, br s), 7.33 (1H, s), 7.80 (1H, s), 8.71 (1H, s), 12.01 (1H, br s); m/z (ES^+) [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ = 205。

[0366] 中间体6:7-(溴甲基)-3-乙基-1H-1,6-萘啶-2-酮

[0367] 在0°C下, 将 CBr_4 (928mg, 2.80mmol) 添加至3-乙基-7-(羟基甲基)-1H-1,6-萘啶-2-酮(中间体5, 381mg, 1.87mmol) 和三苯膦 (734mg, 2.80mmol) 在 CH_2Cl_2 (18.656mL) 中的搅拌溶液中, 并将所得溶液在0°C下搅拌2小时。将反应浓缩, 并将所得残余物通过快速二氧化硅色谱法(洗脱梯度为DCM中的0%至15%MeOH)进行纯化。将产物级分在减压下浓缩以得到呈白色固体的7-(溴甲基)-3-乙基-1H-1,6-萘啶-2-酮(中间体6, 386mg, 77%) (含有三苯基膦氧化物, 难于分离)。将此化合物未经进一步纯化用于下一步骤。

[0368] m/z (ES^+) [M] $^+$ = 267。

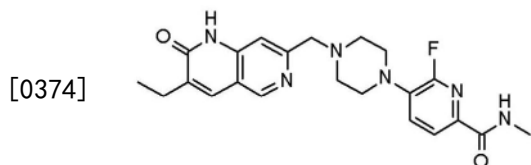
[0369] 合成实例1:5-[4-[(3-乙基-2-氧代-1H-1,6-萘啶-7-基)甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺



[0371] 在20℃下,将DIPEA(0.059mL,0.34mmol)添加至7-(溴甲基)-3-乙基-1H-1,6-萘啶-2-酮(中间体6,30mg,0.11mmol)和N-甲基-5-哌嗪-1-基-吡啶-2-甲酰胺2HCl(中间体13,42.8mg,0.15mmol)在乙腈(1mL)中的搅拌溶液中。将所得溶液在70℃下搅拌2小时。将溶剂在真空下除去并将所得粗材料通过反相色谱法(RediSep Rf Gold®C18,水中0%至90%乙腈,0.1%NH₄OH作为添加剂)进行进一步纯化。将产物级分在减压下浓缩至干燥以得到呈浅黄色固体的5-[4-[(3-乙基-2-氧代-1H-1,6-萘啶-7-基)甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺(合成实例1,23.60mg,51.7%)。

[0372] ¹H NMR(500MHz,DMSO-d₆) 1.18(3H,br t),2.54(2H,m,与溶剂DMSO峰重叠),2.67(4H,br s),2.79(3H,br d),3.38(4H,br s),3.75(2H,br s),7.34(1H,s),7.42(1H,br dd),7.77-7.88(2H,m),8.29(1H,br d),8.40(tH,br d),8.75(1H,s),11.60-12.11(1H,m); m/z(ES⁺) [M+H]⁺=407。

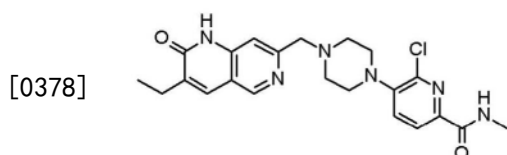
[0373] 合成实例2:5-[4-[(3-乙基-2-氧代-1H-1,6-萘啶-7-基)甲基]哌嗪-1-基]-6-氟-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺



[0375] 在20℃下,将DIPEA(0.082mL,0.47mmol)添加至7-(溴甲基)-3-乙基-1H-1,6-萘啶-2-酮(中间体6,25mg,0.09mmol)和6-氟-N-甲基-5-哌嗪-1-基-吡啶-2-甲酰胺HCl(中间体23,28.3mg,0.10mmol)在乙腈(2mL)中的搅拌溶液中。将所得溶液在70℃下搅拌2小时。将溶剂在真空下除去。将所得残余物通过快速二氧化硅色谱法(洗脱梯度为DCM中的0%至20%MeOH)进行纯化。将产物级分在减压下浓缩以得到呈浅黄色固体的5-[4-[(3-乙基-2-氧代-1H-1,6-萘啶-7-基)甲基]哌嗪-1-基]-6-氟-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺(合成实例2,17.00mg,42.8%)。

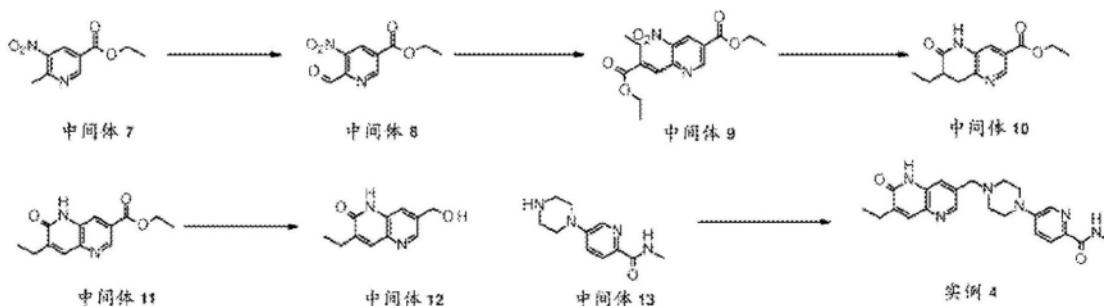
[0376] ¹H NMR(500MHz,DMSO-d₆) 1.18(3H,t),2.52-2.55(2H,m,与溶剂DMSO峰重叠),2.64(4H,br s),2.77(3H,d),3.20(4H,br s),3.70(2H,s),7.32(1H,s),7.59(1H,dd),7.80(1H,s),7.86(1H,d),8.31-8.49(1H,m),8.73(1H,s),11.93(1H,br s); m/z(ES⁺) [M+H]⁺=425。

[0377] 合成实例3:6-氧-5-[4-[(3-乙基-2-氧代-1H-1,6-萘啶-7-基)甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺



[0379] 在20℃下,将DIPEA(0.082mL,0.47mmol)添加至7-(溴甲基)-3-乙基-1H-1,6-萘啶-2-酮(中间体6,25mg,0.09mmol)和6-氯-N-甲基-5-哌嗪-1-基-吡啶-2-甲酰胺2HCl(中间体47,33.7mg,0.10mmol)在乙腈(2mL)中的搅拌溶液中,并将所得溶液在70℃下搅拌2小时。将溶剂在真空下除去。将所得残余物通过快速二氧化硅色谱法(洗脱梯度为DCM中的0%至20%MeOH)进行纯化。将产物级分在减压下浓缩以得到呈白色固体的6-氯-5-[4-[(3-乙基-2-氧代-1H-1,6-萘啶-7-基)甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺(合成实例3,19.20mg,46.5%)。

[0380] $^1\text{H NMR}$ (500MHz,DMSO- d_6) 1.18(3H,t),2.53(2H,m,与溶剂DMSO峰重叠),2.66(4H,br s),2.80(3H,d),3.15(4H,br s),3.72(2H,s),7.33(1H,s),7.68(1H,d),7.81(1H,s),7.95(1H,d),8.43(1H,br d),8.74(1H,s),11.93(1H,s); m/z (ES^+) $[M+H]^+=441$ 。



[0382] 中间体8:乙基6-甲酰基-5-硝基-吡啶-3-甲酸酯

[0383] 将乙基6-甲基-5-硝基-吡啶-3-甲酸酯(中间体7,10g,47.58mmol)和二氧化硒(7.92g,71.36mmol)在1,4-二噁烷(50mL)中的混合物在110℃下搅拌20h。将反应混合物冷却至室温,通过硅藻土垫过滤并将硅藻土用乙酸乙酯洗涤。将合并的滤液浓缩,并将所得残余物通过快速二氧化硅色谱法(洗脱梯度为己烷中的0%至70%乙酸乙酯)进行纯化。将产物级分在减压下浓缩以得到呈棕色油状物的乙基6-甲酰基-5-硝基-吡啶-3-甲酸酯(中间体8,9.70g,91%)。 $^1\text{H NMR}$ (500MHz,氯仿- d) 1.48(3H,t),4.54(2H,q),8.81(1H,d),9.51(1H,d),10.32(1H,s); m/z (ES^+) $[M]^+=224$ 。

[0384] 中间体9:乙基6-[(E)-2-乙氧基羰基丁-1-烯基]-5-硝基-吡啶-3-甲酸酯(EZ异构体的混合物)

[0385] 在0℃下用加料漏斗向氢化钠(9.63g,240.89mmol)(60%,在矿物油中)在无水THF(100mL)中的搅拌溶液中滴加乙基2-(二乙氧基磷酰基)丁酸酯(60.8g,240.89mmol)以给出灰色的混合物。将所得混合物在0℃下搅拌10min并经10分钟加温至室温并在40℃下搅拌持续5分钟。将反应混合物冷却至-78℃,并然后向该冷却的反应混合物中缓慢添加乙基6-甲酰基-5-硝基-吡啶-3-甲酸酯(中间体8,22.5g,100.37mmol)在100ml THF中的溶液。将混合物用饱和 NH_4Cl 溶液淬灭,用乙酸乙酯萃取。将合并的有机层经 Na_2SO_4 干燥,过滤并浓缩以给出粗产物。将所得残余物通过快速二氧化硅色谱法(洗脱梯度为己烷中的0%至50%乙酸乙酯)进行纯化。将产物级分在减压下浓缩以得到呈黄色油状物的乙基6-[(E)-2-乙氧基羰基丁-1-烯基]-5-硝基-吡啶-3-甲酸酯(中间体9,24.30g,75%)(E/Z异构体的1:1混合物)。 ^1H

NMR (500MHz, 氯仿-d) 1.13 (3H, t), 1.18 (3H, t), 1.23 (3H, t), 1.37 (3H, t), 1.45 (6H, q), 2.57 (2H, qd), 2.66 (2H, q), 4.11-4.24 (2H, m), 4.32 (2H, q), 4.45-4.56 (4H, m), 7.08 (1H, s), 7.85 (1H, s), 8.86 (2H, dd), 9.26 (1H, d), 9.43 (1H, d); m/z (ES⁺) [M]⁺ = 322。

[0386] 中间体10: 乙基7-乙基-6-氧代-7,8-二氢-5H-1,5-萘啶-3-甲酸酯

[0387] 将乙基6-[(E)-2-乙氧基羰基丁-1-烯基]-5-硝基-吡啶-3-甲酸酯(E/Z异构体的1:1混合物)(中间体9, 3.75g, 11.63mmol)、Pd/C(1.857g, 1.75mmol)(10%) 在乙醇(30mL)中的混合物脱气, 用H₂(气囊)充满, 并将反应在室温下在H₂气氛搅拌过夜。将混合物通过硅藻土床过滤并将硅藻土床用乙醇洗涤。浓缩后, 将在二噁烷(15ml)中的4M HCl添加至将所得残余物并将混合物在室温下搅拌30min。将混合物用乙醚稀释并将固体过滤出, 用二乙醚洗涤, 并在真空下干燥以得到呈白色固体的乙基7-乙基-6-氧代-7,8-二氢-5H-1,5-萘啶-3-甲酸酯(中间体10, 2.260g, 78%)。1H NMR (500MHz, DMSO-d₆) 0.94 (3H, t), 1.33 (3H, t), 1.41-1.51 (1H, m), 1.69-1.81 (1H, m), 2.41-2.48 (1H, m), 2.94 (1H, dd), 3.20 (1H, dd), 4.35 (2H, t), 7.67 (1H, d), 8.61 (1H, d), 10.32 (1H, s); m/z (ES⁺) [M+H]⁺ = 249。

[0388] 中间体11: 乙基7-乙基-6-氧代-5H-1,5-萘啶-3-甲酸酯

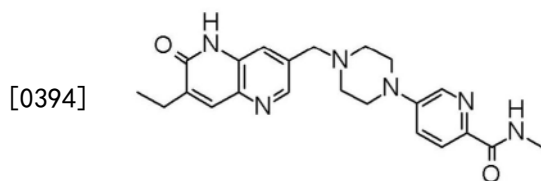
[0389] 将乙基7-乙基-6-氧代-7,8-二氢-5H-1,5-萘啶-3-甲酸酯(中间体10, 2.26g, 9.10mmol) 溶解于1,4-二噁烷(40mL)中, 添加DDQ(2.273g, 10.01mmol) 并将混合物在回流下搅拌3h。在减压下除去溶剂, 添加饱和NaHCO₃溶液并将残余物在室温下搅拌1hr。将固体过滤出, 用水随后10ml二乙醚洗涤。将所得固体在真空下干燥得到呈淡棕色固体的乙基7-乙基-6-氧代-5H-1,5-萘啶-3-甲酸酯(中间体11, 1.738g, 78%)。

[0390] 1H NMR (500MHz, DMSO-d₆) 1.14-1.28 (3H, m), 1.35 (3H, t), 2.58 (2H, q), 4.38 (2H, q), 7.83 (1H, s), 8.17 (1H, s), 8.90 (1H, s), 12.05 (1H, s); m/z (ES⁺) [M+H]⁺ = 247。

[0391] 中间体12: 3-乙基-7-(羟基甲基)-1H-1,5-萘啶-2-酮

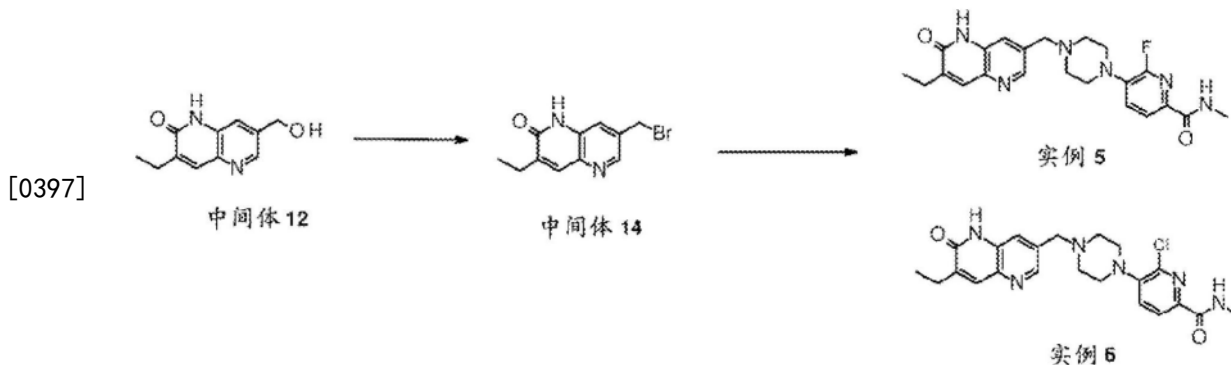
[0392] 在0℃下经45分钟的时间段在氮下, 将氢化铝锂(2M, 在THF(29.2mL, 58.47mmol)中)滴加至在四氢呋喃(150mL)中的乙基7-乙基-6-氧代-5H-1,5-萘啶-3-甲酸酯(中间体11, 7.2g, 29.24mmol)中。将所得混合物在0℃下搅拌1.5小时。将反应混合物通过滴加1M aq HCl(29mL)淬灭。将反应混合物浓缩并将固体用水(约150ml)和29ml 1M HCl溶液稀释给出黄色悬浮液。通过过滤收集固体, 用水、二乙醚洗涤并干燥以产生呈黄色固体的粗产物(被一些无机盐污染)。将此固体悬浮于甲醇和DCM的混合物(2:1)(400ml)中并加热至回流。将固体滤出。将此固体重悬于甲醇/DCM混合物中并重复此程序5次以从此混合物中除去大部分产物。然后将合并的滤液浓缩直至约100ml, 并将固体通过过滤收集, 用乙醚洗涤, 在真空下干燥以产生呈黄色固体的3-乙基-7-(羟基甲基)-1H-1,5-萘啶-2-酮(中间体12, 4.35g, 72.8%)。1H NMR (500MHz, DMSO-d₆) 1.18 (3H, t), 2.52-2.56 (2H, m), 4.61 (2H, d), 5.44 (1H, t), 7.61 (1H, s), 7.74 (1H, s), 8.37 (1H, s), 11.87 (1H, br s); m/z (ES⁺) [M+H]⁺ = 205.3。

[0393] 合成实例4: 5-[4-[(7-乙基-6-氧代-5H-1,5-萘啶-3-基)甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺



[0395] 在0℃下,将亚硫酸氯(6.41mL,88.14mmol)滴加至3-乙基-7-(羟基甲基)-1,5-萘啶-2(1H)-酮(中间体12,3g,14.69mmol)和N,N-二甲基甲酰胺(0.114mL,1.47mmol)在CH₂Cl₂(60mL)中的悬浮液中并将所得溶液在室温下搅拌6小时。将混合物浓缩至干燥以给出粗制7-(氯甲基)-3-乙基-1H-1,5-萘啶-2-酮(中间体17)。

[0396] 在20℃下,将DIPEA(12.83mL,73.45mmol)添加至7-(氯甲基)-3-乙基-1H-1,5-萘啶-2-酮(中间体17,粗制,来自上文)、碘化钾(0.488g,2.94mmol)和N-甲基-5-哌嗪-1-基-吡啶-2-甲酰胺·2HCl(中间体13,4.31g,14.69mmol)在乙腈(50.00mL)中的搅拌溶液中。将所得溶液在80℃下搅拌2小时。将溶剂在真空下除去。将粗材料用水稀释,用NaHCO₃水溶液碱化,并用乙酸乙酯萃取。将有机层经硫酸钠干燥并浓缩以给出粗产物。将所得残余物通过快速二氧化硅色谱法(洗脱梯度为DCM中的0%至15%MeOH)进行纯化。将产物级分在减压下浓缩以得到呈灰白色部分结晶固体的5-[4-[(7-乙基-6-氧代-5H-1,5-萘啶-3-基)甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺(合成实例4,3.93g,65.8%)。¹H NMR(500MHz,DMSO-d₆) 1.19(3H,t),2.53-2.59(6H,m),2.79(3H,d),3.33-3.39(4H,m),3.66(2H,s),7.39(1H,dd),7.64(1H,s),7.76(1H,s),7.83(1H,d),8.27(1H,d),8.36-8.40(1H,m),8.41(1H,d),11.85(1H,s);m/z(ES⁺)[M]⁺=406。

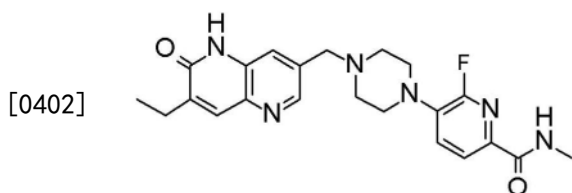


[0398] 中间体14:7-(溴甲基)-3-乙基-1H-1,5-萘啶-2-酮

[0399] 在0℃下,将CBr₄(219mg,0.66mmol)添加至3-乙基-7-(羟基甲基)-1,5-萘啶-2-酮(中间体12,90mg,0.44mmol)和三苯膦(173mg,0.66mmol)在CH₂Cl₂(4mL)中的搅拌溶液中。将所得溶液在0℃下搅拌2小时。将反应在真空下浓缩并将所得残余物通过快速二氧化硅色谱法(洗脱梯度为DCM中的0%至15%MeOH)进行纯化。将产物级分在减压下浓缩以得到7-(溴甲基)-3-乙基-1,5-萘啶-2-酮(中间体14,84mg,71.4%)(含有三苯基膦氧化物,难于分离)。将此化合物未经进一步纯化用于下一步骤。

[0400] m/z(ES⁺)[M]⁺=267。

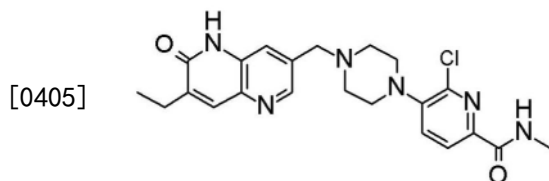
[0401] 合成实例5:5-[4-[(7-乙基-6-氧代-5H-1,5-萘啶-3-基)甲基]哌嗪-1-基]-6-氟-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺



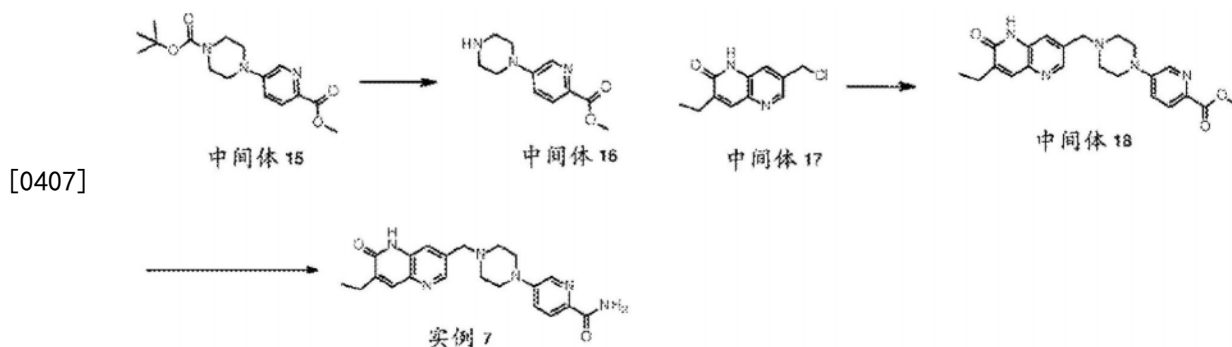
[0403] 在20℃下,将DIPEA(0.082mL,0.47mmol)添加至7-(溴甲基)-3-乙基-1H-1,5-萘啶-2-酮(中间体14,25mg,0.09mmol)和6-氟-N-甲基-5-哌嗪-1-基-吡啶-2-甲酰胺·2HCl

(中间体23, 32.0mg, 0.10mmol) 在乙腈(2mL)中的搅拌溶液中。将所得溶液在70℃下搅拌2小时。将溶剂在真空下除去。将所得残余物通过快速二氧化硅色谱法(洗脱梯度为DCM中的0%至20%MeOH)进行纯化。将产物级分在减压下浓缩以得到浅黄色固体的5-[4-[(7-乙基-6-氧代-5H-1,5-萘啶-3-基)甲基]哌嗪-1-基]-6-氟-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺(合成实例5, 13.00mg, 33%)。¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) 1.19 (3H, t), 2.55 (2H, m, 与溶剂DMSO峰重叠), 2.58 (4H, br d), 2.77 (3H, d), 3.19 (4H, br s), 3.67 (2H, s), 7.57 (1H, dd), 7.63 (1H, s), 7.76 (1H, s), 7.85 (1H, d), 8.32-8.49 (2H, m), 11.85 (1H, s); m/z (ES⁺) [M+H]⁺ = 425。

[0404] 合成实例6: 6-氯-5-[4-[(7-乙基-6-氧代-5H-1,5-萘啶-3-基)甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺



[0406] 在20℃下, 将DIPEA (0.082mL, 0.47mmol) 添加至7-(溴甲基)-3-乙基-1H-1,5-萘啶-2-酮(中间体14, 25mg, 0.09mmol) 和6-氯-N-甲基-5-哌嗪-1-基-吡啶-2-甲酰胺(中间体48, 26.2mg, 0.10mmol) 在乙腈(2mL)中的搅拌溶液中。将所得溶液在70℃下搅拌2小时。将溶剂在真空下除去。将所得残余物通过快速二氧化硅色谱法(洗脱梯度为DCM中的0%至20%MeOH)进行纯化。将产物级分在减压下浓缩以得到呈浅黄色固体的6-氯-5-[4-[(7-乙基-6-氧代-5H-1,5-萘啶-3-基)甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺(合成实例6, 19.80mg, 48.0%)。¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) 1.19 (3H, t), 2.55 (2H, m, 与溶剂DMSO峰重叠), 2.58-2.65 (4H, m), 2.79 (3H, d), 3.13 (4H, br s), 3.68 (2H, s), 7.63 (1H, d), 7.67 (1H, d), 7.76 (1H, s), 7.94 (1H, d), 8.34-8.50 (2H, m), 11.85 (1H, s); m/z (ES⁺) [M+H]⁺ = 441。



[0408] 中间体16: 甲基5-哌嗪-1-基吡啶-2-甲酸酯

[0409] 将在二噁烷中的HCl (4.67mL, 18.67mmol) 添加至叔丁基4-(6-甲氧基羰基-3-吡啶基)哌嗪-1-甲酸酯(中间体15, 600mg, 1.87mmol) 在MeOH(1mL)中的搅拌溶液中, 并将所得溶液在rt下搅拌18小时。将溶剂在真空下除去以给出呈淡黄色固体的甲基5-哌嗪-1-基吡啶-2-甲酸酯2HCl(中间体16, 543mg, 99%)。

[0410] ¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) 3.20 (4H, br s), 3.71 (4H, br s), 3.85 (3H, s), 7.58 (1H, br d), 7.99 (1H, br d), 8.43 (1H, br s), 9.73 (2H, br), 11.29-11.75 (1H, br); m/z (ES⁺) [M+H]⁺ = 222。

[0411] 中间体18: 甲基5-[4-[(7-乙基-6-氧代-5H-1,5-萘啶-3-基)甲基]哌嗪-1-基]吡

氧化硅色谱法(洗脱梯度为己烷中的0%至25%EtOAc)进行纯化。将产物级分在减压下浓缩至干燥以得到甲基5-溴-6-氟-吡啶-2-甲酸酯(中间体20, 5.98g, 产率90%)。¹H NMR (500MHz, 氯仿-d) 4.01 (3H, s), 7.93 (1H, d), 8.15 (1H, t); m/z (ES⁺) [M]⁺ = 234。

[0419] 中间体21:叔丁基4-(2-氟-6-甲氧基羰基-3-吡啶基)哌嗪-1-甲酸酯

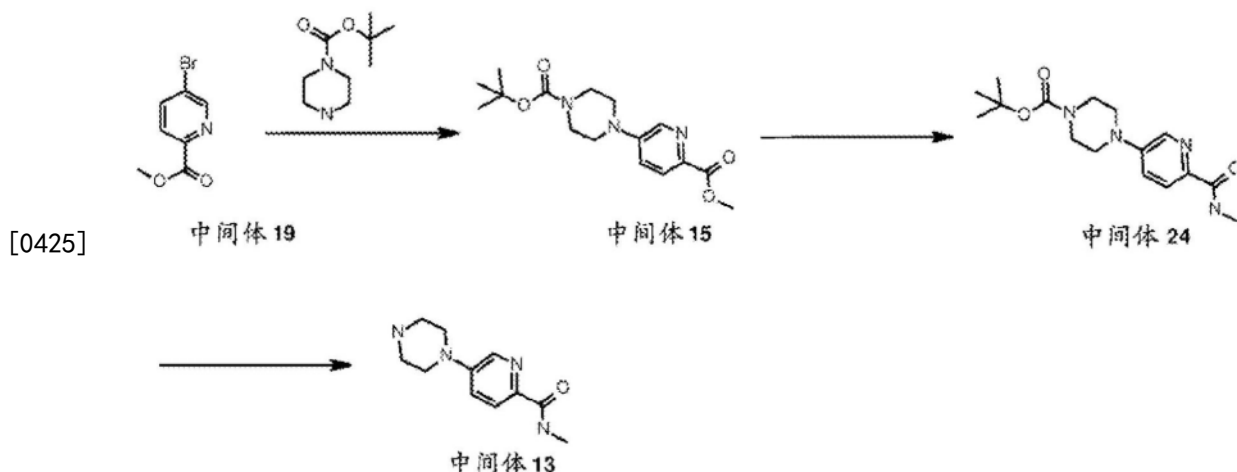
[0420] 在80℃下,将叔丁基哌嗪-1-甲酸酯(13.11g, 70.41mmol)、甲基5-溴-6-氟-吡啶-2-甲酸酯(中间体20, 10.985g, 46.94mmol)、RuphosPd-G3 (2.5g, 2.99mmol)和Cs₂CO₃ (38g, 116.63mmol)在1,4-二噁烷(200mL)中的混合物在N₂下搅拌过夜。将混合物用水和乙酸乙酯稀释,将各层分离。将水层用DCM(100mL x2)萃取。将合并的有机层经Na₂SO₄干燥,过滤并浓缩。将所得残余物通过快速二氧化硅色谱法(洗脱梯度为己烷中的0%至100%EtOAc)进行纯化。将产物级分在减压下浓缩至干燥以得到呈黄色固体的叔丁基4-(2-氟-6-甲氧基羰基-3-吡啶基)哌嗪-1-甲酸酯(中间体21, 14.00g, 88%); ¹H NMR (500MHz, 氯仿-d) 1.51 (9H, s), 3.16-3.32 (4H, m), 3.58-3.72 (4H, m), 3.98 (3H, s), 7.29-7.34 (1H, m), 8.00 (1H, d); m/z (ES⁺) [M+H]⁺ = 340。

[0421] 中间体22:叔丁基4-[2-氟-6-(甲基氨基甲酰基)-3-吡啶基]哌嗪-1-甲酸酯

[0422] 将在甲胺(120mL, 36.80mmol, 33wt%, 在乙醇中)中的叔丁基4-(2-氟-6-甲氧基羰基-3-吡啶基)哌嗪-1-甲酸酯(中间体21, 12.49g, 36.80mmol)在r.t下搅拌24hr(密封管)。在减压下除去溶剂。将残余物溶解于DCM中并通过硅胶床过滤并用乙酸乙酯洗涤。将滤液浓缩并在真空下干燥以得到呈黄色固体的叔丁基4-[2-氟-6-(甲基氨基甲酰基)-3-吡啶基]哌嗪-1-甲酸酯(中间体22, 12.45g, 100%)。 ¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) 1.42 (9H, s), 2.77 (3H, d), 3.04-3.16 (4H, m), 3.43-3.56 (4H, m), 7.59 (1H, dd), 7.80-7.93 (1H, m), 8.41 (1H, q); m/z (ES⁺) [M+H]⁺ = 340。

[0423] 中间体23:6-氟-N-甲基-5-哌嗪-1-基-吡啶-2-甲酰胺

[0424] 在0℃下,将HCl (4M, 在二噁烷中, 100mL, 400.00mmol)添加至叔丁基4-[2-氟-6-(甲基氨基甲酰基)-3-吡啶基]哌嗪-1-甲酸酯(中间体22, 12.5g, 36.94mmol)在1,4-二噁烷(50mL)中的溶液中。将反应搅拌5h,在这期间将温度加温至室温以给出黄色悬浮液。将悬浮液用乙醚稀释,过滤出固体并用乙醚洗涤。将此固体在真空下干燥以得到呈淡黄色固体的6-氟-N-甲基-5-哌嗪-1-基-吡啶-2-甲酰胺2HCl (中间体23, 11.42g, 99%)。 ¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ_{ppm} 2.8 (d, J=4.6Hz, 3H) 3.3 (br s, 4H) 3.4 (br d, J=4.4Hz, 4H) 7.6-7.7 (m, 1H) 7.9 (d, J=8.1Hz, 1H) 8.4 (br d, J=4.4Hz, 1H) 9.0-9.3 (m, 2H); m/z (ES⁺) [M+H]⁺ = 239



[0426] 中间体15:叔丁基4-(6-甲氧基羰基-3-吡啶基)哌嗪-1-甲酸酯

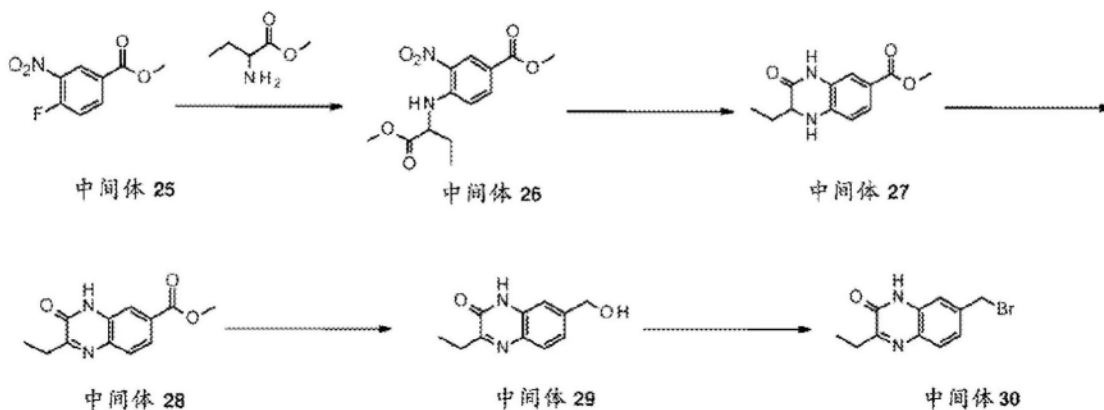
[0427] 将Ruphos Pd G3 (4.07g, 4.86mmol) 添加到甲基5-溴吡啶-2-甲酸酯(中间体19, 30g, 138.87mmol)、哌嗪-1-甲酸叔丁酯(27.2g, 145.81mmol)、 Cs_2CO_3 (90g, 277.73mmol) 在1,4-二噁烷(200mL)中的脱气混合物中,并且将混合物在110°C下在 N_2 气氛下搅拌6h。然后将混合物冷却至室温,用水稀释,用乙酸乙酯萃取(150ml x3)。将合并的有机层经无水 Na_2SO_4 干燥并过滤。向此滤液中添加3-(二亚乙基三氨基)丙基官能化的硅胶(12g, 1.3mmol/g加载)并将混合物在r.t下搅拌1hr。将混合物过滤,并将滤液浓缩至约100ml。将结晶的黄色固体过滤出,用乙醚洗涤并在真空下干燥以得到呈黄色固体的叔丁基4-(6-甲氧基羰基-3-吡啶基)哌嗪-1-甲酸酯(中间体15, 26.36g, 82mmol, 59.1%)。 $^1\text{H NMR}$ (500MHz, 氯仿-d) 1.50 (9H, s), 3.31-3.42 (4H, m), 3.56-3.68 (4H, m), 3.98 (3H, s), 8.04 (1H, d), 8.37 (1H, d); m/z (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 322$ 。

[0428] 中间体24:叔丁基4-/6-(甲基氨基甲酰基)-3-吡啶基]哌嗪-1-甲酸酯

[0429] 将甲胺(100ml, 1155.26mmol, 40%, 在水中)添加至叔丁基4-(6-甲氧基羰基-3-吡啶基)哌嗪-1-甲酸酯(中间体15, 36g, 112.02mmol)在MeOH(100mL)中的溶液中,并将反应在室温下搅拌4h以给出白色悬浮液。将混合物浓缩,将残余物在饱和 NH_4Cl 溶液与DCM之间分配,将各层分离。将水层用DCM萃取,将有机层合并,用盐水洗涤,经 Na_2SO_4 干燥,过滤并浓缩以给出呈黄色固体的叔丁基4-[6-(甲基氨基甲酰基)-3-吡啶基]哌嗪-1-甲酸酯(中间体24, 35.9g, 100%)。 $^1\text{H NMR}$ (500MHz, 氯仿-d) 1.49 (9H, s), 3.02 (3H, d), 3.26-3.35 (4H, m), 3.58-3.67 (4H, m), 7.23 (1H, dd), 7.81 (1H, br d), 8.07 (1H, d), 8.16 (1H, d); m/z (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 321$ 。

[0430] 中间体13:甲酸酯N-甲基-5-哌嗪-1-基-吡啶-2-甲酰胺

[0431] 将HCl (4M, 在二噁烷中, 150ml, 600.00mmol) 添加至叔丁基4-[6-(甲基氨基甲酰基)-3-吡啶基]哌嗪-1-甲酸酯(中间体24, 35.9g, 112.05mmol) 在MeOH(50mL)中的悬浮液中,并将所得橙色悬浮液在r.t下搅拌4hr。在减压下除去约80ml的溶剂,并将混合物用乙醚和己烷(200ml, 1/1)稀释。将固体通过过滤收集,用己烷洗涤,干燥,并在真空下干燥以得到呈黄色固体的N-甲基-5-哌嗪-1-基-吡啶-2-甲酰胺 2HCl 盐(中间体13, 37.0g, 100%)。 $^1\text{H NMR}$ (500MHz, DMSO-d_6) 2.79 (3H, d), 3.22 (4H, br s), 3.53-3.67 (4H, m), 7.51 (1H, dd), 7.91 (1H, d), 8.33 (1H, d), 8.50 (1H, br s), 9.19-9.49 (2H, m); m/z (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 221$



[0433] 中间体26: 甲基4-(1-甲氧基羰基丙基氨基)-3-硝基-苯甲酸酯

[0434] 将碳酸氢钠(27.0g, 321.39mmol)分批添加至甲基4-氟-3-硝基苯甲酸酯(中间体25, 16g, 80.35mmol)、和甲基2-氨基丁酸酯HCl(14.81g, 96.42mmol)在THF(100mL)中的搅拌混合物中。将反应混合物在室温下搅拌过夜。将反应通过添加水淬灭,用乙酸乙酯萃取。将合并的有机层用饱和NaHCO₃水溶液洗涤,将有机层经MgSO₄干燥并浓缩至干燥以给出呈亮黄色固体的甲基4-(1-甲氧基羰基丙基氨基)-3-硝基-苯甲酸酯(中间体26, 22.86g, 96%)。¹H NMR(500MHz, DMSO-d₆) 0.91(3H, t), 1.75-2.12(2H, m), 3.75(3H, s), 3.85(3H, s), 4.63-4.82(1H, m), 7.15(1H, d), 8.00(1H, dd), 8.52-8.76(2H, m)。

[0435] 中间体27: 甲基2-乙基-3-氧代-2,4-二氢-1H-喹啉-6-甲酸酯

[0436] 将Pd/C(4.15g, 3.90mmol)分批添加至甲基4-(1-甲氧基羰基丙基氨基)-3-硝基-苯甲酸酯(中间体26, 23.1g, 77.97mmol)在MeOH(300mL)中的搅拌溶液中,并将所得浆液在H₂气氛下在室温下搅拌30h。将甲醇在真空下除去,添加150mL DMF并将混合物搅拌10min。将钯催化剂在硅藻土上过滤出,用50mL DMF洗涤(材料在有机溶剂(像MeOH/DCM/EtOAc)中具有非常低的溶解度)。将滤液在Genevac中浓缩以给出呈灰色固体的甲基2-乙基-3-氧代-2,4-二氢-1H-喹啉-6-甲酸酯(中间体27, 15.80g, 87%)。将材料通过NMR分析,并不经纯化直接用于下一步骤。¹H NMR(500MHz, DMSO-d₆) 0.91(3H, t), 1.63-1.73(2H, m), 3.75(3H, s), 3.90(1H, td), 6.71(1H, d), 6.84(1H, s), 7.33(1H, d), 7.41(1H, dd), 10.39(1H, s); m/z (ES⁺) [M]⁺ = 235。

[0437] 中间体28: 甲基2-乙基-3-氧代-4H-喹啉-6-甲酸酯

[0438] 将DDQ(15.87g, 69.92mmol)添加至甲基2-乙基-3-氧代-2,4-二氢-1H-喹啉-6-甲酸酯(中间体27, 15.6g, 66.59mmol)在1,4-二噁烷(150mL)中的悬浮液中。将反应混合物在室温下搅拌过夜。将混合物缓慢添加至饱和NaHCO₃水溶液(约500ml)中并在室温下搅拌20min。将沉淀物过滤,用水(100ml)洗涤并干燥以产生呈灰白色固体的甲基2-乙基-3-氧代-4H-喹啉-6-甲酸酯(中间体28, 11.40g, 73.7%)。¹H NMR(500MHz, DMSO-d₆) 1.23(3H, t), 2.83(2H, q), 3.89(3H, s), 7.73-7.86(2H, m), 7.89(1H, d), 12.45(1H, s); m/z (ES⁺) [M+H]⁺ = 233。

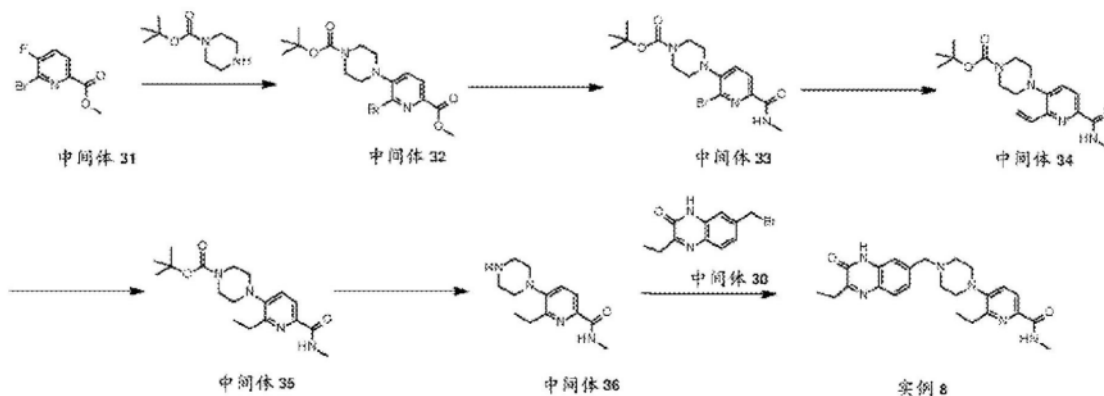
[0439] 中间体29: 3-乙基-7-(羟基甲基)-1H-喹啉-2-酮

[0440] 在0℃下经50分钟的时间段在氮气气氛下,将氢化铝锂(2M, 在THF(49.1mL, 98.17mmol)中)滴加至甲基2-乙基-3-氧代-4H-喹啉-6-甲酸酯(中间体28, 11.4g, 49.09mmol)在四氢呋喃(350mL)中的浆液中。将所得混合物在0℃下搅拌1.5小时。在0℃下,

将反应混合物缓慢倾倒入1M HCl水溶液(300mL)中。将反应混合物用乙酸乙酯(约300ml X2)萃取随后用DCM/甲醇(5:1)(150ml x3)萃取。将合并的有机层浓缩至300ml中,并用乙醚(200ml)稀释以给出悬浮液。将固体通过过滤收集,用乙醚洗涤,在真空下干燥以产生3-乙基-7-(羟基甲基)-1H-喹啉-2-酮(中间体29,8.00g,80%)。¹H NMR(500MHz,DMSO-d₆) 1.22(3H,t),2.80(2H,q),4.59(2H,s),5.19-5.61(1H,m),7.19(1H,dd),7.28(1H,s),7.66(1H,d),12.28(1H,br s);m/z(ES⁺)[M+H]⁺=205。

[0441] 中间体30:7-(溴甲基)-3-乙基-1H-喹啉-2-酮

[0442] 将溴化氢(60ml,48wt%,在水中)添加至3-乙基-7-(羟基甲基)-1H-喹啉-2-酮(中间体29,7.8g,38.19mmol)(产生澄清棕色溶液)并将混合物在80°C下搅拌8hr,将反应混合物冷却至室温,倾倒入150mL冰水中以给出灰白色沉淀物。将固体在真空下过滤,并用水随后二乙醚洗涤,并干燥以给出呈米黄色固体的纯度为80%的7-(溴甲基)-3-乙基-1H-喹啉-2-酮(中间体30,11.10g,84%)。¹H NMR(500MHz,DMSO-d₆) 1.20(3H,t),2.79(2H,q),4.79(2H,s),7.27-7.38(2H,m),7.69(1H,d),12.34(1H,br s);m/z(ES⁺)[M]⁺=267.0。



[0443]

[0444] 中间体32:叔丁基4-(2-溴-6-甲氧基羰基-3-吡啶基)哌嗪-1-甲酸酯

[0445] 将叔丁基哌嗪-1-甲酸酯(中间体31,2.57g,13.80mmol)、甲基6-溴-5-氟-吡啶-2-甲酸酯(1.9g,8.12mmol)和碳酸钾(1.459g,10.55mmol)在DMF(20mL)中的混合物在110°C下搅拌5小时,LCMS指示完全转化。将混合物冷却至r.t,用DCM和水稀释,将各层分离。将水层用DCM萃取两次并将合并的有机层经无水Na₂SO₄干燥,过滤并浓缩。将所得的残余物通过快速二氧化硅色谱法(洗脱梯度为己烷中的0%至50%EtOAc)进行纯化。将产物级分在减压下浓缩至干燥以得到呈淡黄色固体的叔丁基4-(2-溴-6-甲氧基羰基-3-吡啶基)哌嗪-1-甲酸酯(中间体32,2.200g,67.7%)。¹H NMR(500MHz,氯仿-d) 1.50(9H,s),3.05-3.20(4H,m),3.58-3.72(4H,m),3.98(3H,s),7.31(1H,d),8.06(1H,d);m/z(ES⁺)[M+H]⁺=400。

[0446] 中间体33:叔丁基4-[2-溴-6-(甲基氨基甲酰基)-3-吡啶基]哌嗪-1-甲酸酯

[0447] 将密封的压力容器用叔丁基4-(2-溴-6-甲氧基羰基-3-吡啶基)哌嗪-1-甲酸酯(中间体32,2.2g,5.50mmol)和甲胺(22ml,176.72mmol)(33w.t%,在乙醇中)填充,并将混合物在60°C下加热2小时,LCMS指示完全转化。将混合物浓缩,并将所得残余物通过快速二氧化硅色谱法(洗脱梯度为己烷中的0%至80%EtOAc)进行纯化。将产物级分在减压下浓缩至干燥以得到呈白色固体的叔丁基4-[2-溴-6-(甲基氨基甲酰基)-3-吡啶基]哌嗪-1-甲酸酯(中间体33,2.200g,100%)。¹H NMR(500MHz,氯仿-d) 1.50(9H,s),3.02(3H,d),3.05-3.14(4H,m),3.56-3.74(4H,m),7.36(1H,d),7.68(1H,br d),8.11(1H,d);m/z(ES⁺)[M+H]⁺

=399。

[0448] 中间体34:叔丁基4-/6-(甲基氨基甲酰基)-2-乙烯基-3-吡啶基]哌嗪-1-甲酸酯

[0449] 将叔丁基4-[2-溴-6-(甲基氨基甲酰基)-3-吡啶基]哌嗪-1-甲酸酯(中间体33, 200mg, 0.50mmol)、三丁基(乙烯基)锡烷(0.161ml, 0.55mmol)和第二代XPhos Pd循环(19.71mg, 0.03mmol)在1,4-二噁烷(5ml)中的混合物在100℃下在N₂下搅拌2.5hr, LCMS指示完全转化。将混合物用DCM稀释, 用饱和NH₄Cl洗涤, 将有机层干燥(无水Na₂SO₄), 过滤并浓缩。将所得的残余物通过快速二氧化硅色谱法(洗脱梯度为己烷中的0%至80%EtOAc)进行纯化。将产物级分在减压下浓缩至干燥以得到呈白色固体的叔丁基4-[6-(甲基氨基甲酰基)-2-乙烯基-3-吡啶基]哌嗪-1-甲酸酯(中间体34, 174mg, 100%)。m/z (ES⁺) [M+H]⁺=347

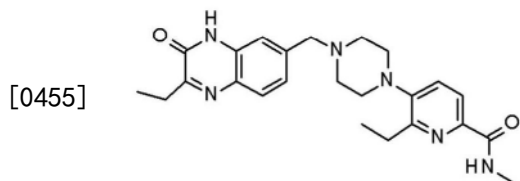
[0450] 中间体35:叔丁基4-[2-乙基-6-(甲基氨基甲酰基)-3-吡啶基]哌嗪-1-甲酸酯

[0451] 将Pd/C (53.5mg, 0.05mmol) (10wt%干重, 湿加载)添加至叔丁基4-[6-(甲基氨基甲酰基)-2-乙烯基-3-吡啶基]哌嗪-1-甲酸酯(中间体34, 174mg, 0.50mmol)在MeOH(6mL)中的溶液中。将烧瓶脱气并用H₂(气囊)重填充。将混合物在r.t下搅拌过夜。LCMS指示反应未完成。添加更多的Pd/C (53.5mg, 0.05mmol), 并将所得混合物在r.t下在H₂气氛下搅拌5hr。将混合物通过硅藻土垫过滤, 用甲醇洗涤, 将滤液浓缩至干燥以产生呈无色残余物的叔丁基4-[2-乙基-6-(甲基氨基甲酰基)-3-吡啶基]哌嗪-1-甲酸酯(中间体35, 172mg, 98%)。¹H NMR (500MHz, 氯仿-d) 1.37 (3H, t), 1.51 (9H, s), 2.82-2.95 (6H, m), 3.05 (3H, d), 3.57-3.73 (4H, m), 7.39 (1H, d), 7.93-8.13 (2H, m); m/z (ES⁺) [M]⁺=348。

[0452] 中间体36:6-乙基-N-甲基-5-哌嗪-1-基-吡啶-2-甲酰胺

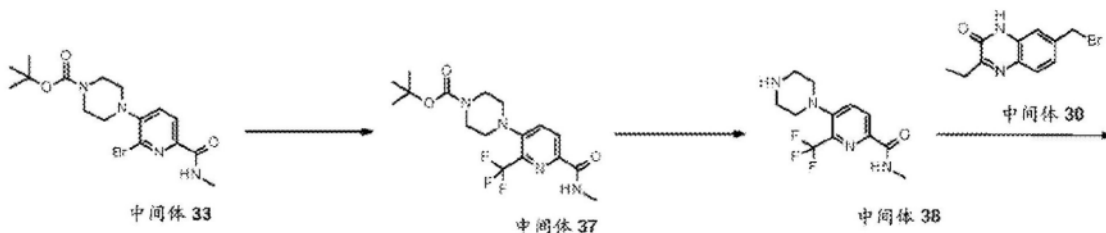
[0453] 将叔丁基4-[2-乙基-6-(甲基氨基甲酰基)-3-吡啶基]哌嗪-1-甲酸酯(中间体35, 172mg, 0.49mmol)在HCl (4M, 在二噁烷中, 8ml, 32.00mmol)中的混合物在r.t下搅拌1hr以给出白色悬浮液。将混合物用乙醚稀释并将固体过滤出并在真空下干燥以给出呈淡黄色固体的6-乙基-N-甲基-5-哌嗪-1-基-吡啶-2-甲酰胺2HCl (中间体36, 159mg, 100%)。¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) 1.31 (3H, t), 2.74-2.86 (5H, m), 3.00-3.14 (4H, m), 3.24 (4H, br s), 7.57 (1H, d), 7.82 (1H, d), 8.43 (1H, br d), 9.20 (2H, br s); m/z (ES⁺) [M+H]⁺=249。

[0454] 合成实例8:6-乙基-5-[4-[(2-乙基-3-氧代-4H-喹啶啉-6-基)甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺

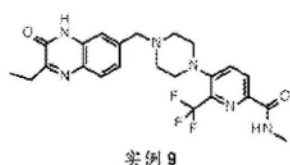


[0456] 将DIPEA (0.203mL, 1.17mmol)添加至6-乙基-N-甲基-5-哌嗪-1-基-吡啶-2-甲酰胺2HCl (中间体36, 75mg, 0.23mmol)和7-(溴甲基)-3-乙基-1H-喹啶啉-2-酮(中间体30, 69.3mg, 0.23mmol)在乙腈(3mL)中的悬浮液中。将所得混合物在60℃下搅拌3hr, LCMS指示完全转化。将混合物冷却至r.t, 浓缩, 将残余物在Gilson反相柱(用0%至95%ACN/水/0.1%TFA洗脱, 运行15min, 从5至9min收集)上进行纯化。将含有产物的级分浓缩并然后将残余物溶解于甲醇和DCM中。300mg的四烷基碳酸氢铵、聚合物键联(40-90目, 2.5-3.5mmol/g), 并将混合物在r.t下搅拌10min。然后将混合物过滤并用甲醇洗涤。将滤液浓缩, 重新溶解于水/CAN的混合物中并将此混合物冻干至干燥以产生呈淡黄色固体的6-乙基-5-[4-

[(2-乙基-3-氧代-4H-喹啉-6-基)甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺(合成实例 8, 60.0mg, 59.1%)。¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) 1.22 (3H, t), 1.30 (3H, t), 2.54-2.69 (2H, m), 2.72-2.86 (7H, m), 2.93 (4H, br s), 3.26 (2H, s), 3.64 (2H, s), 7.17-7.33 (2H, m), 7.52 (1H, d), 7.69 (1H, br d), 7.80 (1H, d), 8.40 (1H, br d), 12.25 (1H, br s); m/z (ES⁺) [M+H]⁺ = 435。



[0457]



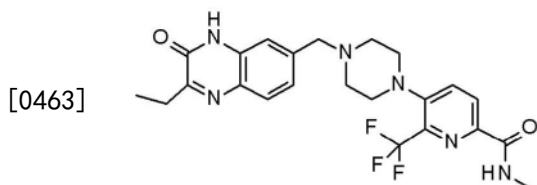
[0458] 中间体37:叔丁基4-[6-(甲基氨基甲酰基)-2-(三氟甲基)-3-吡啶基]哌嗪-1-甲酸酯

[0459] 在室温下,氟化银(I) (176mg, 1.39mmol) 在DMF (2mL) 中的良好搅拌的混合物中添加三甲基(三氟甲基)硅烷(0.247mL, 1.67mmol)。将混合物搅拌20min,随后向其中添加铜粉(133mg, 2.09mmol)。将反应混合物搅拌4h后变为蓝色(指示形成CuCF₃)。将叔丁基4-(2-溴-6-甲氧基羰基-3-吡啶基)哌嗪-1-甲酸酯(中间体33, 150mg, 0.38mmol)添加至混合物中,并将所得深色混合物在90℃下搅拌18hr给出棕色悬浮液。LCMS指示完全转化。将混合物用乙酸乙酯稀释并将过滤出固体。将滤液用水洗涤随后用盐水洗涤。将有机层经无水Na₂SO₄干燥,过滤并浓缩。将所得的残余物通过快速二氧化硅色谱法(洗脱梯度为己烷中的0%至70%EtOAc)进行纯化。将产物级分在减压下浓缩至干燥以得到呈黄色残余物的叔丁基4-[6-(甲基氨基甲酰基)-2-(三氟甲基)-3-吡啶基]哌嗪-1-甲酸酯(中间体37, 146mg, 100%)。¹H NMR (500MHz, 氯仿-d) 1.50 (9H, s), 2.93-3.03 (4H, m), 3.05 (3H, d), 3.55-3.69 (4H, m), 7.71 (1H, d), 7.81 (1H, br d), 8.33 (1H, d); m/z (ES⁺) [M+H]⁺ = 389。

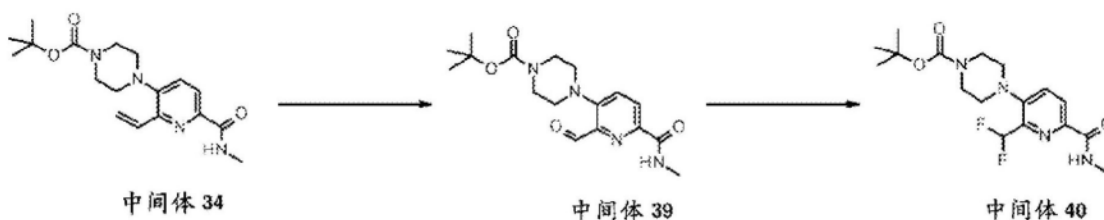
[0460] 中间体38:N-甲基-5-哌嗪-1-基-6-(三氟甲基)吡啶-2-甲酰胺

[0461] 将叔丁基4-[6-(甲基氨基甲酰基)-2-(三氟甲基)-3-吡啶基]哌嗪-1-甲酸酯(中间体37, 146mg, 0.38mmol) 在HCl (4M, 在二噁烷, 8ml, 32.00mmol) 中的混合物在r. t下搅拌2hr。LCMS指示完全转化。将溶剂浓缩至体积2ml, 将混合物用乙醚/己烷(15ml, 5/1) 稀释。过滤出固体并在真空下干燥以得到呈粉色固体的N-甲基-5-哌嗪-1-基-6-(三氟甲基)吡啶-2-甲酰胺2HCl (中间体38, 127mg, 94%)。¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) 2.83 (3H, d), 3.21 (8H, br s), 8.09 (1H, d), 8.23 (1H, d), 8.46 (1H, br d), 9.08 (2H, br d); m/z (ES⁺) [M+H]⁺ = 289。

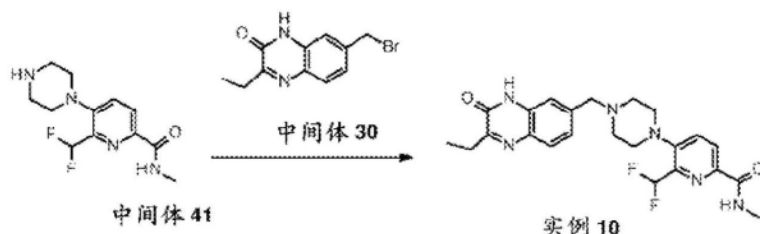
[0462] 合成实例9:5-[4-[(2-乙基-3-氧代-4H-喹啉-6-基)甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-6-(三氟甲基)吡啶-2-甲酰胺



[0464] 将DIPEA(0.121mL,0.69mmol)添加至N-甲基-5-哌嗪-1-基-6-(三氟甲基)吡啶-2-甲酰胺2HCl(中间体38,50mg,0.14mmol)和7-(溴甲基)-3-乙基喹啉-2(1H)-酮(中间体30,46.2mg,0.14mmol)在乙腈(3mL)中的悬浮液中,并将混合物在60℃下搅拌3hr。将混合物冷却至r.t,浓缩,将残余物在Gilson反相柱(用0%至95%ACN/水/0.1%TFA洗脱)上进行纯化。将含有产物的级分在室温下浓缩。然后将残余物溶解于甲醇和DCM中,随后添加250mg的四烷基碳酸氢铵聚合物键联(40-90目,2.5-3.5mmol/g)并将混合物在室温下搅拌10min。然后将固体过滤出,用甲醇洗涤并将滤液浓缩以给出固体。然后将此固体重新溶解于水/CH₃CN的混合物中并冻干至干燥以得到呈白色固体的5-[4-[2-乙基-3-氧代-4H-喹啉-6-基]甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-6-(三氟甲基)吡啶-2-甲酰胺(合成实例9,40.0mg,60.9%)。¹H NMR(500MHz,氯仿-d)1.40(3H,t),2.70(4H,br s),2.98-3.08(5H,m),3.12(4H,br s),3.72(2H,br s),7.29-7.32(1H,m),7.37(1H,dd),7.74(1H,d),7.79-7.88(2H,m),8.33(1H,d),11.06(1H,br s);m/z(ES⁺)[M+H]⁺=475。



[0465]



[0466] 中间体39:叔丁基4-[2-甲酰基-6-(甲基氨基甲酰基)-3-吡啶基]哌嗪-1-甲酸酯

[0467] 将在H₂O中的四氧化锇(0.050mL,6.35μmol)添加至叔丁基4-[6-(甲基氨基甲酰基)-2-乙烯基-3-吡啶基]哌嗪-1-甲酸酯(中间体34,110mg,0.32mmol)、2,6-二甲基吡啶(0.074mL,0.64mmol)和高碘酸钠(272mg,1.27mmol)在THF(5mL)/水(1mL)/叔丁醇(0.304mL,3.18mmol)中的溶液中,并将混合物在rt下搅拌过夜以给出黄色悬浮液。LCMS和TLC指示完全转化。将反应用水稀释并用乙酸乙酯萃取。浓缩后,将所得残余物通过快速二氧化硅色谱法(洗脱梯度为己烷中的0%至100%EtOAc)进行纯化。将产物级分在减压下浓缩至干燥以得到呈黄色固体的叔丁基4-[2-甲酰基-6-(甲基氨基甲酰基)-3-吡啶基]哌嗪-1-甲酸酯(中间体39,100mg,90%)。¹H NMR(500MHz,氯仿-d)1.50(9H,s),3.07(3H,d),3.14-3.29(4H,m),3.66-3.79(4H,m),7.49(1H,d),7.86(1H,br d),8.28(1H,d),10.10(1H,s)。m/z(ES⁺)[M+H]⁺=349。

[0468] 中间体40:叔丁基4-[2-(二氟甲基)-6-(甲基氨基甲酰基)-3-吡啶基]哌嗪-1-甲

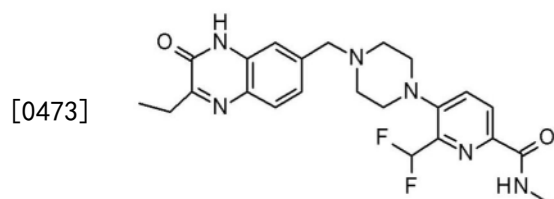
酸酯

[0469] 将在 CH_2Cl_2 (2mL) 中的叔丁基4-[2-甲酰基-6-(甲基氨基甲酰基)-3-吡啶基]哌嗪-1-甲酸酯(中间体39, 99mg, 0.28mmol) 冷却至 0°C , 添加DAST (0.710mL, 0.71mmol) (1M, 在DCM中) 并将所得混合物在室温下搅拌3hr。TLC和LCMS指示完全转化。将反应滴加饱和 NaHCO_3 溶液淬灭并用DCM萃取。将合并的有机物经无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤并浓缩以给出粗产物。将所得残余物通过快速二氧化硅色谱法(洗脱梯度为己烷中的0%至100%EtOAc) 进行纯化。将产物级分在减压下浓缩至干燥以得到呈灰白色固体的叔丁基4-[2-(二氟甲基)-6-(甲基氨基甲酰基)-3-吡啶基]哌嗪-1-甲酸酯(中间体40, 94mg, 89%)。 $^1\text{H NMR}$ (500MHz, 氯仿-d) 1.51 (9H, s), 2.89-3.03 (4H, m), 3.06 (3H, d), 3.54-3.73 (4H, m), 6.82-7.16 (1H, m), 7.64 (1H, d), 7.94 (1H, br d), 8.29 (1H, d); m/z (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 371$ 。

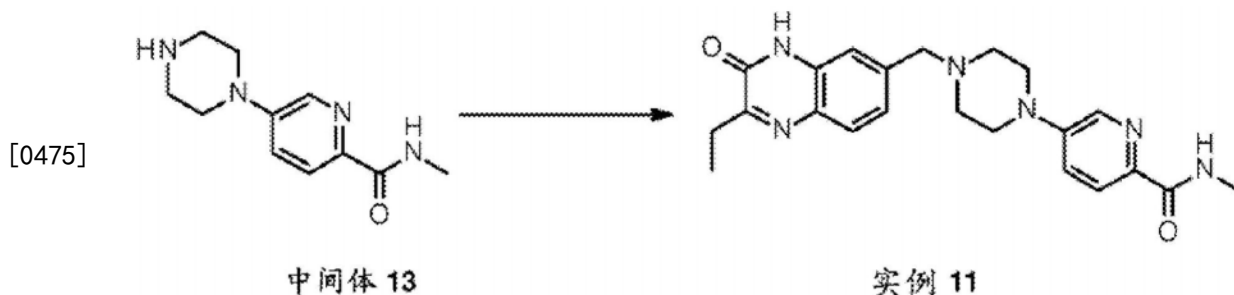
[0470] 中间体41: 6-(二氟甲基)-N-甲基-5-哌嗪-1-基-吡啶-2-甲酰胺

[0471] 将叔丁基4-[2-(二氟甲基)-6-(甲基氨基甲酰基)-3-吡啶基]哌嗪-1-甲酸酯(中间体40, 92mg, 0.25mmol) 在1,4-二噁烷 (6ml, 24.00mmol) 中的HCl 4M中的混合物在r.t下搅拌1.5hr, 给出橙色悬浮液, 将混合物用乙醚稀释, 过滤, 将固体重新溶解于甲醇中, 浓缩至干燥以产生呈橙色固体的6-(二氟甲基)-N-甲基-5-哌嗪-1-基-吡啶-2-甲酰胺 2HCl (中间体41, 56.0mg, 65.7%)。 $^1\text{H NMR}$ (500MHz, DMSO-d₆) 2.83 (3H, d), 3.03-3.23 (5H, m), 3.30 (4H, br s), 7.06-7.49 (1H, m), 7.92 (1H, d), 8.13 (1H, d), 8.43 (1H, br d), 9.00 (2H, br d); m/z (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 271$ 。

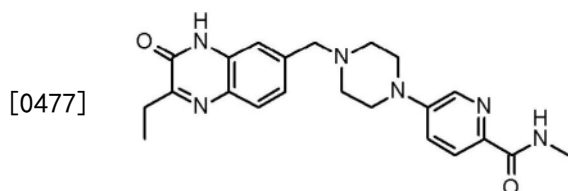
[0472] 合成实例10: 6-(二氟甲基)-5-[4-[(2-乙基-3-氧代-4H-喹啉-6-基)甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺



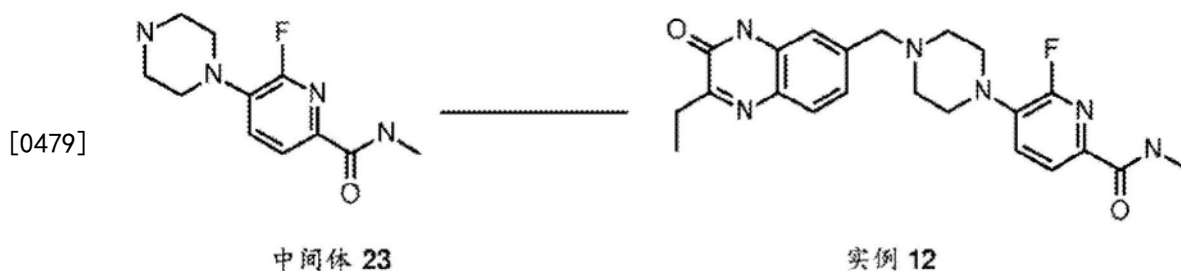
[0474] 将DIPEA (0.127mL, 0.73mmol) 添加至6-(二氟甲基)-N-甲基-5-哌嗪-1-基-吡啶-2-甲酰胺 2HCl (中间体41, 50mg, 0.15mmol) 和7-(溴甲基)-3-乙基喹啉-2(1H)-酮(中间体30, 48.6mg, 0.15mmol) 在乙腈 (3mL) 中的悬浮液中。将所得混合物在 60°C 下搅拌3hr, LCMS指示完全转化。将混合物浓缩, 并将残余物在Gilson反相柱(用0%至95%ACN/水/0.1%TFA洗脱) 上进行纯化。将含有产物的级分在室温下浓缩。然后将残余物溶解于甲醇和DCM中, 随后添加250mg的四烷基碳酸氢铵聚合物键联(40-90目, 2.5-3.5mmol/g), 并将混合物在室温下搅拌10min。然后将固体过滤出, 用甲醇洗涤并将滤液浓缩以给出固体。然后将此固体重新溶解于水/ CH_3CN 的混合物中, 并冻干至干燥以得到呈黄色固体的6-(二氟甲基)-5-[4-[(2-乙基-3-氧代-4H-喹啉-6-基)甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺(合成实例10, 50.0mg, 75%)。 $^1\text{H NMR}$ (500MHz, 氯仿-d) 1.40 (3H, t), 2.72 (4H, br s), 2.97-3.17 (9H, m), 3.73 (2H, s), 6.84-7.15 (1H, m), 7.32 (1H, s), 7.37 (1H, d), 7.64 (1H, d), 7.83 (1H, d), 7.95 (1H, br d), 8.29 (1H, d), 11.32-11.62 (1H, m); m/z (ES^+) $[\text{M}+\text{H}]^+ = 457$ 。



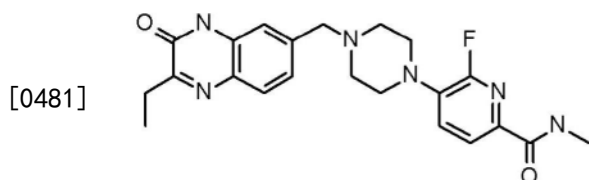
[0476] 合成实例11:5-[4-[(2-乙基-3-氧代-4H-喹喔啉-6-基)甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺



[0478] 在20mL小瓶中添加7-(溴甲基)-3-乙基喹喔啉-2(1H)-酮(中间体30,0.147g,0.55mmol)和N-甲基-5-哌嗪-1-基-吡啶-2-甲酰胺·2HCl(中间体13,0.161g,0.55mmol)。将小瓶密封,抽空,并用N₂重填充。将乙腈(3mL)和DIPEA(0.481mL,2.75mmol)添加至小、瓶中并放置在预加热至70℃的加热块中。将反应混合物在相同的温度下搅拌2小时并冷却至室温。在真空下将反应的体积减少至其初始体积的1/3,并添加NaHCO₃水溶液(2mL)。将反应混合物搅拌30min,过滤并将固体用水(50mL)洗涤。将粗产物通过快速二氧化硅色谱法(使用DCM中的0%-30%MeOH)进行纯化以产生呈淡黄色固体的5-[4-[(2-乙基-3-氧代-4H-喹喔啉-6-基)甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺(合成实例11,93.0mg,41.6%)。¹H NMR(500MHz,DMSO-d₆) 1.22(3H,t),2.52-2.60(4H,m),2.73-2.85(5H,m),3.30(4H,m,overlapped with水peak),3.62(2H,s),7.22-7.31(2H,m),7.39(1H,dd),7.69(1H,d),7.83(1H,d),8.23-8.31(1H,m),8.39(1H,br d),12.13-12.36(1H,m);m/z(ES⁺)[M+H]⁺=407。

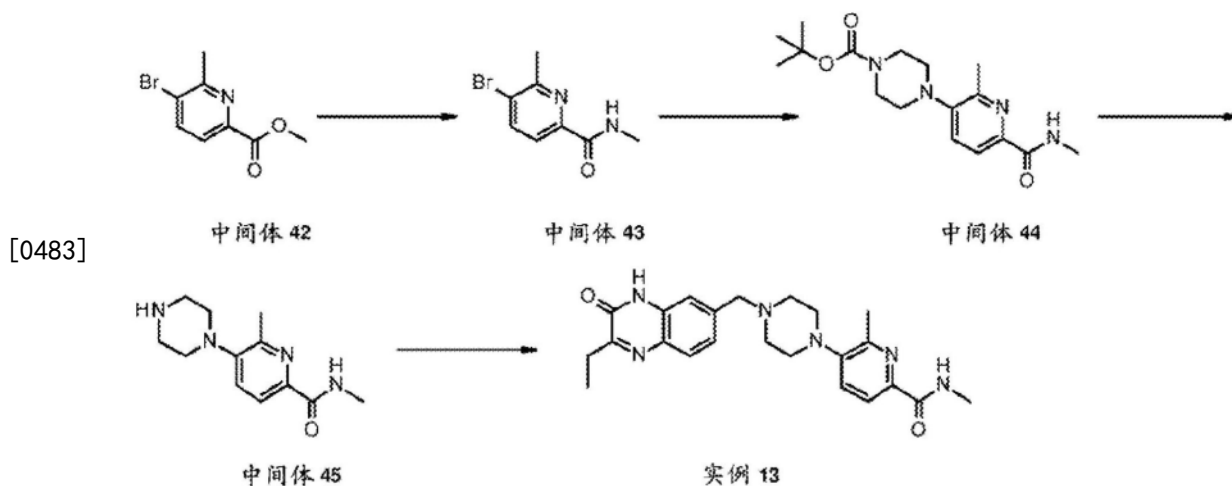


[0480] 合成实例12:5-[4-[(2-乙基-3-氧代-4H-喹喔啉-6-基)甲基]哌嗪-1-基]-6-氟-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺



[0482] 将7-(溴甲基)-3-乙基喹喔啉-2(1H)-酮(中间体30,150mg,0.56mmol)添加至在NMP(2mL)中的6-氟-N-甲基-5-哌嗪-1-基-吡啶-2-甲酰胺(中间体23,60mg,0.25mmol)和DIPEA(0.270mL,1.55mmol)中。将所得混合物在80℃下搅拌2小时。在减压下除去溶剂。将粗

产物通过制备型HPLC(柱:XBridge Shield RP18 OBD柱,5um,19x150mm;流动相A:水(10MMOL/L NH_4HCO_3 ,0.1% $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$),流动相B:ACN;流速:20mL/min;梯度:8min内28%B至38%B;254;220nm;RT:8.02min)进行纯化。将含有所需化合物的级分蒸发至干以提供呈白色固体的5-[4-[(2-乙基-3-氧代-4H-喹啉-6-基)甲基]哌嗪-1-基]-6-氟-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺(合成实例12,9mg,42.9%)。 ^1H NMR(400MHz, CD_3OD) δ 1.33(3H,t),2.65-2.72(4H,m),2.87-2.95(5H,m),3.26-3.30(4H,m),3.71(2H,s),7.33-7.41(2H,m),7.52(1H,dd),7.76(1H,d),7.90(1H,dd); ^{19}F NMR(376MHz, CD_3OD) δ -73.40; m/z (ES^+)[M+H] $^+$ =425。



[0484] 中间体43:5-溴-N,6-二甲基吡啶酰胺

[0485] 将甲胺在THF(20mL,40.00mmol)中的2M溶液添加至甲基5-溴-6-甲基吡啶甲酸酯(中间体42,2.0g,8.69mmol)中,并将所得混合物在80℃下搅拌18小时。在减压下除去溶剂。将粗产物通过反相色谱法(洗脱梯度为水(0.1% NH_4HCO_3)中的5%至80%MeOH)进行纯化。将纯级分蒸发至干燥以得到呈浅黄色固体的5-溴-N,6-二甲基吡啶酰胺(中间体43,1.5g,75%)。 ^1H NMR(400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 2.65(3H,s),2.82(3H,d),7.75(1H,d),8.17(1H,d),8.57-8.76(1H,m); m/z (ES^+)[M+H] $^+$ =229。

[0486] 中间体44:叔丁基4-(2-甲基-6-(甲基氨基甲酰基)吡啶-3-基)哌嗪-1-甲酸酯在

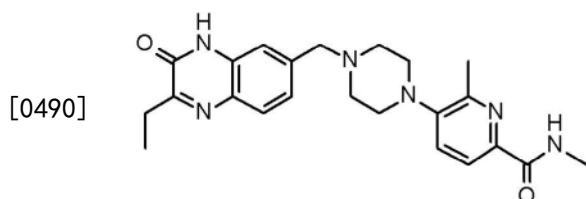
氮下,将5-溴-N,6-二甲基吡啶酰胺(中间体43,1.0g,4.37mmol)添加至在甲苯(20mL)中的叔丁基哌嗪-1-甲酸酯(0.894g,4.80mmol)、BINAP(0.272g,0.44mmol)、 $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0.098g,0.44mmol)和 Cs_2CO_3 (3.56g,10.91mmol)中。将所得混合物在80℃下搅拌16小时。在减压下除去溶剂。将粗产物通过反相色谱法(洗脱梯度为水(0.4% HCO_2H)中的5%至30%MeOH)进行纯化。将纯级分蒸发至干燥以得到呈棕色固体的叔丁基4-(2-甲基-6-(甲基氨基甲酰基)吡啶-3-基)哌嗪-1-甲酸酯(中间体44,1.2g,82%)。 ^1H NMR(300MHz, CD_3OD) δ 1.50(9H,s),2.58(3H,s),2.92-3.00(7H,m),3.62(4H,m),7.50(1H,d),7.88(1H,d); m/z (ES^+)[M+H] $^+$ =335。

[0487] 中间体45:N,6-二甲基-5-(哌嗪-1-基)吡啶酰胺

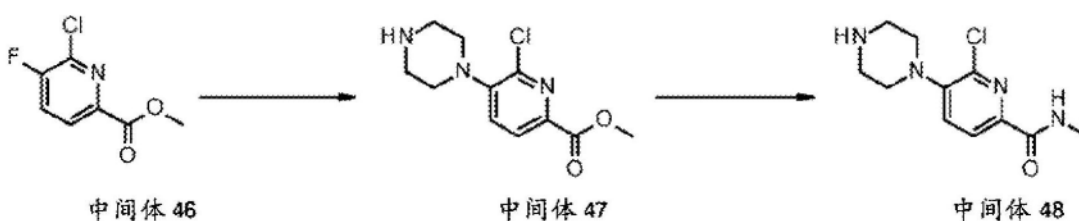
[0488] 将叔丁基4-(2-甲基-6-(甲基氨基甲酰基)吡啶-3-基)哌嗪-1-甲酸酯(中间体44,1.18g,3.53mmol)添加至在1,4-二噁烷(10mL,329.15mmol)中的4M HCl溶液中。将所得混合物在室温下搅拌1小时。将沉淀物通过过滤收集,用石油醚(5mL x2)、 Et_2O (5mL x2)洗涤,并在真空下干燥以得到呈黄色固体的N,6-二甲基-5-(哌嗪-1-基)吡啶酰胺(中间体45,0.77g,81%)。 ^1H NMR(300MHz, CD_3OD) δ 2.86(3H,s),3.02(3H,s),3.42-3.54(8H,m),8.29

(2H,d); m/z (ES⁺) [M+H]⁺ = 235。

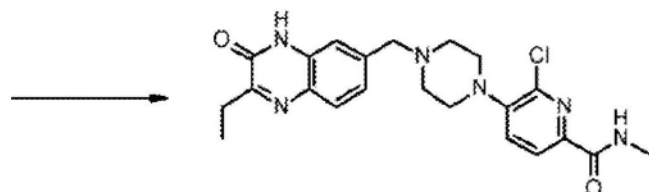
[0489] 合成实例13:5-[4-](2-乙基-3-氧代-4H-喹喔啉-6-基)甲基]哌嗪-1-基]-N,6-三甲基-吡啶-2-甲酰胺



[0491] 将7-(溴甲基)-3-乙基喹喔啉-2(1H)-酮(中间体30,100mg,0.37mmol)添加至在NMP(2mL)中的N,6-二甲基-5-(哌嗪-1-基)吡啶酰胺(中间体45,90mg,0.33mmol)和DIPEA(0.36mL,2.05mmol)中。将所得混合物在80℃下搅拌2小时。在减压下除去溶剂。将粗产物通过制备型HPLC(柱:XBridge Prep OBD C18柱30x150mm,5um;流动相A:水(10MMOL/LNH₄HCO₃),流动相B:ACN;流速:60mL/min;梯度:7min内30%B至40%B;254;220nm;RT:6.43min)进行纯化。将含有希望的化合物的级分蒸发至干燥以得到呈灰白色固体的5-[4-[(2-乙基-3-氧代-4H-喹喔啉-6-基)甲基]哌嗪-1-基]-N,6-二甲基-吡啶-2-甲酰胺(合成实例13,68.7mg,43.6%)。¹H NMR(400MHz,CD₃OD) δ1.33(3H,t),2.55(3H,s),2.71(4H,s),2.87-2.99(5H,m),3.05(4H,t),3.73(2H,s),7.35(1H,s),7.38(1H,d),7.49(1H,d),7.77(1H,d),7.87(1H,d); m/z (ES⁺) [M+H]⁺ = 421。



[0492]



实例 14

[0493] 中间体47:甲基6-氯-5-(哌嗪-1-基)吡啶甲酸酯

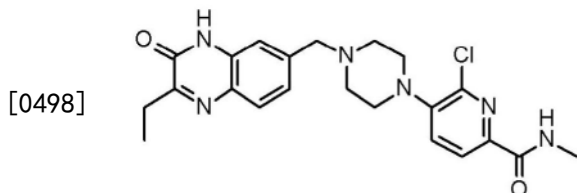
[0494] 将哌嗪(1.0g,11.61mmol)添加至在MeCN(30mL)中的甲基6-氯-5-氟吡啶甲酸酯(中间体46,1.0g,5.28mmol)中。将所得混合物在80℃下搅拌18小时。在减压下除去溶剂。将粗产物通过反相色谱法(洗脱梯度为水(0.1%NH₄HCO₃)中的5%至60%MeCN)进行纯化。将纯级分蒸发至干燥以得到呈红色油状物的甲基6-氯-5-(哌嗪-1-基)吡啶甲酸酯(中间体47,1.28g,95%)。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ2.81-2.91(4H,m),3.04-3.08(4H,m),3.85(3H,s),7.61(1H,d),8.00(1H,d)(未显示NH质子); m/z (ES⁺) [M+H]⁺ = 256。

[0495] 中间体48:6-氯-N-甲基-5-(哌嗪-1-基)吡啶酰胺

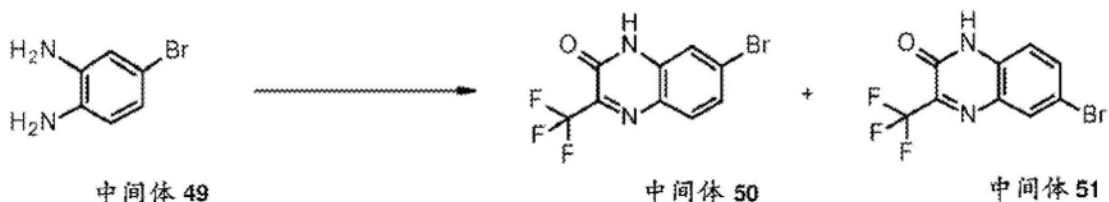
[0496] 将甲胺在THF(40mL,80.00mmol)中的2M溶液添加至甲基6-氯-5-(哌嗪-1-基)吡啶甲酸酯(中间体47,1.26g,4.93mmol)中。将所得混合物在80℃下搅拌18小时。在减压下除去溶剂。将粗产物通过反相色谱法(洗脱梯度为水(0.1%NH₄HCO₃)中的5%至60%MeCN)进行纯

化。将纯级分蒸发至干燥以得到呈浅黄色油状物的6-氯-N-甲基-5-(哌嗪-1-基)吡啶酰胺(中间体48, 1.12g, 89%)。¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ2.79 (3H, d), 2.85-2.89 (4H, m), 2.97-3.02 (4H, m), 7.63 (1H, d), 7.94 (1H, d), 8.45 (1H, q) (哌嗪-未显示NH质子); m/z (ES⁺) [M+H]⁺ = 255。

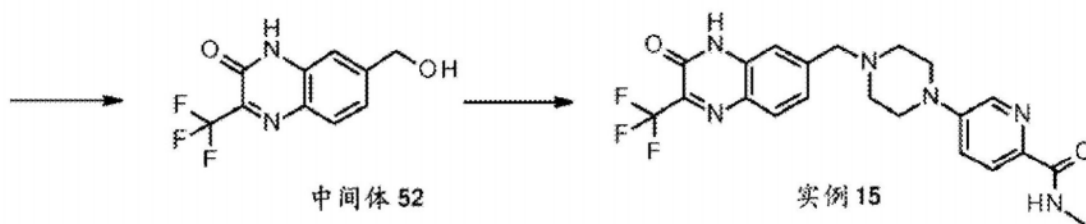
[0497] 合成实例14: 6-氯-5-[4-[(2-乙基-3-氧代-4H-喹喔啉-6-基)甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺



[0499] 将7-(溴甲基)-3-乙基喹喔啉-2(1H)-酮(中间体30, 200mg, 0.75mmol)添加至在NMP(2mL)中的6-氯-N-甲基-5-(哌嗪-1-基)吡啶酰胺(中间体48, 100mg, 0.39mmol)和DIPEA(0.358mL, 2.05mmol)中。将所得混合物在80℃下搅拌2小时。在减压下除去溶剂。将粗产物通过制备型HPLC(柱: XBridge Prep OBD C18柱30×150mm 5μm; 流动相A: 水(10MMOL/LNH₄HCO₃), 流动相B: ACN; 流速: 60mL/min; 梯度: 8min内30%B至40%B; 254; 220nm; RT: 7.3min)进行纯化。将含有所需化合物的级分蒸发至干以提供呈白色固体的6-氯-5-[4-[(2-乙基-3-氧代-4H-喹喔啉-6-基)甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺(合成实例14, 52.6mg, 30.4%)。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ1.33 (3H, t), 2.71 (4H, s), 2.87-2.96 (5H, m), 3.23 (4H, s), 3.73 (2H, s), 7.33-7.41 (2H, m), 7.62 (1H, d), 7.77 (1H, d), 8.00 (1H, d); m/z (ES⁺) [M+H]⁺ = 441。



[0500]



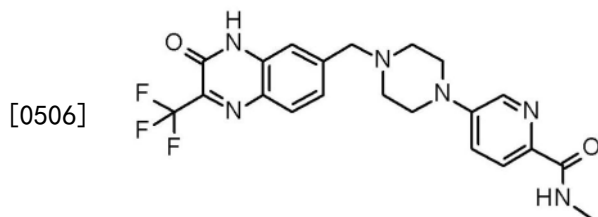
[0501] 中间体50; 7-溴-3-(三氟甲基)喹喔啉-2(1H)-酮

[0502] 将4-溴苯-1,2-二胺(中间体49, 0.9g, 4.81mmol)添加至在甲苯(10mL)中的甲基3,3,3-三氟-2-氧代丙酸酯(0.9g, 5.77mmol)中。将所得混合物在100℃下搅拌60分钟。在减压下除去溶剂。将粗产物通过快速二氧化硅色谱法(洗脱梯度为石油醚中的0%至50%EtOAc)进行纯化。将纯级分蒸发至干燥以得到呈灰白色固体的7-溴-3-(三氟甲基)喹喔啉-2(1H)-酮和6-溴-3-(三氟甲基)喹喔啉-2(1H)-酮(中间体50+中间体51, 1.28g, 45.4%)的区域异构混合物。将区域异构体的混合物分离, 并且未说明¹H NMR谱; m/z (ES⁺) [M+H]⁺ = 295。

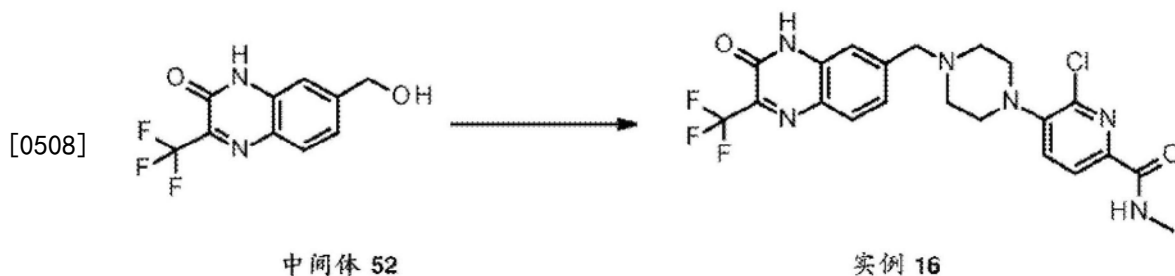
[0503] 中间体52: 7-(羟基甲基)-3-(三氟甲基)喹喔啉-2(1H)-酮

[0504] 将Pd(Ph₃P)₄(0.3g, 0.26mmol)添加至7-溴-3-(三氟甲基)喹喔啉-2(1H)-酮和6-溴-3-(三氟甲基)喹喔啉-2(1H)-酮(中间体50+中间体51, 1.2g, 2.05mmol)和(三丁基锡烷基)甲醇(1.2g, 3.74mmol)在1,4-二噁烷(40mL)中的混合物中。将所得混合物在100℃下在氮下搅拌18小时。在减压下除去溶剂。将粗产物通过反相色谱法(洗脱梯度为水(0.1% HCO₂H)中的5%至50% MeCN)进行纯化。将纯级分蒸发至干燥以得到呈灰白色固体的7-(羟基甲基)-3-(三氟甲基)喹喔啉-2(1H)-酮(中间体52, 0.32g, 64.0%)。¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆) δ4.63(2H, d), 5.52(1H, t), 7.30(1H, dd), 7.38(1H, d), 7.83(1H, d), 13.05(1H, s); m/z(ES⁺) [M+H]⁺=245。

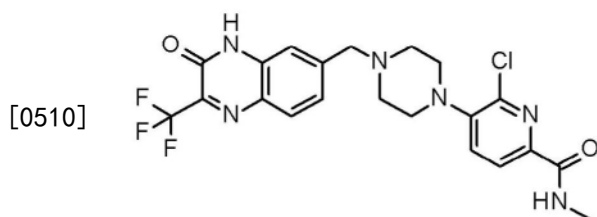
[0505] 合成实例15:N-甲基-5-[4-[[3-氧代-2-(三氟甲基)-4H-喹喔啉-6-基]甲基]哌嗪-1-基]吡啶-2-甲酰胺



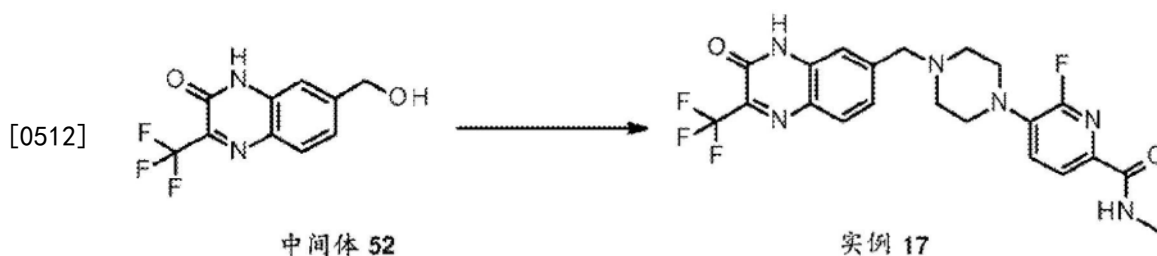
[0507] 将33% HBr在AcOH(3mL, 18.23mmol)中的溶液添加至7-(羟基甲基)-3-(三氟甲基)喹喔啉-2(1H)-酮(中间体52, 111mg, 0.45mmol)中。将所得的混合物在80℃下搅拌1小时。在减压下除去溶剂。将DIEA(0.5mL, 2.86mmol)和N-甲基-5-(哌嗪-1-基)吡啶酰胺(中间体13, 100mg, 0.45mmol)添加至在NMP(3mL)中的上述混合物中。将所得的混合物在80℃下搅拌1小时。在减压下除去溶剂。将粗产物通过制备型HPLC(柱: XBridge Prep OBD C18柱, 30×150mm 5um; 流动相A: 水(10MMOL/L NH₄HCO₃), 流动相B: ACN; 流速: 60mL/min; 梯度: 7min内 22B至32B; 254; 220nm; RT: 5.77)进行纯化。将含有所希望的化合物的级分蒸发至干燥以得到呈白色固体的N-甲基-5-[4-[[3-氧代-2-(三氟甲基)-4H-喹喔啉-6-基]甲基]哌嗪-1-基]吡啶-2-甲酰胺(合成实例15, 44.0mg, 21.71%)。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ2.55-2.62(m, 4H), 2.78(d, 3H), 3.34-3.38(t, 4H), 3.69(s, 2H), 7.34-7.44(m, 3H), 7.80-7.91(m, 2H), 8.27(d, 1H), 8.36-8.41(m, 1H), 12.97(s, 1H); ¹⁹F NMR(376MHz, DMSO-d₆) δ-68.36; m/z(ES⁺) [M+H]⁺=447。



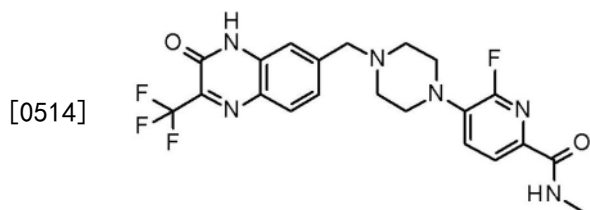
[0509] 合成实例16:6-氯-N-甲基-5-[4-[[3-氧代-2-(三氟甲基)-4H-喹喔啉-6-基]甲基]哌嗪-1-基]吡啶-2-甲酰胺



[0511] 将在AcOH中的33% HBr (3mL, 18.23mmol) 添加至7-(羟基甲基)-3-(三氟甲基)喹啉-2(1H)-酮(中间体52, 43.1mg, 0.18mmol)中。将所得的混合物在80℃下搅拌1小时。在减压下除去溶剂。将DIPEA (0.5mL, 2.86mmol) 和6-氯-N-甲基-5-(哌嗪-1-基)吡啶酰胺(中间体48, 45mg, 0.18mmol)添加至在NMP (5mL) 中的上述混合物中。将所得的混合物在80℃下搅拌1小时。在减压下除去溶剂。将粗产物通过制备型HPLC(柱: XBridge Prep OBD C18柱, 30 × 150mm 5μm; 流动相A: 水 (10MMOL/L NH₄HCO₃), 流动相B: ACN; 流速: 60mL/min; 梯度: 10B至50B, 在7min内; 254; 220nm; RT: 6.75) 进行纯化。将含有所希望的化合物的级分蒸发至干燥以得到呈灰白色固体的6-氯-N-甲基-5-[4-[[3-氧代-2-(三氟甲基)-4H-喹啉-6-基]甲基]哌嗪-1-基]吡啶-2-甲酰胺(合成实例16, 22.00mg, 25.9%)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 2.56-2.64 (s, 4H), 2.79 (d, 3H), 3.09-3.17 (m, 4H), 3.71 (s, 2H), 7.36-7.42 (m, 2H), 7.67 (d, 1H), 7.88 (d, 1H), 7.94 (d, 1H), 8.39-8.44 (m, 1H), 12.89 (s, 1H); ¹⁹F NMR (376MHz, DMSO) δ -68.41; m/z (ES+) [M+H]⁺ = 481。

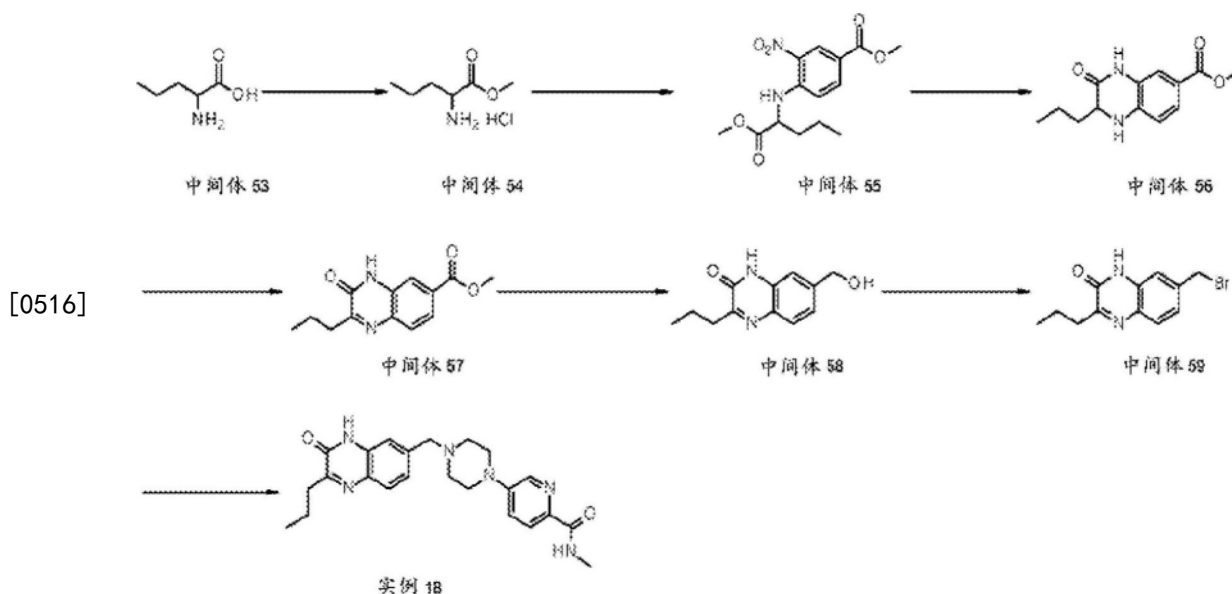


[0513] 合成实例17: 6-氟-N-甲基-5-[4-[[3-氧代-2-(三氟甲基)-4H-喹啉-6-基]甲基]哌嗪-1-基]吡啶-2-甲酰胺



[0515] 将在AcOH中的33% HBr (3mL, 55.25mmol) 添加至7-(羟基甲基)-3-(三氟甲基)喹啉-2(1H)-酮(中间体52, 102mg, 0.42mmol)中。将所得的混合物在80℃下搅拌1小时。在减压下除去溶剂。将6-氟-N-甲基-5-(哌嗪-1-基)吡啶酰胺(中间体23, 100mg, 0.42mmol) 和 DIPEA (0.5mL, 2.86mmol) 添加至在NMP (5mL) 中的上述混合物中。将所得的混合物在80℃下搅拌1小时。在减压下除去溶剂。将粗产物通过制备型HPLC(柱: XBridge Prep OBD C18柱, 30 × 150mm 5μm; 流动相A: 水 (10MMOL/L NH₄HCO₃), 流动相B: ACN; 流速: 60mL/min; 梯度: 在8min内15B至40B; 254; 220nm; RT: 7.2) 进行纯化。将含有所希望的化合物的级分蒸发至干燥以得到呈白色固体的6-氟-N-甲基-5-[4-[[3-氧代-2-(三氟甲基)-4H-喹啉-6-基]甲基]哌嗪-1-基]吡啶-2-甲酰胺(合成实例17, 66.0mg, 33.9%)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 2.55-2.69 (m, 4H), 2.77 (d, 3H), 3.15-3.23 (m, 4H), 3.69 (s, 2H), 7.33-7.46 (m, 2H), 7.58 (dd, 1H),

7.78-7.93 (m, 2H), 8.37-8.42 (m, 1H), 12.99 (s, 1H); ^{19}F NMR (376MHz, DMSO- d_6) δ -68.36, -72.52; m/z (ES $^+$) [M+H] $^+$ =465。



[0517] 中间体54: 甲基2-氨基戊酸酯盐酸盐

[0518] 在0℃下, 将SOCl₂ (17mL, 232.94mmol) 滴加至在MeOH (200mL) 中的2-氨基戊酸 (中间体53, 10.0g, 85.36mmol) 中。将所得混合物在室温下搅拌18小时。将溶剂在减压下除去以得到呈白色固体的甲基2-氨基戊酸酯盐酸盐 (中间体54, 15.78g, 110%)。 ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400MHz) δ 0.88 (3H, t), 1.19-1.51 (2H, m), 1.67-1.83 (2H, m), 3.74 (3H, s), 3.89-3.93 (1H, m), 8.64 (3H, s); m/z (ES $^+$) [M+H] $^+$ =132。

[0519] 中间体55: 甲基4-(1-甲氧基-1-氧代戊烷-2-基氨基)-3-硝基苯甲酸酯

[0520] 将碳酸氢钠 (20.0g, 238.08mmol) 添加至在THF (160mL) 中的甲基2-氨基戊酸酯盐酸盐 (中间体54, 15.57g, 92.88mmol) 和甲基4-氟-3-硝基苯甲酸酯 (9.0g, 45.19mmol) 中。将所得混合物在室温下搅拌18小时。在减压下除去溶剂。将反应混合物用EtOAc (150mL) 稀释, 并依次用水 (100mL x1)、饱和NaHCO₃ (100mL x1) 和饱和盐水 (100mL x1) 洗涤。将有机层经Na₂SO₄干燥, 过滤并蒸发以得到呈黄色油状物的甲基4-(1-甲氧基-1-氧代戊烷-2-基氨基)-3-硝基苯甲酸酯 (中间体55, 14.09g, 100%)。 ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 0.89 (3H, t), 1.26-1.41 (2H, m), 1.84-1.94 (2H, m), 3.73 (3H, s), 3.83 (3H, s), 4.68-4.75 (1H, m), 7.12 (1H, d), 8.00 (1H, d), 8.60 (1H, d), 8.63 (1H, d); m/z (ES $^+$) [M+H] $^+$ =311。

[0521] 中间体56: 甲基3-氧代-2-丙基-1,2,3,4-四氢喹啉-6-甲酸酯

[0522] 将Pd(OH)₂/C (20% wt, 1.58g, 2.25mmol) 添加至在MeOH (300mL) 中的甲基4-((1-甲氧基-1-氧代戊烷-2-基)氨基)-3-硝基苯甲酸酯 (中间体55, 14.05g, 45.28mmol) 中。将所得混合物在室温下在H₂下搅拌30小时。将反应混合物过滤。将沉淀物用DMF (100mL) 洗涤并将滤液蒸发至干燥以得到粗产物。将粗产物用DCM (10mL) 洗涤并在真空下干燥以得到呈白色固体的甲基3-氧代-2-丙基-1,2,3,4-四氢喹啉-6-甲酸酯 (中间体56, 9.12g, 81%)。 ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 0.87 (3H, t), 1.32-1.46 (2H, m), 1.57-1.64 (2H, m), 3.74 (3H, s), 3.88-3.93 (1H, m), 6.70 (1H, d), 6.83 (1H, d), 7.32 (1H, d), 7.40 (1H, dd), 10.38 (1H, s); m/z (ES $^+$) [M+H] $^+$ =249。

[0523] 中间体57:甲基3-氧代-2-丙基-3,4-二氢喹啉-6-甲酸酯

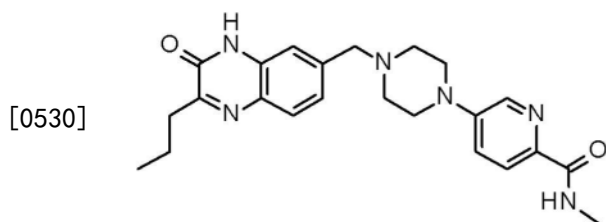
[0524] 将DDQ(9.42g,41.50mmol)添加至在1,4-二噁烷(200mL)中的甲基3-氧代-2-丙基-1,2,3,4-四氢喹啉-6-甲酸酯(中间体56,9.12g,36.73mmol)中。将所得混合物在室温下搅拌18小时。将反应混合物用饱和NaHCO₃(200mL)稀释。将所得混合物在室温下搅拌0.5小时。将沉淀物通过过滤收集,用水(1000mL)洗涤,并在真空下干燥以得到呈灰白色固体的甲基3-氧代-2-丙基-3,4-二氢喹啉-6-甲酸酯(中间体57,7.86g,87%)。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ0.98(3H,t),1.68-1.80(2H,m),2.75-2.83(2H,m),3.89(3H,s),7.73-7.85(2H,m),7.88(1H,d),12.45(1H,s);m/z(ES⁺)[M+H]⁺=247。

[0525] 中间体58:7-(羟基甲基)-3-丙基喹啉-2(1H)-酮

[0526] 在0℃下,将DIBAL-H在THF(100mL,100.00mmol)中的1M溶液滴加至在THF(200mL)中的甲基3-氧代-2-丙基-3,4-二氢喹啉-6-甲酸酯(中间体57,7.81g,31.71mmol)中。将所得混合物在室温下搅拌18小时。将反应混合物用MeOH(5mL)和饱和水性酒石酸单钾单钠四水合物溶液(20mL)淬灭,将有机层蒸发以得到呈白色固体的7-(羟基甲基)-3-丙基喹啉-2(1H)-酮(中间体58,1.2g,17.34%)。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ0.97(3H,t),1.36-1.77(2H,m),2.71-2.79(2H,m),4.59(2H,s),5.39(1H,s),7.18(1H,dd),7.27(1H,d),7.65(1H,d),12.30(1H,s);m/z(ES⁺)[M+H]⁺=219。

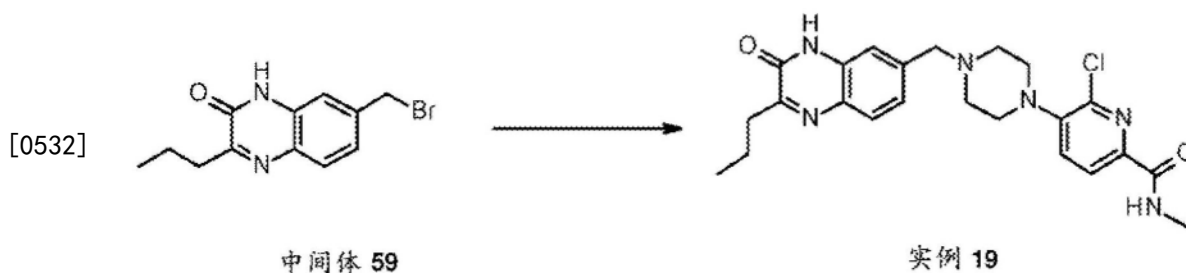
[0527] 中间体59:7-(溴甲基)-3-丙基喹啉-2(1H)-酮

[0528] 将在AcOH中的33%HBr(74.6μl,1.37mmol)添加至7-(羟基甲基)-3-丙基喹啉-2(1H)-酮(中间体58,300mg,1.37mmol)中。将所得的混合物在80℃下搅拌1小时。将溶剂在减压下除去以得到呈棕色固体的7-(溴甲基)-3-丙基喹啉-2(1H)-酮(中间体59,600mg,155%)(粗产物是不纯的并含有AcOH和其他杂质)。将产物不经进一步纯化用于下一步骤。¹H NMR谱不干净,并且未说明;m/z(ES⁺)[M+H]⁺=282。

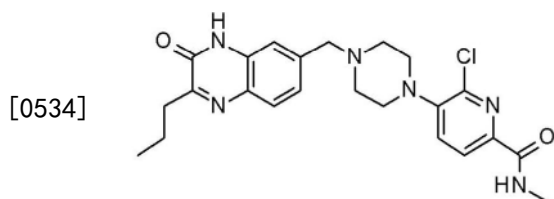
[0529] 合成实例18:N-甲基-5-[4-[(3-氧代-2-丙基-4H-喹啉-6-基)甲基]哌嗪-1-基]吡啶-2-甲酰胺

[0531] 将DIPEA(200μL,1.15mmol)添加至在NMP(3mL)中的7-(溴甲基)-3-丙基喹啉-2(1H)-酮(中间体59,200mg,0.71mmol)和N-甲基-5-(哌嗪-1-基)吡啶酰胺(中间体13,80mg,0.36mmol)。将所得的混合物在80℃下搅拌1小时。在减压下除去溶剂。将粗产物通过制备型HPLC(柱:XBridge Shield RP18 OBD柱,19x250mm,10μm;流动相A:水(10MMOL/LNH₄HCO₃,0.1%NH₃·H₂O),流动相B:ACN;流速:20mL/min;梯度:38B至50B,在7min内;254/220nm;RT:6.20)进行纯化。将含有所希望的化合物的级分蒸发至干燥以得到呈白色固体的N-甲基-5-[4-[(3-氧代-2-丙基-4H-喹啉-6-基)甲基]哌嗪-1-基]吡啶-2-甲酰胺(合成实例18,71.0mg,46.5%)。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ0.97(3H,t),1.66-1.80(2H,m),2.55-2.61(4H,m),2.73-2.85(5H,m),3.33-3.40(4H,m),3.62(2H,s),7.19-7.31(2H,m),7.40(1H,dd),7.68(1H,d),7.83(1H,d),8.27(1H,d),8.35-8.45(1H,m),12.26(1H,s);m/z(ES⁺)[M+H]⁺=

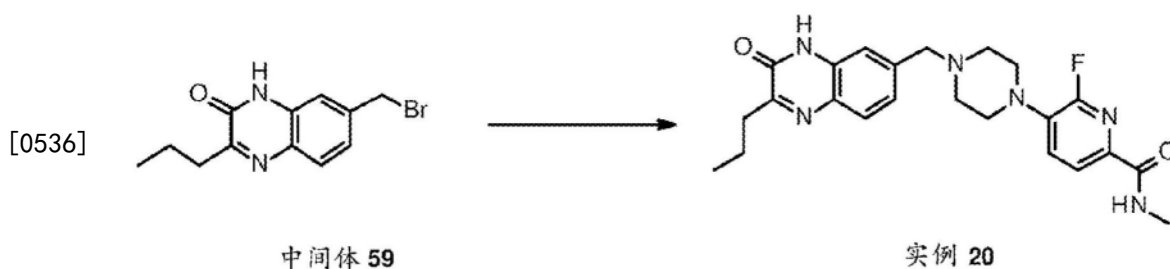
421。



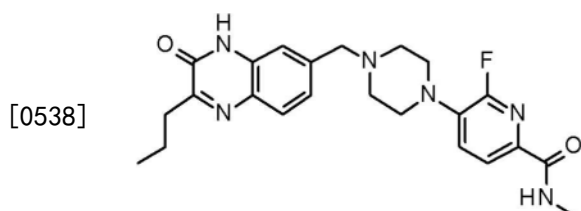
[0533] 合成实例19:6-氯-N-甲基-5-[4-[(3-氧代-2-丙基-4H-喹啉-6-基)甲基]哌嗪-1-基]吡啶-2-甲酰胺



[0535] 将DIPEA (200 μ L, 1.15mmol) 添加至在NMP (3mL) 中的7-(溴甲基)-3-丙基喹啉-2(1H)-酮(中间体59, 200mg, 0.71mmol) 和6-氯-N-甲基-5-(哌嗪-1-基)吡啶酰胺(中间体48, 80mg, 0.31mmol) 中。将所得的混合物在80 $^{\circ}$ C下搅拌1小时。在减压下除去溶剂。将粗产物通过制备型HPLC(柱:XBridge Shield RP18 OBD柱, 19x250mm, 10 μ m; 流动相A:水(0.1% HCO₂H), 流动相B:ACN; 流速:20mL/min; 梯度:在7min内18B至30B; 254/220nm; RT:5.93) 进行纯化。将含有所希望的化合物的级分蒸发至干燥以得到呈白色固体的6-氯-N-甲基-5-[4-[(3-氧代-2-丙基-4H-喹啉-6-基)甲基]哌嗪-1-基]吡啶-2-甲酰胺(合成实例19, 52.0mg, 36.4%)。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ 0.97(3H, t), 1.66-1.79(2H, m), 2.55-2.65(4H, m), 2.71-2.85(5H, m), 3.06-3.12(4H, m), 3.64(2H, s), 7.20-7.32(2H, m), 7.64-7.72(2H, m), 7.94(1H, d), 8.40-8.50(1H, m), 12.27(1H, s); m/z (ES⁺) [M+H]⁺ = 455。

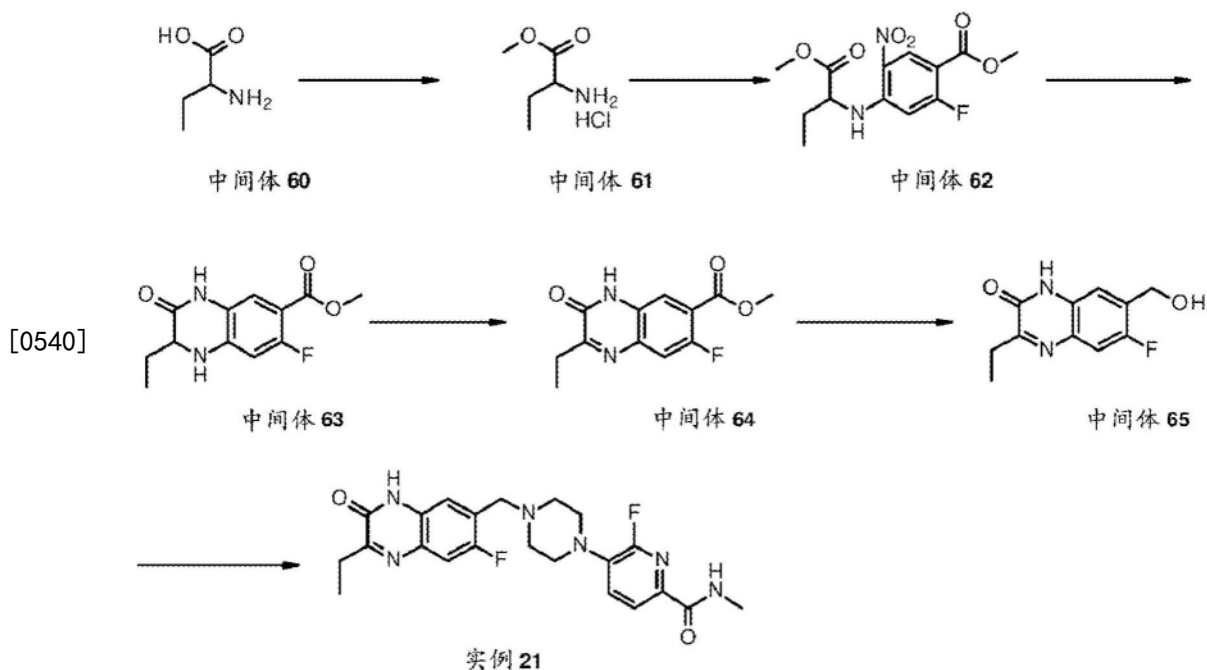


[0537] 合成实例20:6-氟-N-甲基-5-[4-[(3-氧代-2-丙基-4H-喹啉-6-基)甲基]哌嗪-1-基]吡啶-2-甲酰胺



[0539] 将DIPEA (500 μ l, 2.86mmol) 添加至在NMP (3mL) 中的7-(溴甲基)-3-丙基喹啉-2(1H)-酮(中间体59, 200mg, 0.71mmol) 和6-氟-N-甲基-5-(哌嗪-1-基)吡啶酰胺2HCl(中间体23, 100mg, 0.32mmol) 中。将所得的混合物在80 $^{\circ}$ C下搅拌1小时。在减压下除去溶剂。将粗

产物通过制备型HPLC(柱:SunFire C18 OBD Prep柱, 100 Å, 5µm, 19mm x250mm; 流动相A:水(0.1% HCO₂H), 流动相B: ACN; 流速: 25mL/min; 梯度: 在13min内10B至20B; 254/220nm; RT: 12.13) 进行纯化。将含有所希望的化合物的级分蒸发至干燥以得到呈白色固体的6-氟-N-甲基-5-[4-[(3-氧代-2-丙基-4H-喹啉-6-基)甲基]哌嗪-1-基]吡啶-2-甲酰胺(合成实例20, 71.0mg, 50.4%)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 0.97 (3H, t), 1.66-1.78 (2H, m), 2.54-2.60 (4H, m), 2.71-2.83 (5H, m), 3.14-3.25 (4H, m), 3.62 (2H, s), 7.19-7.33 (2H, m), 7.57 (1H, dd), 7.68 (1H, d), 7.85 (1H, dd), 8.37-5.43 (1H, m), 12.27 (1H, s); ¹⁹F NMR (376MHz, DMSO-d₆) δ -72.51; m/z (ES⁺) [M+H]⁺ = 439。



[0541] 中间体61: 甲基2-氨基丁酸酯盐酸盐

[0542] 在0℃下, 将SOCl₂ (17mL, 232.94mmol) 滴加至在MeOH (100mL) 中的2-氨基丁酸(中间体60, 10.0g, 96.97mmol) 中。将所得混合物在室温下搅拌18小时。将溶剂在减压下除去以得到呈白色固体的甲基2-氨基丁酸酯盐酸盐(中间体61, 14.84g, 100%)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 0.91 (3H, t), 1.75-1.95 (2H, m), 3.73 (3H, s), 3.93 (1H, t), 8.72 (3H, s); m/z (ES⁺) [M+H]⁺ = 118。

[0543] 中间体62: 甲基2-氟-4-(1-甲氧基-1-氧代丁烷-2-基氨基)-5-硝基苯甲酸酯

[0544] 将DIPEA (4.02mL, 23.03mmol) 添加至在NMP (10mL) 中的甲基2,4-二氟-5-硝基苯甲酸酯(1.0g, 4.61mmol) 和甲基2-氨基丁酸酯盐酸盐(中间体61, 0.707g, 4.61mmol) 中。将所得混合物在室温搅拌5小时。将粗产物通过反相色谱法(洗脱梯度为水(0.1% NH₄HCO₃) 中的5%至80% MeCN) 进行纯化。将纯级分蒸发至干燥以得到呈黑色固体的甲基2-氟-4-(1-甲氧基-1-氧代丁烷-2-基氨基)-5-硝基苯甲酸酯(中间体62, 1.2g, 83%)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 0.88 (3H, t), 1.78-2.03 (2H, m), 3.75 (3H, s), 3.83 (3H, s), 4.73-4.80 (1H, m), 7.06 (1H, d), 8.66-8.72 (2H, m); m/z (ES⁺) [M+H]⁺ = 315。

[0545] 中间体63: 甲基2-乙基-7-氟-3-氧代-1,2,3,4-四氢喹啉-6-甲酸酯

[0546] 在氢下, 将甲基2-氟-4-((1-甲氧基-1-氧代丁烷-2-基)氨基)-5-硝基苯甲酸酯

(中间体62, 1.15g, 3.66mmol)添加至在MeOH(300mL)和乙酸乙酯(50mL)中的20wt%Pd(OH)₂(500mg, 0.71mmol)中。将所得混合物在室温下搅拌3天。反应未完成。将反应混合物过滤。将有机层蒸发以得到呈棕色胶状物的粗产物甲基2-乙基-7-氟-3-氧代-1,2,3,4-四氢喹啶-6-甲酸酯(中间体63, 0.780g, 85%)。将该粗产物未进一步纯化即直接用于下一步骤。粗产物不干净, 并且未说明¹H NMR谱; m/z (ES⁺) [M+H]⁺ = 253。

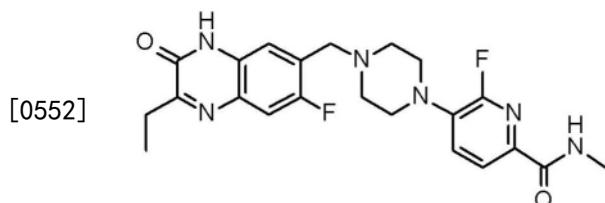
[0547] 中间体64: 甲基2-乙基-7-氟-3-氧代-3,4-二氢喹啶-6-甲酸酯

[0548] 将甲基2-乙基-7-氟-3-氧代-1,2,3,4-四氢喹啶-6-甲酸酯(中间体63, 760mg, 3.01mmol)添加至在DCM(20mL)中的DDQ(821mg, 3.62mmol)中。将所得混合物在室温下搅拌2小时。反应完成。将所得混合物在减压下浓缩以获得棕色固体。将NaHCO₃饱和水溶液(10mL)添加至固体中并在室温下搅拌1小时。将沉淀物过滤并用另外的NaHCO₃水溶液(10mL x5)漂洗。将固体在真空下干燥以得到呈棕色固体的甲基2-乙基-7-氟-3-氧代-3,4-二氢喹啶-6-甲酸酯(中间体64, 750mg, 99%)。¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆) δ 1.20(3H, t), 2.82(2H, q), 3.87(3H, s), 7.65(1H, d), 7.76(1H, d), 12.42(1H, s); m/z (ES⁺) [M+H]⁺ = 251。

[0549] 中间体65: 3-乙基-6-氟-7-(羟基甲基)喹啶-2(1H)-酮

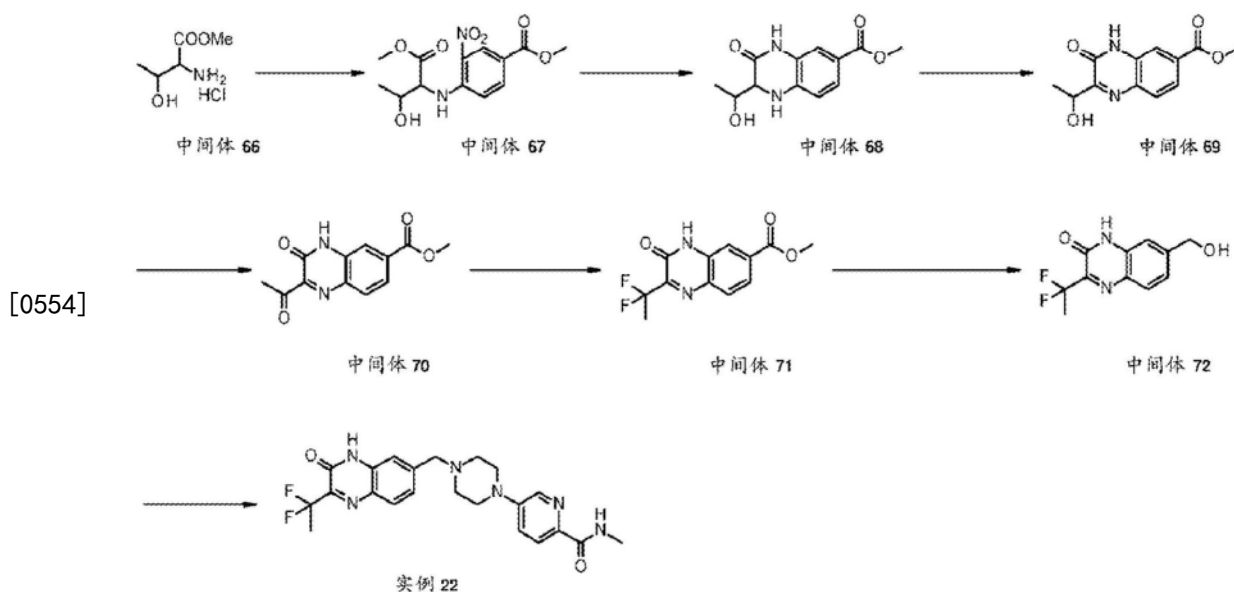
[0550] 将二异丁基氢化铝在THF(15.35mL, 15.35mmol)中的1M溶液分批添加至在THF(300mL)中的甲基2-乙基-7-氟-3-氧代-3,4-二氢喹啶-6-甲酸酯(中间体64, 640mg, 2.56mmol)中。将所得混合物在室温下搅拌16小时。反应完成。在0℃下, 将反应混合物用饱和酒石酸钠钾水溶液(20mL)和MeOH(10mL)淬灭。将所得混合物在室温下搅拌1小时。将反应混合物过滤并用THF(50mL x3)洗涤。将有机层蒸发至干燥以得到粗产物。将粗产物通过反相色谱法(洗脱梯度为水(0.4% HCO₂H)中的5%至60% MeOH)进行纯化。将纯级分蒸发至干燥以得到呈灰白色固体的3-乙基-6-氟-7-(羟基甲基)喹啶-2(1H)-酮(中间体65, 110mg, 19.37%)。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ 1.21(3H, t), 2.80(2H, q), 4.63(2H, d), 5.49(1H, t), 7.41(1H, d), 7.49(1H, d), 12.36(1H, s); m/z (ES⁺) [M+H]⁺ = 223。

[0551] 合成实例21: 5-[4-[(2-乙基-7-氟-3-氧代-4H-喹啶-6-基)甲基]哌嗪-1-基]-6-氟-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺



[0553] 将3-乙基-6-氟-7-(羟基甲基)喹啶-2(1H)-酮(中间体65, 50mg, 0.23mmol)添加至在AcOH(2mL, 12.15mmol)中的33% HBr中。将所得混合物在80℃下搅拌2小时。将反应混合物在真空下蒸发以得到7-(溴甲基)-3-乙基-6-氟喹啶-2(1H)-酮(粗产物)。将该产物不经进一步纯化直接用于下一步骤。将DIPEA(0.196mL, 1.13mmol)添加至在NMP(2mL)中的7-(溴甲基)-3-乙基-6-氟喹啶-2(1H)-酮和6-氟-N-甲基-5-(哌嗪-1-基)吡啶酰胺(中间体23, 70mg, 0.29mmol)中。将所得混合物在80℃下搅拌2小时。将所得混合物通过制备型HPLC(柱: Sunfire prep C18柱, 30x150mm, 5μm; 流动相A: 水(0.1% HCO₂H), 流动相B: ACN; 流速: 60mL/min; 梯度: 在8min内10B至35B; 254/220nm; RT: 7.37)进行纯化。将含有所希望的化合物的级分蒸发至干燥以得到呈灰白色固体的5-[4-[(2-乙基-7-氟-3-氧代-4H-喹啶-

6-基]哌嗪-1-基]-6-氟-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺(合成实例21,55.0mg,53.7%)。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ1.21(3H,t),2.61(4H,m),2.73-2.85(5H,m),3.18(4H,m),3.68(2H,s),7.38(1H,d),7.51-7.61(2H,m),7.84(1H,dd),8.13(0.29H,s),8.38(1H,m),12.29(1H,s);¹⁹F NMR(376MHz,DMSO-d₆) δ-72.53,-124.31;m/z(ES+)[M+H]⁺=443。



[0555] 中间体67:甲基4-(3-羟基-1-甲氧基-1-氧代丁烷-2-基氨基)-3-硝基苯甲酸酯

[0556] 将DIPEA(8.77mL,50.22mmol)添加至在DMF(20mL)中的甲基4-氟-3-硝基苯甲酸酯(2.0g,10.04mmol)和甲基2-氨基-3-羟基丁酸酯盐酸盐(中间体66,2.04g,12.05mmol)中。将所得混合物在室温下搅拌16小时。将反应混合物用EtOAc(100mL)稀释,并依次用饱和NH₄Cl水溶液(100mL x1)、和盐水(100mL x4)洗涤。将有机层经Na₂SO₄干燥,过滤并蒸发以得到呈黄色固体的所希望的产物甲基4-((3-羟基-1-甲氧基-1-氧代丁烷-2-基)氨基)-3-硝基苯甲酸酯(中间体67,2.9g,92%)。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ1.15-1.27(3H,m),3.64-3.74(3H,m),3.83(3H,s),4.08-4.44(1H,m),4.61-4.72(1H,m),5.39-5.60(1H,m),7.03-7.15(1H,m),7.90-8.03(1H,m),8.62-8.69(1H,m),8.73-8.89(1H,m);m/z(ES+)[M+H]⁺=313。

[0557] 中间体68:甲基2-(1-羟基乙基)-3-氧代-1,2,3,4-四氢喹啉-6-甲酸酯

[0558] 在氢下,将20%Pd(OH)₂/C(0.648g,0.92mmol)添加至在MeOH(300mL)中的甲基4-((3-羟基-1-甲氧基-1-氧代丁烷-2-基)氨基)-3-硝基苯甲酸酯(中间体67,2.88g,9.22mmol)中。将所得混合物在室温下搅拌16小时。反应完成。将该反应混合物通过硅藻土过滤。将有机层蒸发以得到呈灰色固体的甲基2-(1-羟基乙基)-3-氧代-1,2,3,4-四氢喹啉-6-甲酸酯(中间体68,2.290g,99%)。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ1.07(3H,m),2.81(1H,d),3.72(1H,m),3.74(3H,s),4.78(1H,d),6.70-6.86(2H,m),7.27(1H,d),7.37(1H,dd),10.38(1H,d);m/z(ES+)[M+H]⁺=251。

[0559] 中间体69:甲基2-(1-羟基乙基)-3-氧代-3,4-二氢喹啉-6-甲酸酯

[0560] 将DDQ(2.265g,9.98mmol)添加至在DCM(100mL)中的甲基2-(1-羟基乙基)-3-氧代-1,2,3,4-四氢喹啉-6-甲酸酯(中间体68,2.27g,9.07mmol)中。将所得混合物在室温下搅拌1小时。反应完成。将反应混合物在减压下浓缩以获得棕色固体。将NaHCO₃饱和水溶

液(100mL)添加至固体并在室温下搅拌1小时。将沉淀物过滤并用另外的NaHCO₃水溶液(30mL x3)漂洗。将固体在真空下干燥以得到呈灰色固体的甲基2-(1-羟基乙基)-3-氧代-3,4-二氢喹喔啉-6-甲酸酯(中间体69,2.24g,99%)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ1.40 (3H, d), 3.88 (3H, s), 4.94 (1H, q), 7.69 (1H, dd), 7.77 (1H, d), 7.90 (1H, d) (2protons are not shown); m/z (ES⁺) [M+H]⁺=249。

[0561] 中间体70:甲基2-乙酰基-3-氧代-3,4-二氢喹喔啉-6-甲酸酯

[0562] 将戴斯-马丁高碘烷(2.56g,6.04mmol)添加至在DCM(30mL)中的甲基2-(1-羟基乙基)-3-氧代-3,4-二氢喹喔啉-6-甲酸酯(中间体69,1.0g,4.03mmol)中。将所得混合物在室温下搅拌3小时。将反应混合物蒸发以得到粗产物。将粗产物通过反相色谱法(洗脱梯度为水(0.4% HCO₂H)中的5%至30% MeCN)进行纯化。将纯级分蒸发至干燥以得到呈浅黄色固体的甲基2-乙酰基-3-氧代-3,4-二氢喹喔啉-6-甲酸酯(中间体70,0.62g,62.5%)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ2.58 (3H, s), 3.91 (3H, s), 7.84 (1H, dd), 7.91-8.03 (2H, m), 12.86 (1H, s); m/z (ES⁺) [M+H]⁺=247。

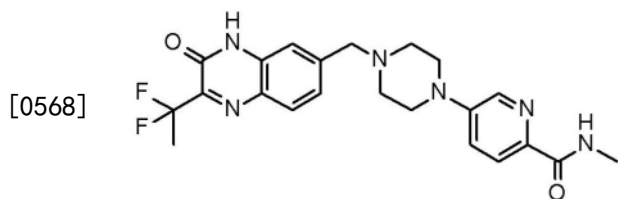
[0563] 中间体71:甲基2-(1,1-二氟乙基)-3-氧代-3,4-二氢喹喔啉-6-甲酸酯

[0564] 将BAST(1.35mL,7.31mmol)添加至在DCM(20mL)中的甲基2-乙酰基-3-氧代-3,4-二氢喹喔啉-6-甲酸酯(中间体70,600mg,2.44mmol)中。将所得混合物在室温下搅拌16小时。将反应混合物蒸发,以得到粗产物。将粗产物通过反相色谱法(洗脱梯度为水(0.4% HCO₂H)中的5%至30% MeCN)进行纯化。将纯级分蒸发至干燥以得到呈灰白色固体的甲基2-(1,1-二氟乙基)-3-氧代-3,4-二氢喹喔啉-6-甲酸酯(中间体71,174mg,26.6%)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ2.07 (3H, t), 3.91 (3H, s), 7.84 (1H, dd), 7.92-7.99 (2H, m), 12.90 (1H, s); ¹⁹F NMR (376MHz, DMSO-d₆) δ-93.26; m/z (ES⁺) [M+H]⁺=269。

[0565] 中间体72:3-(1,1-二氟乙基)-7-(羟基甲基)喹喔啉-2(1H)-酮

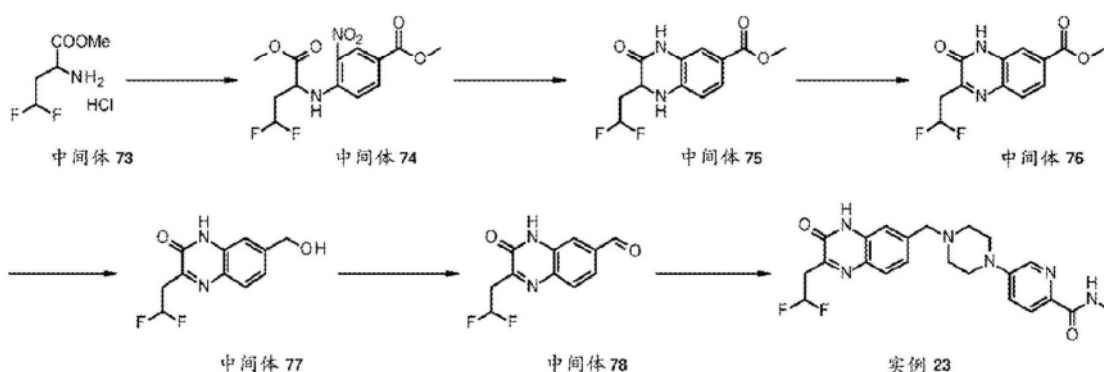
[0566] 在0℃下,将1M二异丁基氢化铝在THF(2.39mL,2.39mmol)中的溶液添加至在THF(50mL)中的甲基2-(1,1-二氟乙基)-3-氧代-3,4-二氢喹喔啉-6-甲酸酯(中间体71,160mg,0.60mmol)中。将所得混合物在室温下搅拌16小时。在0℃下,将反应混合物用饱和酒石酸钠钾水溶液(3mL)和MeOH(1mL)淬灭。将所得混合物搅拌1小时。将反应混合物过滤并用THF(10mL x3)洗涤。将有机层蒸发以得到粗产物3-(1,1-二氟乙基)-7-(羟基甲基)喹喔啉-2(1H)-酮(中间体72,120mg,84%)。将该产物不经进一步纯化直接用于下一步骤。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ2.06 (3H, t), 4.63 (2H, s), 5.47 (1H, s), 7.26 (1H, dd), 7.35 (1H, d), 7.78 (1H, d), 12.75 (1H, br s); m/z (ES⁺) [M+H]⁺=241。

[0567] 合成实例22:5-[4-[[2-(1,1-二氟乙基)-3-氧代-4H-喹喔啉-6-基]甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺



[0569] 将3-(1,1-二氟乙基)-7-(羟基甲基)喹喔啉-2(1H)-酮(中间体72,60mg,0.25mmol)添加至在乙酸(2mL,12.15mmol)中的33% HBr中。将所得混合物在80℃下搅拌2小

时。将反应混合物在真空下蒸发以得到7-(溴甲基)-3-(1,1-二氟乙基)喹啉-2(1H)-酮(粗产物)。将该产物不经进一步纯化直接用于下一步骤。将DIPEA(0.218mL,1.25mmol)添加至在NMP(3mL)中的7-(溴甲基)-3-(1,1-二氟乙基)喹啉-2(1H)-酮(粗产物)和N-甲基-5-(哌嗪-1-基)吡啶酰胺(中间体13,60mg,0.27mmol)中。将所得的混合物在80℃下搅拌1小时。将反应混合物浓缩并通过制备型HPLC(柱:XBridge Shield RP18 OBD柱,30x150mm,5 μ m;流动相A:水(0.05%NH₃H₂O),流动相B:ACN;流速:60mL/min;梯度:在7min内13B至33B;254;220nm;RT:5.70)进行纯化。将含有所希望的化合物的级分蒸发至干燥以得到呈黄色固体的5-[4-[[2-(1,1-二氟乙基)-3-氧代-4H-喹啉-6-基]甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺(合成实例22,47.8mg,43.2%)。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ 2.06(3H,t),2.52-2.62(4H,m),2.78(3H,d),3.30-3.40(4H,m),3.67(2H,s),7.32-7.42(3H,m),7.80-7.86(2H,m),8.27(1H,d),8.34-8.42(1H,m),12.70(1H,s);¹⁹F NMR(376MHz,DMSO-d₆) δ -92.74;m/z(ES⁺)[M+H]⁺=443。



[0570] 中间体74:甲基4-(4,4-二氟-1-甲氧基-1-氧代丁烷-2-基氨基)-3-硝基苯甲酸酯

[0572] 将DIPEA(8.77mL,50.22mmol)添加至在DMF(20mL)中的甲基4-氟-3-硝基苯甲酸酯(2.0g,10.04mmol)和甲基2-氨基-4,4-二氟丁酸酯盐酸盐(中间体73,2.0g,10.55mmol)。将所得混合物在40℃下搅拌8小时。将反应混合物用EtOAc(100mL)稀释,并依次用饱和NH₄Cl(100mL x1)、和盐水(100mL x4)洗涤。将有机层经Na₂SO₄干燥,过滤并蒸发以得到呈黄色固体的所希望的产物甲基4-((4,4-二氟-1-甲氧基-1-氧代丁烷-2-基)氨基)-3-硝基苯甲酸酯(中间体74,2.5g,74.9%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ 2.50-2.76(2H,m),3.71(3H,s),3.82(3H,s),4.95(1H,q),6.22(1H,tt),7.18(1H,d),7.99(1H,dd),8.63(1H,d),8.66(1H,d);m/z(ES⁺)[M+H]⁺=333。

[0573] 中间体75:甲基2-(2,2-二氟乙基)-3-氧代-1,2,3,4-四氢喹啉-6-甲酸酯

[0574] 在氢下,将20%Pd(OH)₂/C(0.465g,0.66mmol)添加至在MeOH(300mL)中的甲基4-((4,4-二氟-1-甲氧基-1-氧代丁烷-2-基)氨基)-3-硝基苯甲酸酯(中间体74,2.2g,6.62mmol)中。将所得混合物在室温下搅拌16小时。将该反应混合物通过硅藻土过滤。将滤液蒸发以得到呈黄色固体的甲基2-(2,2-二氟乙基)-3-氧代-1,2,3,4-四氢喹啉-6-甲酸酯(中间体75,1.64g,92%)。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ 2.24-2.32(2H,m),3.76(3H,s),4.10-4.18(1H,m),6.27(1H,tt),6.73(1H,d),6.89(1H,s),7.37(1H,d),7.44(1H,dd),10.58(1H,s);m/z(ES⁺)[M+H]⁺=271。

[0575] 中间体76:甲基2-(2,2-二氟乙基)-3-氧代-3,4-二氢喹啉-6-甲酸酯

[0576] 将DDQ(1.478g,6.51mmol)添加至在DCM(100mL)中的甲基2-(2,2-二氟乙基)-3-氧

代-1,2,3,4-四氢喹啉-6-甲酸酯(中间体75,1.6g,5.92mmol)中。将所得混合物在室温下搅拌3小时。将所得混合物在减压下除去以获得棕色固体。将NaHCO₃饱和水溶液(100mL)添加至固体并在室温下搅拌1小时。将沉淀物过滤并用另外的NaHCO₃水溶液(30mL x3)漂洗。将固体在真空下干燥以得到呈灰白色固体的甲基-2-(2,2-二氟乙基)-3-氧代-3,4-二氢喹啉-6-甲酸酯(中间体76,1.58g,99%)。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ3.46(2H,td),3.90(3H,s),6.57(1H,t),7.79-7.92(3H,m),12.68(1H,s);m/z(ES⁺)[M+H]⁺=269。

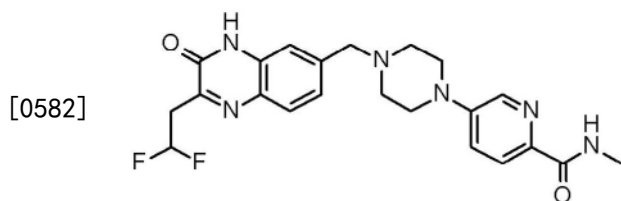
[0577] 中间体77:3-(2,2-二氟乙基)-7-(羟基甲基)喹啉-2(1H)-酮

[0578] 在0℃下,将二异丁基氢化铝在THF(22.37mL,22.37mmol)中的1M溶液分批添加至在THF(100mL)中的甲基-2-(2,2-二氟乙基)-3-氧代-3,4-二氢喹啉-6-甲酸酯(中间体76,1.0g,3.73mmol)中。将所得混合物在室温下搅拌16小时。在0℃下,将反应混合物用饱和酒石酸钠钾水溶液(20mL)和MeOH(10mL)淬灭。将所得混合物搅拌1小时。将反应混合物过滤并用THF(30mL x3)洗涤。将有机层蒸发以得到呈红色固体的3-(2,2-二氟乙基)-7-(羟基甲基)喹啉-2(1H)-酮(0.72g,80%)(粗产物)。将粗产物通过反相色谱法(洗脱梯度为水(0.4%HCO₂H)中的5%至60%MeOH)进行纯化。将纯级分蒸发至干燥以得到呈红色固体的3-(2,2-二氟乙基)-7-(羟基甲基)喹啉-2(1H)-酮(中间体77,500mg,69.4%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ3.42(2H,td),4.61(2H,s),5.42(1H,brs),6.56(1H,tt),7.23(1H,dd),7.32(1H,d),7.71(1H,d),12.55(1H,s);m/z(ES⁺)[M+H]⁺=241。

[0579] 中间体78:2-(2,2-二氟乙基)-3-氧代-3,4-二氢喹啉-6-甲醛

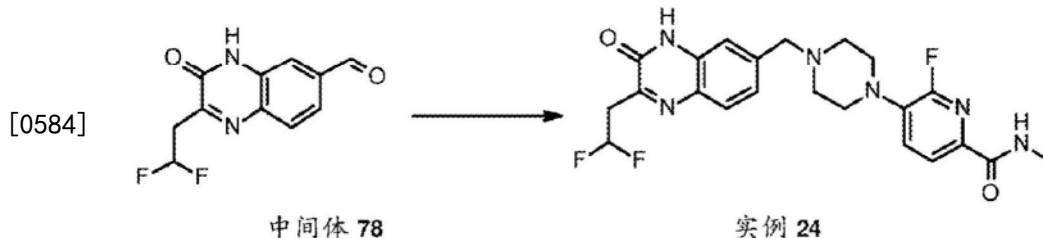
[0580] 将戴斯-马丁高碘烷(530mg,1.25mmol)添加至在DCM(5mL)中的3-(2,2-二氟乙基)-7-(羟基甲基)喹啉-2(1H)-酮(中间体77,200mg,0.83mmol)中。将所得混合物在室温下搅拌2小时。将所得混合物蒸发以得到粗产物。将粗产物通过反相色谱法(洗脱梯度为水(0.4%HCO₂H)中的5%至30%MeCN)进行纯化。将纯级分蒸发至干燥以得到呈黄色固体的2-(2,2-二氟乙基)-3-氧代-3,4-二氢喹啉-6-甲醛(中间体78,160mg,81%)。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ3.47(2H,td),6.58(1H,tt),7.77-7.85(2H,m),7.90-7.98(1H,m),10.09(1H,s),12.79(1H,s);m/z(ES⁺)[M+H]⁺=239。

[0581] 合成实例23:5-[4-[[2-(2,2-三氟乙基)-3-氧代-4H-喹啉-6-基]甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺

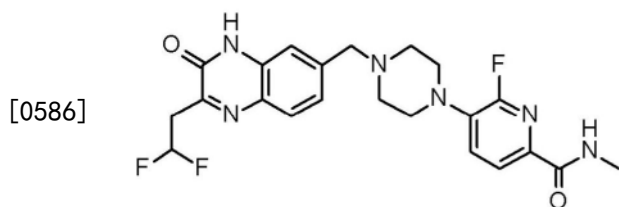


[0583] 将异丙氧基钛(65.6mg,0.23mmol)添加至在THF(2mL)中的2-(2,2-二氟乙基)-3-氧代-3,4-二氢喹啉-6-甲醛(中间体78,55mg,0.23mmol)和N-甲基-5-(哌嗪-1-基)吡啶甲酰胺(中间体13,60mg,0.23mmol)中。将所得混合物在室温下搅拌2分钟。添加三乙酰氧基硼氢化钠(196mg,0.92mmol)。将所得混合物在室温下搅拌1小时。将反应混合物用MeOH(0.1mL)淬灭。将反应混合物蒸发以得到粗产物,将该粗产物通过制备型HPLC(柱:XBridge Shield RP18 OBD柱,30x150mm,5um;流动相A:水(0.05%NH₃H₂O),流动相B:ACN;流速:60mL/min;梯度:在7min内13B至33B;254;220nm;RT:5.70)进行纯化。将含有希望的化合物的级

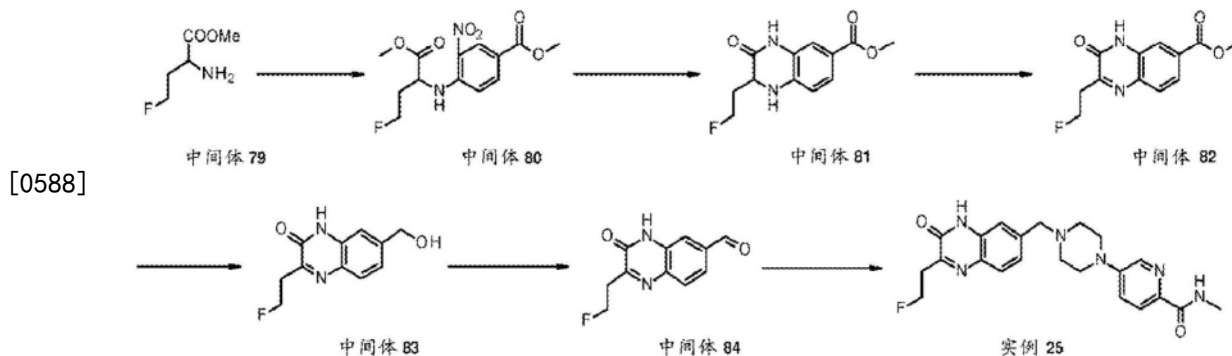
分蒸发至干燥以得到呈黄色固体的5-[4-[[2-(2,2-二氟乙基)-3-氧代-4H-喹啶-6-基]甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺(合成实例23,8.76mg,8.57%)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ2.56 (4H,m), 2.78 (3H,d), 3.32-3.48 (6H,m), 3.64 (2H,s), 6.55 (1H,tt), 7.27-7.33 (2H,m), 7.39 (1H,dd), 7.73 (1H,d), 7.83 (1H,d), 8.26 (1H,d), 8.37 (1H,m), 12.49 (1H,s); ¹⁹F NMR (376MHz, DMSO-d₆) δ-114.29; m/z (ES⁺) [M+H]⁺=443。



[0585] 合成实例24:5-[4-[[2-(2,2-二氟乙基)-3-氧代-4H-喹啶-6-基]甲基]哌嗪-1-基]-6-氟-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺



[0587] 将异丙氧基钛(59.7mg,0.21mmol)添加至在THF(2mL)中的2-(2,2-二氟乙基)-3-氧代-3,4-二氢喹啶-6-甲醛(中间体78,50mg,0.21mmol)和6-氟-N-甲基-5-(哌嗪-1-基)吡啶酰胺(中间体23,50.0mg,0.21mmol)中。将所得混合物在室温下搅拌2分钟。添加三乙酰氧基硼氢化钠(178mg,0.84mmol)。将所得混合物在室温下搅拌1小时。反应完成。将反应混合物用MeOH(0.1mL)淬灭。将反应混合物蒸发,以得到粗产物。将粗产物通过制备型HPLC(柱:Sunfire prep C18柱,30x150,5um;流动相A:水(0.1% HCO₂H),流动相B:ACN;流速:60mL/min;梯度:在7min内2B至27B;254/220nm;RT:6.78)进行纯化。将含有所希望的化合物的级分蒸发至干燥以得到呈黄色固体的5-[4-[[2-(2,2-二氟乙基)-3-氧代-4H-喹啶-6-基]甲基]哌嗪-1-基]-6-氟-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺(合成实例24,21.72mg,22.13%)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ2.54-2.61 (4H,m), 2.76 (3H,d), 3.14-3.22 (4H,m), 3.41 (2H,td), 3.64 (2H,s), 6.39-6.71 (1H,m), 7.26-7.33 (2H,m), 7.57 (1H,dd), 7.73 (1H,d), 7.82-7.86 (1H,m), 8.13 (0.16H,s), 8.37 (1H,m), 12.49 (1H,s); ¹⁹F NMR (376MHz, DMSO-d₆) δ-72.52, -114.29; m/z (ES⁺) [M+H]⁺=461。



[0589] 中间体80:甲基4-(4-氟-1-甲氧基-1-氧代丁烷-2-基氨基)-3-硝基苯甲酸酯

[0590] 将DIPEA(8.77mL,50.22mmol)添加至在DMF(20mL)中的甲基4-氟-3-硝基苯甲酸酯(2.0g,10.04mmol)和甲基2-氨基-4-氟丁酸酯盐酸盐(中间体79,1.81g,10.55mmol)中。将所得混合物在40℃下搅拌8小时。将反应混合物用EtOAc(100mL)稀释,并依次用饱和NH₄Cl(100mL x1)、和盐水(100mL x4)洗涤。将有机层经Na₂SO₄干燥,过滤并蒸发以得到呈黄色固体的所希望的产物甲基4-((4-氟-1-甲氧基-1-氧代丁烷-2-基)氨基)-3-硝基苯甲酸酯(中间体80,2.5g,79%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ2.25-2.35(1H,m),2.35-2.45(1H,m),3.71(3H,s),3.82(3H,s),4.36-4.58(1H,m),4.56-4.74(1H,m),4.84(1H,q),7.14(1H,d),7.99(1H,dd),8.63(1H,d),8.67(1H,d);m/z(ES⁺)[M+H]⁺=315。

[0591] 中间体81:甲基2-(2-氟乙基)-3-氧代-1,2,3,4-四氢喹啉-6-甲酸酯

[0592] 在氢下,将20%Pd(OH)₂/C(0.547g,0.78mmol)添加至在MeOH(300mL)中的甲基4-((4-氟-1-甲氧基-1-氧代丁烷-2-基)氨基)-3-硝基苯甲酸酯(中间体80,2.45g,7.80mmol)中。将所得混合物在室温下搅拌16小时。反应完成。将该反应混合物通过硅藻土过滤。将滤液蒸发以得到呈灰色固体的甲基2-(2-氟乙基)-3-氧代-1,2,3,4-四氢喹啉-6-甲酸酯(中间体81,1.9g,97%)。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ1.91-2.19(2H,m),3.75(3H,s),4.03(1H,m),4.49-4.73(2H,m),6.73(1H,d),6.91(1H,d),7.35(1H,d),7.42(1H,dd),10.46(1H,s);m/z(ES⁺)[M+H]⁺=253。

[0593] 中间体82:甲基2-(2-氟乙基)-3-氧代-3,4-二氢喹啉-6-甲酸酯

[0594] 将DDQ(1.83g,8.07mmol)添加至在DCM(100mL)中的甲基2-(2-氟乙基)-3-氧代-1,2,3,4-四氢喹啉-6-甲酸酯(中间体81,1.85g,7.33mmol)中。将所得混合物在室温下搅拌3小时。将所得混合物在减压下除去以获得棕色固体。将NaHCO₃饱和水溶液(100mL)添加至固体中,并在室温下搅拌1小时。将沉淀物过滤并用另外的NaHCO₃水溶液(30mL x3)漂洗。将固体在真空下干燥以得到呈灰色固体的甲基2-(2-氟乙基)-3-氧代-3,4-二氢喹啉-6-甲酸酯(中间体82,1.8g,98%)。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ3.23(2H,dt),3.89(3H,s),4.90(2H,dt),7.76-7.85(2H,m),7.88(1H,d),12.55(1H,s);m/z(ES⁺)[M+H]⁺=251。

[0595] 中间体83:3-(2-氟乙基)-7-(羟基甲基)喹啉-2(1H)-酮

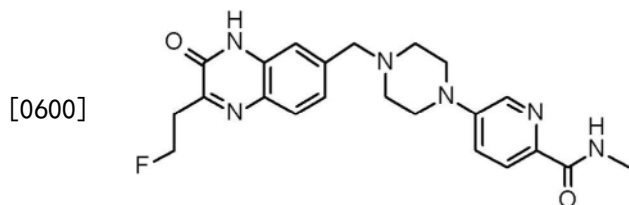
[0596] 在0℃下,将二异丁基氢化铝在THF(15.99mL,15.99mmol)中的1M溶液分批添加至在THF(100mL)中的甲基2-(2-氟乙基)-3-氧代-3,4-二氢喹啉-6-甲酸酯(中间体82,1.0g,4.00mmol)中。将所得混合物在室温下搅拌16小时。在0℃下,将反应混合物用饱和酒石酸钠钾水溶液(20mL)和MeOH(10mL)淬灭。将所得混合物搅拌1小时。将反应混合物过滤并用THF(30mL x3)洗涤。将有机层蒸发以得到粗产物。将粗产物通过反相色谱法(洗脱梯度为水(0.4% HCO₂H)中的5%至60% MeOH)进行纯化。将纯级分蒸发至干燥以得到呈棕色固体的3-(2-氟乙基)-7-(羟基甲基)喹啉-2(1H)-酮(中间体83,0.49g,55.2%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ3.20(2H,dt),4.60(2H,d),4.90(2H,dt),5.41(1H,t),7.21(1H,dd),7.30(1H,d),7.68(1H,d),12.42(1H,s);m/z(ES⁺)[M+H]⁺=223。

[0597] 中间体84:2-(2-氟乙基)-3-氧代-3,4-二氢喹啉-6-甲醛

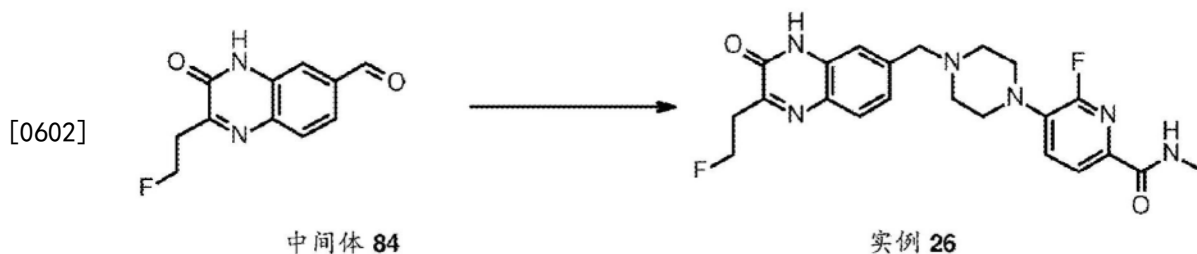
[0598] 将戴斯-马丁高碘烷(229mg,0.54mmol)添加至在DCM(3mL)中的3-(2-氟乙基)-7-(羟基甲基)喹啉-2(1H)-酮(中间体83,100mg,0.45mmol)中。将所得混合物在室温下搅拌2小时。将反应混合物蒸发,以得到粗产物。将粗产物通过反相色谱法(洗脱梯度为水(0.4% HCO₂H)中的5%至30% MeCN)进行纯化。将纯级分蒸发至干燥以得到呈黄色固体的2-(2-氟

乙基)-3-氧代-3,4-二氢喹啉-6-甲醛(中间体84,93mg,94%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ 3.20-3.28(2H,m),4.90(2H,dt),7.74-7.80(2H,m),7.91(1H,d),10.06(1H,s),12.66(1H,s);m/z(ES+)[M+H]⁺=221。

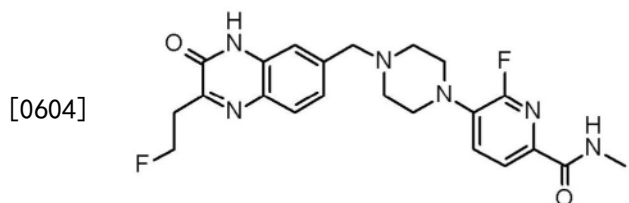
[0599] 合成实例25:5-[4-[[2-(2-氟乙基)-3-氧代-4H-喹啉-6-基]甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺



[0601] 将异丙氧基钛(64.5mg,0.23mmol)添加至在THF(3mL)中的2-(2-氟乙基)-3-氧代-3,4-二氢喹啉-6-甲醛(中间体84,50mg,0.23mmol)和N-甲基-5-(哌嗪-1-基)吡啶酰胺(中间体13,50.0mg,0.23mmol)中。将所得混合物在室温下搅拌2分钟。添加三乙酰氧基硼氢化钠(192mg,0.91mmol)。将所得混合物在室温下搅拌2小时。在另一批次中重复此步骤,并合并两批次进行纯化。将合并的反应混合物通过制备型HPLC(柱:XBridge Prep OBD C18柱,30×150mm 5μm;流动相A:水(10MMOL/L NH₄HCO₃),流动相B:ACN;流速:60mL/min;梯度:在7min内20B至35B;254/210nm;RT:6.38)进行纯化。将含有所希望的化合物的级分蒸发至干燥以得到呈白色固体的5-[4-[[2-(2-氟乙基)-3-氧代-4H-喹啉-6-基]甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺(合成实例25,4.83mg,2.54%)。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ 2.53-2.59(4H,m),2.78(3H,d),3.17(1H,t),3.23(1H,t),3.32-3.38(4H,m),3.63(2H,s),4.83(1H,t),4.95(1H,t),7.25-7.32(2H,m),7.39(1H,dd),7.71(1H,d),7.83(1H,d),8.26(1H,d),8.37(1H,d),12.36(1H,s);¹⁹F NMR(376MHz,DMSO-d₆) δ -217.70;m/z(ES+)[M+H]⁺=425。

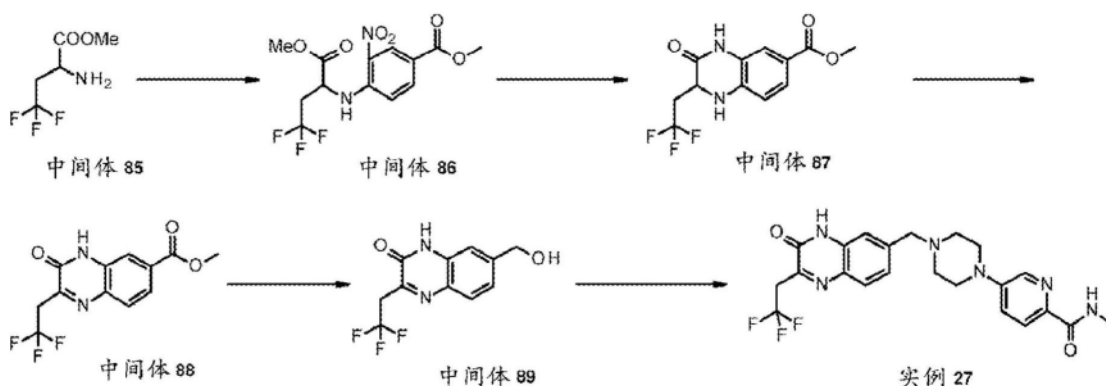


[0603] 合成实例26:6-氟-5-[4-[[2-(2-氟乙基)-3-氧代-4H-喹啉-6-基]甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺



[0605] 将异丙氧基钛(90mg,0.32mmol)添加至在THF(3mL)中的2-(2-氟乙基)-3-氧代-3,4-二氢喹啉-6-甲醛(中间体84,70mg,0.32mmol)和6-氟-N-甲基-5-(哌嗪-1-基)吡啶酰胺(中间体23,76mg,0.32mmol)中。将所得混合物在室温下搅拌2分钟。添加三乙酰氧基硼氢化钠(269mg,1.27mmol)。将所得混合物在室温下搅拌1小时。将反应混合物用MeOH(0.1mL)

淬灭。将反应混合物蒸发,以得到粗产物。将粗产物通过制备型HPLC(柱:XBridge Prep OBD C18柱,30×150mm 5um;流动相A:水(10MMOL/L NH₄HCO₃),流动相B:ACN;流速:60mL/min;梯度:在8min内28B至35B;254/210nm;RT:7将含有所希望的化合物的级分蒸发至干燥以得到粗产物。将粗产物进一步通过制备型HPLC(柱:Xselect CSH OBD柱30*150mm 5um,n;流动相A:水(0.1%HCO₂H),流动相B:ACN;流速:60mL/min;梯度:在7min内5B至20B;254;220nm;RT:6.83)进行纯化。将含有所希望的化合物的级分蒸发至干燥以得到呈黄色固体的6-氟-5-[4-[[2-(2-氟乙基)-3-氧代-4H-喹啉-6-基]甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺(合成实例26,3.79mg,2.65%)。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ2.55-2.60(4H,m),2.76(3H,d),3.14-3.25(6H,m),3.63(2H,s),4.89(2H,dt),7.24-7.31(2H,m),7.57(1H,dd),7.70(1H,d),7.84(1H,d),8.24(0.174H,s),8.38(1H,d),12.37(1H,s);¹⁹F NMR(376MHz,DMSO-d₆) δ-72.51,-217.71;(ES⁺) [M+H]⁺=443。



[0606]

[0607] 中间体86:甲基3-硝基-4-(4,4,4-三氟-1-甲氧基-1-氧代丁烷-2-基氨基)苯甲酸酯

[0608] 将DIPEA(8.77mL,50.22mmol)添加至在DMF(20mL)中的甲基4-氟-3-硝基苯甲酸酯(2.0g,10.04mmol)和甲基2-氨基-4,4,4-三氟丁酸酯盐酸盐(中间体85,2.2g,10.55mmol)中。将所得混合物在50℃下搅拌10小时。将反应混合物用EtOAc(100mL)稀释,并依次用饱和和水性NH₄Cl(100mL x1)、和盐水(100mL x4)洗涤。将有机层经Na₂SO₄干燥,过滤并蒸发以得到呈黄色固体的所希望的产物甲基3-硝基-4-((4,4,4-三氟-1-甲氧基-1-氧代丁烷-2-基)氨基)苯甲酸酯(中间体86,3.0g,85%)。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ2.99-3.28(2H,m),3.73(3H,s),3.84(3H,s),5.18(1H,td),7.28(1H,d),8.01(1H,dd),8.65(1H,d),8.71(1H,d);m/z(ES⁺) [M+H]⁺=351。

[0609] 中间体87:甲基3-氧代-2-(2,2,2-三氟乙基)-1,2,3,4-四氢喹啉-6-甲酸酯在氢下,将20%Pd(OH)₂/C(0.601g,0.86mmol)添加至在MeOH(300mL)中的甲基3-硝基-4-((4,4,4-三氟-1-甲氧基-1-氧代丁烷-2-基)氨基)苯甲酸酯(中间体86,3.0g,8.57mmol)中。将所得混合物在室温下搅拌16小时。将该反应混合物通过硅藻土过滤。将滤液蒸发至干燥以得到呈灰白色固体的甲基3-氧代-2-(2,2,2-三氟乙基)-1,2,3,4-四氢喹啉-6-甲酸酯(中间体87,2.3g,93%)。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ2.64-2.83(2H,m),3.76(3H,s),4.32-4.37(1H,m),6.78(1H,d),6.90(1H,d),7.37(1H,d),7.43(1H,dd),10.64(1H,s);m/z(ES⁺) [M+H]⁺=289。

[0610] 中间体88:甲基3-氧代-2-(2,2,2-三氟乙基)-3,4-二氢喹啉-6-甲酸酯

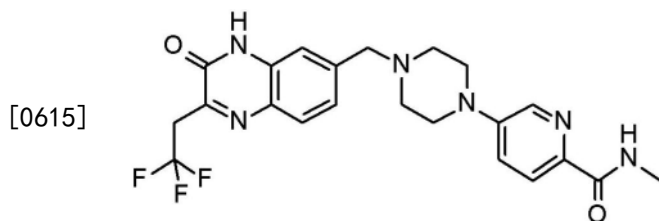
[0611] 将DDQ(1.975g,8.70mmol)添加至在DCM(100mL)中的甲基3-氧代-2-(2,2,2-三氟

乙基)-1,2,3,4-四氢喹啉-6-甲酸酯(中间体87,2.28g,7.91mmol)中。将所得混合物在室温下搅拌3小时。将所得混合物在减压下除去以获得棕色固体。将NaHCO₃饱和水溶液(100mL)添加至固体中,并在室温下搅拌1小时。将沉淀物过滤并用另外的NaHCO₃水溶液(30mL x3)漂洗。将固体在真空下干燥以得到呈棕色固体的甲基3-氧代-2-(2,2,2-三氟乙基)-3,4-二氢喹啉-6-甲酸酯(中间体88,2.2g,97%)。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ3.88-3.98(5H,m),7.81(1H,dd),7.86-7.94(2H,m),12.75(1H,s);m/z(ES⁺)[M+H]⁺=287。

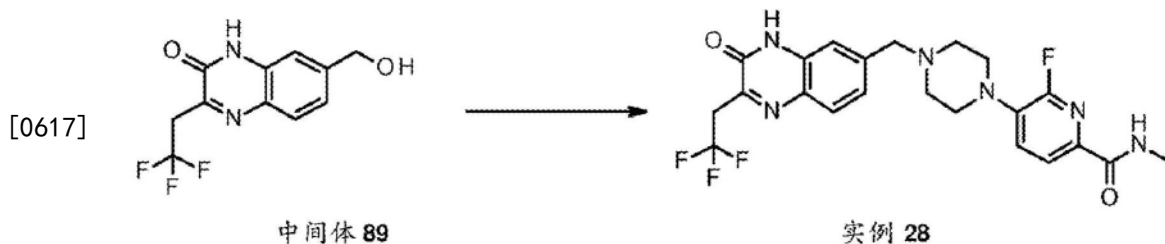
[0612] 中间体89:7-(羟基甲基)-3-(2,2,2-三氟乙基)喹啉-2(1H)-酮

[0613] 在0℃下,将二异丁基氢化铝在THF(20.96mL,20.96mmol)中的1M溶液分批添加至在THF(100mL)中的甲基3-氧代-2-(2,2,2-三氟乙基)-3,4-二氢喹啉-6-甲酸酯(中间体88,1.0g,3.49mmol)中。将所得混合物在室温下搅拌16小时。在0℃下,将反应混合物用饱和酒石酸钠钾水溶液(20mL)和MeOH(10mL)淬灭。将所得混合物搅拌1小时。将反应混合物过滤并用THF(30mL x3)洗涤。将有机层蒸发以得到灰白色固体,将该固体通过快速二氧化硅色谱法(洗脱梯度为水(0.4% HCO₂H)中的5%至55% MeOH)进行纯化。将纯级分蒸发至干燥以得到呈黄色固体的7-(羟基甲基)-3-(2,2,2-三氟乙基)喹啉-2(1H)-酮(中间体89,650mg,72.2%)。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆) δ3.88(2H,q),4.62(2H,d),5.45(1H,t),7.24(1H,dd),7.33(1H,d),7.73(1H,d),12.62(1H,s);m/z(ES⁺)[M+H]⁺=259。

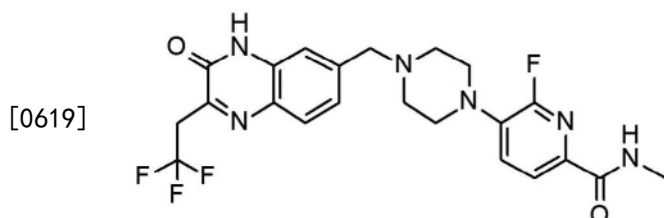
[0614] 合成实例27:N-甲基-5-[4-[[3-氧代-2-(2,2,2-三氟乙基)-4H-喹啉-6-基]甲基]哌嗪-1-基]吡啶-2-甲酰胺



[0616] 将7-(羟基甲基)-3-(2,2,2-三氟乙基)喹啉-2(1H)-酮(中间体89,50mg,0.19mmol)添加至在AcOH(2mL,12.15mmol)中的33% HBr中。将所得混合物在80℃下搅拌2小时。将反应混合物在真空下蒸发以得到7-(溴甲基)-3-(2,2,2-三氟乙基)喹啉-2(1H)-酮(粗产物)。将该产物不经进一步纯化直接用于下一步骤。将DIPEA(0.169mL,0.97mmol)添加至在NMP(2mL)中的7-(溴甲基)-3-(2,2,2-三氟乙基)喹啉-2(1H)-酮(粗产物)和N-甲基-5-(哌嗪-1-基)吡啶酰胺(中间体13,50mg,0.23mmol)中,。将所得的混合物在80℃下搅拌1小时。将反应混合物浓缩,通过制备型HPLC(柱:Sunfire prep C18柱,30x150,5um;流动相A:水(0.1% HCO₂H),流动相B:ACN;流速:60mL/min;梯度:在7min内10B至25B;254/220nm;RT:6.57)进行纯化。将含有所希望的化合物的级分蒸发至干燥以得到呈灰白色固体的N-甲基-5-[4-[[3-氧代-2-(2,2,2-三氟乙基)-4H-喹啉-6-基]甲基]哌嗪-1-基]吡啶-2-甲酰胺(合成实例27,41.5mg,46.6%)。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ2.56(4H,m),2.78(3H,d),3.35(4H,m),3.65(2H,s),3.88(2H,q),7.29-7.42(3H,m),7.79(2H,m),8.25-8.30(1H,m),8.38(1H,m),12.60(1H,br s);¹⁹F NMR(376MHz,DMSO-d₆) δ-61.53;m/z(ES⁺)[M+H]⁺=461。

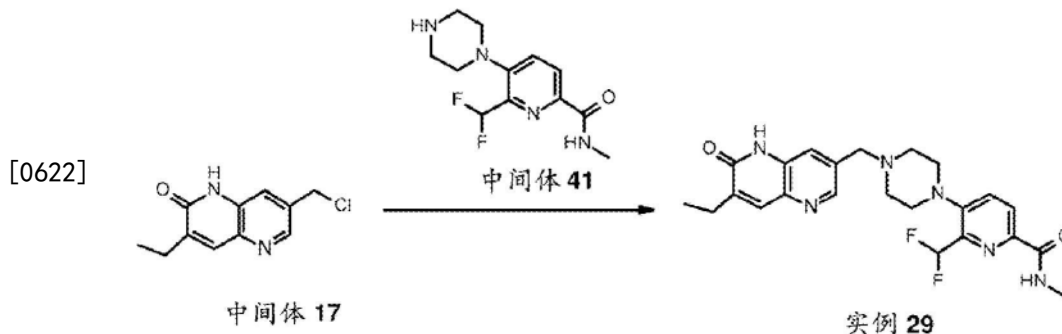


[0618] 合成实例28:6-氟-N-甲基-5-[4-[[3-氧代-2-(2,2,2-三氟乙基)-4H-喹啉-6-基]甲基]哌嗪-1-基]吡啶-2-甲酰胺



[0620] 将7-(羟基甲基)-3-(2,2,2-三氟乙基)喹啉-2(1H)-酮(中间体89,60mg,0.23mmol)添加至在AcOH(2mL,12.15mmol)中的33%HBr中。将所得混合物在80℃下搅拌2小时。将反应混合物在真空下蒸发以得到7-(溴甲基)-3-(2,2,2-三氟乙基)喹啉-2(1H)-酮(粗产物)。将该产物不经进一步纯化直接用于下一步骤。将DIPEA(0.203mL,1.16mmol)添加至在NMP(2mL)中的7-(溴甲基)-3-(2,2,2-三氟乙基)喹啉-2(1H)-酮(粗产物)和6-氟-N-甲基-5-(哌嗪-1-基)吡啶酰胺(中间体23,60mg,0.25mmol)中。将所得混合物在80℃下搅拌2小时。将所得混合物通过制备型HPLC(柱:Sunfire prep C18柱,30x150,5um;流动相A:水(0.1% HCO_2H),流动相B:ACN;流速:60mL/min;梯度:在7min内12B至30B;254/220nm;RT:6.25)进行纯化。将含有所希望的化合物的级分蒸发至干燥以得到呈灰白色固体的6-氟-N-甲基-5-[4-[[3-氧代-2-(2,2,2-三氟乙基)-4H-喹啉-6-基]甲基]哌嗪-1-基]吡啶-2-甲酰胺(合成实例28,49.0mg,43.3%)。 ^1H NMR(400MHz,DMSO- d_6) δ 2.53-2.63(4H,m),2.76(3H,d),3.15-3.22(4H,m),3.65(2H,s),3.88(2H,q),7.28-7.35(2H,m),7.57(1H,dd),7.76(1H,d),7.84(1H,dd),8.17(0.185H,s),8.38(1H,m),12.57(1H,s); ^{19}F NMR(376MHz,DMSO- d_6) δ -61.54,-72.52; m/z (ES^+) $[M+H]^+=479$ 。

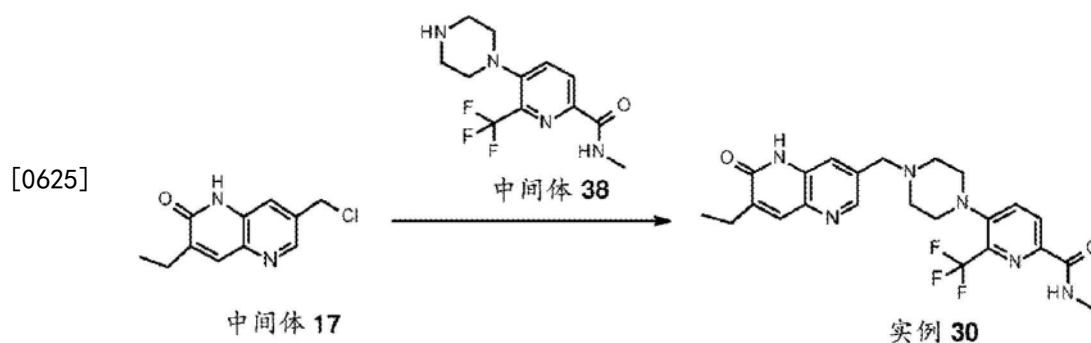
[0621] 合成实例29:6-(二氟甲基)-5-[4-[(7-乙基-6-氧代-5H-1,5-萘啶-3-基)甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺



[0623] 在20℃下,将DIPEA(330 μ l,1.89mmol)添加至7-(氯甲基)-3-乙基-1,5-萘啶-2(1H)-酮HCl(中间体17,70mg,0.27mmol)、碘化钠(4.05mg,0.03mmol)和6-(二氟甲基)-N-甲基-5-哌嗪-1-基-吡啶-2-甲酰胺2HCl(中间体41,102mg,0.30mmol)在乙腈(2.4mL)中的搅

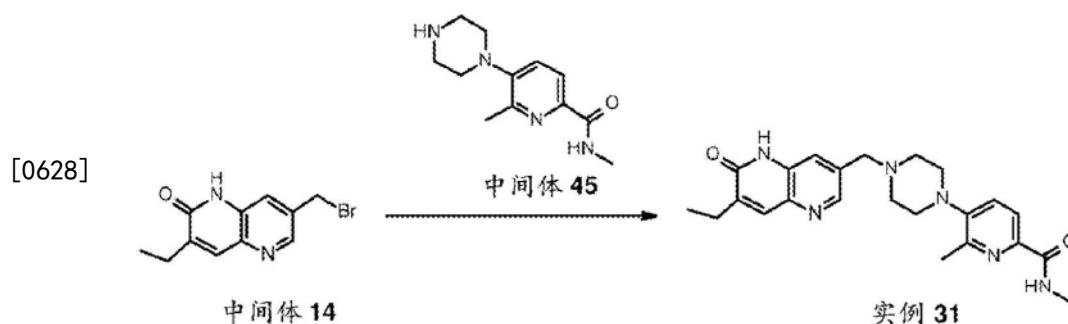
拌溶液中,并将所得溶液在50℃下搅拌3小时。将溶剂在真空下除去并添加50mL水随后3mL饱和NaHCO₃。将混合物用乙酸乙酯萃取。浓缩后,将所得残余物通过快速二氧化硅色谱法(洗脱梯度为DCM中的0%至30%MeOH)进行纯化。将产物级分在减压下浓缩至干燥以得到呈浅黄色固体的6-(二氟甲基)-5-[4-[(7-乙基-6-氧代-5H-1,5-萘啶-3-基)甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺(合成实例29,52.0mg,42%)。¹H NMR(500MHz,DMSO-d₆) 1.19(3H,t),2.54-2.58(2H,m),2.63(4H,br s),2.84(3H,d),3.03(4H,br t),3.68(2H,s),7.14(1H,t),7.62(1H,d),7.76(1H,s),7.86(1H,d),8.10(1H,d),8.32-8.45(2H,m),11.86(1H,s);m/z(ES⁺)[M+H]⁺=457。

[0624] 合成实例30:5-[4-[(7-乙基-6-氧代-5H-1,5-萘啶-3-基)甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-6(三氟甲基)吡啶-2-甲酰胺



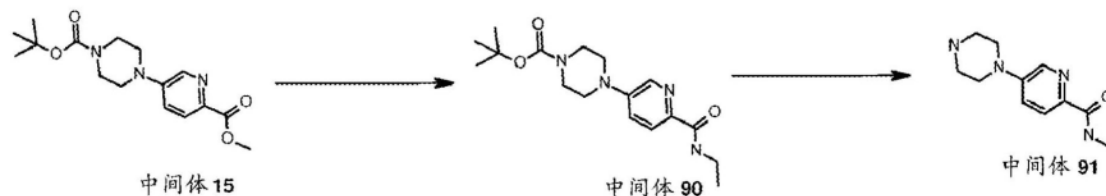
[0626] 在20℃下,将DIPEA(330μl,1.89mmol)添加至7-(氯甲基)-3-乙基-1,5-萘啶-2(1H)-酮HCl(中间体17,70mg,0.27mmol)、碘化钠(4.05mg,0.03mmol)和N-甲基-5-哌嗪-1-基-6-(三氟甲基)吡啶-2-甲酰胺2HCl(中间体38,107mg,0.30mmol)在乙腈(2.4mL)中的搅拌溶液中,并将所得溶液在50℃下搅拌3小时。将溶剂在真空下除去并添加50mL水随后3mL饱和NaHCO₃。将混合物用乙酸乙酯萃取。浓缩后,将所得残余物通过快速二氧化硅色谱法(洗脱梯度为DCM中的0%至30%MeOH)进行纯化。将产物级分在减压下浓缩至干燥以得到呈浅黄色固体的5-[4-[(7-乙基-6-氧代-5H-1,5-萘啶-3-基)甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-6(三氟甲基)吡啶-2-甲酰胺(合成实例30,58.0mg,45%)。¹H NMR(500MHz,DMSO-d₆) 1.19(3H,t),2.54-2.62(6H,m),2.83(3H,d),3.04(4H,br t),3.67(2H,s),7.62(1H,d),7.75(1H,s),8.04(1H,d),8.19(1H,d),8.31-8.48(2H,m),11.85(1H,s);m/z(ES⁺)[M+H]⁺=475。

[0627] 合成实例31:5-[4-[(7-乙基-6-氧代-5H-1,5-萘啶-3-基)甲基]哌嗪-1-基]-N,6-二甲基-吡啶-2-甲酰胺

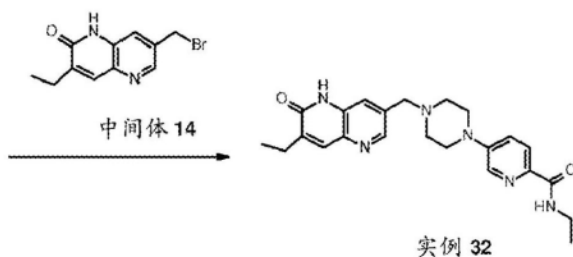


[0629] 在20℃下,将DIPEA(0.366mL,2.10mmol)添加至7-(溴甲基)-3-乙基-1,5-萘啶-2(1H)-酮(中间体14,80mg,0.30mmol)和N,6-二甲基-5-哌嗪-1-基-吡啶-2-甲酰胺2HCl(中间体45,101mg,0.33mmol)在乙腈(2mL)中的搅拌溶液中,并将所得溶液在70℃下搅拌3小

时。将溶剂在真空下除去并添加50mL水随后3mL饱和NaHCO₃。将混合物用乙酸乙酯萃取。浓缩后,将所得残余物通过快速二氧化硅色谱法(洗脱梯度为DCM中的0%至30%MeOH)进行纯化。将产物级分在减压下浓缩至干燥以得到呈浅黄色固体的5-[4-[(7-乙基-6-氧代-5H-1,5-萘啶-3-基)甲基]哌嗪-1-基]-N,6-二甲基-吡啶-2-甲酰胺(合成实例31,36.0mg,29%)。¹H NMR(500MHz,DMSO-d₆) 1.19(3H,t),2.50(3H,s),2.54-2.57(2H,m),2.57-2.64(4H,m),2.81(3H,d),2.96(4H,br s),3.68(2H,s),7.49(1H,d),7.63(1H,d),7.76(1H,s),7.80(1H,d),8.35-8.47(2H,m),11.85(1H,br s);m/z(ES⁺)[M+H]⁺=421。



[0630]

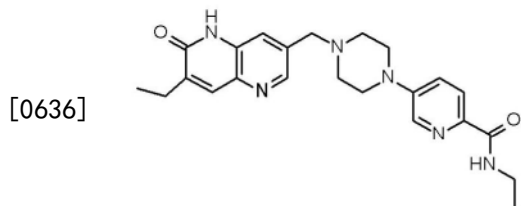
[0631] 中间体90:叔丁基4-[6-(乙基氨基甲酰基)-3-吡啶基]哌嗪-1-甲酸酯

[0632] 将在甲醇中的乙胺(7M,7.78mL,15.56mmol)添加至叔丁基4-(6-(甲氧基羰基)吡啶-3-基)哌嗪-1-甲酸酯(中间体15,500mg,1.56mmol)的溶液中,并将所得溶液在50℃下搅拌18小时。将溶剂在真空下除去并将样品进一步干燥以得到叔丁基4-[6-(乙基氨基甲酰基)-3-吡啶基]哌嗪-1-甲酸酯(中间体90,0.495g,95%)。¹H NMR(500MHz,DMSO-d₆) 1.11(3H,t),1.43(9H,s),3.27-3.32(6H,m),3.44-3.52(4H,m),7.42(1H,dd),7.85(1H,d),8.28(1H,d),8.44(1H,br t)。

[0633] 中间体91:N-乙基-5-哌嗪-1-基-吡啶-2-甲酰胺

[0634] 将在二噁烷中的HCl(0.473mL,15.58mmol)缓慢添加至叔丁基4-(6-(乙基氨基甲酰基)吡啶-3-基)哌嗪-1-甲酸酯(中间体90,521mg,1.56mmol)在甲醇(10mL)中的搅拌溶液中。将所得溶液在室温下搅拌17小时。将反应浓缩,并将固体干燥以给出N-乙基-5-哌嗪-1-基-吡啶-2-甲酰胺2HCl(中间体91,421mg,88%);m/z(ES⁺)[M+H]⁺=235。

[0635] 合成实例32:N-乙基-5-[4-[(7-乙基-6-氧代-5H-1,5-萘啶-3-基)甲基]哌嗪-1-基]吡啶-2-甲酰胺



[0636]

[0637] 在20℃下,将DIPEA(0.320mL,1.83mmol)添加至7-(溴甲基)-3-乙基-1,5-萘啶-2(1H)-酮(中间体14,70mg,0.26mmol)、和N-乙基-5-哌嗪-1-基-吡啶-2-甲酰胺2HCl(中间体

91,89mg,0.29mmol)在乙腈(2mL)中的搅拌溶液中,并将所得溶液在70℃下搅拌3小时。将溶剂在真空下除去并添加50mL水随后3mL饱和NaHCO₃。将混合物用乙酸乙酯萃取。浓缩后,将粗产物通过反相色谱法((柱:XbridC18),洗脱梯度为水(具有0.2%NH₄OH)中的20%至50% MeCN)进行纯化。将纯级分蒸发至干燥以得到呈白色固体的N-乙基-5-[4-[(7-乙基-6-氧代-5H-1,5-萘啶-3-基)甲基]哌嗪-1-基]吡啶-2-甲酰胺(合成实例32,28.0mg,25%)。¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) 1.10 (3H, t), 1.19 (3H, t), 2.52-2.55 (2H, m), 2.55-2.59 (4H, m), 3.26-3.30 (2H, m), 3.34 (4H, br d), 3.66 (2H, s), 7.40 (1H, dd), 7.63 (1H, s), 7.76 (1H, s), 7.83 (1H, d), 8.27 (1H, d), 8.36-8.46 (2H, m), 11.74-11.94 (1H, m); m/z (ES⁺) [M]⁺=420。

[0638] 合成实例4-形式A

[0639] 在合成实例4中,通过在减压下蒸发甲醇/二氯乙烷溶液获得呈部分结晶固体的5-[4-[(7-乙基-6-氧代-5H-1,5-萘啶-3-基)甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺。如此获得的结晶材料被表征为结晶形式A。

[0640] 在结晶度较差的情况下,可以通过在环境温度或环境温度下或在50℃下,将20mg粗样品悬浮于0.20ml的水、甲醇、乙醇、丙酮、乙腈、四氢呋喃、乙酸乙酯或其他溶剂中持续1天,获得结晶形式A。

[0641] 将形式A通过XRPD进行分析,并将结果在图16A中示出并如下列表:

[0642] 针对形式A的XRPD峰

| 角度 (2θ ± 0.2°) | 强度 (%) |
|----------------|--------|
| 8.3 | 100.0 |

[0643]

[0644]

| | |
|------|------|
| 12.4 | 30.9 |
| 19.4 | 26.5 |
| 20.4 | 25.8 |
| 26.3 | 19.2 |
| 21.2 | 17.4 |
| 20.8 | 14.8 |
| 22.8 | 14.1 |
| 16.8 | 14.0 |
| 10.2 | 13.2 |
| 18.4 | 10.8 |
| 11.4 | 9.9 |
| 28.1 | 8.4 |
| 18.0 | 8.4 |
| 25.2 | 8.2 |
| 24.9 | 6.7 |
| 16.5 | 6.4 |
| 17.3 | 5.3 |
| 22.1 | 4.0 |
| 29.3 | 3.3 |
| 24.3 | 2.7 |
| 30.3 | 2.5 |
| 38.2 | 2.0 |
| 33.9 | 1.4 |
| 14.2 | 1.4 |
| 13.7 | 1.4 |
| 33.0 | 1.3 |
| 36.5 | 1.2 |
| 39.2 | 1.2 |

[0645] 形式A的特征在于提供使用CuK α 辐射测量的以下 2θ 值中的至少一者:8.3、12.4、和19.4 $^{\circ}$ 。

[0646] 通过热技术对形式A进行分析。DSC分析表明,形式A具有在254℃开始并且在255℃达到峰的熔点。形式A的代表性DSC迹线图示于图16B中。

[0647] 生物测定(PARP1选择性抑制剂)

[0648] 可以采用以下测试程序来确定本文所述的PARP1选择性抑制剂化合物的抑制特性。

[0649] PARP荧光各向异性结合测定

[0650] 将重组全长6HIS标记的PARP1蛋白用50mM Tris pH 8、0.001% Triton X100、10mM MgCl₂、150mM NaCl稀释至6nM,并用等体积的2nM荧光探针(用50mM Tris pH 8、0.001% Triton X100、10mM MgCl₂、150mM NaCl稀释)孵育四小时。探针的最终DMSO浓度保持在1% (v/v)以下。

[0651] 将重组全长PARP2蛋白用50mM Tris pH 8、0.001% Triton X100、10mM MgCl₂、150mM NaCl稀释至6nM,并用等体积的2nM荧光探针(用50mM Tris pH 8、0.001% Triton X100、10mM MgCl₂、150mM NaCl稀释)孵育四小时。探针的最终DMSO浓度保持在1% (v/v)以下。

[0652] 将重组全长PARP3蛋白用50mM Tris pH 8、0.001% Triton X100、10mM MgCl₂、150mM NaCl稀释至100nM,并用等体积的6nM荧光探针(用50mM Tris pH 8、0.001% Triton X100、10mM MgCl₂、150mM NaCl稀释)孵育四小时。探针的最终DMSO浓度保持在1% (v/v)以下。

[0653] 将重组PARP5a结合结构域用50mM Tris pH 8、0.001% Triton X100、10mM MgCl₂、150mM NaCl稀释至160nM,并用等体积的6nM荧光探针(用50mM Tris pH 8、0.001% Triton X100、10mM MgCl₂、150mM NaCl稀释)孵育四小时。探针的最终DMSO浓度保持在1% (v/v)以下。

[0654] 将重组全长GST标记的PARP6蛋白用50mM Tris pH 8、0.001% Triton X100、10mM MgCl₂、150mM NaCl稀释至160nM,并用等体积的6nM荧光探针(用50mM Tris pH 8、0.001% Triton X100、10mM MgCl₂、150mM NaCl稀释)孵育四小时。探针的最终DMSO浓度保持在1% (v/v)以下。

[0655] 在存在测试化合物或溶剂对照的情况下,使用BMG Pherastar^{FS}®测量与蛋白质结合时探针的荧光各向异性,并且确定对各向异性的影响。计算不同测试化合物浓度的%抑制值,并将其拟合到四参数对数图以确定IC₅₀值。必要时,化合物K_i可以使用Anal. Biochem. [分析生物化学]1980年9月1日;107(1):220-39定义的Munson Rodbard方程由IC₅₀值确定,并且其基于与相关PARP蛋白结合的探针的已知K_p。

[0656] hERG电生理测定

[0657] 使用Nanion Syncropatch 768PE从稳定转染的CHO hKv11.1细胞获得电生理记录(均在RT下进行)。以6个化合物板(每个在不同的浓度下)添加测试化合物、媒介物或阳性对照,以允许向细胞给予累积剂量(10mM、3.167mM、1mM、0.3167mM、0.1mM、0.03167mM)。将600μl的化合物重悬于90μl的参比缓冲液(以mM计,NaCl 80、KCL 4、CaCl 5、MgCl11、NMDG C160、D-葡萄糖一水合物5、HEPES 10(pH 7.4HCL,298mOsm)),最终化合物浓度为39.6μM、13.2μM、4.4μM、1.46μM、0.48μM、0.16μM。对于每次Nanion Syncropatch 768PE运行,使用Syncropatch液体处理系统进行的所有液体添加来测量在存在细胞外溶液(以mM计,NaCl

80、KCL 4、CaCl 5、MgCl 1、NMDG Cl 60、D-葡萄糖一水合物5、HEPES 10 (pH 7.4HCL、298mOsm) 时每个孔中的电流振幅。将40 μ L外部溶液 (以mM计, HBPS、CaCl₂2、MgCl₂1 (pH 7.4、NaOH)) 添加至384孔多孔介质电阻记录芯片中, 并将内部缓冲液 (以mM计, KF 130、KCl 20、MgCl₂ 1、EGTA 10、HEPES 10、Escin 25 (均来自西格玛奥德里奇公司 (Sigma-Aldrich); 使用10M KOH使得达到pH 7.2-7.30, 320mOsm) 灌注至板的底部。以1e6个细胞/ml的密度将20 μ L的保持在约9 $^{\circ}$ C的细胞分配到芯片的每个孔中, 随后添加20 μ L的密封增强剂 (以mM计, NaCl 80、KCl 3、CaCl₁₀、HEPES 10、MgCl₁₁ (pH 7.4NaOH))。执行洗涤步骤, 残余体积为40 μ L。在添加测试化合物之前, 分配40 μ L的参比缓冲液以建立稳定的基线, 并在3min后进行40 μ L去除步骤, 重复此步骤。分配40 μ L的浓度1 (0.16 μ M) 化合物, “实时”记录3min暴露, 然后去除40 μ L。对另外5个后续化合物板重复此步骤, 以生成累积曲线分析。所有数据均进行漏电扣除, 2个脉冲至-80mV 100ms, 100ms延迟。然后, 将向外的K⁺电流从-90mV的保持电势通过电压阶跃诱发到+60mV, 每个脉冲以2Hz的频率以15s的脉冲间隔传送。

[0658] PARP增殖测定(4天的化合物给药)

[0659] 在完全培养基中收获密度分别为1.875E4个细胞/ml和6.25E4个细胞/ml的DLD1细胞和BRCA2-/-) DLD1细胞, 使用Multidrop Combi将它们以40 μ L/孔接种到384孔板 (格瑞纳公司 (Greiner), 克雷姆斯明斯特 (Kremsmunster), 奥地利; 781090) 中, 然后在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下孵育过夜。第二天 (第1天), 使用Multidrop Combi将sytox绿 (sytoxgreen) (5 μ l, 2 μ M) 和皂苷 (10 μ l, 0.25%储备液) 添加至第0天的板中, 使用黑色胶盖密封板, 并在RT下孵育>3hr。使用装有4x物镜的Cell Insight (赛默飞世尔公司 (Thermo Fisher)) 对细胞成像。使用Echo 555添加测试化合物, 并将其置于保持在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下的培养箱中, 并孵育4天。在第5天, 向板中添加sytox绿 (5 μ l, 2 μ M), 然后添加皂苷 (10 μ l, 0.25%储备液), 使用黑色胶盖密封板并在RT下孵育>3hr。使用4x物镜读取Cell Insight上的所有细胞。通过评估针对第0天和第5天的板的CeU Insight输出的总细胞数, 确定Genedata中的增殖速率。

[0660]

| 合成实例编号 | PARP1 IC50 (μM) | PARP2 IC50 (μM) | PARP3 IC50 (μM) | PARP5a IC50 (μM) | PARP6 IC50 (μM) | BRCA2 -/- DLD-1 增殖 4d IC50 (μM) | WT DLD-1 增殖 4d IC50 (μM) | hERG IC50 (μM) |
|--------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|---|---|-----------------------------------|
| 1 | 0.003 | 1.7 | 4 | > 100 | 34 | 0.010 | > 30 | > 40 |
| 2 | 0.004 | 0.88 | 9.9 | 20 | 14 | 0.008 | > 30 | > 40 |
| 3 | 0.005 | 1.3 | 12 | > 100 | 14 | 0.004 | > 30 | 22 |
| 4 | 0.004 | > 1.5 | 4.7 | > 100 | 19 | > 0.017 | > 30 | > 40 |
| 5 | 0.002 | 0.65 | 7.1 | > 100 | 23 | 0.006 | > 30 | > 40 |
| 6 | 0.003 | 0.84 | 9.3 | > 100 | 8.2 | 0.006 | > 30 | > 40 |
| 7 | 0.002 | 1.3 | 2.6 | 94 | 22 | 4.14 | | |
| 8 | 0.003 | 11 | 55 | 93 | 18 | 0.011 | > 19 | > 40 |
| 9 | 0.009 | 22 | > 100 | > 100 | 47 | 0.010 | 17 | > 40 |
| 10 | 0.005 | 17 | 48 | 56 | 26 | 0.006 | > 30 | > 40 |
| 11 | 0.005 | 4 | 13 | > 100 | 22 | 0.184 | > 30 | > 40 |
| 12 | 0.004 | 1.6 | 19 | 89 | 11 | 0.008 | > 30 | > 40 |

[0661]

| 合成实例编号 | PARP1 IC50 (μM) | PARP2 IC50 (μM) | PARP3 IC50 (μM) | PARP5a IC50 (μM) | PARP6 IC50 (μM) | BRCA2 -/- DLD-1 增殖 4d IC50 (μM) | WT DLD-1 增殖 4d IC50 (μM) | hERG IC50 (μM) |
|--------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|---------------------------------|--------------------------|----------------|
| 13 | 0.007 | 8.5 | 30 | > 100 | 30 | 0.005 | > 26 | > 40 |
| 14 | 0.004 | 2.9 | 30 | 50 | 11 | 0.006 | > 30 | > 40 |
| 15 | 0.011 | 3.6 | 35 | > 100 | 80 | 0.090 | > 30 | > 40 |
| 16 | 0.007 | 3.3 | 74 | 61 | 31 | 0.018 | > 22 | > 40 |
| 17 | 0.007 | 1.7 | 96 | > 100 | 59 | 0.020 | > 30 | > 40 |
| 18 | 0.031 | 17 | > 100 | > 100 | > 29 | 4.90 | > 30 | 5.2 |
| 19 | 0.015 | > 100 | > 100 | > 100 | > 29 | 0.015 | > 30 | 21 |
| 20 | 0.014 | 28 | > 100 | > 100 | > 100 | 0.016 | > 24 | 38 |
| 21 | 0.004 | 9.5 | > 100 | > 100 | 33 | 0.016 | > 30 | > 40 |
| 22 | 0.006 | 1 | 2.6 | 26 | 16 | 0.012 | > 30 | > 40 |
| 23 | 0.004 | 4.4 | 60 | 60 | > 100 | | 4.2 | 36 |
| 24 | 0.003 | 5.1 | > 100 | 93 | > 100 | 0.010 | 14 | 37 |
| 25 | 0.002 | 6 | 43 | > 100 | > 100 | | > 25 | > 40 |
| 26 | 0.005 | 6.7 | > 100 | > 100 | > 100 | 0.005 | 23 | > 40 |
| 27 | 0.007 | 16 | > 100 | 71 | > 100 | 10.3 | > 10 | 26 |
| 28 | 0.006 | 14 | > 100 | > 29 | > 100 | 0.027 | > 30 | > 40 |
| 29 | 0.004 | 6.1 | 9.9 | > 100 | 14 | 0.007 | > 30 | > 40 |
| 30 | 0.003 | 7.6 | 4.5 | > 100 | 10 | 0.004 | > 30 | > 40 |
| 31 | 0.005 | 3.7 | 2.6 | > 100 | 28 | | | > 40 |
| 32 | 0.003 | 2.1 | 1.9 | > 100 | 10 | | | > 40 |

[0662] 实例1:抗体-药物缀合物的生产

[0663] 根据WO 2015/115091中描述的生产方法,并使用抗HER2抗体(包含由SEQ ID NO:11表示的氨基酸序列(SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至449)组成的重链和由SEQ ID NO:2的所有氨基酸残基1至214所组成的氨基酸序列组成的轻链的抗体),生产其中由下式表示的药物-接头经由硫醚键与抗HER2抗体缀合的抗HER2抗体-药物缀合物(DS-8201:德卢替康-曲妥珠单抗),

[0675]

| 细胞系 | HER2 状态 | 癌症类型 |
|---------------|----------|------|
| NCI-N87 | Amp (高) | 胃癌 |
| SKBR3 | Amp (高) | 乳腺癌 |
| AU565 | Amp (高) | 乳腺癌 |
| HCC1569 | Amp (高) | 乳腺癌 |
| HCC1187 | 低 | 乳腺癌 |
| HCC1954 | Amp (高) | 乳腺癌 |
| KPL-4 | Amp (高) | 乳腺癌 |
| HCC38 | Amp (低) | 乳腺癌 |
| MCF7 (ER+) | Del (无效) | 乳腺癌 |
| MDA-MB-157 | 低 | 乳腺癌 |
| HCC1419 | Amp (高) | 乳腺癌 |
| ZR-75-30 | Amp (高) | 乳腺癌 |
| ZR-75-1 (ER+) | 低 | 乳腺癌 |
| HCC1395 | 低 | 乳腺癌 |
| BT474 (ER+) | Amp (高) | 乳腺癌 |
| EFM-19 (ER+) | 低 | 乳腺癌 |
| HCC1937 | 无效 | 乳腺癌 |
| BT-549 | Del (无效) | 乳腺癌 |
| MDA-MB-453 | 低 | 乳腺癌 |
| MDA-MB-361 | Amp (低) | 乳腺癌 |
| CAL-51 | 低 | 乳腺癌 |
| MDA-MB-468 | Amp (低) | 乳腺癌 |
| T-47D (ER+) | 低 | 乳腺癌 |
| HCC1143 | 低 | 乳腺癌 |
| JIMT1 | Amp (低) | 乳腺癌 |
| CAMA1 (ER+) | 低 | 乳腺癌 |

| | | | |
|--------|------------|---|-----|
| [0676] | MDA-MB-231 | 低 | 乳腺癌 |
| | HCC70 | 低 | 乳腺癌 |

[0677] 屏幕上的读数是7天CellTiter-Glo细胞活力测定,以6x6剂量响应矩阵进行(DS-8201以5点对数连续稀释,并且AZD5305以半对数连续稀释)。AZD5305的最大浓度是3 μ M并且DS-8201的最大浓度是10 μ g/ml。此外,曲妥珠单抗和依喜替康(DNA拓扑异构酶I抑制剂)也与AZD5305平行地进行筛选,以帮助将有效组合的作用机制解卷积。基于 ΔE_{max} 和Loewe协同评分的组合来评估组合活性。

[0678] 结果:

[0679] HER2高细胞系(KPL4、NCI-N87、SKBR3、HCC1954、HCC1569、AU565)的结果在图12A和12B以及表2中示出,并且HER2低细胞系(MDA-MB-468、MDA-MB-157、HCC1187、T47D、HCC38)的结果在图13A和13B以及表3中示出。

[0680] 图12A和13A示出了测量的细胞活力信号的矩阵。X轴代表药物A(DS-8201),并且Y轴代表药物B(AZD5305)。方框中的值代表在第7天用药物A+B处理的细胞与用DMSO对照处理的细胞的比率。将所有值归一化为第0天的细胞活力值。0和100之间的值代表%生长抑制,并且高于100的值代表细胞死亡。

[0681] 图12B和13B示出了Loewe超额矩阵。方框中的值代表由Loewe加性模型计算的超额值。

[0682] 表2和3示出了HSA协同评分和Loewe加性评分:

[0683] 表2

| | | | | | | | |
|--------|-----------|------|---------|-------|---------|---------|-------|
| [0684] | 细胞系 | KPL4 | NCI-N87 | SKBR3 | HCC1954 | HCC1569 | AU565 |
| | HSA协同评分 | 68.2 | 70.95 | 20.33 | 9.9 | 38.6 | 32.77 |
| | Loewe协同评分 | 68.2 | 70.95 | 20.33 | 9.9 | 38.6 | 32.77 |

[0685] 表3

| | | | | | | |
|--------|-----------|------------|------------|---------|-------|-------|
| [0686] | 细胞系 | MDA-MB-468 | MDA-MB-157 | HCC1187 | T47D | HCC38 |
| | HSA协同评分 | 11.6 | 7.04 | 52.7 | 12.33 | 8.9 |
| | Loewe协同评分 | 11.6 | 6.5 | 52.7 | 12.33 | 8.8 |

[0687] 注意:

[0688] 如果两种化合物通过相同的机制作用于相同的分子靶标,则Loewe剂量加性预测预期的响应。它基于化合物之间零相互作用的假设计算加性,并且它独立于剂量-响应关系的性质。

[0689] HSA(最高单一药剂)[Berenbaum 1989]量化了两种单一化合物在其相应浓度下的较高效果。将组合效果与组合中所用浓度的每种单一药剂的效果进行比较。超过最高单一药剂效果表明协同作用。HSA不要求化合物影响相同的靶标。

[0690] 超额矩阵:对于浓度矩阵中的每个孔,将测量值或拟合值与每个浓度对的预测非协同值进行比较。预测值由选择的模型决定。预测值和观察值之间的差异可能表明协同作用或拮抗作用,并显示在超额矩阵中。超额矩阵值通过组合评分超额量和协同评分进行总结。

[0691] 图14示出在用DS-8201与AZD5305组合处理的不同细胞系中,组合Emax和Loewe协同评分。从图12A和12B以及表2可以看出,AZD5305与DS-8201协同作用,并且也增加了HER2+乳腺和胃细胞系中的细胞死亡。从图13A和13B以及表3可以看出,AZD5305与DS-8201协同作用,并且也在Emax (3 μ M AZD5305和10 μ g/ml DS-8201)下增加了HER2低乳腺癌细胞系中的细胞死亡。从图14可以看出,在十一种细胞系(包括HER2低乳腺癌细胞系)中,用DS-8201与AZD5305组合治疗导致高组合Emax (>100)和高Loewe协同评分(>5)。

[0692] 实例4:抗肿瘤测试

[0693] 抗体-药物缀合物DS-8201(德卢替康-曲妥珠单抗(**Enhertu**[®]))与PARP1选择性抑制剂AZD5305(5-[4-[(7-乙基-6-氧代-5H-1,5-萘啶-3-基)甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺)的组合。

[0694] 方法:

[0695] 将在其各自条件下生长的细胞以最佳密度铺在96孔板中,以允许在整个测定期间(4至8天)进行线性增殖。铺板后,立即给细胞施用所示化合物,总体积为200 μ L/孔,并置于培养箱中。以每个组合6x8的浓度响应矩阵进行组合。在终点,将细胞在室温下在2%PFA中固定20分钟。为了获得处理开始时的细胞数量,每个实验使用一个额外的板,并在细胞附着后固定。然后将细胞在含0.5%Triton-X100的PBS中渗透10分钟。PBS洗涤后,将细胞在RT下在含5%FBS的PBS中封闭1h,并在4 $^{\circ}$ C下与5%FBS+0.05%triton中的一级抗体一起孵育过夜。在PBS中洗涤3次后,将细胞在室温下与含有Hoechst33258的5%FBS+0.05%triton中的二级抗体一起孵育1h。在PBS中洗涤3次后,用Cellinsight仪器以10x物镜和9个视野/孔扫描细胞。基于细胞核Hoechst染色,使用Columbus针对细胞计数对图像进行分析。与溶剂对照相比,总细胞计数/孔用于计算每个孔中的相对生长。为了计算协同评分,使用Combeneft软件(Di Veroli,G.Y.等人,Combeneft:an interactive platform for the analysis and visualization of drug combinations[Combeneft:用于药物组合分析和可视化的交互式平台].Bioinformatics[生物信息学],2016,32(18):第2866-2868页)分析生长抑制数据。

[0696] 结果:

[0697] HER2高细胞系(KPL4)和两种HER2低细胞系(JIMT1,MDA-MB-468)的结果在图15A和15B中示出。

[0698] 图15A示出了细胞计数矩阵,其中Y轴代表药物A(DS-8201),并且X轴代表药物B(AZD5305)。方框中的值代表相对总细胞(核)计数占DMSO媒介物对照的百分比。

[0699] 图15B示出了矩阵,其中Y轴代表药物A(DS-8201),并且X轴代表药物B(AZD5305),并且方框中的值代表所计算的Loewe协同评分。

[0700] 实例3和4中的结果表明,使用AZD5305的选择性PARP1抑制增强了DS-8201在体外高和低HER2表达细胞系两者中的抗肿瘤功效。在实例3中,AZD5305与DS-8201组合示出在五种HER2+乳腺癌细胞系、一种HER2+胃癌细胞系(图12A、12B、14和表2)和五种HER2低乳腺癌细胞系(图13A、13B和14,以及表3)中的组合益处。在实例4中,AZD5305与DS-8201组合示出在HER2高(KPL4)和HER2低(JIMT-1,MDA-MB-468)细胞系中的协同活性(图15A和15B)。

[0701] 实例5:抗肿瘤测试-体内

[0702] 抗体-药物缀合物DS-8201(德卢替康-曲妥珠单抗(**Enhertu**[®]))与PARP1选择性抑

制剂AZD5305 (5-[4-[(7-乙基-6-氧代-5H-1,5-萘啶-3-基)甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺)的组合。

[0703] 方法:

[0704] 使用5周龄至8周龄的雌性裸鼠(查士利华公司(Charles River)),在进入研究前适应环境7天。将 1×10^7 个NCI-N87肿瘤细胞(基质胶中1:1)皮下植入雌性裸小鼠的侧腹。当肿瘤达到大约 150mm^3 时,将大小相似的肿瘤随机分配到治疗组,如表4所示:

[0705] 表4

| 治疗 | 剂量 | 施用途径 | 给药时间表 (28天) |
|-------------------|----------------------------|---------|----------------|
| 媒介物 | ---- | IV + PO | 单个剂量 + QD |
| [0706] DS-8201 | 3 mg/kg | IV | 单个剂量 |
| DS-8201 | 1 mg/kg | IV | 单个剂量 |
| AZD5305 | 1 mg/kg | PO | QD |
| DS-8201 + AZD5305 | 1 mg/kg 或 3mg/kg + 1 mg/kg | IV + PO | 单个剂量 + QD |

[0707] PO:口服(per os)给药

[0708] QD:每天一次(quaque die)给药

[0709] 根据给药当天的个体体重计算每只动物的化合物剂量。DS-8201和AZD5305在同一天给药,其中DS-8201在AZD5305 PO给药后大约1小时施用。在第1天,以1mg/kg或3mg/kg的单个剂量施用DS-8201,并且以1mg/kg QD施用AZD5305,持续28天。给药持续时间为28天。

[0710] 3mg/kg和1mg/kg DS-8201的配制品

[0711] 在给药当天通过在25mM组氨酸缓冲液、9%蔗糖(pH5.5)中将DS-8201储备液(20.1mg/ml)稀释至0.6mg/ml,并分别将3mg/kg和1mg/kg给药溶液稀释至0.2mg/ml来制备DS-8201的给药溶液。在以5ml/kg的给药体积经由IV注射进行施用之前,使用移液管将每种给药溶液充分混合。

[0712] 1mg/kg AZD5305的配制品

[0713] 为了配制1mg/kg给药溶液,制备0.1mg/ml浓度的AZD5305,其导致PO给药的给药体积为10ml/kg。总共需要49ml的媒介物。将体积为15 μ l的1M HCl添加至化合物中并且通过涡旋充分混合。将体积为1ml的无菌水添加至Eppendorf管中,并使用颗粒杵将其与化合物充分混合。将化合物超声处理大约5分钟,然后将内容物转移至玻璃瓶中。使用体积为1ml的无菌水冲洗Eppendorf管中任何残留的化合物,然后将其转移至玻璃瓶中。将剩余体积的无菌水(37.2ml;总媒介物体积的80%)添加至玻璃瓶中,并使用磁力搅拌器充分混合。将给药溶液的pH调节至pH 3.74,然后将剩余的媒介物(9.772ml的无菌水)添加至玻璃瓶中并使用磁力搅拌器充分混合。将给药溶液避光并且每天取少量的等分试样用于给药。将所有剩余的给药溶液在冰箱中保持至多7天。1mg/kg AZD5305的最终给药基质是澄清溶液。

[0714] 测量

[0715] 肿瘤生长抑制(TGI)计算如下:

[0716] $\text{TGI} \% = \{1 - (\text{MTV处理的}/\text{MTV对照})\} * 100$

[0717] 其中MTV=平均肿瘤体积

[0718] 在最终测量当天,使用($\log(\text{相对肿瘤体积}) = \log(\text{最终体积}/\text{开始体积})$)的单尾t检验来评估统计显著性,与媒介物对照进行比较。

[0719] 结果

[0720] 单独用DS-8201或AZD5305或者用DS-8201与AZD5305组合治疗的肿瘤体积在图17中示出。数据表示治疗组的肿瘤体积随时间的变化。图17中的虚线表示给药周期的结束。有关完整剂量和时间表信息,参考上表4。显示的值是均值±SEM;对于媒介物治疗的小鼠,最初n=10,对于所有其他治疗组,n=8。

[0721] 在NCI-N87异种移植物中,单独使用DS-8201或AZD5305或者使用DS-8201与AZD5305组合治疗后的TGI响应(第41天,TGI%)如表5所示:

[0722] 表5

| 治疗组 | 第 41 天的 TGI% | p 值与媒介物 | 显著性 |
|-----------------------------------|--------------|----------|------|
| DS-8201 3 mg/kg | 62% | 0.00071 | *** |
| DS-8201 1 mg/kg | 25% | 0.025 | †ns |
| AZD5305 1 mg/kg | 40% | < 0.0001 | †ns |
| DS-8201 1 mg/kg + AZD5305 1 mg/kg | 55% | < 0.0001 | ** |
| DS-8201 3 mg/kg + AZD5305 1 mg/kg | 90% | < 0.0001 | **** |

[0724] †不显著

[0725] 在治疗后第41天,用3mg/kg DS-8201的单一疗法显示62%的TGI值。在1mg/kg时,DS-8201在治疗后第41天显示25%的TGI值。在治疗后第41天,AZD5305单一疗法达到了40%的TGI。在治疗后第41天,AZD5305与1mg/kg的DS-8201组合治疗导致55%的TGI。使用更高剂量(3mg/kg)的DS-8201与AZD5305的组合治疗在治疗后第41天实现了90%的显著TGI,并且显示出比任一单一疗法更好的响应。

[0726] 治疗组总体上耐受性良好(由于体重减轻>15%,从研究中取出两只离群动物)并且所有治疗组的平均体重在研究过程中保持稳定。

[0727] 实例6:

[0728] 在体外在HER2高、HER2低、和HER2突变表达细胞系中,抗体-药物缀合物DS-8201(德卢替康-曲妥珠单抗(Enhertu[®]))与PARP1选择性抑制剂AZD5305(5-[4-[(7-乙基-6-氧代-5H-1,5-萘啶-3-基)甲基]哌嗪-1-基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺)的组合给药。

[0729] 方法:

[0730] 运行高通量组合筛选,其中将四种具有不同HER2表达的肺癌细胞系(表6)和HER2突变癌细胞系(表7)用DS-8201和AZD5305的组合进行筛选。

[0731] 表6

| | 通过流式细胞术测定的每个细胞的 HER2 受体数 | IHC Dako H2L H-评分 | 癌症类型 | |
|--------|--------------------------|-------------------|------|----------|
| [0732] | HCC1171 | 146050 ± 654 | 200 | NSCLC 腺癌 |
| | NCIH1573 | 51090 ± 165 | 100 | NSCLC 腺癌 |
| | NCIH2170 | 2472499 ± 21851 | 300 | 鳞状非小细胞肺癌 |
| | Calu6 | 12935 ± 200 | 0 | NSCLC 腺癌 |

[0733] 表7

| | 通过流式细胞术测定的每个细胞的 HER2 受体数 | HER2 突变 | 癌症类型 | |
|--------|--------------------------|------------|---------|-----|
| [0734] | 5637 | 27497 ± 14 | p.S310F | 泌尿道 |

[0735] 屏幕上的读数是7天CellTiter-Glo细胞活力测定,以6x6剂量响应矩阵进行(对于每种组合,DS-8201和AZD5305各自以半对数连续稀释)。AZD5305的最大浓度是3.33 μ M或10 μ M并且DS-8201的最大浓度是100 μ g/ml。基于 Δ Emax和Loewe协同评分的组合来评估组合活性。

[0736] 结果:

[0737] HER2+、HER2低、HER2低/无效NSCLC细胞系(HCC1171、NCIH1573、NCIH2170、Calu6)的结果在图18A、18B和18C以及表8中示出,并且HER2突变细胞系(5637)的结果在图19A、19B和19C以及表9中示出。

[0738] 图18A和19A示出了测量的细胞活力信号的矩阵。X轴代表药物A(DS-8201),并且Y轴代表药物B(AZD5305)。方框中的值代表在第7天用药物A+B处理的细胞与用DMSO对照处理的细胞的比率。将所有值归一化为第0天的细胞活力值。0和100之间的值代表%生长抑制,并且高于100的值代表细胞死亡。

[0739] 图18B和19B示出了Loewe超额矩阵。方框中的值代表由Loewe加性模型计算的超额值。

[0740] 图18C和19C示出了HSA超额矩阵。方框中的值代表由HSA(最高单一药剂)模型计算的超额值。

[0741] 表8和9示出了HSA协同评分和Loewe加性评分:

[0742] 表8

| | 细胞系 (NSCLC) | HCC1171 | NCIH1573 | NCIH2170 | Calu6 |
|--------|----------------|---------|----------|----------|-------|
| [0743] | HSA 协同评分 | 6.2 | 6.14 | 33.99 | 10.55 |
| | Loewe 协同评分 | 6.2 | 5.4 | 33.99 | 10.55 |

[0744] 表9

| | 细胞系 (泌尿道) | 5637 |
|--------|--------------|------|
| [0745] | HSA 协同评分 | 11.2 |
| | Loewe 协同评分 | 11.2 |

[0746] 从图18A、18B和18C以及表8可以看出, AZD5305与DS-8201协同作用, 并且也在Emax (0.125 μ M AZD5305和100 μ g/ml DS-8201) 下在HER2+细胞系NCIH2170中、在Emax (0.125 μ M AZD5305和100 μ g/ml DS-8201) 下在HER2低细胞系HCC1171中、和在Emax (1.25 μ M AZD5305和100 μ g/ml DS-8201) 下在HER2低/无效细胞系Calu6中增加了细胞死亡。即使在单一药剂活性不存在或低的情况下, 也观察到组合活性。虽然在细胞系NCIH1573中观察到协同, 但没有细胞死亡。

[0747] 从图19A、19B和19C以及表9可以看出, AZD5305与DS-8201协同作用, 并且也在Emax (1.25 μ M AZD5305和100 μ g/ml DS-8201) 下在HER2突变细胞系5637中增加了细胞死亡。即使在AZD5305作为单一药剂没有活性的情况下, 也观察到组合活性。

[0748] 前述书面说明书被认为是足以使得本领域的技术人员能够实践这些实施例。前述描述和实例详述了某些实施例并且描述了诸位发明人所期望的最佳方式。然而, 将会了解的是无论前述内容可以如何详述出现在本文中, 能以许多方式实践这些实施例并且权利要求书包括其任何等效物。

[0749] 序列表的自由文本

[0750] SEQ ID NO:1-抗HER2抗体的重链的氨基酸序列

[0751] SEQ ID NO:2-抗HER2抗体的轻链的氨基酸序列

[0752] SEQ ID NO:3-重链CDRH1的氨基酸序列 [=SEQ ID NO:1的氨基酸残基26至33]

[0753] SEQ ID NO:4-重链CDRH2的氨基酸序列 [=SEQ ID NO:1的氨基酸残基51至58]

[0754] SEQ ID NO:5-重链CDRH3的氨基酸序列 [=SEQ ID NO:1的氨基酸残基97至109]

[0755] SEQ ID NO:6-轻链CDRL1的氨基酸序列 [=SEQ ID NO:2的氨基酸残基27至32]

[0756] SEQ ID NO:7-包含轻链CDRL2(SAS)的氨基酸序列的氨基酸序列 [=SEQ ID NO:2的氨基酸残基50至56]

[0757] SEQ ID NO:8-轻链CDRL3的氨基酸序列 [=SEQ ID NO:2的氨基酸残基89至97]

[0758] SEQ ID NO:9-重链可变区的氨基酸序列 [=SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至120]

[0759] SEQ ID NO:10-轻链可变区的氨基酸序列 [=SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至107]

[0760] SEQ ID NO:11-重链的氨基酸序列[=SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至449]。

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 165 | | 170 | | 175 | | | | | | | | | | |
| Leu | Gln | Ser | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro |
| | 180 | | 185 | | 190 | | | | | | | | | | |
| Ser | Ser | Ser | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys |
| | 195 | | 200 | | 205 | | | | | | | | | | |
| Pro | Ser | Asn | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp |
| | 210 | | 215 | | 220 | | | | | | | | | | |
| Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Gly | Gly |
| 225 | | | 230 | | 235 | | 240 | | | | | | | | |
| Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile |
| | 245 | | 250 | | 255 | | | | | | | | | | |
| Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu |
| | 260 | | 265 | | 270 | | | | | | | | | | |
| Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His |
| | 275 | | 280 | | 285 | | | | | | | | | | |
| Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg |
| | 290 | | 295 | | 300 | | | | | | | | | | |
| Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys |
| 305 | | | 310 | | 315 | | 320 | | | | | | | | |
| Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu |
| | 325 | | 330 | | 335 | | | | | | | | | | |
| Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr |
| | 340 | | 345 | | 350 | | | | | | | | | | |
| Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Glu | Glu | Met | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu |
| | 355 | | 360 | | 365 | | | | | | | | | | |
| Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp |
| | 370 | | 375 | | 380 | | | | | | | | | | |
| Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val |
| 385 | | | 390 | | 395 | | 400 | | | | | | | | |
| Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | Asp |
| | 405 | | 410 | | 415 | | | | | | | | | | |
| Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His |
| | 420 | | 425 | | 430 | | | | | | | | | | |
| Glu | Ala | Leu | His | Asn | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Pro |
| | 435 | | 440 | | 445 | | | | | | | | | | |
| Gly | Lys | | | | | | | | | | | | | | |
| | 450 | | | | | | | | | | | | | | |
| <210> | 2 | | | | | | | | | | | | | | |
| <211> | 214 | | | | | | | | | | | | | | |

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人源化抗HER2抗体的轻链
 <400> 2
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 3
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人源化抗HER2抗体的重链的CDRH1

<400> 3
 Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr
 1 5
 <210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人源化抗HER2抗体的重链的CDRH2
 <400> 4
 Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr
 1 5
 <210> 5
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人源化抗HER2抗体的重链的CDRH3
 <400> 5
 Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 6
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人源化抗HER2抗体的轻链的CDRL1
 <400> 6
 Gln Asp Val Asn Thr Ala
 1 5
 <210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 包含人源化抗HER2抗体的轻链的CDRL2的序列
 <400> 7
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人源化抗HER2抗体的轻链的CDRL3
 <400> 8
 Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
 1 5
 <210> 9
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人源化抗HER2抗体的重链的可变区
 <400> 9
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 10
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人源化抗HER2抗体的轻链的可变区
 <400> 10

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly

SEQ ID NO: 1 - 抗HER2抗体的重链的氨基酸序列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR
QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSK
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图1

SEQ ID NO: 2 - 抗HER2抗体的轻链的氨基酸序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQ
KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTIS
SLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图2

SEQ ID NO: 3 - 重链CDRH1的氨基酸序列

GFNIKDTY

图3

SEQ ID NO: 4 - 重链CDRH2的氨基酸序列
IYPTNGYT

图4

SEQ ID NO: 5 - 重链CDRH3的氨基酸序列
SRWGGDGFYAMDY

图5

SEQ ID NO: 6 - 轻链CDRL1的氨基酸序列
QDVNTA

图6

SEQ ID NO: 7 - 包含轻链CDRL2 (SAS) 的氨基酸序列的氨基酸序列

SASFLYS

图7

SEQ ID NO: 8 - 轻链CDRL3的氨基酸序列
QQHYTTPPT

图8

SEQ ID NO: 9 - 重链可变区的氨基酸序列
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR
QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSK
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT
LVTVSS

图9

SEQ ID NO: 10 - 轻链可变区的氨基酸序列

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQ
KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTIS
SLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

图10

SEQ ID NO: 11 - 重链的氨基酸序列

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR
QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSK
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT
LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

图11

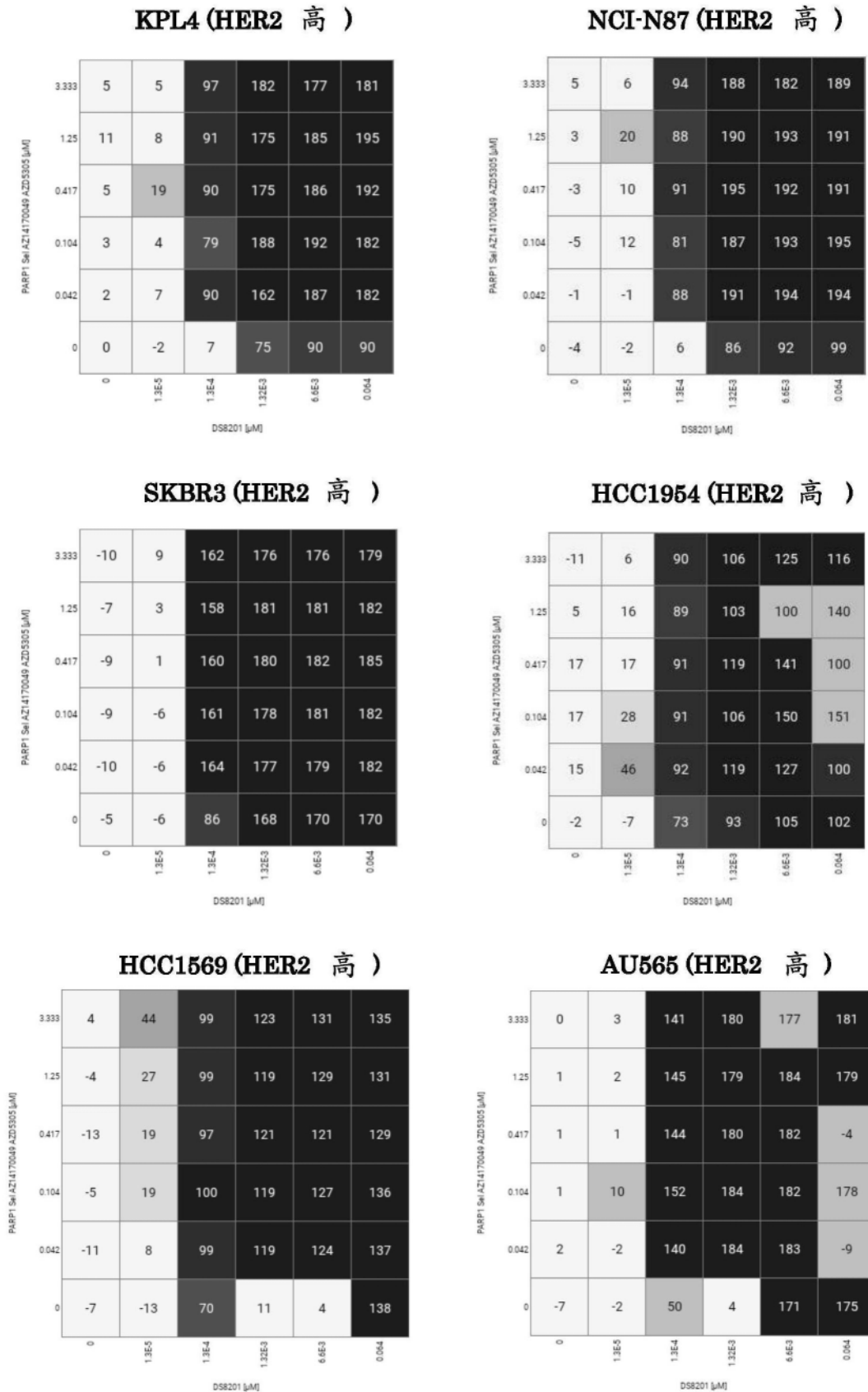


图12A

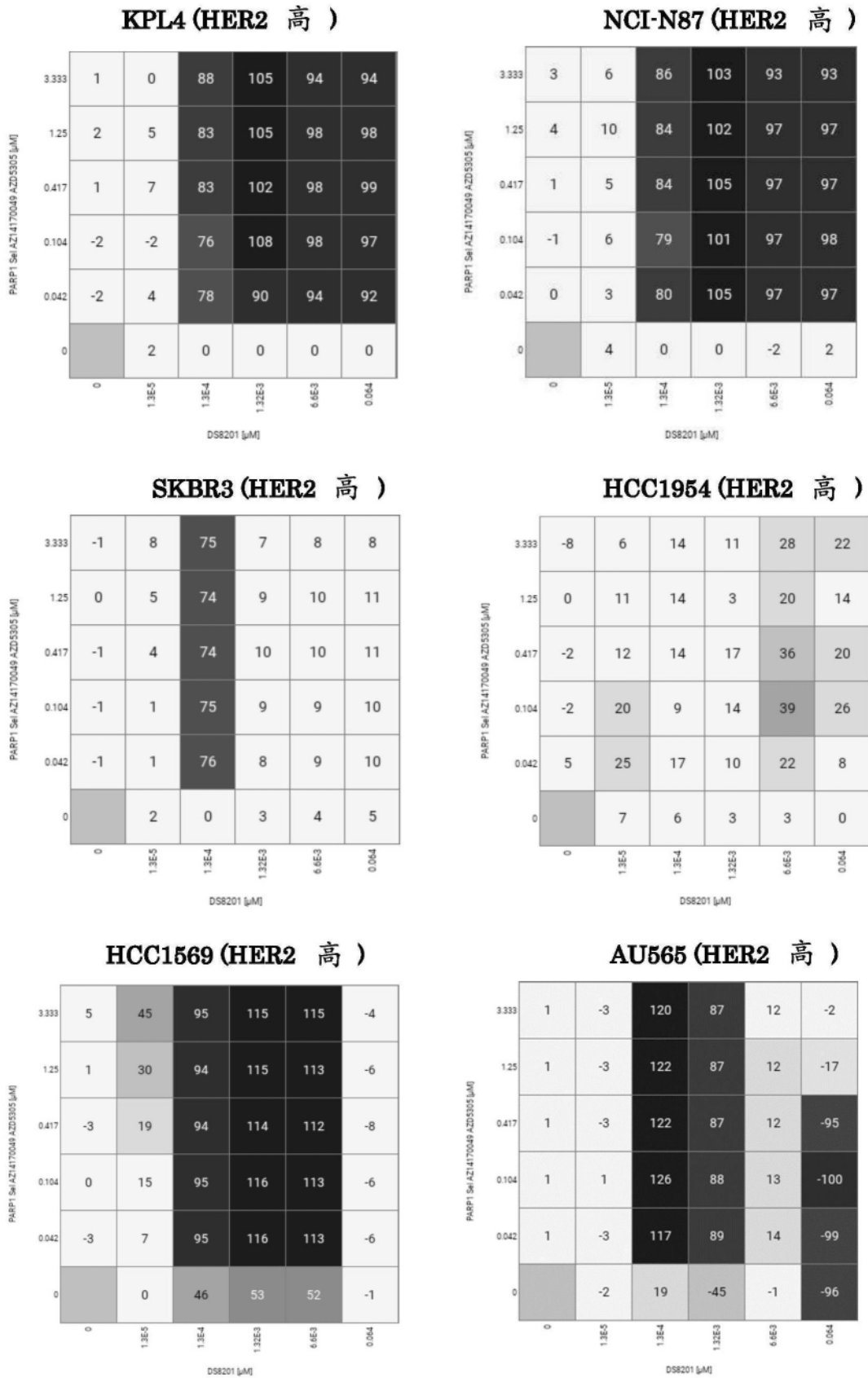


图12B

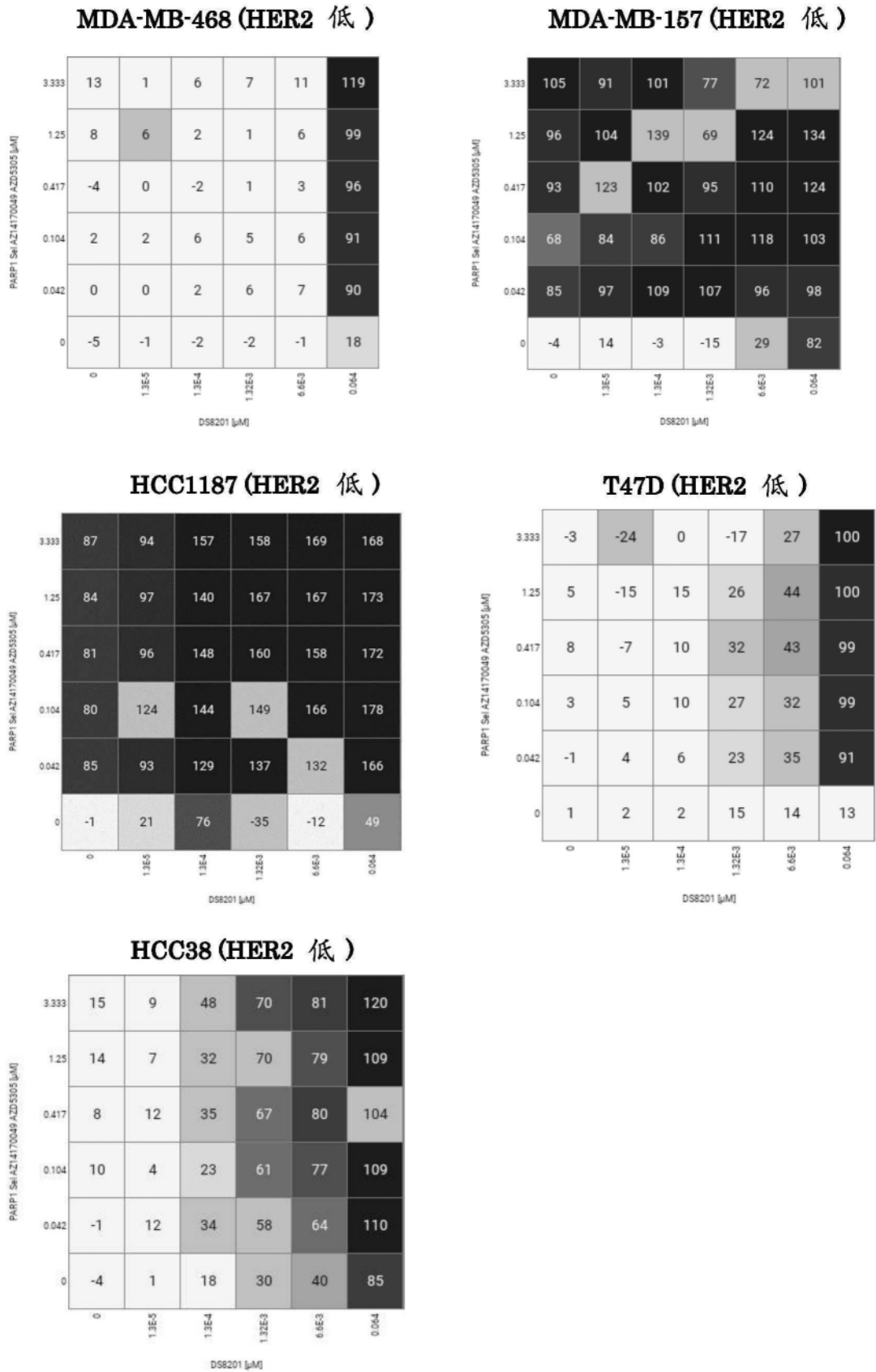


图13A

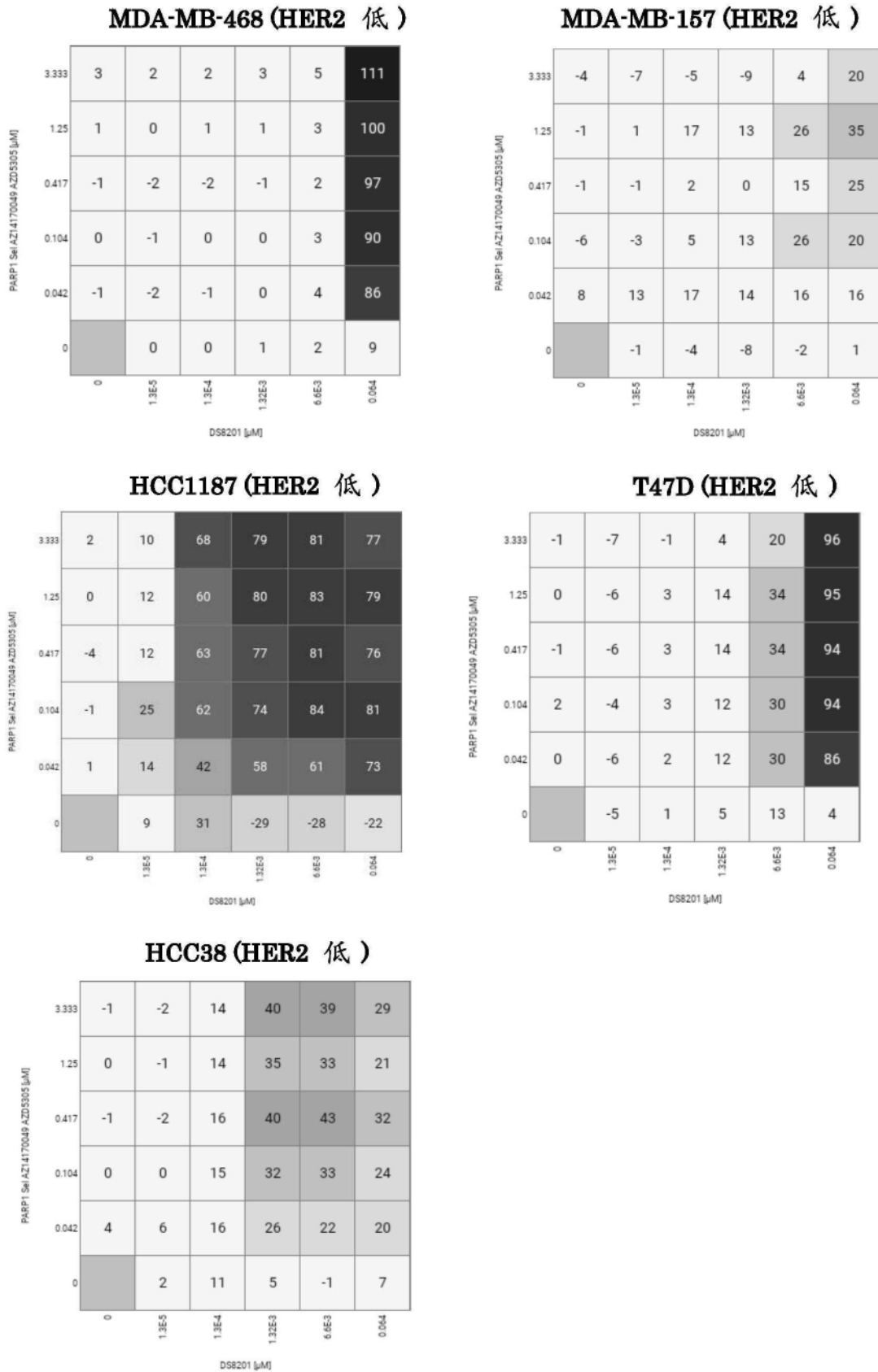


图13B

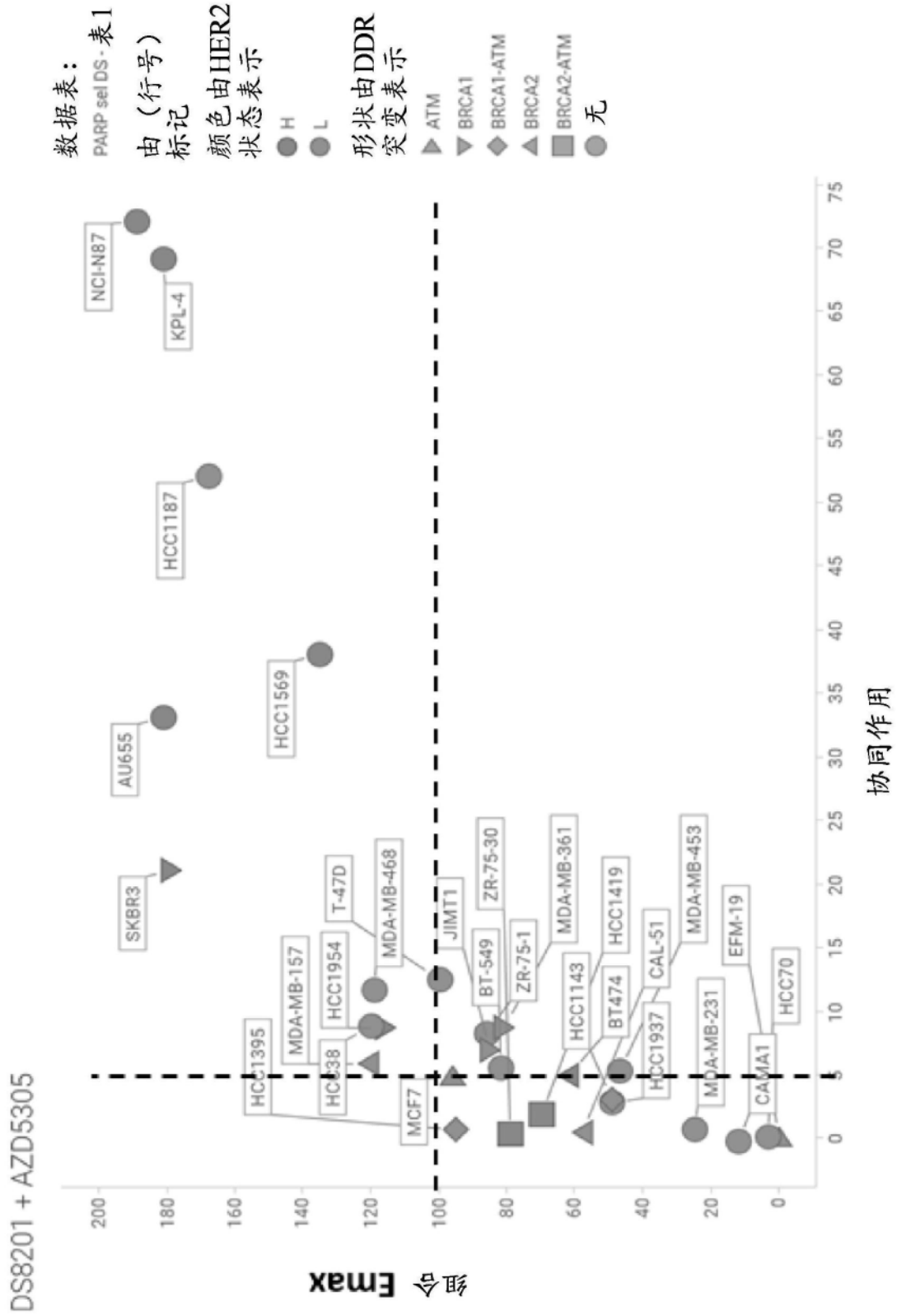
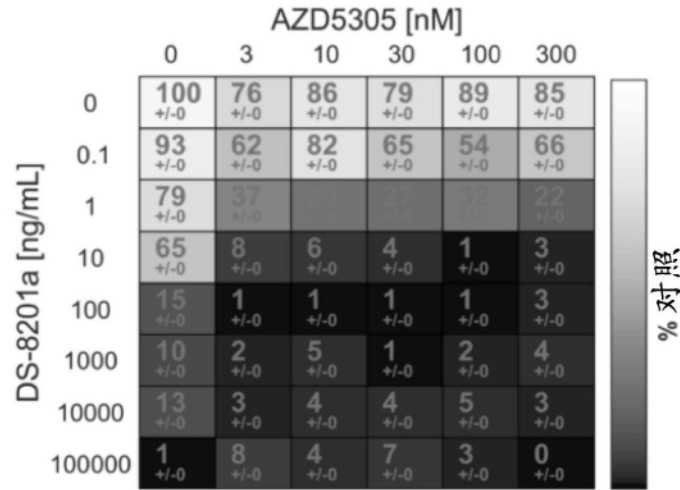
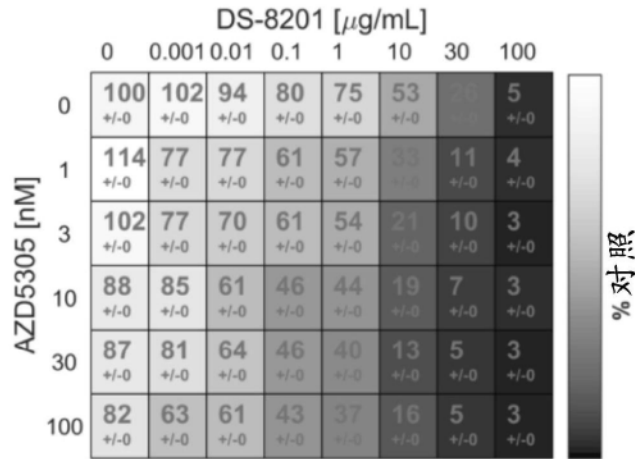


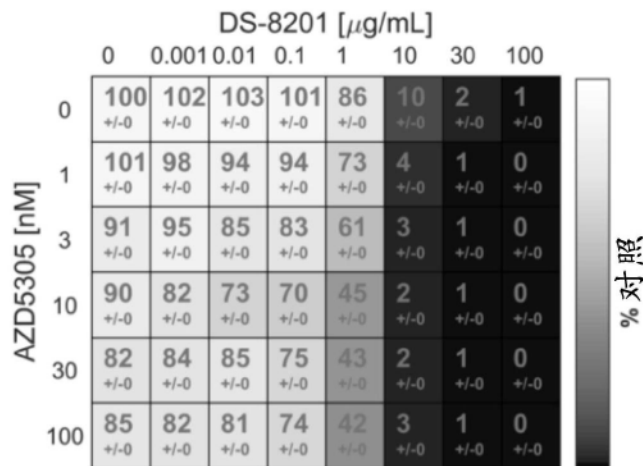
图14



在 KPL4 中 DS-8201a v AZD5305



在 JIMT1 细胞中 AZD5305 + DS-8201



在 MDA-MB-468 细胞中 AZD5305 + DS-8201

图15A

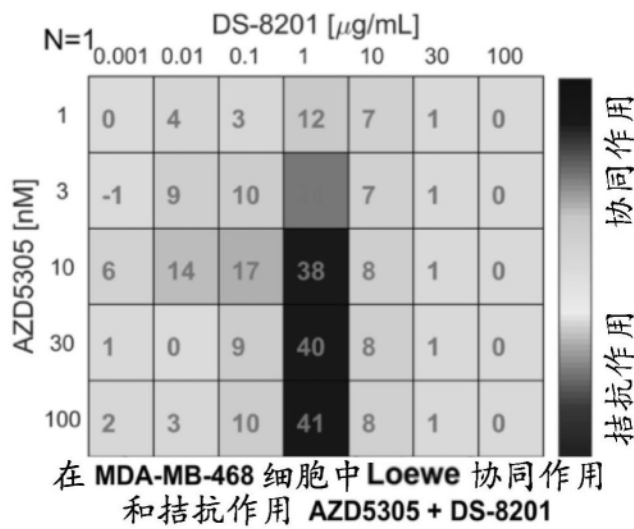
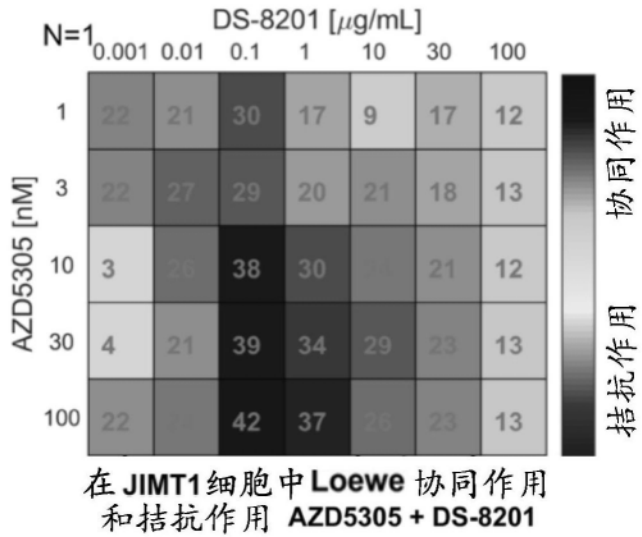
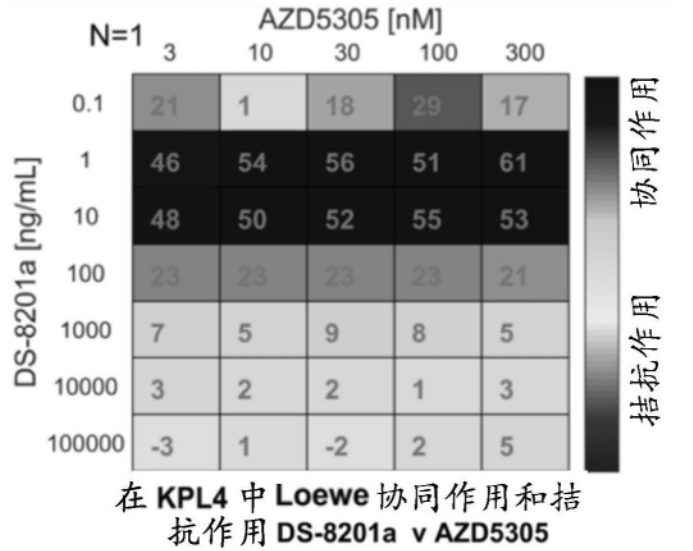


图15B

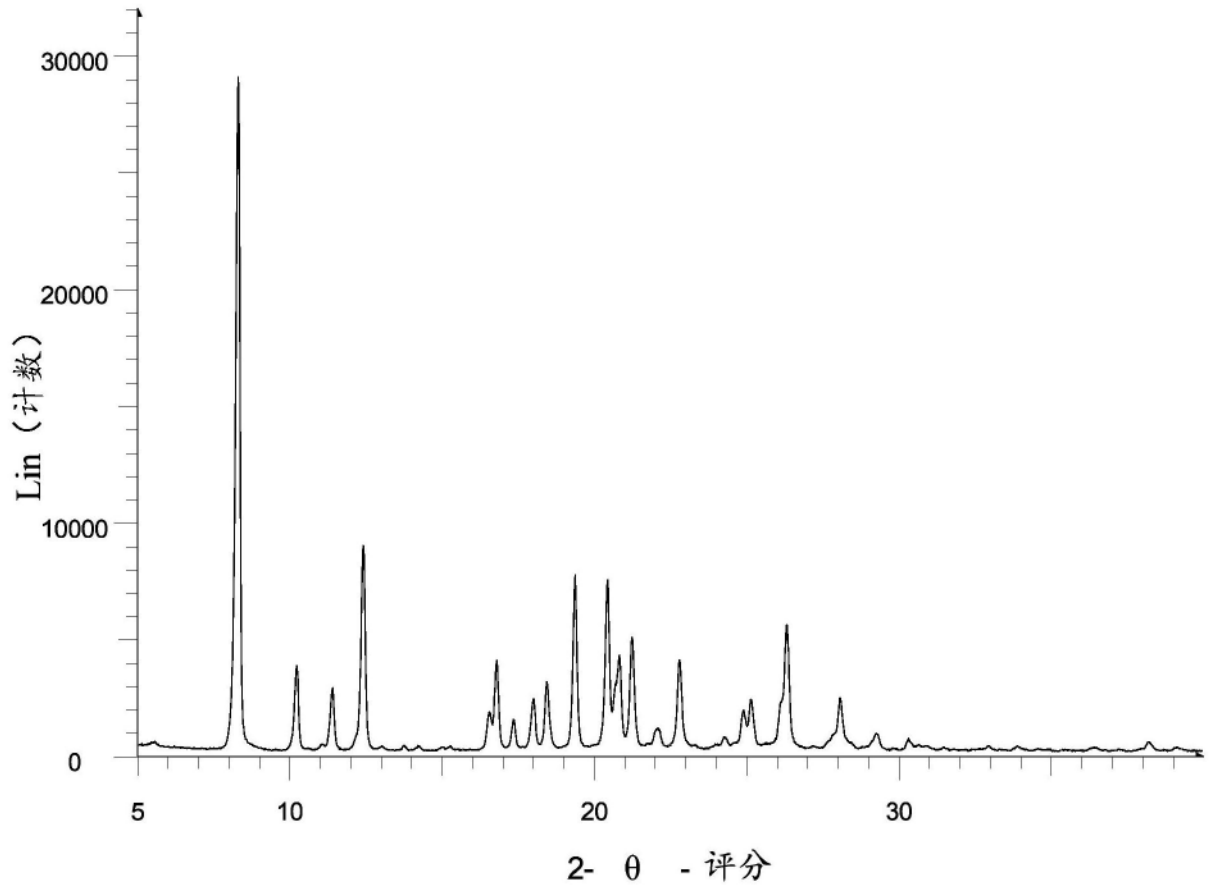


图16A

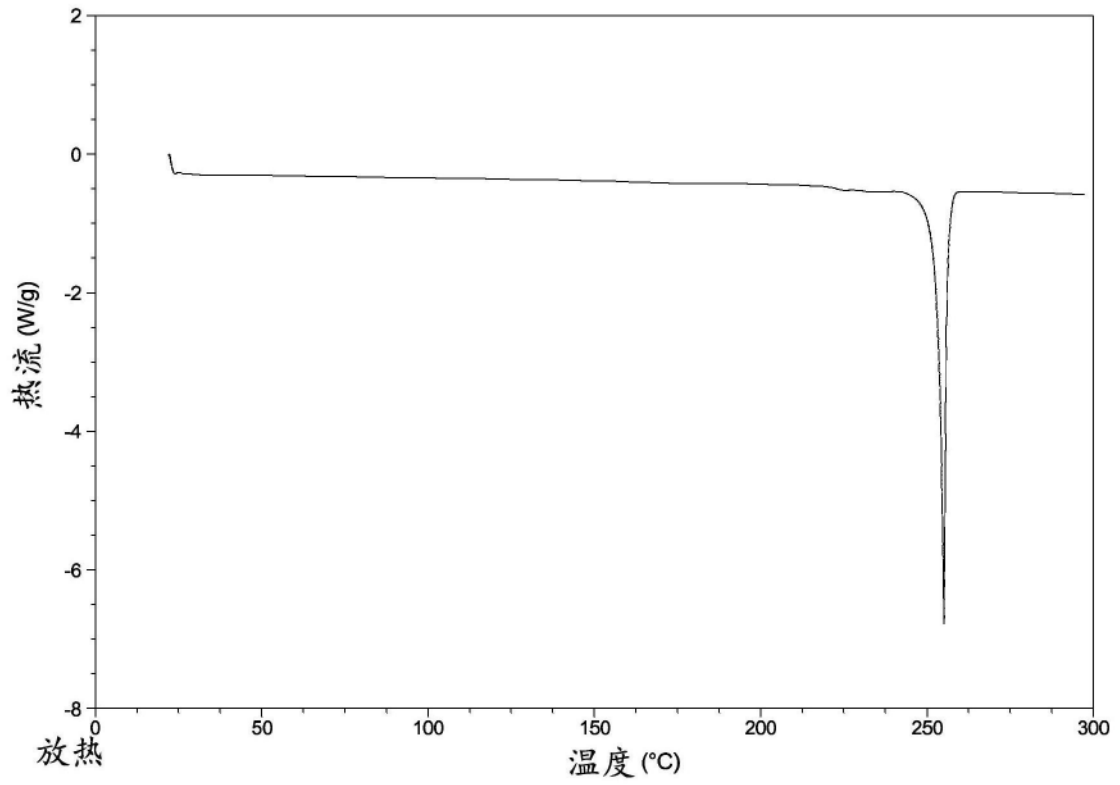


图16B

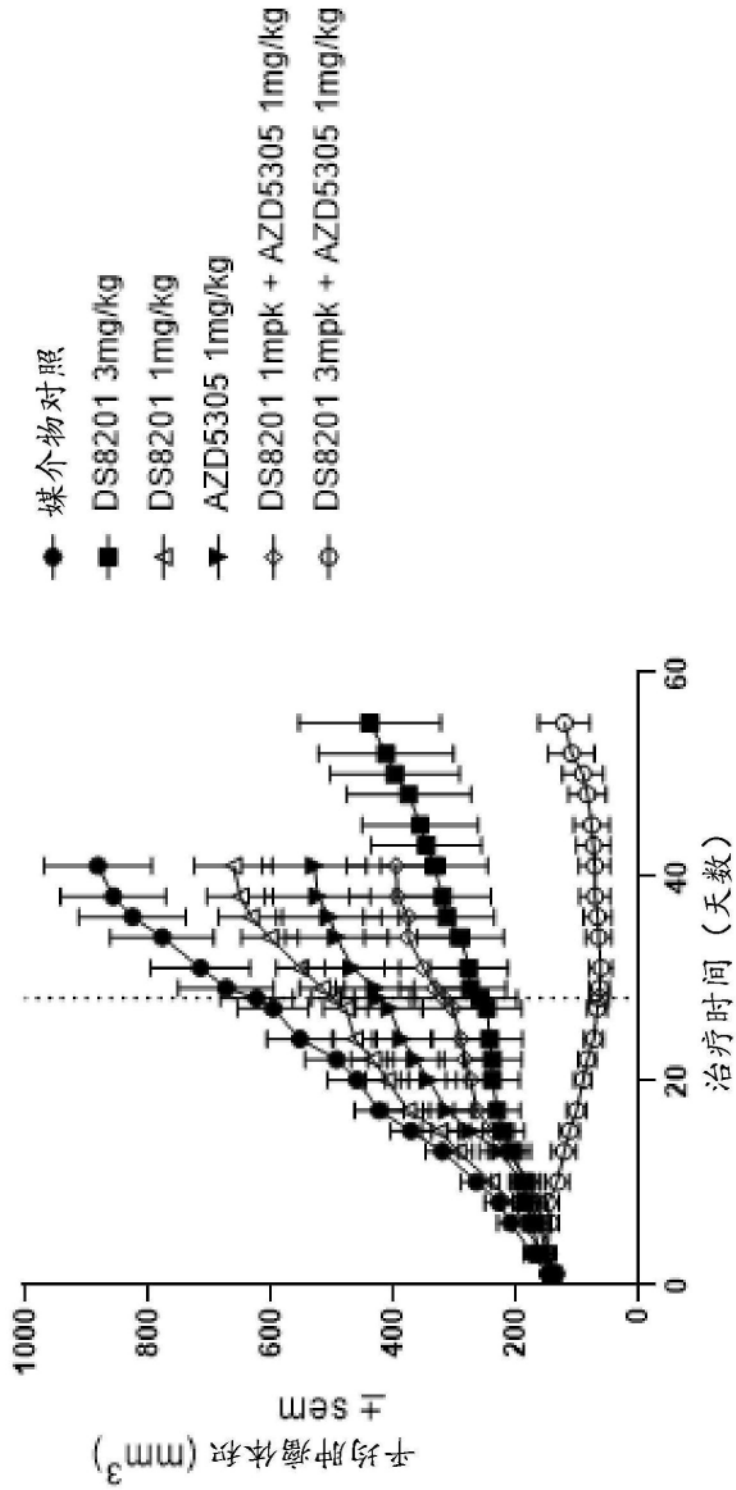


图17

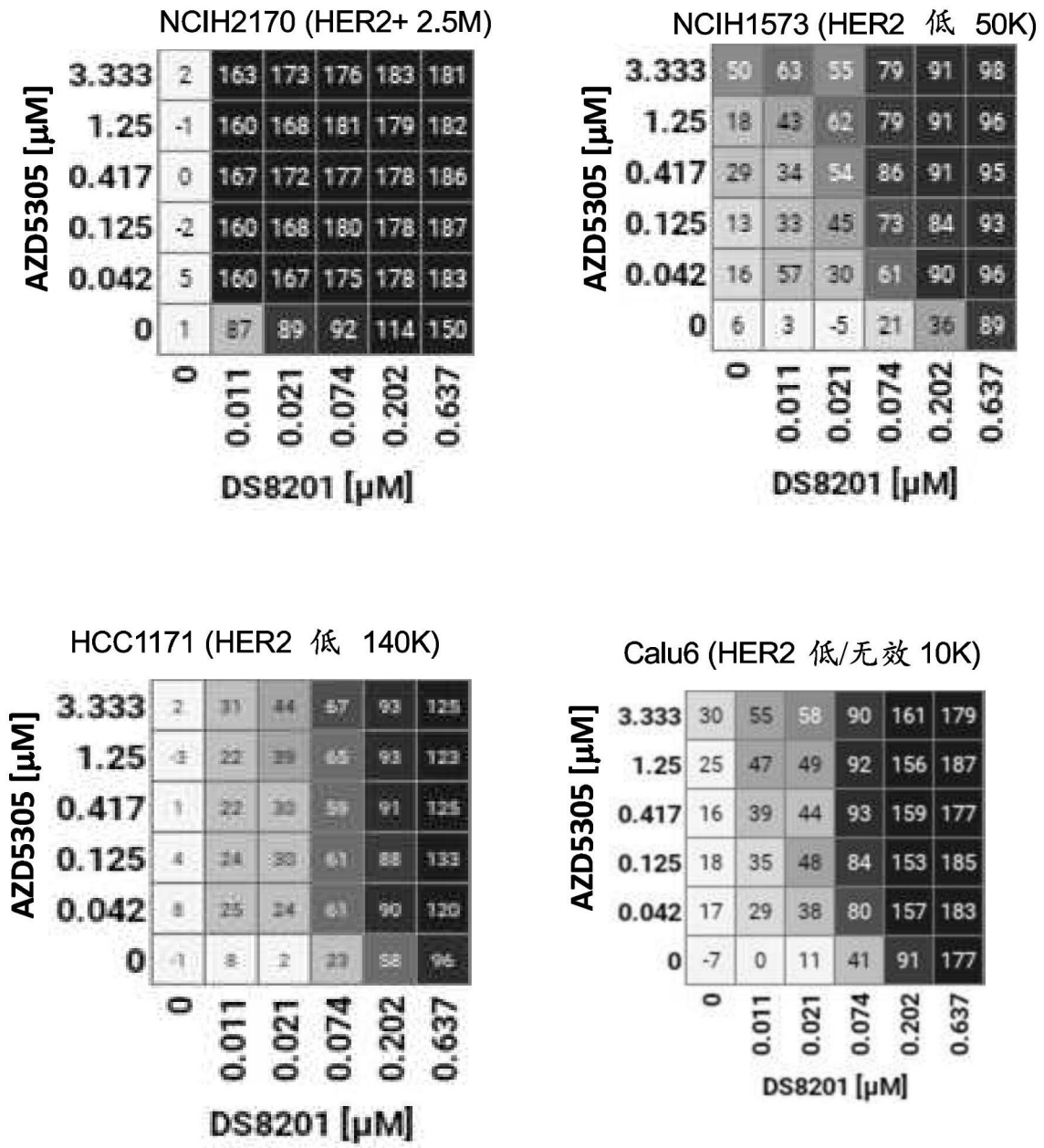


图18A

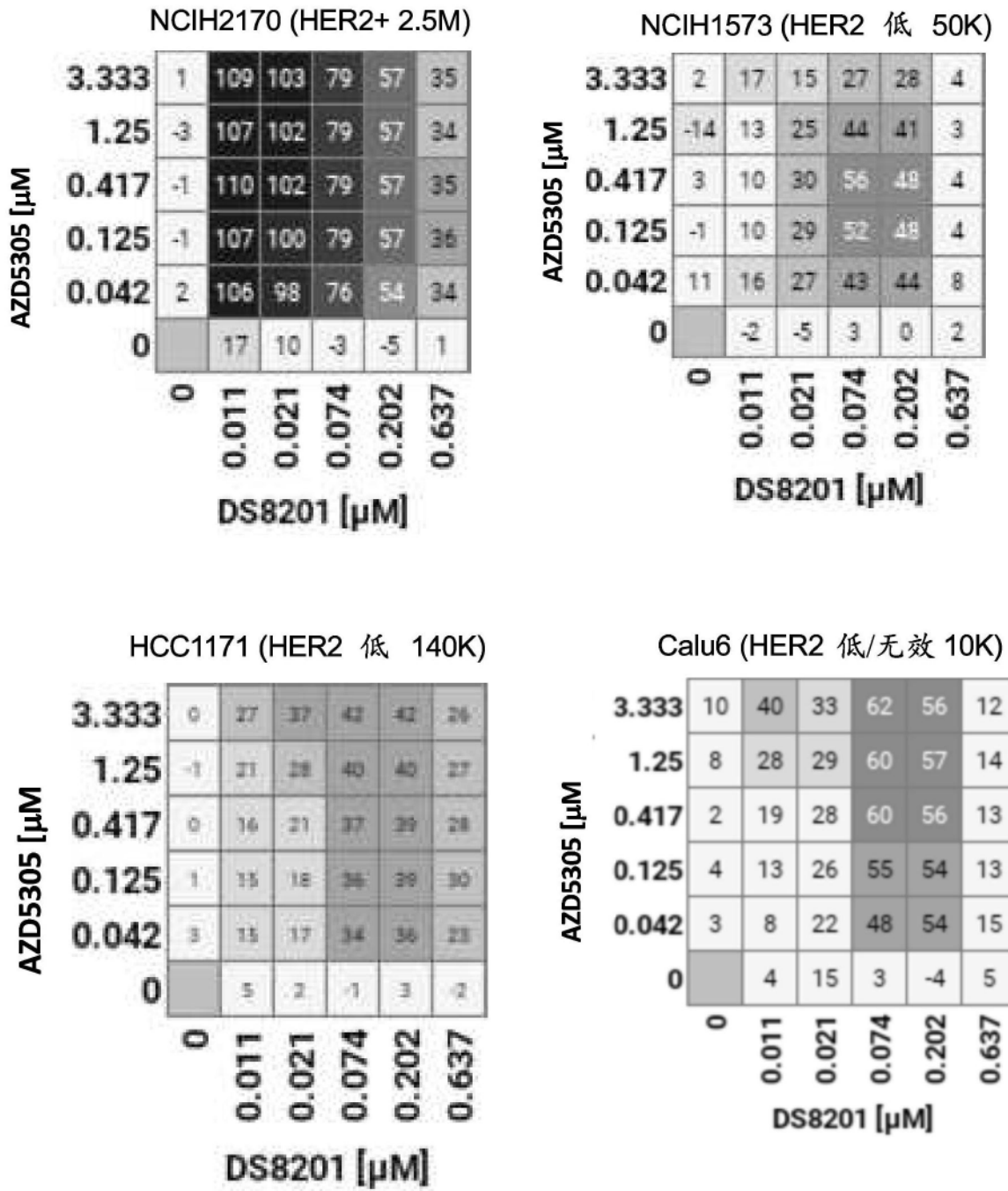


图18B

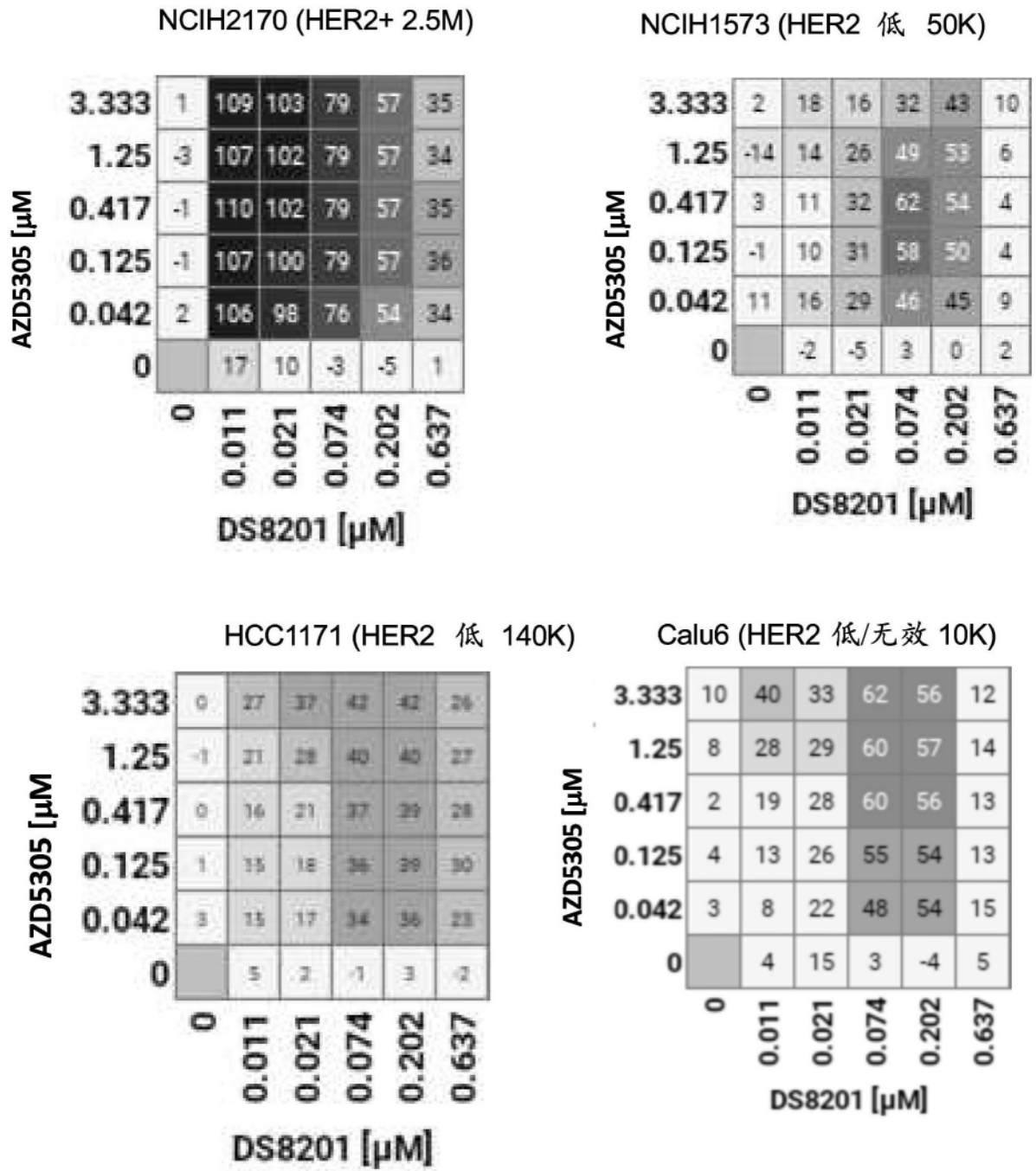


图18C

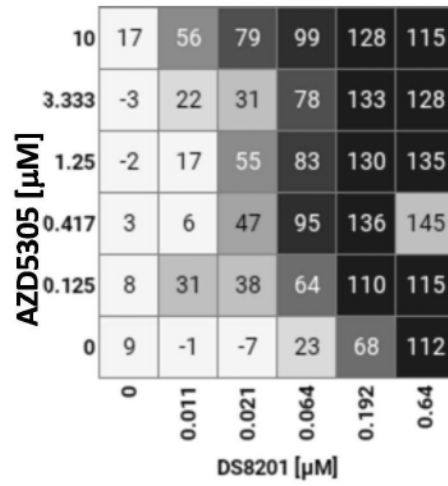


图19A

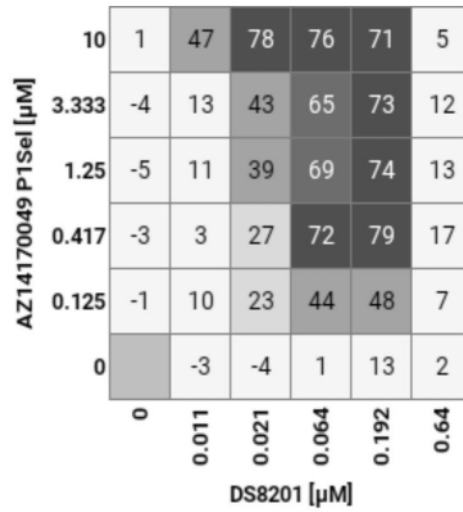


图19B

| | | | | | | |
|-------|-------------------|-------|-------|-------|-------|------|
| 10 | 1 | 47 | 78 | 76 | 71 | 5 |
| 3.333 | -4 | 13 | 43 | 65 | 73 | 12 |
| 1.25 | -5 | 11 | 39 | 69 | 74 | 13 |
| 0.417 | -3 | 3 | 27 | 72 | 79 | 17 |
| 0.125 | -1 | 10 | 23 | 44 | 48 | 7 |
| 0 | -3 | -4 | 1 | 13 | 2 | |
| | 0 | 0.011 | 0.021 | 0.064 | 0.192 | 0.64 |
| | DS8201 [μ M] | | | | | |

图19C