



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104418867 B

(45)授权公告日 2016.12.28

(21)申请号 201310376114.1

(22)申请日 2013.08.26

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104418867 A

(43)申请公布日 2015.03.18

(73)专利权人 上海汇伦生命科技有限公司
地址 201203 上海市浦东新区张江高科技
园区郭守敬路351号2号楼650-10室

(72)发明人 程建军 秦继红

(51)Int.Cl.

C07D 498/04(2006.01)

A61K 31/4745(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 35/04(2006.01)

A61P 35/02(2006.01)

(56)对比文件

WO 2006/097261 A1,2006.09.21,

CN 101607886 A,2009.12.23,

CN 101906076 A,2010.12.08,

CN 102443009 A,2012.05.09,

审查员 张英姝

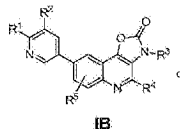
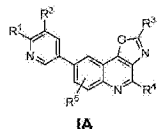
权利要求书4页 说明书35页

(54)发明名称

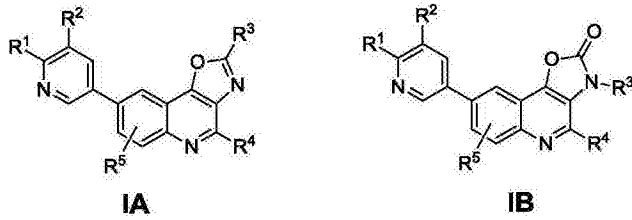
作为PI3K/mTOR抑制剂的化合物,其制备方法和用途

(57)摘要

本发明公开的一种作为PI3K/mTOR抑制剂的化合物,为具有以下通式(IA)或(IB)的化合物,其中,R¹选自氢、卤素、烷基、烷氧基、胺基,或与R²形成并环;R²选自氢、胺基、磺酰胺基、磺酰脲基、烷基、烷氧基,或与R¹形成并环;R³选自氢、C₁-C₆烷基;R⁴选自氢、胺基、酰胺基或磺酰胺基;R⁵选自氢、卤素、烷基或烷氧基。本发明还公开了该作为PI3K/mTOR抑制剂的化合物的制备方法和作为药物用以治疗与PI3K/mTOR相关的疾病,特别是PI3K/mTOR相关的癌症的用途;



1. 一种作为PI3K/mTOR抑制剂的化合物,为具有以下通式(IA)或(IB)的化合物:



其中,

R¹选自氯、甲氧基,或与R²形成苯环;

R²选自 $\begin{matrix} R' & O \\ | & || \\ -N & -S-Ra \\ || & \\ O & \end{matrix}$ 、 $\begin{matrix} R' & O \\ | & || \\ -N & -S-Rb \\ || & \\ O & \end{matrix}$ 其中Ra为甲基、环丙基、任选有一个或多个氟取代苯基,Rb为

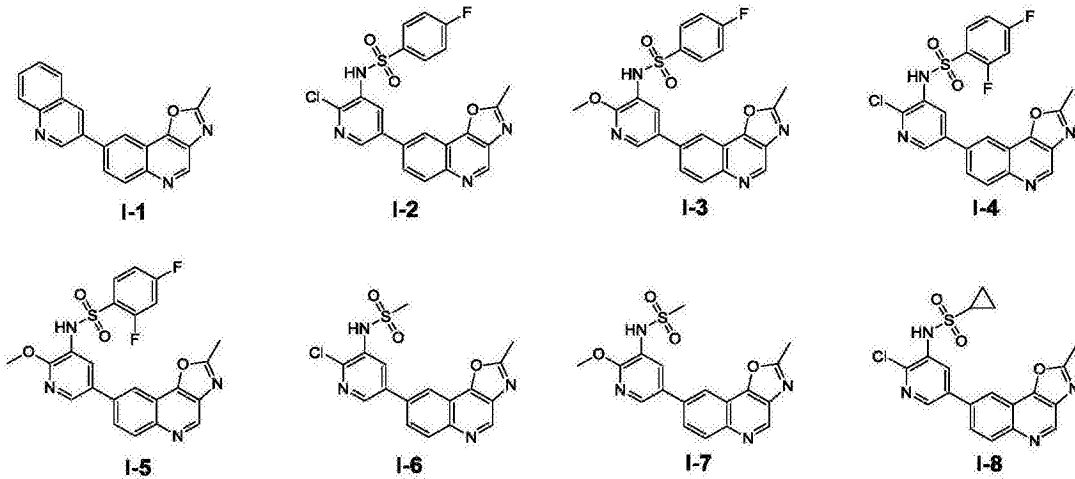
二甲氨基,R'为氢;或与R¹形成苯环;

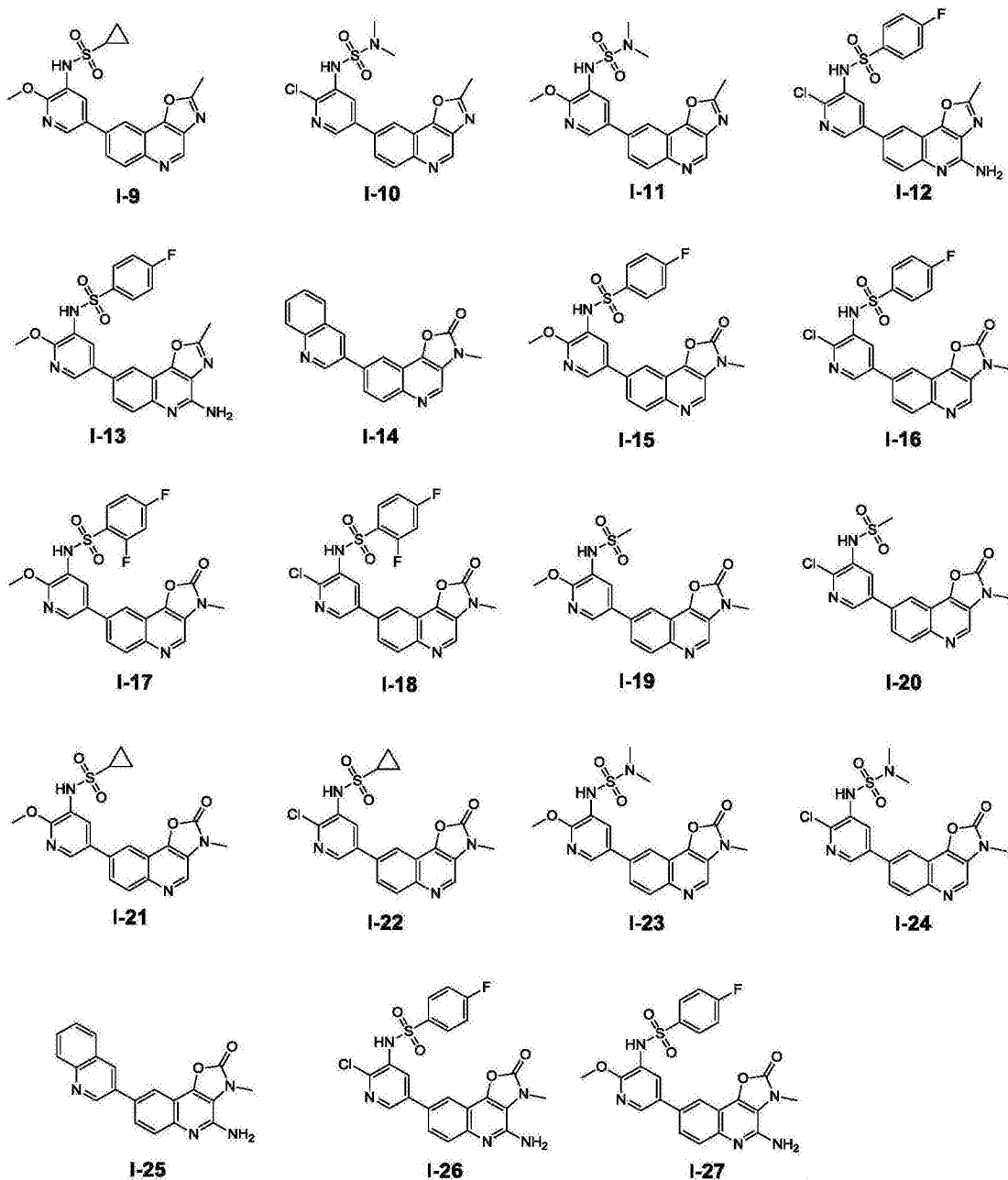
R³选自氢、甲基;

R⁴选自氢;

R⁵选自氢。

2. 一种作为PI3K/mTOR抑制剂的化合物,其特征在于,所述化合物为如下结构(I-1)至(I-27)中的任意一种:



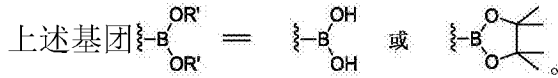
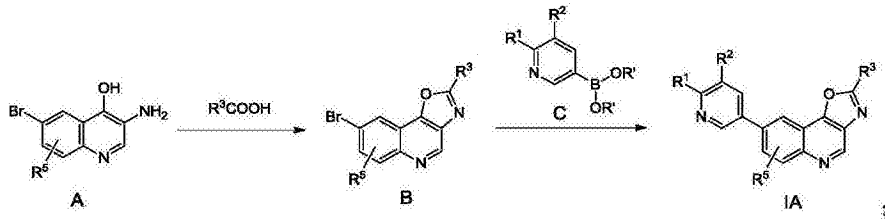


3. 如权利要求1或2任一项权利要求所述的一种作为PI3K/mTOR抑制剂的化合物,其特征在于,所述化合物以药学上可接受的盐的形式存在。

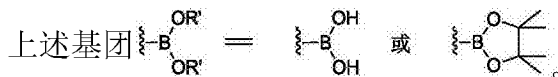
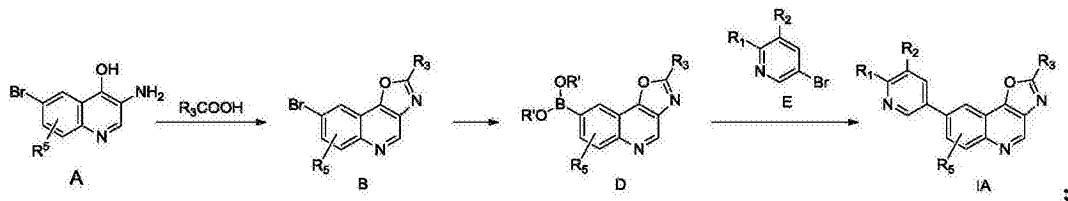
4. 如权利要求3所述的一种作为PI3K/mTOR抑制剂的化合物,其特征在于,所述药学上可接受的盐的形式为与酸所成的盐。

5. 如权利要求4所述的一种作为PI3K/mTOR抑制剂的化合物,其特征在于,所述与酸所成的盐为盐酸盐、氢溴酸盐、甲磺酸盐、硫酸盐、磷酸盐、乙酸盐、三氟乙酸盐、三氟甲磺酸盐、对甲苯磺酸盐、酒石酸盐、马来酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐或苹果酸盐。

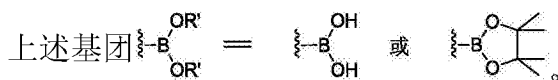
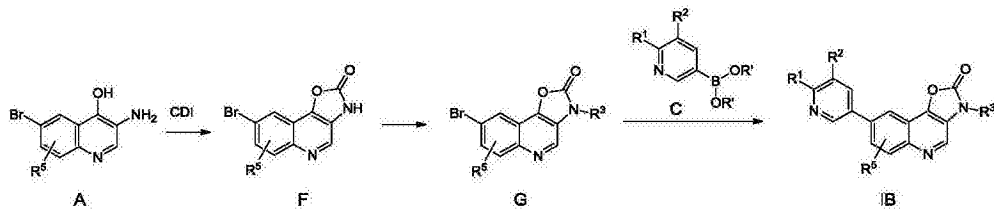
6. 一种制备权利要求1所述的通式(IA)所示的化合物的方法,其特征在于,通式(IA)所示的化合物的制备步骤是:将3-氨基-4-羟基-6-溴喹啉类化合物(A)与羧酸 R^3COOH 进行环合,制备喹啉并咪唑类化合物(B),进一步将利用溴原子与硼酸酯(C)进行Suzuki偶联反应,制备通式(IA)所示的化合物,具体反应式如下:



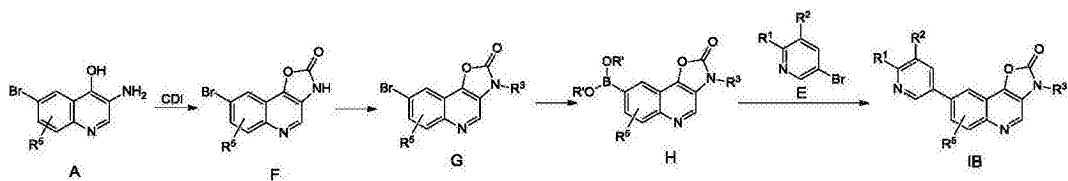
7. 一种制备权利要求1所述的通式(IA)所示的化合物的方法,其特征在于,通式(IA)所示的化合物的制备步骤是:将3-氨基-4-羟基-6-溴喹啉类化合物(A)与羧酸 $R^3\text{COOH}$ 进行环合,制备喹啉并噁唑类化合物(B),然后将噁唑并喹啉类化合物(B)分子中的溴转化为硼酸酯(D),进一步与溴化物(E)进行Suzuki偶联,制备通式(IA)所示的化合物,具体反应式如下:

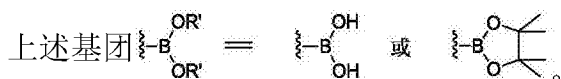


8. 一种制备权利要求1所述的通式(IB)所示的化合物的方法,其特征在于,将3-氨基-4-羟基-6-溴喹啉类化合物(A)与羰基二咪唑(CDI)试剂进行环合,制备喹啉并噁唑-2-酮类化合物(F),进一步将酰胺氮原子烷基化得到溴代的喹啉并噁唑-2-酮类化合物(G),将溴代的喹啉并噁唑-2-酮类化合物(G)与硼酸酯(C)进行Suzuki偶联,制备通式(IB)所示的化合物,具体反应式如下:



9. 一种制备权利要求1所述的通式(IB)所示的化合物的方法,其特征在于,将3-氨基-4-羟基-6-溴喹啉类化合物(A)与羰基二咪唑(CDI)试剂进行环合,制备喹啉并噁唑-2-酮类化合物(F),进一步将酰胺氮原子烷基化得到溴代的喹啉并噁唑-2-酮类化合物(G),然后将溴代的喹啉并噁唑-2-酮类化合物(G)转化为相应的硼酸酯(H),继而与溴化物(E)进行Suzuki偶联,制备通式(IB)所示的化合物,具体反应式如下:





10. 药物组合物,其中所述药物组合物包含治疗有效量的权利要求1至2任一项权利要求所述化合物和药学可接受的赋形剂。

11. 如权利要求10所述的药物组合物,其中所述的药物组合物制成片剂、胶囊剂、水性混悬剂、油性混悬剂、可分散的粉剂、颗粒剂、锭剂、乳剂、糖浆剂、乳膏剂、软膏剂、栓剂或注射剂。

12. 药物组合物,其中所述药物组合物包含治疗有效量的权利要求3至5任一项权利要求所述化合物的药学上可接受的盐和药学可接受的赋形剂。

13. 如权利要求12所述的药物组合物,其中所述的药物组合物制成片剂、胶囊剂、水性混悬剂、油性混悬剂、可分散的粉剂、颗粒剂、锭剂、乳剂、糖浆剂、乳膏剂、软膏剂、栓剂或注射剂。

14. 权利要求1至5任一项权利要求所述化合物或其药学上可接受的盐在制备调节PI3K/mTOR信号通路催化活性制品中的应用。

15. 权利要求10至13任一项权利要求所述药物组合物在制备治疗与PI3K/mTOR信号通路有关的疾病的药物中的应用。

16. 权利要求15所述的应用,其中所述与PI3K/mTOR信号通路有关的疾病为癌症。

17. 权利要求16所述的应用,其中所述癌症为头颈部癌症、呼吸系统癌症、消化系统癌症、泌尿系统癌症、骨骼系统癌症、妇科癌症、血液系统癌症或其他类型癌症。

18. 权利要求17所述的应用,其中所述头颈部癌症为甲状腺癌、鼻咽癌、脑膜癌、听神经瘤、垂体瘤、口腔癌、颅咽管瘤、丘脑和脑干肿瘤、血管源性肿瘤或颅内转移瘤。

19. 权利要求17所述的应用,其中所述呼吸系统癌症为肺癌。

20. 权利要求17所述的应用,其中所述消化系统癌症为肝癌、胃癌、食管癌、大肠癌、直肠癌、结肠癌或胰腺癌。

21. 权利要求17所述的应用,其中所述泌尿系统癌症为肾癌、膀胱癌、前列腺癌或睾丸癌。

22. 权利要求17所述的应用,其中所述骨骼系统癌症为骨癌。

23. 权利要求17所述的应用,其中所述妇科癌症为乳腺癌、宫颈癌或卵巢癌。

24. 权利要求17所述的应用,其中所述血液系统癌症为白血病、恶性淋巴瘤或多发性骨髓瘤。

25. 权利要求17所述的应用,其中所述其他类型癌症为恶性黑色素瘤、神经胶质瘤或皮肤癌。

作为PI3K/mTOR抑制剂的化合物,其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种作为PI3K/mTOR抑制剂的化合物,其制备方法,含有它们作为活性成分的药物组合物,以及其作为药物用以治疗与PI3K/mTOR相关的疾病,特别是PI3K/mTOR相关的癌症的用途。

背景技术

[0002] 在肿瘤的发生发展过程中,“PI3K(phosphatidylinositol3-kinase)-Akt(PKB, protein kinase B)-mTOR(mammalian target of rapamycin)”信号通路控制着众多的细胞生物学过程,包括肿瘤细胞凋亡、转录、翻译、代谢、血管新生以及细胞周期的调控。该信号通路的过度活化会扰乱细胞的生长和存活,导致肿瘤细胞增殖加快、恶性转移以及产生常见的药物抗性。阻断“PI3K-Akt-mTOR”信号通路能抑制肿瘤细胞生长甚至促进肿瘤细胞凋亡。因此,这条通路是新型抗肿瘤药物研发的热门靶点。(Nature Reviews Drug Discovery 2009, 8, 627-644)。

[0003] PI3K是一种胞内磷酸酰肌醇激酶,可催化磷脂酰肌醇的3-羟基磷酸化而介导下游信号通路的活化。PI3K可分为I型、II型和III型。研究表明,I型PI3K在多种人类肿瘤中过表达、活化或突变,与癌症的发生、发展密切相关。I型PI3K主要包括PI3K α 、PI3K β 、PI3K δ 和PI3K γ 四种亚型,其中PI3K α 、PI3K β 、PI3K δ 属于IA型激酶,从受体酪氨酸激酶(RTK)、G-蛋白偶联受体等传递信号;PI3K γ 为IB型激酶,仅从G-蛋白偶联受体(GPCR)传递信号。(Nature Reviews Cancer 2008, 8, 665-669)

[0004] 在“PI3K-Akt-mTOR”信号通路中,mTOR作为PI3K的下游信号分子,是Akt的重要底物之一。mTOR是丝/苏氨酸激酶,抑制该信号分子已被证实可产生抑制肿瘤细胞增殖的作用。Sirolimus、Everolimus、Temsirrolimus等作用于mTOR的雷帕霉素类化合物已经作为药物上市,因此mTOR已被确认是治疗肿瘤的有效靶点。(Nature Reviews Cancer 2006, 6, 729-734)

[0005] 目前,PI3K抑制剂或PI3K/mTOR双重抑制剂已经被证实可以抑制肿瘤生长,多种PI3K抑制剂或PI3K/mTOR双重抑制剂已经进入临床研究。(Anticancer Research 2012, 32, 2463-2470)

[0006] 本发明将提供结构新颖、生物活性强的PI3K/mTOR抑制剂,对这类化合物的深入研究,有可能获得不同于现有临床研究化合物特点的新颖抗肿瘤药物。

发明内容

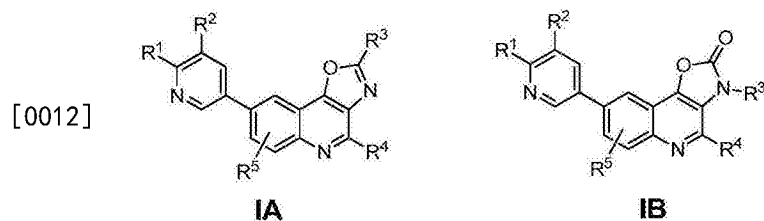
[0007] 本发明所要解决的技术问题之一是提供一种作为PI3K/mTOR抑制剂的化合物。

[0008] 本发明所要解决的技术问题之二是提供一种制备作为PI3K/mTOR抑制剂的化合物的方法。

[0009] 本发明所要解决的技术问题之三是提供含有作为PI3K/mTOR抑制剂的化合物的药物组合物。

[0010] 本发明所要解决的技术问题之四是提供含有作为PI3K/mTOR抑制剂的化合物的药物组合物的应用。

[0011] 作为本发明第一方面的一种作为PI3K/mTOR抑制剂的化合物,为具有以下通式(IA)或(IB)的化合物:



[0013] 其中,

[0014] R^1 选自氢、卤素、烷基、烷氧基、胺基,或与 R^2 形成并环;

[0015] R^2 选自氢、胺基、磺酰胺基、磺酰脲基、烷基、烷氧基,或与 R^1 形成并环;

[0016] R^3 选自氢、 C_1 - C_6 烷基;

[0017] R^4 选自氢、胺基、酰胺基或磺酰胺基;

[0018] R^5 选自氢、卤素、烷基或烷氧基。

[0019] 并且, $R^1 \sim R^5$ 中所述的烷基、烷氧基、胺基、酰胺基、脲基、磺酰胺基、磺酰脲基均可被一个或多个基团任选地取代,这些基团包括烷基、烯基、炔基、卤素、烷氧基、芳基、杂芳基、杂环基、氨基、胺基、氰基、硝基、羧基、酯基、胺甲酰基、磺酰基或磺酰胺基。

[0020] 在本发明的一些实施方案中, R^1 选自氯,甲氧基或与 R^2 并为苯环。

[0021] 在本发明的一些实施方案中, R^2 选自磺酰胺基、磺酰脲基或与 R^1 并为苯环。

[0022] 在本发明的一些实施方案中, R^3 选自氢,甲基。

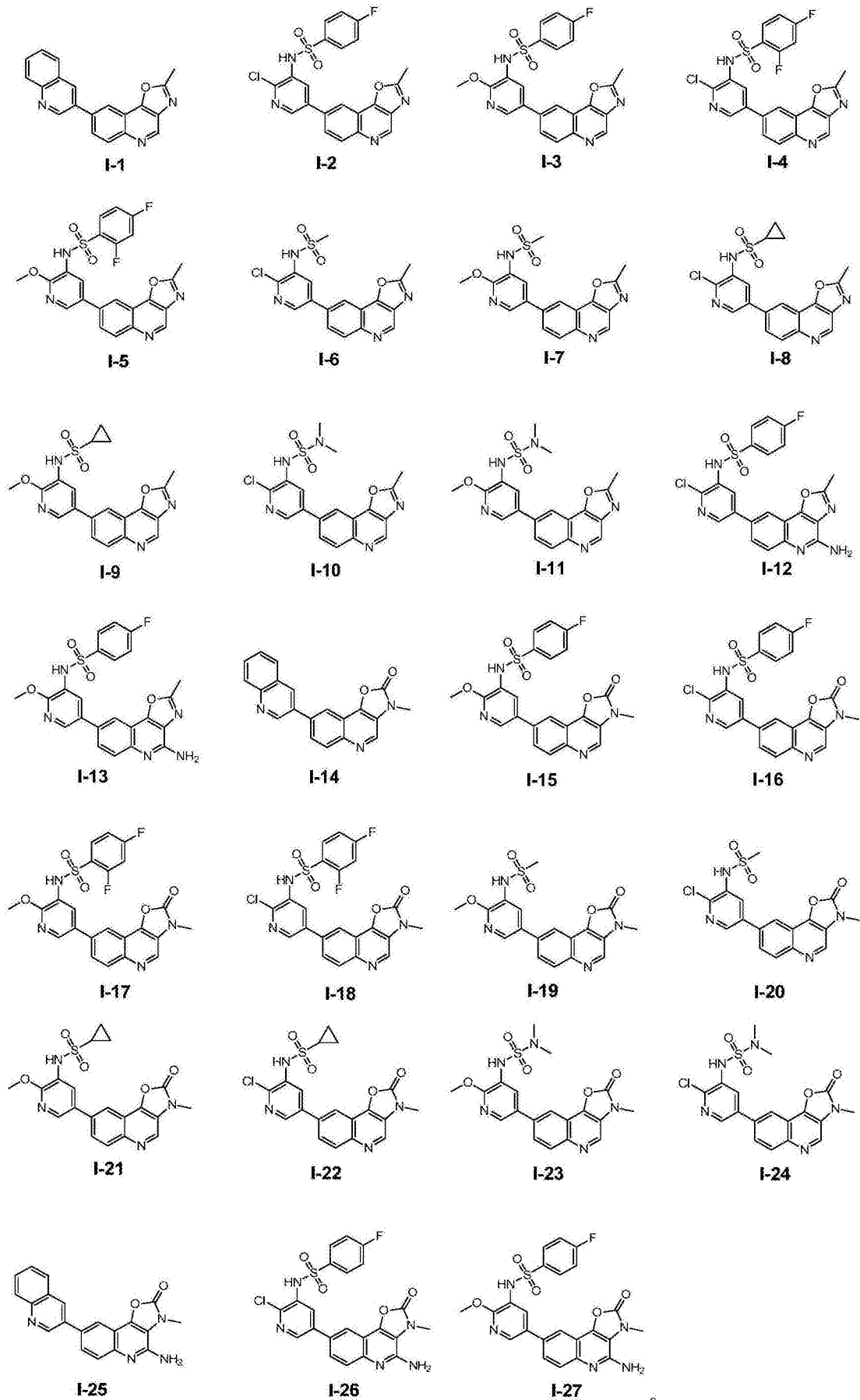
[0023] 在本发明的一些实施方案中, R^4 选自氢,胺基。

[0024] 在本发明的一些实施方案中, R^5 为氢。

[0025] 本发明包括但不限于对所述取代基做如下限定的化合物:通式(IA)或(IB)中 R^1 选自氯,甲氧基或与 R^2 并为苯环,同时 R^2 选自磺酰胺基、磺酰脲基或与 R^1 并为苯环; R^3 选自甲基; R^4 选自氢或胺基; R^5 为氢。

[0026] 本发明所述的化合物,可以是如下结构(I-1)至(I-27)中的任意一种:

[0027]



[0028]

[0029] 所述的通式(IA)或(IB)化合物为对映异构体、非对映异构体、构象异构体中的任

意一种或任意两者或三者的混合物。

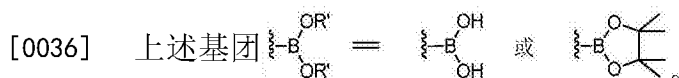
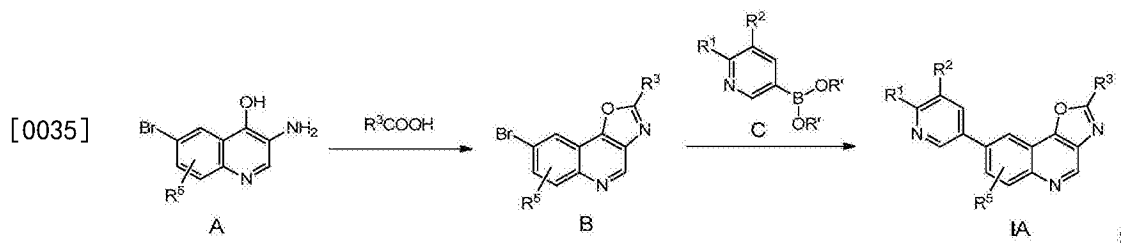
[0030] 所述通式(IA)或(IB)化合物为药学可接受的衍生物。

[0031] 本发明所述通式(IA)或(IB)化合物可以以药学上可接受的盐的形式存在,包括与酸所成的盐,例如盐酸盐、氢溴酸盐、甲磺酸盐、硫酸盐、磷酸盐、乙酸盐、三氟乙酸盐、三氟甲磺酸盐、对甲苯磺酸盐、酒石酸盐、马来酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐或苹果酸盐;或酸性质子被金属离子所取代的钠盐、钾盐、镁盐、钙盐。

[0032] 作为本发明第二方面的上述化合物的制备方法,其中通式(IA)所示的化合物可以由以下方法制备而成:

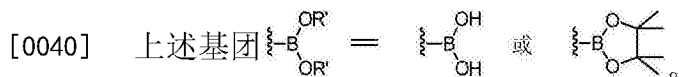
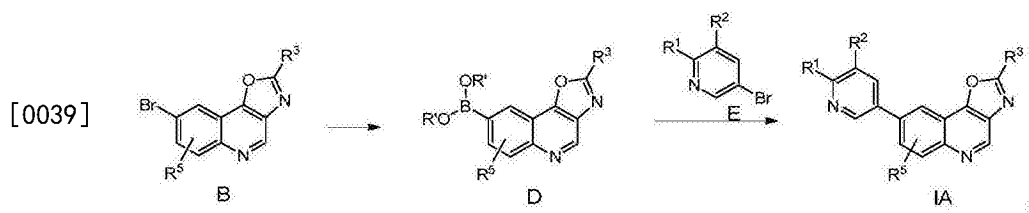
[0033] 方法一:

[0034] 当 R^4 为H, R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^5 如前所述时,通式(IA)所示的化合物的制备步骤是:将3-氨基-4-羟基-6-溴喹啉类化合物(A)与羧酸 R^3COOH 进行环合,制备喹啉并噁唑类化合物(B),进一步将利用溴原子与硼酸酯(C)进行Suzuki偶联反应,制备通式(IA)所示的化合物,具体反应式如下:



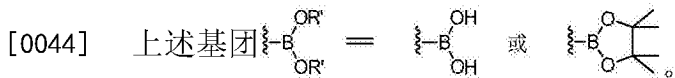
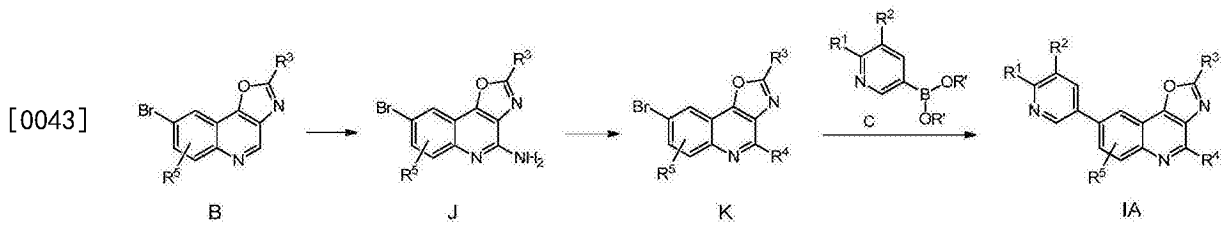
[0037] 方法二:

[0038] 当 R^4 为H, R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^5 如前所述时,通式(IA)所示的化合物的制备步骤是:将3-氨基-4-羟基-6-溴喹啉类化合物(A)与羧酸 R^3COOH 进行环合,制备喹啉并噁唑类化合物(B),然后将噁唑并喹啉类化合物(B)分子中的溴转化为硼酸酯(D),进一步与溴化物(E)进行Suzuki偶联,制备通式(IA)所示的化合物,具体反应式如下:



[0041] 方法三:

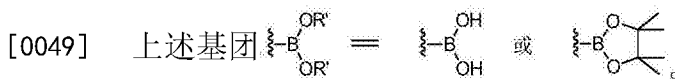
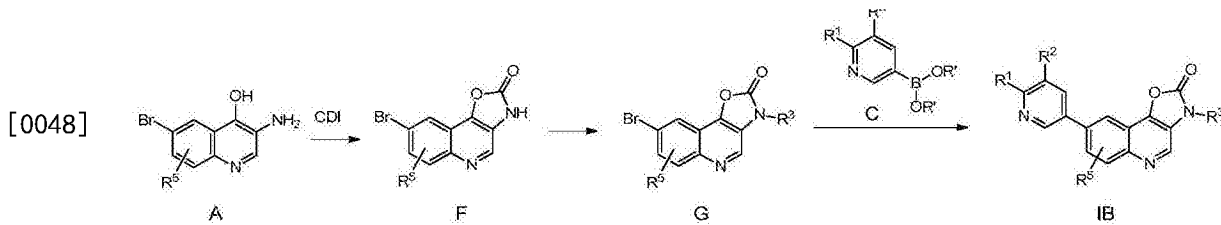
[0042] 当 R^4 为氨基、酰胺基、磺酰胺基、脲基, R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^5 如前所述时,将3-氨基-4-羟基-6-溴喹啉类化合物(A)与羧酸 R^3COOH 进行环合,制备喹啉并噁唑类化合物(B),将喹啉并噁唑类化合物(B)通过氮原子氧化进行喹啉-2位活化,进而引入喹啉-2-氨基(J),通过相应转化制备化合物(K),进一步将其与硼酸酯(C)进行Suzuki偶联,制备通式(IA)所示的化合物,具体反应式如下:



[0045] 作为本发明第二方面的上述化合物的制备方法,其中通式(IB)所示的化合物可以由以下方法制备而成:

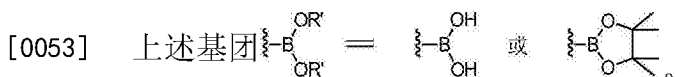
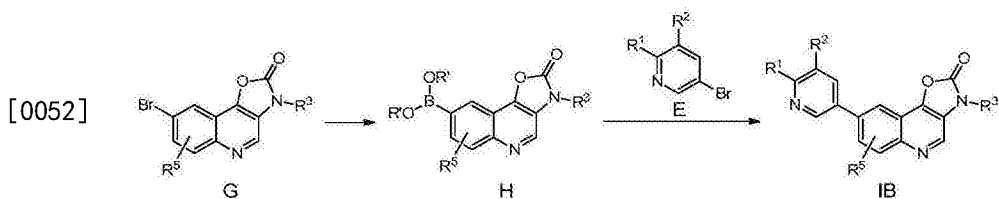
[0046] 方法一:

[0047] 当R⁴为H,R¹、R²、R³、R⁵如前所述时,将3-氨基-4-羟基-6-溴喹啉类化合物(A)与羰基二咪唑(CDI)试剂进行环合,制备喹啉并噁唑-2-酮类化合物(F),进一步将酰胺氮原子烷基化得到溴代的喹啉并噁唑-2-酮类化合物(G),将溴代的喹啉并噁唑-2-酮类化合物(G)与硼酸酯(C)进行Suzuki偶联,制备通式(IB)所示的化合物,具体反应式如下:



[0050] 方法二

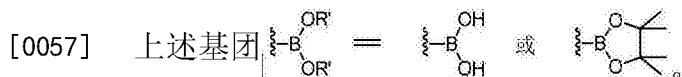
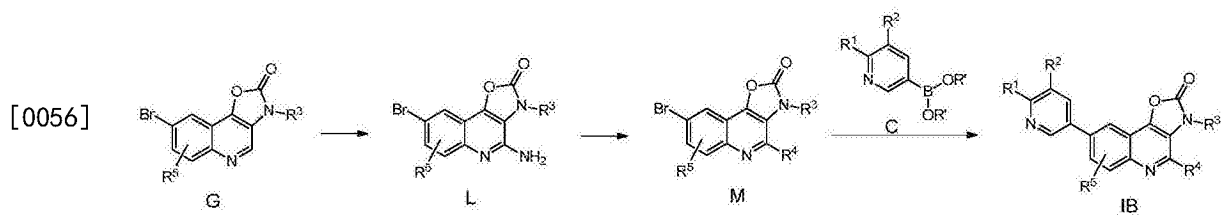
[0051] 当R⁴为H,R¹、R²、R³、R⁵如前所述时,将3-氨基-4-羟基-6-溴喹啉类化合物(A)与羰基二咪唑(CDI)试剂进行环合,制备喹啉并噁唑-2-酮类化合物(F),进一步将酰胺氮原子烷基化得到溴代的喹啉并噁唑-2-酮类化合物(G),然后将溴代的喹啉并噁唑-2-酮类化合物(G)转化为相应的硼酸酯(H),继而与溴化物(E)进行Suzuki偶联,制备通式(IB)所示的化合物,具体反应式如下:



[0054] 方法三

[0055] 当R⁴为胺基、酰胺基、磺酰胺基、脲基,R¹、R²、R³、R⁵如前所述时,将3-氨基-4-羟基-6-溴喹啉类化合物(A)与羰基二咪唑(CDI)试剂进行环合,制备喹啉并噁唑-2-酮类化合物(F),进一步将酰胺氮原子烷基化得到溴代的喹啉并噁唑-2-酮类化合物(G),然后溴代的喹啉并噁唑-2-酮类化合物(G)的喹啉氮原子氧化活化,进而引入喹啉-2-氨基(L),通过相应

转化制备化合物(M),然后将6位溴原子与硼酸酯(C)进行Suzuki偶联,制备通式(IB)所示的化合物,具体反应式如下:



[0058] 作为本发明第三方面的药物组合物,其中所述药物组合物包含治疗有效量的通式(IA)或/和通式(IB)化合物和药学可接受的赋形剂。

[0059] 作为本发明第三方面的一种药物组合物,其中所述药物组合物包含治疗有效量的通式(IA)或/和通式(IB)化合物的药学可接受的衍生物和药学可接受的赋形剂。

[0060] 作为本发明第三方面的一种药物组合物,其中所述药物组合物包含治疗有效量的通式(IA)或/和通式(IB)化合物的药学上可接受的盐和药学可接受的赋形剂。

[0061] 所述的药物组合物制成片剂、胶囊剂、水性混悬剂、油性混悬剂、可分散的粉剂、颗粒剂、锭剂、乳剂、糖浆剂、乳膏剂、软膏剂、栓剂或注射剂。

[0062] 作为本发明第四方面的应用,其中是通式(IA)或/和通式(IB)化合物在制备调节PI3K/mTOR信号通路催化活性制品中的应用。

[0063] 作为本发明第四方面的应用,其中是通式(IA)或/和通式(IB)化合物的药学可接受的衍生物在制备调节PI3K/mTOR信号通路催化活性制品中的应用。

[0064] 作为本发明第四方面的应用,其中是通式(IA)或/和通式(IB)化合物的可药用的盐在制备调节PI3K/mTOR信号通路催化活性制品中的应用。

[0065] 作为本发明第四方面的应用,其中是药物组合物在制备治疗与PI3K/mTOR信号通路有关的疾病的药物中的应用。

[0066] 所述与PI3K/mTOR信号通路有关的疾病为癌症。

[0067] 所述癌症为头颈部癌症、呼吸系统癌症、消化系统癌症、泌尿系统癌症、骨骼系统癌症、妇科癌症、血液系统癌症或其他类型癌症。

[0068] 所述头颈部癌症为甲状腺癌、鼻咽癌、脑膜癌、听神经瘤、垂体瘤、口腔癌、颅咽管瘤、丘脑和脑干肿瘤、血管源性肿瘤或颅内转移瘤。

[0069] 所述呼吸系统癌症为肺癌。

[0070] 所述消化系统癌症为肝癌、胃癌、食管癌、大肠癌、直肠癌、结肠癌或胰腺癌。

[0071] 所述泌尿系统癌症为肾癌、膀胱癌、前列腺癌或睾丸癌。

[0072] 所述骨骼系统癌症为骨癌。

[0073] 所述妇科癌症为乳腺癌、宫颈癌或卵巢癌;

[0074] 所述血液系统癌症为白血病、恶性淋巴瘤或多发性骨髓瘤。

[0075] 所述其他类型癌症为恶性黑色素瘤、神经胶质瘤或皮肤癌。

[0076] 本发明所涉及的通式(IA)、(IB)的化合物还可用于PI3K-Akt-mTOR信号通路的生物学或药理学现象的研究、以及对于新的PI3K或PI3K/mTOR双重抑制剂的比较评价。

具体实施方式

[0077] 本发明提供以上所定义的通式(IA)、(IB)化合物、制备这些化合物的方法、制备这些化合物的药物组合物和使用这些化合物的方法。

[0078] 以下所列出的是对用于描述本发明化合物的各种术语的定义。将这些定义应用于在说明书各处所使用的术语(除非在特定的情况下另有限定),无论这些术语单独使用还是作为更大基团的部分。

[0079] 除非另有定义,本文所使用的术语“烷基”(单独使用或作为另一基团的部分)指烷烃衍生的包含1至12个碳原子的一价基团。优选的烷基具有1至6个碳原子。烷基为任选取代的直链、支链或环状饱和烃基。示范性的烷基包括甲基、乙基、丙基、异丙基、环丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、环丁基、环丙基甲基、戊基、环戊基、己基、异己基、环己基、庚基、4,4-二甲基戊基、辛基、2,2,4-三甲基戊基、壬基、癸基、十一烷基、十二烷基等。且所述“烷基”可被选自以下的基团任意取代:烷基、卤素(如氟、氯、溴、碘)、烷氧基、氨基/胺基、卤代烷基(如三氯甲基、三氟甲基)、芳基、芳基氧基、烷硫基、羟基、氰基、硝基、羧基、烷氧基羰基、烷基羰基氧基、氨甲酰基、脲或巯基。

[0080] 本文所使用的术语“烷氧基”(单独使用或作为另一个基团的部分)指通过氧原子连接的烷基,诸如-OR,其中R为所述烷基,优选具有1至6个碳原子的烷基。

[0081] 本文所使用的术语“氨基”(单独使用或作为另一个基团的部分)指-NH₂。“胺基”可任选取代有一或两个取代基(-NR'R''),其中R'和R''可以是相同或不同的,诸如烷基、芳基、芳基烷基、烯基、炔基、杂芳基、杂芳基烷基、杂环烷基、环烷基、环烷基烷基、卤代烷基、羟基烷基、烷氧基烷基、烷硫基、羰基或羧基。在一些实施方案中,胺基的两个取代基形成环,例如氮杂环丁烷、四氢吡咯、哌啶、哌嗪、吗啉、高吗啉等以氮原子连接在取代位置上,也是本发明所述的胺基范畴。

[0082] 术语“磺酰胺基”指 $\text{—N}(\text{R}')\text{—S}(=\text{O})_2\text{—Ra}$, 其中Ra为所述烷基、芳基或杂芳基;R'为氢或所述烷基。

[0083] 术语“磺酰胺基”指 $\text{—N}(\text{R}')\text{—S}(=\text{O})_2\text{—Rb}$, 其中Rb为所述胺基;R'为氢或所述烷基。

[0084] 术语“酰胺基”指 $\text{—N}(\text{R}')\text{—C}(=\text{O})\text{—Rc}$, 其中Rc为所述烷基、芳基或杂芳基;R'为氢或所述烷基。

[0085] 术语“卤素”指独立选择的氟、氯、溴或碘。

[0086] 本文所使用的术语“芳基”(单独使用或作为另一个基团的部分)指单环芳族环或多环芳族环,例如苯基、取代的苯基等及稠合的基团例如萘基、菲基等。因而,芳基包含至少一个具有至少6个原子的环,包含至多五个这样的环(其中包含至多22个原子),并且相邻的碳原子或合适的杂原子之间具有交替的(共轭的)双键。优选的芳基在环中包含6至14个碳原子。且所述“芳基”可被任选取代有一或多个基团,所述基团包括但不限于卤素(诸如氟、氯、溴)、烷基(诸如甲基、乙基、丙基)、取代烷基(如三氟甲基)、环烷基、烷氧基(诸如甲氧基或乙氧基)、羟基、羧基、胺甲酰基(-C(=O)NR'R''),烷氧基羰基(-CO₂R)、氨基/胺基、硝基、氰

基、烯基氧基、芳基、杂芳基、磺酰基(-SO₂R)等,其中,R、R'、R''为所述烷基。

[0087] 本文所使用的术语“杂芳基”(单独使用或作为另一个基团的部分)指取代和未取代的芳族5或6元单环基团、9或10元双环基团和11至14元三环基团,这些基团在至少一个环中具有至少一个杂原子(O、S或N)。包含杂原子的杂芳基的每个环都可包含一或两个氧原子或硫原子和/或一至四个氮原子,条件为每个环中杂原子的总数均为四个或更少,并且每个环都具有至少一个碳原子,形成上述双环基团和三环基团的稠合的环可只包含碳原子,并且可以是饱和或部分饱和的。氮原子和硫原子可以是氧化的,并且氮原子可以是季胺化的。双环或三环的杂芳基必须包括至少一个完全芳族的环,但其它稠合的环或多个环可以是芳族或非芳族的。杂芳基可在任意环的任意可用氮原子或碳原子处连接。

[0088] 所述“杂芳基”环系可包含零、一、二或三个选自以下的取代基:卤素、烷基、取代的烷基、烯基、炔基、芳基、硝基、氰基、羟基、烷氧基、烷硫基、-CO₂H、-C(=O)H、-CO₂-烷基、-C(=O)烷基、苯基、苄基、苯基乙基、苯基氧基、苯硫基、环烷基、取代的环烷基、杂环烷基、杂芳基、-NR'R''、-C(=O)NR'R''、-CO₂NR'R''、-C(=O)NR'R''、-NR'CO₂R''、-NR'C(=O)R''、-SO₂NR'R''和-NR'SO₂R'',其中R'和R''各自独立选自氢、烷基、取代的烷基和环烷基,或R'和R''一起形成杂环烷基或杂芳基环。

[0089] 单环杂芳基的实例包括吡咯基、吡啶基、吡啶啉基、咪唑基、噁唑基、二唑基、异噁唑基、噻唑基、噻二唑基、异噻唑基、呋喃基、噻吩基、恶二唑基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、三嗪基等。

[0090] 双环杂芳基的实例包括吲哚基、苯并噻唑基、苯并二氧杂环戊烯基、苯并噁唑基、苯并噻吩基、喹啉基、四氢喹啉基、异喹啉基、四氢异喹啉基、苯并咪唑基、苯并吡喃基、吲嗪基、苯并呋喃基、色酮基、香豆素基、苯并呋喃基、喹啉基、吡咯并吡啶基、呋喃并吡啶基等。

[0091] 三环杂芳基的实例包括咪唑基、苯并咪唑基、菲咯啉基、吡啶基、菲啶基等。

[0092] 本文所使用的术语“杂环”(单独使用或作为另一个基团的部分)指环中的一个碳原子被选自O、S或N的杂原子代替和至多3个额外碳原子可被所述杂原子代替的环烷基(非芳族)。本申请所使用的术语“杂环基”(单独使用或作为另一个基团的部分)指包含5至7个环原子(碳原子和选自氮、硫和/或氧的其它原子)的稳定的饱和或部分不饱和的单环环系。杂环可以是5、6或7元单环,并且包含一、二或三个选自氮、氧和/或硫的杂原子。杂环可以是任选取代的,这意味着杂环可在一或多个可取代的环位置取代有一或多个独立选自以下的基团:烷基、杂环烷基、杂芳基、烷氧基、硝基、单烷基胺基、二烷基胺基、氰基、卤素、卤代烷基、烷酰基、氨/胺基羰基、单烷基胺基羰基、二烷基胺基羰基、烷基酰胺基、烷氧基烷基、烷氧基羰基、烷基羰基氧基和芳基,所述芳基任选取代有卤素、烷基和烷氧基。这些杂环烷基的实例包括但不限于:哌啶、吗啉、高吗啉、哌嗪、硫吗啉、吡咯烷和氮杂环丁烷。

[0093] 术语“抗癌药”包括可用于治疗癌症的任意已知的药物,包括:(1)细胞毒类药物:氮芥类药物,如美法仑、环磷酰胺;铂配位络合物,诸如顺铂、卡铂和奥沙利铂;(2)抗代谢类抗肿瘤药:5-氟尿嘧啶、卡培他滨、甲氨蝶呤、亚叶酸钙、雷替曲塞、嘌呤拮抗剂(例如6-硫代鸟嘌呤和6-巯基嘌呤);(3)激素类:17 α -炔雌醇、己烯雌酚、睾酮、泼尼松、氟甲睾酮、丙酸屈他雄酮、睾内酯、醋酸甲地孕酮、甲泼尼龙、甲基睾酮、泼尼松龙、曲安西龙、氯烯雌醚、羟孕酮、氨鲁米特、雌莫司汀、醋酸甲羟孕酮、托瑞米芬;(4)酪氨酸激酶抑制剂:EGFR抑制剂,包

括吉非替尼(Gefitinib)、厄罗替尼(Erlotinib)、西妥昔单抗(Cetuximab)、赫赛汀(Herceptin)等;VEGF抑制剂,诸如抗VEGF抗体(阿瓦斯丁(Avastin))和小分子抑制剂诸如Sunitinib、Sorafenib、Vandetanib、Pazopanib、Axitinib等;Bcr-Abl抑制剂如Imatinib、Nilotinib、Dasatinib;Src抑制剂、MEK激酶抑制剂、MAPK激酶抑制剂、PI3K激酶抑制剂、c-Met抑制剂、ALK抑制剂等;(5)作用于微管蛋白的药物,诸如长春碱类药物、紫杉醇类药物、埃坡霉素类药物如伊沙匹隆(Ixabepilone)等;(6)拓扑异构酶I抑制剂,如拓扑替康、伊立替康;(7)组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂如Vorinostat、Romidepsin;(8)蛋白酶体抑制剂如硼替佐米(Bortezomib);(9)其他类别的抗癌药如极光激酶(aurora kinase)抑制剂、生物应答调节剂、生长抑制剂、抗血管生成和抗脉管药物、基质金属蛋白酶抑制剂等。

[0094] “哺乳动物”包括人类和家畜,如猫、狗、猪、牛、绵羊、山羊、马、兔等。优选地,为了本发明的目的,所述哺乳动物为人类。

[0095] “药学可接受的衍生物”表示向接受者给药时,能够直接或间接提供本发明的化合物或其抑制性的活性代谢物或残余物的任何无毒的盐、酯、酯的盐、酰胺、酰胺的盐或其他衍生物。

[0096] “药学可接受的赋形剂”包括但不限于已由国家食品和药品监督管理局批准作为可用于人类或家畜的任何辅剂、载体、赋形剂、助流剂、甜味剂、分散剂、稀释剂、防腐剂、助悬剂、稳定剂、染料/着色剂、增味剂、表面活性剂、润湿剂、等渗剂、溶剂或乳化剂。

[0097] “药学可接受的盐”包括酸加成盐和碱加成盐。

[0098] “药学可接受的酸加成盐”指这样的盐,它们保留了游离碱的生物学效应和性质,不会在生物学或其他方面产生不良后果,并且是与无机酸例如但不限于盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等,以及有机酸例如但不限于下列酸:甲酸、乙酸、三氟乙酸、甲磺酸、三氟甲磺酸、乙磺酸、2-羟基乙磺酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、2,2-二氯乙酸、己二酸、海藻酸、抗坏血酸、天冬氨酸、苯甲酸、对乙酰氨基苯甲酸、樟脑酸、樟脑-10-磺酸、癸酸、己酸、辛酸、碳酸、肉桂酸、柠檬酸、环己烷氨基磺酸、十二烷基硫酸、乙烷-1,2-二磺酸、延胡索酸、半乳糖二酸、龙胆酸、葡庚糖酸、葡糖酸、葡糖醛酸、谷氨酸、戊二酸、2-氧代-戊二酸、甘油磷酸、乙醇酸、马尿酸、异丁酸、乳酸、乳糖酸、月桂酸、马来酸、苹果酸、丙二酸、扁桃酸、粘酸、萘-2-磺酸、萘-1,5-二磺酸、1-羟基-2-萘甲酸、烟酸、油酸、乳清酸、草酸、棕榈酸、双羟萘酸、丙酸、焦谷氨酸、丙酮酸、水杨酸、4-氨基水杨酸、癸二酸、硬脂酸、富马酸、琥珀酸、酒石酸、硫氰酸、十一烯酸等形成。

[0099] “药学可接受的碱加成盐”指这样的盐,它们保留了游离酸的生物学效应和性质,不会在生物学或其他方面不合适。这些盐由将无机碱或有机碱加成到游离酸上而制得。源自无机碱的盐包括但不限于钠、钾、锂、铵、钙、镁、铁、锌、铜、锰、铝盐等。优选的无机盐是铵、钠、钾、钙和镁盐。源自有机碱的盐包括但不限于下述物质的盐:伯胺、仲胺和叔胺、取代的胺,包括天然存在的取代胺、环胺和碱性离子交换树脂,如氨、甲胺、二甲胺、三甲胺、二乙胺、三乙胺、三丙胺、异丙胺、二乙醇胺、乙醇胺、2-二甲氨基乙醇、2-二乙氨基乙醇、二环己胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、咖啡因、普鲁卡因、海巴明(hydrabamine)、胆碱、甜菜碱、苯乙胺、乙二胺、葡糖胺、甲基葡糖胺、可可碱、三乙醇胺、氨丁三醇、嘌呤、嘧啶、哌啶、N-乙基哌啶、聚胺树脂等。优选的有机碱是异丙胺、二乙胺、乙醇胺、三乙胺、二环己胺、胆碱和咖啡因。

[0100] “药物组合物”指本发明的化合物与将生物学活性化合物递送至哺乳动物如人类中的通常接受的介质所组成的制剂。这样的介质包括对此的所有的药学可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0101] “治疗有效量”指当向哺乳动物给药时(优选人类),足以对哺乳动物(优选人类)的相关疾病或病症实现如下文所定义的治疗的本发明的化合物的量。构成“治疗有效量”的本发明的化合物的量会根据例如所应用的具体化合物的活性;所述化合物的代谢稳定性和作用时长;患者的年龄、体重、整体健康、性别和饮食;给药模式和时间;排泄速率;联合用药;特定疾患或病症的严重性;以及经历治疗的个体而变化,但它可以由本领域普通技术人员根据其自身知识和本公开常规地确定。

[0102] “进行治疗”或“治疗”用于本文时涵盖对具有相关疾病或病症的哺乳动物,优选人类的相关疾病或病症的治疗,并且包括:

[0103] (i)预防哺乳动物中发生疾病或病症,尤其是当这样的哺乳动物已患病但还没有诊断出患病时;

[0104] (ii)抑制疾病或病症,即阻止它发展;

[0105] (iii)缓解疾病或病症,即引起疾病或病症消退;

[0106] (iv)稳定疾病或病症。

[0107] 用于本文时,术语“疾病”和“病症”可以互换使用或者可以不同,原因是特定疾病或病症可能没有已知的诱因(从而还没有研究出病因),因此还没有被认为是疾病而只作为非正常的状况或综合征,其中临床医生已经或多或少地识别出了具体的症候群。

[0108] 本文所示的本发明化合物和它们的结构还表示包括所有异构体(例如对映异构体、非对映异构体、几何异构、或构象异构)形式,它们可以根据对于氨基酸的绝对立体化学定义为(R)-/(S)-或者(D)-/(L)-或者(R,R)-/(R,S)-/(S,S)-。本发明表示包括所有这些可能的异构体,以及它们的外消旋的、对映体富集的和任选的纯的形式。旋光(+)和(-),(R)-和(S)-以及(R,R)-/(R,S)-/(S,S)-或(D)-和(L)-异构体可以使用手性合成、手性拆分制备,或者可以使用常规技术例如但不限于使用手性柱的高效液相(HPLC)拆分。当本文所述的化合物包含烯基双键或其他几何不对称中心时,除非另有说明,所述化合物包括E和Z几何异构体两者。同样,还包括所有互变异构体形式。

[0109] “立体异构体”指由相同的原子以相同的化学键键合构成但具有不同三维结构的化合物,它们不可互换。本发明涵盖各种立体异构体及其混合物并包括“对映异构体”和“非对映异构体”,对映异构体指其分子互为不可重叠的镜像的两种立体异构体;非对映异构体是指分子具有两个或多个手性中心,并且分子间为非镜像关系的立体异构体。

[0110] “互变异构体”指质子从分子的一个原子从原位置移动到同一分子的另一个位置上。本发明包括任何所述化合物的互变异构体。

[0111] 另外,除非另有说明,本发明的化合物还包括结构不同仅在于存在一种或多种同位素富集原子的化合物。例如,具有本发明的结构,除了用“氘”或“氚”代替氢,或者用 ^{18}F -氟标记(^{18}F 同位素)代替氟,或者用 ^{11}C -, ^{13}C -,或者 ^{14}C -富集的碳(^{11}C -, ^{13}C -,或者 ^{14}C -碳标记; ^{11}C -, ^{13}C -,或者 ^{14}C -同位素)代替碳原子的化合物处于本发明的范围内。这样的化合物可用作例如生物学测定中的分析工具或探针,或者可以用作疾病的体内诊断成像示踪剂,或者作为药效学、药动学或受体研究的示踪剂。

[0112] 本发明还提供以下方法：通过将治疗有效量的如以上所定义的通式(IA)或/和通式(IB)化合物与至少一种其它抗癌药组合给予(同时或先后)需要这种治疗的患者,经由调节PI3K/mTOR信号通路来治疗增生性疾病(诸如癌症)。在优选的实施方案中,增生性疾病为癌症。

[0113] 具体地,通式(IA)或/和通式(IB)化合物可用于治疗多种癌症,最具体为依赖于PI3K/mTOR信号活化的那些癌症。通常,可将本发明的化合物用于治疗以下癌症:

[0114] 1. 头颈部癌症,包括甲状腺癌、鼻咽癌、脑膜癌、听神经瘤、垂体瘤、口腔癌、颅咽管瘤、丘脑和脑干肿瘤、血管源性肿瘤、颅内转移瘤;

[0115] 2. 呼吸系统癌症,包括肺癌;

[0116] 3. 消化系统癌症,包括肝癌、胃癌、食管癌、大肠癌、直肠癌、结肠癌、胰腺癌;

[0117] 4. 泌尿系统癌症,包括肾癌、膀胱癌、前列腺癌、睾丸癌;

[0118] 5. 骨骼系统癌症,骨癌;

[0119] 6. 妇科癌症,包括乳腺癌、宫颈癌、卵巢癌;

[0120] 7. 血液系统癌症,包括白血病、恶性淋巴瘤、多发性骨髓瘤;

[0121] 8. 其他类型癌症,包括恶性黑色素瘤、神经胶质瘤、皮肤癌。

[0122] 通式(IA)或/和通式(IB)化合物还可用于治疗特征为细胞异常增殖的任意疾病过程,例如良性前列腺增生、神经纤维瘤病、动脉粥样硬化、肺纤维化、关节炎、牛皮癣、肾小球肾炎、血管成形术或脉管手术之后出现的再狭窄、炎性肠病、移植排斥反应、内毒素性休克和真菌感染。

[0123] 通式(IA)或/和通式(IB)化合物可调节细胞RNA和DNA合成的水平。因此,可将这些物质用于治疗病毒感染(包括但不限于HIV、人乳头瘤病毒、疱疹病毒、痘病毒、EB病毒、辛德毕斯病毒和腺病毒)。

[0124] 通式(IA)或/和通式(IB)化合物可用于癌症的化学预防。将化学预防定义为通过阻断初始的致突变事件或通过阻断已遭受损伤的恶变前细胞的进展来抑制侵袭性癌症的发展或抑制肿瘤复发。

[0125] 通式(IA)或/和通式(IB)化合物可用于抑制肿瘤血管生成和转移。

[0126] 本发明的化合物也可与已知的抗癌药(包括但不限于上述“抗癌药”中提到的那些)或抗癌治疗(诸如放射治疗)组合使用(一起给予或先后给予)。

[0127] 某些通式(IA)或/和通式(IB)化合物通常可按照如下方法来制备。通式(IA)、(IB)化合物的互变异构体和溶剂化物(例如水合物、乙醇合物)也在本发明的范围内。溶剂化物的制备方法在本领域中通常是已知的。因此,本发明的化合物可以是游离形式或水合物形式。

[0128] 在下文所述的方法中,中间体化合物的官能团可能需要被适宜的保护基保护。这样的官能团包括羟基、氨基、巯基和羧酸。用于羟基的适合的保护基包括三烷基甲硅烷基或二芳基烷基甲硅烷基(例如叔丁基二甲基甲硅烷基、叔丁基二苯基甲硅烷基或三甲基甲硅烷基)、四氢吡喃基、苄基、对甲氧基苄基等。用于氨基的适宜保护基包括叔丁氧羰基、苄氧羰基、乙酰基、苯甲酰基、三氟乙酰基、对甲氧基苄基等。用于羧酸的适宜保护基包括烷基、芳基或芳基烷基酯。用于杂芳基比如例如吡啶或咪唑环的NH官能团的适宜保护基包括叔丁氧羰基、苄氧羰基、乙酰基、苯甲酰基、2-三甲基硅烷基-乙氧基甲基、对甲氧基苄基等。

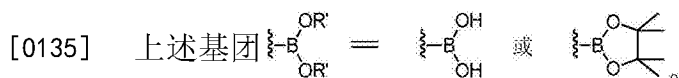
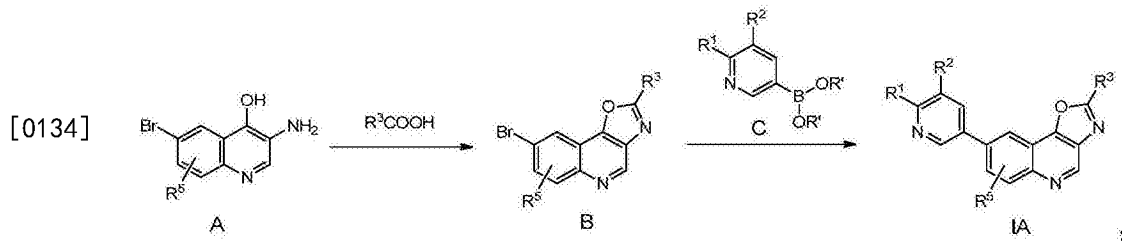
[0129] 保护基可以根据本领域技术人员已知的方法(Greene, T.W., Protective Groups in Organic Synthesis, 1999年, 第3版, Wiley)和本文所述的标准技术添加或去除。所述保护基也可以是聚合物树脂如Wang树脂、Rink树脂或2-氯三苯甲基氯树脂。

[0130] 同时, 尽管本发明化合物的这些受保护衍生物本身可能不具有药理学活性, 但它们可以被给药至哺乳动物, 然后在体内代谢以形成具有药理学活性的本发明化合物。这样的衍生物因此被描述为“前药”。本发明化合物的所有前药均包括在本发明的范围内。

[0131] 作为本发明第二方面的上述化合物的制备方法, 其中通式(IA)所示的化合物可以由以下方法制备而成:

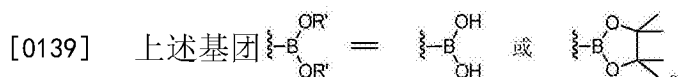
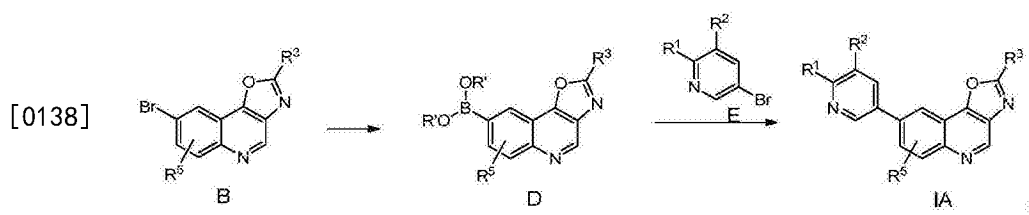
[0132] 方法一:

[0133] 当 R^4 为H, R^1 、 R^2 、 R^3 , R^5 如前所述时, 通式(IA)所示的化合物的制备步骤是: 将3-氨基-4-羟基-6-溴喹啉类化合物(A)与羧酸 R^3COOH 进行环合, 制备喹啉并噁唑类化合物(B), 进一步将利用溴原子与硼酸酯(C)进行Suzuki偶联反应, 制备通式(IA)所示的化合物, 具体反应式如下:



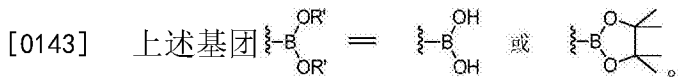
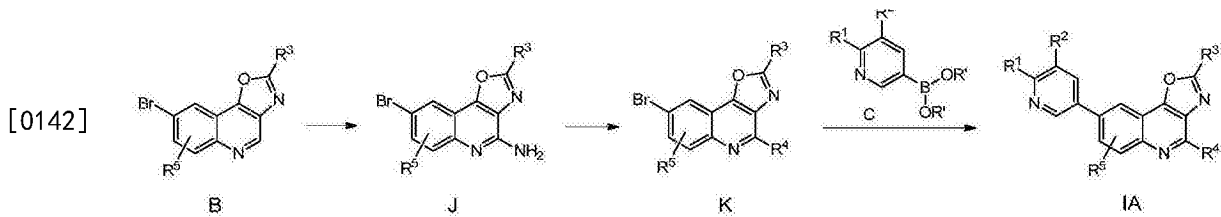
[0136] 方法二:

[0137] 当 R^4 为H, R^1 、 R^2 、 R^3 , R^5 如前所述时, 通式(IA)所示的化合物的制备步骤是: 将3-氨基-4-羟基-6-溴喹啉类化合物(A)与羧酸 R^3COOH 进行环合, 制备喹啉并噁唑类化合物(B), 然后将噁唑并喹啉类化合物(B)分子中的溴转化为硼酸酯(D), 进一步与溴化物(E)进行Suzuki偶联, 制备通式(IA)所示的化合物, 具体反应式如下:



[0140] 方法三:

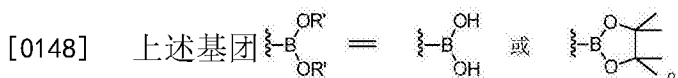
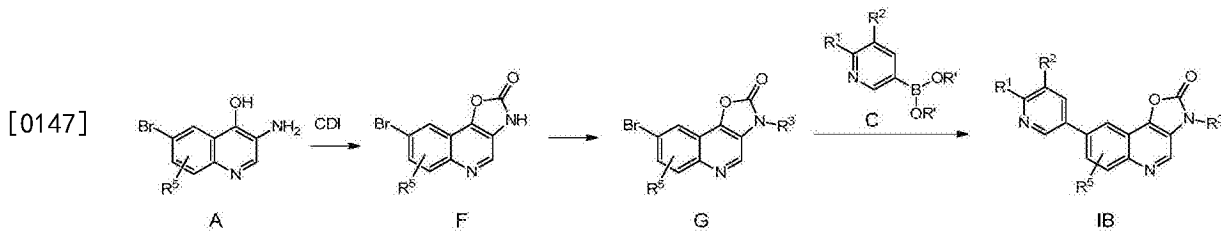
[0141] 当 R^4 为胺基、酰胺基、磺酰胺基、脲基, R^1 、 R^2 、 R^3 , R^5 如前所述时, 将3-氨基-4-羟基-6-溴喹啉类化合物(A)与羧酸 R^3COOH 进行环合, 制备喹啉并噁唑类化合物(B), 将喹啉并噁唑类化合物(B)通过氮原子氧化进行喹啉-2位活化, 进而引入喹啉-2-氨基(J), 通过相应转化制备化合物(K), 进一步将其与硼酸酯(C)进行Suzuki偶联, 制备通式(IA)所示的化合物, 具体反应式如下:



[0144] 作为本发明第二方面的上述化合物的制备方法,其中通式(IB)所示的化合物可以由以下方法制备而成:

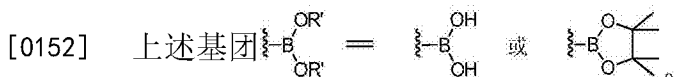
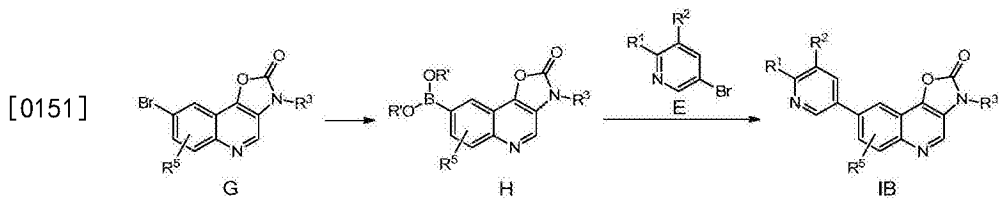
[0145] 方法一:

[0146] 当R⁴为H, R¹、R²、R³, R⁵如前所述时,将3-氨基-4-羟基-6-溴喹啉类化合物(A)与羰基二咪唑(CDI)试剂进行环合,制备喹啉并噁唑-2-酮类化合物(F),进一步将酰胺氮原子烷基化得到溴代的喹啉并噁唑-2-酮类化合物(G),将溴代的喹啉并噁唑-2-酮类化合物(G)与硼酸酯(C)进行Suzuki偶联,制备通式(IB)所示的化合物,具体反应式如下:



[0149] 方法二

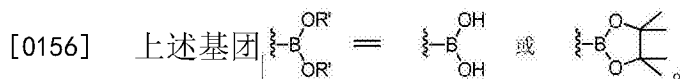
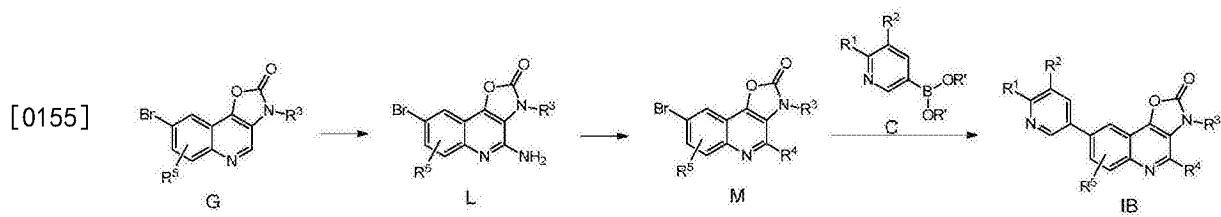
[0150] 当R⁴为H, R¹、R²、R³, R⁵如前所述时,将3-氨基-4-羟基-6-溴喹啉类化合物(A)与羰基二咪唑(CDI)试剂进行环合,制备喹啉并噁唑-2-酮类化合物(F),进一步将酰胺氮原子烷基化得到溴代的喹啉并噁唑-2-酮类化合物(G),然后将溴代的喹啉并噁唑-2-酮类化合物(G)转化为相应的硼酸酯(H),继而与溴化物(E)进行Suzuki偶联,制备通式(IB)所示的化合物,具体反应式如下:



[0153] 方法三

[0154] 当R⁴为胺基、酰胺基、磺酰胺基、脲基, R¹、R²、R³, R⁵如前所述时,将3-氨基-4-羟基-6-溴喹啉类化合物(A)与羰基二咪唑(CDI)试剂进行环合,制备喹啉并噁唑-2-酮类化合物(F),进一步将酰胺氮原子烷基化得到溴代的喹啉并噁唑-2-酮类化合物(G),然后溴代的喹啉并噁唑-2-酮类化合物(G)的喹啉氮原子氧化活化,进而引入喹啉-2-氨基(L),通过相应

转化制备化合物(M),然后将6位溴原子与硼酸酯(C)进行Suzuki偶联,制备通式(IB)所示的化合物,具体反应式如下:



[0157] 本领域技术人员可以使用适当的原料、采用类似的方法,制备上文反应路线中没有具体公开的本发明的其他化合物。

[0158] 通过用适宜的无机或有机碱或酸处理,可以将按照上文制备以游离碱或酸形式存在的所有本发明化合物转化成它们的药学可接受的盐。上文制备的化合物的盐可以通过标准技术转化成它们的游离碱或酸形式。

[0159] 本发明的化合物包括其所有晶型、无定型形式、脱水物、水合物、溶剂合物和盐。此外,所有包含酯基团和酰胺基团的本发明的化合物都可以通过本领域技术人员已知的方法或者通过本文描述的方法转化成相应的酸。同样,包含羧酸基团的本发明化合物可以通过本领域技术人员已知的方法转化为相应的酯和酰胺。也可以通过本领域技术人员已知的方法(例如氢化、烷基化、与酰氯反应等)进行分子上的其他取代和替换。

[0160] 要制备本发明的环糊精包合物,可以将上文发明概述中定义的通式(IA)、(IB)的化合物溶于药理学可接受的溶剂例如(但不限于)醇(优选乙醇)、酮(例如丙酮)或醚(例如乙醚)中,并在20°C至80°C与 α -环糊精、 β -环糊精或 γ -环糊精,优选 β -环糊精的水溶液混合;或者可以将上文发明概述中定义的通式(IA)、(IB)的化合物的酸性质子以其盐(例如钠或钾盐)的水溶液形式与环糊精共混,然后与等当量酸(例如HCl或H₂SO₄)的溶液共混,以提供相应的环糊精包合物。

[0161] 此时或者在冷却后,相应的环糊精包合物晶体能够结晶析出。或者当通式(IA)、(IB)化合物为油状和结晶时,通过在室温下长时间的搅拌(例如1小时至14天),加入环糊精的水溶液处理,也可以转化为相应的环糊精包合物。然后通过过滤和干燥,可以将包合物分离为固体或晶体。

[0162] 用于本发明的环糊精可商购(例如从Aldrich Chemical Co.),或者通过本领域技术人员采用已知的方法制备。参见例如Croft, A.P. 等人, "Synthesis of Chemically Modified Cyclodextrins", Tetrahedron 1983, 39, 9, 1417-1474。适宜的环糊精包括可与上文所列式(IA)、(IB)的化合物制备包合物的各种类型。

[0163] 通过选择适量的环糊精和水,可以按照化学计量组成获得可重复的有效物质含量的包合物。包合物可以为干燥吸水形式或者含水、但较不吸水的形式使用。环糊精与通式(IA)、(IB)的化合物的典型摩尔比为2:1(环糊精:化合物)。

[0164] 包含通式(IA)或/和通式(IB)化合物作为活性成分的药物组合物可以是适于口服的形式,例如为片剂、胶囊剂、水性混悬剂、油性混悬剂、可分散的粉剂或颗粒剂、糖浆剂等。可口服使用的组合物可按照本领域已知的用于制备药物组合物的任意方法来制备,并且这

些组合物可包含一或多种选自甜味剂、调味剂、着色剂和防腐剂的物质,以便提供药学上美观和适口的制剂。

[0165] 片剂包含活性成分,及混有适于制备片剂的无毒可药用赋形剂或载体。这些赋形剂或载体可为惰性稀释剂,诸如碳酸钙、碳酸钠、乳糖、磷酸钙或磷酸钠;造粒剂和崩解剂,例如维晶纤维素、羧甲基纤维素钠、玉米淀粉或藻酸;粘合剂,例如淀粉、明胶、聚乙烯吡咯烷酮或阿拉伯胶;和润滑剂,例如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石粉。片剂可以是未包衣的,或可通过已知的技术来包衣,从而遮蔽令人不悦的药物味道,或在胃肠道中延迟崩解和吸收,由此在较长的时段内提供持续的作用。例如,可使用水溶性的味道遮蔽物质(诸如羟丙基-甲基纤维素或羟丙基-纤维素)或时间延迟物质(诸如乙基纤维素、乙酸丁酸纤维素)。

[0166] 胶囊剂包含硬明胶胶囊剂、软明胶胶囊剂。硬明胶胶囊剂由活性成分与惰性固体稀释剂例如碳酸钙、磷酸钙或高岭土混合;软明胶胶囊剂由活性成分与水溶性载体(诸如聚乙二醇)或油介质(例如花生油、液体石蜡或橄榄油)混合。

[0167] 水性混悬剂包含活性物质和适于制备水性混悬剂的赋形剂。这些赋形剂为助悬剂,例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基-纤维素、藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮和阿拉伯胶;分散剂或润湿剂,可以是天然存在的磷脂(例如卵磷脂)或氧化乙烯与脂肪酸的缩合产物(例如聚氧乙烯硬脂酸酯)或氧化乙烯与长链脂肪醇的缩合产物(例如十七氧乙基鲸蜡醇(heptadecaethylene-oxycetanol))或氧化乙烯与从脂肪酸和己糖醇衍生的偏酯的缩合产物(诸如聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯)或氧化乙烯与从脂肪酸和己糖醇醚混合物衍生的偏酯的缩合产物(例如聚乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯)。水性混悬剂也可包含一种或多种防腐剂(例如对羟基苯甲酸乙酯或正丙酯)、一或多种着色剂、一或多种调味剂和一或多种甜味剂(诸如蔗糖、糖精或阿司帕坦)。

[0168] 油性混悬剂可通过将活性成分混悬在植物油(例如花生油、橄榄油、麻油或椰油)或矿物油(诸如液体石蜡)中来配制。油性混悬剂可包含增稠剂,例如蜂蜡、硬石蜡或鲸蜡醇。可添加甜味剂(诸如以上所列出的那些)和调味剂,从而提供适口的口服制剂。这些组合物可通过添加抗氧化剂(诸如丁羟茴醚或 α -生育酚)来防腐。

[0169] 可分散的粉剂和颗粒剂包含活性成分,及混有分散剂或润湿剂、助悬剂和一或多种防腐剂。合适的分散剂或润湿剂和助悬剂的实例为以上所已提及的那些。也可包含其它赋形剂,例如甜味剂、调味剂和着色剂。这些组合物可通过添加抗氧化剂(诸如抗坏血酸)来防腐。可分散的粉剂和颗粒剂可通过添加水来制备水性混悬剂。

[0170] 糖浆剂可用甜味剂(例如甘油、丙二醇、山梨醇或蔗糖)来配制。这些制剂也可包含缓和剂、防腐剂、调味剂、着色剂和抗氧化剂。

[0171] 本发明的药物组合物也可以是水包油型乳剂的形式。油相可以是植物油(例如橄榄油或花生油)或矿物油(例如液体石蜡)或它们的混合物。合适的乳化剂可以是天然存在的磷脂(例如大豆卵磷脂)、从脂肪酸和己糖醇混合物衍生的酯或偏酯(例如脱水山梨糖醇单油酸酯)和所述偏酯与氧化乙烯的缩合产物(例如聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯)。乳剂也可包含甜味剂、调味剂、防腐剂和抗氧化剂。

[0172] 药物组合物可以是无菌可注射水溶液的形式。可使用的可接受载体和溶剂有水、林格溶液(Ringer's solution)、等渗的氯化钠溶液和葡萄糖溶液。

[0173] 无菌可注射制剂也可以是无菌可注射水包油型微乳,其中将活性成分溶解在油相

中。例如,首先将活性成分溶解在大豆油和卵磷脂的混合物中。然后,将所得到的油溶液倒入到水和甘油的混合物中并且处理,从而形成微乳。

[0174] 可注射溶液或微乳可通过局部推注来导入到患者的血流中,或以某种方式给予所述溶液或微乳,从而维持恒定的本发明化合物的循环浓度。为了维持这种恒定的浓度,可使用输液泵等连续静脉内给药装置。

[0175] 药物组合物可以是用于肌内或皮下给药的无菌可注射水性或油性混悬液的形式。这种混悬液可按照已知的技术使用以上所已提及的那些合适的分散剂或润湿剂和助悬剂来配置。无菌可注射制剂也可以是无毒可药用稀释剂或溶剂的无菌可注射溶液或混悬液,例如1,3-丁二醇的溶液。另外,无菌非挥发油可方便地用作溶剂或混悬介质。为了这个目的,任意温和的非挥发油都可使用,包括合成的单甘油酯或二甘油酯。另外,脂肪酸(诸如油酸)可在制备注射剂中使用。

[0176] 通式(IA)或/和通式(IB)化合物也可按用于直肠给药的栓剂的形式来给予。这些组合物可通过混合药物与合适的无刺激性赋形剂来制备,所述赋形剂在常温为固体但在直肠温度为液体,因此在直肠中融化,从而释放药物。这些物质包括可可脂、甘油明胶、氢化植物油、不同分子量的聚乙二醇的混合物和聚乙二醇的脂肪酸酯。

[0177] 就局部使用而言,可制备和使用包含通式(IA)或/和通式(IB)化合物的乳膏剂、软膏剂、胶冻剂、溶液剂或混悬剂等。

[0178] 本发明的化合物可通过局部使用合适的鼻内载体和给药装置以鼻内形式来给予,或使用那些本领域技术人员众所周知的经皮皮肤贴剂的形式通过经皮途径来给予。本发明的化合物也可按使用诸如以下那样的基质的栓剂的形式来给予:可可脂、甘油明胶、氢化植物油、不同分子量的聚乙二醇的混合物和聚乙二醇的脂肪酸酯。

[0179] 当将本发明的化合物给予到人类受试对象体内时,每日剂量一般由开具处方的医生确定,并且所述剂量通常随患者的年龄、体重、性别和反应及患者的症状的严重程度而变化。通常,对于70kg的患者有效日剂量约为0.001mg/kg至100mg/kg,优选为0.01mg/kg至20mg/kg。

[0180] 如果配制成固定剂量,那么这些组合产品使用在以上所描述的剂量范围内的本发明化合物和在其批准的剂量范围内的其它药用活性剂治疗。当组合制剂不合适时,通式(IA)或/和(IB)化合物也可与已知的抗癌药或细胞毒性药先后给予。本发明不受给药顺序的限制;通式(IA)或/和通式(IB)化合物可在给予已知的抗癌药(多种抗癌药)或细胞毒性药(多种细胞毒性药)之前或之后来给予。

[0181] 本发明的化合物是PI3K/mTOR介导的疾病或PI3K/mTOR介导的病症的抑制剂。术语“PI3K/mTOR介导的疾病”和“PI3K/mTOR介导的病症”表示已知PI3K/mTOR具有作用的任何疾病状态或其他有害病症。术语“PI3K/mTOR介导的疾病”和“PI3K/mTOR介导的病症”还表示通过用PI3K/mTOR抑制剂治疗得到缓解的那些疾病或病症。这些疾病和病症包括但不限于癌症和其他增殖性疾患。

[0182] 因此,所述化合物可用于治疗例如哺乳动物,尤其是人类中的下列疾病或疾患:胃癌、肺癌、食道癌、胰腺癌、肾癌、结肠癌、甲状腺癌、脑癌、乳腺癌、前列腺癌、以及其他实体瘤;淋巴瘤;白血病;调节血管发生;调节血栓形成和肺纤维化。

[0183] 本发明所涉及的化合物还可用于PI3K-Akt-mTOR信号通路的生物学或药理学现象

的研究、以及对于新的PI3K或PI3K/mTOR双重抑制剂的比较评价。

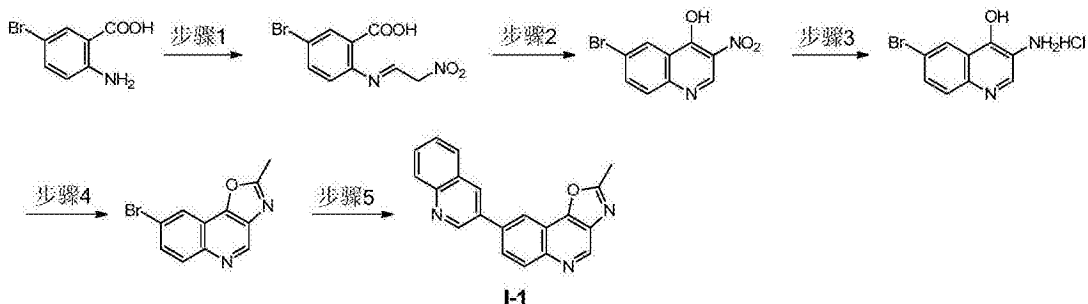
[0184] 本文所涉及的化合物包括但不局限于上述合成路线所给出的结构类型,熟知本领域技术的人员可通过适当的起始原料,应用类似的方法获得没有具体列举的化合物。

[0185] 实施例

[0186] 下面提供的实施例(用于制备本发明的化合物)和生物测试例(用于证明本发明化合物用途的检测)是为了帮助实践本发明,它们不应被认为是限制本发明的范围。

[0187] 实施例1:

[0188] 化合物I-1:2-甲基-8-(喹啉-3-基)噁唑并[4,5-c]喹啉的制备,反应式如下:



[0189]

[0190] 步骤1:将NaOH(18.6g,465mmol)的水(39mL)溶液冷却,滴加硝基甲烷(9.3g,153mmol),保持温度在25-30℃。滴毕,加热至40℃,然后冷却,再滴加硝基甲烷(9.325g,152.76mmol),保持温度在40-45℃。滴毕,保持在40-45℃直到固体完全消失,呈现红色澄清的溶液。然后将反应液加热至50-55℃反应2-5分钟,再将反应液降至30℃,倒入冰(21g)中,用浓盐酸(41.7mL)酸化,所得反应液迅速加入2-氨基-5-溴苯甲酸(30g,138.87mmol)的浓盐酸(13mL)和水(280mL)的混合溶液中,所得反应液室温下搅拌18小时。过滤,滤除物经水洗,干燥,得5-溴-2-((2-硝基乙基)氨基)苯甲酸(39.9g,100%粗品收率)。LC-MS(ESI⁺):287,289[M+1]⁺。

[0191] 步骤2:将5-溴-2-((2-硝基乙基)氨基)苯甲酸(19.93g,69.4mmol)加入醋酸酐(360mL)中,加入无水K₂CO₃(28.79g,208.276mmol),加热至90℃搅拌1小时,冷却,过滤,滤出物经水洗,干燥,所得3-硝基-4-羟基-6-溴喹啉(5.936g,31.7%)粗品直接用于下一步反应。LC-MS(ESI⁺):269,271[M+1]⁺。

[0192] 步骤3:将3-硝基-4-羟基-6-溴喹啉(4.0g,14.9mmol)溶于1N NaOH(148mL,148mmol)中,分批加入偏二亚硫酸钠(15.3g,87.7mmol)。加毕,反应液避光搅拌30分钟。冷却至0℃,用6N的盐酸酸化至pH=7左右,将产生的固体过滤,用少量丙酮洗涤,干燥,所得产物3-氨基-4-羟基-6-溴喹啉盐酸盐(3.07g,86%)粗品直接用于下一步反应。LC-MS(ESI⁺):239,241[M+1]⁺。

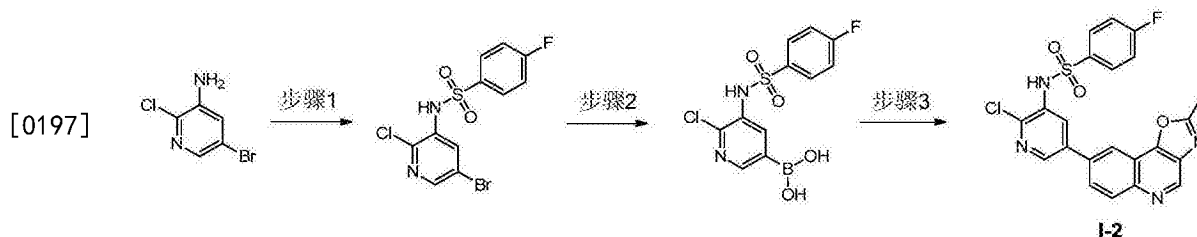
[0193] 步骤4:将3-氨基-4-羟基-6-溴喹啉盐酸盐(400mg,1.45mmol)溶于醋酸酐(5mL)中,加入无水醋酸钠(154mg,1.57mmol),加热至回流反应4小时。冷却至室温,加入浓硫酸(0.1mL),加热至回流搅拌2小时。反应混合物冷却至室温,倒入水(30mL)中,搅拌直到均相,加入浓氢氧化钠溶液,二氯甲烷萃取。二氯甲烷萃取液合并,用饱和食盐水洗涤,干燥,浓缩后柱层析(二氯甲烷:甲醇=100:1)得8-溴-2-甲基噁唑并[4,5-c]喹啉(262mg,69%)。LC-MS(ESI⁺):263,265[M+1]⁺。

[0194] 步骤5:8-溴-2-甲基噁唑并[4,5-c]喹啉(132mg,0.50mmol)溶于1,4-二氧六环

(10mL)和水(2.0mL)中,加入喹啉-3-硼酸(173mg,1.0mmol),Pd(dppf)Cl₂(36mg,0.05mmol)和Cs₂CO₃(489mg,1.50mmol)。氮气置换三次后加热至100℃反应3小时,冷却至室温,乙酸乙酯萃取,萃取液合并,无水硫酸钠干燥,浓缩,柱层析纯化(乙酸乙酯:石油醚=4:1)得2-甲基-8-(喹啉-3-基)噁唑并[4,5-c]喹啉(125mg,80%)。LC-MS(ESI⁺):312[M+1]⁺。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆)9.01(s,1H),8.62(d,1H,J=3.6Hz),8.32-7.98(m,5H),7.90-7.57(m,3H),2.77(s,3H)。

[0195] 实施例2:

[0196] 化合物I-2:N-(2-氯-5-(2-甲基噁唑并[4,5-c]喹啉-8-基)吡啶-3-基)-4-氟苯基磺酰胺的制备,反应式如下:



[0198] 步骤1:将2-氯-3-氨基-5-溴吡啶(500mg,2.46mmol)溶于THF(10mL)中,加入LiHMDS(7.4mL,7.4mmol),搅拌十分钟,再加入4-氟苯磺酰氯(1.44g,7.4mmol),室温下搅拌过夜。加入二氯甲烷(20mL)稀释,用饱和碳酸氢钠洗涤,用二氯甲烷(4×30mL)萃取,合并有机相,干燥,浓缩,残余物柱层析(石油醚:乙酸乙酯=20:1)得N-(5-溴-2-氯吡啶-3-基)-4-氟苯磺酰胺(770mg,87%)。LC-MS(ESI⁺):361,363[M+1]⁺。

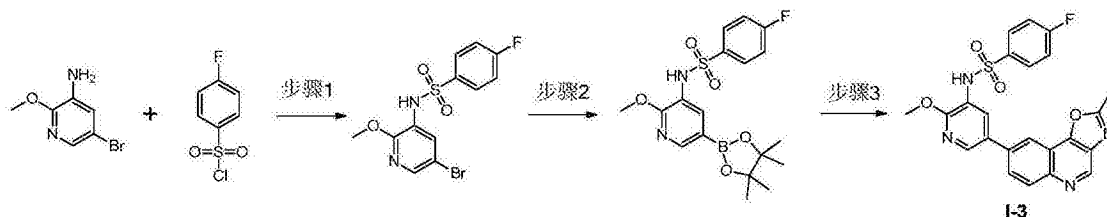
[0199] 步骤2:将N-(5-溴-2-氯吡啶-3-基)-4-氟苯磺酰胺(770mg,2.1mmol)溶于1,4-二氧六环(25mL)中,加入联硼酸频那醇酯(704mg,2.8mmol),Pd(dppf)Cl₂(156mg,0.213mmol)和KOAc(628mg,6.396mmol),氮气置换三次后加热至100℃搅拌3小时。冷却至室温,用乙酸乙酯(30mL)稀释,用水和饱和食盐水洗涤,干燥,浓缩,残余物柱层析(石油醚:乙酸乙酯=10:1)得(6-氯-5-(4-氟苯磺酰胺基)吡啶-3-基)硼酸(861mg,99%)。LC-MS(ESI⁺):331[M+1]⁺。

[0200] 步骤3:将8-溴-2-甲基噁唑并[4,5-c]喹啉(75mg,0.285mmol)溶于1,4-二氧六环(9mL)和水(1.5mL)中,加入(6-氯-5-(4-氟苯磺酰胺基)吡啶-3-基)硼酸(141mg,0.428mmol),Pd(dppf)Cl₂(21mg,0.029mmol)和Cs₂CO₃(279mg,0.855mmol)。氮气置换三次后加热至100℃反应3小时,冷却至室温,用二氯甲烷(30mL)稀释,加水萃取,先分离掉有机相,水相用1N盐酸调pH至7-8,再用二氯甲烷(3×10mL)萃取,二氯甲烷合并,无水硫酸钠干燥,浓缩,柱层析纯化(二氯甲烷:甲醇=80:1)得N-(2-氯-5-(2-甲基噁唑并[4,5-c]喹啉-8-基)吡啶-3-基)-4-氟苯基磺酰胺(91mg,68%)。LC-MS(ESI⁺):469[M+1]⁺。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆)9.24(s,1H),8.23(d,1H,J=9.0Hz),8.03(d,2H,J=9.9Hz),7.90(d,1H,J=10.8Hz),7.81(t,2H,J=6.9Hz),7.73(s,1H),7.28(t,2H,J=8.7Hz),2.80(s,3H)。

[0201] 实施例3:

[0202] 化合物I-3:4-氟-N-(2-甲氧基-5-(2-甲基噁唑并[4,5-c]喹啉-8-基)吡啶-3-基)苯磺酰胺的制备,反应式如下:

[0203]



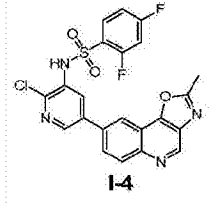

[0204] 步骤1:将2-甲氧基-3-氨基-5-溴吡啶(500mg, 2.5mmol)溶于四氢呋喃(10mL)中,加入LiHMDS(7.4mL, 7.4mmol),搅拌十分钟,再加入4-氟苯磺酰氯(1.44g, 7.4mmol),室温下搅拌过夜。加入二氯甲烷(20mL)稀释反应液,用饱和碳酸氢钠洗涤,无水硫酸钠干燥,浓缩,残余物柱层析(石油醚:乙酸乙酯=20:1)得N-(5-溴-2-甲氧基吡啶-3-基)-4-氟苯磺酰胺(770mg, 87%)。LC-MS(ESI⁺):361, 363[M+1]⁺。

[0205] 步骤2:将N-(5-溴-2-甲氧基吡啶-3-基)-4-氟苯磺酰胺(770mg, 2.1mmol)溶于1,4-二氧六环(25mL)中,加入联硼酸频那醇酯(704mg, 2.8mmol), Pd(dppf)Cl₂(156mg, 0.21mmol)和KOAc(628mg, 6.4mmol)。氮气置换三次后加热至100℃搅拌3小时,冷却至室温,用乙酸乙酯(30mL)稀释,用水和饱和食盐水洗涤,干燥,浓缩,残余物柱层析(石油醚:乙酸乙酯=10:1)得4-氟-N-(2-甲氧基-5-(频哪醇硼酸基)吡啶-3-基)苯磺酰胺(861mg, 99%)。LC-MS(ESI⁺):409[M+1]⁺。

[0206] 步骤3:将8-溴-2-甲基噁唑并[4,5-c]喹啉(75mg, 0.285mmol)溶于1,4-二氧六环(9mL)和水(1.5mL)中,加入4-氟-N-(2-甲氧基-5-(频哪醇硼酸基)吡啶-3-基)苯磺酰胺(177mg, 0.428mmol), Pd(dppf)Cl₂(21mg, 0.029mmol)和Cs₂CO₃(279mg, 0.855mmol)。氮气置换三次后加热至100℃反应3小时,冷却至室温,用二氯甲烷(30mL)稀释,加水萃取,先分离掉有机相,水相用1N盐酸调pH至7-8,再用二氯甲烷(3×10mL)萃取,该二氯甲烷溶液干燥,浓缩,残余物柱层析(二氯甲烷:甲醇=80:1)得4-氟-N-(2-甲氧基-5-(2-甲基噁唑并[4,5-c]喹啉-8-基)吡啶-3-基)苯磺酰胺(45mg, 34%)。LC-MS(ESI⁺):465[M+1]⁺; ¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆)10.12(br, 1H), 9.26(s, 1H), 8.51(s, 1H), 8.27(t, 2H, J=11.0Hz), 8.04(d, 2H, J=15.3Hz), 7.83(t, 2H, J=6.6Hz), 7.42(t, 2H, J=8.7Hz), 3.68(s, 3H), 2.79(s, 3H)。

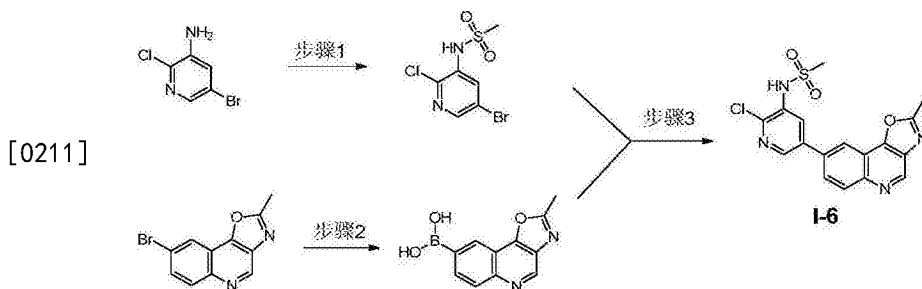
[0207] 仿照实施例2、3的方法,以2,4-二氟苯磺酰氯代替其中的4-氟苯磺酰氯,可分别制备得到如下I-4化合物和I-5化合物:

[0208]

| 实施例 | 化合物结构 | LC-MS | ¹ H NMR |
|-----|---|--------------|---|
| 4 |  | 487 [M+H] | (300 MHz, DMSO-d ₆) 9.26 (s, 1H), 8.27 (d, 1H, <i>J</i> = 9.0 Hz), 8.03 (d, 2H, <i>J</i> = 9.9 Hz), 7.90 (d, 1H, <i>J</i> = 10.8 Hz), 7.81 (t, 2H, <i>J</i> = 6.9 Hz), 7.73 (s, 1H), 7.29-7.32 (m, 1H), 2.81 (s, 3H)。 |
| 5 |  | 483 [M+H] | (300 MHz, DMSO-d ₆) 10.17 (br, 1H), 9.27 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.25-8.31 (m, 2H), 8.04-8.11 (m, 2H), 7.81-7.87 (m, 2H), 7.45-7.51 (m, 1H), 3.68 (s, 3H), 2.79 (s, 3H)。 |

[0209] 实施例6:

[0210] 化合物I-6:N-(2-氯-5-(2-甲基咪唑并[4,5-c]喹啉-8-基)吡啶-3-基)甲磺酰胺的制备,反应式如下:



[0212] 步骤1:将2-氯-3-氨基-5-溴吡啶(2.5g, 12.05mmol)溶于吡啶(30mL)中,加入甲烷磺酰氯(4.66mL, 60.25mmol),室温搅拌48小时。将反应液减压浓缩,残余物中加入甲醇(50mL)和1,4-二氧六环(50mL),再加入无水碳酸钾(16.65g, 120.5mmol),加热至60℃搅拌5小时。冷却至室温,将反应液倒入水中(500mL),用浓盐酸调至pH5。用乙酸乙酯萃取,合并有机相,分别用水,饱和食盐水洗涤,干燥,浓缩,残余物柱层析(石油醚:乙酸乙酯=10:1)得N-(5-溴-2-氯吡啶-3-基)甲磺酰胺(2.70g, 79%)。LC-MS(ESI⁺):285[M+1]。

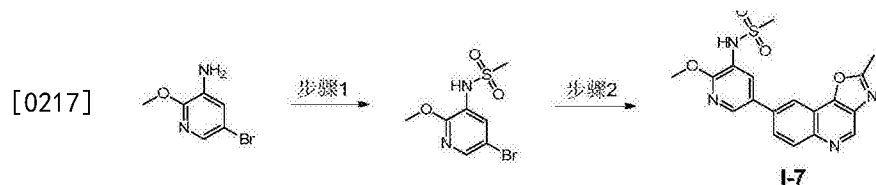
[0213] 步骤2:氮气保护将8-溴-2-甲基咪唑并[4,5-c]喹啉(2.63g, 10mmol)溶于1,4-二氧六环(100mL)中,加入联硼酸频那醇酯(5.08g, 20mmol), Pd(dppf)Cl₂(732mg, 1mmol), KOAc(1.47g, 15mmol),加热至100℃搅拌5小时,浓缩,经硅胶柱层析得(2-甲基咪唑并[4,5-c]喹啉-8-基)硼酸(2.12g, 93%)。

[0214] 步骤3:将(2-甲基咪唑并[4,5-c]喹啉-8-基)硼酸(114mg, 0.50mmol)溶于1,4-二氧六环(10mL)和水(1.5mL)中,加入N-(5-溴-2-氯吡啶-3-基)甲磺酰胺(157mg, 0.55mmol), Pd(dppf)Cl₂(37mg, 0.05mmol)及Cs₂CO₃(245mg, 0.75mmol),氮气充分置换后加热至100℃,搅拌1小时。冷却至室温,用1N的盐酸调节pH5-6,浓缩,经硅胶柱层析,得N-(2-氯-5-(2-甲

基噁唑并[4,5-c]喹啉-8-基)吡啶-3-基)甲磺酰胺(141mg,73%)。MS(ESI+):389[M+H];¹HNMR(300MHz,DMSO-d₆)10.03(br,1H),9.43(s,1H),9.05(s,1H),8.50-8.51(m,1H),7.93-8.21(m,3H),3.52(s,3H),2.85(s,3H)。

[0215] 实施例7:

[0216] 化合物I-7:N-(2-甲氧基-5-(2-甲基噁唑并[4,5-c]喹啉-8-基)吡啶-3-基)甲磺酰胺的制备,反应式如下:

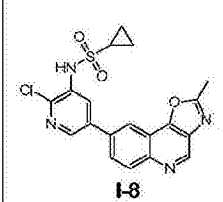


[0218] 步骤1:将2-甲氧基-3-氨基-5-溴吡啶(1g,4.925mmol)溶于吡啶(15mL)中,加入MsCl(1.9mL,24.626mmol),室温下搅拌48小时。将反应液浓缩干,残余物中加入甲醇(20mL)和1,4-二氧六环(20mL),再加入无水碳酸钾(16.81g,49.25mmol),加热至60℃反应5小时。将反应液倒入水中(100mL),用浓盐酸调节pH=5.用乙酸乙酯萃取,合并有机相,分别用水,饱和食盐水洗涤,干燥,浓缩,残余物柱层析(石油醚:乙酸乙酯=10:1)得N-(5-溴-2-甲氧基吡啶-3-基)甲磺酰胺(994mg,72%)。LC-MS(ESI+):281,283[M+1]⁺。

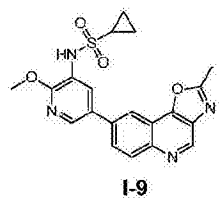
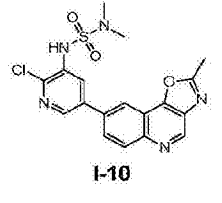
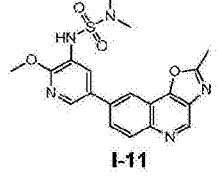
[0219] 步骤2:将(2-甲基噁唑并[4,5-c]喹啉-8-基)硼酸(114mg,0.50mmol)溶于1,4-二氧六环(10mL)和水(1.5mL)中,加入N-(5-溴-2-甲氧基吡啶-3-基)甲磺酰胺(154mg,0.55mmol),Pd(dppf)Cl₂(37mg,0.05mmol)及Cs₂CO₃(245mg,0.75mmol),氮气充分置换后加热至100℃,搅拌1小时。冷却至室温,用1N的盐酸调节pH5-6,浓缩,经硅胶柱层析,得N-(2-甲氧基-5-(2-甲基噁唑并[4,5-c]喹啉-8-基)吡啶-3-基)甲磺酰胺(117mg,61%)。MS(ESI+):385[M+H];¹HNMR(300MHz,DMSO-d₆)9.46(s,1H),9.01(s,1H),8.52(m,1H),7.91-8.07(m,3H),3.91(s,3H),3.52(s,3H),2.86(s,3H)。

[0220] 仿照实施例6和实施例7的方法,分别以环丙基磺酰氯(CAS:139631-62-2)和二甲基磺酰氯(CAS:13360-57-1)代替其中的甲基磺酰氯,可分别制备得到以下化合物I-8、化合物I-9、化合物I-10和、化合物I-11:

[0221]

| 实施例 | 化合物结构 | LC-MS | ¹ H NMR |
|-----|---|----------|---|
| 8 |  | 415[M+H] | (300 MHz, DMSO-d ₆) 10.03 (br, 1H), 9.43 (s, 1H), 9.05 (s, 1H), 8.50-8.51 (m, 1H), 7.93-8.21 (m, 3H), 2.87 (s, 3H), 2.78-2.83 (m, 1H), 0.93-0.96 (m, 4H)。 |

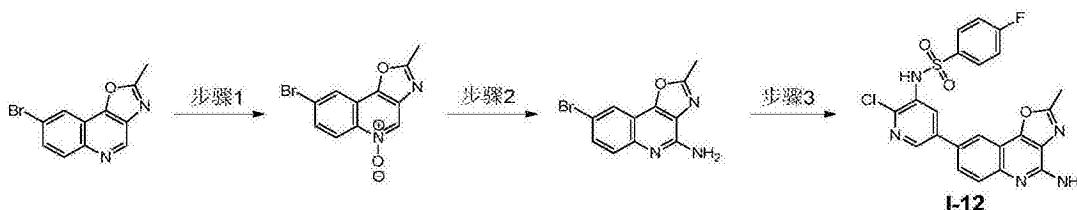
[0222]

| | | | |
|----|--|----------|--|
| 9 |  I-9 | 411[M+H] | (300 MHz, DMSO-d ₆) 9.46 (br, 1H), 8.93 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.13-7.90 (m, 4H), 3.99 (s, 3H), 2.89 (s, 3H), 2.79-2.81 (m, 1H), 0.93 - 0.96 (m, 4H) |
| 10 |  I-10 | 418[M+H] | (300 MHz, DMSO-d ₆) 9.93 (br, 1H), 9.02 (s, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.33-8.16 (m, 3H), 8.02-7.98 (m, 1H), 2.86 (s, 3H), 2.66 (s, 6H). |
| 11 |  I-11 | 414[M+H] | (300 MHz, DMSO-d ₆) 9.52 (br, 1H), 9.01 (s, 1H), 8.47-8.48 (s, 1H), 7.95-8.17 (m, 4H), 4.00 (s, 3H), 2.87 (s, 3H), 2.70 (s, 6H). |

[0223] 实施例12:

[0224] 化合物I-12:N-(5-(4-氨基-2-甲基噁唑并[4,5-c]喹啉-8-基)-2-氯吡啶-3-基)-4-氟苯基磺酰胺的制备,反应式如下:

[0225]



[0226] 步骤1:将8-溴-2-甲基噁唑并[4,5-c]喹啉(980mg,3.725mmol)溶于N,N-二甲基乙酰胺(15mL)和石油醚(30mL)的混合溶液中,分批加入mCPBA(1.021g,5.066mmol)。加毕,室温下搅拌2小时。补加mCPBA(481mg,0.64mmol),继续搅拌1.5小时。过滤,滤除物经N,N-二甲基乙酰胺/石油醚=1/2(20mL)洗涤,干燥后溶解于二氯甲烷(40mL)、甲醇(20mL)和水(20mL)的混合溶液中,加入碳酸钾(612mg,4.428mmol),搅拌反应30分钟,分离掉有机相,水相用二氯甲烷萃取三次,合并有机相,用饱和食盐水洗,干燥,浓缩,残余物柱层析(二氯甲烷:甲醇=80:1),得8-溴-2-甲基噁唑并[4,5-c]喹啉-5-N氧化物(702mg,56%)。LC-MS(ESI⁺):279,281[M+1]⁺。

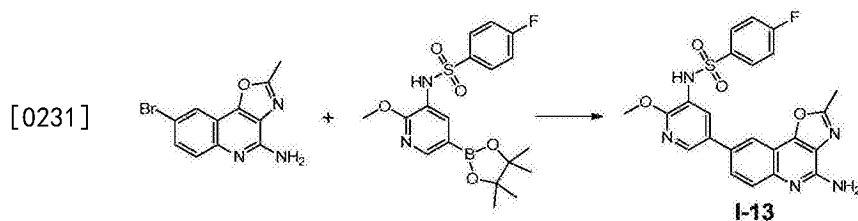
[0227] 步骤2:8-溴-2-甲基噁唑并[4,5-c]喹啉-5-N氧化物(600mg,2.15mmol)溶于二氯甲烷(40mL)和甲醇(20mL)的混合溶剂中,冷却至0℃,加入氨水(5mL),再滴加对甲基苯磺酰氯(1.23g,6.45mmol)的二氯甲烷(10mL)溶液。滴毕升至室温搅拌2小时。将反应液浓缩干,残余物柱层析(二氯甲烷:甲醇=20:1)得8-溴-2-甲基噁唑并[4,5-c]喹啉-4-氨基(255mg,42%)。LC-MS(ESI⁺):278,280[M+1]⁺。

[0228] 步骤3:将8-溴-2-甲基噁唑并[4,5-c]喹啉-4-氨基(100mg,0.36mmol)溶于1,4-二氧六环(9mL)和水(1.5mL)中,加入(6-氯-5-(4-氟苯磺酰胺基)吡啶-3-基)硼酸(178mg,

0.539mmol), Pd(dppf)Cl₂(26mg, 0.036mmol)和Cs₂CO₃(176mg, 0.539mmol)。氮气置换三次后加热至100℃反应3小时,冷却至室温,用二氯甲烷(30mL)稀释,加水萃取,先分离掉有机相,水相用1N盐酸调pH至7-8,再用二氯甲烷(3×10mL)萃取,该二氯甲烷溶液干燥,浓缩,残余物经柱层析分离(二氯甲烷:甲醇=40:1)得N-(5-(4-氨基-2-甲基噁唑并[4,5-c]喹啉-8-基)-2-氯吡啶-3-基)-4-氟苯基磺酰胺(54mg, 31%)。LC-MS(ESI⁺): 484[M+1]⁺; ¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆)δ8.66(s, 1H), 8.06(s, 1H), 7.98(s, 1H), 7.79-7.83(m, 3H), 7.68-7.72(m, 1H), 7.45(t, 2H, J=6.0Hz), 7.26(br, 2H), 2.73(s, 3H)。

[0229] 实施例13:

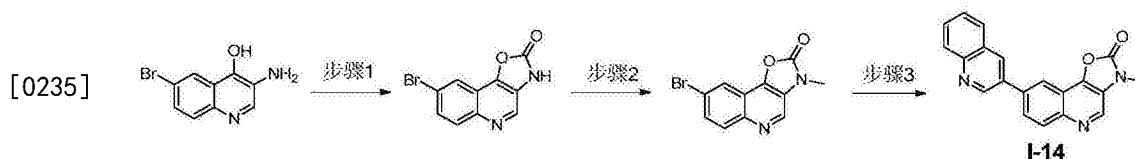
[0230] 化合物I-13:N-(5-(4-氨基-2-甲基噁唑并[4,5-c]喹啉-8-基)-2-甲氧基吡啶-3-基)-4-氟苯磺酰胺的制备,反应式如下:



[0232] 步骤:将8-溴-2-甲基噁唑并[4,5-c]喹啉-4-氨基(100mg, 0.36mmol)溶于1,4-二氧六环(9mL)和水(1.5mL)中,加入4-氟-N-(2-甲氧基-5-(频哪醇硼酸酯基)吡啶-3-基)苯磺酰胺(220mg, 0.539mmol), Pd(dppf)Cl₂(26mg, 0.036mmol)和Cs₂CO₃(176mg, 0.539mmol)。氮气置换三次后加热至100℃反应3小时,冷却至室温,用二氯甲烷(30mL)稀释,加水萃取,先分离掉有机相,水相用1N盐酸调pH至7-8,再用二氯甲烷(3×10mL)萃取,该二氯甲烷溶液干燥,浓缩,残余物经柱层析分离(二氯甲烷:甲醇=40:1)得N-(5-(4-氨基-2-甲基噁唑并[4,5-c]喹啉-8-基)-2-甲氧基吡啶-3-基)-4-氟苯磺酰胺(92mg, 53%)。LC-MS(ESI⁺): 480[M+1]⁺; ¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆)δ10.06(br, 1H), 8.37(s, 1H), 7.65-7.95(m, 6H), 7.42(t, 2H, J=8.9Hz), 7.05(br, 2H), 3.66(s, 3H), 2.72(s, 3H)。

[0233] 实施例14:

[0234] 化合物I-14:3-甲基-8-(喹啉-3-基)噁唑并[4,5-c]喹啉-2(3H)-酮的制备,反应式如下:



[0236] 步骤1:氮气保护,将3-氨基-4-羟基-6-溴喹啉(3.0g, 12.5mmol)溶于THF(100mL)中,加热至回流。在回流状态下,分批加入羰基二咪唑(2.64g, 16.29mmol),加毕继续回流搅拌3小时。冷却至室温,过滤,固体用二氯甲烷(50mL)洗,干燥,得8-溴-噁唑并[4,5-c]喹啉-2(3H)-酮粗品。

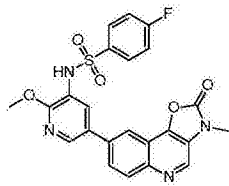
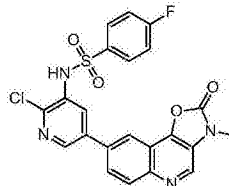
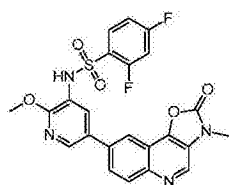
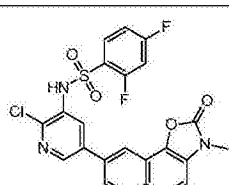
[0237] 步骤2:将8-溴-噁唑并[4,5-c]喹啉-2(3H)-酮(2.3g, 4.35mmol)溶于N,N-二甲基甲酰胺(60mL)中,冰水浴降温,加入NaH(60%, 699mg, 8.69mmol),搅拌20分钟。滴加碘甲烷(1.23g, 4.35mmol),加毕升至室温搅拌1小时。冰水冷却,以1N的盐酸淬灭,并调节体系至pH5-6,加水(300mL),用乙酸乙酯萃取(3×100mL),乙酸乙酯相合并,饱和食盐水洗,无水硫

酸钠干燥,浓缩。残余物经硅胶柱层析纯化得8-溴-3-甲基噁唑并[4,5-c]喹啉-2(3H)-酮(600mg,两步收率17%)。

[0238] 步骤3:8-溴-3-甲基噁唑并[4,5-c]喹啉-2(3H)-酮(140mg,0.50mmol)溶于1,4-二氧六环(10mL)和水(2.0mL)中,加入喹啉-3-硼酸(173mg,1.0mmol),Pd(dppf)Cl₂(36mg,0.05mmol)和Cs₂CO₃(489mg,1.50mmol)。氮气置换三次后加热至100℃反应3小时,冷却至室温,乙酸乙酯萃取,萃取液合并,无水硫酸钠干燥,浓缩,柱层析纯化(乙酸乙酯:石油醚=3:1)得3-甲基-8-(喹啉-3-基)噁唑并[4,5-c]喹啉-2(3H)-酮(116mg,71%)。MS(ESI⁺):328[M+1]⁺。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆)9.07(s,1H),8.65(d,1H,J=3.6Hz),8.33-8.01(m,5H),7.90-7.61(m,3H),3.50(s,3H)。

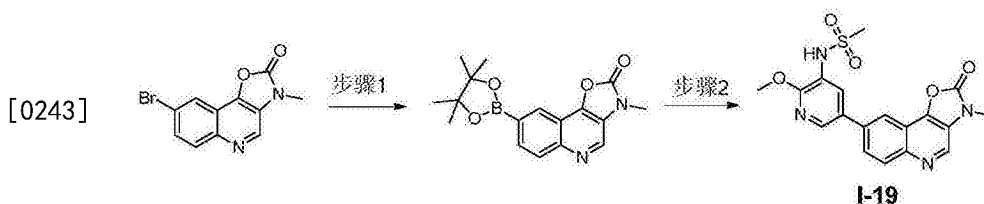
[0239] 仿照实施例14的方法,将8-溴-3-甲基噁唑并[4,5-c]喹啉-2(3H)-酮分别与4-氟-N-(2-甲氧基-5-(频哪醇硼酸基)吡啶-3-基)苯磺酰胺,(6-氯-5-(4-氟苯磺酰胺基)吡啶-3-基)硼酸,2,4-二氟-N-(2-甲氧基-5-(频哪醇硼酸基)吡啶-3-基)苯磺酰胺,(6-氯-5-(2,4-二氟苯磺酰胺基)吡啶-3-基)硼酸进行Suzuki偶联反应,可分别制备下表中的化合物I-15、化合物I-16、化合物I-17和化合物I-18:

[0240]

| 实施例 | 化合物结构 | LC-MS | ¹ H NMR |
|-----|--|--------------|--|
| 15 |  I-15 | 481 [M+H] | (300 MHz, DMSO-d ₆) 10.10 (br, 1H) 9.00 (s, 1H), 8.49 (s, 1H), 7.95-8.16 (m, 4H), 7.78-7.81 (m, 2H), 7.39-7.40 (m, 2H), 3.66 (s, 3H), 3.52 (s, 3H). |
| 16 |  I-16 | 485 [M+H] | (300 MHz, DMSO-d ₆) 10.56 (br, 1H) 9.03 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 7.98 - 8.31 (m, 4H), 7.76 - 7.84 (m, 2H), 7.38 - 7.45 (m, 2H), 3.52 (s, 3H). |
| 17 |  I-17 | 499 [M+H] | (300 MHz, DMSO-d ₆) 10.37 (br, 1H) 9.01 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.08 - 8.22 (m, 3H), 7.98 - 8.01 (m, 1H), 7.74 - 7.76 (m, 1H), 7.54 - 7.61 (m, 1H), 7.16 - 7.23 (m, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.52 (s, 3H). |
| 18 |  I-18 | 503 [M+H] | (300 MHz, DMSO-d ₆) 10.98 (br, 1H) 9.06 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 8.37 - 8.38 (m, 1H), 8.30 (m, 1H), 8.18 - 8.21 (m, 1H), 8.02 - 8.06 (m, 1H), 7.78 - 7.81 (m, 1H), 7.55 - 7.63 (m, 1H), 7.20 - 7.25 (m, 1H), 3.52 (s, 3H). |

[0241] 实施例19:

[0242] 化合物I-19:N-(2-甲氧基-5-(3-甲基-2-氧代-2,3-二氢噁唑并[4,5-c]喹啉-8-基)吡啶-3-基)甲基磺酰胺的制备,反应式如下:

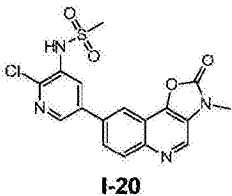
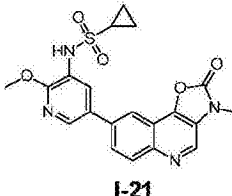
[0244] 步骤1:氮气保护将8-溴-3-甲基噁唑并[4,5-c]喹啉-2(3H)-酮(1.08g,3.87mmol)溶于1,4-二氧六环(100mL)中,加入联硼酸频那醇酯(1.97g,7.74mmol),Pd(dppf)Cl₂

(281mg, 0.389mmol), KOAc(725mg, 5.80mmol), 加热至100℃搅拌5小时, 浓缩, 经硅胶柱层析得3-甲基-8-频哪醇硼酸酯基-噁唑并[4,5-c]喹啉-2(3H)-酮(1.2g, 95%)。

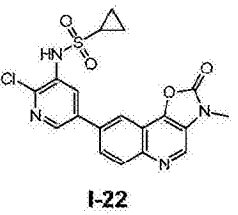
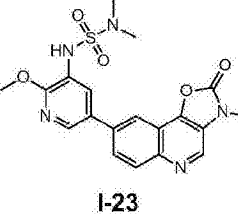
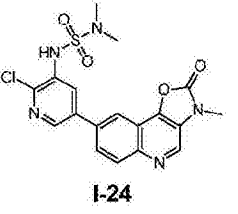
[0245] 步骤2: 氮气保护, 将3-甲基-8-频哪醇硼酸酯基-噁唑并[4,5-c]喹啉-2(3H)-酮(100mg, 0.306mmol)溶于1,4-二氧六环(9mL)和水(1.5mL)中, 加入N-(5-溴-2-甲氧基吡啶-3-基)甲磺酰胺(95mg, 0.337mmol), Pd(dppf)Cl₂(23mg, 0.031mmol)及Cs₂CO₃(150mg, 0.460mmol), 加热至100℃, 搅拌1小时。冷却至室温, 用1N的盐酸调节pH5-6, 浓缩, 经硅胶柱层析, 得N-(2-甲氧基-5-(3-甲基-2-氧代-2,3-二氢噁唑并[4,5-c]喹啉-8-基)吡啶-3-基)甲基磺酰胺(86mg, 70%)。MS(ESI⁺): 401[M+H]; ¹HNMR(300MHz, DMSO-d₆)9.42(s, 1H), 9.00(s, 1H), 8.50-8.51(m, 1H), 7.98-8.22(m, 3H), 3.98(s, 3H), 3.51(s, 3H), 3.11(s, 3H)。

[0246] 仿照实施例19的方法, 将3-甲基-8-频哪醇硼酸酯基-噁唑并[4,5-c]喹啉-2(3H)-酮分别与相应的溴代吡啶基磺酰胺进行Suzuki偶联, 可分别制备得到下表中的化合物I-20、化合物I-21、化合物I-22、化合物I-23、化合物I-24:

[0247]

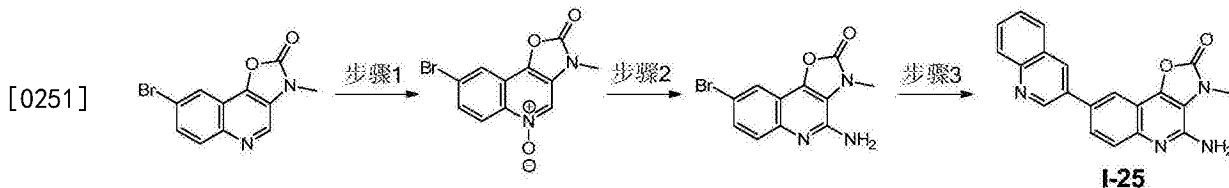
| 实施例 | 化合物结构 | LC-MS | ¹ H NMR |
|-----|--|--------------|--|
| 20 |  <p style="text-align: center;">I-20</p> | 405 [M+H] | (300 MHz, DMSO-d ₆) 9.91 (br, 1H), 9.03 (s, 1H), 8.76 - 8.77 (m, 1H), 8.36 - 8.37 (m, 1H), 8.26 - 8.27 (m, 1H), 8.15 - 8.19 (m, 1H), 8.03 - 8.07 (m, 1H), 3.51 (s, 3H), 3.19 (s, 3H) |
| 21 |  <p style="text-align: center;">I-21</p> | 427 [M+H] | (300 MHz, DMSO-d ₆) 9.44 (br, 1H), 8.96 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.16- 7.92 (m, 4H), 3.98 (s, 3H), 3.49 (s, 3H), 2.79-2.81 (m, 1H), 0.93 - 0.96 (m, 4H) |

[0248]

| | | | |
|----|--|--------------|--|
| 22 |  I-22 | 431 [M+H] | (300 MHz, DMSO-d ₆) 9.97 (br, 1H), 9.04 (s, 1H), 8.81-8.82 (s, 1H), 8.04-8.38 (m, 4H), 3.52 (s, 3H), 2.86-2.91 (m, 1H), 0.94-0.99 (m, 4H). |
| 23 |  I-23 | 430 [M+H] | (300 MHz, DMSO-d ₆) 9.49 (br, 1H), 9.00 (s, 1H), 8.47-8.48 (s, 1H), 7.95-8.17 (m, 4H), 4.00 (s, 3H), 3.51 (s, 3H), 2.71 (s, 6H). |
| 24 |  I-24 | 434 [M+H] | (300 MHz, DMSO-d ₆) 9.93 (br, 1H), 9.02 (s, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.33-8.16 (m, 3H), 8.02-7.98 (m, 1H), 3.51 (s, 3H), 2.76 (s, 6H). |

[0249] 实施例25:

[0250] 化合物I-25:4-氨基-3-甲基-8-(喹啉-3-基)噁唑并[4,5-c]喹啉-2(3H)-酮的制备,反应式如下:



[0252] 步骤1:将8-溴-3-甲基噁唑并[4,5-c]喹啉-2(3H)-酮(2.80g,10mmol)溶于N,N-二甲基乙酰胺(28mL)和石油醚(56mL)的混合溶液中,分批加入mCPBA(4.03g,20mmol)。加毕,室温下搅拌2小时。过滤,滤除物经N,N-二甲基乙酰胺/石油醚=1/2(50mL)洗涤,干燥后溶于二氯甲烷(80mL)、甲醇(40mL)和水(40mL)的混合溶液中,加入碳酸钾(2.07g,15mmol),室温搅拌30分钟。静置,分出有机相,水相用二氯甲烷萃取,合并有机相,用饱和食盐水洗,干燥,浓缩,残余物柱层析(二氯甲烷:甲醇=80:1),得8-溴-3-甲基-2-氧-2,3-二氢噁唑并[4,5-c]喹啉-5-氮氧化物(1.21g,41%)。

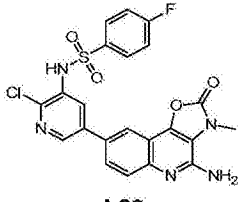
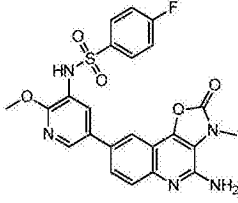
[0253] 步骤2:8-溴-3-甲基-2-氧-2,3-二氢噁唑并[4,5-c]喹啉-5-氮氧化物(1.21g,4.1mmol)溶于二氯甲烷(60mL)和甲醇(30mL)的混合溶剂中,冷却至0℃,加入氨水(10mL),再滴加对甲基苯磺酰氯(2.35g,12.3mmol)的二氯甲烷(20mL)溶液。滴毕升至室温搅拌2小时。将反应液浓缩干,残余物柱层析(二氯甲烷:甲醇=20:1)得4-氨基-8-溴-3-甲基噁唑并[4,5-c]喹啉-2(3H)-酮(470mg,39%)。LC-MS(ESI⁺):294,296[M+1]⁺。

[0254] 步骤3:4-氨基-8-溴-3-甲基噁唑并[4,5-c]喹啉-2(3H)-酮(147mg,0.50mmol)溶于1,4-二氧六环(10mL)和水(2.0mL)中,加入喹啉-3-硼酸(173mg,1.0mmol),Pd(dppf)Cl₂(36mg,0.05mmol)和Cs₂CO₃(489mg,1.50mmol)。氮气置换三次后加热至100℃反应3小时,冷

却至室温,乙酸乙酯萃取,萃取液合并,无水硫酸钠干燥,浓缩,柱层析纯化(二氯甲烷:甲醇=50:1)得4-氨基-3-甲基-8-(喹啉-3-基)噁唑并[4,5-c]喹啉-2(3H)-酮(80mg,47%)。MS (ESI+):343[M+1]⁺。¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆)8.67(d,1H,J=3.6Hz),8.34-8.03(m,5H),7.90-7.61(m,3H),6.49(br,2H),3.51(s,3H)。

[0255] 仿照实施例25的方法,将4-氨基-8-溴-3-甲基噁唑并[4,5-c]喹啉-2(3H)-酮分别与(6-氯-5-(4-氟苯磺酰胺基)吡啶-3-基)硼酸、4-氟-N-(2-甲氧基-5-(频哪醇硼酸基)吡啶-3-基)苯磺酰胺进行Suzuki偶联反应,可分别制备得到化合物I-26、化合物I-27:

[0256]

| 实施例 | 化合物结构 | LC-MS | ¹ H NMR |
|-----|---|--------------|---|
| 26 |  I-26 | 500 [M+H] | (300 MHz, DMSO-d ₆) 10.16 (br, 1H), 8.59 (s, 1H), 7.98-8.31 (m, 4H), 7.76-7.84 (m, 2H), 7.38-7.45 (m, 2H), 6.59 (br, 2H), 3.39 (s, 3H). |
| 27 |  I-27 | 496 [M+H] | (300 MHz, DMSO-d ₆) 10.01 (br, 1H), 8.52 (s, 1H), 7.95-8.16 (m, 4H), 7.78-7.81 (m, 2H), 7.39-7.40 (m, 2H), 6.72 (br, 2H), 3.66 (s, 3H), 3.41 (s, 3H). |

[0257] 本领域人员可以根据本领域已知的常识将上述的中间体进行不同组合制备本发明化合物,或通过制备上述中间体显而易见的类似物并进行本方面所述通式(IA)、(IB)化合物的制备。

[0258] 生物学实施例1:

[0259] 本发明化合物对PI3K α 、PI3K β 、PI3K δ 、PI3K γ 和mTOR的半数抑制浓度(IC₅₀)测定

[0260] 1.原料

[0261] p110 α /p85a,购自Invitrogen,cat No.PV4788;

[0262] p110 δ /p85a,购自Millipore,cat No.14-604-K;

[0263] p110 β ,购自Millipore,cat No.14-603-K;

[0264] p110 γ ,购自Invitrogen,cat No.PR8641C;

[0265] mTOR,购自Millipore,cat No.14-770;

[0266] Kinase-Glo Plus Luminescence-Kinase Assay,购自Promega,cat No.V3771;

[0267] ADP-Glo Kinase Assay,购自Promega,cat No.v9102/3;

[0268] 2.实验方法

[0269] 2.1化合物稀释

[0270] 1)化合物检测终浓度为1 μ M,首先配置成100倍浓度,即100 μ M。在96孔板的第一行孔中分别加入10 μ L的10mM化合物,加入90 μ L的100%DMSO,配成100 μ L的1mM化合物。在96孔板的第二行孔中分别加入10 μ L的1mM化合物,加入90 μ L的100%DMSO,配成100 μ L的100 μ M化合物。

- [0271] 2)在另一96孔板的第二列孔中加入100 μ L上述100 μ M化合物,其他孔加入60 μ L的100%DMSO。从第2孔中取30 μ L化合物加入第3孔中,依次往下做3倍稀释,共稀释8个浓度。
- [0272] 3)第一孔和第十二孔中分别加入100 μ L100%DMSO。
- [0273] 2.2化合物中间稀释
- [0274] 1)转移4 μ L化合物到一个新的96孔板中
- [0275] 2)加入96 μ L的1x的激酶缓冲液
- [0276] 3)在振荡板上振荡混匀10分钟。
- [0277] 2.3转移化合物到反应板
- [0278] 从上述96孔板中取出2.5 μ L到一块384孔反应板中,例如,96孔板的A1孔转移到384孔板的A1和A2孔中,96孔板的A2孔转移到384孔板的A3和A4孔中,以此类推。
- [0279] 3. 配制1x激酶缓冲液
- [0280] 1)1x mTOR激酶缓冲液
- [0281] 50mM HEPES, pH7.5
- [0282] 10mM MgCl₂
- [0283] 1mM EGTA
- [0284] 3mM MnCl
- [0285] 0.01%Tween-20
- [0286] 2mM DTT
- [0287] 2)1x PI3K α ,PI3K δ 激酶缓冲液
- [0288] 50mM HEPES, pH7.5
- [0289] 3mM MgCl₂
- [0290] 1mM EGTA
- [0291] 100mM NaCl
- [0292] 0.03%CHAPS
- [0293] 2mM DTT
- [0294] 3)1x PI3K β ,PI3K γ 激酶缓冲液
- [0295] 50mM HEPES, pH7.5
- [0296] 3mM MgCl₂
- [0297] 1mM EGTA
- [0298] 100mM NaCl
- [0299] 0.03%CHAPS
- [0300] 2mM DTT
- [0301] 4. 配制4x激酶溶液
- [0302] 1)使用1倍激酶缓冲液配置4倍mTOR溶液、PI3K α 溶液、PI3K β 溶液、PI3K γ 溶液和PI3K δ 溶液。激酶溶液终浓度分别为mTOR2.5nM;PI3K α 1.65nM;PI3K β 4.8nM;PI3K γ 7.6nM;PI3K δ 5.7nM。
- [0303] 2)转移2.5mL4倍酶溶液到384孔板反应孔中,阴性对照孔加入1倍激酶缓冲液。
- [0304] 3)振荡,混匀,室温下静置
- [0305] 5. 配制2x底物溶液

- [0306] 1)使用1倍激酶缓冲液配置2倍底物溶液。mTOR、PI3K α 、PI3K β 、PI3K γ 和PI3K δ 五个酶反应体系的底物溶液终浓度分别为
- [0307] mTOR:ULight-4E-BP150nM;ATP10.8 μ M。
- [0308] PI3K α :PIP250 μ M;ATP25 μ M。
- [0309] PI3K β :PIP250 μ M;ATP25 μ M。
- [0310] PI3K γ :PIP250 μ M;ATP25 μ M。
- [0311] PI3K δ :PIP250 μ M;ATP25 μ M。
- [0312] 2)转移5 μ L2倍底物溶液到384孔板反应孔中起始反应
- [0313] 3)振荡,混匀。
- [0314] 6. 激酶反应
- [0315] 将384孔板盖上盖子,于室温下孵育,mTOR、PI3K α 、PI3K β 和PI3K γ 1小时,PI3K δ 2小时。
- [0316] 7. 反应结果的检测
- [0317] 7.1mTOR结果检测
- [0318] 1)将检测试剂平衡到室温。
- [0319] 2)转移10 μ L检测试剂到384孔板反应孔中终止反应。
- [0320] 3)在振板机上轻轻振荡15分钟。室温下平衡1小时。
- [0321] 7.2PI3K α 和PI3K δ 结果检测
- [0322] 1)将Kinase-Glo检测试剂平衡到室温。
- [0323] 2)转移10 μ L Kinase-Glo检测试剂到384孔板反应孔中终止反应。
- [0324] 3)在振板机上轻轻振荡15分钟。
- [0325] 7.3PI3K β 和PI3K γ 结果检测
- [0326] 1)将ADP-Glo试剂平衡到室温。
- [0327] 2)转移5 μ L反应液到一块新的384孔板反应孔中。
- [0328] 3)转移5 μ L ADP-Glo试剂到384孔板反应孔中终止反应。
- [0329] 4)在振板机上轻轻振荡40分钟。
- [0330] 5)转移10 μ L激酶检测试剂到每个反应孔中,振荡1分钟,室温静置1小时。
- [0331] 8. 数据读取
- [0332] 在Envision读取样品发光数值。
- [0333] 9. 曲线拟合
- [0334] 1)从Envision程序上复制发光读数的数据
- [0335] 2)将发光读数的值通过公式转换为抑制百分率。
- [0336] mTOR转换公式:
- [0337] $\text{Percent inhibition} = (\text{Lance signal} - \text{min}) / (\text{max} - \text{min}) * 100$
- [0338] PI3K α 、PI3K β 、PI3K γ 和PI3K δ 转换公式:
- [0339] $\text{Percent inhibition} = (\text{max} - \text{conversion}) / (\text{max} - \text{min}) * 100$
- [0340] “max”为不加酶进行反应的对照样荧光读数;“min”为加入DMSO作为对照的样品荧光读数。
- [0341] 3)将数据导入MS Excel并使用Graphpad5.0进行曲线拟合。

[0342] 本发明部分化合物对PI3K α 、PI3K β 、PI3K γ 、PI3K δ 和mTOR五个酶的IC₅₀测试结果如下表所示：

[0343]

| 化合物 | A: IC ₅₀ < 20 nM; B: 20 nM < IC ₅₀ < 100 nM; “-” : 未测试 | | | | |
|------|--|--------------|---------------|---------------|------|
| | PI3K α | PI3K β | PI3K γ | PI3K δ | mTOR |
| I-1 | A | B | B | B | A |
| I-2 | A | A | A | A | A |
| I-3 | A | A | A | A | A |
| I-4 | A | A | A | A | A |
| I-5 | A | A | A | A | A |
| I-6 | A | A | A | A | A |
| I-7 | A | A | A | A | A |
| I-8 | A | A | A | A | A |
| I-9 | A | A | A | A | A |
| I-10 | A | A | A | A | A |
| I-11 | A | A | A | A | A |
| I-12 | A | B | B | A | B |
| I-13 | A | B | A | A | A |
| I-14 | A | B | A | A | B |
| I-15 | A | A | A | A | A |
| I-16 | A | A | A | A | A |

[0344]

| 化合物 | A: $IC_{50} < 20 \text{ nM}$; B: $20 \text{ nM} < IC_{50} < 100 \text{ nM}$; “-” : 未测 | | | | |
|------|---|--------------|---------------|---------------|------|
| | PI3K α | PI3K β | PI3K γ | PI3K δ | mTOR |
| I-17 | A | A | A | A | B |
| I-18 | A | A | A | A | B |
| I-19 | A | - | - | - | A |
| I-20 | A | - | - | - | A |
| I-21 | A | - | - | - | A |
| I-22 | A | - | - | - | A |
| I-23 | A | - | - | - | A |
| I-24 | A | - | - | - | A |
| I-25 | A | - | - | - | A |
| I-26 | A | - | - | - | A |
| I-27 | A | - | - | - | A |

[0345] 生物学实施例2:采用Cell Titer-Glo荧光素酶试剂盒测定本发明化合物对肿瘤细胞增殖半数抑制浓度(IC_{50})

[0346] 1. 原料

[0347] U-87MG细胞株,购自ATCC,Cat.No.HTB-14,Lot No.5018014;

[0348] A549细胞株,购自ATCC,Cat.No.CCL-185,Lot No.7502546;

[0349] PC-3细胞株,购自ATCC,Cat.No.CRL-1435,Lot No.7348670;

[0350] BT474细胞株,购自ATCC,Cat.No.HTB-20,Lot No.5188737;

[0351] F-12K培养液,购自Invitrogen,Cat.No.21127-022;

[0352] EMEM培养液,购自Invitrogen,Cat.No.11095;

[0353] 96孔板,购自Corning,Cat.No.CLS3903;

[0354] CellTiter Glo assay kit,购自Promega,Cat.No.G7571,Lot.No.256984;

[0355] 胎牛血清,购自Invitrogen,Cat.No.10099-141,Lot.No.8153379。

[0356] 2. 实验方法

[0357] 2.1 细胞铺板

[0358] 配制完全培养基:,充分混匀。

[0359] 选择生长状态良好的细胞株。

[0360] 将细胞培养瓶从培养箱中取出,核对瓶上标记的细胞名称,培养基类型及细胞代数。

[0361] 弃去培养基,用胰酶消化,消化完后,用含血清的培养基中和,吹打细胞,使细胞脱

落。用移液管将细胞悬液移入离心管中,800-1000的转速离心3—5分钟。

[0362] 吸弃离心管中的细胞上清液。

[0363] 向离心管中加适当体积的培养基,轻柔吹打使细胞重悬均匀。

[0364] 使用Vi-Cell XR细胞计数仪计数。

[0365] 将细胞悬液调至合适浓度。

[0366] 将细胞悬液加入底透壁白的96孔板中,100uL/孔。标记细胞名称,种板密度,日期等详细信息,将培养板放置于CO₂培养箱中过夜。

[0367] 2.2细胞实验条件:

[0368]

| 细胞株 | 每孔数目 | 孵育时间 | 介质 |
|--------|------|------|--------------------------|
| U-87MG | 3000 | 72h | EMEM+10%FBS+1%PS+1x NEAA |
| A549 | 2000 | 72h | F12K+10%FBS+1%PS |
| PC-3 | 3000 | 72h | F12K+10%FBS+1%PS |
| BT474 | 4000 | 96h | Hybri-cate+10%FBS+1%PS |

[0369] 2.3化合物的准备和添加:

[0370] 化合物粉末先用DMSO配制成10mM浓度储存液,再用DMSO将化合物3倍梯度稀释稀释成9个浓度点(该9个点均为中间浓度)。

[0371] 从上述的中间浓度取0.5uL的化合物溶液,添加到500uL培养液中,吹打混匀,DMSO终浓度为0.1%,配成最终浓度的含化合物培养基。

[0372] 细胞换液时添加含有不同化合物的培养基。

[0373] 在37℃培养箱中孵育规定时间。

[0374] 2.4检测及分析

[0375] 在倒置显微镜下观察细胞形态。

[0376] 将细胞培养板放置室温中平衡30分钟。

[0377] 将细胞活性检测试剂100μL/孔加入培养板中。

[0378] 在振板机上混匀2分钟,诱导细胞裂解。

[0379] 将96孔板在室温中放置10分钟,使其发光信号稳定。

[0380] 粘贴白色的底膜于培养板底部,使用Flexstation3测板。(相关设置为:发光,整合时间500ms)。

[0381] 记录分析所得的实验结果。

[0382] 根据软件分析结果,本发明部分化合物的细胞增殖抑制活性结果如下表:

[0383]

| 化合物 | A: $IC_{50} < 1 \mu M$; B: $1 \mu M < IC_{50} < 10 \mu M$; “-” ; 未测试 | | | |
|------|--|------|------|-------|
| | U-87MG | A549 | PC-3 | BT474 |
| I-1 | B | B | A | A |
| I-2 | B | A | A | A |
| I-3 | A | A | A | A |
| I-4 | A | A | A | A |
| I-5 | A | A | A | A |
| I-6 | A | - | - | A |
| I-7 | A | - | - | A |
| I-8 | A | - | - | A |
| I-9 | B | B | B | A |
| I-10 | B | B | B | A |
| I-11 | B | B | - | - |
| I-12 | B | B | - | - |
| I-13 | B | B | B | A |
| I-14 | B | B | B | A |
| I-15 | - | - | A | A |
| I-16 | - | - | A | A |
| I-17 | - | - | A | A |
| I-18 | - | - | A | A |
| I-19 | - | - | B | B |

[0384]

| 化合物 | A: $IC_{50} < 1 \mu M$; B: $1 \mu M < IC_{50} < 10 \mu M$; “-” ; 未测试 | | | |
|------|--|------|------|-------|
| | U-87MG | A549 | PC-3 | BT474 |
| I-20 | - | - | B | B |
| I-21 | - | - | B | B |
| I-22 | - | - | A | A |
| I-23 | - | - | B | B |
| I-24 | - | - | B | B |
| I-25 | - | - | A | A |
| I-26 | - | - | A | A |
| I-27 | - | - | B | A |