

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 31/4545 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680045478.X

[43] 公开日 2008年12月10日

[11] 公开号 CN 101321527A

[22] 申请日 2006.11.23

[21] 申请号 200680045478.X

[30] 优先权

[32] 2005.12.5 [33] US [31] 60/742,766

[32] 2006.11.7 [33] US [31] 60/864,637

[86] 国际申请 PCT/IB2006/003397 2006.11.23

[87] 国际公布 WO2007/066187 英 2007.6.14

[85] 进入国家阶段日期 2008.6.3

[71] 申请人 辉瑞产品公司

地址 美国康涅狄格州

[72] 发明人 J·G·克里斯坦森 邹亚红

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利  
商标事务所  
代理人 李华英

权利要求书2页 说明书48页 附图11页

[54] 发明名称

治疗不正常细胞生长的方法

[57] 摘要

本发明涉及一种新的 c - Met/HGFR 抑制剂即 (R) - 3 - [1 - (2, 6 - 二氯 - 3 - 氟 - 苯基) - 乙氧基] - 5 - (1 - 哌啶 - 4 - 基 - 1H - 吡啶 - 4 - 基) - 吡啶 - 2 - 基胺用于治疗哺乳动物体内不正常细胞生长的用途。更具体地说, 本发明提供治疗患有癌症的哺乳动物的方法。

1. 一种治疗需要该治疗的哺乳动物体内不正常细胞生长的方法，其包括：向所述哺乳动物施用治疗有效量的(R)-3-[1-(2,6-二氯-3-氟-苯基)-乙氧基]-5-(1-哌啶-4-基-1H-吡唑-4-基)-吡啶-2-基胺或其药学上可接受的盐。
2. 根据权利要求1所述的方法，其中所述哺乳动物为人类。
3. 根据权利要求1所述的方法，其中所述哺乳动物为狗。
4. 根据权利要求1至3中任一项的方法，其中所述不正常细胞生长是由至少一种遗传改造酪氨酸激酶介导的。
5. 根据权利要求1至3中任一项的方法，其中所述不正常细胞生长是由肝细胞生长因子受体(c-Met/HGFR)激酶或间变性淋巴瘤激酶(ALK)介导的。
6. 根据权利要求5的方法，其中所述不正常细胞生长是由肝细胞生长因子受体(c-Met/HGFR)激酶介导的。
7. 根据权利要求5的方法，其中所述不正常细胞生长是由间变性淋巴瘤激酶(ALK)介导的。
8. 根据权利要求1至3中任一项的方法，其中所述不正常细胞生长为癌症。
9. 根据权利要求8的方法，其中所述癌症选自肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头或颈部癌、表皮或眼内黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛区癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、何杰金氏病、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、慢性或急性白血病、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾脏或输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、脊柱肿瘤、脑干胶质瘤、垂体腺瘤及其组合。
10. 根据权利要求8的方法，其中所述癌症选自具有下列组成的组：非小细胞肺癌(NSCLC)、鳞状细胞癌、激素难治性前列腺癌、乳头状肾

细胞癌、结肠直肠癌、神经母细胞瘤、间变性大细胞淋巴瘤 (ALCL) 及胃癌。

11. 根据前述权利要求中任一项的方法, 其中所述化合物或其药学上可接受的盐作为药物组合物施用, 该药物组合物包含(R)-3-[1-(2,6-二氯-3-氟-苯基)-乙氧基]-5-(1-哌啶-4-基-1H-吡唑-4-基)-吡啶-2-基胺及至少一种药学上可接受的载体。

12. 一种通过施用(R)-3-[1-(2,6-二氯-3-氟-苯基)-乙氧基]-5-(1-哌啶-4-基-1H-吡唑-4-基)-吡啶-2-基胺来抑制细胞中c-Met/HGFR激酶活性的方法。

13. 根据权利要求12的方法, 其中所述细胞选自具有下列组成的组: A549人类肺癌、GTL-16人类胃癌、HT29人类结肠癌、Colo205人类结肠癌、A498人类肾癌、786-0人类肾癌、MBA-MD-231人类乳腺癌、Madlin-Darby犬肾(MDCK)上皮细胞、经改造表达P-糖蛋白的MDCK细胞(MDCK-MDR1)、mIMCD3小鼠肾上皮、HUVEC(人类脐静脉内皮细胞)、Caki-1肾癌和经改造表达人类野生型c-Met/HGFR及包括HGFR-V1092I、HGFR-H1094R、HGFR-Y1230C和HGFR-M1250T在内的突变c-Met/HGFR的NIH-3T3细胞。

## 治疗不正常细胞生长的方法

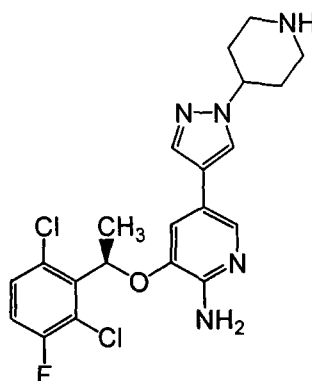
本申请要求2005年12月5日递交的美国临时申请No. 60/742, 766和2006年11月7日递交的美国临时申请No. 60/864, 637的权益，其全部内容引用在此作为参考。

## 技术领域

本发明涉及c-Met/HGFR抑制剂用于治疗哺乳动物体内不正常细胞生长的用途。更具体地说，本发明提供治疗患有癌症的哺乳动物的方法。

## 背景技术

式1代表的化合物(R)-3-[1-(2,6-二氯-3-氟-苯基)-乙氧基]-5-(1-哌啶-4-基-1H-吡唑-4-基)-吡啶-2-基胺

1

为c-Met/HGFR (肝细胞生长因子受体) 激酶及ALK (间变性淋巴瘤激酶) 活性的有效小分子抑制剂。化合物1具有通过抑制c-Met/HGFR (参与调节多种肿瘤类型的生长及转移进程) 及ALK (与ALCL(间变性大细胞淋巴瘤) 发病机理有关) 来以药理学方式介导的抗肿瘤特性。化合物1公开于国际专利申请案第PCT/IB2005/002837号及美国专利申请案第11/212, 331号中，二者以引用方式全部并入本文中。此外，化合物1的外消旋物公开于国际专利申请案第PCT/IB05/002695号及美国专利

申请案第11/213,039号中,二者以引用方式全部并入本文中。

人类癌症包括多种疾病,这样的疾病共同为在全球发达国家中造成死亡的主要原因之一(American Cancer Society, Cancer Facts and Figures 2005. Atlanta: American Cancer Society; 2005)。癌症的发展由一系列复杂的多种基因及分子事件引起,这样的事件包括基因突变、染色体异位及核型异常(Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000; 100: 57-70)。尽管癌症的根本基因起因是多样且复杂的,但已观察到每一癌症类型可表现出共同特征且需要促进其发展的能力。这种所需能力包括失调的细胞生长、持续增补血管的能力(即,血管生成)及肿瘤细胞局部扩散以及转移至二级器官部位的能力(Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000; 100: 57-70)。因此,能够鉴别1) 抑制癌症发展期间会改变的分子靶标、或2) 靶向多种肿瘤中癌症发展所共有的多个过程的新颖治疗剂的能力是一种重要的未得到满足的需求。

大量文献表明c-Met/HGFR是在各种人类癌症中最常发生突变或以其它方式异常激活的RTK之一(Christensen JG, Burrows J, Salgia R. c-Met as a target in human cancer and characterization of inhibitors for therapeutic intervention. Cancer Letters 2005; 225: 1-26)。其中报告称通过突变或基因扩增对c-Met/HGFR进行遗传改造的肿瘤类型包括(但不限于)具有重要的、未得到满足的医疗需求的肿瘤学指征,例如肾癌、转移性结肠直肠癌、神经胶质瘤、非小细胞肺癌、胃癌及头颈部癌症(Christensen JG, Burrows J, Salgia R. c-Met as a target in human cancer and characterization of inhibitor for therapeutic intervention. Cancer Letters 2005; 225: 1-26)。

已发现HGFR突变与肾癌有关(例如,参见L. Schmidt, K. Junker, N. Nakaigawa, T. Kinjerski, G. Weirich, M. Miller等人, Novel mutations of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas, Oncogene 1999; 18: 2343-2350; L. Schmidt, F.M. Duh,

F. Chen, T. Kishida, G. Glenn, P. Choyke等人, Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas, *Nat. Genet.* 1997; 16: 68-73; L. Schmidt, K. Junker, G. Weirich, G. Glenn, P. Choyke, I. Lubensky等人, Two North American families with hereditary papillary renal carcinomas and identical novel mutations in the MET proto-oncogene, *Cancer Res.* 1998; 58: 1719-1722)。HGFR突变与头颈部癌有关(例如, 参见M. F. Di Renzo, M. Olivero, T. Martone, A. Maffe, P. Maggiora, A. D. Stefani等人, Somatic mutations of the MET oncogene are selected during metastatic spread of human HNSC carcinomas, *Oncogene* 2000; 19: 1547-1555; D.M. Aebbersold, O. Landt, S. Berthou, G. Gruber, K. T. Beer, R. H. Greiner, Y. Zimmer, Prevalence and clinical impact of Met Y1253D-activating point mutation in radiotherapytreated squamous cell cancer of the oropharynx, *Oncogene* 2003; 22: 8519-8523)。HGFR突变亦与肺癌有关(例如, 参见P. C. Ma, T. Kijima, G. Maulik, E. A. Fox, M. Sattler, J. D. Griffin等人, c-MET mutational analysis in small cell lung cancer: novel juxtamembrane domain mutations regulating cytoskeletal functions, *Cancer Res.* 2003; 63: 6272-6281; P. C. Ma, S. Jagdeesh, R. Jagadeeswaran, E. A. Fox, J. G. Christensen, G. Maulik等人, c-MET expression/activation, functions, and mutations in non-small cell lung cancer, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 2004; 63: 1875)。

此外, HGFR突变与其它适应症有关, 这样的适应症包括(但不限于)儿童肝细胞癌、人类胃癌、硬癌型胃癌、结肠直肠癌及恶性黑素瘤。(例如, 参见W. S. Park, S. M. Dong, S. Y. Kim, E. Y. Na, M. S. Shin, J. H. Pi等人, Somatic mutations in the kinase domain of the Met/hepatocyte growth factor receptor gene in childhood

hepatocellular carcinomas, *Cancer Res.* 1999; 59: 307-310; J.H. Lee, S.U. Han, H. Cho, B. Jennings, B. Gerrard, M. Dean等人, A novel germ line juxtamembrane Met mutation in human gastric cancer, *Oncogene* 2000; 19: 4947-4953; A. Lorenzato, M. Olivero, S. Patane, E. Rosso, A. Oliaro, P.M. Comoglio, M.F. Di Renzo, Novel somatic mutations of the MET oncogene in human carcinoma metastases activating cell motility and invasion, *Cancer Res.* 2002; 62: 7025-7030; H. Kuniyasu, W. Yasui, Y. Kitadai, H. Yokozaki, H. Ito, E. Tahara, Frequent amplification of the c-met gene in scirrhous type stomach cancer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992; 189: 227-232; M.F. Di Renzo, M. Olivero, A. Giacomini, H. Porte, E. Chastre, L. Mirossay 等人, Overexpression and amplification of the met/HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer, *Clin. Cancer Res.* 1995; 1: 147-154; T. Hara, A. Ooi, M. Kobayashi, M. Mai, K. Yanagihara, I. Nakanishi, Amplification of c-myc, K-sam, and c-met in gastric cancers: detection by fluorescence in situ hybridization, *Lab. Invest.* 1998; 78: 1143-1153).

亦已确定HGFR突变形使功能与致癌潜力之间的关系(例如, 参见, M. Jeffers, L. Schmidt, N. Nakaigawa, C.P. Webb, G. Weirich, T. Kishida等人, Activating mutations for the met tyrosine kinase receptor in human cancer, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1997; 94: 11445-11450; M. Jeffers, M. Fiscella, C.P. Webb, M. Anver, S. Koochekpour, G.F. Vande Woude, The mutationally activated Met receptor mediates motility and metastasis, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1998; 95: 14417-14422)。

最后, HGFR突变与小鼠肿瘤有关且在小鼠肿瘤中加以研究(例如, 参见, H. Takayama, W.J. LaRochelle, R. Sharp, T. Otsuka, P. Kriebel, M. Anver等人, Diverse tumorigenesis associated with

aberrant development in mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor, Proc. Natl Acad. Sci. USA 1997; 94: 701-706; T. Otsuka, H. Takayama, R. Sharp, G. Celli, W.J. LaRochelle, D.P. Bottaro 等人, c-Met autocrine activation induces development of malignant melanoma and acquisition of the metastatic phenotype, Cancer Res. 1998; 58: 5157-5167; M. I. Gallego, B. Bierie, L. Hennighausen, Targeted expression of HGF/SF in mouse mammary epithelium leads to metastatic adenosquamous carcinomas through the activation of multiple signal transduction pathways, Oncogene 2003; 22: 8498-8508; C.R. Graveel, Y. Su, L.M. Wang, M. Fiscella, T. Lino, c. Birchmeier 等人, Tumorigenic effects of activating Met mutations in a knock-in mouse model, Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 2004; 44: 5102)。

NPM-ALK是间变性淋巴瘤激酶的致癌融合蛋白变体,该变体由染色体异位产生,与人类间变性大细胞淋巴瘤的发病机理有关(Pulford K, Morris SW, Turturro F. Anaplastic lymphoma kinase proteins in growth control and cancer. J Cell Physiol 2004; 199: 330-58)。组成型活性ALK嵌合蛋白的异常表现在ALCL发病机理中的作用已得到很好确定(Weihua Wan 等人, Anaplastic lymphoma kinase activity is essential for the proliferation and survival of anaplastic large cell lymphoma cells. Blood First Edition Paper, prepublished online October 27, 2005; DOI 10.1182/blood-2005-08-3254)。

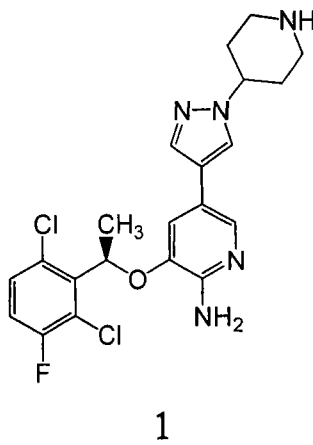
c-Met/HGFR (包括野生型c-Met)的不当激活亦与多种肿瘤致癌过程(例如有丝分裂、存活、血管生成、侵入性生长且尤其为转移过程)的失调有关(Christensen 等人, 2005)。此外,证明c-Met及HGF (其仅有的高亲和配体)的表达在多种主要人类癌症中与不良预后或转移性发展有关(Christensen 等人, 2005)。NPM-ALK与ALCL淋巴瘤细胞中



细胞增殖及凋亡的失调有关 (Pulford等人, 2004)。

### 发明内容

在一个实施方案中, 本发明提供一种治疗需要该治疗的哺乳动物体内不正常细胞生长的方法, 其包括: 向所述哺乳动物施用治疗有效量的式1的化合物:



或其药学上可接受的盐。

在另一个实施方案中, 所述哺乳动物为人类。在另一个实施方案中, 所述哺乳动物为狗。

在另一个实施方案中, 所述不正常细胞生长是由至少一种遗传改造酪氨酸激酶介导。在另一个实施方案中, 所述不正常细胞生长是由肝细胞生长因子受体 (c-Met/HGFR) 激酶或间变性淋巴瘤激酶 (ALK) 介导。在另一个实施方案中, 所述不正常细胞生长是由肝细胞生长因子受体 (c-Met/HGFR) 激酶介导。在另一个实施方案中, 所述不正常细胞生长是由间变性淋巴瘤激酶 (ALK) 介导。

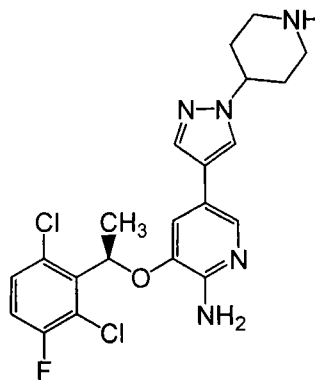
在另一个实施方案中, 所述不正常细胞生长为癌症。在另一个实施方案中, 所述癌症选自肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头或颈部癌、表皮或眼内黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛区癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、何杰金氏病 (Hodgkin's Disease)、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、慢性或急性白血病、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾脏或

输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、脊柱肿瘤、脑干胶质瘤、垂体腺瘤及其组合。

在又一个实施方案中，所述癌症选自具有下列组成的组：非小细胞肺癌(NSCLC)、鳞状细胞癌、激素难治性前列腺癌、乳头状肾细胞癌、结肠直肠腺癌、神经母细胞瘤、间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)及胃癌。

在又一个实施方案中，该化合物或其药学上可接受的盐是以药物组合物的形式施用，该组合物包含该式1的化合物及至少一种药学上可接受的载体。

在又一个实施方案中，本发明提供一种通过施用式1的化合物：



1

或其药学上可接受的盐抑制细胞中c-Met/HGFR激酶活性的方法。

在又一个实施方案中，该细胞选自具有下列组成的组：A549人类肺癌、GTL-16人类胃癌、HT29人类结肠癌、Colo205人类结肠癌、A498人类肾癌、786-0人类肾癌、MBA-MD-231人类乳腺癌、Madlin-Darby犬肾(MDCK)上皮细胞、经改造表达P-糖蛋白的MDCK细胞(MDCK-MDR1)、mIMCD3小鼠肾上皮、HUVEC(人类脐静脉内皮细胞)、Caki-1肾癌及经改造表达人类野生型c-Met/HGFR及包括HGFR-V1092I、HGFR-H1094R、HGFR-Y1230C及HGFR-M1250T在内的突变c-Met/HGFR的NIH-3T3细胞。

#### 附图说明

图1：化合物1对重组的人类c-Met/HGFR激酶活性的ATP-竞争性抑制。

图2: 向具有确定的GTL-16肿瘤的无胸腺小鼠以指定剂量口服施用化合物1或单独施用赋形剂11天。图2A: 探索GTL-16中c-Met/HGFR磷酸化作用的抑制的研究。图2B: 探索GTL-16肿瘤生长抑制的研究。

图3: 向具有确定的U87MG肿瘤(150mm<sup>3</sup>)的无胸腺小鼠以指定剂量口服施用化合物1或单独施用赋形剂9天。图3A: 探索肿瘤生长抑制的研究。图3B: 探索c-Met/HGFR磷酸化作用的抑制的研究。

图4: 向具有大的确定的GTL-16肿瘤异种移植物的无胸腺小鼠每日口服施用化合物1。图4A: 大的确定的GTL-16肿瘤异种移植体在无胸腺小鼠体内的退化。图4B: 每日口服施用化合物1后的小鼠体重。

图5: 向具有确定的NCI-H441或PC-3肿瘤异种移植物的无胸腺小鼠每日口服施用化合物1。图5A: 具有确定的NCI-H441的无胸腺小鼠体内的肿瘤退化。图5B: 具有确定的PC-3肿瘤异种移植物的无胸腺小鼠体内的肿瘤退化。

图6: 化合物1在NPM-ALK-依赖性淋巴瘤模型(Karpas 299 ALCL模型)中的抗肿瘤功效。图6A: 探索肿瘤生长抑制的研究。图6B: 探索NPM-ALK磷酸化作用的抑制的研究。

### 发明详细描述

除非另有说明, 否则本文中所有对本发明的化合物的提及包括提及其盐、溶剂化物、水合物及复合物以及其盐的溶剂化物、水合物及复合物, 包括其多晶型物、立体异构体及同位素标记的形式。

### 定义

除非另有说明, 否则本文所用术语"不正常细胞生长"是指不依赖于正常调节机制的细胞生长(例如, 失去接触抑制)。

除非另有说明, 否则本文所用术语"治疗(treating)"意指逆转、减轻、抑制此术语所应用的疾病或病况或此种疾病或病况的一或多种症状的加剧, 或预防此术语所应用的疾病或病况或此种疾病或病症的一或多种症状。除非另有说明, 否则本文所用术语"治疗(treatment)"是指如上文刚刚定义的"治疗(treating)"的治疗活动。

本文所用术语"药学上可接受的盐"包括酸加成盐及碱加成盐(包括二盐)。

适宜的酸加成盐是由可形成无毒盐的酸形成。实例包括:乙酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、碳酸氢盐/碳酸盐、硫酸氢盐/硫酸盐、硼酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、乙二磺酸盐、乙磺酸盐、甲酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、葡萄糖酸盐、葡糖醛酸盐、六氟磷酸盐、羟苯酰苯酸盐、氢氯酸盐/氯化物、氢溴酸盐/溴化物、氢碘酸盐/碘化物、羟乙磺酸盐、乳酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、甲基硫酸盐、萘酸盐、2-萘磺酸盐、烟碱酸盐、硝酸盐、乳清酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、磷酸盐/磷酸氢盐/磷酸二氢盐、糖二酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、甲苯磺酸盐、及三氟乙酸盐。

适宜的碱加成盐是由可形成无毒盐的碱形成。实例包括铝盐、精氨酸盐、苺星盐(benzathine)、钙盐、胆碱盐、二乙胺盐、二醇胺盐、甘氨酸盐、赖氨酸盐、镁盐、葡胺盐、醇胺盐(olamine)、钾盐、钠盐、氨基丁三醇盐及锌盐。

有关适宜的药学上可接受的盐的评述参见Stahl及Wermuth所著的"Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use" (Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2002), 其公开的内容以引用方式全部并入本文中。

本发明的化合物的药学上可接受的盐可容易地通过在适宜时将该化合物与期望的酸或碱的溶液混合在一起来制备。可将盐从溶液中沉淀出并通过过滤收集或可通过蒸发溶剂回收。该盐的电离度可在完全电离至几乎无电离之间变化。

本发明的化合物既可以非溶剂化形式存在亦可以溶剂化形式存在。本文所用术语"溶剂化物"指一包含本发明的化合物及一或多种药学上可接受的溶剂分子(例如,乙醇)的分子复合物。当溶剂为水时,使用术语"水合物"。本发明药学上可接受的溶剂化物包括其中结晶溶剂可经同位素取代(例如, D<sub>2</sub>O、d<sub>6</sub>-丙酮、d<sub>6</sub>-DMSO)的水合物及溶剂化

物。

本发明亦包括经同位素标记的化合物，除一或多个原子由一原子量或质量数不同于自然界中常见原子量或质量数的原子代替外，这样的化合物与化合物1相同。可加入本发明的化合物中的同位素实例包括氢、碳、氮、氧、磷、硫、氟及氯的同位素，例如分别为 $^2\text{H}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{18}\text{O}$ 、 $^{17}\text{O}$ 、 $^{31}\text{P}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{18}\text{F}$ 及 $^{36}\text{Cl}$ 。含有上述同位素和/或其它原子的其它同位素的本发明的化合物及这样的化合物的药学上可接受的盐涵盖于本发明的范围内。某些经同位素标记的本发明化合物，例如那些加入例如 $^3\text{H}$ 及 $^{14}\text{C}$ 等放射性同位素的本发明化合物可用于药物和/或底物组织分布分析。含氘即 $^3\text{H}$ 及碳-14即 $^{14}\text{C}$ 同位素因其易于制备及可检测性而特别优选。此外，用如氘即 $^2\text{H}$ 的较重同位素取代可因较强的代谢稳定性提供某些治疗优点，例如增加的体内半衰期或降低的剂量需求，从而可在某些情形中优选。本发明经同位素标记的化合物1一般可通过实施对未经标记的化合物所述的程序且用易于得到的经同位素标记的试剂取代未经同位素标记的试剂来制备。

本发明范围内亦包括复合物，诸如笼形化合物、药物-基质包容复合物，其中与上述溶剂化物对比，药物及基质是以化学计量或非化学计量量存在。本发明亦涵盖含有两种或两种以上有机和/或无机组份的药物的复合物，这样的组份可呈化学计量量或非化学计量量。所获得的复合物可离子化、部分离子化或未离子化。有关这种复合物的评述参见Haleblian的J Pharm Sci, 64(8), 1269-1288 (1975年8月)，其公开的内容以引用方式全部并入本文中。

### 口服施用

本发明的化合物可口服施用。口服施用可包括吞咽(因此该化合物可进入胃肠道)和/或口腔或舌下施用(由此，化合物可直接自口腔进入血流)。

适于口服施用的制剂包括固体制剂(例如片剂)、含有颗粒剂的胶囊、液体、或粉剂、含锭(包括液体填充者)、咀嚼剂、多-及纳米颗粒、凝胶、固体溶液、脂质体、膜剂(包括黏性黏合剂)、阴道锭、喷雾剂

及液体制剂。

液体制剂包括悬浮液、溶液、糖浆及酞剂。这样的制剂可作为软质或硬质胶囊内的填充物使用且通常包含药学上可接受的载体(例如,水、乙醇、聚乙二醇、丙二醇、甲基纤维素、或适宜油)及一或多种乳化剂和/或悬浮剂。液体制剂亦可通过装在(例如)药袋中的固体的重制制备。

本发明的化合物亦可用于快速溶解、快速崩解剂型中,例如那些阐述于Liang及Chen所著的Expert Opinion in Therapeutic Patents, 11(6), 981-986 (2001)中者,该文献的公开内容以引用方式全部并入本文中。

对于片剂剂型,根据剂量,药物可占该剂型的1重量%至80重量%,更为通常占该剂型的5重量%至60重量%。除该药物外,片剂中通常包含崩解剂。崩解剂的实例包括羟基乙酸淀粉钠、羧甲基纤维素钠、羧甲基纤维素钙、交联羧甲基纤维素钠、交聚维酮、聚乙烯吡咯烷酮、甲基纤维素、微晶纤维素、低碳烷基取代的羟丙基纤维素、淀粉、预胶化淀粉及藻酸钠。一般而言,该崩解剂会占该剂型的1重量%至25重量%,优选占5重量%至20重量%。

黏合剂一般用来赋予片剂制剂以黏着特性。适宜黏合剂包括微晶纤维素、明胶、糖、聚乙二醇、天然及合成树脂、聚乙烯吡咯烷酮、预胶化淀粉、羟丙基纤维素及羟丙基甲基纤维素。片剂亦可包含稀释剂,例如乳糖(单水合物、经喷雾干燥的单水合物、无水物及例如此类)、甘露醇、木糖醇、葡萄糖、蔗糖、山梨醇、微晶纤维素、淀粉及二水合磷酸氢钙。

片剂亦可根据情况包含表面活性剂(例如月桂基硫酸钠及聚山梨醇酯80)及助流剂(例如二氧化硅及滑石粉)。在含有时,表面活性剂的量通常可占该片剂的0.2重量%至5重量%,助流剂可占该片剂的0.2重量%至1重量%。

片剂通常亦包含润滑剂,例如,硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸锌、硬脂基富马酸钠、及硬脂酸镁与月桂基硫酸钠的混合物。润滑剂一般

以占该片剂的0.25重量%至10重量%、优选占0.5重量%至3重量%的量存在。

其它惯用的成份包括抗氧化剂、着色剂、矫味剂、保存剂及遮味剂。

示例性片剂包含至多约80重量%的药物、约10重量%至约90重量%的黏合剂、约0重量%至约85重量%的稀释剂、约2重量%至约10重量%的崩解剂、及约0.25重量%至约10重量%的润滑剂。

片剂掺合物可直接或通过辊子压制来形成片剂。另一选择，片剂掺合物或掺合物的各部分在压片前可经湿-、干-、或熔融-粒化、熔融凝结、或挤出。最终制剂可包含一或多层且可经涂覆或未经涂覆；或装入胶囊。

片剂制剂详述于H. Lieberman及L. Lachman的"Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, 第1卷", Marcel Dekker, N.Y., N.Y., 1980 (ISBN 0-8247-6918-X)中, 该文献的公开内容以引用方式全部并入本文中。

口服施用的固体制剂可配制成能直接释放和/或以改良方式释放。以改良方式释放制剂包括延时释放、持续释放、脉冲释放、受控释放、靶向释放及程序性释放。

适当改性的释放制剂阐述于美国专利第6,106,864号。其它适宜释放技术(例如高能分散液及渗透性经涂覆颗粒)的详细资料参见Verma等人, Pharmaceutical Technology On-line, 25(2), 1-14, (2001)。使用咀嚼胶达到受控释放阐述于WO 00/35298中。这些参考文献的公开内容均以引用方式全部并入本文中。

### 胃肠外施用

本发明的化合物亦可直接施用至血流、肌肉或内部器官中。适用于胃肠外施用的方式包括静脉内、动脉内、腹腔内、鞘内、心室内、尿道内、胸骨内、颅内、肌内及皮下施用。适用于胃肠外施用的装置包括针式(包括微型针)注射器、无针式注射器及输注技术。

胃肠外制剂通常是水性溶液, 其可包含赋形剂(例如盐、碳水化合物

物)及缓冲剂(优选至3至9的pH值),但对于某些应用,可能更适合将其配制成无菌非水性溶液或配制成干燥形式以同适宜赋形剂(例如无菌、无致热源的水)组合使用。

胃肠外制剂在无菌条件下的制备(例如通过冷冻干燥法)可容易地使用本领域技术人员所熟知的标准药学技术达到。

用于制备胃肠外溶液的本发明化合物的溶解性可借助适宜制剂技术(例如加入增溶剂)来增强。

胃肠外施用的制剂可经配制而能直接释放和/或以改良方式释放。以改良方式释放制剂包括延时释放、持续释放、脉冲释放、受控释放、靶向释放及程序性释放。因此,可将本发明的化合物配制成固体、半固体、或摇溶液体用于以植入的储库形式施用来提供活性化合物的改良释放。这些制剂的实例包括经药物涂布的血管支架及PGLA微球体。

#### 局部施用

本发明的化合物亦可经局部施用至皮肤或黏膜,即经皮或穿过皮肤施用。用于此目的的典型制剂包括凝胶、水凝胶、洗剂、溶液、乳霜、软膏、撒施粉、敷料、泡沫、膜剂、皮肤贴片、糯米纸囊剂、植入物、海绵、纤维、绷带及微型乳剂。亦可使用脂质体。典型载体包括醇、水、矿物油、液体凡士林、白色凡士林、甘油、聚乙二醇及丙二醇。亦可加入增渗剂;参见(例如)Finnin及Morgan的J Pharm Sci, 88(10), 955-958(1999年10月)。其它局部施用方式包括通过电穿孔、离子电渗法、声透法、超音促渗法及微型针或无针(例如, Powderject™、Bioject™等)注射来递送。这些参考文献的公开内容皆以引用方式全部并入本文中。

局部施用的制剂可经配制而能直接释放和/或以改良方式释放。以改良方式释放制剂包括延时释放、持续释放、脉冲释放、受控释放、靶向释放及程序性释放。

#### 吸入/鼻内施用

本发明的化合物亦可经鼻内施用或通过吸入施用,这样的施用所用典型形式为:来自干粉吸入器的干燥粉剂(或单独地、作为混合物(例



如，与乳糖的干燥掺合物)、或作为混合的组份颗粒(例如，与磷脂(如磷脂酰胆碱)混合))、作为来自加压容器、泵、喷射器、雾化器(优选使用电流体动力以生成细雾的雾化器)或喷雾器的气溶胶喷雾剂(其中使用或不使用适宜推进剂，例如1, 1, 1, 2-四氟乙烷或1, 1, 1, 2, 3, 3, 3-七氟丙烷)。对于鼻内使用，该粉剂可包含生物黏附剂，例如，脱乙酰壳多糖或环糊精。

加压容器、泵、喷射器、雾化器或喷雾器含有由(例如)乙醇、乙醇水溶液、或用于活性物质分散、溶解或延长释放的适宜作用剂、呈溶剂形式的推进剂及(根据情况)表面活性剂(例如三油酸山梨醇酐酯、油酸、或寡聚乳酸)构成的本发明的化合物的溶液或悬浮液。

在干燥粉剂或悬浮液制剂中使用之前，将该药品微粉化至适宜通过吸入递送尺寸(通常小于5微米)。此可通过任何适宜粉末化方法(例如螺旋喷射研磨、流化床喷射研磨、超临界流体处理)来形成纳米颗粒、高压均化、或喷雾干燥而达到。

用于吸入器或吹药器中的胶囊(例如通过明胶或HPMC制备而成)、泡罩及药筒可经配制而包含本发明的化合物的粉末混合物、适宜粉末基质(例如乳糖或淀粉)及性能改良剂(例如L-亮氨酸、甘露醇、或硬脂酸镁)。乳糖可为无水的或以单水合物的形式，优选后者。其它适宜赋形剂包括葡聚糖、葡萄糖、麦芽糖、山梨醇、木糖醇、果糖、蔗糖及海藻糖。

适合用于使用电流体动力学以生成细雾的雾化器中的溶液制剂每次喷射可包含1  $\mu$ g至20mg本发明的化合物，并且该喷射体积可在1  $\mu$ l至100  $\mu$ l间变化。典型制剂包含本发明的化合物、丙二醇、无菌水、乙醇及氯化钠。可用于替代丙二醇的替代溶剂包括甘油及聚乙二醇。

可将适宜矫味剂(例如薄荷醇及左薄荷醇)、或增甜剂(例如糖精或糖精钠)添加至那些欲以吸入/鼻内方式施用的本发明制剂中。

用于吸入/鼻内方式施用的制剂可用(例如)聚(DL-乳酸-共乙二醇酸)(PGLA)配制成能直接释放和/或以改良方式释放。以改良方式释放制剂包括延时释放、持续释放、脉冲释放、受控释放、靶向释放及程

序性释放。

当使用干粉吸入剂及气溶胶时，剂量单位借助可递送计量数量的阀来确定。通常将本发明的装置设定至施用计量剂量或含有期望量的本发明化合物的"喷雾量"。整个日剂量可以单个剂量或更通常以分开的剂量全天施用。

#### 直肠/阴道内施用

本发明的化合物可经直肠或阴道(例如以栓剂、阴道栓、或灌肠剂的形式)施用。可可油是惯用的栓剂基质,但适当时可使用多种替代物。

经直肠或阴道施用的制剂可经配制而能直接释放和/或以改良方式释放。以改良方式释放的制剂包括延时释放、持续释放、脉冲释放、受控释放、靶向释放及程序性释放。

#### 眼部施用

本发明的化合物亦可直接施用至眼或耳内，通常是以等渗且pH经调节的无菌盐水中的微粉化悬浮液或溶液的液滴剂形式。其它适合于经眼或耳施用的制剂包括软膏、可生物降解的(例如可吸收凝胶海绵、胶原)及不可生物降解的(例如硅酮)植入物、糯米纸囊剂、晶状体及微粒或多孔系统(例如非离子表面活性剂囊泡(niosome)或脂质体)。可将如交联聚丙烯酸、聚乙烯醇、透明质酸、纤维素聚合物(例如,羟基丙基甲基纤维素、羟基乙基纤维素或甲基纤维素)或杂多糖聚合物(例如,吉兰胶)等聚合物与防腐剂(例如,苯扎氯铵)一起掺入。这样的制剂亦可通过离子电渗法递送。

经眼/耳施用的制剂可经配制而能实时释放和/或以修饰方式释放。以修饰方式释放的制剂包括延时释放、持续释放、脉冲释放、受控释放、靶向释放或程序性释放。

#### 其它技术

本发明的化合物可与可溶性大分子体(例如,环糊精及其适宜衍生物或包含聚乙二醇的聚合物)联合使用,以改善其在以任一上述施用方式使用时的溶解度、溶解速率、遮味情况、生物利用度和/或稳定性。

例如,发现药物-环糊精复合物一般可用于大多数剂型及施用途

径。包含复合物及非包含复合物均可使用。作为与该药直接复合的替代形式，环糊精可用作辅助添加剂，即作为载体、稀释剂或增溶剂。最经常用于这样的目的者是 $\alpha$ -、 $\beta$ -、及 $\gamma$ -环糊精，其实例可参见PCT公开文本第WO 91/11172号、第WO 94/02518号及第WO 98/55148号，这些公开文本的公开内容以引用方式全部并入本文中。

### 剂量

施用的活性化合物的量将取决于被治疗的受试者、病症或病况的严重程度、施用速率、化合物的处置及开处方的医师的判定。然而，有效剂量是介于约0.001mg/kg体重/天至约100mg/kg体重/天之间，优选约0.01mg/kg/天至约35mg/kg/天，以单一或分次剂量给予。对于70kg的人，此剂量可折合约0.07mg/天至约7000mg/天，优选约0.7mg/天至约2500mg/天。在一些情形中，低于上述范围下限的剂量含量可能更为合适，而在其它情形中在不会引起任何有害副作用的情况下还可使用更大剂量，其中通常将这样的较大剂量分成若干较小剂量来在整日之中施用。

### 组件式药盒

由于理想情况是施用活性化合物的组合，例如，出于治疗特定疾病或病况的目的，本发明的范围涵盖：两种或两种以上药物组合物（其中至少一种包含本发明的化合物）可方便地组合成适宜同时施用这样的组合物的药盒形式。因此，本发明的药盒包含两种或两种以上分开的药物组合物（其中至少一种包含本发明的化合物）及用于分别保存这样的组合物的装置（例如容器、分开式瓶子或分开式箔片包装）。此药盒的实例是用于片剂、胶囊及例如此类的封装的常见泡罩包装。

本发明的药盒尤其适用于施用不同剂型（例如，口服及胃肠外）、适用于以不同剂量间隔施用分开的组合物、或适用于滴定相互分开的组合物。为有助于依从性，该药盒通常包含施用说明，且可提供辅助记忆的部件。

### 实例

## 体外分析

### 材料及方法

#### 体外方法

#### 生化激酶分析法

如下利用监测与ATP转换偶联的NADH氧化的普通程序确定化合物1对于c-Met/HGFR激酶的抑制的生化 $K_i$ 值。将化合物及激酶分析试剂加入测试孔中并在37°C下温育10分钟。该分析通过加入c-Met/HGFR酶起始。酶抑制剂可降低所测量的该酶活性。在连续偶联的分光光度测定分析中,通过经由测量340nm处吸光度的降低进行的NADH消耗速率分析确定该激酶的ADP时间依赖性产生。在该激酶产生ADP时,可通过与磷酸烯醇丙酮酸及丙酮酸激酶反应将其重新转化成ATP。在此反应中亦产生丙酮酸盐。随后通过与乳酸脱氢酶反应将丙酮酸盐转化成乳酸盐,同时将NADH转化成NAD。NADH在340nm具有可测量的吸光度而NAD没有。因此,该分析终点是通过分光光度测定法在340nm在指定时间点测量。

#### 细胞信号传导的生化激酶分析法 (Upstate)

在加入分析物之前将激酶预先稀释成10×工作浓度。简言之,除组蛋白H1 (10×工作储备液,存于20 mM MOPS pH 7.4)、PDKtide (10×工作储备液,存于50 mM Tris pH 7.0)及ATF2 (其通常储存为20×工作储备液,存于50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM EGTA, 0.03% Brij-35, 50%甘油、1 mM苯胺、0.2 mM PMSF及0.1%  $\beta$ -巯基乙醇)外将底物在去离子水中溶解并稀释成工作储备液。然后在25  $\mu$ l最终反应体积中对感兴趣的生化酶再加以分析,该体积中含有与8 mM MOPS pH 7.0, 0.2 mM EDTA, 50  $\mu$ M EAIYAAPFAKKK, 10 mM乙酸镁及 $^{32}$ P-ATP (比活性约500 cpm/pmol, 需要时浓缩)一起温育的5至10 mU所选酶。该反应通过加入MgATP混合物起始。在室温温育40分钟后,通过加入5  $\mu$ l的3%磷酸溶液来终止该反应。然后将10  $\mu$ l该反应物点在P30 filtermat上并在75 mM磷酸中洗涤三次每次5分钟且在甲醇中洗涤一次,然后干燥并实施闪烁计数。

#### 细胞系

用来在体外研究中评估化合物1的细胞系如下：A549人类肺癌、GTL-16人类胃癌、HT29人类结肠癌、Colo205人类结肠癌、A498人类肾癌、786-0人类肾癌、MBA-MD-231人类乳腺癌、Madlin-Darby犬肾(MDCK)上皮细胞、经改造表达P-糖蛋白的MDCK细胞(MDCK-MDR1)、mIMCD3小鼠肾上皮、HUVEC(人类脐静脉内皮细胞)；经改造表达人类野生型c-Met/HGFR及包括HGFR-V1092I、HGFR-H1094R、HGFR-Y1230C及HGFR-M1250T在内的突变c-Met/HGFR的NIH-3T3细胞。用来评估其它酪氨酸激酶磷酸化作用的抑制的细胞系如下：KARPAS 299、SU-DHL-1及Jurkat人类淋巴瘤细胞、人类脐静脉内皮细胞(HUVEC)、人类大血管内皮细胞(HMVEC)、经改造表达人类VEGFR2、PDGFR $\beta$ 、TrkA及TrkB的猪动脉内皮(PAE)细胞；经改造表达人类Ron、Axl、Sky及EGFR/Tie-2嵌合体的NIH-3T3细胞；经改造表达人类IRK的HEK293细胞、经改造表达人类Ron的中国仓鼠卵巢(CHO-B)细胞、经改造表达人类BCR-Abl的BaF3细胞。所有经加工细胞系均在Pfizer形成；GTL-16胃癌细胞为来自Paolo Comoglio博士的馈赠(University Torino Medical School, Candiolo, Italy)；HUVEC及HMVEC(人类大血管内皮细胞)购自Clonetics公司(Walkersville, MD)，且其它细胞均来自ATCC(Manassas, VA)。除非另有说明，否则细胞培养试剂均购自Life Technologies公司(Gaithersburg, MD)。在37℃下将细胞保持在潮湿气氛下，其中有5%至10% CO<sub>2</sub>并使用标准细胞培养技术养护。

#### 抗体及生长因子

用来在体外ELISA及免疫印迹研究中评估化合物1的抗体如下：抗-总人类c-Met/HGFR及抗-磷酸化Zap70抗体购自Zymed/Invitrogen, Carlsbad, CA；抗-总Ron、抗-总FGFR1、抗-总PDGFR $\beta$ 、抗-总Trk、抗-总Tie-2及抗-磷酸化酪氨酸(PY-20)抗体购自Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA；抗-总Axl及抗-总小鼠c-Met/HGFR抗体购自R&D Systems, Minneapolis, MN；抗-总IRK抗体购自BD Pharmingen, San Diego, CA；抗-VEGFR2抗体购自Novus Biologicals, Littleton, CO；抗-磷酸化-c-Met/HGFR、抗-总及-磷酸化ALK、抗-

总c-ABL、抗-总及磷酸化Gab1、抗-总及磷酸化AKT、抗-总及磷酸化-MAPK44/42、抗-磷酸化Raf、Mek1/2、P90RSK及STAT5抗体购自Cell Signaling Technologies, Boston, MA。

细胞分析中所采用的大多数生长因子均购自R&D Systems, Minneapolis, MN, 只有BDGF购自GibcoBRL/Invitrogen, Carlsbad, CA, 且EGF购自Roche Applied Science, Indianapolis, IN。

#### 细胞激酶磷酸化作用分析

使用多种血清饥饿细胞实施用于直接确定化合物1抑制配体依赖性<sub>1</sub>或组成型激酶磷酸化作用的细胞分析(即, ELISA或免疫印迹)。

#### 细胞准备

将细胞接种于96孔板内生长培养基(补充有10%胎牛血清-FBS的培养基)中并在37℃下培养过夜以促进附着至分析板上。附着后, 去除生长培养基并将细胞培养在无血清培养基(含有0.04% BSA)中。对化合物1实施连续稀释, 将适宜对照或指定浓度的化合物1加入各孔中, 并将细胞在37℃下温育1小时。在研究依赖于配体的RTK磷酸化作用的实验中, 将相应生长因子(例如, HGF、MSP、Gas6、EGF、NGF、BDNF、胰岛素、VEGF或PDGF BB)加至细胞中保持8至20分钟。如(Konishi, A., Aizawa, T. Mohan, A., Korshunov, V. A.及Berk, B. C., Hydrogen peroxide activates the Gas6-Axl pathway in vascular smooth muscle cells. The Journal of Biological Chemistry, 279: 28766-28770 (2004))所述使用H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>来刺激HUVEC细胞中的人类Axl磷酸化作用。在未加入外源性配体的情形下对具有组成型活性激酶活性的细胞系测量组成型激酶磷酸化作用(例如, GTL-16细胞中c-Met/HGFR、Karpas 299细胞中NPM-ALK、Ron-CHO-B细胞中Ron及BCR-Ab1 BaF3细胞中BCR-Ab1)。将细胞与化合物1和/或适宜配体一起温育指定时间后, 细胞用存于HBSS的1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>洗涤一次且随后使用溶胞缓冲液溶解(Cell Signaling Technologies, Boston MA)。

#### ELISA分析

通过三明治ELISA法利用对每一蛋白有特异性的捕获抗体及对磷

酸化酪氨酸残基有特异性的检测抗体评定感兴趣的蛋白激酶的磷酸化作用。在每一ELISA分析中，将由用适宜RTK配体和/或化合物1处理的各种细胞系形成的蛋白溶解产物转移至预涂有相应抗体(包括抗-c-Met/HGFR、-Ron、-Axl、-Sky、-IR、-Tie2、-KDR、-PDGFR  $\beta$ 、-Zap70等)的96孔板中。将涂有抗体的各板在蛋白溶解产物存在下于4℃温育过夜并用存于PBS的1% Tween 20洗涤七次。将HRP-PY20(辣根过氧化物酶偶联的抗-总-磷酸化酪氨酸, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)按1:500稀释在封阻缓冲液(Pierce, Rockford, IL)中并加入各板中保持30分钟。然后再洗涤各板并加入TMB过氧化物酶底物(Bio-Rad laboratories, Hercules CA)以起始HRP依赖性比色反应。该反应通过加入0.09 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止。使用分光光度计在OD-450nm处测量各板。通过浓度-反应曲线拟合利用四参数分析法在基于Excel的模板中计算IC<sub>50</sub>值。

#### 免疫印迹

亦通过免疫印迹法测量化合物1抑制细胞激酶磷酸化作用的能力。如上所述用化合物1存于无血清培养基的稀释液处理细胞并溶解以得到蛋白提取物。通过BSA分析(Pierce, Rockford, IL)将细胞溶解产物的蛋白浓度标准化并用特异性抗体来免疫沉淀感兴趣的蛋白。通过SDS-PAGE将免疫沉淀的蛋白分开并实施用抗-磷酸化酪氨酸抗体进行的免疫印迹以确定每一药物浓度下磷酸化蛋白的相对含量。此免疫印迹法亦用于确定感兴趣分子的总蛋白含量。

#### 细胞增殖及存活分析

##### 细胞增殖分析

将肿瘤细胞以低密度接种于96孔板内生长培养基(补充有10%胎牛血清-FBS的培养基)并在37℃下培养过夜。第二天,去除生长培养基并将细胞培养在无血清培养基(0% FBS及0.04% BSA)中。进行化合物1的连续稀释,将适宜对照或指定浓度的化合物1加入各孔中,并将细胞在37℃下温育24至72小时。然后实施MTT分析(Promega, Madison, WI)以确定相对细胞数。通过浓度-反应曲线拟合利用四参数分析法计算

IC<sub>50</sub>值。

#### 凋亡/细胞存活分析

将GTL-16细胞以40,000细胞/孔接种于96孔板中。在各孔内无血清培养基中加入指定浓度的PF-02341066或赋形剂。将细胞在37℃、5% CO<sub>2</sub>下温育48小时。使用ssDNA凋亡ELISA药盒(Chemicon International)来检测凋亡。

#### HGF刺激的HUVEC存活分析

使HUVEC细胞(第3代)在EGM2培养基(Walkersville, MD)中生长至汇合。将细胞以高密度(20,000至30,000/孔)接种于96孔板内EGM2培养基中并温育5至6小时以使细胞附着。附着后,将细胞在无血清培养基(Cell Applications, San Diego, CA)中于37℃、5% CO<sub>2</sub>下培养过夜。第二天,将细胞暴露于饥饿培养基(Cell Applications, San Diego, CA)中5小时。将化合物1在无血清培养基中进行连续稀释并将适宜对照或指定浓度的化合物1加入各孔中。1小时后,将人类重组HGF(R&D Systems, Minneapolis, MN)加入指定孔以达到100ng/ml的终浓度。然后在48至72小时后实施MTT分析(Promega)以确定相对细胞数。通过浓度-反应曲线拟合利用四参数分析法计算IC<sub>50</sub>值。

#### HGF依赖性细胞迁移及侵入分析

##### NCI-H441细胞迁移及基质胶侵入分析

使用市售细胞迁移及侵入系统(BD Biosciences, San Jose, CA)确定化合物1对HGF刺激的NCI-H441人类非小细胞肺癌细胞迁移及基质胶侵入的影响。将对数生长期的细胞用胰蛋白酶消化并以400,000个细胞/ml的密度悬浮于无血清培养基(含有0.04% BSA)中。化合物1在无血清培养基中进行连续稀释,将指定浓度化合物1加入悬浮细胞中,并将细胞在室温温育30分钟。将指定对照或经处理悬浮细胞(0.5ml)加至各迁移或侵入小室(即,板插入物)。此外,将25ng/ml HGF(0.75ml)加入每一相伴板的下层孔中作为化学吸引剂来由插入相伴板顶部的迁移或侵入小室板插入物中吸引细胞并将细胞在37℃下温育22小时。然后将侵入或迁移至板下层孔的细胞固定并在37℃下对细胞核染色



(1 $\mu$ g/ml DAPI, 存于100% MeOH) 15分钟。随后用TBS溶液将细胞洗涤两次。自每孔获取显微镜图像并用Image-Pro Plus软件(Media Cybernetics, Silver Spring, MD)在每一条件下确定迁移或侵入的细胞数。通过浓度-反应曲线拟合利用四参数分析法计算IC<sub>50</sub>值。

#### HUVEC基质胶(matrigel)侵入分析

使用ACEA RT-CES系统(ACEA biologicals, San Diego, CA)确定化合物1对体外HUVEC基质胶侵入的影响。用50  $\mu$  l的10.001%纤维连接蛋白及100ng/ml HGF(存于PBS)涂布ACEA电敏96-孔板并在37 $^{\circ}$ C下温育1小时且在4 $^{\circ}$ C下温育30分钟。用PBS在4 $^{\circ}$ C下洗涤各板后,将基质胶(BD Biosciences, San Jose, CA)按1:40稀释于补充有HGF(100ng/ml)和/或不同浓度的化合物1的饥饿培养基(SM, Cell Applications, San Diego, CA)中,将其(50  $\mu$  l)加入指定孔,并使其在37 $^{\circ}$ C下固化2小时。将HUVEC细胞在无血清培养基(Cell Applications, San Diego, CA)中培养5小时且随后在SM中培养2小时。随后将细胞以60,000个细胞/ml收集在SM中并用100ng/ml HGF和/或适宜化合物1在37 $^{\circ}$ C下处理30分钟。在指定条件下将HUVEC细胞悬浮液(100  $\mu$  l)转移至经涂布ACEA板指定孔中基质胶层顶部。然后在37 $^{\circ}$ C、95%空气:5% CO<sub>2</sub>下将ACEA板收集至ACEA Device Station中并通过ACEA Sensor Analyzer实时监测48小时。嵌入ACEA板底部的电子传感器检测到侵入穿过基质胶的HUVEC细胞。使用ACEA RT-CES™集合软件确定侵入的HUVEC细胞的相对数目(细胞指数)。通过浓度-反应曲线拟合利用四参数分析法计算IC<sub>50</sub>值。

#### MDCK细胞分散分析

将MDCK细胞以低密度(25个细胞/孔)接种于96-孔板内补充有10% FBS的培养基中并使之生长直至出现10至15个细胞的小集落。然后用HGF(50ng/ml)在稀释于生长培养基的各种浓度的化合物1存在下刺激细胞。过夜温育后,将集落固定并用存于10%缓冲的福尔马林中的0.2%结晶紫染色且在每一浓度下目测评定分散。

#### HMVEC血管芽生分析

将500个HMVEC加入含有0.24%甲基纤维素的EGM-2培养基中并将其

转移至U底96-孔板中以过夜形成球状体。收集球状体并将其在涂布有凝血酶(2m15,000 U/ml)的48-孔板中混合入含有4%至8% FBS ± 化合物的2mg/ml纤维蛋白原溶液中。所得3-D纤维蛋白凝胶用含有4%至8% FBS的EGM-2覆盖并在37℃、95%空气/5% CO<sub>2</sub>下温育。每日在倒置显微镜下观察内皮管形成。在第7天用连在该显微镜上的数字照相机(Olympus BX60)获取图像。加入若干浓度的化合物<sub>1</sub>并目测评定血管芽生。

#### 通过流式细胞术进行的细胞周期及凋亡分析

通过流式细胞分析(FACSCalibur, BD Biosciences, San Jose, CA)评估化合物<sub>1</sub>对人类淋巴瘤细胞的NPM-ALK依赖性细胞周期分布及凋亡的影响。在生长培养基(RPMI+10% FBS)中用化合物<sub>1</sub>处理Karpas 299及SU-DHL-1人类淋巴瘤细胞24至48小时。细胞用PBS洗涤两次,将其固定并在4℃下用BDCytofix/Cytoperm溶液透化处理20分钟。利用CycloTest Plus DNA试剂药盒(BD Biosciences)评定淋巴瘤细胞的细胞周期分布及凋亡。使用此药盒时,细胞用1×BD Perm/Wash缓冲液洗涤两次,加入非离子型去污剂及胰蛋白酶以分离细胞核,加入碘化丙锭以显现DNA内容物,并通过流式细胞术分析细胞。用Cell Quest Pro评定DNA内容物(确定每一细胞周期中细胞数%的倍性分析)并用ModFit LT软件(BD Biosciences)加以分析。如(Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del-Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M. S., Lassota, P.及Traganos, F., Cytometry 13:795-808 (1992))所述将凋亡峰(A<sub>0</sub>)定义为以低于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>峰的通道数出现的峰。亦通过流式细胞分析使用Annexin V-FITC染色(BD Biosciences, San Jose, CA)确定凋亡且亦使用FACSCalibur加以分析。

#### 体内方法

##### 细胞系

除非另有说明,否则细胞培养试剂均购自Life Technologies公司(Gaithersburg, MD)。在37℃下将细胞保持在具有5%至10% CO<sub>2</sub>的潮湿气氛下并使用标准细胞培养技术传代。U87MG (人类成胶质细胞瘤)、NCI-H441 (人类非小细胞肺腺癌)、PC-3 (人类前列腺腺癌)细胞自美

国典型培养物保藏中心 (Bethesda, MD) 获得且按其推荐培养。

#### 无胸腺小鼠中的皮下异种移植物模型

雌性 or 雄性 nu/nu 小鼠或 SCID/Beige 小鼠 (5-8 周龄) 购自 Harlan (Madison, WI) 或 Charles River (Wilmington, MA)。在洁净室条件下将动物保持于无菌滤盖饲养笼中, 这样的饲养笼具有装于 HEPA-过滤通风笼架上的 Alpha-Dri/bed-o-cob comb 垫料。动物随意接受无菌啮齿动物食物及水。收集用于植入无胸腺小鼠的细胞并通过以  $450 \times g$  离心 5 至 10 分钟来沉淀。将细胞沉淀洗涤一次并重新悬浮于无菌磷酸缓冲盐溶液或无血清培养基中。肿瘤细胞补充有 30% 至 50% 基质胶 (BD Biosciences, San Jose CA) 以促进作为异种移植物的所选肿瘤细胞的肿瘤形成及生长。将细胞 ( $2 \times 10^6$  至  $5 \times 10^6$ ,  $100 \mu l$ ) 以 SC 方式植入小鼠后肋区并使之生长至指定大小, 然后对每一实验施用化合物。通过电子测径器测量来确定肿瘤大小且按肿瘤长度  $\times$  宽度<sup>2</sup>  $\times 0.4$  的得数计算肿瘤体积。

#### 来自体内的靶标介导 (PK/PD) 研究

##### 用于体内药代动力学研究的肿瘤及血浆处理

将表达组成型磷酸化 c-Met/HGFR 或 ALK 的肿瘤细胞经皮下植入裸小鼠体内并使其在未经处理下生长至 300 至 800 mm<sup>3</sup>。以指定剂量含量向小鼠施用单口服剂量形式 (用于急性 PK/PD 研究) 或多口服剂量 (用于稳态 PK/PD 研究) 形式的化合物 1。在施用化合物 1 后的指定时间, 以人道方式对各小鼠实施无痛致死术, 使用以硫酸肝素预处理的注射器自心脏左心室分离血液样品。利用 LCMS 分析对血浆样品中的化合物 1 浓度进行分析。将切除的肿瘤在干冰上快速冷冻, 用经液氮冷却的低温研钵及研棒将其粉碎, 并在冷的  $1 \times$  细胞溶胞缓冲液 (Cell Signaling Technologies, Boston MA) 中溶解。自肿瘤溶解产物中提取蛋白并用 BSA 分析 (Pierce, Rockford, IL) 确定蛋白浓度。每一肿瘤样品中总或/及感兴趣的磷酸化蛋白的含量使用下文捕获 ELISA 法确定。

##### 评定激酶靶标的药代动力学抑制的 ELISA 分析

在每一ELISA分析中, 将自经赋形剂或化合物1处理的肿瘤形成的蛋白溶解产物转移至预涂有抗-c-Met/HGFR (Zymed Lab/Invitrogen, Carlsbad, CA) 或抗-ALK捕获抗体 (Cell Signaling Technologies, Boston MT) 的96孔板中。在4℃下于肿瘤溶解产物存在下将涂有抗体的各板温育过夜并用存于PBS的1% Tween 20洗涤七次。将HRP-PY20 (辣根过氧化物酶偶联的抗-总-磷酸化酪氨酸, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 按1:500稀释在封阻缓冲液 (Pierce, Rockford, IL) 中并将其加至各板中保持30分钟。再洗涤一次各板并加入TMB过氧化物酶底物 (Bio-Rad laboratories, Hercules CA) 以起始HRP依赖性比色反应。通过加入0.09 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>来终止反应。使用分光光度计在450nm处测量每一赋形剂或处理孔的光密度(OD)。在同一时间点根据OD读数对自经化合物1处理的动物切除的肿瘤中c-Met/HGFR或ALK的总磷酸化作用与自经赋形剂处理的动物切除的肿瘤中c-Met/HGFR或ALK的总磷酸化作用加以比较。在此评估中, 使用下列方程式计算肿瘤中化合物1对激酶靶标磷酸化作用的抑制: %抑制=100-[ (平均OD值经处理/平均OD值未经处理) × 100 ]。

### 免疫印迹

亦使用免疫印迹法来确定肿瘤样品中感兴趣的蛋白的相对激酶磷酸化作用状态及总蛋白含量。用不同剂量的化合物1处理具有肿瘤的小鼠, 如上所述制备肿瘤溶解产物及蛋白样品。使用特异性抗体免疫沉淀感兴趣的蛋白。通过SDS-PAGE及用抗-磷酸化酪氨酸或总抗体进行的免疫印迹将免疫沉淀的蛋白分开。

免疫印迹研究中所使用的抗体如下: 购自Zymed/Invitrogen, Carlsbad, CA的抗-总人类c-Met/HGFR抗体; 抗-磷酸化-c-Met/HGFR、抗-总及-磷酸化ALK、抗-总及磷酸化 Gab1、抗-总及磷酸化AKT、抗-总及磷酸化-MAPK44/42、STAT5抗体, 购自Cell Signaling Technologies, Boston, MA。

### 用于体内输注研究的微型渗透泵植入

Alzet 1003D及1007D微型渗透泵购自Durect公司 (Cupertino,

CA)。在微型泵上加载指定浓度的化合物1溶液，并在37℃下用无菌盐水溶液预处理，直至其在4至5小时达到平衡。通过外科手术按照制造商说明书将泵经皮下植入在右侧肋区具有肿瘤的小鼠的左方背侧胸区。用手术夹使切口闭合，5至7天后将手术夹去除，此时皮肤切口已完全愈合。对于所需输注时间及药物体积超过泵容量的研究，在指定时间实施泵更换手术。

### 肿瘤组织学及免疫组织化学(IHC)分析

收集用于对免疫组织化学终点进行评估的肿瘤样本并将其于含有蛋白酶及磷酸酶抑制剂的10%经缓冲的福尔马林中固定24小时，然后将其转移至70%乙醇中。随后用石蜡包埋肿瘤样本并切割成4微米切片且烘焙于显微镜载玻片上。按照制造商说明书使用市售无遮盖室(decloaking chamber)(Biocare Medical, 目录号DC2001)进行去石蜡及抗原回收(基于EDTA)。亦收集肿瘤OCT冷冻样品并切片用于CD-31染色。对于免疫染色，将载玻片与一级抗体一起温育，随后与二级抗体一起温育，且使用比色法(DAO Envision-HARP, DAB药盒, DAO, Carpinteria, CA)或荧光测定法(Alexa 488或Alexa 635, Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad CA)显像。使用苏木精对所有经免疫染色的切片进行复染。亦使用Automated Ventana Discovery XT Staining Module (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ)按照制造商说明书进行组织学染色。用Olympus显微镜对经染色的切片进行分析并利用ACIS系统(Automated Cellular Imaging, Clariant, Irvine CA)实施切片染色的定量分析。亦由内部病理学家使用标准临床方法对载玻片加以分析。

免疫组织化学研究中所使用的抗体包括来自Biosource Internationals/Invitrogen, Carlsbad, CA的抗-磷酸化-c-Met/HGFR; 来自Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA的抗-Ki67; 来自Dacocytomation, Carpinteria, CA的抗-CD31。

### 数据及结果

#### 化合物1针对c-Met/HGFR RTK的酶效力

经证明化合物1是重组、人类c-Met/HGFR激酶活性的有效ATP竞争抑制剂，其中平均 $K_i$ 为4 nM。

在生化酶分析中，化合物1抑制c-Met/HGFR的激酶活性，其中 $K_i$ 为3 nM。为研究相对于c-Met/HGFR的激酶选择性，进一步在针对一组>120个重组激酶的生化激酶筛选分析中评估化合物1。在这些初步的生化激酶选择性筛选中，鉴别出化合物1对其表现出活性的亚组激酶，从而估测对c-Met/HGFR的选择性较c-Met/HGFR低100倍。进一步在跟踪研究中于限定的基于细胞的激酶选择性分析中对化合物1对这些潜在激酶选中物的活性加以评估(表1)。通过监测与ATP转换偶联的NADH氧化确定对于c-Met/HGFR激酶的抑制的化合物1生化 $K_i$ 值。将化合物及激酶分析试剂加入测试孔并在37℃下温育10分钟且通过加入c-Met/HGFR来起始该反应。通过分光光度测定法在340nm处于指定时间点测量NADH。

#### 基于细胞的分析中化合物1的激酶选择性

在一组基于细胞的激酶活性分析中评估化合物1对所选激酶的选择性，这样的激酶为生化分析中的潜在选中物及其它相关RTK (例如，RON、SKY、IR)。在基于细胞的研究中，与c-Met/HGFR相比化合物1对VEGFR2及PDGFR $\beta$  split-RTK的选择性高1000倍，对IR及Lck的选择性高200倍，且对Ax1、Tie2、TrkA及TrkB的选择性高约40至60倍(A549  $IC_{50}$ =8.6 nM) (错误! 参考文献来源未找到1)。为研究50倍窗口对于体内c-Met/HGFR选择性是否足够，评估化合物1在裸鼠体内C6异种移植物中抑制Tie-2磷酸化作用的能力。在此研究中，在施用50mg/kg (24小时内对于c-Met/HGFR抑制表示为 $IC_{99}$ ) 或100mg/kg的单PO剂量后的任何时间点均未观察到明显的对Tie-2磷酸化作用的抑制。这表明，24小时内较c-Met/HGFR的完全抑制有关的剂量含量高多至2倍的剂量下不太可能出现Tie-2、Ax1或TrkA及B的抑制。化合物1对RON激酶的选择性为20至30倍，RON激酶为潜在的有益肿瘤学靶标，这是因为其1) 在所选癌症中的过表达及突变，及2) 没有无RON小鼠中的不良表型。与上述RTK相比，化合物1对ALK RTK (间变性淋巴瘤激酶) 融合蛋白的致癌形式即NPM-ALK表现出近乎相等的 $IC_{50}$ 值(24 nM)，NPM-ALK是ALK RTK (间变

性淋巴瘤激酶)的致癌融合蛋白变体,其是由与人类间变性大细胞淋巴瘤(ALCL, 存在于人类淋巴瘤细胞系(错误! 参考文献来源未找到1))的发病机理有关的染色体异位所致。

#### 细胞中c-Met/HGFR RTK活性的药代动力学抑制

为确认细胞中转变成c-Met/HGFR的抑制的有效酶活性, 评估化合物1在一组肿瘤及内皮细胞系中抑制cMet/HGFR磷酸化作用的能力。在整组人类肿瘤及内皮细胞系中, 化合物1抑制野生型c-Met/HGFR的HGF刺激的或组成型总酪氨酸自磷酸化作用, 其中平均 $IC_{50}$ 值为11 nM(表1)。化合物1在mIMCD3小鼠上皮细胞中表现出类似数值( $IC_{50}=5$  nM)(表1)。

#### 细胞中化合物1针对cMet/HGFR活性位点突变的效力

c-Met/HGFR激活突变已在若干人类癌症中得到鉴别并为证明基于其它RTK靶标的实验证据及临床前实验的概念临床研究提供强有力的基本原理。尽管未预计细胞外或近膜区结构域的c-Met/HGFR突变会影响化合物对活性位点的结合, 但激酶结构域突变有可能会造成活性损失。为解决此问题, 在经化合物1处理的经改造表达野生型c-Met/HGFR或一系列代表性c-Met/HGFR活性位点突变的NIH3T3细胞中评估RTK磷酸化作用 $IC_{50}$ 。在这些研究中, 与野生型受体(12.6 nM)相比化合物1对ATP结合位点突变体(V1092I, 19 nM及H1094R, 2.2 nM)或P-环突变体(M1250T, 15 nM)表现出改良的或类似活性(表1)。化合物1亦有效地表现出抑制NCI-H69 ( $IC_{50}$ : 13 nM)及HOP92 ( $IC_{50}$ : 16 nM)细胞中c-Met磷酸化作用的可比拟的效力, 其中两种细胞分别表达内源c-Met近膜区变体R988C及T1010I(表1)。与之相比, 与野生型受体相比对激活环突变体(Y1230C、127 nM及Y1235D, 92 nM)观察到效力的明显变化(10倍)(表1)。

表1

分析	IC <sub>50</sub> nM	选择性 比值 <sup>d</sup>
体外生化活性		
c-Met/HGFR酶(Ki, nM) <sup>a</sup>	4	NA
体外细胞活性		
人类肿瘤细胞系中的c-Met磷酸化作用(平均IC <sub>50</sub> ) <sup>b,c</sup>	11	NA
小鼠IMCD3上皮细胞中的c-Met磷酸化作用(IC <sub>50</sub> ) <sup>b</sup>	5	NA
NIH3T3细胞中的c-Met WT磷酸化作用(IC <sub>50</sub> ) <sup>b</sup>	13	NA
NIH3T3细胞中的c-Met突变体V1092I的磷酸化作用(IC <sub>50</sub> ) <sup>b</sup>	19	NA
NIH3T3细胞中的c-Met突变体H1094R的磷酸化作用(IC <sub>50</sub> ) <sup>b</sup>	2	0.1 ×
NIH3T3细胞中的c-Met突变体Y1230C的磷酸化作用(IC <sub>50</sub> ) <sup>b</sup>	127	11 ×
T47D细胞中的c-Met突变体Y1235D的磷酸化作用(IC <sub>50</sub> ) <sup>b</sup>	92	8 ×
NIH3T3细胞中的c-Met突变体M1250T的磷酸化作用(IC <sub>50</sub> ) <sup>b</sup>	15	NA
表达c-Met R988C变体的NCI-H69细胞中的c-Met磷酸化作用(IC <sub>50</sub> ) <sup>b</sup>	13	NA
表达c-Met T1010I变体的HOP92细胞中的c-Met磷酸化作用(IC <sub>50</sub> ) <sup>b</sup>	16	NA
人类Karpas299淋巴瘤细胞中的NPM-ALK磷酸化作用(IC <sub>50</sub> ) <sup>b</sup>	24	2 ×
体外针对非靶标激酶的细胞活性		
NIH-3T3-RON细胞中的MSP刺激的RON磷酸化作用(平均IC <sub>50</sub> ) <sup>b</sup>	189	17 ×
RON-GYRB细胞中的RON磷酸化作用(平均IC <sub>50</sub> ) <sup>b</sup>	298	27 ×
NIH-3T3-Ax1细胞中的Gas6刺激的Ax1磷酸化作用(平均IC <sub>50</sub> ) <sup>b</sup>	322	29 ×
NIH-3T3-Tie-2/EGFR细胞中的配体刺激的Tie-2磷酸化作用(平均IC <sub>50</sub> ) <sup>b</sup>	448	41 ×
Trk A-PAE细胞中的NGF刺激的TrkA磷酸化作用(平均IC <sub>50</sub> ) <sup>b</sup>	580	53 ×
Trk B-PAE细胞中的BDNF刺激的TrkB磷酸化作用(平均IC <sub>50</sub> ) <sup>b</sup>	399	36 ×
BCR-Abl-BaF3细胞中的BCR-Abl磷酸化作用(平均IC <sub>50</sub> ) <sup>b</sup>	1159	>100 ×
293-IRK细胞中的胰岛素刺激的胰岛素受体磷酸化作用(平均IC <sub>50</sub> ) <sup>b</sup>	2887	>250 ×
Jurkat细胞中的CD3刺激的Lck依赖性 Zap70磷酸化作用(平均IC <sub>50</sub> ) <sup>b</sup>	2741	>250 ×
NIH-3T3-Sky细胞中的Gas6刺激的Sky磷酸化作用(平均IC <sub>50</sub> ) <sup>b</sup>	>10000	~ 1000 ×
定义		
<sup>a</sup> 通过监测与ATP转换偶联的NADH氧化确定的c-Met/HGFR酶抑制的Ki。		
<sup>b</sup> 在各种细胞系暴露于若干浓度的PF-02341066 1小时后通过ELISA测量细胞蛋白溶解产物中的磷酸化作用来确定IC <sub>50</sub> 值。通过曲线拟合使用四参数分析产生IC <sub>50</sub> 值。		
<sup>c</sup> 由整组7个人类肿瘤细胞系(即, A549、MDA-MB-231、GTL-16、HT29、786-0、Colo-205、A498)的c-Met/HGFR磷酸化作用的平均IC <sub>50</sub> 值推导的平均IC <sub>50</sub> 值。		
<sup>d</sup> 用平均 <sup>c</sup> 细胞c-Met IC <sub>50</sub> 计算细胞分析的选择性比值。以IC <sub>50</sub> , (c-Met)/IC <sub>50</sub> , (靶标)计算选择性指数。		
WT=野生型		



## 化合物1对细胞中c-Met/HGFR-或NPM-ALK依赖性致癌表型的影响 表型分析

已发现c-Met/HGFR与多种肿瘤细胞及肿瘤内皮细胞的细胞生长、迁移及侵入的失调有关,而NPM-ALK与ALCL淋巴瘤细胞中的细胞增殖及凋亡的失调有关。在一系列基于细胞的功能分析中,化合物1有效地抑制了人类GTL-16胃癌细胞生长,诱发GTL-16细胞凋亡,抑制HGF刺激的人类NCI-H441肺癌细胞迁移及侵入透过基质胶基质以及抑制HGF刺激的MDCK细胞运动性/分散。(表2)化合物1亦抑制因t2;5染色体异位而表达NPM-ALK融合蛋白的Karpas 299或SU-DHL-1 ALCL细胞的增殖。这些NPM-ALK阳性淋巴瘤细胞中化合物1对生长的抑制与G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>细胞周期停止及凋亡的诱发有关。亦为研究潜在抗血管生成活性,化合物1抑制了HGF介导的HUVEC内皮细胞存活及基质胶侵入以及纤维蛋白凝胶中的HMVEC内皮细胞管生成。这些数据证明化合物1具有抑制分别表达激活的c-Met/HGFR或NPM-ALK的细胞中c-Met/HGFR-及NPM-ALK依赖性功能二者的能力。此外,这些数据说明,化合物1的抗肿瘤功效可通过直接影响肿瘤细胞生长或存活以及抗血管生成机制来受到介导。

表2

分析	PF-02314066浓度	
	nM	ng/ml
肿瘤细胞表型		
GTL-16胃癌细胞的增殖(MTT分析)(平均IC <sub>50</sub> )	9.7	4.4
GTL-16胃癌细胞的凋亡(ccDNA分析)(平均IC <sub>50</sub> )	8.4	3.8
HGF刺激的NCI-H441 NSCLC细胞Boyden小室迁移(平均IC <sub>50</sub> )	11	5
HGF刺激的NCI-H441 NSCLC细胞基质胶侵入(平均IC <sub>50</sub> )	6.1	2.7
HGF刺激的MDCK细胞集落分散(平均IC <sub>50</sub> )	16	7
内皮细胞表型		
HGF刺激的HUVEC内皮细胞存活(MTT分析)(平均IC <sub>50</sub> )	11	5
HGF刺激的HUVEC细胞基质胶侵入(平均IC <sub>50</sub> )	35	16
纤维蛋白凝胶中的HMVEC内皮细胞管生成(估测IC <sub>50</sub> )	80	36
定义: NSCLC=非小细胞肺癌; MDCK=Madin-Darby犬肾; ALCL=间变性大细胞淋巴瘤; HUVEC=人类脐静脉内皮细胞; HMVEC=人类微血管内皮细胞		

## 体内研究

### 数据及结果

#### 体内激酶靶标抑制及肿瘤生长抑制

#### 肿瘤模型选择

使用 c-Met/HGFR 依赖性肿瘤异种移植物模型来评估体内 c-Met/HGFR 靶标抑制、肿瘤生长抑制与化合物1的血浆暴露的关系。因缺乏由小鼠间充质细胞表达的小鼠HGF对肿瘤异种移植物表达的人类 c-Met/HGFR 的旁泌性激活，故使用如下表现出组成型 c-Met/HGFR 活性的人类异种移植物模型：1) 表达高含量组成型活性 c-Met/HGFR 的 GTL-16 人类胃癌或 Caki-1 肾癌模型，2) 表达含有自分泌环的 HGF 及 c-Met/HGFR 二者的 U87MG 人类成胶质细胞瘤或 PC-3 人类前列腺癌模型或 3) 人类肿瘤细胞 (例如，NCI-H441 NSCLC) 与人类 MRC5 成纤维细胞的一同植入，以提供来自肿瘤间质间隔的生物活性人类 HGF 来源从而恢复 c-Met/HGFR 的物种特异性旁分泌激活。

#### 口服施用后 c-Met/HGFR 抑制与抗肿瘤功效的关系

##### GTL-16 肿瘤

向具有确定的 GTL-16 肿瘤 (250mm<sup>3</sup>) 的无胸腺小鼠以指定剂量口服施用化合物1或单独施用赋形剂11天。对于研究 GTL-16 中 c-Met/HGFR 磷酸化作用的抑制的研究 (图2A)，在该研究结束时于施用后的指定时间点以人道方式对小鼠实施无痛致死术，切除肿瘤并冷冻，且通过 ELISA 定量赋形剂及处理组中的磷酸化作用。肿瘤中化合物1对激酶靶标磷酸化作用的抑制如下计算： $\%抑制 = 100 - [(平均OD值经处理 / 平均OD值未经处理) \times 100]$ 。在研究 GTL-16 肿瘤生长抑制的研究 (图2B) 中，通过测径器在指定天数测量各含15只小鼠的各组的肿瘤体积，以中值肿瘤体积  $\pm$  SEM 表示。所示百分比 (%) 数值为在第20天对经药物处理的小鼠测量的肿瘤生长抑制相比于经赋形剂处理的小鼠的肿瘤生长抑制的 % 且如下计算： $100 * \{1 - [(经处理第20天 - 经处理第10天) / (对照第20天 - 对照第10天)]\}$ 。\* 表示中值肿瘤体积在经处理组中明显小于对照组 ( $P < 0.001$ )，如使用单因素方差分析确定 (参见图2B)。

为评估对化合物1的c-Met/HGFR PD反应，在单次施用及重复施用（稳定状态）研究中于口服施用化合物1后的若干时间点收集GTL-16肿瘤。通过ELISA在一剂量范围内定量肿瘤中c-Met/HGFR磷酸化作用状态。在把注意力集中在稳态PD研究（11天）上以绘制与肿瘤生长抑制的关系时，如图2A及2B中所示化合物1表现如下特征：

在50mg/kg/天时：在GTL-16肿瘤中，100%的肿瘤生长抑制伴随c-Met/HGFR磷酸化作用的完全抑制持续24小时（25mg/kg--磷酸化作用及肿瘤生长二者近乎完全抑制）。在12.5mg/kg/天时：1-8小时时，60%的肿瘤生长抑制伴随80%至90%的c-Met/HGFR磷酸化作用抑制，其在16-24小时时降至50%至60%抑制。

在6.25mg/kg/天时：1-8小时时，非明显的肿瘤生长抑制趋向伴随30%至50%的c-Met/HGFR磷酸化作用抑制，且在16小时时完全恢复。

#### U87MG肿瘤

向具有确定的U87MG肿瘤（150mm<sup>3</sup>）的无胸腺小鼠以指定剂量口服施用化合物1或单独施用赋形剂9天。对于研究肿瘤生长抑制的研究（图3A），通过测径器在指定天数测量各含10-12只小鼠的各组的肿瘤体积，以中值肿瘤体积±SEM表示。所示百分比（%）数值为在第14天测量的经药物处理小鼠的肿瘤生长抑制相比于经赋形剂处理的小鼠的肿瘤生长抑制的%且如下计算： $100 * \{1 - [(经处理第14天 - 经处理第6天) / (对照第14天 - 对照第6天)]\}$ 。\*表示中值肿瘤体积在经处理组中明显低于对照组（ $P < 0.001$ ），如使用单因素方差分析确定（参见图3A）。对于研究c-Met/HGFR磷酸化作用的抑制的研究（图3B），在该研究结束时于施用化合物1后4小时以人道方式对小鼠实施无痛致死术，切除肿瘤并冷冻，且通过ELISA定量赋形剂及处理组中的磷酸化作用。肿瘤中化合物1对激酶靶标磷酸化作用的抑制是如下计算： $\%抑制 = 100 - [(平均OD值经处理 / 平均OD值未经处理) \times 100]$ 。

在U87MG异种移植物中在多至100mg/kg的剂量含量下未观察到Tie-2磷酸化作用的药理学相关抑制，表明化合物1在类似剂量含量下对其预期靶标具有选择性。

## 人类异种移植物模型中化合物1的抗肿瘤功效

在多种代表癌症适应症的人类肿瘤异种移植物模型中评估化合物1的抗肿瘤功效，这样的癌症适应症涉及c-Met/HGFR失调，包括GTL-16胃癌、U87MG成胶质细胞瘤、NCI-H441 NSCLC及PC-3前列腺癌(表4)。

### GTL-16胃癌模型

使用GTL-16胃癌模型时，化合物1表现出使大型确定的肿瘤( $>600\text{mm}^3$ )明显退化的能力(图4)。在此研究中，50mg/kg/天及75mg/kg/天的化合物1治疗组在43天的施用程序表中表现出相等的平均肿瘤退化，此进一步证明50mg/kg/天是最大有效剂量含量。如图4中所示，50mg/kg/天或75mg/kg/天时的平均肿瘤在施用化合物1 43天后退化60%。在本研究中，在43天化合物1施用周期过程中在每一剂量含量下每一肿瘤的质量均降低，其中14只小鼠中有9只表现出 $\geq 30\%$ 的肿瘤质量降低(部分反应)，且一只动物表现出完全反应，即使在停止治疗10天后仍无肿瘤迹象。

每日口服施用化合物1后无胸腺小鼠中大型确定的GTL-16肿瘤异种移植物(图4A)及小鼠体重(图4B)的退化。向具有确定的GTL-16肿瘤( $620\text{mm}^3$ )的无胸腺小鼠以指定剂量含量口服施用化合物1或单独施用赋形剂43天。为研究抗肿瘤功效(图4A)，通过测径器在指定天数测量各含6至8只小鼠的各组的肿瘤体积，以中值肿瘤体积 $\pm$ SEM表示。(图4B)化合物1处理及赋形剂对照组的平均小鼠体显示于右手版面中。

### NCI-H441 NSCLC模式/Caki-1/PC-3肿瘤异种移植物I

分别向具有确定的NCI-H441 ( $100\text{mm}^3$ ) (图5A)、Caki-1 (表3A、表3B)或PC-3肿瘤异种移植物(图5B)的无胸腺小鼠以指定剂量口服施用化合物1或单独施用赋形剂38、40或20天。通过测径器在指定天数测量肿瘤体积，其中表示为中值肿瘤体积 $\pm$ SEM。\*表示中值肿瘤体积在经处理组中明显低于对照组( $P < 0.001$ )，如使用单因素方差分析确定。(参见图5)。

在NCI-H441 NSCLC模型中，在以50mg/kg/天施用化合物1 38天后观察到确定的肿瘤的43%平均退化(图5)。在此研究中，在33天化合物1

施用周期过程中在50mg/kg/天下每一肿瘤的质量均减低，其中11只小鼠中有3只表现出 $\geq 30\%$ 的肿瘤质量降低(部分反应)，且3只动物表现出完全反应，没有肿瘤迹象(图5)。化合物1的抗肿瘤功效具有剂量依赖性，其中在50mg/kg/天下观察到确定的NCI-H441肿瘤的退化且在15mg/kg/天下观察到肿瘤生长(57%肿瘤生长抑制)的部分抑制(图5)。相比于赋形剂处理的对照，化合物处理组中在NCI-H441模型中观察到的化合物1的抗肿瘤功效与肿瘤中c-Met/HGFR磷酸化作用的抑制一致。在Caki-1肾癌模型中，在33天化合物1施用周期过程中在50mg/kg/天下观察到平均肿瘤体积降低53%(图5B)。在Caki-1研究中，每一肿瘤的体积在33天化合物1施用周期过程中至少降低30%(表3B, 表4)。亦在PC-3前列腺癌异种移植物模型中研究化合物1的抗肿瘤功效且在此模型中观察到肿瘤生长的近乎完全抑制(84%生长抑制)。

表3A

肿瘤体积 (mm <sup>3</sup> )													
对照受试者													
天数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均 值	SEM	n
1	63	63	63	108	126	126	126	144	196	196	121	15.7	10
4	108	63	144	256	405	320	405	320	550	446	301.6	50.1	10
8	108	144	196	256	936	405	726	446	1268	700	518.4	120.7	10
12	126	365	196	256	1688	726	936	1008		1437	748.5	187.9	9
15	196	550	352	365		1008	1372				640.4	185.8	6
19	172	864	256	486							444.4	154.9	4
22	288	936	288	726							559.5	162.5	4
26	288	1268	365	650							642.5	222.4	4
29	221		405	1008							544.5	237.8	3
33	320		550								435	115	2
36	405		550								477.5	72.5	2
40	486		600								543	57	2
43	726		864								795	69	2
47	787		936								861.3	74.8	2
50	787		1008								897.3	110.8	2
54	787										786.5		1

表3B

肿瘤体积 (mm <sup>3</sup> )													
实验受试者 (化合物1, 50mg/kg)													
天数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均值	SEM	n
1	63	63	63	108	108	126	126	172	172	196	119.5	15.4	10
4	32	63	63	108	108	196	126	126	172	196	118.9	17.9	10
8	18	40	14	40	32	75	40	63	63	75	45.9	7	10
12	14	32	14	32	32	63	40	40	40	63	36.8	5.3	10
15	4	14	14	32	32	40	32	40	40	40	28.7	4.2	10
19	14	18	14	32	32	40	18	32	63	63	32.4	5.8	10
22	14	14	14	14	32	63	14	32	108	108	41	12.2	10
26	14	14	14	18	32	40	32	63	75	75	37.5	7.9	10
29	14	32	18	32	63	40	40	108	108	108	56.2	12	10
33	14	32	18	32	63	40	40	108	108	108	56.2	12	10
36	32	40	32	63	75	75	63	75	126	126	70.6	10.7	10
40	32	63	32	63	75	75	63	75	172	172	82	15.7	10
43	32	32	14	63	63	63	32	63	256	63	67.8	21.7	10
47	32	40	32	63	75	108	63	75	196	108	79.1	15.6	10
50	32	63	40	63	108	108	63	108	196	172	95.1	17.2	10
54	63	63	40	14	108	75	40	75	172	172	82	16.9	10

### 抗肿瘤功效与c-Met/HGFR的抑制的关系

进行一系列剂量-反应抗肿瘤功效及药代动力学研究以阐明c-Met/HGFR靶标抑制与抗肿瘤功效之间的关系。为评估化合物1对c-Met/HGFR的药代动力学抑制,在口服施用化合物1后的若干时间点收集GTL-16胃癌肿瘤。通过ELISA在一定剂量范围内定量肿瘤中c-Met/HGFR磷酸化作用状态。在这些研究中,化合物1表现出c-Met/HGFR的剂量-及时间依赖性抑制与肿瘤生长抑制间的紧密关系。在GTL-16模型中定义靶标PD与功效间的关系时,下列结论显而易见:

1) 24小时内c-Met/HGFR活性的完全抑制与肿瘤生长的完全抑制一致(50mg/kg, 100% TGI), 2) 仅一部分程序表内的c-Met/HGFR活性的有效抑制与次最佳功效一致(12.5mg/kg, 60% TGI), 3) 无能力达到>50%的c-Met/HGFR活性抑制(3.125, 6.25mg/kg)与缺乏明显肿瘤生长抑制(TGI)一致(图2A及2B)。另外的GTL-16研究显示, 50mg/kg/天及

75mg/kg/天化合物1对照组表现出相等的平均肿瘤退化,此进一步证明50mg/kg/天是最大有效剂量含量(图4及表4)。这些研究结果表明c-Met/HGFR抑制的持续时间与化合物1的抗肿瘤功效直接相关。

此外,利用所有肿瘤模型(GTL-16、U87MG及NCI-H441)及施用程序表均观察到类似的化合物1对肿瘤生长及c-Met/HGFR磷酸化作用的剂量-剂量依赖性影响,这些进一步支持观察结果(表4)。在每一这些研究中,50mg/kg/天剂量含量引起了完全肿瘤生长抑制或肿瘤退化(表4)。此外,在每一模型中于c-Met/HGFR磷酸化作用的抑制与抗肿瘤功效之间均观察到剂量依赖性关系,进一步支持最大化c-Met/HGFR抑制的程度及持续时间可达到完全功效的概念。总而言之,这些研究表明,对于最大化治疗益处施用程序表的持续时间内c-Met/HGFR磷酸化作用的近乎完全的抑制是必要的且抑制c-Met/HGFR活性的程度及持续时间与抗肿瘤功效含量直接相关。此数据支持化合物1的预期药理学靶标即c-Met/HGFR的抑制与抗肿瘤功效程度之间的关联。

#### NPM-ALK-依赖性淋巴瘤模型中化合物1的抗肿瘤功效

##### Karpas 299 ALCL模型

向具有确定的Karpas 299肿瘤(220mm<sup>3</sup>)的SCID-beige小鼠以指定剂量口服施用化合物1或单独施用赋形剂,持续指定时间。对于研究肿瘤生长抑制的研究(图6A),通过测径器在指定天数测量各含8至12只小鼠的各组的肿瘤体积,以中值肿瘤体积±SEM表示。所示百分比(%)数值为在第23天测量的经药物处理的小鼠的肿瘤生长抑制相比于经赋形剂处理的小鼠的肿瘤生长抑制的%且如下计算:  $100 * \{1 - [(经处理第23天 - 经处理第12天) / (对照第23天 - 对照第12天)]\}$ 。\*表示中值肿瘤体积在经处理组中明显低于对照组(P<0.001),如使用单因素方差分析确定。对于研究NPM-ALK磷酸化作用的抑制的研究(图6B),在该研究结束时于施用化合物1后4小时以人道方式对小鼠实施无痛致死术,切除肿瘤并冷冻,且通过ELISA定量赋形剂及经处理肿瘤中ALK磷酸化作用。肿瘤中化合物1对激酶靶标磷酸化作用的抑制是如下计算: %抑制 =  $100 - [(平均OD值经处理 / 平均OD值未经处理) * 100]$ 。



使用Karpas 299 ALCL模型时，化合物1表现出可引起确定的肿瘤(>200mm<sup>3</sup>)明显退化的能力(图6A)。在此研究中，以100mg/kg/天施用化合物1在开始化合物施用后的15天内引起此施用组中所有小鼠的肿瘤的完全退化(图6A)。17天后，停止化合物1处理，导致肿瘤重新生长。在肿瘤生长至较大尺寸(>600mm<sup>3</sup>)时，重新开始化合物1处理，持续13天且再一次表现出肿瘤的完全退化(图6A，表4)。化合物1的细胞减少性作用与其在体外对ALCL细胞的抗增殖及凋亡作用的观察结果相一致。亦在多个剂量含量及时间点确定肿瘤NPM-ALK磷酸化作用的抑制与抗肿瘤功效之间的关系。类似于在c-Met/HGFR依赖性肿瘤模型中观察到的结果，完全施用间隔(24小时)内NPM-ALK活性的近乎完全抑制(>90%抑制)与100mg/kg下最大抗肿瘤功效(完全退化)相一致(图6A及6B)。NPM-ALK磷酸化作用的不完全抑制(在25mg/kg或50mg/kg下<90%抑制)与次最大抗肿瘤功效相一致(图6A及6B)。类似于c-Met/HGFR依赖性肿瘤模型中的研究，此数据支持NPM-ALK依赖性肿瘤模型中化合物1的其它预期药理学靶标即NPM-ALK的抑制与抗肿瘤功效的程度之间的关联。

表4

模型 (肿瘤类型)	初始肿瘤体积 (mm <sup>3</sup> )	剂量及 程序表 (mg/kg)	整体作用				P值 经处理 相比于 对照
			生长抑制% (天数) <sup>1</sup>	退化 <sup>2</sup>	PR	CR	
GTL-16 (胃癌)	230	50, QD	100% (d11)	No	2/15	No	<0.0001
	230	25, QD	89% (d11)	No	No	No	<0.0001
	230	12.5, QD	60% (d11)	No	No	No	0.0013
	230	6.25, QD	34% (d11)	No	No	No	0.074
	230	3.125, QD	29% (d11)	No	No	No	0.144
	230	25, BID	95% (d11)	No	No	No	<0.0001
	230	12.5, BID	84% (d11)	No	No	No	<0.0001
	230	6.25, BID	63% (d11)	No	No	No	<0.0001
GTL-16 (胃癌)	620	75, QD	退化	60% (d43)	6/8	No	<0.0001
	620	50, QD	退化	60% (d43)	3/6	1/6	<0.0001
U87MG (成胶质 细胞瘤)	170	50, QD	97% (d9)	No	1/12	No	<0.0001
	170	25, QD	83% (d9)	No	1/12	No	<0.0001
	170	12.5, QD	71% (d9)	No	No	No	<0.0001
	170	6.25, QD	50% (d9)	No	No	No	0.0003
	170	3.125, QD	34% (d9)	No	No	No	0.0454
H441 (NSCLC)	100	50, QD	退化	48% (d38)	3/11	3/11	<0.0001
	100	15, QD	59% (d9)	No	No	2/12	0.0013
PC-3 (前列腺癌)	290	50, QD	84% (d20)	No	No	No	0.001
Caki-1 (肾癌)	100	50, QD	退化	53%	7/10	3/10	0.001
Karpas 299 (ALK淋巴瘤)	220	100, QD	退化	100% (d16)	No	12/12	<0.0001
	220	50, QD	96% (d11)	No	No	No	<0.0001
	220	25, QD	57% (d11)	No	No	No	<0.0001
	540	100, QD	退化	90% (d13)	3/3	No	<0.0001

## 化合物1的合成

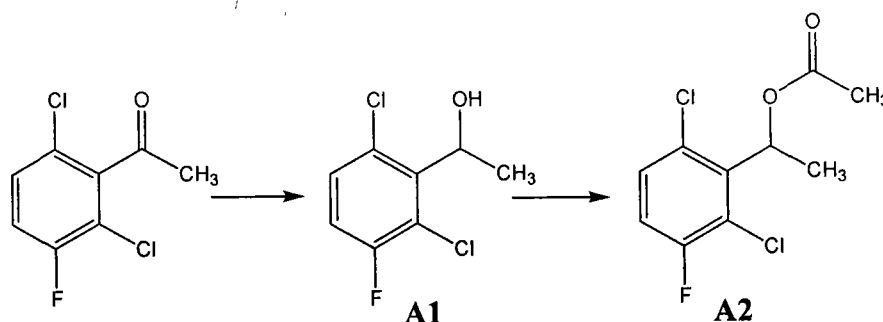
PLE是一种由Roche生产且由Biocatalytics公司以来自猪肝的粗

制酯酶制剂形式出售的酶，常称作PLE-AS（作为ICR-123购自Biocatalytics，以硫酸铵悬浮液形式出售）。该酶在CAS注册号中分类为“羧酸酯水解酶，CAS第9016-18-6号”。相应的酶分类号为EC 3.1.1.1。已知该酶对多种酯的水解具有广泛底物特异性。利用基于水解丁酸乙酯的方法在pH滴定器中测定脂酶活性。1 LU（脂酶单位）为在22℃、pH 8.2下释放1 μmol可滴定的丁酸的酶的量。本文所报告的制剂（PLE-AS，呈悬浮液形式）通常作为不透明的褐色-绿色液体运输，填报活性为>45 LU/mg（蛋白含量约40mg/ml）。

#### (1S)-1-(2,6-二氯-3-氟苯基)乙醇

根据反应图B通过外消旋乙酸1-(2,6-二氯-3-氟苯基)乙酯的酶水解、酯化作用及伴随转位的化学水解的组合制备(1S)-1-(2,6-二氯-3-氟苯基)乙醇（在下方反应图中显示为化合物(S-1)）。根据反应图A制备外消旋1-(2,6-二氯-3-氟苯基)乙酸乙酯（化合物A2）。

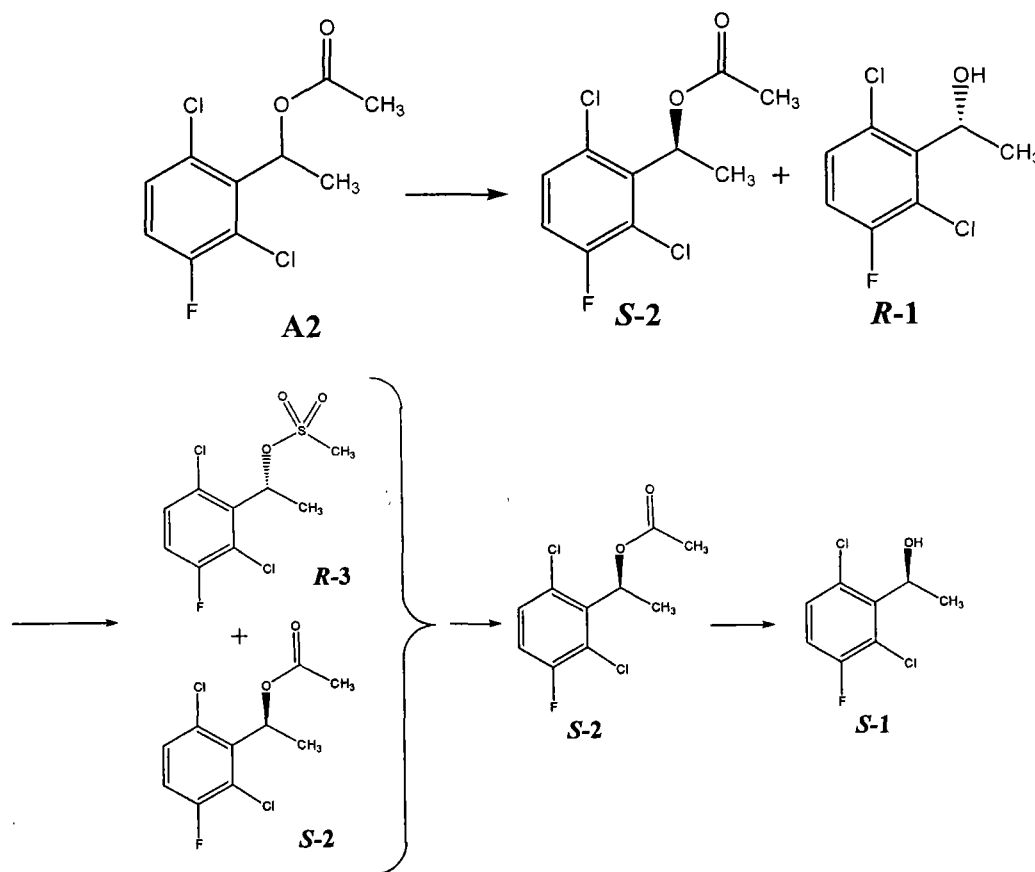
反应图A



1-(2,6-二氯-3-氟苯基)乙醇(A1): 将硼氢化钠(90mg, 2.4mmol)加入 2',6'-二氯-3'-氟-乙酰苯(Aldrich, 目录号52,294-5)(207mg, 1mmol)溶于2ml无水CH<sub>3</sub>OH的溶液中。将该混合物在室温搅拌1小时然后蒸发,得到无色油状剩余物。该剩余物通过快速层析法纯化(用0→10%存于己烷中的EtOAc洗脱),得到无色油状的化合物A1(180mg; 0.88mmol; 产率86.5%); MS (APCI) (M-H)<sup>-</sup> 208; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, 氯仿-D) δ ppm 1.64 (d, J=6.82 Hz, 3H) 3.02 (d, J=9.85 Hz, 1H) 6.97-7.07 (m, 1H) 7.19-7.33 (m, 1H)。

1-(2,6-二氯-3-氟苯基)乙酸乙酯(A2): 将乙酸酐(1.42ml, 15mmol)及吡啶(1.7ml, 21mmol)依序加入化合物A1(2.2克, 10.5mmol)溶于20mlCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>的溶液中。将该混合物在室温搅拌12小时且随后蒸发, 得到浅黄色油状剩余物。该剩余物通过快速层析法纯化(用7→9%存于己烷中的EtOAc洗脱), 得到化合物无色油状的A2(2.26 g; 9.0mmol; 产率85.6%); <sup>1</sup>H NMR(400 MHz, 氯仿-D) δ ppm 1.88 (d, J=6.82 Hz, 3H) 2.31 (s, 3H) 6.62 (q, J=6.82 Hz, 1H) 7.25 (t, J=8.46 Hz, 1H) 7.49 (dd, J=8.84, 5.05 Hz, 1H)。

反应图B



在一个配有pH电极、顶置搅拌器及碱添加线(1 M NaOH)的50ml夹套式烧瓶中加入1.2ml的100 mM磷酸钾缓冲液(pH 7.0)及0.13ml的PLE AS悬浮液。然后, 逐滴加入化合物A2(0.13克, 0.5mmol, 1.00当量)且将所得混合物在室温搅拌20小时, 用1 M NaOH将反应的pH恒定在7.0。由RP-HPLC监测反应物的转化和对映异构体过量值(ee), 并在消耗50%

起始材料后终止(在这些条件下为约17小时)。然后用10ml乙酸乙酯将该混合物萃取三次以回收为R-1与S-2的混合物的酯和醇二者。

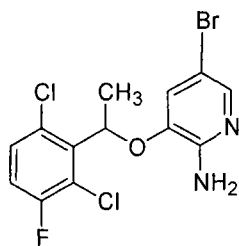
在氮气气氛下,将甲磺酰氯(0.06ml, 0.6mmol)加入R-1与S-2的混合物(0.48mmol)溶于4ml吡啶的溶液中。将该混合物在室温搅拌3小时然后蒸发以得到油。将水(20ml)加入该混合物中且随后加入EtOAc (20ml × 2)以萃取该水溶液。将有机层合并、干燥、过滤并蒸发,得到R-3与S-2的混合物。该混合物无需进一步纯化即可用于下一步反应。

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, 氯仿-D)  $\delta$  ppm 1.66 (d,  $J=7.1$  Hz, 3H) 1.84 (d,  $J=7.1$  Hz, 3H) 2.09 (s, 3H) 2.92 (s, 3H) 6.39 (q,  $J=7.0$  Hz, 1H) 6.46 (q,  $J=6.8$  Hz, 1H) 6.98-7.07 (m, 1H) 7.07-7.17 (m, 1H) 7.23-7.30 (m, 1H) 7.34 (dd,  $J=8.8, 4.80$  Hz, 1H)。

在氮气气氛下,将乙酸钾(0.027克, 0.26mmol)加入R-3与S-2 (0.48mmol)于4mlDMF的混合物中。该反应混合物在100°C加热12小时。将水(20ml)加入该反应混合物中并加入EtOAc (20ml × 2)萃取该水溶液。将合并的有机层干燥、过滤并蒸发,得到S-2的油(72mg, 两步产率61%)。手性ee: 97.6%。 $^1\text{H NMR}$  (400 MHz, 氯仿-D)  $\delta$  ppm 1.66 (d,  $J=7.1$  Hz, 3H) 2.09 (s, 3H) 6.39 (q,  $J=6.8$  Hz, 1H) 7.02 (t,  $J=8.5$  Hz, 1H) 7.22-7.30 (m, 1H)。

在氮气气氛下,将甲醇钠(19mmol; 0.5 M, 于甲醇中)于0°C缓慢加至化合物S-2 (4.64克, 18.8mmol)中。将所得混合物在室温搅拌4小时。蒸发溶剂并加入H<sub>2</sub>O (100ml)。冷却的反应混合物用乙酸钠-乙酸缓冲溶液中和至pH 7。加入乙酸乙酯(100ml × 2)萃取该水溶液。将合并的有机层经由Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并蒸发,得到白色固体状的S-1 (4.36克, 产率94.9%); SFC-MS: 97% ee。 $^1\text{H NMR}$  (400 MHz, 氯仿-D)  $\delta$  ppm 1.65 (d,  $J=6.8$  Hz, 3H) 5.58 (q,  $J=6.9$  Hz, 1H) 6.96-7.10 (m, 1H) 7.22-7.36 (m, 1H)。

5-溴-3-[1-(2,6-二氯-3-氟-苯基)-乙氧基]-吡啶-2-基胺(外消旋物):



1. 在0℃下，将2,6-二氯-3-氟乙酰苯(15克，0.072mol)于THF(150ml，0.5 M)中借助冰浴搅拌10分钟。缓慢加入氢化铝锂(2.75克，0.072mol)。将该反应物在环境温度下搅拌3小时。将该反应物在冰浴中冷却，并逐滴加入水(3ml)，随后缓慢加入15% NaOH(3ml)。将该混合物在环境温度下搅拌30分钟。加入15% NaOH(9ml)、MgSO<sub>4</sub>并将该混合物过滤以去除固体。这样的固体用THF(50ml)洗涤且将滤液浓缩，得到黄色油状1-(2,6-二氯-3-氟-苯基)-乙醇(14.8克，产率95%)。<sup>1</sup>H NMR(400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 1.45 (d, 3H), 5.42 (m, 2H), 7.32 (m, 1H), 7.42 (m, 1H)。

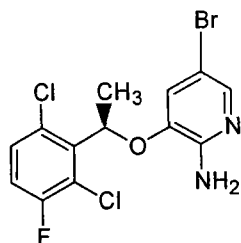
2. 在0℃下向三苯基膦(8.2克，0.03mol)及DEAD(13.65ml，40%溶于甲苯的溶液)溶于THF(200ml)的经搅拌的溶液中加入1-(2,6-二氯-3-氟-苯基)-乙醇(4.55克，0.021mol)及3-羟基-硝基吡啶(3.35克，0.023mol)溶于THF(200ml)的溶液。在氮气气氛下，将所得鲜橙色溶液在环境温度下搅拌4小时，此时所有起始材料已被消耗。去除溶剂，且将干燥粗制材料上样至硅胶上，且用乙酸乙酯-己烷(20:80)洗脱，得到粉红色固体状3-(2,6-二氯-3-氟-苄氧基)-2-硝基-吡啶(6.21克，0.021mol，98%)。<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ 1.8-1.85 (d, 3H), 6.0-6.15 (q, 1H), 7.0-7.1 (t, 1H), 7.2-7.21 (d, 1H), 7.25-7.5 (m, 2H), 8.0-8.05 (d, 1H)。

3. 将3-(2,6-二氯-3-氟-苄氧基)-2-硝基-吡啶(9.43克，0.028mol)及铁屑(15.7克，0.28mol)悬浮于AcOH(650ml)与EtOH(500ml)的经搅拌混合物中。将该反应物缓慢加热至回流且将其搅拌1小时。将该反应物冷却至室温，然后加入二乙醚(500ml)和水(500ml)。通过加入碳酸钠来小心地中和溶液。合并的有机萃取物用饱和NaHCO<sub>3</sub>(2 × 100ml)、H<sub>2</sub>O(2 × 100ml)及盐水(1 × 100ml)洗涤，然后干燥

(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 过滤并在真空中浓缩至干燥状态, 得到浅粉色固体状3-(2,6-二氯-3-氟-苄氧基)-吡啶-2-基胺(9.04克, 0.027mol, 99%)。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ 1.8-1.85 (d, 3H), 4.9-5.2 (brs, 2H), 6.7-6.84 (q, 1H), 7.0-7.1 (m, 1H), 7.2-7.3 (m, 1H), 7.6-7.7 (m, 1H)。

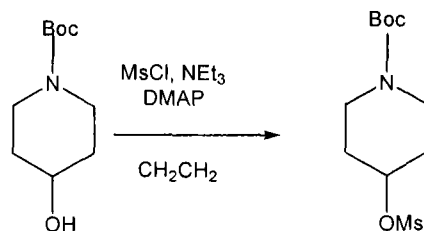
4. 借助冰浴将3-(2,6-二氯-3-氟-苄氧基)-吡啶-2-基胺(9.07克, 0.03mol)溶于乙腈的经搅拌溶液冷却至0℃。在此溶液中逐份加入N-溴琥珀酰亚胺(NBS)(5.33克, 0.03mol)。将该反应物在0℃下搅拌15分钟。将该反应物在真空中浓缩至干燥状态。将所得黑色油溶于EtOAc(500ml), 并经由硅胶层析法纯化。然后在真空中去除溶剂, 得到白色结晶固体状5-溴-3-(2,6-二氯-3-氟-苄氧基)-吡啶-2-基胺(5.8克, 0.015mol, 51%)。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ 1.85-1.95 (d, 3H), 4.7-5.0 (brs, 2H), 5.9-6.01 (q, 1H), 6.8-6.95 (d, 1H), 7.01-7.2 (t, 1H), 7.4-7.45 (m, 1H), 7.8-7.85 (d, 1H)。

5-溴-3-[1(R)-(2,6-二氯-3-氟-苄基)-乙氧基]-吡啶-2-基胺:



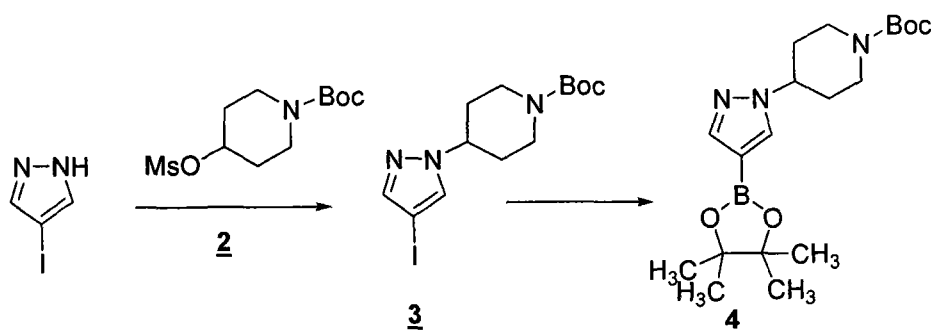
如上所述制备该外消旋物的对映异构体纯R异构体, 但使用上述对映异构体纯起始材料。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 1.74 (d, 3H), 6.40 (m, 1H), 6.52 (br s, 2H), 7.30 (m, 1H), 7.48 (m, 1H), 7.56 (s, 1H); MS m/z 382 (M+1)。

4-甲磺酰基氧基-吡啶-1-羧酸叔丁酯(2)

2

在冷却至0℃的4-羟基-哌啶-1-羧酸叔丁酯(7.94克, 39.45mmol)溶于CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100ml)的经搅拌溶液中缓慢加入NEt<sub>3</sub> (5.54ml, 39.45mmol), 随后加入甲磺酰氯(3.06ml, 39.45mmol)及DMAP (48mg, 0.39mmol)。将该混合物在室温下搅拌过夜。向该混合物中加入水(30ml)。用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 30ml)萃取, 随后干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)并在真空中去除溶剂, 得到白色固体状的4-甲磺酰基氧基-哌啶-1-羧酸叔丁酯(11.00克, 产率>99%)。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 4.89 (m, 1H), 3.69 (m, 2H), 3.31 (m, 2H), 3.04 (s, 3H), 1.95 (m, 2H), 1.83 (m, 2H), 1.46 (s, 9H)。

4-[4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-1H-吡唑-1-基]哌啶-1-羧酸叔丁酯



4-(4-吡唑-1H-吡唑-1-基)哌啶-1-羧酸叔丁酯 (3)

在4℃下, 将NaH (1.2当量, 0.68mmol)逐份加入4-吡唑吡唑(0.57mmol)溶于DMF (2公升)的经搅拌溶液中。将所得混合物在4℃下搅拌1小时且随后加入4-甲磺酰基氧基-哌啶-1-羧酸叔丁酯, 即化合物2 (1.1当量, 0.63mmol)。将所得混合物在100℃加热12小时。用H<sub>2</sub>O淬灭该反应物并用EtOAc萃取若干次。将合并的有机层干燥、过滤并浓缩, 得到橙色油。该剩余物通过硅胶层析法(用5%存于戊烷中的EtOAc

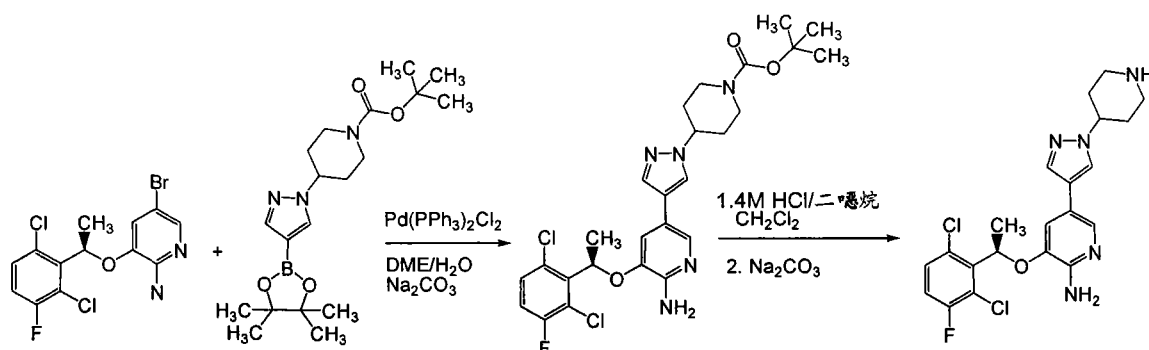


洗脱)纯化,得到白色固体状的化合物<sub>3</sub> (140克, 66%)。

4-[4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-1H-吡唑-1-基]哌啶-1-羧酸叔丁酯(4)

将双(戊酰)二硼(bis(pinacolato)diboron) (1.4当量, 134克, 0.52mol)及乙酸钾(4当量, 145克, 1.48mol)依序加至化合物<sub>3</sub> (140克, 0.37mol)溶于1.5公升DMSO的溶液中。该混合物用氮气净化若干次且随后加入二氯双(三苯基膦)钯(II) (0.05当量, 12.9克, 0.018mol)。将所得混合物在80℃下加热2小时。将该反应混合物冷却至室温并过滤过硅藻土床且用EtOAc洗涤。滤液用饱和NaCl (500ml × 2)洗涤, 经由Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并浓缩。该剩余物通过硅胶层析法(用5%存于己烷中的EtOAc洗脱)纯化, 得到白色固体状的化合物<sub>4</sub> (55克, 40%)。

3-[(R)-1-(2,6-二氯-3-氟-苯基)-乙氧基]-5-(1-哌啶-4-基-1H-吡唑-4-基)-吡啶-2-基胺(1)



在3-[(R)-1-(2,6-二氯-3-氟-苯基)-乙氧基]-5-(4,4,5,5-四甲基-[1,3,2]二氧杂环戊硼烷-2-基)-吡啶-2-基胺(15.22克, 35.64mmol)及4-(4-溴-吡唑-1-基)-哌啶-1-羧酸叔丁酯(14.12克, 42.77mmol)溶于DME (143ml)的经搅拌溶液中加入Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (11.33克, 10692mmol)溶于水(36ml)的溶液。给该溶液脱气并冲入氮气三次。在该溶液中加入Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.25mg, 1.782mmol)。给该反应溶液脱气并再冲入氮气三次。将该反应溶液在87℃油浴中搅拌约16小时(或直至硼烷频哪醇酯耗尽为止), 冷却至环境温度并用EtOAc (600ml)稀释。经由硅藻土垫过滤该反应混合物并用EtOAc洗涤。该EtOAc溶液用盐水洗涤, 经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并浓缩。该粗制产物在用EtOAc/己烷系统洗脱的硅

胶管柱上纯化(Biotage 90+管柱: 用600ml100%己烷平衡, 区段1: 2250ml 50% EtOAc/己烷, 线性; 区段2: 4500ml 75% EtOAc/己烷线性; 区段3: 4500ml100% EtOAc), 得到4-(4-{6-氨基-5-[(R)-1-(2,6-二氯-3-氟-苯基)-乙氧基]-吡啶-3-基}-吡唑-1-基)-哌啶-1-羧酸叔丁酯(11.8克, 产率60%, 纯度约95%), 其中Rf为0.15 (50% EtOAc/己烷)。MS m/e 550 (M+1)<sup>+</sup>。

在4-(4-{6-氨基-5-[(R)-1-(2,6-二氯-3-氟-苯基)-乙氧基]-吡啶-3-基}-吡唑-1-基)-哌啶-1-羧酸叔丁酯(11.8克, 21.45mmol)溶于CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (59ml, 0.2 M)的溶液中加入4 N HCl/二噁烷(21ml)。将该溶液搅拌过夜, 形成一固体。用玻璃棒将该固体彻底碾碎并超声处理以释放该固体中截留的起始材料。加入另外的4 N HCl/二噁烷(21ml)并在室温下再搅拌2小时, 其中LCMS显示不存在起始材料。将该悬浮液在衬有滤纸的布氏漏斗中加以过滤。保存母液, 乃因其含有<5%的产物。将该固体转移至500ml烧杯中并加入HPLC水直至固体完全溶解。借助添加固体Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>将pH调节至10。该水溶液用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 × 200ml)萃取或直至LCMS显示水性层中不存在产物为止。CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>溶液经由Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并浓缩。重新溶于CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10ml)及MeOH (1ml)中的粗制产物在用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NEt<sub>3</sub>系统洗脱的硅胶管柱上纯化(Biotage 40+管柱: 用600mlCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100%平衡, 得到副产物, 区段1: 1200ml10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 线性; 区段2: 2400ml10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 步骤; 区段3: 2400ml9% MeOH/1% NEt<sub>3</sub>/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)。收集所需部分, 得到3-[(R)-1-(2,6-二氯-3-氟-苯基)-乙氧基]-5-(1-哌啶-4-基-1H-吡唑-4-基)-吡啶-2-基胺(7.19克, 组合产率75%, 白色固体)。MS m/e 450 (M+1)<sup>+</sup>。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) δ 7.92 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.58 (m, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.45 (m, 1H), 6.90 (s, 1H), 6.10 (m, 1H), 5.55 (bs, 2H), 4.14 (m, 1H), 3.05 (m, 2H), 2.58 (m, 2H), 1.94 (m, 2H), 1.80 (d, 3H), 1.76 (m, 2H)。

将固体产物3-[(R)-1-(2,6-二氯-3-氟-苯基)-乙氧基]-5-(1-哌啶-4-基-1H-吡唑-4-基)-吡啶-2-基胺溶于二氯甲烷, 并缓慢蒸发溶

---

剂，生成微细结晶固体。高真空下干燥后，该样品经确认为单一多晶型物晶型A，其熔点为194℃。

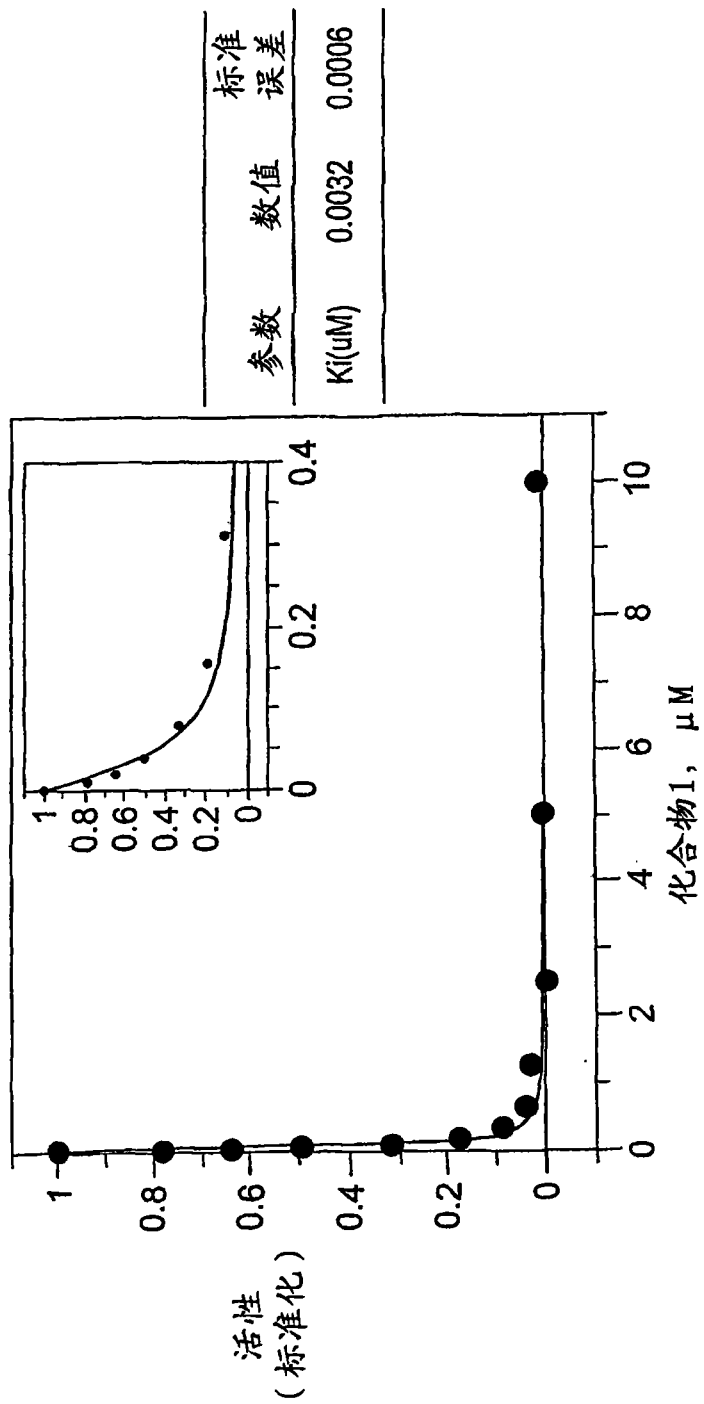


图1

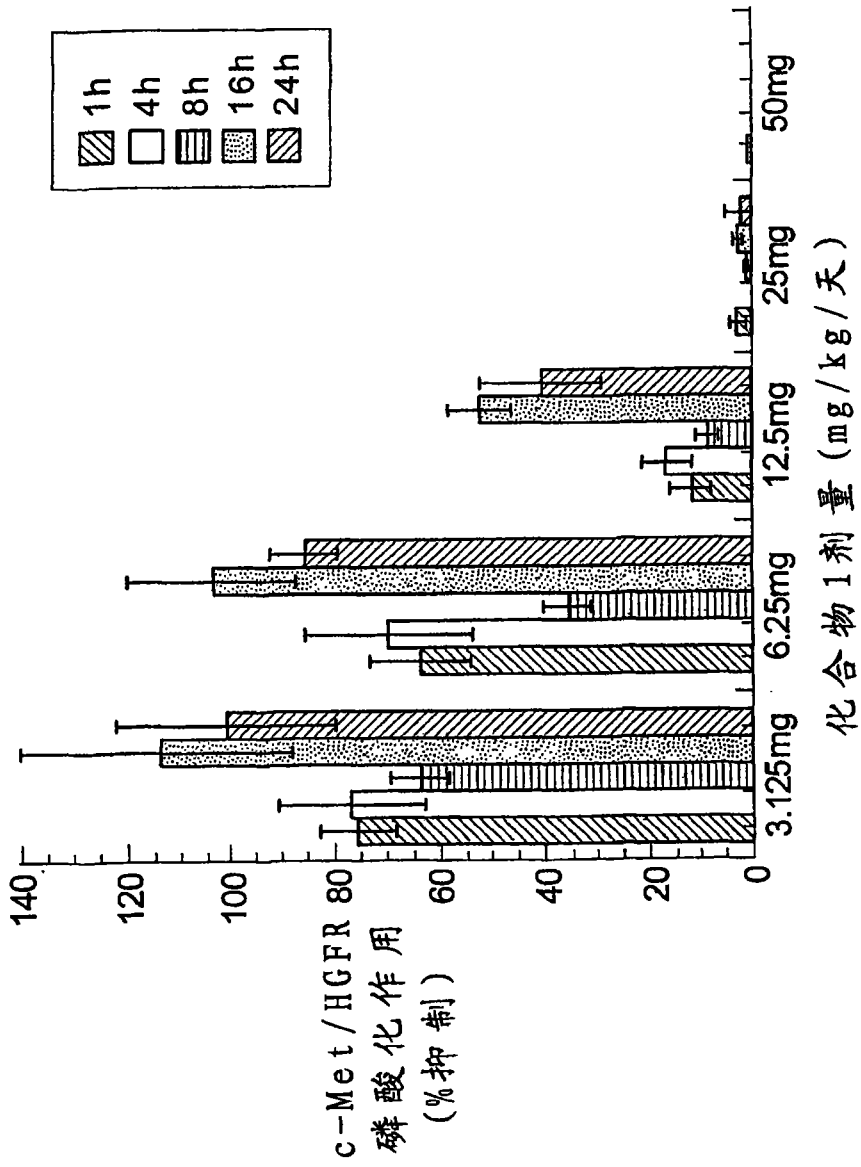


图 2A

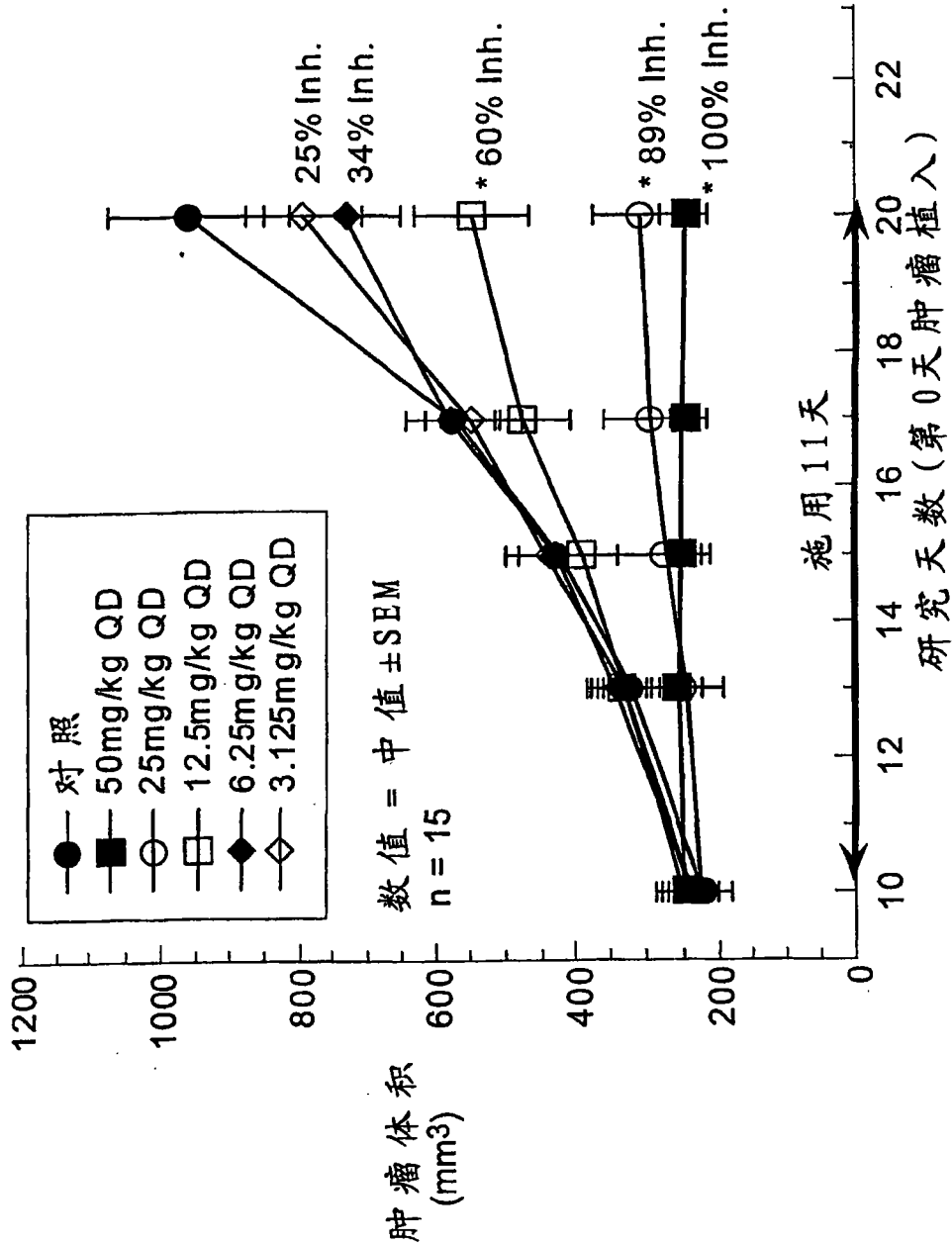


图2B

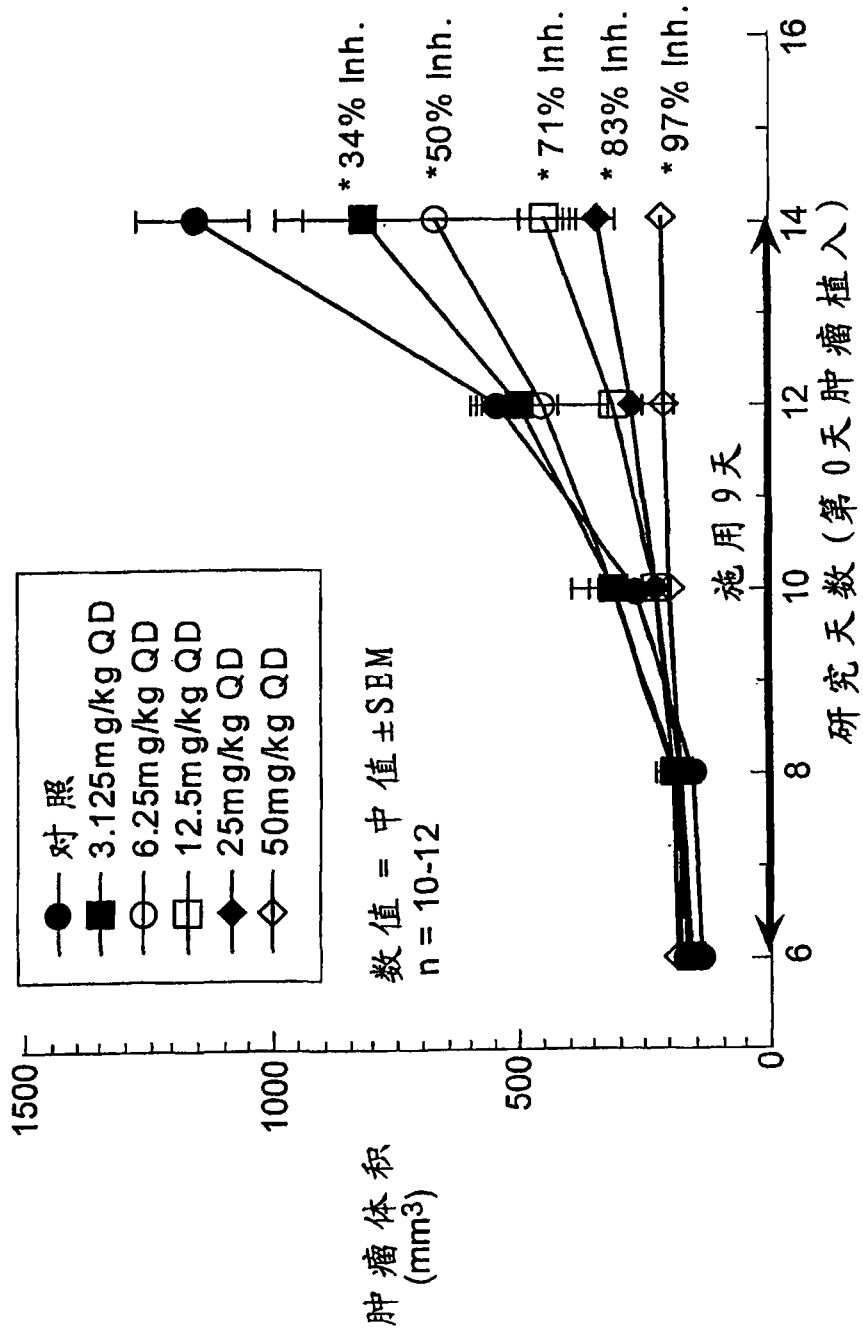


图 3A

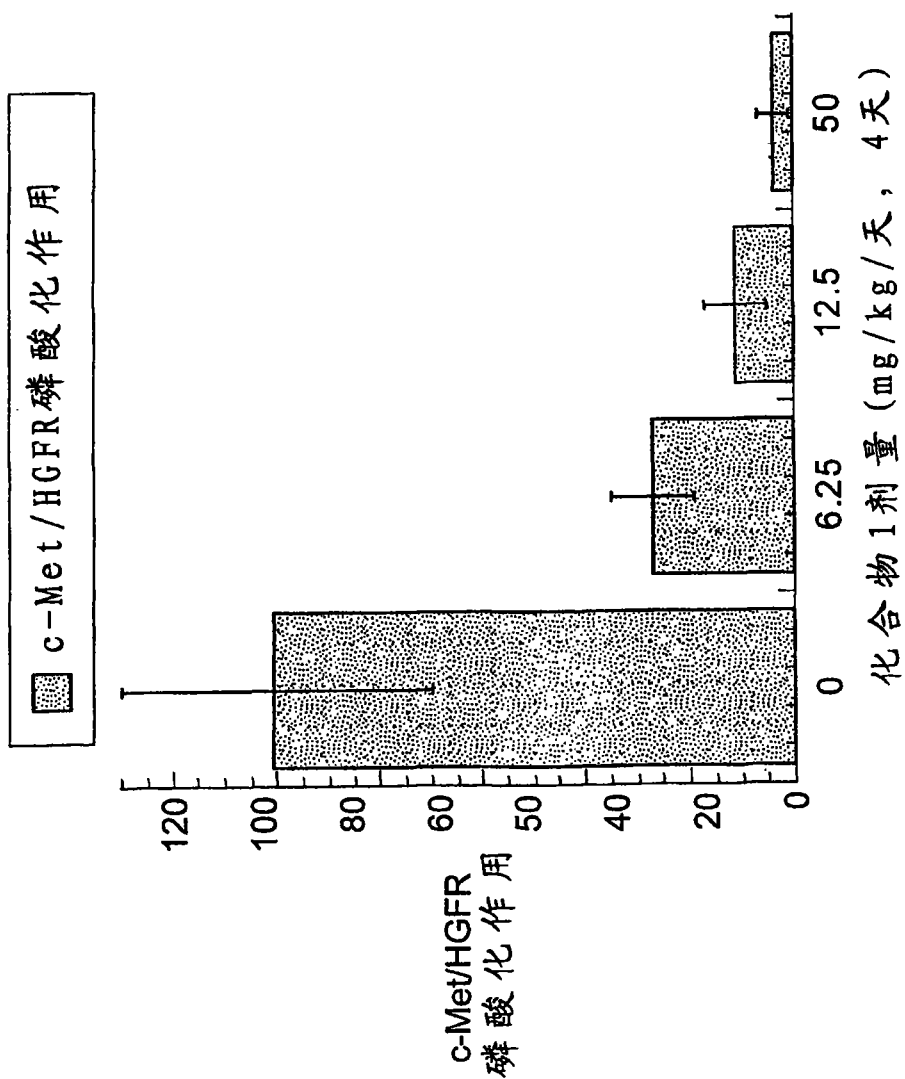


图 3B



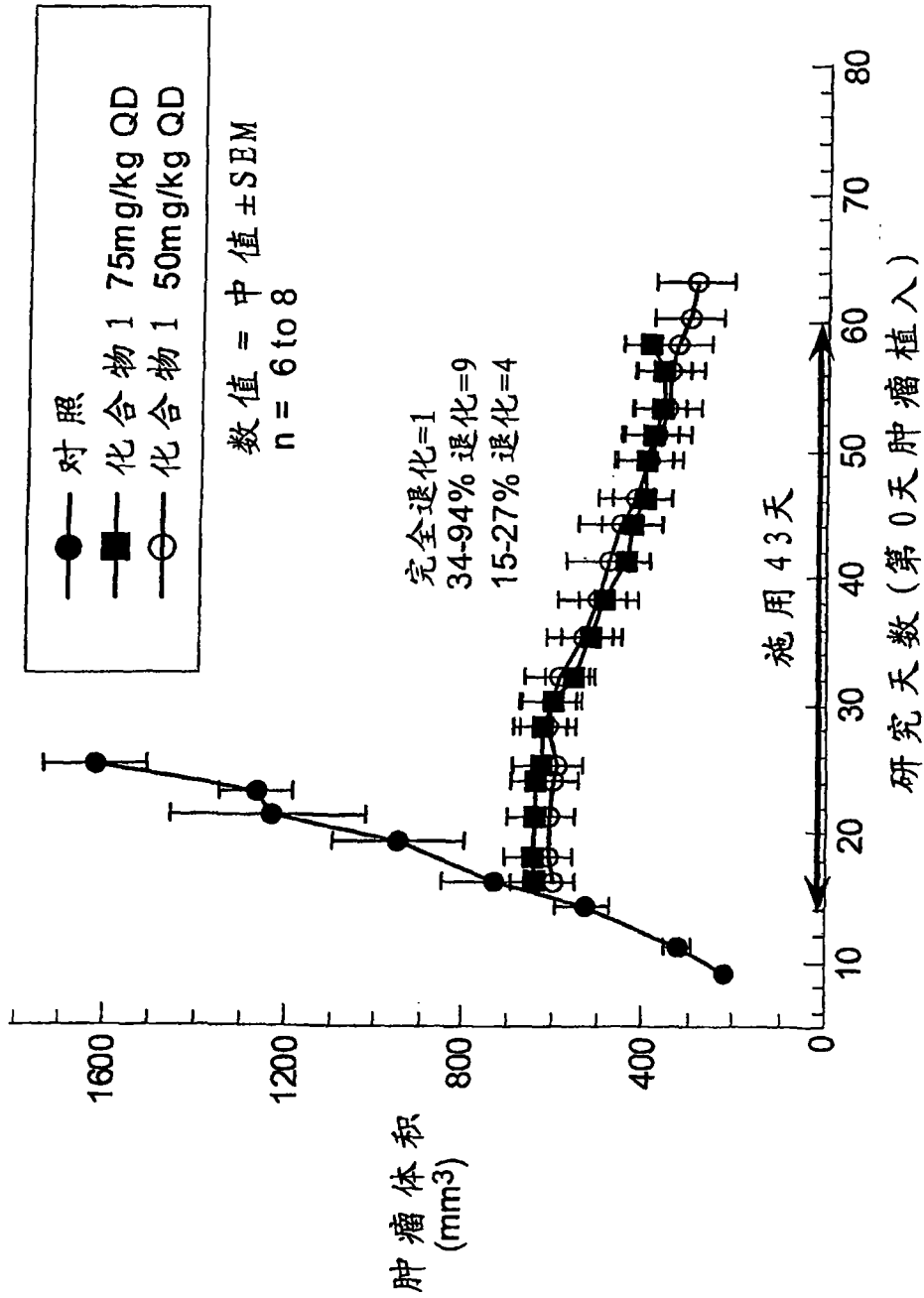


图4A

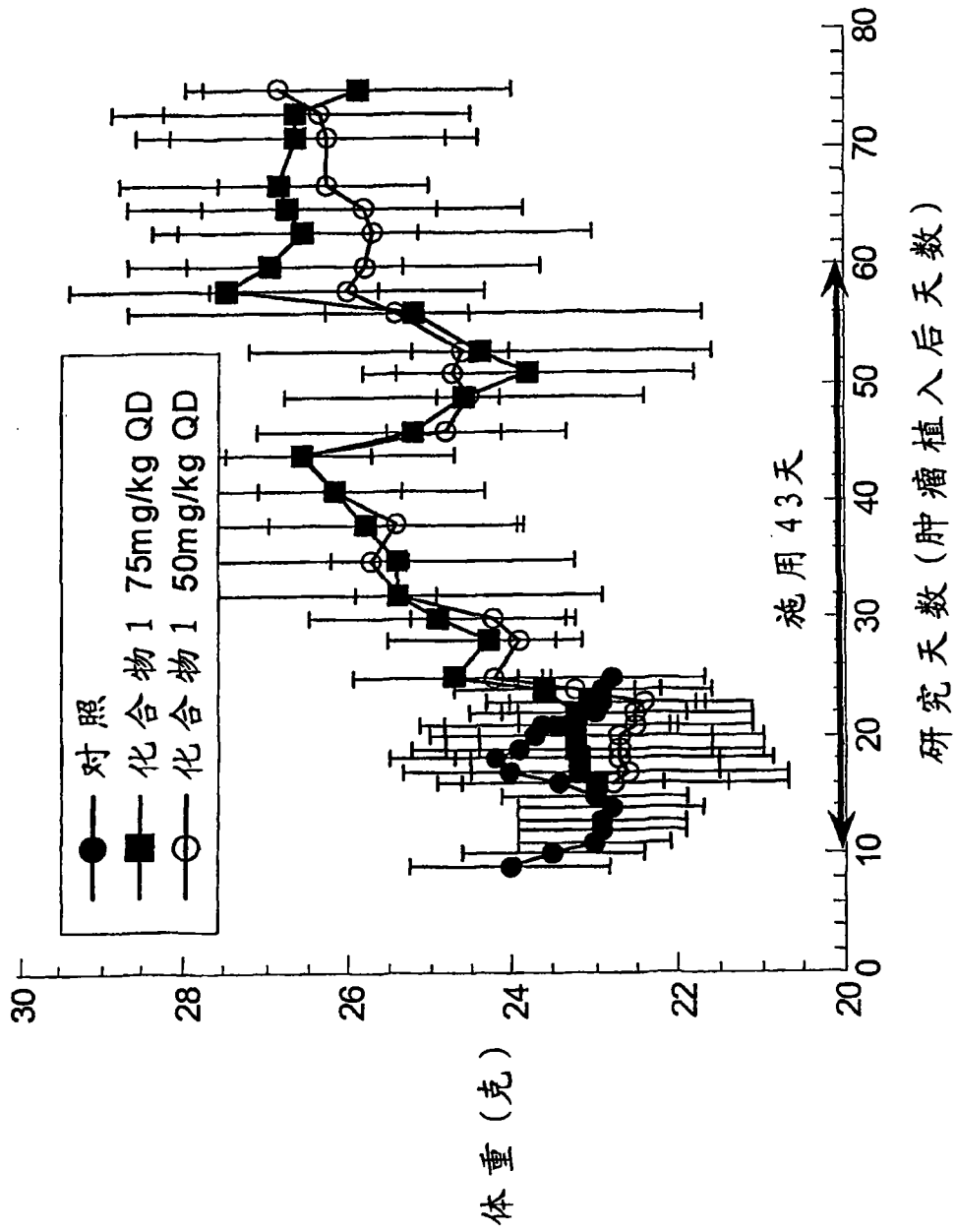


图4B

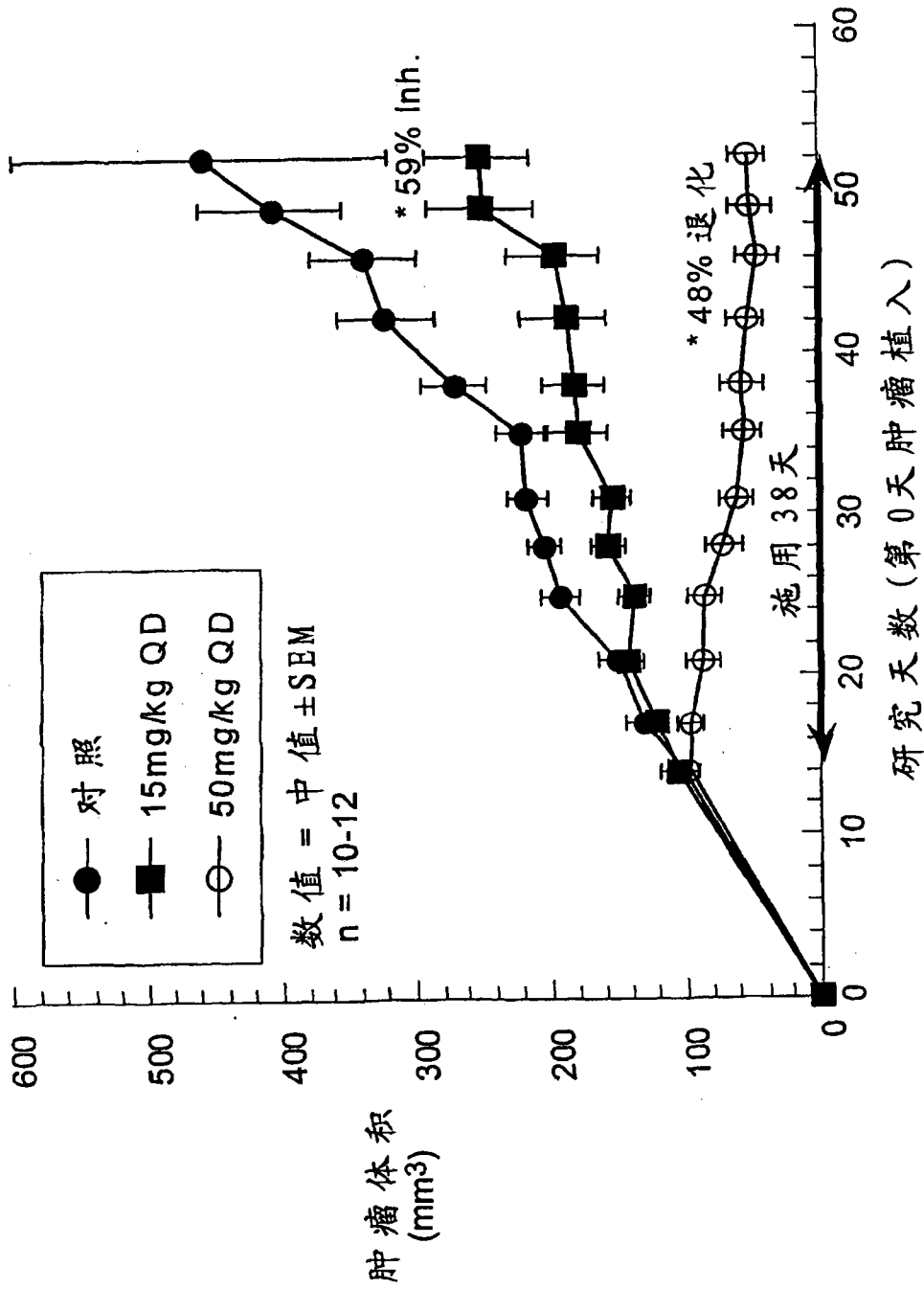


图 5A

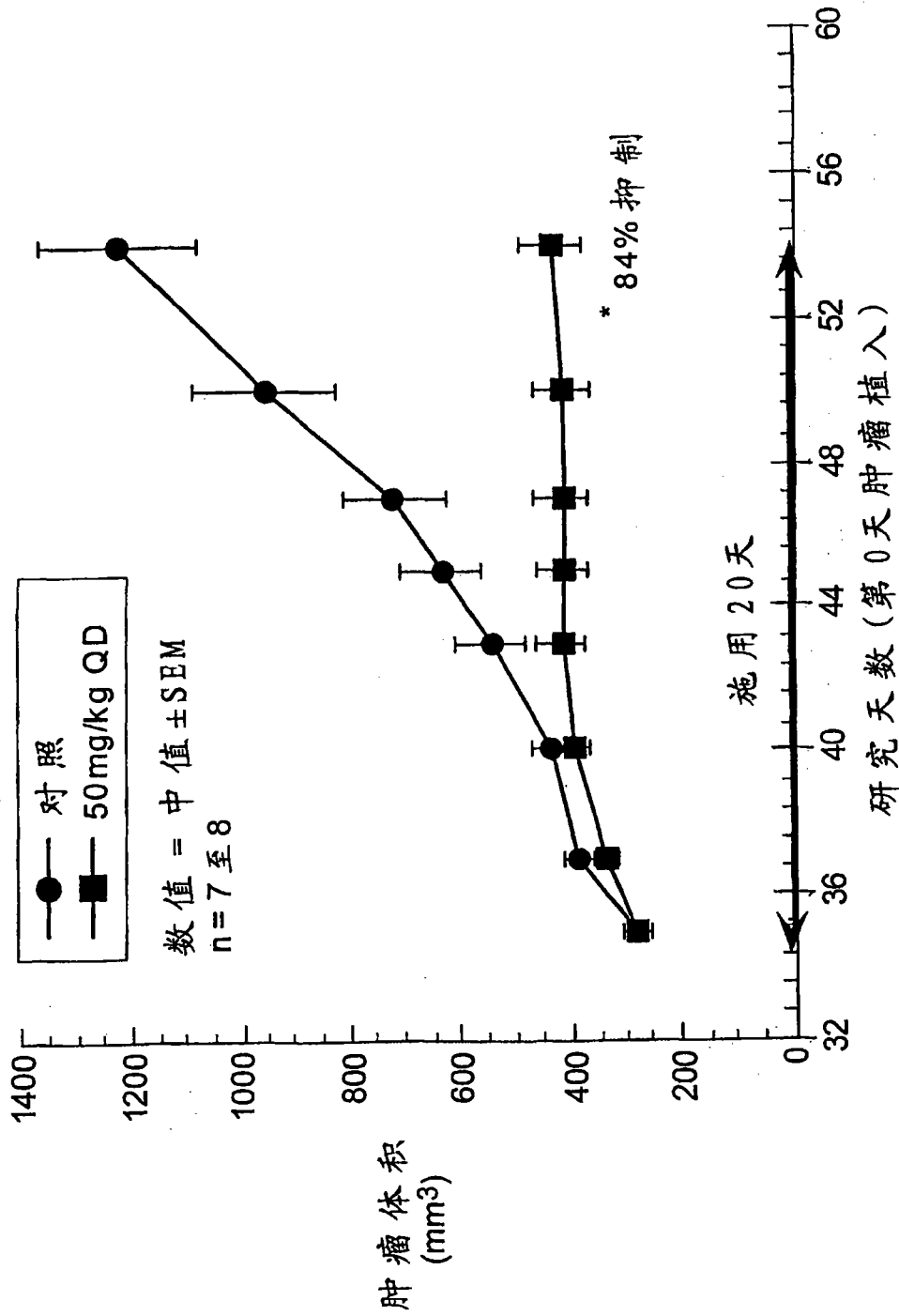


图 5B

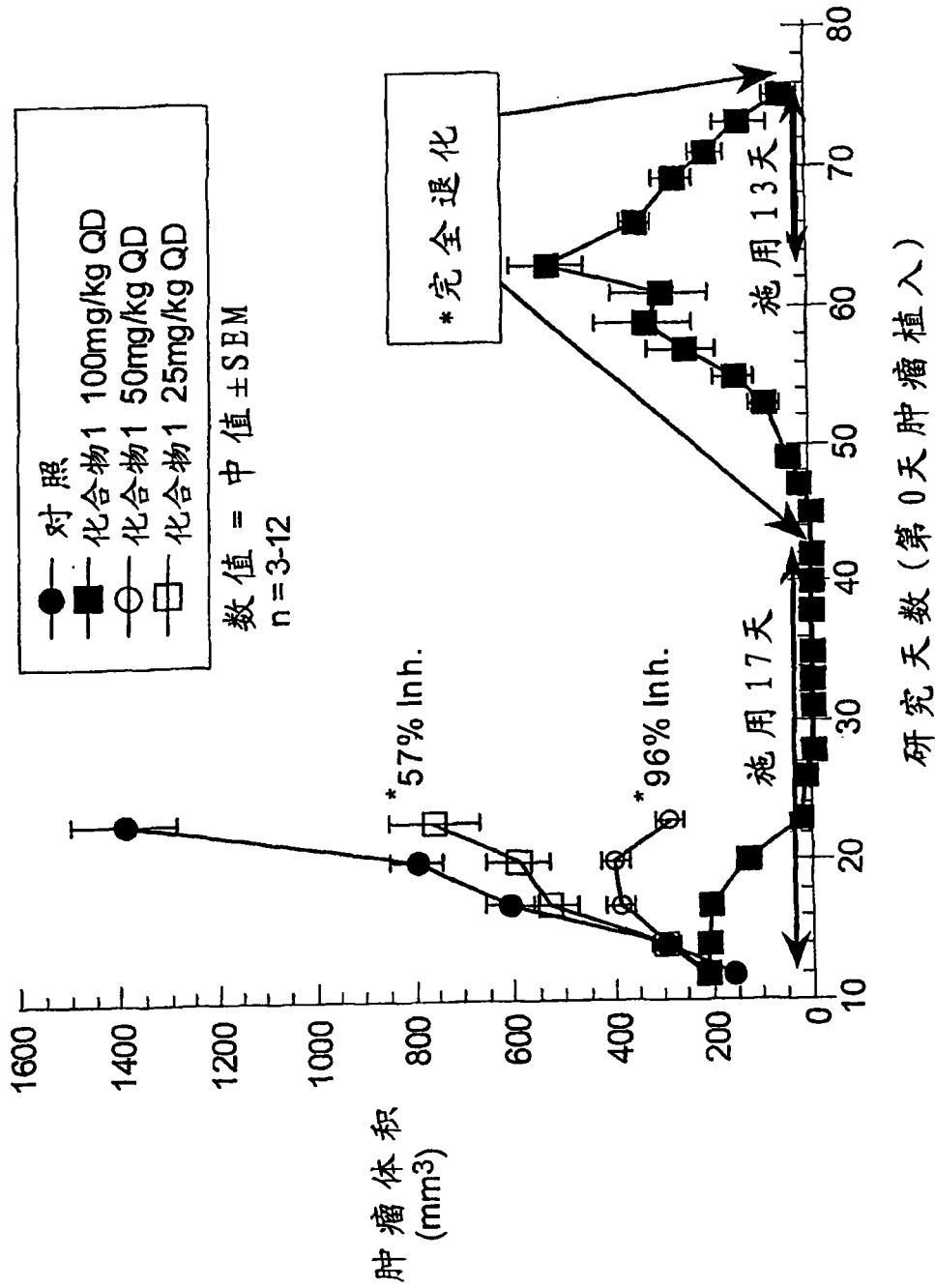


图6A

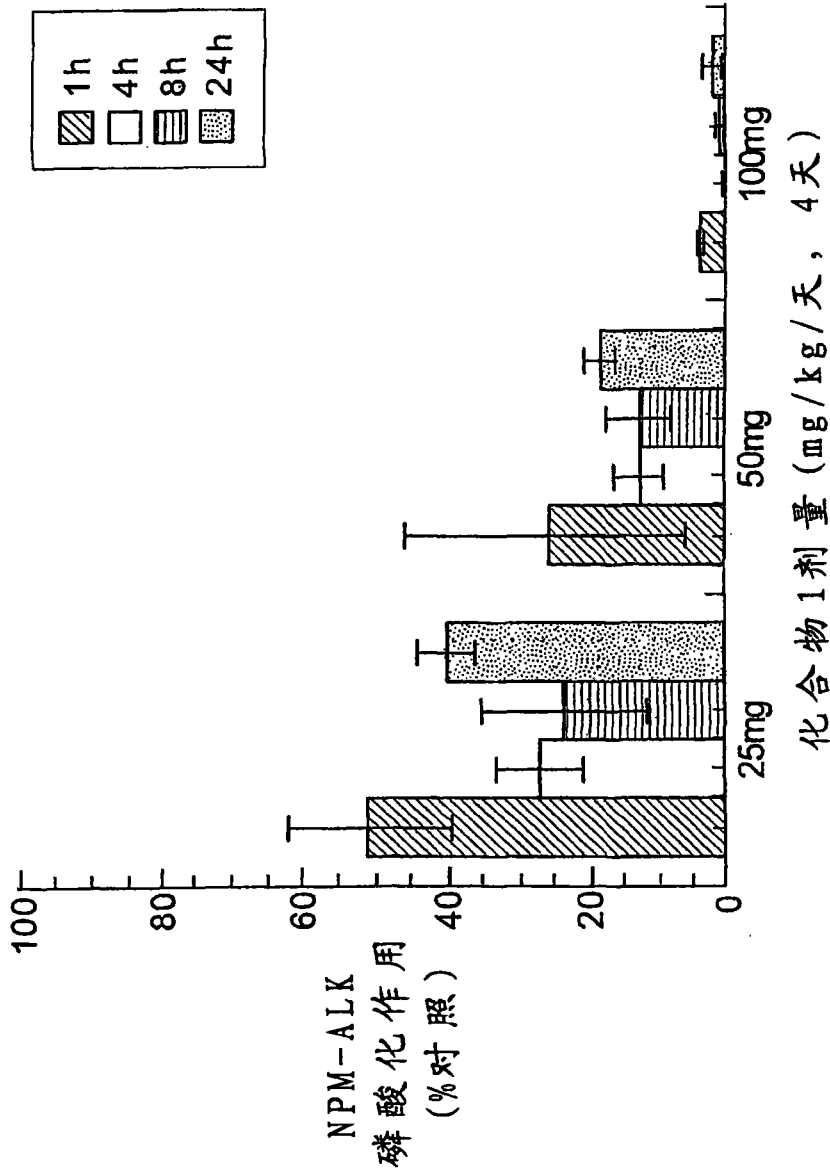


图6B