



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107286077 B

(45) 授权公告日 2021.04.02

(21) 申请号 201610210424.X *A61K 31/45* (2006.01)
 (22) 申请日 2016.04.01 *A61K 31/4545* (2006.01)
 (65) 同一申请的已公布的文献号 *A61K 31/454* (2006.01)
 申请公布号 CN 107286077 A *A61P 35/00* (2006.01)
 (43) 申请公布日 2017.10.24 *A61P 35/02* (2006.01)
 (73) 专利权人 合肥中科普瑞昇生物医药科技有 *A61P 37/02* (2006.01)
 限公司 *A61P 35/04* (2006.01)
 地址 230031 安徽省合肥市高新区望江西 *A61P 25/28* (2006.01)
 路860号创新大厦B座1405-1室 *A61P 29/00* (2006.01)
 (72) 发明人 刘青松 刘静 王强 王蓓蕾 *A61P 19/02* (2006.01)
 刘飞扬 亓爽 齐紫平 邹凤鸣 *A61P 3/10* (2006.01)
 陈程 王文超 胡晨 刘晓川 *A61P 21/02* (2006.01)
 王伟 王傲莉 王黎 胡祯全 *A61P 25/00* (2006.01)
 任涛 *A61P 27/02* (2006.01)
 (74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限 *A61P 7/06* (2006.01)
 公司 11322 *A61P 17/08* (2006.01)
 代理人 李巍 周琴 *A61P 15/00* (2006.01)
A61P 13/10 (2006.01)

(56) 对比文件

(51) Int. Cl. *CN 104844566 A*, 2015.08.19
C07D 211/44 (2006.01) *CN 101528744 A*, 2009.09.09
C07D 401/04 (2006.01) *CN 101291938 A*, 2008.10.22
C07D 413/04 (2006.01) *WO 2008124393 A1*, 2008.10.16
C07D 413/14 (2006.01) *CN 102482203 A*, 2012.05.30
C07D 401/14 (2006.01)
C07D 409/14 (2006.01)

审查员 史骄阳

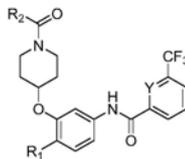
权利要求书3页 说明书22页 附图5页

(54) 发明名称

一种选择性的C-KIT激酶抑制剂

(57) 摘要

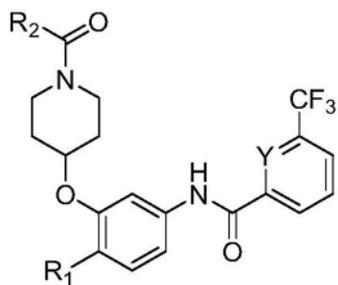
本发明提供一种式(I)的化合物或其药学可接受的盐、溶剂化物、酯、酸、代谢物、或前药。本发明的化合物单独与至少一种另外的治疗剂联合给药可用于预防或治疗由酪氨酸激酶C-KIT活性调节的或者受其影响的或者其中涉及酪氨酸激酶C-KIT活性的疾病、障碍或病症,尤其是癌症和其它细胞增殖性疾病。



式(I)

CN 107286077 B

1. 一种式 (I) 的化合物或其药学可接受的盐:



式 (I)

其中,

Y选自CH;

R₁选自H、C₁₋₆烷基、和卤素;

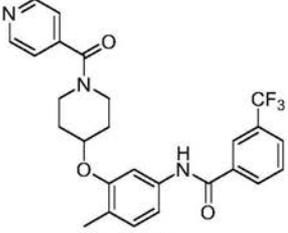
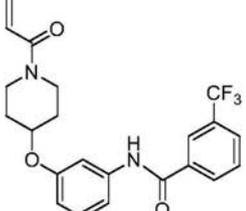
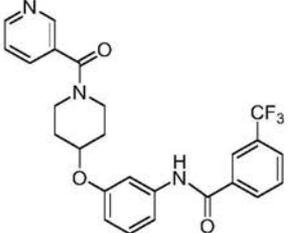
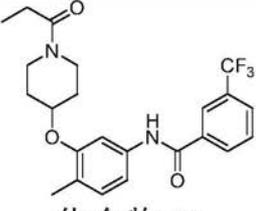
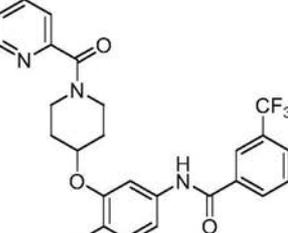
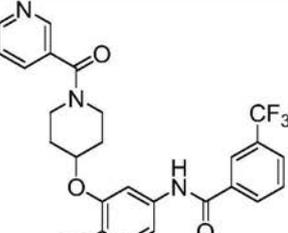
R₂选自C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基和吡啶基。

2. 如权利要求1所述的化合物或其药学可接受的盐,其中R₁为甲基。

3. 如权利要求1所述的化合物或其药学可接受的盐,其中R₂选自乙基、乙烯基、吡啶基。

4. 如权利要求1所述的化合物或其药学可接受的盐,其选自以下化合物:

1	<p>化合物 1</p>	<p>N-(3-((1-丙烯酰基哌啶-4-基)氧基)-4-甲基苯基)-3-(三氟甲基)苯甲酰胺</p>
2	<p>化合物 2</p>	<p>N-(4-甲基-3-(1-烟酸基哌啶-4-基)氧基)苯基)-3-(三氟甲基)苯甲酰胺</p>

4	 <p>化合物 4</p>	N-(4-甲基-3-(1-异烟酸基哌啶-4-基)氧基)苯基)-3-(三氟甲基)苯甲酰胺
8	 <p>化合物 8</p>	N-(3-((1-丙烯酰基哌啶-4-基)氧基)苯基)-3-(三氟甲基)苯甲酰胺
9	 <p>化合物 9</p>	N-(3-((1-烟酸基哌啶-4-基)氧基)苯基)-3-(三氟甲基)苯甲酰胺
11	 <p>化合物 11</p>	N-(3-((1-丙酰基哌啶-4-基)氧基)-4-甲基苯基)-3-(三氟甲基)苯甲酰胺
13	 <p>化合物 13</p>	N-(4-甲基-3-((1-吡啶-2-甲酰基哌啶-4-基)氧基)苯基)-3-(三氟甲基)苯甲酰胺
15	 <p>化合物 15</p>	N-(4-氯-3-(1-烟酸基哌啶-4-基)氧基)苯基)-3-(三氟甲基)-苯甲酰胺

5. 一种药物组合物,其包括如权利要求1-4中任一项所述的化合物或其药学可接受的盐,以及药学上可接受的载体或赋形剂,以及任选的其它治疗剂。

6. 如权利要求1-4中任一项所述的化合物或其药学可接受的盐在制备用于抑制酪氨酸激酶C-KIT和/或PDGFR活性的药物中的用途。

7. 如权利要求1-4中任一项所述的化合物或其药学可接受的盐在制备用于治疗、预防或改善由酪氨酸激酶C-KIT和/或PDGFR活性调节的或者受其影响的或者其中涉及酪氨酸激酶C-KIT和/或PDGFR活性的疾病、障碍或病症的药物中的用途。

8. 如权利要求7所述的用途,其中所述疾病、障碍或病症选自以下增殖性疾病:实体瘤、肉瘤、胃肠道间质瘤、急性粒细胞白血病、慢性髓性白血病、系统性肥大细胞病、嗜酸性粒细胞增多综合征、纤维变性、红斑狼疮、移植物抗宿主病、神经纤维瘤、肺高压、阿尔茨海默病、精原细胞瘤、无性细胞瘤、肥大细胞肿瘤、肺癌、支气管癌、睾丸上皮内瘤形成、黑色素瘤、乳腺癌、神经母细胞瘤、乳头状/滤泡型甲状腺癌、恶性淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、2型多发性内分泌瘤形成、嗜铬细胞瘤、甲状旁腺增生/腺瘤、结肠癌、结肠直肠癌、卵巢癌、前列腺癌、成胶质细胞瘤、脑肿瘤、恶性神经胶质瘤、胰腺癌、恶性胸膜间皮瘤、成血管细胞瘤、血管瘤、肾癌、肝癌、肾上腺癌、膀胱癌、胃癌、直肠癌、阴道癌、宫颈癌、子宫内膜癌、多发性骨髓瘤、颈和头部肿瘤、瘤形成或其组合。

9. 如权利要求7所述的用途,其中所述疾病、障碍或病症选自以下自身免疫性疾病:风湿性关节炎、狼疮、类风湿性关节炎、炎性肠病、银屑病性关节炎、骨关节炎、斯蒂尔病、青少年关节炎、糖尿病、重症肌无力症、桥本甲状腺炎、奥德甲状腺炎、格雷夫斯病、类风湿性关节炎综合征、多发性硬化症、传染性神经元炎、急性播散性脑脊髓炎、阿狄森病、视性眼阵挛-肌阵挛综合征、强直性脊椎炎、抗磷脂抗体综合征、再生障碍性贫血、自身免疫性肝炎、乳糜泻、古德帕斯彻综合征、特发性血小板减少性紫癜、视神经炎、硬皮病、原发性胆汁性肝硬化、莱特尔综合征、高安动脉炎、颞动脉炎、温型自身免疫性溶血性贫血、韦格纳肉芽肿病、银屑病、全身脱毛、贝赫切特病、慢性疲劳、家族性自主神经功能异常、子宫内膜异位、间质性膀胱炎、神经肌强直、或外阴痛。

一种选择性的C-KIT激酶抑制剂

技术领域

[0001] 本申请涉及一种作为选择性的C-KIT激酶抑制剂的化合物、包含这样的化合物的药物组合物、以及使用这样的化合物或组合物抑制C-KIT激酶活性的方法和用途。

背景技术

[0002] C-KIT是一种原癌基因,是HZ4猫科肉瘤病毒的胞浆逆转录病毒同源物,位于4号染色体4q11-12,编码一种相对分子质量为145kD的跨膜糖蛋白,该蛋白属受体酪氨酸激酶家族成员。C-KIT受体分为膜外区、跨膜区和胞质区三部分。C-KIT的异常表达与肿瘤的发生密切相关,在许多恶性肿瘤中均有C-KIT的高表达,包括胃肠道间质瘤、前列腺癌、生殖细胞瘤、乳腺癌及小细胞肺癌等。受体酪氨酸激酶C-KIT(又称CD117)是由逆转录病毒原癌基因C-KIT编码的一类具有酪氨酸激酶活性的跨膜受体蛋白,与血小板衍生生长因子受体(PDGFR)、巨噬细胞集落刺激因子-1受体(CSF-1R)和Fms样酪氨酸激酶受体3(FLT3)共同组成Ⅲ型受体酪氨酸激酶超家族,其在肿瘤的发生发展以及侵袭、迁移和复发过程中起着十分重要的作用。抑制C-KIT介导的信号转导途径以达到治疗肿瘤的目的已成为近年来肿瘤治疗的热点,因此,C-KIT是目前肿瘤分子靶向治疗的热门靶标之一。

[0003] 胃肠间质瘤(GIST)是人体消化系统常见的肿瘤疾病。胃肠间质瘤的概念最早由Mazur和Clark在1983年提出,胃肠间质瘤病理特征是平滑肌和神经源性的消化道肿瘤表现特异。胃肠间质瘤的发病率虽只约为十万分之一至十万分之二之间(我国每年新发GIST病例约20000-30000),然而,67%的胃肠间质瘤是恶性的。胃肠间质瘤多发于中老年人,主要集中在50-65岁年龄段,男女性别发病率无明显差异性。据统计,胃肠间质瘤约60-70%发生在胃部,20-30%发生在小肠,约10%发生在食管、直肠以及结肠。

[0004] 胃肠间质瘤的免疫组织化学的诊断特征是细胞表面抗原CD117(C-KIT蛋白)阳性,CD117在胃肠间质瘤的细胞表面和细胞浆内广泛表达,而在所有非胃肠间质瘤的肿瘤细胞内均不表达,CD117的高灵敏性和特异性使得它一直是胃肠间质瘤的确诊指标。对于胃肠间质瘤的治疗,除了外科手术之外,近年兴起的靶向激酶C-KIT的抑制剂药物已经成为胃肠间质瘤治疗的另一种重要手段。目前,主要采用靶向C-KIT的药物伊马替尼(Imatinib)用于胃肠间质瘤初期治疗。但是,伊马替尼由于抑制激酶Bcr-Abl,因而存在潜在的心脏毒性,部分患者服用伊马替尼后会出现严重的心脏毒性(Kerkelä,R.等人,Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate,Nat.Med.2006,12,908-916;Perik,P.J.等人,Results of plasma n-terminal pro b-type natriuretic peptide and cardiac troponin monitoring in gist patients do not support the existence of imatinib-induced cardiotoxicity,Ann.Oncol.2008,19,359-361;Gianantonio,R.等人,In reply to'cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate',Nat.Med.2007,13,13-4)。

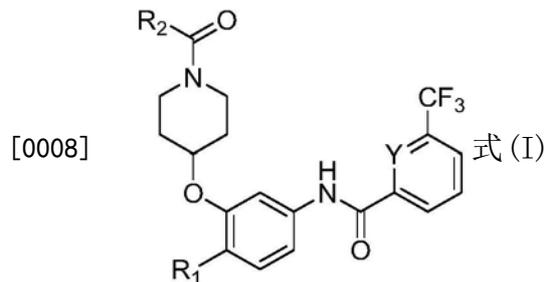
[0005] 同时,采用伊马替尼进行治疗的另一问题是患者对该药物产生耐药性。据统计,伊马替尼的耐药发生率可高达63%(包括原发耐药和继发耐药)。研究发现,胃肠间质瘤患者

对伊马替尼耐药与C-KIT基因突变有关,其导致其酪氨酸激酶活性持续活化,进而导致细胞增殖失控。C-KIT基因突变多发生在其外显子11、9、13以及17,C-KIT基因突变多预示肿瘤的恶性程度高。

[0006] 因此,研究者期望能够开发出选择性高的C-KIT激酶抑制剂,排除潜在的肝脏毒性风险,同时研究者还期望能够开发出不仅对C-KIT基因野生型表现出抑制作用、还对突变型C-KIT基因表现出抑制作用的靶向药物来替代伊马替尼,从而解决耐药性的问题。

发明内容

[0007] 本发明提供一种选择性的C-KIT激酶抑制剂,包括式(I)的化合物或其药学可接受的盐、溶剂化物、酯、酸、代谢物或前药:



[0009] 其中,Y选自CH和N; R_1 选自H、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基和卤素; R_2 选自 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、苯基和杂芳基。

[0010] 在优选的实施方式中,Y为CH。

[0011] 在另外优选的实施方式中, R_1 选自H、甲基、甲氧基和氯,特别是甲基。

[0012] 在又一优选的实施方式中, R_2 选自乙基、乙烯基、苯基、吡啶基、异噁唑基、噻吩基。特别地, R_2 进一步优选为2-吡啶基、3-吡啶基或4-吡啶基,最优选4-吡啶基。

[0013] 本发明还涉及包括以上化合物或其药学可接受的盐、溶剂化物、酯、酸、代谢物或前药的药物组合物,以及该化合物或药物组合物抑制酪氨酸激酶C-KIT(野生型或各种突变或其组合)和/或PDGFR(野生型或各种突变或其组合)活性的方法和用途,及其治疗、预防或改善由酪氨酸激酶C-KIT(野生型或各种突变或其组合)活性调节的或者受其影响的或者其中涉及酪氨酸激酶C-KIT(野生型或各种突变或其组合)活性的疾病、障碍或病症的方法和用途。

附图说明

[0014] 图1a示出化合物4和伊马替尼对人胃肠道间质瘤细胞GIST-T1中的信号通路的蛋白的影响;图1b示出化合物4和伊马替尼对人胃肠道间质瘤细胞GIST-882中的信号通路的蛋白的影响;图1c示出化合物4、伊马替尼和达沙替尼对慢性髓性白血病细胞K562中的信号通路的蛋白的影响;图1d示出对比化合物A、伊马替尼和达沙替尼对慢性髓性白血病细胞K562中的信号通路的蛋白的影响。

[0015] 图2a和2b分别示出化合物4和伊马替尼对人胃肠道间质瘤细胞GIST-T1以及对人胃肠道间质瘤细胞GIST-882的细胞凋亡的影响。

[0016] 图3a和3b分别示出化合物4、伊马替尼和舒尼替尼对人胃肠道间质瘤细胞GIST-T1以及对人胃肠道间质瘤细胞GIST-882中的细胞周期的影响。

[0017] 图4示出化合物4对C-KIT激酶的体外抑制活性的实验结果。

[0018] 图5示出使用不同浓度的化合物4和伊马替尼、溶媒对照分别对人胃肠道间质瘤细胞GIST-T1细胞的小鼠肿瘤模型及人胃肠道间质瘤细胞GIST-882细胞的小鼠肿瘤模型进行处理得到的实验结果,其中图5a示出在人胃肠道间质瘤细胞GIST-T1细胞的小鼠肿瘤模型中,不同处理组中的肿瘤的平均大小随时间的变化;图5b示出在人胃肠道间质瘤细胞GIST-882细胞的小鼠肿瘤模型中,不同处理组中的肿瘤的平均大小随时间的变化;图5c示出在GIST-T1细胞的小鼠肿瘤模型中,不同处理组中的小鼠的平均相对体重(以实验开始时的小鼠重量为基准计算的百分数)随时间的变化;图5d示出在GIST-882细胞的小鼠肿瘤模型中,不同处理组中的小鼠的平均相对体重(以实验开始时的小鼠重量为基准计算的百分数)随时间的变化;图5e示出在GIST-T1细胞的小鼠肿瘤模型中使用不同浓度的化合物4、伊马替尼和溶媒处理小鼠28天后计算出的抑瘤率;图5f示出在GIST-882细胞的小鼠肿瘤模型中使用不同浓度的化合物4、伊马替尼和溶媒处理小鼠21天后计算出的抑瘤率。

具体实施方式

[0019] 术语

[0020] 除非另外定义,所有本文使用的科技术语都具有与要求保护的主体所属领域的技术人员一般理解相同的含义。

[0021] 除非另有说明,本发明采用本领域技术范围内的质谱、NMR、HPLC、蛋白质化学、生物化学、重组DNA技术和药理学等常规方法。除非提供具体的定义,否则与本文描述的分析化学、合成有机化学、以及医学和药物化学等化学上相关的命名和实验室操作和技术,是本领域技术人员已知的。一般而言,前述技术和步骤可以通过本领域众所周知的和在各种一般文献和更具体文献中描述的常规方法来实施,这些文献在本说明书中被引用和讨论。

[0022] “烷基”是指脂肪族烃基团,可以是支链或直链的烷基。根据结构,烷基可以是单价基团或双价基团(即亚烷基)。在本发明中,烷基优选是具有1-8个碳原子的“低级烷基”。典型的烷基包括但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、戊基、己基等。

[0023] “烷氧基”是指-O-烷基,其中烷基如本文中定义。典型的烷氧基包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、戊氧基、己氧基等。

[0024] 术语“卤”或“卤素”是指氟、氯、溴和碘。

[0025] 术语“杂芳基”是指芳基中包括一个或多个选自氮、氧和硫的环杂原子。含N“杂芳基”部分是指芳香基中环上至少有一个骨架原子是氮原子。根据结构,杂芳基可以是单价基团或双价基团(即亚杂芳基)。杂芳基的实例包括但不限于吡啶基、咪唑基、嘧啶基、吡唑基、三唑基、吡嗪基、四唑基、呋喃基、噻吩基、异噻唑基、噻唑基、噁唑基、异噻唑基、吡咯基、喹啉基、异喹啉基、吲哚基、苯并咪唑基、苯并呋喃基、吲唑基、吲嗪基、酞嗪基、哒嗪基、异吲哚基、蝶啶基、嘌呤基、噁二唑基、噻二唑基、呋喃基、苯并呋喃基、苯并噻吩基、苯并噻唑基、苯并噁唑基、喹啉基、萘啶基和呋喃并吡啶基等。

[0026] 本文使用的术语“酪氨酸激酶(tyrosine protein kinase,TPK)”是一类催化ATP上 γ -磷酸转移到蛋白酪氨酸残基上的激酶,能催化多种底物蛋白质酪氨酸残基磷酸化,在细胞生长、增殖、分化中具有重要作用。

[0027] 本文使用的术语激酶的“抑制”、“抑制的”或“抑制剂”,是指磷酸转移酶活性被抑

制。

[0028] 本文公开的化合物的“代谢物”是当该化合物被代谢时形成的化合物的衍生物。术语“活性代谢物”是指当该化合物被代谢时形成的化合物的生物活性衍生物。本文使用的术语“被代谢”，是指特定物质被生物体改变的过程总和(包括但不限于水解反应和由酶催化的反应，例如氧化反应)。因此，酶可以产生特定的结构转变为化合物。例如，细胞色素P450催化各种氧化和还原反应，同时二磷酸葡萄糖苷酸基转移酶催化活化的葡萄糖醛酸分子至芳香醇、脂肪族醇、羧酸、胺和游离的巯基的转化。新陈代谢的进一步的信息可以从《The Pharmacological Basis of Therapeutics》，第九版，McGraw-Hill(1996)获得。本文公开的化合物的代谢物可以通过将化合物给予宿主并分析来自该宿主的组织样品、或通过将化合物与肝细胞在体外孵育并且分析所得化合物来鉴别。这两种方法都是本领域已知的。在一些实施方式中，化合物的代谢物是通过氧化过程形成并与相应的含羟基化合物对应。在一些实施方式中，化合物被代谢为药物活性代谢物。本文使用的术语“调节”，是指直接或间接与靶标相互作用，以改变靶标的活性，仅仅举例来说，包括增强靶标的活性、抑制靶标的活性、限制靶标的活性或者延长靶标的活性。

[0029] 本文使用的术语“靶蛋白”是指能被选择性结合化合物所结合的蛋白质分子或部分蛋白质。在某些实施方式中，靶蛋白是酪氨酸激酶C-KIT(野生型或各种突变或其组合)和/或PDGFR(野生型或各种突变或其组合)。在某些实施方式中，靶蛋白是野生型酪氨酸激酶C-KIT(野生型或各种突变或其组合)。在某些实施方式中，靶蛋白是野生型酪氨酸激酶C-KIT。

[0030] 本文使用的 GI_{50} 是指使50%细胞生长被抑制所需的药物浓度，即药物使50%细胞(如癌细胞)的生长得到抑制或控制时的药物浓度。

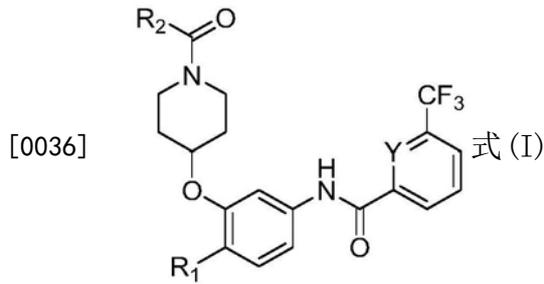
[0031] 本文使用的 IC_{50} 是指在测量这样的效应的分析中获得最大效应的50%抑制的特定测试化合物的量、浓度或剂量。

[0032] 本文使用的 EC_{50} 是指测定化合物的剂量、浓度或量，其引起特定测定化合物诱导、刺激或加强的特定反应的50%的最大表达的剂量依赖反应。

[0033] 在本申请中，特定的基因或其所编码的蛋白质用相同的字母组合符号(部分符号中还使用阿拉伯数字)表示，而不考虑其中的字母是为大写或是小写。举例来说，本文使用的KIT和/或Kit和/或CKIT和/或C-KIT和/或kit均指代KIT基因和/或KIT蛋白；本文所使用的BCR-ABL和/或Bcr-Ab1和/或bcr-ab1和/或BCR/ABL和/或BCR/ABL1和/或Bcr/Ab11和/或bcr/ab11均指代Bcr-Ab1基因和/或Bcr-Ab1蛋白。并且，根据本申请的上下文，本领域技术人员可以容易地确定特定表述中的字母符号是指代基因还是蛋白质。

[0034] 本发明新型的激酶抑制剂

[0035] 本发明提供一种选择性的C-KIT激酶抑制剂，包括式(I)的化合物或其药学可接受的盐、溶剂化物、酯、酸、代谢物或前药：



[0037] 其中, Y选自CH和N; R_1 选自H、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基和卤素; R_2 选自 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、苯基和杂芳基。

[0038] 在优选的实施方式中, Y为CH。

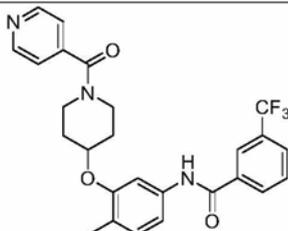
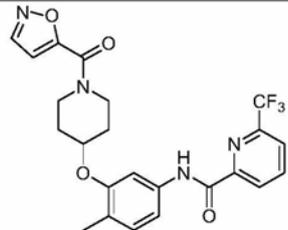
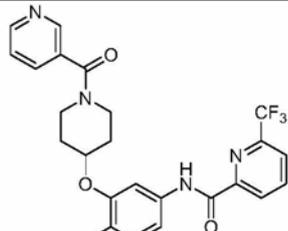
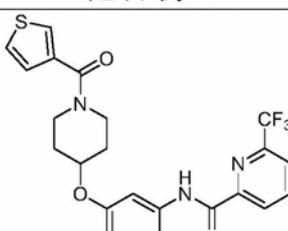
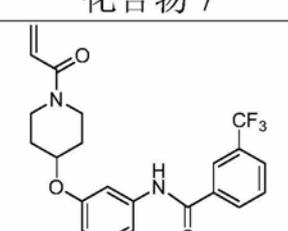
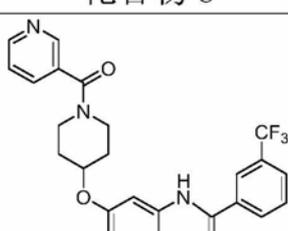
[0039] 在另外优选的实施方式中, R_1 选自H、甲基、甲氧基和氯, 特别是甲基。

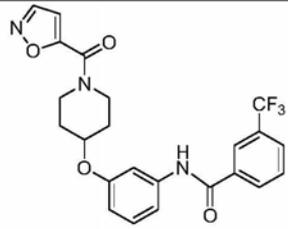
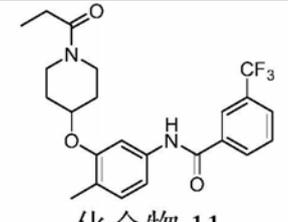
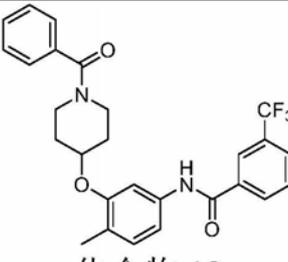
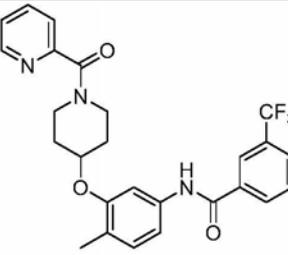
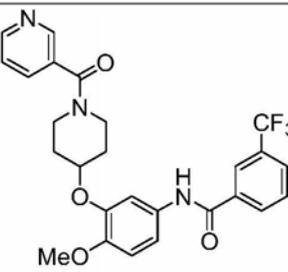
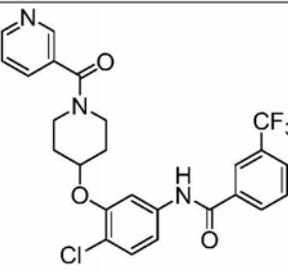
[0040] 在又一优选的实施方式中, R_2 选自乙基、乙烯基、苯基、吡啶基、异噁唑基、噻吩基。特别地, R_2 进一步优选为2-吡啶基、3-吡啶基或4-吡啶基, 最优选4-吡啶基。

[0041] 本发明特别优选的化合物包括下述化合物:

1	<p>化合物 1</p>	N-(3-((1-丙烯酰基哌啶-4-基)氧基)-4-甲基苯基)-3-(三氟甲基)苯甲酰胺
2	<p>化合物 2</p>	N-(4-甲基-3-(1-烟酸基哌啶-4-基)氧基)苯基)-3-(三氟甲基)苯甲酰胺
3	<p>化合物 3</p>	N-(3-((1-(异噁唑-5-羰基)哌啶-4-基)氧基)-4-甲基苯基)-3-(三氟甲基)苯甲酰胺

[0043]

4	 <p>化合物 4</p>	N-(4-甲基-3-(1-异烟酸基哌啶-4-基)氧基)苯基)-3-(三氟甲基)苯甲酰胺
5	 <p>化合物 5</p>	N-(3-((1-(异噁唑-5-羰基)哌啶-4-基)氧基)-4-甲基苯基)-6-(三氟甲基)吡啶酰胺
6	 <p>化合物 6</p>	N-(4-甲基-3-(1-烟酸基哌啶-4-基)氧基)苯基)-6-(三氟甲基)吡啶酰胺
7	 <p>化合物 7</p>	N-(4-甲基-3-((1(噻吩-3-羰基)哌啶-4-基)氧基)苯基)-6-(三氟甲基)吡啶酰胺
8	 <p>化合物 8</p>	N-(3-((1-丙烯酰基哌啶-4-基)氧基)苯基)-3-(三氟甲基)苯甲酰胺
9	 <p>化合物 9</p>	N-(3-((烟酸基哌啶-4-基)氧基)苯基)-3-(三氟甲基)苯甲酰胺

10	 <p>化合物 10</p>	N-(3-((1-(异噁唑-5-羰基)哌啶-4-基)氧基)苯基)-3-(三氟甲基)苯甲酰胺
11	 <p>化合物 11</p>	N-(3-((1-丙酰基哌啶-4-基)氧基)-4-甲基苯基)-3-(三氟甲基)苯甲酰胺
12	 <p>化合物 12</p>	N-(3-(1-苯甲酰基哌啶-4-基)氧基)-4-甲基苯基)-3-(三氟甲基)苯甲酰胺
13	 <p>化合物 13</p>	N-(4-甲基-3-((1-吡啶-2-甲酰基哌啶-4-基)氧基)苯基)-3-(三氟甲基)苯甲酰胺
14	 <p>化合物 14</p>	N-(4-甲氧基-3-(1-烟酸基哌啶-4-基)氧基)苯基)-3-(三氟甲基)-苯甲酰胺
15	 <p>化合物 15</p>	N-(4-氯-3-(1-烟酸基哌啶-4-基)氧基)苯基)-3-(三氟甲基)-苯甲酰胺

[0044]

[0045] 对于各个变量,上述基团的任意组合也在本文考虑之中。可以理解的是:本文所提

供的化合物上的取代基和取代模式可以由本领域技术人员进行选择,以便提供化学上稳定的且可以使用本领域已知的技术以及本文阐述的技术合成的化合物。

[0046] 本文描述的是新型的激酶抑制剂。本文也描述了此化合物的药学可接受的盐、溶剂化物、酯、酸、药物活性代谢物和前药。

[0047] 在另外的或进一步的实施方式中,将本文描述的化合物给予有需要的生物体后在其体内代谢产生代谢物,所产生的代谢物然后用于产生期望的效果,包括期望的治疗效果。

[0048] 本文描述的化合物可以被制成和/或被用作药学可接受的盐。药学可接受的盐的类型包括但不限于:(1) 酸加成盐、通过将化合物的游离碱形式与药学可接受的无机酸反应形成,所述无机酸如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、偏磷酸等;或与有机酸反应形成,所述有机酸如乙酸、丙酸、己酸、环戊烷丙酸、羟基乙酸、丙酮酸、乳酸、丙二酸、苹果酸、柠檬酸、琥珀酸、马来酸、酒石酸、反丁烯二酸、三氟乙酸、苯甲酸、3-(4-羟基苯甲酰基)苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲烷磺酸、乙烷磺酸、1,2-乙二磺酸、2-羟基乙磺酸、苯磺酸、甲苯磺酸、4-甲基双环-[2.2.2]辛-2-烯-1-甲酸、2-萘磺酸、叔丁基乙酸、葡庚糖酸、4,4'-亚甲基双-(3-羟基-2-烯-1-甲酸)、3-苯基丙酸、三甲基乙酸、十二烷基硫酸、葡糖酸、谷氨酸、水杨酸、羟基萘酸、硬脂酸、粘康酸等;(2) 碱加成盐,其在母体化合物中的酸性质子被金属离子置换时形成,例如碱金属离子(例如锂、钠、钾)、碱土金属离子(例如镁或钙)或铝离子;或与有机碱配位。可接受的有机碱包括乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、三甲胺、N-甲基葡萄糖胺,等等。可接受的无机碱包括氢氧化铝、氢氧化钙、氢氧化钾、碳酸钠、氢氧化钠等。

[0049] 药学可接受的盐的相应的平衡离子可以使用各种方法分析和鉴定,所述方法包括但不限于离子交换色谱、离子色谱、毛细管电泳、电感耦合等离子体、原子吸收光谱、质谱或它们的任何组合。

[0050] 使用以下技术的至少一种回收所述盐:过滤、用非溶剂沉淀接着过滤、溶剂蒸发,或水溶液的情况下使用冻干法。

[0051] 筛选和表征药学可接受的盐、多晶型和/或溶剂化物可以使用多种技术完成,所述技术包括但不限于热分析、X射线衍射、光谱、显微镜方法、元素分析。使用的各种光谱技术包括但不限于Raman、FTIR、UVIS和NMR(液体和固体状态)。各种显微镜技术包括但不限于IR显微镜检术和拉曼(Raman)显微镜检术。

[0052] 本发明的药物组合物

[0053] 本申请还提供药物组合物,其包含至少一种式(I)的化合物或所述化合物的药学可接受的盐、溶剂化物、酯、酸、药物活性代谢物或前药,以及药学可接受的载体或赋形剂,以及者任选的其它治疗剂。

[0054] 在治疗过程中,可以根据情况单独或与一种或多种其它的治疗剂组合使用。可以通过注射、口服、吸入、直肠和经皮施用中的至少一种将包含本发明化合物的药物施用给患者。其它的治疗剂可以选自以下药物:免疫抑制剂(例如他克莫司、环孢菌素、雷帕霉素、甲氨蝶呤、环磷酰胺、硫唑嘌呤、巯嘌呤、麦考酚酯或FTY720)、糖皮质激素类药(例如泼尼松、醋酸可的松、泼尼松龙、甲泼尼龙、地塞米松、倍他米松、曲安西龙、氢羟强的松龙、倍氯米松、醋酸氟氢可的松、醋酸脱氧皮质酮、醛固酮)、非甾体抗炎药(例如水杨酸盐、芳基烷酸、2-芳基丙酸、N-芳基邻氨基苯甲酸、昔康类、考昔类或硫酰替苯胺)、变态反应疫苗、抗组胺药、抗白三烯药、 β -激动剂、茶碱、抗胆碱药或其它选择性激酶抑制剂(例如mTOR抑制剂、c-

Met抑制剂)或her2抗体-药物。另外,所提及的其它治疗剂还可以是雷帕霉素(Rapamycin)、克唑替尼(Crizotinib)、他莫昔芬、雷洛昔芬、阿那曲唑、依西美坦、来曲唑、赫赛汀™(曲妥珠单抗)、格列卫™(伊马替尼)、紫杉醇™(紫杉醇)、环磷酰胺、洛伐他汀、美诺四环素(Minosine)、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶(5-FU)、甲氨蝶呤(MTX)、紫杉特尔™(多西他赛)、诺雷德™(戈舍瑞林)、长春新碱、长春碱、诺考达唑、替尼泊苷、依托泊苷、健择™(吉西他滨)、埃博霉素(Epothilone)、诺唯本、喜树碱、柔红霉素(Daunorubicin)、更生霉素、米托蒽醌、安吡啶、多柔比星(亚德里亚霉素)、表柔比星或伊达比星。或者,其它治疗剂也可以是细胞因子例如G-CSF(粒细胞集落刺激因子)。或者,其它治疗剂也可以是,例如但不限于,CMF(环磷酰胺、甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶)、CAF(环磷酰胺、亚德里亚霉素和5-氟尿嘧啶)、AC(亚德里亚霉素和环磷酰胺)、FEC(5-氟尿嘧啶、表柔比星和环磷酰胺)、ACT或ATC(亚德里亚霉素、环磷酰胺和紫杉醇)或CMFP(环磷酰胺、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶和泼尼松)。

[0055] 在本发明的实施方式中,在根据本发明对患者进行治疗时,给定药物的量取决于诸多因素,如具体的给药方案、疾病或病症类型及其严重性、需要治疗的受治疗者或宿主的独特性(例如体重),但是,根据特定的周围情况,包括例如已采用的具体药物、给药途径、治疗的病症、以及治疗的受治疗者或宿主,施用剂量可由本领域已知的方法常规决定。通常,就成人治疗使用的剂量而言,施用剂量典型地在0.02-5000mg/天,例如约1-1500mg/天的范围。该所需剂量可以方便地被表现为一剂、或同时给药的(或在短时间内)或在适当的间隔的分剂量,例如每天二、三、四剂或更多分剂。本领域技术人员可以理解的是,尽管给出了上述剂量范围,但具体的有效量可根据患者的情况并结合医师诊断而适当调节。

[0056] 本发明的药物的用途

[0057] 式(I)的化合物能包括其药学可接受的盐、溶剂化物、酯、酸、代谢物或前药、或药物组合物抑制一种用于抑制酪氨酸激酶C-KIT(野生型或各种突变或其组合)和/或PDGFR(野生型或各种突变或其组合)活性。式(I)的化合物或其药学可接受的盐、溶剂化物、酯、酸、代谢物或前药,或其药物组合物可用于治疗、预防或改善一种或多种选自下组的疾病:实体瘤(包括良性或者尤其恶性类型)、尤其肉瘤、胃肠道间质肿瘤(Gastrointestinal Stromal Tumors,GIST)、结直肠癌(colon cancer)、急性粒细胞白血病(Acute Myeloblastic Leukemia,AML)、慢性髓性白血病(Chronic Myelogenous Leukemia,CML)、瘤形成、甲状腺癌、系统性肥大细胞病、嗜酸性粒细胞增多综合征、纤维变性、红斑狼疮、移植物抗宿主病、神经纤维瘤、肺高压、阿尔茨海默病、精原细胞瘤、无性细胞瘤、肥大细胞肿瘤、肺癌、支气管癌、睾丸上皮内瘤形成、黑色素瘤、乳癌、神经母细胞瘤、乳头状/滤泡型甲状腺癌、恶性淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、2型多发性内分泌瘤形成、嗜铬细胞瘤、甲状腺癌、甲状旁腺增生/腺瘤、结肠癌、结肠直肠癌腺瘤、卵巢癌、前列腺癌、成胶质细胞瘤、脑肿瘤、恶性神经胶质瘤、胰腺癌、恶性胸膜间皮瘤、成血管细胞瘤、血管瘤、肾癌、肝癌、肾上腺癌、膀胱癌、胃癌、直肠癌、阴道癌、宫颈癌、子宫内膜癌、多发性骨髓瘤、颈和头部肿瘤、以及其他增生性或增殖性疾病或类似疾病、或其组合。特别优选治疗胃肠道间质瘤(Gastrointestinal Stromal Tumors,GIST)、结直肠癌(colorectal cancer)、急性粒细胞白血病(Acute Myeloblastic Leukemia,AML)、慢性髓性白血病(Chronic Myelogenous Leukemia,CML)、甲状腺癌(thyroid carcinoma)或类似疾病、或其组合。

[0058] 式(I)所述化合物或其药学可接受的盐、溶剂化物、酯、酸、代谢物或前药,或其药

物组合物可用于治疗、预防或改善选自下组的自身免疫性疾病：关节炎、风湿性关节炎、骨关节炎、狼疮、类风湿性关节炎、炎性肠病、银屑病性关节炎、骨关节炎、斯蒂尔病(Still's disease)、青少年关节炎、糖尿病、重症肌无力症、桥本甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、奥德甲状腺炎(Ord's thyroiditis)、格雷夫斯病(Graves' disease)、类风湿性关节炎综合征(Sjögren's syndrome)、多发性硬化症、传染性神经元炎(Guillain-Barré syndrome)、急性播散性脑脊髓炎、阿狄森病(Addison's disease)、视性眼阵挛-肌阵挛综合征、强直性脊椎炎、抗磷脂抗体综合征、再生障碍性贫血、自身免疫性肝炎、乳糜泻(coeliac disease)、古德帕斯彻综合征(Goodpasture's syndrome)、特发性血小板减少性紫癜、视神经炎、硬皮病、原发性胆汁性肝硬化、莱特尔综合征(Reiter's syndrome)、高安动脉炎(Takayasu's arteritis)、颞动脉炎、温型自身免疫性溶血性贫血、韦格纳肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)、银屑病、全身脱毛、贝赫切特病(Behcet's disease)、慢性疲劳、家族性自主神经功能异常、子宫内膜异位、间质性膀胱炎、神经肌强直、硬皮病或外阴痛。

[0059] 化合物的制备

[0060] 使用本领域技术人员已知的标准合成技术或使用本领域已知的方法与本文描述的方法组合,可以合成式(I)的化合物。另外,本文给出的溶剂、温度和其它反应条件可以根据本领域技术而改变。作为进一步的指导,也可以利用以下的合成方法。

[0061] 所述反应可以按顺序使用,以提供本文描述的化合物;或它们可以用于合成片段,所述片段通过本文描述的方法和/或本领域已知的方法随后加入。

[0062] 在某些实施方式中,本文提供的是本文描述的酪氨酸激酶抑制剂化合物的制备方法及其使用方法。在某些实施方式中,本文描述的化合物可以使用以下合成的方案合成。可以使用与下述类似的方法,通过使用适当的可选择起始原料,合成化合物。

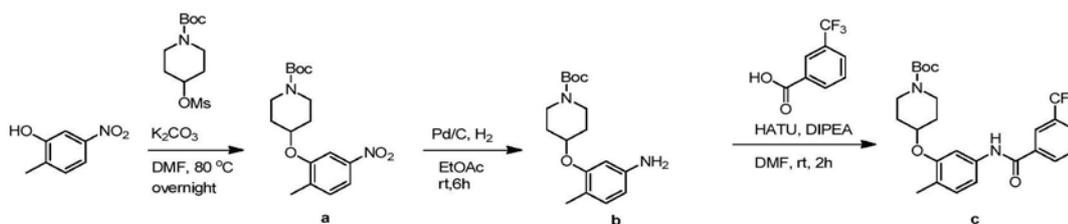
[0063] 用于合成本文描述的化合物的起始原料可以被合成或可以从商业来源获得。本文描述的化合物和其它相关具有不同取代基的化合物可以使用本领域技术人员已知的技术和原料合成。制备本文公开的化合物的一般方法可以来自本领域已知的反应,并且该反应可以通过由本领域技术人员所认为适当的试剂和条件修改,以引入本文提供的分子中的各种部分。

[0064] 如果需要,反应产物可以使用常规技术分离和纯化,包括但不限于过滤、蒸馏、结晶、色谱等方法。这些产物可以使用常规方法表征,包括物理常数和图谱数据。

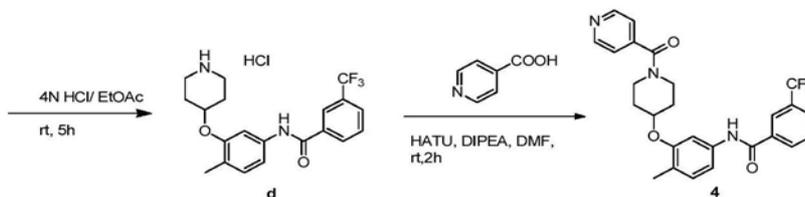
[0065] 制备式(I)的化合物的合成方案的非限制性实施例参见以下合成路线。

[0066] 实施例1

[0067] 化合物4的合成



[0068]

[0069] 叔丁基4-(2-甲基-5-硝基苯氧基)哌啶-1-羧酸酯化合物a的合成

[0070] 将5mmol 2-甲基-5-硝基苯酚、6mmol 1-叔丁氧羰基-4-甲烷磺酰氧基哌啶以及10mmol无水碳酸钾分别依次加入15毫升无水N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中。反应体系于80摄氏度反应过夜,冷却至室温,反应体系用乙酸乙酯萃取,合并有机相并用无水硫酸钠干燥。用旋转蒸发器除去溶剂,粗产品用硅胶色谱柱分离,得到产品叔丁基4-(2-甲基-5-硝基苯氧基)哌啶-1-羧酸酯化合物a(产率:89%)。Exact Mass(计算值):336.17;MS(ESI)m/z(M+Na)⁺:359.20。

[0071] 叔丁基4-(2-甲基-5-氨基苯氧基)哌啶-1-羧酸酯化合物b的合成

[0072] 将4mmol叔丁基4-(2-甲基-5-硝基苯氧基)哌啶-1-羧酸酯化合物a溶解于20毫升乙酸乙酯中,然后加入0.05当量的Pd/C(10%)。体系于一个大气压氢气环境下反应6小时。反应体系用硅藻土过滤,收集滤液并除去溶剂得产品叔丁基4-(2-甲基-5-氨基苯氧基)哌啶-1-羧酸酯化合物b(产率:96%)。Exact Mass(计算值):306.19;MS(ESI)m/z(M+Na)⁺:329.23。

[0073] 叔丁基4-(2-甲基-5-(3-(三氟甲基)苯甲酰氨基)苯氧基)哌啶-1-甲酸化合物c的合成

[0074] 将5mmol的叔丁基4-(2-甲基-5-氨基苯氧基)哌啶-1-羧酸酯b、5mmol 3-三氟甲基苯甲酸、10mmol N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)以及15毫升N,N-二甲基甲酰胺(DMF)依次加入50毫升的圆底烧瓶,搅拌状态下加入6mmol的2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯(HATU)。反应体系于室温搅拌反应2小时。用乙酸乙酯萃取反应体系,并经无水硫酸钠干燥;用旋转蒸发器除去溶剂,粗产品用硅胶色谱柱分离,得到产品叔丁基4-(2-甲基-5-(3-(三氟甲基)苯甲酰氨基)苯氧基)哌啶-1-甲酸化合物c(产率:82%)。Exact Mass(计算值):478.20;MS(ESI)m/z(M+H)⁺:479.20。

[0075] N-(4-甲基-3-(哌啶-4-氧基)苯基)-3-(三氟甲基)苯甲酰胺盐酸盐化合物d的合成

[0076] 3mmol叔丁基4-(2-甲基-5-(3-(三氟甲基)苯甲酰氨基)苯氧基)哌啶-1-甲酸化合物c于25mL圆底烧瓶中加入20mL的4N的盐酸/乙酸乙酯溶液并在室温搅拌5h,抽滤得固体并用乙酸乙酯洗涤,然后干燥得产品N-(4-甲基-3-(哌啶-4-氧基)苯基)-3-(三氟甲基)苯甲酰胺盐酸盐化合物d(产率:76%)。Exact Mass(计算值):378.15;MS(ESI)m/z(M+H)⁺:

379.15。

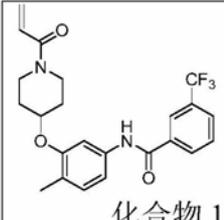
[0077] N-(4-甲基-3-(1-异烟酸基哌啶-4-基)氧基)苯基)-3-(三氟甲基)苯甲酰胺化合物4的合成

[0078] 将0.05mmol的N-(4-甲基-3-(哌啶-4-氧基)苯基)-3-(三氟甲基)苯甲酰胺盐酸盐d、0.05mmol异烟酸、0.1mmol N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)以及1毫升N,N-二甲基甲酰胺(DMF)依次加入5毫升的圆底烧瓶,搅拌状态下加入0.06mmol的2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸酯(HATU)。反应体系于室温搅拌反应2小时。用乙酸乙酯萃取反应体系,并经无水硫酸钠干燥;用旋转蒸发器除去溶剂,粗产品用硅胶色谱柱分离,得到产品N-(4-甲基-3-(1-异烟酸基哌啶-4-基)氧基)苯基)-3-(三氟甲基)苯甲酰胺化合物4(产率:67%)。

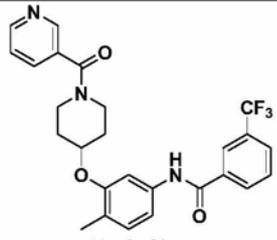
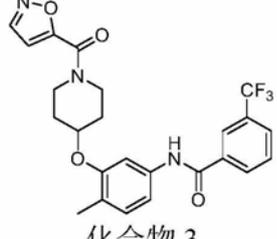
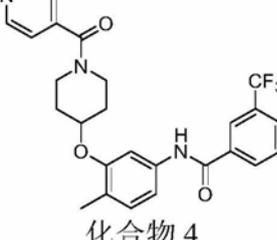
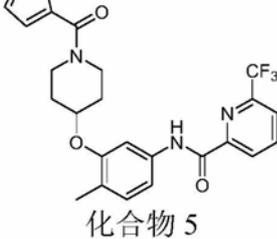
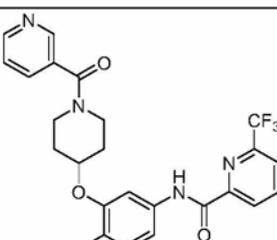
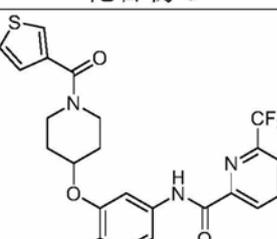
[0079] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ 10.37 (s, 1H), 8.67 (s, 2H), 8.27 (s, 2H), 7.96 (d, J=6.8Hz, 1H), 7.79-7.76 (m, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.43 (s, 2H), 7.29 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.14 (d, J=7.6Hz, 1H), 4.60 (s, 1H), 3.83-3.28 (m, 4H), 2.16 (s, 3H), 1.95 (s, 2H), 1.77 (s, 2H)。Exact Mass (计算值): 483.17; MS (ESI) m/z (M+H) $^+$: 484.17。

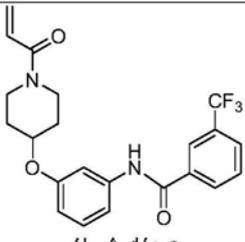
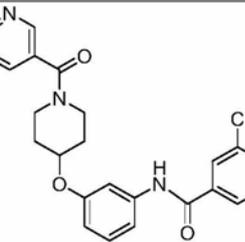
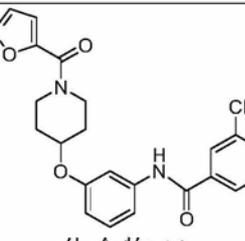
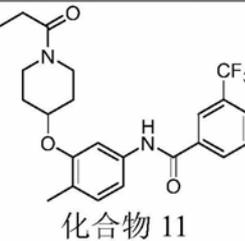
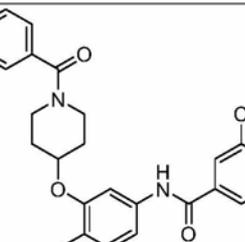
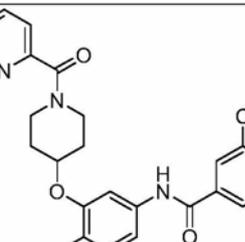
[0080] 本领域技术人员可采用适当的原料,根据已知的标准合成技术以与以上实施例1类似的方法步骤合成本发明的其它优选化合物。其实例如下表1所示。

[0081] 表1. 本发明的示例性化合物及其表征数据

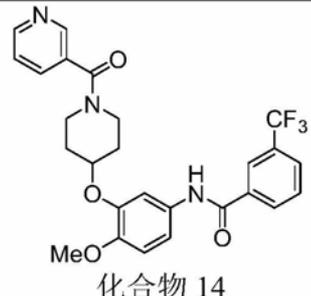
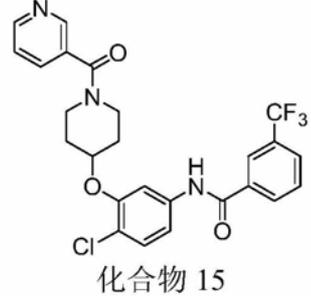
[0082]	 <p>化合物 1</p>	<p>N-(3-((1-丙烯酰基哌啶-4-基)氧基)-4-甲基苯基)-3-(三氟甲基)苯甲酰胺</p> <p>Exact Mass (计算值): 432.16; MS (ESI) m/z (M+1)$^+$: 433.16。</p>
--------	---	--

[0083]

 <p>化合物 2</p>	<p>N-(4-甲基-3-(1-烟酸基哌啶-4-基)氧基)苯基)-3-(三氟甲基)苯甲酰胺</p>	<p>$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 10.39 (s, 1H), 8.65 (s, 2H), 8.27 (s, 2H), 7.87-7.78 (m, 3H), 7.48 (s, 2H), 7.30 (s, 1H), 7.14 (s, 1H), 4.61 (s, 1H), 3.86-3.36 (m, 3H), 2.16 (s, 3H), 2.02 (s, 2H), 1.79 (s, 2H). Exact Mass (计算值): 483.17; MS (ESI) m/z (M+1)$^+$: 484.17。</p>
 <p>化合物 3</p>	<p>N-(3-((1-(异噁唑-5-羰基)哌啶-4-基)氧基)-4-甲基苯)-3-(三氟甲基)苯甲酰胺</p>	<p>Exact Mass (计算值): 473.15; MS (ESI) m/z (M+1)$^+$: 474.15。</p>
 <p>化合物 4</p>	<p>N-(4-甲基-3-(1-异烟酸基哌啶-4-基)氧基)苯基)-3-(三氟甲基)苯甲酰胺</p>	<p>Exact Mass (计算值): 483.17; MS (ESI) m/z (M+1)$^+$: 484.17。</p>
 <p>化合物 5</p>	<p>N-(3-((1-(异噁唑-5-羰基)哌啶-4-基)氧基)-4-甲基苯基)-6-(三氟甲基)吡啶酰胺</p>	<p>$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 10.29 (s, 1H), 8.75 (s, 1H), 8.37 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 8.18 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.41 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.16 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.02-6.86 (m, 1H), 4.69 (s, 1H), 3.79-3.54 (m, 4H), 2.17 (s, 3H), 2.03 (s, 2H), 1.80 (s, 2H). Exact Mass (计算值): 474.15; MS (ESI) m/z (M+1)$^+$: 475.15。</p>
 <p>化合物 6</p>	<p>N-(4-甲基-3-(1-烟酸基哌啶-4-基)氧基)苯基)-6-(三氟甲基)吡啶酰胺</p>	<p>Exact Mass (计算值): 484.17; MS (ESI) m/z (M+1)$^+$: 485.17。</p>
 <p>化合物 7</p>	<p>N-(4-甲基-3-((1-(噻吩-3-羰基)哌啶-4-基)氧基)苯基)-6-(三氟甲基)吡啶酰胺</p>	<p>Exact Mass (计算值): 489.13; MS (ESI) m/z (M+1)$^+$: 490.13。</p>

 <p>化合物 8</p>	<p>N-(3-((1-丙烯酰基哌啶-4-基)氧基)苯基)-3-(三氟甲基)苯甲酰胺</p>	<p>Exact Mass (计算值): 418.15; MS (ESI) m/z (M+1)⁺: 419.15。</p>
 <p>化合物 9</p>	<p>N-(3-((烟酸基哌啶-4-基)氧基)苯基)-3-(三氟甲基)苯甲酰胺</p>	<p>¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.45 (s, 1H), 8.64 (s, 2H), 8.27 (s, 2H), 8.04-7.69 (m, 3H), 7.50 (s, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.27 (s, 1H), 6.78 (s, 1H), 4.64 (s, 1H), 3.95 (s, 1H), 3.52 (s, 2H), 1.98 (s, 2H), 1.70 (s, 2H). Exact Mass (计算值): 469.16; MS (ESI) m/z (M+1)⁺: 470.16。</p>
 <p>化合物 10</p>	<p>N-(3-((1-异噁唑-5-羰基)哌啶-4-基)氧基)苯基)-3-(三氟甲基)苯甲酰胺</p>	<p>Exact Mass (计算值): 459.14; MS (ESI) m/z (M+1)⁺: 460.14。</p>
 <p>化合物 11</p>	<p>N-(3-((1-丙酰基哌啶-4-基)氧基)-4-甲基苯基)-3-(三氟甲基)苯甲酰胺</p>	<p>¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.39 (s, 1H), 8.29 (s, 2H), 7.99 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.81 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.31 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.15 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 4.57 (s, 1H), 3.68 (s, 2H), 3.44 (s, 2H), 2.37 (m, 2H), 2.16 (s, 3H), 1.95 (s, 2H), 1.68 (s, 2H), 1.02 (m, 3H). Exact Mass (计算值): 434.18; MS (ESI) m/z (M+1)⁺: 435.18。</p>
 <p>化合物 12</p>	<p>N-(3-(1-苯甲酰基哌啶-4-基)氧基)-4-甲基苯基)-3-(三氟甲基)苯甲酰胺</p>	<p>¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.96 (s, 1H), 10.39 (s, 1H), 8.29 (s, 2H), 7.98 (s, 3H), 7.81 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.48 (m, 8H), 7.30 (s, 1H), 7.16 (s, 1H), 4.61 (s, 1H), 3.93-3.33 (m, 4H), 2.18 (s, 3H), 2.02 (s, 2H), 1.76 (s, 2H). Exact Mass (计算值): 482.18; MS (ESI) m/z (M+1)⁺: 483.18。</p>
 <p>化合物 13</p>	<p>N-(4-甲基-3-((1-吡啶-2-甲酰基)哌啶-4-基)氧基)苯基)-3-(三氟甲基)苯甲酰胺</p>	<p>¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.39 (s, 1H), 8.61 (s, 1H), 8.28 (s, 2H), 7.96 (m, 2H), 7.80 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.61 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.50 (s, 2H), 7.31 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.16 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 3.96-3.33 (m, 4H), 2.18 (s, 3H), 2.03 (s, 2H), 1.76 (s, 2H). Exact Mass (计算值): 483.17; MS (ESI) m/z (M+1)⁺: 484.17。</p>

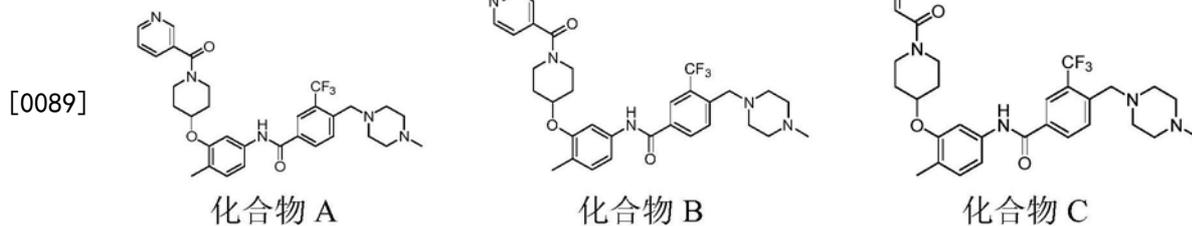
[0084]

[0085]	 <p>化合物 14</p>	<p>N-(4-甲氧基-3-(1-烟酸基哌啶-4-基)氧基)苯基)-3-(三氟甲基)-苯甲酰胺</p> <p>Exact Mass (计算值): 499.17; MS (ESI) m/z (M+1)⁺: 500.17。</p>
	 <p>化合物 15</p>	<p>N-(4-氯-3-(1-烟酸基哌啶-4-基)氧基)苯基)-3-(三氟甲基)-苯甲酰胺</p> <p>¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.57 (s, 1H), 8.67 (s, 2H), 8.27 (s, 2H), 8.00 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.90 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 7.82 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.58-7.38 (m, 3H), 4.71 (s, 1H), 3.91-3.34 (m, 4H), 2.07 (s, 2H), 1.81 (s, 2H).</p> <p>Exact Mass (计算值): 503.12; MS (ESI) m/z (M+1)⁺: 504.12。</p>

[0086] 实施例2

[0087] 新型激酶抑制剂对癌细胞生长的影响

[0088] 通过测试本发明的化合物4作为C-KIT抑制剂对癌细胞增殖的影响,我们对本发明的化合物在癌细胞增殖抑制试验中的活性和选择性进行了评估,并以尼洛替尼(Nilotinib) (购自上海皓元化学科技有限公司)、伊马替尼(购自上海皓元化学科技有限公司)、对比化合物A、B、C作为对照:



[0090] 本实施例选用了慢性髓性白血病细胞K562(表达P210 Bcr-Abl突变型基因)、人成巨核细胞白血病细胞MEG-01(表达P210 Bcr-Abl突变型基因)、人外周血嗜碱性白血病细胞Ku812(表达Bcr-Abl突变型基因)(上述细胞均购自ATCC(美国))、人胃肠道间质瘤细胞系细胞GIST-T1(表达野生型C-KIT基因)(购自Cosmo Bio Co.,Ltd.(日本))、人胃肠道间质瘤细胞系细胞GIST-882(表达野生型C-KIT基因)(美国哈佛大学Dana-Farber癌症研究所Professor Gray实验室赠送)、小鼠原B细胞BaF3(购自ATCC(美国))。

[0091] 此外,本实施例还选用了小鼠P210/BaF3(稳定表达P210 Bcr-Abl突变型基因)、小鼠Tel-ABL-BaF3(稳定表达野生型ABL激酶)、小鼠Tel-cKit-BaF3(稳定表达C-KIT野生型激酶)、小鼠Tel-cKit/V559D-BaF3(稳定表达C-KIT V559D突变型激酶)、小鼠Tel-cKit/V559D/V654A-BaF3(稳定表达C-KIT V559D/V654A突变型激酶)、小鼠Tel-cKit/N822K-BaF3(稳定表达C-KIT N822K突变型激酶)、小鼠Tel-cKit/V654A-BaF3(稳定表达C-KIT V654A突变型激酶)、小鼠Tel-cKit/L567P-BaF3(稳定表达C-KIT L567P突变型激酶)、小鼠Tel-cKit/T670I-BaF3(稳定表达C-KIT T670I突变型激酶)、小鼠Tel-PDGFR α -BaF3(稳定表达PDGFR α 激酶)、小鼠Tel-PDGFR β -BaF3(稳定表达PDGFR β 激酶)、小鼠Tel-VEGFR2-BaF3(稳定

表达VEGFR2激酶)、小鼠Tel-RET-BaF3(稳定表达RET激酶)。上述细胞系均由本实验室构建,构建方法为:经PCR分别扩增人类P210 Bcr-Abl、ABL、C-KIT、C-KIT V559D、C-KIT V559D/V654A、C-KIT N822K、C-KIT V654A、C-KIT L567P、C-KIT T670I、PDGFR α 、PDGFR β 、VEGFR2、RET激酶区序列,并分别插入到带有N端TEL片段和/或者NPM片段和/或者TPR片段的MSCV-Puro载体(购自Clontech),通过逆转录病毒方法,稳定转入小鼠BaF3细胞,并且撤除IL-3生长因子,最终得到依赖P210 Bcr-Abl、ABL、C-KIT、C-KIT V559D、C-KIT V559D/V654A、C-KIT N822K、C-KIT V654A、C-KIT L567P、C-KIT T670I、PDGFR α 、PDGFR β 、VEGFR2、RET转入蛋白的细胞系。

[0092] 在实施例中将不同浓度(0.000508 μ M、0.00152 μ M、0.00457 μ M、0.0137 μ M、0.0411 μ M、0.123 μ M、0.370 μ M、1.11 μ M、3.33 μ M、10 μ M)的化合物4及对照化合物尼洛替尼、伊马替尼、对比化合物A、B、C(按照与实施例1类似的方法在实验室合成)分别加入到上述细胞中,并孵育72小时,通过CCK-8(购自贝博生物公司,中国上海)细胞活力检测试剂盒(CCK-8可被活细胞中的脱氢酶还原为具有高度水溶性的黄色甲瓩产物,生成的甲瓩物数量与活细胞的数量成正比)对孵育后的细胞进行检测,通过酶标仪对活细胞的数目进行定量,并计算化合物和各个对照化合物的GI₅₀(结果示于表2)。

[0093] 表2所示的实验结果表明,本发明的化合物4对表达野生型ABL及突变型Bcr-Abl激酶的细胞的增殖均无明显抑制作用(GI₅₀均大于5 μ M),对表达野生型C-KIT激酶的细胞的增殖具有显著的抑制作用(GI₅₀均小于0.5 μ M)。这样的结果表明,对于ABL激酶(野生型或突变型)和C-KIT激酶(野生型或突变型),本发明的化合物4选择性地并且有效地抑制C-KIT激酶。

[0094] 相比之下,在同样的实验中,对照化合物尼洛替尼、伊马替尼、对比化合物B和C不仅对表达C-KIT激酶的细胞增殖具有明显的抑制作用(GI₅₀均小于0.5 μ M),并且对表达野生型ABL及突变型Bcr-Abl激酶的细胞的增殖也具有明显的抑制作用。这样的结果表明,对照化合物尼洛替尼、伊马替尼、对比化合物B和C对于ABL激酶(野生型或突变型)和C-KIT激酶(野生型或突变型)的抑制作用相近,换言之,上述四种对照化合物表现出的选择性较差。

[0095] 上述比较说明,本发明的化合物4表现出优于对照化合物尼洛替尼、伊马替尼、对比化合物B和C的C-KIT激酶选择性。

[0096] 另外,表2的结果还反映出本发明的化合物4对表达突变型C-KIT激酶的细胞(例如Tel-cKit/V559D-BaF3细胞)的抑制作用。由于在胃肠间质瘤(GIST)治疗中出现的耐药性与C-KIT激酶的突变有关,本实施例的结果揭示了本发明的化合物4用于GIST患者二期治疗的可能性,这有助于解决GIST患者在服药后出现与C-KIT激酶突变相关的耐药性的问题。

[0097] 表2. 不同的抑制剂对癌细胞生长的影响(结果示为GI₅₀值,单位为 μ M)

细胞名称	基因表达	尼洛替尼	伊马替尼	化合物 A	化合物 B	化合物 C	化合物 4
[0098] K562	P210 Bcr-Abl	0.003	0.267	0.056	0.07	0.28	>10
MEG-01	P210 Bcr-Abl	0.0004	0.074	0.018	0.034	0.108	7.43
Ku812	Bcr-Abl	0.0012	0.163	0.057	0.236	0.19	6.71
P210/BaF3	Bcr-Abl	0.0125	0.27	0.164		0.99	6.05
Tel-ABL-BaF3	ABL WT	0.026	0.4	0.145	0.146	0.42	5.06
Tel-cKit-BaF3	KIT WT	0.047	0.412	0.147	0.17	0.16	0.19
GIST-T1	KIT WT	0.006	0.008	0.014	0.027	0.03	0.021

[0099] GIST-882	KIT WT	0.017	0.014	0.067			0.043
Tel-cKit/V559D-BaF3	KIT V559D	0.022	0.039	0.134	0.02	0.036	0.04
Tel-cKit/V559D/V654A-BaF3	KIT V559D/V654A	0.648	3.0	2.45			1.05
Tel-cKit/N822K-BaF3	KIT N822K	0.166	1.29	0.378	0.13	0.38	0.94
Tel-cKit/V654A-BaF3	KIT V654A	0.365	2.49	2.26	0.585	0.401	1.03
Tel-cKit/L576P-BaF3	KIT L576P	0.081	0.102	0.321			0.148
Tel-cKit/T670I-BaF3	KIT T670I	2.86	6.67	1.01	0.427	0.952	5.31
Tel-RET-BaF3	RET WT	2.66	6.31	0.39	0.3	0.49	0.59
Tel-PDGFR α -BaF3	PDGFR α	0.032	0.034	0.095	0.015	0.036	0.038
Tel-PDGFR β -BaF3	PDGFR β	0.032	0.019	0.052	0.04	0.042	0.027
Tel-VEGFR2-BaF3	VEGFR2	5.38	>10	0.017	0.007	0.005	0.347
BaF3		>10	>10	>10	>10	>10	>10

[0100] 实施例3

[0101] 化合物4、对比化合物A、伊马替尼和达沙替尼各自对细胞信号通路的影响

[0102] 在人胃肠道间质瘤细胞系GIST-T1 (表达野生型C-KIT基因)、人胃肠道间质瘤细胞系GIST-882 (表达野生型C-KIT基因)、及慢性髓性白血病细胞K562 (表达P210 Bcr-Abl突变型基因) 三株细胞上,通过测定多个细胞生化终点和功能性终点,对化合物4、及对比化合物A、伊马替尼、达沙替尼 (Dasatinib) (购自上海皓元化学科技有限公司) 对细胞中C-KIT蛋白激酶、Bcr-Abl融合蛋白以及与这些蛋白密切相关的其他蛋白激酶Stat5、AKT、ErK、S6K、S6、

PDGFR α 等蛋白的磷酸化的影响进行评估。

[0103] 使用不同浓度0 μ M、0.03 μ M、0.1 μ M、0.3 μ M、1 μ M、3 μ M、10 μ M的化合物4以及1 μ M的对照化合物伊马替尼,分别处理胃肠道间质瘤细胞系GIST-T1及GIST-882两株细胞2小时;使用不同浓度0 μ M、0.01 μ M、0.03 μ M、0.1 μ M、0.3 μ M、1 μ M、3 μ M的化合物4、对比化合物A以及1 μ M的对照化合物伊马替尼、0.1 μ M的对照化合物达沙替尼处理慢性髓性白血病细胞K562(表达P210 Bcr-Abl突变型基因)2小时;收集样品。测定化合物4、以及对照化合物A、伊马替尼、达沙替尼化合物对细胞中的C-KIT、Stat5、AKT、ErK、S6K、S6、PDGFR α 等蛋白的磷酸化的影响。结果示于图1。

[0104] 结果表明,在胃肠道间质瘤细胞系GIST-T1(表达C-KIT基因)及人胃肠道间质瘤细胞系GIST-882(表达C-KIT基因)中,化合物4的浓度为0.1 μ M时就能够明显地抑制C-KIT致癌蛋白的磷酸化,而且对细胞中关键信号通路中的Stat5、AKT、ErK、S6K、S6、PDGFR α 等蛋白的磷酸化也有非常明显的抑制作用。在该实验中,对照化合物伊马替尼也表现出相似的磷酸化抑制作用。

[0105] 而在慢性髓性白血病细胞K562(表达P210 Bcr-Abl突变型基因)细胞系中,化合物4的用药浓度为3 μ M时对Bcr-Abl激酶的磷酸化都没有任何影响,对细胞中关键信号通路中的AKT、ErK蛋白的磷酸化也没有影响。同样的实验中,对照化合物达沙替尼的用药浓度为0.1 μ M时就非常强烈的抑制住Bcr-Abl激酶的磷酸化,且对其信号通路上下游相关的蛋白也有非常强烈的抑制作用,对照化合物伊马替尼的用药浓度为1 μ M时对Bcr-Abl激酶的磷酸化表现出抑制作用;对比化合物A的用药浓度为0.1 μ M时已经对Bcr-Abl激酶的磷酸化具有非常强烈的抑制作用,同时对其信号通路上下游相关的蛋白也有非常强烈的抑制作用。

[0106] 这样的结果说明,化合物4与伊马替尼都对C-KIT相关的信号通路发挥作用,并且它们可能都通过抑制致癌蛋白C-KIT的磷酸化来影响携带C-KIT致癌蛋白的胃肠道间质瘤细胞GIST-T1及GIST-882细胞的细胞增殖。同时,本发明化合物4对Bcr-Abl激酶的磷酸化没有任何影响或影响较小,这表明本发明化合物4具有很好的C-KIT抑制选择性及较低的毒副作用。

[0107] 实施例4

[0108] 化合物4和伊马替尼各自对细胞凋亡的影响

[0109] 为了研究用药以后细胞的死亡是通过凋亡还是坏死,在胃肠道间质瘤细胞系GIST-T1(表达野生型C-KIT基因)及人胃肠道间质瘤细胞系GIST-882(表达野生型C-KIT基因)中,检测了化合物4在细胞中对与细胞凋亡密切相关的DNA修复酶聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶PARP、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶Caspase 3蛋白剪切的影响。用不同浓度0 μ M、0.1 μ M、0.3 μ M、1 μ M、3 μ M的化合物4和1 μ M的对照化合物伊马替尼处理胃肠道间质瘤细胞系GIST-T1及胃肠道间质瘤细胞系GIST-882细胞,然后分别在48小时、72小时后收集细胞。用Western Blot检测不同浓度的药在不同时间段对DNA修复酶聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶PARP和含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶Caspase 3的剪切蛋白的影响。结果示于图2a和图2b。

[0110] 结果表明,在化合物4的浓度为0.3 μ M的情况下,在胃肠道间质瘤细胞系GIST-T1(表达C-KIT基因)中用药48小时后及在人胃肠道间质瘤细胞系GIST-882(表达C-KIT基因)中用药72小时后,在这两株细胞中均能够观察到明显的DNA修复酶聚腺苷二磷酸-核糖聚合

酶PARP的剪切及PARP的下游Caspase 3的剪切。对于用药1 μ M伊马替尼的实验组,同样观察到明显的DNA修复酶聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶PARP的剪切及PARP的下游Caspase 3的剪切。这表明用化合物4和伊马替尼处理细胞之后引起的细胞死亡属于细胞凋亡而非细胞坏死。也就是说,化合物4和伊马替尼能够引起表达C-KIT致癌蛋白的胃肠道间质瘤细胞系GIST-T1及GIST-882的细胞凋亡。

[0111] 实施例5

[0112] 化合物4和伊马替尼各自对细胞周期的影响

[0113] 为了研究用药后细胞被阻止在哪个生长周期,在胃肠道间质瘤细胞系GIST-T1(表达野生型C-KIT基因)及人胃肠道间质瘤细胞系GIST-882(表达野生型C-KIT基因)中,对化合物4、伊马替尼和舒尼替尼(Sunitinib)(购自上海皓元化学科技有限公司)对这些细胞系的细胞周期分布的影响进行测试。

[0114] 在用不同浓度(0 μ M、0.3 μ M、1 μ M、3 μ M于DMSO中)的化合物4、3 μ M(于DMSO中)的对照化合物伊马替尼及3 μ M(于DMSO中)的对照化合物舒尼替尼作用于上述细胞24小时或48小时后,收集细胞,用1X PBS缓冲液洗涤两次,将其用75%的乙醇于-20 $^{\circ}$ C固定24小时,用1X PBS缓冲液再洗涤两次,加0.5mL 1X PBS缓冲液和0.5mL的PI染色液(购自美国BD Bioscience)到细胞中并将细胞放置于黑暗避光37 $^{\circ}$ C染色15分钟,用流式细胞仪(BD FACS Calibur)检测细胞周期分布。结果参见图3a和图3b。

[0115] 结果显示,在胃肠道间质瘤细胞系GIST-T1(表达C-KIT基因)细胞中作用24小时、及在人胃肠道间质瘤细胞系GIST-882(表达C-KIT基因)细胞中作用48小时后,化合物4对这两株细胞的细胞周期有明显的影响,其使得这两种细胞的细胞周期均显著地被阻止在G0-G1期。

[0116] 实施例6

[0117] 化合物4的体外抑制活性(酶活)检测

[0118] 在体外酶活实验中测定化合物4对蛋白激酶C-KIT的IC₅₀值。将蛋白激酶C-KIT的激酶结构域克隆到昆虫表达载体pFASTHTA(购自Invitrogen life technologies)中,利用昆虫表达体系Bac-to-Bac Baculovirus Expression System(购自Invitrogen life technologies)进行蛋白表达,带有his标签。将构建好的载体转染至SF9包装病毒(购自Invitrogen life technologies),用病毒感染SF9表达蛋白。利用镍亲和层析进行纯化。

[0119] 取纯化的C-KIT蛋白激酶9 μ L(6ng/ μ L)分别与三倍梯度稀释的上述化合物4各1 μ L室温反应4小时(药物终浓度为10 μ M、3 μ M、1 μ M、0.3 μ M、0.1 μ M、0.03 μ M、0.01 μ M、0.003 μ M);

[0120] 加入2 μ L ATP和3 μ L底物Poly(4:1Glu,Tyr)Peptide(Promega,美国)(终浓度分别为10 μ M和0.2 μ g/ μ L),37 $^{\circ}$ C反应1小时;

[0121] 取5 μ L反应后的激酶溶液,加入5 μ L ADP-GloTM(Promega,美国)试剂于室温反应40min,以终止激酶反应并消耗完剩余的ATP;

[0122] 加入10 μ L激酶检测试剂将ADP转化成ATP,使用偶联的萤光素酶/萤光素反应检测新合成的ATP,利用Envision读数后作图,计算IC₅₀值。

[0123] 实验结果如图4所示:本发明的化合物4对C-KIT蛋白激酶具有强烈的抑制作用,其IC₅₀值为99nM。该结果说明本发明的化合物4是有效的C-KIT激酶抑制剂。

[0124] 实施例7

[0125] 化合物4和对照化合物伊马替尼在胃肠道间质瘤细胞系GIST-T1及胃肠道间质瘤细胞系GIST-882的小鼠模型中的实验结果

[0126] 1. 从上海斯莱克实验动物有限责任公司购买饲养4-6周龄的Ba1 b/c雌性小鼠, 饲养于SPF级实验室中, 饮水及垫料均经高压消毒无菌处理, 有关小鼠的所有操作均在无菌条件下进行;

[0127] 2. 第0天分别在所有小鼠左侧背部皮下注入约 5×10^6 个胃肠道间质瘤细胞系GIST-T1或GIST-882 (购自ATCC);

[0128] 3. 从第15天开始, 每天使对应小鼠口服给药甲基纤维素 (HK1) 溶媒 (6只小鼠); 剂量为25mg/kg鼠重的化合物4 (6只小鼠); 剂量为50mg/kg鼠重的化合物4 (6只小鼠); 剂量为100mg/kg鼠重的化合物4 (6只小鼠); 剂量为100mg/kg鼠重的对照化合物伊马替尼 (6只小鼠);

[0129] 4. 第15天开始, 每天用游标卡尺测量皮下肿瘤的长/宽, 并每天记录小鼠体重, 确定化合物4和对照化合物伊马替尼对小鼠体重的影响;

[0130] 5. 第36天 (对于GIST-882小鼠模型) 或43天 (GIST-T1小鼠模型) 处死小鼠, 取出皮下肿瘤, 将肿瘤称重比较;

[0131] 6. 将肿瘤样品组织制备出蛋白裂解液样品待用;

[0132] 7. 统计16-43天内皮下肿瘤生长趋势, 肿瘤体积计算方法: $\text{长} \times \text{宽} \times \text{宽} / 2\text{mm}^3$ 。

[0133] 实验结果如图5a-5b和5e-5f所示, 在胃肠道间质瘤细胞系GIST-T1的小鼠肿瘤模型中, 在用药第四天时, 用药剂量为25mg/kg的化合物4已经表现出一定的抑制小鼠肿瘤的效果, 且随着用药剂量及用药天数的增加, 化合物4对小鼠肿瘤的抑制作用愈发显著。对于化合物4的用药剂量为50mg/kg的小组, 在胃肠道间质瘤细胞系GIST-T1的小鼠模型中用药后第28天、及胃肠道间质瘤细胞系GIST-882的小鼠模型中用药后第21天抑瘤率分别达到65.3%及44%; 对于化合物4的用药剂量为100mg/kg的小组, 在胃肠道间质瘤细胞系GIST-T1及胃肠道间质瘤细胞系GIST-882的小鼠模型中, 抑瘤率分别达到73.8%及58%。在同样的试验中, 对于对照化合物伊马替尼的用药剂量为100mg/kg的小组, 在胃肠道间质瘤细胞系GIST-T1的小鼠模型中用药后第28天、及胃肠道间质瘤细胞系GIST-882的小鼠模型中用药后第21天抑瘤率分别为72.4%及49%; 这说明本发明的化合物4在动物模型中的药效优于对照化合物伊马替尼。

[0134] 另外, 结合图5c-5d的结果, 说明化合物4不仅有效地抑制小鼠肿瘤的生长, 并且对小鼠的体重基本没有影响, 表明化合物4可适用于动物给药。

[0135] 实施例8

[0136] 在胃肠道间质瘤细胞系GIST-T1的小鼠模型中的急毒实验

[0137] 1. 从上海斯莱克实验动物有限责任公司购买饲养4-6周龄的Ba1 b/c雌性小鼠, 饲养于SPF级实验室中, 饮水及垫料均经高压消毒无菌处理, 有关小鼠的所有操作均在无菌条件下进行; 选择10只健康的小鼠, 按体重均衡随机分为5组。

[0138] 2. 给药具体信息

[0139] 给药途径: 口服灌胃给药

[0140] 给药次数: 1次

[0141] 观察期限: 7天。

[0142] 3. 观察指标

[0143] 3.1. 体重

[0144] 称重频率: 分组时、给药当天 (D0) 至给药后第七天 (D7)。以D0天的小鼠体重为基准 (起始值为100%), 绘制相对体重随时间变化的曲线。

[0145] 3.2. 临床症状观察

[0146] 给药后4小时内严密观察, 以后每天观察2次。总共观察7天。观察并记录每只动物出现的异常症状或现象。

[0147] 3.3. 死亡数

[0148] 记录观察期内各剂量组动物死亡的数量。

[0149] 4. 结果分析

[0150] 根据动物死亡情况、临床症状及体重进行综合判断。

[0151] 实验结果如表3所示, 在化合物4的用药剂量为1000mg/kg时, 小鼠的体重没有明显影响, 没有老鼠死亡; 化合物4的用药量剂量为2000mg/kg时, 小鼠的体重略有下降, 没有老鼠死亡。7天后解剖小鼠发现, 小鼠各脏器没有明显异常。这证明本发明的化合物4具有较小的毒副作用; 小鼠对化合物4的最大耐受剂量是2000mg/kg。

[0152] 同样的实验中, 在对比化合物A的用药量剂量为1000mg/kg时, 小鼠在40min左右开始安静、趴卧; 第一天死亡1只; 对比化合物A的用药量剂量为2000mg/kg时: 给药后, 小鼠步态不稳; 第一天2只全部死亡; 这说明与化合物A相比, 本发明的化合物4毒副作用较小。

[0153] 表3. 对小鼠单次灌胃化合物4的急性毒性试验动物死亡信息

组别	供试品	剂量 (mg/kg)	浓度 (mg/ml)	给药容积 (ml/kg)	死亡数 (死亡数/每组动物数)
1 (阴性对照组)	灭菌注射用水	0	0	10	♀: 0/2;
[0154] 2 (2000mg/kg剂量组)	化合物4 溶液	2000	200	10	♀: 0/2;
3 (1000mg/kg剂量组)	化合物4 溶液	1000	100	10	♀: 0/2;
4 (500mg/kg剂量组)	化合物4 溶液	500	50	10	♀: 0/2;
5 (250mg/kg剂量组)	化合物4 溶液	250	25	10	♀: 0/2;

[0155] 续表3. 对小鼠单次灌胃化合物A的急性毒性试验动物死亡信息

组别	供试品	剂量 (mg/kg)	浓度 (mg/ml)	给药容积 (ml/kg)	死亡数 (死亡数/每组动物数)
1 (阴性对照组)	灭菌注射用水	0	0	10	♀: 0/2
[0156] 2 (2000mg/kg剂量组)	化合物A 溶液	2000	200	10	♀: 2/2
3 (1000mg/kg剂量组)	化合物A 溶液	1000	100	10	♀: 1/2
4 (500mg/kg剂量组)	化合物A 溶液	500	50	10	♀: 0/2
5 (250mg/kg剂量组)	化合物A 溶液	250	25	10	♀: 0/2

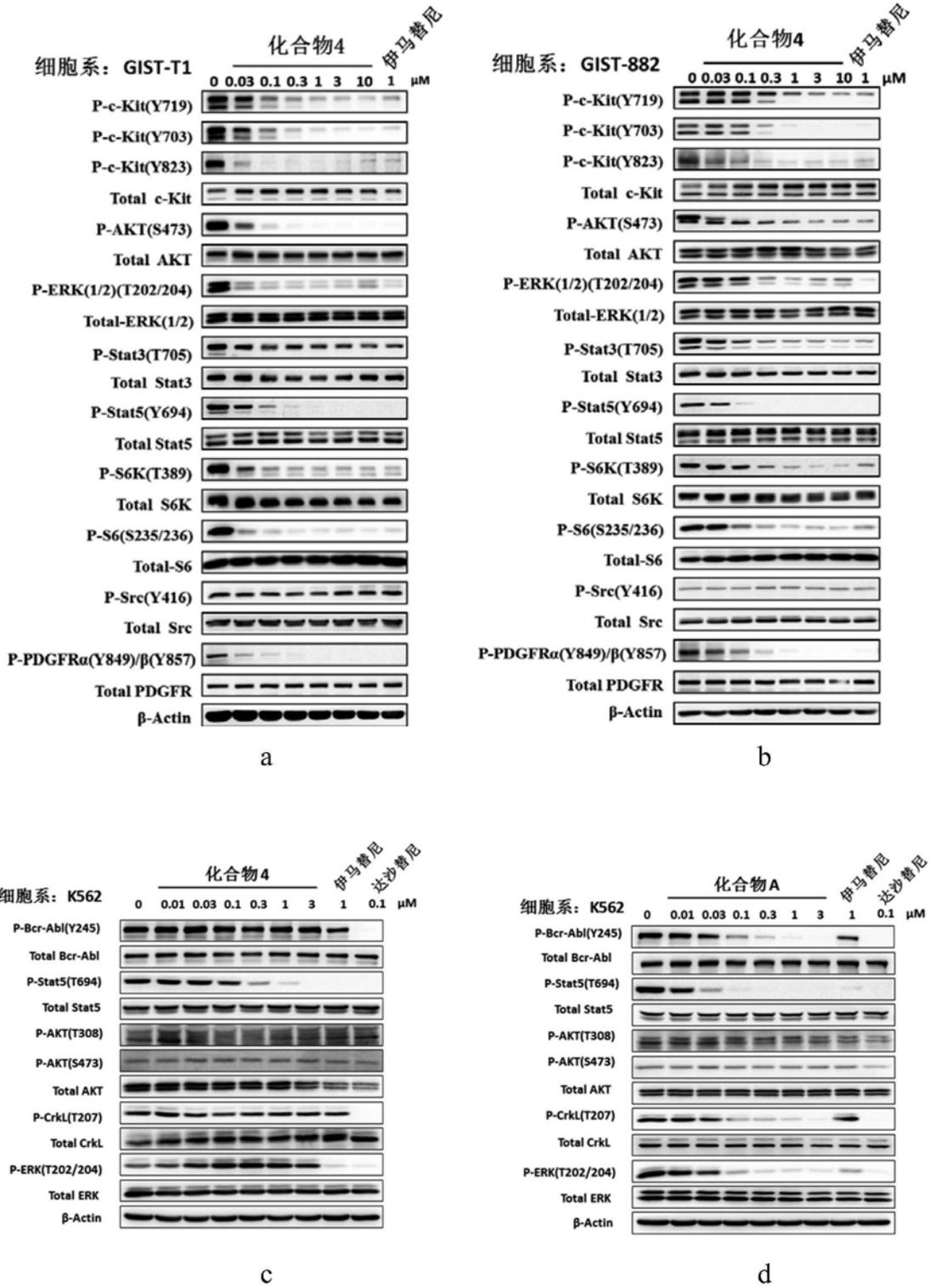
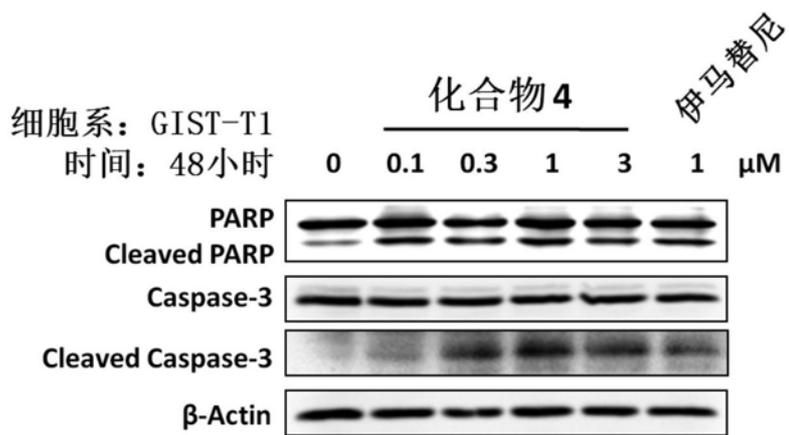
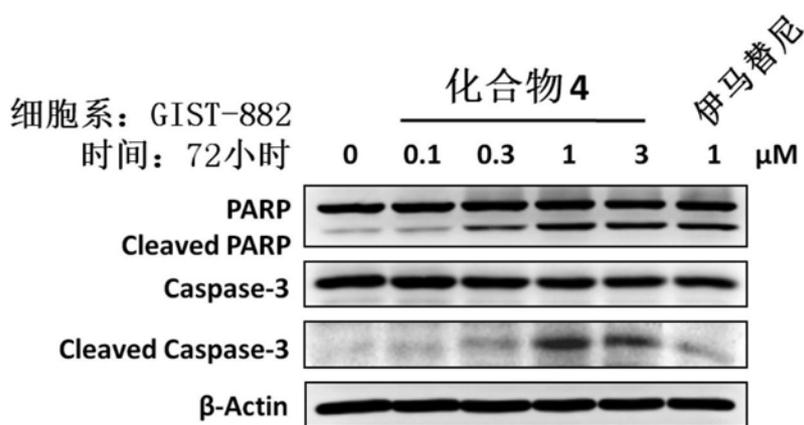


图1



a



b

图2

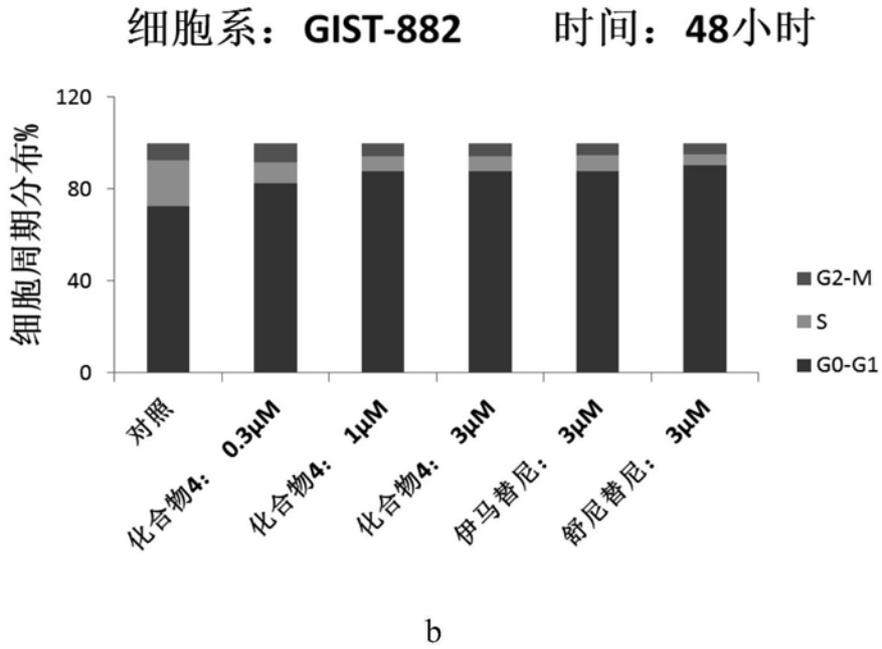
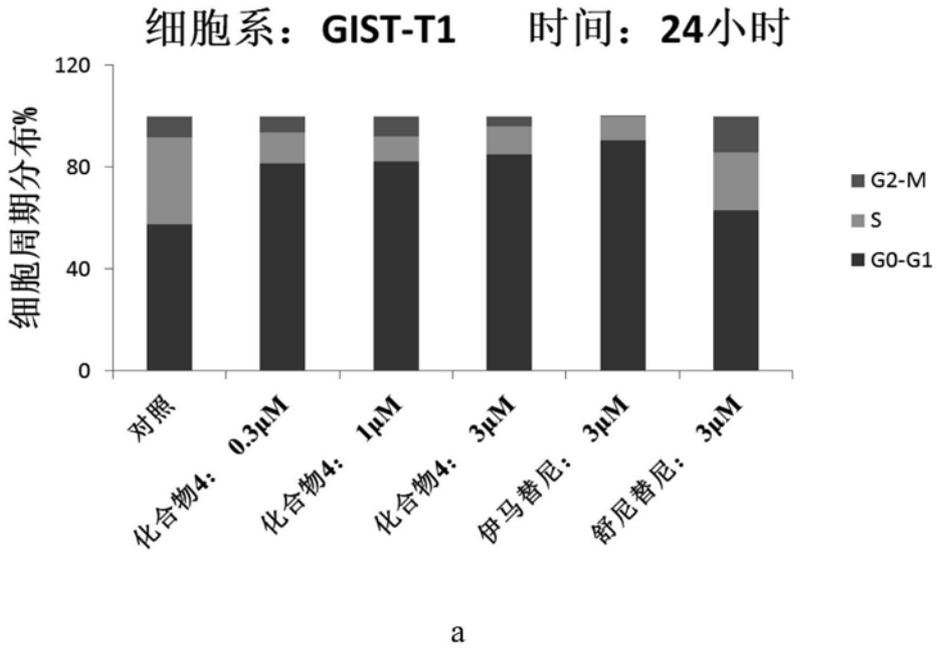


图3

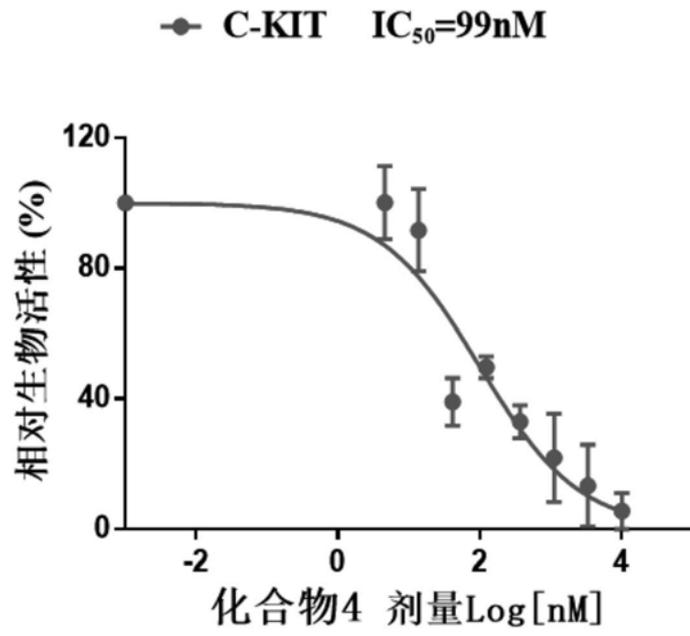
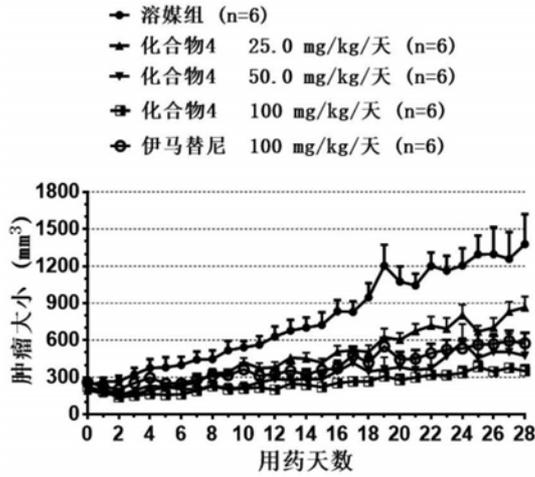
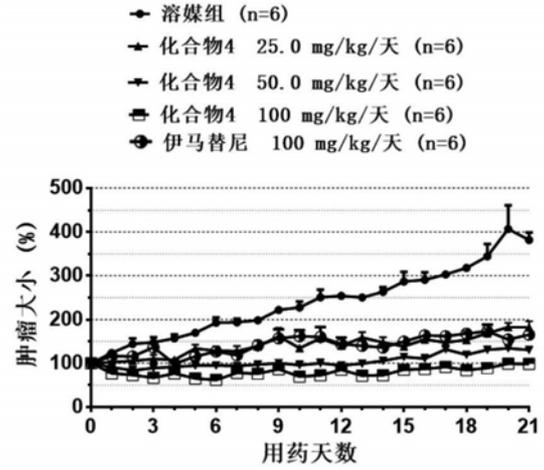


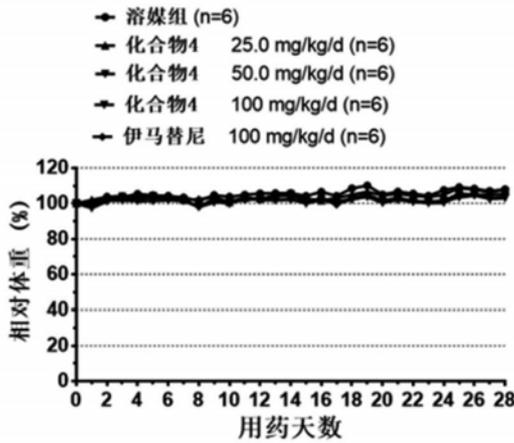
图4



a. GIST-T1 肿瘤动物模型的药效结果

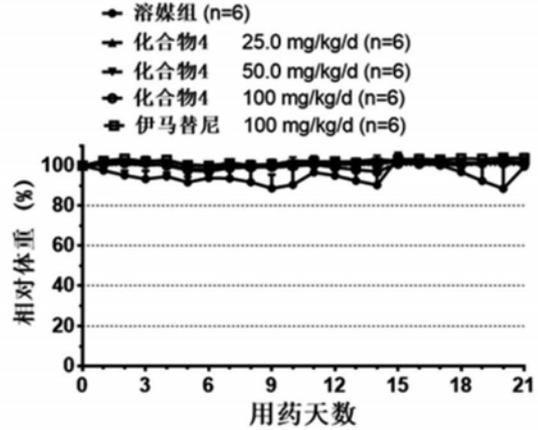


b. GIST-882 肿瘤动物模型的药效结果



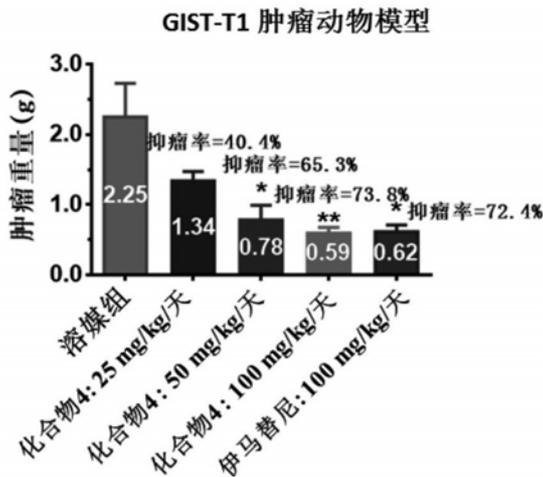
GIST-T1 肿瘤动物模型

c

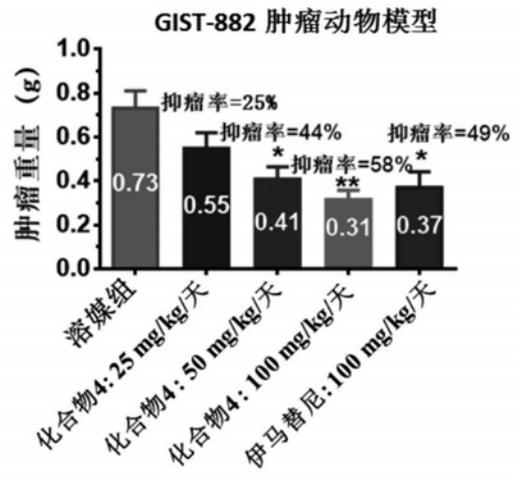


GIST-882 肿瘤动物模型

d



e



f

图5