



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110950848 B

(45) 授权公告日 2024.03.26

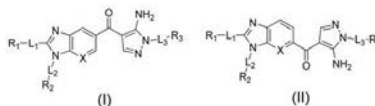
|   |   |
|---|---|
| (21) 申请号 201811130241.2                             | CN 103755595 A, 2014.04.30  |
| (22) 申请日 2018.09.27                                 | CN 104080783 A, 2014.10.01  |
| (65) 同一申请的已公布的文献号<br>申请公布号 CN 110950848 A           | CN 104592205 A, 2015.05.06  |
| (43) 申请公布日 2020.04.03                               | CN 105555785 A, 2016.05.04  |
| (73) 专利权人 徐诺药业<br>地址 美国特拉华州                         | CN 106432246 A, 2017.02.22  |
| (72) 发明人 请求不公布姓名                                    | CN 108349962 A, 2018.07.31  |
| (74) 专利代理机构 北京三聚阳光知识产权代理<br>有限公司 11250<br>专利代理师 李红团 | CN 1092768 A, 1994.09.28  |
| (51) Int. Cl.                                       | CN 1487927 A, 2004.04.07  |
| C07D 403/06 (2006.01)                               | CN 1652780 A, 2005.08.10  |
| C07D 405/14 (2006.01)                               | CN 1832928 A, 2006.09.13  |
| C07D 401/14 (2006.01)                               | CN 1860103 A, 2006.11.08  |
| C07D 403/14 (2006.01)                               | CN 1942464 A, 2007.04.04  |
| A61K 31/4184 (2006.01)                              | JP 2012180344 A, 2012.09.20   |
| A61K 31/454 (2006.01)                               | KR 20160035878 A, 2016.04.01  |
| A61K 31/4439 (2006.01)                              | TW 200530195 A, 2005.09.16  |
| A61K 31/5377 (2006.01)                              | TW 200745047 A, 2007.12.16  |
| A61K 31/506 (2006.01)                               | US 6541423 B1, 2003.04.01   |
| A61P 35/00 (2006.01)                                | WO 2002048140 A1, 2002.06.20  |
| A61P 9/00 (2006.01)                                 | WO 2018059533 A1, 2018.04.05  |
| (56) 对比文件   | Qinghui Wang et al..Structural<br>Modification of the 3,4,5-<br>Trimethoxyphenyl Moiety in the Tubulin<br>Inhibitor VERU-111 Leads to Improved<br>Antiproliferative Activities.《J. Med.<br>Chem.》.2018,第61卷第7877-7891页. |
| CN 102574836 A, 2012.07.11                          | 审查员 周俊廷   |

权利要求书1页 说明书34页

(54) 发明名称  
新型氨基吡唑类衍生物的合成与应用

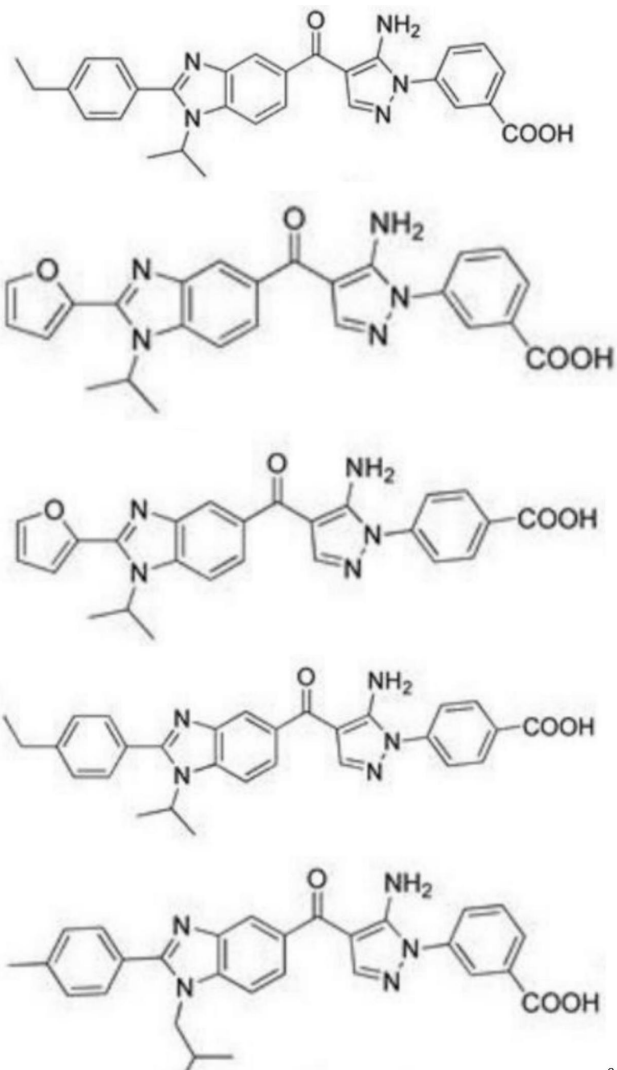
(57) 摘要

本发明公开新型激酶抑制剂氨基吡唑衍生物及其制备方法和医药应用。更具体地说,本发明涉及含苯并咪唑的氨基吡唑衍生物及其制备方法;这些化合物可作为治疗增生性病症、及其它与各种激酶表达异常有关的疾病的药物。其结构如通式(I)或式(II)所示,其中,R<sup>1</sup>,R<sup>2</sup>,R<sup>3</sup>,L<sup>1</sup>,L<sup>2</sup>,L<sup>3</sup>和X的定义见说明书。



CN 110950848 B

1. 化合物,其特征在于,所述化合物的结构式为选自以下结构式之一:



2. 治疗癌症的药学组合物,其特征在于,所述药学组合物含有根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,以及载体。

3. 根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备治疗肺癌、胃癌、乳腺癌的药物中的用途。

## 新型氨基吡唑类衍生物的合成与应用

### 发明领域

[0001] 本发明涉及新型氨基吡唑类衍生物及其制备方法和应用。具体地,涉及一种具有抑制激酶高表达的野生肿瘤株或者相应激酶突变的肿瘤细胞株生长的新型氨基吡唑类衍生物的制备方法。此外,本发明涉及含有这些化合物的药物和这些化合物在制备药物中的应用。

### [0002] 发明背景

[0003] 肿瘤是威胁人类健康的重大疾病之一。肿瘤的治疗仍然是以手术、放疗和化疗为主。随着细胞生物学和肿瘤药理学的发展,肿瘤的化疗也取得了长足的发展,并且在肿瘤的治疗中,起到了重要的作用。肿瘤的小分子靶向治疗以及与其他方法联合治疗,正发挥越来越重要的作用。

[0004] 在众多的靶向治疗药物中,作用于RAF/MEK/ERK信号级联受到广泛关注。该信号通道与人类多种癌症的发生发展及形成的过程中起重要作用(非专利文献1)。研究显示,对RAF的激活,主要包括通过N末端的调控区域来解除来实现的。这种作用模式适用于所有的三种Raf蛋白(A-RAF,B-RAF和C-RAF)。但是对于A-RAF和C-RAF来说还需要一些其他的步骤来达到最大程度的激活,如激活氨基酸残基的磷酸化和负调控氨基酸残基的去磷酸化。因此,B-RAF是该家族中最容易被RAS激活的蛋白。因此,B-RAF激酶的活性要比C-RAF和A-RAF高得多。更为重要的是,B-RAF突变发生率较高。例如,皮肤恶性黑色素瘤中的B-RAF突变的发生率为30~60%(非专利文献2),在甲状腺癌中的发生率为30~50%,在结肠直肠癌中的发生率为5~20%,在卵巢癌中的发生率也达到30%左右(非专利文献3)。目前已经发现B-RAF的突变45多种。突变的B-RAF蛋白在NIH3T3细胞和黑色素瘤细胞(非专利文献4)中被转变,且对于黑色素瘤的存活和转变是必不可少的(非专利文献5)。因此,处于Raf/MEK/ERK的串联信号转导核心的B-RAF在肿瘤的存活中起着至关重要的作用,但是其突变又增加了相关药物开发难度。

[0005] B-RAF激酶抑制剂作为抗肿瘤化合物,通过抑制细胞增生和肿瘤血管生成,已开发出了包括Sorafenib在内的各种药物,临床上用于治疗小细胞肺癌、胰腺癌以及乳腺癌等。但是上述靶向疗法的应用并不理想,会出现诸如耐药性以及一般人群缺乏肿瘤应答等问题。因此,本领域亟需开发新的抑制剂来克服肿瘤治疗中的诸多问题。非专利文献6-8。

[0006] 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)在B-RAF抑制剂的耐药过程中也发挥作用。专利文献1报道了化合物Losmapimod是一个选择性的口服p38MAPK抑制剂剂。一般预期,MAPK抑制剂剂可以提高B-RAF抑制剂的疗效与应用范围。

[0007] 目前,研究表明激酶特别是酪氨酸激酶处于异常激活或突变状态会导致特异性的生物信号紊乱、细胞增殖加速,继而引起增生性疾病的发生。除了B-RAF和MAPK外,相关激酶包括EGFR、TRK、RET、VEGFR、PDGFR、FGFR、FLT3、c-Kit、CDK等多种酪氨酸激酶已作为重要的治疗靶标被应用于抗肿瘤药物的研究开发,并取得了重要的成果(非专利文献9),尤其是前三种尤为重要。通过对经典的EGFR抑制剂进行结构改装,人们寻找到了对EGFR<sup>WT</sup>和EGFR<sup>T790M</sup>同时抑制强大抑制活性的化合物rociletinib和osimertinib,使得新一代

EGFR抑制剂无论是疗效上还是应用上,都要比原来的相关激酶抑制剂疗效更好,适应性更广(非专利文献10)。

[0008] [NTRK/TRK (Tropomyosin receptor kinase) 为神经营养因子酪氨酸激酶受体。Trk家族主要包括3个成员,NTRK1/TrkA,NTRK2/TrkB和NTRK3/TrkC。完整的Trk激酶包括胞外区、跨膜区和胞内区三个部分。Trk激酶的胞外区与相应的配体结合之后,能够引起激酶构型变化,形成二聚体。Trk激酶的胞内区发生自体磷酸化从而激活自身的激酶活性,进而进一步激活下游的信号转导通路(如MAPK,AKT,PKC等),产生相应的生物学功能;其中NGF(神经生长因子)结合TrkA,BDNF(衍生的神经营养因子)结合TrkB,以及NT3(神经营养因子3)结合TrkC。

[0009] 大量的研究表明Trk信号转导通路的活化与肿瘤的发生发展也有很强的相关性,在神经细胞瘤、前列腺癌、乳腺癌等中都发现了活化的Trk信号蛋白。近几年来多种Trk融合蛋白的发现,更显示了其促进肿瘤发生的生物学功能(非专利文献11)。

[0010] 早期的TPM3-TrkA融合蛋白是在结肠癌细胞中发现的。在检测的临床病人中约有1.5%的发生率。在扩大范围后,研究发现不同类型的临床肿瘤病人样本如肺癌,头颈癌、乳腺癌、甲状腺癌、神经胶质瘤等中发现了不同类型与不同程度的Trk融合蛋白,如CD74-NTRK1,MPRIIP-NTRK1,QKI-NTRK2,ETV6-NTRK3,BTB1-NTRK3等。这些不同的NTRK融合蛋白在不需配体结合的情况下,自身处于高度活化的激酶活性状态,因而能够持续性的磷酸化下游的信号途径,诱导细胞增殖,促进肿瘤的发生、发展。因此,近几年来,Trk融合蛋白已经成为一个有效的抗癌靶点和研究热点,专利文献2-7公开了具有不同母核的Trk激酶抑制剂。部分Trk激酶抑制剂已经处于临床的各种不同阶段(非专利文献12)。

[0011] 转染重排(RET)是一种神经生长因子受体酪氨酸激酶;异常RET激酶活性与众多肿瘤有关。因此,RET也是受到高度重视的一个抗肿瘤靶点。

[0012] RET是一种神经元生长因子受体酪氨酸激酶。RET激酶敲除的老鼠缺乏肠内神经元并具有其他神经系统异常,这说明功能性RET激酶蛋白产物是发展所需要的。先天性巨结肠症的病人的种群研究表明其与家族性和偶发性的功能RET突变缺失有较高的。异常RET激酶活性与多样内分泌腺瘤(MEN 2A和2B)、家族性髓样甲状腺瘤(FMTC),甲状腺乳头状癌(PTC)和先天性巨结肠症(HSCR)(非专利文献13)相关。MEN 2A是一种癌症综合征,由RET细胞外富半胱氨酸区域的突变而导致二硫键形成的二聚,从而致使酪氨酸激酶的活性处于连续激活下(非专利文献14)。具有这种突变的个体可能会形成髓样甲状腺瘤(MTC)、甲状腺增生和嗜铬细胞瘤。MEN 2B和MEN 2A类似,但没有甲状腺增生,也导致嘴唇、舌头和肠道各种粘膜腱鞘囊肿。RET被认为在染色体重排过程中介入了PTC的肿瘤引发。PTC包括了80%的甲状腺瘤(非专利文献15)。

[0013] 这些事实都说明治疗RET持续激活相关的肿瘤的一个理想治疗手段。RET抑制剂的研究受到广泛重视,也取得了较快的发展,各种候选药物在临床试验中(非专利文献16. 专利文献8)。近年来,一方面针对RET野生肿瘤株的,开发出了大量的具有高活性的化合物,另一方面,对RET的各种突变株的抑制剂的开发,也取得了可喜的成绩(非专利文献17和非专利文献18)。

[0014] 如前所述,激酶抑制剂的研究开发取得了较大的成功,为广大患者带来福音。但是,从EGFR、B-RAF、TRK到RET(非专利文献19),几乎所有的激酶靶点,耐药性始终是主要存

在问题。因此,本领域亟需一种激酶多靶点抑制剂,特别是可以抑制RET 及其相关激酶的化合物。

[0015] 现有技术文献

[0016] 专利文献:

[0017] 专利文献1:W02003068747

[0018] 专利文献2:W02010048314

[0019] 专利文献3:W02012116217

[0020] 专利文献4:W02010033941

[0021] 专利文献5:JP2018044010A

[0022] 专利文献6:MX2017007748A

[0023] 专利文献7:US2017057948A1

[0024] 专利文献8:W02014/141187A1

[0025] 非专利文献:

[0026] 非专利文献1:David E Durrantl 等, British Journal of Cancer (2018) 118, 3-8;

[0027] 非专利文献2:Helen Davies等,Nature,2002,417,949~954

[0028] 非专利文献3:Claudia Wellbrock等, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2004, 875-885;

[0029] 非专利文献4:Claudia Wellbrock等,Cancer Res.,2004,64,2338~2342;

[0030] 非专利文献5:Sunil R. Hingorani等,Cancer Res., 2003, 63, 5198~5202;

[0031] 非专利文献6:Jeffrey W. Clark等,Clinical Cancer Res 11(15):5472-5480;

[0032] 非专利文献7:Chunrong Yu等,Oncogene 24(46):6861-6869;

[0033] 非专利文献8:Zhe Zhang等,Cancer Res. 64(19):7099-7109;

[0034] 非专利文献9:Richard A. Ward等,RSC Drug Discovery Series No. 19. Royal Society of Chemistry 2012. AstraZeneca, Macclesfield, UK;

[0035] 非专利文献10:Zhendong Song等,J. Med. Chem. 2016, 59, 6580-6594;

[0036] 非专利文献11:Sharan K Bagal等 *J. Med. Chem.*, Just Accepted Manuscript · DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b00633 · Publication Date (Web): 26 Jun 2018;

[0037] 非专利文献12:LISA JARVIS. Bayer, Loxo to develop TRK inhibitors. C&EN, 20 November 2017, 11;

[0038] 非专利文献13:Maria Grazia Borrello等,Lisa Licitra & Marco A Pierotti (2013). Expert Opinion on Therapeutic Targets, 17:4, 403-419;

[0039] 非专利文献14:Samuel A. Wells等,J Clin Endocrinol Metab 98: 3149 - 3164, 2013;

[0040] 非专利文献15:Viglietto,G.et al.,Oncogene,1995,11:1207;

[0041] 非专利文献16:Lucille Lopez-Delisle等,Oncogene (2018) 37:1417-1429;

[0042] 非专利文献17:Hojong Yoon等,J. Med. Chem. 2016, 59, 358-373;

[0043] 非专利文献18:Minsoo Song. Miniperspective. J. Med. Chem. 2015, 58, 3672-3681;



15元杂芳基C1-C6烷基、3-14元杂环烷基、C1-C6烷氧基C1-C6烷基、氨基C1-C6烷基、C1-C6烷基磺酰基、C1-C6烷基亚磺酰基、氨基磺酰基或酰基,上述基团中的任一基团各自独立地可以被选自取代基组A中的一个或多个取代基取代。

[0057] 在某些实施方案中,在上述通式(I)或(II)中, $L^3$ 表示共价键、C1-C6亚烷基或C6-C12亚芳基, $R^3$ 表示氢原子、羧基、C1-C6烷基、C1-C6烷氧基、C2-C14链烯基、C6-C12芳基、C6-C12芳基C1-C6烷基、C3-C9环烷基、4-15元杂芳基、4-15元杂芳基C1-C6烷基、3-14元杂环烷基、C1-C6烷氧基C1-C6烷基、或氨基C1-C6烷基、C1-C6烷基磺酰基、C1-C6烷基亚磺酰基、氨基磺酰基、或酰基,上述基团中的任一基团各自独立地可以被选自取代基组A中的一个或多个取代基取代。

[0058] 在某些实施方案中,在上述通式(I)或(II)中,X为氮。

[0059] 在某些实施方案中,在上述通式(I)或(II)中,X为碳。

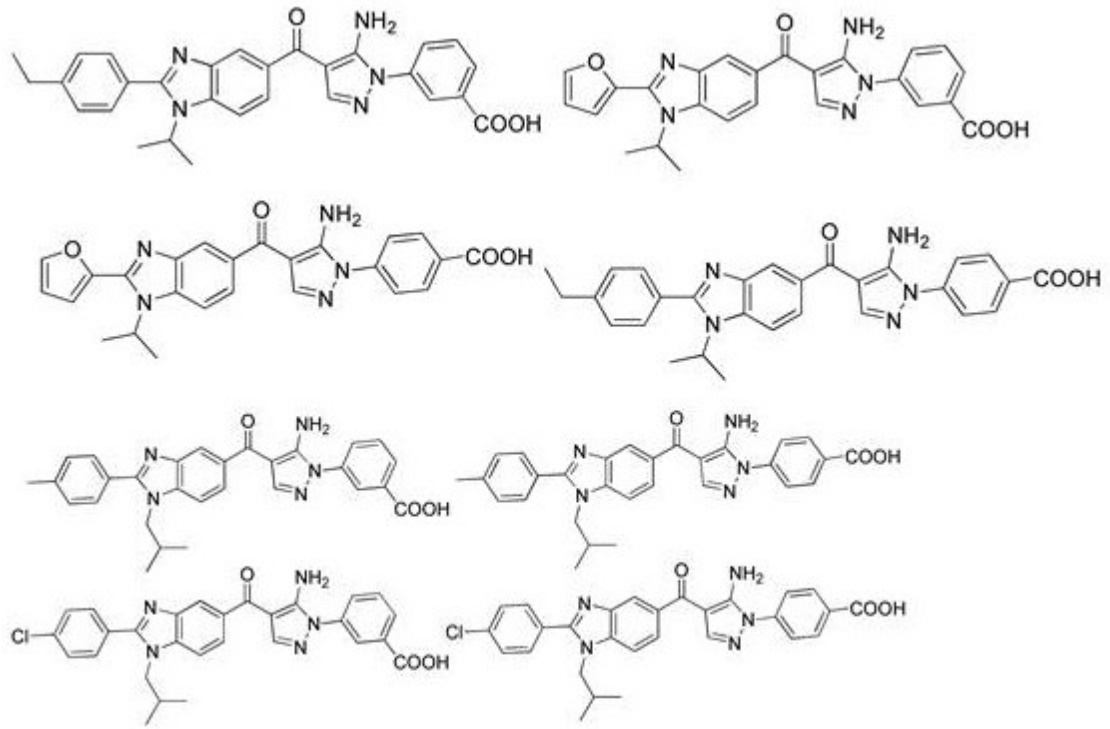
[0060] 在某些实施方案中,在上述通式(I)或(II)中, $R^1-L^1$ -表示氢原子、卤素、氨基、C1-C6烷基、C1-C6烷基氨基、2-二乙基氨基-乙基氨基、3-羟基-丙基氨基、3-甲氧基-丙基氨基、3-异丙氧基-丙基氨基、2,2-二甲基-丙基氨基、3-二甲基氨基-丙基氨基、3-二甲基氨基-2,2-二甲基-丙基氨基、4-二甲基氨基-丁基氨基、嘧啶基、氨基吡啶基、吗啉基、呋喃基、苯基C1-C6烷基、C1-C6烷基苯基、或苯基,上述基团中的任一基团各自独立地可以被选自取代基组A中的一个或多个取代基取代。

[0061] 在某些实施方案中,在上述通式(I)或(II)中, $R^2-L^2$ -表示氢原子、C1-C6烷基、C1-C6环烷基、可被1-4个卤素原子取代的苯基、吗啉基C1-C6烷基、哌啶基C1-C6烷基、四氢吡咯基C1-C6烷基、咪唑基C1-C6烷基、二(C1-C6烷基)氨基C1-C6烷基、苯氧基苯基C1-C6烷基、氨基嘧啶基C1-C6烷基、氧代四氢咪唑C1-C6烷基、氨基C1-C6烷基、C1-C6烷基磺酰基、C1-C6烷基亚磺酰基、氨基磺酰基、或酰基,上述基团中的任一基团各自独立地可以被选自取代基组A中的一个或多个取代基取代。

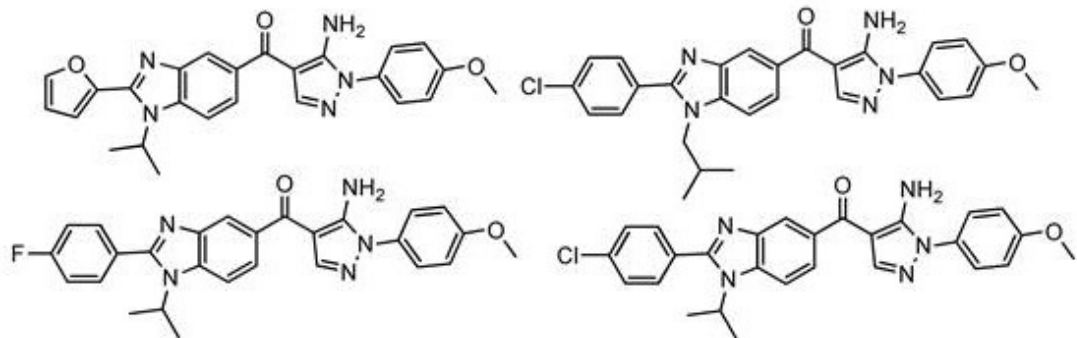
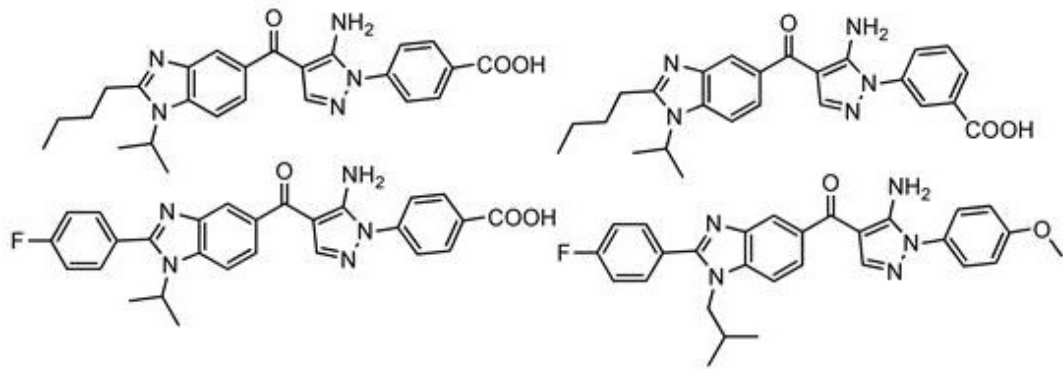
[0062] 在某些实施方案中,在上述通式(I)或(II)中, $R^3-L^3$ -表示氢原子、羧基C6-C12芳基、可被1-4个卤素原子取代的C1-C6烷基、可被1-4个卤素原子取代的苯基C1-C6烷基、C1-C6烷氧基苯基、可被1-4个卤素原子取代的C1-C6烷氧基苯基C1-C6烷基、哌啶基、吡啶基C1-C6烷基、C2-C6链烯基、C1-C6烷基吡啶基C1-C6烷基、吗啉基C1-C6烷基、二(C1-C6烷基)氨基C1-C6烷基、苯并吡咯基C1-C6烷基、四氢吡咯基C1-C6烷基、或C1-C6烷氧基C1-C6烷基,上述基团中的任一基团各自独立地可以被选自取代基组A中的一个或多个取代基取代。

[0063] 在某些实施方案中,本发明的化合物为具有下述结构的化合物:

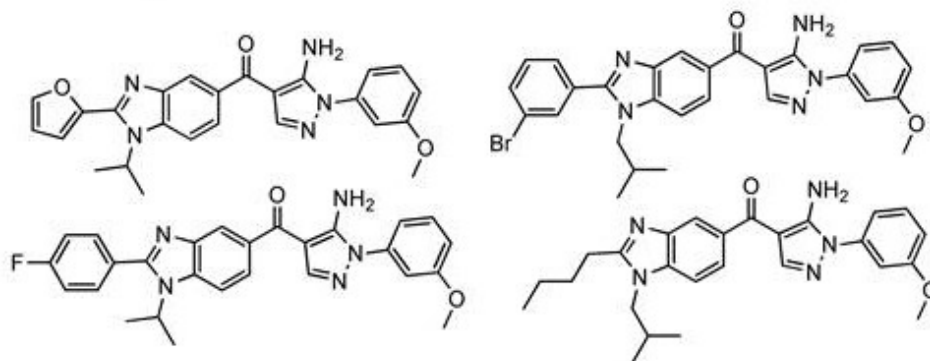
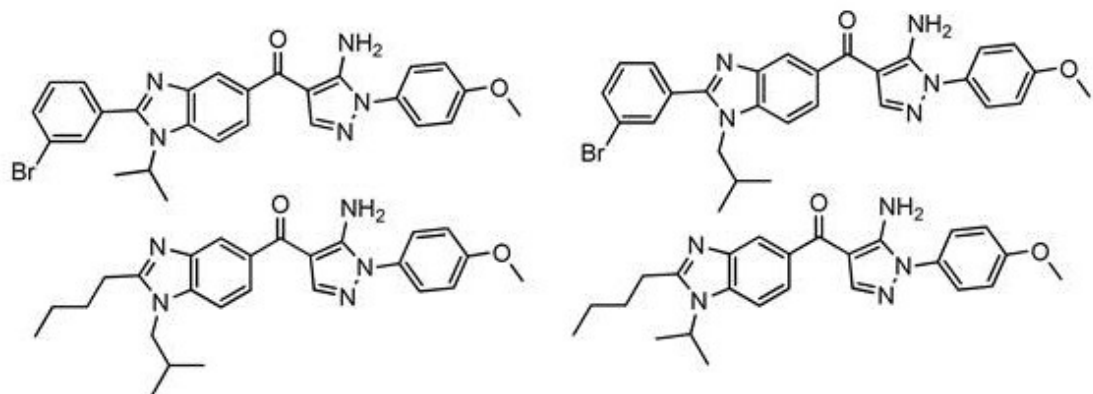
[0064]

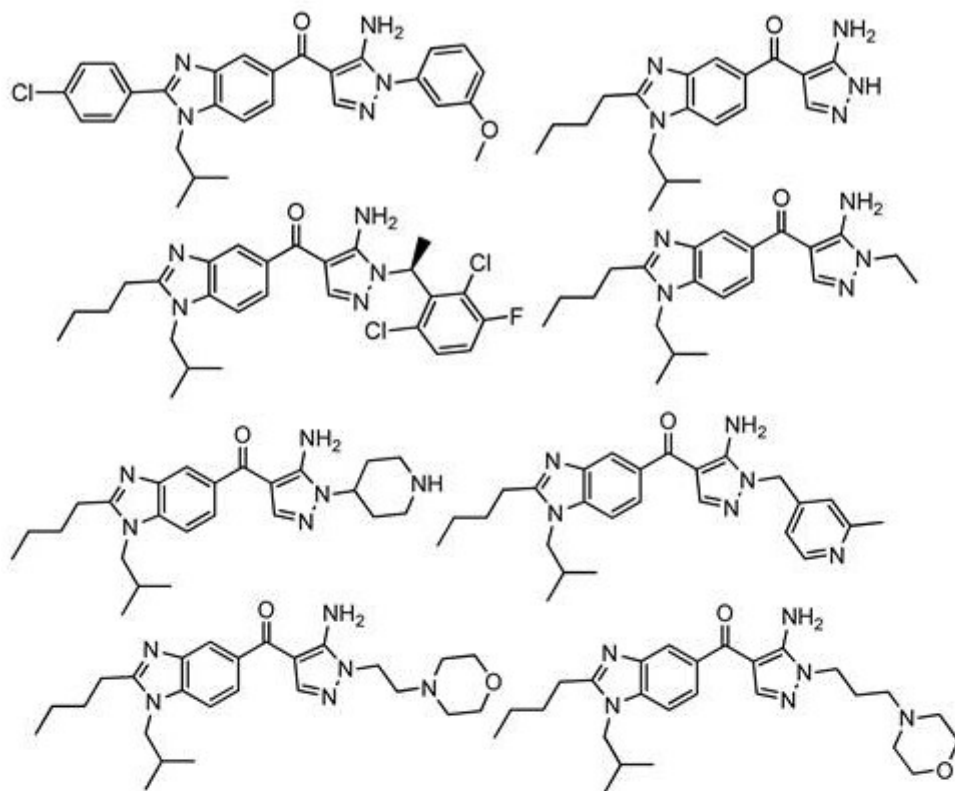




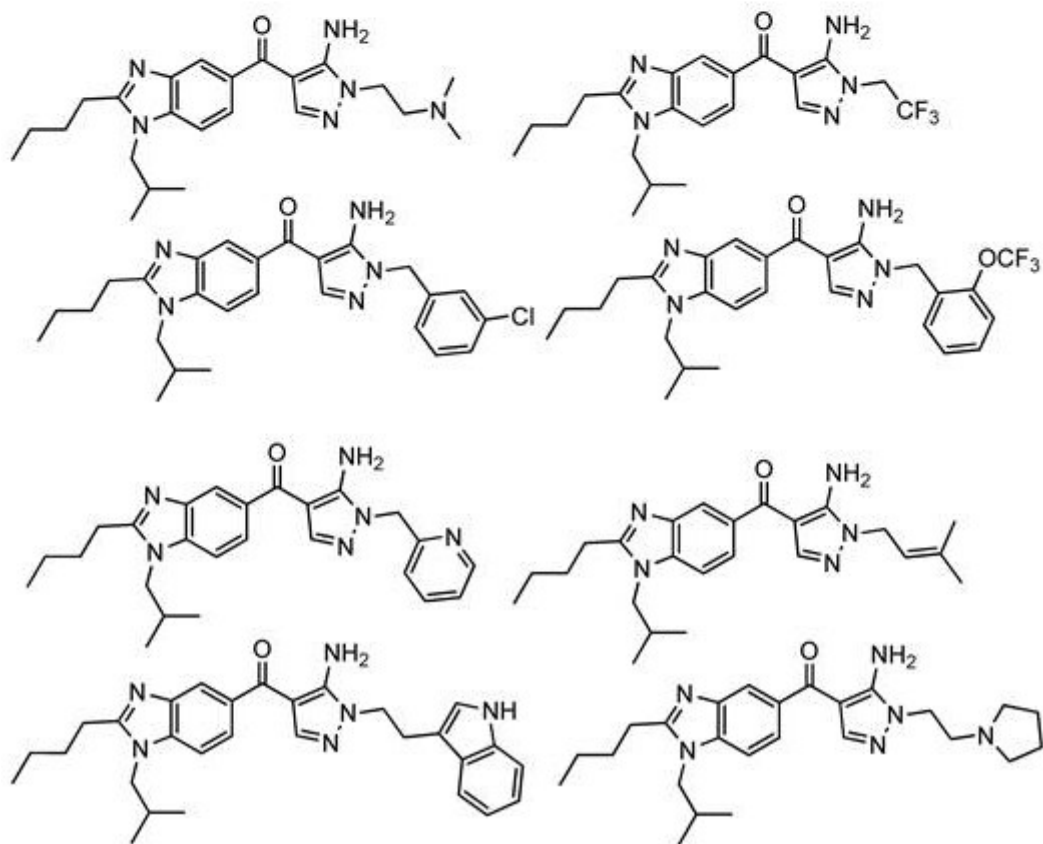


[0065]

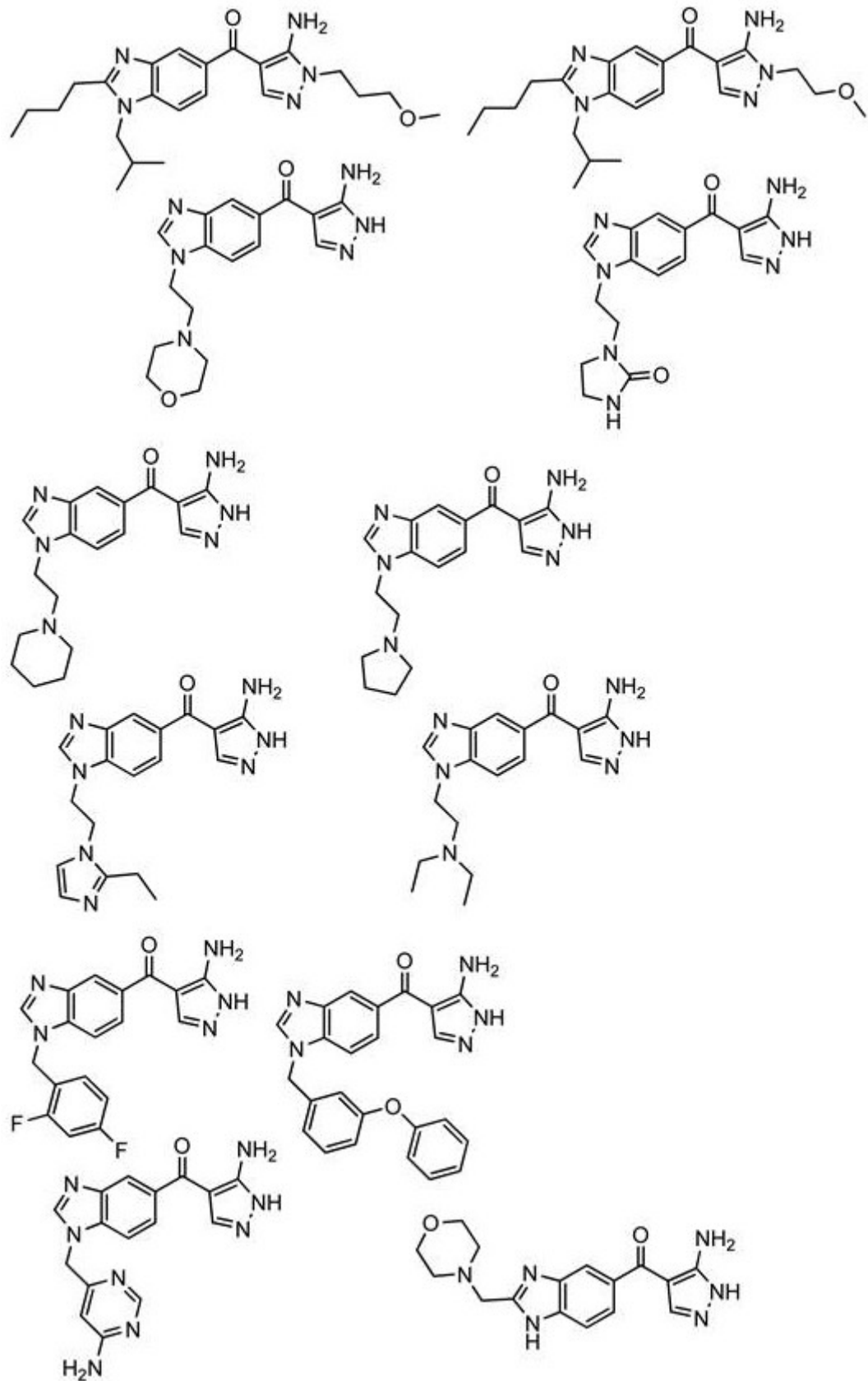


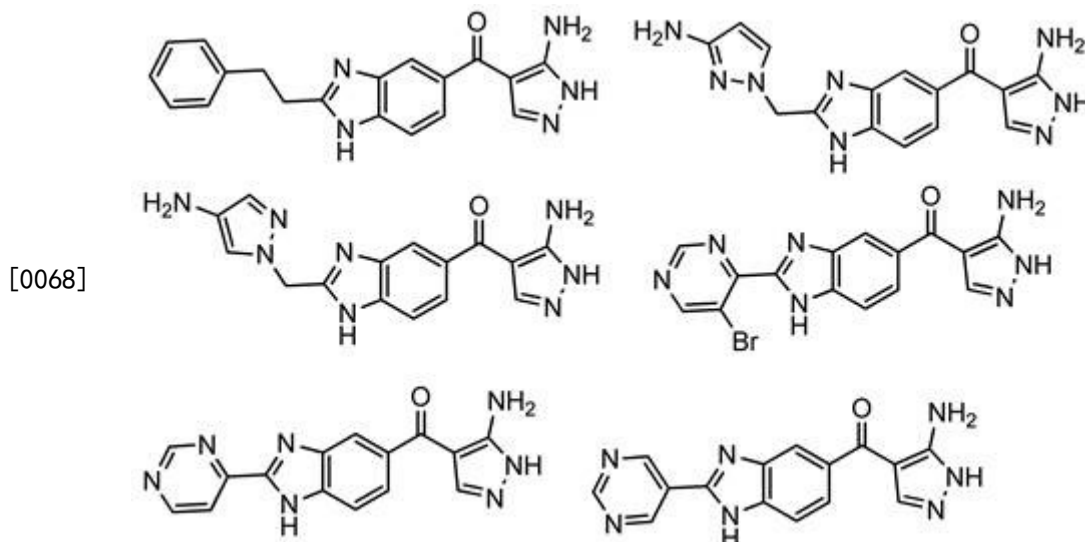


[0066]



[0067]





[0069] 本发明还包括一种药学组合物,其含有上述的通式(I)或通式(II)所示的化合物或其药学上可接受的盐、和载体。

[0070] 本发明还包括上述的通式(I)或通式(II)所示的化合物或其药学上可接受的盐与其它一种或多种药物的联合使用。

[0071] 本发明还包括上述的通式(I)或通式(II)所示的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于治疗由细胞增殖和/或血管新生的破坏所导致、或与该破坏相关联或相伴随的病症的药物中的用途。

[0072] 在某些实施方案中,所述病症是增生性疾病。

[0073] 在某些实施方案中,所述增生性疾病是癌症。

[0074] 本发明还包括上述的通式(I)或通式(II)所示的化合物或其药学上可接受的盐或者如上所述的药物组合物用于抑制激酶的活性的用途。

[0075] 在某些实施方案中,所述抑制激酶的活性是抑制RET、TRK、RAF或者EGFR 的活性。

[0076] 本发明还包括一种用于治疗患者的由细胞增殖和/或血管新生的破坏所导致、或与该破坏相关联或相伴随的病症的方法,所述方法包括给予所述患者治疗有效量的上述的通式(I)或通式(II)所示的化合物或其药学上可接受的盐。

[0077] 本发明还包括一种治疗可通过抑制患者激酶而加以治疗的病症的方法,所述方法包括给予所述患者治疗有效量的上述的通式(I)或通式(II)所示的化合物或其药学上可接受的盐。

[0078] 在某些实施方案中,所述病症选自:增殖性疾病,例如非小细胞肺癌、肝细胞癌、结肠直肠癌、髓样甲状腺癌、滤泡性甲状腺癌、未分化甲状腺癌、乳头状甲状腺癌、脑瘤、腹膜腔癌、实体瘤、其它肺癌、头颈癌、神经胶质瘤、神经母细胞瘤、Von Hippel-Lindau综合征和肾肿瘤、乳腺癌、输卵管癌、卵巢癌、过渡型细胞癌、前列腺癌、食道和食管胃连接处的癌症、胆道癌和腺癌、及带有增加的RET激酶活性的任何恶性肿瘤; 神经变性疾病,包括:亨廷顿病、聚谷氨酰胺病、帕金森病、阿尔茨海默病、癫痫发作、纹状体黑质变性、进行性核上性麻痹、扭转张力不全、痉挛性斜颈和运动障碍、家族性震颤、抽动秽语综合症、弥漫性路易体疾病、皮克病、颅内出血、原发性侧索硬化症、脊髓性肌肉萎缩症、肌萎缩侧索硬化症、肥大性间质性多神经病、视网膜色素变性、遗传性视神经萎缩、遗传性痉挛性截瘫、进行性共济失

调症和Shy-Drager综合征;代谢性疾病,包括:2-型糖尿病;眼部退化疾病,包括:青光眼、老年黄斑变性、虹膜红变性青光眼;涉及血管新生的疾病,包括:癌症、牛皮癣;心理病症,包括:双相性精神障碍、精神分裂症、躁狂症、抑郁和痴呆;心血管疾病包括:心力衰竭、再狭窄和动脉硬化;纤维化疾病,包括:肝纤维化、囊性纤维病和血管纤维痛;感染性疾病,包括:真菌感染。例如:白色念珠菌,细菌感染、病毒性感染。例如:单纯疱疹,原虫感染,例如:疟疾、利什曼原虫感染、布氏锥虫感染、弓形体病和球虫病,以及造血性病症,包括:海洋性贫血、贫血和镰状细胞性贫血。

[0079] 在某些实施方案中,在上述的方法中,所述患者正在接受手术或放射性治疗,所述化合物与所述手术或放射性治疗伴随地、或在手术或放射性治疗之前、或在手术或放射性治疗之后施用于所述患者。

### 具体实施方式

[0080] 以下,对于本发明进行详细说明。

[0081] 对于本发明的通式(I)和通式(II)所示的化合物的各基团,如下述所定义。各基团的记载的顺序表示在通式(I)和通式(II)中键合的顺序。例如, $R^1$ 的“5-12元芳基C1-C6烷基”表示右端的“C1~C6烷基”键合在 $L^1$ 上、“5-12元芳基”与前述“C1~C6烷基”键合的基团。另外,碳原子右边的数字表示碳原子的数目,例如如果是“C1~C6”,则表示“碳原子数为1~6”的物质。

[0082] 本说明书中所使用的部分术语定义如下。

[0083] “卤素”是指氟、氯、溴和碘。

[0084] “=O”是指氧代基。

[0085] “-CF<sub>3</sub>”是指三氟甲基。

[0086] “烷基”当作一基团或一基团的部分时是指直链或支链的脂肪烃基团。优选为C1-C14烷基,更优选为C1-C10烷基;最优选为C1-C6烷基,除非另有指明。C1-C6烷基的实例包括,但不限于:甲基、乙基、正丙基、2-丙基、正丁基、异丁基、特丁基、己基等。

[0087] “烷基氨基”包括单烷基氨基和二烷基氨基两种,除非另有指明。“单烷基氨基”是指:(烷基-NH)-的基团;“二烷基氨基”是指:((烷基)<sub>2</sub>N)-的基团。其中的烷基见本文有关定义。该烷基氨基优选为C1-C6烷基氨基。应予说明,“C1-C6烷基氨基”是指被“C1-C6烷基”取代了的氨基,其实例包括,但不限于:甲氨基、乙氨基、异丙氨基、N,N-(二乙基)氨基等。

[0088] “氨基烷基”是指:(氨基-烷基)-的基团。其中的“烷基”部分见本文有关定义。该氨基烷基优选为氨基C1-C6烷基。应予说明,“氨基C1-C6烷基”是指被“氨基”取代了的C1-C6烷基,其实例包括但不限于:氨基乙基、1-氨基丙基、2-氨基丙基等

[0089] “芳基氨基”包括单-芳基氨基和二-芳基氨基两种,除非另有说明。单-芳基氨基是指:(芳基-)NH-的基团;二-芳基氨基是指(芳基)<sub>2</sub>N-的基团。其中的“芳基”部分的定义见本文相关部分。

[0090] “酰基”包括(烷基-CO)-的基团和(芳基-CO)-的基团,除非另有说明。其中的“烷基”或“芳基”部分均见本文中的有关定义。酰基的实例包括,但不限于:乙酰基、丙酰基、异丁酰基、苯甲酰基等。

[0091] “酰胺基”包括(烷基-CONH)-的基团和(芳基-CONH)-的基团,除非另有说明。其中的“烷基”或“芳基”部分均见本文中的有关定义。酰胺基的实例包括,但不限于:乙酰胺基、丙酰胺基、丁酰胺基、异丁酰胺基、苯甲酰胺基等。

[0092] “烯基”作为一基团或一基团的一部分时是指至少含有一个碳-碳双键的脂肪烃基团,可为直链或支链。优选为C2-C14烯基,更优选为C2-C12烯基,最优选为C2-C6烯基。该基团可在其主链中含有多个双键且其构象可各自为E或Z。烯基基团的例子包括,但不限于:乙烯基、丙烯基等。另外,本发明的“链烯基”是指上述定义的“烯基”为链状时的基团。

[0093] “炔基”作为一基团或一基团的一部分时是指至少含有一个碳-碳三键的脂肪烃基团,可为直链或支链。优选为C2-C14炔基,更优选为C2-C12炔基,最优选为C2-C6炔基。所述炔基的例子包括,但不限于:乙炔基、丙-1-炔-1-基、丙-2-炔-1-基、丁-1-炔-1-基、丁-3-炔-1-基、1-甲基丙-2-炔-1-基、戊-1-炔-1-基、戊-4-炔-1-基、己-1-炔-1-基、己-5-炔-1-基等。

[0094] “烷氧基”是指(烷基-O)-的基团。其中的“烷基”部分见本文有关定义。所述烷氧基优选为C1-C8烷氧基,更优选为C1-C6烷氧基。所述烷氧基的实例包括,但不限于:甲氧基、乙氧基、正丙氧基、1-甲基乙氧基、正丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、正戊氧基、异戊氧基、新戊氧基、1-甲基丁氧基、1-乙基丙氧基、正己氧基、异己氧基、3-甲基戊氧基、2-甲基戊氧基、1-甲基戊氧基、3,3-二甲基丁氧基、2,2-二甲基丁氧基、1,1-二甲基丁氧基、1,2-二甲基丁氧基、1,3-二甲基丁氧基、2,3-二甲基丁氧基、1-乙基丁氧基、2-乙基丁氧基等。另外,“烷氧基羰基”表示上述定义的“烷氧基”与羰基键合的基团,例如可举出甲氧基羰基、乙氧基羰基等。

[0095] “烯氧基”是指(烯基-O)-的基团。其中的“烯基”部分见本文有关定义。优选为C2-C6烯氧基。

[0096] “炔氧基”是指(炔基-O)-的基团。其中的“炔基”部分见本文有关定义。优选为C2-C6炔氧基。

[0097] “烷基亚磺酰基”是指(烷基-S(O))-的基团。其中的“烷基”部分见本文有关定义。优选为C1-C6烷基亚磺酰基。烷基亚磺酰基的实例包括但不限于:甲基亚磺酰基、乙基亚磺酰基等。

[0098] “烷基磺酰基”是指(烷基-S(O)<sub>2</sub>-O)-的基团。其中的“烷基”部分见本文有关定义。优选为C1-C6烷基磺酰基。应予说明,“C1-C6烷基磺酰基”是指被“C1-C6烷基”取代了的磺酰基,可以列举甲基磺酰基、乙基磺酰基、正丙基磺酰基、异丙基磺酰基、正丁基磺酰基、异丁基磺酰基、仲丁基磺酰基、叔丁基磺酰基、正戊基磺酰基、异戊基磺酰基、新戊基磺酰基、叔戊基磺酰基等的基团。

[0099] “烷基氨基羰基”是指烷基氨基-羰基基团。其中的“烷基氨基”部分见本文有关定义。

[0100] “环烷基”是指饱和或部分饱和的单环、稠环或螺环的碳环。优选为以3-9个碳原子组成的环。实例包括但不限于:环丙基、环丁基、环戊基、环己基等。

[0101] “环烷基烷基”是指环烷基-烷基基团。其中,环烷基和烷基部分见本文有关定义。单环烷基烷基包括但不限于:环丙基甲基,环戊基甲基,环己基甲基,环庚基甲基等。

[0102] “杂环烷基”是指上文定义的“环烷基”中的一个或多个(优选1、2或3个)碳原子被

氧、氮、磷、硼、硒、硅或硫原子(优选氧、硫或氮)代替而形成的基团。优选含有1-3个杂原子。优选的环为3-14元环(即,3-14元杂环烷基),更优选的环为4-7元环(即,4-7元杂环烷基)。杂环烷基包括但不限于:吡咯烷基、二氢吡咯基、四氢吡咯基、二氢吡唑基、哌啶基、吗啉基、四氢呋喃基、四氢硫代呋喃基、四氢吡喃基、氧杂环丙基、氮杂环丙基或2-吡唑啉基,以及内酰胺、内酯、环状亚胺和环状酸酐等。杂环烷基可被一个或多个取代基取代。

[0103] “杂环烯基”是指上述定义的“杂环烷基”中至少含有一个双键的基团。

[0104] “杂环烷基烷基”是指:(杂环烷基-烷基)-的基团。其中,杂环烷基和烷基部分见本文有关定义。杂环烷基烷基基团包括但不限于:(2-四氢呋喃基)甲基、(2-四氢硫代呋喃基)甲基等。

[0105] “杂烷基”是指直链或支链的烷基中的一个或多个(优选1、2或3个)碳原子被氧、氮、磷、硼、硒、硅或硫原子(优选氧、硫或氮)代替而形成的基团。优选原子数为2-14的杂烷基,更优选原子数为2-8,特别优选原子数为2-6。杂烷基包括但不限于:醚类、硫醚类、烷基酯类,烷基仲胺类、烷基叔胺类、烷基亚磺酸类、腈、异腈、氰酸酯、硫氰酸酯、异氰酸酯、异硫氰酸酯和烷基腈等的基团,具体可以列举例如:甲氧基、三氟甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、叔丁氧基、甲氧基甲基、乙氧基甲基、甲氧基乙基、甲基氨基、乙基氨基、二甲基氨基、二乙基氨基、异丙基乙基氨基、甲基-氨基甲基、乙基氨基甲基、二-异丙基氨基乙基、烯醇醚、二甲基氨基甲基、二甲基氨基乙基、乙酰基、丙酰基、丁酰氧基、乙酰氧基、甲氧基羰基、乙氧基-羰基、N-乙基-N-甲基氨基甲酰基或N-甲基氨基甲酰基。

[0106] “芳基”作为一基团或一基团的部分是指:(1)芳香性的单环或稠环的芳香族烃环基;优选为6-12元芳基(也表述为C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>芳基),更优选6-10元芳基(也表述为C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>芳基),其实例包括但不限于:苯基、萘基、蒽基和菲基;或(2)可以连接部分饱和的碳环、例如:苯基和C<sub>5</sub>-7环烷基或C<sub>5</sub>-7环烯基基团系互相稠合而形成一环状结构。实例包括但不限于:四氢萘基,茛基或氢茛基等。芳基基团可被一个或多个取代基取代。

[0107] “芳基烯基”是指:(芳基-烯基)-的基团。其中的“芳基”和“烯基”部分见本文有关定义。示例性的芳基烯基基团包括,但不限于:苯基丙烯基等。

[0108] “芳烷基”是指:(芳基-烷基)-的基团。其中,芳基和烷基部分见本文有关定义。示例性的芳烷基基团包括,但不限于:苯甲基,苯乙基、1-萘甲基等。

[0109] “环烯基”是指非芳香性单环或多环环系,其至少含有一个碳-碳双键且每环优选具有5-10个碳原子。示例性的单环状环烯基环包括,但不限于:环戊烯,环己烯或环庚烯。环烯基团可被一个或多个取代基取代。

[0110] “杂芳基”是指单环的或稠合多环的芳香杂环基,优选其是具有一个或多个(优选3至14个、更优选5至10个、尤其优选5或6个)碳原子、和一个或多个(优选1、2、3或4个)氧、氮、磷或硫环原子(优选O、S或N)作为成环原子的芳族基团,优选该芳族基团为4-15元杂芳基,更优选为5-7元杂芳基。所述杂芳基的实例可以列举例如:呋喃基、噻吩基、吡咯基、吡唑基、三唑基、噻唑基、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、吡啶基、咪唑基、3-苯基吡咯基、噻唑基-噁唑基、四唑基、异噁唑基、吡唑基、哒嗪基、喹啉基、嘌呤基、嘧啶基、2,3'-联呋喃基和异喹啉基。

[0111] “杂芳基烷基”是指:(杂芳基-烷基)-的基团。其中,杂芳基和烷基部分见本文有关定义。示例性的杂芳基烷基基团包括,但不限于:2-呋喃甲基、3-呋喃甲基、2-吡啶甲基等。

[0112] 除非另有说明,本发明的亚基是指二价基团,即是指一价基团中一个氢原子被化合价替代的基团。例如,“亚杂环基”是指其中一个氢原子被化合价替代的杂环基,“亚芳基”是指其中一个氢原子被化合价替代的芳基,“亚烷基”是指其中一个氢原子被化合价替代的烷基,“亚烯基”是指其中一个氢原子被化合价替代的烯基,“亚环烷基”是指其中一个氢原子被化合价替代的环烷基,“亚杂芳基”是指其中一个氢原子被化合价替代的杂芳基,“亚杂环烷基”是指其中一个氢原子被化合价替代的杂环烷基,“亚杂环烯基”是指其中一个氢原子被化合价替代的杂环烯基,“亚烷氧基”是指其中一个氢原子被化合价替代的烷氧基,“亚烯氧基”是指其中一个氢原子被化合价替代的烯氧基,“亚炔氧基”是指其中一个氢原子被化合价替代的炔氧基等。其中,上述杂环基、芳基、烷基、烯基、环烷基、杂芳基、杂环烷基、杂环烯基、烷氧基、烯氧基、炔氧基等的定义见本文的相关定义。

[0113] 除此之外,这里未定义的基团遵照通常的定义。

[0114] 本发明优选的方式可以列举以下方式。

[0115] 在本发明的化合物中, $R^1$ 优选为氢原子、羧基、硝基、氨基、烷基、链烯基、卤代烯基、杂烷基、芳基烷基、环烷基、芳基、杂芳基、杂芳基烷基、杂环烷基、杂环烯基、烷氧基、烷氧基烷基、烯氧基、炔氧基、烷基氨基、氨基烷基、烷基氨基羰基、磺酰基、烷基磺酰基、烷基亚磺酰基、氨基磺酰基或酰基,上述基团中的任一基团各自独立地可以被选自上述取代基组A中的一个或多个取代基取代;

[0116]  $R^1$ 更优选为氢原子、C1-C6烷基、C6-C12芳基、5-12元芳基C1-C6烷基、C3-C9环烷基、4-15元杂芳基、4-15元杂芳基C1-C6烷基、3-14元杂环烷基、C1-C6烷氧基C1-C6烷基、氨基C1-C6烷基、C1-C6烷基磺酰基、C1-C6烷基亚磺酰基、氨基磺酰基或酰基,上述基团中的任一基团各自独立地可以被选自上述取代基组A中的一个或多个取代基取代; $R^1$ 进而优选为氢原子、卤素、氨基、C1-C6烷基、C1-C6烷基氨基、2-二乙基氨基-乙基氨基、3-羟基-丙基氨基、3-甲氧基-丙基氨基、3-异丙氧基-丙基氨基、2,2-二甲基-丙基氨基、3-二甲基氨基-丙基氨基、3-二甲基氨基-2,2-二甲基-丙基氨基、4-二甲基氨基-丁基氨基、嘧啶基、氨基吡啶基、吗啉基、呋喃基、苯基C1-C6烷基、C1-C6烷基苯基、或苯基,上述基团中的任一基团各自独立地可以被选自取代基组A中的一个或多个取代基取代

[0117]  $R^1$ 特别优选为氢原子、甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、特丁基、戊基、叔丁基甲基、叔丁基乙基、嘧啶基、溴代嘧啶基、氨基吡啶基、苯基乙基、吗啉基、乙基苯基、呋喃基、溴苯基、或氟苯基。

[0118] 在本发明的化合物中, $L^1$ 优选为共价键、亚氨基、亚烷基、亚烯基、亚芳基、亚环烷基、亚杂芳基、亚杂环烷基、亚杂环烯基、亚烷氧基、亚烯氧基、亚炔氧基、或羰基,上述基团中的任一基团各自独立地可以被选自上述取代基组A中的一个或多个取代基取代;

[0119]  $L^1$ 更优选为共价键、C1-C6亚烷基或C6-C12亚芳基,上述基团中的任一基团各自独立地可以被选自上述取代基组A中的一个或多个取代基取代;

[0120]  $L^1$ 进而优选为共价键、亚甲基、亚乙基、或亚苯基;

[0121]  $L^1$ 特别优选为共价键。

[0122] 在本发明的化合物中, $R^2$ 优选为氢原子、羧基、硝基、氨基、烷基、链烯基、卤代烯基、杂烷基、芳基烷基、环烷基、芳基、杂芳基、杂芳基烷基、杂环烷基、杂环烯基、烷氧基、烷氧基烷基、烯氧基、炔氧基、烷基氨基、氨基烷基、烷基氨基羰基、磺酰基、烷基磺酰基、烷基



亚磺酰基、氨基磺酰基或酰基,上述基团中的任一基团各自独立地可以被选自上述取代基组A中的一个或多个取代基取代;

[0123]  $R^2$ 更优选为氢原子、C1-C6烷基、C6-C12芳基、C6-C12芳基C1-C6烷基、C3-C9环烷基、4-15元杂芳基、4-15元杂芳基C1-C6烷基、3-14元杂环烷基、C1-C6烷氧基C1-C6烷基、氨基C1-C6烷基、C1-C6烷基磺酰基、C1-C6烷基亚磺酰基、氨基磺酰基或酰基,上述基团中的任一基团各自独立地可以被选自取代基组A中的一个或多个取代基取代;

[0124]  $R^2$ 进而优选为氢原子、C1-C6烷基、C1-C6环烷基、可被1-4个卤素原子取代的苯基、吗啉基C1-C6烷基、哌啶基C1-C6烷基、四氢吡咯基C1-C6烷基、咪唑基C1-C6烷基、二(C1-C6烷基)氨基C1-C6烷基、苯氧基苯基C1-C6烷基、氨基嘧啶基C1-C6烷基、氧代四氢咪唑C1-C6烷基、氨基C1-C6烷基、C1-C6烷基磺酰基、C1-C6烷基亚磺酰基、氨基磺酰基、或酰基,上述基团中的任一基团各自独立地可以被选自取代基组A中的一个或多个取代基取代。

[0125]  $R^2$ 特别优选为氢原子、甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、特丁基、戊基、叔丁基甲基、叔丁基乙基、异丙基、吗啉基乙基、氧代四氢咪唑乙基、二氟苯基、哌啶基乙基、四氢吡咯基乙基、2-乙基咪唑乙基、二乙基氨基乙基、苯氧基苯乙基、或氨基嘧啶基甲基。

[0126] 在本发明的化合物中, $L^2$ 优选为共价键、亚氨基、亚烷基、亚烯基、亚芳基、亚环烷基、亚杂芳基、亚杂环烷基、亚杂环烯基、亚烷氧基、亚烯氧基、亚炔氧基、或羰基,上述基团中的任一基团各自独立地可以被选自上述取代基组A中的一个或多个取代基取代;

[0127]  $L^2$ 更优选为共价键、或C1-C6亚烷基,上述基团中的任一基团各自独立地可以被选自上述取代基组A中的一个或多个取代基取代;

[0128]  $L^2$ 进而优选为共价键、亚甲基或亚乙基;

[0129]  $L^2$ 特别优选为共价键。

[0130] 在本发明的化合物中, $R^3$ 优选为氢原子、羧基、硝基、氨基、烷基、链烯基、卤代烯基、杂烷基、芳基烷基、环烷基、芳基、杂芳基、杂芳基烷基、杂环烷基、杂环烯基、烷氧基、烷氧基烷基、烯氧基、炔氧基、烷基氨基、氨基烷基、烷基氨基羰基、磺酰基、烷基磺酰基、烷基亚磺酰基、氨基磺酰基或酰基,上述基团中的任一基团各自独立地可以被选自上述取代基组A中的一个或多个取代基取代;

[0131]  $R^3$ 更优选为氢原子、羧基、C1-C6烷基、C1-C6烷氧基、C2-C14链烯基、C6-C12芳基、C6-C12芳基C1-C6烷基、C3-C9环烷基、4-15元杂芳基、4-15元杂芳基C1-C6烷基、3-14元杂环烷基、C1-C6烷氧基C1-C6烷基、或氨基C1-C6烷基、C1-C6烷基磺酰基、C1-C6烷基亚磺酰基、氨基磺酰基或酰基,上述基团中的任一基团各自独立地可以被选自取代基组A中的一个或多个取代基取代;

[0132]  $R^3$ 进而优选为氢原子、羧基C6-C12芳基、可被1-4个卤素原子取代的C1-C6烷基、可被1-4个卤素原子取代的苯基C1-C6烷基、C1-C6烷氧基苯基、可被1-4个卤素原子取代的C1-C6烷氧基苯基C1-C6烷基、哌啶基、吡啶基C1-C6烷基、C2-C6链烯基、C1-C6烷基吡啶基C1-C6烷基、吗啉基C1-C6烷基、二(C1-C6烷基)氨基C1-C6烷基、苯并吡咯基C1-C6烷基、四氢吡咯基C1-C6烷基、或C1-C6烷氧基C1-C6烷基,上述基团中的任一基团各自独立地可以被选自取代基组A中的一个或多个取代基取代;

[0133]  $R^3$ 特别优选为氢原子、甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、特丁基、戊基、叔丁基甲基、叔丁基乙基、羧基苯基、甲氧基苯基、卤代苯甲基、哌啶基、甲基吡啶甲基、吗啉基

乙基、吗啉基丙基、二氯代氟代苯基乙基、二甲基氨基乙基、三氟乙基、氯苯基甲基、三氟代甲氧基苯基甲基、吡啶基甲基、2-甲基-2-丁烯基、苯并吡咯基乙基、N-四氢吡咯基乙基、甲氧基丙基、甲氧基乙基。

[0134] 在本发明的化合物中,  $L^3$  优选为共价键、亚氨基、亚烷基、亚烯基、亚芳基、亚环烷基、亚杂芳基、亚杂环烷基、亚杂环烯基、亚烷氧基、亚烯氧基、亚炔氧基、或羰基, 上述基团中的任一基团各自独立地可以被选自上述取代基组A中的一个或多个取代基取代;

[0135]  $L^3$  更优选为共价键、C1-C6亚烷基或C6-C12亚芳基, 上述基团中的任一基团各自独立地可以被选自上述取代基组A中的一个或多个取代基取代;

[0136]  $L^3$  进而优选为共价键、亚甲基、亚乙基或亚苯基;

[0137]  $L^3$  特别优选为共价键。

[0138] 在本发明的化合物中, X表示氮或碳。

[0139] 应予说明, 本发明的化合物包括将上述 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $L^1$ 、 $L^2$ 、 $L^3$ 和X中各自列举的基团或原子相互任意地进行组合而得到的一种或一类化合物。

[0140] 在本发明的化合物中,  $R^1-L^1$ - 示例性地优选为氢原子、卤素、氨基、C1-C6烷基、C1-C6烷基氨基、2-二乙基氨基-乙基氨基、3-羟基-丙基氨基、3-甲氧基-丙基氨基、3-异丙氧基-丙基氨基、2,2-二甲基-丙基氨基、3-二甲基氨基-丙基氨基、3-二甲基氨基-2,2-二甲基-丙基氨基、4-二甲基氨基-丁基氨基、嘧啶基、氨基吡啶基、吗啉基、咪唑基、苯基C1-C6烷基、C1-C6烷基苯基、苯基、C1-C6烷氧基C1-C6烷基、氨基C1-C6烷基、C1-C6烷基磺酰基、C1-C6烷基亚磺酰基、氨基磺酰基、或酰基, 上述基团中的任一基团各自独立地可以被选自取代基组A中的一个或多个取代基取代;

[0141]  $R^1-L^1$ - 示例性地优选更优选为氨基、氟、氯、甲氨基、丙氨基、异丙氨基、丁氨基、异丁氨基、戊氨基、己氨基、2-二乙基氨基-乙基氨基、3-羟基-丙基氨基、3-甲氧基-丙基氨基、3-异丙氧基-丙基氨基、2,2-二甲基-丙基氨基、3-二甲基氨基-丙基氨基、3-二甲基氨基-2,2-二甲基-丙基氨基、4-二甲基氨基-丁基氨基、或C1-C6烷基, 上述基团中的任一基团各自独立地可以被选自取代基组A中的一个或多个取代基取代。

[0142] 在本发明的化合物中,  $R^2-L^2$ - 示例性地优选为氢原子、C1-C6烷基、C1-C6环烷基、可被1-4个卤素原子取代的苯基、吗啉基C1-C6烷基、哌啶基C1-C6烷基、四氢吡咯基C1-C6烷基、咪唑基C1-C6烷基、二(C1-C6烷基)氨基C1-C6烷基、苯氧基苯基C1-C6烷基、氨基嘧啶基C1-C6烷基、氧代四氢咪唑基C1-C6烷基、氨基C1-C6烷基、C1-C6烷基磺酰基、C1-C6烷基亚磺酰基、氨基磺酰基、或酰基, 上述基团中的任一基团各自独立地可以被选自取代基组A中的一个或多个取代基取代。

[0143] 在本发明的化合物中,  $R^3-L^3$ - 示例性地优选为氢原子、甲基C6-C12芳基、甲基6-12元杂环芳基、羧基C6-C12芳基、可被1-4个卤素原子取代的C1-C6烷基、可被1-4个卤素原子取代的苯基C1-C6烷基、C1-C6烷氧基苯基、可被1-4个卤素原子取代的C1-C6烷氧基苯基C1-C6烷基、哌啶基、吡啶基C1-C6烷基、C2-C6链烯基、C1-C6烷基吡啶基C1-C6烷基、吗啉基C1-C6烷基、二(C1-C6烷基)氨基C1-C6烷基、苯并吡咯基C1-C6烷基、四氢吡咯基C1-C6烷基、或C1-C6烷氧基C1-C6烷基, 上述基团中的任一基团各自独立地可以被选自取代基组A中的一个或多个取代基取代。

[0144] 本发明包括通式(I)和通式(II)所表示的化合物及其可能的各种异构型式。包括:

非镜像异构体、镜像异构体、互变异构体和“E”或“Z”构型异构体的几何异构体等。本领域技术人员可以根据本领域的常规手段分离出上述光学纯或者立体异构纯的化合物。

[0145] 本发明包括通式 (I) 和通式 (II) 所表示的化合物及其可能的消旋体或/和镜像异构物/或/和非镜像异构物的混合物。

[0146] 此外,通式 (I) 和通式 (II) 所表示的化合物在应用上也涵盖该化合物的溶剂化及非溶剂化形式。因此,各形式均包括具有所指明构造的化合物,包括其水合物及无水物。

[0147] 除了通式 (I) 和通式 (II) 所表示的化合物之外,不同具体实施方案的激酶抑制剂包括:药学上可接受的盐,前药和这些化合物的活性代谢物、和这些代谢物的药学上可接受的盐。

[0148] 术语“药学上可接受的盐”是指上述化合物能保持原有生物活性并且适合于医药用途的某些盐类。通式 (I) 和通式 (II) 所表示的化合物的药学上可接受的盐有两种形成形式:一种是与酸形成的盐;另一种是与碱或者碱金属形成的盐。与通式 (I) 和通式 (II) 所表示的化合物形成药学上可接受的盐的酸包括无机酸和有机酸。合适的无机酸包括:盐酸,硫酸和磷酸。合适的有机酸可选自脂肪族、环脂肪族、芳香性、杂环羧酸和磺酸类有机酸;其实例包括但不限于:甲酸、乙酸、丙酸、琥珀酸、甘醇酸、葡萄糖酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、甘氨酸、精氨酸、柠檬酸、反丁烯二酸、烷基磺酸、芳基磺酸等。与通式 (I) 所表示的化合物形成药学上可接受的盐的碱金属包括:锂、钠、钾、镁、钙、铝、锌等;与通式 (I) 和通式 (II) 所表示的化合物形成药学上可接受的盐的碱包括:胆碱、二乙醇胺、吗啉等。

[0149] “前药”是一种通式 (I) 和通式 (II) 所表示的化合物的衍生物,借助于在体内代谢的方式将其于活体内转化(例如:通过水解,还原或氧化)成通式 (I) 和通式 (II) 所表示的化合物。例如,可以将通式 (I) 和通式 (II) 所表示的含有羟基基团的化合物与酸反应制备成相应的酯。相应的酯即为前药,可以在活体内水解母体药物。适合来制备“前药”的酸包括但不限于:乙酸、柠檬酸、乳酸、酒石酸、丙二酸、草酸、水杨酸、琥珀酸、反丁烯二酸、顺丁烯二酸、亚甲基-双- $\beta$ -羟基萘酸、龙胆酸、羟乙基磺酸、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、对甲苯磺酸等。

[0150] 本发明所指的激酶抑制剂包括 $IC_{50}$ 值为 $10 \mu M$ 或更低的那些化合物。本发明所指的激酶包括但不限于RET、TRK、EGFR和B-RAF,但不包括p38 $\alpha$ 激酶。

[0151] 通式 (I) 和通式 (II) 所表示的化合物的给药方式可以是胃肠道给药也可以是非胃肠道给药。胃肠道给药是指经口或经直肠给药。非胃肠道给药方式包括:皮下、肌肉、静脉内和皮肤内等途径。通常,通式 (I) 和通式 (II) 所表示的活性化合物在给药时可以使用药学上可接受的载体或稀释剂。

[0152] “治疗有效量”或“治疗量”均是指足以产生疗效的量。有效量可分一或多次给药。通常,有效量足以缓和、改善、稳定、减慢或延迟疾病的进一步发展。

[0153] 本发明的化合物可单独使用,也可以与其它一种或者多种药物联合使用;或者用于正在接受手术或者放射线治疗的患者,其中本发明的化合物与所述手术或放射性治疗伴随地、或在手术或放射性治疗之前、或在手术或放射性治疗之后施用于所述患者;或与药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂做成一定的剂型给药。具体的剂型依据给药途径而定。

[0154] 本发明的非肠道注射用药物配方包括药学上可接受的无菌水剂或非水溶液、分散剂、悬浮剂或乳化剂以及使用前才配成可注射的无菌水溶液的粉针剂。

[0155] 若需要,并为了更有效的分布,可将本发明的化合物并入缓慢释放或目标传送系

统、例如：聚合物基质，脂质体和微球体内。

[0156] 口服给药的固态剂型包括：胶囊，药锭，药片，粉末和颗粒。在这些固态剂型中，含有通式(I)和通式(II)所表示的活性化合物和至少一种惰性并且药学上可接受的赋形剂或载体。这些赋形剂或载体包括柠檬酸钠或磷酸二钙和/或 a) 填充剂或增量剂，例如：淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和水杨酸；b) 结合剂，例如：羧甲基纤维素、褐藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶；c) 崩解剂，例如：洋菜胶、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、褐藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠；e) 溶解延迟剂，例如：石蜡；f) 吸收加速剂，例如：季铵化合物；g) 湿润剂，例如：鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯；h) 吸附剂，例如：高岭土和皂土；和i) 润滑剂，例如：滑石粉、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固态聚乙二醇。

[0157] 固态剂型的药锭、糖衣锭、胶囊、药片和颗粒可制备成具有涂层或外壳。

[0158] 活性化合物亦可呈微胶囊形式给药。如需要，可具备一或多种上述的赋形剂。

[0159] 经口给药的液态剂型包括药学上可接受的乳化剂、溶液、悬浮剂、糖浆等。除了活性化合物以外，该液态剂型可含有普遍用于液态剂型中的惰性稀释剂，例如：水或其他溶剂、稳定剂和乳化剂，例如：乙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲酸醇、苯甲酸苯甲酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油类(特别是棉籽，落花生，玉米，胚芽，橄榄，蓖麻和芝麻油)、甘油、四氢呋喃醇、聚乙二醇和山梨醇酐的脂肪酸酯类等。

[0160] 除了惰性稀释剂的外，口服组合物亦可包括：辅料，例如：湿润剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、香料和调香剂。

[0161] 在悬浮液中，除了活性化合物以外，可含有悬浮剂，例如：乙氧基异硬脂醇类、聚氧乙烯山梨醇和山梨醇酐酯等。

[0162] 用于直肠或阴道给予的组合物优选为栓剂，其可通过将本发明的化合物与适当的非刺激性赋形剂或载体混合而制备。

[0163] 本发明化合物的局部给药用的剂型包括粉末、贴片、喷剂、油膏和吸入剂，其可通过将活性化合物在无菌条件下与药学上可接受的载体和所需的任何防腐剂、缓冲剂或推进剂混合而制备。

[0164] 本发明化合物优选的剂量范围为每公斤体重每天约为0.01—400毫克。更优选的剂量范围为每公斤体重每天为0.2—100毫克。也可以选择适当的剂量每天多次分别给药。

[0165] 本发明的氨基吡唑类衍生物可作为但不限于作为激酶抑制剂。本发明公开氨基吡唑衍生物可以单独使用也可以与其它药物或者药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂一起使用，适用于预防或治疗由细胞增殖和/或血管新生的破坏所导致、或与该破坏相关联或相伴随的病症。这些病症的例子之一为癌症。

[0166] 本说明书中所使用的术语“癌症”一般是指广泛的以细胞的失控性异常生长为特征的病症。

[0167] 本发明的化合物预期可用于治疗各种癌症，包括但不限于：骨癌类，包括：尤因肉瘤、骨肉瘤、软骨肉瘤等；脑和CNS肿瘤，包括：听神经瘤、神经母细胞瘤、神经胶瘤和其他脑肿瘤，脊髓肿瘤、乳癌、结肠直肠癌、进展期结肠直肠癌；内分泌癌类，包括：肾上腺皮质癌、胰癌、脑垂体癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、胸腺癌、多发性内分泌肿瘤；胃肠癌类，包括：胃癌、食道癌、小肠癌、肝癌、肝外胆管癌、胃肠类癌性肿瘤、胆囊癌；泌尿生殖器癌类，包括：睾丸癌、阴茎癌、前列腺癌；妇科癌类，包括：子宫颈癌、卵巢癌、阴道癌、子宫/子宫内膜癌、

阴部癌、妊娠滋养细胞肿瘤、输卵管癌、子宫肉瘤；头和颈部肿瘤类，包括：口腔癌、唇癌、唾液腺癌、喉头癌、下咽癌、正咽癌、鼻咽癌、鼻窦癌、鼻咽癌；血癌类，包括：儿童白血病、急性淋巴性白血病、急性骨髓性白血病、慢性淋巴性白血病、慢性骨髓性白血病、发状细胞性白血病、急性早幼粒细胞白血病、浆细胞性白血病；骨髓癌血液病症，包括：骨髓分化不良症候群、骨髓增生性病症、再生障碍性贫血、范禾尼贫血、特发性巨球蛋白血症；肺癌类，包括：小细胞肺癌、非小细胞肺癌；淋巴瘤类，包括：霍奇金病、非霍奇金氏淋巴瘤、皮肤型T-细胞淋巴瘤、周围T-细胞淋巴瘤、AIDS相关性淋巴瘤；眼癌类，包括：视网膜母细胞瘤、葡萄膜黑色素瘤、皮肤癌类，包括：黑色素瘤、非黑色素瘤皮肤癌、梅克尔细胞癌、软组织肉瘤类，例如：儿童软组织肉瘤、成人软组织肉瘤、卡波希肉瘤、泌尿系统癌症，包括：肾癌维尔姆斯肿瘤、膀胱癌、尿道癌和转移性细胞癌。

[0168] 本发明化合物可用来治疗的癌症首先包括：乳癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、头和颈部癌、肾、胃和脑癌。

[0169] 本发明化合物可用来治疗的癌类首先为：皮肤型T-细胞淋巴瘤 (CTCL) 和周围T-细胞淋巴瘤。

[0170] 可通过本发明的化合物加以治疗的优选癌类为固态肿瘤和血液恶性疾病。

[0171] 本发明化合物亦可用于治疗涉及、关于或与组蛋白脱乙酰基酶的调节异常相关联的病症。已有许多病症已知涉及或至少一部分通过HDAC活性所调节，其中已知HDAC活性对于促使疾病发作扮演某种角色，或者该等征状已知或已显示可通过HDAC抑制剂予以减轻。预期可通过本发明的化合物加以治疗的此型病症包括但不限于下列：抗增生性病症（例如：癌症）；神经变性疾病，包括：亨廷顿病、聚谷氨酰胺病、帕金森病、阿尔茨海默病、癫痫发作、纹状体黑质变性、进行性核上性麻痹、扭转张力不全、痉挛性斜颈和运动障碍、家族性震颤、抽动秽语综合征、弥漫性路易体疾病、进行性核上性麻痹、皮克病、颅内出血、原发性侧索硬化症、脊髓性肌肉萎缩症、肌萎缩侧索硬化症、肥大性间质性多神经病、视网膜色素变性、遗传性视神经萎缩、遗传性痉挛性截瘫、进行性共济失调症和Shy-Drager综合征；代谢性疾病，包括：2型糖尿病；眼部退化疾病，包括：青光眼、老年黄斑变性、虹膜红变性青光眼；涉及血管新生的疾病，包括：癌症、牛皮癣；心理病症，包括：双相性精神障碍、精神分裂症、躁狂症、抑郁和痴呆；心血管疾病包括：心力衰竭、再狭窄和动脉硬化；纤维化疾病，包括：肝纤维化、囊性纤维病和血管纤维瘤；感染性疾病，包括：真菌感染，例如：白色念珠菌、细菌感染、病毒性感染，例如：单纯疱疹、原虫感染，例如：疟疾、利什曼原虫感染、布氏锥虫感染、弓形体病和球虫病和造血性病症，包括：海洋性贫血、贫血和镰状细胞性贫血。

[0172] 此外，本发明的化合物可用于治疗对于其他化疗法治疗具有抗性的增生性疾病；及用于治疗高增生疾病，例如：白血病、牛皮癣等。

[0173] 本发明的化合物也可用于治疗神经变性疾病。

[0174] 氨基吡唑类衍生物的合成

[0175] 本发明通式 (I) 和通式 (II) 所表示的化合物可以用下面讨论的合成路线和合成方法来合成。所用原材料方便易得。但是，本发明所用的合成路线和合成方法，可以广泛应用于类似物的合成，只需要变换起始原材料即可。例如，在本文实例中没有详细描述的化合物的合成，只要把起始原材料更换成相应目标化合物的起始原材料，依据化学常识，在有必要时稍为改变一下反应条件即可合成出所需要的目标化合物。

[0176] 各具体实施方案的试剂可利用说明如下的反应途径或合成流程图,使用本领域的技术手段,以可取得的起始原料加以制备。具体实施方案的特定化合物的制备详细说明于下列实施例中,但熟悉此项技术的本领域技术人员知道所说明的化学反应可适用于制备不同具体实施方案中的多种其他化合物,例如:非示例化合物的合成可成功地通过本领域技术人员显而易见的修饰加以施行,例如:通过适当地保护干扰基团,通过改变成该项技术中已知的其他适当的试剂,或通过进行反应条件的例行性修饰。在有机合成中的适当保护基团的列表可参见T.W.Greene的Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, 1981。或者,本文中揭示或本领域中已知的其他反应可被认定为具有用于制备各具体实施方案的其他化合物的适用性。

[0177] 可用于合成化合物的试剂可根据本领域中已知的技术加以取得或制备。

[0178] 在下列实例中,除非另有指明,所有温度为摄氏度。

[0179] 各种起始原料和试剂均来自市售。供应商包括但不限于:Aldrich Chemical Company、Lancaster Synthesis Ltd等等。市售原料和试剂均不经进一步纯化直接使用,除非另有指明。

[0180] 玻璃器皿用烘箱干燥和/或加热干燥。反应用玻璃硅胶-60 F254平板(0.25mm)(TLC)上进行跟踪。分析性薄层层析并以适当的溶剂比例(v/v)加以展开。以TLC上起始物质耗尽时为反应终点。

[0181] 通常,后续处理是用反应所用的溶剂将反应液的体积增大一倍,然后用总体积的25%萃取溶剂来进行萃取三次,除非另有指明。将含产物萃取经无水硫酸钠脱水,在加以过滤于旋转蒸发器上,于减压之下将溶剂蒸发并注意溶剂于真空中的去除。最后,用快速柱层析分离得到目标化合物(J. Org. Chem., 1978;43:2923)。

[0182]  $^1\text{H}$  NMR图谱是用Bruker仪器(400MHz)测定而得,化学位移用ppm表示。使用氯仿作为参照标准(7.25ppm)或四甲基硅烷内标(0.00ppm)。视需要,也可以使用其它NMR常用的溶剂。 $^1\text{H}$  NMR的表示方法:s=单峰,d=双重峰,t=三重峰,m=多重峰,br=变宽的,dd=双重峰的双重峰,dt=三重峰的双重峰。若提供偶合常数时,其单位为Hz。

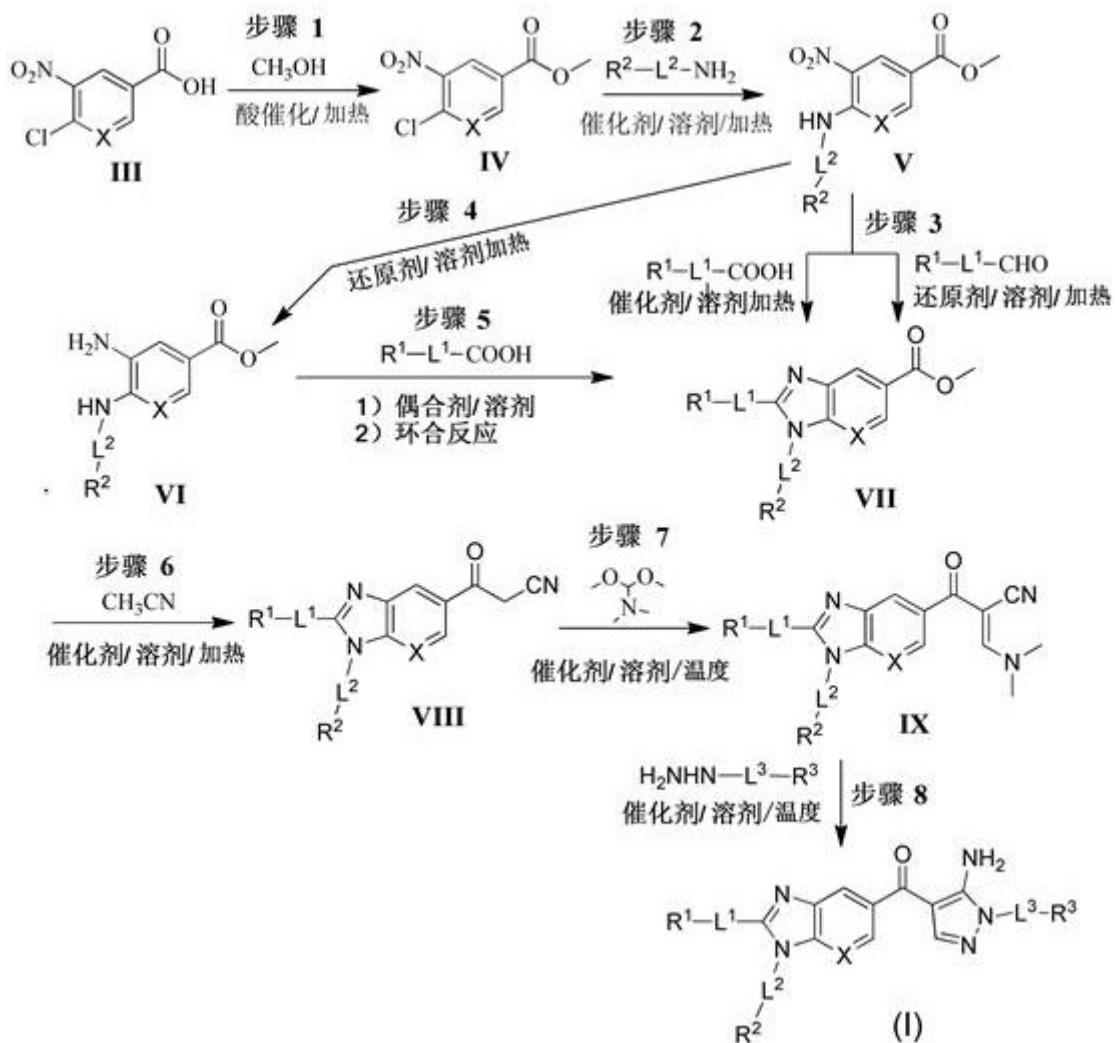
[0183] 质谱是用LC/MS仪测定得到,离子化方式可为ESI或APCI。所有熔点均未经修正。

[0184] 下面的实例仅仅是用来说明所发明的具体化合物的合成方法。但在合成方法上并没有任何限制。在下面未列出的化合物,也可以用与下面同样的合成路线与合成方法,选择适当的起始原材料、在有必要的地方稍加适当的常识性的反应条件调整即可加以制备。

[0185] 合成

[0186] 通式(I)中所示的化合物,当X=CH时,合成方法如下:3-硝基-4-氯-苯甲酸经酯化、胺化、环合得化合物(VII)。在催化下,化合物(VII)与乙腈反应转化为化合物(VIII),后者经缩合并再次环合,即得到通式(I)所示的目标化合物。

[0187] 合成路线1



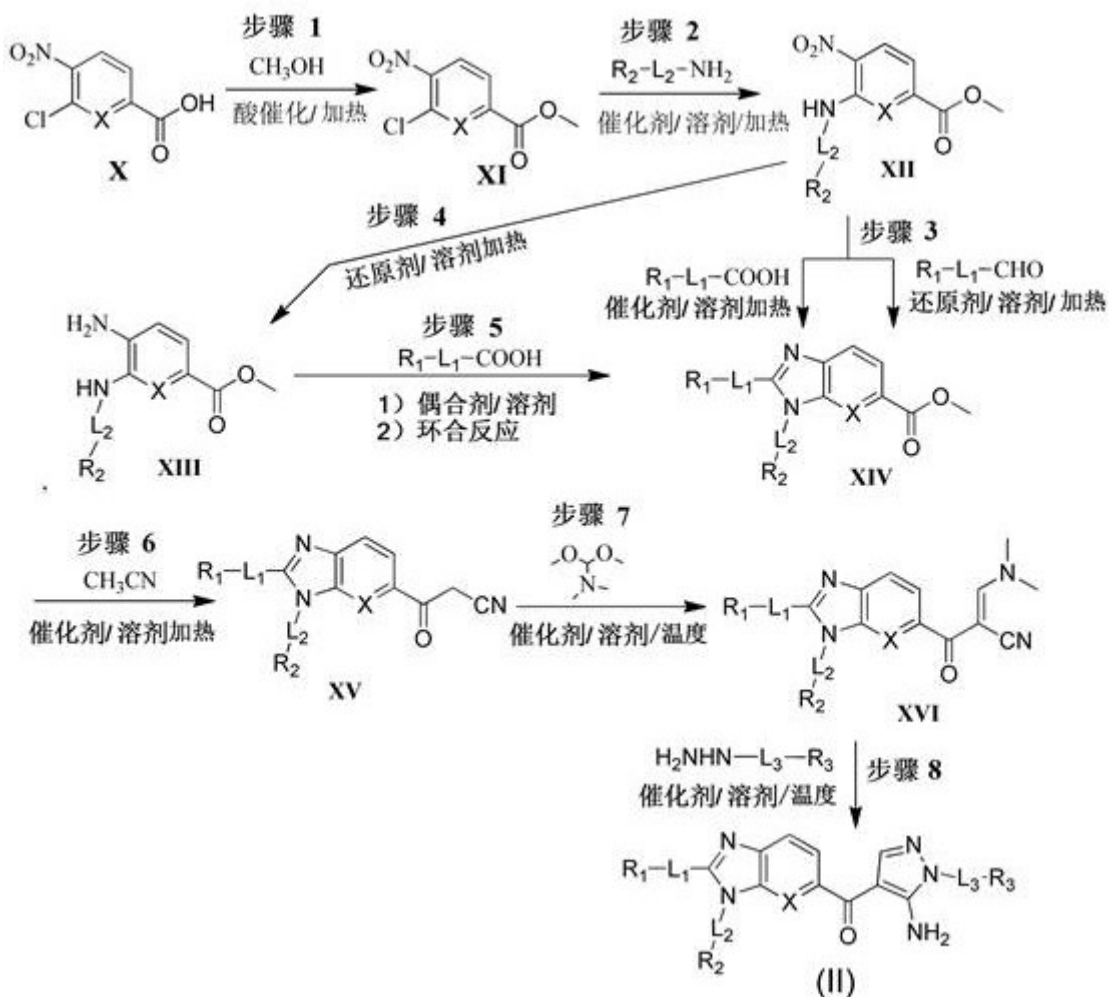
[0188]

[0189] 具体地说,当X=CH时,通式(I)所示的目标化合物可以采用合成路线1所示的方法来合成。3-硝基-4-氯-苯甲酸(III)以甲醇为溶剂,在酸催化(例如:浓 $\text{H}_2\text{SO}_4$ )下反应,得到3-硝基-4-氯-苯甲酸酯(IV)。在加热条件下,化合物(IV)与合适的胺反应,得到化合物(V)。在还原剂的存在下,化合物(V)与合适的醛发生还原环合反应,得到化合物(VII)。在催化下,化合物(VII)与乙腈反应所得的化合物(VIII)与1,1-二甲基-N,N-二甲基甲胺在加热催化下缩合生成化合物(IX)。通式(I)所示的目标化合物可以方便地通过在合适的温度和催化下,使用合适的胍衍生物与化合物(IX)反应而得。

[0190] 在通式(I)中,通过使用合适的还原剂来还原化合物(V),所得化合物(VI)与合适的酸缩合然后脱水,也可以得到关键中间体(VII)。

[0191] 通式(II)中所示的化合物,当X=CH时,合成方法如下:4-硝基-3-氯-苯甲酸经酯化、胺化、环合而得到化合物(XIV)。在催化下,化合物(XIV)与乙腈反应转化为化合物(XV),后者经缩合并再次环合,即得到通式(II)所示的目标化合物。

[0192] 合成路线2



[0193]

[0194] 具体地说,当X=CH时,通式(I)所示的目标化合物可以采用合成路线2所示的方法来合成。4-硝基-3-氯-苯甲酸(X)以甲醇为溶剂,在酸催化(例如:浓H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)下反应,得到3-硝基-4-氯-苯甲酸酯(XI)。在加热条件下,化合物(XI)与合适的胺反应,得到化合物(XII)。在还原剂的存在下,化合物(XII)与合适的醛发生还原环合反应,得到化合物(XIV)。在催化下,化合物(XIV)与乙腈反应所得的化合物(XV)与1,1-二甲基-N,N-二甲基甲胺在加热催化下缩合生成化合物(XVI)。通式(II)所示的目标化合物可以方便地通过在合适的温度和催化下,使用合适的胍衍生物与化合物(XVI)反应而得。

[0195] 在通式(II)中,通过使用合适的还原剂来还原化合物(XII),所得化合物(XIII)与合适的酸缩合然后脱水,也可以得到关键中间体(XIV)。

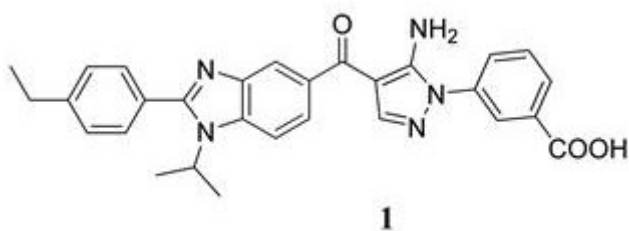
[0196] 下面结合实例进一步阐明本发明的内容。目的在于让具备有本领域相关的基本知识的技术人员更加清楚的了解并实践本发明的具体内容。但是,本发明的保护范围并不仅仅局限于这些实例。

[0197] 实施例1

[0198] 3-(5-氨基-4-(2-(4-乙基苯基)-1-异丙基-1H-苯并咪唑-5-羰基)-1H-吡唑-1-基)苯甲酸(1)



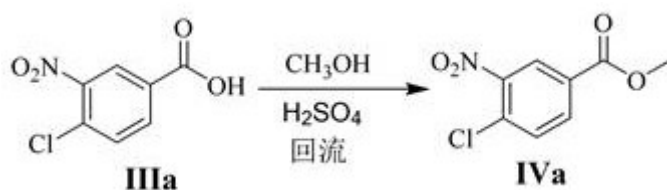
[0199]



[0200] 化合物(1)的合成可以使用合成路线1来进行,实施步骤如下:

[0201] 步骤 1

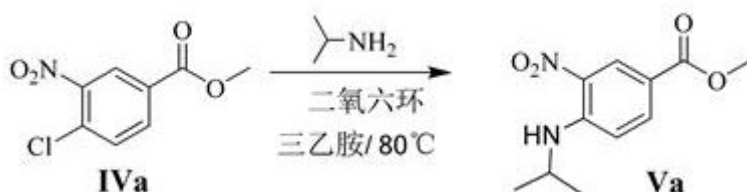
[0202]



[0203] 以化合物IIIa为起始原料,加入到100ml的圆底烧瓶中,放入转子,量取50ml的无水甲醇加入到反应瓶中,以浓 $\text{H}_2\text{SO}_4$ 为催化剂,80℃反应。待原料反应完全后,取出反应瓶,放入冰箱中冷却。有大量白色固体沉淀产生,抽滤,用大量水洗涤。将滤饼于真空干燥箱中干燥,得到白色固体产物IVa(产率:98%)。MS(ESI)  $m/z$ : 217  $[\text{M}+1]^+$ 。

[0204] 步骤 2

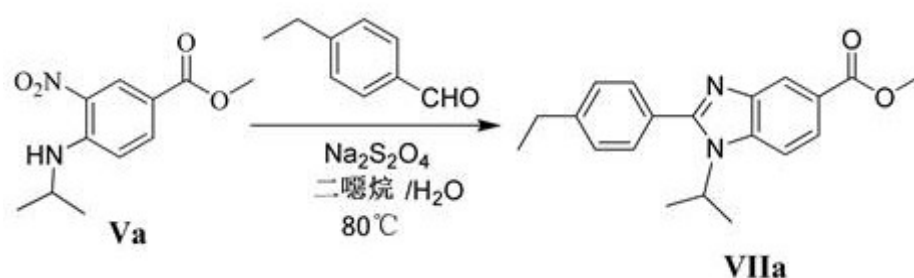
[0205]



[0206] 称取适当的化合物IVa(1eq)于100ml的圆底烧瓶中,放入转子,量取30ml的二氧六环加入到反应瓶中,作为溶剂。依次将称取好的三乙胺(3eq)、异丙胺(2eq)加入到反应瓶中。80℃反应,待IVa反应完全后,取出反应瓶,冷却至室温,旋蒸出去溶剂,油泵抽,最终得到黄色固体产物Va(产率:98%),MS(ESI)  $m/z$ : 239  $[\text{M}+1]^+$ 。

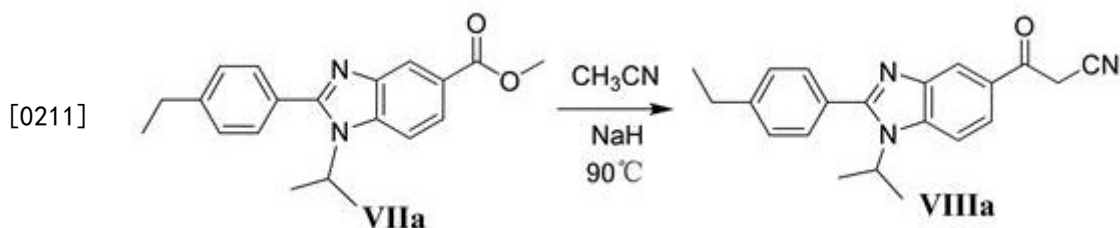
[0207] 步骤 3

[0208]



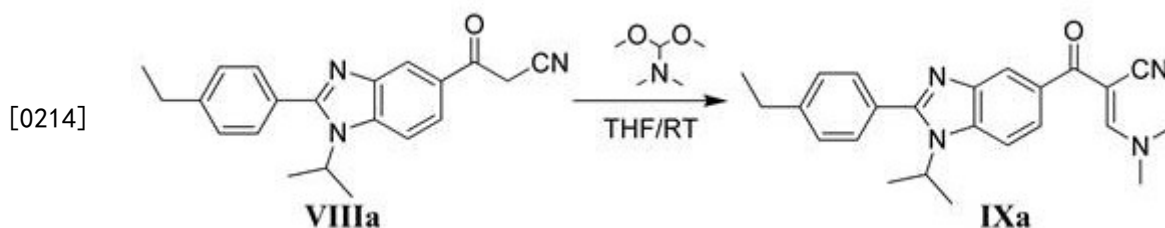
[0209] 称取适量的化合物Va(1eq)于100ml的圆底烧瓶中,量取二氧六环: $\text{H}_2\text{O}$ =1:1(v:v)各30ml,作为溶剂。称取相应的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (3eq)加入到反应瓶中,打开磁力搅拌器,搅拌15min。量取相应的4-乙基苯甲醛(2eq)加入到反应瓶中,80℃反应。待化合物3反应完全后,取出反应瓶,冷却至室温。用3\*40ml的DCM萃取,合并有机相,有机相用无水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥,旋蒸,加入适量硅胶粉拌样,柱层析法分离目标化合物VIIa(产率:50%)。MS(ESI)  $m/z$ : 323  $[\text{M}+1]^+$ 。

[0210] 步骤 6



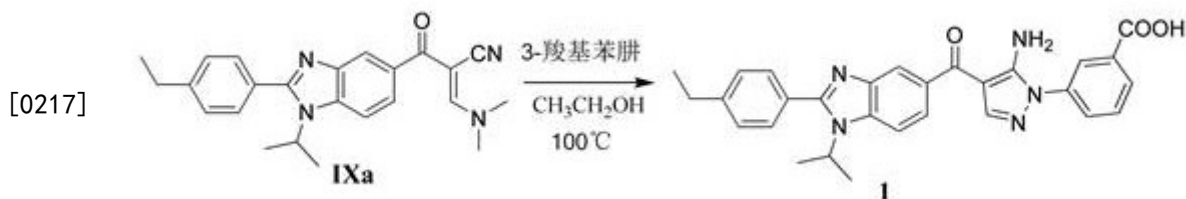
[0212] 称取适量的化合物VIIa (1eq) 于100ml的圆底烧瓶中,量取30ml的甲苯溶液加入到反应瓶中,打开磁力搅拌器,温度为90℃,使化合物4充分溶解。待化合物4溶解后,加入相应的干燥CH<sub>3</sub>CN (2eq) 以及NaH (3eq),将反应装置过夜。待化合物VIIa反应完全后,取出反应瓶,冷却至室温,70℃旋蒸出去甲苯溶液。将固体残渣倒入100ml烧杯中,加入适量水溶解,1N HCl调节pH至5左右。用3\*40ml的DCM萃取,合并有机相,有机相用无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,旋蒸,加入适量硅胶粉拌样,柱层析法分离目标化合物。洗脱剂为PE、EA。最终得到土黄色固体化合物VIIIa (产率:45%)。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.27 (s, 1H), 7.89 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.35 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 4.85-4.72 (m, 1H), 4.16 (s, 2H), 2.73 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.64 (d, *J* = 7.0 Hz, 6H), 1.28 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H)。HPLC: 99.5%。MS (ESI) *m/z*: 332.55 [M+1]<sup>+</sup>。

[0213] 步骤 7



[0215] 称取适量的化合物VIIIa (1eq) 于50ml的圆底烧瓶中,量取20 ml的THF作为溶剂,打开磁力搅拌器,使化合物5充分溶解。用移液枪移去相应的N,N-二甲基甲缩醛 (1.5eq),缓慢加入到反应瓶中,室温搅拌。待化合物5反应完全后,加入适量硅胶粉拌样,柱层析法分离目标化合物。洗脱剂为PE、EA。最终得到土黄色固体化合物IXa (产率:100%)。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.00 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.89 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.59 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.43 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 4.76-4.73 (m, 1H), 3.40 (s, 3H), 3.29 (s, 3H), 2.71 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 1.60 (d, *J* = 7.0 Hz, 6H), 1.25 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H)。HPLC: 99.2%。MS (ESI) *m/z*: 387.57 [M+1]<sup>+</sup>。

[0216] 步骤 7



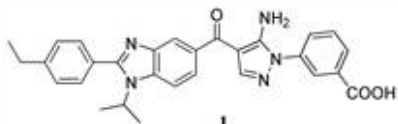
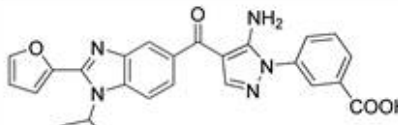
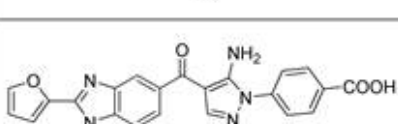
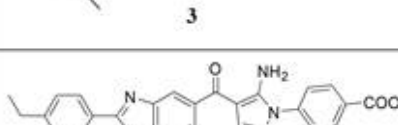
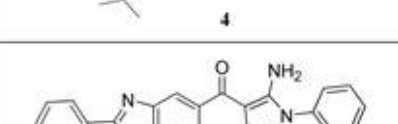
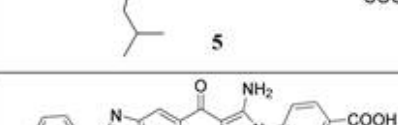
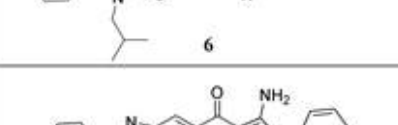
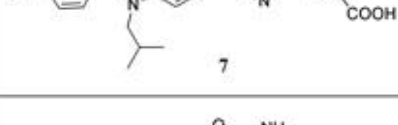
[0218] 称取适量的化合物IXa (1eq) 于50ml的圆底烧瓶中,放入转子,量取20ml的无水CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH,加入反应瓶中,称取相应的3-羧基苯肼 (1.2eq) 加入到反应瓶中,100℃反应。待化

合物6反应完全后,取出反应瓶,加入适量硅胶粉拌样,柱层析法分离目标化合物。洗脱剂为PE、EA。最终得到固体化合物1(产率:10%)。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$  8.14 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 8.00 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.88 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.74 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.71 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.63 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 7.45 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 7.30 (s, 2H), 4.80-4.75 (m, 1H), 2.73 (q,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 1.63 (d,  $J = 6.8$  Hz, 6H), 1.25 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H). HPLC: 99.6%. MS(ESI)  $m/z$ : 494.644 [M+1]<sup>+</sup>。

[0219] 实施例2-8

[0220] 根据实施例1 的方法,只要变换适当的起始原材料,即可以合成出广泛的各种各样的衍生物。实施例 2-8 是其中的一些代表性的示例化合物(见表1)。

[0221] 表1

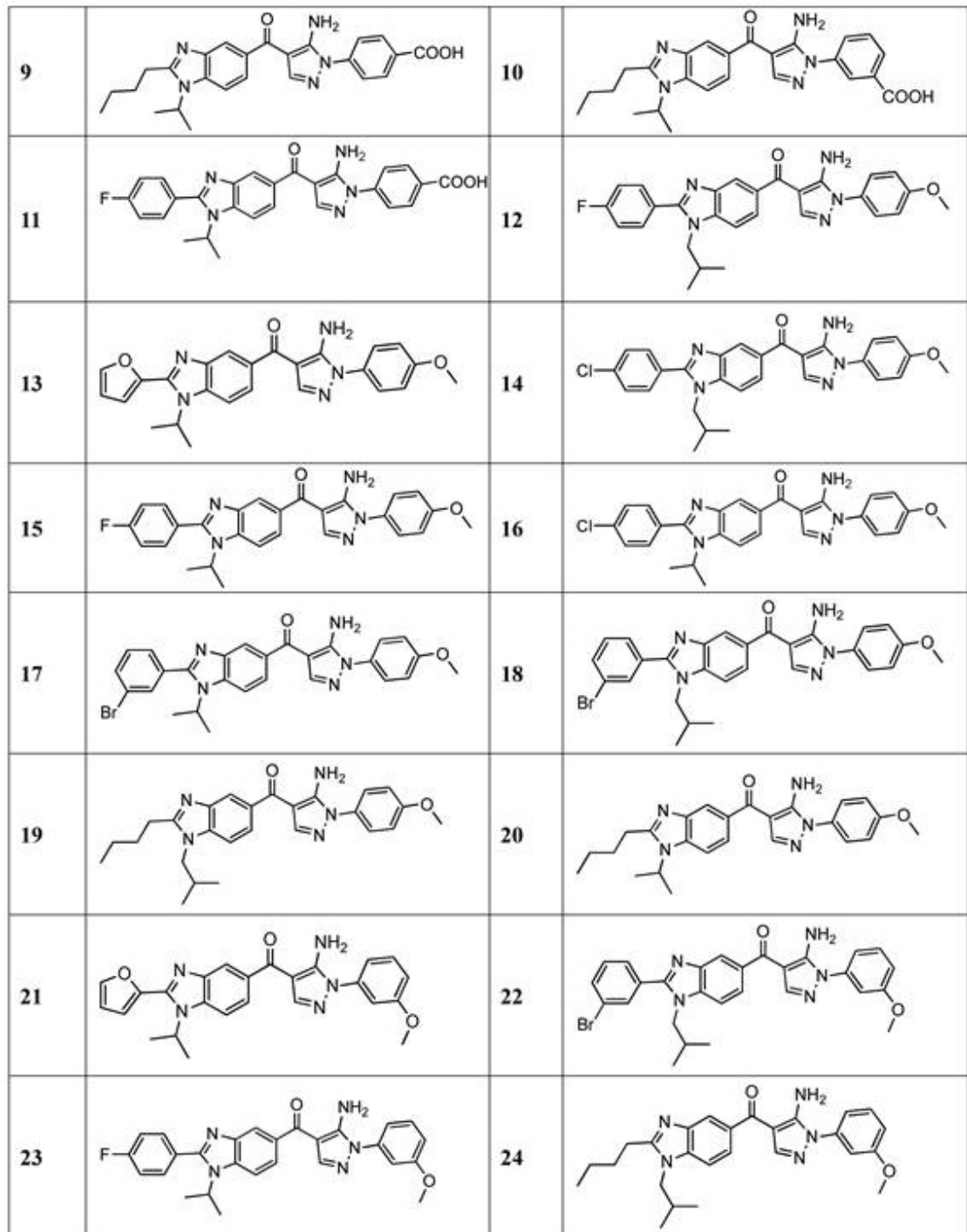
| 实施例 | 结构  | 名称  | $m/z[M]^+$ |
|-----|---|---|------------|
| 1   |    | 3-(5-氨基-4-(2-(4-乙基苯基)-1-异丙基-1H-苯并咪唑-5-羰基)-1H-吡唑-1-基)苯甲酸 | 493        |
| 2   |    | 3-(5-氨基-4-(2-(呋喃-2-基)-1-异丙基-1H-苯并咪唑-5-羰基)-1H-吡唑-1-基)苯甲酸 | 455        |
| 3   |    | 4-(5-氨基-4-(2-(呋喃-2-基)-1-异丙基-1H-苯并咪唑-5-羰基)-1H-吡唑-1-基)苯甲酸 | 455        |
| 4   |    | 4-(5-氨基-4-(2-(4-乙基苯基)-1-异丙基-1H-苯并咪唑-5-羰基)-1H-吡唑-1-基)苯甲酸 | 493        |
| 5   |    | 3-(5-氨基-4-(1-异丁基-2-对甲苯基-1H-苯并咪唑-5-羰基)-1H-吡唑-1-基)苯甲酸     | 493        |
| 6   |  | 4-(5-氨基-4-(1-异丁基-2-对甲苯基-1H-苯并咪唑-5-羰基)-1H-吡唑-1-基)苯甲酸     | 493        |
| 7   |  | 3-(5-氨基-4-(2-(4-氯苯基)-1-异丁基-1H-苯并咪唑-5-羰基)-1H-吡唑-1-基)苯甲酸  | 513        |
| 8   |  | 4-(5-氨基-4-(2-(4-氯苯基)-1-异丁基-1H-苯并咪唑-5-羰基)-1H-吡唑-1-基)苯甲酸  | 513        |

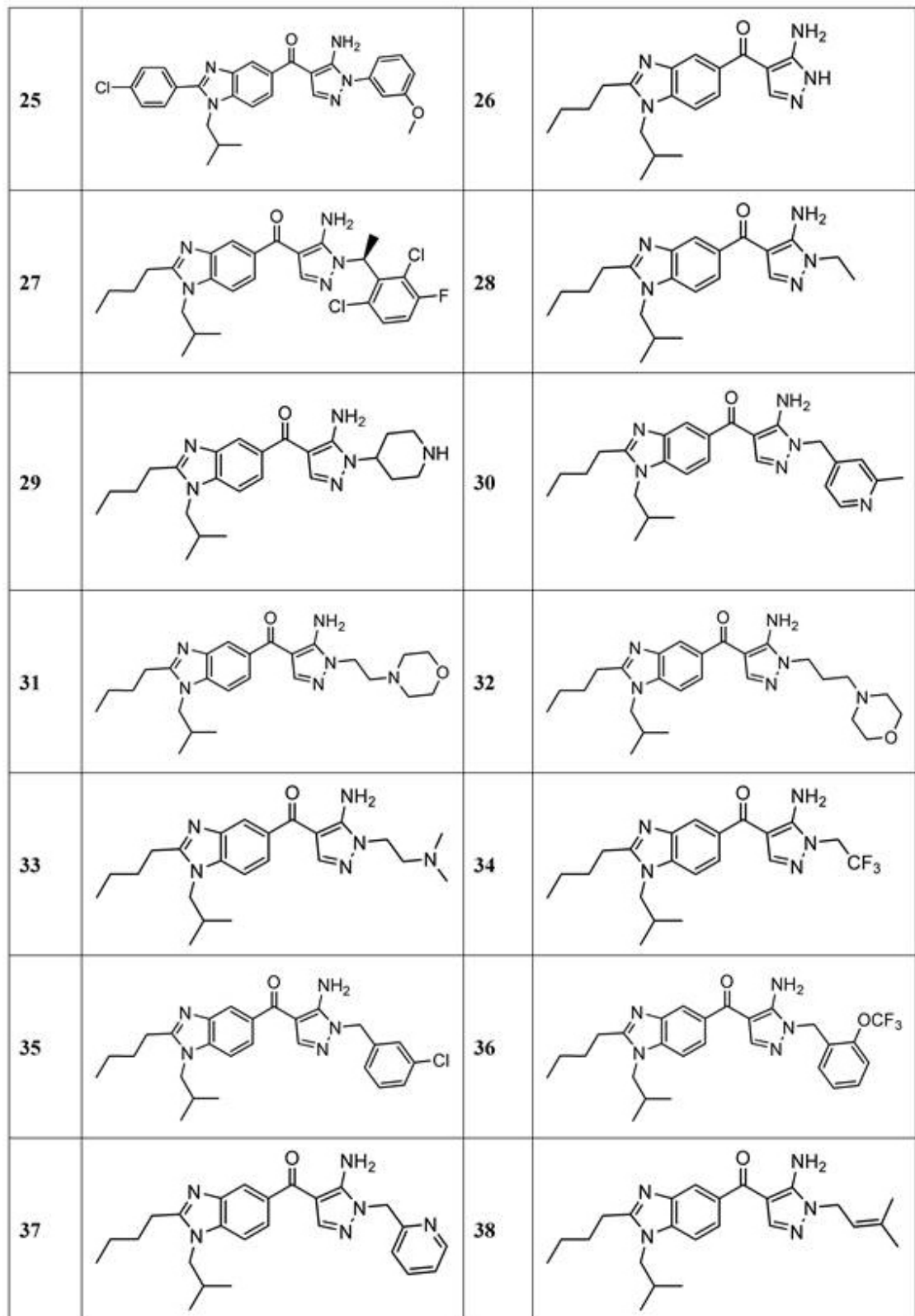
[0222]

[0223] 另外,参考实施例1的方法,只要适当选择起始原材料,还可以合成出更加广泛的各种各样的衍生物,例如表2所列的化合物就是其中的一些典型的示例化合物。

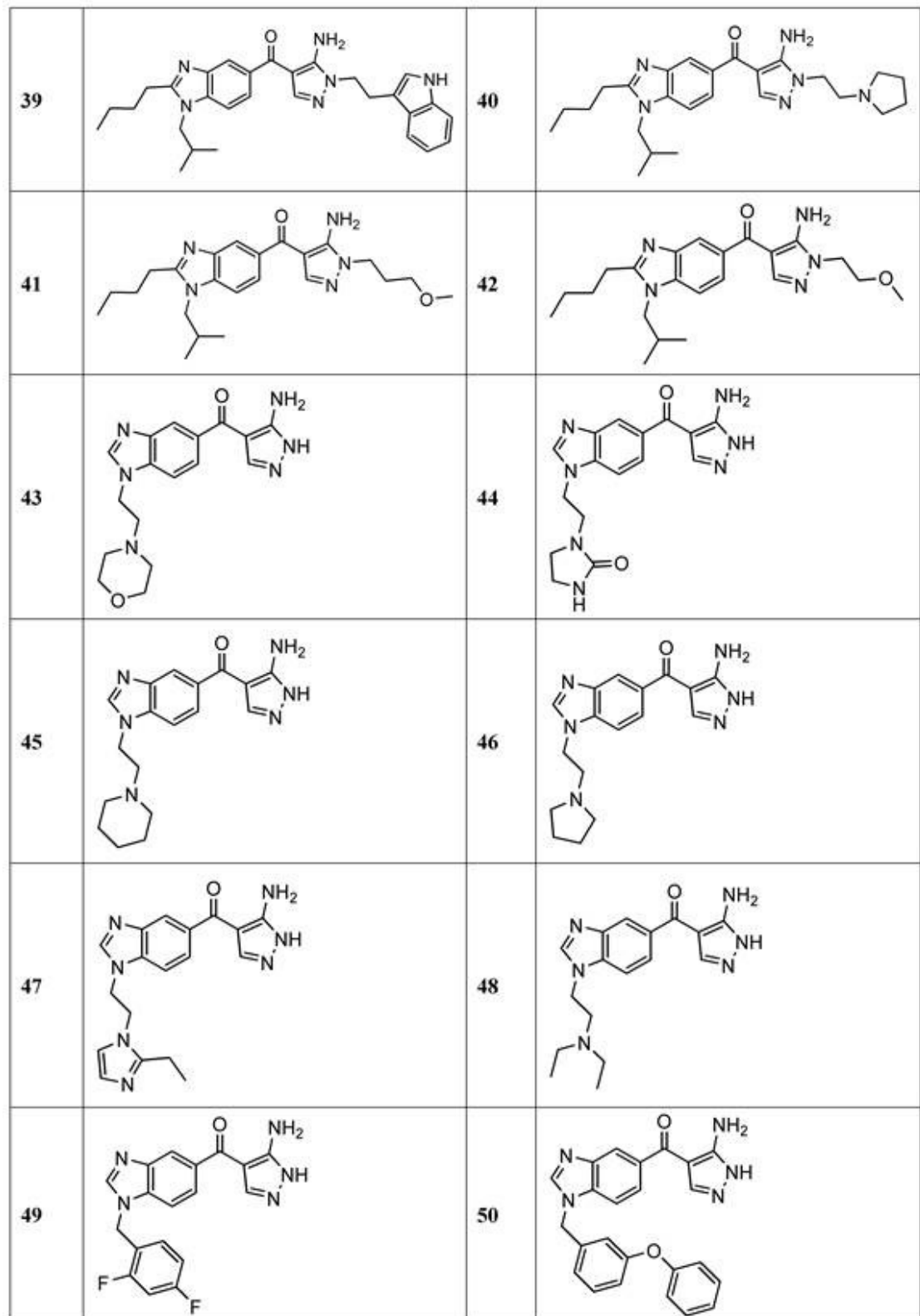
[0224] 表 2

[0225]

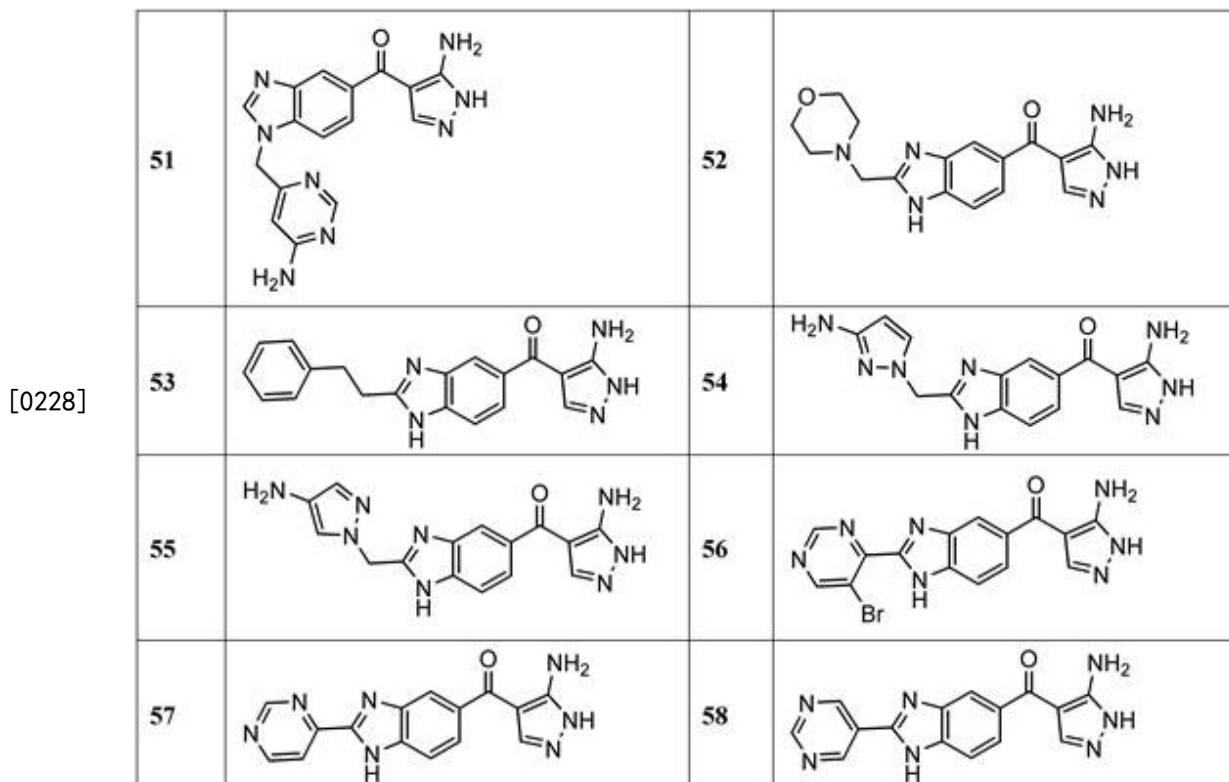




[0226]



[0227]



[0229] 生物实验和药效学分析

[0230] 1) 激酶活性的检测

[0231] 激酶活性的测试有较多的文献报道,同时也有相关的激酶检测试剂盒可供使用。可以选择来源于Promega公司产品但不限于:1)ADP-Glo™ Kinase Assay +RET ; 2) ADP-Glo™ Kinase Assay +RET (V804L); ADP-Glo™ Kinase Assay +RET (Y791F) 。以ADP-Glo™ 激酶检测试剂盒对RET激酶抑制活性的检测为例,实验步骤如下:

[0232] 首先,配置1X 的RET激酶缓冲液与50 μM 的ATP溶液待用。取5X的缓冲液800 μL, DTT 2 μL和1198 μL的去离子水配置成2X的缓冲液,然后再取2X的缓冲液1000 μL和1000 μL的去离子水配置成1X的缓冲液待用。吸取5 μL的ATP溶液(10 mM)于500 μL和500 μL的2X缓冲液中,配置成50 μM的ATP溶液待用。

[0233] 其次,激酶与化合物浓度配置。吸取5 μL的激酶(1 μg/μL)溶液于995 μL的1X激酶缓冲液中,得到5 ng/μL的激酶溶液,然后再稀释200X至0.25 ng/μL备用。化合物用DMSO配置成10 mM的存储液,然后用DMSO稀释至2 mM,最后用1X缓冲液稀释10X至 200 μM备用。由于测试反应中的总体积为20 μL,所以化合物的最终测试浓度为10 μM。

[0234] 最后,激酶与底物反应。本实验共设置3个实验组,其中阳性对照组加入1 μL的D4476溶液,药物实验组加入1 μL的被测化合物溶液,空白对照组加入5%的DMSO激酶缓冲液1μL。于384孔板中分别加入2 μL的TGFβR1激酶溶液,1 μL的TGFβR1多肽和1 μL 50 μM的ATP溶液,室温下孵育1 h。加入5 μL的ADP-Glo™ 试剂,去除剩余的ATP,室温下孵育40 min。加入10μL的激酶检测试剂,室温下孵育30 min。最后,在SpectraMax酶标仪上读板,读数间隔为1秒。

[0235] 2) 肿瘤细胞抑制活性GI<sub>50</sub>值的测定

[0236] 细胞活性测试采用MTT法(四氮唑盐还原法)来测试目标化合物的活性。其原理为:



在活细胞中,线粒体中的脱氢酶如NADPH可将黄色的MTT氧化为不溶性的蓝紫色结晶甲瓚(formazan);而当细胞死亡的时候,胞内的脱氢酶失去活性,不可将MTT转化为甲瓚。因此,细胞增殖抑制活性试验中formazan生成的量与细胞增殖程度成正比,与抗肿瘤药物的活性成反比,通过在酶标仪上检测formazan的吸光度(OD)值,即可根据计算公式得到化合物对肿瘤细胞的抗增殖活性数据。

[0237] 肿瘤细胞抑制活性的测试分三部分进行。为了迅速检测pan-RET对肿瘤细胞生长的影响,检测化合物对甲状腺细胞的TT(RET野生与突变肿瘤细胞)、TPC-1(RET突变细胞)和SW579(RET融合、TRK融合细胞)。以激酶为靶点,则检查目标化合物对:A549(非小细胞肺癌)、SGC-7901(胃癌细胞)、T47D(乳腺癌细胞)。最后,为了确定由针对性地检测目标化合物对KIF5B-RET融合细胞的生长抑制活性。

[0238] 实验所需试剂:1640基础培养基、DMEM基础培养基、胰酶、双抗、胎牛血清、MTT、DMSO。

[0239] (A)、具体实验操作方法与流程:

[0240] 1) 细胞复苏。从液氮保存罐中将冻存的细胞,立即放入37°C恒温水浴中震荡2 min,至细胞冻存液完全融化后,将细胞悬液移入15 mL离心管,缓慢加入4 mL培养液,离心(1000 r/min,5 min),弃上清,吸干原液,加5mL上述培养基,轻轻吹打至单细胞悬液,将其转移至培养瓶中,放入培养箱中培养。

[0241] 2) 细胞培养。将肿瘤细胞按要求的培养条件在37°C、5%CO<sub>2</sub>、100%相对湿度的培养箱中进行培养,每周将细胞传代3次,将处于对数生长期的细胞用于铺板。

[0242] 3) 细胞铺板。设置空白对照组(不加细胞和化合物)、阳性对照组和药物试验组。细胞浓度在每孔3000个左右适宜,在培养板中每孔加90微升细胞悬液,空白对照孔中加不含细胞悬液的培养液后,将培养板在37°C、5% CO<sub>2</sub>及100%相对湿度的培养基中培养过夜。

[0243] 4) 制备化合物存储板。称取化合物溶于DMSO中,配置成1 mM存储液,向V型底的配药板中配置系列梯度浓度的化合物(包括对照品)溶液。使药物最终在96孔板中的起始浓度为100 μM,按3倍梯度用无血清培养基稀释。

[0244] 5) 将不同浓度梯度的药物加入至96孔的细胞培养板中,10 μL/孔。空白组只加培养基,每个浓度设置3个复孔。在细胞培养箱中培养72h。

[0245] 6) MTT检测。细胞用药物处理72小时后,小心吸出培养基,向每孔加入20 μL的5 mg/mL的MTT溶液,所有步骤均需在无菌避光环境中操作;将96孔板放在室温避光条件下培养4小时;加入150 uL的DMSO,震荡10 min后,在450 nm波长处测量吸光度。

$$[0246] \quad \text{抑制率 (\%)} = \frac{\text{吸光平均值}_{\text{空白对照}} - \text{吸光平均值}_{\text{化合物}}}{\text{吸光平均值}_{\text{空白对照}}} \times 100\%$$

[0247] 最后利用Graphpad prism5软件中以化合物浓度对数-抑制率进行非线性回归分析,得到化合物抑制细胞增殖的IC<sub>50</sub>值。

[0248] (B)、化合物对非小细胞肺癌细胞活性测定

[0249] 以下方法用于测定化合物对肿瘤细胞增殖的影响通过采用MTT法来进行测定。针对RET等激酶抑制剂,采用非小细胞肺癌细胞A549(购于中南大学湘雅细胞库),按照相应条件培养。

[0250] 实验方法简述如下:受试化合物首先溶解于DMSO中制备为储存液,然后按照一定的浓度梯度进行稀释,配置成测试样品,化合物的终浓度范围在10 $\mu$ M-4.57nM。将处于对数生长期的细胞以适宜的密度接种至96孔细胞培养板中,于37 $^{\circ}$ C、5%的二氧化碳培养箱中过夜后,加入测试化合物样品后继续培养72小时。培养结束后,向每孔加入适宜体积的MTT溶液,并在室温条件下培养4小时。加入适宜体积的DMSO,震荡10 min 后,在450 nm波长处测量吸光度。通过与对照组的吸光度值进行比较计算化合物在各浓度点的百分比抑制率,之后在Graphpad prism5软件中以化合物浓度对数-抑制率进行非线性回归分析,得到化合物抑制细胞增殖的IC<sub>50</sub>值。

[0251] (C)、化合物对胃癌细胞活性测定

[0252] 以下方法用于测定化合物对肿瘤细胞增殖的影响通过采用MTT法来进行测定。针对RET等激酶抑制剂,采用胃癌细胞SGC-7901(购于中南大学湘雅细胞库),按照相应条件培养。

[0253] 实验方法简述如下:受试化合物首先溶解于DMSO中制备为储存液,然后按照一定的浓度梯度进行稀释,配置成测试样品,化合物的终浓度范围在10 $\mu$ M-4.57nM。将处于对数生长期的细胞以适宜的密度接种至96孔细胞培养板中,于37 $^{\circ}$ C、5%的二氧化碳培养箱中过夜后,加入测试化合物样品后继续培养72小时。培养结束后,向每孔加入适宜体积的MTT溶液,并在室温条件下培养4小时。加入适宜体积的DMSO,震荡10 min 后,在450 nm波长处测量吸光度。通过与对照组的吸光度值进行比较计算化合物在各浓度点的百分比抑制率,之后在Graphpad prism5软件中以化合物浓度对数-抑制率进行非线性回归分析,得到化合物抑制细胞增殖的IC<sub>50</sub>值。

[0254] (D)、化合物对乳腺癌细胞活性测定

[0255] 以下方法用于测定化合物对肿瘤细胞增殖的影响通过采用MTT法来进行测定。针对RET等激酶抑制剂,采用乳腺癌细胞T47D(购于中南大学湘雅细胞库),按照相应条件培养。

[0256] 实验方法简述如下:受试化合物首先溶解于DMSO中制备为储存液,然后按照一定的浓度梯度进行稀释,配置成测试样品,化合物的终浓度范围在10 $\mu$ M-4.57nM。将处于对数生长期的细胞以适宜的密度接种至96孔细胞培养板中,于37 $^{\circ}$ C、5%的二氧化碳培养箱中过夜后,加入测试化合物样品后继续培养72小时。培养结束后,向每孔加入适宜体积的MTT溶液,并在室温条件下培养4小时。加入适宜体积的DMSO,震荡10 min 后,在450 nm波长处测量吸光度。通过与对照组的吸光度值进行比较计算化合物在各浓度点的百分比抑制率,之后在Graphpad prism5软件中以化合物浓度对数-抑制率进行非线性回归分析,得到化合物抑制细胞增殖的IC<sub>50</sub>值。

[0257] 代表性化合物的肿瘤细胞抑制活性的结果见表3。这些数据指出本发明的化合物对于多种肿瘤细胞生长的抑制具有高度活性,尤其是结肠癌、小细胞肺癌等细胞系,并且对正常细胞毒性较低。

[0258] 表3 目标化合物对肿瘤细胞株的生长抑制活性

[0259]

| 化合物 | A549 GI <sub>50</sub> ( $\mu$ M) | SGC-7901 GI <sub>50</sub> ( $\mu$ M) | T47D GI <sub>50</sub> ( $\mu$ M) |
|-----|----------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|
| 1   | 0.038                            | 0.033                                | 0.019                            |
| 2   | 0.097                            | 0.086                                | 0.013                            |

|   |       |       |       |
|---|-------|-------|-------|
| 3 | 0.015 | 0.013 | 0.040 |
| 4 | 0.067 | 0.034 | 0.044 |
| 5 | 0.055 | 0.052 | 0.066 |

[0260] 3) 本发明示例化合物在小鼠肝微粒体代谢清除

[0261] 将10mM的阳性对照药维拉帕米(verapamil)和化合物均作200倍稀释,设置6个反应时间段(分别为0min,5min、15min、30min、45min、60min),每孔作三个复孔。实验设置time zero对照孔和阴性对照(不含孵育液,没有酶),每个化合物和阳性药均设置两个阴性对照浓度(分别为5 uM和2.5 uM)。已稀释的阳性药和化合物分别与预热至37°C的孵育液(用Milli-Q超纯水配制,内含100mM磷酸钾缓冲液、NADPH 溶液B、NADPH 溶液A和小鼠肝微粒体)混匀,置37°C,10min。在另一96孔板(称检测板)对应每孔里先加好100u1终止液(80%乙腈+20%DMSO,均为HPLC级别)。依次在反应时间点0min,5min、15min、30min、45min、60min,从对应孔里取50u1至检测板里的终止液击打混匀,置冰上;然后分别从阴性对照孔里取50u1至检测板对应孔的终止液击打混匀,置冰上,盖上盖。4°C离心,2000rpm,15min,每孔取100u1上清液进行LC/MS分析(或在LC/MS分析前置4°C保存)。

[0262] 使用分析软件:Prism4.0,根据数据计算化合物的残余量%remaining,并根据软件方程 $y=y_0e^{-kt}$ 制作%remaining对应时间曲线,利用软件计算化合物的 $t_{1/2}$ 。结果将以TOP, K,  $t_{1/2}$  (min),R2值和%remaining对应时间曲线呈现。

[0263] 4) 本发明化合物的体内抗肿瘤活性:

[0264] 选择体外活性强,低毒的部分化合物用来测定在小鼠体内的最大耐受剂量(MTD)。本发明的化合物在体内的抗肿瘤活性是在人癌裸鼠异体移植肿瘤模型上进行测定的,探索受试化合物产生药效作用的给药剂量、给药途径、给药频率和周期。

[0265] 取5-6周龄雌性BALB/C裸鼠,体重约18-20克,饲养。建造人癌裸鼠异体移植性肿瘤模型:人结肠癌细胞株co1o205、人类乳腺癌细胞株MDA-MB435、人类肺癌细胞株A549来自ATCC,培养,将单层培养的肿瘤细胞消化脱壁后,收集并重悬于不含血清的培养液,调整到浓度 $5 \times 10^6/0.2\text{ml}$ ,放于冰盒中携至动物房,直接用带6号针头的注射器取0.2 ml细胞悬液移植于裸鼠左腋窝后方肩胛部皮下, $5 \times 10^6/0.2\text{ml}/\text{只}$ ,每2-3天测一次成瘤体积,两周后选择肿瘤生长旺盛且无溃破的荷瘤裸鼠,在无菌条件下,取出肿瘤,将瘤组织剪成直径约2-3 mm接种于裸鼠左腋窝后方肩胛部皮下,传三代后,当肿瘤体积生长至 $100\text{mm}^3$ 时去掉瘤块过大或过小的裸鼠随机分组给药。

[0266] 随机分5个组,包括阴性对照组(溶媒),阳性对照组(SAHA,4mg/kg),高中低三个剂量的治疗组(分别为20mg/kg,12mg/kg,4mg/kg,其中高剂量低于MTD),每组8只裸鼠,其中阴性对照组为16只,腹腔注射给药,每周一次,连续4周。期间每3天检测动物体重,瘤体积并记录动物死亡数。末次给药后24小时处死动物,测量肿瘤体积大小、瘤重、裸鼠体重,绘制肿瘤体积生长曲线、裸鼠体重生长曲线和肿瘤抑制率,动物死亡率,计算相对肿瘤增殖率T/C(%),根据公式 $T/C(\%) = \text{TRTV} / \text{CRTV} * 100\%$ 。(TRTV:治疗组RTV ;CRTV:阴性对照组RTV,相对肿瘤体积 $\text{RTV} = V_t / V_0$ ,其中 $V_0$ 为分组给药时肿瘤体积, $V_t$ 为给药后肿瘤体积)。本发明的示例化合物的体内抗肿瘤药效的相对肿瘤增殖率T/C(%)  $\leq 40\%$ ,并且差异有统计学意义,具有明显药效作用。

[0267] 体内抗肿瘤抑制活性除了使用相关的肿瘤细胞株外,还要使用相关的工程株,例

如KIF5B-RET融合肿瘤细胞株。

[0268] 说明于本发明的特定实例的细节并非用于被推断为其限制。可在不背离本发明的本质及范围的情况下进行各种改变、同义及修饰,且已知这些改变、同义及修饰的具体实施方案是本发明之一部份。