

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日
2007 年 10 月 18 日 (18.10.2007)

PCT

(10) 国际公布号
WO 2007/115473 A1

(51) 国际专利分类号:

C07D 487/04 (2006.01) **A61P 17/06** (2006.01)
A61K 31/407 (2006.01) **A61P 19/02** (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01) **A61P 29/00** (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01) **A61P 43/00** (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)

(30) 优先权:

200610072406.6

2006 年 4 月 11 日 (11.04.2006) CN

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 上海恒瑞医药有限公司(SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO. LTD.) [CN/CN]; 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2007/000980

(22) 国际申请日: 2007 年 3 月 27 日 (27.03.2007)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

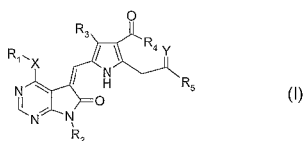
(72) 发明人; 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): 邓炳初(TANG, Peng Cho) [CN/CN]; 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。 苏熠东(SU, Yidong) [CN/CN]; 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。 张蕾(ZHANG, Lei) [CN/CN]; 中国上

[见续页]

(54) Title: PYRROLE DERIVATIVES INHIBITORS, THEIR CURATIVE USES

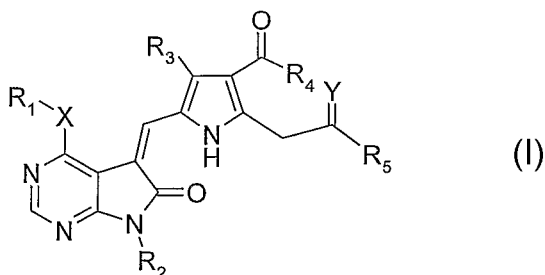
(54) 发明名称: 吡咯衍生物抑制剂及其在医药上的应用



(57) Abstract: The present application discloses 2-acetamido-3-carbomethoxy-5-(6,7-dihydro- 6-oxo-4-arylamido pyrrolo[2,3-d]pyrimidine -5-)methylene-1H-pyrrole derivatives of general formula (I), processes for their preparation, the pharmaceutical compositions containing them and their uses as therapeutic agents especially as protein kinase inhibitors. The definitions of substituents in formula (I) are the same as description.

(57) 摘要:

本发明涉及一种通式(I)所示新的 2-乙酰胺基-3-甲酯基-5(6,7-二氢-6-氧代-4-芳胺基吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚基)甲基-1H-吡咯衍生物、制备方法及其含有它们的药物组合物和它们作为治疗剂特别是作为蛋白激酶抑制剂的用途,其中通式(I)中的各取代基同说明书中的定义相同。



WO 2007/115473 A1



海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。
肖璐(XIAO, Lu) [CN/CN]; 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。赵松竹(ZHAO, Songzhu) [CN/CN]; 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。胡兵(HU, Bing) [CN/CN]; 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。

(74) 代理人: 北京纪凯知识产权代理有限公司(JEEKAI & PARTNERS); 中国北京市西城区宣武门西大街甲129号金隅大厦602室, Beijing 100031 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU,

LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码及其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

吡咯衍生物抑制剂及其在医药上的应用

技术领域

本发明涉及一种新的 2-乙酰胺基-3-甲酯基-5(6,7-二氢-6-氧代-4-芳氨基吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚基)甲基-1H-吡咯衍生物、其制备方法及其含有它们的药物组合物和它们作为治疗剂特别是作为蛋白激酶抑制剂的用途。

背景技术

细胞的信号传导是一种基础的作用机制，在信号传导过程中，来自细胞外的刺激被传递到细胞内部，进而调节不同细胞的进程。这些信号可调节多种生理响应，包括细胞增殖、分化、凋亡和运动等，它们以不同种类溶解因子形式存在，包括以旁分泌因子、自分泌因子和内分泌因子为主的生长因子。通过与特定跨膜受体结合，生长因子配体将细胞外信号传递到细胞内信号途径，从而引起个体细胞对细胞外信号的反应。很多信号传递过程是利用蛋白磷酸化的可逆过程，涉及到特定蛋白激酶和磷酸化酶。

蛋白激酶 (PKs)是对蛋白质的酪氨酸、丝氨酸、苏氨酸残基上的羟基的磷酸化起催化作用的酶。在信号传导过程中，蛋白激酶和磷酸化酶的反向机制能够平衡和调节信号流。一个蛋白质磷酸化状态能影响其构象、酶的活性、细胞定位，蛋白激酶和磷酸酶的相应作用被修改，磷酸化在信号传导中是一个重要的调节机制，在信号传导过程中的异常会导致细胞的非正常分化、转化和生长。例如，细胞可通过将其一部分 DNA 转化为致癌基因而成为癌细胞，酪氨酸激酶就是这样的致癌基因所编码的生长因子受体蛋白；酪氨酸激酶还可以突变为活化形式而导致多种人类细胞的变异，也可以说，过度表达的正常酪氨酸激酶可以引起不正常细胞增殖。

酪氨酸激酶(PKs)可以方便地分成两类：蛋白酪氨酸激酶(PTKs)和丝氨酸—苏氨酸激酶(STKs)。 PTKs 使蛋白质上的酪氨酸残基磷酸化， STKs 使蛋白质上的丝氨酸、苏氨酸残基磷酸化。酪氨酸激酶不仅可以是受体型(包括细胞外域、细胞内域和跨膜细胞域)还可以是非受体型(包括全部细胞内域)。PTK 活性的一个主要方面是它们涉及到作为细胞表面蛋白生长因子受体。具有 PTK 活性的生长因子受体被称为受体酪氨酸激酶 (“RTKs”)，在人类基因中 90 种酪氨酸激酶被识别，其中约 60 种是受体型，约 30 种是非受体型，这些生长因子受体家族可进一步分为 20 种受体酪氨酸激酶亚族和 10 种非受体酪氨酸激酶亚族(Robinson 等, *Oncogene*, 2000, 19, 5548-5557)。

RTKs 亚族包括以下几种: (1)EGF 族, 如 EGF, TGF α , Neu 和 erbB 等; (2) 胰岛素家族, 包括胰岛素受体、胰岛素样生长因子 I 受体(IGF1)和胰岛素受体相关性受体(IRR)); (3)III 型家族, 如血小板衍生生长因子受体(PDGF, 包括 PDGF α 和 PDGF β 受体)、干细胞因子 RTKs(SCF RTK, 通常称作 c-Kit)、fms-相关酪氨酸激酶 3(Flt3)受体酪氨酸激酶和集落刺激因子 1 受体(CSF-1R)酪氨酸激酶等。它们在控制细胞生长及分化方面起着关键的作用, 也是导致产生生长因子和细胞因子的细胞信号的关键传递者(参见 Schlessinger and Ullrich, *Neuron* 1992, 9, 383)。

一部分非限制性激酶包括 Abl, ARaf, ATK, ATM, bcr-abl, Blk, BRaf, Brk, Btk, CDK1, CDK2, CDK3, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7, CDK8, CDK9, CHK, AuroraA, AuroraB, AuroraC, cfms, c-fms, c-Kit, c-Met, cRaf1, CSF1R, CSK, c-Src, EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4, ERK, ERK1, ERK2, Fak, fes, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FGFR5, Fgr, FLK-4, Fps, Frk, Fyn, GSK, gsk3a, gsk3b, Hck, Chk, Axl, Pim-1, Plh-1, IGF-IR, IKK, IKK1, IKK2, IKK3, INS-R, Integrin-linked kinase, Jak, JAK1, JAK2, JAK3, JNK, JNK, Lck, Lyn, MEK, MEK1, MEK2, p38, PDGFR, PIK, PKB1, PKB2, PKB3, PKC, PKCa, PKCb, PKCd, PKCe, PKCg, PKC1, PKCm, PKCz, PLK1, Polo-like kinase, PYK2, tie₁, tie₂, TrkA, TrkB, TrkC, UL13, UL97, VEGF-R1, VEGF-R2, Yes 和 Zap70 等。人们认为 PKs 与中枢神经系统疾病如老年痴呆症(参见 Mandelkow, E. M. 等. *FEBS Lett.* 1992, 314, 315; Sengupta, A. 等. *Mol. Cell. Biochem.* 1997, 167,99)、痛感(参见 Yashpal, K. J. *Neurosci.* 1995, 15, 3263-72)、炎症例如关节炎 (参见 Badger, J. *Pharmn Exp. Ther.* 1996, 279, 1453)、牛皮癣(参见 Dvir, 等, *J. Cell Biol.* 1991, 113, 857)、骨骼疾病例如骨质疏松(参见 Tanaka 等, *Nature*, 1996, 383, 528)、癌症 (参见 Hunter and Pines, *Cell* 1994, 79, 573)、动脉硬化症(参见 Hajjar and Pomerantz, *FASEB J.* 1992, 6, 2933)、血栓症 (参见 Salari, *FEBS* 1990,263,104)、代谢紊乱如糖尿病 (参见 Borthwick, A. C. 等. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995,210,738)、血管增生性疾病如血管生成(参见 Strawn 等 *Cancer Res.* 1996, 56, 3540; Jackson 等 *J. Pharm. Exp. Ther.* 1998, 284, 687)、自身免疫疾病和移植排斥反应 (参见 Bolen and Brugge, *Ann. Rev. Immunol.* 1997, 15, 371)、传染病如病毒 (参见 Littler, E. *Nature* 1992,358,160)和真菌感染(参见 Lum, R. T. PCT Int Appl., WO 9805335 A1 980212)等疾病的靶点有密切的联系。

PTKs 信号传导过程中, 特定生长因子(配体)之间在细胞外相互作用, 随后受体二聚, 瞬间内激活蛋白激酶的内在活性, 并进行磷酸化。内部信号传导分子的结合位点产生, 生成了与细胞质信号分子的复合物, 促进各种细胞应答例如细胞分裂(增殖), 对胞外微环境代谢作用的表达等。

受体酪氨酸激酶磷酸化的结合位点也是与信号传导分子 SH2(与 src 同源)域具有高度亲和力的结合位点。很多与受体酪氨酸激酶相关的细胞内底物蛋白已被

确定,可分为两类:(1)有催化区底物(2)无催化区底物,但可作为结合体,且与某些有催化活性的分子相关。受体或蛋白与底物 SH2 域相互作用的特异性是通过靠近磷酸化酪氨酸残基的氨基酸序列来确定的,SH2 域与磷酸化酪氨酸序列周围的氨基酸序列与特定受体结合的差异性与底物磷酸化的差异性是一致的。蛋白酪氨酸激酶机能可通过表达模式和配体可用性来确定,也可由特定受体激活的下游区信号传导路径来确定。因此,磷酸化提供了一个重要可调节的步骤,此步骤可确定由特定受体激活的信号传导的选择性和分化因子受体。受体酪氨酸激酶的非正常表达或突变可能导致不可控制的细胞增殖(如恶性肿瘤生长)或关键发展过程的缺失等。

酪氨酸激酶,在大部分人类肿瘤,如白血病、乳腺癌、前列腺癌、非小细胞肺癌(包括腺癌、肺鳞状上皮细胞癌)、胃肠癌(包括结肠癌、直肠癌和胃癌)、膀胱癌、食管癌、卵巢癌、胰腺癌等癌症中,都会出现突变或过度表达。通过对人类肿瘤细胞进行检测,酪氨酸激酶广泛性与关联性进一步得到了确认。例如:在人类癌症包括肺癌、脑癌、颈癌、胃肠癌、乳腺癌、食管癌、卵巢癌、子宫癌、膀胱癌和甲状腺癌中,EGFR 酪氨酸激酶会发生突变和过度表达。

"HER" 或 "Erb" 受体酪氨酸激酶亚族包括 EGFR,HER2,HER3 和 HER4。这些亚族由胞外糖基化配体结合域、跨膜域及可将蛋白质上的酪氨酸序列进行磷酸化的胞内细胞质催化域所组成。受体酪氨酸激酶催化活性可通过受体过度表达或配体介导二聚合被激活。HER2 家族聚合体有同型二聚体和异型二聚体两种形式。同型二聚化的一个例子是 HER1(EGFR)与 EGF 家族配体(包括 EGF, 转化生长因子 α , betacellulin, 与肝磷脂结合的 EGF, epiregulin) 的聚合,四种 HER 酪氨酸激酶之间的异型二聚合可通过与 heregulin(也叫 neuregulin)家族配体的结合被加速。虽然 HER3 的受体之一没有酶活性,但 HER2 与 HER3, 或 HER3 与 HER4 的异型二聚也可显著地刺激酪氨酸激酶受体二聚合。在各种类型细胞中,受体过度表达可激活 HER2 激酶的活性。受体同型二聚体和异型二聚体的激活可将受体和其他细胞内蛋白质酪氨酸序列进行磷酸化,随后细胞内信号途径如微管相关蛋白激酶(MAP 激酶)和磷脂酰肌醇(-3)激酶(PI3 激酶)也被激活,这些信号途径的激活促使细胞增殖,抑制细胞凋亡。

RTK 另一个亚族包括胰岛素受体(IR), 胰岛素样生长因子-1 受体(IGF-1R), 胰岛素受体相关受体(IRR)。IR, IGF-1R 与胰岛素, IGF-I 和 IGF-II 相互作用,生成了由两种完全胞外糖基化 α 亚基和两个穿过细胞膜且含有酪氨酸激酶域 β 亚基构成的异四聚体。

RTK 第三个亚族是指血小板源生长因子受体(PDGFR)族,其中包括 PDGFR α , PDGFR β , CSFIR, c-Kit 和 c-fms。这些受体由含有各种免疫球蛋白样环糖基化胞外域和一个胞外域所组成,其中胞内域中酪氨酸激酶区被不相关的氨基酸序列阻

断。

血小板源生长因子受体,如 PDGFR α 和 PDGFR β 等也是跨膜酪氨酸激酶受体。当它们与配体相结合时,或形成同型二聚物(PDGF-AA, PDGF-BB),或异型二聚物(PDGF-AB)。随后受体二聚,酪氨酸激酶被活化,向下游区发信号来促进肿瘤生长。基因突变是受体不依赖于与配体结合而被激活的原因,也是肿瘤生成的驱动力。在多种不同的肿瘤细胞株内,特别是乳房癌、结肠癌、卵巢癌、前列腺癌、肉瘤和胶质瘤的细胞中,都发现能够激活 PDGFR 生长因子—PDGF 的表达,其中脑瘤,前列腺癌(包括腺癌和骨转移癌)恶性神经胶质瘤研究数据有研究价值。

c-Kit是PDGF受体家族的成员,当其与配体SCF(干细胞因子)相结合时,活性被激活。在各种不同的实体瘤中对c-Kit表达模式进行了研究,在肉瘤,胃肠道胶质瘤(GIST),精原细胞瘤和类癌瘤中,c-Kit有过量表达。[参见Weber 等, *J. Clin. Oncol.* 22(14S), 9642 (2004)]。GIST是一种非上皮细胞瘤,大多数存在于胃部,少数分布于小肠,在食道中存在很少,也有分布在肝、腹膜腔等部位。GIST源于Cajal 间质细胞(ICC), ICC可部分形成肠自主神经系统,参与控制胃动力。大多数(50 ~ 80%)GIST产生是由于c-Kit基因发生突变,在消化道内,c-Kit/CD117染色阳性的一般都为GIST, c-Kit突变能够使其不依赖于SCF激活便具有c-Kit机能,从而使细胞分裂率增加,导致基因组的不稳定。在畸变肥大细胞瘤、肥大细胞增生病、骨髓增生综合征、荨麻疹等疾病中,也可检测到c-Kit的表达,在急性AML和恶性淋巴瘤中也有c-Kit的表达,在小细胞支气管癌、精原细胞瘤、无性细胞瘤、睾丸、上皮内瘤样变、黑素瘤、乳房癌、成神经细胞瘤、尤因肉瘤都有c-Kit 表达(参见 Schütte et al., *innovartis* 3/2001)。众所周知,RET(rearranged during transfection)。原癌基因点遗传突变是致瘤的,患有多发性内分泌腺瘤病2 (MEN 2) 病人可能会导致患有嗜铬细胞瘤、甲状腺髓样癌和甲状旁腺腺瘤和增生等病症(见 Huang et al., *Cancer Res.* 60, 6223-6 (2000))。

因胎肝激酶(Flk)受体亚族与PDGFR亚族很相似,有时被归于该族。此亚族由含激酶插入域-受体胎肝激酶-1(KDR/FLK-1, VEGFR2)、Flk-1R, Flk-4和fms样酪氨酸激酶1 (Flt-1)所组成。

酪氨酸激酶生长因子受体家族的另外一个成员是成纤维细胞生长因子(FGF)受体亚族。此亚族由四个受体, FGFR1-4、七个配体和FGF1-7组成。虽然目前尚未确定,但这些受体是由包含各种免疫球蛋白样环糖基化的一个胞外域和一个其中酪氨酸激酶序列被不相关的氨基酸序列所阻断的细胞内域组成。

酪氨酸激酶生长因子受体家族的另外一个成员是血管内皮生长因子(VEGF)受体亚族。与PDGF相似, VEGF是二聚糖蛋白,但生物学功能和体内靶细胞特异性不同。特别是, VEGFR与血管生成有关,通过抑制VEGFRs来抑制血管生成,

正应用于临床治疗肿瘤，且取得了较好疗效。VEGF在各种恶性实体肿瘤中，如肺癌、乳腺癌、非霍奇金恶性淋巴瘤、卵巢癌、胰腺癌、恶性胸膜间皮瘤和黑素瘤有强烈表达，且与癌变进程相关，在白血球过多症和淋巴瘤中也有表达。除了其血管生成活性，VEGFR, VEGF配体也可以通过在肿瘤细胞内直接通过pro-survival性质促进肿瘤生长，PDGF也具有血管生成作用。新生血管生成的过程对于肿瘤持续生长起着关键作用，正常情况下，新生血管的生成在人的生理过程如胚胎生长、伤口愈合和女性生殖的各个过程都是非常重要的。然而，非预料或者病理学上的血管生成却与疾病的一系列状态相关，如糖尿病视网膜病、牛皮癣、癌症、类风湿性关节炎、动脉粥样化、卡波济(氏)肉瘤和血管瘤等。血管内皮细胞的生成激活血管生成，具有刺激体内血管内皮细胞中的的生成活性一些多肽已经被确认，包括酸性、碱性的成纤维细胞生长因子(aFGF and bFGF)和血管内皮生长因子。由于VEGF受体的限制表达，其生长因子的活性与aFGF and bFGF活性相比，对内皮细胞相对来讲具有特异性。最近的证据表明，VEGF在正常情况和病理学情况下的血管生成和血管渗透过程中，都是非常重要的刺激剂。VEGF能够诱导血管萌芽表型，它诱导内皮细胞增殖、蛋白酶的表达和迁移来促进毛细血管生成，从而形成超渗透、不成熟的血管网络，这是典型的病理学血管生成的典型特征。人们期望拮抗VEGF活性在治疗与血管生成作用或者血管渗透性相关的疾病如肿瘤特别是抑制肿瘤生长能够有应用的价值。

FLT3(Fms 样酪氨酸激酶)是酪氨酸激酶(PTK)III 型家族成员，在成人和幼儿急性髓细胞样白血病(AML)、急性髓细胞样白血病、骨髓增生异常综合征等白血球过多症中，FLT3 基因非正常表达。35%的急性髓细胞样白血病病人的 FLT3 突变被激活且预后不良，大多数的突变都有在近膜域的结构内复制的现象，5—10%的病人天冬酰胺 835 发生点突变，FLT3 的酪氨酸激酶活性被激活，致使在配体缺失的情况下也有信号存在且发生增殖。据研究，有突变形式受体表达的患者治愈的几率降低。总之，在人白血球过多症和骨髓增生异常综合征中，FLT3 突变都与肿瘤的发生相关。

经证实肝细胞生长因子(HGF)受体(c-MET 或 HGFR)酪氨酸激酶与肿瘤生成、增强细胞运动性、侵袭和转移密切相关(参见 Ma, P.C 等(2003b). *Cancer Metastasis Rev*, 22, 309-25; Maulik, G.等 (2002b). *Cytokine Growth Factor Rev*, 13, 41-59)。各种肿瘤包括小细胞肺癌(SCLC)中的过度表达或突变可激活c-MET(HGFR)(参见 Ma, P.C.等 (2003a). *Cancer Res*, 63, 6272-6281)。

原癌基因 c-Met 编码肝细胞生长因子受体,是具有酪氨酸激酶活性的细胞膜糖蛋白,对多种细胞增殖、分化具有重要的生理调节作用.c-met 基因在许多恶性肿瘤中过表达,是甲状腺滤泡上皮细胞癌变的重要因素,并与甲状腺癌的病理分期、侵袭及转移密切相关。

关于 PKT 亚族, Plowman 等在 *DN&P* 7(6): 334-339 (1994)中有更为详细描述, 该文献作为一整体通过引用结合到本文中。

除了 PTKs 以外, 还存在另外的细胞酶家族, 称作受体酪氨酸激酶抑制剂, 并在此使用后一名称, 缩写为“CTK”。CTKs 本身缺少细胞外域和跨膜域。目前, 已经在 11 个亚族(Src, Frk, Btk, Csk, Abl, Zap70, Fes/Fps, Fak, Jak, Ack 和 LIMK)中已经鉴定超过 24 种 CTKs。在目前为止, Src 亚族 CTKs 数目似乎最多, 包括 Src, Yes, Fyn, Lyn, Lck, Blk, Hck, Fgr 和 Yrk, 且 Src 亚族酶与肿瘤生成有关。关于 CTKs 更为详尽的描述, 可参见 iBolen, 1993, *Oncogen* 8: 2025-2031, 其全文包括任何附图作为一整体提出, 通过引用结合到本文中。

与 CTKs 相类似, 丝氨酸-苏氨酸激酶或 STKs, 在细胞内占据主导地位, 虽然仅有几种 STK 型受体激酶。STKs 是最普遍的细胞溶质激酶, 即它发挥其功能在部分细胞质中, 而不是在胞质细胞器中。胞质溶胶是细胞内一个区域, 在此大多数细胞中间代谢和生物合成活性发生; 如蛋白质是在胞质溶胶核糖体上进行合成的。

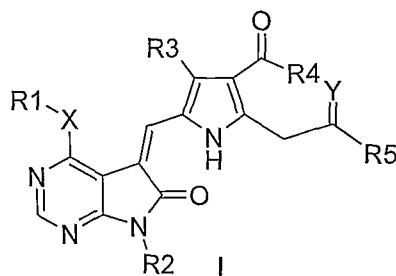
与过度增殖相关疾病如癌症等的特征之一是对细胞传导途径进行破坏, 细胞传导途径通过细胞周期来控制进程。在真核细胞中, 细胞周期与蛋白质的磷酸化有序的级联反应密切相关, 在信号传导的机制中, PKs 很多家族似乎在细胞分裂周期级联中都起着关键的作用。

关于癌症, 提出两个主要的假设解释过度细胞增殖, 该增殖驱动与已知由 PK 调节的功能相关的肿瘤发展。即, 人们觉得恶性肿瘤生长是由于控制细胞分裂或增殖的机制被破坏引起的。原癌基因蛋白质产物能够干扰调节细胞生长和增殖的信号传导途径, 这些原癌基因的蛋白质产物包括上面讨论的细胞外生长因子, 跨膜生长因子 PTK 受体(RTKs), 细胞质 PTKs(CTKs)和细胞溶质 STKs。

人们期待着能够合成具有抗肿瘤细胞增殖活性的抑制剂, 希望能够抑制 PTKs、CTKs或者STKs中的一种或者多种, 有效地治疗和改善由PTKs、CTKs或者STKs以及血管生成作用介导的超增殖生理紊乱。

发明内容

本发明涉及新型的 2-乙酰胺基-3-甲酯基-5(6,7-二氢-6-氧代-4-芳胺基吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚基)甲基-1H-吡咯类衍生物, 它们通式如下通式 (I) 所示:



其中：

X 选自 $W(CH_2)$ 、 $(CH_2)W$ 或 W ，其中 W 是 O 、 S 、 SO 或 SO_2 ；或 X 为 $-NR_6$ ，其中 R_6 是氢原子或烷基；

Y 为氧原子或氢原子；

当 X 是 $-NR_6$ ， R_6 是烷基，则 R_6 可以和 R_1 形成一个 4~8 元杂环基；其中 5~8 元杂环内可以含有一个或多个 N 、 O 或 S 原子，并且 4~8 元杂环上可以进一步被一个或多个选自烷基、卤素、芳基、杂芳基、卤代烷基、卤代烷氧基、羟基、氨基、烷氨基、酰胺基、胺酰基、氰基、烷氧基、芳氧基、胺烷基、羟烷基、杂环烷基、羧酸、羧酸酯或 $-NR_7R_8$ 的取代基所取代；

R_1 选自氢原子、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、芳烷基或杂芳烷基，其中烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、芳烷基或杂芳烷基可以进一步被一个或多个选自烷基、卤素、芳基、羟基、氨基、烷氨基、酰胺基、胺酰基、烷氧基、芳氧基、杂环烷基、羧酸、羧酸酯或 $-NR_7R_8$ 的取代基所取代；其中芳基、杂芳基、芳烷基或杂芳烷基可以并成双环；

R_2 选自氢原子、烷基、环烷基、杂环烷基、 $-(CH_2CH_2O)_nR_6$ 、烯基或炔基、 $-COOR_7$ 、 $-CONR_7R_8$ 、 $-C(=S)NR_7R_8$ 、 $-COR_7$ 、 $-SOR_7$ 、 $-SO_2R_7$ 、 $-SO_2NR_7R_8$ 或者 $-P(=O)(OR_7)(OR_8)$ ，其中烷基、环烷基、杂环烷基、烯基或炔基可以进一步被一个或多个选自烷基、羟基、烷氧基、氰基、氨基、烷氨基、羧酸或羧酸酯的取代基所取代；

R_3 选自氢原子、烷基、芳基、卤素取代的芳基或三氟甲基；

R_4 选自羟基、烷氧基、芳氧基、杂环烷氧基、芳烷氧基、 $-(OCH_2CH_2)_nR_6$ 、 $-N(R_7)(CH_2)_nR_8$ 、 $-NR_7[CH_2CH_2O]_nR_8$ 或者 $-NR_6(CH_2)_n[CH(OH)CH_2]_lZ$ ，其中 Z 是芳基、杂芳基、杂环烷基、 $-NR_7R_8$ 、 $-COOR_6$ 或 $CONR_7R_8$ ；

R_5 选自羟基、烷氧基、芳氧基、杂环烷氧基、芳烷氧基、 $-N(R_7)(CH_2)_nR_8$ 、 $-NR_7[CH_2CH_2O]_nR_8$ 或者 $-NR_6(CH_2)_n[CH(OH)CH_2]_lZ$ (其中 Z 是芳基、杂芳基、杂环烷基、 $-NR_7R_8$ 、 $-COOR_6$ 或 $CONR_7R_8$)；

R_6 是氢原子或烷基；

R_7 和 R_8 分别选自分别选自氢原子、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基或杂芳烷基，其中烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基或者杂芳烷基可以进一步被一个或多个的烷基、卤素、芳基、羟基、氨基、烷氨基、酰胺基、胺酰

基、氰基、烷氧基、芳氧基、胺烷基、羟烷基、杂环烷基、羧酸、羧酸酯或-NR₇R₈所取代；

同时，R₇和R₈可以形成一个4~8元杂环基；其中5~8元杂环内可以含有一个或多个N、O或S原子，并且4~8元杂环上可以进一步被一个或多个的烷基、卤素、芳基、杂芳基、卤代烷基、卤代烷氧基、羟基、氨基、酰胺基、胺酰基、氰基、烷氧基、芳氧基、胺烷基、羟烷基、杂环烷基、羧酸、羧酸酯或-NR₇R₈所取代。

n 是0~6；

r 是1~2。

在本发明的通式(I)所述的化合物或其盐中，更优选的是X是-NH，R₁是氢原子、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、芳烷基或杂芳烷基，其中烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、芳烷基或杂芳烷基可以进一步被一个或多个烷基、卤素、芳基、羟基、氨基、烷氨基、酰胺基、胺酰基、烷氧基、芳氧基、杂环烷基、羧酸、羧酸酯所取代。

在本发明的通式(I)所述的化合物或其盐中，优选的是Y是氧原子。

在本发明的通式(I)所述的化合物或其盐中，优选的是R₂是氢原子。

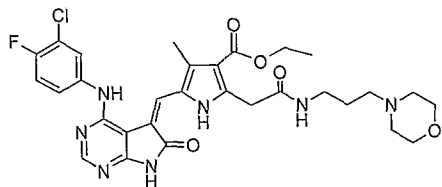
在本发明的通式(I)所述的化合物或其盐中，通式I-1c化合物在室温条件下经氢氧化锂溶液的选择性水解后得到通式I-1d化合物。

具体地，本发明的通式(I)所述的化合物或其盐包括：

实 施 结 构
例

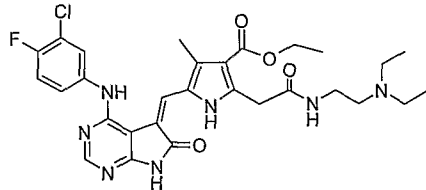
名称

1

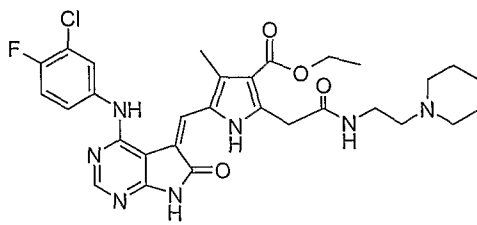
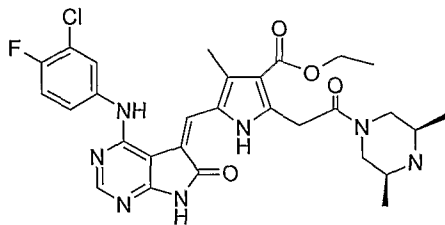
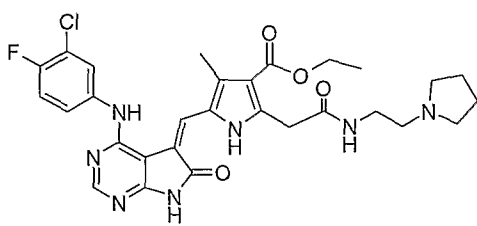
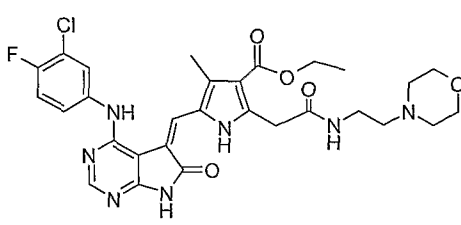
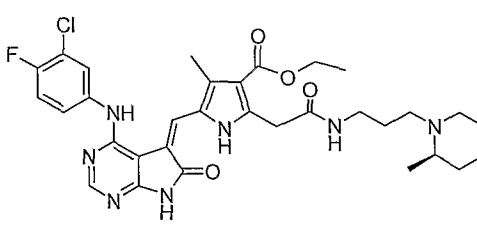
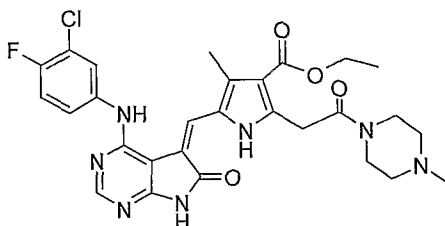
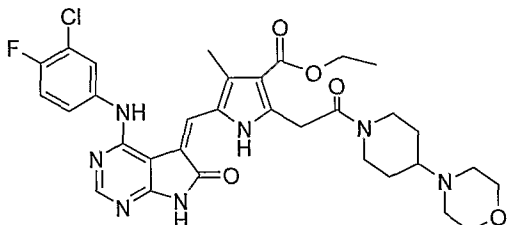


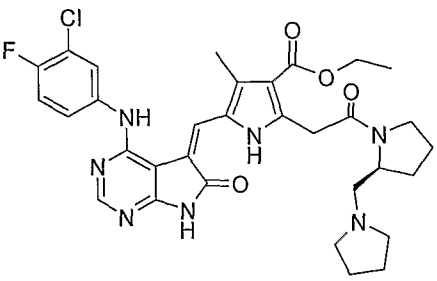
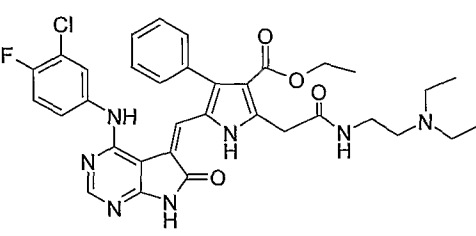
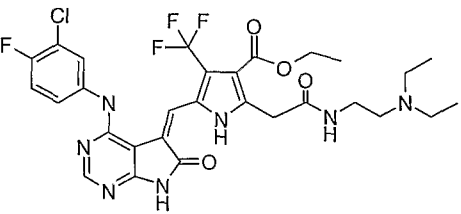
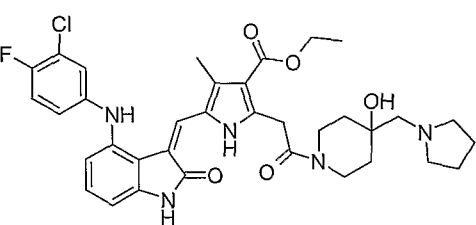
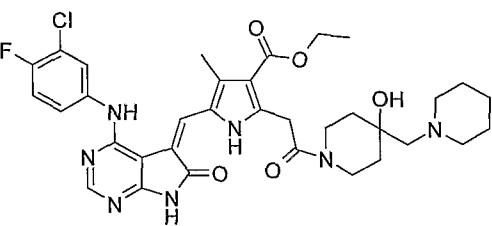
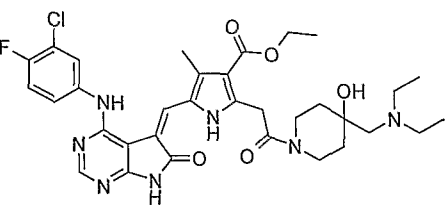
5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-4-甲基-2-[(3-吗啡啉-4-基-丙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯

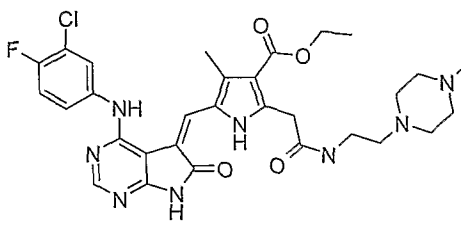
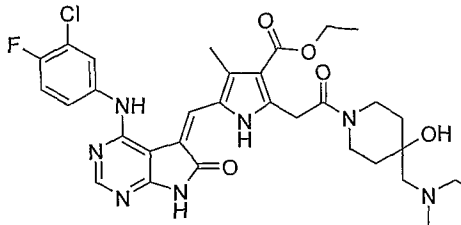
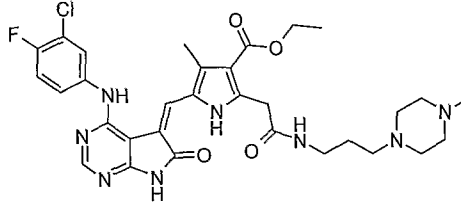
2



5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-2-[(2-二乙胺基-乙氨基甲酰)-甲基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯

- 3  5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-4-甲基-2-[(2-哌啶-1-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1-氢-吡咯-3-甲酸乙酯
- 4  5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-2-[2-(3,5-二甲基-哌嗪-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1-氢-吡咯-3-甲酸乙酯
- 5  5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-4-甲基-2-[(2-吡咯烷-1-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1-氢-吡咯-3-甲酸乙酯
- 6  5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-4-甲基-2-[(2-吗啉-4-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1-氢-吡咯-3-甲酸乙酯
- 7  5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-4-甲基-2-{[3-(2-甲基-哌啶-1-基)-丙氨基甲酰]-甲基}-1-氢-吡咯-3-甲酸乙酯
- 8  5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-4-甲基-2-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-2-氧代-乙基]-1-氢-吡咯-3-甲酸乙酯
- 9  5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-4-甲基-2-[2-(4-吗啉-4-基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-1-氢-吡咯-3-甲酸乙酯

- 10 
- 5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-4-甲基-2-[2-氧代-2-(2-吡咯烷-1-基甲基-吡咯烷-1-基)-乙基]-1-氢-吡咯-3-甲酸乙酯
- 11 
- 5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-2-[(2-二乙胺基-乙氨基甲酰)-甲基]-4-苯基-1-氢-吡咯-3-甲酸乙酯
- 12 
- 5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-2-[(2-二乙胺基-乙氨基甲酰)-甲基]-4-三氟甲基-1-氢-吡咯-3-甲酸乙酯
- 13 
- 5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-次甲基]-2-[2-(4-羟基-4-吡咯烷基-1-甲基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1-氢-吡咯-3-羧酸乙酯
- 14 
- 5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-次甲基]-2-[2-(4-羟基-4-哌啶-1-甲基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1-氢-吡咯-3-羧酸乙酯
- 15 
- 5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-次甲基]-2-[2-(4-二乙基氨基甲基-4-羟基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1-氢-吡咯-3-羧酸乙酯

- 16  5-[4-(3-氯-4-氟-苯氨基)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-次甲基]-4-甲基-2-{[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-乙基氨基甲酰基]-甲基}-1-氢-吡咯-3-羧酸乙酯
- 17  5-[4-(3-氯-4-氟-苯氨基)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-次甲基]-2-[2-(4-羟基-4-吗啡啉-4-甲基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1-氢-吡咯-3-羧酸乙酯
- 18  5-[4-(3-氯-4-氟-苯氨基)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-次甲基]-4-甲基-2-{[3-(4-甲基-哌嗪-1-基)-丙基氨基甲酰基]-甲基}-1-氢-吡咯-3-羧酸乙酯

在本发明的另一个方面，是一种药物组合物，含有本发明通式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或前药，及药学上可以接受的载体。

在本发明的另一个方面，是涉及蛋白激酶催化活性的调节方法，包括使蛋白激酶与本发明通式(I)的化合物或药学上可接受的盐接触。此蛋白激酶选自受体酪氨酸激酶、非受体酪氨酸激酶和丝氨酸-苏氨酸激酶。

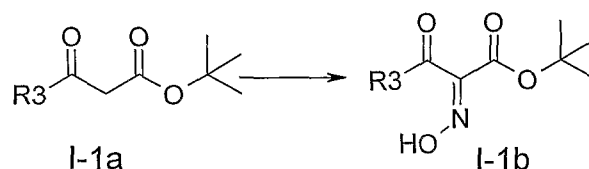
其中，本发明所述的药学上可接受的盐为本发明化合物与化合物与选自以下的酸形成的盐：苹果酸、乳酸、马来酸、盐酸、甲磺酸、硫酸、磷酸、柠檬酸、酒石酸、乙酸或三氟乙酸。

在本发明的另一个方面，是治疗或预防与蛋白质激酶有关的疾病的哺乳动物的方法，包括对该哺乳动物给药治疗有效剂量的本发明药物组合物，该组合物中含有本发明化合物或其药学上可接受的盐，以及药学上可接受的载体或赋形剂。与蛋白质激酶有关的疾病选自 VEGFR-2, EGFR, HER-2, HER-3, HER-4, PDGFR, c-Kit, c-Met, FGFR, Flt3 相关的疾病。与蛋白质激酶有关的疾病还可以是白血病，糖尿病，自免疫病，过度增生病，牛皮癣，骨关节炎，类风湿性关节炎，血管生成，心血管病，Von-Heppel-Lindau 氏病，炎症，纤维变性病。与蛋白质激酶有

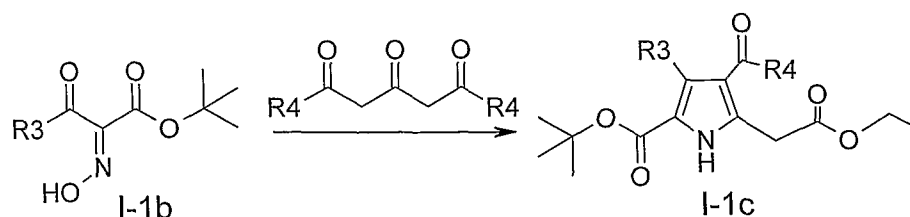
关的疾病还可以是鳞状细胞癌, 肾细胞癌, Kaposi 肉瘤, 非小细胞肺癌, 小细胞肺癌, 淋巴瘤, 甲状腺癌, 乳腺癌, 头颈癌, 子宫癌, 食道癌, 黑素癌, 膀胱癌, 生殖泌尿癌, 胃肠癌, 神经胶质癌, 结肠直肠癌和卵巢癌。优选的, 所述的哺乳动物是人。

进一步, 本发明上述治疗或预防与蛋白质激酶有关的疾病的哺乳动物的方法, 优选治疗患有癌症的哺乳动物的方法包括同时向需要治疗的哺乳动物给药治疗有效量的其它选自紫杉酚或卡铂的抗癌药物。所述哺乳动物优选为人。本发明的另一方面涉及本发明化合物在制备治疗与蛋白质激酶有关的疾病的药物中的用途。其中所述与蛋白质激酶有关的疾病选自与 VEGFR-2, EGFR, HER-2, HER-3, HER-4, PDGFR, c-Kit, c-Met, FGFR 或 Flt3 相关的疾病; 或者, 其中所述与蛋白激酶有关的疾病选自白血病, 糖尿病, 自免疫病, 过度增生病, 牛皮癣, 骨关节炎, 类风湿性关节炎, 血管生成, 心血管病, Von-Heppel-Lindau 氏病, 炎症或纤维变性病; 或者所述与蛋白激酶有关的疾病是癌症, 选自鳞状细胞癌, 肾细胞癌, Kaposi 肉瘤, 非小细胞肺癌, 小细胞肺癌, 淋巴瘤, 甲状腺癌, 乳腺癌, 头颈癌, 子宫癌, 食道癌, 黑素癌, 膀胱癌, 生殖泌尿癌, 胃肠癌, 神经胶质癌, 结肠直肠癌或卵巢癌。

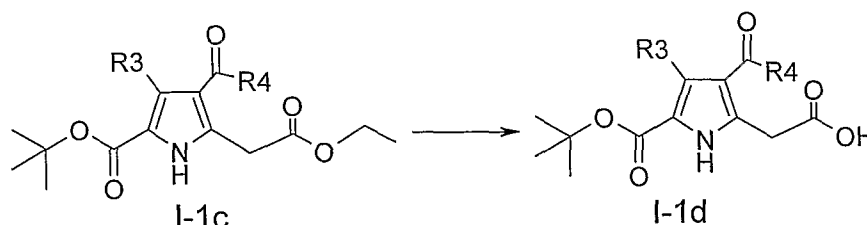
在本发明的另一个方面, 是制备通式 (I) 所示化合物的制备方法, 包括以下步骤:



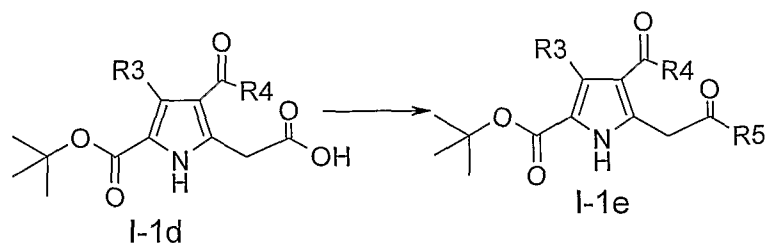
以易得的原料 I-1a 为起始原料, 与亚硝酸钠反应得到通式 I-1b 化合物;



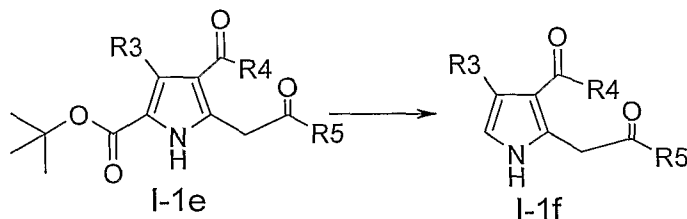
将所得 I-1b 化合物经过 Knorr Pyrrole 成环得到通式 I-1c 化合物;



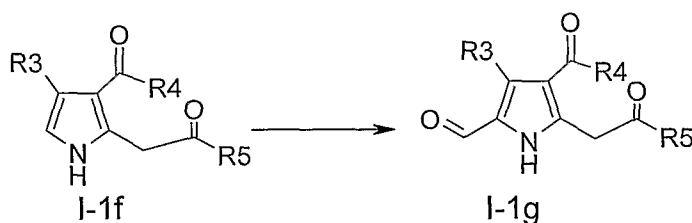
所述 I-1c 化合物室温下经碱金属氢氧化物溶液, 优选氢氧化锂溶液的选择性水解后得到通式 I-1d 化合物;



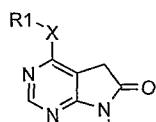
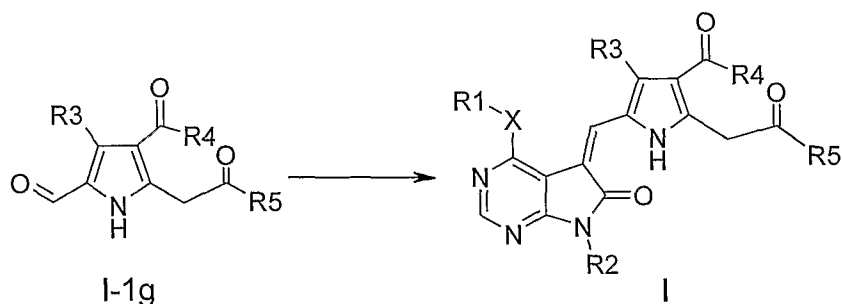
I-1d 化合物与 R_5NH_2 进行酰胺化反应得到通式 I-1e 化合物;



I-1e 化合物经在三氟醋酸作用下的脱羧得到通式 I-1f 化合物;



I-1f 化合物在无水体系中, 与三氯氧磷经甲酰化反应得到通式 I-1g 化合物;



最后, 通式 I-1g 化合物与 缩合即得到通式 I 所示的目标化合物, 其中

X 选自 $W(CH_2)$ 、 $(CH_2)W$ 或 W, 其中 W 是 O、S、SO 或 SO_2 ; 或 X 为 $-NR_6$; 其中 R_6 是氢原子或烷基;

当 X 是 $-NR_6$, R_6 是烷基, 则 R_6 可以和 R_1 形成一个 4~8 元杂环基; 其中 5~8 元杂环内可以含有一个或多个 N、O 或 S 原子, 并且 4~8 元杂环上可以进一步被一个或多个的烷基、卤素、芳基、杂芳基、卤代烷基、卤代烷氧基、羟基、

氨基、烷氨基、酰胺基、胺酰基、氰基、烷氧基、芳氧基、胺烷基、羟烷基、杂环烷基、羧酸、羧酸酯或 $-NR_7R_8$ 所取代；

R_1 选自氢原子、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、芳烷基或杂芳烷基，其中烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、芳烷基或杂芳烷基可以进一步被一个或多个烷基、卤素、芳基、羟基、氨基、烷氨基、酰胺基、胺酰基、烷氧基、芳氧基、杂环烷基、羧酸、羧酸酯或 $-NR_7R_8$ 所取代；其中芳基、杂芳基、芳烷基或杂芳烷基可以并成双环；

R_2 选自氢原子、烷基、环烷基、杂环烷基、 $-(CH_2CH_2O)_nR_6$ 、烯基或炔基、 $-COOR_7$ 、 $-CONR_7R_8$ 、 $-C(=S)NR_7R_8$ 、 $-COR_7$ 、 $-SOR_7$ 、 $-SO_2R_7$ 、 $-SO_2NR_7R_8$ 或者 $-P(=O)(OR_7)(OR_8)$ ，其中烷基、环烷基、杂环烷基、烯基或炔基可以进一步被一个或多个烷基、羟基、烷氧基、氰基、氨基、烷氨基、羧酸或羧酸酯所取代；

R_3 选自氢原子、烷基、芳基、卤素取代的芳基或三氟甲基；

R_4 选自羟基、烷氧基、芳氧基、杂环烷氧基、芳烷氧基、 $-(OCH_2CH_2)_nR_6$ 、 $-N(R_7)(CH_2)_nR_8$ 、 $-NR_7[CH_2CH_2O]_nR_8$ 或者 $-NR_6(CH_2)_n[CH(OH)CH_2]_rZ$ ；其中 Z 是芳基、杂芳基、杂环烷基、 $-NR_7R_8$ 、 $-COOR_6$ 或 $CONR_7R_8$ ；

R_5 选自羟基、烷氧基、芳氧基、杂环烷氧基、芳烷氧基、 $-N(R_7)(CH_2)_nR_8$ 、 $-NR_7[CH_2CH_2O]_nR_8$ 或者 $-NR_6(CH_2)_n[CH(OH)CH_2]_rZ$ ；其中 Z 是芳基、杂芳基、杂环烷基、 $-NR_7R_8$ 、 $-COOR_6$ 或 $CONR_7R_8$ ；

R_6 是氢原子或烷基；

R_7 和 R_8 分别选自分别选自氢原子、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基或杂芳烷基，其中烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基或者杂芳烷基可以进一步被一个或多个的烷基、卤素、芳基、羟基、氨基、烷氨基、酰胺基、胺酰基、氰基、烷氧基、芳氧基、胺烷基、羟烷基、杂环烷基、羧酸、羧酸酯或 $-NR_7R_8$ 所取代；

同时， R_7 和 R_8 可以形成一个 4~8 元杂环基；其中 5~8 元杂环内可以含有一个或多个 N、O 或 S 原子，并且 4~8 元杂环上可以进一步被一个或多个的烷基、卤素、芳基、杂芳基、卤代烷基、卤代烷氧基、羟基、氨基、酰胺基、胺酰基、氰基、烷氧基、芳氧基、胺烷基、羟烷基、杂环烷基、羧酸、羧酸酯或 $-NR_7R_8$ 所取代。

n 是 0~6；

r 是 1~2。。

本发明涉及鉴别蛋白激酶催化活性的化合物，使表达该蛋白激酶的细胞与本发明化合物或盐接触，然后检测对细胞的效果。

本发明还涉及鉴别蛋白激酶催化活性的化合物，使人工重组合成激酶蛋白与

本发明化合物或盐接触，然后用 Elisa 方法检测对激酶活性的影响。

发明详述

除非有相反陈述，下列用在说明书和权利要求书中的术语具有下述含义。

“烷基”指饱和的脂族烃基团，包括 1 至 20 个碳原子的直链和支链基团。优选含有 1 至 10 个碳原子的中等大小烷基，例如甲基、乙基、丙基、2-丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、戊基等。更优选的是含有 1 至 4 个碳原子的低级烷基，例如甲基、乙基、丙基、2-丙基、正丁基、异丁基或叔丁基等。烷基可以取代的或未取代的，当被取代时，优选的基团为卤素、羟基、低级烷氧基、芳基、芳氧基、杂芳基、杂环烷基、 $-\text{COOR}_7$ 、 $-\text{CONR}_7\text{R}_8$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{NR}_7\text{R}_8$ 、 $-\text{COR}_7$ 、 $-\text{SOR}_7$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}_7$ 、 $-\text{SO}_2\text{NR}_7\text{R}_8$ 和 $-\text{P}(=\text{O})(\text{OR}_7)(\text{OR}_8)$ 。

“环烷基”指 3 至 8 元全碳单环、全碳 5 元/6 元或 6 元/6 元稠合环或多环稠合环(“稠合”环系意味着系统中的每个环与体系中的其他环共享毗邻的一对碳原子)基团，其中一个或多个环可以含有一个或多个双键，单没有一个环具有完全共轭的 π 电子系统。环烷基的实例有环丙基、环丁基、环戊基、环戊烯、环己烷、环己二烯、金刚烷、环庚烷、环庚三烯等。环烷基可以是取代或未取代的。当被取代时，取代基优选为一个或多个取代基，独立地选自低级烷基、三卤烷基、卤素、羟基、低级烷氧基、芳基(可选自被一个或多个基团取代，取代基是彼此独立地是卤素、羟基、低级烷基或低级烷氧基)、芳氧基(可选自被一个或多个基团取代，取代基彼此独立地是卤素、羟基、低级烷基或低级烷氧基)、6 元杂芳基(环中具有 1 至 3 个氮原子，环中的碳可选地被一个或多个基团取代，取代基彼此独立地是卤素、羟基、低级烷基或低级烷氧基)、5 元杂芳基(具有 1 至 3 个选自氮、氧和硫的杂原子，该基团的碳和氮原子可选地被一个或多个基团取代，取代基彼此独立地是卤素、羟基、低级烷基或低级烷氧基)、或 5 或 6 元杂环烷基(具有 1 至 3 个选自氮、氧和硫地杂原子，该基团的碳和氮原子(如果有的话)，可选地被一个或多个基团取代，取代基彼此独立地是卤素、羟基、低级烷基或低级烷氧基)、巯基、(低级烷基)巯基、氰基、硝基、羧酸、羧酸酯、 $-\text{OR}_8$ 、 $-\text{NR}_8\text{R}_9$ 、 $-\text{COR}_8$ 、 $-\text{NR}_8\text{COR}_9$ 和 $-\text{SO}_2\text{NR}_8\text{R}_9$ 。

“链烯基”指由至少两个碳原子和至少一个碳-碳双键组成的如上述定义的烷基。代表性实例包括但不限于乙烯基、1-丙烯基、2-丙烯基、1-，2-或 3-丁烯基等。所述的链烯基可以由一个或多个选自以下的取代基任选取代：卤素、三卤甲基、羟基、硝基、氰基、烷氧基、烷基、羧酸、羧酸酯、 $-\text{CONR}_7\text{R}_8$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{NR}_7\text{R}_8$ 、 $-\text{COR}_7$ 、 $-\text{SOR}_7$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}_7$ 、 $-\text{SO}_2\text{NR}_7\text{R}_8$ 和 $-\text{P}(=\text{O})(\text{OR}_7)(\text{OR}_8)$ 。

“炔基”指至少两个碳原子和至少一个碳-碳三键组成的如上所定义的烷基。代

表性实例包括但不限于乙炔基、1-丙炔基、2-丙炔基、1-, 2-或 3-丁炔基等。所述的炔基可以由一个或多个选自以下的取代基任选取代：卤素、三卤甲基、羟基、硝基、氰基、烷氧基、烷基、羧酸、羧酸酯、 $-\text{CONR}_7\text{R}_8$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{NR}_7\text{R}_8$ 、 $-\text{COR}_7$ 、 $-\text{SOR}_7$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}_7$ 、 $-\text{SO}_2\text{NR}_7\text{R}_8$ 和 $-\text{P}(=\text{O})(\text{OR}_7)(\text{OR}_8)$ 。

“芳基”指具有至少一个芳环结构的基团，即具有共轭的 π 电子体系的芳环，包括碳环芳基、杂芳基和联芳基。所述的芳基可以由一个或多个选自以下的取代基任选取代：卤素、三卤甲基、羟基、硝基、氰基、烷氧基、烷基、羧酸、羧酸酯、 $-\text{CONR}_7\text{R}_8$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{NR}_7\text{R}_8$ 、 $-\text{COR}_7$ 、 $-\text{SOR}_7$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}_7$ 、 $-\text{SO}_2\text{NR}_7\text{R}_8$ 和 $-\text{P}(=\text{O})(\text{OR}_7)(\text{OR}_8)$ 。

“杂芳基”指具有 1 至 3 个杂原子作为环原子，其余的环原子为碳的芳基，杂原子包括氧、硫和氮。所述环可以是 5 元或 6 元环。杂环芳基基团的实例包括呋喃基、噻吩基、吡啶基、吡咯、N-烷基吡咯基、嘧啶基、吡嗪基、咪唑基等。所述的杂芳基可以由一个或多个选自以下的取代基任选取代：卤素、三卤甲基、羟基、硝基、氰基、烷氧基、烷基、羧酸、羧酸酯、 $-\text{CONR}_7\text{R}_8$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{NR}_7\text{R}_8$ 、 $-\text{COR}_7$ 、 $-\text{SOR}_7$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}_7$ 、 $-\text{SO}_2\text{NR}_7\text{R}_8$ 和 $-\text{P}(=\text{O})(\text{OR}_7)(\text{OR}_8)$ 。

“杂环烷基”指单环或稠环基团，在环中，具有 5 至 9 个环原子，其中一个或两个环原子选自氮、氧或 $\text{S}(\text{O})_n$ (其中 n 是整数 0 至 2) 的杂原子，其余环原子为碳。这些环还可以具有一个或多个双键、不过，这些环不具有完全共轭的 π 电子系统。未取代的杂环烷基包括但不限于吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基、硫代吗啉基、高哌嗪基等、杂环烷基可以是取代的或未取代的。当被取代时，取代基优选为一个或多个选自以下的取代基任选取代：卤素、三卤甲基、羟基、硝基、氰基、烷氧基、烷基、羧酸、羧酸酯、 $-\text{CONR}_7\text{R}_8$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{NR}_7\text{R}_8$ 、 $-\text{COR}_7$ 、 $-\text{SOR}_7$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}_7$ 、 $-\text{SO}_2\text{NR}_7\text{R}_8$ 和 $-\text{P}(=\text{O})(\text{OR}_7)(\text{OR}_8)$ 。

“羟基”指-OH 基团。

“烷氧基”指-O-(烷基)和-O-(未取代地环烷基)。代表性实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、环丙氧基、环丁氧基、环戊氧基、环己氧基等。所述的烷氧基可以由一个或多个选自以下的取代基任选取代：卤素、三卤甲基、羟基、硝基、氰基、烷氧基、烷基、羧酸、羧酸酯、 $-\text{CONR}_7\text{R}_8$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{NR}_7\text{R}_8$ 、 $-\text{COR}_7$ 、 $-\text{SOR}_7$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}_7$ 、 $-\text{SO}_2\text{NR}_7\text{R}_8$ 和 $-\text{P}(=\text{O})(\text{OR}_7)(\text{OR}_8)$ 。

“卤代烷氧基”指-O-(卤代烷基)。代表性实例包括但不限于三氟甲氧基、三溴甲氧基等。

“芳氧基”指-O-芳基和-O-杂芳基，芳基和杂芳基定义同上。代表性实例包括但不限于苯氧基、吡啶氧基、呋喃氧基、噻吩氧基、嘧啶氧基、吡嗪氧基等及其衍生物。所述的芳氧基可以由一个或多个选自以下的取代基任选取代：卤素、三卤甲基、羟基、硝基、氰基、烷氧基、烷基、羧酸、羧酸酯、 $-\text{CONR}_7\text{R}_8$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{NR}_7\text{R}_8$ 、

-COR₇、-SOR₇、-SO₂R₇、-SO₂NR₇R₈ 和 -P(=O)(OR₇)(OR₈)。

“卤素”指氟、氯、溴或碘，优选氟或氯。

“三卤甲基”指-CX₃，其中 X 是如上所定义的卤素。

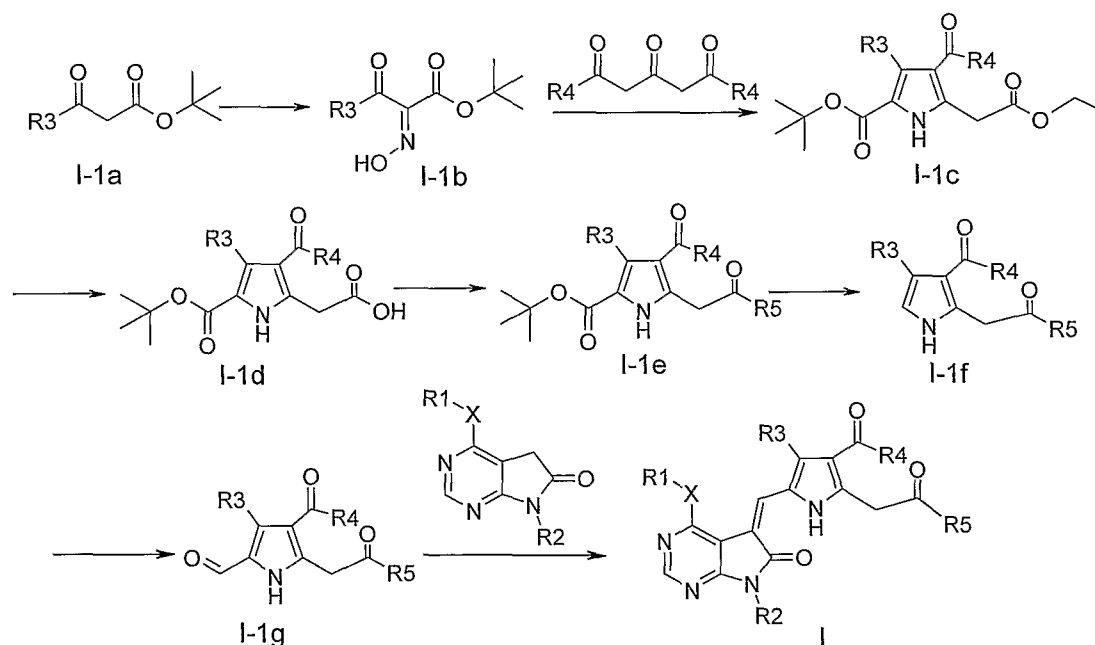
“可选”或“可选地”意味着随后所描述地事件或环境可以但不必发生，该说明包括该事件或环境发生或不发生地场合。例如，“可选被烷基取代地杂环基团”意味着烷基可以但不必存在，该说明包括杂环基团被烷基取代的情形和杂环基团不被烷基取代的情形。

“药物组合物”表示一种或多种本文所述化合物或其生理学上/药学上可接受的盐或前体药物与其他化学组分的混合物，其他组分例如生理学/药学上可接受的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进化合物对生物体的给药。

本发明化合物的合成方法

为了完成本发明的目的，本发明采用如下技术方案：

本发明化合物可通过本领域已知的方法合成。在实施例中提供了这些化合物的合适的合成方法。通常，这些化合物可根据下列合成流程制备：



以易得的原料 I-1a 为起始原料，与亚硝酸钠反应得到通式 I-1b 化合物；所得 I-1b 化合物经过 Knorr Pyrrole 成环得到通式 I-1c 化合物，I-1c 化合物室温下经碱金属氢氧化物溶液，优选氢氧化锂溶液的选择性水解后得到通式 I-1d 化合物，I-1d 化合物不同的胺进行酰胺化反应得到通式 I-1e 化合物，I-1e 化合物经在三氟醋酸作用下的脱羧得到通式 I-1f 化合物，I-1f 化合物在无水体系中，与三氯氧磷经甲酰化反应得到通式 I-1g 化合物，通式 I-1g 化合物最后与不同的酮缩合即得到通式 I 所示的目标化合物，其中以氢氧化锂选择性水解底物 I-1d 的效果相当

好，而且能除去原料中含有的少量 Knorr Pyrrole 成环反应中产生的副产物。

其中，通式(I)分子中双键的构型为 Z 构型(顺式)，这一点通过核磁数据可以推断。通常在吡咯环上 NH 的化学位移为 9ppm 左右，而得到的化合物中吡咯环上的 NH 在 14ppm 左右，主要原因是吡咯环上的 NH 与临近的吲哚酮羰基的氧有分子内氢键作用，导致 NH 的化学位移移向低场。这一点在专利 WO0160814(Su-11248)中也进行了描述。

本发明涉及一种药物组合物，其含有治疗有效剂量的本发明化合物或其盐和药学载体。

进一步，本发明涉及通式(I)化合物或其盐在制备酪氨酸激酶抑制剂药物中的用途。换言之，本发明还提供含有药物有效剂量的上述化合物组合物，以及所述的化合物和/或含有该化合物的药物组合物在制备酪氨酸激酶抑制剂中的用途。

以下结合实施例用于进一步描述本发明，但这些实施例并不限制着本发明的范围。

实施例

化合物的结构是通过核磁共振(NMR)或质谱(MS)来确定的。NMR 位移(δ)以百万分之一(ppm)的单位给出。NMR 的测定是用 Bruker AVANCE-400 核磁仪，测定溶剂为氘代氯仿(CDCl_3)、氘代二甲基亚砷(DMSO-D_6)，内标为四甲基硅烷(TMS)，化学位移是以 10^{-6} (ppm)作为单位给出。

MS 的测定用 FINNIGAN LCQAd (ESI)质谱仪。

激酶 VEGFR 平均抑制率的测定使用 HTScan 酶标仪(Cell Signaling 公司)。

激酶 EGFR/HER-2 平均抑制率的测定用 NovoStar 酶标仪(德国 BMG 公司)。

薄层硅胶使用烟台黄海 HSGF254 或青岛 GF254 硅胶板。

柱层析一般使用烟台黄海硅胶 200~300 目硅胶为载体。

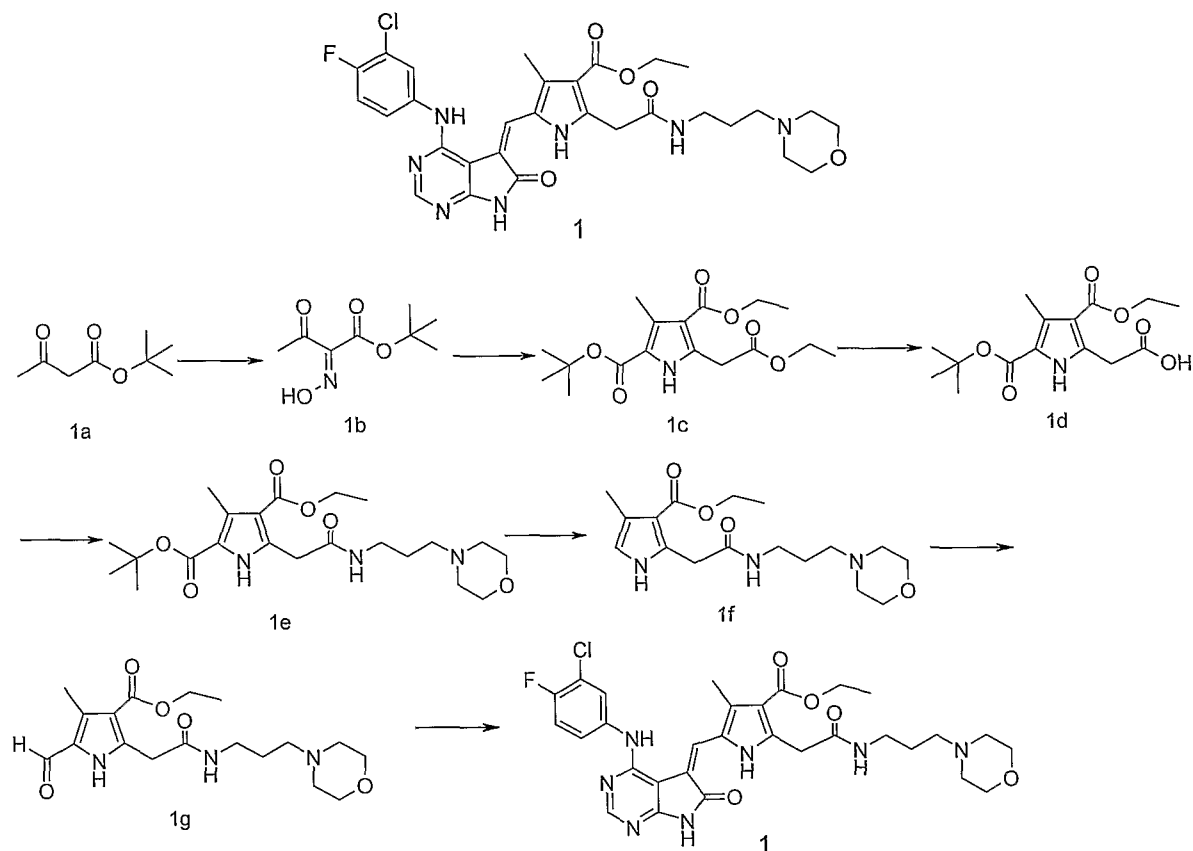
DMSO-D_6 : 氘代二甲基亚砷;

CDCl_3 : 氘代氯仿;

制备实施例:

实施例 1

5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-4-甲基-2-[(3-吗啡啉-4-基-丙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 1 的制备



2-肟基-3-羰基-丁酸叔丁酯 **1b** 的制备

冰浴条件下, 在一个 250 ml 三口烧瓶中, 将 3-羰基-丁酸叔丁酯 **1a** (32 g, 0.2 mol) 搅拌下溶解于 60 ml 冰醋酸, 搅拌下逐滴滴加亚硝酸钠溶液 (20 ml, 10 mol/L, 0.2 mol), 控制反应温度为 0~5℃。滴加结束后, 于冰水浴中反应 1 小时, 彻去冰水浴, 在室温下继续反应约 3 小时, 点板跟踪至原料基本反应完全, 反应结束, 得到标题产物 2-肟基-3-羰基-丁酸叔丁酯 **1b** 的溶液, 直接投下一步反应。

5-乙氧羰甲基-3-甲基-1 氢-吡咯-2,4-二羧酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **1c** 的制备

向一个配有温度计, 滴液漏斗的 250 ml 的三颈烧瓶中, 将 3-羰基-戊二酸二乙酯 (40 g, 0.2 mmol) 搅拌下溶解于 90 ml 冰醋酸, 搅拌下升温至 65℃, 加入 1/8 量的锌粉 (共 26 g, 0.4 mmol), 再滴加 1/8 量的第一步反应液 **1b**, 水浴控制体系温度不能上升太快, 待温度低于 65℃ 后, 再加入 1/8 量的锌粉及 1/8 量的第一步反应液。如此重复至锌粉及第一步反应液 **1b** 全部加完。升高温度至 75℃, 反应约 2 小时后点板跟踪反应结束。搅拌条件下, 将反应液倒入 100 ml 冰水中, 继续搅拌至室温, 过滤除掉未反应的锌粉, 用乙酸乙酯 (100 ml×3) 提取反应液, 合并有机相, 依次用水 (100 ml×3)、饱和碳酸氢钠水 (100 ml×4) 溶液、饱和氯化钠水溶液 (100 ml×1) 洗涤, 有机层用无水硫酸钠干燥, 浓缩得到标题产物 5-乙氧羰甲基-3-甲基-1 氢-吡咯-2,4-二羧酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **1c** (60 g, 油状产物), 产率 88.5

%。

MS: 340.3(M+1)。

5-羧甲基-3-甲基-1 氢-吡咯-2,4-二羧酸-2-叔丁酯-4-乙酯 1d 的制备

在 1000 ml 的单口瓶中, 5-乙氧羰甲基-3-甲基-1 氢-吡咯-2,4-二羧酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **1c** (30 g, 0.088 mol) 溶解于 268 ml 四氢呋喃(268 ml)和 134 ml 甲醇, 搅拌下加入氢氧化锂水溶液(134 ml, 2.36 mol/L, 0.316 mol), 室温条件下反应 1.5 小时, 点板跟踪至原料完全消失。将反应液减压浓缩除去大部分四氢呋喃及甲醇后, 向浓缩液加 200 ml 水, 然后用乙醚(100 ml×5)萃取混合液, 水相转移至 1000 ml 的单口瓶中, 冰浴搅拌下滴加 20% 的盐酸至 pH 为 1~3, 有大量淡黄色沉淀析出, 抽滤, 固体用少量乙醚洗涤, 真空干燥, 得到标题产物 5-羧甲基-3-甲基-1 氢-吡咯-2,4-二羧酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **1d**(20 g, 淡黄色固体), 产率 72.3 %。

3-甲基-5-[(3-吗啡啉-4-基-丙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **1e** 的制备

将 5-羧甲基-3-甲基-1 氢-吡咯-2,4-二羧酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **1d**(2.18 g, 7 mmol) 溶解于 35 ml 二氯甲烷和 3.5 ml N,N-二甲基甲酰胺的混合溶剂中, 冰浴冷却, 搅拌下依次加入 3-吗啡啉-4-基-丙胺(1.1 g, 7.7 mmol), N-乙基-N'-(二甲氨基丙基)-碳二亚胺(2.67 g, 14 mmol)及 1-羟基苯并三唑(0.945 g, 7 mmol), 反应体系自然升至室温, 搅拌过夜。次日点板至原料 **1d** 完全消失后, 剧烈搅拌下向反应液中加入冷水(40 ml), 静置分液, 二氯甲烷萃取反应液(50 ml×3), 合并有机相, 有机相依次用饱和碳酸钾溶液(50 ml×1), 水(50 ml×1)及饱和氯化钠溶液(50 ml×1)洗涤, 二氯甲烷层用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得到标题产物 3-甲基-5-[(3-吗啡啉-4-基-丙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **1e**(4.49 g, 棕褐色油状物), 粗产品直接投入下一步反应。

MS m/z (ESI): 438.5(M+1)。

4-甲基-2-[(3-吗啡啉-4-基-丙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **1f** 的制备

氩气氛下, 将 3-甲基-5-[(3-吗啡啉-4-基-丙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **1e**(4.49 g, 7 mmol) 搅拌下溶解于 224 ml 二氯甲烷及 56 ml 三氟乙酸中, 加热回流 2 小时, 撤去油浴, 室温继续搅拌 2 小时, 点板跟踪至原料完全消失。冰浴冷却, 剧烈搅拌下缓慢滴加 30% 氢氧化钠水溶液至反应液的 pH 为 9, 静置, 分液, 水相用二氯甲烷萃取混合液(100 ml×4), 合并有机相, 有机相用饱和氯化钠溶液洗(25 ml×1), 二氯甲烷层用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液

减压浓缩, 得到标题产物 4-甲基-2-[(3-吗啡啉-4-基-丙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **1f** (2.01 g, 棕褐色粘稠固体)。粗产品直接投入下一步反应。

MS m/z (ESI): 338.5(M+1)。

5-甲酰基-4-甲基-2-[(3-吗啡啉-4-基-丙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 1g 的制备

氩气氛下, 在一个 25 ml 的单口瓶中加入无水 N'N-二甲基甲酰胺(0.12 ml, 1.25 mmol), 冰浴冷却至 0°C, 搅拌下缓慢滴加三氯氧磷(0.05 ml, 0.55 mmol), 滴加完毕后于室温下搅拌 15 分钟, 再继续冰盐浴冷却, 向反应瓶中滴加 4-甲基-2-[(3-吗啡啉-4-基-丙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **1f** 的无水 N'N-二甲基甲酰胺溶液(169 mg, 0.5 mmol, 溶解于 0.6 ml N'N-二甲基甲酰胺中), 保持反应温度为 0°C 反应 2 小时, 点板跟踪至原料消失后, 向反应液中加入冰水(15 ml)淬灭反应, 搅拌 5 分钟, 再用 30% 的氢氧化钠溶液调节 pH 为 12。反应液用乙酸乙酯(15 ml×6)萃取, 合并有机相, 有机相用饱和氯化钠水溶液(10 ml×2)洗涤, 乙酸乙酯层用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得到标题产物 5-甲酰基-4-甲基-2-[(3-吗啡啉-4-基-丙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **1g** (0.192 g, 红棕色粘稠固体), 粗产品直接投入下一步反应。

MS m/z (ESI): 364.3(M+1)。

5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-4-甲基-2-[(3-吗啡啉-4-基-丙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **1** 的制备

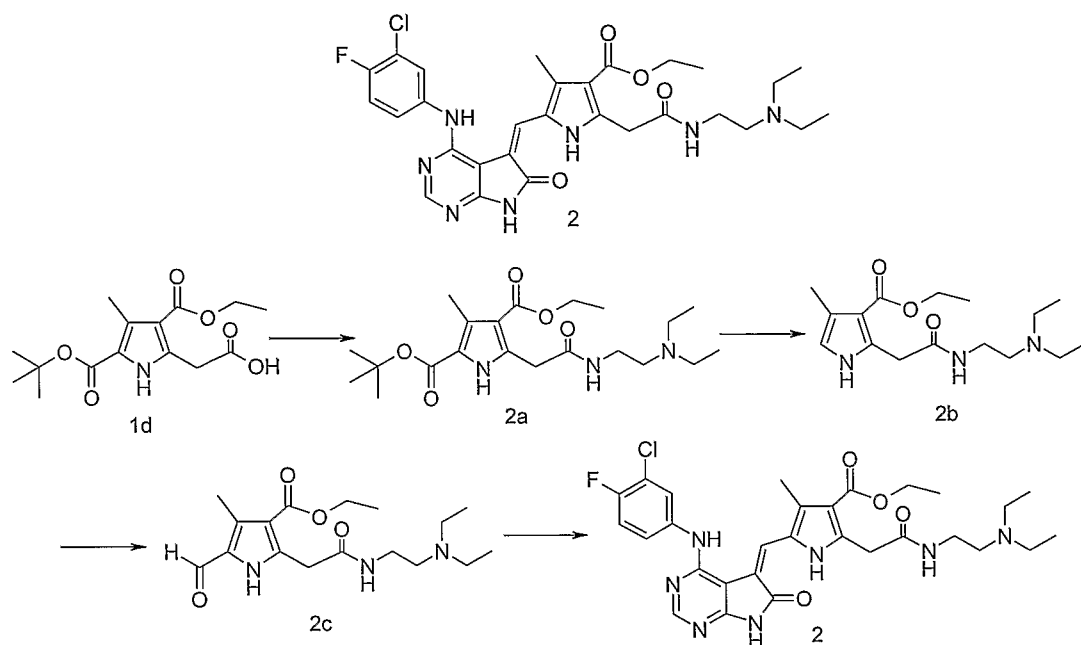
氩气氛下, 在一个 10 ml 的单口瓶中, 依次加入 5-甲酰基-4-甲基-2-[(3-吗啡啉-4-基-丙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **1g** (0.183 g, 0.5 mmol), 4-(3-氯-4-氟-苯胺)-5,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-6-酮(0.139 g, 0.5 mmol) (Bioorganic & Medicinal Chemistry letters., 2002, 12(16), 2153~2157.), 哌啶(0.125 ml, 1.25 mmol) 及乙醇(1.5 ml), 加热回流 1.5 小时, 点板跟踪至 4-(3-氯-4-氟-苯胺)-5,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-6-酮完全消失, 将反应液自然冷却至室温, 有大量固体产生, 减压抽滤, 得到标题产物 5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-4-甲基-2-[(3-吗啡啉-4-基-丙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **1** (0.129 g, 黄色固体), 产率 41.3%。

MS m/z (ESI): 626.4(M+1)。

¹H NMR (DMSO-D₆, 400MHz) δ 8.324(s, 1H, -CH=N), 7.704(dd, 1H, -ArH), 7.389~7.337(m, 3H, -ArH; -CH=C), 4.237; 4.184(q, 2H, -CO₂CH₂-), 3.540(t, 4H, 2×-OCH₂-), 3.289(s, 2H, -CH₂CON-), 3.108(t, 2H, -CONCH₂-), 2.363(s, 3H, -ArCH₃), 2.320~2.266(m, 6H, 3×-NCH₂-), 1.628~1.560(m, 2H, -CH₂-), 1.273(t, 3H, -CH₃)。

实施例 2

5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-2-[(2-二乙氨基-乙氨基甲酰)-甲基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 2 的制备



5-[(2-二乙氨基-乙氨基甲酰)-甲基]-3-甲基-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 2a 的制备

将 5-羧甲基-3-甲基-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **1d** (125 mg, 0.4 mmol) 搅拌下溶解于 2 ml 二氯甲烷和 0.2 ml N,N-二甲基甲酰胺的混合溶剂中, 冰浴冷却, 搅拌下依次加入 N,N-二乙基乙二胺 (60 μ l, 0.44 mmol), N-乙基-N'-(二甲氨基丙基)-碳二亚胺 (154 mg, 0.8 mmol) 及 1-羟基苯并三唑 (56 mg, 0.4 mmol), 反应体系自然升至室温, 搅拌过夜。次日点板至原料 **1d** 完全消失后, 剧烈搅拌下向反应液中加入冷水 (5 ml), 静置分液, 二氯甲烷萃取反应液 (50 ml $\times$ 3), 合并有机相, 有机相依次用饱和碳酸钾溶液 (5 ml $\times$ 1), 水 (5 ml $\times$ 1) 及饱和氯化钠溶液 (25 ml $\times$ 1) 洗涤, 二氯甲烷层用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得到标题产物 5-[(2-二乙氨基-乙氨基甲酰)-甲基]-3-甲基-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **2a** (136 mg, 浅黄色粘液), 产率 83%。

2-[(2-二乙氨基-乙氨基甲酰)-甲基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **2b** 的制备

氩气氛下, 将 5-[(2-二乙氨基-乙氨基甲酰)-甲基]-3-甲基-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **2a** (420 mg, 1 mmol) 搅拌下溶解于 40 ml 二氯甲烷及 10 ml 三氟乙酸中, 加热回流 2 小时, 撤去油浴, 室温继续搅拌 2 小时, 点板跟踪至原

料完全消失。冰浴冷却，剧烈搅拌下缓慢滴加 30% 氢氧化钠水溶液至反应液的 pH 为 12，加 30 ml 冰水，静置分液，水相用二氯甲烷萃取混合液(30 ml×4)，合并有机相，有机相用饱和氯化钠溶液洗(25 ml×1)，二氯甲烷层用无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，得到标题产物 2-[(2-二乙氨基-乙氨基甲酰)-甲基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **2b** (300 mg，灰色粘液)。产率 95%。

MS m/z (ESI): 310.5(M+1)。

2-[(2-二乙氨基-乙氨基甲酰)-甲基]-5-甲酰基-4-甲基-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **2c** 制备

氩气氛下，在一个 25 ml 的单口瓶中加入无水 N'N-二甲基甲酰胺(0.3 ml)，冰浴冷却至 0℃，搅拌下缓慢滴加三氯氧磷(112 ul，1.1 mmol)，滴加完毕后于室温下搅拌 15 分钟，继续冰盐浴冷却，向反应瓶中滴加 2-[(2-二乙氨基-乙氨基甲酰)-甲基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **2b** 的无水 N'N-二甲基甲酰胺溶液(309 mg，1 mmol，溶解于 0.6 ml N'N-二甲基甲酰胺中)，保持反应温度为 0℃ 反应 2 小时，点板跟踪至原料消失，向反应液中加入冰水(4 ml)淬灭反应，搅拌 5 分钟，再用 30% 的氢氧化钠溶液调节 pH 为 12。反应液用乙酸乙酯(15 ml×4)萃取，合并有机相，有机相用饱和氯化钠水溶液(10 ml×1)洗涤，乙酸乙酯层用无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩得到标题产物 2-[(2-二乙氨基-乙氨基甲酰)-甲基]-5-甲酰基-4-甲基-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **2c**(283 mg，灰白色固体)，产率 84%。

MS m/z (ESI): 338.7(M+1)。

5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-2-[(2-二乙氨基-乙氨基甲酰)-甲基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **2** 的制备

氩气氛下，在一个 10 ml 的单口瓶中，依次加入 2-[(2-二乙氨基-乙氨基甲酰)-甲基]-5-甲酰基-4-甲基-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **2c**(0.077 g，0.23 mmol)，4-(3-氯-4-氟-苯胺)-5,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-6-酮(0.056 g，0.2 mmol)，哌啶(0.05 ml，0.5 mmol)及乙醇(0.5 ml)，加热回流 1.5 小时，点板跟踪至 4-(3-氯-4-氟-苯胺)-5,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-6-酮完全消失，将反应液自然冷却至室温，有大量固体产生，减压抽滤，得到标题产物 5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-2-[(2-二乙氨基-乙氨基甲酰)-甲基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **2**(0.049 g，黄色固体)，产率 41%。

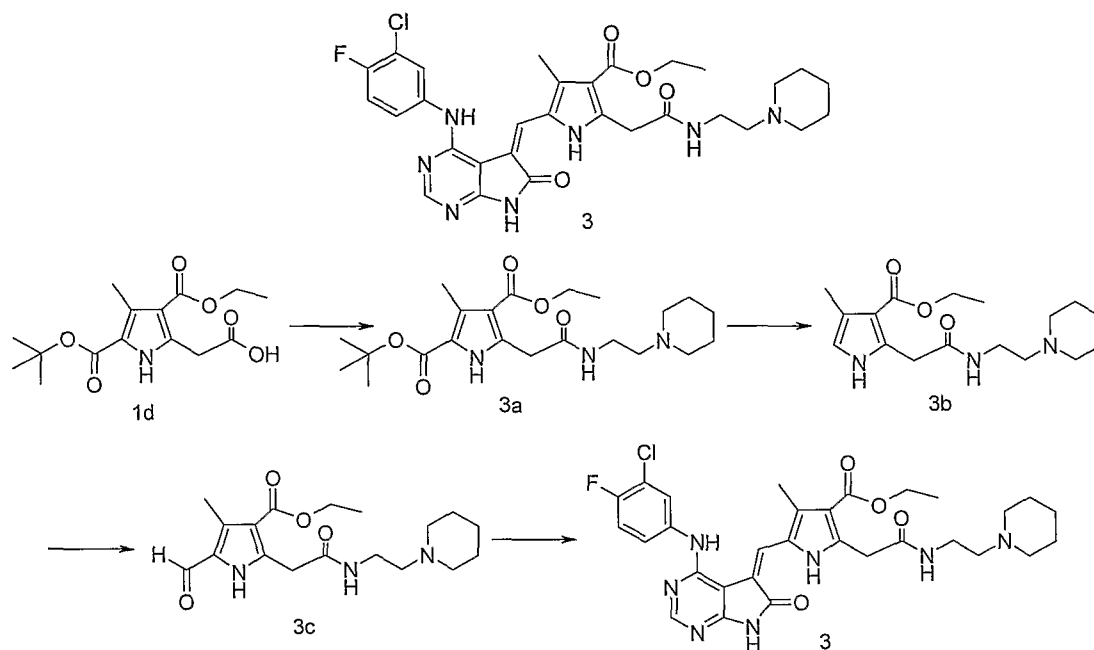
MS m/z (ESI): 598.3(M+1)。

¹H NMR (DMSO-D₆, 400MHz) δ 8.323(s, 1H, -CH=N), 7.686(dd, 1H, -ArH), 7.394~7.360(m, 3H, -ArH; -CH=C), 4.187(q, 2H, -CO₂CH₂-), 3.474(s, 2H, -CH₂CON-), 3.188(t, 2H, -CONCH₂-), 2.351~2.329(m, 9H, 3×-NCH₂-; -ArCH₃),

1.486~1.358(m, 6H, 2×-CH₃), 1.275(t, 3H, -CH₃)。

实施例 3

5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-4-甲基-2-[(2-哌啶-1-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **3** 的制备



3-甲基-5-[(2-哌啶-1-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **3a** 的制备

将 5-羧甲基-3-甲基-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **1d** (4.351 g, 14 mmol) 搅拌下溶解于 70 ml 二氯甲烷和 7 ml N,N-二甲基甲酰胺的混合溶剂中, 冰浴冷却, 搅拌下依次加入 2-哌啶-1-基-乙胺 (1.971 g, 154 mmol), N-乙基-N'-(二甲氨基丙基)-碳二亚胺 (5.351 g, 28 mmol) 及 1-羟基苯并三唑 (1.891 g, 14 mmol), 反应体系自然升至室温, 搅拌过夜。次日点板至原料 **1d** 完全消失后, 剧烈搅拌下向反应液中加入冷水 (40 ml), 静置分液, 二氯甲烷萃取反应液 (50 ml×3), 合并有机相, 有机相依次用饱和碳酸钾溶液 (50 ml×1), 水 (50 ml×1) 及饱和氯化钠溶液 (50 ml×1) 洗涤, 二氯甲烷层用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得到标题产物 3-甲基-5-[(2-哌啶-1-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **3a** (4.818 g, 棕褐色粘稠液体), 粗产品直接投入下一步反应。

MS m/z (ESI): 422.3(M+1)。

4-甲基-2-[(2-哌啶-1-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **3b** 的制备
氩气氛下, 将 3-甲基-5-[(2-哌啶-1-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-2,4-二甲

酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **3a**(4.81 g, 11.4 mmol)溶解于 365 ml 二氯甲烷中及 68 ml 三氟乙酸中, 加热回流 2 小时, 撤去油浴, 室温继续搅拌 2 小时, 点板跟踪至原料完全消失。冰浴冷却, 剧烈搅拌下缓慢滴加 30% 氢氧化钠水溶液至反应液的 pH 为 9, 静置, 分液, 水相用二氯甲烷萃取混合液(100 ml×4), 合并有机相, 有机相用饱和氯化钠溶液洗(25 ml×1), 二氯甲烷层用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩, 得到标题产物 4-甲基-2-[(2-哌啶-1-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **3b**(2.39 g, 棕褐色粘稠液体), 粗产品直接投入下一步反应。

MS m/z (ESI): 322.5(M+1)。

5-甲酰基-4-甲基-2-[(2-哌啶-1-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **3c** 制备

氩气氛下, 在一个 25 ml 的单口瓶中加入无水 N,N-二甲基甲酰胺(0.58 ml, 7.5 mmol), 冰浴冷却至 0℃, 搅拌下缓慢滴加三氯氧磷(0.307 ml, 3.3 mmol), 滴加完毕后于室温下搅拌 15 分钟, 再继续冰盐浴冷却, 向反应瓶中滴加 4-甲基-2-[(2-哌啶-1-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **3b** 的无水 N,N-二甲基甲酰胺溶液(0.963 mg, 3 mmol, 溶解于 3.6 ml N,N-二甲基甲酰胺中), 保持反应温度为 0℃ 反应 2 小时, 点板跟踪至原料消失后, 向反应液中加入冰水(15 ml)淬灭反应, 搅拌 5 分钟, 再用 30% 的氢氧化钠溶液调节 pH 为 12。反应液用乙酸乙酯(15 ml×6)萃取, 合并有机相, 有机相用饱和氯化钠水溶液(10 ml×2)洗涤, 乙酸乙酯层用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得到标题产物 5-甲酰基-4-甲基-2-[(2-哌啶-1-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **3c**(0.952 g, 橙黄色固体), 粗产品直接投入下一步反应。

MS m/z (ESI): 350.4(M+1)。

5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-4-甲基-2-[(2-哌啶-1-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **3** 的制备

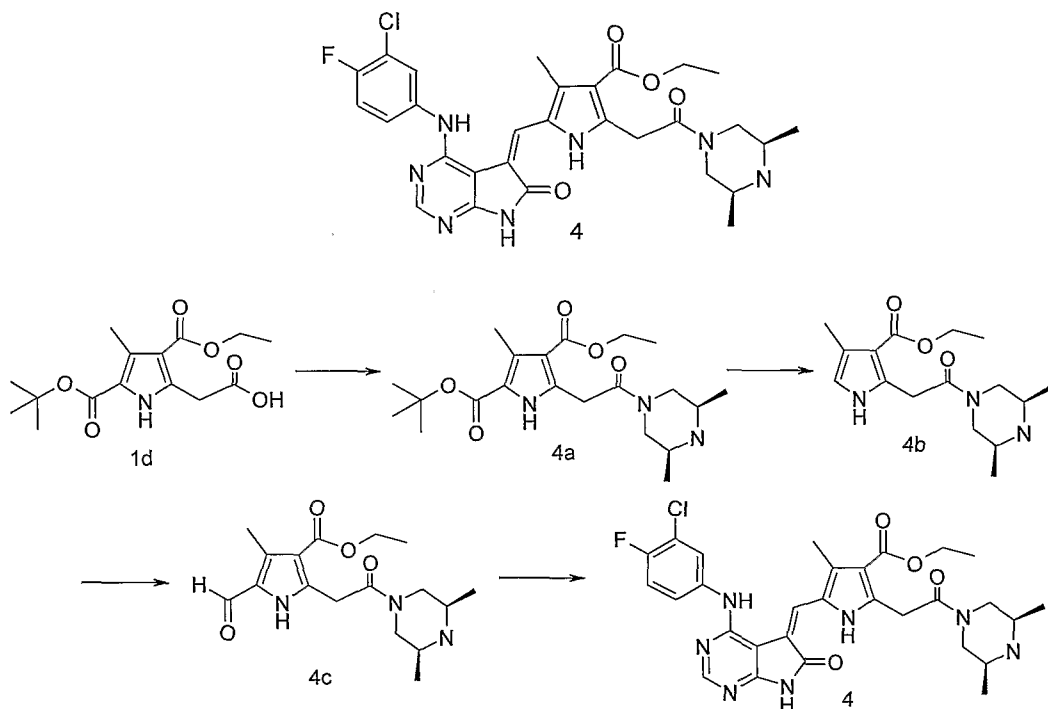
氩气氛下, 在一个 10 ml 的单口瓶中, 依次加入 5-甲酰基-4-甲基-2-[(2-哌啶-1-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **3c**(0.233 g, 0.66 mmol), 4-(3-氯-4-氟-苯胺)-5,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-6-酮(0.169 g, 0.6 mmol), 哌啶(0.15 ml, 1.5 mmol)及乙醇(1.5 ml), 加热回流 1.5 小时, 点板跟踪至 4-(3-氯-4-氟-苯胺)-5,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-6-酮完全消失, 将反应液自然冷却至室温, 有大量固体产生, 减压抽滤, 得到标题产物 5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-4-甲基-2-[(2-哌啶-1-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **3**(0.289 g, 黄色固体), 产率 79%。

MS m/z (ESI): 610.6(M+1)。

^1H NMR (DMSO- D_6 , 400MHz) δ 8.318(s, 1H, $-\text{CH}=\text{N}$), 7.687(dd, 1H, $-\text{ArH}$), 7.405~7.333(m, 3H, $-\text{ArH}$; $-\text{CH}=\text{C}$), 4.183(q, 2H, $-\text{CO}_2\text{CH}_2-$), 3.482(s, 2H, $-\text{CH}_2\text{CON}-$), 3.139(t, 2H, $-\text{CONCH}_2-$), 2.491~2.438(m, 6H, $3\times-\text{NCH}_2-$), 2.348(s, 3H, $-\text{ArCH}_3$), 1.273(t, 3H, $-\text{CH}_3$), 0.915(t, 6H, $3\times-\text{CH}_2-$)。

实施例 4

5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-2-[2-(3,5-二甲基-哌嗪-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 4 的制备



5-[2-(3,5-二甲基-哌嗪-1-基)-2-氧代-乙基]-3-甲基-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 4a 的制备

将 5-羧甲基-3-甲基-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **1d** (0.933 g, 3 mmol) 溶解于 15 ml 二氯甲烷和 1.5 ml N,N-二甲基甲酰胺的混合溶剂中, 冰浴冷却, 搅拌下依次加入 (2S, 6R)-2,6-二甲基-哌嗪 (0.377 g, 3.3 mmol), N-乙基-N'-(二甲氨基丙基)-碳二亚胺 (1.146 g, 6 mmol) 及 1-羟基苯并三唑 (0.405 g, 3 mmol), 反应体系自然升至室温, 搅拌过夜。次日点板至原料 **1d** 完全消失后, 剧烈搅拌下向反应液中加入 40 ml 冷水, 静置分液, 二氯甲烷萃取反应液 (50 ml $\times$ 3), 合并有机相, 有机相依次用饱和碳酸钾溶液 (50 ml $\times$ 1), 水 (50 ml $\times$ 1) 及饱和氯化钠溶液 (50 ml $\times$ 1) 洗涤, 二氯甲烷层用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得到标题产物 5-[2-(3,5-二甲基-哌嗪-1-基)-2-氧代-乙基]-3-甲基-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **4a** 的制备

酯-4-乙酯 **4a**(0.710 g, 棕褐色粘稠液体), 粗产品直接投入下一步反应。

MS m/z (ESI): 408.4(M+1)。

2-[2-(3,5-二甲基-哌嗪-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **4b** 的制备
氩气氛下, 将 5-[2-(3,5-二甲基-哌嗪-1-基)-2-氧代-乙基]-3-甲基-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **4a**(0.710 g, 1.7 mmol) 搅拌下溶解于 55.8 ml 二氯甲烷 (55.8 ml) 及 7 ml 三氟乙酸中, 加热回流 2 小时, 撤去油浴, 室温继续搅拌 2 小时, 点板跟踪至原料完全消失。冰浴冷却, 剧烈搅拌下缓慢滴加 30% 氢氧化钠水溶液至反应液的 pH 为 9, 静置, 分液, 水相用二氯甲烷萃取混合液(100 ml×4), 合并有机相, 有机相用饱和氯化钠溶液洗(25 ml×1), 二氯甲烷层用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩, 得到标题产物 2-[2-(3,5-二甲基-哌嗪-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **4b**(0.309 g, 棕褐色粘稠液体), 粗产品直接投入下一步反应。

MS m/z (ESI): 308.4(M+1)。

2-[2-(3,5-二甲基-哌嗪-1-基)-2-氧代-乙基]-5-甲酰基-4-甲基-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **4c** 的制备

氩气氛下, 在一个 25 ml 的单口瓶中加入无水 N'N-二甲基甲酰胺(0.2 ml, 2.5 mmol), 冰浴冷却至 0℃, 搅拌下缓慢滴加三氯氧磷(0.1 ml, 1.1 mmol), 滴加完毕后于室温下搅拌 15 分钟, 再继续冰盐浴冷却, 向反应瓶中滴加 2-[2-(3,5-二甲基-哌嗪-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **4b** 的无水 N'N-二甲基甲酰胺溶液(0.309 g, 1 mmol, 溶解于 1.2 ml N'N-二甲基甲酰胺中), 保持反应温度为 0℃ 反应 2 小时, 点板跟踪至原料消失后, 向反应液中加入冰水(15 ml) 淬灭反应, 搅拌 5 分钟, 再用 30% 的氢氧化钠溶液调节 pH 为 12。反应液用乙酸乙酯(15 ml×6)萃取, 合并有机相, 有机相用饱和氯化钠水溶液(10 ml×2)洗涤, 乙酸乙酯层用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得到标题产物 2-[2-(3,5-二甲基-哌嗪-1-基)-2-氧代-乙基]-5-甲酰基-4-甲基-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **4c**(0.329 g, 深酒红色粘稠液体), 粗产品直接投入下一步反应。

MS m/z (ESI): 336.4(M+1)。

5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-2-[2-(3,5-二甲基-哌嗪-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **4** 的制备

氩气氛下, 在一个 10 ml 的单口瓶中, 依次加入 2-[2-(3,5-二甲基-哌嗪-1-基)-2-氧代-乙基]-5-甲酰基-4-甲基-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **4c**(0.114 g, 0.34 mmol), 4-(3-氯-4-氟-苯胺)-5,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-6-酮(0.086 g, 0.3 mmol), 哌啶(0.08 ml,

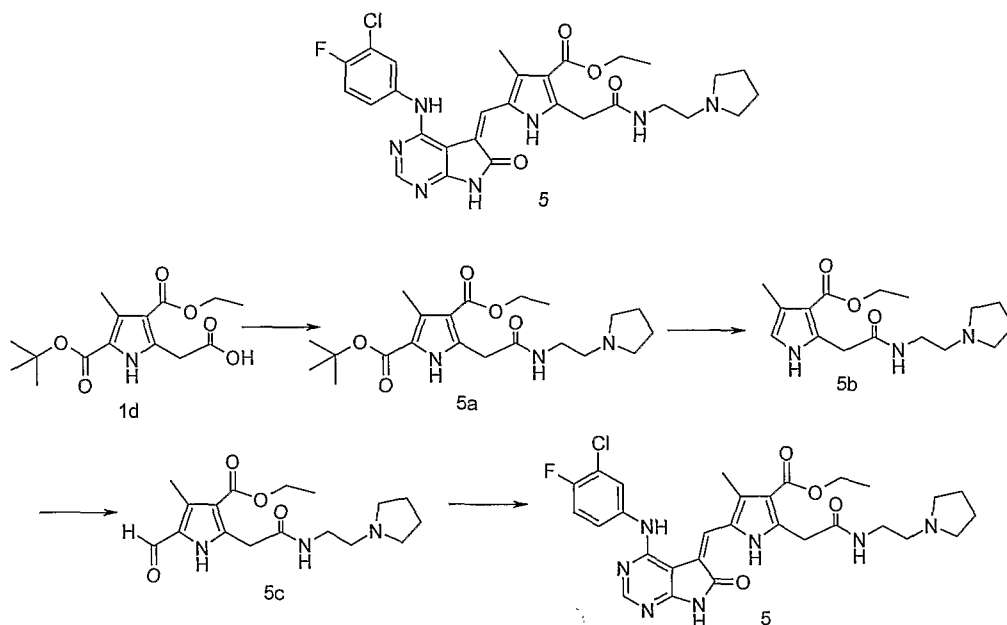
0.8 mmol)及乙醇(0.8 ml), 加热回流 1.5 小时, 点板跟踪至 4-(3-氯-4-氟-苯胺)-5,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-6-酮完全消失, 将反应液自然冷却至室温, 有大量固体产生, 减压抽滤, 得到标题产物 5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-2-[2-(3,5-二甲基-哌嗪-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **4**(0.049 g, 黄色固体), 产率 27.4%。

MS m/z (ESI): 596.6(M+1)。

^1H NMR (DMSO- D_6 , 400MHz) δ 8.324(s, 1H, -CH=N), 7.713(dd, 1H, -ArH), 7.409~7.341(m, 3H, -ArH; -CH=C), 4.166(q, 2H, -CO₂CH₂-), 3.434~3.377(m, 6H, -CH₂CON-; 2×-CONCH₂-), 2.668~2.563(m, 2H, 2×-NCHR-), 2.378(s, 3H, -ArCH₃), 1.255(t, 3H, -CH₃), 0.964(d, 6H, 2×-CH₃)。

实施例 5

5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-4-甲基-2-[(2-吡咯烷-1-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **5** 的制备



3-甲基-5-[(2-吡咯烷-1-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **5a** 的制备

将 5-羧甲基-3-甲基-1 氢-吡咯-2,4-二羧酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **1d** (2.8 g, 9 mmol) 溶解于 45 ml 二氯甲烷和 4.5 ml N,N-二甲基甲酰胺的混合溶剂中, 冰浴冷却, 搅拌下依次加入 2-吡咯烷-1-基-乙胺(1.13 g, 9.09 mmol), N-乙基-N'-(二甲氨基丙基)-碳二亚胺(3.44 g, 18 mmol)及 1-羟基苯并三唑(1.22 g, 9 mmol), 反应体系自然升至室温, 搅拌过夜。次日点板至原料 **1d** 完全消失后, 剧烈搅拌下向反

应液中加入 40 ml 冷水, 静置分液, 二氯甲烷萃取反应液(50 ml×3), 合并有机相, 有机相依次用饱和碳酸钾溶液(50 ml×1), 水(50 ml×1)及饱和氯化钠溶液(50 ml×1)洗涤, 二氯甲烷层用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得到标题产物 3-甲基-5-[(2-吡咯烷-1-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **5a**(4.48 g, 棕褐色粘稠液体), 粗产品直接投入下一步反应。

MS m/z (ESI): 408.3(M+1)。

4-甲基-2-[(2-吡咯烷-1-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **5b** 的制备

氩气氛下, 将 3-甲基-5-[(2-吡咯烷-1-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **5a**(4.48 g, 9 mmol)搅拌下溶解于 288 ml 二氯甲烷及 54 ml 三氟乙酸中, 加热回流 2 小时, 撤去油浴, 室温继续搅拌 2 小时, 点板跟踪至原料完全消失。冰浴冷却, 剧烈搅拌下缓慢滴加 30%氢氧化钠水溶液至反应液的 pH 为 9, 静置, 分液, 水相用二氯甲烷萃取混合液(100 ml×4), 合并有机相, 有机相用饱和氯化钠溶液洗(25 ml×1), 二氯甲烷层用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩, 得到标题产物 4-甲基-2-[(2-吡咯烷-1-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **5b**(1.68 g, 棕褐色粘稠液体), 粗产品直接投入下一步反应。

MS m/z (ESI): 308.4(M+1)。

5-甲酰基-4-甲基-2-[(2-吡咯烷-1-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **5c** 的制备

氩气氛下, 在一个 25 ml 的单口瓶中加入无水 N,N-二甲基甲酰胺(0.4 ml, 5.0mmol), 冰浴冷却至 0℃, 搅拌下缓慢滴加三氯氧磷(0.2 ml, 2.2 mmol), 滴加完毕后于室温下搅拌 15 分钟, 再继续冰盐浴冷却, 向反应瓶中滴加 4-甲基-2-[(2-吡咯烷-1-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **5b** 的无水 N,N-二甲基甲酰胺溶液(0.614 g, 2 mmol, 溶解于 2.4 ml N,N-二甲基甲酰胺中), 保持反应温度为 0℃ 反应 2 小时, 点板跟踪至原料消失后, 向反应液中加入冰水(15 ml)淬灭反应, 搅拌 5 分钟, 再用 30%的氢氧化钠溶液调节 pH 为 12。反应液用乙酸乙酯(15 ml×6)萃取, 合并有机相, 有机相用饱和氯化钠水溶液(10 ml×2)洗涤, 乙酸乙酯层用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得到标题产物 5-甲酰基-4-甲基-2-[(2-吡咯烷-1-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **5c**(0.517 g, 棕色固体), 产率 77%。

MS m/z (ESI): 336.6(M+1)。

5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-4-甲基-2

-(2-吡咯烷-1-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 5 的制备

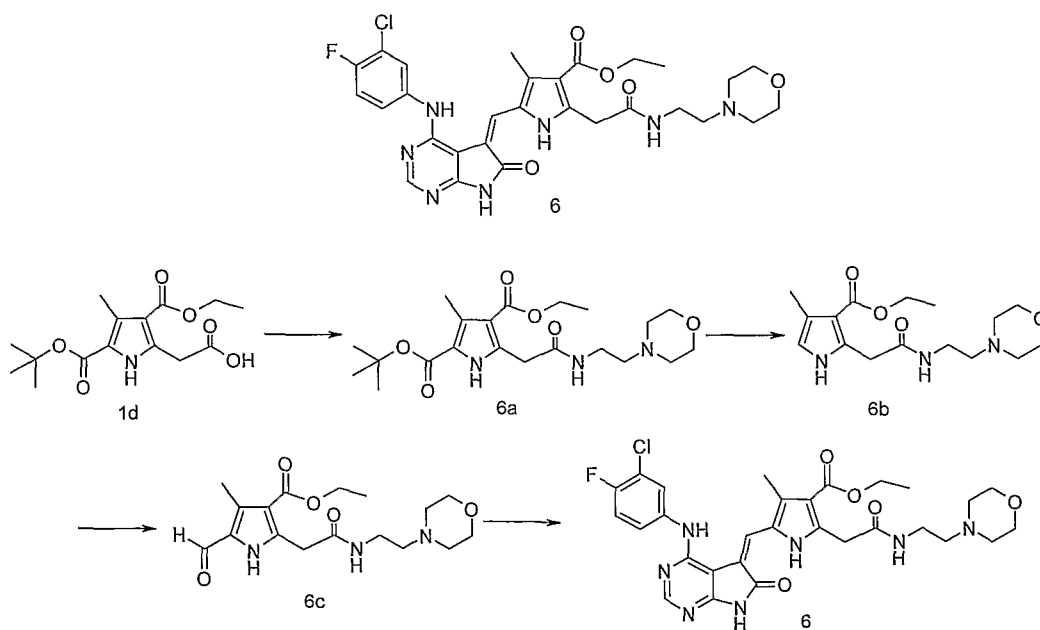
氩气氛下, 在一个 10 ml 的单口瓶中, 依次加入 5-甲酰基-4-甲基-2-[(2-吡咯烷-1-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **5c** (0.26 g, 0.782 mmol), 4-(3-氯-4-氟-苯胺)-5,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-6-酮 (0.112 g, 0.403 mmol), 哌啶 (0.15 ml, 1.5 mmol) 及乙醇 (1.5 ml), 加热回流 1.5 小时, 点板跟踪至 4-(3-氯-4-氟-苯胺)-5,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-6-酮 完全消失, 将反应液自然冷却至室温, 有大量固体产生, 减压抽滤, 得到标题产物 5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-4-甲基-2-[(2-吡咯烷-1-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **5** (39 mg, 黄褐色固体), 产率 16.3%。

MS m/z (ESI): 596.4(M+1)。

^1H NMR (DMSO- D_6 , 400MHz) δ 8.320(s, 1H, -CH=N), 7.684(dd, 1H, -ArH), 7.392~7.356(m, 3H, -ArH; -CH=C), 4.185(q, 2H, -CO₂CH₂-), 3.478(s, 2H, -CH₂CON-), 3.200(t, 2H, -CONCH₂-), 2.567(t, 2H, -NCH₂-), 2.475~2.408(m, 4H, 2×-NCH₂-), 2.350(s, 3H, -ArCH₃), 1.660(q, 4H, 2×-CH₂-), 1.274(t, 3H, -CH₃)。

实施例 6

5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-4-甲基-2-[(2-吗啉-4-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **6** 的制备



3-甲基-5-[(2-吗啉-4-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **6a** 的制备

将 5-羧甲基-3-甲基-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **1d** (10.9 g, 35

mmol)溶解于 175 ml 二氯甲烷和 17.5 ml N,N-二甲基甲酰胺的混合溶剂中, 冰浴冷却, 搅拌下依次加入 2-吗啉-4-基-乙胺(5.0 g, 38.5 mmol), N-乙基-N'-(二甲氨基丙基)-碳二亚胺(13.37 g, 70 mmol)及 1-羟基苯并三唑(4.73 g, 35 mmol), 反应体系自然升至室温, 搅拌过夜。次日点板至原料 **1d** 完全消失后, 剧烈搅拌下向反应液中加入 35 ml 冷水, 静置分液, 二氯甲烷萃取反应液(50 ml×3), 合并有机相, 有机相依次用饱和碳酸钾溶液(50 ml×1), 水(50 ml×1)及饱和氯化钠溶液(50 ml×1)洗涤, 二氯甲烷层用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得到标题产物 3-甲基-5-[(2-吗啉-4-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **6a**(12.88 g, 棕褐色粘稠液体), 粗产品直接投入下一步反应。

MS m/z (ESI): 424.4(M+1)。

4-甲基-2-[(2-吗啉-4-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **6b** 的制备
氩气氛下, 将 3-甲基-5-[(2-吗啉-4-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **6a**(4.23 g, 10 mmol)搅拌下溶解于 320 ml 二氯甲烷及 60 ml 三氟乙酸中, 加热回流 2 小时, 撤去油浴, 室温继续搅拌 2 小时, 点板跟踪至原料完全消失。冰浴冷却, 剧烈搅拌下缓慢滴加 30%氢氧化钠水溶液至反应液的 pH 为 9, 静置, 分液, 水相用二氯甲烷萃取混合液(100 ml×4), 合并有机相, 有机相用饱和氯化钠溶液洗(25 ml×1), 二氯甲烷层用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩, 得到标题产物 4-甲基-2-[(2-吗啉-4-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **6b**(2.35 g, 棕褐色粘稠液体), 粗产品直接投入下一步反应。

MS m/z (ESI): 324.3(M+1)。

5-甲酰基-4-甲基-2-[(2-吗啉-4-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **6c** 制备

氩气氛下, 在一个 25 ml 的单口瓶中加入无水 N,N-二甲基甲酰胺(1.6 ml, 20 mmol), 冰浴冷却至 0℃, 搅拌下缓慢滴加三氯氧磷(0.75 ml, 8.0 mmol), 滴加完毕后于室温下搅拌 15 分钟, 继续冰盐浴冷却, 向反应瓶中滴加 4-甲基-2-[(2-吗啉-4-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **6b** 的无水 N,N-二甲基甲酰胺溶液(2.346 mg, 7.26 mmol, 溶解于 8.7 ml N,N-二甲基甲酰胺中), 保持反应温度为 0℃ 反应 2 小时, 点板跟踪至原料消失后, 向反应液中加入冰水(15 ml)淬灭反应, 搅拌 5 分钟后用 30%的氢氧化钠溶液调节 pH 为 12。反应液用乙酸乙酯(15 ml×6)萃取, 合并有机相, 有机相用饱和氯化钠水溶液(10 ml×2)洗涤, 乙酸乙酯层用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得到标题产物 5-甲酰基-4-甲基-2-[(2-吗啉-4-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **6c**(1.105 g, 棕褐色粘稠液体), 产率 43.3%。

MS m/z (ESI): 352.5(M+1)。

5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-4-甲基-2-[(2-吗啉-4-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1-氢-吡咯-3-甲酸乙酯 6 的制备

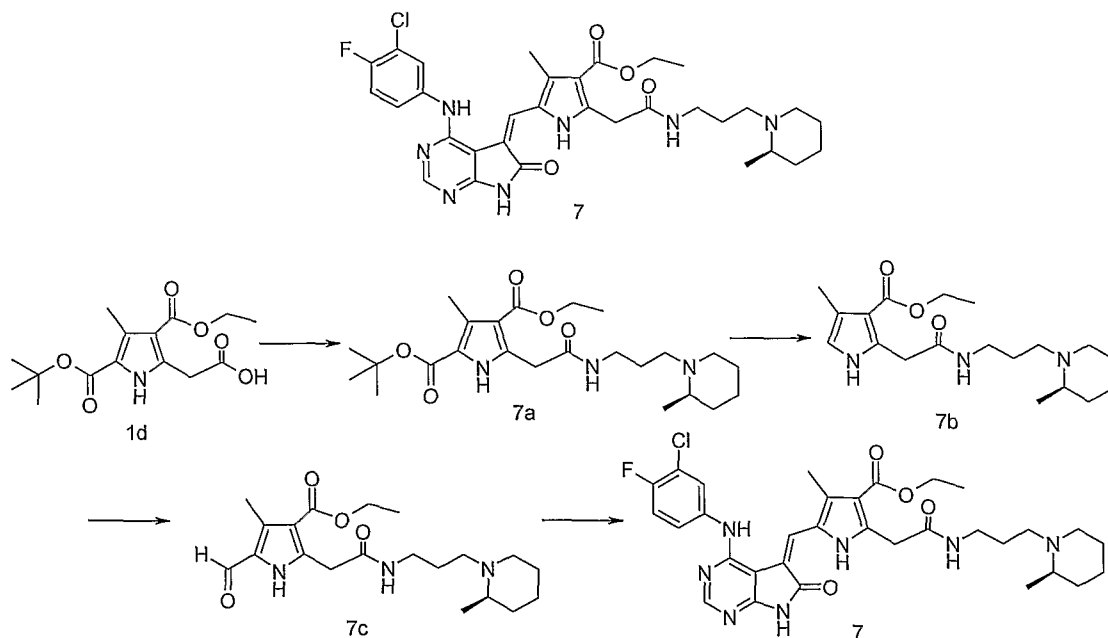
氩气氛下, 在一个 10 ml 的单口瓶中, 依次加入 5-甲酰基-4-甲基-2-[(2-吗啉-4-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1-氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **6c**(0.253 g, 0.72 mmol), 4-(3-氯-4-氟-苯胺)-5,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-6-酮(0.169 g, 0.6 mmol), 哌啶(0.15 ml, 1.5 mmol)及乙醇(3 ml), 加热回流 1.5 小时, 点板跟踪至 4-(3-氯-4-氟-苯胺)-5,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-6-酮完全消失, 将反应液自然冷却至室温, 有大量固体产生, 减压抽滤, 得到标题产物 5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-4-甲基-2-[(2-吗啉-4-基-乙氨基甲酰)-甲基]-1-氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **6**(0.204 g, 黄色固体), 产率 54.8%。

MS m/z (ESI): 612.2(M+1)。

^1H NMR (DMSO- D_6 , 400MHz): δ 8.325(s, 1H, -CH=N), 7.685(dd, 1H, -ArH), 7.394~7.359(m, 3H, -ArH; -CH=C), 4.190(q, 2H, -CO₂CH₂-), 3.541(t, 4H, 2×-OCH₂-), 3.476(s, 2H, -CH₂CON-), 3.213(t, 2H, -CONCH₂-), 2.404~2.334(m, 9H, 3×-NCH₂-, -ArCH₃), 1.276(t, 3H, -CH₃)。

实施例 7

5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-4-甲基-2-[[3-(2-甲基-哌啶-1-基)-丙氨基甲酰]-甲基]-1-氢-吡咯-3-甲酸乙酯 7 的制备



3-甲基-5-{{[3-(2-甲基-哌啶-1-基)-丙氨基甲酰]-甲基}-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 7a 的制备

将 5-羧甲基-3-甲基-1 氢-吡咯-2,4-二羧酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **1d**(4.35 g, 14 mmol)溶解于 70 ml 二氯甲烷和 7 ml N,N'-二甲基甲酰胺的混合溶剂中,冰浴冷却,搅拌下依次加入(2R)-3-(2-甲基-哌啶-1-基)-丙胺(2.41 g, 15.4 mmol), N-乙基-N'-(二甲氨基丙基)-碳二亚胺(5.35 g, 28 mmol)及 1-羟基苯并三唑(1.89 g, 14 mmol), 反应体系自然升至室温,搅拌过夜。次日点板至原料 **1d** 完全消失后,剧烈搅拌下向反应液中加入 40 ml 冷水,静置分液,二氯甲烷萃取反应液(50 ml×3),合并有机相,有机相依次用饱和碳酸钾溶液(50 ml×1),水(50 ml×1)及饱和氯化钠溶液(50 ml×1)洗涤,二氯甲烷层用无水硫酸钠干燥,过滤,滤液减压浓缩得到标题产物 3-甲基-5-{{[3-(2-甲基-哌啶-1-基)-丙氨基甲酰]-甲基}-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **7a**(6.617 g, 棕褐色油状物),粗产品直接投入下一步反应。

MS m/z (ESI): 450.3(M+1)。

4-甲基-2-{{[3-(2-甲基-哌啶-1-基)-丙氨基甲酰]-甲基}-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 7b 制备

氩气氛下,在 500 ml 的三口瓶中依次加入 3-甲基-5-{{[3-(2-甲基-哌啶-1-基)-丙氨基甲酰]-甲基}-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **7a**(6.3 g, 14 mmol)搅拌下溶解于 450 ml 二氯甲烷及 84 ml 三氟乙酸,加热回流 2 小时,撤去油浴,室温继续搅拌 2 小时,点板跟踪至原料完全消失。冰浴冷却,剧烈搅拌下缓慢滴加 30%氢氧化钠水溶液至反应液的 pH 为 9,静置,分液,水相用二氯甲烷萃取混合液(100 ml×4),合并有机相,有机相用饱和氯化钠溶液洗(25 ml×1),二氯甲烷层用无水硫酸钠干燥,过滤,滤液减压浓缩,得到标题产物 4-甲基-2-{{[3-(2-甲基-哌啶-1-基)-丙氨基甲酰]-甲基}-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **7b**(3.348 g, 白色固体),粗产品直接投入下一步反应。

MS m/z (ESI): 350.4(M+1)。

5-甲酰基-4-甲基-2-{{[3-(2-甲基-哌啶-1-基)-丙氨基甲酰]-甲基}-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 7c 的制备

氩气氛下,在一个 25 ml 的单口瓶中加入无水 N,N'-二甲基甲酰胺(0.66 ml, 8.25 mmol),冰浴冷却至 0℃,搅拌下缓慢滴加三氯氧磷(0.3 ml, 3.3 mmol),滴加完毕后于室温下搅拌 15 分钟,再继续冰盐浴冷却,向反应瓶中滴加 4-甲基-2-{{[3-(2-甲基-哌啶-1-基)-丙氨基甲酰]-甲基}-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **7b** 的无水

N,N-二甲基甲酰胺溶液(1.048 mg, 3 mmol, 溶解于 3.6 ml N,N-二甲基甲酰胺中), 保持反应温度为 0°C 反应 2 小时, 点板跟踪至原料消失后, 向反应液中加入冰水(15 ml)淬灭反应, 搅拌 5 分钟, 再用 30%的氢氧化钠溶液调节 pH 为 12。反应液用乙酸乙酯(15 ml×6)萃取, 合并有机相, 有机相用饱和氯化钠水溶液(10 ml×2)洗涤, 乙酸乙酯层用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得到标题产物 5-甲酰基-4-甲基-2-{{[3-(2-甲基-哌啶-1-基)-丙氨基甲酰]-甲基}-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 7c(1.422 g, 棕色固体), 粗产品直接投入下一步反应。

MS m/z (ESI): 378.5(M+1)。

5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-4-甲基-2-{{[3-(2-甲基-哌啶-1-基)-丙氨基甲酰]-甲基}-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 7 的制备

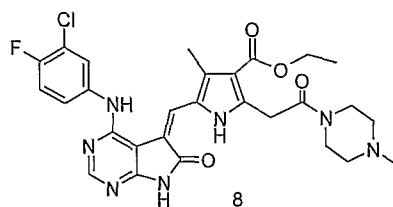
氩气氛下, 在一个 10 ml 的单口瓶中, 依次加入 5-甲酰基-4-甲基-2-{{[3-(2-甲基-哌啶-1-基)-丙氨基甲酰]-甲基}-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 7c(0.226 g, 0.6 mmol), 4-(3-氯-4-氟-苯胺)-5,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-6-酮(0.167 g, 0.6 mmol), 哌啶(0.15 ml, 1.5 mmol)及乙醇(1.5 ml), 加热回流 1.5 小时, 点板跟踪至 4-(3-氯-4-氟-苯胺)-5,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-6-酮完全消失, 将反应液自然冷却至室温, 有大量固体产生, 减压抽滤, 得到标题产物 5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-4-甲基-2-{{[3-(2-甲基-哌啶-1-基)-丙氨基甲酰]-甲基}-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 7(102 mg, 黄色固体), 产率 26.6%。

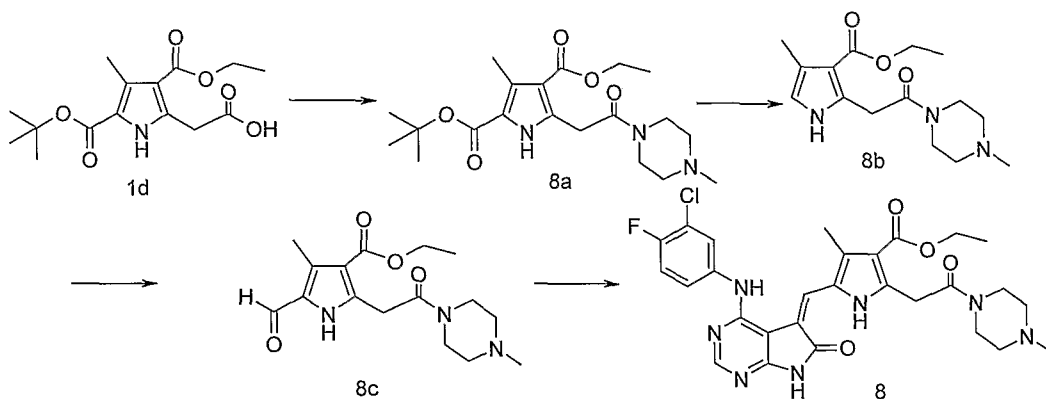
MS m/z (ESI): 639.3(M+1)。

¹H NMR (DMSO-D₆, 400MHz): δ 8.324(s, 1H, -CH=N), 7.684(dd, 1H, -ArH), 7.393~7.359(m, 3H, -ArH; -CH=C), 4.187(q, 2H, -CO₂CH₂-), 3.454(s, 2H, -CH₂CON-), 3.081(t, 2H, -CONCH₂-), 2.350~2.334(m, 6H, -NCH₂-, -NCHR-, -ArCH₃), 2.233(t, 2H, -NCH₂-), 1.579~1.526(m, 6H, 3×-CH₂-), 1.273(t, 3H, -CH₃), 1.204~1.156(m, 2H, -CH₂-), 0.952(d, 3H, -CH₃)。

实施例 8

5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-4-甲基-2-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-2-氧代-乙基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 8 的制备





3-甲基-5-[2-(4-甲基-派嗪-1-基)-2-氧代-乙基]-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 8a 的制备

将 5-羧甲基-3-甲基-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **1d** (933 mg, 3 mmol) 溶解于 15 ml 二氯甲烷和 1.5 ml N,N-二甲基甲酰胺的混合溶剂中, 冰浴冷却, 搅拌下依次加入 1-甲基-派嗪 (331 mg, 3.3 mmol), N-乙基-N'-(二甲氨基丙基)-碳二亚胺 (1.146 g, 6 mmol) 及 1-羟基苯并三唑 (405 mg, 3 mmol), 反应体系自然升至室温, 搅拌过夜。次日点板至原料 **1d** 完全消失后, 剧烈搅拌下向反应液中加入 40 ml 冷水, 静置分液, 二氯甲烷萃取反应液 (50 ml×3), 合并有机相, 有机相依次用饱和碳酸钾溶液 (50 ml×1), 水 (50 ml×1) 及饱和氯化钠溶液 (50 ml×1) 洗涤, 二氯甲烷层用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得到标题产物 3-甲基-5-[2-(4-甲基-派嗪-1-基)-2-氧代-乙基]-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **8a** (676 mg, 棕色油状物), 粗产品直接投入下一步反应。

MS m/z (ESI): 394.4(M+1)。

4-甲基-2-[2-(4-甲基-派嗪-1-基)-2-氧代-乙基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 8b 的制备

氩气氛下, 将 3-甲基-5-[2-(4-甲基-派嗪-1-基)-2-氧代-乙基]-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **8a** (676 mg, 1.7 mmol) 搅拌下溶解于 180 ml 二氯甲烷及 30 ml 三氟乙酸, 加热回流 2 小时, 撤去油浴, 室温继续搅拌 2 小时, 点板跟踪至原料完全消失。冰浴冷却, 剧烈搅拌下缓慢滴加 30% 氢氧化钠水溶液至反应液的 pH 为 9, 静置, 分液, 水相用二氯甲烷萃取混合液 (100 ml×4), 合并有机相, 有机相用饱和氯化钠溶液洗 (25 ml×1), 二氯甲烷层用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩, 得到标题产物 4-甲基-2-[2-(4-甲基-派嗪-1-基)-2-氧代-乙基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **8b** (504 mg, 棕色油状物), 粗产品直接投入下一步反应。

MS m/z (ESI): 294.3(M+1)。

5-甲酰基-4-甲基-2-[2-(4-甲基-派嗪-1-基)-2-氧代-乙基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 8c

的制备

氩气氛下, 在一个 25 ml 的单口瓶中加入无水 N,N'-二甲基甲酰胺(0.37 ml, 4.625 mmol), 冰浴冷却至 0°C, 搅拌下缓慢滴加三氯氧磷(0.17 ml, 1.87 mmol), 滴加完毕后于室温下搅拌 15 分钟, 再继续冰盐浴冷却, 向反应瓶中滴加 4-甲基-2-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-2-氧代-乙基]-1-氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **8b** 的无水 N,N'-二甲基甲酰胺溶液(501 mg, 1.7 mmol, 溶解于 2 ml N,N'-二甲基甲酰胺中), 保持反应温度为 0°C 反应 2 小时, 点板跟踪至原料消失后, 向反应液中加入冰水(15 ml)淬灭反应, 搅拌 5 分钟, 再用 30% 的氢氧化钠溶液调节 pH 为 12。反应液用乙酸乙酯(15 ml×6)萃取, 合并有机相, 有机相用饱和氯化钠水溶液(10 ml×2)洗涤, 乙酸乙酯层用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得到标题产物 5-甲酰基-4-甲基-2-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-2-氧代-乙基]-1-氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **8c**(404 mg, 褐色油状物), 粗产品直接投入下一步反应。

MS m/z (ESI): 324.3(M+1)。

5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-4-甲基-2-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-2-氧代-乙基]-1-氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **8** 的制备

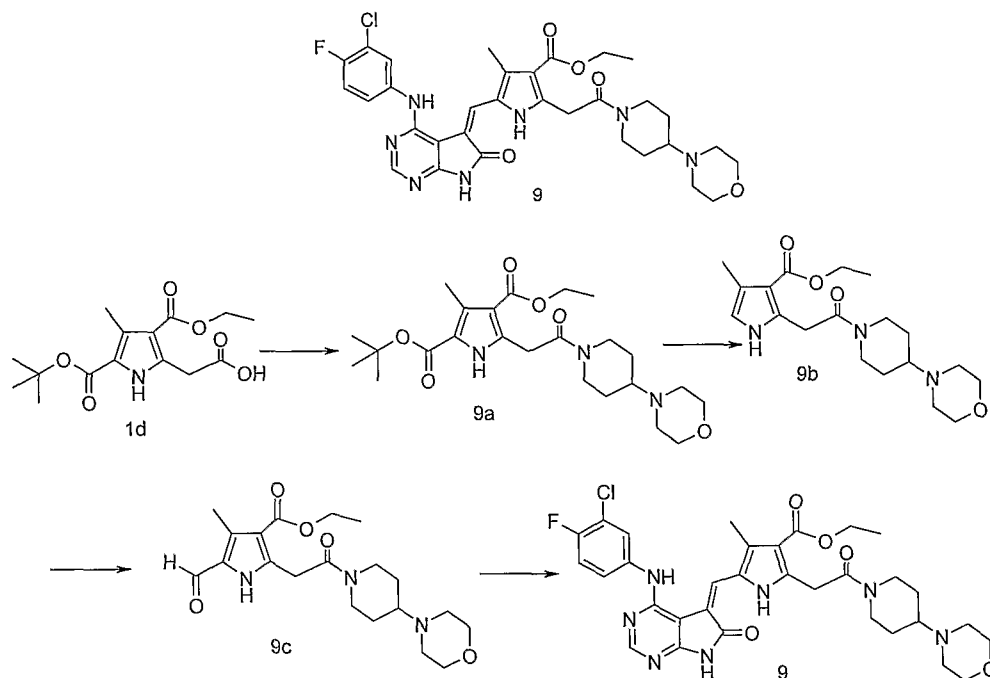
氩气氛下, 在一个 10 ml 的单口瓶中, 依次加入 5-甲酰基-4-甲基-2-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-2-氧代-乙基]-1-氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **8c**(192 mg, 0.6 mmol), 4-(3-氯-4-氟-苯胺)-5,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-6-酮(167 mg, 0.6 mmol), 哌啶(0.15 ml, 1.5 mmol)及乙醇(1.5 ml), 加热回流 1.5 小时, 点板跟踪至 4-(3-氯-4-氟-苯胺)-5,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-6-酮完全消失, 将反应液自然冷却至室温, 有大量固体产生, 减压抽滤, 得到标题产物 5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-4-甲基-2-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-2-氧代-乙基]-1-氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **8**(168 mg, 黄色固体), 产率 48.1%。

MS m/z (ESI): 582.5(M+1)。

¹H NMR (DMSO-D₆, 400MHz): δ8.324(s, 1H, -CH=N), 7.694(dd, 1H, -ArH), 7.403~7.340(m, 3H, -ArH; -CH=C), 4.167(q, 2H, -CO₂CH₂-), 3.534~3.477(m, 6H, -CH₂CON-; 2×-CONCH₂-), 2.366(s, 3H, -ArCH₃), 2.344~2.290(m, 4H, 2×-NCH₂-), 2.190(s, 3H, -NCH₃), 1.257(t, 3H, -CH₃)。

实施例 9

5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-4-甲基-2-[2-(4-吗啉-4-基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-1-氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **9** 的制备



3-甲基-5-[2-(4-吗啉-4-基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 9a 的制备

将 5-羧甲基-3-甲基-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **1d** (1.236 g, 3.97 mmol) 溶解于 20 ml 二氯甲烷和 2 ml N,N'-二甲基甲酰胺的混合溶剂中, 冰浴冷却, 搅拌下依次加入 4-哌啶-4-基-吗啉 (0.75 g, 4.4 mmol), N-乙基-N'-(二甲氨基丙基)-碳二亚胺 (2 g, 7.94 mmol) 及 1-羟基苯并三唑 (0.6 g, 3.97 mmol), 反应体系自然升至室温, 搅拌过夜。次日点板至原料 **1d** 完全消失后, 剧烈搅拌下向反应液中加入 40 ml 冷水, 静置分液, 二氯甲烷萃取反应液 (50 ml×3), 合并有机相, 有机相依次用饱和碳酸钾溶液 (50 ml×1), 水 (50 ml×1) 及饱和氯化钠溶液 (50 ml×1) 洗涤, 二氯甲烷层用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得到标题产物 3-甲基-5-[2-(4-吗啉-4-基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **9a** (1.673 g, 棕褐色粘稠液体), 产率 90.33%。

MS m/z (ESI): 464.7(M+1)。

4-甲基-2-[2-(4-吗啉-4-基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 9b 的制备

氩气氛下, 将 3-甲基-5-[2-(4-吗啉-4-基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **9a** (1.673 g, 3.6 mmol) 搅拌下溶解于 113 ml 二氯甲烷及 20 ml 三氟乙酸中, 加热回流 2 小时, 撤去油浴, 室温继续搅拌 2 小时, 点板跟踪至原料完全消失。冰浴冷却, 剧烈搅拌下缓慢滴加 30% 氢氧化钠水溶液至反应液的 pH 为 9, 静置, 分液, 水相用二氯甲烷萃取混合液 (100 ml×4), 合并

有机相, 有机相用饱和氯化钠溶液洗(25 ml×1), 二氯甲烷层用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩, 得到标题产物 4-甲基-2-[2-(4-吗啉-4-基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **9b**(1.141 g, 棕褐色油状液体)。产率 86.99%。

MS m/z (ESI): 364.5(M+1)。

5-甲酰基-4-甲基-2-[2-(4-吗啉-4-基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **9c** 的制备

氩气氛下, 在一个 25 ml 的单口瓶中加入无水 N,N-二甲基甲酰胺(0.3 ml, 3.9 mmol), 冰浴冷却至 0°C, 搅拌下缓慢滴加三氯氧磷(112 ul, 1.1 mmol), 滴加完毕后于室温下搅拌 15 分钟, 再继续冰盐浴冷却, 向反应瓶中滴加 4-甲基-2-[2-(4-吗啉-4-基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **9b** 的无水 N,N-二甲基甲酰胺溶液(363 mg, 1 mmol, 溶解于 0.6 ml N,N-二甲基甲酰胺中), 保持反应温度为 0°C 反应 2 小时, 点板跟踪至原料消失后, 向反应液中加入冰水(15 ml)淬灭反应, 搅拌 5 分钟, 再用 30% 的氢氧化钠溶液调节 pH 为 12。反应液用乙酸乙酯(15 ml×6)萃取, 合并有机相, 有机相用饱和氯化钠水溶液(10 ml×1)洗涤, 乙酸乙酯层用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得到标题产物 5-甲酰基-4-甲基-2-[2-(4-吗啉-4-基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **9c**(0.292 g, 红棕色固体), 产率 74.68%。

MS m/z (ESI): 392.6(M+1)。

5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-4-甲基-2-[2-(4-吗啉-4-基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **9** 的制备

氩气氛下, 在一个 10 ml 的单口瓶中, 依次加入 5-甲酰基-4-甲基-2-[2-(4-吗啉-4-基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **9c**(0.292 g, 0.75 mmol), 4-(3-氯-4-氟-苯胺)-5,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-6-酮(0.115 g, 0.75 mmol), 哌啶(0.15 ml, 1.5 mmol)及乙醇(1.2 ml), 加热回流 1.5 小时, 点板跟踪至 4-(3-氯-4-氟-苯胺)-5,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-6-酮完全消失, 将反应液自然冷却至室温, 有大量固体产生, 减压抽滤, 得到标题产物 5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-4-甲基-2-[2-(4-吗啉-4-基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **9**(40 mg, 棕黄色固体), 产率 16.43%。

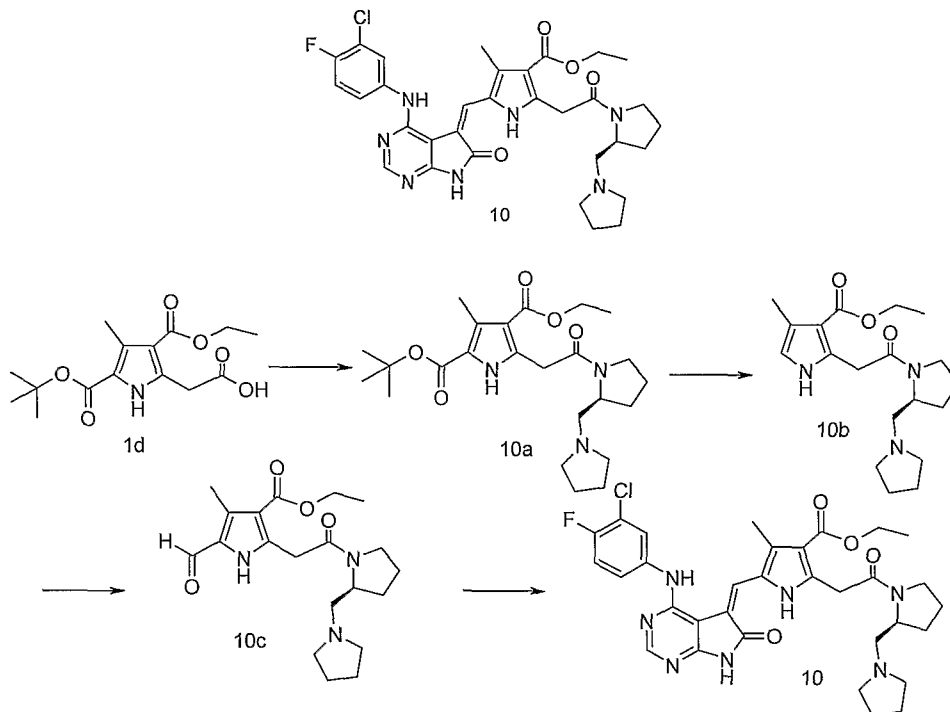
MS m/z (ESI): 652.5(M+1)。

¹H NMR (DMSO-D₆, 400MHz): δ 8.321(s, 1H, -CH=N), 7.692(dd, 1H, -ArH), 7.425~7.337(m, 3H, -ArH; -CH=C), 4.165(q, 2H, -CO₂CH₂-), 3.529(t, 4H, 2×-OCH₂-), 3.474(s, 2H, -CH₂CON-), 3.049(t, 4H, 2×-CONCH₂-), 2.441~2.435(m, 5H, 2×-NCH₂-, -NCHR-), 2.346(s, 3H, -ArCH₃), 1.798~1.768(m, 4H, 2×-CH₂-),

1.273(t, 3H, -CH₃)。

实施例 10

5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-4-甲基-2-[2-氧代-2-(2-吡咯烷-1-基甲基-吡咯烷-1-基)-乙基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 10 的制备



3-甲基-5-[2-氧代-2-(2-吡咯烷-1-基甲基-吡咯烷-1-基)-乙基]-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 10a 的制备

将 5-羧甲基-3-甲基-1 氢-吡咯-2,4-二羧酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **1d** (1.244 g, 4 mmol) 溶解于 20 ml 二氯甲烷和 2 ml N,N-二甲基甲酰胺的混合溶剂中, 冰浴冷却, 搅拌下依次加入(s)-2-(吡咯烷-1-基甲基)-吡咯烷 (0.72 ml, 4.4 mmol), N-乙基-N'-(二甲氨基丙基)-碳二亚胺 (2 g, 8 mmol) 及 1-羟基苯并三唑 (0.6 g, 4 mmol), 反应体系自然升至室温, 搅拌过夜。次日点板至原料 **1d** 完全消失后, 剧烈搅拌下向反应液中加入 40 ml 冷水中, 静置分液, 二氯甲烷萃取反应液 (50 ml×3), 合并有机相, 有机相依次用饱和碳酸钾溶液 (50 ml×1), 水 (50 ml×1) 及饱和氯化钠溶液 (50 ml×1) 洗涤, 二氯甲烷层用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得到标题产物 3-甲基-5-[2-氧代-2-(2-吡咯烷-1-基甲基-吡咯烷-1-基)-乙基]-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **10a** (1.755 g, 棕黄色油状物), 产率 98.15%。

MS m/z (ESI): 448.3(M+1)。

4-甲基-2-[2-氧代-2-(2-吡咯烷-1-基甲基-吡咯烷-1-基)-乙基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 10b 的制备

氩气氛下, 将 3-甲基-5-[2-氧代-2-(2-吡咯烷-1-基甲基-吡咯烷-1-基)-乙基]-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **10a** (1.255 g, 3.93 mmol) 搅拌下溶解于 124 ml 二氯甲烷及 22 ml 三氟乙酸中, 加热回流 2 小时, 撤去油浴, 室温继续搅拌 2 小时, 点板跟踪至原料完全消失。冰浴冷却, 剧烈搅拌下缓慢滴加 30% 氢氧化钠水溶液至反应液的 pH 为 9, 静置, 分液, 水相用二氯甲烷萃取混合液 (100 ml×4), 合并有机相, 有机相用饱和氯化钠溶液洗 (25 ml×1), 二氯甲烷层用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩, 得到标题产物 4-甲基-2-[2-氧代-2-(2-吡咯烷-1-基甲基-吡咯烷-1-基)-乙基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **10b** (0.566 g, 棕黄色油状物)。产率 41.63%。

MS m/z (ESI): 348.3(M+1)。

5-甲酰基-4-甲基-2-[2-氧代-2-(2-吡咯烷-1-基甲基-吡咯烷-1-基)-乙基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 10c 的制备

氩气氛下, 在一个 25 ml 的单口瓶中加入无水 N,N'-二甲基甲酰胺 (ml, mmol), 冰浴冷却至 0°C, 搅拌下缓慢滴加三氯氧磷 (183 μ l, 1.8 mmol), 滴加完毕后于室温下搅拌 15 分钟, 再继续冰盐浴冷却, 向反应瓶中滴加 4-甲基-2-[2-氧代-2-(2-吡咯烷-1-基甲基-吡咯烷-1-基)-乙基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **10b** 的无水 N,N'-二甲基甲酰胺溶液 (566 mg, 1.63 mmol, 溶解于 2 ml N,N'-二甲基甲酰胺中), 保持反应温度为 0°C 反应 2 小时, 点板跟踪至原料消失后, 向反应液中加入冰水 (15 ml) 淬灭反应, 搅拌 5 分钟, 再用 30% 的氢氧化钠溶液调节 pH 为 12。反应液用乙酸乙酯 (15 ml×6) 萃取, 合并有机相, 有机相用饱和氯化钠水溶液 (10 ml×1) 洗涤, 乙酸乙酯层用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得到标题产物 5-甲酰基-4-甲基-2-[2-氧代-2-(2-吡咯烷-1-基甲基-吡咯烷-1-基)-乙基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **10c** (0.536 g, 红棕色固体), 产率 87.72%。

MS m/z (ESI): 376.4(M+1)。

5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-4-甲基-2-[2-氧代-2-(2-吡咯烷-1-基甲基-吡咯烷-1-基)-乙基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 10 制备

氩气氛下, 在一个 10 ml 的单口瓶中, 依次加入 5-甲酰基-4-甲基-2-[2-氧代-2-(2-吡咯烷-1-基甲基-吡咯烷-1-基)-乙基]-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **10c** (0.2 g, 0.5 mmol), 4-(3-氯-4-氟-苯胺)-5,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-6-酮 (0.14 g, 2.5 mmol), 哌

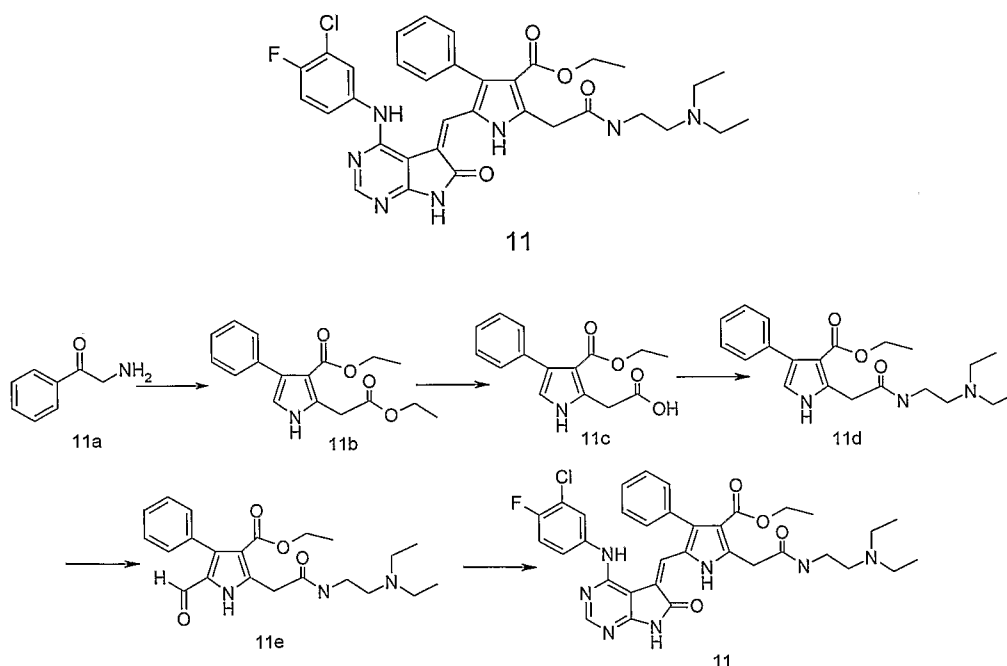
啉(0.1 ml, 1 mmol)及乙醇(1.2 ml), 加热回流 1.5 小时, 点板跟踪至 4-(3-氯-4-氟-苯胺)-5,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-6-酮完全消失, 将反应液自然冷却至室温, 有大量固体产生, 减压抽滤, 得到标题产物 5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-4-甲基-2-[2-氧代-2-(2-吡咯烷-1-基甲基-吡咯烷-1-基)-乙基]-1-氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **10**(0.103 g, 黄色固体), 产率 37.44%。

MS m/z (ESI): 636.5(M+1)。

^1H NMR (DMSO- D_6 , 400MHz): δ 8.323(s, 1H, -CH=N), 7.710(dd, 1H, -ArH), 7.398~7.339(m, 3H, -ArH; -CH=C), 4.209~4.063(m, 3H, -CO₂CH₂-, -CONCHR-), 3.522(t, 2H, -CONCH₂-), 3.291(s, 2H, -CH₂CON-), 2.465~2.433(m, 6H, 3×-NCH₂-), 2.371(s, 3H, -ArCH₃), 1.944~1.837(m, 4H, 2×-CH₂-), 1.666~1.653(m, 4H, 2×-CH₂-), 1.251(t, 3H, -CH₃)。

实施例 11

5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-2-[(2-二乙胺基-乙氨基甲酰)-甲基]-4-苯基-1-氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **11** 的制备



2-乙氧羰甲基-4-苯基-1-氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **11b** 的制备

在一个配有回流冷凝管的 250 ml 的三口烧瓶中, 加入 2-氨基-1-苯基-乙酮 **11a**(10.3 g, 0.06 mol)及醋酸钠(9.86 g, 0.12 mol), 油泵抽至真空, 搅拌下加入 3-羧基-戊二酸二乙酯(10.9 ml, 0.06 mol)及水(60 ml)搅拌, 加热回流 5 小时后停止加热, 室温搅拌过夜。次日, 点板跟踪至原料基本消失, 结束反应。反应液用

乙酸乙酯(50ml×7)萃取, 合并有机相, 用水(50 ml×1)洗, 乙酸乙酯层用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得标题产物干燥有机相, 浓缩得到产物 2-乙氧羰甲基-4-苯基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **11b**(16.802 g, 浅黄色固体), 产率 93.03%。

MS m/z (ESI): 302.2(M+1)。

4-苯基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯-2-羧酸 **11c** 的制备

氩气氛下, 将 2-乙氧羰甲基-4-苯基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **11b**(20.387 g, 0.068 mmol) 搅拌下溶解于 102 ml 甲醇和 102 ml 四氢呋喃的混合溶液中, 加入氢氧化锂水溶液(11.38 g, 0.27 mol 溶解于 154 ml 的水中), 室温反应 0.5 小时后, 加热回流 2 小时, 点板跟踪至原料消失, 结束反应, 减压旋蒸除去甲醇及四氢呋喃, 加水(50 ml)稀释, 冰浴条件下向反应液中滴加 20% 的盐酸至 pH 为 4, 此时有大量白色固体生成, 抽滤得到标题产物 4-苯基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯-2-羧酸 **11c**(18.48 g, 白色固体), 产率 100%。

MS m/z (ESI): 274(M+1)。

2-[(2-二乙氨基-乙氨基甲酰)-甲基]-4-苯基-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **11d** 的制备

将 5-甲基-4-苯基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯-2-羧酸 **11c** (18.48 g, 0.068 mol) 溶解于 34 ml 二氯甲烷和 34 ml N,N-二甲基甲酰胺的混合溶剂中, 冰浴冷却, 搅拌下依次加入 N,N-二乙基乙二胺(10.155ml, 0.074 mmol), N-乙基-N'-(二甲氨基丙基)-碳二亚胺(33.85 g, 0.135 mmol) 及 1-羟基苯并三唑(10.188 g, 0.068 mmol), 反应体系自然升至室温, 搅拌过夜。次日点板至原料 **11c** 完全消失, 剧烈搅拌下向反应液中加入 50 ml 冷水, 静置分液, 二氯甲烷萃取反应液(100 ml×3), 合并有机相, 有机相依次用饱和碳酸钾溶液(50 ml×1), 水(50 ml×1) 及饱和氯化钠溶液(50 ml×1) 洗涤, 二氯甲烷层用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得到标题产物 2-[(2-二乙氨基-乙氨基甲酰)-甲基]-4-苯基-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **11d**(22.94 g, 棕色油状物), 产率 91.33%。

MS m/z (ESI): 372(M+1)。

2-[(2-二乙氨基-乙氨基甲酰)-甲基]-5-甲酰基-4-苯基-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **11e** 制备

氩气氛下, 在一个 25 ml 的单口瓶中加入无水 N,N-二甲基甲酰胺(0.58 ml, 7.5 mmol), 冰浴冷却至 0°C, 搅拌下缓慢滴加三氯氧磷(0.42 ml, 4.5 mmol), 滴加完毕后于室温下搅拌 15 分钟, 再继续冰盐浴冷却, 向反应瓶中滴加 2-[(2-二乙氨基-乙氨基甲酰)-甲基]-4-苯基-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **11d** 的无水 N,N-二甲基甲酰胺溶液(1.113 g, 3 mmol, 溶解于 3.6 ml N,N-二甲基甲酰胺中), 保持反应温度

为 0°C 反应 2 小时, 点板跟踪至原料消失后, 向反应液中加入冰水(25 ml)淬灭反应, 搅拌 5 分钟, 再用 30% 的氢氧化钠溶液调节 pH 为 12。反应液用乙酸乙酯(25 ml×6)萃取, 合并有机相, 有机相用饱和氯化钠水溶液(15 ml×2)洗涤, 乙酸乙酯层用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得到标题产物 2-[(2-二乙氨基-乙氨基甲酰)-甲基]-5-甲酰基-4-苯基-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **11e**(1.19g, 棕色油状物), 产率 99.33%, 粗产品直接投入下一步反应。

MS m/z (ESI): 400.1(M+1)。

5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-2-[(2-二乙氨基-乙氨基甲酰)-甲基]-4-苯基-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **11** 的制备

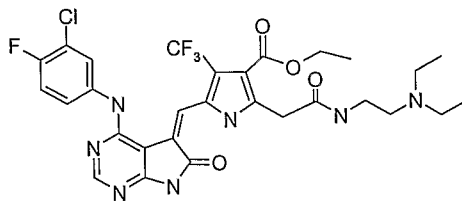
氩气氛下, 在一个 10 ml 的单口瓶中, 依次加入 2-[(2-二乙氨基-乙氨基甲酰)-甲基]-5-甲酰基-4-甲基-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **2c**(0.14 g, 0.35 mmol), 4-(3-氯-4-氟-苯胺)-5,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-6-酮(0.097 g, 0.35 mmol), 哌啶(0.07 ml, 0.7 mmol)及乙醇(0.84 ml), 加热回流 1.5 小时, 点板跟踪至 4-(3-氯-4-氟-苯胺)-5,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-6-酮完全消失, 将反应液自然冷却至室温, 有大量固体产生, 减压抽滤, 得到标题产物 5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-2-[(2-二乙氨基-乙氨基甲酰)-甲基]-4-苯基-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **11**(0.041 g, 黄色固体), 产率 17%。

MS m/z (ESI): 660.8(M+1)。

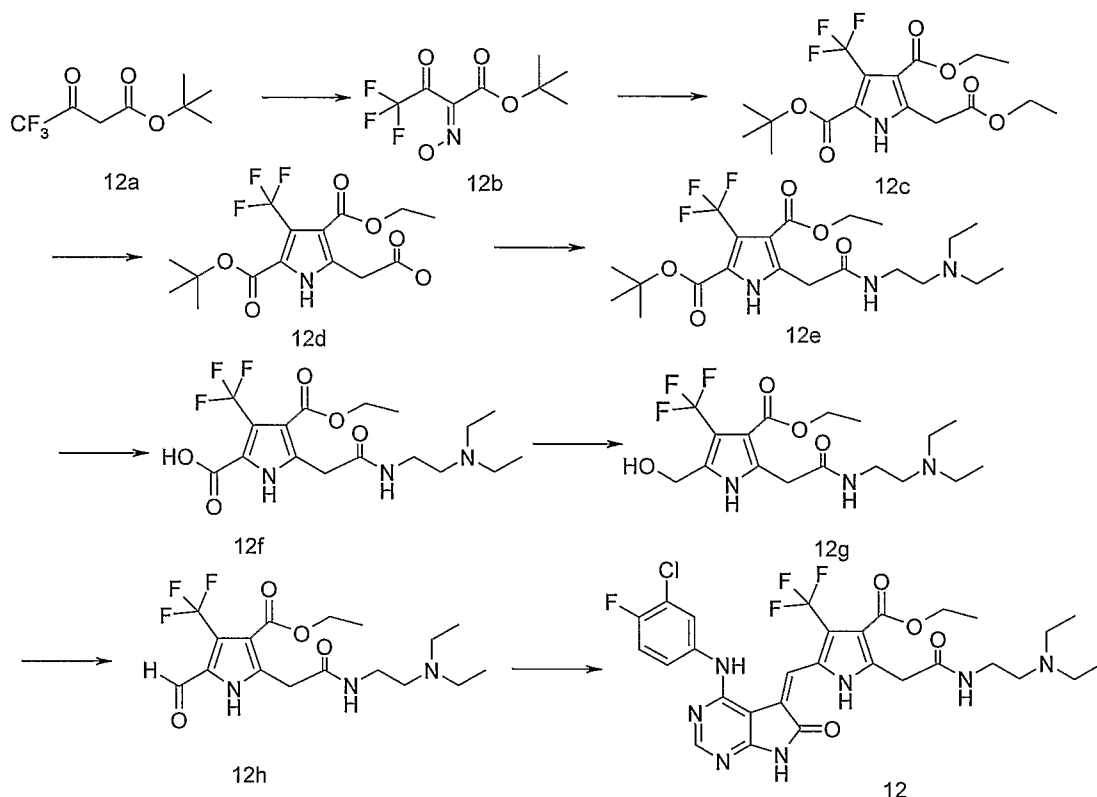
¹H NMR (DMSO-D₆, 400MHz) δ 13.70(s, 1H, NH), 8.84(s, 1H, -NH), 7.36(s, 1H, -CH=C), 7.43(dd, 1H, -ArH), 7.29-7.35(m, 5H, -ArH), 7.22-7.27(m, 2H, -ArH), 7.16(s, 1H, -ArH), 4.02(t, 2H, -CO₂CH₂-), 3.99(s, 2H, -CH₂CON-), 3.19(t, 2H, -CONCH₂-), 2.50(t, 2H, -NCH₂-), 2.49(q, 4H, 2×-NCH₂-), 1.00(t, 3H, CH₃), 0.95(t, 3H, 2×-CH₃)。

实施例 12

5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-2-[(2-二乙氨基-乙氨基甲酰)-甲基]-4-三氟甲基-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **12** 的制备



12



4,4,4-三氟-2-肟基-3-羰基-丁酸叔丁酯 12b 的制备

冰浴条件下, 将 4,4,4-三氟-3-羰基-丁酸叔丁酯 **12a** (42.4 g, 0.2 mol) 溶解于 60 ml 冰醋酸中, 搅拌下逐滴滴加亚硝酸钠的水溶液 (20 ml, 10 mol/L, 0.2 mol), 在整个过程中控制反应温度为 0~5℃。滴加结束后, 于冰水浴中反应 1 小时, 撤去冰水浴, 在室温下继续反应约 3 小时, 点板跟踪至原料消失, 反应结束, 得到标题产物 4,4,4-三氟-2-肟基-3-羰基-丁酸叔丁酯 **12b** 的溶液, 直接投下下一步反应。

5-乙氧羰甲基-3-三氟甲基-1 氢-吡咯-2,4-二羧酸-2-叔丁酯-4-乙酯 12c 的制备

向一个配有温度计, 滴液漏斗的 250 ml 的三颈烧瓶中依次加入 3-羰基-戊二酸二乙酯 (48.2 g, 0.2 mmol) 及冰醋酸 (90 ml), 搅拌下升温至 65℃, 称量锌粉 (共 26 g, 0.4 mol), 加入 1/8 量的锌粉 (3.25 g, 0.05 mmol), 用滴液漏斗滴加 1/8 量的第一步反应液 **12b**, 水浴控制体系温度不能上升太快, 待温度低于 65℃ 后, 再加入 1/8 量的锌粉及 1/8 量的第一步反应液。如此重复至锌粉及第一步反应液 **12b** 全部加完。升高温度至 75℃, 反应约 2 小时, 点板跟踪反应结束。搅拌条件下, 将反应液倒入 100 ml 冰水中, 继续搅拌至室温, 过滤除掉未反应的锌粉, 用乙酸乙酯 (100 ml×3) 提取反应液, 合并有机相, 依次用水 (100 ml×3)、饱和碳酸氢钠水 (100 ml×4) 溶液、饱和氯化钠水溶液 (100 ml×1) 洗涤, 有机层用无水硫酸钠干燥,

过滤，减压浓缩得到标题产物 5-乙氧羰甲基-3-三氟甲基-1 氢-吡咯-2,4-二羧酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **12c**(67.6g, 白色蜡状固体)，产率 86%。

MS m/z (ESI): 394(M+1)。

5-羧甲基-3-三氟甲基-1 氢-吡咯-2,4-二羧酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **12d** 的制备

将 5-乙氧羰甲基-3-三氟甲基-1 氢-吡咯-2,4-二羧酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **12c** (34.6 g, 0.088 mol) 溶解于 268 ml 四氢呋喃及 134 ml 甲醇中，搅拌下加入氢氧化锂水溶液(134 ml, 2.36 mol/L, 0.316 mol)，室温条件下反应 1.5 小时，点板跟踪至原料完全消失。将反应液减压浓缩除去大部分四氢呋喃及甲醇后，向浓缩液加水(200 ml)，然后用乙醚(100 ml×5)萃取混合液，水相转移至 1000 ml 的单口瓶中，冰浴搅拌下滴加 20% 的盐酸至 pH 为 1~3，有大量淡黄色沉淀析出，抽滤，固体用少量乙醚洗涤，真空干燥，得到标题产物 5-羧甲基-3-三氟甲基-1 氢-吡咯-2,4-二羧酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **12d**(24 g, 白色固体)，产率 74.7%。

MS m/z (ESI): 364(M-1)。

5-[(2-二乙氨基-乙氨基甲酰)-甲基]-3-三氟甲基-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **12e** 的制备

将 5-羧甲基-3-三氟甲基-1 氢-吡咯-2,4-二羧酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **12d**(146 mg, 0.4 mmol) 溶解于 2 ml 二氯甲烷和 0.2 ml N,N'-二甲基甲酰胺的混合溶剂中，冰浴冷却，搅拌下依次加入 N,N'-二乙基乙二胺(60 μ l, 0.44 mmol)，N-乙基-N'-(二甲氨基丙基)-碳二亚胺(154 mg, 0.8 mmol) 及 1-羟基苯并三唑(56 mg, 0.4 mmol)，反应体系自然升至室温，搅拌过夜。次日点板至原料 **1d** 完全消失后，剧烈搅拌下向反应液中加入冷水(5 ml)，静置分液，二氯甲烷萃取反应液(50 ml×3)，合并有机相，有机相依次用饱和碳酸钾溶液(5 ml×1)，水(5 ml×1) 及饱和氯化钠溶液(25 ml×1) 洗涤，二氯甲烷层用无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩得到标题产物 5-[(2-二乙氨基-乙氨基甲酰)-甲基]-3-三氟甲基-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **12e**(154 mg, 浅黄色粘液)，产率 83%。

MS m/z (ESI): 464(M+1)。

5-[(2-二乙氨基-乙氨基甲酰)-甲基]-3-三氟甲基-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸 4-乙酯 **12f** 的制备

在 100 ml 的三口瓶中，将 5-[(2-二乙氨基-乙氨基甲酰)-甲基]-3-三氟甲基-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸-2-叔丁酯-4-乙酯 **12e** (5.87 g, 12.67 mmol) 溶解于二氯甲烷(35 ml) 中，搅拌下加入三氟醋酸(5 ml, 67.4 mmol)，室温反应 1.5 小时，点板跟踪原

料基本消失,将反应液减压浓缩旋干溶剂,得到标题产物 5-[(2-二乙氨基-乙氨基甲酰)-甲基]-3-三氟甲基-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸 4-乙酯 **12f** (5.17 g, 浅黄色固体), 产率 100%。直接用于下一步反应。

2-[(2-二乙氨基-乙氨基甲酰)-甲基]-5-羟基甲基-4-三氟甲基-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯
12g 的制备

氮气氛围下,在 250 ml 圆底烧瓶中,将 5-[(2-二乙氨基-乙氨基甲酰)-甲基]-3-三氟甲基-1 氢-吡咯-2,4-二甲酸 4-乙酯 **12f** (13.594 g, 33.4 mmol) 搅拌下溶解于 20 ml 无水四氢呋喃中,向反应液中滴加硼烷的四氢呋喃溶液(100 ml, 1 mol/L, 100 mmol), 室温反应过夜。点板跟踪至原料消失,冷至 0℃,向反应液中慢慢滴加稀盐酸(50 ml, 1mol/L)以淬灭反应,搅拌 15 分钟后,用 10%氢氧化钠中和至 pH12,再用乙酸乙酯提取反应液(50 ml×3)。合并有机相,乙酸乙酯层用无水硫酸镁干燥,过滤,滤液减压浓缩,用硅胶柱色谱法纯化所得残余物,得到标题产物 2-[(2-二乙氨基-乙氨基甲酰)-甲基]-5-羟基甲基-4-三氟甲基-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **12g** (2.94 g, 白色固体), 产率 55%。

MS m/z (ESI): 394(M+1)。

2-[(2-二乙氨基-乙氨基甲酰)-甲基]-5-甲酰基-4-三氟甲基-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯
12h 的制备

将吡啶三氧化铬盐酸盐(4.3 g, 20 mmol)、醋酸钠(1.0 g, 12.19 mmol)及二氯甲烷(50 ml)加至一个 250 ml 圆底烧瓶中,搅拌下缓慢滴加 2-[(2-二乙氨基-乙氨基甲酰)-甲基]-5-羟基甲基-4-三氟甲基-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **12g** 的二氯甲烷混悬溶液(7.14 g, 18.7 mmol, 溶解于 80 ml 二氯甲烷), 室温反应 5 小时,点板跟踪原料基本消失。反应液经硅藻土过滤,减压浓缩,用硅胶柱色谱法纯化所得残余物,得到标题产物 2-[(2-二乙氨基-乙氨基甲酰)-甲基]-5-甲酰基-4-三氟甲基-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **12h** (4.985 g, 白色固体), 产率 70%。

MS m/z (ESI): 392(M+1)。

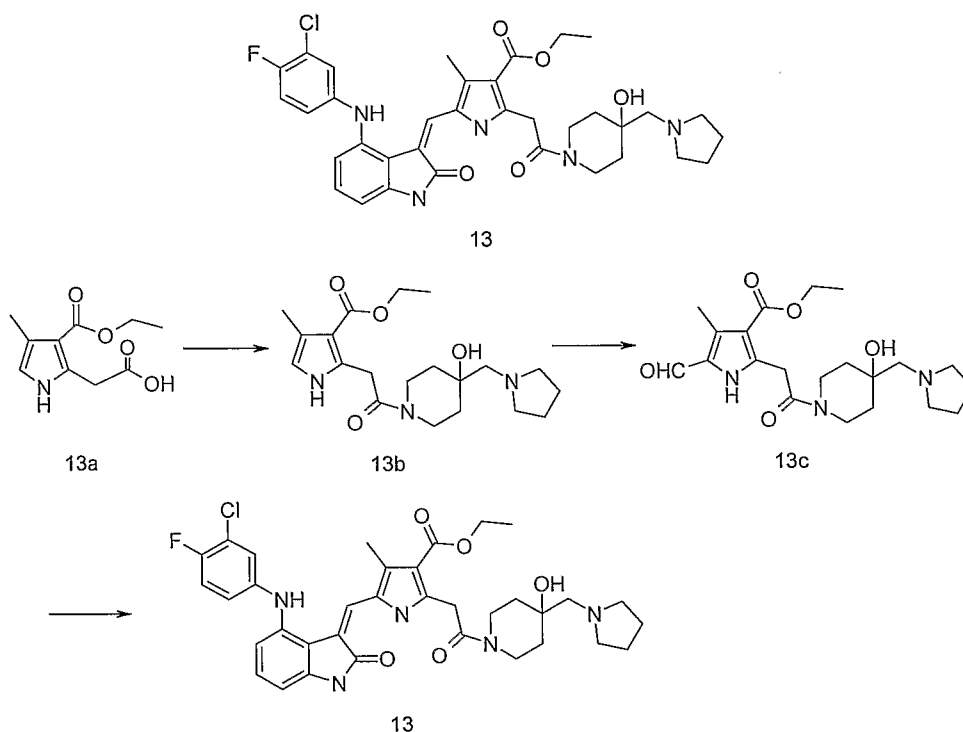
5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-2-[(2-二乙氨基-乙氨基甲酰)-甲基]-4-三氟甲基-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **12** 的制备

氮气氛围下,在一个 10 ml 的单口瓶中,依次加入 2-[(2-二乙氨基-乙氨基甲酰)-甲基]-5-甲酰基-4-三氟甲基-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **12h** (90 mg, 0.23 mmol), 4-(3-氯-4-氟-苯胺)-5,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-6-酮(56 mg, 0.2 mmol), 哌啶(0.05 ml, 0.5 mmol)及乙醇(0.5 ml), 加热回流 1.5 小时,点板跟踪至 4-(3-氯-4-氟-苯胺)-5,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-6-酮完全消失,将反应液自然冷却至室温,有大量固体产

生，减压抽滤，用少量乙醇多次洗涤黄色固体，得到标题产物 5-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-亚甲基-甲基]-2-[(2-二乙氨基-乙氨基甲酰)-甲基]-4-三氟甲基-1 氢-吡咯-3-甲酸乙酯 **12** (61 mg, 黄色固体)，产率 41%。
MS m/z (ESI): 652(M+1)。

实施例 13

5-[4-(3-氯-4-氟-苯氨基)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-次甲基]-2-[(2-(4-羟基-4-吡咯烷基-1-甲基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **13** 的制备



2-[(2-(4-羟基-4-吡咯烷基-1-甲基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **13b** 的制备

氩气氛下，冰浴条件下，将 2-羧甲基-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **13a** (1.55 g, 7.3 mmol)，4-吡咯烷-1-甲基-哌啶-4-羟基 (3.29 g, 11 mmol)，二氯甲烷(37 ml)，N,N-二甲基甲酰胺(3.7 ml)，N-乙基-N'-(二甲氨基丙基)-碳二亚胺(3.7 g, 14.6 mmol)及 1-羟基苯并三唑(1.1 mg, 7.3 mmol)，三乙胺(10 ml, 75 mmol) 加入 100 ml 茄形瓶中，室温下搅拌过夜。次日点板至原料 **13a** 反应完全，加入冰块淬灭反应，分液，有机层依次用饱和氯化钠溶液(40 ml×5)和饱和碳酸钠溶液(30 ml×3)洗涤，无水硫酸钠干燥，抽滤，滤液减压浓缩，得到标题产物 2-[(2-(4-羟基-4-吡咯烷基-1-甲基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **13b** (2 g, 褐色油状物)，产率：74%。

MS m/z (ESI): 378.7(M+1)。

5-甲酰基-2-[2-(4-羟基-4-吡咯烷基-1-甲基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **13c** 的制备

氩气氛下,将 100 ml 无水二氯甲烷加入 250 ml 三口瓶中,干冰-丙酮浴冷却,同时加入 N,N-二甲基甲酰胺(3.9 ml, 0.05 mol),再缓慢滴加三氯氧磷(3.7 ml, 0.04 mol),在干冰-丙酮浴下搅拌 5 分钟后,于室温下继续搅拌 20 分钟,此时反应体系呈微黄色透明溶液。反应体系重新于干冰-丙酮浴中冷却,将 2-[2-(4-羟基-4-吡咯烷基-1-甲基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **13b** (2 g, 5.3 mmol)搅拌下溶解于二氯甲烷(27 ml)和 N,N-二甲基甲酰胺(1.1 ml)的混合溶剂中,缓慢滴加到反应体系中。反应液继续于干冰-丙酮浴中反应 1.5 小时,冰浴中反应 1.5 小时,室温下反应 3 小时,点板跟踪反应至原料 **13b** 点消失,加入冰块淬灭反应。冰浴下,用氢氧化钠调节反应液 pH 至 10 左右,再用盐酸调节 pH 至微酸性,乙酸乙酯萃取反应液(70 ml×9),有机层干燥用无水硫酸钠干燥,抽滤,滤液减压浓缩,得到黑褐色油状残余物,用硅胶柱色谱法纯化(二氯甲烷: 甲醇: 醋酸=10: 0.4: 0.02)得到标题产物 5-甲酰基-2-[2-(4-羟基-4-吡咯烷基-1-甲基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **13c**(1.29 g, 褐色油状物),产率: 60%。

MS m/z (ESI): 406.9(M+1)。

5-[4-(3-氯-4-氟-苯氨基)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-次甲基]-2-[2-(4-羟基-4-吡咯烷基-1-甲基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **13** 的制备

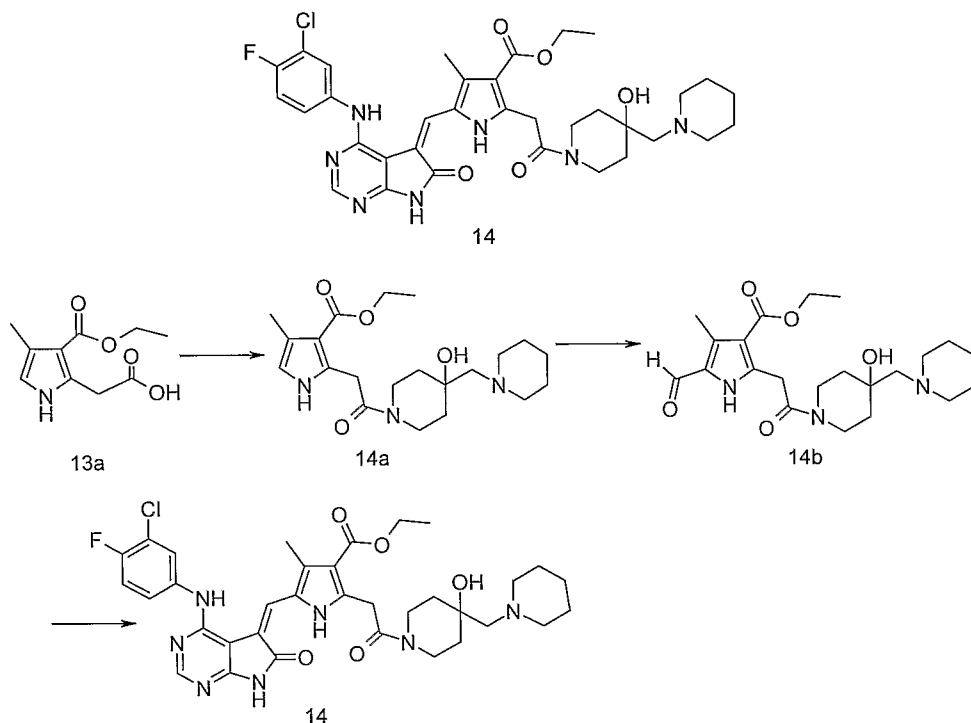
在氩气氛下,在一个 10 ml 的单口瓶中,依次加入 5-甲酰基-2-[2-(4-羟基-4-吡咯烷基-1-甲基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **13c**(0.103 g, 0.255 mmol), 4-(3-氯-4-氟-苯胺)-5,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-6-酮(0.071 g, 0.255 mmol)(Bioorganic & Medicinal Chemistry letters., 2002, 12(16), 2153~2157.), 哌啶(0.637 ml, 0.637 mmol)及乙醇(0.7 ml),加热回流 1.5 小时,点板跟踪至 4-(3-氯-4-氟-苯胺)-5,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-6-酮完全消失,将反应液自然冷却至室温,有大量固体产生,减压抽滤,得到标题产物 5-[4-(3-氯-4-氟-苯氨基)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-次甲基]-2-[2-(4-羟基-4-吡咯烷基-1-甲基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **14** (78 mg, 黄色固体),产率 46.0%。

MS m/z (ESI): 666.7(M+1)。

¹HNMR (DMSO-D₆,400MHz) 8.315(s, 1H, -NH), 7.707~7.685(dd, 1H, -ArH), 4.210~4.156(dd, 2H, -CH₂), 2.450~2.414(d, 4H, 2×CH₂), 2.355(s, 3H, -CH₃), 1.484~1.459 (m, 4H, 2×CH₂), 1.281~1.246(t, 3H, -CH₃)。

实施例 14

5-[4-(3-氯-4-氟-苯氨基)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-次甲基]-2-[2-(4-羟基-4-哌啶-1-甲基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **14** 的制备



2-[2-(4-羟基-4-哌啶-1-甲基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1H-吡咯-3-羧酸乙酯 **14a** 的制备

氩气氛下,在冰浴条件下,将 2-羧甲基-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **13a** (316 mg, 1.5 mmol), 4-哌啶-4-甲基-哌啶-4-羟基 (707 mg, 2.25 mmol), 二氯甲烷(7.6 ml), N,N-二甲基甲酰胺(0.76 ml), N-乙基-N'-(二甲氨基丙基)-碳二亚胺(748 mg, 2.25 mmol)及 1-羟基苯并三唑(304 mg, 2.25 mmol), 三乙胺(2.09 ml, 15 mmol) 加入 25 ml 茄形瓶, 室温下搅拌过夜。次日点板至原料反应完全, 加入冰块淬灭反应, 分液, 有机层依次用饱和氯化钠溶液(20 ml×5)和饱和碳酸钾溶液(20 ml×1)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 抽滤, 滤液减压浓缩得到标题产物 2-[2-(4-羟基-4-哌啶-1-甲基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1H-吡咯-3-羧酸乙酯 **14a**(557 mg, 褐色油状物), 产率: 95%

MS m/z (ESI): 392.6(M+1)。

5-甲酰基-2-[2-(4-羟基-4-哌啶-1-甲基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **14b** 的制备

氩气氛下, 将 100 ml 无水二氯甲烷加入三口瓶中, 干冰-丙酮浴冷却, 加入 N,N-二甲基甲酰胺(3.9 ml, 0.05 mol), 再缓慢滴加三氯氧磷(3.7 ml, 0.04 mol)在干冰-丙酮浴下搅拌 5 分钟后, 于室温下继续搅拌 20 分钟, 此时反应体系呈微黄

色透明溶液。反应体系重新于干冰-丙酮浴中冷却，将 2-[2-(4-羟基-4-哌啶-1-甲基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1H-吡咯-3-羧酸乙酯 **14a** (7.9 g, 0.02 mol) 搅拌下溶解于二氯甲烷 (30 ml) 和 N,N-二甲基甲酰胺 (1 ml) 的混合溶剂中，缓慢滴加到反应体系中。反应液继续于干冰-丙酮浴中反应 1.5 小时，冰浴中反应 1.5 小时，室温下反应 3 小时，点板跟踪反应至原料 **14a** 消失，加入冰块淬灭反应。冰浴下，用氢氧化钠调节反应液 pH 至 10 左右，再用盐酸调节 pH 至微酸性，萃取反应液 (二氯甲烷: 甲醇 = 10: 1, 100 ml × 9)，有机层用无水硫酸钠干燥，抽滤，滤液减压浓缩得到黑褐色油状残余物，用硅胶柱色谱法纯化所得残余物 (二氯甲烷: 甲醇: 醋酸 = 10: 0.4: 0.02)，得到标题产物 5-甲酰基-2-[2-(4-羟基-4-哌啶-1-甲基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **14b** (3.5 g, 褐色油状物)，产率: 36.1%。

MS m/z (ESI): 420.7(M+1)。

5-[4-(3-氯-4-氟-苯氨基)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-次甲基]-2-[2-(4-羟基-4-哌啶-1-甲基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **14** 的制备

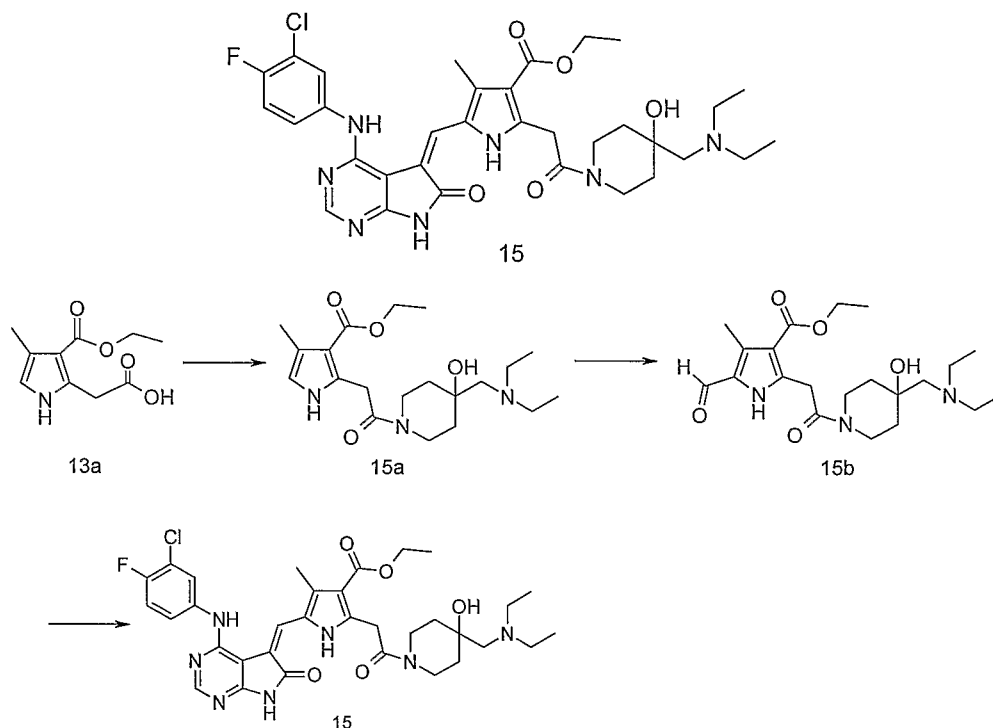
在氩气氛下，在一个 10 ml 的单口瓶中，依次加入 5-甲酰基-2-[2-(4-羟基-4-哌啶-1-甲基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **14b** (0.113 g, 0.27 mmol)，4-(3-氯-4-氟-苯胺)-5,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-6-酮 (0.075 g, 0.27 mmol) (Bioorganic & Medicinal Chemistry letters., 2002, 12(16), 2153~2157.)，哌啶 (0.675 ml, 0.675 mmol) 及乙醇 (0.8 ml)，加热回流 1.5 小时，点板跟踪至 4-(3-氯-4-氟-苯胺)-5,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-6-酮完全消失，将反应液自然冷却至室温，有大量固体产生，减压抽滤，得到标题产物 5-[4-(3-氯-4-氟-苯氨基)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-次甲基]-2-[2-(4-羟基-4-哌啶-1-甲基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **14** (0.103 g, 黄色固体)，产率 56.1%。

MS m/z (ESI): 680.5(M+1)。

¹H NMR (DMSO-D₆, 400 MHz) 13.642(s, 1H, -NH), 9.284(s, 1H, -NH), 8.334(s, 1H, -CH), 7.400~7.378(d, 1H, -ArH), 3.292(s, 2H, -CH₂), 2.431~2.388(t, 4H, 2×-CH₂), 2.190(s, 2H, -CH₂), 1.303~1.267(t, 6H, 2×-CH₃)。

实施例 15

5-[4-(3-氯-4-氟-苯氨基)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]p 嘧啶-5-次甲基]-2-[2-(4-二乙基氨基甲基-4-羟基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **15** 的制备



2-[2-(4-二乙基氨基甲基-4-羟基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **15a** 的制备

氩气氛下，冰浴条件下，将 2-羧甲基-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **13a** (316 mg, 1.5 mmol)，4-二乙基氨基甲基-哌啶-4-羟基 (420 mg, 2.25 mmol)，二氯甲烷 (8 ml)，N,N-二甲基甲酰胺(0.76 ml)，N-乙基-N'-(二甲氨基丙基)-碳二亚胺(748 mg, 2.25 mmol)及 1-羟基苯并三唑(304 mg, 2.25 mmol)，三乙胺(2.09 ml, 15 mmol)加入 25 ml 茄形瓶中，室温下搅拌过夜。次日点板至原料 **13a** 反应完全，加入冰块淬灭反应，分液，有机层依次用饱和氯化钠溶液(20 ml×5)和饱和碳酸钾溶液(20 ml×1)洗涤，无水硫酸钠干燥，抽滤，滤液减压浓缩，得到标题产物 2-[2-(4-二乙基氨基甲基-4-羟基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **15a**(570 mg，褐色油状物)，直接进行下步反应。

MS m/z (ESI): 380.7(M+1)。

2-[2-(4-二乙基氨基甲基-4-羟基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-5-甲酰基-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **15b** 的制备

氩气氛下，将 17 ml 无水二氯甲烷加入三口瓶中，干冰-丙酮浴冷却，加入 N,N-二甲基甲酰胺(0.77 ml, 10 mmol)，再缓慢滴加三氯氧磷(0.62 ml, 6.68 mmol)，干冰-丙酮浴下搅拌 10 分钟后，于室温下继续搅拌 20 分钟，此时反应体系呈微黄色透明溶液。反应体系重新于干冰-丙酮浴中冷却，将 2-[2-(4-二乙基氨基甲基-4-羟基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **15a** (1.265 g, 3.34 mmol)搅拌下溶解于 5 ml 二氯甲烷和 1 ml N,N-二甲基甲酰胺的混合溶剂中，缓慢

滴加到反应体系中。反应液继续于干冰-丙酮浴中反应 1.5 小时,冰浴中反应 1.5 小时,室温下反应 3 小时,点板跟踪反应至原料 **15a** 点消失,加入冰块淬灭反应。冰浴下,用氢氧化钠调节反应液 pH 至 10 左右,再用盐酸调节 pH 至微酸性,萃取反应液(二氯甲烷:甲醇=10:1,100 ml×9),有机层用无水硫酸钠干燥,抽滤,滤液减压浓缩,得到黑褐色油状物残余物,用硅胶柱色谱法纯化所得残余物(二氯甲烷:甲醇:醋酸=10:0.4:0.02)得到标题产物 2-[2-(4-二乙基氨基甲基-4-羟基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-5-甲酰基-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **15b**(297 mg, 黄褐色固体),产率:21.9%。

MS m/z (ESI): 409.0(M+1)。

5-[4-(3-氯-4-氟-苯氨基)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]p 嘧啶-5-次甲基]-2-[2-(4-二乙基氨基甲基-4-羟基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **15** 的制备

在氩气氛下,在一个 10 ml 的单口瓶中,依次加入 2-[2-(4-二乙基氨基甲基-4-羟基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-5-甲酰基-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **15b**(0.037 g, 0.09 mmol), 4-(3-氯-4-氟-苯胺)-5,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-6-酮(0.025 g, 0.09 mmol)(Bioorganic & Medicinal Chemistry letters., 2002, 12(16), 2153~2157.), 哌啶(0.225 ml, 0.225 mmol)及乙醇(0.3 ml),加热回流 1.5 小时,点板跟踪至 4-(3-氯-4-氟-苯胺)-5,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-6-酮完全消失,将反应液自然冷却至室温,有大量固体产生,减压抽滤,得到标题产物 5-[4-(3-氯-4-氟-苯氨基)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]p 嘧啶-5-次甲基]-2-[2-(4-二乙基氨基甲基-4-羟基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **15** (22 mg, 黄色固体),产率 36.6%。

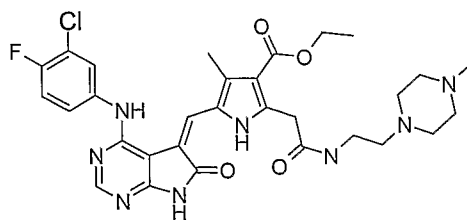
MS m/z (ESI): 668.7(M+1)。

¹HNMR (DMSO-D₆,400MHz) 13.623(s, 1H, -NH), 9.285(s, 1H, -NH), 8.336(s, 1H, -CH), 7.740~7.735(d, 1H, -ArH), 2.514~2.506(s, 3H, -CH₃), 2.282(s, 2H, -CH₂), 1.462~1.435(dd, 4H, 2×-CH₂), 0.931~0.896 (t, 6H, 2×-CH₃)。

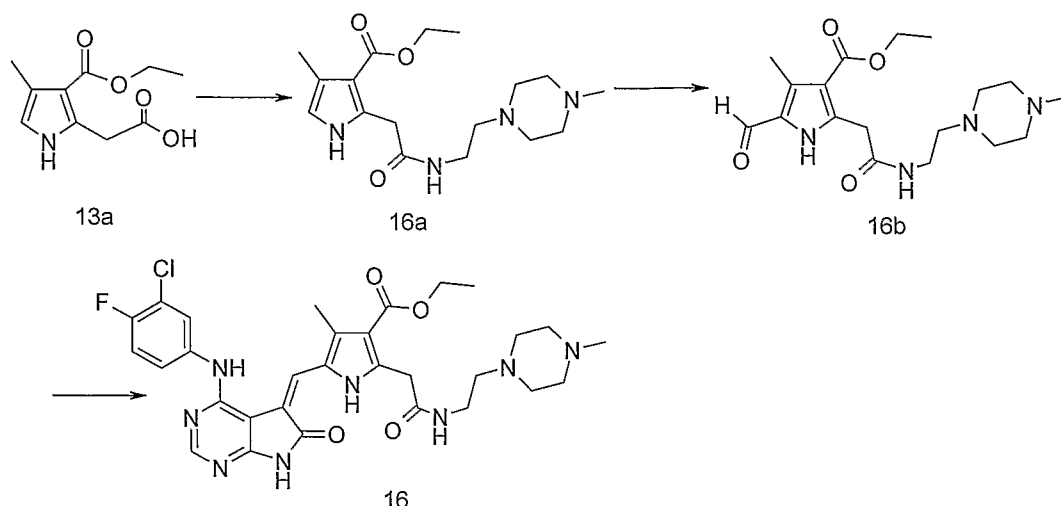
实施例 16

5-[4-(3-氯-4-氟-苯氨基)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-次甲基]-4-甲基-2-{[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-乙基氨基甲酰基]-甲基}-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **16** 的制

备



16



4-甲基-2-{[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-乙基氨基甲酰基]-甲基}-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 16a 的制备

氩气氛下，冰浴条件下，将 2-羧甲基-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **13a** (3 g, 14.2 mmol)，2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-乙胺 (2.23 g, 14.2 mmol)，二氯甲烷(71 ml)，N,N-二甲基甲酰胺(7.1 ml)，N-乙基-N'-(二甲氨基丙基)-碳二亚胺(5.43 g, 28.4 mmol)及 1-羟基苯并三唑(1.92 g, 14.2 mmol) 加入 25 ml 茄形瓶中，室温下搅拌过夜。次日点板至原料 **13a** 反应完全，加入冰块淬灭反应，分液，有机层依次用饱和氯化钠溶液(50 ml×5)和饱和碳酸钾溶液(20 ml×1)洗涤，无水硫酸钠干燥，抽滤，滤液减压浓缩，得到标题产物 4-甲基-2-{[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-乙基氨基甲酰基]-甲基}-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **16a**(1.2 g，黄色固体)，产率：25.1%

5-甲酰基-4-甲基-2-{[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-乙基氨基甲酰基]-甲基}-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **16b** 的制备

氩气氛下，将二氯甲烷(18 ml，干燥)加入三口瓶中，干冰-丙酮浴冷却，加入 N,N-二甲基甲酰胺(0.7 ml, 8.93 mmol)，再缓慢滴加三氯氧磷(0.5 ml, 5.36 mmol)，在干冰-丙酮浴下搅拌 5 分钟后，于室温下继续搅拌 20 分钟，此时反应体系呈微黄色透明溶液。反应体系重新于干冰-丙酮浴中冷却，将 4-甲基-2-{[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-乙基氨基甲酰基]-甲基}-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **16a**(1.2 g, 3.57 mmol)搅拌下溶解于 6 ml 二氯甲烷中，缓慢滴加到反应体系中。反应液继续于干冰-丙酮浴中反应 1.5 小时，冰浴中反应 1.5 小时，室温下反应 3 小时，点板跟踪反应至原料 **16a** 点消失，加入冰块淬灭反应。冰浴下，用氢氧化钠调节反应液 pH 至 11 左右，萃取反应液(二氯甲烷：甲醇=20：1，60 ml×8)，有机层用无水硫酸钠干燥，抽滤，滤液减压浓缩，得到褐色固体残余物，用硅胶柱色谱法纯化所得残余物，得到标题产物 5-甲酰基-4-甲基-2-{[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-乙基氨基甲酰基]-甲基}-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **16b**(892 mg，黄色固体)，产率：68.4%。

MS:365.5(M+1)。

5-[4-(3-氯-4-氟-苯氨基)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-次甲基]-4-甲基-2-{[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-乙基氨基甲酰基]-甲基}-1-氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **16** 的制备

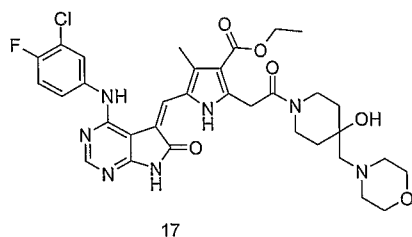
在氩气氛下，在一个 10 ml 的单口瓶中，依次加入 5-甲酰基-4-甲基-2-{[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-乙基氨基甲酰基]-甲基}-1-氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **16b**(0.055 g, 0.15 mmol)，4-(3-氯-4-氟-苯胺)-5,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-6-酮(0.042 g, 0.15 mmol)(Bioorganic & Medicinal Chemistry letters., 2002, 12(16), 2153~2157.)，哌啶(0.375 ml, 0.375 mmol)及乙醇(0.5 ml)，加热回流 1.5 小时，点板跟踪至 4-(3-氯-4-氟-苯胺)-5,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-6-酮完全消失，将反应液自然冷却至室温，有大量固体产生，减压抽滤，得到标题产物 5-[4-(3-氯-4-氟-苯氨基)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-次甲基]-4-甲基-2-{[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-乙基氨基甲酰基]-甲基}-1-氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **16**(44 mg，黄色固体)，产率 47.1%。

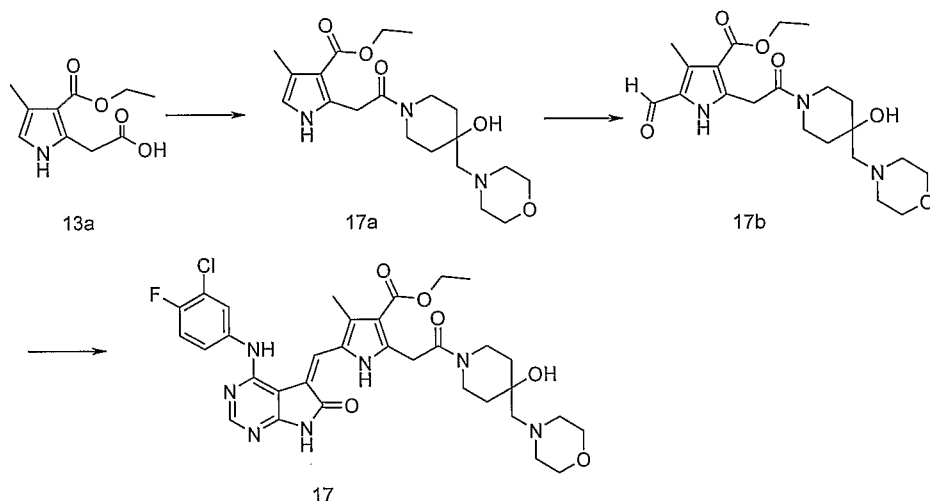
MS m/z (ESI): 625.9(M+1)。

¹HNMR (DMSO-D₆,400MHz) 8.323(s, 1H, -NH), 7.712~7.689(d, 1H, -ArH), 4.238~4.185(q, 2H, -CH₂), 3.219~3.185(t, 2H, -CH₂), 2.445(s, 3H, -CH₃)。

实施例 17

5-[4-(3-氯-4-氟-苯氨基)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-次甲基]-2-[2-(4-羟基-4-吗啡啉-4-甲基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1-氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **17** 的制备





2-[2-(4-羟基-4-吗啡啉-4-甲基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **17a** 的制备

氩气氛下，冰浴条件下，将 2-羧甲基-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **13a** (638 mg, 3.0 mmol)，4-吗啡啉-4-甲基-哌啶-4-羟基 (1.425 g, 4.5 mmol)，二氯甲烷(15.5 ml)，N,N-二甲基甲酰胺(1.55 ml)，N-乙基-N'-(二甲氨基丙基)-碳二亚胺(1.49 g, 4.5 mmol)及 1-羟基苯并三唑(609 mg, 4.5 mmol)，三乙胺(4.22 ml, 30 mmol) 加入 25 ml 茄形瓶中，室温下搅拌过夜。次日点板至原料 **13a** 反应完全，加入冰块淬灭反应，分液，有机层依次用饱和氯化钠溶液(40 ml×5)和饱和碳酸钾溶液(40 ml×1)洗涤，无水硫酸钠干燥，抽滤，滤液减压浓缩得到标题产物 2-[2-(4-羟基-4-吗啡啉-4-甲基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **17a**(1.742 g，褐色油状物)，直接进行下步反应。

MS m/z (ESI): 394.1(M+1)。

5-甲酰基-2-[2-(4-羟基-4-吗啡啉-4-甲基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **17b** 的制备

氩气氛下，将二氯甲烷(23 ml，干燥)加入三口瓶中，干冰-丙酮浴冷却，同时加入 N,N-二甲基甲酰胺(1.0 ml, 0.012 mol)，再缓慢滴加三氯氧磷(0.83 ml, 8.87 mmol)，在干冰-丙酮浴下搅拌 5 分钟后，于室温下继续搅拌 20 分钟，此时反应体系呈微黄色透明溶液。反应体系重新于干冰-丙酮浴中冷却，将 2-[2-(4-羟基-4-吗啡啉-4-甲基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **17a** (1.742 g, 4.43 mmol)搅拌下溶解于 7 ml 二氯甲烷中，缓慢滴加到反应体系中。反应液继续于干冰-丙酮浴中反应 1.5 小时，冰浴中反应 1.5 小时，室温下反应 3 小时，点板跟踪反应至原料 **17a** 点消失，加入冰块淬灭反应。冰浴下，用氢氧化钠调节反应液 pH 至 11 左右，萃取反应液(二氯甲烷：甲醇=20：1，60 ml×8)，有机层用无水硫酸钠干燥，抽滤，滤液减压浓缩得到黑褐色固体残余物，用硅胶柱层析法纯化(二氯甲烷：甲醇：氨水=8：0.2：0.02)得到标题产物 5-甲酰基-2-[2-(4-羟基-4-吗啡啉-4-甲基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **17b**。

基-4-吗啡啉-4-甲基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **17b**(660 mg, 淡黄色固体), 产率: 35.3%。

MS m/z (ESI): 422.7(M+1)。

5-[4-(3-氯-4-氟-苯氨基)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-次甲基]-2-[2-(4-羟基-4-吗啡啉-4-甲基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **17** 的制备

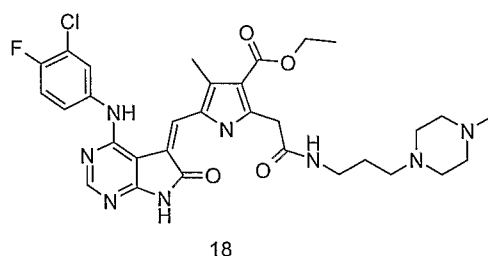
在氩气氛下, 在一个 10 ml 的单口瓶中, 依次加入 5-甲酰基-2-[2-(4-羟基-4-吗啡啉-4-甲基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **17b**(0.057 g, 0.136 mmol), 4-(3-氯-4-氟-苯胺)-5,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-6-酮(0.038 g, 0.136 mmol) (Bioorganic & Medicinal Chemistry letters., 2002, 12(16), 2153~2157.), 哌啶(0.342 ml, 0.342 mmol)及乙醇(0.4 ml), 加热回流 1.5 小时, 点板跟踪至 4-(3-氯-4-氟-苯胺)-5,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-6-酮完全消失, 将反应液自然冷却至室温, 有大量固体产生, 减压抽滤, 得到标题产物 5-[4-(3-氯-4-氟-苯氨基)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-次甲基]-2-[2-(4-羟基-4-吗啡啉-4-甲基-哌啶-1-基)-2-氧代-乙基]-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **17**(25 mg, 黄色固体), 产率 26.8%。

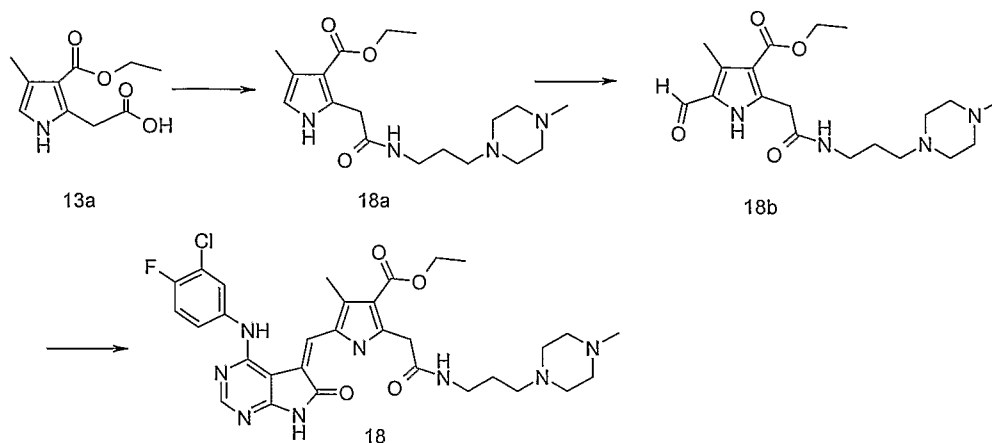
MS m/z (ESI): 682.6(M+1)。

¹HNMR (DMSO-D₆, 400MHz) 13.642(s, 1H, -NH), 9.284(s, 1H, -NH), 8.334(s, 1H, -CH), 7.400~7.378(d, 1H, -ArH), 3.292(s, 2H, -CH₂), 2.431~2.388(t, 4H, 2×-CH₂), 2.190(s, 2H, -CH₂), 1.303~1.267(t, 6H, 2×-CH₃)。

实施例 18

5-[4-(3-氯-4-氟-苯氨基)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-次甲基]-4-甲基-2-[[3-(4-甲基-哌嗪-1-基)-丙基氨基甲酰基]-甲基]-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **18** 的制备





4-甲基-2-{[3-(4-甲基-哌嗪-1-基)-丙基氨基甲酰基]-甲基}-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 18a 的制备

氩气氛下，冰浴条件下，将 2-羧甲基-4-甲基-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **13a** (2.11 g, 10 mmol)，3-(4-甲基-哌嗪-1-基)-丙基胺 (1.73 g, 11 mmol)，二氯甲烷(50 ml)，N,N-二甲基甲酰胺(5 ml)，N-乙基-N'-(二甲氨基丙基)-碳二亚胺(3.8 g, 20 mmol)及 1-羟基苯并三唑(1.35 g, 10 mmol)，三乙胺(3.5 ml, 25 mmol)加入 100 ml 茄形瓶中，室温下搅拌过夜。次日点板至原料 **13a** 反应完全，加入冰块淬灭反应，分液，有机层依次用饱和氯化钠溶液(20 ml×5)和饱和碳酸钾溶液(20 ml×1)洗涤，无水硫酸钠干燥，抽滤，滤液减压浓缩，得到标题产物 4-甲基-2-{[3-(4-甲基-哌嗪-1-基)-丙基氨基甲酰基]-甲基}-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **18a**(3 g，褐色油状物)，产率：85.7%

MS m/z (ESI): 351.8(M+1)。

5-甲酰基-4-甲基-2-{[3-(4-甲基-哌嗪-1-基)-丙基氨基甲酰基]-甲基}-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **18b** 的制备

氩气氛下，将 44 ml 无水二氯甲烷加入 100 ml 三口瓶中，干冰-丙酮浴冷却，同时加入 N,N-二甲基甲酰胺(1.8 ml, 0.02 mol)，再缓慢滴加三氯氧磷(1.41 ml, 9.43 mmol)，搅拌 5 分钟后，彻去干冰-丙酮浴，室温下继续搅拌 20 分钟至反应体系呈微黄色透明溶液。反应体系重新于干冰-丙酮浴中冷却，将 4-甲基-2-{[3-(4-甲基-哌嗪-1-基)-丙基氨基甲酰基]-甲基}-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **18a** (3 g, 8.57 mmol)搅拌下溶解于 10 ml 二氯甲烷和 0.5 ml N,N-二甲基甲酰胺的混合溶剂中，缓慢滴加到反应体系中。反应液分别在干冰-丙酮浴中反应 1.5 小时，冰浴中反应 1.5 小时，室温下反应 3 小时，点板跟踪反应至原料 **18a** 点消失，加入冰块淬灭反应。冰浴下，用 1M 氢氧化钠溶液调节反应液 pH 至 11 左右，萃取反应液(二氯甲烷：甲醇=10：1，50 ml×6)，有机层用无水硫酸钠干燥，抽滤，滤液减压浓缩得到黑褐色油状残余物，用硅胶柱色谱法纯化(二氯甲烷：甲醇：醋酸=50：1：0.1)得到标题产物 5-甲酰基-4-甲基-2-{[3-(4-甲基-哌嗪-1-基)-丙基氨基甲酰基]-

甲基}-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **18b**(200 mg, 褐色油状物), 产率: 6.1%。

MS m/z (ESI): 379.8(M+1)。

5-[4-(3-氯-4-氟-苯氨基)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-次甲基]-4-甲基-2-{[3-(4-甲基-哌嗪-1-基)-丙基氨基甲酰基]-甲基}-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **18** 的制备

氩气氛下, 在一个 10 ml 的单口瓶中, 将 5-甲酰基-4-甲基-2-{[3-(4-甲基-哌嗪-1-基)-丙基氨基甲酰基]-甲基}-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **18b**(0.049 g, 0.129 mmol), 4-(3-氯-4-氟-苯胺)-5,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-6-酮(0.036 g, 0.129 mmol) (Bioorganic & Medicinal Chemistry letters., 2002, 12(16), 2153~2157.) 和哌啶(0.322 ml, 0.322 mmol) 搅拌下溶解于 0.4 ml 乙醇中, 加热回流 1.5 小时, 点板跟踪至 4-(3-氯-4-氟-苯胺)-5,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-6-酮完全消失, 将反应液自然冷却至室温, 有大量固体产生, 减压抽滤, 得到标题产物 5-[4-(3-氯-4-氟-苯氨基)-6-氧代-6,7-二氢-吡咯[2,3-d]嘧啶-5-次甲基]-4-甲基-2-{[3-(4-甲基-哌嗪-1-基)-丙基氨基甲酰基]-甲基}-1 氢-吡咯-3-羧酸乙酯 **18**(35 mg, 黄色固体), 产率 42.5%。

MS m/z (ESI): 639.7(M+1)。

¹H NMR (DMSO-D₆, 400 MHz) 13.642(s, 1H, -NH), 9.284(s, 1H, -NH), 8.334(s, 1H, -CH), 7.400~7.378(d, 1H, -ArH), 3.292(s, 2H, -CH₂), 2.431~2.388(t, 4H, 2×-CH₂), 2.190(s, 2H, -CH₂), 1.303~1.267(t, 6H, 2×-CH₃)。

测试例:

激酶抑制活性的测定

例 1: 抑制细胞增殖测试

下面的体外试验是用来测定本发明化合物对于人类肿瘤细胞 HUVEC VEGFR 高表达的细胞株抑制增殖活性。

下面所述的体外细胞试验可确定受试化合物的对高表达 VEGFR 的肿瘤细胞的抗血管生成活性和抑制增殖活性, 其活性可用 IC₅₀ 值来表示。此类试验的一般方案如下: 首先选择高表达 VEGFR 的人类肿瘤细胞, 以适宜细胞浓度下 (exp 5000 个细胞/ml medium) 接种在 96 孔培养板上, 然后将细胞在二氧化碳恒温箱内进行培养, 当它们生长至 85% 汇合, 更换培养基为加有一系列浓度递度 (一般 6 到 7 个浓度) 受试化合物溶液的培养基, 将培养板重新放回培养箱, 连续培养 72 个小时。72 小时后, 可用 sulforhodamine B (SRB) 方法进行测试化合物对于抑制细胞增殖活性。IC₅₀ 值可通过一系列不同浓度下, 受试化合物对于细胞的

抑制数值进行计算。

材料和方法：

- a. 二甲基亚砷 (Sinophma chemical reagent company, 目录 T20050806 号)
- b. HUVEC 细胞 (购于 Institute of biochemistry and cell biology)
- c. Falcon 100 mm 细胞培养板 (Baton Dickison Labware, Baton Dickison and company, 目录 18677 号)
- d. corning 96 孔培养板 (Corning Incorporated, 目录 3599 号)
- e. Fisher 移液管 (Fisher scientific, 目录 03-692-164 号)
- f. DMEM/F12 细胞培养基 (Gibco, 目录 12400-024 号)
- g. 澳大利亚胎牛血清 (Gibco, 目录 10099-141 号)
- h. 磷酸盐缓冲盐水 (Gibco, 目录 10010-072 号)
- i. 0.25 % 胰岛素-EDTA (Gibco, 目录 25200-056 号)
- j. Sulforhodamine B (Sigma, 目录 3520-42-1 号)
- k. 醋酸 (Sinophma chemical reagent company, 目录 T20060508 号)
- l. 三氯醋酸 (Sinophma chemical reagent company, 目录 T20060305 号)
- m. Tris 碱 (Amresco, 目录 0826 号)
- n. II 级 A/B3 型生物学安全工作橱(ThermoForma 目录. HB0053-03 号)
- o. 系列 II 水套式二氧化碳培养箱 (ThermoForma 模型: 3111)
- p. 离心机 (Fisher Scientific Marathon 8 k, 目录 0027-02 号)
- q. Novastar 板读取器 (BMG Labtech, 目录 700-0081 号)
- r. 定轨摇床 (Qilinbeier, 目录 TS-1 号)

方案：

下面的方案用来测试本发明受试化合物对于 HUVEC 细胞的抑制细胞增殖 IC_{50} 值。

1. 将 HUVEC 细胞殖于 100mm corning 培养板在生长基 (以 DMEM/F12+10%胎牛血清为培养液)中进行培养 (37 °C, 5 % CO_2), 直至细胞充分汇合;
2. 在 100 mm 培养板中用胎牛血清洗涤 HUVEC 细胞, 以 Tyrpsin 消化细胞后, 再将细胞接种在 corning 96 孔细胞培养板上, 浓度为 50000 cells/ml,每个板空 6 孔, 作为对照孔.;
3. 在 37 °C, 5 % CO_2 条件下, 将细胞在 96 孔板中培养, 直至达到约 85 %汇合;
4. 用 DMSO 溶解受试化合物, 配置 20 mM 母液, 后用 DMSO 稀释母液, 得到一系列浓度的受试化合物的溶液, 即 2 mM, 1 mM, 0.2 mM, 20 μ M, 2 μ M, 0.2 μ M;
5. 使用细胞培养基 (DMEM/F12 +10 %胎牛血清为培养液) 稀释上面所配置的

化合物溶液。每个 DMSO 系列浓度化合物溶液稀释 20 倍，每次在细胞培养基中加入 5 μ l DMSO 化合物溶液和 95 μ l 培养液，确保 HUVEC 细胞暴露在 DMSO 溶液中的浓度不超过 0.5 %，用涡旋混合，；

6. 当 HUVEC 细胞贴壁，生长达到 85%汇合后，将培养基换为加有 DMEM/F12 +10 %胎牛血清培养液的新培养基，每孔中再加入 180 μ l 培养液和 20 μ l 在第五步中所制备的受试化合物溶液。阴性对照细胞组，加入含有 0.5%DMSO 的 20 μ l 培养液，这样 HUVEC 细胞暴露在受试化合物溶液中的最终浓度为 100 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 1 μ M, 0.1 μ M, 0.01 μ M, and 0.001 μ M；

7. 将培养板放入恒温箱内，在 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂ 条件下，连续培养 72 小时；

8. 72 小时后，将培养板从恒温箱中转移到无菌工作室；

9. 将试剂级纯水加入到 TCA 中制备固定剂 (50 % 三氯醋酸-TCA)，将细胞慢慢地分层放在 50 μ l 冷 TCA 溶液中；

10. 在 4 $^{\circ}$ C 下，培养 1 小时，后用水洗涤数次以除去 TCA、血清蛋白等。培养板在空气中干燥，存储待用。空白背景光学密度值的测定是在没有细胞生长的培养基中温育培养所得的数值。

11. 用 10 %醋酸溶液制备 0.4 % Sulforhodamine B 溶液，并向每孔中加入 50 μ l sulforhodamine B 溶液；

12. 细胞着色 30 分钟；

13. 制备 10%醋酸洗涤溶液。当着色将要完毕时，弃去着色剂，用 10%的醋酸溶液快速冲洗细胞。重复上述的操作直至着色剂洗净为止，尽量减少冲洗次数以减少与蛋白结合的着色剂的去吸附。冲洗完毕后，将培养板在空气中干燥；

14. 混合的着色剂溶解在一定体积的 Sulforhodamine B 中，增溶溶液 (10 mM Tris) 与培养基原体积相同，将培养板在室温下放置 5 分钟，用摇床缓慢搅拌加快与染料的混合；

15. 用分光光度测量，在波长 565 nm 下读取吸光度值。吸光度数值为 565 nm 下吸光度减去 690 nm 下 96 孔板背景吸光度所得的数值；

16. 使用如下方法计算抑制率比值：

$$IR = 100 \times (\text{对照组吸光度值} - \text{用药组吸光度值}) / \text{对照组吸光度值} \%$$

IC₅₀ 值可通过不同浓度下化合物抑制率比值计算得到。

本发明化合物的活性

本发明化合物的生化学活性通过以上的试验进行测定，测得的 IC₅₀ 值见下表。

实施例编号

IC₅₀ (VEGFR/HUVEC)(μ M)

2	5
3	2.4
4	4.7
7	2.9
10	4.2
11	3.3

例 3：抑制细胞增殖测试

下面的体外试验是用来测定本发明化合物对于人类肿瘤细胞 A431 EGFR 高表达的细胞株抑制增殖活性。

下面所述的体外细胞试验可确定受试化合物的对高表达 EGFR 的肿瘤细胞的抗血管生成活性和抑制增殖活性，其活性可用 IC_{50} 值来表示。此类试验的一般方案如下：首先选择高表达 EGFR 的人类肿瘤细胞，以适宜细胞浓度下（exp 5000 个细胞/ml medium）接种在 96 孔培养板上，然后将细胞在二氧化碳恒温箱内进行培养，当它们生长至 85% 汇合，更换培养基为加有一系列浓度梯度（一般 6 到 7 个浓度）受试化合物溶液的培养基，将培养板重新放回培养箱，连续培养 72 个小时。72 小时后，可用 sulforhodamine B (SRB) 方法进行测试化合物对于抑制细胞增殖活性。 IC_{50} 值可通过一系列不同浓度下，受试化合物对于细胞的抑制数值进行计算。

材料和方法：

- s. 二甲基亚砜 (Sinophma chemical reagent company, 目录 T20050806 号)
- t. A431 细胞 (购于 Institute of biochemistry and cell biology)
- u. Falcon 100 mm 细胞培养板 (Baton Dickison Labware, Baton Dickison and company, 目录 18677 号)
- v. corning 96 孔培养板 (Corning Incorporated, 目录 3599 号)
- w. Fisher 移液管 (Fisher scientific, 目录 03-692-164 号)
- x. DMEM/F12 细胞培养基 (Gibco, 目录 12400-024 号)
- y. 澳大利亚胎牛血清 (Gibco, 目录 10099-141 号)
- z. 磷酸盐缓冲盐水 (Gibco, 目录 10010-072 号)
- aa. 0.25 % 胰岛素-EDTA (Gibco, 目录 25200-056 号)
- bb. Sulforhodamine B (Sigma, 目录 3520-42-1 号)
- cc. 醋酸 (Sinophma chemical reagent company, 目录 T20060508 号)
- dd. 三氯醋酸 (Sinophma chemical reagent company, 目录 T20060305 号)
- ee. Tris 碱 (Amresco, 目录 0826 号)
- ff. II 级 A/B3 型生物学安全工作橱 (ThermoForma 目录. HB0053-03 号)

- gg. 系列 II 水套式二氧化碳培养箱 (ThermoForma 模型: 3111)
- hh. 离心机 (Fisher Scientific Marathon 8 k, 目录 0027-02 号)
- ii. Novastar 板读取器 (BMG Labtech, 目录 700-0081 号)
- jj. 定轨摇床 (Qilinbeier, 目录 TS-1 号)

方案:

下面的方案用来测试本发明受试化合物对于 A431 细胞的抑制细胞增殖 IC_{50} 值。

17. 将 A431 细胞殖于 100mm corning 培养板在生长基 (以 DMEM/F12+10%胎牛血清为培养液)中进行培养 (37 °C, 5 % CO_2), 直至细胞充分汇合;

18. 在 100 mm 培养板中用胎牛血清洗涤 A431 细胞, 以 Trypsin 消化细胞后, 再将细胞接种在 corning 96 孔细胞培养板上, 浓度为 50000 cells/ml, 每个板空 6 孔, 作为对照孔.;

19. 在 37 °C, 5 % CO_2 条件下, 将细胞在 96 孔板中培养, 直至达到约 85 %汇合;

20. 用 DMSO 溶解受试化合物, 配置 20 mM 母液, 后用 DMSO 稀释母液, 得到一系列浓度的受试化合物的溶液, 即 2 mM, 1 mM, 0.2 mM, 20 μ M, 2 μ M, 0.2 μ M;

21. 使用细胞培养基 (DMEM/F12 +10 %胎牛血清为培养液) 稀释上面所配置的化合物溶液。每个 DMSO 系列浓度化合物溶液稀释 20 倍, 每次在细胞培养基中加入 5 μ l DMSO 化合物溶液和 95 μ l 培养液, 确保 A431 细胞暴露在 DMSO 溶液中的浓度不超过 0.5 %, 用涡旋混合.;

22. 当 A431 细胞贴壁, 生长达到 85%汇合后, 将培养基换为加有 DMEM/F12 +10 %胎牛血清培养液的新培养基, 每孔中再加入 180 μ l 培养液和 20 μ l 在第五步中所制备的受试化合物溶液。阴性对照细胞组, 加入含有 0.5 %DMSO 的 20 μ l 培养液, 这样 A431 细胞暴露在受试化合物溶液中的最终浓度为 100 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 1 μ M, 0.1 μ M, 0.01 μ M, and 0.001 μ M;

23. 将培养板放入恒温箱内, 在 37 °C, 5 % CO_2 条件下, 连续培养 72 小时;

24. 72 小时后, 将培养板从恒温箱中转移到无菌工作室;

25. 将试剂级纯水加入到 TCA 中制备固定剂 (50 % 三氯醋酸-TCA), 将细胞慢慢地分层放在 50 μ l 冷 TCA 溶液中;

26. 在 4°C下, 培养 1 小时, 后用水洗涤数次以除去 TCA、血清蛋白等。培养板在空气中干燥, 存储待用。空白背景光学密度值的测定是在没有细胞生长的培养基中温育培养所得的数值。

27. 用 10 %醋酸溶液制备 0.4 % Sulforhodamine B 溶液, 并向每孔中加入 50 μ l sulforhodamine B 溶液;

28. 细胞着色 30 分钟;

29. 制备 10%醋酸洗涤溶液。当着色将要完毕时, 弃去着色剂, 用 10%的醋酸溶

液快速冲洗细胞。重复上述的操作直至着色剂洗净为止，尽量减少冲洗次数以减少与蛋白结合的着色剂的去吸附。冲洗完毕后，将培养板在空气中干燥；

30. 混合的着色剂溶解在一定体积的 Sulforhodamine B 中，增溶溶液 (10 mM Tris) 与培养基原体积相同，将培养板在室温下放置 5 分钟，用摇床缓慢搅拌加快与染料的混合；

31. 用分光光度测量，在波长 565 nm 下读取吸光度值。吸光度数值为 565 nm 下吸光度减去 690 nm 下 96 孔板背景吸光度所得的数值；

32. 使用如下方法计算抑制率比值：

$IR = 100 \times (\text{对照组吸光度值} - \text{用药组吸光度值}) / \text{对照组吸光度值} \%$

IC₅₀ 值可通过不同浓度下化合物抑制率比值计算得到。

本发明化合物的活性

本发明化合物的生化活性通过以上的试验进行测定，测得的 IC₅₀ 值见下表。

实施例编号	IC ₅₀ (EGFR/A431)(μ M)
2	0.28
3	6.77
4	5.94
7	1.44
10	1.02
11	2.16
14	0.17
15	7.13
17	0.56
18	0.5

EXAMPLE 4: EGFR 激酶活性测定

体外 EGFR 激酶活性通过以下的方法进行测试。

材料与试剂：

- 洗涤缓冲液 (PBS-T 缓冲液): 1x PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄, 调 pH 至 7.2) 和 0.05 % Tween-20
- 1% 牛血清白蛋白(BSA, Calbiochem #136593)PBS-T 缓冲液
- 反应中止缓冲液: 50 mM EDTA, pH 8.0.
- DELFI[®] 标记抗鼠 IgG (PerkinElmer Life Sciences #AD0124)
- DELFI[®] 信号倍增液(PerkinElmer Life Sciences #1244-105)

- f. DELFIA[®] Streptavidin包96孔黄板 (PerkinElmer Life Sciences#AAAND-0005)
- g. EGFR 激酶(50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl, 5 mM DTT, 15 mM 谷胱基胱氨酰甘氨酸和 20 %甘油, Cell signaling technology #7908)
- h. 10 mM ATP 溶液 (Cell signaling technology #9804).
- i. PTP1B (Tyr66)生物素酰化蛋白 (Cell signaling technology #1325).
- j. Phospho-酪氨酸鼠 mAb (P-Tyr-100) (Cell signaling technology #9411).
- k. HTScan[™]酪氨酸激酶缓冲液 (4x)
- 1x 激酶缓冲液:
 - 60 mM HEPES
 - 5 mM MgCl₂
 - 5 mM MnCl₂
 - 3 μ M Na₃VO₄
 - (Cell signaling technology #9805).
- l. 1.25 M DTT (1000x) (Cell signaling technology).

方案:

使用如下方案进行测试:

1. 用 DMSO 稀释受试化合物达到最终浓度值;
在每个试验中加入 1 μ l 受试化合物、阴性对照和空白对照 (不接受任何受试化合物), 只加入 1 μ l DMSO;
 2. 用 dH₂O 1:1 稀释 6 μ M 底物蛋白(Tyr589), 并加 15 μ l 到每个测试;
 3. 将酶从-80°C 直接转移到冰上, EGFR 酶解冻在冰上;
 4. 取 3 μ g EGFR 酶到每个测试中;
 5. 加入 10 μ l DTT (1.25 M) 到 2.5 ml 4x HTScan[™] 酪氨酸激酶缓冲液(240 mM HEPES pH 7.5, 20 mM MgCl₂, 20 mM MnCl₂, 12 μ M Na₃VO₄) 中, 制得 DTT/激酶缓冲液;
 6. 转移 0.75 ml DTT/激酶缓冲液到每个每个测试中, 制得 4x 反应混合液, 并在每个测试中加入 7.5 μ l 4x 反应液;
 7. 加入 2 μ l ATP (10 mM) 至 496 μ l dH₂O 中, 并在每个测试中加入 7.5 μ l;
- 30 μ l 反应最终测试条件为:
- 60 mM HEPES pH 7.5
 - 5 mM MgCl₂
 - 5 mM MnCl₂
 - 3 μ M Na₃VO₄
 - 1.25 mM DTT

20 μM ATP

1.5 μM 多肽底物

30 ng EGFR 激酶

8. 在 25°C 下, 将反应管温育 45 分钟;

9. 每个测试中加入 30 μl 中止反应缓冲液(50 mM EDTA, pH 8.0)中止反应;

10. 在 96 孔 streptavidin 包被培养板每孔中加入 25 μl 反应液和 75 μl dH₂O, 在室温下, 并振摇 60 分钟;

11. 每孔用 200 μl PBS-T 缓冲液洗涤 3 次, 在纸巾上轻拍以除去剩余的液体;

12. 用 1%牛血清白蛋白 PBS-T 缓冲液 1:1000 稀释抗体 Phospho-酪氨酸 mAb (P-Tyr-100), 在每孔中加入 100 μl 稀释的抗体;

13. 在室温下, 振摇温育 60 分钟;

14. 按第 11 步所述方法洗涤;

15. 用 1%牛血清白蛋白 PBS-T 缓冲液 1:500 稀释标记抗鼠 IgG, 并在每孔中加入 100 μl 稀释抗体;

16. 在室温下, 振摇温育 30 分钟;

17. 每孔用 PBS-T 缓冲液 200 μl 洗涤 5 次, 在纸巾上轻拍以除去剩余的液体;

18. 每孔中加入 100 μl DELFIA[®]信号倍增液;

19. 在室温下, 振摇温育 5 分钟;

20. 在 615 nm 处, 用合适的时间分辨板读取器读取荧光强度。。

计算抑制率比值: $\text{IR}(\%) = 100 - 100 * (\text{X} - \text{B}) / (\text{N} - \text{B})$

X=受试化合物荧光值

N=阴性对照

B=空白

IC₅₀ 值可通过受试化合物不同浓度递度下的抑制率比值计算得到。

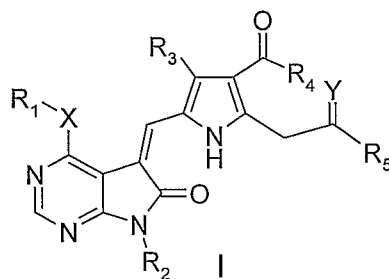
本发明化合物的活性

本发明化合物的生化学活性通过以上的试验进行测定, 测得的 IC₅₀ 值见下表。

实施例编号	IC ₅₀ (EGFR/bio)(μM)
2	0.13
15	0.06
17	0.007
18	0.025

权 利 要 求

1. 一种由下面通式(I)表示的化合物或其药学上可接受的盐:



其中:

X 选自 $W(CH_2)$ 、 $(CH_2)W$ 、或 W, 其中 W 是 O、S、SO 或 SO_2 ; 或 X 为 $-NR_6$; 其中 R_6 是氢原子或烷基;

Y 为氧原子或氢原子;

当 X 是 $-NR_6$, R_6 是烷基, 则 R_6 可以和 R_1 形成一个 4~8 元杂环基; 其中 5~8 元杂环内可以含有一个或多个 N、O、S 原子, 并且 4~8 元杂环进一步被一个或多个选自烷基、卤素、芳基、杂芳基、卤代烷基、卤代烷氧基、羟基、氨基、烷氨基、酰胺基、胺酰基、氰基、烷氧基、芳氧基、胺烷基、羟烷基、杂环烷基、羧酸、羧酸酯或 $-NR_7R_8$ 的取代基所取代;

R_1 选自氢原子、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、芳烷基或杂芳烷基, 其中烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、芳烷基或杂芳烷基进一步被一个或多个选自烷基、卤素、芳基、羟基、氨基、烷氨基、酰胺基、胺酰基、烷氧基、芳氧基、杂环烷基、羧酸、羧酸酯或 $-NR_7R_8$ 的取代基所取代; 其中芳基、杂芳基、芳烷基或杂芳烷基并成双环;

R_2 选自氢原子、烷基、环烷基、杂环烷基、 $-(CH_2CH_2O)_nR_6$ 、烯基或炔基、 $-COOR_7$ 、 $-CONR_7R_8$ 、 $-C(=S)NR_7R_8$ 、 $-COR_7$ 、 $-SOR_7$ 、 $-SO_2R_7$ 、 $-SO_2NR_7R_8$ 或者 $-P(=O)(OR_7)(OR_8)$, 其中烷基、环烷基、杂环烷基、烯基或炔基进一步被一个或多个选自烷基、羟基、烷氧基、氰基、氨基、烷氨基、羧酸或羧酸酯的取代基所取代;

R_3 选自氢原子、烷基、芳基、卤素取代的芳基或三氟甲基;

R_4 选自羟基、烷氧基、芳氧基、杂环烷氧基、芳烷氧基、 $-(OCH_2CH_2)_nR_6$ 、 $-N(R_7)(CH_2)_nR_8$ 、 $-NR_7[CH_2CH_2O]_nR_8$ 或者 $-NR_6(CH_2)_n[CH(OH)CH_2]_rZ$; 其中 Z 是芳基、杂芳基、杂环烷基、 $-NR_7R_8$ 、 $-COOR_6$ 或 $CONR_7R_8$;

R_5 选自羟基、烷氧基、芳氧基、杂环烷氧基、芳烷氧基、 $-N(R_7)(CH_2)_nR_8$ 、 $-NR_7[CH_2CH_2O]_nR_8$ 或者 $-NR_6(CH_2)_n[CH(OH)CH_2]_rZ$; 其中 Z 是芳基、杂芳基、杂环烷基、 $-NR_7R_8$ 、 $-COOR_6$ 或 $CONR_7R_8$;

R_6 是氢原子或烷基;

R_7 和 R_8 分别选自氢原子、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基或杂芳烷基, 其中烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基或者杂芳烷基进一步被一个或多个选自烷基、卤素、芳基、羟基、氨基、烷氨基、酰胺基、胺酰基、氰基、烷氧基、芳氧基、胺烷基、羟烷基、杂环烷基、羧酸、羧酸酯或 $-NR_7R_8$ 的取代基所取代;

同时, R_7 和 R_8 可以形成一个 4~8 元杂环基; 其中 5~8 元杂环内含有一个或多个 N、O、S 原子, 并且 4~8 元杂环进一步被一个或多个选自烷基、卤素、芳基、杂芳基、卤代烷基、卤代烷氧基、羟基、氨基、酰胺基、胺酰基、氰基、烷氧基、芳氧基、胺烷基、羟烷基、杂环烷基、羧酸、羧酸酯或 $-NR_7R_8$ 的取代基所取代。

n 是 0~6;

r 是 1~2。

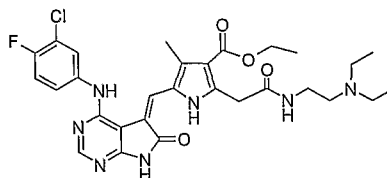
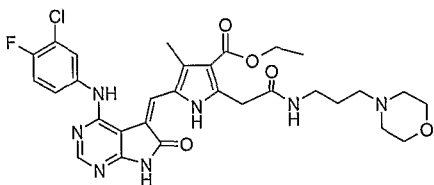
2. 根据权利要求 1 所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中 X 是 $-NH$, R_1 是氢原子、烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、芳烷基或杂芳烷基, 其中烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、芳烷基或杂芳烷基进一步被一个或多个选自烷基、卤素、芳基、羟基、氨基、烷氨基、酰胺基、胺酰基、烷氧基、芳氧基、杂环烷基、羧酸、羧酸酯的取代基所取代。

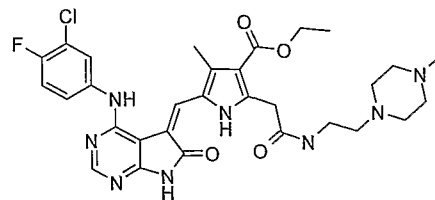
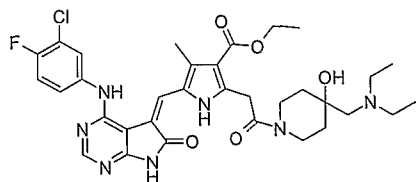
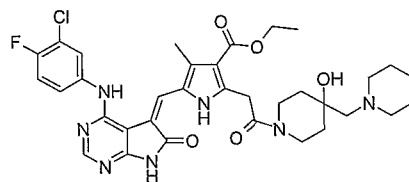
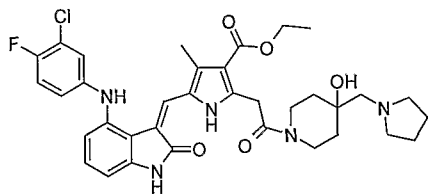
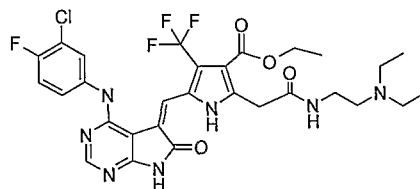
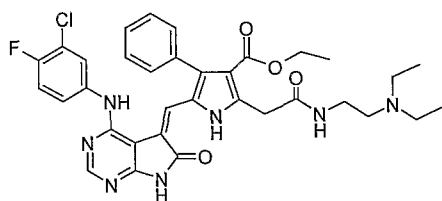
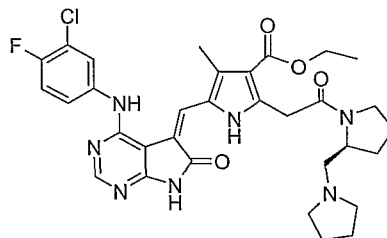
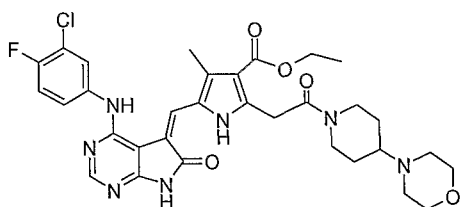
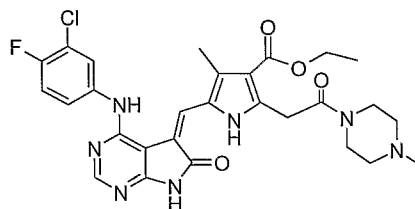
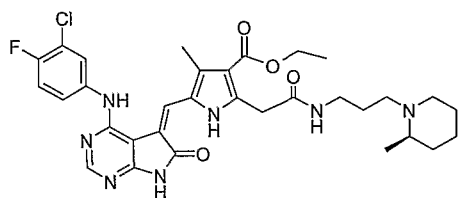
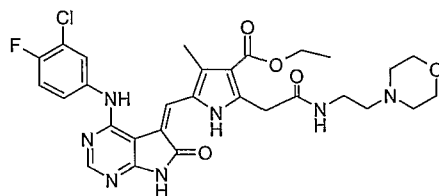
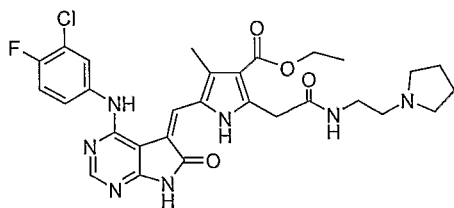
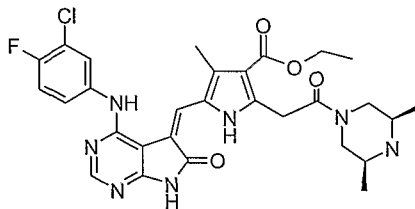
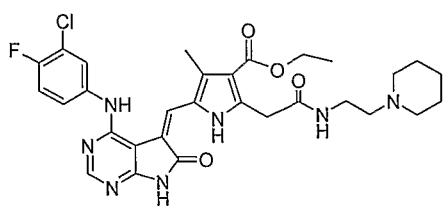
3. 根据权利要求 1 所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中 Y 是氧原子。

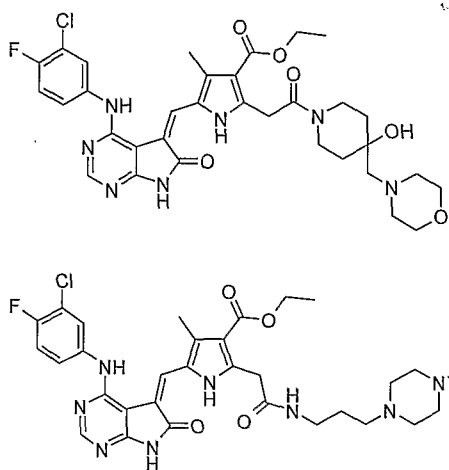
4. 根据权利要求 1 所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中 R_2 是氢原子。

5. 根据权利要求 1 所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中所述的药学上可接受的盐为化合物与选自以下的酸形成的盐: 苹果酸、乳酸、马来酸、盐酸、甲磺酸、硫酸、磷酸、柠檬酸、酒石酸、乙酸或三氟乙酸。

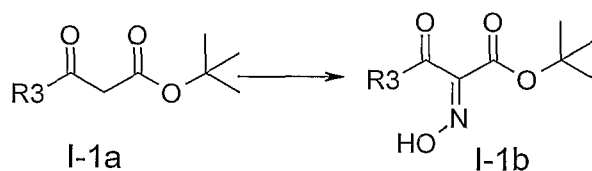
6. 根据权利要求 1~5 任一项所述的化合物或其盐, 其中包括:



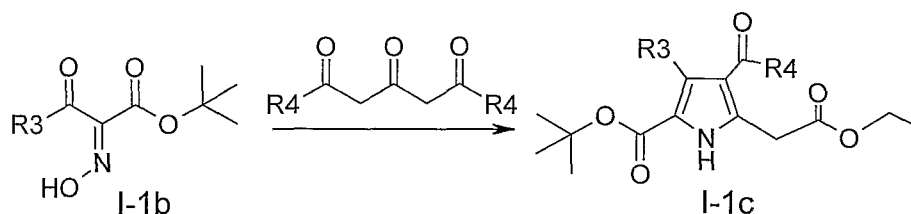




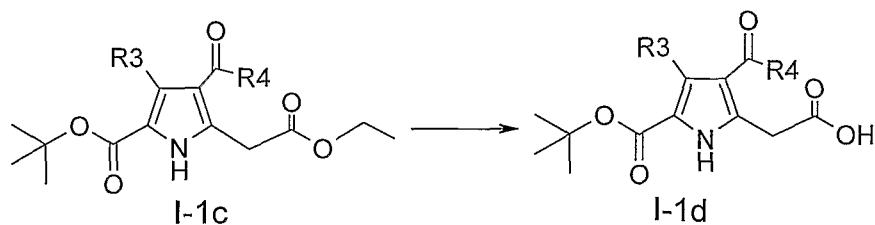
7. 权利要求 1 所述的通式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐的制备方法, 包括以下步骤:



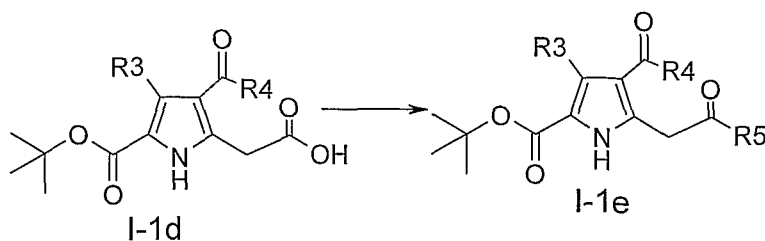
以 I-1a 为起始原料, 与亚硝酸钠反应得到通式 I-1b 化合物;



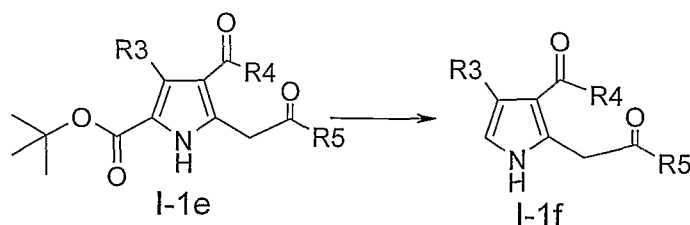
将所得 I-1b 化合物经过 Knorr Pyrrole 成环得到通式 I-1c 化合物;



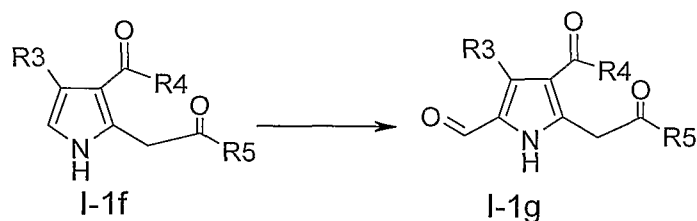
所述 I-1c 化合物室温下经碱金属氢氧化物溶液的选择性水解后得到通式 I-1d 化合物;



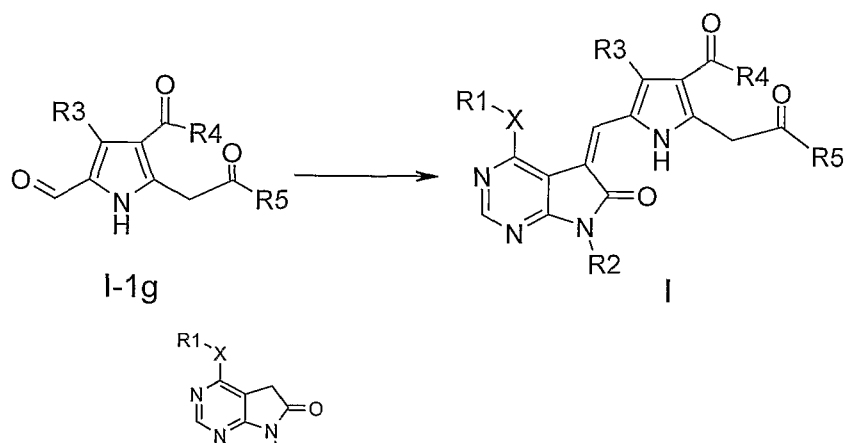
I-1d 化合物与 R_5NH_2 进行酰胺化反应得到通式 I-1e 化合物;



I-1e 化合物经在三氟醋酸作用下的脱羧得到通式 I-1f 化合物;



I-1f 化合物在无水体系中, 与三氯氧磷经甲酰化反应得到通式 I-1g 化合物;



通式 I-1g 化合物与 缩合即得到通式 (I) 化合物。

8. 根据权利要求书 7 所述的制备方法, 其中所述碱金属氢氧化物溶液为氢氧化锂溶液。

9. 一种药物组合物, 其含有治疗有效剂量的根据权利要求 1~6 中任何一项所述的化合物或其药学上可接受的盐和药学载体。

10. 一种调节蛋白激酶催化活性的方法, 其中包括将所述的蛋白激酶与权利要求 1~6 中任何一项所述的化合物或其药学上可接受的盐接触。

11. 根据权利要求 10 所述的方法, 其中所述蛋白激酶选自受体酪氨酸激酶、非受体酪氨酸激酶或丝氨酸-苏氨酸激酶。

12. 一种治疗患有与蛋白质激酶有关的疾病的哺乳动物的方法，所述方法包括对所述哺乳动物给药治疗有效剂量的根据权利要求 9 所述的药物组合物。

13. 根据权利要求 12 所述的方法，其中所述与蛋白质激酶有关的疾病选自与 VEGFR-2, EGFR, HER-2, HER-3, HER-4, PDGFR, c-Kit, c-Met, FGFR 或 Flt3 相关的疾病。

14. 根据权利要求 12 所述的方法，其中所述的哺乳动物是人。

15. 根据权利要求 12 所述的方法，其中所述与蛋白激酶有关的疾病选自白血病，糖尿病，自免疫病，过度增生病，牛皮癣，骨关节炎，类风湿性关节炎，血管生成，心血管病，Von-Heppel-Lindau 氏病，炎症或纤维变性病。

16. 根据权利要求 12 所述的方法，其中所述与蛋白激酶有关的疾病是癌症，选自鳞状细胞癌，肾细胞癌，Kaposi 肉瘤，非小细胞肺癌，小细胞肺癌，淋巴瘤，甲状腺癌，乳腺癌，头颈癌，子宫癌，食道癌，黑素癌，膀胱癌，生殖泌尿癌，胃肠癌，神经胶质癌，结肠直肠癌或卵巢癌。

17. 根据权利要求 16 所述的方法，该方法进一步包括同时向需要治疗的患者给药治疗有效量的其它抗癌药物。

18. 根据权利要求 17 所述的方法，其中所述的其它抗癌药物选自紫杉酚或卡铂。

19. 一种权利要求 1 所述的化合物在制备治疗与蛋白质激酶有关的疾病的药物中的用途。

20. 根据权利要求 19 所述的用途，其中所述与蛋白质激酶有关的疾病选自与 VEGFR-2, EGFR, HER-2, HER-3, HER-4, PDGFR, c-Kit, c-Met, FGFR 或 Flt3 相关的疾病。

21. 根据权利要求 19 所述的方法，其中所述与蛋白激酶有关的疾病选自白血病，糖尿病，自免疫病，过度增生病，牛皮癣，骨关节炎，类风湿性关节炎，血管生成，心血管病，Von-Heppel-Lindau 氏病，炎症或纤维变性病。

22. 根据权利要求 19 所述的方法，其中所述与蛋白激酶有关的疾病是癌症，选自鳞状细胞癌，肾细胞癌，Kaposi 肉瘤，非小细胞肺癌，小细胞肺癌，淋巴瘤，甲状腺癌，乳腺癌，头颈癌，子宫癌，食道癌，黑素癌，膀胱癌，生殖泌尿癌，胃肠癌，神经胶质癌，结肠直肠癌或卵巢癌。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2007/000980

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER See extra sheet <i>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</i>				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: C07D A61K A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI, EPDOC, PAJ, STN, CNPAT, CNKI				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No		
X	US6610688B2(SUGEN INC), 26 Aug. 2003(26.08.2003), compounds 25-28 on column 16, claims 1-22	1-22		
X	Christensen, James G. "High levels of HER-2 expression alter the ability of epidermal growth factor receptor (EGFR) family tyrosine kinase inhibitors to inhibit EGFR phosphorylation in vivo", Clinical Cancer Research (2001), 7(12), 4230-4238 ISSN: 1078-0432	1-22		
X	Sun, Li et al. "Rational design of 4,5-disubstituted-5,7-dihydro-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-6-ones as a novel class of inhibitors of epidermal growth factor receptor (EGF-R) and Her2(p185erbB) tyrosine kinases" Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (2002), 12(16), 2153-2157 ISSN: 0960-894X	1-22		
X	WO2005053686A1(SCRIPPS RES INST), 16 June 2005(16.06.2005), claims 1-8, Examples	1-22		
X	US6797725B2(SUGEN INC), 28 Sep. 2004 (28.09.2004), claim 1, examples	1-22		
X	US6451838B1(PHARMACIA & UPJOHN CO), 17 Sep. 2002(17.09.2002), claim 1, examples	1-22		
X	US6482848B2(SUGEN INC), 19 Nov. 2002(19.11.2002), claim 1, examples	1-22		
A	US6465507B2(SUGEN INC), 15 Oct. 2002(15.10.2002), the whole document	1-22		
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.				
<table border="0"> <tr> <td> * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 19 June 2007 (19.06.2007)		Date of mailing of the international search report 05 Jul. 2007 (05.07.2007)		
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451		Authorized officer HE Xiaoping Telephone No. (86-10)62085629		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2007/000980

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
US6610688B2	26.08.2003	WO0146196A1	28.06.2001
		AU2728201A	03.07.2001
		EP1244672A1	02.10.2002
		US2002183319A1	05.12.2002
		JP2003518123T	03.06.2003
		US2004053924A1	18.03.2004
		US6908930B2	21.06.2005
		EP1244672B1	20.07.2005
		DE60021423E	25.08.2005
		ES2245955T	01.02.2006
		DE60021423T	13.04.2006
US6465507B2	15.10.2002	WO0164681A2	07.09.2001
		AU4179801A	12.09.2001
		US2002042427A1	11.04.2002
		EP1259514A2	27.11.2002
		JP2003525296T	26.08.2003
		EP1259514B1	08.06.2005
		DE60111358E	14.07.2005
		EP1259514B9	09.11.2005
		ES2243461T	01.12.2005
		DE60111358T	11.05.2006
WO2005053686A1	16.06.2005	CA2547066A1	16.06.2005
		AU2004294981A1	16.06.2005
		WO2005053692A1	16.06.2005
		WO2005054183A2	16.06.2005
		WO2005053614A1	16.06.2005
		EP1686987A2	09.08.2006
		CN1905869A	31.01.2007
		BRPI0416994A	06.02.2007

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2007/000980

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
US6797725B2	28.09.2004	WO02081466A1	17.10.2002
		US2003100555A1	29.05.2003
		AU2002307183A1	21.10.2002
		US2004186161A1	23.09.2004
		US7053114B2	30.05.2006
		WO0190104A2	29.11.2001
		AU6339901A	03.12.2001
		US2002035140A1	21.03.2002
		EP1294711A2	26.03.2003
		US2003045565A1	06.03.2003
		JP2003534342T	18.11.2003
		US2004127542A1	01.07.2004
		EP1294711B1	07.12.2005
		EP1294711B8	08.03.2006
		US7008943B2	07.03.2006
		ES2253385T	01.06.2006
US6482848B2	19.11.2002	WO0190103A2	29.11.2001
		AU6487701A	03.12.2001
		US2002037878A1	28.03.2002
		EP1283835A2	19.02.2003
		US2003083363A1	01.05.2003
		JP2003534341T	18.11.2003
		US6716870B2	06.04.2004
		US2005107340A1	19.05.2005
		AU2001264877A8	08.09.2005
US6451838B1	17.09.2002	US7112603B2	26.09.2006
		WO0190104A2	29.11.2001
		AU6339901A	03.12.2001

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2007/000980

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		US2002035140A1	21.03.2002
		EP1294711A2	26.03.2003
		US2003045565A1	06.03.2003
		JP2003534342T	18.11.2003
		US2004127542A1	01.07.2004
		EP1294711B1	07.12.2005
		EP1294711B8	08.03.2006
		US7008943B2	07.03.2006
		ES2253385T	01.06.2006

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2007/000980

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D487/04 (2006.01) i
A61K 31/407 (2006.01) i
A61K 31/519 (2006.01) i
A61P 3/10 (2006.01) i
A61P 7/00 (2006.01) i
A61P 9/00 (2006.01) i
A61P 17/06 (2006.01) i
A61P 19/02 (2006.01) i
A61P 29/00 (2006.01) i
A61P 35/00 (2006.01) i
A61P 43/00 (2006.01) i

Although claims 10-18 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effect of the compounds/compositions.

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2007/000980

A. 主题的分类 参见附加页 按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) IPC: C07D A61K A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) WPI, EPODOC, PAJ, STN, CNPAT, CNKI		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	US6610688B2(SUGEN INC),26.8 月 2003(26.08.2003), 第 16 栏化合物 25-28, 权利要求 1-22	1-22
X	Christensen, James G. "High levels of HER-2 expression alter the ability of epidermal growth factor receptor (EGFR) family tyrosine kinase inhibitors to inhibit EGFR phosphorylation in vivo", Clinical Cancer Research (2001), 7(12), 4230-4238 ISSN: 1078-0432	1-22
X	Sun, Li et al. "Rational design of 4,5-disubstituted-5,7-dihydro-pyrrolo [2,3-d]pyrimidin-6-ones as a novel class of inhibitors of epidermal growth factor receptor (EGF-R) and Her2(p185erbB) tyrosine kinases" Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (2002), 12(16), 2153-2157 ISSN: 0960-894X	1-22
X	WO2005053686A1(SCRIPPS RES INST),16.6 月 2005(16.06.2005), 权利要求 1-8, 实施例	1-22
X	US6797725B2(SUGEN INC),28.9 月 2004(28.09.2004), 权利要求 1, 实施例	1-22
X	US6451838B1(PHARMACIA & UPJOHN CO), 17.9 月 2002(17.09.2002), 权利要求 1, 实施例	1-22
X	US6482848B2(SUGEN INC),19.11 月 2002(19.11.2002),权利要求 1, 实施例	1-22
A	US6465507B2(SUGEN INC),15.10 月 2002 (15.10.2002), 全文	1-22
☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件		"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件
国际检索实际完成的日期 19.6 月 2007 (19.06.2007)		国际检索报告邮寄日期 05.7 月 2007 (05.07.2007)
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451		授权官员 何小平 电话号码: (86-10) 62085629

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2007/000980

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
US6610688B2	26.08.2003	WO0146196A1	28.06.2001
		AU2728201A	03.07.2001
		EP1244672A1	02.10.2002
		US2002183319A1	05.12.2002
		JP2003518123T	03.06.2003
		US2004053924A1	18.03.2004
		US6908930B2	21.06.2005
		EP1244672B1	20.07.2005
		DE60021423E	25.08.2005
		ES2245955T	01.02.2006
		DE60021423T	13.04.2006
WO2005053686A1	16.06.2005	CA2547066A1	16.06.2005
		AU2004294981A1	16.06.2005
		WO2005053692A1	16.06.2005
		WO2005054183A2	16.06.2005
		WO2005053614A1	16.06.2005
		EP1686987A2	09.08.2006
		CN1905869A	31.01.2007
		BRPI0416994A	06.02.2007
US6797725B2	28.09.2004	WO02081466A1	17.10.2002
		US2003100555A1	29.05.2003
		AU2002307183A1	21.10.2002
		US2004186161A1	23.09.2004
		US7053114B	23.05.2006
US6451838B1	17.09.2002	WO0190104A2	29.11.2001
		AU6339901A	03.12.2001
		US2002035140A1	21.03.2002
		EP1294711A2	26.03.2003
		US2003045565A1	06.03.2003
		JP2003534342T	18.11.2003
		US2004127542A1	01.07.2004
		EP1294711B1	07.12.2005
		EP1294711B8	08.03.2006
		US7008943B2	07.03.2006
		ES2253385T	01.06.2006

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2007/000980

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
US6482848B2	19.11.2002	WO0190103A2	29.11.2001
		AU6487701A	03.12.2001
		US2002037878A1	28.03.2002
		EP1283835A2	19.02.2003
		US2003083363A1	01.05.2003
		JP2003534341T	18.11.2003
		US6716870B2	06.04.2004
		US2005107340A1	19.05.2005
		AU2001264877A8	08.09.2005
US6465507B2	15.10.2002	US7112603B2	26.09.2006
		WO0164681A2	07.09.2001
		AU4179801A	12.09.2001
		US2002042427A1	11.04.2002
		EP1259514A2	27.11.2002
		JP2003525296T	26.08.2003
		EP1259514B1	08.06.2005
		DE60111358E	14.07.2005
		EP1259514B9	09.11.2005
		ES2243461T	01.12.2005
		DE60111358T	11.05.2006

主题的分类

C07D487/04 (2006.01) i
A61K 31/407 (2006.01) i
A61K 31/519 (2006.01) i
A61P 3/10 (2006.01) i
A61P 7/00 (2006.01) i
A61P 9/00 (2006.01) i
A61P 17/06 (2006.01) i
A61P 19/02 (2006.01) i
A61P 29/00 (2006.01) i
A61P 35/00 (2006.01) i
A61P 43/00 (2006.01) i

尽管权利要求 10-18 涉及治疗人/动物的方法，还是作了检索，检索是基于所述的化合物/组合物的效果进行的。