

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580003960.2

[51] Int. Cl.

C07D 417/04 (2006.01)

C07D 417/14 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 2 月 14 日

[11] 公开号 CN 1914199A

[22] 申请日 2005.2.7

[21] 申请号 200580003960.2

[30] 优先权

[32] 2004.2.6 [33] GB [31] 0402653.0

[86] 国际申请 PCT/GB2005/000405 2005.2.7

[87] 国际公布 WO2005/075468 英 2005.8.18

[85] 进入国家阶段日期 2006.8.3

[71] 申请人 西克拉塞尔有限公司

地址 英国伦敦

[72] 发明人 肯尼思·邓肯 达伦·吉布森

王淑东 丹尼拉·齐勒瓦

彼得·费希尔

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 张平元 赵仁临

权利要求书 7 页 说明书 55 页 附图 2 页

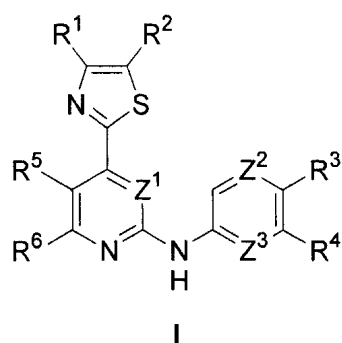
[54] 发明名称

具有蛋白激酶抑制活性的吡啶基或者嘧啶基
噻唑化合物

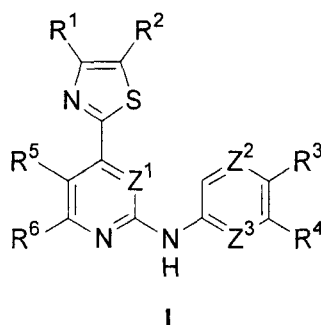
[57] 摘要

本发明涉及式 I 的化合物, 或其可药用盐, 其中 Z^1 为 N 或 CH; Z^2 和 Z^3 各自独立地为 N 或 CR⁷; R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 和 R^7 各自独立地为 H、 R^8 或 R^9 ; 各 R^8 独立地为烷基; 以及各 R^9 独立地为卤素、NO₂、烷氧基、CN、CF₃、SO₃H、SO₂NR¹⁰R¹¹、SO₂R¹²、NR¹³R¹⁴、(CH₂)_aCOOR¹⁵、(CH₂)_bCONR¹⁶R¹⁷、(CH₂)_cCOR¹⁸或(CH₂)_dOH; a、b、c 和 d 各自独立地为 0、1、2、3 或 4; R^{10-18} 各自独立地为 H 或烷基; 条件是当 R^1 和 R^2 都为 H, Z^1 为 CH; 或 Z^2 为 N; 或 Z^1 为 CH 且 Z^2 为 N 的时候; 则其中化合物不为 4-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-N-(3,4,5-三甲氧基苯基)-2-嘧啶胺或 4-(5-(2-羟基乙基)-4-甲基噻唑-2-基)-N-(3,4,5-三甲氧基苯基)-2-嘧啶胺。本发明的另一方面涉

及式 I 的化合物在制备用于治疗选自增生性疾病、病毒性疾病、CNS 疾病、糖尿病、中风和脱发症中一种或多种疾病的药物中的用途。



1. 式 I 的化合物, 或其可药用盐,



其中:

Z^1 为 N 或 CH;

Z^2 和 Z^3 各自独立地为 N 或 CR^7 ;

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 和 R^7 各自独立地为 H、 R^8 或 R^9 ;

各 R^8 独立地为烷基; 以及

各 R^9 独立地为卤素、 NO_2 、烷氧基、CN、 CF_3 、 SO_3H 、 $SO_2NR^{10}R^{11}$ 、 SO_2R^{12} 、 $NR^{13}R^{14}$ 、 $(CH_2)_aCOOR^{15}$ 、 $(CH_2)_bCONR^{16}R^{17}$ 、 $(CH_2)_cCOR^{18}$ 或 $(CH_2)_dOH$;

a、b、c 和 d 各自独立地为 0、1、2、3 或 4;

R^{10-18} 各自独立地为 H 或烷基;

条件是当 R^1 和 R^2 都是 H、

Z^1 为 CH; 或者

Z^2 为 N; 或

Z^1 为 CH 且 Z^2 为 N 的时候;

则所述的化合物不是 4-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-N-(3,4,5-三甲氧基苯基)-2-嘧啶胺或 4-(5-(2-羟基乙基)-4-甲基噻唑-2-基)-N-(3,4,5-三甲氧基苯基)-2-嘧啶胺。

2. 权利要求 1 的化合物, 其中各 R^8 独立地为 C_{1-30} 烷基, 任选包含至多 12 个选自 N、S 和 O 的杂原子, 并任选带有至多 6 个取代基, 各取代基独立地选自卤素、 NO_2 、CN、 CF_3 、 SO_3H 、 SO_2NH_2 、 SO_2Me 、OH、 NH_2 、COOH 和 $CONH_2$ 。

3. 权利要求 1 或 2 的化合物, 其中各 R^8 独立地为烷基、芳基或杂环烷基。

4. 权利要求 1 或 2 的化合物, 其中各 R^9 独立地为卤素、 NO_2 、烷氧基、 CN 、 CF_3 、 SO_3H 、 SO_2NH_2 、 SO_2Me 、 OH 、 NH_2 、 $(CH_2)_aCOOR^{15}$ 、 $(CH_2)_dOH$ 、 $CONH_2$ 或 COR^{18} 。

5. 上述权利要求中任一项的化合物, 其中:

R^1 为 H 、烷基、芳基、 $(CH_2)_aCOOR^{15}$ 或 OH ;

R^2 为 H 、 $(CH_2)_dOH$ 、 $(CH_2)_aCOOR^{15}$ 、 COR^{18} 或烷基;

R^3 为卤素、 H 、烷氧基、杂环烷基、烷基或 OH ;

R^4 为 H 、 NH_2 、 OH 、烷基、 CF_3 或 NO_2 ; 以及

R^5 和 R^6 都为 H 。

6. 上述权利要求中任一项的化合物, 其中:

R^1 为 H 、 Me 、 Ph 、 CH_2COOMe 或 OH ;

R^2 为 H 、 $(CH_2)_2OH$ 、 $COOEt$ 、 $COMe$ 或 Me ;

R^3 为 Cl 、 H 、 OMe 、 N -吗啉基、 N -吡咯烷基、 Me 或 OH ;

R^4 为 H 、 NH_2 、 OH 、 Me 、 CF_3 或 NO_2 ; 以及

R^5 和 R^6 都为 H 。

7. 权利要求 1 的化合物, 其中 Z^1 为 CH 且 Z^2 和 Z^3 各自独立地为 N 或 CR^7 。

8. 权利要求 7 的化合物, 其中 Z^2 和 Z^3 各自独立地为 CR^7 。

9. 权利要求 7 或 8 的化合物, 其中

R^1 为烷基或 OH ;

R^2 为烷基或 COR^{18} ;

R^3 为 OH 或卤素; 并且

Z^2 和 Z^3 都为 CH 。

10. 权利要求 9 的化合物, 其中 R^1 为 Me 或 OH , R^2 为 $COMe$ 或 Me , 且 R^3 为 OH 或 Cl 。

11. 权利要求 1 的化合物, 其中 Z^1 为 N 且 Z^2 和 Z^3 各自独立地为 N 或 CR^7 。

12. 权利要求 11 的化合物, 其中 Z^2 和 Z^3 各自独立地为 CR^7 。

13. 权利要求 12 的化合物, 其中:

R^1 为烷基、芳基、OH 或 $(CH_2)_aCOOR^{15}$;

R^2 为 COR^{18} 、H、 $COOR^{15}$ 或烷基;

R^3 为卤素、H、OH、烷基或吗啉代;

R^4 为 H、 NH_2 、OH、 CF_3 或 NO_2 ; 以及

Z^2 和 Z^3 都为 CH。

14. 权利要求 13 的化合物, 其中:

R^1 为 Me、Ph、OH 或 CH_2COOMe ;

R^2 为 $COMe$ 、H、 $COOEt$ 或 Me; 以及

R^3 为卤素、H、OH、烷基或吗啉代。

15. 权利要求 11 的化合物, 其中 Z^2 为 N 且 Z^3 为 CR^7 。

16. 权利要求 15 的化合物, 其中:

R^1 为 H、OH 或烷基;

R^2 为 H、 $(CH_2)_dOH$ 、烷基、 $(CH_2)_aCOOR^{15}$ 、 COR^{18} ;

R^3 为卤素、烷氧基或杂环烷基;

R^4 为 H 或烷基; 以及

Z^3 为 CH。

17. 权利要求 16 的化合物, 其中:

R^1 为 H、OH 或 Me;

R^2 为 H、 $(CH_2)_2OH$ 、Me、 $COOEt$ 、 $COMe$;

R^3 为卤素、OMe 或 N-吡咯烷基;

R^4 为 H 或 Me; 以及

Z^3 为 CH。

18. 权利要求 1 的化合物, 选自下列化合物:

1-{2-[2-(4-氯-苯基氨基)-嘧啶-4-基]-4-甲基-噻唑-5-基}-乙酮

(4-氯-苯基)-[4-(4-甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-胺

(4-氯-苯基)-[4-(4-苯基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-胺

2-[2-(4-氯-苯基氨基)-嘧啶-4-基]-4-甲基-噻唑-5-羧酸乙基酯

{2-[2-(4-氯-苯基氨基)-嘧啶-4-基]-噻唑-4-基}-乙酸甲基酯

2-[2-(4-氯-苯基氨基)-嘧啶-4-基]-4-羟基-噻唑-5-羧酸乙基酯

N-[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-苯-1,3-二胺

3-[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基氨基]-苯酚

[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-(3-三氟甲基-苯基)-胺
[4-氯-3-三氟甲基-苯基]-[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-胺
[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-(3-硝基-苯基)-胺
(6-甲氧基-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺
(6-氯-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺
1-{2-[2-(6-氯-吡啶-3-基氨基)-嘧啶-4-基]-4-甲基-噻唑-5-基}-乙
酮

[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-(6-甲氧基-吡啶-3-基)-胺。
(6-氯-吡啶-3-基)-[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-胺
[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-(4-吗啉-4-基-苯基)-胺
[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-(4-甲基-3-硝基-苯基)-胺
4-[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基氨基]-苯酚
2-[2-(4-氯-苯基氨基)-吡啶-4-基]-5-甲基-噻唑-4-醇
(6-吡咯烷-1-基-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺
2-[2-(6-氯-吡啶-3-基氨基)-嘧啶-4-基]-4-羟基-噻唑-5-羧酸乙基酯
2-[2-(6-氯-吡啶-3-基氨基)-嘧啶-4-基]-5-甲基-噻唑-4-醇
2-[2-(6-氯-吡啶-3-基氨基)-嘧啶-4-基]-5-(2-羟基-乙基)-噻唑-4-醇
(6-氯-5-甲基-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺。

19. 权利要求 1 的化合物, 选自下列化合物:

2-[2-(4-氯-苯基氨基)-嘧啶-4-基]-4-羟基-噻唑-5-羧酸乙基酯;
N-[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-苯-1,3-二胺
3-[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基氨基]-苯酚
[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-(3-三氟甲基-苯基)-胺
(4-氯-3-三氟甲基-苯基)-[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-胺
(6-甲氧基-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺
(6-氯-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺
[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-(6-甲氧基-吡啶-3-基)-胺
2-[2-(4-氯-苯基氨基)-吡啶-4-基]-5-甲基-噻唑-4-醇
(6-吡咯烷-1-基-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺
2-[2-(6-氯-吡啶-3-基氨基)-嘧啶-4-基]-4-羟基-噻唑-5-羧酸乙基酯
2-[2-(6-氯-吡啶-3-基氨基)-嘧啶-4-基]-5-甲基-噻唑-4-醇

2-[2-(6-氯-吡啶-3-基氨基)-嘧啶-4-基]-5-(2-羟基-乙基)-噻唑-4-醇
(6-氯-5-甲基-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺。

20. 权利要求 1 的化合物, 选自下列化合物:

2-[2-(4-氯-苯基氨基)-嘧啶-4-基]-4-羟基-噻唑-5-羧酸乙基酯;
(6-甲氧基-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺; 以及
(6-氯-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺

2-[2-(4-氯-苯基氨基)-吡啶-4-基]-5-甲基-噻唑-4-醇

(6-吡咯烷-1-基-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺

2-[2-(6-氯-吡啶-3-基氨基)-嘧啶-4-基]-4-羟基-噻唑-5-羧酸乙基酯

2-[2-(6-氯-吡啶-3-基氨基)-嘧啶-4-基]-5-甲基-噻唑-4-醇

2-[2-(6-氯-吡啶-3-基氨基)-嘧啶-4-基]-5-(2-羟基-乙基)-噻唑-4-醇

(6-氯-5-甲基-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺。

21. 权利要求 1 的化合物, 其为(6-氯-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺。

22. 一种药物组合物, 其包括上述权利要求中任一项的化合物并混合有可药用载体、赋形剂或稀释剂。

23. 权利要求 1-21 中任一项的化合物在制备治疗增生性疾病的药物中的用途。

24. 权利要求 23 的用途, 其中增生性疾病是癌症或白血病。

25. 权利要求 23 的用途, 其中增生性疾病是肾小球肾炎、类风湿性关节炎、牛皮癣或慢性阻塞性肺病。

26. 权利要求 1-21 中任一项的化合物在制备治疗病毒性疾病的药物中的用途。

27. 权利要求 23 的用途, 其中病毒性疾病选自人巨细胞病毒(HCMV)、1 型单纯疱疹病毒(HSV-1)、1 型人免疫缺陷病毒(HIV-1)和水痘-带状疱疹病毒(VZV)。

28. 权利要求 1-21 中任一项的化合物在制备治疗 CNS 疾病的药物中的用途。

29. 权利要求 28 的用途, 其中 CNS 疾病为阿耳茨海默氏病或双相性精神障碍。

30. 权利要求 1-21 中任一项的化合物在制备治疗脱发症的药物中的用

途。

31. 权利要求 1-21 中任一项的化合物在制备治疗中风的药物中的用途。

32. 权利要求 23-31 中任一项的用途，其中所述化合物以足以抑制至少一种 PLK 酶的量给药。

33. 权利要求 32 的用途，其中 PLK 酶是 PLK1。

34. 权利要求 23-31 中任一项的用途，其中所述化合物以足以抑制至少一种 CDK 酶的量给药。

35. 权利要求 34 的用途，其中 CDK 酶为 CDK1、CDK2、CDK3、CDK4、CDK6、CDK7、CDK8 和/或 CDK9。

36. 权利要求 23-31 中任一项的用途，其中所述化合物以足以抑制 aurora 激酶的量给药。

37. 权利要求 1-21 中任一项的化合物在制备治疗糖尿病的药物中的用途。

38. 权利要求 37 的用途，其中糖尿病为非胰岛素依赖性糖尿病或 II 型糖尿病。

39. 权利要求 37 或 38 的用途，其中所述化合物以足以抑制 GSK 的量给药。

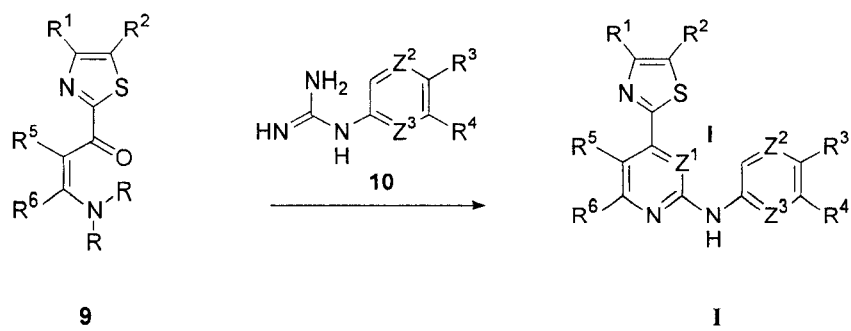
40. 权利要求 39 的用途，其中所述化合物以足以抑制 GSK3 β 的量给药。

41. 权利要求 1-21 中任一项的化合物在制备治疗炎性疾病或感染性疾病的药物中的用途。

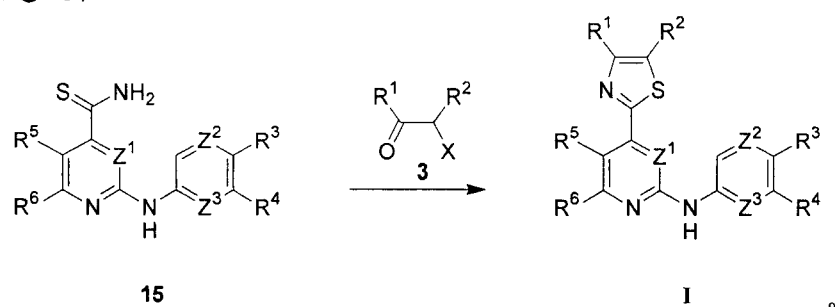
42. 权利要求 1-21 中任一项的化合物在用于鉴别其它候选化合物的测定中的用途，所述候选化合物能够抑制细胞周期蛋白依赖性激酶、aurora 激酶、GSK 和 PLK 酶中的一种或多种。

43. 权利要求 38 的用途，其中所述测定是竞争性结合测定。

44. 一种制备权利要求 1 中限定的式 I 的化合物的方法，所述方法包括将式 9 化合物与式 10 化合物反应以形成式 I 化合物，其中 R¹⁻⁶ 如权利要求 1 中定义，



45. 一种制备权利要求 1 中限定的式 I 的化合物的方法, 所述方法包括将式 15 化合物与式 3 化合物反应以形成式 I 化合物, 其中 R^{1-6} 如权利要求 1 中定义,



具有蛋白激酶抑制活性的吡啶基或者嘧啶基噻唑化合物

本发明涉及取代的嘧啶衍生物。具体地，本发明涉及芳基-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺和芳基-(4-噻唑-2-基-吡啶-2-基)-胺及其治疗用途。更具体地，但是非限定地，本发明涉及能够抑制一种或多种蛋白激酶的化合物。

背景技术

在真核细胞中，所有的生物功能，包括 DNA 复制、细胞周期进程、能量代谢以及细胞生长以及分化，都是通过蛋白的可逆性磷酸化调节的。蛋白的磷酸化状态不仅决定其功能、亚细胞分布以及稳定性，而且决定其结合的其它蛋白或细胞成分的种类。因此，生化通路中的作为整体的蛋白质组，以及单个成员的特定磷酸化的平衡被生物体用作响应于不断变化的环境而保持内环境稳定的策略。执行这些磷酸化以及去磷酸化步骤的酶分别为蛋白激酶以及磷酸酶。

真核蛋白激酶家族为人基因组最大的成员之一，包括约 500 种基因[1,2]。多数激酶包含带有保守的核心结构的 250-300 氨基酸残基催化结构域。这种结构域包括 ATP(较少情形下 GTP)的结合袋(binding pocket)，其末端磷酸被激酶共价转移至其大分子底物上。磷酸供体总是与二价离子(通常为 Mg^{2+} 或 Mn^{2+})结合成复合物。催化结构域的另一种重要功能是大分子底物的磷酸转移的结合以及定位。在绝大多数激酶中存在的催化结构域具有或多或少的同源性。

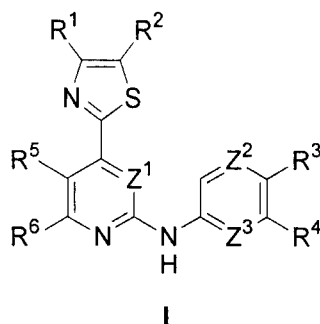
本领域已知有许多通过拮抗 ATP 结合能抑制蛋白激酶功能的分子[3-7]。例如，申请人以前公开了具有激酶抑制特性(特别地具有对周期蛋白-依赖性激酶(CDKs)具有抑制特性)的 2-苯胺基-4-杂芳基-嘧啶化合物[8-12]。CDKs 是与多种周期蛋白亚基结合的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。这些复合物对调节真核细胞周期进程以及对转录的调节非常重要[13,14]。

本发明寻求提供芳基-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺和芳基-(4-噻唑-2-基-吡啶-2-基)-胺。更具体地，本发明提供了芳基-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺和芳基-(4-噻唑-2-基-吡啶-2-基)-胺，其在治疗多种不同疾病中具有广泛治疗应

用和/或能够抑制一种或多种蛋白激酶。

发明内容

本发明的第一方面涉及式 I 的化合物，或其可药用盐，



其中

Z^1 为 N 或 CH;

Z^2 和 Z^3 各自独立地为 N 或 CR^7 ;

R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 和 R^7 各自独立地为 H、 R^8 或 R^9 ;

各 R^8 独立地为烃基(hydrocarbyl); 以及

各 R^9 独立地为卤素、 NO_2 、烷氧基、CN、 CF_3 、 SO_3H 、 $SO_2NR^{10}R^{11}$ 、 SO_2R^{12} 、 $NR^{13}R^{14}$ 、 $(CH_2)_aCOOR^{15}$ 、 $(CH_2)_bCONR^{16}R^{17}$ 、 $(CH_2)_cCOR^{18}$ 或 $(CH_2)_dOH$;

a、b、c 和 d 各自独立地为 0、1、2、3 或 4;

R^{10-18} 各自独立地为 H 或烷基;

条件是当 R^1 和 R^2 都为 H,

Z^1 为 CH; 或

Z^2 为 N; 或

Z^1 为 CH 且 Z^2 为 N 的时候;

则其中化合物不为 4-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-N-(3,4,5-三甲氧基苯基)-2-嘧啶胺或 4-(5-(2-羟基乙基)-4-甲基噻唑-2-基)-N-(3,4,5-三甲氧基苯基)-2-嘧啶胺。

本发明的第二方面涉及药物组合物，其包括式 I 的化合物或其可药用盐并混合有可药用载体、赋形剂或稀释剂。

本发明第三方面涉及用于医药的式 I 的化合物或其可药用盐。

本发明的第四方面涉及式 I 的化合物在制备用于治疗下述中的一种或多种疾病的药物中的用途：

增生性疾病；
病毒性疾病；
CNS 疾病；
糖尿病；
中风；
脱发症；
炎性疾病；或
感染性疾病。

本发明的第五方面涉及式 I 的化合物或其可药用盐在用于鉴别能抑制周期蛋白依赖性激酶、GSK、aurora 激酶、GSK 和 PLK 酶中的一或多种的其它候选化合物的测定中的用途。

本发明的第六方面涉及制备式 I 化合物的方法。

详细描述

如本发明中所使用的，术语“烃基”是指饱和的或不饱和的，直链、支链或环状的包含至少 C 和 H 基团，并任选包含一或多个其他的合适的取代基。所述的取代基的实例可包括卤素、CF₃、OH、CN、NO₂、SO₃H、SO₂NH₂、SO₂Me、NH₂、COOH 和 CONH₂。如果烃基包含多于一个 C，那么这些碳并不是必需地需要彼此连接。例如，至少两个碳原子可通过合适的元素或基团连接。因此，烃基可包含杂原子。合适的杂原子对本领域的普通技术人员而言是很显然的，并包括，例如，硫、氮、氧、磷和硅。当烃基包含一或多个杂原子的时候，烃基可通过碳-碳键或碳-杂原子键连接至分子的其他部分。

优选地，烃基为芳基、烷基、杂环烷基、环烷基、杂烷基或杂芳基。
更优选地，烃基为芳基、烷基或杂环烷基。

这里使用的术语“烷基”包括直链和支链烷基。烷基可被(单-或多-)取代的或未被取代的。合适的取代基包括,例如卤素、 CF_3 、 OH 、 CN 、 NO_2 、 SO_3H 、 SO_2NH_2 、 SO_2Me 、 NH_2 、 COOH 、 CONH_2 和烷氧基。优选地,烷基为 C_{1-20} 烷基,更优选地 C_{1-15} ,更优选地 C_{1-12} 烷基,更优选地, C_{1-6} 烷基,更优选地 C_{1-3} 烷基。特别优选的烷基包括,例如,甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、戊基和己基。

这里使用的术语“杂烷基”包括包括一或多个杂原子的如上定义的烷基。

这里使用的术语“环烷基”指可被(单-或多-)取代的或未被取代的环状烷基。合适的取代基包括,例如卤素、 CF_3 、 OH 、 CN 、 NO_2 、 SO_3H 、 SO_2NH_2 、 SO_2Me 、 NH_2 、 COOH 、 CONH_2 和烷氧基。

类似地,术语“杂环烷基”指可被(单-或多-)取代的或未被取代的环状杂烷基。合适的取代基包括,例如卤素、 CF_3 、 OH 、 CN 、 NO_2 、 SO_3H 、 SO_2NH_2 、 SO_2Me 、 NH_2 、 COOH 、 CONH_2 和烷氧基。优选的杂环烷基包括吗啉代、哌嗪基和哌啶基。

这里使用的术语“芳基”指可被(单-或多-)取代的或未被取代的 C_{6-10} 芳香基团,并包括,例如苯基、萘基等。再次,合适的取代基包括,例如卤素、 CF_3 、 OH 、 CN 、 NO_2 、 SO_3H 、 SO_2NH_2 、 SO_2Me 、 NH_2 、 COOH 、 CONH_2 和烷氧基。

这里使用的术语“杂芳基”指可被(单-或多-)取代的或未被取代的包含一或多个杂原子的 C_{4-10} 芳香基团。优选的杂芳基包括吡咯、吡唑、嘧啶、吡嗪、吡啶、喹啉、噻吩和呋喃。再次,合适的取代基包括,例如卤素、 CF_3 、 OH 、 CN 、 NO_2 、 SO_3H 、 SO_2NH_2 、 SO_2Me 、 NH_2 、 COOH 、 CONH_2 和烷氧基。

在一个优选的本发明的实施方案中,各 R^8 独立地为 C_{1-30} 烃基,任选包含至多12个选自N、S和O的杂原子,并任选包含至多6个取代基,各取代基独立地选自卤素、 NO_2 、 CN 、 CF_3 、 SO_3H 、 SO_2NH_2 、 SO_2Me 、 OH 、 NH_2 、 COOH 和 CONH_2 。

更优选地,各 R^8 独立地为烷基、芳基或杂环烷基。优选地,杂环烷基为吗啉基、吡咯烷基或哌啶基。

优选地,杂环烷基为N-吗啉基、N-吡咯烷基或N-哌啶基。

在一个优选的本发明的实施方案中,各 R^9 独立地为卤素、 NO_2 、烷氧

基、CN、CF₃、SO₃H、SO₂NH₂、SO₂Me、OH、NH₂、(CH₂)_aCOOR¹⁵、(CH₂)_dOH、CONH₂或COR¹⁸。

在一个优选的本发明的实施方案中，各R⁹独立地为卤素、NO₂、烷氧基、CF₃、SO₃H、SO₂NH₂、SO₂Me、OH、NH₂、(CH₂)_aCOOR¹⁵、(CH₂)_dOH、CONH₂或COR¹⁸。

在一个更优选的本发明的实施方案中，各R⁹独立地为卤素、NO₂、OMe、CF₃、SO₃H、SO₂NH₂、SO₂Me、OH、NH₂、CH₂COOMe、COOMe、COOEt、(CH₂)₂OH、CONH₂或COMe。

在一个优选的实施方案中，R⁵和R⁶都为H且R¹⁻⁴和R⁷各自独立地为H、R⁸或R⁹。

在另一个优选的实施方案中，其中Z²和Z³都为CR⁷，R³、R⁴和R⁷中至少一个不为OMe。

在一个特别优选的实施方案中，

R¹为H、烷基、芳基、(CH₂)_aCOOR¹⁵或OH；

R²为H、(CH₂)_dOH、(CH₂)_aCOOR¹⁵、COR¹⁸或烷基；

R³为卤素、H、烷氧基、杂环烷基、烷基或OH；

R⁴为H、NH₂、OH、烷基、CF₃或NO₂；以及

R⁵和R⁶都为H。

在一个特别优选的实施方案中，

R¹为H、Me、Ph、CH₂COOMe或OH；

R²为H、(CH₂)₂OH、COOEt、COMe或Me；

R³为Cl、H、OMe、N-吗啉基、N-吡咯烷基、Me或OH；

R⁴为H、NH₂、OH、Me、CF₃或NO₂；以及

R⁵和R⁶都为H。

在另一个特别优选的实施方案中，

R¹为H、烷基、芳基、(CH₂)_aCOOR¹⁵或OH；

R²为H、COOR¹⁵、COR¹⁸或烷基；

R³为卤素、H、烷氧基、吗啉代、烷基或OH；

R⁴为H、NH₂、OH、CF₃或NO₂；以及

R⁵和R⁶都为H。

更优选地，对于该实施方案，

R^1 为 H、Me、Ph、 $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Me}$ 或 OH;

R^2 为 H、 CO_2Et 、COMe 或 Me;

R^3 为 Cl、H、OMe、吗啉代、Me 或 OH。

一个优选的本发明的实施方案涉及式 I 的化合物, 其中 Z^1 为 CH 且 Z^2 和 Z^3 各自独立地为 N 或 CR^7 。

在一个特别优选的实施方案中, Z^2 和 Z^3 各自独立地为 CR^7 。

在一个特别优选的实施方案中, Z^1 为 CH, 并且 Z^2 和 Z^3 各自独立地为 CR^7 。

在一个优选的实施方案中, 当 Z^1 为 CH 且 Z^2 和 Z^3 各自独立地为 CR^7 ,

R^1 为烷基或 OH;

R^2 为烷基或 COR^{18} ;

R^3 为 OH 或卤素; 以及

Z^2 和 Z^3 都为 CH。

更优选地, R^1 为 Me 或 OH, R^2 为 COMe 或 Me, 以及 R^3 为 OH 或 Cl。

在一个优选的实施方案中, 当 Z^1 为 CH 且 Z^2 和 Z^3 各自独立地为 CR^7 ,

R^1 为烷基;

R^2 为 COR^{18} ;

R^3 为 OH; 以及

Z^2 和 Z^3 都为 CH。

更优选地, R^1 为 Me 且 R^2 为 COMe。

另一个优选的本发明实施方案涉及式 I 的化合物, 其中 Z^1 为 N 且 Z^2 和 Z^3 各自独立地为 N 或 CR^7 。

在一个特别优选的实施方案中, Z^2 和 Z^3 各自独立地为 CR^7 。

在一个更优选的实施方案中, Z^1 为 N, 且 Z^2 和 Z^3 各自独立地为 CR^7 。

更优选地, 其中 Z^1 为 N 以及 Z^2 和 Z^3 各自独立地为 CR^7 ,

R^1 为烷基、芳基、OH 或 $(\text{CH}_2)_a\text{COOR}^{15}$;

R^2 为 COR^{18} 、H、 COOR^{15} 或烷基;

R^3 为卤素、H、OH、烷基或吗啉代;

R^4 为 H、 NH_2 、OH、 CF_3 或 NO_2 ; 以及

Z^2 和 Z^3 都为 CH。

更优选地,

R^1 为 Me、Ph、OH 或 CH_2COOMe ;

R^2 为 $COMe$ 、H、 $COOEt$ 或 Me; 以及

R^3 为卤素、H、OH、烷基或吗啉代。

另一个优选的本发明的实施方案涉及式 I 的化合物, 其中 Z^2 为 N 且 Z^3 为 CR^7 。

在另一个优选的实施方案中, Z^1 为 N, Z^2 为 N 且 Z^3 为 CR^7 。

对于该实施方案, 更优选地,

R^1 为 H、OH 或烷基;

R^2 为 H、 $(CH_2)_dOH$ 、烷基、 $(CH_2)_aCOOR^{15}$ 、 COR^{18} ;

R^3 为卤素、烷氧基或杂环烷基;

R^4 为 H 或烷基; 以及

Z^3 为 CH。

对于该实施方案, 更优选地,

R^1 为 H、OH 或 Me;

R^2 为 H、 $(CH_2)_2OH$ 、Me、 $COOEt$ 、 $COMe$;

R^3 为卤素、OMe 或 N-吡咯烷基;

R^4 为 H 或 Me; 以及

Z^3 为 CH。

在另一个优选的实施方案中,

R^1 为 H 或烷基;

R^2 为 H 或 COR^{18} ;

R^3 为卤素或烷氧基; 以及

Z^3 为 CH。

更优选地,

R^1 为 H 或 Me;

R^2 为 H 或 $COMe$; 以及

R^3 为卤素或 OMe。

在一个特别优选的实施方案中, 式 I 化合物选自下述化合物:

1-{2-[2-(4-氯-苯基氨基)-嘧啶-4-基]-4-甲基-噻唑-5-基}-乙酮

(4-氯-苯基)-[4-(4-甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-胺

(4-氯-苯基)-[4-(4-苯基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-胺

2-[2-(4-氯-苯基氨基)-嘧啶-4-基]-4-甲基-噻唑-5-羧酸乙基酯
{2-[2-(4-氯-苯基氨基)-嘧啶-4-基]-噻唑-4-基}-乙酸甲基酯
2-[2-(4-氯-苯基氨基)-嘧啶-4-基]-4-羟基-噻唑-5-羧酸乙基酯
N-[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-苯-1,3-二胺
3-[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基氨基]-苯酚
[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-(3-三氟甲基-苯基)-胺
(4-氯-3-三氟甲基-苯基)-[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-胺
[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-(3-硝基-苯基)-胺
(6-甲氧基-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺
(6-氯-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺
1-{2-[2-(6-氯-吡啶-3-基氨基)-嘧啶-4-基]-4-甲基-噻唑-5-基}-乙

酮

[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-(6-甲氧基-吡啶-3-基)-胺。
(6-氯-吡啶-3-基)-[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-胺
[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-(4-吗啉-4-基-苯基)-胺
[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-(4-甲基-3-硝基-苯基)-胺
4-[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基氨基]-苯酚
2-[2-(4-氯-苯基氨基)-吡啶-4-基]-5-甲基-噻唑-4-醇
(6-吡咯烷-1-基-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺
2-[2-(6-氯-吡啶-3-基氨基)-嘧啶-4-基]-4-羟基-噻唑-5-羧酸乙基

酯

2-[2-(6-氯-吡啶-3-基氨基)-嘧啶-4-基]-5-甲基-噻唑-4-醇
2-[2-(6-氯-吡啶-3-基氨基)-嘧啶-4-基]-5-(2-羟基-乙基)-噻唑-4-醇
(6-氯-5-甲基-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺。

在一个特别优选的实施方案中，所述的化合物选自下述化合物：

1-{2-[2-(4-氯-苯基氨基)-嘧啶-4-基]-4-甲基-噻唑-5-基}-乙酮
(4-氯-苯基)-[4-(4-甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-胺
(4-氯-苯基)-[4-(4-苯基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-胺
2-[2-(4-氯-苯基氨基)-嘧啶-4-基]-4-甲基-噻唑-5-羧酸乙基酯
{2-[2-(4-氯-苯基氨基)-嘧啶-4-基]-噻唑-4-基}-乙酸甲基酯
2-[2-(4-氯-苯基氨基)-嘧啶-4-基]-4-羟基-噻唑-5-羧酸乙基酯

N-[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-苯-1,3-二胺
3-[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基氨基]-苯酚
[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-(3-三氟甲基-苯基)-胺
(4-氯-3-三氟甲基-苯基)-[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-胺
[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-(3-硝基-苯基)-胺
(6-甲氧基-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺
(6-氯-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺
1-{2-[2-(6-氯-吡啶-3-基氨基)-嘧啶-4-基]-4-甲基-噻唑-5-基}-乙

酮

[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-(6-甲氧基-吡啶-3-基)-胺。
(6-氯-吡啶-3-基)-[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-胺
[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-(4-吗啉-4-基-苯基)-胺
[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-(4-甲基-3-硝基-苯基)-胺
4-[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基氨基]-苯酚

更优选地，式 I 化合物选自下述化合物：

2-[2-(4-氯-苯基氨基)-嘧啶-4-基]-4-羟基-噻唑-5-羧酸乙基酯；
N-[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-苯-1,3-二胺
3-[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基氨基]-苯酚
[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-(3-三氟甲基-苯基)-胺
(4-氯-3-三氟甲基-苯基)-[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-胺
(6-甲氧基-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺
(6-氯-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺
[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-(6-甲氧基-吡啶-3-基)-胺
2-[2-(4-氯-苯基氨基)-吡啶-4-基]-5-甲基-噻唑-4-醇
(6-吡咯烷-1-基-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺
2-[2-(6-氯-吡啶-3-基氨基)-嘧啶-4-基]-4-羟基-噻唑-5-羧酸乙基

酯

2-[2-(6-氯-吡啶-3-基氨基)-嘧啶-4-基]-5-甲基-噻唑-4-醇
2-[2-(6-氯-吡啶-3-基氨基)-嘧啶-4-基]-5-(2-羟基-乙基)-噻唑-4-醇
(6-氯-5-甲基-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺。

在一个特别优选的实施方案中，所述的化合物选自下述化合物：

2-[2-(4-氯-苯基氨基)-嘧啶-4-基]-4-羟基-噻唑-5-羧酸乙基酯;
N-[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-苯-1,3-二胺
3-[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基氨基]-苯酚
[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-(3-三氟甲基-苯基)-胺
(4-氯-3-三氟甲基-苯基)-[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-胺
(6-甲氧基-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺
(6-氯-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺
[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-(6-甲氧基-吡啶-3-基)-胺

更优选地，式 I 化合物选自下述化合物：

2-[2-(4-氯-苯基氨基)-嘧啶-4-基]-4-羟基-噻唑-5-羧酸乙基酯;
(6-甲氧基-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺;
(6-氯-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺
2-[2-(4-氯-苯基氨基)-吡啶-4-基]-5-甲基-噻唑-4-醇
(6-吡咯烷-1-基-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺
2-[2-(6-氯-吡啶-3-基氨基)-嘧啶-4-基]-4-羟基-噻唑-5-羧酸乙基酯
2-[2-(6-氯-吡啶-3-基氨基)-嘧啶-4-基]-5-甲基-噻唑-4-醇
2-[2-(6-氯-吡啶-3-基氨基)-嘧啶-4-基]-5-(2-羟基-乙基)-噻唑-4-醇
(6-氯-5-甲基-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺

在一个特别优选的实施方案中，所述的化合物选自下述化合物：

2-[2-(4-氯-苯基氨基)-嘧啶-4-基]-4-羟基-噻唑-5-羧酸乙基酯;
(6-甲氧基-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺;
(6-氯-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺。

更优选地，所述的化合物为 2-[2-(6-氯-吡啶-3-基氨基)-嘧啶-4-基]-4-羟基-噻唑-5-羧酸乙基酯或 2-[2-(6-氯-吡啶-3-基氨基)-嘧啶-4-基]-5-(2-羟基-乙基)-噻唑-4-醇。

在一个高度优选的本发明的实施方案中，式 I 的化合物为 (6-氯-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺。

在一个特别优选的实施方案中，本发明的化合物能够抑制一种或多种如表 5 或 6 所示的激酶。

在一个优选的实施方案中，本发明的化合物能抑制一或多种激酶，所述的激酶选自周期蛋白依赖性激酶或 GSK。更优选地，所述的化合物能抑制 GSK3、CDK2/E、CDK2/A、CDK1/B、CDK4/D1、CDK7/H 和/或 CDK9/T1 中的一种或者多种。

优选地，本发明的化合物显示出的 IC_{50} 值(对一种或多种上述激酶的激酶抑制)小于 10 μ M，更优选地，小于 5 μ M，更优选地小于 1 μ M，甚至更优选地小于 0.1 μ M，更优选地小于 0.01 μ M，如用适当的激酶测定测量得到的。合适的测定的细节显示在实施例部分中。

在一个特别优选的实施方案中，本发明的化合物能够选择性抑制 GSK (优选地 GSK3)，相对于一或多种选自 CDK2/E、CDK2/A、CDK1/B、CDK4/D1、CDK7/H 和 CDK9/T1 的周期蛋白依赖性激酶而言。优选地，所述的化合物针对 GSK 显示至少 5-倍的选择性(相对于 CDK)，更优选地针对 GSK 至少 10-倍的选择性，更优选地至少 100-倍的选择性。在一个特别优选的实施方案中，所述的化合物相对于 CDK 针对 GSK 显示至少 1000-倍的选择性，更优选地至少 5000-倍的选择性。

在一个特别优选的实施方案中，所述的化合物相对于 CDK 针对 GSK3 显示至少 10-倍的选择性，所述的 CDK 选自 CDK2/周期蛋白 E、CDK1/周期蛋白 B、CDK7/周期蛋白 H、CDK4/周期蛋白 D1、CDK2/周期蛋白 A 和 CDK9/周期蛋白 T1。

在另一个特别优选的实施方案中，所述的化合物相对于 CDK 针对 GSK 3 显示至少 100-倍的选择性，所述的 CDK 选自 CDK2/周期蛋白 E、CDK1/周期蛋白 B、CDK7/周期蛋白 H、CDK4/周期蛋白 D1 和 CDK2/周期蛋白 A。

在另一个特别优选的实施方案中，所述的化合物相对于 CDK 针对 GSK 3 显示至少 1000-倍的选择性，所述的 CDK 选自 CDK1/周期蛋白 B、CDK7/周期蛋白 H、CDK4/周期蛋白 D1 和 CDK2/周期蛋白 A。

在另一个优选的实施方案中，本发明的化合物能激活细胞糖原合酶的活性。优选地，所述的化合物能激活细胞糖原合酶的活性，如在 HEK293、小鼠肌细胞或小鼠脂肪细胞中监测 GS 活性诱导的倍数。优选地，GS 活性被激活至少 1.5-倍，更优选地至少 2-倍，更优选地至少 3-倍、4-倍或 5-倍。

药物组合物

在一个优选的本发明的实施方案中,包括如上定义的 I 化合物与一种或多种可药用稀释剂、赋形剂或载体混合。

尽管本发明的化合物(包括其可药用盐、酯以及可药用溶剂合物)可单独给药,通常它们与可药用载体、赋形剂或稀释剂一起给药,尤其是用于对人治疗的时候。药物组合物可用于人和兽医中供人或动物使用。

本发明所述的各种不同形式的药物组合物的合适赋形剂的实例可见于“Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2nd Edition, (1994), 由 A Wade 和 PJ Weller 编著。

治疗用途的可接受的载体或稀释剂是制药领域中公知的,例如描述于 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co.(A. R. Gennaro edit. 1985)中。

合适的载体的实例包括乳糖、淀粉、葡萄糖、甲基纤维素、硬脂酸镁、甘露醇、山梨醇等。合适的稀释剂的实例包括乙醇、甘油和水。

药用载体、赋形剂或稀释剂可根据将要使用的给药途径以及标准的制药规范进行选择。药物组合物可包含作为或除了载体、赋形剂或稀释剂以外的任何合适的粘合剂、润滑剂、助悬剂、包衣剂、助溶剂。

合适的粘合剂的实例包括淀粉、明胶、天然糖类如葡萄糖、无水乳糖、自由流动的乳糖、 β -乳糖、玉米甜料、天然和合成的树胶,如阿拉伯树胶、黄蓍树胶或藻酸钠、羧基甲基纤维素和聚乙二醇。

合适的润滑剂的实例包括油酸钠、硬脂酸钠、硬脂酸镁、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠等。

防腐剂、稳定剂、染料以及甚至调味剂可提供在本发明的药物组合物中。防腐剂的实例包括苯甲酸钠、山梨酸以及对羟基苯甲酸的酯类。也可使用抗氧化剂以及助悬剂。

盐/酯

式 I 的化合物可以盐或酯,尤其是可药用的盐或酯的形式提供。

本发明化合物的可药用盐包括它们合适的酸加成盐或碱加成盐。合适的可药用盐的评论可参见 Berge 等人的 J. Pharm Sci, 66, 1-19(1977)。例如,盐为与以下酸形成的盐:无机强酸,如矿物酸,例如硫酸、磷酸或氢卤酸;强有机羧酸,如未取代或取代(如被卤代)的 1 至 4 个碳原子的链烷羧酸,例

如乙酸；饱和或不饱和的二元羧酸，例如草酸、丙二酸、丁二酸、马来酸、富马酸、邻苯二甲酸或对苯二甲酸；羟基羧酸，例如抗坏血酸、羟基乙酸、乳酸、苹果酸、酒石酸或柠檬酸；氨基酸，例如天冬氨酸或谷氨酸；苯甲酸；或有机磺酸，如未取代或取代(如被卤代)的(C₁-C₄)烷基磺酸或芳基磺酸，如甲磺酸或对甲苯磺酸。

取决于被酯化的官能团，使用有机酸或醇/氢氧化物形成酯。有机酸包括羧酸，如未取代或取代(如被卤代)的1至12个碳原子的链烷羧酸，例如乙酸；饱和或不饱和的二元羧酸，例如草酸、丙二酸、丁二酸、马来酸、富马酸、邻苯二甲酸或对苯二甲酸；羟基羧酸，例如抗坏血酸、羟基乙酸、乳酸、苹果酸、酒石酸或柠檬酸；氨基酸，例如天冬氨酸或谷氨酸；苯甲酸；或有机磺酸，如未取代或取代(如被卤代)的(C₁-C₄)烷基磺酸或芳基磺酸，如甲磺酸或对甲苯磺酸。合适的氢氧化物包括无机氢氧化物，如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙、氢氧化铝。醇包括未取代或取代(如被卤代)的1至12个碳原子的链烷醇。

对映异构体/互变异构体

在如前讨论的本发明的所有方面中，本发明还适当地包括式I的化合物的全部对映异构体和互变异构体。本领域的技术人员能认识到具有光学性质(一个或多个手性碳原子)或互变异构特征的化合物。可通过本领域中已知的方法分离/制备相应的对映异构体和/或互变异构体。

立体异构体和几何异构体

一些式I的具体化合物可以立体异构体和/或几何异构体的形式存在，例如其可具有一个或多个不对称和/或几何中心，并因此可以二种或多种立体异构和/或几何形式存在。本发明包括这些活性成分的所有单独立体异构体和几何异构体及其混合物的使用。权利要求中使用的术语包括这些形式，只要所述形式保留适当的功能活性(但不必到相同程度)。

本发明还包括所述化合物或其可药用盐的所有合适同位素变体。本发明药物或其可药用盐的同位素变体定义为其中至少一个原子被具有相同原子序数但原子质量与自然界中通常发现的原子质量不同的原子取代的物质。可被掺入到药物和其可药用盐的同位素的例子包括氢、碳、氮、氧、

磷、硫、氟和氯的同位素，分别如 ^2H 、 ^3H 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O 、 ^{18}O 、 ^{31}P 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{18}F 和 ^{36}Cl 。本发明的药物和其可药用盐的一些同位素变体，例如结合放射性同位素如 ^3H 或 ^{14}C 的那些化合物，在药物和/或底物组织分布研究中是有用的。含氘的即 ^3H 和碳-14即 ^{14}C 同位素因其容易制备和可检测性而特别优选。此外，用同位素如氘即 ^2H 的取代可因较大的代谢稳定性而提供特定的治疗益处，例如体内半衰期增加或剂量要求降低，并因此可在一些情况下是优选的。通常可使用合适试剂的适当同位素变体，通过常规过程制备本发明药物和其可药用盐的同位素变体。

溶剂合物

本发明还包括本发明化合物的溶剂合物形式。权利要求中使用的术语包括这些形式。

多晶型物

本发明还涉及本发明化合物的各种结晶形式、多晶型形式和无水(水合)形式。众所周知，在药物工业中可通过稍微改变这种化合物合成制备中所用溶剂的纯化方法和或分离形式来分离得到化合物的任意这类形式。

前体药物

本发明还包括本发明化合物的前体药物形式。这种前体药物通常为一个或多个适当基团已被修饰以使在对人或哺乳动物对象给药后所述的修饰可被逆转的式I的化合物。虽然为了实现体内逆转可与这种前体药物一起给药第二种药物，但通常通过在这类对象中天然存在的酶实现这种逆转。这类修饰的例子包括酯(例如上述那些中的任一种)，其中可通过酯酶等进行逆转。其它这类系统为本领域中那些技术人员所熟知。

治疗用途

已经发现式I的化合物具有抗增殖活性，并因此相信其可用于治疗增殖性疾病例如癌症、白血病和其它与失控细胞增殖有关的疾病，例如牛皮癣和再狭窄。如本发明所定义的，本发明范围内的抗增殖作用可以由在体外全细胞测定法中抑制细胞增殖的能力得到证明，例如使用 A549、HT29、

Saos-2 中的任何一种细胞系。利用这些测定法，可以确定一种化合物在本发明的意义上是否具有抗增殖性。

因此，一种优选的本发明实施方案涉及一或多种式 I 化合物在制备用于治疗增殖性疾病的药物中的用途。

如本发明所使用的，术语“药物的制备”包括式 I 的化合物直接用作药物的用途，还包括其在筛选其它治疗剂的方案中的用途或者其在制备这种药物的任何阶段中的用途。

优选地，增殖性疾病是癌症或白血病。本发明所用的术语“增殖性疾病”在广义上包括任何需要控制细胞周期的疾病，例如，心血管疾病，例如再狭窄和心脏病和心肌梗塞；自体免疫性疾病，例如肾小球肾炎和类风湿性关节炎；皮肤病，例如牛皮癣；抗炎、抗真菌、抗寄生虫性疾病，例如疟疾、肺气肿和脱发症和慢性阻塞性肺病。在这些疾病中，本发明的化合物可以根据需要在所需细胞内诱导细胞凋亡或者维持停滞。

本发明的化合物可以抑制细胞周期中的任意步骤或阶段，例如核被膜的形成、从细胞周期的静止期(G0)退出、G1 进展、染色体解聚、核被膜破裂、START、DNA 复制的引发、DNA 复制的进展、DNA 复制的终止、中心体复制、G2 进展、有丝分裂或减数分裂功能的激活、染色体聚集、中心体分离、微管成核、纺锤体生成与功能、与微管动力蛋白的相互作用、染色单体分离(separation)与隔开(segregation)、有丝分裂功能的失活、收缩环的生成和胞质分裂活动。确切而言，本发明的化合物可以影响某些基因功能，例如染色质结合、复制复合体的生成、复制许可、磷酸化或其它次级修饰活性、蛋白水解性降解、微管结合、肌动蛋白结合、septin 结合、微管组织中心成核活性和与细胞周期发信号通路成分的结合。

在本发明的一个实施方案中，式 I 化合物以抑制至少一种 CDK 酶的有效量给药。

优选地，式 I 化合物以足以抑制 CDK2 和/或 CDK4 中至少一种的量给药。

本发明的另一方面涉及式 I 的化合物在制备用于治疗病毒性疾病如人巨细胞病毒(HCMV)、1 型单纯疱疹病毒(HSV-1)、1 型人免疫缺陷病毒(HIV-1)和水痘-带状疱疹病毒(VZV)的药物中的用途。

在本发明更优选的实施方案中，式 I 的化合物以足以抑制一或多种与病

毒复制相关的宿主细胞 CDKs 即 CDK2、CDK7、CDK8 和 CDK9 [39]的量给药。

如本发明所定义的, 本发明范围内的抗病毒活性可通过抑制 CDK2、CDK7、CDK8 或 CDK9 的能力而得到证实。

在特别优选的实施方案中, 本发明涉及一种或多种式 I 的化合物在治疗 CDK 依赖性或非敏感性的病毒性疾病中的用途。CDK 依赖性或非敏感性疾病与一种或多种 CDK 酶的超过正常活性水平有关。这类疾病优选与 CDK2、CDK7、CDK8 和/或 CDK9 的异常活性水平有关。CDK 敏感性或非敏感性疾病是这样的一种疾病, 其中 CDK 水平的失常不是主要原因, 而是下游初级异常代谢导致的。在这种情况下, CDK2、CDK7、CDK8 和/或 CDK9 被认为是敏感性或非敏感性代谢途径的一部分, 并且因此 CDK 抑制剂可在治疗这类疾病中有活性。

本发明另一方面涉及式 I 的化合物或其可药用盐, 在制备用于治疗糖尿病的药物中的用途。

在特别优选的实施方案中, 所述的糖尿病为 II 型糖尿病。

糖原合酶激酶 3 (GSK3) 为 Ser/Thr 蛋白激酶, 由 2 种同工型(α 和 β) 组成, 其在催化结构域具有高度的同源性。GSK3 为磷酸化糖原合酶(GS)的数种蛋白激酶之一。骨骼肌中胰岛素对糖原合成的刺激源自 GS 的去磷酸化以及活化。因此, GSK3 对 GS 的作用导致后者的失活并因此抑制肌肉中葡萄糖向糖原的转化。

II 型糖尿病(非-胰岛素依赖性糖尿病)是一种多因素疾病。高血糖症是由于肝脏、肌肉以及其它组织中的胰岛素耐受性以及受损的胰岛素分泌导致的。骨骼肌是胰岛素-刺激的葡萄糖摄取的主要部位, 在那里其要么离开循环要么转化成糖原。肌肉糖原沉积是葡萄糖调节平衡作用中的主要决定环节, 并且 II 型糖尿病具有缺损的肌肉糖原贮存。有证据表明 GSK3 活性的增加在 II 型糖尿病中很重要[1]。此外, 已经证实 GSK3 在 II 型糖尿病的肌肉细胞中被过表达, 并且在骨骼肌 GSK3 活性和胰岛素作用之间存在逆相关[2]。

因此, GSK3 的抑制在治疗糖尿病尤其是 II 型糖尿病以及糖尿病神经病变中有治疗意义。有关 GSK3 生物学的最近评述参见[3]。值得注意的是, 已知 GSK3 磷酸化除 GS 以外的许多底物, 并因此参与多种生化通路的调节。GSK-3 底物包括: CREB (已知也为 cAMP 效应元件-结合蛋白 1), 其涉及继

发于增加的 cAMP 水平以及 cAMP-依赖性蛋白激酶 A 的活化后的基因转录。CREB 结合的效应元件见于许多基因中,包括那些被认为对 T 细胞功能重要的基因(以及功能障碍—例如 T 细胞淋巴瘤以及白血病)。CREB 似乎还涉及海马 CA1 神经细胞的长期加强作用以及一般意义上的神经功能的调节以及肿瘤生物学。EIF2B (真核起始因子-2B), 其为蛋白合成必须的 GTP 交换蛋白。HSF-1 (热激因子-1), 细胞响应于应激的成分。C/EBPa (也称为 CCAAT/增强子结合蛋白 a), 已经建议其调节瘦蛋白表达并且已经建议在肥胖中具有功能。定向去除 C/EBPa 基因的纯合系小鼠不储存肝糖原, 表达低水平的 GS 并且不能储存脂质。NF-ATc(激活 T 细胞的核因子), 其活化被钙调磷酸酶, 一种 Ca^{2+} -依赖性磷酸酶控制。最初在 T 细胞中识别作为细胞因子基因表达诱导剂的 NF-AT 蛋白在非免疫过程中发挥多种作用, 尤其是那些与适应性反应有关的过程如心脏肥大以及改变的代谢平衡。c-Jun、c-myc 和 c-myb, 每一种都是原癌基因。 β -联蛋白, 其为见于粘附连接的蛋白并因此对上皮细胞层的建立以及维持至关重要。连接介导细胞之间的黏附, 促进细胞-细胞信号传导, 以及锚定肌动蛋白的细胞骨架。在充当这些角色的时候, 粘附连接调节正常细胞的生长以及行为、伤口愈合以及肿瘤细胞转移。Tau, 可能其最为为人所了解的是其参与阿耳茨海默氏病的病因学。Tau 与微管蛋白共聚成微管, 但是在阿耳茨海默氏病中, tau 形成了大的丝状缠结, 破坏了神经细胞中的微管结构, 从而损坏营养的传输以及神经信息的传递。胰岛素受体底物(IRS-1), 见于许多胰岛素响应的细胞和组织中。其不显示内在的酶活性, 但是据信其在被胰岛素受体激酶磷酸化后充当停靠蛋白, 涉及结合以及激活其他的信号转导分子。已经有人提出 IRS-1 在胰岛素耐受性的发展中发挥作用。

值得注意的是已知 GSK3 磷酸化除了 GS 以外的许多底物, 并因此涉及许多生物化学通路的调节。例如, GSK 在中枢以及外周神经系统中高表达, 并因此提出了在神经退行性疾病中通过 GSK 抑制的生物医学治疗基本原理。

因此, 本发明另一方面涉及式 I 的化合物或其可药用盐, 在制备用于治疗 CNS 疾病例如神经退行性疾病的药物中的用途。

优选地, 所述的 CNS 疾病为阿耳茨海默氏病。

Tau 为参与阿耳茨海默氏病的病因学的 GSK-3 底物。在健康的神经细

胞中, Tau 与微管蛋白共聚成微管。但是, 在阿耳茨海默氏病中, tau 形成了大的丝状缠结, 破坏了神经细胞中的微管结构, 从而损坏营养的传输以及神经信息的传递。

尽管不希望被理论所束缚, GSK3 抑制剂被认为能预防和/或逆转微管-相关蛋白 tau 的异常高度磷酸化, 后者是阿耳茨海默氏病以及许多其它的神经退行性疾病如进行性核上性麻痹、皮质基质变性以及皮克氏病的不变特征。tau 基因中的突变引起额颞痴呆(fronto-temporal dementia)的遗传形式, 进一步支持 tau 蛋白功能障碍与神经退行性变化之间的关系[40]。

本发明另一方面涉及式 I 的化合物或其可药用盐, 在制备用于治疗双相性精神障碍(bipolar disorder)的药物中的用途。

另一方面, 本发明涉及式 I 的化合物或其可药用盐, 在制备用于治疗中风的药物中的用途。

降低神经元细胞凋亡是头外伤、中风、癫痫症以及运动神经元疾病中的重要治疗目标[4]。因此, 作为神经元细胞中的促细胞凋亡因子, GSK3 使该蛋白激酶成为设计用于治疗这些疾病的抑制性药物中有吸引力的治疗靶标。GSK3 抑制剂能够预防和/或逆转微管-结合的蛋白 tau 的异常高度磷酸化, 后者是阿耳茨海默氏病以及大量的其他的神经退行性疾病如进行性核上性麻痹、皮质基质退化以及皮克氏病的不变特征。tau 基因中的突变导致额颞痴呆的遗传形式, 进一步证实了 tau 蛋白功能障碍与神经退行性过程的相关性[5]。

本发明另一方面涉及式 I 的化合物或其可药用盐, 在制备用于治疗脱发症(alopecia)的药物中的用途。

毛发生长受 Wnt 信号通路尤其是 Wnt-3 信号通路的控制。在皮肤的组织培养模型体系中, β -联蛋白(β -联蛋白)的不可降解的突变体的表达导致推定的干细胞的数量显著增加, 所述干细胞具有更大的增殖活性(proliferative potential)[6]。这种干细胞群体表达高水平的非-钙粘蛋白-相关的 β -联蛋白[7], 其可促进高的增殖活性。此外, 皮肤中过量表达截短的 β -联蛋白的转基因小鼠发生全新的发-囊形态发生, 后者在正常情况下只在胚胎形成中才发生。因此, 这凸现出了下述可能性: GSK3 抑制剂的异位使用可用于治疗光秃并可用于化疗诱导的脱发症的头发生长的恢复。

本发明另一方面涉及一种治疗 GSK3-依赖性疾病的方法, 所述的方法

包括对需要该治疗的患者以足以抑制 GSK3 的量给药如上定义的式 I 的化合物或其可药用盐。

优选地，式 I 的化合物或其可药用盐，以足以抑制 GSK3 β 的量给药。

在本发明的一个实施方案中，式 I 的化合物以足以抑制至少一种 PLK 酶的量给药。

polo 样激酶(PLKs)由丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族组成。在 polo 位点的有丝分裂果蝇 *melanogaster* 突变显示出纺锤体异常[41]，并且发现 polo 编码有丝分裂激酶[42]。在人体中，存在三种高度相关的 PLKs[43]。它们包含高度同源的氨基-端催化性激酶结构域并且其羧基端包含两个或三个保守区域，polo 盒。目前不完全了解 polo 盒的功能，但是其参与将 PLKs 靶向亚细胞区[44,45]、调节与其它蛋白的相互作用[46]或可构成自调节结构域部分[47]。此外，polo 盒-依赖性 PLK1 活性对正确的中期/后期转换以及胞质分裂是必须的[48,49]。

研究表明人 PLKs 调节有丝分裂的一些基本方面 [50,51]。具体地，认为 PLK1 活性对 G2 后期/前期早期中的中心体的功能性成熟以及随后的双极纺锤体的形成是必需的。通过小的干扰 RNA(siRNA)技术消耗细胞内 PLK1 已经证实，该蛋白对多重有丝分裂过程以及胞质分裂的完成是必需的[52]。

在本发明更优选的实施方案中，式 I 的化合物以足以抑制 PLK1 的量给药。

在三种人 PLK 中，PLK1 得到最好的表征；其调节多种细胞裂分周期活性(cell division cycle effect)，包括有丝分裂的起始[53,54]、DNA-损害关卡激活[55,56]、后期促进复合物的调节[57-59]、蛋白酶体的磷酸化[60]以及中心体的复制以及成熟[61]。

具体地，有丝分裂的启动要求活化 M-期促进因子(MPF)，细胞周期蛋白依赖性激酶 CDK1 和 B-型细胞周期蛋白之间的复合物[62]。后者在细胞周期的 S 和 G2 期聚集，并由 WEE1、MIK1 和 MYT1 激酶促进对 MPF 复合物的磷酸化抑制作用。在 G2 期末期，由双重-特异性磷酸酶 CDC25C 导致的相应脱磷酸作用引发 MPF 的活化[63]。在分裂间期，细胞周期蛋白 B 定位至细胞质[64]，然后在前期磷酸化并且该事件引起核易位[65,66]。在前期的活性 MPF 的核聚集被认为对启动 M-期事件是重要的[67]。但是，由于 WEE1，核 MPF 保持无活性，除非被 CDC25C 抵消。磷酸酶 CDC25C 自身

在分裂间期定位至细胞质，并在前期在核中聚集[68-71]。周期蛋白 B[60]和 CDC25C[72]二者的核进入可被 PLK1 的磷酸化促进[54]。这种激酶是 M-期启动的重要调节因子。

在一个特别优选的实施方案中，式 I 的化合物为 PLK1 的 ATP-拮抗抑制剂。

在本发明中，ATP 拮抗性指通过削弱或破坏 ATP 结合的方式可逆地或不可逆地在酶活性位点结合，抑制剂化合物减少或防止 PLK 催化活性，即从 ATP 磷酸转移至大分子 PLK 底物的能力。

在另一优选的实施方案中，式 I 的化合物以足以抑制 PLK2 和/或 PLK3 的量给药。

哺乳动物 PLK2(也称为 SNK)和 PLK3(也称为 PRK 和 FNK)最初显示为直接的早期基因产物。PLK3 激酶活性似乎在 S 后期和 G2 期达到高峰。其也在 DNA 损害关卡活化以及严重的氧化应激期间活化。PLK3 也在细胞中微管动力学和中心体功能的调节中发挥重要作用，并且 PLK3 表达下调导致细胞周期停滞和细胞凋亡[73]。PLK2 是三种 PLKs 中了解最少的。PLK2 和 PLK3 二者可能还具有其它重要的有丝分裂后功能[46]。

给药

可使本发明的药物组合物适于口服、直肠、阴道、肠胃外、肌肉、腹膜内、动脉内、鞘内、支气管内、皮下、皮内、静脉内、鼻、口腔或舌下给药途径。

对于口服给药，特别利用压缩片剂、药丸、片剂、凝胶剂(gellules)、滴剂和胶囊剂。优选地，这些组合物每剂包含 1-250mg 的有效成分，更优选包含 10-100mg 的有效成分。

其它给药形式包括溶液剂或乳剂，它们可经静脉内、动脉内、鞘内、皮下、皮内、腹膜内或肌肉内给药，并由无菌或可灭菌溶液制备。本发明的药物组合物还可为栓剂、阴道栓剂、混悬剂、乳剂、洗剂、软膏、乳膏剂、凝胶、喷雾剂、溶液剂或扑粉(dusting powder)的形式。

经皮给药的替代方式是利用透皮贴片(skin patch)。例如，可将有效成分掺入到由聚乙二醇含水乳液或液体石蜡组成的乳膏剂内。还可以 1-10wt% 的浓度将有效成分掺入到由白蜡或白色软石蜡基质与所需要的稳定剂和防

腐剂共同组成的软膏内。

可注射形式每剂可包含 10-1000mg 的有效成分，优选 10-250mg 的有效成分。

组合物可被配制成单位剂型，即包含单位剂量或单位剂量的多重单位或亚单位的形式分散部分。

剂量

本领域的普通技术人员无需过度试验就可容易地确定对患者给药的本发明组合物的适宜剂量。通常，医师会确定对个体患者最适合的实际剂量，并且根据多种因素包括使用的具体化合物的活性、化合物的代谢稳定性以及作用时间的长短、病人的年龄、体重、一般健康状况、性别、饮食、给药的方式以及时间、排泄速率、药物组合以及具体疾病的严重程度以及接受治疗的个体进行调整。本文公开的剂量为一般情况的示例。当然也可有有益的较高或较低剂量范围个别情况，这都在本发明的范围内。

根据需要，可以以 0.01-30 mg/kg 体重，如 0.1-10 mg/kg 体重，更优选 0.1-1 mg/kg 体重的剂量给药所述药物。

在示例性的实施方案中，对病人施用一或多剂 10~150 mg/天。

联合给药

在特别优选的实施方案中，一或多种式 I 化合物与一或多种其它的治疗活性剂(例如，市场上提供的现有药物)联合给药。在这种情况下，本发明的化合物可连续地、同时地或先后地与一或多种活性剂组合给药。

抗癌症药通常在联合使用的时候更有效。尤其地，为避免主要毒性作用、作用机制以及耐药机制的重叠，联合疗法是理想的。此外，也可以以最大耐受剂量并在这些剂量之间以最小的时间间隔给药大多数药物也是理想的。化学治疗药物联合的主要优势在于可能通过生化相互作用促进加和的或可能的协同作用，并且也可能降低在早期肿瘤细胞中的耐药性的出现，后者响应于用单药进行的初始化疗。生化相互作用在选择药物组合时的用途的实例通过下述事实得到证实：施用亚叶酸增加 5-氟尿嘧啶的活性细胞内代谢物对其靶标胸苷酸合酶的结合，从而增加其细胞毒性活性。

许多联合药物目前已经用于癌症和白血病的治疗中。医学实践的更广

泛的综述可见“Oncologic Therapies”，由 E. E. Vokes 和 H.M. Golomb 编著，由 Springer 出版。

通过研究受试化合物与已知的或认为在最初治疗具体的癌症中或衍生自癌症的细胞系中有价值的化合物的抑制活性，从而可建议有利的组合。这种方法也可用于测定施用药物的顺序，即，之前、同时或之后。所述的给药方案可为这里鉴别的所有细胞周期作用药物的特征。

测定

本发明另一方面涉及如前定义的式 I 化合物或其可药用盐在用于鉴别其它的候选化合物的测定中的用途，所述候选化合物能影响一或多种选自周期蛋白依赖性激酶、aurora 激酶、GSK 以及 polo-样激酶的激酶的活性。

优选地，所述的测定能鉴定能够抑制一或多种选自周期蛋白依赖性激酶、aurora 激酶、GSK 以及 polo-样激酶的激酶的候选化合物。

优选地，所述的测定为竞争性结合测定。

这里所用的术语“候选化合物”包括但不限于从任何合适的途径获得的或者产生的化合物，无论是否来自天然的途径。

候选化合物可以从化合物库设计或者从化合物库得到，化合物库包括肽以及其他的化合物，如小的有机分子并且尤其是新的先导化合物。例如，候选化合物可为天然物质、生物大分子或者源自生物材料—如细菌、真菌或者动物(尤其是哺乳动物)细胞或者组织的提取物、有机或者无机分子、合成的候选化合物、半合成的候选化合物、结构或者功能模拟物、肽、肽模拟物、衍生化的候选化合物、从全蛋白裂解的肽技术得到，或者合成方法得到的肽，例如，或者利用肽合成仪或者利用重组技术或其组合、重组的候选化合物、天然或者非天然的候选化合物、融合肽或者其等当物以及突变体、其衍生物或者组合物。候选化合物甚至可以为周期蛋白依赖性激酶、aurora 激酶、GSK 以及 polo-样激酶的调节剂的化合物，如已经通过某种方式例如通过重组 DNA 技术或者化学合成技术修饰的已知抑制剂。

通常，候选化合物可以通过重组 DNA 技术和/或化学合成技术进行制备。

一旦确定能与周期蛋白依赖性激酶、aurora 激酶、GSK 以及 polo-样激酶相互作用的候选化合物，可以进行其他的步骤以选择和/或修饰候选化合

物和/或修饰现有的化合物, 以使其能够调节周期蛋白依赖性激酶、aurora 激酶、GSK 或者 polo-样激酶。

优选地, 所述的候选化合物是通过对本发明化合物进行常规 SAR 修饰而产生。

这里所用的术语“常规 SAR 修饰”指通过化学衍生化改变给定的化合物的本领域公知的标准方法。

因此, 一方面, 鉴别的化合物可用作模型(例如, 模板), 用于开发其他的化合物。在这些测试中使用的化合物可为溶液中的游离状态、固定到固相支持物上、结合至细胞表面或位于细胞内。可测量在所述的化合物和测试的试剂之间的结合复合物的形成或活性的缺失。

本发明的分析可为一种筛选, 其中测试大量的试剂。一方面, 本发明的分析方法为高通量筛选。

本发明还包括利用竞争性药物筛选分析, 其中能结合化合物的中和抗体特异地与受试化合物竞争结合化合物。

用于筛选的另一种技术为对物质具有合适的结合亲和力的试剂的高通量筛选(HTS), 并且基于在 WO 84/03564 中详细描述的方法。

预期本发明的分析方法适于小和大规模的受试化合物的筛选以及用于定量分析。

本发明一方面涉及一种方法, 包括下述步骤:

(a)进行上述的测定方法;

(b)鉴别一或多种能结合周期蛋白依赖性激酶、aurora 激酶、GSK 以及 polo-样激酶的候选化合物; 以及

(c)制备一定量的所述一或多种候选化合物。

本发明另一方面提供了一种方法, 包括下述步骤:

(a)进行上述的测定方法;

(b)鉴别一或多种能结合周期蛋白依赖性激酶、aurora 激酶、GSK 以及 polo-样激酶的候选化合物; 以及

(c)制备包括所述的一或多种所述候选化合物的药物组合物。

本发明另一方面涉及一种方法, 包括下述步骤:

(a)进行上述的测定方法;

(b) 鉴别一或多种能结合周期蛋白依赖性激酶、aurora 激酶、GSK 以及

polo-样激酶的候选化合物;

(c)修饰一或多种所述的能结合周期蛋白依赖性激酶、aurora 激酶、GSK 以及 polo-样激酶的候选化合物;

(d)进行上述的测定方法;

(e)任选地制备包括所述的一或多种候选化合物的药物组合物。

本发明还涉及利用上述方法鉴定的候选化合物。

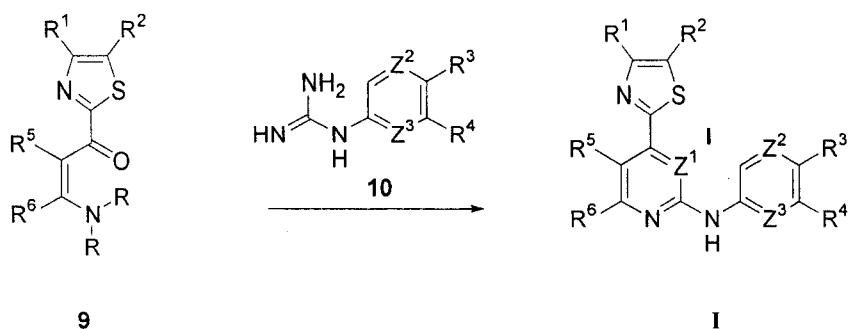
本发明另一方面还涉及包括利用上述方法鉴定的候选化合物的药物组合物。

本发明另一方面涉及利用上述方法鉴定的候选化合物在制备用于治疗增生性疾病的药物组合物中的用途。

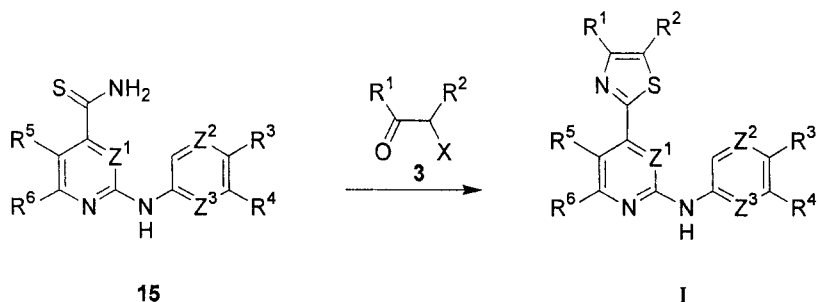
上述方法可用于筛选用作周期蛋白依赖性激酶、aurora 激酶、GSK 以及 polo-样激酶抑制剂的候选化合物。

合成

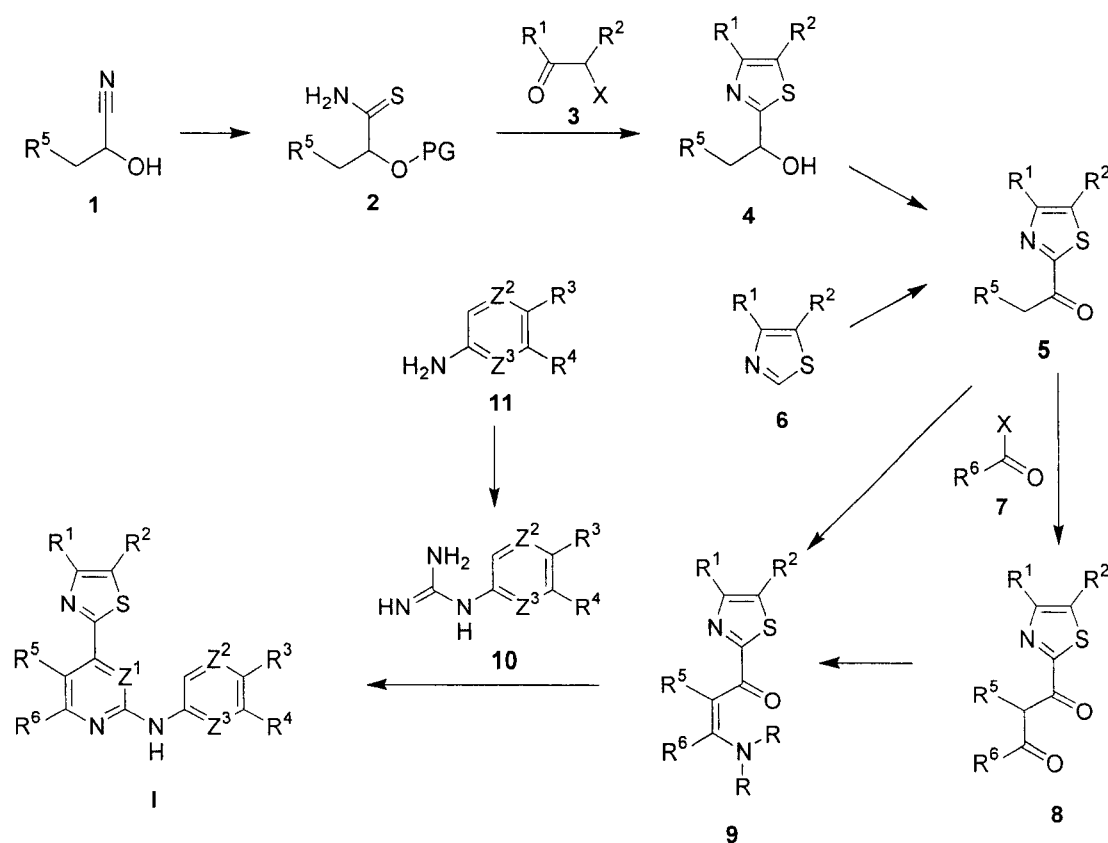
本发明另外一方面涉及用于制备式 I 化合物的制备方法,所述的方法包括将式 9 的化合物与式 10 的化合物反应以形成式 I 的化合物,其中 R^{1-6} 如上定义。



本发明另一方面涉及制备式 I 化合物的替代性方法,所述的方法包括将式 15 化合物与式 3 化合物反应以形成式 I 化合物,其中 R^{1-6} 如上定义。



通式结构 I 的化合物其中 Z^1 为 N, 即 2,4-二取代的嘧啶, 可以通过 Traube 嘧啶合成方法的变通方法制备得到 [8, 9] (流程 1)。在这些步骤中, I ($Z^1=N$) 中的嘧啶环通过下述方法形成: 缩合 1,3-二羰基化合物 8 或相应的烯胺酮 9 (其中 R 为例如 Me) 以及芳基脒 10 [10]。后者可从芳基胺 11 利用许多方法 [11,12] 制备得到, 例如通过用氨脒反应。二酮 8 可从 2-酰基噻唑 5 得到, 利用酰卤 7 (例如 $X=Cl$) 或相应的酸酐进行酰化。在其中 $R^6=H$ 的情形下, 5 的甲酰化将提供相应的酮-醛 8。二羰基化合物 8 然后用适当的碱 HNR_2 能够转化为烯胺酮 9。如果 R^5 和 R^6 都是 H, 则烯胺酮 9 可直接由酰基噻唑 5 制备得到, 借助甲脞、酰胺缩醛 (例如二甲基甲酰胺二甲基缩醛), 或缩醛胺酯 (例如叔丁氧基双(二甲基氨基)甲烷) [13]。

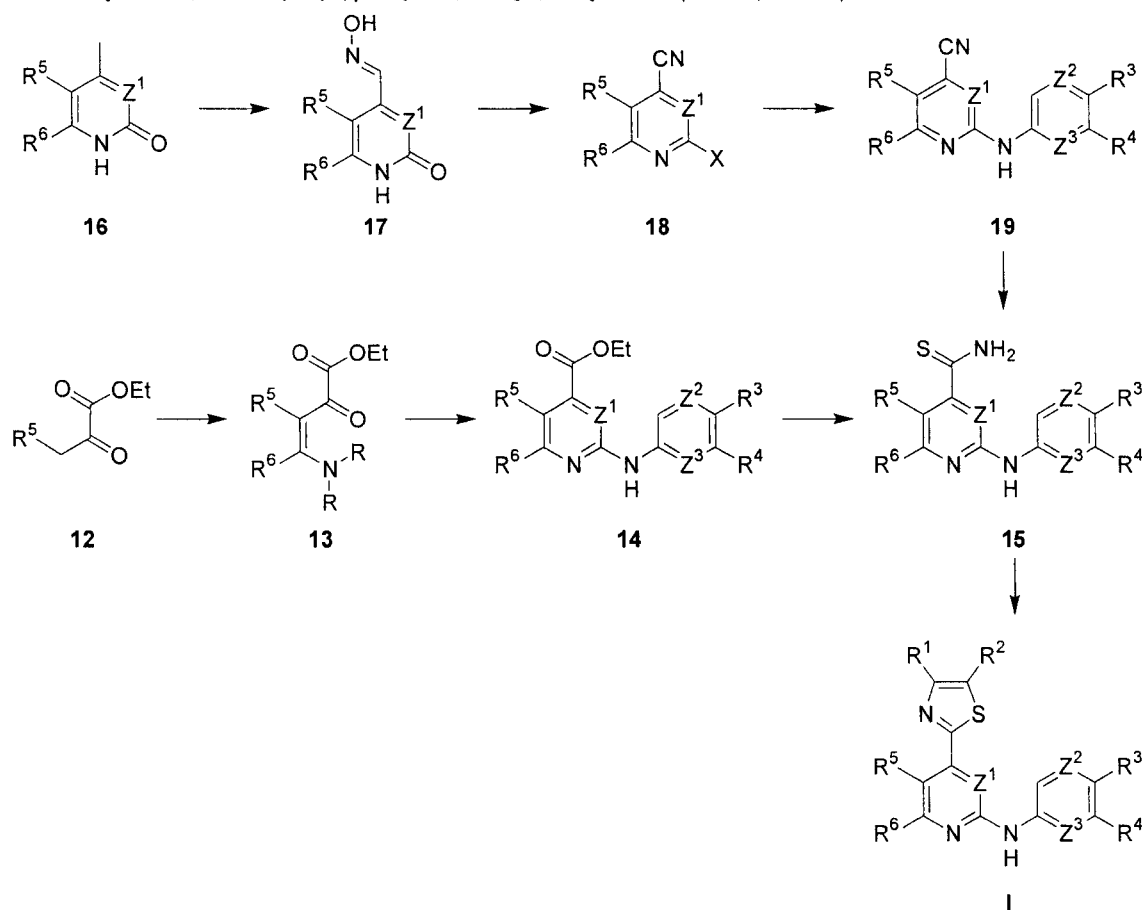


流程 1

2-酰基噻唑 5 可按照下述步骤制备, 锂化噻唑 6 的 C2, 然后将锂化的中间体与醛 R^5CH_2CHO 反应并氧化形成的醇得到酰基噻唑 5。或者, 锂化的噻唑可用适当的酯 R^5CH_2COOR 、酰氯 R^5CH_2COCl , 或酸酐 $(R^5CH_2CO)_2O$

酰化以得到 2-酰基噻唑 5[14,15]。也可能借助乙基溴化镁从 2-未取代的噻唑 6 制备格林雅试剂,然后将这些试剂与酸酐(R^5CH_2CO)₂O 反应以得到 2-酰基噻唑 5[16]。制备 2-酰基噻唑 5[17]的另一种通用的方法起始自 2-羟基丙腈 1,后者可通过 HCN 对醛 R^5CH_2CHO 的加成而制备得到。进行醇功能团的保护,例如作为四氢吡喃醚(PG=四氢吡喃-2-基)的形式,然后将腈官能团转化为产物 2 中的硫代乙酰胺,用例如包含二乙基胺的硫化氢-饱和的乙醇溶液处理。根据 Hantzsch 噻唑合成方法[8],硫代酰胺 2 然后可与 α -卤代酮 3 缩合,然后去除保护基,得到 1-噻唑-2-基-乙醇 4。这些化合物随后氧化,例如借助重铬酸钾在冰醋酸的溶液,得到酮 5。

通式 I 化合物的的替代性合成路线显示在流程 2 中。



流程 2

衍生自丙酮酸乙基酯 12[18]的这里的烯胺酮 13,与芳基胍 10 缩合[19]。产物噻唑酯 14 能很方便地转化成相应的一级甲酰胺,例如用氨的乙醇溶液[20,21]。甲酰胺官能团然后转化成硫代甲酰胺,例如利用 Lawesson 试剂[22-24]、五硫化磷[18,20,21],或硫化铵[25]。也可以按照下述方法实现同样

的转化：活化酰胺作为吡啶基三氟磺酸酯，然后用硫化铵进行硫解[26]。

无论通式 I 中的 Z^1 为 N(嘧啶)或 CH(吡啶)，普遍适用的路线涉及 2-卤代-4-氟基-嘧啶(流程 2; 18, $Z^1=N$)或吡啶(18, $Z^1=CH$)作为关键的中间体。这可通过本领域中公知的许多方法制备得到[27-29]。在嘧啶($Z^1=N$)的情形下，方便的合成[30]起始自 4-甲基-1H-嘧啶-2-酮 16，后者肟化为 17。这些醛肟可脱水得到相应的脒，并且如果脱水利用例如三氯氧磷进行，则直接得到氯代脒 18 ($X=Cl$) [31]。然后 18 中的卤素(X)可用芳基胺 11 取代得到中间体 19 [32]。19 中的脒官能团然后氧化得到硫代甲酰胺 15，例如利用包含硫化铵的甲醇溶液回流。最终，形成噻唑环，例如通过在有机碱如吡啶存在下加热 15 和合适的 α -卤代酮 3 的甲醇溶液。当使用微波辐照的时候，这些反应进行地特别平稳。

本发明进一步通过实施例并参考下述附图进行描述，其中：

图 1 显示 HEK293 细胞响应于暴露于化合物 XIV(受试化合物)时 β -联蛋白蓄积的缺失。

图 2 显示在 ZDF fa/fa 大鼠中化合物 XIV 对口服葡萄糖耐量的作用。受试化合物对 10-11 周龄 ZDF 大鼠以 5 mg/kg i.v.在-270 和-30 分钟给药。在 0 分钟，给药 2g/kg 口服葡萄糖，并以 15 分钟的时间间隔收集血样以测定血液葡萄糖水平。

实施例

本发明的实施例化合物列在表 1 中。

实施例 1

概述

使用 Varian INOVA-500 仪器获得 NMR 光谱。化学位移相对于四甲基硅烷内标物以百万分率(ppm)给出。利用电喷雾离子化(ESI)，使用 Waters ZQ2000 单四极质谱仪获得质谱。分别使用 Vydac 218TP54(250×4.6 mm)和 218TP1022(250×22 mm)柱，进行分析和制备性 RP-HPLC。使用 $H_2O/MeCN$ 系统(含有 0.1% CF_3COOH)，以 1 mL/分钟(分析柱)和 9 mL/分钟(制备柱)的流动速率进行线性梯度洗脱。通过对色谱图进行积分($\lambda=254$ nm)，以评价纯度。硅胶(EM Kieselgel 60, 0.040-0.063 mm, Merck)或 ISOLUTE 预填充柱

(Jones Chromatography Ltd. UK)用于快速色谱。

实施例 2

3-二甲基氨基-1-噻唑-2-基-丙烯酮

将 1-噻唑-2-基-乙酮(1.9 g, 14.9 mmol)和二甲基甲酰胺二甲基缩醛(1.98 mL, 14.9 mmol)混合并在 85 °C 加热 8 小时。冷却并浓缩后, 将残留物从乙醚中结晶并过滤得到形成的固体标题化合物(1.56 g, 58 %)。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 2.91 & 3.19 (6H, s, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 6.01 (1H, s, CH), 7.82 (1H, s, CH), 7.92 (1H, d, ArH, $J=3.4$ Hz), 7.95 (1H, d, ArH, $J=3.4$ Hz)。ESI-MS: m/z 183 $[\text{M} + 1]^+$; $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_2\text{OS}$ 理论值 182.24。Anal RP-HPLC: t_R 18.4 分钟(0 – 60 % MeCN 梯度, 用 20 分钟); 纯度 > 95 %。

3-二甲基氨基-1-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-丙烯酮

将 1-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-乙酮(1.8 g, 11.8 mmol)和二甲基甲酰胺二甲基缩醛(1.7 mL, 14.2 mmol)混合并在 85 °C 加热 8 小时。冷却后, 过滤得到的结晶固体并用冷乙醚洗涤(2.1 g, 85 %)。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ 2.25 (3H, s, CH_3), 2.38 (3H, s, CH_3), 2.81 & 3.18 (6H, s, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 5.91 (1H, s, CH), 7.79 (1H, s, CH)。ESI-MS: m/z 210 $[\text{M} + 1]^+$; $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{OS}$ 理论值 210.08。Anal. RP-HPLC: t_R 14.5 分钟(0 – 60 % MeCN 梯度, 用 20 分钟); 纯度 > 95 %。

实施例 3

(6-氯-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺 (XIV)

将 3-二甲基-氨基-1-噻唑-2-基-丙烯酮(120 mg, 0.66 mmol)、*N*-(6-氯-吡啶-3-基)-胍硝酸盐(154 mg, 0.66 mmol), 6-氯-吡啶-3-基胺用氨脒的水溶液在硝酸存在下胍基化, 以及碳酸钾(228 mg, 1.66 mmol)在 2-甲氧基乙醇中混合并将混合物在 120 °C 加热 20 小时。过滤去除不溶的无机物并将滤液浓缩。将残留物经过硅胶柱层析分级。富集适当的洗脱级分并去除溶剂得到标题化合物(69 mg, 27 %)。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 7.48 (1H, d, ArH, $J=8.3$ Hz), 7.54 (1H, d, ArH, $J=4.9$ Hz), 8.04 (1H, d, ArH, $J=3.4$ Hz), 8.11 (1H, d, ArH, $J=3.4$ Hz), 8.25 (1H,

dd, ArH, $J=8.3, 2.9$ Hz), 8.69 (1H, d, ArH, $J=4.9$ Hz), 8.85 (1H, d, ArH, $J=2.9$ Hz), 10.19 (1H, s, NH). ESI-MS: m/z 290 $[M + H]^+$; $C_{12}H_8ClN_5S$ 理论值 289.02. Anal. RP-HPLC: t_R 20.45 分钟(0 – 60 % MeCN 梯度, 用 20 分钟); 纯度 > 95 %.

在表 1 中列出的实施例化合物 VIII–XIII、XVI、XVII–XX、XXIII 和 XXVII 类似地制备得到, 通过将适当的 3-二甲基-氨基-1-噻唑-2-基-丙烯酮和苯基-或吡啶基-胍进行缩合。

N-[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-苯-1,3-二胺 (VIII)

1H -NMR (DMSO- d_6) δ : 2.36 (3H, s, CH_3), 2.43 (3H, s, CH_3), 4.86 (2H, s, NH_2), 6.21 (1H, d, ArH, $J=8.7$ Hz), 6.93 (1H, dd, ArH, $J=8.7, 8.7$ Hz), 6.98 (1H, d, ArH, $J=8.7$ Hz), 7.02 (1H, s, ArH), 7.30 (1H, d, ArH, $J=5.4$ Hz), 8.52 (1H, d, ArH, $J=5.4$ Hz), 9.46 (1H, s, NH). ESI-MS: m/z 298.3 $[M + H]^+$; $C_{15}H_{15}N_5S$ 理论值 297.10. Anal. RP-HPLC: t_R 14.61 分钟(0 – 60 % MeCN 梯度, 用 20 分钟); 纯度 > 95 %.

3-[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基氨基]-苯酚 (IX)

1H -NMR (DMSO- d_6) δ : 2.36 (3H, s, CH_3), 2.44 (3H, s, CH_3), 6.39 (1H, d, ArH, $J=8.8$ Hz), 7.07 (1H, dd, ArH, $J=8.8, 8.8$ Hz), 7.36 (2H, m, ArH), 7.34 (1H, d, ArH, $J=5.4$ Hz), 8.56 (1H, d, ArH, $J=5.4$ Hz), 9.36 (1H, s, OH), 9.64 (1H, s, NH). ESI-MS: m/z 299.3 $[M + H]^+$; $C_{15}H_{14}N_4OS$ 理论值 298.09. Anal. RP-HPLC: t_R 18.44 分钟(0 – 60 % MeCN 梯度, 用 20 分钟); 纯度 > 95 %.

[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-(3-三氟甲基-苯基)-胺 (X)

1H -NMR (DMSO- d_6) δ : 2.36 (3H, s, CH_3), 2.44 (3H, s, CH_3), 7.31 (1H, d, ArH, $J=8.8$ Hz), 7.42 (1H, d, ArH, $J=5.4$ Hz), 7.54 (1H, d, ArH, $J=8.8, 8.8$ Hz), 7.94 (1H, d, ArH, $J=8.8$ Hz), 8.41 (1H, s, ArH), 8.62 (1H, d, ArH, $J=5.4$ Hz), 10.16 (1H, s, NH). ESI-MS: m/z 351.4 $[M + 1]^+$; $C_{16}H_{13}F_3N_4S$ 理论值 350.08. Anal. RP-HPLC: t_R 20.07 分钟(20 – 80 % MeCN 梯度, 用 20 分钟); 纯度 > 95 %.

(4-氯-3-三氟甲基-苯基)-[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-胺 (XI)

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 2.36 (3H, s, CH_3), 2.43 (3H, s, CH_3), 7.46 (1H, d, ArH, $J=5.4$ Hz), 7.65 (1H, d, ArH, $J=8.8$ Hz), 7.98 (1H, dd, ArH, $J=8.8, 2.9$ Hz), 8.52 (1H, d, ArH, $J=2.9$ Hz), 8.65 (1H, d, ArH, $J=5.4$ Hz), 10.38 (1H, s, NH). ESI-MS: m/z 385.3 $[\text{M} + \text{H}]^+$; $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{ClF}_3\text{N}_4\text{S}$ 理论值 384.04。Anal. RP-HPLC: t_R 24.67 分钟(20 – 80 % MeCN 梯度, 用 20 分钟); 纯度 > 95 %。

[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-(3-硝基-苯基)-胺 (XII)

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 2.38 (3H, s, CH_3), 2.45 (3H, s, CH_3), 7.47 (1H, d, ArH, $J=5.4$ Hz), 7.61 (1H, dd, ArH, $J=8.8, 8.8$ Hz), 7.84 (1H, d, ArH, $J=8.8$ Hz), 8.08 (1H, d, ArH, $J=8.8$ Hz), 8.67 (1H, d, ArH, $J=5.4$ Hz), 9.98 (1H, s, ArH), 10.34 (1H, s, NH)。ESI-MS: m/z 328.4 $[\text{M} + \text{H}]^+$; $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$ 理论值 327.08。Anal. RP-HPLC: t_R 23.70 分钟(10 – 70 % MeCN 梯度, 用 20 分钟); 纯度 > 95 %。

(6-甲氧基-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺 (XIII)

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 3.72 (3H, s, OCH_3), 6.82 (1H, d, ArH, $J=8.8$ Hz), 7.43 (1H, d, ArH, $J=4.9$ Hz), 7.99 (1H, d, ArH, $J=3.4$ Hz), 8.03 (1H, dd, ArH, $J=8.8, 2.9$ Hz), 8.08 (1H, d, ArH, $J=3.4$ Hz), 8.56 (1H, d, ArH, $J=2.9$ Hz), 8.60 (1H, d, ArH, $J=4.9$ Hz), 9.76 (1H, s, NH)。ESI-MS: m/z 285 $[\text{M} + \text{H}]^+$; $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{OS}$ 理论值 285.07。Anal. RP-HPLC: t_R 16.49 分钟(0 – 60 % MeCN 梯度, 用 20 分钟); 纯度 > 95 %。

[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-(6-甲氧基-吡啶-3-基)-胺 (XVI)

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 2.36 (3H, s, CH_3), 2.44 (3H, s, CH_3), 3.83 (3H, s, OCH_3), 6.83 (1H, d, ArH, $J=8.8$ Hz), 7.34 (1H, d, ArH, $J=5.4$ Hz), 8.02 (1H, dd, ArH, $J=2.9$ Hz), 8.55 (1H, d, ArH, $J=5.4$ Hz), 8.56 (1H, d, ArH, $J=2.9$ Hz), 9.70 (1H, s, NH)。ESI-MS: m/z 314.32 $[\text{M} + \text{H}]^+$; $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{OS}$ 理论值 313.10。Anal. RP-HPLC: t_R 20.26 分钟(0 – 60 % MeCN 梯度, 用 20 分钟); 纯度 > 95 %。

(6-氯-吡啶-3-基)-[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-胺 (XVII)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 2.36 (3H, s, CH_3), 2.45 (3H, s, CH_3), 7.44 (1H, d, ArH, $J=5.4$ Hz), 7.48 (1H, d, ArH, $J=8.8$ Hz), 8.21 (1H, dd, ArH, $J=8.8, 2.9$ Hz), 8.62 (1H, d, ArH, $J=5.4$ Hz), 8.67 (1H, d, ArH, $J=2.9$ Hz), 10.13 (1H, s, NH). ESI-MS: m/z 318.24 $[\text{M} + \text{H}]^+$; $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{ClN}_5\text{S}$ 理论值 317.05。Anal. RP-HPLC: t_R 21.72 分钟(10 – 70 % MeCN 梯度, 用 20 分钟); 纯度 > 95 %。

[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-(4-吗啉-4-基-苯基)-胺 (XVIII)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 2.36 (3H, s, CH_3), 2.44 (3H, s, CH_3), 3.05 (4H, m, 吗啉-H), 3.74 (4H, m, 吗啉-H), 6.92 (1H, d, $J=8.5$ Hz, ArH), 7.28 (1H, d, $J=5.0$ Hz, 嘧啶-H), 7.65 (1H, d, $J=8.5$ Hz, ArH), 8.51 (1 H, d, $J=5.0$ Hz, 嘧啶-H), 9.54 (1 H, s, NH)。ESI-MS: m/z 368.5 $[\text{M} + \text{H}]^+$; $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{OS}$ 理论值 367.15。Anal. RP-HPLC: t_R 13.77 分钟(10 – 70 % MeCN 梯度, 用 20 分钟); 纯度 > 95 %。

[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-(4-甲基-3-硝基-苯基)-胺 (XIX)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 2.43 (3H, s, CH_3), 2.47 (3H, s, CH_3), 2.58 (3H, s, CH_3), 7.29 (1H, d, $J=8.0$ Hz, ArH), 7.35 (1H, s, NH), 7.52 (1H, d, $J=5.5$ Hz, 嘧啶-H), 7.59 (1 H, dd, $J=8.0, 2.5$ Hz, ArH), 8.52 (1 H, d, $J=5.5$ Hz, 嘧啶-H), 8.72 (1 H, d, $J=2.5$ Hz, ArH)。ESI-MS; m/z 342.4 $[\text{M} + \text{H}]^+$; $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_2\text{S}$ 理论值 341.09。Anal. RP-HPLC: t_R 10.49 分钟(10 – 70 % MeCN 梯度, 用 20 分钟); 纯度 > 95 %。

4-[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基氨基]-苯酚 (XX)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 2.40 (3H, s, CH_3), 2.43 (3H, s, CH_3), 6.84 (1H, m, ArH), 7.37 (1H, d, $J=5.0$ Hz, 嘧啶-H), 7.47 (1H, m, ArH), 8.40 (1H, d, $J=5.0$ Hz, 嘧啶-H)。ESI-MS: m/z 299.4 $[\text{M} + \text{H}]^+$; $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{OS}$ 理论值 298.09。Anal. RP-HPLC: t_R 13.42 分钟(10 – 70 % MeCN 梯度, 用 20 分钟); 纯度 > 95 %。

(6-吡咯烷-1-基-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺 (XXIII)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 1.80 (2H, m, CH_2), 1.94 (2H, m, CH_2), 3.05 (2H, m,

NCH₂), 3.36 (2H, m, NCH₂), 6.44 (1H, d, ArH, $J=8.8$ Hz), 7.34 (1H, d, ArH, $J=5.4$ Hz), 7.84 (1H, d, ArH, $J=8.8$ Hz), 7.98 (1H, d, ArH, $J=3.4$ Hz), 8.06 (1H, d, ArH, $J=3.4$ Hz), 8.38 (1H, s, ArH), 8.54 (1H, d, ArH, $J=5.4$ Hz), 9.45 (1H, s, NH)。ESI-MS: m/z 325.41 $[M + H]^+$; C₁₆H₁₆N₆S 理论值 324.40。Anal. RP-HPLC: t_R 14.80 分钟(0 – 60 % MeCN 梯度, 用 20 分钟); 纯度 > 95 %。

(6-氯-5-甲基-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺 (XXVII)

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ : 2.36 (3H, s, CH₃), 7.54 (1H, d, ArH, $J=4.9$ Hz), 8.05 (1H, d, ArH, $J=2.9$ Hz), 8.11 (1H, d, ArH, $J=2.9$ Hz), 8.29 (1H, d, ArH, $J=2.9$ Hz), 8.65 (1H, d, ArH, $J=2.9$ Hz), 8.71 (1H, d, ArH, $J=4.9$ Hz), 10.16 (1H, s, NH)。ESI-MS: m/z 304.37 $[M + H]^+$; C₁₃H₁₀ClN₅S 理论值 303.77。Anal. RP-HPLC: t_R 23.19 分钟(0 – 60 % MeCN 梯度, 用 20 分钟); 纯度 > 95 %。

实施例 4

2-氧代-1,2-二氢-嘧啶-4-醛肟

在 15 °C 下, 向 4-甲基-1*H*-嘧啶-2-酮盐酸盐(14.7 g, 0.1 mol)的 50 % 乙酸水溶液(100 mL)中, 在剧烈搅拌下一次性地加入亚硝酸钠(10.4 g, 0.15 mol)。放热反应 (~ 40 °C)后, 形成黄色的沉淀。过滤, 用冷水洗涤, 并真空干燥得到标题化合物(13.51 g, 97 %)。

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ : 6.65 (1H, d, ArH, $J=6.4$ Hz), 7.75 (1H, s, CH), 7.91 (2H, d, ArH, $J=6.4$ Hz), 11.87 (1H, s, NH), 12.41 (1H, s, OH)。ESI-MS: m/z 139.89 $[M + H]^+$; C₅H₅N₃O₂ 理论值 139.11。Anal. RP-HPLC: t_R 5.35 分钟(0 – 60 % MeCN 梯度, 用 20 分钟); 纯度 > 95 %。

2-氯-嘧啶-4-腈

将 2-氧代-1,2-二氢-嘧啶-4-醛肟(5 g, 0.036 mol)在冷的三氯氧磷(20 mL)中的溶液缓慢温热直到开始剧烈的反应, 这时中止温热。一旦完全溶解, 加入二乙基-苯基-胺(2.5 mL)并将反应混合物回流 30 分钟。冷却后, 将混合物倾倒在 ~150 g 冰上并萃取到二氯甲烷(5 × 30 mL)中, 然后用饱和的碳酸氢钠溶液(2 × 50 mL)和水(2 × 50 mL)洗涤, 在无水硫酸镁上干燥。去除溶剂后, 将残留物真空干燥并放置固化。不需要进一步的纯化。

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 7.63 (1H, d, ArH, $J=4.9$ Hz), 8.89 (1H, d, ArH, $J=4.9$ Hz). Anal. RP-HPLC: t_R 12.07 分钟(0 – 60 % MeCN 梯度, 用 20 分钟); 纯度 > 95 %。

2-(4-氯-苯基氨基)-嘧啶-4-腈

将 2-氯-嘧啶-4-腈(1.03 g, 7.38 mmol)和 4-氯苯胺(0.94 g, 7.38 mmol)溶解在乙醇(10 mL)中并将溶液在 100 °C 加热 90 分钟。冷却后, 将标题产物从反应混合物中结晶并过滤(0.84 g, 42 %).

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 7.37 (2H, d, ArH, $J=8.8$ Hz), 7.42 (1H, d, ArH, $J=4.9$ Hz), 7.72 (2H, d, ArH, $J=8.8$ Hz), 8.78 (1H, d, ArH, $J=4.9$ Hz), 10.32 (1H, s, NH). ESI-MS: m/z 231.16 $[\text{M} + \text{H}]^+$; $\text{C}_{11}\text{H}_7\text{ClN}_4$ 理论值 230.65。Anal. RP-HPLC: t_R 22.41 分钟(0 – 60 % MeCN 梯度, 用 20 分钟); 纯度 > 95 %。

2-(4-氯-苯基氨基)-嘧啶-4-硫代甲酰胺(carbothioic acid amid)

将 2-(4-氯-苯基氨基)-嘧啶-4-腈(463 mg, 2.01 mmol)和硫化铵(20 % w/w 的 H_2O 溶液, 4 mL)在甲醇(10 mL)中的溶液加热回流 5 小时。冷却后, 加入水(1 mL)并过滤形成的沉淀得到标题化合物(369 mg, 69 %).

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 7.44 (2H, d, ArH, $J=8.8$ Hz), 7.53 (1H, d, ArH, $J=4.9$ Hz), 7.78 (2H, d, ArH, $J=8.8$ Hz), 8.64 (1H, d, ArH, $J=4.9$ Hz), 9.61 & 10.39 (2H, s, $\text{S}=\text{CNH}_2$), 9.92 (1H, s, NH). ESI-MS: m/z 265.81 $[\text{M} + \text{H}]^+$; $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{ClN}_4\text{S}$ 理论值 264.73。Anal. RP-HPLC: t_R 22.03 分钟(0 – 60 % MeCN 梯度, 用 20 分钟); 纯度 > 95 %。

2-(6-氯-吡啶-3-基氨基)-嘧啶-4-腈

该化合物从 2-氯-嘧啶-4-腈和 6-氯-吡啶-3-基胺制备得到。

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 7.48 (1H, d, ArH, $J=4.9$ Hz), 7.51 (1H, d, ArH, $J=8.8$ Hz), 8.17 (1H, dd, ArH, $J=8.8, 2.9$ Hz), 8.70 (1H, d, ArH, $J=2.9$ Hz), 8.83 (1H, d, ArH, $J=4.9$ Hz), 10.51 (1H, s, NH). ESI-MS: m/z 231 $[\text{M}]^+$; $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{ClN}_5$ 理论值 231.03。Anal. RP-HPLC: t_R 17.84 分钟(0 – 60 % MeCN 梯度, 用 20 分钟); 纯度 > 95 %。

2-(6-氯-吡啶-3-基氨基)-嘧啶-4-硫代甲酰胺

该化合物从 2-(6-氯-吡啶-3-基氨基)-嘧啶-4-腈制备得到,用硫化铵以上述针对 2-(4-氯-苯基氨基)-嘧啶-4-硫代甲酰胺描述的类似的方式。

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): 7.36 (1H, d, ArH, $J=4.9$ Hz), 7.45 (1H, d, ArH, $J=8.8$ Hz), 7.83 & 7.94 (2H, s, $\text{S}=\text{CNH}_2$), 8.28 (1H, dd, ArH, $J=8.8, 2.9$ Hz), 8.74 (2H, m, ArH), 10.16 (1H, s, NH)。ESI-MS: m/z 265 $[\text{M} + \text{H}]^+$ ($\sim 20\%$); $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{ClN}_5\text{S}$ 理论值 265.02。Anal. RP-HPLC: t_R 13.94 分钟(0 – 60 % MeCN 梯度, 用 20 分钟); 纯度 > 95 %。

实施例 5

1-{2-[2-(4-氯-苯基氨基)-嘧啶-4-基]-4-甲基-噻唑-5-基}-乙酮(II)

将 2-(4-氯-苯基氨基)-嘧啶-4-硫代甲酰胺(31 mg, 0.113 mmol)、3-氯-戊烷-2,4-二酮(30 μL , 0.249 mmol)和吡啶(14 μL , 0.17 mmol)在甲醇(2 mL)中的溶液在 150 °C 在 Smith Creator 微波反应器(Personal Chemistry AB, Uppsala, Sweden)中加热 15 分钟。冷却后, 过滤收集形成的标题化合物的沉淀, 并用冷的甲醇洗涤(21 mg, 54 %)。

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): 2.63 (3H, s, CH_3), 2.74 (3H, s, $\text{C}=\text{OCH}_3$), 7.39 (2H, d, ArH, $J=8.8$ Hz), 7.15 (1H, d, ArH, $J=4.9$ Hz), 7.82 (2H, d, ArH, $J=8.8$ Hz), 8.71 (1H, d, ArH, $J=4.9$ Hz), 10.08 (1H, s, NH)。ESI-MS: m/z 345 $[\text{M} + \text{H}]^+$; $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{ClN}_4\text{O}_2\text{S}$ 理论值 344.05。Anal. RP-HPLC: t_R 24.34 分钟(10 – 70 % MeCN 梯度, 用 20 分钟); 纯度 > 95 %。

在表 1 中列出的实施例化合物 III–VII、XV、XXII 和 XXIV–XXVI 类似地进行制备, 将 2-(4-氯-苯基氨基)-嘧啶-4-硫代甲酰胺或 2-(6-氯-吡啶-3-基氨基)-嘧啶-4-硫代甲酰胺与适当的卤代酰基化合物(1-氯-丙烷-2-酮、2-溴-1-苯基-乙酮、2-氯-3-氧代-丁酸乙基酯、4-氯-3-氧代-丁酸甲基酯、2-溴代-丙二酸二乙基酯、2-溴-丙酸 乙基酯, 或 2-溴-4-羟基-丁酸乙基酯)反应制备得到。

(4-氯-苯基)-[4-(4-甲基-噻唑-2-基)-嘧啶-2-基]-胺 (III)

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): 2.47 (3H, s, CH_3), 7.36 (2H, d, ArH, $J=8.8$ Hz), 7.44

(1H, d, ArH, $J=4.9$ Hz), 7.59 (1H, s, ArH), 7.84 (2H, d, ArH, $J=8.8$ Hz), 8.64 (1H, d, ArH, $J=4.9$ Hz), 9.98 (1H, s, NH)。ESI-MS: m/z 303 $[M + H]^+$; $C_{14}H_{11}ClN_4S$ 理论值 302.04。Anal. RP-HPLC: t_R 20.74 分钟(20 – 80 % MeCN 梯度, 用 20 分钟); 纯度 > 95 %。

2-[2-(4-氯-苯基氨基)-嘧啶-4-基]-4-羟基-噻唑-5-羧酸乙基酯(VII)

1H -NMR (DMSO- d_6): 1.28 (3H, t, CH_3 , $J=7.3$ Hz), 4.24 (2H, q, CH_2 , $J=7.3$ Hz), 7.31 (1H, d, ArH, $J=5.4$ Hz), 7.36 (1H, d, ArH, $J=8.8$ Hz), 7.78 (1H, d, ArH, $J=8.8$ Hz), 8.70 (1H, d, ArH, $J=5.4$ Hz), 9.94 (1H, s, NH), 12.18 (1H, s, OH)。ESI-MS: m/z 377.25 $[M + H]^+$; $C_{16}H_{13}ClN_4O_3S$ 理论值 376.04。Anal. RP-HPLC: t_R 20.90 分钟(20 – 80 % MeCN 梯度, 用 20 分钟); 纯度 > 95 %。

1-{2-[2-(6-氯-吡啶-3-基氨基)-嘧啶-4-基]-4-甲基-噻唑-5-基}-乙酮(XV)

1H -NMR (DMSO- d_6): 2.63 (3H, s, CH_3), 2.74 (3H, s, $C=OCH_3$), 7.52 (1H, d, ArH, $J=8.8$ Hz), 7.57 (1H, d, ArH, $J=5.4$ Hz), 8.22 (1H, dd, ArH, $J=8.8, 2.9$ Hz), 8.75 (1H, d, ArH, $J=5.4$ Hz), 8.86 (1H, d, ArH, $J=2.9$ Hz), 10.28 (1H, s, NH)。ESI-MS: m/z 346 $[M + H]^+$; $C_{15}H_{12}ClN_5OS$ 理论值 345.05。Anal. RP-HPLC: t_R 19.77 分钟(10 – 70 % MeCN 梯度, 用 20 分钟); 纯度 > 95 %。

2-[2-(4-氯-苯基氨基)-吡啶-4-基]-5-甲基-噻唑-4-醇 (XXII)

1H -NMR (DMSO- d_6): 2.28 (3H, s, CH_3), 7.26 (1H, d, ArH, $J=5.4$ Hz), 7.37 (2H, d, ArH, $J=8.8$ Hz), 7.36 (2H, d, ArH, $J=8.8$ Hz), 7.82 (1H, d, ArH, $J=5.4$ Hz), 9.91 (1H, s, NH), 10.61 (1H, s, OH)。ESI-MS: m/z 319.24 $[M + H]^+$; $C_{15}H_{12}ClN_3OS$ 理论值 317.04。Anal. RP-HPLC: t_R 16.76 分钟(20 – 80 % MeCN 梯度, 用 20 分钟); 纯度 > 95 %。

2-[2-(6-氯-吡啶-3-基氨基)-嘧啶-4-基]-4-羟基-噻唑-5-羧酸乙基酯 (XXIV)

1H -NMR (DMSO- d_6): 1.28 (3H, t, CH_3 , $J=6.8$ Hz), 4.25 (2H, q, OCH_2 , $J=6.8$ Hz), 7.43 (1H, d, ArH, $J=4.9$ Hz), 7.50 (1H, d, ArH, $J=8.8$ Hz), 8.18 (1H, dd, ArH, $J=8.8, 2.9$ Hz), 8.75 (1H, d, ArH, $J=4.9$ Hz), 8.88 (1H, d, ArH, $J=2.9$

Hz), 10.25 (1H, s, NH). ESI-MS: m/z 378.42 $[M + H]^+$; $C_{15}H_{12}ClN_5O_3S$ 理论值 377.81. Anal. RP-HPLC: t_R 14.67 分钟(10 – 70 % MeCN 梯度, 用 20 分钟); 纯度 > 95 %.

2-[2-(6-氯-吡啶-3-基氨基)-嘧啶-4-基]-5-甲基-噻唑-4-醇 (XXV)

1H -NMR (DMSO- d_6): 2.28 (3H, s, CH_3), 7.32 (1H, d, ArH, $J=4.9$ Hz), 7.47 (1H, d, ArH, $J=8.8$ Hz), 8.22 (1H, dd, ArH, $J=8.8, 2.9$ Hz), 8.62 (1H, d, ArH, $J=4.9$ Hz), 8.86 (1H, d, ArH, $J=2.9$ Hz), 10.10 (1H, s, NH), 10.64 (1H, s, OH).

ESI-MS: m/z 320.22 $[M + H]^+$; $C_{13}H_{10}ClN_5OS$ 理论值 319.77. Anal. RP-HPLC: t_R 15.51 分钟(10 – 70 % MeCN 梯度, 用 20 分钟); 纯度 > 95 %.

2-[2-(6-氯-吡啶-3-基氨基)-嘧啶-4-基]-5-(2-羟基-乙基)-噻唑-4-醇 (XXVI)

1H -NMR (DMSO- d_6): 2.83 (2H, t, CH_2 , $J=6.7$ Hz), 3.35 (CH_2OH , $J=6.7$ Hz), 4.93 (1H, s, OH), 7.33 (1H, d, ArH, $J=5.4$ Hz), 7.47 (1H, d, ArH, $J=8.3$ Hz), 8.22 (1H, dd, ArH, $J=8.3, 2.4$ Hz), 8.61 (1H, d, ArH, $J=5.4$ Hz), 8.88 (1H, d, ArH, $J=2.4$ Hz), 10.10 (1H, s, NH), 10.66 (1H, s, OH). ESI-MS: m/z 348.34 $[M + H]^+$; $C_{14}H_{12}ClN_5O_2S$ 理论值 349.80. Anal. RP-HPLC: t_R 9.41 分钟(20 – 80 % MeCN 梯度, 用 20 分钟); 纯度 > 95 %.

实施例 6

2-(3-羟基-苯基氨基)-异烟碱腈()

将 2-氯-异烟碱腈(1.0 eq)溶解在无水的甲苯中, 然后加入 3-氨基-苯酚(1.1 eq)、乙酸钨-II (0.1 eq)以及双(二苯基膦基)丙烷(0.12 eq)。将反应混合物在室温搅拌 10 分钟, 然后加入叔丁醇钠(1.3 eq)。将形成的悬浮液在 70°C 加热 20 小时。将反应混合物冷却, 用乙醚稀释, 并用盐水洗涤。将有机级分干燥($MgSO_4$)并真空浓缩。将粗制的产物经硅胶柱层析纯化[庚烷: 乙酸乙酯(12: 1 $\rightarrow$ 1: 1)]得到需要的标题化合物, 以及作为副产物的 2-氯-N-(3-羟基-苯基)-异烟碱腈(isonicotinamidine)[33]。

2-(3-羟基-苯基氨基)-硫代异烟碱甲酰胺(thioisonicotinamide)

将 2-(3-羟基-苯基氨基)-异烟碱腈溶解在甲醇中, 然后加入硫化铵(20 %, 水溶液)。将反应混合物在 75 °C 加热 3 小时。将水加入到冷却的溶液中, 并过滤期望的标题化合物, 用冷水洗涤并干燥。

1-{2-[2-(4-羟基-苯基氨基)-吡啶-4-基]-4-甲基-噻唑-5-基}-乙酮(XXI)

将 2-(3-羟基-苯基氨基)-硫代异烟碱甲酰胺(1.0 eq)溶解在甲醇中, 然后加入吡啶(1.4 eq)和 3-氯-2,4-戊二酮(1.1 eq)。将反应混合物在 Smith Creator 微波反应器中加热(150 °C) 15 分钟。冷却形成的溶液并真空浓缩得到粗制的产物。将粗制的产物利用硅胶柱层析纯化[庚烷: 乙酸乙酯(12: 1 → 3: 1)] 得到标题化合物。

¹H-NMR (DMSO-*d*₆) δ: 2.58 (3H, s, CH₃), 2.71 (3H, s, CH₃), 6.70 (2H, d, ArH, *J*=8.5 Hz), 7.15 (1H, d, ArH, *J*=5.5 Hz), 7.36 (3H, m, ArH), 8.14 (1H, d, Ar-H, *J*=5.5 Hz), 9.21 (1H, s, NH)。ESI-MS: *m/z* 326 [M + H]⁺; C₁₇H₁₅N₃O₂S 理论值 325.08。Anal. RP-HPLC: *t*_R 10.49 分钟(10 – 70 % MeCN 梯度, 用 20 分钟); 纯度 > 95 %。

实施例 7

重组蛋白的制备

CDK4/周期蛋白 D1、CDK1/周期蛋白 B、CDK2/周期蛋白 E、CDK2/周期蛋白 A、CDK9/周期蛋白 T1 和 CDK7/周期蛋白 H, 都在其 N-端上具有 His₆ 标记, 利用适当的杆状病毒构建体在 Sf9 昆虫细胞中表达。Sf9 培养(1.6 × 10⁶ 细胞/mL)感染 (MOI 为 3) 2 天。低速离心富集细胞并将蛋白利用金属亲和层析从昆虫细胞沉淀纯化。简言之: 将昆虫细胞沉淀在缓冲液 A (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.02 % NP-40, 5 mM β-巯基乙醇, 20 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 以及 Sigma 蛋白酶抑制剂混合物)中通过超声裂解。离心清出溶解的级分并负载到 Ni-NTA-Agarose (Qiagen)上。未结合的蛋白用 300 mM NaCl, 5 – 15 mM 咪唑在缓冲液 A 中的溶液洗脱去除, 并将结合的蛋白用补充 250 mM 咪唑的缓冲液 A 洗脱。将纯化的蛋白利用储存缓冲液(20 mM HEPES pH 7.4, 50 mM NaCl, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.02 % NP-40, 10 % v/v 甘油)进行充分的透析并在 -70 °C 储存。

实施例 8

GSK-3 β 激酶分析

GSK-3 从 New England Biolabs(UK)Ltd., Hitchin, Herts 得到。重组的酶从带有源自兔骨骼肌 cDNA 文库表达 GSK-3 的克隆的 *E. coli* 株分离得到 [34]。GSK-3 功能的抑制通过测量在受试化合物存在下 CREB 磷酸肽 KRREILSRPpSYR 的磷酸化进行测量。利用 96-孔分析形式,将 GSK3(7.5U)在多种浓度的受试化合物的存在下在 30 °C 孵育 30 分钟,总体积为 25 μ L 的 20 mM MOPS pH 7.2, 25 mM β -甘油磷酸, 5 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM Na_3VO_3 , 40 μ M CREB 肽, 15 mM MgCl_2 和 100 μ M ATP(包含 0.25 μ Ci [γ - ^{32}P]-ATP)。将样品转移到 96-孔 p81 滤板(Whatman Polyfiltronics, Kent, UK)上,将板用 200 μ L/孔的 75 mM 正磷酸水溶液洗涤 4 次。将闪烁液体 (50 μ L)加入到各孔中,并利用闪烁计数器(TopCount, Packard Instruments, Pangbourne, Berks, UK)测定各样品掺入的放射活性。

CDK/细胞周期蛋白激酶分析

考察化合物对 CDK2/细胞周期蛋白 E、CDK2/细胞周期蛋白 A、CDK1/细胞周期蛋白 B 以及 CDK4/细胞周期蛋白 D1 的抑制活性。His₆-标记的重组人细胞周期蛋白-依赖性激酶 CDK1/细胞周期蛋白 B1、CDK2/细胞周期蛋白 E、CDK2/细胞周期蛋白 A 以及 CDK4 利用杆状病毒表达系统在 sf9 昆虫细胞中表达。重组的细胞周期蛋白 D1 在 *E. coli* 中表达。利用金属螯合亲和色谱纯化蛋白至大于 90 % 的同质性。利用重组 CDK/细胞周期蛋白,在 96-孔板中进行激酶分析。在分析缓冲液(25 mM β -甘油磷酸, 20 mM MOPS, 5 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM Na_3VO_3 , pH 7.4)中进行分析,向其中加入 2 - 4 μ g 的活性酶以及适当的底物(对 CDK1 和 CDK2 而言为纯化的组蛋白 H1, 对于 CDK4 而言为重组的 GST-视网膜母细胞癌蛋白(残基 773-928))。加入 Mg/ATP 混合物(15 mM MgCl_2 + 100 μ M ATP 以及 30-50 kBq/孔的 [γ - ^{32}P]-ATP)启动反应,并将混合物按照需要在 30 °C 孵育 10 - 45 分钟。在冰上终止反应,然后滤过 p81 或 GF/C 滤板(对于 CDK4)(Whatman Polyfiltronics, Kent, UK)。用 75 mM 正磷酸水溶液洗涤 3 次后,干燥板,加入闪烁体,并在闪烁计数器(TopCount, Packard Instruments, Pangbourne, Berks, UK)上测量掺入的放射活性。用于激酶分析的化合物配制成 10 mM 的 DMSO 储存液并

用分析缓冲液稀释成 10 % DMSO 的溶液。利用曲线拟合软件(GraphPad Prism version 3.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA) 分析数据以确定 IC₅₀ 值(50 %抑制激酶活性的测试化合物的浓度)。

实施例 9

L6 大鼠肌细胞和 3T3 小鼠脂肪细胞的分化

将大鼠骨骼肌成肌细胞 L6/G8.C5 以 2.4×10^5 细胞/10 cm 培养皿的密度接种在包含青霉素/链霉素的 DMEM 10 %胎牛血清(FCS)中。当达到 90 %融合的时候, 将培养基用 α MEM 替换, 后者补充 2 % FCS 和青霉素/链霉素。每 48 小时更新一次培养基, 并且 4-7 天后形成了肌细胞。

小鼠前脂肪细胞 3T3-F442A 以 9×10^5 细胞/10 cm 培养皿的密度接种在包含青霉素/链霉素的 DMEM 10 % FCS 中。当达到 90 %融合的时候, 相同的培养基补充 1 μ g/mL 的胰岛素。3-5 天后(当大部分细胞分化)撤去胰岛素, 4 天后, 细胞可以使用。

糖原合成酶(GS)分析

在 10 cm 培养皿上的细胞(人胚肾(HEK)293 细胞、L6 大鼠肌细胞, 或 3T3 小鼠脂肪细胞)用不同浓度的 GSK3-抑制剂或 DMSO 溶媒处理 90 分钟。去除培养基并将细胞用冰冷的磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤, 然后在冰上在 50 mM HEPES, pH 7.5, 10 mM EDTA, 100 mM NaF, 5 mM DTT, 蛋白酶抑制剂混合物(Sigma)中裂解。冻/融循环后, 将样品超声 10 秒并在 4 °C 在 15,000 g 离心 10 分钟。将裂解上清液在液氮上快速冻结并在 -80 °C 储存。在缓冲液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 20 mM EDTA, 25 mM NaF, 5 mM DTT, 1%糖原, 0.3 mM UDP-葡萄糖和 0.06 μ Ci 的 [¹⁴C]-UDP-葡萄糖)中在 0.1 或 10 mM 葡萄糖-6-磷酸存在下分析裂解液的糖原合成酶活性。将反应在 30 °C 进行 30 分钟。将 70 μ L 的反应混合物(总体积 90 μ L)转移至 GFC 96-孔滤板(底部用箔片密封)中, 滤板包含 140 μ L 的 96 %乙醇。将 GFC 板在冰上孵育 1 小时并且然后用 66 %乙醇洗涤。向各孔中, 加入 100 μ L 液体闪烁体, 并利用闪烁计数器(Topcount, HP)测量样品的放射活性。数据表示为相对于对照样品的糖原合成酶活性比值增加的倍数。

实施例 10

表 2 总结了例示的化合物的生物活性。

实施例 11

测定了实施例化合物 XIV 对多种 Ser/Thr 激酶的固有的抑制常数(K_i)并总结在表 3 中。

实施例 12

实施例化合物 XIV 增加 HEK293、大鼠肌细胞以及小鼠脂肪细胞中的糖原合酶的活性,利用酶的级分速率测定(浓度为 0.1 和 10 mM 的葡萄糖-6-磷酸酶活性之间的比值)。在 HEK293 细胞以及脂肪细胞中的激活的实例显示在表 4 中。

实施例化合物 XIV 增加 HEK293 细胞和 3T3 脂肪细胞中的 GS 活性。5 μ M XIV 诱导的 HEK293 细胞中的 GS 激活可以与 40 mM LiCl 诱导的激活具有可比性。在 3T3 脂肪细胞中,5 μ M XIV 诱导的激活约 2-倍高于由 40 mM LiCl 诱导的激活。

从剂量效应曲线中计算出被评价的三种细胞系中 XIV-诱导的糖原合酶的 EC_{50} 值: EC_{50} (HEK293)= $1.5 \pm 0.6 \mu$ M; EC_{50} (L6 肌细胞)= $4.0 \pm 1.5 \mu$ M; EC_{50} (3T3 脂肪细胞)= $5.0 \pm 2.3 \mu$ M。

实施例 13

化合物 XIV 的蛋白激酶系列的选择性筛选

包括在选择性筛选中的 29 种激酶的名称以及在各激酶情形下使用的 ATP 浓度,在表 5 中给出。激酶测定按照以前描述的方法进行[35,36]。

1 μ M 的化合物 XIV 在 29-种激酶系列(Dundee University)中进行筛选并且结果显示在下表 6 中。

化合物 XIV 对 GSK3 具有高度选择性。在使用的浓度条件下,只有两种其他的激酶被轻微地抑制(约 40 %)-JNK 和 SAPK4。

实施例 14

β -联蛋白蓄积以及转录激活

与 GSK3 抑制有关的一种可能毒性是 β -联蛋白的蓄积,后者参与结肠癌[37]和黑素瘤[38]的发展。研究了在激活细胞糖原合酶有效的浓度的实施例化合物 XIV 对 HEK293 细胞中 β -联蛋白的内源性水平的作用。化合物 XIV(高达 5 μ M)没有显著改变细胞 β -联蛋白的水平,没有抑制在 GSK3-特异性位点 S33,37/T41 的磷酸化,如图 1 中所示。

此外,研究了化合物 XIV 对 β -联蛋白-依赖性转录活性,如在基于萤光素酶报告基因测定中测量。在用化合物 XIV(高达 10 μ M)处理的 HEK293 细胞中没有观察到诱导的 β -联蛋白转录活性。同时, LiCl 诱导大量的 β -联蛋白-依赖性萤光素酶活性。这些结果暗示在糖原合酶激活需要的浓度条件下,化合物 XIV 不抑制 β -联蛋白的磷酸化并因此不诱导蛋白的蓄积或其转录活性。

β -联蛋白-LEF/TCF 调节的报告基因测定

利用 Lipofectamine Plus 试剂(GibcoBRL),根据厂商的说明, HEK293 细胞用或者 β -联蛋白-LEF/TCF-敏感性或 β -联蛋白-LEF/TCF-不敏感性报告基因载体(Upstate Biotechnology, Inc.)转染。次日,将细胞胰蛋白酶化,洗涤到无血清的培养基中,计数并且以 40,000 细胞每孔接种到 96-孔板中。在细胞附着之后,将 LiCl 或 GSK-3 抑制剂化合物加入到培养基中至需要的浓度。对照细胞为用 DMSO 溶媒处理的细胞。抑制剂加入 16 小时后,利用 Steady-Glo 萤光素酶测定系统(Promega)根据厂商的说明分析细胞的萤光素酶活性。

实施例 15

口服葡萄糖耐量测试(OGTT)

对于 OGTT,使用雄性 ZDF fa/fa 大鼠(Charles River, USA), 10-11 周龄。禁食 15 小时后,动物经静脉给药 5 mg/kg 受试化合物在给药溶媒中的溶液或给药溶媒(10 % DMSO, 90 % PEG-400),只在-270 和-30 分钟给药。在 0 分钟,大鼠经口强饲 2 g/kg 葡萄糖。在 OGTT 之前以及之后每 15 分钟采集血浆样品测定血糖。

化合物 XIV 显著改善 ZDF 大鼠中的葡萄糖耐量,该化合物分别降低反应性和绝对性 AUC 的 44 和 29 %。

在不偏离本发明的范围和精神情形下，描述的本发明方面的各种改变和变化对本领域的普通技术人员而言是显而易见的。尽管本发明结合具体的优选的实施方案进行了描述，应该理解为要求保护的本发明不应该过度地限制到所述的具体的实施方案。实际上，对化学领域或相关领域的普通技术人员而言明显的实施本发明的多种修饰都包括在下述权利要求的范围之内。

参考文献

- [1] Chen, Y.H.; Hansen, L.; Chen, M.X.; Bjorbaek, C.; Vestergaard, H.; Hansen, T.; Cohen, P.T.; Pedersen, O. *Diabetes*, 1994, 43, 1234.
- [2] Nikoulina, S.E.; Ciaraldi, T.P.; Mudaliar, S.; Mohideen, P.; Carter, L.; Henry, R.R. *Diabetes*, 2000, 49, 263.
- [3] Frame, S.; Cohen, P. *Biochem. J.*, 2001, 359, 1.
- [4] Mattson, M.P. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000, 1, 120.
- [5] Goedert, M. *Curr. Opin. Gen. Dev.*, 2001, 11, 343.
- [6] Zhu, A.J.; Watt, F.M. *Development*, 1999, 126, 2285.
- [7] DasGupta, R.; Fuchs, E. *Development*, 1999, 126, 4557.
- [8] Katritzky, A.R.; Ostercamp, D.L.; Yousaf, T.I. *Tetrahedron*, 1987, 43, 5171.
- [9] Baum, F. *Chem. Ber.*, 1908, 41, 532.
- [10] Zimmermann, J.; Caravatti, G.; Mett, H.; Meyer, T.; Müller, M.; Lydon, N.B.; Fabbro, D. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.*, 1996, 329, 371.
- [11] Feichtinger, K.; Zapf, C.; Sings, H.L.; Goodman, M. *J. Org. Chem.*, 1998, 63, 3804.
- [12] Katritzky, A.R.; Parris, R.L.; Allin, S.M.; Steel, P.J. *Synth. Commun.*, 1995, 25, 1173.
- [13] Bredereck, H.; Effenberger, F.; Botsch, H. *Chem. Ber.*, 1964, 97, 3397.
- [14] Davies, D.H.; Hall, J.; Smith, E.H. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1991, 2691.
- [15] Jones, G.; Ollivierre, H.; Fuller, L.S.; Young, J.H. *Tetrahedron*, 1991, 47, 2861
- [16] Metzger, J.; Koether, B. *Bull. Soc. Chim. France*, 1953, 702.
- [17] Kiss, J.; D'Souza, R.; Spiegelberg, H. *Helv. Chim. Acta*, 1968, 51, 825.
- [18] Riley, T.A.; Hennen, W.J.; Dalley, N.K.; Wilson, B.E.; Robins, R.K.; Larson, S.B. *J. Heterocycl. Chem.*, 1987, 24, 955
- [19] Dorigo, P.; Fraccarollo, D.; Santostasi, G.; Maragno, I.; Floreani, M.; Borea, P.A.; Mosti, L.; Sansebastiano, L.; Fossa, P.; et al. *J. Med. Chem.*, 1996, 39, 3671

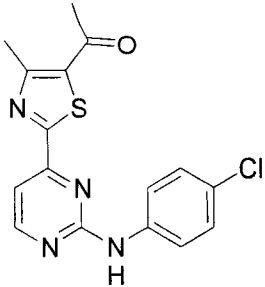
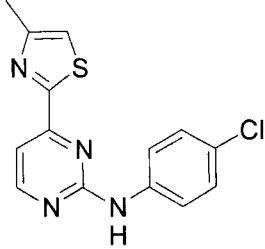
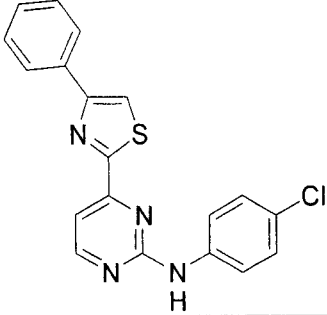
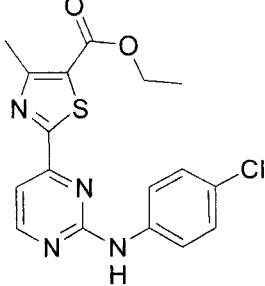
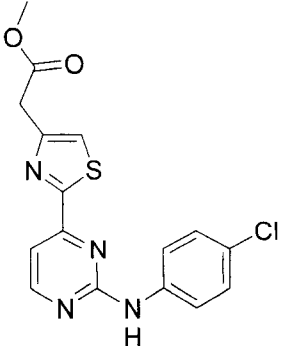
- [20] Goel, O.P.; Krolls, U. *Synthesis*, 1987, 162.
- [21] Raucher, S.; Klein, P. *J. Org. Chem.*, 1981, 46, 3558.
- [22] Yde, B.; Yousif, N.M.; Pedersen, U.; Thomsen, I.; Lawesson, S.O. *Tetrahedron*, 1984, 40, 2047.
- [23] Cava, M.P.; Levinson, M.I. *Tetrahedron*, 1985, 41, 5061.
- [24] Varma, R.S.; Kumar, D. *Org. Lett.*, 1999, 1, 697.
- [25] Spsychala, J. *Tetrahedron*, 2000, 56, 7981.
- [26] Charette, A.B.; Grenon, M. *J. Org. Chem.*, 2003, 68, 5792.
- [27] Hurst, D.T.; Biggadike, K.; Tibble, J.J. *Heterocycles*, 1977, 6, 2005.
- [28] Schlieper, C.A.; Wemple, J. *Nucleosides & Nucleotides*, 1984, 3, 369.
- [29] Clark, J.; Pendergast, W. *Journal of the Chemical Society [Section] C: Organic*, 1969, 2780.
- [30] Daves, G.D., Jr.; O'Brien, D.E.; Lewis, L.R.; Cheng, C.C. *J. Heterocycl. Chem.*, 1964, 1, 130.
- [31] Lipinski, C.A.; Craig, R.H.; Wright, R.B. *J. Heterocycl. Chem.*, 1985, 22, 1723.
- [32] Warczykowska, I.; Wojciechowski, J. *Polish Journal of Chemistry*, 1980, 54, 335.
- [33] Wagaw, S.; Buchwald, S.L. *J. Org. Chem.*, 1996, 61, 7240.
- [34] Wang, Q.M.; Fiol, C.J.; DePaoli-Roach, A.A.; Roach, P.J. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 14566.
- [35] Bain, J.; McLauchlan, H.; Elliott, M.; Cohen, P. *Biochem. J.*, 2003, 371, 199.
- [36] Davies, S.P.; Reddy, H.; Caivano, M.; Cohen, P. *Biochem. J.*, 2000, 351, 95.
- [37] Korinek, V.; Barker, N.; Morin, P.J.; van Wichen, D.; de Weger, R.; Kinzler, K.W.; Vogelstein, B.; Clevers, H. *Science*, 1997, 275, 1784.
- [38] Rubinfeld, B.; Robbins, P.; El-Gamil, M.; Albert, I.; Porfiri, E.; Polakis, P. *Science*, 1997, 275, 1790.
- [39] Wang D, De la Fuente C, Deng L, Wang L, Zilberman I, Eadie C, Healey M, Stein D, Denny T, Harrison LE, Meijer L, Kashanchi F. Inhibition of

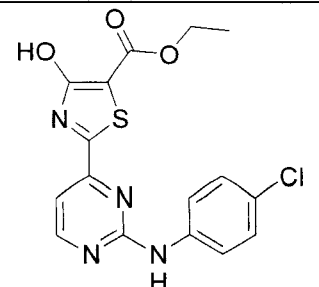
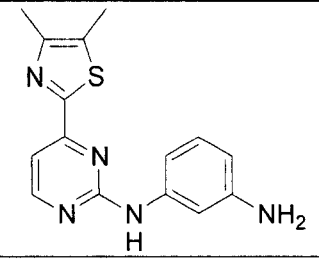
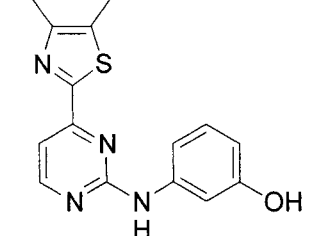
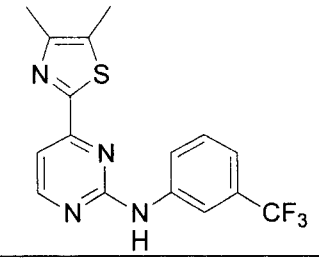
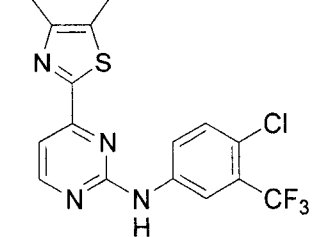
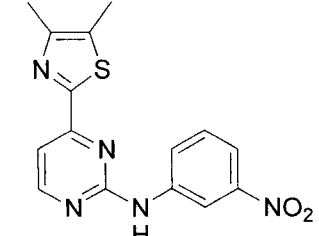
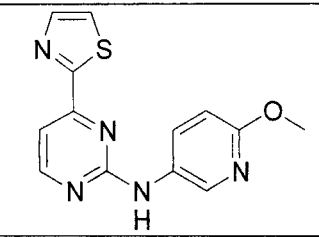
human immunodeficiency virus type 1 transcription by chemical cyclin-dependent kinase inhibitors. *J. Virol.* 2001; 75: 7266-7279.

- [40] Goedert, M. *Curr. Opin. Gen. Dev.*, 2001, 11, 343.
- [41] Sunkel et al., *J. Cell Sci.*, 1988, 89, 25.
- [42] Llamazares et al., *Genes Dev.*, 1991, 5, 2153.
- [43] Glover et al., *Genes Dev.*, 1998, 12, 3777.
- [44] Lee et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 9301.
- [45] Leung et al., *Nat. Struct. Biol.*, 2002, 9, 719.
- [46] Kauselmann et al., *EMBO J.*, 1999, 18, 5528.
- [47] Nigg, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1998, 10, 776.
- [48] Yuan et al., *Cancer Res.*, 2002, 62, 4186.
- [49] Seong et al., *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 32282.
- [50] Lane et al., *J. Cell. Biol.*, 1996, 135, 1701.
- [51] Cogswell et al., *Cell Growth Differ.*, 2000, 11, 615.
- [52] Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, 8672.
- [53] Toyoshima-Morimoto et al., *Nature*, 2001, 410, 215.
- [54] Roshak et al., *Cell. Signalling*, 2000, 12, 405.
- [55] Smits et al., *Nat. Cell Biol.*, 2000, 2, 672.
- [56] van Vugt et al., *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 41656.
- [57] Sumara et al., *Mol. Cell*, 2002, 9, 515.
- [58] Golan et al., *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 15552.
- [59] Kotani et al., *Mol. Cell*, 1998, 1, 371.
- [60] Feng et al., *Cell Growth Differ.*, 2001, 12, 29.
- [61] Dai et al., *Oncogene*, 2002, 21, 6195.
- [62] Nurse, *Nature*, 1990, 344, 503.
- [63] Nigg, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2001, 2, 21.
- [64] Hagting et al., *EMBO J.*, 1998, 17, 4127.
- [65] Hagting et al., *Curr. Biol.*, 1999, 9, 680.
- [66] Yang et al., *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 3604.
- [67] Takizawa et al., *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2000, 12, 658.
- [68] Seki et al., *Mol. Biol. Cell*, 1992, 3, 1373.

-
- [69] Heald et al., *Cell*, 1993, 74, 463.
 - [70] Dalal et al., *Mol. Cell. Biol.*, 1999, 19, 4465.
 - [71] Toyoshima-Morimoto et al., *Nature*, 2001, 410, 215.
 - [72] Toyoshima-Morimoto et al., *EMBO Rep.*, 2002, 3, 341.
 - [73] Wang et al., *Mol. Cell. Biol.*, 2002, 22, 3450.

表1. 实施例化合物

编号	结构	名称
II		1-{2-[2-(4-氯-苯基氨基)-咪唑-4-基]-4-甲基-噻唑-5-基}-乙酮
III		(4-氯-苯基)-[4-(4-甲基-噻唑-2-基)-咪唑-2-基]-胺
IV		(4-氯-苯基)-[4-(4-苯基-噻唑-2-基)-咪唑-2-基]-胺
V		2-[2-(4-氯-苯基氨基)-咪唑-4-基]-4-甲基-噻唑-5-羧酸乙基酯
VI		{2-[2-(4-氯-苯基氨基)-咪唑-4-基]-噻唑-4-基}-乙酸甲基酯

VII		2-[2-(4-氯-苯基氨基)-咪唑-4-基]-4-羟基-噻唑-5-羧酸乙基酯
VIII		N-[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-咪唑-2-基]-苯-1,3-二胺
IX		3-[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-咪唑-2-基]氨基-苯酚
X		[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-咪唑-2-基]-(3-三氟甲基-苯基)-胺
XI		(4-氯-3-三氟甲基-苯基)-[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-咪唑-2-基]-胺
XII		[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-咪唑-2-基]-(3-硝基-苯基)-胺
XIII		(6-甲氧基-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-咪唑-2-基)-胺

XIV		(6-氯-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-噻唑-2-基)-胺
XV		1-{2-[2-(6-氯-吡啶-3-基氨基)-噻唑-4-基]-4-甲基-噻唑-5-基}-乙酮
XVI		[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-噻唑-2-基]-(6-甲氧基-吡啶-3-基)-胺
XVII		(6-氯-吡啶-3-基)-[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-噻唑-2-基]-胺
XVIII		[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-噻唑-2-基]-(4-吗啉-4-基-苯基)-胺
XIX		[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-噻唑-2-基]-(4-甲基-3-硝基-苯基)-胺
XX		4-[4-(4,5-二甲基-噻唑-2-基)-噻唑-2-基氨基]-苯酚

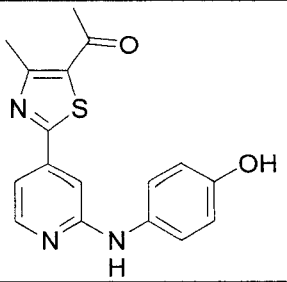
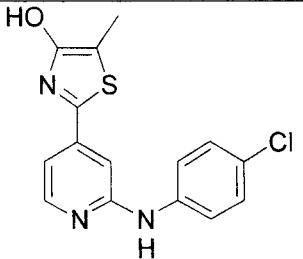
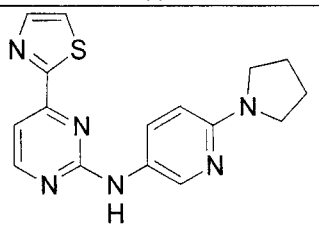
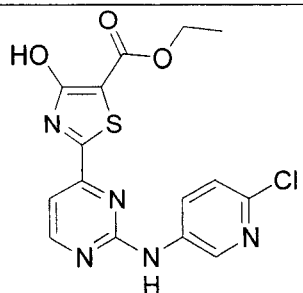
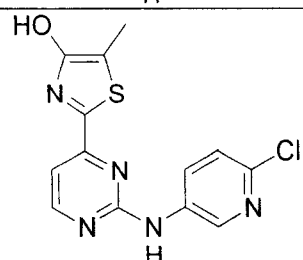
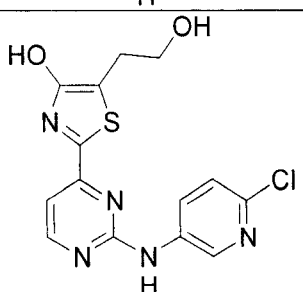
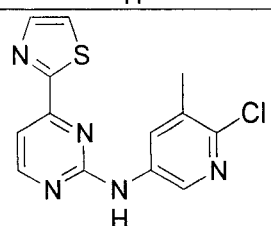
XXI		1-{2-[2-(4-羟基-苯基氨基)-吡啶-4-基]-4-甲基-噻唑-5-基}-乙酮
XXII		2-[2-(4-氯-苯基氨基)-吡啶-4-基]-5-甲基-噻唑-4-醇
XXIII		(6-吡咯烷-1-基-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺
XXIV		2-[2-(6-氯-吡啶-3-基氨基)-嘧啶-4-基]-4-羟基-噻唑-5-羧酸乙基酯
XXV		2-[2-(6-氯-吡啶-3-基氨基)-嘧啶-4-基]-5-甲基-噻唑-4-醇
XXVI		2-[2-(6-氯-吡啶-3-基氨基)-嘧啶-4-基]-5-(2-羟基-乙基)-噻唑-4-醇
XXVII		(6-氯-5-甲基-吡啶-3-基)-(4-噻唑-2-基-嘧啶-2-基)-胺

表 2. 实施例化合物的体外激酶活性以及细胞糖原合酶激活

化合物编号	激酶抑制 IC ₅₀ (μM)					选择性 ^a	- GS 活性诱导 倍数 ^b
	GSK3β	CDK2/E	CDK2/A	CDK1/BI	CDK4/DI		
VII	0.135	>1	>10	>10	>10		2.3
VIII	3.47	NA ^c	NA	NA	NA		ND ^d
IX	1.53	NA	NA	NA	NA		ND
X	12.2	NA	NA	NA	NA		ND
XI	15.6	NA	NA	NA	NA		ND
XIII	0.91	>50	>100	>100	>100		1.5
XIV	0.176	11	>50	>100	>100	63	3.7
XVI	5.45	>1	>10	>10	>10		ND
XVII	2.91	>10	>10	>10	>10		ND
XXII	0.47	NA	NA	NA	NA		1.5 ± 0.4
XXIII	0.482	NA	NA	NA	NA		1.35 ± 0.07
XXIV	0.019	NA	NA	NA	0.96		4.3 ± 0.32
XXV	0.08	NA	NA	NA	N/A		2.1 ± 0.3
XXVI	0.164	NA	NA	NA	2.08		5.2 ± 3.2
XXVII	0.09	NA	ND	ND	ND		1.5 ± 0.4

^a IC₅₀ (CDK2/E)/ IC₅₀ (GSK3β)^b HEK293 细胞, [化合物]=5 μM^c NA –在初级筛选中没有活性(1 μM 的时候抑制< 50 %)^d 没有测定

表 3. 实施例化合物 XIV 对 GSK 相对于 CDK 的选择性

酶	K _i (μM)	GSK3 的选择性倍数
GSK3	0.016	-
CDK2/周期蛋白 E	5.5	345
CDK1/周期蛋白 B	>100	>6,250
CDK7/周期蛋白 H	>50	>3,125
CDK4/周期蛋白 D1	>100	>6,250
CDK2/周期蛋白 A	>50	>3,125
CDK9/周期蛋白 T1	0.5	31

表 4. 实施例化合物 XIV 对细胞糖原合酶活性的激活

测试化合物	GS 活性诱导倍数	
	HEK293 细胞	3T3 细胞
10 μ M XIV	n/d	4.8
5 μ M XIV	3.3	3.7
1 μ M XIV	1.6	2.5
0.5 μ M XIV	1.1	n/d
0.2 μ M XIV	n/d	1.1
0.1 μ M XIV	0.9	n/d
对照	1	1
40 mM LiCl	3.7	2

表 5.蛋白激酶系列的描述

激酶	全称	筛选 [ATP] μM
AMPK	AMP-活化蛋白激酶	50
CDK2-周期蛋白 A	周期蛋白依赖性激酶 2-周期蛋白 A 复合体	20
CHK1	关卡激酶-1	20
CK1	酪蛋白激酶-1	20
CK2	酪蛋白激酶-2	5
CSK	C-端 Src 激酶	20
DYRK1A	双特异性酪氨酸磷酸化调节激酶 1A	50
GSK3- β	糖原合酶激酶 3- β	5
JNK α 1	c-Jun 端激酶	20
LCK	淋巴细胞激酶	50
MAPK2/ERK2	促分裂原活化蛋白激酶	50
MAPKAP-K1a	MAPK-活化蛋白激酶-1a	50
MAPKAP-K2	MAPK-活化蛋白激酶-2	20
MKK1	MAPK 激酶	5
MSK1	促分裂原及应急激活蛋白激酶-1	20
P70S6K	P70 核糖体蛋白 S6 激酶	20
PDK1	3-肌醇磷脂-依赖性蛋白激酶-1	20
PHK	磷酸化酶激酶	20
PKA	周期蛋白 AMP 依赖性蛋白激酶	5
PKB- α	蛋白激酶 B	5
PKC- α	蛋白激酶 C	20
PRAK	P38 调节/活化激酶	20
ROCK-II	Rho-依赖性蛋白激酶	20
SAPK2a/p38	应激-活化蛋白激酶-2a	50
SAPK2b/p38- β 2	应激-活化蛋白激酶-2b	20
SAPK3/p38- γ	应激-活化蛋白激酶-3	5
SAPK4/p38- δ	应激-活化蛋白激酶-4	5
SGK	血清及糖皮质激素活化激酶	20
NEK6	NIMA 家族激酶 6	50

表 6. 实施例 XIV (1 μ M) 的激酶选择性筛选

酶	%活性
MKK1	83 $\pm$ 4
MAPK2/ERK2	84 $\pm$ 8
JNK/SAPK1c	56 $\pm$ 4
SAPK2a/p38	84 $\pm$ 7
SAPK2b/p38b2	92 $\pm$ 4
SAPK3/p38g	88 $\pm$ 3
SAPK4/p38d	91 $\pm$ 9
MAPKAP-K1a	60 $\pm$ 1
MAPKAP-K2	86 $\pm$ 7
MSK1	90 $\pm$ 6
PRAK	83 $\pm$ 3
PKA	76 $\pm$ 3
PKCa	76 $\pm$ 0
PDK1	85 $\pm$ 5
PKB δ PH	98 $\pm$ 1
SGK	79 $\pm$ 4
p70S6K	91 $\pm$ 2
GSK3b	13 $\pm$ 5
ROCK-II	87 $\pm$ 6
AMPK	82 $\pm$ 5
CHK1	78 $\pm$ 4
CK2	84 $\pm$ 1
PHK	120 $\pm$ 7
Lck	66 $\pm$ 5
CSK	93 $\pm$ 8
CK1	69 $\pm$ 1
DYRK1a	74 $\pm$ 8
NEK6	87 $\pm$ 6

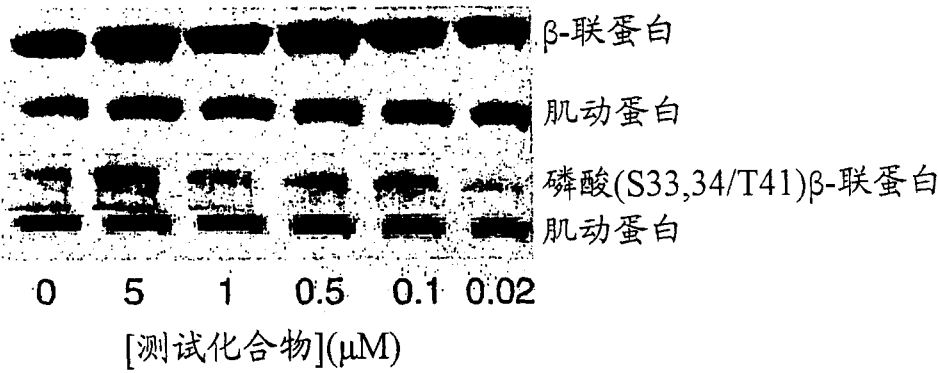


图 1

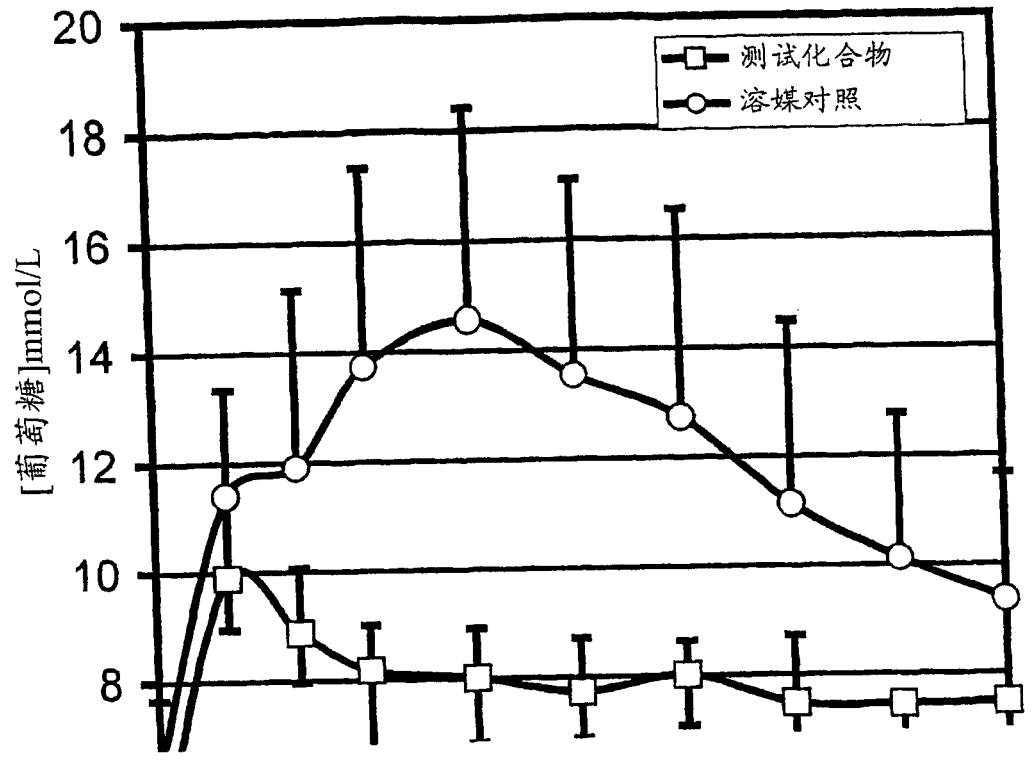


图 2