

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01807157.0

C07D239/48

C07D401/12

C07D403/12

C07D405/12

C07D413/12

A61K 31/505

A61P 35/00

[45] 授权公告日 2005 年 12 月 14 日

[11] 授权公告号 CN 1231471C

[22] 申请日 2001.3.23 [21] 申请号 01807157.0

[30] 优先权

[32] 2000.3.28 [33] GB [31] 0007371.8

[86] 国际申请 PCT/GB2001/001264 2001.3.23

[87] 国际公布 WO2001/072717 英 2001.10.4

[85] 进入国家阶段日期 2002.9.24

[71] 专利权人 阿斯特拉曾尼卡有限公司

地址 瑞典南泰利耶

[72] 发明人 A·P·托马斯

审查员 李彦涛

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 马崇德

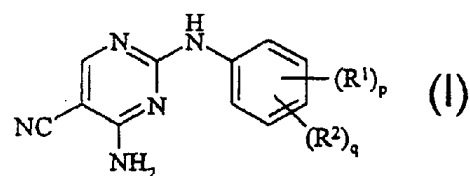
权利要求书 6 页 说明书 35 页

[54] 发明名称 4-氨基-5-氰基-2-苯胺基-嘧啶衍生物和它们作为细胞周期激酶的抑制剂的用途

CDK2、CDK4 和/或 CDK6 的抑制剂的用途。

[57] 摘要

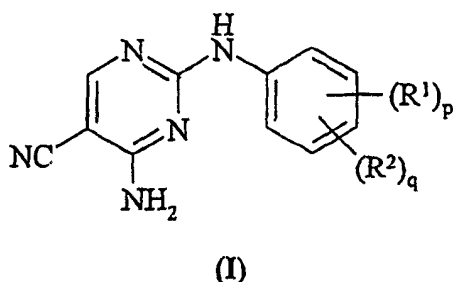
本发明公开式(I)的化合物, 其中: R¹ 为卤基、硝基、氰基、羟基、氨基、羧基、氨基甲酰基、巯基、C₁₋₆烷基、C₂₋₆链烯基或 C₂₋₆炔基; p 为 0-4; 其中 R¹可相同或不同; R²为氨磺酰基或 B-E-的基团, 其中 B 任选如本文定义取代并选自 C₁₋₆烷基、C₂₋₆链烯基、C₂₋₆炔基、C₃₋₈环烷基、C₁₋₆烷基、苯基、杂环基、苯基 C₁₋₆烷基、或(杂环基)C₁₋₆烷基; E 为 C(O)-、N(R^a)C(O)-、-C(O)N(R^a)-、-S(O)_r-、-SO₂N(R^a)-或 -N(R^a)SO₂-; 其中 R^a为氢或任选如本文定义取代的 C₁₋₆烷基; 并且 r 为 1-2; q 为 0-2; 其中 R²可相同或不同; 并且其中 p+q=1-5; 或其药学上可接受的盐或其体内可水解的酯。还公开它们的制备方法和它们作为细胞周期激酶, 特别是



知识产权出版社出版

ISSN 1008-4274

1. 一种式(I)的化合物:



5

式中:

R^1 为卤基、硝基、氰基、羟基、氨基、羧基、氨基甲酰基、巯基、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 链烯基或 C_{2-6} 炔基;

p 为0-4; 其中 R^1 可相同或不同;

10 R^2 为氨磺酰基或B-E-基团; 其中

B选自 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 链烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-8} 环烷基、 C_{3-8} 环烷基
 C_{1-6} 烷基、苯基、杂环基、苯基 C_{1-6} 烷基或(杂环基) C_{1-6} 烷基; 其中所述
 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 链烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-8} 环烷基、 C_{3-8} 环烷基 C_{1-6} 烷基、苯
 基、杂环基、苯基 C_{1-6} 烷基或(杂环基) C_{1-6} 烷基任选在碳上被一个或多
 15 个D取代; 并且其中如果所述杂环基含有-NH-部分, 则氮可任选被选
 自G的基团取代;

E为-C(O)-、-N(R^a)C(O)-、-C(O)N(R^a)-、-S(O) $_r$ -、-SO $_2$ N(R^a)-或-
 N(R^a)SO $_2$ -; 其中 R^a 为氢或任选被一个或多个D取代的 C_{1-6} 烷基, r 为1-
 2;

20 D独立选自卤基、硝基、氰基、羟基、三氟甲基、三氟甲氧基、
 氨基、羧基、氨基甲酰基、巯基、氨磺酰基、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 链烯基、
 C_{2-6} 炔基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 烷酰基、 C_{1-6} 烷酰氧基、 N -(C_{1-6} 烷基)氨基、
 N,N -(C_{1-6} 烷基) $_2$ 氨基、 C_{1-6} 烷酰基氨基、 N -(C_{1-6} 烷基)氨基甲酰基、 N,N -
 (C_{1-6} 烷基) $_2$ 氨基甲酰基、 C_{1-6} 烷基S(O) $_a$, 其中 a 为0-2, C_{1-6} 烷氧基羰基、

N -(C_{1-6} 烷基)氨磺酰基和 N,N -(C_{1-6} 烷基) $_2$ 氨磺酰基;

G 选自 C_{1-4} 烷基、 C_{1-4} 烷酰基、 C_{1-4} 烷基磺酰基、 C_{1-4} 烷氧基羰基、氨基甲酰基、 N -(C_{1-4} 烷基)氨基甲酰基、 N,N -(C_{1-4} 烷基)氨基甲酰基、苄基、苄氧基羰基、苯甲酰基和苯基磺酰基; 和

5 q 为0-2; 其中 R^2 可相同或不同; 并且其中 $p+q=1-5$;

条件是所述化合物不是2-(2,4-二甲基苯胺基)-4-氨基-5-氟基嘧啶; 4-氨基-5-氟基-2-[2-(2-羟基乙氧基羰基)苯胺基]嘧啶; 4-氨基-5-氟基-2-[2-(甲氧基羰基)苯胺基]嘧啶;

或其药学上可接受的盐或其体内可水解的酯。

10 2. 权利要求1所要求保护的式(I)的化合物, 其中所述 R^1 为氟基; 或其药学上可接受的盐或其体内可水解的酯。

3. 权利要求1或2所要求保护的式(I)的化合物, 其中所述 p 为0或1; 或其药学上可接受的盐或其体内可水解的酯。

15 4. 权利要求1-3中任一项所要求保护的式(I)的化合物, 其中所述 R^2 为氨磺酰基或B-E-基团, 其中

B 选自 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 链烯基、 C_{3-8} 环烷基、 C_{3-8} 环烷基 C_{1-6} 烷基、苯基 C_{1-6} 烷基或(杂环基) C_{1-6} 烷基, 其中所述 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 链烯基、 C_{3-8} 环烷基、 C_{3-8} 环烷基 C_{1-6} 烷基、苯基 C_{1-6} 烷基或(杂环基) C_{1-6} 烷基任选在碳上被一个或多个 D 取代, 并且其中如果所述杂环基含有-NH-部分,

20 则氮可任选被选自 G 的基团取代;

E 为 $-N(R^a)SO_2-$ 或 $-N(R^a)C(O)-$; 其中 R^a 为氢;

D 独立选自卤基、羟基、 C_{1-6} 烷氧基或 N -(C_{1-6} 烷基)氨基、 N,N -(C_{1-6} 烷基) $_2$ 氨基; 和

G 为 C_{1-4} 烷基;

25 或其药学上可接受的盐或其体内可水解的酯。

5. 权利要求1-4中任一项所要求保护的式(I)的化合物, 其中所述 R^2 选自氨磺酰基、 N -(环丙基甲基)氨磺酰基、 N -(四氢呋喃-2-基甲基)氨磺酰基、 N -(2-甲氧基乙基)氨磺酰基、 N -(2-吡啶-2-基乙基)氨磺酰基、 N -(2-哌啶-1-基乙基)氨磺酰基、 N -[2-(1-甲基吡咯烷-2-基)乙基]氨磺酰

基、*N*-(2-异丙基氨基乙基)氨磺酰基、*N*-(2,2,2-三氟乙基)氨磺酰基、*N*-(2-二甲氨基乙基)氨磺酰基、*N*-(3-甲氧基丙基)氨磺酰基、*N*-(3-乙氧基丙基)氨磺酰基、*N*-(3-异丙氧基丙基)氨磺酰基、*N*-(3-二甲氨基丙基)氨磺酰基、*N*-[3-(2-氧代吡咯烷-1-基)丙基]氨磺酰基、*N*-(3-吗啉代丙基)氨磺酰基、*N*-(3-咪唑-1-基丙基)氨磺酰基、*N*-(3-异丙基氨基丙基)氨磺酰基、*N*-(丙基)氨磺酰基、*N*-(3-羟基-2,2-二甲基丙基)氨磺酰基、*N*-(戊基)氨磺酰基、*N*-(烯丙基)氨磺酰基、*N*-(环丙基)氨磺酰基、*N*-(环丁基)氨磺酰基、*N*-(3-甲氧基苄基)氨磺酰基、*N*-(4-氟苄基)氨磺酰基、*N*-(苄乙基)氨磺酰基、*N*-(4-羟基苄乙基)氨磺酰基、*N*-(4-甲氧基苄乙基)氨磺酰基和 *N*-(3-咪唑-1-基丙基)氨基甲酰基；或其药学上可接受的盐或其体内可水解的酯。

6. 权利要求 1-5 中任一项所要求保护的式(I)的化合物，其中所述 *q* 为 0 或 1；或其药学上可接受的盐或其体内可水解的酯。

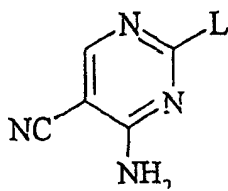
7. 权利要求 1-6 中任一项所要求保护的式(I)的化合物，其中所述 *p+q* 为 1；或其药学上可接受的盐或其体内可水解的酯。

8. 权利要求 1-7 中任一项所要求保护的式(I)的化合物，所述化合物选自：

4-氨基-5-氟基-2-{4-[*N*-(2-甲氧基乙基)氨磺酰基]苯胺基}嘧啶、
4-氨基-5-氟基-2-{4-[*N*-(四氢呋喃-2-基甲基)氨磺酰基]苯胺基}嘧啶、
4-氨基-5-氟基-2-{4-[*N*-(4-氟苄基)氨磺酰基]苯胺基}嘧啶、
4-氨基-5-氟基-2-{4-[*N*-(3-甲氧基丙基)氨磺酰基]苯胺基}嘧啶、
4-氨基-5-氟基-2-{4-[*N*-(环丙基)氨磺酰基]苯胺基}嘧啶、
4-氨基-5-氟基-2-[4-(*N*-烯丙基氨磺酰基)苯胺基]嘧啶、
4-氨基-5-氟基-2-[4-(*N*-丙基氨磺酰基)苯胺基]嘧啶、
4-氨基-5-氟基-2-{4-[*N*-(2-异丙基氨基乙基)氨磺酰基]苯胺基}嘧啶、
4-氨基-5-氟基-2-{4-[*N*-(3-异丙基氨基丙基)氨磺酰基]苯胺基}嘧啶、和
4-氨基-5-氟基-2-{4-[*N*-(2-哌啶子基乙基)氨磺酰基]苯胺基}嘧啶；
或其药学上可接受的盐或其体内可水解的酯。

9. 一种制备式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或其体内可水解的酯的方法, 所述方法包括(其中 R^1 、 R^2 、 p 和 q 如在权利要求 1 中的定义, 另有声明除外):

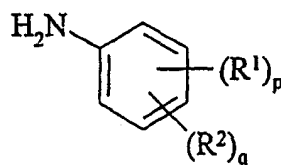
a) 使式(II)的嘧啶:



(II)

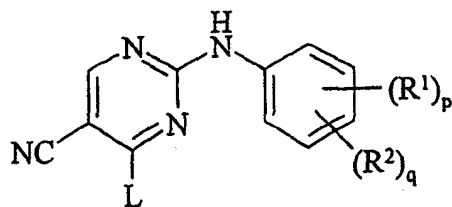
5

式中 L 为可置换的基团, 与式(III)的苯胺反应:



(III)

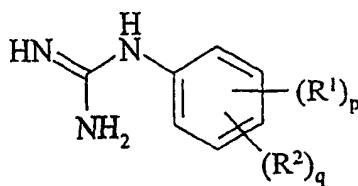
b) 使式(IV)的嘧啶:



(IV)

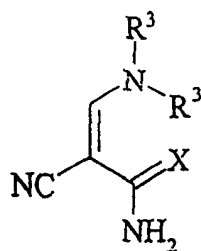
10 式中 L 为可置换的基团, 与氨反应; 或

c) 使式(V)的化合物:



(V)

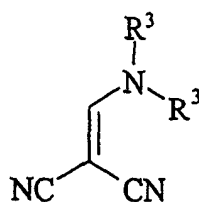
与式(VI)的化合物反应:



(VI)

式中 X 为 O 或 S; R³ 为 C₁₋₆ 烷基;

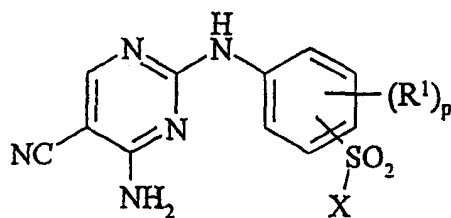
d) 使式(V)的化合物与式(VII)的化合物反应:



(VII)

5

e) 式中 R² 为氨磺酰基或 B-E-基团, 并且 E 为 -NHSO₂-; 使式(VIII)的嘧啶:



(VIII)

式中 X 为可置换的基团, 与式(IX)的胺反应:

10



(IX)

并且随后如果需要:

- i) 将式(I)的化合物转化成另一种式(I)的化合物;
- ii) 除去任何保护基团;

iii) 形成药学上可接受的盐或在体内可水解的酯。

10. 一种药物组合物，所述药物组合物包括权利要求 1-8 中任一项所要求保护的式(I)的化合物，或其药学上可接受的盐或其体内可水解的酯，结合药学上可接受的稀释剂或载体。

5 11. 权利要求 1-8 中任一项所要求保护的式(I)的化合物，或其药学上可接受的盐或其体内可水解的酯在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

12. 权利要求 1-8 中任一项所要求保护的式(I)的化合物，或其药学上可接受的盐或其体内可水解的酯在制备用于在温血动物如人体中
10 产生细胞周期抑制(抗细胞增殖)效应的药物中的用途。

13. 权利要求 1-8 中任一项所要求保护的式(I)的化合物，或其药学上可接受的盐或其体内可水解的酯在制备用于治疗以下疾病的药物中的用途，所述疾病包括癌症(实体肿瘤和白血病)、成纤维细胞增殖和分化紊乱、牛皮癣，类风湿性关节炎，Kaposi 肉瘤、血管瘤，急性
15 和慢性肾病、粉瘤、动脉粥样硬化，动脉再狭窄、自身免疫疾病、急性和慢性炎症、骨疾病和视网膜血管增生的眼疾病。

4-氨基-5-氰基-2-苯胺基-嘧啶衍生物 和它们作为细胞周期激酶的抑制剂的用途

5

本发明涉及嘧啶衍生物，或其药学上可接受的盐或其体内可水解的酯，它们具有细胞周期抑制活性，因此可使用其抗细胞增殖(如抗癌)活性，因而可用于治疗人或动物体的方法中。本发明还涉及制备所述嘧啶衍生物的方法，含有所述嘧啶衍生物的药物组合物以及
10 所述嘧啶衍生物在制备用于在温血动物(如人)中产生抗细胞增殖作用的药物中的用途。

一族称作细胞周期蛋白的胞内蛋白在细胞周期中起着重要的作用。细胞周期蛋白的合成和降解受到严格控制而使它们的表达水平在细胞周期中波动。细胞周期蛋白结合到依赖细胞周期蛋白的丝氨酸/苏氨酸激酶(CDKs)上，并且这种结合对于在细胞中的 CDK(例如
15 CDK1、CDK2、CDK4 和/或 CDK6)活性是必需的。尽管还不十分了解这些因子的每一个是如何结合以调节 CDK 活性的确切细节，然而这两者之间的平衡决定是否细胞将通过细胞周期进化。

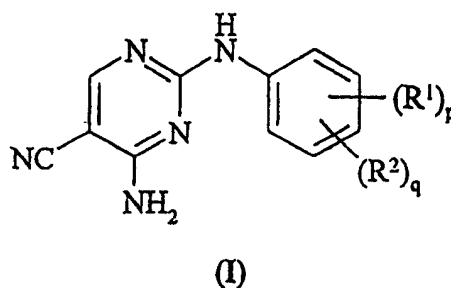
最新的癌基因和肿瘤抑制基因研究已确定对进入细胞周期的调节是肿瘤有丝分裂发生的关键控制点。此外，CDKs 似乎是在多种癌
20 基因传递信号途径的下游。因细胞周期蛋白的上调和/或内源性抑制剂的缺失而失去对 CDK 活性的调节似乎是有丝分裂发生的信号传递途径和肿瘤细胞增殖之间的重要的轴心。

因此，已经认识到细胞周期激酶的抑制剂，特别是 CDK2、CDK4
25 和/或 CDK6(分别在 S-阶段、G1-S 和 G1-S 阶段运作)的抑制剂，作为细胞增殖，例如哺乳动物癌细胞生长的选择性抑制剂，应该是有价值的。

本发明基于如下发现：某些嘧啶化合物意想不到地抑制显示出对

CDK2、CDK4 和 CDK6 呈现选择性的细胞周期激酶的作用，因此具有抗细胞增殖的特性。期望这些特性在治疗与异常细胞周期和细胞增殖相关的疾病上是有价值的，所述疾病如癌症(实体肿瘤和白血病)、成纤维细胞增殖和分化紊乱、牛皮癣，类风湿性关节炎，Kaposi 肉瘤、血管瘤，急性和慢性肾病、粉瘤、动脉粥样硬化，动脉再狭窄、自身免疫疾病、急性和慢性炎症、骨疾病和视网膜血管增殖的眼疾病。

因此，本发明提供了式(I)的化合物：



式(I)中：

R^1 为卤基、硝基、氰基、羟基、氨基、羧基、氨基甲酰基、巯基、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 链烯基或 C_{2-6} 炔基；

p 为0-4；其中 R^1 可相同或不同；

R^2 为氨磺酰基或B-E-基团；其中

B选自 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 链烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-8} 环烷基、 C_{3-8} 环烷基 C_{1-6} 烷基、苯基、杂环基、苯基 C_{1-6} 烷基或(杂环基) C_{1-6} 烷基；其中所述 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 链烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-8} 环烷基、 C_{3-8} 环烷基 C_{1-6} 烷基、苯基、杂环基、苯基 C_{1-6} 烷基或(杂环基) C_{1-6} 烷基任选在碳上被一个或多个D取代；并且其中如果所述杂环基含有-NH-部分，则氮可任选被选自G的基团取代；

E为-C(O)-、-N(R^a)C(O)-、-C(O)N(R^a)-、-S(O)_r-、-SO₂N(R^a)-或-N(R^a)SO₂-；其中 R^a 为氢或任选被一个或多个D取代的 C_{1-6} 烷基，r为1-2；

D独立选自卤基、硝基、氰基、羟基、三氟甲基、三氟甲氧基、氨基、羧基、氨基甲酰基、巯基、氨基磺酰基、C₁₋₆烷基、C₂₋₆链烯基、C₂₋₆炔基、C₁₋₆烷氧基、C₁₋₆烷酰基、C₁₋₆烷酰氧基、N-(C₁₋₆烷基)氨基、N,N-(C₁₋₆烷基)₂氨基、C₁₋₆烷酰基氨基、N-(C₁₋₆烷基)氨基甲酰基、N,N-(C₁₋₆烷基)₂氨基甲酰基、C₁₋₆烷基S(O)_a，其中a为0-2，C₁₋₆烷氧基羰基、N-(C₁₋₆烷基)氨基磺酰基和N,N-(C₁₋₆烷基)₂氨基磺酰基；

G选自C₁₋₄烷基、C₁₋₄烷酰基、C₁₋₄烷基磺酰基、C₁₋₄烷氧基羰基、氨基甲酰基、N-(C₁₋₄烷基)氨基甲酰基、N,N-(C₁₋₄烷基)氨基甲酰基、苄基、苄氧基羰基、苄甲酰基和苄基磺酰基；和

q为0-2；其中R²可相同或不同；并且其中p+q=1-5；或其药学上可接受的盐或其体内可水解的酯。

本发明的另一方面提供了式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或其体内可水解的酯，条件是所述化合物不是2-(2,4-二甲基苯胺基)-4-氨基-5-氰基嘧啶。

在本说明书中，术语“烷基”包括直链和支链烷基，但当提到单个烷基，如“丙基”时则仅是专指其直链构型。例如，“C₁₋₆烷基”包括C₁₋₄烷基、C₁₋₃烷基、丙基、异丙基和叔丁基。但是，当提到单个烷基，如‘丙基’时则仅是专指其直链构型，而当提到单个支链烷基，如‘异丙基’时则仅是专指其支链构型。同样的规定适用于其它基团，例如“苄基 C₁₋₆烷基”包括苄基 C₁₋₄烷基、苄基、1-苄基乙基和2-苄基乙基。术语“卤基”包括氟基、氯基、溴基和碘基。

当任选的取代基选自“一个或多个”基团时，应理解该定义包括所有选自指定基团中的一种的取代基或所有选自所指定基团中的两种或多种的取代基。

“杂环基”是饱和、部分饱和或不饱和的、含有4-12个原子的单或双环，其中至少一个原子选自氮、硫或氧，所述杂环可为(除非另有声明)碳或氮连接，其中-CH₂-基团可任选被-C(O)-置换，并且环上的氮原子可任选带有C₁₋₆烷基和形成季铵化合物，或环上的氮和/

或硫原子可任选被氧化形成 *N*-氧化物或 *S*-氧化物。术语“杂环基”合适的例子有 4-吗啉基、哌啶基、吡啶基、吡喃基、吡咯基、异噻唑基、吲哚基、喹啉基、噻吩基、1,3-苯并二氧戊环基、噻二唑基、哌嗪基、噻唑烷基、吡咯烷基、4-硫代吗啉基、吡咯啉基、高哌嗪基、3,5-二氧杂哌啶基、四氢吡喃基、咪唑基、嘧啶基、吡嗪基、哒嗪基、异噁唑基、*N*-甲基吡咯基、4-吡啶酮、1-异喹诺酮、2-吡咯烷酮、4-噻唑烷酮、吡啶-*N*-氧化物和喹啉-*N*-氧化物。优选“杂环基”为饱和、部分饱和或不饱和的、含有 5 或 6 个原子的单或双环，其中至少一个原子选自氮、硫或氧，所述杂环可为(除非另有声明)碳或氮连接，其中 -CH₂- 基团可任选被 -C(O)- 置换，并且环上的硫原子可任选被氧化形成 *S*-氧化物。更优选“杂环基”为四氢呋喃基、吡啶基、吡咯烷酮基、4-吗啉基、咪唑基、哌啶基或吡咯烷基。

“C₁₋₆ 烷酰氧基”的例子为乙酰氧基。“C₁₋₆ 烷氧基羰基”的例子包括 C₁₋₄ 烷氧基羰基、甲氧基羰基、乙氧基羰基、正丁氧基羰基和叔丁氧基羰基。“C₁₋₆ 烷氧基”的例子包括甲氧基、乙氧基和丙氧基。

“C₁₋₆ 烷酰氨基”的例子包括甲酰胺基、乙酰胺基和丙酰胺基。“C₁₋₆ 烷基 S(O)_a，其中 a 为 0-2”的例子包括 C₁₋₄ 烷基磺酰基、甲硫基、乙硫基、甲基亚磺酰基、乙基亚磺酰基、甲磺酰基和乙磺酰基。“C₁₋₆ 烷基 S(O)_r，其中 r 为 1-2”的例子包括甲基亚磺酰基、乙基亚磺酰基、甲磺酰基和乙磺酰基。“C₁₋₆ 烷酰基”的例子包括 C₁₋₄ 烷酰基、丙酰基和乙酰基。“*N*-C₁₋₆ 烷基氨基”的例子包括甲氨基和乙氨基。“*N,N*-(C₁₋₆ 烷基)₂ 氨基”的例子包括二-*N*-甲氨基、二-(*N*-乙基)氨基和 *N*-乙基-*N*-甲氨基。“C₂₋₆ 链烯基”的例子有乙烯基、烯丙基和 1-丙稀基。“C₂₋₆ 炔基”的例子有乙炔基、1-丙炔基和 2-丙炔基。“*N*-(C₁₋₆ 烷基)氨基磺酰基”的例子有 *N*-(甲基)氨基磺酰基和 *N*-(乙基)氨基磺酰基。“*N*-(C₁₋₆ 烷基)₂ 氨基磺酰基”的例子有 *N,N*-(二甲基)氨基磺酰基和 *N*-(甲基)-*N*-(乙基)氨基磺酰基。“*N*-(C₁₋₆ 烷基)氨基甲酰基”的例子有 *N*-(C₁₋₄ 烷基)氨基甲酰基、甲氨基羰基和乙氨基羰基。“*N,N*-(C₁₋₆ 烷基)₂ 氨基甲酰基”的

例子有 N,N -(C_{1-4} 烷基)₂ 氨基甲酰基、二甲氨基羰基和甲基乙基氨基羰基。“ C_{3-8} 环烷基”的例子有环丙基、环丁基、环丙基和环己基。“(杂环基) C_{1-6} 烷基”的例子包括吡啶基甲基、3-吗啉代丙基和 2-嘧啶-2-基乙基。“ C_{3-8} 环烷基 C_{1-6} 烷基”的例子有环丙基乙基、环丁基甲基、
5 2-环丙基丙基和环己基乙基。

本发明化合物的适合的药学上可接受盐为如具有足够碱性的本发明化合物的酸加成盐，例如与如无机或有机酸的酸加成盐，其中酸的例子如氢氟酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、三氟乙酸、柠檬酸或马来酸。另外，本发明的足够酸性的化合物的适合的药学上可接受盐
10 是碱金属盐(例如钠或钾盐)，碱土金属盐(例如钙或镁盐)，铵盐或与能提供生理上可接受的阳离子的有机碱的盐，例如与甲胺、二甲胺、三甲胺、哌啶、吗啉或三-(2-羟乙基)胺形成的盐。

式(I)的化合物可以以在人或动物体内分解得到式(I)化合物的前体药物的形式给药。前体药物的例子包括式(I)化合物的体内可水解的酯。
15

含有羧基或羟基的式(I)化合物的体内可水解的酯是例如药学上可接受的酯，该酯在人或动物体内水解生成母体酸或醇。适合于羧基的药学上可接受的酯包括 C_{1-6} 烷氧基甲酯，例如甲氧基甲基； C_{1-6} 烷酰氧基甲酯，例如新戊酰氧基甲酯，2-苯并[c]呋喃酮基酯； C_{3-8} 环
20 烷氧基羰基氧基 C_{1-6} 烷基酯，例如 1-环己基羰基氧基乙酯；1,3-dioxolen-2-onyl 甲酯，例如 5-甲基-1,3-dioxolen-2-onyl 甲酯；和 C_{1-6} 烷氧基羰基氧基乙酯，例如 1-甲氧基羰基氧基乙酯；这些酯可以在本发明化合物中的任何羧基上形成。

含有羟基的式(I)化合物的体内可水解的酯包括无机酯例如磷酸
25 酯、 α -酰氧基烷基醚和有关的化合物，该化合物为体内酯水解得到母体羟基的产物。 α -酰氧基烷基醚的例子包括乙酰氧基甲氧基和 2,2-二甲基丙酰氧基-甲氧基。对于体内可水解的酯的羟基形成基团的选择包括烷酰基、苯甲酰基、苯乙酰基和取代的苯甲酰基和苯乙酰、烷

氧基羰基(提供碳酸烷基酯)、二烷基氨基甲酰基和 *N*-(二烷基氨基乙基)-*N*-烷基氨基甲酰基(提供氨基甲酸酯)、二烷基氨基乙酰基和羧基乙酰基。在苯甲酰基上的取代基的例子包括 4-吗啉基和哌嗪基(piperazino), 它们通过亚甲基从环上的氮原子连接到苯甲酰基环的 3-或 4-位上。

一些式(I)的化合物可具有手性中心和/或几何异构体中心(E-和 Z-异构体), 应理解本发明包括所有这些具有 CDK 抑制活性的旋光的、非对映异构体和几何异构体。

本发明涉及具有 CDK 抑制活性的式(I)的化合物的任何和所有的互变异构体形式。

应理解一些式(I)的化合物可以以溶剂化以及非溶剂化形式存在, 例如以水合形式存在。应理解本发明包括所有这些具有 CDK 抑制活性的溶剂化形式。

优选的 R^1 、 R^2 、 p 和 q 如下。可在前述或以下描述的任何定义、权利要求书或实施方案的适当地方使用这些值。

优选 R^1 为卤基或 C_{1-2} 烷基;

更优选 R^1 为氟基、氯基或甲基,

特别是 R^1 为氟基或氯基,

更特别是 R^1 为氯基。

优选 R^1 是式(I)的苯胺的氨基的间位或对位基团,

更优选 R^1 与式(I)的苯胺的氨基相间;

优选 P 为 0-2, 其中 R^1 可相同或不同,

更优选 P 为 0 或 1,

在本发明的一个方面优选 P 为 0,

在本发明的另一个方面优选 P 为 1,

在本发明的还有一个方面优选 P 为 2, 其中 R^1 可以相同或不同;

优选 R^2 为氨磺酰基或 B-E-基团, 其中

B 选自 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 链烯基、 C_{3-8} 环烷基、 C_{3-8} 环烷基 C_{1-6} 烷基、

苯基C₁₋₆烷基或(杂环基)C₁₋₆烷基, 其中所述C₁₋₆烷基、C₂₋₆链烯基、C₃₋₈环烷基、C₃₋₈环烷基C₁₋₆烷基、苯基C₁₋₆烷基或(杂环基)C₁₋₆烷基任选在碳上被一个或多个D取代, 并且其中如果所述杂环基含有-NH-部分, 则氮可任选被选自G的基团取代;

5 E为-N(R^a)SO₂-; 其中R^a为氢;

D独立选自卤基、羟基、C₁₋₆烷氧基或N-(C₁₋₆烷基)氨基、N,N-(C₁₋₆烷基)₂氨基; 和

G为C₁₋₄烷基。

更优选R²为氨磺酰基或B-E-基团, 其中

10 B任选被D取代, 并选自乙基、丙基、戊基、烯丙基、环丙基、环丁基、环丙基甲基、苄基、苯乙基、四氢呋喃基甲基、吡啶基乙基、吡咯烷酮基丙基、吗啉代丙基、咪唑基丙基、哌啶基乙基、吡咯烷基乙基(任选环上的氮原子被甲基取代),

E为-NHSO₂-;

15 D独立选自氟基、羟基、甲氧基、乙氧基、异丙氧基、异丙基氨基和二甲氨基。

特别是R²选自氨磺酰基、N-(环丙基甲基)氨磺酰基、N-(四氢呋喃-2-基甲基)氨磺酰基、N-(2-甲氧基乙基)氨磺酰基、N-(2-吡啶-2-基乙基)氨磺酰基、N-(2-哌啶-1-基乙基)氨磺酰基、N-[2-(1-甲基吡咯烷-2-基)乙基]氨磺酰基、N-(2-异丙基氨基乙基)氨磺酰基、N-(2,2,2-三氟乙基)氨磺酰基、N-(3-甲氧基丙基)氨磺酰基、N-(3-乙氧基丙基)氨磺酰基、N-(3-异丙氧基丙基)氨磺酰基、N-(3-二甲氨基丙基)氨磺酰基、N-[3-(2-氧代吡咯烷-1-基)丙基]氨磺酰基、N-(3-吗啉代丙基)氨磺酰基、N-(3-咪唑-1-基丙基)氨磺酰基、N-(3-异丙基氨基丙基)氨磺酰基、N-(丙基)氨磺酰基、N-(戊基)氨磺酰基、N-(烯丙基)氨磺酰基、N-(环丙基)氨磺酰基、N-(环丁基)氨磺酰基、N-(3-甲氧基苄基)氨磺酰基、N-(4-氟苄基)氨磺酰基、N-(苯乙基)氨磺酰基、N-(4-羟基苯乙基)氨磺酰基和N-(4-甲氧基苯乙基)氨磺酰基。

20

25

在本发明的另一方面，优选 R^2 为氨磺酰基或 B-E-基团；其中

B 选自 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 链烯基、 C_{3-8} 环烷基、 C_{3-8} 环烷基 C_{1-6} 烷基、
 苯基 C_{1-6} 烷基或(杂环基) C_{1-6} 烷基，其中所述 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 链烯基、 C_{3-8}
 环烷基、 C_{3-8} 环烷基 C_{1-6} 烷基、苯基 C_{1-6} 烷基或(杂环基) C_{1-6} 烷基任选在
 5 碳上被一个或多个 D 取代；并且其中如果所述杂环基含有 -NH- 部分，
 则氮可任选被选自 G 的基团取代；

E 为 -N(R^a)SO₂- 或 -N(R^a)C(O)-；其中 R^a 为氢；

D 独立选自卤基、羟基、 C_{1-6} 烷氧基或 *N*-(C_{1-6} 烷基)氨基、*N,N*-(C_{1-6}
 烷基)₂氨基；和

10 G 为 C_{1-4} 烷基。

在本发明的另一方面，更优选 R^2 为氨磺酰基或 B-E-基团，其中

B 任选被 D 取代，并选自乙基、丙基、戊基、2,2-二甲基丙基、
 烯丙基、环丙基、环丁基、环丙基甲基、苄基、苯乙基、四氢呋喃
 基甲基、吡啶基乙基、吡咯烷酮基丙基、吗啉代丙基、咪唑基丙基、
 15 哌啶基乙基、吡咯烷基乙基(任选环上的氮原子被甲基取代)，

E 为 -NH SO₂- 或 -N(R^a)C(O)-；

D 独立选自氟基、羟基、甲氧基、乙氧基、异丙氧基、异丙基
 氨基和二甲氨基。

在本发明的另一方面， R^2 特别选自氨磺酰基、*N*-(环丙基甲基)氨
 磺酰基、*N*-(四氢呋喃-2-基甲基)氨磺酰基、*N*-(2-甲氧基乙基)氨磺酰
 20 基、*N*-(2-吡啶-2-基乙基)氨磺酰基、*N*-(2-哌啶-1-基乙基)氨磺酰基、
N-[2-(1-甲基吡咯烷-2-基)乙基]氨磺酰基、*N*-(2-异丙基氨基乙基)氨磺
 酰基、*N*-(2,2,2-三氟乙基)氨磺酰基、*N*-(2-二甲氨基乙基)氨磺酰基、
N-(3-甲氧基丙基)氨磺酰基、*N*-(3-乙氧基丙基)氨磺酰基、*N*-(3-异丙
 25 氧基丙基)氨磺酰基、*N*-(3-二甲氨基丙基)氨磺酰基、*N*-[3-(2-氧代吡
 咯烷-1-基)丙基]氨磺酰基、*N*-(3-吗啉代丙基)氨磺酰基、*N*-(3-咪唑-1-
 基丙基)氨磺酰基、*N*-(3-异丙基氨基丙基)氨磺酰基、*N*-(丙基)氨磺酰
 基、*N*-(3-羟基-2,2-二甲基丙基)氨磺酰基、*N*-(戊基)氨磺酰基、*N*-(烯

丙基)氨磺酰基、*N*-(环丙基)氨磺酰基、*N*-(环丁基)氨磺酰基、*N*-(3-甲氧基苄基)氨磺酰基、*N*-(4-氟苄基)氨磺酰基、*N*-(苄乙基)氨磺酰基、*N*-(4-羟基苄乙基)氨磺酰基、*N*-(4-甲氧基苄乙基)氨磺酰基和 *N*-(3-咪唑-1-基丙基)氨基甲酰基。

5 优选 R^2 是式(I)的苯胺的氨基间位或对位基团,

更优选 R^2 与式(I)的苯胺的氨基相对;

优选E为-NHSO₂-。

在本发明的另一方面, 优选E为-NHSO₂-或-N(R^a)C(O)-;

优选q为0或1。

10 在本发明的一方面, 优选q为0;

在本发明的另一方面, 优选q为1。

在本发明的还有一方面, 优选q为2; 其中 R^2 可相同或不同。

优选 $p + q = 1$ 或2;

更优选 $p + q = 1$ 。

15 因此本发明的一个方面提供了如上所述的式(I)的化合物, 其中:

R^1 为卤基或 C₁₋₂ 烷基;

P 为 0-2, 其中 R^1 可相同或不同;

R^2 为氨磺酰基或B-E-基团, 其中

20 B选自C₁₋₆烷基、C₂₋₆链烯基、C₃₋₈环烷基、C₃₋₈环烷基C₁₋₆烷基、苯基C₁₋₆烷基或(杂环基)C₁₋₆烷基, 其中所述C₁₋₆烷基、C₂₋₆链烯基、C₃₋₈环烷基、C₃₋₈环烷基C₁₋₆烷基、苯基C₁₋₆烷基或(杂环基)C₁₋₆烷基任选在碳上被一个或多个D取代, 并且其中如果所述杂环基含有-NH-部分, 则氮可任选被选自G的基团取代;

E为-N(R^a)SO₂-; 其中R^a为氢;

25 D独立选自卤基、羟基、C₁₋₆烷氧基或*N*-(C₁₋₆烷基)氨基、*N,N*-(C₁₋₆烷基)₂氨基; 和

G为C₁₋₄烷基; 和

q为0或1; 并且 $p + q = 1$ 或2;

或其药学上可接受的盐或其体内可水解的酯。

因此本发明还有一方面提供了如上所述的式(I)的化合物, 其中:

R^1 为氟基、氯基或甲基;

P 为 0 或 1;

5 R^2 为氨磺酰基或B-E-基团, 其中

B任选被D取代, 并选自乙基、丙基、戊基、烯丙基、环丙基、环丁基、环丙基甲基、苄基、苯乙基、四氢呋喃基甲基、吡啶基乙基、吡咯烷酮基丙基、吗啉代丙基、咪唑基丙基、哌啶基乙基、吡咯烷基乙基(任选环上的氮原子被甲基取代),

10 E为-NHSO₂-;

D独立选自氟基、羟基、甲氧基、乙氧基、异丙氧基、异丙基氨基和二甲氨基; 和

q为0或1; 并且p + q = 1或2;

或其药学上可接受的盐或其体内可水解的酯。

15 因此本发明再一方面提供了如上所述的式(I)的化合物, 其中:

P 为 0;

R^2 选自氨磺酰基、N-(环丙基甲基)氨磺酰基、N-(四氢呋喃-2-基甲基)氨磺酰基、N-(2-甲氧基乙基)氨磺酰基、N-(2-吡啶-2-基乙基)氨磺酰基、N-(2-哌啶-1-基乙基)氨磺酰基、N-[2-(1-甲基吡咯烷-2-基)乙基]氨磺酰基、N-(2-异丙基氨基乙基)氨磺酰基、N-(2,2,2-三氟乙基)氨磺酰基、N-(3-甲氧基丙基)氨磺酰基、N-(3-乙氧基丙基)氨磺酰基、N-(3-异丙氧基丙基)氨磺酰基、N-(3-二甲氨基丙基)氨磺酰基、N-[3-(2-氧代吡咯烷-1-基)丙基]氨磺酰基、N-(3-吗啉代丙基)氨磺酰基、N-(3-咪唑-1-基丙基)氨磺酰基、N-(3-异丙基氨基丙基)氨磺酰基、N-(丙基)氨磺酰基、N-(戊基)氨磺酰基、N-(烯丙基)氨磺酰基、N-(环丙基)氨磺酰基、N-(环丁基)氨磺酰基、N-(3-甲氧基苄基)氨磺酰基、N-(4-氟苄基)氨磺酰基、N-(苄乙基)氨磺酰基、N-(4-羟基苄乙基)氨磺酰基和N-(4-甲氧基苄乙基)氨磺酰基; 和

20

25

q为1;

或其药学上可接受的盐或其体内可水解的酯。

在本发明的另一方面，本发明优选的化合物为实施例 1-27 中的任一种产物或其药学上可接受的盐或其体内可水解的酯。

5 在本发明的另一方面，本发明优选的化合物为实施例 1-31 中的任一种产物或其药学上可接受的盐或其体内可水解的酯。

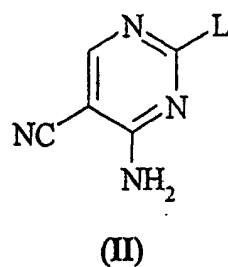
在本发明其它方面，优选的式(I)的化合物有：

4-氨基-5-氟基-2-{4-[N-(2-甲氧基乙基)氨磺酰基]苯胺基}嘧啶、
4-氨基-5-氟基-2-{4-[N-(四氢呋喃-2-基甲基)氨磺酰基]苯胺基}嘧啶、
10 4-氨基-5-氟基-2-{4-[N-(4-氟苄基)氨磺酰基]苯胺基}嘧啶、
4-氨基-5-氟基-2-{4-[N-(3-甲氧基丙基)氨磺酰基]苯胺基}嘧啶、
4-氨基-5-氟基-2-{4-[N-(环丙基)氨磺酰基]苯胺基}嘧啶、
4-氨基-5-氟基-2-[4-(N-烯丙基氨磺酰基)苯胺基]嘧啶、
4-氨基-5-氟基-2-[4-(N-丙基氨磺酰基)苯胺基]嘧啶、
15 4-氨基-5-氟基-2-{4-[N-(2-异丙基氨基乙基)氨磺酰基]苯胺基}嘧啶、
4-氨基-5-氟基-2-{4-[N-(3-异丙基氨基丙基)氨磺酰基]苯胺基}嘧啶、
和
4-氨基-5-氟基-2-{4-[N-(2-哌啶子基乙基)氨磺酰基]苯胺基}嘧啶；
或其药学上可接受的盐或其体内可水解的酯。

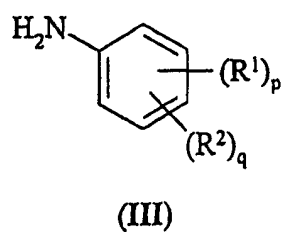
20 本发明的优先方面涉及式(I)的化合物或其药学上可接受盐。

本发明的另一方面提供了一种制备式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或其体内可水解的酯的方法，所述方法包括(其中 R^1 、 R^2 、 p 和 q 如在式(I)中的定义，另有声明除外)：

a) 使式(II)的嘧啶:

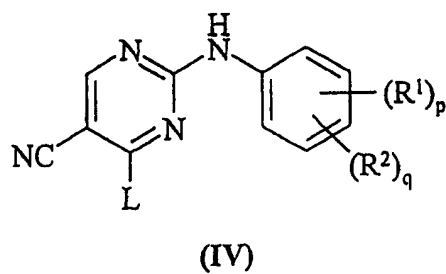


式中 L 为可置换的基团, 与式(III)的苯胺反应:



5

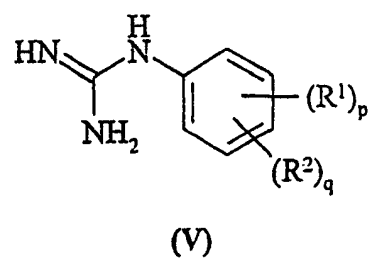
b) 使式(IV)的嘧啶:



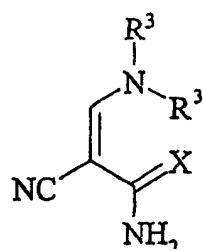
式中 L 为可置换的基团, 与氨反应; 或

10

c) 使式(V)的化合物:



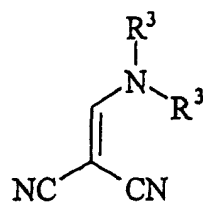
与式(VI)的化合物反应:



(VI)

式中 X 为 O 或 S; R³ 为 C₁₋₆ 烷基;

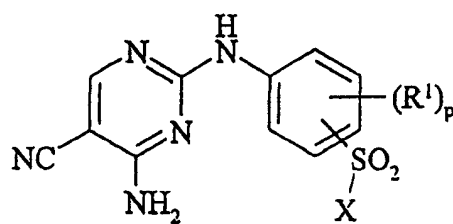
d) 使式(V)的化合物与式(VII)的化合物反应:



(VII)

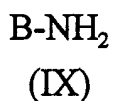
5

e) 其中 R² 为氨磺酰基或 B-E-基团, 并且 E 为 -NHSO₂-; 使式(VIII)的嘧啶:



(VIII)

式中 X 为可置换的基团, 与式(IX)的胺反应:



(IX)

10

并且随后如果需要:

i) 将式(I)的化合物转化成另一种式(I)的化合物;

ii) 除去任何保护基团;

iii) 形成药学上可接受的盐或在体内可水解的酯。

L 是可置换的基团, 对于 L 适合的例子有卤素或磺酰氧基, 例如氟基、溴基、甲磺酰氧基或甲苯-4-磺酰氧基。

5 X 是可置换的基团, 对于 L 适合的例子有卤素, 例如氟基、氯基或溴基。优选 X 为氟基。

上述反应的具体反应条件如下。

a)和 b) 可将式(II)的嘧啶、式(III)的苯胺、式(IV)的嘧啶和氨一起在以下条件下反应:

10 i) 在适合的溶剂, 如酮(如丙酮)或醇(如乙醇或丁醇)或芳烃(如甲苯或 *N*-甲基吡咯烷)存在下, 任选在适合的酸, 如无机酸(如盐酸或硫酸)或者有机酸(如乙酸或甲酸, 或适合的路易斯酸)存在下, 在 0℃ 至回流的温度, 优选回流的温度下; 或

15 ii) 在标准 Buchwald 条件下(例如参见 *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 7215; *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 8451; *J. Org. Chem.*, **62**, 1568 和 6066), 例如在乙酸钨存在下, 在合适的溶剂例如芳族溶剂例如甲苯、苯或二甲苯中, 采用合适的碱例如无机碱例如碳酸铯或有机碱例如叔-丁醇钾, 在合适的配体例如 2,2'-双(二苯基膦基)-1,1'-联萘存在下, 并在 25-80℃ 的温度范围内。

20 式(II)和(IV)的嘧啶和式(III)的苯胺是商业可得的化合物, 或它们在文献中是已知的, 或它们可通过本领域已知的标准方法制备。

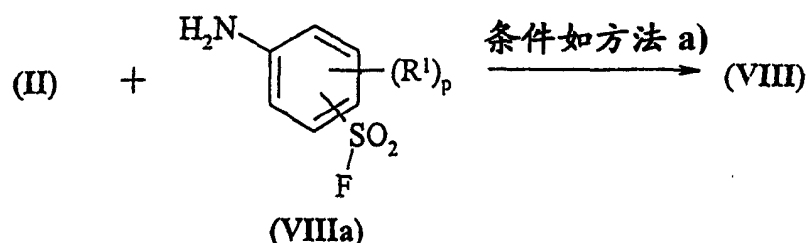
c)和 d) 在适合的溶剂如 *N*-甲基吡咯烷酮或丁醇中, 在 100-200℃、优选 150-170℃ 的温度下, 使式(V)的化合物和式(VI)或式(VII)的化合物一起反应。该反应优选在适合的碱, 例如甲醇钠或碳酸钾存在下实施。

25 式(V)和(VI)的化合物是商业可得的化合物, 或它们在文献中是已知的, 或它们可通过本领域已知的标准方法制备。

e) 可在碱, 如无机碱如碳酸铯存在下, 在惰性溶剂如甲苯或四

氢吡喃的存在下，或在有机碱如过量的(IX)存在下，在 25-80℃ 的温度下使式(VIII)的化合物和式(IX)的化合物反应。

式(VIII)的化合物(其中 X 为氟基)可根据以下方案制备：



5 式(VIIIa)和(IX)的化合物是商业可得的化合物，或它们在文献中是已知的，或它们可通过本领域已知的标准方法制备。

应理解在本发明化合物中，一些不同的环取代基可通过标准芳族取代反应导入，或在以上所提到的方法之前或紧跟其后通过常规官能基团改性产生，这些方法包括在本发明范围内。这些反应和改
10 性包括，例如通过芳族取代反应的取代基的导入、取代基的还原、取代基的烷基化和取代基的氧化。这些方法的试剂和反应条件是化学领域中众所周知的。芳族取代反应的具体例子包括使用浓硝酸导入硝基；使用例如酰卤和路易斯酸(例如三氯化铝)在 Friedel Crafts 条件下的酰基的导入；用烷基卤和路易斯酸(例如三氯化铝)在 Friedel
15 Crafts 条件下的烷基的导入；和卤素基团的导入。改性的具体例子包括通过例如用镍催化剂的催化氢化反应或在盐酸存在下并同时在加热下用铁处理，将硝基还原为氨基；将烷硫基氧化为烷基亚硫酰基或烷基磺酰基。

还应理解，在本文所提到的一些反应中，保护化合物中任何敏感
20 的基团是必需/所要求的。必需或所要求保护的情况和适合的保护方法是本领域技术人员已知的。可根据标准操作规程使用常规的保护基团(为了说明，可参见 T.W. Green, Protective Groups in Organic Synthesis(有机合成中的基团保护), John Wiley and Sons, 1991)。因此，如果反应物包括基团例如氨基、羧基或羟基，在本文所提到的一些

反应中就需要保护这些基团。

对于氨基或烷基氨基的适合的保护基是例如酰基(例如烷基酰基, 如乙酰基), 烷氧基羰基(例如甲氧基羰基、乙氧基羰基或叔-丁氧基羰基)、芳基甲氧基羰基(例如苄氧基羰基), 或芳酰基(例如苯甲酰基)。

5 对于以上保护基团的脱保护条件必须根据所选择的保护基团而定。因此, 例如, 酰基(如烷基酰基或烷氧基羰基或芳酰基)可以例如通过用与适合的碱如碱金属氢氧化物(例如氢氧化锂或钠)水解除去。另外, 酰基(例如叔-丁氧基羰基)可以例如通过用适合的酸如盐酸、硫酸或磷酸或三氟乙酸处理除去, 芳基甲氧基羰基(例如苄基氧基羰基)可以
10 例如通过经催化剂如载于碳上的钨氢化除去, 或通过用路易斯酸例如三(三氟乙酸)硼处理除去。对于伯氨基适合的作为选择的保护基团是例如邻苯二甲酰基, 该基团可以用烷基胺例如二甲氨基丙胺或用肼处理除去。

对于羟基适合的保护基团是例如酰基例如烷基酰基(如乙酰基), 芳
15 酰基例如苯甲酰基或芳基甲基(例如苄基)。对于以上保护基团的脱保护条件必需根据所选择的保护基而改变。因此, 例如酰基如烷基酰基或芳酰基可以例如通过用适合的碱例如碱金属氢氧化物(如氢氧化锂或钠)水解除去。或者, 芳基甲基例如苄基可通过经催化剂例如载于碳上的钨的氢化除去。

20 对于羧基适合的保护基团是例如酯化基团, 例如甲基或乙基, 这些基团可以通过用碱例如氢氧化钠水解除去; 或例如叔-丁基, 该基团可以通过用酸例如有机酸如三氟乙酸处理除去; 或例如苄基, 该基团可以例如通过催化剂例如载于碳上的钨的氢化除去。

25 所述保护基团可以在合成的任何方便的阶段, 用化学领域众所周知的常规技术除去。

如上文所述, 本发明中定义的化合物具有抗细胞增殖活性, 例如抗癌活性, 确信该活性是由于该化合物的 CDK 抑制活性导致的。这些特性可以例如用以下所示方法评估:

测定

使用以下简称:

HEPES 是 *N*-[(2-羟乙基)哌嗪-*N'*-(2-乙磺酸)]

DTT 是二硫苏糖醇

5 PMSF 是苯基甲基磺酰氟

在 96 孔板中, 采用用于测定[γ -33-P]-腺苷三磷酸结合进入试验底物(GST-成视网膜细胞瘤蛋白; GST-Rb)的闪烁亲近测定法(SPA-由 Amersham 获得), 在体外激酶测试中检验所述化合物。在每一孔中放置待测试的化合物(在 DMSO 和水中稀释到适合的浓度), 并在对照孔中放置作为抑制剂对照的 roscovitine 或放置作为阳性对照的 DMSO。

将在 25 μ l 温育缓冲液中稀释的大约 0.2 μ l 的 CDK2/细胞周期蛋白 E 部分纯化的酶(其量根据酶的活性而定)加入到每个孔中, 然后加入 20 μ l 的 GST-Rb/ATP/ATP33 的混合物(含有 0.5 μ g GST-Rb 和 0.2 μ M ATP 和 0.14 μ Ci[γ -33-P]-腺苷三磷酸的温育缓冲液), 将得到的混合物轻轻振荡, 然后在室温下温育 60 分钟。

然后向每一孔中加入 150 μ l 含有 20pM/孔抗-谷胱甘肽转移酶, 兔 IgG (从 Molecular Probes 获得)、61 mM EDTA 和含有 0.05 %叠氮化钠的 50 mM HEPES pH 7.5 的终止溶液(0.8mg/孔蛋白 A-PVT SPA 珠粒(Amersham))。

用 Topseal-S 平板密封物将所述板密封, 放置 2 小时, 然后以 2500rpm、1124 xg 的速度旋转 5 分钟。在 Topcount 上对该平板的每孔读数 30 秒。

用于稀释酶和底物混合物的温育缓冲液含有 50mM HEPES pH 7.5、10mM MnCl₂、1mM DTT、100 μ M 钒酸钠、100 μ M NaF、10mM 甘油磷酸钠、BSA(终浓度为 1mg/ml)。

测试底物

在所述测定中，只使用与 GST 标记物融合的部分成视网膜细胞瘤蛋白(Science 1987 年 3 月 13 日; 235(4794): 1394-1399; Lee W. H., Bookstein R., Hong F., Young L. J., Shew J.Y., Lee E.Y.). 进行成视网膜细胞瘤基因编码的氨基酸 379-928 (由成视网膜细胞瘤质粒 ATCC pLRbRNL 获得)的 PCR，并将该序列克隆进入 pGEX 2T 融合载体中 (Smith D.B.和 Johnson, K.S. Gene 67, 31(1988); 其含有用于诱导型表达的 tac 启动子，用于任何大肠杆菌宿主中使用的内 lac I^s 基因和用于扩增氨基酸 792-928 的凝血酶裂解的编码区(由 Pharmacia Biotech 得到)。将该序列再克隆进入 pGEX 2T 中。

用标准诱导型表达技术将如此得到的成视网膜细胞瘤 792-928 序列表达到大肠杆菌(BL 21 (DE3) pLysS 细胞)中，并进行如下的纯化。

将大肠杆菌糊状物再悬浮在 10 ml/g 的 NETN 缓冲液(50 mM Tris pH 7.5, 120 mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5 % v/v NP-40, 1mM PMSF, 1µg/ml 亮抑酶肽, 1µg/ml 抑酶肽和 1µl/ml 抑胃酶肽)中，并对每 100 ml 匀浆超声处理 2 x 45 秒。离心后，将上层清液上样到 10 ml 谷胱甘肽琼脂糖柱(Pharmacia Biotech, Herts, UK)中，并用 NETN 缓冲液洗涤。用激酶缓冲液(50 mM HEPES pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1mM DTT, 1mM PMSF, 1µg/ml 亮抑酶肽, 1µg/ml 抑酶肽和 1µl/ml 抑胃酶肽)洗涤后，将该蛋白用 50mM 溶于激酶缓冲液中的还原谷胱甘肽洗脱。收集含有 GST-Rb(792-927)的流分，并向激酶缓冲液中透析过夜。通过十二烷基硫酸钠(SDS) PAGE (聚丙烯酰胺凝胶)，用 8-16 % Tris-甘氨酸凝胶(Novex, San Diego, USA)分析最终产物。

CDK2 和细胞周期蛋白 E

通过使用海拉细胞和活化的 T 细胞 mRNA 作为模板逆转录 PCR 离析 CDK2 和细胞周期蛋白 E 的可读框，并克隆到昆虫表达载体

pVL1393 (由 Invitrogen 1995 目录号: V1392-20 得到)中。然后将 CDK2 和细胞周期蛋白 E 二重表达[用标准病毒 Baculogold 共感染技术]进入昆虫 SF21 细胞体系(从 Fall Army Worm 卵巢组织中衍生的秋粘虫细胞, 可购买得到)。

5

产生细胞周期蛋白 E/CDK2 的实例

以下实例提供在对于细胞周期蛋白 E 和 CDK2 的每一种病毒已二重感染 MOI 3 的 SF21 细胞(在 TC100 + 10% FBS(TCS) + 0.2% Pluronic 中)中产生细胞周期蛋白 E/CDK2 的细节。

10 使用在滚瓶培养中生长至 2.33×10^6 细胞/ml 的 SF21 细胞, 以 0.2×10^6 细胞/ml 接种到 10×500 ml 滚瓶中。将该滚瓶在 28℃ 下的滚动设备上温育。

3 天(72 小时)后, 将细胞计数, 并得测得两瓶的平均数是 1.86×10^6 细胞/ml(99%成活率)。然后以每种病毒一个 MOI 3 的量, 将培养物用二重病毒感染。

15 将病毒混合在一起, 然后加入到培养物中, 并将培养物放回到 28℃ 的滚动设备上。

两天(48 小时)后, 收获 5 升感染后的培养物。收获的总细胞计数是 1.58×10^6 细胞/ml(99%成活率)。将细胞以每批 250ml 的 Heraeus Omnifuge 2.0RS, 在 4℃ 下, 以 2500 rpm 旋转 30 分钟。将上清液弃去。

20

Cdk2 和细胞周期蛋白 E 的部分共纯化

25 通过将 Sf21 细胞重新悬浮于溶胞缓冲液(50 mM Tris pH 8.2、10mM 氯化镁、1mM DTT、10mM 磷酸甘油酯、0.1mM 原钒酸钠、0.1 mM 氟化钠、0.1 mM PMSF、1μg/ml 亮抑酶肽和 1μg/ml 抑蛋白酶肽)中, 并在 10ml Dounce 匀化器中匀化 2 分钟。离心后, 将上层清液上样到 Poros HQ/M 1.4/100 阴离子交换柱(PE Biosystems, Hertford, UK)

上。以 0-1M NaCl 梯度(在溶胞缓冲液负型蛋白酶抑制剂中进行)开始, 用 20 倍柱体积量, 将 CDK2 和细胞周期蛋白 E 共同洗脱。使用同时抗 CDK2 和抗细胞周期蛋白 E 的抗体(Santa Cruz Biotechnology, California, US), 通过蛋白质印迹来检测共同洗脱情况。

5 通过上述类似方法, 可设计用于评价 CDK4 和 CDK6 抑制作用的测定方法。CDK2(EMBL 登记号: X62071)可与细胞周期蛋白 A 或细胞周期蛋白 E(参见 EMBL 登记号: M73812)一起使用, 并且在 PCT 国际公布号 WO 99/21845 有关生物化学和生物学评价部分中进一步详细描述了这些测定方法, 该文献通过引用结合到本文中来。

10 虽然式(I)化合物的药理特性随结构改变而变化, 但通常在 IC_{50} 浓度或在 250 μ M 至 1nM 剂量范围内可证明式(I)化合物所具有的活性。

当在以上体外测定中检测时, 测定实施例 21 的 CDK2 抑制活性为 $IC_{50}=0.033\mu$ M, 实施例 23 的活性为 $IC_{50}=0.017\mu$ M。

15 可通过标准技术, 例如通过测量细胞生长抑制作用和评估细胞毒性, 评估本发明的化合物的体内活性。

细胞生长的抑制作用可通过用 Sulforhodamine B(SRB)染色细胞测量, 该荧光染料可使蛋白染色, 因此得到孔中蛋白(即细胞)的估测量(参见 Boyd, M.R. (1989) NCI 临床前抗肿瘤药发明筛选的状况, Prin. Prac Oncol 10:1-12)。因此, 以下提供细胞生长抑制作用测量方法的细节:

20

将细胞涂覆在 96 孔板中 100ml 容量的适合的培养基中; 所述培养基是用于 MCF-7、SK-UT-1B 和 SK-UT-1 的 Dulbecco's Modified Eagle 培养基。将细胞附着过夜, 然后加入以不同浓度溶于最大浓度为 1% DMSO (v/v(体积比))中的抑制剂化合物。测定对照板得到给药前细胞的数值。将细胞在 37 $^{\circ}$ C 温度下、(5% CO_2)温育三天。

25

三天以后, 将 TCA 加入到所述板中, 使最后浓度为 16%(v/v)。然后将所述板在 4 $^{\circ}$ C 下温育 1 小时, 弃去上清液并在自来水中洗涤所

述板。干燥后,用30分钟在37℃下加入100ml SRB染料(0.4% SRB在1%乙酸中的溶液)。除去过量的SRB并用1%乙酸洗涤所述板。将结合蛋白的SRB溶解到10 mM Tris pH 7.5中,并在室温下振荡30分钟。在540nm处读OD,并从抑制剂浓度与吸光度的半对数曲线中测定引起50%生长抑制作用的抑制剂浓度。降低所述光密度到低于实验开始涂覆细胞时得到的光密度的化合物浓度给出毒性值。

当试验进行SRB测定时,本发明化合物的典型 IC_{50} 值在1mM至1nM范围内。

本发明另一方面提供含有如上文所定义的式(I)的嘧啶衍生物,或其药学上可接受的盐或其体内可水解的酯,并结合药学上可接受的稀释剂或载体的药物组合物。

所述组合物可以是适合用于口服给药的形式,例如片剂或胶囊,用于胃肠外注射(包括静脉内、皮下、肌肉、血管内或输注)的无菌溶液、悬浮液或乳液,用于局部给药的软膏或乳膏,或用于直肠给药的栓剂。

一般来说,以上组合物可以通过常规方法用常规赋形剂制备。

通常将式(I)的化合物以每平方米动物体表面积5-5000mg,即大约0.1-100 mg/kg范围内的单位剂量形式给予温血动物,此为通常提供的治疗有效剂量。单位剂量形式例如片剂或胶囊通常含有例如1-250 mg活性成分。优选日剂量在1-50 mg/kg范围内。然而日剂量必需根据所治疗宿主的情况、特定的给药途径和所治疗疾病的严重程度而变化。因此可由治疗任何具体病人的医师来决定最佳剂量。

本发明的又一方面提供如上所定义的式(I)的化合物,或其药学上可接受的盐或其体内可水解的酯,通过疗法在人或动物治疗方法中的用途。

我们已发现本发明所定义的化合物,或其药学上可接受的盐或其体内可水解的酯是有效的细胞周期抑制剂(抗细胞增殖剂),确信其特性是由它们的CDK抑制特性所致。因此,期望本发明的化合物可

用于治疗通过 CDK 酶单独或部分介导的疾病或症状,即可用所述化合物在需要这种治疗的温血动物中产生 CDK 抑制效果。因此,本发明的化合物提供以 CDK 酶的抑制作用为特征的治疗恶性细胞增殖的方法,即该化合物可用于产生通过 CDK 抑制作用单独或部分介导的抗增殖效果。期望这些本发明的化合物具有广泛的抗癌特性,这是因为 CDK 与许多常见人类癌症例如白血病和乳腺、肺、结肠、直肠、胃、前列腺、膀胱、胰腺和卵巢癌有关。因此期望本发明的化合物对这些癌症具有抗癌活性。另外期望本发明的化合物将具有抗各种白血病、淋巴的恶性肿瘤和实体瘤(例如癌)和在组织例如肝、肾、前列腺和胰腺中的肉瘤的活性。特别期望本发明的这些化合物有助于减缓原发和复发实体瘤例如结肠、乳腺、前列腺、肺和皮肤癌的生长。更特别期望本发明的这类化合物或其药学上可接受的盐或体内其可水解的酯可抑制这些原发和复发的、与 CDK 有关的实体瘤,尤其是那些主要依赖于 CDK 而生长和扩散的肿瘤,包括例如一些结肠、乳腺、前列腺、肺、外阴和皮肤肿瘤。

另外期望本发明的化合物在更大范围的其它疾病中具有对抗其它细胞增殖疾病的活性,所述其它疾病包括白血病、纤维增生和分化紊乱、牛皮癣、类风湿性关节炎、Kaposi 肉瘤、血管瘤、急性和慢性肾病、动脉粥样化、动脉粥样硬化、动脉再狭窄、自身免疫性疾病、急性和慢性炎症、骨疾病和伴有视网膜血管增生的眼疾病。

因此,根据本发明的这个方面,提供一种如上文中所定义的式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或其体内可水解的酯作为药物的用途;如上文中所定义的式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或其体内可水解的酯,在用于在温血动物如人体中产生细胞周期抑制(抗细胞增殖)效应的药物制备中的用途。尤其是,通过 CDK2、CDK4 和/或 CDK6,尤其是 CDK2 的抑制作用,阻止进入或通过 S 阶段而产生细胞周期抑制作用。

根据本发明的另一个特征,提供一种如上文中所定义的式(I)的

化合物或其药学上可接受的盐或其体内可水解的酯，在制备用于治疗以下疾病的药物中的用途，所述疾病包括癌症(实体肿瘤和白血病)、成纤维细胞增殖和分化紊乱、牛皮癣，类风湿性关节炎，Kaposi 肉瘤、血管瘤，急性和慢性肾病、粉瘤、动脉粥样硬化，动脉再狭窄、自身免疫疾病、急性和慢性炎症、骨疾病和视网膜血管增生的眼疾病，特别是癌症。

根据本发明的这个方面的另一特征，提供一种在需要此治疗的温血动物例如人体中产生细胞周期抑制(抗细胞增殖)效应的方法，该方法包括给予所述动物有效量的如以上所定义的化合物。特别是，通过 CDK2、CDK4 和/或 CDK6，尤其是 CDK2 抑制作用，阻止进入或通过 S 阶段而产生抑制作用。

根据本发明的这个方面的另一特征，提供一种在需要此治疗的温血动物例如人体中产生细胞周期抑制(抗细胞增殖)效应的方法，该方法包括给予所述动物有效量的如以上所定义的化合物，或其药学上可接受的盐或其体内可水解的酯。特别是，通过 CDK2、CDK4 和/或 CDK6，尤其是 CDK2 抑制作用，阻止进入或通过 S 阶段而产生抑制作用。

根据本发明的这个方面的另一特征，提供一种在需要此治疗的温血动物例如人体中治疗癌症的方法，该方法包括给予所述动物有效量的如以上所定义的化合物，或其药学上可接受的盐或其体内可水解的酯。

如以上所述，用于治疗或预防性治疗特定的细胞增殖疾病所需的剂量大小必须根据所治疗的宿主、给药途径和所治疗疾病的严重程度而改变。考虑单位剂量范围是例如 1-100 mg/kg，优选 1-50 mg/kg。

可将以上定义的 CDK 抑制活性作为单一疗法使用或可包括在除本发明的化合物外的一种或多种其它物质和/或疗法中。这种联合疗法可通过将各治疗组分以同时、连续或分别给药的方式完成。在肿

瘤治疗学领域，通常使用不同形式的联合疗法治疗每个癌症病人。在肿瘤治疗学中，除以上定义的细胞周期抑制疗法外，所述联合疗法的其它组成部分可以是：外科手术、放射疗法或化学疗法。所述化学疗法可包括三种主要治疗剂类型：

5 (i) 通过与以上所定义的机制相同或不同的机制发挥作用的其它细胞周期抑制剂；

(ii) 细胞生长抑制剂，例如抗雌激素(例如他莫昔芬、托瑞米芬、雷洛昔芬、屈洛昔芬、iodoxyfene)、孕激素(例如乙酸甲地孕酮)、芳香酶抑制剂(例如 anastrozole、来曲唑、伏氯唑(vorazole)、依西美坦)、
10 抗孕激素类、抗雄激素物质(例如氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、醋酸环丙孕酮)、LHRH 激动剂和拮抗剂(例如乙酸戈舍瑞林、luprolide)、睾酮 5 α -二氢还原酶抑制剂(例如非那雄胺)、抗-侵袭剂(例如金属蛋白酶抑制剂如 marimastat 和尿激酶纤溶酶激活物受体功能抑制剂)和生长因子功能抑制剂(这些生长因子包括例如血小板衍化的生长因子
15 和肝细胞生长因子，这些抑制剂包括生长因子抗体、生长因子受体抗体、酪氨酸激酶抑制剂和丝氨酸/苏氨酸激酶抑制剂)；和

(iii) 如在肿瘤治疗学中使用的抗增殖/抗肿瘤药物和其组合物，例如抗代谢产物(例如抗叶酸剂如甲氧蝶呤、氟嘧啶如 5-氟尿嘧啶、嘌呤和腺苷类似物、胞嘧啶阿糖胞苷)；抗肿瘤抗生素(例如蒽环类抗
20 生素如多柔比星、柔红霉素、表柔比星和伊达比星、丝裂霉素-C、放线菌素 D、普卡霉素)；铂衍生物(例如顺铂、卡铂)；烷基化剂(例如氮芥、美法仑、苯丁酸氮芥、白消安、环磷酰胺、异环磷酰胺、亚硝基脲、塞替派)；抗有丝分裂剂(例如长春花生物碱如长春新碱和 taxoid 如紫杉醇、taxotere)；拓扑异构酶抑制剂(例如表鬼臼毒素如依
25 托泊苷和替尼泊苷、安吡啶、topotecan)。根据本发明这一方面，提供包含如上文定义的式(I)的化合物和如上文定义用于癌症联合疗法的其它抗肿瘤物质的药用产物。

除了用作治疗药物外，式(I)的化合物和它们药学上可接受的盐

也可以作为新的药理研究工具，作为寻找新治疗剂部分用于评估实验动物例如猫、狗、兔、猴、大鼠和小鼠体内细胞周期活性抑制剂的效应的体外和体内试验系统的开发和标准化中。

5 在此所述的本发明化合物的可替换的和优选的实施方案也适用于以上其它的药物组合物、步骤、方法、用途和药物制备特征中。

实施例

现在，通过以下非限定实施例对本发明作出举例说明，并且除非另有说明，否则其中：

10 (i) 温度单位为摄氏度(°C)；在室温或环境温度中，即是 18-25°C 中操作；

(ii) 有机溶液采用无水硫酸镁干燥；溶剂的蒸发采用旋转式汽化器，在减压(600-4000Pa；4.5-30mmHg)及外浴温度最高可达 60°C 下实施；

15 (iii) 层析法是指采用硅胶的快速层析法；薄层层析法(TLC)在硅胶板上实施；

(iv) 通常，反应过程通过 TLC 监测及反应时间仅仅是作为举例说明；

(v) 终产物具有满意的质子核磁共振(NMR)和/或质谱的数据；

20 (vi) 收率仅是作为举例说明，不一定是那些通过努力加工处理得到的量；如果要求更多的物质，可重复进行制备；

(vii) 除非另有说明，否则当给出时，NMR 数据为主要的特征质子的 δ 值的形式，单位为百万分之一(ppm)，相对于作为内标的四甲基硅烷(TMS)计算，在 300MHz 下，使用氘化二甲亚砜(DMSO- d_6)作为
25 溶剂测定；

(viii) 所用化学符号具有它们通用的含义；使用 SI 单位和符号；

(ix) 溶剂比率单位为体积比(v/v)；和

(x) 质谱采用 70 电子伏特的电子能、在化学电离(CI)方式下、

使用直接暴露探针进行测量；其中所述电离通过电子流轰击(EI)、快原子轰击(FAB)或电喷雾(ESP)实施；给出 m/z 的值；通常只是报导表明母体质量的离子；

5 (xi) 除非另有声明，否则对含有不对称取代的碳和/或硫原子不作解析；

(xii) 当所描述的合成类似于前面实施例所描述的合成时，所用的量为与在前面实施例中所用量的毫摩尔比率等当；

(xvi) 使用以下缩写：

10 NMP 1-甲基-2-吡咯烷酮；和
DMSO 二甲亚砜。

实施例 1

4-氨基-5-氟基-2-(4-氟磺酰基苯胺基)嘧啶

15 将 4-氨基-2-氯-5-氟基嘧啶(0.5g, 3.24mmol)和 4-氟磺酰基苯胺(0.58g, 3.4mmol)在 NMP(2ml)中的溶液在 80℃下加热 20 小时。将所得混合物静置冷却，并用水稀释。过滤收集所得的沉淀物，用水洗涤并在 60℃下真空干燥，得到题述化合物(889mg, 95%)。NMR: 7.08 (s, 2H), 7.60 (s, 2H), 7.67 (d, 2H), 7.95 (d, 2H), 8.40(s, 1H), 10.03(s, 1H); m/z 291(MH)⁺。

20

实施例 2

4-氨基-5-氟基-2-{4-[N-(3-二甲氨基丙基)氟磺酰基]苯胺基}嘧啶

25 将3-二甲氨基丙胺(3ml)加入到4-氨基-5-氟基-2-(4-氟磺酰基苯胺基)嘧啶(方法 1; 250mg, 0.853mmol)中，将所得混合物在 90℃下加热 45min，随后在环境温度下搅拌 18 小时。蒸发除去挥发物，采用硅胶层析纯化残余物，洗脱液为乙酸乙酯/己烷/甲醇(50:50:0)，提高极性至(80:0:20)。将产物与乙醚和几滴甲醇一起研磨，过滤收集所得固体得到题述化合物(176mg, 55%)。NMR: 1.45 (t, 2H), 2.04 (s, 6H), 2.10 (t, 2H), 2.72 (t, 2H), 7.60 (s, 2H), 7.62 (d, 2H), 7.98 (d, 2H), 8.40 (s, 1H); m/z 376

(MH)⁺。

实施例 3-20

按照实施例 2 的方法, 使用 4-氨基-5-氰基-2-(4-氟磺酰基苯胺基)嘧啶(方法 1)和适当的胺制备以下化合物。

实施例	化合物	NMR	M/z (MH) ⁺
3 ¹	4-氨基-5-氰基-2-{4-[N-(2-吡啶子基乙基)氨磺酰基]苯胺基}嘧啶	1.30-1.48(m, 6H), 2.19-2.28(m, 6H), 2.78(t, 2H), 7.60(s, 2H), 7.64(d, 2H), 7.98(d, 2H), 8.40(s, 1H)	402
4 ¹	4-氨基-5-氰基-2-{4-[N-[2-(1-甲基吡咯烷-2-基)乙基]氨磺酰基]苯胺基}嘧啶	1.18-1.30(m, 2H), 1.45-1.80(m, 4H), 1.9-2.0(m, 2H), 2.10(s, 3H), 2.67-2.75(m, 2H), 2.85(m, 1H), 7.61(s, 2H), 7.64(d, 2H), 8.00(d, 2H), 8.42(s, 1H)	402
5 ¹	4-氨基-5-氰基-2-{4-[N(2-异丙基氨基乙基)氨磺酰基]苯胺基}嘧啶	0.86(d, 6H), 2.50(m, 2H), 2.59(m, 1H), 2.78(t, 2H), 7.60(s, 2H), 7.62(d, 2H), 8.00(d, 2H), 8.40(s, 1H), 10.25(s, 1H)	376
6 ¹	4-氨基-5-氰基-2-{4-[N-(3-异丙基氨基丙基)氨磺酰基]苯胺基}嘧啶	0.89(d, 6H), 1.42(m, 2H), 2.40(t, 2H), 2.58(m, 1H), 2.75(t, 2H), 7.60(s, 2H), 7.62(d, 2H), 7.98(d, 2H), 8.40(s, 1H)	390
7 ¹	4-氨基-5-氰基-2-{4-[N-(2-甲氧基乙基)氨磺酰基]苯胺基}嘧啶	2.84(t, 2H), 3.15(s, 3H), 3.28(t, 2H), 7.60(s, 2H), 7.65(d, 2H), 7.96(d, 2H), 8.40(s, 1H)	349
8 ¹	4-氨基-5-氰基-2-{4-[N-(3-甲氧基丙基)氨磺酰基]苯胺基}嘧啶	1.56(m, 2H), 2.73(t, 2H), 3.12(s, 3H), 3.24(t, 2H), 7.60(s, 2H), 7.62(d, 2H), 7.98(d, 2H), 8.40(s, 1H)	363
9 ¹	4-氨基-5-氰基-2-{4-[N-(3-异丙氧基丙基)氨磺酰基]苯胺基}嘧啶	0.99(d, 6H), 1.53(m, 2H), 2.72(t, 2H), 3.28(t, 2H), 3.40(br s, 1H), 7.35(s, 1H), 7.60(s, 2H), 7.62(d, 2H), 7.98(d, 2H), 8.40(s, 1H)	391

10 ¹	4-氨基-5-氟基-2-{4-[N-(3-乙氧基丙基)氨磺酰基]苯胺基}嘧啶	1.02(t, 3H), 1.58(q, 2H), 2.75(t, 2H), 3.24-3.32(m, 4H), 7.38(s, 1H), 7.60(s, 2H), 7.62(d, 2H), 7.98(d, 2H), 8.40(s, 1H)	377
11 ¹	4-氨基-5-氟基-2-{4-[N-(四氢呋喃-2-基甲基)氨磺酰基]苯胺基}嘧啶	1.46-1.52(m, 1H), 1.68-1.83(m, 3H), 2.72(d, 2H), 3.55(m, 1H), 3.64(m, 1H), 3.78(m, 1H), 7.51(s, 1H), 7.60(s, 2H), 7.64(d, 2H), 7.98(d, 2H), 8.40(s, 1H)	375
12 ¹	4-氨基-5-氟基-2-{4-[N-(2-吡啶-2-基乙基)氨磺酰基]苯胺基}嘧啶	2.82(m, 2H), 3.10(t, 2H), 7.15-7.22(m, 3H), 7.60-7.68(m, 4H), 7.95(d, 2H), 8.39-8.42(m, 2H)	394
13 ¹	4-氨基-5-氟基-2-(4-{N-[3-(2-氧代吡咯烷-1-基)丙基]氨磺酰基}苯胺基)嘧啶	1.46-1.58(m, 2H), 1.8-1.9(m, 2H), 2.15(t, 2H), 2.66(t, 2H), 3.10(t, 2H), 3.20(t, 2H), 5.98(s, 2H), 7.61(d, 2H), 7.98(d, 2H), 8.40(s, 1H)	416
14 ¹	4-氨基-5-氟基-2-{4-[N-(3-吗啉代丙基)氨磺酰基]苯胺基}嘧啶	1.50(t, 2H), 2.15-2.20(m, 6H), 2.72(t, 2H), 3.48(t, 4H), 7.60(s, 2H), 7.62(d, 2H), 7.98(d, 2H), 8.40(s, 1H)	418
15 ¹	4-氨基-5-氟基-2-{4-[N-(3-咪唑-1-基丙基)氨磺酰基]苯胺基}嘧啶	1.7-1.8(m, 2H), 2.62(t, 2H), 3.94(t, 2H), 6.85(s, 1H), 7.08(s, 1H), 7.50(s, 1H), 7.58-7.64(m, 4H), 7.98(d, 2H), 8.40(s, 1H)	399
16 ^{1,2}	4-氨基-5-氟基-2-[4-(N-戊基氨磺酰基)苯胺基]嘧啶	0.80(t, 3H), 1.11-1.2(m, 4H), 1.35(m, 2H), 2.65(m, 2H), 7.35(t, 1H), 7.59(s, 2H), 7.62(d, 2H), 7.98(d, 2H), 8.40(s, 1H)	361
17 ^{1,2}	4-氨基-5-氟基-2-[4-(N-烯丙基氨磺酰基)苯胺基]嘧啶	3.35(t, 2H), 5.00(d, 1H), 5.10(d, 1H), 5.65(m, 1H), 7.60(m, 3H), 7.64(d, 2H), 7.98(d, 2H), 8.40(s, 1H)	331

18 ^{1,2}	4-氨基-5-氰基-2-{4-[N-(4-羟基苯乙基)氨磺酰基]苯胺基}嘧啶	2.50-2.58(m, 2H), 2.82(m, 2H), 6.61(d, 2H), 6.90(d, 2H), 7.48(t, 1H), 7.60(s, 2H), 7.62(d, 2H), 7.98(d, 2H), 8.40(s, 1H), 9.12(s, 1H)	411
19 ^{1,2}	4-氨基-5-氰基-2-{4-[N-(4-氟苄基)氨磺酰基]苯胺基}嘧啶	3.92(s, 2H), 7.08(dd, 2H), 7.24(dd, 2H), 7.60(s, 2H), 7.64(d, 2H), 7.98(d, 2H), 8.40(s, 1H)	397 (M-H) ⁻
20 ^{1,2}	4-氨基-5-氰基-2-{4-[N-(苯乙基)氨磺酰基]苯胺基}嘧啶	2.66(t, 2H), 2.90(t, 2H), 7.10-7.26(m, 5H), 7.58(s, 2H), 7.62(d, 2H), 7.98(d, 2H), 8.40(s, 1H)	393 (M-H) ⁻

¹ 将反应混合物在 95℃ 下加热 2 小时

² 层析洗脱液为乙酸乙酯/己烷(50:50)，提高极性至(100:0)

实施例 21

5 4-氨基-5-氰基-2-{4-[N-(环丁基)氨磺酰基]苯胺基}嘧啶

将环丁胺(2ml)加入到4-氨基-5-氰基-2-(4-氟磺酰基苯胺基)嘧啶(方法1; 250mg, 0.853mmol)中, 将所得混合物在40℃下加热1hr, 随后在环境温度下搅拌18小时。蒸发除去挥发物, 采用硅胶层析纯化残余物, 洗脱液为乙酸乙酯/己烷(50:50)。将产物与乙醚/己烷一起研磨, 过滤收集所得固体得到题述化合物(91mg, 31%)。NMR: 1.41-1.50 (m, 2H); 1.62-1.78(m, 2H); 1.82-1.90 (m, 2H); 3.59 (m, 1H); 7.60 (s, 2H); 7.62 (d, 2H); 7.98 (d, 2H); 8.40 (s, 1H); m/z: 345 (MH)⁺。

实施例 21-27

15 按照实施例 21 的方法, 使用 4-氨基-5-氰基-2-(4-氟磺酰基苯胺基)嘧啶(方法 1)和适当的胺制备以下化合物。

实施例	化合物	NMR	M/z (MH) ⁺
22	4-氨基-5-氟基-2-{4-[N-(环丙基)氨基磺酰基]苯胺基}嘧啶	1.41-1.50(m, 2H); 1.62-1.78(m, 2H); 1.82-1.90(m, 2H); 3.59(m, 1H); 7.60(s, 2H); 7.62(d, 2H); 7.98(d, 2H); 8.40(s, 1H)	331
23	4-氨基-5-氟基-2-[4-(N-丙基氨基磺酰基)苯胺基]嘧啶	0.78(t, 3H); 1.35(m, 2H); 2.64(m, 2H); 7.38(t, 1H); 7.60(s, 2H); 7.62(d, 2H); 7.98(d, 2H); 8.40(s, 1H)	333
24	4-氨基-5-氟基-2-{4-[N-(2,2,2-三氟乙基)氨基磺酰基]苯胺基}嘧啶	3.62(q, 2H); 7.60(s, 2H); 7.70(d, 2H); 7.98(d, 2H); 8.40(s, 1H)	373
25	4-氨基-5-氟基-2-{4-[N-(3-甲氧基苄基)氨基磺酰基]苯胺基}嘧啶	3.65(s, 3H); 3.92(s, 2H); 6.72-6.80(m, 3H); 7.18(t, 1H); 7.60(s, 2H); 7.64(d, 2H); 7.98(d, 2H); 8.40(s, 1H)	409 (M-H) ⁺
26	4-氨基-5-氟基-2-{4-[N-(环丙基甲基)氨基磺酰基]苯胺基}嘧啶	0.01-0.05(m, 2H); 0.27-0.32(m, 2H); 0.69-0.79(m, 1H); 2.58(t, 2H); 7.50(t, 1H); 7.58(s, 2H); 7.60(d, 2H); 7.92(d, 2H); 8.39(s, 1H)	345
27	4-氨基-5-氟基-2-{4-[N-(4-甲氧基苯乙基)氨基磺酰基]苯胺基}嘧啶	2.58(t, 2H); 2.86(t, 2H); 3.70(s, 3H); 6.80(d, 2H); 7.04(d, 2H); 7.59(s, 2H); 7.61(d, 2H); 7.98(d, 2H); 8.40(s, 1H)	423 (M-H) ⁺

实施例 28

4-氨基-5-氟基-2-{4-[N-(3-咪唑-1-基丙基)氨基甲酰基]苯胺基}嘧啶

将4-氨基-2-氟-5-氟基嘧啶(200mg, 1.3mmol)和4-[N-(3-咪唑-1-基丙基)氨基甲酰基]苯胺(方法3; 633mg, 2.6mmol)在NMP(10ml)中的溶液在120℃下加热48小时。将所得混合物静置冷却, 用水稀释并用乙酸乙酯萃取。合并有机萃取液, 干燥并通过蒸发除去溶剂。将残余物与乙醚/己烷一起研磨, 过滤收集产物得到题述化合物(10mg,

2%)。NMR: 1.92(q, 2H), 3.20(q, 2H), 4.00(t, 2H), 6.87(s, 1H), 7.19(s, 1H), 7.55(s, 2H), 7.62(s, 1H), 7.86(d, 2H), 8.32(t, 1H), 8.38(s, 1H), 9.90(s, 1H); m/z363(MH)⁺。

5 实施例 29

4-氨基-5-氟基-2-{4-[N-(2-N,N-二甲氨基乙基)氨磺酰基]苯胺基}嘧啶

将2-二甲氨基乙胺(2ml)加入到4-氨基-5-氟基-2-(4-氟磺酰基苯胺基)嘧啶(方法1; 250mg, 0.853mmol)中, 将所得混合物在环境温度下搅拌2小时。蒸发除去挥发物, 采用层析法纯化残余物, 洗脱液为乙酸乙酯/己烷/甲醇(50:50:0), 提高极性至(95:0:5)。将产物与乙醚一起研磨, 过滤收集得到题述化合物(110mg, 36%)。NMR:2.05(s, 6H), 2.20(t, 2H), 2.78(t, 2H), 7.68-7.70(m, 3H), 7.98(d, 2H), 8.40(s, 1H); m/z362(MH)⁺。

15 实施例 30

4-氨基-5-氟基-2-{4-[N-(3-羟基-2,2-二甲基丙基)氨磺酰基]苯胺基}嘧啶

将4-氨基-2-氟-5-氟基嘧啶(150mg, 0.97mmol)和4-[N-(3-羟基-2,2-二甲基丙基)氨磺酰基]苯胺(方法4; 274mg, 1.07mmol)在NMP(5ml)中的溶液在120℃下加热24小时。将所得混合物静置冷却, 用水稀释并用乙酸乙酯萃取。合并有机萃取液, 干燥并通过蒸发除去溶剂。将残余物与乙醚一起研磨, 过滤收集产物得到题述化合物(187mg, 52%)。NMR: 0.72(s, 6H), 2.52(d, 2H), 3.08(d, 2H), 4.40(t, 1H), 7.19(t, 1H), 7.60(s, 1H), 7.64(d, 2H), 7.96(d, 2H), 8.40(s, 1H); m/z375(M-H)⁻。

25

实施例 31

4-氨基-5-氟基-2-(3-氟苯胺基)嘧啶

按照实施例1描述的方法, 采用4-氨基-2-氟-5-氟基嘧啶(0.3g, 2.0mmol)处理3-氟苯胺(277mg, 2.2mmol)得到题述化合物(430mg,

90%)。NMR: 7.00(d, 1H), 7.28(dd, 1H), 7.55(s, 2H), 7.70(d, 1H), 7.89(s, 1H), 8.38(s, 1H), 9.81(s, 1H); m/z246(MH)⁺。

原材料的制备

- 5 用于上述实施例的原材料为商业可得的或可通过标准方法由已知材料容易地制备。例如，以下例子举例说明(但非限定性)一些用于上述反应的原材料的制备。

方法 1

10 4-氨基-5-氟基-2-(4-氟磺酰基苯胺基)嘧啶

- 将 4-氨基-2-氟-5-氟基嘧啶(8.0g, 52mmol)和对氨基苯磺酰氟(9.07g, 52mmol)在 NMP(155ml)中的溶液在 120℃下加热 24 小时。将所得混合物静置冷却，用水稀释。过滤收集沉淀物，用水洗涤并在真空 60℃下干燥 2 小时。粗产物在乙酸乙酯/己烷中重结晶得到题
- 15 述化合物(5.45g, 37%)。NMR:7.70(s, 2H), 7.93(d, 2H), 8.15(d, 2H), 8.45(s, 1H); m/z:292(MH)⁺。

方法 2

4-[N-(3-咪唑-1-基-丙基)氨基甲酰基]硝基苯

- 20 将 1-(3-氨基丙基)咪唑(3.87ml, 33mmol)的乙醇(65ml)溶液加入到 4-硝基苯甲酰氟(4.0g, 22mmol)中，并将所得混合物在环境温度下搅拌 24 小时。蒸发除去挥发物，并将残余物溶解在乙酸乙酯中，用水洗涤并干燥。蒸发除去溶剂，将残余物与己烷一起研磨，过滤收集产物得到题述化合物(3.2g, 55%)。NMR: 1.98(t, 2H), 3.24(q, 2H),
- 25 4.01(t, 2H), 6.87(s, 1H), 7.19(s, 1H), 7.64(s, 2H), 8.15(d, 2H), 8.30(d, 2H); 8.80(t, 1H); m/z275(MH)⁺。

方法 34-[N-(3-咪唑-1-基-丙基)氨基甲酰基]苯胺

5 将 10%的载于碳上的钨(500mg)加入到 4-[N-(咪唑-1-基丙基)氨基甲酰基]硝基苯(方法 2; 3.0g, 11mmol)溶解在乙醇(200ml)和乙酸乙酯(50ml)的溶液中。在氢气气氛下, 将所得的混合物搅拌 2 小时, 通过硅藻土过滤除去催化剂, 并采用甲醇洗涤滤板。蒸发滤液除去溶剂, 得到题述化合物(1.5g, 57%)。NMR: 1.91(t, 2H), 3.19(q, 2H), 3.98(t, 2H), 5.58(s, 2H), 6.52(d, 2H), 6.86(s, 1H), 7.19(s, 1H), 7.58(d, 2H), 7.62(s, 1H); 8.00(t, 1H); m/z245(MH)⁺。

10

方法 44-[N-(3-羟基-2,2-二甲基丙基)氨磺酰基]苯胺

15 将对氨基苯磺酰氟(1g, 5.7mmol)、3-氨基-2,2-二甲基-1-丙醇(884mg, 8.6mmol)和三乙胺(0.876ml, 6.3mmol)在 1-丁醇(20ml)中的混合物加热回流 24 小时。蒸发除去挥发物, 将残余物通过硅胶层析法纯化得到题述化合物。NMR: 0.72(s, 6H), 2.52(d, 2H), 3.08(d, 2H), 4.40(t, 1H), 7.19(t, 1H), 7.60(s, 1H), 7.64(d, 2H), 7.96(d, 2H), 8.40(s, 1H); m/z259(MH)⁺。

20

实施例 32

以下举例说明在人体中有预防或治疗作用的、含有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐或其体内可水解的酯(在下文中是化合物 X)的代表性药物剂量形式:

(a): 片剂 I	mg/片
化合物 X	100
乳糖 Ph. Eur	182.75
交联羧甲基纤维素钠	12.0
玉米淀粉糊(5 % w/v 糊)	2.25

硬脂酸镁	3.0
------	-----

(b): 片剂 II	mg/片
化合物 X	50
乳糖 Ph. Eur	223.75
交联羧甲基纤维素钠	6.0
玉米淀粉	15.0
聚乙烯基吡咯烷酮(5 % w/v 糊)	2.25
硬脂酸镁	3.0

(c): 片剂 III	mg/片
化合物 X	1.0
乳糖 Ph. Eur	93.25
交联羧甲基纤维素钠	4.0
玉米淀粉糊(5 % w/v 糊)	0.75
硬脂酸镁	1.0

(d): 胶囊	mg/胶囊
化合物 X	10
乳糖 Ph. Eur	488.5
硬脂酸镁	1.5

(e): 注射剂 I	(50 mg/ml)
化合物 X	5.0% w/v
1M 氢氧化钠溶液	15.0 % v/v
0.1 M 盐酸	(调节 pH 至 7.6)
聚乙二醇 400	4.5 % w/v

注射用水	至 100 %
------	---------

(f): 注射剂 II	10 mg/ml
化合物 X	1.0% w/v
磷酸钠 BP	3.6 % w/v
0.1 M 氢氧化钠溶液	15.0 % v/v
注射用水	至 100 %

(g): 注射剂 III	(1mg/ml, 缓冲至 pH6)
化合物 X	0.1 % w/v
磷酸钠 BP	2.26 % w/v
柠檬酸	0.38 % w/v
聚乙二醇 400	3.5 % w/v
注射用水	至 100 %

注

5 以上制剂可通过药学领域熟知的常规方法得到。片剂(a)-(c)可用常规方式包肠溶衣, 例如提供乙酸邻苯二甲酸纤维素包衣。