

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2016 年 10 月 20 日 (20.10.2016)



(10) 国际公布号
WO 2016/165657 A1

(51) 国际专利分类号:

C07D 473/32 (2006.01) C07D 487/04 (2006.01)
C07D 473/28 (2006.01) A61K 31/5377 (2006.01)
C07D 473/36 (2006.01) A61K 31/52 (2006.01)
C07D 401/12 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2016/079495

(22) 国际申请日: 2016 年 4 月 15 日 (15.04.2016)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201510186101.7 2015 年 4 月 17 日 (17.04.2015) CN

(71) 申请人: 常州隆赛医药科技有限公司 (CHANG-ZHOU LONGTHERA PHARMACEUTICALS INC) [CN/CN]; 中国江苏省常州市新北区河海西路 108 号生物医药孵化器, Jiangsu 213022 (CN)。

(72) 发明人: 曹文杰 (CAO, Wenjie); 中国江苏省常州市新北区河海西路 108 号生物医药孵化器, Jiangsu 213022 (CN)。程鹏 (CHENG, Peng); 中国江苏省常州市新北区河海西路 108 号生物医药孵化器, Jiangsu 213022 (CN)。耿美玉 (GENG, Meiyu); 中国江苏省常州市新北区河海西路 108 号生物医药孵

化器, Jiangsu 213022 (CN)。黄敏 (HUANG, Min); 中国江苏省常州市新北区河海西路 108 号生物医药孵化器, Jiangsu 213022 (CN)。江磊 (JIANG, Lei); 中国江苏省常州市新北区河海西路 108 号生物医药孵化器, Jiangsu 213022 (CN)。曹建华 (CAO, Jianhua); 中国江苏省常州市新北区河海西路 108 号生物医药孵化器, Jiangsu 213022 (CN)。刘磊 (LIU, Lei); 中国江苏省常州市新北区河海西路 108 号生物医药孵化器, Jiangsu 213022 (CN)。唐帅 (TANG, Shuai); 中国江苏省常州市新北区河海西路 108 号生物医药孵化器, Jiangsu 213022 (CN)。苏毅 (SU, Yi); 中国江苏省常州市新北区河海西路 108 号生物医药孵化器, Jiangsu 213022 (CN)。陈春麟 (CHEN, Chunlin); 中国江苏省常州市新北区河海西路 108 号生物医药孵化器, Jiangsu 213022 (CN)。丁健 (DING, Jian); 中国江苏省常州市新北区河海西路 108 号生物医药孵化器, Jiangsu 213022 (CN)。

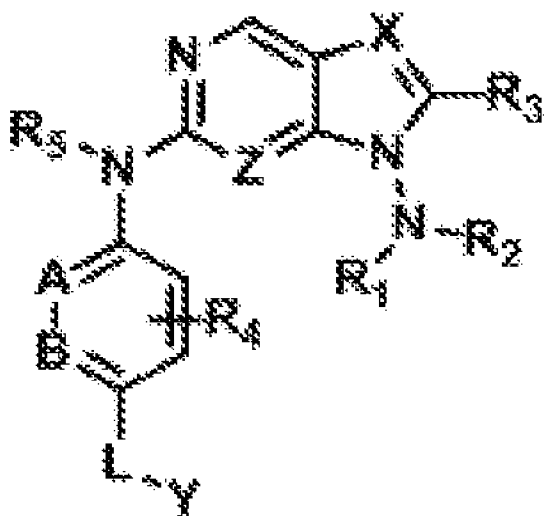
(74) 代理人: 上海一平知识产权代理有限公司 (XU & PARTNERS, LLC.); 中国上海市普陀区真北路 958 号天地科技广场 1 号楼 106 室, Shanghai 200333 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,

[见续页]

(54) Title: PREPARATION AND USE OF KINASE INHIBITOR

(54) 发明名称: 激酶抑制剂的制备及应用



I

(57) Abstract: Disclosed are a preparation method for a kinase inhibitor and a use thereof. The kinase inhibitor is a compound represented by formula (I) wherein the groups are defined as described in the description. The compound of formula (I) has a kinase inhibitory activity and therefore can be used for the preparation of medicines for treating kinase activity-related diseases.

(57) 摘要: 一种激酶抑制剂的制备方法及其应用, 该激酶抑制剂为式 I 所示化合物, 其中各基团的定义如说明书中所述, 式 I 化合物具有激酶抑制活性, 可以用于制备治疗与激酶活性相关的疾病的药物。



BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

(84) **指定国** (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

激酶抑制剂的制备及应用

技术领域

5 本发明属于药物化学领域，具体地，本发明涉及一种新型激酶抑制剂的制备和应用。

背景技术

细胞周期异常是癌症的一个标志性特征，周期蛋白依赖性激酶（cyclin-dependent kinase, CDK）是一类丝氨酸/苏氨酸激酶，在细胞周期中起中心作用，主导细胞周期的启动、进行和结束。CDK 家族包括 CDK1-13。

10 其中 CDK4/6 在许多癌症中均过度活跃，导致细胞增殖失控。研究发现，CyclinD1 和 CDK4 的过表达可能参与食管癌的发生，两者的表达增加与食管癌的分化程度相关；无论在良性还是恶性的胰腺内分泌肿瘤中，CDK4 都普遍表达。在肺癌组织中 CDK4 的表达也远高于正常肺组织，高阳性表达的程度与肺癌的组织病理学分类、淋巴结转移和临床分期恶性度呈正相关，是一个潜在的预后不良因素。CDK6 在多种肿瘤细胞中也过量表达，例如对雄性激素敏感的前列腺癌细胞系 CDK6 被检测到稳定地过表达。而且外源性过表达 CDK6 导致了肿瘤细胞生长加速，而干扰了 CDK6 的肿瘤细胞生长速度则明显减慢。

20 CDK4 与 CDK6 在氨基酸组成上有 71% 的同源性，这一结果提示了它们在功能上的相似性。近期研究还揭示 CDK4/6-CyclinD 可以磷酸化转录因子 FOXM1，提高它在黑色素瘤中的稳定性和活性。因此，抑制 CDK4/6 可以实现从信号通路的下游抑制细胞增殖。CDK4/6 抑制剂联合内分泌治疗可以达到双重抑制的效果，在临床前研究中也证实了 CDK4/6 抑制剂联合内分泌治疗具有显著的协同作用。

25 在过去的 20 年作为潜在的肿瘤治疗靶点，CDK 家族抑制剂已经得到了广泛的关注。但是第一代的 CDK 抑制剂缺乏选择性，是泛抑制剂，例如 flavopiridol 可以抑制 CDK1, CDK2, CDK4, CDK6, CDK7 和 CDK9。尽管 flavopiridol 可以诱导细胞周期阻滞，同时也表现出细胞毒作用，临床疗效差强人意。第二代 CDK 抑制剂致力于提高选择性，尤其是单纯靶向 CDK4/6 的选择性抑制剂表现出较好的临床疗效和较少的毒副作用备受关注。目前辉瑞的 CDK4/6 双抑制剂 Palbociclib（商品名 Ibrance）成为了第一个上市的 CDK4/6 双抑制剂，美国 FDA 批准其作为一线药物治疗 ER 阳性、HER2 阴性乳腺癌。

30 诺华的 LEE011 是一种 CDK4/CDK6 的双重抑制剂，对恶性横纹肌样瘤和成神经细胞瘤最为敏感。在临床实验中，LEE011 主要用于联合芳香酶类抑制剂以及 PI3K 抑制剂能够起到较好的抗肿瘤活性。LEE011 联合来曲唑用于治疗转移性的 HR 阳性/HER2 阴性乳腺癌处于临床 III 阶段；LEE011 联合 BYL719 和来曲唑治疗转移性 HR 阳性乳腺癌处于临床 Ib/II 阶段。

此外，还有礼来的 LY-2835219 目前也处于临床三期研究阶段，如果这些临床试

验都能取得预期的效果,那么 CDK4/CDK6 的双重抑制剂必将给大批晚期乳腺癌患者带来更多的生存获益。

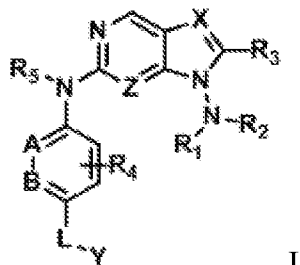
如上所述,CDK4/CDK6 的选择性双重抑制剂的研发已成为抗肿瘤药物研究的前沿热点及重点领域,因此,亟需研究开发新的 CDK 激酶抑制剂。

5

发明内容

本发明的目的是提供一种新的 CDK 激酶抑制剂及其制备方法及用途。

本发明的第一方面提供了一种如式 I 所示的化合物,或其药学上可接受的盐:



I

10 式中,

R_1 和 R_2 各自独立地选自: H、取代或未取代的 C1-C8 烷基、C(O)OR₈、CONR₉R₁₀、C(O)R₁₁、取代或未取代的 5~8 元芳基、取代或未取代的 5~8 元杂芳基、取代或未取代的 3~12 元饱和或不饱和杂环或碳环; 其中, 所述的杂芳基包含 1-3 个选自下组的杂原子: N、O 或 S; 所述的杂环包含 1-3 个选自下组的杂原子: N、O 或 S;

15 此外, R_1 和 R_2 可与相邻的 N 原子连接构成环状结构, 所述的环状结构包括取代或未取代的 3~12 元饱和或不饱和的杂环或桥环或螺环; 其中, 所述的杂环是指环结构中除了包含连接母核的氮原子之外, 还包含 0-3 个选自下组的杂原子: N、O 或 S;

R_3 选自: 取代或未取代的 C1-C8 烷基、CN、C(O)OR₁₂、CONR₁₃R₁₄、C(O)R₁₅、
20 取代或未取代的 5~8 元芳基、取代或未取代的 5~8 元杂芳基、取代或未取代的 3~12 元饱和或不饱和的杂环或碳环; 其中, 所述的杂芳基包含 1-3 个选自下组的杂原子: N、O 或 S; 所述的杂环包含 1-3 个选自下组的杂原子: N、O 或 S;

R_4 选自: H、取代或未取代的 C1-C4 烷基、取代或未取代的 C1-C8 烷氧基、卤素、OH、CN、C(O)OR₁₂、CONR₁₃R₁₄、C(O)R₁₅、取代或未取代的 5~8 元芳基、
25 取代或未取代的 5~8 元杂芳基、取代或未取代的 3~12 元饱和或不饱和的杂环或碳环; 其中, 所述的杂芳基包含 1-3 个选自下组的杂原子: N、O 或 S; 所述的杂环包含 1-3 个选自下组的杂原子: N、O 或 S;

R_5 选自: H 或 C1-C4 烷基;

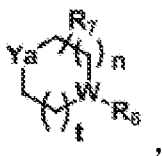
X 为 CR₁₆ 或 N;

30 A、B 和 Z 各自独立地选自: N 或 CR₁₆;

R_{16} 为 H、C1-C4 烷基或 C1-C4 卤代烷基;

L 为选自下组的基团: 无、C1-C6 亚烷基、C(O)、CONR₁₇ 或 S(O)₂;

Y 为: H, R₁₈, NR₁₉R₂₀, OH, 或 Y 为选自下组基团的一部分:



其中,

R_6 为无、H、取代或未取代的 C1-C8 烷基、取代或未取代的 C1-C8 烷氧基、取代或未取代的 C2-C6 酰基、取代或未取代的 C2-C6 磺酰基、取代或未取代的 C1-C6 亚烷基羟基、 $\text{CONR}_{22}\text{R}_{23}$ 或 C(O)R_{24} ;

R_7 可以是 0~3 个取代基且 R_7 为取代或未取代的 C1-C8 烷基、氧或卤素, 或 2 个或更多 R_7 形成桥环烷基; W 为 CR_{21} 、N 或 O (当 W 为 O 时, R_6 是不存在的);

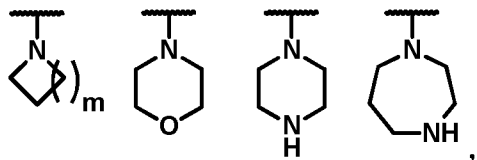
Ya 为 CR_{21} 或 N; R_{21} 为 H 或卤素;

R_8 、 R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 、 R_{17} 、 R_{18} 、 R_{19} 、 R_{20} 、 R_{22} 、 R_{23} 和 R_{24} 各自独立地选自: H、取代或未取代的 C1-C8 烷基、取代或未取代的 C1-C8 烷氧基、取代或未取代的 C1-C6 亚烷基-胺基、取代或未取代的 C1-C6 亚烷基-羟基、取代或未取代的 5~8 元芳基、或取代或未取代的 5~8 元杂芳基; 取代或未取代的 3~12 元饱和杂环或碳环; 其中, 所述的杂芳基包含至少一个选自下组的杂原子: N、O 或 S, 所述的杂环包含至少一个选自下组的杂原子: N、O 或 S;

n 和 t 分别为 0, 1 或 2;

上述的任一“取代”指基团上的一个或多个氢原子被选自下组的取代基取代: 卤素、OH、 NH_2 、CN、未取代或卤代的 C1-C8 烷基、C1-C8 烷氧基、未取代或卤代的 C2-C6 烯基、未取代或卤代的 C2-C6 炔基、未取代或卤代的 C2-C6 酰基、未取代或卤代的 5~8 元芳基、未取代或卤代的 5~8 元杂芳基、未取代或卤代的 3~12 元饱和杂环或碳环; 其中, 所述的杂芳基包含 1-3 个选自下组的杂原子: N、O 或 S, 所述的杂环包含 1~3 个选自下组的杂原子: N、O 或 S。

在另一优选例中, $\text{R}_1\text{-N-R}_2$ 为取代或未取代的选自下组的基团:



其中, m 是 0、1、2、3、4、5、6、7、8 或 9, 所述“取代”如上文所述。

在另一优选例中, R_1 和 R_2 与相邻的氮原子形成 4-12 元环状结构。

在另一优选例中, R_1 和 R_2 与相邻的氮原子形成 5-7 元环状结构。

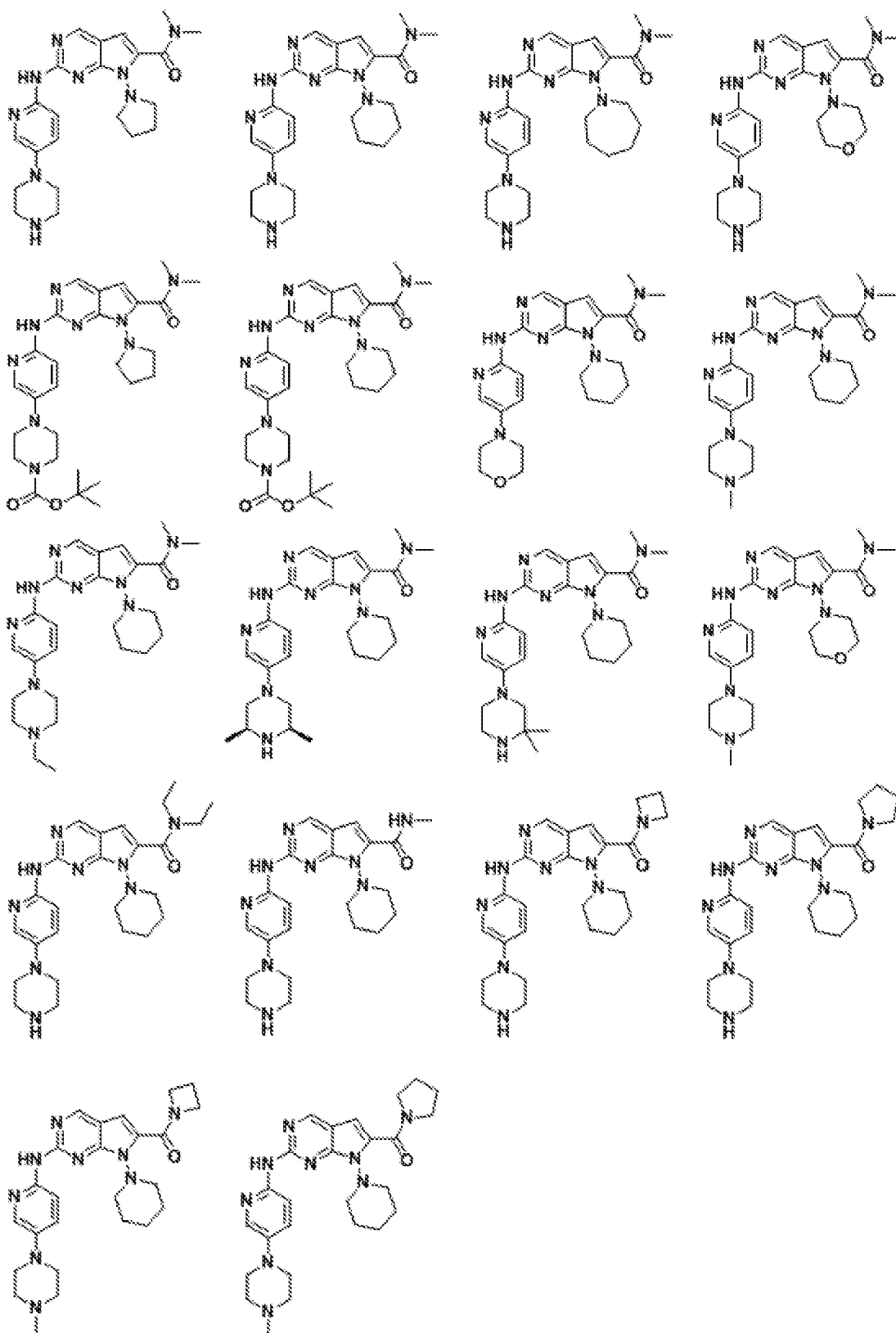
在另一优选例中, R_1 和 R_2 与相邻的氮原子形成六元环状结构。

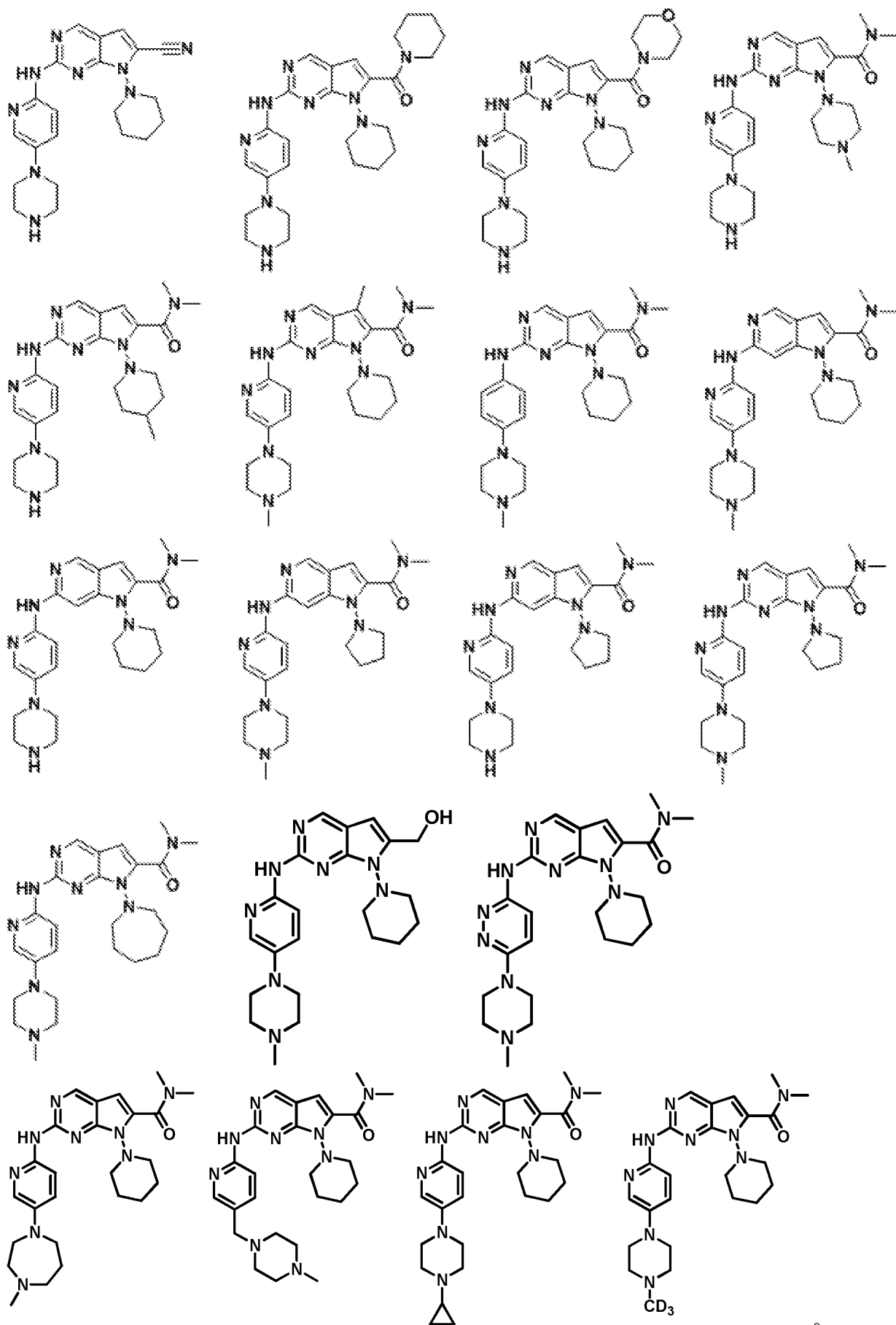
在另一优选例中, R_{13} 和 R_{14} 与相邻的氮原子形成 4-6 元环状结构。

在另一优选例中, 当 L 为无时, Y 为含氮原子的六元杂环。

在另一优选例中, A、B、L、X、Y、Z、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 或 R_5 为实施例中所述具体化合物中所对应的基团。

在另一优选例中, 所述式 I 化合物为如下所示的化合物:

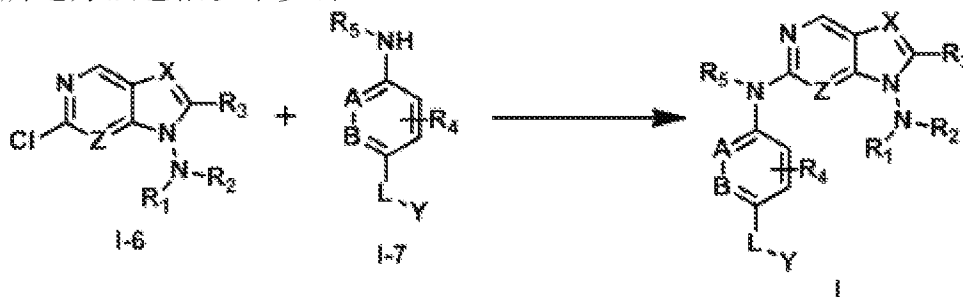




5

本发明的第二方面提供了一种制备如本发明第一方面所述的式 I 化合物的方

法, 所述方法包括以下步骤:



a) 在惰性溶剂中, 式 I-6 化合物和式 I-7 化合物反应, 形成式 I 化合物, 其中各基团的定义如上文中所述。

5 在另一优选例中, 所述惰性溶剂选自下组: 甲苯、二甲苯、乙二醇二甲醚、二氧六环、THF、DMF、DMSO、NMP, 或其组合。

在另一优选例中, 所述反应在钯催化剂存在下进行。

在另一优选例中, 所述的钯催化剂选自下组: $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ 、 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ 、 $\text{Pd}(\text{dba})_2$ 、 $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ 、 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ 、 $\text{Pd}(\text{dppe})\text{Cl}_2$ 、 $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ 、 $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$, 或其组合。

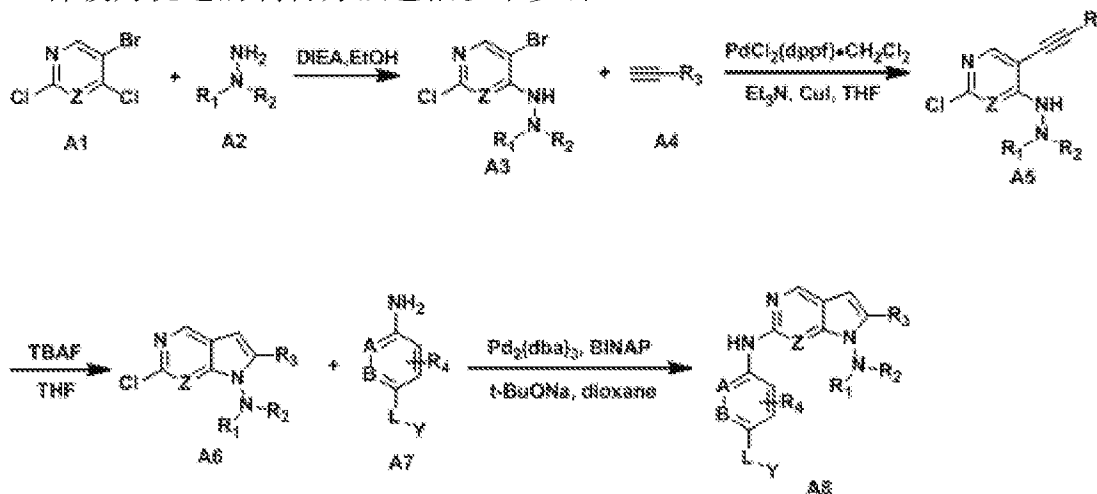
10 在另一优选例中, 所述反应在配体存在下进行。

在另一优选例中, 所述的配体为单齿膦配体或双齿膦配体; 更佳地, 所述的配体选自下组: 三苯基膦、三甲苯基膦、三环己基膦、三叔丁基膦、X-Phos、S-Phos、联萘二苯基膦、1,1'-双(二苯基膦)二茂铁、1, 2-二(二苯基膦基)乙烷、Xant-Phos, 或其组合。

15 在另一优选例中, 所述反应在碱存在下进行。

在另一优选例中, 所述的碱选自下组: Na_2CO_3 、 K_2CO_3 、 Cs_2CO_3 、LiHMDS、NaHMDS、KHMDS、叔丁醇钠、叔丁醇钾、三乙胺、二异丙基胺、二异丙基乙胺, 或其组合。

一种较为优选的制备方法包括以下步骤:



(1) 化合物 A3 可由化合物 A1 和相应的胍 A2 在碱(包括但不限于二异丙基乙基胺, 三乙胺)的催化下于惰性溶剂(乙醇, THF 等)中反应。

(2) 化合物 A5 可由化合物 A3 和相应的末端炔烃 A4 进行 Sonogashira 耦合 (Sonogashira coupling), 在惰性溶剂(如 THF、DMF、DMSO、二氧六环等)中, 在催

化剂 a(如四(三苯基膦)钯、三(二亚苄基丙酮)二钯($\text{Pd}_2(\text{dba})_3$)、双(二亚苄基丙酮)钯、二氯二(三苯基膦)钯、双(三邻苯甲基膦)二氯化钯、1, 2-二(二苯基膦基)乙烷二氯化钯、[1,1'-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯、[1,1'-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯二氯甲烷络合物等)、催化剂 b(如碘化亚铜、氯化锌、氧化银、碳酸银等)和碱(如碳酸钾、氟化钾、碳酸铯、氟化铯、氟化钠、磷酸钾、水合磷酸钾、碳酸钠、碳酸氢钠、1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯、三乙胺、二异丙基胺、二异丙基乙胺、吡啶或其组合等)的存在下, 进行 Sonogashira 偶联反应(反应时间为 2-8 小时), 得到化合物 A5;

(3) 化合物 A6 可由化合物 A5 在惰性溶剂中(二氯甲烷, THF, 乙腈等), 加入四丁基氟化铵 (TBAF), 加热下反应得到。

(4) 化合物 A8 可由化合物 A6 和相应的芳香胺 A7 进行布赫瓦尔德-哈特维希耦合(Buchwald-Hartwig coupling), 在惰性溶剂(如甲苯、THF、DMF、DMSO、二氧六环等)中, 在催化剂 (如四(三苯基膦)钯、三(二亚苄基丙酮)二钯($\text{Pd}_2(\text{dba})_3$)、双(二亚苄基丙酮)钯、二氯二(三苯基膦)钯、双(三邻苯甲基膦)二氯化钯、1, 2-二(二苯基膦基)乙烷二氯化钯、[1,1'-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯、[1,1'-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯二氯甲烷络合物等)、配体(如三甲苯基膦、三环己基膦、三叔丁基膦、联萘二苯基膦等)和碱(如碳酸钾、氟化钾、碳酸铯、氟化铯、氟化钠、磷酸钾、水合磷酸钾、碳酸钠、碳酸氢钠、叔丁醇钠、叔丁醇钾、1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯、三乙胺、二异丙基胺、二异丙基乙胺、吡啶或其组合等)的存在下, 进行 Buchwald-Hartwig 偶联反应 (反应时间为 2-8 小时), 得到化合物 A8。

本发明的第三方面提供了如本发明第一方面所述的式 I 化合物的用途, 用于:

(a)制备治疗与 CDK 激酶活性或表达量相关的疾病的药物;

(b)制备 CDK 激酶靶向抑制剂;

(c)体外非治疗性地抑制 CDK 激酶的活性;

(d)体外非治疗性地抑制肿瘤细胞增殖; 和/或

(e)治疗与 CDK 激酶活性或表达量相关的疾病。

在另一优选例中, 所述 CDK 激酶选自下组: CDK4、CDK6, 或其组合; 和/或所述的肿瘤细胞为白血病细胞株, 较佳地为髓源白血病细胞株, 更佳地为急性髓源白血病细胞株 KG1 细胞。

本发明的第四方面提供了一种药物组合物, 所述的药物组合物包括: (i)有效量的式 I 化合物, 或其药学上可接受的盐; 和(ii)药学上可接受的载体。

本发明的第五方面提供了一种抑制 CDK 激酶活性的方法, 所述方法包括步骤: 对抑制对象施用抑制有效量的如本发明第一方面所述的式 I 化合物或其药学上可接受的盐, 或对抑制对象施用抑制有效量的如本发明第四方面所述的药物组合物。

本发明第六方面提供了一种体外抑制肿瘤细胞的方法, 所述方法包括: 对抑制对象施用抑制有效量的如本发明第一方面所述的式 I 化合物或其药学上可接受的盐, 或对抑制对象施用抑制有效量的如本发明第四方面所述的药物组合物。

应理解, 在本发明范围内中, 本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中

具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

具体实施方式

5 本发明人经过长期而深入的研究，制备了一类具有式 I 所示结构的化合物，并发现其具有 CDK 激酶抑制活性。且所述的化合物在极低浓度(可低至 $\leq 100\text{nM}$)下，即对一系列 CDK 激酶产生抑制作用，抑制活性相当优异，因而可以用于治疗与 CDK 激酶活性或表达量相关的疾病如肿瘤。基于上述发现，发明人完成了本发明。

10 术语

如本文所用，术语“C1-C6 烷基”指具有 1~6 个碳原子的直链或支链烷基，例如甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基，或类似基团。

如本文所用，术语“C2-C6 酰基”指形如“具有 1~6 个碳原子的直链或支链烷基-羰基”结构的取代基，如乙酰基、丙酰基、丁酰基，或类似基团。

15 术语“C1-C6 亚烷基”指如上文所述的 C1~C6 烷基失去一个氢原子之后形成的基团，例如 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ，或类似基团。

术语“C6-C10 亚芳基”指具有 6-10 个碳原子的芳基失去一个氢原子形成的基团，包括单环或二环亚芳基，例如亚苯基、亚萘基，或类似基团。

术语“六元芳基”指苯基。

20 术语“5~8 元芳基”指 5~8 元环的碳非饱和系的取代基，如苯基，或类似基团。

术语“5~8 元杂芳基”指具有 5~8 元的环系上具有一个或多个选自 O、S、N 或 P 的杂原子的非饱和环系取代基，如吡啶基、噻吩基，或类似基团。

术语“饱和 3~12 元碳环”指具有 3~12 个碳原子的饱和碳环，例如环己基，或类似基团。

25 术语“3~12 元杂环”指具有 3~12 元的环系上具有一个或多个选自 O、S、N 或 P 的杂原子的饱和环系取代基，如哌啶基，吡咯基，或类似基团。

术语“卤素”指 F、Cl、Br 和 I。

本发明中，术语“含有”、“包含”或“包括”表示各种成分可一起应用于本发明的混合物或组合物中。因此，术语“主要由...组成”和“由...组成”包含在术语“含有”中。

30 本发明中，术语“药学上可接受的”成分是指适用于人和/或动物而无过度不良反应(如毒性、刺激和变态反应)，即有合理的效益/风险比的物质。

本发明中，术语“有效量”指治疗剂治疗、缓解或预防目标疾病或状况的量，或是表现出可检测的治疗或预防效果的量。对于某一对象的精确有效量取决于该对象的体型和健康状况、病症的性质和程度、以及选择给予的治疗剂和/或治疗剂的组合。

35 因此，预先指定准确的有效量是没用的。然而，对于某给定的状况而言，可以用常规实验来确定该有效量，临床医师是能够判断出来的。

在本文中，除特别说明之处，术语“取代”指基团上的一个或多个氢原子被选自

下组的取代基取代：卤素、未取代或卤代的 C1-C6 烷基、未取代或卤代的 C2-C6 酰基、未取代或卤代的 C1-C6 烷基-羟基。

除非特别说明，本发明中，所有出现的化合物均意在包括所有可能的光学异构体，如单一手性的化合物，或各种不同手性化合物的混合物(即外消旋体)。本发明的所有化合物之中，各手性碳原子可以任选地为 R 构型或 S 构型，或 R 构型和 S 构型的混合物。

如本文所用，术语“本发明化合物”指式 I 所示的化合物。该术语还包括及式 I 化合物的各种晶型形式、药学上可接受的盐、水合物或溶剂合物。

如本文所用，术语“药学上可接受的盐”指本发明化合物与酸或碱所形成的适合用作药物的盐。药学上可接受的盐包括无机盐和有机盐。一类优选的盐是本发明化合物与酸形成的盐。适合形成盐的酸包括但不限于：盐酸、氢溴酸、氢氟酸、硫酸、硝酸、磷酸等无机酸，甲酸、乙酸、丙酸、草酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、苦味酸、甲磺酸、苯甲磺酸，苯磺酸等有机酸；以及天冬氨酸、谷氨酸等酸性氨基酸。

药物组合物和施用方法

由于本发明化合物具有优异的对 CDK 激酶例如 CDK4、CDK6 的抑制活性，因此本发明化合物及其各种晶型，药学上可接受的无机或有机盐，水合物或溶剂合物，以及含有本发明化合物为主要活性成分的药物组合物可用于治疗、预防以及缓解由与 CDK 活性或表达量相关的疾病。根据现有技术，本发明化合物可用于治疗以下疾病：乳腺癌、子宫内膜癌、胃癌、膀胱癌、淋巴瘤、头颈癌等等；特别是，还能与 PI3K、B-RAF、FGFR 等激酶抑制剂联合用药，克服激酶抑制剂耐药，用于靶向药物耐药的黑色素瘤、乳腺癌、非小细胞肺癌、肝癌、神经胶质瘤、结肠癌等肿瘤的治疗。

本发明的药物组合物包含安全有效量范围内的本发明化合物或其药理上可接受的盐及药理上可以接受的赋形剂或载体。其中“安全有效量”指的是：化合物的量足以明显改善病情，而不至于产生严重的副作用。通常，药物组合物含有 1-2000mg 本发明化合物/剂，更佳地，含有 5-200mg 本发明化合物/剂。较佳地，所述的“一剂”为一个胶囊或药片。

“药学上可以接受的载体”指的是：一种或多种相容性固体或液体填料或凝胶物质，它们适合于人使用，而且必须有足够的纯度和足够低的毒性。“相容性”在此指的是组合物中各组份能和本发明的化合物以及它们之间相互掺和，而不明显降低化合物的药效。药学上可以接受的载体部分例子有纤维素及其衍生物(如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素钠、纤维素乙酸酯等)、明胶、滑石、固体润滑剂(如硬脂酸、硬脂酸镁)、硫酸钙、植物油(如豆油、芝麻油、花生油、橄榄油等)、多元醇(如丙二醇、甘油、甘露醇、山梨醇等)、乳化剂(如吐温®)、润湿剂(如十二烷基硫酸钠)、着色剂、调味剂、稳定剂、抗氧化剂、防腐剂、无热原水等。

本发明化合物或药物组合物的施用方式没有特别限制，代表性的施用方式包括(但并不限于)：口服、瘤内、直肠、肠胃外(静脉内、肌肉内或皮下)、和局部给药。

用于口服给药的固体剂型包括胶囊剂、片剂、丸剂、散剂和颗粒剂。在这些固体剂型中，活性化合物与至少一种常规惰性赋形剂(或载体)混合，如柠檬酸钠或磷酸二钙，或与下述成分混合：(a)填料或增容剂，例如，淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅酸；(b)粘合剂，例如，羟甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶；(c)保湿剂，例如，甘油；(d)崩解剂，例如，琼脂、碳酸钙、马铃薯淀粉或木薯淀粉、藻酸、某些复合硅酸盐、和碳酸钠；(e)缓溶剂，例如石蜡；(f)吸收加速剂，例如，季胺化合物；(g)润湿剂，例如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯；(h)吸附剂，例如，高岭土；和(i)润滑剂，例如，滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠，或其混合物。胶囊剂、片剂和丸剂中，剂型也可包含缓冲剂。

固体剂型如片剂、糖丸、胶囊剂、丸剂和颗粒剂可采用包衣和壳材制备，如肠衣和其它本领域公知的材料。它们可包含不透明剂，并且，这种组合物中活性化合物或化合物的释放可以延迟的方式在消化道内的某一部分中释放。可采用的包埋组分的实例是聚合物物质和蜡类物质。必要时，活性化合物也可与上述赋形剂中的一种或多种形成微胶囊形式。

用于口服给药的液体剂型包括药学上可接受的乳液、溶液、悬浮液、糖浆或酏剂。除了活性化合物外，液体剂型可包含本领域中常规采用的惰性稀释剂，如水或其它溶剂，增溶剂和乳化剂，例如，乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺以及油，特别是棉籽油、花生油、玉米胚油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油或这些物质的混合物等。

除了这些惰性稀释剂外，组合物也可包含助剂，如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、矫味剂和香料。

除了活性化合物外，悬浮液可包含悬浮剂，例如，乙氧基化异十八烷醇、聚氧乙烯山梨醇和脱水山梨醇酯、微晶纤维素、甲醇铝和琼脂或这些物质的混合物等。

用于肠胃外注射的组合物可包含生理上可接受的无菌含水或无水溶液、分散液、悬浮液或乳液，和用于重新溶解成无菌的可注射溶液或分散液的无菌粉末。适宜的含水和非水载体、稀释剂、溶剂或赋形剂包括水、乙醇、多元醇及其适宜的混合物。

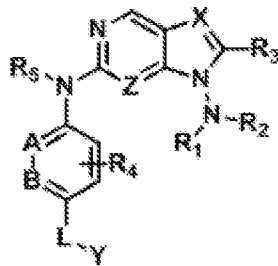
用于局部给药的本发明化合物的剂型包括软膏剂、散剂、贴剂、喷射剂和吸入剂。活性成分在无菌条件下与生理上可接受的载体及任何防腐剂、缓冲剂，或必要时可能需要的推进剂一起混合。

本发明化合物可以单独给药，或者与其他药学上可接受的化合物联合给药。

使用药物组合物时，是将安全有效量的本发明化合物适用于需要治疗的哺乳动物(如人)，其中施用剂量为药学上认为的有效给药剂量，对于 60kg 体重的人而言，日给药剂量通常为 1~2000mg，优选 5~500mg。当然，具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素，这些都是熟练医师技能范围内的。

式 I 化合物

本发明提供了一种如式 I 所示的化合物，或其药学上可接受的盐：



I

5 式中，

R_1 和 R_2 各自独立地选自：H、取代或未取代的 C1-C8 烷基、C(O)OR₈、CONR₉R₁₀、C(O)R₁₁、取代或未取代的 5~8 元芳基、取代或未取代的 5~8 元杂芳基、取代或未取代的 3~12 元饱和或不饱和杂环或碳环；其中，所述的杂芳基包含 1-3 个选自下组的杂原子：N、O 或 S；所述的杂环包含 1-3 个选自下组的杂原子：N、O 或 S；

10 此外， R_1 和 R_2 可与相邻的 N 原子连接构成环状结构，所述的环状结构包括取代或未取代的 3~12 元饱和或不饱和的杂环或桥环或螺环；其中，所述的杂环是指环结构中除了包含连接母核的氮原子之外，还包含 0-3 个选自下组的杂原子：N、O 或 S；

R_3 选自：取代或未取代的 C1-C8 烷基、CN、C(O)OR₁₂、CONR₁₃R₁₄、C(O)R₁₅、取代或未取代的 5~8 元芳基、取代或未取代的 5~8 元杂芳基、取代或未取代的 3~12 元饱和或不饱和的杂环或碳环；其中，所述的杂芳基包含 1-3 个选自下组的杂原子：N、O 或 S；所述的杂环包含 1-3 个选自下组的杂原子：N、O 或 S；

R_4 选自：H、取代或未取代的 C1-C4 烷基、取代或未取代的 C1-C8 烷氧基、卤素、OH、CN、C(O)OR₁₂、CONR₁₃R₁₄、C(O)R₁₅、取代或未取代的 5~8 元芳基、取代或未取代的 5~8 元杂芳基、取代或未取代的 3~12 元饱和或不饱和的杂环或碳环；其中，所述的杂芳基包含 1-3 个选自下组的杂原子：N、O 或 S；所述的杂环包含 1-3 个选自下组的杂原子：N、O 或 S；

R_5 选自：H 或 C1-C4 烷基；

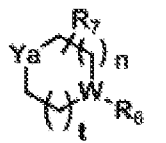
X 为 CR₁₆ 或 N；

25 A、B 和 Z 各自独立地选自：N 或 CR₁₆；

R_{16} 为 H、C1-C4 烷基或 C1-C4 卤代烷基；

L 为选自下组的基团：无、C1-C6 亚烷基、C(O)、CONR₁₇ 或 S(O)₂；

Y 为：H， R_{18} ，NR₁₉R₂₀，OH，或 Y 为选自下组基团的一部分：



30 其中，

R_6 为无、H、取代或未取代的 C1-C8 烷基、取代或未取代的 C1-C8 烷氧基、取

代或未取代的 C2-C6 酰基、取代或未取代的 C2-C6 磺酰基、取代或未取代的 C1-C6 亚烷基羟基、 $\text{CONR}_{22}\text{R}_{23}$ 或 C(O)R_{24} ;

R_7 可以是 0~3 个取代基且 R_7 为取代或未取代的 C1-C8 烷基、氧或卤素, 或 2 个或更多 R_7 形成桥环烷基; W 为 CR_{21} 、N 或 O (当 W 为 O 时, R_6 是不存在的);

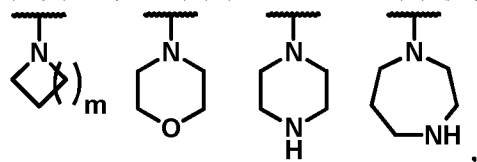
5 Y_a 为 CR_{21} 或 N; R_{21} 为 H 或卤素;

R_8 、 R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 、 R_{17} 、 R_{18} 、 R_{19} 、 R_{20} 、 R_{22} 、 R_{23} 和 R_{24} 各自独立地选自: H、取代或未取代的 C1-C8 烷基、取代或未取代的 C1-C8 烷氧基、取代或未取代的 C1-C6 亚烷基-胺基、取代或未取代的 C1-C6 亚烷基-羟基、取代或未取代的 5~8 元芳基、或取代或未取代的 5~8 元杂芳基; 取代或未取代的 3~12 元饱和杂环或碳环; 其中, 所述的杂芳基包含至少一个选自下组的杂原子: N、O 或 S, 所述的杂环包含至少一个选自下组的杂原子: N、O 或 S;

n 和 t 分别为 0, 1 或 2;

上述的任一“取代”指基团上的一个或多个氢原子被选自下组的取代基取代: 卤素、OH、 NH_2 、CN、未取代或卤代的 C1-C8 烷基、C1-C8 烷氧基、未取代或卤代的 C2-C6 烯基、未取代或卤代的 C2-C6 炔基、未取代或卤代的 C2-C6 酰基、未取代或卤代的 5~8 元芳基、未取代或卤代的 5~8 元杂芳基、未取代或卤代的 3~12 元饱和杂环或碳环; 其中, 所述的杂芳基包含 1-3 个选自下组的杂原子: N、O 或 S, 所述的杂环包含 1~3 个选自下组的杂原子: N、O 或 S。

在另一优选例中, R_1 - N - R_2 为取代或未取代的选自下组的基团:



20

其中, m 是 0、1、2、3、4、5、6、7、8 或 9, 所述“取代”如上文所述。

在另一优选例中, R_1 和 R_2 与相邻的氮原子形成 4-12 元环状结构。

在另一优选例中, R_1 和 R_2 与相邻的氮原子形成 5-7 元环状结构。

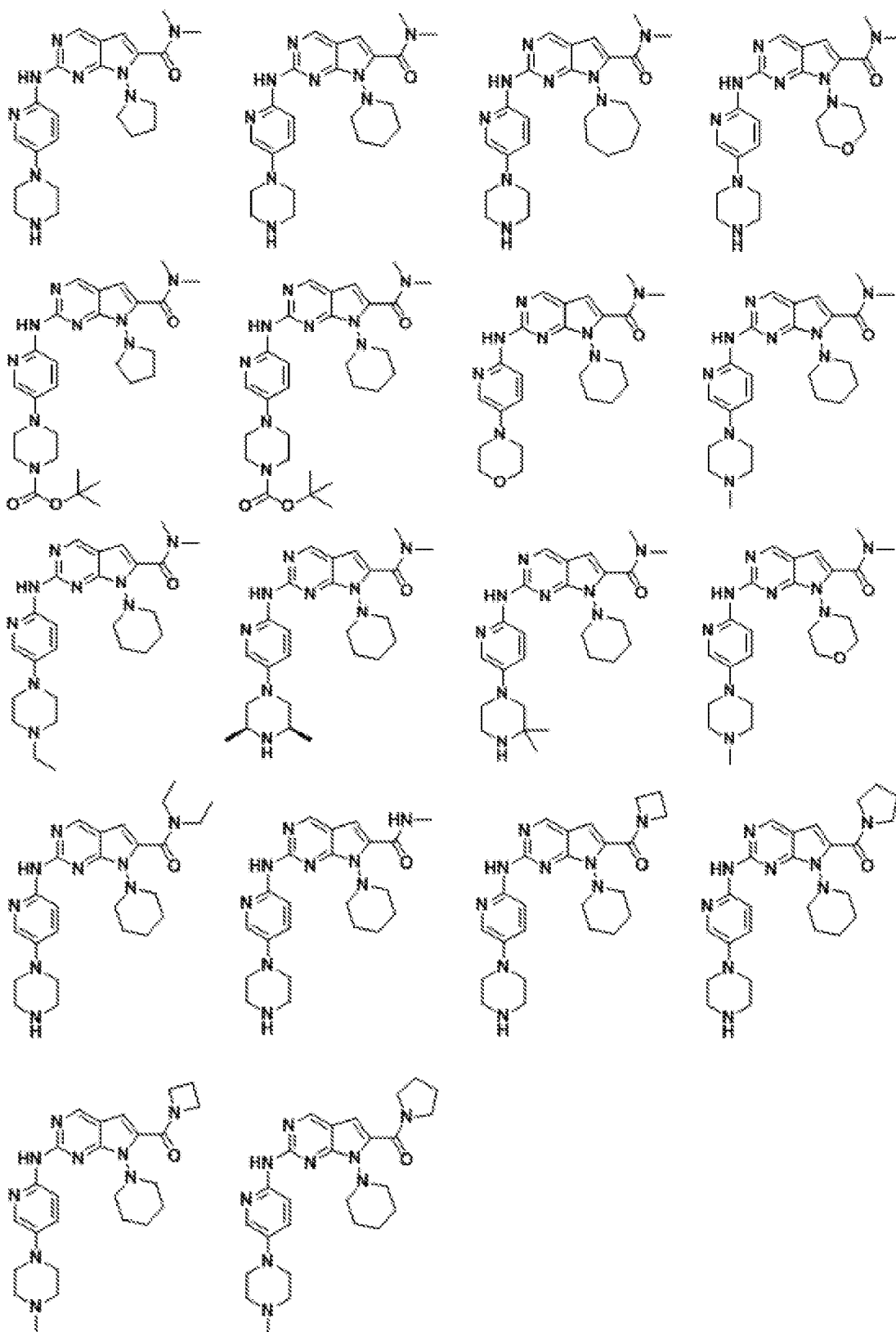
在另一优选例中, R_1 和 R_2 与相邻的氮原子形成六元环状结构。

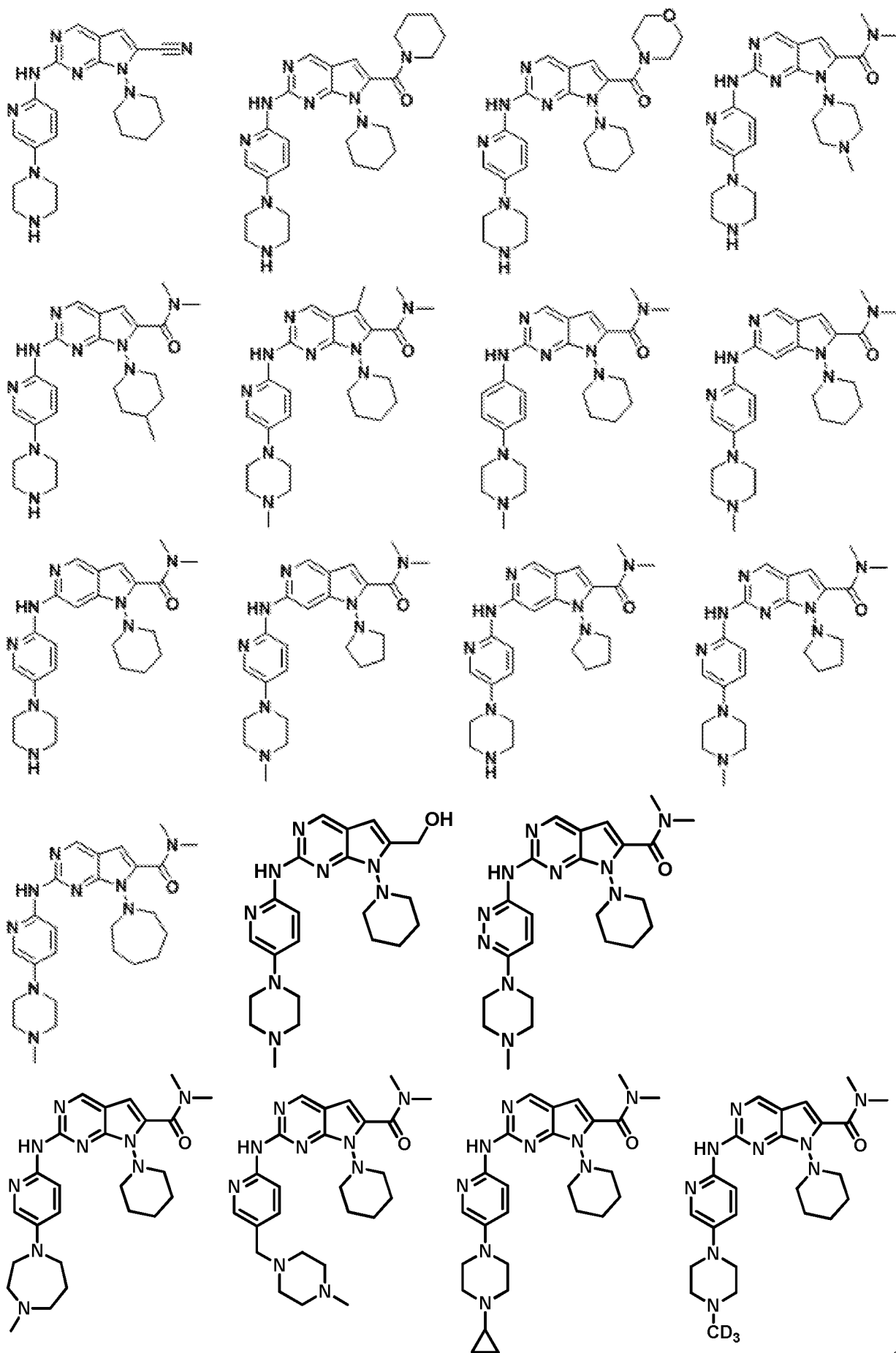
25 在另一优选例中, R_{13} 和 R_{14} 与相邻的氮原子形成 4-6 元环状结构。

在另一优选例中, 当 L 为无时, Y 为含氮原子的六元杂环。

在另一优选例中, A 、 B 、 L 、 X 、 Y 、 Z 、 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 或 R_5 为实施例中所述具体化合物中所对应的基团。

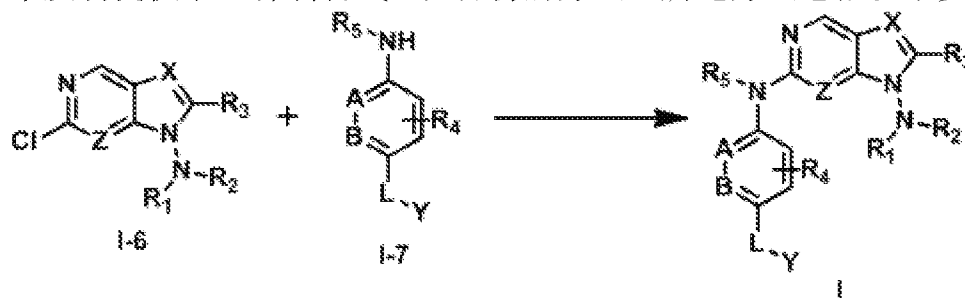
在另一优选例中, 所述式 I 化合物为如下所示的化合物:





式 I 化合物的制备方法

本发明提供了一种制备式 I 化合物的方法，所述方法包括以下步骤：



a) 在惰性溶剂中，式 I-6 化合物和式 I-7 化合物反应，形成式 I 化合物，其中各基团的定义如上文中所述。

在另一优选例中，所述惰性溶剂选自下组：甲苯、二甲苯、乙二醇二甲醚、二氧六环、THF、DMF、DMSO、NMP，或其组合。

在另一优选例中，所述反应在钯催化剂存在下进行。

在另一优选例中，所述的钯催化剂选自下组： $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ 、 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ 、 $\text{Pd}(\text{dba})_2$ 、 $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ 、 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ 、 $\text{Pd}(\text{dppe})\text{Cl}_2$ 、 $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ 、 $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ ，或其组合。

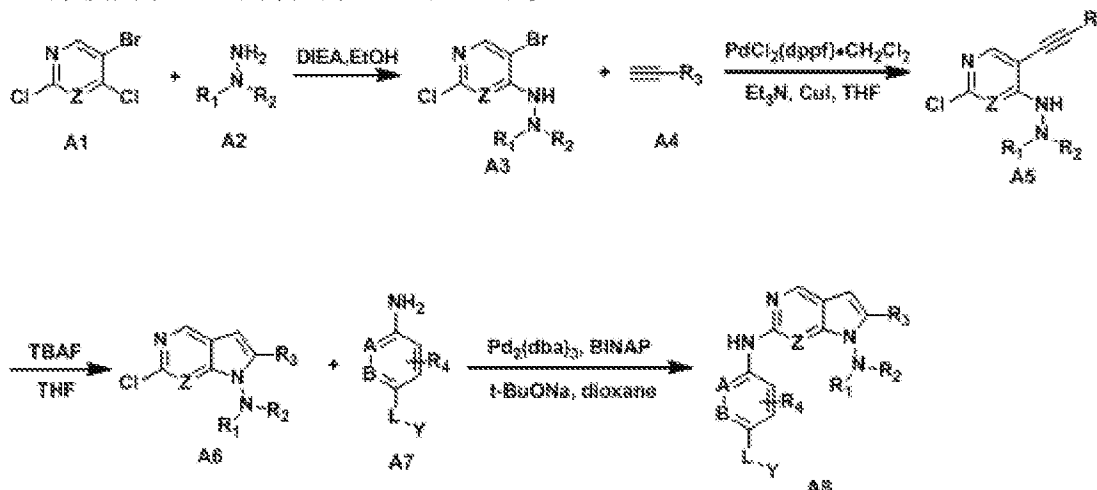
在另一优选例中，所述反应在配体存在下进行。

在另一优选例中，所述的配体为单齿膦配体或双齿膦配体；更佳地，所述的配体选自下组：三苯基膦、三甲苯基膦、三环己基膦、三叔丁基膦、X-Phos、S-Phos、联萘二苯基膦、1,1'-双(二苯基膦)二茂铁、1,2-二(二苯基膦基)乙烷、Xant-Phos，或其组合。

在另一优选例中，所述反应在碱存在下进行。

在另一优选例中，所述的碱选自下组： Na_2CO_3 、 K_2CO_3 、 Cs_2CO_3 、LiHMDS、NaHMDS、KHMDS、叔丁醇钠、叔丁醇钾、三乙胺、二异丙基胺、二异丙基乙胺，或其组合。

一种较为优选的制备方法包括以下步骤：



(1) 化合物 A3 可由化合物 A1 和相应的胺 A2 在碱(例如但不限于二异丙基乙基胺，三乙胺)的催化下于惰性溶剂(乙醇，THF 等)中反应。

(2) 化合物 A5 可由化合物 A3 和相应的末端炔烃 A4 进行 Sonogashira 耦合

(Sonogashira coupling), 在惰性溶剂(如 THF、DMF、DMSO、二氧六环等)中, 在催化剂 a(如四(三苯基膦)钯、三(二亚苄基丙酮)二钯(Pd₂(dba)₃)、双(二亚苄基丙酮)钯、二氯二(三苯基膦)钯、双(三邻苯甲基膦)二氯化钯、1, 2-二(二苯基膦基)乙烷二氯化钯、[1,1'-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯、[1,1'-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯二氯甲烷络合物等)、催化剂 b(如碘化亚铜、氯化锌、氧化银、碳酸银等)和碱(如碳酸钾、氟化钾、碳酸铯、氟化铯、氟化钠、磷酸钾、水合磷酸钾、碳酸钠、碳酸氢钠、1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯、三乙胺、二异丙基胺、二异丙基乙胺、吡啶或其组合等)的存在下, 进行 Sonogashira 偶联反应(反应时间为 2-8 小时), 得到化合物 A5;

(3) 化合物 A6 可由化合物 A5 在惰性溶剂中(二氯甲烷, THF, 乙腈等), 加入四丁基氟化铵 (TBAF), 加热下反应得到。

(4) 化合物 A8 可由化合物 A6 和相应的芳香胺 A7 进行布赫瓦尔德-哈特维希耦合(Buchwald-Hartwig coupling), 在惰性溶剂(如甲苯、THF、DMF、DMSO、二氧六环等)中, 在催化剂 (如四(三苯基膦)钯、三(二亚苄基丙酮)二钯(Pd₂(dba)₃)、双(二亚苄基丙酮)钯、二氯二(三苯基膦)钯、双(三邻苯甲基膦)二氯化钯、1, 2-二(二苯基膦基)乙烷二氯化钯、[1,1'-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯、[1,1'-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯二氯甲烷络合物等)、配体(如三甲苯基膦、三环己基膦、三叔丁基膦、联萘二苯基膦等)和碱(如碳酸钾、氟化钾、碳酸铯、氟化铯、氟化钠、磷酸钾、水合磷酸钾、碳酸钠、碳酸氢钠、叔丁醇钠、叔丁醇钾、1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯、三乙胺、二异丙基胺、二异丙基乙胺、吡啶或其组合等)的存在下, 进行 Buchwald-Hartwig 偶联反应 (反应时间为 2-8 小时), 得到化合物 A8。

式 I 化合物的应用

本发明提供了式 I 化合物的应用, 用于:

(a)制备治疗与 CDK 激酶活性或表达量相关的疾病的药物;

(b)制备 CDK 激酶靶向抑制剂;

(c)体外非治疗性地抑制 CDK 激酶的活性;

(d)体外非治疗性地抑制肿瘤细胞增殖; 和/或

(e)治疗与 CDK 激酶活性或表达量相关的疾病。

在另一优选例中, 所述 CDK 激酶选自下组: CDK4、CDK6, 或其组合; 和/或所述的肿瘤细胞为白血病细胞株, 较佳地为髓源白血病细胞株, 更佳地为急性髓源白血病细胞株 KG1 细胞。

本发明的主要优点包括:

1.提供了一种如式 I 所示的化合物。

2.提供了一种结构新颖的 CDK 激酶抑制剂及其制备和应用, 所述的抑制剂在极低浓度下即可抑制各类 CDK 激酶的活性。

3.提供了一类治疗与 CDK 激酶活性相关疾病的药物组合物。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

各实施例中：

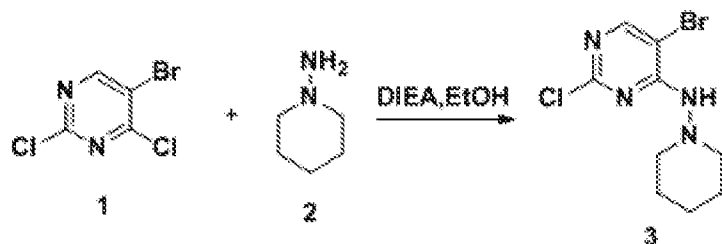
LCMS 仪器：PumpAgilent1100UV 检测器：Agilent1100DAD；

MassSpectrometer：API3000；

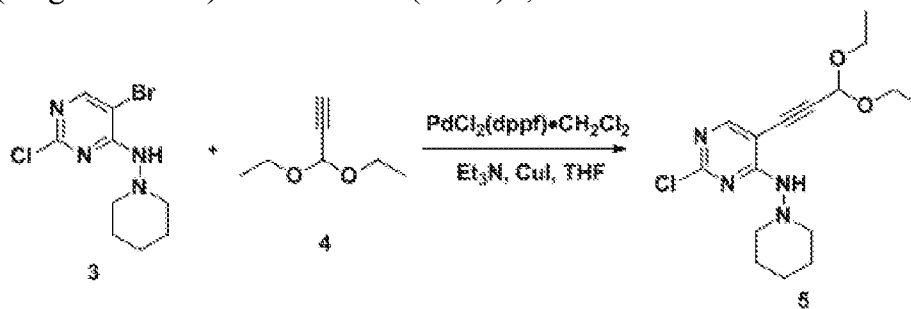
层析柱：WaterssunfireC18,4.6×50mm,5um；

流动相：A—乙腈；B-H₂O(0.1%FA)。

实施例 1

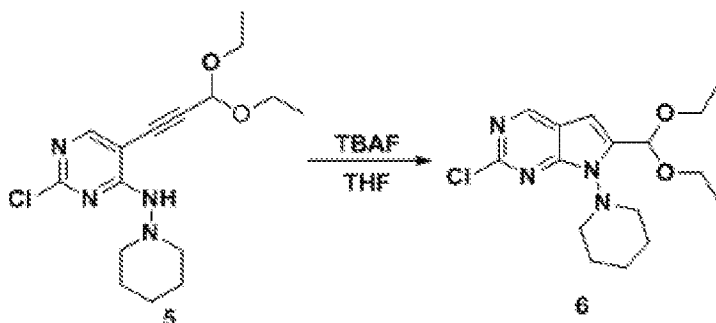


在干燥的 250mL 三口瓶中加入化合物 1(5.00g, 21.94mmol)和乙醇(100.0mL)，-20°C 缓慢滴加 1-氨基吡咯 2(3.30g, 32.91mmol)和 N,N-二异丙基乙胺(4.25g, 32.91mmol)。-20°C 下搅拌 3 小时，反应液旋干溶剂并过硅胶柱纯化得白色固体化合物 3(2.9g, 45.24%)。LCMS:293(M+H)⁺,RT=0.50min.



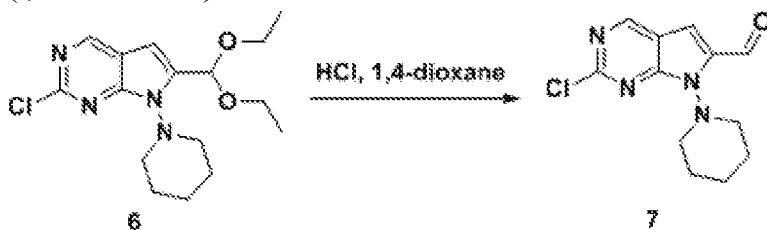
化合物 3 (2.5g, 8.56mmol) 和[1,1'-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯二氯甲烷络合物 (0.35g, 0.4281mmol) 溶于四氢呋喃 (12mL),在室温下加入三乙胺 (1.3g, 12.84mmol) 和 3,3-二乙氧基-1-丙炔 4 (1.64g,12.84mmol)。氮气置换 1 分钟，室温下搅拌 10 分钟。然后加入碘化亚铜 (65.1mg, 0.3425mmol)，氮气置换 3 次。100°C 下微波 6 小时，混合物拌硅胶过柱纯化得到黄色油状化合物 5 (1.512g, 52.25%)。

LCMS:339(M+H)⁺,RT=1.72min.

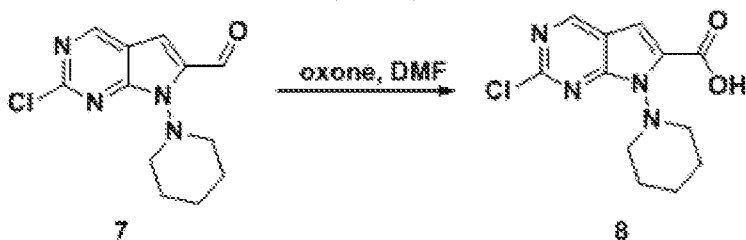


把化合物 **5** (1.512g, 4.47mmol) 溶于四氢呋喃 (80ml), 在室温下加入四丁基氟化铵 (7.13g, 27.29mmol)。65°C 下搅拌 2 小时, 反应液旋干溶剂并过硅胶柱纯化得黄色油状化合物 **6** (1.208g, 79.89%)。LCMS: 339(M+H)⁺, RT=1.72min。

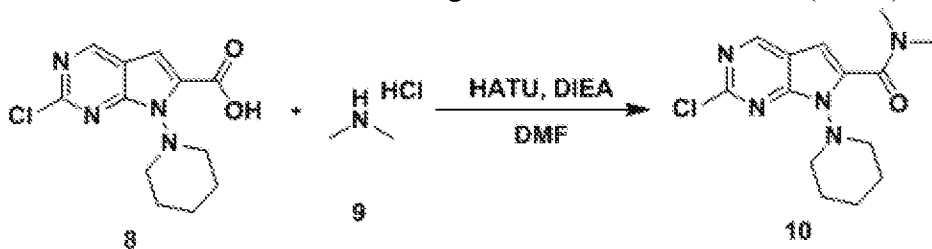
¹HNMR(CD₃Cl₃, 400MHz) δ(ppm) 8.723(s, 1H), 6.512(s, 1H), 5.728(s, 1H), 3.967(t, 2H, J=11Hz), 3.646-3.729(m, 4H), 3.104(d, 2H, J=10Hz), 1.689-1.838(m, 6H), 1.261(t, 6H, J=7Hz)。



化合物 **6** (0.98g, 2.899mmol) 溶于 1,4-二氧六环 (15ml) 室温下加入浓盐酸 (8ml), 搅拌 10 分钟。反应液用 60mL 水稀释, 80mL 乙酸乙酯萃取 2 次, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 旋干溶剂得褐色固体化合物 **7** (0.765g, 100%), 无需纯化直接用于下一步。LCMS: 265(M+H)⁺, RT=1.34min。

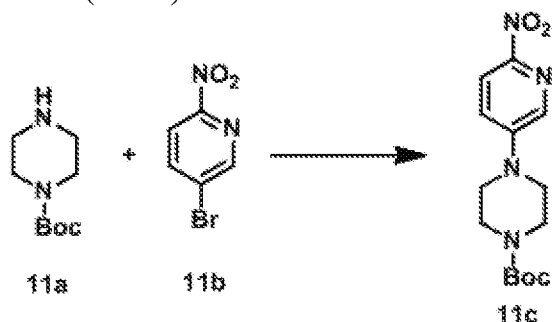


化合物 **7** (0.765g, 2.899mmol) 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (5ml) 中, 室温下加入过氧单磺酸钾 (1.96g, 3.1875mmol), 室温搅拌过夜。反应液加水, 固体析出, 过滤得到黄色固体化合物 **8** (0.812g, 100%)。LCMS: 281(M+H)⁺, RT=0.92min。

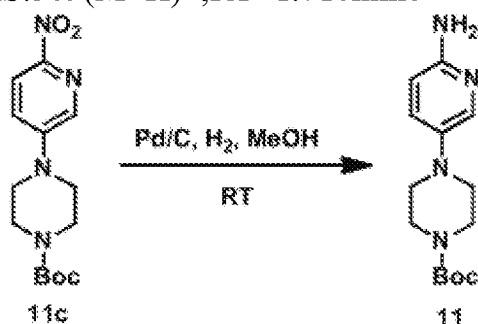


化合物 **8** (0.54g, 1.929mmol) 和二甲胺盐酸盐 **9** (0.189g, 2.3143mmol) 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (6ml), 室温下加入 2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯 (0.733g, 1.929mmol) 和 N,N-二异丙基乙胺 (0.784g, 5.786mmol),

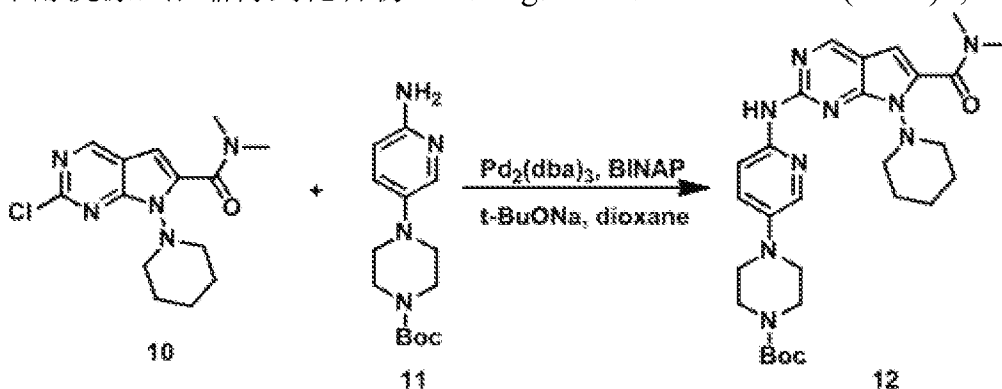
搅拌 1 小时。反应液油泵旋干并过硅胶柱纯化得黄色固体化合物 **10**(0.118g, 19.93%)。LCMS:308(M+H)⁺, RT=1.42min.



把化合物 **11a** (13.7g, 73.9mmol)、化合物 **11b** (10g, 49.3mmol)、碘化钾 (81.8mg, 0.493mmol) 和碳酸钾 (13.6g, 98.6mmol) 加入 DMSO (100mL) 中, 反应液在 120°C 下搅拌过夜。把反应液降温至室温, 用 1mol 盐酸调 pH 约为 7, 用 DCM 萃取, 水相再用饱和碳酸钠碱化, 接着水相再用 DCM 萃取。合并有机相, 用无水硫酸钠干燥, 浓缩, 再用水打浆, 得到化合物 **11c** (9.2g, 60%)。LCMS:309(M+H)⁺, RT=1.710min。



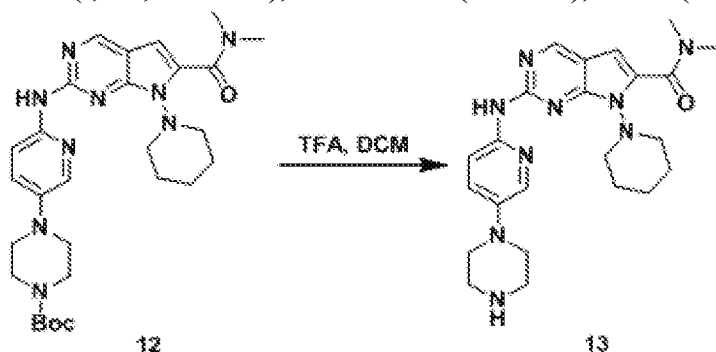
把化合物 **11c** (9.2g, 29.9mmol) 和湿钯碳 (2g) 加入甲醇 (100mL) 中, 反应液中的空气用氢气置换 4-5 次, 然后在氢气氛围下室温搅拌过夜。反应液过滤, 用少量甲醇洗涤, 浓缩得到化合物 **11** (7.1g, 85%)。LCMS:279(M+H)⁺, RT=1.120min。



将化合物 **10**(90mg, 0.2932mmol), 4-(6-氨基吡啶-3-基)哌嗪-1-羧酸叔丁酯 **11**(122.2mg, 0.4397mmol)和三(二亚苄基丙酮)二钯(26.8mg, 0.02932mmol)溶入 1, 4-二氧六环 (1ml) 并加入叔丁醇钠 (50.7mg, 0.5277mmol) 和联萘二苯磷 (36.5mg, 0.05863mmol), 氮气置换 3 次。在 110°C 下微波 1.5 小时。混合物旋干并纯化得褐色固体化合物 **12** (68mg, 42.3%)。LCMS:550(M+H)⁺, RT=1.41min。

¹H NMR(CDCl₃, 400MHz) δ(ppm) 8.931(s, 1H), 8.280(s, 1H), 8.118(s, 1H),

7.916(s,1H), 6.455(s, 1H),3.719(s,4H),3.647(s, 2H), 3.300(s,5H), 3.147(s, 3H),3.006(s, 3H),3.243(t,1H,J=7.6Hz),1.990-2.018(m, 4H), 1.481(s.9H),1.427(s,2H)。

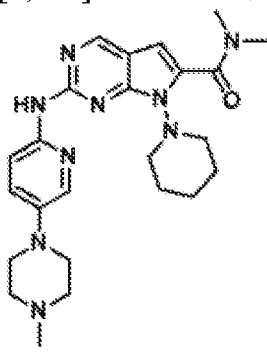


把化合物 **12**(68mg,0.1239mmol)溶于二氯甲烷(10mL)中并加入三氟乙酸(2ml), 室温下搅拌过夜。旋干得粗产品, pre-TLC 纯化后, 得 33mg 黄色固体产物 **13**, 产率为 59.34%。LCMS:450(M+H)⁺, RT=1.12min。

¹HNMR(MeOD,400MHz)δ(ppm)8.680(s, 1H), 8.308(d, 1H, J=9.2Hz), 7.972(d, 1H, J=2.8Hz), 7.498-7.528(m, 1H), 6.413(s, 1H), 3.990(s, 2H), 3.344(s, 1H), 3.138(t, 6H,J=4.8Hz), 3.056(s,3H),2.987-3.011(m, 4H),2.121-2.205(m,1H),1.986-2.088(m,1H)1.581-1.737(m,6H)。

使用类似方法可得到如下化合物:

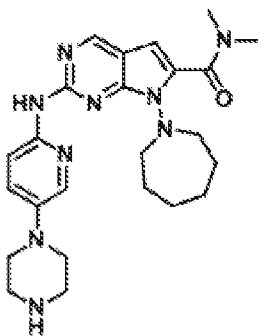
N, N-二甲基-2-((5-(4-甲基哌嗪-1-基)吡啶-2-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-甲酰胺,



LCMS:464(M+H)⁺, RT=1.13min

¹HNMR(DMSO,400MHz)δ(ppm)9.361(s,1H),8.732(s, 1H), 8.240(d, 1H, J=9.2Hz), 8.006(d,1H,J=2.4Hz), 7.465-7.493(m, 1H),6.379(s,1H),3.857(s, 2H), 3.132(s,5H),3.020(s, 3H),2.952(m, 3H),2.479-2.490(m,4H),2.234(s, 3H),1.196(s,1H),1.547-1.703(m,6H)。

7-(环己亚胺-1-基)N, N-二甲基-2-((5-(哌嗪-1-基)吡啶-2-基)氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-甲酰胺

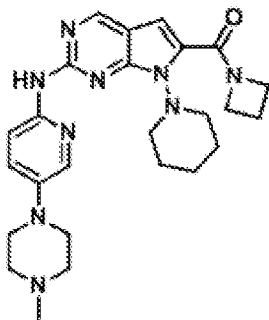


15

LCMS:464(M+H)⁺, RT=1.18min

¹HNMR(MeOD,400MHz)δ(ppm)8.686(s,1H),8.373(d,1H,J=8.8Hz),8.006(d,1H,J=2.8Hz),7.565-7.595(m,1H),6.397(s,1H),5.338(t,1H,J=4.8Hz),3.958(s,2H),3.221-3.245(m,4H),3.158(s,3H),3.065(s,3H),2.156-2.209(m,1H),2.002-2.048(m,2H),1.781(s,6H),1.581-1.674(m,4H)。

氮杂环丁-1-基(2-((5-(4-甲基哌嗪-1-基)吡啶-2-基)氨基)-7-(哌啶-1-基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-基)甲酮,

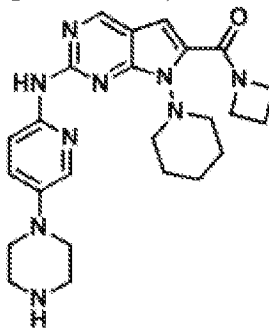


16

LCMS:476(M+H)⁺, RT=1.16min

¹HNMR(MeOD,400MHz)δ(ppm)8.696(s,1H),8.316(d,1H,J=8.8Hz),7.985(d,1H,J=2.8Hz),7.514-7.544(m,1H),6.593(s,1H),4.288(t,2H,J=7.6Hz),4.208(t,2H,J=7.6Hz),3.953(s,2H),3.232(t,4H,J=4.8Hz),2.710(s,4H),2.367-2.424(m,4H),2.152-2.187(m,1H),2.019-2.033(m,1H),1.787(s,5H),1.598(m,1H)。

氮杂环丁-1-基(2-((5-(哌啶-1-基)吡啶-2-基)氨基)-7-(哌啶-1-基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-基)甲酮,



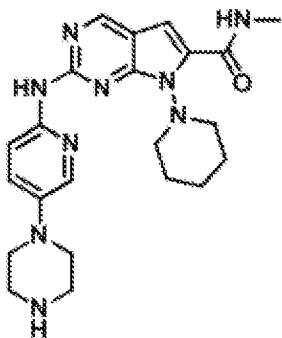
17

LCMS:462(M+H)⁺, RT=1.19min

¹HNMR(MeOD,400MHz)δ(ppm)8.706(s,1H),8.351(d,1H,J=8.4Hz),8.008(d,1H,J=2.8Hz),7.543-7.573(m,1H),6.602(s,1H),4.290(t,2H,J=7.6Hz),

4.210(t,2H,J=8Hz),3.952(s, 2H), 3.215-3.229(m,6H),2.349-2.427(m, 2H),2.152-2.205(m, 2H),2.008-2.033(m,1H),1.788(m, 1H),1.787(s,5H), 1.598(t,1H,J=6.4Hz)。

N-甲基-2-((5-(哌嗪-1-基)吡啶-2-基)氨基)-7-(哌啶-1-基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-甲酰胺，



5

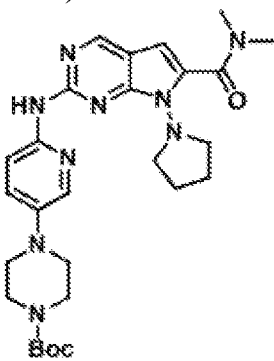
18

LCMS:436(M+H)⁺, RT=1.15min

¹HNMR(MeOD,400MHz)δ(ppm)8.777(s,1H),8.7251(d, 1H,J=9.2Hz), 7.994 (d, 1H, J=2.8Hz), 7.511-7.542(m,1H), 7.130(s, 1H), 4.201(t,2H,J=10.8Hz), 3.132-3.166(m, 5H), 3.004(s,5H),2.187(t, 2H,J=7.6Hz),2.019-2.003(m, 1H),1.944(s,2H),1.790(d, 2H,J=13.6Hz), 1.580-1.616(m,2H)。

10

叔丁基 4-(6-((6-(二甲基氨基甲酰基)-7-(吡咯烷-1-基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-2-基)氨基)吡啶-3-基)哌嗪-1-羧酸酯，



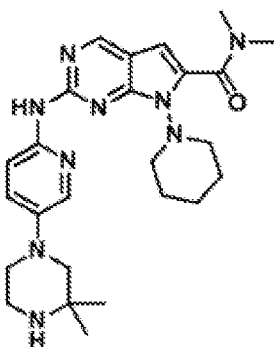
19

LCMS:536(M+H)⁺, RT=1.36min

¹HNMR(CDCl₃,400MHz)δ(ppm)8.723(s,1H),8.395(d, 1H,J=9.2Hz), 7.713 (d, 1H, J=9.2Hz), 7.593(s,1H), 6.374(s, 1H),3.604(d,7H,J=13.6Hz), 3.494 (s, 1H), 3.163(s,3H),3.121(s, 4H),3.031(s, 3H),2.075(s,4H), 1.497(s, 9H)。

15

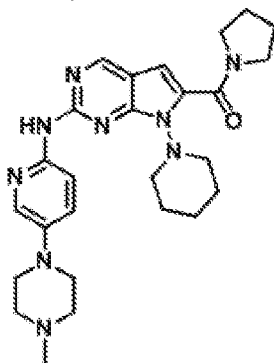
2-((5-(3,3-二甲基哌嗪-1-基)吡啶-2-基)氨基)-N,N-二甲基-7-(哌啶-1-基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-甲酰胺

**20**

LCMS:478(M+H)⁺, RT=1.20min

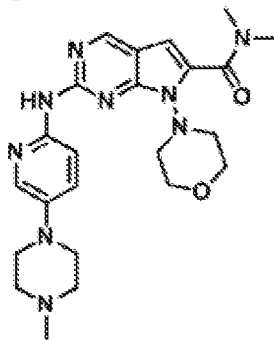
¹HNMR(MeOD,400MHz)δ(ppm)8.720(s,1H),8.277(s,1H),8.018(s,1H),7.624(s,1H),6.434(s,1H),4.003(m,2H),3.477(m,1H),3.141(m,4H),3.049(s,3H),2.177(d,2H,J=8Hz),2.026(d,4H,J=5.6Hz),1.735-1.757(m,3H),1.580-1.616(m,3H),1.471(s,4H),1.401(s,2H)。

(2-((5-(4-甲基哌嗪-1-基)吡啶-2-基)氨基)-7-(哌啶-1-基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-基)-吡咯烷-1-基甲酮

**21**

¹HNMR(400MHz,DMSO-d₆)δ9.37(d,1H,J=3.2Hz),8.72(s,1H),8.24(d,1H,J=5.6Hz),8.00(d,1H,J=0.8Hz),7.48(m,1H),6.45(s,1H),3.45(m,4H),3.15(m,6H),2.28(m,4H),1.96(s,3H),1.84(m,6H),1.64(m,8H).

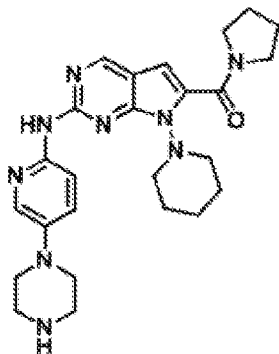
N, N-二甲基-2-((5-(4-甲基哌嗪-1-基)吡啶-2-基)氨基)-7-吗啡啉基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-甲酰胺

**22**

¹HNMR(400MHz,DMSO-d₆)δ9.36(s,1H),8.74(s,1H),8.16(d,1H,J=9.2Hz),8.00(d,1H,J=2.4Hz),7.39(dd,1H,J=2.8Hz),6.42(s,1H),3.71(m,4H),3.12(t,4H,J=4.6Hz),3.03(s,3H),2.97(s,3H),2.47(m,8H),2.23(s,3H).

(2-((5-(哌嗪-1-基)吡啶-2-基)氨基)-7-(哌啶-1-基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-

基)-吡咯烷-1-基甲酮

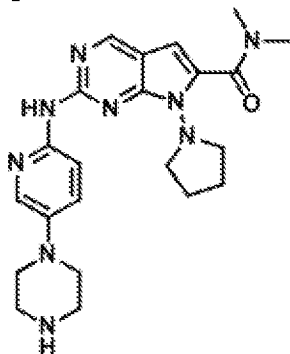


23

^1H NMR(400MHz,DMSO- d_6) δ 9.38(s,1H),8.73(s,1H),8.23(d,1H, J =8.4Hz),8.00(d,1H, J =1.2Hz),7.46(dd,1H, J =6Hz),6.45(s,1H),3.48(m,4H),3.10(m,8H),2.93(m,6H),1.65(m,8H)

5

N, N-二甲基-2-((5-(哌嗪-1-基)吡啶-2-基)氨基)-7-(吡咯烷-1-基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-甲酰胺

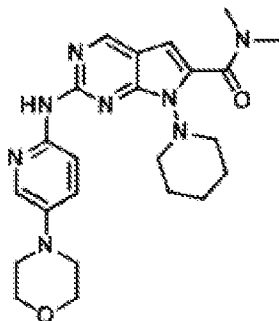


24

^1H NMR(400MHz,MeOD- d_4) δ 8.69(s,1H),8.20(d,1H, J =9.2Hz),7.97(d,1H, J =2.4Hz),7.52(dd,1H, J =2.8Hz),6.43(s,1H),3.63(m,4H),3.14(m,4H),3.13(s,3H),3.08(s,3H),3.00(m,4H),2.06(m,4H).

10

N, N-二甲基-2-((5-(吗啡啉基)吡啶-2-基)氨基)-7-(哌啶-1-基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-甲酰胺



25

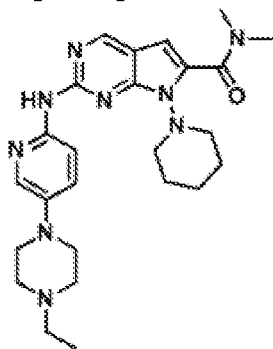
LCMS:450(M+H) $^+$, RT=6.41min。

15

^1H NMR(CDCl $_3$,400MHz) δ (ppm)8.661(s,1H),8.414(d,1H, J =8.8Hz),8.014(d,1H, J =2.4Hz),7.895(s,1H),7.349-7.320(m,1H),6.288(s,1H),3.967-3.882(m,6H),3.240-3.133(m,9H),3.016(s,3H),1.776-1.630(m,6H,)。

N, N-二甲基-2-((5-(4-乙基哌嗪-1-基)吡啶-2-基)氨基)-7-(哌啶-1-基)-7H-

吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-甲酰胺

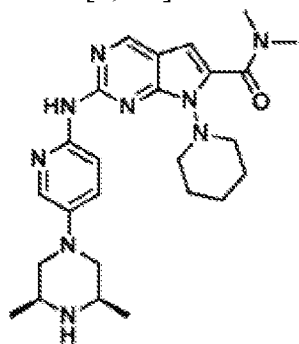


26

LCMS:477(M+H)⁺, RT=5.56min

¹HNMR(DMSO-d₆,400MHz)δ(ppm)9.385 (s, 1H), 8.730 (s, 1H), 8.248 (d, 1H, J=8.8Hz), 8.009 (s, 1H), 7.493 (d, 1H, J=8.4Hz), 6.377 (s, 1H), 3.146 (s, 6H), 3.014-2.949 (m, 7H), 2.567(m, 5H), 1.706-1.552 (m, 4H), 1.235 (s, 4H), 1.054 (s, 3H)。

2-((5-((3S,5R)-3,5-二甲基哌嗪-1-基)吡啶-2-基)氨基)-N,N-二甲基-7-(哌啶-1-基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-甲酰胺

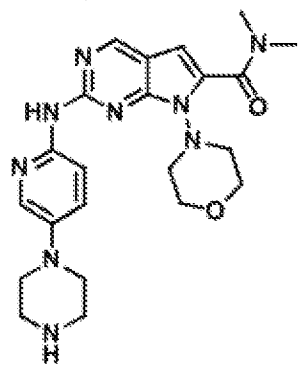


27

LCMS:478(M+H)⁺,RT=1.20min.

¹HNMR(d₆-DMSO,400MHz)δ(ppm)9.30(s,1H),8.72(s,1H),8.22(d,1H,J=8.0Hz),7.97(s,1H),7.46(d,1H,J=8.0Hz),6.37(s,1H),3.83(s,1H),3.49(d,2H,J=8.0Hz),3.01(s,3H),2.94(s,3H),2.89(m,2H),2.33(s,1H),2.14(m,2H),2.01(m,2H),1.23(s,6H),1.04(d,6H,J=8.0Hz),0.85(m,1H).

N,N-二甲基-2-((5-(哌嗪-1-基)吡啶-2-基)氨基)-7-吗啡啉基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-甲酰胺

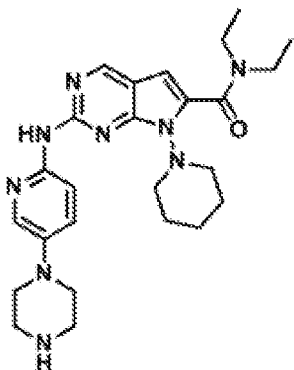


28

¹HNMR(400MHz,DMSO-d₆)δ9.47

(s, 1H), 8.77(s, 1H), 8.17(d, 1H, J=4Hz), 8.01(s, 1H), 7.40(m, 1H), 6.43(s, 1H), 3.71(m, 8H), 3.03(s, 6H), 3.00(m, 4H), 2.87(m, 4H),

N, N-二乙基-2-((5-(哌嗪-1-基)吡啶-2-基)氨基)-7-(哌啶-1-基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-甲酰胺,



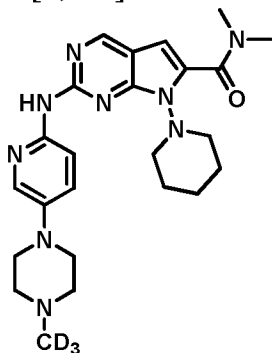
5

29

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, MeOD- d_4) δ 8.72

(s, 1H), 8.35(d, 1H, J=4Hz), 8.02(d, 1H, J=4Hz), 7.55(t, 1H, J=3Hz), 6.42(s, 1H), 4.01(m, 2H), 3.61(q, 2H, J=8Hz), 3.39(m, 4H), 3.17(m, 4H), 3.03(m, 4H), 1.83(m, 4H), 1.64(m, 4H), 1.34(m, 8H),

10 N-N-二甲基-2-((5-(4-氘代甲基哌嗪-1-基)吡啶-2-基)氨基)-7-(哌啶-1-基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-甲酰胺

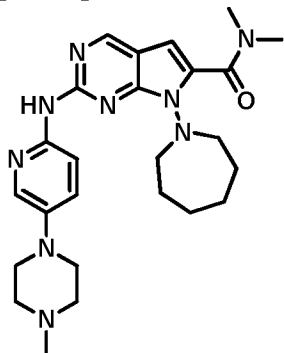


30

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm) 9.34 (s, 1H), 8.72 (s, 1H), 8.23 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.47 (dd, J = 9.2 Hz, 1H), 6.37 (s, 1H), 3.51 (m, 2H), 3.21 (s, 6H), 3.01 (s, 3H), 2.95 (s, 3H), 1.68 (m, 10H).

15

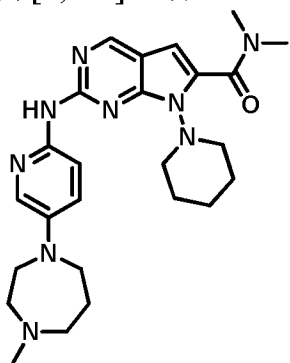
N,N-二甲基-2-((5-(4-甲基哌嗪-1-基)吡啶-2-基)氨基)-7-(高哌啶-1-基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-甲酰胺



31

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm) 9.34 (s, 1H), 8.71 (s, 1H), 8.29 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.50 (m, 1H), 6.34 (s, 1H), 3.83 (m, 2H), 3.20 (m, 8H), 3.03 (s, 3H), 2.95 (s, 3H), 1.67 (m, 10H).

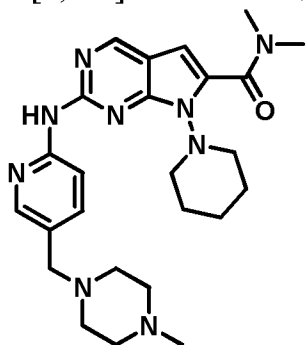
5 N-N-二甲基-2-((5-(4-甲基-1,4-高哌嗪-1-基)吡啶-2-基)氨基)-7-(哌啶-1-基)-7H-吡咯并[2,3-d] 嘧啶-6-甲酰胺



32

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm) 9.16 (s, 1H), 8.70 (s, 1H), 8.15 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.87 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 7.27 (m, 1H), 6.36 (s, 1H), 3.66 (s, 3H), 3.48 (m, 3H), 3.01 (m, 10H), 2.60 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 1.64 (m, 6H).

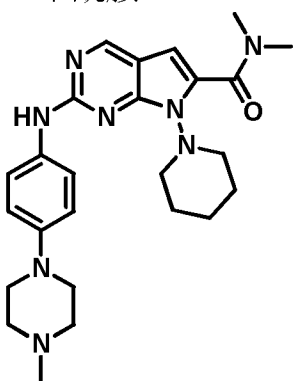
10 N-N-二甲基-2-((5-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)吡啶-2-基)氨基)-7-(哌啶-1-基)-7H-吡咯并[2,3-d] 嘧啶-6-甲酰胺



33

15 ^1H NMR (甲醇- d_4 , 400 MHz) δ (ppm) 8.98 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.20 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.53 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.64 (s, 1H), 3.98 (s, 2H), 3.71 (s, 2H), 3.57-3.43 (m, 2H), 3.34 (m, 2H), 3.16 (s, 6H), 3.06 (s, 4H), 2.91 (s, 3H), 2.52 (s, 2H), 1.76-1.60 (s, 6H).

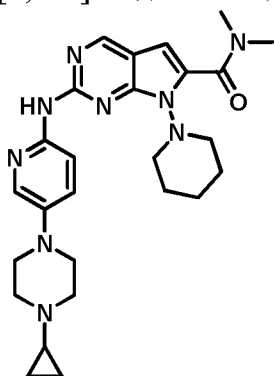
N-N-二甲基-2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)-7-(哌啶-1-基)-7H-吡咯并[2,3-d] 嘧啶-6-甲酰胺



34

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm) 9.37 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 7.75 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 6.95 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.33 (s, 1H), 3.86 (m, 2H), 3.26-3.13 (m, 6H), 3.01 (s, 4H), 2.95 (s, 6H), 2.57 (s, 3H), 1.73-1.55 (m, 6H).

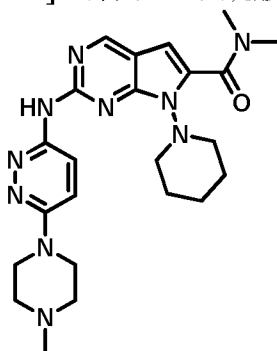
5 N-N-二甲基-2-((5-(4-环丙基哌嗪-1-基)吡啶-2-基)氨基)-7-(哌啶-1-基)-7H-吡咯并[2,3-d] 嘧啶-6-甲酰胺



35

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm) 9.31 (s, 1H), 8.72 (s, 1H), 8.23 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.99 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 7.48 (m, 1H), 6.37 (s, 1H), 3.18 (d, $J = 5.6$ Hz, 4H), 3.01 (s, 3H), 2.95 (s, 3H), 2.70 (t, $J = 8.8$ Hz, 4H), 1.67 (m, 8H), 0.45 (d, $J = 4.4$ Hz, 2H),
10 0.35 (d, $J = 2.8$ Hz, 2H).

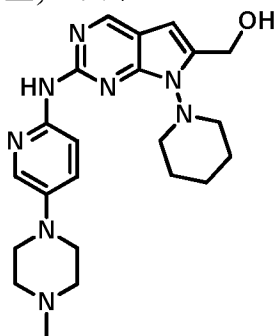
N,N-二甲基-2-((6-(4-甲基哌嗪-1-基)哒嗪-3-基)氨基)-7-(哌啶-1-基)-7H-吡咯并[2,3-d] 嘧啶-6-甲酰胺



36

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm) 9.85 (s, 1H), 8.73 (s, 1H), 8.29 (d, 1H, $J =$
15 10 Hz), 7.45 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz), 6.39 (s, 1H), 3.80-3.71 (m, 2H), 4.45 (s, 4H), 3.02 (s, 3H), 2.95 (s, 3H), 2.45 (s, 4H), 2.24 (s, 3H), 1.66-1.58 (m, 6H), 1.24 (s, 2H),

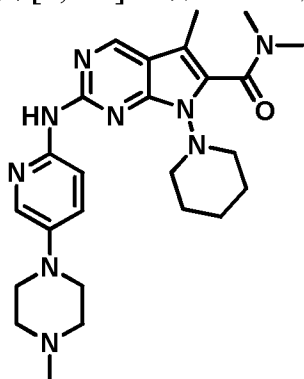
2-((5-(4-甲基哌嗪-1-基)吡啶-2-基)氨基)-7-(哌啶-1-基)-7H-吡咯并[2,3-d] 嘧啶-6-基) 甲醇



37

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm) 11.02 (s, 1H), 10.23 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.89 (d, 1H, $J = 8.4\text{Hz}$), 7.71 (d, 1H, $J = 8.8\text{Hz}$), 6.44 (s, 1H), 4.61 (s, 2H), 4.06-3.79 (m, 6H), 3.27-2.89 (m, 6H), 2.89 (s, 3H), 1.77-1.65 (m, 6H).

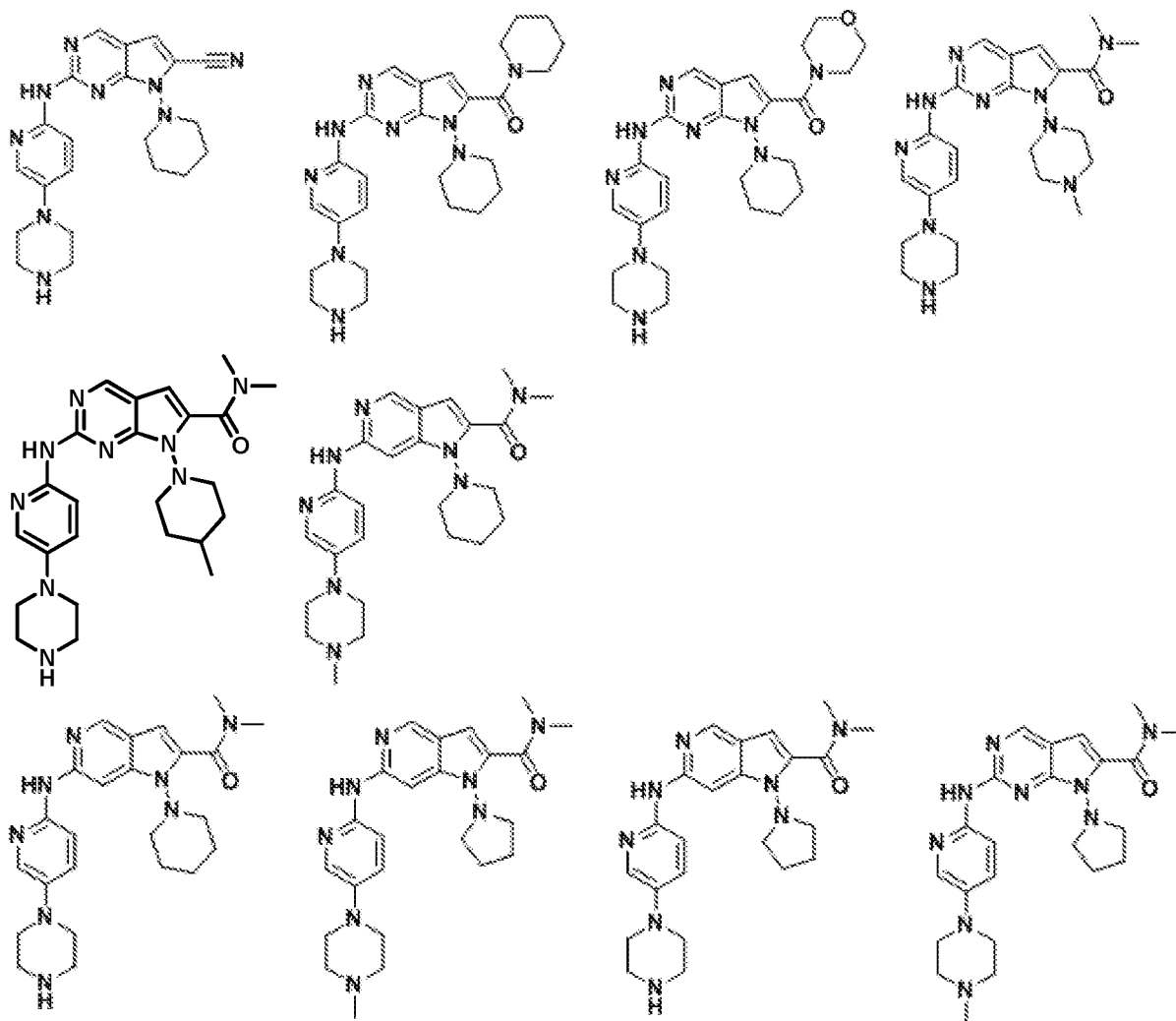
5 N-N-二甲基-2-((5-(4-甲基哌嗪-1-基)吡啶-2-基)氨基)-5-甲基-7-(哌啶-1-基)-7H-吡咯并[2,3-d] 嘧啶-6-甲酰胺



38

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm) 8.58 (s, 1H), 7.93 (s, 2H), 7.37 (s, 1H), 3.98-3.93 (t, 3H, $J = 8.8\text{ Hz}$, 10.8 Hz), 3.49 (s, 9H), 3.18-2.71 (m, 12H), 2.44 (s, 3H), 2.04-1.62 (m, 6H).

10 以下化合物也可采用类似方法制备:



实施例 2 本发明化合物对 CDK 激酶活性的测定

1. 试验材料

本实验使用的 CDK 激酶：CDK4/CyclinD1 (invitrogen, 货号 PV4400) ;
5 CDK6/CyclinD1(invitrogen,货号 PV4401); CDK1/CyclinB(invitrogen,货号: PV3292)。

使用试剂：底物是 ULight-4E-BP1 (PerkinElmer, 货号 TRF0128) ; 抗体是 Eu-labeledanti-phospho-eIF4E-bindingprotein1(Thr37/46) (Perkin -Elmer , 货号 TRF0216) 。

2. 试验方法

10 将受试化合物溶解于二甲亚枫中, 并根据试验需要用缓冲液(50mMHEPES、10mMMgCl₂、1mMEGTA、2mMDTTand0.01%Tween20)稀释至各浓度梯度, 二甲亚枫浓度为 4%;再用缓冲液稀释 ATP 和底物 ULight-4E-BP1 配制成浓度为 800μMATP 和 200nM 底物溶液的混合物待用;在反应孔中加上 2.5μL 底物和 ATP 混合液或者 2.5μL 底物, 再加入 2.5μL 化合物或者 4%二甲亚枫的缓冲液, 最后加入 5μL 酶 (终
15 浓度 0.66μg/mL) , 室温避光孵育 60 分钟。每孔加入 5μL1xdetectionbuffer (LANCEDetectionBuffer, 10x, PerkinElmer, 货号 CR97-100) 稀释的 EDTA 终止液 (终浓度 6mM) , 再加入 5μL1xdetectionbuffer 稀释的抗体 (终浓度 2nM) 室温避光孵育 60 分钟。用 Perkin Elmer EnVision® TRFRETmode (激发波长:320nm, 发射波长:615nm 和 665nm) 测板。

20 样品的抑制率通过下列公式求得:

$$\text{抑制率 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{化合物孔信号比值} - \text{无 ATP 对照孔信号比值}}{\text{阴性对照信号比值} - \text{无 ATP 对照孔信号比值}} \right) \times 100\%$$

IC₅₀ 值采用 GraphPadPrism 软件计算求得。

3. 结果

所得结果见表 1。符号+代表 IC₅₀ 小于 100nM, 符号++代表 IC₅₀ 为 100nM 至 500nM, 符号+++代表 IC₅₀ 大于 500nM, 符号 N/A 代表暂无数据。

表 1

实施例编号	CDK4 IC ₅₀ (nM)	CDK1 IC ₅₀ (nM)
12	+	N/A
13	+	+++
14	+	+++
15	+	+++
16	+	+++
17	+	+++
18	+	+++
19	+	N/A
20	+	+++
21	+	+++
22	++	N/A

23	+	+++
24	+	+++
25	+	+++
26	+	+++
27	+	+++
28	++	N/A
29	+	+++

结果显示, 本发明化合物在极低浓度($\leq 100\text{nM}$)下, 即可有效抑制 CDK4 激酶的活性, 同时对 CDK1 激酶有较弱的抑制活性。

实施例 3 本发明化合物对人结肠癌细胞株 Colo205 的增殖抑制活性测定

5 1. 试验方法

以下所述的体外细胞试验可测定受试化合物对人结肠癌细胞株的增殖抑制活性, 其活性可用 IC_{50} 值来表示。

10 将 Colo205 细胞(中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库)以适宜细胞浓度 2000 个/孔接种在 96 孔培养板上, 每孔 $140\mu\text{L}$ 培养基, 在二氧化碳恒温箱内 37°C 培养过夜后, 加入 $10\mu\text{L}$ 不同浓度的受试化合物作用 96 小时, 并设定溶剂对照组(阴性对照)。96 小时后, 用 CCK8(Cell Counting Kit-8, 货号:CK04, 购于同仁化学)方法进行测试化合物对肿瘤细胞的增殖抑制活性。用全波长式微孔板酶标仪 SpectraMax190 读数, 测定波长为 450nm 。

样品的抑制率通过下列公式求得:

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{化合物孔 OD 值}}{\text{阴性对照 OD 值}}\right) \times 100\%$$

15 IC_{50} 值采用酶标仪随机附带软件以四参数法回归求得。

2. 结果

所得结果见表 2。符号+代表 IC_{50} 小于 $0.5\mu\text{M}$, 且符号++代表 IC_{50} 为 $0.5\mu\text{M}$ 至 $2\mu\text{M}$, 符号+++代表 IC_{50} 大于 $2\mu\text{M}$, 符号 N/A 代表暂无数据。

表 2

实施例编号	Colo205 $\text{IC}_{50}(\mu\text{M})$
12	+++
13	++
14	++
15	+++
16	++
17	+++
18	++
19	+++
20	++
21	+++
22	N/A

23	+++
24	+++
25	+++
26	++
27	++
28	N/A
29	+++

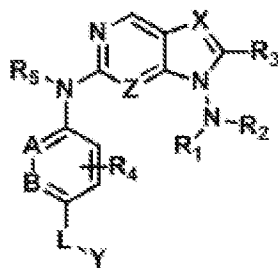
结果显示，本发明化合物在低浓度($\leq 2\mu\text{M}$)下，即可有效抑制肿瘤细胞增殖。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

5

权 利 要 求

1.一种如式 I 所示的化合物，或其药学上可接受的盐：



I

式中，

R_1 和 R_2 各自独立地选自：H、取代或未取代的 C1-C8 烷基、C(O)OR₈、CONR₉R₁₀、C(O)R₁₁、取代或未取代的 5~8 元芳基、取代或未取代的 5~8 元杂芳基、取代或未取代的 3~12 元饱和或不饱和杂环或碳环；其中，所述的杂芳基包含 1-3 个选自下组的杂原子：N、O 或 S；所述的杂环包含 1-3 个选自下组的杂原子：N、O 或 S；

此外， R_1 和 R_2 可与相邻的 N 原子连接构成环状结构，所述的环状结构包括取代或未取代的 3~12 元饱和或不饱和的杂环或桥环或螺环；其中，所述的杂环是指环结构中除了包含连接母核的氮原子之外，还包含 0-3 个选自下组的杂原子：N、O 或 S；

R_3 选自：取代或未取代的 C1-C8 烷基、CN、C(O)OR₁₂、CONR₁₃R₁₄、C(O)R₁₅、取代或未取代的 5~8 元芳基、取代或未取代的 5~8 元杂芳基、取代或未取代的 3~12 元饱和或不饱和的杂环或碳环；其中，所述的杂芳基包含 1-3 个选自下组的杂原子：N、O 或 S；所述的杂环包含 1-3 个选自下组的杂原子：N、O 或 S；

R_4 选自：H、取代或未取代的 C1-C4 烷基、取代或未取代的 C1-C8 烷氧基、卤素、OH、CN、C(O)OR₁₂、CONR₁₃R₁₄、C(O)R₁₅、取代或未取代的 5~8 元芳基、取代或未取代的 5~8 元杂芳基、取代或未取代的 3~12 元饱和或不饱和的杂环或碳环；其中，所述的杂芳基包含 1-3 个选自下组的杂原子：N、O 或 S；所述的杂环包含 1-3 个选自下组的杂原子：N、O 或 S；

R_5 选自：H 或 C1-C4 烷基；

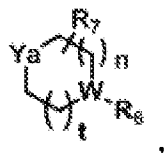
X 为 CR₁₆ 或 N；

A、B 和 Z 各自独立地选自：N 或 CR₁₆；

R_{16} 为 H、C1-C4 烷基或 C1-C4 卤代烷基；

L 为选自下组的基团：无、C1-C6 亚烷基、C(O)、CONR₁₇ 或 S(O)₂；

Y 为：H、R₁₈、NR₁₉R₂₀、OH、或 Y 为选自下组基团的一部分：



其中，

R_6 为无、H、取代或未取代的 C1-C8 烷基、取代或未取代的 C1-C8 烷氧基、取代或未取代的 C2-C6 酰基、取代或未取代的 C2-C6 磺酰基、取代或未取代的 C1-C6 亚烷基羟基、 $\text{CONR}_{22}\text{R}_{23}$ 或 C(O)R_{24} ;

R_7 可以是 0~3 个取代基且 R_7 为取代或未取代的 C1-C8 烷基、氧或卤素, 或 2 个或更多 R_7 形成桥环烷基;

W 为 CR_{21} 、N 或 O (当 W 为 O 时, R_6 是不存在的);

Ya 为 CR_{21} 或 N;

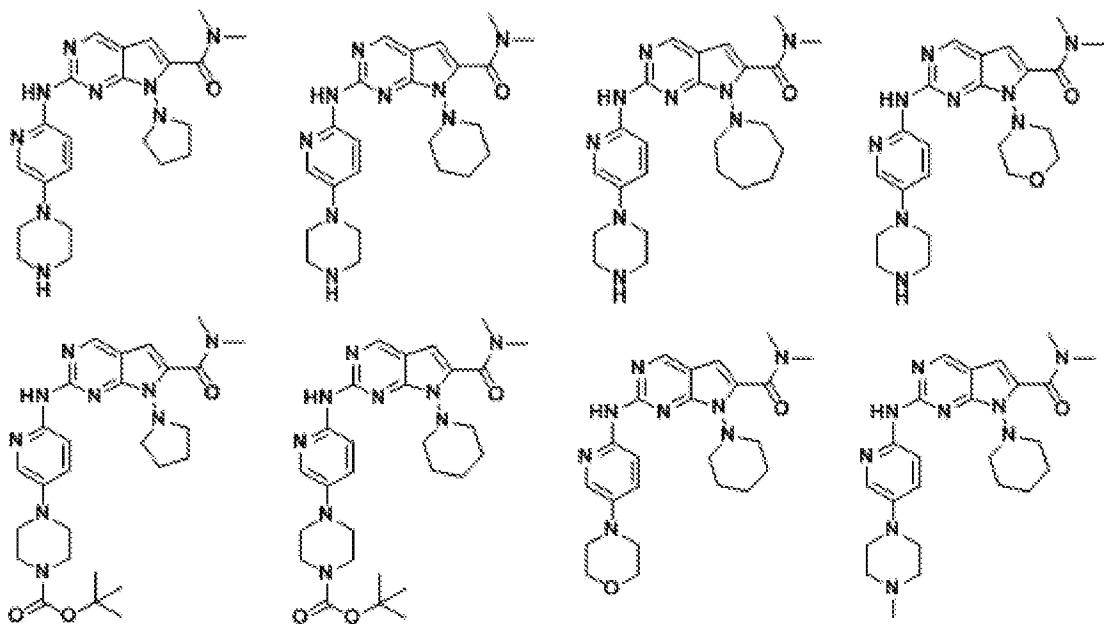
R_{21} 为 H 或卤素;

R_8 、 R_9 、 R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} 、 R_{14} 、 R_{15} 、 R_{17} 、 R_{18} 、 R_{19} 、 R_{20} 、 R_{22} 、 R_{23} 和 R_{24} 各自独立地选自: H、取代或未取代的 C1-C8 烷基、取代或未取代的 C1-C8 烷氧基、取代或未取代的 C1-C6 亚烷基-胺基、取代或未取代的 C1-C6 亚烷基-羟基、取代或未取代的 5~8 元芳基、或取代或未取代的 5~8 元杂芳基; 取代或未取代的 3~12 元饱和杂环或碳环; 其中, 所述的杂芳基包含至少一个选自下组的杂原子: N、O 或 S, 所述的杂环包含至少一个选自下组的杂原子: N、O 或 S;

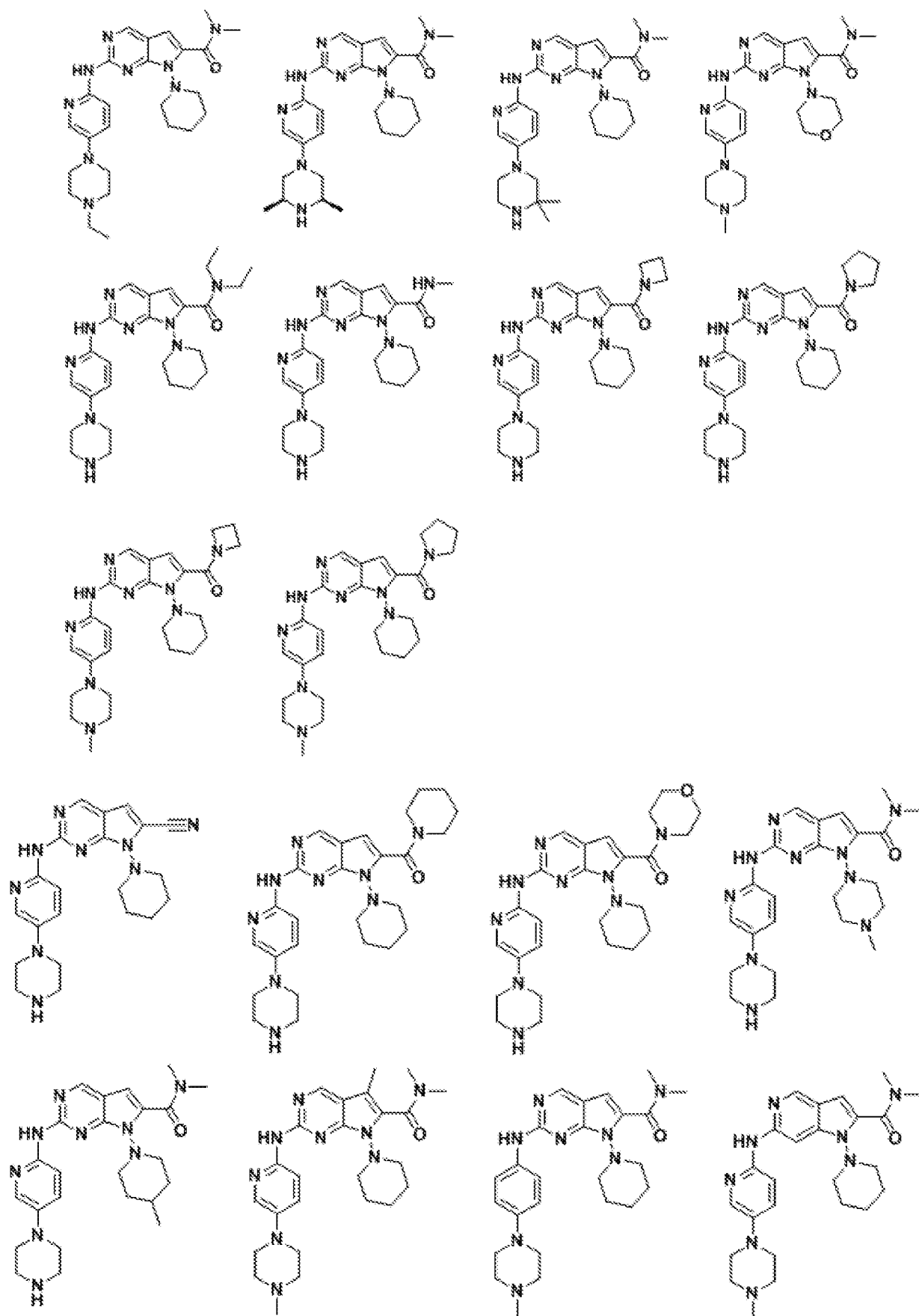
n 和 t 分别为 0, 1 或 2;

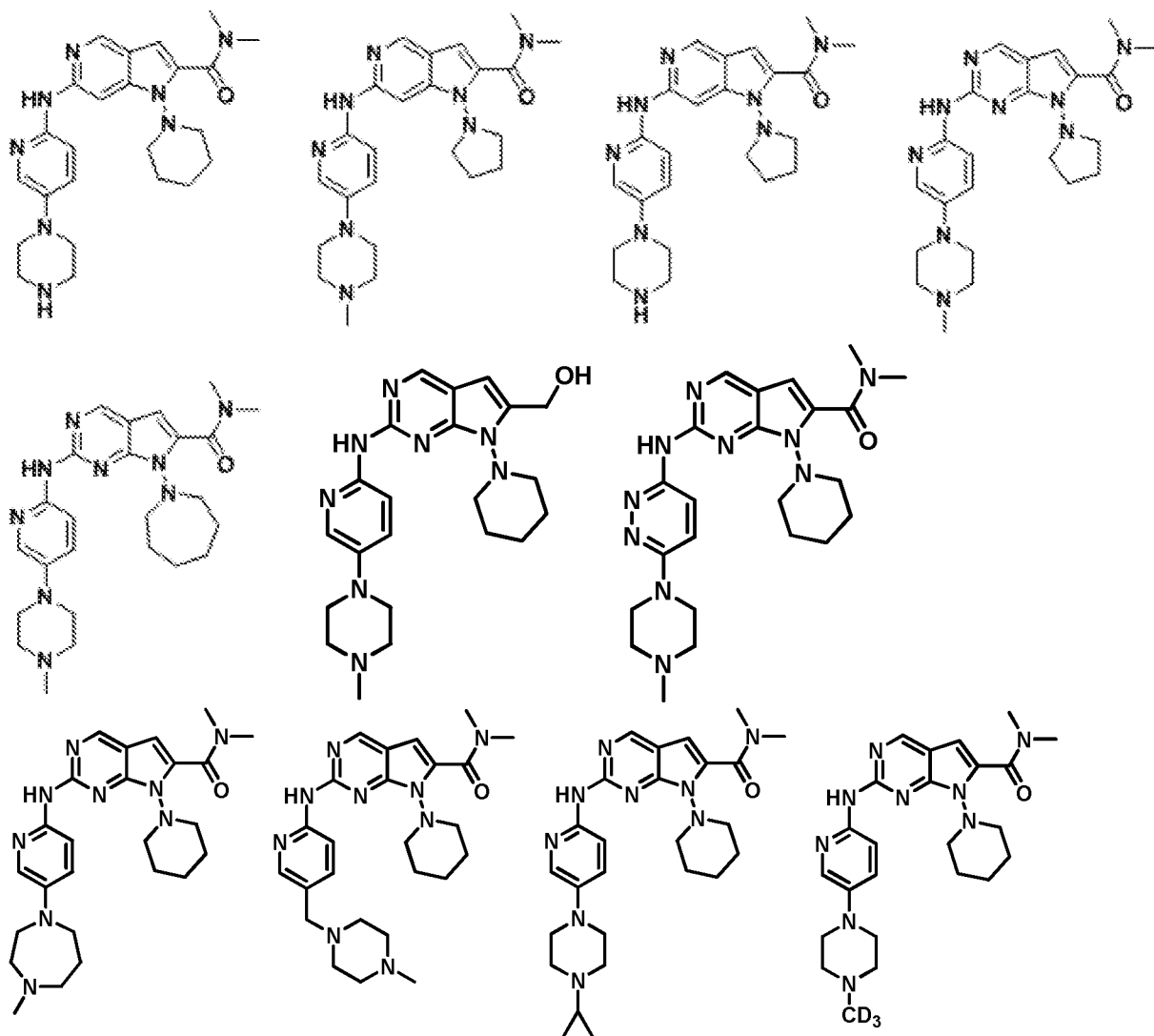
上述的任一“取代”指基团上的一个或多个氢原子被选自下组的取代基取代: 卤素、OH、 NH_2 、CN、未取代或卤代的 C1-C8 烷基、C1-C8 烷氧基、未取代或卤代的 C2-C6 烯基、未取代或卤代的 C2-C6 炔基、未取代或卤代的 C2-C6 酰基、未取代或卤代的 5~8 元芳基、未取代或卤代的 5~8 元杂芳基、未取代或卤代的 3~12 元饱和杂环或碳环; 其中, 所述的杂芳基包含 1-3 个选自下组的杂原子: N、O 或 S, 所述的杂环包含 1~3 个选自下组的杂原子: N、O 或 S。

2. 如权利要求 1 所述的式 I 化合物, 其特征在于, 所述式 I 化合物为如下所示的化合物:

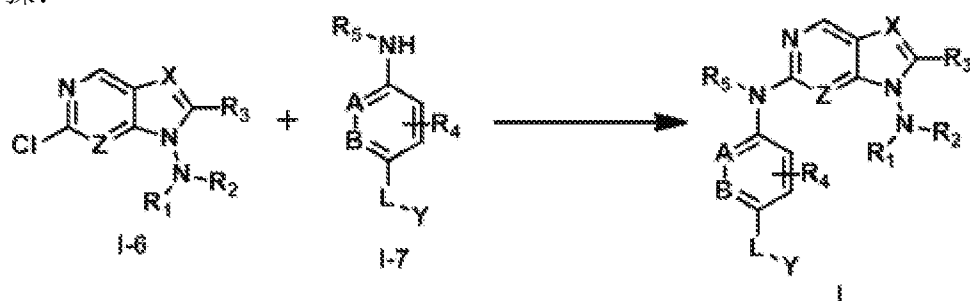


25





3.如权利要求 1 所述的式 I 化合物的制备方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:



a)在惰性溶剂中,式 I-6 化合物和式 I-7 化合物反应,形成式 I 化合物,其中各基团的定义如权利要求 1 中所述。

4.如权利要求 3 所述的制备方法,其特征在于,所述惰性溶剂选自下组:甲苯、二甲苯、乙二醇二甲醚、二氧六环、THF、DMF、DMSO、NMP,或其组合。

5.如权利要求 3 所述的制备方法,其特征在于,所述方法具有以下一个或多个特征:

所述反应在钯催化剂存在下进行,且所述的钯催化剂选自下组: Pd(PPh₃)₄、Pd₂(dba)₃、Pd(dba)₂、Pd(OAc)₂、Pd(PPh₃)₂Cl₂、Pd(dppe)Cl₂、Pd(dppf)Cl₂、

Pd(dppf)Cl₂·CH₂Cl₂, 或其组合;

所述反应在配体存在下进行, 所述的配体为单齿膦配体或双齿膦配体, 且所述的配体选自下组: 三苯基膦、三甲苯基膦、三环己基膦、三叔丁基膦、X-Phos、S-Phos、联萘二苯基膦、1,1'-双(二苯基膦)二茂铁、1, 2-二(二苯基膦基)乙烷、Xant-Phos, 或其组合; 和/或

所述反应在碱存在下进行, 且所述的碱选自下组: Na₂CO₃、K₂CO₃、Cs₂CO₃、LiHMDS、NaHMDS、KHMDS、叔丁醇钠、叔丁醇钾、三乙胺、二异丙基胺、二异丙基乙胺, 或其组合。

6.如权利要求 1 所述的式 I 化合物的用途, 其特征在于, 用于:

(a)制备治疗与 CDK 激酶活性或表达量相关的疾病的药物;

(b)制备 CDK 激酶靶向抑制剂;

(c)体外非治疗性地抑制 CDK 激酶的活性;

(d)体外非治疗性地抑制肿瘤细胞增殖; 和/或

(e)治疗与 CDK 激酶活性或表达量相关的疾病。

7.如权利要求 6 所述的用途, 其特征在于, 所述 CDK 激酶选自下组: CDK4、CDK6, 或其组合; 和/或

所述的肿瘤细胞为白血病细胞株, 较佳地为髓源白血病细胞株, 更佳地为急性髓源白血病细胞株 KG1 细胞。

8.一种药物组合物, 其特征在于, 所述的药物组合物包括: (i)有效量的式 I 化合物, 或其药学上可接受的盐; 和(ii)药学上可接受的载体。

9.一种抑制 CDK 激酶活性的方法, 其特征在于, 包括步骤: 对抑制对象施用抑制有效量的如权利要求 1 所述的式 I 化合物或其药学上可接受的盐, 或对抑制对象施用抑制有效量的如权利要求 8 所述的药物组合物。

10.一种体外抑制肿瘤细胞的方法, 其特征在于, 所述方法包括: 对抑制对象施用抑制有效量的如权利要求 1 所述的式 I 化合物, 或如权利要求 8 所述的药物组合物。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/079495

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 473/32 (2006.01) i; C07D 473/28 (2006.01) i; C07D 473/36 (2006.01) i; C07D 401/12 (2006.01) i; C07D 487/04 (2006.01) i;
A61K 31/5377 (2006.01) i; A61K 31/52 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D 473/-; C07D 401/-; C07D 487/-; A6IK 31/-; A6IP 35/

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT, CNKI, WPI, VEN, ISI Web of Knowledge, STN (REGISTRY, MARPAT): cancer, tumor?, kinase?, CDK?, pyrimidin+, pyrrol+,
piperazin+, amlno

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004065378 A1 (WARNERLAMBERT COMPANY LLC et al.) 05 August 2004 (05.08.2004) description, page 3, line 20 to page 6, line 19, embodiments 1-16, page 28, line 6 to page 30, line 25, and claim 17	1-10
X	CN 103864792 A (KBP BIOSCIENCES CO., LTD.) 18 June 2014 (18.06.2014) description, paragraphs [0014]-[0126], [0181]-[0198], and embodiments 1-12	1-10
A	WO 2011147066 A1 (SICHUAN UNIVERSITY) 01 December 2011 (01.12.2011) description, page 2, line 18 to page 37, line 4-8, and embodiments 1-124	1-10
A	WO 2015006754 A2 (ACEA BIOSCIENCES INC.) 15 January 2015 (15.01.2015) description, paragraphs [0007], [0011]-[0016], and embodiments 1-71	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 02 June 2016	Date of mailing of the international search report 04 July 2016
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer ZHANG, Yao Telephone No. (86-10) 82246759

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/079495

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 6-7, 9
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] Claims 6-7, 9 relate to a method of treatment of the human or animal body by therapy, but the examiner performed search based on the pharmaceutical use of the compound that this application claims.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/079495

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2004065378 A1	05 August 2004	AT 433967 T	15 July 2009
		EP 1590341 A1	02 November 2005
		MX PA05007503 A	21 September 2005
		JP 2006516561 A	06 July 2006
		US 2004236084 A1	25 November 2004
		CA 2512646 A1	05 August 2004
		BR 0406809 A	27 December 2005
		DE 602004021558 D1	30 July 2009
		EP 1590341 B1	17 June 2009
		BR PI0406809 A	27 December 2005
CN 103864792 A	18 June 2014	None	
WO 2011147066 A1	01 December 2011	CN 103003278 A	27 March 2013
		JP 2013528164 A	08 July 2013
		CN 102260263 A	30 November 2011
		JP 5662564 B2	04 February 2015
		EP 2578584 A4	30 October 2013
		US 2013203986 A1	08 August 2013
		KR 20130109984 A	08 October 2013
		US 9096601 B2	04 August 2015
		EP 2578584 A1	10 April 2013
		CN 103003278 B	30 March 2016
WO 2015006754 A2	15 January 2015	CA 2917364 A1	15 January 2015
		SG 11201600062R A	26 February 2016
		AU 2014287016 A1	04 February 2016
		WO 2015006754 A3	12 March 2015
		KR 20160037929 A	06 April 2016

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/079495

A. 主题的分类

C07D 473/32(2006.01)i; C07D 473/28(2006.01)i; C07D 473/36(2006.01)i; C07D 401/12(2006.01)i; C07D 487/04(2006.01)i; A61K 31/5377(2006.01)i; A61K 31/52(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07D473/-; C07D401/-; C07D487/-; A61K31/-; A61P35/-

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNPAT, CNKI, WPI, VEN, ISI Web of Knowledge, STN(REGISTRY, MARPAT): 常州隆赛医药科技有限公司, 曹文杰, 激酶, 癌, 瘤, 嘧啶, 吡咯, 哌嗪, 氨基, 结构式, cancer, tumor?, kinase?, CDK?, pyrimidin+, pyrrol+, piperazin+, amino

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	WO 2004065378 A1 (WARNER-LAMBERT COMPANY LLC等) 2004年 8月 5日 (2004 - 08 - 05) 说明书第3页第20行至第6页第19行, 实施例1-16, 第28页第6行至第30页第25行, 权利要求17	1-10
X	CN 103864792 A (山东亨利医药科技有限责任公司) 2014年 6月 18日 (2014 - 06 - 18) 说明书第14-126、181-198段, 实施例1-12	1-10
A	WO 2011147066 A1 (四川大学 等) 2011年 12月 1日 (2011 - 12 - 01) 说明书第2页第18行至第37页第4-8行, 实施例1-124	1-10
A	WO 2015006754 A2 (ACEA BIOSCIENCES INC.) 2015年 1月 15日 (2015 - 01 - 15) 说明书第7、11-16段, 实施例1-71	1-10

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2016年 6月 2日

国际检索报告邮寄日期

2016年 7月 4日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

张瑶

电话号码 (86-10)01082246759

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 6-7、9
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求6-7、9涉及人或动物体的治疗方法，但审查员基于本申请所要求保护的化合物的制药用途进行了检索。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/079495

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2004065378	A1	2004年 8月 5日	AT	433967	T	2009年 7月 15日
				EP	1590341	A1	2005年 11月 2日
				MX	PA05007503	A	2005年 9月 21日
				JP	2006516561	A	2006年 7月 6日
				US	2004236084	A1	2004年 11月 25日
				CA	2512646	A1	2004年 8月 5日
				BR	0406809	A	2005年 12月 27日
				DE	602004021558	D1	2009年 7月 30日
				EP	1590341	B1	2009年 6月 17日
				BR	PI0406809	A	2005年 12月 27日
CN	103864792	A	2014年 6月 18日	无			
WO	2011147066	A1	2011年 12月 1日	CN	103003278	A	2013年 3月 27日
				JP	2013528164	A	2013年 7月 8日
				CN	102260263	A	2011年 11月 30日
				JP	5662564	B2	2015年 2月 4日
				EP	2578584	A4	2013年 10月 30日
				US	2013203986	A1	2013年 8月 8日
				KR	20130109984	A	2013年 10月 8日
				US	9096601	B2	2015年 8月 4日
				EP	2578584	A1	2013年 4月 10日
				CN	103003278	B	2016年 3月 30日
				无			
WO	2015006754	A2	2015年 1月 15日	CA	2917364	A1	2015年 1月 15日
				SG	11201600062R	A	2016年 2月 26日
				AU	2014287016	A1	2016年 2月 4日
				WO	2015006754	A3	2015年 3月 12日
				KR	20160037929	A	2016年 4月 6日
				无			

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)