

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 31/5025

A61K 31/407

A61K 31/4406

A61K 31/4427

C07D487/04



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03825102.7

[43] 公开日 2005 年 11 月 9 日

[11] 公开号 CN 1694706A

[22] 申请日 2003.9.19 [21] 申请号 03825102.7

[30] 优先权

[32] 2002.9.23 [33] US [31] 60/412,906

[86] 国际申请 PCT/US2003/029456 2003.9.19

[87] 国际公布 WO2004/026310 英 2004.4.1

[85] 进入国家阶段日期 2005.5.12

[71] 申请人 先灵公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 K·帕鲁奇 T·J·古兹

M·P·德怀尔 R·J·多尔

V·M·吉里亚瓦拉布汉

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 张元忠 谭明胜

权利要求书 7 页 说明书 27 页

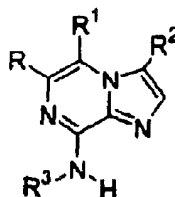
[54] 发明名称 用作依赖细胞周期蛋白的激酶抑制剂的新的咪唑并吡嗪

[57] 摘要

在其许多具体实施方案中,本发明提供了一种新颖的作为依赖细胞周期蛋白的激酶抑制剂的咪唑并 [1,2-a] 吡嗪化合物、制备这些化合物的方法、包含一或多种这些化合物的医药组合物、制备含有一或多种这些化合物的医药制剂的方法、以及使用这些化合物或医药组合物治疗、预防、抑制或改善一或多种与 CDK 有关连的疾病的方法。

ISSN 1008-4274

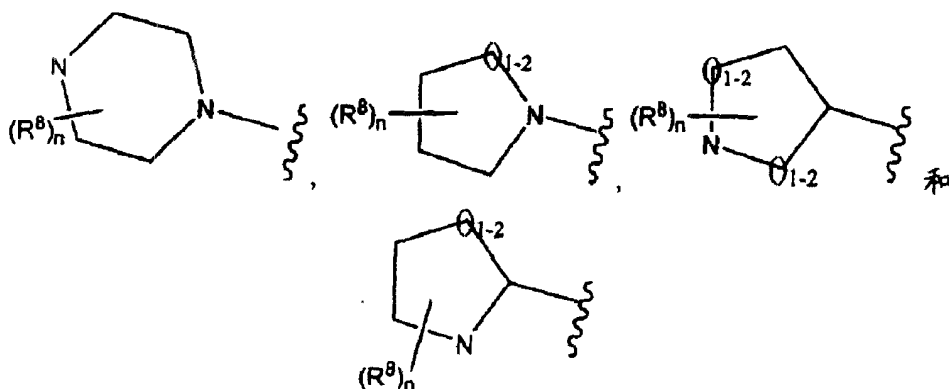
1. 一种以结构式 III 代表的化合物



式 III

其中:

R 选自烷基、CF₃、杂芳基、杂芳烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环基、杂环烷基、芳烷基、-C(O)R⁷、



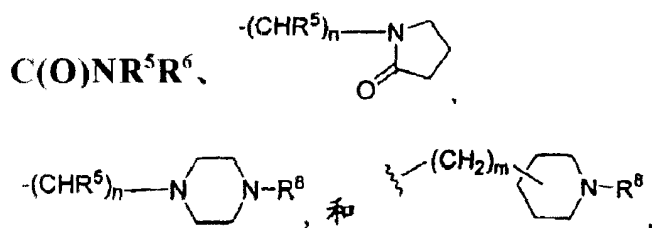
，其中每一个该烷基、杂芳基、芳烷基、环烷基、杂环基和杂环基部份结构如以上 R 所示并可以未经取代或视需要独立以一或多个可以相同或不相同的部份取代，每一部份独立选自卤素、烷基、环烷基、CF₃、CN、-OCF₃、-OR⁶、-C(O)R⁷、-NR⁵R⁶、-C(O₂)R⁶、-C(O)NR⁵R⁶、-
15 (CHR⁵)_nOR⁶、-SR⁶、-S(O₂)R⁷、-S(O₂)NR⁵R⁶、-N(R⁵)S(O₂)R⁷、-N(R⁵)C(O)R⁷和-N(R⁵)C(O)NR⁵R⁶;

R¹ 是 H、卤素或烷基;

R² 是选自 H、卤素、CN、环烷基、杂环基、炔基和-CF₃;

R³ 选自芳基(除了苯基之外)、杂芳基(除了咪唑基之外)、杂环基、

20 -(CHR⁵)_n-杂芳基、-S(O₂)R⁶、-C(O)R⁶、-S(O₂)NR⁵R⁶、-C(O)OR⁶、-



其中每一个该芳基、杂芳基和杂环基可以未经取代或视需要以一或多个可以相同或不不同的部份取代，每一部份独立选自卤素、烷基、芳基、环烷基、 CF_3 、 CN 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OR}^5$ 、 $-\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 $-\text{C}(\text{O}_2)\text{R}^5$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 $-\text{SR}^6$ 、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^6$ 、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^7$ 、 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})\text{R}^7$ 和 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})\text{NR}^5\text{R}^6$ ，其先决条件是当 R^3 是 $-(\text{CHR}^5)_n$ -杂芳基时，则 R^2 可以另外是烷基；

R^5 是 H 或烷基；

R^6 选自 H、烷基、芳基、杂芳基、芳烷基和杂芳烷基，其中每一个该烷基、杂芳烷基、芳基、杂芳基和芳烷基可以未经取代或视需要以一或多个可以相同或不不同的部份取代，每一部份独立选自卤素、烷基、芳基、环烷基、 CF_3 、 OCF_3 、 CN 、 $-\text{OR}^5$ 、 $-\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 $-\text{CH}_2\text{OR}^5$ 、 $-\text{C}(\text{O}_2)\text{R}^5$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 $-\text{SR}^6$ 、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^7$ 、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^7$ 、 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})\text{R}^7$ 和 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})\text{NR}^5\text{R}^6$ ；

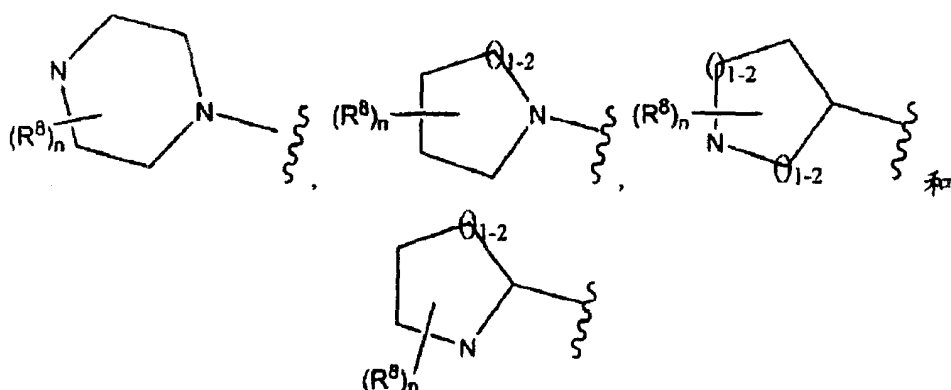
R^7 选自烷基、芳基、杂芳基、芳烷基和杂芳烷基，其中每一个该烷基、杂芳烷基、芳基、杂芳基和芳烷基可以未经取代或视需要以一或多个可以相同或不不同的部份取代，每一部份独立选自卤素、烷基、芳基、环烷基、 CF_3 、 OCF_3 、 CN 、 $-\text{OR}^5$ 、 $-\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 $-\text{CH}_2\text{OR}^5$ 、 $-\text{C}(\text{O}_2)\text{R}^5$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 $-\text{SR}^6$ 、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^7$ 、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^7$ 、 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})\text{R}^7$ 和 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})\text{NR}^5\text{R}^6$ ；

R^8 选自 R^6 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^7$ 、 $-\text{C}(\text{O}_2)\text{R}^6$ 、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^7$ 和 $-(\text{CH}_2)$ -芳基；

m 是 0 至 4；和

n 是 1-4。

2. 权利要求 1 的化合物，其中 R 选自烷基、杂芳烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环基、杂环烷基、芳烷基、

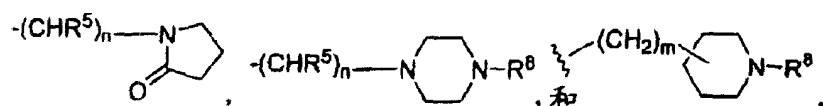


，其中以上 R 所示的每一个该烷基、杂芳基、环烷基、芳烷基、杂环基和杂环基部份可以未经取代或视需要独立以一或多个可以相同或不相同的部份取代，每一部份独立选自卤素、烷基、环烷基、CF₃、CN、
 5 -OCF₃、-OR⁶、-C(O)R⁷、-NR⁵R⁶、-C(O₂)R⁶、-C(O)NR⁵R⁶、-SR⁶、-S(O₂)R⁷、-S(O₂)NR⁵R⁶、-N(R⁵)S(O₂)R⁷、-N(R⁵)C(O)R⁷ 和 -N(R⁵)C(O)NR⁵R⁶;

R¹ 是 H 或卤素;

R² 选自 H、卤素、环烷基、CN、炔基和-CF₃;

10 R³ 选自芳基、杂芳基、杂环基、-(CHR⁵)_n-杂芳基、-S(O₂)R⁶、-C(O)R⁶、-S(O₂)NR⁵R⁶、-C(O)OR⁶、-C(O)NR⁵R⁶、



其中每一个该芳基、杂芳基和杂环基可以未经取代或视需要以一或多个
 15 个可以相同或不相同的部份取代，每一部份独立选自卤素、烷基、芳基、环烷基、CF₃、CN、-OCF₃、-N(R⁵)C(O)R⁷、-C(O)NR⁵R⁶、-S(O₂)R⁶和-N(R⁵)C(O)R⁷;

R⁵ 是 H 或低碳烷基;

m 是 0 至 2; 和

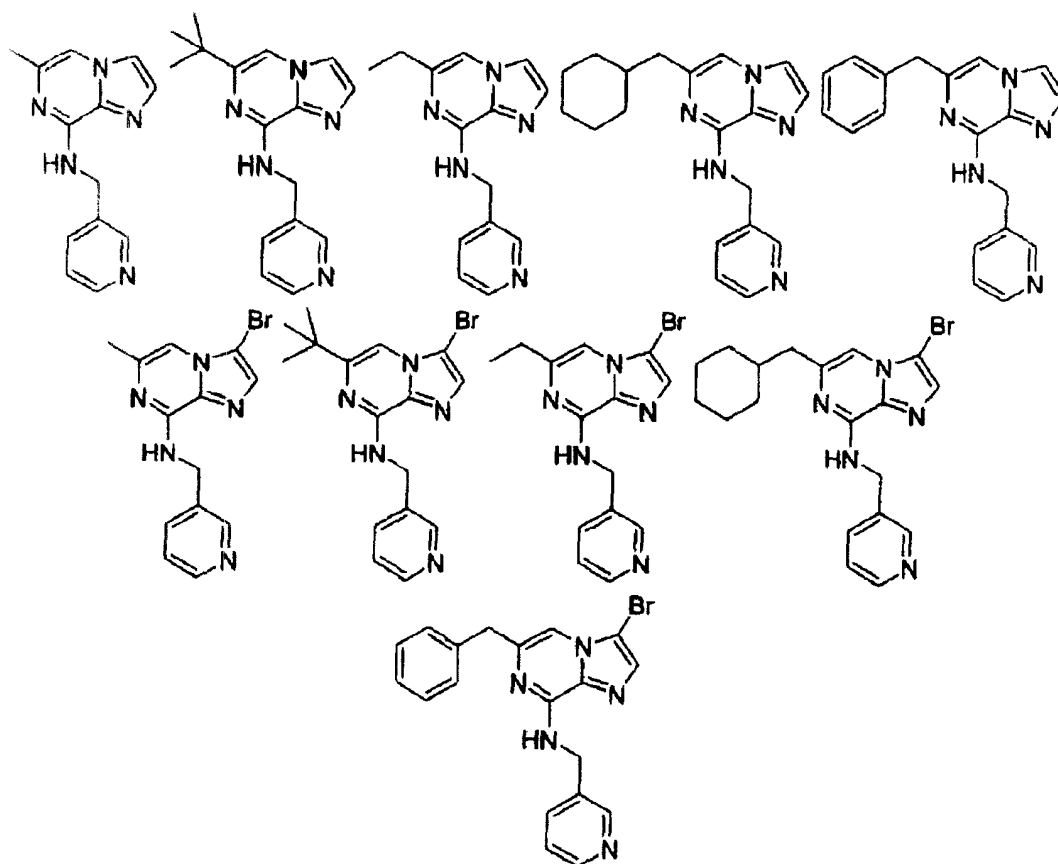
20 n 是 1 至 3.

3. 权利要求 2 的化合物，其中 R 是烷基、芳烷基或环烷基烷基。

4. 权利要求 3 的化合物，其中 R 是选自甲基、乙基、三级-丁基、环己基甲基、苄基和苯乙基。

5. 权利要求 2 的化合物，其中 R¹ 是 H。

6. 权利要求 2 的化合物, 其中 R^1 是甲基。
7. 权利要求 2 的化合物, 其中 R^2 是 H、F 或 Cl、Br 或 I。
8. 权利要求 7 的化合物, 其中 R^2 是 Br。
9. 权利要求 8 的化合物, 其中 R^3 是(吡啶-2-基)甲基、(吡啶-3-基)甲基、(吡啶-4-基)甲基、噻吩-2-基或噻吩-3-基, 其中该吡啶基和噻吩基可以未经取代或视需要独立以一或多个可以相同或不相同的部份取代, 每一部份独立选自 F、Cl、Br、 CF_3 、低碳烷基、甲氧基和 CN。
10. 权利要求 9 的化合物, 其中 R^3 是(吡啶-2-基)甲基。
11. 权利要求 9 的化合物, 其中 R^3 是(吡啶-3-基)甲基。
12. 权利要求 9 的化合物, 其中 R^3 是(吡啶-4-基)甲基。
13. 权利要求 2 的化合物, 其中 m 是 0。
14. 权利要求 2 的化合物, 其中 n 是 1。
15. 一种如下式的化合物:



或其医药上可接受的盐或溶剂合物。

16. 一种用于抑制一或多种依赖细胞周期蛋白的方法, 其包含给

药有效治疗剂量的至少一种如权利要求 1 的化合物予需要的患者。

17. 一种用于治疗一或多种与依赖细胞周期蛋白激酶有关连的疾病的方法，其包含给需要治疗的患者有效治疗剂量的至少一种如权利要求 1 的化合物。

5 18. 权利要求 17 的方法，其中该依赖细胞周期蛋白激酶是 CDK2。

19. 权利要求 17 的方法，其中该依赖细胞周期蛋白激酶是以促细胞分裂剂活化的蛋白激酶(MAPK/ERK)。

20. 权利要求 17 的方法，其中该依赖细胞周期蛋白激酶是糖原合成酶激酶 3 (GSK3 β)。

21. 权利要求 17 的方法，其中该疾病选自以下：

膀胱癌、乳癌、直肠癌、肾癌、肝癌、肺癌、非小细胞肺癌、食道癌、胆囊癌、卵巢癌、胰脏癌、胃癌、子宫颈癌、甲状腺癌、摄护腺癌和皮肤癌(包括鳞状细胞瘤)；

15 白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性淋巴性白血病、B-细胞淋巴瘤、T-细胞淋巴瘤、何杰金氏淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤、发状细胞淋巴瘤和巴奇氏恶性淋巴瘤；

急性和慢性骨髓性白血病、骨髓发育不良征候群和前骨髓细胞白血病；

20 纤维肉瘤和横纹肌肉瘤；

星状细胞瘤、神经细胞瘤、神经胶质瘤和神经鞘瘤；

黑色素细胞瘤、精母细胞瘤、畸胎瘤、骨瘤、着色性干皮病、角化棘皮瘤、甲状腺滤泡癌和卡波西氏肉瘤。

22. 一种用于治疗一或多种与依赖细胞周期蛋白激酶有关连的疾病的方法，其包含给需要治疗的哺乳动物

25 第一种化合物的剂量，其是一种如权利要求 1 的化合物或其医药上可接受的盐或溶剂合物；和

至少一个第二种化合物的剂量，该第二种化合物是抗癌剂；

其中以第一种化合物和该第二种化合物的剂量得到疗效。

30 23. 权利要求 22 的方法，其进一步包含放射疗法。

24. 权利要求 22 的方法，其中该抗癌剂选自细胞抑制剂、顺铂、多柔比星、克癌易、红豆杉醇、依托泊苷、CPT-11、伊利替康、刊普

- 托斯塔、托波替康、紫杉醇、欧洲紫杉醇、埃波霉素、他莫昔芬、5-氟尿嘧啶、氟甲蝶呤、5FU、替莫唑胺、环磷酰胺、SCH 66336、R115777、L778,123、BMS 214662、艾瑞沙、塔西伐、EGFR 的抗体、格里维克、内含子、ara-C、多柔比星、环磷酰胺、吉西它宾、乌拉莫司汀、氟芥、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥、哌泊溴烷、三亚乙基蜜胺、三亚乙基硫代磷酸酰胺、白消安、卡莫司汀、洛莫司汀、链佐星、达卡巴嗪、氟尿苷、阿糖胞苷、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、氟达拉滨磷酸盐、奥沙利铂、琉可维瑞、ELOXATINTM、喷司他汀、长春碱、长春新碱、长春地辛、博来霉素、放线霉素 D、柔红菌素、阿霉素、表阿霉素、伊达比星、普卡霉素、脱氧肋间型霉素、丝裂霉素-C、L-天冬酰胺酶、替尼泊苷 17 α -乙炔基雌二醇、二乙基己烯雌酚、睾酮、泼尼松、氟甲睾酮、屈他雄酮丙酸盐、睾内酯、甲地孕酮醋酸盐、甲基脱氢皮醇、甲基睾酮、脱氢皮醇、曲安西龙、氟烯雌醚、羟基孕激素、胺鲁米特、雌莫司汀、甲羟孕酮醋酸盐、琉普利德、氟他胺、托瑞米芬、戈舍瑞林、顺铂、卡铂、羟基脲、安吡啶、丙卡巴腓、米托坦、米托蒽醌酮、左旋咪唑、纳维宾、CPT-11、安纳退唑、来曲唑、凯普西塔宾、瑞罗杉芬、拓罗山芬和六甲基蜜胺。

25. 一种医药组合物，其包含有效治疗剂量的至少一种权利要求 1 的化合物与至少一种医药上可接受的载体。
26. 权利要求 25 的医药组合物，其另外包含一或多种选自细胞抑制剂、顺铂、多柔比星、克癌易、红豆杉醇、依托泊苷、CPT-11、伊利替康、刊普托斯塔、托波替康、紫杉醇、欧洲紫杉醇、埃波霉素、他莫昔芬、5-氟尿嘧啶、氟甲蝶呤、5FU、替莫唑胺、环磷酰胺、SCH 66336、R115777、L778,123、BMS 214662、艾瑞沙、塔西伐、EGFR 的抗体、格里维克、内含子、ara-C、多柔比星、环磷酰胺、吉西它宾、乌拉莫司汀、氟芥、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥、哌泊溴烷、三亚乙基蜜胺、三亚乙基硫代磷酸酰胺、白消安、卡莫司汀、洛莫司汀、链佐星、达卡巴嗪、氟尿苷、阿糖胞苷、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、氟达拉滨磷酸盐、奥沙利铂、琉可维瑞、ELOXATINTM、喷司他汀、长春碱、长春新碱、长春地辛、博来霉素、放线霉素 D、柔红菌素、阿霉素、表阿霉素、伊达比星、普卡霉素、脱氧肋间型霉素、丝裂霉素-C、L-天冬酰胺酶、替尼泊苷 17 α -乙炔基雌二醇、二

- 乙基己烯雌酚、睾酮、泼尼松、氟甲睾酮、屈他雄酮丙酸盐、睾内酯、甲地孕酮醋酸盐、甲基脱氢皮醇、甲基睾酮、脱氢皮醇、曲安西龙、氟烯雌醚、羟基孕激素、胺鲁米特、雌莫司汀、甲羟孕酮醋酸盐、疏普利德、氟他胺、托瑞米芬、戈舍瑞林、顺氯氨铂、卡铂、羟基脲、
- 5 安吖啶、丙卡巴阱、米托坦、米托蒽醌酮、左旋咪唑、纳维宾、CPT-11、安纳退唑、来曲唑、凯普西塔宾、瑞罗杉芬、拓罗山芬和六甲基蜜胺的抗癌剂。

27. 一种纯化型式的权利要求 1 的化合物。

用作依赖细胞周期蛋白的激酶抑制剂的新的咪唑并吡嗪

发明领域

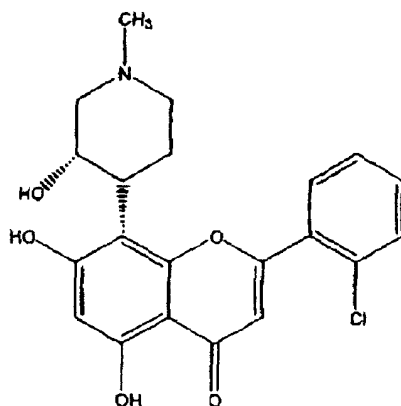
5 本发明是关于用作蛋白激酶抑制剂(如例如依赖细胞周期蛋白的激酶抑制剂、以促细胞分裂剂活化的蛋白激酶(MAPK/ERK)、糖原合成酶激酶 3 (GSK3 β)和类似物)的咪唑并[1,2-a]吡嗪化合物、含此类化合物的医药组合物以及使用该化合物和该组合物治疗疾病的方法, 如例如癌症、发炎、关节炎、病毒疾病、神经变性疾病(如阿兹海默氏病)、
10 心血管疾病和霉菌性疾病之类的疾病。本申请案要求在 2002 年 9 月 23 日提交的美国临时专利申请第 60/412,906 号的优先权。

发明背景

蛋白激酶抑制剂包括如例如依赖细胞周期蛋白的激酶抑制剂(CDK)、以促细胞分裂剂活化的蛋白激酶(MAPK/ERK)、糖原合成酶
15 激酶 3 (GSK3 β)和类似物之类的激酶。依赖细胞周期蛋白的激酶是丝胺酸/苏胺酸蛋白激酶, 其是在细胞循环和细胞增殖之后的起动力。个别的 CDK(如 CDK1、CDK2、CDK3、CDK4、CDK5、CDK6 和 CDK7、CDK8 和类似物)在细胞循环进度中执行不同的作用, 并可以分类成或 G1、S 或 G2M 相酶。不受控制的增殖作用是癌症细胞的标记, 并在
20 许多重要的固体肿瘤中经常发生不规则的 CDK 机能。CDK2 和 CDK4 是特别重要的, 因为它们在各种广泛的人类癌症中常常有不规则的活性。CDK2 活性是经由细胞循环的 G1 进展至 S 相所要求的, 以及 CDK2 是 G1 关卡的重要组成部分之一。关卡具有维持适当的细胞循环事件的序列和允许细胞回应伤害或增殖信号, 而且丧失在癌症细胞中适当的关卡控制会助长肿瘤生成作用。CDK2 路径会影响肿瘤抑制机能(例如,
25 p52、RB 和 p27)和致癌基因活化(细胞周期蛋白 E)程度的肿瘤生成作用。许多报告已证明辅助活化剂, 细胞周期蛋白 E 和 CDK2 的抑制剂(p27)两者分别在乳癌、直肠癌、非小细胞肺癌、胃癌、摄护腺癌、膀胱癌、非何杰金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's)、卵巢癌和其它癌症中或过
30 度表现或表现不足。已证明这些不同的表现与增加的 CDK2 活性值和差的总存活率有相互的关系。该观察是以 CDK2 和其调整路径为多年发展的强制标的, 已在文献中报告以许多腺苷 5'-三磷酸(ATP)竞争性

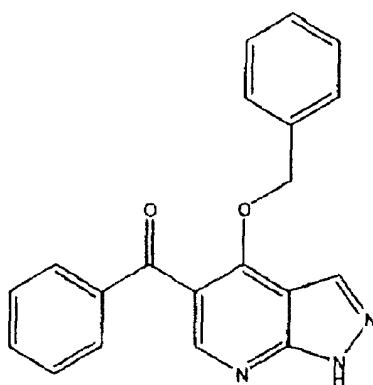
小有机分子以及肽作为有效的癌症治疗的 CDK 抑制剂。美国专利第 6,413,974 号第 1 段第 23 行至第 15 段第 10 行提供各种 CDK 的完整说明和其与各种癌症的相互关系。

已知 CDK 抑制剂, 例如, 氟维皮瑞多(flavopiridol)(式 I)是目前正在进行人类临床试验的非选择性 CDK 抑制剂, 详见 A. M. 山德若威兹(Sanderowicz)等人的 J. Clin. Oncol. (1998) 16, 2986-2999。



式 I

其它已知的 CDK 抑制剂包括例如欧罗茂辛(olomoucine)(J. 维斯理(Vesely)等人的 Eur. J. Biochem., (1994) 224, 771-786)和若斯可维提(roscovitine)(I. 梅杰尔(Meijer)等人的 Eur. J. Biochem., (1997) 243, 527-536)。U.S. 6,107,305 叙述了一些作为 CDK 抑制剂的吡唑并[3,4-b]吡啶化合物。该专利的典型化合物具有式 II:



式 II

K. S. 金姆(Kim)等人的 J. Med. Chem. 45 (2002) 3905-3927 和 WO 02/10162 揭示了一些作为 CDK 抑制剂的氨基噻唑化合物。

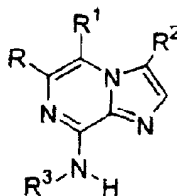
已知吡唑并嘧啶，例如，WO92/18504、WO02/50079、WO95/35298、WO02/40485、EP94304104.6、EP0628559(相当于美国专利第 5,602,136 号、第 5,602,137 号和第 5,571,813 号)、U.S. 6,383,790、Chem. Pharm. Bull., (1999) 47 928、J. Med. Chem., (1977) 20, 296、J. Med. Chem., (1976) 19 517 和 Chem. Pharm. Bull., (1962) 10 620 揭示了各种吡唑并嘧啶。

鉴于治疗与 CDK 有关疾病和病症的新化合物、制剂、治疗和疗法有需求。因此，本发明的目的是提供在治疗或预防或改善这些疾病和病症方面有用的化合物。

10 发明概述

在本发明的许多实施方案中，提供了一类作为依赖细胞周期蛋白的激酶抑制剂的咪唑并[1,2-a]吡嗪化合物、制备这些化合物的方法、包含一或多种这类化合物的医药组合物、制备含有一或多种这类化合物的医药制剂的方法、以及使用这些化合物或医药组合物治疗、预防、抑制或改善一或多种与 CDK 有关连的疾病的方法。

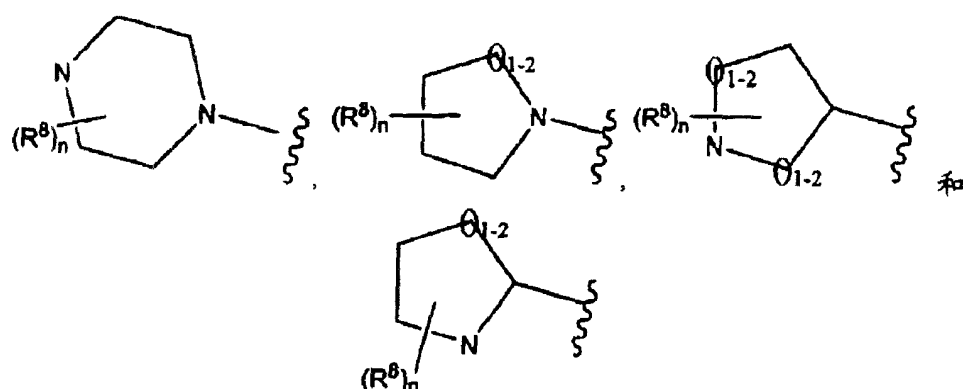
本发明的一方面，揭示一种化合物或该化合物的医药上可接受的盐类或溶剂合物，该化合物具有以式 III 所示的通式结构：



式 III

其中：

R 选自烷基、CF₃、杂芳基、杂芳烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环基、杂环烷基、芳烷基、-C(O)R⁷、



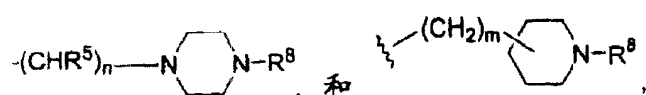
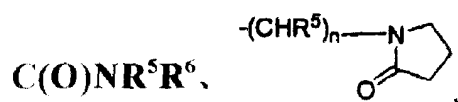
其中每一个该烷基、杂芳基、芳烷基、环烷基、杂环基和杂环基部份结构是如上 R 所示并可以未经取代或视需要独立地以一或多个可以相同或不相同的部份取代，每一部份独立地选自卤素、烷基、环烷基、

- 5 CF_3 、 CN 、 $-OCF_3$ 、 $-OR^6$ 、 $-C(O)R^7$ 、 $-NR^5R^6$ 、 $-C(O_2)R^6$ 、 $-C(O)NR^5R^6$ 、 $-(CHR^5)_nOR^6$ 、 $-SR^6$ 、 $-S(O_2)R^7$ 、 $-S(O_2)NR^5R^6$ 、 $-N(R^5)S(O_2)R^7$ 、 $-N(R^5)C(O)R^7$ 和 $-N(R^5)C(O)NR^5R^6$;

R^1 是 H、卤素或烷基;

R^2 选自 H、卤素、 CN 、环烷基、杂环基、炔基和 $-CF_3$;

- 10 R^3 选自芳基(除了苯基之外)、杂芳基(除了呋喃基之外)、杂环基、 $-(CHR^5)_n$ -杂芳基、 $-S(O_2)R^6$ 、 $-C(O)R^6$ 、 $-S(O_2)NR^5R^6$ 、 $-C(O)OR^6$ 、 $-$



- 其中每一个该芳基、杂芳基和杂环基可以未经取代或视需要以一或多个可以相同或不相同的部份取代，每一部份独立选自卤素、烷基、芳基、环烷基、 CF_3 、 CN 、 $-OCF_3$ 、 $-OR^5$ 、 $-NR^5R^6$ 、 $-C(O_2)R^5$ 、 $-C(O)NR^5R^6$ 、 $-SR^6$ 、 $-S(O_2)R^6$ 、 $-S(O_2)NR^5R^6$ 、 $-N(R^5)S(O_2)R^7$ 、 $-N(R^5)C(O)R^7$ 和 $-N(R^5)C(O)NR^5R^6$ ，条件是，当 R^3 是 $-(CHR^5)_n$ -杂芳基时，则 R^2 可以另外是烷基;
- 15

- 20 R^5 是 H 或烷基;

R^6 选自 H、烷基、芳基、杂芳基、芳烷基和杂芳烷基，其中每一个该烷基、杂芳烷基、芳基、杂芳基和芳烷基可以未经取代或视需要

以一或多个可以相同或不相同的部份取代，每一部份独立选自卤素、烷基、芳基、环烷基、 CF_3 、 OCF_3 、 CN 、 $-\text{OR}^5$ 、 $-\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 $-\text{CH}_2\text{OR}^5$ 、 $-\text{C}(\text{O}_2)\text{R}^5$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 $-\text{SR}^6$ 、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^7$ 、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^7$ 、 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})\text{R}^7$ 和 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})\text{NR}^5\text{R}^6$;

- 5 R^7 选自烷基、芳基、杂芳基、芳烷基和杂芳烷基，其中每一个该烷基、杂芳烷基、芳基、杂芳基和芳烷基可以未经取代或视需要以一或多个可以相同或不相同的部份取代，每一部份独立选自卤素、烷基、芳基、环烷基、 CF_3 、 OCF_3 、 CN 、 $-\text{OR}^5$ 、 $-\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 $-\text{CH}_2\text{OR}^5$ 、 $-\text{C}(\text{O}_2)\text{R}^5$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 $-\text{SR}^6$ 、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^7$ 、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^7$ 、 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})\text{R}^7$ 和 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})\text{NR}^5\text{R}^6$;

R^8 选自 R^6 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^7$ 、 $-\text{C}(\text{O}_2)\text{R}^6$ 、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^7$ 和 $-(\text{CH}_2)\text{-芳基}$;

m 是 0 至 4; 和

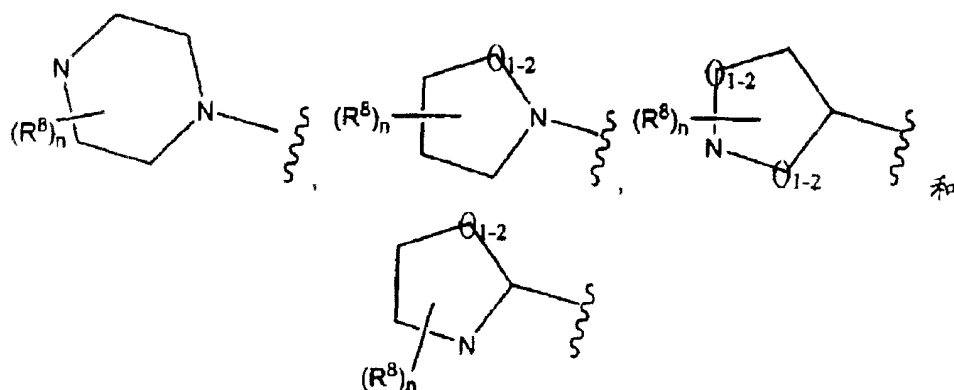
n 是 1-4。

- 15 式 III 化合物可用作蛋白激酶抑制剂，并可用于治疗 and 预防增殖性疾病，例如，癌症、发炎和关节炎。也可用于治疗神经变性疾病(如阿兹海默氏病)、心血管疾病、病毒疾病和霉菌性疾病。

发明详述

- 20 在本发明的一个具体实施方案中，揭示以结构式 III 代表的咪唑并[1,2-a]吡嗪化合物，其在医药上可接受的盐或溶剂合物，其中各部份的含义如以上所述。

在一优选的具体实施方案中， R 选自烷基、杂芳烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环基、杂环烷基、芳烷基、

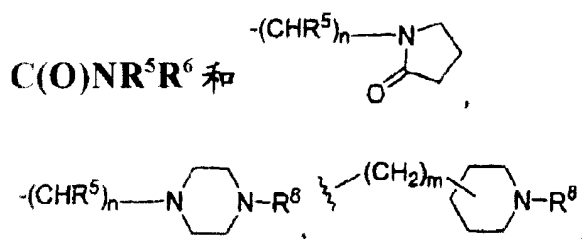


，其中以上 R 所示的每一个该烷基、杂芳基、环烷基、芳烷基、杂环基和杂环基部份可以未经取代或视需要独立以一或多个可以相同或不相同的部份取代，每一部份独立选自卤素、烷基、环烷基、 CF_3 、 CN 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OR}^6$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^7$ 、 $-\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 $-\text{C}(\text{O}_2)\text{R}^6$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 $-\text{SR}^6$ 、
 5 $\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^7$ 、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^7$ 、 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})\text{R}^7$ 和 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})\text{NR}^5\text{R}^6$;

在另一个优选的具体实施方案中， R^1 是 H 或卤素。

在另一个优选的具体实施方案中， R^2 是选自 H、卤素、环烷基、 CN 、炔基和 $-\text{CF}_3$ 。

10 在另一个优选的具体实施方案中， R^3 选自芳基、杂芳基、杂环基、 $-(\text{CHR}^5)_n$ -杂芳基、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^6$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^6$ 、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^6$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^5\text{R}^6$ 和



15 其中每一个该芳基、杂芳基和杂环基可以未经取代或视需要以一或多个可以相同或不相同的部份取代，每一部份独立选自卤素、烷基、芳基、环烷基、 CF_3 、 CN 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})\text{R}^7$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^6$ 和 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})\text{R}^7$ 。

在另一个优选的具体实施方案中， R^5 是 H 或低碳烷基。

在另一个优选的具体实施方案中， m 是 0 至 2。

20 在另一个优选的具体实施方案中， n 是 1 至 3。

在额外优选的具体实施方案中， R 选自甲基、乙基、三级-丁基、环己基甲基、苄基和苯乙基。

在额外优选的具体实施方案中， R^1 是 H、Br 或甲基。

在额外优选的具体实施方案中， R^2 是 F、Cl、Br、I、环己基或 CF_3 。

25 在额外优选的具体实施方案中， R^3 是(吡啶-2-基)甲基、(吡啶-3-基)甲基、(吡啶-4-基)甲基、噻吩-2-基或噻吩-3-基，其中该吡啶基或噻吩基可以未经取代或视需要以一或多个可以相同或不相同的部份取代，每一部份独立选自 F、Cl、Br、 CF_3 、低碳烷基、甲氧基和 CN 。

在额外优选的具体实施方案中， R^5 是 H。

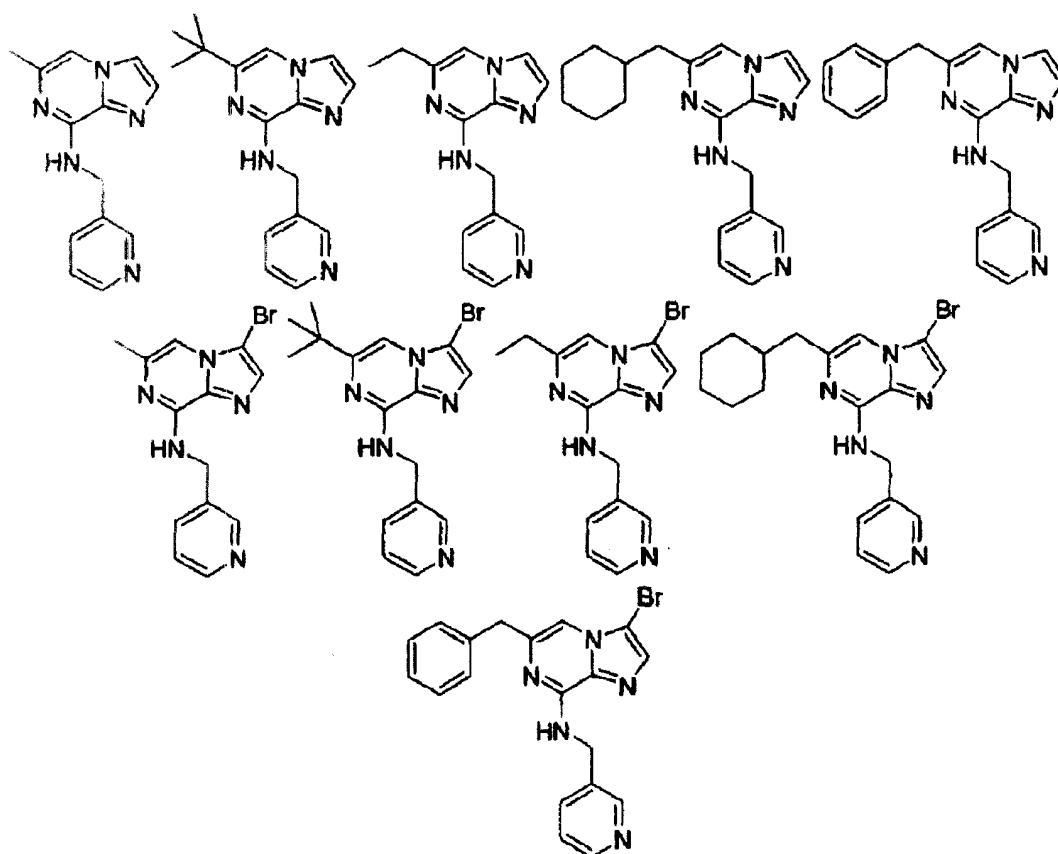
在额外优选的具体实施方案中， m 是 0。

在额外优选的具体实施方案中， n 是 1 或 2。

本发明特别优选的化合物示于表 1 中。

5

表 1



本文所使用的以下术语具有以下意义，除非有另外的指定：

10

"患者"同时包括人类和动物。

"哺乳动物"代表人类和其它哺乳类动物。

15

"烷基"代表直链或支链和在链中包含约 1 至约 20 个碳原子的脂肪族烃基。优选的烷基包括约 1 至约 12 个碳原子。更优选的烷基包括约 1 至约 6 个碳原子。支链是指一或多个低碳烷基(如甲基、乙基或丙基)衔接于直链烷基。"低碳烷基"代表具有约 1 至约 6 个碳原子的基，其可以是直链或支链。"取代的烷基"是指烷基被一或多个相同或不不同的取代基取代，每一个取代基是独立选自卤素、烷基、芳基、

环烷基、氰基、羟基、烷氧基、烷硫基、胺基、-NH(烷基)、-NH(环烷基)、-N(烷基)₂、羧基和-C(O)O-烷基。适合的烷基的非限制性实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基和叔丁基。

"炔基"代表包括至少一个碳-碳叁键和其可以是直链或支链和包含约 2 至约 15 个在链中的碳原子的脂肪族烃基。优选的炔基具有约 2 至约 12 个在链中的碳原子,并以约 2 至约 4 个在链中的碳原子更优选。支链代表以一或多个低碳烷基(如甲基、乙基或丙基)附接于直链炔基。"低碳炔基"代表约 2 至约 6 个在链中的碳原子,其可以是直链或支链。适合的炔基的非限制性实例包括乙炔基、丙炔基、2-丁炔基和 3-甲基丁炔基。"取代的炔基"是指炔基以一或多个相同或不不同的取代基取代,每一个取代基独立选自烷基、芳基和环烷基。

"芳基"代表含有约 6 至约 14 个碳原子的芳族单环或多环环系统,以约 6 至约 10 个碳原子优选。可将芳基视需要以一或多个相同或不不同和如本文定义的"环系统取代基"取代。适合的芳基的非限制性实例包括苯基和萘基。

以"杂芳基"代表含有约 5 至约 14 个环原子的芳族单环或多环环系统,以约 5 至约 10 个环原子优选,其中一或多个环原子是除了碳之外的元素,例如,单独或组合的氮、氧或硫。优选的杂芳基包括约 5 至约 6 个环原子。可将"杂芳基"视需要以一或多个相同或不不同和如本文定义的"环系统取代基"取代。在杂芳基根命名之前附加的氮杂、氧杂或硫杂分别代表至少一个氮、氧或硫原子以环原子存在。可将杂芳基的氮原子视需要氧化成对应的 N-氧化物。适合的杂芳基的非限制性实例包括吡啶基、吡嗪基、呋喃基、噻吩基、嘧啶基、吡啶酮(包括以 N-取代的吡啶酮)、异噁唑基、异噻唑基、噁唑基、噻唑基、吡唑基、呋咱基、吡咯基、吡唑基、三唑基、1,2,4-噻二唑基、吡嗪基、哒嗪基、喹喔啉基、二氮杂萘基、羟吲哚基、咪唑并[1,2-a]吡啶基、咪唑并[2,1-b]吡唑基、苯并呋咱基、吲哚基、氮杂吲哚基、苯并咪唑基、苯并噻吩基、喹啉基、咪唑基、噻吩并吡啶基、喹唑啉基、噻吩并嘧啶基、吡咯并吡啶基、咪唑并吡啶基、异喹啉基、苯并氮杂吲哚基、1,2,4-三嗪基、苯并噻唑基和类似物。"杂芳基"术语也表示部份饱和杂芳基部份,如例如四氢异喹啉基、四氢喹啉基和类似物。

"芳烷基"或"芳基烷基"代表其中芳基和烷基是如先前所述的芳基

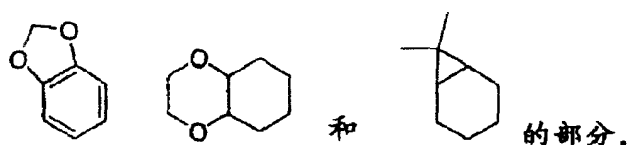
-烷基。优选的芳烷基包含低碳烷基。适合的芳烷基的非限制性实例包括苄基、2-苯乙基和萘甲基。与母体部份是经由烷基结合。

"烷基芳基"代表其中烷基和芳基是如先前所述的烷基-芳基。优选的烷基芳基包含低碳烷基。适合的烷基芳基的非限制性实例包括甲基、

5 以"环烷基"代表含有约 3 至约 10 个碳原子的非芳族单-或多环环系统，以约 5 至约 10 个碳原子优选。优选的环烷基环包括约 5 至约 7 个环原子。环烷基视需要以一或多个相同或不相同和如本文定义的"环系统取代基"取代。适合的单环系环烷基的非限制性实例包括环丙基、环戊基、环己基、环庚基和类似物。适合的多环系环烷基的非限制性实例包括 1-萘烷基、降冰片烷基、金刚烷基和类似物以及部份饱和物，如例如二氢化茚基、四氢萘基和类似物。

以"卤素"代表氟、氯、溴或碘。

"环系统取代基"代表附接于芳族或非芳族环系统上的取代基，例如如置换在环系统上的氢。环系统取代基可以相同或不相同，每一个独立选自烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、芳烷基、烷基芳基、杂芳烷基、杂芳烯基、杂芳炔基、烷基杂芳基、羟基、羟烷基、烷氧基、芳氧基、芳烷氧基、酰基、芳酰基、卤素、硝基、氰基、羧基、烷氧基羰基、芳氧基羰基、芳烷氧基羰基、烷磺酰基、芳磺酰基、杂芳磺酰基、烷硫基、芳硫基、杂芳硫基、芳烷硫基、杂芳烷硫基、环烷基、杂环基、 $-C(=N-CN)-$ 、 NH_2 、 $-C(=NH)-NH_2$ 、 $-C(=NH)-NH(烷基)$ 、 Y_1Y_2N- 、 $Y_1Y_2N-烷基-$ 、 $Y_1Y_2NC(O)-$ 、 $Y_1Y_2NSO_2-$ 和 $-SO_2NY_1Y_2$ ，其中 Y_1 和 Y_2 可以相同或不相同，并是独立选自由氢、烷基、芳基、环烷基和芳烷基。"环系统取代基"也可以代表同时置换在环系统上两个邻接的碳原子上的两个氢(在各碳上一个氢)的单一部份。该部份的实例是亚甲二氧基、亚乙二氧基、 $-C(CH_3)_2-$ 和类似物，其形成如例如：

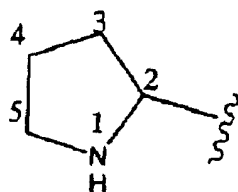


"杂环基"代表含有约 3 至约 10 个环原子的非芳族饱和单环或多环环系统，以约 5 至约 10 个环原子优选，其中一或多个在环系统中

的原子是除了碳之外的元素，例如，单独或组合的氮、氧或硫。没有任何邻接的氧和/或硫原子出现在环系统中。优选的杂环基包括约 5 至约 6 个环原子。在杂环基根命名之前附加的氮杂、氧杂或硫杂分别代表至少一个氮、氧或硫原子以环原子存在。可将任何在杂环基环中的-NH 以保护成例如-N(Boc)、-N(CBz)、-N(Tos)基和类似物存在，也可将 5 这些保护作用视为本发明的一部份。杂环基视需要以一或多个可以相同或不相同和如本文定义的"环系统取代基"取代。可将杂环基的氮或硫原子视需要氧化成对应的 N-氧化物、S-氧化物或 S,S-二氧化物。适合的单环系杂环基环的非限制性实例包括哌啶基、吡咯烷基、哌嗪基、10 吗啉基、硫代吗啉基、噻唑烷基、1,4-二氧杂环己烷基、四氢呋喃基、四氢噻吩基、内酰胺、内酯和类似物。

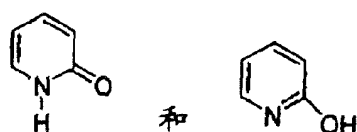
应注意的是在本发明的含杂原子的环系统中，在与 N、O 或 S 邻接的碳原子上没有任何羟基，以及在与另一个杂原子邻接的碳原子上没有任何 N 或 S 基。因此，例如，在以下环中：

15



没有任何-OH 直接附接於以 2 和 5 标记的碳上。

也应注意的是如，例如：



20

部份的互变异构形式在本发明的具体实施例中被视为是相同的。

"炔烷基"代表其中炔基和烷基是如先前所述的炔基-烷基。优选的炔烷基包括低碳炔基和低碳烷基。与母体部份是经由烷基结合。适合的炔烷基的非限制性实例包括炔丙基甲基。

25

"杂芳烷基"代表其中杂芳基和烷基是如先前所述的杂芳基-烷基。优选的杂芳烷基包括低碳烷基。适合的杂芳烷基的非限制性实例包括吡啶基甲基和噻啉-3-基甲基。与母体部份是经由烷基结合。

"羟烷基"代表其中烷基是如先前定义的 HO-烷基。优选的羟烷基包括低碳烷基。适合的羟烷基的非限制性实例包括羟甲基和 2-羟乙基。

5 "酰基"代表其中各种基是如先前所述的 H-C(O)-、烷基-C(O)-或环烷基-C(O)-。与母体部份是经由羰基结合。优选的酰基包括低碳烷基。适合的酰基的非限制性实例包括甲酰基、乙酰基和丙酰基。

"芳酰基"代表其中芳基是如先前所述的芳基-C(O)-。与母体部份是经由羰基结合。适合的芳酰基的非限制性实例包括苯甲酰基和 1-萘甲酰基。

10 "烷氧基"代表其中烷基是如先前所述的烷基-O-。适合的烷氧基的非限制性实例包括甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基和正丁氧基。与母体部份是经由醚氧结合。

"芳氧基"代表其中芳基是如先前所述的芳基-O-。适合的芳氧基的非限制性实例包括苯氧基和萘氧基。与母体部份是经由醚氧结合。

15 "芳烷氧基"代表其中芳烷基是如先前所述的芳烷基-O-。适合的芳烷氧基的非限制性实例包括苄氧基和 1-或 2-萘甲氧基。与母体部份是经由醚氧结合。

"烷硫基"代表其中烷基是如先前所述的烷基-S-。适合的烷硫基的非限制性实例包括甲硫基和乙硫基。与母体部份是经由硫结合。

20 "芳硫基"代表其中芳基是如先前所述的芳基-S-。适合的芳硫基的非限制性实例包括苯硫基和萘硫基。与母体部份是经由硫结合。

"芳烷硫基"代表其中芳烷基是如先前所述的芳烷基-S-。适合的芳烷硫基的非限制性实例包括苄硫基。与母体部份是经由硫结合。

25 "烷氧基羰基"代表烷基-O-CO-。适合的烷氧基羰基的非限制性实例包括甲氧基羰基和乙氧基羰基。与母体部份是经由羰基结合。

"芳氧基羰基"代表芳基-O-C(O)-。适合的芳氧基羰基的非限制性实例包括苯氧基羰基和萘氧基羰基。与母体部份是经由羰基结合。

"芳烷氧基羰基"代表芳烷基-O-C(O)-。适合的芳烷氧基羰基的非限制性实例包括苄氧基羰基。与母体部份是经由羰基结合。

30 "烷磺酰基"代表烷基-S(O₂)-。优选其中烷基是低碳烷基的基。与母体部份是经由磺酰基结合。

"芳磺酰基"代表芳基-S(O₂)-。与母体部份是经由磺酰基结合。

"取代的"术语代表以选自指定的基置换在选定的原子上的一或多个氢原子,其先决条件是不超过选定的原子在现存环境下的正常价数和以取代作用生成安定的化合物。取代基和/或变异体的结合物,只有这些结合物会生成安定的化合物才被许可。"安定的化合物"或"安定的结构"是指自反应混合物中充分分离成有用的纯度并配制成有效治疗剂的化合物。

"视需要经取代"术语代表以指定的基、基团或部份视需要取代。

"分离"或化合物的"分离形式"表示在自合成法分离之后或来自天然来源的该化合物或其结合物的物理状态。"纯化"或化合物的"纯化形式"表示自纯化法或本文所述的方法或熟悉的技术员熟知的方法获得之后的该化合物的物理状态,具有以本文所述或熟悉的技术员熟知的标准分析技术为特征的充份纯度。

也应注意的是假设在本文的文章、方程式、实例和表格中任何具有不满意的价数的杂原子具有使价数满意的氢原子。

在将化合物中的官能基称为"经保护"时,则其代表当化合物进行反应时具有修改型的基,预先阻止在保护位置上不希望的副反应。那些熟悉本技术领域的人以及参考标准参考书(如例如 T. W. 桂尼(Greene)等人的 *Protective Groups in organic Synthesis* (1991), Wiley, New York) 认知适合的保护基。

当任何变异体(例如,芳基、杂环、 R^2 等)在任何成份或式 III 中出现一次以上时,则其在每一种情况中的定义与其在每一种其它情况中的定义无关。

本文所使用的"组合物"术语包括含有指定量的指定成份的产物以及由指定量的指定成份结合直接或间接得到的任何产物。

本文也涵盖本发明化合物的前药和溶剂合物。本文所使用的"前药"代表作为药物前体的化合物,在一经投予病人时,以代谢或化学过程进行化学转化作用,产生式 III 化合物或其盐和/或溶剂合物。在 A.C.S. Symposium Series 的 T. 亥固奇(Higuchi)和 V. 史黛拉(Stella)的 *Pro-drugs as Novel Delivery Systems* (1987) 14 和在 *Bioreversible Carriers in Drug Design*, (1987) 爱德华(Edward) B. 罗曲(Roche)编辑的 *American Pharmaceutical Association and Pergamon Press* 中提供前药的讨论,将两篇文章并入本文以供参考。

"溶剂合物"代表本发明化合物与一或多种溶剂分子的物理缔结物。该物理缔结作用包含不同程度的离子和共价键结,包括氢键结。在特定的实例中,溶剂合物能够分离,例如,在将一或多个溶剂分子并入结晶固体的晶格中时。"溶剂合物"包含溶液相和可分离溶剂合物两种。适合的溶剂合物的非限制性实例包括乙醇盐、甲醇盐和类似物。"水合物"指其中溶剂分子是 H_2O 的溶剂合物。

"有效量"或"有效治疗剂量"指有效抑制 CDK 和因此产生预期的治疗、改善、抑制或预防效果的本发明化合物量或组合物量。

式 III 化合物可以形成也在本发明范围内的盐类。本文说明的式 III 化合物当然包括其盐类的说明,除非有其它另外的指定。本文所使用的"盐(类)"指以无机和/或有机酸所形成的酸性盐类以及无机和/或有机碱所形成的碱性盐类。此外,当式 III 化合物包括碱性部份(如吡啶或咪唑,但不限于此)和酸性部份(如羧酸,但不限于此)时,则可以形成两性离子("内盐类")并包括在本文所使用的"盐(类)"内。以在医药上可接受的盐类(即,可接受的无毒盐类)优选,虽然其它的盐类也有用。例如,式 III 化合物分别与酸量或碱量(如等量)在介质中(如使盐沉淀的介质)或在水性介质中反应,接着冷冻干燥,可以形成式 III 化合物的盐类。

典型的酸加成盐类包括醋酸盐、抗坏血酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、柠檬酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、富马酸盐、氢氟酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、乳酸盐、马来酸盐、甲烷磺酸盐、萘磺酸盐、硝酸盐、草酸盐、磷酸盐、丙酸盐、水杨酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫代氰酸盐、甲苯磺酸盐(也是已知的甲苯磺酸盐)和类似物。此外,例如以 S.伯格(Berge)等人的 Journal of Pharmaceutical Sciences (1977) 66(1) 1-19; P. 高德 (Gould) 的 International J. of Pharmaceutics (1986) 33 201-217; 纽约 Academic 出版社的安德森 (Anderson) 等人的 The Practice of Medicinal Chemistry (1996)和在 The Orange Book (华盛顿 D.C.的食品药物管理局(Food & Drug Administration)的网页上)讨论的自碱性医药化合物形成在医药上有用的盐类的酸通常被视为是适合的。将这些揭示内容并入本文以供参考。

典型的碱性盐类包括铵盐、碱金属盐类(如钠、锂和钾盐)、碱土

金属盐类(如钙和镁盐)、具有有机碱的盐类(例如,有机胺,如二环己胺、三级-丁胺)和具有氨基酸的盐类(例如,精胺酸、赖胺酸和类似物)。可将碱性含氮基以如低碳烷基卤(甲基、乙基和丁基氟、溴和碘)、硫酸二烷基酯(例如,硫酸二甲酯、二乙酯和二丁酯)、长链卤化物(例如, 5 癸基、月桂基和硬脂基氟、溴和碘)、芳烷基卤(例如,苄基溴和苯乙基溴)和其它的试剂季盐化。

希望所有这些酸性盐类和碱性盐类是在本发明范围内的在医药上可接受的盐类,并将所有酸性和碱性盐类视为以本发明为目的的对应化合物的自由形式的等同物。

10 式 III 化合物和其盐类、溶剂合物和前药可以其互变体形式存在(例如,成为酰胺或亚胺醚)。在本文涵盖所有的这些互变体形式,成为本发明的一部份。

在本发明的范围内涵盖本发明化合物(包括化合物的那些盐类、溶剂合物和前药与前体药物的盐类和溶剂合物)所有的立体异构物(例如, 15 如,几何异构物、光学异构物和类似物),如那些由于在各种取代基上不对称的碳而可以存在的立体异构物,包括对映异构形式(其甚至在没有不对称的碳存在下而可以存在)、旋转异构形式、阻转异构形式和非对映异构形式包括在本发明范围内作为位置异构物(如例如 4-吡啶基和 3-吡啶)。本发明化合物的各个立体异构物可以例如几乎不含其它 20 异构物,或可以掺合,成为外消旋物,或与所有其它或其它经选择的立体异构物掺合。本发明的手性中心可以具有如以 IUPAC 1974 推荐书所定义的 S 或 R 构型。"盐"、"溶剂合物"、"前药"和类似术语的使用同样适用于本发明化合物的对映异构物、立体异构物、旋转异构物、互变体、位置异构物、外消旋物或前药的盐、溶剂合物和前药。

25 本发明的化合物具有医药特性:具体地说,式 III 化合物可以是蛋白激酶抑制剂,如例如依赖细胞周期蛋白的激酶抑制剂、以促细胞分裂剂活化的蛋白激酶(MAPK/ERK)、糖原合成酶激酶 3 (GSK3 β)和类似物。依赖细胞周期蛋白的激酶(CDK)包括例如 CDC2 (CDK1)、CDK2、CDK4、CDK5、CDK6、CDK7 和 CDK8。期待新颖的式 III 30 化合物是增殖性疾病治疗法中有用的化合物,如癌症、自身免疫疾病、病毒疾病、霉菌性疾病、神经性/神经变性异常、关节炎、发炎、抗增殖性(例如,眼部视网膜病变)、神经元、脱发和心血管疾病。在以上

引用的 U.S. 6,413,974 中陈列许多这些疾病和异常, 将该揭示内容并入本文以供参考。

5 更具体地说, 式 III 化合物可用于治疗各种癌症, 包括(但不限于此)以下: 瘤, 包括膀胱瘤、乳房瘤、直肠瘤、肾瘤、肝瘤、肺癌(包括非小细胞肺癌)、食道瘤、胆囊瘤、卵巢瘤、胰脏瘤、胃癌、子宫颈瘤、甲状腺瘤、摄护腺瘤和皮肤瘤(包括鳞状细胞瘤);

10 淋巴系统的造血肿瘤, 包括白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性淋巴性白血病、B-细胞淋巴瘤、T-细胞淋巴瘤、何杰金氏淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤、发状细胞淋巴瘤和巴奇氏(Burkett's)恶性淋巴瘤;
骨髓细胞系统的造血肿瘤, 包括急性和慢性骨髓性白血病、骨髓发育不良微候群和前骨髓细胞白血病;

间质源的肿瘤, 包括纤维肉瘤和横纹肌肉瘤;

15 中枢和末梢神经系统的肿瘤, 包括星状细胞瘤、神经细胞瘤、神经胶质瘤和神经鞘瘤; 和

其它肿瘤, 包括黑色素细胞瘤、精母细胞瘤、畸胎瘤、骨癌、着色性乾皮病、角化棘皮瘤、甲状腺滤泡瘤和卡波西氏(Kaposi's)肉瘤。

20 由于 CDK 在一般细胞增殖的调节作用中的关键性角色, 可将抑制剂当作可逆式细胞抑制剂, 其可用于治疗任何以不正常的细胞增殖为特点的疾病过程, 例如, 良性摄护腺肥大、家族性大肠腺肿症、神经纤维瘤、动脉粥样硬化症、肺纤维化、关节炎、牛皮癣、肾丝球肾炎、在血管形成术或血管手术之后的再狭窄症、肥厚性疤痕形成、发炎性肠道疾病、移植排斥、内毒性休克和霉菌性感染。

式 III 化合物也可用于治疗阿兹海默氏病, 如最近发现建议 CDK5 涉及变性蛋白质的磷酸化作用(J. Biochem, (1995) 117, 741-749)。

25 式 III 化合物可以诱发或抑制细胞凋零。细胞凋零反应是各种人类疾病中的异常。作为细胞凋零调节剂的式 III 化合物可用于治疗癌症(包括那些上述型式的癌症, 但不限于此)、病毒感染(包括疱疹病毒、痘病毒、爱波斯坦-巴尔(Epstein-Barr)病毒、辛德比斯(Sindbis)病毒和腺病毒, 但不限于此)、预防在以 HIV 感染的个体中发生 AIDS、自身免疫疾病(包括全身性红斑性狼疮、红斑性狼疮、以自身免疫介入的肾丝球肾炎、类风湿性关节炎、牛皮癣、发炎性肠道疾病和自身免疫性糖尿病, 但不限于此)、神经变性异常(阿兹海默氏病、以 AIDS 介

30

入的痴呆症、巴金森氏病、肌萎缩性脊髓侧索硬化症、视网膜色素变性、脊髓性肌肉萎缩症和小脑退化症，但不限于此)、骨髓发育不良征候群、再生不良性贫血、与心肌梗塞有关连的缺血性伤害、中风和再灌注伤害、心律不整、动脉粥样硬化症、以毒素诱发或与酒精有关的肝疾病、造血功能性疾病(包括慢性贫血和再生不良性贫血，但不限于此)、肌肉骨骼系统的退化性疾病(包括骨质疏松症和关节炎，但不限于此)、阿司匹灵敏感性鼻窦炎、囊肿纤维化、多发性硬化症、肾脏疾病和癌症疼痛。

作为 CDK 抑制剂的式 III 化合物可以调节细胞 RNA 和 DNA 合成程度。这些试剂因此可用于治疗病毒感染(包括 HIV、人类乳突状病毒、疱疹病毒、痘病毒、爱波斯坦-巴尔病毒、辛德比斯病毒和腺病毒，但不限于此)。

式 III 化合物也可用于癌症的化学预防作用。将化学预防作用定义成以阻断突变事件开始或阻断已承受伤害的癌症前期的细胞进展或抑制肿瘤复发的方式抑制侵犯性癌症的发生。

式 III 化合物也可用于抑制肿瘤血管生成和转移。

式 III 化合物也可以作为其它蛋白激酶抑制剂(例如，蛋白激酶 C、her2、raf 1、MEK1、MAP 激酶、EGF 受体、PDGF 受体、IGF 受体、PI3 激酶、wee1 激酶、Src、Abl)和因此有效治疗与其它蛋白激酶有关连的疾病。

本发明的另一方面涉及治疗具有与 CDK 有关连的疾病或症状的哺乳动物(例如，人类)的方法，其是以有效治疗剂量的至少一种式 III 化合物或该化合物在医药上可接受的盐或溶剂合物投予哺乳动物。

优选的剂量是约 0.001 至 500 毫克/公斤体重/天的式 III 化合物。尤其优选的剂量是约 0.01 至 25 毫克/公斤体重/天的式 III 化合物或该化合物在医药上可接受的盐或溶剂合物。

本发明的化合物也可用于与一或多种抗癌症治疗法(如照射治疗法)和/或与一或多种抗癌剂的组合施用(一起或连续投药)，抗癌剂选自细胞抑制剂、胞毒剂(如例如 DNA 交互作用剂(如顺铂(cisplatin)或多柔比星(doxorubicin)，但不限于此)、紫杉烷(例如，克癌易(taxotere)、红豆杉醇(taxol))、拓扑异构酶 II 抑制剂(如顺铂)、拓扑异构酶 I 抑制剂(如伊利替康(irinotecan)(或 CPT-11)、刊普托斯塔(camptostar)或托

波替康(topotecan))、微管交互作用剂(如紫杉醇、欧洲紫杉醇(docetaxel)或埃波霉素(epothilones))、荷尔蒙剂(如他莫昔芬)、胸苷酸合成酶抑制剂(如 5-氟尿嘧啶)、抗代谢剂(如氮甲蝶呤)、烷基化试剂(如蒂蒙柔罗麦德(temozolomide)(来自新泽西州肯尼沃斯(Kenilworth)的仙灵葆雅(Schering-Plough)公司的 TEMODAR™)、环磷酰胺)、法呢基蛋白转移酶抑制剂(如来自新泽西州肯尼沃斯的仙灵葆雅公司的 SARASAR™ (4-[2-[4-[(11R)-3,10-二溴基-8-氯基-6,11-二氢-5H-苯并[5,6]环庚[1,2-b]吡啶-11-基]-1-吡啶基]-2-氧乙基]-1-吡啶羧酰胺或 SCH 66336)、提皮法尼毕(tipifarnib)(来自杨森制药(Janssen Pharmaceuticals)的 Zarnestra®或 R115777)、L778, 123 (来自新泽西州白屋站(Whitehouse Station)的默克公司(Merck & Company)的法呢基蛋白转移酶抑制剂)、BMS 214662(来自新泽西州普林斯顿(Princeton)的必治妥施贵宝制药(Bristol-Myers Squibb Pharmaceuticals)的法呢基蛋白转移酶抑制剂))、信号转导抑制剂(如艾瑞沙(Iressa)(来自英国阿斯特捷利康(Astra Zeneca)制药)、塔西伐(Tarceva)(EGFR 激酶抑制剂)、EGFR 的抗体(例如, C225)、GLEEVEC®(来自新泽西州东汉诺威市(East Hanover)的诺华(Novartis)制药的 C-abl 激酶抑制剂))、干扰素(如例如内含子(来自仙灵葆雅公司)、长效干扰素(来自仙灵葆雅公司))、荷尔蒙治疗组合法、芳香酶组合、ara-C、亚德里亚霉素、环磷酰胺和吉西它宾(gemcitabine)的抗癌剂。

其它的抗癌剂(也称为抗肿瘤剂)包括(但不限于此)乌拉莫司汀、氮芥、异环磷酰胺(Ifosfamide)、美法仑(Melphalan)、苯丁酸氮芥、吡泊溴烷(Pipobroman)、三亚乙基蜜胺、三亚乙基硫代磷酸酰胺、白消安(Busulfan)、卡莫司汀(Carmustine)、洛莫司汀(Lomustine)、链佐星、达卡巴嗪(Dacarbazine)、氟尿苷、阿糖胞苷、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、氟达拉滨(Fludarabine)磷酸盐、奥沙利铂(oxaliplatin)、琉可维瑞(leucovirin)、奥沙利宾(来自法国赛诺菲圣德拉堡制药(Sanofi-Synthelabo Pharmaceuticals)的 ELOXATIN™)、喷司他汀(pentostatine)、长春碱、长春新碱、长春地辛、博来霉素、放线霉素、柔红菌素、阿霉素、表阿霉素(Epirubicin)、伊达比星(Idarubicin)、普卡霉素、脱氧肋间型霉素(Deoxycorformycin)、丝裂霉素-C、L-天冬酰胺酶、替尼泊酶(Teniposide) 17 α -炔雌二醇、二乙基己烯雌酚、睾

酮、泼尼松、氟甲睾酮(Fluoxymesterone)、屈他雄酮(Dromostanolone)丙酸盐、睾内酯(Testolactone)、甲地孕酮醋酸盐、甲基脱氢皮醇、甲基睾酮、脱氢皮醇、曲安西龙、氯烯雌醚(Chlorotrianisene)、羟基孕激素类、胺鲁米特(Aminoglutethimide)、雌莫司汀(Estramustine)、甲羧孕酮(Medroxyprogesterone)醋酸盐、疏普利德(Leuprolide)、氟他胺(Flutamide)、托瑞米芬(Toremifene)、戈舍瑞林(Goserelin)、顺氯氨铂、卡铂(Carboplatin)、羟基脲、安吡啶(Amsacrine)、丙卡巴腓(Procarbazine)、米托坦(Mitotane)、米托蒽醌(Mitoxantrone)、左旋咪唑(Levamisole)、纳维宾(Navelbine)、安纳退唑(Anastrozole)、来曲唑(Letrozole)、凯普西塔宾(Capecitabine)、瑞罗杉芬(Reloxafine)、拓罗山芬(Droloxafine)和六甲基蜜胺。

如果调配成固定剂量，则这些结合产物使用本文所述剂量范围内的本发明化合物和其它在其剂量范围内的医药活性剂或治疗剂。例如，已发现 CDC2 抑制剂欧鲁幕辛(olomucine)与减低细胞凋零的已知的胞毒剂具有协乘作用(J. Cell Sci., (1995) 108, 2897)。当结合调配物不适合时，则也可将式 III 化合物与已知的抗癌剂或胞毒剂连续投药。本发明不限于以连续投药，可在或投予已知的抗癌剂或胞毒剂之前，或之后投予式 III 化合物。例如，与抗癌剂的投药顺序会影响依赖细胞周期蛋白的激酶抑制剂(氟维皮瑞多)的胞毒活性(Cancer Research, (1997) 57, 3375)。这些技术是在熟悉本技艺的人与主诊医师的技巧内。

因此，一方面本发明包括含有至少一种式 III 化合物或其在医药上可接受的盐或溶剂合物的剂量和一或多种以上所述的抗癌治疗法和抗癌剂的剂量的结合，其中通过化合物/治疗剂的剂量得到预期的疗效。

可通过许多药理检定确认本发明化合物的药理特性。叙述于下的典型的药理检定已经以本发明的化合物和其盐类进行。

本发明也涉及含有至少一种式 III 化合物或其医药上可接受的盐或溶剂合物和至少一种在医药上可接受的载体的医药组合物。

为了以本发明所述的化合物制备医药组合物，医药上可接受的惰性载体可以是固体或液体。固体型制剂包括药粉、药片、分散型药粒、胶囊、酞剂和栓剂。药粉和药片可由从约 5 至约 95% 的活性成份所组成的。在本技艺已知适合的固体载体，例如，碳酸镁、硬脂酸镁、滑

石粉、糖或乳糖。可以使用适合于口服投药的固体剂型的药片、药粉、酞剂和胶囊。可在宾州伊斯顿(Easton)的马克出版公司(Mack Publishing Co.)以 A.吉纳若(Gennaro)(编辑)的第 18 版 Remington's Pharmaceutical Sciences (1990)中发现用于各种组合物的在医药上可接受的载体和制造方法的实例。

液体型制剂包括溶液、悬浮液和乳液。可以用于非经肠注射的水或丙二醇水溶液作为实例说明，或以甜味剂和遮光剂加入口服溶液、悬浮液和乳液中。液体型制剂也可以包括用于鼻内投药的溶液。

适合于吸入的喷雾制剂可以包括溶液或粉末型固体，它们可以与医药上可接受的载体，如惰性压缩气体，例如，氮气结合。

本发明也包括在使用之前转化成用于口服或非经肠投药的液体制剂的固体型制剂。这些液体制剂包括溶液、悬浮液和乳液。

本发明的化合物也可经皮肤输送。皮肤用组合物可以采用乳膏、水乳液、喷雾和/或乳液型式，并可以包括在就该目的而言为本技艺所熟知的基质或贮存型的皮肤贴片中。

也可将本发明的化合物经皮下输送。

本发明化合物以口服投药为优选。

医药制剂以单位剂型为优选。在该剂型中，将制剂再分成包括适当的活性组份量的适当大小的单位剂型，例如，达成预期目的的有效剂量。

根据特殊的应用，可将在制剂的单位剂量中的活性化合物量从约 1 毫克改变或调整至约 100 毫克，优选从约 1 毫克至约 50 毫克，更优选从约 1 毫克至约 25 毫克。

所使用的实际剂量可依据患者的需求和欲治疗的病状严重性而改变。对特殊情况适当的剂量摄取的决定是本技术范围内清楚的。为了方便起见，可将总日剂量依需要在一天之内分批投药。

根据主治医师考量如年龄、患者的病况和重量与欲治疗病症的严重性等因素调节本发明的化合物和/或其在医药上可接受的盐类的剂量和频率。用于口服投药的代表性建议日剂量可在从约 1 毫克/天至约 500 毫克/天为范围的 2 至 4 次分次剂量，优选 1 毫克/天至 200 毫克/天。

本发明的另一方面是含有有效治疗剂量的至少一种式 III 化合物或其医药上可接受的盐或溶剂合物和医药上可接受的载体、赋形剂或

稀释剂的药盒。

本发明还有的另一个方面是含有至少一种式 III 化合物或其医药上可接受的盐或溶剂合物的剂量和至少一种上述抗癌治疗剂和/或抗癌剂的剂量的药盒，其中以二或多种成份的剂量得到预期的疗效。

以下制剂和实例说明本文揭示的本发明，不应该将其解释成限制本发明的范围。那些熟悉本技术的人将会明白可替换的机理和类似结构。

在 NMR 数据中，在或 Varian VXR-200 (200 MHz, ^1H), Varian Gemini-300 (300 MHz)或 XL-400 (400 MHz)上获得的 ^1H 光谱，并自具有数个质子(多重性)的 Me_4Si 的 ppm 低磁场并以括弧表示的赫兹 (Hertz)计的耦合常数提出报告。在提出 LC/MS 数据时，则使用 Applied Biosystems API-100 质谱仪和 Shimadzu SCL-10A LC 管柱：Altech 铂 C18，3 微米，33 毫米 x7 毫米 ID；梯度流动：0 分钟-10% CH_3CN ，5 分钟-95% CH_3CN ，7 分钟-95% CH_3CN ，7.5 分钟-10% CH_3CN ，9 分钟-终止进行分析。提供保留时间和观察的母离子。

括弧中的缩写表示以下的溶剂和试剂：

薄层色层分离法：TLC

二氯甲烷： CH_2Cl_2

醋酸乙酯：AcOEt 或 EtOAc

20 甲醇：MeOH

三氟醋酸酯：TFA

三乙胺： Et_3N 或 TEA

丁氧基羰基：n-Boc 或 Boc

核磁共振光谱：NMR

25 液相色谱法：LCMS

高分辨质谱法：HRMS

毫升：mL

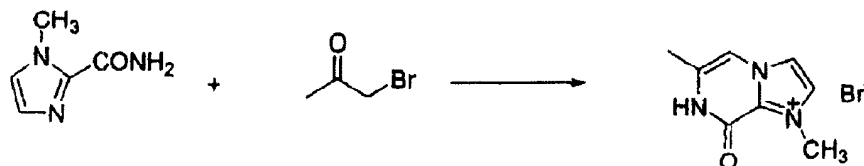
毫摩尔：mmol

微升： μl

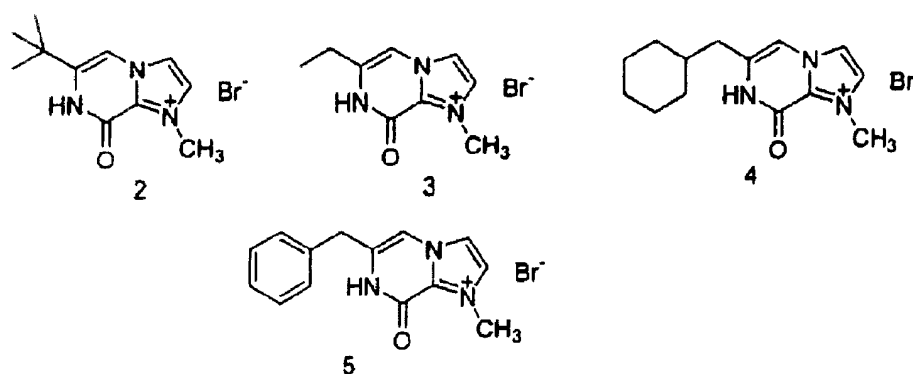
30 克：g

毫克：mg

室温或 rt(室温)：约 25°C

实例制备实例 1

将在无水 CH_3CN 中的 1-甲基咪唑-2-羧酰胺(1 当量)与溴基丙酮(1.2 当量)的混合物在 N_2 下搅拌和回流 1 天。将溶剂蒸发,并在 MeOH 中的 CH_2Cl_2 : 7 当量 NH_3 的硅胶上的柱色层分离之后获得纯产物。

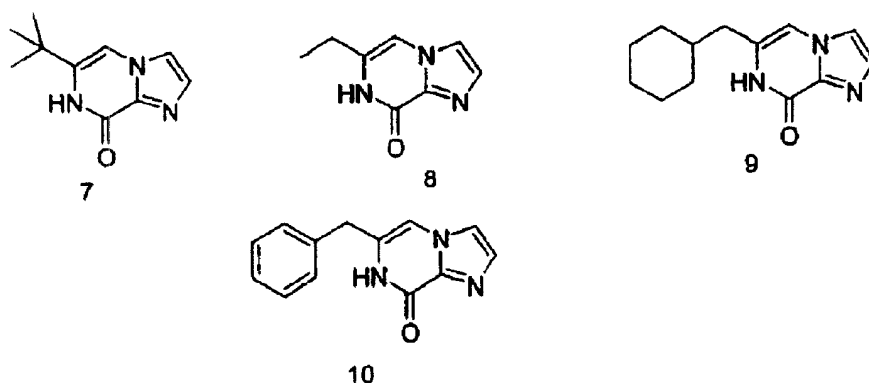
制备实例 2-5:

以制备实例 1 所述基本上相同的步骤制备这些化合物。

制备实例 6:

将来自制备实例 1 的产物(1 当量)与咪唑(25 当量)的混合物在 N_2 和 175°C 下搅拌 20 小时。将咪唑在真空中蒸出,并将残余物在 MeOH 中的 CH_2Cl_2 : 7 当量 NH_3 的硅胶上的柱色层分离纯化,获得纯产物。

制备实例 7-10:



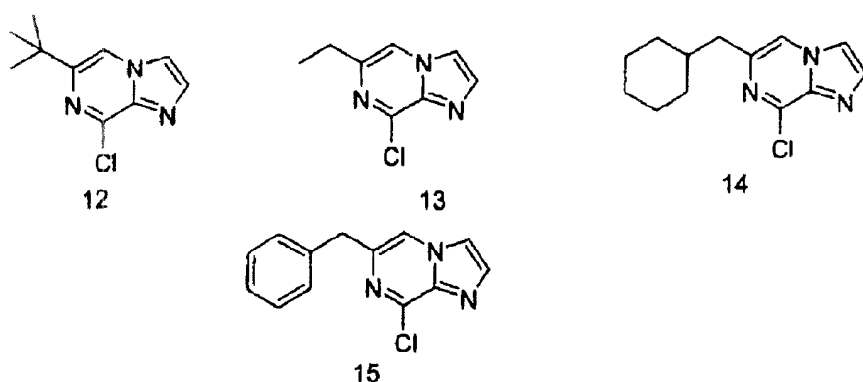
以与制备实例 6 所述基本上相同的步骤制备这些化合物。

制备实例 11:



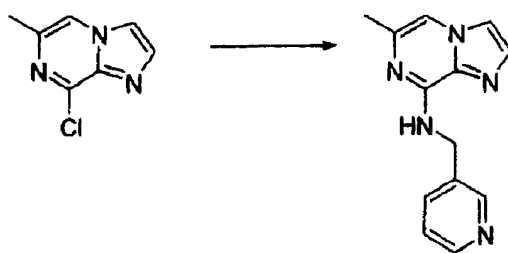
将在 POCl_3 (30 当量) 中的制备实例 6 的产物(1 当量)和吡啶(0.75 当量)的混合物在 N_2 下搅拌和回流 5 小时。将混合物倒入冰中,以 10% NaOH 水溶液中和并以 CH_2Cl_2 萃取。将萃取物经 Na_2SO_4 干燥,过滤和将溶剂蒸发。在以 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ 的硅胶上的柱色层分离,得到纯产物。

制备实例 12-15:



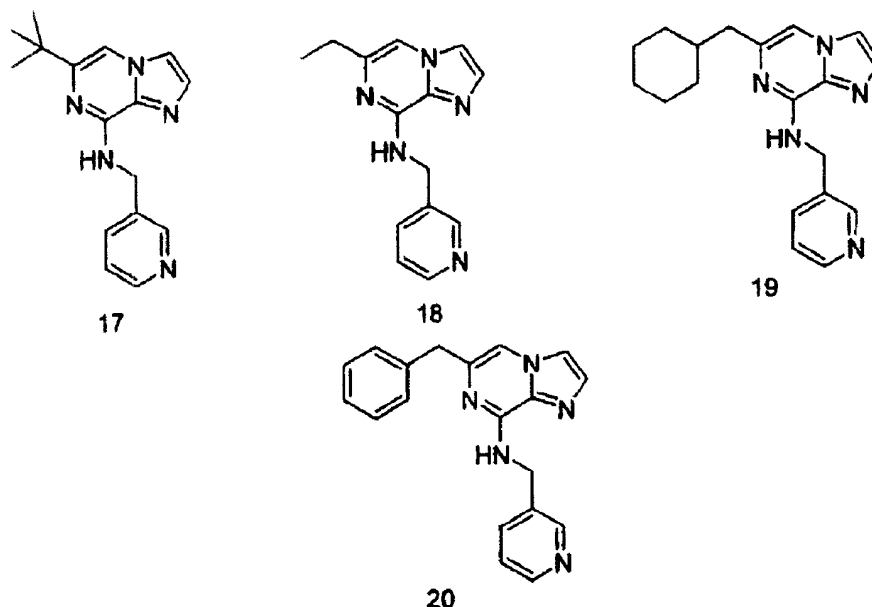
以与制备实例 11 所述基本上相同的步骤制备这些化合物。

实例 16:



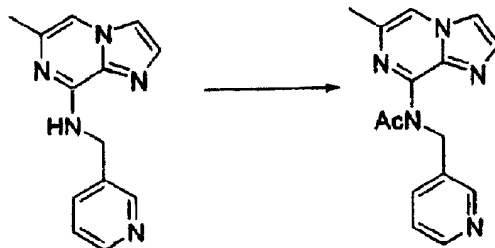
将来自制备实例 11 的产物(1 当量)、3-(胺甲基)吡啶(1.1 当量)、二异丙基乙胺(20 当量)与无水二噁烷的混合物在 90℃ 和 N₂ 下搅拌 48 小时。将溶剂蒸发, 并将残余物在以 CH₂Cl₂/MeOH/浓氨水的硅胶上的柱色层分离法纯化, 获得纯产物。

实例 17-20:



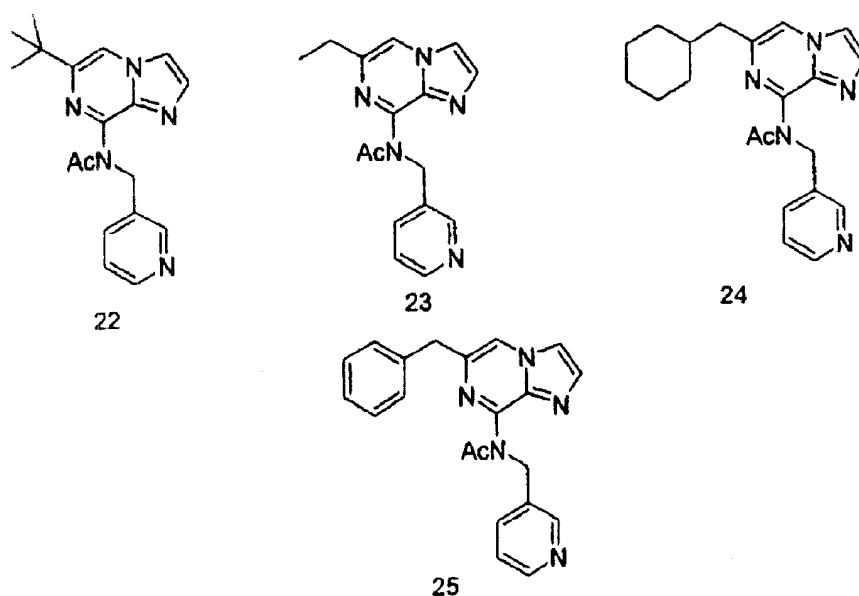
以与制备实例 16 所述基本上相同的步骤制备这些化合物。

实例 21:



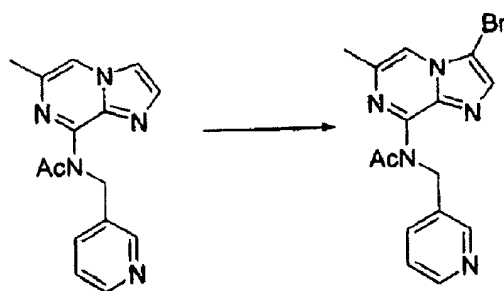
将来自制备实例的产物(1 当量)、乙酰氯(3 当量)、二异丙基乙胺(6 当量)与无水 1,2-二氯乙烷的混合物在 N_2 下回流 24 小时。将混合物倒入饱和 $NaHCO_3$ 水溶液中,以 CH_2Cl_2 萃取并将萃取物经 Na_2SO_4 干燥。将溶剂蒸发,并将残余物在以 CH_2Cl_2 / EtOAc 的硅胶上的柱色层分离法纯化,得到纯产物。

实例 22-25:



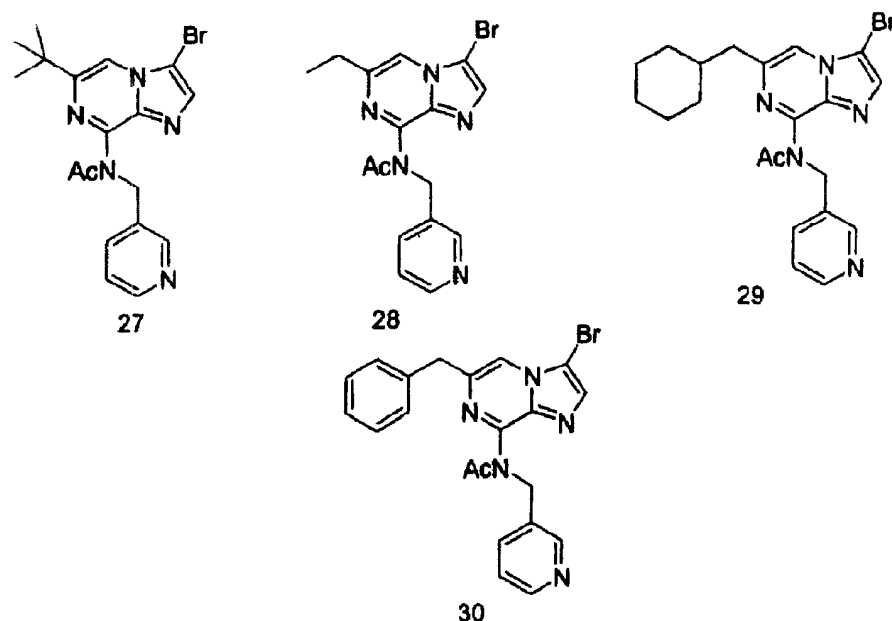
以与制备实例 21 所述基本上相同的步骤制备这些化合物。

实例 26:



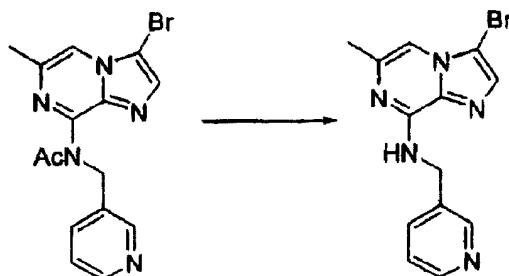
在无水 CH_3CN 中的 NBS (1 当量)的溶液在 N_2 下加入在无水 CH_3CN 中的制备实例的产物(1 当量)的搅拌溶液中。将混合物在 $25^\circ C$ 下搅拌 2 小时并接着将溶剂蒸发。在以 EtOAc/MeOH 的硅胶上的色层分离法供给产物。

实例 27-30:



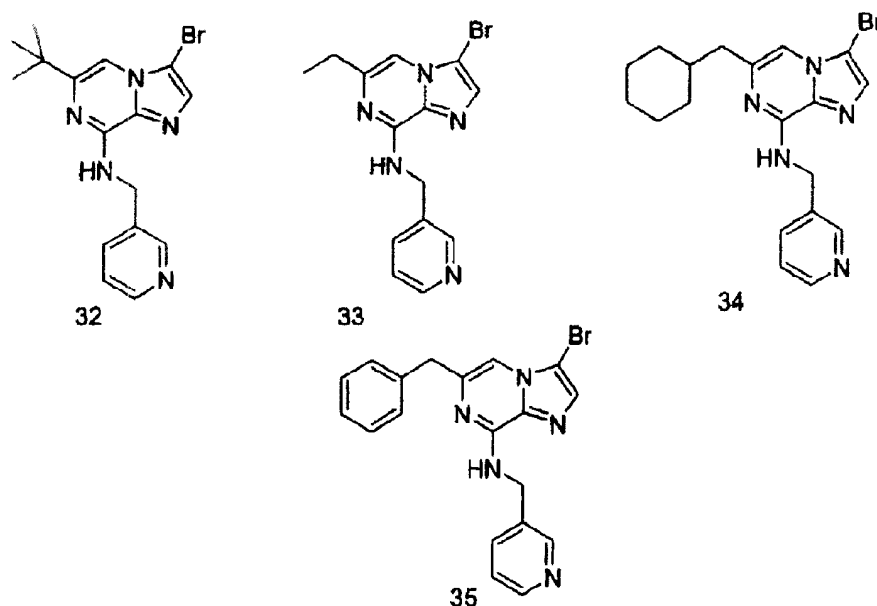
以与制备实例 26 所述基本上相同的步骤制备这些化合物。

实例 31:



将在 MeOH、1,2-二甲氧基乙烷和 H₂O 中的制备实例的产物(1 当量)与碳酸钾(10 当量)的混合物在 50℃和 N₂ 下搅拌 2 小时。接着加入 CH₂Cl₂，将混合物经 Na₂SO₄ 干燥和过滤。将溶剂蒸发，并将残余物在以 EtOAc/MeOH 的硅胶上的柱色层分离法纯化，得到纯产物。

实例 32-35:



以与制备实例 31 所述基本上相同的步骤制备这些化合物。

检定：以下述方法进行本发明化合物的检定。

杆状病毒构成：将细胞周期蛋白 A 和 E 以 PCR 克隆成 pVL1393(加州拉后拉(La Jolla)的 Pharmingen)，在胺基末端加入 5 个组胺酸残基，允许在镍树脂上纯化。表达蛋白质具有约 46 kDa(细胞周期蛋白 E)和 50 kDa(细胞周期蛋白 A)的尺寸。将 CDK2 以 PCR 克隆成 pVL1393，在羧基末端加入血细胞凝集素附加表位(YDVPDYAS)。表达蛋白质具有约 34 kDa 的尺寸。

酶生产法：将表达细胞周期蛋白 A、E 与 CDK2 的重组杆状病毒以相同的多重感染(MOI=5)经 48 小时共同感染成 SF9 细胞。在 1000 RPM 下以离心 10 分钟收集细胞，接着将细胞片在冰上经 30 分钟溶解在 5 倍细胞片体积的溶胞缓冲液中(该缓冲液包括 50 毫克分子量 Tris pH 8.0、150 毫克分子量 NaCl、1% NP40、1 毫克分子量 DTT 和蛋白酶抑制剂(德国曼海姆(Mannheim)的 Roche Diagnostics GmbH))。将溶胞液在 15000 RPM 下旋转 10 分钟，并保留上澄液。将 5 毫升镍珠在溶胞缓冲液中(德国奇尔根(Qiagen)GmbH)清洗 3 次(对 1 公升 SF9 细胞而言)。将咪唑加入杆状病毒上澄液中，成为 20 毫克分子的最终浓度，接着与镍珠在 4℃ 下培育 45 分钟。将蛋白质以包括 250 毫克分子量咪唑的溶胞缓冲液溶离。将洗出液在包括 50 毫克分子量 Tris pH 8.0、1 毫克分子量 DTT、10 毫克分子量 $MgCl_2$ 、100 微克分子量原钒

酸钠和 20%甘油的 2 公升激酶缓冲液中经隔夜透析。将酶整份贮存在 -70℃ 下。

在活体外的激酶检定：在以低蛋白质结合的 96 井平盘(纽约寇尼(Corning)的寇尼公司)中进行 CDK2 激酶检定(或细胞周期蛋白 A 或 E-依赖性)。将酶在包括 50 毫克分子量 Tris pH 8.0、10 毫克分子量 $MgCl_2$ 、1 毫克分子量 DTT 和 0.1 毫克分子量原钒酸钠的激酶缓冲液中稀释成 50 微克/毫升的最终浓度。在这些反应中所使用的基质是衍生自抗组蛋白抗体 H1(来自英国安莫山(Amersham))的生物素化多肽。将基质在冰上解冻和在激酶缓冲液中稀释成 2 微克分子量。将化合物在 10% DMSO 中稀释成预期浓度。对每一种激酶反应而言，将 20 微升的 50 微克/毫升酶溶液(1 微克酶)与 20 微升的 2 微克分子量基质溶液混合，接着与在每一个井中的 10 微升稀释化合物合并，以供测试。加入 50 微升的 2 微克分子量 ATP 和 0.1 μCi 的 ^{33}P -ATP(来自英国安莫山)开始激酶反应。允许反应在室温下进行 1 小时。加入包括 0.1% Triton X-100、1 毫克分子量 ATP、5 毫克分子 EDTA 和 5 毫克/毫升以链霉抗生物素涂布的 SPA 珠(来自英国安莫山)的 200 微升终止缓冲液经 15 分钟终止反应。接着使用 Filtermate 万能的捕获器(帕卡德/铂金艾尔默生物科技(Packard/Perkin Elmer Life Sciences))将 SPA 珠捕获在 96-井 GF/B 过滤盘上(帕卡德/铂金艾尔默生物科技)。以 2 克分子量 NaCl 清洗珠两次并接着以具有 1%磷酸的 2 克分子量 NaCl 清洗珠两次，以消除非特异性信号。接着使用 TopCount 96 井液体闪烁计数器(来自帕卡德/铂金艾尔默生物科技)测量放射活性信号。

IC_{50} 测定：自每次重复的 8 点连续的抑制化合物稀释剂产生的抑制数据作出剂量反应曲线图。以化合物浓度对以未治疗样品的 CPM 除以治疗的样品的 CPM 计算的激酶活性%作图。为了产生 IC_{50} 值(使用上述检定的细胞周期蛋白 A 或细胞周期蛋白 E)，接着将剂量反应曲线配合标准的 S 型曲线，并以非线性回归分析得到 IC_{50} 值。

虽然已连同以上所述的具体实施例说明本发明，但是熟悉本技术的人会明白许多其替换实例、修改实例和其它变化实例。所有这些替换实例、修改实例和变化实例都落在本发明的精神和范围内。