

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 31/50

A61P 35/00

C07D487/04

/(C07D487/04,239:00,
231:00)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03824908.1

[43] 公开日 2005 年 11 月 9 日

[11] 公开号 CN 1694705A

[22] 申请日 2003.9.3 [21] 申请号 03824908.1

[30] 优先权

[32] 2002.9.4 [33] US [31] 60/408,182

[86] 国际申请 PCT/US2003/027564 2003.9.3

[87] 国际公布 WO2004/022062 英 2004.3.18

[85] 进入国家阶段日期 2005.4.30

[71] 申请人 先灵公司

地址 美国新泽西州

共同申请人 法马科皮亚药物研发公司

[72] 发明人 T·J·古兹 K·普拉奇

M·P·多怀尔 R·J·多尔

V·M·吉拉加威拉汉 C·肯特森

B·麦克基崔克 L·W·迪拉德

V·D·崔恩 希建明

R·A·詹姆斯 朴涵宋

[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 王景朝

权利要求书 11 页 说明书 56 页

[54] 发明名称 用作依赖细胞周期蛋白激酶抑制剂的吡唑并嘧啶

[57] 摘要

在本发明的许多实施方案中,本发明提供了一类新的用作依赖细胞周期蛋白激酶抑制剂的吡唑并[1,5-a]嘧啶化合物、所述化合物的制备方法、含有一种或多种所述化合物的药物组合物、含有一种或多种所述化合物的药物制剂的制备方法以及使用所述化合物或药物组合物治疗、预防、抑制或减轻一种或多种与 CDK 相关的疾病的方法。

ISSN 1008-4274

1. 本下列结构式所示的化合物:



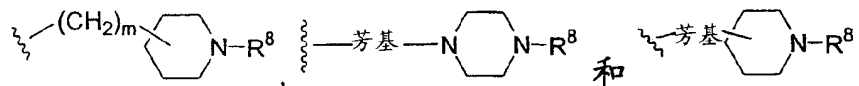
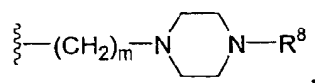
5

式 III

其中:

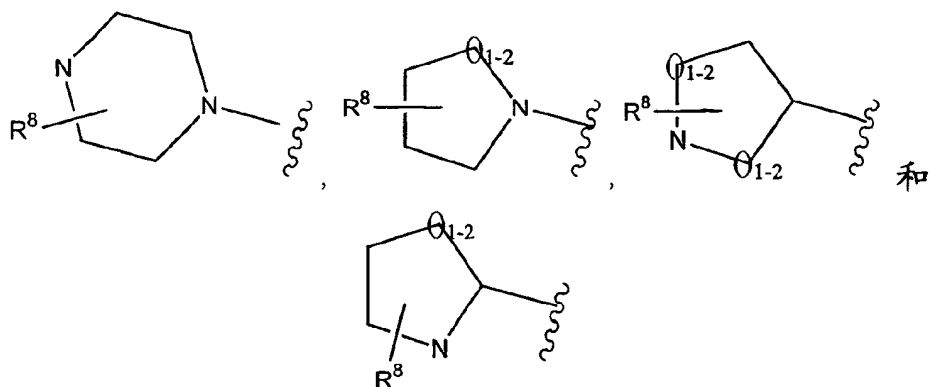
Q 选自 $-S(O_2)NR^6R^7-$ 、 $-C(O)NR^6R^7-$ 和 $-C(O)OR^7-$;

R^2 选自 R^9 、烷基、炔基、炔基烷基、环烷基、 $-CF_3$ 、 $-C(O_2)R^6$ 、芳基、芳烷基、杂芳烷基、杂环基、被 1-6 个相同或不同的 R^9 基团取代的烷基, 并且 R^9 基团独立地选自下列一系列 R^9 ,



其中上述规定的 R^2 中的芳基可以是未取代的或任选被相同或不同的一个或多个基团取代, 各取代基团独立地选自卤素、 CN 、 $-OR^5$ 、 SR^5 、 $-S(O_2)R^6$ 、 $-S(O_2)NR^5R^6$ 、 $-NR^5R^6$ 、 $-C(O)NR^5R^6$ 、 CF_3 、烷基、芳基和 OCF_3 ;

R^3 选自 H 、卤素、烷基、炔基、 $-NR^5R^6$ 、 $-C(O)NR^5R^6$ 、 $-C(O)OR^4$ 、环烷基、环烷基烷基、芳基、芳烷基、杂环基、杂环基烷基、杂芳基和杂芳基烷基、



其中 R^3 定义中所述各烷基、环烷基、芳基、芳烷基、杂环基、杂环基
 烷基、杂芳基和杂芳基烷基以及刚才在上文 R^3 定义中列出的杂环基基
 团可以是未被取代的或被相同或不同的一个或多个基团独立取代，各
 取代基团独立地选自卤素、烷基、芳基、环烷基、 CF_3 、 CN 、 $-OCF_3$ 、
 $-(CR^4R^5)_nOR^5$ 、 $-OR^5$ 、 $-NR^5R^6$ 、 $-(CR^4R^5)_nNR^5R^6$ 、 $-C(O_2)R^5$ 、 $-C(O)R^5$ 、
 $-C(O)NR^5R^6$ 、 $-SR^6$ 、 $-S(O_2)R^6$ 、 $-S(O_2)NR^5R^6$ 、 $-N(R^5)S(O_2)R^7$ 、 $-N(R^5)C(O)R^7$
 和 $-N(R^5)C(O)NR^5R^6$ ；

R^4 是 H、卤素或烷基；

R^5 是 H 或烷基；

R^6 选自 H、烷基、芳基、芳烷基、环烷基、杂环基、杂环基烷基、
 杂芳基和杂芳基烷基，其中所述各烷基、芳基、芳烷基、环烷基、杂
 环基、杂环基烷基、杂芳基和杂芳基烷基，可以是未取代的或任选被
 相同或不同的一个或多个基团取代，各基团独立地选自卤素、烷基、
 芳基、环烷基、杂环基烷基、 CF_3 、 OCF_3 、 CN 、 $-OR^5$ 、 $-NR^5R^{10}$ 、 $-N(R^5)Boc$ 、
 $-(CR^4R^5)_nOR^5$ 、 $-C(O_2)R^5$ 、 $-C(O)R^5$ 、 $-C(O)NR^5R^{10}$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SR^{10}$ 、 $-S(O_2)R^7$ 、
 $-S(O_2)NR^5R^{10}$ 、 $-N(R^5)S(O_2)R^7$ 、 $-N(R^5)C(O)R^7$ 和 $-N(R^5)C(O)NR^5R^{10}$ ；

R^{10} 选自 H、烷基、芳基、芳烷基、环烷基、杂环基、杂环基烷基、
 杂芳基和杂芳基烷基，其中所述各烷基、芳基、芳烷基、环烷基、杂
 环基、杂环基烷基、杂芳基和杂芳基烷基，可以是未取代的或任选被
 一个或相同或不同的多个基团取代，各基团独立地选自卤素、烷基、
 芳基、环烷基、杂环基烷基、 CF_3 、 OCF_3 、 CN 、 $-OR^5$ 、 $-NR^4R^5$ 、 $-N(R^5)Boc$ 、
 $-(CR^4R^5)_nOR^5$ 、 $-C(O_2)R^5$ 、 $-C(O)NR^4R^5$ 、 $-C(O)R^5$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SR^5$ 、 $-S(O_2)R^7$ 、

$-\text{S}(\text{O}_2)\text{NR}^4\text{R}^5$ 、 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^7$ 、 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})\text{R}^7$ 和 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})\text{NR}^4\text{R}^5$;

或任选 (i) 基团 $-\text{NR}^5\text{R}^{10}$ 中的 R^5 和 R^{10} , 或 (ii) 基团 $-\text{NR}^5\text{R}^6$ 中的 R^5 和 R^6 可以连接在一起形成环烷基或杂环基, 所述各环烷基或杂环基是未取代的或任选独立地被一个或多个 R^9 基团取代;

- 5 R^7 选自烷基、环烷基、芳基、杂芳基、芳烷基和杂芳基烷基, 其中所述各烷基、环烷基、杂芳基烷基、芳基、杂芳基和芳烷基可以是未取代的或任选独立地被一个或多个相同或不同的基团取代, 并且各取代基团独立地选自卤素、烷基、芳基、环烷基、 CF_3 、 OCF_3 、 CN 、 $-\text{OR}^5$ 、 $-\text{NR}^5\text{R}^{10}$ 、 $-\text{CH}_2\text{OR}^5$ 、 $-\text{C}(\text{O}_2)\text{R}^5$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^5\text{R}^{10}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^5$ 、 $-\text{SR}^{10}$ 、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^{10}$ 、
10 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{NR}^5\text{R}^{10}$ 、 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^{10}$ 、 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})\text{R}^{10}$ 和 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})\text{NR}^5\text{R}^{10}$;

R^8 选自 R^6 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^5\text{R}^{10}$ 、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{NR}^5\text{R}^{10}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^7$ 和 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^7$;

R^9 选自卤素、 CN 、 $-\text{NR}^5\text{R}^{10}$ 、 $-\text{C}(\text{O}_2)\text{R}^6$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^5\text{R}^{10}$ 、 $-\text{OR}^6$ 、 $-\text{SR}^6$ 、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^7$ 、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{NR}^5\text{R}^{10}$ 、 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^7$ 、 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})\text{R}^7$ 和 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})\text{NR}^5\text{R}^{10}$;

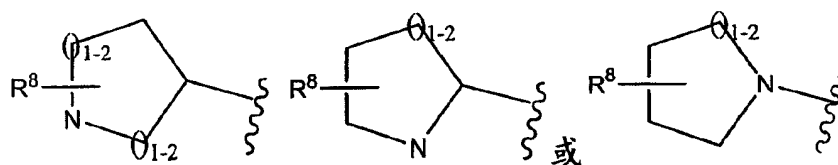
- 15 m 是 0-4; 和

n 是 1-4。

2. 根据权利要求 1 的化合物, 其中 R^6 是 H 和 R^7 是未取代的芳基、未取代的杂芳基、被 1-3 个取代基取代的芳基 (这些取代基可以相同或不同, 每个独立地选自自苯基、吡啶基、硫代苯基、卤素、氰基、
20 $-\text{OR}^5$ 、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^6$ 、 CF_3 、烷基和 $-\text{OCF}_3$), 和 1-3 个部分与芳基或杂芳基稠合的芳基取代的杂芳基 (其中芳基或杂芳基可未取代或被任选的 1-3 个相同或不同的取代基取代, 各取代基独立地选自苯基、吡啶基、咪唑基和噻唑基、卤素、氰基、 $-\text{OR}^5$ 、 $-\text{SR}^5$ 、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^6$ 、 $-\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 CF_3 、烷基和 $-\text{OCF}_3$);

- 25 R^2 是卤素、 CF_3 、 CN 、低级烷基、 $-\text{CH}_2\text{OR}^6$ 、 $-\text{OR}^6$ 、环烷基、芳基或杂芳基; 和

R^3 是 H、卤素、低级烷基、芳基、杂芳基、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^4$ 、环烷基、 $-\text{NR}^5\text{R}^6$ 、杂环烷基、

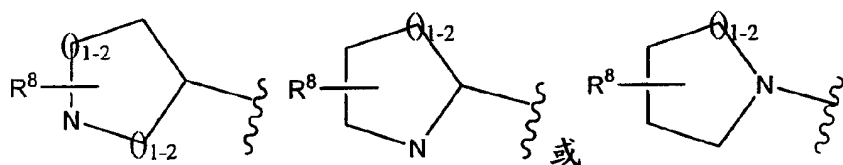


其中所述烷基、芳基、杂芳基、杂环基和环烷基是未取代的或任选独立地被一个或多个相同或不同的选自卤素、 CF_3 、 $-\text{OCF}_3$ 、低级烷基、 CN 和 $-\text{OR}^5$ 取代。

3. 根据权利要求1的化合物, 其中 R^{10} 是 H 和 R^7 是未取代的芳基、未取代的杂芳基、被 1-3 个取代基取代的芳基 (这些取代基相同或不同, 每个独立地选自自苯基、吡啶基、硫代苯基、卤素、氰基、 $-\text{OR}^5$ 、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^6$ 、 CF_3 、烷基和 $-\text{OCF}_3$) , 和 1-3 个部分与芳基或杂芳基稠合的芳基取代的杂芳基 (其中芳基或杂芳基可未取代或被任选的 1-3 个相同或不同的取代基取代, 各取代基独立地选自苯基、吡啶基、呋喃基和噻唑基、卤素、氰基、 $-\text{OR}^5$ 、 $-\text{SR}^5$ 、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^6$ 、 $-\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 CF_3 、烷基和 $-\text{OCF}_3$) ;

R^2 是卤素、 CF_3 、 CN 、低级烷基、 $-\text{CH}_2\text{OR}^6$ 、 $-\text{OR}^6$ 、环烷基、芳基或杂芳基; 和

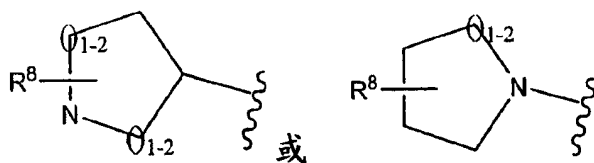
- R^3 是 H 、卤素、低级烷基、芳基、杂芳基、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^4$ 、环烷基、 $-\text{NR}^5\text{R}^6$ 、杂环烷基、环烷基烷基,



- 其中所述 R^3 的烷基、芳基、杂芳基、杂环基和环烷基各自是未取代的或任选独立地被一个或多个相同或不同的选自卤素、 CF_3 、 $-\text{OCF}_3$ 、低级烷基、 CN 和 $-\text{OR}^5$ 取代。

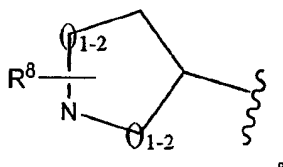
4. 根据权利要求2的化合物, 其中 R^2 是卤素、 $-\text{CH}_2\text{OR}^6$ 、 CN 、 CF_3 、低级烷基、环丙基、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^6$ 、 $-\text{OR}^6$ 或芳基。

5. 根据权利要求2的化合物, 其中 R^3 是 H 、低级烷基、环烷基、 $\text{C}(\text{O})\text{OR}^4$ 、芳基、杂芳基、环烷基烷基,

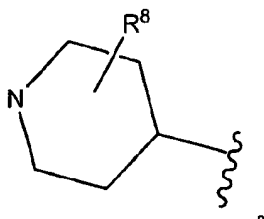


其中所述 R^3 的烷基、芳基、环烷基、杂芳基和杂环基各自是未取代的或任选独立地被一个或多个相同或不同的选自卤素、 CF_3 、低级烷基、OMe、芳基、环丙基和 CN 取代。

6. 根据权利要求 2 的化合物, 其中 R^4 是 H。
- 5 7. 根据权利要求 2 的化合物, 其中 R^5 是 H。
8. 根据权利要求 2 的化合物, 其中 R^6 是 H 和 R^7 是未取代的芳基。
9. 根据权利要求 2 的化合物, 其中 R^6 是 H 和 R^7 是未取代的杂芳基。
10. 根据权利要求 9 的化合物, 其中 R^7 是 4-吡啶基。
- 10 11. 根据权利要求 2 的化合物, 其中 R^7 是 4-吡啶基-N-氧化物。
12. 根据权利要求 2 的化合物, 其中 R^7 是 4-吡啶基和 Q 是 $-S(O_2)NHR^7$ 。
13. 根据权利要求 2 的化合物, 其中 R^7 是 4-吡啶基-N-氧化物和 Q 是 $-C(O)NHR^7$ 。
- 15 14. 根据权利要求 3 的化合物, 其中所述 R^2 是 Br。
15. 根据权利要求 3 的化合物, 其中 R^2 是 Cl。
16. 根据权利要求 3 的化合物, 其中 R^2 是异丙基或乙基。
17. 根据权利要求 3 的化合物, 其中 R^2 是 $-CH_2OH$ 或 $-CH_2OCH_3$ 。
18. 根据权利要求 3 的化合物, 其中 R^2 是环丙基。
- 20 19. 根据权利要求 3 的化合物, 其中 R^2 是 CN。
20. 根据权利要求 5 的化合物, 其中 R^3 是低级烷基、环烷基、环烷基烷基、芳基或



- 25 21. 根据权利要求 20 的化合物, 其中 R^3 是异丙基。
22. 根据权利要求 20 的化合物, 其中 R^3 是:

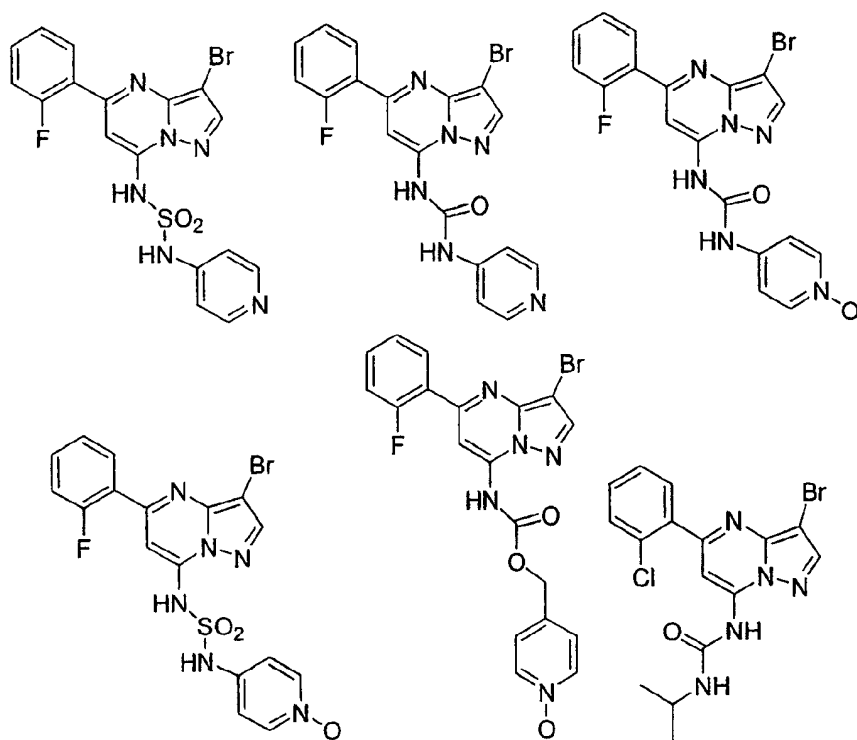


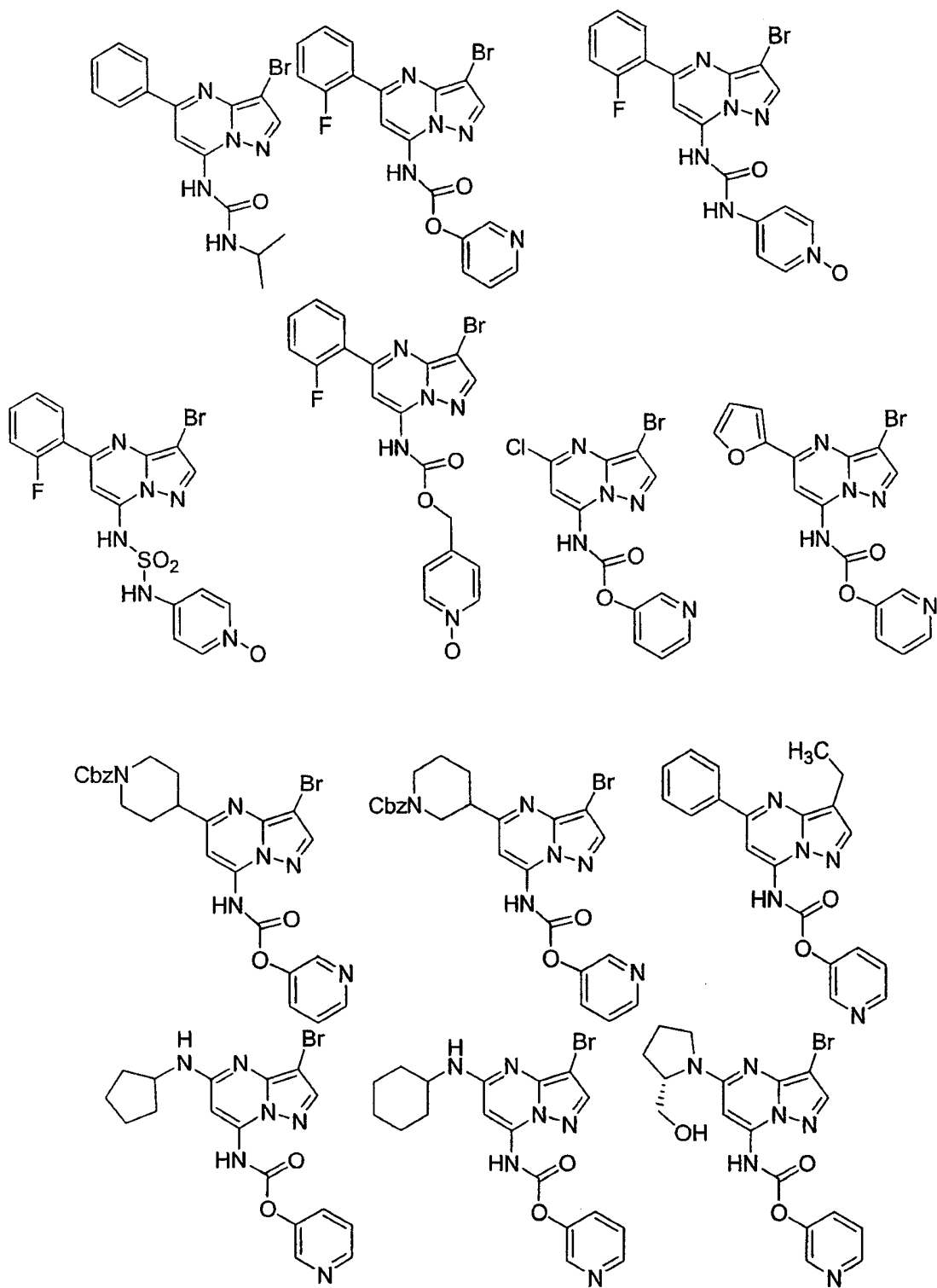
23. 根据权利要求 20 的化合物, 其中 R^3 是未取代的苯基。

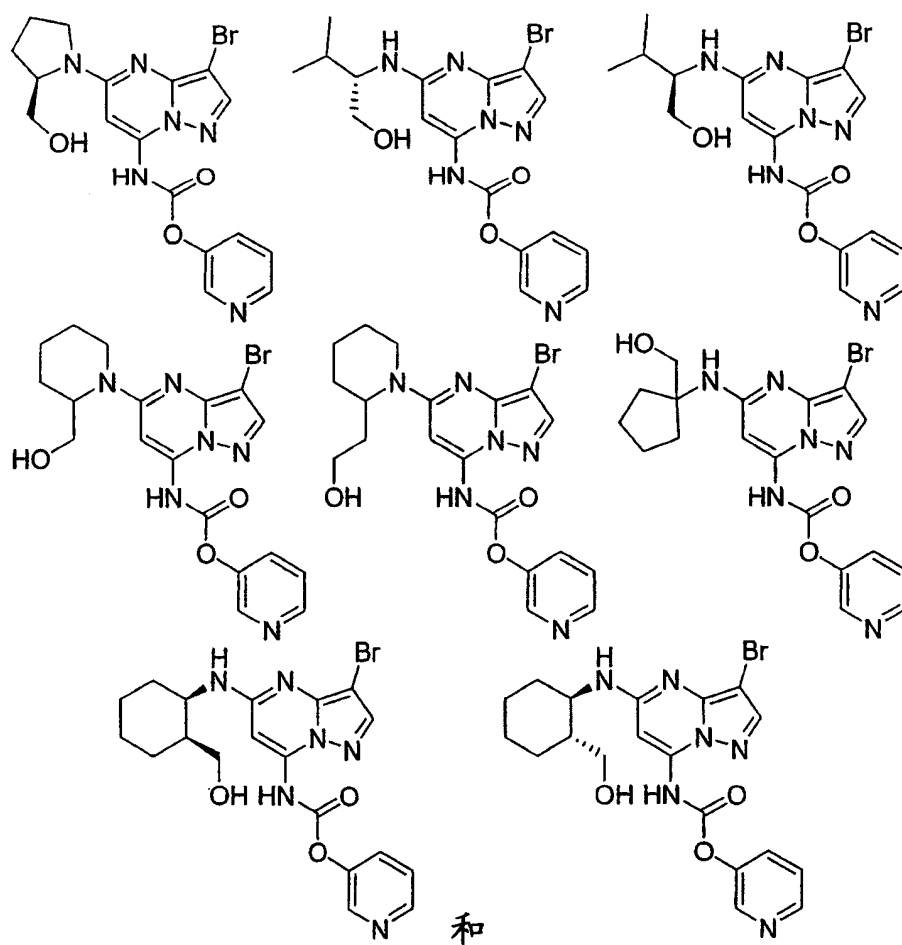
24. 根据权利要求 5 的化合物, 其中 R^8 是 $-(CH_2)_nOH$ 或 $-(CH_2)_nOCH_3$, 其中 n 是 1 或 2。

25. 根据权利要求 20 的化合物, 其中 R^8 是被一个或多个选自 F、Br、Cl、低级烷基、烷氧基和 CF_3 取代基取代的苯基。

26. 一种化合物, 选自

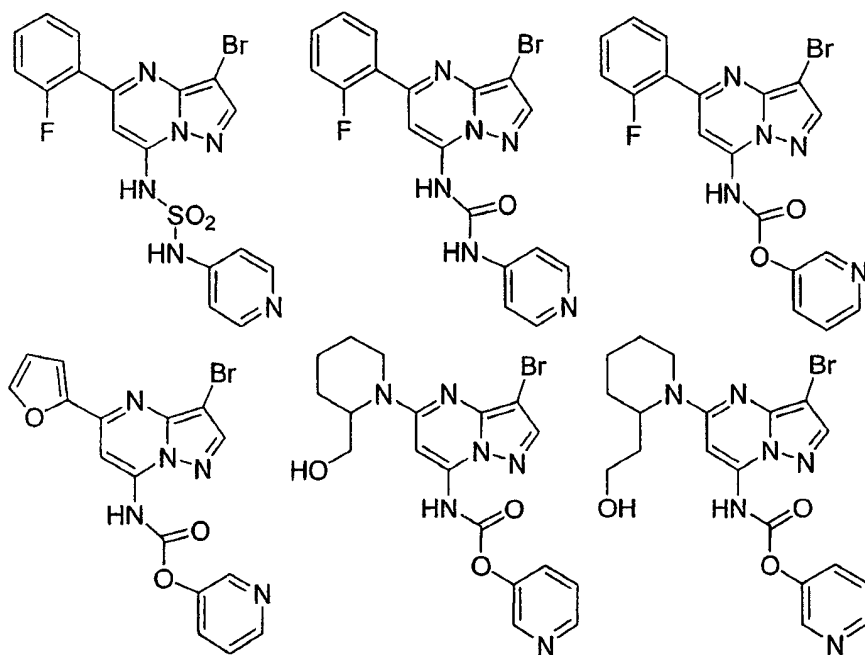


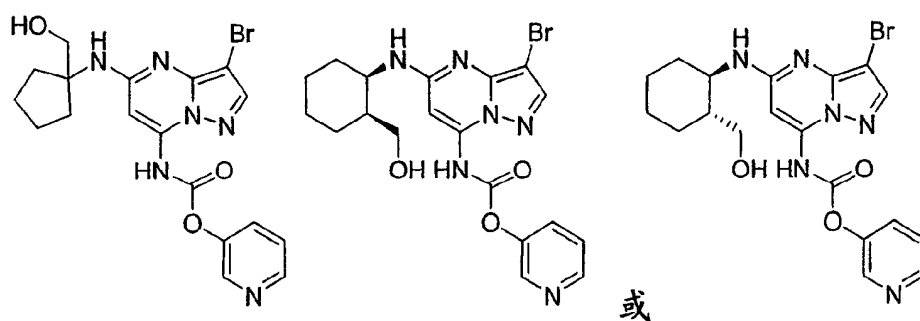




或其可药用盐或其溶剂化物。

27. 下式所示的化合物或其可药用盐或其溶剂化物：





28. 一种或多种依赖细胞周期蛋白激酶的抑制方法，包括对需要这种抑制的患者施用治疗有效量的至少一种权利要求 1 的化合物。

29. 与依赖细胞周期蛋白激酶有关的一种或多种疾病的治疗方法，包括对需要这种治疗的患者施用治疗有效量的至少一种权利要求 1 的化合物。

30. 根据权利要求 29 的方法，其中所述依赖细胞周期蛋白激酶是 CDK2。

31. 根据权利要求 29 的方法，其中所述疾病选自：

膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、肾癌、肝癌、肺癌（包括小细胞肺癌）、食道癌、胆囊癌、卵巢癌、胰腺癌、胃癌、宫颈癌、甲状腺癌、前列腺癌和皮肤癌（包括扁平细胞癌）；

白血病、急性淋巴细胞白血病、急性成淋巴细胞白血病、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、多毛细胞淋巴瘤和伯基特淋巴瘤；

急性和慢性骨髓性白血病、脊髓发育不良综合征和前髓细胞性白血病；

纤维肉瘤和横纹肌肉瘤；

星形细胞瘤、成神经细胞瘤、神经胶质瘤和神经鞘瘤；

黑素瘤、精原细胞瘤、畸胎瘤、骨肉瘤、xeroderma pigmentosum、角化棘皮瘤（keratoacanthoma）、甲状腺滤泡肿瘤和卡波济氏肉瘤。

32. 与依赖细胞周期蛋白激酶有关的一种或多种疾病的治疗方法，包括对需要这种治疗的哺乳动物施用

一定量第一化合物或其可药用盐或溶剂化物，该化合物是权利要求 1 的化合物，和

一定量至少一种第二化合物，所述第二化合物是抗癌剂；

其中第一化合物和所述第二化合物的量能够产生治疗效果。

33. 根据权利要求 32 的方法, 还包括放射疗法。

34. 根据权利要求 32 的方法, 其中所述抗癌剂选自细胞抑制剂、顺铂、阿霉素、泰素帝、紫杉酚、依托泊甙、CPT-11、irinotecan、
5 camptostar、topotecan、紫杉醇、docetaxel、epothilones、他莫昔芬、5-氟尿嘧啶、氮甲蝶呤、5-FU、替莫唑胺、环磷酰胺、4-[2-[4-[(11R)-3,10-二溴-8-氯-6,11-二氢-5H-苯并[5,6]环庚基[1,2-b]吡啶-11-基]-1-哌啶基]-2-氧乙基]-1-哌啶甲酰胺、tipifarnib、L778,123(一种法呢基蛋白转移酶抑制剂)、BMS 214662
10 (一种法呢基蛋白转移酶抑制剂)、Iressa、Tarceva、EGFR 抗体、Gleevec、内含子、阿糖胞嘧啶、阿霉素、环磷酰胺、gemcitabine、尿嘧啶芥子气、氮芥、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥、哌泊溴烷、曲他胺、塞替派、白消安、卡莫司汀、环己亚硝脲、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、磷酸氟达拉滨、
15 奥沙利铂、亚叶酸(leucovirin)、ELOXATIN™、喷托司它丁、长春碱、长春新碱、长春地辛、博莱霉素、放线菌素、柔红霉素、阿霉素、表阿霉素、伊达比星、普卡霉素、脱氧考福酶素、丝裂霉素-C、L-天冬酰胺酶、替尼泊甙、17 α -炔雌醇、己烯雌酚、睾酮素、泼尼松、氟甲睾酮、丙酸屈他雄酮、睾内酯、乙酸甲地孕酮、甲泼尼龙、甲睾酮、
20 泼尼松龙、曲安西龙、氯烯雌醚、羟孕酮、氯鲁米特、雌莫司汀、乙酸甲羟孕酮、亮丙瑞林、氟他胺、托瑞米芬、戈舍瑞林、顺铂、卡铂、羟基脲、安吖啶、丙卡巴肼、米托坦、米托蒽醌、左旋咪唑、Navelbene、CPT-11、Anastrozole、Letrozole、Capecitabine、Reloxafine、屈洛昔芬或六甲蜜胺。

25 35. 一种药物组合物, 含有治疗有效量的至少一种权利要求 1 化合物和至少一种可药用载体。

36. 根据权利要求 35 的药物组合物, 还含有一种或多种抗癌剂, 所述抗癌剂选自细胞抑制剂、顺铂、阿霉素、泰素帝、紫杉酚、依托泊甙、CPT-11、irinotecan、camptostar、topotecan、紫杉醇、
30 docetaxel、epothilones、他莫昔芬、5-氟尿嘧啶、氮甲蝶呤、5-FU、替莫唑胺、环磷酰胺、4-[2-[4-[(11R)-3,10-二溴-8-氯-6,11-二氢-5H-苯并[5,6]环庚基[1,2-b]吡啶-11-基]-1-哌啶基]-2-氧乙

- 基]-1-哌啶甲酰胺、Zarnestra® (tipifarnib)、L778, 123 (一种法呢基蛋白转移酶抑制剂)、BMS 214662 (一种法呢基蛋白转移酶抑制剂)、Iressa、Tarceva、EGFR 抗体、Gleevec、内含子、阿糖胞嘧啶、阿霉素、环磷酰胺、gemcitabine、尿嘧啶芥子气、氮芥、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥、哌泊溴烷、曲他胺、噻替派、白消安、卡莫司汀、环己亚硝脲、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、磷酸氟达拉滨、喷托司它丁、长春碱、长春新碱、长春地辛、博莱霉素、放线菌素、柔红霉素、阿霉素、表阿霉素、伊达比星、普卡霉素、脱氧考福酶素、丝裂霉素-C、L-天冬酰胺酶、替尼泊甙、17 α -炔雌醇、己烯雌酚、睾酮素、泼尼松、氟甲睾酮、丙酸屈他雄酮、睾内酯、乙酸甲地孕酮、甲泼尼龙、甲睾酮、泼尼松龙、曲安西龙、氯烯雌醚、羟孕酮、氨鲁米特、雌莫司汀、乙酸甲羟孕酮、亮丙瑞林、氟他胺、托瑞米芬、戈舍瑞林、顺铂、卡铂、羟基脲、安吖啶、丙卡巴肼、米托坦、米托蒽醌、左旋咪唑、Navelbene、CPT-11、Anastrozole、Letrozole、Capecitabine、Reloxafine、屈洛昔芬或六甲蜜胺。

37. 根据权利要求 1 的化合物，其为被分离出的精制化合物。

用作依赖细胞周期蛋白激酶抑制剂的吡唑并嘧啶

发明领域

5 本发明涉及可用作蛋白激酶抑制剂的吡唑并[1,5-a]嘧啶类化合物、含有所述化合物的药物组合物以及使用该化合物和组合物治疗诸如癌、炎症、关节炎、病毒性疾病、神经变性疾病（如，阿尔茨海默氏病）、心血管疾病和真菌性疾病的方法。本申请要求于2002年9月4日提交的美国临时专利申请编号60/408,182的优先权。

10

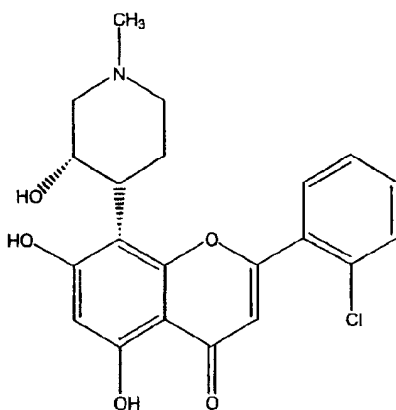
发明背景

依赖细胞周期蛋白激酶(CDKs)是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,其为细胞周期和细胞增殖的驱动力。在细胞周期进行过程中,诸如CDK1、CDK2、CDK3、CDK4、CDK5、CDK6、CDK7、CDK8等各种CDK发挥不同作用,并可分为G1、S期酶或G2M期酶。失控增殖是癌细胞的特征标志,并且,在许多重要实体瘤中,高频率发生CDK功能调控异常。CDK2和CDK4尤为令人关注,因为它们活性在广泛的各种人类癌症中频繁调控异常。从细胞周期过程的G1期进行到S期需要CDK2活性,并且CDK2是G1检测点的关键组分之一。检测点用于维持细胞周期过程的正常顺序,并使细胞对损伤或增殖信号作出响应,而癌细胞中正常检测点失控导致肿瘤发生。CDK2通道在肿瘤抑制剂功能(例如,p52、RB和p27)和致癌基因激活(细胞周期蛋白E)水平上影响肿瘤发生。许多报道表明,在乳腺癌、结肠癌、非小细胞细胞肺癌、胃癌、前列腺癌、膀胱癌、非何杰金氏淋巴瘤、卵巢癌和其它癌症中,辅活化蛋白、细胞周期蛋白E以及CDK2的抑制剂p27分别被过量表达或表达不足。它们的变更表达被证明与增加的CDK2活性水平和不良总存活有关。该观察结果使人们对CDK2及其调控通道强制靶进行了多年研究,文献已报道,许多腺苷5'-三磷酸(ATP)竞争性有机小分子和肽被用作CDK抑制剂用于有效治疗癌症。US 6,413,974第1栏23行-第15栏10行对各种CDK及其与各类癌症之间的关系进行了详细说明。

30

CDK抑制剂是已知的。例如,flavopiridol(式I)是一种非选择性CDK抑制剂,目前正在进行人类临床试验(A. M. Sanderowicz et

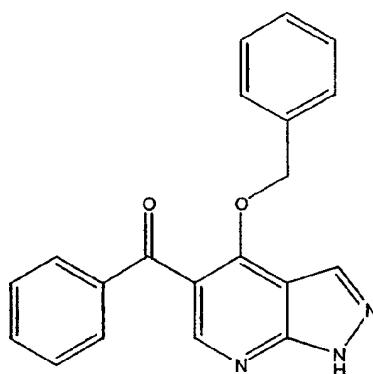
a1, J. Clin. Oncol. (1998) 16, 2986-2999)。



式 I

5

其它已知的 CDK 抑制剂包括, 例如, olomoucine (J. Vesely 等人, Eur. J. Biochem., (1994) 224, 771-786) 和 roscovitine (I. Meijer 等人, Eur. J. Biochem., (1997) 243, 527-536)。US6,107,305 描述了用作 CDK 抑制剂的某些吡唑并[3,4-b]吡啶化合物。
10 物。'305 专利的一个例证化合物具有式 II 结构:



式 II

15 K. S. Kim et al, J. Med. Chem. 45 (2002) 3905-3927 和 WO 02/10162 公开了用作 CDK 抑制剂的某些氨基噻唑化合物。

吡唑并嘧啶类化合物是已知的。例如, WO 92/18504、WO

02/50079、WO 95/35298、WO 02/40485、EP94304104.6、EP 0628559 (与 US 5,602,136、5,602,137 和 5,571,813 相同)、US 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 5 620 公开了许多吡唑并嘧啶类化合物。

现需要用于治疗 CDK 相关疾病和病症的新化合物、制剂、处理方法和治疗方法。因此,本发明的一个目的是提供可用于治疗或预防或改善所述疾病和病症的化合物。

10

发明概述

15

在许多实施方案中,本发明提供了一类新的用作依赖细胞周期蛋白激酶抑制剂的吡唑并[1,5-a]嘧啶化合物、所述化合物的制备方法、含有一种或多种所述化合物的药物组合物、制备含有一种或多种所述化合物的药物制剂的方法以及使用所述化合物或药物组合物治疗、预防、抑制或改善一种或多种 CDK 相关疾病的方法。

在一个方面,本申请公开了一种具有通式 III 结构的化合物或其可药用盐或其溶剂化物:



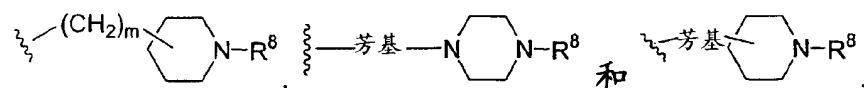
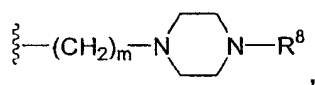
20

式 III

其中:

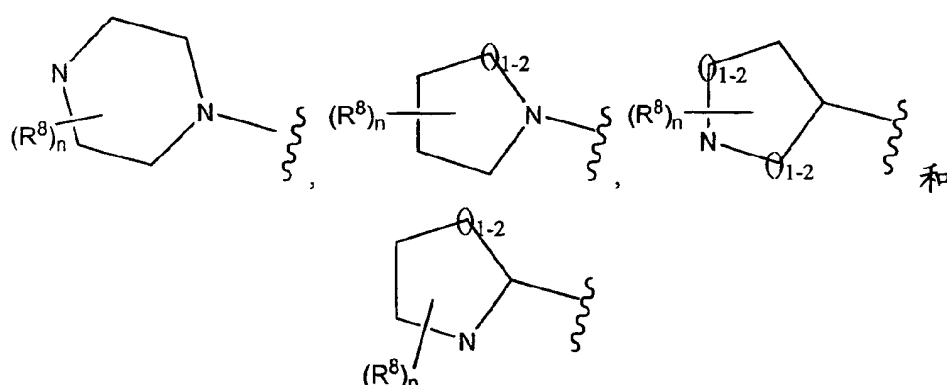
Q 选自 $-S(O_2)NR^6R^7-$ 、 $-C(O)NR^6R^7-$ 和 $-C(O)OR^7-$;

25 R^2 选自 R^9 、烷基、炔基、炔基烷基、环烷基、 $-CF_3$ 、 $-C(O_2)R^6$ 、芳基、芳烷基、杂芳烷基、杂环基、被 1-6 个相同或不同的 R^9 基团取代的烷基,并且 R^9 基团独立地选自下列所示一系列 R^9 ,



其中上述规定的 R^2 中的芳基可以是未取代的或任选被相同或不同的一个或多个基团取代, 各取代基团独立地选自卤素、CN、 $-\text{OR}^5$ 、 SR^5 、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^6$ 、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 $-\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 CF_3 、烷基、芳基和 OCF_3 ;

R^3 选自 H、卤素、烷基、炔基、 $-\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^4$ 、环烷基、环烷基烷基、芳基、芳烷基、杂环基、杂环基烷基、杂芳基和杂芳基烷基、



10

其中 R^3 定义中所述各烷基、环烷基、芳基、芳烷基、杂环基、杂环基烷基、杂芳基和杂芳基烷基以及刚才在上文 R^3 定义中列出的杂环基基团可以是未被取代的或任选被相同或不同的一个或多个基团独立取代, 各取代基团独立地选自卤素、烷基、芳基、环烷基、 CF_3 、CN、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-(\text{CR}^4\text{R}^5)_n\text{OR}^5$ 、 $-\text{OR}^5$ 、 $-\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 $-(\text{CR}^4\text{R}^5)_n\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 $-\text{C}(\text{O}_2)\text{R}^5$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^5$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 $-\text{SR}^6$ 、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^6$ 、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^7$ 、 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})\text{R}^7$ 和 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})\text{NR}^5\text{R}^6$;

R^4 是 H、卤素或烷基;

R^5 是 H 或烷基;

R^6 选自 H、烷基、芳基、芳烷基、环烷基、杂环基、杂环基烷基、

20

杂芳基和杂芳基烷基, 其中所述各烷基、芳基、芳烷基、环烷基、杂环基、杂环基烷基、杂芳基和杂芳基烷基, 可以是未取代的或任选被相同或不同的一个或多个基团取代, 各基团独立地选自卤素、烷基、芳基、环烷基、杂环基烷基、 CF_3 、 OCF_3 、 CN 、 $-\text{OR}^5$ 、 $-\text{NR}^5\text{R}^{10}$ 、 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{Boc}$ 、
5 $-(\text{CR}^4\text{R}^5)_n\text{OR}^5$ 、 $-\text{C}(\text{O}_2)\text{R}^5$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^5$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^5\text{R}^{10}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SR}^{10}$ 、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^7$ 、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{NR}^5\text{R}^{10}$ 、 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^7$ 、 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})\text{R}^7$ 和 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})\text{NR}^5\text{R}^{10}$;

R^{10} 选自 H、烷基、芳基、芳烷基、环烷基、杂环基、杂环基烷基、杂芳基和杂芳基烷基, 其中所述各烷基、芳基、芳烷基、环烷基、杂环基、杂环基烷基、杂芳基和杂芳基烷基可以是未取代的或任选被一个或相同或不同的多个基团取代, 各基团独立地选自卤素、烷基、芳基、环烷基、杂环基烷基、 CF_3 、 OCF_3 、 CN 、 $-\text{OR}^5$ 、 $-\text{NR}^4\text{R}^5$ 、 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{Boc}$ 、
10 $-(\text{CR}^4\text{R}^5)_n\text{OR}^5$ 、 $-\text{C}(\text{O}_2)\text{R}^5$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^4\text{R}^5$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^5$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SR}^5$ 、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^7$ 、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{NR}^4\text{R}^5$ 、 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^7$ 、 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})\text{R}^7$ 和 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})\text{NR}^4\text{R}^5$;

或任选 (i) 基团 $-\text{NR}^5\text{R}^{10}$ 中的 R^5 和 R^{10} , 或 (ii) 基团 $-\text{NR}^5\text{R}^6$ 中的 R^5 和 R^6 可以连接在一起形成环烷基或杂环基, 所述各环烷基或杂环基是未取代的或任选独立地被一个或多个 R^9 基团取代;

R^7 选自烷基、环烷基、芳基、杂芳基、芳烷基和杂芳基烷基, 其中所述各烷基、环烷基、杂芳基烷基、芳基、杂芳基和芳烷基可以是未取代的或任选独立地被一个或多个相同或不同的基团取代, 并且各取代基团独立地选自卤素、烷基、芳基、环烷基、 CF_3 、 OCF_3 、 CN 、 $-\text{OR}^5$ 、
20 $-\text{NR}^5\text{R}^{10}$ 、 $-\text{CH}_2\text{OR}^5$ 、 $-\text{C}(\text{O}_2)\text{R}^5$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^5\text{R}^{10}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^5$ 、 $-\text{SR}^{10}$ 、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^{10}$ 、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{NR}^5\text{R}^{10}$ 、 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^{10}$ 、 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})\text{R}^{10}$ 和 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})\text{NR}^5\text{R}^{10}$;

R^8 选自 R^6 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^5\text{R}^{10}$ 、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{NR}^5\text{R}^{10}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^7$ 和 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^7$;

R^9 选自卤素、 CN 、 $-\text{NR}^5\text{R}^{10}$ 、 $-\text{C}(\text{O}_2)\text{R}^6$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^5\text{R}^{10}$ 、 $-\text{OR}^6$ 、 $-\text{SR}^6$ 、
25 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^7$ 、 $-\text{S}(\text{O}_2)\text{NR}^5\text{R}^{10}$ 、 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{S}(\text{O}_2)\text{R}^7$ 、 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})\text{R}^7$ 和 $-\text{N}(\text{R}^5)\text{C}(\text{O})\text{NR}^5\text{R}^{10}$;

m 是 0-4; 和

n 是 1-4。

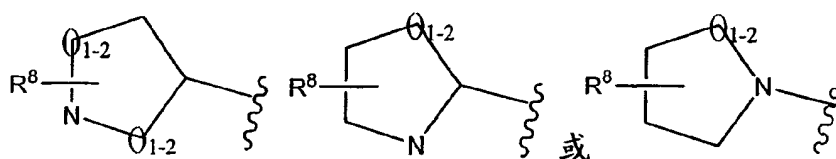
式 III 化合物可以用作蛋白激酶抑制剂并可用于治疗和预防增生性疾病, 例如, 癌、炎症和关节炎。它们还可以用于治疗神经变性疾病 (如阿尔茨海默氏病)、心血管疾病、病毒性疾病和真菌性疾病。

发明详述

在一个实施方案中，本发明公开了结构式 III 所示的吡唑并 [1,5-a] 嘧啶化合物、或其可药用盐或其溶剂化物，其中各基团的定义如上所述。

- 5 在另一个实施方案中， R^2 是卤素、 CF_3 、 CN 、低级烷基、 $-OR^6$ 、环烷基、 $-C(O)OR^6$ 、 $-CH_2OR^6$ 、芳基或杂芳基。

在另一个实施方案中， R^3 是 H、卤素、低级烷基、芳基、杂芳基、 $-C(O)OR^4$ 、环烷基、 $-NR^5R^6$ 、杂环烷基、环烷基烷基、



10

其中所述烷基、芳基、杂芳基、杂环基和环烷基是未取代的或任意独立地被一个或多个相同或不同的选自卤素、 CF_3 、 $-OCF_3$ 、低级烷基、 CN 和 $-OR^5$ 取代。

在另一个实施方案中， R^4 是 H 或低级烷基。

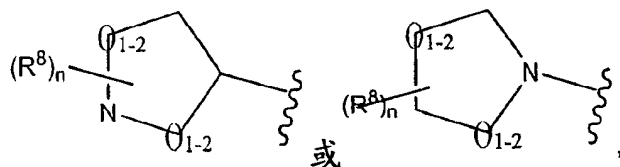
- 15 在另一个实施方案中， R^5 是 H 或低级烷基。

在另一个实施方案中， m 是 0-2。

在又一个实施方案中， R^2 是卤素、 CF_3 、 CN 、环丙基、低级烷基、芳基、 $-C(O)OR^6$ 、 $-CH_2OR^6$ 或 $-OR^6$ 。

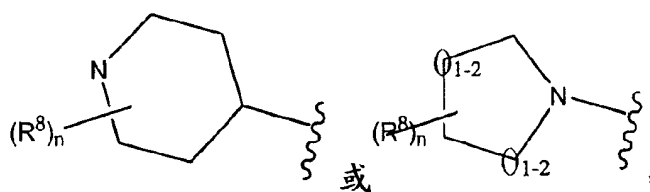
在又一个实施方案中， R^3 是 H、低级烷基、环烷基、 $C(O)OR^4$ 、

20



芳基、杂芳基、环烷基烷基，其中所述烷基、环烷基、杂芳基和芳基是未取代的或任选独立地被一个或多个相同或不同的基团取代，各基团独立地选自卤素、 CF_3 、低级烷基、甲氧基和 CN 。

- 25 在又一个实施方案中， R^3 是



在又一个实施方案中， R^4 是 H。

5 在又一个实施方案中， R^5 是 H。

在又一个实施方案中， R^8 是 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 或 $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$ 。

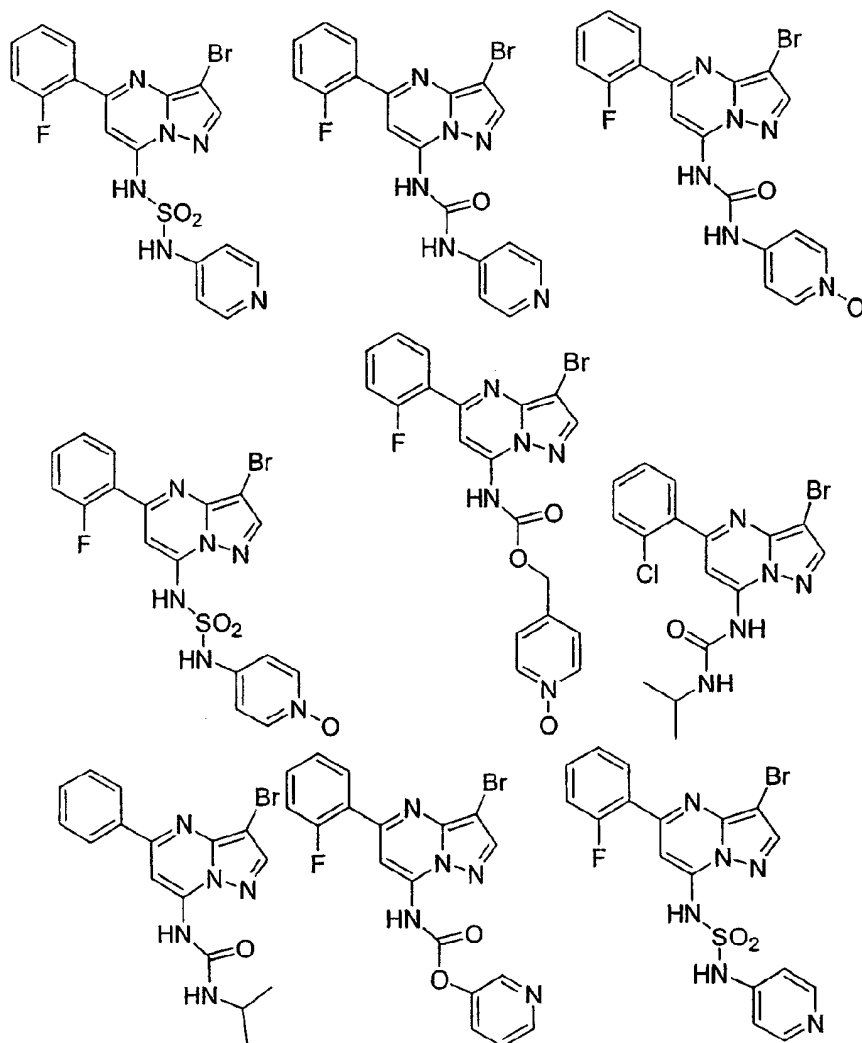
在又一个实施方案中， m 是 0。

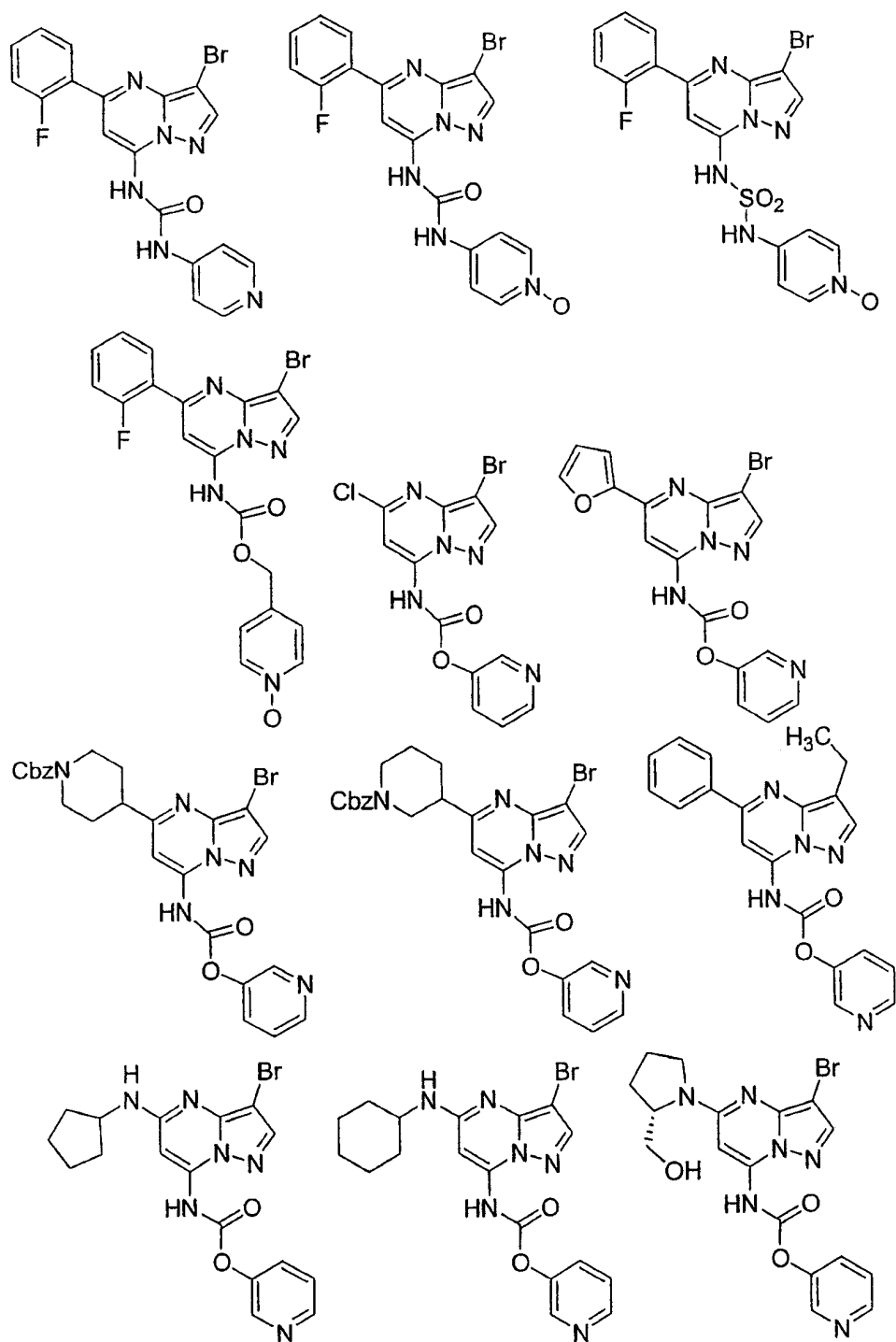
在又一个实施方案中， n 是 1 或 2。

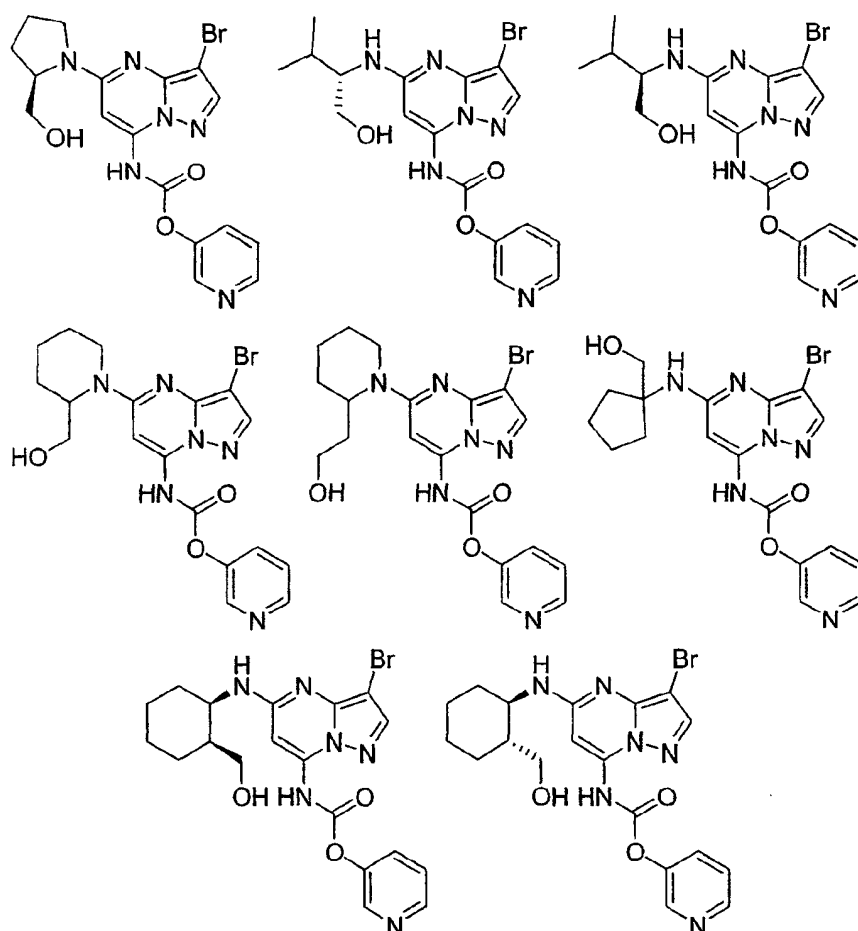
一组创造性的化合物如表 1 所示。

10

表 1







在整个说明书中，除非另有说明，如上文所使用的下列术语应当理解为具有下列含义：

“患者”包括人类和动物。

5 “哺乳动物”是指人类和其它哺乳类动物。

“烷基”是指链中具有约 1-20 个碳原子的直链或支链脂族烃基。优选的烷基在链中含有约 1-12 个碳原子。更优选的烷基在链中含有约 1-6 个碳原子。支链是指一个或多个诸如甲基、乙基或丙基的低级烷基连接到直链烷基链上。“低级烷基”是指链中具有约 1-6 个碳原子的直链或支链基团。术语“取代的烷基”是指可以被一个或多个相同或不同的取代基取代的烷基，各取代基独立地选自卤素、烷基、芳基、环烷基、氰基、羟基、烷氧基、烷硫基、氨基、-NH(烷基)、-NH(环烷基)、-N(烷基)₂、羧基和-C(=O)O-烷基。适宜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。

15 “炔基”是指含有至少一个碳-碳三键且链中含有约 2-15 个碳原

子的直链或支链脂族烃基。优选的炔基在链中具有约 2-12 个碳原子；更优选链中具有约 2-4 个碳原子。支链是指一个或多个诸如甲基、乙基或丙基的低级烷基连接到直链炔基链上。“低级炔基”是指链中具有约 2-6 个碳原子并可以是直链或支链。合适的非限制性炔基实例包括乙炔基、丙炔基、2-丁炔基和 3-甲基丁炔基。术语“取代的炔基”是指可以被一个或多个相同或不同的取代基取代的炔基，各取代基独立地选自烷基、芳基和环烷基。

“芳基”是指具有约 6-14 个碳原子，优选具有约 6-10 个碳原子的芳香单环或多环体系。芳基可以任选这里所定义的一个或多个相同或不同的“环系取代基”取代。合适的非限制性芳基实例包括苯基和萘基。

“杂芳基”是指具有约 5-14 个环上原子，优选具有约 5-10 个环上原子的芳香单环或多环体系，其中一个或多个环上原子为除碳之外的元素，例如，单独为氮、氧和/或硫，或它们的组合。优选的杂芳基含有约 5-6 个环上原子。“杂芳基”可以任选被这里所定义的一个或多个相同或不同的“环系取代基”取代。杂芳基根名前的前缀氮杂、氧杂或硫杂是指至少分别存在氮、氧或硫原子作为环上原子。杂芳基的氮原子可以任选被氧化为相应的 N-氧化物。合适的非限制性杂芳基实例包括吡啶基、吡嗪基、呋喃基、噻吩基、嘧啶基、异噁唑基、异噻唑基、噁唑基、吡唑基、咪唑基、吡咯基、吡啶基、三唑基、1,2,4-噻二唑基、吡嗪基、吡啶基、喹啉基、2,3-二氮杂萘基、咪唑并[1,2-a]吡啶基、咪唑并[2,1-b]噻唑基、苯并呋喃基、吡啶基、氮杂吡啶基、苯并咪唑基、苯并噻吩基、喹啉基、咪唑基、噻吩并吡啶基、喹啉基、噻吩并嘧啶基、吡咯并吡啶基、咪唑并吡啶基、异喹啉基、苯并氮杂吡啶基、1,2,4-三嗪基、苯并噻唑基等等。

“芳烷基”或“芳基烷基”是指芳基-烷基基团，其中芳基和烷基定义如上。优选的芳烷基含有低级烷基。合适的非限制性芳烷基实例包括苄基、2-苄乙基和萘甲基。与母体部分的连接是通过烷基。

“烷基芳基”是指烷基-芳基基团，其中烷基和芳基定义如上。优选的烷基芳基含有低级烷基。合适的非限制性烷基芳基实例是甲苯基。与母体部分的连接是通过芳基。

“环烷基”是指含有约 3-10 个碳原子，优选含有约 5-10 个碳

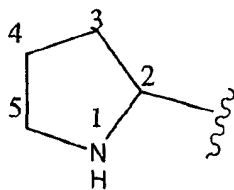
原子的非芳族单环或多环体系。优选的环烷基环含有约 5-7 个环上原子。环烷基可以任选被上面定义的一个或多个相同或不同的“环系取代基”取代。合适的非限制性单环环烷基实例包括环丙基、环戊基、环己基、环庚基等。合适的非限制性多环环烷基实例包括 1-萘烷基、降冰片烷基、金刚烷基等。

“卤素”是指氟、氯、溴或碘。优选氟、氯和溴。

“环系取代基”是指与芳族或非芳族环系相连的取代基，例如，该取代基替代环系上的有效氢。环系取代基可以相同或不同，各自独立地选自芳基、杂芳基、芳烷基、烷基芳基、杂芳烷基、烷基杂芳基、羟基、羟基烷基、烷氧基、芳氧基、芳基烷氧基、酰基、芳酰基、卤素、硝基、氰基、羧基、烷氧基羰基、芳氧基羰基、芳基烷氧基羰基、烷基磺酰基、芳基磺酰基、杂芳基磺酰基、烷硫基、芳硫基、杂芳硫基、芳基烷硫基、杂芳基烷硫基、环烷基、杂环基、 Y_1Y_2N- 、 Y_1Y_2N- 烷基、 $Y_1Y_2NC(O)-$ 和 $Y_1Y_2NSO_2-$ ，其中 Y_1 和 Y_2 可以相同或不同，且独立地选自氢、烷基、芳基和芳烷基。

“杂环基”是指含有约 3-10 个环上原子，优选含约 5-10 个环上原子的非芳族饱和单环或多环体系，其中环系中的一个或多个原子为除碳以外的元素，如单独的氮、氧和/或硫或其组合。在该环系中，不存在相邻氧和/或硫原子。优选的杂环基含有约 5-6 个环上原子。杂环基根名前的前缀氮杂、氧杂或硫杂是指至少分别存在氮、氧或硫原子作为环上原子。杂环基环中的任何-NH 可以被保护的形式存在，例如，以-N(Boc)、-N(Cbz)、-N(Tos)等基团形式存在；这种被保护的基团也被认为是本发明的一部分。杂环基可以任选被这里所定义的一个或多个相同或不同的“环系取代基”取代。杂环基的氮或硫原子可以任选被氧化为相应的 N-氧化物、S-氧化物或 S,S-二氧化物。合适的非限制性单环杂环基实例包括吡啶基、吡咯烷基、哌嗪基、吗啉基、硫代吗啉基、噻唑烷基、1,4-二氧六环基、四氢呋喃基、四氢噻吩基等等。

应该注意的是，在本发明含杂原子的环系中，在与 N、O 或 S 相邻的碳原子上不存在羟基，并且，在与另一个杂原子相邻的碳原子上不存在 N 或 S 基团。因此，例如，在下列环中，没有-OH 与标号为 2 和 5 的碳原子直接相连。



“炔基烷基”是指炔基-烷基基团，其中炔基和烷基定义如上。优选的炔基烷基含有低级炔基和低级烷基。与母体部分的连接是通过烷基。
5 基。合适的非限制性炔基烷基实例包括炔丙基甲基。

“杂芳烷基”是指杂芳基-烷基基团，其中杂芳基和烷基定义如上。优选的杂芳烷基含有低级烷基。合适的非限制性杂芳烷基实例包括吡啶基甲基和喹啉-3-基甲基。与母体部分的连接是通过烷基。

“羟烷基”是指 HO-烷基基团，其中烷基定义如上。优选的羟烷基含有低级烷基。合适的非限制性羟烷基实例包括羟基甲基和 2-羟基乙基。
10 基。

“酰基”是指 H-C(O)-, 烷基-C(O)-或环烷基-C(O)-, 其中各基团的定义如上。与母体部分的连接是通过羰基。优选的酰基含有低级烷基。合适的非限制性的酰基实例包括甲酰基、乙酰基和丙酰基。

“芳酰基”是指芳基-C(O)-基团，其中芳基定义如上。与母体部分的连接是通过羰基。合适的非限制性实例包括苯甲酰基和 1-萘甲酰基。
15 基。

“烷氧基”是指烷基-O-基团，其中烷基定义如上。合适的非限制性的烷氧基实例包括甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基和正丁氧基。
20 基。与母体部分的连接是通过醚氧。

“芳氧基”是指芳基-O-基团，其中芳基定义如上。合适的非限制性的芳氧基实例包括苯氧基和萘氧基。与母体部分的连接是通过醚氧。

“芳烷基氧基”是指芳烷基-O-基团，其中芳烷基定义同上。合适的非限制性的芳烷基氧基实例包括苄氧基和 1-或 2-萘甲氧基。与母体部分的连接是通过醚氧。
25 基。

“烷硫基”是指烷基-S-基团，其中烷基定义同上。合适的非限制性的烷硫基实例包括甲硫基和乙硫基。与母体部分的连接是通过硫。

“芳硫基”是指芳基-S-基团，其中芳基定义同上。合适的非限制性的芳硫基实例包括苯硫基和萘硫基。与母体部分的连接是通过硫。

5 “芳烷基硫基”是指芳烷基-S-基团，其中芳烷基定义同上。合适的非限制性的芳烷基硫基实例包括苄硫基。与母体部分的连接是通过硫。

“烷氧基羰基”是指烷基-O-CO-基团。合适的非限制性的烷氧基羰基实例包括甲氧基羰基和乙氧基羰基。与母体部分的连接是通过羰基。

10 “芳氧基羰基”是指芳基-O-C(O)-基团。合适的非限制性的芳氧基羰基实例包括苯氧基羰基和萘氧基羰基。与母体部分的连接是通过羰基。

“芳烷氧基羰基”是指芳烷基-O-C(O)-基团。合适的非限制性的芳烷氧基羰基实例包括苄氧基羰基。与母体部分的连接是通过羰基。

“烷基磺酰基”是指烷基-S(O₂)-基团。优选的基团是其中烷基为低级烷基的基团。与母体部分的连接是通过磺酰基。

15 “芳基磺酰基”是指芳基-S(O₂)-基团。与母体部分的连接是通过磺酰基。

术语“取代的”是指在指定原子上的一个或多个氢被所指出的基团代替，前提条件是，不超出指定原子在现有情况下的正常价态，并且通过取代得到稳定的化合物。可以将取代基和/或可变取代基组合，
20 唯一的条件是这种组合应得到稳定的化合物。“稳定的化合物”或“稳定的结构”是指：化合物足够稳定，从而能够经受从反应混合物中分离得到有效纯度化合物，并能配制成有效治疗试剂。

术语“任选取代的”是指用特定的基、根或基团任选取代。

还应当注意的是，在本发明说明书、实施方案、实施例和表格中，
25 假设任何化合价不饱和的杂原子由氢原子来满足化合价。

如果化合物中的官能团被称作是“被保护的”，这意味着该官能团为改良型，从而在化合物进行反应时，避免了在被保护部位发生不需要的副反应。本领域普通技术人员能够确认合适的保护基，以及参考标准教科书，例如，T. W. Greene et al, Protective Groups in
30 organic Synthesis (1991), Wiley, New York 确认它们。

在任一组分或式 III 中，如果任何可变的基团（例如，芳基、杂环基、R² 等）出现一次以上，那么，其在每种情况下的定义与其在所

有其它情况下的定义无关。

本发明使用的术语“组合物”包括产物，该产物中含有特定量特定组分，该术语还包括由特定量特定组分的混合而直接或间接得到的任何产物。

5 本发明化合物的前药和溶剂化物也包括在本发明范围内。这里所使用的术语“前药”是指一种化合物，该化合物是药物前体，在对患者给药后，该化合物通过代谢或化学过程发生化学转化，得到式 III 化合物或其盐和/或溶剂化物。关于前药的讨论可参见 T. Higuchi and V. Stella, Pro-drugs as Novel Delivery Systems (1987) 14 of the
10 A. C. S. Symposium Series 以及 Bioreversible Carriers in Drug Design, (1987) Edward B. Roche, ed., American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 它们均收入本发明中供参考。

“溶剂化物”是指本发明化合物与一种或多种溶剂分子之间的物理缔合。该物理缔合涉及改变离子和共价键合度，包括氢键键合度。
15 在某些情况下，例如，当结晶固体的晶格中掺入一种或多种溶剂分子时，可以对溶剂化物进行分离。“溶剂化物”包括溶液-相和可分离的溶剂化物。合适的非限制性的溶剂化物实例包括乙醇化物、甲醇化物等。“水合物”是溶剂分子为 H₂O 的溶剂化物。

“有效量”或“治疗有效量”是指能有效抑制 CDK 从而能产生所
20 需的治疗、缓解、抑制或预防效果的本发明化合物或组合物的量。

式 III 化合物可以形成盐，其也包括在本发明范围内。除非另有说明，本发明中提及式 III 化合物时显然应包括其盐。本发明中使用的术语“盐”表示与无机和/或有机酸形成的酸性盐以及与无机和/或有机碱形成的碱性盐。此外，当式 III 化合物同时含有碱性基团（例
25 如，但不限于，吡啶或咪唑）和酸性基团（例如，但不限于，羧酸）时，可以形成两性离子（“内盐”），其包括在本发明使用的术语“盐”的范围内。优选可药用盐（即，无毒的、生理上可接受的），当然，其它盐也是有效的。例如，通过在介质中，例如，在能够沉淀出盐的介质中或在含水介质中，使式 III 化合物与一定量的酸或碱（例如，1
30 当量）反应，可以形成式 III 化合物的盐，如果使用含水介质，则随后进行冷冻干燥。

可列举的酸加成盐包括乙酸盐、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、延胡索酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、乳酸盐、马来酸盐、甲磺酸盐、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、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐等。此外，例如，在 S. Berge et al, Journal of Pharmaceutical Sciences (1977) 66 (1) 1-19; P. Gould, International J. of Pharmaceutics (1986) 33 201-217; Anderson et al, The Practice of Medicinal Chemistry (1996), Academic Press, New York 中以及在 The Orange Book (Food & Drug Administration, Washington, D. C. on their website) 中讨论了通常被认为适用于由可药用碱性化合物形成药学上有效的盐的那些酸。这些公开内容在本发明中引作参考。

可列举的碱性盐包括铵盐、碱金属盐（如钠、锂和钾盐）、碱土金属盐（如钙和镁盐）、与有机碱（例如，有机胺，如二环己基胺、叔丁基胺）形成的盐、与氨基酸（如精氨酸、赖氨酸）形成的盐等。碱性含氮基团可以用诸如下列试剂季铵化：低级烷基卤化物（例如，甲基、乙基和丁基氯化物、溴化物和碘化物）、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，癸基、月桂基和十八烷基的氯化物、溴化物和碘化物）、芳烷基卤（例如，苄基溴和苯乙基溴）以及其它等等。

所有上述酸式盐和碱式盐被规定属于本发明范围内的可药用盐，并且，对本发明来说，所有酸式盐和碱式盐被认为与游离形式的相应化合物等效。

式 III 化合物及其盐、溶剂化物和前药可以其互变异构体的形式存在（例如，以酰胺或亚氨醚的形式存在）。所有这些互变异构体都包括在本发明中作为本发明的一部分。

同位置异构体（例如，4-吡啶基和 3-吡啶基）一样，本发明化合物（包括化合物的盐、溶剂化物和前药以及前药的盐和溶剂化物）的所有立体异构体（例如，几何异构体、旋光异构体等），例如，由于不同取代基上存在的不对称碳而导致可能存在的立体异构体，均包括在本发明范围内，包括对映异构体（即使没有不对称碳，也可能存在对映异构体）、旋转异构体、阻转异构体和非对映异构体。本发明化合物的各立体异构体可以，例如，基本上不含其它异构体，或者可以

混合例如形成外消旋体，或与所有其它立体异构体混合或与其它选择的立体异构体混合。本发明的手性中心可以具有如 IUPAC 1974 Recommendations 中定义的 S 或 R 构型。规定“盐”、“溶剂化物”、“前药”等术语的使用同样适用于本发明化合物的对映体、立体异构体、旋转异构体、互变异构体、位置异构体、外消旋体或前药的盐、溶剂化物和前药。

本发明化合物具有药理学特性，特别是，式 III 化合物能够抑制蛋白激酶，如依赖细胞周期蛋白激酶(CDK)，例如，CDC2 (CDK1)、CDK2、CDK4、CDK5、CDK6、CDK7 和 CDK8。预期式 III 新化合物可以用于治疗增生性疾病，例如，癌、自身免疫性疾病、病毒性疾病、真菌性疾病、神经病学疾病/神经变性疾病、关节炎、炎症、抗-增生性疾病（例如，眼视网膜膜病）、神经元性疾病、脱发和心血管疾病。这其中的许多疾病和病症列于上文引用的 US6413974 中，其内容在本发明中引作参考。

更具体地讲，式 III 化合物可用于治疗各种癌症，包括（但不限于）以下癌症：癌，包括膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、肾癌、肝癌、肺癌（包括小细胞肺癌）、食道癌、胆囊癌、卵巢癌、胰腺癌、胃癌、宫颈癌、甲状腺癌、前列腺癌和皮肤癌（包括扁平细胞癌）；淋巴血统造血肿瘤，包括白血病、急性淋巴细胞白血病、急性成淋巴细胞白血病、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、多毛细胞淋巴瘤和伯基特淋巴瘤；脊髓血统造血肿瘤，包括急性和慢性骨髓性白血病、脊髓发育不良综合征和前髓细胞性白血病；间充质来源肿瘤，包括纤维肉瘤和横纹肌肉瘤；中枢和周围神经系统肿瘤，包括星形细胞瘤、成神经细胞瘤、神经胶质瘤和神经鞘瘤；和其它肿瘤，包括黑素瘤、精原细胞瘤、畸胎瘤、骨肉瘤、xenoderoma pigmentosum、角化棘皮瘤（keratoctanthoma）、甲状腺滤泡肿瘤和卡波济氏肉瘤。

由于 CDK 在大多数细胞增殖调节中起重要作用，因此，抑制剂可以用作可逆细胞抑制剂，其可以用于治疗以异常细胞增殖为特征的任何疾病过程，例如，良性前列腺增生、家族性腺上皮增生息肉病、神经纤维瘤病、动脉粥样硬化、肺纤维化、关节炎、牛皮癣、肾小球性肾炎、血管成形术或血管手术后的再狭窄、肥厚性瘢痕形成、炎性肠

病、移植排斥、内毒素性休克和真菌感染。

最近发现 CDK5 涉及 tau 蛋白的磷酸化作用 (J. Biochem, (1995) 117, 741-749), 这意味着, 式 III 化合物还可以用于治疗阿耳茨海默氏疾病。

- 5 式 III 化合物可诱导或抑制细胞凋亡。在各种人类疾病中, 细胞凋亡应答异常。用作细胞凋亡调节剂的式 III 化合物可用于治疗癌症 (包括但不限于上述癌症类型)、病毒性 (包括但不限于疱疹病毒、痘病毒、埃-巴二氏病毒、新培斯病毒和腺病毒) 感染、预防 HIV-感染个体的爱滋病发展、自身免疫病 (包括但不限于系统性红斑狼疮、自身免疫介导的肾小球性肾炎、风湿性关节炎、牛皮癣、炎性肠病、和自身免疫糖尿病)、神经变性疾病 (包括但不限于阿耳茨海默氏病、AIDS-相关性痴呆、帕金森氏病、肌萎缩性侧索硬化、色素性视网膜炎、脊髓性肌萎缩和小脑变性)、脊髓发育异常综合征、再生障碍性贫血、与心肌梗死、中风和再灌注损伤有关的局部缺血性损伤、心律失常、动脉粥样硬化、毒素导致的或与酒精有关的肝疾病、血液病 (包括但不限于慢性贫血和再生障碍性贫血)、肌与骨骼系统的变性疾病 (包括但不限于骨质疏松和关节炎)、阿斯匹林敏感性鼻窦炎、囊性纤维化、多发性硬化、肾疾病和癌痛。
- 10
- 15

- 20 作为 CDK 抑制剂的式 III 化合物能够调节细胞 RNA 和 DNA 合成水平。因此, 这些试剂可用于治疗病毒性感染 (包括但不限于 HIV、人类乳头瘤病毒、疱疹病毒、痘病毒、埃-巴二氏病毒、新培斯病毒和腺病毒)。

- 25 式 III 化合物也可用于化学预防癌症。化学预防的定义是通过阻断起始诱变事件或通过阻断已损伤癌前期细胞的发育或抑制肿瘤复发来抑制侵袭性癌症发展。

式 III 化合物也可用于抑制肿瘤血管生成和转移。

- 30 式 III 化合物还可用作其它蛋白激酶 (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、wee 1 激酶、Src 和 Abl) 抑制剂, 因此, 式 III 化合物可有效治疗与其它蛋白激酶有关的疾病。

本发明另一方面涉及一种治疗哺乳动物 (例如, 人类) 所患 CDK 相关疾病或病症的方法, 该方法是通过哺乳动物施用治疗有效量的至

少一种式 III 化合物或其可药用盐或其溶剂化物。

式 III 化合物的优选剂量为约 0.001 - 500mg /kg 体重/天。式 III 化合物或其可药用盐或其溶剂化物特别优选的剂量为约 0.01 - 25mg /kg 体重/天。

- 5 本发明化合物还可与一种或多种抗癌疗法（如放射疗法）和/或一种或多种下述抗癌剂联用（一同给药或相继给药）：细胞抑制剂、细胞毒素剂（例如，但不限于，DNA 交互剂（例如，顺铂或阿霉素）；紫杉碱类（例如，泰素帝和紫杉醇）；交连异构酶 II 抑制剂（例如，依托泊甙）；交连异构酶 I 抑制剂（例如，irinotecan（或 CPT-11）、camptostar 或 topotecan）；微管蛋白交互剂（例如，紫杉醇、docetaxel 或 epothilones）；激素药（例如，他莫昔芬）；胸苷酸合酶抑制剂（例如，5-氟尿嘧啶）；抗代谢物（例如，氮甲蝶呤）；烷基化剂（例如，替莫唑胺（购自 Schering-Plough Corporation, Kenilworth, New Jersey, 商品名为 TEMODAR™）、环磷酰胺）；法尼基蛋白转移酶抑制剂（例如，
- 15 SARASAR™（4-[2-[4-[(11R)-3,10-二溴-8-氯-6,11-二氢-5H-苯并[5,6]环庚[1,2-b]吡啶-11-基]-1-哌啶基]-2-氧代乙基]-1-哌啶甲酰胺或从 Schering-Plough Corporation, Kenilworth, New Jersey 购得的 SCH66336）、tipifarnib（从 Janssen Pharmaceuticals 购得的 Zarnestra®或 R115777）、L778, 123（购自 Merck & Company, 20 Whitehouse Station, New Jersey 的法尼基蛋白转移酶抑制剂）、BMS 214662（购自 Bristol-Myers Squibb Pharmaceuticals, Princeton, New Jersey 的法尼基蛋白转移酶抑制剂）；信号转导抑制剂（例如，Iressa（购自 Astra Zeneca Pharmaceuticals, England）、Tarceva（EGFR 激酶抑制剂）、EGFR 抗体（例如，C225）、GLEEVEC™（购 25 自 Novartis Pharmaceuticals, East Hanover, New Jersey 的 C-abl 激酶抑制剂）；干扰素，例如，内含子（购自 Schering-Plough Corporation）、Peg-内含子（购自 Schering-Plough Corporation）；激素疗法联用；芳香酶联用；阿糖胞嘧啶、阿霉素、环磷酰胺和 gemcitabine。

- 30 其它抗癌（也称作抗肿瘤）剂包括但不限于尿嘧啶芥子气、氮芥、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥、哌泊溴烷、曲他胺、塞替派、白消安、卡莫司汀、环己亚硝脒、链佐星、达卡巴嗪、氟尿苷、阿糖胞

昔、6-巯基嘌呤、6-硫代鸟嘌呤、磷酸氟达拉滨、奥沙利铂、亚叶酸（亮丙瑞林 leucovirin）、奥沙利铂（购自 Sanofi-Synthelabo Pharmaceuticals, France, 商品名为 ELOXATIN™）、喷托司它丁、长春碱、长春新碱、长春地辛、博莱霉素、放线菌素、柔红霉素、阿霉素、表阿霉素、伊达比星、普卡霉素、脱氧考福酶素、丝裂霉素-C、L-天冬酰胺酶、替尼泊甙、17 α -炔雌醇、己烯雌酚、睾酮素、泼尼松、氟甲睾酮、丙酸屈他雄酮、睾内酯、乙酸甲地孕酮、甲泼尼龙、甲睾酮、泼尼松龙、曲安西龙、氯烯雌醚、羟孕酮、氨鲁米特、雌莫司汀、乙酸甲羟孕酮、亮丙瑞林、氟他胺、托瑞米芬、戈舍瑞林、顺铂、卡铂、羟基脲、安吡啶、丙卡巴肼、米托坦、米托蒽醌、左旋咪唑、Navelbene、Anastrozole、Letrozole、Capecitabine、Reloxafine、屈洛昔芬或六甲蜜胺。

如果配制成固定的剂量，上述组合产品可以采用在本发明所述剂量范围内的本发明化合物和在其剂量范围内的其它药用活性剂或治疗。例如，现已发现，在诱导细胞凋亡中，CDC2 抑制剂 Olomucine 与已知的细胞毒素剂起协同作用 (J. Cell Sci., (1995) 108, 2897)。当组合制剂不适当时，式 III 化合物也可以与已知的抗癌剂或细胞毒素剂一起按序给药。本发明对给药顺序没有限制；可以在施用已知抗癌剂或细胞毒素剂之前或之后施用式 III 化合物。例如，依赖细胞周期蛋白激酶抑制剂 flavopiridol 的细胞毒素活性受施用抗癌剂顺序的影响。Cancer Research, (1997), 57, 3375。这些技术是本领域技术人员和主治医师熟知的。

因此，一方面，本发明包括组合物，其含有一定量的至少一种式 III 化合物或其可药用盐或其溶剂化物以及定量的一种或多种上述抗癌治疗和抗癌药，其中，化合物/治疗的量能达到所需的治疗效果。

本发明化合物的药理学性质可通过许多药理学试验证实。使用本发明化合物和其盐进行下文描述的例示药理学试验。

本发明还涉及一种药物组合物，其含有至少一种式 III 化合物或其可药用盐或溶剂化物和至少一种可药用载体。

对于由本发明化合物制备药物组合物，惰性可药用载体可以是固体或液体。固体制剂包括粉剂、片剂、可分散粒剂、胶囊、扁囊剂和栓剂。粉剂和片剂可以由大约 5-95% 活性组分组成。合适的固体载体

是本领域已知的，例如，碳酸镁、硬脂酸镁、滑石、蔗糖或乳糖。片剂、粉剂、扁囊剂和胶囊剂可以用作适合于口服给药的固体剂型。可药用载体的实例以及各种组合物的制备方法可参见A. Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, (1990), Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania.

液体制剂包括溶液、悬浮液和乳剂。可列举的实例是水或水-丙二醇溶液（用于肠胃外注射）或添加了甜料和遮光剂用于口服溶液、悬浮液和乳剂。液体制剂还可包括鼻内给药溶液。

适于吸入给药的气雾剂可以包括溶液和固体粉末，其可以与可药用载体（例如，惰性压缩气体，如氮气）混合。

还包括固体制剂，其在临用前转化成用于口服或肠胃外给药的液体制剂。所述液体制剂包括溶液、悬浮液和乳剂。

本发明化合物还可以经皮提供。经皮组合物可以是乳膏、洗剂、气雾剂和/或乳剂，并且，如同本领域常规实际应用的那样，其能包含在基质型或贮库型经皮贴剂中。

本发明化合物还可以经皮下提供。

优选将化合物用于口服给药。

优选，药物制剂为单位剂型。在这种剂型中，制剂再细分成含有适量（例如，达到所需效果的有效量）活性组分的适当规模的单位剂量。

根据本申请，在单位剂量制剂中，活性化合物的量可以在大约 1 - 100mg，优选约 1 - 50mg，更优选约 1 - 25mg 范围内变化或调整。

实际使用剂量可以根据患者需求和所治疗疾病的严重程度变化。本领域技术人员能够确定具体情况下的合适剂量方案。为方便起见，在一天中，可以根据需要，将总日剂量均分和分次给药。

本发明化合物和/或其可药用盐的给药量和给药频率由主治临床医师根据诸如患者年龄、病情和体重以及所治疗症状的严重程度等因素进行判断调整。一般建议的口服日剂量可以为约 1 - 500mg/天，优选为 1 - 200mg/天，采用 2 - 4 个均分剂量。

本发明另一方面涉及一种试剂盒，该试剂盒包含治疗有效量的至少一种式 III 化合物或其可药用盐或其溶剂化物和可药用载体、赋形剂或稀释剂。

本发明另一方面还涉及一种试剂盒，其包含一定量的至少一种式 III 化合物或其可药用盐或其溶剂化物和一定量的至少一种上述抗癌治疗和/或抗癌药，其中，两种或多种组分的量能达到所需的治疗效果。

- 5 通过下述制备例和实施例来举例说明本发明，但其不限制本发明的公开范围。其它机械途径和类似结构对本领域技术人员而言是显而易见的。

如果存在 NMR 数据，则 ^1H 波谱在 Varian VXR-200 (200 MHz, ^1H)、Varian Gemini-300 (300MHz) 或 XL-400 (400MHz) 上获得，作为 Me_4Si 低磁场的 ppm 报道，并在括号内指出质子数、多重态和以赫兹表示的偶合常数。当存在 LC/MS 数据时，用 Applied Biosystems API-100 质谱仪和 Shimadzu SCL-10A LC 柱进行分析：Altech 铂 C18、3 微米、33mm x 7mm ID；梯度流：0 min-10% CH_3CN ，5 min-95% CH_3CN ，7 min-95% CH_3CN ，7.5 min-10% CH_3CN ，9 min-停止。得到保留时间和观测到的母离子。

15 下述溶剂和试剂可用其缩写来表示：

薄层色谱法：TLC

二氯甲烷： CH_2Cl_2

乙酸乙酯：AcOEt 或 EtOAc

20 甲醇：MeOH

三氟乙酸酯：TFA

三乙胺： Et_3N 或 TEA

丁氧基羰基：n-Boc 或 Boc

核磁共振谱：NMR

25 液相色谱质谱：LCMS

高分辨质谱：HRMS

毫升：ml

毫摩尔：mmol

微升： μl

30 克：g

毫克：mg

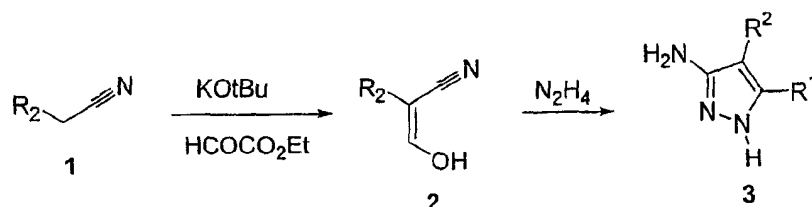
室温或 rt (环境温度)：约 25°C

实施例

一般，本发明所述的化合物可通过下述流程 1 的一般途径制得。
 用叔丁醇钾和甲酸乙酯处理原料腈，得到中间体烯醇 2，紧接着用肼处
 5 理该烯醇，得到所需的取代的 3-氨基吡唑。如反应流程 3 所示，将式 3 化合物与适当官能化的式 5 酮酸酯缩合，制得式 6 吡啶酮。在上述一般途径中使用的酮酸酯是市售产品或可以根据流程图解 2 制得。

反应流程 1

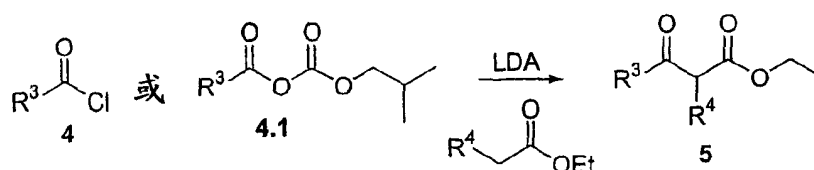
10



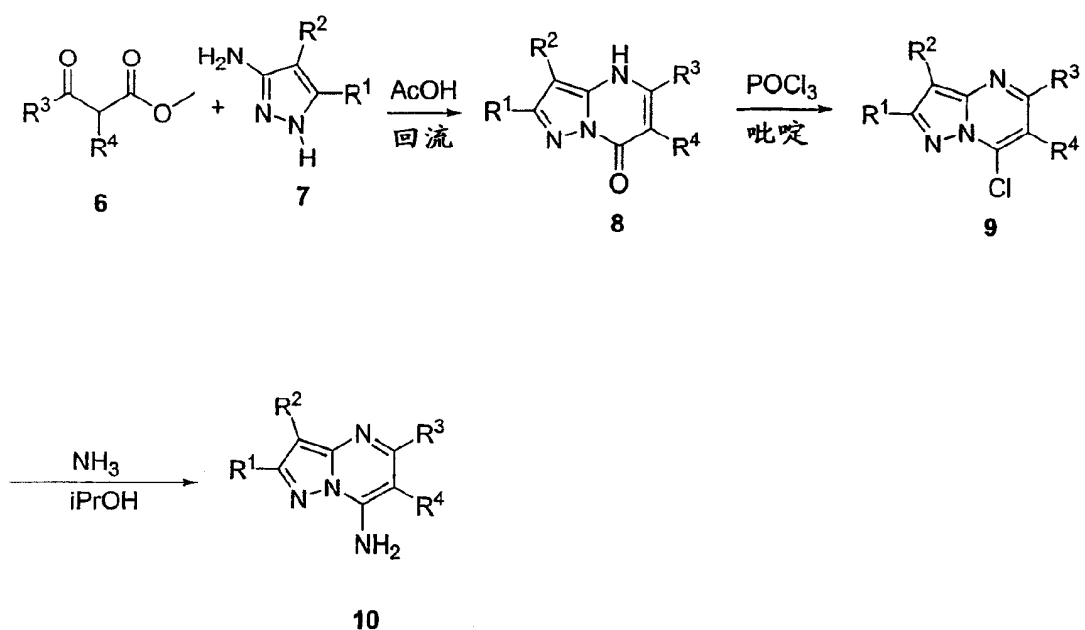
用 POCl₃ 处理吡啶酮 8，可制得式 9 氯化物。当 R² 是 H 时，通过亲电卤化、酰化和其它各种亲电芳香族取代，可以在式 9 化合物的上述位置上进行取代。

15

反应流程 2



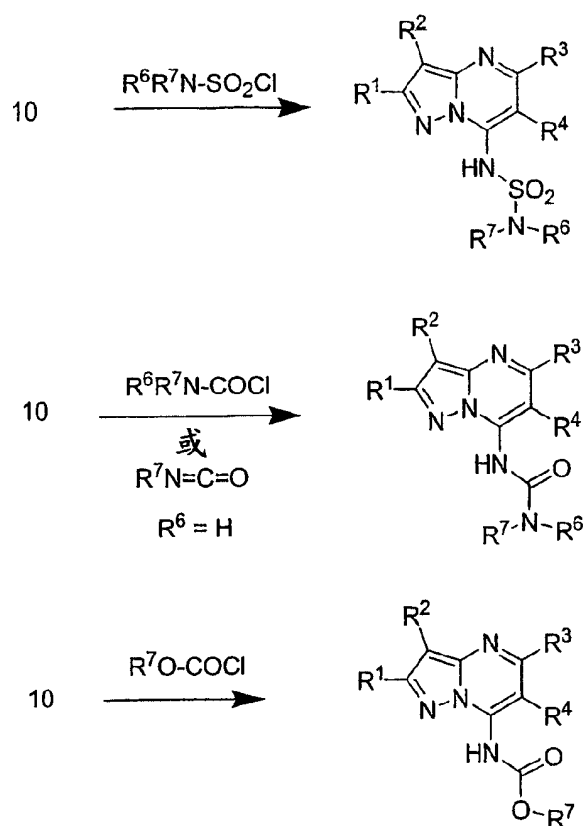
反应流程 3



通过在 2-丙醇中用与氨反应替代式 9 化合物的氯，可以引入 N7-氨基官能度(反应流程 3)。

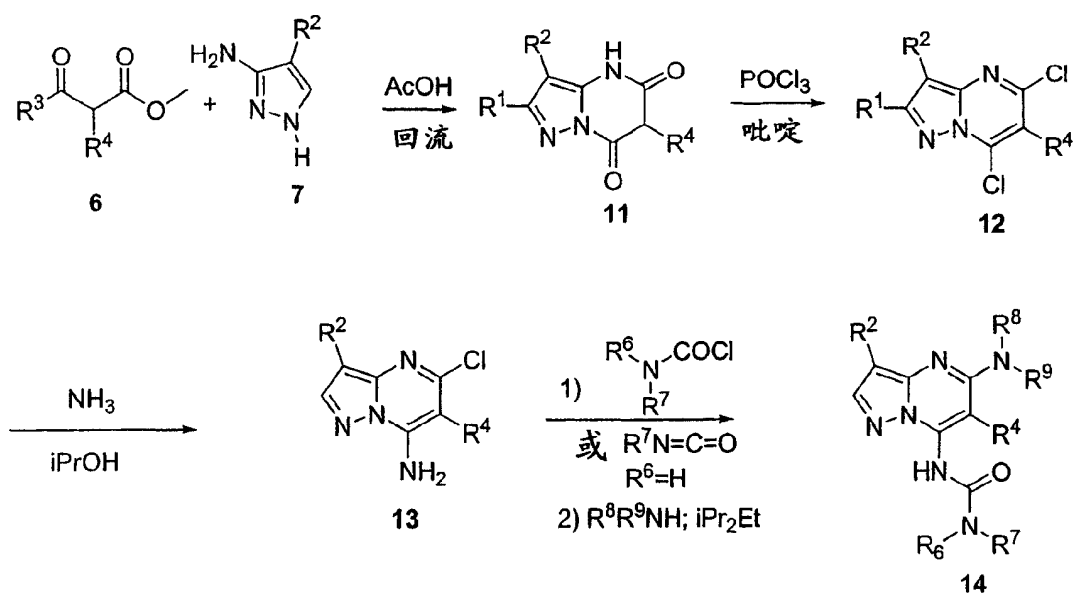
C-7 氨基中间体 10 然后用适当的氨磺酰氯或氨基甲酰氯或氯甲酸酯进行酰化或磺酰化得到所需产物，见反应流程 4。

反应流程 4



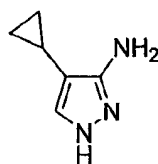
当式 6 化合物中 $R^3 = OEt$ 时，用反应图解 4 的方法能容易地制得式 12 的二氯化物。对 7-氯化物进行选择取代，制得式 13 化合物，该化合物能容易地转化成式 14 的产物或相应的磺酰亚胺 (sulfonimides)。

反应流程 5

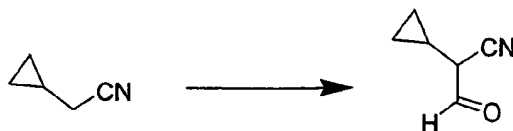


制备实施例:

5 制备例 1:



步骤 A:

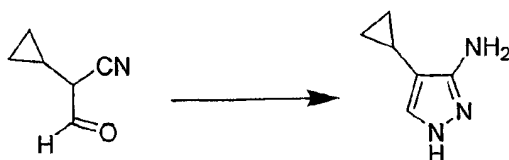


10

采用 DE 19834047A1, p19 中的方法。向 KOtBu (6.17g, 0.055mol) 的无水 THF (40ml) 溶液中滴加环丙基乙腈 (2.0g, 0.025mol) 和甲酸乙酯 (4.07g, 0.055mol) 的无水 THF (4ml) 溶液。立即形成沉淀。搅拌该混合物 12 小时。真空浓缩并用 Et₂O (50ml) 搅拌残余物。将得到的残余物倾析, 用 Et₂O (2 x 50ml) 洗涤并在真空下从残余物中除去 Et₂O。将

残余物溶解在冷 H_2O (20ml) 中, 用 12N HCl 调节其 pH 至 4-5。用 CH_2Cl_2 (2 x 50ml) 萃取该混合物。合并有机层, 用 MgSO_4 干燥并真空浓缩, 得到黄褐色液体醛。

5 步骤 B:



将制备例 1 步骤 A 的产物 (2.12g, 0.0195mol)、 $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1.95g, 0.039mol) 和 1.8g (0.029mol) 冰醋酸 (1.8g, 0.029mol) 溶解在 EtOH (10ml) 中。回流该混合物 6 小时并真空浓缩。使残余物在 CH_2Cl_2 (150ml) 中形成浆料并用 1N NaOH 调节其 pH 至 9。用盐水洗涤有机层, 用 MgSO_4 干燥并真空浓缩, 得到蜡状橙色固体产物。

制备例 2-3:

使用与制备例 1 基本相同的方法, 不过使用表 2 第 2 栏中的腈代替, 制得表 2 第 3 栏中的化合物:

表 2

制备例	栏 2	栏 3
2		
3		

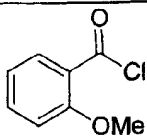
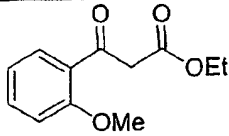
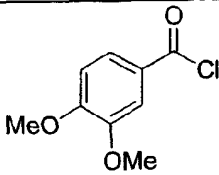
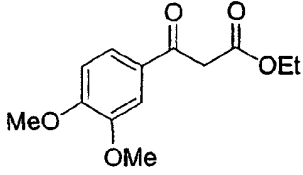
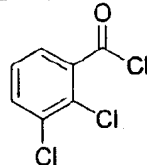
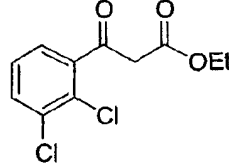
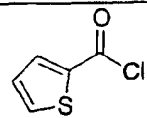
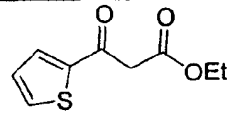
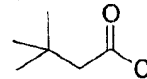
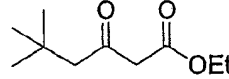
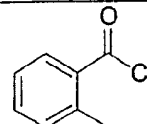
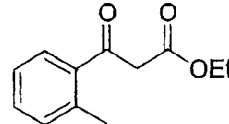
制备例 4:

根据 K. O. Olsen, J. Org. Chem., (1987) 52, 4531-4536 中
 5 描述的方法进行反应。因此, 在 $-65 - -70^{\circ}\text{C}$ 下, 向二异丙基氨基化锂
 的 THF 搅拌溶液中滴加新近蒸馏的乙酸乙酯。将所得溶液搅拌 30 分
 钟, 并加入酰基氯的 THF 溶液。在 $-65 - -70^{\circ}\text{C}$ 搅拌反应混合物 30 分钟,
 然后加入 1N HCl 溶液终止反应。使得到的两相混合物温热至室温。所
 得混合物用 EtOAc (100ml) 稀释, 并收集有机层。水层用 EtOAc (100ml)
 10 萃取。合并有机层, 用盐水洗涤, 干燥(Na_2SO_4)并真空浓缩, 得到用于
 下一步缩合反应的 β -酮酸酯粗产物。

制备例 5-10:

按照与制备例 4 基本相同的方法, 不过替代使用表 3 第 2 栏中的
 15 酰基氯, 制得表 3 第 3 栏中的 β -酮酸酯:

表 3

制备例	栏2	栏3	数据
5			收率 = 99% LCMS: $MH^+ = 223$
6			收率 = 99% LCMS: $MH^+ = 253$
7			收率 = 80% LCMS: $MH^+ = 261$
8			收率 = 93% $MH^+ = 199$
9			收率 = 93%
10			收率 = 100%

制备例 11:

5



10

向酸的 THF 溶液中加入 Et_3N , 然后在 $-20 - -30^\circ\text{C}$ 加入氯甲酸异丁酯。在 $-20 - -30^\circ\text{C}$ 搅拌混合物 30 分钟后, 在氩气气氛下滤出盐酸三乙胺, 并在 $-65 - 70^\circ\text{C}$ 下, 将滤液加入 LDA-EtOAc 反应混合物 (按方法 A 制得) 中。加入 1N HCl 后, 按常规处理反应混合物并蒸发溶剂, 分离出 β -酮酸酯粗产物, 该粗产物用于随后的缩合反应中。

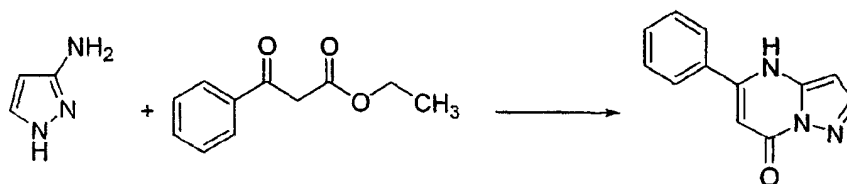
制备例 12-13. 12:

根据与制备例 11 基本相同的方法, 不过替代使用表 4 第 2 栏中的羧酸, 制得表 4 第 3 栏中的化合物:

5

表 4

制备例	栏2	栏3	数据
12			收率 = 99% MH ⁺ = 213
13			收率 = 70% MH ⁺ = 275
13.10			收率 = 99 MH ⁺ = 199
13.11			收率 = 99 MH ⁺ = 334
13.12			收率 = 99 MH ⁺ = 334

制备例 14:

10

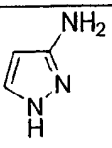
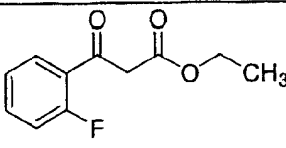
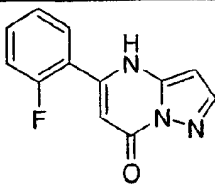
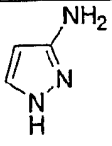
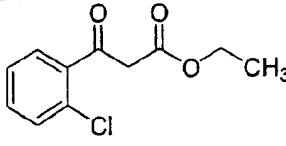
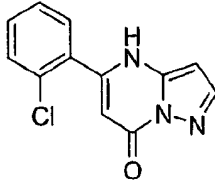
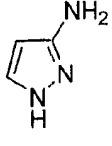
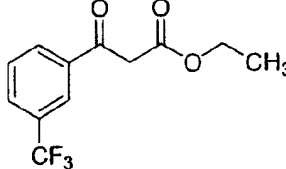
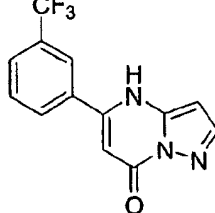
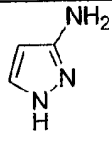
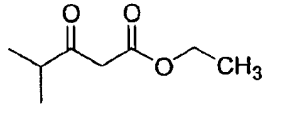
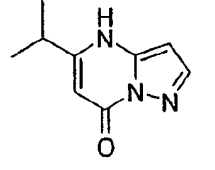
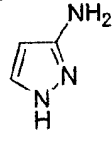
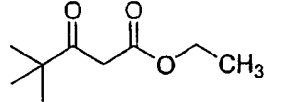
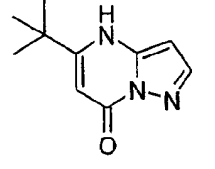
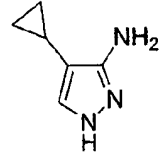
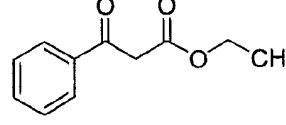
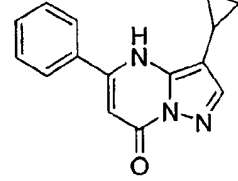
将 3-氨基吡唑 (2.0g, 24.07mmol) 和苯甲酰乙酸乙酯 (4.58ml, 1.1eq.) 的 AcOH (15ml) 溶液加热回流 3 小时。冷却反应混合物至室温, 并真空浓缩。用 EtOAc 稀释所得的固体, 过滤得到白色固体 (2.04g, 40%收率)。

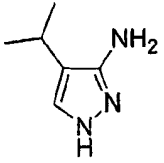
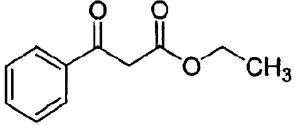
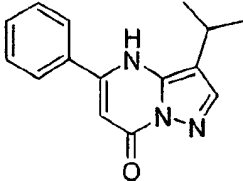
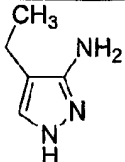
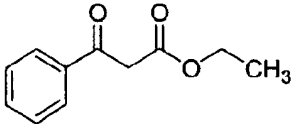
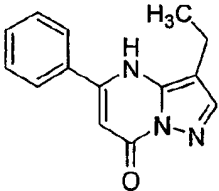
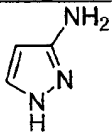
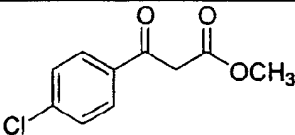
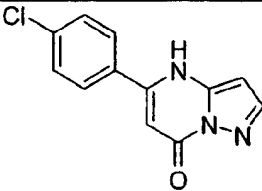
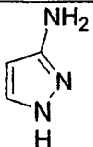
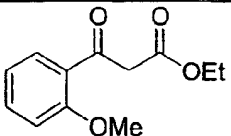
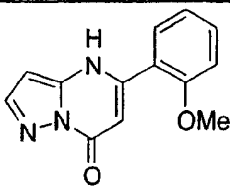
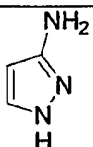
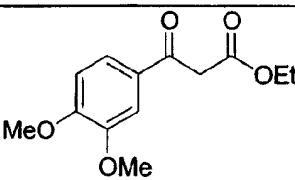
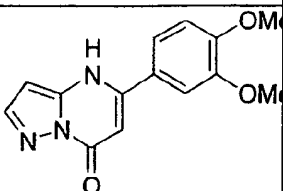
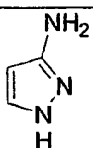
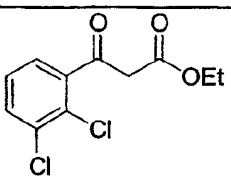
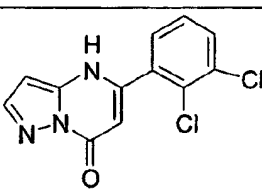
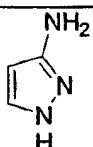
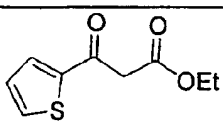
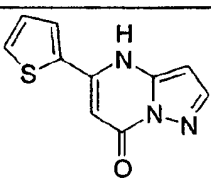
制备例 15-32.15:

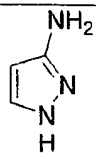
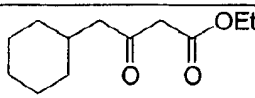
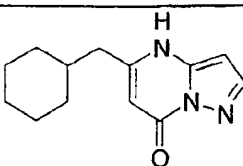
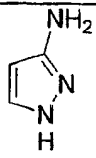
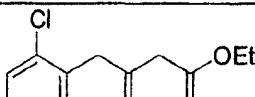
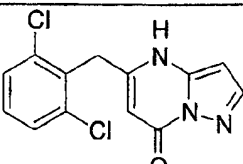
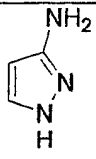
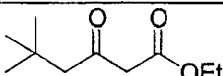
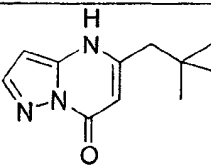
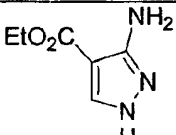
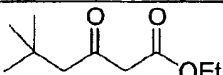
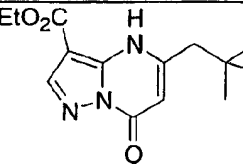
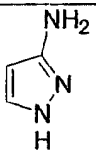
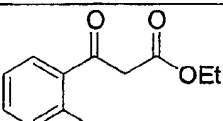
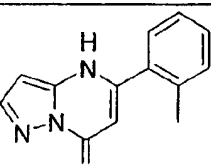
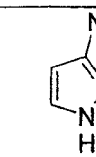
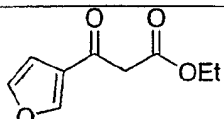
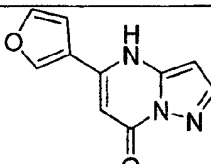
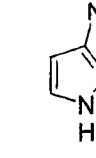
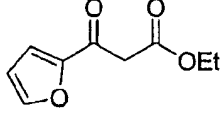
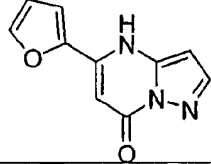
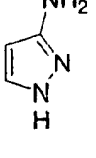
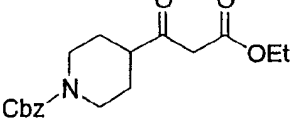
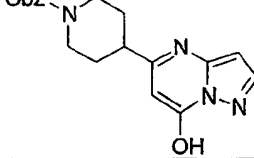
根据与制备例 14 基本相同的方法, 不过替代使用表 5 第 2 栏中的氨基吡唑和表 5 第 3 栏中的酯, 制得表 5 第 4 栏中的化合物:

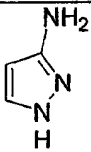
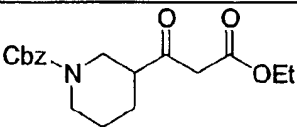
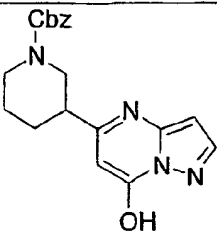
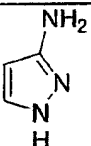
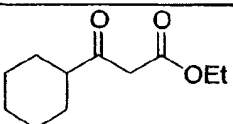
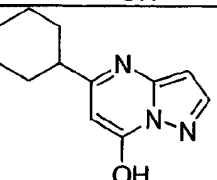
5

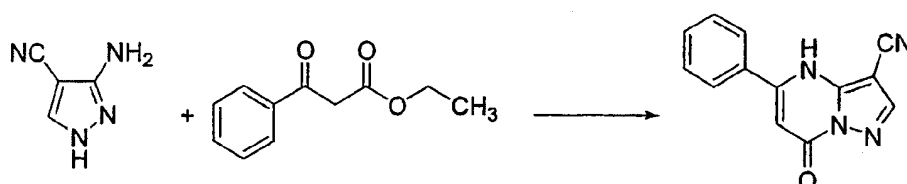
表 5

制备例	栏2	栏3	栏4
15			
16			
17			
18			
19			
20			

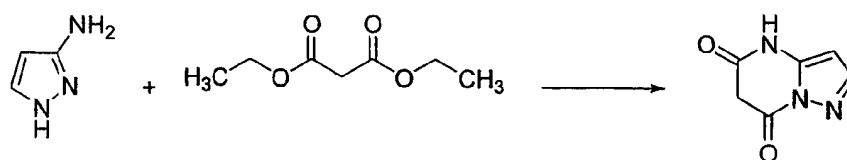
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			

28			
29			
30			
31			
32			
32.11			
32.12			
32.13			

32.14			
32.15			

制备例 33:

将苯甲酰乙酸乙酯 (1.76ml, 1.1eq.) 和 3-氨基-4-氰基吡啶 (1.0g, 9.25mmol) 的 AcOH (5.0ml) 和 H₂O (10ml) 溶液加热回流 72 小时。所得溶液冷却至室温，真空浓缩，并用 EtOAc 稀释。滤出所得的沉淀，用 EtOAc 洗涤并真空干燥 (0.47g, 21% 收率)。

制备例 33.10:

采用 US 3,907,799 中公开的方法。将钠 (2.3g, 2eq.) 分批加入 EtOH (150ml) 中。当钠完全溶解后，加入 3-氨基吡啶 (4.2g, 0.05mol) 和 丙二酸二乙酯 (8.7g, 1.1eq.)，并将所得溶液加热回流 3 小时。冷却得到的悬浮液至室温并过滤。将滤饼用乙醇 (100ml) 洗涤并溶解在

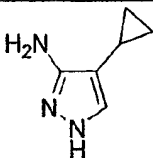
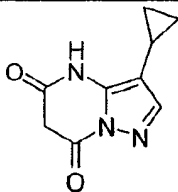
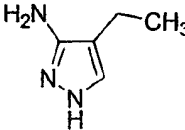
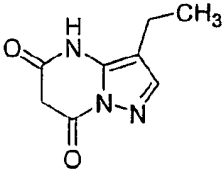
H₂O (250ml) 中。所得溶液在冰浴中冷却并用浓 HCl 调节 pH 至 1-2, 过滤得到的悬浮液, 用 H₂O (100ml) 洗涤, 真空干燥, 得到白色固体 (4.75g, 收率 63%)。

5 制备例 33.11-33.12:

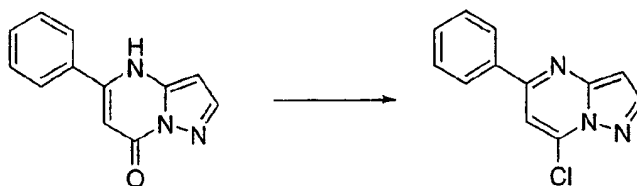
根据与制备例 33.10 基本相同的方法, 不过替代使用表 5.1 第 2 栏中的化合物, 制得表 5.1 第 3 栏中的化合物:

表 5.1

10

制备例	栏2	栏3
33.11		
33.12		

制备例 34:



15 在室温下, 将制备例 14 制得的化合物 (1.0g, 4.73mmol) 在 POCl₃ (5ml) 和吡啶 (0.25ml) 中的溶液搅拌 3 天。用 Et₂O 稀释所得的淤浆, 过滤, 固体残余物用 Et₂O 洗涤。将合并的 Et₂O 洗液冷却至 0℃, 并用冰处理。当剧烈反应停止时, 将得到的混合物用 H₂O 稀释, 分离, 且水层用 Et₂O 萃取。合并的有机物用 H₂O 和饱和 NaCl 洗涤, Na₂SO₄ 干燥, 过滤并浓缩, 得到浅黄色固体 (0.86g, 收率 79%)。LCMS: MH⁺=230。

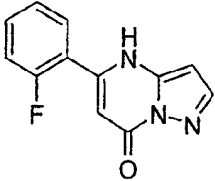
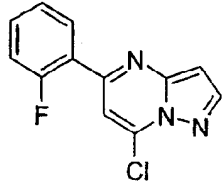
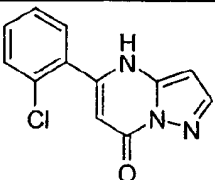
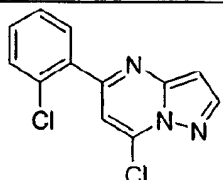
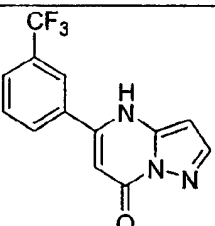
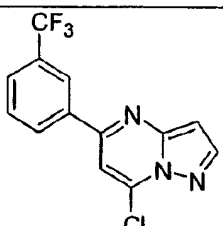
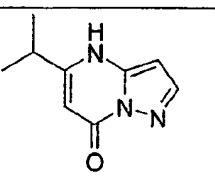
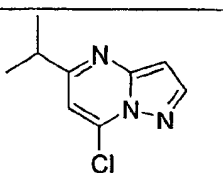
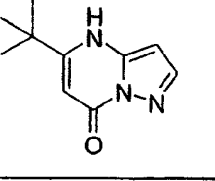
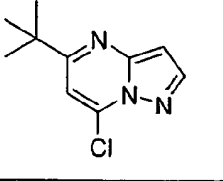
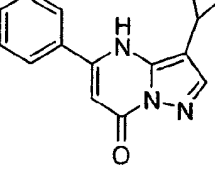
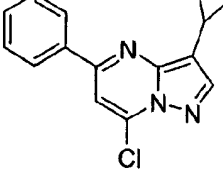
20

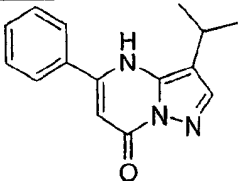
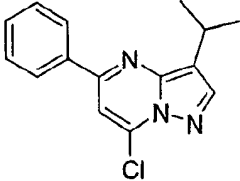
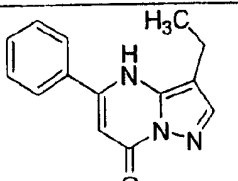
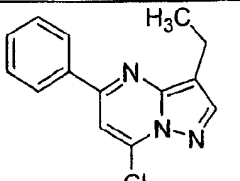
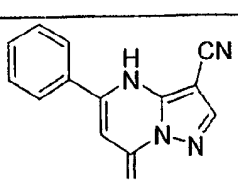
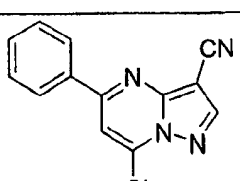
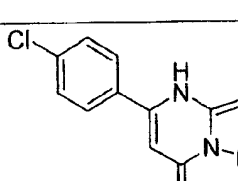
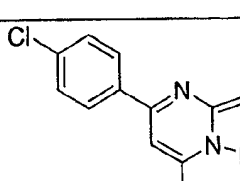
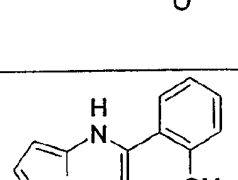
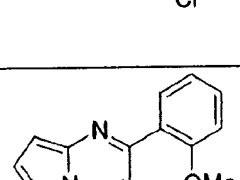
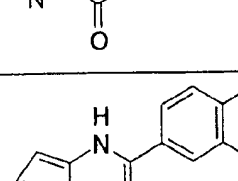
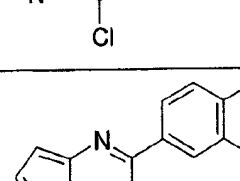
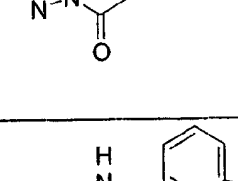
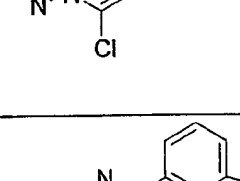
制备例 35-53.15:

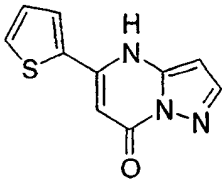
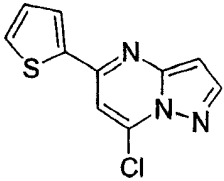
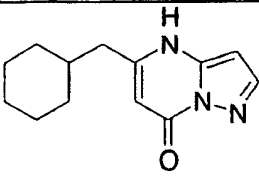
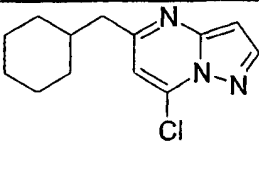
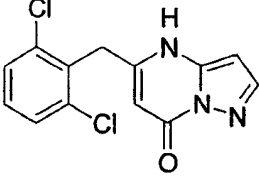
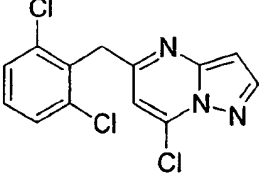
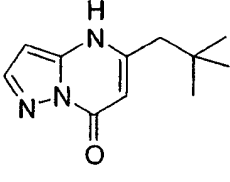
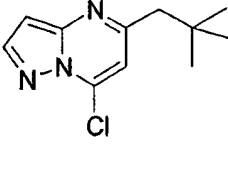
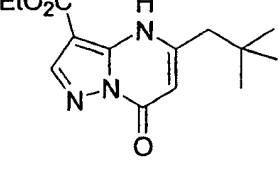
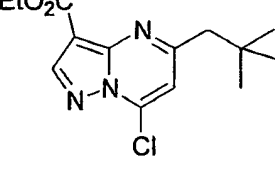
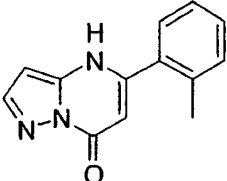
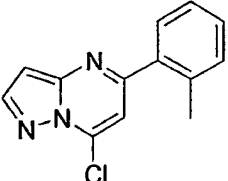
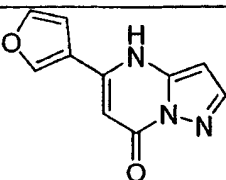
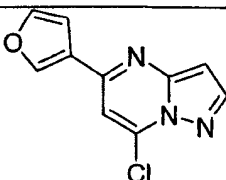
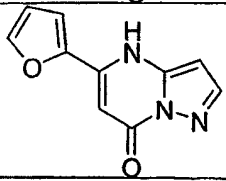
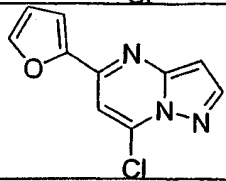
根据与制备例 34 基本相同的方法, 不过替代使用表 6 第 2 栏中的化合物, 制得表 6 第 3 栏中的化合物:

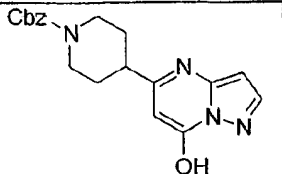
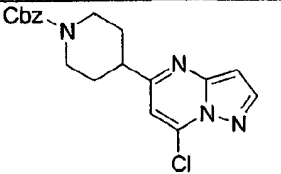
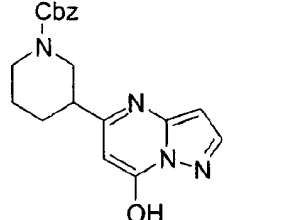
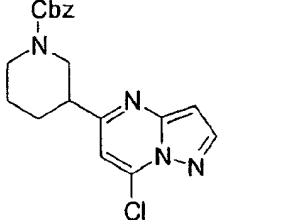
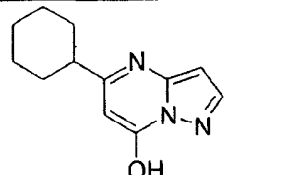
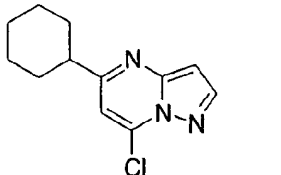
5

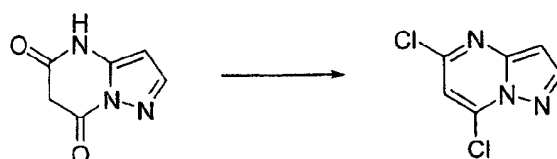
表 6

制备例	栏2	栏3	数据
35			LCMS: MH ⁺ =248
36			
37			LCMS: MH ⁺ =298
38			LCMS: MH ⁺ =196
39			LCMS: MH ⁺ =210
40			

41			LCMS: MH ⁺ =272
42			
43			LCMS: MH ⁺ =255
44			
45			收率 = 65% LCMS: MH ⁺ = 260
46			收率 = 35% LCMS: MH ⁺ = 290
47			收率 = 32% LCMS: MH ⁺ = 298

48			收率 = 45% LCMS: MH^+ = 236
49			收率 = 100% LCMS: MH^+ = 250
50			收率 = 88% LCMS: MH^+ = 314
51			收率 = 43% LCMS: MH^+ = 223
52			收率 = 30% LCMS: MH^+ = 295
53			收率 = 98% LCMS: MH^+ = 244
53.11			
53.12			

53.13			收率 = 96 MH ⁺ = 371
53.14			收率 = 99 MH ⁺ = 371
53.15			收率 = quant. MH ⁺ = 236

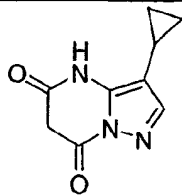
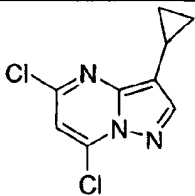
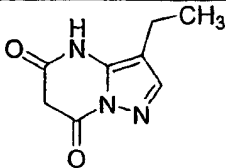
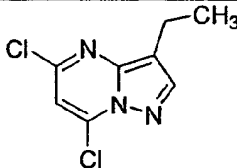
制备例 53.16:

- 5 将 POCl₃ (62ml) 和二甲基苯胺 (11.4g, 2.8eq.) 和制备例 33.10 制得的化合物 (4.75g, 0.032mmol) 在氮气下冷却至 5℃。将反应混合物温热至 60℃ 并搅拌过夜。冷却反应混合物至 30℃ 并减压蒸馏除去 POCl₃。将残余物溶解在二氯甲烷 (300ml) 中并倾倒入冰中。搅拌 15 分钟后, 用固体碳酸氢钠调节混合物的 pH 至 7-8。分离为两层并用水
- 10 (3X200ml) 洗涤有机层, 用 MgSO₄ 干燥, 过滤并真空浓缩。将粗产物用快速色谱法提纯, 以 50:50 二氯甲烷: 己烷溶液作为洗脱液洗脱二甲基苯胺。然后将洗脱液变为 75:25 二氯甲烷: 己烷溶液洗脱所需产物 (4.58g, 收率 77%)。MS: MH⁺ = 188。

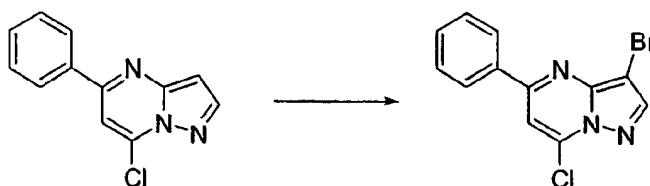
15 制备例 53.17-53.18:

根据与制备例 53.16 基本相同的方法, 不过替代使用表 6.10 第 2 栏中的化合物, 制得表 6.10 第 3 栏中的化合物:

表 6.10

制备例	栏2	栏3
53.17		
53.18		

5 制备例 54:

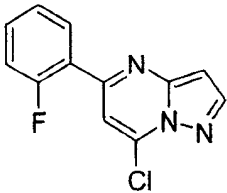
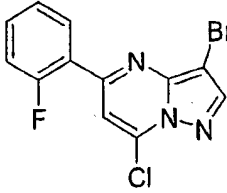
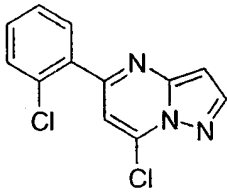
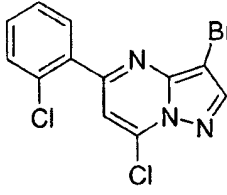
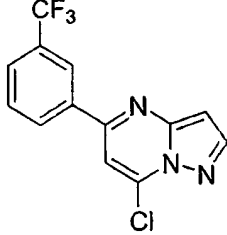
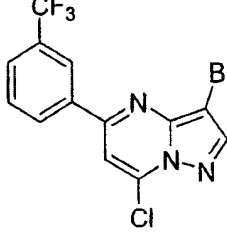
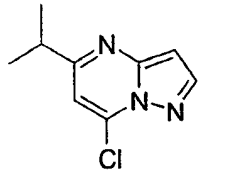
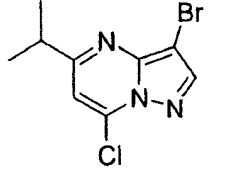
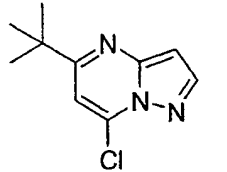
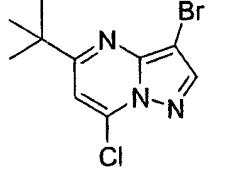
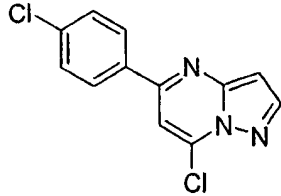
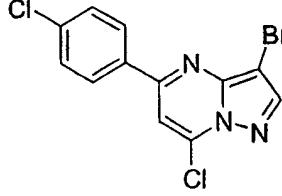


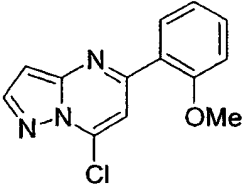
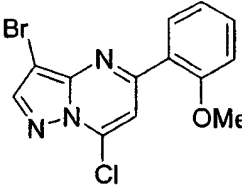
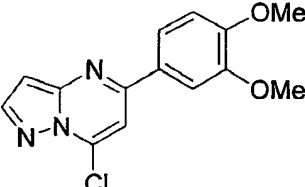
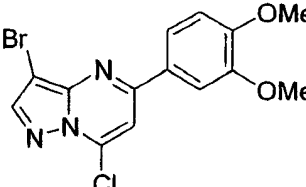
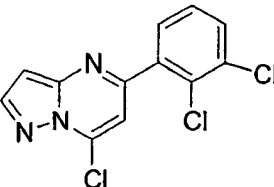
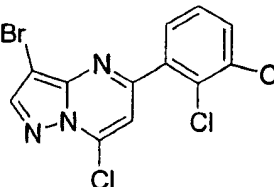
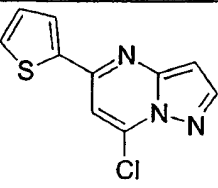
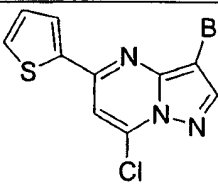
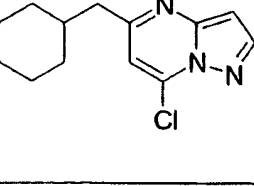
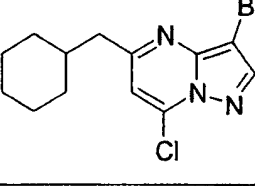
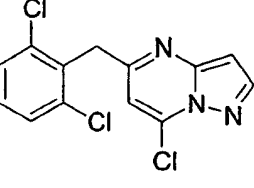
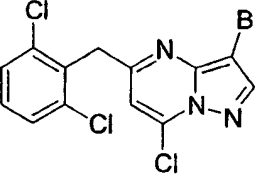
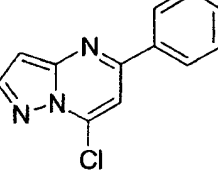
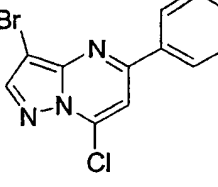
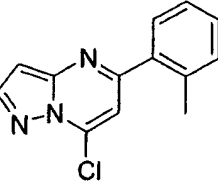
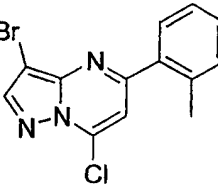
用 NBS (0.085g, 1.1eq.) 处理制备例 34 制得的化合物 (0.10g, 0.435mmol) 的 CH₃CN (3ml) 溶液。在室温搅拌反应混合物 1 小时并减压浓缩。粗产物用快速色谱法提纯, 用 20% 的 EtOAc 的己烷溶液作为洗脱液 (0.13g, 收率 100%)。LCMS: MH⁺=308。

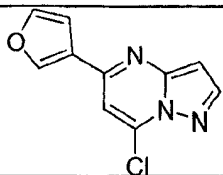
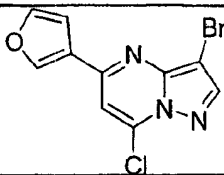
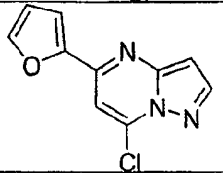
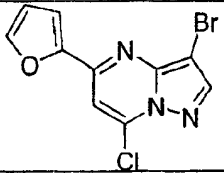
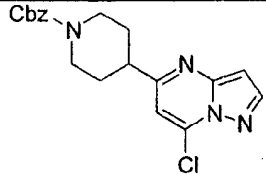
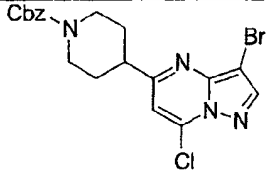
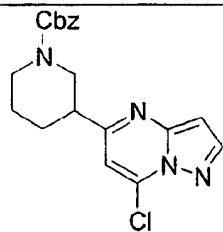
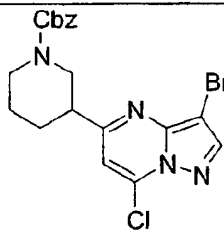
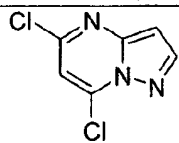
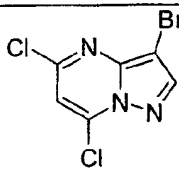
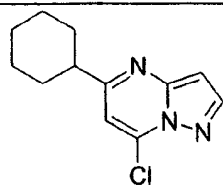
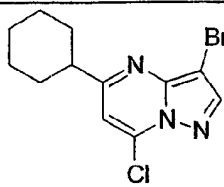
制备例 55-68.15:

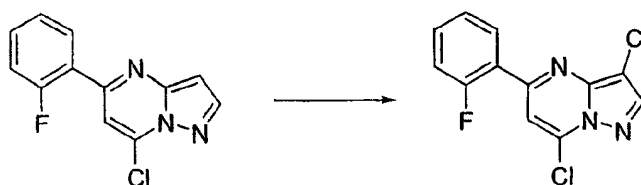
根据与制备例 54 基本相同的方法, 替代使用表 7 第 2 栏中的化合物, 制得表 7 第 3 栏中的化合物:

表 7

制备例	栏2	栏3	数据
55			LCMS: $MH^+ = 326$
56			LCMS: $MH^+ = 342$
57			LCMS: $MH^+ = 376$
58			LCMS: $MH^+ = 274$
59			LCMS: $MH^+ = 288$
60			

61			收率 = 75% LCMS: MH^+ = 338
62			收率 = 52% LCMS: MH^+ = 368
63			收率 = 87% LCMS: MH^+ = 376
64			收率 = 100% LCMS: MH^+ = 316
65			收率 = 92% LCMS: MH^+ = 330
66			收率 = 82% LCMS: MH^+ = 395
67			收率 = 88% LCMS: MH^+ = 308
68			收率 = 100% LCMS: MH^+ = 322

68.10			
68.11			
68.12			收率 = 99 MH ⁺ = 449
68.13			收率 = 95 MH ⁺ = 449
68.14			MH ⁺ = 266
68.15			收率 = quant. MH ⁺ = 314

制备例 69:

用 NCS (0.18g, 1.1eq.) 处理制备例 35 制备的化合物 (0.3g, 1.2mmol) 的乙腈 (15ml) 溶液并将所得溶液加热回流 4 小时。加入另

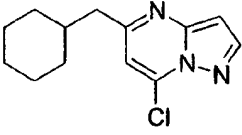
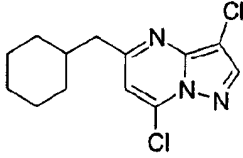
外的 NCS (0.032g, 0.2eq.) 并将所得溶液搅拌回流过夜。将反应混合物冷却至室温, 真空浓缩并将残余物通过快速色谱提纯, 用 20%EtOAc 的己烷溶液作为洗脱液 (0.28g, 83%收率)。LCMS: $MH^+ = 282$ 。

5 制备例 70:

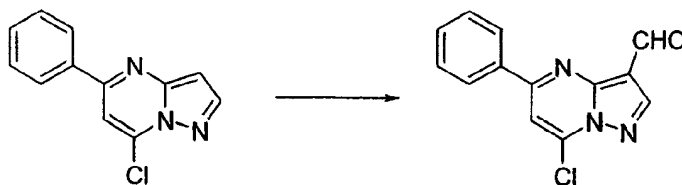
根据与制备例 69 基本相同的方法, 不过替代使用表 8 第 2 栏中的化合物, 制得表 8 第 3 栏中的化合物:

表 8

10

制备例	栏2	栏3	数据
70			收率 = 82% LCMS: $MH^+ = 286$

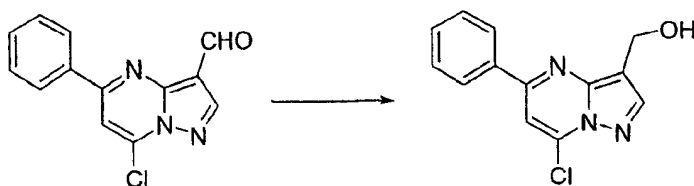
制备例 71:



15 向制备例 34 得到的化合物 (1.0g, 4.35mmol) 的 DMF (6ml) 溶液中加入 $POCl_3$ (1.24ml, 3.05eq.) 并将所得混合物在室温下搅拌过夜。将反应混合物冷却至 $0^\circ C$ 并加入冰以骤冷过量的 $POCl_3$ 。用 1N NaOH 中和所得溶液, 用水稀释, 用二氯甲烷萃取。合并的有机物用硫酸钠干燥, 过滤并真空浓缩。粗产物用快速色谱法提纯, 用 5% 甲醇的二氯

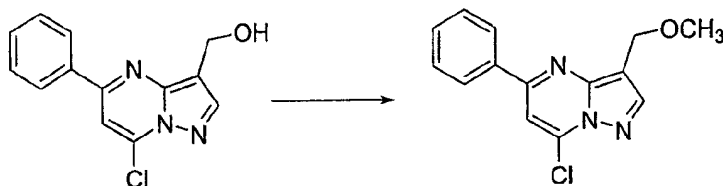
20 甲烷溶液作为洗脱液 (0.95g, 85%收率)。LCMS: $MH^+ = 258$ 。

制备例 72:



向制备例 71 的产物 (0.25g, 0.97mmol) 的 THF 溶液中加入 NaBH_4 (0.041g, 1.1eq.) 并将所得溶液在室温下搅拌过夜。加水骤冷反应混合物并用二氯甲烷萃取。合并的有机物用硫酸钠干燥, 过滤, 并减压浓缩。粗产物通过快速色谱法提纯, 用 60: 40 己烷: EtOAc 混合物作为洗脱液 (0.17g, 收率 69%)。LCMS: $\text{MH}^+=260$ 。

制备例 73:

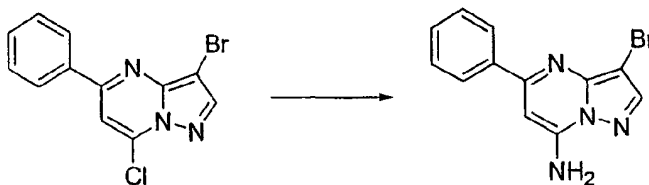


10

将制备例 72 制得的化合物 (0.12g, 0.462mmol)、硫酸二甲酯 (0.088ml, 2.0eq)、50% NaOH (0.26ml) 和催化的 Bu_4NBr 的二氯甲烷 (4ml) 溶液在室温下搅拌过夜。用水稀释反应混合物并用二氯甲烷萃取。合并的有机物用硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩。粗产物用快速色谱法提纯, 使用 30% 乙酸乙酯的己烷溶液作为洗脱液 (0.062g, 48% 收率)。

15

制备例 74:



将制备例 54 制得的化合物 (3.08g, 10.0mmol)、2.0M NH_3 的 2-丙醇 (50ml, 100.0mmol) 和 37% NH_3 水溶液 (10.0ml) 在密封的压力

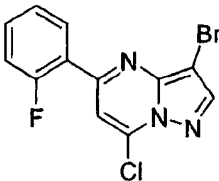
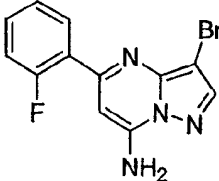
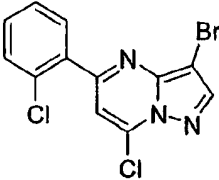
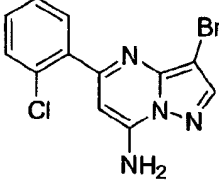
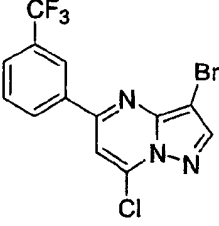
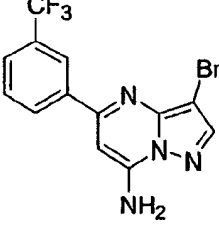
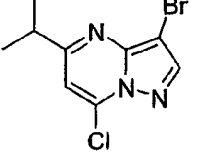
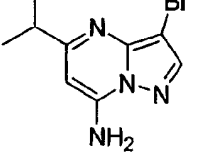
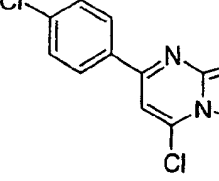
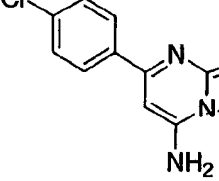
20

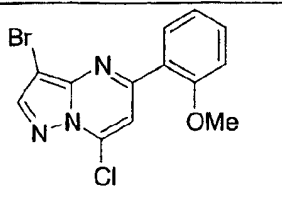
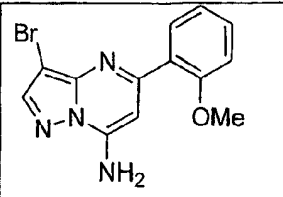
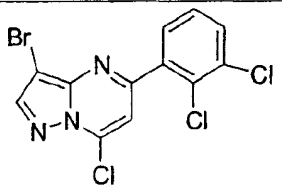
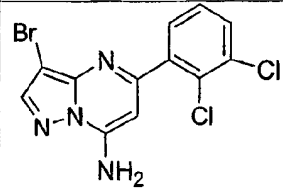
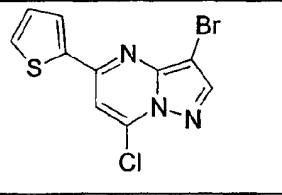
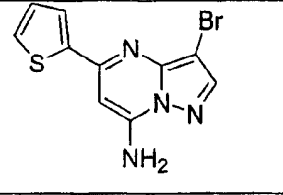
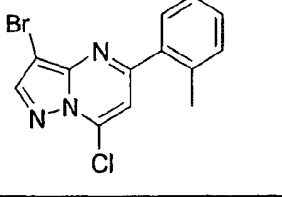
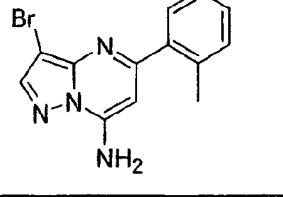
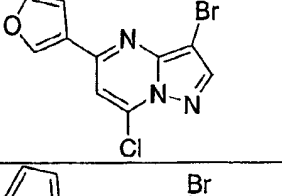
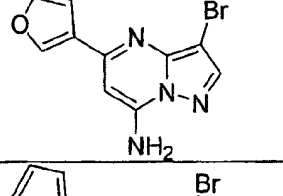
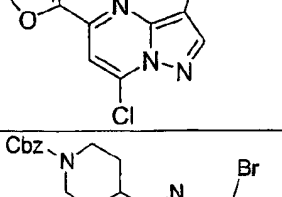
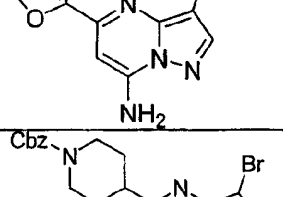
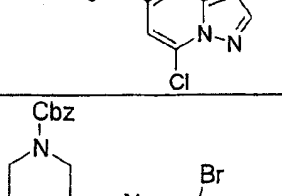
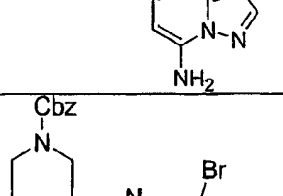
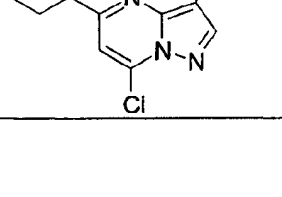
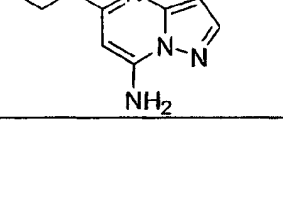
容器中在 50℃ 搅拌 1 天。蒸发溶剂并将残余物用快速色谱法提纯，用 3: 1 二氯甲烷: 乙酸乙酯为洗脱剂。得到浅黄色固体 (2.30g, 80%)。LCMS: $M^+ = 289$ 。

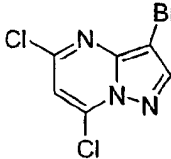
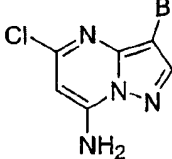
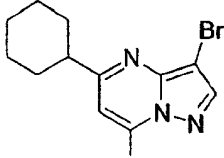
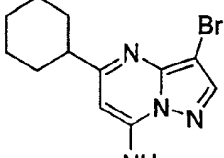
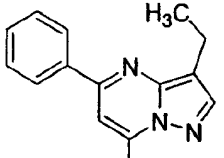
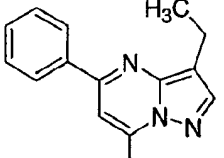
5 制备例 75-90:

根据与制备例 74 基本相同的方法，不过替代使用表 8.10 第 2 栏中的化合物，制得表 8.10 第 3 栏中的化合物：

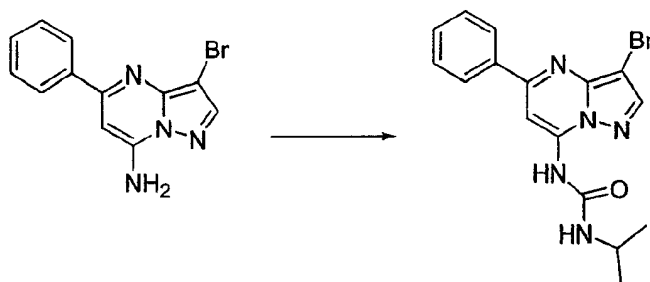
表 8.10

制备例	栏2	栏3
75		
76		
77		
78		
79		

80		
81		
82		
83		
84		
85		
86		
87		

88		
89		
90		

实施例 1:



5 向制备例 74 制得的化合物 (15mg, 0.05mmol) 的 DMF (2ml) 溶液中加入 DMAP (1.0mg) 和异氰酸异丙酯 (30 μ l)。将反应混合物在 60 $^{\circ}$ C 加热 20 小时, 冷却至室温并分配在乙酸乙酯 (20ml) 和水 (20ml) 中。除去有机层, 用 Na₂SO₄ 干燥并浓缩, 得到膜状的产物。膜用反向 HPLC 提纯, 得到为无色固体的终产物。MS: m/z=289.1。

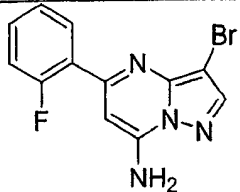
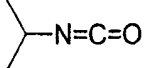
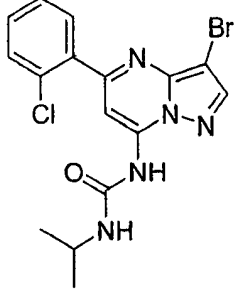
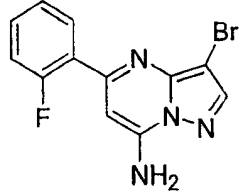
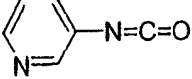
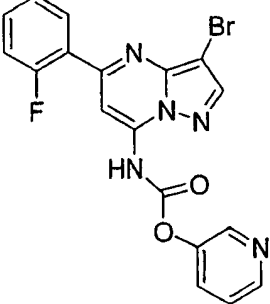
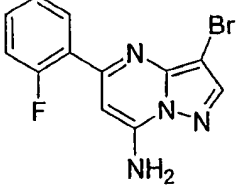
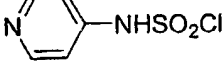
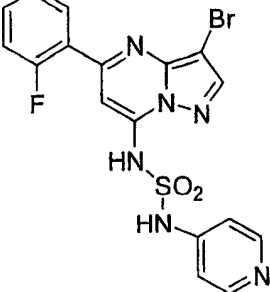
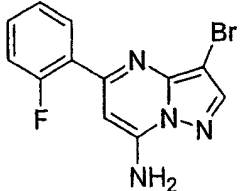
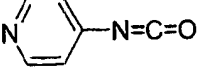
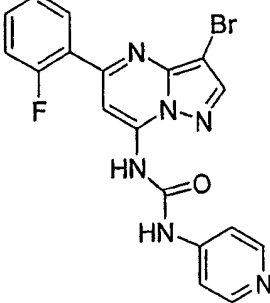
10

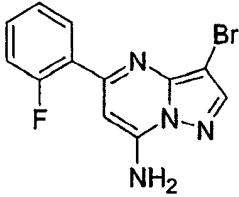
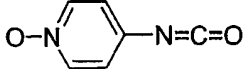
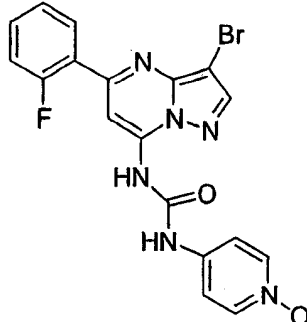
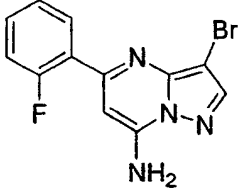
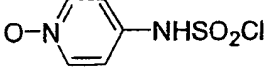
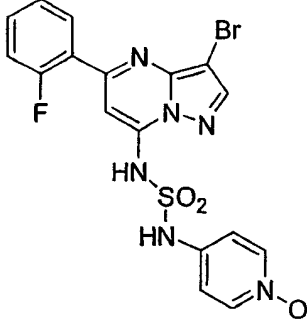
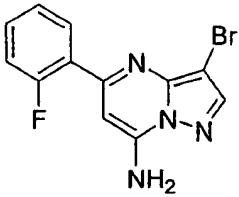
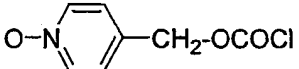
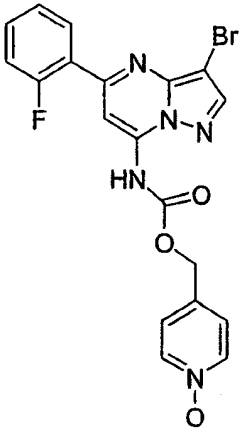
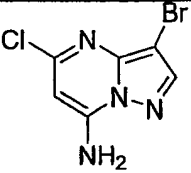
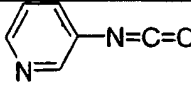
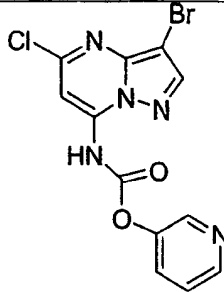
实施例 2-13:

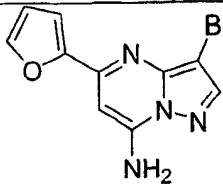
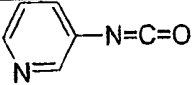
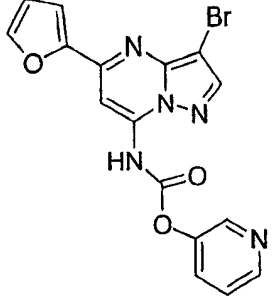
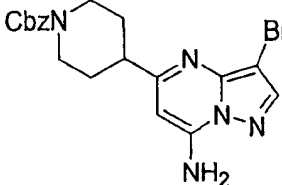
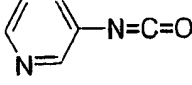
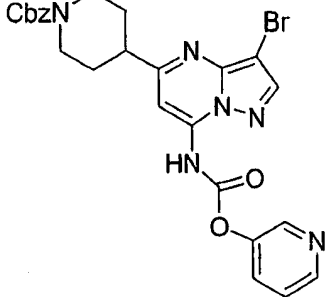
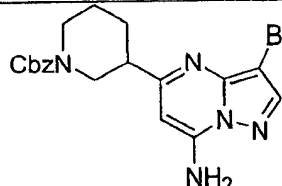
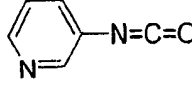
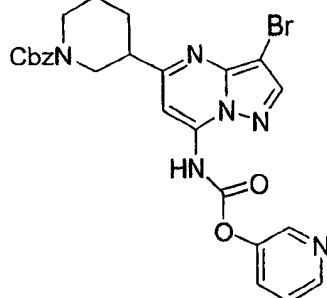
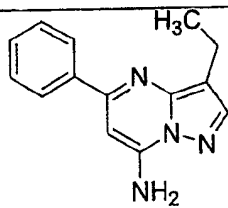
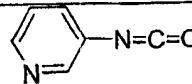
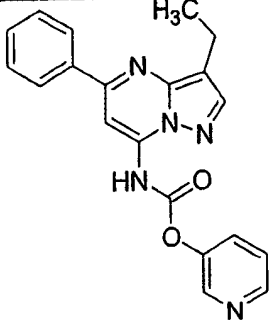
用与实施例 1 基本相同的方法, 不过替代使用表 9 第 2 栏中的化合物, 和适合的酰化或磺化试剂, 一些解释性具体实例见表 9 第 3 栏, 可制得本发明公开的化合物, 一些解释性实例见表 9 第 4 栏。

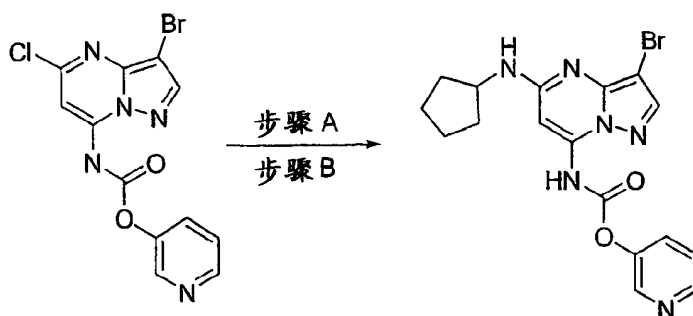
15

表 9

实施例	栏2	栏3	栏4
2			 ms: m/z = 323.1
3			
4			
5			

6			
7			
8			
9			

10			
11			
12			
13			

实施例 14:步骤 A:

- 5 在室温下，向实施例 9 制得的化合物的二噁烷/DIPEA (2.5/1.0) 溶液中滴加环戊基胺 (1.2eq.)。将所得溶液回流搅拌 16 小时，冷却至室温并减压浓缩。粗产物用制备薄层色谱法 (8 x 1000 μ M) 提纯。

步骤 B:

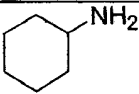
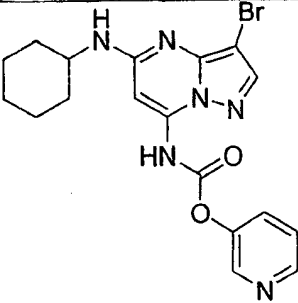
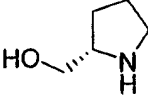
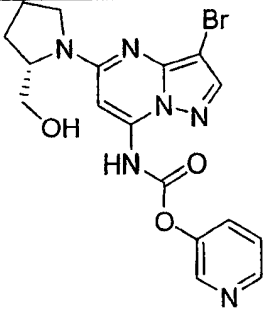
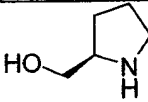
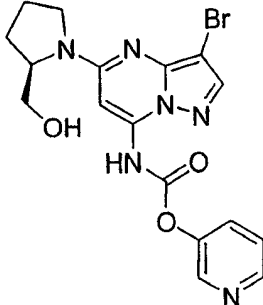
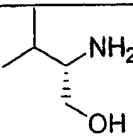
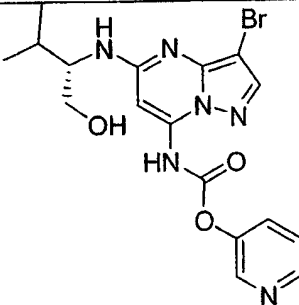
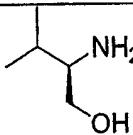
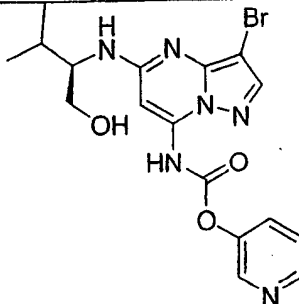
- 10 在室温下，向实施例 14 步骤 A 制得的化合物的 CH_2Cl_2 溶液中滴加 TFA (5eq.)。得到的溶液在室温下搅拌 18 小时，并减压浓缩。将粗产物再溶解在 CH_2Cl_2 中，有机层依次用饱和 NaHCO_3 水溶液 (2 x 2ml) 和盐水 (1 x 2ml) 洗涤。干燥有机层 (Na_2SO_4)，过滤并减压浓缩。粗产物用制备薄层色谱法 (8 x 1000 μ M) 提纯。

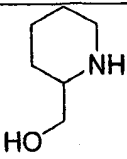
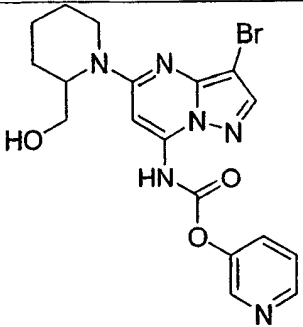
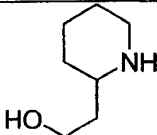
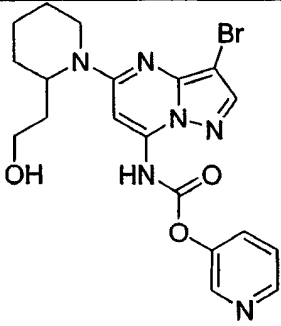
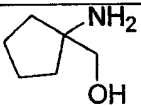
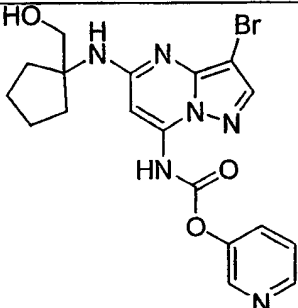
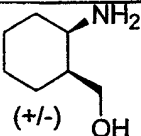
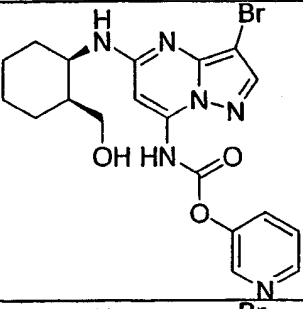
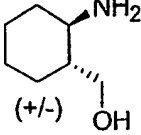
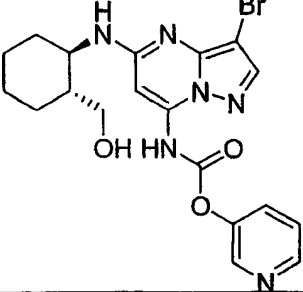
15

实施例 15-24:

用与实施例 48 基本相同的方法，不过替代使用表 10 第 2 栏中的氯化物，制得表 10 第 3 栏中的化合物：

表 10

实施例	栏2	栏4
15		
16		
17		
18		
19		

20		
21		
22		
23		
24		

试验：可按本领域技术人员已知的方法对本发明公开的化合物进行分析。代表性的试验如下。

杆状病毒构建：在末端氨基添加 5 个组氨酸残基，使其能在镍树脂上提纯，通过 PCR 将细胞周期蛋白 E 克隆为 pVL1393 (Pharmingen, La Jolla, California)。该表达蛋白为大约 45kDa。在末端羧基 (YDVDPDYAS) 添加血细胞凝集素附加表位，通过 PCR 将 CDK2 克隆为 pVL1393。该表达蛋白长短约为 34kDa。

酶的制备：在相等多重性感染下 (MOI=5)，将表达细胞周期蛋白 E 和 CDK2 的重组杆状病毒协同感染到 SF9 细胞中 48 小时。在 1000 RPM 下离心 10 分钟收获细胞，然后，使用所得粉末体积 5 倍的溶胞缓冲液，将所得粉末在冰上溶胞 30 分钟，所述溶胞缓冲液含有 50mM Tris pH8.0、150mM NaCl、1% NP40、1mM DTT 和蛋白酶抑制剂 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)。使溶胞产物在 15000RPM 下离心 10 分钟，将保留了 5ml 镍珠 (对于 1 升 SF9 细胞) 的上清液在溶胞缓冲液 (Qiagen GmbH, Germany) 中洗涤三次。将咪唑加入到杆状病毒上清液中，使最终浓度为 20mM，然后在 4℃ 下用镍珠培养 45 分钟。将蛋白质用含有 250mM 咪唑的溶胞缓冲液洗脱。将洗脱液在 2 升激酶缓冲液中透析过夜，所述激酶缓冲液含有 50mM Tris pH8.0、1mM DTT、10mM MgCl₂、100μM 原钒酸钠和 20%甘油。将酶在 -70℃ 等分贮藏。

体外激酶试验：在低蛋白结合 96-孔板 (Corning Inc, Corning, New York) 中进行细胞周期蛋白 E/CDK2 激酶试验。在激酶缓冲液中稀释酶至最终浓度为 50μg/ml，所述激酶缓冲液含有 50mM Tris pH 8.0、10mM MgCl₂、1mM DTT 和 0.1mM 原钒酸钠。这些反应中使用的底物是衍生于组蛋白 H1 (购自 Amersham, UK) 的生物素化肽。将底物在冰上融化，并在激酶缓冲液中稀释至 2μM。将化合物在 10% DMSO 中稀释至所需浓度。对于各激酶反应，将 20μl 50μg/ml 酶溶液 (1μg 酶) 和 20μl 2μM 底物溶液混合，然后与各孔中 10μl 稀释的试验化合物混合。加入 50μl 2μM ATP 和 0.1μCi 33P-ATP (购自 Amersham, UK)，开始激酶反应。反应在室温进行 1 小时。加入 200μl 终止缓冲液 15 分钟，使反应终止，所述终止缓冲液含有 0.1% Triton X-100、1mM ATP、5mM EDTA 和 5mg/ml 链霉抗生物素包被的 SPA 珠 (购自 Amersham, UK)。然后，使用 Filtermate 通用捕获器 (Packard/Perkin Elmer Life Sciences)，

将 SPA 珠捕获至 96-孔 GF/B 滤板(Packard/Perkin Elmer Life Sciences)上。依次用 2M NaCl 和含 1%磷酸的 2M NaCl 各洗涤珠两次,以消除非特异性信号。使用 TopCount 96 孔液体闪烁计数器(购自 Packard/Perkin Elmer Life Sciences),测定放射性信号。

- 5 IC₅₀ 测定: 由 8 点系列抑制化合物稀释液(各一式两份)产生抑制数据,根据这些数据绘制剂量响应曲线。用化合物浓度对%激酶活性作图,用处理样品的 CPM 除以未经处理样品的 CPM 来计算%激酶活性。为了得到 IC₅₀ 值,使剂量响应曲线拟合标准 S 形曲线,并通过非线性回归分析法获得 IC₅₀ 值。
- 10 虽然本发明已连同上述具体实施方案一起进行了描述,但是,许多替换方法、改良方法和其它变更方法对本领域技术人员而言是显而易见的。所有这些替换方法、改良方法和其它变更方法都被认为落入本发明的精神实质和范围内。