

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2017年6月8日 (08.06.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/092635 A1

(51) 国际专利分类号:

C07D 401/14 (2006.01) A61P 35/02 (2006.01)
C07D 471/04 (2006.01) A61P 31/18 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2016/107455

(22) 国际申请日: 2016年11月28日 (28.11.2016)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201510856641.1 2015年11月30日 (30.11.2015) CN

(71) 申请人: 甘李药业股份有限公司 (GAN&LEE PHARMACEUTICALS) [CN/CN]; 中国北京市通州区中关村科技园区通州园金桥科技产业基地景盛北三街8号, Beijing 101102 (CN)。

(72) 发明人: 尹磊 (YIN, Lei); 中国北京市通州区中关村科技园区通州园金桥科技产业基地景盛北三街8号, Beijing 101102 (CN)。 刘文剑 (LIU, Wenjian); 中国北京市通州区中关村科技园区通州园金桥科技产业基地景盛北三街8号, Beijing 101102 (CN)。 李恒 (LI, Heng); 中国北京市通州区中关村科技园区通州园金桥科技产业基地景盛北三街8号,

Beijing 101102 (CN)。 朱殿玺 (ZHU, Dianxi); 中国北京市通州区中关村科技园区通州园金桥科技产业基地景盛北三街8号, Beijing 101102 (CN)。

(74) 代理人: 北京市英智伟诚知识产权代理事务所 (普通合伙) (INNOWISE INTELLECTUAL PROPERTY LAW OFFICE); 中国北京市海淀区中关村南大街甲6号铸诚大厦B座708室刘丹妮, Beijing 100086 (CN)。

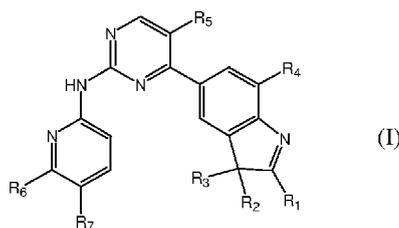
(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,

[见续页]

(54) Title: PROTEIN KINASE INHIBITOR, PREPARATION METHOD AND MEDICAL USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种蛋白激酶抑制剂及其制备方法和医药用途



(57) Abstract: The present invention provides compounds as shown in formula I or a tautomer, a mesomer, a racemate, an enantiomer, a diastereomer, a deuterated compound, a prodrug or a mixture thereof, or a pharmaceutically acceptable salt or solvate of the compounds as shown in formula I or a tautomer, a mesomer, a racemate, an enantiomer, a diastereomer, a deuterated compound, a prodrug or a mixture thereof, wherein R1 to R7 are as defined in the description. The present invention also provides a preparation method and a medical use of the compounds. The compounds of the present invention have an activity superior or equivalent to the candidate drug LY2835219 currently under phase III clinical trial, and some of the compounds exhibit better selectivity. Moreover, the preferred compounds exhibit good absorption and good blood-brain distribution when administered orally. The compounds of the present invention thus show promise for development into novel drugs for the treatment of diseases associated with cell proliferation, particularly brain tumors, providing new options for clinicians and patients.

(57) 摘要: 本发明提供一种结构式 I 所示的化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、氘代化合物, 前药或其混合物形式, 或结构式 I 所示的化合物、其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、氘代化合物, 前药或其混合物的药学上可以接受的盐或溶剂化物, 其中 R1~R7 如文中定义。本发明还提供所述化合物的制备方法和医药用途。本发明所述的化合物活性优于或与目前处于 III 期临床试验的候选药物 LY2835219 相当, 部分化合物表现出更好的选择性。而且优选的化合物口服吸收良好、血脑分布好, 预示着本发明的化合物有希望被开发成新的治疗细胞增殖相关疾病的药物, 尤其是脑瘤, 为临床医生和患者提供新的选择。



WO 2017/092635 A1

RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, **本国际公布:**
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, — 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
TG)。

根据细则 4.17 的声明:

- 发明人资格(细则 4.17(iv))

一种蛋白激酶抑制剂及其制备方法和医药用途

相关申请的交叉引用

本申请要求 2015 年 11 月 30 日提交的第 CN201510856641.1 号中国发明专利的优先权，所述申请以引用的方式整体并入本文。

技术领域

本发明属于医药领域，具体涉及一系列具有蛋白激酶抑制作用的取代 2-(吡啶-2-基)氨基嘧啶类化合物及其制备方法和医药用途。

10

背景技术

细胞周期是细胞生命活动的重要部分，在正常的细胞生长过程中，细胞周期进程的实现有赖于各级调控因子对细胞周期精确而严密的调控。这些调控因子的核心是细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶(Cyclin Dependent Kinase, CDK) 及其正、负性调控因子——细胞周期蛋白(Cyclin) 和细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶抑制剂(CDI)。细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶和细胞周期蛋白形成的 CDK-Cyclin 复合物，参与细胞的生长、增殖、休眠或者进入凋亡。细胞周期的过程中，细胞周期蛋白周期性连续的表达和降解，并分别结合到由它们瞬时活化的 CDK 上，通过 CDK 活性，催化不同底物磷酸化，实现对细胞周期不同时相的推进和转化作用。

目前 CDK 家族已经发现了 13 个成员，分别是 CDK1-CDK13；其中 CDK1、CDK2、CDK3、CDK4 和 CDK6 与调节细胞增殖有关，CDK7、CDK8、CDK9、CDK11、CDK12 和 CDK13 参与调控转录。

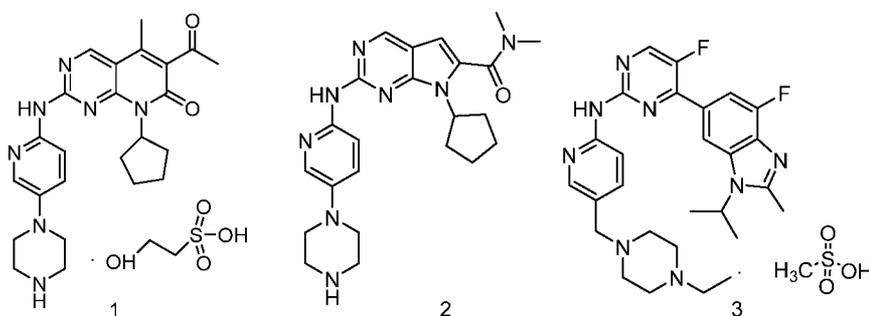
Cyclin 分为 A-L，不同的 CDK 分别连接不同亚型的 Cyclin。其中，Cyclin D 家族(Cyclin D1, D2, D3)，在 G1 期开始表达，结合并激活 CDK4 和 CDK6，形成 CDK4/6-Cyclin D 复合物，使包括视网膜母细胞瘤蛋白(Retinoblastomaprotein, Rb)在内的一系列底物磷酸化。Rb 磷酸化后释放与其结合并被其抑制的蛋白，主要是转录因子 E2F 等，E2F 激活并转录进入 S 期所必须的一些基因(马珂，CDK4/6 抑制剂抗肿瘤作用研究进展，《国外医药·抗生素分册》，2013, 34(5): 197-202)。如果由于各种因素使平衡被打破，无论是促进细胞增殖的信号增强，或者是抑制细胞增殖的信号减弱到某种程度，细胞增殖都会失控，进而出现肿瘤。研究发现，大约 80% 的人类肿瘤中存在 Cyclin D-CDK4/6-INK4-Rb 通路的异常(1. Malumbres M, Barbacid M., To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer[J]. Nature Reviews Cancer, 2001, 1(3):222; 2. Shapiro GI., Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment[J]. J Clinical Oncology, 2006, 24(11):1770)。这条通路的改变，加速了 G1 期进程，使得肿瘤细胞增殖加快而获得生存优势。因此，对其的干预成为一种治疗策略，CDK4/6 因此成为潜在的抗肿瘤的靶点之一。

CDK4/6 作为抗肿瘤靶点的优势在于：(1)大多数增殖的细胞依赖 CDK2 或者 CDK4/6 增殖，但 CDK4/6 的抑制剂不表现出“泛-CDK 抑制剂”的细胞毒性，如骨髓抑制和肠道反应。(2)临床前实验表明，如果细胞 Cyclin D 水平升高或者 p16INK4a 失活，能够增加细胞对药物的敏感性，由于肿瘤细胞相对于正常细胞存在上述现象，所以一定程度上增加了药物的靶向。

除了抑制肿瘤生长，也有 CDKs 抑制剂用于其它病症的治疗；如用于治疗心血管障碍，包括动脉粥样硬化、血管支架植入后再狭窄和其它由细胞异常增殖引起的心血管障碍；再如用于治疗真菌、原生动动物寄生虫（如恶性疟原虫）和 DNA 与 RNA 病毒感染引起的疾病，包括疟疾、艾滋病等。此外，还有研究发现 CDKs 抑制剂还可以用于自身免疫系统疾病（如牛皮癣、类风湿性关节炎、肾小球性肾炎和红斑狼疮等），抑制炎症细胞的增殖。

自 WO9811095 中公开了一系列具有细胞激酶抑制活性的 2-嘧啶胺类化合物后，基于这

样的母核结构, 现有技术陆续出现了很多具有 CDK4/6 抑制活性的化合物, 有的已经成为有希望的候选药物, 甚至进入临床 III 期试验阶段。如, 化合物 PD0332991 在 WO2003062236 中被公开, 又名 Palbociclib, 结构式如 1 所示, 由辉瑞公司开发。PD0332991 抑制 CDK4 和 CDK6 的 IC₅₀ 分别为 11 nmol/L 和 15 nmol/L; 而抑制 CDK2、CDK1 和 CDK5 的 IC₅₀ 则大于 10 μmol/L (Fry DW, Harvey PJ, Keller PR, et al. Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts[J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2004, 3(11): 1427)。诺华公司在研的化合物 LEE011(由 WO2011101409 公开), 结构式如 2 所示。化合物 LY2835219(由 WO2010075074 公开), 又名 Bemaciclib, 结构式如 3 所示; 据报道, 它对 CDK4 和 CDK6 的抑制 IC₅₀ 分别为 2 nmol/L 和 9.9 nmol/L (Lawrence M. G., S.F. Cai, X. Lin et al. Preclinical characterization of the CDK4/6 inhibitor LY2835219: in-vivo cell cycle-dependent/independent anti-tumor activities alone/in combination with gemcitabine[J]. Invest New Drugs, (2014), 32: 825)。目前 LY2835219 正在由礼来公司进行 III 期临床实验。



15 由于这些化合物的出现, CDK4/6 已经成为明确的抗肿瘤靶点。申请人也就一系列新的取代 2-(吡啶-2-基)氨基嘧啶类化合物提出过专利申请(申请号 201510708487.3, 申请日 2015 年 10 月 27 日), 这些化合物显示出选择性抑制 CDK4/6 的活性。

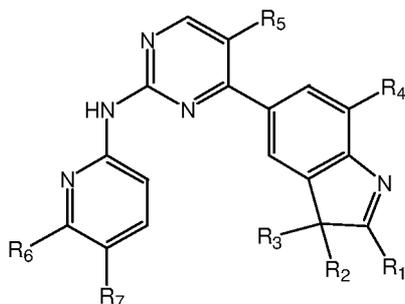
20 恶性肿瘤依然严重威胁人类的健康。研发出活性、选择性、生物利用度更好的 CDK4/6 抑制剂, 从而为临床提供更多治疗癌症等与细胞异常增殖相关疾病的新选择, 是十分必要和迫切的。

发明内容

25 针对上述问题, 本发明的一个目的在于提供一种新的取代 2-(吡啶-2-基)氨基嘧啶类化合物。本发明提供的化合物, 能够选择性抑制细胞周期蛋白激酶 CDK4/6, 使细胞停止在 G1 期, 从而可以用于治疗细胞增殖障碍性疾病。

为了达到上述技术效果, 本发明采用了如下的技术方案:

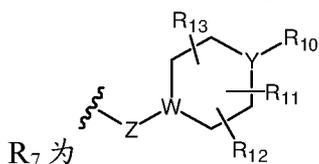
30 一方面, 本发明提供了一种结构式 I 的化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体, 氘代化合物, 前药或其混合物形式, 或结构式 I 的化合物、其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体, 氘代化合物, 前药或其混合物的药学上可以接受的盐或溶剂化物,



I

其中, R₁, R₂, R₃各自独立地选自氢原子、未被取代的 C₁-C₆的烃基或被一个或多个选自 C₁-C₆的烃基、C₃-C₆的环烷基、C₁-C₆的卤代烷基、C₁-C₆的烷氧基、羟基、卤素、氰基、-NR₈R₉、 $\text{—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CNR}_8\text{R}_9$ 、 $\text{—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CR}_8$ 、 $\text{—O—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CR}_8$ 或 $\text{—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{COR}_8$ 的取代基取代的 C₁-C₆的烃基;

- 5 或者 R₁, R₂, R₃中的任意两个与各自连接的 C 原子一起形成饱和或不饱和的 3-7 元环; R₄和 R₅各自独立地选自氢、卤素,且 R₄和 R₅中至少一个是卤素; R₆选自氢原子、C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、羟基或卤素;



R₇为 ; 其中, Z 是羰基、O、S、亚胺基、磺酰基或 $\text{—}(\text{CH}_2)_n\text{—}$, n=0-4 的整数; W 和 Y 各自独立地是 C、N、O 或 S, 但 W 和 Y 不能同时是 C, 且当 Z 是 O 或 S 10 时, W 是 C; R₁₀, R₁₁, R₁₂和 R₁₃各自独立地选自氢原子、C₁-C₆的烷基、C₃-C₆的环烷基、

C₁-C₆的羟基烷基、C₁-C₆的卤代烷基、C₁-C₆的烷氧基、羟基、卤素、氰基、-NR₈R₉、 $\text{—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CNR}_8\text{R}_9$ 、 $\text{—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CR}_8$ 、 $\text{—O—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CR}_8$ 或 $\text{—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{COR}_8$, 且 Y=N 时, R₁₀ 不能是 NH₂、-NHR₈、-NR₈R₉、 $\text{—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CNR}_8\text{R}_9$ 、 $\text{—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CR}_8$ 、 $\text{—O—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CR}_8$ 或 $\text{—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{COR}_8$;

- 15 或者, R₆和 R₇与其连接的 C 原子一起形成含一个或多个选自 N、O 或 S 的 5-7 元杂环, 并且所述 5-7 元杂环被一个或多个选自 C₁-C₆的烷基、C₃-C₆的环烷基、C₁-C₆的卤代烷基、C₁-C₆的烷氧基、C₁-C₆的羟基烷基、羟基、卤素、氰基、-NH₂、-NHR₈、-NR₈R₉、 $\text{—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CNR}_8\text{R}_9$ 、 $\text{—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CR}_8$ 、 $\text{—O—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{CR}_8$ 或 $\text{—}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{COR}_8$ 的取代基所取代;

其中, R₈和 R₉各自独立地选自氢原子、C₁-C₆的烷基、C₁-C₆的羟基烷基。

- 20 优选的, R₁, R₂, R₃各自独立地选自氢原子、未被取代的 C₁-C₆的烃基或被一个或多个选自 C₁-C₆的烃基、C₃-C₆的环烷基、C₁-C₆的卤代烷基、C₁-C₆的烷氧基、羟基或卤素的取代基取代的 C₁-C₆的烃基。

更优选的, R₁, R₂, R₃各自独立地选自氢原子、未被取代的 C₁-C₆的烃基或被一个或多个选自 C₁-C₆的烃基、羟基或卤素的取代基取代的 C₁-C₆的烃基。

进一步优选的, R₁, R₂, R₃各自独立地选自氢原子、未被取代的 C₁-C₆的直链或支链烷

基、未被取代的 C₂-C₄ 的直链或支链烯基。

最优的, R₁, R₂, R₃ 各自独立地选自氢原子、未被取代的 C₁-C₄ 的直链或支链烷基。
作为另一种优选的方式, R₂ 和 R₃ 与共同连接的 C 原子一起形成饱和或不饱和的 3-7 元环。

5 更优选的, R₂ 和 R₃ 与共同连接的 C 原子一起形成饱和的 3-7 元环。

优选的, R₄ 和 R₅ 各自独立地是氢、氟或氯, 且 R₄ 和 R₅ 中至少一个是氟或氯。

更优选的, R₄ 和 R₅ 各自独立地是氢或氟, 且 R₄ 和 R₅ 中至少一个是氟。

最优的, R₄ 是氢或氟, R₅ 是氟。

优选的, R₆ 选自氢原子或 C₁-C₆ 的烷基。

10 优选的, Z 是羰基、O 或 $-(\text{CH}_2)_n-$, n=0-4 的整数。

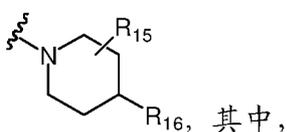
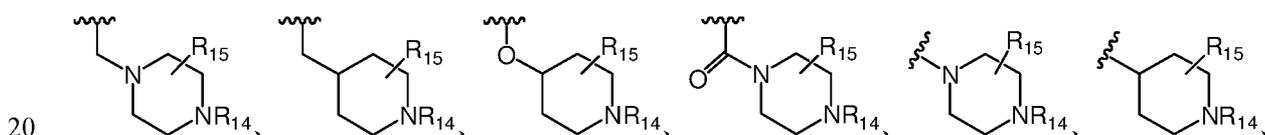
更优选的, Z 是 $-(\text{CH}_2)_n-$, n=0-2 的整数, 进一步优选的, n=0 或 1。

优选的, W 和 Y 各自独立地选自 C 或 N, 但 W 和 Y 不能同时是 C。

15 优选的, R₁₀、R₁₁、R₁₂ 和 R₁₃ 各自独立地选自氢原子、C₁-C₆ 的烷基、C₃-C₆ 的环烷基、C₁-C₆ 的羟基烷基、C₁-C₆ 的卤代烷基、C₁-C₆ 的烷氧基、羟基或 -NR₈R₉, 且 Y=N 时, R₁₀ 不能是 -NR₈R₉, R₈ 和 R₉ 各自独立地选自氢原子和 C₁-C₄ 的烷基。

更优选的, R₁₀、R₁₁、R₁₂ 和 R₁₃ 各自独立地选自氢原子、C₁-C₆ 的烷基、C₁-C₆ 的羟基烷基、C₁-C₆ 的卤代烷基、C₁-C₆ 的烷氧基或 -NR₈R₉, R₈ 和 R₉ 各自独立地选自氢原子和 C₁-C₄ 的烷基。

进一步优选的, R₇ 选自如下结构的取代基:



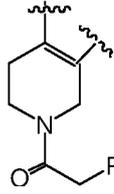
25 R₁₄ 和 R₁₅ 各自独立地选自氢原子、C₁-C₆ 的烷基、C₃-C₆ 的环烷基、C₁-C₆ 的卤代烷基、C₁-C₆ 的羟基烷基、C₁-C₆ 的烷氧基或羟基, R₁₆ 选自氢原子、C₃-C₆ 的环烷基、C₁-C₆ 的卤代烷基、C₁-C₆ 的羟基烷基、C₁-C₆ 的烷氧基、羟基或 -NR₈R₉, R₈ 和 R₉ 各自独立地选自氢原子和 C₁-C₄ 的烷基。

更优选的, R₁₄ 和 R₁₅ 各自独立地选自氢原子、C₁-C₆ 的烷基、C₃-C₆ 的环烷基、C₁-C₆ 的羟基烷基, R₁₆ 选自氢原子、C₁-C₆ 的烷基、C₃-C₆ 的环烷基、C₁-C₆ 的羟基烷基或 -NR₈R₉, R₈ 和 R₉ 各自独立地选自氢原子和 C₁-C₄ 的烷基。

30 作为另一种优选的方式, R₆ 和 R₇ 与其连接的 C 原子一起形成含一个或多个选自 N、O 或 S 的 6 元杂环。

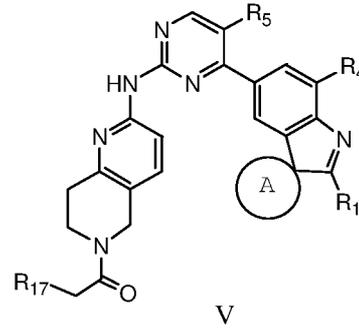
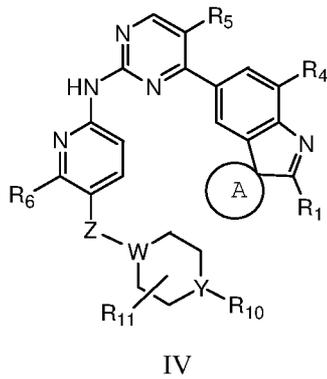
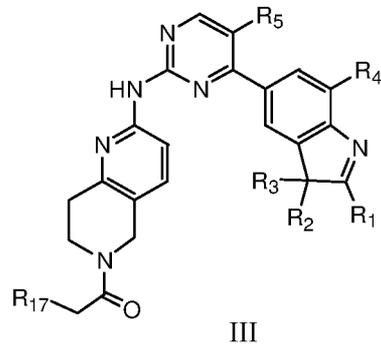
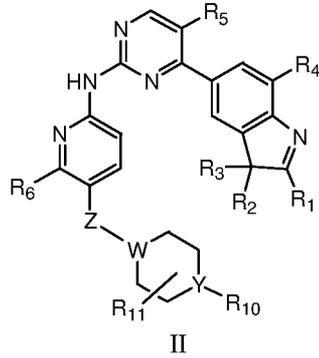
更优选的, R₆ 和 R₇ 与其连接的 C 原子一起形成含一个 N 的 6 元杂环。

进一步优选的, R₆ 和 R₇ 与其连接的 C 原子一起形成如下的化学结构:



其中 R₁₇ 选自羟基或 C₁-C₃ 的烷氧基；进一步优选为羟基。

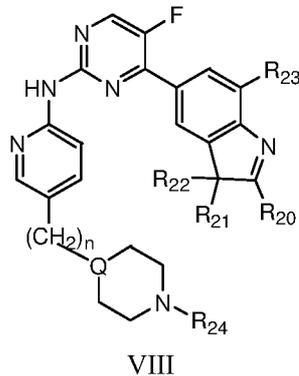
5 作为优选实施方式，本发明还提供结构式 II、III、IV 或 V 的化合物或各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体，氘代化合物，前药或其混合物形式，或所述结构式 II、III、IV 或 V 的化合物、各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体，氘代化合物，前药或其混合物的药学上可以接受的盐或溶剂化物，



其中，Z、W、Y、R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₁₀、R₁₁ 和 R₁₇ 的定义如前，A 环为饱和的 3-7 元环。

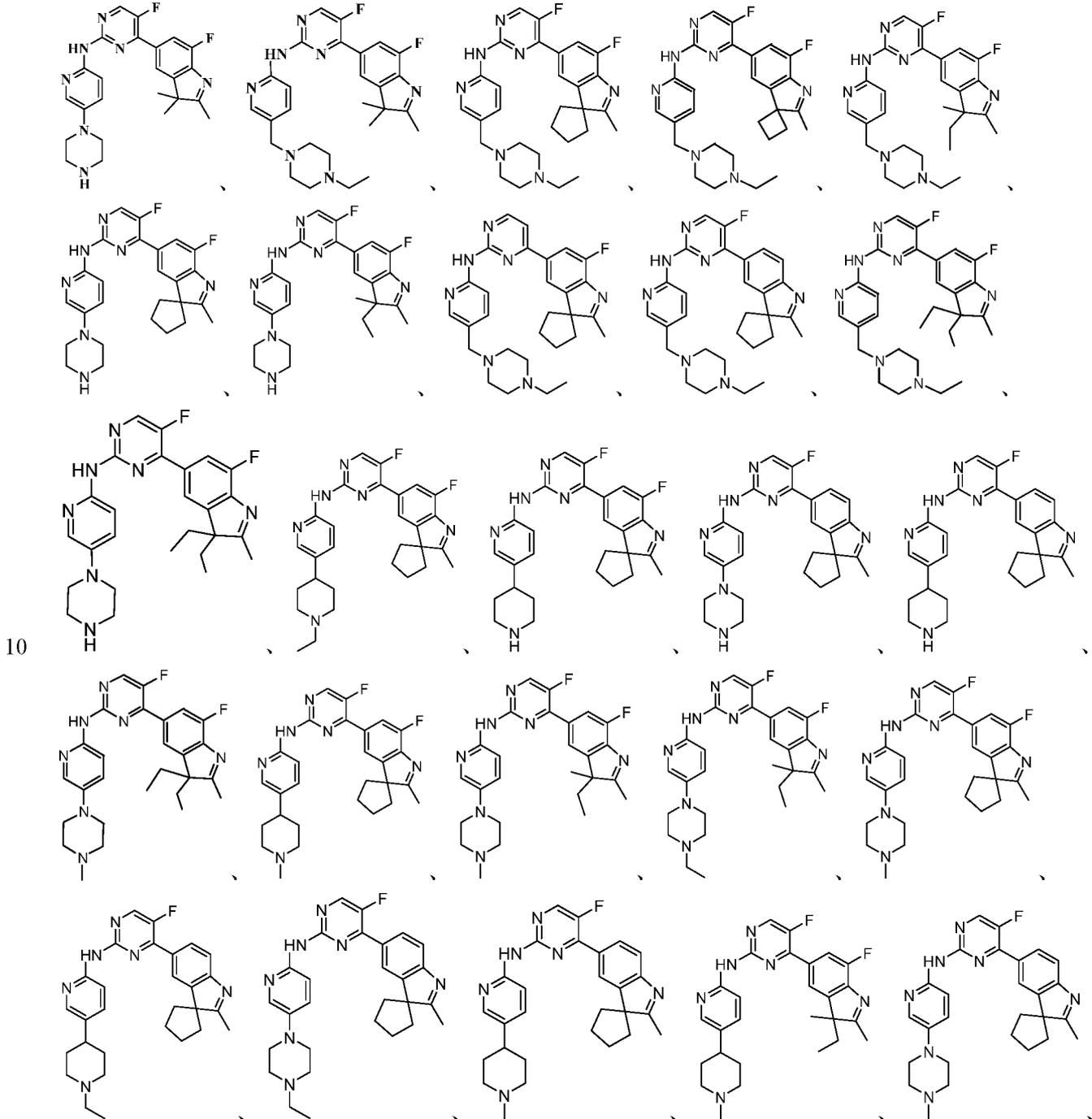
10 优选的，A 环为饱和 3-6 元环。

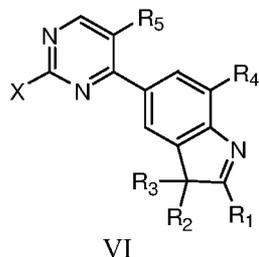
更优选的，本发明提供结构式 VIII 的化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体，氘代化合物，前药或其混合物形式，或所述结构式 VIII 的化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体，氘代化合物，前药或其混合物的药学上可以接受的盐或溶剂化物，



其中，R₂₀、R₂₁、R₂₂各自独立地选自C₁-C₄的烷基，或者R₂₀为C₁-C₄的烷基，R₂₁和R₂₂与其共同连接的C原子形成5-6元饱和环；R₂₃选自氢或氟；n=0或1；R₂₄选自氢、C₁-C₄的烷基或C₁-C₄的羟基烷基；Q为C或N。

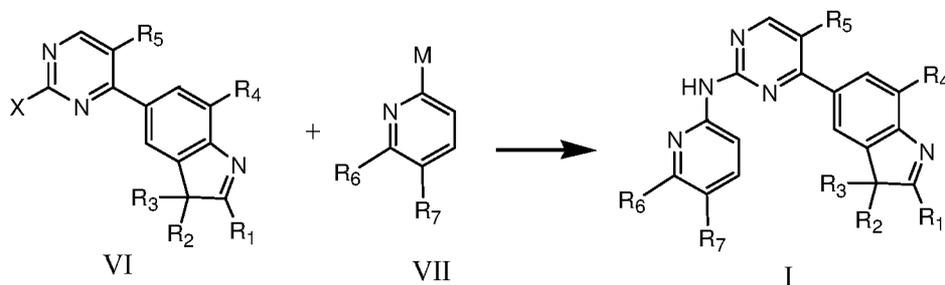
5 作为更优选的实施方式，本发明提供如下结构的化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体，氘代化合物，前药或其混合物形式，或所述化合物、其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体，氘代化合物，前药或其混合的药学上可以接受的盐或溶剂化物：





其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_5 的定义如前，X 为离去基团或氨基。
优选的，X 是卤素或氨基，更优选是氟、溴、氯或氨基。

- 5 又一方面，本发明提供结构式 I 的化合物的制备方法，包括结构式 VI 和结构式 VII 的化合物在溶剂中，经钯催化偶联反应得到结构式 I 的化合物，



其中， R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 的定义如前，X 和 M 各自独立地为离去基团或氨基，X 和 M 中只能有一个且必须有一个为氨基；

- 10 优选的，所述离去基团为卤素；

更优选的，所述离去基团为氟、溴或氯。

其中，上述制备方法还可以包括脱保护基。

其中，上述制备方法还可以包括产物分离、精制，所述分离和/或精制可以采用通常有机合成中采用的方法，例如过滤、萃取、洗涤、浓缩、层析等适当组合进行。

15

再一方面，本发明提供结构式 I-V 和 VIII 的化合物或其各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体，氘代化合物，前药或其混合物形式，或所述结构式 I-V 和 VIII 的化合物或其各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体，氘代化合物，前药或其混合物的药学上可以接受的盐或溶剂化物在制备用于治疗细胞增殖障碍性疾病的药物制剂中的用途。

20

优选的，所述药物制剂包括药学上可以接受的辅料。

优选的，所述细胞增殖障碍性疾病是指哺乳动物或人的癌症，更优选的是指人的癌症，包括恶性实体瘤和恶性非实体瘤，具体包括但不限于乳腺癌、肺癌、前列腺癌、白血病、脑癌、胃癌、胶质瘤等。

25

优选的，所述细胞增殖障碍性疾病还可以是指艾滋病、动脉粥样硬化、血管支架植入后再狭窄。

30

优选的，上述用途是指所述结构式 I-V 和 VIII 的化合物或其各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体，氘代化合物，前药或其混合物形式，或所述结构式 I-V 和 VIII 的化合物或其各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体，氘代化合物，前药或其混合物的药学上可以接受的盐或溶剂化物作为唯一活性成分或联合其它具有生物活性的物质在制备用于治疗细胞增殖障碍性疾病的药物制剂中的用途。

所述其它具有生物活性的物质包括但不限于抗癌剂、免疫抑制剂、抗病毒剂等。其中，

所述抗癌剂选自烷化剂(如环磷酰胺、异环磷酰胺、塞替派、司莫司汀、盐酸氮芥、白消安、苯丁酸氮芥、苯丙氨酸氮芥、硝卡芥、氮甲、卡莫司汀、洛莫司汀、六甲蜜胺、二溴甘露醇、替莫唑胺等), 抗代谢类抗肿瘤药(阿糖胞苷、氟尿嘧啶、甲氨喋呤、羟基脲、替加氟、甲异脞、巯嘌呤等), 铂络合剂(如顺铂、卡铂、奥沙利铂等), 抗生素类抗肿瘤药(放线菌素 D、丝裂霉素、阿霉素、平阳霉素、表柔比星、吡柔比星、柔红霉素、博来霉素等), 天然来源抗肿瘤药(高三尖杉酯碱及其衍生物、长春新碱及其衍生物、羟基树碱及其衍生物、依托泊苷及其衍生物、长春地辛及其衍生物、长春碱及其衍生物、重酒石酸长春瑞宾、紫杉醇及其衍生物、秋水仙碱及其衍生物、榄香烯及其衍生物等), 激素类抗肿瘤药(如氨鲁米特、他莫昔芬、地塞米松、度他雄胺、氟他胺、戈那瑞林、醋酸亮丙瑞林、来曲唑等), VEGFR 或 EGFR 抑制剂(如舒尼替尼、索拉非尼、伊马替尼、吉非替尼、埃罗替尼、凡德替尼、帕唑帕尼、拉帕替尼、卡奈替尼、阿法替尼、木利替尼、达沙替尼、来那替尼等), 抗体抗肿瘤药(如曲妥单抗、帕妥珠单抗、利妥昔单抗、帕尼单抗、贝伐单抗、伊匹单抗、奥法木单抗、雷莫卢单抗等), mTOR 抑制剂(如依维莫司、西罗莫司、佐他莫司等), 治疗脑瘤类用药替莫唑胺等。

15

还一方面, 本发明提供一种用于治疗细胞增殖障碍性疾病的组合产品, 所述组合产品包括选自结构式 I-V、VIII 的化合物或其各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体, 氘代化合物, 前药或其混合物形式, 结构式 I-V、VIII 的化合物或其各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体, 氘代化合物, 前药或其混合物形式的药学上可以接受的盐或溶剂化物中的一种或多种。

20

优选地, 所述药物产品还包括药学可以接受的辅料。和/或所述组合产品为试剂盒。

另一方面, 本发明还提供一种治疗细胞增殖障碍性疾病的方法, 包括对患有所述细胞增殖障碍性疾病的患者通过口服或非口服途径给予有效剂量的本发明所述化合物或上述组合产品。

25

优选的, 上述治疗细胞增殖障碍性疾病的方法, 包括对所述患者通过口服或非口服途径给予有效剂量的本发明所述化合物和所述其它具有生物活性的物质。所述其它具有生物活性的物质包括但不限于抗癌剂、免疫抑制剂、抗病毒剂等。其中, 所述抗癌剂选自烷化剂(如环磷酰胺、异环磷酰胺、塞替派、司莫司汀、盐酸氮芥、白消安、苯丁酸氮芥、苯丙氨酸氮芥、硝卡芥、氮甲、卡莫司汀、洛莫司汀、六甲蜜胺、二溴甘露醇、替莫唑胺等), 抗代谢类抗肿瘤药(阿糖胞苷、氟尿嘧啶、甲氨喋呤、羟基脲、替加氟、甲异脞、巯嘌呤等), 铂络合剂(如顺铂、卡铂、奥沙利铂等), 抗生素类抗肿瘤药(放线菌素 D、丝裂霉素、阿霉素、平阳霉素、表柔比星、吡柔比星、柔红霉素、博来霉素等), 天然来源抗肿瘤药(高三尖杉酯碱及其衍生物、长春新碱及其衍生物、羟基树碱及其衍生物、依托泊苷及其衍生物、长春地辛及其衍生物、长春碱及其衍生物、重酒石酸长春瑞宾、紫杉醇及其衍生物、秋水仙碱及其衍生物、榄香烯及其衍生物等), 激素类抗肿瘤药(如氨鲁米特、他莫昔芬、地塞米松、度他雄胺、氟他胺、戈那瑞林、醋酸亮丙瑞林、来曲唑等), VEGFR 或 EGFR 抑制剂(如舒尼替尼、索拉非尼、伊马替尼、吉非替尼、埃罗替尼、凡德替尼、帕唑帕尼、拉帕替尼、卡奈替尼、阿法替尼、木利替尼、达沙替尼、来那替尼等), 抗体抗肿瘤药(如曲妥单抗、帕妥珠单抗、利妥昔单抗、帕尼单抗、贝伐单抗、伊匹单抗、奥法木单抗、雷莫卢单抗等), mTOR 抑制剂(如依维莫司、西罗莫司、佐他莫司等), 治疗脑瘤类用药替莫唑胺等。

30

35

40

所述口服或非口服途径可以为通过口服、注射、贴片、喷雾和其他已知的一种或多种递送给所述患者。所述有效量可以包括对治疗、降低、缓和、减轻、消除或 1 状况的一种或多种症状有效的量, 所述状况寻求被治疗, 或可选地, 所述状况寻求被避免, 或另外在所述状

45

况或其效果中产生临床上可确认的有利变化。

又一方面,本发明提供一种用于治疗细胞增殖障碍性疾病的化合物或其各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体,氘代化合物,前药或其混合物形式,或所述化合物或其各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体,氘代化合物,前药或其混合物形式的药学上可以接受的盐或溶剂化物,所述化合物的结构式选自结构式 I-V 和 VIII 中的一种或多种;

优选的,所述细胞增殖障碍性疾病是指哺乳动物或人的癌症,更优选的是指人的癌症,包括恶性实体瘤和恶性非实体瘤,具体包括但不限于乳腺癌、肺癌、前列腺癌、白血病、脑癌、胶质瘤和胃癌。和/或

所述细胞增殖障碍性疾病选自艾滋病、动脉粥样硬化和血管支架植入后再狭窄中的一种或多种。

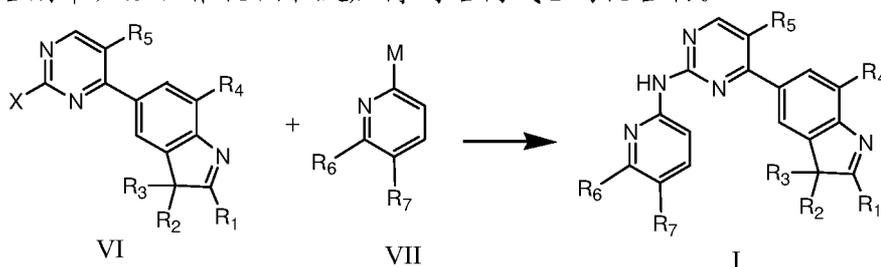
本发明的说明书中,如无特殊说明,所述“C₁-C₆烷基”指的是 C₁-C₆的直链或支链烷基;“C₁-C₄烷基”指的是 C₁-C₄的直链或支链烷基,优选为甲基、乙基、丙基或异丙基。所述“C₁-C₆烷氧基”,指的是 C₁-C₆的直链或支链烷氧基,优选为 C₁-C₄的直链或支链烷氧基,进一步优选为甲氧基、乙氧基、丙氧基或 2-甲基乙氧基。所述“C₃-C₆环烷基”,指的是未取代或 C₁-C₄烷基、C₁-C₄烷氧基取代的 C₃-C₆的环烷基,优选为未取代或 C₁-C₄烷基、C₁-C₄烷氧基取代的 C₃-C₆的环烷基,进一步优选为环丙烷、环丁烷、甲基环丙烷、环戊烷或环己烷。所述“卤素”,指的是溴,氯或氟。所述“C₁-C₆卤代烷基”指的是溴取代,氯取代或氟取代 C₁-C₆的直链或支链烷基,优选为氯取代或氟取代 C₁-C₄的直链或支链烷基,进一步优选为一氟代甲基、二氟代甲基、三氟代甲基、一氯代甲基、二氯代甲基、三氯代甲基、1-氟乙基、1-氯丙基、1-氯乙基、1-氯丙基。

现有研究认为,CDKs 抑制剂的毒性主要与其抑制 CDK1 和其它蛋白激酶有关,如由同名的原癌基因编码的苏氨酸/丝氨酸激酶 Pim-1。因此,作为 CDKs 抑制剂类化合物,希望其对 CDK4/CDK6 和 CDK1 以及其它激酶的作用差异越显著越好,即选择性抑制 CDK4/CDK6。本发明提供的化合物其活性优于或与目前处于 III 期临床试验的候选药物 LY2835219 相当,部分化合物表现出更好的激酶选择性。而且优选的化合物(实施例 17 制备)口服吸收良好、血脑分布好。上述结果预示着本发明的化合物有希望被开发成新的治疗细胞增殖相关疾病,尤其是恶性肿瘤(特别是脑癌)的药物。

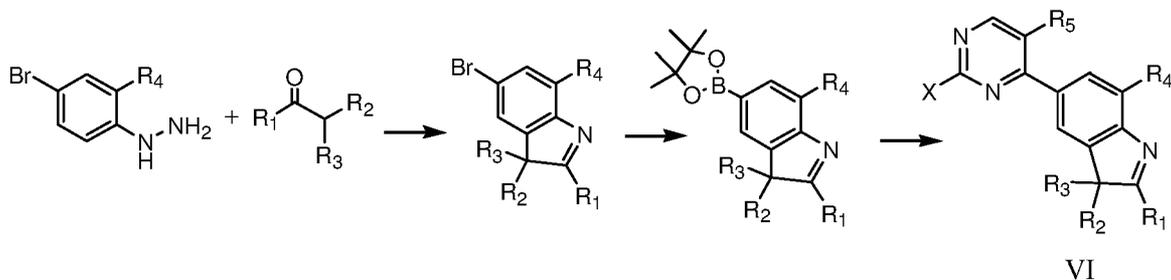
具体实施方式

以下参照具体的实施例来说明本发明。本领域技术人员能够理解,这些实施例仅用于说明本发明,其不以任何方式限制本发明的范围。

本发明所述的结构式 VI 的化合物是合成结构式 I 的化合物的关键中间体,其和结构式 VII 的化合物在溶剂中,经钨催化偶联反应得到结构式 I 的化合物。



结构式 VI 的化合物可以通过如下的反应路线合成:



其中， R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 的定义如前， X 为离去基团或氨基。

优选的， R_1 、 R_2 、 R_3 各自独立地选自氢原子、未被取代的 C_1 - C_6 的烷基或被一个或多个选自 C_1 - C_6 的烷基、羟基或卤素的取代基取代的 C_1 - C_6 的烷基。

5 更优选的， R_1 、 R_2 、 R_3 各自独立地选自氢原子、未被取代的 C_1 - C_6 的直链或支链烷基、未被取代的 C_2 - C_4 的直链或支链烯基。

进一步优选的， R_1 、 R_2 、 R_3 各自独立地选自氢原子、未被取代的 C_1 - C_4 的直链或支链烷基。

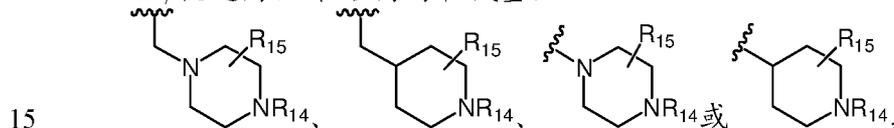
10 或者，作为另一种优选的方式， R_1 如前所述， R_2 和 R_3 与共同连接的C原子一起形成饱和和或不饱和的3-7元环；更优选的， R_2 和 R_3 与共同连接的C原子一起形成饱和的3-7元环。

优选的， R_4 和 R_5 各自独立地是氢或氟，且 R_4 和 R_5 中至少一个是氟。

X 优选为卤素或氨基，更优选为氟、溴、氯或氨基。

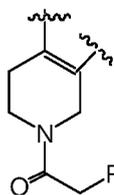
R_6 优选为氢原子或 C_1 - C_4 的烷基。

R_7 优选为如下结构的取代基：



其中， R_{14} 和 R_{15} 各自独立地选自氢原子、 C_1 - C_4 的烷基、 C_1 - C_4 的羟基烷基。

10 或者，作为另一个优选的实施方式， R_6 和 R_7 与其连接的C原子一起形成如下的化学结构：



其中 R_{17} 选自羟基或 C_1 - C_3 的烷氧基；进一步优选为羟基。

20 下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。下述实施例中所用的化学原料、试剂等，如无特殊说明，均为市售购买产品。

本发明实施例中出现的缩略语及其含义如下所示：

PE: 石油醚

25 EA: 乙酸乙酯

DCM: 二氯甲烷

MeOH: 甲醇

Pd(dppf) Cl_2 : [1,1'-双(二苯基磷)二茂铁]二氯化钯

Pd(PPh $_3$) $_4$: 四(三苯基磷)钯

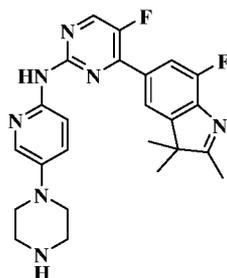
30 Pd $_2$ (dba) $_3$: 三(二亚苺基丙酮)二钯

NaHB(OAc) $_3$: 三乙酰氧基硼氢化钠

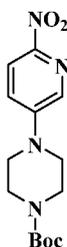
LHMDS: 六甲基二硅基胺基锂

DAPI: DAPI 荧光染料

实施例 1 5-氟-4-(7-氟-2,3,3-三甲基-3H-吡啶-5-基)-N-(5-(哌嗪-1-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基



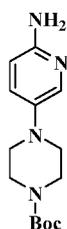
5 步骤 1 4-(6-硝基吡啶-3-基)哌嗪-1-羧基叔丁酯



向反应瓶中加入 5-溴-2-硝基吡啶(5.0g, 24.63mmol), 哌嗪-1-羧基叔丁酯 (5.04g, 27.09mmol), 乙腈(30mL), 二异丙基乙胺(4.77g, 36.94mmol), 回流反应 2 h, 旋干溶剂, 柱色谱分离(PE/EA=1:1 至 DCM / MeOH = 20:1), 得到标题化合物 3.8g (黄色固体)。

10 MS (ESI): mass calcd. for $C_{14}H_{20}N_4O_4$ 308.1, m/z found 309.1[M+H]⁺.

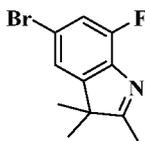
步骤 2 4-(6-氨基吡啶-3-基)哌嗪-1-羧基叔丁酯



向反应瓶中加入步骤 1 制备的 4-(6-硝基吡啶-3-基)哌嗪-1-羧基叔丁酯(0.92g, 3.0mmol), 乙酸乙酯/甲醇(10mL/10mL), Pd/C(0.1g), 通入氢气室温反应 2 小时, 过滤, 浓缩, 得到标题化合物 792mg (类白色固体)。

15 MS (ESI): mass calcd. for $C_{14}H_{22}N_4O_2$ 278.2, m/z found 279.2 [M+H]⁺.

步骤 3 5-溴-7-氟-2,3,3-三甲基-3H-吡啶的合成

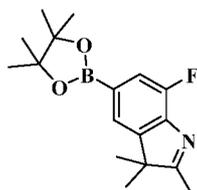


20 向反应瓶中加入(4-溴-2-氟苯)胍盐酸盐 (1.0g, 4.14mmol), 醋酸(10ml), 3-甲基-2-丁酮 (0.32g, 4.14mmol), 然后回流反应 5 小时, 旋干溶剂, 加入 20ml 水, 用乙酸乙酯萃取三次, 每次 20ml, 合并有机相, 然后用 25ml 饱和氯化钠水溶液洗涤一次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干, 柱色谱分离(DCM:MeOH=50:1 - 25:1), 得到标题化合物 420mg(黄色固体)。

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ7.23-7.21 (m, 2H), 2.30 (s, 3H), 1.32 (s, 6H).

MS (ESI): m/z 258.0 [M+H]⁺.

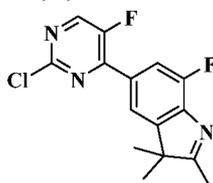
25 步骤 4 7-氟-2,3,3-三甲基-5-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼酸-2-基)-3H-吡啶的合成



5 向反应瓶中加入步骤 1 制备的 5-溴-7-氟-2,3,3-三甲基-3H-吲哚(400.0mg, 1.56mmol), 4,4',4',5,5,5,5'-八甲基-2,2'-双(1,3,2-二氧杂环戊硼烷) (436.5mg, 1.71mmol), 乙酸钾(306.3mg, 3.12mmol), 二氧六环(10ml), Pd(dppf)Cl₂ (228.7mg, 0.32mmol), 氮气保护, 加热至 90°C, 反应过夜; 混合物冷却至室温, 过滤, 加入 10ml 水, 用乙酸乙酯萃取三次, 每次 20ml; 合并乙酸乙酯有机相, 用 25ml 饱和食盐水洗涤一次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 硅胶柱色谱分离(DCM:MeOH=50:1 - 30:1), 得到标题化合物 306.5mg(黄色油状物)。

MS (ESI): m/z 304.1 [M+H]⁺.

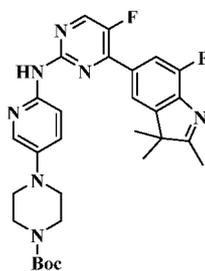
步骤 5 5-(2-氯-5-氟嘧啶-4-基)-7-氟-2,3,3-三甲基-3H-吲哚的合成



10 向微波反应瓶中加入步骤 2 制备的 7-氟-2,3,3-三甲基-5-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼酸-2-基)-3H-吲哚(300mg, 0.99mmol), 2,4-二氯-5-氟嘧啶(181.8mg, 1.08mmol), 磷酸钾(419.8mg, 1.98mmol), 二氧六环/水(4mL/1mL), Pd(PPh₃)₄ (114.5mg, 0.09mmol), 氮气保护, 在 130°C 下微波反应 1 小时; 冷却至室温, 过滤, 加入 10ml 水, 用二氯甲烷萃取三次, 每次 15ml; 15 合并二氯甲烷有机相, 用 20ml 饱和氯化钠水溶液洗涤一次, 然后用无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干, 硅胶柱色谱分离(DCM:MeOH=100:1 - 50:1), 得到标题化合物 301.2mg(黄色固体)。

MS (ESI): mass calcd. for C₁₅H₁₂ClF₂N₃ 307.1, m/z found 308.1 [M+H]⁺.

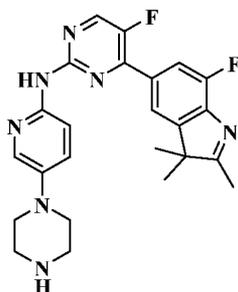
步骤 6 4-(6-((5-氟-4-(7-氟-2,3,3-三甲基-3H-吲哚-5-基)嘧啶-2-基)氨基)吡啶-3-基)哌嗪-1-羧基叔丁酯的合成



20 向反应瓶中加入步骤 5 制备的 5-(2-氯-5-氟嘧啶-4-基)-7-氟-2,3,3-三甲基-3H-吲哚 (150.0mg, 0.48mmol), 步骤 2 制备的 4-(6-氨基吡啶-3-基)哌嗪-1-羧基叔丁酯(135.8mg, 0.48mmol), 碳酸铯(371.6mg, 0.96mmol), 二氧六环(3ml), Pd₂(dba)₃ (44.7mg, 0.05mmol), 4,5- 25 双二苯基膦-9,9-二甲基氧杂蒽 (30.4mg, 0.05mmol), 氮气保护, 加热至 150°C, 微波反应 1 小时, 冷却至室温; 过滤, 加入 10ml 水, 用二氯甲烷萃取三次, 每次 10ml, 合并有机相, 用 30ml 饱和氯化钠水溶液洗涤一次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 硅胶柱色谱分离 (DCM / MeOH = 50:1), 得到标题化合物 53.4mg(黄色固体)。

MS (ESI): mass calcd. for C₂₉H₃₃F₂N₇O₂ 549.3, m/z found 550.3 [M+H]⁺.

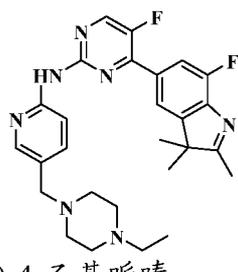
30 步骤 7 5-氟-4-(7-氟-2,3,3-三甲基-3H-吲哚-5-基)-N-(5-(哌嗪-1-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基三氟乙酸盐的合成



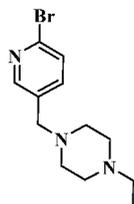
5 向反应瓶中加入步骤 6 制备的 4-(6-((5-氟-4-(7-氟-2,3,3-三甲基-3H-咪唑-5-基)嘧啶-2-基)氨基)吡啶-3-基)哌嗪-1-羧基叔丁酯(30.0mg, 0.054mmol), 二氯甲烷(4ml), 三氟乙酸(1ml), 室温搅拌反应 2 小时; 旋干溶剂, 用饱和碳酸氢钠水溶液调 pH 到 8, 用二氯甲烷萃取三次,

10 每次 5ml, 合并有机相, 用 10ml 饱和氯化钠水溶液洗涤一次, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干, 硅胶柱色谱分离(DCM / MeOH = 20:1), 得到标题化合物 10.5mg(黄色固体).
 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ 9.75 (br s, 1H), 8.65 (d, 1H, $J=3.2\text{Hz}$), 8.02-7.94 (m, 3H), 7.82 (d, 1H, $J=10.8\text{Hz}$), 7.43 (d, 1H, $J=8.8\text{Hz}$), 3.09-3.02 (m, 4H), 2.84-2.83 (m, 4H), 2.31(s, 3H), 1.34 (s, 6H).
 MS (ESI): mass calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{F}_2\text{N}_7$ 449.50, m/z found 450.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

实施例 2 N-(5-((4-乙基哌嗪-1-基)甲基)吡啶-2-基)-5-氟-4-(7-氟-2,3,3-三甲基-3H-咪唑-5-基)嘧啶-2-氨基



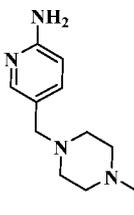
15 步骤 1 1-((6-溴吡啶-3-基 yl)甲基)-4-乙基哌嗪



向反应瓶中加入 2-溴-5 醛基吡啶(1.5g, 8.15 mmol), 1-乙基哌嗪(0.93g, 8.15 mmol), 二氯甲烷(15 mL), 然后分批加入 $\text{NaHB}(\text{OAc})_3$ (2.58g, 12.23 mmol)。室温反应过夜, 过滤, 浓缩, 柱色谱分离(DCM / MeOH = 100:1 - 10:1), 得到标题产物 1.64g (黄色油状物)。

20 MS (ESI): mass calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{BrN}_3$ 285.1, m/z found 286.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

步骤 2 5-((4-乙基哌嗪-1-基)甲基)吡啶-2-氨基

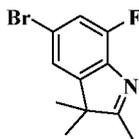


25 向反应瓶中加入步骤 1 制备的 1-((6-溴吡啶-3-基 yl)甲基)-4-乙基哌嗪 (2.84g, 10mmol), 2-(二环己基膦基)联苯(700mg, 2mmol), $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (915mg, 1mmol), 甲苯(30mL), 氮气保护下加入 LHMDS(1N)(20ml, 20mmol). 该混合物加热到 80°C 反应过夜, 然后冷却到室温, 过滤,

浓缩，柱色谱分离 (DCM / MeOH = 100:1 - 10:1)，得到标题产物 1.52g (褐色固体)。

MS (ESI): mass calcd. for $C_{13}H_{21}N_3$ 220.2, m/z found 221.2 $[M+H]^+$.

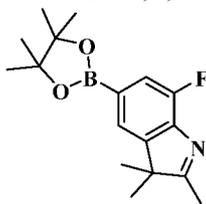
步骤 3 5-溴-7-氟-2,3,3-三甲基-3H-吲哚的合成



- 5 向反应瓶中加入(4-溴-2-氟苯)肼(900.0mg, 3.73mmol)，乙酸(5mL)，3-甲基丁基-2-酮(353.3mg, 4.09mmol)，回流反应 5 小时；旋干溶剂，加入 10ml 水，用乙酸乙酯萃取三次，每次 20ml，合并有机相，有机相用 25ml 饱和氯化钠水溶液洗涤一次，无水硫酸钠干燥，过滤，旋干，硅胶柱色谱分离(乙酸乙酯:石油醚=1:50 - 1:25)，得到标题化合物 910mg(黄色固体)。

10 MS (ESI): m/z 258.0 $[M+H]^+$.

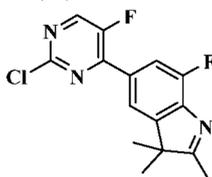
步骤 4 7-氟-2,3,3-三甲基-5-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼酸-2-基)-3H-吲哚的合成



- 15 向反应瓶中加入按照步骤 3 所述方法制备的 5-溴-7-氟-2,3,3-三甲基-3H-吲哚(1.0g, 3.91mmol)，4,4,4',4',5,5,5',5'-八甲基-2,2'-双(1,3,2-二氧杂硼烷)(1.09g, 4.29mmol)，醋酸钾(770mg, 7.82mmol)，二氧六环(10ml)，Pd(dppf)Cl₂(570mg, 0.78mmol)，氮气保护，升温至 90°C 过夜反应，然后冷却至室温，过滤，加入 10ml 水稀释，用乙酸乙酯萃取三次，每次 20ml。合并有机相，有机相用 25ml 饱和食盐水洗涤一次，硫酸钠干燥，过滤，旋干，硅胶柱色谱分离(EA:PE=1:100- 1:20)，得到标题化合物 1.02g(黄色油状物)。

20 MS (ESI): m/z 304.2 $[M+H]^+$.

步骤 5 5-(2-氯-5-氟嘧啶-4-基)-7-氟-2,3,3-三甲基-3H-吲哚的合成

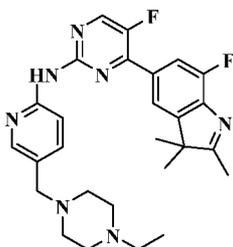


- 25 向微波反应瓶中加入步骤 4 制备的 7-氟-2,3,3-三甲基-5-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼酸-2-基)-3H-吲哚(1.0g, 3.30mmol)，2,4-二氯-5 氟嘧啶(610mg, 3.63mmol)，磷酸钾(1.39g, 6.60mmol)，二氧六环/水(8mL/2mL)，Pd(PPh₃)₄(380mg, 0.33mmol)，氮气保护，在 130°C 下微波反应 1 小时；冷却至室温，过滤，加入 10ml 水，用二氯甲烷萃取三次，每次 15ml，合并有机相，有机相用 20ml 饱和食盐水洗涤一次，用无水硫酸钠干燥，过滤，浓缩，硅胶柱色谱分离(EA:PE=1:50 - 1:10)，得到标题化合物 290.0mg(黄色固体)。

MS (ESI): m/z 308.1 $[M+H]^+$.

步骤 6 N-(5-((4-以及嘧啶-1-基)甲基)吡啶-2-基)-5-氟-4-(7-氟-2,3,3-三甲基-3H-吲哚-5-基)

- 30 嘧啶-2-氨基的合成

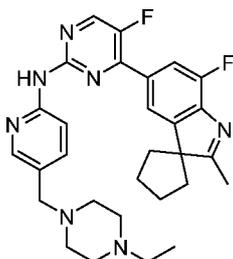


5 向反应瓶中加入步骤 5 制备的 5-(2-氯-5-氟嘧啶-4-基)-7-氟-2,3,3-三甲基-3H-吲哚 (290.0mg, 0.94mmol), 步骤 2 制备的 5-((4-乙基哌嗪-1-基)甲基)吡啶-2-氨基(228.6mg, 1.04mmol), 磷酸钾(400.5mg, 1.88mmol), 二氧六环 10ml, Pd₂(dba)₃ (86.4mg, 0.09mmol), 4,5-双二苯基膦-9,9-二甲基氧杂蒽 (109.2mg, 0.19mmol), 氮气保护, 升温至 150°C 微波反应 1 小时; 混合物冷却至室温, 过滤, 加入 10ml 水稀释, 用二氯甲烷萃取三次, 每次 10ml, 合并有机相; 有机相用 30ml 饱和食盐水洗涤一次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干, 硅胶柱色谱分离(二氯甲烷: 甲醇=30: 1), 得到标题化合物 140.3mg(黄色固体)。

10 ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8.72 (s, 1H), 8.49 (d, 1H, J=3.2Hz), 8.38 (d, 1H, J=8.4Hz), 8.31 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.73 (d, 1H, J=8.4Hz), 3.52 (s, 2H), 2.54-2.41 (m, 10H), 2.38 (s, 3H), 1.40 (s, 6H), 1.10 (t, 3H, J=7.2Hz).

MS (ESI): m/z 492.2 [M+H]⁺.

15 实施例 3 N-(5-((4-乙基哌嗪-1-基)甲基)吡啶-2-基)-5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)嘧啶-2-氨基

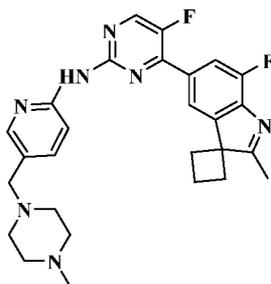


按照实施例 2 中相似的步骤得到标题化合物。

20 ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ 9.75 (s, 1H), 8.54 (d, 1H, J=3.2Hz), 8.38-8.37 (m, 2H), 7.94 (s, 1H), 7.87(d, 1H, J=10.8Hz), 7.68(d, 1H, J=8.4Hz), 3.49 (s, 2H), 2.99-2.39 (m, 10H), 2.37 (s, 3H), 2.14-2.08 (m, 6H), 1.87-1.84 (m, 2H), 1.06(t, 3H, J=6.4Hz).

MS (ESI): m/z 518.3 [M+H]⁺.

实施例 4 氮-(5-((4-乙基哌嗪-1-基)甲基)吡啶-2-基)-5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环丁烷-1,3'-吡啶]-5'-基)氨基嘧啶-2-氨基

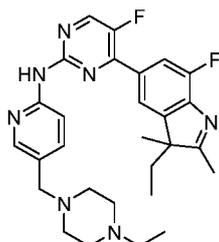


25 按照实施例 2 中相似的步骤得到标题化合物。

30 ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8.36-8.32 (m, 2H), 8.23 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.78-7.75 (m, 2H), 7.71 (d, 1H, J=8.4Hz), 5.84-5.83 (m, 1H), 5.63-5.62 (m, 1H), 4.39-4.38 (m, 1H), 3.66-3.64 (m, 1H), 3.51 (s, 2H), 3.06-3.00 (m, 1H), 2.71-2.38 (m, 11H), 1.55 (s, 3H), 1.11(t, 3H, J=7.2Hz).

MS (ESI): m/z 504.3 [M+H]⁺.

实施例 5 4-(3-乙基-7-氟-2,3-二甲基-3H-咪唑-5-基)-N-(5-((4-乙基哌嗪-1-基)甲基)吡啶-2-基)-5-氟嘧啶-2-氨基

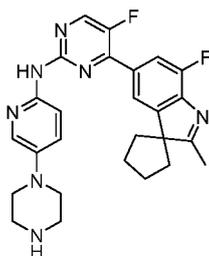


5 按照实施例 2 中相似的步骤得到标题化合物。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 8.71 (s, 1H), 8.49 (d, 1H, $J=3.6\text{Hz}$), 8.38 (d, 1H, $J=8.4\text{Hz}$), 8.31 (s, 1H), 7.94 (d, 1H, $J=11.2\text{Hz}$), 7.86 (s, 1H), 7.72 (dd, 1H, $J=8.0, 1.2\text{Hz}$), 3.52 (s, 2H), 2.53-2.41 (m, 10H), 2.34 (s, 3H), 2.06-1.93 (m, 1H), 1.91-1.84 (m, 1H), 1.39 (s, 3H), 1.09 (t, 3H, $J=7.2\text{Hz}$), 0.50 (t, 3H, $J=7.2\text{Hz}$).

10 MS (ESI): m/z 506.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

实施例 6 5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-咪唑]-5'-基)-氮-(5-(哌嗪-1-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基



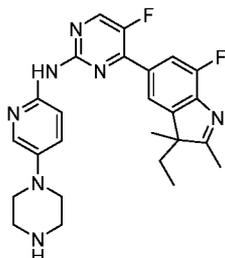
15 按照实施例 1 中相似的步骤得到标题化合物。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 8.67 (br s, 1H), 8.44 (d, 1H, $J=3.6\text{Hz}$), 8.29 (d, 1H, $J=9.2\text{Hz}$), 8.11(d, 1H, $J=2.4\text{Hz}$), 7.95 (s, 1H), 7.89 (d, 1H, $J=10.8\text{Hz}$), 7.36 (dd, 1H, $J=9.2, 2.8\text{Hz}$), 3.12-3.06 (m, 8H), 2.39 (s, 3H), 2.16-2.10 (m, 6H), 1.89-1.86 (m, 2H).

MS (ESI): m/z 476.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

20

实施例 7 4-(3-乙基-7-氟-2,3-二甲基-3H-咪唑-5-基)-5-氟-氮-(5-(哌嗪-1-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基

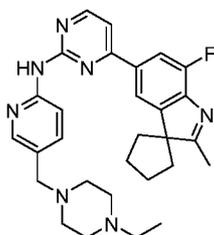


按照实施例 1 中相似的步骤得到标题化合物。

25 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 9.33 (br s, 1H), 8.46 (d, 1H, $J=3.6\text{Hz}$), 8.28 (d, 1H, $J=8.8\text{Hz}$), 8.16 (d, 1H, $J=2.4\text{Hz}$), 7.90 (d, 1H, $J=10.8\text{Hz}$), 7.82 (s, 1H), 7.35 (dd, 1H, $J=8.8\text{Hz}, 2.8\text{Hz}$), 3.10-3.03 (m, 8H), 2.31 (s, 3H), 2.03-1.80 (m, 3H), 1.36 (s, 3H), 0.47 (t, 6H, $J=7.6\text{Hz}$).

MS (ESI): m/z 464.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

30 实施例 8 氮-(5-((4-乙基哌嗪-1-基)甲基)吡啶-2-基)-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-咪唑]-5'-基)嘧啶-2-氨基

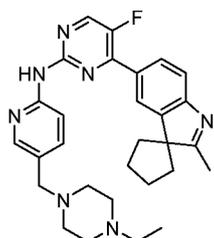


按照实施例 2 中相似的步骤得到标题化合物。

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8.83 (s, 1H), 8.61 (d, 1H, J=5.2Hz), 8.49 (d, 1H, J=8.8Hz), 8.32 (d, 1H, J=1.2Hz), 7.91 (d, 1H, J=1.2Hz), 7.78 (d, 1H, J=10.8Hz), 7.78 (dd, 1H, J=8.4, 1.6Hz), 7.21 (d, 1H, J=5.2Hz), 3.52 (s, 2H), 2.54-2.41 (m, 10H), 2.38 (s, 3H), 2.19-2.08 (m, 6H), 1.90-1.87 (m, 2H), 1.10(t, 3H, J=6.8Hz).

MS (ESI): m/z 500.3 [M+H]⁺.

10 实施例 9 氮-(5-((4-乙基哌嗪-1-基)甲基)吡啶-2-基)-5-氟-4-(2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)嘧啶-2-氨基

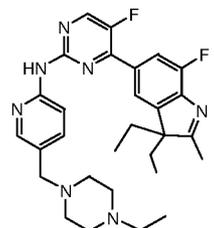


按照实施例 2 中相似的步骤得到标题化合物。

15 ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8.73 (br s, 1H), 8.47 (d, 1H, J=3.6Hz), 8.43 (d, 1H, J=8.4Hz), 8.30 (s, 1H), 8.15-8.13 (m, 2H), 7.70-7.64 (m, 2H), 3.52 (s, 2H), 2.53-2.37 (m, 10H), 2.31(s, 3H), 2.21-2.06 (m, 6H), 1.89-1.86 (m, 2H), 1.10 (t, 3H, J=7.2Hz).

MS (ESI): m/z 500.3 [M+H]⁺.

20 实施例 10 4-(3,3-二乙基-7-氟-2-甲基-3H-吡啶-5-基)-氮-(5-((4-乙基哌嗪-1-基)甲基)吡啶-2-基)-5-氟嘧啶-2-氨基

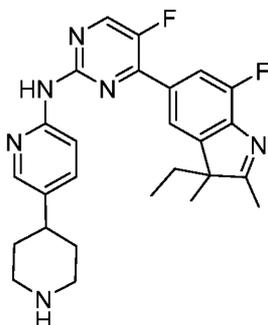


按照实施例 2 中相似的步骤得到标题化合物。

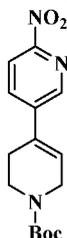
25 ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ 9.19 (br s, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.39-8.34 (m, 2H), 7.95 (d, 1H, J=11.2Hz), 7.83 (s, 1H), 7.72(d, 1H, J=8.0Hz), 3.51 (s, 2H), 2.52-2.41 (m, 10H), 2.31 (s, 3H), 2.06-2.01 (m, 2H), 1.90-1.85(m, 2H), 1.08 (t, 3H, J=6.8Hz), 0.46 (t, 6H, J=6.8Hz).

MS (ESI): m/z 520.3 [M+H]⁺.

实施例 11 4-(3-乙基-7-氟-2,3-二甲基-3H-吡啶-5-基)-5-氟-氮-(5-(哌啶-1-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基



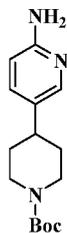
步骤 1 6-硝基-3',6'-二氢-[3,4'-二吡啶]-1'(2'H)-羧基叔丁酯



向反应瓶中加入 5-溴-2-硝基吡啶(20.3g, 0.1 mol), 4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧基硼酸-2-基)-5,6-二氢吡啶-1(2H)-羧基叔丁酯 (31g, 0.1mol), 二氧六环/水(250 mL/30mL), 碳酸铯(66g, 0.2mol), Pd(dppf)Cl₂ (7.33g, 0.01mol), 氮气保护。该混合物被加热至 85 °C 反应 12 小时, 冷却至室温, 浓缩, 柱色谱分离 (PE/EA=1:1-DCM / MeOH = 20:1)得到标题产物 11g (黄色固体)。

MS (ESI): mass calcd. for C₁₅H₁₉N₃O₄ 305.1, m/z found 306.1[M+H]⁺.

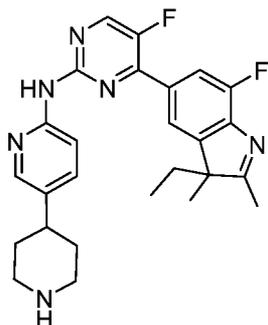
10 步骤 2 4-(6-氨基吡啶-3-基)哌啶-1-羧基叔丁酯



向反应瓶中加入步骤 1 制备的 6-硝基-3',6'-二氢-[3,4'-二吡啶]-1'(2'H)-羧基叔丁酯 (0.9g, 3.0mmol), 乙酸乙酯/甲醇(10mL/10mL), Pd/C(0.1g), 通入氢气, 室温反应 2 小时, 过滤, 浓缩, 得到标题产物 790 mg(类白色固体)。

15 MS (ESI): mass calcd. for C₁₅H₂₃N₃O₂ 277.2, m/z found 278.2 [M+H]⁺.

4-(3-乙基-7-氟-2,3-二甲基-3H-咪唑-5-基)-5-氟-氮-(5-(哌啶-1-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基

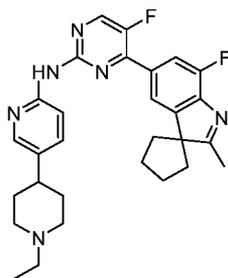


其他步骤按照实施例 1 中 3-7 相似的步骤得到本实施例的标题化合物。

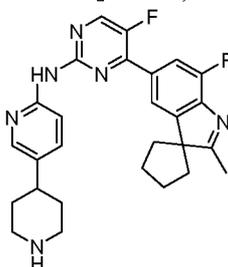
20 ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8.61 (br s, 1H), 8.46 (d, 1H, J=3.6Hz), 8.34 (d, 1H, J=8.8Hz), 8.26 (d, 1H, J=1.6Hz), 7.93 (d, 1H, J=11.2Hz), 7.64 (d, 1H, J=8.0Hz), 7.86 (s, 1H), 7.61 (dd, 1H, J=8.4Hz, 2.0Hz), 3.24-3.21 (m, 2H), 2.77 (t, 1H, J=10.8Hz), 2.64-2.61 (m, 1H), 2.34 (s, 3H), 2.06-1.91 (m, 4H), 1.89-1.84 (m, 3H), 1.72-1.63 (m, 2H), 1.39 (s, 3H), 0.50 (t, 1H, J=7.2Hz).

MS (ESI): m/z found 463.3 $[M+H]^+$.

实施例 12 氮-(5-(1-乙基哌啶-4-基)吡啶-2-基)-5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)嘧啶-2-氨基

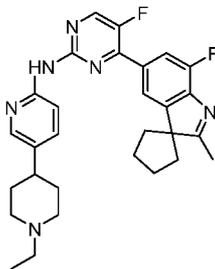


5 5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)-氮(5-(哌啶-4-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基



按照实施例 11 相似的步骤得到该中间体

10 氮-(5-(1-乙基哌啶-4-基)吡啶-2-基)-5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)嘧啶-2-氨基

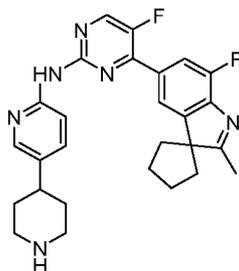


15 向反应瓶中加入上步制备得到的 5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)-氮(5-(哌啶-4-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基 50 mg (0.1 mmol), 乙醛 26 mg (0.6 mmol), 二氯甲烷 5 ml, 室温反应 0.5 小时, 然后加入三乙基硼氢化钠 60 mg (0.28 mmol), 室温反应 2 小时, 向反应液中加入 20 ml 饱和碳酸钠水溶液, 然后用二氯甲烷萃取三次, 每次 10 mL, 合并有机相; 有机相用饱和食盐水洗涤一次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 真空浓缩, 硅胶柱色谱分离 (PE/EA = 5:1), 得到标题化合物 11 mg, 收率 22%。

20 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.45 (d, 1H, $J=3.6\text{Hz}$), 8.38 (s, 1H), 8.33 (d, 1H, $J=8.8\text{Hz}$), 8.25 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.90 (d, 1H, $J=11.2\text{Hz}$), 7.62 (dd, 1H, $J=8.8, 2.0\text{Hz}$), 3.14-3.11 (m, 2H), 2.55-2.46 (m, 3H), 2.40 (s, 3H), 2.18-2.03 (m, 8H), 1.90-1.82 (m, 6H), 1.15 (t, 3H, $J=7.2\text{Hz}$).

MS (ESI): m/z 503.3 $[M+H]^+$.

实施例 13 5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)-氮(5-(哌啶-4-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基

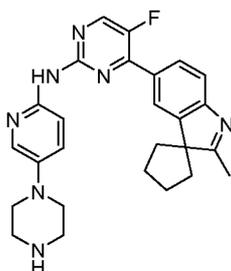


按照实施例 11 相似的步骤得到标题化合物。

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ 9.14 (br s, 1H), 8.48 (d, 1H, *J* = 3.2Hz), 8.34-8.30 (m, 2H), 7.96 (s, 1H), 7.89 (d, 1H, *J* = 10.8Hz), 7.58 (d, 1H, *J* = 8.4Hz), 3.22-3.19 (m, 2H), 2.76 (t, 2H, *J* = 11.6Hz), 2.66-2.60 (m, 1H), 2.38 (s, 3H), 2.16-2.02 (m, 6H), 1.88-1.83(m, 4H), 1.69-1.61 (m, 2H).

MS (ESI): *m/z* 475.3 [M+H]⁺.

10 实施例 14 5-氟-4-(2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)-氮-(5-(哌嗪-1-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基

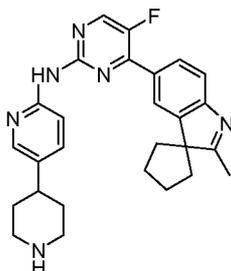


按照实施例 1 中相似的步骤得到标题化合物。

15 ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ 9.28 (br s, 1H), 8.43 (d, 1H, *J* = 3.6Hz), 8.33 (d, 1H, *J* = 9.2Hz), 8.16-8.09 (m, 3H), 7.63 (d, 1H, *J* = 8.0Hz), 7.32 (dd, 1H, *J* = 9.2Hz, 2.8Hz), 3.08-3.06 (m, 4H), 3.03-3.02 (m, 4H), 2.34 (s, 3H), 2.29-2.04 (m, 7H), 1.86-1.83 (m, 2H).

MS (ESI): *m/z* 458.3 [M+H]⁺.

20 实施例 15 5-氟-4-(2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)-氮-(5-(哌啶-4-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基

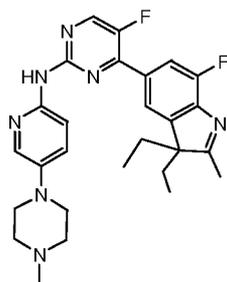


按照实施例 11 中相似步骤得到标题化合物

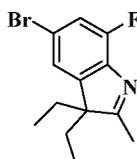
25 ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8.99 (br s, 1H), 8.46 (d, 1H, *J* = 3.6Hz), 8.39 (d, 1H, *J* = 8.4Hz), 8.29 (d, 1H, *J* = 1.6Hz), 8.15-8.11 (m, 2H), 7.65 (d, 1H, *J* = 8.0Hz), 7.58 (dd, 1H, *J* = 8.8Hz, 2.0Hz), 3.22-3.19 (m, 2H), 2.76 (t, 2H, *J* = 10.4Hz), 2.65-2.59 (m, 1H), 2.36 (s, 3H), 2.18-2.05 (m, 7H), 1.88-1.83 (m, 4H), 1.70-1.60 (m, 2H).

MS (ESI): *m/z* 457.3 [M+H]⁺.

实施例 16 4-(3,3-二乙基-7-氟-2-甲基-3H-吡啶-5-基)-5-氟-氮-(5-(4-甲基哌嗪-1-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基



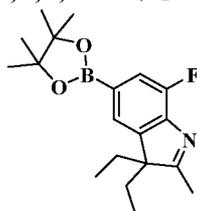
步骤 1 5-溴-3,3-二乙基-7-氟-2-甲基-3H-咪唑的合成



- 5 向反应瓶中加入 10ml 乙酸, (4-溴-2-氟苯)胍盐酸盐 5.0g(20.75mmol), 3-乙基戊烷-2 酮 2.35g (20.75mmol), 混合物回流反应 5 小时, 旋干溶剂, 加入 50ml 水, 然后用乙酸乙酯萃取三次, 每次 50ml, 合并有机相; 有机层用 50ml 盐水洗涤一次, 加入硫酸钠干燥, 过滤, 旋干, 柱色谱分离(EA:PE=1:100 - 1:10), 得到标题化合物 2.5g(黄色油状物), 收率 87.1%。

MS (ESI): m/z 286.1[M+H]⁺.

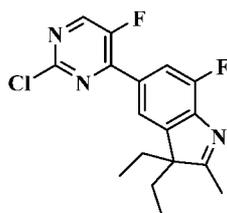
步骤 2 3,3-二乙基-7-氟-2-甲基-5-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼基-2-基)-3H-咪唑的合成



- 10 向反应瓶中加入步骤 1 制备的 5-溴-3,3-二乙基-7-氟-2-甲基-3H-咪唑 2.0g(7.07mol), 4,4,4',4',5,5,5',5'-八甲基-2,2'-双(1,3,2-二氧硼戊环) 1.97g, (7.77mmol), 醋酸钾 1.38g(1.41mmol), 1,4-二氧六环 10ml, Pd(dppf)Cl₂ 1.03g(1.41mmol), 氮气保护, 混合物加热到 90°C, 反应过夜。混合物冷却到室温过滤, 用 10ml 水稀释, 用乙酸乙酯萃取三次, 每次 10ml, 合并有机相。有机相用 15ml 食盐水洗涤一次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 硅胶柱色谱分离(EA:PE=1:50-1:10), 得到标题化合物 2.0g(黄色油状物), 收率 86.96%。

MS (ESI): m/z 332.3 [M+H]⁺.

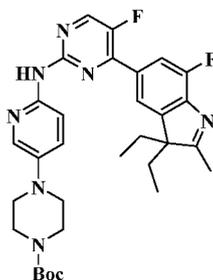
步骤 3 5-(2-氯-5-氟嘧啶-4-基)-3,3-二乙基-7-氟-2-甲基-3H-咪唑



- 20 向反应瓶中加入步骤 2 制备得到的 3,3-二乙基-7-氟-2-甲基-5-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼基-2-基)-3H-咪唑 2.0g(6.05mmol), 2,4-二氯-5-氟嘧啶 1.10g(6.65mmol), 磷酸钾 2.56g (12.1mmol), 1,4-二氧六环/水 20mL / 5ml, Pd(PPh₃)₄ 0.69g(0.61mmol), 氮气保护, 混合物加热到 120°C 反应 2 小时。混合物冷却到室温, 过滤, 用 10ml 水稀释, 用 50ml 二氯甲烷萃取三次, 合并有机相。有机相用 20ml 食盐水洗涤一次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 真空浓
- 25 缩, 硅胶柱色谱分离(EA:PE=1:100 - 1:10), 得到 1.2g 标题化合物(黄色固体), 收率 59.4%。

MS (ESI): m/z 336.1 [M+H]⁺.

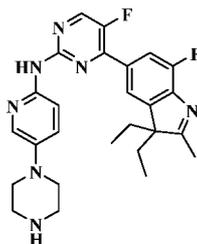
步骤 4 4-(6-((4-(3,3-二乙基-7-氟-2-甲基-3H-咪唑-5-基)-5-氟嘧啶-2-基)氨基)吡啶-3-基)哌嗪-1-羧基叔丁酯



向反应瓶中加入步骤3制备得到的 5-(2-氟-5-氟嘧啶-4-基)-3,3-二乙基-7-氟-2-甲基-3H-吡啶 400.0mg(1.19 mmol), 按照实施例1的步骤1-2制备的叔丁基 4-(6-氨基吡啶-3-基)哌嗪-1-羧酸盐 331.9mg(1.19mmol), 碳酸铯 776.2mg(2.38mmol), 1,4-二氧六环 10ml, Pd₂(dba)₃ 109.5mg(0.12mmol), 4,5-双二苯基膦-9,9-二甲基氧杂蒽 69.0mg(0.12mmol), 氮气保护. 混合物在 130°C, 微波反应 1 小时. 混合物冷却到室温, 过滤, 用 10ml 水稀释, 用 10ml 二氯甲烷萃取三次, 合并有机相. 有机相用 30ml 食盐水洗涤一次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, TLC 分离得到 253.1mg 标题化合物(黄色固体), 收率 36.74%.

MS (ESI): m/z 578.3 [M+H]⁺.

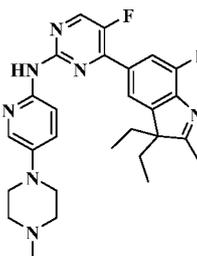
10 步骤 5 4-(3,3-二乙基-7-氟-2-甲基-3H-吡啶-5-基)-5-氟-N-(5-(哌嗪-1-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基



向反应瓶中加入步骤4制备得到的 4-(6-((4-(3,3-二乙基-7-氟-2-甲基-3H-吡啶-5-基)-5-氟嘧啶-2-基)氨基)吡啶-3-基)哌嗪-1-羧基叔丁酯 250.0mg(0.43mmol), 二氯甲烷 4mL, TFA 1ml. 混合物室温旋转搅拌 2 小时, 除去溶剂, 用 5ml 饱和碳酸氢钠溶液调节 pH 到 8, 用二氯甲烷萃取三次, 每次 5ml, 合并有机相. 有机相用 10ml 饱和食盐水洗涤一次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 真空浓缩, TLC 分离纯化, 得到标题化合物 201.2mg(黄色固体), 收率 97.6%.

MS (ESI): m/z 478.3 [M+H]⁺.

20 步骤 6 4-(3,3-二乙基-7-氟-2-甲基-3H-吡啶-5-基)-5-氟-氮-(5-(4-甲基哌嗪-1-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基

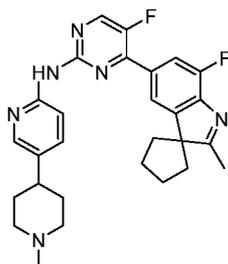


向反应瓶中加入 4-(3,3-二乙基-7-氟-2-甲基-3H-吡啶-5-基)-5-氟-氮-(5-(哌嗪-1-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基 50.0mg(0.10 mmol), 甲醛 30.8mg(1.0mmol), 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺 2ml, 三乙基硼氢化钠 65.3mg(0.3mmol), 反应过夜. 加入 2ml 甲醇淬灭, 用二氯甲烷萃取三次, 每次 5ml. 有机相用 10ml 饱和食盐水洗涤一次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, TLC 分离, 得到 20.3mg 标题化合物(黄色固体), 收率 39.4%.

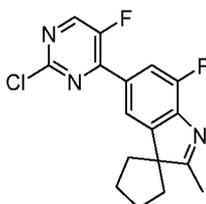
¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ 9.57 (br s, 1H), 8.47 (d, 1H, J=3.2Hz), 8.28 (d, 1H, J=8.8Hz), 8.18 (d, 1H, J=2.0Hz), 7.91 (d, 1H, J=11.2Hz), 7.78 (s, 1H), 7.33 (d, 1H, J=8.8Hz), 3.16-3.15 (m, 4H), 2.58-2.57 (m, 4H), 2.33 (s, 3H), 2.26 (s, 3H), 2.04-1.95 (m, 2H), 1.85-1.78 (m, 7H), 0.43 (t, 6H, J=7.2Hz).

MS (ESI): m/z 492.3 [M+H]⁺

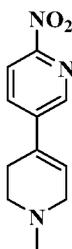
实施例 17 5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-咪唑]-5'-基)-氮-(5-(1-甲基哌啶-4-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基



5 按照实施例 1 相似步骤得到中间体 5'-(2-氯-5-氟嘧啶-4-基)-7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-咪唑]



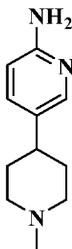
10 步骤 1 1'-甲基-6-硝基-1',2',3',6'-四氢-3,4'-二吡啶



15 向反应瓶中加入 5-溴-2-硝基吡啶(20.3g, 0.1 mol), 1-甲基-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧基硼酸-2-基)-1,2,3,6-四氢吡啶(22.3g, 0.1mol), 二氧六环/水 (250 mL/30mL), 碳酸铯 (66g, 0.2mol), Pd(dppf)Cl₂ (7.33g, 0.01mol), 氮气保护。该混合物在 85 °C 搅拌反应 12 小时, 冷却至室温, 浓缩, 柱色谱分离 (PE/EA=1:1-DCM/MeOH=20:1), 得到标题产物 5.7g (白色固体)。

MS (ESI): mass calcd. for C₁₁H₁₃N₃O₂ 219.1, m/z found 220.1[M+H]⁺.

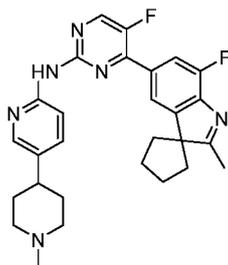
步骤 2 5-(1-甲基哌啶-4-基)吡啶-2-氨基



20 向反应瓶中加入步骤 1 制备的 1'-甲基-6-硝基-1',2',3',6'-四氢-3,4'-二吡啶(657mg, 3.0mmol), 乙酸乙酯/甲醇(10mL/10mL), Pd/C(0.1g)。向该混合物中通入氢气, 搅拌反应 2 小时, 过滤, 浓缩, 得到标题产物 550 mg(白色固体)。

MS (ESI): mass calcd. for C₁₁H₁₇N₃ 191.1, m/z found 192.2 [M+H]⁺.

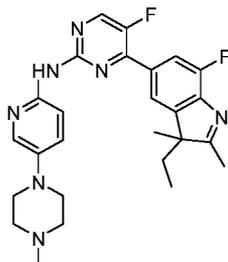
25 步骤 3 5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-咪唑]-5'-基)-氮-(5-(1-甲基哌啶-4-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基



5 向反应瓶中加入中间体 5'-(2-氟-5-氟嘧啶-4-基)-7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶](150.0mg, 0.45mmol), 步骤 2 制备的 5-(1-甲基哌啶-4-基)吡啶-2-氨基(86.6mg, 0.45mmol), 碳酸铯(293.2mg, 0.9mmol), 二氧六环(3ml), Pd₂(dba)₃ (44.7mg, 0.05mmol), 4,5-双二苯基膦-9,9-二甲基氧杂蒽 (30.4mg, 0.05mmol), 氮气保护, 加热至 150°C, 微波反应 1 小时, 冷却至室温, 过滤, 加入 10ml 水, 用二氯甲烷萃取三次, 每次 10ml, 合并有机相, 用 30ml 饱和氯化钠水溶液洗涤一次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 硅胶柱色谱分离(二氯甲烷 / 甲醇 = 50:1), 得到标题化合物 51.1mg(黄色固体)。

10 ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ 9.38 (br s, 1H), 8.49 (d, 1H, *J* =3.2Hz), 8.34-8.33 (m, 2H), 7.96 (s, 1H), 7.88 (d, 1H, *J* =11.2Hz), 7.58 (dd, 1H, *J* =8.8Hz, 1.6Hz), 3.01-2.98 (m, 2H), 2.52-2.44 (m, 1H), 2.38 (s, 3H), 2.34 (s, 3H), 2.25-2.04 (m, 8H), 1.87-1.76 (m, 6H).
MS (ESI): *m/z* 489.3 [M+H]⁺.

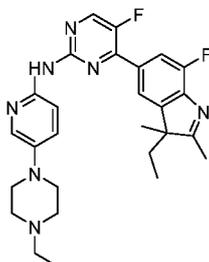
15 实施例 18 4-(3-乙基-7-氟-2,3-二甲基-3H-咪唑-5-基)-5-氟-氮-(5-(4-甲基哌嗪-1-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基



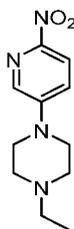
按照实施例 16 中相似的步骤得到标题化合物。

20 ¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ 9.48 (br s, 1H), 8.47 (d, 1H, *J* =3.2Hz), 8.28 (d, 1H, *J* =9.2Hz), 8.17 (s, 1H), 7.90 (d, 1H, *J* =10.8Hz), 7.82 (s, 1H), 7.34 (d, 1H, *J* =8.4Hz), 3.17-3.16 (m, 4H), 2.59-2.58 (m, 4H), 2.35 (s, 3H), 2.31 (s, 3H), 2.01-1.96 (m, 1H), 1.87-1.82(m, 1H), 1.35 (s, 3H), 0.47 (t, 3H, *J* =7.2Hz).
MS (ESI): *m/z* 478.3 [M+H]⁺.

25 实施例 19 4-(3-乙基-7-氟-2,3-二甲基-3H-咪唑-5-基)-氮-(5-(4-乙基哌嗪-1-基)吡啶-2-基)-5-氟嘧啶-2-氨基



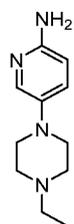
步骤 1 1-乙基-4-(6-硝基吡啶-3-基)哌嗪的合成



- 依次将 5-溴-2-硝基吡啶 4.00g (19.7 mmol)、1-乙基哌嗪 3.40g(2.98mmol)、碳酸钾 4.10g(29.6mmol)、四丁基碘化铵 0.4g (1.2mmol)、DMSO 40mL, 加入反应瓶中, 80℃反应 16h。然后将反应液倒入冰水中, 用二氯甲烷萃取三次, 每次 20ml, 合并有机相, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 柱色谱分离得到(DCM/MeOH = 100:1 - 10:1)得到 3.59g 黄色固体, 收率 56.1%。

MS (ESI): m/z 237.2 [M+H]⁺.

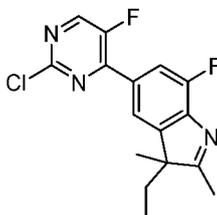
步骤 2 5-(4-乙基哌嗪-1-基)吡啶-2-氨基的合成



- 10 将步骤 1 制备得到的 1-乙基-4-(6-硝基吡啶-3-基)哌嗪 650mg(2.13mmol)溶于 45ml 甲醇中, 加入 10%钨碳(250mg, cat), 氢气置换三次, 3 个大气压下氢气氛围中室温反应 12h。停止反应, 少量硅藻土过滤, 滤饼用二氯甲烷和甲醇(V/V=10:1)的混合溶剂 20ml 洗涤一次, 收集滤液, 减压浓缩, 得到 559mg 标题化合物粗品(透明粘稠状物), 未进一步纯化, 直接用于后续反应。

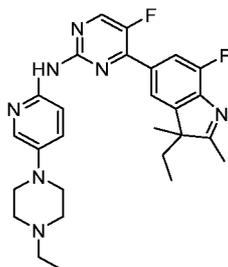
- 15 MS (ESI): m/z 207.1 [M+H]⁺.

步骤 3 5-(2-氯-5-氟嘧啶-4-基)-3-乙基-7-氟-2,3-二甲基-3H-咪唑的合成



该中间体的合成方法与实施例 16 步骤 1-3 相同的方法制备得到。

- 20 步骤 4 4-(3-乙基-7-氟-2,3-二甲基-3H-咪唑-5-基)-氮-(5-(4-乙基哌嗪-1-基)吡啶-2-基)-5-氟嘧啶-2-氨基的合成



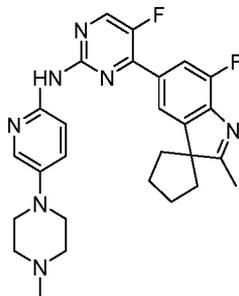
- 25 向反应瓶中加入步骤 3 制备得到的 5-(2-氯-5-氟嘧啶-4-基)-3-乙基-7-氟-2,3-二甲基-3H-咪唑 321 mg(1 mmol), 步骤 2 制备得到的 5-(4-乙基哌嗪-1-基)吡啶-2-氨基 206 mg(1 mmol), 1,4-二氧六环 2 ml, Cs₂CO₃ 650 mg(2 mmol), Pd₂(dba)₃ 91 mg(0.1 mmol), 二苯基膦 58 mg(0.1 mmol); 混合物加热到 120℃, 微波反应 1 小时; 冷却至室温, 加入 10ml 水, 然后用乙酸乙酯萃取三次, 每次 40ml, 合并有机相。有机相用 40ml 饱和食盐水洗涤一次, 硫酸钠干燥,

过滤, 真空浓缩, 硅胶柱色谱分离(DCM / MeOH = 10:1), 得到 49mg 标题化合物(黄色固体), 收率 10%。

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ 9.25 (br s, 1H), 8.46 (d, 1H, *J*=3.2Hz), 8.28 (d, 1H, *J*=9.2Hz), 8.17 (d, 1H, *J*=2.0Hz), 7.90 (d, 1H, *J*=11.2Hz), 7.82 (s, 1H), 7.35 (dd, 1H, *J*=9.2Hz, 2.8Hz), 3.20-3.18 (m, 4H), 2.64-2.61 (m, 4H), 2.51 (q, 2H, *J*=6.8Hz), 2.31 (s, 3H), 2.03-1.94 (m, 1H), 1.89-1.82(m, 1H), 1.36 (s, 3H), 1.13 (t, 3H, *J*=7.2Hz), 0.48 (t, 3H, *J*=7.2Hz).

MS (ESI): *m/z* 492.3 [M+H]⁺.

10 实施例 20 5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)-氮-(5-(4-甲基哌嗪-1-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基

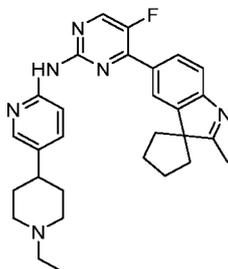


按照实施例 16 中相似的步骤得到标题化合物。

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 9.77 (br s, 1H), 8.63 (d, 1H, *J*=4.0Hz), 8.02-7.98 (m, 3H), 7.82 (d, 1H, *J*=11.2Hz), 7.41 (dd, 1H, *J*=8.8Hz, 2.8Hz), 3.13-3.11 (m, 4H), 2.49-2.46 (m, 4H), 2.33 (s, 3H), 2.26 (s, 3H), 2.23-2.07 (m, 6H), 1.76-1.74 (m, 2H).

MS (ESI): *m/z* 490.3 [M+H]⁺.

实施例 21 氮-(5-(1-乙基哌啶-4-基)吡啶-2-基)-5-氟-4-(2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)嘧啶-2-氨基



20

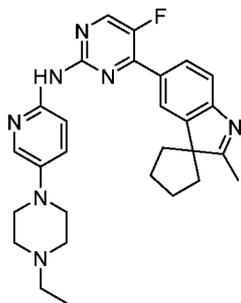
按照实施例 12 中相似的步骤得到标题化合物。

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 9.91 (br s, 1H), 8.65 (d, 1H, *J*=4.0Hz), 8.28-8.14 (m, 3H), 8.04 (d, 1H, *J*=8.4Hz), 7.43 (dd, 1H, *J*=8.4Hz, 2.0 Hz), 7.60 (d, 1H, *J*=8.0Hz), 3.00-2.97 (m, 4H), 2.38-2.33 (m, 2H), 2.30(s, 3H), 2.08-2.07 (m, 6H), 1.99-1.94 (m, 2H), 1.77-1.64 (m, 6H), 1.02 (t, 3H, *J*=7.2Hz).

25

MS (ESI): *m/z* 485.3 [M+H]⁺.

实施例 22 氮-(5-(4-乙基哌嗪-1-基)吡啶-2-基)-5-氟-4-(2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)嘧啶-2-氨基

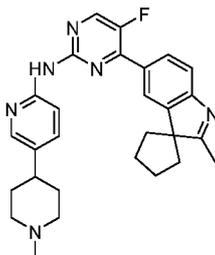


按照实施例 19 中相似的步骤得到标题化合物。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 8.87 (br s, 1H), 8.42 (d, 1H, $J=3.6\text{Hz}$), 8.33 (d, 1H, $J=9.2\text{Hz}$), 8.13-8.10 (m, 3H), 7.65 (d, 1H, $J=8.0\text{Hz}$), 7.35 (dd, 1H, $J=8.8\text{Hz}$, 2.4Hz), 3.19-3.18 (m, 4H), 2.64-2.63 (m, 4H), 2.53 (q, 2H, $J=6.8\text{Hz}$), 2.35 (s, 3H), 2.27-2.06 (m, 6H), 1.88-1.85 (m, 2H), 1.14 (t, 3H, $J=6.8\text{Hz}$).

MS (ESI): m/z 486.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

10 实施例 23 氮-(5-(4-甲基哌啶-1-基)吡啶-2-基)-5-氟-4-(2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)嘧啶-2-氨基

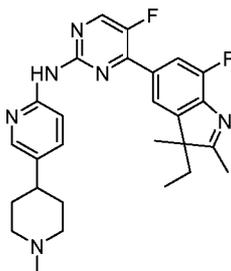


按照实施例 17 中相似的步骤得到标题化合物。

15 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 9.24 (br s, 1H), 8.47 (d, 1H, $J=3.2\text{Hz}$), 8.38 (d, 1H, $J=8.8\text{Hz}$), 8.31 (s, 1H), 8.14-8.09 (m, 2H), 7.64 (d, 1H, $J=8.4\text{Hz}$), 7.57 (dd, 1H, $J=8.4\text{Hz}$, 2.4Hz), 3.00-2.98 (m, 2H), 2.49-2.46 (m, 1H), 2.35 (s, 3H), 2.33 (s, 3H), 2.16-1.99 (m, 8H), 1.85-1.76 (m, 6H).

MS (ESI): m/z 471.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

实施例 24 4-(3-乙基-7-氟-2,3-二甲基-3H-吡啶-5-基)-5-氟-氮-(5-(1-甲基哌啶-4-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基



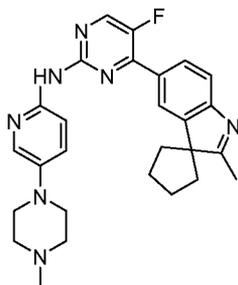
20

按照实施例 17 中相似的步骤得到标题化合物。

25 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 9.74 (br s, 1H), 8.50 (d, 1H, $J=3.6\text{Hz}$), 8.35-8.32 (m, 2H), 7.88-7.82 (m, 2H), 7.57 (d, 1H, $J=8.8\text{Hz}$), 2.97-2.95 (m, 2H), 2.49-2.42 (m, 1H), 2.30 (s, 6H), 2.24-1.93 (m, 3H), 1.88-1.74 (m, 5H), 1.35 (s, 3H), 0.47 (t, 3H, $J=7.2\text{Hz}$).

MS (ESI): m/z 477.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

实施例 25 5-氟-氮-(5-(4-甲基哌啶-1-基)吡啶-2-基)-4-(2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)嘧啶-2-氨基

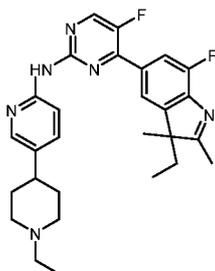


按照实施例 16 中相似的步骤得到标题化合物。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 9.28 (br s, 1H), 8.44 (d, 1H, $J=3.6\text{Hz}$), 8.33 (d, 1H, $J=9.2\text{Hz}$), 8.18 (d, 1H, $J=2.0\text{Hz}$), 8.12-8.09 (m, 2H), 7.64 (d, 1H, $J=8.0\text{Hz}$), 7.33 (dd, 1H, $J=9.2\text{Hz}$, 2.4Hz), 3.16-3.14 (m, 4H), 2.59-2.58 (m, 4H), 2.35 (s, 3H), 2.34 (s, 3H), 2.15-2.06 (m, 6H), 1.87-1.83 (m, 2H).

MS (ESI): m/z 472.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

10 实施例 26 4-(3-乙基-7-氟-2,3-二甲基-3H-吲哚-5-基)-氮-(5-(1-乙基哌啶-4-基)吡啶-2-基)-5-氟嘧啶-2-氨基

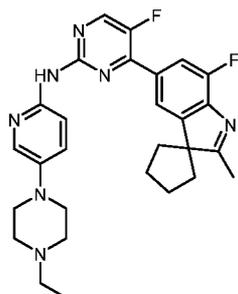


按照实施例 12 中相似的步骤得到标题化合物。

15 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO-d_6) δ 9.99 (br s, 1H), 8.70 (d, 1H, $J=3.2\text{Hz}$), 8.19 (s, 1H), 8.14 (d, 1H, $J=8.8\text{Hz}$), 7.92 (s, 1H), 7.85 (d, 1H, $J=11.2\text{Hz}$), 7.69 (d, 1H, $J=8.4\text{Hz}$), 3.04-3.02 (m, 2H), 2.42-2.41 (m, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.04-1.99 (m, 3H), 1.89-1.84 (m, 1H), 1.78-1.63 (m, 4H), 1.33 (s, 3H), 1.04 (t, 3H, $J=6.8\text{Hz}$), 0.36 (t, 3H, $J=7.2\text{Hz}$).

MS (ESI): m/z 491.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

20 实施例 27 氮-(5-(4-乙基哌嗪-1-基)吡啶-2-基)-5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)嘧啶-2-氨基



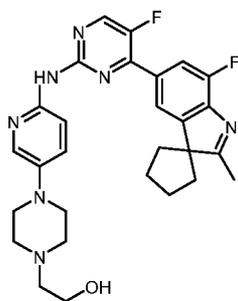
按照实施例 19 中相似的步骤得到标题化合物。

25 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 8.92 (br s, 1H), 8.44 (d, 1H, $J=3.6\text{Hz}$), 8.29 (d, 1H, $J=9.2\text{Hz}$), 8.15 (d, 1H, $J=2.8\text{Hz}$), 7.94 (s, 1H), 7.89 (d, 1H, $J=11.2\text{Hz}$), 7.36 (dd, 1H, $J=9.2\text{Hz}$, 2.8Hz), 3.21-3.19 (m, 4H), 2.65-2.63 (m, 4H), 2.51 (q, 2H, $J=7.2\text{Hz}$), 2.38 (s, 3H), 2.22-2.07 (m, 6H), 1.89-1.86 (m, 2H), 1.15 (t, 3H, $J=7.2\text{Hz}$).

MS (ESI): m/z 504.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

实施例 28 2-(4-(6-((5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)嘧啶-2-基)氨基)吡啶

-3-基)哌嗪-1-基)乙醇

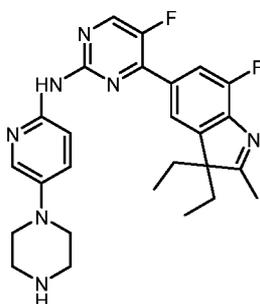


5 向反应瓶中加入 5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-咪唑]-5'-基)-氮-(5-(哌嗪-1-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基 20mg(0.04mmol, 按照实施例 6 相同方法制备), 2-溴-乙醇 16mg(0.12mmol), DMF 2ml, 碳酸铯 17mg(0.12mmol), 加热至 80 °C, 反应 1 小时, 然后冷却至室温, 加入 10ml 水, 然后用乙酸乙酯萃取三次, 每次 40ml, 合并有机相。有机相用 40ml 饱和食盐水洗涤一次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 真空浓缩, 硅胶柱色谱分离(DCM / MeOH = 10:1), 得到标题化合物 10mg (黄色固体), 收率 55%。

10 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 8.52 (br s, 1H), 8.43 (d, 1H, $J=2.8\text{Hz}$), 8.29 (d, 1H, $J=9.2\text{Hz}$), 8.09 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.89 (d, 1H, $J=10.8\text{Hz}$), 7.36 (d, 1H, $J=8.8\text{Hz}$), 3.70-3.68 (m, 2H), 3.19-3.18 (m, 4H), 2.71-2.63 (m, 7H), 2.39 (s, 3H), 2.25-2.00 (m, 6H), 1.90-1.87 (m, 2H).

MS (ESI): m/z 520.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

15 实施例 29 4-(3,3-二乙基-7-氟-2-甲基-3H-咪唑-5-基)-5-氟-氮-(5-(哌嗪-4-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基

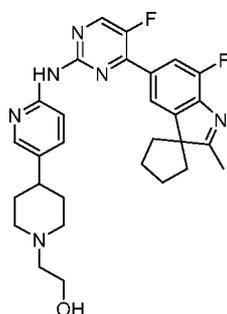


按照实施例 1 中相似的步骤得到标题化合物。

20 $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 8.66 (br s, 1H), 8.45 (d, 1H, $J=3.6\text{Hz}$), 8.29 (d, 1H, $J=9.2\text{Hz}$), 8.11 (d, 1H, $J=2.8\text{Hz}$), 7.94 (d, 1H, $J=11.2\text{Hz}$), 7.81 (s, 1H), 7.37 (dd, 1H, $J=8.8\text{Hz}$, 2.4Hz), 3.13-3.12 (m, 4H), 3.08-3.07 (m, 4H), 2.30 (s, 3H), 2.08-1.99 (m, 2H), 1.91-1.82 (m, 3H), 0.46 (t, 6H, $J=7.6\text{Hz}$).

MS (ESI): m/z 478.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

25 实施例 30 2-(4-(6-((5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-咪唑]-5'-基)嘧啶-2-基)氨基)吡啶-3-基)哌啶-1-基)乙醇

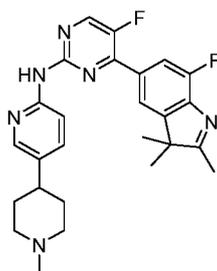


向反应瓶中加入按照实施例 13 相同的方法制备得到的 5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)-氮-(5-(哌啶-4-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基 20mg(0.04mmol), 2-溴乙醇 16mg(0.12mmol), DMF 2mL, 碳酸铯 17mg(0.12mmol), 加热至 80℃, 反应 1 小时; 然后冷却至室温, 加入 10ml 水, 用乙酸乙酯萃取三次, 每次 40ml, 合并有机相。有机相用 40ml 饱和食盐水洗涤一次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 真空浓缩, 硅胶柱色谱分离(DCM / MeOH = 10:1), 得到标题化合物 10mg(黄色固体), 收率 55%。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 8.63 (br s, 1H), 8.46 (d, 1H, $J=3.2\text{Hz}$), 8.34 (d, 1H, $J=8.4\text{Hz}$), 8.26 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.90 (d, 1H, $J=10.8\text{Hz}$), 7.60 (d, 1H, $J=8.0\text{Hz}$), 3.67-3.66 (m, 2H), 3.08-3.06 (m, 2H), 2.60-2.52 (m, 4H), 2.39 (s, 3H), 2.25-2.11 (m, 8H), 1.89-1.83 (m, 4H), 1.80-1.77 (m, 2H).

MS (ESI): m/z 519.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

实施例 31 5-氟-4-(7-氟-2,3,3-三甲基-3H-吡啶-5-基)-氮-(5-(1-甲基哌啶-4-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基

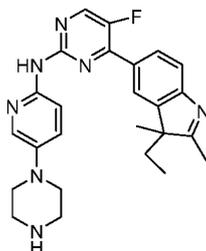


按照实施例 17 中相似的步骤得到标题化合物。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, Methanol- d_4) δ 8.57 (br s, 1H), 8.37 (d, 1H, $J=3.6\text{Hz}$), 8.18 (s, 1H), 8.13 (d, 1H, $J=8.8\text{Hz}$), 7.84 (s, 1H), 7.70 (d, 1H, $J=11.2\text{Hz}$), 7.51 (d, 1H, $J=7.2\text{Hz}$), 3.21-3.18 (m, 2H), 2.60-2.54 (m, 4H), 2.50-2.44 (m, 2H), 2.37 (s, 3H), 1.90-1.79 (m, 4H), 1.38 (s, 6H).

MS (ESI): m/z 463.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

实施例 32 4-(3-乙基-2,3-二甲基-3H-吡啶-5-基)-5-氟-氮-(5-(哌啶-1-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基



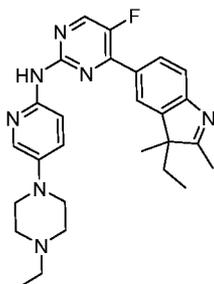
按照实施例 6 中相似的步骤得到标题化合物。

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 9.68 (br s, 1H), 8.44 (d, 1H, $J=3.6\text{Hz}$), 8.32 (d, 1H, $J=8.8\text{Hz}$), 8.18 (d, 1H, $J=2.4\text{Hz}$), 8.11 (d, 1H, $J=8.0\text{Hz}$), 7.98 (s, 1H), 7.64 (d, 1H, $J=8.0\text{Hz}$), 7.30 (d, 1H, $J=2.8\text{Hz}$), 3.05-3.04 (m, 4H), 3.00-2.98 (m, 4H), 2.26 (s, 3H), 2.00-1.90 (m, 2H), 1.83-1.74 (m, 1H), 1.32 (s, 3H), 0.45 (t, 1H, $J=7.2\text{Hz}$).

MS (ESI): m/z 446.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

实施例 33 4-(3-乙基-2,3-二甲基-3H-吡啶-5-基)-5-氟-氮-(5-(哌啶-4-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基

嘧啶-2-氨基

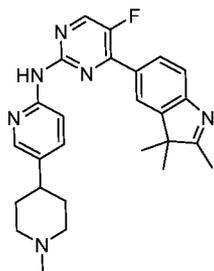


按照实施例 19 中相似的步骤得到标题化合物。

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8.93 (br s, 1H), 8.44 (d, 1H, *J*=3.6Hz), 8.33 (d, 1H, *J*=9.2Hz),
5 8.15-8.13 (m, 2H), 8.02 (s, 1H), 7.67 (d, 1H, *J*=8.0Hz), 7.35 (d, 1H, *J*=8.0Hz), 3.19-3.18 (m, 4H),
2.63-2.62 (m, 4H), 2.52-2.47 (m, 2H), 2.30 (s, 3H), 2.02-1.97 (m, 1H), 1.86-1.80 (m, 1H), 1.36 (s,
3H), 1.14 (t, 3H, *J*=7.2Hz), 0.57 (t, 1H, *J*=7.2Hz).

MS (ESI): *m/z* 474.3 [M+H]⁺.

10 实施例 37 5-氟-氮-(5-(1-甲基哌啶-4-基)吡啶-2-基)-4-(2,3,3-三甲基-3H-吡啶-5-基)嘧啶-2-氨基

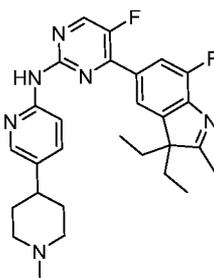


按照实施例 17 中相似的步骤得到标题化合物。

¹H-NMR (400MHz, CDCl₃) δ 9.03 (br s, 1H), 8.46 (d, 1H, *J*=3.2Hz), 8.38 (d, 1H, *J*=8.4Hz),
15 8.29 (s, 1H), 7.67 (d, 1H, *J*=8.0Hz), 7.60 (dd, 1H, *J*=8.8Hz, 1.6Hz), 3.00-2.97 (m, 2H), 2.49-2.44
(m, 1H), 2.34 (s, 3H), 2.33 (s, 3H), 2.10-2.03 (m, 2H), 1.84-1.79 (m, 4H), 1.37 (s, 6H).

MS (ESI): *m/z* 445.3[M+H]⁺.

20 实施例 38 4-(3,3-二乙基-7-氟-2-甲基-3H-吡啶-5-基)-5-氟-N-(5-(1-甲基哌啶-4-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基

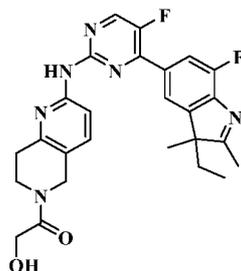


按照实施例 17 中相似的步骤得到标题化合物。

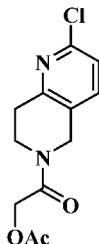
¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 9.95 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.19-8.11 (m, 2H), 7.89-7.84 (m,
25 2H), 7.67 (d, 1H, *J*=7.6Hz), 2.87-2.85 (m, 2H), 2.25 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 2.02-1.92 (m, 6H),
1.90-1.65(m, 4H), 0.34 (m, 6H).

MS (ESI): *m/z* 491.3[M+H]⁺.

实施例 39 1-(2-((4-(3-乙基-7-氟-2,3-二甲基-3H-吡啶-5-基)-5-氟嘧啶-2-基)氨基)-7,8-二氢-1,6-萘啶-6(5H)-基)-2-羟基乙酰胺



步骤 1 2-(2-氯-7,8-二氢-1,6-萘啶-6(5H)-基)-2-乙酰氧基乙酰胺

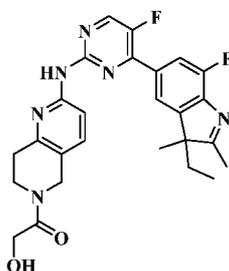


向反应瓶中中加入 2-氯-5,6,7,8-四氢-1,6-萘啶 1.0g(5.95mmol) , 三乙胺

- 5 1.21g(11.90mmol) , 二氯甲烷 5ml, 然后缓慢滴加 2-氯-2-乙酰氧基乙酰胺 1.22g(8.93mmol). 该混合物室温反应 1 小时, 加入 5ml 水淬灭反应, 移除溶剂, 用二氯甲烷萃取三次, 每次 15ml, 合并有机相。有机相用 10ml 饱和食盐水洗涤一次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 真空浓缩, 得到标题化合物灰白色粗品 1.09g, 收率 68.21%。

MS (ESI): m/z 269.1 $[M+H]^+$.

- 10 步骤 2 1-(2-((4-(3-乙基-7-氟-2,3-二甲基-3H-吡啶-5-基)-5-氟嘧啶-2-基)氨基)-7,8-二氢-1,6-萘啶-6(5H)-基)-2-羟基乙酰胺

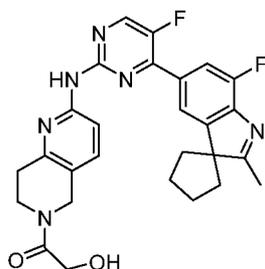


- 15 向反应瓶中加入按照实施 1 步骤 1-3 相似的方法得到 4-(3-乙基-7-氟-2,3-二甲基-3H-吡啶-5-基)-5-氟嘧啶-2-氨基 101 mg(0.34 mmol), 步骤 1 制备得到的 2-(2-氯-7,8-二氢-1,6-萘啶-6(5H)-基)-2-乙酰氧基乙酰胺 85.2 mg(0.32 mmol), 二氧六环 10mL, 叔丁醇钠 65.3mg (0.68 mmol), $Pd_2(dba)_3$ 31.2 mg (0.034 mmol), 4,5-双二苯基膦-9,9-二甲基氧杂蒽 19.7 mg (0.034 mmol)。该混合物加热至 120°C, 微波反应 1 小时, 然后冷却至室温, 加入 50ml 水, 用乙酸乙酯萃取三次, 每次 50ml, 合并有机相。有机相用 50ml 饱和食盐水洗涤一次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 硅胶柱色谱分离(二氯甲烷/ 甲醇= 10:1) 得到标题化合物 20mg(白色固体), 收率 12%。

- 20 1H -NMR (400MHz, $DMSO-d_6$) δ 9.98 (s, 1H), 8.70 (d, 1H, $J=3.6$ Hz), 8.07 (d, 1H, $J=8.4$ Hz), 7.94 (s, 1H), 7.87 (d, 1H, $J=11.2$ Hz), 7.64-7.57 (m, 1H), 4.68-4.55 (m, 3H), 4.22-4.21 (m, 2H), 4.21-4.19 (m, 2H), 2.89-2.81 (m, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.04-1.84 (m, 2H), 1.33 (s, 3H), 0.37 (t, 3H, $J=7.2$ Hz).

- 25 MS (ESI): m/z 493.2 $[M+H]^+$.

实施例 40 1-(2-((5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)嘧啶-2-基)氨基)-7,8-二氢-1,6-萘啶-6(5H)-基)-2-羟基乙酰胺

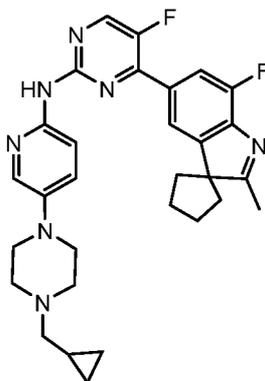


按照实施例 39 中相似的步骤得到标题化合物

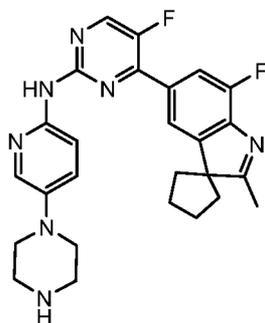
¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 10.07 (brs, 1H), 8.69 (d, 1H, J=3.6Hz), 8.53 (s, 1H), 8.09-8.02 (m, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.88 (d, 1H, J=12.4Hz), 7.62-7.54 (m, 1H), 4.73 (brs, 1H), 4.62-4.61 (m, 2H), 4.21-4.19 (m, 2H), 2.89-2.81(m, 2H), 2.50 (s, 2H), 2.34-2.11 (m, 5H), 1.75-1.72 (m, 2H).

MS (ESI): m/z 505.2 [M+H]⁺.

10 实施例 41 N-(5-(4-(环丙基甲基)哌嗪-1-基)吡啶-2-基)-5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-
吡啶]-5'-基)嘧啶-2-氨基



按照实施例 6 相似步骤得到中间体 5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)-氮
-(5-(哌嗪-1-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基



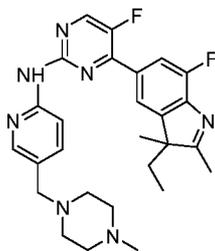
15 向反应瓶中加入上述中间体 5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)-氮
-(5-(哌嗪-1-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基 (150mg, 0.32 mmol), 溴甲基环丙烷, 乙腈 (5ml), 碳酸钾
(130.0mg, 0.96mmol), 加热至 80 °C 反应 4h, 冷却至室温, 加入 50ml 水, 用二氯甲烷萃取
三次, 每次 10ml. 合并有机层, 用 15mg 饱和食盐水洗涤一次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 柱
色谱分离(二氯甲烷/甲醇 = 10:1), 得到本实施例的标题产物 42.1mg (白色固体)。

20 ¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 9.89 (s, 1H), 8.68 (m, 1H), 8.64-8.01 (m, 3H), 7.87 (d, 1H,
J=14.4Hz), 7.42-7.40 (m, 1H), 3.14-3.13 (m, 5H), 2.60-2.51 (m, 5H), 2.33 (s, 3H), 2.24-2.23 (m,
2H), 2.09-2.02 (m, 6H), 1.99-1.97(m, 2H), 1.75-1.74 (m, 2H), 0.85-0.83 (m, 2H), 0.48-0.47(m,
2H).

MS (ESI): m/z 530.3 [M+H]⁺.

25 实施例 42 4-(3-乙基-7-氟-2,3-二甲基-3H-吡啶-5-基)-5-氟-N-(5-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)

吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基

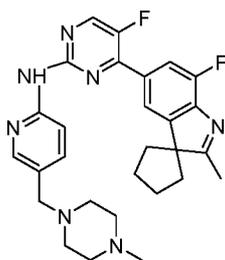


按照实施例 2 中相似的步骤得到标题化合物

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 10.06 (brs, 1H), 8.72 (d, 1H, J=3.2Hz), 8.18-8.15 (m, 2H),
5 7.93 (s, 1H), 7.86 (d, 1H, J=11.6Hz), 7.67 (d, 1H, J=5.2Hz), 3.42 (s, 2H), 2.35-2.28 (m, 8H), 2.14
(s, 3H), 2.04-1.98 (m, 1H), 1.89-1.84 (m, 1H), 1.34 (s, 3H), 0.36 (t, 3H, J=7.2Hz).

MS (ESI): m/z 492.3 [M+H]⁺.

10 实施例 43 5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)-N-(5-((4-甲基哌嗪-1-基)甲
基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基

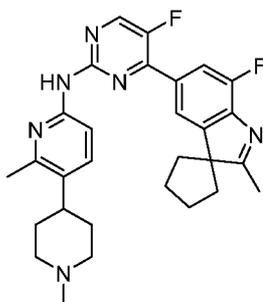


按照实施例 2 中相似的步骤得到标题化合物

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 10.09 (s, 1H), 8.71 (d, 1H, J=3.2Hz), 8.18-8.15 (m, 2H),
8.02 (s, 1H), 7.85 (d, 1H, J=11.2Hz), 7.67 (d, 1H, J=8.4Hz), 3.43 (s, 2H), 2.50-2.34 (m, 8H), 2.14
15 (s, 3H), 2.14-2.08 (m, 6H), 1.75-1.74 (m, 2H), 1.75-1.72 (m, 2H).

MS (ESI): m/z 504.2 [M+H]⁺.

20 实施例 44 氮-(5-(1-甲基哌啶-4-基)-(6-甲基吡啶)-2-基)-5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷
-1,3'-吡啶]-5'-基)嘧啶-2-氨基

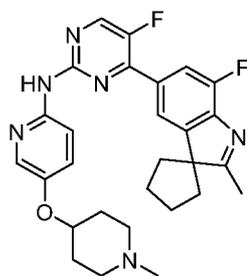


按照实施例 12 中相似的步骤得到标题化合物。

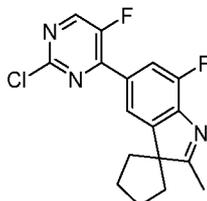
¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 9.84(s,1H), 8.70(s,1H), 8.11 (s, 1H), 7.98-8.01 (d,2H),
7.81-7.85 (d,1H), 2.87-2.90 (d,2H), 2.50-2.51(m,1H), 2.20-2.34 (m,6H), 1.78-1.98 (m,8H),
1.69-1.75 (m,6H).

25 MS (ESI): m/z 503.3 [M+H]⁺.

实施例 45 氮-(5-((1-甲基哌啶-4-基)氧基)-吡啶-2-基)-5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷
-1,3'-吡啶]-5'-基)嘧啶-2-氨基

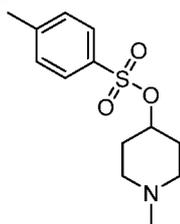


按照实施例 1 相似步骤得到中间体 5'-(2-氯-5-氟嘧啶-4-基)-7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]



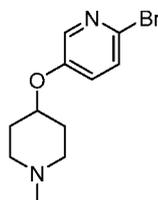
5

步骤 1 1-甲基哌啶-4-基 4 甲基苯磺酸酯



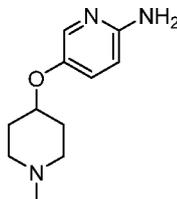
10 向反应瓶中加入 4-羟基-1-甲基哌啶 (1000mg, 8.69 mmol), 对甲苯磺酰氯(3310mg, 17.38 mmol), 二氯甲烷 (50ml), 三乙胺 (1 mL), 室温反应 2 h, 加入 50ml 水, 用二氯甲烷萃取三次, 每次 30ml.合并有机层, 用 50mg 饱和食盐水洗涤一次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 柱色谱分离(二氯甲烷/甲醇 = 50:1), 得到中间体 1.87g, 产率 80.0% (淡黄色固体)。

步骤 2 2-溴-5-((1-甲基哌啶-4-基)氧基)吡啶



15 向反应瓶中加入中间体 1-甲基哌啶-4-基 4 甲基苯磺酸酯 (1000mg, 3.70 mmol), 2-溴-5-羟基吡啶 (637mg, 3.70 mmol), DMF (50ml), 加热 90°C 反应 2 h, 加入 50ml 水, 用二氯甲烷萃取三次, 每次 30ml.合并有机层, 用 50mg 饱和食盐水洗涤一次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 柱色谱分离(二氯甲烷/甲醇 = 40:1), 得到中间体 0.49g, 产率 50.1% (淡黄色固体)。

步骤 3 5-((1-甲基哌啶-4-基)氧基)吡啶-2-胺



20 向反应瓶中加入中间体 2-溴-5-((1-甲基哌啶-4-基)氧基)吡啶 (1000mg, 3.70 mmol), 二(三甲基硅基)氨基钠 (618mg, 3.70 mmol), 四氢呋喃 (50ml), 2-(二环己基膦基)联苯 (120mg, 0.37 mmol), 三(二亚苄基茚丙酮)二钯 (338mg, 0.37mmol) 加热 65°C 反应 12 h, 加入 50ml 水, 用二氯甲烷萃取三次, 每次 30ml.合并有机层, 用 50mg 饱和食盐水洗涤一次,

无水硫酸钠干燥, 过滤, 柱色谱分离(二氯甲烷/甲醇 = 10:1), 得到中间体 0.37g, 产率 49.3% (黄色固体)。

步骤 4 按照实施例 1 步骤 6 的试验方法完成氮-(5-((1-甲基哌啶-4-基)氧基)-吡啶-2-基)-5-氟-4-(7-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-咪唑]-5'-基)嘧啶-2-氨基的合成。

- 5 ^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6), δ 9.69(s,1H), 8.63(s,1H), 7.93-7.99 (d, 1H), 7.80-7.83 (d,1H), 7.81-7.85(d,1H),7.12-7.14(d,1H),5.76-5.82(m,1H),5.02-5.13(m,2H),3.79(s,2H), 2.56-2.59(m,13H), 2.28-2.33 (m,6H), 1.74-1.99(m,2H).
MS (ESI): m/z 505.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

- 10 以下实验例中所用的对照品, 编号为 LY2835219, 参考专利 WO2010075074 制备方法制备, 其结构式如背景技术结构式 3 所示。

实验例 1 本发明化合物的 CDKs 激酶抑制活性测定

- 15 本发明所述化合物体外对 CDK(CDK1、CDK4、CDK6)激酶活性的抑制作用通过以下的方法进行测试。

1.1 仪器和试剂盒信息

名称	型号	生产厂家
摇板机	MTS2/4	IKA
酶标仪	M1000pro	TECAN
离心机	Avanti J-26XP	Beckman Coulter
ADP-Glo™ Kinase Assay + CDK1/CyclinA2 Kinase Enzyme System	V9211	Promega
ADP-Glo™ Kinase Assay + CDK4/CyclinE1 Kinase Enzyme System	V4489	Promega
ADP-Glo™ Kinase Assay + CDK6/CyclinD3 Kinase Enzyme System	V4511	Promega
ADP-Glo™ Kinase Assay + CDK9/CyclinK Kinase Enzyme System	V4105	Promega
5×Reaction Buffer A	V307A-C	Promega

1.2 实验准备:

- 20 1.2.1 激酶反应缓冲液 I 的配制: 将试剂盒中给出的 5×Reaction Buffer A (Promega; V307A-C) 用 Milli Q H₂O 和 0.1M DTT (二硫苏糖醇) 混合稀释成 4x 激酶缓冲液; 再按比例加入 Milli Q H₂O, 最终配制成 1x 激酶缓冲液。

激酶反应缓冲液 II 的配制: 在 1x 激酶反应缓冲液中加入 0.5 %DMSO (二甲基亚砜) 混匀即可。

1.2.2 激酶溶液的配制: 用 1x 激酶反应缓冲液将 100ng/ μl 激酶储液配制每个反应体系所需浓度的激酶溶液。

- 25 1.2.3 供试化合物和对照品 LY2835219 溶液的配制:

(1) 配制对照品 LY2835219 溶液

a. 分别取 1 μl 的 10 mM 标准品储液, 加入到 9 μl 的激酶反应缓冲液 I 中, 混匀; 再加

入 90 μ l 的激酶反应缓冲液 I，混匀；再加入 100 μ l 的激酶反应缓冲液 I，混匀；得到终浓度为 50 μ M。

b. 在 96-孔板的 B2-B10 中加入 40 μ l 的激酶反应缓冲液 II；在 B1 中加入 50 μ l 上述溶液；

5 c. 从孔 B1 中取出 10 μ l 加入 B2，混匀，然后取 10 μ l 加入到 B3，依次稀释 B9；得到依次 5 倍稀释的对照品溶液。

(2) 准备供试化合物溶液：

a. 分别取一定浓度的供试化合物溶液，用激酶反应缓冲液 I 稀释到终浓度为 50 μ M 的化合物溶液；

10 b. 在 96-孔板的 H2-H10 中加入 40 μ l 的激酶反应缓冲液 II；在 H1 中加入 50 μ l 上述溶液；

c. 从孔 H1 中取出 10 μ l 加入 H2，混匀，然后取 10 μ l 加入到 H3，依次稀释 H9；得到依次 5 倍稀释的供试化合物溶液。

1.2.4 准备反应底物和 ATP 混合溶液：

15 a. 准备 ATP 溶液：

200 μ l 0.1 mM ATP 溶液：2 μ l 10 mM ATP 加入 198 μ l 激酶反应缓冲液 I；

300 μ l 50 μ M ATP 溶液：加 150 μ l 的激酶反应缓冲液 I 到 150 μ l 上述 0.1mM ATP 溶液中；

b. 准备 300 μ l 的反应底物溶液：

将 150 μ l 1 μ g/ μ l 的反应底物储液，加入 150 μ l 激酶反应缓冲液 I 混匀；

20 c. 将上述 a/b 两种溶液混合分别得到混合溶液。

1.3 实验过程：1.3.1 取 2 μ l 各浓度的化合物溶液加入到 384 孔板中，离心 3min；

1.3.2 每孔加入 4 μ l 激酶溶液，18 $^{\circ}$ C，5000 rpm 离心 10 min，摇板机上摇匀 10 min；

1.3.3 每孔加入 4 μ l 底物和 ATP 混合溶液，18 $^{\circ}$ C，5000 rpm 离心 10 min，摇板机 37 $^{\circ}$ C 摇匀 90min；

25 1.3.4 取出 384 孔板，放置至室温；

1.3.5 每孔加入 10 μ l 的 ADP-Glo 试剂，18 $^{\circ}$ C、5000 rpm 离心 10 min，摇板机 25 $^{\circ}$ C 摇匀 40 min，终止反应；

1.3.6 每孔加入 20 μ l 的激酶检测试剂，18 $^{\circ}$ C、5000 rpm 离心 10 min，摇板机 25 $^{\circ}$ C 摇匀 30min；

30 1.3.7 M1000pro 酶标仪读取荧光数值。

1.4 数据处理：

按如下公式计算各化合物在各浓度点的抑制率，并通过软件 GraphPad Prism 5 进行曲线拟合得到 IC₅₀ 值。

35 各浓度点抑制率 (inh%) = $\frac{\text{零点浓度荧光值} - \text{各浓度点荧光值}}{\text{零点浓度荧光值}} \times 100\%$

40 1.5 检测结果：

由 WO2010075074 公开的 LY2835219 以及实施例 1-43 的化合物对 CDK1/CyclinA2 和 CDK6/CyclinD3 的抑制作用，以 IC₅₀ 表示，具体结果见表 1。

表 1 受试化合物对 CDK1/CyclinA2 和 CDK6/CyclinD3 抑制活性检测结果 (IC₅₀: nM)

实施例	CDK1/CyclinA2	CDK6/CyclinD3	CDK1/CDK6
LY2835219	319.43	3.81	83.83
1	2223.92	43.03	51.68
2		158.7	-

实施例	CDK1/CyclinA2	CDK6/CyclinD3	CDK1/CDK6
3	1678	79.06	21.22
4	-	2147	-
5	438.5	7.528	58.23
6	152.2	6.45	23.59
7	83.83	3.26	25.71
8	-	85.77	-
9	268.28	20.42	13.13
10	435.68	47.11	9.25
11	110.06	5.62	19.58
12	1071.23	3.78	283.33
13	327.00	0.39	838.46
14	233.64	4.07	57.40
15	26.92	4.31	6.25
16	95.70	9.02	10.61
17	2707.11	0.73	3708.37
18	189.86	2.74	69.29
19	64.82	65.49	0.99
20	1444.45	87.60	16.49
21	135.19	27.67	4.89
22	915.35	52.50	17.43
23	50.27	4.53	11.10
24	76.44	12.86	5.94
25	417.16	8.78	47.51
26	216.08	12.51	17.27
27	1160.23	16.21	71.57
28	328.47	6.24	52.63
29	82.42	3.145	26.20
30	176.58	0.49	360.37
31	-	58.84	-
32	142.03	10.14	14.01
33	166.28	15.61	10.65
34	111.59	5.13	21.75
35	64.03	8.74	7.33
36	100.9	3.79	26.65
37	73.67	22.87	3.22
38	19.83	0.20	99.15
39	38.51	5.65	6.82
40	161.60	24.97	6.47
41		76.65	
42	3681.98	2.33	1580.25
43	268.90	0.90	298.78

实施例	CDK1/CyclinA2	CDK6/CyclinD3	CDK1/CDK6
44	-	37.5	-
45	-	43.9	-

本发明部分代表化合物对 CDK9/CyclinD3、Pim-1 和 CDK2/CyclinE1 及 CDK4/CyclinE1 的抑制作用分别见表 2、表 3 和表 4。

表 2 部分受试化合物对 CDK9/CyclinD3 抑制活性检测结果 (IC₅₀: nM)

实施例	CDK1/CyclinA2	CDK6/CyclinD3	CDK9/CyclinD3	CDK1/CDK6	CDK9/CDK6
LY2835219	319.43	3.81	5.08	83.83	1.33
1	2223.92	43.03	244.97	51.68	5.69
3	1678	79.06	50.02	21.22	0.63
6	152.2	6.45	0.42	23.59	0.06
7	83.83	3.26	4.58	25.71	1.40
9	268.28	20.42	14.43	13.13	0.71
10	435.68	47.11	27.04	9.25	0.57
12	1071.23	3.78	57.19	283.33	18.75
13	327.00	0.39	2.56	838.46	6.56
16	95.70	9.02	16.37	10.61	1.81
17	2707.11	0.73	5.36	3708.37	7.33
18	189.86	2.74	1.00	69.29	0.36
20	1444.45	87.60	0.24	16.49	0.003
22	915.35	52.50	0.50	17.43	0.009
24	76.44	12.86	1.74	5.94	0.13
25	417.16	8.78	1.09	47.51	0.12
26	216.08	12.51	10.95	17.27	0.88
27	1160.23	16.21	2.83	71.57	0.17
28	328.47	6.24	0.96	52.63	0.15
30	176.58	0.49	0.43	360.37	0.88

5

表 3 部分受试化合物对 Pim-1 抑制活性检测结果 (IC₅₀: nM)

实施例	CDK1/ CyclinA2	CDK6/ CyclinD3	CDK9/ CyclinD3	Pim-1	CDK1/ CDK6	CDK9/ CDK6	Pim-1/ CDK6
LY2835219	319.43	3.81	5.08	3.92	83.83	1.33	1.03
1	2223.92	43.03	244.97	220.42	51.68	5.69	5.12
3	1678	79.06	50.02	197.8	21.22	0.63	2.50
6	152.2	6.45	0.42	15.09	23.59	0.06	2.33
7	83.83	3.26	4.58	461.39	25.71	1.40	141.53
9	268.28	20.42	14.43	173.89	13.13	0.71	8.51
12	1071.23	3.78	57.19	15.11	283.33	18.75	3.99
13	327.00	0.39	2.56	2.22	838.46	6.56	5.69

实施例	CDK1/ CyclinA2	CDK6/ CyclinD3	CDK9/ CyclinD3	Pim-1	CDK1/ CDK6	CDK9/ CDK6	Pim-1/ CDK6
14	233.64	4.07	-	28.65	57.40	-	7.03
16	95.70	9.02	16.37	686.40	10.61	1.81	76.10
17	2707.11	0.73	5.36	38.27	3708.37	7.33	52.43
24	76.44	12.86	1.74	72.81	5.94	0.13	5.66

表 4 部分受试化合物对 CDK4 和 CDK2 的抑制作用 (IC₅₀: nM)

实施例	CDK1/ CyclinA2	CDK2/ CyclinE1	CDK4/ CyclinE1	CDK6/ CyclinD3	CDK9/ CyclinD3	Pim-1	CDK1/ CDK6	CDK9/ CDK6	Pim-1/ CDK6
LY2835219	319.43	769.22-	14.83	3.81	5.08	3.92	83.83	1.33	1.03
6	152.2	-	80.9	6.45	0.42	15.09	23.59	0.06	2.33
12	1071.23	394.21	4.46	3.78	57.19	15.11	283.33	18.75	3.99
17	2707.11	2320.88	2.62	0.73	5.36	38.27	3708.37	7.33	52.43

1.6 试验结论:

1) 本发明的化合物对 CDK6 和 CDK4 具有显著的抑制作用。

- 2) CDK1/CDK6、CDK9/CKD6 和 Pim-1/CDK6 可以体现化合物对于蛋白激酶的选择性, 数值越大, 则化合物对 CDK6 的选择性越好, 预示着化合物的泛蛋白激酶抑制的毒性可能越小。对照化合物(LY2835219)的 CDK1/CDK6=83.83, CDK9/CDK6=1.33, Pim-1/CDK6=1.03; 本发明的部分化合物显示出比 LY2835219 更好的选择性, 特别是实施例 17 制备的化合物表现出对于 CDK6 具有更高的酶学活性, 对于 CDK1, CDK9 和 Pim1 具有更好的选择性。

10

实验例 2 本发明代表化合物对人乳腺癌细胞 MDB-MA-231 的增殖抑制测定

2.1 实验材料: 人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 购于北京协和细胞资源中心, DAPI (5 mg/mL, 碧云天, c1002), 4%多聚甲醛 (鼎国生物, AR-0211), 黑色透明底 96 孔板 (PE, 6005182), In Cell Analyzer 2200 (GE Healthcare)

15 2.2 实验准备:

2.2.1 人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 培养基的配制: RPIM1640 + 10% FBS + 1% 青霉素/链霉素

2.2.2 供试化合物和标准品 LY2835219 溶液的配制:

(1) 配制标准品 LY2835219 溶液

- 20 a. 分别取 3.6 μl 的 10 mM 标准品储液, 加入到 6.4 ul 培养基中, 混匀; 再加入 90μl 的培养基, 混匀; 再加入 200μl 的培养基, 混匀; 配制成 20 uM 起始浓度。

b. 在 96-孔板的 B2-B10 中加入 200 μl 的含 0.2% DMSO (二甲基亚砷) 的培养基; 在 B1 中加入 300 μl 上述溶液;

- 25 c. 从孔 B1 中取出 100 μl 加入 B2, 混匀, 然后取 100 μl 加入到 B3, 依次稀释 B9; 得到依次 3 倍稀释的标准品溶液。

(2) 准备供试化合物溶液:

a. 分别取一定浓度的供试化合物溶液, 用培养基稀释到终浓度为 20 μM 的化合物溶液;

b. 在 96-孔板的 H2-H10 中加入 200 μl 的含 0.2% DMSO (二甲基亚砷) 的培养基; 在 H1 中加入 300 μl 上述溶液;

- 30 c. 从孔 H1 中取出 100 μl 加入 H2, 混匀, 然后取 100 μl 加入到 H3, 依次稀释 H9; 得到依次 3 倍稀释的供试化合物溶液。

2.3 实验过程:

2.3.1 MDA-MB-231 细胞分别以 4000 cells/100ul/well 接种至 96 孔黑色透明底细胞板, 37°C 培养过夜;

2.3.2 上述样品分别以 100 μ l/孔加入接种有细胞的培养板中, 轻拍使混匀, 37°C 孵育 72 h;

5 2.3.3 固定: 取出细胞板, 去除培养基, 每孔加入 50 μ l 4% 多聚甲醛固定 10 min;

2.3.4 加入 50 μ l 0.1 M glycine (甘氨酸) 中和 10 min;

2.3.5 1 \times PBS (磷酸盐缓冲液 PH7.2) 洗两次;

2.3.6 通透: 每孔加 50 μ l 0.2% TritonX-100 (曲拉通) 室温通透 10 min;

2.3.7 1 \times PBS (磷酸盐缓冲液 PH7.2) 洗两次;

10 2.3.8 5 mg/mL 的 DAPI 储备液 1:5000 稀释 (终浓度 1 μ g/ml) 室温染色 20 min

2.3.9 1 \times PBS (磷酸盐缓冲液 PH7.2) 洗三次;

2.3.10 In cell analyser 扫描并分析。

2.4 数据处理:

15 按如下公式计算各化合物在各浓度点的抑制率, 并通过软件 GraphPad Prism 5 进行曲线拟合得到 IC₅₀ 值。

$$\text{各浓度点抑制率 (inh\%)} = \frac{\text{零点浓度细胞数值} - \text{各浓度点细胞数值}}{\text{零点浓度细胞数值}} \times 100\%$$

2.5 测定结果:

25 由 WO2010075074 公开的 LY2835219 以及实施例 12 和 17 的化合物的细胞学活性测定结果, 以 IC₅₀ 表示, 具体结果见表 5。

表 5 本发明代表化合物对人乳腺癌细胞 MDB-MA-231 增殖的抑制活性 (IC₅₀: nM)

实施例	IC ₅₀
LY2835219	229.05
12	182.72
17	109.82

2.6 实验结论:

30 实施例 12 和 17 的化合物对 MDA-MB-231 细胞系具有明显的增殖抑制活性, 相对于对照化合物 LY2835219, 本发明代表化合物具有更高的增殖抑制活性。

实验例 3 本发明代表化合物的大鼠药代动力学测定

3.1 实验摘要

35 以 SD 大鼠为受试动物, 应用 LC/MS/MS 方法测定大鼠静脉注射给药和灌胃给药代表化合物后不同时刻血浆中的药物浓度, 以研究本发明化合物在大鼠体内的药代动力学行为, 评价其药动学特征。

3.2 实验方案

3.2.1 供试药品:

40 本发明实施例 17 制备的化合物;

对照药 LY2835219, 自制。

3.2.2 供试动物:

健康成年 SD 大鼠 12 只, 雄性, 6-8 周龄, 体重 200-250g, 购自苏州昭衍新药研究中心

有限公司，动物生产许可证号：SCXK(苏)2013-0003

3.2.3 供试药物配制

灌胃给药：称取适量样品，加入 0.1%羟乙基纤维素/0.5%吐温 80 至终体积，配成 1mg/ml 溶液；

5 静脉注射：称取适量样品，加入 10%的 N-甲基-2-吡咯烷酮和 90%的 18%磺丁基- β -环糊精至终体积，配成 0.4mg/ml 溶液，供静脉注射给药。

3.2.4 供试药品给药

静脉注射给药：每个供试化合物 3 只雄性 SD 大鼠，禁食一夜后分别静脉注射给药，剂量为 2 mg/kg，给药体积为 1 ml/kg。

10 灌胃给药：每个供试化合物 3 只雄性 SD 大鼠，禁食一夜后分别灌胃给药，剂量为 5mg/kg，给药体积为 5 ml/kg。

3.3 实验操作

15 在给药前及给药后 0.0833、0.25、0.5、1、2、4、8、12、24 小时后，经过颈动脉插管取血。全血 EDTA-K2 抗凝，离心去上清，-20 摄氏度冷冻保存，直至样品分析。用 LC-MS/MS 进行血浆样品分析，蛋白沉淀法进行样品前处理，样品分析线性范围 1-2000ng/ml。最低定量限为 1ng/ml。

3.4 药代动力学数据结果

本发明化合物的药代动力学参数见表 6 和表 7。

表 6 本发明化合物 17 的大鼠单次静脉给药 PK 参数 (Mean \pm SD)

PK 参数	LY2835219	实施例 17
半衰期 T _{1/2} (hr)	3.69 \pm 1.40	8.67 \pm 4.98
曲线下面积 AUC _{0-t} (ng·hr/mL)	1499 \pm 337.3	1018 \pm 239
曲线下面积 AUC _{0-∞} (ng·hr/mL)	1535 \pm 346.9	1220 \pm 456
表观分布容积 V _z (L/Kg)	6.95 \pm 2.43	19.42 \pm 5.89
清除率 Cl (mL/min/kg)	22.4 \pm 4.49	30.0 \pm 11.1
滞留时间 MRT(hr)	3.82 \pm 1.44	7.78 \pm 1.30

20

表 7 本发明化合物 17 的大鼠单次灌胃给药 PK 参数 (Mean \pm SD)

PK 参数	LY2835219	实施例 17
半衰期 T _{1/2} (hr)	4.07	2.00
血药浓度 C _{max} (ng/mL)	312 \pm 33.0	188 \pm 75
曲线下面积 AUC _{0-t} (ng·hr/mL)	3275 \pm 731	2608 \pm 1217.8
曲线下面积 AUC _{0-∞} (ng·hr/mL)	3438	5256
滞留时间 MRT(hr)	7.97 \pm 1.17	10.21 \pm 0.27
生物利用度(%)	87.4	102.5

3.5 实验结论：本发明的代表化合物（实施例 17 制备），相对于化合物 LY2835219，在大鼠中具有更高的生物利用度和良好的口服吸收效果。

25

实验例 4 本发明代表化合物的小鼠药代动力学测定

4.1 实验摘要

以 ICR 小鼠为受试动物，应用 LC/MS/MS 方法测定小鼠灌胃、静脉注射给予本发明代表化合物后不同时刻血浆中的药物浓度，以研究本发明化合物在小鼠体内的药代动力学行为，评价其药动学特征。

30

4.2 实验方案

4.2.1 供试药品:

本发明实施例 17 制备的化合物;

对照药 LY2835219, 自制。

4.2.2 供试动物:

- 5 健康成年 ICR 小鼠, 12 只, 雄性, 6-8 周龄, 体重 20-25g, 购自苏州昭衍新药研究中心有限公司, 动物生产许可证号: SCXK(苏)2013-0003

4.2.3 供试药物配制

称取适量样品, 加入 0.1%羟乙基纤维素/0.5%吐温 80 至终体积, 配成 0.5mg/ml 溶液, 供灌胃给药。

- 10 称取适量样品, 加入 10%的 N-甲基-2-吡咯烷酮和 90%的 18%磺丁基- β -环糊精至终体积, 配成 0.2mg/ml 溶液, 供静脉注射给药。

4.2.4 供试药品给药

每个供试药品, 雄性 ICR 小鼠 3 只, 禁食一夜后分别灌胃给药, 剂量为 5mg/kg, 给药体积为 10 ml/kg;

- 15 每个供试药品, 雄性 ICR 小鼠 3 只, 禁食一夜后分别静脉注射给药, 剂量为 2 mg/kg, 给药体积为 10 ml/kg.

4.3 实验操作

- 灌胃给药组于给药前及给药后在 0.25、0.5、1、2、4、8、12、24 小时后, 经过颈动脉插管取血。全血 EDTA-K2 抗凝, 离心去上清, -20 摄氏度冷冻保存, 直至样品分析。静脉注射给药组于给药前及给药后在 0.083h、0.25、0.5、1、2、4、8、12、24 小时后, 经过颈动脉插管取血。血浆样品处理同灌胃给药。用 LC-MS/MS 进行血浆样品分析, 蛋白沉淀法进行样品前处理, 样品分析线性范围 1-2000ng/ml. 最低定量限为 1ng/ml.

4.4 药代动力学数据结果: 见表 8 和表 9。

表 8 本发明化合物 17 的小鼠单次静脉给药 PK 参数 (Mean \pm SD)

PK 参数	LY2835219	实施例 17
半衰期 T _{1/2} (hr)	1.68 \pm 0.10	9.1 \pm 0.26
曲线下面积 AUC _{0-t} (ng·hr/mL)	674 \pm 82.1	1137 \pm 77.8
曲线下面积 AUC _{0-∞} (ng·hr/mL)	679 \pm 81.0	1327 \pm 4
表观分布容积 V _z (L/Kg)	7.21 \pm 1.08	19.8 \pm 0.81
清除率 Cl (mL/min/kg)	49.6 \pm 5.72	25.2 \pm 1.72
滞留时间 MRT(hr)	1.64 \pm 0.17	7.51 \pm 0.28

25

表 9 本发明化合物 17 的小鼠单次灌胃给药 PK 参数 (Mean \pm SD)

PK 参数	LY2835219	实施例 17
半衰期 T _{1/2} (hr)	1.70 \pm 0.02	8.38 \pm 3.16
血药浓度 C _{max} (ng/mL)	154 \pm 6.4	134 \pm 11.8
曲线下面积 AUC _{0-t} (ng·hr/mL)	756 \pm 34	2134 \pm 96.9
曲线下面积 AUC _{0-∞} (ng·hr/mL)	765 \pm 34	2504 \pm 387
滞留时间 MRT(hr)	3.08 \pm 0.02	9.45 \pm 1.05
生物利用度(%)	45.1	75.1

4.5 实验结论: 本发明的代表化合物 17, 相对于化合物 LY2835219, 在小鼠中具有更高的生物利用度, 更长的半衰期, 具有良好的口服吸收效果。

30

实验例 5 本发明代表化合物 17 血浆和脑暴漏水平的测定

5.1 实验摘要

以 CD-1 小鼠为受试动物,应用 LC/MS/MS 方法测定小鼠单次灌胃给药本发明代表化合物后不同时刻血浆和脑组织中的药物浓度,以研究本发明化合物在小鼠体内的血浆和脑暴露水平。

5 5.2 实验方案

5.2.1 供试药品:

本发明实施例 17 制备的化合物;

对照药 LY2835219, 自制。

5.2.2 供试动物:

10 健康成年 CD-1 小鼠, 24 只, 雄性, 6-8 周龄, 体重 20-25g, 购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 动物生产许可证号: SCXK (沪) 2013-0016。

5.2.3 供试药物配制

称取适量样品, 加入 0.1%羟乙基纤维素/0.5%吐温 80 至终体积, 配成 1.0mg/ml 溶液。

5.2.4 供试药品给药

15 每个供试药品, 雄性 CD-1 小鼠 12 只, 禁食一夜后分别灌胃给药, 剂量为 10mg/kg, 给药体积为 10 ml/kg。

5.3 实验操作

LY2835219: 给药前及给药后在 0.25、1.5、6 小时时, 经过颈动脉插管取血, 同时处死 3 只小鼠, 收集整个脑并且捣碎后冻存于液氮中; 给药后 10 小时, 将剩余的动物处死, 并且通过心脏穿刺采集全血, 收集整个脑并且捣碎后冻存于液氮中。

20 实施例 17: 给药前及给药后在 2、4、24 小时时, 经过颈动脉插管取血, 同时处死 3 只小鼠, 收集整个脑并且捣碎后冻存于液氮中; 给药后 48 小时, 将剩余的动物处死, 并且通过心脏穿刺采集全血, 收集整个脑并且捣碎后冻存于液氮中。

25 全血样品处理: 采集的全血 EDTA-K2 抗凝, 离心去上清, -20℃冷冻保存, 直至样品用 LC-MS/MS 分析。

脑部匀浆取样: 脑部匀浆用 5 倍于脑匀浆溶液体积的 PBS(pH=7.4): MeOH (v:v, 2:1)溶液分散, 取 100 μ L, 用 600 μ L IS 沉淀其中的蛋白, 混合物在 20-25℃, 13000rpm 离心 15 分钟, 取 50 μ L 上层清液用 150 μ L 含有 0.3%FA 的水混合, 4℃离心, 取 5 μ L 样品用 LC-MS/MS 进行分析。

30 样品分析线性范围 1-2000ng/ml. 最低定量限为 1ng/ml。

5.4 血脑暴露水平测定结果: 见表 10。

表 10 受试化合物在 CD-1 小鼠中血浆和脑部的平均暴露

参数		LY2835219	17
血药浓度 C _{max} (ng/mL)	血浆	836	639
	脑	188	1270
	脑/血浆	0.22	1.98
血药浓度达峰时间 T _{max} (h)	血浆	1.50	4.00
	脑	6.00	4.00
曲线下面积 AUC _{0-last} (ng·h/mL)	血浆	4247	7661
	脑	1113	16786
	脑/血浆	0.28	2.19

35 5.5 实验结论: 本发明的代表化合物 (实施例 17 制备), 相对于化合物 LY2835219, 具有更好的血脑分布, 更高的 AUC_{0-last} 比值 (脑部/血浆), 更高的 C_{max} 比值 (脑部/血浆), 而

且脑部 T_{\max} 和血浆中的 T_{\max} 相等, 说明药物在脑部与血浆中具有相似的 PK 行为。提示本发明的化合物可以穿过血脑屏障从而抑制脑部肿瘤 (脑癌) 的生长, 治疗脑癌。

实验例 6 本发明代表化合物 17 对 U87 MG 细胞系的增殖抑制测定

5 6.1 实验材料: 人胶质瘤细胞系 U87 MG 购于上海中科院细胞库, DAPI (5 mg/mL, 碧云天, c1002), 4%多聚甲醛 (鼎国生物, AR-0211), 黑色透明底 96 孔板 (PE, 6005182), In Cell Analyzer 2200 (GE Healthcare)。

6.2 实验准备:

6.2.1 U87 MG 培养基的配制: RPIM1640 + 10% FBS + 1% 青霉素/链霉素

10 6.2.2 供试化合物和标准品 LY2835219 溶液的配制:

(1) 配制标准品 LY2835219 溶液

a. 分别取 3.6 μ l 的 10 mM 标准品储液, 加入到 6.4 μ l 培养基中, 混匀; 再加入 90 μ l 的培养基, 混匀; 再加入 200 μ l 的培养基, 混匀; 配制成 20 μ M 起始浓度。

15 b. 在 96-孔板的 B2-B10 中加入 200 μ l 的含 0.2% DMSO (二甲基亚砜) 的培养基; 在 B1 中加入 300 μ l 上述溶液;

c. 从孔 B1 中取出 100 μ l 加入 B2, 混匀, 然后取 100 μ l 加入到 B3, 依次稀释 B9; 得到依次 3 倍稀释的标准品溶液。

(2) 准备供试化合物溶液:

a. 分别取一定浓度的供试化合物溶液, 用培养基稀释到终浓度为 20 μ M 的化合物溶液;

20 b. 在 96-孔板的 H2-H10 中加入 200 μ l 的含 0.2% DMSO (二甲基亚砜) 的培养基; 在 H1 中加入 300 μ l 上述溶液;

c. 从孔 H1 中取出 100 μ l 加入 H2, 混匀, 然后取 100 μ l 加入到 H3, 依次稀释 H9; 得到依次 3 倍稀释的供试化合物溶液。

6.3 实验过程:

25 6.3.1 U87 MG 细胞分别以 4000 cells/100 μ l/well 接种至 96 孔黑色透明底细胞板, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜;

6.3.2 上述样品分别以 100 μ l/孔加入接种有细胞的培养板中, 轻拍使混匀, 37 $^{\circ}$ C 孵育 72 h;

6.3.3 固定: 取出细胞板, 去除培养基, 每孔加入 50 μ l 4%多聚甲醛固定 10 min;

30 6.3.4 加入 50 μ l 0.1 M glycine (甘氨酸) 中和 10 min;

6.3.5 1 \times PBS (磷酸盐缓冲液 PH7.2) 洗两次;

6.3.6 通透: 每孔加 50 μ l 0.2% TritonX-100 (曲拉通) 室温通透 10 min;

6.3.7 1 \times PBS (磷酸盐缓冲液 PH7.2) 洗两次;

6.3.8 5 mg/mL 的 DAPI 储备液 1:5000 稀释 (终浓度 1 μ g/ml) 室温染色 20 min

35 6.3.9 1 \times PBS (磷酸盐缓冲液 PH7.2) 洗三次;

6.3.10 In cell analyser 扫描并分析。

6.4 数据处理:

按如下公式计算各化合物在各浓度点的抑制率, 并通过软件 GraphPad Prism 5 进行曲线拟合得到 IC₅₀ 值。

$$\text{各浓度点抑制率 (inh\%)} = \frac{\text{零点浓度细胞数值} - \text{各浓度点细胞数值}}{\text{零点浓度细胞数值}} \times 100\%$$

45

6.5 测定结果:

由 WO2010075074 公开的 LY2835219 以及实施例 17 的化合物的细胞学活性测定结果,

以 IC₅₀ 表示，具体结果见表 11。

表 11 本发明代表化合物对 U87 MG 细胞系增殖的抑制活性 (IC₅₀: nM)

实施例	IC ₅₀
LY2835219	150.70
17	35.43

5 6.6 实验结论:

实施例 17 的化合物对 U87 MG 细胞系具有明显的增殖抑制活性，相对于对照化合物 LY2835219，本发明代表化合物具有更高的增殖抑制活性。

实验例 7 本发明化合物 17 以及与替莫唑胺的组合用药在 U87-luc 原位脑异种移植模型

10 中的药效学研究

7.1 实验摘要

以成年雌性 BALB/c 裸鼠为受试动物，应用原位脑异种移植模型，灌胃给药以研究本发明代表化合物 17 对雌性 BALB/c 裸鼠中值生存的影响。

7.2 实验方案

15 7.2.1 供试药品:

本发明实施例 17 制备的化合物;

对照药 LY2835219, 自制。

替莫唑胺购自 selleck。

7.2.2 供试动物:

20 健康成年雌性 BALB/c 裸鼠，8 只/组，6-8 周龄，体重 18-22gg, 购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司，动物生产许可证号：2008001658261; 2008001658263。

7.2.3 供试化合物的配置

称取适量化合物 17，加入 0.1%羟乙基纤维素/0.5%吐温 80 的溶媒至 0.3125mg/ml。

称取适量替莫唑胺样品，加入 1%CMC-Na+0.25%Tween80 的溶媒至 0.3mg/ml。

25 7.3 原位脑异种移植模型

将成年雌性 BALB/c 裸鼠以 80mg/kg 剂量的戊巴比妥钠腹腔注射进行麻醉。为了减轻疼痛，在术前 30 分钟以及术后 6 个小时给动物皮下注射丁丙诺啡，剂量是 0.1mg/kg。在麻醉后观察动物，直至所有的动物苏醒。

30 麻醉后的动物被恰当固定，动物的头部皮肤用 70%的乙醇消毒，在中线偏右侧、前额至耳间线之间实施约 10mm 长的切口。在距离每一只动物前卤右侧 2 mm 及冠状缝前侧 1 mm 处的右侧大脑额叶处接种 3 × 10⁵ U87-luc 细胞 (3 μl, PBS 和 Matrigel 以 4:1 混合)。切口用 No.6 线缝合，用聚乙烯吡咯碘酮消毒。动物被保暖直到复苏。在肿瘤细胞移植后 6 天，根据荧光信号强度值，以分层随机法对荷瘤动物进行分组，分组给药时平均生物发光达到了 2.812E+07 photons/sec。不同的动物组按照不同的剂量开始给药，总计给药时间为 35 天。

35 7.4 本发明化合物 17 以及与替莫唑胺的组合用药在 U87-luc 原位脑异种移植模型中的中值生存 (天)

表 12 化合物 17 以及与替莫唑胺的组合用药引起的中值生存

组	中值生存(天)	P value ^b	P value ^c
溶媒	30 (29~37) ^a	-	-

化合物 17 3.125 mg/kg QD	38.5 (26~59)	0.0822	-
化合物 17 6.25 mg/kg QD	43.5 (31~48)	0.0007	-
化合物 17 12.5 mg/kg QD	44.5 (31~114)	0.0004	-
化合物 17 25 mg/kg QD	61 (41~76)	<0.0001	-
化合物 17 50 mg/kg QD	78.5 (63~>114)	<0.0001	-
替莫唑胺 3 mg/kg IP Day0,7,14,21,28	47 (38~83)	<0.0001	-
化合物 17 6.25 mg/kg QD +替莫唑胺 3 mg/kg IP Day0,7,14,21,28	57 (42~>114)	<0.0001	0.0454

a 生存时间范围。

b 各组与溶媒组对照时的 p 值。

c 各组与替莫唑胺单剂量组对照时的 p 值。

- 5 7.5 实验结论: 本发明的代表化合物 17 在 U87-luc 原位脑异种移植模型中能够显著延长动物的中值生存期, 并且具有剂量依赖关系。在与替莫唑胺的组合用药研究中, 相比于替莫唑胺单独给药, 组合给药更加延长了动物的中值生存期。

- 10 总之, 本发明提供了一系列新的具有选择性 CDK4/6 激酶抑制活性的化合物, 其活性优于或与目前处于 III 期临床试验的候选药物 LY2835219 相当, 部分化合物表现出更好的选择性。而且优选的化合物口服吸收良好、血脑分布好, 对 U87-luc 原位脑异种移植模型具有显著的药效, 预示着本发明的化合物有希望被开发成新的治疗细胞增殖相关疾病, 尤其是恶性肿瘤 (特别是脑癌) 的药物, 为临床医生和患者提供新的选择。

试剂盒

- 15 本发明还提供了一种试剂盒, 所述试剂盒包括结构式 I-V、VIII 的化合物或其各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体, 氘代化合物, 前药或其混合物形式, 或结构式 I-V 和 VIII 的化合物或其各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体, 氘代化合物, 前药或其混合物形式的药学上可以接受的盐或溶剂化合物。

- 20 此外, 所述试剂盒还可包括使用说明书。

药物组合物

- 25 本发明还涉及了一种用于治疗细胞增殖障碍性疾病的组合产品, 其包含药学上可接受的载体, 以及结构式 I-V、VIII 的化合物或其各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体, 氘代化合物, 前药或其混合物形式, 或结构式 I-V、VIII 的化合物或其各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体, 氘代化合物, 前药或其混合物形式的药学上可以接受的盐或溶剂化合物。所述化合物或其各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体, 氘代化合物, 前药或其混合物形式, 或结构式 I-V 和 VIII 的化合物或其各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体, 氘代化合物, 前药或其混合物形式的药学上可以接受的盐或溶剂化合物在该药物组合物中可以为有效量的或治疗有效量的。

如本文所用, “有效量”是指可对人和/或动物产生功能或活性的且可被人或/或动物所接受的量。

如本文所用, “药学上可接受的”成分是适用于人和/或动物 (如哺乳动物或禽类) 而无过

度不良副反应（如毒性、刺激和变态反应）的，即具有合理的效益/风险比的物质。“药学上可接受的载体”是指用于给药的载体，可以包括各种赋形剂和稀释剂等。这类载体可以包括但不限于：水、生理盐水、脂质体、脂质、蛋白、蛋白-抗体缀合物、肽类物质、纤维素、纳米凝胶、缓冲液、葡萄糖、甘油、乙醇及其组合。载体的选择通常应与给药方式相匹配，这是本领域的普通技术人员所熟知的。

本发明所述的有效量可随给药的模式和待治疗的疾病的严重程度等而变化。优选的有效量可以由本领域普通技术人员根据各种因素来确定（例如通过临床试验）。所述的因素包括但不限于：所述的活性成分的药代动力学参数，例如生物利用率、代谢、半衰期等；患者所要治疗的疾病的严重程度、患者的体重、患者的免疫状况、给药的途径等。

10 治疗方法

本发明还提供了一种治疗细胞增殖性疾病的方法，所述方法包括对所述患者通过口服或非口服途径给予有效剂量的结构式 I-V、VIII 的化合物或其各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体，氘代化合物，前药或其混合物形式，或结构式 I-V 和 VIII 的化合物或其各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体，氘代化合物，前药或其混合物形式的药学上可以接受的盐或溶剂化物，或上述药物组合物。

所述口服或非口服途径可以为通过胃肠道、鼻腔、气管、肺、非病灶部位的静脉或表皮、皮内、皮下、心内、肌肉、骨髓、腹腔、硬膜外、口腔、舌下、眼部、直肠、阴道、尿道、耳道等途径给药。优选施用方式或给药方式包括：口服、呼吸道、注射、透皮、粘膜或腔道给药。

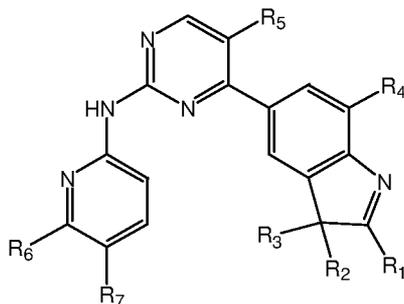
其中，所述口服给药包括吞服、含化等。所述呼吸道给药方式包括吸入方式，例如超声雾化吸入、氧气雾化吸入、手压式雾化吸入等。所述注射给药方式包括动脉注射、静脉注射、肌肉注射、心内注射、皮内注射等。所述透皮给药或经皮给药方式，包括离子导入法、电致孔透皮法等。所述粘膜给药方式包括鼻粘膜给药、口腔粘膜给药、眼粘膜给药、直肠粘膜给药、子宫给药以及阴道粘膜给药等。所述腔道给药方式包括直肠给药、阴道给药、尿道给药、鼻腔给药、耳道给药等。

在本发明所提及的所有文献（包括专利文献或非专利文献）都在本发明中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。

尽管本发明已进行了一定程度的描述，明显地，在不脱离本发明的精神和范围的条件下，可进行各个条件的适当变化。可以理解，本发明不限于所述实施方案，而归于权利要求的范围，其包括所述每个因素的等同替换。

权 利 要 求

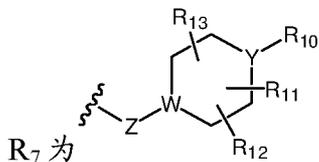
1. 一种结构式 I 所示的化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体、氘代化合物，前药或其混合物形式，或结构式 I 的化合物、其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体，氘代化合物，前药或其混合物的药学上可以接受的盐或溶剂化物，



I

其中， R_1 , R_2 , R_3 各自独立地选自氢原子、未被取代的 C_1 - C_6 的烷基或被一个或多个选自 C_1 - C_6 的烷基、 C_3 - C_6 的环烷基、 C_1 - C_6 的卤代烷基、 C_1 - C_6 的烷氧基、羟基、卤素、氰基、

- 10 $-NR_8R_9$ 、 $-\overset{\text{O}}{\parallel}CNR_8R_9$ 、 $-\overset{\text{O}}{\parallel}CR_8$ 、 $-\overset{\text{O}}{\parallel}O-CR_8$ 或 $-\overset{\text{O}}{\parallel}O-COR_8$ 的取代基取代的 C_1 - C_6 的烷基；
或者 R_1 , R_2 , R_3 中的任意两个与各自连接的 C 原子一起形成饱和或不饱和的 3-7 元环；
 R_4 和 R_5 各自独立地选自氢、卤素，且 R_4 和 R_5 中至少一个是卤素；
 R_6 选自氢原子、 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_6 烷氧基、羟基或卤素；



- 15 R_7 为 Z 是羰基、O、S、亚胺基、磺酰基或 $-(CH_2)_n-$ ， $n=0-4$ 的整数； W 和 Y 各自独立地是 C、N、O 或 S，但 W 和 Y 不能同时是 C，且当 Z 是 O 或 S 时， W 是 C； R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 和 R_{13} 各自独立地选自氢原子、 C_1 - C_6 的烷基、 C_3 - C_6 的环烷基、

C_1 - C_6 的羟基烷基、 C_1 - C_6 的卤代烷基、 C_1 - C_6 的烷氧基、羟基、卤素、氰基、 $-NR_8R_9$ 、 $-\overset{\text{O}}{\parallel}CNR_8R_9$ 、

$-\overset{\text{O}}{\parallel}CR_8$ 、 $-\overset{\text{O}}{\parallel}O-CR_8$ 或 $-\overset{\text{O}}{\parallel}O-COR_8$ ，且 $Y=N$ 时， R_{10} 不能是 NH_2 、 $-NHR_8$ 、 $-NR_8R_9$ 、 $-\overset{\text{O}}{\parallel}CNR_8R_9$ 、 $-\overset{\text{O}}{\parallel}CR_8$ 、

$-\overset{\text{O}}{\parallel}O-CR_8$ 或 $-\overset{\text{O}}{\parallel}O-COR_8$ ；

- 20 或者， R_6 和 R_7 与其连接的 C 原子一起形成含一个或多个选自 N、O 或 S 的 5-7 元杂环，并且所述 5-7 元杂环被一个或多个选自 C_1 - C_6 的烷基、 C_3 - C_6 的环烷基、 C_1 - C_6 的卤代烷基、

C_1 - C_6 的烷氧基、 C_1 - C_6 的羟基烷基、羟基、卤素、氰基、 $-NH_2$ 、 $-NHR_8$ 、 $-NR_8R_9$ 、 $-\overset{\text{O}}{\parallel}CNR_8R_9$ 、

$-\overset{\text{O}}{\parallel}CR_8$ 、 $-\overset{\text{O}}{\parallel}O-CR_8$ 或 $-\overset{\text{O}}{\parallel}O-COR_8$ 的取代基所取代；

其中, R_8 和 R_9 各自独立地选自氢原子、 C_1-C_6 的烷基、 C_1-C_6 的羟基烷基。

2. 根据权利要求 1 所述结构式 I 所示的化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体, 氘代化合物, 前药或其混合物形式, 或结构式 I 的化合物、其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体, 氘代化合物, 前药或其混合物的药学上可以接受的盐或溶剂化物, 其特征在于, R_1 , R_2 , R_3 各自独立地选自氢原子、未被取代的 C_1-C_6 的烃基或被一个或多个选自 C_1-C_6 的烃基、 C_3-C_6 的环烷基、 C_1-C_6 的卤代烷基、 C_1-C_6 的烷氧基、羟基或卤素的取代基取代的 C_1-C_6 的烃基;

5 优选的, R_1 , R_2 , R_3 各自独立地选自氢原子、未被取代的 C_1-C_6 的烃基或被一个或多个选自 C_1-C_6 的烃基、羟基或卤素的取代基取代的 C_1-C_6 的烃基;

10 进一步优选的, R_1 , R_2 , R_3 各自独立地选自氢原子、未被取代的 C_1-C_6 的直链或支链烷基、未被取代的 C_2-C_4 的直链或支链烯基;

最优选的, R_1 , R_2 , R_3 各自独立地选自氢原子、未被取代的 C_1-C_4 的直链或支链烷基。

15 3. 根据权利要求 1 所述结构式 I 所示的化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体, 氘代化合物, 前药或其混合物形式, 或结构式 I 的化合物、其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体, 氘代化合物, 前药或其混合物的药学上可以接受的盐或溶剂化物, 其特征在于, R_2 和 R_3 与共同连接的 C 原子一起形成饱和或不饱和的 3-7 元环; 更优选的, R_2 和 R_3 与共同连接的 C 原子一起形成饱和的 3-7 元环。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述结构式 I 所示的化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体, 氘代化合物, 前药或其混合物形式, 或结构式 I 的化合物、其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体, 氘代化合物, 前药或其混合物的药学上可以接受的盐或溶剂化物, 其特征在于, R_4 和 R_5 各自独立地是氢、氟或氯, 且 R_4 和 R_5 中至少一个是氟或氯;

25 优选的, R_4 和 R_5 各自独立地是氢或氟, 且 R_4 和 R_5 中至少一个是氟;

最优选的, R_4 是氢或氟, R_5 是氟。

30 5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述结构式 I 所示的化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体, 氘代化合物, 前药或其混合物形式, 或结构式 I 的化合物、其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体, 氘代化合物, 前药或其混合物的药学上可以接受的盐或溶剂化物, 其特征在于, R_6 选自氢原子或 C_1-C_6 的烷基。

35 6. 根据权利要求 1 至 5 中任一项所述结构式 I 所示的化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体, 氘代化合物, 前药或其混合物形式, 或结构式 I 的化合物、其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体, 氘代化合物, 前药或其混合物的药学上可以接受的盐或溶剂化物, 其特征在于, Z 是羰基、O 或 $-(CH_2)_n-$, $n=0-4$ 的整数;

40 优选的, Z 是 $-(CH_2)_n-$, $n=0-2$ 的整数, 进一步优选的, $n=0$ 或 1;

还优选的, W 和 Y 各自独立地选自 C 或 N, 但 W 和 Y 不能同时是 C;

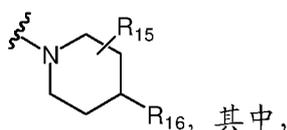
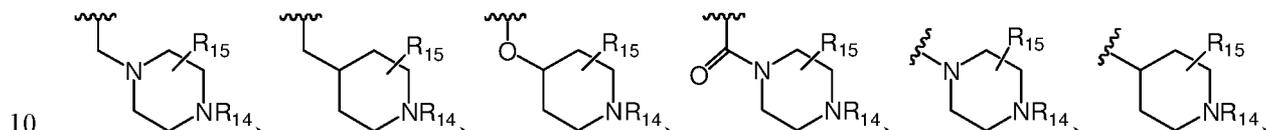
还优选的, R_{10} 、 R_{11} 、 R_{12} 和 R_{13} 各自独立地选自氢原子、 C_1-C_6 的烷基、 C_3-C_6 的环烷基、

C₁-C₆的羟基烷基、C₁-C₆的卤代烷基、C₁-C₆的烷氧基、羟基或-NR₈R₉，且Y=N时，R₁₀不能是-NR₈R₉；

更优选的，R₁₀、R₁₁、R₁₂和R₁₃各自独立地选自氢原子、C₁-C₆的烷基、C₁-C₆的羟基烷基、C₁-C₆的卤代烷基、C₁-C₆的烷氧基或-NR₈R₉。

5

7. 根据权利要求1至5中任一项所述结构式I所示的化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体，氘代化合物，前药或其混合物形式，或结构式I的化合物、其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体，氘代化合物，前药或其混合物的药学上可以接受的盐或溶剂化物，其特征在于，R₇选自如下结构的取代基：



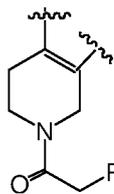
R₁₄和R₁₅各自独立地选自氢原子、C₁-C₆的烷基、C₃-C₆的环烷基、C₁-C₆的卤代烷基、C₁-C₆的羟基烷基、C₁-C₆的烷氧基或羟基，R₁₆选自氢原子、C₃-C₆的环烷基、C₁-C₆的卤代烷基、C₁-C₆的羟基烷基、C₁-C₆的烷氧基、羟基或-NR₈R₉；

15 更优选的，R₁₄和R₁₅各自独立地选自氢原子、C₁-C₆的烷基、C₃-C₆的环烷基、C₁-C₆的羟基烷基，R₁₆选自氢原子、C₁-C₆的烷基、C₃-C₆的环烷基、C₁-C₆的羟基烷基或-NR₈R₉；
优选的，R₈和R₉各自独立地选自氢原子和C₁-C₄的烷基。

20 8. 根据权利要求1至4中任一项所述结构式I所示的化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体，氘代化合物，前药或其混合物形式，或结构式I的化合物、其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体，氘代化合物，前药或其混合物的药学上可以接受的盐或溶剂化物，其特征在于，R₆和R₇与其连接的C原子一起形成含一个或多个选自N、O或S的6元杂环；

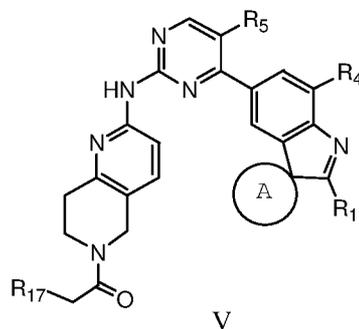
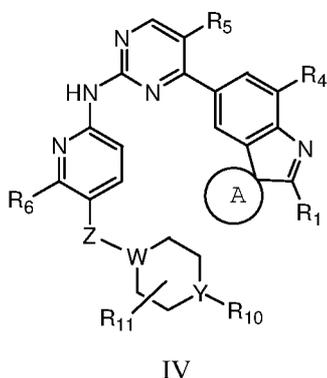
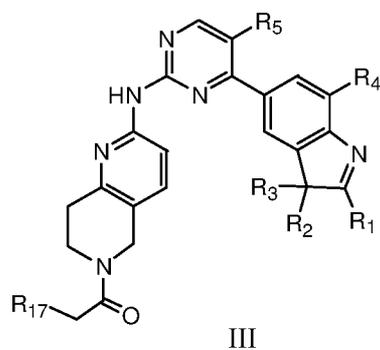
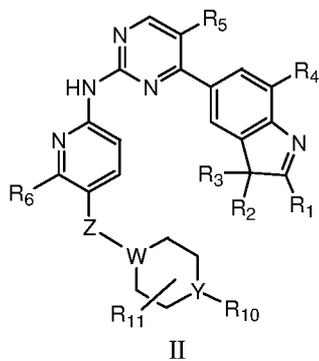
优选的，R₆和R₇与其连接的C原子一起形成含一个N的6元杂环；

25 进一步优选的，R₆和R₇与其连接的C原子一起形成如下的化学结构：



其中R₁₇选自羟基或C₁-C₃的烷氧基；进一步优选为羟基。

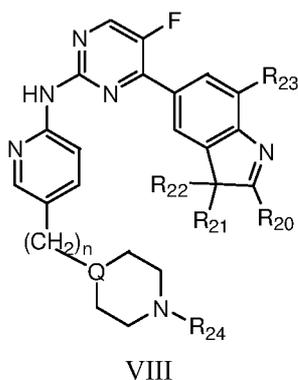
30 9. 结构式II、III、IV或V所示的化合物或各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体，氘代化合物，前药或其混合物形式，或所述结构式II、III、IV或V所示的化合物、各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体，氘代化合物，前药或其混合物的药学上可以接受的盐或溶剂化物，



其中, R_1 、 R_2 和 R_3 的定义如权利要求 1 或 2 所述, R_4 和 R_5 的定义如权利要求 1 或 4 所述; R_6 定义如权利要求 1 或 5 所述; R_{10} 和 R_{11} 的定义如权利要求 1 或 6 所述; R_{17} 的定义如权利要求 8 所述; Z 、 W 和 Y 的定义如权利要求 1 或 6 所述;

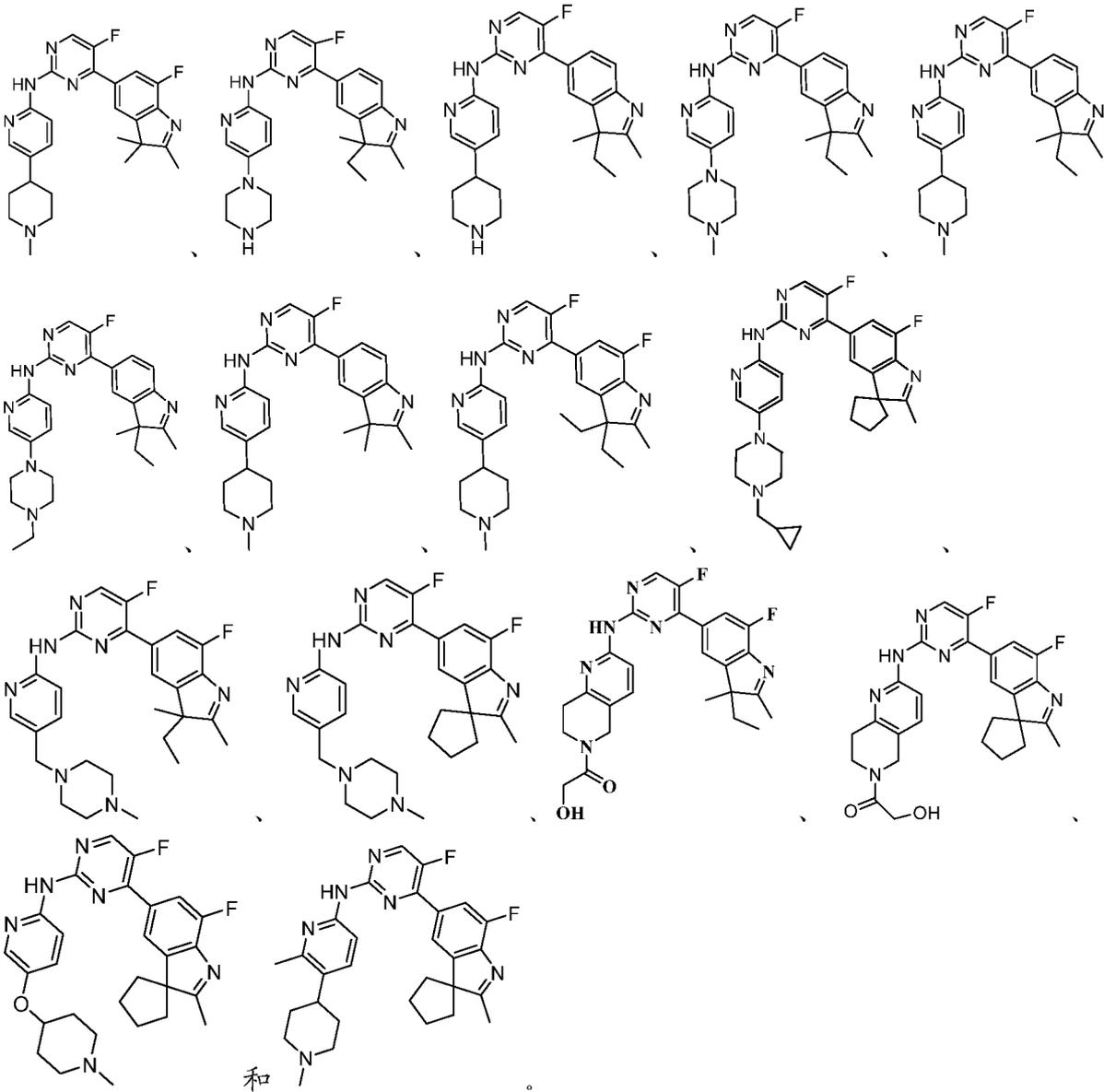
A 环为饱和的 3-7 元环; 优选的, A 环为饱和 3-6 元环。

10. 一种结构式 VIII 所示的化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体, 氘代化合物, 前药或其混合物形式, 或所述结构式 VIII 的化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体, 氘代化合物, 前药或其混合物的药学上可以接受的盐或溶剂化物,



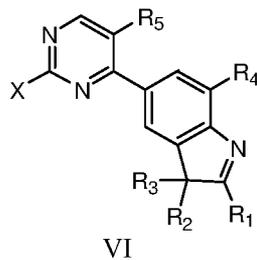
其中, R_{20} 、 R_{21} 、 R_{22} 各自独立地选自 C_1 - C_4 的烷基, 或者 R_{20} 为 C_1 - C_4 的烷基, R_{21} 和 R_{22} 与其共同连接的 C 原子形成 5-6 元饱和环; R_{23} 选自氢或氟; $n=0$ 或 1; R_{24} 选自氢、 C_1 - C_4 的烷基或 C_1 - C_4 的羟基烷基, Q 为 C 或 N。

11. 结构如下的化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体, 氘代化合物, 前药或其混合物形式, 或所述化合物、其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体, 氘代化合物, 前药或其混合的药学上可以接受的盐或溶



5

12. 一种结构式 VI 所示的化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体或其混合物形式，或所述结构式 VI 的化合物、其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体的药学上可以接受的盐或溶剂化物，

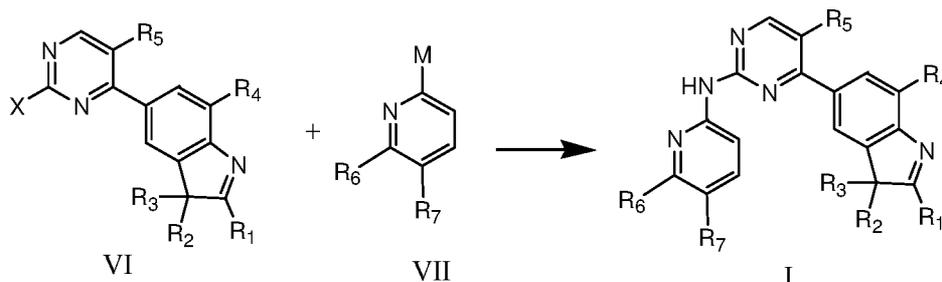


10 其中 R₁、R₂ 和 R₃ 的定义如权利要求 1 或 2 所述；R₄ 和 R₅ 的定义如权利要求 1 或 4 所述；X 为离去基团或氨基；

优选的，X 是卤素或氨基，更优选是氟、溴、氯或氨基。

13. 权利要求 1 所述的结构式 I 所示的化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、

对映异构体、非对映异构体，氘代化合物，前药或其混合物形式，或结构式 I 的化合物、其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体，氘代化合物，前药或其混合物的药学上可以接受的盐或溶剂化的制备方法，包括结构式 VI 和结构式 VII 所示的化合物在溶剂中，经钨催化偶联反应得到结构式 I 所示的化合物，



5

其中， R_1 、 R_2 和 R_3 的定义如权利要求 1 或 2 所述， R_4 和 R_5 的定义如权利要求 1 或 4 所述； R_6 定义如权利要求 1、5 或 8 所述； R_7 的定义如权利要求 1、6、7 或 8 所述；X 和 M 各自独立地为离去基团或氨基，X 和 M 中只能有一个且必须有一个为氨基；

优选的，所述离去基团为卤素；

10 更优选的，所述离去基团为氟、溴或氯。

14. 结构式 I-V 和 VIII 所示的化合物或其各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体，氘代化合物，前药或其混合物形式，或所述结构式 I-V 和 VIII 的化合物或其各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体，氘代化合物，前药或其混合物的药学上可以接受的盐或溶剂化物在制备用于治疗细胞增殖障碍性疾病的药物制剂中的用途；

优选的，所述药物制剂包括药学上可以接受的辅料；

所述细胞增殖障碍性疾病是指哺乳动物或人的癌症，更优选的是指人的癌症，包括恶性实体瘤和恶性非实体瘤，具体包括但不限于乳腺癌、肺癌、前列腺癌、白血病、脑癌、胃癌、胶质瘤；和/或

20

所述细胞增殖障碍性疾病选自艾滋病、动脉粥样硬化、血管支架植入后再狭窄中的一种或多种；

还优选的，上述用途是指所述结构式 I-V 和 VIII 所示的化合物或其各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体，氘代化合物，前药或其混合物形式，或所述结构式 I-V 和 VIII 所示的化合物或其各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体，氘代化合物，前药或其混合物的药学上可以接受的盐或溶剂化物作为唯一活性成分或联合其它具有生物活性的物质在制备用于治疗细胞增殖障碍性疾病的药物制剂中的用途；

25

更优选的，所述其它具有生物活性的物质包括但不限于抗癌剂、免疫抑制剂和抗病毒剂；其中，所述抗癌剂选自环磷酰胺、异环磷酰胺、塞替派、司莫司汀、盐酸氮芥、白消安、苯丁酸氮芥、苯丙氨酸氮芥、硝卡芥、氮甲、卡莫司汀、洛莫司汀、六甲蜜胺、二溴甘露醇、阿糖胞苷、氟尿嘧啶、甲氨喋呤、羟基脲、替加氟、甲异靛、巯嘌呤、顺铂、卡铂、奥沙利铂、放线菌素 D、丝裂霉素、阿霉素、平阳霉素、表柔比星、吡柔比星、柔红霉素、博来霉素、高三尖杉酯碱及其衍生物、长春新碱及其衍生物、羟基树碱及其衍生物、依托泊苷及其衍生物、长春地辛及其衍生物、长春碱及其衍生物、重酒石酸长春瑞宾、紫杉醇及其衍生物、秋水仙碱及其衍生物、榄香烯及其衍生物、氨鲁米特、他莫昔芬、地塞米松、度他雄胺、氟他胺、戈那瑞林、醋酸亮丙瑞林、来曲唑、舒尼替尼、索拉非尼、伊马替尼、吉非替尼、埃罗替尼、凡德替尼、帕唑帕尼、拉帕替尼、卡奈替尼、阿法替尼、木利替尼、达沙替尼、来那替尼、替莫唑胺、曲妥单抗、帕妥珠单抗、利妥昔单抗、帕尼单抗、贝伐单抗、伊匹单抗、

30

35

奥法木单抗、雷莫卢单抗、依维莫司、西罗莫司和佐他莫司中的一种或多种。

15. 一种用于治疗细胞增殖障碍性疾病的组合产品，其特征在于，所述组合产品包括选自结构式 I-V、VIII 所示的化合物或其各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体，氘代化合物，前药或其混合物形式，结构式 I-V、VIII 所示的化合物或其各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体，氘代化合物，前药或其混合物形式的药学上可以接受的盐或溶剂化物中的一种或多种；

优选地，所述药物产品还包括药学可以接受的辅料；和/或
所述组合产品为试剂盒。

16. 一种治疗细胞增殖障碍性疾病的方法，其特征在于，所述方法包括对有需要的受试者通过口服或非口服途径给予有效剂量的结构式 I-V、VIII 所示的化合物或其各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体，氘代化合物，前药或其混合物形式，或结构式 I-V、VIII 所示的化合物或其各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体，氘代化合物，前药或其混合物形式的药学上可以接受的盐或溶剂化物，或权利要求 15 所述的组合产品；

优选地，所述细胞增殖障碍性疾病是指哺乳动物或人的癌症、艾滋病、动脉粥样硬化、血管支架植入后再狭窄中的一种或多种；其中，所述癌症优选为人的癌症，包括恶性实体瘤和恶性非实体瘤，具体包括但不限于乳腺癌、肺癌、前列腺癌、白血病、脑癌、胃癌、胶质瘤；和/或

优选的，所述方法中，所述结构式 I-V 和 VIII 所示的化合物或其各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体，氘代化合物，前药或其混合物形式，或所述结构式 I-V 和 VIII 的化合物或其各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体，氘代化合物，前药或其混合物的药学上可以接受的盐或溶剂化物作为唯一活性成分或联合其它具有生物活性的物质向所述有需要的受试者给药；所述其它具有生物活性的物质包括但不限于抗癌剂、免疫抑制剂和抗病毒剂；其中，所述抗癌剂选自环磷酰胺、异环磷酰胺、塞替派、司莫司汀、盐酸氮芥、白消安、苯丁酸氮芥、苯丙氨酸氮芥、硝卡芥、氮甲、卡莫司汀、洛莫司汀、六甲蜜胺、二溴甘露醇、阿糖胞苷、氟尿嘧啶、甲氨喋呤、羟基脲、替加氟、甲异靛、巯嘌呤、顺铂、卡铂、奥沙利铂、放线菌素 D、丝裂霉素、阿霉素、平阳霉素、表柔比星、吡柔比星、柔红霉素、博来霉素、高三尖杉酯碱及其衍生物、长春新碱及其衍生物、羟基树碱及其衍生物、依托泊苷及其衍生物、长春地辛及其衍生物、长春碱及其衍生物、重酒石酸长春瑞滨、紫杉醇及其衍生物、秋水仙碱及其衍生物、榄香烯及其衍生物、氨鲁米特、他莫昔芬、地塞米松、度他雄胺、氟他胺、戈那瑞林、醋酸亮丙瑞林、来曲唑、舒尼替尼、索拉非尼、伊马替尼、吉非替尼、埃罗替尼、凡德替尼、帕唑帕尼、拉帕替尼、卡奈替尼、阿法替尼、木利替尼、达沙替尼、来那替尼、替莫唑胺、曲妥单抗、帕妥珠单抗、利妥昔单抗、帕尼单抗、贝伐单抗、伊匹单抗、奥法木单抗、雷莫卢单抗、依维莫司、西罗莫司和佐他莫司中的一种或多种。

17. 一种用于治疗细胞增殖障碍性疾病的化合物或其各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体，氘代化合物，前药或其混合物形式，或所述化合物或其各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体，氘代化合物，前药或其混合物形式的药学上可以接受的盐或溶剂化物，其特征在于，所述化合物的结构式选自结构式 I-V 和 VIII 中的一种或多种；

优选的，所述细胞增殖障碍性疾病是指哺乳动物或人的癌症，更优选的是指人的癌症，包括恶性实体瘤和恶性非实体瘤，具体包括但不限于乳腺癌、肺癌、前列腺癌、白血病、脑

癌、胶质瘤和胃癌；和/或

所述细胞增殖障碍性疾病选自艾滋病、动脉粥样硬化和血管支架植入后再狭窄中的一种或多种。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/107455

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 401/14 (2006.01) i; C07D 471/04 (2006.01) i; A61K 31/506 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i; A61P 35/02 (2006.01) i; A61P 31/18 (2006.01) i; A61P 9/10 (2006.01) i; A61P 9/00 (2006.01) i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D 401/-; C07D 471/-; A61K 31/-; A61P 35/-; A61P 31/-; A61P 9/-

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

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

CNKI, VEN, DWPI, CNABS, STN (REG, CAPLUS, CASREACT: protein kinase; GAN & LEE PHARMACEUTICALS; YIN, Lei; LIU, Wenjian; LI, Heng; ZHU, Dianxi; protein, cyclin+, dependent w kinase, CDK, inhibit+, +tumor, cell w proliferation, pyrimidin+, pyridin+.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 102264725 A (ELI LILLY AND COMPANY), 30 November 2011 (30.11.2011), claims 1-14 and 17-20; and description, pages 5-6 and 8; and embodiments 1-33	1-15, 17
A	WO 2013173506 A3 (RIGEL PHARMACEUTICALS INC.), 09 January 2014 (09.01.2014), the whole document	1-15, 17
A	CN 102007124 A (RIGEL PHARMACEUTICALS INC.), 06 April 2011 (06.04.2011), the whole document	1-15, 17
A	WO 2005076854 A2 (SMITHKLINE BEECHAM CORP. et al.), 25 August 2005 (25.08.2005), the whole document	1-15, 17

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

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

Date of the actual completion of the international search
21 February 2017 (21.02.2017)

Date of mailing of the international search report
01 March 2017 (01.03.2017)

Name and mailing address of the ISA/CN:
State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No.: (86-10) 62019451

Authorized officer
MA, Liangxiao
Telephone No.: (86-10) **62086312**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/107455

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

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

1. Claims Nos.: 16
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] claim 16 relates to a method of treatment of the human/animal body by therapy (PCT Rule 39.1(iv)).

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2016/107455

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102264725 A	30 November 2011	EA 018808 B1	30 October 2013
		TN 2011000293 A1	17 December 2012
		PE 01072012 A1	20 February 2012
		IL 213350 A	31 August 2014
		WO 2010075074 A1	01 July 2010
		CN 102264725 B	16 April 2014
		MA 32903 B1	01 December 2011
		D0 P2011000204 A	30 September 2011
		PA 8852901 A1	27 July 2010
		PT 2379528 E	25 November 2013
		US 7855211 B2	21 December 2010
		IL 213350 D0	31 July 2011
		JO 2885 B	15 March 2015
		CO 6382125 A2	15 February 2012
		SG 172331 A1	28 July 2011
		EP 2379528 A1	26 October 2011
		TW I429635 B	11 March 2014
		ES 2435798 T3	23 December 2013
		CA 2747055 C	14 January 2014
		JP 2012513396 A	14 June 2012
		KR 101297497 B1	20 August 2013
		NZ 593114 A	30 November 2012
		UA 104603 C2	25 February 2014
		TW 201031653 A	01 September 2010
		AU 2009330365 B2	12 July 2012
		RS 53061 B	30 April 2014
		CA 2747055 A1	01 July 2010
		SI 2379528 T1	29 November 2013
		EA 201170872 A1	30 December 2011
		HK 1159630 A1	14 March 2014
		EP 2379528 B1	18 September 2013
		DK 2379528 T3	14 October 2013
		ZA 201104505 B	28 November 2012
MY 150547 A	30 January 2014		
US 2010160340 A1	24 June 2010		
JP 5417453 B2	12 February 2014		
AU 2009330365 A1	01 July 2010		
AR 074575 A1	26 January 2011		
HR P20131051 T1	06 December 2013		
GT 201100181 A	08 April 2014		
HN 2011001701 A	22 July 2013		
CR 20110343 A	14 September 2011		
BR PI0924183 A2	05 July 2016		
MX 2011006757 A	20 July 2011		
KR 20110091551 A	11 August 2011		
EC SP11011157 A	29 July 2011		
WO 2013173506 A3	09 January 2014	WO 2013173506 A2	21 November 2013
CN 102007124 A	06 April 2011	US 2013310340 A1	21 November 2013
		US 2013018041 A1	17 January 2013
		US 2014213585 A1	31 July 2014

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/107455

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2005076854 A2	25 August 2005	AU 2009214440 A1	20 August 2009
		CA 2715658 A1	20 August 2009
		US 8735418 B2	27 May 2014
		MX 2010008926 A	23 February 2011
		IL 207609 D0	30 December 2010
		EP 2265607 B1	14 December 2016
		AU 2009214440 B2	25 September 2014
		JP 5711537 B2	07 May 2015
		JP 2011512361 A	21 April 2011
		US 8309566 B2	13 November 2012
		IL 207609 A	31 August 2015
		KR 20100124292 A	26 November 2010
		JP 2015061846 A	02 April 2015
		CN 102007124 B	18 June 2014
		US 2009258864 A1	15 October 2009
		WO 2009103032 A1	20 August 2009
		EP 2265607 A1	29 December 2010
		CA 2715658 C	19 July 2016
		NZ 587589 A	26 October 2012
		EP 1713793 A2	25 October 2006
JP 2007520558 A	26 July 2007		
WO 2005076854 A3	22 December 2005		
US 2007117818 A1	24 May 2007		
EP 1713793 A4	02 September 2009		

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07D 401/14(2006.01)i; C07D 471/04(2006.01)i; A61K 31/506(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 35/02(2006.01)i; A61P 31/18(2006.01)i; A61P 9/10(2006.01)i; A61P 9/00(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																	
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07D401/-; C07D471/-; A61K31/-; A61P35/-; A61P31/-; A61P9/-</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNKI, VEN, DWPI, CNABS, STN(REG, CAPLUS, CASREACT): 蛋白激酶, 抑制, 细胞增殖, 甘李药业, 尹磊, 刘文剑, 李恒, 朱殿玺, protein, cyclin+, dependent w kinase, CDK, inhibit+, +tumor, cell w proliferation, pyrimidin+, pyridin+.</p>																	
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 102264725 A (伊莱利公司) 2011年 11月 30日 (2011 - 11 - 30) 权利要求1-14、17-20; 说明书第5-6、8页; 实施例1-33。</td> <td>1-15、17</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2013173506 A3 (RIGEL PHARMACEUTICALS INC) 2014年 1月 9日 (2014 - 01 - 09) 全文</td> <td>1-15、17</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102007124 A (里格尔制药公司) 2011年 4月 6日 (2011 - 04 - 06) 全文</td> <td>1-15、17</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2005076854 A2 (SMITHKLINE BEECHAM CORP等) 2005年 8月 25日 (2005 - 08 - 25) 全文</td> <td>1-15、17</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 102264725 A (伊莱利公司) 2011年 11月 30日 (2011 - 11 - 30) 权利要求1-14、17-20; 说明书第5-6、8页; 实施例1-33。	1-15、17	A	WO 2013173506 A3 (RIGEL PHARMACEUTICALS INC) 2014年 1月 9日 (2014 - 01 - 09) 全文	1-15、17	A	CN 102007124 A (里格尔制药公司) 2011年 4月 6日 (2011 - 04 - 06) 全文	1-15、17	A	WO 2005076854 A2 (SMITHKLINE BEECHAM CORP等) 2005年 8月 25日 (2005 - 08 - 25) 全文	1-15、17
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
X	CN 102264725 A (伊莱利公司) 2011年 11月 30日 (2011 - 11 - 30) 权利要求1-14、17-20; 说明书第5-6、8页; 实施例1-33。	1-15、17															
A	WO 2013173506 A3 (RIGEL PHARMACEUTICALS INC) 2014年 1月 9日 (2014 - 01 - 09) 全文	1-15、17															
A	CN 102007124 A (里格尔制药公司) 2011年 4月 6日 (2011 - 04 - 06) 全文	1-15、17															
A	WO 2005076854 A2 (SMITHKLINE BEECHAM CORP等) 2005年 8月 25日 (2005 - 08 - 25) 全文	1-15、17															
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																	
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>																	
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2017年 2月 21日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2017年 3月 1日</p>															
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>马良晓</p> <p>电话号码 (86-10)62086312</p>															

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求： 16
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求16涉及对人体/动物体实施的治疗方法(细则39.1(iv) PCT)。
2. 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/107455

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	102264725	A	2011年 11月 30日	EA	018808	B1	2013年 10月 30日
				TN	2011000293	A1	2012年 12月 17日
				PE	01072012	A1	2012年 2月 20日
				IL	213350	A	2014年 8月 31日
				WO	2010075074	A1	2010年 7月 1日
				CN	102264725	B	2014年 4月 16日
				MA	32903	B1	2011年 12月 1日
				DO	P2011000204	A	2011年 9月 30日
				PA	8852901	A1	2010年 7月 27日
				PT	2379528	E	2013年 11月 25日
				US	7855211	B2	2010年 12月 21日
				IL	213350	D0	2011年 7月 31日
				JO	2885	B	2015年 3月 15日
				CO	6382125	A2	2012年 2月 15日
				SG	172331	A1	2011年 7月 28日
				EP	2379528	A1	2011年 10月 26日
				TW	1429635	B	2014年 3月 11日
				ES	2435798	T3	2013年 12月 23日
				CA	2747055	C	2014年 1月 14日
				JP	2012513396	A	2012年 6月 14日
				KR	101297497	B1	2013年 8月 20日
				NZ	593114	A	2012年 11月 30日
				UA	104603	C2	2014年 2月 25日
				TW	201031653	A	2010年 9月 1日
				AU	2009330365	B2	2012年 7月 12日
				RS	53061	B	2014年 4月 30日
				CA	2747055	A1	2010年 7月 1日
				SI	2379528	T1	2013年 11月 29日
				EA	201170872	A1	2011年 12月 30日
				HK	1159630	A1	2014年 3月 14日
				EP	2379528	B1	2013年 9月 18日
				DK	2379528	T3	2013年 10月 14日
				ZA	201104505	B	2012年 11月 28日
				MY	150547	A	2014年 1月 30日
				US	2010160340	A1	2010年 6月 24日
				JP	5417453	B2	2014年 2月 12日
				AU	2009330365	A1	2010年 7月 1日
				AR	074575	A1	2011年 1月 26日
				HR	P20131051	T1	2013年 12月 6日
				GT	201100181	A	2014年 4月 8日
				HN	2011001701	A	2013年 7月 22日
				CR	20110343	A	2011年 9月 14日
				BR	PI0924183	A2	2016年 7月 5日
				MX	2011006757	A	2011年 7月 20日
				KR	20110091551	A	2011年 8月 11日
				EC	SP11011157	A	2011年 7月 29日
WO	2013173506	A3	2014年 1月 9日	WO	2013173506	A2	2013年 11月 21日
				US	2013310340	A1	2013年 11月 21日
CN	102007124	A	2011年 4月 6日	US	2013018041	A1	2013年 1月 17日
				US	2014213585	A1	2014年 7月 31日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/107455

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		AU 2009214440 A1	2009年 8月 20日
		CA 2715658 A1	2009年 8月 20日
		US 8735418 B2	2014年 5月 27日
		MX 2010008926 A	2011年 2月 23日
		IL 207609 D0	2010年 12月 30日
		EP 2265607 B1	2016年 12月 14日
		AU 2009214440 B2	2014年 9月 25日
		JP 5711537 B2	2015年 5月 7日
		JP 2011512361 A	2011年 4月 21日
		US 8309566 B2	2012年 11月 13日
		IL 207609 A	2015年 8月 31日
		KR 20100124292 A	2010年 11月 26日
		JP 2015061846 A	2015年 4月 2日
		CN 102007124 B	2014年 6月 18日
		US 2009258864 A1	2009年 10月 15日
		WO 2009103032 A1	2009年 8月 20日
		EP 2265607 A1	2010年 12月 29日
		CA 2715658 C	2016年 7月 19日
		NZ 587589 A	2012年 10月 26日
WO 2005076854 A2	2005年 8月 25日	EP 1713793 A2	2006年 10月 25日
		JP 2007520558 A	2007年 7月 26日
		WO 2005076854 A3	2005年 12月 22日
		US 2007117818 A1	2007年 5月 24日
		EP 1713793 A4	2009年 9月 2日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)