



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103476765 A

(43) 申请公布日 2013. 12. 25

(21) 申请号 201280013673. X

A61K 31/506 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 02. 09

A61P 35/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/441, 896 2011. 02. 11 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013. 09. 17

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2012/024440 2012. 02. 09

(87) PCT申请的公布数据

W02012/109423 EN 2012. 08. 16

(71) 申请人 达娜-法勃肿瘤研究所公司

地址 美国马萨诸塞

(72) 发明人 J·J·赵 Q·王

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 唐伟杰

(51) Int. Cl.

C07D 401/04 (2006. 01)

权利要求书3页 说明书20页 附图3页

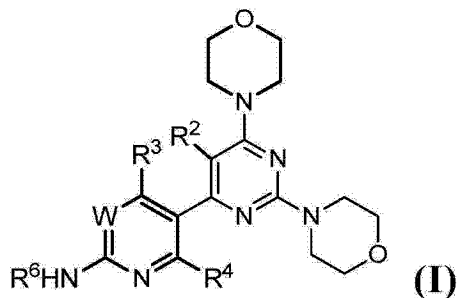
(54) 发明名称

抑制错构瘤肿瘤细胞的方法

(57) 摘要

2,6-二吗啉代嘧啶类可用于抑制错构瘤肿瘤细胞的生长或增殖。因为二吗啉代嘧啶类抑制错构瘤肿瘤细胞的生长和增殖,所以它们还可用于治疗 PTEN 错构瘤肿瘤综合征。本发明提供的治疗性和预防性治疗通过向有需要的患者施用对抑制错构瘤肿瘤细胞的生长或增殖有效的量的 2,6-二吗啉代嘧啶衍生物化合物来实现。

1. 抑制错构瘤肿瘤细胞的生长或增殖的方法,其包括以对抑制错构瘤肿瘤细胞的生长或增殖有效的量向有需要的患者施用下式化合物或其可药用盐



其中 R^2 是氢或卤素; R^3 是氢、氰基、硝基、卤素、羟基、氨基或三氟甲基; R^4 是氢或卤素; R^6 是氢、甲基或乙基; 且 W 是 CR_{w_1} 或 N , 其中 R_{w_1} 是氢、氰基、卤素、甲基、三氟甲基或磺酰氨基。

2. 根据权利要求 1 的方法, 其中 W 是 CH 。

3. 根据权利要求 1 的方法, 其中 R^2 是氢; R^3 是氢或三氟甲基; R^4 是氢; 且 R^6 是氢。

4. 根据权利要求 3 的方法, 其中 W 是 CH 。

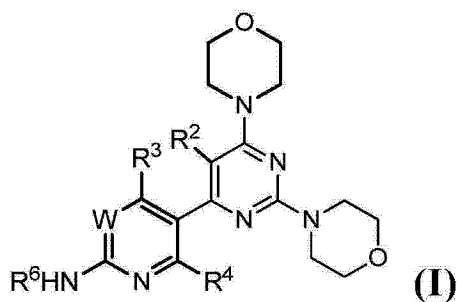
5. 根据权利要求 4 的方法, 其中 R^3 是三氟甲基。

6. 根据权利要求 1 的方法, 其中式 (I) 化合物是 4-(三氟甲基)-5-(2,6-二吗啉代嘧啶-4-基)吡啶-2-胺或其可药用盐。

7. 根据权利要求 1 的方法, 其中对抑制错构瘤肿瘤细胞的生长或增殖有效的式 (I) 化合物或盐的量为 0.001 至 1000mg/kg 的范围的施用量。

8. 根据权利要求 6 的方法, 其中对抑制错构瘤肿瘤细胞的生长或增殖有效的式 (I) 化合物或盐的量为 1.0 至 1000mg/kg 的范围的施用量。

9. 治疗 PTEN 错构瘤综合征的方法, 其包括以对抑制错构瘤肿瘤细胞的生长或增殖有效的量向有需要的患者施用下式化合物或其可药用盐



其中 R^2 是氢或卤素; R^3 是氢、氰基、硝基、卤素、羟基、氨基或三氟甲基; R^4 是氢或卤素; R^6 是氢、甲基或乙基; 且 W 是 CR_{w_1} 或 N , 其中 R_{w_1} 是氢、氰基、卤素、甲基、三氟甲基或磺酰氨基。

10. 根据权利要求 9 的方法, 其中 W 是 CH 。

11. 根据权利要求 10 的方法, 其中 R^2 是氢; R^3 是氢或三氟甲基; R^4 是氢; 且 R^6 是氢。

12. 根据权利要求 11 的方法, 其中 W 是 CH 。

13. 根据权利要求 12 的方法, 其中 R^3 是三氟甲基。

14. 根据权利要求 9 的方法, 其中式 (I) 化合物为 4-(三氟甲基)-5-(2,6-二吗啉代嘧啶-4-基)吡啶-2-胺或其可药用盐。

15. 根据权利要求 9 的方法, 其中对抑制错构瘤肿瘤细胞的生长或增殖有效的式 (I) 化

合物或盐的量为 0.001 至 1000mg/kg 的范围的施用量。

16. 根据权利要求 14 的方法,其中对抑制错构瘤肿瘤细胞的生长或增殖有效的式 (I) 化合物或盐的量为范围为 1.0 至 30mg/kg 的施用量。

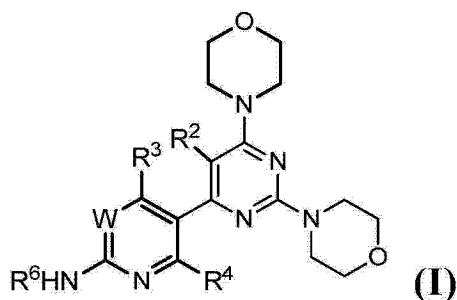
17. 根据权利要求 9 的方法,其中所述 PTEN 错构瘤肿瘤综合征选自考登综合征、Lhemitte-Duclos 病、斑-赖-卢综合征和 Proteus 综合征。

18. 根据权利要求 9 的方法,其中所述 PTEN 错构瘤肿瘤综合征是考登综合征。

19. 根据权利要求 14 的方法,其中所述 PTEN 错构瘤肿瘤综合征选自考登综合征、Lhemitte-Duclos 病、斑-赖-卢综合征和 Proteus 综合征。

20. 根据权利要求 14 的方法,其中所述 PTEN 错构瘤肿瘤综合征是考登综合征。

21. 用于治疗 PTEN 错构瘤肿瘤综合征的下式的化合物



其中 R^2 是氢或卤素; R^3 是氢、氰基、硝基、卤素、羟基、氨基或三氟甲基; R^4 是氢或卤素; R^6 是氢、甲基或乙基; 且 W 是 CR_w 或 N, 其中 R_w 是氢、氰基、卤素、甲基、三氟甲基或磺酰氨基; 或其可药用盐。

22. 根据权利要求 21 的化合物,其中 W 是 CH。

23. 根据权利要求 21 或 22 的化合物,其中 R^2 是氢; R^3 是氢或三氟甲基; R^4 是氢; 且 R^6 是氢。

24. 根据权利要求 21 至 23 中任意一项的化合物,其中 R^3 是三氟甲基。

25. 根据权利要求 21 的化合物,其中式 (I) 化合物为 4-(三氟甲基)-5-(2,6-二吗啉代嘧啶-4-基)吡啶-2-胺或其可药用盐。

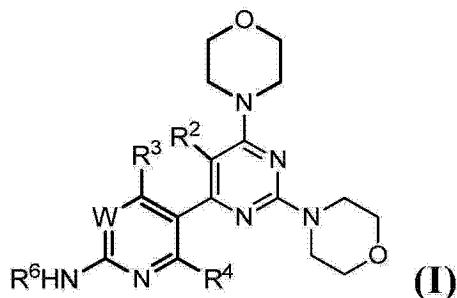
26. 根据权利要求 21 至 25 中任意一项的化合物,其中对抑制错构瘤肿瘤细胞的生长或增殖有效的式 (I) 化合物或盐的量为范围为 0.001 至 1000mg/kg 的施用量。

27. 根据权利要求 21 至 25 中任意一项的化合物,其中对抑制错构瘤肿瘤细胞的生长或增殖有效的式 (I) 化合物或盐的量为范围为 1.0 至 30mg/kg 的施用量。

28. 根据权利要求 21 至 27 中任意一项的化合物,其中所述 PTEN 错构瘤肿瘤综合征选自考登综合征、Lhemitte-Duclos 病、斑-赖-卢综合征和 Proteus 综合征。

29. 根据权利要求 28 的化合物,其中所述 PTEN 错构瘤肿瘤综合征是考登综合征。

30. 下式化合物用于制备药物的应用,所述药物用于用于治疗 PTEN 错构瘤肿瘤综合征



其中 R^2 是氢或卤素； R^3 是氢、氰基、硝基、卤素、羟基、氨基或三氟甲基； R^4 是氢或卤素； R^6 是氢、甲基或乙基；且 W 是 CR_w 或 N ，其中 R_w 是氢、氰基、卤素、甲基、三氟甲基或磺酰氨基；或其可药用盐。

31. 根据权利要求 30 的应用，其中 W 是 CH 。

32. 根据权利要求 30 或 31 的应用，其中 R^2 是氢； R^3 是氢或三氟甲基； R^4 是氢；且 R^6 是氢。

33. 根据权利要求 30 至 32 中任意一项的应用，其中 R^3 是三氟甲基。

34. 根据权利要求 30 的应用，其中式 (I) 化合物为 4-(三氟甲基)-5-(2,6-二吗啉代嘧啶-4-基)吡啶-2-胺或其可药用盐。

35. 根据权利要求 30 至 34 中任意一项的应用，其中对抑制错构瘤肿瘤细胞的生长或增殖有效的式 (I) 化合物或盐的量为范围为 0.001 至 1000mg/kg 的施用量。

36. 根据权利要求 30 至 34 中任意一项的应用，其中对抑制错构瘤肿瘤细胞的生长或增殖有效的式 (I) 化合物或盐的量为范围为 1.0 至 30mg/kg 的施用量。

37. 根据权利要求 30 至 36 中任意一项的应用，其中所述 PTEN 错构瘤综合征选自考登综合征、Lhemitte-Duclos 病、斑-赖-卢综合征和 Proteus 综合征。

38. 根据权利要求 37 的应用，其中所述 PTEN 错构瘤综合征是考登综合征。

抑制错构瘤肿瘤细胞的方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请根据 35U. S. C. § 119(e) 要求 2011 年 2 月 11 日提交的美国临时专利申请系列号 61/441, 896 的提交日的权益, 将其全部内容引入本文作为参考。

[0003] 联邦资助的研究或开发

[0004] 本文描述的发明至少部分地受到美国国立卫生院 (NIH) 和国立癌症研究所 (NCI) 授予的合同号 R01CA134502 的支持。美国政府可以保留本发明中的某些权利。

[0005] 发明背景

[0006] PTEN 错构瘤综合征 (PHTS) 为与肿瘤抑制基因 PTEN (磷酸酶和张力蛋白同系物, 在染色体 10 上缺失) 中的胚系突变相关的罕见的和不同的异常的集合。这些综合征特征为在几乎任何器官中导致良性错构瘤的细胞过度生长。PTEN 编码负调节 PI3K/Akt/mTOR 通路的双重磷酸酶蛋白质。已经在多种散发性人类癌症 (包括脑癌、乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、肺癌和子宫内膜癌) 中描述了通过突变、缺失或甲基化导致的 PTEN 功能的身体损失, 且癌症研究人员因此在对其进行研究。Blumenthal, G. M. 和 Dennis, P. A., Eur. J. Hum. Gen. 16, 1289-1300 (2008)。

[0007] 错构瘤是组织结构上独特的良性肿瘤的亚型, 其中细胞保持正常的分化, 但在结构上而言是紊乱的。考登综合征 (CS) 是原型综合征, 特征为皮肤粘膜的损伤、良性错构瘤、巨头和增加的乳腺癌、甲状腺癌和子宫内膜癌的易感性。小脑发育不良性神经节细胞瘤 (Lhermitte - Duclos) (LD) 是 CS 的变种, 特征为小脑的发育不良性神经节细胞瘤, 其可以导致脑积水、共济失调和癫痫发作。在发现 PTEN 基因以及 CS 由 PTEN 的胚系突变引起这一事实之后, 变得明显的是: CS 与其它的似乎无关的临床综合征等位。斑 - 赖 - 卢综合征 (BRRS), 特征为发育迟缓、巨头、脂肪瘤、血管瘤和男性的有斑点的阴茎 (speckled penis), 在约 60% 的病例中与 PTEN 突变相关。Proteus 综合征也已经与 PTEN 胚系突变相联系, 但这一点尚有争议。历史上 PHTS 患者的临床管理集中在遗传咨询和遗传筛选。患有 PHTS 的患者、特别是患有 CS 的那些患者, 应当进行易感恶性肿瘤的早期的和频繁的监视。目前没有用于 PHTS 患者的药物治疗法。

[0008] PTEN 基因 (也称为 MMAC1 或 TEP1) 涵盖 9 种外显子, 且位于染色体 10q22 - 23。该基因编码 403 个氨基酸的蛋白质, 其作为对脂类和蛋白质脱磷酸的双重特异性磷酸酶而发挥活性。PTEN 通过对 PI3K 的 30-磷酸肌醇产物脱磷酸发挥其脂质磷酸酶活性, 引起磷脂酰肌醇 (3, 4, 5) 三磷酸向磷脂酰肌醇 (4, 5) 二磷酸的转化以及磷脂酰肌醇 (3, 4) 二磷酸向磷脂酰肌醇 (4) 单磷酸的转化。30-磷酸肌醇的还原降低 PI3K 下游激酶例如磷酸肌醇依赖性激酶 1、Akt 和 mTOR 的活性, 并且是其肿瘤抑制活性的原因。由于负调节 Akt 通路, 所以 PTEN 间接降低磷酸化 Akt 的其他下游底物, 例如 p27、p21、GSK-3、Bad、ASK-1, 以及分叉头型转录因子家族成员 (例如, AFX、FKHR、FKHRL1)。因此 PTEN 活性的损失或降低导致多种关键的细胞蛋白质的磷酸化增加, 从而可以影响过程、例如细胞周期进程、新陈代谢、迁移、细胞凋亡、转录和翻译。

[0009] G. M. Blumenthal 和 P. A. Dennis 假设许多不同类型的疗法可用于治疗 PHTS, 所述

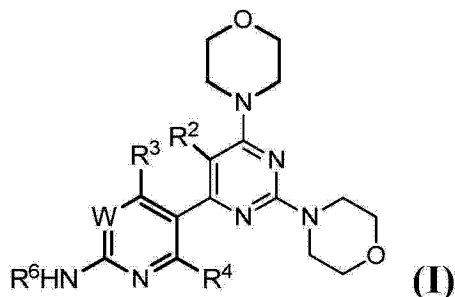
疗法包括 PI3K/Akt/mTOR 通路的抑制剂、雷帕霉素、高特异性 mTOR 抑制剂、结合 FKBP12 的活性剂、包括硼替佐米的蛋白体抑制剂和 PINK1 激动剂。然而,Blumenthal 和 Dennis 没有教导任何用于 PHTS 的具体的疗法,并指出在有效的治疗学的发展中可能会有显著的障碍。

[0010] 本发明的一个目的是提供抑制错构瘤肿瘤细胞的生长或增殖的治疗剂。本发明的另一个目的是治疗 PTEN 错构瘤肿瘤综合征。

[0011] 发明概述

[0012] 本申请涉及抑制错构瘤肿瘤细胞的生长或增殖的方法,其包括以对抑制错构瘤肿瘤细胞的生长或增殖有效的量向有需要的患者施用下式化合物

[0013]



[0014] 其中 R² 是氢或卤素; R³ 是氢、氰基、硝基、卤素、羟基、氨基或三氟甲基; R⁴ 是氢或卤素; R⁶ 是氢、甲基或乙基; 且 W 是 CR_w 或 N, 其中 R_w 是氢、氰基、卤素、甲基、三氟甲基或磺酰氨基; 或其可药用盐。

[0015] 本发明还涉及治疗 PTEN 错构瘤肿瘤综合征的方法,其包括以对抑制错构瘤肿瘤细胞的生长或增殖有效的量向有需要的患者施用式 (I) 化合物或其可药用盐。

[0016] 附图简述

[0017] 图 1a 为一系列阐述了在 PHTS 小鼠模型中切除 PI3K 的 p110-α 和 p110-β 亚型阻止 PHTS 发展的照片。(i)K14-cre Pten f/f(n=28), (ii)K14-cre Pten f/f;p110a f/f(n=16), (iii)K14-cre Pten f/f;p110b f/f(n=11) 和 (iv)k14-cre-Pten f/f;p110a f/f;p110b f/f(n=15) 小鼠。只切除这两个亚型中的一个显示只部分抑制 PHTS。

[0018] 图 1b 为在 (i)K14-cre Pten f/f(n=28), (ii)K14-cre Pten f/f;p110a f/f(n=16), (iii)K14-cre Pten f/f;p110b f/f(n=11) 和 (iv)k14-cre-Pten f/f;p110a f/f;p110b f/f(n=15) 小鼠中 PHTS 发作的 Kaplan-Meier 图。PHTS 发作的中位值:

[0019]

K14-cre Pten f/f	62 天
K14-cre Ptenf/f;p110a f/f	134 天
f K14-cre Ptenf/f;p110b f/f	121 天

[0020] 图 2a 为一系列说明以下内容的照片:用 4-(三氟甲基)-5-(2,6-二吗啉代嘧啶-4-基)吡啶-2-胺(化合物 A)治疗的小鼠保持无 PHTS 症状(ii);而只用介质治疗的小鼠在它们的脸和四肢发展了特征性的 PHTS 损害(i)。

[0021] 图 2b 表示在 K14-cre-Pten f/f 小鼠(n=12)中用上文所述的 4-(三氟甲基)-5-(2,6-二吗啉代嘧啶-4-基)吡啶-2-胺(化合物 A)维持的无 PHTS 存活的

Kaplan-Meier 曲线 (ii) ;或仅用介质处理的无 PHTS 存活的 Kaplan-Meier 曲线 (i)。

[0022] 图 3 表示显示每天用 45mg/ml 4-(三氟甲基)-5-(2,6-二吗啉代嘧啶-4-基)吡啶-2-胺(化合物 A) 治疗的两只 K14-cre-Pten f/f 小鼠的头部和左前爪的一系列照片。图 3 阐述了药物治疗对具有完全发展的 PHTS 的小鼠相对于时间的作用。

[0023] 发明详述

[0024] 本发明涉及以下发现:选定组的如式 (I) 所描述的被取代的 2,6-二吗啉代嘧啶可用于抑制错构瘤肿瘤细胞的生长或增殖。因为式 (I) 的 2,6-二吗啉代嘧啶抑制错构瘤肿瘤细胞的生长和增殖,所以它们还可用于治疗 PTEN 错构瘤肿瘤综合征。本发明提供的治疗性和预防性治疗通过向有需要的患者施用对抑制错构瘤肿瘤细胞的生长或增殖有效的量的式 (I) 化合物来实现。

[0025] 术语“卤素”是指氟、氯、溴和碘。

[0026] 如本文使用的术语对于错构瘤肿瘤细胞的“抑制”或“抑制生长或增殖”是指减慢、中断、抑制或停止错构瘤肿瘤细胞的生长,且不一定表明完全消除错构瘤肿瘤细胞生长。术语“抑制”等是指两种状态之间的定量差异,是指两种状态之间的至少统计显著的差异。例如,“对抑制错构瘤肿瘤细胞的生长有效的量”意指细胞生长的速度将至少统计显著地不同于未治疗的细胞。该术语在本文应用于例如细胞增殖率。

[0027] 本发明上下文中的“治疗”意指与障碍或疾病相关的症状的减轻,或症状的进一步发展或恶化的停止。例如,在本发明的上下文中,成功的治疗可包括与错构瘤肿瘤相关的症状的减轻或例如 PHTS 的疾病的发展的停止。在某些情况中,治疗可还包括处于发展为错构瘤肿瘤或 PHTS 的风险中的无症状患者的鉴定。

[0028] “错构瘤”或“错构瘤肿瘤”是指良性肿瘤的组织结构上独特的亚型,其中细胞保持正常的分化,但在结构上而言是紊乱的。

[0029] “PTEN 错构瘤肿瘤综合征”或“PHTS”是指具有特征在于异常生长的可变的临床表现并与 PTEN 胚系突变相关的综合征谱。考登综合征 (CS)、Lhermitt-Duclos 综合征 (LD)、斑-赖-卢综合征和 Proteus 综合征均为 PHTS 的实例。

[0030] 如本文使用的术语“可药用盐”是指本发明的嘧啶化合物的无毒酸或碱土金属盐。这些盐可以在嘧啶化合物的最终分离和纯化期间在原位制备,或者通过将碱或酸官能团分别与适合的有机或无机酸或碱单独地反应来制备。代表性的盐包括但不限于以下的盐:乙酸盐、己二酸盐、藻酸盐、柠檬酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、硫酸氢盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、二葡萄糖酸盐、环戊烷丙酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、葡萄糖庚酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、富马酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、2-羟基乙磺酸盐、乳酸盐、马来酸盐、甲磺酸盐、烟酸盐、2-萘磺酸盐、草酸盐、双羟萘酸盐、果胶酯酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、对甲苯磺酸盐和十一烷酸盐。而且,碱性含氮基团可以用例如以下试剂季铵化:烷基卤、例如甲基、乙基、丙基和丁基的氯化物、溴化物和碘化物;二烷基硫酸酯、如硫酸二甲酯、硫酸二乙酯、硫酸二丁酯及硫酸二戊酯,长链卤化物例如癸基、月桂基、肉豆蔻基和硬脂基的氯化物、溴化物和碘化物,芳烷基卤化物,如苄基溴和苯乙基溴及其它。由此得到水或油溶性或可分散的产品。

[0031] 可用于形成可药用酸加成盐的酸的实例包括无机酸、例如盐酸、氢溴酸、硝酸、硫

酸和磷酸及有机酸、例如甲酸、乙酸、三氟乙酸、富马酸、酒石酸、草酸、马来酸、甲磺酸、琥珀酸、苹果酸、甲磺酸、苯磺酸和对甲苯磺酸、柠檬酸和酸性氨基酸、例如天冬氨酸和谷氨酸。

[0032] 碱加成盐可以在嘧啶化合物的最终分离和纯化期间原位制备,或者独立地通过将羧酸基团与适合的碱、例如可药用金属阳离子的氢氧化物、碳酸盐或碳酸氢盐或与氨、或有机的伯胺、仲胺或叔胺进行反应来制备。可药用盐包括但不限于基于碱金属和碱土金属的阳离子盐,例如钠盐、锂盐、钾盐、钙盐、镁盐、铝盐等,以及无毒铵、季铵和胺阳离子,其包括但不限于铵、四甲铵、四乙铵、甲胺、二甲胺、三甲胺、三乙胺、乙胺等。可用于形成碱加成盐的其他代表性的有机胺包括二乙胺、乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、哌嗪、吡啶、甲基吡啶、三乙醇胺等和碱性氨基酸例如精氨酸、赖氨酸和鸟氨酸。

[0033] 式(I)化合物可单独使用或与可药用载体或赋形剂一起组合使用。本发明的药物组合物包含治疗有效量的式(I)化合物,及与其配制在一起的一种或多种可药用载体。如本文使用的术语“可药用载体”意指无毒的、惰性固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、包封材料或任何类型的制剂助剂。可以用作可药用载体的物质的一些实例为糖、例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉例如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物、例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素;粉状黄耆胶;麦芽;明胶;滑石粉;赋形剂、例如可可脂和栓剂蜡;油、例如花生油、棉子油;红花油;芝麻油;橄榄油;玉米油和豆油;二醇类;例如丙二醇;酯类、例如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂、例如氢氧化镁和氢氧化铝;藻酸;无热原水;等渗盐水;林格氏液;乙醇和磷酸盐缓冲液溶液,以及其它的无毒的相容的润滑剂、例如十二烷基硫酸钠和硬脂酸镁,且根据配方设计师的判断,着色剂、释放剂、包衣材料、甜味剂、矫味剂和芳香剂、防腐剂和抗氧化剂也可以存在于组合物中。其它适合的可药用赋形剂在“Remington's Pharmaceutical Sciences,”Mack Pub. Co., New Jersey, 1991 中描述,其引入本文作为参考。

[0034] 式(I)化合物可以以含所需的常规无毒可药用载体、辅助剂和介质的剂量单位制剂形式经口、胃肠外、舌下、通过气雾化作用或吸入喷雾、直肠、脑池内(intracisternally)、阴道内、腹膜内、经颊(buccally)或局部地施用于人和其它动物。局部施用还可涉及透皮施用、例如透皮贴剂或离子电渗疗法装置的使用。如本文使用的术语胃肠外包括皮下注射、静脉注射、肌肉注射、胸骨内注射或输注技术。

[0035] 配制的方法在本领域中众所周知,且公开于例如 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 第 19 版(1995)中。用于本发明中的药物组合物可以为无菌的、无热原液体溶液剂或混悬剂、包衣的胶囊剂、栓剂、冻干粉、透皮贴剂的形式或本领域已知的其它形式。

[0036] 可根据已知的技术使用适合的分散剂或润湿剂及悬浮剂来配制可注射制剂,例如无菌可注射水性或油性悬浮液。无菌可注射制剂还可以是在无毒的胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液剂、混悬剂或乳剂,例如,作为溶于 1,3-丙二醇或 1,3-丁二醇中的溶液。可采用的可接受的介质和溶剂尤其为水、林格氏液、U.S.P. 以及等渗氯化钠溶液。此外,通常采用无菌不挥发性油作为溶剂或悬浮介质。为达此目的,可采用任何温和和不挥发性油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。此外,脂肪酸例如油酸应用于可注射制剂。可注射制剂可以例如通过细菌截留性滤器过滤,或者掺入无菌固体组合物形式的灭菌剂进行灭菌,可以在使用前将所述无菌固体组合物溶解或分散在无菌的水或其他无菌可注射介质

中。

[0037] 为了延长药物效果,经常期望放慢在皮下或肌内注射以后的药物吸收。这可以通过使用水溶性差的结晶或无定形材料的液体混悬液来实现。于是,药物的吸收速率取决于它的溶解速率,其相应地可以取决于晶粒大小和晶形。或者,可通过将药物溶解或悬浮于油介质中来实现胃肠外施用剂型的吸收延迟。通过在可生物降解聚合物例如聚丙交酯-聚乙交酯中形成药物的微囊化基质来制备可注射储库制剂形式。根据药物与聚合物的比率和所采用的特定聚合物的特性,可以控制药物释放速率。其它可生物降解聚合物的实例包括聚(原酸酯)和聚(酐)。还可通过将药物包埋在与身体组织相容的脂质体或微乳中来制备可注射储库制剂。

[0038] 用于直肠或阴道施用的组合物优选地是栓剂,它们可以通过将本发明化合物与适合的无刺激性赋形剂或载体(例如可可脂、聚乙二醇或栓剂用蜡,其在环境温度下是固体,但是在体温下是液体,因此在直肠或阴道腔中融化,并释放出活性化合物)混合来制备。

[0039] 用于口服施用的固体剂型包括胶囊剂、片剂、丸剂、粉剂和颗粒剂。在这类固体剂型中,将活性化合物与至少一种惰性的可药用赋形剂或载体混合,例如柠檬酸钠或磷酸二钙,和/或 a) 填充剂或增充剂,例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅酸, b) 粘合剂,例如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶, c) 润湿剂,例如甘油, d) 崩解剂,例如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠, e) 溶解延迟剂,例如石蜡, f) 吸收促进剂,例如季铵化合物, g) 湿润剂,例如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯, h) 吸收剂,例如高岭土和膨润土,和 i) 润滑剂,例如滑石粉、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠及其混合物。在胶囊剂、片剂和丸剂的情况下,所述剂型也可以包含缓冲剂。

[0040] 还可采用相似类型的固体组合物作为软或硬的填充的明胶胶囊剂中的填充剂,所述胶囊使用赋形剂例如乳糖(lactose)或乳糖(milk sugar)以及高分子聚乙二醇等。

[0041] 片剂、糖锭剂、胶囊剂、丸剂和颗粒剂等固体剂型可以被制备为带有包衣和外壳,例如肠溶衣和药物配制领域熟知的其他包衣。它们可以任选地含有遮光剂,还可以为仅在或优先在肠道某一部分任选地以延迟方式释放活性成分的组合物。可以使用的包埋组合物的实例包括聚合物物质和蜡类。

[0042] 活性化合物也可以是具有一种或多种上述赋形剂的微囊包封的形式。片剂、糖锭剂、胶囊剂、丸剂和颗粒剂等固体剂型可以被制备为带有包衣和外壳,例如肠溶衣、控制释放包衣和药物配制领域熟知的其它包衣。在这类固体剂型中,可以将活性化合物与至少一种惰性稀释剂混合,例如蔗糖、乳糖或淀粉。在正常情况下,这类剂型还可以包含除惰性稀释剂以外的其他物质,例如压片润滑剂和其它压片助剂,例如硬脂酸镁和微晶纤维素。在胶囊剂、片剂和丸剂的情况下,剂型也可以包含缓冲剂。它们可任选地含有遮光剂,还可以为仅在或优先在肠道某一部分任选地以延迟方式释放活性成分的组合物。可以使用的包埋组合物的实例包括聚合物物质和蜡类。

[0043] 用于口服施用的液体剂型包括可药用乳剂、微乳剂、溶液剂、悬浮剂、糖浆剂和酏剂。除了活性化合物以外,液体剂型可含有在本领域中通常使用的惰性稀释剂、例如例如水或其它溶剂、增溶剂和乳化剂、例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、EtOAc、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油(尤其是棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖

麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和山梨糖醇酐的脂肪酸酯及其混合物。除了惰性稀释剂以外,口服组合物可还包含辅助剂、例如湿润剂、乳化剂和助悬剂、甜味剂、矫味剂和芳香剂。

[0044] 用于局部或透皮施用本发明化合物的剂型,包括软膏剂、糊剂、霜剂、洗剂、凝胶剂、粉剂、溶液剂、喷雾剂、吸入剂或贴剂。在无菌条件下,将活性组分与可药用载体和任何需要的防腐剂或可能需要的缓冲剂混合。眼用制剂、滴耳剂等也视为在本发明范围之内。

[0045] 除了本发明活性化合物之外,软膏剂,糊剂,霜剂和凝胶剂也可以含有赋形剂,例如动物脂肪和植物脂肪、油类、蜡类、石蜡、淀粉、黄蓍胶、纤维素衍生物、聚乙二醇类、聚硅氧烷、膨润土、硅酸、滑石粉和氧化锌或其混合物。

[0046] 也可以将本发明的组合物配制用于以液体气溶胶或吸入干粉递送。可以将液体气溶胶制剂主要雾化为可以递送至终末细支气管和呼吸细支气管中的微粒尺寸。

[0047] 可以使用气溶胶形成装置递送本发明的雾化制剂,例如喷射器、振动多孔板或超声雾化器,优选地选择使形成的气溶胶粒子主要具有 1 至 5 μm 之间的质量中位平均直径(mass medium average diameter)。进一步,制剂优选地具有平衡的摩尔渗透压浓度离子强度和氯化物浓度,及能够将有效剂量的本发明化合物递送至感染部位的最小可气溶胶化体积。此外,雾化制剂优选地不能负面地损害气道的功能,并且不引起不希望的作用。

[0048] 适合于施用本发明气雾剂的雾化装置包括例如喷射器、振动多孔板、超声雾化器和激发干粉吸入器,其能够使本发明制剂雾化为粒径主要尺寸在 1-5 μm 范围内的气溶胶。在本申请中,主要是指至少 70% 但优选超过 90% 的所有产生的气溶胶粒子在 1-5 μm 的范围内。喷射雾化器通过气压进行工作,将液体溶液破碎为气溶胶微滴。振动多孔板雾化器是通过使用快速振动多孔板产生的声波真空而工作的,从而挤压溶剂微滴穿过多孔板。超声雾化器是利用将液体剪切为小的气溶胶微滴的压电晶体来工作的。可得到多种合适的装置,包括例如, AERONEB 和 AERODOSE 振动多孔板雾化器 (AeroGen, Inc., Sunnyvale, 加利福尼亚)、SIDESTREAM 雾化器 (Medic-Aid Ltd., West Sussex, 英格兰)、PARI LC 和 PARI LC STAR 喷射雾化器 (Pari Respiratory Equipment, Inc., Richmond, 弗吉尼亚), 和 AEROSONIC (DeVilbiss Medizinische Produkte (德国) GmbH, Heiden, 德国) 和 ULTRAIRE (Omron Healthcare, Inc., Vernon Hills, 伊利诺伊) 超声波雾化器。

[0049] 也可以将本发明化合物配制为局部使用的粉剂和喷雾剂,除了本发明的化合物之外,其还可以包含赋形剂、例如乳糖、滑石粉、硅酸、氢氧化铝、硅酸钙和聚酰胺粉末,或这些物质的混合物。喷雾剂可以另外含有常用的推进剂,例如氯代氟代烃类。

[0050] 透皮贴片具有更多的优点,其可以将化合物控制递送至身体。可以通过将化合物溶解或分散在适当介质中来制备这种剂型。还可以使用吸收促进剂,以提高化合物穿过皮肤的流量。通过提供速率控制膜或者通过在聚合物基质或凝胶中分散化合物,可以控制速度。本发明化合物还可以以脂质体形式施用。如本领域所公知,脂质体一般源自磷脂或其他脂类物质。脂质体可通过散布于水性介质中的单一或多层水合液晶体来形成。任何生理上可接受且可代谢的能形成脂质体的无毒脂质均可用。除本发明化合物外,本发明脂质体形式的组合物可含有稳定剂、防腐剂、赋形剂等。优选脂质为天然及合成的磷脂及磷脂酰胆碱(卵磷脂)。形成脂质体的方法为本领域所公知。参见,例如, Prescott (编撰), "Methods in Cell Biology," 第 XIV 卷, Academic Press, New York, 1976, 第 33 页以及参考以下。

[0051] 本发明化合物的有效量通常包括足以可检测地抑制错构瘤肿瘤细胞的生长或增殖或者检测 PHTS 的症状的抑制或减轻的任何量。可与载体物质组合以生产单一剂型的有效成分的量将根据待治疗宿主和施用的特定模式而变化。然而,应了解,用于任何特定患者的具体给药水平应根据多种因素而定,所述因素包括所用具体化合物的活性、患者年龄、体重、总体健康状况、性别、膳食、施用时间、施用途径、排泄速度、药物组合及经受治疗的特定疾病的严重程度。对于给定情形,治疗有效量可以通过常规实验容易地确定且其属于普通临床医师的技术和判断范围。

[0052] 根据本发明的治疗方法,通过向患者施用一定量的式 (I) 化合物在患者例如人或低级哺乳动物中减少或预防错构瘤肿瘤生长,用这种量并经过所必需的时间以达到所需要的结果。式 (I) 化合物的“对于抑制错构瘤肿瘤细胞的生长或增殖有效的量”是指以适用于任何医疗治疗的合理的益处/风险比例治疗错构瘤肿瘤生长的化合物的足够的量。然而应当理解,在可靠医学判断范围内,本发明化合物和组合物的总日剂量取决于主治医师。对于任何特定患者的具体治疗有效剂量水平应根据多种因素而定,包括所治疗的病症和病症的严重度;所使用的具体化合物的活性;所使用的具体组合物;患者的年龄、体重、总体健康状况、性别和膳食;所使用具体化合物的施用时间、施用途径和排泄速度;治疗时间;与所使用的具体化合物组合、或其同时施用的药物;和医学领域众所周知的类似因素。

[0053] 用于本发明目的,治疗有效剂量通常为以单次或分开剂量施用于宿主的总日剂量,其可以是例如每日 0.001 至 1000mg/kg 体重,且更优选为每日 1.0 至 30mg/kg 体重的量。单位剂量组合物可包含其约数的量以组成日剂量。通常,根据本发明的治疗方案包括以单或多剂量形式向需要这种治疗的患者施用每天大约 10mg 至大约 2000mg 本发明化合物。

[0054] 以下给出式 (I) 化合物备选的实施方案:

[0055] 1) 化合物,其中 R^2 为:

[0056] a. 氢;

[0057] b. 氢或氟;或

[0058] c. 氢、氟或氯;

[0059] 2) 化合物,其中 R^3 是:

[0060] a. 三氟甲基;

[0061] b. 氢或三氟甲基;

[0062] c. 氢、卤素或三氟甲基;

[0063] 3) 化合物,其中 R^4 是:

[0064] a. 氢;或

[0065] b. 氢、氟或氯;

[0066] 4) 化合物,其中 R^6 是氢;

[0067] 5) 化合物,其中 W 是:

[0068] a. CH;或

[0069] b. N。

[0070] 应理解式 (I) 化合物的另外的实施方案可以通过要求式 (I) 化合物的以上实施方案 (1) 至 (5) 中的一个或多个而选择。例如,另外的备选的实施方案可以通过进行以下组合获得:(1) (a) 和 (2) (a);(1) (a) 和 (2) (b);(1) (b) 和 (2) (a);(1) (b) 和 (2) (b);(1) (c) 和

(2) (a) ; (1) (c) 和 (2b) ; (1) (c) 和 (2) (c) ; (1) (b) 和 (2) (c) ; (1) (a) 和 (2) (c) ; (1) (a)、(2) (a) 和 (3) (a) ; (1) (b)、(2) (a) 和 (3) (a) ; (1) (a)、(2) (b) 和 (3) (a) ; (1) (a)、(2) (a) 和 (3) (b) ; (1) (b)、(2) (b) 和 (3) (a) ; (1) (a)、(2) (b) 和 (3) (b) ; (1) (a)、(2) (a)、(3) (a) 和 (4) ; (1) (b)、(2) (a)、(3) (a) 和 (4) ; (1) (a)、(2) (a)、(3) (b) 和 (4) ; (1) (b)、(2) (b)、(3) (a) 和 (4) ; (1) (b)、(2) (a)、(3) (b) 和 (4) ; (1) (b)、(2) (b)、(3) (b) 和 (4) ; (1) (c)、(2) (a)、(3) (a) 和 (4) ; (1) (c)、(2) (b)、(3) (a) 和 (4) ; (1) (c)、(2) (b)、(3) (b) 和 (4) ; (1) (c)、(2) (c)、(3) (a) 和 (4) ; (1) (c)、(2) (c)、(3) (b) 和 (4) ; (1) (a)、(2) (a)、(3) (a)、(4) 和 (5) (a) ; (1) (b)、(2) (a)、(3) (a)、(4) 和 (5) (a) ; (1) (a)、(2) (b)、(3) (a)、(4) 和 (5) (a) ; (1) (a)、(2) (a)、(3) (b)、(4) 和 (5) (a) ; (1) (b)、(2) (b)、(3) (a)、(4) 和 (5) (a) ; (1) (b)、(2) (b)、(3) (a)、(4) 和 (5) (a) ; (1) (c)、(2) (a)、(3) (a)、(4) 和 (5) (a) ; (1) (a)、(2) (c)、(3) (a)、(4) 和 (5) (a) ; (1) (c)、(2) (c)、(3) (b)、(4) 和 (5) (a) ; (1) (a)、(2) (a)、(3) (a)、(4) 和 (5) (b) ; (1) (b)、(2) (a)、(3) (a)、(4) 和 (5) (b) ; (1) (a)、(2) (b)、(3) (a)、(4) 和 (5) (b) ; (1) (a)、(2) (a)、(3) (b)、(4) 和 (5) (b) ; (1) (c)、(2) (a)、(3) (a)、(4) 和 (5) (b) ; (1) (c)、(2) (b)、(3) (a)、(4) 和 (5) (b) ; (1) (b)、(2) (c)、(3) (a)、(4) 和 (5) (b) ; (1) (b)、(2) (b)、(3) (b)、(4) 和 (5) (b) ; (1) (c)、(2) (c)、(3) (b)、(4) 和 (5) (b) ; (1) (a) 和 (4) ; (1) (b) 和 (4) ; (2) (a) 和 (4) ; (3) (a) 和 (4) ; (2) (a)、(3) (a) 和 (4) ; (1) (a) 和 (5) (a) ; (1) (b)、(4) 和 (5) ; 等。

[0071] 通过参考以下实施例将更容易理解本发明,所述实施例以例证的方式提供,而非意欲限制本发明。

[0072] 式 (I) 化合物使用美国专利申请公开号 US2010/0249126A1 (2010 年 9 月 30 日) 中所述的方法进行合成,将其由此引入本文作为参考,如同将其进行了充分阐述一样。选择的实例也在此公开,如下文流程和实施例所述。

[0073] 化合物和 / 或中间体通过使用具有 2695 分离模块的 Waters Millenium 色谱系统的高效液相色谱 (HPLC) (Milford, MA) 来表征。分析柱是 Alltima C-18 反相柱 (4.6x50mm, 流速 2.5mL/min, 来自 Alltech (Deerfield, IL))。使用梯度洗脱,通常从 5% 乙腈 / 95% 水开始,进行到 100% 乙腈,历经 40 分钟。所有溶剂均包含 0.1% 三氟乙酸 (TFA)。化合物通过在 220 或 254nm 紫外线 (UV) 吸收而检测。HPLC 溶剂来自 Burdick and Jackson (Muskegan, MI) 或 Fisher Scientific (Pittsburgh, PA)。在某些情况下,通过使用玻璃或塑料支撑的硅胶板的薄层色谱 (TLC) 来评价纯度,例如, Baker-Flex 硅胶 1B2-F 可弯屈片。TLC 结果易于在紫外线下目测,或通过使用公知的碘蒸气以及其他各种染色技术检测。

[0074] 质谱分析经两台 LCMS 仪器之一进行: Waters 系统 (Alliance HTHPLC 和 Micromass ZQ 质谱仪; 柱: Eclipse XDB-C18, 2.1x50mm; 溶剂系统: 在含 0.05% TFA 的水中的 5-95% (或 35-95%, 或 65-95% 或 95-95%) 乙腈; 流速 0.8mL/min; 分子量范围 200-1500; 锥孔电压 20V; 柱温 40°C) 或 Hewlett Packard 系统 (1100 系列 HPLC; 柱: Eclipse XDB-C18, 2.1x50mm; 溶剂系统: 在含 0.05% TFA 的水中的 1-95% 乙腈; 流速 0.8mL/min; 分子量范围 150-850; 锥孔电压 50V; 柱温 30°C)。所有质量以质子化的母离子的质量报告。

[0075] GCMS 分析在 Hewlett Packard 仪器进行 (HP6890 系列气相色谱, 配备质量选择性检测器 (Mass Selective Detector) 5973; 进样器体积: 1 μ L; 最初柱温: 50°C; 最终柱温: 250°C; 上升时间: 20 分钟; 气体流速: 1mL/min; 柱: 5% 苯基甲基硅氧烷, 型号

HP190915-443。尺寸 :30.0m x25m x0.25m)。

[0076] 对一些化合物用 Varian300MHz NMR(Palo Alto,CA) 进行核磁共振 (NMR) 分析。谱图的参比是 TMS 或溶剂的已知的化学位移。一些化合物样品在升高的温度下 (例如,75°C) 测试,以提高样品的溶解度。

[0077] 一些本发明化合物的纯度通过元素分析 (Desert Analytics,Tucson,AZ) 进行评价。

[0078] 熔点经 Laboratory Devices Mel-Temp 装置 (Holliston,MA) 测定。

[0079] 制备型分离使用 Flash40 色谱系统和 KP-Sil,60A(Biotage, Charlottesville, VA)、或通过使用硅胶 (230-400 目) 填料的快速柱色谱法、或通过使用 Waters2767 样品管理器、C-18 反相柱 (30X50mm,流速 75mL/min) 的 HPLC 来进行。用于 Flash40Biotage 系统和快速柱色谱的典型的溶剂是二氯甲烷、甲醇、乙酸乙酯、己烷、丙酮、氨水 (或氢氧化铵) 和三乙胺。用于反相 HPLC 的典型的溶剂是不同浓度的乙腈和含 0.1% 三氟乙酸的水。

[0080] 应当理解的是,本发明的有机化合物可以呈现互变异构现象。由于本申请中的化学结构仅能代表可能的互变异构形式中的一种,所以应当理解的是本发明涵盖所绘制结构的任何互变异构形式。

[0081] 应当以解的是,本发明不限于本文所述的用于例证的实施方案,还包括其所有所述的形式,如同处于以上公开的范围中一样。

[0082] 缩写

[0083]	ACN	乙腈
[0084]	BINAP	2,2' - 双 (二苯膦基) -1,1' - 联萘
[0085]	DIEA	二异丙基乙胺
[0086]	DME	1,2- 二甲氧基乙烷
[0087]	DMF	N,N- 二甲基甲酰胺
[0088]	DPPF	1,1' - 双 (二苯膦基) 二茂铁
[0089]	EtOAc	乙酸乙酯
[0090]	EtOH	乙醇
[0091]	MCPBA	间 - 氯过苯甲酸
[0092]	NBS	N- 溴琥珀酰亚胺
[0093]	NMP	N- 甲基 -2- 吡咯烷酮
[0094]	RT	室温
[0095]	THF	四氢呋喃

[0096] 用于合成式 (I) 化合物的通用方法

[0097] 提供了用于制备式 (I) 化合物的方法。所述方法包括: 将 4- 卤代 -2,6- 二吗啉代嘧啶与含反应性的硼酸酯取代基的被取代的吡啶基或嘧啶基在钯催化剂的存在下进行反应。在一个实施方案中,含反应性的硼酸酯取代基的被取代的吡啶基或嘧啶基具有位于硼酸酯对位的 -NH₂ 基。在另一个实施方案中,含反应性的硼酸酯取代基的被取代的吡啶基或嘧啶基具有位于硼酸酯对位的 -NH₂ 基和位于硼酸酯邻位的另外的非氢取代基。在某些实施方案中,所述非氢取代基为 -CF₃、-CN、-NH₂、卤素、羟基或硝基。

[0098] 在另一个实施方案中,吡啶基硼酸酯是 4-(三氟甲基)-5-(4,4,5,5-四甲基-1,

3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)吡啶-2-胺。在另一个实施方案中,钯催化剂为 Pd(dppf)Cl₂ 二氯甲烷加合物。

[0099] 在另一个实施方案中,4-氯-2,6-二吗啉代嘧啶基团通过将 4,6-二氯-2-吗啉代嘧啶与吗啉进行反应来制备。在另一个实施方案中,4,6-二氯-2-吗啉代嘧啶基团通过将 2-吗啉代嘧啶-4,6-二醇与 POCl₃ 进行反应来制备。在另一个实施方案中,2-吗啉代嘧啶-4,6-二醇通过将吗啉-4-甲脒与丙二酸二乙酯在碱、例如乙醇钠的存在下进行反应来制备。

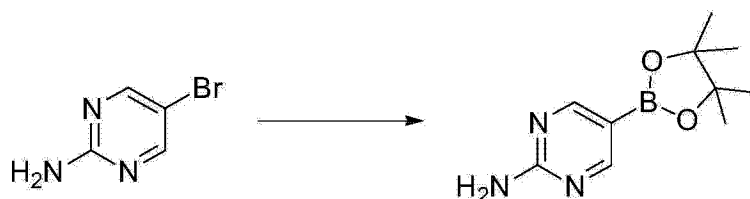
[0100] 在另一个实施方案中,含反应性的硼酸酯取代基的被取代的吡啶基或嘧啶基通过将含溴取代基的被取代的吡啶基或嘧啶基与二硼酸酯(diboronic ester)、例如 4,4,5,5-四甲基-2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷进行反应来制备。在另一个实施方案中,含溴取代基的被取代的吡啶基或嘧啶基通过将取代的吡啶基或嘧啶基与 N-溴琥珀酰亚胺(NBS)进行反应来制备。

[0101] 本发明的另一个实施方案提供了制备 4-氯-2,6-二吗啉代嘧啶的方法,其包括将吗啉与 2,4,6-三氯嘧啶在适合的溶剂中反应。在一个更特别的实施方案中,所述溶剂为极性非质子溶剂。更特别的是,所述溶剂是 THF。在另一个更特别的实施方案中,历经至少 10 分钟或至少 20 分钟或 30 分钟将 4-氯-2,6-二吗啉代嘧啶加入含吗啉的溶液中。或者,将吗啉加入中含 4-氯-2,6-二吗啉代嘧啶的溶液中。更特别的是,将该溶液冷却至低于 20°C 或低于 10°C 或低于 5°C 或低于 0°C。更特别地,在 4-氯-2,6-二吗啉代嘧啶添加期间或之后,使该溶液升温至高于 20°C 或高于 25°C 或高于 30°C。在另一个实施方案中,将吗啉和 4-氯-2,6-二吗啉代嘧啶合并之后,通过加入水溶液将该溶液淬灭。更特别地,将吗啉和 4-氯-2,6-二吗啉代嘧啶合并至少 10 小时或至少 20 小时或至少 30 小时或至少 40 小时或至少 50 小时或约 64 小时之后,通过加入水溶液将该溶液淬灭。更特别地,淬灭后,将该溶液经柱色谱纯化。更特别的是,所述柱是硅胶柱。在另一个实施方案中,将 4-氯-2,6-二吗啉代嘧啶与 2-氨基吡啶基或 2-氨基嘧啶基反应,形成式(I)化合物。

[0102] 方法 1

[0103] 5-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)嘧啶-2-基胺的合成

[0104]



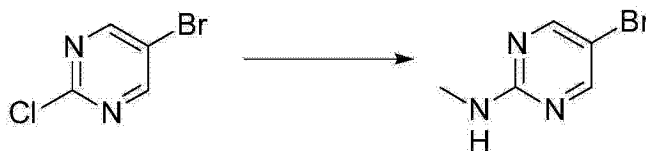
[0105] 向干燥的 500-mL 烧瓶中加入 2-氨基-5-溴嘧啶(10g, 57.5mmol)、乙酸钾(16.9g, 172mmol)、4,4,5,5-四甲基-2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷(16.1g, 63.0mmol)和二噁烷(300mL)。将氩气通入该溶液中达 15 分钟,这时加入二氯[1,1'-双(二苯膦基)二茂铁]钯(II)二氯甲烷加合物(Pd(dppf)Cl₂CH₂Cl₂)(2.34g, 2.87mmol)。在氩气下将该反应混合物在 115°C 的油浴中回流 4 小时。冷却至室温后,加入 EtOAc(500mL),将得到的浆体超声处理,并过滤。使用另外的 EtOAc(500mL)洗涤固体。将合并的有机萃取物用 H₂O(2x300mL)、NaCl(饱和的)(300mL)洗涤,经 Na₂SO₄ 干燥,并经 5cm 硅胶垫过滤。使用另外的 EtOAc 冲洗产物。将溶剂浓缩

后,将粗品用二氯甲烷和己烷的 1:3 的混合液 (40mL) 处理,过滤,并用己烷洗涤,得到淡黄色固体 (8.5g,75%)。LCMS(m/z):140(羟基硼酸的 MH^+ ,由产物在 LC 上水解获得)。 ^1H NMR(CDCl_3): δ 8.58(s,2H),5.74(s,2H),1.32(s,12H)。

[0106] 方法 2

[0107] 2-氨基甲基-5-溴嘧啶的合成

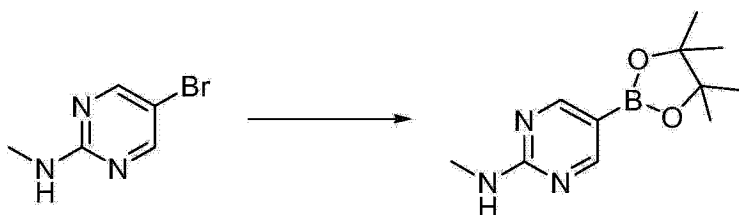
[0108]



[0109] 将甲胺 (2.0M 在甲醇中,40mL,80mmol) 加入在可密封的反应容器中的 5-溴-2-氯嘧啶 (5.6g,29.0mmol) 中。在允许排气几分钟后,将反应容器密封,置于防护罩后,并在 115°C 的油浴中加热 48 小时。冷却后,在真空下除去挥发物。将该物质溶于 CH_2Cl_2 (200mL) 中,并用 1M NaOH (40mL) 洗涤。将水层另外用 CH_2Cl_2 (2x50mL) 萃取。将合并的有机物经 MgSO_4 干燥,过滤,并浓缩,得到米白色固体 (5.1g,93%)。LCMS(m/z):188.0/190.0(MH^+)。

[0110] 甲基 [5-(4,4,5,5-四甲基 (1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)) 嘧啶-2-基] 胺的合成

[0111]

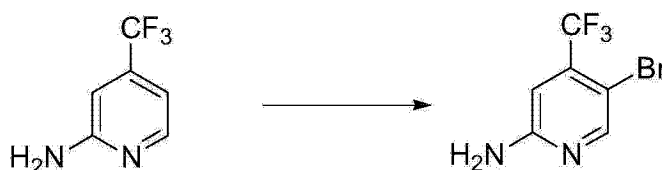


[0112] 向干燥的 500mL 烧瓶中加入 2-甲基氨基-5-溴嘧啶 (9.5g,50.5mmol)、乙酸钾 (15.1g,154.4mmol)、4,4,5,5-四甲基-2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷 (14.1g,55.5mmol) 和二噁烷 (280mL)。将氩气通入该溶液中达 15 分钟,此时加入 1,1'-双(二苯膦基)二茂铁氯化钯 (II) 二氯甲烷加合物 (2.05g,2.51mmol)。在氩气下将该反应在 115°C 的油浴中回流 4 小时。冷却至室温后,加入 EtOAc (500mL),将得到的浆体超声处理,并过滤。使用另外的 EtOAc (500mL) 洗涤固体。将合并的有机物用 H_2O (2x300mL)、NaCl (饱和的) (300mL) 洗涤,经 Na_2SO_4 干燥,过滤,并在真空下除去溶剂。经 SiO_2 色谱纯化 (50%EtOAc/己烷),得到米白色固体 (7.66g,64%)。LCMS(m/z):154(羟基硼酸的 MH^+ ,由产物在 LC 上原位水解获得)。 ^1H NMR(CDCl_3): δ 8.58(s,2H),5.56(s,1H),3.02(d,3H),1.32(s,12H)。

[0113] 方法 3

[0114] 5-溴-4-(三氟甲基)-2-吡啶基胺的合成

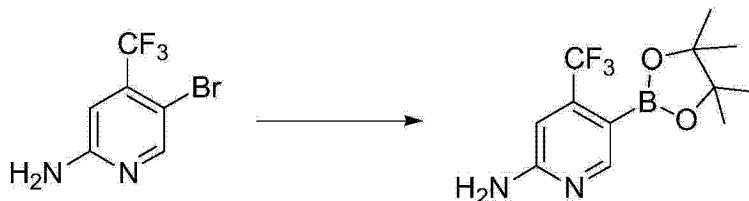
[0115]



[0116] 向 2-氨基-4-三氟甲基吡啶 (10.0g, 62.1mmol) 在氯仿 (200mL) 中的溶液中加入 N-溴琥珀酰亚胺 (12.0g, 67.4mmol)。将该溶液在黑暗中搅拌 2 小时, 此时将其加入 CH_2Cl_2 (200mL) 和 1N NaOH (200mL) 中。混合后, 将各层分离, 并将有机层用 NaCl (饱和的) (100mL) 洗涤, 经 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 并浓缩。将粗制的物质经 SiO_2 色谱纯化 (0-5% EtOAc/ CH_2Cl_2), 得到 12.0g (80%) 5-溴-4-(三氟甲基)-2-吡啶基胺 LCMS(m/z): 241/243 (MH^+)。 ^1H NMR(CDCl_3): δ 8.28(s, 1H), 6.77(s, 1H), 4.78(bs, 2H)。

[0117] 5-(4,4,5,5-四甲基(1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基))-4-(三氟甲基)-2-吡啶基胺的合成

[0118]



[0119] 向干燥的 500mL 烧瓶中加入 5-溴-4-(三氟甲基)-2-吡啶基胺 (11.8g, 49.0mmol)、乙酸钾 (14.4g, 146.9mmol)、4,4,5,5-四甲基-2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷 (13.6g, 53.9mmol) 和二噁烷 (300mL)。将氩气通入该溶液中达 15 分钟, 此时加入 1,1'-双(二苯膦基)二茂铁氯化钯 (II) 二氯甲烷加合物 (2.0g, 2.45mmol)。在氩气下将该反应在 115 $^{\circ}\text{C}$ 的油浴中回流 8 小时。冷却至室温后, 在真空下除去二噁烷。加入 EtOAc (500mL), 将得到的浆体超声处理, 并过滤。使用另外的 EtOAc (500mL) 洗涤固体。将合并的有机萃取物浓缩, 并将粗制的物质经 SiO_2 色谱部分纯化 (30-40% EtOAc/己烷)。将溶剂除去后, 加入己烷 (75mL); 超声处理后, 将得到的固体过滤, 并在高真空下干燥 3 天, 得到 2.4g 米白色固体。经 ^1H NMR 该物质为硼酸酯和 2-氨基-4-三氟甲基吡啶副产物的 5:1 的混合物。将该物质原样用于以下的铃木反应中。LCMS(m/z): 207 (烷基硼酸的 MH^+ , 由产物在 LC 上原位水解获得)。 ^1H NMR(CDCl_3): δ 8.50(s, 1H), 6.72(s, 1H), 4.80(bs, 2H), 1.34(s, 12H)。

[0120] 方法 4

[0121] 5-溴-4-(三氟甲基)嘧啶-2-胺的合成

[0122]

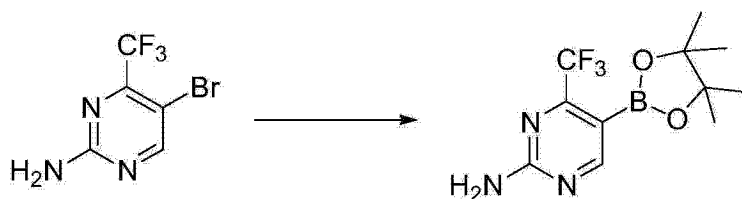


[0123] 向 2-氨基-4-三氟甲基嘧啶 (8.0g, 49.1mmol) 在氯仿 (300mL) 中的溶液中加入 N-溴琥珀酰亚胺 (8.9g, 50mmol)。将该溶液在黑暗中搅拌 16 小时, 此时加入另外的 N-溴琥珀酰亚胺 (4.0g, 22.5mmol)。再搅拌 4 小时后, 将该溶液加入 CH_2Cl_2 (200mL) 和 1N NaOH (200mL) 中。混合后, 将各层分离, 并将有机层用 NaCl (饱和的) (100mL) 洗涤, 经 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 并浓缩, 得到 10.9g (82%) 5-溴-4-(三氟甲基)-2-嘧啶基胺。LCMS(m/z): 242/244 (MH^+)。 ^1H NMR(CDCl_3): δ 8.52(s, 1H), 5.38(bs, 2H)。

[0124] 5-(4,4,5,5-四甲基(1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基))-4-(三氟甲基)嘧

啉-2-基胺的合成

[0125]

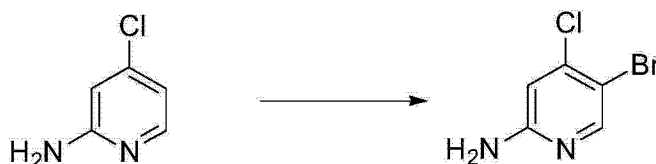


[0126] 向干燥的 500mL 烧瓶中加入 5-溴-4-(三氟甲基)-2-吡啶基胺 (10.1g, 41.7mmol)、乙酸钾 (12.3g, 125.2mmol)、4,4,5,5-四甲基-2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷 (11.6g, 45.9mmol) 和二噁烷 (150mL)。将氩气通入该溶液中达 15 分钟,此时加入 1,1'-双(二苯膦基)二茂铁氯化钯 (II) (1.7g, 2.1mmol)。在氩气下将该反应在 115℃ 的油浴中回流 6 小时。冷却至室温后,在真空下除去二噁烷。加入 EtOAc (500mL),将得到的浆体超声处理,并过滤。使用另外的 EtOAc (500mL) 洗涤固体。将合并的有机萃取物浓缩,并将粗制的物质经 SiO₂ 色谱纯化 (30-40%EtOAc/己烷),得到 4.40g 米白色固体。经 ¹H NMR 该物质为硼酸酯和 2-氨基-4-三氟甲基吡啶副产物的 1:1 的混合物。将该物质原样用于以下的铃木反应中。LCMS(m/z): 208 (烷基硼酸的 MH⁺, 由产物在 LC 上原位水解获得)。¹H NMR(CDCl₃): δ 8.72(s, 1H), 5.50(bs, 2H), 1.34(s, 12H)。

[0127] 方法 5

[0128] 5-溴-4-氯-2-吡啶基胺的合成

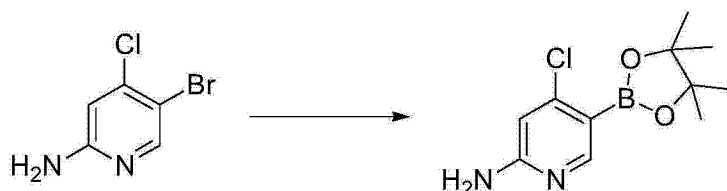
[0129]



[0130] 向 4-氯-2-吡啶基胺 (6.0g, 46.7mmol) 在氯仿 (180mL) 中的溶液中加入 N-溴琥珀酰亚胺 (8.3g, 46.7mmol)。将该溶液在黑暗中搅拌 2 小时,此时将其加入 CH₂Cl₂ (800mL) 和 1N NaOH (100mL) 中。混合后,将各层分离,并将有机层用 NaCl_(饱和的) (100mL) 洗涤,经 Na₂SO₄ 干燥,过滤,并浓缩。将粗制的物质经 SiO₂ 色谱纯化 (25-35%EtOAc/己烷),得到 3.63g (38%) 5-溴-4-氯-2-吡啶基胺。LCMS(m/z): 206.9/208.9 (MH⁺)。 ¹H NMR(CDCl₃): δ 8.18(s, 1H), 6.62(s, 1H), 4.52(bs, 2H)。

[0131] 4-氯-5-(4,4,5,5-四甲基(1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基))-2-吡啶基胺的合成

[0132]



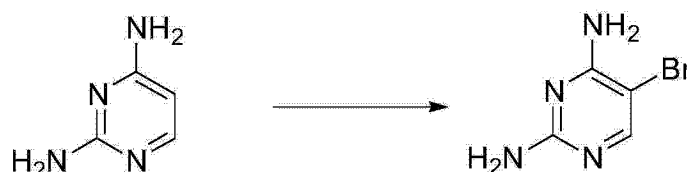
[0133] 向干燥的 500-mL 烧瓶中加入 5-溴-4-氯-2-吡啶基胺 (7.3g, 35.8mmol)、乙酸

钾 (10.3g, 105mmol)、4,4,5,5-四甲基-2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷 (10.1g, 39.8mmol) 和二噁烷 (150mL)。将氩气通入该溶液中达 15 分钟, 此时加入 1,1'-双(二苯膦基)二茂铁氯化钯(II)二氯甲烷加合物 (0.85g, 1.04mmol)。在氩气下将该反应在 115℃ 的油浴中回流 6 小时。冷却至室温后, 在真空下除去二噁烷。然后加入 EtOAc (500mL), 将得到的浆体超声处理, 并过滤。使用另外的 EtOAc (500mL) 洗涤固体。将合并的有机萃取物浓缩, 并将粗制的物质经 SiO₂ 色谱纯化 (EtOAc 作为洗脱液)。将溶剂除去后, 加入 3:1 的己烷/CH₂Cl₂ (100mL)。超声处理后, 将得到的固体过滤, 并在真空下浓缩, 得到 2.8g 白色固体。经 ¹H NMR 该物质为硼酸酯和 2-氨基-4-氯吡啶副产物的 10:1 的混合物。将该物质原样用于以下的铃木反应中。LCMS(m/z): 173 (羟基硼酸的 MH⁺, 由产物在 LC 上原位水解获得)。¹H NMR(CDCl₃): δ 8.36(s, 1H), 6.46(s, 1H), 4.70(bs, 2H), 1.38(s, 12H)。

[0134] 方法 6

[0135] 5-溴嘧啶-2,4-二胺的合成

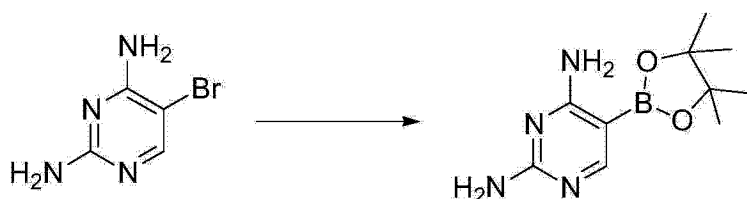
[0136]



[0137] 向 2,4-二氨基嘧啶 (1.0g, 9.1mmol) 在氯仿 (30mL) 中的溶液中加入 N-溴琥珀酰亚胺 (1.62g, 9.08mmol)。将该溶液在黑暗中搅拌 12 小时, 此时将其加入 CH₂Cl₂ (150mL) 和 1N NaOH (50mL) 中。将形成的固体过滤, 用水冲洗, 并在真空下浓缩, 得到 1.4g (74%) 5-溴嘧啶-2,4-二胺。LCMS(m/z): 189/191 (MH⁺)。 ¹H NMR(DMSO-d₆): δ 7.78(s, 1H), 6.58(bs, 2H), 6.08(bs, 2H)。

[0138] 5-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)嘧啶-2,4-二胺的合成

[0139]



[0140] 向干燥的 1L 烧瓶中加入 5-溴嘧啶-2,4-二胺 (30.0g, 158.7mmol)、乙酸钾 (45.8g, 466.7mmol)、4,4,5,5-四甲基-2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷 (51.2g, 202.2mmol) 和二噁烷 (500mL)。将氩气通入该溶液中达 15 分钟, 此时加入 1,1'-双(二苯膦基)二茂铁氯化钯(II) (2.5g, 3.11mmol)。在氩气下将该反应在 115℃ 的油浴中回流 16 小时。冷却至室温后, 将固体无机物质过滤, 用 EtOAc (1L) 冲洗。将有机滤液在真空下浓缩, 并向得到的固体中加入二氯甲烷 (1L)。超声处理后, 过滤该固体。该固体为脱溴的 2,4-二氨基嘧啶。将含期望的羟基硼酸酯的滤液在真空下浓缩。向该残余物中加入乙醚 (100mL)。超声处理后, 将该溶液过滤, 用另外的乙醚 (50mL) 冲洗, 并得到的固体在高真空下干燥, 得到期望的 2,4-二氨基嘧啶基-5-硼酸酯

(10.13g, 27%)。经 ^1H NMR 该物质为 2,4-二氨基嘧啶基-5-硼酸酯和 2,4-二氨基嘧啶副产物的 4:1 的混合物。将该物质原样用于以下的铃木反应中。LCMS (m/z): 155 (羟基硼酸的 MH^+ , 由产物在 LC 上原位水解获得)。 ^1H NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$): δ 8.16 (s, 1H), 1.34 (s, 12H)。

[0141] 方法 7

[0142] 5-溴-6-氟-2-吡啶基胺的合成

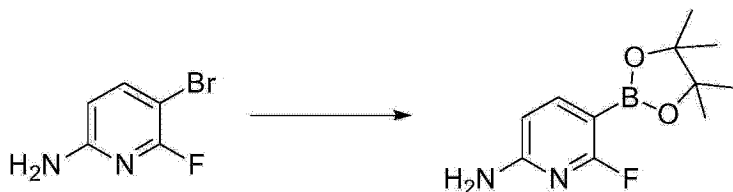
[0143]



[0144] 向 6-氟-2-吡啶基胺 (1.0g, 8.93mmol) 在氯仿 (55mL) 中的溶液中加入 N-溴琥珀酰亚胺 (1.59g, 8.93mmol)。将该溶液在黑暗中搅拌 15 小时, 此时将其加入 CH_2Cl_2 (200mL) 和 1N NaOH (50mL) 中。混合后, 将各层分离, 并将有机层用 NaCl (饱和的) (50mL) 洗涤, 经 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 并浓缩。将粗制的物质经 SiO_2 色谱纯化 (25%EtOAc/己烷), 得到 5-溴-6-氟-2-吡啶基胺 (386mg, 22%)。LCMS (m/z): 190.9/192.9 (MH^+); ^1H NMR (CDCl_3): δ 7.59 (t, $J=8.7\text{Hz}$, 1H), 6.25 (dd, $J=8.1, 1.2\text{Hz}$, 1H), 4.58 (bs, 1H)。

[0145] 6-氟-5-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)-2-吡啶基胺的合成

[0146]



[0147] 向干燥的 50-mL 烧瓶中加入 5-溴-6-氟-2-吡啶基胺 (370mg, 1.93mmol)、乙酸钾 (569mg, 5.8mmol)、4,4,5,5-四甲基-2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷 (538mg, 2.12mmol) 和二噁烷 (15mL)。将氩气通入该溶液中达 15 分钟, 此时加入 1,1'-双(二苯膦基)二茂铁氯化钯 (II) 二氯甲烷加合物 (79mg, 0.09mmol)。在氩气下将该反应在 115°C 的油浴中回流 4 小时。将挥发物在真空下除去后。加入 EtOAc (150mL), 并将该溶液用 H_2O (3x40mL)、 NaCl (饱和的) (300mL) 洗涤, 经 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 并浓缩。经 SiO_2 色谱纯化 (30%EtOAc/己烷), 得到硼酸酯 (161mg, 35%)。LCMS (m/z): 157 (羟基硼酸的 MH^+ , 由产物在 LC 上原位水解获得) ^1H NMR (CDCl_3): δ 7.86 (t, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 6.29 (dd, $J=8.1, 2.7\text{Hz}$, 1H), 4.70 (bs, 1H), 1.32 (s, 12H)。

[0148] 方法 8

[0149] 5-溴-4-氟吡啶-2-胺的合成

[0150]

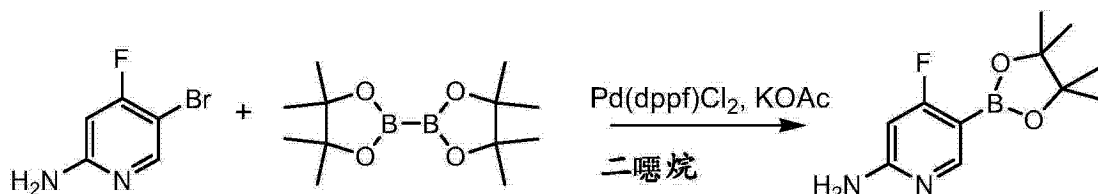


[0151] 在黑暗的通风橱中将 N-溴琥珀酰亚胺 (126mg, 0.71mmol) 加入在铝箔-包裹的烧

瓶中的 4- 氟吡啶 -2- 胺 TFA 盐 (162mg, 0.72mmol) 在乙腈 (4mL) 中的溶液中。将该反应溶液在室温在黑暗中搅拌 2 小时。将溶剂蒸发后, 将粗制的产物经硅胶柱用 EtOAc 洗脱纯化, 得到 5- 溴 -4- 氟吡啶 -2- 胺, 为乳白色固体 (92mg, 67%)。LC/MS(m/z): 190.9/192.9(MH⁺), Rt1.02 分钟。

[0152] 4- 氟 -5-(4,4,5,5- 四甲基 -1,3,2- 二氧杂硼杂环戊烷 -2- 基) 吡啶 -2- 胺的合成

[0153]

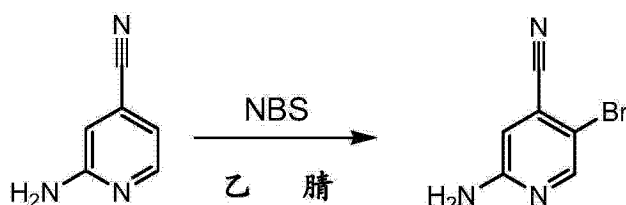


[0154] 在氩气下在可密封的 Pyrex 压力容器中, 将 5- 溴 -4- 氟吡啶 -2- 胺 (25mg, 0.13mmol)、4,4,5,5- 四甲基 -2-(4,4,5,5- 四甲基 -1,3,2- 二氧杂硼杂环戊烷 -2- 基) -1,3,2- 二氧杂硼杂环戊烷 (40mg, 0.16mmol)、乙酸钾 (51mg, 0.52mmol) 和二氯 [1,1'- 双(二苯膦基) 二茂铁] 钯(II) - 二氯甲烷加合物 (16mg, 0.019mmol) 的混合物混悬于二噁烷 (1.7mL) 中。将该压力容器密封, 并将该反应混合物在 110°C 搅拌 2 小时。通过 LCMS 判断该反应完成后, 将该反应混合物冷却至室温, 并将 4- 氟 -5-(4,4,5,5- 四甲基 -1,3,2- 二氧杂硼杂环戊烷 -2- 基) 吡啶 -2- 胺未经进一步纯化地用于下一个反应中, 推测为定量收率 (0.13mmol)。LC/MS(m/z): 157.0 (由产物在 LC 上水解形成的羟基硼酸的 MH⁺), Rt0.34 分钟。

[0155] 方法 9

[0156] 2- 氨基 -5- 溴 - 异烟腈的合成

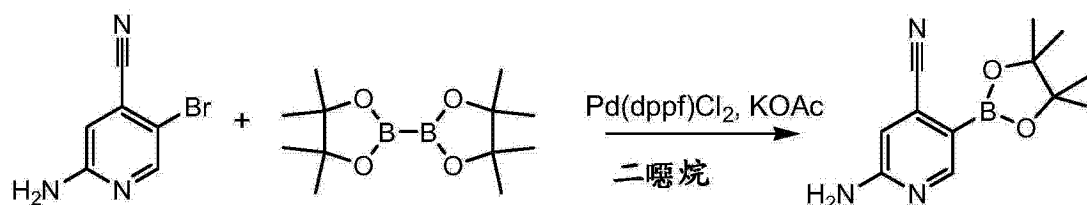
[0157]



[0158] 在黑暗的通风橱中在铝箔 - 覆盖的烧瓶中, 将 2- 氨基 - 异烟腈 TFA 盐 (125mg, 0.54mmol) 溶于乙腈 (3.5mL) 中。将固体 N- 溴琥珀酰亚胺 (89.2mg, 0.501mmol) 在室温下一次加入该搅拌的溶液中。将该反应溶液在室温在黑暗中搅拌 90 分钟。将溶剂蒸发后, 将粗制的物质经硅胶色谱进一步纯化, 得到 2- 氨基 -5- 溴 - 异烟腈 (53mg, 49%)。LC/MS(m/z): 197.9(MH⁺), Rt2.92 分钟。

[0159] 2- 氨基 -5- 硼酸酯 - 异烟腈的合成

[0160]

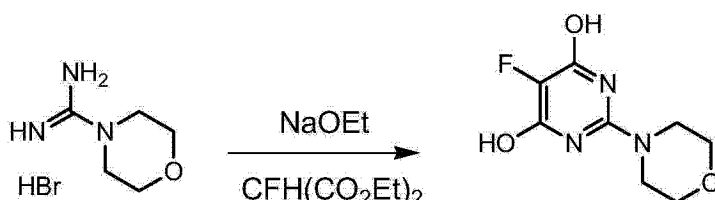


[0161] 在玻璃的压力容器中,将 2-氨基-5-溴-异烟腈 (25mg, 0.126mmol)、4,4,5,5-四甲基-2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷 (38mg, 0.151mmol) 和乙酸钾 (49mg, 0.504mmol) 的混合物混悬于二噁烷 (1.8mL) 中。将该混合物用氩气净化 1-2min 后,一次性加入二氯 [1,1'-双(二苯膦基)二茂铁] 钯(II) 二氯甲烷加合物 (16mg, 0.019mmol)。将该反应容器密封,并在 120℃ 在搅拌下加热 2 小时。将该粗制的反应溶液冷却至室温,并未经进一步纯化地使用,推测为羟基硼酸的定量收率 (0.126mmol)。LC/MS(m/z): 164.0 (由产物在 LC 上水解形成的羟基硼酸的 MH^+), R_t 0.37 分钟。

[0162] 方法 10

[0163] 5-氟-2-吗啉代嘧啶-4,6-二醇的合成

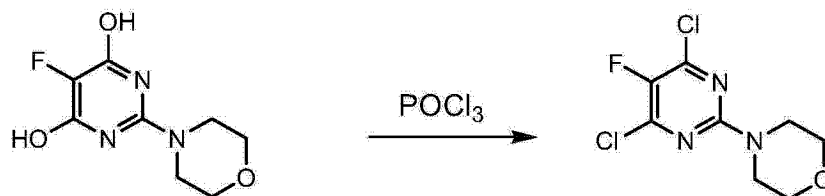
[0164]



[0165] 在氩气下将氢化钠 (60% 在油中, 3.9g, 96.5mmol) 用己烷在圆底烧瓶中洗涤, 并使用冰水浴冷却。缓慢加入 EtOH (100mL)。将得到的混合物升温至室温, 并搅拌 30 分钟。向该碱性混合物中加入 2-氟丙二酸二乙酯 (5.7g, 32.2mmol), 随后加入吗啉代甲脒氢溴酸盐 (6.8g, 32.2mmol)。将该混合物在搅拌下在氩气下加热至 90-95℃。12 小时后, 将该反应冷却至室温, 并在真空下除去 EtOH。将得到的白色固体溶于水 (25mL) 中, 并使用浓 HCl 酸化至 pH=3-4。将形成的白色沉淀经布氏漏斗收集, 用水 (2x50mL) 洗涤, 经过滤器风干, 并在真空下干燥, 得到 5-氟-2-吗啉代嘧啶-4,6-二醇 (0.87g, 12%)。LC/MS(m/z): 216.0 (MH^+), R_t 0.63 分钟。

[0166] 4-(4,6-二氯-5-氟嘧啶-2-基)吗啉的合成

[0167]

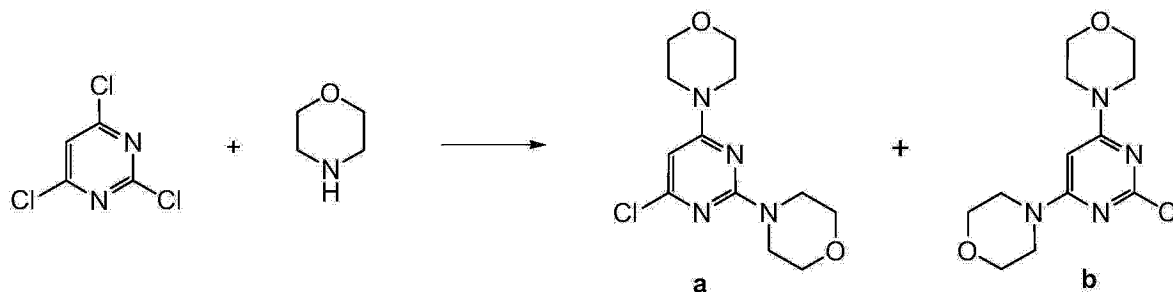


[0168] 将 5-氟-2-吗啉代嘧啶-4,6-二醇 (0.87g, 4.0mmol) 和 POCl_3 (10mL) 的混合物在 120℃ 加热 16 小时, 然后冷却至室温。在减压下除去过量的 POCl_3 , 得到半固体, 将其进一步在真空下干燥。真空干燥 12h 后, 将该固体在 EtOAc (150mL) 中稀释, 并用饱和的 NaHCO_3 (60mL) 洗涤。在洗涤过程中形成了固体, 将其与水层弃去。将有机层用饱和的

NaHCO₃ (2x30mL)、盐水 (30mL) 再次洗涤, 用 Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 减压蒸发, 得到粗制的产物。将该产物经快速色谱用 25%EtOAc/ 己烷洗脱纯化, 得到 4-(4,6-二氯-5-氟嘧啶-2-基) 吗啉 (418mg, 42%)。LC/MS(m/z): 251.9 (MH⁺), R_t 3.22 分钟。

[0169] 方法 11

[0170]



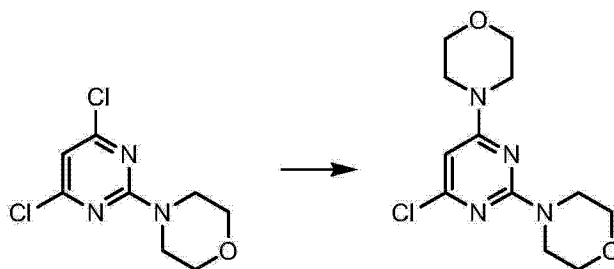
[0171] 将吗啉 (100g ; 1.15mol ; 5.3 当量) 在 THF (450mL) 中的溶液用冰浴冷却。历经 30 分钟加入 2,4,6-三氯嘧啶 (39.9g ; 217mmoles ; 1.0 当量) 在 THF (100mL) 中的溶液。加入 2,4,6-三氯嘧啶后, 形成大量白色沉淀, 且该反应混合物迅速增稠。将该混合物升温至环境温度, 并机械搅拌 64 小时 (加入 2,4,6-三氯嘧啶后, 将该反应混合物在回流下加热, 使得反应在 60min 内完成。a 与 b 的比例没有改变)。然后将该混合物过滤, 并将滤饼用另外的 THF (2x100mL) 洗涤。将滤液用旋转蒸发仪浓缩。加入水 (600mL), 并将得到的浆体搅拌 30 分钟。将固体通过过滤分离, 用另外的水 (2x100mL) 洗涤, 并在真空下干燥过夜。收率 a+b: 61.3g (99%)。通过 HPLC 面积百分比得知产物 87% 为 a ; 其余的为 b。

[0172] 将 31g 粗制的固体溶于 200mL CH₂Cl₂ 中, 并加至多孔玻璃漏斗中的 600g 干燥二氧化硅。将该二氧化硅用 1:1 己烷:EtOAc 洗脱, 并收集 300mL 级分。TLC 分析显示 a 存在于级分 1-7 中, 且 4,6-二吗啉代-2-氯嘧啶存在于级分 6-10 中。将级分 1-5 合并, 并浓缩, 得到白色固体。收率: 28.2g (通过 HPLC 面积百分比得知产物 98% 为 a)。

[0173] 实施例 1

[0174] 4-(三氟甲基)-5-(2,6-二吗啉代嘧啶-4-基)吡啶-2-胺的制备

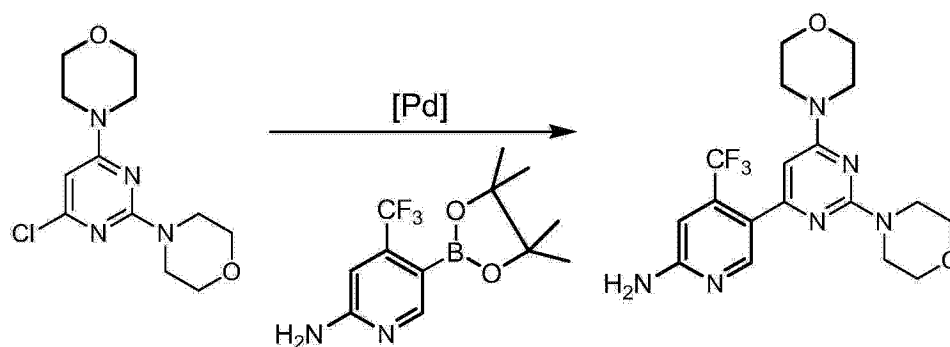
[0175]



[0176] 向 2-吗啉代-4,6-二氯嘧啶 (如方法 22 中制备, 2.0g, 8.54mmol) 在 NMP (14mL) 中的浆体中加入三乙胺 (1.43mL, 10.25mmol)。将该不均匀混合物搅拌 15 分钟, 然后用吗啉 (0.75mL, 8.54mmol) 处理。在 85℃ 在氩气下回流 2 小时后, 将该溶液冷却, 然后加入 EtOAc (160mL) 中。将有机溶液用 25mL NaHCO₃ (饱和的) (2x)、水 (2x) 和盐水洗涤, 经 Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 并浓缩。将该粗制的物质溶于 200mLEtOAc 中, 并经 SiO₂ 垫过滤, 进一步用 EtOAc 洗脱, 得到 2.2g (93%) 2,4-二吗啉代-6-氯嘧啶, 为米白色固体。LCMS(m/z): 285.0 (MH⁺), ¹H NMR(CDCl₃): δ 5.86 (s, 1H), 3.71-3.76 (m, 12H), 3.52-3.56 (m, 4H)。

[0177] 4-(三氟甲基)-5-(2,6-二吗啉代嘧啶-4-基)吡啶-2-胺

[0178]



[0179] 将氩气通入 2,4-二吗啉代-6-氯嘧啶 (4.1g, 14.3mmol) 和 4-(三氟甲基)-5-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼杂环戊烷-2-基)吡啶-2-胺 (16.5g, 57.3mmol) 在 1,2-二甲氧基乙烷和 2M Na_2CO_3 (3:1) 中的不均匀混合物中达 20 分钟。加入 1,1'-双(二苯膦基)二茂铁氯化钯 (II) (292mg, 0.36mmol), 并将含该混合物的高压玻璃容器密封。然后将该反应混合物在 90℃ 加热 15 小时, 冷却, 并用 EtOAc (300mL) 稀释。将该有机溶液用 300mL 水: Na_2CO_3 (饱和的): NH_4OH (浓)=5:4:1 的混合物洗涤, 然后用 NH_4Cl (饱和的) 和盐水 (2x) 洗涤, 经 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 并浓缩。将粗制的物质经 SiO_2 色谱纯化 (50-90%EtOAc/ 带有 0.1%TEA 的己烷), 得到 5.62g (95%) 4-(三氟甲基)-5-(2,6-二吗啉代嘧啶-4-基)吡啶-2-胺, 为米白色固体。LCMS(m/z): 411.3 (MH^+); ^1H NMR(CDCl_3): δ 8.27(s, 1H), 6.78(s, 1H), 5.97(s, 1H), 4.77(bs, 2H), 3.59-3.80(m, 12H), 3.58-3.61(m, 4H)。

[0180] 实施例 2

[0181] 4-(三氟甲基)-5-(2,6-二吗啉代嘧啶-4-基)吡啶-2-胺的测试配制物

[0182] 将 4-(三氟甲基)-5-(2,6-二吗啉代嘧啶-4-基)吡啶-2-胺粉末溶于 1 体积的 NMP (1-甲基-2-吡咯烷酮) 中。溶解 (如需要, 在温水中) 后, 添加 9 体积的 PEG300。最终比例为: NMP10%/PEG30090%。

[0183] 实施例 3

[0184] p110a 和 / 或 p110b 在 Pten 错构瘤综合征或 PHTS 的发展中的作用

[0185] 将 Pten f/f 小鼠 (Lesche, R., 等, Cre/loxP-mediated inactivation of the murine Pten tumor suppressor gene. *Genesis*, 2002. 32(2):148-9) 与 K14-cre 小鼠 (Jonkers, J., 等, Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. *Nat Genet*, 2001. 29(4):418-25) 杂交, 得到 K14-Cre Pten f/f 小鼠, 其中通过 K14-启动的 Cre 重组酶在角质形成细胞中特异性删除 floxed Pten 等位基因。将这些小鼠与 p110a f/f (Zhao, J. J., 等, The p110alpha isoform of PI3K is essential for proper growth factor signaling and oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(44):16296-300) 和 p110b f/f 小鼠 (Jia, S., 等, Essential roles of PI(3)K-p110beta in cell growth, metabolism and tumorigenesis. *Nature*, 2008) 进一步杂交, 得到 K14-cre Pten f/f; K14-cre Pten f/f; p110a f/f; K14-cre Pten f/f; p110b f/f 和 K14-cre-Pten f/f; p110a f/f; p110b f/f 小鼠。在 K14-cre Pten f/f 小鼠中 Pten 的角质形成细胞特异性删除导致多种皮肤损害, 其类似于多种 PHTS 皮肤错构瘤。在图 1 中的图面 (a) 阐述了在 12 周龄的具有相关基因型的小

鼠的头部和前爪。所有的小鼠具有 FVB 背景。另外切除 p110a 或 p110b 延缓了发作并降低了损害的严重性,并且切除这两种 p110 亚型阻断症状的出现,其如在 (a) 图面的照片中可见的情况所证明。

[0186] 图 1 图面 (b) 为在 K14-cre Pten f/f(n=28), K14-cre Pten f/f;p110a f/f(n=16), K14-cre Pten f/f;p110b f/f(n=11) 和 k14-cre-Pten f/f;p110a f/f;p110b f/f(n=15) 小鼠中 PHTS 发作的 Kaplan-Meier 图。K14-cre Pten f/f 小鼠的 PHTS 发作的中位值(红线)为 62 天。切除 p110a(绿色的线)或 p110b(蓝色的线)使症状发作延缓约 60 天,但这些基因型的的所有的小鼠使症状延缓约 210-225 天。与之形成鲜明的对比,所有的 K14-cre-Pten f/f;p110a f/f;p110b f/f 小鼠保持无 PHTS 症状达至少 300 天。

[0187] 实施例 4

[0188] 在 K14-cre-Pten f/f 小鼠中早期施用式 (I) 化合物预防 PHTS 症状的发展。

[0189] 每天用 25mg/kg 4-(三氟甲基)-5-(2,6-二吗啉代嘧啶-4-基)吡啶-2-胺通过经口灌胃治疗 K14-cre-Pten f/f 小鼠,在 3 周龄开始,并监测 PHTS 症状的发展。图 2,图面 (a) 证明用 4-(三氟甲基)-5-(2,6-二吗啉代嘧啶-4-基)吡啶-2-胺治疗的小鼠保持无 PHTS 症状,而只用介质治疗的小鼠在它们的脸和四肢发展了特征性的 PHTS 损害。图 2 图面 (b) 表示上文所述的 4-(三氟甲基)-5-(2,6-二吗啉代嘧啶-4-基)吡啶-2-胺维持的或仅用介质处理的 K14-cre-Pten f/f 小鼠 (n=12) 中无 PHTS 存活的 Kaplan-Meier 曲线。

[0190] 实施例 5

[0191] 在 K14-cre-Pten f/f 小鼠中施用式 (I) 化合物减轻 PHTS 症状。

[0192] 每天用 45mg/kg 4-(三氟甲基)-5-(2,6-二吗啉代嘧啶-4-基)吡啶-2-胺通过经口灌胃治疗患有完全发展的 PHTS 的 K14-cre-Pten f/f 小鼠 (12-14 周龄)。图 3 的照片显示两只每天用 45mg/kg 4-(三氟甲基)-5-(2,6-二吗啉代嘧啶-4-基)吡啶-2-胺治疗的 K14-cre-Pten f/f 小鼠的头部和左前爪,如图 3 的图例中所述。将 4-(三氟甲基)-5-(2,6-二吗啉代嘧啶-4-基)吡啶-2-胺施用 4 周,并在治疗前以及 2 周和 4 周对小鼠拍照。施用 4-(三氟甲基)-5-(2,6-二吗啉代嘧啶-4-基)吡啶-2-胺在这些小鼠中显著减轻了 PHTS 症状。在 4-周的 4-(三氟甲基)-5-(2,6-二吗啉代嘧啶-4-基)吡啶-2-胺治疗的末尾大多数 PHTS 症状明显或完全降低。

[0193] 结果

[0194] 该发现显示在 PHTS 的动物模型中,虽然 PI3K 的 p110 α 或 p110 β 亚型的损失显著减少了 PHTS 的发生和严重性,但这两种亚型的切除完全防止了 PHTS 的发展。该发现进一步证实在年轻小鼠中施用 4-(三氟甲基)-5-(2,6-二吗啉代嘧啶-4-基)吡啶-2-胺也完全阻止 PHTS 的出现。更令人瞩目的是,在具有晚期皮肤损害的小鼠中施用 4-(三氟甲基)-5-(2,6-二吗啉代嘧啶-4-基)吡啶-2-胺完全逆转了 PHTS 的表现型。

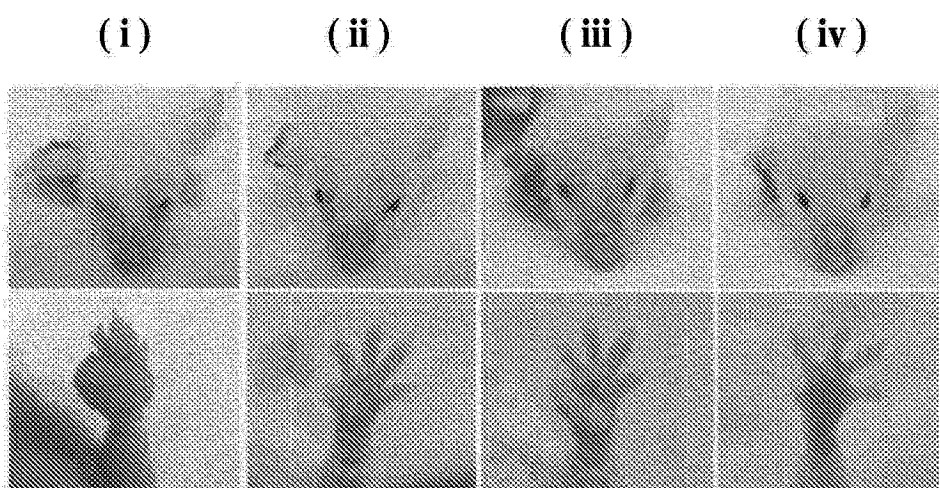


图 1a

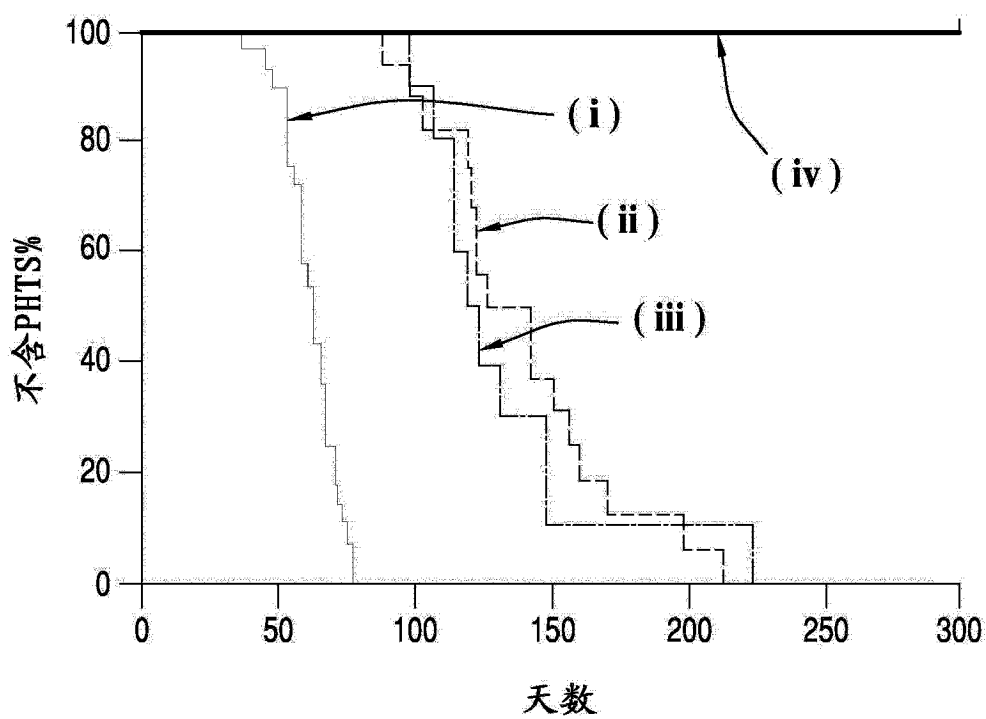


图 1b

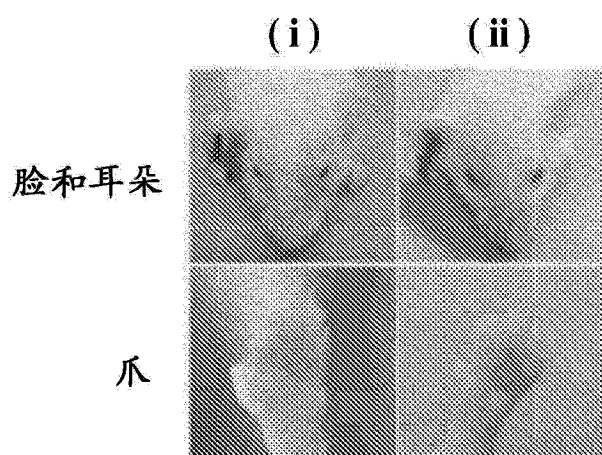


图 2a

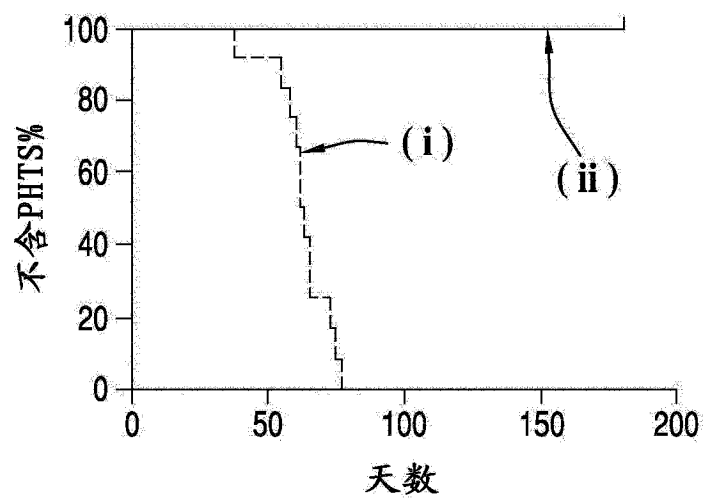
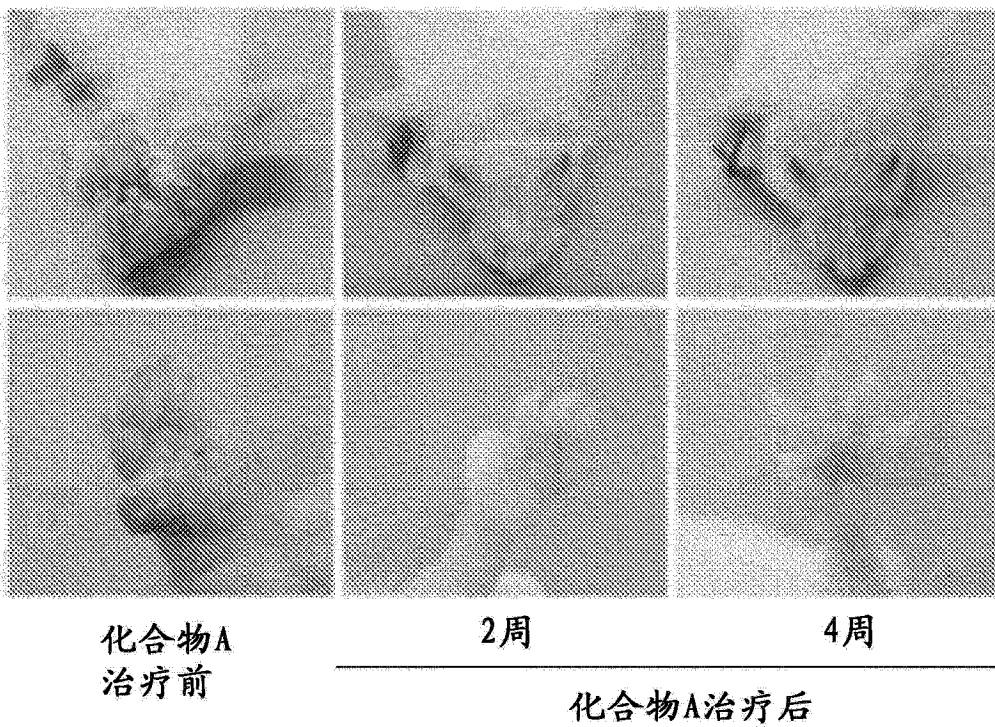


图 2b

化合物A治疗前和治疗后

小鼠 #1



小鼠 #2

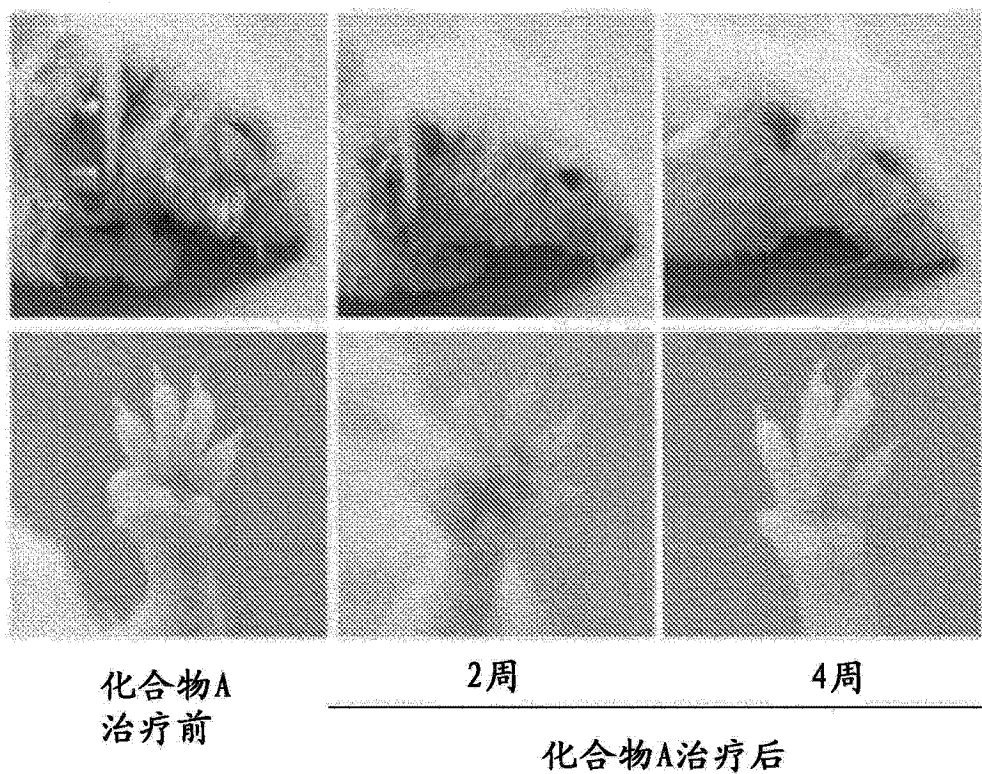


图 3