



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102659785 B

(45) 授权公告日 2014. 04. 30

(21) 申请号 201210146803. 9

(22) 申请日 2012. 05. 11

(73) 专利权人 山东大学

地址 250012 山东省济南市历下区文化西路
44 号

(72) 发明人 方浩 王泉德 易凡 徐文方

(74) 专利代理机构 济南金迪知识产权代理有限
公司 37219

代理人 王绪银

(51) Int. Cl.

C07D 473/16(2006. 01)

A61K 31/52(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101331135 A, 2008. 12. 24, 说明书全文.

Stuart C. Wilson et al. Design,

synthesis and biological evaluation
of 6-pyridylmethylaminopurines as CDK
inhibitors. 《Bioorganic & Medicinal
Chemistry》. 2011, 第 19 卷 6949-6965.

审查员 刘长娥

权利要求书2页 说明书22页

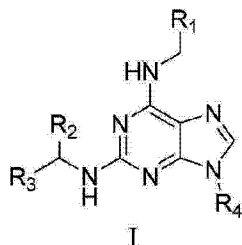
(54) 发明名称

一种 2-氨基-6-氨基嘌呤类化合物及其制
备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种 2-氨基-6-氨基嘌呤类
化合物及其制备方法和应用。化合物具有如通式
1 的结构。活性筛选实验显示其对细胞周期蛋白
依赖性激酶和多种肿瘤细胞增殖具有抑制活性，
可能治疗细胞周期蛋白依赖性激酶活性失调导
致的疾病。本发明还涉及具有通式 I 结构化合

组合物的制药用途。

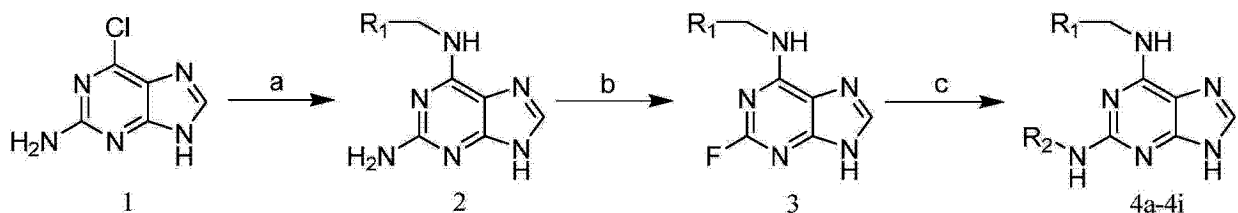


1. 2-氨基-6-氨基甲基嘌呤类化合物或其药学上可接受的盐、立体异构体,其特征之处在于是下述化合物之一:

- N^6 -苄基- N^2 -(4-溴代苄基)-9H-嘌呤-2,6-二胺(4a)、
 N^6 -苄基- N^2 -(4-甲氧基苄基)-9H-嘌呤-2,6-二胺(4b)、
 N^6 -苄基- N^2 -对甲苯基-9H-嘌呤-2,6-二胺(4c)、
 N^6 -苄基- N^2 -(3-甲氧基苄基)-9H-嘌呤-2,6-二胺(4d)、
 4-((6-苄胺-9H-嘌呤-2)-胺基)苯酚(4e)、
 N^6 -苄基- N^2 -(4-氟苄基)-9H-嘌呤-2,6-二胺(4f)、
 4-((6-苄胺-9H-嘌呤-2)-胺基)苯磺酰胺(4g)、
 N^6 -苄基- N^2 -苄基-9H-嘌呤-2,6-二胺(4h)、
 N^6 -苄基- N^2 -(4-甲磺基苄基)-9H-嘌呤-2,6-二胺(4i)、
 4-((6-环己甲胺-9H-嘌呤-2)-胺基)苯磺酰胺(4j)、
 N^6 -环己甲基- N^2 -苄基-9H-嘌呤-2,6-二胺(4k)、
 4-(6-环己甲胺)-9H-嘌呤-2-胺基)苯酚(4l)、
 N^6 -环己甲基- N^2 -(4-氟苄基)-9H-嘌呤-2,6-二胺(4m)、
 N^6 -环己甲基- N^2 -(4-甲苯基)-9H-嘌呤-2,6-二胺(4n)、
 N^6 -环己甲基- N^2 -(4-甲氧基苄基)-9H-嘌呤-2,6-二胺(4o)、
 N^6 -环己甲基- N^2 -(4-溴苄基)-9H-嘌呤-2,6-二胺(4p)、
 N^6 -环己甲基- N^2 -(4-甲磺基苄基)-9H-嘌呤-2,6-二胺(4q)。

2. 权利要求1所述化合物的制备方法,其特征之处在于化合物4a-4i的制备步骤如下:

以2-氨基-6-氯嘌呤为原料,与苄胺发生亲核取代反应得2-氨基-6-取代嘌呤,然后在 HBF_4 和 NaNO_2 作用下,经巴尔茨-席曼(Balz-Schiemann)反应制得2-氟-6-取代嘌呤,最后再与各种取代的苄胺反应生成目标化合物4a-4i;合成路线一如下:

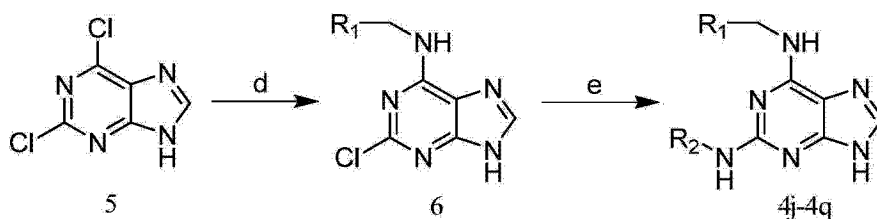


其中, R_1 为苄基, 和 R_2 为没有取代或被以下基团取代的苄基: 4-Br, 4- OCH_3 , 4- CH_3 , 3- OCH_3 , 4-OH, 4-F, 4- SO_2HN_2 , 4- SO_2CH_3 ;

上述合成路线一反应式中的试剂和条件:a. 正丁醇, 三乙胺, 130 °C 回流; b. HBF_4 , NaNO_2 , H_2O , -15 °C ;c. 三氟乙酸 (TFA), 正丁醇, 130 °C 或三氟乙酸 (TFA), 三氟乙醇 (TFE), 85 °C。

3. 权利要求1所述化合物的制备方法,其特征之处在于化合物4j-4q的制备步骤如下:

以2,6-二氯嘌呤为原料,与环己基甲基胺发生亲核取代反应后得到2-氯-6-取代嘌呤,然后再次与各种取代的苄胺反应生成目标化合物4j-4q;合成路线二如下:



其中, R_1 为环己基, R_2 为没有取代或被以下基团取代的苯基: 4-Br, 4-OCH₃, 4-CH₃, 4-OH, 4-F, 4-SO₂HN₂, 4-SO₂CH₃;

上述合成路线二反应式中的试剂和条件: d. 正丁醇, 三乙胺, 130°C 回流; e. 三氟乙酸, 正丁醇, 130°C 或三氟乙酸, 三氟乙醇, 85°C。

4. 权利要求 1 中所述的化合物在制备预防或治疗与细胞周期蛋白依赖性激酶活性失调相关的哺乳动物疾病的药物中的应用; 所述的与细胞周期蛋白依赖性激酶活性异常表达的相关哺乳动物疾病包括癌症、神经变性疾病、疟疾和糖尿病。

5. 一种适于口服给予哺乳动物的药物组合物, 包含权利要求 1 中所述的化合物和一种或多种药学上可接受载体或赋形剂。

6. 一种适于胃肠外给予哺乳动物的药物组合物, 包含权利要求 1 中所述的化合物和一种或多种药学上可接受载体或赋形剂。

一种 2-氨基-6-氨基嘌呤类化合物及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及 2-氨基-6-氨基嘌呤类化合物及其制备方法和应用,属于化学技术领域。

背景技术

[0002] 恶性肿瘤,又称为癌症,是严重危害人类生命健康的疾病。根据世界卫生组织(WTO)于 2008 年发布的《世界癌症报告》,2008 年全世界范围内有 1200 万人被确诊患有癌症,并且还有 760 万人因癌症而死亡,这一死亡人数占到了全世界死亡人数的 13%,预计全球范围内因癌症死亡的人数还会继续增加,如果对癌症不加以干预,2030 年将有 1200 万人死于癌症,这其中 70% 的死亡是发生在低收入或中等收入的国家。因此,恶性肿瘤已经成为全人类共同关心的重大问题。掌握恶性肿瘤的发病原因及发生发展的分子机制,寻找高效低毒的选择性抗癌药物已成为医学领域研究的重大任务。恶性肿瘤是在环境因素和遗传因素共同作用下,导致细胞周期紊乱、细胞失控性生长所致的一类疾病。自从调控细胞周期的分子机制在 20 世纪 70 年代初被发现以来,细胞周期关卡就成为了抗肿瘤药物研究的重要靶点。细胞周期蛋白依赖性激酶(CDKs)是细胞周期的主要调节子,抑制 CDKs 可有效阻滞肿瘤细胞周期,抑制细胞的增殖和分化,为肿瘤的治疗提供了新的思路。

[0003] 细胞周期蛋白依赖性激酶(CDKs)是一类依赖细胞周期蛋白(Cyclin)的蛋白激酶,属于丝氨酸和苏氨酸激酶家族(参见 Nurse, P., Nature, 1975, 256, 547-551.)。CDKs 的相对分子量在 35kD 到 45kD 之间(包含 200 到 400 个氨基酸),不同亚型的 CDK 的同源性约为 40-75%,均含有一个约 300 个氨基酸的保守性催化中心,这与其他蛋白激酶一样。迄今为止,在人类基因组中已经发现有 13 个 CDK 亚型(CDK1-13)和多于 25 种的 cyclins。CDKs 需要与调节亚基 cyclin 结合后才能发挥其活性,且不同的 CDK/cyclin 复合物在细胞周期的不同时相的作用是不同的(参见 Wang, Q., et al., Curr Med. Chem., 2011, 18, 2025-2043)。根据经典的细胞周期模型,直接参与细胞周期各时相转换的 CDKs/cyclin 复合物是 CDK4(6)/cyclin D、CDK2/cyclin E、CDK2/cyclin A 和 CDK1/cyclin B。Cyclin D 与 CDK4 及 CDK6 结合后在 G1 期发挥着重要作用;CDK2/cyclin E 可以促使细胞从 G1 期进入 S 期;cyclin A 分别与 CDK2 及 CDK1 结合后,可以促使细胞周期完成 S 期的转换,准备进入 M 期;而 M 期的进入和调节则是在 CDK1/cyclinB 的控制下完成的(参见 van den Heuvel, S.; et al., Science, 1993, 262, 2050-2054 和 Hochegger, H., et al., Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9, 910-916.)。

[0004] 细胞周期的失调是人类癌症的重要标志,其调节装置中组成成分的改变与大部分人类肿瘤的发生有关。因此,CDKs 被认为是新一代抗癌药物的潜在靶点。开发一些能够阻断癌症细胞周期以及诱导细胞凋亡的特异性 CDKs 抑制剂对于癌症的治疗应当是非常有效的。在过去的几十年里,已经开发了众多结构类型的 CDKs 抑制剂,并且抑制剂的种类范围也在不断的扩大,包括了一些天然产物及其衍生物。再加上药物设计学的迅速发展,通过大量的 CDKs 与抑制剂所形成的 X-射线晶体结构来进行合理的药物设计,不仅提供了抑制剂

的竞争性结合方式,还可以观察小分子抑制剂的活性结合位点。迄今为止,已有十多个化合物进入临床 I 期或 II 期的研究。

[0005] 本发明根据 CDK2 的三维结构特征,基于计算机辅助药物设计的方法,在充分考虑 2-氨基-6-氨基嘌呤类化合物与 CDK2 中 ATP 结合位点的结合模式的基础上,设计了一系列的小分子 CDK 抑制剂,然后进行化学合成和活性筛选,得到了具有开发价值的先导化合物。

发明内容

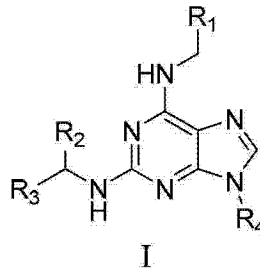
[0006] 本发明针对现有技术的不足,提供一种 2-氨基-6-氨基嘌呤类化合物及其制备方法;本发明还提供该类化合物的应用。

[0007] 本发明的技术方案如下:

[0008] 一、本发明 2-氨基-6-氨基嘌呤类化合物

[0009] 2-氨基-6-氨基嘌呤类化合物或其药学上可接受的盐、立体异构体、溶剂合物或前药,具有通式 I 所示的结构:

[0010]



[0011] 其中,

[0012] R1 是芳基,杂芳基,杂烷基,环烷基,任选被一个或多个如下基团取代:羟基,卤素,硝基,腈基,羧基,烷基,烷氧基,磺酰胺基或甲磺酸基;

[0013] R2 是芳基,苄基,烷基,杂芳基,任选被一个或多个如下基团取代:羟基,卤素,硝基,腈基,羧基,烷基,烷氧基,磺酰胺基或甲磺酸基;

[0014] R3 是氢、羧基或羟基甲基;

[0015] R4 是氢、甲基,乙基,异丙基,环丙基或环戊基;

[0016] 所述的芳基是指芳族碳环基团,芳环含有 6-10 个碳原子;

[0017] 所述的杂芳基是芳族杂环,是单环或双环基团;包括噻吩基,呋喃基,吡咯基,吡啶基,吡嗪基,噻唑基,嘧啶基,喹啉基,四氮唑基,苯并噻唑基,苯并呋喃基或吲哚基;

[0018] 所述的杂烷基指饱和或不饱和、含碳原子和至少一个杂原子的链,其中任意一个杂原子不相邻;杂烷基中含有 2-15 个碳原子,优选含有 2-10 个原子;杂烷基是直链或支链、取代或未取代的;

[0019] 所述的环烷基是取代或未取代的,饱和或不饱和的环状基团,其含有碳原子和/或一个或多个杂原子;该环是单环或稠环,桥环或螺环的环系;单环有 3-9 个原子,优选有 4-7 个原子,多环含有 7-17 个原子,优选含有 7-13 个原子;

[0020] 所述的烷基是指饱和碳原子的链,优选含有 1-8 个原子;烷基是直链或支链的;

[0021] 所述的卤素包括氟,氯,溴或碘。

[0022] 优选的, R_1 为苯基或环己基; R_2 为取代苯基或羟基取代烷基; R_3 为氢、羧基或羟基甲基; R_4 为氢或异丙基。

[0023] 进一步优选的, 上述式 I 化合物是下列之一:

[0024] N^6 -苄基- N^2 -(4-溴代苯基)-9H-嘌呤-2,6-二胺(4a)、

[0025] N^6 -苄基- N^2 -(4-甲氧基苯基)-9H-嘌呤-2,6-二胺(4b)、

[0026] N^6 -苄基- N^2 -对甲苯基-9H-嘌呤-2,6-二胺(4c)、

[0027] N^6 -苄基- N^2 -(3-甲氧基苯基)-9H-嘌呤-2,6-二胺(4d)、

[0028] 4-((6-苄胺-9H-嘌呤-2)-胺基)苯酚(4e)、

[0029] N^6 -苄基- N^2 -(4-氟苯基)-9H-嘌呤-2,6-二胺(4f)、

[0030] 4-((6-苄胺-9H-嘌呤-2)-胺基)苯磺酰胺(4g)、

[0031] N^6 -苄基- N^2 -苯基-9H-嘌呤-2,6-二胺(4h)、

[0032] N^6 -苄基- N^2 -(4-甲磺基苯基)-9H-嘌呤-2,6-二胺(4i)、

[0033] 4-((6-环己甲胺-9H-嘌呤-2)-胺基)苯磺酰胺(4j)、

[0034] N^6 -环己甲基- N^2 -苯基-9H-嘌呤-2,6-二胺(4k)、

[0035] 4-(6-环己甲胺)-9H-嘌呤-2-胺基)苯酚(4l)、

[0036] N^6 -环己甲基- N^2 -(4-氟苯基)-9H-嘌呤-2,6-二胺(4m)、

[0037] N^6 -环己甲基- N^2 -(4-甲苯基)-9H-嘌呤-2,6-二胺(4n)、

[0038] N^6 -环己甲基- N^2 -(4-甲氧基苯基)-9H-嘌呤-2,6-二胺(4o)、

[0039] N^6 -环己甲基- N^2 -(4-溴苯基)-9H-嘌呤-2,6-二胺(4p)、

[0040] N^6 -环己甲基- N^2 -(4-甲磺基苯基)-9H-嘌呤-2,6-二胺(4q)、

[0041] 2-(6-(环己甲胺基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-胺基)-1-丁醇(10a)、

[0042] 2-(6-(环己甲胺基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-胺基)乙醇(10b)、

[0043] 2-(6-(环己甲胺基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-胺基)-3-羟基丙酸(10c)、

[0044] 2-(6-(环己甲胺基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-胺基)-3-羟基丁酸(10d)、

[0045] 2-(6-(环己甲胺基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-氨基)丙烷-1,3-二醇(10e)、

[0046] 2-(6-(环己甲胺基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-胺基)-4-甲基戊烷-1-醇(10f)、

[0047] 2-(6-(环己甲胺基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-胺基)-3-甲基-1-丁醇(10g)、

[0048] 2-(6-(环己甲胺基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-胺基)丙烷-1-醇(10h)或

[0049] 2-(6-(环己甲胺基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-胺基)丙酸(10i)。

[0050] 本文中所述的术语和定义含义如下:

[0051] “药学上可接受的盐”是指通式 I 化合物具有疗效且无毒的盐形式。其可由任一酸性基团(如羧基)形成阴离子盐,或由任一碱性基团(如氨基)形成阳离子盐。本领域已知许多这样的盐。在任何酸性基团(如羧基)上形成的阳离子盐,或是在任何碱性基团(如氨基)上形成的阴离子盐。这些盐有许多是本领域已知的,如阳离子盐包括碱金属(如钠和钾)和碱土金属(如镁和钙)的盐以及有机盐(如铵盐)。还可通过使用相应的酸处理碱性形式的 I 方便地获得阴离子盐,这样的酸包括无机酸如硫酸、硝酸、磷酸等;或有机酸如乙酸、丙酸、羟基乙酸、2-羟基丙酸、2-氧代丙酸、草酸、丙二酸、琥珀酸、马来酸、富马酸、苹果酸、酒石酸、2-羟基-1,2,3-丙三酸、甲磺酸、乙磺酸、苯甲磺酸、4-甲基苯磺酸、环己基亚磺酸、2-羟基苯甲酸、4-氨基-2-羟基苯甲酸等。这些盐是熟练技术人员熟知的,熟练的

技术人员可制备本领域知识所提供的任何盐。此外,熟练技术人员可根据溶解度、稳定性、容易制剂等因素取某种盐而舍另一种盐。这些盐的测定和最优化在熟练技术人员的经验范围内。

[0052] 本发明所用的“立体异构体”定义了本发明化合物或其生理上的衍生物所有可能的立体异构体的形式。除非另有指示,本发明化合物的化学命名包括所有可能的立体化学形式的混合物,所属混合物包含基本结构分子的所有非对映体和对映体,以及基本纯净的本发明化合物的单个异构体形式,即其中含有低于 10%,优选低于 5%,特别是低于 2%,最优选低于 1%的其它异构体。本发明类肽化合物各种立体异构体形式均明显包含于本发明的范围内。

[0053] “溶剂合物”是溶质(如细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂)和溶剂(如水)组合形成的配合物。参见 J. Honig 等, *The Van Nostrand Chemist's Dictionary*, p. 650 (1953)。本发明采用的药学上可接受的溶剂包括不干扰细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂的生物活性的那些溶剂(例如水、乙醇、乙酸、N, N-二甲基甲酰胺、二甲基亚砷以及该领域技术人员所知的或容易确定的溶剂)。

[0054] 通式 I 化合物还可以其它被保护的形式或衍生物的形式存在,这些形式对本领域技术人员而言是显而易见的,均应该包含于本发明的范围内。

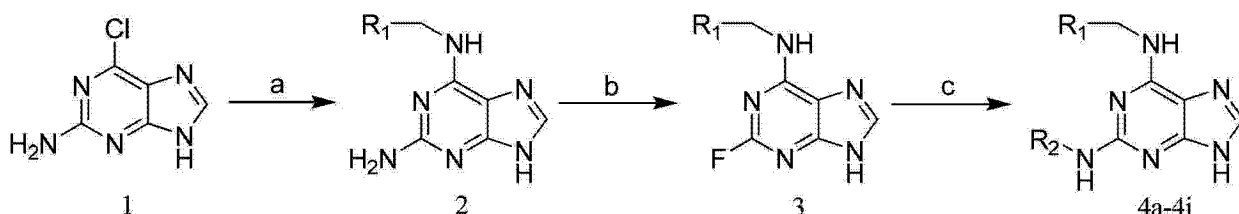
[0055] 如上所述的取代基自身还可被一个或多个取代基取代。这样的取代基包括在 C. Hansch 和 A. Leo, *Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology* (1979) 中列出的那些取代基。优选的取代基包括烷基,烯基,烷氧基,羟基,氧基,硝基,氨基,氨基烷基(如氨基甲基等),氰基,卤素,羧基,羰基烷氧基(如羰基乙氧基等),硫基,芳基,环烷基,杂芳基,杂环烷基(如哌啶基,吗啉基,吡咯基等),亚氨基,羟烷基,芳基氧基,芳基烷基及其结合。

[0056] 二、本发明 2-氨基-6-氨基嘌呤类化合物的制备方法

[0057] 本发明 2-氨基-6-氨基嘌呤类化合物的制备方法,是下述方法之一:

[0058] 合成路线一:以 2-氨基-6-氯嘌呤为原料,与各种取代的胺发生亲核取代反应得 2-氨基-6-取代嘌呤,然后在 HBF_4 和 NaNO_2 作用下,经巴尔茨-席曼(Balz-Schiemann)反应制得 2-氟-6-取代嘌呤,最后再与各种取代的胺反应生成目标化合物 4a-4i;路线一如下:

[0059]



[0060] 其中, R1 和 R2 同上结构通式 I 所述;

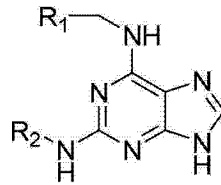
[0061] 所述的各种取代的胺为被苯基、杂芳基、杂烷基或环烷基取代的胺,并且有机胺结构中可能存在羟基,卤素,硝基,腈基,羧基,烷基,烷氧基,磺酰胺基或甲磺酸基。

[0062] 上述合成路线一反应式中的试剂和条件:a. 正丁醇,三乙胺,130℃回流;b. HBF_4 , NaNO_2 , H_2O , -15℃;c. 三氟乙酸(TFA),正丁醇,130℃或三氟乙酸(TFA),三氟乙醇

(TFE), 85°C。

[0063] 合成路线一的目标化合物的结构式如下表 1 所示：

[0064]



[0065] 表 1 化合物 4a-4i 结构式

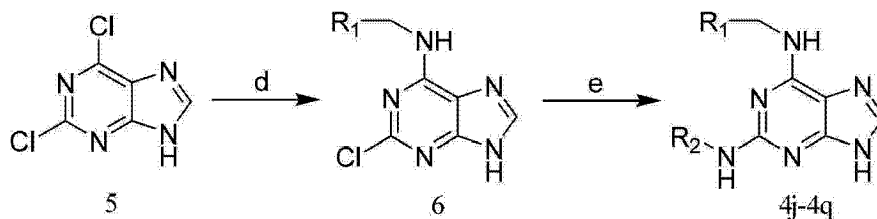
[0066]

编号	R ₁	R ₂
4a		
4b		
4c		
4d		
4e		
4f		
4g		
4h		
4i		

[0067]

[0068] 合成路线二：以 2,6-二氯嘌呤为原料，与各种取代的胺发生亲核取代反应后得到 2-氯-6-取代嘌呤，然后再与各种取代的胺反应生成目标化合物 4j-4q；路线二如下：

[0069]



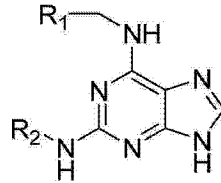
[0070] 其中，R₁ 和 R₂ 同上结构通式 I 所述；

[0071] 所述的各种取代的胺为被苯基、杂芳基、杂烷基或环烷基取代的胺,并且有机胺结构中可能存在羟基,卤素,硝基,腈基,羧基,烷基,烷氧基,磺酰胺基或甲磺酸基。

[0072] 上述合成路线二反应式中的试剂和条件:d. 正丁醇,三乙胺,130℃回流;e. 三氟乙酸,正丁醇,130℃或三氟乙酸,三氟乙醇,85℃。

[0073] 合成路线二的目标化合物的结构式如下表 2 所示:

[0074]



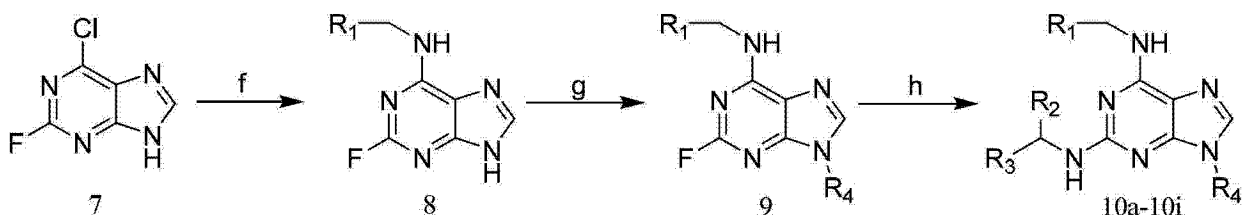
[0075] 表 2 化合物 4j-4q 结构式

[0076]

编号	R ₁	R ₂
4j		
4k		
4l		
4m		
4n		
4o		
4p		
4q		

[0077] 合成路线三:以 2-氟-6-氯嘌呤为原料,与各种取代的胺发生亲核取代反应,得到 2-氟-6-取代嘌呤,然后将 9-H 烷基化,最后与各种氨基酸或氨基醇反应生成得到目标化合物 10a-10i;路线三如下:

[0078]



[0079] 其中, R₁、R₂、R₃ 和 R₄ 同上结构通式 I ;

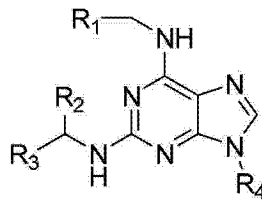
[0080] 所述的各种取代的胺为被苯基、杂芳基、杂烷基或环烷基取代的胺, 并且有机胺结构中可能存在羟基, 卤素, 硝基, 腈基, 羧基, 烷基, 烷氧基, 磺酰胺基或甲磺酸基。

[0081] 所述的各种氨基酸或氨基醇为丝氨酸、苏氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸等常用的氨基酸及其对应的氨基醇。

[0082] 上述合成路线三反应式中的试剂和条件 : f. 正丁醇, 三乙胺, 130°C 回流 ; g. 卤代烷, K₂CO₃, 二甲基亚砜 ; h. 氨基酸, N-甲基吡咯烷酮, 1, 8-二氮杂二环 [5. 4. 0] 十一碳-7-烯 (DBU), 160°C 或者氨基醇, 二甲基亚砜, 二异丙基乙胺, 120-160°C。

[0083] 合成路线三的目标化合物的结构式如下表 3 所示 :

[0084]



[0085] 表 3 化合物 10a-10i 结构式

编号	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
10a				
10b		H		
10c				
10d				
10e				
10f				
10g				
10h		-CH ₃		
10i		-CH ₃		

[0087] 所述化合物的具体操作步骤在实施例中将加以详细说明。

[0088] 三、含有本发明化合物的药物组合物

[0089] 一种适于口服给予哺乳动物的药物组合物, 包含上述通式 I 的任一化合物和一种或多种药学上可接受的赋形剂。

[0090] 一种适于胃肠外给予哺乳动物的药物组合物,包含上述通式 I 的任一化合物和一种或多种药学上可接受的赋形剂。

[0091] 本发明的部分衍生物可以游离形式或以盐形式存在。本领域技术人员已知许多化合物类型的药学上可接受的盐及其制备方法。药学上可接受的盐包括常规的无毒性的盐,包括这样的化合物碱与无机或有机酸形成的季铵盐。

[0092] 本发明的化合物可形成水合物或溶剂合物。本领域熟练人员已知将化合物与水一起冻干时所形成的水合物或在溶液中与合适的有机溶剂浓缩时形成溶剂合物的方法。

[0093] 本发明包含含有治疗量本发明化合物的药物,和一种或多种药学上可接受载体和/或赋形剂的药物组合物。载体包括如盐水,缓冲盐水,葡萄糖,水,甘油,乙醇和它们的结合物,下文更详细地论述。如果需要,该组合物还可以包含较小量的润湿剂或乳化剂,或 pH 缓冲剂。该组合物可以是液体,悬浮液,乳剂,片剂,丸剂,胶囊,持续释放制剂或粉末。该组合物可以用传统的黏合剂和载体如三酸甘油酯配制成栓剂。口服制剂可以包括标准载体如药物品级的甘露糖醇,乳糖,淀粉,硬脂酸镁,糖精钠,纤维素和碳酸镁等等。视需要制剂而定,配制可以设计混合,制粒和压缩或溶解成分。在另一个途径中,该组合物可以配制成纳米颗粒。

[0094] 使用的药物载体可以为固体或者液体。

[0095] 典型的固体载体包括乳糖,石膏粉,蔗糖,滑石,凝胶,琼脂,果胶,阿拉伯胶,硬脂酸镁,硬脂酸等等。固体载体可以包括一种或多种可能同时作为增香剂,润滑剂,增溶剂,悬浮剂,填料,助流剂,压缩助剂,粘合剂或片剂-崩解剂的物质;它还可以是包封材料。在粉末中,载体为精细粉碎的固体,它与精细粉碎的活性成分的混合。在片剂中活性成分与具有必要的压缩性质的载体以合适的比例混合,以需要的形状和大小压缩。粉末和片剂优选包含至多 99% 活性成分。合适的固体载体包括,例如,磷酸钙,硬脂酸镁,滑石,糖,乳糖,糊精,淀粉,凝胶,纤维素,甲基纤维素,羧甲基纤维素钠盐,聚乙烯吡咯烷酮,低熔点蜡和离子交换树脂。

[0096] 典型的液体载体包括糖浆,花生油,橄榄油,水,等等。液体载体用于制备溶液,悬浮液,乳剂,糖浆,酏剂和密封的组合物。活性成分可以溶解或悬浮于药学上可接受的液体载体如水,有机溶剂,二者的混合物或药学上可接受的油类或脂肪。液体载体可以包含其他合适的药物添加剂如增溶剂,乳化剂,缓冲剂,防腐剂,增甜剂,增香剂,悬浮剂,增稠剂,颜料,粘度调节剂,稳定形或渗透压-调节剂。用于口服和肠胃外给药的液体载体的合适的例子包括水(部分地包含如同上述的添加剂,例如纤维素衍生物,优选羧甲基纤维素钠盐溶液),醇(包括一元醇和多元醇,例如乙二醇)和它们的衍生物,和油类(例如分馏椰子油和花生油)。用于肠胃外给药的载体还可以为油脂如油酸乙酯和异丙基肉豆蔻酸盐。无菌的液体载体用于肠胃外给药的无菌的液态组合物。用于加压组合物的液体载体可以为卤代烃或其他药学上可接受的推进剂。无菌溶液或悬浮溶液液体药物组合物可以用来,例如,静脉内,肌内,腹膜内或皮下注射。注射时可单次推入或逐渐注入,入 30 分钟的经脉内灌注。该化合物还可以以液体或者固体组合物的形式口服给药。

[0097] 载体或赋形剂可以包括本领域已知的时间延迟材料,如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯,还可包括蜡,乙基纤维素,羟丙基甲基纤维素,异丁烯酸甲酯等等。当制剂用于口服时,公认 PHOSALPG-50 (phospholipid 与 1,2-丙二醇浓缩,A. Nattermann & Cie. GmbH) 中

的 0.01% 吐温 80 用于其他化合物的可接受的口服制剂的配制, 可以适应于本发明各种化合物的配制。

[0098] 给予本发明化合物时可以使用各式各样的药物形式。如果使用固体载体, 制剂可以为片剂, 被放入硬胶囊中的粉末或小药丸形式或锭剂或糖锭形式。固体载体的量在很大程度上变化, 但是优选从约 25mg 到约 1.0g。如果使用液体载体, 制剂可以为糖浆, 乳剂, 软胶囊, 在安瓿或小瓶或非水的液体悬浮液中的无菌注射溶液或悬浮液。

[0099] 为了获得稳定的水溶性的剂型, 可以将化合物或其药学上可接受的盐溶于有机或无机酸的水溶液, 0.3M 琥珀酸或柠檬酸溶液。选择性地, 酸性的衍生物可以溶于合适的碱性溶液。如果得不到可溶形式, 可将化合物溶于合适的共溶剂或它们的结合。这样的合适的共溶剂的例子包括, 但是不局限于, 浓度范围从 0-60% 总体积的乙醇, 丙二醇, 聚乙二醇 300, 聚山梨酸酯 80, 甘油, 聚氧乙烯脂肪酸酯, 脂肪醇或甘油羟脂肪酸酯等等。

[0100] 各种释放系统是已知的并且可以用于化合物或其他各种制剂的给药, 这些制剂包括片剂, 胶囊, 可注射的溶液, 脂质体中的胶囊, 微粒, 微胶囊, 等等。引入的方法包括但是不局限于皮肤的, 皮内, 肌内, 腹膜内的, 静脉内的, 皮下的, 鼻腔内的, 肺的, 硬膜外的, 眼睛的和 (通常优选的) 口服途径。化合物可以通过任何方便的或者其它适当的途径给药, 例如通过注入或快速浓注, 通过上皮的或粘膜线路 (例如, 口腔粘膜, 直肠和肠粘膜, 等等) 吸收或通过负载药物的支架以及可以于其他生物活性剂一起给药。可以全身或局部给药。用于鼻, 支气管或肺疾病的治疗或预防时, 优选的给药途径为口服, 鼻给药或支气管烟雾剂或喷雾器。

[0101] 四、应用

[0102] 本发明所述的化合物在制备预防或治疗与细胞周期蛋白依赖性激酶活性失调相关的哺乳动物疾病的药物中的应用。所述的与细胞周期蛋白依赖性激酶活性失调相关的哺乳动物疾病包括癌症、神经变性疾病、疟疾和糖尿病等。

具体实施方式

[0103] 下面结合实施例对本发明做进一步说明, 但不限于此。

[0104] 实施例 1、化合物 4a-4i 的制备

[0105] (1) N⁶-苄基-9H-嘌呤-2,6-二胺(2)

[0106] 将 2-氨基-6-氯嘌呤 (10.0g, 59.0mmol) 和正丁醇 (150mL) 加至茄形瓶中, 然后在搅拌条件下依次加入苄胺 (9.7mL, 88.5mmol) 和三乙胺 (20mL, 147.5mmol), 加毕, 混合液置于油浴 130°C 中, 冷凝管冷却回流。TLC 检测原料全部反应完毕后, 停止回流, 反应液冷却, 减压回收溶剂, 得类白色固体, 固体再用正丙醇充分洗涤后, 抽滤, 收集固体, 真空干燥后得白色粉末 13.94g (58mmol, 98.4%), mp 234-238°C。HRMS:m/z calcd for C₁₂H₁₂N₆[M+1]⁺241.1201 Found: 241.1218; ¹H-NMR (600MHz, DMSO-d₆): δ ppm 4.64 (s, 2H); 5.75 (s, 2H); 7.20 (t, 2H); 7.28 (t, 2H); 7.34 (d, 2H); 7.68 (s, 1H); 12.15 (s, 1H)

[0107] (2) N-苄基-2-氟-9H-嘌呤-6-胺(3)

[0108] 化合物 3 (2.4g, 10mmol) 用 HBF₄ (30mL) 溶解后, 反应液冷却至 -15°C。在此温度下, 用恒压滴液漏斗向反应液中缓慢滴加 NaNO₂ (1.4g, 20mmol) 的水溶液, 滴加完毕后, -15°C 继续搅拌 30min, 然后用 50%NaOH (w/v) 调 pH 至 7, 析出大量固体, 过滤, 滤液弃

去,固体加入乙酸乙酯中,搅拌 10min 后,再次过滤,固体用乙酸乙酯反复洗涤后,合并乙酸乙酯,无水硫酸镁干燥。减压回收溶剂得到的粗品经硅胶柱层析纯化后得白色固体粉末 0.83g (3.4mmol, 34%), mp 225–227°C。HRMS:m/z calcd for $C_{12}H_{10}FN_5[M+1]^+$ 244.0998 Found: 244.0997; 1H -NMR (600MHz, DMSO- d_6): δ ppm 4.64 (d, 2H); 7.24 (d, 1H); 7.31–7.36 (m, 4H); 8.11 (s, 1H); 8.80 (s, 1H); 13.05 (1H, s).

[0109] (3) N^6 -苄基- N^2 -(4-溴代苯基)-9H-嘌呤-2,6-二胺(4a)

[0110] 化合物 3 (0.57g, 2.34mmol), 对溴苯胺 (2.82g, 16.4mmol), 三氟乙酸 (0.1mL, 1.3mmol), 加至正丁醇 (10mL) 中, 混合液置于油浴 130°C 中, 冷凝管冷却回流。TLC 监测, 待化合物 3 反应完毕后, 停止回流, 反应液冷却, 析出大量固体。抽滤, 固体用二氯甲烷或甲醇洗涤, 干燥, 粗品经硅胶柱层析纯化后得棕黄色固体 0.5g (1.6mmol, 83%), mp 261–262°C。HRMS:m/z calcd for $C_{18}H_{16}N_6[M+1]^+$ 317.1514 Found: 317.1521; 1H -NMR (600MHz, DMSO- d_6): δ ppm 4.74 (s, 2H); 6.88 (t, 1H); 7.20 (t, 2H); 7.25 (d, 1H); 7.33 (t, 2H); 7.39 (d, 2H); 7.70 (d, 2H); 8.11 (s, 1H); 8.32 (s, 1H); 9.10 (s, 1H); 12.81 (s, 1H)。

[0111] (4) N^6 -苄基- N^2 -(4-甲氧基苯基)-9H-嘌呤-2,6-二胺(4b)

[0112] 方法同 4a。化合物 3 (0.25g, 1mmol), 对甲氧基苯胺 (0.19g, 1.5mmol), 三氟乙酸 (0.4mL, 5mmol), 正丁醇 (10mL)。硅胶柱层析纯化, 得到类白色固体 0.11g (0.32mmol, 32%), mp 229–232°C。HRMS:m/z calcd for $C_{19}H_{18}N_6O[M+1]^+$ 347.1620 Found: 347.1610; 1H -NMR (600MHz, DMSO- d_6): δ ppm 3.69 (s, 3H); 4.69 (s, 2H); 6.77 (d, 2H); 7.20 (t, 1H); 7.30 (t, 2H); 7.37 (d, 2H); 7.61 (d, 2H); 7.78 (s, 1H); 7.96 (s, 1H); 8.60 (s, 1H); 12.37 (s, 1H)。

[0113] (5) N^6 -苄基- N^2 -对甲苯基-9H-嘌呤-2,6-二胺(4c)

[0114] 方法同 4a。化合物 3 (0.61g, 2.5mmol), 对甲基苯胺 (1.88g, 17.6mmol), 三氟乙酸 (0.1mL, 1.3mmol), 正丁醇 (20mL)。类白色固体 0.39g (1.2mmol, 48%), mp 277–279°C。HRMS:m/z calcd for $C_{19}H_{18}N_6[M+1]^+$ 331.1671 Found: 331.1668; 1H -NMR (600MHz, DMSO- d_6): δ ppm 2.21 (s, 3H); 4.70 (s, 2H); 6.97 (d, 2H); 7.20 (t, 1H); 7.30 (t, 2H); 7.38 (d, 2H); 7.61 (d, 2H); 7.79 (s, 1H); 8.01 (s, 1H); 8.69 (s, 1H); 12.40 (s, 1H)。

[0115] (6) N^6 -苄基- N^2 -(3-甲氧基苯基)-9H-嘌呤-2,6-二胺(4d)

[0116] 方法同 4a。化合物 3 (0.3g, 1.2mmol), 间甲氧基苯胺 (1.1g, 8.6mmol), 三氟乙酸 (0.1mL, 1.3mmol), 正丁醇 (10mL)。硅胶柱层析纯化, 得到白色固体 0.18g (0.5mmol, 42%), mp 236–238°C。HRMS:m/z calcd for $C_{19}H_{18}N_6O[M+1]^+$ 347.1620 Found: 347.1614; 1H -NMR (600MHz, DMSO- d_6): δ ppm 3.68 (d, 3H); 4.72 (s, 2H); 7.06 (t, 1H); 7.20 (t, 1H); 7.29 (t, 3H); 7.39 (d, 2H); 7.57 (t, 2H); 7.82 (s, 1H); 8.04 (s, 1H); 8.81 (s, 1H); 12.45 (s, 1H)。

[0117] (7) 4-((6-苄胺-9H-嘌呤-2)-胺基)苯酚(4e)

[0118] 方法同 4a。化合物 3 (0.4g, 1.6mmol), 对氨基苯酚 (1.26g, 11.5mmol), 三氟乙酸 (0.1mL, 1.3mmol), 正丁醇 (12mL)。硅胶柱层析纯化得到类白色固体 0.22g (0.66mmol, 41%), mp 258–260°C。HRMS:m/z calcd for $C_{18}H_{16}N_6O[M+1]^+$ 333.1464 Found: 333.1462; 1H -NMR (600MHz, DMSO- d_6): δ ppm 4.71 (t, 2H); 6.60 (d, 2H); 7.20 (t, 1H); 7.29 (t, 2H); 7.37 (d, 2H); 7.46 (t, 2H); 7.75 (s, 1H); 7.94 (s, 1H); 8.45 (s, 1H); 8.83 (s, 1H); 12.32 (s, 1H)。

, 1H).

[0119] (8) N⁶-苄基-N²-(4-氟苯基)-9H-嘌呤-2,6-二胺(4f)

[0120] 方法同 4a。化合物 3(0.46g, 1.9mmol), 对氟苯胺(1.3mL, 13.2mmol), 三氟乙酸(0.1mL, 1.3mmol), 正丁醇(10mL)。白色固体 0.13g(0.39mmol, 21%), mp 247-250 °C。HRMS:m/z calcd for C₁₈H₁₅FN₆[M+1]⁺335.1420 Found:335.1350; ¹H-NMR(600MHz, DMSO-d₆): δ ppm 4.71(s, 2H, -NCH₂-); 7.04(t, 2H); 7.24(t, 1H); 7.33(t, 2H); 7.38(d, 2H); 7.68(s, 2H); 8.14(s, 1H); 8.32(s, 1H); 9.16(s, 1H); 12.93(s, 1H)

[0121] (9) 4-((6-苄胺-9H-嘌呤-2)-胺基)苯磺酰胺(4g)

[0122] 将化合物 3(0.6g, 2.47mmol) 加至 10mL 三氟乙醇(TFE)中, 开启电磁搅拌, 然后加入磺胺(1.7g, 9.87mmol)和三氟乙酸(1.83mL, 24.7mmol), 混合液至于油浴 85°C 中, 冷凝管冷却回流。TLC 监测, 待化合物 3 反应完毕后, 停止回流, 反应液冷却, 浓缩, 向残余物中加入甲醇后, 搅拌至充分溶解, 得白色混悬液, 过滤, 收集滤液, 得到的粗品经硅胶柱层析纯化得白色固体 0.07g(0.18mmol, 8%), mp 215-218 °C。HRMS:m/z calcd for C₁₈H₁₇N₇O₂S[M+1]⁺396.1242 Found:396.1238; ¹H-NMR(600MHz, DMSO-d₆): δ ppm 4.72(s, 2H); 7.10(s, 2H); 7.22(s, 1H); 7.32(s, 2H); 7.39(d, 2H); 7.60(d, 2H); 7.86(s, 2H); 7.90(s, 1H); 8.19(s, 1H); 9.32(s, 1H); 12.55(s, 1H)

[0123] (10) N⁶-苄基-N²-苯基-9H-嘌呤-2,6-二胺(4h)

[0124] 方法同 4a。化合物 3(0.47g, 1.9mmol), 苯胺(1.3mL, 13.2mmol), 三氟乙酸(0.1mL, 1.3mmol), n-butanol(10mL)。棕黄色固体 0.5g(1.6mmol, 83%), mp 261-262 °C。HRMS:m/z calcd for C₁₈H₁₆N₆[M+1]⁺317.1514 Found:317.1521; ¹H-NMR(600MHz, DMSO-d₆): δ ppm 4.74(s, 2H); 6.88(t, 1H); 7.20(t, 2H); 7.25(d, 1H); 7.33(t, 2H); 7.39(d, 2H); 7.70(d, 2H); 8.11(s, 1H); 8.32(s, 1H); 9.10(s, 1H); 12.81(s, 1H)

[0125] (11) N⁶-苄基-N²-(4-甲磺基苯基)-9H-嘌呤-2,6-二胺(4i)

[0126] 方法同 4g。化合物 3(0.6g, 2.47mmol), 对甲基磺酸苯胺(1.69g, 9.87mmol), 三氟乙酸(1.83mL, 24.7mmol), 三氟乙醇(10mL)。类白色固体 0.04g(0.1mmol, 4%), mp 241-244 °C。HRMS:m/z calcd for C₁₈H₁₇N₇O₂S[M+1]⁺395.1290 Found:395.1305; ¹H-NMR(600MHz, DMSO-d₆): δ ppm 3.14(s, 3H); 4.78(s, 2H); 7.25(s, 1H); 7.35(s, 2H); 7.42(s, 2H); 7.73(d, 2H); 7.94(s, 2H); 8.52(s, 1H); 8.74(s, 1H); 9.81(s, 1H); 13.27(s, 1H)

[0127] 实施例 2、化合物 4j-4q 的制备

[0128] (1) N-(环己基甲基)-2-氯-9H-嘌呤-6-胺(6)

[0129] 将 2,6-二氯嘌呤(5.0g, 26.5mmol) 和正丁醇(30mL) 加至茄形瓶中, 然后在搅拌条件下依次加入氨甲基环己烷(4.2mL, 31.7mmol) 和三乙胺(5.4mL, 40mmol), 加毕, 混合液置于油浴 130 °C 中, 冷凝管冷却回流。TLC 监测原料全部反应完毕后, 停止回流, 反应液冷却, 析出大量白色固体, 抽滤, 固体用正丙醇充分洗涤后, 收集, 真空干燥后得白色固体 6.41g(24.1mmol, 91%), mp 208-210 °C。HRMS:m/z calcd for C₁₂H₁₆ClN₅[M+1]⁺266.1172 Found:266.1177; ¹H-NMR(400MHz, DMSO-d₆): δ ppm 0.92-1.00(m, 2H); 1.57-1.21(m, 3H); 1.61-1.73(m, 6H); 3.23(s, 2H); 7.94(s, 1H); 8.08(s, 1H); 12.85(s, 1H)

[0130] (2) 4-((6-环己甲胺-9H-嘌呤-2)-胺基)苯磺酰胺(4j)

[0131] 将化合物(6, 0.6g, 2.26mmol) 加至 15mL 三氟乙醇中, 开启电磁搅拌, 然后加入磺

胺 (1.56g, 9mmol) 和三氟乙酸 (1.7mL, 22.6mmol), 混合液至于油浴 90°C 中, 冷凝管冷却回流。TLC 监测, 待化合物 6 反应完毕后, 停止回流, 反应液冷却, 减压蒸干溶剂, 残留物经硅胶柱层析纯化后得白色固体 0.1g (0.25mmol, 11%), mp 258°C 分解。HRMS:m/z calcd for C₁₈H₂₃N₇O₂S[M+1]⁺402.1712 Found: 402.1688; ¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ ppm 1.02 (t, 2H); 1.19 (t, 3H); 1.64 (s, 1H); 1.70 (s, 3H); 1.82 (d, 2H); 3.39 (s, 2H); 7.16 (s, 2H); 7.70 (d, 2H); 7.96 (d, J = 8.4Hz, 2H); 8.22 (s, 1H); 8.39 (s, 1H); 9.65 (s, 1H); 13.32 (s, 1H)

[0132] (3) N⁶-环己甲基-N²-苯基-9H-嘌呤-2,6-二胺(4k)

[0133] 将化合物 (6, 0.6g, 2.25mmol) 加至正丁醇 (15mL) 中, 开启电磁搅拌, 然后加入苯胺 (1.5mL, 15.8mmol) 和三氟乙酸 (0.1mL) 后, 混合液置于油浴 130°C 中, 冷凝管冷却回流。TLC 监测, 待化合物 6 反应完毕后, 停止回流, 反应液冷却, 析出大量固体。抽滤, 固体用二氯甲烷或甲醇洗涤, 干燥后得白色固体 0.47g (1.5mmol, 65%), mp > 290°C。HRMS:m/z calcd for C₁₈H₂₂N₆[M+1]⁺323.1984 Found: 323.1987; ¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ ppm 0.95-1.03 (m, 2H); 1.13-1.21 (m, 3H); 1.63-1.80 (m, 6H); 3.36 (s, 2H); 6.94 (t, 1H); 7.26 (t, 2H); 7.75 (d, 2H); 8.20 (s, 2H); 9.27 (s, 1H); 13.13 (s, 1H)。

[0134] (4) 4-(6-环己甲胺)-9H-嘌呤-2-胺基)苯酚(4l)

[0135] 方法同 4k。化合物 (6, 0.6g, 2.25mmol), 对氨基苯酚 (1.6g, 15.8mmol), 三氟乙酸 (0.1mL), 正丁醇 (15mL)。类白色固体 0.39g (1.2mmol, 51%), 285°C 分解。HRMS:m/z calcd for C₁₈H₂₂N₆O[M+1]⁺339.1933 Found: 339.1936; ¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ ppm 0.96 (t, 2H); 1.17 (t, 3H); 1.63-1.77 (m, 6H); 3.31 (s, 2H); 6.66 (d, 2H); 7.52 (d, 2H); 7.63 (br s, 1H); 7.84 (s, 1H); 8.60 (s, 1H); 8.90 (s, 1H); 12.48 (s, 1H)

[0136] (5) N⁶-环己甲基-N²-(4-氟苯基)-9H-嘌呤-2,6-二胺(4m)

[0137] 方法同 4k。化合物 (6, 0.6g, 2.25mmol), 对氟苯胺 (1.5mL, 15.8mmol), 三氟乙酸 (0.1mL), 正丁醇 (15mL)。白色固体 0.50g (1.5mmol, 65%), mp > 300°C。HRMS:m/z calcd for C₁₈H₂₁FN₆[M+1]⁺341.1890 Found: 341.1876; ¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ ppm 0.93-1.02 (m, 2H); 1.13-1.24 (m, 3H); 1.63-1.78 (m, 6H); 3.34 (s, 2H); 7.10 (t, 2H); 7.73-7.77 (m, 2H); 8.23 (s, 2H); 9.30 (s, 1H); 12.32 (s, 1H)

[0138] (6) N⁶-环己甲基-N²-(4-甲基苯基)-9H-嘌呤-2,6-二胺(4n)

[0139] 方法同 4k。化合物 (6, 0.6g, 2.25mmol), 对甲基苯胺 (1.69g, 15.8mmol), 三氟乙酸 (0.1mL), 正丁醇 (15mL)。白色固体 0.45g (1.3mmol, 60%), mp > 300°C。HRMS:m/z calcd for C₁₉H₂₄N₆[M+1]⁺337.2140 Found: 337.2139; ¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ ppm 0.99 (t, 2H); 1.13-1.21 (m, 3H); 1.63-1.78 (m, 6H); 2.25 (s, 3H); 3.36 (s, 2H); 7.07 (d, 2H); 7.62 (d, 2H); 8.15 (s, 1H); 8.24 (s, 1H); 9.20 (s, 1H); 13.13 (s, 1H)

[0140] (7) N⁶-环己甲基-N²-(4-甲氧基苯基)-9H-嘌呤-2,6-二胺(4o)

[0141] 方法同 4k。化合物 (6, 0.6g, 2.25mmol), 对甲氧基苯胺 (1.95g, 15.8mmol), 三氟乙酸 (0.1mL), 正丁醇 (15mL)。白色固体 0.48g (1.4mmol, 61%), mp > 300°C。HRMS:m/z calcd for C₁₉H₂₄N₆O[M+1]⁺353.2090 Found: 353.2078; ¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ ppm 0.93-1.02 (m, 2H); 1.13-1.24 (m, 3H); 1.63-1.77 (m, 6H); 3.35 (s, 2H); 3.73 (s, 3H); 6.86 (d, 2H); 7.60 (d, 2H); 8.08 (s, 1H); 8.17 (s, 1H); 9.06 (s, 1H); 13.01 (s, 1H)

[0142] (8) N⁶-环己甲基-N²-(4-溴苯基)-9H-嘌呤-2,6-二胺(4p)

[0143] 方法同 4k。化合物 (6, 0.6g, 2.25mmol), 对溴苯胺 (2.72g, 15.8mmol), 三氟乙酸 (0.1mL), 正丁醇 (15mL)。白色固体 0.53g (1.3mmol, 59%), mp >300°C。HRMS:m/z calcd for $C_{18}H_{21}BrN_6[M+1]^+$ 401.1089 Found: 401.1114; ^1H-NMR (400MHz, DMSO- d_6): δ ppm 1.02 (d, 2H); 1.18 (t, 3H); 1.63-1.79 (m, 6H); 3.36 (s, 2H); 7.42 (d, 2H); 7.76 (d, 2H); 8.20 (s, 1H); 8.32 (s, 1H); 9.41 (s, 1H); 13.35 (s, 1H)

[0144] (9) N^6 -环己甲基- N^2 -(4-甲磺基苯基)-9H-嘌呤-2,6-二胺 (4q)

[0145] 方法同 4j。化合物 (6, 0.6g, 2.26mmol), 对甲基磺酸苯胺 (1.55g, 9mmol), 三氟乙酸 (1.7mL, 22.6mmol), 三氟乙醇 (12mL)。白色固体 0.05g (0.12mmol, 6%), mp 250-253°C。HRMS:m/z calcd for $C_{19}H_{24}N_6O_2S[M+1]^+$ 401.1759 Found: 401.1762; ^1H-NMR (400MHz, DMSO- d_6): δ ppm 1.03 (d, 2H); 1.17-1.22 (m, 3H); 1.63-1.83 (m, 6H); 3.14 (s, 3H); 3.41 (s, 2H); 7.78 (d, 2H); 8.05 (d, 2H); 8.34 (s, 1H); 8.41 (s, 1H); 9.81 (s, 1H); 13.16 (s, 1H)

[0146] 实施例 3、化合物 10a-10i 的制备

[0147] (1) N -(环己甲基)-2-氟-9H-嘌呤-6-胺 (8)

[0148] 将 2-氟-6-氯嘌呤 (5.0g, 29mmol) 溶于无水乙醇 (30mL) 中, 然后依次加入氨甲基环己烷 (4.5mL, 34.9mmol) 和三乙胺 (5.9mL, 43.6mmol), 加毕, 混合液置于油浴 80°C 中, 冷凝管冷却回流。TLC 监测原料全部反应完毕后, 停止回流, 冷却, 反应液减压蒸干后, 得浅黄色固体, 真空干燥后经柱层析纯化后得白色固体粉末 4.80g (19.3mmol, 66%), mp 164-168°C。ESI-MS:m/z 250.4[M+1] $^+$; ^1H-NMR (300MHz, DMSO- d_6): δ ppm 0.88-0.99 (m, 2H); 1.14-1.16 (t, 3H); 1.61-1.72 (m, 6H); 3.25 (s, 2H); 8.06 (s, 1H); 8.17 (s, 1H); 12.98 (s, 1H)

[0149] (2) N -(环己甲基)-2-氟-9-异丙基-9H-嘌呤-6-胺 (9)

[0150] 将化合物 (8, 4.80g, 19.3mmol) 溶于二甲基亚砜 (15mL) 中, 然后依次加入溴代异丙烷 (4.5mL, 48.1mmol) 和无水碳酸钾 (8.0g, 57.8mmol), 加毕, 混合液置于油浴 80°C 中反应。TLC 监测, 待原料全部反应完毕后, 反应液用水稀释, 转移至分液漏斗中, 用乙酸乙酯萃取, 合并有机层, 再用饱和氯化钠洗涤, 分取有机层, 无水硫酸镁干燥。过滤, 减压回收溶剂, 粗品经硅胶柱层析纯化后得白色固体粉末 4.03g (13.8mmol, 72%), mp 112-115°C。ESI-MS:m/z 292.4[M+1] $^+$; ^1H-NMR (400MHz, DMSO- d_6): δ ppm 0.94 (m, 2H); 1.14-1.16 (m, 3H); 1.49 (d, 6H); 1.64-1.67 (m, 6H); 3.26 (t, 2H); 4.59-4.65 (m, 1H); 8.20 (s, 1H); 8.29 (s, 1H)

[0151] (3) 2-(6-(环己胺基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-胺基)-1-丁醇 (10a)

[0152] 将化合物 (9, 0.6g, 2.1mmol), 2-氨基-1-丁醇 (1.2mL, 13.4mmol) 加至二甲基亚砜 (10mL) 中, 氮气保护下抽取真空后, 混合液置于油浴 130°C 中反应。TLC 监测, 待化合物 9 反应完毕后, 停止反应, 反应液加水稀释后, 用乙酸乙酯萃取, 合并乙酸乙酯层, 用饱和氯化钠洗涤, 无水硫酸镁干燥。过滤, 减压回收溶剂, 粗品经柱层析纯化得白色固体 0.23g (0.6mmol, 32.3%)。mp 116-118°C。HRMS:m/z calcd for $C_{19}H_{32}N_6O[M+1]^+$ 361.2716 Found: 361.2711; ^1H-NMR (600MHz, $CDCl_3$): 0.97-1.01 (m, 2H); 1.03 (t, 3H); 1.13-1.26 (m, 3H); 1.53 (d, 6H); 1.56-1.60 (m, 2H); 1.61-1.67 (m, 2H); 1.71-1.73 (m, 2H); 1.82 (d, 2H); 3.38 (s, 2H); 3.62-3.65 (dd, 1H); 3.82-3.89 (m, 2H); 4.57-4.61 (m, 1H); 4.88 (s, 1H); 5.45-5.67 (d, 2H); 7.49 (s, 1H)。

[0153] (4) 2-(6-(环己胺基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-胺基)乙醇 (10b)

[0154] 方法同 10a。化合物 (9, 0.5g, 1.7mmol), 乙醇胺 (1mL, 11.2mmol), DMSO (10mL)。类

白色固体 0.18g (0.5mmol, 31.6%). mp 95-98°C. HRMS: m/z calcd for $C_{17}H_{28}N_6O[M+1]^+$ 333.2401 Found: 333.2418; 1H -NMR (600MHz, $CDCl_3$): 0.94-1.03 (m, 2H); 1.18-1.27 (m, 3H); 1.53 (d, 6H); 1.55-1.61 (m, 1H); 1.63 (t, 1H), 1.72 (t, 2H); 1.81 (d, 2H); 3.38 (s, 2H); 3.55-3.58 (m, 2H); 3.83 (t, 2H); 4.57-4.64 (m, 1H); 5.02 (br s, 1H), 5.37 (t, 1H); 5.87 (s, 1H); 7.50 (s, 1H)

[0155] (5) 2-(6-(环己甲胺基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-胺基)-3-羟基丙酸(10c)

[0156] 将化合物(9, 0.5g, 1.7mmol), L-丝氨酸(3.6g, 34mmol)和1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯(DBU)(5.3mL, 34mmol)加至N-甲基吡咯烷酮(10mL)中,氮气保护下抽取真空后,混合液置于油浴160°C中反应。TLC监测,待化合物9反应完毕后,停止反应,反应液用10%柠檬酸稀释,二氯甲烷萃取,合并二氯甲烷层,用饱和氯化钠洗涤,无水硫酸镁干燥。过滤,减压回收溶剂,粗品经柱层析纯化后得类白色固体0.11g(0.3mmol, 17%). mp 158-160°C. HRMS: m/z calcd for $C_{18}H_{28}N_6O_3[M+1]^+$ 377.2301 Found: 377.2319; 1H -NMR (300MHz, CD_3OD): 0.98-1.12 (m, 2H); 1.29-1.40 (m, 3H); 1.58 (d, 6H); 1.65-1.73 (m, 2H); 1.78-1.89 (m, 4H); 3.38 (s, 2H); 4.03 (d, 2H); 4.61 (t, 1H); 4.66-4.72 (m, 1H); 7.86 (s, 1H)。

[0157] (6) 2-(6-(环己甲胺基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-胺基)-3-羟基丁酸(10d)

[0158] 方法同10c。化合物(9, 0.6g, 2.1mmol), L-苏氨酸(5.0g, 41.2mmol), DBU(6.3mL, 41.2mmol), N-甲基吡咯烷酮(10mL)。类白色固体0.15g(0.38mmol, 18.8%). mp 138-142°C. HRMS: m/z calcd for $C_{19}H_{30}N_6O_3[M+1]^+$ 391.2457 Found: 391.2469; 1H -NMR (300MHz, CD_3OD): 0.95-1.07 (m, 2H); 1.17-1.27 (m, 3H); 1.30 (d, 3H); 1.53 (d, 6H); 1.58-1.83 (m, 6H); 3.34 (s, 2H); 4.22-4.37 (m, 1H); 4.51-4.57 (m, 1H); 4.58-4.68 (m, 1H); 7.81 (s, 1H)

[0159] (7) 2-(6-(环己甲胺基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-氨基)丙烷-1,3-二醇(10e)

[0160] 方法同10a。化合物(9, 0.3g, 1mmol), L-丝氨酸(0.61g, 6.7mmol), 二甲基亚砜(4mL)。白色固体0.15g(0.4mmol, 40.5%). mp 166-168°C. HRMS: m/z calcd for $C_{18}H_{30}N_6O_2[M+1]^+$ 363.2508 Found: 363.2536; 1H -NMR (600MHz, $CDCl_3$): 0.93-0.99 (m, 2H); 1.09-1.27 (m, 3H); 1.50 (d, 6H); 1.53-1.60 (m, 1H); 1.63 (d, 1H), 1.69 (d, 2H); 1.78 (d, 2H); 3.32 (s, 2H); 3.82-3.90 (m, 4H); 4.08 (t, 1H); 4.53-4.59 (hept., 1H); 5.12 (s, 2H); 5.70 (d, 1H); 5.96 (s, 1H); 7.50 (s, 1H)

[0161] (8) 2-(6-(环己甲胺基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-胺基)-4-甲基戊烷-1-醇(10f)

[0162] 方法同10a。化合物(9, 0.3g, 1mmol), L-亮氨酸(0.86g, 6.7mmol), 二异丙基乙胺(1.7mL, 10mmol), 二甲基亚砜(4mL)。淡黄色胶状液体,用氯化氢饱和的乙酸乙酯成盐后得白色固体0.08g(0.19mmol, 18.2%). mp 145-149°C. HRMS: m/z calcd for $C_{21}H_{36}N_6O[M+1]^+$ 389.3029 Found: 389.3007; 1H -NMR (400MHz, CD_3OD): 1.02 (t, 6H); 1.07-1.15 (m, 2H); 1.25-1.36 (m, 3H); 1.51-1.59 (m, 2H); 1.62 (t, 6H); 1.73-1.81 (m, 4H); 1.92 (d, 2H); 3.43-3.47 (m, 2H); 3.64-3.72 (m, 2H); 4.24-4.27 (m, 1H); 4.74-4.80 (m, 1H); 8.51 (s, 1H)

[0163] (9) 2-(6-(环己甲胺基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-胺基)-3-甲基-1-丁醇(10g)

[0164] 方法同10a。化合物(9, 0.6g, 2.1mmol), L-缬氨酸(1.5mL, 13.4mmol), 二异丙基乙胺(3.4mL, 20.6mmol), 二甲基亚砜(6mL)。淡黄色胶状液体,用氯化氢饱和的乙酸乙酯成盐后得类白色固体0.15g(0.3mmol, 17.6%). mp 75-79°C. HRMS: m/z calcd for $C_{20}H_{34}N_6O[M+1]^+$ 375.2872 Found: 375.2884; 1H -NMR (400MHz, CD_3OD): 1.03-1.07 (m, 6H); 1.13 (d, 2H); 1.24-1.35 (m, 3H); 1.58-1.61 (dd, 6H); 1.72-1.81 (m, 4H); 1.89 (d, 2H); 2.07 (t, 1H); 3.41 (s, 2H)

; 3.75 (d, 2H); 4.02 (s, 1H); 4.67-4.73 (m, 1H); 8.04 (s, 1H)

[0165] (10) 2-(6-(环己甲胺基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-胺基)丙烷-1-醇(10h)

[0166] 方法同 10a。化合物 (9, 0.6g, 2.1mmol), L-氨基丙醇 (1.0g, 13.4mmol), 二异丙基乙胺 (3.4mL, 20.6mmol), 二甲基亚砜 (8mL)。淡黄色胶状液体, 用氯化氢饱和的乙酸乙酯成盐后得白色固体 0.55g (1.4mmol, 70.5%)。mp 184-188°C。HRMS: m/z calcd for C₁₈H₃₀N₆O [M+1]⁺ 347.2559 Found: 347.2556; ¹H-NMR (400MHz, CD₃OD): 1.09-1.17 (m, 2H); 1.24-1.30 (m, 3H); 1.34 (d, 3H); 1.67 (d, 6H); 1.74 (d, 2H); 1.81 (d, 2H); 1.95 (d, 2H); 3.52 (d, 2H); 3.63-3.74 (m, 2H); 4.20-4.24 (m, 1H); 4.84-4.90 (m, 1H); 9.00 (s, 1H)

[0167] (11) 2-(6-(环己甲胺基)-9-异丙基-9H-嘌呤-2-胺基)丙酸(10i)

[0168] 方法同 10c。化合物 (9, 0.6g, 2.1mmol), L-丙氨酸 (3.7g, 41.2mmol), DBU (6.3mL, 41.2mmol), N-甲基吡咯烷酮 (4mL)。类白色固体 0.21g (0.6mmol, 28.4%)。mp 84-90°C。HRMS: m/z calcd for C₁₈H₂₈N₆O₂ [M+1]⁺ 361.2352 Found: 361.2354; ¹H-NMR (400MHz, CD₃OD): 0.98-1.07 (m, 2H); 1.19-1.33 (m, 3H); 1.51 (d, 3H); 1.55-1.57 (dd, 6H); 1.69 (d, 2H); 1.77 (d, 2H); 1.85 (d, 2H); 3.38 (s, 2H); 4.43-4.48 (m, 1H); 4.61-4.68 (m, 1H); 7.82 (s, 1H)

[0169] 实施例 4、目标化合物抑制细胞周期蛋白依赖性激酶的初步活性实验 (In vitro)

[0170] 1) 材料: CDK1/cyclin B Kinase (CDK1/cyclin B 激酶); Kinase-Glo Plus reagent (Kinase-Glo[®] Plus 试剂); ATP (三磷酸腺苷);

[0171] Substrate (底物): Histone H derived peptide (Histone H derived peptide, 组氨酸 H 衍生肽): H09-19T;

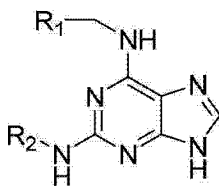
[0172] Assay Buffer: 25mM HEPES (4-羟乙基哌嗪乙磺酸), 10mM MgCl₂, 0.01% Triton X-100, 100 μg/mL BSA, 2.5mM DTT (二硫苏糖醇), pH7.4。

[0173] Roscovitine: 细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂类抗肿瘤药物, 现正进行临床 II 期研究。

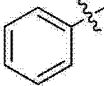
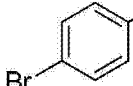
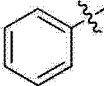
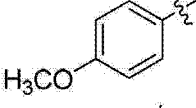
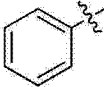
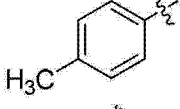
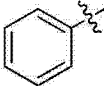
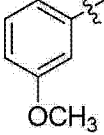
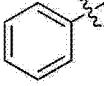
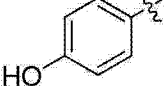
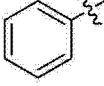
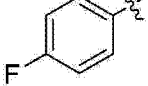
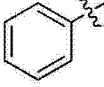
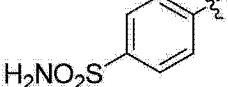
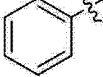
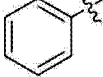
[0174] 2) 方法: 将化合物配制成 10 μg/mL 的溶液。在 384 孔板中实验孔每孔加入 1 μL 测定浓度为 10 μM 的待测化合物, 空白孔 (ZPE) 和阴性对照孔 (HPE) 加入 1 μL 10% DMSO 溶液。然后待测化合物实验孔和 ZPE 每孔加入 4 μL 2.5×CDK1/cyclin B 激酶, HPE 孔中加入 4 μL assay buffer。混合液混匀后每孔加入 5 μL 2×ATP-substrate mixtures (ATP 与底物混合液), 混合液混匀, 30°C 条件下孵育 1 小时。每孔加入 10 μL Kinase Glo Plus 试剂, 混合液混匀 27°C 条件下孵育 20min。最后在 EnVision 上读取发光强度, 计算抑制率。实验结果见表 4、表 5。

[0175] 表 4. 目标化合物 4a-4q 的体外抑酶实验结果

[0176]



[0177]

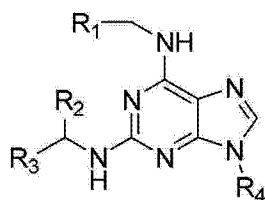
编号	R1	R2	抑制率 (% , 10 μ M)
4a			14.3
4b			50.1
4c			3.27
4d			34.5
4e			79.9
4f			32.7
4g			89.4
4h			35.9

[0178]

4i			72.7
4j			107.2
4k			69.5
4l			105.3
4m			96.5
4n			5.03
4o			77.9
4p			57.7
4q			96.7
Roscovitine			86.2

[0179] 表 5. 目标化合物 10a-10i 的体外抑酶实验结果

[0180]



[0181]

编号	R1	R2	R3	R4	抑制率(%, 10 μ M)
10a					87.8

[0182]

10b		H			31.0
10c					7.27
10d					6.19
10e					52.5
10f					66.9
10g					84.7
10h		-CH ₃			76.5
10i		-CH ₃			5.16
Roscovitine					86.2

[0183] 通过对 CDK1/cyclin B 激酶初步抑制活性实验发现, 化合物 4g、4j、4l、4m、4q、10a 在 10 μ M 浓度水平的抑制活性优于阳性对照药 Roscovitine, 同时化合物 4e、4i、4o、10g 和 10h 在 10 μ M 浓度水平上与 Roscovitine 的抑制活性比较接近。

[0184] 实施例 5、目标化合物抑制细胞增殖的活性试验 (In vitro)

[0185] 对目标化合物进行体外抑制癌细胞增殖的活性实验, 结果见表 6、表 7。

[0186] 1) 材料: MD-MBA-231 细胞株, 四甲基偶氮唑蓝 MTT, 10% 胎牛血清, 96 孔板。

[0187] 2) 方法:

[0188] 细胞培养: MD-MBA-231 肿瘤细胞株都采用常规培养。实验时均用对数生长期细胞。

[0189] 细胞生长检测 (MTT 法): MD-MBA-231 细胞悬液均调整至 5×10^4 / mL, 分别接种于 96 孔板 (100 μ L / 孔), 5000 个细胞 / 孔。铺板 4h 后, 每孔中加入 100 μ L 含不同浓度化合物的培养基, 使孔中化合物终浓度分别为: 100、50、25、12.5、6.25 μ g / mL, 每个浓度设四个复孔, 不加细胞的孔读数时作空白孔, 加细胞不加化合物的孔作阴性对照孔, Roscovitine 作化合物阳性对照。于 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 中孵育 48h, 每孔加入 10 μ L 0.5% 的 MTT 染色液, 继续孵育 4h 后, 2500rpm, 离心 12min, 然后抛弃板孔中培养基, 加入 DMSO 溶液, 100 μ L / 孔。酶标仪上于

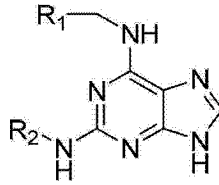
570nm 处测定每孔的吸光度 OD 值, 细胞生长抑制率按下式计算:

[0190]

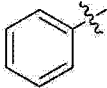
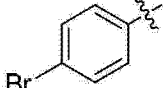
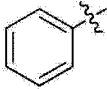
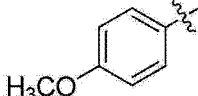
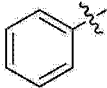
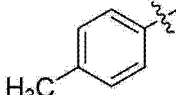
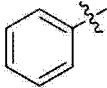
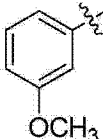
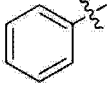
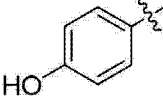
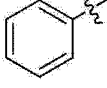
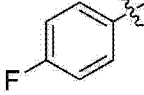
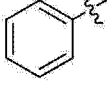
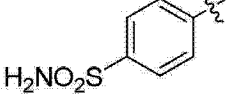
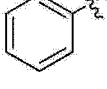
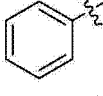
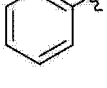
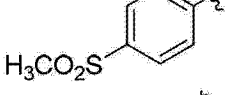
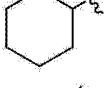
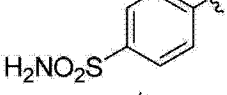
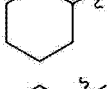
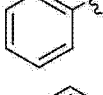
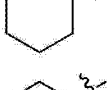
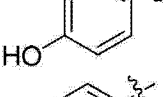
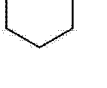
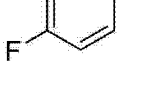
$$\text{抑制率 (\%)} = \frac{\text{阴性对照孔平均 OD 值} - \text{实验孔平均 OD 值}}{\text{阴性对照孔平均 OD 值} - \text{空白孔平均 OD 值}} \times 100\%$$

[0191] 表 6. 目标化合物 4a-4q 的抗增殖实验结果

[0192]



[0193]

编号	R1	R2	IC ₅₀ of MD-MBA-231 (μM) ^a
4a			28.7±3.9
4b			52.1±3.7
4c			>200
4d			>200
4e			31.1±3.0
4f			69.2±2.6
4g			32.1±3.8
4h			40.6±4.6
4i			39.7±6.6
4j			21.3±6.4
4k			23.0±4.0
4l			27.4±5.6
4m			23.4±6.4

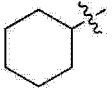

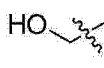

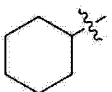
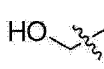

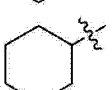
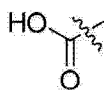

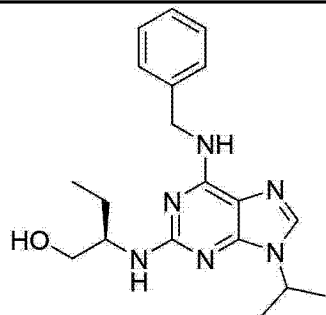
	4n			>200
	4o			39.2±4.0
	4p			15.2±3.7
[0194]	4q			23.6±6.8
	Roscovitine			49.4±9.0

[0195] ^a表中数值为三次试验的平均值，“±”后的数值表示标准偏差。

[0196] 表 7. 目标化合物 10a-10i 的抗增殖实验结果

[0197]

编号	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	IC ₅₀ of MD-MBA-231 (μM) ^a
10a					30.8±4.7
10b		H			66.3±5.9
[0198] 10c					>200
10d					>200
10e					73.1±4.9
10f					39.3±3.8

10g					32.5±6.7
10h		-CH ₃			41.0±4.1
10i		-CH ₃			>200
[0199]					49.4±9.0

[0200] ^a表中数值为三次试验的平均值，“±”后的数值表示标准偏差。

[0201] 上表测试数据表明，化合物 4a、4e、4g、4h、4i、4j、4k、4l、4m、4o、4p、4q、10a、10f、10g 和 10h 在体外对 MD-MBA-231 细胞增殖抑制活性比阳性对照 Roscovitine 要好。