

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03819160.1

[51] Int. Cl.

C07D 487/04 (2006.01)

A61K 31/505 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07D 239/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 6 月 27 日

[11] 授权公告号 CN 1323080C

[22] 申请日 2003.8.7 [21] 申请号 03819160.1

[30] 优先权

[32] 2002.8.14 [33] US [31] 60/403,519

[86] 国际申请 PCT/EP2003/008744 2003.8.7

[87] 国际公布 WO2004/018472 英 2004.3.4

[85] 进入国家阶段日期 2005.2.7

[73] 专利权人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 陈 奕 A·R·丹尼斯基

W·阿里斯 M·M·卡巴特

埃米莉·爱军·刘 刘进军 陆建春

C·米舒

[56] 参考文献

WO0129041A 2001.4.26

WO9961444A 1999.12.2

WO0024744A 2000.5.4

WO0164679A 2001.9.7

WO0129042A 2001.4.26

审查员 潘 剑

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公
司

代理人 王 旭

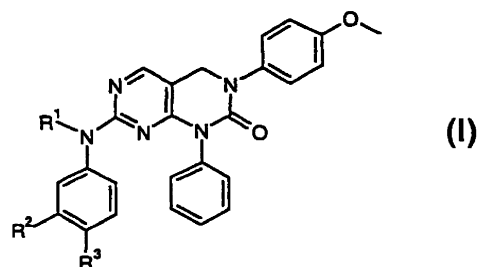
权利要求书 7 页 说明书 52 页

[54] 发明名称

具有抗增殖活性的嘧啶并化合物

[57] 摘要

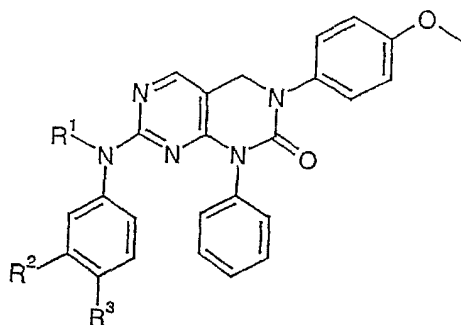
本发明公开新的式 I 的嘧啶并化合物，其是 KDR 和 FGFR 激酶的选择性抑制剂并且选择性抗 LCK。这些化合物和它们的药用盐是用于治疗或控制实体瘤，特别是乳腺癌、结肠瘤、肺癌和前列腺瘤的抗增殖剂。还公开了含有这些化合物的药物组合物和它们的制备方法。



1. 下式的化合物或其药用盐，

5

10



I,

其中

R¹ 选自

15

-H,

-COR⁴, 和

-COOCHR⁵OCOR⁴;

R² 和 R³ 独立地选自

-H, 和

20

-OR⁵;

R⁴ 选自

-C₁₋₆ 烷基,

-被高至 4 个选自下组的基团取代的 C₁₋₆ 烷基

-NR⁵R⁶,

25

-SR⁵,

-OR⁵,

-芳基,

-被高至 2 个独立地选自-OR⁵和 C₁₋₄ 烷基的基团取代的芳基, 和

-杂芳基, 和

30

-杂环基;

R^5 和 R^6 独立地选自

-H, 和

-C₁₋₅ 烷基,

或者, -NR⁵R⁶ 可以形成含有 3-7 个原子的环, 所述环任选地包括一个或多个另外的 N 或 O 原子。

2. 按照权利要求 1 的式 I 的化合物, 其中

R^1 选自

-H,

-COR⁴, 和

-COOCHR⁵OCOR⁴;

R^2 和 R^3 独立地选自

-H, 和

-OR⁵;

R^4 选自

-C₁₋₆ 烷基,

-被 1-4 个独立地选自下组的基团取代的 C₁₋₆ 烷基

-NR⁵R⁶,

-SR⁵,

-OR⁵,

-苯基,

-被 1-2 个独立地选自 -OR⁵ 和 C₁₋₄ 烷基的基团取代的苯基, 和

-噻吩基, -呋喃基, -吡咯基, -吡咯基, -吡啶基, -吡嗪基, -噁唑基, -

噻唑基, 喹啉基, 嘧啶基, 咪唑基和四唑基, 和

- 哌啶基, 哌嗪基, 吡咯烷基, 和吗啉基;

R^5 和 R^6 独立地选自

-H, 和

-C₁₋₅ 烷基,

或者, -NR⁵R⁶ 可以形成含有 3-7 个原子的环, 所述环任选地包括一个或多个另外的 N 或 O 原子。

3. 权利要求 1 或权利要求 2 的式 I 的化合物, 其中 R^1 是 -COR⁴。

4. 权利要求 3 的式 I 的化合物, 其中 R^4 是 C_{1-6} 烷基。

5. 权利要求 4 的式 I 的化合物, 其选自以下各项:

N-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基乙酰胺;

5 *N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基丙酰胺;

N-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基戊酰胺; 和

10 *N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基丁酰胺。

6. 权利要求 3 的式 I 的化合物, 其中 R^4 是

被- NR^5R^6 取代的- C_{1-6} 烷基,

或被- NR^5R^6 和另一个选自下组的基团取代的- C_{1-6} 烷基:

- NR^5R^6 ,

15 - SR^5 ,

- OR^5 ,

-苯基,

-被 1-2 个独立地选自- OR^5 和 C_{1-4} 烷基的基团取代的苯基, 和

-噻吩基, -呋喃基, -吡啶基, -吡咯基, -吡啶基, -吡嗪基, -噁唑基, -

20 噻唑基, 喹啉基, 嘧啶基, 咪唑和四唑基;

和 R^5 和 R^6 独立地选自-H 和- C_{1-5} 烷基。

7. 权利要求 6 的式 I 的化合物, 其选自以下各项:

(2*S*)-2-氨基-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-4-甲硫基-*N*-苯基丁酰胺;

25 (2*S*)-2-氨基-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-3-苯基-*N*-苯基丙酰胺;

(2*S*)-2-氨基-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-4-甲基-*N*-苯基戊酰胺乙酸盐; 和

30 (2*S*)-2-氨基-3-吡啶-3-基-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基丙酰胺盐酸盐。

8. 权利要求 3 的式 I 的化合物, 其中 R^3 是 $-OR^5$ 和 R^5 是 $-H$ 或 $-C_{1-5}$ 烷基。

9. 权利要求 8 的式 I 的化合物, 其选自以下各项:

N-(4-羟基苯基)-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]乙酰胺; 和

5 *N*-(4-甲氧苯基)-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]乙酰胺。

10. 权利要求 1 或权利要求 2 的式 I 的化合物, 其中 R^1 是 $-COOCHR^5OCOR^4$ 。

11. 权利要求 10 的式 I 的化合物, 其选自以下各项:

10 {*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基氨基甲酰基氧基}甲基乙酸酯;

{*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基氨基甲酰基氧基}甲基 2-(二甲基氨基)乙酸酯;

15 {*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基氨基甲酰基氧基}甲基 2-(二甲基氨基)乙酸酯盐酸盐; 和

{*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基氨基甲酰基氧基}甲基哌啶-4-羧酸酯三氟乙酸盐。

12. 权利要求 1 或权利要求 2 的式 I 的化合物, 其中 R^1 是 H 。

13. 权利要求 12 的式 I 的化合物, 其选自以下各项:

20 3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-7-(苯基氨基)-1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮;
3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-7-(苯基氨基)-1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮
甲磺酸盐;

7-[(4-羟基苯基)氨基]-3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮; 和

25 3-(4-甲氧苯基)-7-[(4-甲氧苯基)氨基]-1-苯基-1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮。

14. 一种药物组合物, 其含有治疗有效量的按照权利要求 1-13 中任何一项的化合物和药用载体或赋形剂。

15. 权利要求 14 的药物组合物, 其中所述化合物适合给药于癌症患者。

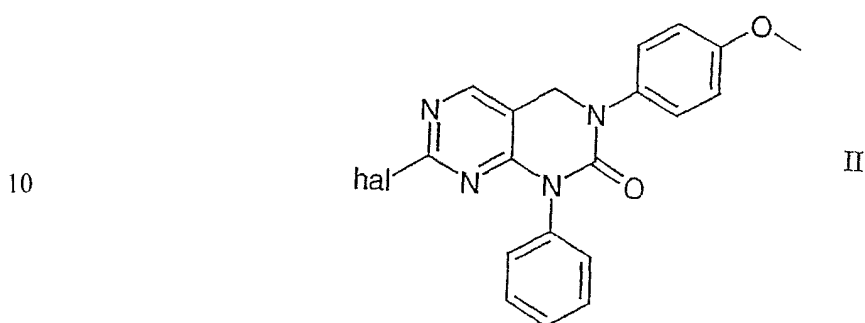
30 16. 权利要求 1-13 中任何一项的化合物在制备用于治疗和控制癌症的

药物中的应用。

17. 按照权利要求 16 的应用，其用于治疗和控制实体瘤。

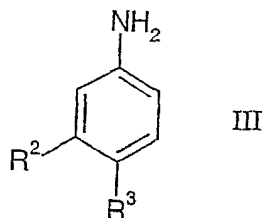
18. 按照权利要求 16 的应用，其用于治疗和控制乳腺癌，肺癌，结肠癌或前列腺癌。

- 5 19. 一种制备权利要求 1 的式 I 的化合物的方法，该方法包含
a) 将式 II 的化合物

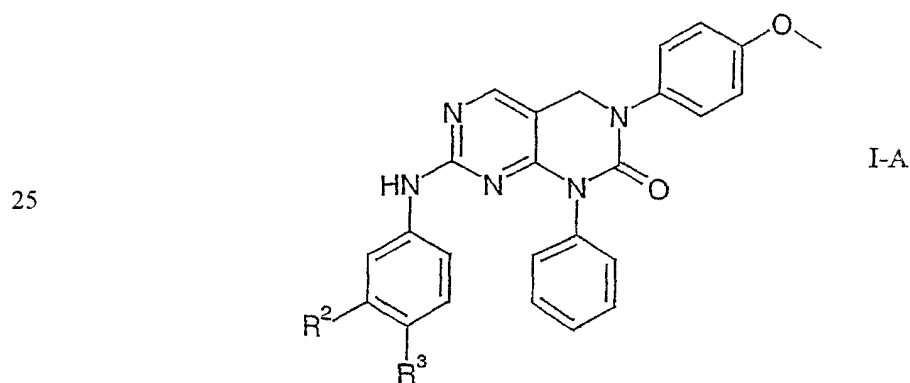


其中 hal 是氯，溴或碘，

15 与式 III 的苯胺衍生物反应，



20 其中 R^2 和 R^3 是 H 或 $-OR^{5'}$ ，其中 $R^{5'}$ 是 H, C_{1-5} 烷基或甲硅烷基保护基，
以获得下式化合物，

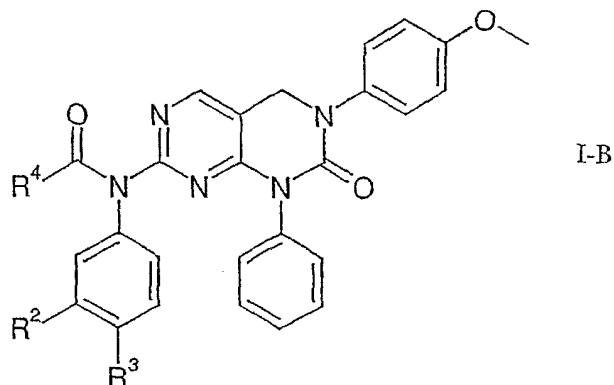


和/或

30 b) 将式 I-A 的化合物与式 IV 的酰基卤或酐反应

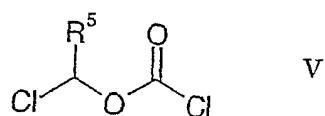


其中 X 是卤素或-OCOR⁴，和 R⁴ 如权利要求 1 所定义，
以获得下式化合物，

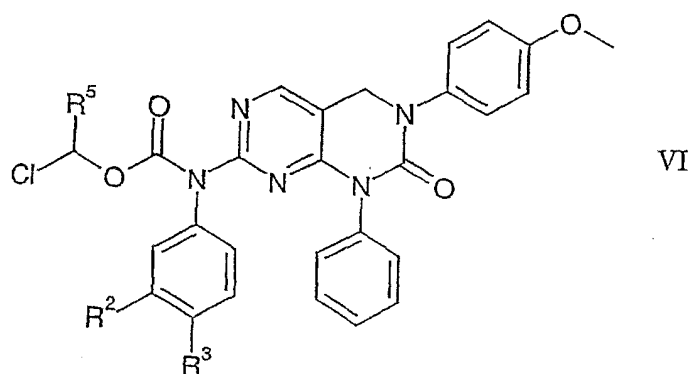


或者，

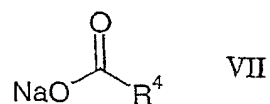
c) 将式 I-A 的化合物与式 V 的氯甲酸酯反应



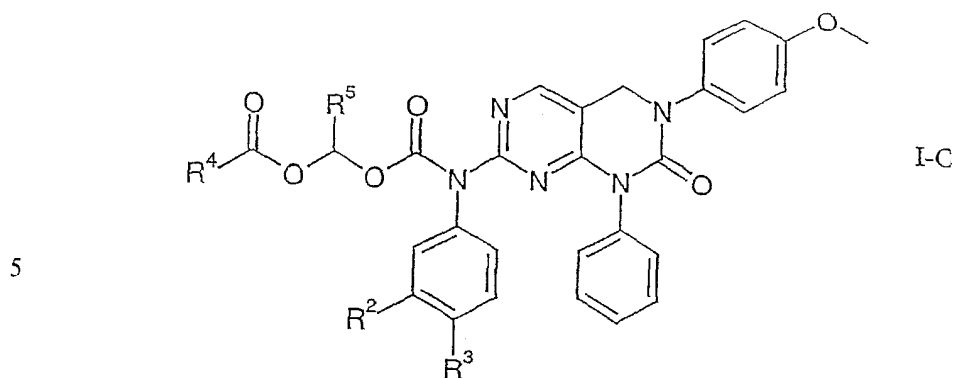
其中 R⁵ 如权利要求 1 所定义，以获得式 VI 的化合物，



其然后与式 VII 的钠盐反应



以获得式 I-C 的化合物



其中 R^4 如权利要求 1 所定义。

20. 按照权利要求 19 的方法, 进一步包含将式 I-A, I-B 或 I-C 的化合
10 物转化为药用盐。

21. 通过按照权利要求 19 的方法制备的按照权利要求 1-13 中任何一项的式 I 的化合物。

22. 选自下组的化合物:

(氯代甲氧基)-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并
15 [4,5-*d*]嘧啶-7-基)]-*N*-苯甲酰胺,

3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-7-{[4-(1,1,2,2-四甲基-1-硅杂丙氧基)苯基]氨基}-1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮, 和

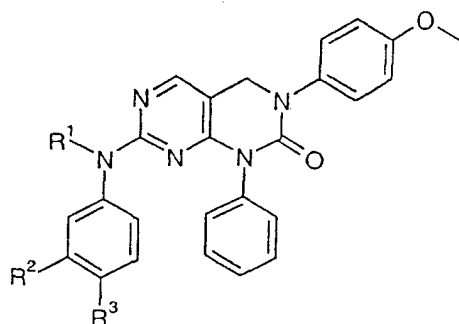
N-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-*N*-[4-(1,1,2,2-四甲基-1-硅杂丙氧基)苯基]乙酰胺。

具有抗增殖活性的嘧啶并化合物

5

本发明涉及新的式 I 的嘧啶并化合物及其药用盐，

10



I

其中

15

R^1 选自

-H,

$-\text{COR}^4$, 和

$-\text{COOCHR}^5\text{OCOR}^4$;

R^2 和 R^3 独立地选自

20

-H, 和

$-\text{OR}^5$;

R^4 选自

$-\text{C}_{1-6}$ 烷基,

-被高至 4 个选自下组的基团取代的 C_{1-6} 烷基

25

$-\text{NR}^5\text{R}^6$,

$-\text{SR}^5$,

$-\text{OR}^5$,

-芳基,

-被高至 2 个独立地选自 $-\text{OR}^5$ 和 C_{1-4} 烷基的基团取代的芳基, 和

30

-杂芳基, 和

-杂环基；

R^5 和 R^6 独立地选自

-H, 和

-C₁₋₅ 烷基,

5 或备选地, $-NR^5R^6$ 可以形成含有 3-7 个原子的环, 所述环任选地包括一个或多个另外的 N 或 O 原子。

这些化合物抑制 KDR (含有激酶插入结构域的受体) 和 FGFR (成纤维细胞生长因子) 激酶并选择性抗 LCK (T-细胞酪氨酸激酶 p56^{lck})。这些化合物和它们的药用盐具有抗增殖活性和用于治疗或控制癌症, 特别是实体瘤。另外, 这些化合物具有有利的生物利用度曲线。本发明还涉及包含
10 这些化合物的药物组合物和治疗或控制癌症的方法, 尤其是治疗或控制乳腺癌、肺癌、结肠瘤和前列腺瘤。

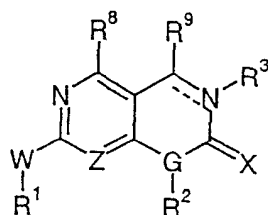
蛋白激酶是一类调节多种细胞功能的蛋白质(酶)。这伴随着蛋白质底物上特定氨基酸的磷酸化, 导致底物蛋白质的构象改变。构象变化调节底物的活性或它与其它结合配体的相互作用活性。蛋白激酶的酶活性是指激酶将磷酸基团加至底物上的速率。它可以例如通过测定作为时间的函数的转化为产物的底物的量来测量。底物的磷酸化在蛋白激酶的活性位点处发生。
15

酪氨酸激酶是催化腺苷三磷酸的末端磷酸转移至蛋白质底物上的酪氨酸残基的蛋白激酶亚类。这些激酶在导致细胞增殖、分化和迁移的生长因子信号转导的传播中发挥重要作用。
20

例如, 成纤维细胞生长因子 (FGF) 和血管内皮生长因子 (VEGF) 已经公认为肿瘤促进的血管生成的重要介质。VEGF 通过两个高亲和力的受体的信号传导激活内皮细胞, 其中一个受体是含有激酶插入结构域的受体 (KDR, Hennequin L. F.等, J. Med. Chem. 2002, 45 (6), pp. 1300)。FGF 通过 FGF 受体 (FGFR) 的信号传导激活内皮细胞。实体瘤依赖于新血管形成 (血管生成) 来生长。因此, 干扰生长信号转导和因此减缓或预防血管生成 (angiogenesis) 的受体 FGFR 和 KDR 的抑制剂是预防和治疗实体瘤的有效试剂 (Klohs W. E.等, Current Opinion in Biotechnology 1999, 10, p.
25 544)。
30

存在蛋白激酶催化活性的小分子抑制剂的几个实例。特别是，小分子抑制剂典型地通过与蛋白激酶 ATP 结合位点（或“活性位点”，参见 WO 98/24432 和 Hennequin L. F.等, J. Med. Chem. 2002, 45 (6), pp. 1300）紧密相互作用阻止底物磷酸化。这些化合物中的几种抑制多个目标。例如，

5 WO99/61444 (Warner-Lambert)公开了下式的二环嘧啶和二环 3,4-二氢嘧啶，

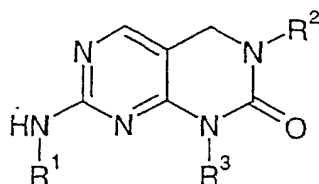


10

其宣称抑制依赖细胞周期蛋白的激酶 Cdk1, Cdk2 和 Cdk4 以及生长因子受体酪氨酸激酶 PDGFR 和 FGFR。一些化合物还据称抑制 Cdk6。

美国专利 No. 6,150,373 (Hoffmann-La Roche Inc.)公开了下式的二环氮杂环，

15



20

其声称抑制 T-细胞酪氨酸激酶 p56^{lck}。

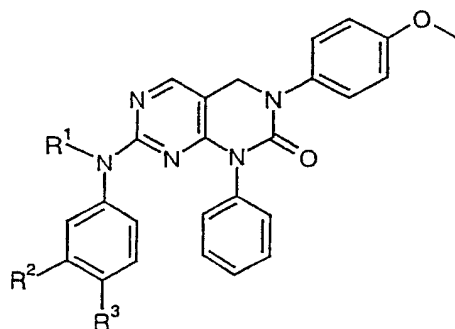
继续有对有效抑制蛋白激酶（特别是 FGF 和 KDR 激酶）催化活性、用于治疗一种或多种类型的实体瘤的易合成的小分子化合物的需要。特别期望提供对于 FGF 和 KDR 选择性的小分子抑制剂。这是理想的，是由于抑制多个目标可能产生的潜在的伴生毒性和其它不希望有的并发症。优选

25 该小分子抑制剂还具有有利的生物利用度曲线。因此本发明的目的是提供这些化合物和含有这些化合物的药物组合物。

本发明涉及能够选择性抑制 KDR 和 FGFR 活性的新的嘧啶并化合物。这些化合物用于治疗或控制癌症，特别是治疗或控制实体瘤。具体地本发明

30 涉及下式的化合物或其药用盐，

5



I,

其中

 R^1 选自

10

-H,

-COR⁴, 和-COOCHR⁵OCOR⁴; R^2 和 R^3 独立地选自

-H, 和

15

-OR⁵; R^4 选自-C₁₋₆ 烷基,-被高至 4 个选自下组的基团取代的 C₁₋₆ 烷基-NR⁵R⁶,

20

-SR⁵,-OR⁵,

-芳基,

-被高至 2 个独立地选自-OR⁵和 C₁₋₄ 低级烷基的基团取代的芳基,

和

25

-杂芳基, 和

-杂环基;

 R^5 和 R^6 独立地选自

-H,

-C₁₋₅ 低级烷基, 或

30

备选地, -NR⁵R⁶ 可以形成含有 3-7 个原子的环, 所述环任选地包括一

个或多个另外的 N 或 O 原子。

本发明还涉及包含治疗有效量的一种或多种式 I 的化合物和药用载体或赋形剂的药物组合物。

5 本发明另外涉及式 I 的化合物在治疗实体瘤、特别是乳腺癌或结肠瘤中的应用，其是通过向需要该治疗的人类患者施用有效量的式 I 的化合物和/或其盐。特别是，本发明涉及式 I 的化合物在治疗和控制肺癌、结肠癌或前列腺癌中的应用。

本发明还涉及制备式 I 的化合物的方法以及用于制备式 I 的化合物的新中间体化合物。

10 如本文所用，下列术语应当具有下列定义：

“低级烷基”是指含有 1-6 个、优选 1-4 个碳原子的直链或支链饱和脂族烃。典型的低级烷基包括甲基，乙基，丙基，异丙基，丁基，叔丁基，2-丁基，戊基和己基。如本文所用实例名为 C₁₋₄ 烷基是指含有 1-4 个碳原子的低级烷基。

15 如在取代的烷基中的“取代的”是指取代可以在一个或多个位置发生，除非另外指出，每个取代基位点的取代基独立地选自特定选项。

“芳基”是指芳族碳环基团，例如 6-10 元芳族或部分芳族环系统。优选的芳族基团包括但不限于苯基，萘基，甲苯基和二甲苯基。

20 “杂芳基”是指含有可达两个环的芳族杂环系统。优选的杂芳族基团包括但不限于噻吩基，呋喃基，吡咯基，吡咯基，吡啶基，吡啶基，吡嗪基，噁唑基，噻唑基 (thiazolyl)，喹啉基，嘧啶基，咪唑和四唑基。

“杂环”或“杂环基”是指饱和或部分未饱和的芳族一价环状基团，其含有 1-3 个选自下组的杂原子：氮，氧或硫或其组合。优选杂环的实例是哌啶基，哌嗪基，吡咯烷基，和吗啉基。

25 “环烷基”是指含有 3-8 个原子的非芳族部分或完全饱和的环状芳烃。环烷基的实例包括环丙基，环戊基和环己基。

“卤素”是指氟，氯，溴或碘，优选氯。

“杂原子”是指选自 N，O 和 S 的原子，优选 N。

30 “甲硅烷基保护基”是指作为羟基官能团的保护基的甲硅烷基醚。通过与有机硅试剂反应制备甲硅烷基醚。它们容易在温和条件下形成和裂

解，并且它们的相对稳定性可以通过简单地改变硅上的取代基来细调。甲基烷基保护基的实例包括三甲基甲硅烷基，三乙基甲硅烷基，三异丙基甲硅烷基，叔丁基二甲基甲硅烷基和叔丁基二苯基甲硅烷基。

“有效量”是指有效预防、减轻或改善疾病症状或延长被治疗的受试者存活5 的量。

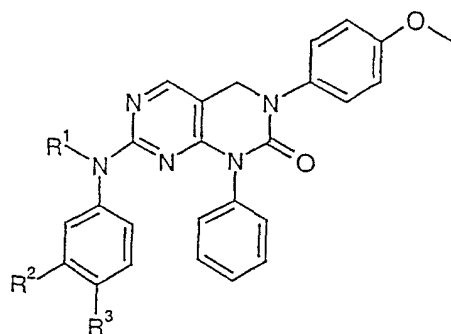
“IC₅₀”是指抑制 50%特定测量的活性所需的按照本发明的具体化合物的浓度。尤其可以如下文实施例 22 中描述测量 IC₅₀。

“药用盐”是指保留式 I 的化合物的生物效能和性能并且由适当非毒性有机或无机酸或有机或无机碱形成的常规酸加成盐或碱加成盐。酸加成盐实例包括衍生于无机酸如盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、氨基磺酸、磷酸和硝酸的那些，和衍生于有机酸如对甲苯磺酸、水杨酸、甲磺酸、草酸、琥珀酸、柠檬酸、苹果酸、乳酸、富马酸等的那些。碱加成盐实例包括衍生于铵、钾、钠和氢氧化季铵如例如氢氧化四甲铵的那些。将药物化合物（即药物）的化学修饰成盐是药物化学家公知的获得化合物改善的物理和化学稳定性、吸湿性、流动性和溶解度的技术。参见例如 H. Ansel 等，15 Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (6th Ed. 1995)，第 196 页和第 1456-1457 页。

“药用的”如药用载体，赋形剂等，是指对于向其施用特定化合物，对于受试者在药理学上可接受的和基本上非毒性的。

20 “治疗有效量”是指至少一种式 I 的化合物或其药用盐或酯的量，其显著抑制人肿瘤细胞增殖和/或防止人肿瘤细胞分化，所述人肿瘤细胞包括人肿瘤细胞系。

在一个实施方案中，本发明涉及下式化合物或其药用盐，



I,

其中

R^1 选自

-H,

-COR⁴, 和

5 -COOCHR⁵OCOR⁴;

R^2 和 R^3 独立地选自

-H, 和

-OR⁵;

R^4 选自

10 -C₁₋₆ 烷基,

-被 1-4 个独立地选自下组的基团取代的 C₁₋₆ 烷基

-NR⁵R⁶,

-SR⁵,

-OR⁵,

15 -苯基,

-被 1-2 个独立地选自-OR⁵和 C₁₋₄ 烷基的基团取代的苯基, 和

-噻吩基, -呋喃基, -吡啶基, -吡咯基, -吡嗪基, -噁唑基, -噻

唑基, 喹啉基, 嘧啶基, 咪唑基和四唑基, 和

- 哌啶基, 哌嗪基, 吡咯烷基, 和吗啉基;

20 R^5 和 R^6 独立地选自

-H, 和

-C₁₋₅ 烷基,

或备选地, -NR⁵R⁶ 可以形成含有 3-7 个原子的环, 所述环任选地包括一个或多个另外的 N 或 O 原子。

25 在优选实施方案中, 本发明涉及其中 R^1 是-COR⁴的式 I 的化合物。

特别优选式 I 的化合物, 其中权利要求 3 的式 I 的化合物, 其中 R^1 是-COR⁴ 并且 R^4 是 C₁₋₆ 烷基。

这些化合物的实例如下:

30 N-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-N-苯基乙酰胺;

N-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基丙酰胺;

N-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基戊酰胺; 和

5 *N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基丁酰胺。

还优选式 I 的化合物, 其中 R^1 是 $-COR^4$ 和 R^4 是被 $-NR^5R^6$ 取代的 $-C_{1-6}$ 烷基, 或被 $-NR^5R^6$ 和另一个选自下组的基团取代的 $-C_{1-6}$ 烷基:

- 10 $-NR^5R^6$,
 $-SR^5$,
 $-OR^5$,
-苯基,
-被 1-2 个独立地选自 $-OR^5$ 和 C_{1-4} 烷基的基团取代的苯基, 和
-噻吩基, -呋喃基, -吡咯基, -吡啶基, -吡嗪基, -噁唑基, -噻唑
15 基, 喹啉基, 嘧啶基, 咪唑和四唑基;
和 R^5 和 R^6 独立地选自 $-H$ 和 $-C_{1-5}$ 烷基。

下列各项是这些化合物的实例:

- (2*S*)-2-氨基-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-4-甲硫基-*N*-苯基丁酰胺;
20 (2*S*)-2-氨基-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-3-苯基-*N*-苯基丙酰胺;
(2*S*)-2-氨基-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-4-甲基-*N*-苯基戊酰胺乙酸盐; 和
(2*S*)-2-氨基-3-吡啶基-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢
25 嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基丙酰胺盐酸盐。

这些化合物另外的实例有:

- 2-氨基-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基乙酰胺乙酸盐;
2-氨基-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶
30 -7-基)]-*N*-苯基乙酰胺盐酸盐;

(2S)-2-氨基-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-4-甲硫基-*N*-苯基丁酰胺乙酸盐;

(2S)-2-氨基-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-4-甲硫基-*N*-苯基丁酰胺盐酸盐;

5 (2S)-2-氨基-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-3-苯基-*N*-苯基丙酰胺盐酸盐;

(2S)-2-氨基-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-4-甲基-*N*-苯基戊酰胺盐酸盐;

10 (2S)-2-氨基-3-(4-羟基苯基)-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基丙酰胺盐酸盐;

(2S)-2,6-二氨基-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基己酰胺二盐酸盐;

(2S)-2-氨基-3-羟基-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基丙酰胺;

15 (2R)-2-氨基-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-4-甲硫基-*N*-苯基丁酰胺盐酸盐;

N-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基戊酰胺; 和

20 *N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基丁酰胺。

更优选式 I 的化合物, 其中 R^1 是-COR⁴, R^3 是-OR⁵ 和 R^5 是-H 或-C₁₋₅ 烷基。

下列化合物是其实例:

25 *N*-(4-羟基苯基)-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]乙酰胺; 和

N-(4-甲氧苯基)-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]乙酰胺。

在更优选的实施方案中, 本发明涉及式 I 的化合物, 其中 R^1 是-COOCHR⁵OCOR⁴。

30 这些化合物的实例如下:

{N-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-N-苯基氨基甲酰基氧基}甲基乙酸酯;

{N-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-N-苯基氨基甲酰基氧基}甲基 2-(二甲基氨基)乙酸酯;

5 {N-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-N-苯基氨基甲酰基氧基}甲基 2-(二甲基氨基)乙酸酯盐酸盐; 和

{N-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-N-苯基氨基甲酰基氧基}甲基哌啶-4-羧酸酯三氟乙酸盐。

在另一个优选实施方案中, 本发明涉及式 I 的化合物, 其中 R^1 是 H。

10 下列化合物是其实例:

3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-7-(苯基氨基)-1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮;

3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-7-(苯基氨基)-1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮
甲磺酸盐;

15 7-[(4-羟基苯基)氨基]-3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮; 和

3-(4-甲氧苯基)-7-[(4-甲氧苯基)氨基]-1-苯基-1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮。

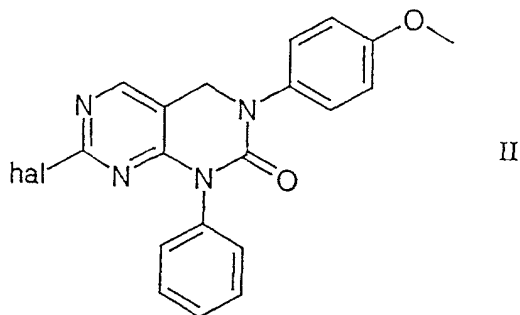
在式 I 的化合物的另一个优选实施方案中, R^2 是 H。

在式 I 的化合物的另一个优选实施方案中, R^2 和 R^3 是 H。

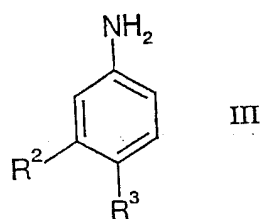
20 本发明的化合物对于 FGF 和 KDR 激酶是选择性的。这些化合物用于治疗或控制癌症, 特别是治疗或控制实体瘤, 特别是乳腺癌, 肺癌和前列腺瘤。这些化合物是可溶的和因此具有有利的生物利用度曲线 (profile) 如改善的口服生物利用度。

通过一种方法可以制备本发明式 I 的化合物, 该方法包含

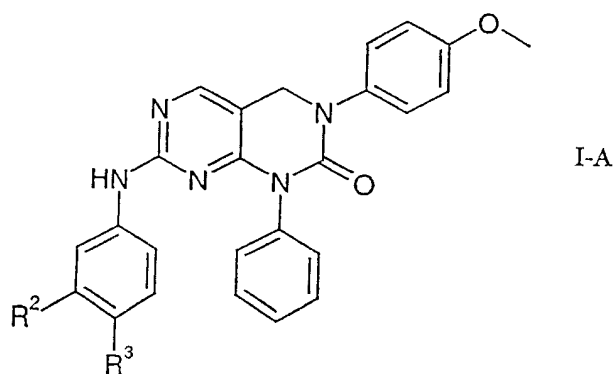
25 a) 将式 II 的化合物



其中 hal 是氯, 溴或碘,
与式 III 的苯胺衍生物反应,

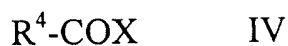


其中 R^2 和 R^3 是 H 或 $-OR^{5'}$, 其中 $R^{5'}$ 是 H, C_{1-5} 烷基或甲硅烷基保护基,
以获得下式化合物,

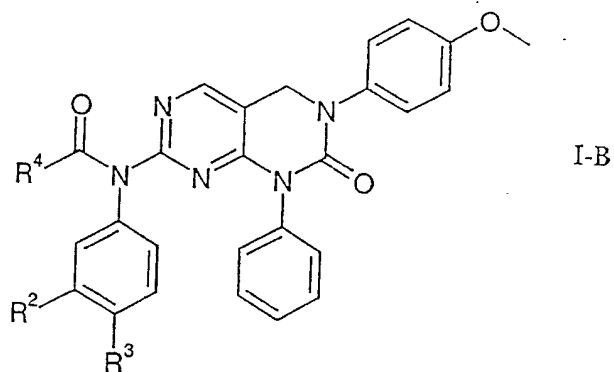


和/或

b) 将式 I-A 的化合物与式 IV 的酰基卤或酐反应

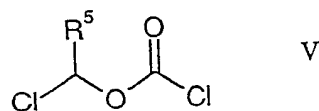


其中 X 是卤素或 $-OCOR^4$, 和 R^4 如上所定义,
以获得下式化合物,

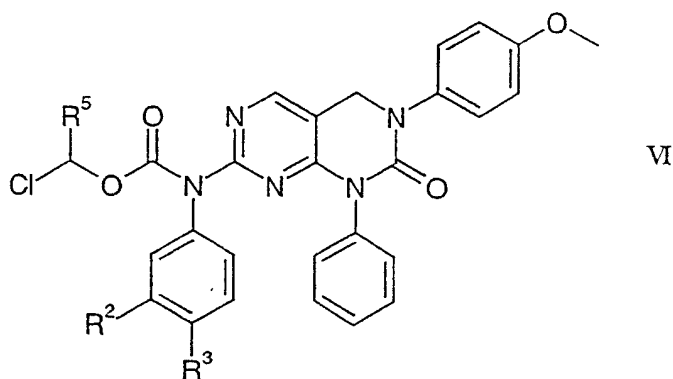


或备选地,

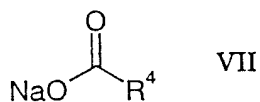
c) 将式 I-A 的化合物与式 V 的氯甲酸酯反应



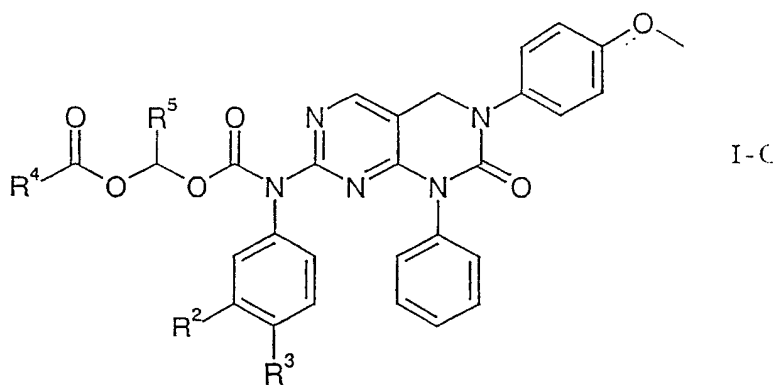
其中 R⁵ 如上所定义, 以获得式 VI 的化合物,



其然后与式 VII 的钠盐反应



以获得下式的化合物



和 d) 如果需要, 将式 I-A, I-B 或 I-C 的化合物转化为药用盐。

本发明还涉及下列用于合成式 I 的化合物的新中间体:

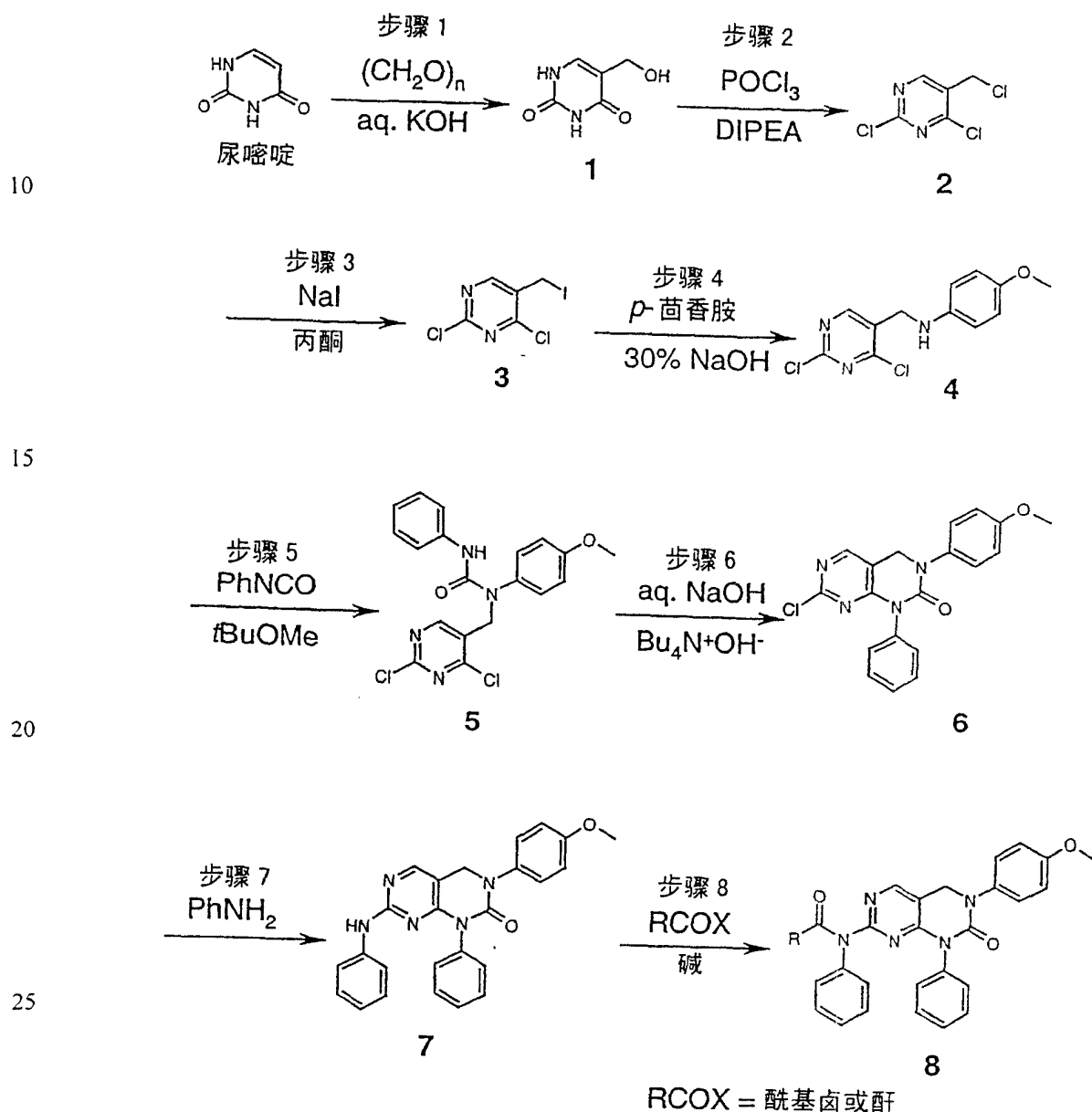
(氯代甲氧基)-N-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-N-苯甲酰胺 [实施例 4a]

3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-7-{[4-(1,1,2,2-四甲基-1-硅杂丙氧基)苯基]氨

基}-1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮 [实施例 19c], 和

N-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-*N*-[4-(1,1,2,2-四甲基-1-硅杂丙氧基)苯基]乙酰胺 [实施例 19d]。

本发明的化合物可以通过任何常规方法制备。合成这些化合物的适当方法在实施例 5 中提供。通常, 式 I 的化合物可以按照以下描述的合成路线制备。



其中 $\text{R}^1 = -\text{COOCHR}^5\text{OCOR}^4$ 的式 I 的化合物的合成在本领域公知并且在 J. Alexander, R. Cargill, S. R. Michelson, H. Schwam *J. Med. Chem.* **1988**, 31, 318-322 中记录。

在备选的实施方案中，本发明涉及包含至少一种式 I 的化合物或其药用盐或酯的药物组合物。

这些药物组合物可以例如以片剂、包衣片剂、糖锭剂、硬或软明胶胶囊、溶液剂、乳剂或者混悬剂的形式口服给药。它们还可以例如以栓剂形式直肠给药，或例如以注射液形式肠胃外给药。

包含式 I 的化合物和/或其盐的本发明药物组合物可以以本领域已知的方式，例如通过常规混合、包封、溶解、造粒、乳化、截留 (entrapping)，制糖锭或冻干方法制备。这些药物制剂可以用在治疗学上惰性的无机或有机载体配制。乳糖，玉米淀粉或其衍生物，滑石，硬脂酸或其盐可以用作这些用于片剂、包衣片剂、糖锭剂和硬明胶胶囊的载体。软明胶胶囊的适当载体包括植物油，蜡和脂肪。取决于活性物质的性质，在软明胶胶囊的情形中通常不需要载体。用于制备溶液剂和糖浆剂的适当载体是水、多元醇、糖类、转化糖和葡萄糖。注射液的适当载体是水，醇，多元醇，甘油，植物油，磷脂和表面活性剂。栓剂的适当载体是天然或者硬化油、蜡、脂肪和半液体多元醇。

该药物制剂还可以含有防腐剂、增溶剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、甜味剂、着色剂、调味剂、改变渗透压的盐、缓冲剂、掩蔽剂或者抗氧化剂。它们也可以含有其它在治疗上有价值的物质，包括除了式 I 的那些的另外的活性成分。

如上所述，本发明的化合物，包括式 I 的化合物，用于治疗或控制细胞增殖疾病，特别是肿瘤疾病。这些化合物和含有所述化合物的制剂特别有效用于治疗或控制实体瘤，如例如，乳腺癌，结肠瘤，肺癌和前列腺瘤。因此，本发明另外涉及通过向需要该治疗的患者施用有效量的式 I 的化合物和/或其盐来治疗这些实体瘤的方法。

按照本发明的化合物的治疗有效量是指有效预防、减轻或改善疾病症状或延长被治疗的受试者的存活的化合物的量。治疗有效量的测定在本领域技术范围内。

按照本发明的化合物的治疗有效量或剂量可以在广泛范围内变化并且可以以本领域已知的方法测定。该剂量可以根据每个具体病例中的个别需要而调整，包括被施用的具体化合物，给药途径，治疗的疾病，以及被治

疗的患者。通常，在向重量约 70 kg 的成年人口服或肠胃外给药的情形中，约 10 mg 至约 10,000 mg，优选约 200 mg 至约 1,000 mg 的日剂量应当是适当的，尽管当指示时可以超过上限。日剂量可以作为单剂量或分剂量施用，或者对于肠胃外给药，它可以作为连续输注施用。

5

实施例

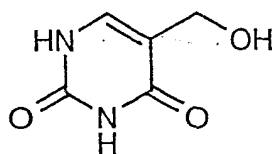
下列实施例举例说明了合成本发明的化合物和制剂的优选方法。

实施例 1

实施例 1a

10

5-(羟基甲基)-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮

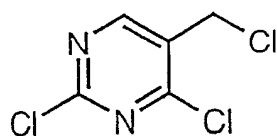


15 在装备有机械搅拌器、温度计、冷凝器和氮-入口鼓泡器的 2-L 三颈烧瓶中装入尿嘧啶 (185.0 g, 1650 mmol) (Aldrich), 低聚甲醛 (61.50 g, 作为
甲醛 2050 mmol) (Aldrich), 和氢氧化钾 (86.9%, 59.95 g, 928.5 mmol) (Aldrich)水溶液(1.445 L)。将混合物在 50-52℃下搅拌 68 小时。TLC 分析
显示完全反应。在 60℃/14 mmHg 下浓缩至约 500 mL 的体积后,用丙酮(500
20 mL)稀释残渣。通过过滤收集产生的沉淀,用丙酮洗涤,通过抽吸干燥,
然后在 50℃/25 mmHg 抽吸以提供粗制 5-(羟基甲基)-1,3-二氢嘧啶-2,4-二
酮(250 g), 其为白色固体。将合并的母液和洗液浓缩至约 100 mL 的体积,
加入盐酸羟胺(27.52 g, 396.0 mmol, Aldrich)在水(100 mL)中的溶液。通过过
滤收集产生的沉淀,用丙酮洗涤,然后通过抽吸干燥以提供第二次收获的
25 粗制 5-(羟基甲基)-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮(34 g), 其为白色固体。将两批合
并(244 g, 4%过夜)并且直接用于下一个步骤。

实施例 1b

2,4-二氯-5-(氯甲基)嘧啶

30

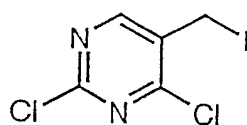


5 在装备有机械搅拌器、添加漏斗、温度计和氮-入口鼓泡器的 1-L 三颈烧瓶中装入粗制 5-(羟基甲基)-1,3-二氢嘧啶-2,4-二酮(50.25 g, 约 340 mmol) (来自以上实施例 1a), 磷酸氯(164.8 mL, 1768 mmol) (Aldrich), 和甲苯 (100 mL)。在 10 分钟内向该混合物中加入 *N,N*-二异丙基乙胺(184.7 mL, 1060 mmol) (Aldrich), 同时使用水浴保持混合物的温度低于 70°C。在加入
10 完成后, 去除冷却浴并将混合物加热至回流 (113-116°C) 1 小时。通过蒸馏去除一些甲苯 (约 35 mL) 以将反应混合物的温度提高至 120°C, 在 120-123°C 下搅拌混合物 5 小时。TLC 分析显示反应完成。在使混合物冷却至室温过夜后, 在 67 分钟内将混合物小心加至搅拌的水 (200 mL) 和乙酸异丙酯 (150 mL) 的两相混合物中, 同时使用冰水冷却保持温度为
15 17-21°C, 用甲苯(4 x 150 mL)萃取混合物。干燥合并的有机层 (硫酸钠), 过滤, 然后减压浓缩至干燥, 以提供粗制的作为白色固体的 2,4-二氯-5-(氯甲基)嘧啶, 其含有极性杂质。(产率 56.1 g, 从尿嘧啶的 83.6%的产率)。

将粗制 2,4-二氯-5-(氯甲基)嘧啶(70.39 g)溶解在二氯甲烷(80 mL)中, 将获得的溶液过滤通过 TLC 级别的硅胶垫(100 g)。然后用二氯甲烷:己烷
20 (1 L, 7: 3)洗涤硅胶, 将合并的滤液和洗液减压浓缩至干燥, 提供作为白色固体的 2,4-二氯-5-(氯甲基)嘧啶。(产率 58.77 g, 83.5%的回收率, 从尿嘧啶的 69.8%的总产率)。该化合物是高度腐蚀性的。

实施例 1 c

25 2,4-二氯-5-(碘甲基)嘧啶

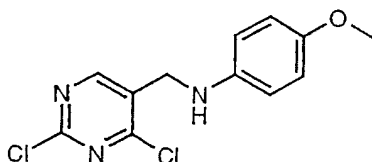


30 在装备有磁力搅拌器、冷凝器和氮-入口鼓泡器的 500-mL 圆底烧瓶中

装入碘化钠(38.5 g, 256.9 mmol) (Aldrich)和丙酮(300 mL)。在获得澄清溶液后，一份加入 2,4-二氯-5-(氯甲基)嘧啶(50.0 g, 253.2 mmol) (来自以上实施例 1b)。在室温下搅拌 20 分钟后，加热混合物至回流 15 分钟。NMR 分析显示 98%的转化。在冷却至室温后，将获得的沉淀(氯化钠)通过半烧结的玻璃漏斗过滤去除和用丙酮洗涤。将合并的滤液和洗液浓缩至约 75 g 的重量。将获得的 2,4-二氯-5-(碘甲基)嘧啶在丙酮中的浓缩液用甲苯(20 mL)稀释。在浓缩至约 85 g 的重量以便去除残余的丙酮后，将该浓缩的 2,4-二氯-5-(碘甲基)嘧啶甲苯溶液直接用于下一个步骤。

实施例 1d

[(2,4-二氯嘧啶-5-基)甲基](4-甲氧苯基)胺

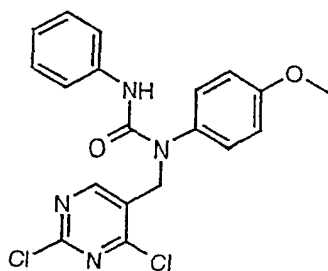


在装备有磁力搅拌器、温度计和氮-入口鼓泡器的 500-mL 三颈烧瓶中装入来自先前步骤的 2,4-二氯-5-(碘甲基)嘧啶(85 g, 约 253.2 mmol) (来自以上实施例 1c) 在甲苯(13.7 mL)中的溶液和甲苯(96.3 mL, 因此总共大约 110 mL 甲苯)。在用冰水浴冷却后，加入对甲氧基苯胺(31.18 g, 253.2 mmol) (Aldrich)。在搅拌 30 分钟后，在 8 分钟内滴加氢氧化钠(13.54 g, 331.7 mmol) 水溶液(50 mL)，同时保持反应混合物的温度为 10-15°C。加入己烷(55 mL)，在 10-15°C 下搅拌混合物 45 分钟，然后在室温下 22 小时以提供淤浆。上清液的 TLC 分析显示完全反应。用水(100 mL)稀释淤浆并通过过滤收集固体，用冷水和冷(-50°C)甲醇(100 mL)洗涤，通过抽吸干燥以提供[(2,4-二氯嘧啶-5-基)甲基](4-甲氧苯基)胺，其为灰白色固体；通过 HPLC 分析纯度为 97%。(产率 59.87 g, 83.2%)。

实施例 1e

N-[(2,4-二氯嘧啶-5-基)甲基]-*N*-(4-甲氧苯基)-苯基氨基-甲酰胺

5



10

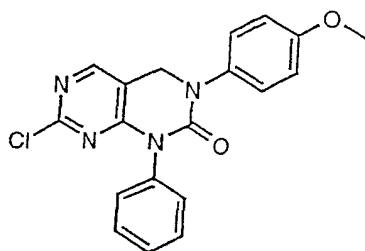
在装备有机械搅拌器、温度计、冷凝器和氮-入口鼓泡器的 500-mL 三颈烧瓶中装入[(2,4-二氯嘧啶-5-基)甲基](4-甲氧苯基)胺(59.6 g, 209.7 mmol) (来自以上实施例 1d) 和叔丁基甲基醚(300 mL) (Aldrich)。在加热至 55 °C 提供澄清溶液后, 加入异氰酸苯酯(27.48 g, 230.7 mmol) (Aldrich) 并将混合物加热至回流 10 小时。TLC 分析显示基本上完全反应。在冷却至室温后, 通过过滤收集产生的固体, 用叔丁基甲基醚(100 mL)洗涤, 通过抽吸干燥以提供作为白色固体的 *N*-[(2,4-二氯嘧啶-5-基)甲基]-*N*-(4-甲氧苯基)(苯基氨基)甲酰胺; 通过 HPLC 分析 98.46% 的纯度。(产率 78.8 g, 91.3%)。

15

实施例 1f

7-氯-3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮

20



25

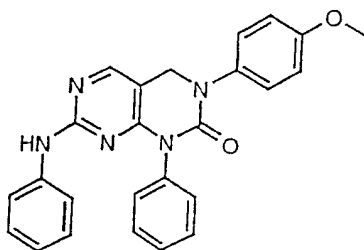
在装备有磁力搅拌器、温度计和氮-入口鼓泡器的 500-mL 三颈烧瓶中装入 *N*-[(2,4-二氯嘧啶-5-基)甲基]-*N*-(4-甲氧苯基)(苯基氨基)甲酰胺(78.8 g, 195.4 mmol) (来自以上实施例 1e) 和二氯甲烷(120 mL)。在用冷水浴冷却至 16°C 后, 加入氢氧化钠(14.04 g, 343.9 mmol)水溶液(28 mL)和 40% 的氢氧四丁基铵水溶液(1.0 mL, 3.8 mmol) (Aldrich)。在 20-24°C 搅拌 2 小时后, 加入另一份 40% 的氢氧四丁基铵水溶液(0.75 mL, 2.9 mmol)。在搅拌 1 小

30

时后，加入第三份 40%的氢氧四丁基铵水溶液(0.75 mL, 2.9 mmol)，在室温下搅拌混合物 2.3 小时。TLC 分析显示基本上反应完成。然后用浓盐酸(15 mL)和水(80 mL)的混合物淬灭反应。分离有机层，用水(90 mL)洗涤，通过硫酸钠干燥，在减压下浓缩至大约 140 g 的重量。将该残渣溶解在甲
5 苯(90 mL)中，在减压下将溶液浓缩至 100 g 的重量。将获得的 7-氯-3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮的浓甲苯溶液直接用于下一个步骤。

实施例 1g

10 3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-7-(苯基氨基)-1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮



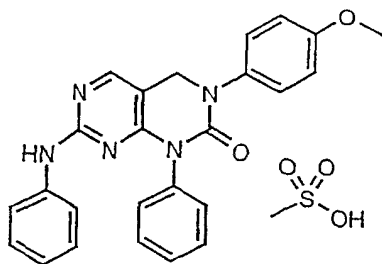
15

在装备有机械搅拌器、冷凝器和氮-入口鼓泡器的 500-mL 三颈烧瓶中装入来自先前步骤的 7-氯-3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮(约 50 g, 大约 97.7 mmol)(来自以上实施例 1f)在甲苯溶液中的溶液, (70 mL), 苯胺 (22.75 g, 244.3 mmol) (Fluka), 和盐酸苯胺(0.2 g, 1.54 mmol) (Aldrich)。将混合物在回流下 (111-113°C) 加热 2 小时以提供淤浆。TLC 分析显示反应完成。在冷却至大约 80°C 后, 加入水(50 mL), 接着加入己烷(90 mL)。在 30 分钟内允许获得的混悬液冷却至室温以后, 通过过滤收集固体, 用水(100 mL)和甲醇(2 x 45 mL)洗涤, 并通过抽吸干
20 燥以提供粗制 3-(4-甲氧基-苯基)-1-苯基-7-(苯基氨基)-1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮, 其为淡黄色固体; 通过 HPLC 分析 98.9% 的纯度。(产率 40.5 g, 98%)。将该物质溶解在热乙酸(50 mL)(约 100°C)中。在冷却至约 70°C 后, 在几分钟内加入甲醇(125 mL)。将获得的淤浆冷却至 45°C, 通过过滤收集固体, 用甲醇(50 mL)洗涤, 通过抽吸干燥以提供 3-(4-甲氧苯
25 基)-1-苯基-7-(苯基氨基)-1,3,4-三氢-嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮, 其为白色固
30

体; 通过 HPLC 分析 99.49% 的纯度。(产率 38.2 g, 从 *N*-[(2,4-二氯嘧啶-5-基)甲基]-*N*-(4-甲氧苯基)(苯基氨基)甲酰胺的 92.3% 总产率)。

实施例 1h

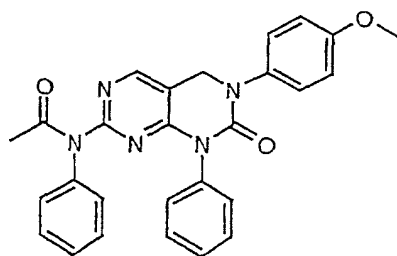
3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-7-(苯基氨基)-1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮甲磺酸盐



将 3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-7-(苯基氨基)-1,3,4-三氢-嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮(7.50 g, 17.71 mmol) (来自以上实施例 1g) 溶解在热 1,4-二噁烷(120 mL)中, 将溶液过滤通过玻璃滤器。在室温下向澄清的滤液中滴加甲磺酸溶液(10 mL), 然后将混合物在-15℃下静置过夜。收集形成的晶体物质, 用 1,4-二噁烷、甲醇和乙醚洗涤, 在 85℃下真空干燥过夜以产生 3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-7-(苯基氨基)-1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮甲磺酸盐, 其为无色晶体。mp. 245-251℃。(产率 5.5 g, 59.8%)。

实施例 2

N-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基乙酰胺



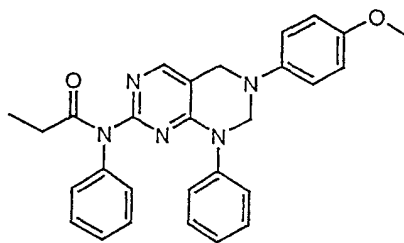
在装备有磁力搅拌器、温度计、冷凝器和氮-入口鼓泡器的 250-mL 三颈烧瓶中装入 3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-7-(苯基氨基)-1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮(37.90 g, 89.50 mmol) (来自以上实施例 1g), 乙酸酐(45.3 mL, 481.5 mmol) (J. T. Baker)和 *N,N*-二异丙基乙胺(22.76 mL, 130.7 mmol) (Aldrich)。将混合物在回流下 (123-127°C) 加热 2 小时。TLC 分析显示基本上反应完成。在 60°C/18 mmHg 下去除挥发物以提供固体残渣 (大约 69 g), 其在 67-70°C 下溶解在丙酮(45 mL)中。向获得的溶液中缓慢加入己烷(50 mL), 同时保持混合物的温度稍微高于 54°C, 加入 *N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基乙酰胺(大约 5 mg) 的晶种。将获得的淤浆进一步用己烷(50 mL)稀释, 同时保持混合物的温度为约 53°C。在冷却至室温后, 通过过滤收集固体, 用丙酮-己烷(1: 2, 3 X 40 mL)洗涤, 通过抽吸简短干燥以提供粗制产物 (产率 55 g)。将该物质悬浮在己烷(200 mL)中并将获得的淤浆加热至回流 (68-70°C) 20 分钟。在冷却至室温后, 通过过滤收集固体, 用己烷(100 mL)洗涤, 通过抽吸提供 *N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基乙酰胺, 其为灰白色固体; 通过 HPLC 98.5%的纯度, 含有 1.07% 3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-7-(苯基氨基)-1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮。(产率 39.4 g, 94.6%)。

20

实施例 3

N-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基丙酰胺

25



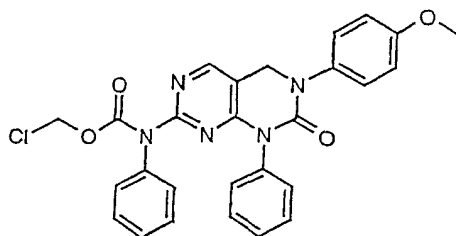
30

向 3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-7-(苯基氨基)-1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮(304.0 mg, 0.718 mmol) (来自以上实施例 1g) 在吡啶(5 mL) (Fisher)

中的溶液加入丙酸酐(1.0 mL, 7.8 mmol) (Aldrich)和 4-二甲基氨基吡啶(45.0 mg, 0.37 mmol) (Aldrich)。将混合物在回流下加热 1.5 小时并冷却至室温。将它倒入冰(15 g)中并搅拌 5 分钟。用乙酸乙酯(15 mL)萃取混合物。用水, 5%盐酸水溶液, 和水洗涤有机层, 干燥(Na_2SO_4), 过滤并减压浓缩至干燥。将残渣溶解在二氯甲烷中并过滤通过 TLC 级别的硅胶, 用乙酸乙酯-己烷(V/V 1: 1)和乙酸乙酯洗涤。将滤液在减压下浓缩至干燥。将残渣溶解在乙醚中并用己烷缓慢稀释。然后在减压下去除乙醚。通过过滤收集固体, 用己烷洗涤和通过抽吸干燥。将固体溶解在热乙酸异丙酯(2 mL)中, 用己烷稀释至浑浊。允许它在冷藏箱中冷却 4 天。将获得的混悬液减压浓缩至干燥以提供 *N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基丙酰胺, 其为白色固体。(产率 270 mg, 78.4%)。

实施例 4a

(氯代甲氧基)-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢-嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-*N*-苯甲酰胺

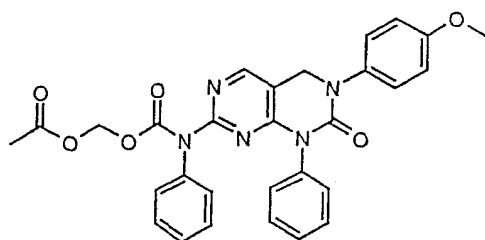


在 0°C 下向 3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-7-(苯基氨基)-1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮(3.5 g, 8.26 mmol) (来自以上实施例 1g) 和 *N,N*-二异丙基乙胺(8.63 mL, 49.6 mmol) (Aldrich)在二氯甲烷(50 mL)中的溶液滴加新鲜氯甲酸氯甲酯 (2.55 mL, 28.9 mmol) (Lancaster)。将反应混合物在室温下搅拌 18 小时。用二氯甲烷稀释混合物并用水和盐水洗涤, 干燥 (MgSO_4), 过滤并减压浓缩。通过快速色谱法(Biotage)纯化残渣, 用二氯甲烷中的 5% 乙醚洗涤以提供粗制(氯代甲氧基)-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-*N*-苯甲酰胺, 其含有痕量 3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-7-(苯基氨基)-1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮和其它杂质。该物质

不进一步纯化而立即使用。(产率 3.28 g, 77%)。

实施例 4b

{*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基氨基甲酰基氧基}甲基乙酸酯



10

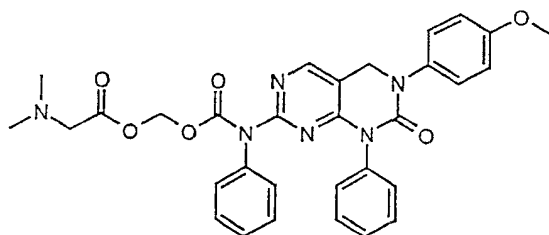
向(氯代甲氧基)-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-*N*-苯甲酰胺(3.23 g, 6.32 mmol) (来自以上实施例 4a) 在二甲基甲酰胺(60 mL)中的溶液中加入无水乙酸钠(5.18 g, 63.2 mmol) (Aldrich)和硫酸氢四丁基铵(3.22 g, 9.48 mmol) (Aldrich)。在室温下搅拌混合物 18 小时, 然后用水稀释和用乙酸乙酯-乙醚(3X, 1: 1)萃取。用水和盐水洗涤合并的有机相, 干燥 (MgSO₄), 过滤和减压浓缩。通过快速色谱法(Biotage)纯化残渣, 用乙酸乙酯-己烷(1 : 1 和 3: 2)洗脱以提供{*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基氨基甲酰基氧基}甲基乙酸酯, 其为白色泡沫。(产率 3.20 g, 93.8%)。

20

实施例 5a

{*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基氨基甲酰基氧基}甲基 2-(二甲基氨基)乙酸酯

25



30

在氮气下向(氯代甲氧基)-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-*d*]嘧啶-7-基)]-*N*-苯甲酰胺(300 mg, 0.58 mmol) (来自以上实施例 4a) 在无水四氢呋喃(15 mL)中的溶液中加入 *N,N*-二甲基甘氨酸钠盐 (300 mg, 2.1 mmol, 通过用等当量的氢氧化钠处理酸(Aldrich)制备钠盐),
 5 接着用硫酸氢四丁基铵(329 mg, 0.87 mmol) (Aldrich)处理。反应混合物在室温下搅拌 72 小时。过滤混合物和通过快速色谱法(Biotage, 40 S 柱)纯化固体, 含有 0.1%三乙胺的二氯甲烷中的 16%甲醇作为溶剂, 然后相同溶剂系统中的 30%甲醇。含有产品的合并级分从甲醇-二氯甲烷-己烷中重结晶以提供{*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-*d*]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基氨基甲酰基氧基}甲基 2-(二甲基氨基)乙酸酯。(产率 166 mg, 49%)。

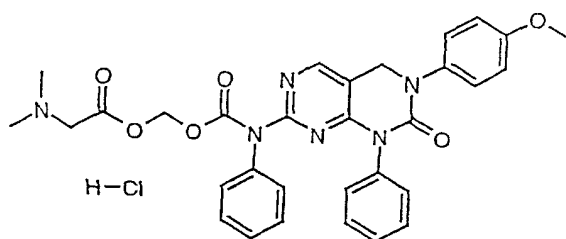
(M. p.: 172°C; MS HR-ES[M+H]⁺-583.2306 (实验值) 583.2300 (理论值))。

15

实施例 5b

{*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-*d*]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基氨基甲酰基氧基}甲基 2-(二甲基氨基)乙酸酯盐酸盐

20



25

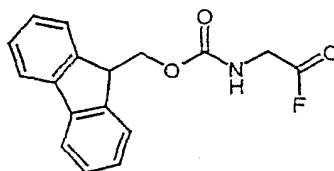
将{*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-*d*]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基氨基甲酰基氧基}甲基 2-(二甲基氨基)乙酸酯(144 mg, 0.247 mmol) (来自以上实施例 5a) 溶解在四氢呋喃(3 mL)、乙腈(2mL)和水 (15 滴) 的混合物中。将其冷却至 0°C。加入含水 1N 盐酸(272 μL, 0.27 mmol) 并将反应在室温下搅拌 4 小时。用水(10 mL)稀释混合物并在减压下去除有机溶剂。将水溶液冻干以提供{*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-*d*]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基-氨基甲酰基氧基}甲基 2-(二甲基氨基)乙
 30

酸酯盐酸盐，其为白色固体。

实施例 6a

FMOC-甘氨酸酰氟

5

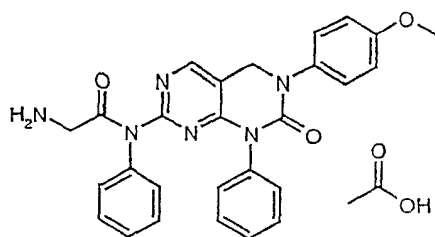


10 将FMOC-甘氨酸(5.02 g, 16.82 mmol) (Bachem)溶解在二氯甲烷(85 mL)中。在室温下依次加入吡啶(1.36 mL, 16.82 mmol) (Aldrich)和氰尿酸氟(2.27 g, 16.82 mmol) (Aldrich), 搅拌混合物过夜。加入冰冷水(100 mL)和过滤获得的淤浆。将滤液倒入分液漏斗和分层。通过无水硫酸钠干燥有机层, 过滤, 和减压浓缩以提供 FMOC-甘氨酸酰氟, 其为白色粉末。(产率 3.67 g, 15 73%)。

实施例 6b

2-氨基-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-*d*]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基乙酰胺乙酸盐

20



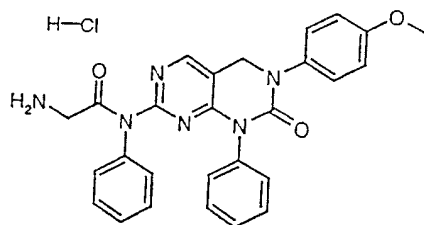
25

将 3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-7-(苯基氨基)-1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-*d*]嘧啶-2-酮(150 mg, 0.35 mmol) (来自以上实施例 1g) 溶解在乙腈(2 mL)中。在室温下加入 FMOC-甘氨酸酰氟(265 mg, 0.89 mmol) (来自以上实施例 6a), 在微波装置(Smith SynthesizerTM)中将混合物加热至 120°C 30 分钟。将溶液过滤通过活化的碱性氧化铝塞(Alfa Aesar)和用乙酸乙酯洗涤氧化铝。将 30

溶液在减压下浓缩和将残渣溶解在乙腈-哌啶(Aldrich) (10: 1)的混合物中。在室温下 10 分钟后, 浓缩混合物和用乙醚-己烷(1: 1)研磨残渣。通过过滤收集沉淀和在真空下 45℃干燥。将粗产物通过反相 HPLC (水-乙腈梯度, 溶剂中含有 0.1%乙酸) 纯化以提供 2-氨基-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-*d*]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基乙酰胺乙酸盐。(产率 63 mg, 34%)。

实施例 6c

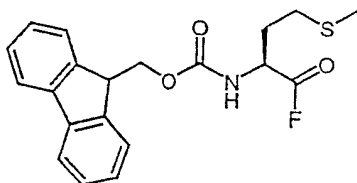
2-氨基-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-*d*]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基乙酰胺盐酸盐



将 2-氨基-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-*d*]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基乙酰胺乙酸盐(126 mg, 0.24 mmol) (来自以上实施例 6b) 溶解在二噁烷(4 mL) (Aldrich)中的 4N 盐酸中。将该溶液保持在室温下 15 分钟, 然后浓缩至干燥。用乙醚研磨残渣, 通过抽吸过滤收集固体以提供 2-氨基-*N*-[3-(4-甲氧基-苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-*d*]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基乙酰胺盐酸盐。(产率 124 mg, 100%)。

实施例 7a

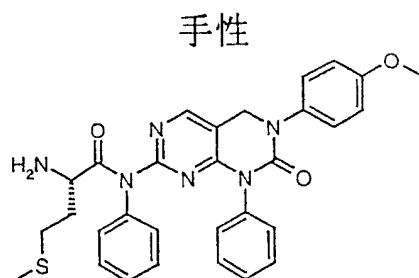
FMOC-L-甲硫氨酰氟



将 Fmoc-L-甲硫氨酰氟(5.00 g, 13.46 mmol) (Bachem)溶解在二氯甲烷(70 mL)中。在室温下依次加入吡啶 (1.09 mL, 13.46 mmol) (Aldrich)和氰尿酸氟(1.82 g, 13.46 mmol) (Aldrich), 搅拌混合物过夜。加入冰冷水(100 mL)并过滤获得的淤浆。将滤液倒入分液漏斗中并分离层。通过无水硫酸钠干燥有机层, 过滤, 和在减压下浓缩以提供 Fmoc-L-甲硫氨酰氟, 其为白色粉末。(产率 3.7 g., 74%)。

实施例 7b

(2S)-2-氨基-N-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢-嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-4-甲硫基-N-苯基丁酰胺



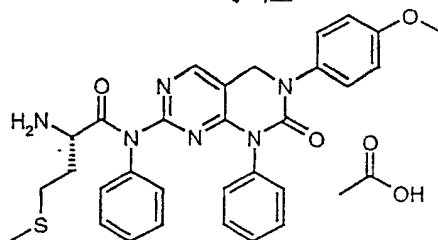
将 3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-7-(苯基氨基)-1,3,4-三氢-嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮(150 mg, 0.35 mmol) (来自以上实施例 1g) 溶解在乙腈(2 mL)中。在室温下加入 Fmoc-L-甲硫氨酰氟(420 mg, 1.12 mmol) (来自以上实施例 7a), 在微波装置(Smith Synthesizer™)中将混合物加热至 120°C 10 分钟。将溶液过滤通过活化的碱性氧化铝塞(Alfa Aesar)和用乙酸乙酯洗涤氧化铝。将滤液在减压下浓缩和通过反相 HPLC 纯化残渣以产生 Fmoc 保护的胺(228 mg, 0.29 mmol)。将该衍生物溶解在乙腈-哌啶(Aldrich) (10: 1, 2 mL)中。在室温下 10 分钟后, 将混合物浓缩和用乙醚-己烷(1: 1)研磨残渣。通过过滤收集沉淀和在 45°C 真空干燥以提供(2S)-2-氨基-N-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-4-甲硫基-N-苯基丁酰胺, 其为白色固体。(产率 120 mg, 62%)。

实施例 7c

(2S)-2-氨基-N-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]

嘧啶-7-基)]-4-甲硫基-*N*-苯基丁酰胺乙酸盐

手性



5

将 3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-7-(苯基氨基)-1,3,4-三氢-嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮(100 mg, 0.24 mmol) (来自以上实施例 1g) 溶解在乙腈(1.5 mL)中。

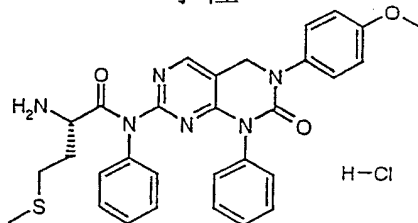
10 在室温下加入 FMOC-L-甲硫氨酰氟(445 mg, 1.18 mmol) (来自以上实施例 7a), 在微波装置(Smith Synthesizer™)中将混合物加热至 120°C 10 分钟。将溶液过滤通过活化的碱性氧化铝塞(Alfa Aesar)和用乙酸乙酯洗涤氧化铝。将滤液在减压下浓缩和通过反相 HPLC 纯化残渣以产生 FMOC 保护的胺(42 mg, 0.05 mmol)。将该衍生物溶解在乙腈-哌啶(Aldrich) (10: 1, 1.1 mL)中。在室温下 10 分钟后, 将混合物浓缩和通过反相 HPLC (水-乙腈梯度, 溶剂中含有 0.1%乙酸) 纯化残渣以提供(2S)-2-氨基-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-4-甲硫基-*N*-苯基丁酰胺乙酸盐。(产率 25 mg, 17%)。

15

20 实施例 7d

(2S)-2-氨基-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢-嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-4-甲硫基-*N*-苯基丁酰胺盐酸盐

手性



25

将(2S)-2-氨基-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢-嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-4-甲硫基-*N*-苯基丁酰胺(350 mg, 0.63 mmol) (来自以上

30

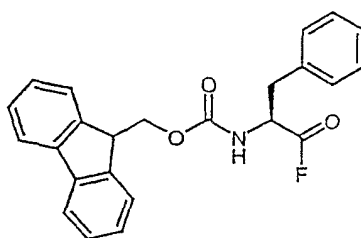
实施例 7b) 溶解在二噁烷(6 mL) (Aldrich)中的 4N 盐酸中。将均相溶液保持在室温 15 分钟, 然后浓缩至干燥。用乙醚研磨残渣。通过抽吸过滤收集沉淀, 用乙醚洗涤和在室温下在真空室中干燥以提供(2S)-2-氨基-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-4-甲

5 硫基-*N*-苯基丁酰胺盐酸盐, 其为灰白色固体。(产率 368 mg, 98%)。

实施例 8a

FMOC-L-苯丙氨酰氟

10



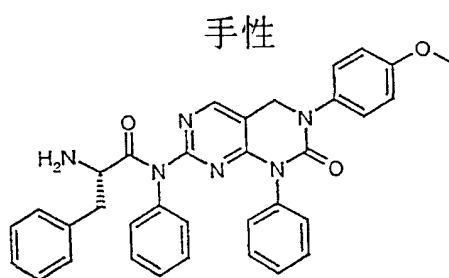
15 将 FMOC-L-苯丙氨酸(17 g, 44 mmol) (Bachem)溶解在二氯甲烷(100 mL)中。在室温下依次加入吡啶(3.55 mL, 44 mmol) (Aldrich)和氰尿酸氟 (6 g, 44 mmol) (Aldrich)并搅拌混合物 3.5 小时。加入冰冷水(300 mL)并过滤获得的淤浆。将滤液倒入分液漏斗和分层。通过无水硫酸钠干燥有机层, 过滤和减压浓缩以提供 FMOC-L-苯丙氨酰氟, 其为白色固体。(产率 13.6

20 g, 80%)。

实施例 8b

(2S)-2-氨基-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢-嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-3-苯基-*N*-苯基丙酰胺

25

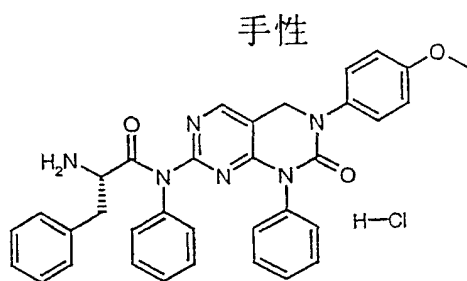


30

将 3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-7-(苯基氨基)-1,3,4-三氢-嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮 (450 mg, 1.05 mmol) (来自以上实施例 1g) 溶解在乙腈(6 mL)中。在室温下加入 Fmoc-L-苯丙氨酰氟(2.1 g, 5.25 mmol) (来自以上实施例 8a), 在微波装置(Smith Synthesizer™)中将混合物加热至 120°C 10 分钟。将溶液过滤通过活化的碱性氧化铝塞(Alfa Aesar)和用乙酸乙酯洗涤氧化铝。将滤液在减压下浓缩和用 1: 1 乙醚-己烷研磨残渣。通过抽吸过滤收集淡橙色的沉淀, 通过反相 HPLC 纯化以产生 Fmoc 保护的胺(232 mg, 0.29 mmol)。将该中间体溶解在 10: 1 乙腈-哌啶(Aldrich) (5 mL)中。在室温下 10 分钟后, 浓缩混合物并用 1: 1 乙醚-己烷研磨残渣。通过过滤收集沉淀和在 45°C 下真空干燥以提供(2S)-2-氨基-N-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-3-苯基-N-苯基丙酰胺, 其为白色固体。(产率 110 mg, 20%)。

实施例 8c

(2S)-2-氨基-N-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢-嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-3-苯基-N-苯基丙酰胺盐酸盐

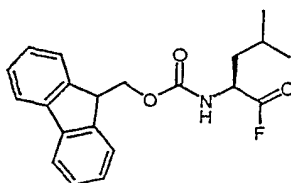


将(2S)-2-氨基-N-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢-嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-3-苯基-N-苯基丙酰胺(184 mg, 0.32 mmol) (来自以上实施例 8b) 溶解在二噁烷(4 mL) (Aldrich)的 4N 盐酸中。将均相溶液保持在室温 15 分钟, 然后浓缩至干燥。用乙醚研磨残渣。通过抽吸过滤收集沉淀, 和用乙酸乙酯搅拌过夜。通过抽吸过滤收集沉淀, 用乙酸乙酯洗涤和在 30°C 干燥以提供(2S)-2-氨基-N-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-3-苯基-N-苯基丙酰胺盐酸盐, 其为灰白色固

体。(产率 125 mg, 64%)。

实施例 9a

FMOC-L-亮氨酸酐

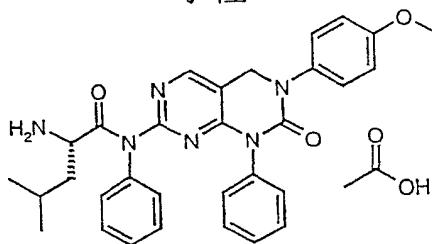


将 FMOC-L-亮氨酸(5 g, 14.14 mmol) (Bachem)溶解在乙腈(70 mL)中。在室温下依次加入吡啶(1.14 mL, 14.14 mmol) (Aldrich)和氰尿酸酐 (1.91 g, 14.14 mmol) (Aldrich), 搅拌混合物过夜。加入冰冷水(300 mL)并过滤获得的淤浆。将滤液倒入分液漏斗并分层。通过无水硫酸钠干燥有机层, 过滤和减压浓缩以产生 FMOC-L-亮氨酸酐, 其为白色粉末。(产率 4.57 g, 91%)。

实施例 9b

(2S)-2-氨基-N-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基 (1,3,4-三氢-嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-4-甲基-N-苯基戊酰胺 乙酸盐

手性

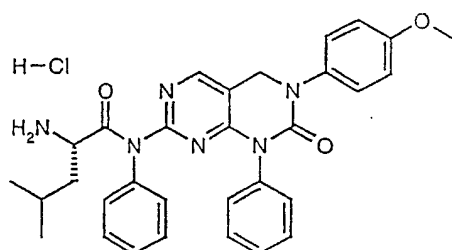


将 3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-7-(苯基氨基)-1,3,4-三氢-嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮 (400 mg, 0.93 mmol) (来自以上实施例 1g) 溶解在乙腈(4.5 mL)中。在微波装置(Smith Synthesizer™)中将混合物加热至 120°C 10 分钟。将溶液过滤通过活化的碱性氧化铝塞(Alfa Aesar)和用乙酸乙酯洗涤氧化铝。将滤液在减压下浓缩和通过反相 HPLC 纯化以产生 FMOC 保护的胺(323 mg,

0.43 mmol)。将该中间体溶解在 10: 1 乙腈-哌啶(Aldrich) (4 mL)中。在室温下 10 分钟后, 浓缩混合物和用 1: 1 乙醚-己烷研磨残渣。通过研磨收集沉淀和在真空下 45°C干燥, 并通过反相 HPLC (水-乙腈梯度, 溶剂中含有 0.1%乙酸) 纯化以提供(2S)-2-氨基-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-*d*]嘧啶-7-基)]-4-甲基-*N*-苯基戊酰胺乙酸盐, 其为白色固体。(产率 96 mg, 17%)。

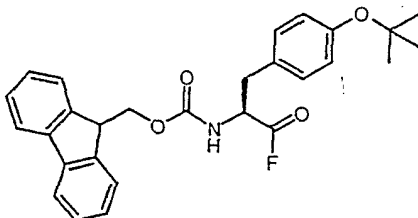
实施例 9c

(2S)-2-氨基-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢-嘧啶并[4,5-*d*]嘧啶-7-基)]-4-甲基-*N*-苯基戊酰胺盐酸盐
手性



将 3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-7-(苯基氨基)-1,3,4-三氢-嘧啶并[4,5-*d*]嘧啶-2-酮 (600 mg, 1.42 mmol) (来自以上实施例 1g) 溶解在乙腈(8 mL)中。在室温下加入 FMOC-L-亮氨酸酐(629 mg, 1.77 mmol) (来自以上实施例 9a), 在微波装置(Smith SynthesizerTM)中将混合物加热至 120°C 10 分钟。将溶液过滤通过活化的碱性氧化铝塞(Alfa Aesar)和用乙酸乙酯洗涤氧化铝。将滤液在减压下浓缩和通过反相 HPLC 纯化以产生 FMOC 保护的胺(562 mg, 0.74 mmol)。将该中间体溶解在 10: 1 乙腈-哌啶(Aldrich) (4 mL)中。在室温下 10 分钟后, 浓缩混合物和用乙醚研磨残渣。通过过滤收集沉淀和在 45 °C干燥, 然后溶解在二噁烷(4 mL) (Aldrich)中的 4N 盐酸中。减压浓缩溶液并用乙醚研磨残渣以提供(2S)-2-氨基-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-*d*]嘧啶-7-基)]-4-甲基-*N*-苯基戊酰胺盐酸盐。(产率 333 mg, 57%)。

实施例 10a

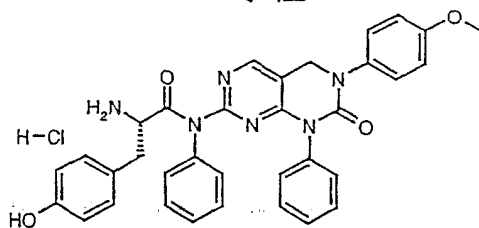
N-FMOC-O-叔丁基-L-酪氨酰氟

将 *N*-FMOC-O-叔丁基-L-酪氨酸(5 g, 10.88 mmol) (Bachem)溶解在二氯甲烷(50 mL)中。在室温下依次加入吡啶 (0.88 mL, 10.88 mmol) (Aldrich) 和氰尿酰氟(1.47 g, 10.88 mmol) (Aldrich), 搅拌混合物 5 小时。加入冰冷水(100 mL)并过滤获得的淤浆。将滤液倒入分液漏斗中并分层。通过无水硫酸钠干燥有机层, 过滤和减压浓缩, 以提供 *N*-FMOC-O-叔丁基-L-酪氨酰氟, 其为白色粉末。(产率 4.43 g, 88%)。

实施例 10b

(2*S*)-2-氨基-3-(4-羟基苯基)-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-*d*]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基丙酰胺盐酸盐

手性

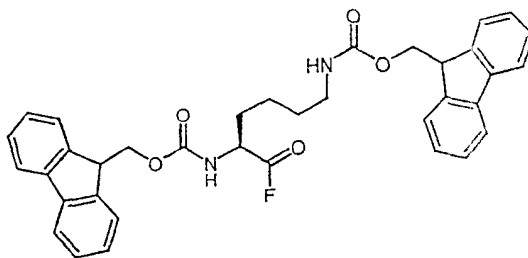


将 3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-7-(苯基氨基)-1,3,4-三氢-嘧啶并[4,5-*d*]嘧啶-2-酮 (600 mg, 1.41 mmol) (来自以上实施例 1g) 溶解在乙腈(4.5 mL)中。室温下加入 *N*-FMOC-O-叔丁基-L-酪氨酰氟(3.26 g, 7.06 mmol) (来自以上实施例 10a), 在微波装置(Smith SynthesizerTM)中将混合物加热至 120°C 10

分钟。将溶液过滤通过活化的碱性氧化铝塞(Alfa Aesar)和用乙酸乙酯洗涤氧化铝。将滤液在减压下浓缩和通过反相 HPLC 纯化以产生 Fmoc 叔丁基醚保护的衍生物(648 mg, 0.75 mmol)。将该中间体溶解在 1:1 的二氯甲烷-三氟乙酸(Aldrich)中。在室温下 1 小时后, 浓缩混合物和用乙醚研磨残渣。收集该沉淀, 在减压下干燥和用 10:1 乙腈-吡啶 (Aldrich) (5 mL)处理 1 小时。浓缩该溶液和用 1:1 乙醚-己烷研磨固体残渣。收集该固体, 减压干燥, 和溶解在二噁烷(10 mL) (Aldrich)中的 4 N 盐酸中。浓缩接着从乙醚中沉淀提供(2S)-2-氨基-3-(4-羟基苯基)-N-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-N-苯基-丙酰胺盐酸盐, 其为黄色固体。(产率 216 mg, 25%)。

实施例 11a

双-Fmoc-L-赖氨酰氟

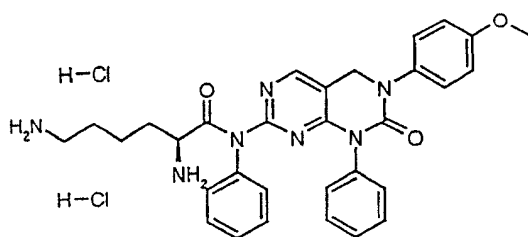


将双-Fmoc-L-赖氨酸(5 g, 8.46 mmol) (Bachem)溶解在二氯甲烷(50 mL)中。室温下依次加入吡啶 (0.69 mL, 8.46 mmol) (Aldrich)和氰尿酸氟(1.14 g, 8.46 mmol) (Aldrich), 搅拌混合物过夜。加入冰冷水(100 mL)并过滤获得的淤浆。将滤液倒入分液漏斗中并分层。通过无水硫酸钠干燥有机层, 过滤并减压浓缩以提供双-Fmoc-L-赖氨酰氟, 其为白色粉末。(产率 1.14 g, 23%)。

实施例 11b

(2S)-2,6-二氨基-N-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢-嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-N-苯基己酰胺二盐酸盐

手性



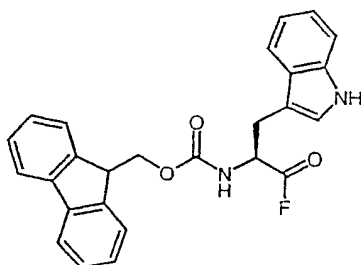
5

将 3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-7-(苯基氨基)-1,3,4-三氢-嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮 (150 mg, 0.35 mmol) (来自以上实施例 1g) 溶解在乙腈(2 mL)中。在室温下加入双-FMOC-L-赖氨酰氟(1.05 g, 1.77 mmol) (来自以上实施例 11a), 在微波装置(Smith Synthesizer™)中将混合物加热至 120℃ 10 分钟。将溶液过滤通过活化的碱性氧化铝塞(Alfa Aesar)和用乙酸乙酯洗涤氧化铝。将滤液在减压下浓缩和通过反相 HPLC 纯化以产生双-FMOC 保护的二-胺(36 mg, 0.036 mmol)。将该中间体溶解在 10: 1 乙腈-哌啶(Aldrich) (1 mL)中。在室温下 10 分钟后, 浓缩混合物和用 1: 1 乙醚-己烷研磨残渣。通过过滤收集固体物质, 减压干燥, 然后溶解在二噁烷(5 mL) (Aldrich)中的 4 N 盐酸中。减压下浓缩接着从乙醚中沉淀提供(2S)-2,6-二氨基-N-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-N-苯基己酰胺二-盐酸盐, 其为黄色固体。(产率 25 mg, 10%)。

20

实施例 12a

FMOC-L-色氨酰氟



25

将 FMOC-L-色氨酸(5 g, 11.72 mmol) (Bachem)溶解在二氯甲烷(60 mL)中。在室温下依次加入吡啶 (0.95 mL, 11.72 mmol) (Aldrich)和氰尿酸酰氟

30

(1.58 g, 11.72 mmol) (Aldrich), 搅拌混合物 6.5 小时。加入冰冷水(100 mL)并过滤获得的淤浆。将滤液倒入分液漏斗中并分层。通过无水硫酸钠干燥有机层, 过滤和减压浓缩以提供 Fmoc-L-色氨酰氟, 其为米色粉末。(产率 4.36 g, 87%)。

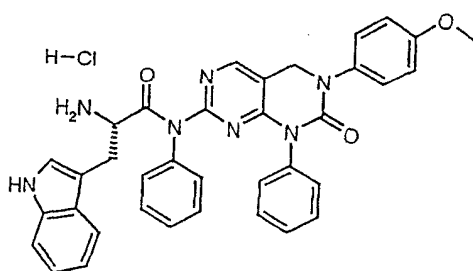
5

实施例 12b

(2S)-2-氨基-3-吲哚-3-基-N-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-N-苯基丙酰胺盐酸盐

手性

10

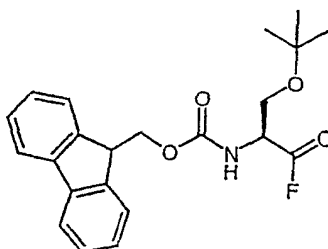


15

将 3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-7-(苯基氨基)-1,3,4-三氢-嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮 (600 mg, 1.41 mmol) (来自以上实施例 1g) 溶解在乙腈(6 mL)中。室温下加入 Fmoc-L-色氨酰氟(3.02 g, 7.06 mmol) (来自以上实施例 12a), 在微波装置(Smith Synthesizer™)中将混合物加热至 120°C 10 分钟。将溶液过滤通过活化的碱性氧化铝塞(Alfa Aesar)和用乙酸乙酯洗涤氧化铝。将滤液在减压下浓缩和通过反相 HPLC 纯化以产生 Fmoc 保护的胺(575 mg, 0.69 mmol)。将该中间体溶解在 10: 1 乙腈-哌啶(Aldrich) (3 mL)中。在室温下 10 分钟后, 浓缩混合物和用 1: 1 乙醚-己烷研磨残渣。通过过滤收集固体物质, 减压干燥, 然后溶解在二噁烷(20 mL) (Aldrich)中的 4 N 盐酸中。减压下浓缩接着从乙腈中沉淀提供(2S)-2-氨基-3-吲哚-3-基-N-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-N-苯基丙酰胺盐酸盐, 其为黄色固体。(产率 122 mg, 14%)。在浓缩母液和用乙醚研磨后获得第二次收获的产品。(产率 285 mg, 31%)。

30

实施例 13a

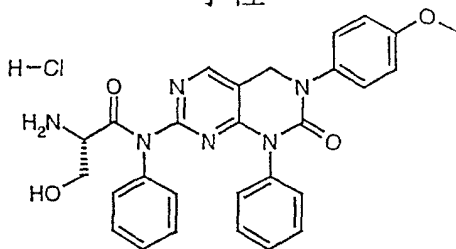
N-FMOC-O-叔丁基-L-丝氨酰氟

将 *N*-FMOC-O-叔丁基-L-丝氨酸(10 g, 26.07 mmol) (Bachem)溶解在二氯甲烷(135 mL)中。室温下依次加入吡啶 (2.11 mL, 26.07 mmol) (Aldrich)和氰尿酰氟 (3.52 g, 26.07 mmol) (Aldrich), 搅拌混合物过夜。加入冰冷水(100 mL)并过滤获得的淤浆。将滤液倒入分液漏斗中并分层。通过无水硫酸钠干燥有机层, 过滤并减压浓缩以提供 *N*-FMOC-O-叔丁基-L-丝氨酰氟, 其为无色油, 静置后固化。(产率 9.79 g., 97%)。

实施例 13b

(2*S*)-2-氨基-3-羟基-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-*d*]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基丙酰胺

手性

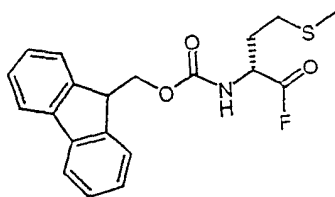


将 3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-7-(苯基氨基)-1,3,4-三氢-嘧啶并[4,5-*d*]嘧啶-2-酮 (300 mg, 0.71 mmol) (来自以上实施例 1g) 溶解在乙腈(4 mL)中。室温下加入 *N*-FMOC-O-叔丁基-L-丝氨酰氟(1.38 g, 3.58 mmol) (来自以上实施例 13a), 在微波装置(Smith SynthesizerTM)中将混合物加热至 120°C 10 分钟。将溶液过滤通过活化的碱性氧化铝塞(Alfa Aesar)和用乙酸乙酯洗涤

氧化铝。将滤液在减压下浓缩和通过反相 HPLC 纯化以产生 FMOC-叔丁基保护的衍生物(214 mg, 0.27 mmol)。该中间体用 1: 1 二氯甲烷-三氟乙酸 (Aldrich) (10 mL)处理 1 小时。浓缩该混合物并通过反相 HPLC (97 mg, 0.13 mmol)纯化残渣。将该 FMOC 衍生物溶解在 10: 1 乙腈-哌啶(Aldrich) (2 mL) 5 中。在室温下 10 分钟后, 浓缩混合物和用乙醚研磨残渣。通过过滤收集固体物质, 减压干燥, 然后溶解在二噁烷(20 mL) (Aldrich)中的 4 N 盐酸中。减压浓缩接着从乙醚中沉淀提供(2S)-2-氨基-3-羟基-N-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-N-苯基丙酰胺, 其为黄色固体。(产率 60 mg, 15%)。

10

实施例 14a
FMOC-D-甲硫氨酰氟



15

将 FMOC-D-甲硫氨酸(5.00 g, 13.46 mmol) (Bachem)溶解在二氯甲烷 (70 mL)中。室温下依次加入吡啶 (1.09 mL, 13.46 mmol) (Aldrich)和氰尿酰氟 (1.82 g, 13.46 mmol) (Aldrich), 搅拌混合物 4 小时。加入冰冷水(100 mL), 过滤获得的淤浆。将滤液倒入分液漏斗中并分离层。通过无水硫酸钠干燥有机层, 过滤, 和减压浓缩以提供 FMOC-D-甲硫氨酰氟, 其为白色粉末。(产率 3.7 g., 74%)。

20

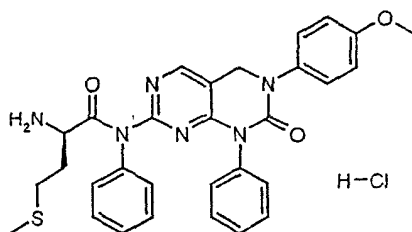
25

实施例 14b

(2R)-2-氨基-N-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢-嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-4-甲硫基-N-苯基丁酰胺盐酸盐

30

手性



5

将 3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-7-(苯基氨基)-1,3,4-三氢-嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮 (300 mg, 0.71 mmol) (来自以上实施例 1g) 溶解在乙腈(4 mL)中。室温下加入 Fmoc-D-甲硫氨酰氟(1.32 g, 3.54 mmol) (来自以上实施例 14a), 在微波装置(Smith Synthesizer™)中将混合物加热至 120℃ 10 分钟。将溶液过滤通过活化的碱性氧化铝塞(Alfa Aesar)和用乙酸乙酯洗涤氧化铝。将滤液在减压下浓缩和通过反相 HPLC 纯化以产生 Fmoc 保护的胺(242 mg, 0.31 mmol)。将该中间体溶解在 10: 1 乙腈-哌啶(Aldrich) (5 mL)中。在室温下 1 小时后, 浓缩该混合物并用乙醚研磨残渣。通过过滤收集固体物质, 通过反相 HPLC 纯化, 然后溶解在二噁烷(10 mL) (Aldrich)中的 4 N 盐酸中 30 分钟。将均相溶液减压浓缩并用乙醚研磨残渣。通过抽吸过滤收集沉淀和减压干燥以提供(2R)-2-氨基-N-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-4-甲硫基-N-苯基丁酰胺盐酸盐, 其为米色固体。(产率 20 mg, 5%)。

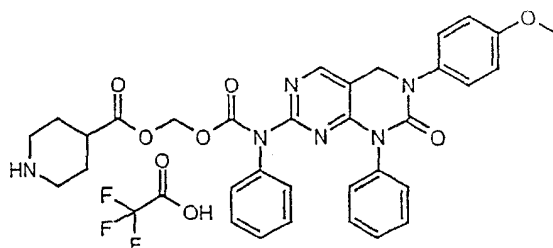
15

20

实施例 15

{N-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-N-苯基氨基甲酰基氧基} 甲基哌啶-4-羧酸酯三氟乙酸盐

25



30

在氮气氛下向(氯代甲氧基)-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-*N*-苯甲酰胺(200 mg, 0.39 mmol) (来自以上实施例 4a) 溶解在无水四氢呋喃中的溶液中加入 BOC-异哌啶甲酸钠盐(356 mg, 1.4 mmol) (356 mg, 1.4 mmol)[通过用一当量的 NaOH 处理酸(Bachem) 5 制备的钠盐], 接着用硫酸氢四丁基铵(220 mg, 0.582 mmol) (Aldrich)处理。室温搅拌反应 22 小时。TLC 显示原物质仍然存在。加入另一份 BOC-异哌啶甲酸钠盐(178 mg, 0.7 mmol)和硫酸氢四丁基铵(110 mg, 0.75 mmol), 室温下搅拌反应另外 23 小时。用氮气流吹干溶剂, 粗反应混合物在二氯甲烷和水之间分配。用水和盐水洗涤有机层并通过硫酸镁干燥, 然后过滤和 10 减压浓缩。通过快速色谱法(Biotage, 40 S 柱)纯化保护的中间体, 用二氯甲烷中的 10%甲醇, 然后 15 和 20%的甲醇作为溶剂以提供 BOC 保护的产物。(产率 259 mg, 94%)。

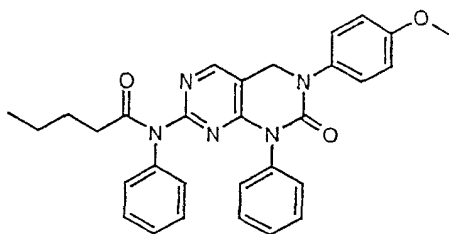
将 BOC 保护的产物(235 mg, 0.33 mmol)溶解在无水二氯甲烷(7.5 mL)和三氟乙酸(2 mL)中, 在室温下搅拌 3 小时。在氮气流下浓缩反应混合物。15 通过快速色谱法(Biotage, 40 S 柱)纯化残渣, 使用二氯甲烷中的 20%, 然后 30%甲醇以提供 {*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基氨基甲酰基氧基} 甲基哌啶-4-羧酸三氟乙酸盐。(产率 121 mg, 50%)。从二氯甲烷-乙醚中重结晶产物。(Mp- 88-90°C)。

20

实施例 16

N-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7基)]-*N*-苯基戊酰胺

25

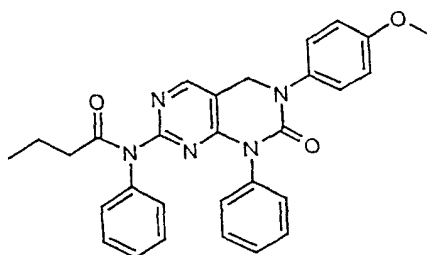


在氮气下向 3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-7-(苯基氨基)-1,3,4-三氢嘧啶并 30 [4,5-d]嘧啶-2-酮 (0.20g, 0.47 mmol) (来自以上实施例 1g) 在无水二氯甲

烷（10 mL）中的溶液加入戊酰氯(0.14 mL, 1.18 mmol) (Aldrich)和 *N,N*-二异丙基乙胺(0.41 mL, 2.36 mmol) (Aldrich)。室温下搅拌反应混合物 1 天。然后用乙酸乙酯稀释混合物，用 1 N HCl 水溶液、水、饱和碳酸钠水溶液和盐水洗涤，干燥（MgSO₄），过滤和浓缩。通过快速色谱法纯化残渣，
5 用乙酸乙酯/己烷(3: 2, V/V)洗脱以提供 *N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-*d*]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基戊酰胺，其为白色泡沫。(产率 0.23 g, 96%)。

实施例 17

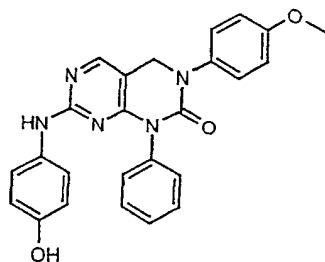
10 *N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-*d*]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基丁酰胺



15 在氩气下向 3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-7-(苯基氨基)-1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-*d*]嘧啶-2-酮 (0.20g, 0.47 mmol)（来自以上实施例 1g）在无水二氯甲烷（10 mL）中的溶液加入丁酰氯(0.12 mL, 1.18 mmol) (Aldrich)和 *N,N*-二异丙基乙胺(0.41 mL, 2.36 mmol) (Aldrich)。室温下搅拌反应混合物 4 小时。然后用乙酸乙酯稀释混合物，用 1 N HCl 水溶液、水、饱和碳酸钠水溶液和盐水洗涤，干燥（MgSO₄），过滤和浓缩。通过快速色谱法纯化残渣，
20 用乙酸乙酯/己烷(3: 2, V/V)洗脱以提供 *N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-*d*]嘧啶-7-基)]-*N*-苯基丁酰胺，其为白色泡沫。(产率 0.23 g, 100%)。

实施例 18

30 7-[(4-羟基苯基)氨基]-3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-*d*]嘧啶-2-酮



5

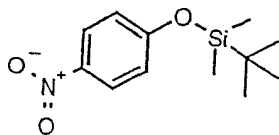
将 7-氯-3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-1,3,4-三氢-嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮(0.15 g, 0.41 mmol) (来自以上实施例 1f) 和 4-氨基-苯酚(57.8 mg, 0.53 mmol) (Aldrich)在 2-丙醇(3.5 mL)中的溶液放置在微波反应器(Smith Synthesizer™)中。将反应混合物在 160℃加热 10 分钟。过滤形成的沉淀,用乙醇洗涤和干燥以提供 7-[(4-羟基苯基)氨基]-3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮。(产率 0.12g, 67 %)。

10

实施例 19a

15

1-硝基-4-(1,1,2,2-四甲基-1-硅杂丙氧基)苯



20

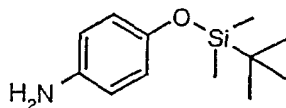
向 4-硝基苯酚(5.0 g, 35.9 mmol) (Aldrich)在二甲基甲酰胺(50 mL)中的溶液中加入咪唑 (3.18 g, 46.7 mmol) (Aldrich)和叔丁基二甲基甲硅烷基氯(6.49 g, 43.1 mmol) (Avocado Research Chemicals Ltd.)。室温下搅拌反应混合物 1 天。TLC 分析显示原材料仍然存在。加入另一份叔丁基二甲基甲硅烷基氯(1.0 g, 6.63 mmol), 室温下搅拌混合物另外 1 天。减压下浓缩反应混合物。将残渣溶解在乙酸乙酯(200 mL)中,用水(100 mL)和含水 1N HCl(80 mL)的混合物洗涤。然后用水、饱和碳酸氢钠水溶液和盐水洗涤有机层,干燥 (MgSO₄), 过滤和浓缩。通过快速色谱法纯化残渣,用乙酸乙酯/己烷(1: 9, V/V)洗脱以提供 1-硝基-4-(1,1,2,2-四甲基-1-硅杂丙氧基)苯。(产率 7.8 g, 86%)。

25

30

实施例 19b

4-(1,1,2,2-四甲基-1-硅杂丙氧基)苯基胺

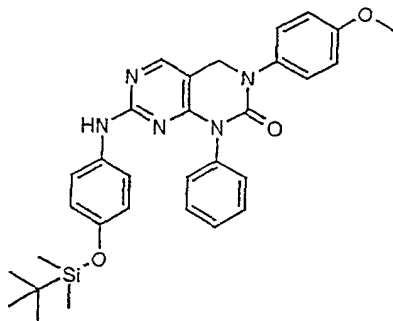


5

将 1-硝基-4-(1,1,2,2-四甲基-1-硅杂丙氧基)苯(7.8 g, 30.8 mmol) (来自以上实施例 19a) 和 10 % Pd/C (0.70 g) (Aldrich) 在乙酸乙酯(100 mL)中的溶液氢化 1 天。将反应混合物通过硅藻土过滤, 并浓缩。通过快速色谱法
10 纯化残渣, 用乙酸乙酯/己烷洗脱(1:9 V/V)以提供 4-(1,1,2,2-四甲基-1-硅杂丙氧基)苯基胺。(产率 6.7 g, 97%)。

实施例 19c

3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-7-{[4-(1,1,2,2-四甲基-1-硅杂丙氧基)苯基]氨基}-1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮
15 基}



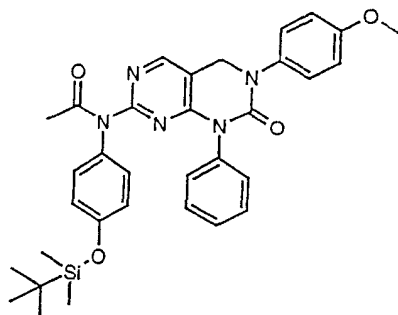
20

将 7-氯-3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-1,3,4-三氢-嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮(0.20 g, 0.55 mmol) (来自以上实施例 1f) 和 4-(1,1,2,2-四甲基-1-硅杂丙氧基)苯基胺(0.16 g, 0.71 mmol) (来自以上实施例 19b) 在 2-丙醇(4 mL)中的溶液放置在微波反应器(Smith Synthesizer™)中。将反应混合物在 160°C 加热 10 分钟。过滤形成的沉淀, 用 2-丙醇洗涤和干燥以提供 3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-7-{[4-(1,1,2,2-四甲基-1-硅杂丙氧基)苯基]氨基}-1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮。(产率 0.28 g, 93%)。
25

30

实施例 19d

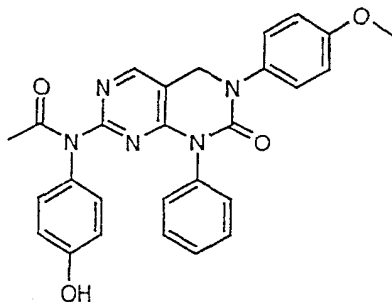
N-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-*N*-[4-(1,1,2,2-四甲基-1-硅杂丙氧基)苯基]乙酰胺



在氩气下向 3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-7-[[4-(1,1,2,2-四甲基-1-硅杂丙氧基)苯基]氨基]-1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮(0.28g, 0.51 mmol) (来自以上实施例 19c) 和 *N,N*-二异丙基乙胺(0.44mL, 2.55 mmol) (Aldrich)在无水二氯甲烷(10 mL)中的溶液加入乙酰氯(0.09 mL, 1.26 mmol) (Aldrich)。室温下搅拌反应混合物 4 小时。用二氯甲烷稀释混合物并用水和盐水洗涤, 干燥 (MgSO₄), 过滤和浓缩。通过快速色谱法纯化残渣, 用乙酸乙酯/己烷(3:7, 然后 2:3, V/V)洗脱, 提供 *N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-*N*-[4-(1,1,2,2-四甲基-1-硅杂丙氧基)苯基]乙酰胺。(产率 0.18 g, 60%)。

实施例 19e

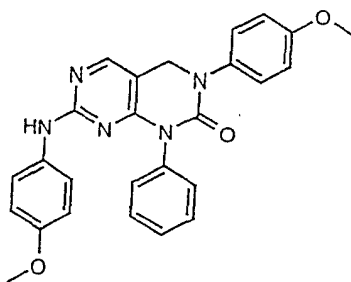
N-(4-羟基苯基)-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]乙酰胺



在氩气下向 *N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]-*N*-[4-(1,1,2,2-四甲基-1-硅杂丙氧基)苯基]乙酰胺(0.17g, 0.29 mmol) (来自以上实施例 19d) 在无水四氢呋喃(5 mL)中的溶液加入氟化四丁基铵(四氢呋喃中的 1.0 M 溶液, 0.43 mL, 0.43 mmol) (Aldrich)。室温下搅拌反应混合物 4 小时。浓缩混合物, 通过快速色谱法纯化残渣, 用乙酸乙酯/己烷(4: 1 V/V)和乙酸乙酯洗脱, 提供 *N*-(4-羟基苯基)-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢-嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]乙酰胺。(产率 73 mg, 52%)。

实施例 20

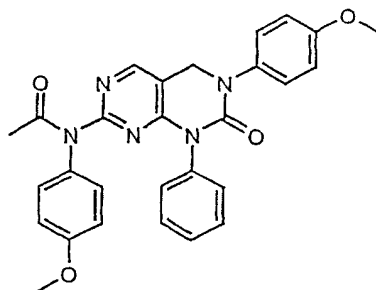
3-(4-甲氧苯基)-7-[(4-甲氧苯基)氨基]-1-苯基-1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮



将 7-氯-3-(4-甲氧苯基)-1-苯基-1,3,4-三氢-嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮(0.15 g, 0.41 mmol) (来自以上实施例 1f) 和对甲氧基苯胺(65 mg, 0.53 mmol) (Aldrich)在 2-丙醇(3.5 mL)中的溶液放置在微波反应器(Smith Synthesizer™)中。将反应混合物在 160°C 加热 10 分钟。过滤形成的沉淀, 用 2-丙醇洗涤并干燥以提供 3-(4-甲氧苯基)-7-[(4-甲氧苯基)氨基]-1-苯基-1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮。(产率 0.18 g, 97%)。

实施例 21

N-(4-甲氧苯基)-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]乙酰胺



5

在氩气下向 3-(4-甲氧苯基)-7-[(4-甲氧苯基)氨基]-1-苯基-1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-2-酮(0.10 g, 0.22 mmol)和 *N,N*-二异丙基-乙胺(0.19 mL, 1.1 mmol) (来自以上实施例 20) 在无水二氯甲烷(10mL)中的溶液加入乙酰氯(0.04 mL, 0.55 mmol) (Aldrich)。室温下搅拌反应混合物过夜。然后用二氯甲烷稀释混合物并用水和盐水洗涤, 干燥 (MgSO_4), 过滤并浓缩。通过快速色谱法纯化残渣, 用乙酸乙酯/己烷(7: 3V/V)洗脱以提供 *N*-(4-甲氧苯基)-*N*-[3-(4-甲氧苯基)-2-氧代-1-苯基(1,3,4-三氢嘧啶并[4,5-d]嘧啶-7-基)]乙酰胺。(产率 24 mg, 22%)。

15

抗增殖活性

本发明化合物的抗增殖活性在以下实施例 22 和 23 中举例说明。这些活性表明本发明的化合物在治疗癌症、特别是实体瘤如乳腺癌和结肠瘤中有效。

20

实施例 22

激酶测定

为了测定 KDR, FGFR, EGFR, 和 PDGFR 活性的抑制, 使用 HTRF (均匀时间分辨荧光) 测定进行激酶测定。该测定在 A. J. Kolb 等, Drug Discovery Today, 1998, 3(7), p 333 中描述。

25

在激酶反应之前, 将重组 EEE-标记的 KDR 在激活缓冲液(50 mM HEPES, pH 7.4, 1mM DTT, 10%甘油, 150mM NaCl, 0.1mM EDTA, 26mM MgCl_2 , 和 4 mM ATP)的存在下活化。将酶在 4°C 温育 1 小时。

激酶活性测定在 96-孔聚乙烯板(Falcon)中进行, 每孔中总体积为 90 μl 。每孔含有 1 μM KDR 底物(生物素-EEEEYFELVAKKKK), 1 nM 活化

30

的 KDR, 和具有 8 个测定浓度之一的试验化合物, 测定浓缩范围为 100 μM -128 pM(1:5 连续稀释)。激酶活性测定在 100 mM HEPES, pH 7.4, 1mM DTT, 0.1mM Na_2VO_4 , 25mM MgCl_2 , 50mM NaCl (来自 KDR 贮液), 1% DMSO (来自化合物), 0.3mM ATP (K_m 浓度) 和 0.02% BSA 的存在下进行。反应在 37°C 下温育 30 分钟。为了终止 KDR 反应, 将 72 μL 反应混合物转移到含有 18 μL 显示缓冲液(20mM EDTA, 50mM HEPES, pH 7.4, 0.02% BSA, 10nM Eu-标记的抗-pY 抗体(终浓度 2nM), 和 100nM 链霉抗生物素(终浓度 20nM))的 STOP 板。在混合后, 将 35 μL 溶液转移到 384-孔黑板(Costar)的双孔中, 在 Wallac Victor 5 读数器上在 615/665 nm 下读取。

如上关于 KDR 活性测定所述进行 FGFR, EGFR, 和 PDGFR 活性测定, 不同之处如下。GST-标记的 FGFR 酶在室温下在下列激活缓冲液中活化 1 小时: 100 mM HEPES, pH 7.4, 50 mM NaCl, 20mM MgCl_2 , 和 4mM ATP。使用 1 μM 底物(生物素-EEEEYFELV), 1.5 nM 活化 FGFR, 和试验化合物, 在 100 mM HEPES, 1 mM DTT, 0.4 mM MgCl_2 , 0.4 mM MnCl_2 , 50mM NaCl, 1% DMSO, 10 μM ATP (对于 FGFR, $K_m=8.5 \mu\text{M}$), 0.1mM Na_2VO_4 , 和 0.02% BSA 的存在下进行激酶活性测定, 总体积为 90 μL 。测定其余部分以与 KDR 测定相同的方式进行。

用 1 μM 底物 (生物素-EEEEYFELV), 1.5 nM EGFR, 试验化合物, 100 mM HEPES, pH 7.4, 1mM DTT, 5mM MgCl_2 , 2mM MnCl_2 , 1% DMSO, 0.5 μM ATP(对于 EGFR 的 K_m), 0.1 mM Na_2VO_4 , 和 0.02% BSA 进行 EGFR 激酶活性测定。测定其余部分以与 KDR 测定相同的方式进行。

用 1 μM 底物 (生物素-EEEEYFELV), 1.0 nM PDGFR, 试验化合物, 100 mM HEPES, pH 7.4, 1mM DTT, 5mM MgCl_2 , 2mM MnCl_2 , 1% DMSO, 2.3 μM ATP(对于 PDGFR 的 K_m), 0.1 mM Na_2VO_4 , 和 0.02% BSA 进行 PDGFR 激酶活性测定。测定其余部分以与 KDR 测定相同的方式进行。

从双份数据中测定化合物 IC_{50} 值, 并通过使用 Excel 和拟合数据至方程 $Y = [(a-b)/(1+(X/c)^d)] + b$ 来计算, 其中 a 和 b 分别是在没有试验抑制剂化合物存在下和在极大量的抑制剂试验化合物存在下的酶活性, c 是 IC_{50} , d 是化合物应答的斜率常数 (hill constant)。 IC_{50} 值是在所述试验条件下降低 50%酶活性的试验化合物的浓度。

前述体外实验结果，包括 IC₅₀ 值在以下表 1 中列出。

表 1

酶抑制的 IC₅₀

实施例	KDR	FGFR	EGFR	PDGFR
	IC ₅₀ (μM)			
1g	0.044	0.190	0.360	0.130
1h	0.076	0.170	0.350	0.150
18	0.029	0.110	0.130	0.064
20	0.024	0.091	0.180	0.082

5

实施例 23

VEGF 和 FGF-刺激的 HUVEC 增殖测定

本发明试验化合物在基于细胞的测定中的增殖活性通过使用 BrdU 试剂盒(Roche Biochemicals 1-647-229)的 BrdU 测定评估。将人脐静脉内皮细胞(Clonetics CC-2519)培养在 EGM-2 (Clonetics CC-3162)培养基中并以每
 10 孔 10000 个细胞接种在 96-孔平底板(Costar 3595)的体积为 200 μL 的 EGM-2(Clonetics CC-3162)培养基中过夜。在 37℃下 5% CO₂ 培养 24 小时后，通过抽吸缓慢去除温育培养基，用 300 μL 预热的 EBM-2 (Clonetics CC-3156)洗涤各孔的内容物，该 EBM-2 含有 50 μg/mL 的庆大霉素和 50 ng/mL 两性霉素-B (Clonetics CC-4083)。随后，再次吸出剩余的培养基和
 15 用 160 μL/孔的缺血培养基(EBM-2 补充 1%热灭活 FBS (Clonetics CC-4102), 50 μg/mL 庆大霉素和 50 ng/mL 两性霉素-B (Clonetics CC-4083), 10 单位/mL 的 Wyeth-Ayerst 肝素(NDC0641-0391-25), 和 2 mM L-谷氨酰胺 (GIBCO 25030-081)替换。在使细胞缺乏血清 24 小时后，向适当细胞中加入 20 μL 10X 试验浓度的在含有 2.5% DMSO 的血清缺乏培养基中的试验
 20 化合物。对照细胞含有 20 μL 含有 2.5% DMSO 的血清缺乏培养基。将平板返回培养箱 2 小时。在将细胞与试验化合物预温育 2 小时后，加入 20 μL 10X 测定浓度的稀释在血清缺乏培养基中的生长因子，50 ng/mL 的 FGF，或 200 ng/mL 的 VEGF(R & D systems 293-VE)。测定中 FGF 的终浓度为 5 ng/mL，测定中 VEGF 的终浓度为 20 ng/mL。无生长因子的对照孔含有 20

ng/孔的血清缺乏培养基和与含有生长因子的孔相同量的 BSA。将板返回至培养箱另外 22 小时。

BrdU ELISA

5 在暴露于试验化合物 24 小时后,通过加入 20 μL/孔的已经稀释(1: 100)在血清缺乏培养基中的 BrdU 标记试剂,用 BrdU (Roche Biochemicals 1-647-229)标记细胞。然后将板返回至培养箱 4 小时。通过将培养基排干在纸巾上去除标记培养基。通过加入 200 μL 固定/变性溶液至各孔中,并在室温下温育 45 分钟,将细胞固定和 DNA 变性。将固定/变性溶液排干至纸巾上,向各孔中加入 100 μL 抗-BrdU-POD 并将孔在室温下温育 2 小时。去除抗体溶液并将各孔用 300 μL PBS 洗涤 3-4 次。将 100 μL TMB 底物溶液加入各孔并将孔在室温下温育 5-8 分钟。然后通过加入 100 μL/孔的 1M 磷酸终止反应。在 450 nm 读取平板,参考波长为 650 nm。通过从所有孔中减去空白(无细胞)的吸光度,然后用 1 减去每个试验双份的平均吸光度与对照平均值的商来计算每种试验化合物的抑制百分比。最后结果然后乘以 100 (%抑制=(1-试验双份的平均吸光度/对照平均值)100)。IC₅₀ 值是抑制 50% BrdU 标记的试验化合物的浓度,是细胞增殖抑制的量度。从浓度对抑制百分比的对数曲线的线性回归中测定 IC₅₀。IC₅₀ 值在以下表 2 中显示。

20

表 2
VEGF 和 FGF-刺激的 HUVEC 增殖测定的 IC₅₀

实施例	HUVEC/VEFG	HUVEC/bFGFR
	IC ₅₀ (μM)	
lg	0.120	0.310
1h	0.120	0.430
18	0.063	0.150
20	0.096	0.350

实施例 24

片剂制剂

项	成分	Mg/片剂					
1	化合物 A*	5	25	100	250	500	750
2	无水乳糖	103	83	35	19	38	57
3	交联羧甲基纤维素钠	6	6	8	16	32	48
4	聚乙烯吡咯烷酮 K30	5	5	6	12	24	36
5	硬脂酸镁	1	1	1	3	6	9
	总重量	120	120	150	300	600	900

*化合物 A 表示本发明的化合物。

制备方法:

1. 在适当混合器中混和第 1, 2 和 3 项 15 分钟。
- 5 2. 用 20%聚乙烯吡咯烷酮 K30 溶液 (第 4 项) 将来自步骤 1 的粉末混合物制粒。
3. 在 50°C 干燥来自步骤 2 的颗粒。
4. 将步骤 3 的颗粒通过适当研磨装置。
5. 将第 5 项加入磨碎的步骤 4 的颗粒并混和 3 分钟。
- 10 6. 在适当压力机上压制步骤 5 的颗粒。

实施例 25

胶囊制剂

项	成分	mg/胶囊				
1	化合物 A*	5	25	100	250	500
2	无水乳糖	159	123	148	--	--
3	玉米淀粉	25	35	40	35	70
4	滑石	10	15	10	12	24
5	硬脂酸镁	1	2	2	3	6
	总填充重量	200	200	300	300	600

化合物 A 表示本发明的化合物。

15

制备方法:

1. 在适当混合器中混和第 1, 2 和 3 项 15 分钟。
2. 加入第 4 和 5 项, 并混和 3 分钟。
3. 填充到适当胶囊中。

5

实施例 26

注射液/乳剂制剂

项	成份	mg/mL
1	化合物 A*	1 mg
2	PEG 400	10-50 mg
3	卵磷脂	20-50 mg
4	大豆油	1-5 mg
5	甘油	8-12 mg
6	水适量	1 mL

化合物 A 表示本发明的化合物。

制备方法:

1. 将第 1 项溶解在第 2 项中。
- 10 2. 将第 3, 4 和 5 项加入第 6 项并混和直至分散, 然后均化。
3. 将步骤 1 的溶液加入步骤 2 的混合物中并均化直至分散体半透明。
4. 无菌过滤通过 0.2 μm 滤器并装入小瓶。

15

实施例 27

注射液/乳剂制剂

项	成份	mg/mL
1	化合物 A*	1 mg
2	Glycofurol	10-50 mg
3	卵磷脂	20-50 mg
4	大豆油	1-5 mg
5	甘油	8-12 mg
6	水	适量 1 mL

化合物 A 表示本发明的化合物。

制备方法:

1. 将第 1 项溶解在第 2 项中。
2. 将第 3, 4 和 5 项加入第 6 项中, 并混和直至分散, 然后均化。
3. 将步骤 1 的溶液加入步骤 2 的混合物中并均化直至分散体半透明。
- 5 5. 无菌过滤通过 0.2 μm 滤器并装入小瓶。

尽管已经通过参考具体和优选实施方案举例说明本发明, 本领域技术人员将理解可以通过常规实验和实施本发明进行各种变化和修改。因此, 本发明意欲不受以上描述限制, 而是通过后附权利要求和它们的等同方案

10 限定。