

[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 02826422.3

[51] Int. Cl.

C07D 487/04 (2006.01)

A61K 31/53 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008年7月16日

[11] 授权公告号 CN 100402530C

[22] 申请日 2002.12.27 [21] 申请号 02826422.3

[30] 优先权

[32] 2001.12.27 [33] US [31] 60/343,937

[32] 2002.7.26 [33] US [31] 60/399,110

[86] 国际申请 PCT/EP2002/014771 2002.12.27

[87] 国际公布 WO2003/055883 英 2003.7.10

[85] 进入国家阶段日期 2004.6.28

[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 K·R·格廷 L·Q·塞蒂

[56] 参考文献

WO9965909A 1999.12.23

CN1018245A 1988.5.11

CN1236780A 1999.12.1

HENRIK SUNE ANDERSEN ET AL. J.
BIO. CHEM., Vol. 275 No. 10. 2000

审查员 王景华

[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

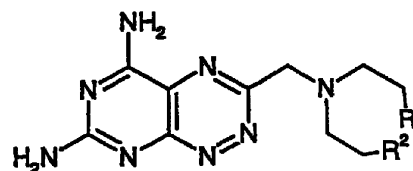
权利要求书 3 页 说明书 26 页

[54] 发明名称

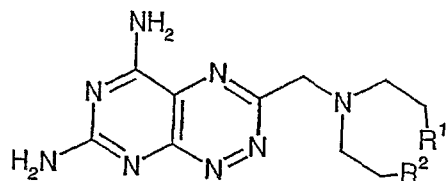
作为磷酸酶抑制剂的嘧啶并三嗪

[57] 摘要

本发明涉及所示通式的化合物，其中 R¹ 和 R² 如权利要求 1 中所定义，其用于生产药物。



1、下式的化合物



I

其中

R^1 和 R^2 单独地选自氢, 或

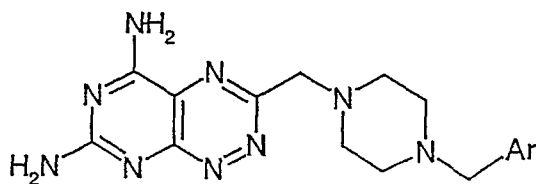
R^1 和 R^2 一起形成一个键, $-\text{CH}_2-$, $-\text{O}-$, $-\text{NH}-$ 或 $-\text{N}-\text{R}^3$,

R^3 为 C_{1-6} 烷基或 $-\text{CH}_2-\text{Ar}$, 和

Ar 选自未取代的苯基; 未取代的萘基; 由 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、芳基、环烷基、 C_{1-6} 烷基-芳基、 C_{1-6} 烷氧基-芳基、 C_{1-6} 烷基-环烷基、 C_{1-6} 烷氧基-环烷基、卤素、氰基或三氟甲基单-或二-取代的苯基; 和由 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、芳基、环烷基、 C_{1-6} 烷基-芳基、 C_{1-6} 烷氧基-芳基、 C_{1-6} 烷基-环烷基、 C_{1-6} 烷氧基-环烷基或卤素单-或二-取代的萘基;

或其药用盐。

2、按照权利要求 1 的化合物, 其为具有下列结构式的化合物:



II

其中 Ar 选自未取代的苯基; 未取代的萘基; 由 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、芳基、环烷基、 C_{1-6} 烷基-芳基、 C_{1-6} 烷氧基-芳基、 C_{1-6} 烷基-环烷基、 C_{1-6} 烷氧基-环烷基、卤素、氰基或三氟甲基单-或二-取代的苯基; 和由 C_{1-6} 烷

基、C₁₋₆ 烷氧基、芳基、环烷基、C₁₋₆ 烷基-芳基、C₁₋₆ 烷氧基-芳基、C₁₋₆ 烷基-环烷基、C₁₋₆ 烷氧基-环烷基或卤素单-或二-取代的萘基；

或式 II 化合物的药用盐。

3、按照权利要求 1 或 2 的化合物，其中 Ar 是未取代的苯基或未取代的萘基。

4、按照权利要求 1 或 2 的化合物，其中 Ar 是由 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基、芳基、环烷基、C₁₋₆ 烷基-芳基、C₁₋₆ 烷氧基-芳基、卤素、氰基或三氟甲基单取代的苯基。

5、按照权利要求 1 或 2 的化合物，其中 Ar 是由 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基、卤素、氰基或三氟甲基单取代的苯基。

6、按照权利要求 1 或 2 的化合物，其中 Ar 是由 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基、卤素或氰基二取代的苯基。

7、按照权利要求 1 或 2 的化合物，其中 Ar 是由 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基、C₁₋₆ 烷基-芳基、C₁₋₆ 烷氧基-芳基或卤素单取代的萘基。

8、按照权利要求 1 或 2 的化合物，其中 Ar 是由 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基或卤素单取代的萘基。

9、按照权利要求 1 或 2 的化合物，其中 Ar 是由 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基或卤素二取代的萘基。

10、按照权利要求 1 或 2 的化合物，其选自

3-二乙基氨基甲基-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺；

3-(4-苄基-哌嗪-1-基甲基)-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺；

3-(4-萘-2-基甲基-哌嗪-1-基甲基)-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺；

3-(4-萘-1-基甲基-哌嗪-1-基甲基)-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺；

3-(4-联苯基-4-基甲基-哌嗪-1-基甲基)-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺；

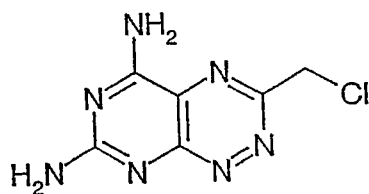
3-[4-(2, 4-二甲基-苄基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺；

3-[4-(4-乙基-2-甲基-萘-1-基甲基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5, 7-二胺；和

3-[4-(4-苄氧基-苄基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二

胺。

11、按照权利要求 1 至 10 之一的化合物的制备方法，包括将式 3 的化合物



3

在式 R^4NHR^5 化合物的存在下反应，其中 R^4 为 $-CH_2CH_2R^1$ ， R^5 为 $-CH_2CH_2R^2$ ， R^1 和 R^2 如权利要求 1 所定义。

12、一种含有按照权利要求 1 至 10 之一的化合物和药用载体的药物组合物。

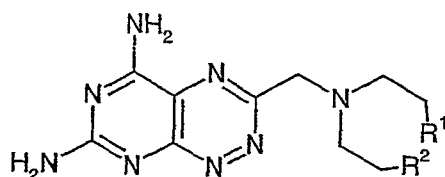
13、权利要求 1 至 10 之一的化合物在制备用于治疗 and/或预防与血糖水平有关的疾病的药物中的用途。

14、按照权利要求 13 的用途，其中所述疾病是糖尿病。

作为磷酸酶抑制剂的嘧啶并三嗪

本发明涉及嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺化合物，其用于抑制蛋白质酪氨酸磷酸酶，特别是 PTP1B。

本发明具体涉及下式的化合物



I

其中

R¹ 和 R² 单独地选自氢，或

R¹ 和 R² 一起形成一个键，-CH₂-, -O-, -NH-或-N-R³，

R³ 为低级烷基或-CH₂-Ar，和

Ar 选自未取代的苯基；未取代的萘基；由低级烷基，低级烷氧基，芳基，环烷基，低级烷基-芳基，低级烷氧基-芳基，低级烷基-环烷基，低级烷氧基-环烷基，卤素，氰基或三氟甲基单-或二-取代的苯基；和由低级烷基，低级烷氧基，芳基，环烷基，低级烷基-芳基，低级烷氧基-芳基，低级烷基-环烷基，低级烷氧基-环烷基或卤素单-或二-取代的萘基；

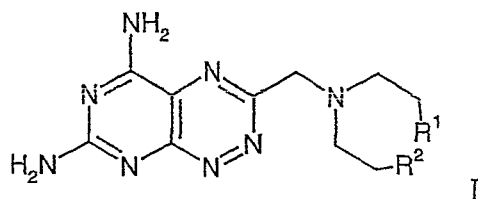
或其药用盐。

蛋白质酪氨酸磷酸酶 (PTPases) 是调节细胞生长和分化过程中的关键酶。这些酶的抑制能够在多信号传递途径的调节中发挥作用，其中酪氨酸磷酸化脱磷酸化发挥作用。PTP1B 是一种具体的蛋白质酪氨酸磷酸酶，其通常用作该类酶的原型。

PTPase 抑制剂认为是一种潜在的用于治疗糖尿病的治疗药。参见例如，Moeller 等，3 (5): 527-40, Current Opinion in Drug Discovery and

Development, 2000; 或 Zhang, Zhong-Yin, 5: 416-23, Current Opinion in Chemical Biology, 2001。

已发现下式的化合物



及其药用盐，其中 R^1 和 R^2 如下所定义，抑制蛋白质酪氨酸磷酸酶，特别是 PTP1B，因此应能够用于降低哺乳动物血糖浓度。

本发明中使用的术语"低级烷基"，单独或组合，表示含有最多六个碳原子的直链或支链烷基，例如甲基，乙基，n-丙基，异丙基，n-丁基，仲-丁基，异丁基，叔-丁基，n-戊基，n-己基等。低级烷基可以是未取代的，或被一个或多个独立地选自环烷基，硝基，芳氧基，芳基，羟基，卤素，氰基，低级烷氧基，低级烷酰基，低级烷硫基，低级烷基亚磺酰基，低级烷基磺酰基和取代的氨基取代。取代的低级烷基的例子包括 2-羟基乙基，3-氧丁基，氰基甲基和 2-硝基丙基。

术语"环烷基"指未取代的或取代的 3-至 7-元碳环。用于本发明的取代基是羟基，卤素，氰基，低级烷氧基，低级烷酰基，低级烷基，芳酰基，低级烷硫基，低级烷基亚磺酰基，低级烷基磺酰基，芳基，杂芳基和取代的氨基。

术语"低级烷氧基"指含有最多六个碳原子的直链或支链烷氧基，例如甲氧基，乙氧基，n-丙氧基，异丙氧基，n-丁氧基，叔-丁氧基等。

术语"低级烷硫基"指通过二价硫原子结合的低级烷基，例如甲基巯基或异丙基巯基。

术语"芳基"指单-或二环芳基，例如苯基或萘基，其是未取代的或通过常规取代基取代。优选的取代基是低级烷基，低级烷氧基，羟基低级烷基，羟基，羟基烷氧基，卤素，低级烷硫基，低级烷基亚磺酰基，低级烷基磺酰基，氰基，硝基，全氟代烷基，烷酰基(alkanyoyl)，芳酰基，芳基炔基，低级炔基和低级烷酰基氨基。特别优选的取代基是低级烷基，低级烷氧基，

羟基, 卤素, 氰基和全氟代低级烷基。用于本发明的芳基的例子是苯基, p-甲苯基, p-甲氧基苯基, p-氯苯基, m-羟基苯基, m-甲硫基苯基, 2-甲基-5-硝基苯基, 2,6-二氯苯基, 1-萘基等。

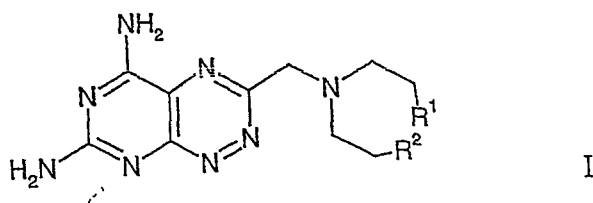
术语"低级烷基-芳基"指前面定义的低级烷基, 其中一个或多个氢原子被前面定义的芳基取代。任何常规低级烷基-芳基均可用于本发明, 例如苄基等。

术语"低级烷氧基-芳基"指前面定义低级烷氧基, 其中一个或多个氢原子被前面定义的芳基取代。任何常规低级烷氧基-芳基均可以用于本发明, 例如苄氧基。

术语"低级烷氧基羰基"指结合有羰基的低级烷氧基。烷氧基羰基的例子有乙氧基羰基等。

术语“药用盐”指保留通式 I 化合物的生物有效性和性质的常规酸加成盐或碱加成盐, 其由适当的非毒性有机或无机酸, 或者有机或无机碱形成。酸加成盐的例子包括来源于无机酸例如盐酸, 氢溴酸, 氢碘酸, 硫酸, 氨基磺酸, 磷酸和硝酸的那些盐, 以及来源于有机酸例如 p-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。碱加成盐的例子包括来源于铵、钾、钠和季铵的氢氧化物, 例如氢氧化四甲基铵的那些盐。药物化合物(即药物)化学修饰成盐是药学工作者的常规技术, 以便获得该化合物改进的物理、化学稳定性, 吸湿性, 流动性和溶解性。参见例如, H. Ansel 等, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems* (6th Ed. 1995) pp. 196 和 1456-1457。

本发明包括式 I 的化合物:



及其药用盐。按照本发明,

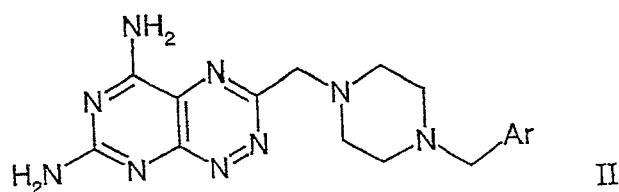
R^1 和 R^2 单独地选自氢, 或

R^1 和 R^2 一起形成一个键, $-CH_2-$, $-O-$, $-NH-$ 或 $-N-R^3$,

R^3 为低级烷基或 $-CH_2-Ar$, 和

Ar 选自未取代的苯基; 未取代的萘基; 由低级烷基, 低级烷氧基, 芳基, 环烷基, 低级烷基-芳基, 低级烷氧基-芳基, 低级烷基-环烷基, 低级烷氧基-环烷基, 卤素, 氰基或三氟甲基单-或二-取代的苯基; 和由低级烷基, 低级烷氧基, 芳基, 环烷基, 低级烷基-芳基, 低级烷氧基-芳基, 低级烷基-环烷基, 低级烷氧基-环烷基或卤素单-或二-取代的萘基。

在式 I 的化合物中, 优选的化合物是式 II 的化合物:



其中 Ar 选自未取代的苯基; 未取代的萘基; 由低级烷基, 低级烷氧基, 芳基, 环烷基, 低级烷基-芳基, 低级烷氧基-芳基, 低级烷基-环烷基, 低级烷氧基-环烷基, 卤素, 氰基或三氟甲基单-或二-取代的苯基; 和由低级烷基, 低级烷氧基, 芳基, 环烷基, 低级烷基-芳基, 低级烷氧基-芳基, 低级烷基-环烷基, 低级烷氧基-环烷基或卤素单-或二-取代的萘基。

在式 II 化合物的一个优选实施方案中, Ar 是未取代的苯基或未取代的萘基。

在式 II 化合物的另一个优选实施方案中, Ar 是由低级烷基, 低级烷氧基, 芳基, 环烷基, 低级烷基-芳基, 低级烷氧基-芳基, 卤素, 氰基或三氟甲基单取代的苯基。

在式 II 化合物的再一个优选实施方案中, Ar 是由低级烷基, 低级烷氧基, 卤素, 氰基或三氟甲基单取代的苯基。

在式 II 化合物的再一个优选实施方案中, Ar 是由低级烷基, 低级烷氧基, 卤素, 或氰基二取代的苯基。

在式 II 化合物的再一个优选实施方案中, Ar 是由低级烷基, 低级烷氧基, 低级烷基-芳基, 低级烷氧基-芳基或卤素单取代的萘基。

在式 II 化合物的再一个优选实施方案中, Ar 是由低级烷基, 低级烷氧基, 或卤素单取代的萘基。

在式 II 化合物的再一个优选实施方案中, Ar 是由低级烷基, 低级烷氧基, 或卤素二取代的萘基。

本发明的化合物能够以立体异构体形式存在, 特别是对映异构体和非对映异构体形式存在, 所有这些均包括在本发明范围内。

本发明的优选化合物选自下列化合物:

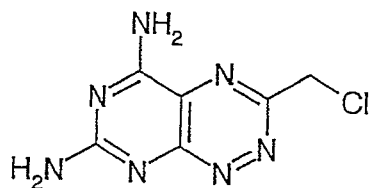
1. 3-哌嗪-1-基甲基-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺;
2. 3-二乙基氨基甲基-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺;
3. 3-吡咯烷-1-基甲基-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺;
4. 3-哌啶-1-基甲基-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺;
5. 3-吗啉-4-基甲基-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺;
6. 3-(4-甲基-哌嗪-1-基甲基)-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺;
7. 3-(4-苄基-哌嗪-1-基甲基)-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺;
8. 3-(4-萘-2-基甲基-哌嗪-1-基甲基)-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺;
9. 3-(4-萘-1-基甲基-哌嗪-1-基甲基)-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺;
10. 3-(4-联苯基-4-基甲基-哌嗪-1-基甲基)-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺;
11. 3-[4-(2-氯-苄基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺;
12. 3-[4-(3-氯-苄基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺;
13. 3-[4-(4-氯-苄基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺;
14. 3-[4-(3-甲氧基-苄基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺;
15. 3-[4-(3-氟-苄基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺;
16. 3-[4-(3-三氟甲基-苄基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺;

17. 3-[4-(4-三氟甲基-苄基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺;
18. 3-[4-(3-溴-苄基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺;
19. 3-[4-(3-氰基-苄基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺;
20. 3-[4-(2,4-二甲基-苄基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺;
21. 3-[4-(4-乙基-2-甲基-萘-1-基甲基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺; 和
22. 3-[4-(4-苄氧基-苄基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺。

本发明特别优选的化合物选自下列化合物:

- 3-二乙基氨基甲基-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺;
- 3-(4-苄基-哌嗪-1-基甲基)-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺;
- 3-(4-萘-2-基甲基-哌嗪-1-基甲基)-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺;
- 3-(4-萘-1-基甲基-哌嗪-1-基甲基)-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺;
- 3-(4-联苯基-4-基甲基-哌嗪-1-基甲基)-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺;
- 3-[4-(2,4-二甲基-苄基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺;
- 3-[4-(4-乙基-2-甲基-萘-1-基甲基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺; 和
- 3-[4-(4-苄氧基-苄基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺。

进一步优选式 I 化合物的制备方法, 包括将式 3 的化合物:



3

在式 R_4NHR_5 化合物的存在下反应，其中 R^4 为 $-CH_2CH_2R_1$ ， R^5 为 $-CH_2CH_2R_2$ ， R^1 和 R^2 如前面所定义。

还优选式 I 化合物用作治疗活性物质。

进一步优选用于制备预防和/或治疗糖尿病的药物式 I 化合物。

本发明另一个优选方面是含有式 I 化合物和治疗惰性载体的药物组合物。

本发明的再一个优选实施方案是按照上述方法制备的式 I 化合物。

进一步优选的是治疗和/或预防与血糖水平有关的疾病的方法，该方法包括施用有效量的式 I 化合物。特别优选的是治疗糖尿病的方法。

本发明的化合物在体外抑制 PTP1B，并已显示可在体内降低血糖水平。因此，本发明的化合物可用于治疗糖尿病。

本发明的化合物可以口服、直肠、或非肠道给药，例如静脉内、肌内、皮下、鞘内或经皮给药；或者舌下给药或作为 ophthalmological 制剂。给药剂型的例子有用于口服给药的胶囊、片剂、混悬液或溶液，栓剂、注射液、滴眼液、药膏剂或喷雾溶液。

静脉内、肌内、口服或吸入给药是优选的给药方式。本发明化合物施用有效的剂量根据特定活性成分的性质、患者的年龄和要求、以及给药方式而改变。剂量可以通过任何常规方法确定，例如限制剂量的临床试验。通常，剂量优选每天约 0.1 到 100 mg/kg 体重，特别优选的剂量为每天 1-25 mg/kg。

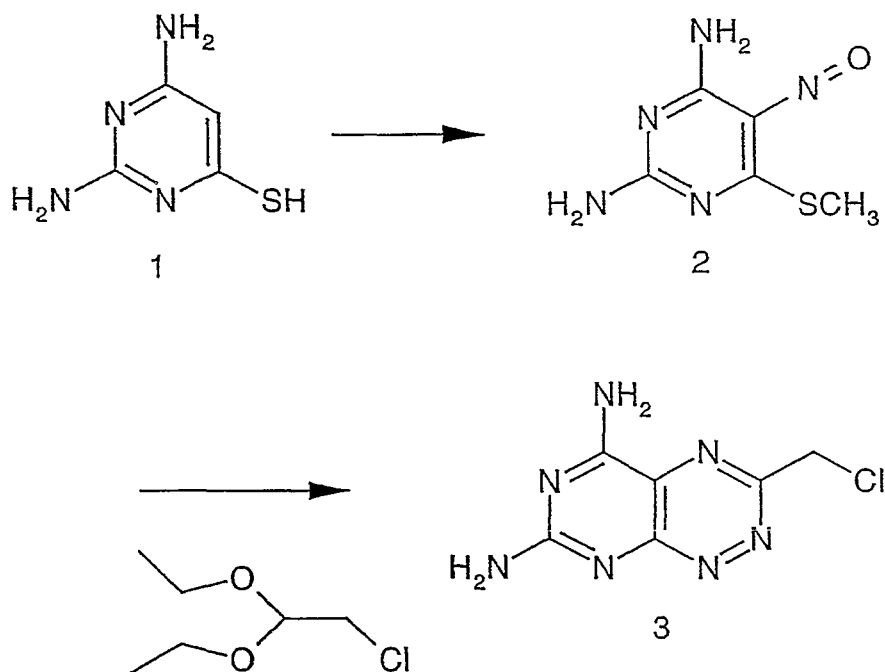
本发明进一步包括含有药物有效量的本发明化合物和药用载体的药物组合物。该组合物可以通过任何常规方法配制。片剂或颗粒剂可以含有一系列粘合剂、填充剂、载体或稀释剂。液体组合物可以为，例如无菌水-混溶溶液形式。胶囊除了含有活性成分之外，还可以含有填充剂或增稠剂。

另外，还可以存在改善口味的添加剂，通常用作防腐、稳定、保湿和乳化的物质，以及改变渗透压的盐、缓冲液和其它添加剂。

上述载体材料和稀释剂可以含有任何常规药用有机或无机物质，例如水、明胶、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、滑石粉、阿拉伯胶、聚亚烷基二醇等。

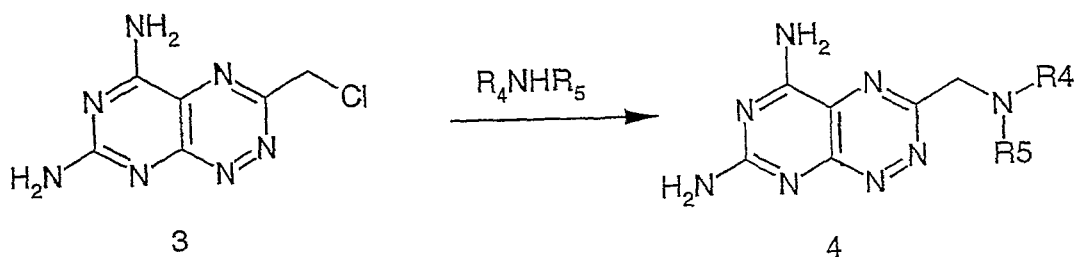
口服单元剂型，例如片剂和胶囊，优选含有 25 mg 至 1000 mg 本发明的化合物。本发明的化合物可以通过任何常规方法合成。下面反应路线 1-3 描述了一种具体方法。

反应路线 1



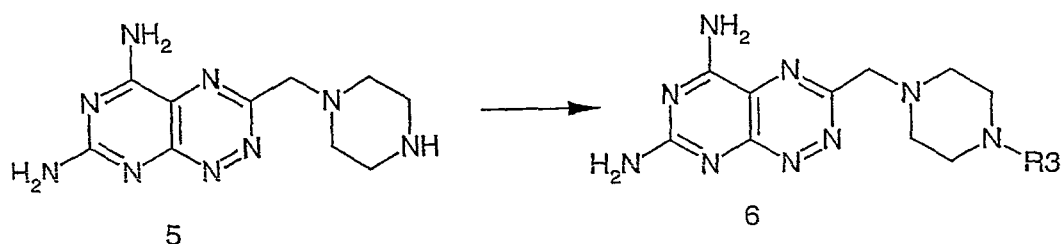
中间体氯甲基化合物 3 从商业可获得的反应路线 1 中所示的 2,4-二氨基-2-巯基嘧啶半硫酸盐(hemisulfate) 1 制备。对 1 进行 S-甲基化（例如用氢氧化钠和碘甲烷），然后在标准条件下（例如，在约 50°C 下用硝酸钠和乙酸）进行亚硝酰化，得到中间体芳基亚硝酰基衍生物 2。在室温下，在适当的溶剂例如二甲基甲酰胺中，用胍取代 2 中的硫甲基，然后在酸性条件(例如 HCl)和加热(例如，约 85°C)下，与商业可获得的氯甲基乙醛二乙缩醛缩合，得到氯甲基衍生物 3。

反应路线 2



然后将氯甲基衍生物 3 在适当溶剂例如乙醇中和加热(例如, 约 80-100 °C)条件下与各种已知胺反应, 得到反应路线 2 中所示的相应氨基甲基衍生物 4。对于反应路线 2 中的胺 R^4NHR^5 , R^4 为 $-CH_2CH_2R_1$, R^5 为 $-CH_2CH_2R_2$, R^1 和 R^2 如前面所定义。

反应路线 3

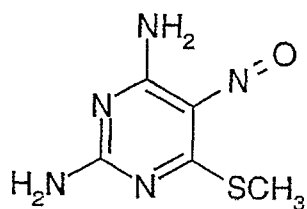


哌嗪衍生物 5(例如, 其中 R^4 和 R^5 一起形成 $-CH_2CH_2NHCH_2CH_2-$ 部分的衍生物 4) 从反应路线 2 中所示的氯甲基衍生物 3 和哌嗪制备。衍生物 5 与多种已知卤代烷(例如, R^3Br 或 R^3I , 其中 R^3 如上文所定义)的烷基化在适当的溶剂例如二甲基甲酰胺中, 并应用适当的碱例如碳酸钾, 在室温下进行, 得到反应路线 3 中所示的二烷基化哌嗪衍生物 6。

实施例

实施例 1

6-甲硫基-5-亚硝基-嘧啶-2,4-二胺



步骤 1: 向搅拌下的 105g KOH 在 1L 水中的溶液中加入 2,4-二氨基-6-巯基嘧啶半硫酸盐 1 (70.0 g), 然后加入碘甲烷 (91 mL)。将得到的混合液剧烈搅拌 4h, 然后过滤出固体沉淀, 用水洗涤, 空气干燥过夜, 得到 54.0g 6-甲巯基-嘧啶-2,4-二胺, 其为棕褐色固体。

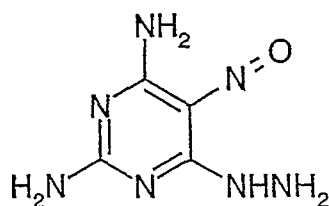
$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , ppm): 6.20 (s, 2H), 5.90 (s, 2H), 5.55 (s, 1H), 2.30 (s, 3H)。

步骤 2: 向搅拌下的 6-甲巯基-嘧啶-2,4-二胺 (50.0g; 321 mmol) 在水 (1000 mL) 中的悬浮液中, 加入 500mL 2N 乙酸。将混合液加热到 50°C, 然后迅速加入 NaNO_2 溶液 (24.0g; 353 mmol 在 200 mL H_2O 中)。50°C 下保持 1 hr 后, 将深蓝色/紫色混合液冷却到室温, 然后过滤。将该深蓝/紫色固体用水洗涤几次, 最后用乙醚洗涤。将该固体空气干燥, 得到 51.0g 6-甲巯基-5-亚硝基-嘧啶-2,4-二胺 2, 其为蓝/紫色固体。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , ppm): 9.70 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.95 (m, 2H), 2.43 (s, 3H)。

实施例 2

6-胍基-5-亚硝基-嘧啶-2,4-二胺



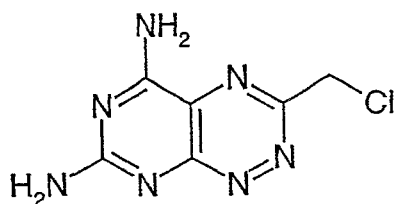
在室温下, 将胍水合物 (55% 溶液, 14.5 mL) 快速加入 6-甲巯基-5-亚硝基-嘧啶-2,4-二胺 2 (12.0g; 64.9 mmol) 在 DMF 的悬浮液中。将该混合液搅

拌过夜，然后过滤该亮粉色混合液，固体用 DMF 然后用乙醚洗涤几次，空气干燥，得到 9.53g 6-胍基-5-亚硝基-嘧啶-2,4-二胺，其为亮粉色固体。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , ppm): 8.00 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.05 (m, 2H), 5.35 (m, 2H)。

实施例 3

3-氯甲基-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺

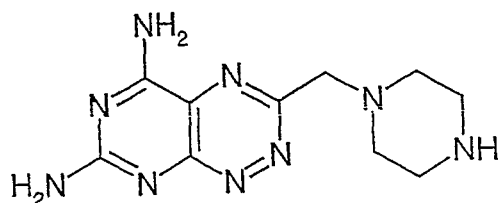


将浓 HCl (14 mL)加入搅拌中的冰冷却的 DMF (350 mL)，然后加入 7.14g 6-胍基-5-亚硝基-嘧啶-2,4-二胺。5 min 后，用 2 分钟的时间加入氯乙醛二乙缩醛(15.4 mL)。撤去冰浴，使混合物回温到室温。1 小时后，将混合物升温至 85°C 1.5 小时，然后在 2.5 小时内冷却至室温。过滤混合物以除去少量的棕色不溶物，用浓 NH_4OH 溶液使滤液呈碱性，然后用等量的水稀释。将混合物置于一边 1 小时，然后过滤以收集橙色/棕色固体，其进一步在真空下通过 P_2O_5 干燥，得到 3.50 g 3-氯甲基-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺 3。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , ppm): 8.25 (s, 2H), 7.95 (s, 1H), 7.30 (bs, 1H), 5.02 (s, 2H)。

实施例 4

3-哌嗪-1-基甲基-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺

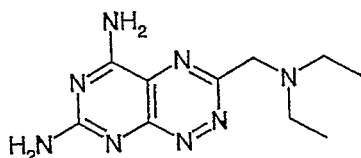


将 3-氯甲基-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺 3 (2.00g; 9.5 mmol)和 哌嗪 (2.50g; 29 mmol)在无水乙醇中的混合物在密封的管子里加热至 100 °C 4 小时。然后将混合物冷却至室温并蒸发。通过反相 HPLC (Rainin C₁₈, 0% CH₃CN 至 30% CH₃CN 梯度, CH₃CN/H₂O, 0.1% TFA)纯化粗产物, 在真空下除去 CH₃CN 后冻干含有产物的亮黄色级分, 得到 1.44g 黄色 3-哌嗪-1-基甲基-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺 5, 其为三氟乙酸盐。

¹H NMR (DMSO-d₆, ppm): 9.55 (s, 1H), 9.40 (s, 1H), 8.80 (s, 2H), 8.45 (s, 1H), 4.15 (s, 2H), 3.10 (m, 4H), 2.80 (m, 4H).

实施例 5

3-二乙基氨基甲基-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺

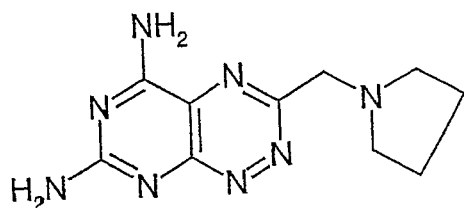


将 3-氯甲基-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺 3 (200 mg; 0.95 mmol)和二乙胺 (2.00 mL)在无水乙醇(2.0 mL)中的混合物在密封的管子里加热至 100 °C 5 小时。然后将混合物冷却至室温并在真空下浓缩。通过反相 HPLC (Rainin C₁₈, 0% CH₃CN 至 30% CH₃CN 梯度, CH₃CN/H₂O, 0.1% TFA)纯化粗产物, 在真空下除去 CH₃CN 后冻干含有产物的亮黄色级分, 得到 65 mg 黄色 3-二乙基氨基甲基-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺 4, 其为三氟乙酸盐。

¹H NMR (DMSO-d₆, ppm): 9.10 (bs, 1H), 8.90 (bs, 1H), 8.15 (bs, 2H), 4.80 (s, 2H), 3.25 (q, 4H), 1.30 (t, 6H).

实施例 6

3-吡咯烷-1-基甲基-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺

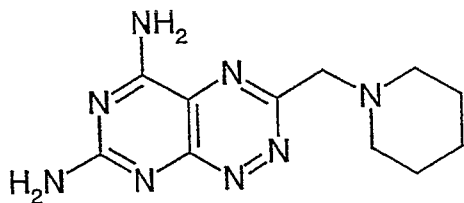


将 3-氯甲基-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺 3 (70 mg; 0.33 mmol) 和 1.0 mL 吡咯烷的混合物在密封的管子里加热至 80°C 7 小时。然后将混合物冷却至室温并在真空下浓缩。通过反相 HPLC (Rainin C₁₈, 0% CH₃CN 至 30% CH₃CN 梯度, CH₃CN/H₂O, 0.1% TFA) 纯化粗产物, 在真空下除去 CH₃CN 后冻干含有产物的亮黄色级分, 得到 50 mg 黄色 3-吡咯烷-1-基甲基-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺, 其为三氟乙酸盐。

¹H NMR (DMSO-d₆, ppm): 9.15 (bs, 1H), 8.88 (bs, 1H), 8.20 (bs, 2H), 3.67 (s, 2H), 3.20 (bm, 2H), 1.85-2.10 (m, 4H).

实施例 7

3-哌啶-1-基甲基-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺

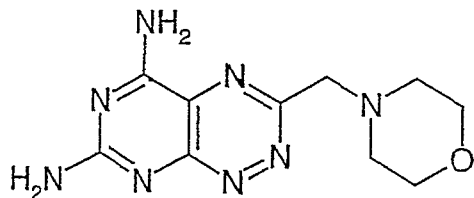


将 3-氯甲基-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺 3 (70 mg; 0.33 mmol) 和 1.0 mL 哌啶的混合物在密封的管子里加热至 80°C 7 小时。然后将混合物冷却至室温并在真空下浓缩。通过反相 HPLC (Rainin C₁₈, 0% CH₃CN 至 30% CH₃CN 梯度, CH₃CN/H₂O, 0.1% TFA) 纯化粗产物, 在真空下除去 CH₃CN 后冻干含有产物的亮黄色级分, 得到 111 mg 黄色 3-哌啶-1-基甲基-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺, 其为三氟乙酸盐。

¹H NMR (DMSO-d₆, ppm): 9.18 (bs, 1H), 8.95 (bs, 1H), 8.30 (bs, 2H), 4.80 (s, 2H), 3.50 (bm, 2H), 3.10 (bm, 2H), 1.35-1.90 (m, 6H).

实施例 8

3-吗啉-4-基甲基-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺

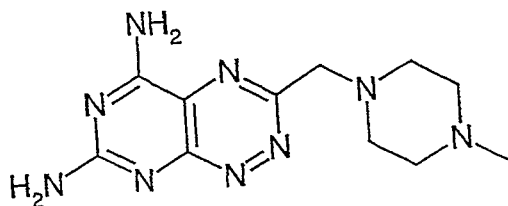


将 3-氯甲基-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺 3 (200 mg; 0.95 mmol) 和 2.0 mL 吗啉的混合物在密封的管子里加热至 80°C 7 小时。然后将混合物冷却至室温并在真空下浓缩。通过反相 HPLC (Rainin C₁₈, 0% CH₃CN 至 30% CH₃CN 梯度, CH₃CN/H₂O, 0.1% TFA) 纯化粗产物, 在真空下除去 CH₃CN 后冻干含有产物的亮黄色级分, 得到 261 mg 黄色 3-吗啉-4-基甲基-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺, 其为三氟乙酸盐。

¹H NMR (DMSO-d₆, ppm): 9.25 (bs, 1H), 9.00 (bs, 1H), 8.30 (bs, 2H), 4.80 (s, 2H), 3.85 (m, 4H), 3.30 (m, 4H).

实施例 9

3-(4-甲基-哌嗪-1-基甲基)-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺

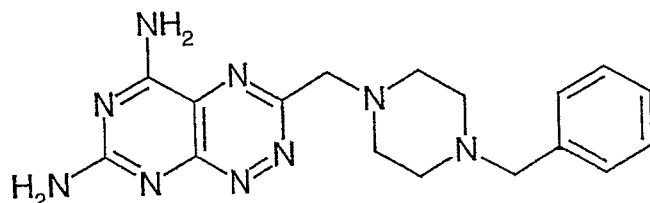


将 3-氯甲基-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺 3 (200 mg; 0.95 mmol) 和 N-甲基哌嗪 (2.00 mL) 的混合物在密封的管子里加热至 80°C 7 小时。然后将混合物冷却至室温并在真空下浓缩。通过反相 HPLC (Rainin C₁₈, 0% CH₃CN 至 30% CH₃CN 梯度, CH₃CN/H₂O, 0.1% TFA) 纯化粗产物, 在真空下除去 CH₃CN 后冻干含有产物的亮黄色级分, 得到 178 mg 黄色 3-(4-甲基-哌嗪-1-基甲基)-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺, 其为三氟乙酸盐。

$^1\text{H NMR}$ (D_2O , ppm): 4.45 (s, 2H), 3.10-3.60 (m, 8H), 2.90 (s, 3H).

实施例 10

3-(4-苄基-哌嗪-1-基甲基)-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺

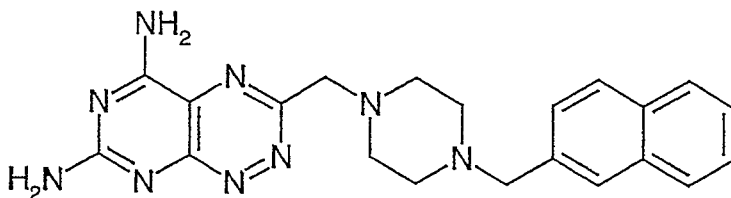


将 3-氯甲基-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺 3 (48 mg; 0.23 mmol) 和 N-苄基哌嗪 (0.12 mL) 在乙醇 (0.1 mL) 中的混合物在密封的管子里加热至 90°C 2 小时。然后将混合物冷却至室温并在真空下浓缩。通过反相 HPLC (Rainin C_{18} , 0% CH_3CN 至 50% CH_3CN 梯度, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, 0.1% TFA) 纯化粗产物, 在真空下除去 CH_3CN 后冻干含有产物的亮黄色级分, 得到 26 mg 黄色 3-(4-苄基-哌嗪-1-基甲基)-嘧啶并[5,4e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺, 其为三氟乙酸盐。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO-d_6 , ppm): 7.50 (m, 5H), 4.34 (s, 2H), 4.25 (s, 2H), 2.90-3.40 (m, 8H).

实施例 11

3-(4-萘-2-基甲基-哌嗪-1-基甲基)-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺



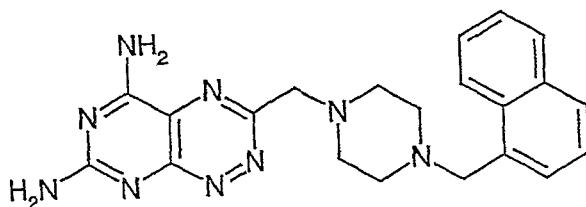
向搅拌下的 3-哌嗪-1-基甲基-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺 TFA 盐 5 (30 mg; 0.05 mmol; 实施例 4 中制备) 在无水的 DMF (1.0 mL) 的溶液中加入 2-溴甲基萘 (17 mg; 0.075 mmol), 然后加入碳酸钾 (28 mg; 0.20 mmol)。在室温下将混合液搅拌 24h, 然后置于 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/0.1\%$ TFA 中。

经反相 HPLC (Rainin C18, 0% CH₃CN 至 30% CH₃CN 梯度, CH₃CN/H₂O, 0.1% TFA) 纯化混合物, 在真空下除去 CH₃CN 后冻干含有产物的亮黄色级分, 得到 19 mg 黄色 3-(4-萘-2-基甲基-哌嗪-1-基甲基)-嘧啶并[5, 4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺, 其为三氟乙酸盐。

¹H NMR (DMSO-d₆, ppm): 9.37 (bs, 1H), 9.23 (bs, 1H), 8.20 (bs, 1H), 7.98 (m, 5H), 7.57 (m, 3H), 4.45 (bs, 2H), 4.15 (bs, 2H), 2.60-3.35 (m, 8H).

实施例 12

3-(4-萘-1-基甲基-哌嗪-1-基甲基)-嘧啶并[5, 4-e] [1,2, 4]三嗪-5, 7-二胺

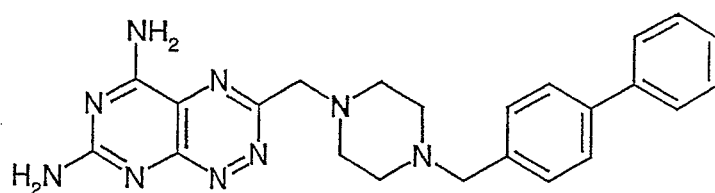


向搅拌下的 3-哌嗪-1-基甲基-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺 TFA 盐 5 (70 mg; 0.12 mmol; 实施例 4 中制备) 在无水的 DMF (1.0 mL) 的溶液中加入 1-氯甲基萘(0.023 mL; 0.18 mmol), 然后加入碳酸钾(65 mg; 0.470 mmol)。在室温下将混合液搅拌 24h, 然后置于 CH₃CN/H₂O/0.1% TFA 中。经反相 HPLC (Rainin C18, 0% CH₃CN 至 30% CH₃CN 梯度, CH₃CN/H₂O, 0.1% TFA) 纯化混合物, 在真空下除去 CH₃CN 后冻干含有产物的亮黄色级分, 得到 35 mg 黄色 3-(4-萘-1-基甲基-哌嗪-1-基甲基)-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺, 其为三氟乙酸盐。

¹H NMR (DMSO-d₆, ppm): 9.36 (bs, 1H), 9.23 (bs, 1H), 8.53 (bs, 1H), 8.32 (m, 1H), 8.23 (bs, 1H), 8.00 (m, 2H), 7.60 (m, 4H), 4.68 (bs, 2H), 4.23 (bs, 2H), 2.80-3.40 (m, 8H).

实施例 13

3-(4-联苯基-4-基甲基-哌嗪-1-基甲基)-嘧啶并[5, 4-e] [1,2,4]三嗪-5, 7-二胺

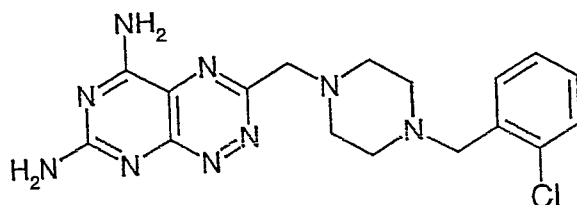


向搅拌下的 3-哌嗪-1-基甲基-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺 TFA 盐 5 (30 mg; 0.05 mmol; 实施例 4 中制备) 在无水的 DMF (1.0 mL) 的溶液中加入 4-氯甲基联苯基 (15 mg; 0.08 mmol), 然后加入碳酸钾 (28 mg; 0.20 mmol)。在室温下将混合液搅拌 24h, 然后置于 CH₃CN/H₂O/0.1% TFA 中。经反相 HPLC (Rainin C18, 0% CH₃CN 至 30% CH₃CN 梯度, CH₃CN/H₂O, 0.1% TFA) 纯化混合物, 在真空下除去 CH₃CN 后冻干含有产物的亮黄色级分, 得到 20 mg 黄色 3-(4-联苯基-4-基甲基-哌嗪-1-基甲基)-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺, 其为三氟乙酸盐。

¹H NMR (DMSO-d₆, ppm): 9.60 (s, 1H), 9.43 (s, 1H), 8.83 (bs, 1H), 8.53 (bs, 1H), 7.35-7.82 (m, 9H), 4.33 (s, 2H), 4.15 (s, 2H), 2.70-3.40 (m, 8H).

实施例 14

3-[4-(2-氯-苄基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺



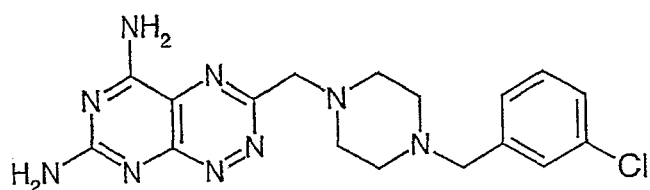
向搅拌下的 3-哌嗪-1-基甲基-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺 TFA 盐 5 (50 mg; 0.08 mmol; 实施例 4 中制备) 在无水的 DMF (1.0 mL) 的溶液中加入 o-氯苄基氯化物 (0.015 mL; 0.12 mmol), 然后加入碳酸钾 (55 mg; 0.40 mmol)。在室温下将混合液搅拌 24h, 然后置于 CH₃CN/H₂O/0.1% TFA 中。经反相 HPLC (Rainin C18, 0% CH₃CN 至 50% CH₃CN 梯度, CH₃CN/H₂O,

0.1% TFA) 纯化混合物, 在真空下除去 CH_3CN 后冻干含有产物的亮黄色级分, 得到 17 mg 黄色 3-[4-(2-氯-苄基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺, 其为三氟乙酸盐。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO-d_6 , ppm): 7.40-7.70 (m, 4H), 4.44 (s, 2H), 4.36 (s, 2H), 2.80-3.40 (m, 8H).

实施例 15

3-[4-(3-氯-苄基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺

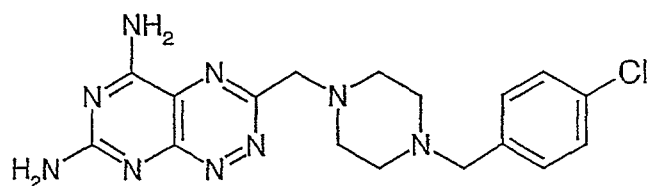


向搅拌下的 3-哌嗪-1-基甲基-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺 TFA 盐 5 (50 mg; 0.08 mmol; 实施例 4 中制备) 在无水的 DMF (1.0 mL) 的溶液中加入 m-氯苄基氯化物 (0.015 mL; 0.12 mmol), 然后加入碳酸钾 (55 mg; 0.40 mmol)。在室温下将混合液搅拌 24h, 然后置于 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/0.1\%$ TFA 中。经反相 HPLC (Rainin C18, 0% CH_3CN 至 50% CH_3CN 梯度, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, 0.1% TFA) 纯化混合物, 在真空下除去 CH_3CN 后冻干含有产物的亮黄色级分, 得到 9 mg 黄色 3-[4-(3-氯-苄基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺, 其为三氟乙酸盐。

$^1\text{H NMR}$ (MeOH-d_4 , ppm): 7.40-7.58 (m, 4H), 4.32 (s, 4H), 2.80-3.40 (m, 8H).

实施例 16

3-[4-(4-氯-苄基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺

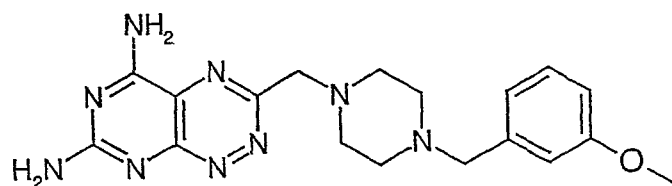


向搅拌下的 3-哌嗪-1-基甲基-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺 TFA 盐 5 (50 mg; 0.08 mmol; 实施例 4 中制备) 在无水的 DMF (1.0 mL) 的溶液中加入 p-氯苄基氯化物 (29 mg; 0.18 mmol), 然后加入碳酸钾 (55 mg; 0.40 mmol)。在室温下将混合液搅拌 24h, 然后置于 CH₃CN/H₂O/0.1% TFA 中。经反相 HPLC (Rainin C18, 0% CH₃CN 至 50% CH₃CN 梯度, CH₃CN/H₂O, 0.1% TFA) 纯化混合物, 在真空下除去 CH₃CN 后冻干含有产物的亮黄色级分, 得到 21 mg 黄色 3-[4-(4-氯-苄基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5, 4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺, 其为三氟乙酸盐。

¹H NMR (MeOH-d₄, ppm): 8.20 (m, 4H), 4.30 (s, 4H), 2.88-3.40 (m, 8H).

实施例 17

3-[4-(3-甲氧基-苄基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺

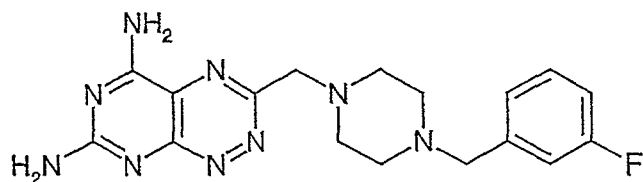


向搅拌下的 3-哌嗪-1-基甲基-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺 TFA 盐 5 (50 mg; 0.08 mmol; 实施例 4 中制备) 在无水的 DMF (1.0 mL) 的溶液中加入 m-甲氧基苄基氯化物 (19 mg; 0.12 mmol), 然后加入碳酸钾 (55 mg; 0.40 mmol)。在室温下将混合液搅拌 24h, 然后置于 CH₃CN/H₂O/0.1% TFA 中。经反相 HPLC (Rainin C18, 0% CH₃CN 至 50% CH₃CN 梯度, CH₃CN/H₂O, 0.1% TFA) 纯化混合物, 在真空下除去 CH₃CN 后冻干含有产物的亮黄色级分, 得到 30 mg 黄色 3-[4-(3-甲氧基-苄基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺, 其为三氟乙酸盐。

¹H NMR (MeOH-d₄, ppm): 7.40 (m, 1H), 7.06 (m, 3H), 4.30 (s, 2H), 4.23 (s, 2H), 3.81 (s, 3H), 2.80-3.40 (m, 8H).

实施例 18

3-[4-(3-氟-苄基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺

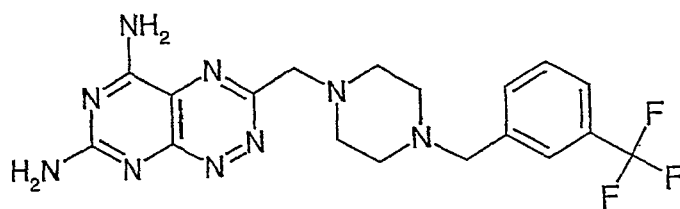


向搅拌下的 3-哌嗪-1-基甲基-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺 TFA 盐 5 (50 mg; 0.08 mmol; 实施例 4 中制备) 在无水的 DMF (1.0 mL) 的溶液中加入 m-氟苄基氯化物 (0.0143 mL; 0.12 mmol), 然后加入碳酸钾 (55 mg; 0.40 mmol)。在室温下将混合液搅拌 24h, 然后置于 CH₃CN/H₂O/0.1% TFA 中。经反相 HPLC (Rainin C18, 0% CH₃CN 至 50% CH₃CN 梯度, CH₃CN/H₂O, 0.1% TFA) 纯化混合物, 在真空下除去 CH₃CN 后冻干含有产物的亮黄色级分, 得到 11 mg 黄色 3-[4-(3-氟-苄基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺, 其为三氟乙酸盐。

¹H NMR (MeOH-d₄, ppm): 7.18-7.60 (m, 4H), 4.33 (s, 2H), 4.27 (s, 2H), 2.83-3.38 (m, 8H).

实施例 19

3-[4-(3-三氟甲基-苄基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺



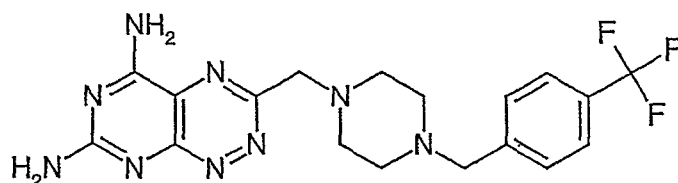
向搅拌下的 3-哌嗪-1-基甲基-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺 TFA 盐 5 (50 mg; 0.08 mmol; 实施例 4 中制备) 在无水的 DMF (1.0 mL) 的溶液中加入 m-三氟甲基苄基溴化物 (0.021 mL; 0.14 mmol), 然后加入碳酸钾 (55 mg; 0.40 mmol)。在室温下将混合液搅拌 24h, 然后置于 CH₃CN/H₂O/0.1% TFA 中。经反相 HPLC (Rainin C18, 0% CH₃CN 至 50% CH₃CN 梯度,

CH₃CN/H₂O, 0.1% TFA) 纯化混合物, 在真空下除去 CH₃CN 后冻干含有产物的亮黄色级分, 得到 13 mg 黄色 3-[4-(3-三氟甲基-苄基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺, 其为三氟乙酸盐。

¹H NMR (MeOH-d₄, ppm): 7.63-7.92 (m, 4H), 4.38 (s, 2H), 4.32 (s, 2H), 2.85-3.38 (m, 8H).

实施例 20

3-[4-(4-三氟甲基-苄基)-哌嗪-1-基甲基]嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺

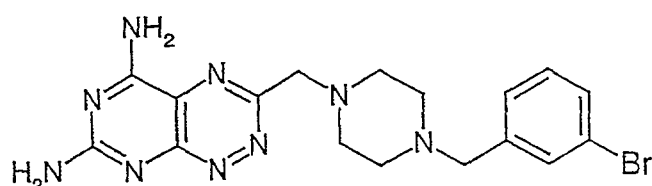


向搅拌下的 3-哌嗪-1-基甲基-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺 TFA 盐 5 (50 mg; 0.08 mmol; 实施例 4 中制备) 在无水的 DMF (1.0 mL) 的溶液中加入 p-三氟甲基苄基溴化物 (0.021 mL; 0.14 mmol), 然后加入碳酸钾 (55 mg; 0.40 mmol)。在室温下将混合液搅拌 24h, 然后置于 CH₃CN/H₂O/0.1% TFA 中。经反相 HPLC (Rainin C18, 0% CH₃CN 至 50% CH₃CN 梯度, CH₃CN/H₂O, 0.1% TFA) 纯化混合物, 在真空下除去 CH₃CN 后冻干含有产物的亮黄色级分, 得到 22 mg 黄色 3-[4-(4-三氟甲基-苄基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺, 其为三氟乙酸盐。

¹H NMR (MeOH-d₄, ppm): 7.77 (m, 4H), 4.37 (s, 2H), 4.33 (s, 2H), 2.90-3.38 (m, 8H).

实施例 21

3-[4-(3-溴-苄基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺

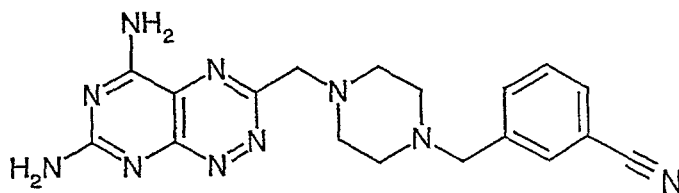


向搅拌下的 3-哌嗪-1-基甲基-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺 TFA 盐 5 (50 mg; 0.08 mmol; 实施例 4 中制备) 在无水 DMF (1.0 mL) 的溶液中加入 *m*-溴苄基溴化物(34 mg; 0.14 mmol), 然后加入碳酸钾(55 mg; 0.40 mmol)。在室温下将混合液搅拌 24h, 然后置于 CH₃CN/H₂O/0.1% TFA 中。经反相 HPLC (Rainin C18, 0% CH₃CN 至 50% CH₃CN 梯度, CH₃CN/H₂O, 0.1% TFA) 纯化混合物, 在真空下除去 CH₃CN 后冻干含有产物的亮黄色级分, 得到 15 mg 黄色 3-[4-(3-溴-苄基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5, 4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺, 其为三氟乙酸盐。

¹H NMR (MeOH-d₄, ppm): 7.38-7.80 (m, 4H), 4.30 (s, 4H), 2.85-3.38 (m, 8H).

实施例 22

3-[4-(3-氰基-苄基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e] [1,2, 4]三嗪-5,7-二胺

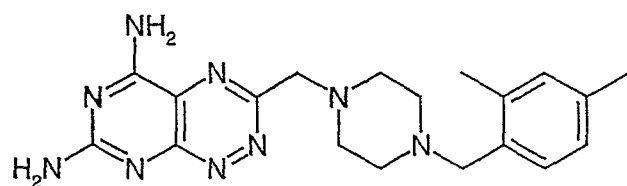


向搅拌下的 3-哌嗪-1-基甲基-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5,7-二胺 TFA 盐 5 (50 mg; 0.08 mmol; 实施例 4 中制备) 在无水 DMF (1.0 mL) 的溶液中加入 *m*-氰基苄基溴化物(23 mg; 0.18 mmol), 然后加入碳酸钾(55 mg; 0.40 mmol)。在室温下将混合液搅拌 24h, 然后置于 CH₃CN/H₂O/0.1% TFA 中。经反相 HPLC (Rainin C18, 0% CH₃CN 至 50% CH₃CN 梯度, CH₃CN/H₂O, 0.1% TFA) 纯化混合物, 在真空下除去 CH₃CN 后冻干含有产物的亮黄色级分, 得到 12 mg 黄色 3-[4-(3-氰基-苄基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e] [1,2,4]三嗪-5, 7-二胺, 其为三氟乙酸盐。

¹H NMR (MeOH-d₄, ppm): 7.60-7.92 (m, 4H), 4.37 (s, 2H), 4.27 (s, 2H), 2.95-3.35 (m, 8H).

实施例 23

3-[4-(2,4-二甲基-苄基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺

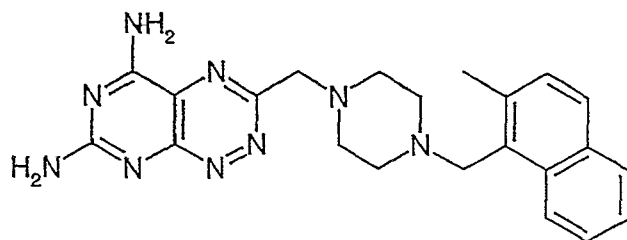


向搅拌下的 3-哌嗪-1-基甲基-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺 TFA 盐 5 (50 mg; 0.08 mmol; 实施例 4 中制备) 在无水的 DMF (1.0 mL) 的溶液中加入 2,4-二甲基苄基氯化物 (0.020 mL; 0.13 mmol), 然后加入碳酸钾 (55 mg; 0.40 mmol)。在室温下将混合液搅拌 24h, 然后置于 CH₃CN/H₂O/0.1% TFA 中。经反相 HPLC (Rainin C18, 0% CH₃CN 至 50% CH₃CN 梯度, CH₃CN/H₂O, 0.1% TFA) 纯化混合物, 在真空下除去 CH₃CN 后冻干含有产物的亮黄色级分, 得到 10 mg 黄色 3-[4-(2,4-二甲基-苄基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺, 其为三氟乙酸盐。

¹H NMR (dms_o-d₆, ppm): 9.40 (bs, 1H), 8.17 (bs, 2H), 7.00-7.40 (m, 3H), 4.28 (bs, 2H), 4.10 (bs, 2H), 2.95-3.35 (m, 8H), 2.34 (s, 3H), 2.28 (s, 3H).

实施例 24

3-[4-(4-乙基-2-甲基-萘-1-基甲基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺



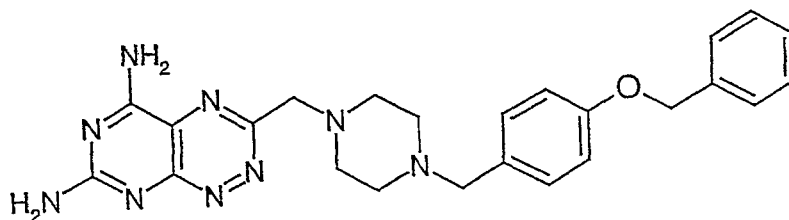
向搅拌下的 3-哌嗪-1-基甲基-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺 TFA 盐 5 (50 mg; 0.08 mmol; 实施例 4 中制备) 在无水的 DMF (1.0 mL) 的溶液中加入 1-氯甲基-2-甲基-萘 (34 mg; 0.18 mmol), 然后加入碳酸钾 (55 mg; 0.40

mmol)。在室温下将混合液搅拌 24h, 然后置于 CH₃CN/H₂O/0.1% TFA 中。经反相 HPLC (Rainin C18, 0% CH₃CN 至 50% CH₃CN 梯度, CH₃CN/H₂O, 0.1% TFA) 纯化混合物, 在真空下除去 CH₃CN 后冻干含有产物的亮黄色级分, 得到 23 mg 黄色 3-[4-(4-乙基-2-甲基-萘-1-基甲基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺, 其为三氟乙酸盐。

¹H NMR (MeOH-d₄, ppm): 8.07 (m, 1H), 7.92 (m, 2H), 7.40-7.50 (m, 3H), 4.90 (s, 2H), 4.37 (s, 2H), 2.70 (s, 3H), 2.80-3.45 (m, 8H).

实施例 25

3-[4-(4-苄氧基-苄基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺



向搅拌下的 3-哌嗪-1-基甲基-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺 TFA 盐 5 (50 mg; 0.08 mmol; 实施例 4 中制备) 在无水的 DMF (1.0 mL) 的溶液中加入 1-氯甲基-2-甲基-萘 (27 mg; 0.12 mmol), 然后加入碳酸钾 (58 mg; 0.42 mmol)。在室温下将混合液搅拌 24h, 然后置于 CH₃CN/H₂O/0.1% TFA 中。经反相 HPLC (Rainin C18, 0% CH₃CN 至 50% CH₃CN 梯度, CH₃CN/H₂O, 0.1% TFA) 纯化混合物, 在真空下除去 CH₃CN 后冻干含有产物的亮黄色级分, 得到 23 mg 黄色 3-[4-(4-苄氧基-苄基)-哌嗪-1-基甲基]-嘧啶并[5,4-e][1,2,4]三嗪-5,7-二胺, 其为三氟乙酸盐。

¹H NMR (dmsO-d₆, ppm): 9.63 (s, 1H), 9.50 (s, 1H), 8.91 (bs, 1H), 8.77 (bs, 1H), 7.40 (m, 7H), 7.05 (m, 2H), 5.12 (s, 2H), 4.25 (s, 2H), 4.17 (s, 2H), 2.60-3.40 (m, 8H).

实施例 26 PTP1B 的体外抑制

用常规分子生物学方法从人 cDNA 文库克隆人 PTP1B (1-321)。该

cDNA 序列与报道的人 PTP1B 序列(登记号 M33689)相同。按照 Barford D. 等 J. Mol Biol (1994) 239, 726-730 的描述从大肠杆菌(E. coli)表达和纯化该蛋白质。

PTPase 检测

PTPase 活性的测定用下述两种方法之一进行:

第一种方法用于测定 PTP1B 抑制活性, 使用以胰岛素受体酪氨酸自磷酸化位点(TRDI (pY) E)的氨基酸序列为基础的磷酸化的酪氨酸肽作为底物。反应条件如下:

在含有 37.5 mM Mes 缓冲液 pH 6.2, 140mM NaCl, 0.05% BSA 和 300nM DTT 的缓冲液中将 PTP1B (0.5-2nM)与化合物孵育 15 min。加入 50 μ M 底物起始反应。在室温下 (22-25 $^{\circ}$ C)保持 20 min 后, 加入 KOH 终止反应, 按照以前的报道(Harder 等 1994 Biochem J. 298; 395), 利用孔雀绿 (Malachite Green) 检测游离磷酸的量。

第二种方法用于通过 PTPase 板测定一般 PTPase 抑制活性。每种酶使用的底物(6,8-二氟-4-甲基 umbelliferyl 磷酸(DiFMUP; 来源于 Molecular Probes)在 Km。缓冲条件与上述孔雀绿检测法中的相同, 除了用 37.5 mM 二乙基戊二酸 pH 6.2 代替 MES。用 KOH 终止反应。在这种方法中, 脱磷酸化的产品发出荧光, 记录荧光(激发: 360nm/发射: 460nm)。

对于动力学实验, 使用相同的缓冲条件, 除了用酶起始反应, 反应 10 分钟后终止。

按照上述体外分析试验, 本发明化合物对 PTP1B 的 IC₅₀ 低于 500 μ M, 优选低于 100。

如上述体外分析试验所测定, 实施例 4-25 的所有化合物的 PTP1B IC₅₀ 均低于 30 μ M。

实施例 27 化合物在小鼠模型中对血糖水平的影响

为了测定抗血糖效果, 在已确立的 II 型糖尿病和肥胖啮齿动物体内模型中测试化合物。

肥胖 ob/ob 小鼠

使用雄性或雌性 ob/ob (C57BL6/J)小鼠(Diabetologia 14,141-148 (1978)) (Jackson Labs) 40-50g 评价化合物对于降糖以及降低甘油三酸酯的效果。将小鼠根据血糖水平以及体重分成 10-12 只动物的组。用啮齿动物常规食物和水无限制地喂养小鼠。用填喂法每天给小鼠喂化合物（悬浮于 1% Na-CMC），连续 5 天。第一天给药前，剪下小鼠部分尾巴，从尾静脉采血，记录初始血糖。第五天处理后 2 小时，用同样的方法再次测量血糖。然后麻醉动物，放血处死。采集血液和组织用于分析。如果化合物处理鼠的血糖相对于载体处理鼠的血糖表现统计学显著($p \leq 0.05$)降低，则认为该化合物具有活性。

饮食诱导的肥胖 C57BL6/J 小鼠 (DIO 小鼠)

将小鼠用高脂肪饮食喂养 4-6 个月，可以产生 II 型糖尿病小鼠。(Diabetes 37: 1163-67 Sept 1988)。将雄性 C57BL6/J 小鼠 (3-4 周龄)用高脂肪饮食喂养 4-6 周。此时，这些小鼠表现高血糖和高胰岛素，体重 40-50 g。将 DIO 小鼠(n=6)称重，口服给药处理之前禁食 2 小时。填喂法给药之前，按照上述方法从小鼠尾静脉得出初始(零时刻)血糖值。

用化合物处理小鼠每天 1 次，连续 5 天。载体小鼠不给化合物。在第 5 天给药前 (0 时刻) 以及给药后 2 小时和 4 小时，测量血糖。给药后 4 小时，测量胰岛素和甘油三酸酯。

如果化合物在动物中的效果相对于载体处理动物表现糖、胰岛素和甘油三酸酯统计学显著($p < 0.05$)降低，则认为该化合物具有活性。

按照实施例 27 的方法，用实施例 5, 10 和 13 的化合物进行小鼠体内实验，它们显示血糖水平至少降低 15%。