



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106810536 A

(43) 申请公布日 2017. 06. 09

(21) 申请号 201510856641. 1

C07D 471/04(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 11. 30

A61K 31/506(2006. 01)

(71) 申请人 甘李药业股份有限公司

A61P 35/00(2006. 01)

地址 101102 北京市通州区中关村科技园区
通州园金桥科技产业基地景盛北三街
8号

A61P 35/02(2006. 01)

A61P 31/18(2006. 01)

A61P 9/10(2006. 01)

A61P 9/00(2006. 01)

(72) 发明人 尹磊 刘文剑 李恒

(74) 专利代理机构 北京瑞恒信达知识产权代理
事务所(普通合伙) 11382

代理人 李琰

(51) Int. Cl.

C07D 401/14(2006. 01)

权利要求书7页 说明书47页

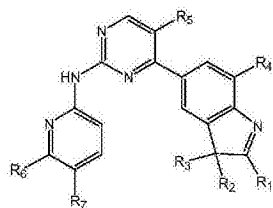
(54) 发明名称

一种蛋白激酶抑制剂及其制备方法和医药用途

(57) 摘要

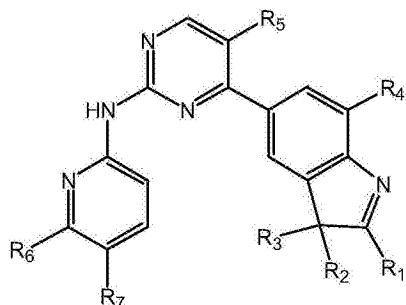
本发明提供了一种结构式 I 的化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体, 氘代化合物, 前药或其混合物形式, 或结构式 I 的化合物、其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体, 氘代化合物, 前药或其混合物的药学上可以接受的盐或溶剂化物, 其中 R₁~R₇如文中定义。本发明还提供所述化合物的制备方法和医药用途。本发明所述的化合物活性优于或与目前处于 III 期临床试验的候选药物 LY2835219 相当, 部分化合物表现出更好的选择性。而且优选的化合物口服吸收良好、血脑分布好, 预示着本发明的化合物有希望被开发成新的治疗细胞增殖相关疾病, 为临床医生和患者

提供新的选择。



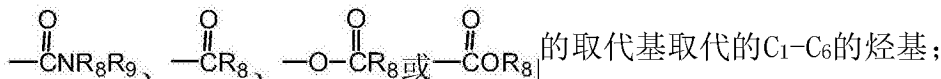
I

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



I

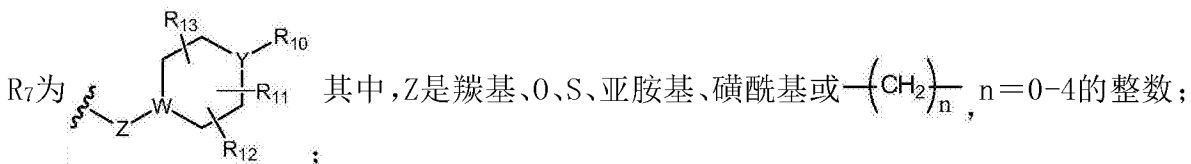
其中, R₁, R₂, R₃各自独立地选自氢原子、未被取代的C₁-C₆的烷基或被一个或多个选自C₁-C₆的烷基、C₃-C₆的环烷基、C₁-C₆的卤代烷基、C₁-C₆的烷氧基、羟基、卤素、氰基、-NR₈R₉、



或者R₁, R₂, R₃中的任意两个与各自连接的C原子一起形成饱和或不饱和的3-7元环;

R₄和R₅各自独立地选自氢、卤素, 且R₄和R₅中至少一个是卤素;

R₆选自氢原子、C₁-C₆烷基、C₁-C₆烷氧基、羟基或卤素;



W和Y各自独立地是C、N、O或S, 但W和Y不能同时是C, 且当Z是O或S时, W是C; R₁₀、R₁₁、R₁₂和R₁₃各自独立地选自氢原子、C₁-C₆的烷基、C₃-C₆的环烷基、C₁-C₆的羟基烷基、C₁-C₆的卤代烷基、C₁-

C₆的烷氧基、羟基、卤素、氰基、-NR₈R₉、 $\text{—C(=O)NR}_8\text{R}_9$ 、 —C(=O)R_8 、 —O—C(=O)R_8 或 —C(=O)OR_8 , 且Y=N时, R₁₀

不能是NH₂、-NHR₈、-NR₈R₉、 $\text{—C(=O)NR}_8\text{R}_9$ 、 —C(=O)R_8 、 —O—C(=O)R_8 或 —C(=O)OR_8 ;

或者, R₆和R₇与其连接的C原子一起形成含一个或多个选自N、O或S的5-7元杂环, 并且所述5-7元杂环被一个或多个选自C₁-C₆的烷基、C₃-C₆的环烷基、C₁-C₆的卤代烷基、C₁-C₆的烷氧基、C₁-C₆的羟基烷基、羟基、卤素、氰基、-NH₂、-NHR₈、-NR₈R₉、



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

2. 根据权利要求1所述的构式I的化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体, 氘代化合物, 前药或其混合物形式, 或结构式I的化合物、其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体, 氘代化合物, 前药或其混合物的药学

上可以接受的盐或溶剂化物,其特征在于, R_1, R_2, R_3 各自独立地选自氢原子、未被取代的 C_1-C_6 的烃基或被一个或多个选自 C_1-C_6 的烃基、 C_3-C_6 的环烷基、 C_1-C_6 的卤代烷基、 C_1-C_6 的烷氧基、羟基或卤素的取代基取代的 C_1-C_6 的烃基;

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

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

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

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

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

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

最优选的, R_4 是氢或氟, R_5 是氟。

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

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

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

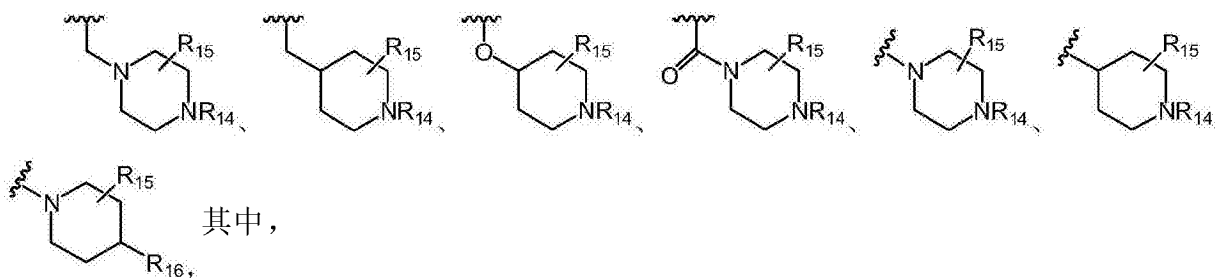
还优选的, W 和 Y 各自独立地选自C或N,但 W 和 Y 不能同时是C;

还优选的, R_{10}, R_{11}, R_{12} 和 R_{13} 各自独立地选自氢原子、 C_1-C_6 的烷基、 C_3-C_6 的环烷基、 C_1-C_6 的羟基烷基、 C_1-C_6 的卤代烷基、 C_1-C_6 的烷氧基、羟基或 $-NR_8R_9$,且 $Y=N$ 时, R_{10} 不能是 $-NR_8R_9$;

更优选的, R_{10}, R_{11}, R_{12} 和 R_{13} 各自独立地选自氢原子、 C_1-C_6 的烷基、 C_1-C_6 的羟基烷基、 C_1-C_6 的卤代烷基、 C_1-C_6 的烷氧基或 $-NR_8R_9$ 。

7. 根据权利要求1至5中任一项所述的构式I的化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体,氘代化合物,前药或其混合物形式,或结构式I的化合物、

其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体, 氘代化合物, 前药或其混合物的药学上可以接受的盐或溶剂化物, 其特征在于, R_7 选自如下结构的取代基:



R_{14} 和 R_{15} 各自独立地选自氢原子、 C_1 - C_6 的烷基、 C_3 - C_6 的环烷基、 C_1 - C_6 的卤代烷基、 C_1 - C_6 的羟基烷基、 C_1 - C_6 的烷氧基或羟基, R_{16} 选自氢原子、 C_3 - C_6 的环烷基、 C_1 - C_6 的卤代烷基、 C_1 - C_6 的羟基烷基、 C_1 - C_6 的烷氧基、羟基或 $-NR_8R_9$;

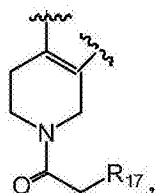
更优选的, R_{14} 和 R_{15} 各自独立地选自氢原子、 C_1 - C_6 的烷基、 C_3 - C_6 的环烷基、 C_1 - C_6 的羟基烷基, R_{16} 选自氢原子、 C_1 - C_6 的烷基、 C_3 - C_6 的环烷基、 C_1 - C_6 的羟基烷基或 $-NR_8R_9$;

优选的, R_8 和 R_9 各自独立地选自氢原子和 C_1 - C_4 的烷基。

8. 根据权利要求1至4中任一项所述结构式I的化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体, 氘代化合物, 前药或其混合物形式, 或结构式I的化合物、其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体, 氘代化合物, 前药或其混合物的药学上可以接受的盐或溶剂化物, 其特征在于, R_6 和 R_7 与其连接的C原子一起形成含一个或多个选自N、O或S的6元杂环;

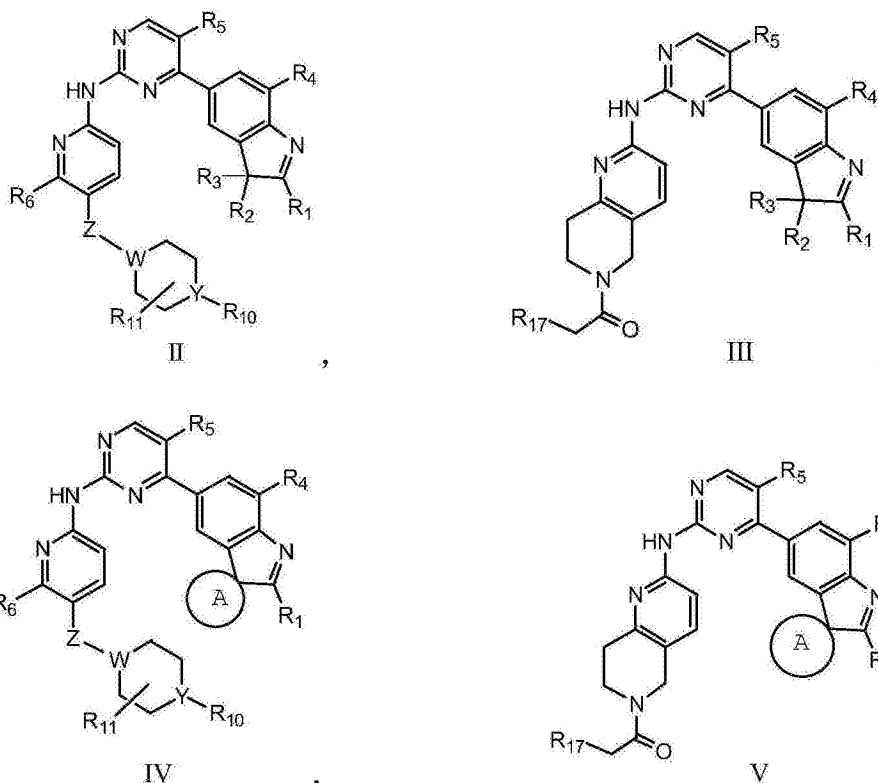
优选的, R_6 和 R_7 与其连接的C原子一起形成含一个N的6元杂环;

进一步优选的, R_6 和 R_7 与其连接的C原子一起形成如下的化学结构:



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

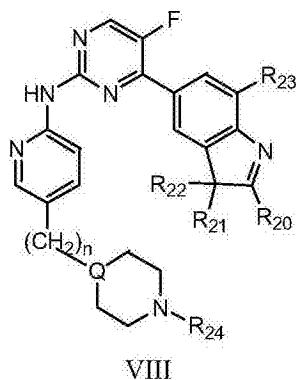
9. 结构式II、III、IV或V的化合物或各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体, 氘代化合物, 前药或其混合物形式, 或所述结构式II、III、IV或V的化合物、各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体, 氘代化合物, 前药或其混合物的药学上可以接受的盐或溶剂化物,



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

A环为饱和的3-7元环; 优选的, A环为饱和3-6元环。

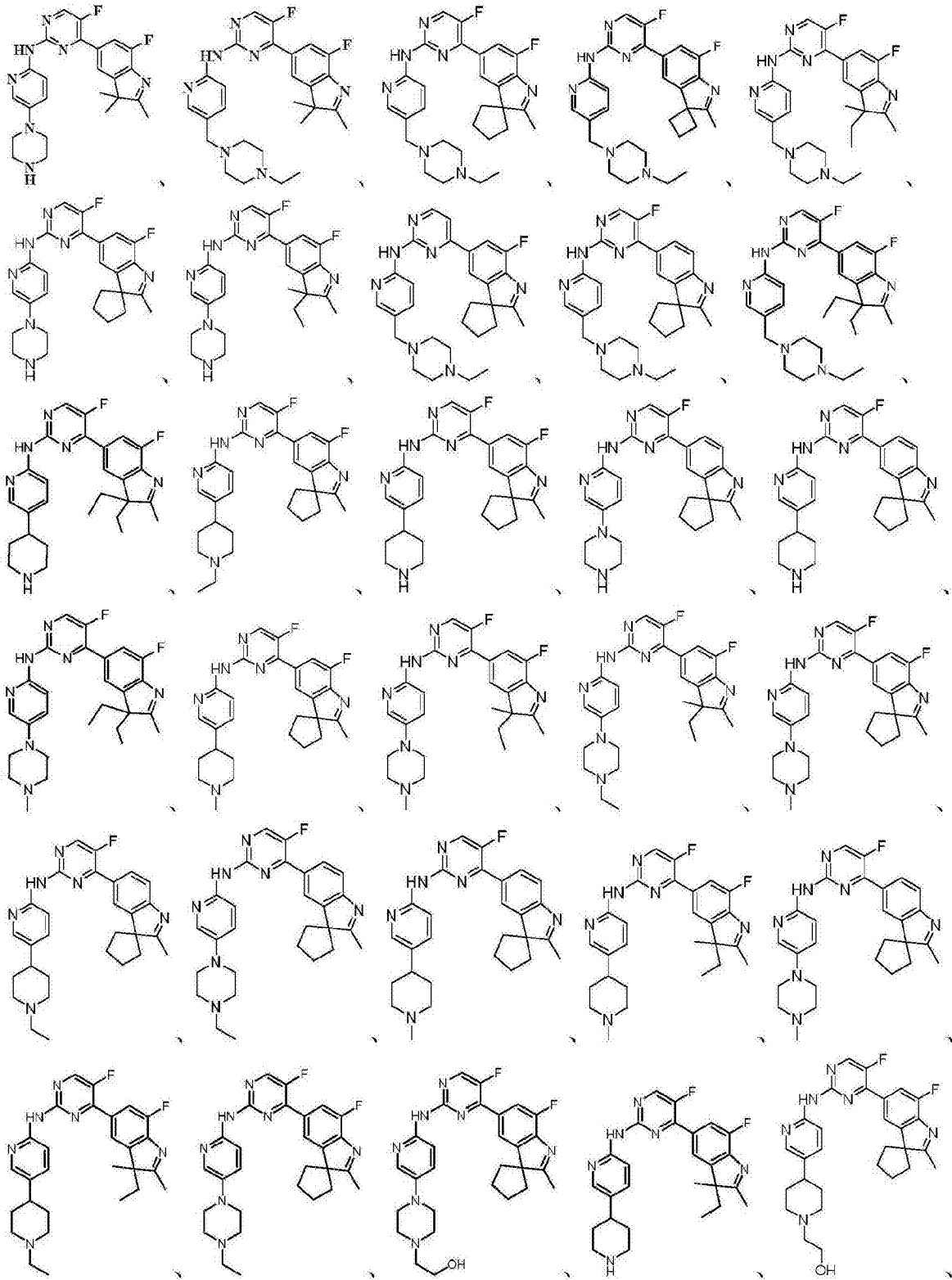
10. 一种结构式VIII的化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体, 氘代化合物, 前药或其混合物形式, 或所述结构式VIII的化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体, 氘代化合物, 前药或其混合物的药学上可以接受的盐或溶剂化物,

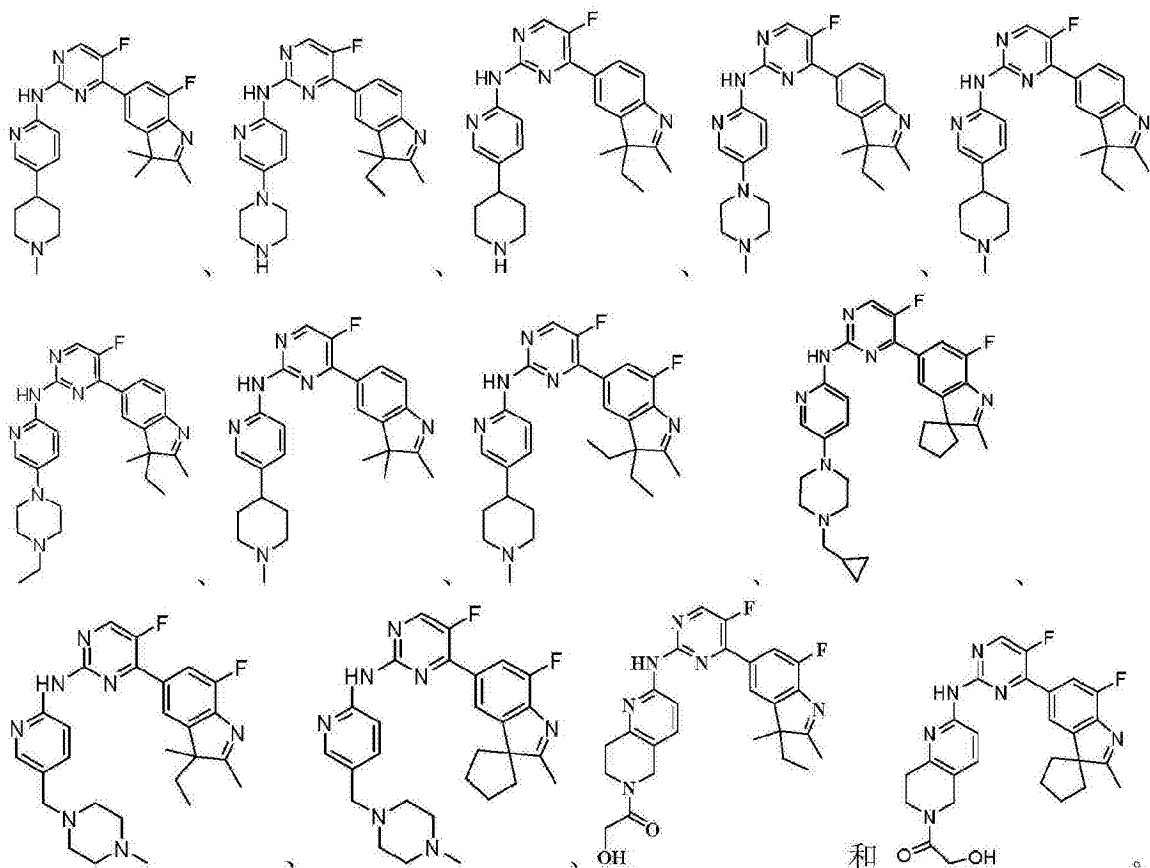


其中, R_{20} 、 R_{21} 、 R_{22} 各自独立地选自 C_1 - C_4 的烷基, 或者 R_{20} 为 C_1 - C_4 的烷基, R_{21} 和 R_{22} 与其共同连接的C原子形成5-6元饱和环; R_{23} 选自氢或氟; $n=0$ 或1; R_{24} 选自氢、 C_1 - C_4 的烷基或 C_1 - C_4 的羟基烷基。

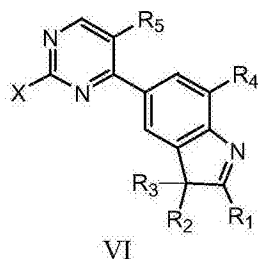
11. 结构如下的化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体, 氘代化合物, 前药或其混合物形式, 或所述化合物、其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体, 氘代化合物, 前药或其混合的药学上可以接受的盐或溶剂化

物,





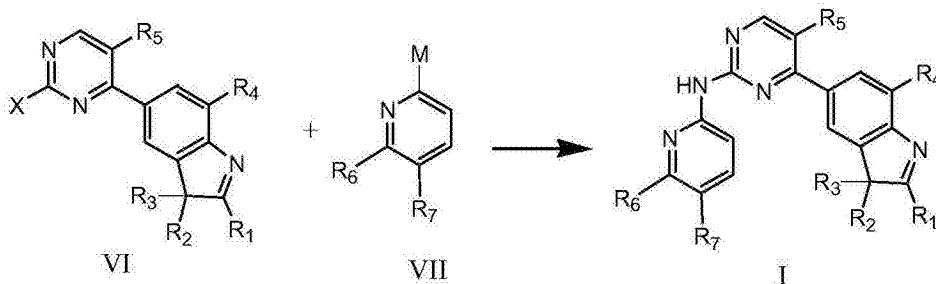
12. 一种结构式VI的化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体或其混合物形式,或所述结构式VI的化合物、其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体的药学上可以接受的盐或溶剂化物,



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

优选的,X是卤素或氨基,更优选是氟、溴、氯或氨基。

13. 权利要求1所述的结构式I的化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体,氘代化合物,前药或其混合物形式,或结构式I的化合物、其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体,氘代化合物,前药或其混合物的药学上可以接受的盐或溶剂化的制备方法,包括结构式VI和结构式VII的化合物在溶剂中,经钯催化偶联反应得到结构式I的化合物,



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

优选的, 所述离去基团为卤素;

更优选的, 所述离去基团为氟、溴或氯。

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

优选的, 所述药物制剂包括药学上可以接受的辅料;

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

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

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

一种蛋白激酶抑制剂及其制备方法和医药用途

技术领域

[0001] 本发明属于医药领域,具体涉及一系列具有蛋白激酶抑制作用的取代2-(吡啶-2-基)氨基嘧啶类化合物及其制备方法和医药用途。

背景技术

[0002] 细胞周期是细胞生命活动的重要部分,在正常的细胞生长过程中,细胞周期进程的实现在于各级调控因子对细胞周期精确而严密的调控。这些调控因子的核心是细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶(Cyclin Dependent Kinase,CDK)及其正、负性调控因子——细胞周期蛋白(Cyclin)和细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶抑制剂(CDI)。细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶和细胞周期蛋白形成的CDK-Cyclin复合物,参与细胞的生长、增殖、休眠或者进入凋亡。细胞周期的过程中,细胞周期蛋白周期性连续的表达和降解,并分别结合到由它们瞬时活化的CDK上,通过CDK活性,催化不同底物磷酸化,实现对细胞周期不同时相的推进和转化作用。

[0003] 目前CDK家族已经发现了13个成员,分别是CDK1-CDK13;其中CDK1、CDK2、CDK3、CDK4和CDK6与调节细胞增殖有关,CDK7、CDK8、CDK9、CDK11、CDK12和CDK13参与调控转录。

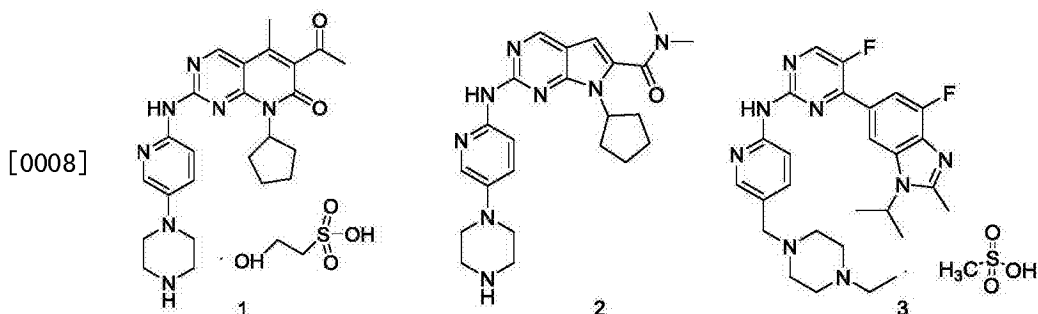
[0004] Cyclin分为A-L,不同的CDK分别连接不同亚型的Cyclin。其中,Cyclin D家族(Cyclin D1,D2,D3),在G1期开始表达,结合并激活CDK4和CDK6,形成CDK4/6-Cyclin D复合物,使包括视网膜母细胞瘤蛋白(Retinoblastomaprotein,Rb)在内的一系列底物磷酸化。Rb磷酸化后释放与其结合并被其抑制的蛋白,主要是转录因子E2F等,E2F激活并转录进入S期所必须的一些基因(马珂,CDK4/6抑制剂抗肿瘤作用研究进展,《国外医药·抗生素分册》,2013,34(5):197-202)。如果由于各种因素使平衡被打破,无论是促进细胞增殖的信号增强,或者是抑制细胞增殖的信号减弱到某种程度,细胞增殖都会失控,进而出现肿瘤。研究发现,大约80%的人类肿瘤中存在Cyclin D-CDK4/6-INK4-Rb通路的异常(1.Malumbres M,Barbacid M.,To cycle or not to cycle:a critical decision in cancer[J].Nature Reviews Cancer,2001,1(3):222;2.Shapiro GI.,Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment[J].JClinical Oncology,2006,24(11):1770)。这条通路的改变,加速了G1期进程,使得肿瘤细胞增殖加快而获得生存优势。因此,对其的干预成为一种治疗策略,CDK4/6因此成为潜在的抗肿瘤的靶点之一。

[0005] CDK4/6作为抗肿瘤靶点的优势在于:(1)大多数增殖的细胞依赖CDK2或者CDK4/6增殖,但CDK4/6的抑制剂不表现出“泛-CDK抑制剂”的细胞毒性,如骨髓抑制和肠道反应。(2)临床前实验表明,如果细胞Cyclin D水平升高或者p16INK4a失活,能够增加细胞对药物的敏感性,由于肿瘤细胞相对于正常细胞存在上述现象,所以一定程度上增加了药物的靶向。

[0006] 除了抑制肿瘤生长,也有CDKs抑制剂用于其它病症的治疗;如用于治疗心血管障碍,包括动脉粥样硬化、血管支架植入后再狭窄和其它由细胞异常增殖引起的心血管障碍;再如用于治疗真菌、原生动物寄生虫(如恶性疟原虫)和DNA与RNA病毒感染引起的疾病,包

括疟疾、艾滋病等。此外,还有研究发现CDKs抑制剂还可以用于自身免疫系统疾病(如牛皮癣、类风湿性关节炎、肾小球性肾炎和红斑狼疮等),抑制炎症细胞的增殖。

[0007] 自W09811095中公开了一系列具有细胞激酶抑制活性的2-嘧啶胺类化合物后,基于这样的母核结构,现有技术陆续出现了很多宣称具有CDK4/6抑制活性的化合物,有的已经成为有希望的候选药物,甚至进入临床III期试验阶段。如,化合物PD0332991在W02003062236中被公开,又名Palbociclib,结构式如1所示,由辉瑞公司开发。PD0332991抑制CDK4和CDK6的IC₅₀分别为11nmol/L和15nmol/L;而抑制CDK2、CDK1和CDK5的IC₅₀则大于10μmol/L(Fry DW,Harvey PJ,Keller PR,et al.Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts[J].Molecular Cancer Therapeutics,2004,3(11):1427)。诺华公司在研的化合物LEE011(由W02011101409公开),结构式如2所示。化合物LY2835219(由W02010075074公开),又名Bemaciclib,结构式如3所示;据报道,它对CDK4和CDK6的抑制IC₅₀分别为2nmol/L和9.9nmol/L(Lawrence M.G.,S.F.Cai,X.Lin et al.Preclinical characterization of the CDK4/6 inhibitor LY2835219:in-vivo cell cycle-dependent/independent anti-tumor activities alone/in combination with gemcitabine[J].Invest New Drugs,(2014),32:825)。目前LY2835219正在由礼来公司进行III期临床实验。



[0009] 由于这些化合物的出现,CDK4/6已经成为明确的抗肿瘤靶点。申请人也就一系列新的取代2-(吡啶-2-基)氨基嘧啶类化合物提出过专利申请(申请号201510708487.3,申请日2015年10月27日),这些化合物显示出选择性抑制CDK4/6的活性。

[0010] 恶性肿瘤依然严重威胁人类的健康。研发出活性、选择性、生物利用度更好的CDK4/6抑制剂,从而为临床提供更多治疗癌症等与细胞异常增殖相关疾病的新选择,是十分必要和迫切的。

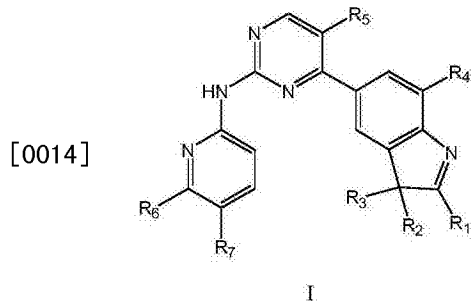
发明内容

[0011] 针对上述问题,本发明的一个目的在于提供一种新的取代2-(吡啶-2-基)氨基嘧啶类化合物。本发明提供的化合物,能够选择性抑制细胞周期蛋白激酶CDK4/6,使细胞停止在G₁期,从而可以用于治疗细胞增殖障碍性疾病。

[0012] 为了达到上述技术效果,本发明采用了如下的技术方案:

[0013] 一种结构式I的化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体,氘代化合物,前药或其混合物形式,或结构式I的化合物、其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体,氘代化合物,前药或其混合物的药学上可以接受的

盐或溶剂化物，



[0015] 其中, R_1, R_2, R_3 各自独立地选自氢原子、未被取代的 C_1-C_6 的烃基或被一个或多个选自 C_1-C_6 的烃基、 C_3-C_6 的环烷基、 C_1-C_6 的卤代烷基、 C_1-C_6 的烷氧基、羟基、卤素、氰基、 $-NR_8R_9$ 、

$-\overset{\text{O}}{\parallel}CNR_8R_9$ 、 $-\overset{\text{O}}{\parallel}CR_8$ 、 $-\overset{\text{O}}{\parallel}O-CR_8$ 或 $-\overset{\text{O}}{\parallel}COR_8$ 的取代基取代的 C_1-C_6 的烃基；

[0016] 或者 R_1, R_2, R_3 中的任意两个与各自连接的C原子一起形成饱和或不饱和的3-7元环；

[0017] R_4 和 R_5 各自独立地选自氢、卤素,且 R_4 和 R_5 中至少一个是卤素；

[0018] R_6 选自氢原子、 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_6 烷氧基、羟基或卤素；

[0019] R_7 为 其中, Z是羰基、O、S、亚胺基、磺酰基或 $-(CH_2)_n$, $n=0-4$ 的

整数;W和Y各自独立地是C、N、O或S,但W和Y不能同时是C,且当Z是O或S时,W是C; R_{10}, R_{11}, R_{12} 和 R_{13} 各自独立地选自氢原子、 C_1-C_6 的烷基、 C_3-C_6 的环烷基、 C_1-C_6 的羟基烷基、 C_1-C_6 的卤代

烷基、 C_1-C_6 的烷氧基、羟基、卤素、氰基、 $-NR_8R_9$ 、 $-\overset{\text{O}}{\parallel}CNR_8R_9$ 、 $-\overset{\text{O}}{\parallel}CR_8$ 、 $-\overset{\text{O}}{\parallel}O-CR_8$ 或 $-\overset{\text{O}}{\parallel}COR_8$,且Y

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

[0020] 或者, R_6 和 R_7 与其连接的C原子一起形成含一个或多个选自N、O或S的5-7元杂环,并且所述5-7元杂环被一个或多个选自 C_1-C_6 的烷基、 C_3-C_6 的环烷基、 C_1-C_6 的卤代烷基、 C_1-C_6 的

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

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

[0021] 其中, R_8 和 R_9 各自独立地选自氢原子、 C_1-C_6 的烷基、 C_1-C_6 的羟基烷基。

[0022] 优选的, R_1, R_2, R_3 各自独立地选自氢原子、未被取代的 C_1-C_6 的烃基或被一个或多个选自 C_1-C_6 的烃基、 C_3-C_6 的环烷基、 C_1-C_6 的卤代烷基、 C_1-C_6 的烷氧基、羟基或卤素的取代基取代的 C_1-C_6 的烃基。

[0023] 更优选的, R_1, R_2, R_3 各自独立地选自氢原子、未被取代的 C_1-C_6 的烃基或被一个或多个选自 C_1-C_6 的烃基、羟基或卤素的取代基取代的 C_1-C_6 的烃基。

[0024] 进一步优选的, R_1, R_2, R_3 各自独立地选自氢原子、未被取代的 C_1-C_6 的直链或支链烷

基、未被取代的C₂-C₄的直链或支链烯基。

[0025] 最优选的, R₁, R₂, R₃各自独立地选自氢原子、未被取代的C₁-C₄的直链或支链烷基。

[0026] 作为另一种优选的方式, R₂和R₃与共同连接的C原子一起形成饱和或不饱和的3-7元环。

[0027] 更优选的, R₂和R₃与共同连接的C原子一起形成饱和的3-7元环。

[0028] 优选的, R₄和R₅各自独立地是氢、氟或氯, 且R₄和R₅中至少一个是氟或氯。

[0029] 更优选的, R₄和R₅各自独立地是氢或氟, 且R₄和R₅中至少一个是氟。

[0030] 最优选的, R₄是氢或氟, R₅是氟。

[0031] 优选的, R₆选自氢原子或C₁-C₆的烷基。

[0032] 优选的, Z是羰基、O或 $-(CH_2)_n$, n=0-4的整数。

[0033] 更优选的, Z是 $-(CH_2)_n$, n=0-2的整数, 进一步优选的, n=0或1。

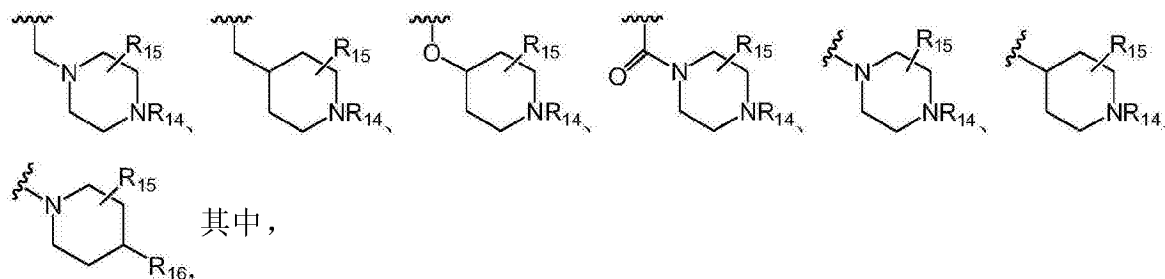
[0034] 优选的, W和Y各自独立地选自C或N, 但W和Y不能同时是C。

[0035] 优选的, R₁₀、R₁₁、R₁₂和R₁₃各自独立地选自氢原子、C₁-C₆的烷基、C₃-C₆的环烷基、C₁-C₆的羟基烷基、C₁-C₆的卤代烷基、C₁-C₆的烷氧基、羟基或-NR₈R₉, 且Y=N时, R₁₀不能是-NR₈R₉, R₈和R₉各自独立地选自氢原子和C₁-C₄的烷基。

[0036] 更优选的, R₁₀、R₁₁、R₁₂和R₁₃各自独立地选自氢原子、C₁-C₆的烷基、C₁-C₆的羟基烷基、C₁-C₆的卤代烷基、C₁-C₆的烷氧基或-NR₈R₉, R₈和R₉各自独立地选自氢原子和C₁-C₄的烷基。

[0037] 进一步优选的, R₇选自如下结构的取代基:

[0038]



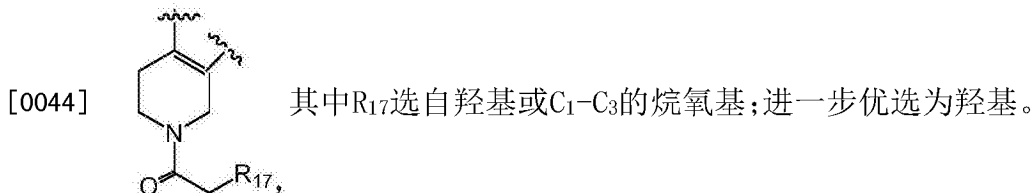
[0039] R₁₄和R₁₅各自独立地选自氢原子、C₁-C₆的烷基、C₃-C₆的环烷基、C₁-C₆的卤代烷基、C₁-C₆的羟基烷基、C₁-C₆的烷氧基或羟基, R₁₆选自氢原子、C₃-C₆的环烷基、C₁-C₆的卤代烷基、C₁-C₆的羟基烷基、C₁-C₆的烷氧基、羟基或-NR₈R₉, R₈和R₉各自独立地选自氢原子和C₁-C₄的烷基。

[0040] 更优选的, R₁₄和R₁₅各自独立地选自氢原子、C₁-C₆的烷基、C₃-C₆的环烷基、C₁-C₆的羟基烷基, R₁₆选自氢原子、C₁-C₆的烷基、C₃-C₆的环烷基、C₁-C₆的羟基烷基或-NR₈R₉, R₈和R₉各自独立地选自氢原子和C₁-C₄的烷基。

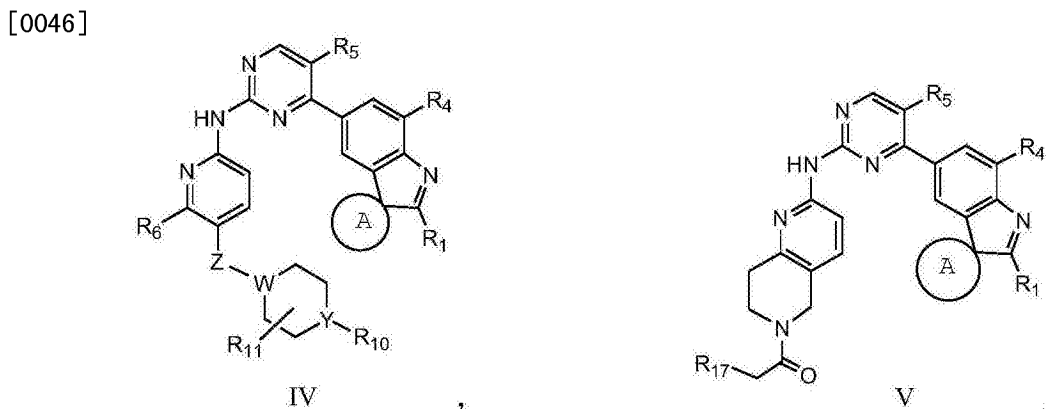
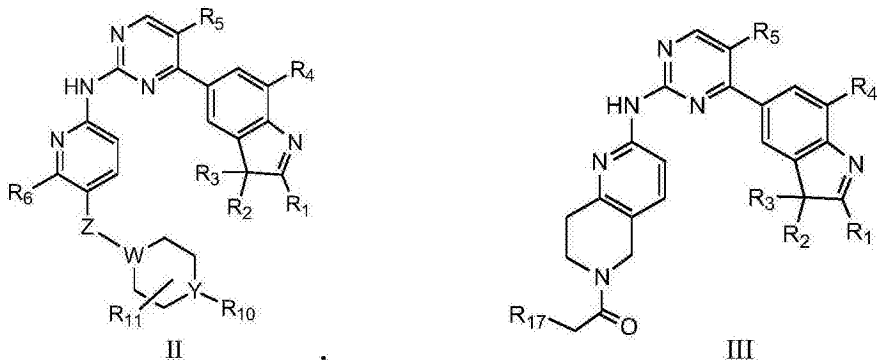
[0041] 作为另一种优选的方式, R₆和R₇与其连接的C原子一起形成含一个或多个选自N、O或S的6元杂环。

[0042] 更优选的, R₆和R₇与其连接的C原子一起形成含一个N的6元杂环。

[0043] 进一步优选的, R₆和R₇与其连接的C原子一起形成如下的化学结构:



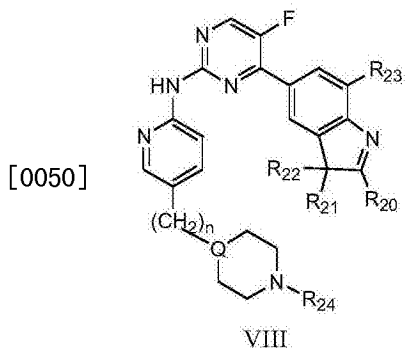
[0045] 作为优选实施方式,本发明还提供结构式II、III、IV或V的化合物或各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体,氘代化合物,前药或其混合物形式,或所述结构式II、III、IV或V的化合物、各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体,氘代化合物,前药或其混合物的药学上可以接受的盐或溶剂化物,



[0047] 其中,Z、W、Y、R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₁₀、R₁₁和R₁₇的定义如前,A环为饱和的3-7元环。

[0048] 优选的,A环为饱和3-6元环。

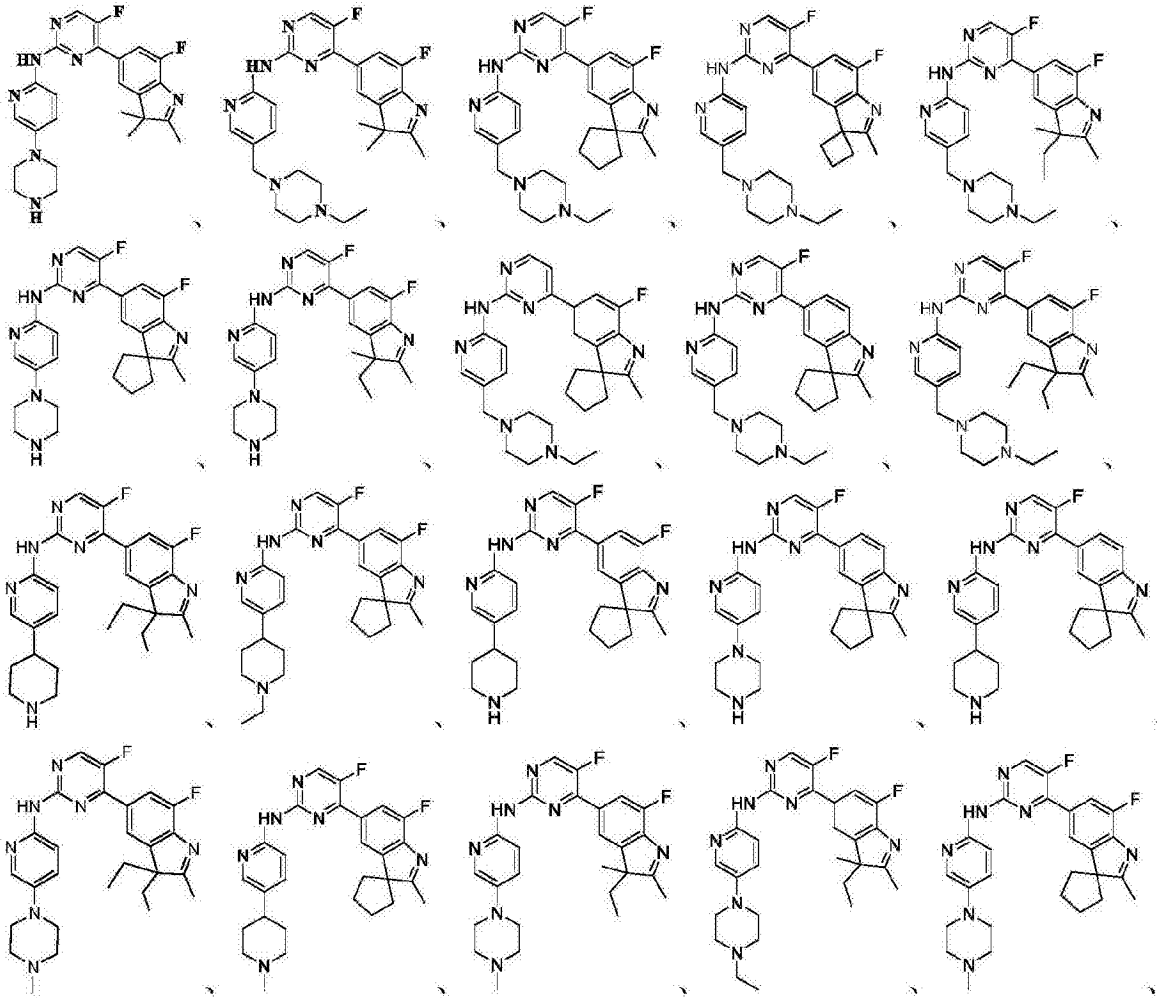
[0049] 更优选的,本发明提供结构式VIII的化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体,氘代化合物,前药或其混合物形式,或所述结构式VIII的化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体,氘代化合物,前药或其混合物的药学上可以接受的盐或溶剂化物,



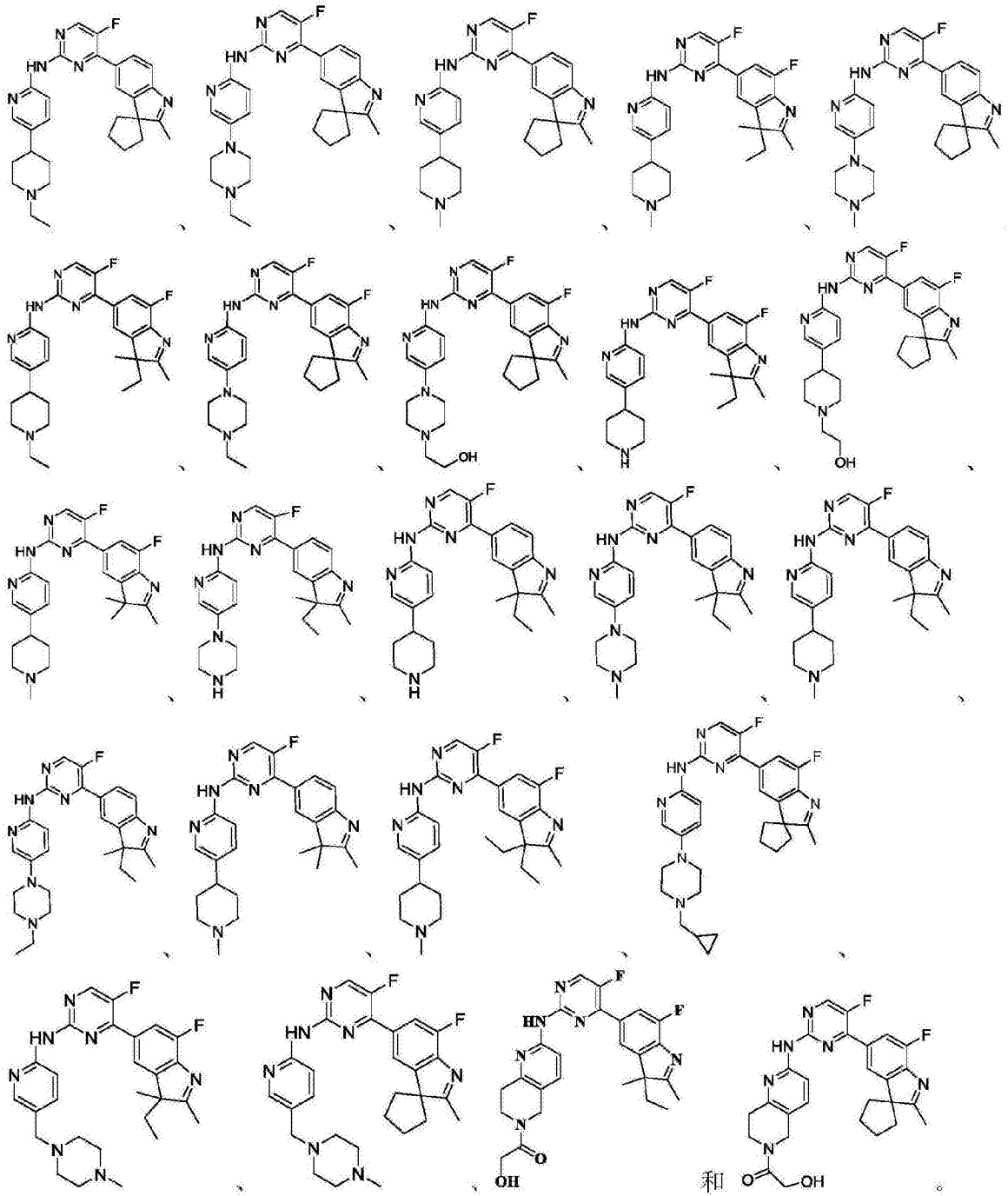
[0051] 其中, R_{20} 、 R_{21} 、 R_{22} 各自独立地选自 C_1 - C_4 的烷基,或者 R_{20} 为 C_1 - C_4 的烷基, R_{21} 和 R_{22} 与其共同连接的C原子形成5-6元饱和环; R_{23} 选自氢或氟; $n=0$ 或1; R_{24} 选自氢、 C_1 - C_4 的烷基或 C_1 - C_4 的羟基烷基。

[0052] 本发明提供如下结构的化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体,氘代化合物,前药或其混合物形式,或所述化合物、其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体,氘代化合物,前药或其混合的药学上可以接受的盐或溶剂化物:

[0053]

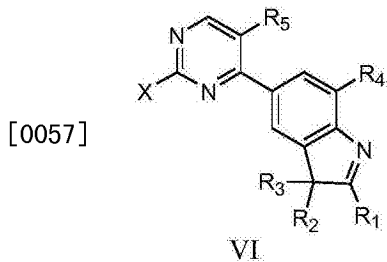


[0054]



[0055] 本发明所述的化合物还包括同位素标记的上述所有化合物。

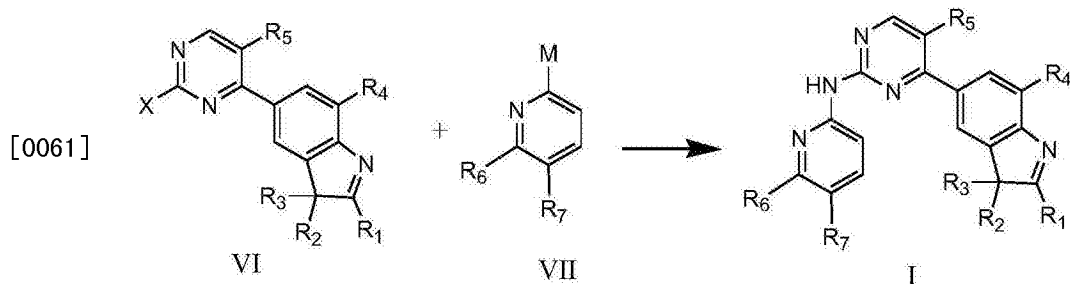
[0056] 本发明还提供一种结构式VI的化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体或其混合物形式,或所述结构式VI的化合物、其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体的药学上可以接受的盐或溶剂化物,



[0058] 其中R₁、R₂、R₃、R₄和R₅的定义如前，X为离去基团或氨基。

[0059] 优选的，X是卤素或氨基，更优选是氟、溴、氯或氨基。

[0060] 本发明还有一个目的在于提供结构式I的化合物的制备方法，包括结构式VI和结构式VII的化合物在溶剂中，经钯催化偶联反应得到结构式I的化合物，



[0062] 其中，R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆和R₇的定义如前，X和M各自独立地为离去基团或氨基，X和M中只能有一个且必须有一个为氨基；

[0063] 优选的，所述离去基团为卤素；

[0064] 更优选的，所述离去基团为氟、溴或氯。

[0065] 本发明的另一个目的在于提供结构式I-V和VIII的化合物或其各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体，氘代化合物，前药或其混合物形式，或所述结构式I-V和VIII的化合物或其各自的互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体，氘代化合物，前药或其混合物的药学上可以接受的盐或溶剂化物在制备用于治疗细胞增殖障碍性疾病的药物制剂中的用途。

[0066] 优选的，所述药物制剂包括药学上可以接受的辅料。

[0067] 优选的，所述细胞增殖障碍性疾病是指哺乳动物或人的癌症，更优选的是指人的癌症，包括恶性实体瘤和恶性非实体瘤，具体包括但不限于乳腺癌、肺癌、前列腺癌、白血病、脑癌、胃癌等。

[0068] 还优选的，所述细胞增殖障碍性疾病还可以是指艾滋病、动脉粥样硬化、血管支架植入后再狭窄。

[0069] 优选的，上述用途是指所述结构式I-V的化合物或其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体或其混合物形式，或所述结构式I-V的化合物、其互变异构体、内消旋体、外消旋体、对映异构体、非对映异构体的药学上可以接受的盐或溶剂化物作为唯一活性成分或联合其它具有生物活性的物质在制备用于治疗细胞增殖障碍性疾病的药物制剂中的用途。

[0070] 所述其它具有生物活性的物质包括但不限于抗癌剂、免疫抑制剂、抗病毒剂等。其中，所述抗癌剂选自烷化剂(如环磷酰胺、异环磷酰胺、塞替派、司莫司汀、盐酸氮芥、白消安、苯丁酸氮芥、苯丙氨酸氮芥、硝卡芥、氮甲、卡莫司汀、洛莫司汀、六甲蜜胺、二溴甘露醇等)，抗代谢类抗肿瘤药(阿糖胞苷、氟尿嘧啶、甲氨喋呤、羟基脲、替加氟、甲异靛、巯嘌呤等)，铂络合剂(如顺铂、卡铂、奥沙利铂等)，抗生素类抗肿瘤药(放线菌素D、丝裂霉素、阿霉素、平阳霉素、表柔比星、吡柔比星、柔红霉素、博来霉素等)，天然来源抗肿瘤药(高三尖杉酯碱及其衍生物、长春新碱及其衍生物、羟基树碱及其衍生物、依托泊苷及其衍生物、长春地辛及其衍生物、长春碱及其衍生物、重酒石酸长春瑞宾、紫杉醇及其衍生物、秋水仙碱及其衍生物、榄香烯及其衍生物等)，激素类抗肿瘤药(如氨鲁米特、他莫昔芬、地塞米松、度他

雄胺、氟他胺、戈那瑞林、醋酸亮丙瑞林、来曲唑等), VEGFR或EGFR抑制剂(如舒尼替尼、索拉非尼、伊马替尼、吉非替尼、埃罗替尼、凡德替尼、帕唑帕尼、拉帕替尼、卡奈替尼、阿法替尼、木利替尼、达沙替尼、来那替尼等), 抗体抗肿瘤药(如曲妥单抗、帕妥珠单抗、利妥昔单抗、帕尼单抗、贝伐单抗、伊匹单抗、奥法木单抗、雷莫卢单抗等), mTOR抑制剂(如依维莫司、西罗莫司、佐他莫司等), 治疗脑瘤类用药替莫唑胺等。

[0071] 本发明还提供一种治疗患有所述细胞增殖障碍性疾病的患者的方法, 包括对所述患者通过口服或非口服途径给予有效剂量的本发明所述化合物。

[0072] 优选的, 上述治疗患有所述细胞增殖障碍性疾病的患者的方法, 包括对所述患者通过口服或非口服途径给予有效剂量的本发明所述化合物和所述其它具有生物活性的物质。所述其它具有生物活性的物质包括但不限于抗癌剂、免疫抑制剂、抗病毒剂等。其中, 所述抗癌剂选自烷化剂(如环磷酰胺、异环磷酰胺、塞替派、司莫司汀、盐酸氮芥、白消安、苯丁酸氮芥、苯丙氨酸氮芥、硝卡芥、氮甲、卡莫司汀、洛莫司汀、六甲蜜胺、二溴甘露醇等), 抗代谢类抗肿瘤药(阿糖胞苷、氟尿嘧啶、甲氨喋呤、羟基脲、替加氟、甲异靛、巯嘌呤等), 铂络合剂(如顺铂、卡铂、奥沙利铂等), 抗生素类抗肿瘤药(放线菌素D、丝裂霉素、阿霉素、平阳霉素、表柔比星、吡柔比星、柔红霉素、博来霉素等), 天然来源抗肿瘤药(高三尖杉酯碱及其衍生物、长春新碱及其衍生物、羟基树碱及其衍生物、依托泊苷及其衍生物、长春地辛及其衍生物、长春碱及其衍生物、重酒石酸长春瑞宾、紫杉醇及其衍生物、秋水仙碱及其衍生物、榄香烯及其衍生物等), 激素类抗肿瘤药(如氨鲁米特、他莫昔芬、地塞米松、度他雄胺、氟他胺、戈那瑞林、醋酸亮丙瑞林、来曲唑等), VEGFR或EGFR抑制剂(如舒尼替尼、索拉非尼、伊马替尼、吉非替尼、埃罗替尼、凡德替尼、帕唑帕尼、拉帕替尼、卡奈替尼、阿法替尼、木利替尼、达沙替尼、来那替尼等), 抗体抗肿瘤药(如曲妥单抗、帕妥珠单抗、利妥昔单抗、帕尼单抗、贝伐单抗、伊匹单抗、奥法木单抗、雷莫卢单抗等), mTOR抑制剂(如依维莫司、西罗莫司、佐他莫司等), 治疗脑瘤类用药替莫唑胺等。

[0073] 本发明的说明书中, 如无特殊说明, 所述“C₁-C₆烷基”指的是C₁-C₆的直链或支链烷基; “C₁-C₄烷基”指的是C₁-C₄的直链或支链烷基, 优选为甲基、乙基、丙基或异丙基。所述“C₁-C₆烷氧基”, 指的是C₁-C₆的直链或支链烷氧基, 优选为C₁-C₄的直链或支链烷氧基, 进一步优选为甲氧基、乙氧基、丙氧基或2-甲基乙氧基。所述“C₃-C₆环烷基”, 指的是未取代或C₁-C₄烷基、C₁-C₄烷氧基取代的C₃-C₆的环烷基, 优选为未取代或C₁-C₄烷基、C₁-C₄烷氧基取代的C₃-C₆的环烷基, 进一步优选为环丙烷、环丁烷、甲基环丙烷、环戊烷或环己烷。所述“卤素”, 指的是溴, 氯或氟。所述“C₁-C₆卤代烷基”指的是溴取代, 氯取代或氟取代C₁-C₆的直链或支链烷基, 优选为氯取代或氟取代C₁-C₄的直链或支链烷基, 进一步优选为一氟代甲基、二氟代甲基、三氟代甲基、一氯代甲基、二氯代甲基、三氯代甲基、1-氟乙基、1-氯丙基、1-氯乙基、1-氯丙基。

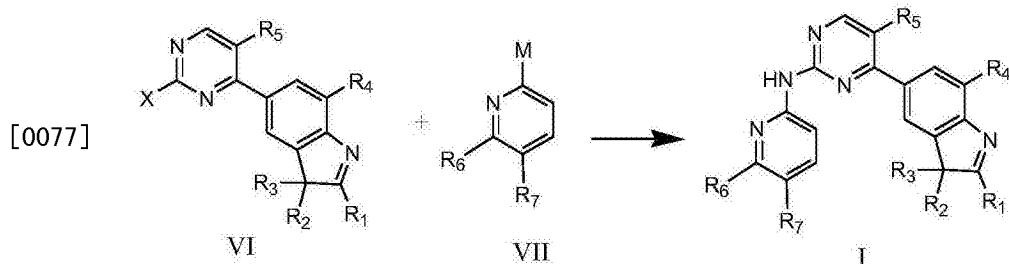
[0074] 现有研究认为, CDKs抑制剂的毒性主要与其抑制CDK1和其它蛋白激酶有关, 如由同名的原癌基因编码的苏氨酸/丝氨酸激酶Pim-1。因此, 作为CDKs抑制剂类化合物, 希望其对CDK4/CDK6和CDK1以及其它激酶的作用差异越显著越好, 即选择性抑制CDK4/CDK6。本发明提供的化合物其活性优于或与目前处于III期临床试验的候选药物LY2835219相当, 部分化合物表现出更好的激酶选择性。而且优选的化合物(实施例17制备)口服吸收良好、血脑分布好。上述结果预示着本发明的化合物有希望被开发成新的治疗细胞增殖相关疾病, 尤

其是恶性肿瘤(特别是脑癌)的药物。

具体实施方式

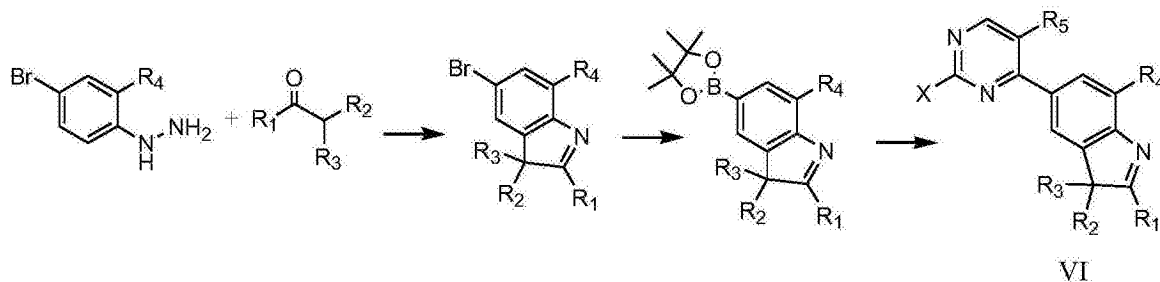
[0075] 以下参照具体的实施例来说明本发明。本领域技术人员能够理解,这些实施例仅用于说明本发明,其不以任何方式限制本发明的范围。

[0076] 本发明所述的结构式VI的化合物是合成结构式I的化合物的关键中间体,其和结构式VII的化合物在溶剂中,经钯催化偶联反应得到结构式I的化合物。



[0078] 结构式VI的化合物可以通过如下的反应路线合成:

[0079]



[0080] 其中, R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 的定义如前, X 为离去基团或氨基。

[0081] 优选的, R_1 、 R_2 、 R_3 各自独立地选自氢原子、未被取代的 C_1 - C_6 的烷基或被一个或多个选自 C_1 - C_6 的烷基、羟基或卤素的取代基取代的 C_1 - C_6 的烷基。

[0082] 更优选的, R_1 、 R_2 、 R_3 各自独立地选自氢原子、未被取代的 C_1 - C_6 的直链或支链烷基、未被取代的 C_2 - C_4 的直链或支链烯基。

[0083] 进一步优选的, R_1 、 R_2 、 R_3 各自独立地选自氢原子、未被取代的 C_1 - C_4 的直链或支链烷基。

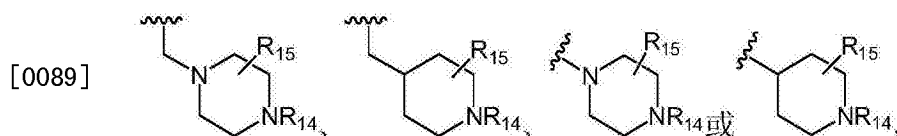
[0084] 或者,作为另一种优选的方式, R_1 如前所述, R_2 和 R_3 与共同连接的C原子一起形成饱和或不饱和的3-7元环;更优选的, R_2 和 R_3 与共同连接的C原子一起形成饱和的3-7元环。

[0085] 优选的, R_4 和 R_5 各自独立地是氢或氟,且 R_4 和 R_5 中至少一个是氟。

[0086] X 优选为卤素或氨基,更优选为氟、溴、氯或氨基。

[0087] R_6 优选为氢原子或 C_1 - C_4 的烷基。

[0088] R_7 优选为如下结构的取代基:



[0090] 其中, R_{14} 和 R_{15} 各自独立地选自氢原子、 C_1 - C_4 的烷基、 C_1 - C_4 的羟基烷基。

[0091] 或者,作为另一个优选的实施方式, R_6 和 R_7 与其连接的C原子一起形成如下的化学

结构:



[0093] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的化学原料、试剂等,如无特殊说明,均为市售购买产品。

[0094] 本发明实施例中出现的缩略语及其含义如下所示:

[0095] PE:石油醚

[0096] EA:乙酸乙酯

[0097] DCM:二氯甲烷

[0098] MeOH:甲醇

[0099] Pd(dppf)Cl₂: [1,1'-双(二苯基磷)二茂铁]二氯化钯

[0100] Pd(PPh₃)₄: 四(三苯基膦)钯

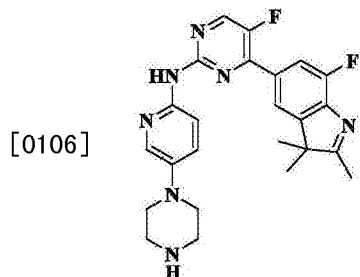
[0101] Pd₂(dba)₃: 三(二亚苄基丙酮)二钯

[0102] NaHB(OAc)₃: 三乙酰氧基硼氢化钠

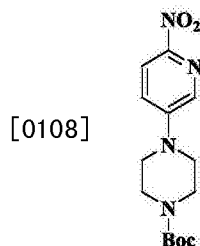
[0103] LHMS: 六甲基二硅基胺基锂

[0104] DAPI: DAPI 荧光染料

[0105] 实施例1 5-氟-4-(7-氟-2,3,3-三甲基-3H-吡啶-5-基)-N-(5-(哌嗪-1-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基



[0107] 步骤1 4-(6-硝基吡啶-3-基)哌嗪-1-羧基叔丁酯的合成

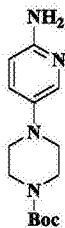


[0109] 向反应瓶中加入5-溴-2-硝基吡啶(5.0g, 24.63mmol), 哌嗪-1-羧基叔丁酯(5.04g, 27.09mmol), 乙腈(30mL), 二异丙基乙胺(4.77g, 36.94mmol), 回流反应2h, 旋干溶剂, 柱色谱分离(PE/EA=1:1至DCM/MeOH=20:1), 得到标题化合物3.8g(黄色固体)。

[0110] MS(ESI): mass calcd. for C₁₄H₂₀N₄O₄ 308.1, m/z found 309.1[M+H]⁺.

[0111] 步骤2 4-(6-氨基吡啶-3-基)哌嗪-1-羧基叔丁酯的合成

[0112]

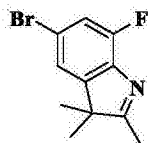


[0113] 向反应瓶中加入步骤1制备的4-(6-硝基吡啶-3-基)哌嗪-1-羧基叔丁酯(0.92g, 3.0mmol), 乙酸乙酯/甲醇(10mL/10mL), Pd/C(0.1g), 通入氢气室温反应2小时, 过滤, 浓缩, 得到标题化合物792mg(类白色固体)。

[0114] MS(ESI): mass calcd. for $C_{14}H_{22}N_4O_2$ 278.2, m/z found 279.2[M+H]⁺.

[0115] 步骤3 5-溴-7-氟-2,3,3-三甲基-3H-吡啶的合成

[0116]



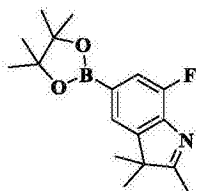
[0117] 向反应瓶中加入(4-溴-2-氟苯)肼盐酸盐(1.0g, 4.14mmol), 醋酸(10ml), 3-甲基-2-酮(0.32g, 4.14mmol), 然后回流反应5小时, 旋干溶剂, 加入20ml水, 用乙酸乙酯萃取三次, 每次20ml, 合并有机相, 然后用25ml饱和氯化钠水溶液洗涤一次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干, 柱色谱分离(DCM:MeOH=50:1-25:1), 得到标题化合物420mg(黄色固体)。

[0118] ¹H-NMR(CDCl₃, 300MHz) δ: 7.21(s, 1H), 7.19(s, 1H), 2.28(s, 3H), 1.30(s, 6H).

[0119] MS(ESI): 257.1[M+H]⁺.

[0120] 步骤4 7-氟-2,3,3-三甲基-5-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼酸-2-基)-3H-吡啶的合成

[0121]

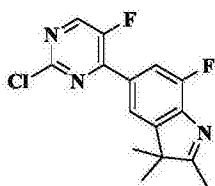


[0122] 向反应瓶中加入步骤1制备的5-溴-7-氟-2,3,3-三甲基-3H-吡啶(400.0mg, 1.56mmol), 4,4',4',5,5,5',5'-八甲基-2,2'-双(1,3,2-二氧杂环戊硼烷)(436.5mg, 1.71mmol), 乙酸钾(306.3mg, 3.12mmol), 二氧六环(10ml), Pd(dppf)Cl₂(228.7mg, 0.32mmol), 氮气保护, 加热至90°C, 反应过夜; 混合物冷却至室温, 过滤, 加入10ml水, 用乙酸乙酯萃取三次, 每次20ml; 合并乙酸乙酯有机相, 用25ml饱和食盐水洗涤一次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 硅胶柱色谱分离(DCM:MeOH=50:1-30:1), 得到标题化合物306.5mg(黄色油状物)。

[0123] MS(ESI): m/z 304.1[M+H]⁺.

[0124] 步骤5 5-(2-氯-5-氟嘧啶-4-基)-7-氟-2,3,3-三甲基-3H-吡啶的合成

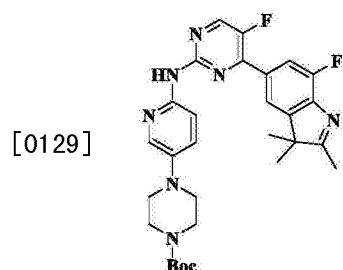
[0125]



[0126] 向微波反应瓶中加入步骤2制备的7-氟-2,3,3-三甲基-5-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧化杂硼酸-2-基)-3H-吡啶(300mg, 0.99mmol), 2,4-二氯-5-氟嘧啶(181.8mg, 1.08mmol), 磷酸钾(419.8mg, 1.98mmol), 二氧六环/水(4mL/1mL), Pd(PPh₃)₄(114.5mg, 0.09mmol), 氮气保护, 在130℃下微波反应1小时; 冷却至室温, 过滤, 加入10ml水, 用二氯甲烷萃取三次, 每次15ml; 合并二氯甲烷有机相, 用20ml饱和氯化钠水溶液洗涤一次, 然后用无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干, 硅胶柱色谱分离(DCM:MeOH=100:1-50:1), 得到标题化合物301.2mg(黄色固体)。

[0127] MS(ESI):mass calcd.for C₁₅H₁₂ClF₂N₃307.1, m/z found 308.1[M+H]⁺.

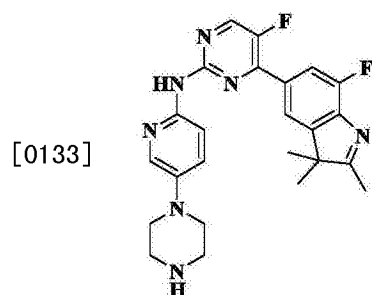
[0128] 步骤6 4-(6-((5-氟-4-(7-氟-2,3,3-三甲基-3H-吡啶-5-基)嘧啶-2-基)氨基)吡啶-3-基)哌嗪-1-羧基叔丁酯的合成



[0130] 向反应瓶中加入步骤5制备的5-(2-氯-5-氟嘧啶-4-基)-7-氟-2,3,3-三甲基-3H-吡啶(150.0mg, 0.48mmol), 步骤2制备的4-(6-氨基吡啶-3-基)哌嗪-1-羧基叔丁酯(135.8mg, 0.48mmol), 碳酸铯(371.6mg, 0.96mmol), 二氧六环(3ml), Pd₂(dba)₃(44.7mg, 0.05mmol), 4,5-双二苯基膦-9,9-二甲基氧杂蒽(30.4mg, 0.05mmol), 氮气保护, 加热至150℃, 微波反应1小时, 冷却至室温; 过滤, 加入10ml水, 用二氯甲烷萃取三次, 每次10ml, 合并有机相, 用30ml饱和氯化钠水溶液洗涤一次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 硅胶柱色谱分离(DCM/MeOH=50:1), 得到标题化合物53.4mg(黄色固体)。

[0131] MS(ESI):mass calcd.for C₂₉H₃₃F₂N₇O₂549.3, m/z found 550.3[M+H]⁺.

[0132] 步骤7 5-氟-4-(7-氟-2,3,3-三甲基-3H-吡啶-5-基)-N-(5-(哌嗪-1-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基三氟乙酸盐的合成

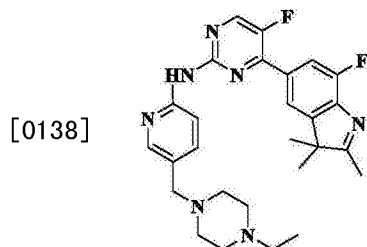


[0134] 向反应瓶中加入步骤6制备的4-(6-((5-氟-4-(7-氟-2,3,3-三甲基-3H-吡啶-5-基)嘧啶-2-基)氨基)吡啶-3-基)哌嗪-1-羧基叔丁酯(30.0mg, 0.054mmol), 二氯甲烷(4ml), 三氟乙酸(1ml), 室温搅拌反应2小时; 旋干溶剂, 用饱和碳酸氢钠水溶液调pH到8, 用二氯甲烷萃取三次, 每次5ml, 合并有机相, 用10ml饱和氯化钠水溶液洗涤一次, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干, 硅胶柱色谱分离(DCM/MeOH=20:1), 得到标题化合物10.5mg(黄色固体)。

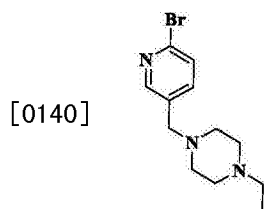
[0135] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300MHz) δ 11.49(s, 1H), 9.91(s, 1H), 8.71(d, $J=2.7\text{Hz}$, 1H), 8.19-8.11(m, 2H), 7.97(s, 1H), 7.85(d, $J=8.7\text{Hz}$, 1H), 7.66(m, 1H), 3.20-3.17(m, 4H), 3.07-2.99(m, 4H), 2.37(s, 3H), 1.35(s, 6H).

[0136] MS(ESI): mass calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{F}_2\text{N}_7$ 449.50, m/z found 450.2[M+H] $^+$.

[0137] 实施例2 N-(5-((4-乙基哌嗪-1-基)甲基)吡啶-2-基)-5-氟-4-(7-氟-2,3,3-三甲基-3H-吡啶-5-基)嘧啶-2-氨基



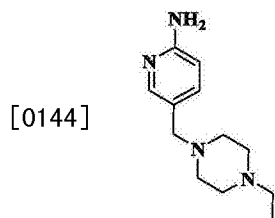
[0139] 步骤1 1-((6-溴吡啶-3-基)甲基)-4-乙基哌嗪的合成



[0141] 向反应瓶中加入2-溴-5-醛基吡啶(1.5g, 8.15mmol), 1-乙基哌嗪(0.93g, 8.15mmol), 二氯甲烷(15mL), 然后分批加入 $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (2.58g, 12.23mmol)。室温反应过夜, 过滤, 浓缩, 柱色谱分离(DCM/MeOH=100:1-10:1), 得到标题产物1.64g(黄色油状物)。

[0142] MS(ESI): mass calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{BrN}_3$ 283.1, m/z found 284.1[M+H] $^+$.

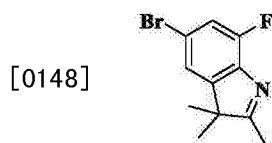
[0143] 步骤2 5-((4-乙基哌嗪-1-基)甲基)吡啶-2-氨基的合成



[0145] 向反应瓶中加入步骤1制备的1-((6-溴吡啶-3-基)甲基)-4-乙基哌嗪(2.84g, 10mmol), 2-(二环己基膦基)联苯(700mg, 2mmol), $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (915mg, 1mmol), 甲苯(30mL), 氮气保护下加入LHMDS(1N)(20ml, 20mmol)。该混合物加热到 80°C 反应过夜, 然后冷却到室温, 过滤, 浓缩, 柱色谱分离(DCM/MeOH=100:1-10:1), 得到标题产物1.52g(褐色固体)。

[0146] MS(ESI): mass calcd. for $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{N}_3$ 220.2, m/z found 221.2[M+H] $^+$.

[0147] 步骤3 5-溴-7-氟-2,3,3-三甲基-3H-吡啶的合成

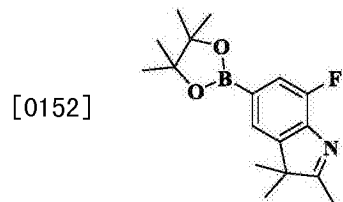


[0149] 向反应瓶中加入(4-溴-2-氟苯)肼(900.0mg, 3.73mmol), 乙酸(5mL), 3-甲基丁基-2-酮(353.3mg, .09mmol), 回流反应5小时; 旋干溶剂, 加入10ml水, 用乙酸乙酯萃取三次, 每

次20ml,合并有机相,有机相用25ml饱和氯化钠水溶液洗涤一次,无水硫酸钠干燥,过滤,旋干,硅胶柱色谱分离(乙酸乙酯:石油醚=1:50-1:25),得到标题化合物910mg(黄色固体)。

[0150] MS(ESI):m/z 257.1[M+H]⁺.

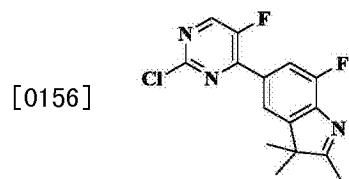
[0151] 步骤4 7-氟-2,3,3-三甲基-5-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼酸-2-基)-3H-吡啶的合成



[0153] 向反应瓶中加入按照步骤3所述方法制备的5-溴-7-氟-2,3,3-三甲基-3H-吡啶(1.0g,3.91mmol),4,4,4',4',5,5,5',5'-八甲基-2,2'-双(1,3,2-二氧杂硼烷)(1.09g,4.29mmol),醋酸钾(770mg,7.82mmol),二氧六环(10ml),Pd(dppf)Cl₂(570mg,0.78mmol),氮气保护,升温至90℃过夜反应,然后冷却至室温,过滤,加入10ml水稀释,用乙酸乙酯萃取三次,每次20ml。合并有机相,有机相用25ml饱和食盐水洗涤一次,硫酸钠干燥,过滤,旋干,硅胶柱色谱分离(EA:PE=1:100-1:20),得到标题化合物1.02g(黄色油状物)。

[0154] MS(ESI):m/z 304.2[M+H]⁺.

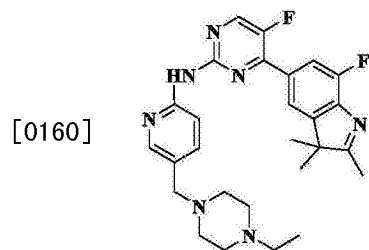
[0155] 步骤5 5-(2-氯-5-氟嘧啶-4-基)-7-氟-2,3,3-三甲基-3H-吡啶的合成



[0157] 向微波反应瓶中加入步骤4制备的7-氟-2,3,3-三甲基-5-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼酸-2-基)-3H-吡啶(1.0g,3.30mmol),2,4-二氯-5-氟嘧啶(610mg,3.63mmol),磷酸钾(1.39g,6.60mmol),二氧六环/水(8mL/2mL),Pd(PPh₃)₄(380mg,0.33mmol),氮气保护,在130℃下微波反应1小时;冷却至室温,过滤,加入10ml水,用二氯甲烷萃取三次,每次15ml,合并有机相,有机相用20ml饱和食盐水洗涤一次,用无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩,硅胶柱色谱分离(EA:PE=1:50-1:10),得到标题化合物290.0mg(黄色固体)。

[0158] MS(ESI):m/z 308.1[M+H]⁺.

[0159] 步骤6 N-(5-((4-以及哌嗪-1-基)甲基)吡啶-2-基)-5-氟-4-(7-氟-2,3,3-三甲基-3H-吡啶-5-基)嘧啶-2-氨基的合成



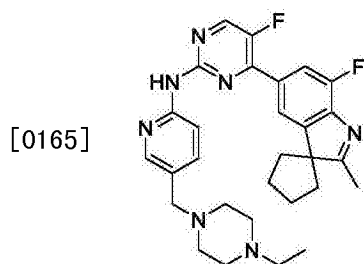
[0161] 向反应瓶中加入步骤5制备的5-(2-氯-5-氟嘧啶-4-基)-7-氟-2,3,3-三甲基-3H-吡啶(290.0mg,0.94mmol),步骤2制备的5-((4-乙基哌嗪-1-基)甲基)吡啶-2-氨基

(228.6mg, 1.04mmol), 磷酸钾(400.5mg, 1.88mmol), 二氧六环10ml, $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (86.4mg, 0.09mmol), 4,5-双二苯基膦-9,9-二甲基氧杂蒽(109.2mg, 0.19mmol), 氮气保护, 升温至150°C微波反应1小时; 混合物冷却至室温, 过滤, 加入10ml水稀释, 用二氯甲烷萃取三次, 每次10ml, 合并有机相; 有机相用30ml饱和食盐水洗涤一次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干, 硅胶柱色谱分离(二氯甲烷: 甲醇=30:1), 得到标题化合物140.3mg(黄色固体)。

[0162] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300MHz), δ 9.98(s, 1H), 8.71(s, 1H), 8.19-8.15(m, 2H), 7.98(s, 1H), 7.83(d, $J=8.7\text{Hz}$, 1H), 7.69(d, $J=6.3\text{Hz}$, 1H), 3.45(s, 2H), 2.42-2.37(m, 10H), 2.32(s, 3H), 1.35(s, 6H), 1.00(brs, 3H).

[0163] MS(ESI): m/z 492.3[M+H] $^+$.

[0164] 实施例3 N-(5-((4-乙基哌嗪-1-基)甲基吡啶-2-基)-5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)嘧啶-2-氨基

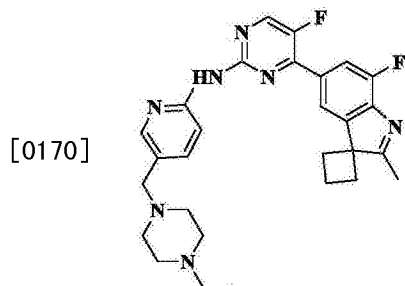


[0166] 按照实施例2中相似的步骤得到标题化合物。

[0167] $^1\text{HNMR}$ (DMSO, 400MHz), δ 10.06(s, 1H), 8.71-8.70(d, 1H), 8.19-8.16(m, 2H), 8.04-8.02(d, 1H), 7.99(s, 1H), 7.85-7.82(d, 1H), 7.68-7.66(d, 1H), 3.45(s, 1H), 2.31(m, 11H), 2.31(m, 11H), 2.11-2.09(m, 2H), 1.01-0.97(m, 3H).

[0168] MS(ESI): m/z 518.3[M+H] $^+$.

[0169] 实施例4 氮-(5-((4-乙基哌嗪-1-基)甲基)吡啶-2-基)-5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环丁烷-1,3'-吡啶]-5'-基)氨基嘧啶-2-氨基



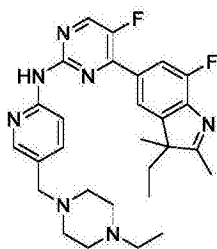
[0171] 按照实施例2中相似的步骤得到标题化合物。

[0172] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300MHz), δ 11.67(s, 1H), 9.95(s, 1H), 8.63(d, $J=3.3\text{Hz}$, 1H), 8.23(d, $J=6.9\text{Hz}$, 1H), 8.09(s, 1H), 7.70-7.60(m, 2H), 3.51(s, 2H), 2.89-2.75(m, 8H), 2.89-2.75(m, 8H), 2.33-2.31(m, 3H), 2.02-2.01(m, 2H), 1.35(s, 3H), 1.25-1.23(m, 4H), 0.86-0.85(m, 2H).

[0173] MS(ESI): m/z 504.3[M+H] $^+$.

[0174] 实施例5 4-(3-乙基-7-氟-2,3-二甲基-3H-吡啶-5-基)-N-(5-((4-乙基哌嗪-1-基)甲基)吡啶-2-基)-5-氟嘧啶-2-氨基

[0175]



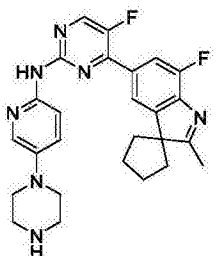
[0176] 按照实施例2中相似的步骤得到标题化合物。

[0177] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400MHz), δ 10.03(s, 1H), 8.72-8.71(d, 1H), 8.20-8.16(m, 2H), 7.93(s, 1H), 7.94(s, 1H), 7.87-7.84(d, 1H), 7.71-7.69(d, 1H), 3.34(m, 3H), 2.00(s, 3H), 1.99-1.97(m, 1H), 1.90-1.88(m, 1H), 1.33(s, 1H), 1.01-0.97(t, 3H).

[0178] MS(ESI):m/z 506.3[M+H]⁺.

[0179] 实施例6 5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)-氮-(5-(哌嗪-1-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基

[0180]



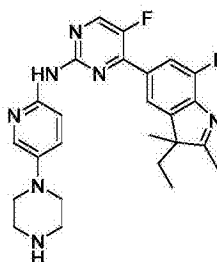
[0181] 按照实施例1中相似的步骤得到标题化合物。

[0182] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400MHz), δ 10.60(s, 1H), 8.92(s, 2H), 8.74-8.73(d, 1H), 8.04-8.03(d, 1H), 7.95-7.91(m, 2H), 7.84-7.81(d, 1H), 7.75-7.73(m, 1H), 3.36(brs, 4H), 3.29(brs, 4H), 2.50-2.34(s, 3H), 2.09-1.74(m, 8H).

[0183] MS(ESI):m/z 476.2[M+H]⁺.

[0184] 实施例7 4-(3-乙基-7-氟-2,3-二甲基-3H-吡啶-5-基)-5-氟-氮-(5-(哌嗪-1-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基

[0185]



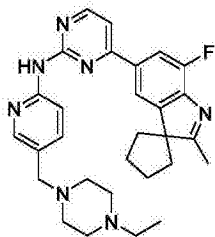
[0186] 按照实施例1中相似的步骤得到标题化合物。

[0187] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400MHz), δ 9.83(s, 1H), 8.67-8.66(d, 1H), 8.07-8.05(m, 2H), 7.91(s, 1H), 7.85-7.82(d, 1H), 7.49-7.47(d, 1H), 3.34-3.28(m, 4H), 3.15(brs, 4H), 2.27(s, 3H), 1.33(m, 3H), 1.23(m, 3H), 0.38-0.34(m, 2H).

[0188] MS(ESI):m/z 464.2[M+H]⁺.

[0189] 实施例8 氮-(5-((4-乙基哌嗪-1-基)甲基)吡啶-2-基)-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)嘧啶-2-氨基

[0190]



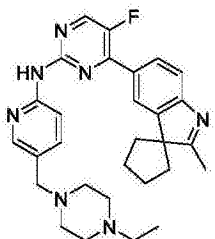
[0191] 按照实施例2中相似的步骤得到标题化合物。

[0192] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400MHz), δ 9.92(s, 1H), 8.61-8.60(d, 1H), 8.29-8.7.27(m, 1H), 8.19-8.14(d, 2H), 8.02-7.99(d, 1H), 7.69-7.62(m, 2H), 3.45-3.34(m, 2H), 2.50-2.21(m, 11H), 2.16-2.06(m, 7H), 1.79-1.77(m, 2H), 1.23(s, 1H), 1.00-0.97(m, 3H).

[0193] MS(ESI):m/z 500.3[M+H]⁺.

[0194] 实施例9氮-(5-((4-乙基哌嗪-1-基)甲基)吡啶-2-基)-5-氟-4-(2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)嘧啶-2-氨基

[0195]



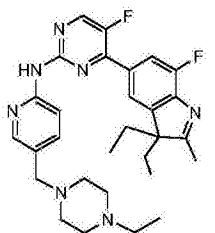
[0196] 按照实施例2中相似的步骤得到标题化合物。

[0197] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400MHz), δ 10.08(s, 1H), 8.68-8.67(d, 1H), 8.25-8.23(d, 2H), 8.16(s, 1H), 8.05-8.03(d, 1H), 7.69-7.67(d, 1H), 7.61-7.59(d, 1H), 3.59-3.53(d, 2H), 3.08-2.50(m, 6H), 2.39-2.31(m, 5H), 2.09-2.07(m, 6H), 1.73-1.71(m, 2H), 1.34-1.05(m, 6H).

[0198] MS(ESI):m/z 500.3[M+H]⁺.

[0199] 实施例10 4-(3,3-二乙基-7-氟-2-甲基-3H-吡啶-5-基)-氮-(5-((4-乙基哌嗪-1-基)甲基)吡啶-2-基)-5-氟嘧啶-2-氨基

[0200]



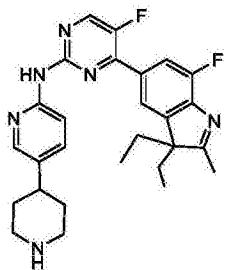
[0201] 按照实施例2中相似的步骤得到标题化合物。

[0202] $^1\text{H-NMR}$ (D₂O, 300MHz), δ 8.67(s, 1H), 8.66(s, 1H), 8.24(s, 1H), 8.15(d, J=6.3Hz, 1H), 7.87(s, 2H), 7.70(d, J=6.3Hz, 1H), 3.47(s, 2H), 2.53-2.50(m, 8H), 2.23(s, 3H), 2.23-2.01(m, 2H), 2.00-1.98(m, 2H), 1.04(t, J=5.4Hz, 3H), 0.31(t, J=4.2Hz, 6H).

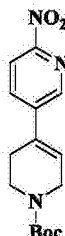
[0203] MS(ESI):m/z 520.3[M+H]⁺.

[0204] 实施例11 4-(3,3-二乙基-7-氟-2-甲基-3H-吡啶-5-基)-5-氟-氮-(5-(哌嗪-1-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基

[0205]

[0206] 步骤1 6-硝基-3',6'-二氢-[3,4'-二吡啶]-1'(2'H)-羧基叔丁酯的合成

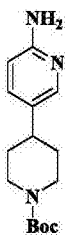
[0207]



[0208] 向反应瓶中加入5-溴-2-硝基吡啶(20.3g,0.1mol),4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧基硼酸-2-基)-5,6-二氢吡啶-1(2H)-羧基叔丁酯(31g,0.1mol),二氧六环/水(250mL/30mL),碳酸铯(66g,0.2mol),Pd(dppf)Cl₂(7.33g,0.01mol),氮气保护。该混合物被加热至85°C反应12小时,冷却至室温,浓缩,柱色谱分离(PE/EA=1:1-DCM/MeOH=20:1)得到标题产物11g(黄色固体)。

[0209] MS(ESI):mass calcd.for C₁₅H₁₉N₃O₄305.1,m/z found 306.1[M+H]⁺.[0210] 步骤2 4-(6-氨基吡啶-3-基)哌啶-1-羧基叔丁酯的合成

[0211]

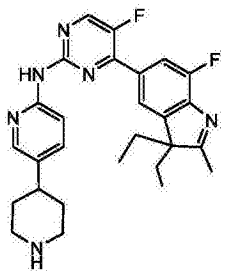


[0212] 向反应瓶中加入步骤1制备的6-硝基-3',6'-二氢-[3,4'-二吡啶]-1'(2'H)-羧基叔丁酯(0.9g,3.0mmol),乙酸乙酯/甲醇(10mL/10mL),Pd/C(0.1g),通入氢气,室温反应2小时,过滤,浓缩,得到标题产物790mg(类白色固体)。

[0213] MS(ESI):mass calcd.for C₁₅H₂₃N₃O₂277.2,m/z found 278.2[M+H]⁺.

[0214] 4-(3,3-二乙基-7-氟-2-甲基-3H-咪唑-5-基)-5-氟-氮-(5-(哌嗪-1-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基的合成

[0215]



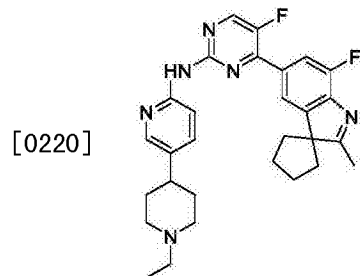
[0216] 其他步骤按照实施例1中3-7相似的步骤得到本实施例的标题化合物。

[0217] ¹H-NMR(D₂O,300MHz),δ8.61(d,J=2.4Hz,1H),8.04-8.02(m,2H),7.83-7.80(m,

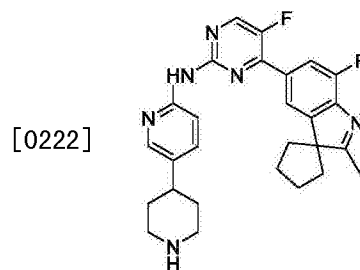
2H), 7.43(dd, $J^1=6.9\text{Hz}$, $J^2=1.8\text{Hz}$, 1H), 3.32-3.31(m, 4H), 3.07-3.06(m, 4H), 2.22(s, 3H), 2.02-1.95(m, 2H), 1.87-1.81(m, 2H), 0.30(t, $J=5.4\text{Hz}$, 6H).

[0218] MS(ESI):m/z found 477.3[M+H]⁺.

[0219] 实施例12氮-(5-(1-乙基哌啶-4-基)吡啶-2-基)-5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)嘧啶-2-氨基

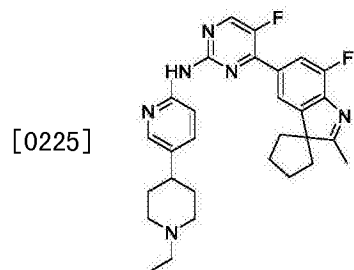


[0221] 5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)-氮(5-(哌啶-4-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基的合成



[0223] 按照实施例11相似的步骤得到该中间体

[0224] 氮-(5-(1-乙基哌啶-4-基)吡啶-2-基)-5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)嘧啶-2-氨基的合成

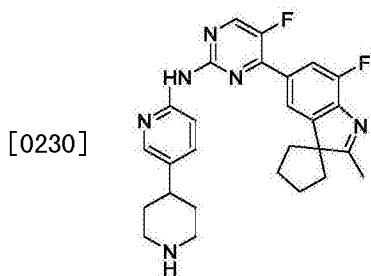


[0226] 向反应瓶中加入上步制备得到的5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)-氮-(5-(哌啶-4-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基50mg(0.1mmol), 乙酸酐26mg(0.6mmol), 二氯甲烷5ml, 室温反应0.5小时, 然后加入三乙基硼氢化钠60mg(0.28mmol), 室温反应2小时, 向反应液中加入20ml饱和碳酸钠水溶液, 然后用二氯甲烷萃取三次, 每次10mL, 合并有机相; 有机相用饱和食盐水洗涤一次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 真空浓缩, 硅胶柱色谱分离(PE/EA=5:1), 得到标题化合物11mg, 收率22%。

[0227] ¹H-NMR(DMSO, 400MHz), δ 10.08(s, 1H), 9.88(brs, 1H), 8.71-8.70(d, 1H), 8.21-8.16(m, 2H), 8.01(s, 1H), 7.85-7.82(d, 1H), 7.65-7.62(m, 1H), 3.58-3.55(m, 2H), 3.17-3.13(s, 2H), 3.02-2.99(m, 2H), 2.86(m, 1H), 2.34(s, 3H), 2.09-1.95(m, 10H), 1.75(brs, 2H), 1.34-1.23(m, 3H).

[0228] MS(ESI):m/z 503.3[M+H]⁺.

[0229] 实施例13 5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)-氮-(5-(哌啶-4-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基

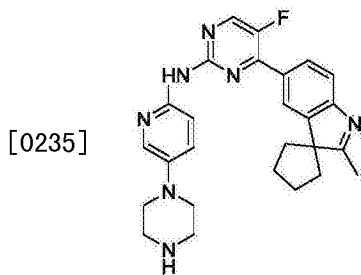


[0231] 按照实施例11相似的步骤得到标题化合物。

[0232] $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 400MHz), δ 8.63-8.62(d, 1H), 8.16(s, 1H), 8.08-8.06(d, 1H), 7.97(s, 1H), 7.81-7.80(d, 1H), 7.61-7.59(d, 1H), 3.03-3.00(d, 2H), 2.61-2.51(m, 3H), 2.31(brs, 3H), 2.01(brs, 4H), 1.71-1.68(m, 4H), 1.58-1.49(m, 2H), 1.06(s, 2H).

[0233] MS(ESI):mass calcd.for $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{F}_2\text{N}_6$ 474.2, m/z found 475.2[M+H]⁺

[0234] 实施例14 5-氟-4-(2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)-氮-(5-(哌嗪-1-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基

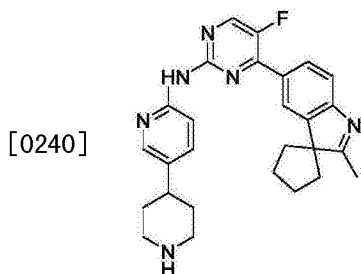


[0236] 按照实施例11中相似的步骤得到标题化合物。

[0237] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400MHz), δ 9.81-9.76(d, 1H), 9.12(s, 1H), 8.62-8.61(d, 1H), 8.13-8.08(m, 3H), 8.04-8.01(m, 1H), 7.59-7.57(d, 1H), 7.48-7.45(m, 1H), 3.25-3.23(d, 5H), 2.30(brs, 3H), 2.14-2.05(m, 6H), 1.73-1.68(m, 2H).

[0238] MS(ESI):m/z 458.2[M+H]⁺.

[0239] 实施例15 5-氟-4-(2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)-氮-(5-(哌啶-4-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基

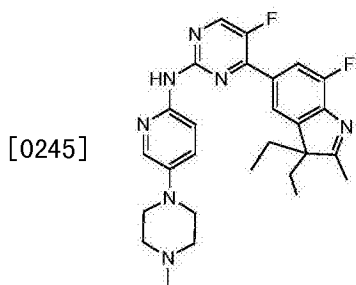


[0241] 按照实施例11中相似步骤得到标题化合物

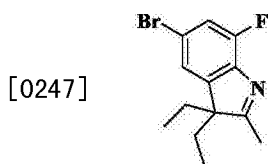
[0242] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400MHz), δ 9.95(s, 1H), 8.65(s, 1H), 8.38(s, 1H), 8.19-8.17(d, 2H), 8.04-8.03(d, 1H), 7.63-7.58(m, 2H), 3.26-3.23(d, 5H), 2.86-2.73(m, 4H), 2.31(brs, 3H), 2.17-2.08(m, 4H), 1.87-1.84(m, 2H), 1.74-1.71(m, 2H).

[0243] MS(ESI):m/z 457.2[M+H]⁺.

[0244] 实施例16 4-(3,3-二乙基-7-氟-2-甲基-3H-吡啶-5-基)-5-氟-氮-(5-(4-甲基哌啶-1-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基



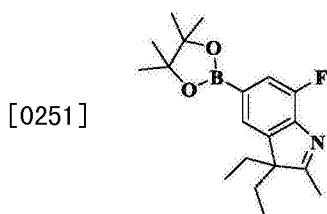
[0246] 步骤1 5-溴-3,3-二乙基-7-氟-2-甲基-3H-吡啶的合成



[0248] 向反应瓶中加入10ml乙酸,(4-溴-2-氟苯)肼盐酸盐5.0g(20.75mmol),3-乙基戊烷-2酮2.35g(20.75mmol),混合物回流反应5小时,旋干溶剂,加入50ml水,然后用乙酸乙酯萃取三次,每次50ml,合并有机相;,有机层用50ml盐水洗涤一次,加入硫酸钠干燥,过滤,旋干,柱色谱分离(EA:PE=1:100-1:10),得到标题化合物2.5g(黄色油状物),收率87.1%。

[0249] MS(ESI):m/z 284.1[M+H]⁺.

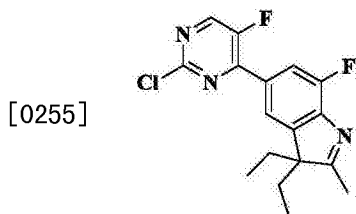
[0250] 步骤2 3,3-二乙基-7-氟-2-甲基-5-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼基-2-基)-3H-吡啶的合成



[0252] 向反应瓶中加入步骤1制备的5-溴-3,3-二乙基-7-氟-2-甲基-3H-吡啶2.0g(7.07mmol),4,4,4',4',5,5,5',5'-八甲基-2,2'-双(1,3,2-二氧硼戊环)1.97g,(7.77mmol),醋酸钾1.38g(1.41mmol),1,4-二氧六环10ml,Pd(dppf)Cl₂1.03g(1.41mmol),氮气保护,混合物加热到90℃,反应过夜。混合物冷却到室温过滤,用10ml水稀释,用乙酸乙酯萃取三次,每次10ml,合并有机相。有机相用15ml食盐水洗涤一次,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩,硅胶柱色谱分离(EA:PE=1:50-1:10),得到标题化合物2.0g(黄色油状物),收率86.96%。

[0253] MS(ESI):m/z 332.3[M+H]⁺.

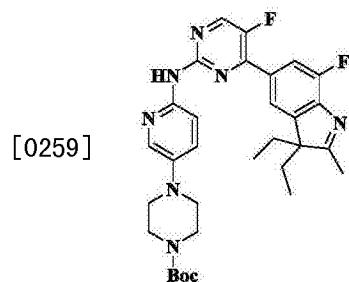
[0254] 步骤3 5-(2-氯-5-氟嘧啶-4-基)-3,3-二乙基-7-氟-2-甲基-3H-吡啶的合成



[0256] 向反应瓶中加入步骤2制备得到的3,3-二乙基-7-氟-2-甲基-5-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧基硼-2-基)-3H-吡啶2.0g(6.05mmol),2,4-二氯-5-氟嘧啶1.10g(6.65mmol),磷酸钾2.56g(12.1mmol),1,4-二氧六环/水20mL/5mL,Pd(PPh₃)₄0.69g(0.61mmol),氮气保护,混合物加热到120℃反应2小时。混合物冷却到室温,过滤,用10mL水稀释,用50mL二氯甲烷萃取三次,合并有机相。有机相用20mL食盐水洗涤一次,无水硫酸钠干燥,过滤,真空浓缩,硅胶柱色谱分离(EA:PE=1:100-1:10),得到1.2g标题化合物(黄色固体),收率59.4%。

[0257] MS(ESI):m/z 336.1[M+H]⁺。

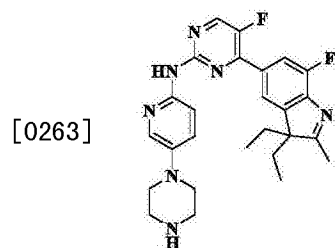
[0258] 步骤4 4-(6-((4-(3,3-二乙基-7-氟-2-甲基-3H-吡啶-5-基)-5-氟嘧啶-2-基)氨基)吡啶-3-基)哌嗪-1-羧基叔丁酯的合成



[0260] 向反应瓶中加入步骤3制备得到的5-(2-氯-5-氟嘧啶-4-基)-3,3-二乙基-7-氟-2-甲基-3H-吡啶400.0mg(1.19mmol),按照实施例1的步骤1-2制备的叔丁基4-(6-氨基吡啶-3-基)哌嗪-1-羧酸盐331.9mg(1.19mmol),碳酸铯776.2mg(2.38mmol),1,4-二氧六环10mL,Pd₂(dba)₃109.5mg(0.12mmol),4,5-双二苯基膦-9,9-二甲基氧杂蒽69.0mg(0.12mmol),氮气保护。混合物在130℃,微波反应1小时。混合物冷却到室温,过滤,用10mL水稀释,用10mL二氯甲烷萃取三次,合并有机相。有机相用30mL食盐水洗涤一次,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩,TLC分离得到253.1mg标题化合物(黄色固体),收率36.74%。

[0261] MS(ESI):m/z 578.3[M+H]⁺。

[0262] 步骤5 4-(3,3-二乙基-7-氟-2-甲基-3H-吡啶-5-基)-5-氟-N-(5-(哌嗪-1-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基的合成

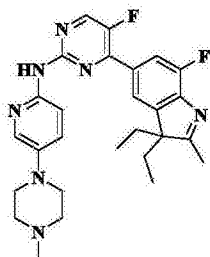


[0264] 向反应瓶中加入步骤4制备得到的4-(6-((4-(3,3-二乙基-7-氟-2-甲基-3H-吡啶-5-基)-5-氟嘧啶-2-基)氨基)吡啶-3-基)哌嗪-1-羧基叔丁酯250.0mg(0.43mmol),二氯甲烷4mL,TFA1mL。混合物室温旋转搅拌2小时,除去溶剂,用5mL饱和碳酸氢钠溶液调节pH到8,用二氯甲烷萃取三次,每次5mL,合并有机相。有机相用10mL饱和食盐水洗涤一次,无水硫酸钠干燥,过滤,真空浓缩,TLC分离纯化,得到标题化合物201.2mg(黄色固体),收率97.6%。

[0265] MS(ESI):m/z 478.3[M+H]⁺。

[0266] 步骤6 4-(3,3-二乙基-7-氟-2-甲基-3H-吡啶-5-基)-5-氟-氮-(5-(4-甲基哌嗪-1-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基的合成

[0267]



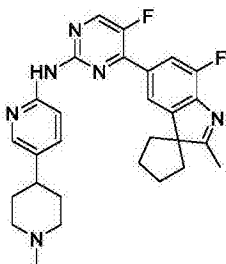
[0268] 向反应瓶中加入4-(3,3-二乙基-7-氟-2-甲基-3H-吡啶-5-基)-5-氟-氮-(5-(哌嗪-1-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基50.0mg(0.10mmol),甲醛30.8mg(1.0mmol),1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺2ml,三乙基硼氢化钠65.3mg(0.3mmol),反应过夜。加入2ml甲醇淬灭,用二氯甲烷萃取三次,每次5ml。有机相用10ml饱和食盐水洗涤一次,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩,TLC分离,得到20.3mg标题化合物(黄色固体),收率39.4%。

[0269] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300MHz), δ 9.72(s, 1H), 8.64(s, 1H), 8.02-8.00(m, 2H), 7.90-7.82(m, 2H), 7.43(d, $J=7.2\text{Hz}$, 1H), 3.12-3.10(m, 4H), 2.50-2.47(m, 4H), 2.05(s, 6H), 2.03-2.00(m, 2H), 1.89-1.84(m, 2H), 0.34(t, $J=5.4\text{Hz}$, 6H)。

[0270] MS(ESI): m/z 491.3[M+H] $^+$

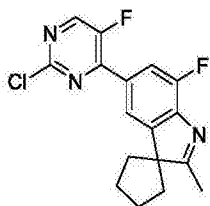
[0271] 实施例17 5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)-氮-(5-(1-甲基哌嗪-4-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基

[0272]



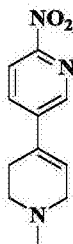
[0273] 按照实施例1相似步骤得到中间体5'-(2-氯-5-氟嘧啶-4-基)-7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]

[0274]



[0275] 步骤1 1'-甲基-6-硝基-1',2',3',6'-四氢-3,4'-二吡啶的合成

[0276]

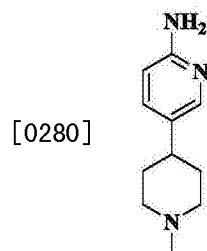


[0277] 向反应瓶中加入5-溴-2-硝基吡啶(20.3g, 0.1mol), 1-甲基-4-(4,4,5,5-四甲基-

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

[0278] MS(ESI):mass calcd.for C₁₁H₁₃N₃O₂219.1,m/z found 220.1[M+H]⁺.

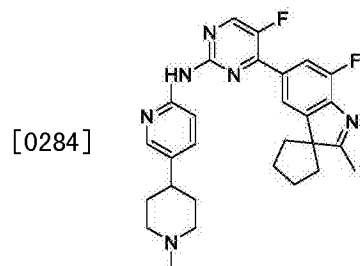
[0279] 步骤2 5-(1-甲基哌啶-4-基)吡啶-2-氨基的合成



[0281] 向反应瓶中加入步骤1制备的1'-甲基-6-硝基-1',2',3',6'-四氢-3,4'-二吡啶(657mg,3.0mmol),乙酸乙酯/甲醇(10mL/10mL),Pd/C(0.1g)。向该混合物中通入氢气,搅拌反应2小时,过滤,浓缩,得到标题产物550mg(白色固体)。

[0282] MS(ESI):mass calcd.for C₁₁H₁₇N₃191.1,m/z found 192.1[M+H]⁺.

[0283] 步骤3 5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)-氮-(5-(1-甲基哌啶-4-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基的合成



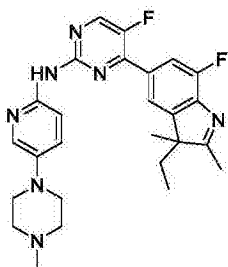
[0285] 向反应瓶中加入中间体5'-(2-氯-5-氟嘧啶-4-基)-7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶](150.0mg,0.45mmol),步骤2制备的5-(1-甲基哌啶-4-基)吡啶-2-氨基(86.6mg,0.45mmol),碳酸铯(293.2mg,0.9mmol),二氧六环(3mL),Pd₂(dba)₃(44.7mg,0.05mmol),4,5-双二苯基膦-9,9-二甲基氧杂蒽(30.4mg,0.05mmol),氮气保护,加热至150°C,微波反应1小时,冷却至室温,过滤,加入10mL水,用二氯甲烷萃取三次,每次10mL,合并有机相,用30mL饱和氯化钠水溶液洗涤一次,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩,硅胶柱色谱分离(二氯甲烷/甲醇=50:1),得到标题化合物51.1mg(黄色固体)。

[0286] ¹H-NMR(DMSO,400MHz),δ9.99(s,1H),8.69(s,1H),8.19(s,1H),8.13-8.11(d,1H),8.01(s,1H),7.85-7.82(d,1H),7.66-7.64(d,1H),3.83-3.69(m,3H),2.92-2.89(m,4H),2.34(brs,4H),2.23(brs,3H),2.14-2.03(m,5H),1.74-1.67(m,4H).

[0287] MS(ESI):m/z 489.2[M+H]⁺.

[0288] 实施例18 4-(3-乙基-7-氟-2,3-二甲基-3H-吡啶-5-基)-5-氟-氮-(5-(4-甲基哌啶-1-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基

[0289]



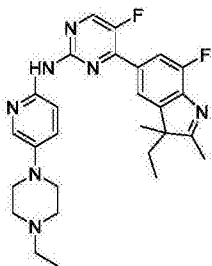
[0290] 按照实施例16中相似的步骤得到标题化合物。

[0291] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400MHz), δ 9.71(s, 1H), 8.65-8.64(d, 1H), 8.02-8.7.90(m, 2H), 7.90-7.80(d, 2H), 7.44-7.41(d, 1H), 3.12-3.11(brs, 4H), 2.50-2.47(brs, 4H), 2.47(s, 3H), 2.27(s, 3H), 2.23-1.84(m, 2H), 1.33-1.23(m, 3H), 0.38-0.34(m, 3H).

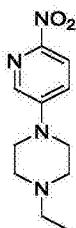
[0292] MS(ESI):m/z 478.3[M+H]⁺.

[0293] 实施例19 4-(3-乙基-7-氟-2,3-二甲基-3H-咪唑-5-基)-氮-(5-(4-乙基哌嗪-1-基)吡啶-2-基)-5-氟吡啶-2-氨基

[0294]

[0295] 步骤1 1-乙基-4-(6-硝基吡啶-3-基)哌嗪的合成

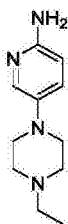
[0296]



[0297] 依次将5-溴-2-硝基吡啶720mg(3.56mol)、4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2,-二氧杂戊硼烷-2-基)-5,6-二氢吡啶-1(2H)-乙基1g(3.24mmol)、碳酸铯2.12g(6.50mmol)、1,4-二氧六环和水(V/V=16:1)17mL,加入封管中,氩气氛下,加入[1,1'-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钡二氯甲烷络合物230mg(0.32mmol),85°C反应2h。冷却至室温,减压浓缩,柱色谱分离得到677mg标题化合物(淡黄色固体),收率67.7%。

[0298] MS(ESI):m/z 237.1[M+H]⁺.[0299] 步骤2 5-(4-乙基哌嗪-1-基)吡啶-2-氨基的合成

[0300]



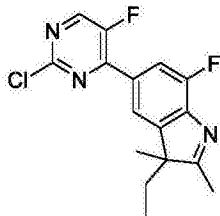
[0301] 将步骤1制备得到的1-乙基-4-(6-硝基吡啶-3-基)哌嗪650mg(2.13mmol)溶于45ml甲醇中,加入10%钯碳(250mg,cat),氢气置换三次,3个大气压下氢气氛围中室温反应

12h。停止反应,少量硅藻土过滤,滤饼用二氯甲烷和甲醇(V/V=10:1)的混合溶剂20ml洗涤一次,收集滤液,减压浓缩,得到559mg标题化合物粗品(透明粘稠状物),未进一步纯化,直接用于后续反应。

[0302] MS(ESI):m/z207.1[M+H]⁺.

[0303] 步骤3 5-(2-氯-5-氟嘧啶-4-基)-3-乙基-7-氟-2,3-二甲基-3H-吡啶的合成

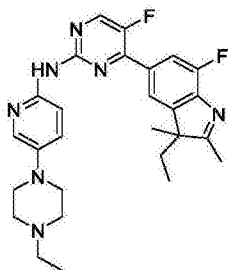
[0304]



[0305] 该中间体的合成方法与实施例16步骤1-3相同的方法制备得到。

[0306] 步骤4 4-(3-乙基-7-氟-2,3-二甲基-3H-吡啶-5-基)-氮-(5-(4-乙基哌嗪-1-基)吡啶-2-基)-5-氟嘧啶-2-氨基的合成

[0307]



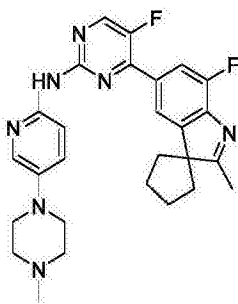
[0308] 向反应瓶中加入步骤3制备得到的5-(2-氯-5-氟嘧啶-4-基)-3-乙基-7-氟-2,3-二甲基-3H-吡啶321mg(1mmol),步骤2制备得到的5-(4-乙基哌嗪-1-基)吡啶-2-氨基206mg(1mmol),1,4-二氧六环2ml,Cs₂CO₃650mg(2mmol),Pd₂(dba)₃91mg(0.1mmol),二苯基膦58mg(0.1mmol);混合物加热到120°C,微波反应1小时;冷却至室温,加入10ml水,然后用乙酸乙酯萃取三次,每次40ml,合并有机相。有机相用40ml饱和食盐水洗涤一次,硫酸钠干燥,过滤,真空浓缩,硅胶柱色谱分离(DCM/MeOH=10:1),得到49mg标题化合物(黄色固体),收率10%。

[0309] ¹H-NMR(DMSO,400MHz):δ9.71(s,1H),8.65-8.64(d,1H),8.02-8.7.90(m,2H),7.90-7.80(d,2H),7.44-7.41(d,1H),3.18(brs,4H),3.06(brs,4H),2.47(s,3H),2.27(s,3H),2.23-1.84(m,2H),1.33-1.23(m,3H),0.38-0.34(m,3H).

[0310] MS(ESI):m/z 492.3[M+H]⁺.

[0311] 实施例20 5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)-氮-(5-(4-甲基哌嗪-1-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基

[0312]

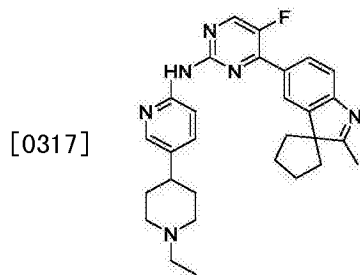


[0313] 按照实施例16中相似的步骤得到标题化合物。

[0314] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400MHz), δ 9.77(s, 1H), 8.65-8.64(d, 1H), 8.02-8.7.90(m, 2H), 7.90-7.80(d, 2H), 7.44-7.41(d, 1H), 3.12-3.11(brs, 4H), 2.50-2.46(brs, 4H), 2.33(s, 3H), 2.21(s, 3H), 2.09-1.17(m, 8H).

[0315] MS(ESI):m/z 490.3[M+H]⁺.

[0316] 实施例21氮-(5-(1-乙基哌啶-4-基)吡啶-2-基)-5-氟-4-(2'-甲基螺[环戊烷-1, 3'-吡啶]-5'-基)嘧啶-2-氨基

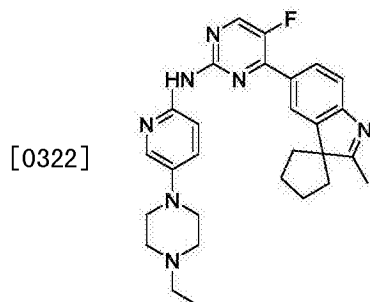


[0318] 按照实施例12中相似的步骤得到标题化合物。

[0319] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400MHz), δ 9.91(s, 1H), 8.65-8.64(d, 1H), 8.02-8.7.90(m, 3H), 7.90-7.80(d, 2H), 7.44-7.41(d, 1H), 3.12-3.11(brs, 4H), 2.50-2.46(brs, 4H), 2.33(s, 3H), 2.21(s, 3H), 2.09-1.17(m, 8H), 1.04(s, 3H).

[0320] MS(ESI):m/z 485.3[M+H]⁺.

[0321] 实施例22氮-(5-(4-乙基哌啶-1-基)吡啶-2-基)-5-氟-4-(2'-甲基螺[环戊烷-1, 3'-吡啶]-5'-基)嘧啶-2-氨基



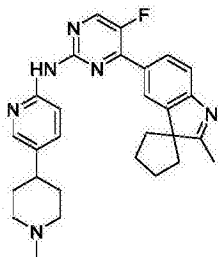
[0323] 按照实施例19中相似的步骤得到标题化合物。

[0324] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400MHz): δ 9.68(s, 1H), 8.65-8.64(d, 1H), 8.02-8.7.90(m, 2H), 7.90-7.80(d, 2H), 7.44-7.41(d, 2H), 3.13-3.11(brs, 4H), 2.50-2.46(brs, 4H), 2.38-2.37(m, 2H), 2.35-2.30(m, 3H), 2.09-1.17(m, 8H). 1.02(s, 3H).

[0325] MS(ESI):m/z 486.3[M+H]⁺.

[0326] 实施例23氮-(5-(4-甲基哌啶-1-基)吡啶-2-基)-5-氟-4-(2'-甲基螺[环戊烷-1, 3'-吡啶]-5'-基)嘧啶-2-氨基

[0327]



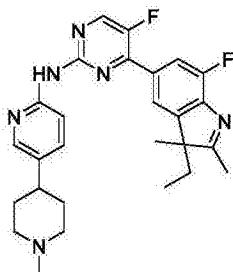
[0328] 按照实施例17中相似的步骤得到标题化合物。

[0329] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400MHz): δ 9.90(s, 1H), 8.65-8.64(d, 1H), 8.19-8.14(m, 3H), 7.90-7.80(d, 1H), 7.64-7.58(d, 2H), 3.13-3.11(brs, 4H), 2.50-2.46(brs, 4H), 2.38-2.37(m, 2H), 2.35-2.30(m, 3H), 2.09-1.17(m, 8H).

[0330] MS(ESI):m/z 471.3[M+H]⁺.

[0331] 实施例24 4-(3-乙基-7-氟-2,3-二甲基-3H-吡咯-5-基)-5-氟-氮-(5-(1-甲基哌啶-4-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基

[0332]



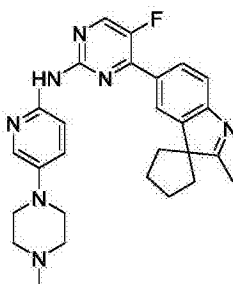
[0333] 按照实施例17中相似的步骤得到标题化合物。

[0334] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400MHz): δ 9.93(s, 1H), 8.65-8.64(d, 1H), 8.02-8.7.90(m, 2H), 7.90-7.80(d, 2H), 7.44-7.41(d, 1H), 3.12-3.11(brs, 4H), 2.50-2.47(brs, 4H), 2.47(s, 3H), 2.27(s, 3H), 2.23-1.84(m, 2H), 1.33-1.23(m, 3H), 0.38-0.34(m, 3H).

[0335] MS(ESI):m/z 477.3[M+H]⁺.

[0336] 实施例25 5-氟-氮-(5-(4-甲基哌嗪-1-基)吡啶-2-基)-4-(2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡咯]-5'-基)嘧啶-2-氨基

[0337]



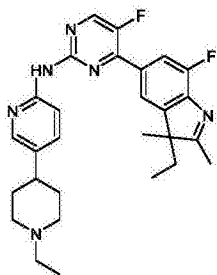
[0338] 按照实施例16中相似的步骤得到标题化合物。

[0339] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400MHz), δ 9.66(s, 1H), 8.65-8.64(d, 1H), 8.02-8.7.90(m, 2H), 7.90-7.80(d, 2H), 7.44-7.41(d, 2H), 3.13-3.11(brs, 4H), 2.50-2.46(brs, 4H), 2.38-2.37(m, 2H), 2.35-2.30(m, 3H), 2.09-1.17(m, 8H).

[0340] MS(ESI):m/z 472.3[M+H]⁺.

[0341] 实施例26 4-(3-乙基-7-氟-2,3-二甲基-3H-吡咯-5-基)-氮-(5-(1-乙基吡啶-4-基)吡啶-2-基)-5-氟嘧啶-2-氨基

[0342]



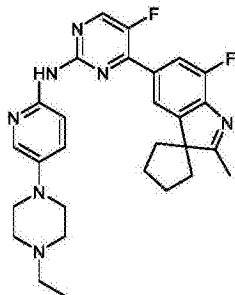
[0343] 按照实施例12中相似的步骤得到标题化合物。

[0344] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400MHz), δ 9.91(s, 1H), 8.65-8.64(d, 1H), 8.02-8.7.90(m, 2H), 7.90-7.80(d, 2H), 7.44-7.41(d, 1H), 3.12-3.11(brs, 4H), 2.50-2.47(brs, 4H), 2.47(s, 3H), 2.27(s, 3H), 2.23-1.84(m, 2H), 1.33-1.23(m, 3H), 0.38-0.34(m, 3H).

[0345] MS(ESI):m/z 491.3[M+H]⁺.

[0346] 实施例27氮-(5-(4-乙基哌嗪-1-基)吡啶-2-基)-5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)嘧啶-2-氨基

[0347]



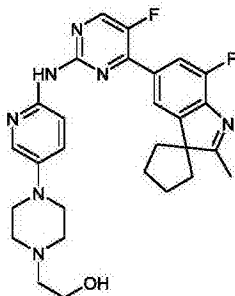
[0348] 按照实施例19中相似的步骤得到标题化合物。

[0349] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400MHz), δ 9.74(s, 1H), 8.65-8.64(d, 1H), 8.02-8.7.90(m, 2H), 7.90-7.80(d, 2H), 7.44-7.41(d, 1H), 3.12-3.11(brs, 4H), 2.50-2.46(brs, 4H), 2.33(s, 3H), 2.21(s, 3H), 2.09-1.17(m, 8H), 1.04(s, 3H).

[0350] MS(ESI):m/z 504.3[M+H]⁺.

[0351] 实施例28 2-(4-(6-((5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)嘧啶-2-基)氨基)-3-基)哌嗪-1-基)乙醇

[0352]



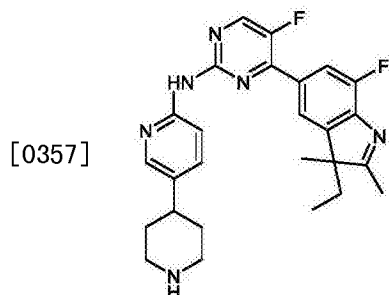
[0353] 向反应瓶中加入5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)-氮-(5-(哌嗪-1-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基20mg(0.04mmol, 按照实施例6相同方法制备), 2-溴-乙醇16mg(0.12mmol), DMF2ml, 碳酸铯17mg(0.12mmol), 加热至80℃, 反应1小时, 然后冷却至室温, 加入10ml水, 然后用乙酸乙酯萃取三次, 每次40ml, 合并有机相。有机相用40ml饱和食盐水洗涤一次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 真空浓缩, 硅胶柱色谱分离(DCM/MeOH=10:1), 得

到标题化合物10mg(黄色固体),收率55%。

[0354] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400MHz), δ 9.74(s, 1H), 8.65-8.64(d, 1H), 8.02-8.7.90(m, 2H), 7.90-7.80(d, 2H), 7.44-7.41(d, 1H), 3.12-3.11(brs, 4H), 2.50-2.46(brs, 4H), 2.33(s, 3H), 2.21(s, 3H), 2.09-1.17(m, 8H), 1.04(s, 3H).

[0355] MS(ESI):m/z 520.3[M+H]⁺.

[0356] 实施例29 4-(3-乙基-7-氟-2,3-二甲基-3H-吡唑-5-基)-5-氟-氮-(5-(哌啶-4-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基

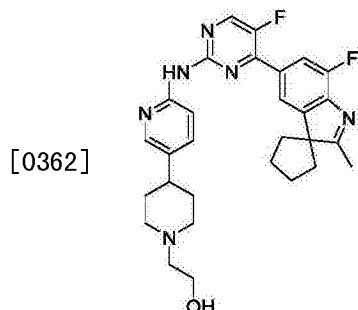


[0358] 按照实施例13中相似的步骤得到标题化合物。

[0359] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400MHz): δ 9.95(s, 1H), 8.65-8.64(d, 1H), 8.02-8.7.90(m, 2H), 7.90-7.80(d, 2H), 7.44-7.41(d, 1H), 3.12-3.11(brs, 4H), 2.50-2.47(brs, 4H), 2.47(s, 3H), 2.23-1.84(m, 2H), 1.33-1.23(m, 3H), 0.38-0.34(m, 3H).

[0360] MS(ESI):m/z 463.3[M+H]⁺.

[0361] 实施例30 2-(4-(6-((5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡唑]-5'-基)嘧啶-2-基)氨基)吡啶-3-基)哌啶-1-基)乙醇



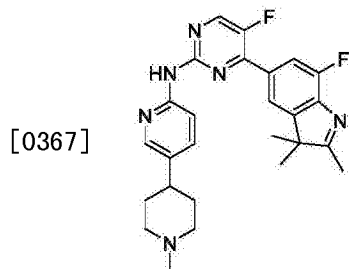
[0363] 向反应瓶中加入按照实施例13相同的方法制备得到的5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡唑]-5'-基)-氮-(5-(哌啶-4-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基20mg(0.04mmol), 2-溴乙醇16mg(0.12mmol), DMF 2mL, 碳酸铯17mg(0.12mmol), 加热至80°C, 反应1小时; 然后冷却至室温, 加入10ml水, 用乙酸乙酯萃取三次, 每次40ml, 合并有机相。有机相用40ml饱和食盐水洗涤一次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 真空浓缩, 硅胶柱色谱分离(DCM/MeOH=10:1), 得到标题化合物10mg(黄色固体), 收率55%。

[0364] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400MHz): δ 9.74(s, 1H), 8.65-8.64(d, 1H), 8.02-8.7.90(m, 2H), 7.90-7.80(d, 2H), 7.44-7.41(d, 1H), 3.12-3.11(brs, 4H), 2.50-2.46(brs, 4H), 2.33(s, 3H), 2.21(s, 3H), 2.09-1.17(m, 8H), 1.04(s, 3H).

[0365] MS(ESI):m/z 519.3[M+H]⁺.

[0366] 实施例31 5-氟-4-(7-氟-2,3,3-三甲基-3H-吡唑-5-基)-氮-(5-(1-甲基哌啶-4-

基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基

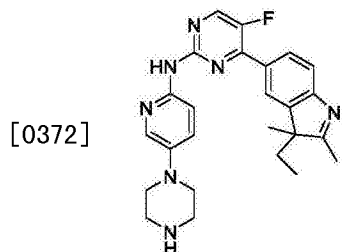


[0368] 按照实施例17中相似的步骤得到标题化合物。

[0369] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400MHz): δ 9.90(s, 1H), 8.65-8.64(d, 1H), 8.02-8.7.90(m, 2H), 7.90-7.80(d, 2H), 7.44-7.41(d, 1H), 3.12-3.11(brs, 4H), 2.50-2.47(brs, 4H), 2.47(s, 3H), 2.27(s, 3H), 2.23-1.84(m, 2H), 1.33(s, 6H).

[0370] MS(ESI):m/z 463.3[M+H]⁺.

[0371] 实施例32 4-(3-乙基-2,3-二甲基-3H-吡啶-5-基)-5-氟-氮-(5-(哌嗪-1-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基

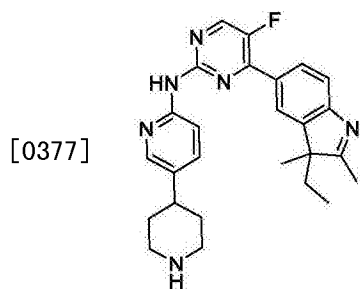


[0373] 按照实施例6中相似的步骤得到标题化合物。

[0374] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400MHz): δ 9.62(s, 1H), 8.65-8.64(d, 1H), 8.02-8.7.90(m, 4H), 7.90-7.80(d, 1H), 7.44-7.41(d, 1H), 3.12-3.11(brs, 4H), 2.50-2.47(brs, 4H), 2.24(s, 3H), 2.23-1.84(m, 2H), 1.33-1.23(m, 3H), 0.38-0.34(m, 3H).

[0375] MS(ESI):m/z 446.3[M+H]⁺.

[0376] 实施例33 4-(3-乙基-2,3-二甲基-3H-吡啶-5-基)-5-氟-氮-(5-(哌啶-4-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基



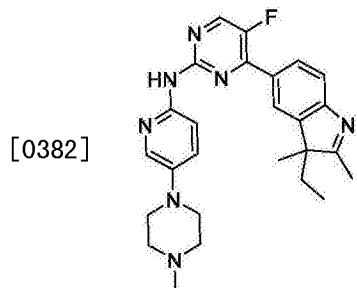
[0378] 按照实施例13中相似的步骤得到标题化合物。

[0379] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400MHz): δ 9.83(s, 1H), 8.65-8.64(d, 1H), 8.02-8.7.90(m, 2H), 7.90-7.80(d, 2H), 7.44-7.41(d, 2H), 3.12-3.11(brs, 4H), 2.64-2.61(brs, 1H), 2.50-2.47(brs, 4H), 2.24(s, 3H), 2.23-1.84(m, 2H), 1.33-1.23(m, 3H), 0.38-0.34(m, 3H).

[0380] MS(ESI):m/z 445.3[M+H]⁺.

[0381] 实施例34 4-(3-乙基-2,3-二甲基-3H-吡啶-5-基)-5-氟-氮-(5-(4-甲基哌嗪-1-

基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基

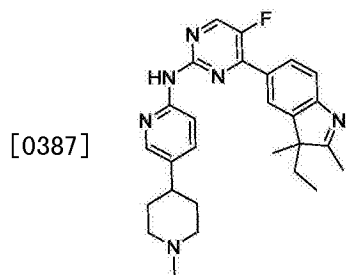


[0383] 按照实施例16中相似的步骤得到标题化合物。

[0384] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400MHz): δ 9.62(s, 1H), 8.65-8.64(d, 1H), 8.02-8.7.90(m, 4H), 7.90-7.80(d, 1H), 7.44-7.41(d, 1H), 3.12-3.11(brs, 4H), 2.50-2.47(brs, 4H), 2.24(s, 3H), 2.23-1.84(m, 2H), 1.33-1.23(m, 3H), 0.38-0.34(m, 3H).

[0385] MS(ESI):m/z 460.3[M+H]⁺.

[0386] 实施例35 4-(3-乙基-2,3-二甲基-3H-吡啶-5-基)-5-氟-氮-(5-(1-甲基哌啶-4-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基

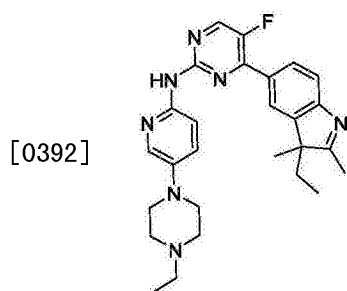


[0388] 按照实施例17中相似的步骤得到标题化合物。

[0389] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400MHz): δ 9.84(s, 1H), 8.65-8.64(d, 1H), 8.02-8.7.90(m, 2H), 7.90-7.80(d, 2H), 7.44-7.41(m, 2H), 2.91-2.67(brs, 3H), 2.33-2.22(m, 6H), 2.02-1.67(m, 8H), 1.33-1.23(m, 3H), 0.38-0.34(m, 3H).

[0390] MS(ESI):m/z 459.3[M+H]⁺.

[0391] 实施例36 4-(3-乙基-2,3-二甲基-3H-吡啶-5-基)-氮-(5-(4-乙基哌啶-1-基)吡啶-2-基)-5-氟嘧啶-2-氨基

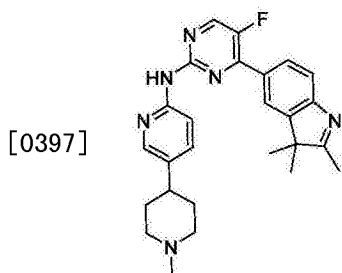


[0393] 按照实施例19中相似的步骤得到标题化合物。

[0394] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400MHz): δ 9.65(s, 1H), 8.61-8.60(d, 1H), 8.15-8.00(m, 4H), 7.62-7.60(m, 1H), 7.44-7.41(d, 1H), 3.18(brs, 4H), 3.06(brs, 4H), 2.52-2.50(m, 2H), 2.47(s, 3H), 2.03-1.79(m, 2H), 2.23-1.84(m, 3H), 1.33-1.23(m, 3H), 0.38-0.34(m, 3H).

[0395] MS(ESI):mass calcd.for C₂₈H₃₃F₂N₇473.3, m/z found 474.3[M+H]⁺.

[0396] 实施例37 5-氟-氮-(5-(1-甲基哌啶-4-基)吡啶-2-基)-4-(2,3,3-三甲基-3H-咪唑-5-基)嘧啶-2-氨基

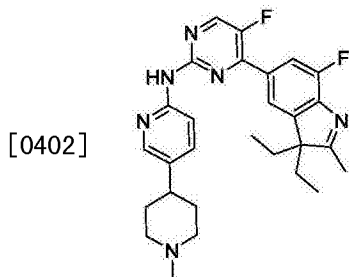


[0398] 按照实施例17中相似的步骤得到标题化合物。

[0399] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400MHz): δ 9.85(s, 1H), 8.66-8.65(m, 1H), 8.18-8.15(m, 3H), 8.10-8.01(m, 1H), 7.68-7.63(m, 2H), 2.88-2.85(m, 3H), 2.50(s, 3H), 2.28(s, 3H), 2.19-1.75(m, 6H), 1.66-1.65(m, 6H), 1.32-1.00(m, 3H).

[0400] MS(ESI): m/z 445.3[M+H]⁺.

[0401] 实施例38 4-(3,3-二乙基-7-氟-2-甲基-3H-咪唑-5-基)-5-氟-N-(5-(1-甲基哌啶-4-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基

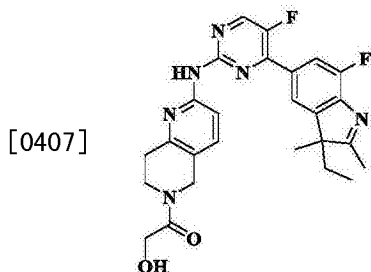


[0403] 按照实施例17中相似的步骤得到标题化合物。

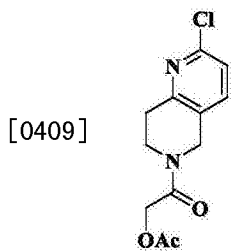
[0404] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400MHz), δ 9.95(s, 1H), 8.69(s, 1H), 8.19-8.11(m, 2H), 7.89-7.84(m, 2H), 7.67(d, J=7.6Hz, 1H), 2.87-2.85(m, 2H), 2.25(s, 3H), 2.19(s, 3H), 2.02-1.92(m, 6H), 1.90-1.65(m, 4H), 0.34(m, 6H).

[0405] MS(ESI): m/z 491.3[M+H]⁺.

[0406] 实施例39 1-(2-((4-(3-乙基-7-氟-2,3-二甲基-3H-咪唑-5-基)-5-氟嘧啶-2-基)氨基)-7,8-二氢-1,6-萘啶-6(5H)-基)-2-羟基乙酰胺



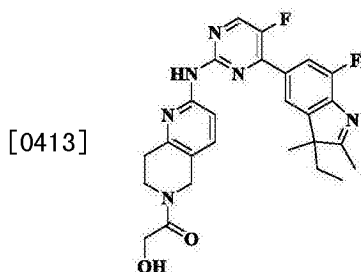
[0408] 步骤1 2-(2-氯-7,8-二氢-1,6-萘啶-6(5H)-基)-2-乙酰氧基乙酰胺的合成



[0410] 向反应瓶中加入2-氯-5,6,7,8-四氢-1,6-萘啶1.0g(5.95mmol),三乙胺1.21g(11.90mmol),二氯甲烷5ml,然后缓慢滴加2-氯-2-乙酰氧基乙酰氯1.22g(8.93mmol).该混合物室温反应1小时,加入5ml水淬灭反应,移除溶剂,用二氯甲烷萃取三次,每次15ml,合并有机相。有机相用10ml饱和食盐水洗涤一次,无水硫酸钠干燥,过滤,真空浓缩,得到标题化合物灰白色粗品1.09g,收率68.21%。

[0411] MS(ESI):m/z 269.1[M+H]⁺.

[0412] 步骤2 1-(2-((4-(3-乙基-7-氟-2,3-二甲基-3H-吡啶-5-基)-5-氟嘧啶-2-基)氨基)-7,8-二氢-1,6-萘啶-6(5H)-基)-2-羟基乙酰胺的合成



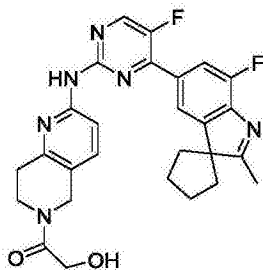
[0414] 向反应瓶中加入按照实施1步骤1-3相似的方法得到4-(3-乙基-7-氟-2,3-二甲基-3H-吡啶-5-基)-5-氟嘧啶-2-氨基101mg(0.34mmol),步骤1制备得到的2-(2-氯-7,8-二氢-1,6-萘啶-6(5H)-基)-2-乙酰氧基乙酰胺85.2mg(0.32mmol),二氧六环10mL,叔丁醇钠65.3mg(0.68mmol),Pd2(dba)331.2mg(0.034mmol),4,5-双二苯基膦-9,9-二甲基氧杂蒽19.7mg(0.034mmol)。该混合物加热至120℃,微波反应1小时,然后冷却至室温,加入50ml水,用乙酸乙酯萃取三次,每次50ml,合并有机相。有机相用50ml饱和食盐水洗涤一次,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩,硅胶柱色谱分离(二氯甲烷/甲醇=10:1)得到标题化合物20mg(白色固体),收率12%。

[0415] ¹H-NMR(DMSO,400MHz),δ9.98(s,1H),8.70(d,J=3.6Hz,1H),8.07(d,J=8.4Hz,1H),7.94(s,1H),7.87(d,J=11.2Hz,1H),7.64-7.57(m,1H),4.68-4.55(m,3H),4.22-4.21(m,2H),4.21-4.19(m,2H),2.89-2.81(m,2H),2.28(s,3H),2.04-1.84(m,2H),1.33(s,3H),0.37(t,J=7.2Hz,3H)。

[0416] MS(ESI):m/z 493.2[M+H]⁺.

[0417] 实施例40 1-(2-((5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)嘧啶-2-基)氨基)-7,8-二氢-1,6-萘啶-6(5H)-基)-2-羟基乙酰胺

[0418]



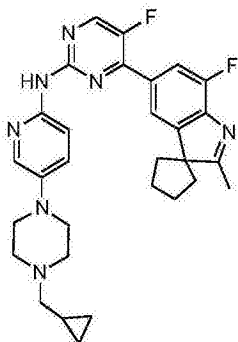
[0419] 按照实施例39中相似的步骤得到标题化合物

[0420] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400MHz), δ 10.07(s, 1H), 8.69(d, $J=2.7\text{Hz}$, 1H), 8.53(s, 1H), 8.09-8.02(m, 1H), 7.98(s, 1H), 7.88(d, $J=9.3\text{Hz}$, 1H), 7.62-7.54(m, 1H), 4.73(br, 1H), 4.62-4.61(m, 2H), 4.21-4.19(m, 2H), 2.89-2.81(m, 2H), 2.50(s, 2H), 2.34-2.11(m, 5H), 1.75-1.72(m, 2H).

[0421] MS(ESI):mass calcd.for $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_2$ 504.2, m/z found 505.2[M+H] $^+$.

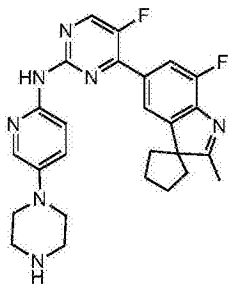
[0422] 实施例41 N-(5-(4-(环丙基甲基)吡啶-1-基)吡啶-2-基)-5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)嘧啶-2-氨基

[0423]



[0424] 按照实施例6相似步骤得到中间体5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)-氮-(5-(吡啶-1-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基

[0425]

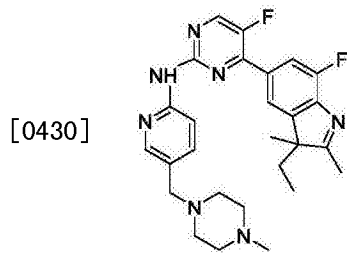


[0426] 向反应瓶中加入上述中间体5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)-氮-(5-(吡啶-1-基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基(150mg, 0.32mmol), 溴甲基环丙烷, 乙腈(5ml), 碳酸钾(130.0mg, 0.96mmol), 加热至80°C反应4h, 冷却至室温, 加入50ml水, 用二氯甲烷萃取三次, 每次10ml. 合并有机层, 用15mg饱和食盐水洗涤一次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 柱色谱分离(二氯甲烷/甲醇=10:1), 得到本实施例的标题产物42.1mg(白色固体).

[0427] $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400MHz), δ 9.89(s, 1H), 8.68(m, 1H), 8.64-8.01(m, 3H), 7.87(d, $J=14.4\text{Hz}$, 1H), 7.42-7.40(m, 1H), 3.14-3.13(m, 5H), 2.60-2.51(m, 5H), 2.33(s, 3H), 2.24-2.23(m, 2H), 2.09-2.02(m, 6H), 1.99-1.97(m, 2H), 1.75-1.74(m, 2H), 0.85-0.83(m, 2H), 0.48-0.47(m, 2H).

[0428] MS(ESI):mass calcd.for $C_{30}H_{33}F_2N_7$ 529.3,m/z found 530.3[M+H]⁺.

[0429] 实施例42 4-(3-乙基-7-氟-2,3-二甲基-3H-吡啶-5-基)-5-氟-N-(5-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基

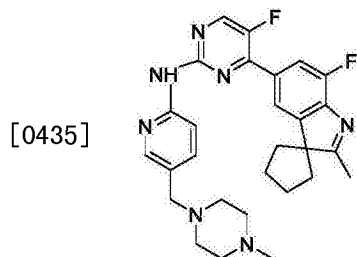


[0431] 按照实施例2中相似的步骤得到标题化合物

[0432] ¹H-NMR(DMSO,400MHz), δ 10.06(s,1H),8.72(d,J=3.2Hz,1H),8.18-8.15(m,2H),7.93(s,1H),7.86(d,J=11.6Hz,1H),7.67(d,J=5.2Hz,1H),3.42(s,2H),2.35-2.28(m,8H),2.14(s,3H),2.04-1.98(m,1H),1.89-1.84(m,1H),1.34(s,3H),0.36(t,J=7.2Hz,3H).

[0433] MS(ESI):mass calcd.for $C_{27}H_{31}F_2N_7$ 491.3,m/z found 492.3[M+H]⁺.

[0434] 实施例43 5-氟-4-(7'-氟-2'-甲基螺[环戊烷-1,3'-吡啶]-5'-基)-N-(5-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)吡啶-2-基)嘧啶-2-氨基



[0436] 按照实施例2中相似的步骤得到标题化合物

[0437] ¹H-NMR(DMSO-d₆,400MHz), δ 10.09(s,1H),8.71(d,J=3.2Hz,1H),8.18-8.15(m,2H),8.02(s,1H),7.85(d,J=11.2Hz,1H),7.67(d,J=8.4Hz,1H),3.43(s,2H),2.50-2.34(m,8H),2.14(s,3H),2.14-2.08(m,6H),1.75-1.74(m,2H),1.75-1.72(m,2H).

[0438] MS(ESI):mass calcd.for $C_{28}H_{31}F_2N_7$ 503.2,m/z found 504.2[M+H]⁺.

[0439] 以下实验例中所用的对照品,编号为LY2835219,参考专利W02010075074制备方法制备,其结构式如背景技术结构式3所示。

[0440] 实验例1本发明化合物的CDKs激酶抑制活性测定

[0441] 本发明所述化合物体外对CDK(CDK1、CDK4、CDK6)激酶活性的抑制作用通过以下的方法进行测试。

[0442] 1.1仪器和试剂盒信息

[0443]

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

[0444]

ADP-Glo™ Kinase Assay + CDK9/CyclinK Kinase Enzyme System	V4105	Promega
5×Reaction Buffer A	V307A-C	Promega

[0445] 1.2实验准备:

[0446] 1.2.1 激酶反应缓冲液I的配制:将试剂盒中给出的5×Reaction Buffer A (Promega;V307A-C)用Milli Q H₂O和0.1M DTT(二硫苏糖醇)混合稀释成4x激酶缓冲液;再按比例加入Milli Q H₂O,最终配制成1x激酶缓冲液。

[0447] 激酶反应缓冲液II的配制:在1x激酶反应缓冲液中加入0.5%DMSO(二甲基亚砷)混匀即可。

[0448] 1.2.2 激酶溶液的配制:用1x激酶反应缓冲液将100ng/μl激酶储液配制每个反应体系所需浓度的激酶溶液。

[0449] 1.2.3 供试化合物和对照品LY2835219溶液的配制:

[0450] (1)配制对照品LY2835219溶液

[0451] a. 分别取1μl的10mM标准品储液,加入到9μl的激酶反应缓冲液I中,混匀;再加入90μl的激酶反应缓冲液I,混匀;再加入100μl的激酶反应缓冲液I,混匀;得到终浓度为50μM。

[0452] b. 在96-孔板的B2-B10中加入40μl的激酶反应缓冲液II;在B1中加入50μl上述溶液;

[0453] c. 从孔B1中取出10μl加入B2,混匀,然后取10μl加入到B3,依次稀释B9;得到依次5倍稀释的对照品溶液。

[0454] (2)准备供试化合物溶液:

[0455] a. 分别取一定浓度的供试化合物溶液,用激酶反应缓冲液I稀释到终浓度为50μM的化合物溶液;

[0456] b. 在96-孔板的H2-H10中加入40μl的激酶反应缓冲液II;在H1中加入50μl上述溶液;

[0457] c. 从孔H1中取出10μl加入H2,混匀,然后取10μl加入到H3,依次稀释H9;得到依次5

倍稀释的供试化合物溶液。

[0458] 1.2.4准备反应底物和ATP混合溶液：

[0459] a.准备ATP溶液：

[0460] 200 μ l 0.1mM ATP溶液：2 μ l 10mM ATP加入198 μ l激酶反应缓冲液I；

[0461] 300 μ l 50 μ M ATP溶液：加150 μ l的激酶反应缓冲液I到150 μ l上述0.1mM ATP溶液中；

[0462] b.准备300 μ l的反应底物溶液：

[0463] 将150 μ l 1 μ g/ μ l的反应底物储液，加入150 μ l激酶反应缓冲液I混匀；

[0464] c.将上述a/b两种溶液混合分别得到混合溶液。

[0465] 1.3实验过程：1.3.1取2 μ l各浓度的化合物溶液加入到384孔板中，离心3min；

[0466] 1.3.2每孔加入4 μ l激酶溶液，18 $^{\circ}$ C，5000rpm离心10min，摇板机上摇匀10min；

[0467] 1.3.3每孔加入4 μ l底物和ATP混合溶液，18 $^{\circ}$ C，5000rpm离心10min，摇板机37 $^{\circ}$ C摇匀90min；

[0468] 1.3.4取出384孔板，放置至室温；

[0469] 1.3.5每孔加入10 μ l的ADP-Glo试剂，18 $^{\circ}$ C、5000rpm离心10min，摇板机25 $^{\circ}$ C摇匀40min，终止反应；

[0470] 1.3.6每孔加入20 μ l的激酶检测试剂，18 $^{\circ}$ C、5000rpm离心10min，摇板机25 $^{\circ}$ C摇匀30min；

[0471] 1.3.7 M1000pro酶标仪读取荧光数值。

[0472] 1.4数据处理：

[0473] 按如下公式计算各化合物在各浓度点的抑制率，并通过软件GraphPad Prism 5进行曲线拟合得到IC₅₀值。

$$[0474] \quad \text{各浓度点抑制率 (inh\%)} = \frac{\text{零浓度点荧光} - \text{各浓度点荧光}}{\text{零浓度点荧光}} \times 100\%$$

[0475] 1.5检测结果：

[0476] 由W02010075074公开的LY2835219以及实施例1-43的化合物对CDK1/CyclinA2和CDK6/CyclinD3的抑制作用，以IC₅₀表示，具体结果见表1。

[0477] 表1 受试化合物对CDK1/CyclinA2和CDK6/CyclinD3抑制活性检测结果 (IC₅₀:nM)

[0478]

实施例	CDK1/CyclinA2	CDK6/CyclinD3	CDK1/CDK6
Ly2835219	319.43	3.81	83.83
1	2223.92	43.03	51.68
2		158.7	-
3	1678	79.06	21.22
4	-	2147	-
5	438.5	7.528	58.23
6	152.2	6.45	23.59
7	83.83	3.26	25.71
8	-	85.77	-

9	268.28	20.42	13,.13
10	435.68	47.11	9.25
11	82.42	3.145	26.20
12	1071.23	3.78	283.33
13	327.00	0.39	838.46
14	233.64	4.07	57.40
15	26.92	4.31	6.25
16	95.70	9.02	10.61
17	2707.11	0.73	3708.37
18	189.86	2.74	69.29
19	64.82	65.49	0.99
20	1444.45	87.60	16.49
21	135.19	27.67	4.89
22	915.35	52.50	17.43
23	50.27	4.53	11.10
24	76.44	12.86.	5.94
25	417.16	8.78	47.51
26	216.08	12.51	17.27
27	1160.23	16.21	71.57
28	328.47	6.24	52.63
29	110.06	5.62	19.58
30	176.58	0.49	360.37
31	-	58.84	-
32	142.03	10.14	14.01
33	166.28	15.61	10.65

[0479]

实施例	CDK1/CyclinA2	CDK6/CyclinD3	CDK1/CDK6
34	111.59	5.13	21.75
35	64.03	8.74	7.33
36	100.9	3.79	26.65
37	73.67	22.87	3.22
38	19.83	0.20	99.15
39	38.51	5.65	6.82
40	161.60	24.97	6.47
41		76.65	
42	3681.98	2.33	1580.25
43	268.90	0.90	298.78

[0480] 本发明部分代表化合物对CDK9/CyclinD3、Pim-1和CDK2/CyclinE1及CDK4/CyclinE1的抑制作用分别见表2、表3和表4。

[0481] 表2 部分受试化合物对CDK9/CyclinD3抑制活性检测结果 (IC₅₀:nM)

[0482]

实施例	CDK1/CyclinA2	CDK6/CyclinD3	CDK9/CyclinD3	CDK1/CDK6	CDK9/CDK6
Ly2835219	319.43	3.81	5.08	83.83	1.33
1	2223.92	43.03	244.97	51.68	5.69
3	1678	79.06	50.02	21.22	0.63
6	152.2	6.45	0.42	23.59	0.06
7	83.83	3.26	4.58	25.71	1.40
9	268.28	20.42	14.43	13,.13	0.71
10	435.68	47.11	27.04	9.25	0.57
12	1071.23	3.78	57.19	283.33	18.75
13	327.00	0.39	2.56	838.46	6.56
16	95.70	9.02	16.37	10.61	1.81
17	2707.11	0.73	5.36	3708.37	7.33
18	189.86	2.74	1.00	69.29	0.36
20	1444.45	87.60	0.24	16.49	0.003
22	915.35	52.50	0.50	17.43	0.009
24	76.44	12.86.	1.74	5.94	0.13
25	417.16	8.78	1.09	47.51	0.12
26	216.08	12.51	10.95	17.27	0.88
27	1160.23	16.21	2.83	71.57	0.17
28	328.47	6.24	0.96	52.63	0.15
30	176.58	0.49	0.43	360.37	0.88

[0483] 表3 部分受试化合物对Pim-1抑制活性检测结果 (IC₅₀:nM)

[0484]

实施例	CDK1/ CyclinA2	CDK6/ CyclinD3	CDK9/ CyclinD3	Pim-1	CDK1/ CDK6	CDK9/ CDK6	Pim-1/ CDK6
Ly2835219	319.43	3.81	5.08	3.92	83.83	1.33	1.03
1	2223.92	43.03	244.97	220.42	51.68	5.69	5.12
3	1678	79.06	50.02	197.8	21.22	0.63	2.50

[0485]

实施例	CDK1/ CyclinA2	CDK6/ CyclinD3	CDK9/ CyclinD3	Pim-1	CDK1/ CDK6	CDK9/ CDK6	Pim-1/ CDK6
6	152.2	6.45	0.42	15.09	23.59	0.06	2.33
7	83.83	3.26	4.58	461.39	25.71	1.40	141.53
9	268.28	20.42	14.43	173.89	13.13	0.71	8.51
12	1071.23	3.78	57.19	15.11	283.33	18.75	3.99
13	327.00	0.39	2.56	2.22	838.46	6.56	5.69
14	233.64	4.07	-	28.65	57.40	-	7.03
16	95.70	9.02	16.37	686.40	10.61	1.81	76.10
17	2707.11	0.73	5.36	38.27	3708.37	7.33	52.43
24	76.44	12.86	1.74	72.81	5.94	0.13	5.66

[0486] 表4 部分受试化合物对CDK4和CDK2的抑制作用 (IC₅₀:nM)

[0487]

实施例	CDK1/ CyclinA2	CDK2/ CyclinE1	CDK4/ CyclinE1	CDK6/ CyclinD3	CDK9/ CyclinD3	Pim-1	CDK1/ CDK6	CDK9/ CDK6	Pim-1/ CDK6
Ly2835219	319.43	769.22	14.83	3.81	5.08	3.92	83.83	1.33	1.03
6	152.2	-	80.9	6.45	0.42	15.09	23.59	0.06	2.33
12	1071.23	394.21	4.46	3.78	57.19	15.11	283.33	18.75	3.99
17	2707.11	2320.88	2.62	0.73	5.36	38.27	3708.37	7.33	52.43

[0488] 1.6试验结论:

[0489] 1)本发明的化合物对CDK6和CDK4具有显著的抑制作用。

[0490] 2)CDK1/CDK6、CDK9/CDK6和Pim-1/CDK6可以体现化合物对于蛋白激酶的选择性,数值越大,则化合物对CDK6的选择性越好,预示着化合物的泛蛋白激酶抑制的毒性可能越小。对照化合物(LY2835219)的CDK1/CDK6=83.83,CDK9/CDK6=1.33,Pim-1/CDK6=1.03;本发明的部分化合物显示出比LY2835219更好的选择性,特别是实施例17制备的化合物就表现出对于CDK6具有更高的酶学活性,对于CDK1,CDK9和Pim1具有更好的选择性。

[0491] 实验例2本发明代表化合物对人乳腺癌细胞MDA-MB-231的增殖抑制测定

[0492] 2.1实验材料:人乳腺癌细胞MDA-MB-231购于北京协和细胞资源中心,DAPI(5mg/mL,碧云天,c1002),4%多聚甲醛(鼎国生物,AR-0211),黑色透明底96孔板(PE,6005182),In Cell Analyzer 2200(GE Healthcare)

[0493] 2.2实验准备:

[0494] 2.2.1人乳腺癌细胞MDA-MB-231培养基的配制:RPIM1640+10%FBS+1%青霉素/链霉素

[0495] 2.2.2供试化合物和标准品LY2835219溶液的配制:

[0496] (1)配制标准品LY2835219,PD0332992溶液

[0497] a.分别取3.6 μ l的10mM标准品储液,加入到6.4 μ l培养基中,混匀;再加入90 μ l的培养基,混匀;再加入200 μ l的培养基,混匀;配制成20 μ M起始浓度。

[0498] b.在96-孔板的B2-B10中加入200 μ l的含0.2%DMSO(二甲基亚砷)的培养基;在B1中加入300 μ l上述溶液;

[0499] c.从孔B1中取出100 μ l加入B2,混匀,然后取100 μ l加入到B3,依次稀释B9;得到依次3倍稀释的标准品溶液。

[0500] (2)准备供试化合物溶液:

[0501] a. 分别取一定浓度的供试化合物溶液,用培养基稀释到终浓度为20 μ M的化合物溶液;

[0502] b. 在96-孔板的H2-H10中加入200 μ l的含0.2%DMSO(二甲基亚砷)的培养基;在H1中加入300 μ l上述溶液;

[0503] c. 从孔H1中取出100 μ l加入H2,混匀,然后取100 μ l加入到H3,依次稀释H9;得到依次3倍稀释的供试化合物溶液。

[0504] 2.3实验过程:

[0505] 2.3.1 MDA-MB-231细胞分别以4000cells/100ul/well接种至96孔黑色透明底细胞板,37 $^{\circ}$ C培养过夜;

[0506] 2.3.2上述样品分别以100 μ l/孔加入接种有细胞的培养板中,轻拍使混匀,37 $^{\circ}$ C孵育72h;

[0507] 2.3.3固定:取出细胞板,去除培养基,每孔加入50 μ l 4%多聚甲醛固定10min;

[0508] 2.3.4加入50 μ l 0.1M glycine(甘氨酸)中和10min;

[0509] 2.3.5 1 \times PBS(磷酸盐缓冲液PH7.2)洗两次;

[0510] 2.3.6通透:每孔加50ul 0.2%TritonX-100(曲拉通)室温通透10min;

[0511] 2.3.7 1 \times PBS(磷酸盐缓冲液PH7.2)洗两次;

[0512] 2.3.8 5mg/mL的DAPI储备液1:5000稀释(终浓度1 μ g/ml)室温染色20min

[0513] 2.3.9 1 \times PBS(磷酸盐缓冲液PH7.2)洗三次;

[0514] 2.3.10 In cell analyser扫描并分析。

[0515] 2.4数据处理:

[0516] 按如下公式计算各化合物在各浓度点的抑制率,并通过软件GraphPad Prism 5进行曲线拟合得到IC₅₀值。

[0517] 各浓度点抑制率 (inh%) = $\frac{\text{零浓度点细胞数量} - \text{各浓度点细胞数量}}{\text{零浓度点细胞数量}} \times 100\%$

[0518] 2.5测定结果:

[0519] 由W02010075074公开的LY2835219以及实施例12和17的化合物的细胞学活性测定结果,以IC₅₀表示,具体结果见表5。

[0520] 表5 本发明代表化合物对人乳腺癌细胞MDA-MB-231增殖的抑制活性 (IC₅₀:nM)

[0521]

实施例	IC ₅₀
Ly2835219	229.05
12	182.72
17	109.82

[0522] 2.6实验结论:

[0523] 实施例12和17的化合物对MDA-MB-231细胞系具有明显的增殖抑制活性,相对于对照化合物LY2835219,本发明代表化合物具有更高的增殖抑制活性。

[0524] 实验例3本发明代表化合物的大鼠药代动力学测定

[0525] 3.1实验摘要

[0526] 以SD大鼠为受试动物,应用LC/MS/MS方法测定大鼠静脉注射给药和灌胃给予代表化合物后不同时刻血浆中的药物浓度,以研究本发明化合物在大鼠体内的药代动力学行为,评价其药动学特征。

[0527] 3.2实验方案

[0528] 3.2.1供试药品:

[0529] 本发明实施例17制备的化合物;

[0530] 对照药LY2835219,自制。

[0531] 3.2.2供试动物:

[0532] 健康成年SD大鼠12只,雄性,6-8周龄,体重200-250g,购自苏州昭衍新药研究中心有限公司,动物生产许可证号:SCXK(苏)2013-0003

[0533] 3.2.3供试药物配制

[0534] 灌胃给药:称取适量样品,加入0.1%羟乙基纤维素/0.5%吐温80至终体积,配成1mg/ml溶液;

[0535] 静脉注射:称取适量样品,加入10%的N-甲基-2-吡咯烷酮和90%的18%磺丁基-β-环糊精至终体积,配成0.4mg/ml溶液,供静脉注射给药。

[0536] 3.2.4供试药品给药

[0537] 静脉注射给药:每个供试化合物3只雄性SD大鼠,禁食一夜后分别静脉注射给药,剂量为2mg/kg,给药体积为1ml/kg。

[0538] 灌胃给药:每个供试化合物3只雄性SD大鼠,禁食一夜后分别灌胃给药,剂量为5mg/kg,给药体积为5ml/kg。

[0539] 3.3实验操作

[0540] 在给药前及给药后0.0833、0.25、0.5、1、2、4、8、12、24小时后,经过颈动脉插管取血。全血EDTA-K2抗凝,离心去上清,-20摄氏度冷冻保存,直至样品分析。用LC-MS/MS进行血浆样品分析,蛋白沉淀法进行样品前处理,样品分析线性范围1-2000ng/ml.最低定量限为1ng/ml。

[0541] 3.4药代动力学数据结果

[0542] 本发明化合物的药代动力学参数见表6和表7。

[0543] 表6 本发明化合物17的大鼠单次静脉给药PK参数(Mean±SD)

[0544]

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

[0545] 表7 本发明化合物17的大鼠单次灌胃给药PK参数(Mean±SD)

[0546]

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

[0547] 3.5实验结论:本发明的代表化合物(实施例17制备),相对于化合物Ly2835219,在大鼠中具有更高的生物利用度和良好的口服吸收效果。

[0548] 实验例4本发明代表化合物的小鼠药代动力学测定

[0549] 4.1实验摘要

[0550] 以ICR小鼠为受试动物,应用LC/MS/MS方法测定小鼠灌胃、静脉注射给予本发明代表化合物后不同时刻血浆中的药物浓度,以研究本发明化合物在小鼠体内的药代动力学行为,评价其药动学特征。

[0551] 4.2实验方案

[0552] 4.2.1供试药品:

[0553] 本发明实施例17制备的化合物;

[0554] 对照药LY2835219,自制。

[0555] 4.2.2供试动物:

[0556] 健康成年ICR小鼠,12只,雄性,6-8周龄,体重20-25g,购自苏州昭衍新药研究中心有限公司,动物生产许可证号:SCXK(苏)2013-0003

[0557] 4.2.3供试药物配制

[0558] 称取适量样品,加入0.1%羟乙基纤维素/0.5%吐温80至终体积,配成0.5mg/ml溶液,供灌胃给药。

[0559] 称取适量样品,加入10%的N-甲基-2-吡咯烷酮和90%的18%磺丁基-β-环糊精至终体积,配成0.2mg/ml溶液,供静脉注射给药。

[0560] 4.2.4供试药品给药

[0561] 每个供试药品,雄性ICR小鼠3只,禁食一夜后分别灌胃给药,剂量为5mg/kg,给药体积为10ml/kg;

[0562] 每个供试药品,雄性ICR小鼠3只,禁食一夜后分别静脉注射给药,剂量为2mg/kg,给药体积为10ml/kg。

[0563] 4.3实验操作

[0564] 灌胃给药组于给药前及给药后在0.25、0.5、1、2、4、8、12、24小时后,经过颈动脉插管取血。全血EDTA-K2抗凝,离心去上清,-20摄氏度冷冻保存,直至样品分析。静脉注射给药组于给药前及给药后在0.083h、0.25、0.5、1、2、4、8、12、24小时后,经过颈动脉插管取血。血浆样品处理同灌胃给药。用LC-MS/MS进行血浆样品分析,蛋白沉淀法进行样品前处理,样品分析线性范围1-2000ng/ml。最低定量限为1ng/ml。

[0565] 4.4药代动力学数据结果:见表8和表9。

[0566] 表8 本发明化合物17的小鼠单次静脉给药PK参数(Mean±SD)

[0567]

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

[0568] 表9 本发明化合物17的小鼠单次灌胃给药PK参数(Mean±SD)

[0569]

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

[0570] 4.5实验结论:本发明的代表化合物17,相对于化合物Ly2835219,在小鼠中具有更高的生物利用度,更长的半衰期,具有良好的口服吸收效果。

[0571] 实验例5本发明代表化合物17血浆和脑暴漏水平的测定

[0572] 5.1实验摘要

[0573] 以CD-1小鼠为受试动物,应用LC/MS/MS方法测定小鼠单次灌胃给予本发明代表化合物后不同时刻血浆和脑组织中的药物浓度,以研究本发明化合物在小鼠体内的血浆和脑暴漏水平。

[0574] 5.2实验方案

[0575] 5.2.1供试药品:

[0576] 本发明实施例17制备的化合物;

[0577] 对照药LY2835219,自制。

[0578] 5.2.2供试动物:

[0579] 健康成年CD-1小鼠,24只,雄性,6-8周龄,体重20-25g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,动物生产许可证号:SCXK(沪)2013-0016。

[0580] 5.2.3供试药物配制

[0581] 称取适量样品,加入0.1%羟乙基纤维素/0.5%吐温80至终体积,配成1.0mg/ml溶液。

[0582] 5.2.4供试药品给药

[0583] 每个供试药品,雄性CD-1小鼠12只,禁食一夜后分别灌胃给药,剂量为10mg/kg,给药体积为10ml/kg。

[0584] 5.3实验操作

[0585] LY2835219:给药前及给药后在0.25、1.5、6小时,经过颈动脉插管取血,同时处死3只小鼠,收集整个脑并且捣碎后冻存于液氮中;给药后10小时,将剩余的动物处死,并且通过心脏穿刺采集全血,收集整个脑并且捣碎后冻存于液氮中。

[0586] 实施例17:给药前及给药后在2、4、24小时,经过颈动脉插管取血,同时处死3只

小鼠,收集整个脑并且捣碎后冻存于液氮中;给药后48小时,将剩余的动物处死,并且通过心脏穿刺采集全血,收集整个脑并且捣碎后冻存于液氮中。

[0587] 全血样品处理:采集的全血EDTA-K2抗凝,离心去上清,-20°C冷冻保存,直至样品用LC-MS/MS分析。

[0588] 脑部匀浆取样:脑部匀浆用5倍于脑匀浆溶液体积的PBS(pH=7.4):MeOH(v:v,2:1)溶液分散,取100 μ L,用600 μ L IS沉淀其中的蛋白,混合物在20-25°C,13000rpm离心15分钟,取50 μ L上层清液用150 μ L含有0.3%FA的水混合,4°C离心,取5 μ L样品用LC-MS/MS进行分析。

[0589] 样品分析线性范围1-2000ng/ml.最低定量限为1ng/ml。

[0590] 5.4血脑暴露水平测定结果:见表10。

[0591] 表10 受试化合物在CD-1小鼠中血浆和脑部的平均暴露

[0592]

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

[0593] 5.5实验结论:本发明的代表化合物(实施例17制备),相对于化合物LY2835219,具有更好的血脑分布,更高的 AUC_{0-last} 比值(脑部/血浆),更高的 C_{max} 比值(脑部/血浆),而且脑部 T_{max} 和血浆中的 T_{max} 相等,说明药物在脑部与血浆中具有相似的PK行为。提示本发明的化合物可以穿过血脑屏障从而抑制脑部肿瘤(脑癌)的生长,治疗脑癌。

[0594] 总之,本发明提供了一系列新的具有选择性CDK4/6激酶抑制活性的化合物,其活性优于或与目前处于III期临床试验的候选药物LY2835219相当,部分化合物表现出更好的选择性。而且优选的化合物口服吸收良好、血脑分布好,预示着本发明的化合物有望被开发成新的治疗细胞增殖相关疾病,尤其是恶性肿瘤(特别是脑癌)的药物,为临床医生和患者提供新的选择。