(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 113582995 B
(45)授权公告日 2022.08.16

(21)申请号 202110943740.9
(22)申请日 2021.08.17
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113582995 A
(43)申请公布日 2021.11.02
(73)专利权人 西安交通大学
地址 710049 陕西省西安市咸宁西路28号
(72)发明人 张三奇 赵宏义 曹永孝 毛宇泽 雷浩 辛敏行
(74)专利代理机构 西安通大专利代理有限责任公司 61200
专利代理师 范巍
(51)Int.Cl.
C07D 473/32(2006.01)
A61K 31/52(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

审查员 王瑞

权利要求书2页 说明书17页 附图1页

(54)发明名称

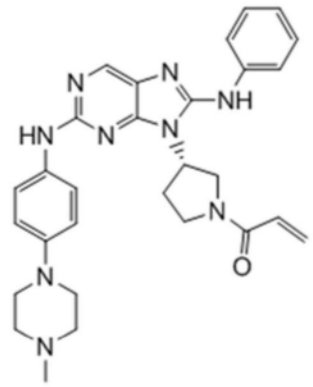
9-位含有丙烯酰氨基片段的-9H-嘌呤类化合物及其盐和应用

(57)摘要

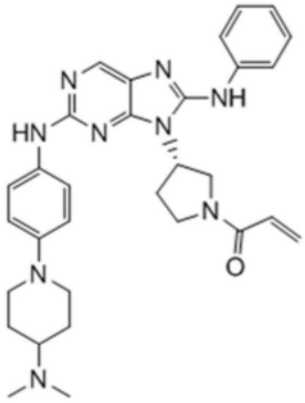
本发明公开了9-位含有丙烯酰氨基片段的-9H-嘌呤类化合物及其盐和应用，属于抗癌药物技术领域。该类化合物结构新颖，具有抑制表皮生长因子受体(EGFR)酪氨酸激酶的活性，对于EGFR单突变的细胞HCC827和EGFR双突变(L858R/T790M)的细胞H1975均具有显著的抑制活性，可用于与EGFR突变相关的癌症的治疗，而且其合成原料易得、合成方法容易实现。

CN 113582995 B

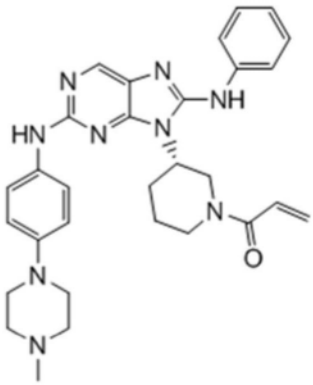
1.一种9-位含有丙烯酰氨基片段的-9H-嘌呤类化合物，其特征在于，所述化合物为如下化合物中的一种：



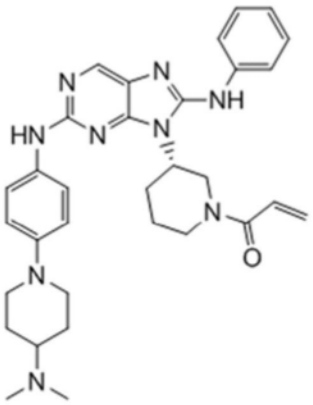
1



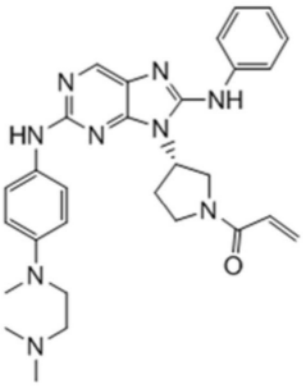
2



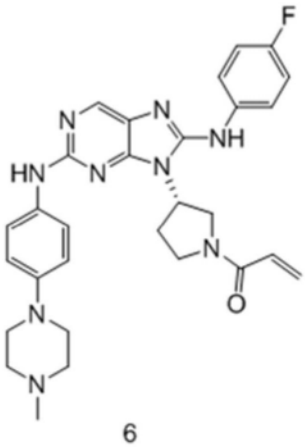
3



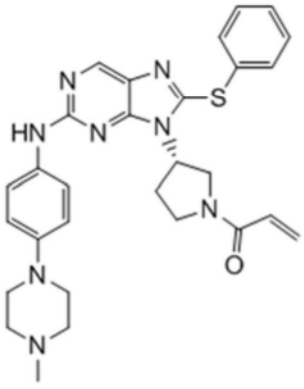
4



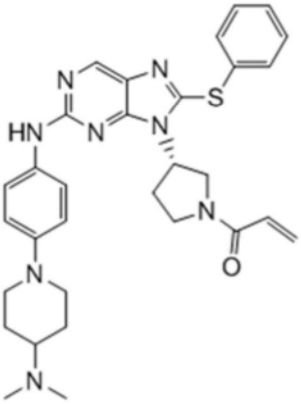
5



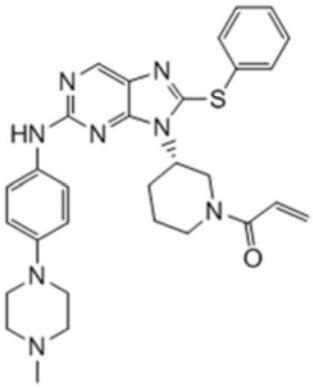
6



19



20



21

。

2.权利要求1所述的9-位含有丙烯酰氨基片段的-9H-嘌呤类化合物的可药用盐，其特征在于，所述可药用盐为盐酸盐、氢溴酸盐、硝酸盐、磷酸盐、硫酸盐、醋酸盐、富马酸盐、苹果酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、马来酸盐、乳酸盐、枸橼酸盐、樟脑磺酸盐、苯甲酸盐、葡糖酸盐、谷氨酸盐、羟乙磺酸盐、琥珀酸盐或甲磺酸盐。

3.权利要求1所述的9-位含有丙烯酰氨基片段的-9H-嘌呤类化合物或权利要求2所述的9-位含有丙烯酰氨基片段的-9H-嘌呤类化合物的可药用盐在制备抗癌药物制剂中的应用。

4.如权利要求3所述的应用，其特征在于，所述抗癌药物制剂为片剂、胶囊剂或注射剂，其中每片、每粒或每支制剂中含10～300mg的9-位含有丙烯酰氨基片段的-9H-嘌呤类化合物或其可药用盐。

9-位含有丙烯酰氨基片段的-9H-嘌呤类化合物及其盐和应用

技术领域

[0001] 本发明属于抗癌药物技术领域，具体涉及一种9-位含有丙烯酰氨基片段的-9H-嘌呤类化合物及其盐和应用。

背景技术

[0002] 癌症是严重威胁人类健康的恶性疾病之一。近30年来，我国癌症发生率正处于快速上升期。近年来，癌症发病率约为300例/10万人，每年新发病例达400万例以上，死亡约250多万人，在治患者700万人以上。目前癌症的主要治疗手段仍然是手术治疗、药物治疗和放射治疗，其中药物治疗发挥着主要作用。因此，研究开发新的抗癌药物具有重要意义。传统的抗肿瘤药物活性强，但缺乏选择性，毒性大，患者无法长期用药。近年来，随着肿瘤分子生物学研究的进展，对肿瘤发病机理有了更多的认识，找到了许多抗癌药物作用的新靶点，如表皮生长因子受体(EGFR)酪氨酸激酶、PI3Ks、BTK等。

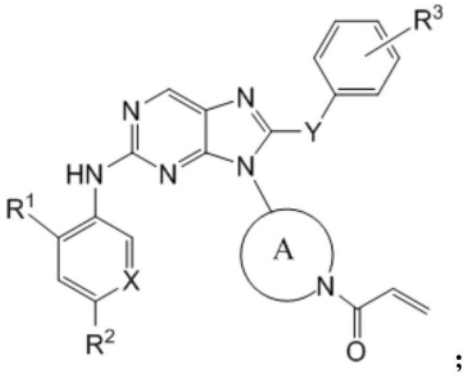
[0003] 在非小细胞肺癌中，约有50％的患者呈现EGFR的突变。针对这一特点，已经开发了第一代EGFR酪氨酸激酶抑制剂，如吉非替尼、埃罗替尼、埃克替尼、第二代EGFR酪氨酸激酶抑制剂阿法替尼、第三代EGFR酪氨酸激酶抑制剂奥希替尼，用作抗癌药物。因此，研发结构新颖、活性高的EGFR单突变或EGFR双突变(L858R/T790M)的抑制剂用于治疗EGFR突变癌症具有重要意义。

发明内容

[0004] 为了克服现有技术的缺点，本发明的目的在于提供一种9-位含有丙烯酰氨基片段的-9H-嘌呤类化合物及其盐和应用，该类化合物结构新颖，具有显著的抑制EGFR酪氨酸激酶单突变和双突变(L858R/T790M)的活性，具有明显的外抗肿瘤活性，可应用于抗癌药物制剂的制备，而且其合成原料易得、合成方法容易实现。

[0005] 为了达到上述目的，本发明采用以下技术方案予以实现：

[0006] 本发明公开了一种9-位含有丙烯酰氨基片段的-9H-嘌呤类化合物，其结构式为：

[0007] 

；

[0008] 式中，A环含4-7个原子的含氮杂环；

[0009] R^1为烷氧基或卤素取代；

[0010] R^2为烷氧基或取代氨基；

[0011] R^3为氢或氟；

[0012] X为CH或N；

[0013] Y为NH或S。

[0014] 优选地，所述的A环为氮杂环丁烷环、吡咯烷环、哌啶环或氮杂环庚烷。

[0015] 优选地，所述的9-位丙烯酰氨基片段为N-丙烯酰基-3-氮杂环丁烷基、N-丙烯酰基-3-吡咯烷基、N-丙烯酰基-3-哌啶基、N-丙烯酰基-4-哌啶基或N-丙烯酰基-3-氮杂环庚烷基；其中，N-丙烯酰基-3-吡咯烷基、N-丙烯酰基-3-哌啶基和N-丙烯酰基-3-氮杂环庚烷基中的手性中心为S-型。

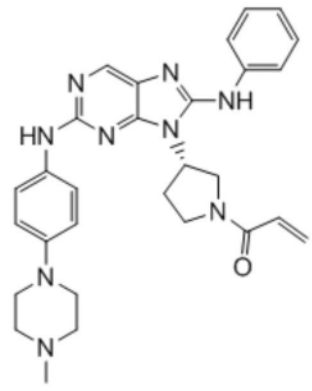
[0016] 优选地，所述的R^1为甲氧基、乙氧基、三氟甲氧基、三氟乙氧基、氟或氯。

[0017] 优选地，R^2为2-(二甲氨基)乙氧基、1-吡咯烷基、1-哌啶基、4-二甲氨基-1-哌啶基、4-甲基-1-哌嗪基、4-乙基-1-哌嗪基、N-甲基-N-(2-二甲氨基乙基)氨基或4-吗啉基。

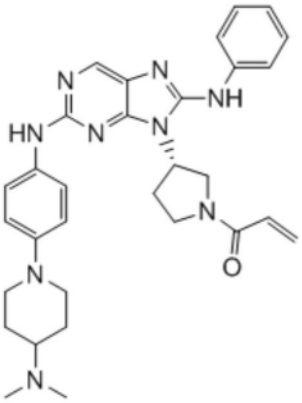
[0018] 优选地，R^3为氢取代、2-氟取代、3-氟取代、4-氟取代或2,4-二氟取代。

[0019] 优选地，所述化合物为如下化合物中的一种：

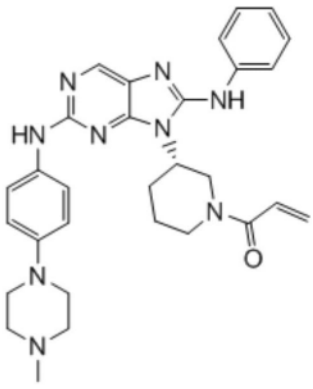
[0020]



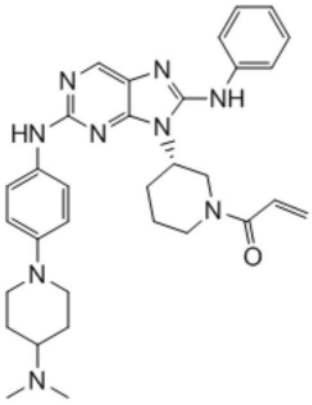
1



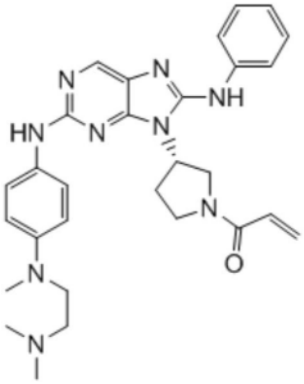
2



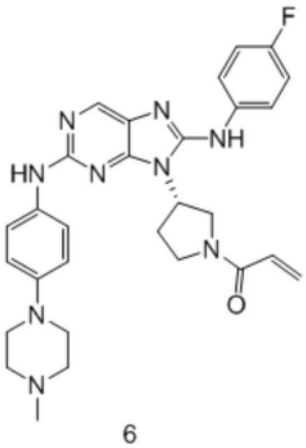
3



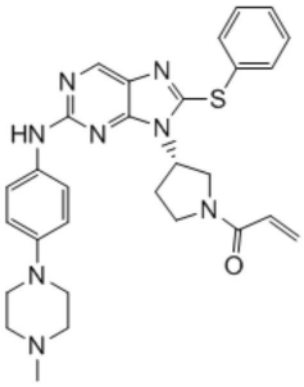
4



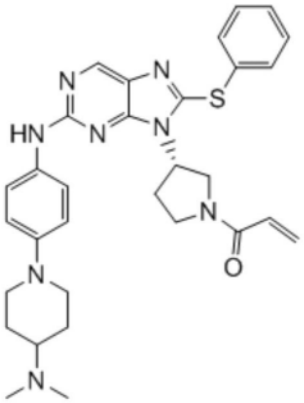
5



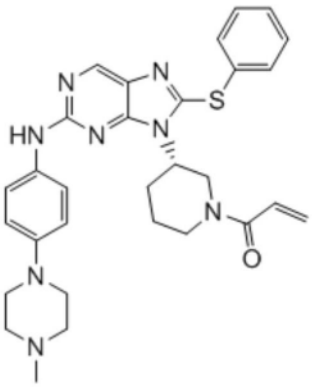
6



19



20



21

[0021] 本发明还公开了基于上述的9-位含有丙烯酰氨基片段的-9H-嘌呤类化合物的可药用盐，所述可药用盐为盐酸盐、氢溴酸盐、硝酸盐、磷酸盐、硫酸盐、醋酸盐、富马酸盐、苹果酸盐、柠檬酸盐、酒石酸盐、马来酸盐、乳酸盐、枸橼酸盐、樟脑磺酸盐、苯甲酸盐、葡糖酸盐、谷氨酸盐、羟乙磺酸盐、琥珀酸盐或甲磺酸盐。

[0022] 本发明还公开了基于上述的9-位含有丙烯酰氨基片段的-9H-嘌呤类化合物或上述的9-位含有丙烯酰氨基片段的-9H-嘌呤类化合物的可药用盐在制备抗癌药物制剂中的应用。

[0023] 优选地，所述抗癌药物制剂为片剂、胶囊剂或注射剂，其中每片、每粒或每支制剂中含10～300mg的9-位含有丙烯酰氨基片段的-9H-嘌呤类化合物或其可药用盐。

[0024] 与现有技术相比，本发明具有以下有益效果：

[0025] 本发明提供的9-位含有丙烯酰氨基片段的-9H-嘌呤类化合物或其盐类化合物结构新颖、易于合成，在嘌呤环的9-位引入的丙烯酰氨基片段，可以与EGFR797位的半胱氨酸残基侧链的巯基发生迈克尔加成反应，形成C-S键，产生共价抑制作用，活性更强，作用持久。因此，本发明提供的9-位含有丙烯酰氨基片段的-9H-嘌呤类化合物或其盐类化合物具有抑制表皮生长因子受体(EGFR)酪氨酸激酶的活性，对于单突变和双突变(L858R/T790M)的EGFR均有明显的抑制活性，其活性强于已经上市的药物吉非替尼和奥希替尼，可用于与EGFR突变相关的癌症的治疗。本发明提供的化合物具有显著的HCC827和H1975等人肺癌细胞增殖的活性。比如化合物3抑制人肺癌细胞HCC827和H1975的IC_{50}值分别为0.33和12nmol·L^{-1}。而在同样条件下，阳性药吉非替抑制HCC827的IC_{50}值为10nmol·L^{-1}；阳性药尼奥希替尼(AZD9291)抑制HCC827和H1975的IC_{50}值分别为1.47和17nmol·L^{-1}。

[0026] 本发明提供的9-位含有丙烯酰氨基片段的-9H-嘌呤类化合物或其盐类化合物具有抑制表皮生长因子受体(EGFR)酪氨酸激酶的活性，对于单突变或双突变的EGFR均有明显的抑制活性，IC_{50}值为纳摩尔级，可用于与EGFR突变相关的癌症的治疗。

[0027] 本发明提供的9-位含有丙烯酰氨基片段的-9H-嘌呤类化合物及其盐类化合物，能够应用于制备抗癌药物制剂，其中每片或粒或支该药物制剂中含有10～300mg。在利用本发明给出的活性化合物制备抗癌药物制剂时，可以将该药物制成片剂、胶囊剂或注射剂。这些药物制剂可按照各种制剂的常规制备工艺制成。对于片剂或胶囊剂，优选的含量为50～100mg。并且本发明涉及的口服制剂中可含有药用辅料，包括添加剂、稳定剂、增溶剂、润滑剂、崩解剂等，如淀粉、糊精、葡萄糖、乳糖、纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、交联聚乙烯吡咯烷酮、果胶、环糊精、土温-80、聚乙烯醇、硬脂酸镁、滑石粉等。

附图说明

[0028] 图1为9-位含有丙烯酰氨基片段的-9H-嘌呤类化合物的合成方法；

[0029] 图2为化合物1和3对EGFR(L858R/T790M)磷酸化的抑制活性；其中，(A)为化合物1在浓度为10nmol·L^{-1}时，几乎完全抑制了EGFR(L858R/T790M)的磷酸化；(B)为化合物3在浓度为10nmol·L^{-1}时，完全抑制了EGFR(L858R/T790M)的磷酸化。

具体实施方式

[0030] 为了使本技术领域的人员更好地理解本发明方案，下面将结合本发明实施例中的附图，对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅仅是本发明一部分的实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都应当属于本发明保护的范围。

[0031] 需要说明的是，本发明的说明书和权利要求书及上述附图中的术语“第一”、“第二”等是用于区别类似的对象，而不必用于描述特定的顺序或先后次序。应该理解这样使用的数据在适当情况下可以互换，以便这里描述的本发明的实施例能够以除了在这里图示或描述的那些以外的顺序实施。此外，术语“包括”和“具有”以及他们的任何变形，意图在于覆盖不排他的包含，例如，包含了一系列步骤或单元的过程、方法、系统、产品或设备不必限于

清楚地列出的那些步骤或单元，而是可包括没有清楚地列出的或对于这些过程、方法、产品或设备固有的其它步骤或单元。

[0032] 下面结合附图对本发明做进一步详细描述：

[0033] 参见图1，一种9-位含有丙烯酰氨基片段的-9H-嘌呤类化合物及其盐的合成方法，包括以下步骤：

[0034] 步骤一：在叔胺存在下，2,4-二氯-5-硝基嘧啶与环状胺在溶剂中搅拌得到4-取代-2-氯-5-硝基嘧啶，即中间体a；

[0035] 步骤二：在碱存在下，中间体a与芳胺或取代的芳胺反应得到中间体b；

[0036] 步骤三：中间体b经铁粉还原得到中间体c；

[0037] 步骤四：在叔胺存在下，中间体c与异硫氰酸苯酯或取代的异硫氰酸苯酯以及EDCI反应成环得到中间体d；

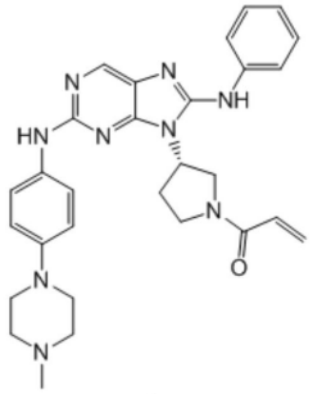
[0038] 步骤五：中间体d在酸作用下脱除叔丁氧羰基(BOC)得到中间体e；

[0039] 步骤六：中间体e与丙烯酰氯反应得到目标物。

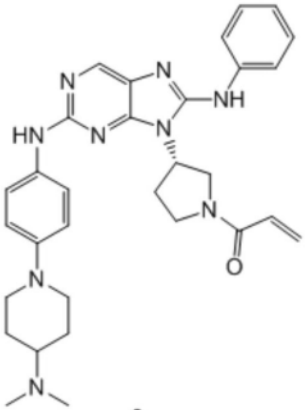
[0040] 1、合成化合物1-21的具体实施例

[0041] 代表性化合物的结构式、编号如下：

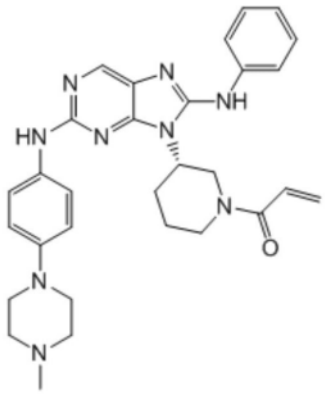
[0042]



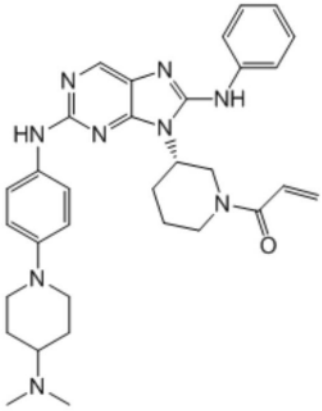
1



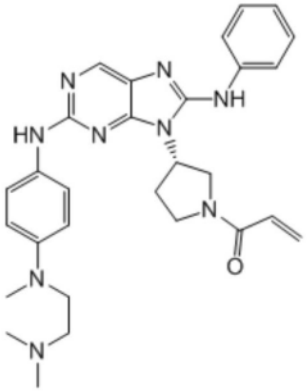
2



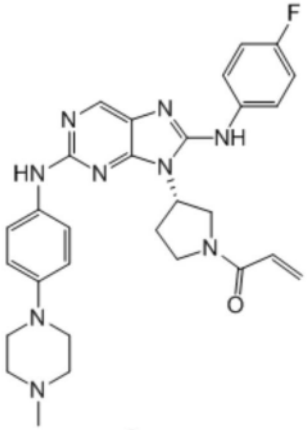
3



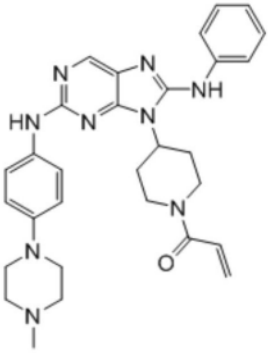
4



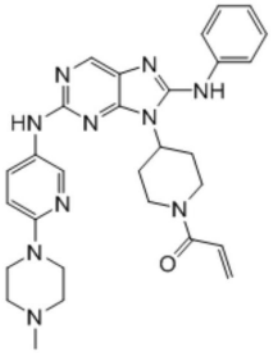
5



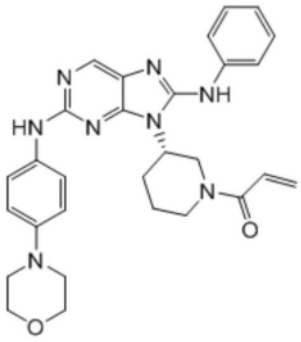
6



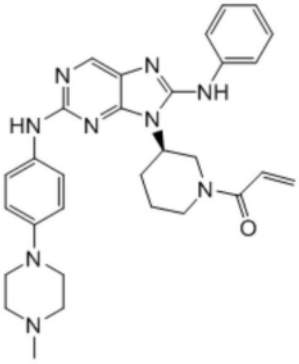
7



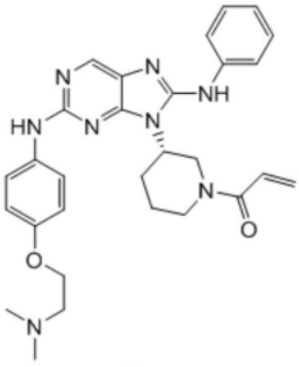
8



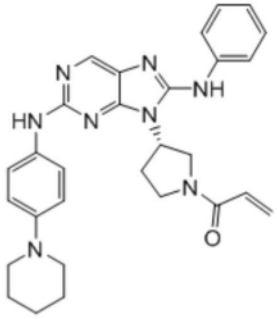
9



10

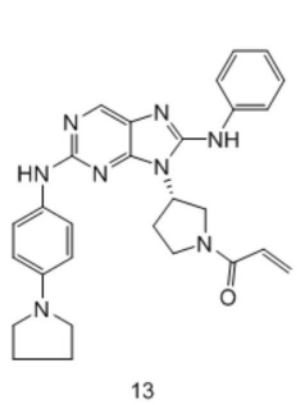


11

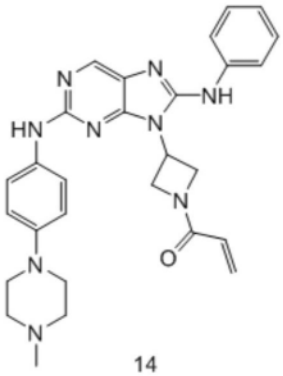


12

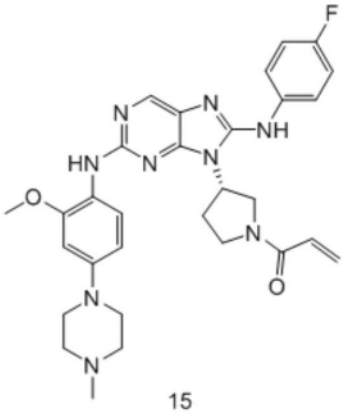
[0043]



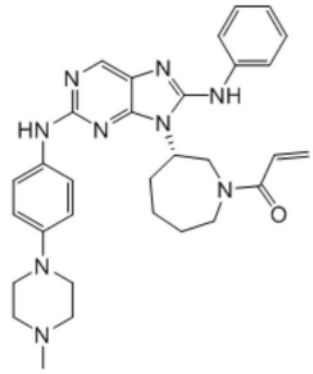
13



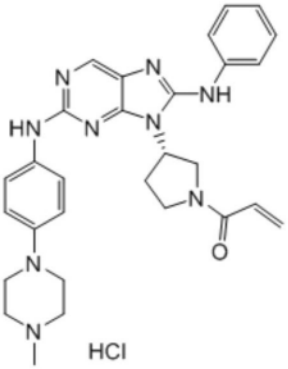
14



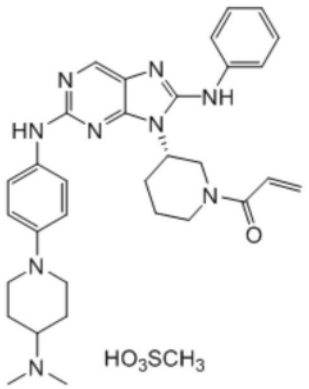
15



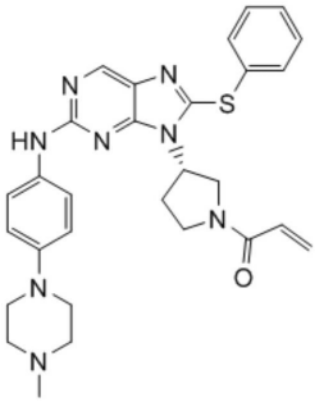
16



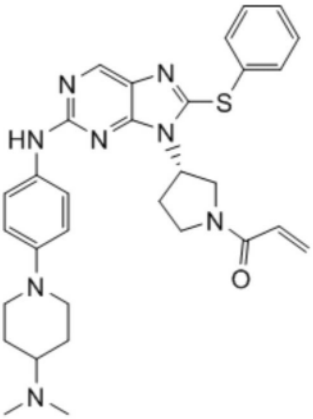
17



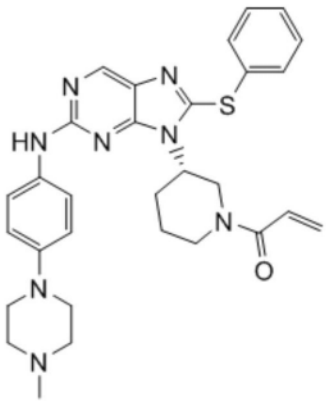
18



19



20

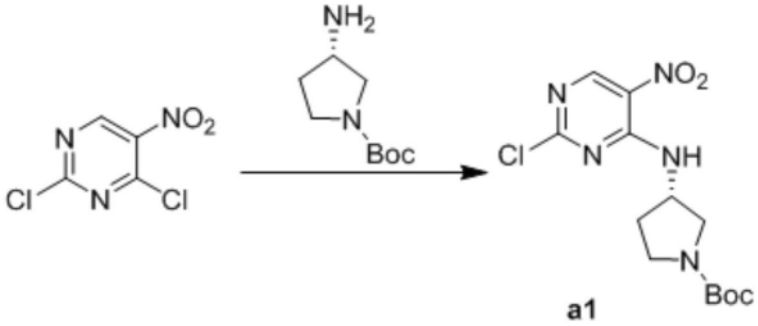


21

[0044] 下面给出上述化合物合成的实施例,化合物的结构经MS表征。

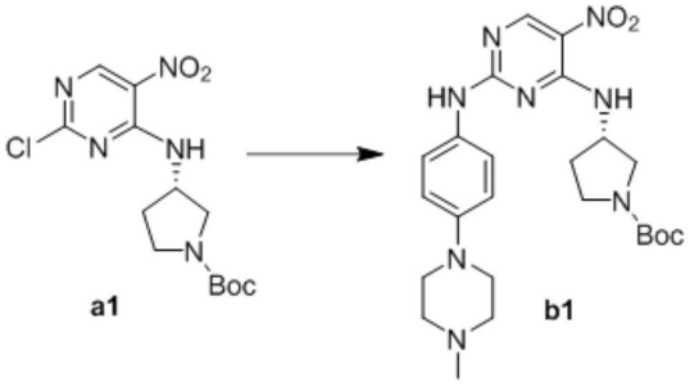
[0045] 实施例1:(S)-2-(4-(4-甲基-1-哌嗪基)苯氨基)-8-苯氨基-9-(N-丙烯酰基-3-吡咯烷基)-9H-嘌呤(结构式1)的合成:

[0046] 步骤一:(S)-3-((2-氯-5-硝基-4-嘧啶基)氨基)吡咯-1-甲酸叔丁酯(a1)的合成

[0047] 

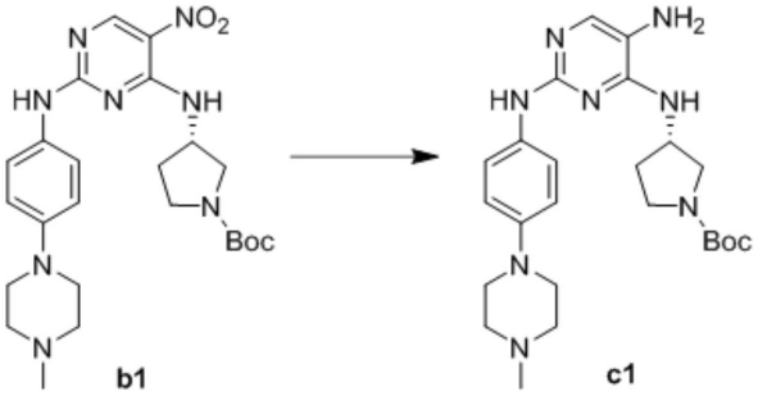
[0048] 参考文献Eur.J.Med.Chem.2020,186,111888制备a1。收率90%。

[0049] 步骤二：(S)-3-(2-(4-(4-甲基-1-哌嗪基)苯氨基)-5-硝基-4-嘧啶基)氨基)吡咯-1-甲酸叔丁酯(b1)的合成

[0050] 

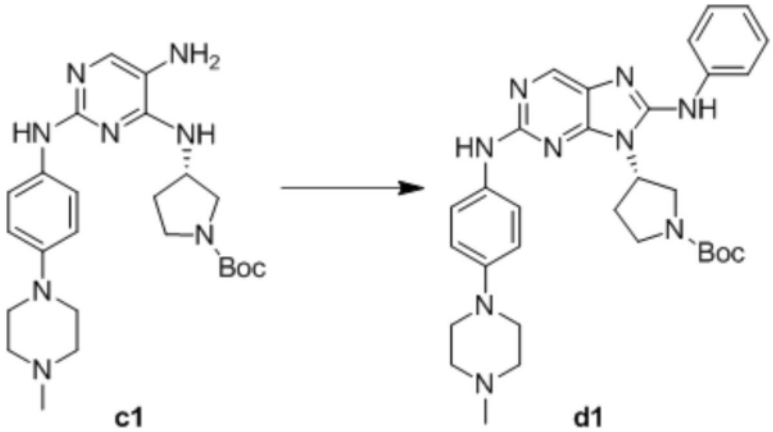
[0051] 将a1(0.50g,1.46mmol)溶于无水乙醇(5mL)，然后加入4-(4-甲基-1-哌嗪基)苯胺(0.28g,1.46mmol)的乙醇溶液(5mL)，搅拌下加入Na_2CO_3(0.23g,0.22mmol)，室温搅拌过夜，蒸干乙醇，残留物用硅胶柱色谱分离(二氯甲烷:甲醇＝50:1)，得化合物b1，收率81%。

[0052] 步骤三：(S)-3-((2-(4-(4-甲基-1-哌嗪基)苯氨基)-5-氨基-4-嘧啶基)氨基)吡咯-1-甲酸叔丁酯(c1)的合成

[0053] 

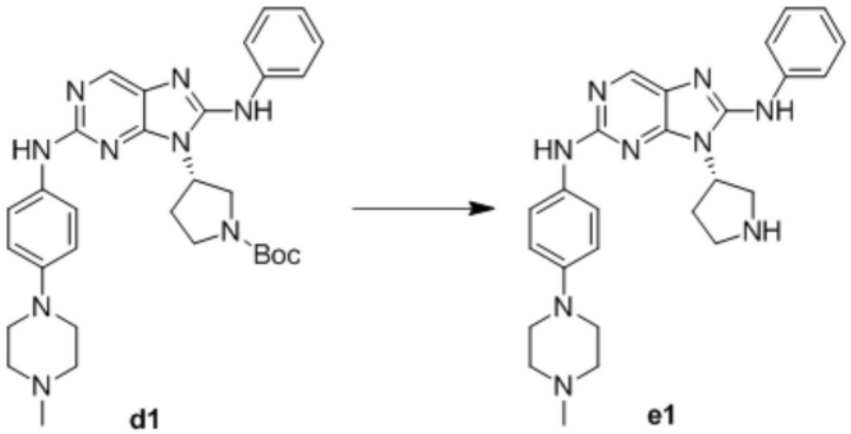
[0054] 将b1(0.50g,1.00mmol)，还原铁粉(0.56g,10.00mmol)，氯化铵(0.54g,10mmol)加入到圆底烧瓶中，然后加入无水乙醇(10mL)和水(2mL)，加热回流1h，稍冷却，垫硅藻土趁热抽滤，热乙醇洗涤滤饼，滤液蒸干溶剂，向残留物中加入水(10mL)和饱和碳酸钠溶液(20mL)，用二氯甲烷萃取(6×30mL)，有机相用饱和食盐水洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，蒸除溶剂得黑色固体0.40g，收率85%。

[0055] 步骤四：(S)-3-(2-(4-(4-甲基-1-哌嗪基)苯氨基)-8-苯氨基-9H-9-嘌呤基)吡咯烷-1-甲酸叔丁酯(d1)的合成

[0056] 

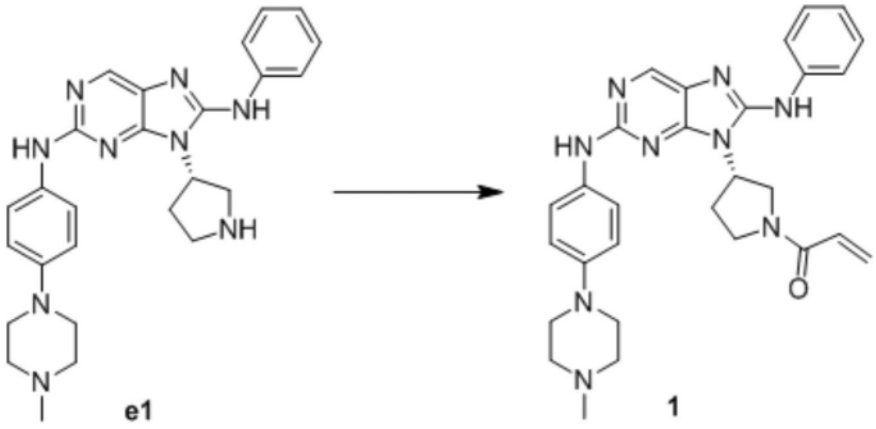
[0057] 将c1(0.48g,1.02mmol),EDCI(0.30g,1.54mmol),异硫氰酸苯酯(0.21g,1.54mmol)混合于烧瓶中,然后加入DCE以及DIPEA。将烧瓶置于65℃油浴锅中搅拌4h,蒸除溶剂,残留物溶于二氯甲烷(80mL),水洗(3×20mL),然后用饱和食盐水(20mL)洗涤,有机相用无水硫酸钠干燥。硅胶柱色谱分离(DCM:MeOH=50:1-30:1)得黄色固体d1,收率52%。

[0058] 步骤五:(S)-2-(4-(4-甲基-1-哌嗪基)苯基氨基)-8-苯氨基-9-(3-吡咯基)-9H-嘌呤(e1)的合成

[0059] 

[0060] 将d1(0.25g,0.44mmol)溶于二氯甲烷(4mL),然后加入三氟乙酸(2mL),室温搅拌2h,蒸除溶剂,向残留物中加入甲苯,再减压蒸干,剩余物用二氯甲烷和甲醇的混合溶剂溶解,加入K_2CO_3粉末至不再有气泡产生,硅胶柱色谱分离(DCM:MeOH=15:1)得e1。收率73%。

[0061] 步骤六:(S)-2-(4-(4-甲基-1-哌嗪基)苯氨基)-8-苯氨基-9-(N-丙烯酰基-3-吡咯烷基)-9H-嘌呤(1)的合成:

[0062] 

[0063] 将e1(0.10g,0.21mmol)混悬于丙酮(2mL)中,冰浴冷却搅拌5min,然后滴加丙烯酰氯(26μL,0.32mmol)的丙酮(3mL)溶液,滴毕后撤去冰浴,混合物于室温搅拌10分钟,然后加入10滴饱和碳酸钠溶液猝灭反应。蒸干溶剂,向残留物中加入水(10mL)及饱和碳酸钠溶液(20mL),二氯甲烷萃取(5×30mL),有机相用饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,蒸除溶剂后残留物用硅胶柱色谱分离(DCM:MeOH=30:1-10:1),得产物。用乙酸乙酯结晶得1,收率46%,MS(ESI):计算值:524.3[M+H]$^+$,测量值:524.4。

[0064] 实施例2:(S)-2-(4-(4-二甲氨基-1-哌啶基)苯氨基)-8-苯氨基-9-(N-丙烯酰基-3-吡咯烷基)-9H-嘌呤(结构式2)的合成:

[0065] 方法同化合物1的制备。用4-(4-二甲氨基-1-哌啶基)苯胺代替4-(4-甲基-1-哌嗪基)苯胺可合成化合物2。MS(ESI):计算值:552.3[M+H]$^+$,测量值:552.4。

[0066] 实施例3:(S)-2-(4-(4-甲基-1-哌嗪基)苯氨基)-8-苯氨基-9-(N-丙烯酰基-3-哌啶基)-9H-嘌呤(结构式3)的合成:

[0067] 方法同化合物1的制备。用(S)-3-氨基哌啶-1-甲酸叔丁酯代替3-氨基吡咯-1-甲酸叔丁酯可合成化合物3。MS(ESI):计算值:538.3[M+H]$^+$,测量值:538.4。

[0068] 实施例4:(S)-2-(4-(4-二甲氨基-1-哌啶基)苯氨基)-8-苯氨基-9-(N-丙烯酰基-3-哌啶基)-9H-嘌呤(结构式4)的合成:

[0069] 方法同化合物1的制备。MS(ESI):计算值:566.3[M+H]$^+$,测量值:566.4。

[0070] 实施例5:(S)-2-(4-(N-甲基-N-(2-二甲氨基乙基)氨基)苯氨基)-8-苯氨基-9-(N-丙烯酰基-3-吡咯烷基)-9H-嘌呤(结构式5)的合成:

[0071] 方法同化合物1的制备。MS(ESI):计算值:526.3[M+H]$^+$,测量值:526.4。

[0072] 实施例6:2-(4-(4-甲基-1-哌嗪基)苯氨基)-8-(4-氟苯基)-9-(N-丙烯酰基-3-吡咯基)-9H-嘌呤(结构式6)的合成:

[0073] 方法同化合物1的制备。用对氟异硫氰酸苯酯代替异硫氰酸苯酯合成MS(ESI):计算值:542.3[M+H]$^+$,测量值:542.3。

[0074] 实施例7:2-(4-(4-甲基-1-哌嗪基)苯氨基)-8-苯氨基-9-(N-丙烯酰基-4-哌啶基)-9H-嘌呤(结构式7)的合成:

[0075] 方法同化合物1的制备。MS(ESI):计算值:538.3[M+H]$^+$,测量值:538.3。

[0076] 实施例8:2-(6-(4-甲基-1-哌嗪基)-3-吡啶基氨基)-8-苯氨基-9-(N-丙烯酰基-4-哌啶基)-9H-嘌呤(结构式8)的合成:

[0077] 方法同化合物1的制备。MS(ESI):计算值:539.3[M+H]$^+$,测量值:539.3。

[0078] 实施例9:(S)-2-(4-(4-吗啉基))苯氨基)-8-苯氨基-9-(N-丙烯酰基-3-哌啶基)-9H-嘌呤(结构式9)的合成:

[0079] 方法同化合物1的制备。MS(ESI):计算值:525.3[M+H]$^+$,测量值:525.4。

[0080] 实施例10:(R)-2-(4-(4-甲基-1-哌嗪基)苯氨基)-8-苯氨基-9-(N-丙烯酰基-3-哌啶基)-9H-嘌呤(结构式3)的合成:

[0081] 方法同化合物1的制备。用(R)-3-氨基哌啶-1-甲酸叔丁酯代替(S)-3-氨基吡咯-1-甲酸叔丁酯可合成化合物10。538.3[M+H]$^+$,测量值:538.4。

[0082] 实施例11:(S)-2-(4-(2-二甲氨基乙氧基)苯氨基)-8-苯氨基-9-(N-丙烯酰基-3-哌啶基)-9H-嘌呤(结构式11)的合成:

[0083] 方法同化合物1的制备。MS(ESI):计算值:527.3[M+H]$^+$,测量值:527.4。

[0084] 实施例12:(S)-2-(4-(1-哌啶基)苯氨基)-8-苯氨基-9-(N-丙烯酰基-3-吡咯烷基)-9H-嘌呤(结构式12)的合成:

[0085] 方法同化合物1的制备。MS(ESI):计算值:509.3[M+H]$^+$,测量值:509.4。

[0086] 实施例13:(S)-2-(4-(1-吡咯基)苯氨基)-8-苯氨基-9-(N-丙烯酰基-3-吡咯烷基)-9H-嘌呤(结构式13)的合成:

[0087] 方法同化合物1的制备。MS(ESI):计算值:495.3[M+H]$^+$,测量值:495.4。

[0088] 实施例14:2-(4-(4-甲基-1-哌嗪基)苯氨基)-8-苯氨基-9-(N-丙烯酰基-3-氮杂环丁烷基)-9H-嘌呤(结构式14)的合成:

[0089] 方法同化合物1的制备。MS(ESI):计算值:510.3[M+H]$^+$,测量值:510.4。

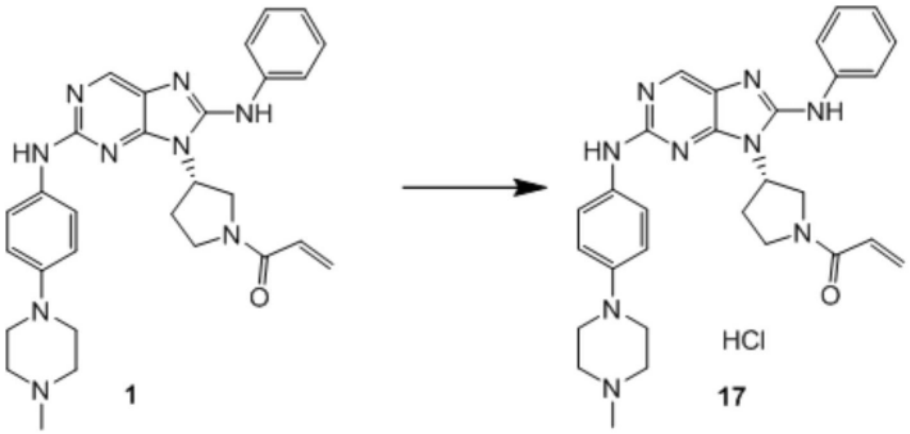
[0090] 实施例15:(S)-2-(2-甲氧基-4-(4-甲基-1-哌嗪基)苯氨基)-8-苯氨基-9-(N-丙烯酰基-3-吡咯烷基)-9H-嘌呤(结构式15)的合成

[0091] 方法同化合物1的制备。MS(ESI):计算值:572.3[M+H]$^+$,测量值:572.4。

[0092] 实施例16:2-(4-(4-甲基-1-哌嗪基)苯氨基)-8-苯氨基-9-(N-丙烯酰基-3-氮杂环庚烷基)-9H-嘌呤(结构式16)的合成:

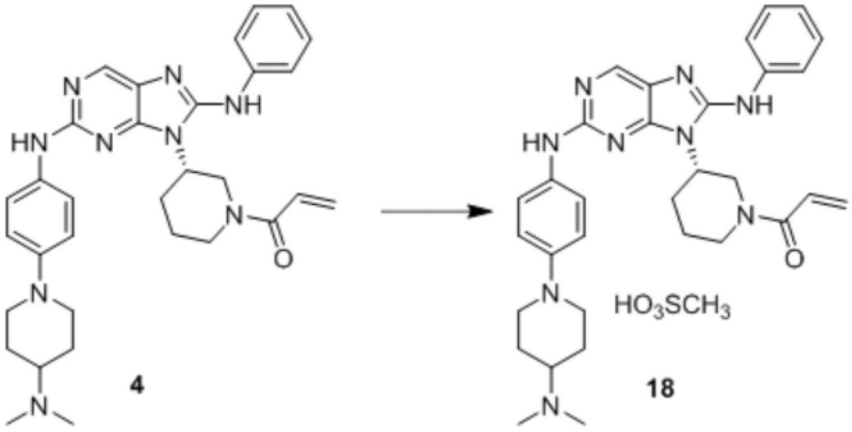
[0093] 方法同化合物1的制备。MS(ESI):计算值:552.3[M+H]$^+$,测量值:552.4。

[0094] 实施例17:(S)-2-(4-(4-甲基-1-哌嗪基)苯氨基)-8-苯氨基-9-(N-丙烯酰基-3-吡咯烷基)-9H-嘌呤盐酸盐(结构式17)的合成:

[0095] 

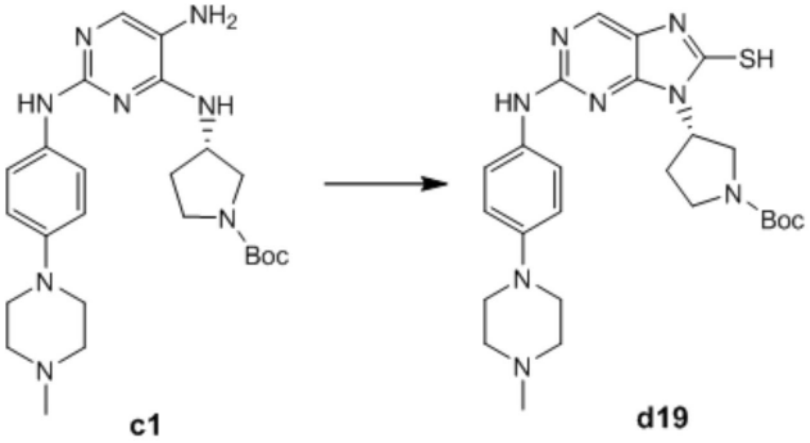
[0096] 化合物1(0.30g,0.57mmol)溶于丙酮(10mL),滴加浓盐酸(1mL),析出固体,抽滤,丙酮洗涤,干燥得化合物17,收率79%。MS(ESI):计算值:524.3[M+H]$^+$,测量值:524.4。

[0097] 实施例18:(S)-2-(4-(4-二甲氨基-1-哌啶基)苯氨基)-8-苯氨基-9-(N-丙烯酰基-3-哌啶基)-9H-嘌呤甲磺酸盐(结构式18)的合成:

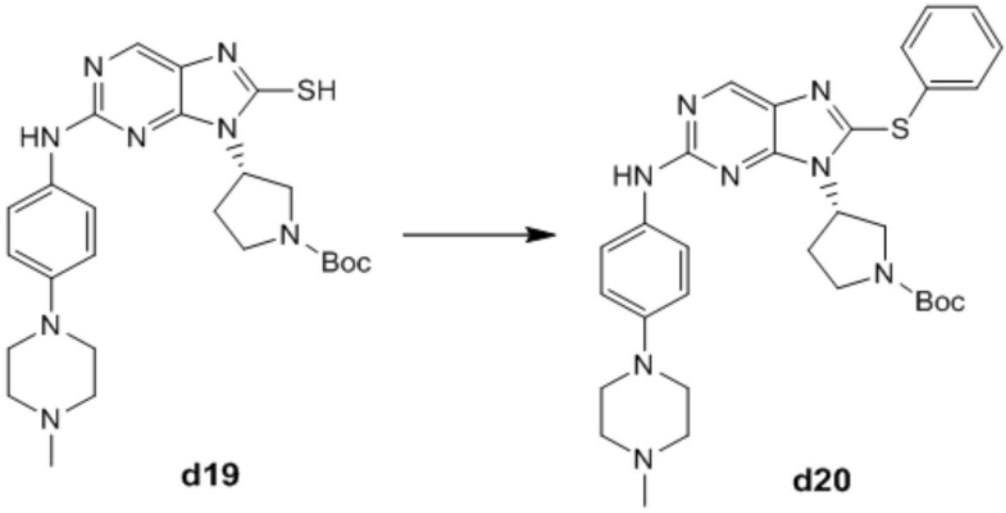
[0098] 

[0099] 将化合物4溶解于二氯甲烷，加入1.2倍摩尔量的甲磺酸，混合物于室温搅拌过夜，抽滤，干燥得化合物18。MS(ESI)：计算值：566.3[M+H]$^+$，测量值：566.4。

[0100] 实施例19：(S)-2-(4-(4-甲基-1-哌嗪基)苯氨基)-8-苯硫基-9-(N-丙烯酰基-3-吡咯烷基)-9H-嘌呤(结构式19)的合成：

[0101] 

[0102] 于100mL的圆底烧瓶中加入EtOH(30mL)、H_2O(3mL)、中间体c1(350mg)、CS_2(85μL)、KOH(50mg)，加热回流4h，冷却至室温。减压蒸除溶剂，残留物经硅胶柱色谱(洗脱剂：二氯甲烷/甲醇＝20/1)分离，纯化得淡黄色固体，收率80％。

[0103] 

[0104] 向圆底烧瓶中加入c1(0.24g)，CuI(8.2mg)，1,10-邻菲咯啉(16.2mg)，K_2CO_3(160mg)和DMSO(5mL)。混合物在氮气保护下于140℃搅拌24h。冷却到室温，加入二氯甲烷

(50mL)，有机相用水洗3次，无水硫酸钠干燥，除去溶剂后，残留物经硅胶柱色谱分离(二氯甲烷/甲醇＝10:1)。收率66％。

[0105] 化合物19合成的最后两步反应方法同化合物1的制备。MS(ESI)：计算值：541.2[M+H]$^+$，测量值：541.3。

[0106] 实施例20：(S)-2-(4-(4-二甲氨基-1-哌啶基)苯氨基)-8-苯硫基-9-(N-丙烯酰基-3-吡咯烷基)-9H-嘌呤(结构式20)的合成：

[0107] 制备方法同化合物19。MS(ESI)：计算值：569.3[M+H]$^+$，测量值：569.4。

[0108] 实施例21：(S)-2-(4-(4-甲基-1-哌嗪基)苯氨基)-8-苯氨基-9-(N-丙烯酰基-3-哌啶基)-9H-嘌呤(结构式3)的合成：

[0109] 方法同化合物19的制备。用(S)-3-氨基哌啶-1-甲酸叔丁酯代替3-氨基吡咯烷-1-甲酸叔丁酯，可合成化合物21。MS(ESI)：计算值：554.3[M+H]$^+$，测量值：554.4。

[0110] 2、抑制EGFR-酪氨酸激酶活性的测定

[0111] 方法：将待测定化合物分别用DMSO溶解配制成10mmol/L的母液，逐级稀释，得到浓度为0.1μmol/L的溶液，并将5mL待测定的不同药物或DMSO分别加入酶反应体系中。酶反应体系的组成为：40mmol/L Tris，pH 7.4，10mmol/L$MgCl_2$，0.1mg/mL BSA，1mmol/L DTT，10μmol/L ATP，EGFR(L858R)25mg/L，底物为0.2mg/mL Poly(Glu,Tyr)，反应体系的终体积为50μL，而药物的终浓度为10nmol/L。反应体系置于30℃反应40min后，加入终止液终止反应，并用荧光素酶的方法检测体系内的ATP含量，在MD-SpectraMax M5多功能酶标仪上检测化学发光信号，化学发光信号的强度与反应体系的酶的活性成反比。将检测到的化学发光信号值代入公式：

[0112] 抑制率＝[1-(($Lu_{酶}$-$Lu_{本底}$)/($Lu_{药物}$-$Lu_{本底}$))]×100％

[0113] 式中：$Lu_{药物}$表示给药组，$Lu_{本底}$表示空白组(不加酶不加药)，$Lu_{酶}$表示溶剂对照组。

[0114] 实验测定的结果展示在表1中。

[0115] 表1.化合物在浓度为10nmol·L^{-1}时对EGFR(L858R)活性的抑制率(％)

[0116]

化合物	抑制率(％)	化合物	抑制率(％)	化合物	抑制率(％)
1	93	**8**	51	**15**	97
2	98	**9**	91	**16**	98
3	100	**10**	97	**19**	95
4	98	**11**	98	**20**	98
5	91	**12**	84	**21**	99
6	98	**13**	77	**奥希替尼**	86
7	54	**14**	51	**吉非替尼**	80

[0117] 同理，用EGFR(L858R/T790M)代替EGFR(L858R)，可测定化合物对EGFR双突变激酶的抑制活性，结果见表2。

[0118] 表2.化合物在浓度为10nmol·L^{-1}时对EGFR(L858R/T790M)活性的抑制率(％)

[0119]

化合物	抑制率（%）	化合物	抑制率（%）	化合物	抑制率（%）
1	93	**8**	23	**15**	91
2	95	**9**	88	**16**	78
3	100	**10**	32	**19**	95
4	98	**11**	86	**20**	99
5	86	**12**	66	**21**	98
6	85	**13**	56	**奥希替尼**	81
7	25	**14**	68		

[0120] 其中化合物1-4,19-20对EGFR双突变体的抑制活性很强，在浓度为10nmol·L^{-1}时对EGFR(L858R/T790M)活性的抑制率大于93%。

[0121] 3、Western Blotting分析

[0122] 为了进一步验证本发明合成的9-位含有丙烯酰氨基片段的-9H-嘌呤类化合物抑制EGFR-TK的活性，我们采用Western Blotting方法测定了化合物1和3对EGFR(L858R/T790M)磷酸化的影响。

[0123] 方法：将H1975细胞按8×10^5/孔的数量接种到六孔板中，在37℃、5%CO_2培养箱中培养24h，加入2μL不同浓度梯度的化合物1或3的DMSO溶液，继续培养24h后，用含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的裂解液裂解细胞，12000rpm离心20min，取上清，加入loading buffer混匀后在95℃水浴锅中加热10min变性，蛋白按每孔25μg上样量用8%SDS-PAGE分离并转移至PVDF膜，将PVDF膜置于5%脱脂牛奶中封闭1h，然后于一抗溶液中4℃孵育过夜、二抗溶液中室温孵育1h，最后曝光拍照，结果如图2。

[0124] 4、体外抗癌活性的验证

[0125] 为了验证本发明合成的9-位含有丙烯酰氨基片段的-9H-嘌呤类化合物及其盐类的抗癌活性，以吉非替尼和奥希替尼(AZD9291)为阳性对照药物，采用体外MTT法测定了化合物1-18对人肺癌细胞HCC827($EGFR^{Del19}$)，H1975($EGFR^{L858R/T790M}$)和人表皮癌细胞A431($EGFR^{WT}$)的生长抑制作用。

[0126] 验证方法：将肿瘤细胞HCC827培养在含10%胎牛血清的RPMI1640培养基中，内含青霉素有100U·mL^{-1}，链霉素100μg·mL^{-1}，于37℃、5%CO_2培养箱中传代培养。取0.25%胰酶消化贴壁的肿瘤细胞，含10%胎牛血清的RPMI1640培养液配制细胞悬液，浓度为2.5×10^4个细胞/毫升。于96孔培养板内每孔接种200μL(约含5000个肿瘤细胞)，37℃培养24h。给药组加入不同浓度药物，每药设定0.0003、0.001、0.003、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3和10μmol·L^{-1} 10个浓度梯度，每组设3个平行孔。对照组加入与药等体积的溶剂，置于37℃、5%CO_2培养箱中培养72h后弃去培养液，每孔加入20μL 5mg·mL^{-1}的MTT溶液，孵育4h后，弃去上清液，每孔加入DMSO 200μL，轻度振荡后用酶标仪在490nm下测定光密度值(OD)。结果计算：

[0127] 以溶剂对照处理的肿瘤细胞为对照组，按照下式求药物对肿瘤细胞的抑制率：

[0128] $$肿瘤细胞抑制率=\frac{对照组平均OD值-给药组平均OD值}{对照组平均OD值}\times 100\%$$

[0129] 并进一步采用线性回归法求出半数抑制浓度(IC_{50})。

[0130] 测定结果见表3。

[0131] 表3.化合物对三种人癌细胞的抗增殖抑性(IC_{50},$nmol \cdot L^{-1}$)

[0132]

化合物编号	IC_{50}		
	H1975	HCC827	A431
1	15	0.47	2905
2	14	0.51	ND
3	12	0.33	7090
4	10	0.35	ND
5	16	0.56	ND
6	12	0.35	ND
7	360	2.19	ND
8	290	3.05	ND
9	26	0.88	ND
10	266	1.77	ND
11	17	0.42	ND
12	88	1.03	ND
13	102	1.05	ND
14	98	1.02	ND

[0133]

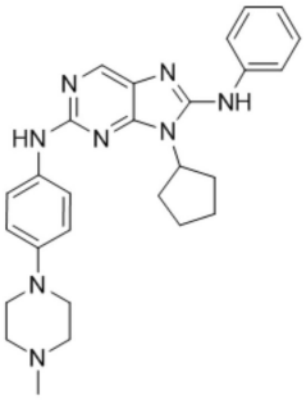
15	20	0.49	ND
16	32	0.68	ND
17	15	0.46	ND
18	11	0.40	ND
19	12	0.33	ND
20	10	0.30	ND
21	12	0.36	ND
奥希替尼	17	1.47	1310
吉非替尼	ND	10.5	ND

[0134] “ND”:未测定。

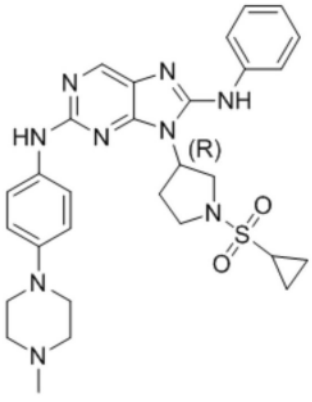
[0135] 表3的结果说明,本发明提供的化合物3、4、6和18、19-21抑制H1975细胞的活性强于阳性药AZD9291;化合物3和20抑制HCC827细胞的活性强于奥希替尼4.45倍,强于吉非替尼31.82倍。并且化合物3对A431细胞的活性很弱,预示着化合物3对野生型EGFR的作用弱,应用于临床后副作用小。

[0136] 文献J.Med.Chem.2012,55,10685-10699报道的活性最好的化合物是9e。但是,9e的CLogP为6.40,水溶性差,成药性差。9e属于可逆的EGFR-TKI,对HCC827细胞活性强,抑制H1975细胞的活性弱。本研究组报道的化合物D9(Eur.J.Med.Chem.2020,186,111888),也属于可逆的EGFR-TKI,对HCC827细胞活性强,抑制H1975细胞的活性弱(IC_{50}值为200nmol·L^{-1})。中国专利ZL201811205782.7披露的化合物C-ZLF002,属于不可逆的EGFR-TKI,与我们合成的化合物结构相近。我们合成了化合物C-ZLF002,在同样条件下,测定了其抑制HCC827和H1975细胞的活性,其IC_{50}分别值为0.38和41nmol·L^{-1}。而本发明提供的化合物3抑制H1975细胞的IC_{50}值为12nmol·L^{-1}。相对C-ZLF002而言,化合物3的活性提高了3.4倍。本发明提供的化合物的活性具有显著性进步。此外,化合物9e和C-ZLF002的ClogP值大于6,成药性差。

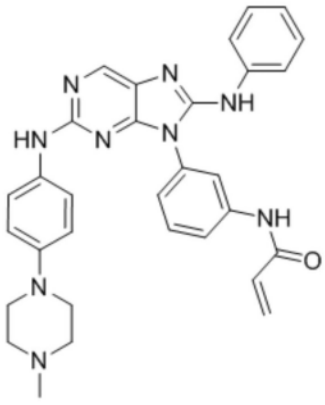
[0137]



9e



D9



C-ZLF002

[0138] 本发明涉及的9-位含有丙烯酰氨基片段的-9H-嘌呤类化合物及其盐类的组合物

在制备抗癌药物中的应用，这些应用可以是胶囊剂、口服液或颗粒剂或注射剂。这些制剂可按照各种制剂的常规制备工艺制成，其中有效成分的含量为1-300mg，优选的含量为30-100mg。

[0139] 本发明涉及的口服制剂中可含有药用辅料，包括稳定剂、增溶剂、润滑剂等，如葡萄糖、乳糖、纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、交联聚乙烯吡咯烷酮、淀粉、果胶、环糊精、土温-80、聚乙烯醇、硬脂酸镁、滑石粉等。

[0140] 以上内容仅为说明本发明的技术思想，不能以此限定本发明的保护范围，凡是按照本发明提出的技术思想，在技术方案基础上所做的任何改动，均落入本发明权利要求书的保护范围之内。

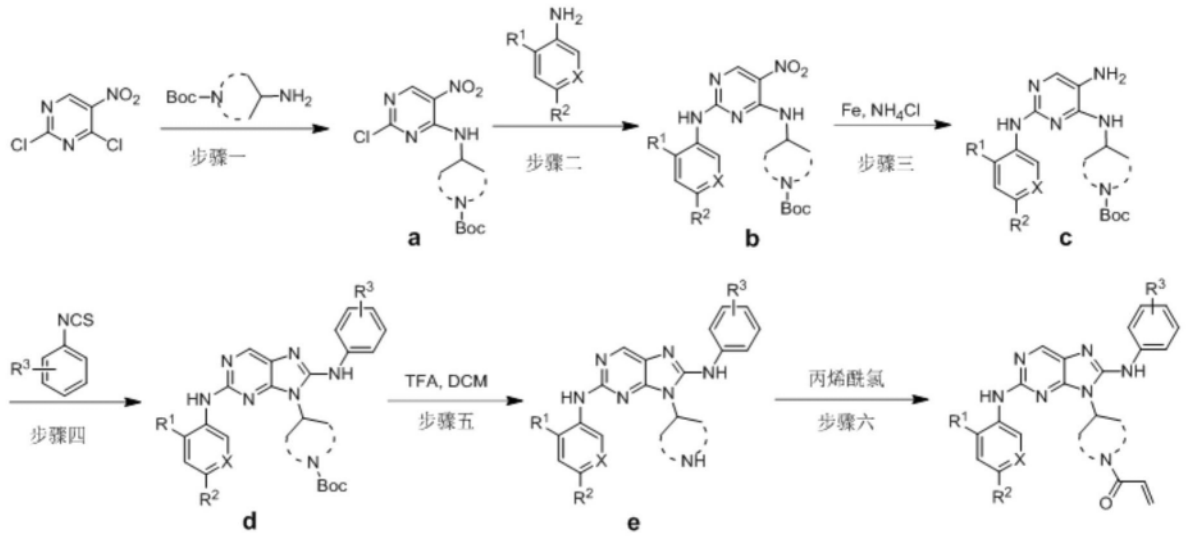

步骤一
步骤二
Fe, NH4Cl
步骤三
步骤四
TFA, DCM
步骤五
丙烯酰氯
步骤六
a
b
c
d
e

图1

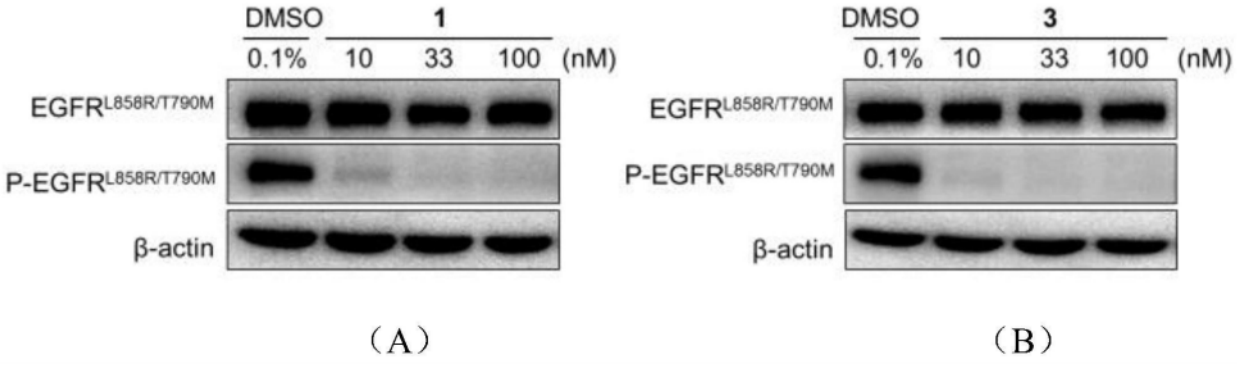

DMSO
1
0.1%
10
33
100
(nM)
EGFRL858R/T790M
P-EGFRL858R/T790M
β-actin
DMSO
3
0.1%
10
33
100
(nM)
EGFRL858R/T790M
P-EGFRL858R/T790M
β-actin
（A）
（B）

图2