



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107098909 A

(43)申请公布日 2017. 08. 29

(21)申请号 201710358334.X

(22)申请日 2017.05.19

(71)申请人 四川大学华西医院

地址 610000 四川省成都市武侯区国学巷
37号

(72)发明人 何杨 周兴龙 柴莹莹 李长富
黄日东 陈海 陈勃江 李为民

(74)专利代理机构 成都高远知识产权代理事务
所(普通合伙) 51222

代理人 李高峡 全学荣

(51)Int.Cl.

C07D 487/04(2006.01)

A61K 31/519(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图2页

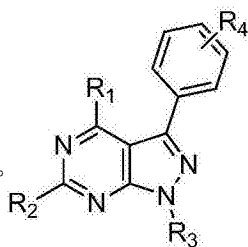
(54)发明名称

烷氧端基寡PEG修饰的氨基嘧啶衍生物及抗
肿瘤应用

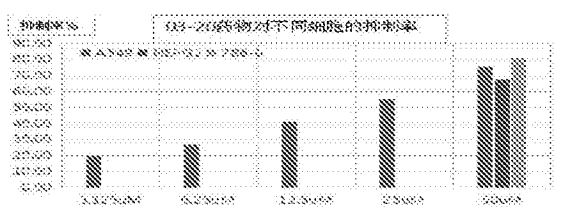
(57)摘要

本发明公开了式(I)所示的吡唑并[3,4-d]
嘧啶衍生物。本发明提供的化合物对肿瘤细胞具
有显著的抑制增长作用、促凋亡作用和减缓细胞
增殖作用,可以用于预防和/或治疗肿瘤相关疾

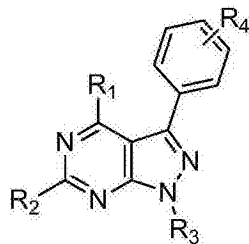
病,具有广泛的应用前景。



(I)



1. 式 (I) 所示的化合物或其药学上可接受的盐、或其溶剂合物:



(I)

其中,

R₁表示-NH₂、-NH(C₁-C₄烷基)或者-N(C₁-C₄烷基)₂;

R₂表示氢或C₁-C₆烷基;

R₃表示氢或C₁-C₆烷基;

R₄表示无或苯环上的一个或多个取代基,所述取代基分别独立地选自羟基或-O-(R₅O)_n-X;

n表示1~10的正整数;

R₅选自亚甲基、亚乙基、亚丙基、亚丁基、亚戊基、亚己基、亚庚基、亚辛基、亚壬基或亚癸基;

X表示卤素原子、-OH、C₁-C₆烷基。

2. 根据权利要求1所述的化合物,其特征在于:R₁为-NH₂。

3. 根据权利要求1所述的化合物,其特征在于:R₂为氢。

4. 根据权利要求1所述的化合物,其特征在于:R₃为C₁-C₆烷基。

5. 根据权利要求4所述的化合物,其特征在于:R₃为叔丁基。

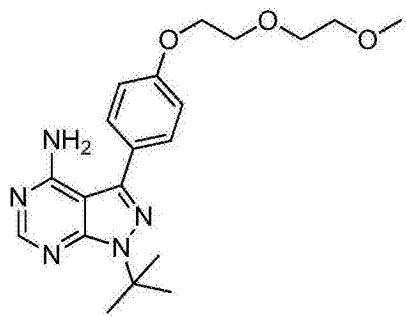
6. 根据权利要求1-5任一项所述的化合物,其特征在于:R₁为-NH₂,且R₂为氢,且R₃为叔丁基。

7. 根据权利要求1-6任一项所述的化合物,其特征在于:n为1、2或3。

8. 根据权利要求1-7任一项所述的化合物,其特征在于:R₅为亚乙基。

9. 根据权利要求1-8任一项所述的化合物,其特征在于:X为甲基。

10. 根据权利要求1所述的化合物,其特征在于:所述化合物结构为:



11. 权利要求1-10任一项所述的化合物、或其溶剂合物、或其药学上可接受的盐在制备抗肿瘤药物中的用途;优选的,所述肿瘤为肝癌、肺癌和肾癌。

12. 一种药物组合物,其特征在于:它是以权利要求1-10任一项所述的化合物、或其溶剂合物、或其药学上可接受的盐为活性成分,加上药学上可接受的辅料制备而成的制剂。

烷氧端基寡PEG修饰的氨基嘧啶衍生物及抗肿瘤应用

技术领域

[0001] 本发明属于化合物药物领域,具体涉及吡唑并[3,4-d]嘧啶衍生物及其应用。

背景技术

[0002] 恶性肿瘤生长速度快,呈浸润性生长,易发生出血、坏死、溃疡等,并常有远处转移,造成人体消瘦、无力、贫血、食欲不振、发热以及严重的脏器功能受损,最终造成患者死亡,对人群健康和生命有巨大的威胁。

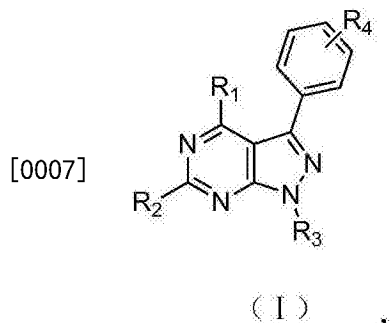
[0003] 手术治疗根治性切除仍是肺癌、肾癌、肝癌等癌症目前最基本和常用的治疗方法,但是通常切除手术创伤性较大、术后会造成机体组织的损伤及气血的亏损,所以不适合老年人、自身身体素质较差以及合并有心、肺、肝等重要脏器疾病者选用,因此需要开发新的化学药物治疗。此外,化学药物治疗也是目前治疗肿瘤及某些自身免疫性疾病的主要手段之一。尽管市场上已经存在多种治疗癌症的药物,但是都存在着各种缺陷,例如生物利用度不高、专属性不强、毒副作用大等问题。而这些缺陷,往往是由于化合物本身的结构特点及其作用靶标所带来的,难以在进一步的研究开发中克服。

[0004] 因此,本领域人员都希望合成出结构各异的多种化合物以及探索到新的作用靶标以克服前述缺陷。

发明内容

[0005] 为解决上述问题,本发明提供了一种全新结构的吡唑并[3,4-d]嘧啶衍生物。

[0006] 式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐、或其溶剂合物:



[0008] 其中,

[0009] R_1 表示 $-NH_2$ 、 $-NH(C_1-C_4\text{烷基})$ 或者 $-N(C_1-C_4\text{烷基})_2$;

[0010] R_2 表示氢或 C_1-C_6 烷基;

[0011] R_3 表示氢或 C_1-C_6 烷基;

[0012] R_4 表示无或苯环上的一个或多个取代基,所述取代基分别独立地选自羟基或

[0013] $-O-(R_5O)_n-X$;

[0014] n 表示1~10的正整数;

[0015] R_5 选自亚甲基、亚乙基、亚丙基、亚丁基、亚戊基、亚己基、亚庚基、亚辛基、亚壬基或亚癸基;

[0016] X表示卤素原子、-OH、C₁-C₆烷基。

[0017] 进一步地,R₁为-NH₂。

[0018] 进一步地,R₂为氢。

[0019] 进一步地,R₃表示C₁-C₆烷基。

[0020] 进一步地,R₃表示叔丁基。

[0021] 进一步地,R₁为-NH₂,且R₂为氢,且R₃表示叔丁基。

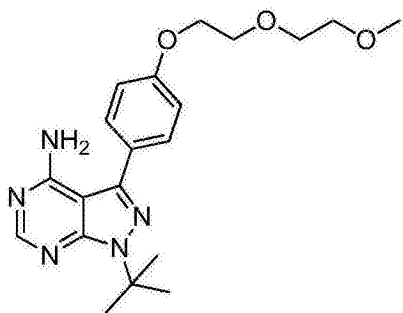
[0022] 进一步地,n为1、2或3。

[0023] 进一步地,R₅为亚乙基。

[0024] 进一步地,X为甲基。

[0025] 更进一步地,所述化合物结构为:

[0026]



[0027] 本发明还提供了前述的化合物、或其溶剂合物、或其药学上可接受的盐在制备抗肿瘤药物中的用途;优选的,所述肿瘤为肝癌、肺癌和肾癌。

[0028] 本发明还提供了一种药物组合物,它是以前述的化合物、或其溶剂合物、或其药学上可接受的盐为活性成分,加上药学上可接受的辅料制备而成的制剂。

[0029] 本发明中,所述C₁-C₄的烷基是指C₁、C₂、C₃、C₄的烷基,即具有1~4个碳原子的直链或支链的烷基,例如甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基等等。类似的,所述C₁-C₆的烷基是指C₁、C₂、C₃、C₄、C₅、C₆的烷基,即具有1~6个碳原子的直链或支链的烷基,例如甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、仲丁基、戊基、己基等等。

[0030] 本发明中,“治疗”也包括复发性(relapse)预防或阶段性(phase)预防,以及急性或慢性体征、症状和/或功能失常的治疗。治疗可以是对症治疗,例如抑制症状。它可以在短期内实现,在中期内调整,或者可以说是长期治疗,例如在维持疗法里面。

[0031] 所述“预防”包括延迟和/或阻止病症、疾病或病况和/或其伴发症状的发作;防止对象染上病症、疾病或病况;或降低对象染上病症、疾病或病况的风险的方法。

[0032] 本发明中,“药学上可接受的”是指某载体、运载物、稀释剂、辅料,和/或所形成的盐通常在化学上或物理上与构成某药物剂型的其它成分相兼容,并在生理上与受体相兼容。

[0033] 本发明中,“盐”是将化合物或其立体异构体,与无机和/或有机酸和碱形成的酸式和/或碱式盐,也包括两性离子盐(内盐),还包括季铵盐,例如烷基铵盐。这些盐可以是在化合物的最后分离和纯化中直接得到。也可以是通过将化合物,或其立体异构体,与一定数量的酸或碱适当(例如等当量)进行混合而得到。这些盐可能在溶液中形成沉淀而以过滤方法收集,或在溶剂蒸发后回收而得到,或在水介质中反应后冷冻干燥制得。本发明中所述盐可以是化合物的盐酸盐、硫酸盐、枸橼酸盐、苯磺酸盐、氢溴酸盐、氢氟酸盐、磷酸盐、乙酸盐、

丙酸盐、丁二酸盐、草酸盐、苹果酸盐、琥珀酸盐、富马酸盐、马来酸盐、酒石酸盐或三氟乙酸盐。

[0034] 试验结果显示,本发明的化合物对肺癌细胞株A549、肝癌细胞株HEPG2和肾癌细胞株786-0都有抑制细胞增殖的作用。对A549细胞有促进凋亡的作用和使得A549细胞增殖减慢的作用。可以预期其具有治疗肺癌、肝癌和肾癌的作用,临床药用的前景明确。

[0035] 显然,根据本发明的上述内容,按照本领域的普通技术知识和惯用手段,在不脱离本发明上述基本技术思想前提下,还可以做出其它多种形式的修改、替换或变更。

[0036] 以下通过实施例形式的具体实施方式,对本发明的上述内容再作进一步的详细说明。但不应将此理解为本发明上述主题的范围仅限于以下的实例。凡基于本发明上述内容所实现的技术均属于本发明的范围。

附图说明

[0037] 下述附图中,03-20为本发明化合物、或其溶剂合物、或其药学上可接受的盐为活性成分,加上药学上可接受的辅料制备而成的制剂。

[0038] 图1为03-20对不同细胞(A549,HEPG2,786-0)处理72h后的抑制率。

[0039] 图2为不同浓度的03-20对A549的凋亡影响结果。

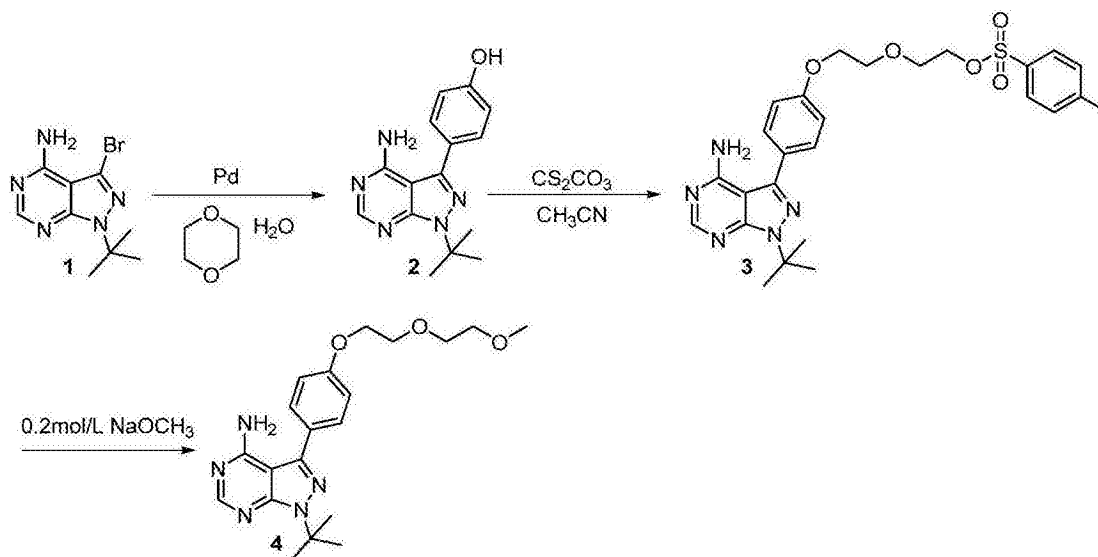
[0040] 图3为不同浓度的03-20对A549的周期影响结果。

具体实施方式

[0041] 下述实施例中,关键中间体产物可通过自制得到,其余所有参与合成的试剂在商业中均可从国药、长征公司购买得到。

[0042] 实施例1本发明化合物的制备

[0043]



[0044] 化合物1 (269mg, 1mmol) 溶解在1,4-二氧六环/水(4:1) 150ml溶液中,并转移到250ml的圆底烧瓶中,再向反应液中加入(1.38g, 10mmol) 碳酸钾,在室温下搅拌三分钟以后,加入催化剂双二苯膦基二茂铁合氯化钯(73.1mg, 0.1mmol),将反应混合物加热到100℃,通过TLC检测反应,待反应结束以后,首先,待反应液冷却,加入50ml的蒸馏水,然后转移到分

液漏斗中,加入100ml的二氯甲烷萃取3次,合并有机相,加入无水硫酸钠,旋干有机溶剂,通过硅胶柱分离得到中间化合物2 (200mg,70%), (二氯甲烷: (二氯甲烷: 甲醇) =100:2.5)。

[0045] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 9.83 (s, 1H, HOAr), 8.28 (s, 1H, CH), 6.97–7.83 (m, 4H, Ar), 5.83 (s, 1H), 1.80 (m, 9H, t-Bu); HR-MS (ESI+): Calc. for $[\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}]$: 284.1433 $[\text{M}+\text{H}]^+$; Found 284.1513 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0046] 化合物2 (283mg, 1mol) 溶解在20ml的无水乙腈中,然后通过滴液漏斗加入到 (68mg, 0.5mol) 碳酸铯和二对甲苯磺酸三乙二醇酯的乙腈溶液中,回流反应3小时,通过TLC监测反应的进行,待反应结束,反应液冷却以后,加入50ml的蒸馏水,然后转移到分液漏斗中,加入100ml的二氯甲烷萃取3次,合并有机相,加入无水硫酸钠,旋干有机溶剂,通过硅胶柱分离得到中间化合物3 (400mg, 76%), (二氯甲烷: (二氯甲烷: 甲醇) =100:1)。

[0047] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 8.22 (s, 1H), 7.79–7.06 (m, 8H, Ar), 4.51–3.50 (t, 8H), 4.10–4.05 (m, 6H), 2.36 (s, 3H), 1.72 (s, 9H); HR-MS (ESI+): Calc. for $[\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_5\text{S}]$: 526.2046 $[\text{M}+\text{H}]^+$; Found 526.1277 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0048] 化合物3 (525mg, 1mol) 溶解在0.2mol/L的甲醇钠甲醇溶液中,在室温下搅拌6小时,通过TLC监测反应的进行,待反应结束。反应液冷却以后,加入50ml的蒸馏水,然后转移到分液漏斗中,加入100ml的二氯甲烷萃取3次,合并有机相,加入无水硫酸钠,旋干有机溶剂,通过硅胶柱分离得到终产物4 (300mg, 78%), (二氯甲烷: (二氯甲烷: 甲醇) =100:1.5)。

[0049] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 8.21 (s, 1H), 7.57–7.08 (m, 4H), 4.15–3.40 (m, 8H), 3.24 (s, 3H), 1.72 (s, 9H); HR-MS (ESI+): Calc. for $[\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_3]$: 386.2114 $[\text{M}+\text{H}]^+$; Found 386.2123 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0050] 以下通过试验说明本发明的有益效果

[0051] 试验1.细胞活性检验

[0052] 采用MTT检测法,其为黄色化合物,是一种接受氢离子的染料,可作用于活细胞线粒体中的呼吸。

[0053] HuaXi03-20药物为本发明化合物(化合物4)、或其溶剂合物、或其药学上可接受的盐为活性成分,加上药学上可接受的辅料制备而成的制剂。

[0054] (1) 所需实验试剂、耗材、仪器

[0055] 实验材料:HuaXi03-20药物,HEPG2细胞,A549细胞,786-0细胞;

[0056] 实验试剂:DMSO,MTT,DMEM完全培养基+10%FBS+1%双抗,胰酶,PBS(灭菌);

[0057] 实验耗材:96孔板,10ul枪尖(均灭菌),1ml离心管,配套移液枪;

[0058] 实验仪器:多功能荧光酶标仪(BioTek Synergy Mx)、涡旋振荡器。

[0059] (2) 实验步骤:

[0060] (a) 收集对数期细胞,调整细胞悬液浓度,每孔加入100 μl ,铺板使待测细胞调密度至3000个/孔,(边缘孔用无菌PBS填充)。

[0061] (b) 5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$ 孵育,次日上午加药,一般5个浓梯度,每孔100 μl ,设4—6个复孔。

[0062] (c) 5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$ 孵育72小时,倒置显微镜下观察。

[0063] (d) 每孔加入20 μl MTT溶液 (5mg/ml, 即0.5% MTT), 继续培养4h。

[0064] (e) 终止培养,小心吸去孔内培养液。

[0065] (f) 每孔加入150 μl 二甲基亚砷,置摇床上低速振荡10min,使结晶物充分溶解。在

酶标仪OD490nm处测量各孔的吸光值。

[0066] (g) 同时设置调零孔(培养基、MTT、二甲基亚砷),对照孔(细胞、相同浓度的药物溶解介质、培养液、MTT、二甲基亚砷)。

[0067] (h) 计算:抑制率=(对照-给药)/对照 $\times$ 100%。

[0068] (2) 实验结果:

[0069] A549细胞作用72h,药物剂量分别为3.125 μ M、6.25 μ M、12.5 μ M、24 μ M和50 μ M,试验结果见表1和图1。HEPG2和786-0细胞作用时间为72h,药物剂量为50 μ M,试验结果见图1。HEPG2和786-0细胞在5%CO₂,37℃条件下作用时间为72h,药物剂量为50 μ M,试验结果见图1。

[0070] 表1MTT法测试不同浓度作用A549细胞72h后的吸光度

[0071]

A549 细胞	03-20	DMSO
------------	-------	------

[0072]

药物作用72小时后MTT的吸光值	50um	25um	12.5um	6.25um	3.125um	50um	25um	12.5um	6.25um	3.125um
	0.224	0.381	0.675	0.92	1.046	0.831	0.871	1.295	1.196	1.292
	0.255	0.395	0.694	0.923	1.066	0.778	0.887	1.009	1.184	1.108
	0.226	0.429	0.713	0.876	0.958	0.984	1.108	1.18	1.34	1.377
	0.226	0.413	0.673	0.866	0.964	1.218	0.759	1.274	1.201	1.258
平均值	0.23	0.40	0.69	0.90	1.01	0.95	0.91	1.19	1.23	1.26
抑制率	75.57	55.37	40.00	27.13	19.83					

[0073] 结论:从细胞活性实验可以看出,03-20对A549、HEPG2和786-0细胞都有抑制细胞增殖的作用。

[0074] 试验2.细胞凋亡检测

[0075] (1) 所需实验试剂、耗材、仪器

[0076] 实验材料:HuaXi03-20药物,A549细胞;

[0077] 实验试剂:DMEM完全培养基+10%FBS+1%双抗,凋亡试剂盒(四正柏),胰酶,PBS(灭菌);

[0078] 实验耗材:6孔板,1ml枪尖,200ul枪尖,10ul枪尖(均灭菌),配套移液枪;

[0079] 实验仪器:涡旋振荡器、恒温孵箱流式分析仪(Beckman,cytoflex)。

[0080] (2) 实验步骤

[0081] (a) 用冷的PBS洗2次,然后用1x的结合液重悬细胞(1×10^6 cells/mL)。

[0082] (b) 将100ul溶液(1×10^5 cells)转移至5mL的离心管中。

[0083] (c) 加5ul的FITC Annexin V避光孵育10分钟,然后加入5ul的PI试剂轻轻涡旋细胞,避光,室温孵育15min。

[0084] (d) 加400ul/tube 1X的结合液,流式分析。

[0085] (3) A549凋亡实验结果

[0086] 实验室结果见图2和表2所示。

[0087] 表2不同浓度的03-20对A549的凋亡结果

[0088]

	对照	03-20 8uM	03-20 10uM	03-20 12uM	03-20 15uM
(早调+晚调) %	8.31	11.36	11.48	15.11	37.42

[0089] 结论:从凋亡实验结果可以得出,03-20对A549细胞有促进凋亡的作用,并且随着浓度升高,凋亡作用越明显。

[0090] 试验3.细胞周期检测

[0091] (1) 所需实验试剂、耗材、仪器

[0092] 实验材料:HuaXi03-20药物,A549细胞;

[0093] 实验试剂:DMEM完全培养基+10%FBS+1%双抗,周期试剂盒(四正柏),胰酶,PBS(灭菌);

[0094] 实验耗材:6孔板,1ml枪尖,200ul枪尖,10ul枪尖(均灭菌),配套移液枪;

[0095] 实验仪器:多功能荧光酶标仪(BioTek Synergy Mx)、涡旋振荡器、恒温孵箱,流式分析仪(Beckman,cytoflex)。

[0096] (2) 实验步骤

[0097] (a) 0.25%胰酶(无EDTA)消化,将细胞消化成单个,离心收集细胞,弃上清,用预冷PBS洗细胞两次(加3ml,吹悬,离心,弃上清算洗一次)。

[0098] (b) 将细胞沉淀加入1ml预冷(-20℃)70%乙醇中,震荡混匀后于4℃固定过夜。

[0099] (c) 离心收集细胞,以1mL的PBS洗细胞两次,加入500uLPBS含50ug/mL溴化乙锭(PI),100ug/mL RNase A,0.2%Triton X-100,4℃避光孵育30分钟。

[0100] (d) 送实验室,上机。

[0101] (3) 实验结果如表3和图3所示

[0102] 表3不同浓度的03-20对A549的周期结果

[0103]

	对照	03-20 10uM	03-20 12uM
(G1期+S期) %	90.41	91.25	91.94
S期%	29.41	34.80	34.88
G2期%	9.59	8.75	8.06

[0104] 结论:从周期实验可以得出,和对照相比,A549细胞在03-20药物10uM和12uM作用下,处于S期的比例提高,而G2期降低,使得细胞增殖减慢。

[0105] 综上所述,本发明提供的化合物对肿瘤细胞具有显著的抑制增长作用、促凋亡作用和减缓癌细胞的增殖作用,可以用于预防和/或治疗肿瘤相关疾病,尤其是肺癌、肾癌和肝癌,具有广泛的应用前景。

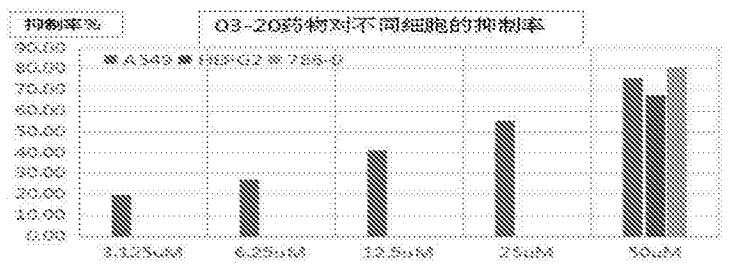


图1

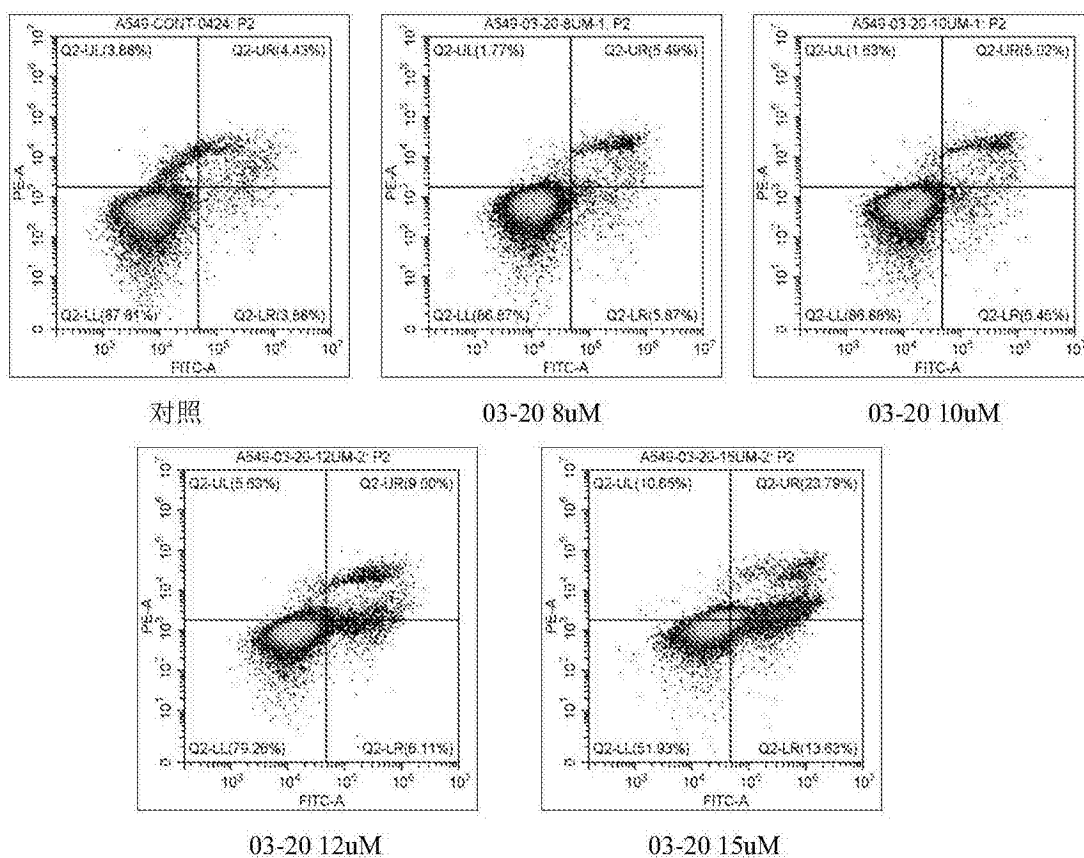


图2

