



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112375112 B

(45) 授权公告日 2021.12.21

(21) 申请号 202011307537.4

(22) 申请日 2020.11.20

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112375112 A

(43) 申请公布日 2021.02.19

(73) 专利权人 中国人民解放军东部战区总医院
地址 210000 江苏省南京市玄武区中山东路305号

(72) 发明人 田迎 潘璟 卢光明 马龙

(74) 专利代理机构 南京华恒专利代理事务所
(普通合伙) 32335

代理人 宋方园

(51) Int. Cl.

C07H 19/052 (2006.01)

C07H 1/00 (2006.01)

A61K 31/706 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2009076019 A1, 2009.03.19

WO 2008052770 A2, 2008.05.08

Mizutani, Hiroko等. Antitumor and antiviral effect of riboside of

benzimidazole derivatives.《Japan. J. Med. Sci. & Biol.》.1960,第13卷第147-153页.

Shannon, William M.等. Selective inhibition of RNA tumor virus replication in vitro and evaluation of candidate antiviral agents in vivo.《Annals of the New York Academy of Sciences》.1977,第284卷第472-507页.

Mizutani, Hiroko等. Antitumor and antiviral effect of riboside of benzimidazole derivatives.《Japan. J. Med. Sci. & Biol.》.1960,第13卷第147-153页.

Sarika Sinha等. Some Novel Adenosine Mimics: Synthesis and Anticancer Potential against Cervical Cancer caused by Human Papilloma Virus.《Taylor & Francis》.2007,第26卷第773-777页.

Wikoff, William R.等. Untargeted Metabolomics Identifies Enterobiome Metabolites and Putative Uremic Toxins as Substrates of Organic Anion Transporter 1 (Oat1).《Journal of Proteome Research》.2011,第10卷(第6期),第2842-2851页.

审查员 王少华

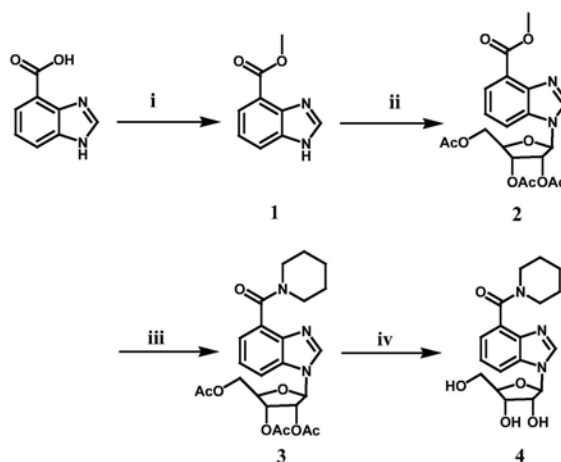
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种苯并咪唑衍生物BI361及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种苯并咪唑衍生物BI361及其制备方法,其化学命名为{1-[四氢-3,4-二羟基-5-(羟甲基)咪唑-2-基]-1H-苯并[d]咪唑-4-基}(哌啶-1-基)甲酮。本发明的苯并咪唑衍生物及其药学上可接受的盐、溶剂化物和水合物对MCF-7、SK-BR-3、HCT 116、U-118 MG、U-87 MG、MDA-MB-468具有优秀的抗肿瘤体内活性,在制备抗肿瘤药物的上具有较好的应用前景。



1. 一种苯并咪唑衍生物BI361,其化学命名为{1-[四氢-3,4-二羟基-5-(羟甲基)咪喃-2-基]-1H-苯并[d]咪唑-4-基}(哌啶-1-基)甲酮,及该化合物的药学上可接受的盐。

2. 权利要求1所述的苯并咪唑衍生物BI361的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

S1:将1H-1,3-苯并二唑-4-羧酸、甲醇、硫酸放入反应瓶中,油浴回流,搅拌过夜,用碳酸氢钠饱和溶液调pH值调节至中性,过滤收集固体并干燥,得到化合物(1),即1H-1,3-苯并二唑-4-羧酸甲酯;

S2:将化合物(1)、ACN和BSA放入250 mL闭塞反应瓶中,80-85℃下搅拌15-20分钟;室温下向CH₃CN中添加TMSOTf和[3,4,5-三(乙酰氧基)氧代戊烷-2-基]乙酸甲酯溶液,将上述溶液,80-85℃下混合搅拌2.5-3 h,真空浓缩,用NaHCO₃溶液溶解,并用乙酸乙酯萃取,将有机层合并,无水硫酸钠干燥,真空浓缩,将残渣用1:1混合的乙酸乙酯/石油醚在硅胶柱上洗脱,得到化合物(2),即甲基-1-{3,4-二(乙酰氧基)-5-[(乙酰氧基)甲基]恶唑-2-基}-1H-1,3-苯并二唑-4-羧酸甲酯;

S3:冰浴下向哌啶与THF的溶液中添加Me₃Al,然后加入化合物(2)的THF溶液;所得溶液在油浴中回流搅拌过夜,滤液真空浓缩,得到化合物(3),即{5-[4-(二甲基氨基甲酰)-1H-1,3-苯并二唑-1-基]-3-[(4-甲基苯基)羰基]恶唑-2-基}甲基4-甲基苯甲酸甲酯;

S4:将化合物(3),加入NH₃-甲醇溶液在室温下搅拌过夜,然后真空浓缩,采用快速制备高效液相色谱法纯化粗产物,得到化合物(4),即{1-[四氢-3,4-二羟基-5-(羟甲基)咪喃-2-基]-1H-苯并[d]咪唑-4-基}(哌啶-1-基)甲酮。

3. 根据权利要求2所述的苯并咪唑衍生物BI361的制备方法,其特征在于,步骤S1中,1H-1,3-苯并二唑-4-羧酸、甲醇、硫酸的用量比为10~50 g:20~100 mL:5~50 mL。

4. 根据权利要求2所述的苯并咪唑衍生物BI361的制备方法,其特征在于,步骤S2中,化合物(1)、ACN、BSA、TMSOTf和[3,4,5-三(乙酰氧基)氧代戊烷-2-基]乙酸甲酯的用量比为:3~9 g:100~350 mL:3~20g:3~20g:2~30g。

5. 根据权利要求2所述的苯并咪唑衍生物BI361的制备方法,其特征在于,步骤S3中,反应温度从0~60℃,哌啶、THF、Me₃Al、化合物(2)的用量比为1~5 g:30~100 mL:3~20 mL:1~5g。

6. 根据权利要求2所述的苯并咪唑衍生物BI361的制备方法,其特征在于,步骤S4中,化合物(3)、NH₃-甲醇钠的用量比为:1~5g:50~100 mL;制备色谱进行纯化的流动相梯度洗脱条件为:在30分钟内,流动相由含0.5%NH₃·H₂O的H₂O:CH₃CN=1:0增加至含0.5%NH₃·H₂O的H₂O:CH₃CN=2:1。

7. 一种药物组合物,其特征在于,包括上述权利要求1中所述的化合物和药学上可接受的载体。

8. 权利要求1所述的化合物,或者权利要求7所述的药物组合物在制备药剂中的用途。

9. 权利要求1所述的苯并咪唑衍生物BI361或者该化合物的药学上可接受的盐在制备抗肿瘤剂中的应用。

10. 权利要求1所述的苯并咪唑衍生物BI361或者该化合物的药学上可接受的盐与一种或多种抗癌药剂结合在制备用于治疗肿瘤的药物中的应用。

一种苯并咪唑衍生物BI361及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,具体地涉及一种苯并咪唑衍生物BI361及其制备方法和应用。

背景技术

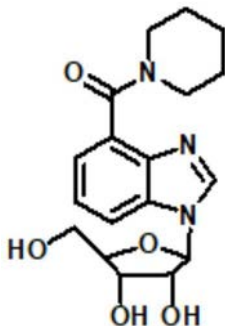
[0002] 恶性肿瘤是一种严重威胁人类健康的常见病和多发病,近20年来,我国肿瘤死亡率上升了29.42%。在35至59岁的中壮年人群中,肿瘤已列居各类死因之首。有数据显示:我国肿瘤发病率约为200/10万人,每年新发病例约220万人以上,在治患者约600万人以上。肿瘤的治疗方法有手术治疗,放射治疗和化学治疗。目前,化学治疗仍然是临床治疗肿瘤的主要手段。寻找抗肿瘤药物是新药研究的热点之一。近些年来,苯并咪唑类化合物因具有优良的生物活性,备受人们的广泛关注,成为生物学界和化学界学者们研究的热点。其适应症包括:消化道溃疡、寄生虫感染、细菌感染、病毒感染、肿瘤等,尤其表现出具有选择性抑制胶质母细胞瘤和其他肿瘤的功效。发明人意外发现, {1-[四氢-3,4-二羟基-5-(羟甲基)咪喃-2-基]-1H-苯并[d]咪唑-4-基} (哌啶-1-基) 甲酮有一定抗肿瘤活性,发明人提出与 {1-[四氢-3,4-二羟基-5-(羟甲基)咪喃-2-基]-1H-苯并[d]咪唑-4-基} (哌啶-1-基) 甲酮或者该化合物的药学上可接受的盐、溶剂化物或者药物前体或者立体异构体或者互变异构体或者代谢物相关的发明。

发明内容

[0003] 发明目的:为解决现有技术中存在的问题,本发明提供一种苯并咪唑衍生物BI361,其化学命名为 {1-[四氢-3,4-二羟基-5-(羟甲基)咪喃-2-基]-1H-苯并[d]咪唑-4-基} (哌啶-1-基) 甲酮,其对MCF-7、SK-BR-3、HCT116、U-118MG、U-87MG、MDA-MB-468六株肿瘤细胞增殖具有抑制活性。

[0004] 技术方案:为实现上述技术目的,本发明提供了一种苯并咪唑衍生物BI361,其化学命名为 {1-[四氢-3,4-二羟基-5-(羟甲基)咪喃-2-基]-1H-苯并[d]咪唑-4-基} (哌啶-1-基) 甲酮,其结构式如下所示:

[0005]



[0006] 本发明进一步提出了上述苯并咪唑衍生物BI361的制备方法,包括如下步骤:

[0007] S1:将1H-1,3-苯并二唑-4-羧酸、甲醇、硫酸放入反应瓶中,油浴回流,搅拌过夜,用碳酸氢钠饱和溶液调pH值调节至中性,过滤收集固体并干燥,得到化合物(1),即1H-1,3-

苯并二唑-4-羧酸甲酯；

[0008] S2:将化合物1、ACN和BSA放入250mL闭塞反应瓶中,80-85℃下搅拌15-20分钟;室温下向CH₃CN中添加TMSOTf和[3,4,5-三(乙酰氧基)氧代戊烷-2-基]乙酸甲酯溶液,将上述溶液,80-85℃下混合搅拌2.5-3h,真空浓缩,用NaHCO₃溶液溶解,并用乙酸乙酯萃取,将有机层合并,无水硫酸钠干燥,真空浓缩,将残渣用乙酸乙酯/石油醚(1:1)在硅胶柱上洗脱,得到化合物(2),即甲基-1-{3,4-二(乙酰氧基)-5-[(乙酰氧基)甲基]恶唑-2-基}-1H-1,3-苯并二唑-4-羧酸甲酯;

[0009] S3:冰浴下向哌啶与THF的溶液中添加Me₃Al,然后加入化合物(2)的THF溶液;所得溶液在油浴中回流搅拌过夜,滤液真空浓缩,得到化合物(3),即{5-[4-(二甲基氨基甲酰)-1H-1,3-苯并二唑-1-基]-3-[(4-甲基苯基)羰基]恶唑-2-基}甲基-4-甲基苯甲酸甲酯;

[0010] S4:将化合物(3),加入NH₃-甲醇溶液在室温下搅拌过夜,然后真空浓缩,采用快速制备高效液相色谱法纯化粗产物,得到化合物(4),即{1-[四氢-3,4-二羟基-5-(羟甲基)咪喃-2-基]-1H-苯并[d]咪唑-4-基}(哌啶-1-基)甲酮。

[0011] 优选地,步骤S1中,1H-1,3-苯并二唑-4-羧酸、甲醇、硫酸的用量比为10~50g:20~100mL:5~50mL。

[0012] 步骤S2中,化合物1、ACN、BSA、TMSOTf和[3,4,5-三(酰氧基)氧代戊烷-2-基]乙酸甲酯的用量比为:3~9g:100~350mL:3~20g:3~20g:2~30g,反应温度60~100℃,反应时间60~180分钟。

[0013] 步骤S3中,反应温度从0~60℃,哌啶、THF、Me₃Al、化合物(2)的用量比为1~5g:30~100mL:3~20mL:1~5g。

[0014] 步骤S4中,化合物(3)、NH₃-甲醇钠的用量比为:1~5g:50~100mL。制备色谱进行纯化的流动相梯度洗脱条件为:H₂O(0.5%NH₃·H₂O):CH₃CN=1:2~5:1。

[0015] 本发明进一步提出了上述新型苯并咪唑衍生物在制备抗肿瘤剂中的应用。

[0016] 本发明同时提出一种药物组合物,该组合物包括上述权利要求1中所述的化合物和药学上可接受的载体。

[0017] 更近一步地,本发明提出了上述化合物,或者上述的药物组合物在制备药剂中的用途。

[0018] 同时,本发明还提出了上述新型苯并咪唑衍生物BI361或者该化合物的药学上可接受的盐、溶剂化物或者药物前体或者立体异构体或者互变异构体或者代谢物在制备抗肿瘤剂中的应用。

[0019] 最后,本发明提出了上述新型苯并咪唑衍生物BI361或者该化合物的药学上可接受的盐、溶剂化物或者药物前体或者立体异构体或者互变异构体或者代谢物与一种或多种抗癌药剂结合在制备用于治疗肿瘤的药物上的用途。

[0020] 有益效果:本发明公开了一种苯并咪唑衍生物BI361,并采用MTT法评价其抑制MCF-7、SK-BR-3、HCT 116、U-118MG、U-87MG、MDA-MB-468这6株肿瘤细胞增殖活性,计算抑制这六种肿瘤细胞增殖的IC₅₀值,结果表明所制备的新型苯并咪唑衍生物BI361对上述肿瘤细胞具有抑制作用,可用于制备抗肿瘤制剂。

附图说明

[0021] 图1为苯并咪唑衍生物的合成路线图,其中:i) 硫酸,甲醇;ii) BSA, TMSOTf, 乙腈;iii) 哌啶, Me₃Al, THF;iv) 氨-甲醇。

具体实施方式

[0022] 为了进一步阐述本发明,下面给出一系列实施例。这些实施例完全是例证性的,它们仅用来对本发明进行具体描述,不应当理解为对本发明的限制。

[0023] 实施例1制备1H-1,3-苯并二唑-4-羧酸甲酯(化合物1)

[0024] 将30g 1H-1,3-苯并二唑-4-羧酸、80mL甲醇、20mL硫酸放入250mL圆底烧瓶中。所得溶液油浴回流,搅拌过夜。用碳酸氢钠饱和溶液调pH值调节至中性。过滤收集固体并干燥。得到27.5g(产率84%)化合物1,呈黄色固体。对化合物1进行液质联用表征,结果如下:

[0025] LC-MS: (ES, m/z) : 177.2 [M+H]⁺

[0026] 实施例2制备甲基1-[3,4-二(乙酰氧基)-5-[(乙酰氧基)甲基]恶唑-2-基]-1H-1,3-苯并二唑-4-羧酸甲酯(化合物2)

[0027] 将5g化合物1、150mL ACN和5.77g BSA放入250mL闭塞圆底烧瓶中,85°C下搅拌15分钟。随后在室温下向20mL CH₃CN中添加8.20g TMSOTf和9.94g[3,4,5-三(乙酰氧基)氧代戊烷-2-基]乙酸甲酯溶液。将上述溶液在85°C下混合搅拌2.5h。真空浓缩,用100mL NaHCO₃溶液溶解,并用100mL乙酸乙酯萃取。将有机层合并,无水硫酸钠干燥,真空浓缩。将残渣用乙酸乙酯/石油醚(1:1)在硅胶柱上洗脱。得到8.4g(产率68%)化合物2,呈黄色油状。

[0028] 对化合物2进行液质联用表征,结果如下:

[0029] LC-MS: (ES, m/z) : 435.1 [M+H]⁺

[0030] 实施例3制备[5-[4-(二甲基氨基甲酰)-1H-1,3-苯并二唑-1-基]-3-[(4-甲基苯基)羰基]恶唑-2-基]甲基4-甲基苯甲酸甲酯(化合物3)

[0031] 冰浴下,在5分钟内向1.96g哌啶与40mL THF的溶液中添加13.8mL Me₃Al,然后在5mL THF中添加4g化合物2的溶液,混合上述溶液在油浴中回流搅拌过夜,过滤掉固体,滤液真空浓缩。得到4.5g的化合物3,呈黄色油状。对化合物3进行液质联用表征,结果如下:

[0032] LC-MS: (ES, m/z) : 488.2 [M+H]⁺

[0033] 实施例4制备{1-[四氢-3,4-二羟基-5-(羟甲基)咪唑-2-基]-1H-苯并[d]咪唑-4-基}(哌啶-1-基)甲酮(化合物4)

[0034] 将4g化合物3,50mL NH₃-甲醇溶液在室温下搅拌过夜,然后真空浓缩。采用快速制备高效液相色谱法纯化粗产物,条件如下:C₁₈柱;流动相:H₂O(0.5%NH₃·H₂O):CH₃CN=1:0,增加至H₂O(0.5%NH₃·H₂O):CH₃CN=2:1,30分钟内;检测器,UV 254nm。得到554.4mg(产率19%)化合物4,呈白色固体。

[0035] 对制备的化合物4进行ESI-MS等标准,结果如下:

[0036] LC-MS: (ES, m/z) : 362.25 [M+H]⁺

[0037] ¹H-NMR: (300MHz, DMSO-d₆, ppm) : δ 8.50 (s, 1H), 7.80 (d, J=8.1Hz, 1H), 7.30 (t, J=7.5Hz, 1H), 7.15 (d, J=7.2Hz, 1H), 5.89 (d, J=6.3Hz, 1H), 5.49 (d, J=6.6Hz, 1H), 5.23 (d, J=4.8Hz, 1H), 5.12 (t, J=5.1Hz, 1H), 4.42-4.36 (q, 1H), 4.14-4.10 (q, 1H), 3.98 (d, d,

$J=3.3\text{Hz}$, 1H), 3.66-3.58 (m, 4H), 3.10 (t, $J=4.8\text{Hz}$, 2H), 1.59 (s, 4H), 1.42 (s, 2H) .

[0038] $[\alpha] = -17.560$ (C=0.41g/100mL, T=24.8°C, MeOH)

[0039] 实验例5化合物4抗肿瘤细胞增殖活性评价。

[0040] (1) 受试样品:

[0041] 本发明的化合物4均用含0.1%DMSO的培养基配制成所需浓度。

[0042] (2) 细胞株:

[0043] MCF-7 (人乳腺癌细胞, ATCC:HTB-22)、SK-BR-3 (人乳腺癌细胞, ATCC:HTB-30)、HCT116 (人结肠癌细胞, ATCC:CCL-247)、U-118MG (人脑星形胶质母细胞瘤, ATCC:HTB-15)、U-87MG (人脑星形胶质母细胞瘤, ATCC:HTB-14)、MDA-MB-468 (人乳腺癌细胞, ATCC:HTB-132) 6株肿瘤细胞均购自美国标准菌种收藏所 (ATCC)。

[0044] (3) 主要仪器及材料

[0045] 超纯水仪:MILLIPORE Direct-Q 3;

[0046] 高压灭菌锅:HVE-50, Hirayama公司;

[0047] 数显恒温水浴锅:HH-4, 国华电器有限公司;

[0048] 超净台:VS-1300-U洁净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司;

[0049] 细胞孵育箱:HF151UVC02培养箱, 上海力申公司;

[0050] 低温离心机:上海安亭科学仪器厂

[0051] 酶标仪:ELx800, Biotek公司

[0052] 平板振荡器:ZD-9556, 太仓市科教器材厂;

[0053] 96孔细胞培养板、25cm²培养瓶:Corning Costar公司;

[0054] 2mL冻存管:Corning Costar公司;

[0055] (4) 主要试剂

[0056] RPMI-1640培养基:Gibco公司;DMEM培养基:Gibco公司;

[0057] L-15培养基:Gibco公司;McCoy's 5A培养基:Gibco公司;

[0058] MEM培养基:Gibco公司;PBS缓冲液:Gibco公司;

[0059] 胎牛血清:Gibco公司;0.25%胰酶溶液:Hyclone公司;

[0060] MTT (四噻唑蓝):Sigma公司, 溶于PBS溶液中, 制成5mg/mL的溶液, 过滤除菌后使用, 避光保存;

[0061] 阿霉素 (ADR):北京华丰联合技术有限公司。DMSO:二甲基亚砜, Sigma公司;

[0062] (5) 试验方法

[0063] MCF-7、U-118MG细胞选用DMEM培养基, U-87MG细胞选用MEM培养基、MDA-MB-468细胞选用L-15培养基, HCT 116细胞选用McCoy's 5A培养基, 其他细胞选用RPMI-1640培养基。培养基中均含10%灭活的胎牛血清和80U·mL⁻¹青霉素和0.08mg·mL⁻¹链霉素。

[0064] 将生长状态良好、处于对数生长期的MCF-7、SK-BR-3、HCT 116、U-118MG、U-87MG、MDA-MB-468细胞按 1×10^4 个/mL的密度接种于96孔板, 每孔100 μ l。置于37°C、5%CO₂培养箱中培养12小时待贴壁。加药细胞孔按预设的浓度梯度加入待测、经灭菌处理的溶于培养基的化合物4, 每孔200 μ l, 空白细胞孔加入等体积的培养基, 对照细胞孔按预设的浓度梯度加入等体积溶于培养基的阿霉素 (ADR), 平行6孔。在37°C、5%CO₂培养箱中培养48小时后, 每孔加入10 μ l浓度为5mg/mL的MTT溶液, 继续置于37°C、5%CO₂培养箱中培养4小时。小心吸出

上清液,每孔加入150 μ l DMSO溶解紫色残留物(甲瓩),平板振荡10分钟使沉淀全部溶解,于酶标仪上测定O.D.值(吸光度),波长570nm。

[0065] 按照公式“相对生存率 = (D含药 - D空白) / (D对照 - D空白) \times 100%”计算每一个样品浓度下的样品对肿瘤细胞的抑制率。

[0066] 实验平行重复3次,以抑制率对化合物浓度作图,计算本发明化合物4的IC₅₀(半数有效抑制浓度)值。同时采用阿霉素(ADR)作为阳性对照药物。

[0067] (6) 实验结果

[0068] 表1化合物4BI361抗肿瘤细胞增殖活性(IC₅₀ \pm SD μ M)

化合物	MCF-7	SK-BR-3	HCT 116	U-118 MG	U-87 MG	MDA-MB-468
ADR	3.98 \pm 0.07	4.65 \pm 0.02	26.57 \pm 0.12	13.49 \pm 1.75	82.47 \pm 7.15	2.45 \pm 0.31
化合物 4	33.57 \pm 5.26	27.82 \pm 4.33	42.79 \pm 5.03	10.18 \pm 2.04	26.59 \pm 4.91	27.62 \pm 5.69

[0070] 如表1所示,给出了化合物4抗肿瘤细胞增殖活性的测试结果,结果表明所制备的新型苯并咪唑衍生物对上述肿瘤细胞具有抑制作用,可用于制备抗肿瘤制剂。

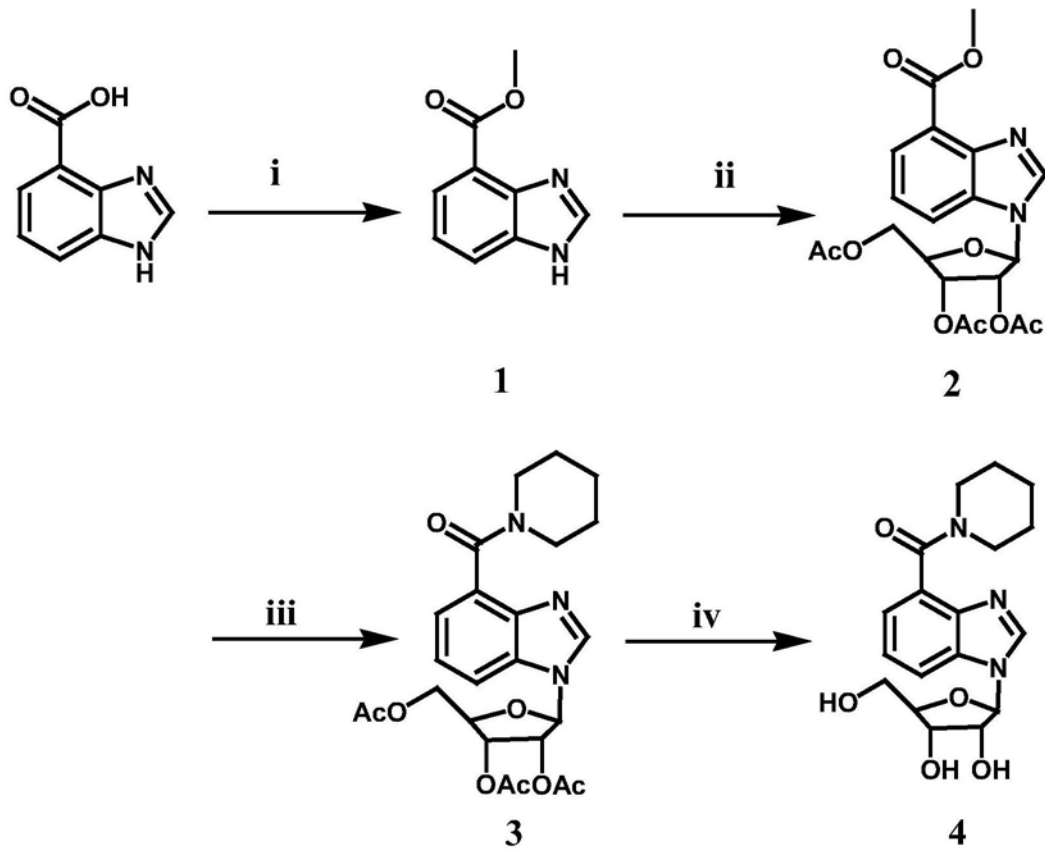


图1