

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2017 年 6 月 15 日 (15.06.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/096648 A1

(51) 国际专利分类号:

C07D 403/14 (2006.01) A61K 31/4184 (2006.01)
A61K 31/4178 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/497 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2015/098880

(22) 国际申请日: 2015 年 12 月 25 日 (25.12.2015)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201510916228.X 2015 年 12 月 10 日 (10.12.2015) CN

(71) 申请人: 深圳先进技术研究院 (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。

(72) 发明人: 栗武 (SU, Wu); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。 李红昌 (LI, Hongchang); 中国广东省深圳

市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。 房丽晶 (FANG, Lijing); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。 刘科 (LIU, Ke); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。 张建超 (ZHANG, Jianchao); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。 潘正银 (PAN, Zhengyin); 中国广东省深圳市南山区西丽大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。

(74) 代理人: 北京三友知识产权代理有限公司 (BEIJING SANYOU INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY LTD.); 中国北京市金融街 35 号国际企业大厦 A 座 16 层, Beijing 100033 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU,

[见续页]

(54) Title: PLK1 INHIBITOR AND PREPARATION METHOD AND USE THEREOF

(54) 发明名称: PLK1 抑制剂及其制备方法与应用

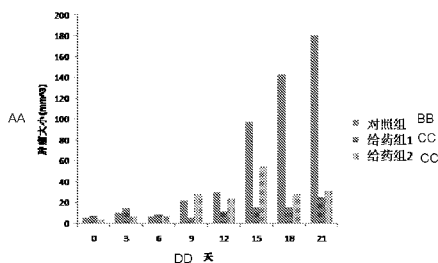
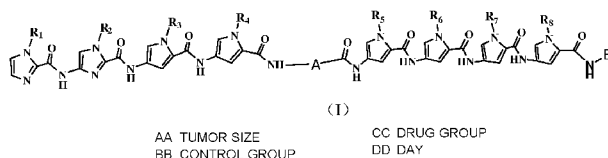


图 13



(I)

AA TUMOR SIZE
BB CONTROL GROUP
CC DRUG GROUP
DD DAY

(57) Abstract: The present invention provides a PLK1 inhibitor and a preparation method and a use thereof. The PLK1 inhibitor is a compound of general formula (I), or a stereoisomer or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein the groups in formula (I) are as defined in the description. The PLK1 inhibitor of the present invention can specifically bind with high affinity to a DNA sequence, as shown by SEQ ID NO: 1, in the transcription promoter region of a PLK1 gene to inhibit the transcription of the PLK1 gene and thus inhibit the expression of a PLK1 protein, resulting in inhibition of growth of tumor cells or apoptosis of the cells. Moreover, the PLK1 inhibitor of the present invention can pass through cell membranes and nuclear membranes and resist hydrolysis by nucleases. Further, the PLK1 inhibitor of the present invention overcomes the problem of drug resistance facing small-molecule kinase inhibitors.

(57) 摘要: 本发明提供 PLK1 抑制剂及其制备方法与应用, 所述 PLK1 抑制剂具有通式(I)所示的化合物、其立体异构体或药学上可接受的盐, 式(I)中的各基团的定义与说明书相同。本发明所述 PLK1 抑制剂能够特异性高强度的结合于 SEQ:NO:1 所示的 PLK1 基因转录启动子区域中的 DNA 序列, 抑制 PLK1 基因的转录, 抑制 PLK1 蛋白的表达, 造成肿瘤细胞生长抑制或凋亡, 并且其能够穿过细胞膜和核膜及抵抗核酸酶水解, 此外, 其还克服了小分子激酶抑制剂的耐药性难题。



WO 2017/096648 A1



LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

- (84) **指定国** (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

PLK1 抑制剂及其制备方法与应用

技术领域

本发明涉及 PLK1 抑制剂及其制备方法与应用，属于药物化学领域。

5 背景技术

PLK1 是 Polo-类激酶家族成员，是一类高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，参与细胞分裂过程中的中心体成熟、纺锤体形成以及染色体分离等过程，对细胞有丝分裂过程起重要的调控作用。研究发现，PLK1 在肺癌、乳腺癌及胃癌等多种恶性肿瘤中异常高表达，其过表达也是肿瘤不良预后的标志之一，但在正常细胞中其表达水平很低，有时甚至无法测出。因此，PLK1 在肿瘤诊断和治疗中是广受关注的靶点。

应用反义技术、小分子 RNA 干扰技术或小分子抑制剂敲除肿瘤细胞中表达 PLK1 的基因或抑制 PLK1 的活性，能造成肿瘤细胞生长抑制甚至凋亡。已有研究证明，反义寡核苷酸或小分子干扰 RNA，能特异性地降低 PLK1 的表达，但对正常细胞没有明显影响。也有研究报道从有机合成的化学小分子或天然产物中筛选 PLK1 的化学小分子抑制剂，如 ON01910、BI2536、HMN-214、GSK461364 等，可通过与 ATP 竞争性或非竞争性结合来抑制 PLK1 活性，这些小分子抑制剂部分已进入临床研究阶段。

然而，反义寡核苷酸易被核酸酶水解，有效作用时间短；小分子 RNA 干扰技术也存在安全性、稳定性的问题。此外，寡核苷酸以及小分子 RNA 都难以穿透细胞膜，跨膜运输的问题一直难以解决。因此，目前主要的研究方向是从有机合成的化学小分子或天然产物中筛选 PLK1 的化学小分子抑制剂。然而，目前成功上市用于肿瘤治疗的小分子激酶抑制剂都存在一个共同的弱点——产生耐药性。由于肿瘤细胞能够在治疗过程中很快产生突变，从而使激酶对小分子抑制剂的结合力下降，使其对小分子抑制剂的治疗不敏感，因而产生耐药性，PLK1 的化学小分子抑制剂具有同样的耐药性问题。

因此，开发新型的 PLK1 抑制剂是本领域亟需解决的技术问题之一。

25 发明内容

本发明的目的之一在于提供一类新型的 PLK1 抑制剂。

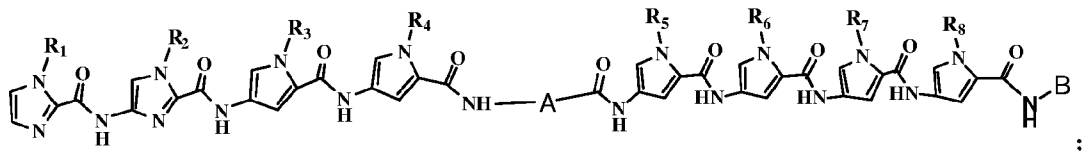
本发明的另一目的在于提供所述 PLK1 抑制剂的制备方法。

本发明的再一目的在于提供含有所述 PLK1 抑制剂的组合物。

30 本发明的再一目的在于提供所述 PLK1 抑制剂或含有所述 PLK1 抑制剂的组合物的应用。

为实现上述目的，一方面，本发明提供通式 (I) 所示的化合物、其立体异构体或药学上可接受的盐：

2



式 (I)

其中:

$R_1 \sim R_8$ 各自独立地为氢或 C_{1-3} 烷基; 优选地, $R_1 \sim R_8$ 均为甲基

5 A 为 $-(CH_2)_m-$, 在 A 中, 任意 CH_2 上的氢原子被 C_{1-3} 烷基、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-O-(C=O)-R_9$ 或 $-NH-(C=O)-R_9$ 所取代;

B 为 $-(CH_2)_n-CH_3$, 在 B 中, 任意 CH_2 或 CH_3 上的氢原子被 C_{1-3} 烷基、 $-OR_{11}$ 或 $-NR_{10}R_{11}$ 所取代;

优选地, 所述 A 为 $-\{CH_2\}_{m-1}-R_{12}$, 所述 R_{12} 选自 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-O-(C=O)-R_9$ 或 $-NH-(C=O)-R_9$;

10 更优选地, A 为 $-\{CH_2\}_{m-1}-R_{12}$ 或 $-\{CH_2\}_{m-1}-R_{12}$;

优选地, 所述 B 为 $-\{CH_2\}_n-CH_2-O-R_{11}$ 或 $-\{CH_2\}_n-CH_2-N(R_{10})-R_{11}$;

R_9 为 $-(CH_2)_p-X-$ 或 $-(CH_2)_p-Y-$, 其中 X 或 Y 为 O 、 NH 或 NR_{22} , 且 $R_{13} \sim R_{15}$ 各自独立地为 H 、卤素、 C_{1-3} 烷基;

R_{10} 为 C_{1-3} 烷基;

R_{11} 为 C_{1-6} 烷基或 R_{17} ;

15 R_{17} 为 $-(CH_2)_{p'}-Y-C(=O)-$ 或 $-(CH_2)_{p'}-Y-C(=O)-$, 其中 Y 为 O 、 NH 或 NR_{22} , 且 $R_{13} \sim R_{15}$ 各自独立地为 H 、卤素、 C_{1-3} 烷基;

在 R_9 或 R_{17} 中, 任意 CH_2 上的氢原子被 0~2 个 C_{1-6} 烷基、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、卤素、 $-OR_{19}$ 、 $-NHR_{20}$ 或 $-NR_{20}R_{21}$ 所取代;

X 或 Y 各自独立地为 O 、 NH 或 NR_{22} ,

20 $R_{13} \sim R_{15}$ 各自独立地为 H 、卤素、 C_{1-3} 烷基;

R_{16} 为 C_{1-6} 烷基; 优选地, R_{16} 为甲基、乙基、正丙基、异丙基、一氟甲基、二氟甲基或三氟甲基;

3

R_{18} 为氢、卤素、 C_{1-3} 烷基、羧基或硝基, 优选地, R_{18} 为羧基;

所述 $R_{19} \sim R_{22}$ 各自独立地为 C_{1-3} 烷基;

所述 C_{1-6} 烷基或所述 C_{1-3} 烷基被 0~3 个卤素取代, 优选被 0~3 个氟取代;

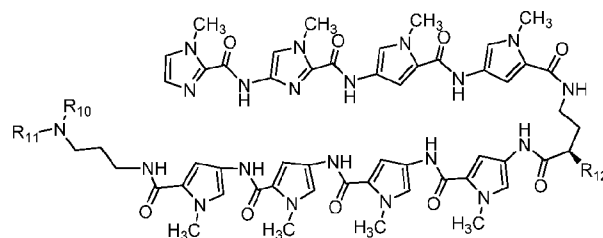
p 、 p' 各自独立地选自 0、1、2、3 或 4; 优选地, p 、 p' 各自独立地为 1、2、3 或 4;

5 q 、 q' 、 r 、 r' 、 s 、 s' 各自独立地选自 0、1、2、3 或 4; 优选地, q 、 q' 、 r 、 r' 、 s 、 s' 均为 0;

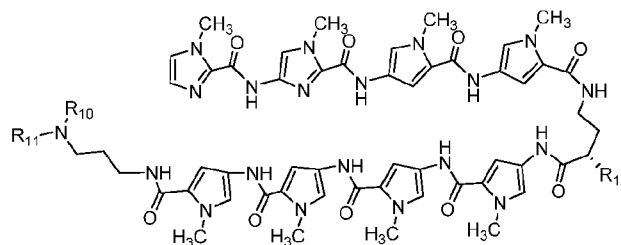
t 选自 0、1、2、3 或 4; 优选地, t 为 1。

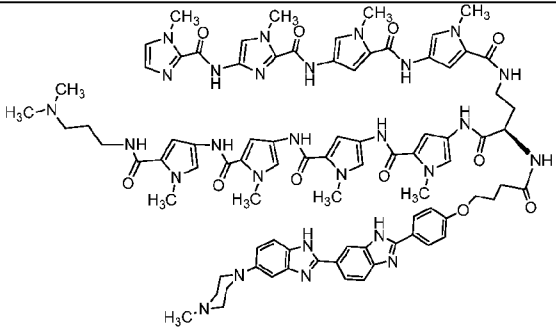
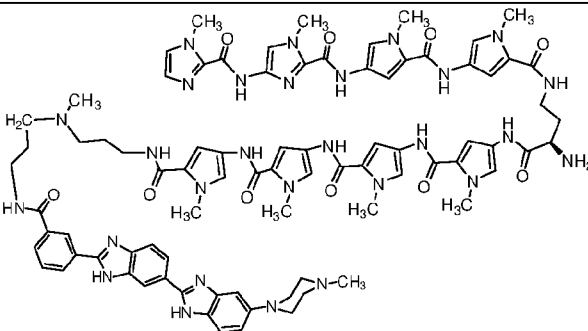
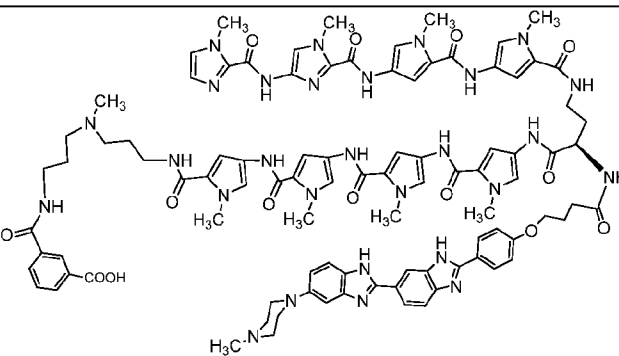
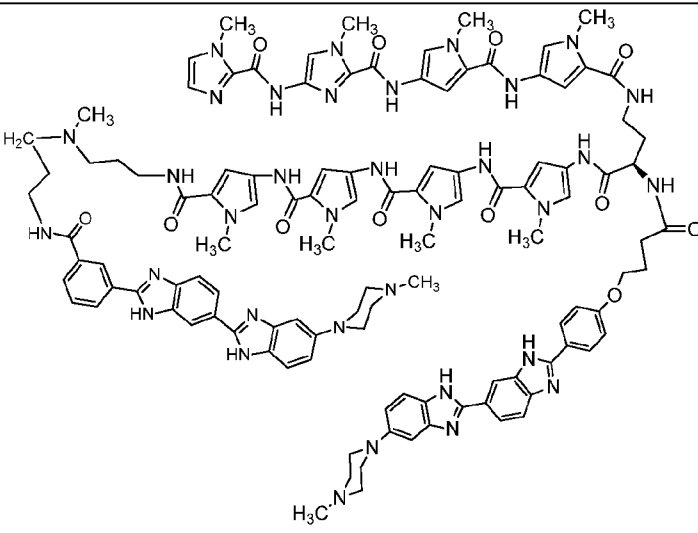
本发明通式 (I) 所示的化合物为吡咯-咪唑类聚酰胺化合物能够特异性识别且高强度的结合于 SEQ IN NO:1 所示的 PLK1 基因转录启动子区域中的 DNA 序列, 抑制 PLK1 基因的转录, 抑制 PLK1 蛋白的表达, 造成肿瘤细胞生长抑制或凋亡。本发明通式 (I) 所示的化合物能够穿过细胞膜和核膜, 特异性地识别 PLK1 基因转录启动子序列, 并且其属于聚酰胺类化合物, 现有技术 (Single-dose pharmacokinetic and toxicity analysis of pyrrole-imidazole polyamides in mice, Synold, Timothy W.; Xi, Bixin; Wu, Jun; et al, CANCER CHEMOTHERAPY AND PHARMACOLOGY Volume: 70 Issue: 4 Pages: 617-625, Published: OCT 2012) 表明这类结构能够抵抗核酸酶水解, 因此本发明通式 (I) 所示的化合物还能够抵抗核酸酶的水解。因此, 本发明通式 (I) 所示的吡咯-咪唑类聚酰胺化合物克服了寡核苷酸以及小分子 RNA 有效作用时间短和跨膜运输的问题。此外, 本发明通式 (I) 所示的吡咯-咪唑类聚酰胺直接作用于 PLK1 基因转录启动子区域中的序列, 不同于小分子抑制剂作用于激酶蛋白分子, 因此克服了小分子激酶抑制剂的耐药性难题。

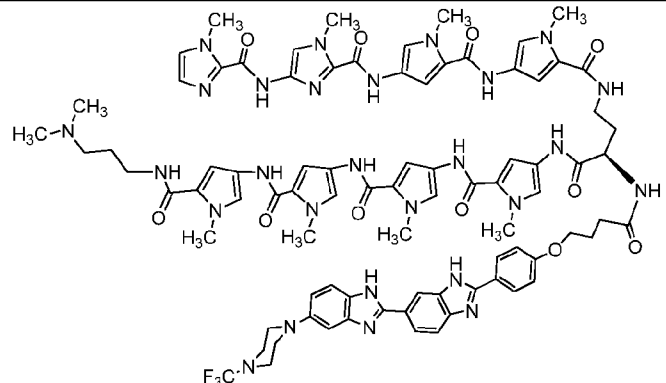
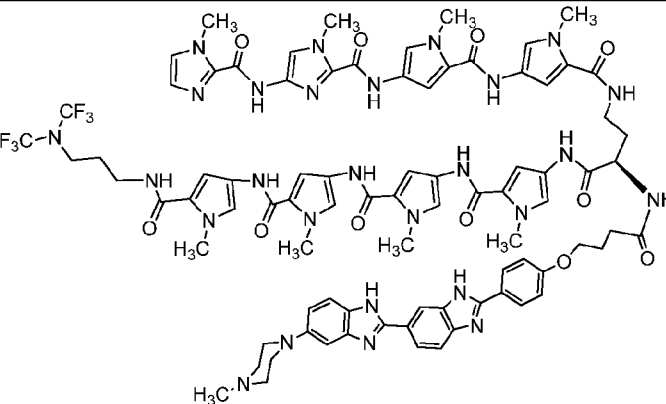
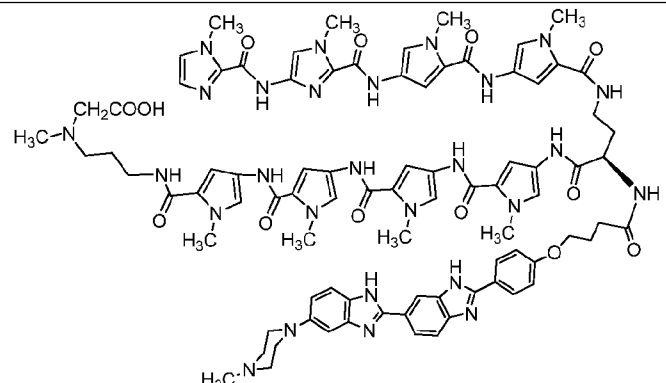
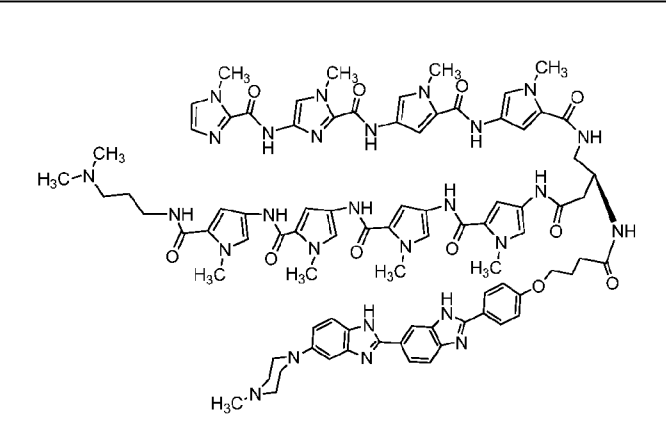
20 优选地, 在本发明所述的通式 (I) 所示的化合物、其立体异构体或药学上可接受的盐中, 所述化合物具有式 (II) ~ 式 (V) 所示的结构:



式 (II)



化合物 2	
化合物 3	
化合物 4	
化合物 5	

化合物 6	
化合物 7	
化合物 8	
化合物 9	

本发明所述C₁₋₃烷基包括甲基、乙基、正丙基或异丙基；所述C₁₋₆烷基表示碳原子数为1~6的直链或直链烷基，包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、仲戊基、正己基或异己基等。

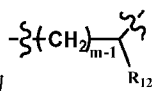
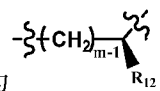
本发明所述C₁₋₆烷基或所述C₁₋₃烷基被0~3个卤素取代表示如上所述的C₁₋₃烷基或C₁₋₆烷基中的氢被0~3个卤素原子取代，例如-CH₂F、-CHF₂、-CF₃、-CH₂FCH₃、-CHF₂CH₃、-CF₂CH₂CH₃等。

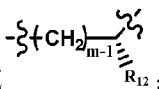
另一方面，本发明提供所述的通式(I)所示的化合物、其立体异构体或药学上可接受的盐的制备方法，其中，所述方法包括如下步骤：

(a) 制备苯肼树脂负载的式(IV)树脂；

式(IV)

A'为-(CH₂)_m-, 在A中，任意CH₂上的氢原子被-OP_{OH}、-NHP_{NH}所取代；

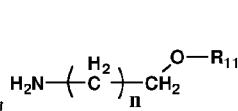
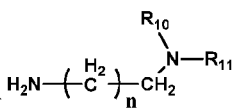
优选地，所述A'为 ，所述R₁₂为-OP_{OH}或-NHP_{OH}；更优选地，A'为 

或 ；

(b) 脱除式(IV)中的P_{OH}或P_{NH}；

(c) 以氧化剂及切割剂进行氧化反应及切割反应以制得式(I)所示的化合物；

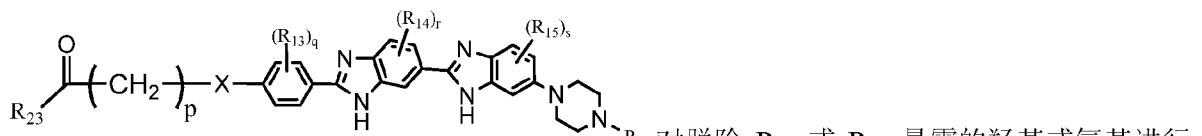
所述切割剂为NH₂-(CH₂)_n-CH₃，在切割剂中，任意CH₂或CH₃上的氢原子被-OR₁₁或-NR₁₀R₁₁所取代；

优选地，所述切割剂为  或 ；

优选地，所述氧化剂为醋酸铜、N-溴代丁二酰亚胺和氧气中的一种或多种的组合；

A'及切割剂中各基团的定义与本发明相同，P_{OH}、P_{NH}分别表示羟基保护基及氨基保护基；
优选地，所述P_{OH}、P_{NH}为Boc、Fmoc、Cbz、Trt或Allyl，更优选Fmoc。

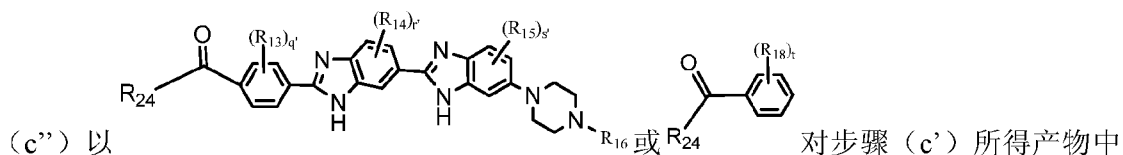
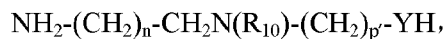
根据本发明的具体实施方案，在本发明方法中，在步骤(b)与步骤(c)之间以



缩合反应以形成-O-(C=O)-R₉或-NH-(C=O)-R₉的步骤；所述R₂₃为羟基或卤素。

根据本发明的具体实施方案，在本发明方法中，所述方法中的步骤(c)被步骤(c')所替代，并且在步骤(c')之后进一步包括步骤(c'')；

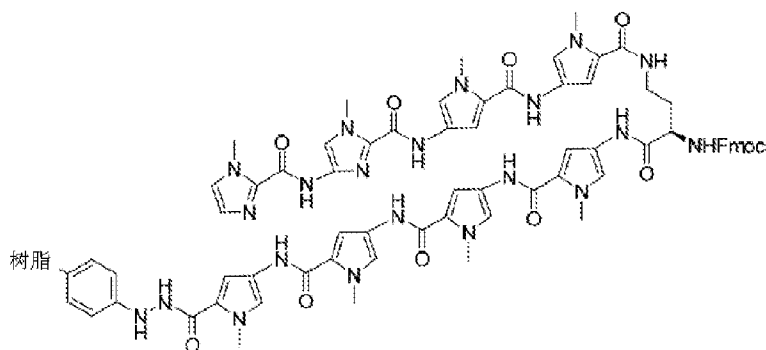
(c') 以氧化剂及切割剂进行氧化反应及切割反应；所述切割剂为



的 YH 进行缩合反应后以制得式 (I) 所示的所述的化合物; R_{24} 为羟基或卤素;

选择性地, 在步骤 (b) 与步骤 (c') 之间, 将脱除 P_{OH} 或 P_{NH} 暴露的羟基或氨基以 P_{OH}' 或 P_{NH}' 进行保护, 所述 P_{OH}' 或 P_{NH}' 为可耐受碱性条件的羟基保护基或氨基保护基; 并在步骤 (c'') 进行缩合反应之后脱除 P_{OH}' 或 P_{NH}' 以制得式 (I) 所示的所述的化合物; 优选地, 所述 P_{OH}' 或 P_{NH}' 为叔丁氧羰基。

根据本发明的具体实施方案, 在本发明方法中, 所述式 (VI) 为式 (VI-1);

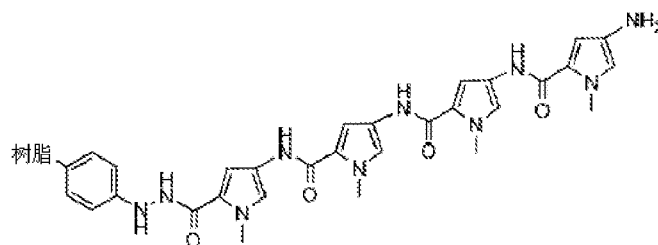


10

式 (VI-1)

优选地, 式 (VI-1) 按如下路线制备:

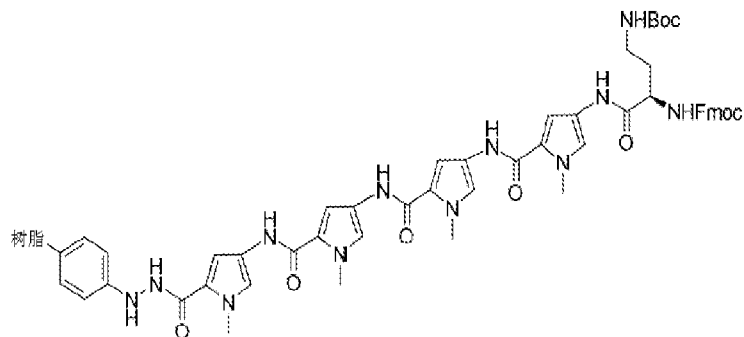
(1) 以苯肼树脂以及 4-叔丁氧羰基氨基-1-甲基-1H-吡咯-2-羧酸为原料经重复缩合及脱叔丁氧羰基保护基制得式 (1) 所示的化合物:



式 (1)

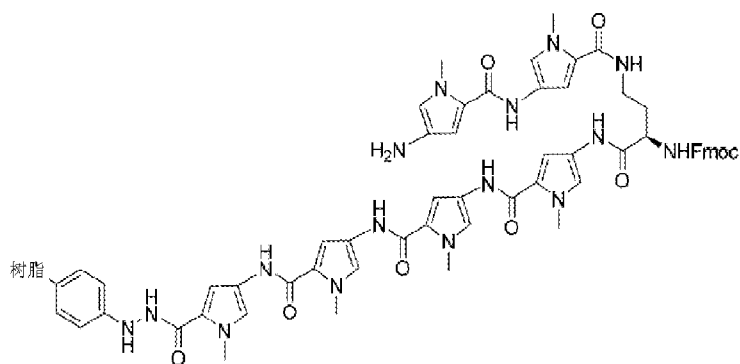
15

(2) 以式 (1) 所示的化合物与 R-2-(9-苄氧羰基氨基)-4-叔丁氧羰基氨基丁酸进行缩合反应制得式 (2) 所示的化合物;



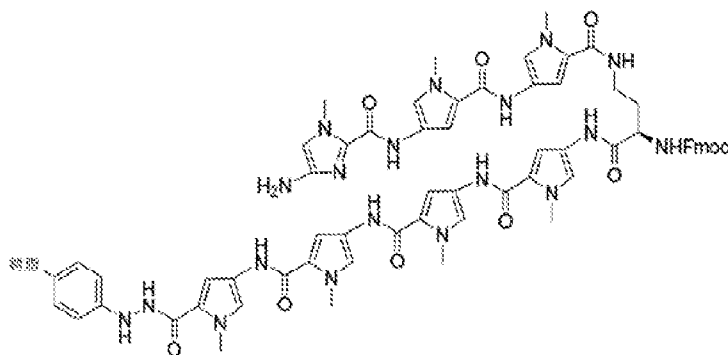
式 (2)

(3) 式 (2) 所示的化合物脱除叔丁氧羰基保护基后与 4-叔丁氧羰基氨基-1-甲基-1*H*-吡咯-2-羧酸进行缩合反应, 重复脱叔丁氧羰基保护基及缩合反应制得式 (3) 所示的化合物:



式 (3)

5 (4) 以式 (3) 所示的化合物与 4-叔丁氧羰基氨基-1-甲基-1*H*-咪唑-2-羧酸进行缩合反应并脱除叔丁氧羰基保护基得式 (4) 所示的化合物:



式 (4)

(5) 以式 (4) 所示的化合物与1-甲基-1*H*-咪唑-2-羧酸进行缩合反应制得式 (VI-1) 所示的化合物。

10 本发明对上述路线中缩合反应以及脱叔丁氧羰基保护基反应的条件不作限定。

再一方面, 本发明提供药物组合物, 其包含有效剂量的本发明所述的通式 (I) 所示的化合物、其立体异构体或药学上可接受的盐, 或进一步包含一种或多种药学上可接受的载体或赋

形剂。

再一方面，本发明提供所述的通式 (I) 所示的化合物、其立体异构体或药学上可接受的盐或所述的药物组合物在制备治疗或预防细胞过度增殖性疾病的药物中的应用。

优选地，所述的细胞过度增殖性疾病包括结肠癌、直肠癌、脑瘤、肺癌、表皮鳞癌、膀胱癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫内膜癌、结直肠癌、肾细胞癌、胃癌、食管腺癌、食管鳞状细胞癌、非霍奇金淋巴瘤、肝癌、皮肤癌、甲状腺癌、头颈癌、前列腺癌、神经胶质瘤及鼻咽癌中的一种或多种；更优选地，所述的细胞过度增殖性疾病包括乳腺癌、肺癌或胃癌。

综上所述，本发明提供了一种新型的PLK1抑制剂以及制备方法与应用。该PLK1抑制剂能够特异性高强度的结合于SEQ:NO:1所示的PLK1基因转录启动子区域中的DNA序列，抑制PLK1基因的转录，抑制PLK1蛋白的表达，造成肿瘤细胞生长抑制或凋亡。并且其能够穿过细胞膜和核膜及抵抗核酸酶水解。此外，其还克服了小分子激酶抑制剂的耐药性难题。

本发明中的缩写具有如下意义：

PLK1: Polo-Like Kinase1, 保罗样激酶 1; BOC: t-butyloxycarbonyl, 叔丁氧羰基;

Fmoc: fluorenylmethyloxycarbonyl, 芴甲氧羰基; HOAt: 1-羟基-7-偶氮苯并三氮唑; DMF: N,N-二甲基甲酰胺; THF: 四氢呋喃; DIEA: N,N-二异丙基乙胺; TFA: 三氟乙酸; PyBOP: 六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷。

附图说明

图 1 为化合物 1~5 的合成路线图;

图 2 为化合物 1 的 HRMS 图谱;

图 3 为化合物 2 的 HRMS 图谱;

图 4 为化合物 3 的 HRMS 图谱;

图 5 为赫斯特酸衍生物 Ht-2 的 HNMS 图谱;

图 6 为化合物 4 的 HRMS 图谱;

图 7 为化合物 5 的 HRMS 图谱;

图 8 为化合物 2 穿透细胞膜与核膜的实验结果图;

图 9 为化合物 2 抑制 Hela 细胞 PLK1 蛋白表达实验结果图;

图 10 为化合物 2 抑制 Hela 细胞增殖的实验结果图;

图 11 为实施例 9 给药组的给药剂量和频率示意图;

图 12~图 14 为实施例 9 化合物 2 抑制非小细胞肺癌肿瘤细胞在荷瘤小鼠中的增殖实验结果图。

具体实施方式

为了对本发明的技术特征、目的和有益效果有更加清楚的理解，现结合具体实施例及附图对本发明的技术方案进行以下详细说明，应理解这些实例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。

图1为化合物1~5的合成路线图，其由Fmoc保护的苯胍树脂为原料，经多步制得式(1)，随后依次制得式(2)~式(6)，最后根据式(5)或式(6)制得化合物1~5。

实施例1 化合物1的制备

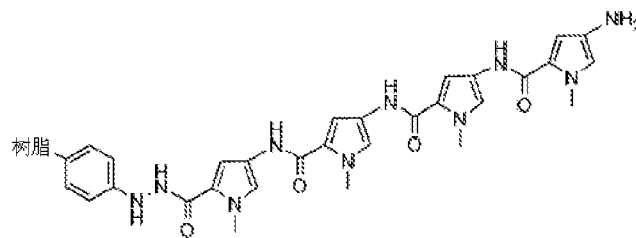
(a) 树脂溶胀：于一个10 mL的固相反应器中加入400 mg Fmoc保护的苯胍树脂（0.66 mmol/g，0.264 mmol）及3 mL CH_2Cl_2 ，将树脂溶胀30 min，抽除 CH_2Cl_2 ，备用；

(b) 脱除Fmoc保护基：将3 mL 20% 哌啶/DMF溶液加入步骤(a)溶胀后的树脂中， N_2 鼓泡混匀，10 min后，抽除溶剂，再加入3 mL 20% 哌啶/DMF溶液， N_2 鼓泡混匀，10 min后，用DMF (4×3 mL)洗涤树脂，再用3 mL无水DMF洗涤树脂，备用；

(c) 氨基酸缩合：将4-叔丁氧羰基氨基-1-甲基-1*H*-吡咯-2-羧酸（254 mg，1.056 mmol）和三光气（BTC，128 mg，0.433 mmol）溶于2 mL无水THF，向该溶液中缓慢滴加三甲基吡啶（collidine，488 μL ，3.696 mmol），反应立即产生大量白色沉淀，加完反应3 min，再加入2 mL DIEA/DMF溶液(5%, v/v)，白色沉淀完全消失，将该反应液转移到步骤(b)脱除保护基的苯胍树脂中， N_2 鼓泡混匀，缩合反应0.5~1h，抽除反应液，用DMF (4×3 mL)洗涤树脂，备用；

(d) 脱除叔丁氧羰基保护基：用 CH_2Cl_2 (2×3 mL) 洗涤，抽除 CH_2Cl_2 ，加入3.0 mL TFA/苯酚/ H_2O (v:v:v=92:5:2.5)混合溶液脱除步骤(b)所得缩合产物上的叔丁氧羰基保护基，2 min后抽除溶剂，再次加入3.0 mL TFA/苯酚/ H_2O (v:v:v=92:5:2.5)混合溶液反应20 min，用 CH_2Cl_2 (2×3 mL) 及DMF (4×3 mL)洗涤树脂，再用3 mL无水DMF洗涤树脂，备用；

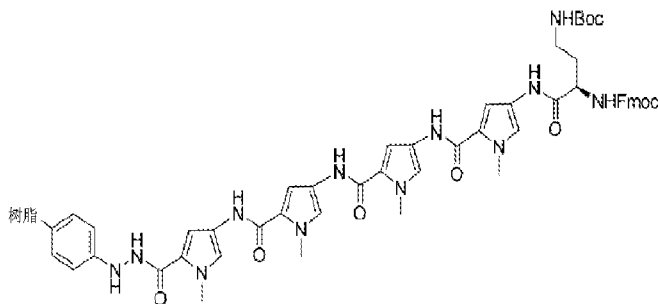
重复上述缩合及脱保护步骤(c)和(d)，直至完成式(1)所示的负载在苯胍树脂上的肽的合成；



式(1)

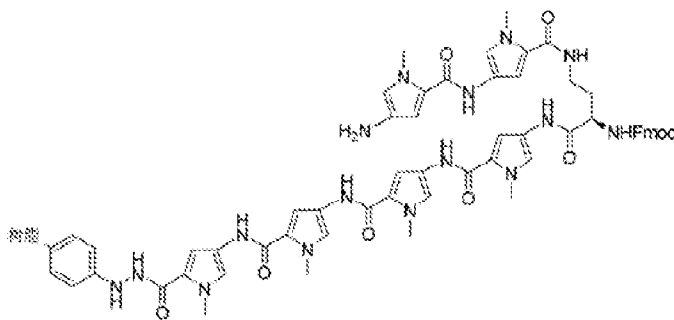
(e) γ -氨基酸的缩合：将R-2-(9-苄氧羰基氨基)-4-叔丁氧羰基氨基丁酸（465 mg，1.056 mmol）和三光气（128 mg，0.433 mmol）溶于2 mL无水THF，向该溶液中缓慢滴加三甲基吡啶（488 μL ，3.696 mmol），反应立即产生大量白色沉淀，加完反应1 min，加入HOAt（144 mg，1.056 mmol），再加入2 mL DIEA/DMF溶液(5%, v/v)，反应5 min，白色沉淀完全消失，将该反

应液转移到式(1)所示的负载在苯胼树脂上的直链肽($\text{NH}_2\text{-Py-Py-Py-Py-苯胼树脂}$)中, N_2 鼓泡混匀, 缩合反应0.5~1h, 抽除反应液, 用DMF ($4\times 3\text{ mL}$)洗涤树脂, 得到式(2)所示的负载在苯胼树脂上的肽;



式(2)

- 5 (f) 重复脱保护及缩合步骤(d)和(c), 其中, 直至完成得到式(3)所示的负载在苯胼树脂上的肽的合成;

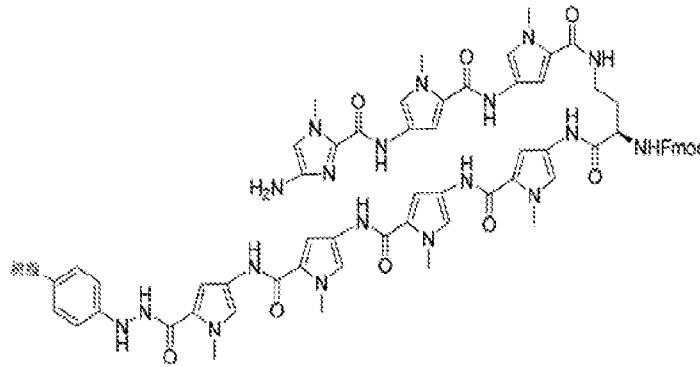


式(3)

- (g) 氨基酸缩合: 将4-叔丁氧羰基氨基-1-甲基-1*H*-咪唑-2-羧酸(255 mg, 1.056 mmol)和三光气(128 mg, 0.433 mmol)溶于1 mL无水THF, 向该溶液中缓慢滴加三甲基吡啶(488 μL , 3.696 mmol), 反应立即产生大量白色沉淀, 加完反应3 min, 加入HOAt(144 mg, 1.056 mmol),
10 再加入2 mL DIEA/DMF溶液(5%, v/v), 白色沉淀完全消失, 将该反应液转移到步骤(f)所得式(3)所示的负载在苯胼树脂上的肽中, N_2 鼓泡混匀, 缩合反应0.5~1h, 抽除反应液, 用DMF ($4\times 3\text{ mL}$)洗涤树脂, 备用;

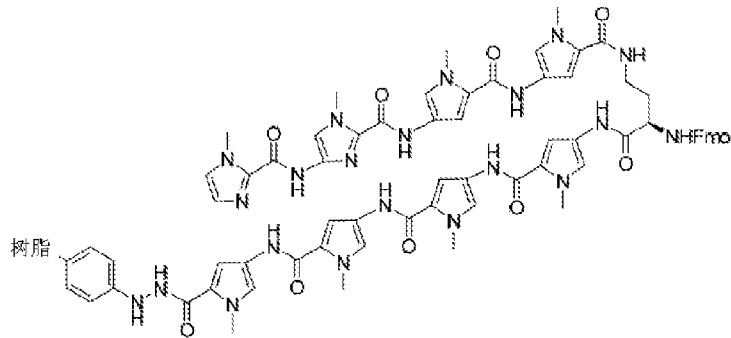
- (h) 脱除叔丁氧羰基保护基: 用 CH_2Cl_2 ($2\times 3\text{ mL}$)洗涤, 抽除 CH_2Cl_2 , 加入3.0 mL TFA/苯酚/ H_2O (v:v:v=92:5:2.5)混合溶液脱除步骤(g)所得产物上的叔丁氧羰基保护基, 2 min后抽除溶剂, 再次加入3.0 mL TFA/苯酚/ H_2O (v:v:v=92:5:2.5)混合溶液反应20 min, 用 CH_2Cl_2 ($2\times 3\text{ mL}$)及DMF ($4\times 3\text{ mL}$)洗涤树脂, 再用3 mL无水DMF洗涤树脂, 得式(4)所示的负载在苯胼树脂上的肽;

13



式 (4)

(i) 末端氨基酸的缩合: 将1-甲基-1*H*-咪唑-2-羧酸 (132 mg, 1.056 mmol) 和 PyBOP (550 mg, 1.056 mmol) 溶于3 mL无水DMF, 加入DIEA (350 μ L, 2.112 mmol), 反应5 min, 将该反应液转移到步骤 (h) 所得的式 (4) 所示的负载在苯胼树脂上的肽中, N₂鼓泡混匀, 缩合反应 2h, 抽除反应液, 用DMF (4 $\times$ 3 mL)洗涤树脂, 得到式 (5) 所示的负载在苯胼树脂上的肽;



式 (5)

(j) 化合物1的合成

采用步骤 (b) 中的方法脱除式 (5) 所示的负载在苯胼树脂上的肽中的Fmoc保护基后, 将树脂取出, 加入1 mL DMF、200 μ L 二甲氨基丙胺及10 mg Cu(OAc)₂, 室温振摇反应12h, 将树脂滤除, 并用20 mL CH₂Cl₂洗涤树脂; 将有机相浓缩, 残留物用半制备型HPLC纯化: 10% 乙腈-H₂O (含1%的TFA)等梯度洗脱5min, 10%至100%的乙腈-H₂O (含1%的TFA) 梯度洗脱 25min, 保留时间T_R=15min, 收集产物, 冷冻干燥, 得到淡黄色固体化合物1, 其HRMS如图2 所示。

HRMS (ESI) *m/z*: 理论计算值C₅₅H₆₈N₂₁O₉ [M+H]⁺ 1166.5503 实测:1166.5508。

实施例 2 化合物 2 的制备

按实施例1同样的步骤制得式 (5) 所示的负载在苯胼树脂上的肽, 并采用实施例1中的步骤 (b) 脱除式 (5) 所示的负载在苯胼树脂上的肽中的Fmoc保护基;

将赫斯特酸衍生物Ht-1 (539 mg, 1.056 mmol) 和 PyBOP (550 mg, 1.056 mmol) 溶于3 mL 无水DMF, 加入DIEA (350 μ L, 2.112 mmol), 反应5 min, 将该反应液转移到脱除Fmoc的式 (5)

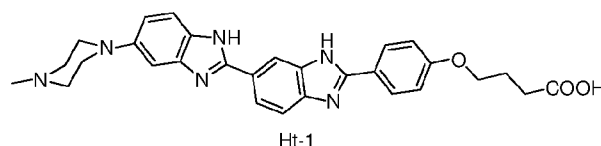
所示的负载在苯胼树脂上的肽中, N₂鼓泡混匀, 缩合反应1 h, 抽除反应液, 用DMF (4 × 3 mL) 洗涤树脂; 将树脂取出, 加入1 mL DMF、200 μL 二甲氨基丙胺及10 mg Cu(OAc)₂, 室温振摇反应12h, 将树脂滤除, 并用20 mL CH₂Cl₂洗涤树脂; 将有机相浓缩, 残留物用半制备型HPLC纯化: 10% 乙腈-H₂O (含1%的TFA)等梯度洗脱5min, 10%至100%的乙腈-H₂O (含1%的TFA) 5 梯度洗脱25min, 保留时间T_R=18.5 min, 收集产物, 冷冻干燥, 得到淡黄色固体化合物2, 其HRMS如图3所示。

HRMS (ESI) *m/z*: 理论计算值C₈₄H₉₆N₂₇O₁₁ [M+H]⁺ 1658.7777, 实测:1658.7774.

C₈₄H₉₇N₂₇O₁₁²⁺;

赫斯特酸衍生物Ht-1的结构如下 (制备方法参见 *J. AM. CHEM. SOC.* **2004**, *126*,

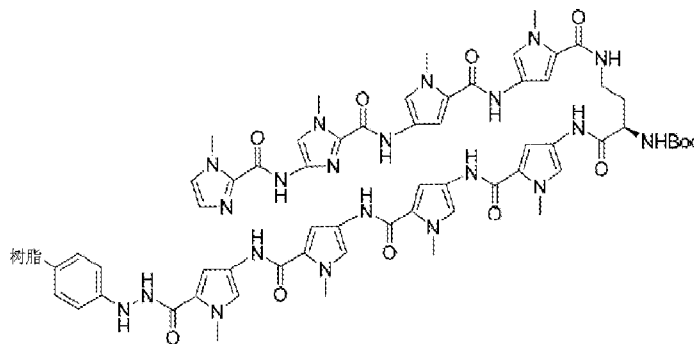
10 3736-3747) :



实施例 3 化合物 3 的制备

按实施例1同样的步骤制得式 (5) 所示的负载在苯胼树脂上的肽, 并采用实施例1中的步骤 (b) 脱除式 (5) 所示的负载在苯胼树脂上的肽中的Fmoc保护基;

15 将Boc₂O (243 μL, 1.056 mmol) 溶于3 mL无水DMF, 加入DIEA (350 μL, 2.112 mmol), 将该反应液转移到脱除Fmoc的式 (5) 所示的负载在苯胼树脂上的肽中, N₂鼓泡混匀, 缩合反应20 min. 抽除反应液, 用DMF (4 × 3 mL)洗涤树脂, 得到Boc保护的式 (6) 所示的负载在苯胼树脂上的肽;



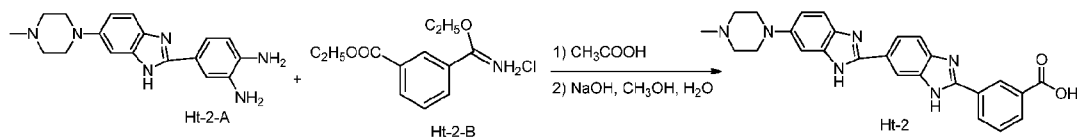
式 (6)

20 将以上所得树脂取出, 加入1 mL DMF、200 μL N,N-双 (3-氨基丙基) 甲胺, 90℃振摇反应1h, 冷至室温, 将树脂滤除, 并用20 mL CH₂Cl₂洗涤树脂; 将有机相浓缩, 残留物用半制备型HPLC纯化: 10% 乙腈-H₂O (含1%的TFA)等梯度洗脱5min, 10%至100%的乙腈-H₂O (含1%的TFA) 梯度洗脱25min, 保留时间T_R= 16 min, 收集产物, 冷冻干燥, 得到淡黄色固体, 备用;

取上述固体4 mg (3 μ mol) 溶于0.5 mL无水DMF, 加入赫斯特酸衍生物Ht-2 (2.7 mg, 6 μ mol)、PyBOP (3.1 mg, 6 μ mol) 和 DIEA (5 μ L, 30 μ mol), 室温振摇反应 2 h, 用半制备型HPLC纯化: 10% 乙腈-H₂O (含1%的TFA)等梯度洗脱5min, 10%至100%的乙腈-H₂O (含1%的TFA) 梯度洗脱25min, 保留时间 T_R = 18 min, 收集产物, 冷冻干燥得固体; 将该固体溶于1 mL CH₂Cl₂, 冰浴下加入1 mL TFA, 0°C反应1 h, 加入20 mL冷的乙醚, 离心收集沉淀, 用半制备型HPLC纯化: 10% 乙腈-H₂O (含1%的TFA)等梯度洗脱5min, 10%至100%的乙腈-H₂O (含1%的TFA) 梯度洗脱25min, 保留时间 T_R = 17 min, 收集产物, 冷冻干燥, 得到淡黄色固体产物化合物 3, 其HRMS如图4所示。

HRMS (ESI) m/z : 理论计算值 C₈₃H₉₅N₂₈O₁₀ [M+2H]²⁺ 822.3926, 实测822.3934.

赫斯特酸衍生物Ht-2的结构及合成路线如下:



将Ht-2-B (11.4 g, 44.2 mmol)与4-(5-(4-甲基哌嗪-1-基)-1H-苯并[d]咪唑-2-基)苯-1,2-二胺 (Ht-2-A, 10 g, 31.0 mmol, 制备方法参见 *Inorg. Chem.* **1998**, 37, 6018- 6022) 溶于乙酸 (100 mL) 中, 油浴加热回流反应4小时。减压蒸除乙酸, 冷却至室温, 柱层析纯化, 得到草绿色固体。将所得产物溶于甲醇 (100 ml), 磁力搅拌, 氮气保护, 冰水浴冷却, 缓慢滴加3.1g氢氧化钠的50ml水溶液, 滴毕, 室温反应8h, TLC检测反应完全, 蒸除甲醇, 稀盐酸调pH酸性, 析出固体, 过滤, 干燥, 得黄绿色固体Ht-2, 其HNMR分别如图5所示。

HNMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): 2.44 (s, 3H), 2.79 (s, 2H), 3.23 (s, 2H), 6.96 (m, 1H), 7.05 (br s, 1H), 7.47 (m, 1H), 7.69-7.73 (m, 2H), 8.08 (m, 1H), 8.33-8.49 (m, 2H), 8.83 (s, 1H), 12.73 (br s, 1H), 13.41 (br s, 1H)。MS (ES): 453.2 [(M+H)⁺].

实施例 4 化合物 4 的制备

按实施例1同样的步骤制得式 (5) 所示的负载在苯胍树脂上的肽, 并采用实施例1中的步骤 (b) 脱除式 (5) 所示的负载在苯胍树脂上的肽中的Fmoc保护基;

将实施例2中的赫斯特酸衍生物Ht-1 (539 mg, 1.056 mmol) 和 PyBOP (550 mg, 1.056 mmol) 溶于3 mL无水DMF, 加入DIEA (350 μ L, 2.112 mmol), 反应5 min, 将该反应液转移到脱除Fmoc的式 (5) 所示的负载在苯胍树脂上的肽中, N₂鼓泡混匀, 缩合反应1 h, 抽除反应液, 用DMF (4 $\times$ 3 mL)洗涤树脂; 将树脂取出, 加入1 mL DMF、200 μ L N,N-双 (3-氨基丙基) 甲胺及10 mg Cu(OAc)₂, 室温振摇反应12h, 将树脂滤除, 并用20 mL CH₂Cl₂洗涤树脂; 将有机相浓缩, 残留物用半制备型HPLC纯化: 10% 乙腈-H₂O (含1%的TFA)等梯度洗脱5min, 10%至100%的乙

腈-H₂O (含1%的TFA) 梯度洗脱25min, 保留时间 T_R = 17 min, 收集产物, 冷冻干燥, 得固体, 备用;

将 3.4 mg 上述所得固体 (2 μ mol) 溶于 0.5 mL 无水 DMF, 加入间苯二甲酸 (3.3 mg, 20 μ mol)、PyBOP (10.4 mg, 20 μ mol) 和 DIEA (50 μ L, 300 μ mol), 室温振摇反应 2 h, 用半制备型 HPLC 纯化: 10% 乙腈-H₂O (含 1%的 TFA) 等梯度洗脱 5min, 10%至 100%的乙腈-H₂O (含 1%的 TFA) 梯度洗脱 25min, 保留时间 T_R = 18.0 min, 收集产物, 冷冻干燥, 得到淡黄色产物化合物 4; 其 HRMS 如图 6 所示。

HRMS (ESI) m/z : 理论计算值 $C_{94}H_{106}N_{28}O_{14}$ $[M+2H]^{2+}$ 925.4216, 实测 925.4209。

实施例 5 化合物 5 的制备

按实施例1同样的步骤制得式 (5) 所示的负载在苯胼树脂上的肽, 并采用实施例1中的步骤 (b) 脱除式 (5) 所示的负载在苯胼树脂上的肽中的Fmoc保护基;

将实施例2中的赫斯特酸衍生物Ht-1 (539 mg, 1.056 mmol) 和 PyBOP (550 mg, 1.056 mmol) 溶于3 mL无水DMF, 加入DIEA (350 μ L, 2.112 mmol), 反应5 min, 将该反应液转移到脱除Fmoc的式 (5) 所示的负载在苯胼树脂上的肽中, N₂鼓泡混匀, 缩合反应1 h, 抽除反应液, 用DMF (4 $\times$ 3 mL) 洗涤树脂; 将树脂取出, 加入1 mL DMF、200 μ L N,N-双 (3-氨基丙基) 甲胺及10 mg Cu(OAc)₂, 室温振摇反应12h, 将树脂滤除, 并用20 mL CH₂Cl₂洗涤树脂; 将有机相浓缩, 残留物用半制备型HPLC纯化: 10% 乙腈-H₂O (含1%的TFA) 等梯度洗脱5min, 10%至100%的乙腈-H₂O (含1%的TFA) 梯度洗脱25min, 保留时间 T_R = 17 min, 收集产物, 冷冻干燥, 得固体, 备用;

将 3.4 mg 上述所得固体 (2 μ mol) 溶于 0.5 mL 无水 DMF, 加入实施例 3 中的赫斯特酸衍生物 Ht-2 (2.7 mg, 6 μ mol)、PyBOP (3.1 mg, 6 μ mol) 和 DIEA (5 μ L, 30 μ mol), 室温振摇反应 2 h, 用半制备型 HPLC 纯化: 10% 乙腈-H₂O (含 1%的 TFA) 等梯度洗脱 5min, 10%至 100%的乙腈-H₂O (含 1%的 TFA) 梯度洗脱 25min, 保留时间 T_R = 18.5 min, 收集产物, 冷冻干燥, 得到淡黄色产物化合物 5; 其 HRMS 如图 7 所示。

HRMS (ESI) m/z : 理论计算值 $C_{112}H_{124}N_{34}O_{12}$ $[M+2H]^{2+}$ 1068.5064, 实测 1068.5052。

实施例 6 化合物 2 穿透细胞膜与核膜的实验

取处于对数生长期的 HeLa 细胞, 按每孔 1mL (含 5 万个细胞) 接种于 12 孔板中, 置于 37 度, 5%二氧化碳细胞培养箱中培养 24 小时; 吸除原培养基, 分别加入含有不同浓度化合物 2 的 DMEM 高糖培养基中, 使每孔的药物浓度分别为 0 μ M、2 μ M、10 μ M、50 μ M; 将细胞重新放入培养箱中孵育 24-72 小时, 荧光显微镜下观察药物在细胞中的定位, 所得结果如图 8 所示, 从图 8 中可以看出 10 μ M 浓度化合物 2 处理 HeLa 细胞 24 和 48 小时后, 能够有效到达细胞。

实施例 7 化合物 2 抑制 HeLa 细胞 PLK1 蛋白表达实验

取处于对数生长期的 HeLa 细胞，按每孔 1mL(含 5 万个细胞)接种于 12 孔板中，置于 37 度，5%二氧化碳细胞培养箱中培养 24 小时；吸除原培养基，分别加入含有不同浓度化合物 2 的 DMEM 高糖培养基中，使每孔的药物浓度分别为 0 μ M、2 μ M、10 μ M、50 μ M；将细胞重新放入培养箱中孵育 72 小时；吸除培养基，用 0.25%胰蛋白酶室温消化 1min，用新鲜 DMEM 培养基重悬细胞，3000rpm 离心 3 分钟，收集细胞，用冰冷的 PBS 清洗两次。

去除 PBS，5000rpm 离心 3 分钟，加 RIPA 裂解液，冰上孵育 2 小时，4 度 13000rpm 离心 15min，收集上清液，利用比如 Bradford 法测量蛋白浓度，加相应裂解液，使各组蛋白浓度一致。配置 10% 的 SDS-PAGE 蛋白分离胶和 5% 的 SDS-PAGE 蛋白浓缩胶；取 50 μ g 总蛋白 80v 电压跑胶分离样品，200 mA 恒流转膜 2h。

将膜浸泡于 5% 脱脂牛奶封闭液，室温封闭 1 小时。加一抗 PLK1 (稀释比 1: 3000) 和 GAPDH (1: 20000)，4 度慢摇过夜。用 PBST 清洗 3 次，加 HRP 标记的二抗 (稀释比 1: 3000)，室温 1 小时孵育；然后在暗室进行显色曝光；所得结果如图 9 所示，从图 9 中可以看出化合物 2 能够有效地抑制 Plk1 的表达，且抑制效率与药物浓度呈正相关，并且以肌动蛋白作为 Western 印迹实验中的内参，以证明不同样品中的蛋白检测时上样量相同。

实施例 8 化合物 2 抑制 HeLa 细胞增殖的实验

取处于对数生长期的 HeLa 细胞，按每孔 1mL(含 10 万个细胞)接种于 6 孔板中，置于 37°C，5% 二氧化碳细胞培养箱中培养 24 小时；吸除原培养基，分别加入含有不同浓度化合物 2 的 DMEM 高糖培养基中，使每孔的药物浓度分别为 0 μ M、2 μ M、10 μ M、50 μ M；将细胞重新放入培养箱中孵育 48 小时或 72 小时，然后统计最终的细胞数量，所得结果如图 10 所示，从图 10 中可以看出随着药物浓度的升高和作用时间的延长，HeLa 细胞的数量明显减少，说明药物能有效抑制肿瘤细胞的增殖作用。

实施例 9 化合物 2 抑制非小细胞肺癌肿瘤细胞在荷瘤小鼠中的增殖实验

将 A549 细胞接种在 10mm 塑料培养皿中，完全培养基使用 DMEM 高糖，其含 10% FBS 和 10% 双抗 (氯霉素/链霉素)；待 A549 细胞生长密度达到 90% 左右，吸除培养基，用 0.25% 胰蛋白酶 (trypsin) 于 37°C 消化 1 分钟；每个 10mm 培养皿加入完全培养基 4 mL，终止胰蛋白酶活性；轻轻吹打，将贴壁细胞全部吹散为悬浮细胞；在离心机中，用 1000 rpm 的速度离心 3 分钟，去除上清液，用 PBS 重悬 A549 细胞；用血球计数板计算细胞浓度，加适量 PBS，将细胞浓度调整至 1.0×10^7 个 /ml

取 1mL 注射管，吸取 1mL A549 细胞悬浮液，在每只裸鼠的右侧腋下接种 200 万细胞，即 200 μ l 细胞悬浮液；接种完 A549 细胞后，将裸鼠放回饲养笼。待肿瘤大小长到约 200 mm³，边长 5~8 mm 时，开始进行给药。

给药 1 组：给药剂量和频率示意图如图 11 所示；药物的剂量为 1 mg/Kg 体重，换算后化合物 2 的给药浓度约为 20 μmol /只小鼠；将化合物 2 溶解在生理盐水中（0.9% NaCl）。从第一次给药起，每三天给一次药，一共持续 7 次，第 21 天不给药，处死小鼠后收集肿瘤样本；

5 给药 2 组：其给药剂量与给药频率与给药 1 组相同，其目的在于重复和确认给药 1 组的可靠性；

对照组：对照组小鼠只给予生理盐水；

每三天在给药前，称量并记录小鼠体重和肿瘤的长宽。肿瘤体积的计算公式为 $V = 0.5 \times \text{长} \times \text{宽} \times \text{宽}$ ；给药后的第 21 天，处死裸鼠，收集肿瘤样本；化合物 2 对肿瘤增殖的抑制效果如图 12~14 所示，从图 12~14 中可以看出，与对照组相比，给药组裸鼠体内接种的人 A549 10 肺癌细胞移植瘤体积和重量都显著降低，说明以图 11 方式进行间隔连续给药后，能明显抑制肿瘤细胞在裸鼠体内的增殖。

实施例 10

采用 SPR（surface plasmon resonance analysis using a Proteon XPR36 (Bio-Rad, California, USA)）对化合物 1~5 与 PLK1 基因转录启动子区域 DNA 序列结合位置以及强度进行测定，其中， 15 所述 PLK1 基因转录启动子区域具有如下 DNA 序列：

gggcgctcccatggtgccgcgcggcgGCGGGGtttgatttaaatcccgcgGCCAATCAGtggcgcgcaggctttgtaacgttc
ccagcGCCGCGtttgaattcggggaggagcgGAGCGGTGCGGAGGCtctgctcgatcgaggtctgcagcgcagcttcggg
agcATGAGTGCTGCAGTGACTGCAG

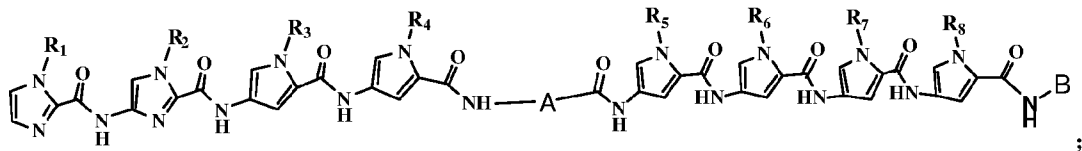
20 测试结果表明化合物 1~5 均能与上述 DNA 序列中灰色部分发生特异性结合，并且化合物 2~5 与该 DNA 序列的结合强度结果如表 1 所示：

化合物	化合物 2	化合物 3	化合物 4	化合物 5
KD (M)	2.04×10^{-9}	2.24×10^{-9}	4.57×10^{-9}	1.44×10^{-8}

从上表中可以看出化合物 2~5 与靶标 DNA 的结合非常强，亲和力达到纳摩尔水平，特别是化合物 2~4，其中化合物 2 的与靶标 DNA 的结合力最强，KD 值达到 2.04×10^{-9} 。

权利要求书

1. 通式 (I) 所示的化合物、其立体异构体或药学上可接受的盐:



式 (I)

5 其中:

$R_1 \sim R_8$ 各自独立地为氢或 C_{1-3} 烷基; 优选地, $R_1 \sim R_8$ 均为甲基

A 为 $-(CH_2)_m-$, 在 A 中, 任意 CH_2 上的氢原子被 C_{1-3} 烷基、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-O-(C=O)-R_9$ 或 $-NH-(C=O)-R_9$ 所取代;

10 B 为 $-(CH_2)_n-CH_3$, 在 B 中, 任意 CH_2 或 CH_3 上的氢原子被 C_{1-3} 烷基、 $-OR_{11}$ 或 $-NR_{10}R_{11}$ 所取代;

优选地, 所述 A 为 $-(CH_2)_{m-1}-R_{12}$, 所述 R_{12} 选自 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-O-(C=O)-R_9$ 或 $-NH-(C=O)-R_9$;

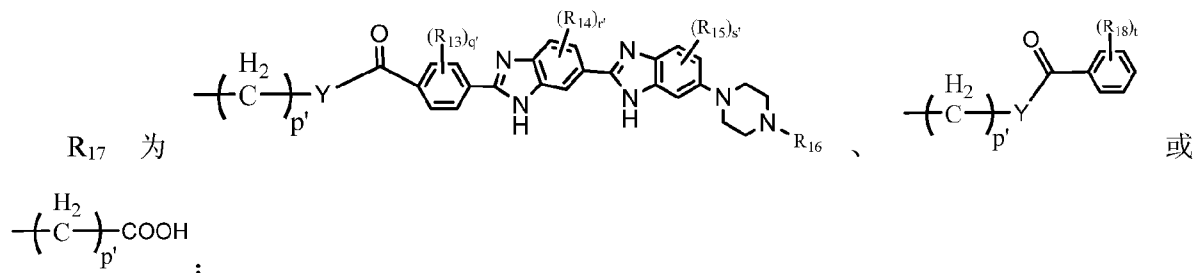
更优选地, A 为 $-(CH_2)_{m-1}-R_{12}$ 或 $-(CH_2)_{m-1}-R_{12}$;

优选地, 所述 B 为 $-(CH_2)_n-CH_2-O-R_{11}$ 或 $-(CH_2)_n-CH_2-N(R_{10})-R_{11}$;

R_9 为 $-(CH_2)_p-X$ 或 $-(CH_2)_p-N(R_{16})$ 或;

15 R_{10} 为 C_{1-3} 烷基;

R_{11} 为 C_{1-6} 烷基或 R_{17} ;



20 在 R_9 或 R_{17} 中, 任意 CH_2 上的氢原子被 0~2 个 C_{1-6} 烷基、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、卤素、 $-OR_{19}$ 、 $-NHR_{20}$ 或 $-NR_{20}R_{21}$ 所取代;

X 或 Y 各自独立地为 O、NH 或 NR_{22} ,

$R_{13} \sim R_{15}$ 各自独立地为 H、卤素、 C_{1-3} 烷基;

R_{16} 为 C_{1-6} 烷基；优选地， R_{16} 为甲基、乙基、正丙基、异丙基、一氟甲基、二氟甲基或三氟甲基；

R_{18} 为氢、卤素、 C_{1-3} 烷基、羧基或硝基，优选地， R_{18} 为羧基；

所述 $R_{19} \sim R_{22}$ 各自独立地为 C_{1-3} 烷基；

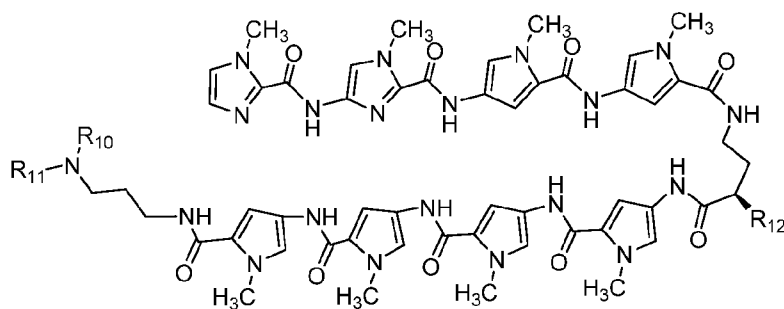
5 所述 C_{1-6} 烷基或所述 C_{1-3} 烷基被 0~3 个卤素取代，优选被 0~3 个氟取代；

p 、 p' 各自独立地选自 0、1、2、3 或 4；优选地， p 、 p' 各自独立地为 1、2、3 或 4；

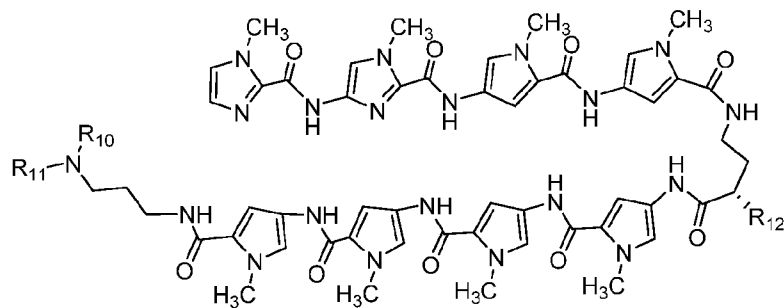
q 、 q' 、 r 、 r' 、 s 、 s' 各自独立地选自 0、1、2、3 或 4；优选地， q 、 q' 、 r 、 r' 、 s 、 s' 均为 0；

t 选自 0、1、2、3 或 4；优选地， t 为 1。

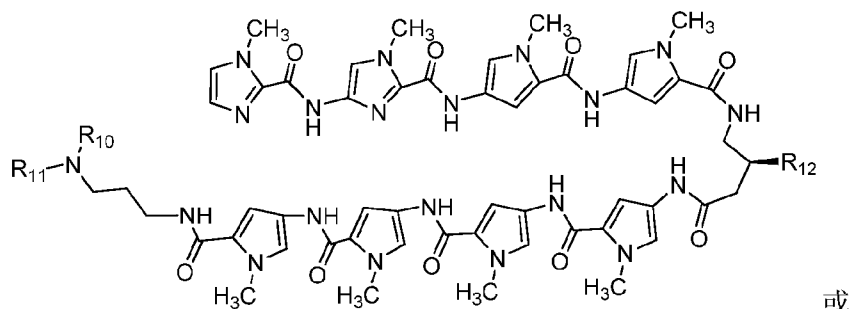
10 2. 根据权利要求 1 所述的通式 (I) 所示的化合物、其立体异构体或药学上可接受的盐，其中，所述化合物具有式 (II) ~ 式 (V) 所示的结构：



式 (II)

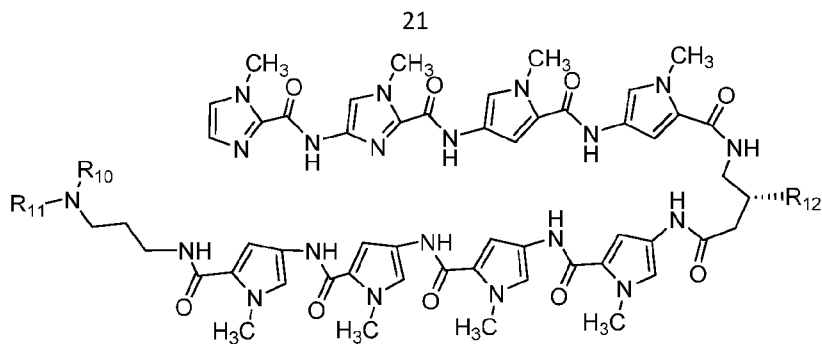


式 (III)



式 (IV)

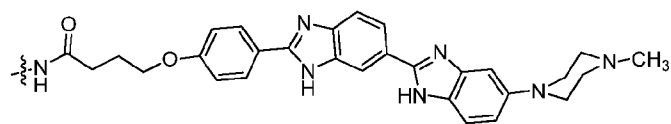
或



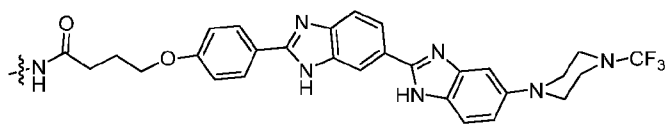
式 (V)

优选地, R_{10} 为甲基或三氟甲基;

优选地, 所述 R_{12} 选自 NH_2 、



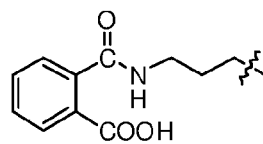
或



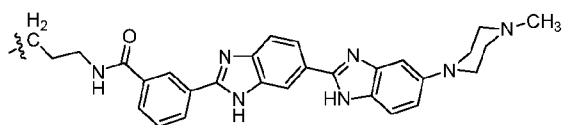
5

;

优选地, 所述 R_{11} 选自 CH_3 、 CF_3 、 CH_2COOH 、

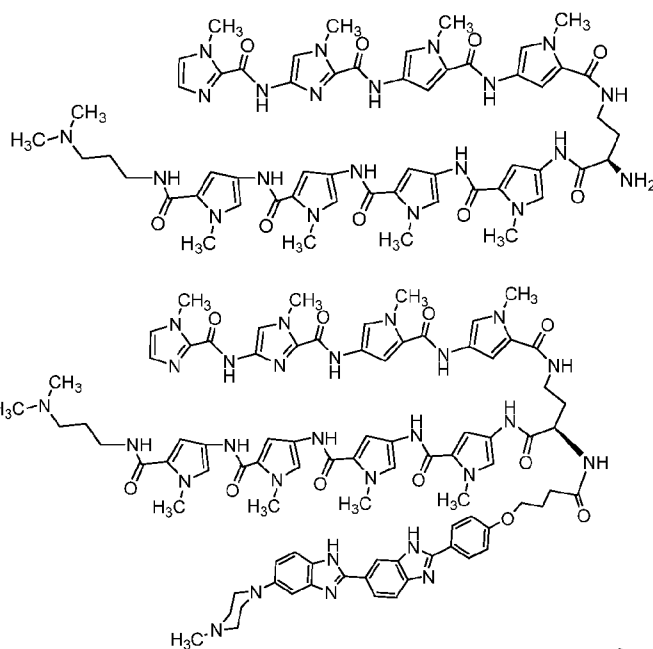


或



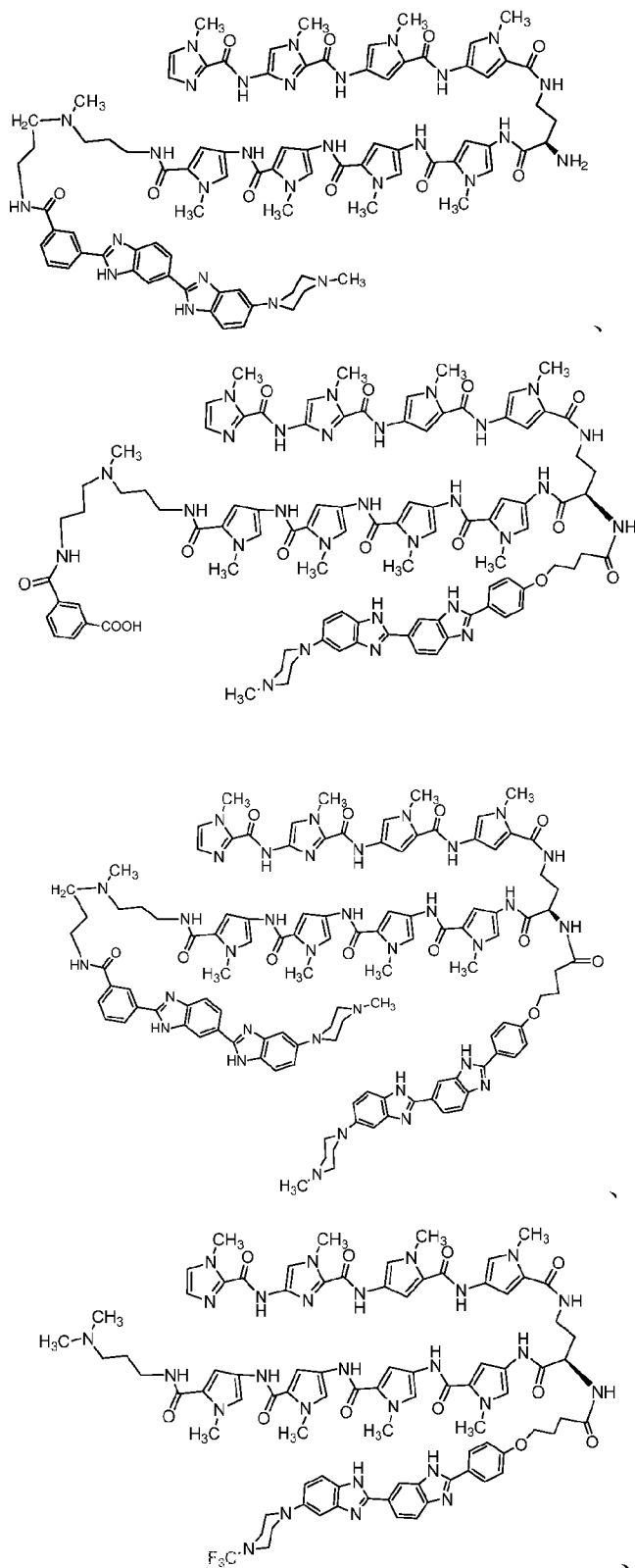
。

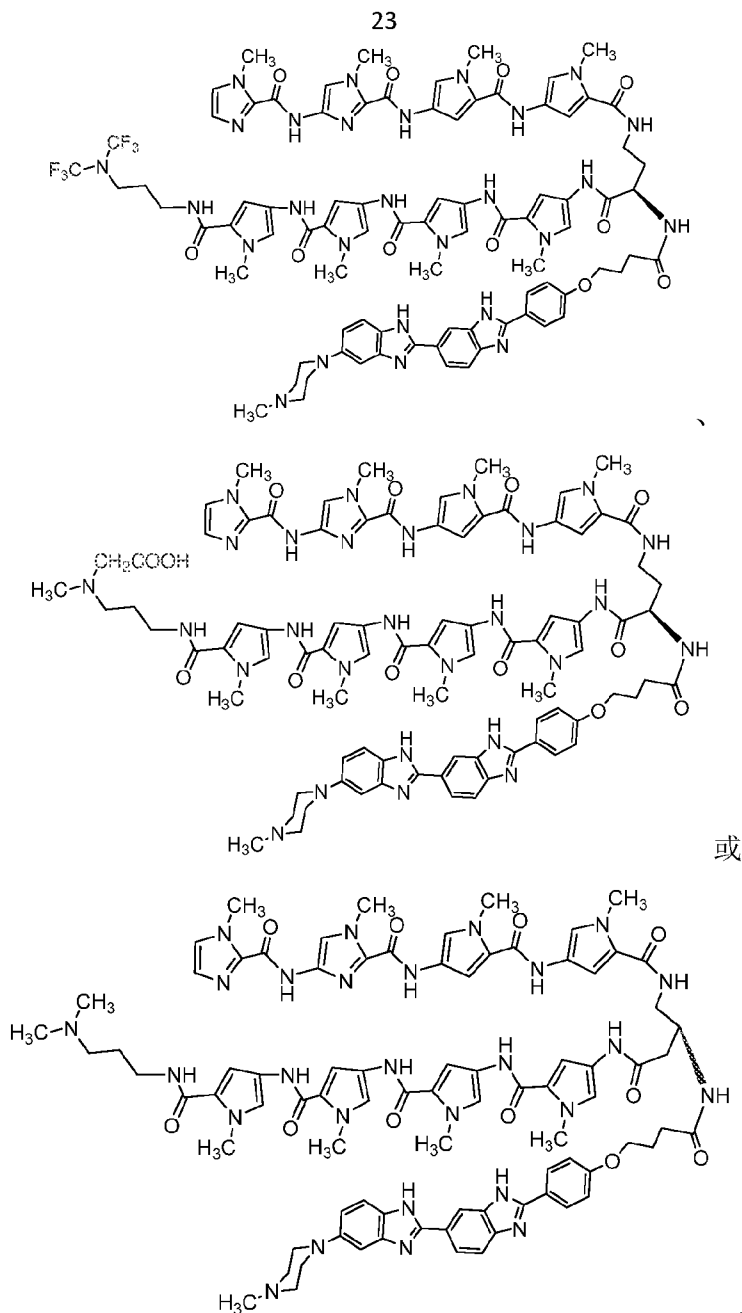
3. 根据权利要求1所述的通式(I)所示的化合物、其立体异构体或药学上可接受的盐, 所述化合物包括:



10

22

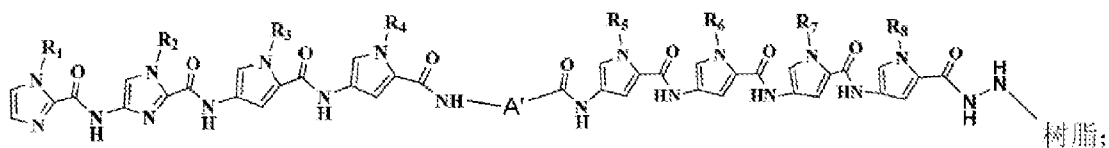




4. 权利要求 1~3 中任一项所述的通式 (I) 所示的化合物、其立体异构体或药学上可接受

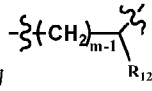
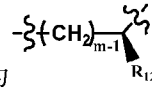
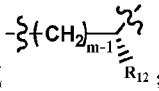
5 的盐的制备方法, 其中, 所述方法包括如下步骤:

(a) 制备肼树脂负载的式 (VI), 优选所述肼树脂包括苯肼树脂;



式 (VI)

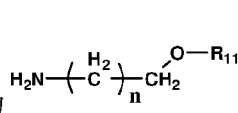
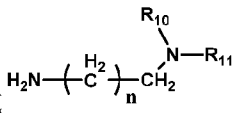
A'为 $-(CH_2)_m-$, 在A中, 任意 CH_2 上的氢原子被 $-OP_{OH}$ 、 $-NHP_{NH}$ 所取代;

优选地, 所述 A' 为  R_{12} , 所述 R_{12} 为 $-OP_{OH}$ 或 $-NHP_{OH}$; 更优选地, A' 为  R_{12} 或  R_{12} ;

(b) 脱除式 (VI) 中的 P_{OH} 或 P_{NH} ;

(c) 以氧化剂及切割剂进行氧化反应及切割反应以制得式 (I) 所示的所述的化合物;

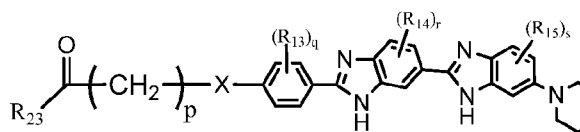
5 所述切割剂为 $NH_2-(CH_2)_n-CH_3$, 在切割剂中, 任意 CH_2 或 CH_3 上的氢原子被 $-OR_{11}$ 或 $-NR_{10}R_{11}$ 所取代;

优选地, 所述切割剂为  或  ;

优选地, 所述氧化剂为醋酸铜、N-溴代丁二酰亚胺和氧气中的一种或多种的组合;

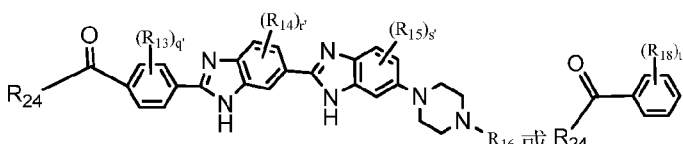
A' 及切割剂中各基团的定义与权利要求 1~3 中任一项相同, P_{OH} 、 P_{NH} 分别表示羟基保护基及氨基保护基; 优选地, 所述 P_{OH} 、 P_{NH} 为 Boc、Fmoc、Cbz、Trt 或 Allyl, 更优选 Fmoc。

5. 根据权利要求 4 所述的方法, 其中, 在步骤 (b) 与步骤 (c) 之间以

 R_{23} 对脱除 P_{OH} 或 P_{NH} 暴露的羟基或氨基进行缩合反应以形成 $-O-(C=O)-R_9$ 或 $-NH-(C=O)-R_9$ 的步骤; 所述 R_{23} 为羟基或卤素。

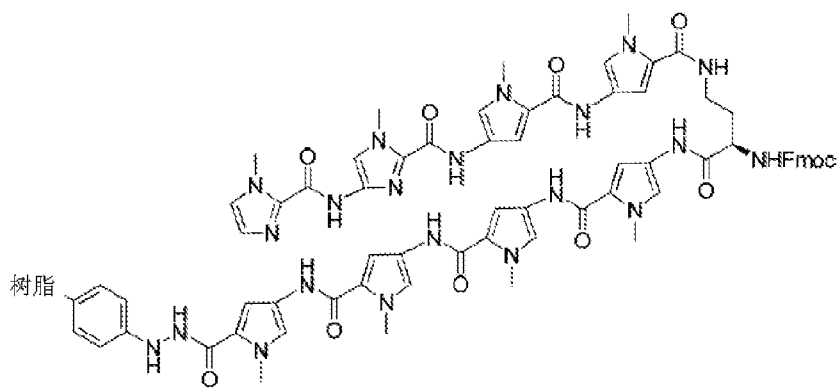
6. 根据权利要求 4 或 5 所述的方法, 其中, 所述方法中的步骤 (c) 被步骤 (c') 所替代, 并且在步骤 (c') 之后进一步包括步骤 (c''); 15

(c') 以氧化剂及切割剂进行氧化反应及切割反应; 所述切割剂为 $NH_2-(CH_2)_n-CH_2N(R_{10})-(CH_2)_p-YH$,

(c'') 以  R_{24} 对步骤 (c') 所得产物中的 YH 进行缩合反应后以制得式 (I) 所示的所述的化合物; R_{24} 为羟基或卤素;

20 选择性地, 在步骤 (b) 与步骤 (c') 之间, 将脱除 P_{OH} 或 P_{NH} 暴露的羟基或氨基以 P_{OH}' 或 P_{NH}' 进行保护, 所述 P_{OH}' 或 P_{NH}' 为可耐受碱性条件的羟基保护基或氨基保护基; 并在步骤 (c'') 进行缩合反应之后脱除 P_{OH}' 或 P_{NH}' 以制得式 (I) 所示的所述的化合物; 优选地, 所述 P_{OH}' 或 P_{NH}' 为叔丁氧羰基。

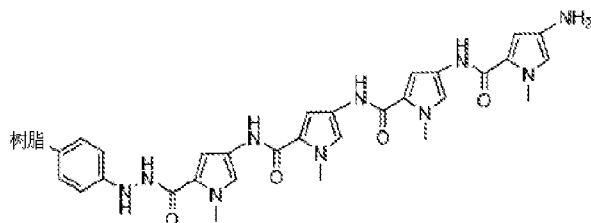
7. 根据权利要求 4 所述的方法, 其中, 所述式 (VI) 为式 (VI-1);



式 (VI-1)

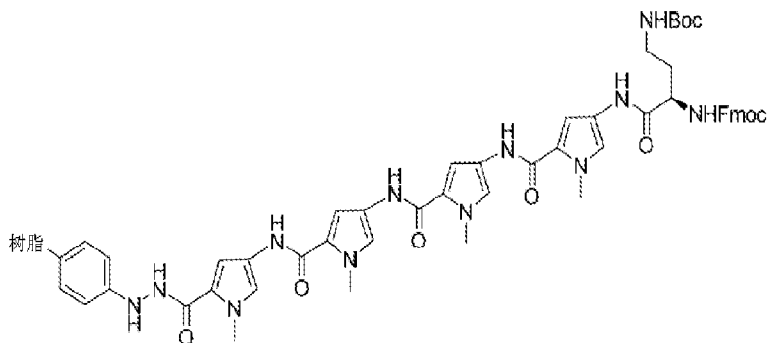
优选地，式 (VI-1) 按如下路线制备：

- (1) 以苯肼树脂以及 4-叔丁氧羰基氨基-1-甲基-1*H*-吡咯-2-羧酸为原料经重复缩合及脱叔丁氧羰基保护基制得式 (1) 所示的化合物：



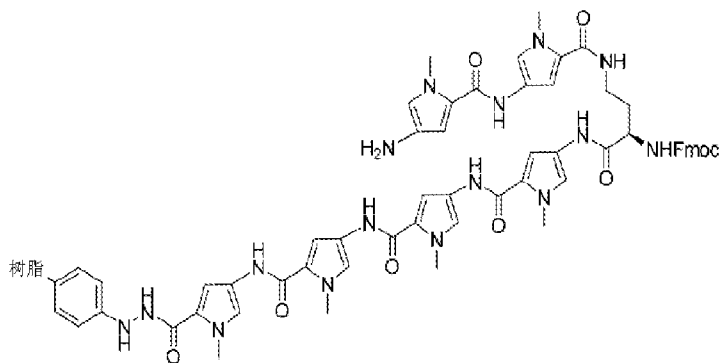
式 (1)

- (2) 以式 (1) 所示的化合物与 R-2-(9-苄氧羰基氨基)-4-叔丁氧羰基氨基丁酸进行缩合反应制得式 (2) 所示的化合物：



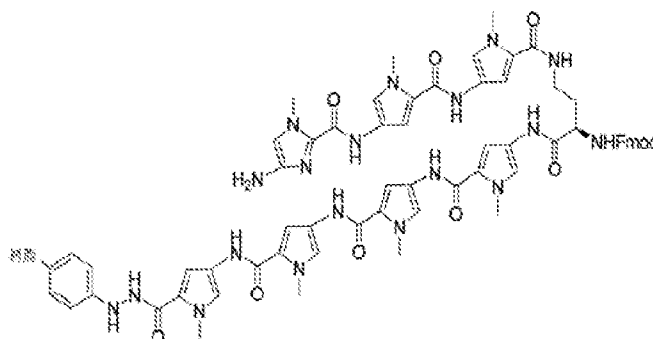
式 (2)

- (3) 式 (2) 所示的化合物脱除叔丁氧羰基保护基后与 4-叔丁氧羰基氨基-1-甲基-1*H*-吡咯-2-羧酸进行缩合反应，重复脱叔丁氧羰基保护基及缩合反应制得式 (3) 所示的化合物：



式 (3)

(4) 以式(3)所示的化合物与 4-叔丁氧羰基氨基-1-甲基-1*H*-咪唑-2-羧酸进行缩合反应并脱除叔丁氧羰基保护基得式(4)所示的化合物:



22 (4)

5 (5) 以式(4)所示的化合物与1-甲基-1*H*-咪唑-2-羧酸进行缩合反应制得式(VI-1)所示的化合物。

8. 药物组合物, 其包含有效剂量的权利要求 1~3 中任一项所述的通式 (I) 所示的化合物、其立体异构体或药学上可接受的盐, 或进一步包含一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂。

9. 权利要求 1~3 中任一项所述的通式 (I) 所示的化合物、其立体异构体或药学上可接受
10 的盐或权利要求 8 所述的药物组合物在制备治疗或预防细胞过度增殖性疾病的药物中的应用。

10. 根据权利要求 9 所述的应用, 其中, 所述的细胞过度增殖性疾病包括结肠癌、直肠癌、
脑瘤、肺癌、表皮鳞癌、膀胱癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫内膜癌、结直肠癌、
肾细胞癌、胃癌、食管腺癌、食管鳞状细胞癌、非霍奇金淋巴瘤、肝癌、皮肤癌、甲状腺癌、
头颈癌、前列腺癌、神经胶质瘤及鼻咽癌中的一种或多种; 优选地, 所述的细胞过度增殖性疾
15 病包括乳腺癌、肺癌或胃癌。

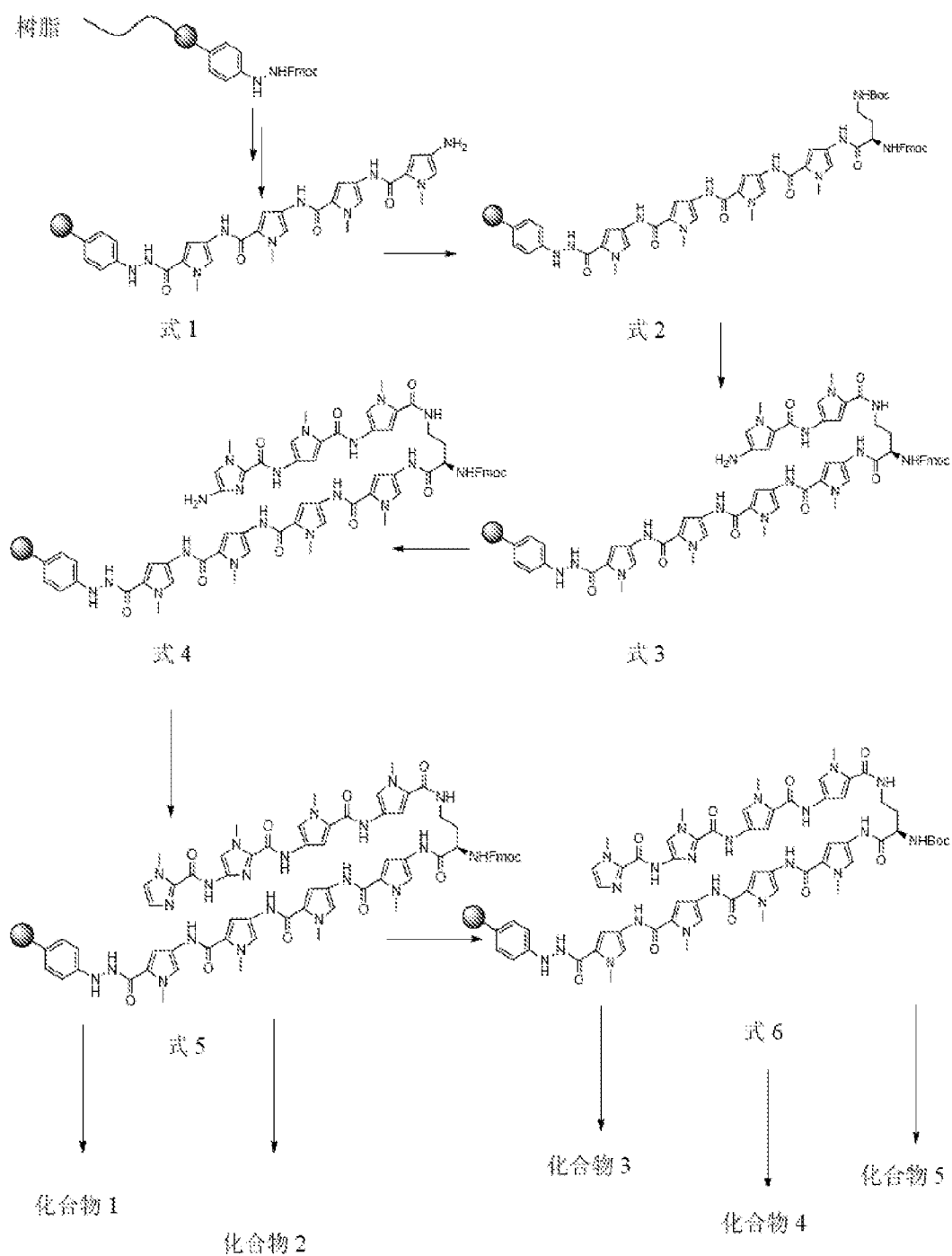


图 1

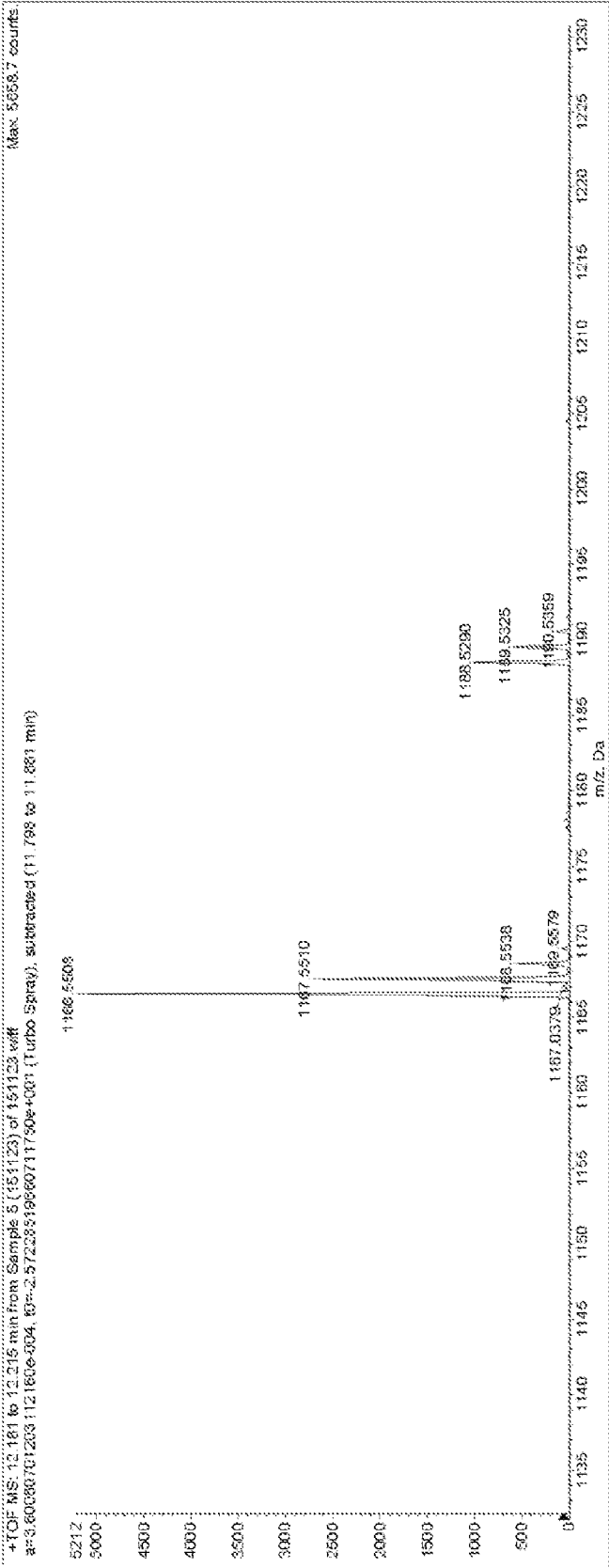
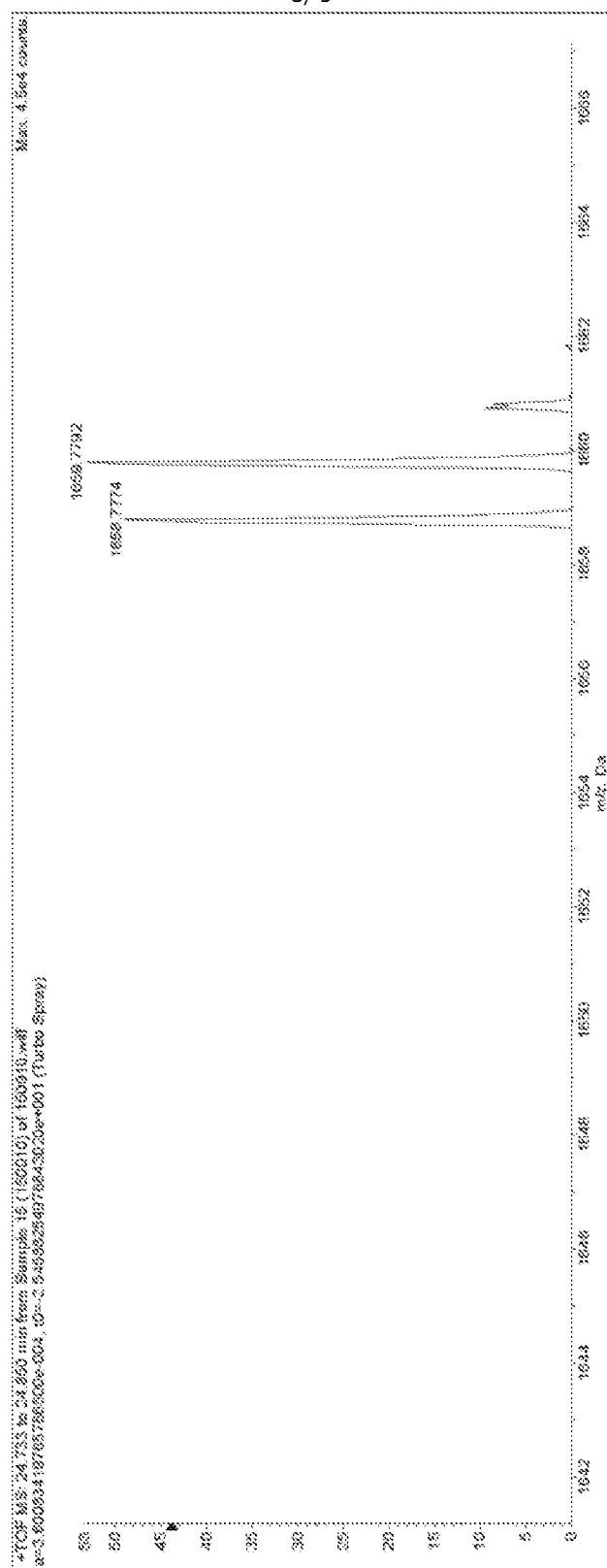


图 2

3

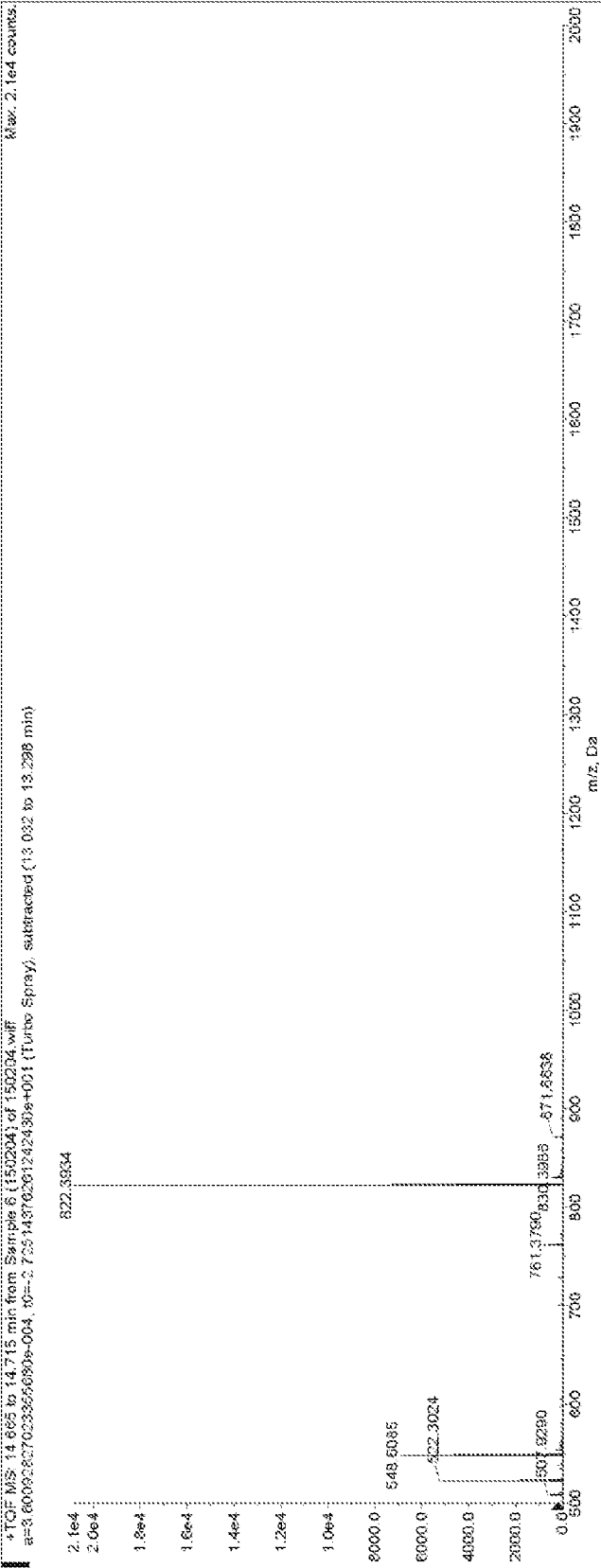


图 4

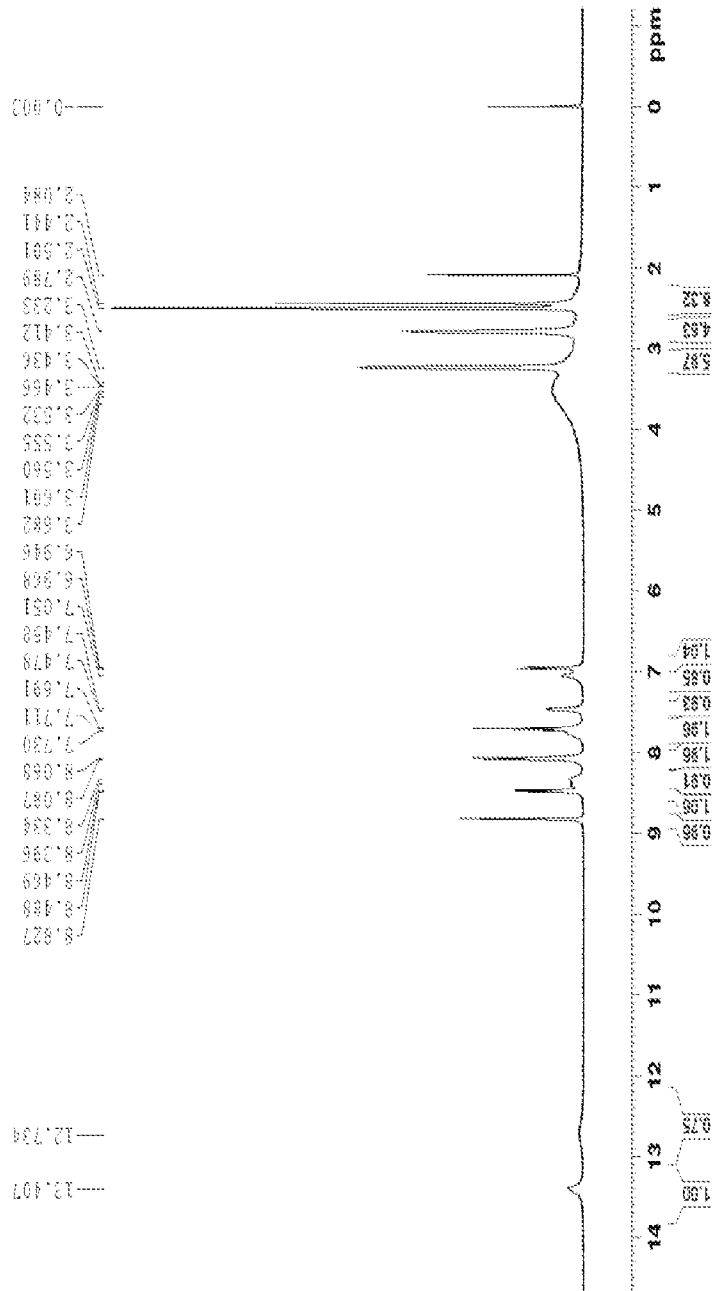


图 5

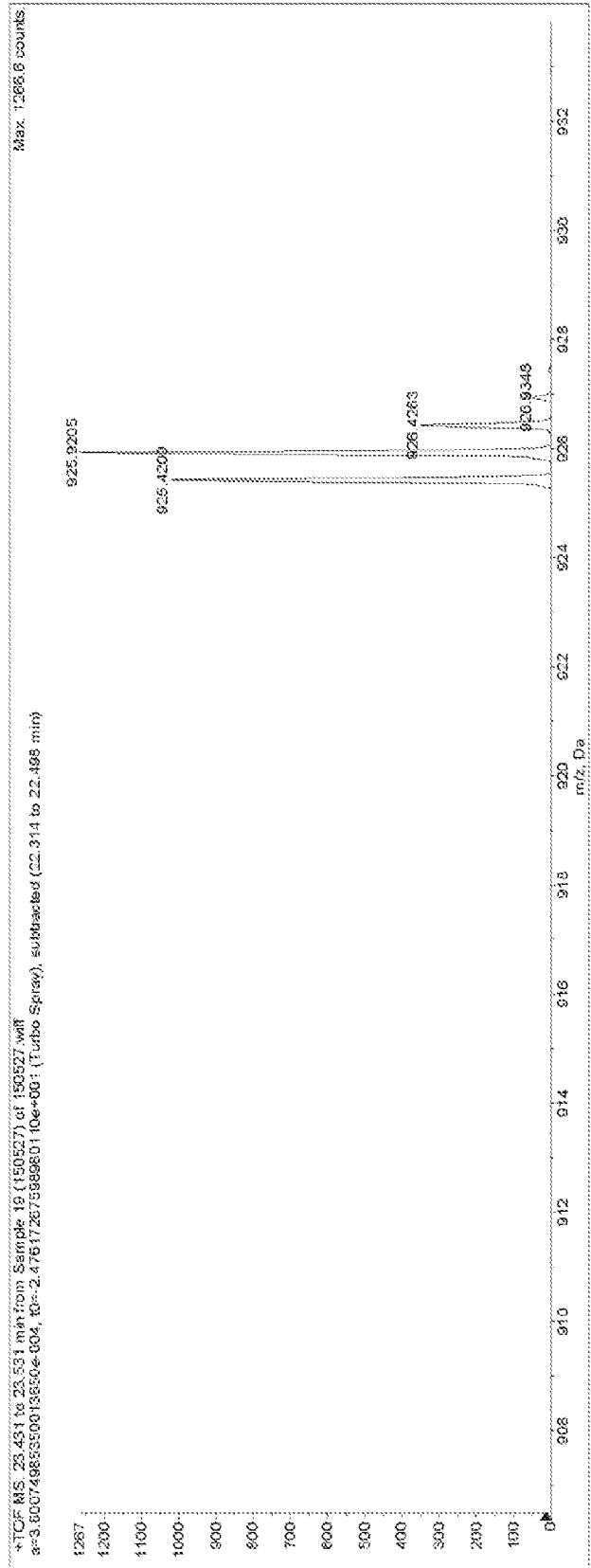
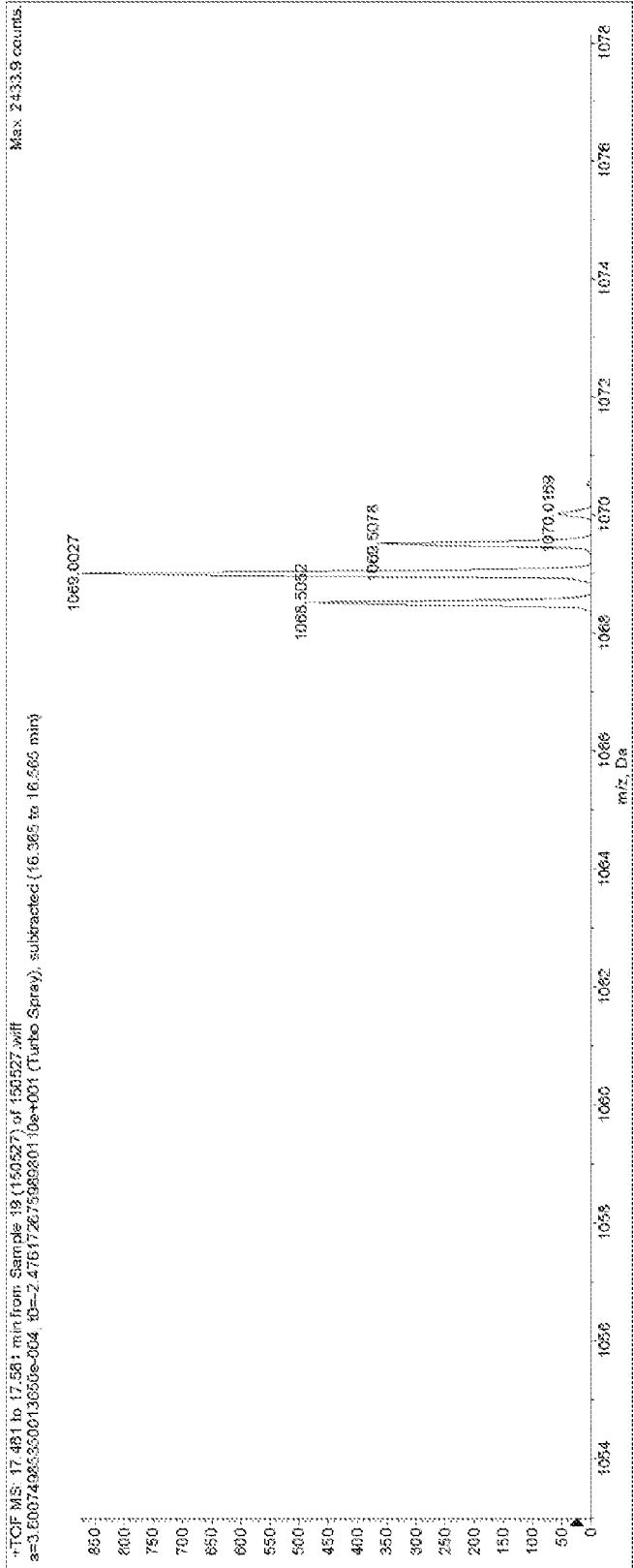


图 6



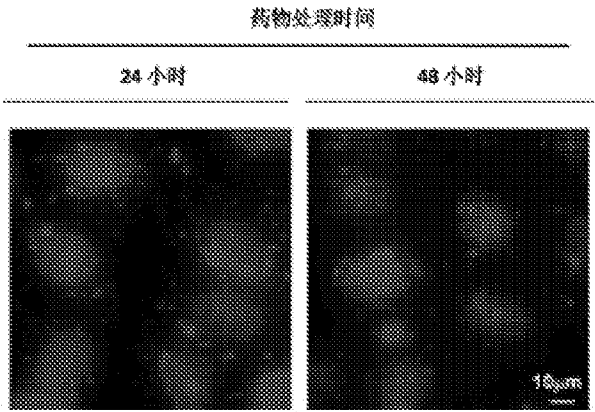


图 8

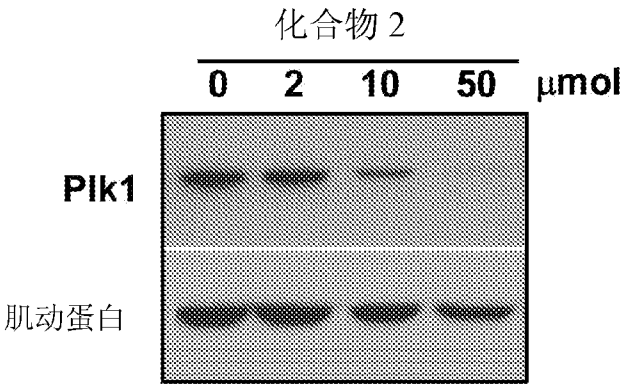


图 9

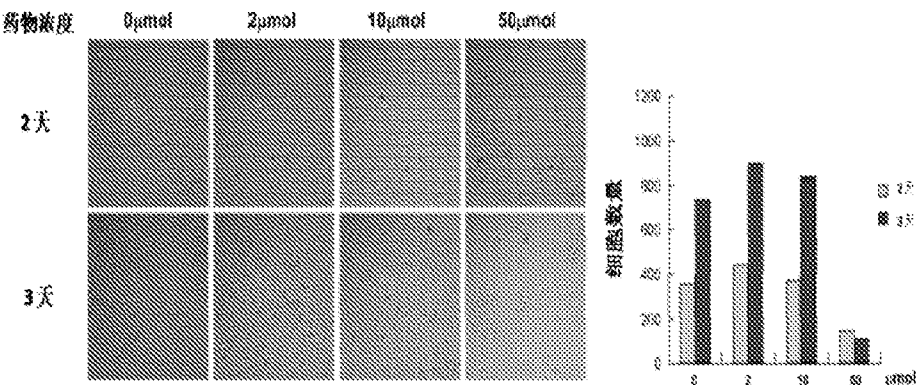


图 10

9/9

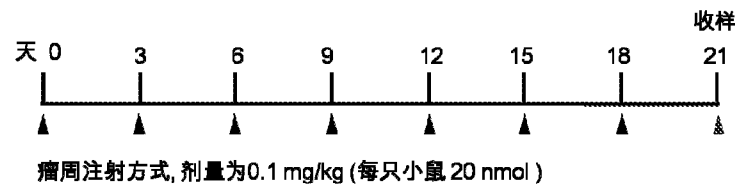


图 11



图 12

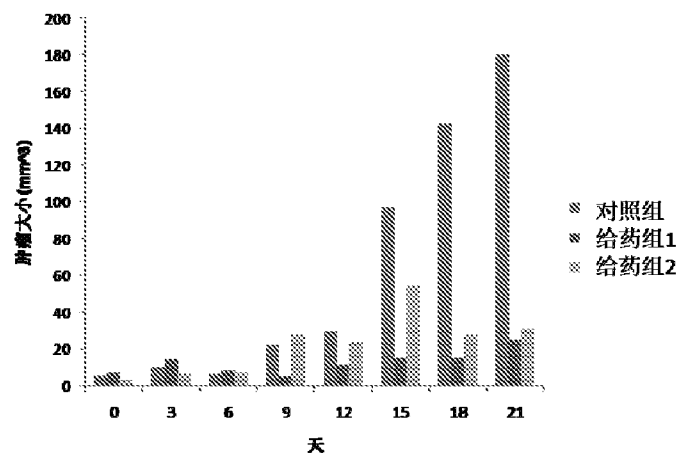


图 13

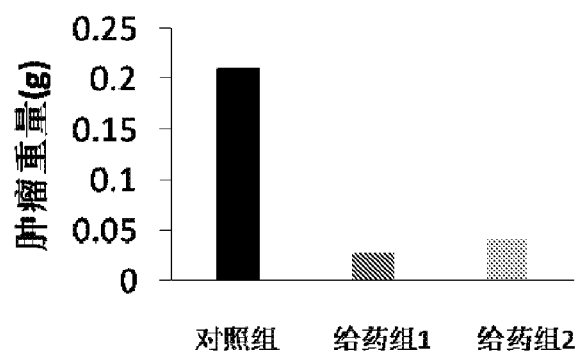


图 14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2015/098880

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 403/14 (2006.01) i; A61K 31/4178 (2006.01) i; A61K 31/497 (2006.01) i; A61K 31/4184 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D; A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CNKI, DWPI, SIPOABS, STN (REGISTRY, CAPLUS): plk1, pyrrole w imidazole, py w im, polyamide?, cancer?, tumor,
structure retrieve-type based on claim 1

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ABRAMYAN ARA M. et al. "An ab-initio study of pyrrole and imidazole arylamides" J. Serb. Chem. Soc., volume 78, number 11, 31 December 2013 (31.12.2013), pages 1789-1795, specially page 1790, figure 1	1-3, 7-10
X	NICKOLS N.G. et al. "Activity of a Py-Im Polyamide Targeted to the Estrogen Response Element" Mol. Cancer Ther., volume 12, number 5, 31 May 2013 (31.05.2013), pages 675-684, specially page 678, figure 1, compound 3, Introduction, Figure 2, page 676, the left column, the second paragraph from the bottom	1-10
X	PUKETT JAMES W. et al. "Microwave Assisted Synthesis of Py-Im Polyamides" Org. Lett., volume 14, number 11, 11 May 2012 (11.05.2012), pages 2774-2777, specially figures 2 and 4, pages 2776-2777	4-6
A	WO 2014142092 A1 (UNIV NIHON) 18 September 2014 (18.09.2014) the whole document	1-10
A	EP 1491534 B1 (JAPAN SCIENCE & TECH AGENCY) 05 August 2009 (05.08.2009) the whole document	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 01 September 2016	Date of mailing of the international search report 13 September 2016
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer WANG, Ying Telephone No. (86-10) 62084463

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2015/098880

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2014142092 A1	18 September 2014	JP 2014173032 A	22 September 2014
		EP 2975036 A1	20 January 2016
		US 2016032057A1	04 February 2016
EP 1491534 B1	05 August 2009	EP 1491534 A1	29 December 2004
		JP 3898532 B2	28 March 2007
		US 7456294 B2	25 November 2008
		EP 1491534 A4	10 May 2006
		JP 2003261541 A	19 September 2003
		US 2005176647 A1	11 August 2005
		DE 60328669 D1	17 September 2009
		WO 03076412 A1	18 September 2003

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2015/098880

A. 主题的分类

C07D 403/14(2006.01)i; A61K 31/4178(2006.01)i; A61K 31/497(2006.01)i; A61K 31/4184(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07D, A61K, A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS, CNKI, DWPI, SIPOABS, STN (REGISTRY, CAPLUS): 吡咯, 咪唑, 聚酰胺, 增殖, 癌, 肿瘤, plkl, pyrrole w imidazole, py w im, polyamide?, cancer?, tumor?, 基于权利要求1的结构式检索

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	ABRAMYAN ARA M. 等. "An ab-initio study of pyrrole and imidazole arylamides" J. Serb. Chem. Soc., 第78卷, 第11期, 2013年 12月 31日 (2013 - 12 - 31), 第1789-1795页, 尤其是第1790页fig. 1	1-3, 7-10
X	NICKOLS N. G. 等. "Activity of a Py-Im Polyamide Targeted to the Estrogen Response Element" Mol. Cancer Ther., 第12卷, 第5期, 2013年 5月 31日 (2013 - 05 - 31), 第675-684页, 尤其是第678页, Figure 1, 化合物3, Introduction, Figure 2, 第676页左栏倒数第2段	1-10
X	PUKETT JAMES W. 等. "Microwave Assisted Synthesis of Py-Im Polyamides" Org. Lett., 第14卷, 第11期, 2012年 5月 11日 (2012 - 05 - 11), 第2774-2777页, 尤其是figure 2, 4, 第2776-2777页	4-6
A	WO 2014142092 A1 (UNIV NIHON) 2014年 9月 18日 (2014 - 09 - 18) 全文	1-10
A	EP 1491534 B1 (JAPAN SCIENCE & TECH AGENCY) 2009年 8月 5日 (2009 - 08 - 05) 全文	1-10

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2016年 9月 1日

国际检索报告邮寄日期

2016年 9月 13日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

王影

传真号 (86-10) 62019451

电话号码 (86-10) 62084463

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/098880

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2014142092	A1	2014年 9月 18日	JP	2014173032	A	2014年 9月 22日
				EP	2975036	A1	2016年 1月 20日
				US	2016032057	A1	2016年 2月 4日
EP	1491534	B1	2009年 8月 5日	EP	1491534	A1	2004年 12月 29日
				JP	3898532	B2	2007年 3月 28日
				US	7456294	B2	2008年 11月 25日
				EP	1491534	A4	2006年 5月 10日
				JP	2003261541	A	2003年 9月 19日
				US	2005176647	A1	2005年 8月 11日
				DE	60328669	D1	2009年 9月 17日
				WO	03076412	A1	2003年 9月 18日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)