



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113603676 B

(45) 授权公告日 2022.05.24

(21) 申请号 202110468180.6

A61P 35/00 (2006.01)

(22) 申请日 2021.04.28

A61P 35/02 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 113603676 A

(56) 对比文件

CN 110372669 A, 2019.10.25

CN 110372693 A, 2019.10.25

(43) 申请公布日 2021.11.05

CN 112174940 A, 2021.01.05

(73) 专利权人 浙江工业大学

CN 112176418 A, 2021.01.05

地址 310014 浙江省杭州市潮王路18号浙

CN 104736569 A, 2015.06.24

江工业大学科技处

US 2018215731 A1, 2018.08.02

(72) 发明人 张兴贤 王文冰

审查员 张旋

(74) 专利代理机构 杭州天正专利事务所有限公

司 33201

专利代理师 黄美娟 朱思兰

(51) Int. Cl.

C07D 401/14 (2006.01)

A61K 31/517 (2006.01)

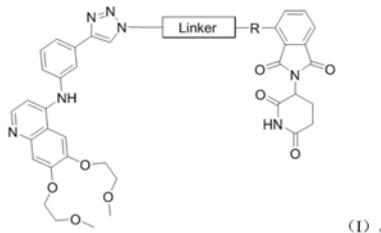
权利要求书2页 说明书9页 附图3页

(54) 发明名称

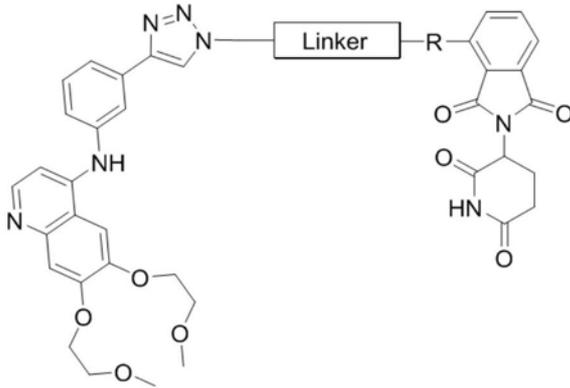
基于厄洛替尼靶向降解EGFR蛋白小分子化合物及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明提供了一种基于厄洛替尼靶向降解EGFR蛋白小分子化合物及其制备方法和应用,该化合物(I)或其药学上可接受的盐或水合物,以及包含该化合物的药物组合物可应用于制备预防或/和治疗癌症的药物;本发明选用泊马度胺作为PROTACs中与E3连接酶进行结合的部位,厄洛替尼为靶向EGFR小分子化合物,选用合适的连接链将两者相连接构建PROTACs,体外抗肿瘤活性测试及体外EGFR蛋白降解活性表明,本发明化合物表现出了良好的抗肿瘤活性,并表现出优异的EGFR蛋白降解作用,可用于预防或/和治疗多种癌症,在医药领域具有巨大的应用前景。



1. 一种式 (I) 所示的靶向泛素化诱导EGFR蛋白降解的化合物或其药学上可接受的盐：



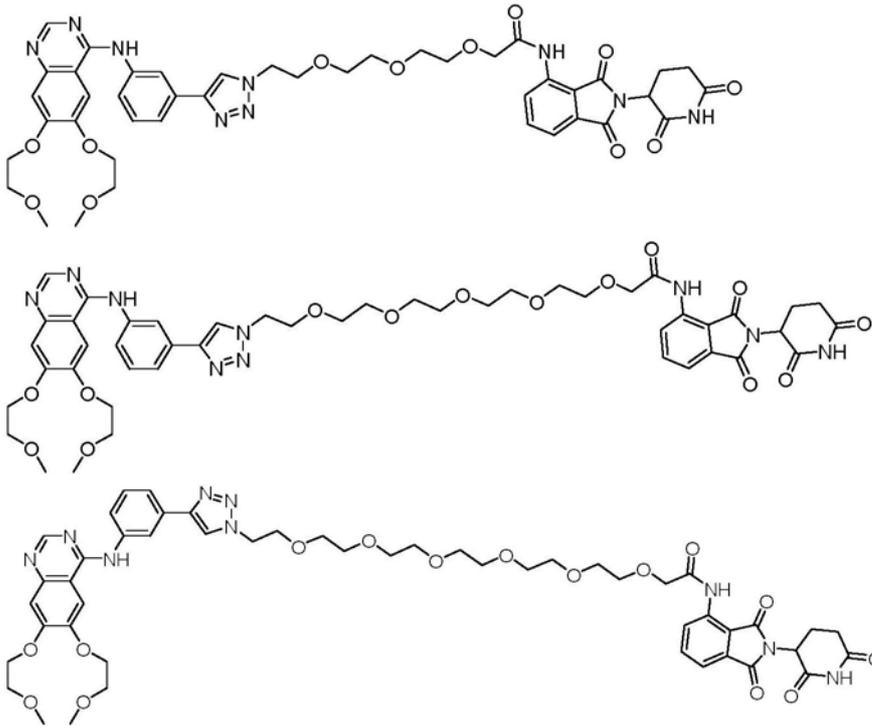
(I)

式 (I) 中,

R为 $C_1 \sim C_6$ 烷基、 $C_1 \sim C_6$ 烯基、 $C_1 \sim C_6$ 炔基、氨基或乙酰胺基；

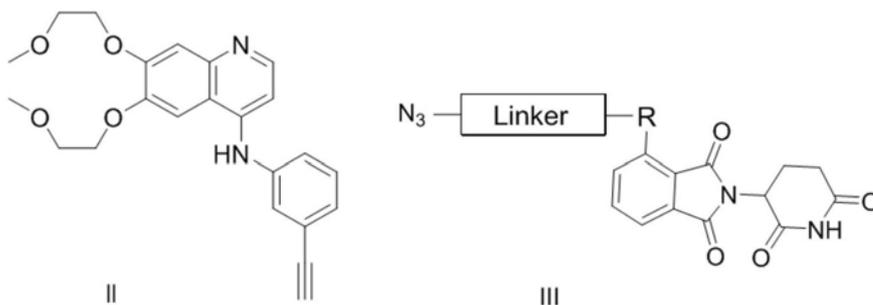
Linker为 $C_1 \sim C_6$ 烷基,或者 $\left(\text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{O} \right)_n$, $n=1 \sim 10$ 。

2. 如权利要求1所述靶向泛素化诱导EGFR蛋白降解的化合物,其特征在于,化合物结构为如下之一:



3. 如权利要求1所述式 (I) 所示的靶向泛素化诱导EGFR蛋白降解的化合物的制备方法,其特征在于,所述制备方法为:

将厄洛替尼(II)溶于有机溶剂中,于室温下加入化合物(III)、五水硫酸铜和维生素C,加热至 $40 \sim 90^\circ\text{C}$ 反应 $4 \sim 10\text{h}$,之后经后处理,得到产物(I);



式(III)中,R、Linker的定义与式(I)中相同。

4.如权利要求3所述的制备方法,其特征在于,所述厄洛替尼(II)、化合物(III)、五水硫酸铜、维生素C的物质的量之比为1:1:0.15~0.2:0.3~0.4。

5.如权利要求3所述的制备方法,其特征在于,所述有机溶剂为二甲基亚砜,所述有机溶剂的体积用量以厄洛替尼(II)的物质的量为5~10L/mol。

6.如权利要求3所述的制备方法,其特征在于,所述后处理的方法为:反应结束后,反应液中加入水,乙酸乙酯萃取,合并有机相,饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,减压浓缩,柱层析分离,以二氯甲烷:甲醇体积比为10:1的混合液为洗脱剂,收集含目标化合物的洗脱液,蒸除溶剂并干燥,得到产物(I)。

7.如权利要求1所述式(I)所示的靶向泛素化诱导EGFR蛋白降解的化合物或其药学上可接受的盐或水合物在制备预防或/和治疗癌症的药物中的应用。

8.一种药物组合物,其特征在于,所述药物组合物含有式(I)所示化合物或其药学上可接受的盐或水合物和药物上可接受的赋形剂。

基于厄洛替尼靶向降解EGFR蛋白小分子化合物及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种靶向降解EGFR蛋白的化合物及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin proteasome system,UPS)是细胞内蛋白质降解的主要途径,参与细胞内80%以上蛋白质的降解,UPS属于一个多步骤反应过程,有多种不同蛋白质参与,蛋白质先被泛素(多肽)标记,然后被蛋白酶体识别和降解。

[0003] 该系统由泛素、泛素活化酶E1、泛素结合酶E2、泛素连接酶E3、蛋白酶体及其底物(蛋白质)构成。UPS特异性降解蛋白质的过程分两个阶段:(1)蛋白底物泛素化:泛素分子由APP提供能量,被E1激活转移到E2,然后经E3与特异性蛋白底物结合;(2)蛋白底物降解:被泛素化的蛋白分子能够被蛋白酶体识别,并进入蛋白酶体降解成短链的多肽分子。

[0004] 蛋白水解靶向嵌合分子(Proteolysis Targeting Chimeras,PROTACs)是利用一种双功能小分子将目标蛋白和细胞内的E3拉近,从而导致目标蛋白质的降解。PROTACs包含三部分功能结构:(1)可以与蛋白底物相结合的部分;(2)能够与E3相结合的部分;(3)前两部分的连接链(Linker)。细胞内PROTACs可以同时与靶蛋白及E3结合,使本来不能与E3结合的靶蛋白泛素化,进而被蛋白酶体识别并降解(Angew.Chem.Int.Ed.Engl.,2016,55(6),1996-1973)。

[0005] 研究证明,泊马度胺可以与CRBN蛋白结合,CRBN蛋白为CUL4-RBX1-DDB1-Cereblon(CRL4^{CRBN})E3泛素连接酶复合物的底物受体蛋白,结合后通过泛素-蛋白酶体途径进行蛋白水解(Nature,2014,512(7512):49-53)。

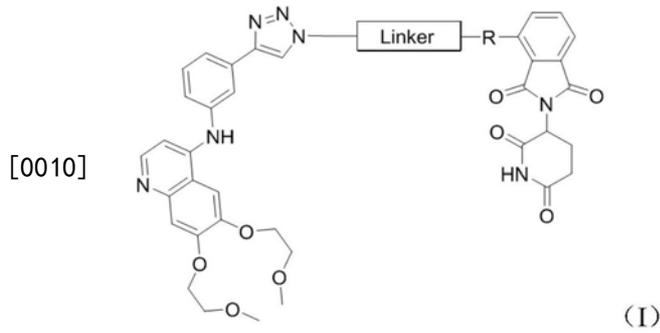
[0006] 当前,在许多实体肿瘤中存在EGFR的高表达或异常表达,EGFR与肿瘤细胞的增殖、血管生成、肿瘤侵袭、转移及细胞凋亡的抑制有关。EGFR的过表达在恶性肿瘤的演变进程中起重要作用,胶质细胞、肾癌、肺癌、前列腺癌、胰腺癌、乳腺癌等组织中都有EGFR的过表达。EGFR已成为有效的抗肿瘤靶点,多个EGFR抑制剂已经上市用于多种癌症的治疗。但是目前所用的EGFR抑制剂抑制效果有限,且已存在一定的耐药问题,因此,开发出一种可降解EGFR蛋白的化合物具有极其重要的制药价值。

发明内容

[0007] 本发明提供了一种基于厄洛替尼靶向泛素化诱导EGFR蛋白降解的化合物及其制备方法和应用,该化合物不仅具有EGFR蛋白降解作用和抗肿瘤活性,且对人体毒副作用小,可用于制备抗肿瘤药物。

[0008] 本发明的技术方案如下:

[0009] 一种式(I)所示的靶向泛素化诱导EGFR蛋白降解的化合物或其药学上可接受的盐:



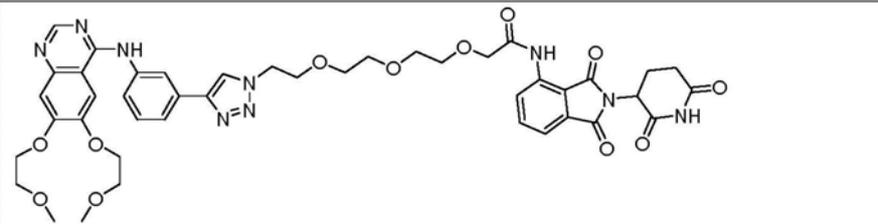
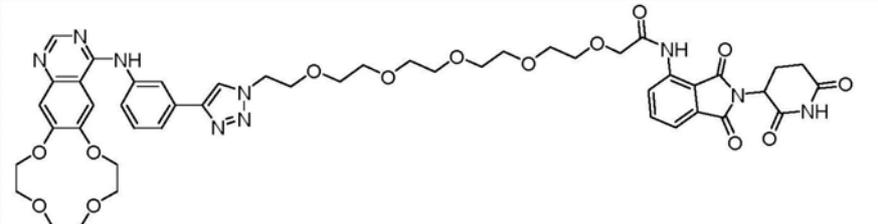
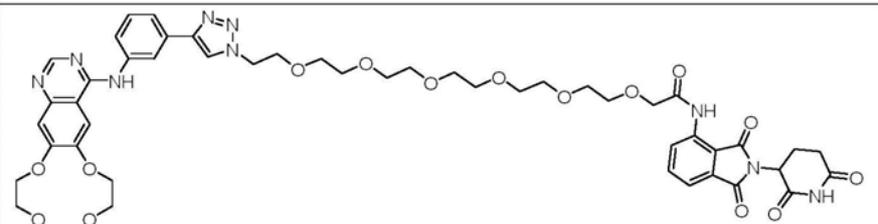
[0011] 式(I)中,

[0012] R为C₁~C₆烷基、C₁~C₆烯基、C₁~C₆炔基、氨基或乙酰胺基;

[0013] Linker为C₁~C₆烷基,或者* $\left(\text{---}\text{O---}\right)_n$, n=1~10(优选n=3~6)。

[0014] 本发明特别优选如下表1中所示的化合物。

[0015] 表1

编号	结构式
ALP-1	
ALP-2	
ALP-3	

[0017] 本发明所述的化合物为一种蛋白水解靶向嵌合分子(PROTACs),其包括可以与EGFR蛋白底物相结合的部分、可以与E3结合的部分以及连接链,利用这种双功能小分子可以将目标蛋白和细胞内的E3拉近,从而使本来不能与E3结合的EGFR靶蛋白泛素化,进而被蛋白酶体识别并降解。

[0018] 本发明所述式(I)所示的靶向泛素化诱导EGFR蛋白降解的化合物的制备方法为:

[0019] 将厄洛替尼(II)溶于有机溶剂中,于室温(20~30℃)下加入化合物(III)、五水硫酸铜和维生素C(Vc),加热至40~90℃反应4~10h,之后经后处理,得到产物(I);

[0020] 所述厄洛替尼(II)、化合物(III)、五水硫酸铜、维生素C的物质的量之比为1:1:0.15~0.2:0.3~0.4;

[0037] 药物制剂可以经口服或胃肠外方式(如静脉内、皮下、腹膜内或局部)给药,如果某些药物在胃部条件下是不稳定的,可将其配制成肠衣片剂。

[0038] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0039] 本发明选用泊马度胺作为PROTACs中与E3连接酶进行结合的部位,厄洛替尼为靶向EGFR小分子化合物,选用合适的连接链将两者相连接构建PROTACs。体外抗肿瘤活性测试及体外EGFR蛋白降解活性表明,本发明化合物表现出了良好的抗肿瘤活性,并表现出优异的EGFR蛋白降解作用,可用于预防或/和治疗多种癌症,在医药领域具有巨大的应用前景。

附图说明

[0040] 图1PROTACs技术原理示意图。

[0041] 图2实施例2得到的化合物ALP-1的核磁谱图。

[0042] 图3实施例3得到的化合物ALP-2的核磁谱图。

[0043] 图4实施例4得到的化合物ALP-3的核磁谱图。

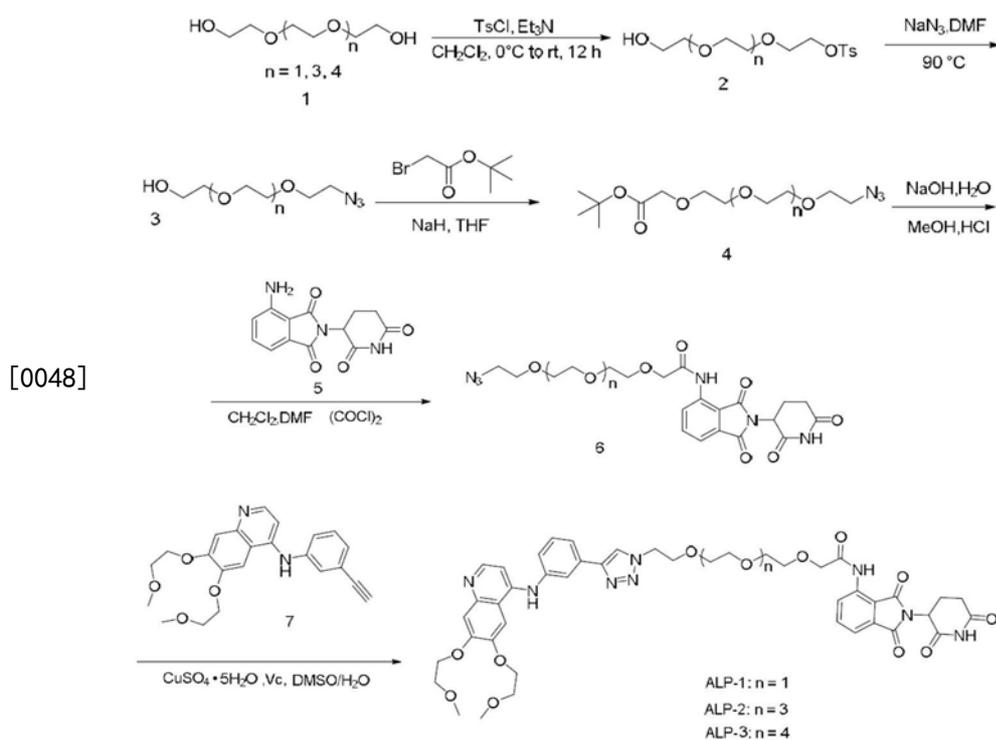
[0044] 图5实施例5中ALP-2和ALP-3不同浓度下EGFR蛋白降解情况。

具体实施方式

[0045] 下面通过具体实施例进一步描述本发明,但本发明的保护范围并不仅限于此。

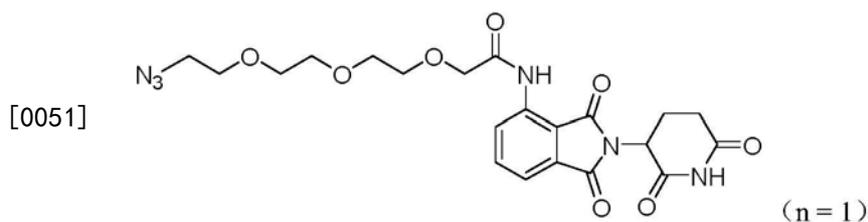
[0046] 本发明中涉及的缩写词意义为:Boc为叔丁氧羰基,DMF为二甲基甲酰胺,DIPEA为二异丙基乙胺,TBAB为四丁基溴化铵,EA为乙酸乙酯,Et为乙基,Me为甲基,M即摩尔,PE为石油醚,Ph为苯基,THF为四氢呋喃,TFA为三氟乙酸,TLC为薄层色谱,NSCLC为非小细胞肺癌,WT为野生型。

[0047] 下面的合成路线描述了本发明通式(I)化合物的制备,所有的原料都是通过这些路线中描述的方法、通过有机化学领域普通技术人员熟知的方法制备的或者可商购。本发明的全部最终化合物都是通过这些路线中描述的方法或通过与其类似的方法制备的,这些方法是有机化学领域普通技术人员熟知的。这些路线中应用的全部可变因数如下文的定义或如权利要求中的定义。



[0049] 实施例1:E3配体小分子化合物的制备(化合物6)

[0050] 化合物6a的制备:



[0052] 将化合物1a (100mmol) (n=1) 溶于30mL DCM中,加入 Et_3N (200mmol),将TsCl (140mmol) 溶于70mL DCM中,在冰浴条件下滴入反应液。过夜反应后,TLC检测(PE:EA=1:2)原料反应完全,产物 $R_f=0.3$ 。将反应液抽滤,用少量DCM洗涤滤饼,滤液用6N盐酸调节pH至中性,加适量水,用DCM萃取水相两次,合并有机相,减压浓缩,柱层析分离后得到化合物2a,产率40.7%。

[0053] 将所得化合物2a溶于100mL DMF中,常温下加入 NaN_3 (100mmol),油浴温度 100°C 条件下反应。反应4h后,TLC检测(PE:EA=1:2)碘显,原料反应完全,产物 $R_f=0.6$ 。加入大量水,用EA萃取水相4次,合并有机相后,用饱和食盐水洗涤有机相2次,减压浓缩,过柱纯化,得到化合物3a,产率92.1%。

[0054] 将NaH (10.2mmol) 置于50mL圆底烧瓶中,置换 N_2 后,冰浴下加入化合物3a (5mmol)的4mL THF溶液,反应半小时。撤去冰浴,室温下加入溴乙酸叔丁酯,室温下反应6h,TLC检测(PE:EA=2:1)反应完全,产物 $R_f=0.5$ 。加水淬灭反应,EA萃取水相三次,合并有机相,饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,减压浓缩,柱层析分离,得到化合物4a,产率60.1%。

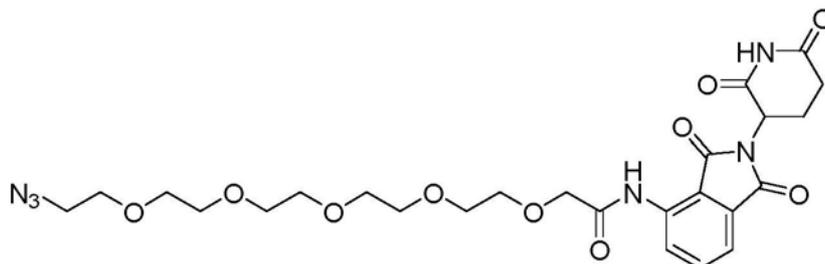
[0055] 将化合物4a (2.5mmol) 溶于甲醇 (4.2mL),将氢氧化钠固体 (6.2mmol) 溶于水 (4.2mL) 后加入反应液。过夜反应后,TLC检测(PE:EA=1:1)原料反应完全,将3.0mol/L盐酸调pH=3~4,二氯甲烷萃取,减压浓缩。向此浓缩物中滴加草酰氯 (7mmol)。反应30min,减压

除去草酰氯,加入4mL DMF和泊马度胺(1.1mmol),于90℃油浴下反应20min,TLC检测(PE:EA=1:2),原料反应完全,产物 $R_f=0.4$ 。加水,EA萃取,合并有机相,饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,减压浓缩,柱层析纯化,得化合物6a,产率62%。

[0056] ^1H NMR (500MHz, DMSO) δ 11.18 (s, 1H), 10.36 (s, 1H), 8.73 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 7.98-7.77 (m, 1H), 7.63 (d, $J=7.3\text{Hz}$, 1H), 5.17 (dd, $J=12.9, 5.4\text{Hz}$, 1H), 4.21 (s, 2H), 3.77 (dd, $J=5.8, 3.4\text{Hz}$, 2H), 3.69 (dd, $J=5.7, 3.5\text{Hz}$, 2H), 3.62-3.45 (m, 6H), 3.35 (d, $J=5.7\text{Hz}$, 2H), 2.91 (ddd, $J=17.1, 13.9, 5.4\text{Hz}$, 1H), 2.69-2.58 (m, 1H), 2.57-2.47 (m, 1H), 2.09 (ddd, $J=10.4, 5.3, 3.1\text{Hz}$, 1H)。

[0057] 化合物6b的制备:

[0058]

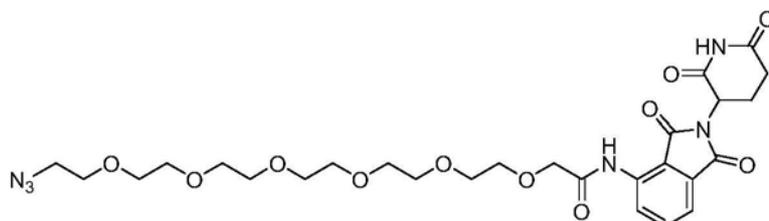


[0059] 依照化合物6a的制备方法将起始化合物2a改用化合物2b(100mmol) ($n=2$),其余合成步骤及反应条件相同,得化合物6b,产率为66%。

[0060] ^1H NMR (500MHz, DMSO) δ 11.18 (s, 1H), 10.37 (s, 1H), 8.73 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 7.95-7.82 (m, 1H), 7.64 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 1H), 5.18 (dd, $J=12.9, 5.4\text{Hz}$, 1H), 4.21 (s, 2H), 3.77 (dd, $J=5.7, 3.5\text{Hz}$, 2H), 3.68 (dd, $J=5.6, 3.6\text{Hz}$, 2H), 3.61-3.47 (m, 14H), 3.42-3.37 (m, 2H), 2.91 (ddd, $J=17.1, 14.0, 5.4\text{Hz}$, 1H), 2.60 (dd, $J=19.8, 11.2\text{Hz}$, 1H), 2.55-2.45 (m, 1H), 2.09 (ddd, $J=10.3, 5.2, 3.0\text{Hz}$, 1H)。

[0061] 化合物6c的制备:

[0062]

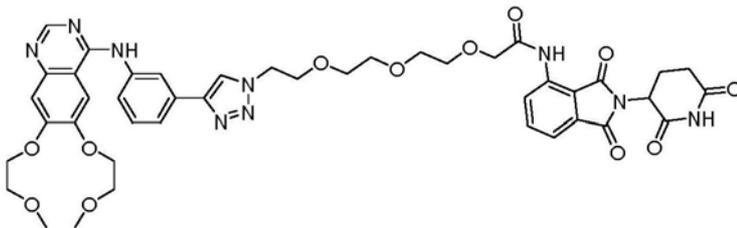


[0063] 依照化合物6a的制备方法将起始化合物2a改用化合物2c(100mmol) ($n=3$),其余合成步骤及反应条件相同,得化合物6c,产率为64%。

[0064] ^1H NMR (500MHz, DMSO) δ 11.17 (s, 1H), 10.37 (s, 1H), 8.73 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 7.91-7.83 (m, 1H), 7.64 (d, $J=7.2\text{Hz}$, 1H), 5.17 (dd, $J=12.9, 5.4\text{Hz}$, 1H), 4.21 (s, 2H), 3.77 (dd, $J=5.7, 3.5\text{Hz}$, 2H), 3.68 (dd, $J=5.6, 3.6\text{Hz}$, 2H), 3.59 (dd, $J=6.5, 3.4\text{Hz}$, 2H), 3.57-3.47 (m, 16H), 3.40-3.37 (m, 2H), 2.89 (s, 1H), 2.66-2.58 (m, 1H), 2.55 (dd, $J=13.5, 4.4\text{Hz}$, 1H), 2.09 (d, $J=5.4\text{Hz}$, 1H)。

[0065] 实施例2:PROTACs化合物ALP-1的制备

[0066]

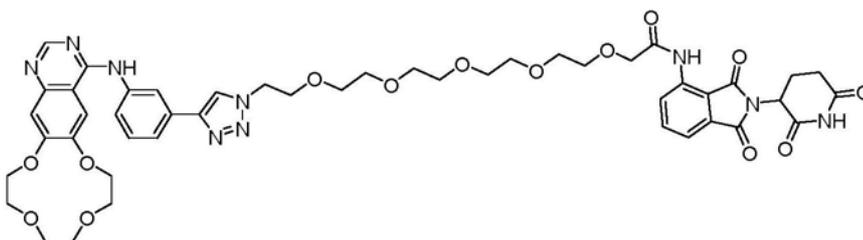


[0067] 将实施例1制得的化合物6a (0.11mmol), 厄洛替尼7 (0.11mmol) 溶于1mL DMSO中, 开启搅拌。将五水硫酸铜 (0.02mmol), 维生素C (0.04mmol) 溶于0.5mL水加入反应体系, 50℃反应4h。TLC检测 (EA:MeOH=10:1) 原料反应完全。加入水, EA萃取, 合并有机相, 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 柱层析分离, 得化合物ALP-1, 产率70%。

[0068] $^1\text{H NMR}$ (500MHz, DMSO- d_6) δ 11.19 (s, 1H), 10.29 (s, 1H), 9.61 (s, 1H), 8.67 (d, J=8.4Hz, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.47 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.88 (d, J=8.1Hz, 1H), 7.84-7.77 (m, 1H), 7.58 (d, J=7.2Hz, 1H), 7.53 (d, J=7.7Hz, 1H), 7.43 (t, J=7.9Hz, 1H), 7.20 (s, 1H), 5.15 (dd, J=12.9, 5.4Hz, 1H), 4.58 (t, J=5.1Hz, 2H), 4.30 (dt, J=16.6, 4.6Hz, 4H), 4.13 (s, 2H), 3.86 (t, J=5.2Hz, 2H), 3.82-3.73 (m, 4H), 3.69 (dd, J=5.8, 3.3Hz, 2H), 3.62 (dd, J=5.8, 3.3Hz, 2H), 3.59-3.52 (m, 4H), 3.36 (s, 6H), 2.90 (ddd, J=17.3, 14.0, 5.4Hz, 1H), 2.55 (s, 2H), 2.12-2.05 (m, 1H) .

[0069] 实施例3: PROTACs化合物ALP-2的制备

[0070]



[0071] 将实施例1制得的化合物6b (0.35mmol), 厄洛替尼7 (0.35mmol) 溶于2mL DMSO中, 开启搅拌。将五水硫酸铜 (0.06mmol), 维生素C (0.14mmol) 溶于2mL水加入反应体系, 50℃反应5h。TLC检测 (EA:MeOH=10:1) 原料反应完全, 加入水, EA萃取, 合并有机相, 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 柱层析分离, 得化合物ALP-2, 产率72%。

[0072] $^1\text{H NMR}$ (500MHz, DMSO- d_6) δ 11.18 (s, 1H), 10.33 (s, 1H), 9.60 (s, 1H), 8.70 (d, J=8.4Hz, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.47 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.90 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.87-7.82 (m, 1H), 7.61 (d, J=7.3Hz, 1H), 7.54 (d, J=7.7Hz, 1H), 7.45 (t, J=7.9Hz, 1H), 7.22 (s, 1H), 5.16 (dd, J=12.9, 5.4Hz, 1H), 4.59 (t, J=5.1Hz, 2H), 4.30 (dt, J=14.2, 4.5Hz, 4H), 4.17 (s, 2H), 3.88 (t, J=5.2Hz, 2H), 3.81-3.70 (m, 6H), 3.61 (dd, J=5.6, 3.6Hz, 2H), 3.56-3.47 (m, 8H), 3.43 (t, J=4.2Hz, 6H), 2.89 (ddd, J=18.3, 13.9, 5.3Hz, 2H), 2.61 (dd, J=15.2, 2.4Hz, 1H), 2.11-1.95 (m, 2H) .

[0073] 实施例4: PROTACs化合物ALP-3的制备

30min离心,取上清,即细胞总蛋白。用BCA法定量检测蛋白量,用5×蛋白上样缓冲液稀释蛋白后100℃变性5min。蛋白在SDS—PAGE电泳分离,转膜,封闭2h,一抗4℃孵育过夜。TBST洗膜,二抗1:2000孵育2h,洗膜,化学发光后显影。

[0087] 实验结果表明(图5),ALP-2和ALP-3均能降解EGFR蛋白,其中化合物ALP-3具有较佳的降解效果。

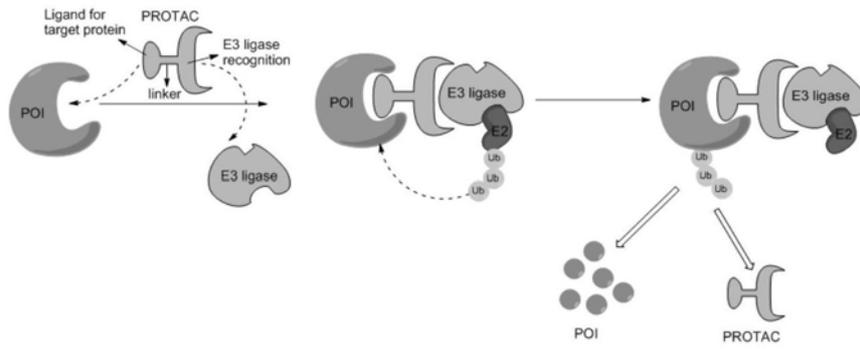


图1

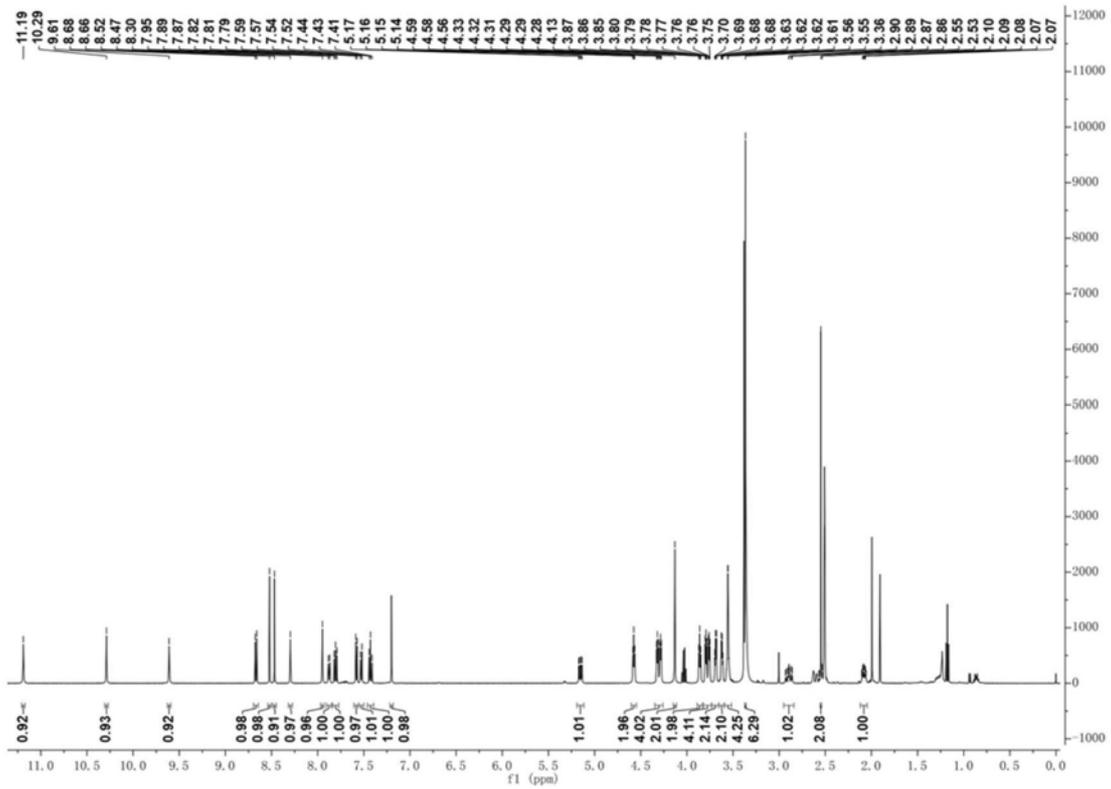


图2

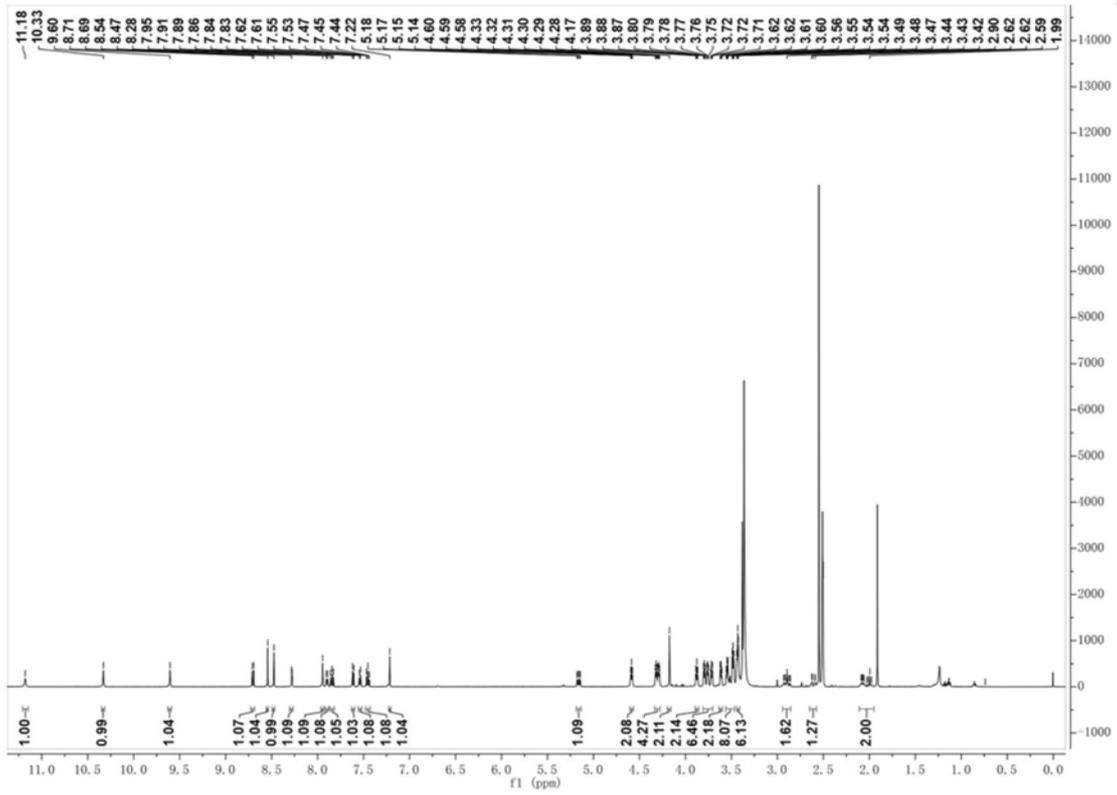


图3

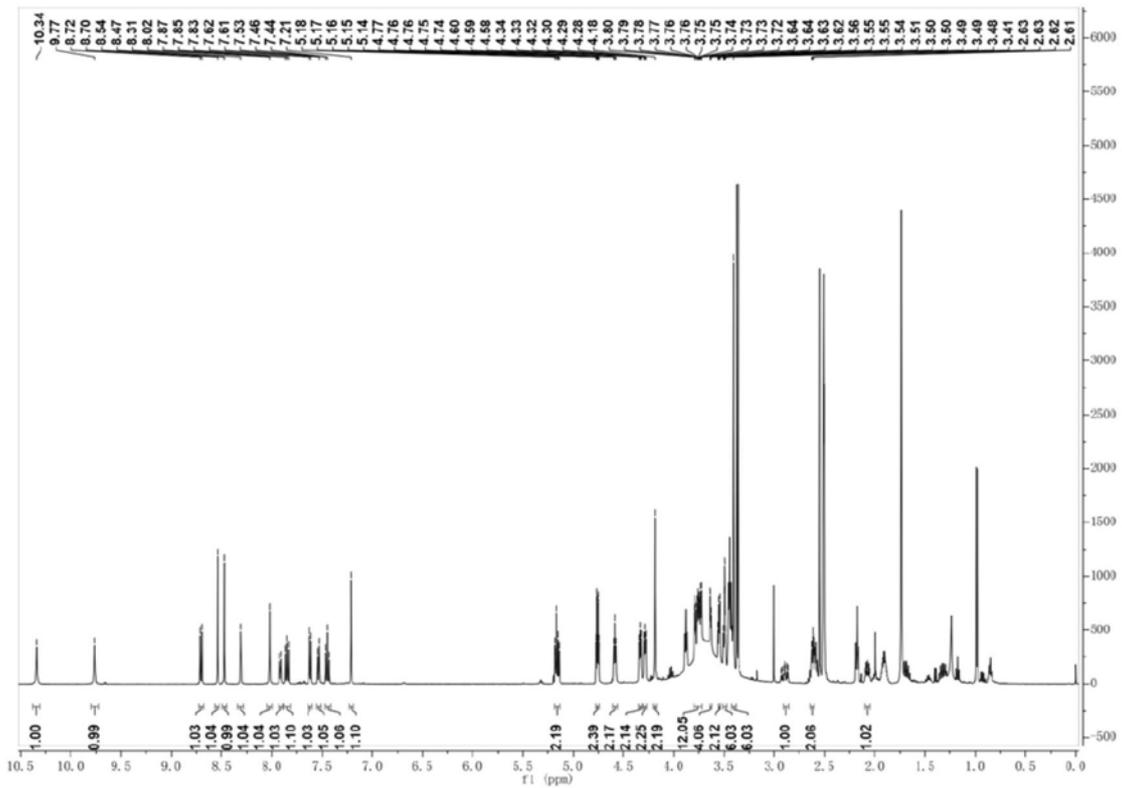


图4

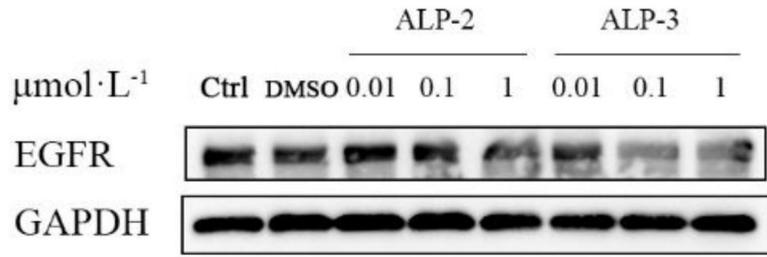


图5