



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108586439 A

(43)申请公布日 2018.09.28

(21)申请号 201810560174.1

(22)申请日 2018.06.03

(71)申请人 刘思良

地址 250355 山东省济南市长清区大学科技园大学路4655号山东中医药大学南门和谐宅园

(72)发明人 刘思良

(51)Int.Cl.

C07D 405/12(2006.01)

A61K 31/443(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 35/02(2006.01)

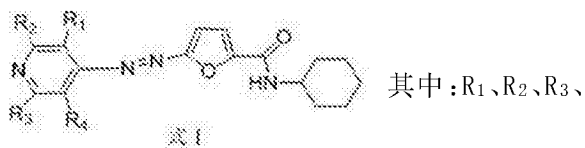
权利要求书1页 说明书7页

(54)发明名称

一种Raf激酶抑制剂及其在癌症治疗中的应用

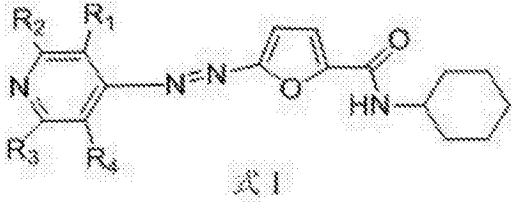
(57)摘要

本发明公开了一种Raf激酶抑制剂式I及其在癌症治疗中的应用，



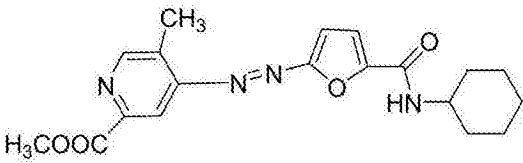
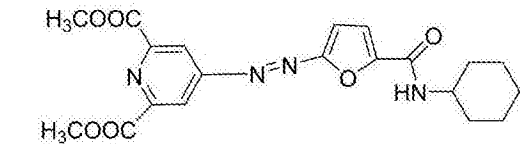
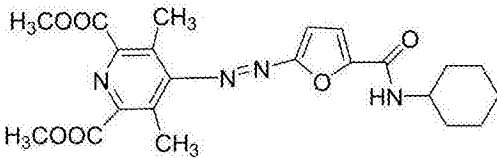
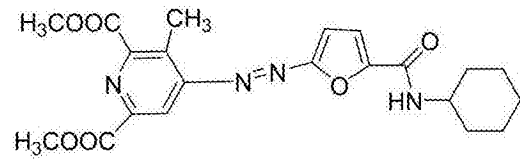
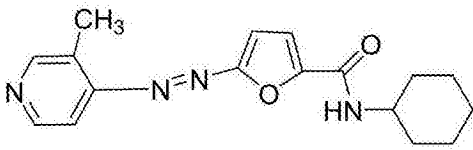
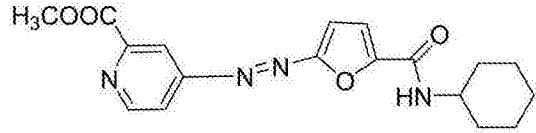
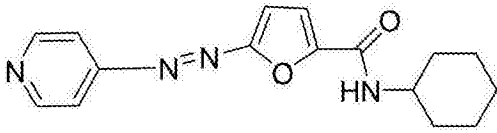
体外药理实验证实本发明化合物式I具有Raf-1激酶的抑制活性，可以抑制A498、HT-29、COLO-205活性。与Raf激酶抑制剂有关的癌症可以是黑色素瘤、肝癌、肾癌、急性白血病、非小细胞肺癌、前列腺癌、甲状腺癌、皮肤癌、结肠直肠癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、骨髓增生异常综合症、食管癌、胃癌或间皮瘤等。

1. 一种通式结构为式I的化合物及其药学上可接受的盐或溶剂化物



其中：R₁、R₂、R₃、R₄各自独立的选自H、CH₃或COOCH₃。

2. 如权利要求1所述的化合物式I，其特征是，选自以下化合物：



3. 如权利要求1或2所述的化合物式I作为Raf激酶抑制剂的应用。

4. 如权利要求1或2所述的化合物式I在制备治疗癌症药物中的应用。

5. 如权利要求4所述的应用，所述的癌症选自黑色素瘤、肝癌、肾癌、急性白血病、非小细胞肺癌、前列腺癌、甲状腺癌、皮肤癌、结肠直肠癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、骨髓增生异常综合症、食管癌、胃癌或间皮瘤等。

一种Raf激酶抑制剂及其在癌症治疗中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于化学医药领域,涉及一种Raf激酶抑制剂式I及其在癌症治疗中的应用。

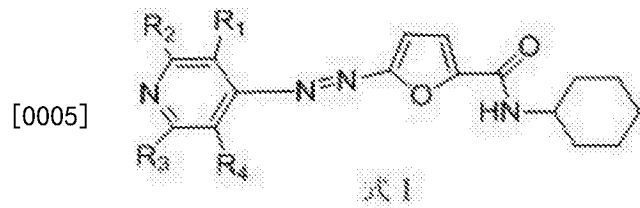
背景技术

[0002] 随着分子生物学技术的发展,以Raf-1为靶点的肿瘤治疗逐渐受到人们的关注和认可。由于Raf-1激酶在信号通路的调节以及许多复杂的病理生理现象调控方面发挥重要作用,其在肿瘤治疗方面亦发挥着重要作用,以Raf-1为靶点的治疗研究已经在临床前期和不同临床试验中应用,并且与传统的化疗方法相比具有毒性小且特异性强的特点,因此以Raf-1为靶点的治疗有相当大的应用前景。研究表明,在大部分真核细胞中存在有Ras/Raf/MEK/ERK信号通路,随着人们对Ras/Raf/MEK/ERK信号转导通路的研究,以Raf-1为靶点的肿瘤治疗前景将逐渐扩展。从临床研究进入临床治疗,为以后的肿瘤治疗提供更多的手段与方法。

[0003] 索拉非尼(Sorafenib, BAY43-9006)是第一个通过临床试验的Raf抑制剂。临床前试验显示,在肿瘤细胞株以及Ras激酶依赖型肿瘤的异种移植模型中,索拉非尼能显著抑制Raf-1和B-Raf的活性。进一步研究表明,索拉非尼可以用于治疗晚期肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)以及原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)。然而,索拉非尼单体或联合用药对于黑色素瘤尤其是携带B-Raf突变的恶性黑色素瘤的临床治疗效果不是很理想。索拉非尼作为一种特异性的Raf-1激酶抑制剂被研发,尽管其对突变的B-Raf不能充分抑制,但它对血管内皮生长因子(vascularendothelial growth factor, VEGF)和血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)受体激酶具有高度抑制效应。

发明内容

[0004] 本发明公开了一种化合物式I,其结构为:

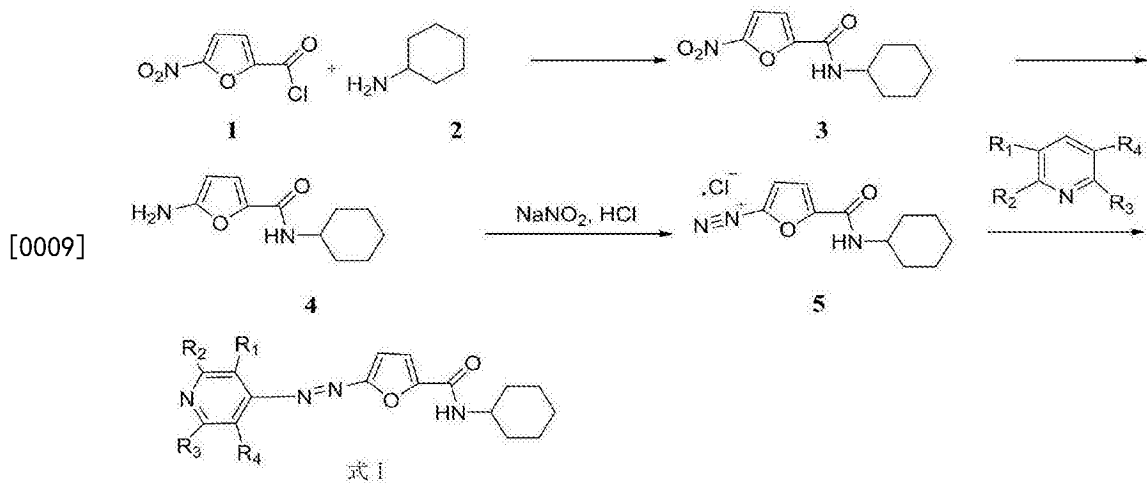


其中:R₁、R₂、R₃、R₄各自独立的选自H、CH₃或COOCH₃。进一步地,R₁、R₄各自独立的选自H或CH₃,R₂、R₃各自独立的选自H或-COOCH₃。本发明还涉及所述化合物式I的药学上可接受的盐或溶剂化物。

[0006] 进一步地,一些优选的方案中所述化合物式I为

化合物编号	结构	结构数据
RY-5001		LC-MS(ESI, pos, ion) m/z: 299[M+H]
RY-5002		LC-MS(ESI, pos, ion) m/z: 357 [M+H]
RY-5003		LC-MS(ESI, pos, ion) m/z: 313[M+H]
[0007] RY-5004		LC-MS(ESI, pos, ion) m/z: 429 [M+H]
RY-5005		LC-MS(ESI, pos, ion) m/z: 443[M+H]
RY-5006		LC-MS(ESI, pos, ion) m/z: 415[M+H]
RY-5007		LC-MS(ESI, pos, ion) m/z: 371[M+H]

[0008] 本发明的另一目的公开了所述的化合物式I的合成路线为:



[0010] 具体合成方法为:

[0011] 1) 合适的温度下,化合物1与环己基胺(化合物2)发生缩合反应生成N-(环己基氨基)-5-硝基呋喃-2-甲酰胺(化合物3);

[0012] 2) 化合物3在Pd-C催化剂作为催化剂的作用下发生还原反应,经过柱色谱分离生成5-氨基-N-(环己基氨基)呋喃-2-甲酰胺(化合物4);

[0013] 3) 化合物4与 NaNO_2/HCl 反应制得重氮盐5-((环己基氨基)氨基甲酰基)呋喃-2-重氮盐(化合物5);

[0014] 4) 在碱性条件下,化合物5再与相对应的共轭化合物偶合制得最终产物。

[0015] 进一步地,所述步骤1)的反应温度范围是 $0\sim 10^\circ\text{C}$,优选 $3\sim 5^\circ\text{C}$ 。

[0016] 进一步地,所述步骤2)中柱色谱分离所用的展开剂可以是乙酸乙酯:甲醇=1:1,乙酸乙酯:冰乙酸=4:1,优选乙酸乙酯:甲醇=1:1。

[0017] 进一步地,所述步骤4)中的碱可以是碳酸钠,碳酸钾,醋酸钾,优选碳酸钠。

[0018] 本发明的另一目的公开了所述化合物式I作为Raf激酶抑制剂进行药物开发,与Raf激酶抑制剂有关的癌症可以是黑色素瘤、肝癌、肾癌、急性白血病、非小细胞肺癌、前列腺癌、甲状腺癌、皮肤癌、结肠直肠癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、骨髓增生异常综合症、食管癌、胃癌或间皮瘤等。

[0019] 本发明化合物Raf激酶抑制活性和对不同肿瘤细胞的体外抑制活性在试验例部分进行详细公开。本发明化合物药理药效实验中还进行了体外对结核分枝杆菌的抑制活性实验,简述如下:

[0020] 在96孔板中进行,受试化合物溶于适量DMSO中,配成浓度为 $12.8\text{mg}/\text{ml}$ 的溶液,然后加入到7H9-OADC培养液中,配成终浓度为 $128\mu\text{g}/\text{ml}$ 的储存液,再以液体培养基稀释到实验所需的浓度。受试的药物终浓度设置如下:128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$,共11个浓度梯度。检测时,各取上述药物溶液 $100\mu\text{L}$ 于96孔板中,同一药物稀释度设置三组平行对照。结核分枝杆菌标准株H37Rv加到培养孔中, 37°C 培养一周后观察受试化合物对结核分枝杆菌的最低抑菌浓度,其中RY-5002、RY-5004、RY-5005、RY-5007最低抑菌浓度小于 $15\mu\text{M}$ 。

[0021] 本发明所述的药学上可接受的盐是指本发明化合物的有机盐和无机盐。药学上可接受的无毒的酸形成的盐包括,但并不限于,无机酸盐,如盐酸盐,氢溴酸盐,磷酸盐,硫酸盐,高氯酸盐;有机酸盐,如乙酸盐,草酸盐,马来酸盐,酒石酸盐,柠檬酸盐,琥珀酸盐,丙二酸盐;或通过书籍文献上所记载的其他方法如离子交换法来得到这些盐。其他药学上可接受的盐包括,己二酸盐,藻酸盐,抗坏血酸盐,天冬氨酸盐,苯磺酸盐,苯甲酸盐,重硫酸盐,硼酸盐,丁酸盐,樟脑酸盐,樟脑磺酸盐,环戊基丙酸盐,二葡萄糖酸盐,十二烷基硫酸盐,乙磺酸盐,甲酸盐,反丁烯二酸盐,葡庚糖酸盐,甘油磷酸盐,葡萄糖酸盐,半硫酸盐,庚酸盐,己酸盐,氢碘酸盐,2-羟基-乙磺酸盐,乳糖醛酸盐,乳酸盐,月桂酸盐,月桂基硫酸盐,苹果酸盐,甲磺酸盐,2-萘磺酸盐,烟酸盐,硝酸盐,油酸盐,棕榈酸盐,扑酸盐,果胶酸盐,过硫酸盐,3-苯基丙酸盐,苦味酸盐,特戊酸盐,丙酸盐,硬脂酸盐,硫氰酸盐,对甲苯磺酸盐,十一酸盐,戊酸盐,等等。通过与适当的碱反应得到的盐包括碱金属,碱土金属,铵和 N^+ (C1-4烷基)4的盐。水溶性或油溶性或分散产物可以通过季铵化作用得到。可以形成盐的碱金属或碱土金属包括钠,锂,钾,钙,镁,等等。药学上可接受的盐进一步包括适当的、无毒的铵,季铵盐和抗平衡离子形成的胺阳离子,如卤化物,氢氧化物,羧化物,硫酸化物,磷酸化物,硝

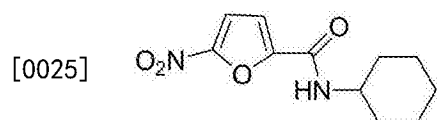
酸化物,C1-8磺酸化和芳香磺酸化物。

[0022] 本发明所述的溶剂化物是指一个或多个溶剂分子与本发明的化合物所形成的缔合物。形成溶剂化物的溶剂包括,但并不限于,水,异丙醇,乙醇,甲醇,二甲亚砜,乙酸乙酯,乙酸和氨基乙醇。

具体实施方式

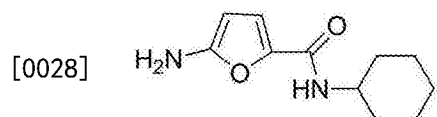
[0023] 实施例1:N-(环己基氨基)-5-((吡啶基-4)二氮烯基)呋喃-2-甲酰胺的合成

[0024] 1-1、N-(环己基氨基)-5-硝基呋喃-2-甲酰胺的合成



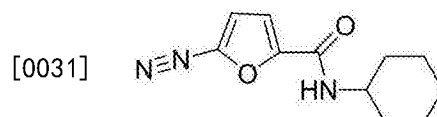
[0026] 将水(40mL)、NaOH(1.13g,28.25mmol)、环己基胺(化合物2)(1.40g,14.13mmol)加入到100mL反应瓶中,并在室温下搅拌至溶解。冰浴冷却至3~5℃后,分批加入5-硝基呋喃-2-碳酰氯(化合物1)(2.00g,11.39mmol),加完以后,继续搅拌1小时,然后在室温下搅拌2小时,得到浅黄绿色溶液。将上述溶液倒入由37%浓盐酸(54.3mL)和冰(约20.0g)组成的混合物中,析出晶体,抽滤,滤饼分别用水、丙酮洗涤,干燥后得浅黄色固体N-(环己基氨基)-5-硝基呋喃-2-甲酰胺(化合物3),2.49g,产率92%。¹H-NMR(400MHz,CDCl₃)δ:1.20-1.37(m,5H),1.62(m,1H),1.84(m,2H),2.19(m,2H),4.95(m,1H),6.26(s,1H),7.79(d,1H),7.99(d,1H)。¹³C-NMR(125MHz,CDCl₃)δ:24.73,25.92,33.63,50.21,111.99,114.67,150.14,152.40,161.37.LC-MS(ESI,pos,ion)m/z:239[M+H]。

[0027] 1-2、5-氨基-N-(环己基氨基)呋喃-2-甲酰胺的合成



[0029] 在100mL氢化反应釜中,加入化合物3(2.49g,10.48mmol)、乙醇(20mL)、5%Pd-C催化剂(0.31g),通入H₂,常压、室温搅拌反应5~6个小时(反应过程用TLC进行跟踪,所用展开剂为乙酸乙酯:甲醇=1:1)。反应结束后,过滤,减压浓缩滤液,然后在冰浴冷却下倒入乙醚(约70.0mL)中,有结晶析出。抽滤,滤饼用乙醚进行洗涤,得白色固体5-氨基-N-(环己基氨基)呋喃-2-甲酰胺(化合物4),1.61g,产率74%。¹H-NMR(400MHz,CDCl₃)δ:1.20-1.35(m,5H),1.66(m,1H),1.84(m,2H),2.19(m,2H),4.95(m,1H),6.16(s,1H),7.20(d,1H),7.44(d,1H),8.52(s,2H)。¹³C-NMR(125MHz,CDCl₃)δ:24.05,25.87,33.53,50.21,86.35,114.17,143.55,155.00,161.58.LC-MS(ESI,pos,ion)m/z:209[M+H]。

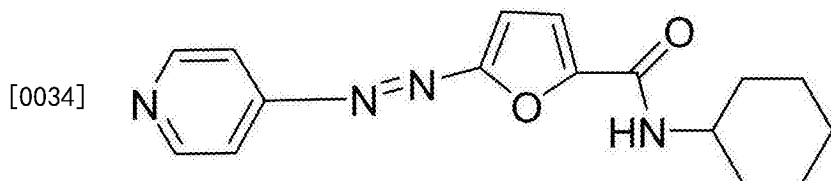
[0030] 1-3、5-((环己基氨基)氨基甲酰基)呋喃-2-重氮盐的合成



[0032] 在100mL反应瓶中,加入化合物4(1.61g,7.75mmol)、37%盐酸(2.06mL,24.63mmol)、水(17.0mL),搅拌使固体溶解,冰盐浴冷却至-5℃,滴加预冷的亚硝酸钠(7.85molmol)和水(3.43mL)配成的溶液。滴毕,维持冰浴(约-5~0℃)并搅拌反应3小时,得重氮盐溶液5-((环己基氨基)氨基甲酰基)呋喃-2-重氮盐(化合物5),直接用于下一步反

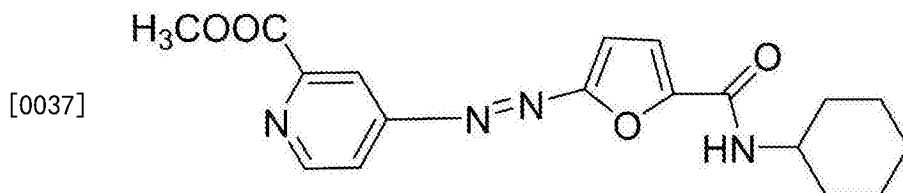
应。LC-MS (ESI, pos, ion) m/z: 257 [M+H]。

[0033] 1-4,N-(环己基氨基)-5-((吡啶基-4)二氮烯基)呋喃-2-甲酰胺的合成



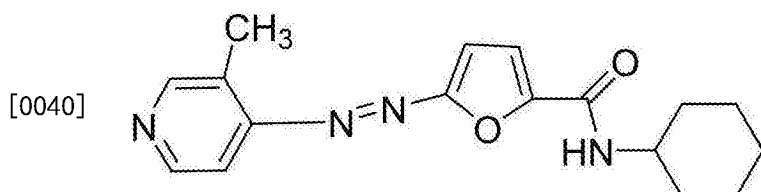
[0035] 在100mL反应瓶中,加入NaOH(0.40g,10.00mmol)、Na₂CO₃(0.77g,7.28mmol)、水(7.75mL)、吡啶(6.00mmol),搅拌使固体溶解,冰盐浴冷却至-2℃,分批加入重氮盐溶液化合物5(2.22g,6.05mmol)。加毕,补加少量NaHCO₃,调至反应液pH=8,搅拌反应3~4小时。将反应液倾入由37%盐酸(2.35mL)和冰(约2.35g)配成的混合液中,析出大量土黄色固体,抽滤,滤饼以水洗涤(至滤液pH=4~5),干燥得粗品。以乙醇-水重结晶,得桔黄色固体N-(环己基氨基)-5-((吡啶基-4)二氮烯基)呋喃-2-甲酰胺,1.50g,产率83%。¹H-NMR(400MHz,CDCl₃)δ:1.19-1.21(m,4H),1.41-1.54(m,2H),1.70-1.77(m,4H),3.82(m,1H),5.67(s,1H),6.58(d,1H),7.44(d,1H),7.82(d,2H),8.63(d,2H)。¹³C-NMR(125MHz,CDCl₃)δ:24.73,25.92,33.63,50.21,100.91,114.37,114.67,145.97,150.04,150.14,158.51,161.37。LC-MS(ESI,pos,ion)m/z:299[M+H]。

[0036] 实施例2:N-(环己基氨基)-5-((2-甲酸甲酯基-吡啶基-4)二氮烯基)呋喃-2-甲酰胺的合成



[0038] 在100mL反应瓶中,加入NaOH(0.40g,10.00mmol)、Na₂CO₃(0.77g,7.28mmol)、水(7.75mL)、2-甲酸甲酯基吡啶(6.00mmol),搅拌使固体溶解,冰盐浴冷却至-2℃,分批加入重氮盐溶液化合物5(2.22g,6.05mmol)。加毕,补加少量NaHCO₃,调至反应液pH=8,搅拌反应3~4小时。将反应液倾入由37%盐酸(2.35mL)和冰(约2.35g)配成的混合液中,析出大量土黄色固体,抽滤,滤饼以水洗涤(至滤液pH=4~5),干燥得粗品。以乙醇-水重结晶,得桔黄色固体N-(环己基氨基)-5-((2-甲酸甲酯基-吡啶基-4)二氮烯基)呋喃-2-甲酰胺,1.92g,产率89%。LC-MS(ESI,pos,ion)m/z:357[M+H]。

[0039] 实施例3:N-(环己基氨基)-5-((3-甲基-吡啶-4-基)二氮烯基)呋喃-2-甲酰胺的合成



[0041] 在100mL反应瓶中,加入NaOH(0.40g,10.00mmol)、Na₂CO₃(0.77g,7.28mmol)、水(7.75mL)、3-甲基吡啶(6.00mmol),搅拌使固体溶解,冰盐浴冷却至-2℃,分批加入重氮盐溶液化合物5(2.22g,6.05mmol)。加毕,补加少量NaHCO₃,调至反应液pH=8,搅拌反应3~4

小时。将反应液倾入由37%盐酸(2.35mL)和冰(约2.35g)配成的混合液中,析出大量土黄色固体,抽滤,滤饼以水洗涤(至滤液pH=4~5),干燥得粗品。以乙醇-水重结晶,得桔黄色固体N-(环己基氨基)-5-((3-甲基-吡啶-4-基)二氮烯基)呋喃-2-甲酰胺,1.53g,产率81%。LC-MS (ESI, pos, ion) m/z: 313 [M+H]。

[0042] 试验例1:Raf-1激酶的抑制活性测试

[0043] ADP Glo模式用来测试Raf-1的抑制活性。测试过程如下所示。缓冲液的成分是25mM HEPES,10mM MgCl₂,0.01% Triton X-100,100μg/mL BSA,2.5mM DTT,pH=7.4。将缓冲液、酶、底物、ATP和待测物混合在384-孔的细胞板上,总体积是10μL。然后,细胞板在30℃下孵育1小时,再以10μL/孔的剂量向反应混合物中加入ADP Glo试剂,再在27℃孵育40分钟。接着,再向检测板中加入检测试剂(20μL/孔),并在27℃孵育30分钟,最后读数。此外,Hotspot激酶试验也用来测试化合物的抑制活性(IC₅₀),用合适的激酶浓度对化合物进行滴定。

[0044] 表1对Raf-1激酶的抑制活性

[0045]

化合物编号	IC ₅₀ (μM)
RY-5001	0.35
RY-5002	0.25
RY-5003	0.29
RY-5004	0.19
RY-5005	0.21
RY-5006	0.26
RY-5007	0.29

[0046] 由表1可知,本发明涉及的化合物具有Raf-1激酶抑制活性,可以在与Raf-1激酶相关的疾病中确定适应症进行更加深入的药理活性研究。

[0047] 试验例2:CellTiter-Glo法测试细胞抑制活性

[0048] 1、细胞株:

[0049] 人肾癌细胞株A498;人结肠癌细胞株HT-29;人结肠癌细胞株COLO-205。

[0050] 2、细胞铺板:

[0051] 收集处于指数生长期的细胞并用Vi-Cell XR细胞计数仪进行活细胞计数。用培养基将细胞悬液调整到适当的浓度,每孔加90μL细胞悬液于96-孔细胞培养板。铺好的细胞置于37℃,5%CO₂的培养箱培养24小时。

[0052] 3、化合物处理:

[0053] 对设定为化合物处理板,每株细胞每孔分别加10μL相应的3倍梯度稀释的10×化合物溶液(最终起始浓度20μM或10μM),每个药物浓度各3个复孔。

[0054] 读T3:药物处理72小时后,每孔加入50μL预先融化并平衡到室温的CTG溶液,用微孔板震荡器混匀2分钟,于室温放置10分钟后用Envision2104读板仪测定luminescence信号。

[0055] 4、数据分析:

[0056] POC(percent of control:与对照的百分比)的计算公式:

[0057] 化合物处理孔的值/DMSO处理孔的平均值*100%

[0058] 其中化合物处理孔的值为药物处理孔的T3 luminescence值,DMSO处理孔的平均值为每块板上6个DMSO处理孔的T3 luminescence值的平均值,应用GraphPad Prism 5.0软件,使用非线性回归模型绘制S型剂量-POC曲线并计算IC₅₀值。

[0059] 5、实验结果:

[0060] 表2对不同肿瘤细胞的抑制活性 (IC₅₀值)

[0061]

化合物编号	IC ₅₀ (μM)		
	A498	HT-29	COLO-205
RY-5001	<10	<10	<10
RY-5002	<10	<10	<10
RY-5003	<10	<10	<10
RY-5004	<10	<10	<10
RY-5005	<10	<10	<10
RY-5006	<10	<10	<10
RY-5007	ND	<10	ND
Sorafenib	7.4	9.8	9.3

[0062] 由表2可知,本发明所涉及的化合物对A498、HT-29和COLO-205具有体外抑制活性。与Raf激酶抑制剂有关的疾病可以是黑色素瘤、肝癌、肾癌、急性白血病、非小细胞肺癌、前列腺癌、甲状腺癌、皮肤癌、结肠直肠癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、骨髓增生异常综合症、食管癌、胃癌或间皮瘤等。