



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110885332 B

(45) 授权公告日 2022.03.18

(21) 申请号 201911243548.8

审查员 吴永英

(22) 申请日 2019.12.06

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 110885332 A

(43) 申请公布日 2020.03.17

(73) 专利权人 中国人民解放军第二军医大学  
地址 200433 上海市杨浦区翔殷路800号

(72) 发明人 盛春泉 董国强 程俊飞 陈龙  
王旭

(74) 专利代理机构 上海卓阳知识产权代理事务  
所(普通合伙) 31262

代理人 曹翠娟

(51) Int.Cl.

C07D 487/04 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书2页 说明书15页 附图1页

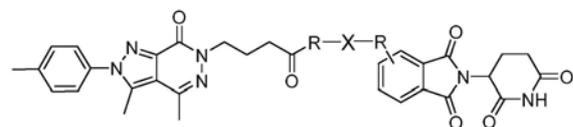
(54) 发明名称

一种PDE δ 蛋白降解靶向嵌合体及其制备方法和应用

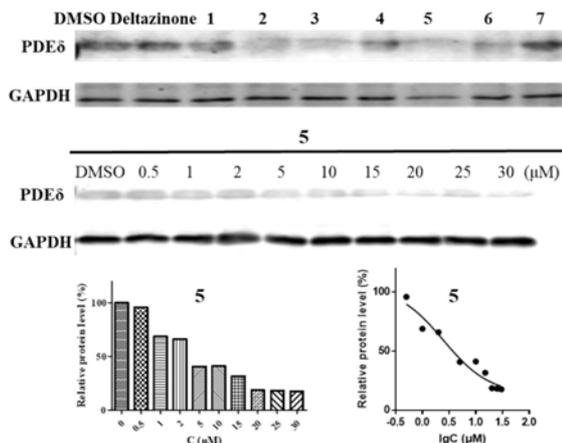
(57) 摘要

本发明涉及医药技术领域,具体是一种PDE δ 蛋白降解靶向嵌合体及其制备方法和应用,所述PDE δ 蛋白降解靶向嵌合体是具有化学结构通式(I)的衍生物及其药学上可接受的盐类。药理实验表明,本发明所述的衍生物或盐,对KRAS-PDE δ 蛋白相互作用具有很强的抑制活性,而且具有较强的体外抗肿瘤活性。本发明还提供了上述衍生物及其药学上可接受的盐的制备方法。体内实验表明,化合物(I)能够有效的下调体内PDE δ 表达量,并且能够明显的延缓肿瘤生长,可以应用于由于Kras突变引起的肿瘤疾病。该类化合物作为首次报道的PDE δ 蛋白降解靶向嵌合体,具有进一步的开发和研究价值。

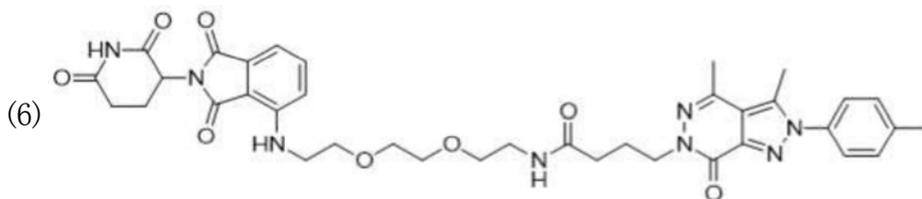
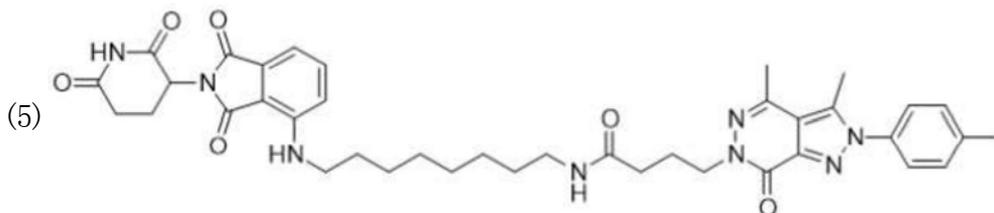
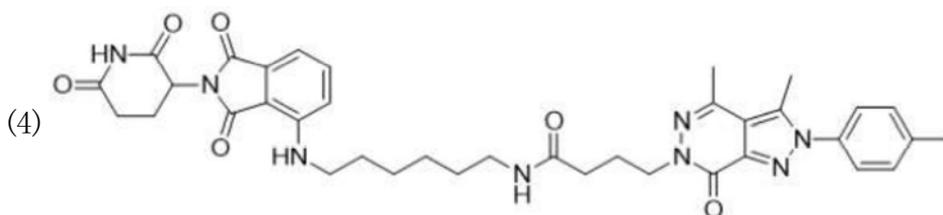
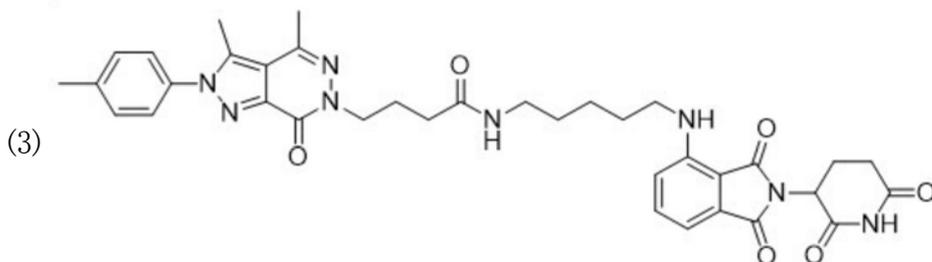
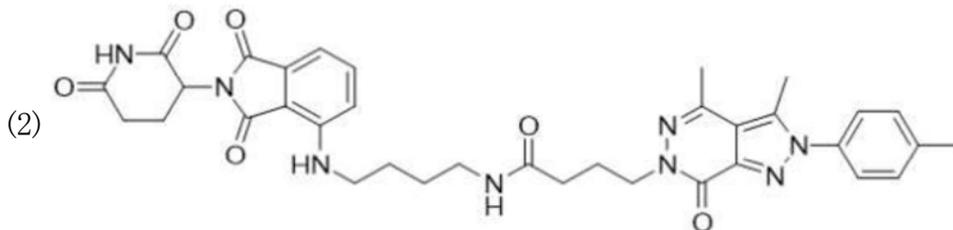
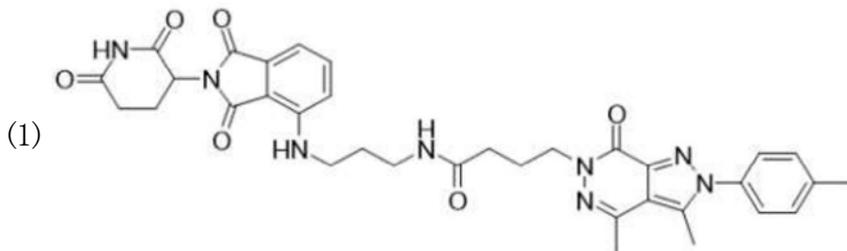
CN 110885332 B

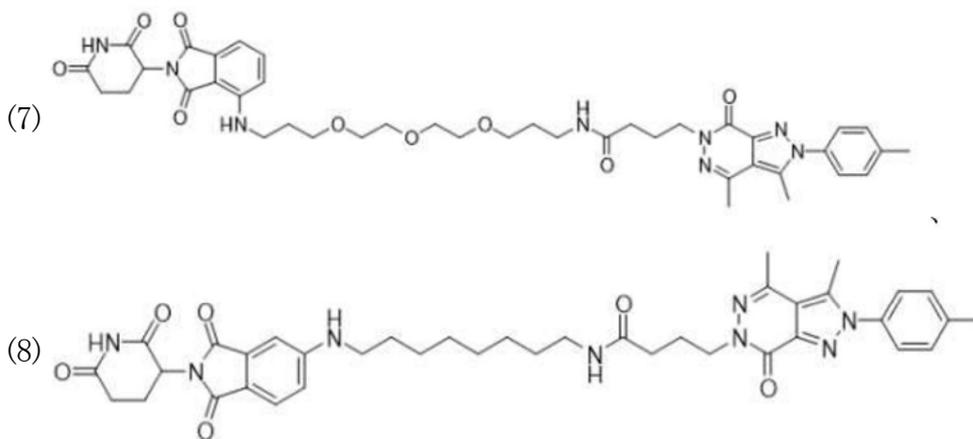


式(I)



1. 一种化合物或其药学上可接受的盐,其特征在于,所述化合物为:





2. 根据权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其特征在于,所述药学上可接受的盐为无机酸盐或有机酸盐;所述的无机酸盐选自盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸;所述的有机酸盐选自甲磺酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、萘磺酸、柠檬酸、酒石酸、乳酸、丙酮酸、乙酸、马来酸或琥珀酸、富马酸、水杨酸、苯基乙酸、杏仁酸。

3. 权利要求1-2任一所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备抗肿瘤药物中的应用,所述肿瘤为KRAS突变引起的肿瘤,选自胰腺癌、结直肠癌和肺癌。

4. 权利要求1-2任一所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备KRAS-PDE $\delta$ 蛋白结合抑制剂中的应用。

5. 权利要求1-2任一所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备PDE $\delta$ 蛋白降解靶向嵌合体中的应用。

6. 一种药物组合物,其特征在于,包含治疗有效量的一种或多种权利要求1-2任一所述的化合物以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。

## 一种PDE $\delta$ 蛋白降解靶向嵌合体及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医药技术领域,具体地说,是一种PDE $\delta$ 蛋白降解靶向嵌合体及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] RAS蛋白能够调节人体内的许多细胞活动,包括细胞增殖,细胞分化等。大约有30%的肿瘤是由于RAS基因发生突变引起的,其中KRAS是RAS家族中最常见的突变亚型,大约有30%的肺癌,45%的结肠癌,90%的胰腺癌是由KRAS突变引起的。因此KRAS被公认为治疗癌症的一个有吸引力的靶点。但是由于KRAS蛋白表面缺少良好的小分子结合空腔,基于KRAS的小分子抑制剂的研发一直是药物化学领域的难点之一。

[0003] PDE $\delta$ 也被命名为PDE6D,其能够影响细胞中KRAS的动态分布并促进KRAS蛋白在细胞膜上的富集。法尼基化的KRAS蛋白在与PDE $\delta$ 结合后在细胞内被溶解,随后其扩散得到增强至整个细胞中。之后,KRAS通过释放因子Ar12从PDE $\delta$ 结合袋释放,被回收小体捕获并通过囊泡运输重新定位到质膜。异常的致癌信号最终是由质膜上高浓度的KRAS引起的。在前期,人们针对KRAS-PDE $\delta$ 蛋白相互作用发现了一系列小分子抑制剂,尽管这些抑制剂与PDE $\delta$ 有着很强的结合,但是由于Ar12诱导PDE $\delta$ 高亲和力抑制剂快速释放,最终降低了其抗肿瘤作用。为了克服这些固有的局限性,迫切需要开发一种新的策略来更有效地瞄准PDE $\delta$ 。

[0004] 蛋白水解靶向嵌合体是一种新兴的消除致病蛋白的治疗策略,在此,本发明通过连接PDE $\delta$ 小分子抑制剂和E3连接酶配体设计了第一代PDE $\delta$ 降解剂。

[0005] 关于本发明一种PDE $\delta$ 蛋白降解靶向嵌合体及其制备方法和应用目前还未见报道。

### 发明内容

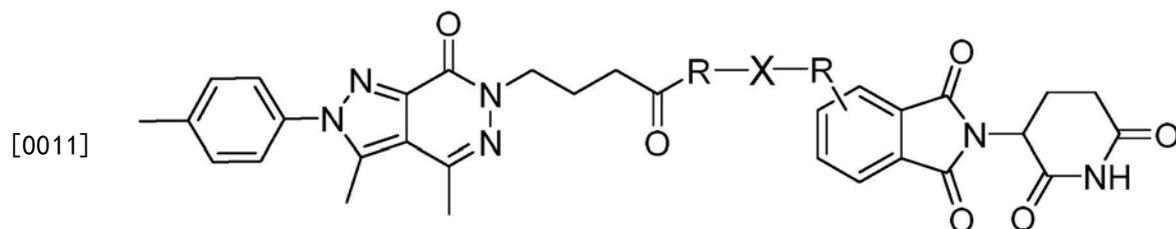
[0006] 本发明的第一个目的是针对现有技术的不足,提供一种PDE $\delta$ 蛋白降解靶向嵌合体。

[0007] 本发明的第二个目的是针对现有技术的不足,提供一种PDE $\delta$ 蛋白降解靶向嵌合体的用途。

[0008] 本发明的第三个目的是针对现有技术中的不足,提供一种药物组合物。

[0009] 为实现上述第一个目的,本发明采取的技术方案是:

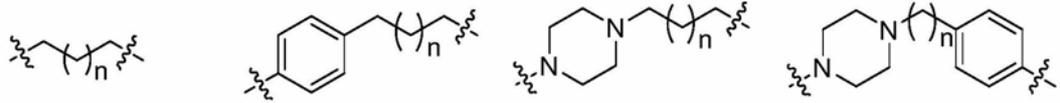
[0010] 式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐:



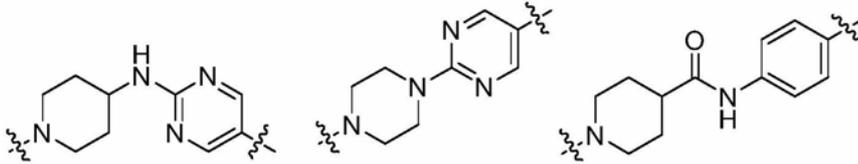
式(I)

[0012] 其中X为1~12个碳原子的饱和或不饱和的直链烷基、氧杂链、苯基、杂环基团或者

以下任一基团：

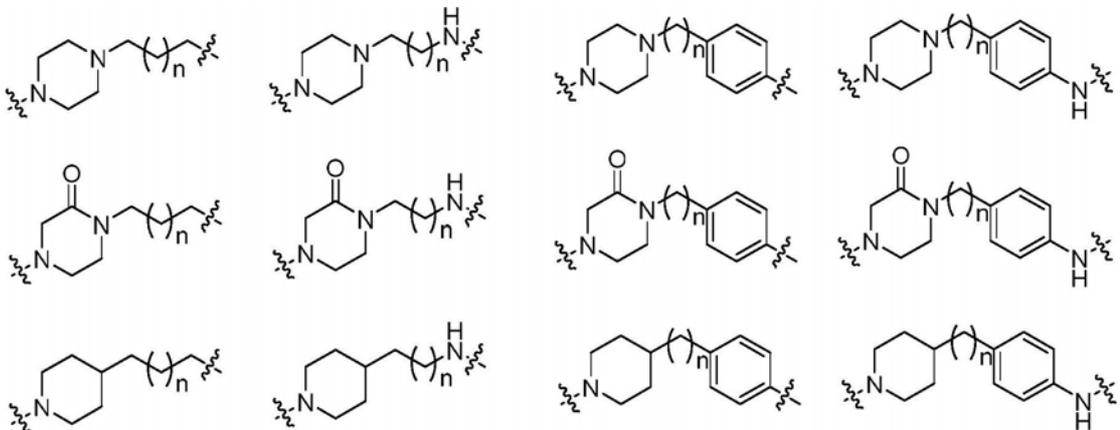


[0013]



[0014] 其中 $n=0\sim 10$ ,所述杂环基团为哌嗪基、吡咯基、吡唑基、呋喃基、噻吩基、噁唑基、异噁唑基、噻唑基、异噻唑基、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基或哒嗪基；

[0015] 其中R为氨基、碳原子、哌嗪基、哌啶基、杂环基团或者以下任一基团：



[0017] 其中 $n=0\sim 8$ ,所述杂环基团为哌嗪基、吡咯基、吡唑基、呋喃基、噻吩基、噁唑基、异噁唑基、噻唑基、异噻唑基、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基或哒嗪基。

[0018] 作为本发明的一个优选实施方案,所述化合物为：

[0019] 4-(3,4-二甲基-7-氧代-2-(对甲苯基)-2,7-二氢-6H-吡唑啉[3,4-d]哒嗪-6-基)-N-(3-((2-(2,6-二氧哌啶-3-基)-1,3-二氧异吡啶-4-基)氨基)丙基)丁酰胺(1)

[0020] 4-(3,4-二甲基-7-氧代-2-(对甲苯基)-2,7-二氢-6H-吡唑啉[3,4-d]哒嗪-6-基)-N-(4-((2-(2,6-二氧哌啶-3-基)-1,3-二氧异吡啶-4-基)氨基)丁基)丁酰胺(2)、

[0021] 4-(3,4-二甲基-7-氧代-2-(对甲苯基)-2,7-二氢-6H-吡唑啉[3,4-d]哒嗪-6-基)-N-(5-((2-(2,6-二氧哌啶-3-基)-1,3-二氧异吡啶-4-基)氨基)戊基)丁酰胺(3)、

[0022] 4-(3,4-二甲基-7-氧代-2-(对甲苯基)-2,7-二氢-6H-吡唑啉[3,4-d]哒嗪-6-基)-N-(6-((2-(2,6-二氧哌啶-3-基)-1,3-二氧异吡啶-4-基)氨基)己基)丁酰胺(4)、

[0023] 4-(3,4-二甲基-7-氧代-2-(对甲苯基)-2,7-二氢-6H-吡唑啉[3,4-d]哒嗪-6-基)-N-(8-((2-(2,6-二氧哌啶-3-基)-1,3-二氧异吡啶-4-基)氨基)辛基)丁酰胺(5)、

[0024] 4-(3,4-二甲基-7-氧代-2-(对甲苯基)-2,7-二氢-6H-吡唑啉[3,4-d]哒嗪-6-基)-N-(2-(2-((2-(2,6-二氧哌啶-3-基)-1,3-二氧异吡啶-4-基)氨基)乙氧基)乙氧基)乙基)丁酰胺(6)、

[0025] 4-(3,4-二甲基-7-氧代-2-(对甲苯基)-2,7-二氢-6H-吡唑啉[3,4-d]哒嗪-6-基)-N-(3-(2-(3-((2-(2,6-二氧哌啶-3-基)-1,3-二氧异辛多林-4-基)氨基)丙氧基)

乙氧基)丙氧基)丁酰胺(7)、

[0026] 4-(3,4-二甲基-7-氧代-2-(对甲苯基)-2,7-二氢-6H-吡唑啉[3,4-d]哒嗪-6-基)-N-(8-((2-(2,6-二氧嘧啶-3-基)-1,3-二氧异吲哚-5-基)氨基)辛基)丁酰胺(8)。

[0027] 作为本发明的一个优选实施方案,所述药学上可接受的盐为无机酸盐或有机酸盐;所述的无机酸盐选自盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸;所述的有机酸盐选自甲磺酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、萘磺酸、柠檬酸、酒石酸、乳酸、丙酮酸、乙酸、马来酸或琥珀酸、富马酸、水杨酸、苯基乙酸、杏仁酸。

[0028] 为实现上述第二个目的,本发明采取的技术方案是:

[0029] 如上所述的式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐在制备抗肿瘤药物中的应用,所述肿瘤为KRAS突变引起的肿瘤,选自胰腺癌、结直肠癌和肺癌,所述的PDE $\delta$ 蛋白降解靶向嵌合体用于杀伤肿瘤细胞或延缓肿瘤生长。

[0030] 优选地,所述的式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐在制备KRAS-PDE $\delta$ 蛋白结合抑制剂中的应用。

[0031] 优选地,所述式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐在制备PDE $\delta$ 蛋白降解靶向嵌合体中的应用。

[0032] 为实现上述第三个目的,本发明采取的技术方案是:

[0033] 一种药物组合物,包含治疗有效量的一种或多种如上所述的化合物以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。

[0034] 本发明优点在于:

[0035] 本发明所述的上述通式(I)化合物在分子和细胞水平上均表现出较好的PDE $\delta$ 抑制活性,其中化合物5的IC<sub>50</sub>和DC<sub>50</sub>分别为 $8.0 \pm 2.7 \mu\text{M}$ 和 $3.6 \mu\text{M}$ 。这类化合物在抑制体外肿瘤细胞增殖试验中,表现出靶向KRAS突变的抗肿瘤活性。化合物5在小鼠结肠癌肿瘤模型中,能够有效的抑制肿瘤的生长。本发明所述的上述通式(I)化合物作为一类PDE $\delta$ 蛋白降解靶向嵌合体不仅具有良好的抑酶活性,而且在体外和体内均表现出较好的抗肿瘤活性,用于具有KRAS突变的病理学特征的肿瘤疾病,其作为首次报道的PDE $\delta$ 蛋白降解靶向嵌合体,有很好的抗肿瘤药物开发价值。

## 附图说明

[0036] 附图1是化合物1-7在 $10 \mu\text{M}$ 单浓度作用24h下的蛋白条带以及化合物5在不同浓度下作用24h的蛋白条带。(柱状图和曲线图为化合物5在不同浓度下的蛋白条带灰度统计结果)

## 具体实施方式

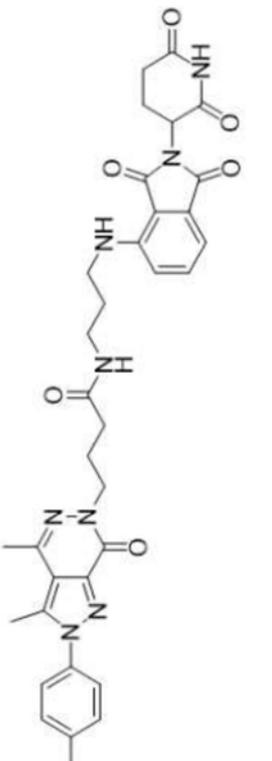
[0037] 下面结合具体实施方式,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。此外应理解,在阅读了本发明记载的内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0038] 下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0039] 以下实施例所涉化合物的<sup>1</sup>HNMR, <sup>13</sup>CNMR和MS数据详见表1。表1中序号1-8为化合物编号, 不仅一一对应于表1中的序号, 同时也对应下面的实施例1-8制备的具体化合物。

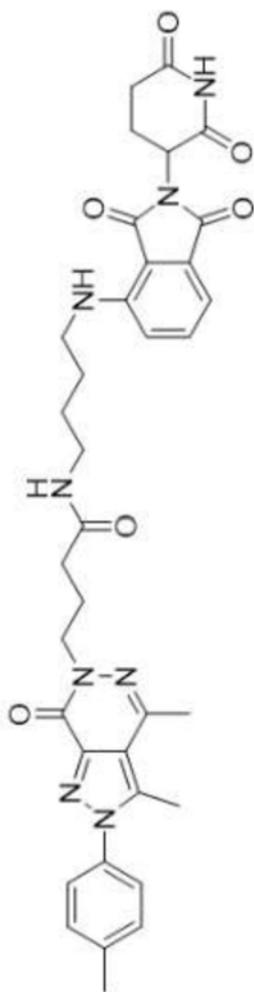
[0040] 表1、目标化合物<sup>1</sup>HNMR, <sup>13</sup>CNMR和MS数据

[0041]

序号	结构	<sup>1</sup> HNMR, <sup>13</sup> CNMR 和 MS
1		<sup>1</sup> H-NMR (600 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ: 11.08 (s, 1H), 7.90 (t, J = 5.69 Hz, 1H), 7.57-7.53 (m, 1H), 7.47 (d, J = 8.19 Hz, 2H), 7.42 (d, J = 8.19 Hz, 2H), 7.08 (d, J = 8.70 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 6.91 Hz, 1H), 6.66 (t, J = 6.14 Hz, 1H), 5.05-5.00 (m, 1H), 4.03 (t, J = 7.17 Hz, 2H), 3.33-3.28 (m, 2H), 3.12-3.07 (m, 2H), 2.90-2.82 (m, 1H), 2.61-2.55 (m, 4H), 2.54-2.50 (m, 1H), 2.50 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 2.11 (t, J = 7.68 Hz, 2H), 2.04-1.98 (m, 1H), 1.95-1.89 (m, 2H), 1.68-1.62 (m, 2H). <sup>13</sup> C-NMR (DMSO-d <sub>6</sub> , 150 MHz) δ: 173.27, 172.04, 170.55, 169.27, 167.76, 155.64, 146.75, 141.60, 141.46, 139.81, 137.88, 136.68, 136.34, 132.72, 130.36, 126.17, 117.60, 110.82, 109.61, 49.02, 49.00, 36.36, 33.09, 31.44, 29.47, 29.21, 25.08, 22.62, 21.20, 19.88, 12.32. HR-MS (ESI <sup>+</sup> ): m/z calcd for [M+H] <sup>+</sup> C <sub>34</sub> H <sub>37</sub> N <sub>8</sub> O <sub>6</sub> : 653.2831, found: 653.2832.

[0042]

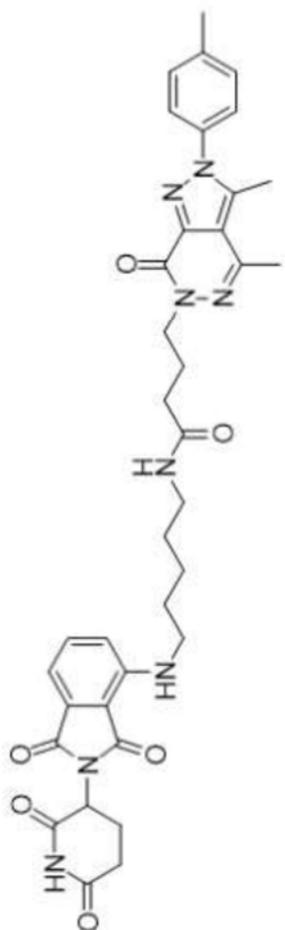
2



<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 11.11 (s, 1H), 7.85 (t, J = 5.53 Hz, 1H), 7.57-7.53 (m, 1H), 7.49 (d, J = 9.22 Hz, 2H), 7.44 (d, J = 8.61 Hz, 2H), 7.09 (d, J = 8.53 Hz, 1H), 6.97 (d, J = 7.13 Hz, 1H), 6.55 (t, J = 5.81 Hz, 1H), 5.06-5.02 (m, 1H), 4.02 (t, J = 6.87 Hz, 2H), 3.32-3.27 (m, 2H), 3.10-3.05 (m, 2H), 2.91-2.83 (m, 1H), 2.63-2.56 (m, 4H), 2.55-2.53 (m, 1H), 2.51 (s, 3H), 2.43 (s, 3H), 2.11 (t, J = 7.13 Hz, 2H), 2.05-1.99 (m, 1H), 1.95-1.88 (m, 2H), 1.60-1.53 (m, 2H), 1.49-1.43 (m, 2H). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 150 MHz) δ: 173.31, 171.92, 170.56, 169.37, 167.77, 155.64, 146.85, 141.57, 141.54, 139.85, 137.93, 136.70, 136.31, 132.60, 130.37, 126.17, 117.67, 117.59, 110.82, 109.42, 49.06, 48.99, 41.98, 38.52, 33.14, 31.41, 26.94, 26.62, 25.15, 22.60, 21.19, 19.84, 12.29. HR-MS (ESI<sup>+</sup>): m/z calcd for [M+H]<sup>+</sup> C<sub>35</sub>H<sub>39</sub>N<sub>8</sub>O<sub>6</sub>: 667.2987, found: 667.2987.

[0043]

3



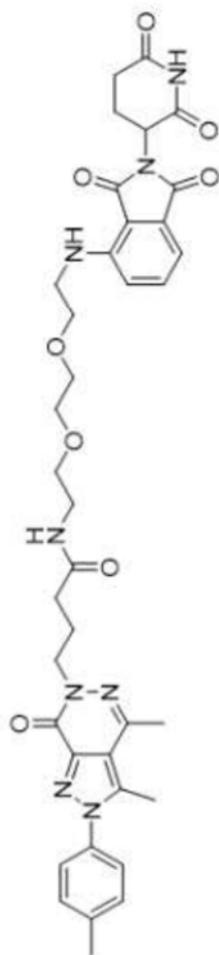
<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 11.10 (s, 1H), 7.82 (t, J = 5.59 Hz, 1H), 7.58-7.54 (m, 1H), 7.62 (d, J = 8.13 Hz, 2H), 7.44 (d, J = 8.13 Hz, 2H), 7.09 (d, J = 8.70 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 6.91 Hz, 1H), 6.52 (t, J = 6.02 Hz, 1H), 5.07-5.02 (m, 1H), 4.03 (t, J = 7.14 Hz, 2H), 3.32-3.25 (m, 2H), 3.07-3.01 (m, 2H), 2.91-2.84 (m, 1H), 2.63-2.57 (m, 4H), 2.56-2.52 (m, 1H), 2.52 (s, 3H), 2.43 (s, 3H), 2.10 (t, J = 7.58 Hz, 2H), 2.07-2.00 (m, 1H), 1.96-1.88 (m, 2H), 1.61-1.54 (m, 2H), 1.46-1.40 (m, 2H), 1.38-1.31 (m, 2H).  
<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 150 MHz) δ: 173.30, 171.85, 170.55, 169.39, 167.77, 155.64, 146.88, 141.57, 141.51, 139.84, 137.89, 136.74, 136.32, 132.59, 130.36, 126.16, 117.64, 117.59, 110.82, 109.42, 49.05, 49.01, 42.26, 38.76, 33.12, 31.42, 29.26, 28.84, 25.12, 24.16, 22.60, 21.18, 19.84, 12.29. HR-MS (ESI<sup>+</sup>): m/z calcd for [M+H]<sup>+</sup> C<sub>36</sub>H<sub>41</sub>N<sub>8</sub>O<sub>6</sub>: 681.3144, found: 681.3148.





[0046]

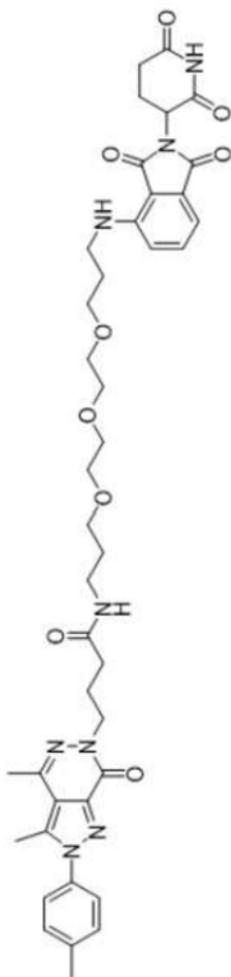
6



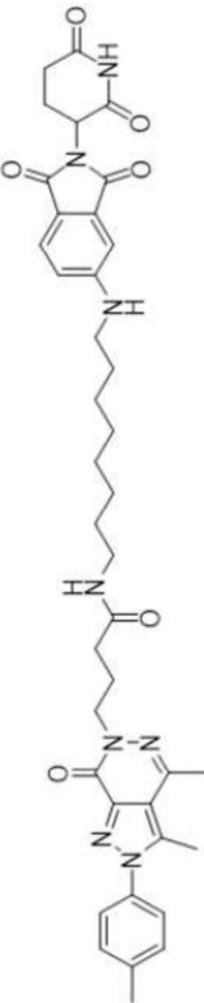
<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 11.05 (s, 1H), 7.82 (t, J = 5.72 Hz, 1H), 7.52-7.49 (m, 1H), 7.42 (d, J = 8.32 Hz, 2H), 7.37 (d, J = 8.19 Hz, 2H), 7.06 (d, J = 8.45 Hz, 1H), 6.96 (d, J = 6.89 Hz, 1H), 6.54 (t, J = 5.59 Hz, 1H), 5.03-4.99 (m, 1H), 3.98 (t, J = 7.02 Hz, 2H), 3.56 (t, J = 5.33 Hz, 2H), 3.53-3.50 (m, 2H), 3.49-3.46 (m, 2H), 3.42-3.38 (m, 2H), 3.37-3.34 (m, 2H), 3.17-3.12 (m, 2H), 2.89-2.80 (m, 1H), 2.58-2.51 (m, 4H), 2.50-2.46 (m, 1H), 2.45 (s, 3H), 2.37 (s, 3H), 2.08 (t, J = 7.93 Hz, 2H), 2.01-1.96 (m, 1H), 1.90-1.83 (m, 2H). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 150 MHz) δ: 173.26, 172.04, 170.54, 169.39, 167.74, 155.60, 146.83, 141.58, 141.41, 139.79, 137.80, 136.63, 136.33, 132.51, 130.33, 126.14, 117.83, 117.58, 111.09, 109.68, 70.14, 70.04, 69.62, 69.33, 49.04, 42.15, 38.96, 33.04, 31.45, 25.11, 22.61, 21.18, 19.84, 12.29. HR-MS (ESI<sup>+</sup>): m/z calcd for [M+H]<sup>+</sup> C<sub>37</sub>H<sub>43</sub>N<sub>8</sub>O<sub>8</sub>: 727.3198, found: 727.3206.

[0047]

7



<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 11.07 (s, 1H), 7.75 (t, J = 5.00 Hz, 1H), 7.54 (t, J = 7.01 Hz, 1H), 7.46 (d, J = 8.27 Hz, 2H), 7.41 (d, J = 7.93 Hz, 2H), 7.07 (d, J = 8.96 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 6.89 Hz, 1H), 6.64 (t, J = 5.17 Hz, 1H), 5.07-4.98 (m, 1H), 4.02 (t, J = 6.55 Hz, 2H), 3.54-3.44 (m, 10H), 3.34-3.38 (m, 4H), 3.08-3.01 (m, 2H), 2.92-2.83 (m, 1H), 2.61-2.55 (m, 4H), 2.54-2.49 (m, 4H), 2.41 (s, 3H), 2.10-2.05 (m, 2H), 2.04-1.97 (m, 1H), 1.93-1.86 (m, 2H), 1.82-1.74 (m, 2H), 1.63-1.54 (m, 2H). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 150 MHz) δ: 173.25, 171.78, 170.53, 169.29, 167.77, 155.61, 146.90, 141.60, 141.41, 139.80, 137.83, 136.71, 136.34, 132.64, 130.34, 126.16, 117.59, 117.52, 110.80, 109.52, 70.26, 70.20, 70.15, 70.00, 68.67, 68.56, 49.04, 49.00, 40.07, 36.25, 33.09, 31.44, 29.83, 29.34, 25.10, 22.62, 21.19, 19.86, 12.30. HR-MS (ESI<sup>+</sup>): m/z calcd for [M+H]<sup>+</sup> C<sub>41</sub>H<sub>51</sub>N<sub>8</sub>O<sub>9</sub>: 799.3774, found: 799.3777.

[0048]	8		<p><sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 11.03 (s, 1H), 7.74 (t, J = 5.85 Hz, 1H), 7.53 (d, J = 8.32 Hz, 1H), 7.46 (d, J = 8.32 Hz, 2H), 7.42 (d, J = 8.32 Hz, 2H), 7.09-7.04 (m, 1H), 6.93-6.89 (m, 1H), 6.83-6.78 (m, 1H), 5.03-4.98 (m, 1H), 4.02 (t, J = 7.20 Hz, 2H), 3.14-3.08 (m, 2H), 3.03-2.97 (m, 2H), 2.90-2.82 (m, 1H), 2.63-2.54 (m, 4H), 2.53-2.49 (m, 4H), 2.41 (s, 3H), 2.07 (t, J = 7.42 Hz, 2H), 2.01-1.94 (m, 1H), 1.93-1.87 (m, 2H), 1.58-1.50 (m, 2H), 1.37-1.33 (m, 2H), 1.31-1.24 (m, 8H). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 150 MHz) δ: 173.25, 171.66, 170.61, 168.16, 167.61, 155.61, 154.62, 141.60, 141.42, 139.80, 137.85, 136.35, 134.66, 130.35, 126.17, 125.53, 117.60, 116.23, 49.08, 42.95, 38.86, 33.14, 31.45, 30.30, 29.46, 29.16, 26.94, 26.80, 25.16, 22.70, 21.19, 19.87, 14.40, 12.31. HR-MS (ESI<sup>+</sup>): m/z calcd for [M+H]<sup>+</sup> C<sub>39</sub>H<sub>47</sub>N<sub>8</sub>O<sub>6</sub>: 723.3613, found: 723.3617.</p>
--------	---	--	--

[0049] 实施例1:化合物1的合成

[0050] A、叔丁基(3-((2-(2,6-二氧哌啶-3-基)-1,3-二氧异吲哚-4-基)氨基)丙基)氨基甲酸酯的制备

[0051] 化合物2-(2,6-二氧哌啶-3-基)-4-氟异吲哚-1,3-二酮(0.20g,0.7mmol)与叔丁基(3-氨基丙基)氨基甲酸酯(0.14g,0.8mmol)溶于DMF中,加入DIPEA(0.18g,1.4mmol),90℃搅拌12h后,反应液倒入冰水中,乙酸乙酯萃取,饱和氯化钠水溶液洗,无水硫酸钠干燥,浓缩得粗产物,经由硅胶柱层析纯化(洗脱剂:二氯甲烷/甲醇=100:1)得黄色固体叔丁基(3-((2-(2,6-二氧哌啶-3-基)-1,3-二氧异吲哚-4-基)氨基)丙基)氨基甲酸酯0.12g,收率40%。

[0052] B、4-(3,4-二甲基-7-氧代-2-(对甲苯基)-2,7-二氢-6H-吡啶啉[3,4-d]哒嗪-6-基)-N-(3-((2-(2,6-二氧哌啶-3-基)-1,3-二氧异丙醇-4-基)氨基)丙胺)的制备

[0053] 化合物叔丁基(3-((2-(2,6-二氧哌啶-3-基)-1,3-二氧异吲哚-4-基)氨基)丙基)氨基甲酸酯(0.2g,0.47mmol)溶于DCM(2mL)中,加入1mL TFA常温条件下搅拌1小时后,TCL点板检测反应完全,反应液浓缩蒸干,加入2mL DMF溶解,再加入HATU(0.27g,0.7mmol),DIPEA(0.18g,1.4mmol)以及化合物IV(0.24g,0.7mmol),在室温下反应2h后,反应液倒入冰水中,乙酸乙酯萃取,饱和氯化钠水溶液洗,无水硫酸钠干燥,浓缩得粗产物,经由硅胶柱层

析纯化(洗脱剂:二氯甲烷/甲醇=100:1)得黄色固体4-(3,4-二甲基-7-氧代-2-(对甲基)-2,7-二氢-6H-吡唑啉[3,4-d]哒嗪-6-基)-N-(3-((2-(2,6-二氧哌啶-3-基)-1,3-二氧异丙醇-4-基)氨基)丙胺)0.12g,收率40%。

[0054] 实施例2-7:化合物2-7的合成

[0055] 操作与投料与实施例1相同。

[0056] 实施例8:化合物8的合成

[0057] A、叔丁基(8-((2-(2,6-二氧哌啶-3-基)-1,3-二氧异吲哚-5-基)氨基)辛基)氨基甲酸酯的制备

[0058] 化合物2-(2,6-二氧哌啶-3-基)-5-氟异吲哚-1,3-二酮(0.20g,0.7mmol)与叔丁基(8-氨基辛基)氨基甲酸酯(0.19g,0.8mmol)溶于DMF中,加入DIPEA(0.18g,1.4mmol),90℃搅拌12h后,反应液倒入冰水中,乙酸乙酯萃取,饱和氯化钠水溶液洗,无水硫酸钠干燥,浓缩得粗产物,经由硅胶柱层析纯化(洗脱剂:二氯甲烷/甲醇=100:1)得黄色固体叔丁基(8-((2-(2,6-二氧哌啶-3-基)-1,3-二氧异吲哚-5-基)氨基)辛基)氨基甲酸酯0.12g,收率34%。

[0059] B、4-(3,4-二甲基-7-氧代-2-(对甲基)-2,7-二氢-6H-吡唑啉[3,4-d]哒嗪-6-基)-N-(8-((2-(2,6-二氧哌啶-3-基)-1,3-二氧异吲哚-5-基)氨基)辛基)的制备

[0060] 化合物叔丁基(8-((2-(2,6-二氧哌啶-3-基)-1,3-二氧异吲哚-5-基)氨基)辛基)氨基甲酸酯(0.2g,0.47mmol)溶于DCM(2mL)中,加入1mL TFA常温条件下搅拌1小时后,TCL点板检测反应完全,反应液浓缩蒸干,加入2mL DMF溶解,再加入HATU(0.27g,0.7mmol),DIPEA(0.18g,1.4mmol)以及化合物IV(0.24g,0.7mmol),在室温下反应2h后,反应液倒入冰水中,乙酸乙酯萃取,饱和氯化钠水溶液洗,无水硫酸钠干燥,浓缩得粗产物,经由硅胶柱层析纯化(洗脱剂:二氯甲烷/甲醇=100:1)得黄色固体4-(3,4-二甲基-7-氧代-2-(对甲基)-2,7-二氢-6H-吡唑啉[3,4-d]哒嗪-6-基)-N-(8-((2-(2,6-二氧哌啶-3-基)-1,3-二氧异吲哚-5-基)氨基)辛基)丁酰胺0.12g,收率35%。

[0061] 实施例9:本发明化合物荧光偏振法测定KRAS-PDE $\delta$ 蛋白结合抑制活性实验材料:

[0062] 阿托伐他汀荧光探针(Atrovastatin-PEG3-FITC),缓冲液(0.1M PBS,0.05% chaps,0.5%DMSO),PDE $\delta$ 蛋白,黑色96孔板。

[0063] 1.FITC探针与PDE $\delta$ 蛋白的结合常数测定

[0064] a.取黑色96孔板1块,平衡至室温;

[0065] b.用缓冲液将阿托伐他汀荧光探针稀释至100nM;

[0066] c.用缓冲液稀释PDE $\delta$ 蛋白,蛋白浓度依次为1000nM、500nM、250nM、125nM、62.5nM、31.25nM、15.63nM、7.81nM、3.90nM、1.85nM;

[0067] d.三复孔测量,在96孔板中1-10孔依次加入配好的PDE $\delta$ 蛋白溶液50 $\mu$ L,1-11孔中加入稀释的探针溶液50 $\mu$ L(11孔为空白对照),用缓冲液补充每孔溶液体积至200 $\mu$ L,加毕30℃下避光孵育2小时;

[0068] e.用Biotek Synergy H2酶标仪读取荧光各向异性值(激发波长:485,检测波长535),探针与PDE $\delta$ 蛋白的结合常数根据荧光各向异性值的非线性回归拟合得到Mathamatica 9(Wolfram Research Inc.),公式如下:

$$[0069] \quad A = \frac{Q \times F \times A_B + (1 - F) \times A_F}{1 - (1 - Q) \times F}$$

$$[0070] \quad F = \frac{\left( K_{D1} + L_{ST} + R_T - \sqrt{(K_{D1} + L_{ST} + R_T)^2 - 4 \times L_{ST} \times R_T} \right)}{2 \times L_{ST}}$$

[0071] 公式中,F为荧光探针 (Atrovastatin-PEG3-FITC) 结合比例,A为荧光偏振各向异性测量值,Q值是指探针与浓度最高组蛋白结合的荧光强度同自由状态的荧光强度的比值, $A_B$ 值为结合状态下的探针各向异性值, $A_F$ 值为自由状态下的探针的各向异性值, $L_{ST}$ 为荧光探针浓度, $R_T$ 为蛋白浓度, $K_{D1}$ 为FITC探针的蛋白结合常数。

[0072] 根据曲线确定测量化合物结合常数时选定的蛋白浓度为160nM,探针浓度为100nM。

[0073] 2. 化合物与PDE $\delta$ 蛋白的结合常数测定

[0074] a. 取黑色96孔板1块,平衡至室温;

[0075] b. 用缓冲液分别将阿托伐他汀荧光探针和PDE $\delta$ 蛋白稀释至100nM和160nM;

[0076] c. 用DMSO溶解化合物,并用含0.2% Tween-80的缓冲液稀释化合物浓度依次为10 $\mu$ M、5 $\mu$ M、2.5 $\mu$ M、1.25 $\mu$ M、0.625 $\mu$ M、312.5nM、156.3nM、78.12nM、39.1nM、19.5nM;

[0077] d. 三复孔测量,在96孔板中1-1孔依次加入PDE $\delta$ 蛋白溶液50 $\mu$ L,1-12孔中加入FITC探针溶液50 $\mu$ L,1-10孔分别加入配好的化合物溶液100 $\mu$ L,其余孔用缓冲液补充每孔溶液体积至200 $\mu$ L,加毕30 $^{\circ}$ C下避光孵育10小时;

[0078] e. 用Biotek Synergy H2酶标仪读取荧光各向异性值(激发波长:485,检测波长535),化合物与蛋白的结合常数根据荧光各向异性值的非线性回归拟合得到Mathematica 9(Wolfram Research Inc.),公式如下:

$$[0079] \quad d = K_{D1} + K_{D2} + L_{ST} + L_T - R_T;$$

$$[0080] \quad e = (L_T - R_T) \times K_{D1} + (L_{ST} - R_T) \times K_{D2} + K_{D1} \times K_{D2};$$

$$[0081] \quad f = -K_{D1} \times K_{D2} \times R_T;$$

$$[0082] \quad \theta = \text{ArcCos} \left[ \frac{-2 \times d^3 + 9 \times d \times e - 27f}{2 \times \sqrt{(d^2 - 3 \times e)^3}} \right];$$

$$[0083] \quad F = \frac{2 \times \left( \sqrt{d^2 - 3 \times e} \right) \times \text{Cos} \left[ \frac{\theta}{3} \right] - d}{3 \times K_{D1} + 2 \times \left( \sqrt{d^2 - 3 \times e} \right) \times \text{Cos} \left[ \frac{\theta}{3} \right] - d};$$

$$[0084] \quad A = \frac{Q \times F \times A_B + (1 - F) \times A_F}{1 - (1 - Q) \times F}$$

[0085] 公式中,F为荧光探针 (Atrovastatin-PEG3-FITC) 结合比例,A为荧光偏振各向异性测量值,Q值是指探针与浓度最高组蛋白结合的荧光强度同自由状态的荧光强度的比值, $A_B$ 值为结合状态下的探针各向异性值, $A_F$ 值为自由状态下的探针的各向异性值, $L_{ST}$ 为荧光探针浓度, $R_T$ 为蛋白浓度, $K_{D1}$ 为FITC探针的蛋白结合常数, $K_{D2}$ 为化合物的蛋白结合抑制常数。

[0086] 实验结果:本发明化合物的 $K_{D2}$ 值如表2所示,测试化合物表现出中等到优秀的蛋白水平结合活性,其中化合物5和化合物8表现出与对照药Deltazinone同等水平的蛋白水平活性。

[0087] 实施例10:本发明化合物的体外抗肿瘤活性测试( $IC_{50}$ )

[0088] 对本发明的化合物进行了两种肿瘤细胞增殖抑制能力测试,测试方法采用常规的CCK8法。将对于对数生长期的肿瘤细胞(HCT116和SW480)用胰酶消化,然后用培养基(DMEM+10%FBS)将细胞稀释悬浮成单细胞悬液,调整细胞密度为 $7-10 \times 10^4$ 个/mL,每孔加入100 $\mu$ L接种于96孔板中,置37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱内培养24小时,再分别加入不同浓度的化合物,每个浓度平行三个复孔,并设置实验组和对照组,继续孵育72小时后,向每孔加入10 $\mu$ L CCK8溶液,然后37 $^{\circ}$ C下避光孵育约0.5小时后,用MK-2全自动酶标仪测450nm OD值。计算半数抑制浓度 $IC_{50}$ 。

[0089] 实验结果:本发明化合物对肿瘤细胞半数抑制浓度 $IC_{50}$ 值如表2所示,测试结果显示这一系列PDE $\delta$ 蛋白降解靶向嵌合体表现对KRAS依赖型肿瘤株有较强的抑制活性特点部分发明的化合物结果优于对照药Deltazinone。

[0090] 表2

Compds	$K_D$ (nM)	SW480 DC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	SW480 IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	HCT116 IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
1	216 $\pm$ 9.6	30	81 $\pm$ 8.2	68 $\pm$ 8.0
2	30 $\pm$ 3.8	25	76 $\pm$ 3.9	51 $\pm$ 2.4
3	29 $\pm$ 4.6	22	17 $\pm$ 1.8	32 $\pm$ 4.0
[0091] 4	17 $\pm$ 2.1	15	15 $\pm$ 3.4	19 $\pm$ 1.0
5	9.0 $\pm$ 1.3	3.6	8.0 $\pm$ 2.7	8.0 $\pm$ 3.6
6	160 $\pm$ 8.8	30	58 $\pm$ 9.8	25 $\pm$ 1.3
7	70 $\pm$ 6.4	10	26 $\pm$ 3.9	23 $\pm$ 0.6
8	8.0 $\pm$ 2.1	5	7 $\pm$ 3.1	8.0 $\pm$ 4.2
Deltazinone	8.0 $\pm$ 2.1	-	56 $\pm$ 4.3	74 $\pm$ 5.4

[0092] 实施例11:本发明化合物对小鼠结肠癌肿瘤模型治疗效果研究

[0093] 细胞系:人结肠癌细胞(SW480)。

[0094] 实验动物:四周龄Bab1/C雌性小鼠购置上海斯莱克实验动物有限公司,合格证号:SCXK-2013-0016。

[0095] 小鼠肿瘤模型建立、分组及给药:SW480细胞被注射于小鼠前肢腋下,每只注射 $5 \times 10^6$ 个细胞。肿瘤体积达到 $100\text{mm}^3$ 时开始给药,本实验小鼠共分为3组,每组6只。分别口服给予羧甲基纤维素(0.5%CMC)、Deltazinone(50mg/kg)、化合物5(50mg/kg)。每天给药一次,连续给药15天。治疗过程中每2天监测肿瘤体积变化,肿瘤体积计算公式:(宽度<sup>2</sup>×长度)/2。

[0096] 实验结果:优选化合物体内肿瘤模型治疗效果如如表3所示,化合物5均表现出较好的体内抗肿瘤活性,且其体内抑瘤率要优于对照药Deltazinone。

[0097] 表3肿瘤体积

组别	平均肿瘤体积 $\text{mm}^3$
[0098] 空白组	1510.12
Deltazinone 组	1133.83
[0099] 化合物 5 组	860.66

[0100] 本发明通式(I)化合物在分子和细胞水平上均表现出较好的PDE $\delta$ 抑制活性,其中化合物5的 $\text{IC}_{50}$ 和 $\text{DC}_{50}$ 分别为 $8.0 \pm 2.7\mu\text{M}$ 和 $3.6\mu\text{M}$ 。这类化合物在抑制体外肿瘤细胞增殖试验中,表现出靶向KRAS突变的抗肿瘤活性。化合物5在小鼠结肠癌肿瘤模型中,能够有效的抑制肿瘤的生长。本发明的通式(I)化合物作为一类PDE $\delta$ 蛋白降解靶向嵌合体不仅具有良好的抑酶活性,而且在体外和体内均表现出较好的抗肿瘤活性,用于具有KRAS突变的病理学特征的肿瘤疾病,其作为首次报道的PDE $\delta$ 蛋白降解靶向嵌合体,有很好的抗肿瘤药物开发价值。

[0101] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和补充,这些改进和补充也应视为本发明的保护范围。

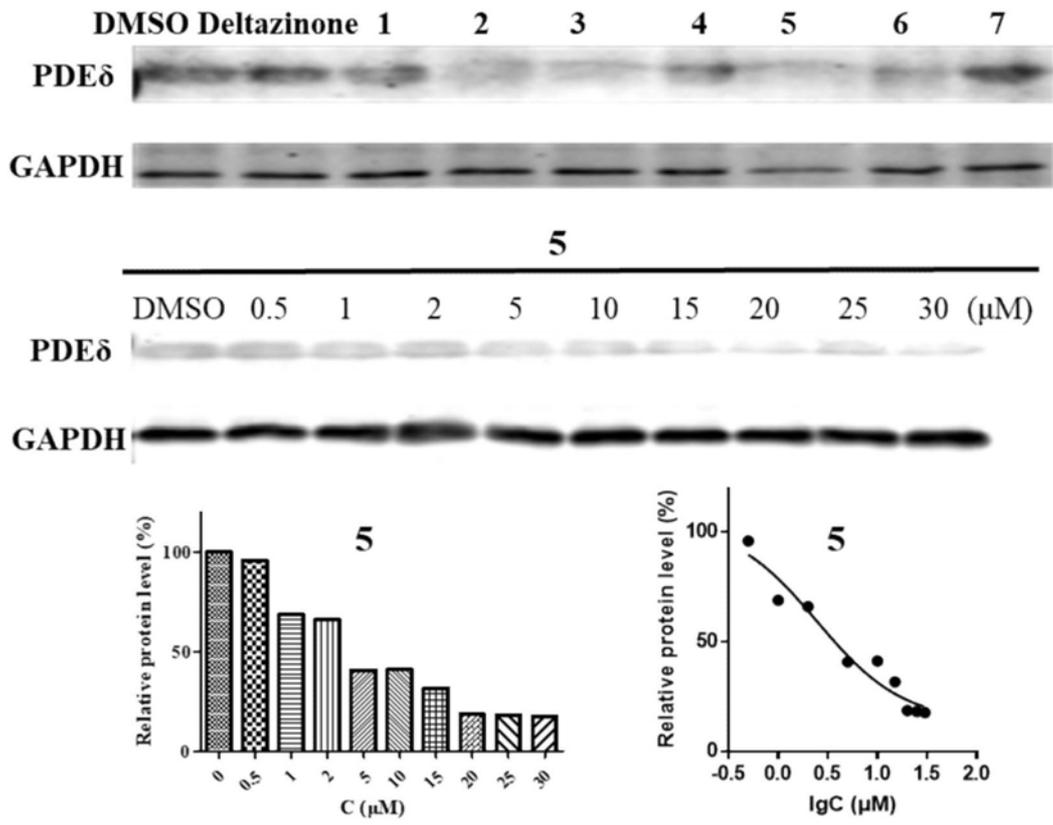


图1