

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C07D 491/22 (2006.01)

A61K 31/4745 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710066688.3

[43] 公开日 2007 年 8 月 1 日

[11] 公开号 CN 101007809A

[22] 申请日 2007.1.12

[21] 申请号 200710066688.3

[71] 申请人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路 38 号

[72] 发明人 杨波 吕伟 何俏军 罗宇

[74] 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公司

代理人 韩介梅

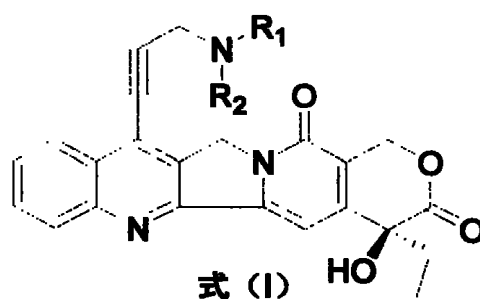
权利要求书 2 页 说明书 8 页

[54] 发明名称

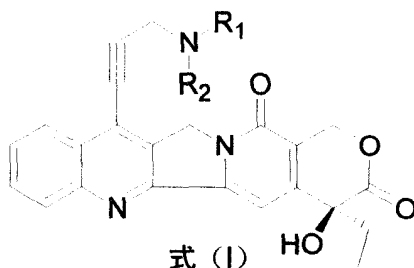
一类水溶性喜树碱衍生物及其制备方法和应用

[57] 摘要

本发明公开的一类水溶性喜树碱衍生物是具有式(I)的化合物, 以及该类化合物的单一异构体、对映体以及有关混合物、药用盐类以及活性代谢产物, 其中 R1 和 R2 如说明书中定义。采用在有机磷配体和碱存在下, 7-氯代喜树碱利用钯催化进行 Sonogashira 反应制备。本发明的一类水溶性喜树碱衍生物对多种肿瘤细胞株均有明显的抗肿瘤作用, 可在制备治疗肿瘤药物中应用。



1. 一类水溶性喜树碱衍生物，其特征是具有式(I)的化合物，以及该类化合物的单一异构体、对映体以及有关混合物、药用盐类以及活性代谢产物：



其中：R1 和 R2 为 C1 至 C6 的直链或支链的烷基，或环烷基，或 C6 至 C14 的芳基，或含有杂原子的烷基，或 R1 和 R2 共同和 N 原子成环的取代基，R 和 R2 可以相同，也可以不相同。

2. 根据权利要求 1 所述的一类水溶性喜树碱衍生物，其特征在于 C1 至 C6 的直链或支链烷基是甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基以及它们的可能异构体。

3. 根据权利要求 1 所述的一类水溶性喜树碱衍生物，其特征在于 C1 至 C6 的环烷基是环丙基、环丁基、环戊基或环己基。

4. 根据权利要求 1 所述的一类水溶性喜树碱衍生物，其特征在于 C6 至 C14 的芳基是苯基或萘基。

5. 根据权利要求 1 所述的一类水溶性喜树碱衍生物，其特征在于 R1、R2 和 N 原子成环的取代基是哌啶基、甲基哌嗪基、吗啉基或吡咯基。

6. 根据权利要求 1 所述的一类水溶性喜树碱衍生物，其特征是为下列化合物或为下列化合物的无机酸或有机酸的盐：

7-(3'-二甲氨基丙炔基)喜树碱；

7-(3'-二乙氨基丙炔基)喜树碱；

7-(3'-二丙氨基丙炔基)喜树碱；

7-(3'-二丁氨基丙炔基)喜树碱；

7-(3'-二己氨基丙炔基)喜树碱；

7-(3'-二异丙基氨基丙炔基)喜树碱；

7-(3'-二叔丁基氨基丙炔基)喜树碱；

7-(3'-二异丁基氨基丙炔基)喜树碱；

7-(3'-哌啶基丙炔基)喜树碱;

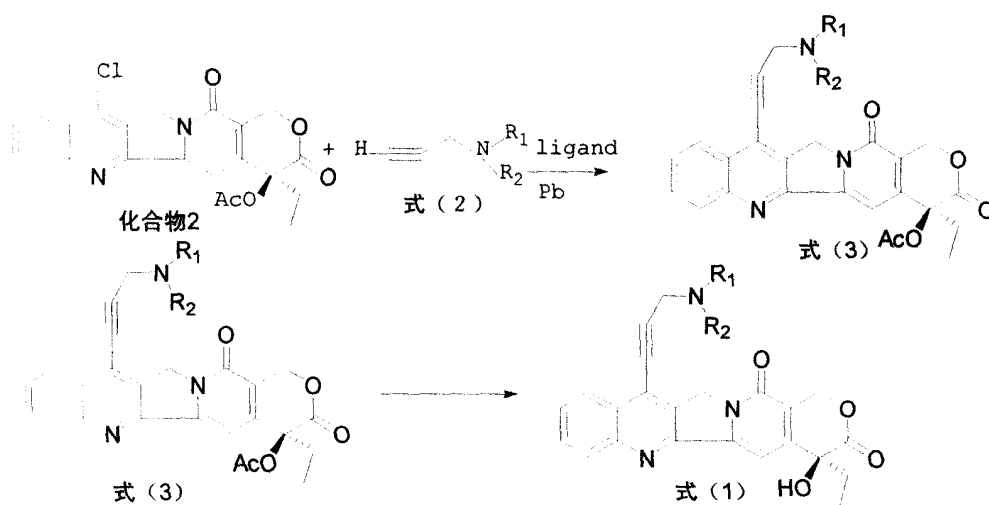
7-(3'-吗啉基丙炔基)喜树碱;

7-(3'-吡咯基丙炔基)喜树碱;

7-(3'-甲基哌嗪基丙炔基)喜树碱。

7. 根据权利要求6所述的一类水溶性喜树碱衍生物,其特征是所说的无机酸为盐酸或硫酸、有机酸为乙酸、三氟乙酸或三氟甲磺酸。

8. 权利要求1所述的一类水溶性喜树碱衍生物的制备方法,其特征是:7-氯代喜树碱(化合物2)在有机磷配体和碱存在下,利用钯催化进行 Sonogashira 反应,反应式如下所示:



其中 R_1 和 R_2 如权利要求1所述,反应式中所示的 ligand 是有机磷配体,配体的用量在 0.01-1 当量之间,钯催化剂为零价钯或二价钯,钯催化剂用量在 0.01-1 当量之间,碱的用量在 1-10 当量,反应溶剂选用二甲基甲酰胺、甲苯或乙腈,反应温度在 40-150℃ 之间。

9. 根据权利要求8所述的一类水溶性喜树碱衍生物的制备方法,其特征是所说的有机磷配体选自 PPh_3 , DPPF, DPPD, BINAP 或 tri-tolylphosphine; 所说的碱为碳酸钾、碳酸钠、碳酸铯、氢氧化钠、氢氧化钾、三乙胺或吡啶。

10. 权利要求1所述的一类水溶性喜树碱衍生物,其特征是在制备治疗肿瘤药物中的应用。

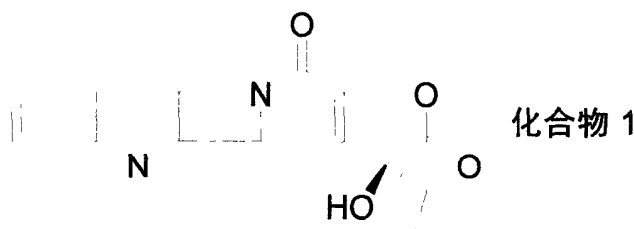
一类水溶性喜树碱衍生物及其制备方法和应用

技术领域

本发明涉及具有抗肿瘤活性的化合物，特别涉及水溶性喜树碱衍生物、它们的制备方法及其作为药物在肿瘤治疗中的作用。

背景技术

喜树碱（化合物 1）由 Wall 等人（J. Am. Chem. Soc., 1966, 88, 3888）首次从喜树中提取分离得到，是一种吡咯[3, 4-b]喹啉类生物碱，其结构中含有五个环，E 环的 20 位有一个 S 型手性中心，旁边有一个内酯结构。喜树碱对胃癌、直肠癌等有一定疗效，但其水溶性、酯溶性都很差，毒副反应大，因而中止了临床研究。



喜树碱虽是一种生物碱，但其并不能和其他的酸成盐达到水溶性目的。因此人们合成了许多喜树碱类似物，目的是获得低毒性并且有水溶性的化合物。现在市场上已有两个喜树碱类药物上市，一个是依立替康，被用来治疗多种实体瘤，主要是用来治疗肠癌。另一个药物是拓扑替康，其盐酸盐具有很好的水溶性，现在在临床上主要是用来治疗卵巢癌，进行也被用来治疗非小细胞肺癌。另外，还有其他很多药物正在进行临床研究，例如 9-硝基喜树碱、9-氨基喜树碱，BNP-13503, Silatecan, Gimatecan, Lurtotecan 等等。

通过对喜树碱类化合物结构改造所得到的结果进行分析总结，可以得到以下结论：

1) 喜树碱 20 位的 S 构型的内酯环是活性所必需的；2) 在喜树碱的 9、10、7 三个位子上引入基团可以增加抗肿瘤活性；3) 在 11、12、5 上引入取代基太多的情况可以使活性降低。对现在临床和临床研究的药物进行分析，可以发现在 7 位上引入相应的取代基可增加抗肿瘤活性，例如：临床使用的依立替康是 7-乙基-10-羟基喜树碱（SN38）的水溶性的前药（Fig 1），也就是说在 7 位上引入简单的乙基就可以增加抗肿瘤活性（US4604463）。

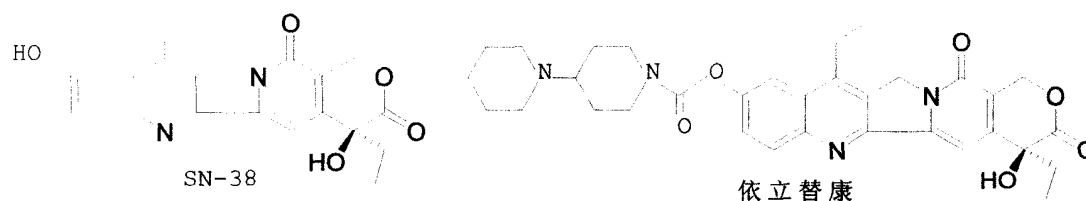


Fig 1

正在临床研究的 Gimitecan(J.Med.Chem., 2001, 44, 3264)、Silatecan(J. Med. Chem., 2000, 43, 3970)、BNP-1350 (Ann. N. Y.Acad. Sci., 2000, 922, 175)、Lurtotecan(J.Med. Chem., 1998, 41, 2216)、CDK-602 (*Proc.Am. Soc. Clin. Oncol.*, 2003 22,1877) 均是喜树碱 7 位取代的类似物 (Fig 2)。

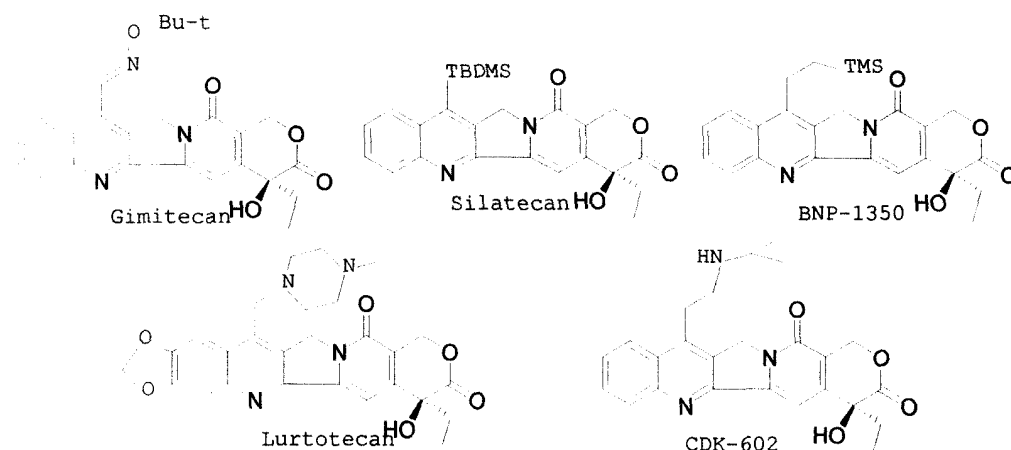
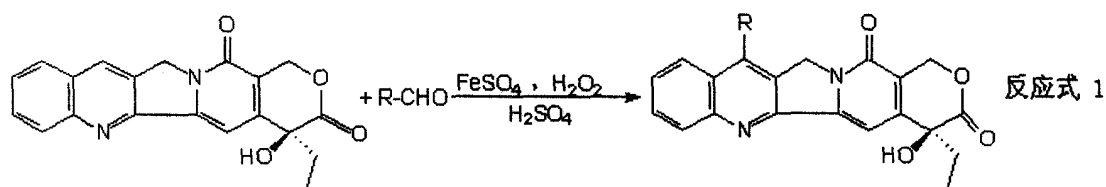


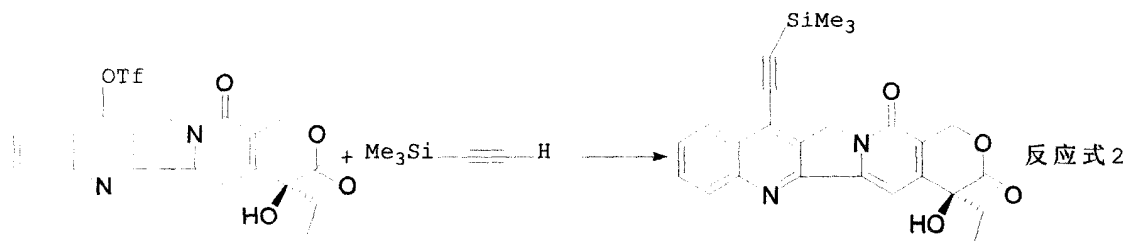
Fig 2

所以, 可以肯定地说明, 在喜树碱 7 位上引入适当的基团可以增加抗肿瘤活性。

通常在喜树碱 7 位上引入取代基大都采用 Minisci 反应, 反应通式如下所示 (反应式 1):



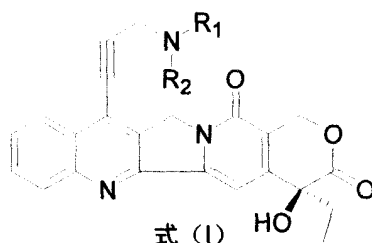
最近 Hausheer, F,M 等人报道了利用 7-三氟甲磺酰氧代喜树碱和三甲基硅基乙炔的 Sonogashira 反应 (W09835940), 见反应式 2。然而这个反应条件并不能制备其他的含炔基取代的喜树碱衍生物。



发明内容

本发明的目的是提供一类水溶性喜树碱衍生物及其制备方法和应用。

本发明的一类水溶性喜树碱衍生物是具有式 (I) 的化合物, 以及该类化合物的单一异构体、对映体以及有关混合物、药用盐类以及活性代谢产物:



其中: R1 和 R2 为 C1 至 C6 的直链或支链的烷基, 或环烷基, 或 C6 至 C14 的芳基, 或含有杂原子的烷基, 或 R1 和 R2 共同和 N 原子成环的取代基, R 和 R2 可以相同, 也可以不相同。

在本发明的范围内, C1 至 C6 的直链或支链烷基可以是甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基以及它们的可能异构体, 例如异丙基、异丁基、叔丁基。

C1-C6 的环烷基可以是环丙基、环丁基、环戊基或环己基。

C6-C14 的芳香基可以是苯基或萘基。

R1、R2 和 N 原子成环的取代基可以是哌啶基、甲基哌啶基、吗啉基或吡咯基。

上述取代基中, R1 和 R2 可以是相同的, 也可以是不同的。

本发明所涉及的化合物可特别优选下列化合物或下列化合物的无机酸或有机酸的盐:

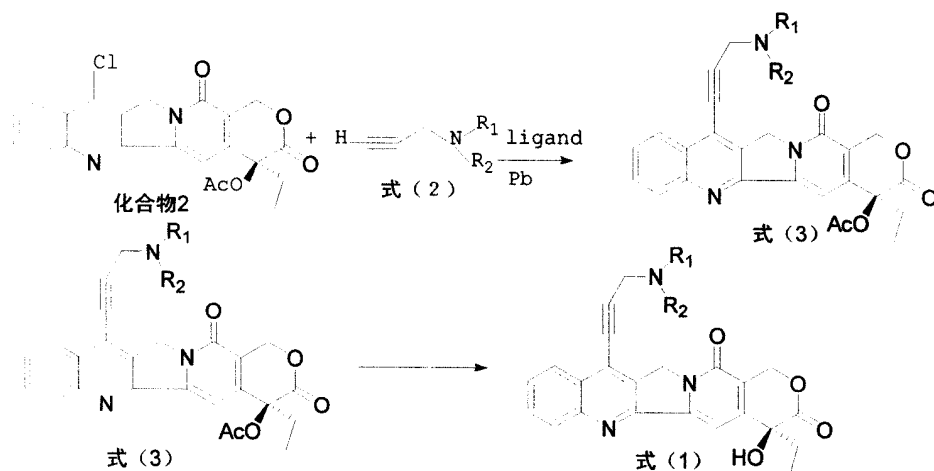
- 7-(3'-二甲氨基丙炔基)喜树碱 (CPT-11);
- 7-(3'-二乙氨基丙炔基)喜树碱 (CPT-12);
- 7-(3'-二丙氨基丙炔基)喜树碱 (CPT-13);
- 7-(3'-二丁氨基丙炔基)喜树碱 (CPT-14);
- 7-(3'-二己氨基丙炔基)喜树碱 (CPT-16);
- 7-(3'-二异丙基氨基丙炔基)喜树碱 (CPT-17);
- 7-(3'-二叔丁基氨基丙炔基)喜树碱 (CPT-18);
- 7-(3'-二异丁基氨基丙炔基)喜树碱 (CPT-19);

- 7-(3'-哌啶基丙炔基)喜树碱 (CPT-21);
 7-(3'-吗啉基丙炔基)喜树碱 (CPT-22);
 7-(3'-吡咯基丙炔基)喜树碱 (CPT-23);
 7-(3'-甲基哌嗪基丙炔基)喜树碱 (CPT-24)。

上述的无机酸可以为盐酸或硫酸、有机酸可以为乙酸、三氟乙酸或三氟甲磺酸。

本发明的水溶性喜树碱衍生物制备方法, 包括以下步骤:

7-氯代喜树碱(化合物2)在有机磷配体和碱存在下, 利用钯催化进行 Sonogashira 反应, 反应式如下所示:



其中 R1 和 R2 如上所述, 反应式中所示的 ligand 是有机磷配体, 配体的用量在 0.01-1 当量之间, 钯催化剂为零价钯或二价钯, 钯催化剂用量在 0.01-1 当量之间, 碱的用量在 1-10 当量, 反应溶剂选用二甲基甲酰胺、甲苯或乙腈, 反应温度在 40-150℃之间。

化合物 2 可按文献报道的方法 (US6825194) 所提及的方法制备。

式 (2) 所述化合物为已知化合物, 一般有机化学工作者可以使用丙炔基溴和相应的氨基物反应得到。

利用 Sonogashira 反应可以制备结构式 (3) 的化合物, 式 (3) 中的 20 位上的乙酰基可容易地利用酸催化脱去, 也可以利用碱催化脱去, 本领域的技术人员借助文献中的方法完成。

本发明制备方法, 所说的有机磷配体可以选自 PPh_3 , DPPF, DPPD, BINAP 或 tri-tolylphosphine, 最好以 BINAP 为配体, 配体的优化用量为 0.10 当量。

所说的钯催化剂优选醋酸钯和氯化钯, 钯催化剂用量优选 0.05 当量。

所说的碱为碳酸钾、碳酸钠、碳酸铯、氢氧化钠、氢氧化钾、三乙胺或吡啶。碱的优选用量为 2 当量。

本发明制备方法采用在有机磷配体和碱存在下，利用钯催化进行 Sonogashira 反应，反应并不需铜盐，例如氯化亚铜、碘化亚铜等催化，从而可以避免铜盐存在，而生成副产物。

本发明的水溶性喜树碱衍生物可用于制备治疗肿瘤的药物，这些化合物的化学特性使它们可以配成水溶性盐。根据需要按照药学领域的常规生产方法制备成口服、静脉、肌肉注射等剂型，适当时也可以使用介入疗法。

本发明的有益效果在于：合成工艺简单，成本低，水溶性好，有利于制备成各种药用剂型，抗癌谱广，抗癌活性高，治疗指数高，本发明的一类水溶性喜树碱衍生物对多种肿瘤细胞株均有明显的抗肿瘤作用，可在制备治疗肿瘤药物中应用。

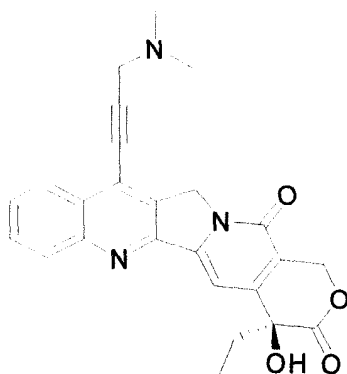
具体实施方式

下面的实施例可使本专业技术人员更全面地理解本发明，但不以任何方式限制本发明。

实施例 1：7-(3'-二甲氨基丙炔基)喜树碱 (CPT-11) 的制备

将 500mg 7-氯-20-乙酰基喜树碱，40mg 醋酸钯，220mg BINAP，325mg 无水碳酸钾加入到烧瓶中，氮气保护，加入 0.40ml 3-二甲氨基丙炔，75mL 甲苯，回流反应 22 小时，检测反应完全，冷却，过滤，减压蒸去甲苯，剩余物硅胶柱层析，氯仿：甲醇 (200:1) 洗脱，得 7-(3'-二甲氨基丙炔基)-20-乙酰基喜树碱 400mg。

上述产物加入到 20mL 的浓硫酸中，室温搅拌至反应完全，将反应混合物加入到碎冰中，用 NaOH 水溶液调至中性，氯仿萃取，柱层析，得 250mg 7-(3'-二甲氨基丙炔基)喜树碱 (CPT-11)



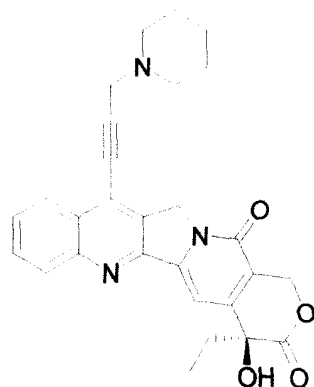
¹H NMR (CDCl₃) δ = 8.31(d, J=8.1Hz, 1H), 8.22(d, J=8.7 Hz, 1H), 7.82(t, J=8.2 Hz, 1H), 7.68(t, J=7.8 Hz, 1H), 7.66(s, 1H), 5.74(d, J=16.2 Hz, 1H), 5.30(d, J=16.2 Hz, 1H), 5.27(s, 2H), 3.89(s, 2H), 2.65(s, 6H), 1.87(m, 2H), 1.00(t, J=7Hz, 3H)

实施例 2：7-(3'-哌啶基丙炔基)喜树碱 (CPT-21) 制备：

将 500mg 7-氯-20-乙酰基喜树碱，40mg 醋酸钯，220mg BINAP，325mg 无水碳酸钾加入到烧瓶中，氮气保护，加入 0.45ml 3-哌啶基丙炔，75mL 甲苯，回流反应 22 小时，检测反应完全，冷却，过滤，减压蒸去甲苯，剩余物硅胶柱层析，氯仿：甲醇 (200:1) 洗脱，得

7-(3'-哌啶基丙炔基)-20-乙酰基喜树碱 460mg.

上述产物加入到 20mL 的浓硫酸中, 室温搅拌至反应完全, 将反应混合物加入到碎冰中, 用 NaOH 水溶液调至中性, 氯仿萃取, 柱层析, 得 300mg 7-(3'-哌啶基丙炔基)喜树碱 (CPT-21)

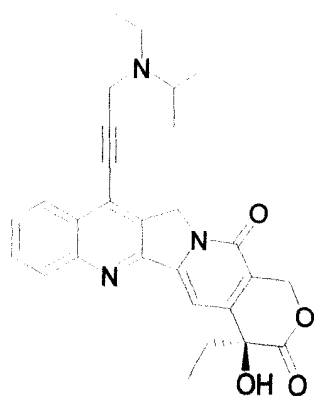


^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 1.00 (t, J =7.5, 3H), 1.71 (m, 6H), 1.87 (m, 2H), 2.69 (t, J =6, 4H), 3.77 (s, 2H), 3.85 (s, 1H), 5.30 (d, J =15, 1H), 5.31 (s, 1H), 5.75 (d, J =15, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.69 (dd, J =9, J =6, 1H), 7.84 (dd, J =9, J =6, 1H), 8.21 (d, J =9, 1H), 8.33 (d, J =9, 1H). MS (EI): m/z =469.

实施例 3: 7-(3'-二异丙基胺基丙炔基)喜树碱 (CPT-17)

将 500mg 7-氯-20-乙酰基喜树碱, 40mg 醋酸钨, 220mg BINAP, 325mg 无水碳酸钾加入到烧瓶中, 氮气保护, 加入 0.50ml 3-二异丙基胺基丙炔, 75mL 甲苯, 回流反应 22 小时, 检测反应完全, 冷却, 过滤, 减压蒸去甲苯, 剩余物硅胶柱层析, 氯仿:甲醇 (200:1) 洗脱, 得 7-(3'-二异丙基胺基丙炔基)-20-乙酰基喜树碱 300mg.

上述产物加入到 20mL 的浓硫酸中, 室温搅拌至反应完全, 将反应混合物加入到碎冰中, 用 NaOH 水溶液调至中性, 氯仿萃取, 柱层析, 得 150mg 7-(3'-二异丙基胺基丙炔基)喜树碱 (CPT-17)。



^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 1.06 (t, J =7.5, 3H), 1.63 (d, J =6, 12H), 1.89 (m, 2H), 3.77 (s, 1H), 3.99 (m, 2H), 4.44 (s, 2H), 5.30 (d, J =15, 1H), 5.32 (s, 1H), 5.75 (d, J =15, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.88 (dd, J =9, J =6, 1H), 7.84 (dd, J =9, J =6, 1H), 8.26 (m, 2H). MS (EI): m/z =485.

本发明的一类水溶性喜树碱衍生物对多种肿瘤细胞株均有明显的抗肿瘤作用。受试的肿瘤细胞株包括人肝癌细胞株 Bel-7402、人食道癌细胞株 ECA-109、人白血病细胞株 HL-60 和 K562、人乳腺癌细胞株 MCF-7、人非小细胞肺癌细胞株 A549、人前列腺癌细胞株 PC-3、人口腔癌细胞株 KB、人脑癌细胞株 U251、人胃癌细胞株 SGC-7901, 将上述处于对数生长期的肿瘤细胞, 以 2×10^4 个/ml 接种于 96 孔培养板中, 培养 24 h 后, 分别加入六种不同浓度的 CPT-21, CPT-11, CPT-14, CPT-17, CPT-23 ($0.016 - 10.0 \mu\text{g/ml}$) $10.0 \mu\text{l}$, 每个浓度设 3 个复孔。细胞在 37°C , 5 % CO_2 培养箱中孵育 48 小时后, 加入浓度为 5 mg/ml 的 MTT 溶液 $10 \mu\text{l}$, 继续培养 4 小时。吸去上清液, 加入 $100 \mu\text{l}$ DMSO 摇匀, 用酶标仪于 570 nm 波长下测定各孔的 OD 值, 细胞抑制率的计算公式为: 细胞抑制率% = (对照组 OD 值 - 用药组 OD 值) / 对照细胞 OD 值 $\times 100\%$ 。用 Bliss 法求出 IC_{50} , 求得的 IC_{50} (M) 值见下表:

受试人 癌细胞 株	CPT-11	CPT-14	CPT-17	CPT-23	CPT-21
Bel-7402	$7.2 \pm 2.3 \times 10^{-6}$	$2.5 \pm 0.8 \times 10^{-6}$	$3.4 \pm 0.9 \times 10^{-7}$	$5.6 \pm 1.0 \times 10^{-6}$	$3.0 \pm 1.7 \times 10^{-6}$
ECA-109	$6.3 \pm 1.4 \times 10^{-6}$	$5.5 \pm 2.1 \times 10^{-6}$	$2.5 \pm 0.7 \times 10^{-6}$	$5.2 \pm 2.1 \times 10^{-5}$	$7.9 \pm 3.5 \times 10^{-6}$
HL-60	$2.1 \pm 1.0 \times 10^{-7}$	$3.6 \pm 0.7 \times 10^{-7}$	$7.1 \pm 1.7 \times 10^{-6}$	$2.4 \pm 0.9 \times 10^{-7}$	$1.0 \pm 0.5 \times 10^{-7}$
K562	$4.5 \pm 0.7 \times 10^{-7}$	$8.2 \pm 2.4 \times 10^{-7}$	$6.2 \pm 1.8 \times 10^{-6}$	$8.1 \pm 2.3 \times 10^{-7}$	$1.3 \pm 0.4 \times 10^{-7}$
A549	$9.4 \pm 4.0 \times 10^{-5}$	$8.1 \pm 1.0 \times 10^{-6}$	$5.3 \pm 1.4 \times 10^{-6}$	$6.2 \pm 1.8 \times 10^{-6}$	$7.3 \pm 3.5 \times 10^{-6}$
PC-3	$4.2 \pm 1.6 \times 10^{-6}$	$2.4 \pm 0.6 \times 10^{-6}$	$1.8 \pm 0.3 \times 10^{-7}$	$5.3 \pm 1.5 \times 10^{-6}$	$1.0 \pm 0.8 \times 10^{-7}$
KB	$1.0 \pm 0.4 \times 10^{-5}$	$4.7 \pm 2.5 \times 10^{-5}$	$5.4 \pm 1.3 \times 10^{-5}$	$2.1 \pm 0.7 \times 10^{-6}$	$5.0 \pm 2.1 \times 10^{-6}$
MCF-7	$5.7 \pm 1.4 \times 10^{-6}$	$9.2 \pm 2.4 \times 10^{-5}$	$7.0 \pm 2.2 \times 10^{-6}$	$4.3 \pm 0.7 \times 10^{-5}$	$1.3 \pm 1.1 \times 10^{-6}$
U251	$2.4 \pm 1.1 \times 10^{-6}$	$6.5 \pm 3.0 \times 10^{-5}$	$3.7 \pm 1.1 \times 10^{-5}$	$2.8 \pm 0.6 \times 10^{-5}$	$1.2 \pm 0.4 \times 10^{-5}$
SGC-7901	$8.5 \pm 2.5 \times 10^{-6}$	$4.2 \pm 2.3 \times 10^{-6}$	$2.7 \pm 1.2 \times 10^{-6}$	$7.4 \pm 2.2 \times 10^{-5}$	$6.3 \pm 3.1 \times 10^{-6}$

本发明化合物对 SGC7901 胃癌移植瘤有较好的抗肿瘤活性。将受试裸鼠分为空白对照组, irinotecan 10 mg/kg , CPT-21 10 mg/kg 和 CPT-21 5 mg/kg 。10 mg Irinotecan 溶于 10 ml 的生理盐水, 即 1 mg/ml ; 4.0 mg CPT-21 溶于 4 ml 蒸馏水后与 $8 \mu\text{l}$ 浓盐酸混合, 再加适

量的氢氧化钠溶液调整 PH 值为 7 左右，即 1 mg/ml；将 CPT-21 1 mg/ml 稀释一倍作为 CPT-21 5 mg/kg 组的受试药。各组腹腔注射（i.p.）受试药物 0.1 ml/10g，每隔二到三天给药一次。实验结果见下表：

组别		瘤体积 (mm ³)		抑瘤率 (%)
		开始	结束	
空白对照组		69.2±21.1	787.7±254.2	—
CPT-21	10mg/kg	60.7±24.5	196.5±72.3	75.1
CPT-21	5mg/kg	84.7±28.7	452.8±169.8	42.5

本发明的水溶性喜树碱衍生物对小鼠的急性毒性实验中发现，其 LD₅₀ 为 600mg/kg，治疗指数大于 100。