

学校编码: 10384  
学号: 21620141152575

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_  
UDC \_\_\_\_\_

廈門大學

硕士学位论文

**三类含氮母核激酶抑制剂的设计、合成和  
生物活性评价**

**Design, synthesis and biological activity evaluation of three  
types of kinase inhibitors with nitrogen-containing skeletons**

张婧芳

指导教师姓名: 邓贤明 教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2017年 04月

论文答辩时间: 2017年 05月

学位授予日期: 2017年 06月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2017年 05月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版)，允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

(        ) 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于  
年    月    日解密，解密后适用上述授权。

(        ) 2.不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人(签名)：

年    月    日

缩略语索引 .....	I
摘要.....	II
Abstract.....	IV
<b>第一章 前言 .....</b>	<b>1</b>
<b>第一节 蛋白激酶 .....</b>	<b>1</b>
<b>第二节 小分子激酶抑制剂 .....</b>	<b>2</b>
<b>第三节 临床使用的激酶抑制剂的发现、发展 .....</b>	<b>4</b>
1. Sorafenib & Regorafenib .....	4
2. Lenvatinib .....	6
3. Cabozantinib .....	7
4. Vandetanib.....	8
5. Alectinib.....	9
6. Sunitinib.....	9
<b>第四节 含氮母核的优越性及化合物库的构建策略 .....</b>	<b>10</b>
1.吡咯并嘧啶类衍生物的活性研究进展.....	10
2.噻吩并嘧啶类衍生物的活性研究进展.....	14
<b>第五节 激酶抑制剂的应用前景 .....</b>	<b>18</b>
<b>第二章 基于吡咯并嘧啶化合物库的构建 .....</b>	<b>20</b>
<b>第一节 背景介绍 .....</b>	<b>20</b>
<b>第二节 基于优势骨架构建化合物库 .....</b>	<b>21</b>
<b>第三节 化合物库小分子的设计、合成和生物活性评价 .....</b>	<b>23</b>
1. KQF-04-013-01 类似物的设计.....	23
2. KQF-04-013-01 类似物的合成.....	25
3. 生物活性评价.....	26

<b>第四节 小结与讨论</b> .....	<b>30</b>
<b>第三章 基于噻吩并嘧啶化合物库的构建</b> .....	<b>31</b>
<b>第一节 化合物库的构建</b> .....	<b>31</b>
<b>第二节 化合物库小分子的设计、合成和生物活性评价</b> .....	<b>31</b>
1. 噻吩并嘧啶类似物的设计 .....	31
2. 噻吩并嘧啶类似物的合成路线.....	32
3. 生物活性评价.....	33
<b>第三节 小结与讨论</b> .....	<b>36</b>
<b>第四章 实验部分</b> .....	<b>37</b>
<b>第一节 有机合成实验</b> .....	<b>37</b>
4.1. KQF-04-013-01 类似物的合成.....	37
4.2. 吡咯并嘧啶类似物的合成.....	59
4.3. 噻吩并嘧啶类似物的合成.....	74
<b>第二节 生物活性研究实验方法</b> .....	<b>87</b>
<b>参考文献</b> .....	<b>92</b>
<b>新化合物数据一览表</b> .....	<b>95</b>
<b>致 谢</b> .....	<b>98</b>

## CONTENTS

<b>Abbreviation index</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract(Chinese)</b> .....	<b>II</b>
<b>Abstract(English)</b> .....	<b>IV</b>
<b>Chapter I Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Section I Protein kinase</b> .....	<b>1</b>
<b>Section II Small molecule kinase inhibitor</b> .....	<b>2</b>
<b>Section III The discovery of clinical-used kinase inhibitors</b> .....	<b>4</b>
1. Sorafenib & Regorafenib .....	4
2. Lenvatinib .....	6
3. Cabozantinib .....	7
4. Vandetanib.....	8
5. Alectinib.....	9
6. Sunitinib.....	9
<b>Section IV The superiority of nitrogen scaffold and strategy in library design</b> .....	<b>10</b>
1. The activity of pyridine and pyrimidine derivatives.....	10
2. The activity of thiophene and pyridine derivatives.....	14
<b>Section V Kinase inhibitor application prospect</b> .....	<b>18</b>
<b>Chapter II The construction of pyrrole and pyrimidine compound library</b> .....	<b>20</b>
<b>Section I Background</b> .....	<b>20</b>
<b>Section II The construction of compound library based on privileged skeleton</b> .....	<b>21</b>
<b>Section III Design, synthesis and evaluation of small moleculars in library</b> .....	<b>23</b>

1. Design of KQF-04-013-01 analogs.....	23
2. Synthesis of KQF-04-013-01 analogs.....	25
3. Bioactivities evaluation.....	26
<b>Section IV Summary and discussion .....</b>	<b>30</b>
<b>Chapter III The construction of thiophene and pyrimidine compound library.....</b>	<b>31</b>
<b>Section I Construction of compound library .....</b>	<b>31</b>
<b>Section II Design, synthesis and evaluation of small moleculars in library ..</b>	<b>31</b>
1. Design of thiophene and pyrimidine analogs.....	31
2. Synthesis of thiophene and pyrimidine analogs.....	32
3. Bioactivities evaluation.....	33
<b>Section III Summary and discussion.....</b>	<b>36</b>
<b>Chapter IV Experimental part .....</b>	<b>37</b>
<b>Section I Organic synthesis procedure.....</b>	<b>37</b>
4.1. Synthesis of KQF-04-013-01 analogs.....	37
4.2. Synthesis of pyrrole and pyrimidine analogs.....	59
4.3. Synthesis of thiophene and pyrimidine analogs.....	74
<b>Section II Experimental methods for biological activity evaluation .....</b>	<b>87</b>
<b>References .....</b>	<b>92</b>
<b>Data of new compounds .....</b>	<b>95</b>
<b>Acknowledgments .....</b>	<b>98</b>

## 缩略语索引

DCM	dichloromethane
DIEA	diisopropylethylamine
DMF	<i>N, N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
EA	ethyl acetate
EDCI	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride
Et	ethyl
HATU	<i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-yl)- <i>N, N, N', N'</i> -tetramethyluronium hexafluorophosphate
HOBT	<i>N</i> -hydroxybenzotriazole
Me	methyl
PE	petroleum ether
Ph	phenyl
SEMCl	2-(trimethylsilyl)ethoxymethyl chloride
TFA	trifluoroacetic acid
THF	tetrahydrofuran



## 摘要

蛋白激酶是人类生命活动中重要的信号传递使者，小分子蛋白激酶抑制剂是以蛋白激酶信号通路功能为基础，结合蛋白激酶结构进行设计合成的小分子药物。自 2001 年，第一个激酶抑制剂类药物 Imatinib 获得 FDA 批准，成为本领域发展的里程碑后，小分子激酶抑制剂发展迅速，大量的小分子激酶抑制剂类化合物进入临床使用。在众多蛋白激酶中，*RET* 融合基因被鉴定为 NSCLC（非小细胞性肺癌）亚型中的新致癌基因，即 *RET* 重排的存在与肺腺癌亚型相关，所以开发针对 *RET* 激酶的抑制剂有望用于相关非小细胞肺癌的治疗。

本论文以三类含氮双环母核为基础，以 KQF-04-013-01 为先导化合物（lead compound），辅助以蛋白质结晶结合模式图分析、活性拼接和骨架跃迁等药物化学设计手段，通过有机合成方法设计并合成了 71 个靶向于 *RET* 的小分子激酶抑制剂并依照其分类建立类药小分子化合物库。在细胞水平对其抑制活性进行了评价。

论文的第一部分是对咪唑并吡嗪和吡咯并嘧啶两类化合物的构效关系进行研究。经过对早期小分子化合物库的筛选发现一个咪唑并吡嗪类化合物 KQF-04-013-01，具有抑制 *RET* 激酶的活性。我们以 KQF-04-013-01 作为先导化合物，设计合成了一系列咪唑并吡嗪衍生物和吡咯并嘧啶衍生物，通过系统的生物活性评价和构效关系分析获得了活性进一步提高的 3 个化合物: **IA-3**、**IIA-6** 和 **IIA-12**，其  $IC_{50}$  值分别为 4 nmol/L、22 nmol/L、51 nmol/L。

论文的第二部分是对噻吩并嘧啶类化合物的构效关系进行研究。基于对第一部分 *RET* 激酶抑制剂衍生物的构效关系分析，我们保留吡咯并嘧啶衍生物取代基设计，更换骨架母核，即将吡咯环上的氮原子替换为硫原子，考察母核更替对小分子激酶抑制剂构效关系的影响。通过生物活性评价发现化合物 **IIIB-4** 对 *RET* 显示了良好的活性（ $IC_{50} = 54$  nmol/L）。

综上所述，本论文研究了一系列以咪唑并吡嗪、吡咯并嘧啶和噻吩并嘧啶结构为母核的小分子蛋白激酶抑制剂，并较为系统的研究了这三类含氮母核衍生物在细胞水平的 *RET* 激酶抑制活性，得到了一些对 *RET* 有较好抑制活性的活性化

合物。这些化合物可以作为小分子探针、苗头化合物，为今后 RET 激酶抑制剂的设计指明方向。

**关键词：**RET；激酶抑制剂；构效关系

厦门大学博硕士论文摘要库

## Abstract

Protein kinase is an important signaling messenger in human life. Small molecule protein kinase inhibitor can be designed on the basis of protein kinase structure. In 2001, Imatinib was the first kinase inhibitor, approved by FDA, serving as a milestone in the field of targeted cancer therapy. Until now, 32 small molecule kinase inhibitors have been approved by FDA and achieved great success in clinic. *RET*, encodes one of the receptor tyrosine kinases, which are cell-surface molecules that transduce signals for cell growth and differentiation has been reported as a new oncogene in NSCLC. Therefore, RET has emerged as a promising therapeutic target for NSCLC therapy.

In this thesis, three nitrogen-containing bicyclic scaffolds were utilized for the optimization of lead compound KQF-04-013-01. Based on co-crystal structure analysis, active fragment assembling and scaffold hooping, 71 small molecule kinase inhibitors targeting RET were designed and synthesized for the development of novel RET inhibitors with good selectivities and activities. And their activity against RET has been evaluated by MTS experiment.

In the first part of this thesis, we focused on the structure-activity relationship study of imidazo-pyrazine and pyrrolopyrimidine compounds. KQF-04-013-01, an imidazopyrazine compound, was identified as an inhibitor of RET kinase by screening the early small molecule compound library. Using KQF-04-013-01 as a lead compound, a series of imidazopyrazine derivatives and pyrrolopyrimidine derivatives were designed and synthesized. Structure-activity relationship study led to the identification of compounds **IA-3**, **IIA-6** and **IIA-12** exhibiting improved activities with IC<sub>50</sub> values of 4, 22 and 51 nmol/L, respectively.

In the second part of this thesis, we studied the structure-activity relationship of thienopyrimidine compounds. Based on the structure-activity relationship analysis in the first part, we retained the substituents of the pyrrolopyrimidine derivatives, replaced the nitrogen atom on the pyrrole ring with sulfur atom, and studied the impact of these

variations.

In summary, we have identified a series of imidazopyrazine and pyrrolopyrimidine derivatives representing by **IA-3**, **IIA-6** with good potency and selectivity against RET. These results provide a good starting point of further drug development for targeting RET.

**Key Words:** RET; Kinase Inhibitors; Structure-activity Relationship Study

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 第一章 前言

### 第一节 蛋白激酶

蛋白激酶是细胞生命活动过程中重要的信号传递使者，是一类将三磷酸腺苷 (ATP) 上的  $\gamma$ -磷酸转移到蛋白质分子特定氨基酸残基上，催化蛋白质磷酸化的磷酸转移酶，从而传递各种信号<sup>[1]</sup>。蛋白激酶参与了众多的生理过程，包括细胞增殖、凋亡、代谢、转录、分化等。信号通路异常表达或者基因突变都可能导致各种肿瘤性疾病的产生<sup>[2-3]</sup>。药理学及病理学研究表明，对于很多疾病，如肿瘤、炎症、中枢神经系统性疾病、心血管疾病及糖尿病等，蛋白激酶都是一个理想的药物靶点<sup>[4-5]</sup>。

对于蛋白激酶的研究始于 20 世纪 50 年代，在 90 年代随着 MAPK/ERK、JAK 及 PI3K 等信号通路的揭示而达到一个研究热潮。迄今为止，在人体中发现了 518 种蛋白激酶，而编码具有激酶活性蛋白的基因则高达 900 多种<sup>[1]</sup>。与之相对应，有关激酶抑制剂的研究也逐步发展，并在激酶作用机制的阐明过程中扮演了重要角色，并成为重要的药物研究热点。该领域研究的文献数量也是逐年上升，从侧面反映了其在基础研究和药物发现中的重要性<sup>[6]</sup>。

研究蛋白激酶信号通路抑制作用的机制主要有以下七点，如图一所示：最常见的激酶抑制剂的设计方式是在 ATP 结合口袋插入“类 ATP”，即 (a) 阶段，阻断  $\gamma$ -磷酸转移到蛋白质分子特定氨基酸残基的步骤。然而，临床研究中显示，抑制剂实际上影响了未成熟蛋白形成成熟蛋白大分子，形成正确的折叠构象的过程 (b)；通过调节翻译激酶蛋白的效率，或调节激活激酶蛋白的速率来抑制信号通路 (c)；阻断激酶表达基因的转录，或阻断调节子的转录 (d) 进而阻断细胞周期；激酶自身的稳定性 (e) 或与底物竞争性结合的能力 (f)；激活磷酸酶，加速底物的磷酸化达到除去底物的目的 (g)<sup>[7]</sup>。这种研究信号通路的思路也可以借鉴到小分子激酶抑制剂的设计思路中，进行激酶抑制剂的设计。

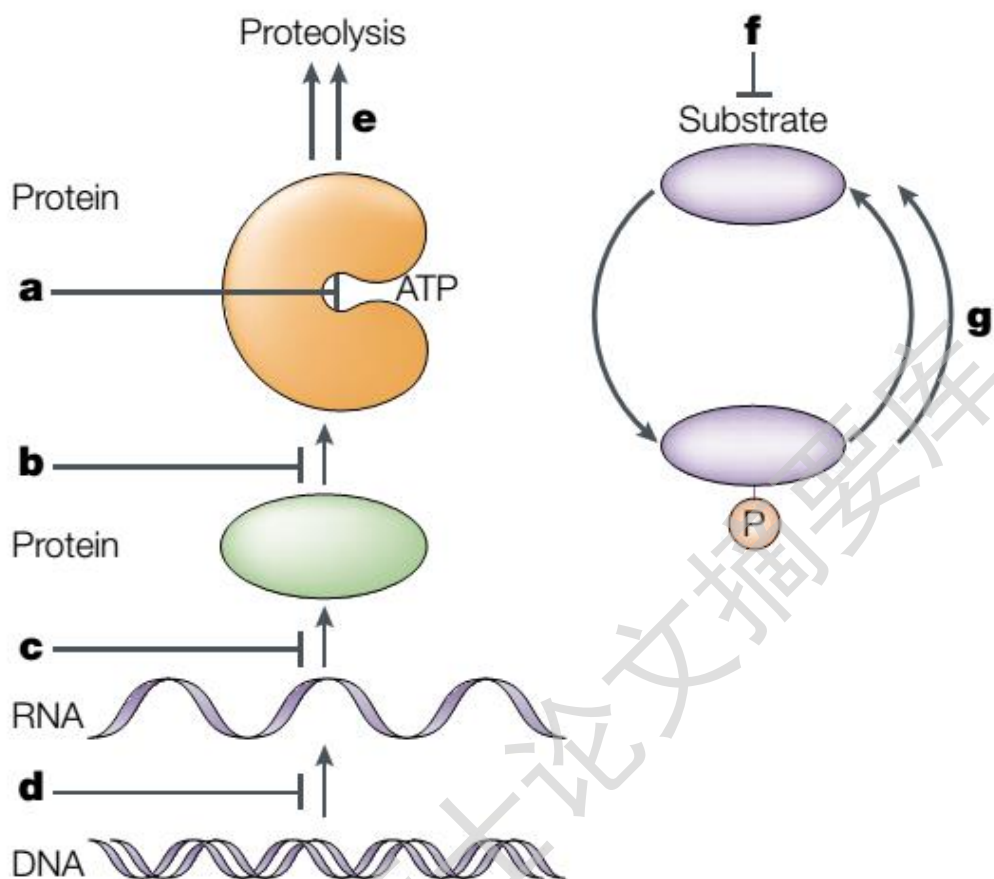
图 1 七种抑制激酶信号通路的机制<sup>[7]</sup>

Figure 1 Several mechanisms can inhibit kinase signalling.

## 第二节 小分子激酶抑制剂

尽管组成人类蛋白激酶的氨基酸序列千变万化，但是人类激酶在 3D 结构上有很程度的相似性，尤其是在他们的激酶活性催化域—ATP 结合口袋：一个以  $\beta$  折叠为主的 N 端(N-lobe)，一个含  $\alpha$  螺旋的 C 端(C-lobe)，以及一个连接铰链区<sup>[8]</sup>，而激酶抑制剂与 ATP 结合口袋有不同的结合模式。

通过结合模式分类，激酶抑制剂可以分为两类：不可逆激酶抑制剂和可逆激酶抑制剂<sup>[9-10]</sup>。前者倾向于共价结合到靠近 ATP 结合位点的亲核活性半胱氨酸残基上，ATP 结合位点被阻塞，进而导致不可逆抑制。后者根据结合口袋的构象和 DFG 的形式可以进一步分为四个主要类型，如图二所示：I 型抑制剂是 ATP 竞争型抑制剂，结合于激酶的活性构象 DFG 结构的天冬氨酸残基，面向激酶的活性

位点。II型抑制剂结合于激酶的非活性构象DFG结构的天冬氨酸残基，自ATP结合位点向外突出。由于DFG结构的旋转特性，很多II型抑制剂的设计会寻找一些毗邻ATP结合位点的特别的口袋进行结合。在III型结合模式中，抑制剂仅仅结合在靠近ATP的一个别构口袋中，不与ATP结合口袋发生作用。IV型抑制剂结合于远离ATP结合口袋的别构位点<sup>[11]</sup>。还有其他一些抑制剂的结合模式不同于以上四种结合模式<sup>[12]</sup>。

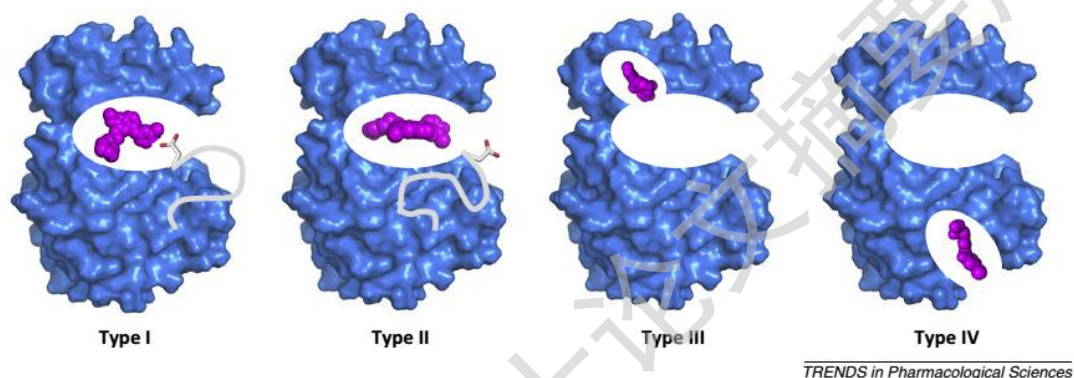


图 2 四种可逆抑制剂结合模式图<sup>[12]</sup>

Figure 2 Four types of reversible binding mode

选择小分子激酶抑制剂作为治疗肿瘤的药物有一定的优势：其一，小分子化合物的设计需符合辉瑞公司资深药物化学家 Christopher A. Lipinski 在 1997 年提出的筛选类药分子的“类药五原则”，由 Lipinski 规则设计的化合物药代动力学性质优良，在生物体内代谢过程中生物利用度高<sup>[13]</sup>。其二，突变的蛋白激酶引发致癌基因（oncogene）的过度表达，在人体内形成实体肿瘤。抑制突变激酶的活性不但不影响正常细胞的调节机制，反而能预防正常细胞发生癌变。其三，有一些蛋白激酶位于转导致癌因子的关键信号通路下游，能够保证肿瘤细胞的存活并促进肿瘤细胞的增殖，抑制此类蛋白激酶可以使肿瘤细胞呈现综合致死因子表型，自然凋亡。其四，部分蛋白激酶仅在肿瘤细胞或者肿瘤细胞的周边组织中存在，为不同阶段肿瘤的形成、发展提供帮助，如 VEGFR(血管内皮生长因子受体)为肿瘤细胞供血形成血管传递信号。对这类蛋白激酶的抑制能高效的选择性杀死肿瘤细胞。

### 第三节 临床使用的激酶抑制剂的发现、发展

目前,蛋白激酶已成为重要的类肿瘤药物发现的靶标。2001年,第一个激酶抑制剂类药物 Imatinib 获得 FDA 批准,成为本领域发展的里程碑。此后十年,此类药物以平均每年获批一种的速度稳步发展,与此同时,我们对激酶信号传导网络和疾病病理学的理解也在逐年增长。在 2012 年 1 月至 2015 年 2 月期间,小分子激酶抑制剂类药物迎来空前的爆发式增长,共有 15 种新药获得 FDA 批准;到 2015 年 4 月,共有 28 个小分子激酶抑制剂获得批准<sup>[12]</sup>;截至 2016 年 12 月底,共有 31 种小分子激酶抑制剂类药物获得审批,同时还有大量的小分子激酶抑制剂类化合物处于临床或临床前研究中<sup>[14]</sup>。

在这里,我们主要介绍 FDA 批准的七种针对 RET 的可逆型 RTK (receptor tyrosine kinase) 抑制剂:

#### 1. Sorafenib & Regorafenib

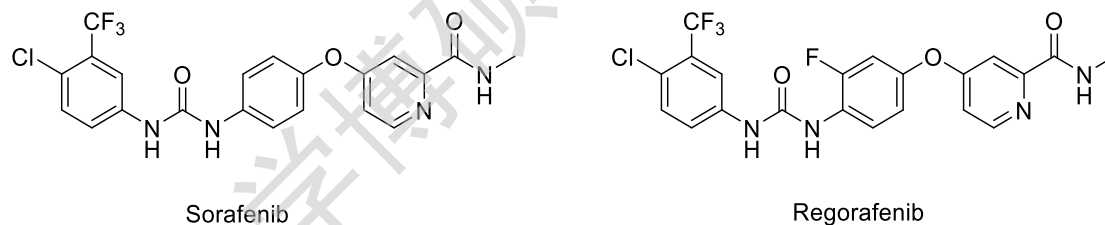


图 3 索拉非尼和瑞戈非尼

Figure 3 Sorafenib and Regorafenib

2005 年 FDA 批准对甲苯磺酸索拉非尼片(Sorafenib)上市。Regorafenib (Stivarga, Bayer) 是其姊妹产品,是由拜耳和美国生技制药公司联合开发的一种多激酶抑制剂,通过抑制多种促进肿瘤生长的蛋白质激酶,靶向作用于肿瘤生成、肿瘤血管发生和肿瘤微环境信号传导的维持。2012 年 9 月 27 日美国食品药品监督管理局 FDA 批准 Regorafenib (Stivarga)治疗经常规治疗后进展和转移的结直肠癌患者。这两种药物都是多激酶抑制剂,可以抑制肿瘤的生长。临床前研究中证明瑞戈非尼(regorafenib, Stivarga®)抑制在肿瘤新生血管发生中起重要作用的几种促血管生成的 VEGF 受体激酶。它还抑制几种致癌和肿瘤微环境激酶,包括



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库