



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102216292 B

(45) 授权公告日 2014. 08. 13

(21) 申请号 200980145551. 4

A61P 35/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2009. 11. 09

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

61/115, 362 2008. 11. 17 US

W0 03088970 A2, 2003. 10. 30, 说明书摘要、
权利要求 1-25.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 05. 16

W0 2008110611 A1, 2008. 09. 18, 说明书第
3-6 页、权利要求 1-10.

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/063696 2009. 11. 09

审查员 李士坤

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/056620 EN 2010. 05. 20

(73) 专利权人 伊莱利利公司

地址 美国印第安纳州

(72) 发明人 J·M·克雷 P·A·希普斯金德

D·J·萨尔 T·威尔森 (尼高桑)

M·L·汤普森 J·A·巴斯蒂安

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 陈润杰 黄革生

(51) Int. Cl.

C07D 403/04 (2006. 01)

A61K 31/501 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书13页

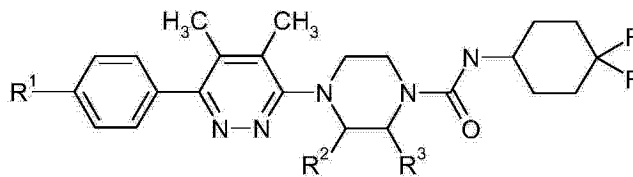
(54) 发明名称

四取代的哒嗪 HEDGEHOG 途径拮抗剂

(57) 摘要

本发明提供了可用于治疗癌症的新的四取代
的哒嗪 hedgehog 途径拮抗剂。

1. 下式的化合物或其可药用盐：



其中：

R¹ 是氢、氟或氰基；以及

R² 和 R³ 独立地为甲基或氢。

2. 权利要求 1 的化合物或其可药用盐，其中 R¹ 是氢。

3. 权利要求 1 或 2 的化合物或其可药用盐，其中 R² 和 R³ 中的一个为氢，另一个为甲基。

4. 根据权利要求 1 或 2 的化合物，其为 (S)-N-(4,4-二氟环己基)-4-(4,5-二甲基-6-苯基吡唑-3-基)-2-甲基哌嗪-1-甲酰胺盐酸盐。

5. 药物组合物，其包含根据权利要求 1-4 中任一项的化合物，和可药用载体或赋形剂。

6. 根据权利要求 1-4 中任一项的化合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

7. 根据权利要求 6 的用途，其中所述癌症选自脑癌、基底细胞瘤、食道癌、胃癌、胰腺癌、胆道癌、前列腺癌、乳腺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、B 细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、卵巢癌、结肠直肠癌、肝癌、肾癌和黑素瘤。

四取代的哒嗪 HEDGEHOG 途径拮抗剂

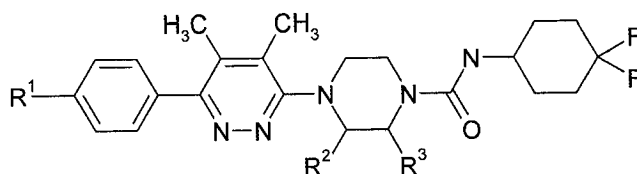
[0001] 本发明涉及 Hedgehog 途径拮抗剂,更具体而言,涉及新的四取代的哒嗪及其治疗用途。Hedgehog (Hh) 信号传导途径通过指导细胞分化和增殖在胚胎模式形成和成人组织维护方面起重要的作用。包括 SonicHedgehog (Shh)、Indian Hedgehog (Ihh) 和 Desert Hedgehog (Dhh) 在内的 Hedgehog (Hh) 蛋白家族是经历翻译后修饰的分泌性糖蛋白,所述修饰包括自身催化性切割和将胆固醇与氨基端肽偶联以形成具有信号传导活性的片段。Hh 与 12 次跨膜蛋白 Ptch (Ptch1 和 Ptch2) 结合,因而减轻 Ptch 介导的对 Smoothened (Smo) 的抑制。Smo 活化触发一系列胞内事件,最终使 Gli 转录因子 (Gli1、Gli2 和 Gli3) 稳定并表达对细胞增殖、细胞存活、血管发生和侵袭负责的 Gli 依赖性基因。

[0002] 最近,基于 Shh 信号传导的异常活化导致多种肿瘤、例如胰腺癌、成神经管细胞瘤、基底细胞瘤、小细胞肺癌和前列腺癌的形成的发现,Hh 信号传导已引起人们相当大的兴趣。在本领域中已报道了某些 Hh 拮抗剂,例如甾体生物碱化合物 IP-609;氨基脯氨酸化合物 CUR61414;和 2,4-二取代的噻唑化合物 JK18。W02005033288 公开了某些被认为是 hedgehog 拮抗剂的 1,4-二取代的酞嗪。类似地,W02008110611 公开了某些与诊断和治疗 hedgehog 途径相关病理学有关的 1,4-二取代的酞嗪化合物。

[0003] 对有效的 hedgehog 途径抑制剂、特别是那些具有所需药效学、药动学和毒理学特性的 hedgehog 途径抑制剂仍存在需求。本发明提供了新的四取代的哒嗪,它们是这种途径的有效拮抗剂。

[0004] 本发明提供了下式的化合物或其可药用盐:

[0005]



[0006] 其中:

[0007] R¹ 是氢、氟或氰基;且

[0008] R² 和 R³ 独立地为甲基或氢。

[0009] 本领域技术人员应理解,本发明的化合物包含叔胺部分并且能够与多种无机和有机酸反应以形成可药用酸加成盐。此类可药用酸加成盐和用于制备它们的常用方法为本领域所熟知。参见例如,P. Stahl 等人, HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE (VCHA/Wiley-VCH, 2002); S. M. Berge 等人, "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Sciences, 第 66 卷, No. 1, 1977 年 1 月。

[0010] 本发明的具体实施方案包括式 I 化合物或其可药用盐,其中:

[0011] (a) R¹ 是氢;和

[0012] (b) 权利要求 1 或 2 的化合物,其中 R² 和 R³ 中的一个为氢,另一个为甲基。

[0013] 本发明还提供了药物组合物,其包含与可药用赋形剂、载体或稀释剂组合的式 I 化合物或其可药用盐。

[0014] 本发明的化合物优选被配制成通过多种途径施用的药物组合物。优选, 此类组合物用于口服或静脉内施用。此类药物组合物和用于制备它们的方法为本领域所熟知。参见例如 REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (A. Gennaro 等人编辑, 第 19 版, Mack Publishing Co., 1995)。

[0015] 本发明还提供了治疗患者中的脑癌、基底细胞瘤、食道癌、胃癌、胰腺癌、胆道癌、前列腺癌、乳腺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、B 细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、卵巢癌、结肠直肠癌、肝癌、肾癌或黑素瘤的方法, 包括向需要这种治疗的患者施用有效量的式 I 化合物、或其可药用盐。

[0016] 应理解的是, 实际上所施用的化合物的量将由内科医师根据相关情况确定, 包括待治疗的条件、所选的施用路径、所施用的实际化合物、个体患者的年龄、重量和响应、以及患者综合征的严重度。每天剂量通常落入约 0.1 至约 5mg/kg 体重的范围。在某些情况下, 低于所述范围下限的剂量水平可以绰绰有余, 而在其他情况下, 也可以使用更大的剂量。因此, 上述剂量范围不意欲以任何方式限制本发明的范围。本发明还提供了用作药物的式 I 化合物或其可药用盐。

[0017] 此外, 本发明提供了式 I 化合物或其可药用盐在制备用于治疗癌症的药物中的用途。具体而言, 所述癌症选自脑癌、基底细胞瘤、食道癌、胃癌、胰腺癌、胆道癌、前列腺癌、乳腺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、B 细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、卵巢癌、结肠直肠癌、肝癌、肾癌或黑素瘤。

[0018] 而且, 本发明提供了药物组合物, 其包含作为活性成分的式 I 化合物或其可药用盐, 用于治疗脑癌、基底细胞瘤、食道癌、胃癌、胰腺癌、胆道癌、前列腺癌、乳腺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、B 细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、卵巢癌、结肠直肠癌、肝癌、肾癌或黑素瘤。

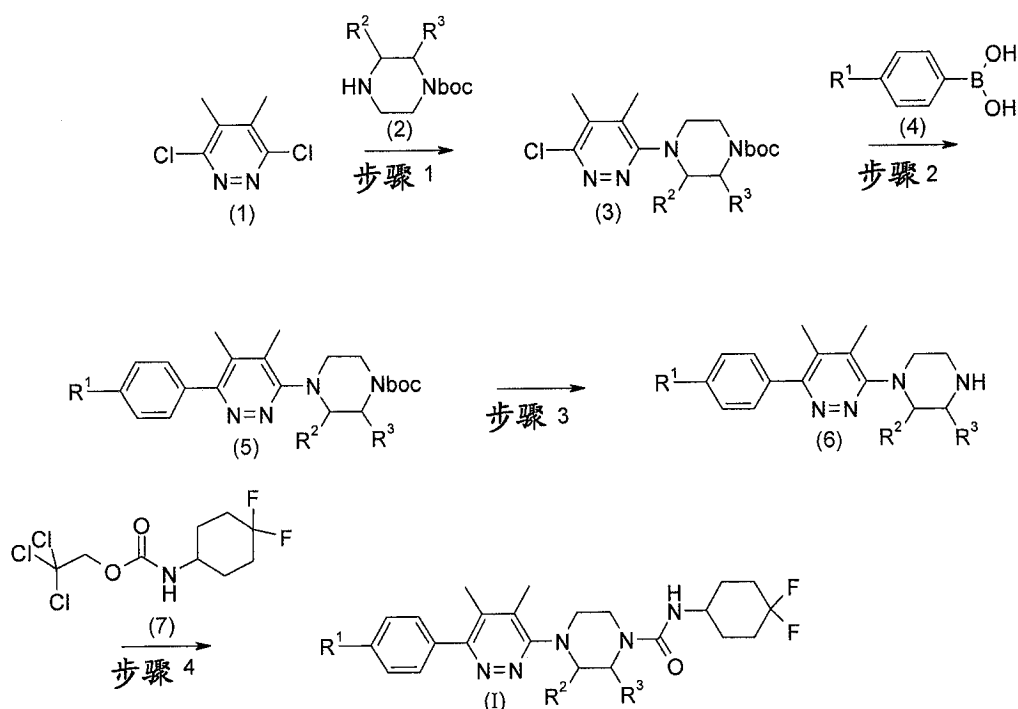
[0019] 式 I 化合物或其盐可通过本领域已知的多种方法以及在下面流程、制备例和实施例中所述的那些操作来制备。所述的每种路径的具体合成步骤可以以不同方式组合或结合不同流程的步骤, 来制备式 I 化合物或其盐。

[0020] 除非另有说明, 否则取代基如上所定义。试剂和原料通常对本领域技术人员来说是容易可得。其他试剂和原料可通过有机和杂环化学的标准技术、与已知结构相似化合物的合成类似的技术以及下面包括任何新操作的制备例和实施例中所述的操作来制备。

[0021] 如本文所述, 下面术语具有所示的含义: “*boc*” 或 “*t-boc*” 是指叔丁氧基羰基; “*EDCI*” 是指 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐; “*Et₂O*” 是指乙醚; “*HOBT*” 是指 1-羟基苯并三唑水合物; “*DMF*” 是指 N,N-二甲基甲酰胺; “*DMSO*” 是指二甲亚砜; “*EtOAc*” 是指乙酸乙酯; “*MeOH*” 是指甲醇; “*TFA*” 是指三氟乙酸; “*SCX*” 是指强阳离子交换; 和 “*IC₅₀*” 是指产生对该活性剂来说可能的最大抑制反应的 50% 的活性剂的浓度。

[0022] 流程 1

[0023]



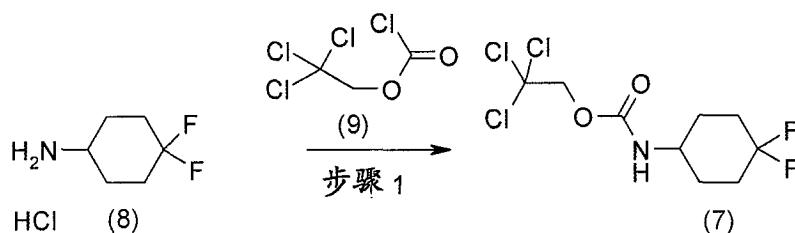
[0024] 可以根据流程 1 中所述的反应制备式 I 化合物。

[0025] 在流程 1 中,在亲核芳香族取代反应(SNAr)中,用单-boc保护的取代的哌嗪(2)取代3,6-二氯-4,5-二甲基哒嗪(1)以提供式(3)的3-氯-4,5-二甲基-6-(取代的)哒嗪。例如,在步骤1中,可将(1)的氯在极性非质子溶剂如DMSO中、在有机碱如二异丙基乙胺存在下与取代的单-boc保护的哌嗪反应。在步骤2中,在Suzuki-Miyaura交叉偶联反应中,可将二甲基哒嗪(3)上剩余的氯与苯基代硼酸(4)反应以得到相应的4,5-二甲基-6-取代的苯基哒嗪-3-取代的哌嗪(5)。熟练技术人员将认识到,有多种可用于促进此类交叉偶联反应的条件。反应条件利用适合的溶剂如二噁烷或二噁烷/水并且在碱如氟化铯存在下实现。反应在钯催化剂例如(1,1'-双(二苯基膦)二茂铁)氯化钯(II)存在下、在惰性气氛下、在约80-160°C的温度发生,以得到式(5)化合物。可通过标准脱保护方法将该胺脱保护。用于引入以及移除氮保护基团的方法为本领域所熟知(参见例如Greene和Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第3版, John Wiley and Sons, New York(1999))。例如,式(5)的哌嗪的-boc脱保护可在酸性条件下如氯化氢、在适合的溶剂如甲醇或二噁烷中实现,从而得到式(6)化合物。步骤4中胺的酰化可以用取代的氨基甲酸三氯乙酯(7)、使用有机碱如三乙胺、在极性非质子溶剂如DMSO中并加热至约90-110°C来实现。可通过本领域已知的方法将式I化合物转化为盐例如HCl盐,例如加入Et₂O中的HCl以得到式I化合物。

[0026] 可以如流程2所示制备取代的氨基甲酸三氯乙酯。

[0027] 流程2

[0028]

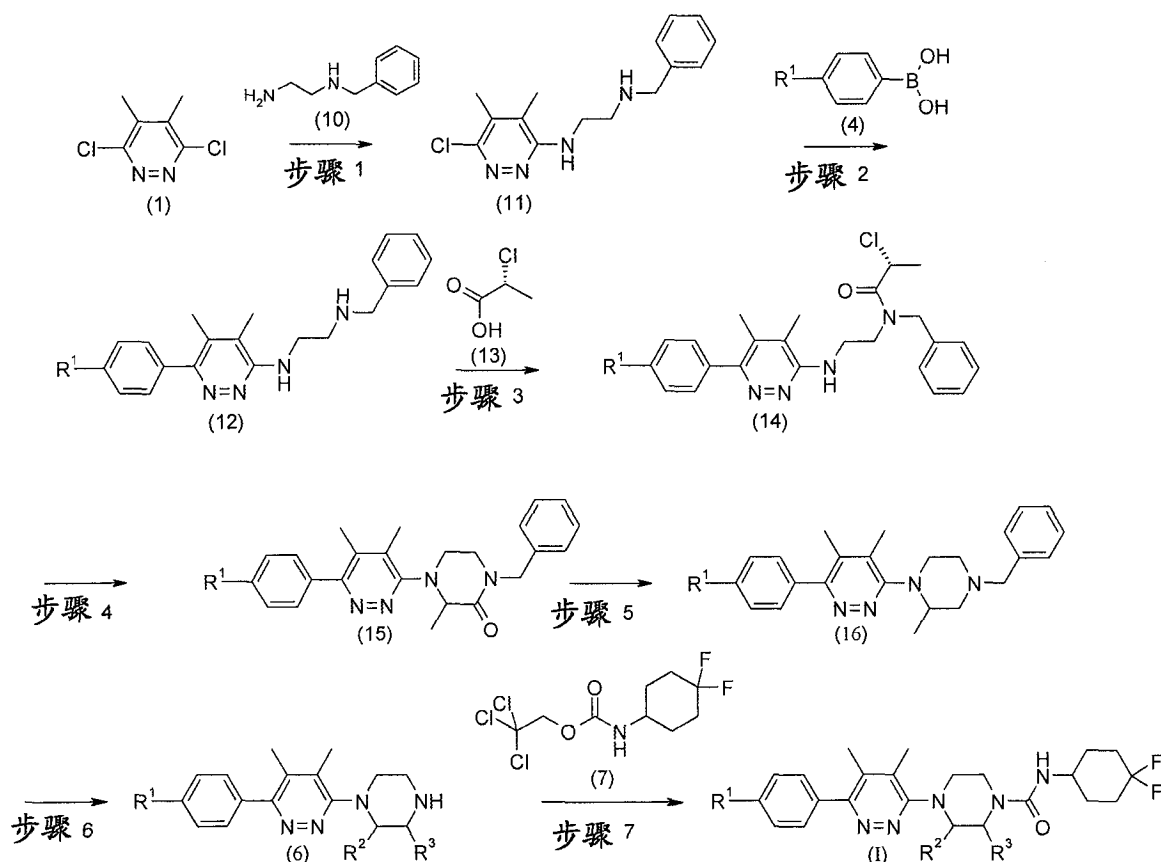


[0029] 步骤 1 中, 在惰性溶剂如二氯甲烷中、使用有机碱如三乙胺, 用氯甲酸 2,2,2-三氯乙酯 (9) 酰化 4,4-二氟环己胺盐酸盐 (8), 以得到 4,4-二氟环己基氨基甲酸 2,2,2-三氯乙酯 (7)。

[0030] 可选地, 可以用苄基乙二胺将 3,6-二氯-4,5-二甲基吡嗪烷基化, 而苄基乙二胺可被加工成环化哌嗪, 如流程 3 所示。

[0031] 流程 3

[0032]



[0033] 如流程 3 步骤 1 所示, (1) 的氯可以用苄基乙二胺 (10)、使用有机碱如二异丙胺、在极性非质子溶剂如 DMSO 中、在 110-130°C 加热下取代, 以得到保护的式 (11) 的乙二胺吡嗪。可如前所述将第二个氯与如步骤 2 所示的代硼酸 (4) 反应, 以得到式 (12) 的化合物。使用有机碱如三乙胺和合适的偶联试剂如 EDCI 和 HOBT、用 2-氯丙酸 (13) 酰化苄基氮, 以得到如步骤 3 所示的式 (14) 的化合物。步骤 4 中, 在惰性溶剂如 THF 中用氢化钠实现环化以形成吡嗪, 以得到式 (15) 化合物。步骤 5 中, 还原剂例如硼烷-二甲硫醚还原酮得到式 (16) 化合物。例如, 可用硼烷-二甲硫醚复合物在惰性溶剂如 THF 中处理式 (15) 化合物。可以将混合物加热至 40-60°C, 以得到式 (16) 的取代的哌嗪。步骤 6 中, 在 40-70psi 氢气和催化剂如 10% Pd/C 的氢化条件下、使用极性溶剂如乙醇, 实现哌嗪的脱保护, 以得到式

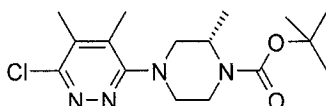
(6) 化合物。步骤 7 中,可以在极性非质子溶剂如 DMSO 中、使用有机碱如三乙胺并且加热至约 90–110℃,用取代的氨基甲酸三氯乙酯 (7) 实现胺的酰化,以得到式 I 化合物,其可通过本领域已知的方法、例如加入 Et₂O 中的 HCl 转化成盐例如 HCl 盐。

[0034] 提供下面制备例和实施例更详细地阐明本发明,这些制备例和实施例表示式 I 化合物的典型合成。本发明的化合物的名称一般通过 ChemDraw **Ultra®** 10.0 提供。

[0035] 制备例 1

[0036] (S)-4-(6-氯-4,5-二甲基哒嗪-3-基)-2-甲基哌嗪-1-甲酸-叔丁酯

[0037]

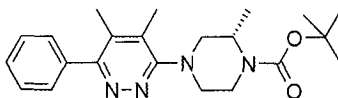


[0038] 在 120℃、将 1,4-二氯-2,3-二甲基哒嗪 (6.06g, 34.2mmol)、(S)-2-甲基-哌嗪-1-甲酸叔丁酯 (6.88g, 34.4mmol) 和二异丙基乙胺 (30ml, 172mmol) 在 DMSO (30mL) 中的混合物加热 5 天。冷却,并用另外的 (S)-2-甲基-哌嗪-1-甲酸叔丁酯 (3.74g, 18.7mmol) 处理混合物,在 120℃ 重新开始加热另外 2 天。用 EtOAc 稀释反应混合物,并用 H₂O 和盐水洗涤。经 Na₂SO₄ 干燥,过滤,在减压下浓缩。通过闪式硅胶层析法 (梯度为 20 ~ 50% 在己烷中的 EtOAc) 纯化残渣,得到为浅黄色泡沫的标题化合物 (7.36g, 63%)。ES/MS m/z (³⁵Cl) 341.0 (M+1)。

[0039] 制备例 2

[0040] (S)-4-(4,5-二甲基-6-苯基哒嗪-3-基)-2-甲基哌嗪-1-甲酸叔丁酯

[0041]



[0042] 用 (1,1'-双(二苯基膦)二茂铁)氯化钯 (II) (1.08g, 1.32mmol) 处理经 N₂ 除气的 (S)-4-(6-氯-4,5-二甲基哒嗪-3-基)-2-甲基哌嗪-1-甲酸叔丁酯 (3.03g, 8.87mmol)、苯基代硼酸 (1.62g, 13.3mmol) 和 CsF (4.09g, 26.9mmol) 在 1,4-二噁烷 (120mL) 中的混合物。在 95℃ 加热反应混合物过夜。冷却反应,在 EtOAc 与 H₂O 之间分配。用盐水洗涤有机层,经 Na₂SO₄ 干燥,过滤,在减压下浓缩。通过闪式硅胶层析法 (梯度为 15 ~ 85% 在己烷中的 EtOAc) 纯化残渣,得到为白色固体的标题化合物 (2.93g, 86%)。ES/MS m/z 383.0 (M+1)。

[0043] 基本上按照制备例 2 中所述的操作,使用适当的苯基代硼酸,制备下表中的取代的二甲基哒嗪。

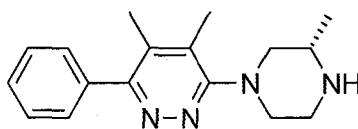
[0044]

制备例 编号	化学名	结构	ES/MS m/z
3	(S)-4-(6-(4-氰基苯基)-4,5-二甲基吡嗪-3-基)-2-甲基哌嗪-1-甲酸叔丁酯		408.2 (M+1)
4	(S)-4-(6-氟-4,5-二甲基吡嗪-3-基)-2-甲基哌嗪-1-甲酸叔丁酯		400.8 (M+1)

[0045] 制备例 5

[0046] (S)-4,5-二甲基-3-(3-甲基哌嗪-1-基)-6-苯基吡嗪

[0047]



[0048] 用 4M 在 1,4-二噁烷中的 HCl (10ml, 40.0mmol) 处理 (S)-4-(4,5-二甲基-6-苯基吡嗪-3-基)-2-甲基哌嗪-1-甲酸叔丁酯 (2.93g, 7.66mmol) 在 MeOH (20mL) 中的溶液。在环境温度搅拌反应混合物过夜。在减压下浓缩反应混合物。将残渣溶解在 MeOH 中, 倒入 SCX 柱 (Varian, 10g) 上。用 MeOH 漂洗柱子。用 2M NH_3 /MeOH 洗脱所需产物。在减压下浓缩, 得到标题化合物 (2.07g, 95%)。ES/MS m/z 283.0 (M+1)。

[0049] 使用适当的 boc-保护的哌嗪、反应时间为 3 小时以及使用 1,4-二噁烷替代 MeOH 作为溶剂, 基本上按照制备例 5 中所述的操作, 制备下表中的脱保护的哌嗪。

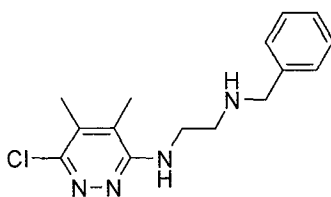
[0050]

制备例 编号	化学名	结构	ES/MS m/z
6	(S)-4,5-二甲基-6-(3-甲基哌嗪-1-基)哒嗪-3-甲腈		308.2 (M+1)
7	(S)-3-(4-氟苯基)-4,5-二甲基-6-(3-甲基哌嗪-1-基)哒嗪		301.2 (M+1)

[0051] 制备例 8

[0052] N1-苄基-N2-(6-氯-4,5-二甲基哒嗪-3-基)乙烷-1,2-二胺

[0053]

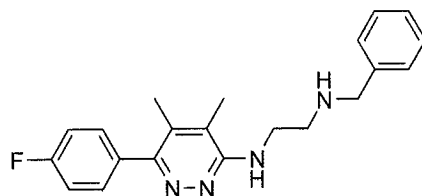


[0054] 在 120 °C、将 3,6-二氯-4,5-二甲基哒嗪 (6.90g, 39.0mmol)、N-苄基乙二胺 (8.78g, 58.5mmol) 和二异丙基乙胺 (25.2g, 195mmol) 在 DMSO (78mL) 中的混合物加热 3 天。冷却反应混合物, 倒入 H₂O 中, 用 Et₂O 萃取混合物。用 H₂O 洗涤有机层, 经 Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 在减压下浓缩。使用闪式硅胶层析法 (梯度为 0 ~ 5% 2M NH₃/MeOH 在 CH₂Cl₂ 中) 纯化残渣, 获得为蜡状固体的标题化合物 (6.41g, 57%)。ES/MS m/z 291.2 (M+1)。

[0055] 制备例 9

[0056] N1-苄基-N2-(6-(4-氟苯基)-4,5-二甲基哒嗪-3-基)乙烷-1,2-二胺

[0057]

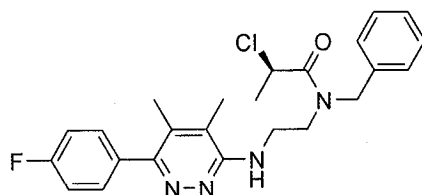


[0058] 用 (1,1'-双(二苯基膦)二茂铁)氯化钯 (II) (2.70g, 3.30mmol) 处理经 N₂ 脱气的 N1-苄基-N2-(6-氯-4,5-二甲基哒嗪-3-基)乙烷-1,2-二胺 (6.40g, 22.0mmol)、4-氟苯基代硼酸 (9.24g, 66.0mmol) 和 CsF (10.0g, 66.0mmol) 在 1,4-二噁烷 (220mL) 中的混合物。在 95°C 加热反应混合物过夜。冷却, 在饱和 NaHCO₃ (水溶液) 和 EtOAc 之间分配。分离各层, 用 EtOAc 萃取水层。合并有机层, 经 Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 在减压下浓缩。通过闪式硅胶层析法 (梯度为 0 ~ 6% 2M NH₃/MeOH 在 CH₂Cl₂ 中) 纯化残渣, 得到为蜡状固体的标题化合物 (4.91g, 64%)。ES/MS m/z 351.2 (M+1)。

[0059] 制备例 10

[0060] (R)-N-苄基-2-氯-N-(2-(6-(4-氟苯基)-4,5-二甲基哒嗪-3-基氨基)乙基)丙酰胺

[0061]

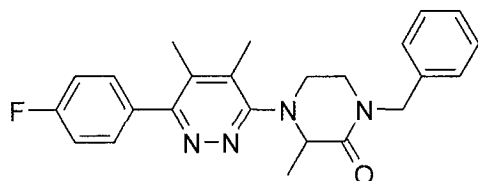


[0062] 用 (R)-(+)-2-氯丙酸 (1.84ml, 20.97mmol)、三乙胺 (2.92ml, 20.97mmol)、HOBT (3.21g, 20.97mmol) 和 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (4.02g, 20.97mmol) 相继处理 N1-苄基-N2-(6-(4-氟苯基)-4,5-二甲基哒嗪-3-基)乙烷-1,2-二胺 (4.90g, 13.98mmol) 在 CH_2Cl_2 (70mL) 中的溶液。在环境温度搅拌所得混合物过夜。用饱和 NaHCO_3 水溶液洗涤反应混合物。用 CH_2Cl_2 萃取水层。合并有机层, 经 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 在减压下浓缩。通过闪式硅胶层析法 (20% 在己烷中的 EtOAc) 纯化残渣, 得到为黄色泡沫的标题化合物 (4.59g, 74%)。ES/MS m/z 441.2 (M+1)。

[0063] 制备例 11

[0064] 1-苄基-4-(6-(4-氟苯基)-4,5-二甲基哒嗪-3-基)-3-甲基哌嗪-2-酮

[0065]

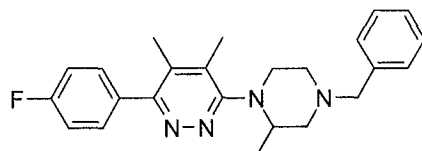


[0066] 用 NaH (60%, 625mg, 15.6mmol) 处理 0℃ 的 (R)-N-苄基-2-氯-N-(2-(6-(4-氟苯基)-4,5-二甲基哒嗪-3-基氨基)乙基)丙酰胺 (4.59g, 10.4mmol) 在 THF (104mL) 中的溶液。使反应混合物升温至环境温度, 搅拌过夜。将反应冷却至 0℃, 用另外的 NaH (60%, 208mg, 5.20mmol)。使反应混合物升温至环境温度, 搅拌 3 天。在盐水与 EtOAc 之间分配反应混合物。分离有机层, 经 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 在减压下浓缩。通过闪式硅胶层析法 (梯度为 0 ~ 2% 2M NH_3/MeOH 在 CH_2Cl_2 中) 纯化残渣, 得到为白色泡沫的标题化合物 (3.64g, 86%)。ES/MS m/z 405.2 (M+1)。

[0067] 制备例 12

[0068] 3-(4-苄基-2-甲基哌嗪-1-基)-6-(4-氟苯基)-4,5-二甲基哒嗪

[0069]

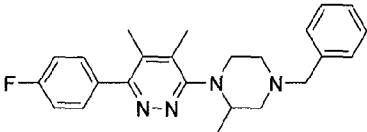
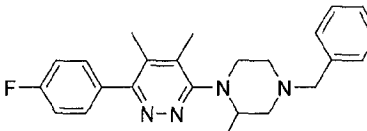


[0070] 用硼烷-二甲硫醚复合物 (1.96ml, 21.1mmol) 处理 1-苄基-4-(6-(4-氟苯基)-4,5-二甲基哒嗪-3-基)-3-甲基哌嗪-2-酮 (2.84g, 7.02mmol) 在 THF (70mL) 中的溶液。在 50℃ 加热所得混合物 2 天。在冰浴中冷却反应混合物, 通过滴液漏斗加入 MeOH (20mL), 然后加入 4M 在 1,4-二噁烷 (20mL) 中的 HCl。在 65℃ 加热所得混合物 1 小时。在减压下浓

缩混合物。在 CH_2Cl_2 与饱和 NaHCO_3 (水溶液) 之间分配残渣。分离各层, 用 CH_2Cl_2 萃取水层。合并有机层, 经 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 在减压下浓缩。通过闪式硅胶层析法 (梯度为 0 ~ 3% 2M NH_3/MeOH 在 CH_2Cl_2 中) 纯化残渣, 得到蜡状固体的标题化合物 (2.45g, 89%)。ES/MS m/z 391.2(M+1)。

[0071] 通过手性层析法 (Chiralcel OJ-H, 流速 30mL/min, 检测 225nm, 6 : 4MeOH : 乙腈) 分离 3-(4-苄基-2-甲基哌嗪-1-基)-6-(4-氟苯基)-4,5-二甲基哒嗪的异构体。第一洗脱峰, 异构体 1 : 99% ee。第二洗脱峰, 异构体 2 : 99% ee。

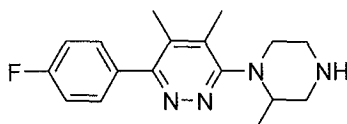
[0072]

制备例 编号	化学名	结构	ES/MS m/z
13	3-(4-苄基-2-甲基哌嗪-1-基)-6-(4-氟苯基)-4,5-二甲基哒嗪, 异构体 1		391.2(M+1)
14	3-(4-苄基-2-甲基哌嗪-1-基)-6-(4-氟苯基)-4,5-二甲基哒嗪, 异构体 2		391.2(M+1)

[0073] 制备例 15

[0074] 3-(4-氟苯基)-4,5-二甲基-6-(2-甲基哌嗪-1-基)哒嗪

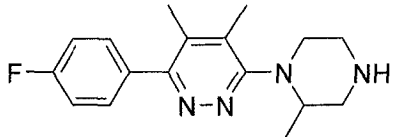
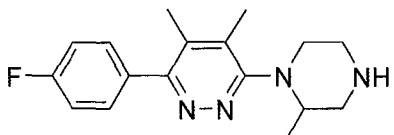
[0075]



[0076] 将 3-(4-苄基-2-甲基哌嗪-1-基)-6-(4-氟苯基)-4,5-二甲基哒嗪 (200mg, 3.25mmol) 在无水 EtOH (15mL) 中的溶液加至用 EtOH (5mL) 预先浸湿的 10% Pd/C (46.8mg)。在用 H_2 加压的 60psi 的 Parr 瓶中振摇混合物 10 小时。过滤反应混合物, 将溶液直接施加至 SCX 柱 (Varian, 2g)。用 MeOH 和 CH_2Cl_2 漂洗柱子。用 2M NH_3/MeOH 和 CH_2Cl_2 的 1 : 1 混合物洗脱产物。在减压下浓缩洗脱液, 得到为灰白色泡沫的标题化合物 (142mg, 92%)。ES/MS m/z 301.2(M+1)。

[0077] 使用适当的经保护的胺, 按照实施例 15 中所述的操作, 制备下表中的脱保护的甲基哌嗪。

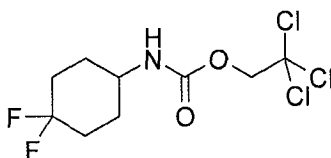
[0078]

制备例 编号	化学名	结构	ES/MS m/z
16	3-(4-氟苯基)-4,5-二甲基-6-(2-甲基哌嗪-1-基)哒嗪		301.2 (M+1)
17	3-(4-氟苯基)-4,5-二甲基-6-(2-甲基哌嗪-1-基)哒嗪		301.2 (M+1)

[0079] 制备例 18

[0080] 4,4-二氟环己基氨基甲酸 2,2,2-三氯乙酯

[0081]

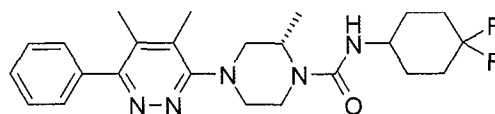


[0082] 用氯甲酸 2,2,2-三氯乙酯 (2.91ml, 21.1mmol) 逐滴处理 0℃ 的 4,4-二氟环己胺盐酸盐 (3.29g, 19.2mmol) 和三乙胺 (5.88ml, 42.2mmol) 在 CH₂Cl₂ (192mL) 中的混合物。1 小时后, 使反应混合物升温至环境温度, 搅拌过夜。在 H₂O 与 CH₂Cl₂ 之间分配反应混合物, 分离各层。经 Na₂SO₄ 干燥有机层, 过滤, 在减压下浓缩, 得到为灰白色固体的标题化合物 (5.75g, 97%)。GC/MS m/z ³⁵Cl 309 (M⁺)。

[0083] 实施例 1

[0084] (S)-N-(4,4-二氟环己基)-4-(4,5-二甲基-6-苯基哒嗪-3-基)-2-甲基哌嗪-1-甲酰胺盐酸盐

[0085]



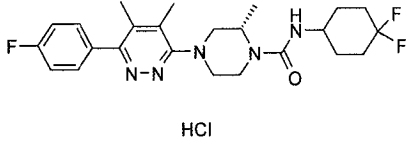
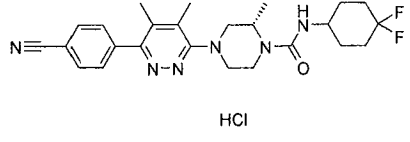
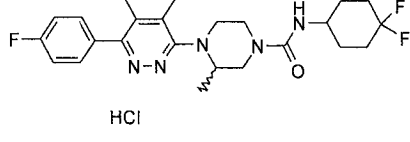
HCl

[0086] 用 4,4-二氟环己基氨基甲酸 2,2,2-三氯乙酯 (341mg, 1.10mmol) 处理 (S)-4,5-二甲基-3-(3-甲基哌嗪-1-基)-6-苯基哒嗪 (199mg, 0.70mmol) 和三乙胺 (0.30ml, 2.15mmol) 在 DMSO (5mL) 中的混合物。在 100℃ 加热反应 4 天。将反应混合物倒入 H₂O, 用 EtOAc 漂洗。用 EtOAc 萃取混合物。用 H₂O, 然后用盐水洗涤有机层两次。经 Na₂SO₄ 干燥, 在减压下浓缩。通过闪式硅胶层析法 (梯度为 0 ~ 10% 在 CH₂Cl₂ 中的 MeOH) 纯化所得残渣。在 MeOH (1mL) 中溶解纯化的游离碱, 用 1M 在 Et₂O (1mL) 中的 HCl 处理。浓缩混合物, 提供为黄色泡沫的标题化合物 (256mg, 76%)。ES/MS m/z 444.2 (M+1)。

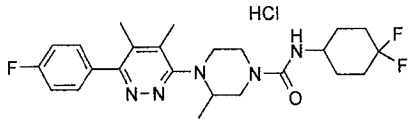
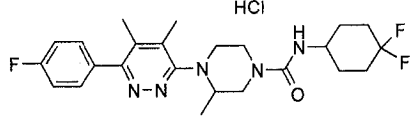
[0087] 使用适当的哌嗪基哒嗪, 基本上按照实施例 1 中所述的操作, 制备下表中的哌嗪

基脲。

[0088]

实施例 编号	化学名	结构	ES/MS m/z
2	(S)-N-(4,4-二氟环己基)-4-(6-(4-氟苯基)-4,5-二甲基哒嗪-3-基)-2-甲基哌嗪-1-甲酰胺盐酸盐	 HCl	461.8 (M+1)
3	(S)-4-(6-(4-氰基苯基)-4,5-二甲基哒嗪-3-基)-N-(4,4-二氟环己基)-2-甲基哌嗪-1-甲酰胺盐酸盐	 HCl	468.8(M+1)
4	N-(4,4-二氟环己基)-4-(6-(4-氟苯基)-4,5-二甲基哒嗪-3-基)-3-甲基哌嗪-1-甲酰胺盐酸盐	 HCl	462.2 (M+1)

[0089]

5	<i>N</i> -(4,4-二氟环己基)-4-(6-(4-氟苯基)-4,5-二甲基吡嗪-3-基)-3-甲基哌嗪-1-甲酰胺盐酸盐, 异构体 1	 异构体 1	462.2 (M+1)
6	<i>N</i> -(4,4-二氟环己基)-4-(6-(4-氟苯基)-4,5-二甲基吡嗪-3-基)-3-甲基哌嗪-1-甲酰胺盐酸盐, 异构体 2	 异构体 2	462.2 (M+1)

[0090] 生物学

[0091] Hedgehog 已经牵涉作为下述癌症的存活因子: 基底细胞癌; 上胃肠道癌 (食道癌、胃癌、胰腺癌和胆道癌); 前列腺癌; 乳腺癌; 小细胞肺癌; 非小细胞肺癌; B 细胞淋巴瘤; 多发性骨髓瘤; 胃癌; 卵巢癌; 结肠直肠癌; 肝癌; 黑素瘤; 肾癌; 和脑癌。

[0092] hedgehog 途径的组成元件已被称为是用于治疗癌症的潜在药物靶。由成神经管细胞瘤 (ATCC, HTB-186) 确立的 Daoy 细胞系对 Hh 配体有响应。当这些细胞用外源添加的 Shh 条件培养基处理, Hh 信号传导途径被激活, 并导致 Gli1 的表达增加。环巴胺, 从玉米百合加州藜芦 (corn lily *Veratrum californicum*) 分离的生物碱, 是一种弱的 hedgehog 拮抗剂并且已显示抑制 Gli1 响应于 Shh 刺激的表达。最近的观察表明, 环巴胺抑制经培养的成神经管细胞瘤细胞和同种异体移植物的生长。使用 Daoy 细胞模型系统, 可以鉴定 hedgehog 信号传导途径的有效抑制剂。由于本发明的化合物是 hedgehog 拮抗剂, 所以它们适用于治疗前述的肿瘤类型。

[0093] 生物活性 IC_{50} 的测定

[0094] 下面的测定方案及其结果进一步表明本发明的化合物和方法的用途和功效。功能测定提供了支持, 即本发明化合物显示出抑制 Shh 信号传导的能力。在以下测定中所用的所有配体、溶剂和试剂从商业来源容易可得或可由本领域技术人员容易制备。

[0095] 使用 Daoy 神经元癌细胞中的功能测定以及通过 bDNA (支链脱氧核糖核酸) 测定系统 (Panomics 公司, Fremont, CA) 测量的 Gli1 核糖核酸水平确定生物活性。Gli 最初在成胶质细胞瘤细胞系中发现并编码由 Shh 信号传导激活的锌指蛋白。通过用条件培养基 (稳定表达重组 Shh 的人胚肾 HEK-293 细胞) 诱导 Gli1 在 Daoy 细胞中的转录 24 小时, 然后测量被激活的 Gli1 转录的量, 从而获得最大响应。最小响应是在已被条件培养基 (稳定表达重组 Shh 的人胚肾 HEK-293 细胞) 刺激 24 小时的 Daoy 细胞中用对照化合物抑制的 Gli1

转录的量。

[0096] 用于测量 Gli1 在 Daoy 细胞中的抑制的功能测定

[0097] bDNA 测定系统采用支链 DNA 技术以容许靶核糖核酸（转录物）的扩增。该技术采用三种类型的合成杂交型短 Gli1 特异性 cDNA 探针，其确定靶转录物 [捕获延伸物 (CE)、指示延伸物 (LE) 和阻断物 (BL)] 的特异性，该探针类型与靶转录物一起杂交成复合物以扩增杂交信号。在扩增步骤期间添加致化学发光底物使得可以使用发光检测。

[0098] 从 American Type Culture collection (ATCC) 获得的 Daoy 细胞系是 Shh 响应性人神经元肿瘤细胞系，其在 1985 年从促结缔组织增生的小脑髓母细胞瘤 (cerebellar medullablastoma tumor) 建立，是一种生理学相关的肿瘤细胞系。Gli1 转录物的内源性水平在 Daoy 细胞中较低，但可通过使用取自稳定过表达人 Shh 的细胞（用 hShh 稳定转染的 HEK-293 细胞系）的条件培养基来刺激。

[0099] 在组织培养 T225- 烧瓶中，在含有最低必需培养基 (MEM)+10% 胎牛血清 (FBS) 以及 0.1nM 非必需氨基酸和 1mM 丙酮酸钠的 Daoy 生长培养基中使 Daoy 细胞生长至汇合。使用胰蛋白酶乙二胺四乙酸 (EDTA) 从 T225- 烧瓶移除细胞，离心，在培养基中再悬浮，然后计数。

[0100] 然后将 Daoy 细胞以每孔 50,000 个细胞接种到 Costar 96 孔透明组织培养基板中的生长培养基中，并容许在 37°C 和 5% 二氧化碳 (CO₂) 下孵育过夜。将细胞在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中洗涤 1 次，然后加入 100 μ L Shh 条件培养基 (Shh-CM) 以刺激 Gli1 表达的水平。使用对照生长培养基 -0.1% FBS/DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium) 稀释 Shh-CM 以实现最大刺激。然后，将经 Shh-CM 处理的 Daoy 细胞用约 1 μ M 至 0.1nM 的各种浓度 hedgehog 抑制剂进行处理。在 37°C 和 5% CO₂ 下允许测试化合物孵育 24 小时。

[0101] 如生产商 (Panomics 公司) 所述，通过使用 Quantigene 2.0 Gli1 测定法进行 Gli1 转录物的测量。制备经稀释的裂解混合物 (DLM) 缓冲液，其包括蛋白酶 K。用化合物孵育 24 小时后，将细胞用 PBS 洗涤 1 次，将 180 μ L DLM 加入细胞中。将含有裂解缓冲液的细胞板密封，在 55°C 放置 30 至 45 分钟。然后研磨所得细胞裂解液 5 次。根据生产商指导、通过在 DLM 中稀释探针而制备含有 Gli1 探针的工作探针组，然后将 20 μ L 工作探针和 80 μ L Daoy 裂解液加入到 bDNA 测定板中。密封各板，在 55°C 孵育过夜。然后根据生产商指导处理 bDNA 板。通过在检测发光的 Perkin Elmer Envision 读数器上读数各板而对信号进行定量。发光信号正好与存在于样品中的靶转录物的量成比例。

[0102] 来自功能测定的发光信号数据用于计算体外测定的 IC₅₀。基于最大对照值（用 Shh-CM 处理的 Daoy 细胞）和最小对照值（用 Shh-CM 和抑制浓度的对照化合物 1 μ M N-(3-(1H- 苯并 [d] 咪唑 -2- 基)-4- 氯苯基)-3,5- 二甲氧基苯甲酰胺处理的 Daoy 细胞)，计算数据。使用 Activity Base 软件程序版本 5.3，方程 205 (Assay Guidance Manual Version 5.0, 2008, Eli Lilly and Company and NIH Chemical Genomics Center)，采用四参数逻辑曲线拟合来产生 IC₅₀ 值。

[0103] 按照所述方案，本文示例的本发明化合物展现出 < 15nM 的 IC₅₀。例如，实施例 1 的化合物的 IC₅₀ 为约 1.26nM，在上述测定中标准误差为 0.139 (n = 3)。这些结果提供了证据，即本发明化合物是 hedgehog 拮抗剂并且因此可用作抗癌剂。