

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2014 年 10 月 23 日 (23.10.2014)



(10) 国际公布号
WO 2014/169882 A2

(51) 国际专利分类号:

C07D 401/04 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07D 401/14 (2006.01) A61P 35/02 (2006.01)
C07D 413/14 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2014/079859

(22) 国际申请日: 2014 年 6 月 13 日 (13.06.2014)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201310139335.7 2013 年 4 月 20 日 (20.04.2013) CN

(71) 申请人: 复旦大学 (FUDAN UNIVERSITY) [CN/CN];
中国上海市杨浦区邯郸路 220 号, Shanghai 200433 (CN)。

(72) 发明人: 及

(71) 申请人: 郎恒元 (LANG, Hengyuan) [US/CN]; 中国
山西省忻州市代县城关前巷, Shanxi 034200 (CN)。

(72) 发明人: 余科 (YU, Ke); 中国上海市杨浦区邯郸路
220 号, Shanghai 200433 (CN)。 赵荟 (ZHAO, Hui);
中国上海市杨浦区邯郸路 220 号, Shanghai 200433 (CN)。

(74) 代理人: 石家庄国域专利商标事务所有限公司
(SHIJIAZHUANG GUOYU PATENT TRADEMARK
AGENCY); 中国河北省石家庄市新华区和平西路
334 号, Hebei 050071 (CN)。

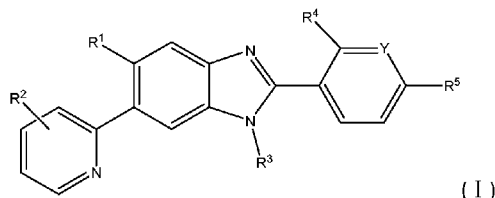
(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保
护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS,
JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY,
MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保
护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA,
RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ,
BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH,
CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,
RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

[见续页]

(54) Title: BENZIMIDAZOLE-TYPE COMPOUND EXHIBITING ANTI-TUMOR ACTIVITY, PREPARATION METHOD AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 具有抗肿瘤活性的苯并咪唑类化合物、制备方法及其应用



(57) Abstract: The present invention discloses, as shown in Formula (I), a benzimidazole-type compound exhibiting anti-tumor activity, and a preparation method and use thereof. Wherein, R¹, R², R³, R⁴, and R⁵ are as described in the description, and the compound and pharmaceutically acceptable salt of the present invention maintain, in regard to an Hh signaling pathway, activation of an inhibitory effect related to tumor cancer cell growth comparable to or superior to that of GDC-0449, thus providing a new option for tumor-related treatment.

(57) 摘要: 本发明公开了式(I)所示具有抗肿瘤活性的苯并咪唑类化合物、制备方法及其应用。其中, R¹, R², R³, R⁴, R⁵如说明书所述, 本发明的化合物及其可药用盐对与 Hh 信号通路持续激活相关肿瘤的癌细胞生长的抑制作用与 GDC-0449 相当甚至优于 GDC-0449, 从而为相关肿瘤的治疗提供新的选择。



WO 2014/169882 A2



本国际公布:

— 不包括国际检索报告，在收到该报告后将重新公布(细则 48.2(g))。

— 包括关于请求恢复一项或多项优先权要求的信息(细则 26 之二.3 和 48.2(b)(vii))。

具有抗肿瘤活性的苯并咪唑类化合物、制备方法及其应用

技术领域

本发明涉及医药技术领域，具体地说是一种具有抗肿瘤活性的苯并咪唑类化合物、制备方法及其应用。

背景技术

Hedgehog 基因是在 1980s 早期由 Wieschaus 和 Nusslein-Vollhard 在果蝇中首次发现。Hedgehog(Hh) 信号通路主要由分泌型糖蛋白配体 Hedgehog、跨膜蛋白受体 Ptched(Ptch) 、跨膜蛋白 Smoothened(Smo) 、核转录因子 Gli 蛋白及下游靶基因组成。正常体内，组织 Hh 配体表达关闭，Ptch 与 Smo 结合抑制 Smo 的活性，该通路处于关闭状态。当 Hh 与 Ptch 结合，解除了 Ptch 对 Smo 的抑制作用，Smo 将信号传导至细胞质内，激活下游 Gli 转录因子进而活化整个信号通路。

近年来，Hh 信号通路与肿瘤的关系日益受到人们的重视。有文献表明，在正常条件下，Hedgehog (Hh) 信号通路在胚胎时期调控组织细胞的生长和分化。胚胎发育成熟后，该通路进入关闭状态。另有多项研究表明，Hh 信号通路的异常激活与多种肿瘤密切相关，如皮肤基底细胞癌、髓母细胞瘤、肺癌、消化道肿瘤、乳腺癌、胰腺癌等。因此，阻断肿瘤细胞中的 Hh 信号通路将是人类治疗肿瘤的一个新的有效手段。随着研究的进行，Hh 信号通路在肿瘤发生、发展过程中的作用也越来越清晰。在大量的人类肿瘤细胞中，Hh 信号通路持续激活并调控下游的基因转录，从而参与肿瘤的增殖分化、细胞凋亡、血管新生和侵袭转移。因此针对 Hh 信号通路的靶向抑制也成为抗癌治疗的热点。有文献记载 Hh 信号通路的抑制剂主要分为 3 类：Shh 抑制剂、Smo 抑制剂和 Gli 转录抑制剂。其中 Smo 抑制剂 Cyclopamine 能抑制 Smo 的活性，阻止 Hh 信号通路的激活，从而发挥抗肿瘤作用。近年来，Cyclopamine 及其衍生物作为抗肿瘤药物的研究在国外发展迅速。有些已进入临床阶段，其中 GDC-0449 在 2012 年初已被 FDA 批准上市用于治疗基底细胞癌 (BCC)，而 GDC-0449 治疗其他多种实体瘤的研究也进入临床 II/ I 期。综上所述，Hh 信号通路为抗肿瘤药物的研发提供了一个很有前途的靶点。

然而，目前唯一一个上市的 Hh 信号通路抑制剂 GDC-0449 在应用中也存在一些问题，比如无论 GDC-0449 的用量加到多大，在患者体内都无法达到更高的血药浓度，而且对于某些 Smo 位点的突变，GDC-0449 药效降低甚至无效。

发明内容

本发明的目的就是要提供针对 Smo 靶点抑制 Hh 信号通路的具有抗肿瘤活性的化合物及其药用盐，以用于制备抗肿瘤药物。

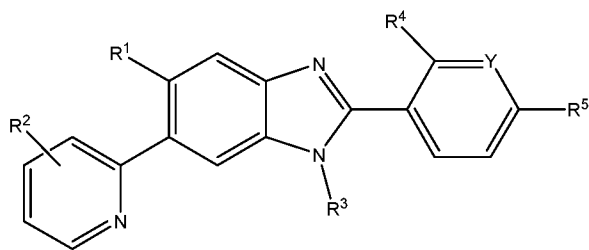
本发明的另一目的是提供上述化合物及其药用盐的制备方法。

本发明的进一步的目的是提供上述化合物在制备抗肿瘤药物上的应用。

本发明的更进一步的目的是提供一种以上述化合物及其药用盐为有效成份的药物组合物。

为实现上述目的，本发明的技术方案为：

一种式 (I) 所示的化合物或其药学上可以接受的盐



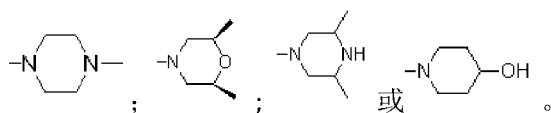
其中, R^1, R^2, R^3, R^4 独立地为 H, 卤素, C1-6 直链、支链烷基, 环烷基或者卤素取代的 C1-6 直链或支链烷基; $Y = C$ 或 N ; R^5 为:

杂原子为氮或氧、杂原子数量为一个或两个、未取代或以烷基、羟基或氨基取代的 4-8 元杂

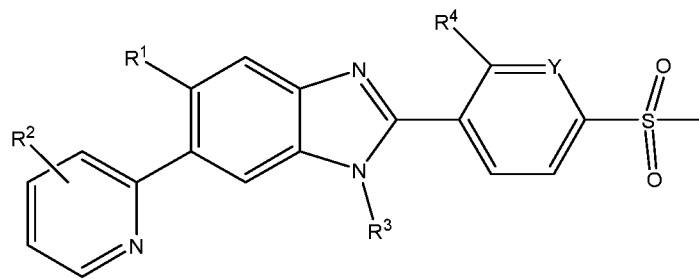
环, —O—R^6 , $\text{—N(R}^7\text{)(R}^8\text{)—}$ 或 $\text{—N(R}^9\text{)(R}^{10}\text{)—}$; 其中, R^6 独立地为 C1-4 直链烷基, 支链烷基或环烷基; R^7, R^8 独立地为 H, C1-6 直链烷基, 环烷基, 氨基或羟基取代烷基, 烷基氨基取代烷基 $R^9R^{10}NR$, 或烷氧基取代烷基 $R^{11}OR$; 其中, R^9, R^{10} 可以独立地为 H、C1-6 直链烷基, 支链烷基, 环烷基或 R^9, R^{10} 闭合成环; R^{11} 为 C1-4 直链烷基, 支链烷基或环烷基。

优选地, R^5 为杂原子为氮或氧、杂原子数量为一个或两个、未取代或以烷基、羟基取代的 4, 6, 8 元单杂环。

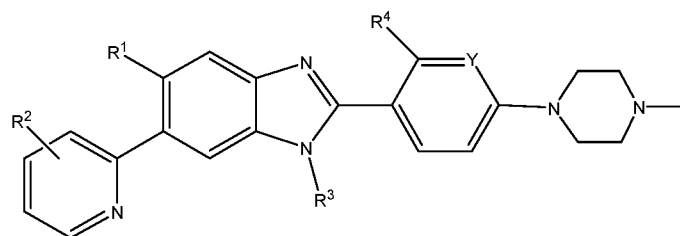
较优选地 R^5 为



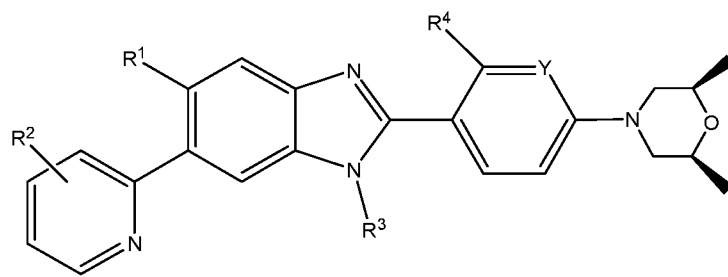
更优选地, 本发明所述的化合物或其药学上可接受的盐选自以下化合物之一:



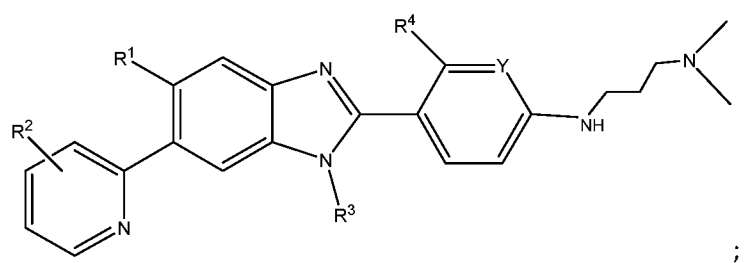
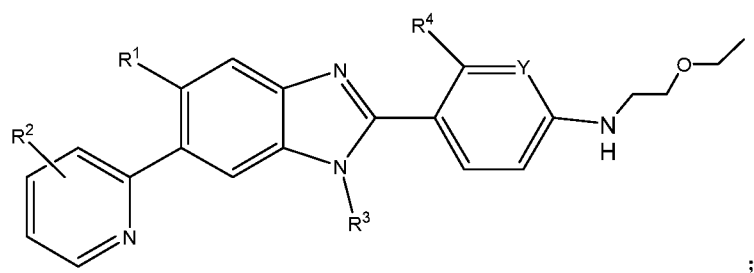
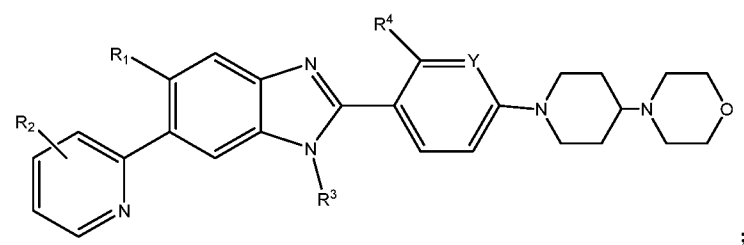
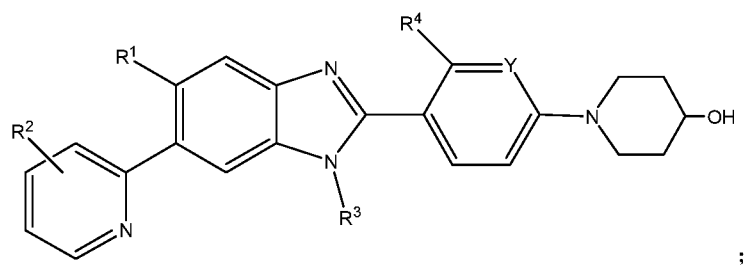
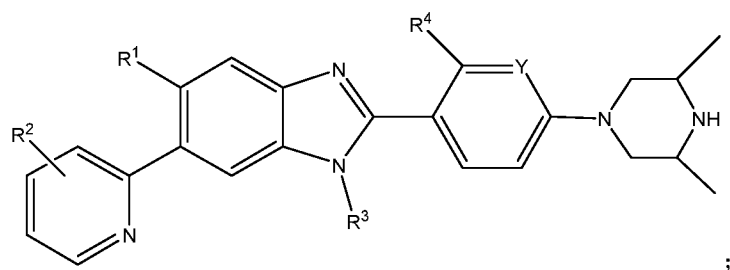
;



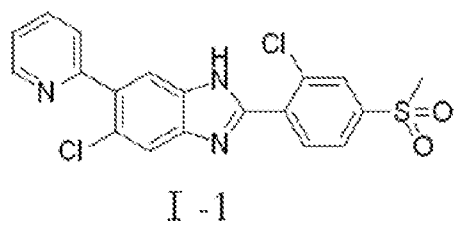
;

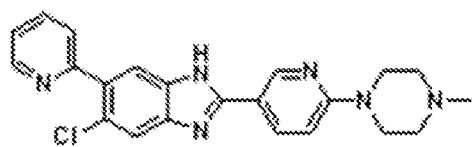


;



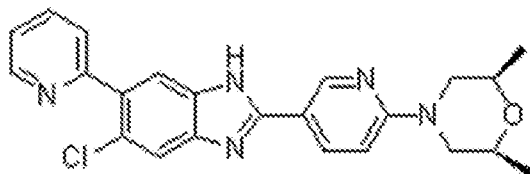
最优选地，本发明所述的化合物或其药学上可接受的盐，选自以下化合物之一：





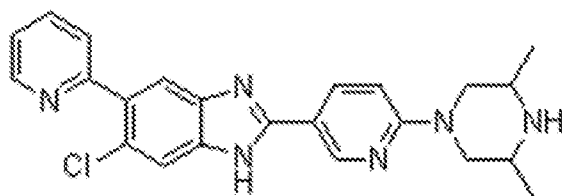
I -2

;



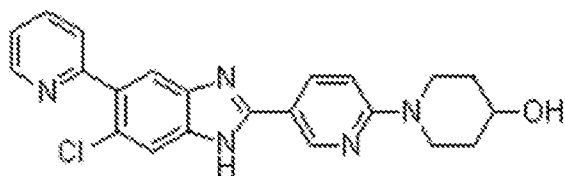
I -3

;



I -4

;



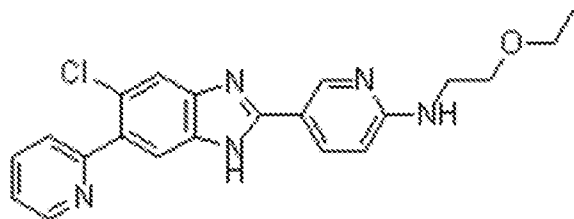
I -5

;

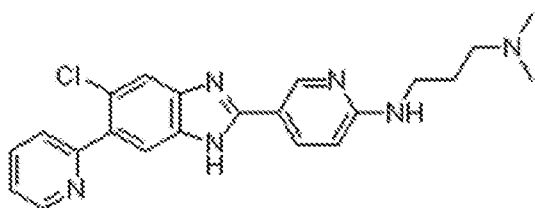


I -6

;



I-7

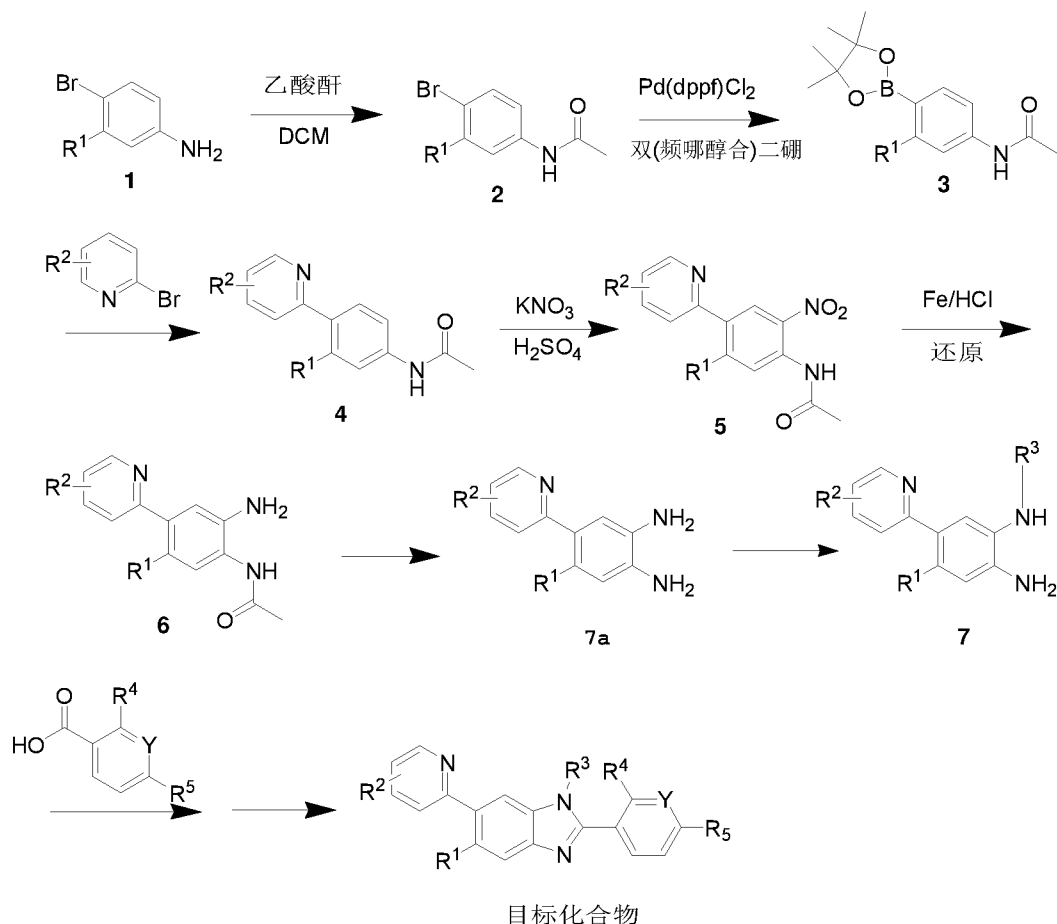


I-8

本发明的化合物的制备方法中，最终产物是按下述步骤制备：

- a. 化合物1在溶剂中（ CH_2Cl_2 ，THF 等）与醋酸酐反应制得化合物2；
- b. 化合物2与双(频哪醇合)二硼反应制得化合物3；
- c. 化合物3与2-溴吡啶反应制得化合物4；
- d. 化合物4在浓硫酸中硝化反应制得化合物5；
- e. 还原化合物5制得化合物6；
- f. 把化合物6脱保护去掉乙酰基制得化合物7a
- g. 烷基化7a得到化合物7；
- h. 然后反应7或者7a与已取代的芳基羧酸得到所要的化合物

具体可参照下述反应式（II）进行：



(II),

其中, R^1, R^2, R^3, R^4, R^5 和 Y 的定义同前。

另一方面, 本发明提供所述化合物或其可药物接受的盐用于制备抗肿瘤药物。所述肿瘤为与 Hh 信号通路持续激活相关的肿瘤。更具体地说, 所述肿瘤为: 皮肤基底细胞癌、髓母细胞瘤、肺癌、消化道肿瘤、乳腺癌或胰腺癌等。

再一方面, 本发明提供药物组合物, 其包含本发明所述的化合物或其可药物接受的盐作为有效成份, 以及一种或多种药学上可接受的辅料。

本发明提供的药物组合, 含有上述化合物或其可在制药学上许可的盐、制药学上许可的载体或以该类化合物作为活性成分的混以要用赋形剂或稀释剂的组合。

所述的本发明的用于治疗肿瘤的药物组合中药学上可以接受的载体是指药学领域常规的药物载体, 例如: 稀释剂如水等; 赋形剂剂如淀粉、蔗糖等, 粘合剂如纤维素衍生物、藻酸盐、明胶等; 湿润剂如甘油; 崩解剂如琼脂、碳酸钙、碳酸氢钙等; 吸收剂如季铵化合物; 表面活性剂如十六烷醇; 吸附载体如高岭土等; 润滑剂如滑石粉、硬脂酸钙、镁等。另外还可以在组合物中加入其它辅料如香味剂、甜味剂等。

本发明化合物可能组合物的形式通过口服、鼻吸入、直肠或肠胃外给药的方式施用于需要这种治疗的患者。用于口服时, 可将其制成常规的固体制剂如片剂、粉剂、粒剂、胶囊等, 制成液体制剂如水或油悬浮剂或其他液体制剂如糖浆、酏剂等; 用于肠胃外给药时, 可将其制成注射用的溶液、水或油性悬浮剂等, 优选的形式是片剂、胶囊和注射剂。

本发明药物组合的各种剂型可以按照药学领域的常规生产方法制备。例如使活性成分与一种或多种载体混合, 然后将其制成所需的剂型。

本发明的化合物及其可药用盐对与 Hh 信号通路持续激活相关肿瘤的癌细胞生长的抑制

作用与 GDC-0449 相当甚至优于 GDC-0449，从而为相关肿瘤的治疗提供新的选择。

具体实施方式

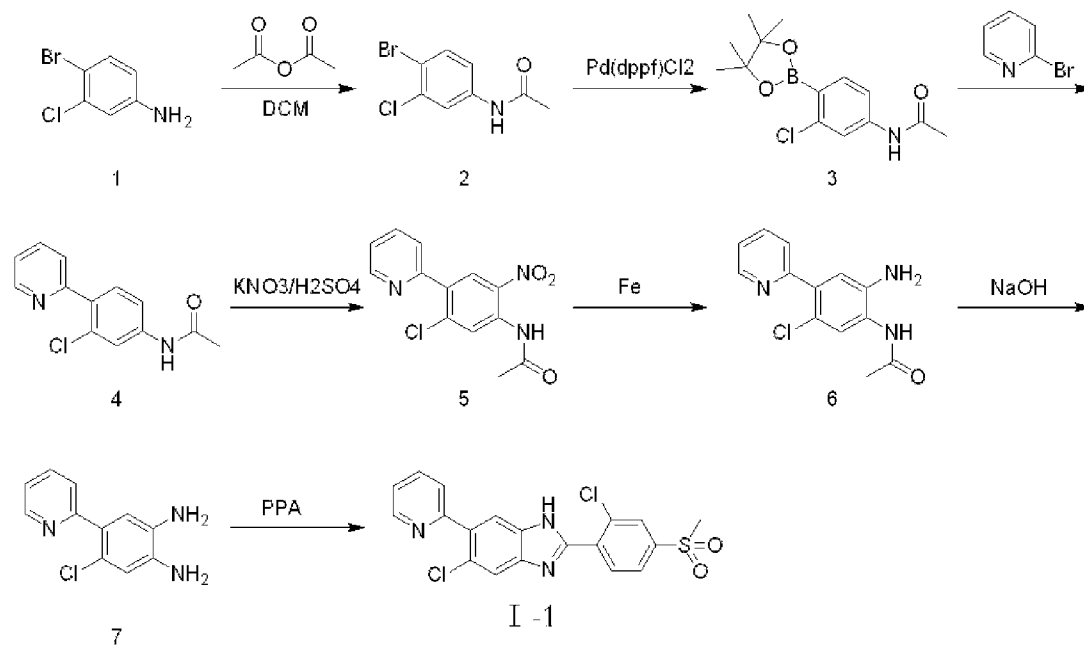
下面结合具体的实施例进一步详细描述本发明。应理解，这些实施例只是为了举例说明本发明，而非以任何方式限制发明的范围。

在以下的实施例中,未详细描述的各种过程和方法是本领域中公知的常规方法。所用试剂未标明来源、规格的均为市售分析纯或化学纯。

所述的化合物经核磁共振谱、质谱确证其结构。

实施例1

5-氯-2-(2-氯-4-甲磺酰基)苯基-6-(吡啶-2-基)苯并咪唑 (I-1) 的合成:



化合物 1 (10 g) 溶于二氯甲烷，加入醋酸酐 (5.93 g)，体系加热到 40 °C 反应2 小时。体系降至室温，NaHCO₃水溶液洗两次，有机相旋干得化合物 2 (11 g, 收率92%)。

化合物 2 (11 g) , 醋酸钾 (8.8 g) 溶于二氧六环, 加入双联硼 (20.5 g)。体系氮气置换反应15 分钟, 加入Pd (dppf) Cl₂ (1 g) , 加热至 80℃反应过夜 (12小时)。降温, 旋干过柱 (PE/EA =2/1) 得到化合物 3 (8 g, 收率61%)。

化合物 3 (2.1 g) , 碳酸铯 (4 g) 溶于二氧六环, 加入2-溴吡啶 (1.27 g)。体系氮气置换反应15 分钟, 加入 Pd (dppf) Cl₂ (0.2 g) , 加热至 80℃ 反应过夜 (12小时)。旋干过柱 (PE/EA =1/1) 得到化合物 4 (1.2 g, 收率61%)。

化合物 4 (10 g) 溶于浓硫酸 (10 ml), 降温至 5 °C, 分批加入硝酸钾 (15 g), 点 TLC板至原料反应完全。体系打入冰水中, 15% NaOH水溶液调PH至7, 有固体缓慢析出, 抽滤, 固体干燥得化合物5 (8 g, 收率92%)。

化合物 5 (2 g) 溶于 EtOH/H₂O=5/1 (60 ml), 加入氯化铵 (1.8 g), 醋酸 (5 ml), 体

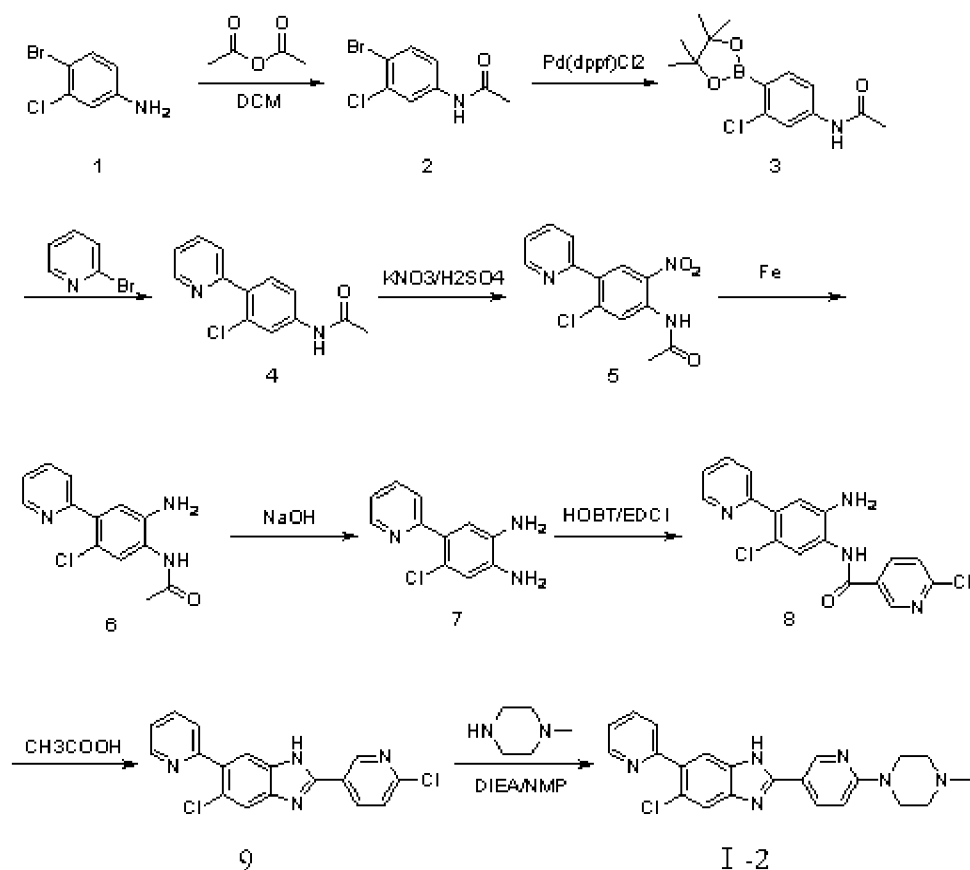
系加热至60℃，铁粉分批加入 (1.9 g)。保持60℃反应1小时。降温，乙酸乙酯萃取，旋干过柱 (PE/EA =1/1) 得到化合物 6 (1.2 g, 收率67%)。

化合物 6 (3 g) in 溶于15%NaOH，加热至70℃，点TLC板至原料反应完全。降温，有固体析，过滤，固体干燥得红色固体化合物7 (1.5 g, 收率60%)。

化合物 7 (500, mg), 2-氯-4-甲磺基苯甲酸 (1 g) 溶于多聚磷酸，加热至 60℃反应5小时，点TLC板至原料反应完全。体系打入冰水中，15% NaOH水溶液调PH至7，有固体缓慢析出，抽滤，固体干燥得灰色固体状化合物 I -1 (510 mg, 收率54%)。¹HNMR CDCl₃ δ: 3.12 (s, 3 H), 7.36 (m, 1 H), 7.54-7.89 (m, 5 H), 8.02 (s, 1 H), 8.37-8.47 (dd, 1 H), 8.73 (s, 1 H), 11.64 (s, 1 H); LC-MS: *m/z* = 417.8 (M+1)

实施例 2

5-氯-2-(6-(4-甲基哌嗪-1-基)吡啶-3-基)-6-(吡啶-2-基)苯并咪唑 (I -2) 的合成:



化合物 1 (10 g) 溶于二氯甲烷，加入醋酸酐 (5.93 g).，体系加热到 40℃ 反应2小时。体系降至室温，NaHCO₃水溶液洗两次，有机相旋干得化合物 2 (11 g, 92%)。

化合物 2 (11 g)，醋酸钾 (8.8 g) 溶于二氧六环，加入双联硼 (20.5 g)。体系氮气

置换反应15 分钟,加入Pd(dppf)Cl₂ (1 g),加热至 80℃反应过夜。降温,旋干过柱 (PE/EA =2/1) 得到化合物 3 (8 g, 61%)。

化合物 3 (2.1 g), 碳酸铯 (4 g) 溶于二氧六环,加入2-溴吡啶 (1.27 g)。体系氮气置换反应15 分钟,加入 Pd(dppf)Cl₂ (0.2 g),加热至 80℃ 反应过夜。旋干过柱 (PE/EA =1/1) 得到化合物 4 (1.2 g, 61%)。

化合物 4 (10 g) 溶于浓硫酸 (10 ml),降温至 5 °C,分批加入硝酸钾 (15 g),点TLC板至原料反应完全。体系打入冰水中,15% NaOH水溶液调PH至7,有固体缓慢析出,抽滤,固体干燥得化合物5 (8 g, 92%)。

化合物 5 (2 g) 溶于 EtOH/H₂O=5/1 (60 ml),加入氯化铵 (1.8 g),醋酸 (5 ml),体系加热至60℃,铁粉分批加入 (1.9 g)。保持60℃反应1小时。降温,乙酸乙酯萃取,旋干过柱 (PE/EA =1/1) 得到化合物 6 (1.2 g, 67%)。

化合物 6 (3 g) in 溶于15%NaOH,加热至70℃,点TLC板至原料反应完全。降温,有固体析出,过滤,固体干燥得红色固体化合物7 (1.5 g, 60%)。

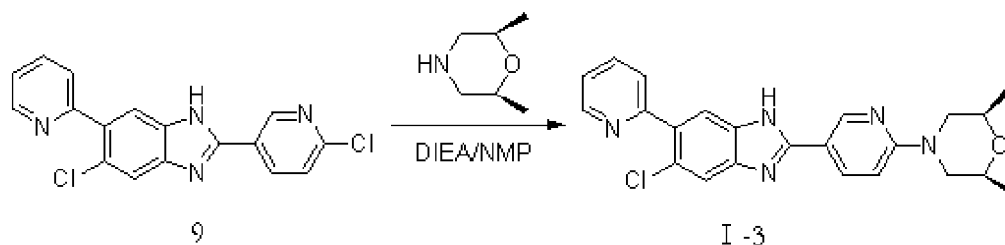
化合物 7 (5 g) 溶于二氯甲烷 (200 ml),加入6-氯烟酸(3.6 g),HOBT (4 g),Et₃N (5.7 g),EDCI (5.2 g),室温搅拌过夜。体系打入水中,二氯甲烷萃取,浓缩过柱(PE/EA =1/1-EA) 得到化合物8 (5.2 g, 63%)。

化合物8 (2 g) 溶液醋酸,体系加热至100℃,点TLC板至原料反应完全。体系降温,打入水中,15% NaOH水溶液调PH至7,有固体缓慢析出,抽滤,固体干燥得化合物9 (1.5 g, 79%)。

化合物9 (500 mg) 溶于N-甲基吡咯烷酮(10 ml),加入N-甲基哌嗪 (147 mg),DIEA (114 mg),体系加热至130℃反应过夜。降温,打入水中,乙酸乙酯萃取,旋干过柱 (MeOH/DCM =1/10)得到红色固体状化合物 I-2 (204 mg, 收率34%)。¹HNMR CDCl₃ δ: 2.304 (s, 3 H), 2.445-2.456 (d, 4 H), 3.569-3.579 (d, 4 H), 6.491-6.514 (d, 1 H), 7.264-7.607 (m, 4 H), 7.733-7.775 (m, 1 H), 7.943-7.965 (d, 1 H), 8.635-8.646 (d, 1 H), 8.75-8.756 (d, 1 H); LC-MS: *m/z* = 405.9 (M+1)

实施例 3

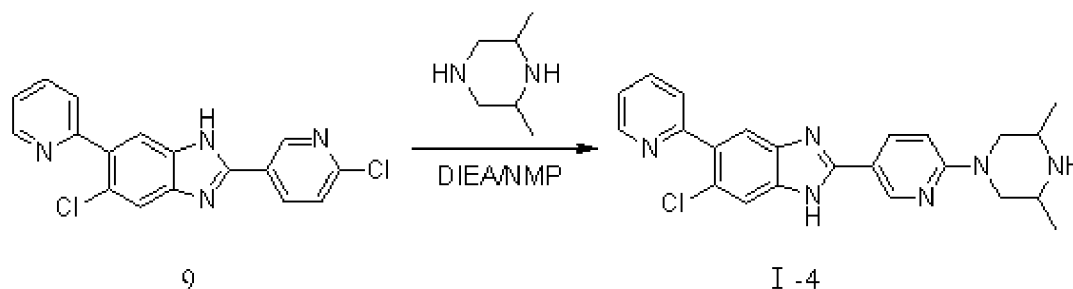
5-氯-2-(6-(2,6-二甲基吗啉基)吡啶-3-基)-6-(吡啶-2-基)苯并咪唑 (I-3) 的合成:



化合物9溶于N-甲基吡咯烷酮(10 ml), 加入(2S,6R)-2,6-二甲基吗啉 (147 mg), DIEA (455 mg), 体系加热至130℃反应过夜。降温, 打入水中, 乙酸乙酯萃取, 旋干过柱 (MeOH/DCM = 1/10)得到黄色固体状化合物 I -3 (32 mg, 收率13%)。¹HNMR CD₃OD δ: 1.269-1.304 (t, 6 H), 2.582-2.642 (q, 2 H), 3.702-3.749 (m, 2 H), 4.301-4.332 (d, 2 H), 6.976-6.999 (d, 1 H), 7.471-7.502 (q, 1 H), 7.678-7.721 (t, 3 H), 7.949-7.992 (m, 1 H), 8.176-8.232 (m, 1 H), 8.654-8.666 (d, 1 H), 8.852-8.858 (d, 1 H); LC-MS: *m/z* = 420 (M+1)

实施例 4

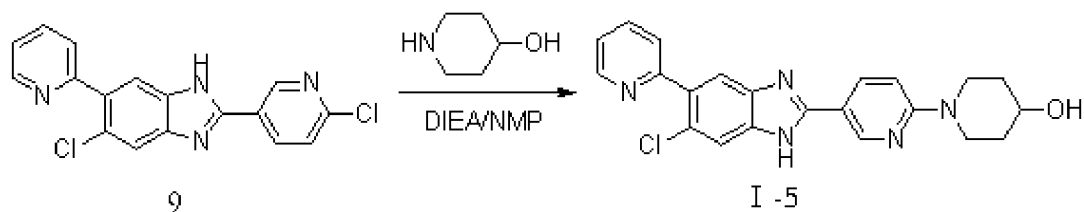
5-氯-2-(6-(3,5-二甲基哌嗪-1-基)吡啶-3-基)-6-(吡啶-2-基)苯并咪唑 (I -4) 的合成:



化合物9(200 mg) 溶于N-甲基吡咯烷酮(10 ml), 加入2,6-二甲基哌嗪(134 mg), DIEA (455 mg), 体系加热至130℃反应过夜。降温, 打入水中, 乙酸乙酯萃取, 旋干过柱 (MeOH/DCM = 1/10)得到黄色固体状化合物 I -4 (18 mg, 收率7%)。¹HNMR CD₃OD δ: 1.427-1.443 (d, 6 H), 2.898-2.962 (q, 2 H), 3.368-3.410 (t, 2 H), 4.679-4.711 (d, 2 H), 7.086-7.109 (d, 1 H), 7.474-7.505 (q, 1 H), 7.686-7.722 (t, 3 H), 8.246-8.274 (q, 1 H), 8.422 (br.s, 1 H), 8.660-8.672 (d, 1 H), 8.887-8.892 (d, 1 H); LC-MS: *m/z* = 420 (M+1)

实施例 5

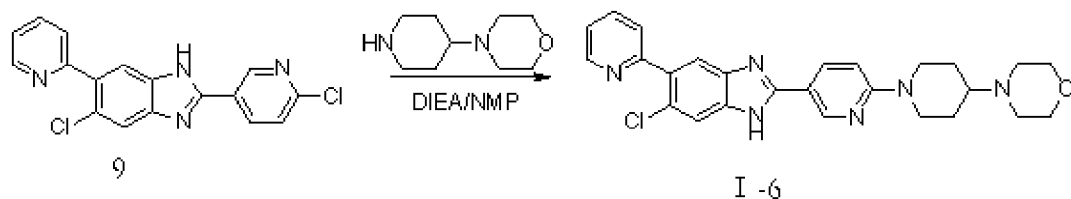
5-氯-2-(6-(4-羟基哌啶基)吡啶-3-基)-6-(吡啶-2-基)苯并咪唑 (I-5) 的合成:



化合物9(200 mg) 溶于N-甲基吡咯烷酮(10 ml), 加入4-羟基哌啶(120 mg), DIEA (455 mg), 体系加热至130℃反应过夜。降温, 打入水中, 乙酸乙酯萃取, 旋干过柱 (MeOH/DCM =1/10)得到黄色固体状化合物 I -5 (23 mg, 收率10%)。¹HNMR CD₃OD δ: 1.124-1.588 (m, 2 H), 1.943-2 (m, 2 H), 3.248-3.337 (m, 2 H), 3.882-3.926 (m, 1 H), 4.191-4.245 (m, 2 H), 6.949-6.972 (d, 1 H), 7.457-7.488 (m, 1 H), 7.650-7.707 (q, 3 H), 7.931-7.974 (m, 1 H), 8.136-8.164 (m, 1 H), 8.648-8.659 (d, 1 H), 8.804-8.810 (d, 1 H); LC-MS: *m/z* = 406.9 (M+1)

实施例 6

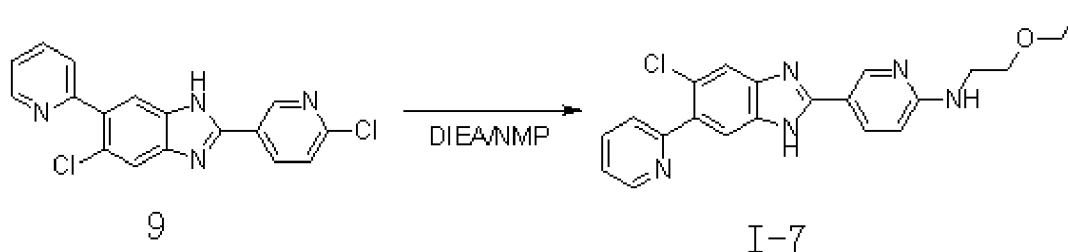
5-氯-2-(6- (4-吗啉基哌啶基)吡啶-3-基) -6-(吡啶-2-基)苯并咪唑 (I -6) 的合成



化合物 9(200 mg) 溶于N-甲基吡咯烷酮(10 ml), 加入4-哌啶基吗啉 (200 mg), DIEA (455 mg), 体系加热至130℃反应过夜。降温, 打入水中, 乙酸乙酯萃取, 旋干过柱 (MeOH/DCM =1/10)得到黄色固体状化合物 I -6 (41 mg, 纯度95%, 收率15%)。¹HNMR CDCl₃ δ: 1.401-1.50 (m, 2 H), 1.855-1.884 (d, 2 H), 2.372-2.4 (m, 1 H), 2.519-2.54 (t, 4 H), 2.805-2.865 (t, 2 H), 3.691-3.713 (t, 4 H), 4.293-4.326 (d, 2 H), 6.516-6.539 (d, 1 H), 7.269-7.305 (m, 1 H), 7.434-7.486 (d, 2 H), 7.606-7.626 (d, 1 H), 7.741-7.784 (m, 1 H), 7.933-7.962 (q, 1 H), 8.654-8.665 (d, 1 H), 8.728-8.733 (d, 1 H); LC-MS: *m/z* = 476.1 (M+1)

实施例7

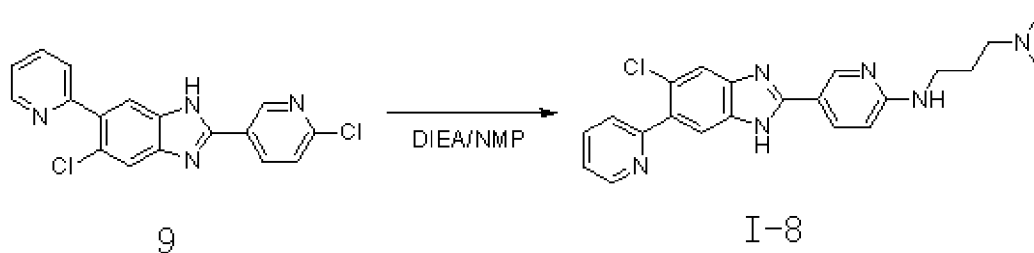
5-氯-2-(6- (乙氧基乙基氨基)吡啶-3-基) -6-(吡啶-2-基)苯并咪唑 (I -7) 的合成:



化合物9 (100 mg) 溶于N-甲基吡咯烷酮(10 ml), 加入4-羟基哌啶(120 mg), DIEA (400 g), 体系加热至130℃反应过夜。降温, 打入水中, 乙酸乙酯萃取, 旋干过柱 (MeOH/DCM =1/10)得到黄色油状化合物I-7 (16 mg, 收率13.9%)。¹HNMR CD₃OD δ: 1.181-1.241 (m, 3 H), 3.528-3.668 (m, 6 H), 6.688-6.708 (d, 1 H), 7.452-7.482 (m, 1 H), 7.643-7.701 (m, 3 H), 7.930-7.967 (q, 1 H), 8.061-8.080 (m, 1 H), 8.645-8.718 (m, 2 H); LC-MS: *m/z* = 394.9 (M+1)

实施例 8

5-氯-2-(6-(3-N,N-二甲基氨基丙基氨基)吡啶-3-基)-6-(吡啶-2-基)苯并咪唑 (I-8) 的合成:



化合物 9 (100 mg) 溶于N-甲基吡咯烷酮(10 ml), 加入4-羟基哌啶(120 mg), DIEA (400 g), 体系加热至130℃反应过夜。降温, 打入水中, 乙酸乙酯萃取, 旋干过柱 (MeOH/DCM =1/10)得到黄色固体状化合物 I-8 (25 mg, 收率21%)。¹HNMR CD₃OD δ: 1.490-1.508 (d, 2 H), 2.938 (s, 6 H), 3.189-3.239 (m, 2 H), 3.533-3.564 (m, 2 H), 6.709-6.731 (d, 1 H), 6.466-7.501 (m, 1 H), 7.673-7.720 (m, 3 H), 7.945-7.988 (m, 1 H), 8.089-8.116 (m, 1 H), 8.3 (s, 2 H), 8.655-8.666 (d, 1 H), 8.787-8.792 (d, 1 H); LC-MS: *m/z* = 407.9 (M+1)

实施例 9

制成盐酸盐

取化合物 I-2 (50mg), 溶于甲醇中 (1-2ml), 然后再加入 2ml 盐酸甲醇溶液。然后挥发溶剂, 得 52mg 固体。LC-MS: *m/z* = 405.9 (M+1)

试验实施例 10

本发明的具有式 (I) 结构的化合物及其药学上可接受的盐, 在抗肿瘤方面有明显的效用, 现通过以下药理实验说明:

MTS 细胞增殖实验

1. 试验材料

1.1 化合物及溶媒

受试样品

前述实施例所制备的式 (I) 系列化合物 I-1, I-2, I-3, I-4, I-5, I-6; I-7, I-8。阳性对照品: GDC-0449 从上海翰香香料有限公司购买。

DMSO 作为本实验的溶媒, 购自 Sigma 公司, 货号: D8418。

1.2 细胞株

本实验使用二种类型细胞株, 1) 人胰腺癌细胞株 PANC-1 来源于中科院细胞库。2) 人慢性髓系白血病细胞株 K562 来源于中科院细胞库。

1.3 试剂

MTS 检测细胞增殖试剂粉末, 购自 Promega 公司, 货号: G1111。PMS 购自 sigma 公司, 货号: P9625。细胞培养基 RPMI-1640 和 DMEM 购自 Gibco 公司。胎牛血清购自 HyClone 公司, 货号: SV30087 02

2. 试验方法

2.1 药物处理剂量及配制方法

空白溶媒组成: DMSO

受试品式 (I) 系列化合物及阳性对照品 GDC-0449 配制方法: 称取适量样品, 加入适量 DMSO 使药物储存浓度为 20 mmol/L, 涡旋混合均匀。根据药物在 DMSO 中的溶解度及 DMSO 在细胞培养中的安全浓度 (DMSO 在 1% 以下), 设置以下药物处理浓度: 60 μ mol/L、20 μ mol/L、6.67 μ mol/L、2.22 μ mol/L、0.74 μ mol/L、0.25 μ mol/L、0.082 μ mol/L、0.027 μ mol/L。

2.2 细胞培养

人胰腺癌细胞株 PANC-1 培养于 DMEM 完全培养基 (含有 10% 的胎牛血清, 100U/ml 青霉素, 100 μ g/ml 链霉素)。人慢性髓系白血病细胞株 K562 (悬浮细胞) 培养于 RPMI-1640 完全培养基 (含有 10% 的胎牛血清, 100U/ml 青霉素, 100 μ g/ml 链霉素)。

2.3 MTS 法检测 HB 系列化合物对体外培养癌细胞生长的抑制作用

将处于对数生长期的 PANC-1 细胞, 用 0.25% 的胰蛋白酶消化, 制成细胞悬液, 5 $\times 10^3$ /孔加入 96 孔细胞培养板内 (150 μ L/孔), 三复孔, 置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 孵箱内培养次日贴壁后, 按照实验设计每孔加入 50 μ L 系列浓度的受试化合物或对照的培液, 并设置细胞对照组 (仅含细胞和培养基而不含药物的孔)、空白对照组 (仅含培养基而不含细胞的)。K562 悬浮细胞直接计数, 1 $\times 10^4$ /孔加入 96 孔细胞培养板内, 其他处理与 PANC-1 相同。PANC-1 和 K562 给药后均培养 3 天, 培养完成后, 采用 MTS 方法检测细胞增殖情况并计算细胞相对于细胞对照组的细胞活力。

细胞相对活力% = (加药组细胞吸光值 - 空白对照组平均吸光值) / (细胞对照组平均吸光值 - 空白对照组平均吸光值) $\times 100\%$

3. 试验结果

HB 系列化合物对体外培养癌细胞生长的抑制作用

加药 3 天后, MTS 法检测本发明系列化合物对 PANC-1 和 K562 细胞生长的抑制作用。结果显示其中几个化合物的抑制作用与 GDC-0449 相当甚至优于 GDC-0449, IC₅₀ 结果见表 1。

表 1: 本发明化合物对癌细胞生长的抑制作用 (IC₅₀: Mean ± SD)

IC ₅₀ (μM)	K562	PANC-1
I -1	6.003±0.646	28.214±9.491
I -2	5.858±0.795	17.348±3.320
I -3	3.325±1.252	12.863±4.644
I -4	6.205±0.999	9.072±0.394
I -5	3.779±1.027	8.667±1.892
I -6	2.598±0.447	8.915±2.495
I-7	12.48±0.603	
I-8	19.245±0.808	

RT-PCR Gli1 mRNA 检测

1. 试验材料

1.1 化合物及溶媒

受试样品

式 (I) 系列化合物 (I -1、I -2、I -3、I -4、I -5、I -6、I -7、I -8); 阳性对照品: GDC-0449

DMSO 作为本实验的溶媒。

1.2 细胞株

本实验使用一种类型细胞株, 人慢性髓系白血病细胞株 K562。

1.3 试剂及仪器

试剂: SuperfecTRI RNA 提取试剂, 购自上海普飞生物技术有限公司, 货号: 3101-100。RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 FERMENTAS 公司, 货号: K1622。FastStart Universal SYBR Green Master (Rox)试剂, 购自罗氏公司, 货号: 04913914001。

仪器: Bio-Rad 公司 MJ Mini 48-Well Personal Thermal Cycler PCR 仪, 型号: PTC-1148; Bio-Rad 公司 iQ5 实时荧光定量 PCR 仪, 型号: iQ5。

2. 试验方法

将 K562 细胞加入 12 孔板内, 2×10^5 个细胞/孔。按照实验设计每孔加预设好浓度的受试化合物和阳性对照品 (30、10、3.3 μM), 两副孔。24 h 后, SuperfecTRI RNA 提取试剂按照标准实验方案提取总 RNA, 并使用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 将 mRNA 逆转录成 cDNA。然后, 使用 FastStart Universal SYBR Green Master (Rox)试剂按照标准实验方案在 iQ5 实时 PCR 检测系统上进行 qPCR 实验。引物序列如下: Gli1 上游引物: AGCGTGAGCCTGAATCTGTG, 下游引物: CAGCATGTACTGGGCTTTGAA; GADPH 上游引物: TTCACCACCATGGAGAAGGC, 下游引物: GGCATGGACTGTGGTCATGA。所有数值采用 $2^{-\Delta Ct1 - \Delta Ct2}$ 法进行相对定量分析。

3. 试验结果

式 (I) 系列化合物对 Gli1 mRNA 表达水平的影响

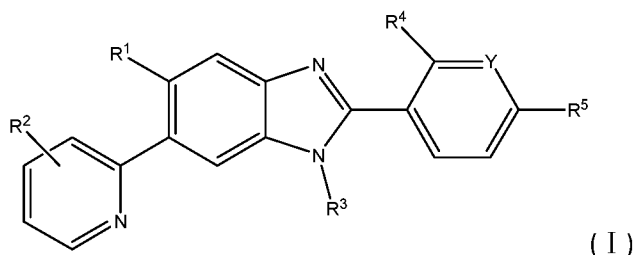
加药 24h 后, 提取 RNA, RT-PCR 检测 HB 系列化合物对 Gli1 mRNA 表达水平的影响。结果表明, 在 30、10、3.3 μM 处理 24 h 的条件下, I -1 和 I -2 有与 GDC-0449 相同的抑制效果, 结果见表 2。

表 2:本发明化合物对 Gli1 mRNA 表达水平的影响

抑制率 (%)	3.3 μ M	10 μ M	30 μ M
I -1	67.72 $\pm$ 4.96	53.25 $\pm$ 0.17	55.31 $\pm$ 5.15
I -2	62.48 $\pm$ 11.00	67.83 $\pm$ 2.66	64.09 $\pm$ 2.86

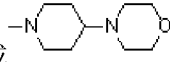
权 利 要 求 书

1、一种式 (I) 所示的苯并咪唑类化合物或其药学上可以接受的盐,



其中, R^1, R^2, R^3, R^4 独立地为 H, 卤素, C1-6 直链、支链烷基, 环烷基或者卤素取代的 C1-6 直链或支链烷基; $Y = C$ 或 N ; R^5 为:

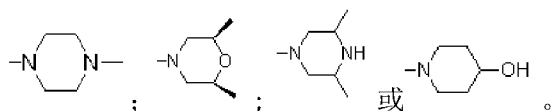
杂原子为氮或氧、杂原子数量为一个或两个、未取代或以烷基、羟基或氨基取代的 4-8 元杂

环, ,  或 ; 其中, R^6 独立地为 C1-4 直链烷基, 支链烷基或环

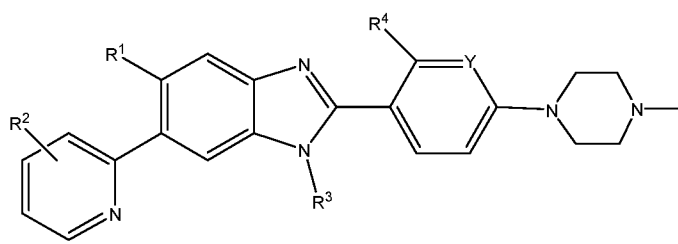
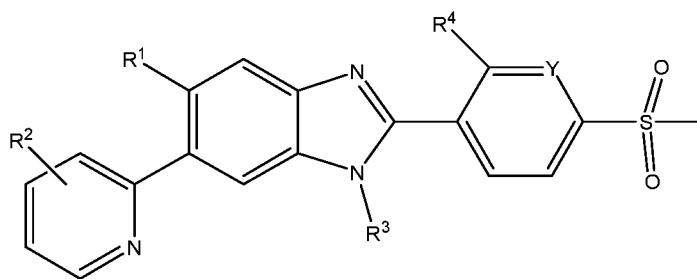
烷基; R^7, R^8 独立地为 H, C1-6 直链烷基, 环烷基, 氨基或羟基取代烷基, 烷基氨基取代烷基 $R^9R^{10}NR$, 或烷氧基取代烷基 $R^{11}OR$; 其中, R^9, R^{10} 可以独立地为 H、C1-6 直链烷基, 支链烷基, 环烷基或 R^9, R^{10} 闭合成环; R^{11} 为 C1-4 直链烷基, 支链烷基或环烷基。

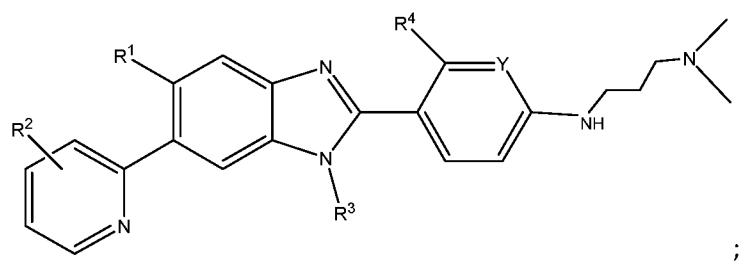
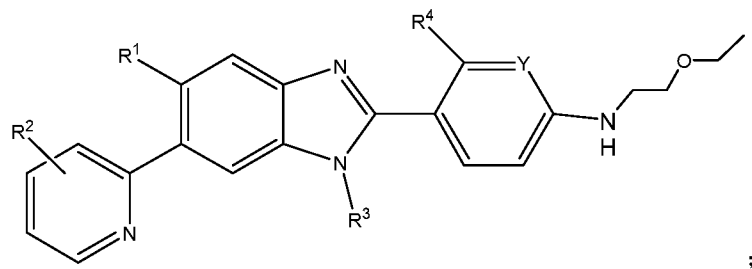
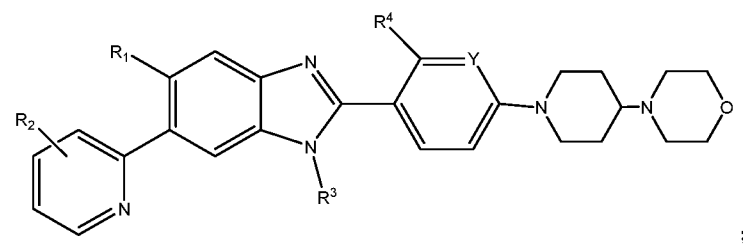
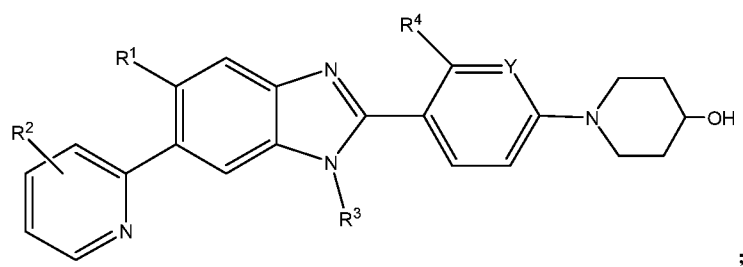
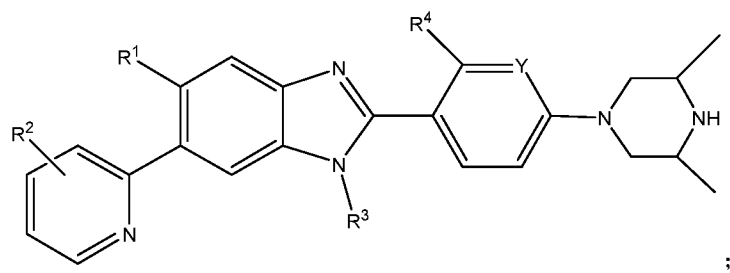
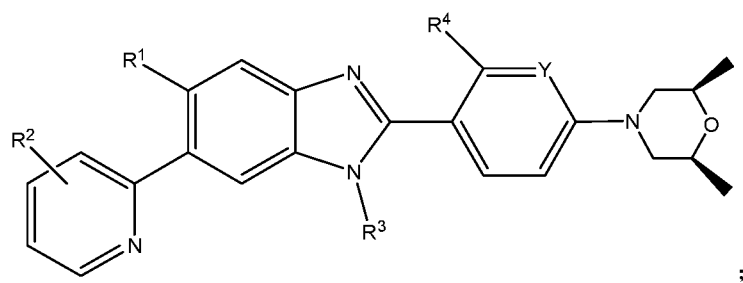
2、根据权利要求 1 所述的式 (I) 所示的化合物或其药学上可接受的盐, 其特征在于 R^5 为杂原子为氮或氧、杂原子数量为一个或两个、未取代或以烷基、羟基取代的 4, 6, 8 元单杂环。

3、根据权利要求 2 所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其特征在于, R^5 为



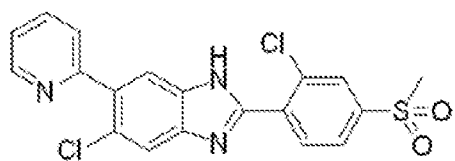
4、根据权利要求 1 所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其特征在于为以下化合物之一:





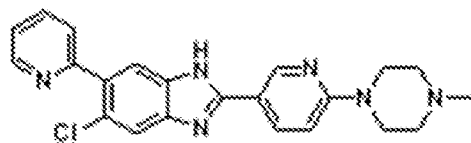
其中, R^1, R^2, R^3, R^4 以及 Y 的定义同权利要求 1。

5、根据权利要求 1 所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其特征在于为以下化合物之一:



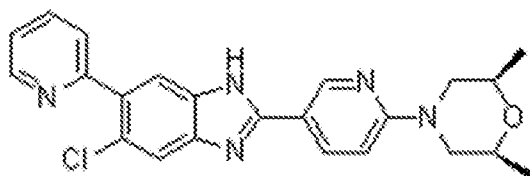
I -1

;



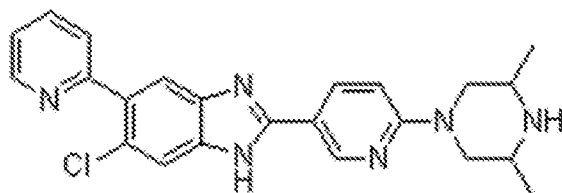
I -2

;



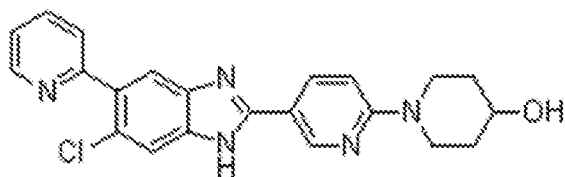
I -3

;



I -4

;



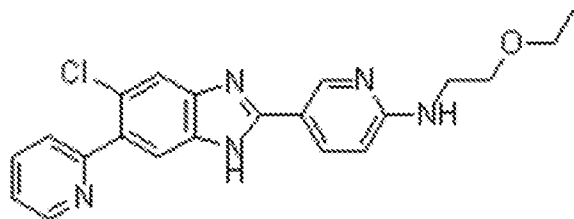
I -5

;

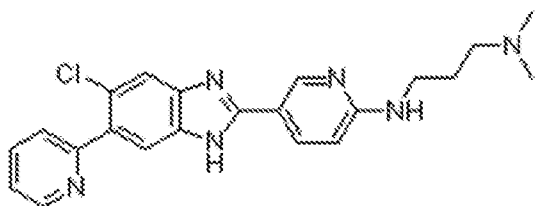


I -6

;



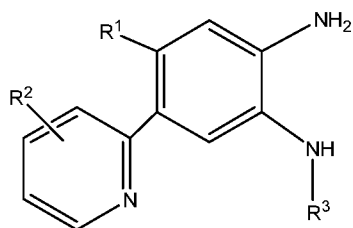
I-7



I-8

(II)

6、权利要求 1、2、3、4 或 5 所述的化合物或其药用盐的制备方法，其特征在于，由化合物 7（式 II 所示）制备式（I）所示的化合物，所述化合物 7 的结构为：



7

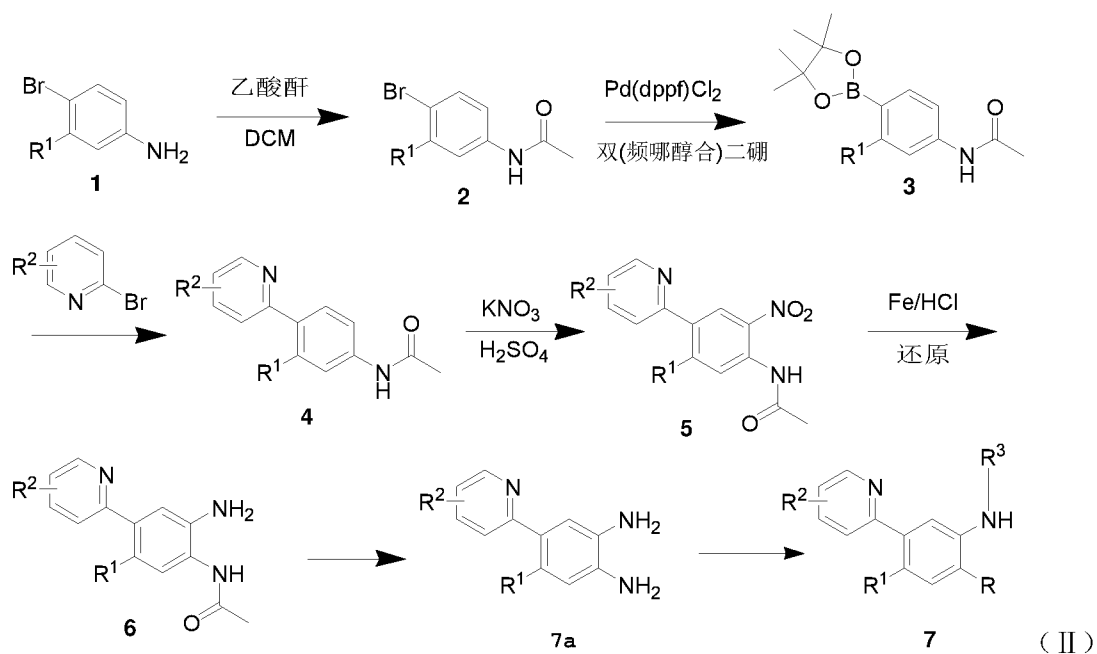
，其中 R^1, R^2, R^3 的定义同权利要求 1；

(II)

所述化合物 7 按下述步骤制备：

- a. 化合物 1 在溶剂中（ CH_2Cl_2 , THF 等）与醋酸酐反应制得化合物 2；
- b. 化合物 2 与双(频哪醇合)二硼反应制得化合物 3；
- c. 化合物 3 与 2-溴吡啶反应制得化合物 4；
- d. 化合物 4 在浓硫酸中硝化反应制得化合物 5；
- e. 还原化合物 5 制得化合物 6；
- f. 把化合物 6 脱保护去掉乙酰基制得化合物 7a
- g. 烷基化 7a 得到化合物 7；

反应式为：



其中, R¹, R², R³, R⁴以及Y的定义同权利要求1。

7、权利要求 1、2、3、4 或 5 所述的化合物或其可药物接受的盐, 其特征在于, 在制备抗肿瘤药物方面的应用。

8、根据权利要求 7 所述的化合物或其可药物接受的盐, 其特征在于, 所述肿瘤为与 Hh 信号通路持续激活相关的肿瘤。

9、根据权利要求 8 所述的化合物或其可药物接受的盐, 其特征在于, 所述肿瘤为: 皮肤基底细胞癌、髓母细胞瘤、肺癌、消化道肿瘤、乳腺癌或胰腺癌。

10、药物组合物, 其特征在于, 其中含权利要求 1、2、3、4 或 5 所述的化合物或其可药物接受的盐作为有效成份, 以及一种或多种药学上可接受的辅料。