



(21)申請案號：105138848

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 11 月 25 日

(51)Int. Cl.：

C07D403/14 (2006.01)

A61K31/501 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2015/11/27

英國

1520959.6

(71)申請人：阿斯特捷利康公司 (瑞典) ASTRAZENECA AB (SE)

瑞典

癌症研究科技股份有限公司 (英國) CANCER RESEARCH TECHNOLOGY LIMITED

(GB)

英國

(72)發明人：芬萊 慕里斯 雷蒙 佛斯裘爾 FINLAY, MAURICE RAYMOND VERSCHOYLE

(GB)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：15 項 圖式數：0 共 50 頁

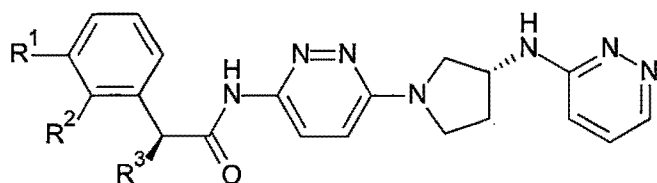
(54)名稱

雙嗒吡化合物及它們在治療癌症中之用途

BIS-PYRIDAZINE COMPOUNDS AND THEIR USE IN TREATING CANCER

(57)摘要

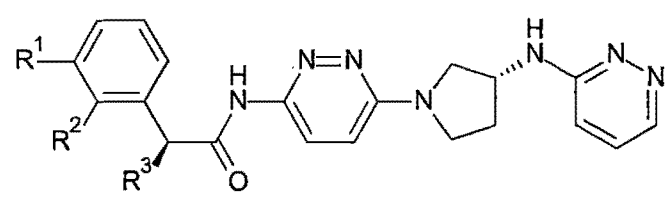
一種具有式(I)之化合物：



(I)

或其藥學上可接受的鹽，其中 R^1 可以是氫、甲氧基、二氟甲氧基或三氟甲氧基； R^2 可以是氫、甲氧基、三氟甲氧基或三氟甲基；並且 R^3 可以是氫或甲氧基。具有式(I)之化合物可以抑制穀胺醯胺酶，例如 GLS1。

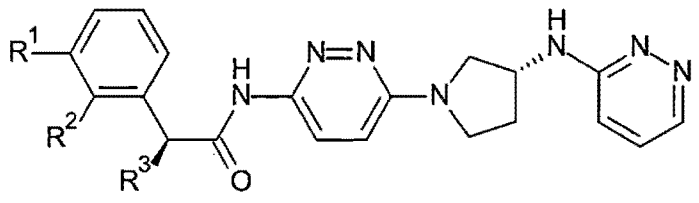
A compound of Formula (I):



(I)

or a pharmaceutically acceptable salt thereof, where R^1 can be hydro, methoxy, difluoromethoxy or trifluoromethoxy; R^2 can be hydro, methoxy, trifluoromethoxy or trifluoromethyl; and R^3 can be hydro or methoxy. The compound of formula (I) can inhibit glutaminase, e.g., GLS1.

特徵化學式：



(I)

201731837

發明摘要

※ 申請案號：105138848

※ 申請日：105/11/25

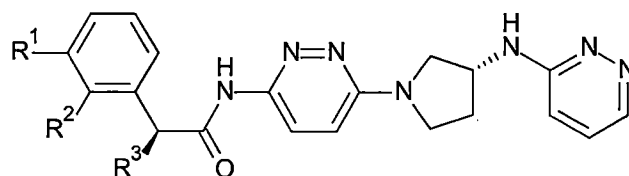
※IPC 分類：**C07D 403/14** (2006.01)
A61K 31/501 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

雙嗒咭化合物及它們在治療癌症中之用途/*bis-Pyridazine Compounds and Their Use in Treating Cancer*

【中文】

一種具有式 (I) 之化合物：

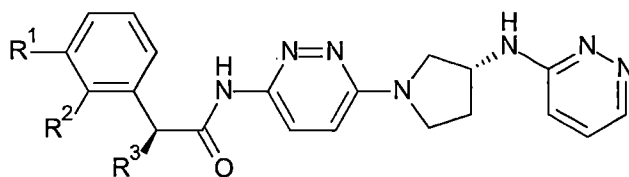


(I)

或其藥學上可接受的鹽，其中R¹可以是氫、甲氧基、二氟甲氧基或三氟甲氧基；R²可以是氫、甲氧基、三氟甲氧基或三氟甲基；並且R³可以是氫或甲氧基。具有式 (I) 之化合物可以抑制穀胺醯胺酶，例如GLS1。

【英文】

A compound of Formula (I):



(I)

or a pharmaceutically acceptable salt thereof, where R^1 can be hydro, methoxy, difluoromethoxy or trifluoromethoxy; R^2 can be hydro, methoxy, trifluoromethoxy or trifluoromethyl; and R^3 can be hydro or methoxy. The compound of formula (I) can inhibit glutaminase, e.g., GLS1.

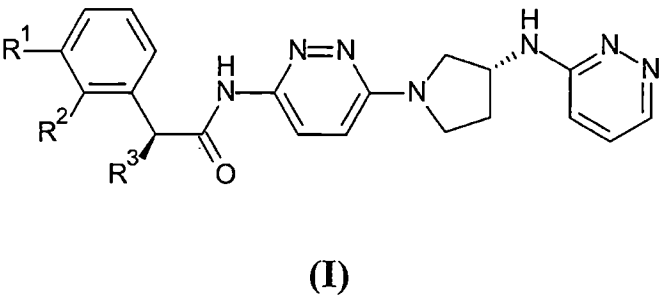
【代表圖】

【本案指定代表圖】：無

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有式時，請揭示最能顯示發明特徵的式】：



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

雙嗒吡化合物及它們在治療癌症中之用途/*bis-Pyridazine Compounds and Their Use in Treating Cancer*

【發明領域】

【0001】 本說明書總體上涉及雙嗒吡化合物及其藥學上可接受的鹽。該等化合物對穀胺醯胺酶1酶(“GLS1”)起作用，並且因此本說明書還涉及此類化合物及其鹽治療或預防GLS1介導的疾病(包括癌症)之用途。本發明書進一步涉及包含雙嗒吡化合物及其藥學上可接受的鹽之醫藥組成物；包含此類化合物和鹽的套組(kit)；生產此類化合物和鹽之方法；在生產此類化合物和鹽中有用的中間體；並且涉及使用此類化合物和鹽治療GLS1激酶介導的疾病(包括癌症)之方法。

【背景】

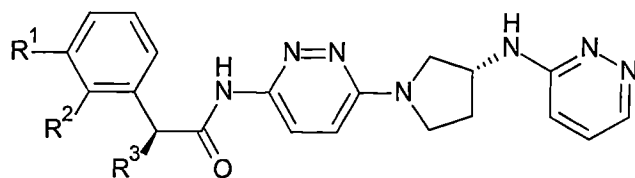
【0002】 穀胺醯胺係最豐富的血漿胺基酸並且參與許多生長促進途徑。特別地，穀胺醯胺參與三羧酸循環中的氧化並且參與維持細胞氧化還原平衡，並且還為核苷酸和胺基酸合成提供氮(庫裡(Curi)等人，生物科學前沿(*Front. Biosc.*)**2007**，*12*，344-57；德邦汀斯(DeBardinis)和成(Cheng)，致癌基因(*Oncogene*)**2009**，313-324)。由於細胞中代謝發生改變的原因，許多癌症細胞依賴於穀胺醯胺代謝(包括瓦伯格(Warburg)效應)，其中醣酵解丙酮酸被轉化為乳酸而不是被用於產生乙醯輔酶A(考普諾

(Koppenol)等人，自然綜述(*Nature Reviews*)**2011**，*11*，325-337)。
由於對穀胺醯胺代謝的這種依賴，此類癌症細胞對外源穀胺醯胺水平的變化是敏感的。而且，有許多證據表明穀胺醯胺分解在某些癌症類型中起關鍵作用(漢斯來(Hensley)等人，臨床研究雜誌(*J. Clin. Invest.*)**2013**，*123*，3678-3684)，並且與已知的致癌驅動子(例如Myc)有關(黨(Dang)，癌症研究(*Cancer Res.*)**2010**，*70*，859-863)。

【0003】 穀胺醯胺分解代謝為穀胺酸鹽的第一步驟係由穀胺醯胺酶催化，穀胺醯胺酶以2種同種型(GLS1和GLS2，最初鑒定為各自在腎和肝臟中表現)存在。已知腎穀胺醯胺酶(GLS1)比肝穀胺醯胺酶(GLS2)的表現更加廣泛，並且具有2種剪接變體(KGA和較短GAC同種型)，這兩種都位於線粒體中(埃爾加迪(Elgadi)等人，生理基因組學(*Physiol. Genomics*)**1999**，*1*，51-62；卡薩戈(Cassago)等人，美國國家科學院院刊(*Proc. Natl. Acad. Sci.*)**2012**，*109*，1092-1097)。GLS1表現與腫瘤生長以及許多疾病類型的惡性腫瘤有關(王(Wang)等人，癌細胞(*Cancer Cell*)**2010**，*18*，207-219；范德侯偉(van der Heuvel)等人，癌症生物學與治療(*Cancer Bio. Ther.*)**2012**，*13*，1185-1194)。因此，預期GLS1的抑制劑在治療癌症中是有用的(作為單一療法或與其他抗癌劑組合)。

【發明概述】

【0004】 簡言之，本說明書部分地描述了具有式 **(I)** 之化合物：



(I)

或其藥學上可接受的鹽，其中：

R¹係氫、甲氧基、二氟甲氧基或三氟甲氧基；

R²係氫、甲氧基、三氟甲氧基或三氟甲基；並且

R³係氫或甲氧基。

【0005】 本說明書還部分地描述了包含具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽、以及至少一種藥學上可接受的稀釋劑或載體的醫藥組成物。

【0006】 本說明書還部分地描述了具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽，用於在療法中使用。

【0007】 本說明書還部分地描述了具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽，用於在癌症的治療中使用。

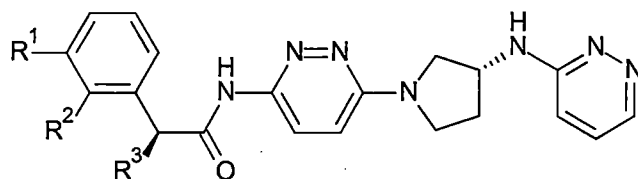
【0008】 本說明書還部分地描述了具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽在生產用於治療癌症的藥物中之用途。

【0009】 本說明書還部分地描述了用於在需要這種治療的溫血動物中治療癌症之方法，該方法包括向所述溫血動物給予治療有效量的具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽。

【示意性實施方式的說明】

【0010】 許多實施方式在整個說明書中詳細描述，並且對於本領域有技術的讀者而言將是明顯的。本發明不被解釋為受限於其任何具體的一個或多個實施方式。

【0011】 在第一個實施方式中，提供了具有式 (I) 之化合物：



(I)

或其藥學上可接受的鹽，其中：

R¹係氫、甲氧基、二氟甲氧基或三氟甲氧基；

R²係氫、甲氧基、三氟甲氧基或三氟甲基；並且

R³係氫或甲氧基。

【0012】 氫基團係單個氫原子。例如，當R³係氫時，在式 (I) 中鄰接至羰基基團的基團係亞甲基基團。當R¹或R²係氫時，它們和它們附接至其上的碳原子形成芳香族的CH基團。

【0013】 術語“藥學上可接受的”用於指定物件（例如鹽、劑型、稀釋劑或載體）係適合在患者中使用的。藥學上可接受的鹽的實例清單可以發現於：藥用鹽手冊：性質、選擇和使用（the *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use*），P. H. 斯塔爾（Stahl）和C. G. 韋穆特（Wermuth）編輯，魏因海姆（Weinheim）/蘇黎世（Zürich）：威利（Wiley）-VCH出

版社/VHCA，2002。具有式 (I) 之化合物的適合的藥學上可接受的鹽例如是酸加成鹽。在技術人員已知的條件下，具有式 (I) 之化合物的酸加成鹽可以藉由使該化合物與適合的無機酸或有機酸接觸來形成。酸加成鹽例如可以使用選自鹽酸、氫溴酸、硫酸和磷酸的無機酸來形成。酸加成鹽例如也可以使用選自三氟乙酸、甲磺酸和苯磺酸的有機酸來形成。

【0014】 因此，在一個實施方式中，提供了具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽，其中該藥學上可接受的鹽係鹽酸鹽、氫溴酸鹽、硫酸鹽、磷酸鹽、三氟乙酸鹽、甲磺酸鹽或苯磺酸鹽。

【0015】 在一個實施方式中，提供了具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽，其中該藥學上可接受的鹽係鹽酸鹽或氫溴酸鹽。

【0016】 應當理解的是，可能用具有適當PKa的其他適合的酸來形成其他藥學上可接受的鹽，並且該等包括在“藥學上可接受的鹽”的定義中。

【0017】 具有式 (I) 之化合物的另外的適合的藥學上可接受的鹽係鹼加成鹽。在技術人員已知的條件下，具有式 (I) 之化合物的鹼加成鹽可以藉由使該化合物與適合的無機鹼或有機鹼接觸來形成。例如可以使用選自鹼金屬氫氧化物（例如氫氧化鈉、氫氧化鉀、或氫氧化鋰）或鹼土金屬氫氧化物（例如氫氧化鈣或氫氧化鎂）的無機鹼來形成鹼加成鹽。也可以使用選自甲胺、二甲胺、三甲胺、哌啶、咪啉和三-(2-羥乙基)胺的有機鹼來形成鹼

加成鹽。

【0018】 因此，在一個實施方式中，提供了具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽，其中該藥學上可接受的鹽係氫氧化鈉鹽、氫氧化鉀鹽、氫氧化鋰鹽、氫氧化鈣鹽、氫氧化鎂鹽、甲胺鹽、二甲胺鹽、三甲胺鹽、哌啶鹽、咪啉鹽或三-(2-羥乙基)胺鹽。

【0019】 在一個實施方式中，提供了具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽，其中該藥學上可接受的鹽係鹽酸鹽、氫溴酸鹽、硫酸鹽、磷酸鹽、三氟乙酸鹽、甲磺酸鹽、苯磺酸鹽、氫氧化鈉鹽、氫氧化鉀鹽、氫氧化鋰鹽、氫氧化鈣鹽、氫氧化鎂鹽、甲胺鹽、二甲胺鹽、三甲胺鹽、哌啶鹽、咪啉鹽或三-(2-羥乙基)胺鹽。

【0020】 應當理解的是，可能與其他適合的鹼形成其他藥學上可接受的鹼，並且該等包括在“藥學上可接受的鹽”的定義中。

【0021】 另一個實施方式提供了本文所定義的任何實施方式（例如如申請專利範圍1所述的實施方式），其條件係選自實例1、2、3、4、5和6的一個或多個具體的實例（例如一個、兩個或三個具體的實例，或可替代地一個具體的實例）單獨地被放棄。

【0022】 式 (I) 中的可變基團的一些值如下。該等值可以與任何定義、申請專利範圍（例如申請專利範圍1）、或本文所定義的實施方式組合使用以提供另外的實施方式。

a) R^1 係甲氧基、二氟甲氧基或三氟甲氧基。

- b) R^1 係甲氧基或二氟甲氧基。
- c) R^1 係甲氧基或三氟甲氧基。
- d) R^1 係二氟甲氧基或三氟甲氧基。
- e) R^1 係氫。
- f) R^1 係甲氧基。
- g) R^1 係二氟甲氧基。
- h) R^1 係三氟甲氧基。
- i) R^2 係甲氧基、三氟甲氧基或三氟甲基。
- j) R^2 係氫。
- k) R^2 係甲氧基。
- l) R^2 係三氟甲氧基。
- m) R^2 係三氟甲基。
- n) R^3 係氫。
- o) R^3 係甲氧基。

【0023】 在一個實施方式中，提供了具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽，其中：

R^1 係氫、甲氧基、二氟甲氧基或三氟甲氧基；

R^2 係氫；並且

R^3 係甲氧基。

【0024】 在一個實施方式中，提供了具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽，其中：

R^1 係甲氧基、二氟甲氧基或三氟甲氧基；

R^2 係氫；並且

R^3 係甲氧基。

【0025】 在一個實施方式中，提供了具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽，其中：

R^1 係氫；

R^2 係甲氧基、三氟甲氧基或三氟甲基；並且

R^3 係氫。

【0026】 在一個實施方式中，提供了具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽，其中該具有式 (I) 之化合物選自：

(2*S*)-2-[3-(二氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-*N*-[6-[(3*R*)-3-(嗒吡啶-3-基胺基)吡咯啉-1-基]嗒吡啶-3-基]乙醯胺；

(2*S*)-2-[3-(三氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-*N*-[6-[(3*R*)-3-(嗒吡啶-3-基胺基)吡咯啉-1-基]嗒吡啶-3-基]乙醯胺；

(2*S*)-2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)-*N*-[6-[(3*R*)-3-(嗒吡啶-3-基胺基)吡咯啉-1-基]嗒吡啶-3-基]乙醯胺；

2-(2-甲氧基苯基)-*N*-[6-[(3*R*)-3-(嗒吡啶-3-基胺基)吡咯啉-1-基]嗒吡啶-3-基]乙醯胺；

N-[6-[(3*R*)-3-(嗒 咩 -3- 基 胺 基) 吡 咯 啉 -1- 基] 嗒 咩 -3- 基]-2-[2-(三 氟 甲 基) 苯 基] 乙 醯 胺 ; 和

N-[6-[(3*R*)-3-(嗒 咩 -3- 基 胺 基) 吡 咯 啉 -1- 基] 嗒 咩 -3- 基]-2-[2-(三 氟 甲 氧 基) 苯 基] 乙 醯 胺 。

【0027】 在一個實施方式中，提供了(2*S*)-2-[3-(二 氟 甲 氧 基) 苯 基]-2-甲 氧 基-*N*-[6-[(3*R*)-3-(嗒 咩 -3- 基 胺 基) 吡 咯 啉 -1- 基] 嗒 咩 -3- 基] 乙 醯 胺 ， 或 其 藥 學 上 可 接 受 的 鹽 。

【0028】 在一個實施方式中，提供了(2*S*)-2-[3-(二 氟 甲 氧 基) 苯 基]-2-甲 氧 基-*N*-[6-[(3*R*)-3-(嗒 咩 -3- 基 胺 基) 吡 咯 啉 -1- 基] 嗒 咩 -3- 基] 乙 醯 胺 。

【0029】 在一個實施方式中，提供了(2*S*)-2-[3-(二 氟 甲 氧 基) 苯 基]-2-甲 氧 基-*N*-[6-[(3*R*)-3-(嗒 咩 -3- 基 胺 基) 吡 咯 啉 -1- 基] 嗒 咩 -3- 基] 乙 醯 胺 的 藥 學 上 可 接 受 的 鹽 。

【0030】 在一個實施方式中，提供了(2*S*)-2-[3-(三 氟 甲 氧 基) 苯 基]-2-甲 氧 基-*N*-[6-[(3*R*)-3-(嗒 咩 -3- 基 胺 基) 吡 咯 啉 -1- 基] 嗒 咩 -3- 基] 乙 醯 胺 ， 或 其 藥 學 上 可 接 受 的 鹽 。

【0031】 在一個實施方式中，提供了(2*S*)-2-[3-(三 氟 甲 氧 基) 苯 基]-2-甲 氧 基-*N*-[6-[(3*R*)-3-(嗒 咩 -3- 基 胺 基) 吡 咯 啉 -1- 基] 嗒 咩 -3- 基] 乙 醯 胺 。

【0032】 在一個實施方式中，提供了(2*S*)-2-[3-(三 氟 甲 氧 基) 苯 基]-2-甲 氧 基-*N*-[6-[(3*R*)-3-(嗒 咩 -3- 基 胺 基) 吡 咯 啉 -1- 基] 嗒 咩 -3- 基] 乙 醯 胺 的 藥 學 上 可 接 受 的 鹽 。

【0033】 在一個實施方式中，提供了(2*S*)-2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)-*N*-[6-[(3*R*)-3-(嗒吡-3-基胺基)吡咯啉-1-基]嗒吡-3-基]乙醯胺，或其藥學上可接受的鹽。

【0034】 在一個實施方式中，提供了(2*S*)-2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)-*N*-[6-[(3*R*)-3-(嗒吡-3-基胺基)吡咯啉-1-基]嗒吡-3-基]乙醯胺。

【0035】 在一個實施方式中，提供了(2*S*)-2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)-*N*-[6-[(3*R*)-3-(嗒吡-3-基胺基)吡咯啉-1-基]嗒吡-3-基]乙醯胺的藥學上可接受的鹽。

【0036】 在一個實施方式中，提供了2-(2-甲氧基苯基)-*N*-[6-[(3*R*)-3-(嗒吡-3-基胺基)吡咯啉-1-基]嗒吡-3-基]乙醯胺，或其藥學上可接受的鹽。

【0037】 在一個實施方式中，提供了2-(2-甲氧基苯基)-*N*-[6-[(3*R*)-3-(嗒吡-3-基胺基)吡咯啉-1-基]嗒吡-3-基]乙醯胺。

【0038】 在一個實施方式中，提供了2-(2-甲氧基苯基)-*N*-[6-[(3*R*)-3-(嗒吡-3-基胺基)吡咯啉-1-基]嗒吡-3-基]乙醯胺的藥學上可接受的鹽。

【0039】 本說明書中所描述的化合物和鹽可以按溶劑化形式和非溶劑化形式存在。例如，溶劑化形式可以是水合形式，如半水合物、一水合物、二水合物、三水合物或其可替代的數量。本發明涵蓋具有式 (I) 之化合物的所有此類溶劑化形式以及非溶劑化形式。

【0040】 本說明書所描述的該等化合物和鹽的原子可以作為它們的同位素存在。本發明涵蓋了具有式 (I) 之所有化合物，其中原子被其同位素中的一個或多個替換（例如具有式 (I) 之化合物，其中一個或多個碳原子係¹¹C或¹³C碳同位素，或其中一個或多個氫原子係²H（氘）或³H（氚）同位素）。

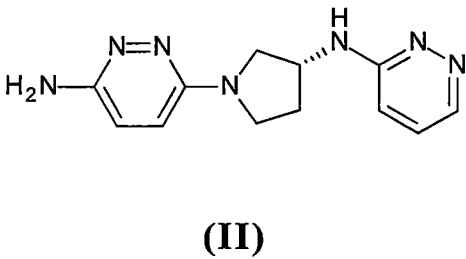
【0041】 本說明書中所描述的化合物和鹽可以按互變異構物的混合物存在。“互變異構物”係結構異構物，其存在於由氫原子的遷移產生的平衡中。本發明包括具有式 (I) 之化合物的所有互變異構物。

【0042】 借助於它們的不對稱碳原子，具有式 (I) 之化合物以光學活性形式存在。

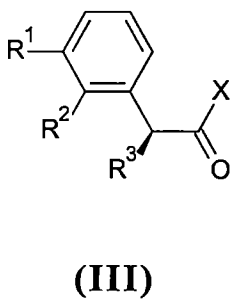
【0043】 某些具有式 (I) 之化合物（例如那些其中 R^3 係氫的化合物）以單一鏡像異構物存在。因此，在一個實施方式中，提供了具有式 (I) 之化合物、或其藥學上可接受的鹽，其係鏡像異構物過量（%ee） $\geq 95\%$ 、 $\geq 98\%$ 或 $\geq 99\%$ 的單一鏡像異構物。在一個實施方式中，單一鏡像異構物以鏡像異構物過量（%ee） $\geq 99\%$ 存在。

【0044】 某些具有式 (I) 之化合物（例如那些其中 R^3 係甲氧基的化合物）以單一非鏡像異構物存在。因此，在一個實施方式中，提供了具有式 (I) 之化合物、或其藥學上可接受的鹽，其係非鏡像異構物過量（%de） $\geq 95\%$ 、 $\geq 98\%$ 或 $\geq 99\%$ 的單一非鏡像異構物。在一個實施方式中，單一非鏡像異構物以非鏡像異構物過量（%de） $\geq 99\%$ 存在。

【0045】 具有式 (I) 之化合物可以例如藉由具有式 (II) 之化合物：



與具有式 (III) 化合物反應來製備：



其中 R^1 、 R^2 和 R^3 係如本文任何實施方式中所定義的，並且 X 係離去基團（例如鹵素原子（例如氯原子）或羥基基團）。該反應在適合的溶劑（例如 DMF 或 DMA）中並且在鹼（例如 DIPEA）的存在下，在適合的溫度（例如在大約 20°C 至 30°C 的環境溫度下或在升高的溫度（例如在 80°C 和 120°C 之間或可替代地在大約 100°C ）下）下便利地進行。其中 X 係羥基基團，適合的偶聯劑（例如 HATU）被用來形成醯胺鍵。

【0046】 因此具有式 (II) 之化合物及其鹽在具有式 (I) 之化合物的製備中作為中間體係有用的，並且提供了另一個實施方式。

【0047】 在一個實施方式中，提供了 6-[(3R)-3-(吡啶-3-基胺基)吡咯啉-1-基]吡啶-3-胺，或其鹽。

【0048】 在一個實施方式中，提供了6-[(3*R*)-3-(嗒咩-3-基胺基)吡咯啉-1-基]嗒咩-3-胺。

【0049】 類似地，具有式 (III) 之化合物及其鹽在具有式 (I) 之化合物的製備中作為中間體係有用的，並且提供了另一個實施方式。

【0050】 在一個實施方式中，提供了具有式 (III) 之化合物或其鹽，其中：

R^1 係二氟甲氧基或三氟甲氧基；

R^2 係氫；

R^3 係甲氧基；並且

X 係離去基團。在一個實施方式中， X 係羥基或氯。在一個實施方式中， X 係羥基。

【0051】 在一個實施方式中，提供了2-[3-(二氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基乙酸，或其鹽。

【0052】 在一個實施方式中，提供了2-甲氧基-2-[3-(三氟甲氧基)苯基]乙酸，或其鹽。

【0053】 在一個實施方式中，提供了2-[3-(二氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基乙酸。

【0054】 在一個實施方式中，提供了2-甲氧基-2-[3-(三氟甲氧基)苯基]乙酸。

【0055】 具有式 (II) 和式 (III) 之化合物可以藉由類似於

實例部分示出的那些方法來製備。

【0056】 具有式 (II) 之化合物的適合的鹽例如是酸加成鹽。具有式 (II) 之化合物的酸加成鹽可以藉由在技術人員已知的條件下使該化合物與適合的無機酸或有機酸接觸來形成。當與具有式 (II) 之化合物配對時，此類酸不需要產生藥學上可接受的鹽。酸加成鹽例如可以使用選自鹽酸、氫溴酸、硫酸和磷酸的無機酸來形成。酸加成鹽例如也可以使用選自三氟乙酸、甲磺酸和苯磺酸的有機酸來形成。

【0057】 因此，在一個實施方式中，提供了具有式 (II) 之化合物或其鹽，其中該鹽係鹽酸鹽、氫溴酸鹽、硫酸鹽、磷酸鹽、三氟乙酸鹽、甲磺酸鹽或苯磺酸鹽。

【0058】 具有式 (III) 之化合物的適合的鹽係鹼加成鹽。在技術人員已知的條件下，具有式 (III) 之化合物的鹼加成鹽可以藉由使該化合物與適合的無機鹼或有機鹼接觸來形成。當與具有式 (III) 之化合物配對時，此類鹼不需要產生藥學上可接受的鹽。例如可以使用選自鹼金屬氫氧化物（例如氫氧化鈉、氫氧化鉀、或氫氧化鋰）或鹼土金屬氫氧化物（例如氫氧化鈣或氫氧化鎂）的無機鹼來形成鹼加成鹽。也可以使用選自甲胺、二甲胺、三甲胺、吡啶、咪啉和三-(2-羥乙基)胺的有機鹼來形成鹼加成鹽。

【0059】 因此，在一個實施方式中，提供了具有式 (III) 之化合物或其鹽，其中該鹽係氫氧化鈉鹽、氫氧化鉀鹽、氫氧化鋰鹽、氫氧化鈣鹽、氫氧化鎂鹽、甲胺鹽、二甲胺鹽、三甲胺鹽、吡啶鹽、咪啉鹽或三-(2-羥乙基)胺鹽。

【0060】 作為其GLS1抑制活性的結果，具有式 (I) 之化合物、及其藥學上可接受的鹽預期在療法中(例如在至少部分由GLS1介導的疾病或醫學病狀，包括癌症的治療中)是有用的。

【0061】 在提及“癌症”的情況下，這包括非轉移性癌症和轉移性癌症兩者，使得治療癌症涉及治療原發性腫瘤和腫瘤轉移兩者。

【0062】 在一個實施方式中，該癌症係轉移性癌症。

【0063】 在一個實施方式中，該癌症係非轉移性癌症。

【0064】 “GLS1抑制活性”係指作為對具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽的存在的直接或間接響應，GLS1的活性相對於在不存在具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽下GLS1的活性降低。此類活性的降低可以由於具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽與GLS1的直接相互作用，或由於具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽與一種或多種反過來影響GLS1活性的其他因素相互作用。例如，具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽可以藉由直接與GLS1結合、藉由(直接或間接)引起另一因素降低GLS1活性、或藉由(直接或間接)降低存在於細胞或有機體中的GLS1的量來降低GLS1。

【0065】 術語“療法”旨在具有其正常的含義：處理疾病，以便完全或部分緩解其症狀的一種、一些或全部，或以便針對潛在病理進行糾正或補償。術語“療法”還包括“預防”，除非有相反的具體指示。術語“治療的”和“治療地”應以相應的方式

被解釋。

【0066】術語“預防”旨在具有其正常的含義，並包括防止疾病發展的初級預防和繼發性預防，其中該疾病已經發展並且患者被暫時或永久保護對抗疾病的加重或惡化或者對抗與疾病相關的新症狀的發展。

【0067】術語“治療”（treatment）與“療法”（therapy）同義地使用。類似地，術語“治療”（treat）可視為施加療法（applying therapy），其中“療法”（therapy）係如本文所定義的。

【0068】在一個實施方式中，提供了具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽，用於在療法中使用。

【0069】在一個實施方式中，提供了具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽用於生產藥物的用途。

【0070】在任何實施方式中，具有式 (I) 之化合物選自以下實例。在任何實施方式中，具有式 (I) 之化合物選自實例1、2、3、4、5和6。

【0071】在一個實施方式中，提供了具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽，用於在治療由GLS1介導的疾病中使用。在一個實施方式中，由GLS1介導的所述疾病係癌症。在一個實施方式中，所述癌症選自乳癌（例如三陰性乳癌）、肺癌（例如非小細胞肺癌）、胰腺癌和肝細胞癌。

【0072】“三陰性乳癌”係不表現雌性素受體、孕酮受體和Her2/neu的該等基因的任何乳癌。

【0073】 在一個實施方式中，提供了具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽，用於在癌症的治療中使用。

【0074】 在一個實施方式中，提供了具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽用於生產治療GLS1介導的疾病的藥物的用途。在一個實施方式中，由GLS1介導的所述疾病係癌症。在一個實施方式中，所述癌症選自乳癌（例如三陰性乳癌）、肺癌（例如非小細胞肺癌）、胰腺癌和肝細胞癌。

【0075】 在一個實施方式中，提供了具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽用於生產治療癌症的藥物的用途。

【0076】 在任何實施方式中，具有式 (I) 之化合物選自以下實例。在任何實施方式中，具有式 (I) 之化合物選自實例1、2、3、4、5和6。

【0077】 在一個實施方式中，提供了用於在需要這種治療的溫血動物中治療GLS1的抑制係有益的疾病之方法，該方法包括向所述溫血動物給予治療有效量的具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽。

【0078】 術語“治療有效量”係指如在本文的任何實施方式中所描述的具有式 (I) 之化合物之量，該量有效地在受試者中提供“療法”，或在受試者中有效地“治療”疾病或失調。在癌症的情況下，如在以上“療法”、“治療”和“預防”的定義中所述的，治療有效量可以在受試者中引起任何可觀察的或可測量的變化。例如，該有效量可以降低癌症或腫瘤細胞的數量；降低總

體腫瘤大小；抑制或停止腫瘤細胞浸潤至外周器官（包括，例如軟組織和骨）；抑制或停止腫瘤轉移；抑制或停止腫瘤生長；在某種程度上減輕與癌症有關的一個或多個症狀；降低發病率和死亡率；提高生命質量；或該等作用的組合。有效量可以是足以減少響應於GLS1活性的抑制的疾病的症狀的量。對於癌症療法，例如可以藉由評估存活期、疾病進展時間（TTP）、應答率（RR）、響應期、和/或生命質量來測定體內療效。如由熟習該項技術者所認可的，有效量可以取決於給予途徑、賦形劑的使用、以及與其他藥劑共同使用而改變。例如，在使用聯合療法的情況下，在動物患者中，對於治療靶向的失調，當聯合時，本說明書中所描述的具有式 (I) 之化合物或藥學上可接受的鹽的量和和其他一種或多種藥學上有活性的藥劑的量係共同有效的。在該背景下，如果它們在組合時足以降低如以上所述的響應於GLS1活性抑制的疾病的症狀，組合的量係“治療有效量”的。典型地，熟習該項技術者可以藉由例如從針對具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽的、本說明書中所描述的劑量範圍開始，以及從其他一種或多種藥學上有活性的化合物的一個或多個批准的或另外公開的劑量範圍開始，來確定此類量。

【0079】 “溫血動物”包括例如人類。

【0080】 在一個實施方式中，提供了用於在需要這種治療的溫血動物中治療癌症之方法，該方法包括向所述溫血動物給予治療有效量的具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽。在一個實施方式中，所述癌症選自乳癌（例如三陰性乳癌）、肺癌（例如

非小細胞肺癌)、胰腺癌和肝細胞癌。

【0081】 在任何實施方式中，具有式 **(I)** 之化合物選自以下實例。在任何實施方式中，具有式 **(I)** 之化合物選自實例1、2、3、4、5和6。

【0082】 在本說明書中所描述的抗癌治療可以作為單一療法係實用的，或者除了給予具有式 **(I)** 之化合物以外，還可以包括常規手術、放射療法或化學療法；或該等另外的療法的組合。這種常規手術、放射療法或化學療法可以與具有式 **(I)** 之化合物同時地、順序地或分開地給予，以進行治療。

【0083】 因此，在一個實施方式中，提供了具有式 **(I)** 之化合物或其藥學上可接受的鹽、以及至少一種另外的抗腫瘤物質，用於在癌症的治療中使用。

【0084】 在一個實施方式中，提供了具有式 **(I)** 之化合物或其藥學上可接受的鹽、以及至少一種另外的抗腫瘤物質，用於在癌症的治療中同時地、分開地或順序地使用。

【0085】 在一個實施方式中，提供了具有式 **(I)** 之化合物或其藥學上可接受的鹽，用於在癌症的治療中使用，其中該具有式 **(I)** 之化合物與至少一種另外的抗腫瘤物質被同時地、分別地或順序地給予。

【0086】 在一個實施方式中，提供了在需要這種治療的溫血動物中治療癌症的方法，該方法包括向所述溫血動物給予具有式 **(I)** 之化合物或其藥學上可接受的鹽以及至少一種另外的抗腫瘤

物質，其中具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽、以及另外的抗腫瘤物質的量在產生抗癌作用方面是共同有效的。

【0087】 在一個實施方式中，提供了在需要這種治療的溫血動物中治療癌症之方法，該方法包括向所述溫血動物給予具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽，並且向所述溫血動物同時地、分開地或順序地給予至少一種另外的抗腫瘤物質，其中具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽、以及另外的抗腫瘤物質的量在產生抗癌作用方面是共同有效的。

【0088】 在任何實施方式中，該另外的抗腫瘤物質係紫杉烷。在一個實施方式中，紫杉烷係紫杉醇。在一個實施方式中，紫杉烷係多西他賽 (docetaxel)。

【0089】 在任何實施方式中，該另外的抗腫瘤物質係鉑療法。在一個實施方式中，該鉑療法係順鉑 (cis-platin)、奧沙利鉑 (oxaliplatin)、或卡鉑 (carboplatin)。

【0090】 在一個實施方式中，提供了包含具有式 (I) 之化合物以及至少一種另外的抗腫瘤物質的醫藥組成物。在一個實施方式中，該醫藥組成物還包含至少一種藥學上可接受的稀釋劑或載體。

【0091】 在一個實施方式中，提供了包含具有式 (I) 之化合物以及至少一種另外的抗腫瘤物質的醫藥組成物，用於在癌症的治療中使用。在一個實施方式中，該醫藥組成物還包含至少一種藥學上可接受的稀釋劑或載體。

【0092】 在一個實施方式中，該另外的抗腫瘤物質係紫杉烷。在一個實施方式中，紫杉烷係紫杉醇。在一個實施方式中，紫杉烷係多西他賽。

【0093】 在一個實施方式中，該另外的抗腫瘤物質係鉑療法。在一個實施方式中，該鉑療法係順鉑、奧沙利鉑、或卡鉑。

【0094】 在任何實施方式中，具有式 (I) 之化合物選自以下實例。在任何實施方式中，具有式 (I) 之化合物選自實例1、2、3、4、5和6。

【0095】 根據另一個實施方式，提供了一種套組，該套組包括：

a) 處於第一單位劑型的、具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽；

b) 處於另外的單位劑型的又另外的抗腫瘤物質；

c) 用於容納所述第一單位劑型和另外的單位劑型的容器裝置；以及視情況

d) 使用說明書。

【0096】 在一個實施方式中，該另外的抗腫瘤物質係紫杉烷。在一個實施方式中，紫杉烷係紫杉醇。在一個實施方式中，紫杉烷係多西他賽。

【0097】 在一個實施方式中，該另外的抗腫瘤物質係鉑療法。在一個實施方式中，該鉑療法係順鉑、奧沙利鉑、或卡鉑。

【0098】 在一個實施方式中，具有式 (I) 之化合物選自以下實例。在一個實施方式中，具有式 (I) 之化合物選自實例1、2、3、4、5和6。

【0099】 具有式 (I) 之化合物及其藥學上可接受的鹽可以作為醫藥組成物被給予，該等醫藥組成物包含一種或多種藥學上可接受的稀釋劑或載體。

【0100】 因此，在一個實施方式中，提供了包含具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽、以及至少一種藥學上可接受的稀釋劑或載體的醫藥組成物。

【0101】 在一個實施方式中，具有式 (I) 之化合物選自以下實例。在一個實施方式中，具有式 (I) 之化合物選自實例1、2、3、4、5和6。

【0102】 本發明的該等組成物可以處於適於口服使用的形式（例如作為片劑、錠劑、硬或軟膠囊，水性或油性懸浮液、乳液、可分散的粉劑或顆粒劑、糖漿或酏劑），適用於局部使用的形式（例如作為乳膏、軟膏、凝膠、或水性或油性溶液或懸浮液），適用於藉由吸入給藥的形式（例如作為精細分散粉末或液體氣霧劑），適用於藉由吹入給藥的形式（例如作為精細分散粉末）或適用於腸胃外給藥的形式（例如作為無菌水性或油性溶液，用於靜脈內、皮下、肌肉或肌內給藥），或作為栓劑用於直腸給藥。本發明的該等組成物可以藉由常規程序使用本領域眾所周知的常規藥物賦形劑獲得。因此，旨在口服使用的組成物可以含有例如一種或多種著色劑、甜味劑、調味劑和/或防腐劑。

【0103】 在一個實施方式中，提供了包含具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽、以及至少一種藥學上可接受的稀釋劑或載體之醫藥組成物，用於在療法中使用。

【0104】 在一個實施方式中，提供了包含具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽、以及至少一種藥學上可接受的稀釋劑或載體的醫藥組成物，用於在癌症的治療中使用。在一個實施方式中，所述癌症選自乳癌（例如三陰性乳癌）、肺癌（例如非小細胞肺癌）、胰腺癌和肝細胞癌。

【0105】 在任何實施方式中，具有式 (I) 之化合物選自以下實例。在任何實施方式中，具有式 (I) 之化合物選自實例1、2、3、4、5和6。

【0106】 具有式 (I) 之化合物通常以範圍為5-5000 mg/m²的動物體表面積內的單位劑量，或例如約0.1-100 mg/kg給予至溫血動物，並且這通常提供治療有效劑量。單位劑型如片劑或膠囊劑通常含有例如1-250 mg的活性成分。每日劑量將必然取決於所治療的宿主、具體的給予途徑、共給予的任何療法、以及正在治療的疾病的嚴重性而變化。因此，治療任何具體病人的執業醫生可以確定最佳劑量。

【實例】

【0107】 藉由以下實例闡明多個實施方式。本發明不被解釋為受限於該等實例。在實例的製備期間，通常：

- i. 除非另有說明，在環境溫度下在約17°C至30°C的範

圍內並且在惰性氣體的氣氛（如氮氣）下進行操作；

ii. 藉由旋轉蒸發或使用Genevac真空設備進行蒸發，並且在藉由過濾去除殘餘固體之後進行後處理程序；

iii. 在自動化Isco Combiflash Companion上（使用Grace Resolve預包裝的矽膠柱）和（反向快速）Isco Combiflash Rf（使用RediSep Gold C18柱）上進行快速層析法純化；

iv. 產率，在存在的情況下，不必是可達到的最大值；

v. 具有式 **(I)** 之終產物的結構藉由核磁共振（NMR）光譜法證實，伴隨在 δ 規模上測量的NMR化學位移值。使用Bruker advance 700(700 MHz)、Bruker Avance 500(500 MHz)、Bruker 400 (400 Mhz) 或Bruker 300 (300 Mhz) 儀器測定質子核磁共振譜；在282 MHz或376 MHz處測定 ^{19}F NMR；在75 MHz或100 MHz處測定 ^{13}C NMR；除非另外指明，在約20°C-30°C下進行測量；已使用以下縮寫：s，單峰；d，二重峰；t，三重峰；q，四重峰；m，多重峰；dd，雙二重峰；ddd，雙二重峰的雙重峰；dt，雙三重峰；bs，寬信號；

vi. 具有式 **(I)** 之終產物藉由液相層析隨後質譜（LCMS）來進行表徵，使用基於沃特斯（Waters）2790/95 LC系統（具有2996 PDA和2000 amu ZQ 單四極質譜儀）的HPLC系統。使用的溶劑係A = 水，B = 乙腈，C = 50 : 50乙腈 : 含0.1%甲酸的水和D = 50 : 50乙腈 : 含0.1%氫氧化銨的水。在1.1 mL/min的流速下，將5 μL 的樣品注入50 x 2.1 5 μm Phenomenex Gemini NX

柱中。梯度從95% A至95% B伴隨注入恒量為5%的C運行持續4.0 min (用於酸分析, D係用於鹼分析)。在回歸至起始條件之前, 將流速維持在95% B處0.5 min。在質譜儀上正離子和負離子模式兩者從150 amu至850 amu以及在PDA上220 nm-320 nm獲得數據。LCMS也在UPLC系統上進行(利用具有樣品管理器的沃特斯Acquity二元泵、Acquity PDA和SQD質譜儀)。使用的溶劑係A1 = 0.1%甲酸(水性), B1 0.1%甲酸在乙腈中, A2 = 0.1%氫氧化銨(水性)和B2 0.1%氫氧化銨在乙腈中。在1 mL/min的流速下, 將1 μ L的樣品注入50 x 2.1 1.7 μ m沃特斯BEH柱(在40°C下)中。在保持0.2 min並回歸至起始條件(將A1和B1取代為A2和B2用於鹼分析)之前, 該梯度從97% A1至97% B1經1.30 min運行。在質譜儀上在正離子和負離子模式從150 amu-1000 amu以及在PDA上在245 amu-320 amu獲得數據;

vii. 中間物總體上未經完全表徵且純度藉由薄層層析、質譜、HPLC和/或NMR分析來評估;

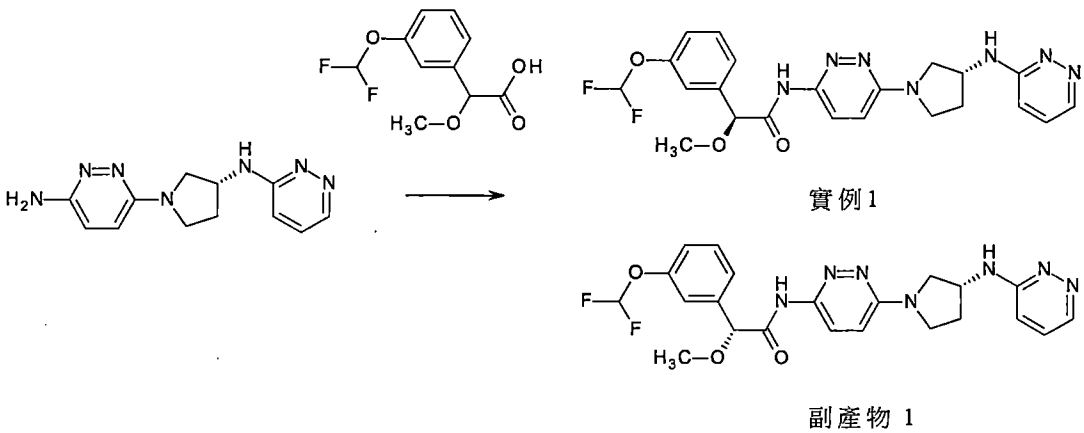
viii. 使用以下縮寫: h = 小時; r.t. = 室溫(約17°C-30°C); conc. = 濃縮的; FCC = 使用二氧化矽的快速柱層析法; DCM = 二氯甲烷; DIPEA = 二-異丙基乙胺; DMA = *N,N*-二甲基乙醯胺; DMF = *N,N*-二甲基甲醯胺; DMSO = 二甲基亞砜; Et₂O = 乙醚; EtOAc = 乙酸乙酯; EtOH = 乙醇; HATU = 1-[雙(二甲基胺基)亞甲基]-1H-1,2,3-三唑並[4,5-*b*]吡啶鎘3-氧化物六氟磷酸鹽; K₂CO₃ = 碳酸鉀; MeOH = 甲醇; MeCN = 乙腈; MgSO₄ = 無水硫酸鎂; Na₂SO₄ = 無水硫酸鈉; TFA = 三氟乙酸; THF = 四

氫呋喃；sat. = 飽和水性溶液；並且

ix. 使用 'SmiToSd' (圍繞OpenEye Lexichem toolkit (<http://www.eyesopen.com/lexichem-tk>) 建立的專有程式) 生成 IUPAC名稱。

實例 1

(2*S*)-2-[3-(二氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-*N*-[6-[(3*R*)-3-(嗒吡啶-3-基胺基)吡咯啉-1-基]嗒吡啶-3-基]乙醯胺



【0108】 將HATU(931 mg, 2.45 mmol)添加至在DMF(12 mL) 中的6-[(3*R*)-3-(嗒吡啶-3-基胺基)吡咯啉-1-基]嗒吡啶-3-胺 (中間體1, 525 mg, 2.04 mmol)、2-(3-(二氟甲氧基)苯基)-2-甲氧基乙酸 (中間體6, 521 mg, 2.24 mmol) 和DIPEA (1.066 mL, 6.12 mmol) 中。將所得溶液在0°C下攪拌5分鐘，並且然後在室溫下攪拌3 h。將該溶液用MeOH (7 mL) 稀釋並且使其穿過20 g SCX-2筒，用MeOH沖洗以去除雜質，隨後用在MeOH中的1 N氨溶液以獲得產物。將溶劑在減壓下蒸發以產生粗產物。將殘餘物藉由FCC，在DCM中0至6% MeOH的洗提梯度進行純化。將含有產物的級分蒸發至乾燥以得到呈固體的2-(3-(二氟甲氧基)苯基)-2-甲氧基

-*N*-(6-((*R*)-3-(嗒咩-3-基胺基)吡咯啉-1-基)嗒咩-3-基)乙醯胺 (490 mg, 50%)。將粗產物藉由製備型HPLC (Chiralpak IF柱, 20 μ m 二氧化矽, 50 mm直徑, 250 mm長度), 用MeOH 100%以150 mL/min洗提進行純化。將包含希望的化合物的級分蒸發至乾燥以得到:

【0109】 (2*S*)-2-[3-(二氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-*N*-[6-[(3*R*)-3-(嗒咩-3-基胺基)吡咯啉-1-基]嗒咩-3-基]乙醯胺 (實例1), 作為第一洗提的同分異構物 (169 mg, 18%)。

^1H NMR (400 MHz, DMSO, 30°C) δ 2.0 - 2.1 (1H, m), 2.29 - 2.39 (1H, m), 3.37 (3H, s), 3.39 - 3.45 (1H, m), 3.51 - 3.66 (2H, m), 3.83 (1H, dd), 4.58 - 4.67 (1H, m), 5.02 (1H, s), 6.81 (1H, dd), 6.98 (1H, d), 7.04 - 7.48 (7H, m), 7.91 (1H, d), 8.46 (1H, dd), 10.58 (1H, s); m/z : ES^+ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 472。

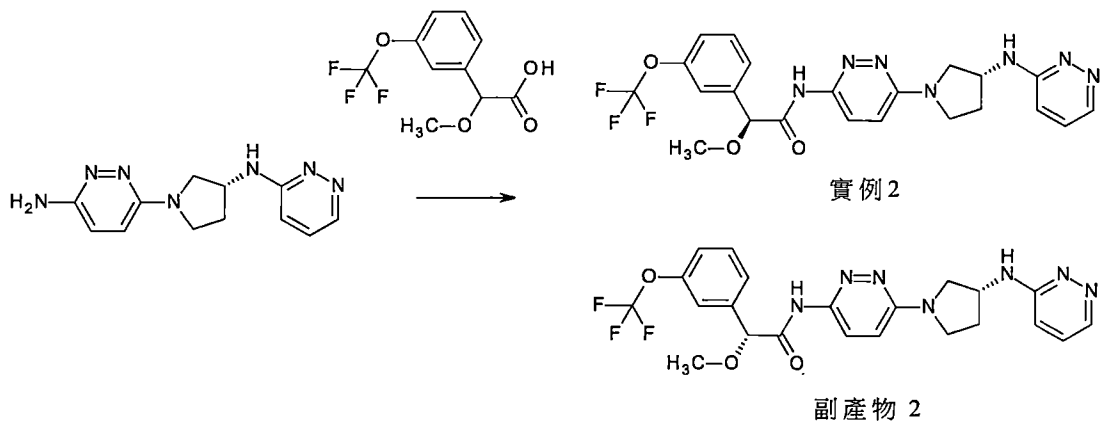
【0110】 (2*R*)-2-[3-(二氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-*N*-[6-[(3*R*)-3-(嗒咩-3-基胺基)吡咯啉-1-基]嗒咩-3-基]乙醯胺 (副產物1), 作為第二洗提的同分異構物 (178 mg, 19%)。

^1H NMR (400 MHz, DMSO, 30°C) δ 2.04 - 2.15 (1H, m), 2.32 - 2.44 (1H, m), 3.41 (3H, s), 3.46 (1H, dd), 3.55 - 3.71 (2H, m), 3.87 (1H, dd), 4.62 - 4.72 (1H, m), 5.07 (1H, s), 6.86 (1H, d), 7.02 (1H, d), 7.09 - 7.53 (7H, m), 7.95 (1H, d), 8.50 (1H, d), 10.65 (1H, s); m/z : ES^+ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 472。

實例2

(2*S*)-2-[3-(三氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-*N*-[6-[(3*R*)-3-(嗒咩-3-

基胺基)吡咯啉-1-基]嗒吡-3-基]乙醯胺



【0111】 在21°C，將HATU（355 mg，0.93 mmol）添加至在DMF（4 mL）中的2-甲氧基-2-(3-(三氟甲氧基)苯基)乙酸（中間體7，214 mg，0.86 mmol）、6-[(3*R*)-3-(嗒吡-3-基胺基)吡咯啉-1-基]嗒吡-3-胺（中間體1，200 mg，0.78 mmol）、和DIPEA（0.406 mL，2.33 mmol）中。然後將所得溶液在環境溫度下攪拌1 h。將該粗產物藉由離子交換層析（使用SCX柱）進行純化。將粗產物使用1M 氨/MeOH從柱中進行洗提並且吸附在二氧化矽上。將粗產物藉由FCC，在DCM中0至7% MeOH（具有7M氨/MeOH）的洗提梯度進行純化。將純的級分蒸發至乾燥以得到呈膠狀的非鏡像異構物的混合物（150 mg）。然後將混合物使用製備型手性HPLC（20 μ m 二氧化矽，50 mm直徑，250 mm長度），使用MeOH作為洗提液進行分離。將包含希望的化合物的級分蒸發至乾燥以得到：

【0112】 (2*R*)-2-[3-(三氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-N-[6-[(3*R*)-3-(嗒吡-3-基胺基)吡咯啉-1-基]嗒吡-3-基]乙醯胺（副產物2），作為第一洗提的同分異構物（47.0 mg，12%）。

^1H NMR (400 MHz, DMSO, 30°C) δ 2 - 2.14 (1H, m), 2.26 - 2.43

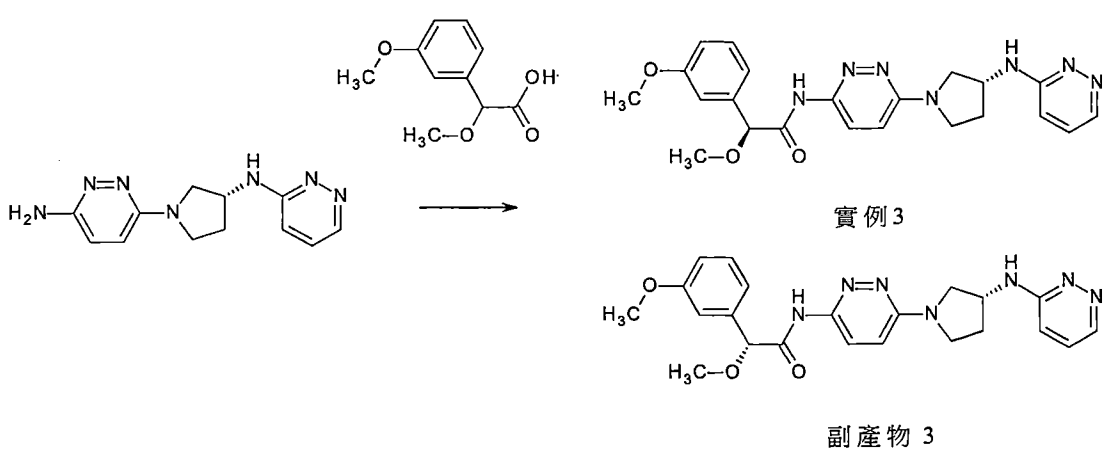
(1H, m), 3.38 (3H, s), 3.42 (1H, m), 3.51 - 3.66 (2H, m), 3.83 (1H, m), 4.53 - 4.71 (1H, m), 5.07 (1H, s), 6.81 (1H, dd), 6.97 (1H, d), 7.08 (1H, d), 7.24 (1H, dd), 7.3 - 7.4 (1H, m), 7.48 (1H, s), 7.52 - 7.59 (2H, m), 7.90 (1H, d), 8.45 (1H, dd), 10.63 (1H, s); *m/z*: ES⁺ [M+H]⁺ 490。

【0113】 (2*S*)-2-[3-(三氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-N-[6-[(3*R*)-3-(嗒咩-3-基胺基)吡咯啉-1-基]嗒咩-3-基]乙醯胺 (實例2)，作為第二洗提的同分異構物 (178 mg，19%)。

¹H NMR (400 MHz, DMSO, 30°C) δ 2 - 2.14 (1H, m), 2.26 - 2.43 (1H, m), 3.38 (3H, s), 3.42 (1H, m), 3.51 - 3.66 (2H, m), 3.83 (1H, m), 4.53 - 4.71 (1H, m), 5.07 (1H, s), 6.81 (1H, dd), 6.97 (1H, d), 7.08 (1H, d), 7.24 (1H, dd), 7.3 - 7.4 (1H, m), 7.48 (1H, s), 7.52 - 7.59 (2H, m), 7.90 (1H, d), 8.45 (1H, dd), 10.63 (1H, s); *m/z*: ES⁺ [M+H]⁺ 490。

實例3

(2*S*)-2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)-N-[6-[(3*R*)-3-(嗒咩-3-基胺基)吡咯啉-1-基]嗒咩-3-基]乙醯胺



【0114】 在21°C，將HATU（355 mg，0.93 mmol）添加至在DMF（4 mL）中的2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)乙酸（**中間體8**，168 mg，0.86 mmol）、6-[(3*R*)-3-(嗒吡啶-3-基胺基)吡咯啶-1-基]嗒吡啶-3-胺（**中間體1**，200 mg，0.78 mmol）、和DIPEA（0.406 mL，2.33 mmol）中。然後將所得溶液在環境溫度下攪拌1 h。將該粗產物藉由離子交換層析（使用SCX柱）進行純化。將所希望的產物使用1M氨/MeOH從該柱進行洗提，並且將純的級分吸附在二氧化矽上。將粗產物藉由FCC，在DCM中0至7% MeOH（具有7M氨/MeOH）的洗提梯度進行純化。將純的級分蒸發至乾燥以得到呈固體的非鏡像異構物的混合物。將粗產物藉由手性製備型HPLC（Phenomenex Lux C2柱，20 μm二氧化矽，50 mm直徑，250 mm長度），EtOH/MeOH 50/50以100 mL/min進行純化。將包含希望的化合物的級分蒸發至乾燥以得到：

【0115】 (2*S*)-2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)-*N*-[6-[(3*R*)-3-(嗒吡啶-3-基胺基)吡咯啶-1-基]嗒吡啶-3-基]乙醯胺（實例3），作為第一洗提的同分異構物（80 mg，24%）。

¹H NMR (500 MHz, DMSO, 30°C) δ 1.95 - 2.16 (1H, m), 2.21 - 2.42 (1H, m), 3.35 (3H, s), 3.42 (1H, m), 3.52 - 3.68 (2H, m), 3.76 (3H, s), 3.82 (1H, m), 4.55 - 4.7 (1H, m), 4.95 (1H, s), 6.82 (1H, d), 6.86 - 6.93 (1H, d), 6.98 (1H, d), 7.04 - 7.15 (3H, m), 7.25 (1H, dd), 7.28 - 7.32 (1H, dd), 7.91 (1H, d), 8.46 (1H, dd), 10.47 (1H, s); *m/z*: ES⁺ [M+H]⁺ 436。

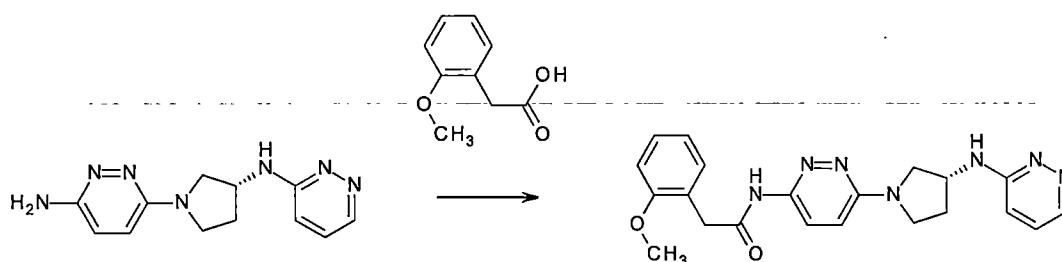
【0116】 (2*R*)-2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)-*N*-[6-[(3*R*)-3-(嗒吡

-3-基胺基)吡咯啉-1-基]嗒吡-3-基]乙醯胺 (副產物3)，作為第二洗提的同分異構物 (75 mg, 22%)。

^1H NMR (500 MHz, DMSO, 30°C) δ 1.95 - 2.16 (1H, m), 2.21 - 2.42 (1H, m), 3.35 (3H, s), 3.42 (1H, m), 3.52 - 3.68 (2H, m), 3.76 (3H, s), 3.82 (1H, m), 4.55 - 4.7 (1H, m), 4.95 (1H, s), 6.82 (1H, d), 6.86 - 6.93 (1H, d), 6.98 (1H, d), 7.04 - 7.15 (3H, m), 7.25 (1H, dd), 7.28 - 7.32 (1H, dd), 7.91 (1H, d), 8.46 (1H, dd), 10.47 (1H, s); m/z : $\text{ES}^+ [\text{M}+\text{H}]^+ 436$ 。

實例4

2-(2-甲氧基苯基)-*N*-[6-[(3*R*)-3-(嗒吡-3-基胺基)吡咯啉-1-基]嗒吡-3-基]乙醯胺

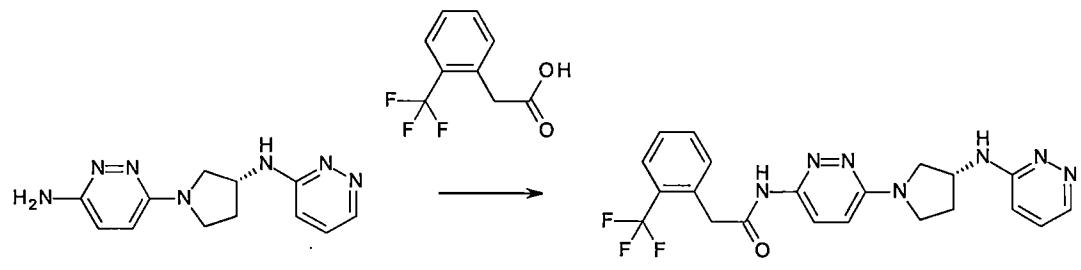


【0117】 將6-[(3*R*)-3-(嗒吡-3-基胺基)吡咯啉-1-基]嗒吡-3-胺 (中間體1, 0.03 g, 0.117 mmol) 和(2-甲氧基苯基)乙酸 (0.02 g, 0.117 mmol) 溶解於DMF (1 mL) 中。隨後，添加HATU (0.04 g, 0.117 mmol) 並且將反應攪拌5 min。然後一次性添加DIPEA (0.04 g, 0.291 mmol) 並且允許該混合物在室溫下攪拌15 h。在減壓下將溶劑去除並且將粗產物吸附在二氧化矽上，並且藉由FCC，用從100% DCM至10% MeOH 90% DCM的溶劑梯度進行純化。將級分合併並且在減壓下濃縮以得到無色膠狀物 (30 mg)。這種材料的

LCMS顯示其係不純的，因此將該固體溶解於DMSO中，並且藉由製備型HPLC（沃特斯（Waters）C18 SunFire柱，5 μm孔徑大小，4.60 mm直徑，50 mm長度），使用極性逐漸減小的水（含有0.1%的甲酸）和乙腈（含有0.1%的甲酸）的混合物作為洗提液進行純化。將含有所希望的化合物的級分蒸發至乾燥，溶解於MeOH中並且使其穿過SCX柱，用MeOH進行沖洗並且然後用在MeOH中的2M 氨對產物進行洗提。將溶劑在減壓下蒸發以得到呈奶油色固體狀的2-(2-甲氧基苯基)-N-[6-[(3R)-3-(嗒吡-3-基胺基)吡咯啉-1-基]嗒吡-3-基]乙醯胺（17 mg，47%）。¹H NMR (400 MHz, DMSO, 21.8°C) δ 2.04 - 2.12 (1H, m), 2.32 - 2.41 (1H, m), 3.44 - 3.47 (m, 1H), 3.56 - 3.68 (m, 2H), 3.73 (s, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.85 (dd, 1H), 4.62 - 4.69 (m, 1H), 6.85 (dd, 1H), 6.93 (td, 1H), 7.01 (d, 2H), 7.17 (d, 1H), 7.23 - 7.30 (m, 3H), 8.01 (d, 1H), 8.49 (dd, 1H), 10.65 (s, 1H); *m/z*: ES⁺ [M+H]⁺ 406.3。

實例5

N-[6-[(3R)-3-(嗒吡-3-基胺基)吡咯啉-1-基]嗒吡-3-基]-2-[2-(三氟甲基)苯基]乙醯胺



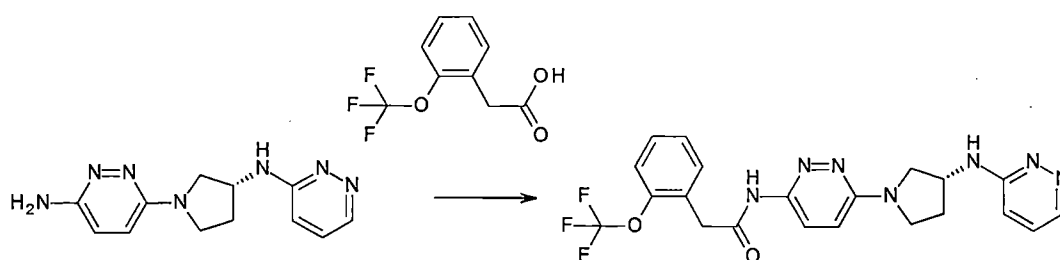
【0118】 向6-[(3R)-3-(嗒吡-3-基胺基)吡咯啉-1-基]嗒吡-3-胺（中間體1，0.041 g，0.159 mmol）、2-[2-(三氟甲基)苯基]乙酸（0.032

g, 0.159 mmol) 和 HATU (0.061 g, 0.159 mmol) 在乾 DMF (1 mL) 中的攪拌混合物中添加 DIPEA (0.052 g, 0.398 mmol) 並且將混合物在氮氣氣氛下攪拌 15 h。將溶劑藉由在減壓下蒸發去除以給出棕色膠狀物，將該棕色膠狀物溶解於 DMSO 中，並且藉由製備型 HPLC (沃特斯 C18 SunFire 柱，5 μ m 孔徑大小，4.60 mm 直徑，50 mm 長度)，使用極性逐漸減小的水 (含有 0.1% 的甲酸) 和乙腈 (含有 0.1% 的甲酸) 的混合物作為洗提液進行純化。將含有所希望的化合物的級分蒸發至乾燥以給出呈無色粉末的 *N*-[6-[(3*R*)-3-(嗒咩-3-基胺基)吡咯啶-1-基]嗒咩-3-基]-2-[2-(三氟甲基)苯基]乙醯胺 (0.065 g, 41%)。

^1H NMR (400 MHz, DMSO, 21.8°C) δ 2.07 - 2.12 (1H, m), 2.30 - 2.38 (1H, m), 3.48 - 3.51 (m, 1H), 3.55 - 3.66 (m, 2H), 3.83 (dd, 1H), 4.00 (s, 2H), 4.59 - 4.61 (m, 1H), 7.01 (d, 1H), 7.11 (d, 1H), 7.43 (br s, 1H), 7.47- 7.53 (m, 2H), 7.63 - 7.66 (m, 1H), 7.70 - 7.73 (m, 2H) 8.00 (d, 1H), 8.53 (br s, 1H), 10.95 (s, 1H); m/z : $\text{ES}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$ 444。

實例 6

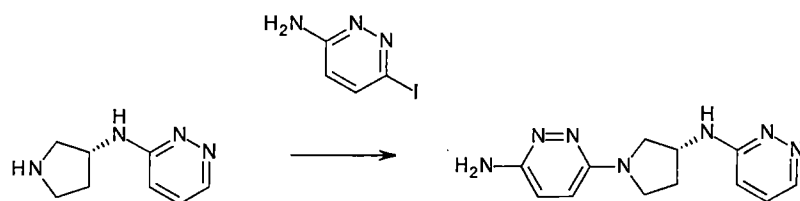
N-[6-[(3*R*)-3-(嗒咩-3-基胺基)吡咯啶-1-基]嗒咩-3-基]-2-[2-(三氟甲氧基)苯基]乙醯胺



【0119】 將2-[2-(三氟甲氧基)苯基]乙酸(0.04 g, 0.159 mmol)和6-[(3*R*)-3-(嗒吡-3-基胺基)吡咯啉-1-基]嗒吡-3-胺(中間體1, 0.04 g, 0.159 mmol)稱量到圓底燒瓶中。添加DMF (1 mL) 和HATU (0.06 g, 0.159 mmol) 並且攪拌5 min以達到溶解目的。然後一次性添加DIPEA (0.05 g, 0.398 mmol) 並且允許該混合物在室溫下攪拌15小時。在減壓下將該溶劑去除並且吸附在二氧化矽上, 並且藉由快速柱層析法進行純化, 用100% DCM高達10%甲醇胺:90% DCM的洗提梯度進行洗提, 以得到呈淺黃色固體的標題化合物(50 mg)。LCMS分析顯示有5%的羥基苯並三唑(HOBt)雜質。將該固體溶解於DMSO (1 mL) 中並且藉由質量指導的LCMS (沃特斯C18 SunFire柱, 5 μ m粒度大小, 4.60 mm直徑, 50 mm長度) 進行純化。流速係25 mL/min, 並且水和乙腈的流動相含有0.1%甲酸。以95%水 : 5%乙腈開始洗提, 其維持1.5分鐘, 然後經10分鐘加大至5%水 : 95%乙腈。然後將這維持30秒, 這樣使得運行的完整長度係12分鐘。將適當的級分添加至SCX筒中並且用甲醇洗滌, 然後將標題化合物用2M在甲醇中的氨進行洗提。將溶劑在減壓下蒸發以提供呈白色固體的*N*-[6-[(3*R*)-3-(嗒吡-3-基胺基)吡咯啉-1-基]嗒吡-3-基]-2-[2-(三氟甲氧基)苯基]乙醯胺 (0.038 g, 51%)。

^1H NMR (400 MHz, DMSO, 21.8°C) δ 2.01 - 2.08 (1H, m), 2.28 - 2.37 (1H, m), 3.42 (dd, 1H), 3.52 - 3.64 (m, 2H), 3.81 (dd, 1H), 3.85 (s, 2H), 4.60 - 4.63 (m, 1H), 6.81 (dd, 1H), 6.98 (d, 1H), 7.13 (d, 1H), 7.24 (dd, 1H), 7.32 - 7.43 (m, 3H), 7.47 - 7.49 (m, 1H) 7.95 (d, 1H), 8.45 (dd, 1H), 10.90 (s, 1H); m/z : ES^+ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 460。

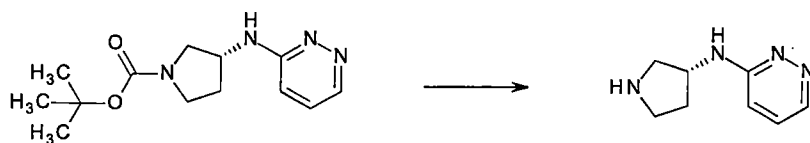
中間體1

6-[(3*R*)-3-(嗒吡-3-基胺基)吡咯啉-1-基]嗒吡-3-胺

【0120】 將(2*S*,4*R*)-4-羥基吡咯啉-2-羧酸 (0.240 g, 1.83 mmol) 添加至(*R*)-*N*-(吡咯啉-3-基)嗒吡-3-胺(中間體2, 1.5 g, 9.13 mmol) 在乾DMSO (12 mL) 中的溶液中。然後, 依次添加碘化銅(I) (0.174 g, 0.91 mmol) 隨後添加6-碘代嗒吡-3-胺(中間體3, 2.62 g, 11.88 mmol) 並且然後添加磷酸鉀 (5.82 g, 27.40 mmol)。然後將反應混合物在室溫下在氮氣下攪拌24 h。將該混合物用MeOH (12 mL) 和水 (12 mL) 進行稀釋。將該混合物用乙酸中和, 使固體沈澱, 將其收集。將液體層傾析出用於SCX步驟並且將固體用MeOH (2 x 5 mL) 洗滌, 將洗滌層與來自先前步驟的液體層合併並且使其穿過20 g SCX筒, 用MeOH沖洗, 以去除雜質隨後用在MeOH中的1N氨溶液以獲得產物。將溶劑在減壓下蒸發並且將殘餘物藉由FCC進行純化, 洗提梯度為在DCM中0至10% (在MeOH中的7N氨)。將純的級分蒸發至乾燥以得到呈膠狀的6-[(3*R*)-3-(嗒吡-3-基胺基)吡咯啉-1-基]嗒吡-3-胺 (1.220 g, 52%)。

^1H NMR (400 MHz, DMSO, 30°C) δ 1.99 (1H, m), 2.22 - 2.37 (1H, m), 3.44 (1H, m), 3.53 (1H, m), 3.73 (1H, m), 4.05 (1H, m), 4.55 - 4.66 (1H, m), 5.43 (2H, s), 6.75 (1H, d), 6.79 - 6.88 (2H, m), 7.04 (1H, d), 7.23 (1H, dd), 8.44 (1H, dd); m/z : ES+ [M+H]⁺ 258。

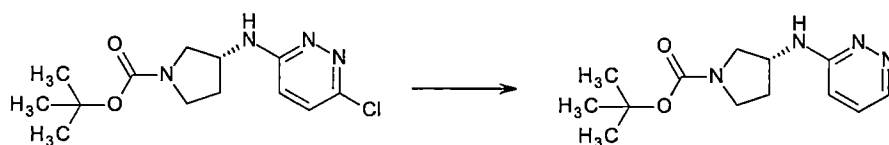
中間體2

N-[(3*R*)-吡咯啉-3-基]嗒吡-3-胺

【0121】 將TFA (12.00 mL) 添加至在DCM (80 mL) 中的三級丁基(3*R*)-3-(嗒吡-3-基胺基)吡咯啉-1-甲酸酯 (中間體3, 2.2 g, 8.32 mmol) 中, 並且將該黃色溶液在環境溫度攪拌1 h。將該粗產物藉由離子交換層析, 使用SCX柱進行純化。將所希望的產物從柱中洗提 (使用7M氨/MeOH) 並且將純的級分蒸發至乾燥以得到呈黃色膠狀的*N*-[(3*R*)-吡咯啉-3-基]嗒吡-3-胺 (1.39 g, 102%)。

^1H NMR (400 MHz, DMSO, 30°C) δ 1.57 (1H, m), 1.91 - 2.1 (1H, m), 2.61 (1H, m), 2.78 (1H, m), 2.89 (1H, m), 3.04 (1H, m), 4.14 - 4.38 (1H, m), 6.76 (2H, m), 7.20 (1H, d), 8.40 (1H, d); m/z : $\text{ES}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$ 165。

中間體3

三級丁基(3*R*)-3-(嗒吡-3-基胺基)吡咯啉-1-甲酸酯

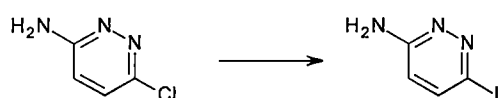
【0122】 在21°C下, 在氮氣下, 將10%鈀碳 (0.810 g, 7.61 mmol) 添加至在乙醇 (200 mL) 中的三級丁基(3*R*)-3-[(6-氯代嗒吡-3-基)胺基]吡咯啉-1-甲酸酯 (中間體5, 7 g, 15.23 mmol) 和甲酸銨 (14.40 g, 228.44 mmol) 中。將所得混合物在回流下攪拌3 h。

將反應混合物通過矽藻土過濾並且用MeOH/DCM洗滌。將粗產物藉由FCC，在DCM中0至15% MeOH的洗提梯度進行純化。將純的級分蒸發至乾燥以得到呈黃色固體的三級丁基(3*R*)-3-(嗒咩-3-基氨基)吡咯啉-1-甲酸酯 (2.230 g, 55%)。

^1H NMR (400 MHz, DMSO, 30°C) δ 1.40 (9H, s), 1.86 (1H, m), 2.16 (1H, m), 3.29 - 3.46 (3H, m), 3.60 (1H, m), 4.43 (1H, m), 6.81 (1H, dd), 7.00 (1H, d), 7.24 (1H, dd), 8.45 (1H, dd); m/z : ES^+ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 265。

中間體4

6-碘代嗒咩-3-胺。

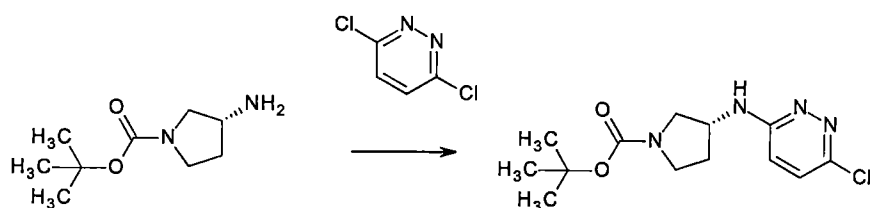


【0123】 將6-氯代嗒咩-3-胺 (3.7 g, 28.56 mmol) 填裝至100-mL圓底燒瓶 (裝備有回流冷凝器和磁性攪拌棒) 中。然後向其中添加碘化氫 (在水中的57 wt%溶液, 20 mL, 265.96 mmol), 並且將所得深棕色溶液加熱至溫和回流並且攪拌6 h。將混合物冷卻至室溫並且將粗固體過濾出, 用另外的體積的冰水 (2 x 約30 mL) 在濾餅上沖洗反應器。將所得固體在乙酸乙酯和2N水性氫氧化鈉之間進行分配, 將有機層用水性鹽水洗滌, 乾燥, 過濾並且在減壓下蒸發以產生呈固體的6-碘代嗒咩-3-胺 (4.10 g, 65%)。

^1H NMR (400 MHz, DMSO, 27°C) δ 6.52 (2H, s), 6.55 (1H, d), 7.54 (1H, d)。

中間體5

三級丁基(3*R*)-3-[(6-氯代嗒吡-3-基)胺基]吡咯啉-1-甲酸酯

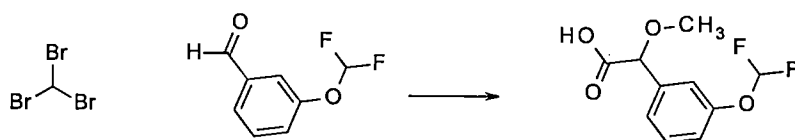


【0124】 在21°C下，在氮氣下，將DIPEA（22.44 mL，128.86 mmol）添加至在NMP（150 mL）中的3,6-二氯代嗒吡（6.40 g，42.95 mmol）、三級丁基(3*R*)-3-胺基吡咯啉-1-甲酸酯（8 g，42.95 mmol）中。將混合物在150°C下攪拌24 h。將該反應混合物用EtOAc（400 mL）稀釋，並且用水（200 mL）洗滌兩次。將有機層經Na₂SO₄乾燥，過濾並且吸附在二氧化矽上。將粗產物藉由FCC，在庚烷中的20%至70% EtOAc的洗提梯度進行純化。將純的級分蒸發至乾燥以得到呈粉色/紅色固體的三級丁基(3*R*)-3-[(6-氯代嗒吡-3-基)胺基]吡咯啉-1-甲酸酯（7.10 g，55%）。

¹H NMR (400 MHz, DMSO, 30°C) δ 1.40 (9H, s), 1.86 (1H, m), 2.15 (1H, m), 3.16 (1H, m), 3.33 - 3.49 (2H, m), 3.59 (1H, m), 4.38 (1H, m), 6.91 (1H, d), 7.31 (1H, d), 7.38 (1H, d); *m/z*: ES⁻ [M-H]⁻ 297。

中間體6

2-[3-(二氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基乙酸

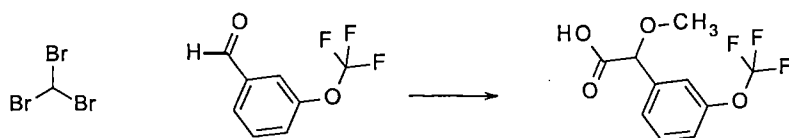


【0125】 在0°C下，將氫氧化鉀固體（5.38 g，95.86 mmol）經1 h分批添加至3-(二氟甲氧基)苯甲醛（3 g，17.43 mmol）、三溴甲烷（1.829 mL，20.91 mmol）和無水MeOH（25 mL）的攪拌溶液中。去除冷卻浴並且將該反應在環境溫度下攪拌（強放熱反應開始）。將反應攪拌過夜。將無機固體過濾出並且用MeOH洗滌。在真空中將濾液濃縮至小體積，用水（100 mL）稀釋並且用Et₂O（2 x 50 mL）洗滌兩次並且藉由緩慢添加37% HCl酸化至pH 2。將混合物用乙酸乙酯（3 x 50 mL）進行萃取。將有機層經Na₂SO₄乾燥，過濾並蒸發以提供粗產物。將粗產物藉由FCC，在庚烷（具有0.5%的甲酸）中的0%至60%乙酸乙酯的洗提梯度進行純化。將純的級分蒸發至乾燥以得到呈膠狀的2-[3-(二氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基乙酸（1.710 g，42%）。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 30°C) δ 3.33 (3H, s), 4.82 (1H, s), 7.16 (2H, dd), 7.28 (1H, d), 7.23 (1H, t), 7.42 - 7.47 (1H, m), 12.93 (1H, s); *m/z*: ES⁻ [M-H]⁻ 231.25。

中間體7

2-甲氧基-2-[3-(三氟甲氧基)苯基]乙酸



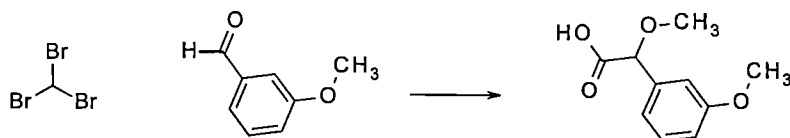
【0126】 在0°C下，將氫氧化鉀（1.851 g，33.00 mmol）在MeOH（10 mL）中的溶液經2 h以小部分添加至3-(三氟甲氧基)苯甲醛（1.141 g，6 mmol）和三溴甲烷（0.630 mL，7.20 mmol）在

MeOH (5.00 mL) 中的攪拌混合物中。然後允許混合物加溫至室溫並且攪拌過夜。在反應混合物中形成白色沈澱物。將反應靜置過夜。在減壓下將固體過濾，用 MeOH (15 mL) 沖洗。將濾液溶液蒸發至緊密的白色糊狀物然後重新溶解於水 (50 mL) 中。然後將其用 Et₂O (50 mL) 洗滌並且然後將水相酸化至 pH 2 (約 5 mL 2M HCl 溶液)，從而給出渾濁的水層。將水相萃取至乙酸乙酯 (3 x 50 mL) 中。將合併的有機物經無水硫酸鎂乾燥並且過濾，然後將溶劑在減壓下蒸發以給出澄清的油。將粗產物藉由 FCC，在庚烷中的 10% 至 50% 乙酸乙酯的洗提梯度進行純化。將純的級分蒸發至乾燥以得到呈無色油的 2-甲氧基-2-[3-(三氟甲氧基)苯基]乙酸 (0.832 g, 55%)。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 30°C) δ 3.47 (3H, s), 4.81 (1H, s), 7.2 - 7.24 (1H, m), 7.33 (1H, s), 7.37 - 7.46 (2H, m); *m/z*: ES⁻ [M-H]⁻ 249.4。

中間體 8

2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)乙酸



【0127】 在 0°C 下，將氫氧化鉀 (2.267 g, 40.40 mmol) 在 MeOH (10 mL) 中的溶液經 2 h 以小部分添加至 3-甲氧基苯甲醛 (1 g, 7.34 mmol) 和三溴甲烷 (0.771 mL, 8.81 mmol) 在 MeOH (5.00 mL) 中的攪拌混合物中。然後允許該混合物加溫至室溫並且攪拌

過夜。在減壓下將固體過濾，將該固體用MeOH（15 mL）沖洗。將濾液蒸發至緊密的白色糊狀物然後重新溶解於水（50 mL）中。然後將其用Et₂O（50 mL）洗滌並且然後將水性部分酸化至pH = 2（約5 mL 2M HCl溶液）。然後將水相用乙酸乙酯（3 x 50 mL）萃取。將合併的有機物經無水硫酸鎂乾燥並且過濾，然後將溶劑在減壓下蒸發以給出呈黃色油的2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)乙酸（1.4 g，97%），將其未經進一步純化使用。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 30°C) δ 3.18 (3H, s), 3.75 (3H, s), 4.74 (1H, s), 6.82 - 7.05 (3H, m), 7.29 (1H, m), 12.78 (1H, s)。

生物分析

【0128】 使用以下測定來測量本發明的該等化合物的效應：

a) GLS酶效力測定；b) GLS細胞效力測定；c) GLS細胞增值測定。

在測定的描述中，通常：

i. 使用以下縮寫：CO₂ = 二氧化碳；DMEM = 杜氏改良的伊格爾氏培養基（Dulbecco's Modified Eagle Medium）；DMSO = 二甲基亞砜；EDTA = 乙二胺四乙酸；EGTA = 乙二醇四乙酸；FCS = 胎牛血清；h = 小時；NBS = 非鍵合表面；SDS = 十二烷基硫酸鈉；TRIS = 三(羥甲基)胺基甲烷。

ii. 使用Genedata智慧擬合模型計算IC₅₀值。IC₅₀值係抑制50%生物學活性的測試化合物的濃度。

測定a)：GLS酶效力測定

【0129】 在體外，使用谷氨酸氧化酶/AmpLexRed耦合測定來

測量化合物結合和抑制GLS1的活性的能力。對在大腸桿菌中表現的6His標記的GLS蛋白質（胺基酸63-669）進行純化並且在-80°C下按等分進行儲存。將GLS1稀釋至2 x 工作濃度並在室溫下培養以允許四聚/二聚體形式達到穩定狀態。測定測量在緩衝液（包括50 mM TRIS pH 7.8，100 mM NaPO₄，pH 7.8，0.001% v/v吐溫（Tween）20）中進行。將純化的重組GLS1蛋白質在測定緩衝液中稀釋至12 nM並且在室溫下預溫育30分鐘。將測試化合物藉由在100% DMSO中稀釋來製備，以給出用於12點濃度響應的正確劑量範圍和分配在384微孔測定板（格雷納（Greiner）產品代碼784900）中的適當體積（2.5 nl-60 nl）（使用Labcyte Echo 555聲學分配器）。藉由用DMSO溶液反填充將DMSO濃度保持在2%。然後將3 µL的稀釋GLS1蛋白（12 nM）分配到每個孔（使用BioRapttr自動分配器（貝克曼庫爾特公司（Beckman-Coulter）））並且在室溫下培養15分鐘。然後添加稀釋於測定緩衝液中3 µL的100 mM穀胺醯胺，並且將反應在室溫下培養60分鐘。然後藉由加入45 µM 6-(2-溴乙炔基)-2,3-二甲基-喹啉-4-酮、75 µM Amplex Red、0.375單位/mL辣根過氧化物酶、0.12單位/mL穀胺酸氧化酶在pH 7.5的100 mM TRIS中停止該反應。在黑暗中在室溫下30分鐘之後，在珀金埃爾默預想（Perkin Elmer EnVision）上讀取該等板（使用535/590 nm光學過濾器）並且進行原始數據分析（使用Genedata）來產生IC₅₀值。一種假像版本的分析，其中該6His標記的GLS蛋白和穀胺醯胺用測定緩衝液替換還用來在測定組分上排除非特異性效果。

測定b)：GLS細胞效力測定

【0130】 針對化合物在抑制細胞GLS活性方面的潛力對它們進行評估，藉由使用測量細胞穀胺酸鹽損耗的PC3耦合測定。將測試化合物藉由在100% DMSO中稀釋來製備，以給出用於12點濃度響應的正確劑量範圍和分配到384孔微測定板(康寧公司(Corning)產品代碼3712)的適當體積(5 nl-120 nl)(使用Labcyte Echo 555聲學分配器)。藉由用DMSO溶液反填充將DMSO濃度保持在0.3%。PC3細胞在無苯酚DMEM、10%透析的FCS、2 mM穀胺醯胺和以下散佈藉由胰酶消化鋪板在 5.6×10^3 細胞每孔在40 μ l的生長培養基直接進入384孔測定板(含有分配化合物)上生長。在37°C下培養6 h之後，抽吸5% CO₂生長培養基並且細胞在15 μ l的緩衝液(含有10 mM TRIS pH 7.4、100 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM EGTA、1 mM NaF、20 mM Na₄P₂O₇、2 mM Na₃VO₄、1% Triton X-100、10%甘油、0.1% SDS和0.5%去氧膽酸鹽)中裂解。然後將4 μ l的細胞裂解物轉移到384孔NBS板(康寧公司產品代碼3575)並且添加35 μ l的27.5 μ M Amplex Red、0.1375 U/mL辣根過氧化物酶、0.044 U/mL穀胺酸氧化酶、100 mM TRIS pH 7.5。在黑暗中在室溫下30分鐘之後，在珀金埃爾默預想(Perkin Elmer EnVision)上讀取該等板(使用535/590 nm光學過濾器)並且進行原始數據分析(使用專有軟體)來產生IC₅₀值。

測定c)：GLS細胞增值測定

【0131】 使用384孔板NCI-H1703細胞增殖測定來測量化合物抑制細胞生長的能力。NCI-H1703細胞在不含酚紅RPMI1640、10% FCS和2 mM穀胺醯胺中生長並且在40 μ l的生長培養基中在透

明底384孔測定板（康恩公司產品代碼3712）中以750個細胞/孔的密度進行接種，並且在37°C、5% CO₂下培養24 h。將測試化合物藉由在100% DMSO中稀釋來製備，以給出用於12點濃度響應的正確劑量範圍和直接分配到測定板的適當體積（5 nl-120 nl）（包含平板的細胞）。藉由用DMSO溶液反填充將DMSO濃度保持在0.3%。在37°C、5% CO₂下，將該等板培養持續5天，添加Sytox Green和皂苷至最終濃度分別為2 μM和0.25%，並且將其在分析前培養6 h。在Acumen eX3（TTP萊伯泰科公司（TTP Labtech））上讀取板（使用488 nm激發和FITC濾光鏡套件（500 nm-530 nm）來發射。IC₅₀值藉由曲線擬合到第零天生長的最大抑制來進行計算（使用基因數據軟體分析）。

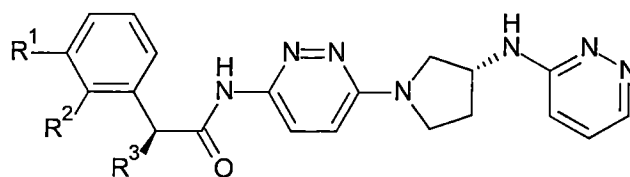
【0132】 本發明的實例在測定a）-c）中的效價顯示在表1中。結果可以是多個測試的平均值，並且不同的實例可以用多種不同的測試進行測試。結果係四捨五入至小數位的某個數字。

表1：在測定a）-c）中針對實例1-4的效價數據

實例	測定a) GLS酶效力 測定 IC ₅₀ (μM)	測定b) GLS細胞效力 測定 IC ₅₀ (μM)	測定c) GLS細胞增值測定 (μM)
1	0.0247	0.001	0.009
2	0.0957	0.001	0.011
3	0.0298	0.001	0.003
4	0.0309	0.007	0.043
5	0.0306	0.001	0.003
6	0.0252	0.001	0.012

申請專利範圍

1. 一種具有式 (I) 之化合物：



(I)

或其藥學上可接受的鹽，其中：

R¹係氫、甲氧基、二氟甲氧基或三氟甲氧基；

R²係氫、甲氧基、三氟甲氧基或三氟甲基；並且

R³係氫或甲氧基。

2. 如申請專利範圍第1項所述之具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽，其中**R¹**係甲氧基、二氟甲氧基或三氟甲氧基。
3. 如申請專利範圍第2項所述之具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽，其中**R¹**係甲氧基。
4. 如申請專利範圍第1至3項中任一項所述之具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽，其中**R²**係氫。
5. 如申請專利範圍第1至3項中任一項所述之具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽，其中**R²**係甲氧基。
6. 如申請專利範圍第1至5項中任一項所述之具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽，其中**R³**係甲氧基。
7. 如申請專利範圍第1至5項中任一項所述之具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽，其中**R³**係氫。
8. 如申請專利範圍第1項所述之具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的

鹽，其中：

R^1 係甲氧基、二氟甲氧基或三氟甲氧基；

R^2 係氫；並且

R^3 係甲氧基。

9. 如申請專利範圍第1項所述之具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽，其中：

R^1 係氫；

R^2 係甲氧基、三氟甲氧基或三氟甲基；並且

R^3 係氫。

10. 具有式 (I) 之化合物、具有式 (I) 之化合物或其藥學上可接受的鹽，其中具有式 (I) 之化合物選自：

(2*S*)-2-[3-(二氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-*N*-[6-[(3*R*)-3-(嗒吡-3-基胺基)吡咯啉-1-基]嗒吡-3-基]乙醯胺；

(2*S*)-2-[3-(三氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-*N*-[6-[(3*R*)-3-(嗒吡-3-基胺基)吡咯啉-1-基]嗒吡-3-基]乙醯胺；

(2*S*)-2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)-*N*-[6-[(3*R*)-3-(嗒吡-3-基胺基)吡咯啉-1-基]嗒吡-3-基]乙醯胺；

2-(2-甲氧基苯基)-*N*-[6-[(3*R*)-3-(嗒吡-3-基胺基)吡咯啉-1-基]嗒吡-3-基]乙醯胺；

N-[6-[(3*R*)-3-(嗒吡-3-基胺基)吡咯啉-1-基]嗒吡-3-基]-2-[2-(三氟甲基)苯基]乙醯胺；和

N-[6-[(3*R*)-3-(嗒吡-3-基胺基)吡咯啉-1-基]嗒吡-3-基]-2-[2-(三氟甲

氧基)苯基]乙醯胺。

11. 一種醫藥組成物，該醫藥組成物包含如申請專利範圍第1至10項中任一項所述之具有式 **(I)** 之化合物或其藥學上可接受的鹽、以及至少一種藥學上可接受的稀釋劑或載體。
12. 如申請專利範圍第1至10項中任一項所述之具有式 **(I)** 之化合物或其藥學上可接受的鹽，用於在療法中使用。
13. 如申請專利範圍第1至10項中任一項所述之具有式 **(I)** 之化合物或其藥學上可接受的鹽，用於在癌症的治療中使用。
14. 如申請專利範圍第1至10項中任一項所述之具有式 **(I)** 之化合物或其藥學上可接受的鹽用於生產治療癌症的藥物之用途。
15. 一種用於在需要此類治療的溫血動物中治療癌症之方法，該方法包括向所述溫血動物給予治療有效量的如申請專利範圍第1至10項中任一項所述之具有式 **(I)** 之化合物或其藥學上可接受的鹽。