



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105985321 B

(45)授权公告日 2018.10.26

(21)申请号 201510072260.4

A61K 31/502(2006.01)

(22)申请日 2015.02.11

A61P 35/00(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105985321 A

(56)对比文件

CN 101657430 A, 2010.02.24, 说明书第5页第8段, 第6页第1段, 第21页第4段, 第22页第4-5段, 第52页实施例54a, 第119页表格, .

(43)申请公布日 2016.10.05

(73)专利权人 复旦大学

地址 200433 上海市杨浦区邯郸路220号

CN 102459233 A, 2012.05.16, 权利要求1.

CN 102066353 A, 2011.05.18, 权利要求1-

(72)发明人 赵伟利 董肖椿 陆秀宏 谭文福

杨君 鲍小龙 王娟 彭元求

刘原

12.

CN 102202737 A, 2011.09.28, 权利要求1-

15.

WO 2014191736 A1, 2014.12.04, 权利要求

1-30.

(74)专利代理机构 上海元一成知识产权代理事务  
所(普通合伙) 31268

代理人 吴桂琴

审查员 郝小燕

(51) Int. Cl.

C07D 401/14(2006.01)

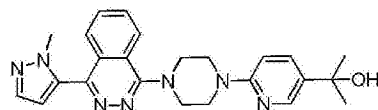
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

吡唑啉酮化合物及其制备方法和用途

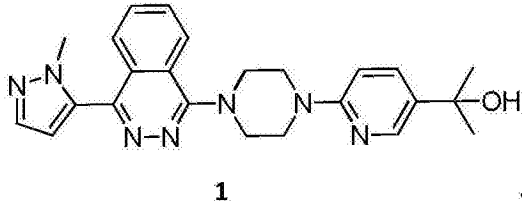
(57)摘要

本发明属药物合成领域,涉及式1的吡唑啉酮化合物,尤其涉及一种含哌嗪的吡唑啉酮化合物,及其制备方法和在医学上的应用。本发明的化合物通过体外Hedgehog信号通路中的靶基因Gli抑制活性测试,结果显示,所述的化合物具有良好的Hedgehog信号通路抑制活性,可进一步Hedgehog信号通路抑制剂和制备抗肿瘤药物。



i

1. 吡唑啉酮化合物, 其特征在于, 所述的化合物为含哌嗪的吡唑啉酮化合物及其可药用盐, 为具有下述结构的化合物1及其可药用盐,



2. 权利要求1的吡唑啉酮化合物在制备Hedgehog信号通路抑制剂中的用途。
3. 权利要求1的吡唑啉酮化合物在制备治疗恶性肿瘤药物中的用途。
4. 按权利要求3的用途, 其特征在于, 所述的恶性肿瘤是Hedgehog信号通路异常激活所致的相关肿瘤, 包括髓母细胞瘤、乳腺癌、前列腺癌、肺癌、结肠癌、膀胱癌、卵巢癌、皮肤癌。
5. 包含治疗有效量的权利要求1所述的化合物及其药用盐的药物组合物。

## 吡唑啉酮化合物及其制备方法和用途

### 技术领域

[0001] 本发明属药物合成领域,涉及新型吡唑啉酮化合物,制备方法和应用。具体涉及一种含哌嗪的吡唑啉酮化合物,及其制备方法和在医学上的应用。

### 背景技术

[0002] 据报道,恶性肿瘤已成为严重危害人民生命健康的常见病。据不完全统计,全世界每年约有2000万的新发病例;我国每年的新发病例约为160-200万,死亡130万。研究显示,由于肿瘤早期具有转移的能力,临床诊断的原发肿瘤中约50%的患者已产生远位转移,肿瘤细胞增长快、易变异,从而产生多药耐药,导致化疗失败,据有关统计,其中90%以上与肿瘤细胞的多药耐药相关,目前临床上应用的抗肿瘤药物远不能满足治疗的要求。

[0003] 分子靶向抗肿瘤药物的研究是当前抗肿瘤药物研究领域的主要潮流和趋势。近年来,靶向Hedgehog (Hh) 信号通路的抗肿瘤药物成为该领域新的研究热点。研究显示了Hedgehog (Hh) 信号通路在肿瘤的发生发展中发挥着重要的作用,与人类约1/3的肿瘤有着密切的联系。异常激活Hh信号传导,将导致髓母细胞瘤、乳腺癌、前列腺癌、肺癌、结肠癌、膀胱癌、卵巢癌等多种肿瘤的发生。Hedgehog是在研究果蝇的发育过程中发现的一种分节性基因,Hh信号主要是通过跨膜蛋白Ptch和Smo介导向胞内传递。无Hh信号时,Ptch与Smo结合,抑制Smo的作用,导致其下游转录因子Gli转录活性的抑制。当有Hh信号时,Hh与Ptch结合,解除Ptch对Smo的抑制作用,恢复活性的Smo通过级次信号转递,激活Gli转录活性,启动Hh靶基因的转录和表达。

[0004] 目前在靶向Hh信号通路的抗肿瘤药物研究中,已有多个药物上市或进入临床研究,如美国Genentech公司的Vismodegic (GDC-0449) 于2012年已被FDA批准上市,用于皮肤癌的治疗。另外,Erismodegic (LDE225,瑞士Novartis公司)、LEQ-506 (瑞士Novartis公司) 和LY-2940680 (美国Lilly公司) 等正在进行临床II期及III期,临床研究显示对皮肤癌、脑癌、髓母细胞瘤和其他实体瘤疗效显著。

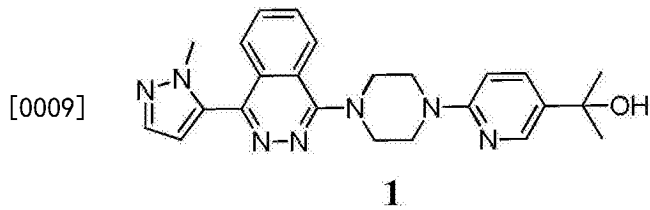
[0005] 更为有意义的是,有研究显示,Hedgehog信号通路抑制剂在治疗对酪氨酸激酶抑制剂伊马替尼产生耐药的肺非小细胞肺癌 (CML) 患者过程中,不仅能减少CML细胞的数量,还能减少耐伊马替尼CML细胞的生长,针对目前已有抗肿瘤药物耐药性的问题是肿瘤临床治疗面临的重要难题,本申请的发明人拟提供具有我国自主知识产权的靶向Hh信号通路的抗肿瘤药物,其对改善我国肿瘤患者的经济负担,提高肿瘤临床治疗效果,具有重要的意义。

### 发明内容:

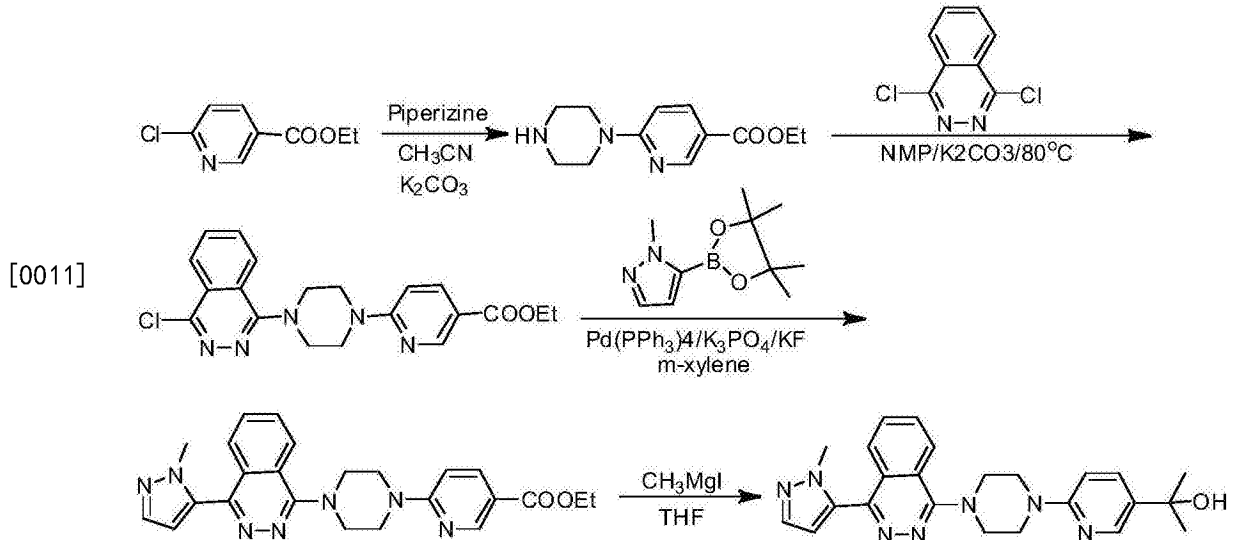
[0006] 本发明的目的是提供具有良好Hedgehog信号通路抑制作用的新型吡唑啉酮化合物及其可药用盐,具体涉及一种含哌嗪的吡唑啉酮化合物及其可药用盐。

[0007] 本发明的另一目的是提供上述含哌嗪的吡唑啉酮化合物的制备方法。

[0008] 本发明的吡唑啉酮化合物具有下述式1的结构:



[0010] 本发明的化合物1的制备过程如下：



[0012] 本发明所述的化合物通过体外Hedgehog信号通路抑制活性测试，结果了所述的化合物具有良好的Hedgehog信号通路抑制活性，可进一步研制开发用于诊断和治疗与Hedgehog通路有关的病变，包括但不限于肿瘤形成、癌症、瘤形成和非恶性过度增殖性疾病的药物。

[0013] 本发明对体外Hedgehog信号通路抑制活性测试结果显示，所述的化合物1显示出较好的Hedgehog信号通路抑制活性，对于Hh信号通路中的靶基因Gli抑制活性IC<sub>50</sub>值小于2nM；所述的化合物可进一步制备Hedgehog信号通路抑制剂。

[0014] 本发明中，所采用的药效学试验方法，是本领域技术人员所熟知的方法；

[0015] 本发明中，所采用的NIH3T3细胞、双荧光素酶报告检测试剂盒、Ptch<sup>+</sup>/<sup>-</sup>P53<sup>-</sup>/<sup>-</sup>小鼠和BrdU Cell Proliferation Kit试剂盒是本领域技术人员可通过市购的途径所获得的。

[0016] 本发明的吡唑啉酮化合物及其药用盐可制备治疗肿瘤的药物组合物，其中包含治疗有效量的所述的化合物及其药用盐。

[0017] 本发明的吡唑啉酮化合物尤其可制备Hedgehog信号通路抑制剂和抗恶性肿瘤药物。鉴于异常激活Hh信号传导，将导致髓母细胞瘤、乳腺癌、前列腺癌、肺癌、结肠癌、膀胱癌、卵巢癌等多种肿瘤的发生，本发明所述的Hedgehog信号通路异常激活所致的相关肿瘤包括，髓母细胞瘤、乳腺癌、前列腺癌、肺癌、结肠癌、膀胱癌、卵巢癌、皮肤癌。

## 附图说明

[0018] 图1是本发明化合物对ptch<sup>+</sup>/<sup>-</sup>p53<sup>-</sup>/<sup>-</sup>小鼠髓母细胞瘤移植瘤模型体内抗肿瘤活性结果。

**具体实施方式：**

[0019] 实施例1:制备化合物1,2-(6-(4-(4-苄基酞嗪-1-基)-3-氮杂环丁醇-基)-吡啶-3-基)-丙-2-醇

[0020] 1) 合成6-哌嗪烟酸乙酯

[0021] 在乙腈(100ml)中加入6-氯烟酸乙酯(12g,0.06mol)和哌嗪(8.35g,0.10mol)。加入碳酸钾(17.87g,0.13mol)。氮气保护下,100℃回流,过夜反应。TLC(DCM:MeOH=20:1)监测反应完全,抽滤,滤除碳酸钾,蒸干滤液。加入乙酸乙酯、水分液,少量水洗两次,取有机层。加入无水硫酸钠,静置。滤液旋干,即得产品11.63g(乳白色固体),无须纯化直接用于下一步反应。粗品产率:86.6%。HPLC-MS(ESI<sup>+</sup>):[M+H]<sup>+</sup>:236.1。

[0022] 2) 合成6-(4-(4-氯酞嗪-1-基)哌嗪-1-基)烟酸乙酯

[0023] 在NMP(10ml)中加入1,4-二氯酞嗪(1.5g,7.6mmol,1.2equiv)、6-哌嗪烟酸乙酯(1.5g,6.4mmol,1.0equiv)。碳酸钾(1.8g,12.8mmol,2.0equiv)氮气保护下,80℃下搅拌12h。TLC(PE:EA=1:1)监测反应完全,反应液倾至水(50ml)中,加入乙酸乙酯(50ml),分液,水层EA(50ml×3)萃取,合并有机层,饱和氯化钠(50ml×3)洗NMP,无水硫酸钠干燥,减压蒸去溶剂,柱层析纯化(PE:EA=2:1~1:1),EA重结晶,得6-(4-(4-氯酞嗪-1-基)哌嗪-1-基)烟酸乙酯1.8g(淡黄色固体),产率:59.5%。<sup>1</sup>H-NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>)δ(ppm):8.84(d,J=2.3Hz,1H),8.31-8.22(m,1H),8.17-8.03(m,2H),8.00-7.88(m,2H),6.69(d,J=9.0Hz,1H),4.34(q,J=7.1Hz,2H),3.96-3.94(m,4H),3.66=3.63(m,4H),1.37(t,J=7.1Hz,3H)。HPLC-MS(ESI<sup>+</sup>):[M+H]<sup>+</sup>:398.0,400.0。

[0024] 3) 合成6-(4-(4-(1-甲基吡唑-6-基)酞嗪-1-基)哌嗪-1-基)烟酸乙酯

[0025] 在20ml微波管中依次加入化合物6-(4-(4-氯酞嗪-1-基)哌嗪-1-基)烟酸乙酯(600mg,1.5mmol)、1-甲基-5-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼烷-2-基)-1H-吡唑(628mg,3.0mmol)、K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/3H<sub>2</sub>O(804mg,3.0mmol),KF(175mg,3.0mmol),二甲苯(10ml),氩气流吹3分钟,加入Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(105mg,0.15mmol),氩气流吹3分钟,密闭。微波下(biotage microwave reactor,120℃,High absorption)辐射3h,TLC(PE:EA=1:1)监测反应完全,将反应液倾至水(50ml)中,加入乙酸乙酯(50ml),分液,水层EA(20ml×2)萃取,合并有机层,饱和氯化钠(50ml×3)洗涤,无水硫酸钠干燥,旋干溶剂,得粗品500mg,柱层析纯化(PE:EA=1:1~1:2)洗脱,得6-(4-(4-(1-甲基吡唑-6-基)酞嗪-1-基)哌嗪-1-基)烟酸乙酯400mg(白色固体)产率:60.1%。HPLC-MS(ESI<sup>+</sup>):[M+H]<sup>+</sup>:444.3。

[0026] 4) 合成2-(6-(4-(4-(1-甲基吡唑-6-基)酞嗪-1-基)哌嗪-1-基)-吡啶-3-基)-丙-2-醇

[0027] THF(50ml)中加入6-(4-(4-(1-甲基吡唑-6-基)酞嗪-1-基)哌嗪-1-基)烟酸乙酯(200mg,0.45mmol),恒压滴液漏斗装置密闭体系,氩气保护下转移碘甲烷格式试剂(CH<sub>3</sub>MgI,1.4mmol/ml,1M)至恒压滴液漏斗,冰浴下滴入格氏试剂,滴加完后,常温反应5h。TLC(EA)监测反应完全,加入饱和氯化铵溶液30ml,EA(20ml×2)萃取,旋干,得粗品220mg,制备薄层层析纯化,EA展开3次,得2-(6-(4-(4-(1-甲基吡唑-6-基)酞嗪-1-基)哌嗪-1-基)-吡啶-3-基)-丙-2-醇72mg(淡黄色固体)产率:16.6%。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,CDCl<sub>3</sub>)δ(ppm):8.35(d,J=2.4Hz,1H),8.18(d,J=8.0Hz,1H),8.07(d,J=7.7Hz,1H),7.91-7.83(m,2H),

7.71 (dd, J=8.8, 2.5Hz, 1H), 7.65 (d, J=1.9Hz, 1H), 6.75 (d, J=8.8Hz, 1H), 6.59 (d, J=1.9Hz, 1H), 4.05 (s, 3H), 3.83 (d, J=6.4, 4H), 3.74 (d, J=6.3, 4H), 1.58 (s, 6H). HPLC-MS (ESI<sup>+</sup>): [M+H]<sup>+</sup>: 430.2.

[0028] 实施例2: 体外Hedgehog信号通路抑制活性测试试验

[0029] 转录因子Gli的双荧光素酶报告基因实验: NIH3T3细胞接种至48孔板, 24h后以lipo2000转染试剂转染Gli-firefly luciferase reporter和TK-Renilla luciferase reporter载体至NIH3T3细胞。转染36h后, 将鼠源重组的SHH及待测药物加至48孔板(每组设3复孔; n=3)。常规培养36h后, 细胞用PBS洗1次, 以双荧光素酶报告检测试剂盒(Promega公司)测定Gli-luciferase活性, 作为判断Hh通路活性指标;

[0030] 结果表明(如表1所示), 本发明的化合物1显示出较好的Hedgehog信号通路抑制活性, 对于Hh信号通路中的靶基因Gli抑制活性IC<sub>50</sub>值小于2nM; 本发明的化合物可以进一步研制开发Hedgehog信号通路抑制剂, 作为新型抗肿瘤药物。

[0031] 表1 是本发明化合物的Hedgehog信号通路的体外抑制活性结果。

[0032] 表1

[0033]

化合物	Hh 信号通路中的靶基因 Gli 抑制活性 IC <sub>50</sub> (nM; mean±SD)
1	1.2 ± 0.1

[0034] 实施例3: 对髓母细胞瘤的体外抗肿瘤活性测试试验

[0035] 从Ptch<sup>+</sup>/<sup>-</sup>P53<sup>-</sup>/<sup>-</sup>小鼠分离髓母细胞瘤, 机械剪碎, 0.25%胶原酶(collagenase I)消化后获得的髓母细胞瘤细胞培养于添加B-27supplement (Invitrogen), EGF 20ng/ml (Invitrogen), bFGF 20ng/ml (Invitrogen), nonessential amino acids (Invitrogen), N-acetyl cysteine 60mg/ml, 和Glutamax (Invitrogen)的Neurobasal A培养基(Invitrogen);

[0036] 髓母细胞瘤细胞接种于96空培养板, 加各种浓度的化合物1作用36h。Brdu实验采用Merck Millipore的Brdu Cell Proliferation Kit试剂盒, 按照试剂盒说明进行;

[0037] 结果表明(如表2所示), 本发明的化合物1显示出较好的对ptch<sup>+</sup>/<sup>-</sup>p53<sup>-</sup>/<sup>-</sup>小鼠髓母细胞瘤体外抑制活性, 其IC<sub>50</sub>值为40.4nM; 本发明的化合物可以进一步研制开发Hedgehog信号通路抑制剂, 作为新型抗肿瘤药物。

[0038] 表2是本发明化合物对ptch<sup>+</sup>/<sup>-</sup>p53<sup>-</sup>/<sup>-</sup>小鼠髓母细胞瘤的体外抑制活性结果。

[0039] 表2

[0040]

化合物	对 ptch <sup>+</sup> / <sup>-</sup> p53 <sup>-</sup> / <sup>-</sup> 小鼠髓母细胞瘤体外抑制活性 IC <sub>50</sub> (nM; mean±SD)
1	40.4±8.2

[0041] 实施例4: 体内抗肿瘤活性测试实验

[0042] 取生长良好的Ptch<sup>+</sup>/<sup>-</sup>P53<sup>-</sup>/<sup>-</sup>小鼠, 待髓母细胞瘤长到合适大小, 取出, 剪切成1.5mm左右, 在无菌条件下, 接种于5周龄雌性裸鼠(华阜康)的左侧腋窝皮下, 待移植瘤体积长至110mm<sup>3</sup>左右, 剔除移植瘤过大、过小以及未见生长的裸小鼠, 随机分组给药, 实验组灌胃给药(12.5、25、50mg/kg, 一天两次, 灌胃给药), 阴性对照组同时给等量的溶媒0.5%CMC-

Na;

[0043] 肿瘤体积 (tumor volume, TV) 的计算公式为:  $TV = 1/2 \times \text{长} \times \text{宽} \times \text{宽}$ , 根据测量的结果计算相对瘤体积 (relative tumor volume, RTV), 计算公式为:  $RTV = V_t / V_0$  其中  $V_0$  为分笼给药时测量所得的肿瘤体积,  $V_t$  为每一次测量时的肿瘤体积;

[0044] 结果表明 (如图1所示), 本发明的化合物1显示出较好的对髓母细胞瘤的体内抑制活性, 在  $12.5\text{mg/kg (bid, ig)}$ 、 $25\text{mg/kg (bid, ig)}$ 、 $50\text{mg/kg (bid, ig)}$  三个不同剂量下均显示很强的体内抗肿瘤活性; 本发明的化合物可以进一步研制开发Hedgehog信号通路抑制剂, 作为新型抗肿瘤药物。

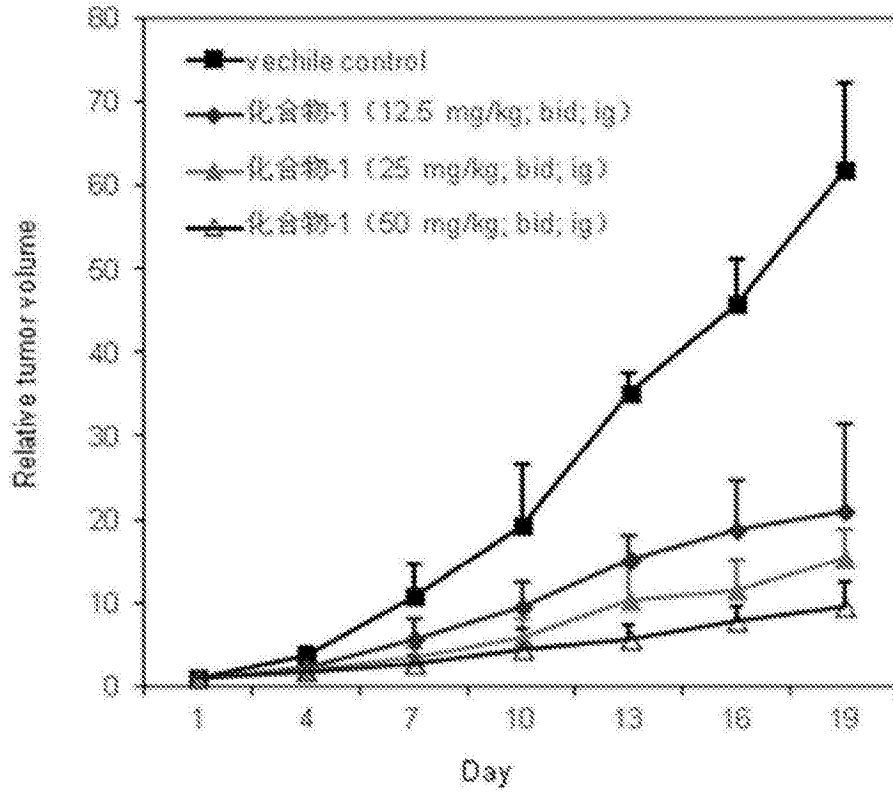


图1