



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 112585136 B

(45) 授权公告日 2024. 06. 25

(21) 申请号 201980054231.1

T · D · 史密斯 R · 恩塔甘达

(22) 申请日 2019.08.12

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

(65) 同一申请的已公布的文献号

专利代理师 陈润杰 黄革生

申请公布号 CN 112585136 A

(43) 申请公布日 2021.03.30

(51) Int.Cl.

(30) 优先权数据

C07D 417/12 (2006.01)

62/765,138 2018.08.17 US

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/4439 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2021.02.07

Julien P. N. Papillon等.Discovery of Orally Active Inhibitors of Brahma Homolog (BRM)/ SMARCA2 ATPase Activity for the Treatment of Brahma Related Gene 1 (BRG1)/SMARCA4-Mutant Cancers. J. Med. Chem..2018,第61卷10155-10172.

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2019/056847 2019.08.12

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/035779 EN 2020.02.20

(73) 专利权人 诺华股份有限公司

审查员 杨杰

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 C · 阿代尔 J · 巴比隆 中岛胜正

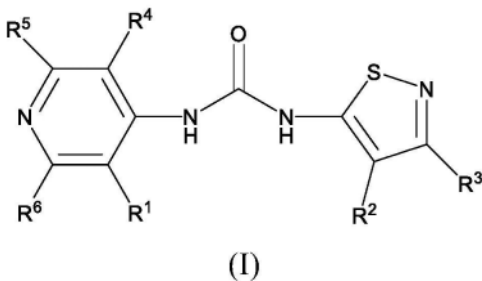
权利要求书3页 说明书40页
序列表22页

(54) 发明名称

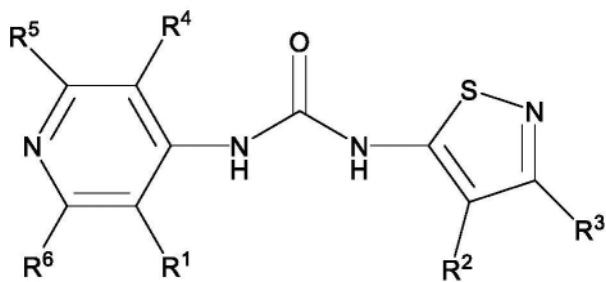
作为SMARCA2/BRM ATP酶抑制剂的脲化合物和组合物

(57) 摘要

提供了已表明可用于治疗BRM介导的和/或BRG1介导的疾病或障碍的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐:式(I),其中R¹至R⁶如本文所定义。



1. 一种具有式I的化合物或其药学上可接受的盐：



其中：

R¹选自氢、氨基和羟基取代的C₁₋₂烷基；

R²是氢；

R³选自C₁₋₂烷基和卤代取代的C₁₋₂烷基；

R⁴是氢；

R⁵选自氢和卤代；并且

R⁶选自氢和卤代。

2. 如权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐，其中：

R¹选自氢、氨基和羟基-甲基；

R²是氢；

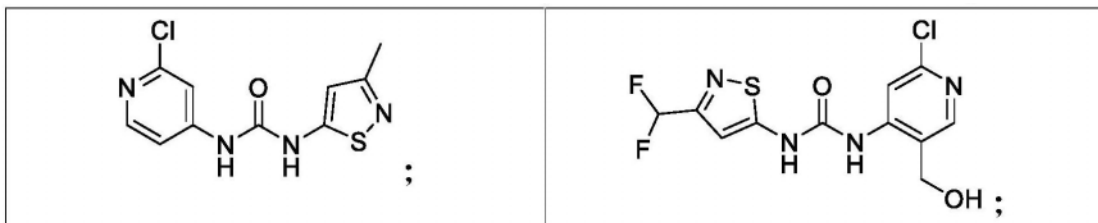
R³选自甲基、二氟甲基和三氟甲基；

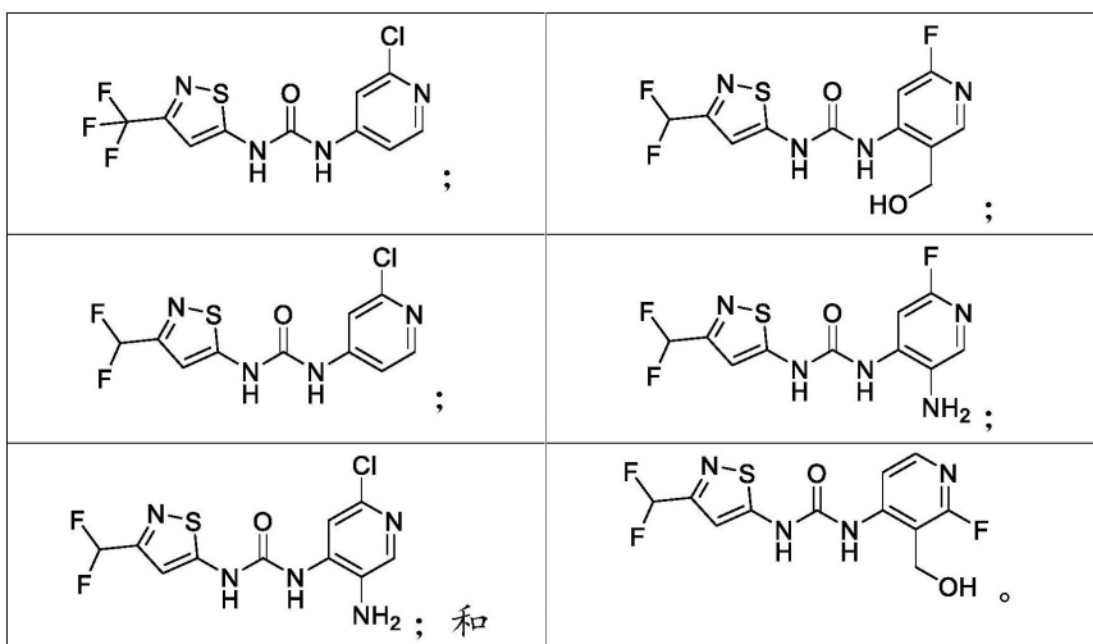
R⁴是氢；

R⁵选自氢、氯和氟；并且

R⁶选自氢和氟。

3. 如权利要求2所述的化合物或其药学上可接受的盐，选自：





4. 化合物,其具有以下结构:



5. 一种药物组合物,其包含治疗有效量的如权利要求1至4任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、以及一种或多种药学上可接受的载体。

6. 一种药物组合,其包含治疗有效量的如权利要求1至4任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、以及一种或多种治疗活性剂。

7. 如权利要求6所述的药物组合,其中所述一种或多种治疗活性剂独立地选自抗癌剂、抗过敏剂、止吐药、止痛药、免疫调节剂和细胞保护剂。

8. 如权利要求1至4任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于治疗BRM介导的和/或BRG1介导的障碍或疾病的药物中的用途。

9. 如权利要求8所述的用途,其中所述BRM介导的和/或BRG1介导的障碍或疾病是以BRG1缺陷和/或BRM缺陷为特征的恶性肿瘤。

10. 如权利要求9所述的用途,其中所述BRM介导的和/或BRG1介导的障碍或疾病是以BRG1突变和/或BRM突变为特征的恶性肿瘤。

11. 如权利要求10所述的用途,其中所述BRM介导的和/或BRG1介导的障碍或疾病是实体瘤、白血病或淋巴瘤。

12. 如权利要求11所述的用途,其中所述BRM介导的和/或BRG1介导的障碍或疾病选自肺癌、皮肤黑色素瘤、促纤维增生性黑色素瘤、葡萄膜黑色素瘤、卵巢小细胞癌、皮肤鳞状细胞癌、神经胶质瘤、子宫体子宫内膜癌、卵巢浆液性囊腺癌、膀胱尿路上皮癌、原发性中枢神经系统淋巴瘤、食道癌、膀胱癌、胃腺癌、腺样囊性癌、胰腺癌、结直肠腺癌、胆管癌、肉瘤、头颈癌、宫颈癌和宫颈管癌、髓母细胞瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、肝细胞癌、肾乳头状细胞癌、乳腺

癌、套细胞淋巴瘤、胆囊癌、睾丸生殖细胞癌、肾细胞透明细胞癌、前列腺癌、胸腺瘤、肾嫌色细胞癌、肾非透明细胞癌、嗜铬细胞瘤和副神经节瘤、甲状腺癌、恶性周围神经鞘瘤、头颈鳞状细胞癌、肾上腺皮质癌、成胶质细胞瘤、成神经细胞瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、急性髓样白血病、慢性淋巴细胞性白血病、多发性骨髓瘤、恶性横纹肌样瘤、家族性神经鞘瘤病、肾髓质癌和脑膜瘤。

13. 如权利要求12所述的用途, 其中所述BRM介导的和/或BRG1介导的障碍或疾病选自非小细胞肺癌、肺腺癌、大细胞肺癌、肺鳞状细胞癌、小细胞肺癌、卵巢横纹肌样瘤、子宫癌肉瘤、膀胱癌浆细胞样变体、淋巴样肿瘤弥漫性大B细胞淋巴瘤、尤因肉瘤、神经内分泌前列腺癌、上皮样肉瘤、多形性成胶质细胞瘤和滑膜肉瘤。

作为SMARCA2/BRM ATP酶抑制剂的脲化合物和组合物

[0001] 序列表

[0002] 本申请含有已经以ASCII格式电子递交的序列表,并且将该序列表通过引用以其整体特此并入。所述ASCII副本创建于2016年11月30日,名称PAT 057524-US-PSP_SL.txt,大小为31,078字节。

技术领域

[0003] 本披露涉及化合物、包含此类化合物的组合物、及其用于治疗BRM介导的和/或BRG1介导的障碍或疾病(包括BRG1/SMARCA4突变型癌症)的用途。

背景技术

[0004] 哺乳动物SWI/SNF (mSWI/SNF) 多蛋白复合物通过ATP依赖性核小体重塑来调节染色质结构,从而控制许多关键的细胞过程。mSWI/SNF复合物的几个亚基起着肿瘤抑制因子的作用,并且最近的基因组研究揭示了这些亚基中的一些频发突变,其在所有癌症中的总体突变频率为大约20%。催化SWI/SNF亚基BRG1(也称为SMARCA4)在肺腺癌和其他癌症类型中频发突变。

[0005] BRM(也称为SMARCA2)是BRG1(或BRM/SWI2相关基因1,也称为SMARCA4)的旁系同源物,并且这两种蛋白质在哺乳动物SWI/SNF染色质重塑复合物中起着相互排斥的ATP依赖性亚基的作用。细胞需要BRM或BRG1来组装具有催化活性的SWI/SNF复合物。SWI/SNF复合物的多个变体已被表征为具有不同的亚基组成,但每个复合物中仅存在一个催化亚基(BRM或BRG1)。

[0006] 已表明BRG1起着肿瘤抑制因子的作用,并在人类癌症中高频突变。通过野生型BRG1在BRG1突变型细胞系中的重新表达,已证实BRG1具有肿瘤抑制功能,这导致分化和细胞周期停滞。Brg1^{+/-}小鼠在一年内患乳腺癌的发生率为10%。在约30%的已建立的非小细胞肺癌细胞系中已鉴定出BRG1的功能丧失性突变,并且在许多其他癌细胞系和肿瘤样品(包括肺癌、胰腺癌和卵巢癌、黑色素瘤、以及小儿横纹肌样肉瘤)中发现了BRG1沉默。重要的是,癌症基因组图谱(TCGA)项目的最新结果鉴定出BRG1突变是肺腺癌患者肿瘤样品中的显著突变基因,发生在所有肿瘤样品中的约10%(与其他特征明确的癌基因和肿瘤抑制因子(如EGFR和LKB1)的发生率相似)中。TCGA项目同样已鉴定了包括肺癌在内的各种癌症中的BRM突变和缺失。

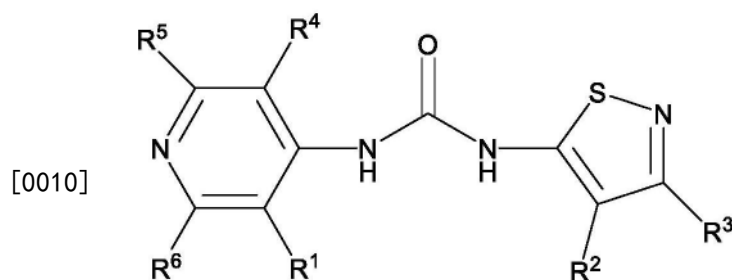
[0007] 对SWI/SNF突变型癌症的治疗性靶向的见解来自如下研究,该研究表明残余的SWI/SNF复合物在具有SWI/SNF突变的癌症的存活率方面发挥作用。特别地,发现在复合物的两个ATP酶BRM和BRG1之间存在一种合成致死关系,由此失去一种导致对另一种的依赖性。例如,证明了BRM耗竭可诱导BRG1突变型癌细胞中的生长抑制。此外,其他研究已表明,SNF5缺陷型肿瘤细胞(SNF5是SWI/SNF复合物的亚基)依赖于BRG1。最后,据报道,某些缺乏SWI/SNF突变的癌症对例如急性髓样白血病(AML)中的BRG1抑制也很敏感。因此,抑制某些SWI/SNF亚基(包括BRG1和BRM)为开发新型治疗剂提供了机会,以治疗包括癌症在内的人类

疾病。

发明内容

[0008] 仍然需要针对BRM介导的和/或BRG1介导的障碍或疾病的新治疗和疗法。本披露提供了化合物、其药学上可接受的盐、其药物组合物及其组合,这些化合物是BRM和/或BRG1抑制剂。本披露进一步提供了治疗BRM介导的和/或BRG1介导的障碍或疾病的方法,该方法包括向有需要的受试者施用有效量的BRM和/或BRG1抑制剂(例如,本披露的化合物)。

[0009] 本披露的一个方面提供了具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐,其中 R^1 - R^6 如本文所定义。



式 (I)

[0011] 本披露的另一个方面提供了药物组合物,其包含治疗有效量的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、以及一种或多种药学上可接受的载体。

[0012] 在本披露的又另一个方面,提供了药物组合,其包含治疗有效量的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、以及一种或多种治疗活性剂。

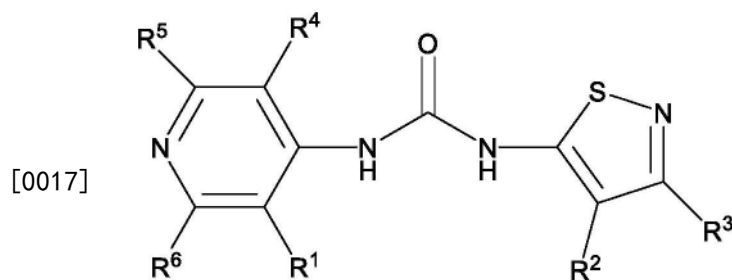
[0013] 在本披露的又另一个方面,提供了用于治疗BRM介导的和/或BRG1介导的障碍或疾病的方法,该方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐。

[0014] 在本披露的又另一个方面,提供了用于制备具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐的方法。

具体实施方式

[0015] 本文描述了本披露的各种(列举的)实施例。将认识到的是,每个实施例中指定的特征可以与其他指定的特征组合,以提供本披露进一步的实施例。

[0016] 实施例1:一种具有式(I)的化合物



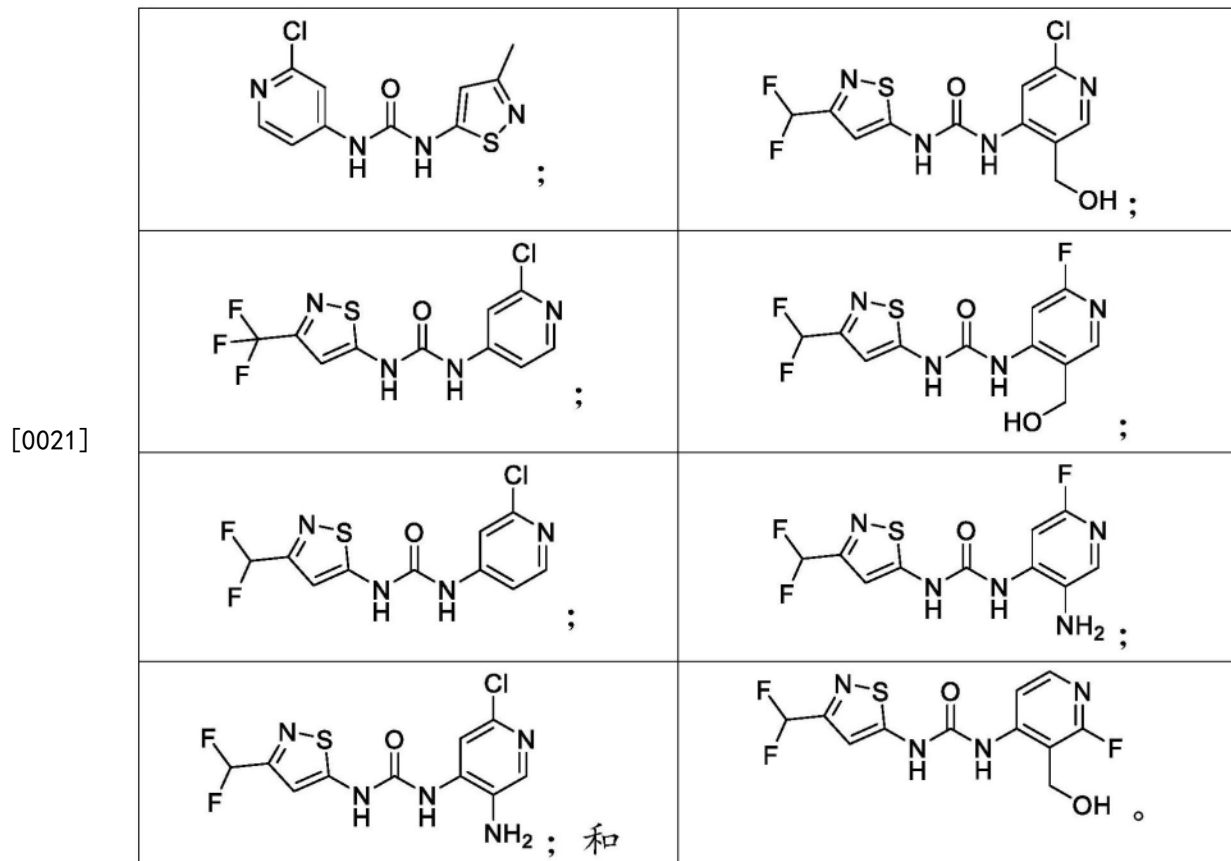
式 (I)

[0018] 或其药学上可接受的盐,其中: R^1 选自氢、氨基和羟基取代的 C_{1-2} 烷基; R^2 是氢; R^3 选

自C₁₋₂烷基和卤代取代的C₁₋₂烷基;R⁴是氢;R⁵选自氢和卤代;并且R⁶选自氢和卤代。

[0019] 实施例2:如实施例1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其中:R¹选自氢、氨基和羟基-甲基;R²是氢;R³选自甲基、二氟甲基和三氟甲基;R⁴是氢;R⁵选自氢、氯和氟;并且R⁶选自氢和氟。

[0020] 实施例3:如实施例1所述的化合物或其药学上可接受的盐,选自:



[0022] 实施例4:一种药物组合物,其包含治疗有效量的如实施例1至3中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、以及一种或多种药学上可接受的载体。

[0023] 实施例5:一种药物组合,其包含治疗有效量的如实施例1至4中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、以及一种或多种治疗活性剂。

[0024] 实施例6:如实施例5所述的药物组合,其中所述一种或多种治疗活性剂独立地选自抗癌剂、抗过敏剂、止吐药、止痛药、免疫调节剂和细胞保护剂。

[0025] 实施例7:一种治疗BRM介导的和/或BRG1介导的障碍或疾病的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的如实施例1至27中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐。

[0026] 实施例8:如实施例7所述的方法,其中所述障碍或疾病是以BRG1缺陷和/或BRM缺陷为特征的恶性肿瘤。

[0027] 实施例9:如实施例7或8所述的方法,其中所述障碍或疾病是以BRG1突变和/或BRM突变为特征的恶性肿瘤。

[0028] 实施例10:如实施例7-9中任一项所述的方法,其中所述障碍或疾病是实体瘤、白血病或淋巴瘤。

[0029] 实施例11:如实施例7-10中任一项所述的方法,其中所述障碍或疾病选自自由以下组成的组:非小细胞肺癌、肺腺癌、肺癌、大细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺鳞状细胞癌、小细胞肺癌、皮肤黑色素瘤、促纤维增生性黑色素瘤、葡萄膜黑色素瘤、卵巢小细胞癌(高钙血症型)、卵巢横纹肌样瘤、皮肤鳞状细胞癌、神经胶质瘤、子宫癌肉瘤、子宫体子宫内膜癌、卵巢浆液性囊腺癌、膀胱尿路上皮癌、原发性中枢神经系统淋巴瘤、食道癌、膀胱癌、膀胱癌浆细胞样变体、胃腺癌、腺样囊性癌、淋巴样肿瘤弥漫性大B细胞淋巴瘤、胰腺癌、结直肠腺癌、胆管癌、肉瘤、头颈癌、宫颈癌和宫颈管癌、髓母细胞瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、肝细胞癌、肾乳头状细胞癌、乳腺癌、套细胞淋巴瘤、胆囊癌、睾丸生殖细胞癌、肾细胞透明细胞癌、前列腺癌、小儿尤因肉瘤、胸腺瘤、肾嫌色细胞癌、肾非透明细胞癌、嗜铬细胞瘤和副神经节瘤、甲状腺癌、恶性周围神经鞘瘤、神经内分泌前列腺癌、头颈鳞状细胞癌、肾上腺皮质癌、宫颈癌和宫颈管癌、皮肤鳞状细胞癌、睾丸生殖细胞癌、成胶质细胞瘤、多形性成胶质细胞瘤、尤因肉瘤、透明细胞肾细胞癌、成神经细胞瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、急性髓样白血病、慢性淋巴细胞性白血病、多发性骨髓瘤、恶性横纹肌样瘤、上皮样肉瘤、家族性神经鞘瘤病、肾髓质癌、滑膜肉瘤和脑膜瘤。

[0030] 实施例12:如实施例7-11中任一项所述的方法,其中所述障碍或疾病选自自由以下组成的组:非小细胞肺癌、肺腺癌、肺癌、大细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺鳞状细胞癌、小细胞肺癌、皮肤黑色素瘤、促纤维增生性黑色素瘤和葡萄膜黑色素瘤。

[0031] 实施例13:如实施例7或8所述的方法,其中所述障碍或疾病是以BRG1缺陷为特征的恶性肿瘤。

[0032] 实施例14:如实施例7、8或13中任一项所述的方法,其中所述障碍或疾病是以BRG1突变为特征的恶性肿瘤。

[0033] 实施例15:如实施例7、8、13和14中任一项所述的方法,其中所述障碍或疾病选自自由以下组成的组:非小细胞肺癌、肺腺癌、肺癌、大细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺鳞状细胞癌、小细胞肺癌、皮肤黑色素瘤、促纤维增生性黑色素瘤、葡萄膜黑色素瘤、卵巢小细胞癌、皮肤鳞状细胞癌、神经胶质瘤、子宫癌肉瘤、子宫体子宫内膜癌、卵巢浆液性囊腺癌、膀胱尿路上皮癌、原发性中枢神经系统淋巴瘤、食道癌、膀胱癌、膀胱癌浆细胞样变体、胃腺癌、腺样囊性癌、淋巴样肿瘤弥漫性大B细胞淋巴瘤、胰腺癌、结直肠腺癌、胆管癌、肉瘤、头颈癌、宫颈癌和宫颈管癌、髓母细胞瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、肝细胞癌、肾乳头状细胞癌、乳腺癌、套细胞淋巴瘤、胆囊癌、睾丸生殖细胞癌、肾细胞透明细胞癌、前列腺癌、小儿尤因肉瘤、胸腺瘤、肾嫌色细胞癌、肾非透明细胞癌、嗜铬细胞瘤和副神经节瘤、以及甲状腺癌。

[0034] 实施例16:如实施例7、8和13-15中任一项所述的方法,其中所述障碍或疾病选自自由以下组成的组:非小细胞肺癌、肺腺癌、肺癌、大细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺鳞状细胞癌、小细胞肺癌、皮肤黑色素瘤、促纤维增生性黑色素瘤和葡萄膜黑色素瘤。

[0035] 实施例17:如实施例7或8所述的方法,其中所述障碍或疾病是以BRM缺陷为特征的恶性肿瘤。

[0036] 实施例18:如实施例7、8和17中任一项所述的方法,其中所述障碍或疾病是以BRM突变为特征的恶性肿瘤。

[0037] 实施例19:如实施例7、8和17-18中任一项所述的方法,其中所述障碍或疾病选自自由以下组成的组:恶性周围神经鞘瘤、神经内分泌前列腺癌、乳腺癌、膀胱尿路上皮癌、腺样

囊性癌、胃腺癌、乳腺癌、卵巢浆液性囊腺癌、子宫癌肉瘤、食道癌、头颈鳞状细胞癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、小细胞肺癌、胰腺癌、肾上腺皮质癌、皮肤黑色素瘤、肉瘤、结直肠腺癌、宫颈癌和宫颈管癌、肝细胞癌、皮肤鳞状细胞癌、睾丸生殖细胞癌、成胶质细胞瘤、多形性成胶质细胞瘤、胆管癌、尤因肉瘤、透明细胞肾细胞癌、成神经细胞瘤、急性髓样白血病和弥漫性大B细胞淋巴瘤。

[0038] 实施例20:如实施例7-8和17-19中任一项所述的方法,其中所述障碍或疾病选自由以下组成的组:非小细胞肺癌、肺腺癌、肺癌、大细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺鳞状细胞癌、小细胞肺癌、皮肤黑色素瘤、促纤维增生性黑色素瘤和葡萄膜黑色素瘤。

[0039] 实施例21:如实施例7所述的方法,其中所述障碍或疾病是以除BRM或BRG1以外的SWI/SNF亚基的突变为特征的恶性肿瘤。

[0040] 实施例22:如实施例7或21所述的方法,其中所述障碍或疾病是实体瘤、白血病或淋巴瘤。

[0041] 实施例23:如实施例7、21和22中任一项所述的方法,其中所述障碍或疾病选自由以下组成的组:恶性横纹肌样瘤(以SNF5/SMARCB1缺陷为特征)、上皮样肉瘤、家族性神经鞘瘤病、肾髓质癌、尤因肉瘤、滑膜肉瘤、子宫体子宫内膜癌、胃腺癌、膀胱尿路上皮癌、膀胱癌、腺样囊性癌、胆管癌、促纤维增生性黑色素瘤、皮肤鳞状细胞癌、胰腺癌、肝细胞癌、黑色素瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、乳腺癌、结直肠癌、卵巢透明细胞癌、成神经细胞瘤、食道癌、肺癌、肾透明细胞癌、间皮瘤、乳腺腺样囊性癌、腺样囊性癌、甲状腺癌、脑膜瘤、葡萄膜黑色素瘤和急性髓样白血病。

[0042] 实施例24:如实施例7、21、22和23中任一项所述的方法,其中所述障碍或疾病选自由以下组成的组:恶性横纹肌样瘤、乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌、卵巢透明细胞癌、膀胱癌、肾透明细胞癌、结直肠癌、胃癌、肝癌、黑色素瘤、神经胶质瘤、急性髓样白血病和肺癌。

[0043] 实施例25:如实施例1-3中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,用作药物。

[0044] 本披露的其他特征在示例性实施例的以上描述中应变得显而易见,这些示例性实施例为了说明本披露而给出,且并不旨在对其进行限制。

[0045] 定义

[0046] 出于解释本说明书的目的,将应用下面的定义,并且在适宜的情况下,以单数形式使用的术语还包括复数形式。除非上下文中另有明确说明,否则本说明书中使用的术语具有以下含义。

[0047] 在本文描述的所有方法能够以任何适合顺序进行,除非本文另外指示或另外与上文明显矛盾。本文提供的任何和所有实例或示例性语言(例如“如”)的应用仅旨在更好地说明本披露,而不对另外要求保护的本披露范围做出限制。

[0048] 术语“一个/种(a/an)”、“所述(the)”以及在本披露的上下文中使用的类似术语(特别是在权利要求的上下文中)应被解释为涵盖单数和复数二者,除非本文另外指示或与上文明显矛盾。

[0049] 如本文所用,术语“烷基”是指具有通式 C_nH_{2n+1} 的烃基。烷基基团可以是直链的或支链的。例如,术语“ C_1 - C_6 烷基”或“ C_1 至 C_6 烷基”是指含有1至6个碳原子的单价、直链或支链脂族基团(例如,甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、1-甲基

丁基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、新戊基、3,3-二甲基丙基、己基、2-甲基戊基等)。当烷基被一个或多个取代基取代时,这些取代基可以在该烷基的任何碳原子上取代。

[0050] “卤素”或“卤代”可以是氟、氯、溴或碘(作为取代基优选的卤素是氟和氯)。

[0051] “卤代烷基”旨在包括被一种或多种卤素取代的、具有指定碳原子数的支链和直链饱和脂族烃基。因此,“C₁-C₆卤代烷基”或“C₁至C₆卤代烷基”旨在包括但不限于氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、三氯甲基、五氟乙基、五氯乙基、2,2,2-三氟乙基、七氟丙基和七氯丙基。

[0052] 如本文所指,术语“取代的”意指至少一个氢原子被非氢基团替代,条件是维持正常的化合价并且取代产生稳定的化合物。当取代基是酮基(即,=O)时,则原子上的2个氢被替代。酮基取代基不存在于芳香族部分上。

[0053] 短语“药学上可接受的”指示必须与包含配制品的其他成分和/或正用其治疗的哺乳动物在化学上和/或毒理学上相容的物质或组合物。

[0054] 除非另外规定,否则术语“本披露的化合物”是指具有式(I)的化合物,以及异构体,例如立体异构体(包括非对映异构体、对映异构体和外消旋体)、几何异构体、构象异构体(包括旋转异构体和阻转异构体)、互变异构体、同位素标记的化合物(包括氘取代)、和固有形成的部分(例如,多晶型物、溶剂化物和/或水合物)。当存在能够形成盐的部分时,则同样包括盐,特别是药学上可接受的盐。

[0055] 取决于工艺条件,本披露的终产物以游离(中性)或盐形式获得。这些终产物的游离形式和盐均在本披露的范围内。如果有此需要,可将化合物的一种形式转化成另一种形式。游离碱或酸可转化成盐;盐可转化成游离化合物或另一种盐;本披露的异构体化合物的混合物可分离成单独的异构体。

[0056] 药学上可接受的盐是优选的。然而,其他盐可能适用,例如适用于可在制备期间采用的分离或纯化步骤,并因此被认为在本披露的范围内。

[0057] 如本文所用,“药学上可接受的盐”是指所披露的化合物的衍生物,其中通过制成其酸盐或碱盐对母体化合物进行修饰。例如,药学上可接受的盐包括但不限于乙酸盐、抗坏血酸盐、己二酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、溴化物/氢溴酸盐、碳酸氢盐/碳酸盐、硫酸氢盐/硫酸盐、樟脑磺酸盐、癸酸盐、氯化物/盐酸盐、氯脲磺酸盐(chlorotheophyllonate)、柠檬酸盐、乙二磺酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、葡萄糖酸盐、葡萄糖醛酸盐、谷氨酸盐、戊二酸盐、羟乙酸盐、马尿酸盐、氢碘酸盐/碘化物、羟乙基磺酸盐、乳酸盐、乳糖醛酸盐、十二烷基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐/羟基丙二酸盐、扁桃酸盐、甲磺酸盐、甲基硫酸盐、黏酸盐、萘甲酸盐、萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、十八烷酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、苯乙酸盐、磷酸盐/磷酸氢盐/磷酸二氢盐、聚半乳糖醛酸盐、丙酸盐、水杨酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、氨基磺酸盐、磺基水杨酸盐、酒石酸盐、甲苯磺酸盐、三氟乙酸盐或昔萘酸盐形式。

[0058] 可以用无机酸和有机酸形成药学上可接受的酸加成盐。可以衍生出盐的无机酸包括,例如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等。可以衍生出盐的有机酸包括例如乙酸、丙酸、乙醇酸、草酸、马来酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、甲苯磺酸、磺基水杨酸等。

[0059] 可以用无机碱和有机碱形成药学上可接受的碱加成盐。可以衍生出盐的无机碱包括例如铵盐和来自元素周期表第I至XII列的金属。在某些实施例中,盐衍生自钠、钾、铵、

钙、镁、铁、银、锌和铜；特别合适的盐包括铵盐、钾盐、钠盐、钙盐和镁盐。可以衍生出盐的有机碱包括例如伯胺、仲胺和叔胺；取代的胺（包括天然存在的取代的胺）；环胺；碱性离子交换树脂等。某些有机胺包括异丙胺、苄星、胆碱盐、二乙醇胺、二乙胺、赖氨酸、葡甲胺、哌嗪和氨丁三醇。

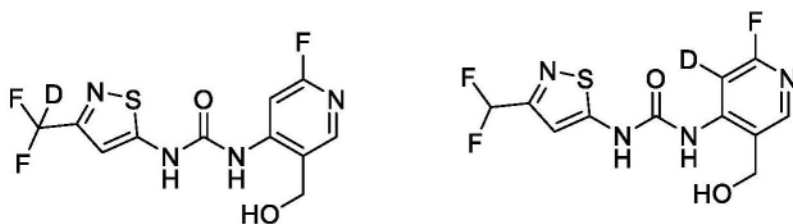
[0060] 本披露的药理学上可接受的盐可通过常规化学方法由含有碱性或酸性部分的母体化合物合成。通常，此类盐可以通过使这些化合物的游离酸或碱的形式与化学计算量的适当的碱或酸在水中或在有机溶剂中或者在两者的混合物中进行反应来制备；通常，非水性介质像醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇、或乙腈是优选的。合适的盐的清单见于Allen, L.V., Jr. 编, Remington: The Science and Practice of Pharmacy [雷明顿: 药理学科学与实践], 第22版, Pharmaceutical Press, London, UK [英国伦敦市医药出版社] (2012), 该文献的披露内容通过引用特此并入。

[0061] 含有能够充当氢键的供体和/或受体的基团的本披露化合物可与合适的共晶形成体形成共晶。这些共晶可通过已知的共晶形成程序由本披露化合物制备。此类程序包括在溶液中使本披露化合物与共晶形成体在结晶条件下研磨、加热、共升华、共熔或接触并分离借此形成的共晶。合适的共晶形成体包括WO 2004/078163中描述的那些。因此，本披露进一步提供了包含本披露化合物的共晶。

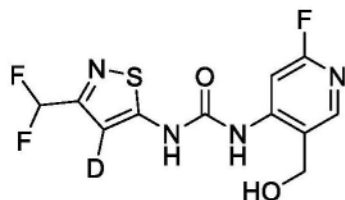
[0062] 本文给出的任何式还旨在表示这些化合物的未标记的形式以及同位素标记的形式。同位素标记的化合物具有由本文给出的式绘示的结构，除了一个或多个原子被具有所选择的原子质量或质量数的原子替代。可以掺入本披露化合物的同位素的实例包括氢、碳、氮、氧、磷、氟、氯和碘的同位素，例如，分别是 ^2H 、 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{18}F 、 ^{31}P 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{36}Cl 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 。本披露包括如本文所定义的各种同位素标记的化合物，例如其中存在放射性同位素（如 ^3H 和 ^{14}C ）的那些化合物，或其中存在非放射性同位素（如 ^2H 和 ^{13}C ）的那些化合物。此类同位素标记的化合物可用于代谢研究（用 ^{14}C ）、反应动力学研究（例如用 ^2H 或 ^3H ）、检测或成像技术（如正电子发射断层扫描（PET）或单光子发射计算机断层扫描（SPECT），包括药物或底物组织分布测定），或用于患者的放射性治疗。特别地， ^{18}F 或标记的化合物对于PET或SPECT研究可能是特别期望的。

[0063] 此外，用较重的同位素，特别是氘（即， ^2H 或D）取代可以提供来源于更大的代谢稳定性（例如，体内半衰期延长或剂量需求减少或治疗指数改进）的某些治疗优点。应当理解，在此上下文中氘被认为是本披露的化合物的取代基。这种较重的同位素（特别是氘）的浓度可以由同位素富集因子来定义。如本文所用的术语“同位素富集因子”是指同位素丰度与指定同位素的天然丰度之间的比率。如果本披露化合物中的取代基指示氘，这样的化合物具有针对每个指定的氘原子的同位素富集因子为至少3500（在每个指定的氘原子上52.5%氘掺入）、至少4000（60%氘掺入）、至少4500（67.5%氘掺入）、至少5000（75%氘掺入）、至少5500（82.5%氘掺入）、至少6000（90%氘掺入）、至少6333.3（95%氘掺入）、至少6466.7（97%氘掺入）、至少6600（99%氘掺入）或至少6633.3（99.5%氘掺入）。

[0064] 例如，本发明的氘代化合物可以是：



[0065]



[0066] 本披露的同位素标记的化合物通常可通过本领域技术人员已知的常规技术或者通过以下描述的方案或实例和制备中所披露的方法(或与本文描述的那些类似的方法),通过用适当或容易获得的同位素标记的试剂取代在其他情况下使用的非同位素标记的试剂来制备。此类化合物具有多种潜在用途,例如作为测定潜在药物化合物与靶蛋白或受体结合的能力的标准品及试剂,或用于在体内或体外对结合于生物受体的本披露化合物成像。

[0067] 术语“溶剂化物”是指本披露化合物与一种或多种溶剂分子(不论有机或无机)的物理性缔合。此物理性缔合包括氢键合。在某些情况下,溶剂化物能够分离(例如当一种或多种溶剂分子掺入结晶固体的晶格中时)。溶剂化物中的溶剂分子可以规则排列和/或无序排列存在。溶剂化物可包含化学计量量或非化学计量量的溶剂分子。“溶剂化物”涵盖溶液相和可分离的溶剂化物两者。示例性溶剂化物包括但不限于水合物、乙醇化物、甲醇化物和异丙醇化物。溶剂化方法一般在本领域中是已知的。

[0068] 如本文所用,“一种或多种多晶型物”是指一种或多种具有相同化学结构/组成但形成晶体的分子和/或离子的空间排列不同的结晶形式。本披露的化合物能够以无定形固体或结晶固体提供。可采用冻干以提供呈固体的本披露化合物。

[0069] “BRM”和“BRG1”是指SWI/SNF复合物中ATP酶亚基的两个旁系同源物,也分别称为SMARCA2和SMARCA4。除非另有特别说明,如本文所用的BRM是指人BRM(Entrez基因6595),其蛋白质序列具有Swiss-Prot登录号P51531.2;如本文所用的BRG1是指人BRG1(Entrez基因6597),其蛋白质序列具有Swiss-Prot登录号P51532.2。BRM、BRG1和SWI/SNF复合物在例如Wilson, BG等人Nat Rev Cancer. [癌症自然评论]2011年6月9日;11(7):481-92的此类综述中有详细描述。BRG1(SMARCA4)基因组序列具有NCBI参考序列:NG_011556.1;其mRNA来源于多种剪接形式(即转录变体),包括NCBI参考号NM_001128844.1、NM_001128849.1、NM_001128845.1、NM_001128846.1、NM_001128847.1、NM_001128848.1和NM_003072.3。BRM(SMARCA2)基因组序列具有NCBI参考序列:NC_000009.11,其mRNA来源于两种剪接形式(即转录变体),包括NCBI参考号NM_003070.3和NM_139045.2。

[0070] 术语“BRM介导的障碍或疾病”是指由BRM直接或间接调节的任何障碍或疾病。术语“BRG1介导的障碍或疾病”是指由BRG1直接或间接调节的任何障碍或疾病。BRM介导的或BRG1介导的障碍或疾病可以表征为BRG1缺陷和/或BRM缺陷。BRM介导的或BRG1介导的障碍

或疾病可以表征为除BRM/SMARCA2或BRG1/SMARCA4以外的SWI/SNF亚基的突变,例如ARID1A、ARID1B、ARID2、PBRM1、SMARCB1/SNF5、SMARCE1、SMARCC1、SMARCC2、PHF10、DPF1、DPF3、DPF2、ACTL6A、ACTL6B、SMARCD2、SMARCD3、SMARCD1、BCL11A、BCL11B、BCL7A、BCL7B、BCL7C、BRD9、BRD7、SS18和ACTB的突变。BRM介导的或BRG1介导的障碍或疾病可以通过对BRM、BRG1或如上所述的其他SWI/SNF亚基的依赖性来表征,其中所述依赖性与BRM、BRG1或其他SWI/SNF亚基的突变无关。

[0071] 术语“BRG1缺陷型”和“BRG1缺陷”是指具有BRG1基因的突变或缺失,或者具有相对于对照(例如,参考细胞或正常细胞或非癌细胞)显著降低的BRG1的产生、表达、水平、稳定性和/或活性的细胞(包括但不限于癌细胞、细胞系、组织、组织类型、肿瘤等)。降低可以是至少约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。在一些实施例中,降低是至少20%。在一些实施例中,降低是至少50%。BRG1基因的突变导致功能丧失,其中突变可以是无义类型,插入/缺失导致移码或错义突变。BRG1缺陷型细胞包括其中BRG1基因已被突变或缺失的那些。

[0072] 术语“BRM缺陷型”和“BRM缺陷”是指具有BRM基因的功能丧失性(“LOF”)突变或缺失,或者具有相对于对照(例如,参考细胞或正常细胞或非癌细胞)显著降低的BRM的产生、表达、水平、稳定性和/或活性的细胞(包括但不限于癌细胞、细胞系、组织、组织类型、肿瘤等)。降低可以是至少约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。在一些实施例中,降低是至少20%。在一些实施例中,降低是至少50%。BRM缺陷型细胞包括其中BRM基因已被突变或缺失的那些。

[0073] 术语“与BRG1缺陷相关的障碍或疾病”或“以BRG1缺陷为特征的障碍或疾病”是指其中细胞是BRG1缺陷型细胞的障碍或疾病。例如,在与BRG1缺陷相关的障碍或疾病中,一种或多种疾病细胞可以具有BRG1基因的突变或缺失,或者具有显著降低的BRG1的产生、表达、水平、稳定性和/或活性。在患有与BRG1缺陷相关的障碍或疾病的患者中,一些疾病细胞(例如,癌细胞)可能是BRG1缺陷型细胞,而另一些可能不是。

[0074] 术语“与BRM缺陷相关的障碍或疾病”或“以BRM缺陷为特征的障碍或疾病”是指其中细胞是BRM缺陷型细胞的障碍或疾病。例如,在与BRM缺陷相关的障碍或疾病中,一种或多种疾病细胞可以具有BRM基因的突变或缺失,或者具有显著降低的BRM的产生、表达、水平、稳定性和/或活性。在患有与BRM缺陷相关的障碍或疾病的患者中,一些疾病细胞(例如,癌细胞)可能是BRM缺陷型细胞,而另一些可能不是。

[0075] 术语“恶性肿瘤”(也称为癌症)是指其中异常细胞不受控制地分裂并且可以侵袭附近组织的疾病。恶性细胞还可以通过血液和淋巴系统扩散到身体的其他部位。恶性肿瘤有几种主要类型。癌是始于皮肤或者衬贴于内部器官或覆盖内部器官的组织的恶性肿瘤。肉瘤是始于骨、软骨、脂肪、肌肉、血管或其他结缔组织或支持组织的恶性肿瘤。白血病是始于造血组织(如骨髓),并导致大量异常血细胞产生并进入血液的恶性肿瘤。淋巴瘤和多发性骨髓瘤是始于免疫系统细胞的恶性肿瘤。中枢神经系统癌症是始于脑和脊髓组织的恶性肿瘤。

[0076] 术语“实体瘤”是指由通常不含有囊肿或液体区域的异常组织块形成的恶性肿瘤/癌症。实体瘤根据起源的组织/细胞进行命名/分类。实例包括但不限于肉瘤和癌。

[0077] 术语“白血病”是指始于造血组织(如骨髓)的血液细胞或血细胞恶性肿瘤/癌症。

实例包括但不限于急性髓样白血病(AML)、慢性髓样白血病(CML)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)和慢性淋巴细胞性白血病(CLL)。

[0078] 术语“淋巴瘤”是指始于免疫系统细胞的淋巴细胞恶性肿瘤/癌症。实例包括但不限于非霍奇金淋巴瘤和多发性骨髓瘤。

[0079] 如本文所用,术语“患者”涵盖所有的哺乳动物物种。

[0080] 如本文所用,术语“受试者”是指动物。典型地,动物是哺乳动物。受试者也是指例如灵长类动物(例如人)、牛、绵羊、山羊、马、狗、猫、兔、大鼠、小鼠、鱼、鸟等。在某些实施例中,受试者是灵长类动物。在又其他实施例中,受试者是人。示例性受试者包括具有癌症疾病风险因素的任何年龄的人。

[0081] 如本文所用,如果受试者(优选人)将在生物学上、在医学上或在生活质量上从治疗中获益,则该受试者是“需要”这种治疗的。

[0082] 如本文所用,术语“抑制(inhibit、inhibition或inhibiting)”是指减少或抑制给定的病症、症状或障碍、或疾病,或在生物活性或过程的基线活性方面的显著降低。

[0083] 如本文所用,术语“治疗(treat/treating/treatment)”任何疾病/障碍是指治疗哺乳动物(特别是人)的疾病/障碍,并且包括:(a)改善疾病/障碍(即,减慢或遏制或减缓疾病/障碍、或其至少一种临床症状的发展);(b)减轻或调节疾病/障碍(即,使疾病/障碍身体上消退(例如,使可辨别的症状稳定)、生理学上消退(例如,使身体参数稳定)或两者皆有);(c)缓解或改善至少一个身体参数,其包括可能不由受试者可辨别的那些参数;和/或(d)预防或延迟疾病或障碍的起始或发展或进展出现在哺乳动物中,特别地,在此类哺乳动物易患有疾病或障碍但又尚未诊断为患有该疾病或障碍时进行预防或延迟。

[0084] 本披露化合物的术语“治疗有效量”是指将引起受试者的生物学或医学应答(例如,酶或蛋白质活性的降低或抑制)或改善症状,减轻病症,减慢或延迟疾病进展,或预防疾病等的本披露化合物的量。在一个非限制性实施例中,术语“治疗有效量”是指本披露化合物的如下量:当施用至受试者时,该量有效地(1)至少部分地缓解、抑制、预防和/或改善由BRM和/或BRG1介导的病症、或障碍或疾病;或(2)降低或抑制BRM和/或BRG1的活性。

[0085] 在另一个非限制性实施例中,术语“治疗有效量”是指本披露化合物的如下量:当施用至细胞、或组织、或非细胞生物材料、或介质时,该量有效地至少部分地降低或抑制BRM和/或BRG1的活性;或至少部分地降低或抑制BRM和/或BRG1的表达。

[0086] 有效量可以取决于如受试者的体重和大小、疾病的类型、或本披露的特定化合物之类的因素而变化。本领域普通技术人员将能够研究本文中所包含的因素,并且无需过多实验即可确定本披露的化合物的有效量。

[0087] 施用方案可影响有效量的构成。可以在BRM和/或BRG1介导的病症发作之前或之后向受试者施用本披露的化合物。此外,可以每天或顺序施用几个分开的剂量以及间隔的剂量,或者可连续地输注该剂量,或者可以是推注。此外,本披露的一种或多种化合物的剂量可以根据治疗或预防的情形的紧急程度成比例地增加或降低。

[0088] 化合物的制备

[0089] 考虑到本文提供的方法、反应方案和实例,可以以有机合成领域的技术人员已知的多种方式制备本披露化合物。本披露化合物可以使用下文所述的方法、以及合成有机化学领域中已知的合成方法或本领域技术人员所理解的其变体来合成。优选的方法包括但不

限于下文所述的那些。反应在适合于所用试剂和材料并且适于实现转化的溶剂或溶剂混合物中进行。有机合成领域的技术人员应当理解,分子上存在的官能团应与所提出的转化一致。这有时将需要判断以修改合成步骤的顺序或选择一种特定的工艺方案而不是另一种,以便获得本披露所希望的化合物。

[0090] 起始材料通常可从商业来源获得,例如西格玛奥德里奇公司(Sigma Aldrich)或其他商业供应商,或如本披露所述进行制备,或者使用本领域技术人员熟知的方法容易地制备(例如通过一般描述于以下中的方法制备:Louis F.Fieser和Mary Fieser, *Reagents for Organic Synthesis* [用于有机合成的试剂],第1-19卷,Wiley[威利出版社],纽约(1967-1999编辑),Larock,R.C., *Comprehensive Organic Transformations* [综合有机转化],第2版,Wiley-VCH[威利-VCH出版社]Weinheim[韦因海姆],德国(1999),或Beilsteins *Handbuch der organischen Chemie* [贝尔斯坦有机化学手册],4,Aufl.编辑Springer-Verlag[斯普林格出版社],柏林,包括增刊(也可以经由Beilstein在线数据库获得))。

[0091] 为了说明的目的,下面描述的反应方案提供了合成本披露化合物以及关键中间体的潜在途径。有关各个反应步骤的详细说明,请参见下面的实例部分。本领域技术人员将理解,可以使用其他合成路线来合成本发明化合物。尽管在方案中描述了具体的起始材料和试剂,并在下面进行了讨论,但是可以容易地替换其他起始材料和试剂以提供各种衍生物和/或反应条件。另外,根据本披露,可以使用本领域技术人员熟知的常规化学进一步修饰通过下述方法制备的许多化合物。

[0092] 在本披露化合物的制备中,可能需要保护中间体的远端官能性。对这种保护的需要根据远端官能性的性质和制备方法的条件而变化。对这种保护的需要是本领域技术人员容易确定的。有关保护基团及其使用的一般说明,参见Greene,T.W.等人, *Protecting Groups in Organic Synthesis* [有机合成中的保护基团],第4版,Wiley[威利出版社](2007)。在本披露化合物的制备中引入的保护基团(如三苯甲基保护基团)可以显示为一个区域异构体,但是也可以作为区域异构体的混合物存在。

[0093] 本文使用的以下缩写具有对应的含义:

[0094] (app) 明显; (br) 宽峰; (BSA) 牛血清白蛋白; (d) 二重峰; (dd) 双二重峰; (DCM) 二氯甲烷; (DIPEA) 二异丙基乙胺; (DMF) N,N-二甲基甲酰胺; (DMSO) 二甲基亚砷; (ESI) 电喷雾电离; (Et) 乙基; (EtOAc) 乙酸乙酯; (h) 小时; (HPLC) 高压液相色谱法; (LAH) 氢化铝锂; (LCMS) 液相色谱法和质谱法; (LHMDS) 六甲基二硅叠氮化锂; (MTBE) 甲基叔丁基醚; (MeCN) 乙腈; (MeOH) 甲醇; (MHz) 兆赫兹; (MS) 质谱法; (m) 多重峰; (mg) 毫克; (min) 分钟; (mL) 毫升; (mmol) 毫摩尔; (m/z) 质荷比; (NMR) 核磁共振; (Ph) 苯基; (ppm) 百万分率; (q) 四重峰; (Rt) 保留时间; (RT) 室温; (s) 单重峰; (t) 三重峰; (TBDMS) 叔丁基二甲基甲硅烷基; (tert) 叔; (TFA) 三氟乙酸; (THF) 四氢呋喃; (TMAF) 四甲基氟化铵; (TMS) 三甲基甲硅烷基。

[0095] 实例的表征中采用的LC/MS方法

[0096] 使用带有Waters Micromass ZQ的Agilent 1100HPLC系统或者带有Waters SQ检测器或带有Waters 25ACQUITY Qda检测器的Waters ACQUITY UPLC记录LC/MS数据。下面描述了用于获取所有LCMS数据的方法。

[0097] LCMS方法1

- | | | |
|--------|--|---|
| | 柱 | Sunfire C18 3.0 x 30 mm, 3.5 μ m |
| | 柱温 | 40°C |
| [0098] | 洗脱液 | A: 含有 0.05% TFA 的 H ₂ O, B: MeCN |
| | 流速 | 2.0 mL/min |
| | 梯度 | 在 1.7 min 内 5%至 95% B, 0.3 min 95% B |
| [0099] | <u>LCMS方法2</u> | |
| | 柱 | XBridge C18 3.0 x 30 mm, 3.5 μ m |
| | 柱温 | 40°C |
| [0100] | 洗脱液 | A: H ₂ O + 5 mM 氢氧化铵, B: MeCN |
| | 流速 | 2.0 mL/min |
| | 梯度 | 在 1.7 min 内 5%至 95% B, 0.3 min 95% B |
| [0101] | <u>LCMS方法3</u> | |
| | 柱 | AcQuity UPLC BEH C18 2.1 x 30 mm, 1.7 μ m |
| | 柱温 | 50°C |
| [0102] | 洗脱液 | A: 在水中的 0.1%甲酸, B: 在 MeCN 中的 0.1%甲酸 |
| | 流速 | 1.0 mL/min |
| | 梯度 | 在 1.5 min 内 2%至 98% B, 0.3 min 98% B |
| [0103] | <u>LCMS方法4</u> | |
| | 柱 | AcQuity UPLC BEH C18 2.1 x 30 mm, 1.7 μ m |
| | 柱温 | 50°C |
| [0104] | 洗脱液 | A:在水中的 5 mM NH ₄ OH, B:在 MeCN 中的 5 mM NH ₄ OH |
| | 流速 | 1.0 mL/min |
| | 梯度 | 在 1.2 min 内 1%至 30% B, 在 0.95 min 内 30%至 98% B |
| [0105] | 实例的表征中采用的NMR | |
| [0106] | 用布鲁克傅里叶 (Bruker Fourier) 变换光谱仪在如下频率下操作获得 ¹ H NMR光谱: ¹ H NMR:400MHz (布鲁克)。光谱数据按以下格式报道:化学位移(多重性,氢的数目)。化学位移在四甲基硅烷内标(δ 单位,四甲基硅烷=0ppm)的低场中以ppm指定和/或参考溶剂峰,在 ¹ H NMR光谱中,在2.50ppm处出现CD ₃ SOCD ₃ ,在3.31ppm处出现CD ₃ OD,在1.94ppm处出现CD ₃ CN,在4.79ppm处出现D ₂ O,在5.32ppm处出现CD ₂ Cl ₂ ,并且在7.26ppm处出现CDCl ₃ 。 | |
| [0107] | 实例的纯化中采用的方法 | |
| [0108] | 中间体和终产物的纯化通过正相色谱法、反相色谱法或超临界流体色谱法 (SFC) | |

来进行。正相色谱法使用预填充的 SiO_2 小柱(例如来自特利丹蒂斯公司(Teledyne Isco, Inc.)的RediSep® Rf柱),用适当的溶剂体系的梯度洗脱(例如庚烷和乙酸乙酯;DCM和MeOH;或除非另外指示)来进行。使用以下描述的方法进行反向制备型HPLC:

[0109] (1) 基本方法: XBridge 5 μm 柱,在乙腈和水中的5mM NH_4OH 。

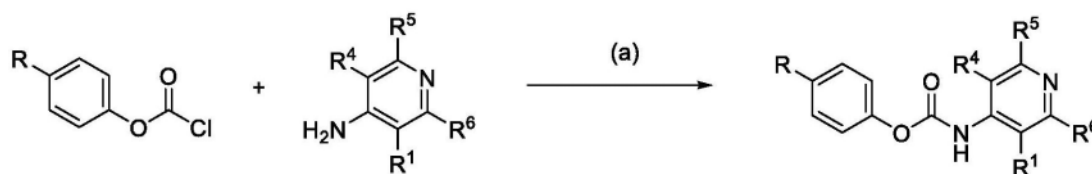
[0110] (2) 甲酸方法: XBridge 5 μm 柱;在乙腈和水中的0.1%甲酸。

[0111] 上述HPLC方法从15%乙腈至40%乙腈来运行集中梯度。

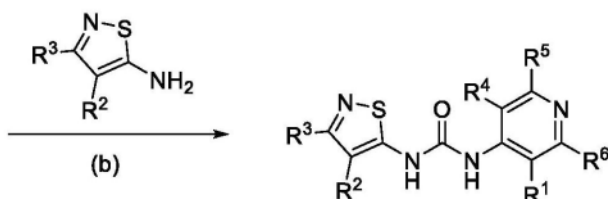
[0112] 通用合成方案

[0113] 方案1和2(如下所示)描述了用于制备本披露化合物的潜在途径,这些化合物包括具有式(I)的化合物,其中 R^1 - R^6 如发明内容中所定义。用于以下反应方案的起始材料是可商购获得的,或者可以根据本领域技术人员已知的方法或通过本文所披露的方法制备。具有式(I)的化合物可通过使用基本上光学纯的起始材料或通过分离色谱法、重结晶或本领域中熟知的其他分离技术来制备为基本上光学纯的。对于更详细的描述,参见以下实例部分。

[0114] 方案1



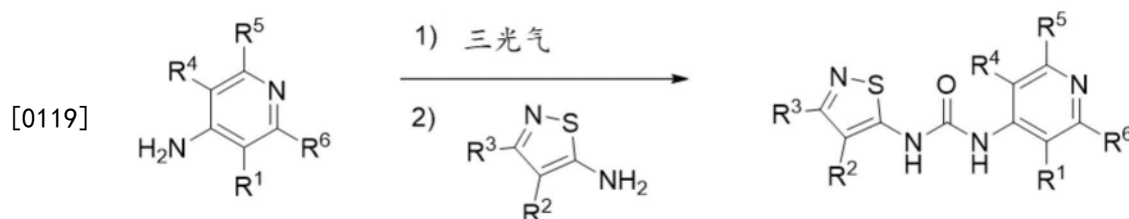
[0115]



[0116] 步骤(a)涉及在合适的温度(如RT)下,在合适的溶剂(如DCM或二噁烷)中,用合适的碱(如吡啶)进行的(未)取代的氯甲酸苯酯(例如,R可以是H或硝基)与(未)取代的4-氨基吡啶的反应。

[0117] 步骤(b)涉及在合适的温度(如60°C)下,在合适的溶剂(如THF或二噁烷)中,用合适的碱(如二异丙基乙胺)进行的取代的5-氨基异噻唑(或取代的3-氨基苯并噻唑)与步骤(a)中获得的氨基甲酸酯中间体的反应。可替代地,取代的5-氨基异噻唑(或取代的3-氨基苯并噻唑)可以首先通过合适的碱(如LHMDS)去质子化,随后与步骤(a)中获得的氨基甲酸酯中间体反应。形成脲后, R^1 - R^6 基团可根据需要进行进一步的转化以提供所希望的产物。

[0118] 方案2



[0120] 脲产物的形成涉及在合适的温度(如RT)下,在合适的溶剂(如THF)中,用合适的碱(如三乙胺)进行的(未)取代的4-氨基吡啶与三光气,随后与取代的5-氨基异噻唑的反应。

形成脲后, R^1 - R^6 基团可根据需要进行进一步的转化以提供所希望的产物。

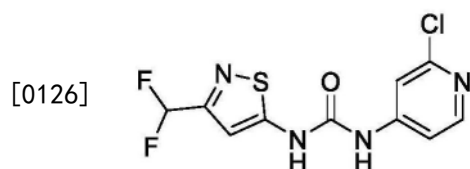
[0121] 实例

[0122] 已经使用本文披露的方法制备、分离和表征了以下实例。下列实例说明了本披露的部分范围, 并不意味着限制本披露的范围。

[0123] 除非另外规定, 否则起始材料通常可从非限制性商业来源获得, 例如TCI精细化学品公司(TCI Fine Chemicals) (日本)、奥罗拉精细化学品公司(Aurora Fine Chemicals LLC) (圣地亚哥, 加利福尼亚州)、FCH集团(FCH Group) (乌克兰)、奥德里奇化学品公司(Aldrich Chemicals Co.) (密尔沃基, 威斯康星州)、阿克洛斯有机公司(Acros Organics) (费尔劳恩, 新泽西州)、美桥化工有限公司(Maybridge Chemical Company, Ltd.) (康沃尔, 英格兰)、美奇丝科学公司(Matrix Scientific) (美国)、安娜敏公司(Enamine Ltd) (乌克兰)、Combi-Blocks公司(Combi-Blocks, Inc.) (圣地亚哥, 美国)、奥克伍德公司(Oakwood Products, Inc.) (美国)、阿波罗科学公司(Apollo Scientific Ltd.) (英国)。

[0124] 实例1

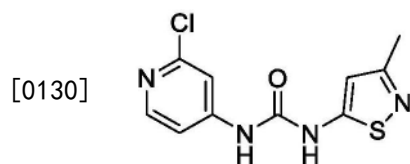
[0125] 1-(2-氯吡啶-4-基)-3-(3-(二氟甲基)异噻唑-5-基)脲



[0127] 在0°C下, 向2-氯-4-氨基吡啶(1.57g, 12.25mmol)和吡啶(1.38mL, 17.05mmol)在DCM(100mL)中的混合物中添加4-硝基苯基氯甲酸酯(2.6g, 12.89mmol)。将混合物在0°C下保持2min, 然后在rt下温热。再过20min后, 将混合物在真空中浓缩以给出残余物, 将其吸收在二噁烷(80mL)中。快速添加3-(二氟甲基)异噻唑-5-胺(中间体1)(1.60g, 10.66mmol)在二噁烷(10mL)中的溶液, 随后添加DIPEA(6.51mL, 37.3mmol)。将混合物加热至60°C。3h后, 将混合物冷却至RT, 然后添加水和EtOAc。用水、饱和碳酸氢钠水溶液和盐水重复洗涤有机层。将有机相经硫酸钠干燥, 过滤并在真空中浓缩以获得残余物, 将其通过快速色谱法(EtOH/EtOAc/庚烷)纯化。将部分纯化的残余物与醚一起研磨, 并将获得的固体吸收在水中。冻干除去残余的醚以给出标题化合物。 ^1H NMR(400MHz, DMSO- d_6) δ 11.08(s, 1H), 10.15(s, 1H), 8.26(d, $J=4\text{Hz}$, 1H), 7.68(d, $J=2\text{Hz}$, 1H), 7.46(dd, $J=4, 2\text{Hz}$, 1H), 7.15(s, 1H), 6.97(t, $J=52\text{Hz}$, 1H)。MS(ESI) m/z 305.1 $[M+H]^+$ 。LCMS: $R_t=1.25\text{min}$, m/z 305.1 (M+H) (LCMS方法1)。 ^1H NMR(400MHz, DMSO- d_6) δ 11.08(s, 1H), 10.15(s, 1H), 8.26(d, $J=4\text{Hz}$, 1H), 7.68(d, $J=2\text{Hz}$, 1H), 7.46(dd, $J=4, 2\text{Hz}$, 1H), 7.15(s, 1H), 6.97(t, $J=52\text{Hz}$, 1H)。

[0128] 实例2

[0129] 1-(2-氯吡啶-4-基)-3-(3-甲基异噻唑-5-基)脲

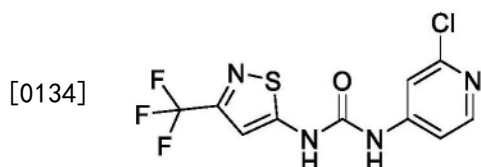


[0131] 在RT下, 将2-氯-4-氨基吡啶(101mg, 0.786mmol)在THF(2mL)中的溶液缓慢添加至三光气(101mg, 0.340mmol)在THF(2mL)中的溶液中。然后添加三乙胺(0.11mL, 0.790mmol)。

将混合物在RT下搅拌20min后,添加3-甲基-5-氨基异噻唑盐酸盐(120mg,0.797mmol)和三乙胺(0.12mL,0.863mmol)在THF(2mL)中的混合物。将混合物在RT下搅拌18h,并且分配在EtOAc和KOH水溶液之间。将合并的有机萃取物经MgSO₄干燥并且浓缩。将残余物通过HPLC(基本方法)纯化以给出标题化合物。LCMS:Rt=0.85min,m/z 269.0 (M+H) (LCMS方法2)。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ10.78(s,1H),9.87(s,1H),8.24(d,J=4Hz,1H),7.66(s,1H),7.43(d,J=4Hz,1H),6.73(s,1H),2.30(s,3H)。

[0132] 实例3

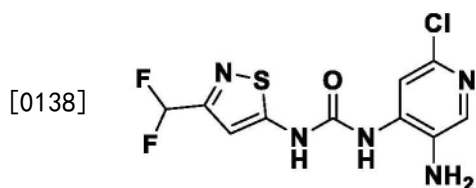
[0133] 1-(2-氯吡啶-4-基)-3-(3-(三氟甲基)异噻唑-5-基)脲



[0135] 向3-(三氟甲基)异噻唑-5-胺(中间体2)(70mg,0.41mmol)和苯基(2-氯吡啶-4-基)氨基甲酸酯(中间体3)(104mg,0.41mmol)在DMF(1.2mL)中的冰冷混合物中添加LHMDS溶液(1M在THF中,0.41mL,0.41mmol)。将混合物温热至RT并搅拌16h。将混合物在真空中浓缩,然后通过HPLC(基本方法)纯化以获得标题化合物。LCMS:Rt=1.38min,m/z 323 (M+H) (LCMS方法1)。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ11.21(br s,1H),10.18(br s,1H),8.23(d,J=5.6Hz,1H),7.69(d,J=1.8Hz,1H),7.46(dd,J=5.7,1.9Hz,1H),7.22(s,1H)。

[0136] 实例4

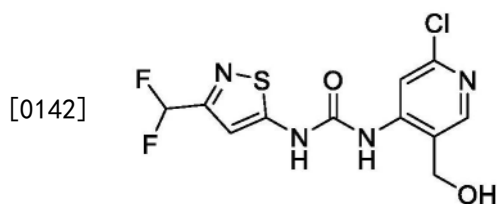
[0137] 1-(5-氨基-2-氯吡啶-4-基)-3-(3-(二氟甲基)异噻唑-5-基)脲



[0139] 将1-(5-硝基-2-氯吡啶-4-基)-3-(3-(二氟甲基)异噻唑-5-基)脲(中间体5)(7.63g,21.82mmol)、铁(4.87g,87mmol)和氯化铵(9.34g,175mmol)在乙醇(84mL)和水(25mL)中的混合物在50°C下加热1h。将混合物通过硅藻土过滤,将滤饼用MeOH冲洗,并将滤液在真空中浓缩。将残余物吸收在EtOAc中,并用盐水洗涤。将有机级分经硫酸镁干燥并在真空中浓缩以给出残余物,将其通过硅胶色谱法(EtOAc/庚烷)纯化,随后在C18柱上使用ISCO反相纯化,用水+0.1%甲酸和乙腈+0.1%甲酸洗脱进行纯化。LCMS:Rt=0.76min,m/z =320.2 (M+H) (LCMS方法2)。¹H NMR(400MHz,甲醇-d₄) δ7.88(s,1H),7.84(s,1H),6.99(s,1H),6.66(t,J=54.9Hz,1H)。

[0140] 实例5

[0141] 1-(2-氯-5-(羟甲基)吡啶-4-基)-3-(3-(二氟甲基)异噻唑-5-基)脲



[0143] 步骤1: 1-(5-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-2-氯吡啶-4-基)-3-(3-(二氟甲基)异噻唑-5-基)脲的合成

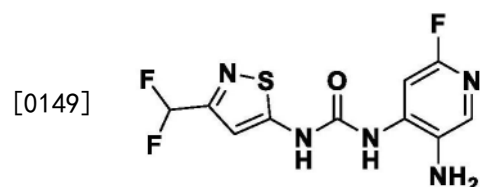
[0144] 将LHMDS (1M在THF中, 9.2mL, 9.2mmol)滴加到苯基(5-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-2-氯吡啶-4-基)氨基甲酸酯(中间体6) (3.46g, 8.81mmol)和3-(二氟甲基)异噻唑-5-胺(中间体1) (1.15g, 7.66mmol)在DMF (30mL)中的溶液,并将反应在RT下搅拌30min。将反应用MeOH (10mL)淬灭,并且在真空中除去挥发物。将残余物吸收在1:1的EtOAc/饱和NH₄Cl水溶液中,并分离各层。将水层用EtOAc萃取。将有机物合并,用Na₂SO₄干燥,过滤,并且在真空中除去挥发物。将粗残余物通过硅胶色谱法(EtOAc/庚烷)纯化。LCMS: Rt = 1.79min, m/z = 449.2 (M+H) (LCMS方法1)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 11.39 (s, 1H), 8.93 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.19 (s, 1H), 6.96 (t, J = 54.5Hz, 1H), 4.79 (s, 2H), 0.86 (s, 9H), 0.07 (s, 6H)。

[0145] 步骤2: 1-(2-氯-5-(羟甲基)吡啶-4-基)-3-(3-(二氟甲基)异噻唑-5-基)脲的合成

[0146] 将TBAF (1M在THF中, 2.45mL, 2.45mmol)添加至1-(5-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-2-氯吡啶-4-基)-3-(3-(二氟甲基)异噻唑-5-基)脲(在以上步骤1中获得的) (1.1g, 2.45mmol)在THF (8mL)中的溶液,并将混合物在RT下搅拌2h。将反应混合物倒入水中,并将产物用EtOAc萃取。将有机萃取物合并,用Na₂SO₄干燥,过滤,并且在真空中除去挥发物。将粗产物物通过硅胶色谱法(MeOH/DCM)纯化以给出标题化合物。LCMS: Rt = 0.78min, m/z = 335.2 (M+H) (LCMS方法2)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 11.75 (s, 1H), 9.22 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.20 (s, 1H), 6.97 (t, J = 56Hz, 1H), 5.79 (t, J = 5Hz, 1H), 4.59 (d, J = 5Hz, 2H)。

[0147] 实例6

[0148] 1-(5-氨基-2-氟吡啶-4-基)-3-(3-(二氟甲基)异噻唑-5-基)脲

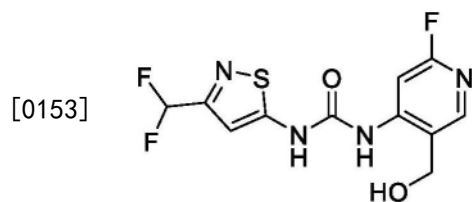


[0150] 将1-(5-硝基-2-氯吡啶-4-基)-3-(3-(二氟甲基)异噻唑-5-基)脲(中间体5) (3.77g, 8.62mmol)、TMAF (3.61g, 38.8mmol)和DMF (83mL)的混合物在75°C下加热1h。将反应用水淬灭并用EtOAc萃取。将合并的有机级分用水、盐水洗涤,然后用硫酸钠干燥,过滤并在真空中浓缩。然后将残余物通过快速色谱法(EtOAc/庚烷)纯化以给出部分纯化的产物(2.73g),将其吸收在乙醇(100mL)和水(20mL)中。添加氯化铵(2.13g, 39.8mmol)和铁(1.91g, 34.2mmol),并将混合物加热至45°C持续30min。然后将反应混合物在短硅藻土垫上过滤,将其用MeOH洗涤。将滤液浓缩,然后用EtOAc和水稀释。将水层用EtOAc萃取。将合并的有机级分用盐水洗涤,然后用硫酸钠干燥,过滤并在真空中浓缩。将残余物通过硅胶色谱法(EtOAc/庚烷),随后在C18柱上通过ISCO反相纯化,用水+0.1%甲酸和乙腈+0.1%甲酸洗脱依次纯化。最后通过HPLC(甲酸方法)纯化少量不纯的部分,并且合并的级分提供了标题化合物。LCMS: Rt = 1.12min, m/z 304.2 (M+H) (LCMS方法1)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 11.15 (s, 1H), 8.92 (s, 1H), 7.63 (d, J = 0.9Hz, 1H), 7.46 (d, J = 0.8Hz, 1H), 7.14 (s, 1H), 6.95 (t, J

=54.5Hz, 1H), 4.82 (s, 2H)。

[0151] 实例7

[0152] 1-(3-(二氟甲基)异噻唑-5-基)-3-(2-氟-5-(羟甲基)吡啶-4-基)脲



[0154] 步骤1: 1-(5-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-2-氟吡啶-4-基)-3-(3-(二氟甲基)异噻唑-5-基)脲的合成。

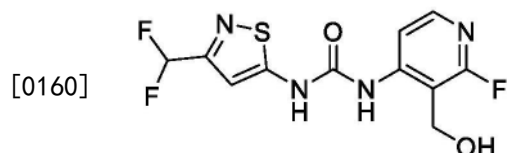
[0155] 向3-(二氟甲基)异噻唑-5-胺(中间体1) (48mg, 0.323mmol) 和苯基(5-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-2-氟吡啶-4-基)氨基甲酸酯(中间体7) (135mg, 0.323mmol) 在DMF (2mL) 中的溶液中添加LHMDS (1M在THF中, 0.484mL, 0.484mmol), 并将得到的混合物在RT下搅拌30min。将混合物在真空中浓缩, 并且将产物通过硅胶色谱法 (EtOAc/庚烷) 纯化以给出标题化合物。LCMS: Rt=1.76min, m/z 433.2 (M+H) (LCMS方法1)

[0156] 步骤2: 1-(3-(二氟甲基)异噻唑-5-基)-3-(2-氟-5-(羟甲基)吡啶-4-基)脲的合成。

[0157] 向1-(5-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-2-氟吡啶-4-基)-3-(3-(二氟甲基)异噻唑-5-基)脲 (119mg, 0.275mmol) 在THF (5mL) 中的溶液中添加TBAF (1M在THF中, 0.275mL, 0.275mmol), 并将得到的混合物在RT下搅拌2h。将混合物在真空中浓缩, 并通过硅胶色谱法 (MeOH/DCM, 将氢氧化铵作为改性剂) 纯化以给出标题化合物。LCMS: Rt=1.16min, m/z 337 (M+H) (LCMS方法1)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 11.76 (s, 1H), 9.26 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.22-6.70 (m, 2H), 5.73 (t, J=5.4Hz, 1H), 4.59 (d, J=5.1Hz, 2H)。

[0158] 实例8

[0159] 1-(3-(二氟甲基)异噻唑-5-基)-3-(2-氟-3-(羟甲基)吡啶-4-基)脲



[0161] 步骤1: 1-(3-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-2-氟吡啶-4-基)-3-(3-(二氟甲基)异噻唑-5-基)脲的合成

[0162] 在0°C下, 向3-(二氟甲基)异噻唑-5-胺(中间体1) (1.04g, 6.93mmol) 和苯基(3-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-2-氟吡啶-4-基)氨基甲酸酯(中间体8) (3.39g, 9.00mmol) 在DMF (35mL) 中的溶液中添加LHMDS (1M在THF中, 13.8mL, 13.8mmol)。除去冷却浴, 并将得到的混合物在RT下搅拌45min。将混合物在真空中浓缩, 并且将产物通过硅胶色谱法 (EtOAc/庚烷) 纯化以给出标题化合物。LCMS: Rt=1.74min, m/z 433.3 (M+H) (LCMS方法1)。

[0163] 步骤2: 1-(3-(二氟甲基)异噻唑-5-基)-3-(2-氟-3-(羟甲基)吡啶-4-基)脲的合成

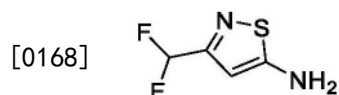
[0164] 向1-(3-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-2-氟吡啶-4-基)-3-(3-(二氟甲

基) 异噻唑-5-基) 脲 (2.19g, 5.06mmol) 在 THF (40mL) 中的溶液中添加 TBAF (1M 在 THF 中, 6.6mL, 6.6mmol), 并将得到的混合物在 RT 下搅拌 30min。将反应用水淬灭, 然后用 EtOAc 稀释。将水层用 EtOAc 萃取。将合并的有机级分合并, 用盐水洗涤, 然后用硫酸钠干燥, 过滤并在真空中浓缩。将粗混合物通过快速色谱法 (MeOH/DCM) 纯化以给出标题化合物。LCMS: Rt = 1.12min, m/z 319.2 (M+H) (LCMS 方法1)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 11.89 (s, 1H), 9.44 (s, 1H), 8.10-8.02 (m, 2H), 7.05 (s, 1H), 6.95 (t, J=54.5Hz, 1H), 5.83 (s, 1H), 4.62 (s, 2H)。

[0165] 中间体

[0166] 中间体1

[0167] 3-(二氟甲基) 异噻唑-5-胺



[0169] 步骤1: 3-甲基-5-硝基异噻唑

[0170] 将铜粉 (96g, 1.5mol) 置于 5L 反应器中。添加水 (1L), 随后添加 NaNO₂ (104g, 1.5mol)。添加 HCl 水溶液 (12M, 1.5mL, 18mmol), 并将反应混合物搅拌 20min。通过加料漏斗滴加 3-甲基-5-氨基异噻唑盐酸盐 (58g, 507mmol) 在 500mL 水和 HCl 水溶液 (12M, 65mL, 0.78mol) 中的溶液, 保持温度低于 30°C。添加另外的 100mL 水。添加后, 将反应混合物搅拌 3h。将反应混合物用水和 MTBE 通过硅藻土过滤。将滤液转移至反应器, 并分离各层。将水层用 MTBE 洗涤两次。将合并的有机层经 MgSO₄ 干燥, 过滤并浓缩以给出标题化合物。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 8.12 (s, 1H), 2.50 (s, 3H)。

[0171] 步骤2: 5-硝基异噻唑-3-甲酸

[0172] 向配备有机械搅拌器和温度监测器的水浴中的 1L 3颈圆底烧瓶中添加 3-甲基-5-硝基异噻唑 (26.5g, 184mmol), 然后以一定速率添加 H₂SO₄ (350mL) 以保持温度低于 30°C。每 20min 分 6 批添加 CrO₃ (55.1g, 552mmol), 以确保温度保持低于 24°C。将反应在水浴的存在下搅拌 3 天。将反应混合物倒入冰水 (总计 1.4L) 中, 并用 Et₂O (1L) 萃取 3 次。将合并的有机层用盐水洗涤, 然后经 MgSO₄ 干燥, 过滤并浓缩以提供黄色固体。将固体吸收在庚烷 (80mL) 和 Et₂O (20mL) 中并研磨。剧烈搅拌 2min 后, 将混合物过滤, 然后用 5:1 的庚烷/醚混合物 (最小量) 冲洗以提供标题化合物。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 9.89 (s, 1H), 8.57 (s, 1H)。

[0173] 步骤3: (5-硝基异噻唑-3-基) 甲醇

[0174] 将烧瓶用在 THF (50mL) 中的 5-硝基异噻唑-3-甲酸 (3.0g, 17.2mmol) 填充, 在冰浴上冷却, 然后经 30min 滴加硼烷四氢呋喃复合物 (1M 在 THF 中) (22.4mL, 22.4mmol), 并且将反应温热过夜。将反应混合物重新冷却至 0°C, 然后滴加甲醇 (20mL)。将反应在 0°C 下剧烈搅拌 5min, 然后将其温热至 RT 并再搅拌 15min。将反应混合物在真空中浓缩至一半体积, 然后用 EtOAc (100mL), 饱和 NH₄Cl 水溶液 (50mL) 和水 (50mL) 稀释。分离各层, 并且用 EtOAc (2x 100mL) 萃取水性部分。将有机级分合并, 并用盐水洗涤, 然后经硫酸钠干燥, 过滤并在真空中浓缩。通过硅胶色谱法 (EtOAc/DCM) 纯化以给出标题化合物。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 8.09 (s, 1H), 5.77 (t, J=6.1Hz, 1H), 4.58 (d, J=6.1Hz, 2H)。MS (ESI) m/z 161.0 [M+H]⁺。

[0175] 步骤4: 5-硝基异噻唑-3-甲醛的合成

[0176] 在 0°C 下, 经 5min 将戴斯-马丁高碘烷 (2.23g, 5.27mmol) 分小批添加至在 DCM (25mL) 中的 (5-硝基异噻唑-3-基) 甲醇 (767mg, 4.79mmol) 中。将混合物在 0°C 下搅拌 10min,

温热至RT并在RT下搅拌20min。将混合物用DCM稀释。添加饱和NaHCO₃水溶液和饱和硫代硫酸钠水溶液。将混合物剧烈搅拌10min,然后分离两层。将水层用DCM萃取。将合并的有机萃取物用盐水洗涤,经硫酸钠干燥并在真空中浓缩以给出标题化合物。该产物无需纯化即直接用于下一步。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 9.85 (s, 1H), 8.58 (s, 1H)。

[0177] 步骤5: 3-(二氟甲基)-5-硝基异噻唑的合成

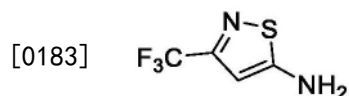
[0178] 在0℃下,将DAST (0.201mL, 1.518mmol)以逐滴的方式添加至5-硝基异噻唑-3-甲醛(在以上步骤1中获得的) (80mg, 0.506mmol)在DCM (3.5mL)中的溶液中。将混合物在0℃下搅拌25min,温热至RT并在RT下搅拌2h。将混合物在0℃下用饱和NaHCO₃水溶液淬灭,并用DCM稀释。将混合物剧烈搅拌1min,并分离两层。将水层用DCM萃取。将合并的有机萃取物用盐水洗涤,经硫酸钠干燥并在真空中浓缩以给出标题化合物。该产物无需纯化即立即用于下一步。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 8.54 (s, 1H), 7.16 (t, J=52Hz, 1H)。

[0179] 步骤6: 3-(二氟甲基)异噻唑-5-胺的合成

[0180] 将3-(二氟甲基)-5-硝基异噻唑 (49mg, 0.27mmol)、铁粉 (46mg, 0.81mmol)和乙酸 (1.5mL)的混合物加热至50℃持续2h。将混合物用乙酸乙酯稀释,并用30%氢氧化铵碱化。分离有机层并在真空中浓缩,然后通过硅胶色谱法 (EtOAc/庚烷)纯化以获得标题化合物。LCMS: Rt=0.42min; m/z 151.2 (M+H) (LCMS方法2); ¹H NMR (400MHz, 甲醇-d₄) δ 6.46 (t, J=55.0Hz, 1H), 6.39 (s, 1H)。¹⁹F NMR (376MHz, MeOD) δ -116.06。

[0181] 中间体2

[0182] 3-(三氟甲基)异噻唑-5-胺



[0184] 步骤1: 4,4,4-三氟-3-氧代丁腈的合成

[0185] 将干燥的100mL烧瓶用KOt-Bu (1M在THF中, 85mL, 85mmol)填充,并在冰上冷却。30min后,经3min添加三氟乙酸乙酯 (7.27mL, 60.9mmol)和乙腈 (3.18mL, 60.9mmol)的混合物。反应混合物变成悬浮液。将混合物缓慢温热至RT,并搅拌24h。将混合物用1M HCl淬灭,并将粗产物用乙醚萃取并用水洗涤。将有机层分离,经硫酸镁干燥,过滤并在真空中浓缩以提供标题化合物,将其无需纯化即用于下一步。LCMS: Rt=0.22min, m/z 136.1 (M-1) (LCMS方法4)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 2.99 (s, 2H)。

[0186] 步骤2: (Z)-3-氨基-4,4,4-三氟丁-2-烯腈的合成

[0187] 将4,4,4-三氟-3-氧代丁腈(在步骤1中制备的) (1.1g, 8.03mmol)、甲酸铵 (1.518g, 24.08mmol)和乙酸 (0.046mL, 0.803mmol)在甲苯 (100mL)中的混合物在非共沸条件下加热至120℃,持续18h。将混合物在真空中浓缩,并且无需进一步纯化即用于下一步。

[0188] 步骤3: (Z)-3-氨基-4,4,4-三氟丁-2-烯硫酰胺的合成

[0189] 将(Z)-3-氨基-4,4,4-三氟丁-2-烯腈(在步骤2中制备的) (1.00g, 7.35mmol)、MgCl₂ (0.70g, 7.35mmol)和NaSH (0.824g, 14.70mmol)在DMF (20mL)中的混合物在RT下搅拌24h。将混合物分配在乙酸乙酯和水之间。将合并的有机萃取物经硫酸镁干燥,过滤并在真空中浓缩以提供标题化合物。LCMS: Rt=0.81min, m/z 171 (M+H) (LCMS方法1)。

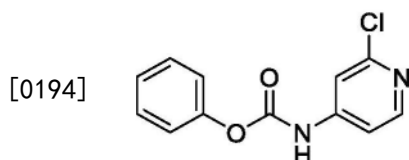
[0190] 步骤4: 3-(三氟甲基)异噻唑-5-胺的合成

[0191] 在0℃-5℃下,向(Z)-3-氨基-4,4,4-三氟丁-2-烯硫酰胺(在步骤3中制备的)

(1.2g, 7.05mmol) 在吡啶 (24mL) 中的混合物中添加 H_2O_2 (3mL, 29.4mmol), 并将混合物温热至 RT 并搅拌 2h。将混合物在真空中浓缩, 并将残余物在硅胶上进行色谱分离 (乙酸乙酯/庚烷) 以给出标题化合物。LCMS: $R_t = 0.97\text{min}$, m/z 169 (M+H) (LCMS 方法1)。 ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.21 (s, 2H), 6.44 (s, 1H)。

[0192] 中间体3

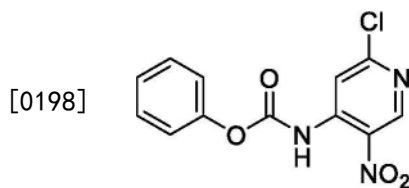
[0193] 苯基 (2-氯吡啶-4-基) 氨基甲酸酯



[0195] 在 0°C 下, 向 2-氯吡啶-4-胺 (12.9g, 101mmol) 和吡啶 (8.13mL, 101mmol) 在 DCM (315mL) 中的溶液中添加氯甲酸苯酯 (13.3mL, 106mmol)。将混合物经 2h 温热至 RT, 并在真空中浓缩。添加水, 并将混合物在 RT 下搅拌。将固体经烧结的塑料漏斗过滤, 用水冲洗并在 40°C 下在高真空中干燥 24h 以给出标题化合物。LCMS: $R_t = 1.20\text{min}$, $m/z = 249.2$ (M+H) (LCMS 方法2)。

[0196] 中间体4

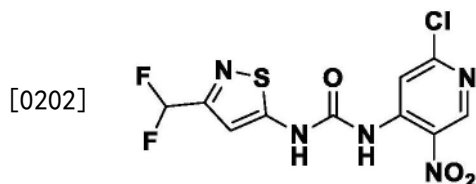
[0197] 苯基 (2-氯-5-硝基吡啶-4-基) 氨基甲酸酯



[0199] 在 0°C 下, 向 4-氨基-2-氯-5-硝基吡啶 (150mg, 0.864mmol) 和吡啶 (0.070mL, 0.86mmol) 在二噁烷 (4mL) 中的溶液中添加氯甲酸苯酯 (0.114mL, 0.907mmol)。将混合物在 80°C 下加热 18h, 冷却至 RT 并倒入水中。将产物用 EtOAc 萃取。将合并的有机萃取物经 Na_2SO_4 干燥, 并在真空中浓缩。将粗残余物通过硅胶色谱法 (EtOAc/庚烷) 纯化以给出标题化合物。LCMS: $R_t = 1.51\text{min}$, $m/z = 294.1$ (M+H) (LCMS 方法1)。

[0200] 中间体5

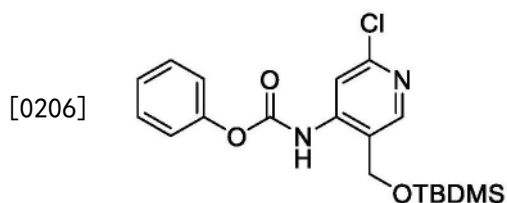
[0201] 1- (5-硝基-2-氯吡啶-4-基) -3- (3- (二氟甲基) 异噻唑-5-基) 脲



[0203] 将苯基 (2-氯-5-硝基吡啶-4-基) 氨基甲酸酯 (中间体4) (4.50g, 15.32mmol)、3- (二氟甲基) 异噻唑-5-胺 (中间体1) (2.0g, 13.32mmol) 和 DIPEA (5.8mL, 33.3mmol) 在二噁烷 (59mL) 中的溶液在 85°C 下加热 16h。将混合物在真空中浓缩, 并将残余物通过硅胶色谱法 (EtOAc/庚烷) 纯化以给出标题化合物。LCMS: $R_t = 1.43\text{min}$, $m/z = 350.1$ (M+H) (LCMS 方法1)。

[0204] 中间体6

[0205] 苯基 (5- ((叔丁基二甲基甲硅烷基) 氧基) 甲基) -2-氯吡啶-4-基) 氨基甲酸酯



[0207] 步骤1: 甲基6-氯-4-((4-甲氧基苄基)氨基)烟酸酯的合成

[0208] 将对甲氧基苄胺 (19.0mL, 146mmol)、甲基4,6-二氯烟酸酯 (25g, 121mmol)、三乙胺 (20.3mL, 146mmol) 在 MeCN (60mL) 中的混合物在 RT 下搅拌 24h。添加更多的 4-甲氧基苄胺 (2.5mL), 并且将混合物在 RT 下搅拌 72h。将混合物浓缩, 并将残余物分配在 EtOAc 和饱和 NH_4Cl 水溶液之间。将有机萃取物合并, 用 Na_2SO_4 干燥, 过滤并在真空中浓缩。将粗残余物通过硅胶色谱法 (EtOAc/庚烷) 纯化以给出标题化合物。LCMS: $R_t = 1.42\text{min}$, $m/z = 307.1$ (M+H) (LCMS 方法1)。

[0209] 步骤2: (6-氯-4-((4-甲氧基苄基)氨基)吡啶-3-基)甲醇的合成

[0210] 在 0°C 的搅拌下, 向 LAH (2M 在 THF 中, 21.52mL, 43.0mmol) 在 THF (150mL) 中的溶液中滴加甲基6-氯-4-((4-甲氧基苄基)氨基)烟酸酯的溶液 (在步骤1中制备的) (12g, 39.1mmol) 在 THF (100mL) 中的溶液。将反应温热至 RT 并搅拌 30min。通过在冰浴中缓慢添加 EtOAc 来淬灭反应, 随后进行斯坦哈特条件 (Steinhardt condition) 以淬灭 LAH (2mL H_2O , 随后是 2mL 的 15% NaOH 和 6mL 的 H_2O)。将得到的溶液搅拌 15min, 并温热至 RT。将混合物经硅藻土过滤, 并将滤液转移至分液漏斗。将产品用水进一步稀释, 然后用 EtOAc 萃取。将有机物合并, 用 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 并且在真空中除去挥发物以给出标题化合物。LCMS: $R_t = 0.84\text{min}$, $m/z = 279.3$ (M+H) (LCMS 1 方法1)。

[0211] 步骤3: (4-氨基-6-氯吡啶-3-基)甲醇的合成

[0212] 将 (6-氯-4-((4-甲氧基苄基)氨基)吡啶-3-基)甲醇 (在步骤2中制备的) (9.82g, 35.2mmol) 在 TFA (2.71mL, 35.2mmol) 中的溶液在 60°C 下加热 18h。将反应用 10% 的 K_2CO_3 水溶液中和至 pH 约 7。然后将混合物转移至分液漏斗, 并用 DCM 萃取。将有机物合并, 用 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 并且在真空中除去挥发物以给出一部分标题化合物。将水层在真空中浓缩, 并将得到的固体稀释于异丙醇中。滤出不溶性盐, 并将溶液在冰上冷却。滤出沉淀出的另外的盐。在真空中除去挥发物以给出更多量的标题化合物。LCMS: $R_t = 0.26\text{min}$, $m/z = 159.1$ (M+H) (LCMS 方法2)。

[0213] 步骤4: 5-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-2-氯吡啶-4-胺的合成

[0214] 将 (4-氨基-6-氯吡啶-3-基)甲醇 (在步骤3中制备的) (5g, 32mmol)、TBDMSCl (5.23g, 34.7mmol) 和咪唑 (5.37g, 79mmol) 在 DMF (10mL) 中的混合物在 RT 下搅拌 1h。将反应混合物倒入水中并用 EtOAc 萃取。将有机物合并, 用 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 并且在真空中除去挥发物。将粗残余物通过硅胶色谱法 (EtOAc/庚烷) 纯化以给出标题化合物。LCMS: $R_t = 1.52\text{min}$, $m/z = 273.2$ (M+H) (LCMS 方法2)。

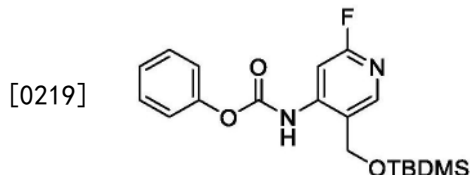
[0215] 步骤5: 苯基 (5-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-2-氯吡啶-4-基)氨基甲酸酯的合成

[0216] 在 RT 的搅拌下, 向 5-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-2-氯吡啶-4-胺 (在步骤4中制备的) (5.55g, 20.3mmol) 和吡啶 (1.8mL, 22.4mmol) 在 DCM (75mL) 中的溶液中添加

氯甲酸苯酯 (2.68mL, 21.4mmol)。将反应经2h温热至RT。在真空中除去挥发物,并且将残余物用EtOAc和饱和NaHCO₃水溶液稀释。然后将混合物用EtOAc萃取。将有机物合并,用Na₂SO₄干燥,过滤,并且在真空中除去挥发物。将粗残余物通过硅胶色谱法(EtOAc/庚烷)纯化以给出标题化合物。LCMS:Rt=1.94min,m/z=393.3(M+H) (LCMS方法1)。

[0217] 中间体7

[0218] 苯基(5-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-2-氟吡啶-4-基)氨基甲酸酯



[0220] 步骤1: 甲基4-氨基-6-氟烟酸酯的合成。

[0221] 向含有甲基-4,6-二氯烟酸酯(6.75g, 32.8mmol)和TMAF(8.0g, 86mmol)的500mL烧瓶中添加DMF(100mL),并将混合物在RT下搅拌1.5h直到通过LCMS鉴定出中间体甲基-4,6-二氟烟酸酯的完全形成。然后向此反应混合物中添加2M氨在异丙醇(35mL, 70mmol)中的溶液,并在RT下搅拌20h。通过LCMS鉴定出标题化合物的完全形成。将反应混合物用水淬灭,并将粗产物用EtOAc萃取。将有机层用盐水洗涤,然后经硫酸钠干燥,过滤并在真空中浓缩。将残余物通过硅胶色谱法(EtOAc/庚烷)纯化以获得标题化合物。LCMS:Rt=0.97min,m/z 174(M+H) (LCMS方法1)。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ8.43(s, 1H), 7.52(s, 2H), 6.30(s, 1H), 3.82(s, 3H)。

[0222] 步骤2: (4-氨基-6-氟吡啶-3-基)甲醇的合成。

[0223] 通过加料漏斗经45min,向进一步用THF(200mL)稀释的LAH(2M在THF中, 24.8mL, 49.6mmol)的冰冷(0°C)溶液中添加甲基4-氨基-6-氟烟酸酯(4.22g, 24.8mmol)在THF(100mL)中的溶液,得到悬浮液。将混合物温热至RT持续2h,然后通过LCMS判断反应完成。将反应混合物用THF(200mL)稀释,并在冰上冷却。将十水合硫酸钠分批添加至混合物中直到鼓泡停止。将混合物搅拌18h,然后过滤并在真空中浓缩。将得到的残余物通过硅胶色谱法(EtOAc/庚烷)纯化以获得标题化合物。LCMS:Rt=0.27min,m/z 143(M+H) (LCMS方法3)。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ7.63(s, 1H), 6.20(s, 2H), 6.09(s, 1H), 5.04(t, J=5.5Hz, 1H), 4.35(d, J=5.5Hz, 2H)。

[0224] 步骤3: 5-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-2-氟吡啶-4-胺的合成。

[0225] 将(4-氨基-6-氟吡啶-3-基)甲醇(1.52g, 10.7mmol)、TBDMSCl(1.77g, 11.8mmol)和咪唑(1.82g, 26.7mmol)在DMF(50mL)中的混合物在RT下搅拌1h,然后通过TLC, 100% EtOAc判断反应完成。将反应混合物在真空中浓缩,然后通过硅胶色谱法(EtOAc/庚烷)纯化以获得标题化合物。LCMS:Rt=1.46min,m/z 257(M+H) (LCMS方法1)。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ7.60(s, 1H), 6.11(s, 2H), 6.04(s, 1H), 4.50(s, 2H), 0.81(s, 9H), 0.00(s, 6H)。

[0226] 步骤4: 苯基(5-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-2-氟吡啶-4-基)氨基甲酸酯的合成。

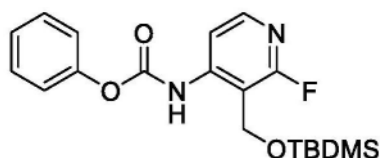
[0227] 向(4-氨基-6-氟吡啶-3-基)甲醇(1.45g, 5.66mmol)和吡啶(0.46mL, 5.66mmol)在二噁烷(30mL)中的混合物中添加氯甲酸苯酯(0.710mL, 5.66mmol),并将得到的混合物搅拌1h。然后将混合物用EtOAc稀释,然后用碳酸氢钠随后是水洗涤。将有机部分经硫酸钠干燥

并在真空中浓缩。将残余物通过硅胶色谱法 (EtOAc/庚烷) 纯化以获得标题化合物。LCMS: Rt = 1.89min, m/z 377 (M+H) (LCMS方法1)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 9.66 (s, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.39-7.31 (m, 2H), 7.16-7.09 (m, 2H), 6.74-6.52 (m, 1H), 4.78 (s, 2H), 0.80 (s, 9H), 0.00 (s, 6H)。

[0228] 中间体8

[0229] 苯基 (3-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-2-氟吡啶-4-基)氨基甲酸酯

[0230]



[0231] 步骤1: 甲基2,4-二氟烟酸酯的合成

[0232] 在-78°C下,将2,4-二氟吡啶 (5g, 43.4mmol) 在THF (120mL) 中的溶液滴加到二异丙基酰胺锂 (2M在THF/庚烷/乙苯中, 26.1mL, 52.1mmol) 的搅拌溶液中。搅拌1h后,在-78°C下,将反应通过套管转移至氯甲酸甲酯 (5.05mL, 65.2mmol) 在THF (120mL) 中的搅拌溶液。将反应混合物经30min温热至RT。将反应用水 (100mL) 缓慢淬灭,并用EtOAc (3x 100mL) 萃取。将有机物合并,用Na₂SO₄干燥,过滤,并且在真空中除去挥发物。将产物通过硅胶色谱法 (EtOAc/庚烷) 纯化以给出标题化合物。LCMS: Rt = 0.94min, m/z 174.1 (M+H) (LCMS方法1)。

[0233] 步骤2: 甲基4-氨基-2-氟烟酸酯的合成

[0234] 向甲基2,4-二氟烟酸酯 (在步骤1中制备的) (2g, 11.55mmol) 在二噁烷 (40mL) 中的溶液中添加在二噁烷中的氨 (0.5M, 46.2mL, 23.11mmol)。将反应在60°C下搅拌18h。将反应倒入饱和NaHCO₃ (水溶液) 中并用EtOAc (3x100mL) 萃取。将有机物合并,用Na₂SO₄干燥,过滤,并且在真空中除去挥发物。将产物通过硅胶色谱法 (EtOAc/庚烷) 纯化以给出标题化合物。LCMS: Rt = 0.77min, m/z 171.1 (M+H) (LCMS方法1)。

[0235] 步骤3: (4-氨基-2-氟吡啶-3-基) 甲醇的合成

[0236] 在冰浴中的搅拌下,向甲基4-氨基-2-氟烟酸酯 (2.02g, 11.87mmol) 在THF (70mL) 中的溶液中滴加LAH (2M在THF中, 7.1mL, 14.2mmol)。将反应在0°C下搅拌30min,并通过缓慢添加十水合硫酸钠 (3.5g) 来淬灭反应。将混合物搅拌15min,然后添加无水Na₂SO₄。将混合物经硅藻土过滤,并且在真空中除去挥发物。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 7.56 (d, J = 5.7Hz, 1H), 6.47 (dd, J = 5.7, 1.2Hz, 1H), 6.29 (s, 2H), 4.96 (t, J = 5.4Hz, 1H), 4.40 (d, J = 5.4Hz, 2H)。

[0237] 步骤4: 3-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-2-氟吡啶-4-胺的合成

[0238] 将 (4-氨基-2-氟吡啶-3-基) 甲醇 (1.57g, 11.05mmol)、TBDMSCl (2.00g, 13.26mmol) 和咪唑 (1.88g, 27.6mmol) 的混合物在DMF (30mL) 中在RT下搅拌。90min后,将反应用饱和NaHCO₃水溶液淬灭,然后用EtOAc稀释。将水层用EtOAc萃取。将有机级分合并,用盐水洗涤,然后用硫酸钠干燥,过滤并在真空中浓缩。将粗混合物通过快速色谱法 (EtOAc/庚烷) 纯化。LCMS: Rt = 1.47min, m/z 257.3 (M+H) (LCMS方法1)。

[0239] 步骤5: 苯基 (3-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-2-氟吡啶-4-基)氨基甲酸酯的合成

[0240] 在RT下,向3-(((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)甲基)-2-氟吡啶-4-胺 (2.36g,

9.20mmol) 和吡啶 (0.89mL, 11.0mmol) 在二噁烷 (40mL) 中的溶液中添加氯甲酸苯酯 (1.21mL, 9.7mmol)。2.5h后, 将反应用饱和NaHCO₃水溶液淬灭, 然后用EtOAc稀释。将水层用EtOAc萃取。将有机级分合并, 用盐水洗涤, 然后用硫酸钠干燥, 过滤并在真空中浓缩。

[0241] 将粗混合物通过快速色谱法 (EtOAc/庚烷) 纯化以给出标题化合物。LCMS: Rt = 1.91min, m/z 377.4 (M+H) (LCMS方法1)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 9.92 (s, 1H), 8.11 (d, J = 5.7Hz, 1H), 7.78 (d, J = 5.7Hz, 1H), 7.52-7.42 (m, 2H), 7.36-7.26 (m, 1H), 7.26-7.19 (m, 2H), 4.90 (s, 2H), 0.87 (s, 9H), 0.08 (s, 6H)。

[0242] 药物组合物和组合

[0243] 将本披露化合物典型地用作药物组合物 (例如本披露化合物和至少一种药学上可接受的载体)。“药学上可接受的载体 (稀释剂或赋形剂)”是指在本领域中普遍接受的用于向动物 (尤其哺乳动物) 递送生物活性剂的介质, 包括普遍认为安全 (GRAS) 的溶剂、分散介质、包衣、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂 (例如抗细菌剂、抗真菌剂)、等张剂、吸收延迟剂、盐、防腐剂、药物稳定剂、粘合剂、缓冲剂 (例如马来酸、酒石酸、乳酸、柠檬酸、乙酸、碳酸氢钠、磷酸钠等)、崩解剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、染料等, 及其组合, 如本领域技术人员已知的 (参见例如Allen, L.V., Jr. 等人, Remington: The Science and Practice of Pharmacy [雷明顿: 药学科学与实践] (第2卷), 第22版, Pharmaceutical Press [医药出版社] (2012))。

[0244] 在一个方面, 本披露提供了药物组合物, 该药物组合物包含本披露的化合物、或其药学上可接受的盐、和药学上可接受的载体。在另一个实施例中, 组合物包含至少两种药学上可接受的载体, 例如本文所述的那些。出于本披露的目的, 除非另有指定, 否则溶剂化物和水合物通常被认为是组合物。优选地, 药学上可接受的载体是无菌的。可以将药物组合物配制用于特定的施用途径, 如口服施用、肠胃外施用和直肠施用等。另外, 本披露的药物组合物可以固体形式 (包括但不限于胶囊、片剂、丸剂、颗粒、粉末或栓剂)、或以液体形式 (包括但不限于溶液、悬浮液或乳液) 制成。可以对药物组合物进行常规的制药操作, 如灭菌和/或可以使其含有常规的惰性稀释剂、润滑剂或缓冲剂, 以及辅助剂 (如防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂和缓冲液等)。典型地, 药物组合物是包含活性成分及以下中的一种或多种的片剂或明胶胶囊:

[0245] a) 稀释剂, 例如乳糖、右旋糖、蔗糖、甘露糖醇、山梨糖醇、纤维素和/或甘氨酸;

[0246] b) 润滑剂, 例如二氧化硅、滑石、硬脂酸、其镁盐或钙盐和/或聚乙二醇; 就片剂而言还包含

[0247] c) 粘合剂, 例如硅酸镁铝、淀粉糊、明胶、黄芪胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和/或聚乙烯基吡咯烷酮; 如果希望的话

[0248] d) 崩解剂, 例如淀粉、琼脂、海藻酸或其钠盐, 或泡腾混合物; 以及

[0249] e) 吸附剂、着色剂、调味剂及甜味剂。

[0250] 片剂可根据本领域已知的方法添加薄膜包衣或肠溶包衣。

[0251] 合适的用于口服施用的组合物包括有效量的本披露化合物, 其形式为片剂、锭剂、水性或油性悬浮液、可分散粉剂或颗粒、乳液、硬或软胶囊、或糖浆或酞剂。将旨在用于口服使用的组合物根据本领域已知的用于制造药物组合物的任何方法来制备, 并且为了提供药学上精致的并且适口的制剂, 此类组合物可以包含一种或多种选自下组的试剂, 该组由以下组成: 甜味剂、调味剂、着色剂以及防腐剂。片剂可含有与适用于制造片剂的非毒性药学

上可接受的赋形剂混合的活性成分。这些赋形剂是,例如,惰性稀释剂,如碳酸钙、碳酸钠、乳糖、磷酸钙或磷酸钠;造粒剂及崩解剂,例如,玉米淀粉或海藻酸;粘合剂,例如,淀粉、明胶或阿拉伯胶;以及润滑剂,例如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石。片剂是不添加包衣或借由已知技术添加包衣以延迟在胃肠道中的分解及吸收且借此提供长期持续作用。例如,可采用时间延迟材料,如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。用于口服使用的配制品可以呈现为硬明胶胶囊,其中活性成分是与惰性固体稀释剂(例如,碳酸钙、磷酸钙或高岭土)混合,或呈现为软明胶胶囊,其中活性成分是与水或油培养基(例如,花生油、液体石蜡或橄榄油)混合。

[0252] 某些可注射的组合物是水性等渗溶液或悬浮液,并且栓剂有利地由脂肪乳液或悬浮液制备。所述组合物可以是灭菌的和/或含有辅助剂(例如,防腐剂、稳定剂、润湿剂或乳化剂、溶液促进剂、用于调节渗透压的盐和/或缓冲液)。另外,它们还可以含有其他有治疗价值的物质。所述组合物分别根据常规的混合、制粒或包衣方法制备,并含有约0.1% - 75%,或含有约1% - 50%的活性成分。

[0253] 用于透皮应用的合适组合物包括有效量的本披露化合物和合适的载体。适于透皮递送的载体包括可吸收的药理学上可接受的溶剂,以帮助通过宿主的皮肤。例如,透皮装置呈绷带的形式,该绷带包含背衬构件、含有化合物(任选地具有载体)的贮存器、任选地控制速率的屏障以在长时段内以受控和预定的速率将化合物递送至宿主皮肤,以及将设备固定在皮肤上的装置。

[0254] 适用于局部应用(例如,应用至皮肤和眼睛)的组合物包括水溶液、悬浮液、软膏剂、霜剂、凝胶或可喷雾配制品,例如,用于通过气溶胶等递送。这些局部递送系统将尤其适用于真皮应用,例如,用于治疗皮肤癌,例如,用于防晒霜、洗剂、喷雾等中的预防用途。因此它尤其适用于局部中的用途,包括本领域中熟知的化妆品、配制品。此类系统可含有增溶剂、稳定剂、张力增强剂、缓冲液和防腐剂。

[0255] 如本文所用,局部应用还可以涉及吸入或鼻内应用。它们可以在使用或不使用适用于推进剂的情况下自干燥粉末吸入器以干燥粉末的形式(单独的作为混合物,例如与乳糖的干燥掺混物,或经混合的组分颗粒,例如与磷脂混合的组分颗粒)或自加压容器、泵、喷雾、雾化器或喷雾器以气溶胶喷雾形式便利地递送。

[0256] 本披露进一步提供了包含本披露化合物作为活性成分的无水药物组合物和剂型,因为水可以促进某些化合物的降解。

[0257] 本披露的无水药物组合物和剂型可以使用无水或含水量低的成分和低水分或低湿度条件来制备。无水药物组合物可经制备及储存使得保持其无水性质。因此,无水组合物是使用已知可防止暴露在水中的材料进行包装的,使得它们可包括在合适的规定试剂盒中。适合的包装的实例包括但不限于经气密密封的箔、塑料、单位剂量容器(例如,小瓶)、泡罩包装、及条形包装。

[0258] 本披露进一步提供了如下药物组合物和剂型,其包含一种或多种药剂,该药剂降低本发明化合物作为活性成分分解的速率。这些药剂(本文中称为“稳定剂”)包括(但不限于)抗氧化剂(如抗坏血酸)、pH缓冲液或盐缓冲液等。

[0259] 本披露化合物典型地被配制成药物剂型,以提供可易于控制的药物剂量,并为患者提供优雅且易于处理的产品。当然,本披露化合物的剂量方案将根据已知因素而变化,例

如特定试剂的药效学特征及其施用方式和途径;接受者的物种、年龄、性别、健康、医疗状况和体重;症状的性质和程度;并行治疗的种类;治疗频率;施用途径、患者的肾和肝功能以及所希望的效果。本披露化合物可以以单个日剂量施用,或总日剂量可以以每天两次、三次或四次的分开的剂量施用。

[0260] 在某些情况下,将本披露化合物与一种或多种治疗活性剂组合施用可以是有利的,这些治疗活性剂独立地选自抗癌剂、抗过敏剂、止吐药、止痛药、免疫调节剂和细胞保护剂。

[0261] 术语“组合疗法”是指施用两种或更多种治疗剂以治疗本披露中所描述的治疗性疾病、障碍或病症。这种施用涵盖以基本上同时的方式共同施用这些治疗剂,如以具有固定比率的活性成分的单个胶囊施用。可替代地,这种施用涵盖在多个容器中或在每种活性成分的独立容器(例如,胶囊、粉末和液体)中共同施用。本披露化合物和另外的治疗剂可以通过相同施用途径或通过不同的施用途径施用。可以将粉末和/或液体在施用之前重构或稀释到所希望的剂量。另外,这类施用也涵盖在大致相同的时间或在不同的时间顺序使用每种类型的治疗剂。在任何一种情况下,治疗方案将在治疗本文所述的疾病、病症或障碍方面提供药物组合的有益作用。

[0262] 考虑用于组合疗法中的一般化学治疗剂包括卡培他滨(Xeloda®)、N4-戊氧基羰基-5-脱氧-5-氟胞苷、卡铂(Paraplatin®)、顺铂(Platinol®)、克拉屈滨(Leustatin®)、环磷酰胺(Cytosan®或Neosar®)、阿糖胞苷、胞嘧啶阿拉伯糖苷(Cytosar-U®)、阿糖胞苷脂质体注射液(DepoCyt®)、达卡巴嗪(DTIC-Dome®)、盐酸阿霉素(Adriamycin®、Rubex®)、磷酸氟达拉滨(Fludara®)、5-氟尿嘧啶(Adrucil®、Efudex®)、吉西他滨(二氟脱氧胞苷(difluorodeoxycytidine))、伊立替康(Camptosar®)、L-天冬酰胺酶(ELSPAR®)、6-巯基嘌呤(Purinethol®)、甲氨蝶呤(Folex®)、喷司他丁、6-硫鸟嘌呤、塞替派、以及注射用盐酸拓扑替康(Hycamptin®)。

[0263] 尤其受关注的用于与本披露化合物组合的抗癌剂包括:

[0264] 磷酸肌醇3-激酶(PI3K)抑制剂:4-[2-(1H-呋唑-4-基)-6-[[4-(甲基磺酰基)哌嗪-1-基]甲基]噻吩并[3,2-d]嘧啶-4-基]吗啉(也称为GDC 0941,并且描述于PCT公开号W0 09/036082和W0 09/055730);4-(三氟甲基)-5-(2,6-二吗啉代嘧啶-4-基)吡啶-2-胺(也称为BKM120或NVP-BKM120,并且描述于PCT公开号W0 2007/084786);阿培利司(Alpelisib)(BYL719):(5Z)-5-[[4-(4-吡啶基)-6-喹啉基]亚甲基]-2,4-噻唑烷二酮(GSK 1059615,CAS 958852-01-2);5-[8-甲基-9-(1-甲基乙基)-2-(4-吗啉基)-9H-嘌呤-6-基]-2-嘧啶胺(VS-5584,CAS 1246560-33-7)和依维莫司(AFINITOR®)。

[0265] 丝裂原激活蛋白激酶(MEK)抑制剂:XL-518(也称为GDC-0973,Cas号1029872-29-4,可购自ACC集团(ACC Corp.));司美替尼(5-[(4-溴-2-氯苯基)氨基]-4-氟-N-(2-羟乙氧基)-1-甲基-1H-苯并咪唑-6-甲酰胺,也称为AZD6244或ARRY 142886,并且描述于PCT公开号W0 2003077914);2-[(2-氯-4-碘苯基)氨基]-N-(环丙基甲氧基)-3,4-二氟-苯甲酰胺

(也称为CI-1040或PD184352,并且描述于PCT公开号W0 2000035436);N-[(2R)-2,3-二羟基丙氧基]-3,4-二氟-2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]-苯甲酰胺(也称为PD 0325901,并且描述于PCT公开号W0 2002006213);2,3-双[氨基[(2-氨基苯基)硫代]亚甲基]-丁二腈(也称为U0126,并且描述于美国专利号2,779,780);N-[3,4-二氟-2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]-6-甲氧基苯基]-1-[(2R)-2,3-二羟基丙基]-环丙烷磺酰胺(也称为RDEA119或BAY869766,并且描述于PCT公开号W0 2007014011);(3S,4R,5Z,8S,9S,11E)-14-(乙基氨基)-8,9,16-三羟基-3,4-二甲基-3,4,9,19-四氢-1H-2-苯并氧杂环四癸炔-1,7(8H)-二酮(也称为E6201,并且描述于PCT公开号W0 2003076424);2'-氨基-3'-甲氧基黄酮(也称为PD98059,可从德国比亚芬股份有限公司(Biaffin GmbH&Co.,KG)获得);(R)-3-(2,3-二羟基丙基)-6-氟-5-(2-氟-4-碘苯基氨基)-8-甲基吡啶并[2,3-d]嘧啶-4,7(3H,8H)-二酮(TAK-733,CAS 1035555-63-5);匹玛舍替(Pimasertib)(AS-703026,CAS 1204531-26-9);二甲基亚砷曲美替尼(GSK-1120212,CAS 1204531-25-80);2-(2-氟-4-碘苯基氨基)-N-(2-羟乙氧基)-1,5-二甲基-6-氧代-1,6-二氢吡啶-3-甲酰胺(AZD 8330);3,4-二氟-2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]-N-(2-羟乙氧基)-5-[(3-氧代-[1,2]唑烷-2-基)甲基]苯甲酰胺(CH 4987655或Ro 4987655);以及5-[(4-溴-2-氟苯基)氨基]-4-氟-N-(2-羟乙氧基)-1-甲基-1H-苯并咪唑-6-甲酰胺(MEK162)。

[0266] 表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂:盐酸厄洛替尼(**Tarceva®**)、吉非替尼(**Iressa®**);达克替尼(PF299804);N-[4-[(3-氯-4-氟苯基)氨基]-7-[[3''S'']-四氢-3-呋喃基]氧基]-6-喹唑啉基]-4(二甲基氨基)-2-丁烯酰胺,**Tovok®**);凡德他尼(Vandetanib)(**Caprelsa®**);拉帕替尼(**Tykerb®**);(3R,4R)-4-氨基-1-((4-((3-甲氧基苯基)氨基)吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-5-基)甲基)哌啶-3-醇(BMS 690514);二盐酸卡奈替尼(CI-1033);6-[4-[(4-乙基-1-哌嗪基)甲基]苯基]-N-[(1R)-1-苯基乙基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-胺(AEE788,CAS 497839-62-0);木利替尼(Mubritinib)(TAK165);培立替尼(EKB569);阿法替尼(BIBW2992);来那替尼(Neratinib)(HKI-272);N-[4-[[1-[(3-氟苯基)甲基]-1H-吡唑-5-基]氨基]-5-甲基吡咯并[2,1-f][1,2,4]三嗪-6-基]-氨基甲酸、(3S)-3-吗啉基甲酯(BMS599626);N-(3,4-二氯-2-氟苯基)-6-甲氧基-7-[[3α,5β,6α]-八氢-2-甲基环戊[c]吡咯-5-基]甲氧基]-4-氨基喹唑啉(XL647,CAS 781613-23-8);以及4-[4-[[1-[(1R)-1-苯基乙基]氨基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-基]-苯酚(PKI166,CAS 187724-61-4)。

[0267] EGFR抗体:西妥昔单抗(Cetuximab)(**Erbitux®**);帕尼单抗(**Vectibix®**);马妥珠单抗(EMD-72000);曲妥珠单抗(**Herceptin®**);尼妥珠单抗(Nimotuzumab)(hR3);扎妥木单抗(Zalutumumab);TheraCIM h-R3;MDX0447(CAS 339151-96-1);和ch806(mAb-806,CAS 946414-09-1)。

[0268] MAPK抑制剂:维罗非尼(Vemurafinib/**Zelboraf®**)、索拉非尼(Sorafenib/**Nexavar®**)、达拉非尼(Dabrafenib/**Tafinlar®**)、曲美替尼(Trametinib/**Mekinist®**)和司美替尼(Selumetinib/AZD6244/ARRY-142886)

[0269] EED/EZH2抑制剂:他泽司他(tazemetostat/EPZ-6438)、GSK2816126(CAS

1346574-57-9)、CPI-1205(CAS 1621862-70-1)和DS-3201(也称为DS-3201b,第一三共株式会社(Daiichi Sankyo, Inc))。

[0270] 免疫检查点调节剂:派姆单抗(Keytruda®)、纳武单抗(Opdivo®)、阿特珠单抗(Tecentriq®)和艾匹利木单抗(Yervoy®)。

[0271] 一些患者在施用期间或之后可能经历对本披露化合物和/或一种或多种其他抗癌剂的过敏反应;因此,通常施用抗过敏剂以最小化过敏反应的风险。适合的抗过敏剂包括皮质类固醇(Knutson, S., 等人, PLoS One[公共科学图书馆综合], DOI:10.1371/journal.pone.0111840(2014)), 如地塞米松(例如, Decadron®)、倍氯米松(例如, Beclovent®)、氢化可的松(也称为可的松、氢化可的松琥珀酸钠、氢化可的松磷酸钠,并在商品名Ala-Cort®、氢化可的松磷酸盐、Solu-Cortef®、Hydrocort Acetate®和Lanacort®下出售)、泼尼松龙(在商品名Delta-Cortel®、Orapred®、Pediapred®和Prelone®下出售)、强的松(在商品名Deltasone®、Liquid Red®、Meticorten®和Orasone®下出售)、甲基泼尼松龙(也称为6-甲基泼尼松龙、乙酸甲基泼尼松龙、甲基泼尼松龙琥珀酸钠,在商品名Duralone®、Medralone®、Medrol®、M-Prednisol®和Solu-Medrol®下出售);抗组胺药,如苯海拉明(例如, Benadryl®)、羟嗪、和赛庚啶;和支气管扩张剂,如 β -肾上腺素能受体激动剂、沙丁胺醇(例如, Proventil®)、和特布他林(Brethine®)。

[0272] 一些患者在施用本披露化合物和/或一种或多种其他抗癌剂期间或之后可能经历恶心;因此,使用止吐药用于预防恶心(反胃)和呕吐。合适的止吐药包括阿瑞匹坦(Emend®)、昂丹司琼(Zofran®)、HCl 格拉司琼(Kytril®)、劳拉西泮(Ativan®)、地塞米松(Decadron®)、丙氯拉嗪(Compazine®)、卡索匹坦(casopitant)(Rezonic®和Zunrisa®)、及其组合。

[0273] 通常开具用于缓解治疗期间经历的疼痛的药物以使患者更舒适。通常使用常见的非处方镇痛药,如Tylenol®。然而,阿片类镇痛药如氢可酮/对乙酰氨基酚或氢可酮/醋氨酚(例如, Vicodin®)、吗啡(例如, Astramorph®或Avinza®)、羟考酮(例如, OxyContin®或Percocet®)、盐酸羟吗啡酮(Opana®)和芬太尼(例如, Duragesic®)也可用于中度或重度疼痛。

[0274] 尤其受关注的用于与本披露化合物组合的免疫调节剂包括:阿托珠单抗(可购自Roche®);聚乙二醇非格司亭(Neulasta®);来那度胺(CC-5013, Revlimid®);沙利度胺(Thalomid®)、Actimid(CC4047);和IRX-2(包括白介素1、白介素2、和干扰素 γ 的人细胞因子的混合物,CAS 951209-71-5,可购自IRX治疗公司(IRX Therapeutics))。

[0275] 为了保护正常细胞免受治疗毒性并限制器官毒性,可以使用细胞保护剂(如神经

保护剂、自由基清除剂、心脏保护剂、蒽环类外渗中和剂、营养素等)作为辅助疗法。合适的细胞保护剂包括氨磷汀(Ethyol®)、谷氨酰胺、地美司钠(dimesna)(Tavocept®)、美司纳(mesna)(Mesnex®)、右丙亚胺(dexrazoxane)(Zinecard®或Totect®)、扎利罗登(xaliproden)(Xapрила®)、和甲酰四氢叶酸(也称为甲酰四氢叶酸钙、嗜橙菌(citrovorum)因子和亚叶酸)。

[0276] 由编号、通用名或商品名识别的活性化合物的结构可以取自标准纲要“默克索引(The Merck Index)”的、或来自数据库(例如,国际专利(例如IMS世界出版物))的实际版本。

[0277] 在一个实施例中,本披露提供了药物组合物,这些药物组合物包含至少一种本披露化合物或其药学上可接受的盐以及适于施用至人或动物受试者的药学上可接受的载体,单独地或与其他抗癌剂一起。

[0278] 在另一个实施例中,本披露提供了治疗患有细胞增生性疾病(如恶性肿瘤)的人或动物受试者的方法。本披露提供了治疗需要这种治疗的人或动物受试者的方法,这些方法包括向该受试者单独地或与其他抗癌剂组合施用治疗有效量的本披露化合物或其药学上可接受的盐。

[0279] 特别地,组合物可以作为组合治疗剂配制在一起或分开施用。

[0280] 在一个实施例中,本披露提供了药物组合,该药物组合包含本披露化合物或其药学上可接受的盐以及一种或多种治疗活性剂,该一种或多种治疗活性剂选自以下组成的组:阿比曲特(Abitrexate)(甲氨蝶呤)、阿布沙星(Abraxane)(紫杉醇白蛋白稳定的纳米颗粒配制品)、阿法替尼双马来酸酯、飞尼妥(Afinitor)(依维莫司)、安圣莎(Alecensa)(艾乐替尼)、艾乐替尼、力比泰(培美曲塞二钠)、安维汀(贝伐单抗)、贝伐单抗、卡铂、色瑞替尼、克唑替尼、克瑞姆扎(Cyramza)(雷莫芦单抗)、多西他赛、盐酸厄洛替尼、依维莫司、重氮片(Folex)(甲氨蝶呤)、重氮片PFS(甲氨蝶呤)、吉非替尼、吉泰瑞(阿法替尼双马来酸酯)、盐酸吉西他滨、健择(Gemzar)(盐酸吉西他滨)、易瑞沙(吉非替尼)、可瑞达(Keytruda)(派姆单抗)、盐酸氮芥、甲氨蝶呤、甲氨蝶呤LPF(甲氨蝶呤)、氨甲喋呤钠(甲氨蝶呤)、氨甲喋呤钠-AQ(甲氨蝶呤)、氮芥(盐酸氮芥)、诺维本(酒石酸长春瑞滨)、奈妥珠单抗、纳武单抗、欧狄沃(Opdivo)(纳武单抗)、奥希替尼、紫杉醇、紫杉醇白蛋白稳定的纳米颗粒配制品、伯尔(Paraplat)(卡铂)、伯尔定(卡铂)、派姆单抗、培美曲塞二钠、奈妥珠单抗(Portrazza/Necitumumab)、雷莫芦单抗、泰瑞沙(奥希替尼)、特罗凯(盐酸厄洛替尼)、泰素(紫杉醇)、泰素帝(多西他赛)、酒石酸长春瑞滨、赛可瑞(Xalkori)(克唑替尼)、赞可达(Zykadia)(色瑞替尼)、卡铂-泰素和吉西他滨-顺铂,用于治疗肺癌(包括但不限于非小细胞肺癌、肺腺癌、肺癌、大细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺鳞状细胞癌、小细胞肺癌)。

[0281] 在另一个实施例中,本披露提供了药物组合,该药物组合包含本披露化合物或其药学上可接受的盐以及一种或治疗活性剂,该一种或多种治疗活性剂选自以下组成的组:阿地白介素、考比替尼、考比替尼(Cotellic/Cobimetinib)、达拉非尼、达卡巴嗪、DTIC-Dome(达卡巴嗪)、IL-2(阿地白介素)、ImLygic(Talimogene Laherparepvec)、白介素-2(阿地白介素)、甘乐能(Intron A)(重组干扰素 α -2b)、艾匹利木单抗、可瑞达(派姆单抗)、曲美替尼(Mekinist/Trametinib)、纳武单抗、欧狄沃(纳武单抗)、聚乙二醇干扰素 α -2b、佩乐能

(PEG-Intron) (聚乙二醇干扰素 α -2b)、派姆单抗、阿地白介素 (Proleukin/Aldesleukin)、重组干扰素 α -2b、萨拉琼 (Sylatron) (聚乙二醇干扰素 α -2b)、达拉非尼 (Tafinlar/Dabrafenib)、Talimogene Laherparepvec、曲美替尼、维罗非尼、艾匹利木单抗 (Yervoy/Ipilimumab) 和泽波拉夫 (维罗非尼), 用于治疗黑色素瘤 (包括但不限于皮肤黑色素瘤、促纤维增生性黑色素瘤和葡萄膜黑色素瘤)。

[0282] 在用于恶性肿瘤治疗的组合疗法中, 本披露化合物和一种或多种其他抗癌剂可以同时、并行或顺序 (没有特定的时间限制) 施用, 其中这种施用在受试者的体内提供治疗有效水平的这两种化合物。

[0283] 在优选的实施例中, 本披露化合物和一种或多种其他抗癌剂通常通过输注或口服以任何次序顺序地施用。给药方案可以取决于疾病的阶段、患者的身体健康、单个药物的安全性、单个药物的耐受性、以及主治医师和一个或多个执业医师熟知的施用该组合的其他标准而变化。本披露化合物和一种或多种其他抗癌剂可以在彼此分开的数分钟、数小时、数天或甚至数周内施用, 这取决于用于治疗的特定周期。另外, 该周期可包括在治疗周期期间比另一种药物更频繁地施用一种药物, 并且每次施用药物时的剂量不同。

[0284] 在本披露的另一个方面, 提供了试剂盒, 该试剂盒包含两种或更多种分开的药物组合物, 其中至少一种药物组合物含有本披露的化合物。在一个实施例中, 该试剂盒包含用于分别保留所述组合物的装置 (例如容器、分开的瓶子、或分开的箔包)。这种试剂盒的实例是泡罩包装, 如典型地用于片剂、胶囊及类似物的包装。

[0285] 本披露的试剂盒可用于施用不同剂型 (例如, 口服及肠胃外), 用于以不同剂量间隔施用分开的组合物、或用于相对彼此滴定分开的组合物。为了有助于顺应性, 本披露的试剂盒通常包含用于施用的用法说明书。

[0286] 本披露化合物还可以有利地与已知的治疗方法 (例如激素或尤其是放射的施用) 组合使用。本披露化合物可以特别地用作放射增敏剂, 尤其用于治疗对放射疗法表现出差敏感性的肿瘤。

[0287] 在本披露的组合疗法中, 本披露化合物和其他治疗剂可以由相同或不同的制造商生产和/或配制。此外, 可以将本披露化合物和另一种治疗剂 (或药剂) 一起形成组合疗法: (i) 在向医师发布组合产品 (例如, 在包含本披露化合物和另一种治疗剂的试剂盒的情况下) 之前进行; (ii) 在施用之前不久, 由医师自身 (或在医师的指导下) 进行; (iii) 在患者自身中, 例如在顺序施用本披露化合物和另一种治疗剂期间。

[0288] 用于施加的药物组合物 (或配制品) 可以根据用于施用药物的方法而以多种方式包装。一般来说, 用于分配的物件包括药物配制品以适当形式在其内贮存的容器。适合的容器对于本领域的技术人员是熟知的并且包括材料例如瓶 (塑料和玻璃)、小袋、安瓿、塑料袋、金属圆筒及其类似物。容器还可以包括防干扰组件, 以防止不小心接触到包装的内容物。另外, 容器设有描述容器的内容物的标签。标签还可以包括适当的警示语。

[0289] 对于约50-70kg的受试者, 本披露的药物组合物或组合可以是约1-1000mg的一种或多种活性成分的单位剂量, 或约1-500mg或约1-250mg或约1-150mg或约0.5-100mg、或约1-50mg的活性成分的单位剂量。化合物、药物组合物、或其组合的治疗有效剂量取决于受试者的物种、体重、年龄和所治疗的个体病症、障碍或疾病或其严重程度。具有普通技能的医师、临床医生或兽医可以容易地确定预防、治疗障碍或疾病或抑制该障碍或疾病的进展所

必需的每种活性成分的有效量。

[0290] 可以使用有利的哺乳动物(例如,小鼠、大鼠、狗、猴)或其分离的器官、组织和制品在体外和体内测试中证明上述剂量特性。本披露化合物可以以溶液形式(例如水溶液)体外应用,并且可以肠内、肠胃外、有利地静脉内,例如作为悬浮液或在水溶液中应用。体外剂量可以在约 10^{-3} 摩尔浓度与 10^{-9} 摩尔浓度之间的范围内。取决于施用途径,体内治疗有效量可以在约0.1-500mg/kg之间,或约1-100mg/kg之间的范围内。

[0291] 药理学和效用

[0292] SWI/SNF染色质重塑复合物的突变在癌症中非常普遍,发生频率为大约20%(Kadoch,C.,Hargreaves,D.C.等人2013 Nat Genet.[自然遗传学]45:592-601)(Shain,A.H.和Pollack,J.R.2013PLoS ONE[公共科学图书馆综合]8(1):e55119)。SWI/SNF复合物由多个亚基组成,并在染色质的ATP依赖性重塑中起作用,以控制关键的细胞事件,例如基因表达的调节。SWI/SNF复合物中的催化ATP酶亚基由BRM/SMARCA2或BRG1/SMARCA4组成,并因此是相互排斥的(Hodges,C.,Kirkland,J.G.等人2016 Cold Spring Harb Persp Med[冷泉港医学透视]6(8))。通过shRNA进行功能基因组学筛选揭示了这两个SWI/SNF ATP酶(BRM和BRG1)之间具有强烈的合成致死关系(Hoffman,G.R.;Rahal,R等人2014 PNAS[美国国家科学院院刊]111(8):3128-33;Wilson,B.G.,Helming,K.C.等人2014 Molecular and Cellular Biology[分子与细胞生物学]34(6):1136-44)。特别地,缺乏功能性BRG1(例如通过功能丧失性突变或缺失)的癌细胞对经由shRNA介导的敲低产生的BRM耗竭极为敏感,从而导致生长抑制(Hoffman,G.R.,Rahal,R等人,2014 PNAS[美国国家科学院院刊]111(8):3128-33;Oike,T.,Ogiwara,H.等人2013 Cancer Research[癌症研究]73(17):5508-5518);和Vangamudi,B.,Paul,T.A.等人2015Cancer Research[癌症研究]75(18):3865-3878)。因此,这些研究揭示了,在没有SWI/SNF ATP酶之一的情况下,癌细胞会变得高度依赖于剩余的ATP酶来生存,从而发现了靶向疗法可利用的漏洞。实际上,已经在各种癌症中鉴定出BRG1的遗传损伤,主要是在非小细胞肺癌中鉴定出(占大约10%),还在其他癌症类型(例如肝癌、胰腺癌、黑色素瘤等)中鉴定出(Imielinski,M.,A.H.Berger等人(2012)Cell[细胞]150(6):1107-1120);癌症基因组图谱(TCGA)数据门户,以及cBioPortal癌症基因组学(cBioPortal for Cancer Genomics))。因此,这些构成了高度显著的患者群体,这些患者群体的医疗需求明显未得到满足且预期将受益于BRM的治疗性抑制。就像某些癌细胞由于BRG1功能的丧失而依赖于BRM一样,有趣的是,据报道,其他癌症类型也具有BRG1依赖性,这可能通过多种机制(包括SWI/SNF复合物的其他亚基的突变)发生(Shi,J.;Whyte,W.A.等人2013 Genes and Development[基因和发展]27(24):2648-2662;Xi,W.,Sansam,C.G.等人2009 Cancer Research[癌症研究]69(20):8094-8101;和Zuber,J.,Shi,J.等人2011 Nature[自然]478(7370):524-528)。另外,据报道,SWI/SNF活性在其他疾病环境中也发生了改变,使其成为在除癌症外的其他疾病中的有吸引力的治疗靶标(Han,P.,Li,W.等人2014 Nature[自然]514(7520):102-06)。因此,抑制任一ATP酶或两种ATP酶的潜力可在治疗不同类型的癌症和疾病中具有多种应用。

[0293] 可导致功能丧失的BRG1突变、缺失或表达丧失可发生在多种类型的癌症中(癌症基因组图谱(TCGA)数据门户;cBioPortal癌症基因组学;Becker,T.M.,S.Haferkamp等人(2009)Mol Cancer[癌症分子学]8:4.;Matsubara,D.,Kishaba,Y.等人.2013 Cancer

Science[癌症科学]104(2):266-273;和Yoshimoto,T.,Matsubara,D.等人2015 Pathology International[国际病理学]65(11):595-602)。具有BRG1突变、缺失或表达丧失的特定类型癌症的实例包括但不限于:非小细胞肺癌、肺腺癌、肺癌、大细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺鳞状细胞癌、小细胞肺癌、皮肤黑色素瘤、促纤维增生性黑色素瘤、葡萄膜黑色素瘤、卵巢小细胞癌、皮肤鳞状细胞癌、神经胶质瘤、子宫癌肉瘤、子宫体子宫内膜癌、卵巢浆液性囊腺癌、膀胱尿路上皮癌、原发性中枢神经系统淋巴瘤、食道癌、膀胱癌、膀胱癌浆细胞样变体、胃腺癌、腺样囊性癌、淋巴样肿瘤弥漫性大B细胞淋巴瘤、胰腺癌、结直肠癌腺癌、胆管癌、肉瘤、头颈癌、宫颈癌和宫颈管癌、髓母细胞瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、肝细胞癌、肾乳头状细胞癌、乳腺癌、套细胞淋巴瘤、胆囊癌、睾丸生殖细胞癌、肾细胞透明细胞癌、前列腺癌、小儿尤因肉瘤、胸腺瘤、肾嫌色细胞癌、肾非透明细胞癌、嗜铬细胞瘤和副神经节瘤、甲状腺癌。

[0294] SMARCB1/SNF5突变型癌症包括其中已证实具有BRG1依赖性的恶性横纹肌样瘤(Xi,W.,Sansam,C.G.等人2009 Cancer Research[癌症研究]69(20):8094-8101),还包括SMARCB1/SNF5突变型上皮样肉瘤、家族性神经鞘瘤病、肾髓质癌和尤因肉瘤(Jahromi,M.S.;Putnam,A.R等人2012 Cancer Genetics[癌症遗传学]205(7-8):391-404;Prensner,J.R.,Iyer,M.K.等人2013 Nature Genetics[自然遗传学]45(11):1392-8;以及Roberts,C.W.M.和Biegel,J.A.,2009 Cancer Biology and Thereapy[癌症生物学与疗法]8(5):412-416),以及其中SNF5在SWI/SNF复合物中有缺陷且并非由突变引起的癌症,例如滑膜肉瘤(Kadoch,C.,和Crabtree,G.R.,2013 Cell[细胞]153(1):71-85),连同BRG1依赖性造血系统恶性肿瘤,例如急性髓样白血病(AML)(Shi,J.,Whyte,W.A.等人2013 Genes and Development[基因和发展]27(24):2648-2662;和Zuber,J.,Shi,J.等人2011Nature[自然]478(7370):524-528)。BRM突变型(包括缺失)或SNF5/SMARCB1突变型(包括缺失)癌症(癌症基因组图谱(TCGA)数据门户和cBioPortal癌症基因组学)包括但不限于:恶性周围神经鞘瘤、神经内分泌前列腺癌、乳腺癌、膀胱尿路上皮癌、腺样囊性癌、胃腺癌、卵巢浆液性囊腺癌、子宫癌肉瘤、食道癌、头颈鳞状细胞癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、小细胞肺癌、胰腺癌、肾上腺皮质癌、皮肤黑色素瘤、肉瘤、结直肠癌、宫颈癌和宫颈管癌、肝细胞癌、皮肤鳞状细胞癌、睾丸生殖细胞癌、成胶质细胞瘤、多形性成胶质细胞瘤、胆管癌、尤因肉瘤、透明细胞肾细胞癌、成神经细胞瘤、胸腺瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、急性髓样白血病、慢性淋巴细胞性白血病、髓母细胞瘤、嗜铬细胞瘤和副神经节瘤、以及多发性骨髓瘤。

[0295] 具有BRM、BRG1或BRM和BRG1抑制益处的双重抑制剂还可适用于含有除了如上所述的BRG1/SMARCA4、BRM/SMARCA2或SNF5/SMARCB1以外的SWI/SNF亚基(例如ARID1A、ARID1B、ARID2、PBRM1、SMARCE1、SMARCC1、SMARCC2、PHF10、DPF1、DPF3、DPF2、ACTL6A、ACTL6B、SMARCD2、SMARCD3、SMARCD1、BCL11A、BCL11B、BCL7A、BCL7B、BCL7C、BRD9和ACTB)的突变或缺陷的癌症。在其他情况下,对BRM/BRG1 ATP酶的依赖性可能来自除SWI/SNF突变以外的机制。

[0296] 本披露化合物对BRM介导的和/或BRG1介导的障碍或疾病具有有利的治疗益处。处于游离形式或药学上可接受的盐形式的本披露化合物表现出有价值的药理性质,这至少可以通过使用以下测试程序中的任一种来证实。在生化测定中评估了本披露化合物抑制BRM和BRG1活性的能力。

[0297] BRM ATP酶抑制测定

[0298] I. 重组BRM ATP酶结构域的分离

[0299] A. His₁₀-ZZ-HCV3C-BRM(636-1331) 克隆到pFastBac1中

[0300] 使用标准DNA合成方法,将编码His₁₀标签的序列(SEQ ID NO:1)、蛋白质A(金黄色葡萄球菌)的免疫球蛋白G(IgG)结合ZZ结构域、和人鼻病毒3C蛋白酶位点融合在BRM残基636-1331的上游。使用以下5' 和3' 引物:5' -GACCGAAGTAGTATGGCTTCTCACCACCAT-3' (SEQ ID NO:2) 和5' -AGCGTTAAGCTTTTAATCCTCGATGGCGCG-3' (SEQ ID NO:3),通过PCR扩增将合成构建体克隆到pFastBac1(生命技术公司(Life Technologies))的MCS中以包括终止密码子,并使用标准分子生物学技术将其连接到SpeI和HindIII位点。最终的重组载体pFB1-His₁₀-ZZ-HCV3C-BRM(636-1331) 导致在编码ATP酶和SnAC结构域的天然BRM序列上游表达HCV3C蛋白酶可裂解的His₁₀-ZZ标签(下划线)。

MASHHHHHHHHHHAQHDEAVDNKFNKEQQNAFYELHLPNLNNEEQRNAFIQSLKDDPSQSAN
LLAEAKKLNDAPKVDNKFNKEQQNAFYELHLPNLNNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAK
KLNDAPKVDANGGGGSGGGGSLEVLFGPEESDSYEEEEEEEESSRQETEEKILLDPNS
EEVSEKDAKQIETAKQDVDDDEYSMQYSARGSQSYTVAHAISERVEKQSALLINGTLKHYQLQ
GLEWMVSLYNNNLNGILADEMGLGKTIQTIALITYLMEHKRLNGPYLIIVPLSTLSNWTYEFDKW
APSVVKISYKGTAPMRRSLVPQLRSGKFNVLTTTYEYIHKDKHILAKIRWKYMIVDEGHRMKNHH
CKLTQVLNTHYVAPRRILLTGTPQLNKLPELWALLNLLPTIFKSCSTFEQWFNAPFAMTGERV
[0301] DLNEEETILIIRRLHKVLRPFLLRRLKKEVESQLPEKVEYVIKCDMSALQKILYRHMQAQKILLTDG
SEKDKKGKGGAKTLMNTIMQLRKICNHPYMFQHIEESFAEHLGYSNGVINGAELYRASGKFELL
DRILPKLRATNHRVLLFCQMTSLMTIMEDYFAFRNFLYLRLDGTTKSEDRAALLKKFNEPGSQY
FIFLLSTRAGGLGLNLQAADTVWIFDSDWNPHQDLQAQDRAHRIGQQNEVRVRLCTVNSVEE
KILAAAKYKLNVQKVIQAGMFDQKSSSHERRAFLQAILEHEEENEEDEVPDDETINQMIARR
EEEFDLFMRMDMDRRREDARNPKRKPRLMEEDELPIWKDDAEVERLTCEEEEEKIFGRGSRQ
RRDVDYSDALTEKQWLRAIED (SEQ ID NO: 4)

[0302] B. BRM(636-1331) 的表达

[0303] 通过使用如制造商(生命技术公司)详述的标准方案将以上产生的重组载体转化为DH10Bac细胞来制备重组杆粒。高滴度的P3病毒是通过使用如生命技术公司详述的标准方法将杆粒转染到草地贪夜蛾9(Sf9)细胞中并扩增该病毒而产生的。His₁₀-ZZ-HCV3C-BRM(636-1331)在WAVE生物反应器(GE医疗生命科学公司集团(GE Healthcare Life Sciences))中以1:100v/v的病毒从对数生长期(1.5×10^6 个细胞/mL)中的25L Sf9细胞表达。使感染在27°C的摇动培养箱中进行,并在感染后三天在细胞活力降至80%且与感染一致的总细胞直径增加后收获。以4,000xg持续20min来收获细胞,将这些细胞快速冷冻并在-80°C储存直至使用。

[0304] C. BRM(636-1331) 的纯化

[0305] 将表达重组His₁₀-ZZ-HCV3C-BRM(636-1331)的Sf9细胞在50mM Tris(8.0)、300mM NaCl、10%甘油和补充有蛋白酶抑制剂混合物(Roche cOmplete)的2mM TCEP中裂解,每克细胞糊使用7.5mL裂解缓冲液。解冻后将细胞裂解、匀浆,随后在JA25.50转子中以50,000xg澄清30min,以除去不溶性材料。将澄清的裂解物施加到5mL His-Trap HP柱(GE医疗生命科学公司集团)上,在不含补充有25mM咪唑的蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液中严格洗涤。针对补充有500mM咪唑的裂解缓冲液,经十五个柱体积梯度洗脱结合的蛋白质。合并含有His₁₀-ZZ-

HCV3C-BRM(636-1331)的级分,并用50mM Tris(8.0)、300mM NaCl、10%甘油和补充有HCV3C蛋白酶的2mM TCEP透析过夜,以除去His₁₀-ZZ标签。通过考马斯染色的SDS/PAGE和LC/MS监测切割。完整的质量与BRM残基636-1331一致,两个非天然氨基酸Gly-Pro(HCV3C切割位点的残余部分)位于这些残基之前。预期质量比预测值大160Da,与两个磷酸化位点一致。

[0306] 将切割产物在未补充盐的透析缓冲液中稀释至最终NaCl浓度为100mM,使其通过0.2μm注射器过滤器,并立即上样至预先在50mM Tris(8.0)、100mM NaCl、10%甘油和1mM TCEP中平衡的1mL HiTrap Q HP柱(GE健康生物科学公司(GE Health Biosciences))。捕获后,结合的蛋白质与补充有1M NaCl的相同缓冲液竞争。合并含有BRM(636-1331)的级分,并将其上样至在50mM Tris(8.0)、200mM NaCl、10%甘油和2mM TCEP中平衡的S200 16/60尺寸排阻柱。将纯化的构建体浓缩至2.5mg/mL,快速冷冻并在-80℃下储存直到用于下游测定。

[0307] II. Brm ATP酶抑制活性

[0308] 通过使用来自普洛麦格公司(Promega)(V6930)的ADP-Glo测定试剂盒来测量Brm ATP酶-SnAC(636-1331)的ATP酶活性的化合物抑制。使用来自EDC生物系统公司(EDC Biosystems)的ATS声学转移系统,将100% DMSO中的120nL化合物转移至白色的384孔微量滴定测定板。使用MultiFlo FX多模式分配器(MultiFlo FX Multi-Mode Dispenser)进行所有后续试剂添加。测定缓冲液是20mM HEPES pH 7.5、1mM MgCl₂、20mM KCl、1mM DTT、0.01% BSA、0.005%吐温20。将测定缓冲液中的4μL 7.5nM Brm ATP酶-SnAC添加至测定板中,并在RT下与化合物孵育5min。将测定缓冲液中的2μL 255μM ATP和6nM pCMV-dR8.91质粒添加至测定板中以开始反应。试剂的最终浓度为5nM BRM ATP酶-SnAC、85μM ATP和2nM pCMV-dR8.91质粒。将ATP酶反应在RT下孵育60min。添加3μL ADP-Glo试剂以终止反应,并在RT下孵育30min。将3μL激酶检测试剂添加至测定板中,将其在RT下孵育90min。使用超灵敏发光检测用2103多标记读取仪(2103 Multilabel Envision reader)读取板。通过对相对化合物浓度绘图的百分比抑制值进行非线性回归分析,从重复数据点的平均值确定IC₅₀值。

[0309] BRG1 ATP酶抑制测定

[0310] I. 重组BRG1 ATP酶结构域的分离

[0311] A. BRG1(658-1361)-His₆克隆到pDEST8中

[0312] 如下通过PCR从全长BRG1质粒pDONR221-BRG1-His₆(OPS7173)亚克隆用于在昆虫细胞中表达的构建体BRG1(658-1361)-His₆。使用以下引物产生编码BRG1(658-1361)-His₆的ATTB侧接的PCR片段:正向,ATTB1 BRG1(658-x)5'-GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC GAAGGAGATAGAACCATGGA

[0313] AGAAAGTGGCTCAGAAGAAGAGGAAG(SEQ ID NO:5);反向,BRG1(x-1361)HISstpATTB2rev,5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAGTGATGATGATGATGCTCCTCG ATGGCCTTGAGCCACTGC(SEQ ID NO:6)。按照制造商的方案(生命技术公司),使用Gateway®方法将该PCR片段重组到载体pDEST8中。通过测序确认插入,并且该插入在杆粒产生之前即进入OPS数据库(OPS8023)。

MEESGSEEEEE EEEEEEQPQA AQPPTLPVEE KKKIPDPDSD DVSEVDARHI IENAKQDVDD
EYGVSQLAR GLQSYAVAH AVTERVDKQS ALMVNGVLKQ YQIKGLEWLV SLYNNNLNGI
LADEMGLGKT IQTIALITYL MEHKRINGPF LIIVPLSTLS NWAYEFDKWA PSVVKVSYKG
SPAARRAFVP QLRSGKFNV LTTYEYIIKD KHILAKIRWK YMIVDEGHRM KNHHCKLTQV
LNTHYVAPRR LLLTGTPLQN KLPELWALLN FLLPTIFKSC STFEQWFNAP FAMTGEKVDL
NEEETILIIR RLHKVLRPFL LRRLKKEVEA QLPEKVEYVI KCDMSALQRV LYRHMQAQGV
[0314] LLTDGSEKDK KGKGGTKTLM NTIMQLRKIC NHPYMFQHIE ESFSEHLGFT GGIVQGLDLY
RASGKFELLD RILPKLRATN HKVLLFCQMT SLMTIMEDYF AYRGFKYLRL DGTTKAEDRG
MLLKTFNEPG SEYFIFLLST RAGGLGLNLQ SADTVIIFDS DWNPHQDLQA QDRAHRIGQQ
NEVRVLRCT VNSVEEKILA AAKYKLNVDQ KVIQAGMFDQ KSSSHERRAF LQAILEHEEQ
DEEEDEVDD ETVNQMIARH EEEFDLFMRM DLDRRREEAR NPKRKPRIME EDELPSWIK
DDAEVERLTC EEEEEKMFGR GSRHRKEVDY SDSLTEKQWL KAIEHHHHH H (SEQ ID NO:
7)

[0315] B.BRG1 (658-1361) -His₆的表达

[0316] 通过使用如制造商(生命技术公司)详述的标准方案将以上产生的重组载体转化为DH10Bac细胞来制备重组杆粒。高滴度的P3病毒是通过使用如生命技术公司详述的标准方法将杆粒转染到草地贪夜蛾9(Sf9)细胞中并扩增该病毒而产生的。BRG1 (658-1361) -His₆以15个病毒/细胞从对数生长期($1.5-3.9 \times 10^6$ 个细胞/mL)中的Sf9细胞表达。使感染在27°C的摇动培养箱中进行,并在感染后三天在细胞活力降至80%且与感染一致的总细胞直径增加后收获。以4,000xg持续20min来收获细胞,将这些细胞快速冷冻并在-80°C储存直至使用。

[0317] C.BRG1 (658-1361) -His₆的纯化

[0318] 将表达重组BRG1 (658-1361) -His₆的Sf9细胞在50mM Tris(8.0)、300mM NaCl、5%甘油和补充有蛋白酶抑制剂混合物(Roche cOmplete)的1mM TCEP中裂解,每克细胞糊使用7.5mL裂解缓冲液。解冻后将细胞裂解、匀浆,随后在JA25.50转子中以50,000xg澄清30min,以除去不溶性材料。将澄清的裂解物施加到5mL His-Trap HP柱(GE医疗生命科学公司集团)上,在不含补充有20mM咪唑的蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液中严格洗涤。针对补充有250mM咪唑的裂解缓冲液,经十个柱体积梯度洗脱结合的蛋白质。合并含有BRG1 (658-1361) -His₆的级分,并使用50mM Tris pH 8.0、5%甘油和1mM TCEP稀释直到电导率达到约6mS/cm(约60mM NaCl),使其通过2μ过滤器,并立即上样至预先在50mM Tris(pH 8.0)、100mM NaCl、5%甘油和1mM TCEP中平衡的5mL HiTrap Q HP柱(GE健康生物科学公司)。捕获后,结合的蛋白质与补充有1M NaCl的相同缓冲液竞争。合并含有BRG1 (658-1361) -His₆的级分,并将其上样至在50mM Tris(8.0)、200mM NaCl、5%甘油和1mM TCEP中平衡的S200 16/60尺寸排阻柱。将纯化的构建体浓缩至1至2.5mg/mL,快速冷冻并在-80°C下储存直到用于下游测定。

[0319] BRG1 ATP酶抑制活性

[0320] 通过使用来自普洛麦格公司(V6930)的ADP-Glo测定试剂盒来测量BrG1 ATP酶-SnAC (658-1361)的ATP酶活性的化合物抑制。使用来自EDC生物系统公司的ATS声学转移系统,将100%DMSO中的120nL化合物转移至白色的384孔微量滴定测定板。使用MultiFlo FX多模式分配器进行所有后续试剂添加。测定缓冲液是20mM HEPES pH 7.5、1mM MgCl₂、20mM

KCl、1mM DTT、0.01%BSA、0.005%吐温20。将测定缓冲液中的4 μ L 7.5nM Brg1 ATP酶-SnAC添加至测定板中,并在RT下与化合物孵育5min。将测定缓冲液中的2 μ L 195 μ M ATP和6nM pCMV-dR8.91质粒添加至测定板中以开始反应。试剂的最终浓度为5nM Brg1 ATP酶-SnAC、65 μ M ATP和2nM pCMV-dR8.91质粒。将ATP酶反应在RT下孵育60min。添加3 μ L ADP-Glo试剂以终止反应,并在RT下孵育30min。将3 μ L激酶检测试剂添加至测定板中,将其在RT下孵育90min。使用超灵敏发光检测用2103多标记读取仪读取板。通过对相对化合物浓度绘图的百分比抑制值进行非线性回归分析,从重复数据点的平均值确定IC₅₀值。

[0321] 用于BRM/BRG1 ATP酶抑制测定的pCMV-dR8.91质粒:

[0322] 按照提供有一次Stb13化学感受态大肠杆菌(One Shot Stb13 Chemically Competent E.coli)(目录号C73C7303,英杰公司(Invitrogen)/赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific))的转化方案,使用该试剂繁殖质粒模板pCMV-dR8.91(参见以下序列)。然后在含有氨苄青霉素/羧苄青霉素抗生素选择培养基(目录号L1010,天惠华公司(Teknova))的LB琼脂板上选择转化的细菌菌落。使细菌菌落在含有100微克/mL氨苄青霉素的LB液体肉汤(目录号10855001,英杰公司)中生长,并根据提供有凯杰质粒分离试剂盒(Qiagen Plasmid Isolation Kit)(Maxi prep,产品编号10063)的制造商方案,根据所需规模分离质粒DNA。

```
ttgattattgactagtattaatagtaatacaattacggggcattagttcatagcccatatatggagttccgcgttacataacttacggtaaatt
ggcccgccctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttcc
attgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaaactgccacttggcagtagatcaagtgtatcatatgccaagtagccccctattgacgt
caatgacggtaaatggcccgctggcattatgccagtagatgaccttatgggactttcctacttggcagtagatctacgtattagtcac
gctattacatgggtgatcggttttggcagtagatcaatgggcgtggatagcggtttgactcacggggattccaagtctccaccccatg
acgtcaatgggagttgttttggcaccaaaatcaacggggactttccaaatgtcgtacaactccgccccattgacgcaaatgggcggt
[0323] aggcgtgtacgggtgggaggtctatataagcagagctcgttttagtgaaccgtcagatcgctggagacgccatccacgctgtttgacct
ccatagaagacaccgggaccgatccagcctccgcggccgggaacgggtgattggaacgcggattccccgtgccaagagtgcgt
aagtagccgctatagagtctataggccaccccttggcttctatgcgacggatcgatcccgaataagcttcgaggtccgcggccgg
ccgcgttgacgcgcacggcaagaggcgagggcgggcagctggtgagagatgggtgagagagcgtcagtattaagcgggggaga
attagatcgatgggaaaaaattcggttaaggccagggggaaagaaaaatataaattaaaacatatagtatgggcaagcaggag
ctagaacgattcgagtaatacctggcctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaatactgggacagctacaacctccctcaga
caggatcagaagaacttagatcattatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaaggatagagataaaagacaccaagg
```

[0324]

aagctttagacaagatagaggaagagcaaaacaaaagtaagaaaaagcacagcaagcagcagctgacacaggacacagca
atcagggtcagccaaaattaccctatagtgcagaacatccaggggcaaatggtacatcaggccatatcacctagaactttaatgcatg
ggtaaaagtagtagaagagaaggcttcagcccagaagtatgatacccatgttttcagcattatcagaaggagccaccccacaagattt
aaacaccatgtctaaacacagtggggggacatcaagcagccatgcaaatgttaaaagagacatcaatgaggaagctgcagaatg
ggatagagtgcacatcagtgcatgcagggcctattgcaccaggccagatgagagaaccaaggggaagtacatagcaggaactac
tagtacccttcaggaacaaataggatggatgacacataatccacctatcccagtaggagaaaatctataaaagatggataatcctggg
attaaataaaatagtaagaatgtatagccctaccagcattctggacataagacaaggaccaaaggaacccttagagactatgtaga
ccgattctataaaactctaagagccgagcaagcttcacaagaggtaaaaaattggatgacagaaacctgtgtggtccaaaatgcaa
cccagattgtaagactattttaaaagcattgggaccaggagcgacactagaagaaatgatgacagcatgtcagggagtgggggga
ccgggccataaagcaagagttttggctgaagcaatgagccaagtaacaaatccagctaccataatgatacagaaaggcaatttttag
gaaccaaaagaaagactgttaagtgtttcaattgtggcaagaaggggcacatagccaaaaattgcagggcccctaggaaaaagggc
tgttggaatgtggaagggaaggacaccaaataagaaatgtactgagagacaggctaatttttagggaagatctggcctccaca
agggaaggccagggaattttctcagagcagaccagagccaacagccccaccagaagagagcttcaggttggggaagagaca
acaactccctctcagaagcaggagccgatagacaaggaactgtatccttttagcttccctcagatcactcttggcagcgacccctctgc
acaataaagataggggggcaattaaaggaagctctattagatacaggagcagatgatacagtattagaagaaatgaattgccagg
aagatggaaaccaaataatgataggggaattggaggtttatcaagtaagacagtatgatcagatactcatagaaatctgaggaca
taaagctataggtacagtatttagtaggacctacacctgtcaacataattggaagaaatctgttgactcagattggctgcactttaatttc
ccattagtcctattgagactgtaccagtaaaattaaagccaggaatggatggccaaaagttaacaatggccattgacagaagaaa
aaataaaagcattagtagaaattgtacagaaatggaaaaggaaggaaaaattcaaaaattggcctgaaaatccatacaatactc
cagtattgccataaagaaaaagacagtactaaatggagaaaattagtagatttcagagaacttaataagagaactcaagattctg
ggaagtcaattaggaataccacatcctgcaggggttaaaacagaaaaaatcagtaacagtactggatgtggcgatgcataattttca
gttcccttagataaagacttcaggaagtatactgcattaccatacctagtataaacaatgagacaccagggttagatatcagtacaat
gtgtctccacagggatggaaggatcaccagcaatattccagtgtagcatgacaaaaatcttagaccccttttagaaaaacaaatcca
gacatagtcattatcaatacatggatgattgtatgtaggatctgacttagaaatagggcagcatagacaaaaatagaggaactga
gacaacatctgttaggtgggatttaccacaccagacaaaaaacatcagaaagaacctccattcctttggatgggttatgaactccat
cctgataaatggacagtacagcctatagtgtgccagaaaaggacagctggactgtcaatgacatacagaaatagtgggaaaattg
aattgggcaagtcagattatgcagggattaaagtaaggcaattatgtaaacttcttaggggaaccaaagcactaacagaagtagtac
cactaacagaagaagcagagctagaactggcagaaaacaggagattctaaaagaaccggtacatggagtgtattatgacccatc
aaaagacttaatagcagaaatacagaagcaggggcaaggccaatggacatatcaaatatcaagagccatttaaaatctgaaa
acaggaaagtatgcaagaatgaagggtgccacactaatgatgtgaaacaattaacagaggcagtaaaaaatagccacaga
aagcatagtaatatggggaagactcctaatttaattaccatacaaaaaggaaacatgggaagcatggtggacagagtattggc
aagccacctggattcctgagtgggagttgtcaataccctcccttagtgaagttatggtaccagttagagaaagaaccataatagga
gcagaaacttctatgtagatggggcagccaatagggaactaaataggaaaagcaggatatgtaactgacagaggaagacaaa
aagttgtcccctaaccggacacacaaatcagaagactgagttacaagcaattcatctagcttgcaggattcgggattagaagtaaa

[0325]

catagtgcagactcacaatatgcattgggaatcattcaagcacaaccagataagagtgaatcagagtagtcagtcacaataataga
gcagttaataaaaaaggaaaaagctacctggcatgggtaccagcacacaaaggaattggaggaaatgaacaagtagataaattg
gtcagtgtggaatcaggaaagtactattttagatggaatagataaggcccaagaagaacatgagaaatatcacagtaattggaga
gcaatggctagtgttttaacctaccacctgtagtagcaaaagaaatagtagccagctgtgataaatgtcagctaaaaggggaagcc
atgcatggacaagtagactgtagcccaggaatatggcagctagattgtacacattagaaggaaaagttatcttgtagcagttcatgt
agccagtggatatatagaagcagaagtaattccagcagagacagggcaagaacagcatacttctcttaaaattagcaggaagat
ggccagtaaaaaacgtacatacagacaatggcagcaatttcaccagtactacagttaaggccgctgttggtgggagggtcaag
caggaatttggcattccctacaatccccaaagtcaaggagtaatagaatctatgaataaagaattaaagaaaattataggacaggt
agagatcaggctgaacatcttaagacagcagtagcaaatggcagttatccacaattttaaaagaaaaggggggattgggggta
cagtgcaggggaagaatagtagacataatagcaacagacatacaaaactaaagaattacaaaaaattacaaaaattcaaaa
ttttcgggtttattacaggacagcagagatccagtttgaaaggaccagcaaaagctcctctggaaagggtgaagggcagtagta
acaagataatgtgacataaaagtagtgccaagaagaaaagcaaaagatcatcagggtattggaaaacagatggcaggtgatga
ttgtgtggcaagtagacaggatgaggattaacacatggaattctgcaacaactgtgtttatccatttcagaattgggtgtcgacatagca
gaataggcgttactcgacagaggagagcaagaaatggagccagtagatcctagactagagccctggaagcatccaggaagtcag
cctaaaactgctgtaccaattgtctattgtaaaaagtggtgttcttattgccaagtttggttcatgacaaaagccttaggcattctcctatggca
ggaagaagcggagacagcgacgaagagctcatcagaacagtcagactcatcaagcttctctatcaaaagcagtaagtagtacatgt
aatgcaacctataatagtagcaatagtagcattagtagtagcaataataatagcaatagttgtgtgtccatagtaatacatagaatag
gaaaatggccgctgtatcttcagacctggaggaggagatatgaggggacaattggagaaggaattatataataaagtagtaaaa
attgaaccattaggtagtagcaccaccaaggcaagagaagagtggtgcagagagaaaaagagcagtggggaataggagcttt
gttcttgggttcttgggagcagcaggaagcactatggcgagcgtcaatgacgctgacggtacaggccagacaattattgtctggt
atagtgcagcagcagaacaatttctgagggctattgaggcgcaacagcatctgttgcaactcacagctctggggcatcaagcagctc
caggcaagaatcctggctgtggaaagatacctaaaggatcaacagctcctgggatttggggtgtctgtgaaaactcatttgcacca
ctgtgtgccttggatgctagtgtggagtaataatctctggaacagatttggatcacacgacctggatggagtgaggacagagaaat
aacaattacacaagcttaatacactccttaattgaagaatcgaaaaccagcaagaaaagaatgaacaagaattattggaattagat
aaatgggcaagtttgggaattggttaacatacaaaatggctgtgtgtatataaaattattcataatgatagtaggaggcttggtagggtta
agaatagttttgtgtactttctatagtagaatagtagtaggagggatattcaccattatcgtttcagaccacctcccaaccccgagggg
acccgacaggccgaaggaatagaagaagaagggtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatccttgg
cacttatctgggacgatctgaggagcctgtgcctcttcagctaccacggcttgagagacttactcttgattgtaacgaggattgtggaactt
ctgggacgcaggggtgggaagccctcaaatattggtggaatcctacaatattggagtcaggagctaaagaatagtgtgttagctt
gtcaatgccacagccatagcagtagctgaggggacagatagggttagaagtagtacaaggagcttgtagagctattcgccacat
acctagaagaataagacagggttggaaggatttgcataagctcgaggccgccccggtagaccttcagaccttgccactggaggt
ggcccggcagaagcgcgcatctggtatcagtgctgcaccagcatctgctctctaccaactggagaactactgcaactaggccc
accactaccctgtccaccctctgcaatgaataaaaccttgaagagcactacaagttgtgtgtacatgctgcatgtgcatatgtgtg
gcggggggaacatgagtggggtggctggagtgccgatgataagctgtcaaacatgagaattaattctgaagacgaaagggcctc
gtgatacgctattttatagggttaattgtcatgataataatggttcttagtctagaattaattccgtgtattctatagtgacctaataatcgatgt
gtatgatacataagggtatgtattaattgtagccgcttcaacgacaatatgtacaagcctaattgtgtagcatctggcttactgaagcag

[0326]

accctatcatctctctgtaaactgccgtcagagtcggttgggtggacgaaccttctgagtttctggaacgccgtcccgaccccgaaa
tggtcagcgaaccaatcagcagggatcatcgtagccagatcctctacgccggacgcatcgtagccggcatcaccggcgccacaggt
gcggttctggcgctatatcgccgacatcaccgatggggaagatcgggctcggcactcgggctatgagcgcttcttggcggtggg
tatgggtggcaggccccgtggccgggggactgttggcgccatctccttgcacacattccttggcgcggtgtcaacggcctc
aacctactactgggctgcttctaatagcaggagtcgcataagggagagcgctgaatggtgactctcagtacaatctgctctgatgccg
catagttaagccagccccgaccccccaacacccgctgacgcgcctgacgggcttctgctcccgcatccgcttacagacaa
gctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggtttcacgcgtacaccgaaacgcgcgagacgaaagggcctcgtagacgc
ctattttataggttaatgcatgataataatggttcttagacgtcaggtggcacttttcggggaatgtgcgaggaacccctattgtttat
tctaatacattcaaataatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttaataatattgaaaaaggaagagtatgagtattc
aacatttccgtgctgcccttattccctttttgcggcattttgccttctgttttgcacccagaaacgcgtggtgaaagtaaaagatgctgaa
gatcagttgggtgcacgagtggtttacatgaactggatctaacagcggtgaagatccttgagagtttgcggcgaagaacggtttcca
atgatgagcacttttaaagtctgctatgtggcggttattatcccgatttgacgcgggcaagagcaactcggctcggcgatacactatt
ctcagaatgacttgggtgagtactaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgacgtgctgcat
aacatgagtataactgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatggg
ggatcatgtaactcgcttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtag
caatggcaacaacgttgcgcaaaactattaactgggaacttactctagcttccgggaacaattaatagactggatggaggcgga
taaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttccggctggtggttattgtctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgggt
atcattgcagcactggggccagatggtgaagccctcccgatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggtgaacga
aatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaagcatttgtaactgtcagaccaagttactcatatatacttttagattgattaaa
acttcattttaatttaaaagatctaggtgaagatccttttgataatctcatgaccaaataccctaacgtgagtttcttccactgagcgt
cagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttctgagatcctttttctgcgcgtaatctgctgtgcaaaaaaaaccaccgctac
cagcgtggttgttggccgatcaagagctaccaactcttttccgaaggaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgttct
tctagttagccgtagttaggccaccacttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgtaactctgttaccagtggctgct
gccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggtggactcaagacgatagttaccggataaggcgacgagcgtgggtgaaacgggggg
ttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgaaaagcgccacgcttc
ccgaagggagaaaaggcgacaggtatccggaagcggaagggtcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaa
acgcctggtatcttatagtcctgtcgggttccgacacttgactgagcgtcgattttgtgatgctcgtcagggggcgagcctatgga
aaaacgccagcaacgcggccttttacggttctggttcttgccttttgcacatgttcttctgcgttatcccctgattctgtggata
accgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcggcgacccgaacgacccgagcgcagcagtgatgagcaggaagcgga
agagcgcccaatacgaaacgccttccccgcggttggccgattcattaatgcagctgtggaatgtgtcagttaggggtgtgaa
agtccccaggctccccagcaggcagaagtatgaaagcatgcatctcaattagtcagcaaccagggtgtggaagtccccaggctcc
ccagcaggcagaagtatgaaagcatgcatctcaattagtcagcaaccatagtcggcccttaactccgcccattccgcccctaact
ccgcccagttccgcccatttccgccccatggctgactaatttttttatgtcagaggccgaggccgctcggcctctgagctattcca
gaagtagtgaggaggcttttggaggcctaggcttttgcaaaaagcttgacacaagacaggcttgcgagatatgttggagaatacca
ctttatccgcgtcagggagaggcagtgctaaaaagacgcggactcatgtgaaatactggttttagtcgccagatctctataatctc
gcgcaacctattttccctcgaacacttttaagccgtagataaacagggtgggacacttcacatgagcgaaaaatacatcgctcacctg

[0327]

ggacatgttgacagatccatgcacgtaaaactcgcaagccgactgatgccttctgaacaatggaaaggcattattgccgtaagccgtggc
 ggtctgtaccgggtgcgttactggcgctgaactgggtattcgtcatgtcgataccgtttgtatttcagctacgatcacgacaaccagcg
 cgagcttaaagtctgaaacgcgcagaaggcgatggcgaaggctcatcgttattgatgacctggtggataccgggtggtactgcggtt
 gcgattcgtgaaatgtatccaaaagcgcactttgtcaccatcttcgcaaaaccggctggtcgtccgctggtgatgactatgtttgatat
 cccgcaagataacctggattgaacagccgtgggatatgggcgtcgtattcgtcccgccaatctccggtcgtaacttttcaacgcctggc
 actgccggggtgttcttttaacttcaggcgggttacaatagttccagtaagtattctggaggctgcatccatgacacaggcaaacctg
 agcgaaacctgttcaaaccctgtttaaacatcctgaaacctcgacgctagtccgcgctttaatcacggcgcaaacccgctgtgc
 agtcggccctgtatggtaaaaccatccctcactggtatcgcatgattaaccgtctgatgtggatcggcgcgccattgacccacgcgaa
 atcctcgacgtccaggcacgtattgtgatgagcgatgccgaacgtaccgacgatgattatacgatacggtgattggctaccgtggcgg
 caactggatttatgagtgggccccggatctttgtgaaggaaccttacttctgtggtgtgacataattggacaaactacctacagagattta
 aagctctaaggtaaaataaaaaattttaaccggatctttgtgaaggaaccttacttctgtggtgtgacataattggacaaactacctacag
 agatttaaagctctaaggtaaaataaaaaattttaagtgataatgtgttaaactactgattctaattgtttgtatttttagattccaacctatgg
 aactgatgaatgggagcagtggtggaatgccttaatgaggaaaacctgtttgctcagaagaaatgccatctagtatgatgaggcta
 ctgctgactctcaacattctactcctcaaaaaagaagagaaaggtagaagacccaaggacttctcctcagaattgctaagttttga
 gtcatgtgtgttagtaatagaactcttgctgtctttgctatttacaccacaaaggaaaaagctgcactgctatacaagaaaattatggaa
 aaatatctgtaacctttataagtaggcataacagtataatcataactgttttttctactccacacaggcatagagtgtctgtattaa
 taactatgctcaaaaattgtgtacctttagcttttaattgtaaaggggttaataaggaatatttgatgtatagtccttgactagagatcata
 atcagccataaccacattgtagaggttttacttgctttaaaaaacctcccacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattg
 ttgtgttgggctgcaggaattaattcgagctcgcccgaca (SEQ ID NO: 8)

[0328] 下表1中提供了来自上述两种测定(例如,BRM ATP酶抑制测定;和BRG1 ATP酶抑制测定)的本披露的代表性化合物的抑制活性数据。

[0329] 表1

[0330]

实例编号	BRM IC ₅₀ (μ M)	BRG1 IC ₅₀ (μ M)
1	0.005	0.006
2	0.033	0.03
3	0.010	0.010
4	< 0.005	< 0.005
5	< 0.005	< 0.005
6	< 0.005	< 0.005
7	< 0.005	< 0.005
8	0.09	0.019

序列表

<110> 诺华公司 (NOVARTIS AG)

<120> 脲化合物及其用途

<130> PAT057524-US-PSP

<140>

<141>

<160> 8

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

[0001]

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成10xHis标签

<400> 1

His His His His His His His His His

1 5 10

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成引物

<400> 2

gaccgaacta gtatggcttc tcaccacat

30

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成引物

<400> 3

agcgtaaagc ttttaatcct cgatggcgcg

30

<210> 4

<211> 852

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多肽

<400> 4

Met Ala Ser His His His His His His His His His His Ala Gln His

[0002]

1 5 10 15

Asp Glu Ala Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe

20 25 30

Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala

35 40 45

Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu

50 55 60

Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Asn

65 70 75 80

Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu

85 90 95

Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys
100 105 110

Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu
115 120 125

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Ala Asn Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Glu Glu Ser
145 150 155 160

Asp Ser Asp Tyr Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Ser Ser Arg Gln
165 170 175

[0003] Glu Thr Glu Glu Lys Ile Leu Leu Asp Pro Asn Ser Glu Glu Val Ser
180 185 190

Glu Lys Asp Ala Lys Gln Ile Ile Glu Thr Ala Lys Gln Asp Val Asp
195 200 205

Asp Glu Tyr Ser Met Gln Tyr Ser Ala Arg Gly Ser Gln Ser Tyr Tyr
210 215 220

Thr Val Ala His Ala Ile Ser Glu Arg Val Glu Lys Gln Ser Ala Leu
225 230 235 240

Leu Ile Asn Gly Thr Leu Lys His Tyr Gln Leu Gln Gly Leu Glu Trp
245 250 255

Met Val Ser Leu Tyr Asn Asn Asn Leu Asn Gly Ile Leu Ala Asp Glu

260 265 270

Met Gly Leu Gly Lys Thr Ile Gln Thr Ile Ala Leu Ile Thr Tyr Leu
275 280 285

Met Glu His Lys Arg Leu Asn Gly Pro Tyr Leu Ile Ile Val Pro Leu
290 295 300

Ser Thr Leu Ser Asn Trp Thr Tyr Glu Phe Asp Lys Trp Ala Pro Ser
305 310 315 320

Val Val Lys Ile Ser Tyr Lys Gly Thr Pro Ala Met Arg Arg Ser Leu
325 330 335

[0004] Val Pro Gln Leu Arg Ser Gly Lys Phe Asn Val Leu Leu Thr Thr Tyr
340 345 350

Glu Tyr Ile Ile Lys Asp Lys His Ile Leu Ala Lys Ile Arg Trp Lys
355 360 365

Tyr Met Ile Val Asp Glu Gly His Arg Met Lys Asn His His Cys Lys
370 375 380

Leu Thr Gln Val Leu Asn Thr His Tyr Val Ala Pro Arg Arg Ile Leu
385 390 395 400

Leu Thr Gly Thr Pro Leu Gln Asn Lys Leu Pro Glu Leu Trp Ala Leu
405 410 415

Leu Asn Phe Leu Leu Pro Thr Ile Phe Lys Ser Cys Ser Thr Phe Glu
420 425 430

Gln Trp Phe Asn Ala Pro Phe Ala Met Thr Gly Glu Arg Val Asp Leu
435 440 445

Asn Glu Glu Glu Thr Ile Leu Ile Ile Arg Arg Leu His Lys Val Leu
450 455 460

Arg Pro Phe Leu Leu Arg Arg Leu Lys Lys Glu Val Glu Ser Gln Leu
465 470 475 480

Pro Glu Lys Val Glu Tyr Val Ile Lys Cys Asp Met Ser Ala Leu Gln
485 490 495

Lys Ile Leu Tyr Arg His Met Gln Ala Lys Gly Ile Leu Leu Thr Asp
500 505 510

[0005] Gly Ser Glu Lys Asp Lys Lys Gly Lys Gly Gly Ala Lys Thr Leu Met
515 520 525

Asn Thr Ile Met Gln Leu Arg Lys Ile Cys Asn His Pro Tyr Met Phe
530 535 540

Gln His Ile Glu Glu Ser Phe Ala Glu His Leu Gly Tyr Ser Asn Gly
545 550 555 560

Val Ile Asn Gly Ala Glu Leu Tyr Arg Ala Ser Gly Lys Phe Glu Leu
565 570 575

Leu Asp Arg Ile Leu Pro Lys Leu Arg Ala Thr Asn His Arg Val Leu
580 585 590

Leu Phe Cys Gln Met Thr Ser Leu Met Thr Ile Met Glu Asp Tyr Phe

595

600

605

Ala Phe Arg Asn Phe Leu Tyr Leu Arg Leu Asp Gly Thr Thr Lys Ser
610 615 620

Glu Asp Arg Ala Ala Leu Leu Lys Lys Phe Asn Glu Pro Gly Ser Gln
625 630 635 640

Tyr Phe Ile Phe Leu Leu Ser Thr Arg Ala Gly Gly Leu Gly Leu Asn
645 650 655

Leu Gln Ala Ala Asp Thr Val Val Ile Phe Asp Ser Asp Trp Asn Pro
660 665 670

[0006] His Gln Asp Leu Gln Ala Gln Asp Arg Ala His Arg Ile Gly Gln Gln
675 680 685

Asn Glu Val Arg Val Leu Arg Leu Cys Thr Val Asn Ser Val Glu Glu
690 695 700

Lys Ile Leu Ala Ala Ala Lys Tyr Lys Leu Asn Val Asp Gln Lys Val
705 710 715 720

Ile Gln Ala Gly Met Phe Asp Gln Lys Ser Ser Ser His Glu Arg Arg
725 730 735

Ala Phe Leu Gln Ala Ile Leu Glu His Glu Glu Glu Asn Glu Glu Glu
740 745 750

Asp Glu Val Pro Asp Asp Glu Thr Leu Asn Gln Met Ile Ala Arg Arg
755 760 765

Glu Glu Glu Phe Asp Leu Phe Met Arg Met Asp Met Asp Arg Arg Arg
770 775 780

Glu Asp Ala Arg Asn Pro Lys Arg Lys Pro Arg Leu Met Glu Glu Asp
785 790 795 800

Glu Leu Pro Trp Ile Ile Lys Asp Asp Ala Glu Val Glu Arg Leu Thr
805 810 815

Cys Glu Glu Glu Glu Glu Lys Ile Phe Gly Arg Gly Ser Arg Gln Arg
820 825 830

Arg Asp Val Asp Tyr Ser Asp Ala Leu Thr Glu Lys Gln Trp Leu Arg
835 840 845

[0007] Ala Ile Glu Asp
850

<210> 5

<211> 77

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成引物

<400> 5

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cgaaggagat agaaccatgg aagaaagtgg 60

ctcagaagaa gaggaag

77

<210> 6

<211> 76

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成引物

<400> 6

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc tcagtgatga tgatgatgat gctcctcgat 60

ggccttgagc cactgc 76

<210> 7

<211> 711

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 7

[0008] Met Glu Glu Ser Gly Ser Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
1 5 10 15

Gln Pro Gln Ala Ala Gln Pro Pro Thr Leu Pro Val Glu Glu Lys Lys
20 25 30

Lys Ile Pro Asp Pro Asp Ser Asp Asp Val Ser Glu Val Asp Ala Arg
35 40 45

His Ile Ile Glu Asn Ala Lys Gln Asp Val Asp Asp Glu Tyr Gly Val
50 55 60

Ser Gln Ala Leu Ala Arg Gly Leu Gln Ser Tyr Tyr Ala Val Ala His
65 70 75 80

Ala Val Thr Glu Arg Val Asp Lys Gln Ser Ala Leu Met Val Asn Gly
85 90 95

Val Leu Lys Gln Tyr Gln Ile Lys Gly Leu Glu Trp Leu Val Ser Leu
100 105 110

Tyr Asn Asn Asn Leu Asn Gly Ile Leu Ala Asp Glu Met Gly Leu Gly
115 120 125

Lys Thr Ile Gln Thr Ile Ala Leu Ile Thr Tyr Leu Met Glu His Lys
130 135 140

Arg Ile Asn Gly Pro Phe Leu Ile Ile Val Pro Leu Ser Thr Leu Ser
145 150 155 160

Asn Trp Ala Tyr Glu Phe Asp Lys Trp Ala Pro Ser Val Val Lys Val
165 170 175

[0009]

Ser Tyr Lys Gly Ser Pro Ala Ala Arg Arg Ala Phe Val Pro Gln Leu
180 185 190

Arg Ser Gly Lys Phe Asn Val Leu Leu Thr Thr Tyr Glu Tyr Ile Ile
195 200 205

Lys Asp Lys His Ile Leu Ala Lys Ile Arg Trp Lys Tyr Met Ile Val
210 215 220

Asp Glu Gly His Arg Met Lys Asn His His Cys Lys Leu Thr Gln Val
225 230 235 240

Leu Asn Thr His Tyr Val Ala Pro Arg Arg Leu Leu Leu Thr Gly Thr
245 250 255

Pro Leu Gln Asn Lys Leu Pro Glu Leu Trp Ala Leu Leu Asn Phe Leu
260 265 270

Leu Pro Thr Ile Phe Lys Ser Cys Ser Thr Phe Glu Gln Trp Phe Asn
275 280 285

Ala Pro Phe Ala Met Thr Gly Glu Lys Val Asp Leu Asn Glu Glu Glu
290 295 300

Thr Ile Leu Ile Ile Arg Arg Leu His Lys Val Leu Arg Pro Phe Leu
305 310 315 320

Leu Arg Arg Leu Lys Lys Glu Val Glu Ala Gln Leu Pro Glu Lys Val
325 330 335

[0010] Glu Tyr Val Ile Lys Cys Asp Met Ser Ala Leu Gln Arg Val Leu Tyr
340 345 350

Arg His Met Gln Ala Lys Gly Val Leu Leu Thr Asp Gly Ser Glu Lys
355 360 365

Asp Lys Lys Gly Lys Gly Gly Thr Lys Thr Leu Met Asn Thr Ile Met
370 375 380

Gln Leu Arg Lys Ile Cys Asn His Pro Tyr Met Phe Gln His Ile Glu
385 390 395 400

Glu Ser Phe Ser Glu His Leu Gly Phe Thr Gly Gly Ile Val Gln Gly
405 410 415

Leu Asp Leu Tyr Arg Ala Ser Gly Lys Phe Glu Leu Leu Asp Arg Ile
420 425 430

Leu Pro Lys Leu Arg Ala Thr Asn His Lys Val Leu Leu Phe Cys Gln
435 440 445

Met Thr Ser Leu Met Thr Ile Met Glu Asp Tyr Phe Ala Tyr Arg Gly
450 455 460

Phe Lys Tyr Leu Arg Leu Asp Gly Thr Thr Lys Ala Glu Asp Arg Gly
465 470 475 480

Met Leu Leu Lys Thr Phe Asn Glu Pro Gly Ser Glu Tyr Phe Ile Phe
485 490 495

Leu Leu Ser Thr Arg Ala Gly Gly Leu Gly Leu Asn Leu Gln Ser Ala
500 505 510

[0011]

Asp Thr Val Ile Ile Phe Asp Ser Asp Trp Asn Pro His Gln Asp Leu
515 520 525

Gln Ala Gln Asp Arg Ala His Arg Ile Gly Gln Gln Asn Glu Val Arg
530 535 540

Val Leu Arg Leu Cys Thr Val Asn Ser Val Glu Glu Lys Ile Leu Ala
545 550 555 560

Ala Ala Lys Tyr Lys Leu Asn Val Asp Gln Lys Val Ile Gln Ala Gly
565 570 575

Met Phe Asp Gln Lys Ser Ser Ser His Glu Arg Arg Ala Phe Leu Gln
580 585 590

Ala Ile Leu Glu His Glu Glu Gln Asp Glu Glu Glu Asp Glu Val Pro
595 600 605

Asp Asp Glu Thr Val Asn Gln Met Ile Ala Arg His Glu Glu Glu Phe
610 615 620

Asp Leu Phe Met Arg Met Asp Leu Asp Arg Arg Arg Glu Glu Ala Arg
625 630 635 640

Asn Pro Lys Arg Lys Pro Arg Leu Met Glu Glu Asp Glu Leu Pro Ser
645 650 655

Trp Ile Ile Lys Asp Asp Ala Glu Val Glu Arg Leu Thr Cys Glu Glu
660 665 670

[0012] Glu Glu Glu Lys Met Phe Gly Arg Gly Ser Arg His Arg Lys Glu Val
675 680 685

Asp Tyr Ser Asp Ser Leu Thr Glu Lys Gln Trp Leu Lys Ala Ile Glu
690 695 700

Glu His His His His His His
705 710

<210> 8

<211> 12150

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 8

ttgattattg actagttatt aatagtaatc aattacgggg tcattagttc atagcccata 60

	tatggagttc cgcgttacat aacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgccaacga	120
	ccccgcccc ttgacgtcaa taatgacgta tgtcccata gtaacgcaa tagggacttt	180
	ccattgacgt caatgggtgg agtatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt	240
	gtatcatatg ccaagtacgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaattggc ccgcctggca	300
	ttatgcccag tacatgacct tatgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt	360
	catcgctatt accatggtga tgcggttttg gcagtacatc aatgggcgtg gatagcggtt	420
	tgactcacgg ggatttcaa gtctccacc cattgacgtc aatgggagtt tgtttggca	480
	ccaaaatcaa cgggactttc caaatgtcg taacaactcc gcccattga cgaaaatggg	540
	cggtaggcgt gtacggtggg aggtctatat aagcagagct cgtttagtga accgtcagat	600
	cgctggaga cgccatccac gctgtttga cctccataga agacaccggg accgatccag	660
[0013]	cctccgcggc cggaacggt gcattggaac gcggattccc cgtgccaaga gtgacgtaag	720
	taccgcctat agagtctata ggcccacccc ctggcttct tatgcgacgg atcgatccc	780
	taataagctt cgaggccgc ggccggccgc gttgacgac acggcaagag gcgagggg	840
	gcgactggtg agagatgggt gcgagagcgt cagtattaag cgggggagaa ttagatcgat	900
	gggaaaaaat tcggttaagg ccagggggaa agaaaaata taaattaaaa catatagtat	960
	gggcaagcag ggagctagaa cgattcgag ttaatcctgg cctgttagaa acatcagaag	1020
	gctgtagaca aatactggga cagctacaac catccctca gacaggatca gaagaactta	1080
	gatcattata taatacagta gcaaccctct attgtgtgca tcaaaggata gagataaaag	1140
	acaccaagga agctttagac aagatagagg aagagcaaaa caaaagtaag aaaaagcac	1200
	agcaagcagc agctgacaca ggacacagca atcaggctag ccaaattac cctatagtgc	1260
	agaacatcca ggggcaaatg gtacatcagg ccatatcacc tagaacttta aatgcatggg	1320

	taaaagtagt agaagagaag gctttcagcc cagaagtgat acccatgttt tcagcattat	1380
	cagaaggagc caccacacaa gatttaaaca ccatgctaaa cacagtgggg ggacatcaag	1440
	cagccatgca aatgttaaaa gagaccatca atgaggaagc tgcagaatgg gatagagtgc	1500
	atccagtgc tgcagggcct attgcaccag gccagatgag agaaccaagg ggaagtgaca	1560
	tagcaggaac tactagtacc cttcaggaac aaataggatg gatgacacat aatccaccta	1620
	tcccagtagg agaaatctat aaaagatgga taatcctggg attaaataaa atagtaagaa	1680
	tgtatagccc taccagcatt ctggacataa gacaaggacc aaaggaaccc ttagagact	1740
	atgtagaccg attctataaa actctaagag ccgagcaagc ttcacaagag gtaaaaaatt	1800
	ggatgacaga aaccttggtg gtccaaaatg cgaaccaga ttgtaagact attttaaag	1860
	cattgggacc aggagcgaca ctagaagaaa tgatgacagc atgtcaggga gtgggggggac	1920
[0014]	ccggccataa agcaagagtt ttggctgaag caatgagcca agtaacaaat ccagctacca	1980
	taatgataca gaaaggcaat tttaggaacc aaagaaagac tgtaagtgt ttcaattgtg	2040
	gcaaagaagg gcacatagcc aaaaattgca gggcccctag gaaaaagggc tgttggaat	2100
	gtggaaagga aggacaccaa atgaaagatt gtactgagag acaggctaatt ttttaggga	2160
	agatctggcc tcccacaag ggaaggccag ggaattttct tcagagcaga ccagagccaa	2220
	cagccccacc agaagagagc ttcaggttg gggaagagac aacaactccc ttcagaagc	2280
	aggagccgat agacaaggaa ctgtatcctt tagcttcct cagatcactc ttggcagcg	2340
	accctcgtc acaataaaga taggggggca attaaaggaa gctctattag atacaggagc	2400
	agatgataca gtattagaag aatgaattt gccaggaaga tggaaccaa aatgatagg	2460
	gggaattgga ggttttatca aagtaagaca gtatgatcag atactcatag aaatctcgg	2520
	acataaagct ataggtacag tattagtagg acctacacct gtcaacataa ttggaagaaa	2580

	tctgttgact cagattggct gcactttaa tttccatt agtcctattg agactgtacc	2640
	agtaaaatta aagccaggaa tggatggccc aaaagttaaa caatggccat tgacagaaga	2700
	aaaaataaaa gcattagtag aaattgtac agaaatggaa aaggaaggaa aaatttcaaa	2760
	aattgggcct gaaaatccat acaatactcc agtatttgcc ataaagaaaa aagacagtac	2820
	taaatggaga aaattagtag atttcagaga acttaataag agaactcaag atttctggga	2880
	agttcaatta ggaataccac atcctgcagg gttaaaacag aaaaaatcag taacagtact	2940
	ggatgtgggc gatgcatatt ttcagttcc ctagataaa gattcagga agtatactgc	3000
	attaccata ctagtataa acaatgagac accagggatt agatatcagt acaatgtgct	3060
	tccacagga tggaaaggat caccagcaat attccagtgt agcatgacaa aaatcttaga	3120
	gccttttaga aaacaaaatc cagacatagt catctatcaa tacatggatg attgtatgt	3180
[0015]	aggatctgac ttagaaatag ggcagcatag aacaaaaata gaggaactga gacaacatct	3240
	gttgaggtgg ggattacca caccagacaa aaaacatcag aaagaacctc cattcctttg	3300
	gatgggttat gaactccatc ctgataaatg gacagtacag cctatagtgc tgccagaaaa	3360
	ggacagctgg actgtcaatg acatacagaa attagtggga aaattgaatt gggcaagtca	3420
	gatttatgca gggattaaag taaggcaatt atgtaaactt ctaggggaa ccaaagcact	3480
	aacagaagta gtaccactaa cagaagaagc agagctagaa ctggcagaaa acagggagat	3540
	tctaaaagaa ccggtacatg gagtgtatta tgacctatca aaagacttaa tagcagaaat	3600
	acagaagcag gggcaaggcc aatggacata tcaaatttat caagagccat ttaaaaatct	3660
	gaaaacagga aagtatgcaa gaatgaaggg tgcccacact aatgatgtga aacaattaac	3720
	agaggcagta caaaaaatag ccacagaaag catagtaata tggggaaaga ctctaaatt	3780
	taaattaccc atacaaaagg aaacatggga agcatggtgg acagagtatt ggcaagccac	3840

	ctggattcct gagtgggagt ttgtcaatac ccctccctta gtgaagttat ggtaccagtt	3900
	agagaaagaa cccataatag gagcagaaac tttctatgta gatggggcag ccaataggga	3960
	aactaaatta ggaaaagcag gatatgtaac tgacagagga agacaaaaag ttgtcccct	4020
	aacggacaca acaaatcaga agactgagtt acaagcaatt catctagctt tgcaggattc	4080
	gggattagaa gtaaacaatag tgacagactc acaatatgca ttgggaatca ttcaagcaca	4140
	accagataag agtgaatcag agttagtcag tcaaataata gagcagttaa taaaaagga	4200
	aaaagtctac ctggcatggg taccagcaca caaaggaatt ggaggaaatg aacaagtaga	4260
	taaattggtc agtgctggaa tcaggaaagt actattttta gatggaatag ataaggccca	4320
	agaagaacat gagaaatatac acagtaattg gagagcaatg gctagtattt ttaacctacc	4380
	acctgtagta gcaaaagaaa tagtagccag ctgtgataaa tgcagctaa aaggggaagc	4440
[0016]	catgcatgga caagtagact gtagcccagg aatatggcag ctagattgta cacatttaga	4500
	aggaaaagtt atcttggtag cagttcatgt agccagtggg tatatagaag cagaagtaat	4560
	tccagcagag acagggcaag aaacagcata cttcctctta aaattagcag gaagatggcc	4620
	agtaaaaaca gtacatacag acaatggcag caatttcacc agtactacag ttaaggccgc	4680
	ctgttggtgg gcggggatca agcaggaatt tggcattccc tacaatcccc aaagtcaagg	4740
	agtaatagaa tctatgaata aagaattaaa gaaaattata ggacaggtaa gagatcaggc	4800
	tgaacatctt aagacagcag tacaatggc agtattcatc cacaatttta aaagaaaagg	4860
	ggggattggg gggtagctg caggggaaag aatagtagac ataatagcaa cagacataca	4920
	aactaaagaa ttacaaaaac aaattacaaa aattcaaaat ttcggggtt attacaggga	4980
	cagcagagat ccagtttgga aaggaccagc aaagctctc tggaaagggtg aaggggcagt	5040
	agtaatacaa gataatagt acataaaagt agtgccaaga agaaaagcaa agatcatcag	5100

	ggattatgga aaacagatgg caggtgatga ttgtgtggca agtagacagg atgaggatta	5160
	acacatggaa ttctgcaaca actgctgttt atccatttca gaattgggtg tcgacatagc	5220
	agaataggcg ttactcgaca gaggagagca agaaatggag ccagtagatc ctgactaga	5280
	gccctggaag catccaggaa gtcagcctaa aactgcttgt accaattgct attgtaaaaa	5340
	gtgttgcttt cattgccaag ttgtttcat gacaaaagcc ttaggcatct cctatggcag	5400
	gaagaagcgg agacagcgac gaagagctca tcagaacagt cagactcatc aagcttctct	5460
	atcaaagcag taagtagtac atgtaatgca acctataata gtagcaatag tagcattagt	5520
	agtagcaata ataatagcaa tagttgtgtg gtccatagta atcatagaat ataggaaaat	5580
	ggccgctgat cttcagacct ggaggaggag atatgaggga caattggaga agtgaattat	5640
	ataaatataa agtagtaaaa attgaacat taggagtagc accaccaag gcaaagagaa	5700
[0017]	gagtggtgca gagagaaaaa agagcagtgg gaataggagc ttgttcctt gggttcttgg	5760
	gagcagcagg aagcactatg ggcgagcgt caatgacgct gacggtacag gccagacaat	5820
	tattgtctgg tatagtgcag cagcagaaca attgctgag ggctattgag gcgcaacagc	5880
	atctgttgca actcacagtc tggggcatca agcagctcca ggcaagaatc ctggctgtgg	5940
	aaagatacct aaaggatcaa cagctcctgg ggattgggg ttgctctgga aaactcattt	6000
	gcaccactgc tgtgccttgg aatgctagtt ggagtaataa atctctggaa cagatttga	6060
	atcacacgac ctggatggag tgggacagag aaattaacaa ttacacaagc ttaatacact	6120
	ccttaattga agaatcgcaa aaccagcaag aaaagaatga acaagaatta ttggaattag	6180
	ataaatgggc aagtttgtgg aattggttta acataacaaa ttggctgtgg tatataaaat	6240
	tattcataat gatagtagga ggcttggtag gttaagaat agttttgct gtactttcta	6300
	tagtgaatag agttaggcag ggatattcac cattatcgtt tcagaccac ctccaaccc	6360

cgaggggacc cgacaggccc gaaggaatag aagaagaagg tggagagaga gacagagaca 6420
gatccattcg attagtgaac ggatccttgg cacttatctg ggacgatctg cggagcctgt 6480
gcctcttcag ctaccaccgc ttgagagact tactcttgat tgtaacgagg attgtggaac 6540
ttctgggacg caggggggtg gaagccctca aatattggtg gaatctcta caatattgga 6600
gtcaggagct aaagaatagt gctgttagct tgctcaatgc cacagccata gcagtagctg 6660
aggggacaga taggggtata gaagtagtac aaggagcttg tagagctatt cgccacatac 6720
ctagaagaat aagacagggc ttggaaagga ttttctata agctcgaggc cgccccggtg 6780
accttcagac cttggcactg gaggtggccc ggcagaagcg cggcatcgtg gatcagtgtc 6840
gcaccagcat ctgctcttc taccaactgg agaactactg caactaggcc caccactacc 6900
ctgtccaccc ctctgcaatg aataaaacct ttgaaagagc actacaagtt gtgtgtacat 6960
[0018] gcgtgcatgt gcatatgtgg tgcgggggga acatgagtgg ggctggctgg agtggcgatg 7020
ataagctgtc aaacatgaga attaattctt gaagacgaaa gggcctcgtg atacgcctat 7080
ttttataggt taatgtcatg ataataatgg tttcttagtc tagaattaat tccgtgtatt 7140
ctatagtgtc acctaaatcg tatgtgtatg atacataagg ttatgtatta attgtagccg 7200
cgttctaacg acaatatgta caagcctaatt tgtgtagcat ctggcttact gaagcagacc 7260
ctatcatctc tctcgtaaac tgccgtcaga gtcggtttgg ttggacgaac cttctgagtt 7320
tctggtaacg ccgtcccgca cccggaaatg gtcagcgaac caatcagcag ggtcatcgct 7380
agccagatcc tctacgccgg acgcatcgtg gccggcatca ccggcgccac aggtgcggtt 7440
gctggcgctt atatcgccga catcaccgat ggggaagatc gggctcgcca cttcgggctc 7500
atgagcgctt gtttcggcgt gggatatgtg gcaggccccg tggccggggg actgttgggc 7560
gccatctcct tgcatgcacc attccttgcg gcggcggtgc tcaacggcct caacctacta 7620

	ctgggctgct tcctaagca ggagtcgcat aaggagagac gtcgaatggg gactctcag	7680
	tacaatctgc tctgatgccg catagttaag ccagccccga caccgcgcaa caccgctga	7740
	cgcgccctga cgggcttgct tgctcccggc atccgcttac agacaagctg tgaccgtctc	7800
	cgggagctgc atgtgtcaga ggttttcacc gtcacaccg aaacgcgcga gacgaaaggg	7860
	cctcgtgata cgcctatatt tataggttaa tgcatgata ataatgggtt ctagacgtc	7920
	aggtaggact ttccggggaa atgtgcgcgg aaccctatt tggttattt tctaaataca	7980
	ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa	8040
	aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgctgccctt attcccttt ttgcggcatt	8100
	ttgccttct gttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca	8160
	gttggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcgtaaga tcctgagag	8220
[0019]	tttcgcccc gaagaacgtt ttcaatgat gagcactttt aaagttctgc tatgtggcgc	8280
	ggattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggg cgccgcatac actattctca	8340
	gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat ctacggatg gcatgacagt	8400
	aagagaatta tgcagtgtg ccataacat gagtgataac actgcggcca acttacttct	8460
	gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgctttttg cacaacatgg gggatcatgt	8520
	aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaagc acgagcgtga	8580
	caccagatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact	8640
	tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc	8700
	acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gttattgct gataaatctg gagccggtga	8760
	gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt	8820
	agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgtga	8880

	gataggtgcc tactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact catatatact	8940
	ttagattgat ttaaaacttc attttaatt taaaaggatc taggtgaaga tccttttga	9000
	taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcggtc cactgagcgt cagaccccgt	9060
	agaaaagatc aaaggatctt cttagatcc ttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca	9120
	aacaaaaaaaa ccaccgtac cagcgggtgt ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct	9180
	ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgttc ttctagtga	9240
	gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgt	9300
	aatctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg gggtggactc	9360
	aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggt cgtgcacaca	9420
	gcccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga	9480
[0020]	aagcgccacg ctcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggaagcg gcagggtcgg	9540
	aacaggagag cgcacgaggg agcttcagg gggaaacgcc tggtatctt atagtctgt	9600
	cggtttcgc cacctctgac ttgagcgtc atttttga tgctcgtcag gggggcggag	9660
	cctatgaaa aacgccagca acgcggcctt ttacgggtc ctggccttt gctggcctt	9720
	tgctcacatg ttcttctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt	9780
	tgagtgaagt gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt cagtgaacga	9840
	ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctccc gcgcgttggc cgattcatta	9900
	atgcagctgt ggaatgtgtg tcagttaggg tgtggaaagt cccaggtc cccagcaggc	9960
	agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca ggtgtggaaa gtccccaggc	10020
	tccccagcag gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt agtcagcaac catagtcccg	10080
	cccctaactc cgccatccc gccctaact ccgcccagtt ccgccattc tccgcccac	10140

ggctgactaa tttttttat ttatgcagag gccgaggccg cctcggcctc tgagctattc 10200
cagaagtagt gaggaggctt ttttgaggc ctaggctttt gcaaaaagct tggacacaag 10260
acaggcttgc gagatatgtt tgagaatacc actttatccc gcgtcagggg gaggcagtgc 10320
gtaaaaagac gcggactcat gtgaaatact ggtttttagt gcgccagatc tctataatct 10380
cgcgcaacct attttcccct cgaacacttt ttaagccgta gataaacagg ctgggacact 10440
tcacatgagc gaaaaatata tcgtcacctg ggacatgttg cagatccatg cacgtaaact 10500
cgcaagccga ctgatgcctt ctgaacaatg gaaaggcatt attgccgtaa gccgtggcgg 10560
tctgtaccgg gtgcgttact ggcgcgtgaa ctgggtattc gtcatgtcga taccgtttgt 10620
attccagct acgatcacga caaccagcgc gagcttaaag tgctgaaacg cgagaaggc 10680
gatggcgaag gcttcacgt tattgatgac ctggtggata ccggtggtac tgcggttgcg 10740
[0021] attcgtgaaa tgtatccaaa agcgcacttt gtcaccatct tcgcaaaacc ggctggctgt 10800
ccgctgggtg atgactatgt tttgatatc ccgaagata cctggattga acagccgtgg 10860
gatatgggcg tcgtattcgt cccgccaatc tccggtcgct aatctttca acgctggca 10920
ctgccgggcg ttgttcttt taacttcagg cgggttacia tagtttccag taagtattct 10980
ggaggctgca tccatgacac aggcaaact gagcgaaacc ctgttcaaac cccgcttta 11040
acatcctgaa acctcgacgc tagtccgccg cttaatcac ggcgcacaac cgctgtgca 11100
gtcggccctt gatggtaaaa ccatccctca ctggtatcgc atgattaacc gtctgatgtg 11160
gatctggcgc ggcattgacc cacgcgaaat cctcgacgtc caggcacgta ttgtgatgag 11220
cgatgccgaa cgtaccgacg atgatttata cgatacgggtg attggctacc gtggcgga 11280
ctggatttat gagtgggccc cggatctttg tgaaggaacc ttacttctgt ggtgtgacat 11340
aattggacaa actacctaca gagatttaaa gctctaaggt aaatataaaa ttttaaccc 11400

	ggatctttgt gaaggaacct tacttctgtg gtgtgacata attggacaaa ctacctacag	11460
	agatttaaag ctctaaggta aatataaaat tttaagtgt ataatgtgtt aaactactga	11520
	ttctaattgt ttgtgtattt tagattccaa cctatggaac tgatgaatgg gagcagtgg	11580
	ggaatgcctt taatgaggaa aacctgtttt gtcagaaga aatgccatct agtgatgatg	11640
	aggctactgc tgactctcaa cattctactc ctccaaaaa gaagagaaag gtagaagacc	11700
	ccaaggactt tccttcagaa ttgctaagtt ttttgagtca tgctgtgttt agtaatagaa	11760
[0022]	ctcttgcttg ctttgctatt tacaccacaa aggaaaaagc tgcactgcta tacaagaaaa	11820
	ttatggaaaa atattctgta acctttataa gtaggcataa cagttataat cataacatac	11880
	tgtttttct tactccacac aggcatagag tgtctgctat taataactat gctcaaaaat	11940
	tgtgtacctt tagcttttta atttgtaaag gggttaataa ggaatatttg atgtatagt	12000
	ccttgactag agatcataat cagccatacc acattttag aggttttact tgctttaaaa	12060
	aacctccac acctcccct gaacctgaaa cataaaatga atgcaattgt tgtgttggg	12120
	ctgcaggaat taattcgagc tcgcccgaca	12150