(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108349951 B
(45)授权公告日 2020.11.13

(21)申请号 201680064313.0
(22)申请日 2016.11.25
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108349951 A
(43)申请公布日 2018.07.31
(30)优先权数据
1520959.6 2015.11.27 GB
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.05.03
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2016/078899 2016.11.25
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/089587 EN 2017.06.01
(73)专利权人 阿斯利康(瑞典)有限公司
地址 瑞典南泰利耶
专利权人 癌症研究科技有限公司
(72)发明人 M.R.V.芬莱
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 郭慧 罗文锋
(51)Int.Cl.
C07D 403/14(2006.01)
A61K 31/501(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
(56)对比文件
WO 2013078123 A1,2013.05.30
WO 2015101957 A2,2015.07.09
WO 2015101958 A2,2015.07.09
审查员 李士坤

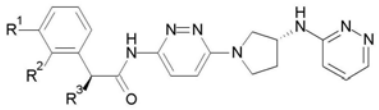
权利要求书2页 说明书21页

(54)发明名称

双哒嗪化合物

(57)摘要

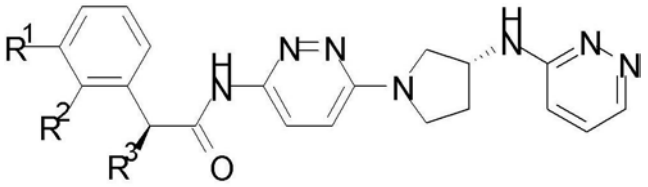
描述了一种具有式(I)的化合物



或其药学上可接受的盐,其中R^1可以是氢、甲氧基、二氟甲氧基或三氟甲氧基;R^2可以是氢、甲氧基、三氟甲氧基或三氟甲基;并且R^3可以是氢或甲氧基。具有式(I)的化合物可以抑制谷氨酰胺酶,例如GLS1。

(I)

1.一种具有式(I)的化合物：



(I)

或其药学上可接受的盐,其中：

R^1是氢、甲氧基、二氟甲氧基或三氟甲氧基；

R^2是氢、甲氧基、三氟甲氧基或三氟甲基;并且

R^3是氢或甲氧基。

2.如权利要求1所述的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐,其中R^1是甲氧基、二氟甲氧基或三氟甲氧基。

3.如权利要求2所述的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐,其中R^1是甲氧基。

4.如权利要求1至3中任一项所述的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐,其中R^2是氢。

5.如权利要求1至3中任一项所述的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐,其中R^2是甲氧基。

6.如权利要求1至3中任一项所述的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐,其中R^3是甲氧基。

7.如权利要求1至3中任一项所述的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐,其中R^3是氢。

8.如权利要求1所述的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐,其中：

R^1是甲氧基、二氟甲氧基或三氟甲氧基；

R^2是氢;并且

R^3是甲氧基。

9.如权利要求1所述的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐,其中：

R^1是氢；

R^2是甲氧基、三氟甲氧基或三氟甲基;并且

R^3是氢。

10.具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐,其中具有式(I)的化合物选自：

(2S)-2-[3-(二氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-N-[6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3-基]乙酰胺；

(2S)-2-[3-(三氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-N-[6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3-基]乙酰胺；

(2S)-2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)-N-[6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3-基]乙酰胺；

2-(2-甲氧基苯基)-N-[6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3-基]乙酰胺；

N-[6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3-基]-2-[2-(三氟甲基)苯基]乙酰胺;和

N-[6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3-基]-2-[2-(三氟甲氧基)苯基]乙酰胺。

11.一种药物组合物,该药物组合物包含如权利要求1至10中任一项所述的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、以及至少一种药学上可接受的稀释剂或载体。

12.如权利要求1至10中任一项所述的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐用于生产治疗癌症的药物的用途。

双哒嗪化合物

发明领域

[0001] 本说明书总体上涉及双哒嗪化合物及其药学上可接受的盐。这些化合物对谷氨酰胺酶1酶(“GLS1”)起作用,并且因此本说明书还涉及此类化合物及其盐治疗或预防GLS1介导的疾病(包括癌症)的用途。本发明书进一步涉及包含双哒嗪化合物及其药学上可接受的盐的药物组合物;包含此类化合物和盐的试剂盒;生产此类化合物和盐的方法;在生产此类化合物和盐中有用的中间体;并且涉及使用此类化合物和盐治疗GLS1激酶介导的疾病 (包括癌症)的方法。

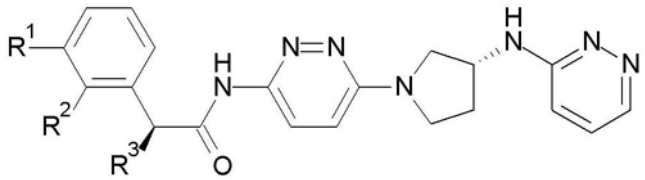
[0002] 背景

[0003] 谷氨酰胺是最丰富的血浆氨基酸并且参与许多生长促进途径。特别地,谷氨酰胺参与三羧酸循环中的氧化并且参与维持细胞氧化还原平衡,并且还为核苷酸和氨基酸合成提供氮(Curi等人,Front.Biosc.[生物科学前沿] 2007,12,344-57;DeBardinis和Cheng,Oncogene[致癌基因]2009,313- 324)。许多癌细胞依赖于谷氨酰胺代谢作为细胞代谢变化的结果,包括瓦尔堡效应(Warburg effect),其中糖酵解丙酮酸转化为乳酸而不是用于产生乙酰辅酶A(Koppenol等人,Nature Reviews[自然综述]2011,11,325- 337)。由于对谷氨酰胺代谢的这种依赖,此类癌症细胞对外源谷氨酰胺水平的变化是敏感的。而且,有许多证据表明谷氨酰胺分解在某些癌症类型中起关键作用(Hensley等人,J.Clin.Invest.[临床研究杂志]2013,123,3678- 3684),并且与已知的致癌驱动子(例如Myc)有关(Dang,Cancer Res.[癌症研究]2010,70,859-863)。

[0004] 谷氨酰胺分解代谢为谷氨酸盐的第一步骤是由谷氨酰胺酶催化,谷氨酰胺酶以2种同种型(GLS1和GLS2,最初鉴定为各自在肾和肝脏中表达)存在。已知肾谷氨酰胺酶(GLS1)比肝谷氨酰胺酶(GLS2)的表达更加广泛,并且具有2种剪接变体(KGA和较短GAC同种型),这两种都位于线粒体中(Elgadi等人,Physiol.Genomics[生理基因组学]1999,1,51-62;Cassago 等人,Proc.Natl.Acad.Sci.[美国国家科学院院刊]2012,109,1092-1097)。GLS1表达与肿瘤生长以及许多疾病类型的恶性肿瘤有关(Wang等人, Cancer Cell[癌细胞]2010,18,207-219;van der Heuval等人,Cancer Bio. Ther.[癌症生物学与治疗]2012,13,1185-1194)。因此,预期GLS1的抑制剂在治疗癌症中是有用的(作为单一疗法或与其他抗癌剂组合)。

[0005] 发明概述

[0006] 简言之,本说明书部分地描述了具有式(I)的化合物:

[0007] 

(I)

[0008] 或其药学上可接受的盐,其中:

[0009] R^1是氢、甲氧基、二氟甲氧基或三氟甲氧基；

[0010] R^2是氢、甲氧基、三氟甲氧基或三氟甲基；并且

[0011] R^3是氢或甲氧基。

[0012] 本说明书还部分地描述了包含具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、以及至少一种药学上可接受的稀释剂或载体的药物组合物。

[0013] 本说明书还部分地描述了具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐，用于在疗法中使用。

[0014] 本说明书还部分地描述了具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐，用于在癌症的治疗中使用。

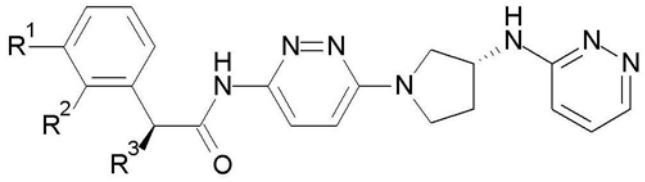
[0015] 本说明书还部分地描述了具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐在生产用于治疗癌症的药物中的用途。

[0016] 本说明书还部分地描述了用于在需要这种治疗的温血动物中治疗癌症的方法，该方法包括向所述温血动物给予治疗有效量的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐。

[0017] 示意性实施例的说明

[0018] 许多实施例在整个说明书中详细描述，并且对于本领域有技术的读者而言将是明显的。本发明不被解释为受限于其任何具体的一个或多个实施例。

[0019] 在第一个实施例中，提供了具有式(I)的化合物：

[0020] 

(I)

[0021] 或其药学上可接受的盐，其中：

[0022] R^1是氢、甲氧基、二氟甲氧基或三氟甲氧基；

[0023] R^2是氢、甲氧基、三氟甲氧基或三氟甲基；并且

[0024] R^3是氢或甲氧基。

[0025] 氢基团是单个氢原子。例如，当R^3是氢时，在式(I)中邻接至羰基基团的基团是亚甲基基团。当R^1或R^2是氢时，它们和它们附接至其上的碳原子形成芳香族的CH基团。

[0026] 术语“药学上可接受的”用于指定对象(例如盐、剂型、稀释剂或载体)是适合在患者中使用的。药学上可接受的盐的实例列表可以发现于：Handbook of Pharmaceutical Salts：Properties，Selection and Use[药用盐手册：性质、选择和使用]，P.H.Stahl和C.G.Wermuth编辑，Weinheim/Zürich：Wiley-VCH出版社/VHCA，2002。具有式(I)的化合物的适合的药学上可接受的盐例如是酸加成盐。在技术人员已知的条件下，具有式(I)的化合物的酸加成盐可以通过使该化合物与适合的无机酸或有机酸接触来形成。酸加成盐例如可以使用选自盐酸、氢溴酸、硫酸和磷酸的无机酸来形成。酸加成盐例如也可以使用选自三氟乙酸、甲磺酸和苯磺酸的有机酸来形成。

[0027] 因此，在一个实施例中，提供了具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐，其中该药学上可接受的盐是盐酸盐、氢溴酸盐、硫酸盐、磷酸盐、三氟乙酸盐、甲磺酸盐或苯磺酸

盐。

[0028] 在一个实施例中，提供了具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐，其中该药学上可接受的盐是盐酸盐或氢溴酸盐。

[0029] 应当理解的是，可能用具有适当PKa的其他适合的酸来形成其他药学上可接受的盐，并且这些包括在“药学上可接受的盐”的定义中。

[0030] 具有式(I)的化合物的另外的适合的药学上可接受的盐是碱加成盐。在技术人员已知的条件下，具有式(I)的化合物的碱加成盐可以通过使该化合物与适合的无机碱或有机碱接触来形成。例如可以使用选自碱金属氢氧化物(例如氢氧化钠、氢氧化钾、或氢氧化锂)或碱土金属氢氧化物(例如氢氧化钙或氢氧化镁)的无机碱来形成碱加成盐。也可以使用选自甲胺、二甲胺、三甲胺、哌啶、吗啉和三-(2-羟乙基)胺的有机碱来形成碱加成盐。

[0031] 因此，在一个实施例中，提供了具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐，其中该药学上可接受的盐是氢氧化钠盐、氢氧化钾盐、氢氧化锂盐、氢氧化钙盐、氢氧化镁盐、甲胺盐、二甲胺盐、三甲胺盐、哌啶盐、吗啉盐或三-(2-羟乙基)胺盐。

[0032] 在一个实施例中，提供了具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐，其中该药学上可接受的盐是盐酸盐、氢溴酸盐、硫酸盐、磷酸盐、三氟乙酸盐、甲磺酸盐、苯磺酸盐、氢氧化钠盐、氢氧化钾盐、氢氧化锂盐、氢氧化钙盐、氢氧化镁盐、甲胺盐、二甲胺盐、三甲胺盐、哌啶盐、吗啉盐或三-(2- 羟乙基)胺盐。

[0033] 应当理解的是，可能与其他适合的碱形成其他药学上可接受的碱，并且这些包括在“药学上可接受的盐”的定义中。

[0034] 另一个实施例提供了本文所定义的任何实施例(例如如权利要求1所述的实施例)，其条件是选自实例1、2、3、4、5和6的一个或多个具体的实例(例如一个、两个或三个具体的实例，或可替代地一个具体的实例)单独地被放弃。

[0035] 式(I)中的可变基团的一些值如下。这些值可以与任何定义、权利要求 (例如权利要求1)、或本文所定义的实施例组合使用以提供另外的实施例。

[0036] a)R^1是甲氧基、二氟甲氧基或三氟甲氧基。

[0037] b)R^1是甲氧基或二氟甲氧基。

[0038] c)R^1是甲氧基或三氟甲氧基。

[0039] d)R^1是二氟甲氧基或三氟甲氧基。

[0040] e)R^1是氢。

[0041] f)R^1是甲氧基。

[0042] g)R^1是二氟甲氧基。

[0043] h)R^1是三氟甲氧基。

[0044] i)R^2是甲氧基、三氟甲氧基或三氟甲基。

[0045] j)R^2是氢。

[0046] k)R^2是甲氧基。

[0047] l)R^2是三氟甲氧基。

[0048] m)R^2是三氟甲基。

[0049] n)R^3是氢。

[0050] o)R^3是甲氧基。

[0051] 在一个实施例中，提供了具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐，其中：

[0052] R^1是氢、甲氧基、二氟甲氧基或三氟甲氧基；

[0053] R^2是氢；并且

[0054] R^3是甲氧基。

[0055] 在一个实施例中，提供了具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐，其中：

[0056] R^1是甲氧基、二氟甲氧基或三氟甲氧基；

[0057] R^2是氢；并且

[0058] R^3是甲氧基。

[0059] 在一个实施例中，提供了具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐，其中：

[0060] R^1是氢；

[0061] R^2是甲氧基、三氟甲氧基或三氟甲基；并且

[0062] R^3是氢。

[0063] 在一个实施例中，提供了具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐，其中该具有式(I)的化合物选自：

[0064] (2S)-2-[3-(二氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-N-[6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3-基]乙酰胺；

[0065] (2S)-2-[3-(三氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-N-[6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3-基]乙酰胺；

[0066] (2S)-2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)-N-[6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基] 哒嗪-3-基]乙酰胺；

[0067] 2-(2-甲氧基苯基)-N-[6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3-基]乙酰胺；

[0068] N-[6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3-基]-2-[2-(三氟甲基)苯基] 乙酰胺；和

[0069] N-[6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3-基]-2-[2-(三氟甲氧基)苯基]乙酰胺。

[0070] 在一个实施例中，提供了(2S)-2-[3-(二氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-N-[6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3-基]乙酰胺，或其药学上可接受的盐。

[0071] 在一个实施例中，提供了(2S)-2-[3-(二氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-N-[6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3-基]乙酰胺。

[0072] 在一个实施例中，提供了(2S)-2-[3-(二氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-N-[6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3-基]乙酰胺的药学上可接受的盐。

[0073] 在一个实施例中，提供了(2S)-2-[3-(三氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-N-[6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3-基]乙酰胺，或其药学上可接受的盐。

[0074] 在一个实施例中，提供了(2S)-2-[3-(三氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-N-[6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3-基]乙酰胺。

[0075] 在一个实施例中，提供了(2S)-2-[3-(三氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-N-[6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3-基]乙酰胺的药学上可接受的盐。

[0076] 在一个实施例中，提供了(2S)-2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)-N-[6-[(3R)-3- (哒

嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3-基]乙酰胺,或其药学上可接受的盐。

[0077] 在一个实施例中,提供了(2S)-2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)-N-[6-[(3R)-3- (哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3-基]乙酰胺。

[0078] 在一个实施例中,提供了(2S)-2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)-N-[6-[(3R)-3- (哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3-基]乙酰胺的药学上可接受的盐。

[0079] 在一个实施例中,提供了2-(2-甲氧基苯基)-N-[6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基) 吡咯烷-1-基]哒嗪-3-基]乙酰胺,或其药学上可接受的盐。

[0080] 在一个实施例中,提供了2-(2-甲氧基苯基)-N-[6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基) 吡咯烷-1-基]哒嗪-3-基]乙酰胺。

[0081] 在一个实施例中,提供了2-(2-甲氧基苯基)-N-[6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基) 吡咯烷-1-基]哒嗪-3-基]乙酰胺的药学上可接受的盐。

[0082] 本说明书中所描述的化合物和盐可以按溶剂化形式和非溶剂化形式存在。例如,溶剂化形式可以是水合形式,如半水合物、一水合物、二水合物、三水合物或其可替代的数量。本发明涵盖具有式(I)的化合物的所有此类溶剂化形式以及非溶剂化形式。

[0083] 本说明书所描述的这些化合物和盐的原子可以作为它们的同位素存在。本发明涵盖了具有式(I)的所有化合物,其中原子被其同位素中的一个或多个替换(例如具有式(I)的化合物,其中一个或多个碳原子是^{11}C或^{13}C碳同位素,或其中一个或多个氢原子是^{2}H(氘)或^{3}H(氚)同位素)。

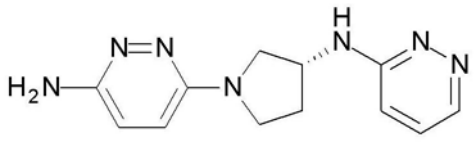
[0084] 本说明书中所描述的化合物和盐可以按互变异构体的混合物存在。“互变异构体”是结构异构体,其存在于由氢原子的迁移产生的平衡中。本发明包括具有式(I)的化合物的所有互变异构体。

[0085] 借助于它们的不对称碳原子,具有式(I)的化合物以光学活性形式存在。

[0086] 某些具有式(I)的化合物(例如那些其中R^3是氢的化合物)以单一对映异构体存在。因此,在一个实施例中,提供了具有式(I)的化合物、或其药学上可接受的盐,其是对映异构体过量(%ee)≥95%、≥98%或≥99%的单一对映异构体。在一个实施例中,单一对映异构体以对映异构体过量(%ee)≥ 99%存在。

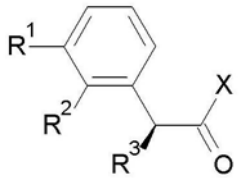
[0087] 某些具有式(I)的化合物(例如那些其中R^3是甲氧基的化合物)以单一非对映异构体存在。因此,在一个实施例中,提供了具有式(I)的化合物、或其药学上可接受的盐,其是非对映异构体过量(%de)≥95%、≥98%或≥ 99%的单一非对映异构体。在一个实施例中,单一非对映异构体以非对映异构体过量(%de)≥99%存在。

[0088] 具有式(I)的化合物可以例如通过具有式(II)的化合物:

[0089] 

(II)

[0090] 与具有式(III)化合物反应来制备:

[0091] 

(III)

[0092] 其中R^1、R^2和R^3是如本文任何实施例中所定义的，并且X是离去基团 (例如卤素原子(例如氯原子)或羟基基团)。该反应在适合的溶剂(例如 DMF或DMA)中并且在碱(例如DIPEA)的存在下，在适合的温度(例如在大约20℃至30℃的环境温度或在升高的温度(例如在80℃和120℃之间或可替代地在大约100℃))便利地进行。其中X是羟基基团，适合的偶联剂(例如HATU)被用来形成酰胺键。

[0093] 因此具有式(II)的化合物及其盐在具有式(I)的化合物的制备中作为中间体是有用的，并且提供了另一个实施例。

[0094] 在一个实施例中，提供了6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3- 胺，或其盐。

[0095] 在一个实施例中，提供了6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3- 胺。

[0096] 类似地，具有式(III)的化合物及其盐在具有式(I)的化合物的制备中作为中间体是有用的，并且提供了另一个实施例。

[0097] 在一个实施例中，提供了具有式(III)的化合物或其盐，其中：

[0098] R^1是二氟甲氧基或三氟甲氧基；

[0099] R^2是氢；

[0100] R^3是甲氧基；并且

[0101] X是离去基团。在一个实施例中，X是羟基或氯。在一个实施例中，X 是羟基。

[0102] 在一个实施例中，提供了2-[3-(二氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基乙酸，或其盐。

[0103] 在一个实施例中，提供了2-甲氧基-2-[3-(三氟甲氧基)苯基]乙酸，或其盐。

[0104] 在一个实施例中，提供了2-[3-(二氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基乙酸。

[0105] 在一个实施例中，提供了2-甲氧基-2-[3-(三氟甲氧基)苯基]乙酸。

[0106] 具有式(II)和式(III)的化合物可以通过类似于实例部分示出的那些方法来制备。

[0107] 具有式(II)的化合物的适合的盐例如是酸加成盐。具有式(II)的化合物的酸加成盐可以通过在技术人员已知的条件下使该化合物与适合的无机酸或有机酸接触来形成。当与具有式(II)的化合物配对时，此类酸不需要产生药学上可接受的盐。酸加成盐例如可以使用选自盐酸、氢溴酸、硫酸和磷酸的无机酸来形成。酸加成盐例如也可以使用选自三氟乙酸、甲磺酸和苯磺酸的有机酸来形成。

[0108] 因此，在一个实施例中，提供了具有式(II)的化合物或其盐，其中该盐是盐酸盐、氢溴酸盐、硫酸盐、磷酸盐、三氟乙酸盐、甲磺酸盐或苯磺酸盐。

[0109] 具有式(III)的化合物的适合的盐是碱加成盐。在技术人员已知的条件下，具有式(III)的化合物的碱加成盐可以通过使该化合物与适合的无机碱或有机碱接触来形成。当与具有式(III)的化合物配对时，此类碱不需要产生药学上可接受的盐。例如可以使用选自

碱金属氢氧化物(例如氢氧化钠、氢氧化钾、或氢氧化锂)或碱土金属氢氧化物(例如氢氧化钙或氢氧化镁)的无机碱来形成碱加成盐。也可以使用选自甲胺、二甲胺、三甲胺、哌啶、吗啉和三-(2-羟乙基)胺的有机碱来形成碱加成盐。

[0110] 因此,在一个实施例中,提供了具有式(III)的化合物或其盐,其中该盐是氢氧化钠盐、氢氧化钾盐、氢氧化锂盐、氢氧化钙盐、氢氧化镁盐、甲胺盐、二甲胺盐、三甲胺盐、哌啶盐、吗啉盐或三-(2-羟乙基)胺盐。

[0111] 作为其GLS1抑制活性的结果,具有式(I)的化合物、及其药学上可接受的盐预期在疗法中(例如在至少部分由GLS1介导的疾病或医学病状,包括癌症的治疗中)是有用的。

[0112] 在提及"癌症"的情况下,这包括非转移性癌症和转移性癌症两者,使得治疗癌症涉及治疗原发性肿瘤和肿瘤转移两者。

[0113] 在一个实施例中,该癌症是转移性癌症。

[0114] 在一个实施例中,该癌症是非转移性癌症。

[0115] "GLS1抑制活性"是指作为对具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐的存在的直接或间接响应,GLS1的活性相对于在不存在具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐下GLS1的活性降低。此类活性的降低可以由于具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐与GLS1的直接相互作用,或由于具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐与一种或多种反过来影响GLS1活性的其他因素相互作用。例如,具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐可以通过直接与GLS1结合、通过(直接或间接)引起另一因素降低GLS1活性、或通过(直接或间接)降低存在于细胞或有机体中的GLS1的量来降低 GLS1。

[0116] 术语"疗法"旨在具有其正常的含义:处理疾病,以便完全或部分缓解其症状的一种、一些或全部,或以便针对潜在病理进行纠正或补偿。术语"疗法"还包括"预防",除非有相反的具体指示。术语"治疗的"和"治疗地"应以相应的方式被解释。

[0117] 术语"预防"旨在具有其正常的含义,并包括防止疾病发展的初级预防和继发性预防,其中该疾病已经发展并且患者被暂时或永久保护对抗疾病的加重或恶化或者对抗与疾病相关的新症状的发展。

[0118] 术语"治疗"(treatment)与"疗法"(therapy)同义地使用。类似地,术语"治疗"(treat)可视为"施加疗法"(applying therapy),其中"疗法"(therapy)是如本文所定义的。

[0119] 在一个实施例中,提供了具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐,用于在疗法中使用。

[0120] 在一个实施例中,提供了具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐用于生产药物的用途。

[0121] 在任何实施例中,具有式(I)的化合物选自以下实例。在任何实施例中,具有式(I)的化合物选自实例1、2、3、4、5和6。

[0122] 在一个实施例中,提供了具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐,用于在治疗由GLS1介导的疾病中使用。在一个实施例中,由GLS1介导的所述疾病是癌症。在一个实施例中,所述癌症选自乳腺癌(例如三阴性乳腺癌)、肺癌(例如非小细胞肺癌)、胰腺癌和肝细胞癌。

[0123] "三阴性乳腺癌"是不表达雌激素受体、孕酮受体和Her2/neu的这些基因的任何乳

腺癌。

[0124] 在一个实施例中，提供了具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐，用于在癌症的治疗中使用。

[0125] 在一个实施例中，提供了具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐用于生产治疗GLS1介导的疾病的药物的用途。在一个实施例中，由GLS1介导的所述疾病是癌症。在一个实施例中，所述癌症选自乳腺癌(例如三阴性乳腺癌)、肺癌(例如非小细胞肺癌)、胰腺癌和肝细胞癌。

[0126] 在一个实施例中，提供了具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐用于生产治疗癌症的药物的用途。

[0127] 在任何实施例中，具有式(I)的化合物选自以下实例。在任何实施例中，具有式(I)的化合物选自实例1、2、3、4、5和6。

[0128] 在一个实施例中，提供了用于在需要这种治疗的温血动物中治疗GLS1 的抑制是有益的疾病的方法，该方法包括向所述温血动物给予治疗有效量的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐。

[0129] 术语“治疗有效量”是指如在本文的任何实施例中所描述的具有式(I) 的化合物的量，该量有效地在受试者中提供“疗法”，或在受试者中有效地“治疗”疾病或失调。在癌症的情况下，如在以上“疗法”、“治疗”和“预防”的定义中所述的，治疗有效量可以在受试者中引起任何可观察的或可测量的变化。例如，该有效量可以降低癌症或肿瘤细胞的数量；降低总体肿瘤大小；抑制或停止肿瘤细胞浸润至外周器官(包括，例如软组织和骨)；抑制或停止肿瘤转移；抑制或停止肿瘤生长；在某种程度上减轻与癌症有关的一个或多个症状；降低发病率和死亡率；提高生命质量；或这些作用的组合。有效量可以是足以减少响应于GLS1活性的抑制的疾病的症状的量。对于癌症疗法，例如可以通过评估存活期、疾病进展时间(TTP)、应答率(RR)、响应期、和/或生命质量来测定体内疗效。如由本领域技术人员所认可的，有效量可以取决于给予途径、赋形剂的使用、以及与其他药剂共同使用而改变。例如，在使用联合疗法的情况下，在动物患者中，对于治疗靶向的失调，当联合时，本说明书中所描述的具有式(I)的化合物或药学上可接受的盐的量和其他一种或多种药学上有活性的药剂的量是共同有效的。在该背景下，如果它们在组合时足以降低如以上所述的响应于GLS1活性抑制的疾病的症状，组合的量是“治疗有效量”的。典型地，本领域普通技术人员可以通过例如从针对具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐的、本说明书中所描述的剂量范围开始，以及从其他一种或多种药学上有活性的化合物的一个或多个批准的或另外公开的剂量范围开始，来确定此类量。

[0130] “温血动物”包括例如人类。

[0131] 在一个实施例中，提供了用于在需要这种治疗的温血动物中治疗癌症的方法，该方法包括向所述温血动物给予治疗有效量的具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐。在一个实施例中，所述癌症选自乳腺癌(例如三阴性乳腺癌)、肺癌(例如非小细胞肺癌)、胰腺癌和肝细胞癌。

[0132] 在任何实施例中，具有式(I)的化合物选自以下实例。在任何实施例中，具有式(I)的化合物选自实例1、2、3、4、5和6。

[0133] 在本说明书中所描述的抗癌治疗可以作为单一疗法是实用的，或者除了给予具有

式(I)的化合物以外，还可以包括常规手术、放射疗法或化学疗法；或这些另外的疗法的组合。这种常规手术、放射疗法或化学疗法可以与具有式(I)的化合物同时地、顺序地或分开地给予，以进行治疗。

[0134] 因此，在一个实施例中，提供了具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、以及至少一种另外的抗肿瘤物质，用于在癌症的治疗中使用。

[0135] 在一个实施例中，提供了具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、以及至少一种另外的抗肿瘤物质，用于在癌症的治疗中同时地、分开地或顺序地使用。

[0136] 在一个实施例中，提供了具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐，用于在癌症的治疗中使用，其中该具有式(I)的化合物与至少一种另外的抗肿瘤物质被同时地、分别地或顺序地给予。

[0137] 在一个实施例中，提供了在需要这种治疗的温血动物中治疗癌症的方法，该方法包括向所述温血动物给予具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐以及至少一种另外的抗肿瘤物质，其中具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、以及另外的抗肿瘤物质的量在产生抗癌作用方面是共同有效的。

[0138] 在一个实施例中，提供了在需要这种治疗的温血动物中治疗癌症的方法，该方法包括向所述温血动物给予具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐，并且向所述温血动物同时地、分开地或顺序地给予至少一种另外的抗肿瘤物质，其中具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、以及另外的抗肿瘤物质的量在产生抗癌作用方面是共同有效的。

[0139] 在任何实施例中，该另外的抗肿瘤物质是紫杉烷。在一个实施例中，紫杉烷是紫杉醇。在一个实施例中，紫杉烷是多西他赛。

[0140] 在任何实施例中，该另外的抗肿瘤物质是铂疗法。在一个实施例中，该铂疗法是顺铂、奥沙利铂、或卡铂。

[0141] 在一个实施例中，提供了包含具有式(I)的化合物以及至少一种另外的抗肿瘤物质的药物组合物。在一个实施例中，该药物组合物还包含至少一种药学上可接受的稀释剂或载体。

[0142] 在一个实施例中，提供了包含具有式(I)的化合物以及至少一种另外的抗肿瘤物质的药物组合物，用于在癌症的治疗中使用。在一个实施例中，该药物组合物还包含至少一种药学上可接受的稀释剂或载体。

[0143] 在一个实施例中，该另外的抗肿瘤物质是紫杉烷。在一个实施例中，紫杉烷是紫杉醇。在一个实施例中，紫杉烷是多西他赛。

[0144] 在一个实施例中，该另外的抗肿瘤物质是铂疗法。在一个实施例中，该铂疗法是顺铂、奥沙利铂、或卡铂。

[0145] 在任何实施例中，具有式(I)的化合物选自以下实例。在任何实施例中，具有式(I)的化合物选自实例1、2、3、4、5和6。

[0146] 根据另一个实施例，提供了一种试剂盒，该试剂盒包括：

[0147] a)处于第一单位剂型的、具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐；

[0148] b)处于另外的单位剂型的又另外的抗肿瘤物质；

[0149] c)用于容纳所述第一单位剂型和另外的单位剂型的容器装置；以及任选地

[0150] d)使用说明书。

[0151] 在一个实施例中，该另外的抗肿瘤物质是紫杉烷。在一个实施例中，紫杉烷是紫杉醇。在一个实施例中，紫杉烷是多西他赛。

[0152] 在一个实施例中，该另外的抗肿瘤物质是铂疗法。在一个实施例中，该铂疗法是顺铂、奥沙利铂、或卡铂。

[0153] 在一个实施例中，具有式(I)的化合物选自以下实例。在一个实施例中，具有式(I)的化合物选自实例1、2、3、4、5和6。

[0154] 具有式(I)的化合物及其药学上可接受的盐可以作为药物组合物被给予，这些药物组合物包含一种或多种药学上可接受的稀释剂或载体。

[0155] 因此，在一个实施例中，提供了包含具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、以及至少一种药学上可接受的稀释剂或载体的药物组合物。

[0156] 在一个实施例中，具有式(I)的化合物选自以下实例。在一个实施例中，具有式(I)的化合物选自实例1、2、3、4、5和6。

[0157] 本发明的这些组合物可以处于适于口服使用的形式(例如作为片剂、锭剂、硬或软胶囊，水性或油性悬浮液、乳液、可分散的粉剂或颗粒剂、糖浆或酏剂)，适用于局部使用的形式(例如作为乳膏、软膏、凝胶、或水性或油性溶液或悬浮液)，适用于通过吸入给药的形式(例如作为精细分散粉末或液体气雾剂)，适用于通过吹入给药的形式(例如作为精细分散粉末)或适用于肠胃外给药的形式(例如作为无菌水性或油性溶液，用于静脉内、皮下、肌肉或肌内给药)，或作为栓剂用于直肠给药。本发明的这些组合物可以通过常规程序使用本领域众所周知的常规药物赋形剂获得。因此，旨在口服使用的组合物可以含有例如一种或多种着色剂、甜味剂、调味剂和/或防腐剂。

[0158] 在一个实施例中，提供了包含具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、以及至少一种药学上可接受的稀释剂或载体的药物组合物，用于在疗法中使用。

[0159] 在一个实施例中，提供了包含具有式(I)的化合物或其药学上可接受的盐、以及至少一种药学上可接受的稀释剂或载体的药物组合物，用于在癌症的治疗中使用。在一个实施例中，所述癌症选自乳腺癌(例如三阴性乳腺癌)、肺癌(例如非小细胞肺癌)、胰腺癌和肝细胞癌。

[0160] 在任何实施例中，具有式(I)的化合物选自以下实例。在任何实施例中，具有式(I)的化合物选自实例1、2、3、4、5和6。

[0161] 具有式(I)的化合物通常以范围为5mg/m^2至5000mg/m^2的动物体表面积内的单位剂量，或例如约0.1mg/kg至100mg/kg给予至温血动物，并且这通常提供治疗有效剂量。单位剂型如片剂或胶囊剂通常含有例如1mg至250 mg的活性成分。每日剂量将必然取决于所治疗的宿主、具体的给予途径、共给予的任何疗法、以及正在治疗的疾病的严重性而变化。因此，治疗任何具体病人的执业医生可以确定最佳剂量。

[0162] 实例

[0163] 通过以下实例阐明多个实施例。本发明不被解释为受限于这些实例。在实例的制备期间，通常：

[0164] i.除非另有说明，在环境温度(在约17℃至30℃的范围内)并且在惰性气体的气氛(如氮气)下进行操作；

[0165] ii通过旋转蒸发或使用Genevac真空设备进行蒸发，并且在通过过滤去除残余固

体之后进行后处理程序；

[0166] iii.在自动化Isco Combiflash Companion上(使用Grace Resolve预包装的硅胶柱)和(反向快速)Isco Combiflash Rf(使用RediSep Gold C18 柱)上进行快速色谱法纯化；

[0167] iv.产率,在存在的情况下,不必是可达到的最大值；

[0168] v.具有式(I)的终产物的结构通过核磁共振(NMR)光谱法证实,伴随在δ规模上测量的NMR化学位移值。使用Bruker advance 700(700 MHz)、Bruker Avance 500(500MHz)、Bruker 400(400MHz)或Bmker 300(300MHz)仪器测定质子核磁共振谱;在282MHz或376MHz处测定 19F NMR;在75MHz或100MHz处测定13C NMR;除非另外指明,在约 20℃至30℃进行测量;已使用以下缩写:s,单峰;d,二重峰;t,三重峰;q,四重峰;m,多重峰;dd,双二重峰;ddd,双二重峰的双重峰;dt,双三重峰;bs,宽信号；

[0169] vi.具有式(I)的终产物通过液相色谱随后质谱(LCMS)来进行表征,使用基于沃特斯(Waters)2790/95LC系统(具有2996PDA和2000amu ZQ单四极杆质谱仪)的HPLC系统。使用的溶剂是A＝水,B＝乙腈,C＝ 50:50乙腈:含0.1％甲酸的水和D＝50:50乙腈:含0.1％氢氧化铵的水。在 1.1mL/min的流速下,将5μL的样品注入50x2.1 5μm Phenomenex Gemini NX柱中。梯度从95％A至95％B伴随注入恒量为5％的C运行持续4.0min (用于酸分析,D是用于碱分析)。在回归至起始条件之前,将流速维持在 95％B处0.5min。在质谱仪上正离子和负离子模式两者从150amu至850 amu以及在PDA上220nm至320nm获得数据。LCMS也在UPLC系统上进行(利用具有样品管理器的沃特斯Acquity二元泵、Acquity PDA和SQD质谱仪)。使用的溶剂是A1＝0.1％甲酸(水性),B1 0.1％甲酸在乙腈中,A2＝ 0.1％氢氧化铵(水性)和B2 0.1％氢氧化铵在乙腈中。在1mL/min的流速下,将1μL的样品注入50x2.1 1.7μm沃特斯BEH柱(在40℃)中。在保持0.2min并回归至起始条件(将A1和B1取代为A2和B2用于碱分析)之前,该梯度从97％A1至97％B1经1.30min运行。在质谱仪上在正离子和负离子模式从150amu至1000amu以及在PDA上在245amu至320amu获得数据；

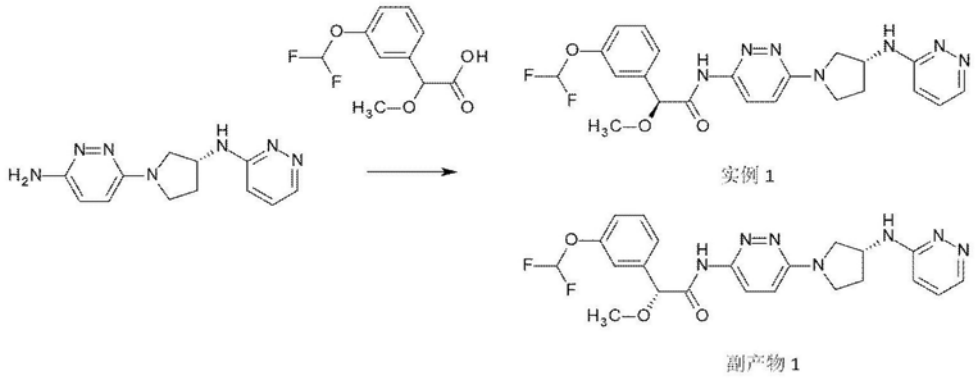
[0170] vii.中间物总体上未经完全表征且纯度通过薄层色谱、质谱、HPLC和/ 或NMR分析来评估；

[0171] viii.使用以下缩写:h＝小时;r.t.＝室温(约17℃至30℃);conc.＝浓缩的;FCC＝使用二氧化硅的快速柱色谱法;DCM＝二氯甲烷;DIPEA＝二-异丙基乙胺;DMA＝N,N-二甲基乙酰胺;DMF＝N,N-二甲基甲酰胺; DMSO＝二甲基亚砜;Et_2O＝乙醚;EtOAc＝乙酸乙酯;EtOH＝乙醇; HATU＝1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物六氟磷酸盐;K_2CO_3＝碳酸钾;MeOH＝甲醇;MeCN＝乙腈;$MgSO_4$＝无水硫酸镁;Na_2SO_4＝无水硫酸钠;TFA＝三氟乙酸;THF＝四氢呋喃;sat.＝饱和水性溶液;并且

[0172] ix.使用‘SmiToSd’(一种围绕OpenEye Lexichem toolkit (http://www.eyesopen.com/lexichem-tk)建立的专有程序)生成IUPAC名称。

[0173] 实例1

[0174] (2S)-2-[3-(二氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-N-[6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1- 基]哒嗪-3-基]乙酰胺

[0175] 

[0176] 将HATU(931mg,2.45mmol)添加至在DMF(12mL)中的6-[(3R)-3- (哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3-胺(中间体1,525mg,2.04mmol)、2- (3-(二氟甲氧基)苯基)-2-甲氧基乙酸(中间体6,521mg,2.24mmol)和 DIPEA(1.066mL,6.12mmol)中。将所得溶液在0℃搅拌5分钟,并且然后在室温搅拌3h。将该溶液用MeOH(7mL)稀释并且使其穿过20g SCX-2 筒,用MeOH冲洗以去除杂质,随后用在MeOH中的1N氨溶液以获得产物。将溶剂在减压下蒸发以产生粗产物。将残余物通过FCC,在DCM中0至6% MeOH的洗脱梯度进行纯化。将含有产物的级分蒸发至干燥以得到呈固体的2- (3-(二氟甲氧基)苯基)-2-甲氧基-N-(6-((R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基)哒嗪- 3-基)乙酰胺(490mg,50%)。将粗产物通过制备型HPLC(Chiralpak IF柱, 20μm二氧化硅,50mm直径,250mm长度),用MeOH 100%以150mL/min 洗脱进行纯化。将包含希望的化合物的级分蒸发至干燥以得到:

[0177] (2S)-2-[3-(二氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-N-[6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3-基]乙酰胺(实例1),作为第一洗脱的同分异构体(169mg, 18%)。

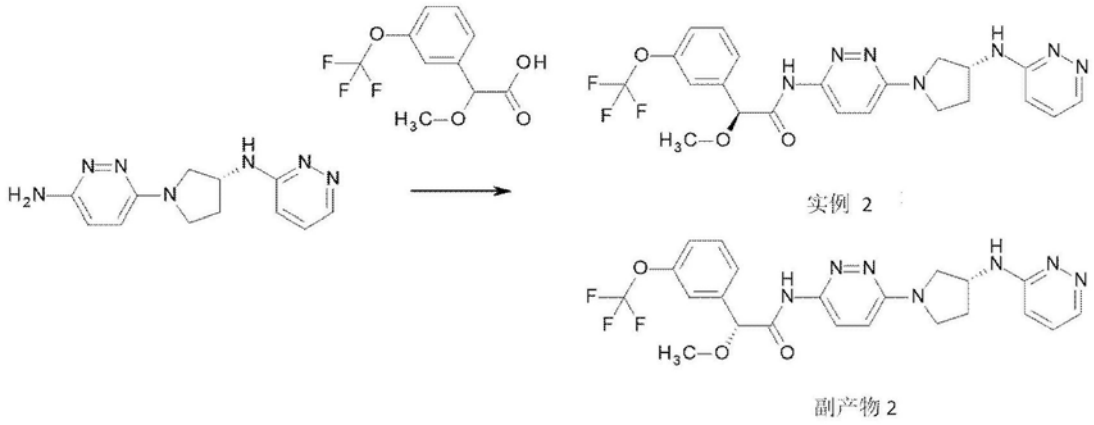
[0178] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO,30℃)δ2.0-2.1(1H,m),2.29-2.39(1H,m), 3.37(3H,s),3.39-3.45(1H,m),3.51-3.66(2H,m),3.83(1H,dd),4.58-4.67 (1H,m),5.02(1H,s),6.81(1H,dd),6.98(1H,d),7.04-7.48(7H,m),7.91(1H,d), 8.46(1H,dd),10.58(1H,s);m/z:ES$^+$[M+H]$^+$472。

[0179] (2R)-2-[3-(二氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-N-[6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3-基]乙酰胺(副产物1),作为第二洗脱的同分异构体(178 mg,19%)。

[0180] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO,30℃)δ2.04-2.15(1H,m),2.32-2.44(1H,m), 3.41(3H,s),3.46(1H,dd),3.55-3.71(2H,m),3.87(1H,dd),4.62-4.72(1H,m), 5.07(1H,s),6.86(1H,d),7.02(1H,d),7.09-7.53(7H,m),7.95(1H,d),8.50(1H, d),10.65(1H,s);m/z:ES$^+$[M+H]$^+$472。

[0181] 实例2

[0182] (2S)-2-[3-(三氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-N-[6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1- 基]哒嗪-3-基]乙酰胺

[0183] 

[0184] 在21℃,将HATU(355mg,0.93mmol)添加至在DMF(4mL)中的2- 甲氧基-2-(3-(三氟甲氧基)苯基)乙酸(中间体7,214mg,0.86mmol)、6- [(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3-胺(中间体1,200mg,0.78 mmol)、和DIPEA(0.406mL,2.33mmol)中。然后将所得溶液在环境温度搅拌1h。将该粗产物通过离子交换层析(使用SCX柱)进行纯化。将粗产物使用1M氨/MeOH从柱中进行洗脱并且吸附在二氧化硅上。将粗产物通过 FCC,在DCM中0%至7%MeOH(具有7M氨/MeOH)的洗脱梯度进行纯化。将纯的级分蒸发至干燥以得到呈胶状的非对映异构体的混合物(150mg)。然后将混合物使用制备型手性HPLC(20μm二氧化硅,50mm直径,250mm 长度),使用MeOH作为洗脱液进行分离。将包含希望的化合物的级分蒸发至干燥以得到:

[0185] (2R)-2-[3-(三氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-N-[6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3-基]乙酰胺(副产物2),作为第一洗脱的同分异构体(47.0 mg,12%)。

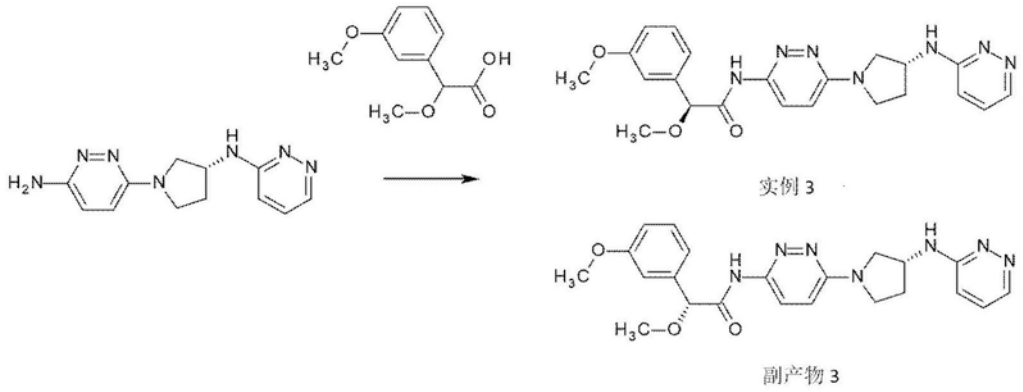
[0186] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO,30℃)δ2-2.14(1H,m),2.26-2.43(1H,m), 3.38(3H,s),3.42(1H,m),3.51-3.66(2H,m),3.83(1H,m),4.53-4.71(1H,m), 5.07(1H,s),6.81(1H,dd),6.97(1H,d),7.08(1H,d),7.24(1H,dd),7.3-7.4(1H, m),7.48(1H,s),7.52-7.59(2H,m),7.90(1H,d),8.45(1H,dd),10.63(1H,s);m/z: ES$^+$[M+H]$^+$490。

[0187] (2S)-2-[3-(三氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基-N-[6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3-基]乙酰胺(实例2),作为第二洗脱的同分异构体(178mg, 19%)。

[0188] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO,30℃)δ2-2.14(1H,m),2.26-2.43(1H,m), 3.38(3H,s),3.42(1H,m),3.51-3.66(2H,m),3.83(1H,m),4.53-4.71(1H,m), 5.07(1H,s),6.81(1H,dd),6.97(1H,d),7.08(1H,d),7.24(1H,dd),7.3-7.4(1H, m),7.48(1H,s),7.52-7.59(2H,m),7.90(1H,d),8.45(1H,dd),10.63(1H,s);m/z: ES$^+$[M+H]$^+$490。

[0189] 实例3

[0190] (2S)-2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)-N-[6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪 -3-基]乙酰胺

[0191] 

[0192] 在21℃,将HATU(355mg,0.93mmol)添加至在DMF(4mL)中的2- 甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)乙酸(中间体8,168mg,0.86mmol)、6-[(3R)-3- (哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3-胺(中间体1,200mg,0.78mmol)、和 DIPEA(0.406mL,2.33mmol)中。然后将所得溶液在环境温度搅拌1h。将该粗产物通过离子交换层析(使用SCX柱)进行纯化。将所希望的产物使用 1M氨/MeOH从该柱进行洗脱,并且将纯的级分吸附在二氧化硅上。将粗产物通过FCC,在DCM中0％至7％MeOH(具有7M氨/MeOH)的洗脱梯度进行纯化。将纯的级分蒸发至干燥以得到呈固体的非对映异构体的混合物。将粗产物通过手性制备型HPLC(Phenomonex Lux C2柱,20μm二氧化硅,50mm直径,250mm长度),EtOH/MeOH 50/50以100mL/min进行纯化。将包含希望的化合物的级分蒸发至干燥以得到:

[0193] (2S)-2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)-N-[6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基] 哒嗪-3-基]乙酰胺(实例3),作为第一洗脱的同分异构体(80mg,24％)。

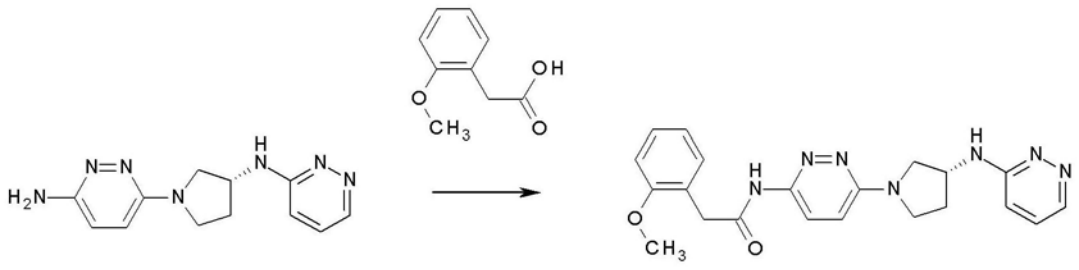
[0194] ^{1}H NMR(500MHz,DMSO,30℃)δ1.95-2.16(1H,m),2.21-2.42(1H,m), 3.35(3H,s),3.42(1H,m),3.52-3.68(2H,m),3.76(3H,s),3.82(1H,m),4.55- 4.7(1H,m),4.95(1H,s),6.82(1H,d),6.86-6.93(1H,d),6.98(1H,d),7.04-7.15 (3H,m),7.25(1H,dd),7.28-7.32(1H,dd),7.91(1H,d),8.46(1H,dd),10.47(1H, s);m/z:ES$^+$[M+H]$^+$436。

[0195] (2R)-2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)-N-[6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基] 哒嗪-3-基]乙酰胺(副产物3),作为第二洗脱的同分异构体(75mg, 22％)。

[0196] ^{1}H NMR(500MHz,DMSO,30℃)δ1.95-2.16(1H,m),2.21-2.42(1H,m),3.35(3H,s),3.42(1H,m),3.52-3.68(2H,m),3.76(3H,s),3.82(1H,m),4.55- 4.7(1H,m),4.95(1H,s),6.82(1H,d),6.86-6.93(1H,d),6.98(1H,d),7.04-7.15 (3H,m),7.25(1H,dd),7.28-7.32(1H,dd),7.91(1H,d),8.46(1H,dd),10.47(1H, s);m/z:ES$^+$[M+H]$^+$436。

[0197] 实例4

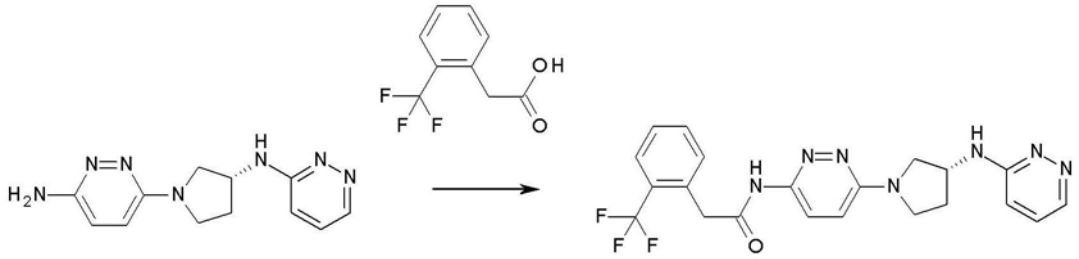
[0198] 2-(2-甲氧基苯基)-N-[6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3-基]乙酰胺

[0199] 

[0200] 将6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3-胺(中间体1,0.03g,0.117mmol)和(2-甲氧基苯基)乙酸(0.02g,0.117mmol)溶解于DMF(1 mL)中。随后,添加HATU(0.04g,0.117mmol)并且将反应搅拌5min。然后一次性添加DIPEA(0.04g,0.291mmol)并且允许该混合物在室温搅拌 15h。在减压下将溶剂去除并且将粗产物吸附在二氧化硅上,并且通过 FCC,用从100%DCM至10%MeOH 90%DCM的溶剂梯度进行纯化。将级分合并并且在减压下浓缩以得到无色胶状物(30mg)。这种材料的LCMS显示其是不纯的,因此将该固体溶解于DMSO中,并且通过制备型HPLC(沃特斯(Waters)C18 SunFire柱,5μm孔径大小,4.60mm直径,50mm长度),使用极性逐渐减小的水(含有0.1%的甲酸)和乙腈(含有0.1%的甲酸)的混合物作为洗脱液进行纯化。将含有所希望的化合物的级分蒸发至干燥,溶解于MeOH中并且使其穿过SCX柱,用MeOH进行冲洗并且然后用在MeOH中的2M氨对产物进行洗脱。将溶剂在减压下蒸发以得到呈奶油色固体状的2-(2-甲氧基苯基)-N-[6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3- 基]乙酰胺(17mg,47%)。^{1}H NMR(400MHz,DMSO,21.8℃)δ 2.04-2.12 (1H,m),2.32-2.41(1H,m),3.44-3.47(m,1H),3.56-3.68(m,2H),3.73(s,2H),3.79(s,3H),3.85(dd,1H),4.62-4.69(m,1H),6.85(dd,1H),6.93(td,1H),7.01 (d,2H),7.17(d,1H),7.23-7.30(m,3H),8.01(d,1H),8.49(dd,1H),10.65(s,1H); m/z:ES$^+$[M+H]$^+$ 406.3。

[0201] 实例5

[0202] N-[6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3-基]-2-[2-(三氟甲基)苯基]乙酰胺

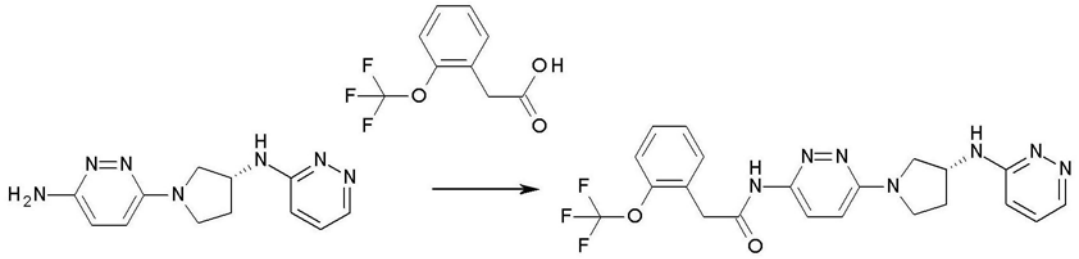
[0203] 

[0204] 向6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3-胺(中间体1,0.041g,0.159mmol)、2-[2-(三氟甲基)苯基]乙酸(0.032g,0.159mmol)和HATU (0.061g,0.159mmol)在干DMF(1mL)中的搅拌混合物中添加DIPEA (0.052g,0.398mmol)并且将混合物在氮气气氛下搅拌15h。将溶剂通过在减压下蒸发去除以给出棕色胶状物,将该棕色胶状物溶解于DMSO中,并且通过制备型HPLC(沃特斯C18 SunFire柱,5μm孔径大小,4.60mm直径,50 mm长度),使用极性逐渐减小的水(含有0.1%的甲酸)和乙腈(含有0.1%的甲酸)的混合物作为洗脱液进行纯化。将含有所希望的化合物的级分蒸发至干燥以给出呈无色粉末的N-[6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3-基]- 2-[2-(三氟甲基)苯基]乙酰胺(0.065g,41%)。

[0205] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO,21.8℃)δ2.07-2.12(1H,m),2.30-2.38(1H, m),3.48-3.51(m,1H),3.55-3.66(m,2H),3.83(dd,1H),4.00(s,2H),4.59-4.61 (m,1H),7.01(d,1H),7.11(d,1H),7.43(br s,1H),7.47-7.53(m,2H),7.63-7.66 (m,1H),7.70-7.73(m,2H)8.00(d,1H),8.53(br s,1H),10.95(s,1H);m/z:ES$^+$ [M+H]$^+$444。

[0206] 实例6

[0207] N-[6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3-基]-2-[2-(三氟甲氧基)苯基]乙酰胺

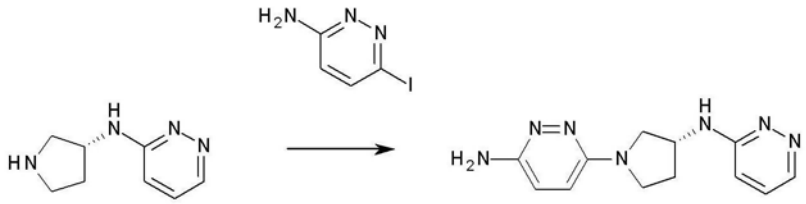
[0208] 

[0209] 将2-[2-(三氟甲氧基)苯基]乙酸(0.04g,0.159mmol)和6-[(3R)-3-(哒嗪- 3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3-胺(中间体1,0.04g,0.159mmol)称量到圆底烧瓶中。添加DMF(1mL)和HATU(0.06g,0.159mmol)并且搅拌5min以达到溶解目的。然后一次性添加DIPEA(0.05g,0.398mmol)并且允许该混合物在室温搅拌15小时。在减压下将该溶剂去除并且吸附在二氧化硅上,并且通过快速柱色谱法进行纯化,用100％DCM高达10％甲醇氨:90％DCM的洗脱梯度进行洗脱,以得到呈浅黄色固体的标题化合物(50mg)。LCMS分析显示有5％的羟基苯并三唑(HOBt)杂质。将该固体溶解于DMSO(1mL) 中并且通过质量指导的LCMS(沃特斯C18 SunFire柱,5μm粒度大小,4.60 mm直径,50mm长度)进行纯化。流速是25mL/min,并且水和乙腈的流动相含有0.1％甲酸。以95％水:5％乙腈开始洗脱,其维持1.5分钟,然后经10分钟加大至5％水:95％乙腈。然后将这维持30秒,这样使得运行的完整长度是 12分钟。将适当的级分添加至SCX筒中并且用甲醇洗涤,然后将标题化合物用2M在甲醇中的氨进行洗脱。将溶剂在减压下蒸发以提供呈白色固体的N-[6- [(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3-基]-2-[2-(三氟甲氧基)苯基]乙酰胺 (0.038g,51％)。

[0210] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO,21.8℃)δ2.01-2.08(1H,m),2.28-2.37(1H, m),3.42(dd,1H),3.52-3.64(m,2H),3.81(dd,1H),3.85(s,2H),4.60-4.63(m, 1H),6.81(dd,1H),6.98(d,1H),7.13(d,1H),7.24(dd,1H),7.32-7.43(m,3H), 7.47-7.49(m,1H)7.95(d,1H),8.45(dd,1H),10.90(s,1H);m/z:ES$^+$[M+H]$^+$ 460。

[0211] 中间体1

[0212] 6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3-胺

[0213] 

[0214] 将(2S,4R)-4-羟基吡咯烷-2-羧酸(0.240g,1.83mmol)添加至(R)-N-(吡咯烷-3-基)哒嗪-3-胺(中间体2,1.5g,9.13mmol)在干DMSO(12mL)中的溶液中。然后,依次添加碘化铜(I)(0.174g,0.91mmol)随后添加6-碘代哒嗪-3-胺(中间体3,2.62g,11.88mmol)并且然后添加磷酸钾(5.82g, 27.40mmol)。然后将反应混合物在室温在氮气下搅拌24h。将该混合物用 MeOH(12mL)和水(12mL)进行稀释。将该混合物用乙酸中和,使固体沉淀,将其收集。将液体层倾析出用于SCX步骤并且将固体用MeOH(2x5 mL)洗涤,将洗涤层与来自先前步骤的液体层合并并且使其穿过20g SCX 筒,用MeOH冲洗,以去除杂质随后用在MeOH中的1N氨溶

液以获得产物。将溶剂在减压下蒸发并且将残余物通过FCC进行纯化，洗脱梯度为在DCM中0％至10％(在MeOH中的7N氨)。将纯的级分蒸发至干燥以得到呈胶状的6-[(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-基]哒嗪-3-胺(1.220g,52％)。

[0215] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO,30℃)δ1.99(1H,m),2.22-2.37(1H,m),3.44 (1H,m),3.53(1H,m),3.73(1H,m),4.05(1H,m),4.55-4.66(1H,m),5.43(2H,s), 6.75(1H,d),6.79-6.88(2H,m),7.04(1H,d),7.23(1H,dd),8.44(1H,dd);m/z: ES+[M+H]+258。

[0216] 中间体2

[0217] N-[(3R)-吡咯烷-3-基]哒嗪-3-胺

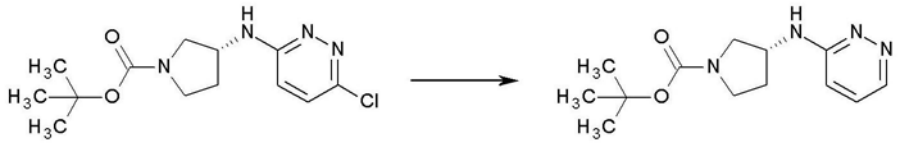
[0218] 

[0219] 将TFA(12.00mL)添加至在DCM(80mL)中的叔丁基(3R)-3-(哒嗪-3- 基氨基)吡咯烷-1-甲酸酯(中间体3,2.2g,8.32mmol)中，并且将该黄色溶液在环境温度搅拌1h。将该粗产物通过离子交换层析，使用SCX柱进行纯化。将所希望的产物从柱中洗脱(使用7M氨/MeOH)并且将纯的级分蒸发至干燥以得到呈黄色胶状的N-[(3R)-吡咯烷-3-基]哒嗪-3-胺(1.39g,102％)。

[0220] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO,30℃)δ1.57(1H,m),1.91-2.1(1H,m),2.61 (1H,m),2.78(1H,m),2.89(1H,m),3.04(1H,m),4.14-4.38(1H,m),6.76(2H, m),7.20(1H,d),8.40(1H,d);m/z:ES$^+$[M+H]$^+$165。

[0221] 中间体3

[0222] 叔丁基(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-甲酸酯

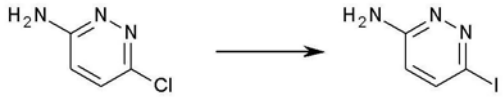
[0223] 

[0224] 在21℃，在氮气下，将10％钯碳(0.810g,7.61mmol)添加至在乙醇 (200mL)中的叔丁基(3R)-3-[(6-氯代哒嗪-3-基)氨基]吡咯烷-1-甲酸酯(中间体5,7g,15.23mmol)和甲酸铵(14.40g,228.44mmol)中。将所得混合物在回流下搅拌3h。将反应混合物通过硅藻土过滤并且用MeOH/DCM洗涤。将粗产物通过FCC，在DCM中0至15％MeOH的洗脱梯度进行纯化。将纯的级分蒸发至干燥以得到呈黄色固体的叔丁基(3R)-3-(哒嗪-3-基氨基)吡咯烷-1-甲酸酯(2.230g,55％)。

[0225] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO,30℃)δ1.40(9H,s),1.86(1H,m),2.16(1H,m), 3.29-3.46(3H,m),3.60(1H,m),4.43(1H,m),6.81(1H,dd),7.00(1H,d),7.24 (1H,dd),8.45(1H,dd);m/z:ES$^+$[M+H]$^+$265。

[0226] 中间体4

[0227] 6-碘代哒嗪-3-胺。

[0228] 

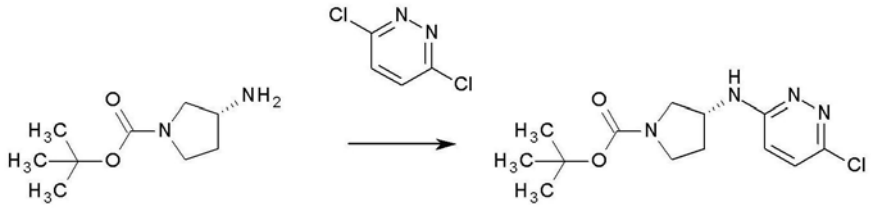
[0229] 将6-氯代哒嗪-3-胺(3.7g,28.56mmol)填装至100-mL圆底烧瓶(装备有回流冷凝

器和磁性搅拌棒)中。然后向其中添加碘化氢(在水中的57wt%溶液,20mL,265.96mmol),并且将所得深棕色溶液加热至温和回流并且搅拌6h。将混合物冷却至室温并且将粗固体过滤出,用另外的体积的冰水(2 x约30mL)在滤饼上冲洗反应器。将所得固体在乙酸乙酯和2N水性氢氧化钠之间进行分配,将有机层用水性盐水洗涤,干燥,过滤并且在减压下蒸发以产生呈固体的6-碘代哒嗪-3-胺(4.10g,65%)。

[0230] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO,27℃)δ6.52(2H,s),6.55(1H,d),7.54(1H, d)。

[0231] 中间体5

[0232] 叔丁基(3R)-3-[(6-氯代哒嗪-3-基)氨基]吡咯烷-1-甲酸酯

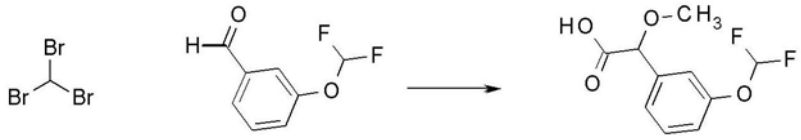
[0233] 

[0234] 在21℃,在氮气下,将DIPEA(22.44mL,128.86mmol)添加至在NMP (150mL)中的3,6-二氯代哒嗪(6.40g,42.95mmol)、叔丁基(3R)-3-氨基吡咯烷-1-甲酸酯(8g,42.95mmol)中。将混合物在150℃搅拌24h。将该反应混合物用EtOAc(400mL)稀释,并且用水(200mL)洗涤两次。将有机层经Na_2SO_4干燥,过滤并且吸附在二氧化硅上。将粗产物通过FCC,在庚烷中的20%至70%EtOAc的洗脱梯度进行纯化。将纯的级分蒸发至干燥以得到呈粉色/红色固体的叔丁基(3R)-3-[(6-氯代哒嗪-3-基)氨基]吡咯烷-1-甲酸酯(7.10 g,55%)。

[0235] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO,30℃)δ1.40(9H,s),1.86(1H,m),2.15(1H,m), 3.16(1H,m),3.33-3.49(2H,m),3.59(1H,m),4.38(1H,m),6.91(1H,d),7.31 (1H,d),7.38(1H,d);m/z:ES$^-$[M-H]$^-$297。

[0236] 中间体6

[0237] 2-[3-(二氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基乙酸

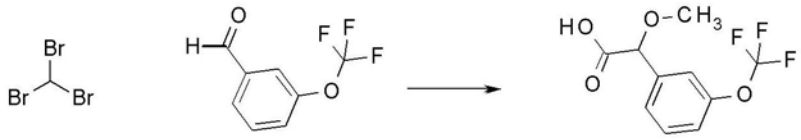
[0238] 

[0239] 在0℃,将氢氧化钾固体(5.38g,95.86mmol)经1h分批添加至3-(二氟甲氧基)苯甲醛(3g,17.43mmol)、三溴甲烷(1.829mL,20.91mmol)和无水MeOH(25mL)的搅拌溶液中。去除冷却浴并且将该反应在环境温度搅拌(强放热反应开始)。将反应搅拌过夜。将无机固体过滤出并且用MeOH洗涤。在真空中将滤液浓缩至小体积,用水(100mL)稀释并且用Et_2O(2x50mL)洗涤两次并且通过缓慢添加37%HCl酸化至pH 2。将混合物用乙酸乙酯 (3x50mL)进行萃取。将有机层经Na_2SO_4干燥,过滤并蒸发以提供粗产物。将粗产物通过FCC,在庚烷(具有0.5%的甲酸)中的0%至60%乙酸乙酯的洗脱梯度进行纯化。将纯的级分蒸发至干燥以得到呈胶状的2-[3-(二氟甲氧基)苯基]-2-甲氧基乙酸(1.710g,42%)。

[0240] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6,30℃)δ3.33(3H,s),4.82(1H,s),7.16(2H, dd),7.28(1H,d),7.23(1H,t),7.42-7.47(1H,m),12.93(1H,s);m/z:ES$^-$[M-H]$^-$ 231.25。

[0241] 中间体7

[0242] 2-甲氧基-2-[3-(三氟甲氧基)苯基]乙酸

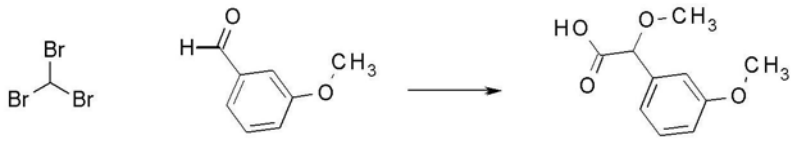
[0243] 

[0244] 在0℃,将氢氧化钾(1.851g,33.00mmol)在MeOH(10mL)中的溶液经2h以小部分添加至3-(三氟甲氧基)苯甲醛(1.141g,6mmol)和三溴甲烷(0.630mL,7.20mmol)在MeOH(5.00mL)中的搅拌混合物中。然后允许混合物加温至室温并且搅拌过夜。在反应混合物中形成白色沉淀物。将反应静置过夜。在减压下将固体过滤,用MeOH(15mL)冲洗。将滤液溶液蒸发至紧密的白色糊状物然后重新溶解于水(50mL)中。然后将其用Et_2O(50 mL)洗涤并且然后将水相酸化至pH 2(约5mL 2M HCl溶液),从而给出浑浊的水层。将水相萃取至乙酸乙酯(3x50mL)中。将合并的有机物经无水硫酸镁干燥并且过滤,然后将溶剂在减压下蒸发以给出澄清的油。将粗产物通过FCC,在庚烷中的10%至50%乙酸乙酯的洗脱梯度进行纯化。将纯的级分蒸发至干燥以得到呈无色油的2-甲氧基-2-[3-(三氟甲氧基)苯基]乙酸(0.832g,55%)。

[0245] ^1H NMR(400MHz,$CDCl_3$,30℃)δ3.47(3H,s),4.81(1H,s),7.2-7.24(1H, m),7.33(1H,s),7.37-7.46(2H,m);m/z:ES^-[M-H]$^-$249.4。

[0246] 中间体8

[0247] 2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)乙酸

[0248] 

[0249] 在0℃,将氢氧化钾(2.267g,40.40mmol)在MeOH(10mL)中的溶液经2h以小部分添加至3-甲氧基苯甲醛(1g,7.34mmol)和三溴甲烷 (0.771mL,8.81mmol)在MeOH(5.00mL)中的搅拌混合物中。然后允许该混合物加温至室温并且搅拌过夜。在减压下将固体过滤,将该固体用MeOH (15mL)冲洗。将滤液蒸发至紧密的白色糊状物然后重新溶解于水(50 mL)中。然后将其用Et_2O(50mL)洗涤并且然后将水性部分酸化至pH=2 (约5mL 2M HCl溶液)。然后将水相用乙酸乙酯(3x50mL)萃取。将合并的有机物经无水硫酸镁干燥并且过滤,然后将溶剂在减压下蒸发以给出呈黄色油的2-甲氧基-2-(3-甲氧基苯基)乙酸(1.4g,97%),将其未经进一步纯化使用。

[0250] ^1H NMR(400MHz,DMSO-d6,30℃)δ3.18(3H,s),3.75(3H,s),4.74(1H, s),6.82-7.05(3H,m),7.29(1H,m),12.78(1H,s)。

[0251] 生物分析

[0252] 使用以下测定来测量本发明的这些化合物的效应:a)GLS酶效力测定; b)GLS细胞效力测定;c)GLS细胞增值测定。在测定的描述中,通常:

[0253] i.使用以下缩写:CO_2=二氧化碳;DMEM=杜氏改良的伊格尔氏培养基;DMSO=二甲基亚砜;EDTA=乙二胺四乙酸;EGTA=乙二醇四乙酸;FCS=胎牛血清;h=小时;NBS=非键合表面;SDS=十二烷基硫酸钠;TRIS=三(羟甲基)氨基甲烷。

[0254] ii使用Genedata智能拟合模型计算IC_{50}值。IC_{50}值是抑制50%生物学活性的测试化合物的浓度。

[0255] 测定a):GLS酶效力测定

[0256] 在体外,使用谷氨酸氧化酶/AmplexRed耦合测定来测量化合物结合和抑制GLS1的活性的能力。对在大肠杆菌中表达的6His标记的GLS蛋白质(氨基酸63-669)进行纯化并且在-80℃按等分进行储存。将GLS1稀释至2x工作浓度并在室温孵育,以允许四聚体/二聚体形式达到稳定状态。测定测量在缓冲液(包括50mM TRIS pH 7.8,100mM $NaPO_4$,pH 7.8,0.001%v/v Tween 20)中进行。将纯化的重组GLS1蛋白质在测定缓冲液中稀释至12nM并且在室温预温育30分钟。将测试化合物通过在100%DMSO中稀释来制备,以给出用于12点浓度响应的正确剂量范围和分配在384微孔测定板(格雷钠 (Greiner)产品代码784900)中的适当体积(2.5nl至60nl)(使用Labcyte Echo 555声学分配器)。通过用DMSO溶液反填充将DMSO浓度保持在2%。然后将3μL的稀释GLS1蛋白(12nM)分配到每个孔(使用BioRaptr自动分配器(贝克曼库尔特公司(Beckman-Coulter)))并且在室温孵育15分钟。然后添加稀释于测定缓冲液中3μL的100mM谷氨酰胺,并且将反应在室温孵育 60分钟。然后通过加入45μM 6-(2-溴乙炔基)-2,3-二甲基-喹唑啉-4-酮、75μM Amplex Red、0.375单位/mL辣根过氧化物酶、0.12单位/mL谷氨酸氧化酶在pH 7.5的100mM TRIS中停止该反应。在黑暗中在室温30分钟之后,在Perkin Elmer EnVision上读取这些板(使用535/590nm光学过滤器)并且进行原始数据分析(使用Genedata)来产生IC_{50}值。一种假象版本的分析,其中该6His标记的GLS蛋白和谷氨酰胺用测定缓冲液替换还用来在测定组分上排除非特异性效果。

[0257] 测定b):GLS细胞效力测定

[0258] 针对化合物在抑制细胞GLS活性方面的潜力对它们进行评估,通过使用测量细胞谷氨酸盐损耗的PC3耦合测定。将测试化合物通过在100%DMSO中稀释来制备,以给出用于12点浓度响应的正确剂量范围和分配到384孔微测定板(康宁公司(Corning)产品代码3712)的适当体积(5nl-120nl)(使用 Labcyte Echo 555声学分配器)。通过用DMSO溶液反填充将DMSO浓度保持在0.3%。PC3细胞在无苯酚DMEM、10%透析的FCS、2mM谷氨酰胺和以下散布通过胰酶消化铺板在$5.6x10^3$细胞每孔在40μl的生长培养基直接进入384孔测定板(含有分配化合物)上生长。在37℃孵育6h之后,抽吸5%CO_2生长培养基并且细胞在15μl的缓冲液(含有10mM TRIS pH 7.4、100mM NaCl、1 mM EDTA、1mM EGTA、1mM NaF、20mM $Na_4P_2O_7$、2mM Na_3VO_4、1% Triton X-100、10%甘油、0.1%SDS和0.5%脱氧胆酸盐)中裂解。然后将4μl的细胞裂解物转移到一个384孔NBS板(康宁公司产品代码3575)并且添加35μl 的27.5μM Amplex Red、0.1375U/mL辣根过氧化物酶、0.044U/mL谷氨酸氧化酶、100mM TRIS pH 7.5。在黑暗中在室温30分钟之后,在Perkin Elmer EnVision上读取这些板(使用535/590nm光学过滤器)并且进行原始数据分析 (使用专有软件)来产生IC_{50}值。

[0259] 测定c):GLS细胞增值测定

[0260] 使用384孔板NCI-H1703细胞增殖测定来测量化合物抑制细胞生长的能力。NCI-H1703细胞在不含酚红RPMI1640、10%FCS和2mM谷氨酰胺中生长并且在40μl的生长培养基中在透明底384孔测定板(康恩公司产品代码3712) 中以750个细胞/孔的密度进行接种,并且在37℃、5%CO_2下孵育24h。将测试化合物通过在100%DMSO中稀释来制备,以给出用于12点浓度响应的正确剂量范围和直接分配到测定板的适当体积(5nl至120nl)(包含平板的细胞)。通过用DMSO溶液反填充将DMSO浓度保持在0.3%。在37℃、5%CO_2下,将这些板孵育持续5天,添加Sytox Green和皂苷至最终浓度分别为2μM和 0.25%,并且将其在分析前孵育

6h。在Acumen eX3(TTP莱伯泰科公司(TTP Labtech))上读取板(使用488nm激发和FITC滤光镜套件(500nm-530 nm)来发射。IC_{50}值通过曲线拟合到第零天生长的最大抑制来进行计算(使用GeneData软件分析)。

[0261] 本发明的实例在测定a)-c)中的效价显示在表1中。结果可以是多个测试的平均值,并且不同的实例可以用多种不同的测试进行测试。结果是四舍五入至小数位的某个数字。

[0262] 表1:在测定a)-c)中针对实例1-4的效价数据

[0263]

实例	测定 a) GLS 酶效力测定 IC_{50} (μM)	测定 b) GLS 细胞效力测定 IC_{50} (μM)	测定 c) GLS 细胞增值测定 (μM)
1	0.0247	0.001	0.009
2	0.0957	0.001	0.011
3	0.0298	0.001	0.003
4	0.0309	0.007	0.043
5	0.0306	0.001	0.003
6	0.0252	0.001	0.012