



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118251387 A

(43) 申请公布日 2024. 06. 25

(21) 申请号 202280073643.1

(22) 申请日 2022.08.30

(30) 优先权数据

63/239,797 2021.09.01 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.04.30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/075678 2022.08.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/034808 EN 2023.03.09

(71) 申请人 美国政府(由卫生和人类服务部的
部长所代表)

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 J·F·布罗格纳德 R·E·斯温森

A·L·芬克 C·W·希特科

K·M·纽斯婉儿 K·L·伯格曼

V·萨巴萨尼 E·林德伯格

S·D·卡佩尔 M·卡特吉

(74) 专利代理机构 北京华睿卓成知识产权代理
事务所(普通合伙) 11436

专利代理师 程淼 刘海

(51) Int.Cl.

C07D 401/12 (2006.01)

C07D 401/14 (2006.01)

C07D 487/08 (2006.01)

C07D 405/14 (2006.01)

A61K 31/4427 (2006.01)

A61K 31/4545 (2006.01)

A61K 31/497 (2006.01)

A61K 31/5377 (2006.01)

A61K 31/498 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书16页 说明书109页

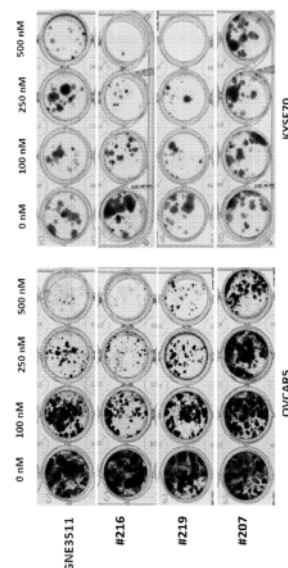
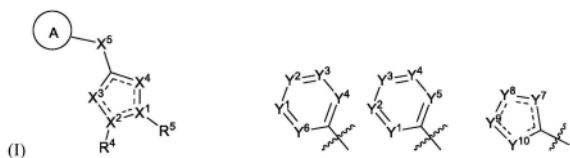
序列表(电子公布) 附图38页

(54) 发明名称

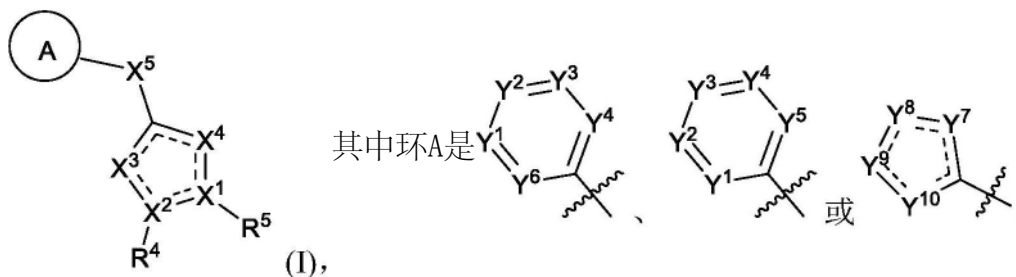
混合谱系激酶抑制剂及其使用方法

(57) 摘要

本发明公开了混合谱系激酶(MLK)抑制剂。所述化合物抑制激酶活性。所述化合物可用于治疗至少部分以一种或更多种MLK过表达为特征
的疾病或病况。所述化合物具有根据式I的结构,或
其立体异构体、互变异构体或药学上可接受的
盐。



1. 一种具有通式I的化合物或其立体异构体、互变异构体或药学上可接受的盐：



其中 $\equiv$ 所表示的每个键是满足化学价要求所需的单键或双键；

$-X^1(R^5)-$ 是 $-C(H)-C(R^5)-$ 、 $-C(R^5)-$ 、 $-C(R^5)-C(H)-$ 、 $-C(R^5)-N-$ 、 $-N-C(R^5)-$ 或 $-N(R^5)-$ ；

X^2 是C或N；

X^3 是N或CH,其中 X^1-X^3 中的一个或两个包含N；

X^4 是CH或S；

X^5 是 $-N(H)-$ 或不存在；

Y^1 是N或 $C(R^1)$ ；

Y^2 是 $C(R^2)$ 或N；

Y^3 是 $C(R^3)$ 或N；

Y^4 是N或 $C(R^6)$ ；

Y^5 是 $C(R^7)$ 或N；

Y^6 是 $C(R^8)$ 或N；

Y^1-Y^6 中的一个或两个是N,并且 Y^1-Y^3 中的至少一个或 Y^6 不是C(H)；

Y^7-Y^{10} 中的两个、三个或四个独立地是N或 $N(R^9)$,并且 Y^7-Y^{10} 中的其他是 $C(R^{10})$ ；

R^1 是氰基、全卤代烷基、H、烷基或全卤代烷氧基；

R^2 是烷基、H、烷氧基、全卤代烷基、全卤代烷氧基、卤代烷氧基、卤代烷基、氰基、氰基烷基、氨基、杂芳基烷氧基、杂烷基、酰胺基、卤代基、烯基或卤代烯基,或 R^1 和 R^2 与它们所附接的原子一起形成5元或6元芳基环或杂芳基环；

R^3 是H、氨基、烷基氨基、氨基烷基、烷氧基或 $R'C(O)N(H)-$,其中 R' 是烷基,或 R^2 和 R^3 与它们所附接的原子一起形成5元或6元芳基环或杂芳基环；

R^4 是氮杂烷基、脂族基、芳基或氨基；

R^5 是杂脂族基、脂族基或烷基氨基,或；

R^6 和 R^7 独立地是H、烷基、烷氧基、全卤代烷基、全卤代烷氧基或氰基；

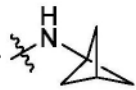
R^8 是H、烷基、烷氧基、全卤代烷基、全卤代烷氧基或氰基,或 R^8 和 R^1 与它们所附接的原子一起形成5元或6元芳基环或杂芳基环；

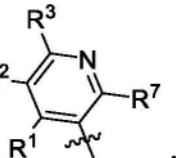
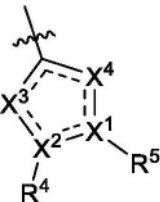
每个 R^9 独立地是H或烷基；并且

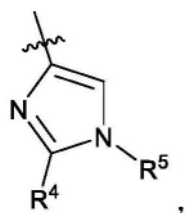
每个 R^{10} 独立地是H、烷基或氰基,

具有以下附带条件：



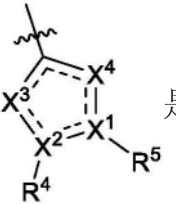
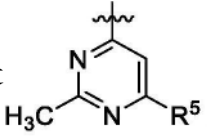
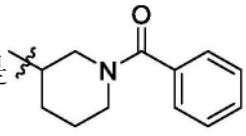
或杂脂族基,则(i) X^5 是N(H),或(ii) R^3 是H、氨基烷基、烷氧基、或 $R'C(O)N(H)-$,其中 R' 是烷基,或(iii) R^2 为烷氧基、氰基烷基、氨基或杂芳基烷氧基,或(iv) R^1 和 R^7 中的一个不是-H,或(v) X^1-X^4 中仅一个包含N,或(vi) X^3 是C(H),或(vii) X^4 是S,或(viii) $-X^1(R^5)-$ 是 $-C(R^5)-C(H)-$ 、 $-C(H)-C(R^5)-$ 、 $-C(R^5)-N-$ 、或 $-N-C(R^5)-$,或(viii) R^1 和 R^2 与它们所附接的原子一起形成5元或6元芳基环或杂芳基环,

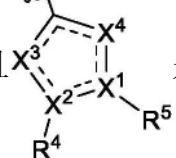
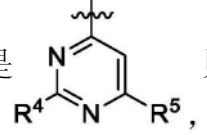
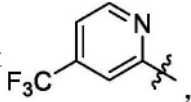
(b) 如果环A是 , 其中 R^3 是氨基或烷基氨基,并且  是

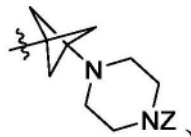
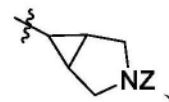
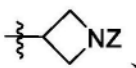
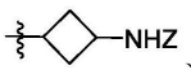
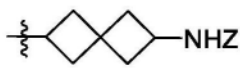
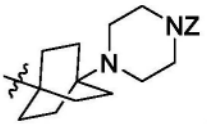


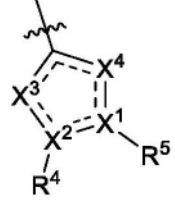
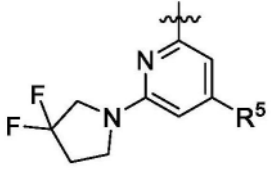
则(i) X^5 是N(H),或(ii) R^1 是氰基、全卤代烷基或全卤代烷氧基,或(iii) R^2 是氰

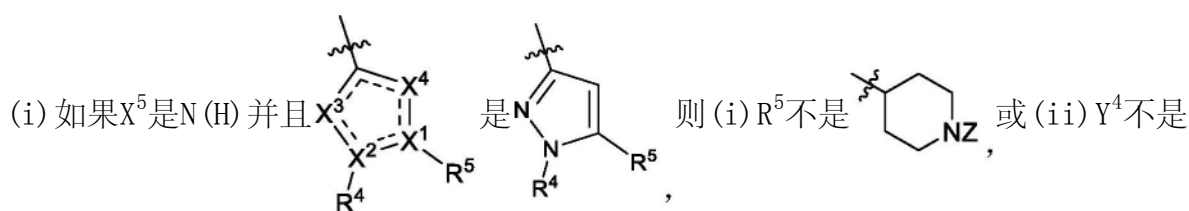
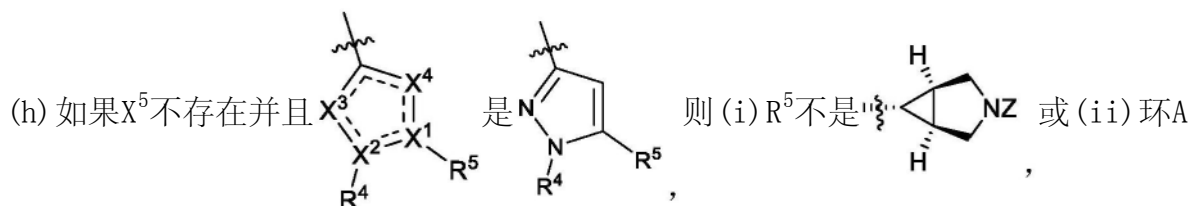
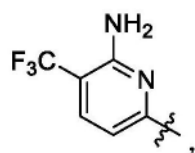
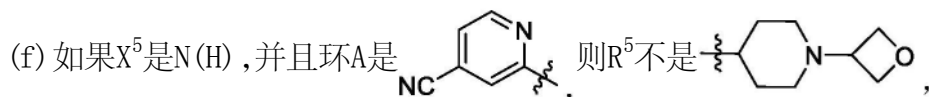
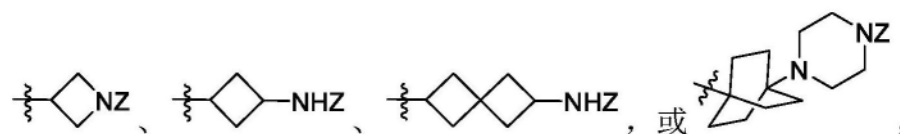
基、氰基烷基、氨基或杂烷基烷氧基,或(iv) R^7 是全卤代烷基、全卤代烷氧基或氰基,或(v) R^4 是芳基,或(vi) R^1 和 R^2 与它们所附接的原子一起形成5元或6元芳基环或杂芳基环,或(viii) R^2 和 R^3 与它们所附接的原子一起形成5元或6元芳基环或杂芳基环,

(c) 如果 X^5 是N(H)并且  是 , 则 R^5 不是 ,

(d) 如果 X^5 是N(H)并且  是 , 则(i)环A不是 , 或(ii)

R^4 不是甲基或氮杂环烷基,或(iii) R^5 是 、、、、、, 或 ,

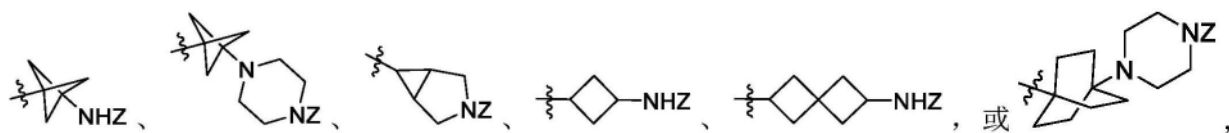
(e) 如果 X^5 是N(H)并且  是 , 则(i)环A不是

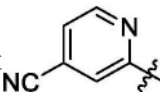
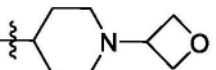


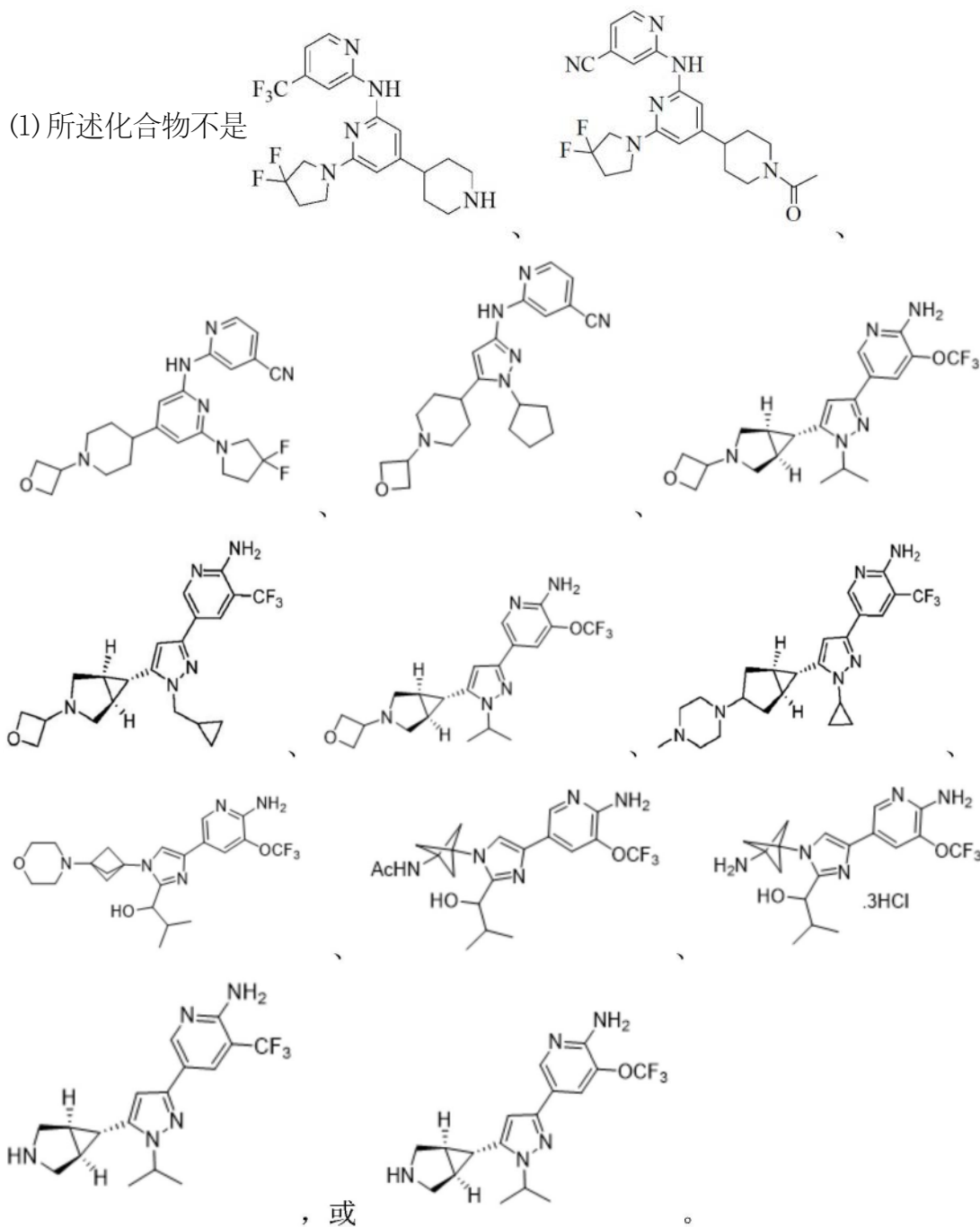
N, 或(iii) R²不是-H、-CN或-CF₃, 或(iv) R¹不是-H、-CN或-CF₃,



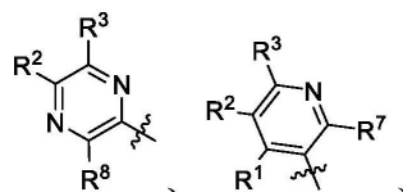
(ii) Y⁴不是N, 或(iii) R¹不是-CN, 或(iv) R²、R³和R⁸中的一个不是H, 或(v) R⁵是烷基、

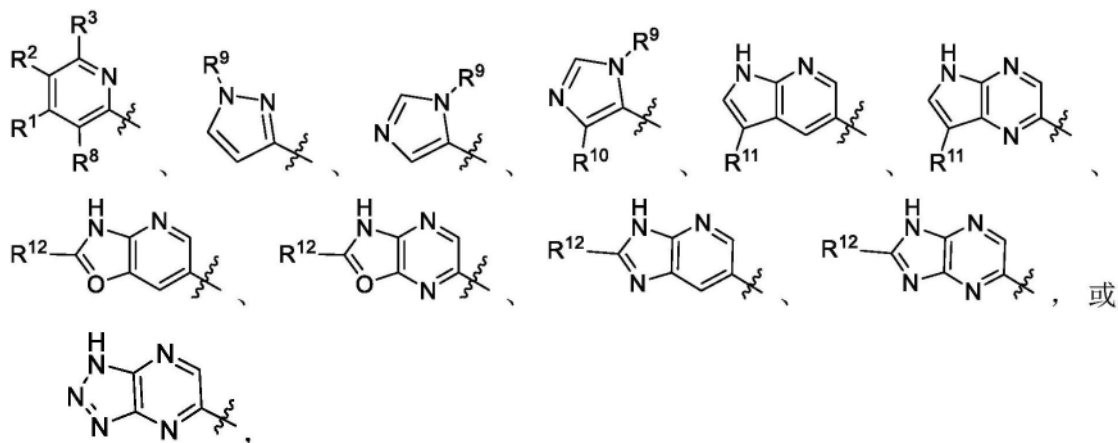


(k) 如果环A是  并且X⁵是N(H), 则R⁵不是  并且



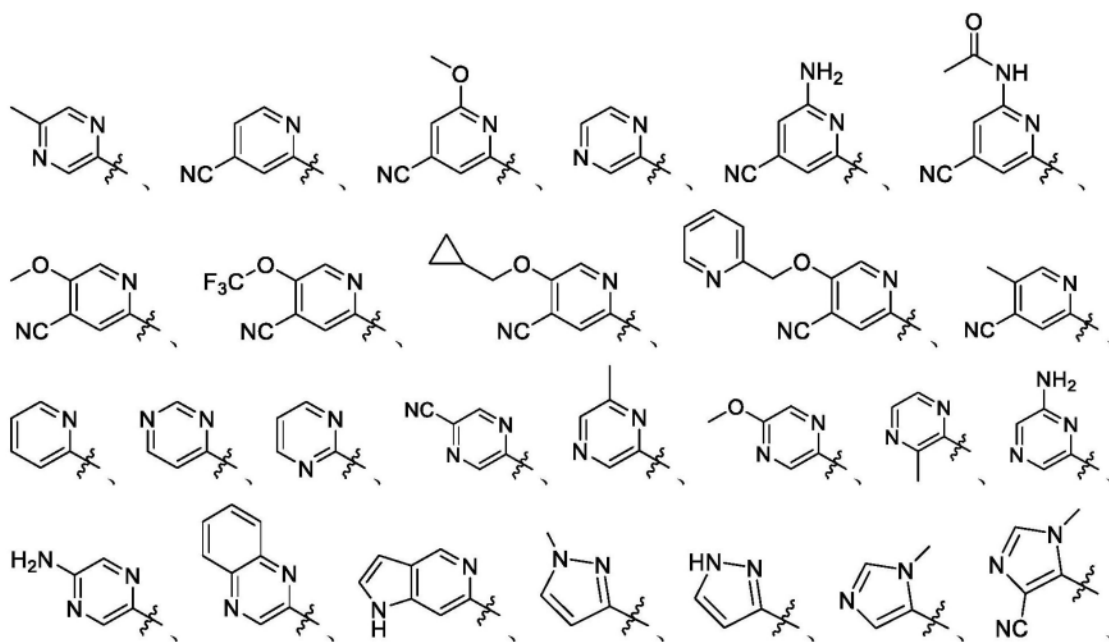
2. 根据权利要求1所述的化合物, 其中环A是

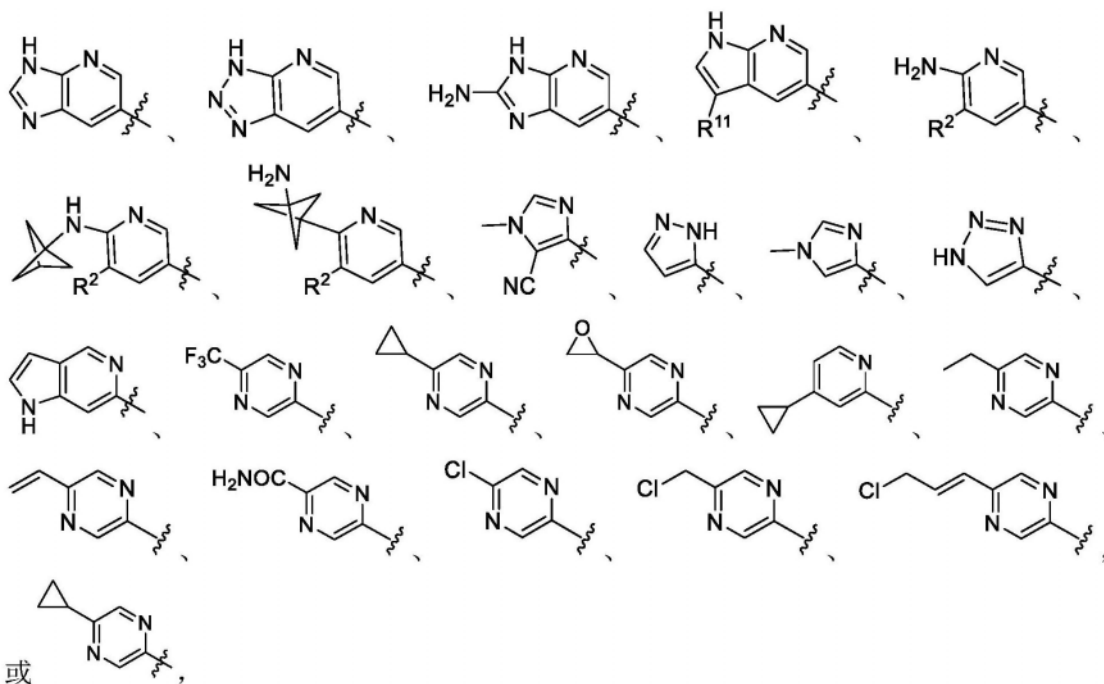




其中 R^{11} 和 R^{12} 是H、烷基、全卤代烷基、烷氧基、全卤代烷氧基、氰基或氨基。

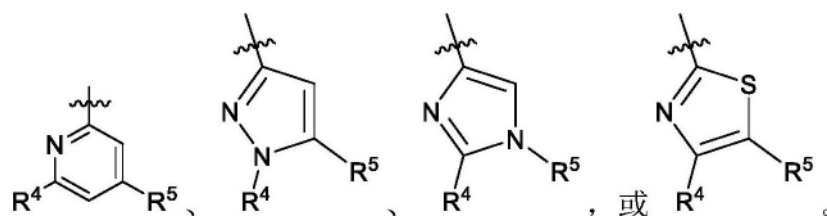
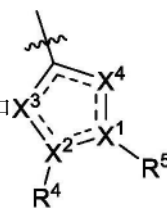
3. 根据权利要求1所述的化合物,其中环A为:



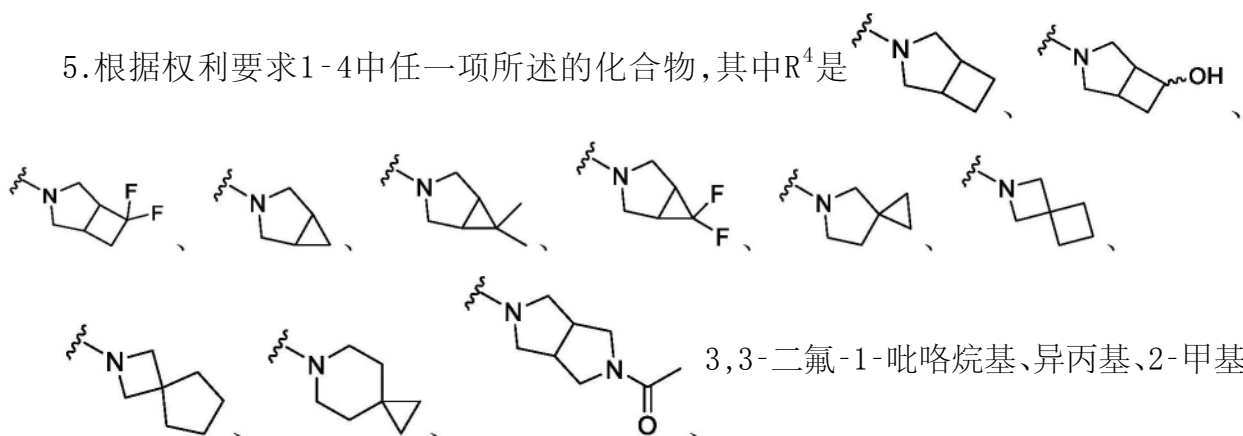


其中 R^2 是 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CN}$ 或 $-\text{H}$,并且
 R^{11} 是 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{CN}$ 或 $-\text{H}$ 。

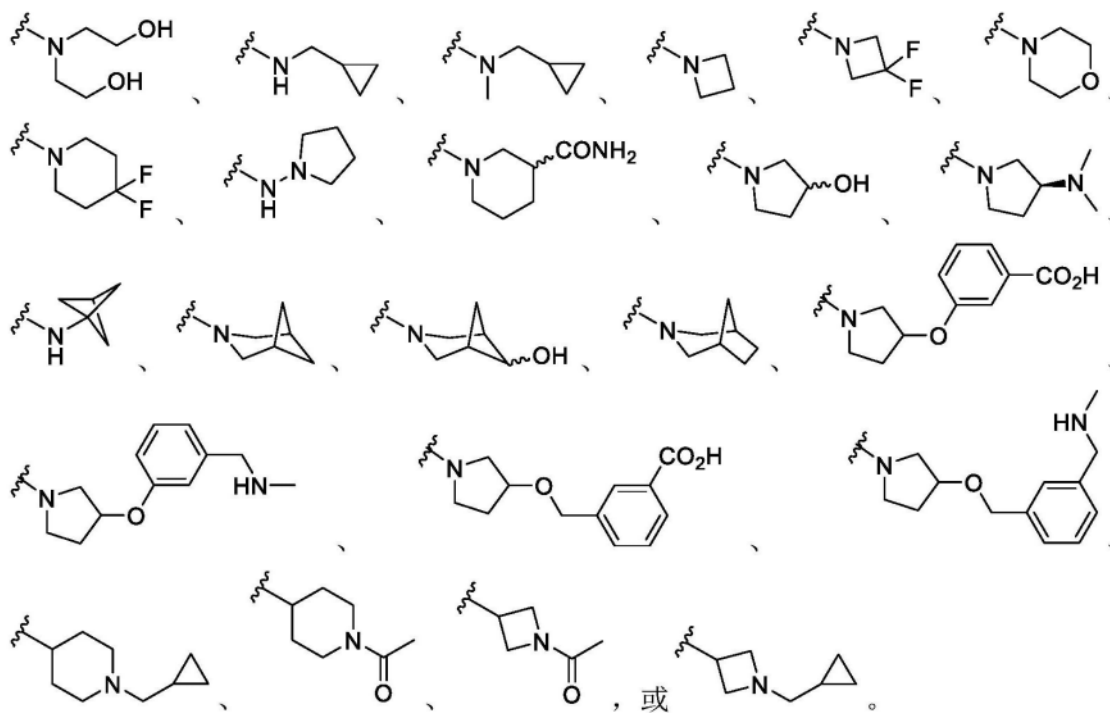
4. 根据权利要求1-3中任一项所述的化合物,其中



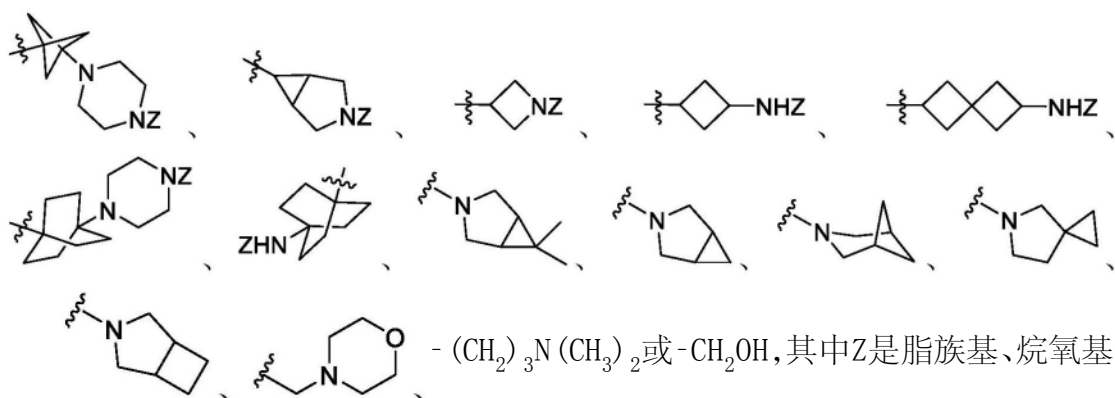
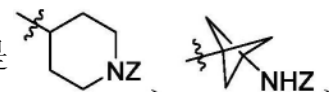
5. 根据权利要求1-4中任一项所述的化合物,其中 R^4 是

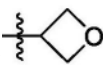


丙基、环丙基、环丙甲基、 $-\text{C}(\text{H})(\text{OH})-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{N}(\text{H})(\text{CH}_2)_4\text{OH}$ 、 $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ 、



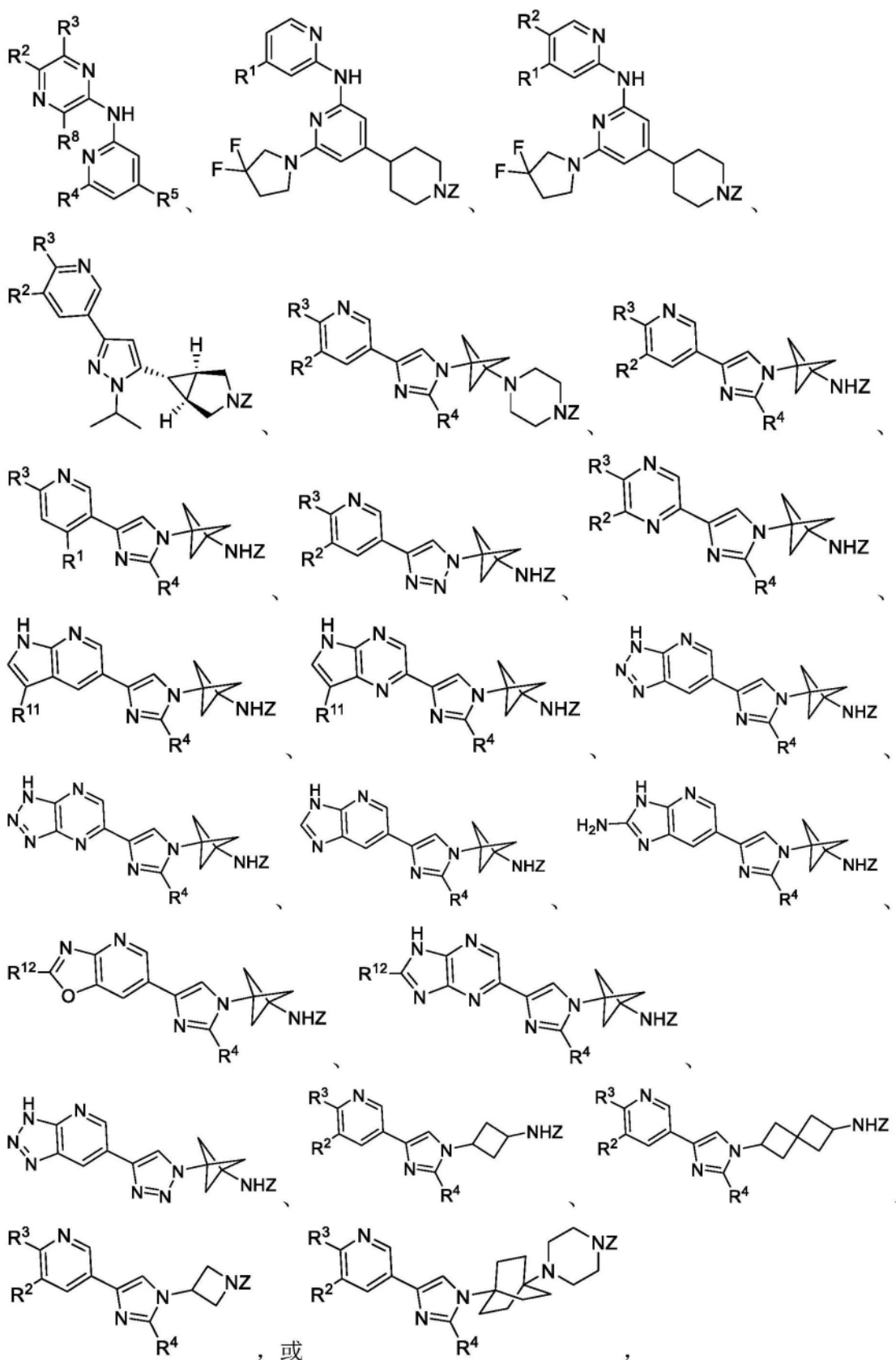
6. 根据权利要求1-5中任一项所述的化合物, 其中 R^5 是



族基。
 7. 根据权利要求6所述的化合物, 其中Z是 $-C(O)CH_3$ 、H、甲基、乙基、异丙基、2-甲基丙基、环丙基、环丙甲基、环丁基、环戊基、环己基、 $-(CH_2)_2(OCH_2CH_2)_nOCH_3$, 或 , 其中n是1-10的整数。

8. 根据权利要求6所述的化合物, 其中Z是 C_1-C_3 烷氧基、H、 C_1-C_6 烷基或杂烷基。

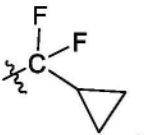
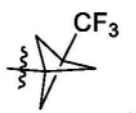
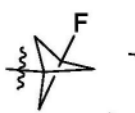
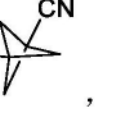
9. 根据权利要求6-8中任一项所述的化合物, 其中所述化合物是:



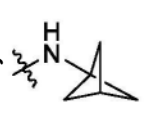
其中R¹¹和R¹²是H、烷基、全卤代烷基、烷氧基、全卤代烷氧基、氰基或氨基。

10. 根据权利要求9所述的化合物, 其中:

R¹是-CN、-OCF₃或-CF₃;

R^2 是 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、、、、、

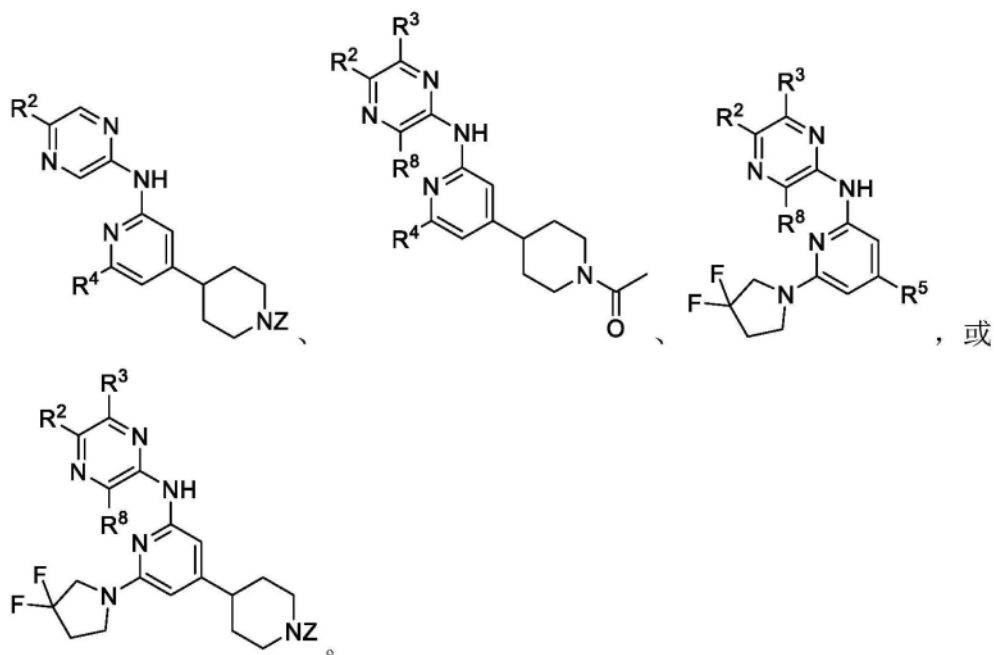
或 $-\text{H}$;

R^3 是 $-\text{NH}_2$ 、、 或 $-\text{H}$;

R^8 是 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{CH}_3$ 或 H ; 并且

R^{11} 和 R^{12} 独立地是 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{H}$ 、 $-\text{OCH}_3$ 或 $-\text{OCF}_3$ 。

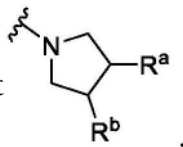
11. 根据权利要求 9 或权利要求 10 所述的化合物, 其中

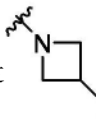
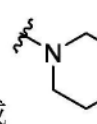


12. 根据权利要求 11 所述的化合物, 其中所述化合物是

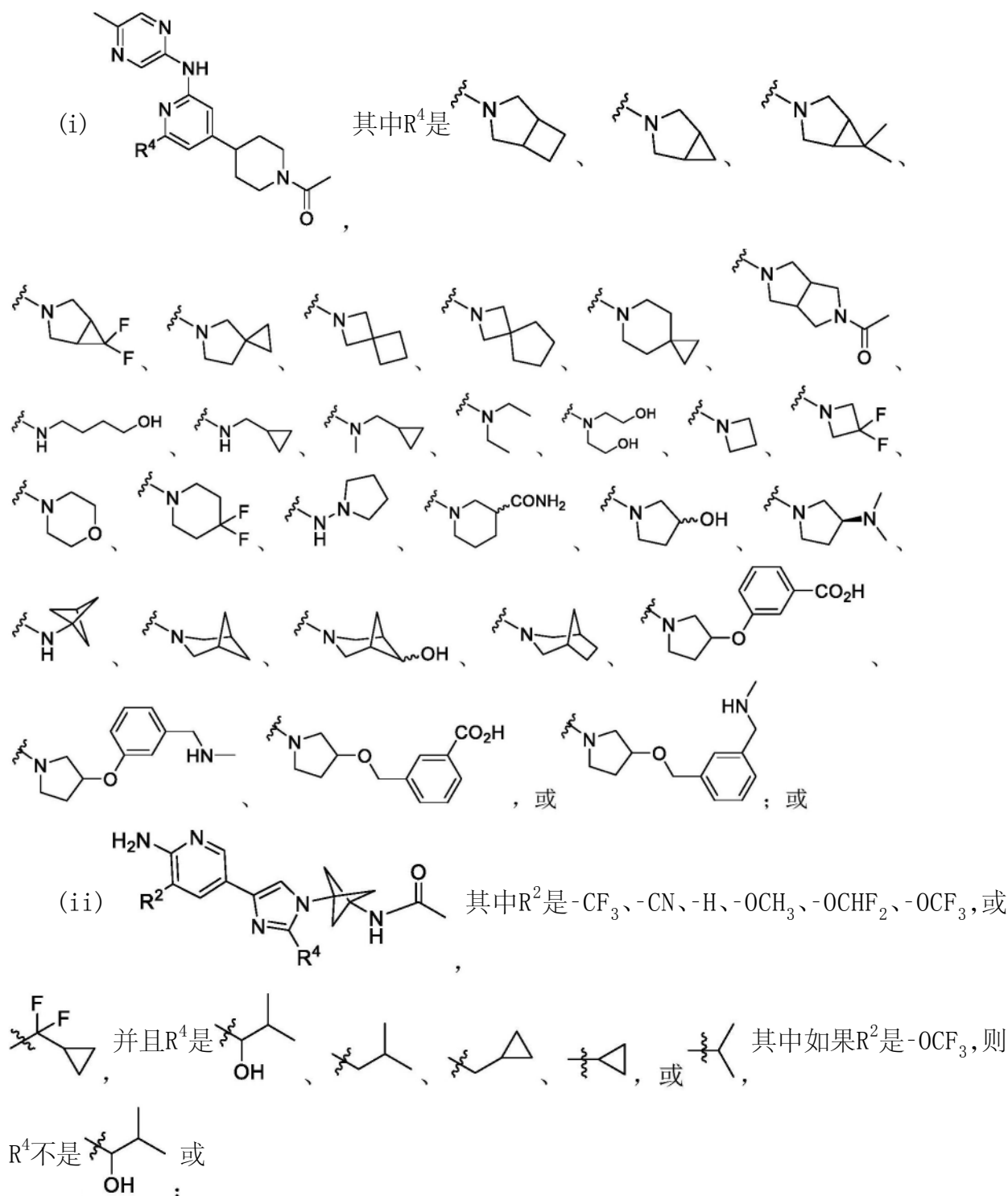


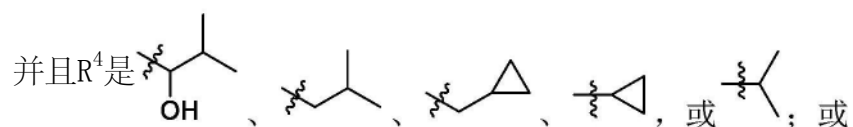
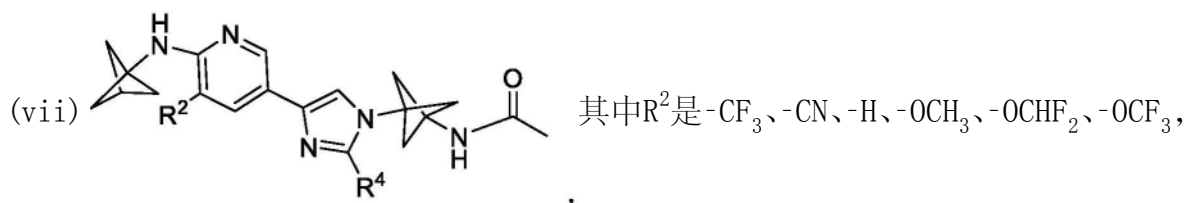
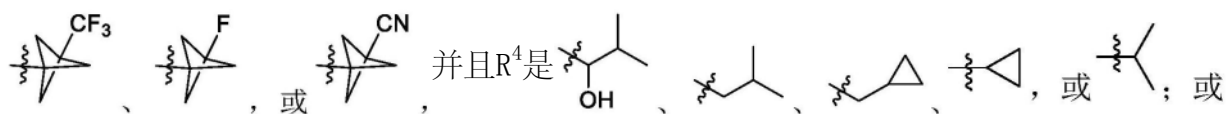
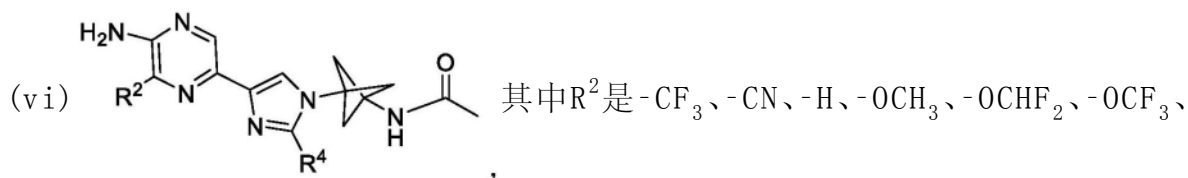
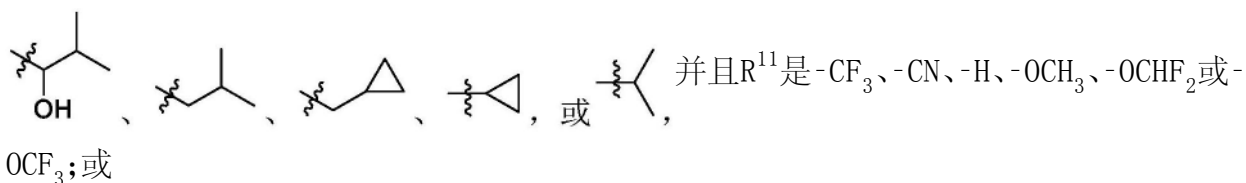
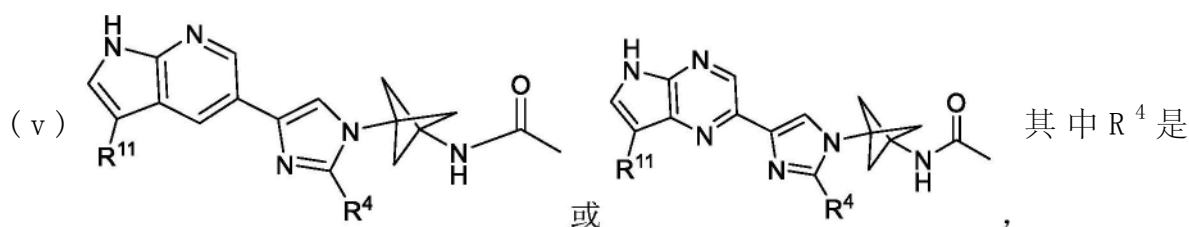
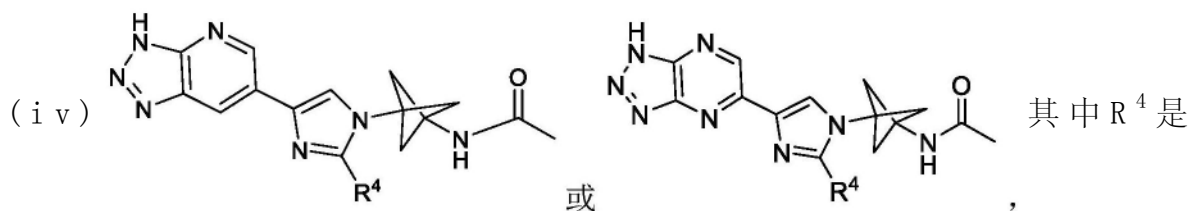
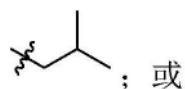
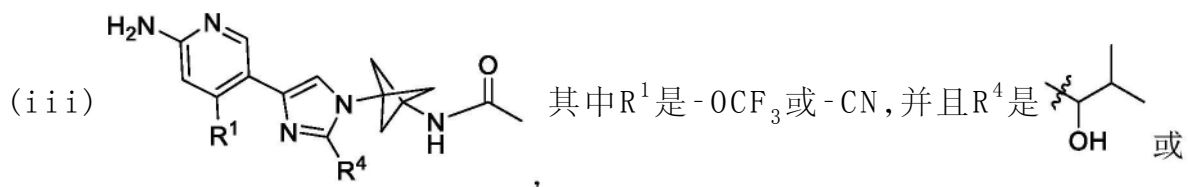
Z 是脂族基; 并且

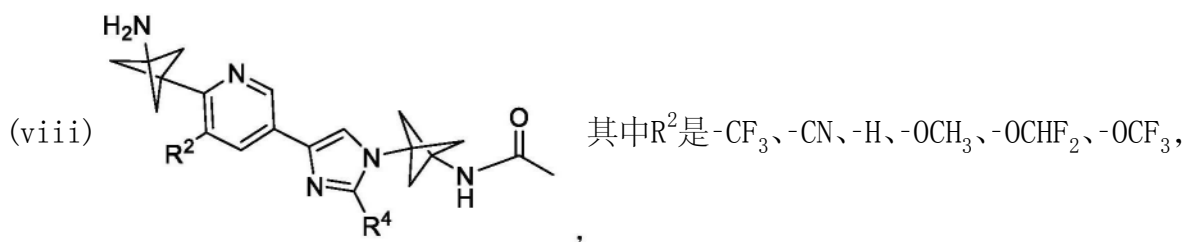
R^4 是  其中 R^a 和 R^b 与它们结合的原子一起形成耦合的环脂族基环或杂环脂

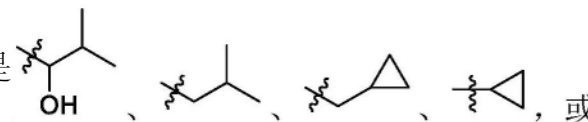
族基环,或 R^a 是环脂族基并且 R^b 是-H,或 R^4 是  或  , 其中 R^a 是环脂族基。

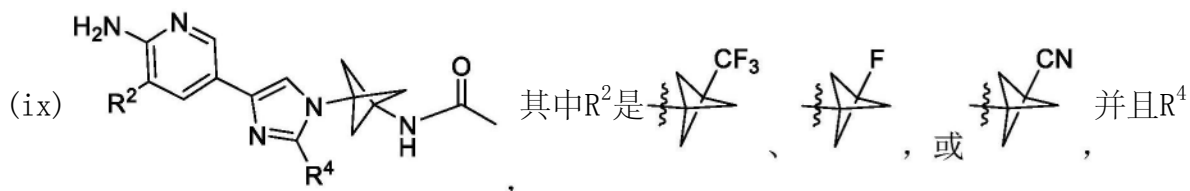
13. 根据权利要求1所述的化合物,其中所述化合物是:



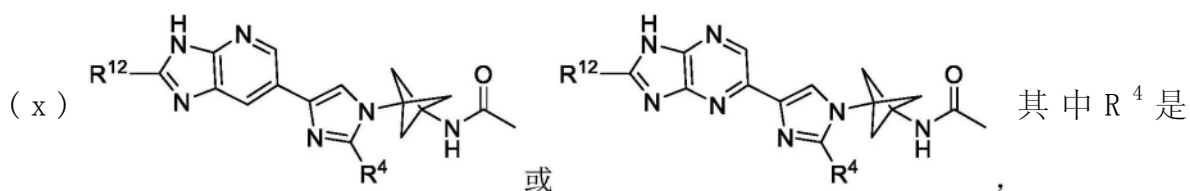


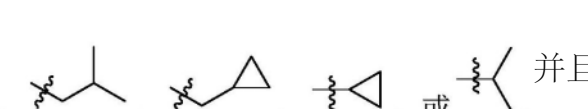


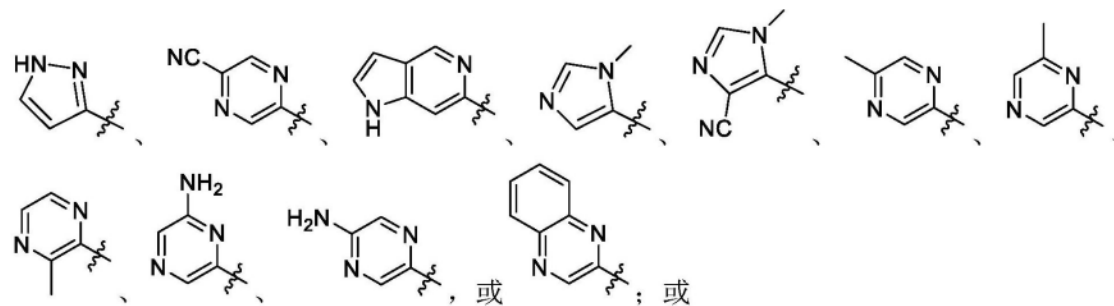
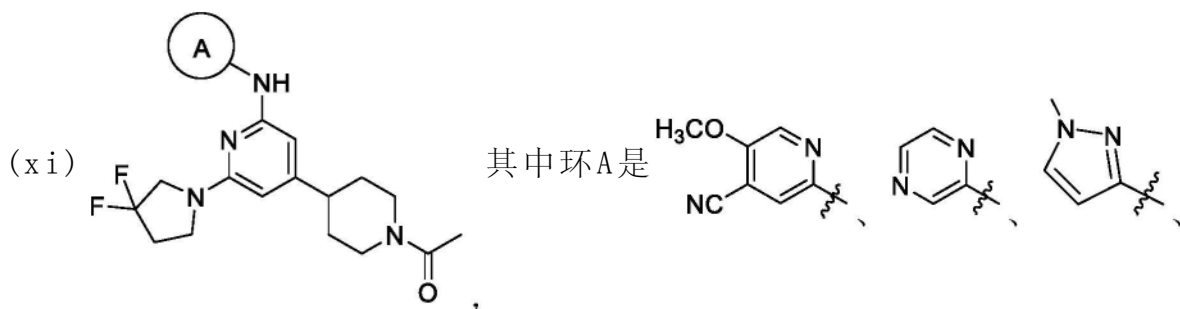
并且R⁴是 ; 或

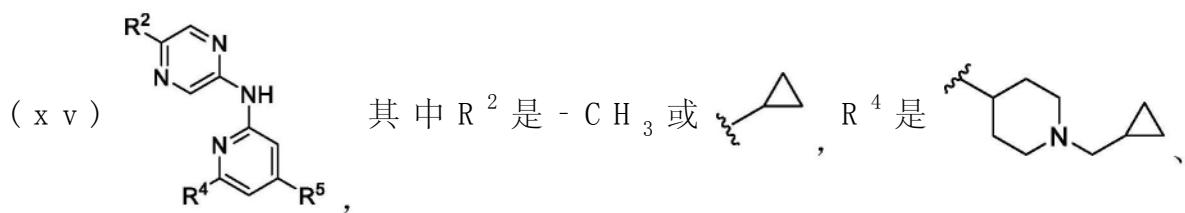
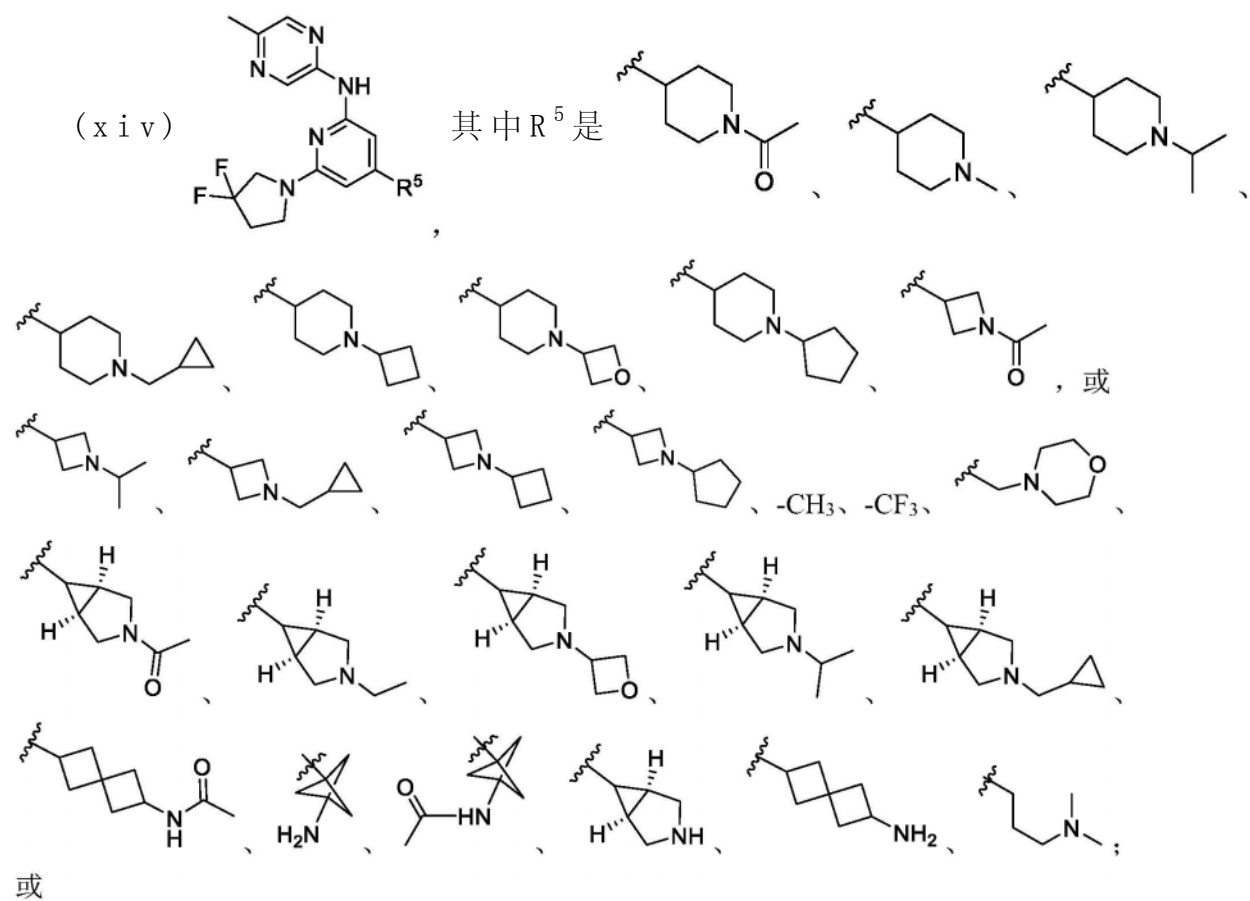
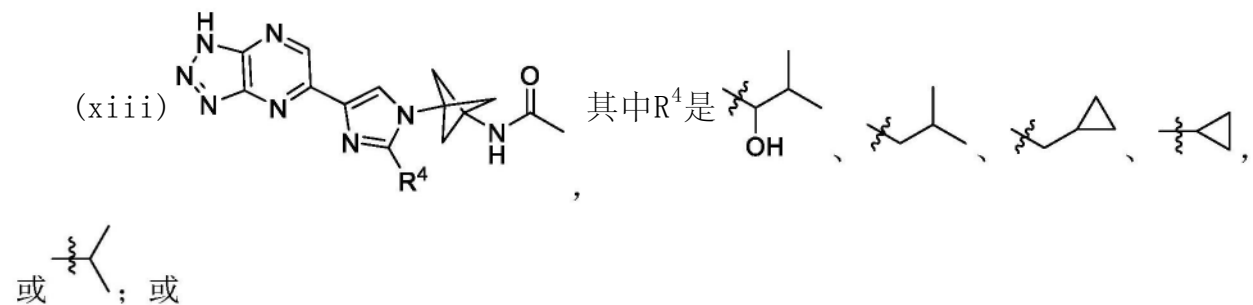
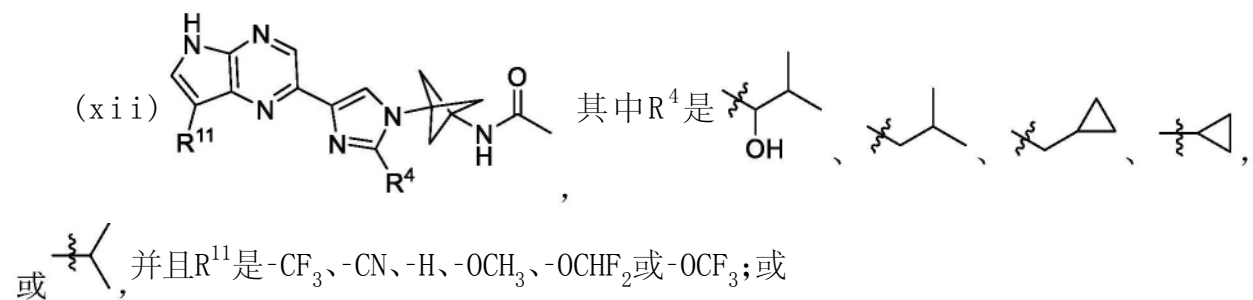


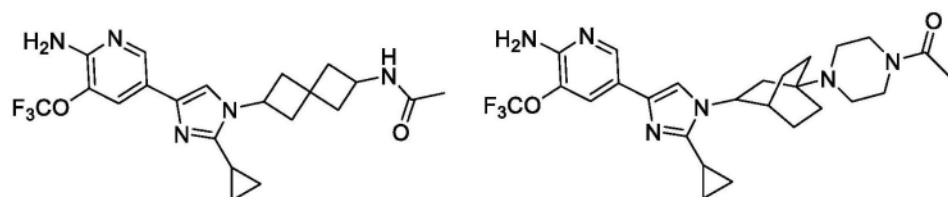
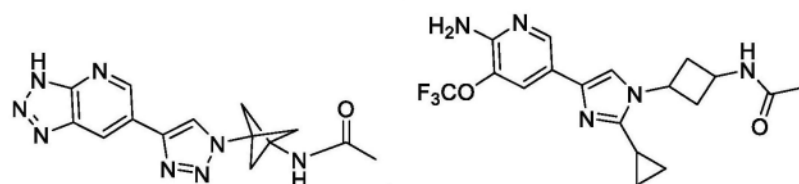
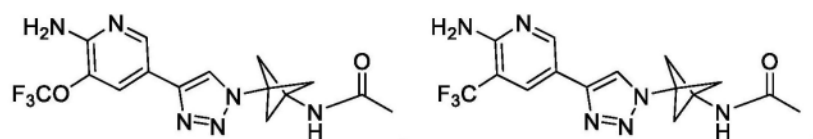
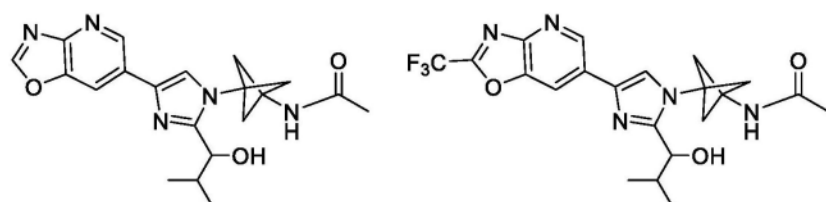
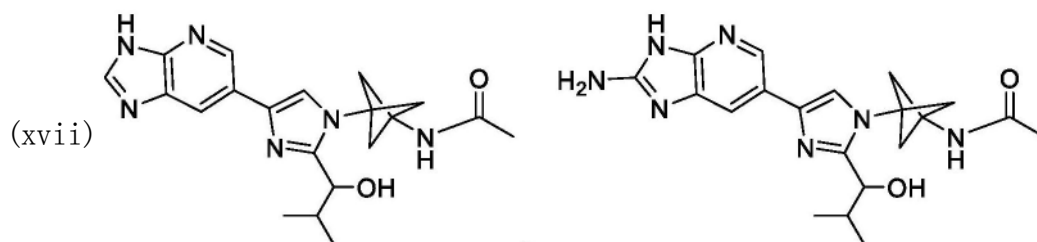
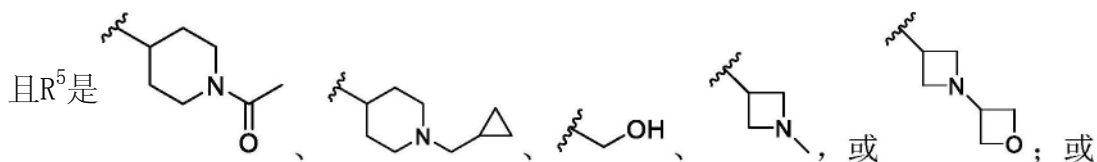
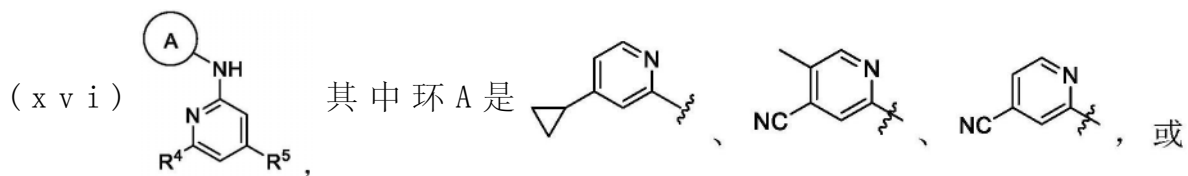
是 ; 或



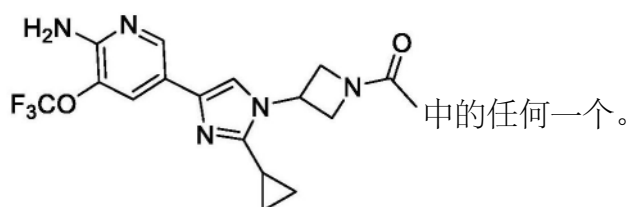
 并且R¹²是-CF₃、-CN、-H、-OCH₃、-OCHF₂或-OCF₃;或







, 或



14. 一种药物组合物, 包含根据权利要求1-13中任一项的化合物和至少一种药学上可接受的载体。

15. 一种抑制混合谱系激酶 (MLK) 活性的方法, 包含:

使表达MLK的细胞与有效量的根据权利要求1-13中任一项的化合物接触, 从而抑制MLK活性。

16. 根据权利要求15所述的方法, 其中所述MLK是MLK1 (MAP3K9)、MLK2 (MAP3K10)、MLK3 (MAP3K11)、MLK4 (MAP3K21)、DLK (MAP3K12)、LZK (MAP3K13)、ZAK1 (MAP3K20) 或它们的任意组合。

17. 根据权利要求16所述的方法, 其中所述MLK是LZK、MLK3或MLK4。

18. 根据权利要求15-17中任一项所述的方法, 其中抑制MLK活性抑制细胞周期进程, 降低c-MYC表达, 抑制c-Jun N末端激酶 (JNK) 通路信号传导, 抑制PI3K/AKT通路信号传导, 抑制细胞周期蛋白依赖性激酶2 (CDK2) 活性, 抑制细胞外信号调节激酶 (ERK) 通路信号传导、NF- κ B信号传导或它们的任意组合。

19. 根据权利要求15-18中任一项所述的方法, 其中所述细胞的特征在于染色体3q的扩增、染色体11q的扩增、丝裂原活化蛋白激酶 (MAP3K) 的过表达, 或它们的任意组合。

20. 根据权利要求15-19中任一项所述的方法, 其中所述细胞是头颈部鳞状细胞癌 (HNSCC) 细胞、肺鳞状细胞癌 (LSCC) 细胞、食管癌症细胞、肝细胞癌细胞、卵巢癌症细胞、小细胞肺癌细胞、神经内分泌前列腺癌症细胞或乳腺癌细胞。

21. 根据权利要求15-20中任一项所述的方法, 其中使所述细胞与所述化合物接触包含向受试者施用治疗有效量的所述化合物或一定量的包含治疗有效量所述化合物的药物组合物。

22. 根据权利要求21所述的方法, 其中所述受试者患有至少部分以MLK过表达为特征的疾病或病况。

23. 根据权利要求22所述的方法, 其中所述疾病或病况是癌症。

24. 根据权利要求23所述的方法, 其中所述癌症是HNSCC、LSCC、食管鳞状细胞癌 (ESCC)、肝细胞癌、卵巢癌症、小细胞肺癌、神经内分泌前列腺癌症、食管腺癌或乳腺癌。

25. 根据权利要求24所述的方法, 其中所述癌症是HNSCC、LSCC、ESCC或三阴性乳腺癌。

26. 根据权利要求23-25中任一项所述的方法, 其中施用治疗有效量的所述化合物, 或一定量的所述药物组合物, 降低所述癌症细胞活力, 抑制肿瘤生长, 或它们的组合。

27. 根据权利要求21-26中任一项所述的方法, 其中施用是通过肠胃外、口服或局部进行的。

28. 根据权利要求1-13中任一项的化合物用于抑制MLK活性的用途, 其中抑制MLK活性

包含使表达MLK的细胞与有效量的所述化合物接触,从而抑制MLK活性。

29.根据权利要求1-13中任一项的化合物用于治疗至少部分以MLK过表达为特征的疾病或病况的用途,其中治疗包含将治疗有效量的所述化合物或一定量的包含治疗有效量所述化合物的药物组合物施用至患有至少部分以MLK过表达为特征的疾病或病况的受试者。

30.根据权利要求1-13中任一项的化合物在制备用于治疗至少部分以MLK过表达为特征的疾病或病况的药物中的用途。

31.根据权利要求28-30中任一项所述的用途,其中所述MLK是MLK1 (MAP3K9)、MLK2 (MAP3K10)、MLK3 (MAP3K11)、MLK4 (MAP3K21)、DLK (MAP3K12)、LZK (MAP3K13)、ZAK1 (MAP3K20)或它们的任意组合。

32.根据权利要求31所述的用途,其中所述MLK是LZK、MLK3或MLK4。

33.根据权利要求29-32中任一项所述的用途,其中所述疾病或病况是癌症。

34.根据权利要求33所述的用途,其中所述癌症是HNSCC、LSCC、ESCC、肝细胞癌、卵巢癌、小细胞肺癌、神经内分泌前列腺癌、食管腺癌或乳腺癌。

混合谱系激酶抑制剂及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2021年9月1日提交的第63/239,797号美国临时申请的在先申请日期的权益,该临时申请的全部内容通过引用的方式并入本文。

[0003] 政府支持声明

[0004] 本发明是在国家卫生研究院所授予的项目号Z01

600.129.15.01.024.001.0021.012下经政府支持完成的。政府对本发明有一定的权利。

技术领域

[0005] 本发明涉及混合谱系激酶抑制剂以及使用所述抑制剂的方法。

背景技术

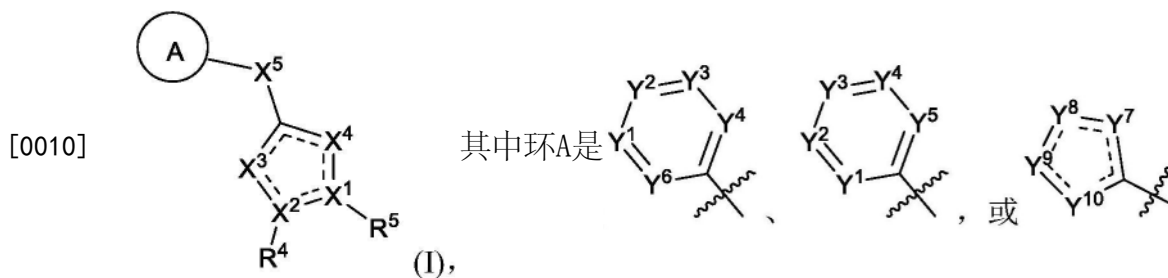
[0006] 全球头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)的发病率约为每年80万新病例,每年有43万人死亡,统计数据几十年来一直保持不变。HNSCC患者的治疗选择主要局限于手术、放疗、基于铂的化疗或它们的组合。西妥昔单抗是一种靶向EGFR的单克隆抗体,是唯一批准的HNSCC靶向疗法(Bonner et al.,NEJM 2006,364:567-578;Vermorken et al.,NEJM 2008,359:1116-1127)。然而,仅有一部分(13%)HNSCC患者对西妥昔单抗有反应(Vermorken et al.,J Clin Oncol 2007,25:2171-2177);因此,迫切需要新的疗法。

[0007] 肺鳞状细胞癌(LSCC)占有肺癌病例的三分之一。尽管进行了广泛的基因组测序,但确定LSCC中致癌驱动因子仍具有挑战性,而且大多数LSCC患者体内可操作改变是尚不明确(Gold et al.,Clin Cancer Res 2012,18(11):3002-7;Gandara et al.,Clin Cancer Res 2015,21(10):2236-43)。因此,尚未批准用于治疗LSCC的靶向疗法,因此治疗仍然依赖于化疗或放疗。LSCC肿瘤的基因组特征表明,染色体3q远端扩增(3q26-29)是LSCC中最常见的基因组改变,约50%的LSCC患者体内发生这种改变(Cancer Genome Atlas Research Network,“Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers,”Nature 2012,489(7417):519-25.)。

[0008] 三阴性乳腺癌(TNBC)占有浸润性乳腺癌的10-20%,并且与其他乳腺癌相比预后较差(Mehlich et al.,Cell Death and Disease 2021,12:1111;Marusiak et al.,oncogene2019,38:2860-2875)。TNBC的特征在于缺乏雌性激素受体和孕激素受体,并且没有HER2过表达。化疗的内在耐药性和获得性耐药性导致复发率高、疗效差(Mehlich et al.)。因此,需要新的疗法。

发明内容

[0009] 本公开涉及混合谱系激酶(MLK)抑制剂以及使用所述抑制剂的方法。在一些方面,所公开的抑制剂是具有通式I的化合物或其立体异构体、互变异构体或药学上可接受的盐:



[0011] 关于式I,由 $\equiv$ 表示的每个键是满足化学价要求所需的单键或双键。 $-X^1(R^5)-$ 部分是 $-C(R^5)-$ 、 $-C(R^5)-C(H)-$ 、 $-C(H)-C(R^5)-$ 、 $-C(R^5)-N-$ 、 $-N-C(R^5)-$ 、或 $-N(R^5)-$ 。 X^2 是N或C。 X^3 是N或CH。 X^1-X^3 中的一个或两个包含N。 X^4 是CH或S。 X^5 是 $-N(H)-$ 或不存在。 Y^1 是C(R^1)或N。 Y^2 是C(R^2)或N。 Y^3 是C(R^3)或N。 Y^4 是N或C(R^6)。 Y^5 是C(R^7)或N。 Y^6 是C(R^8)或N。 Y^1-Y^6 中的一个或两个是N,并且 Y^1-Y^3 中的至少一个或 Y^6 不是C(H)。 Y^7-Y^{10} 中的两个、三个或四个独立地是N或N(R^9),并且 Y^7-Y^{10} 中的其他是C(R^{10})。 R^1 是氰基、全卤代烷基、H、烷基或全卤代烷氧基。 R^2 是H、烷氧基、全卤代烷基、全卤代烷氧基、卤代烷氧基、卤代烷基、氰基、烷基、氰基烷基、氨基、杂芳基烷氧基、杂烷基、酰胺基、卤代基、烯基或卤代烯基,或 R^1 和 R^2 与它们所附接的原子一起形成5元或6元芳基环或杂芳基环。 R^3 是H、氨基、烷基氨基、氨基烷基、烷氧基或 $-N(H)C(O)R'$,其中 R' 是烷基,或 R^2 和 R^3 与它们所附接的原子一起形成5元或6元芳基环或杂芳基环。 R^4 是脂族基、氮杂烷基、芳基或氨基。 R^5 是脂族基、杂脂族基或烷基氨基。 R^6 和 R^7 独立地是H、烷基、烷氧基、全卤代烷基、全卤代烷氧基或氰基。 R^8 为H、烷基、烷氧基、全卤代烷基、全卤代烷氧基或氰基,或 R^8 和 R^1 与它们所附接的原子一起形成5元或6元芳基环或杂芳基环。每个 R^9 独立地是H或烷基。每个 R^{10} 独立地是H、烷基或氰基。

[0012] 本公开还包括药物组合物。药物组合物包括至少一种本文公开的化合物和至少一种药学上可接受的载体。

[0013] 公开了使用所公开的化合物的方法。在一些方面,抑制MLK活性的方法包括使表达MLK的细胞与有效量的本文所公开化合物接触,从而抑制MLK的活性。所述MLK可以是MLK1(MAP3K9)、MLK2(MAP3K10)、MLK3(MAP3K11)、MLK4(MAP3K21)、DLK(MAP3K12)、LZK(MAP3K13)、ZAK1(MAP3K20)或它们的任意组合。在一些方面,抑制MLK活性抑制细胞周期进程,降低c-MYC表达,抑制c-Jun N末端激酶(JNK)通路信号传导,抑制PI3K/AKT通路信号传导,抑制细胞周期蛋白依赖性激酶2(CDK2)活性,或它们的任意组合。在任何前述或以下实施方式中,所述细胞的特征可能在于染色体3q的扩增、染色体11q的扩增、丝裂原活化蛋白激酶(MAP3K)的过表达、细胞外信号调节激酶(ERK)的过表达或它们的任意组合。在一些实例中,所述细胞是头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)细胞、肺鳞状细胞癌(LSCC)细胞、肝细胞癌细胞、卵巢癌症细胞、小细胞肺癌细胞、神经内分泌前列腺癌症细胞、食管癌症细胞或乳腺癌细胞。

[0014] 在一些实施方式中,使所述细胞与所述化合物接触包含向受试者施用治疗有效量的所述化合物或一定量的包含治疗有效量的所述化合物的药物组合物。所述受试者可能患有至少部分以MLK过表达为特征的疾病或病况。在一些实施方式中,所述疾病或病况是癌症,例如HNSCC、LSCC、肝细胞癌、卵巢癌症、小细胞肺癌、神经内分泌前列腺癌症、食管癌症或乳腺癌。施用治疗有效量的所述化合物或一定量的所述药物组合物可降低所述癌症细胞的活力,抑制肿瘤生长或它们的组合。

[0015] 通过参考附图进行的以下详细描述,本公开的上述和其他目的、特征和优势将变得更加明显。

附图说明

[0016] 专利或申请文件含有至少一张彩色绘制的附图。在提出请求并支付必要费用后,专利局将提供带有彩色附图的本专利或专利申请出版物的副本。

[0017] 图1是GNE-3511的结构。

[0018] 图2A-2C显示,如通过24小时从100nM到5 μ M (2A) 和250nM下长达72小时 (2B) 下游JNK磷酸化监测,GNE-3511抑制LZK活性;图2C是数据的图形表示。

[0019] 图3显示RT-PCR分析四环素诱导LZK表达的CAL33 TR LZK WT或240S细胞系。

[0020] 图4显示250nM的GNE-3511在15分钟内抑制LZK对JNK的活性。

[0021] 图5显示GNE-3511降低了LZK直接下游靶标MKK7的体外磷酸化。

[0022] 图6A和6B是一系列图像 (6A) 和条形图 (6B),显示14天后GNE-3511抑制MAP3K13扩增的头颈部鳞状细胞癌 (HNSCC) 细胞系 (CAL33和BICR56) 的克隆性生长,而对对照HNSCC细胞系 (MSK921) 或永生化正常人支气管上皮细胞系 (BEAS-2B) 的克隆性生长仅有轻微影响。

[0023] 图7A和7B是条形图 (7A) 和图像 (7B),显示了用500nM的GNE-3511抑制LZK降低了3q扩增的肺鳞状细胞癌 (LSCC) 细胞系 (LK2和NCI-H520) 的克隆性生长。

[0024] 图8的图显示了GNE-3511处理72小时内显著降低CAL33和BICR56细胞的细胞活力。

[0025] 图9显示,如通过下游JNK磷酸化评估,LZK耐药突变体形式Q240S在GNE-3511存在下仍保持催化活性。

[0026] 图10显示,如在293T细胞中通过过表达LZK^{Q240S}耐药突变体来挽回JNK信号传导所观察到的那样,1小时GNE-3511处理特异性抑制LZK活性。

[0027] 图11显示在72小时MTS测定中,GNE-3511抑制了携带扩增的MAP3K13的CAL33和BICR56细胞系中HNSCC活力,并且LZK^{Q240S}的表达挽回了活力。

[0028] 图12A-12C显示在体内HNSCC PDX小鼠模型中,与媒介物对照组相比,用GNE-3511 (50mg/kg,每日一次,5天治疗/2天停止) 治疗的小鼠 (n=10) 肿瘤生长抑制;图12A是平均肿瘤体积 $\pm$ SEM的图;图12B是显示治疗结束时的平均肿瘤体积的条形图,以平均肿瘤体积 $\pm$ SEM表示,学生t检验,*p<0.05;图12C是研究结束时的肿瘤图像。

[0029] 图13A-13D显示,在LZK扩增的两个体内HNSCC PDX小鼠模型中,与媒介物对照组 (50mg/kg,每日一次,5天治疗/2天停止) 相比,用GNE-3511 (50mg/kg,每日一次,5天治疗/2天停止) 治疗的小鼠 (n=10) 的肿瘤生长被显著抑制 (图13A、图13B),而在缺少LZK扩增的HNSCC PDX模型中,肿瘤体积未变小 (图13C、图13D)。图中显示了平均肿瘤体积 $\pm$ SEM。治疗结束时的平均肿瘤体积。以平均值 $\pm$ SEM表示;学生t检验;*p<0.05。

[0030] 图14显示在体内HNSCC CAL33异种移植物小鼠模型中,与媒介物对照组相比,用100mg/kg GNE-3511治疗的小鼠 (n=10) 肿瘤生长受到抑制。

[0031] 图15A和15B是教导治疗组CAL33异种移植物中凋亡标记物—裂解的半胱天冬酶3的免疫组织化学 (IHC) 染色图像 (15A),以及裂解的半胱天冬酶-3染色的量化图像,显示了与对照相比,GNE-3511治疗后肿瘤中凋亡标记物增加 (15B)。

[0032] 图16的图表示了3号染色体上每个基因扩增的HNSCC PDX模型的百分比;所述基因

沿3号染色体按基因起始点排序;MAP3K13用叉号标记;曲线是损失法的回归线。

[0033] 图17显示了RT-PCR分析dox诱导LZK敲低的CAL33、BICR56和MSK921细胞系。

[0034] 图18显示了从NCIPDMR获得58个HNSCC PDX小鼠模型的3号染色体拷贝数(CN)谱;热图颜色表示拷贝数的log2比率。

[0035] 图19显示了MAP3K13拷贝数不同的58个PDX模型中MAP3K13基因表达的箱线图。

[0036] 图20是RPPA测定结果,证实了在缺失LZK的CAL33和BICR56细胞中48小时内c-MYC水平降低。

[0037] 图21是在缺失LZK的CAL33和BICR56细胞中48小时内c-MYC丰度的一系列蛋白质印迹。

[0038] 图22是在缺失LZK的CAL33细胞中48小时内细胞周期组分丰度的一系列蛋白质印迹。

[0039] 图23的蛋白质印迹显示了用MG132(10 μ M)处理6小时挽回了在缺失LZK的CAL33和BICR56细胞中48小时内的c-MYC水平降低。

[0040] 图24的蛋白质印迹显示了用GNE-3511处理CAL33细胞在高达72小时内降低c-MYC丰度。

[0041] 图25的蛋白质印迹显示了LZK^{Q240S}表达挽回了在用GNE-3511处理的CAL33细胞中c-MYC水平损失。

[0042] 图26的图显示了如下游JNK磷酸化监测的那样,通过几种公开类似物对LZK活性的抑制。

[0043] 图27是GNE-3511和LZK抑制剂2的蛋白质印迹比较,显示了LZK抑制剂2在100nM下是有效的LZK抑制剂。

[0044] 图28显示LZK抑制剂2在250nM下72小时内维持JNK通路失活。

[0045] 图29显示LZK信号传导活性在5分钟被LZK抑制剂2(250nM)抑制。

[0046] 图30显示LZK抑制剂2在低于GNE-3511的浓度下在一小时抑制JNK信号传导。

[0047] 图31A和31B的图像显示了LZK抑制剂2抑制携带扩增MAP3K13的HNSCC细胞(CAL33、BICR56和Detroit 562)的克隆性生长(图31A),以及揭示所有三种细胞系生长显著降低的量化情况。平均值 $\pm$ SEM;学生t检验;** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (图31B)。

[0048] 图32的图像显示了LZK抑制剂2(1 μ M)显著降低LK2和NCI-H520细胞系中LSCC细胞生长。

[0049] 图33的图显示了LZK^{Q240S}耐药突变体表达挽回了用LZK抑制剂2处理的CAL33细胞活力的下降。

[0050] 图34的蛋白质印迹,显示了在用LZK抑制剂2(250nM)处理期间LZK^{Q240S}耐药突变体表达挽回了JNK信号传导。

[0051] 图35-39的条形图显示了几种公开的MLK抑制剂(1 μ M,1小时)降低了用多西环素诱导LZK表达的CAL33细胞中的磷酸化JNK水平,使用ELISA测定进行评估。与GNE-3511对照相比,对抑制剂的疗效进行初步筛选。

[0052] 图40-42的图显示了三种公开的MLK抑制剂对LZK的剂量依赖性抑制。

[0053] 图43的图显示了具有3q扩增子的食管鳞状细胞癌(ESCC)细胞对GNE-3511敏感。

[0054] 图44是软琼脂测定的图像,证实了具有3q扩增子的ESCC细胞对GNE-3511敏感。

- [0055] 图45是集落形成测定的图像,证实了具有3q扩增子的ESCC细胞对GNE-3511敏感。
- [0056] 图46是集落形成测定的图像,显示了具有耐药突变体形式LZK的ESCC细胞对GNE-3511具有耐药性。
- [0057] 图47是集落形成测定的图像,证实了具有3q扩增子的ESCC细胞对两种公开的MLK抑制剂敏感。
- [0058] 图48的蛋白质印迹显示了具有耐药突变体形式LZK的ESCC细胞对所公开MLK抑制剂具有耐药性。
- [0059] 图49是集落形成测定的图像,显示了具有耐药突变体形式LZK的ESCC细胞对所公开MLK抑制剂具有耐药性。
- [0060] 图50是集落形成测定的图像,显示了ESCC细胞对两种公开的MLK抑制剂非常敏感。
- [0061] 序列表
- [0062] 序列表XML (根据37C.F.R. §1.831 (a) 提交,符合§§1.832至1.834的规定) 以“Sequence.xml”文件名随附提交,创建于2022年8月18日,20,480字节,通过引用并入本文。
- [0063] 每个核酸序列只显示了一条链,但互补链理解成包括在所显示链的任何引用中。在随附的序列列表中:
- [0064] SEQ ID NO:1是LZK Q240S正向引物的示例性核苷酸序列。
- [0065] SEQ ID NO:2是LZK Q240S反向引物的示例性核苷酸序列。
- [0066] SEQ ID NO:3是LZK K195M正向引物的示例性核苷酸序列。
- [0067] SEQ ID NO:4是LZK K195M反向引物的示例性核苷酸序列。
- [0068] SEQ ID NO:5是Xba1至LZK正向引物起始端的示例性核苷酸序列。
- [0069] SEQ ID NO:6是Not1至LZK反向引物末端的示例性核苷酸序列。
- [0070] SEQ ID NO:7是T7启动子引物的示例性核苷酸序列。
- [0071] SEQ ID NO:8是BGH反向引物的示例性核苷酸序列。
- [0072] SEQ ID NO:9是Xba1至LZK激酶结构域正向引物的示例性核苷酸序列。
- [0073] SEQ ID NO:10是Xba1至LZK末端激酶结构域反向引物的示例性核苷酸序列。
- [0074] SEQ ID NO:11是Not1至LZK末端拉链结构域反向引物的示例性核苷酸序列。
- [0075] SEQ ID NO:12是Not1至LZK末端终止密码子反向引物的示例性核苷酸序列。
- [0076] SEQ ID NO:13是MAP3K13正向引物的示例性核苷酸序列。
- [0077] SEQ ID NO:14是MAP3K13反向引物的示例性核苷酸序列。
- [0078] SEQ ID NO:15是ACTB正向引物的示例性核苷酸序列。
- [0079] SEQ ID NO:16是ACTB反向引物的示例性核苷酸序列。
- [0080] SEQ ID NO:17是GAPDH正向引物的示例性核苷酸序列。
- [0081] SEQ ID NO:18是GAPDH反向引物的示例性核苷酸序列。
- [0082] SEQ ID NO:19是编码shRNA的示例性DNA序列。
- [0083] SEQ ID NO:20是编码shRNA的示例性DNA序列。

具体实施方式

[0084] 本公开涉及混合谱系激酶(MLK)抑制剂,以及制备和使用所述抑制剂的方法。MLK与头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)、肺鳞状细胞癌(LSCC)、肝细胞癌、卵巢癌症、小细胞肺癌症、

神经内分泌前列腺癌、食管癌和乳腺癌有关。例如,LZK与头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)和肺鳞状细胞癌(LSCC)都有关。LZK也已被证明调节肝细胞癌中的c-MYC蛋白稳定性,并且是维持肝细胞癌细胞生长所必需的(Zhang et al.,Cell Death&Differentiation 2020,27:420-433)。此外,LZK在20%的卵巢癌症、25%的小细胞肺癌、20%的神经内分泌前列腺癌和20%的食管腺癌中扩增,表明LZK是这些其他癌症的驱动因子。MLK3在10%携带11q扩增子的头颈癌症中扩增。MLK4是25%携带MAP3K21(MLK4)扩增的三阴性乳腺癌的驱动因子。

[0085] 激酶信号传导通路是细胞生存和增殖不可或缺的,激酶抑制是治疗多种形式癌症的既定方法。亮氨酸拉链携带激酶(LZK,MAPK3K13)是与MAPK3K12(DLK)具有高度同源性的丝氨酸/苏氨酸激酶(Patel et al.,J Med Chem 2015,58:8182-8199)。LZK已被证明在大多数HNSCC肿瘤中扩增或具有拷贝数增益,使其成为有吸引力的疗法靶标。LZK以激酶依赖性的方式调节c-MYC(Soth et al.,US2018/0057507 A1;Soth et al.,US10,093,664B2)和PI3K/AKT通路。此外,所述c-MYC和PI3K/AKT通路与多种癌症有关。通过LZK抑制来防止这些通路的上调是癌症研究人员广泛关注的。

[0086] LZK可以直接磷酸化MAP2K(MAP激酶)MKK7和MKK4,造成JNK(c-Jun N末端激酶)通路活化(Ikeda et al.,J Biochem 2001,130:773-781)。扩增的内源性LZK并不活化HNSCC中JNK通路(Edwards et al.,Cancer Res 2017,77:4961-4972;Ikeda et al.)。然而,过表达的LZK造成JNK通路活化,这可以用作评估LZK催化抑制剂的读数(Edwards et al.)。经常观察到HNSCC中拷贝数的改变,最常见的是3号染色体的远端扩增(3q26-3q29,3q扩增子)(TCGA,Nature 2012,489:519-525),包括由MAP3K13编码的蛋白质LZK。这种扩增发生在20%的HNSCC患者中,另外50%的患者表现为染色体3q增益(Edwards et al.,Cancer Res 2017,77:4961-4972)。

[0087] MLK4是一种丝氨酸-苏氨酸激酶,其磷酸化JNK、p38 MAPK和细胞外信号调节激酶(ERK)信号传导通路(Marusiak et al.,oncogene 2019,38:2860-2875)。MLK4可以直接磷酸化MEK,从而活化ERK通路(Id)。MLK4还调节转录因子NF- κ B(Id)的活化。MLK4在23%的浸润性乳腺癌中过表达,尤其是三阴性乳腺癌(TNBC)(Id)。MLK4还通过调节对DNA损伤疗法的促生存反应,促进TNBC化疗耐药性(Mehlich et al.,Cell Death and Disease 2021,12:1111)。

[0088] MLK3是另一种丝氨酸-苏氨酸激酶,与NF- κ B、ERK、JNK和p38 MAP激酶通路有关(Brancho et al.,Mol Cell Biol 2005,3670-3681)。MLK3信号传导与几种癌症有关,例如携带11q扩增子的头颈癌症。

[0089] 所公开化合物的一些实例抑制MLK活性,从而降低癌症细胞的活力和/或抑制体内肿瘤生长。例如,抑制LZK活性,降低MAP3K13扩增的癌症细胞的活力和/或抑制体内肿瘤生长。癌基因c-MYC被确定为受LZK催化活性调节的下游靶标。有利的是,所公开化合物的一些实施方式可以抑制LZK激酶依赖性的MYC稳定和PI3K/AKT通路的活化。此外,所公开化合物的一些实例在基于细胞系的头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)模型中促进几乎完全的细胞死亡,在肺鳞状细胞癌(LSCC)模型中促进显著水平的细胞死亡。

[0090] I.术语和缩写

[0091] 提供以下对术语和缩写的解释是为了更好地描述本公开,并指导本领域普通技术

人员实施本公开。如本文所用,“包含”是指“包括”,单数形式“a”或“an”或“the”包括复数引用,除非上下文另有明确说明。除非上下文另有明确说明,否则术语“或”是指所述备选要素中的单一要素或两个或更多个要素的组合。

[0092] 除非另有解释,否则本文中使用的所有技术和科学术语的含义与本公开所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同。尽管在实施或测试本公开中可以使用与本文所述方法和材料相似或等效的方法和材料,但下文描述了合适的方法和物质。所述材料、方法和实例仅为说明性的,而非限制性的。根据以下具体实施方式和权利要求书,本公开的其他特征是显而易见的。

[0093] 除非另有说明,否则公开数值范围应理解为指所述范围内的每个离散点,包括端点。除非另有声明,否则说明书或权利要求书中使用的所有表示组分数、分子量、百分比、温度、时间等的数值应理解为由“大约”一词修饰。因此,除非另有隐含或明确的声明,或除非本领域普通技术人员对上下文有合适的理解,认为有更明确的解释,否则所列出的数值参数都是近似值,可能取决于所寻求的预期特性和/或本领域普通技术人员已知的标准测试条件/方法下的检测限。当直接和明确地将各方面与所讨论的现有技术区分开来时,除非引用“大约”一词,否则所述方面的数值不是近似值。

[0094] 尽管本文提出了各种组分、参数、操作条件等的备选方案,但这并不意味着这些备选方案必然是等效的和/或性能得同样好。除非另有说明,这也不意味着这些备选方案按优先顺序列出。

[0095] 常见化学术语的定义可参见Richard J. Lewis, Sr. (ed.), *Hawley's Condensed Chemical Dictionary*, published by John Wiley & Sons, Inc., 2016 (ISBN 978-1-118-13515-0)。

[0096] 为了便于查阅本公开的各个方面,具体术语的解释提供如下:

[0097] 施用:通过任何有效途径向受试者提供或给予药剂,例如本文提供的一种或更多种化合物。示例性施用途包括但不限于口服途径、注射(例如皮下、肌内、皮内、腹膜内、静脉内、骨内、侧脑室内、鞘内和肿瘤内)途径、舌下途径、直肠途径、透皮途径、鼻内途径、阴道途径和吸入途径。

[0098] 脂族基:基本上基于烃的化合物或其自由基(例如, C_6H_{13} ,表示己烷自由基),包括烷烃、烯烃、炔烃,包括其环状(单环、双环和多环)版本,还包括直链和支链排列,以及所有立体和位置异构体。除非另有明确说明,脂族基基团含有1至25个碳原子;例如,1至15个、1至10个、1至6个,或1至4个碳原子。脂族基链可以是取代的或未取代的。除非明确称为“未取代的脂族基”,否则脂族基基团可以是未取代的或取代的。脂族基基团可被一个或更多个取代基取代(脂族基链中每个亚甲基碳至多两个取代基,或脂族基链中 $-C=C-$ 双键的每个碳至多一个取代基或末端次甲基基团的碳至多一个取代基)。取代的脂族基基团包括至少一个 sp^3 杂化碳或两个与双键结合的 sp^2 杂化碳或至少两个与三键结合的 sp 杂化碳。示例性取代基包括但不限于烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷基氨基、烷硫基、酰基、醛基、酰胺、氨基、氨基烷基、芳基、芳基烷基、羧基、氰基、环烷基、二烷基氨基、卤代基、卤代脂族基、杂脂族基、异芳基、杂环脂族基、羟基、氧代基、磺酰胺、巯基、硫代烷氧基或其他官能团。

[0099] 烷氧基:具有 $-OR$ 结构的自由基(或取代基),其中R是取代或未取代的脂族基基团。甲氧基($-OCH_3$)是示例性的烷氧基基团。在取代的烷氧基中,R是被非干扰取代基取代的烷

基。R可以是直链、支链、环状或它们组合(例如,环丙基甲氧基)。

[0100] 烷基:具有饱和碳链的烃自由基或取代基。所述链可以是环状的、支链的或非支链的。除非明确称为“未取代的烷基”,否则烷基基团可以是未取代的或取代的。烷基基团的实例(但不限于)包括甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基和癸基。术语低级烷基是指所述链包括1-10个碳原子。术语烯基和炔基分别指具有含有一个或更多个双键或三键的碳链的烃基团。

[0101] 烷基氨基:具有烷基取代基的氨基基团,例如-N(H)R或-N(R)R',其中R和R'是烷基基团,通过氮原子与分子其余部分结合。烷基部分可以是直链的、支链的或环状的。

[0102] 烷基芳基:烷基取代的芳基基团。

[0103] 氨基:化学官能团-N(R)R',其中R和R'独立地是氢、烷基、杂烷基、卤代烷基、脂族基、杂脂族基、芳基(例如任选取代的苯基或苄基)、杂芳基、烷基磺酰基或其他官能团。“伯氨基”基团是-NH₂。“单取代氨基”或“仲氨基”是指如上所述取代的自由基-N(H)R,包括例如甲基氨基、(1-甲基乙基)氨基、苯基氨基等。“二取代氨基”或“叔氨基”是指如上所述取代的自由基-N(R)R',包括例如二甲基氨基、甲基乙基氨基、二(1-甲基乙基)氨基等。

[0104] 氨基酸:同时含有碱性氨基基团(-NH₂)和酸性羧基基团(-COOH)的有机酸。作为蛋白质组成成分的25种氨基酸是 α -氨基酸,即-NH₂基团附接在-COOH基团旁边的碳原子上。如本文所用,术语氨基酸还涵盖D-氨基酸和非天然存在的氨基酸,例如诸如鸟氨酸和2,4-二氨基丁酸的氨基酸。

[0105] 氨基烷基:包括至少一个氨基取代基的烷基基团,其中通过所述烷基基团的碳原子与分子其余部分结合。烷基部分可以是直链的、支链的或环状的。

[0106] 芳基:除非另有规定,6至15个碳原子的单价芳香族碳环基团,具有单环(例如苯基)或多个稠环,其中至少一个环是芳香族的(例如喹啉、吡啶、苯并二噁茂、吡啶、嘧啶、吡唑、苯并吡唑、噻唑、异噻唑、噁唑、三唑等),条件是附接点通过芳基基团的芳香族部分的原子,并且附接点处的芳香族部分仅含有芳香族环中的碳。如果任何芳香族环部分含有杂原子,则所述基团为杂芳基,而不是芳基。芳基基团是单环的、双环的、三环的或四环的。除非明确称为“未取代的芳基”,否则芳基基团可以是未取代的或取代的。

[0107] 芳基烷基:芳基取代的烷基基团,例如苄基,其中通过所述烷基基团的碳原子与分子其余部分结合。

[0108] 氮杂烷基:包括氮杂原子的杂烷基基团。所述杂烷基基团可以是直链的、支链的或环状的。氮杂烷基基团通过所述氮杂原子附接到分子的其余部分。除非明确称为“未取代的氮杂烷基”,否则氮杂烷基基团可以是未取代的或取代的。

[0109] 衍生物:衍生自类似化合物的化合物,或可以想象由另一种化合物产生的化合物,例如,如果一个原子被另一个原子或原子团取代。后一种定义在有机化学中很常见。在生物化学中,这个词用于至少在理论上可以由前体化合物形成的化合物。

[0110] 解离常数(K_D):结合亲和力的量度。K_D是配体在平衡状态下占据靶标蛋白质一半结合位点的所述配体摩尔浓度。K_D越小表明结合亲和力越高。

[0111] DLK:双亮氨酸拉链携带激酶。

[0112] ESCC:食管鳞状细胞癌。

[0113] 赋形剂:生理惰性物质,用作药物组合物的添加剂。如本文所用,赋形剂可以掺入

药物组合物的颗粒内,或可以与药物组合物的颗粒进行物理混合。赋形剂可用于例如稀释活性药剂和/或改变药物组合物的性质。赋形剂的实例包括但不限于聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、生育酚聚乙二醇1000琥珀酸酯(也称为维生素E TPGS或TPGS)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、海藻糖、碳酸氢钠、甘氨酸、柠檬酸钠和乳糖。

[0114] 杂脂族基:脂族化合物或基团,链中具有至少一个碳原子和至少一个杂原子,即一个或更多个碳原子被非碳原子(通常是氮、氧、磷、硅或硫)取代。杂脂族化合物或基团可以是取代的或未取代的、支链的或未支链的、环状的或无环的,并且包括“杂环”、“杂环基”、“杂环脂族”或“杂环”基团。杂烷基是指烷基或环烷基自由基,在链中具有至少一个碳原子并含有至少一个杂原子,例如N、O、S或S(O)_n(其中n为1或2)。除非明确称为“未取代的脂族基”,否则脂族基团可以是未取代的或取代的。

[0115] 杂芳基:具有至少一个杂原子的芳香族化合物或基团,即环中的一个或更多个碳原子已被非碳原子(通常为氮、氧、磷、硅或硫)取代。除非明确称为“未取代的杂芳基”,否则杂芳基基团可以是未取代的或取代的。

[0116] 杂环:指作为与另一基团(尤其是其他有机基团)结合的取代基闭环化合物,或其自由基,其中环结构中至少一个原子是碳原子以外的原子,通常是氧、硫和/或氮原子。除非明确称为“未取代的杂环”,否则杂环基团可以是未取代的或取代的。

[0117] HNSCC:头颈部鳞状细胞癌。

[0118] IAP:凋亡蛋白抑制因子。包括cIAP—细胞IAP 1和xIAP—X连接IAP。

[0119] LSCC:肺鳞状细胞癌。

[0120] LZK:亮氨酸拉链携带激酶,例如,神经元损伤后和/或神经退行性疾病中的神经元变性调节因子。

[0121] MAP3K:丝裂原活化激酶

[0122] MDM2:鼠双微体2同源物

[0123] MLK:混合谱系激酶,是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族,通过p38丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和c-Jun氨基末端激酶(JNK)通路调节信号传导。MLK包括MLK1(MAP3K9)、MLK2(MAP3K10)、MLK3(MAP3K11)、DLK(MAP3K12)、LZK(MAP3K13)和ZAK1(MAP3K20)等。

[0124] 药学上可接受的:可被受试者摄入而不会对所述受试者产生严重不良毒理影响的物质。术语“药学可接受形式”是指任何药学可接受的衍生物或变体,例如立体异构体、立体异构体混合物、对映体、溶剂化物、水合物、同晶型体、多晶型体、假晶型体、中性形式、盐形式和前药药剂。

[0125] 药学上可接受的载体:用于本公开的药学上可接收的载体(媒介物)是常规的。Remington:The Science and Practice of Pharmacy,The University of the Sciences in Philadelphia,Editor,Lippincott,Williams,&Wilkins,Philadelphia,PA,21st Edition(2005)描述了适用于药物递送一种或更多种治疗组合物和其他药物药剂的组合物和配制物。一般来说,所述载体的性质将取决于所采用的特定施用模式。例如,肠胃外配制物通常包含可注射流体,所述可注射流体包括药学上和生理学上可接受的流体,例如水、生理盐水、平衡盐溶液、葡萄糖水溶液、甘油等作为媒介物。在一些实例中,所述药学上可接受的载体可以是无菌的,以适合施用至受试者(例如,通过胃肠外、肌肉或皮下注射)。除了生物中性载体外,待施用的药物组合物还可以含有少量的无毒辅助物质,例如润湿剂或乳化

剂、防腐剂和pH缓冲剂等,例如乙酸钠或山梨醇单月桂酸酯。在一些实例中,所述药学上可接受的载体是非天然存在的或合成的载体。所述载体也可以配制成单位剂型,所述单位剂型例如在丸剂、小瓶、瓶子或注射器中携带预先选择的治疗剂量的活性药剂。

[0126] 药学上可接受的盐:可作为药物使用的化合物的生物相容性盐,所述盐衍生自本领域公知的各种有机和无机反离子,并且包括仅作为示例的钠、钾、钙、镁、铵、四烷基铵等;当分子含有碱性官能团时,有机酸或无机酸的盐,例如盐酸盐、氢溴酸盐、酒石酸盐、甲磺酸盐、乙酸盐、马来酸盐、草酸盐等。药学上可接受的酸加成盐是那些保留游离碱的生物有效性,同时由在生物或其他方面不可取的酸伴侣(partner)形成的盐,例如无机酸如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等,以及有机酸如乙酸、三氟乙酸、丙酸、乙醇酸、丙酮酸、草酸、马来酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、苯磺酸(苯磺酸盐)、肉桂酸、扁桃酸、甲基磺酸、乙基磺酸、对甲苯磺酸、水杨酸等。药学上可接受的碱加成盐包括衍生自无机碱的加成盐,例如钠盐、钾盐、锂盐、铵盐、钙盐、镁盐、铁盐、锌盐、铜盐、锰盐、铝盐等。示例性的盐是铵盐、钾盐、钠盐、钙盐和镁盐。衍生自药学上可接受的有机无毒碱的盐包括但不限于伯胺盐、仲胺盐和叔胺盐,取代胺包括天然存在的取代胺、环胺和碱性离子交换树脂,例如异丙胺、三甲胺、二乙胺、三乙胺、三丙胺、乙醇胺、2-二甲氨基乙醇、2-二乙氨基乙醇、二环己基胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、咖啡因、普鲁卡因、海巴明、胆碱、甜菜碱、乙二胺、葡萄糖胺、甲基葡萄糖胺、可可碱、嘌呤、哌嗪、哌啶、N-乙基哌啶、多胺树脂等。示例性的有机碱是异丙胺、二乙胺、乙醇胺、三甲胺、二环己基胺、胆碱和咖啡因。(例如,参见,S.M.Berge, et al., "Pharmaceutical Salts," J.Pharm.Sci., 1977; 66:1-19, 通过引用并入本文。)

[0127] 立体异构体:异构体,具有相同的分子式和键合原子序列,但原子在空间中仅三维取向不同。

[0128] 受试者:接受治疗、观察或实验的动物(人类或非人类)。包括人类受试者和动物受试者,包括人类和非人类哺乳动物,如大鼠、小鼠、猫、狗、猪、马、牛和非人类灵长类动物。在某些方面,所述受试者患有癌症,例如头颈部鳞状细胞癌或肺鳞状细胞癌。

[0129] 取代基:因反应而取代分子中另一个原子的原子或原子团。术语“取代基”通常是指取代母体烃链或环上的一个氢原子或两个氢原子(如果所述取代基通过双键附接)的原子或原子团。术语“取代基”也可涵盖与所述分子有多个附接点的原子团,例如,所述取代基取代了母体烃链或环上的两个或更多个氢原子。在这种情况下,除非另有说明,否则所述取代基可以以任何空间取向附接到所述母体烃链和环上。示例性取代基包括,例如,烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷基氨基、烷硫基、酰基、醛基、酰胺基、氨基、氨基烷基、芳基、芳基烷基、芳基氨基、碳酸酯基(carbonate)、羧基、氰基、环烷基、二烷基氨基、卤代基、卤代脂族基(例如卤代烷基)、卤代烷氧基、杂脂族基、杂芳基、杂环脂族基、羟基、氧代基、磺酰胺、巯基、硫代基和硫代烷氧基基团。除非另有明确说明或上下文另有规定,否则取代基可以被进一步取代。

[0130] 取代的:基本化合物,例如芳基或脂族基化合物,或其自由基,与之偶联有一个或更多个取代基,每个取代基通常取代所述基本化合物上的氢原子。本领域普通技术人员将认识到,本文公开的化合物可以参照特定结构和与这些结构偶联的取代基来描述,并且除非另有明确说明或上下文另有规定,否则这些结构和/或取代基也可以被进一步取代。仅作为示例而非为了限制,取代的芳基化合物可以具有与芳基基础的闭环相偶联(例如与甲苯

偶联)的脂族基基团。再次仅作为示例而非为了限制,长链烃可以具有与其结合的羟基基团。

[0131] 互变异构体:有机化合物的结构异构体,仅在质子和电子的位置上有所不同,并且可以通过氢原子的迁移而相互转换。互变异构体通常在平衡状态下同时存在。

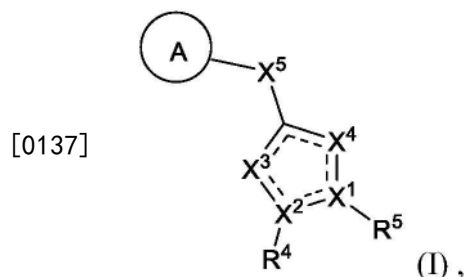
[0132] 治疗有效量或剂量:足以向受试者或给定百分比的受试者提供有益或治疗效果的数量。

[0133] 治疗(treating)或治疗(treatment):就疾病而言,任一术语包括(1)预防所述疾病,例如,使可能接触或易患所述疾病但尚未经历或表现出所述疾病症状的动物不出现所述疾病的临床症状,(2)抑制所述疾病,例如阻止所述疾病或其临床症状的出现,或(3)减轻所述疾病,例如引起所述疾病或其临床症状消退。

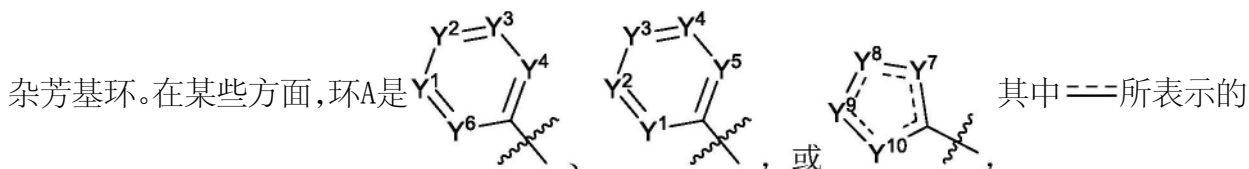
[0134] ZAK:拉链无菌- α 基序激酶

[0135] II.混合谱系激酶抑制剂

[0136] 所公开的混合谱系激酶(MLK)抑制剂包括具有通式I的化合物或其立体异构体、互变异构体或药学上可接受的盐:



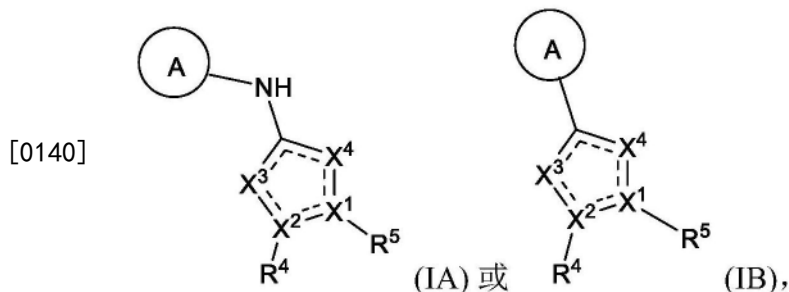
[0138] 其中==所表示的每个键是满足化学价要求所需的单键或双键。环A是单环或双环



每个键是满足化学价要求所需的单键或双键。 $-X^1(R^5)-$ 部分是 $-C(R^5)-$ 、 $-C(R^5)-C(H)-$ 、 $-C(H)-C(R^5)-$ 、 $-C(R^5)-N-$ 、 $-N-C(R^5)-$ 、或 $-N(R^5)-$ 。 X^2 是N或C。 X^3 是N或C(H)。 X^1-X^3 中的一个或两个包含N。 X^4 是C(H)或S。 X^5 是 $-N(H)-$ 或不存在。 Y^1 是C(R^1)或N。 Y^2 是C(R^2)或N。 Y^3 是C(R^3)或N。 Y^4 是N或C(R^6)。 Y^5 是C(R^7)或N。 Y^6 是C(R^8)或N。 Y^1-Y^6 中的一个或两个是N。如果 Y^1-Y^6 中的两个是N,则氮可以不直接彼此紧邻。 Y^1-Y^3 中的至少一个或 Y^6 不是C(H)。 Y^7-Y^{10} 中的两个、三个或四个独立地是N或N(R^9),并且 Y^7-Y^{10} 中的其他为C(R^{10});氮原子可以彼此紧邻或被至少一个碳原子分隔开。在一些方面中, Y^7-Y^{10} 中的两个独立地是N或N(R^9),并且 Y^7-Y^{10} 中的另外两个为C(R^{10})。 R^1 是氰基、全卤代烷基、H、烷基或全卤代烷氧基。 R^2 为H、烷氧基、全卤代烷基、全卤代烷氧基、卤代烷氧基、卤代烷基、氰基、烷基、氰基烷基、氨基、杂芳基烷氧基、杂烷基、酰胺基、卤代基、烯基或卤代烯基,或 R^1 和 R^2 与它们所附接的原子一起形成5元或6元芳基环或杂芳基环。 R^3 为H、氨基、烷基氨基、氨基烷基、烷氧基或 $-N(H)C(O)R'$,其中 R' 为烷基,或 R^2 和 R^3 与它们所附接的原子一起形成5元或6元芳基环或杂芳基环。 R^4 是脂族基、氮杂烷基、芳基或氨基。 R^5 是脂族基、杂脂族基或烷基氨基。 R^6 和 R^7 独立地是H、烷基、烷氧基、全卤代烷基、全卤代烷氧基或氰基。 R^8 为H、烷基、烷氧基、全卤代烷基、全卤代烷氧基或氰基,或 R^8 和 R^1 与它们

所附接的原子一起形成5元或6元芳基环或杂芳基环。每个 R^9 独立地是H或烷基。每个 R^{10} 独立地是H、烷基或氰基。在前述或以下任一方面中,卤素可以是氟。在任一前述或以下实施方式中,除非另有说明或上下文另有指示,否则每个取代基可以是取代的或未被取代的(例如,氰基基团是未被取代的)。

[0139] 在一些方面,所述化合物具有通式IA或IB:

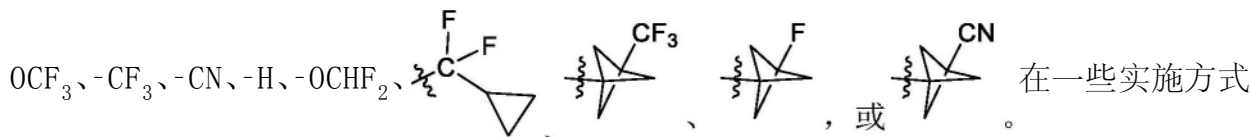


[0141] 其中 --- 所表示的每个键是满足化学价要求所需的单键或双键。

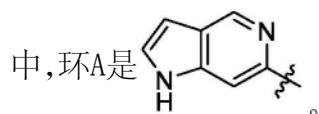
[0142] 在前述或以下任一方面中, Y^4 可以是N。在一些方面中, Y^1 和 Y^4 是N。在前述或以下任一方面中, Y^1 - Y^3 中的至少一个或 Y^6 可以不是C(H)。

[0143] R^1 是氰基、全卤代烷基、H、烷基或全卤代烷氧基。示例性 R^1 基团包括但不限于氰基、-H、-OCF₃或-CF₃。在特定实施方式中, R^1 是氰基、-H或-OCF₃。

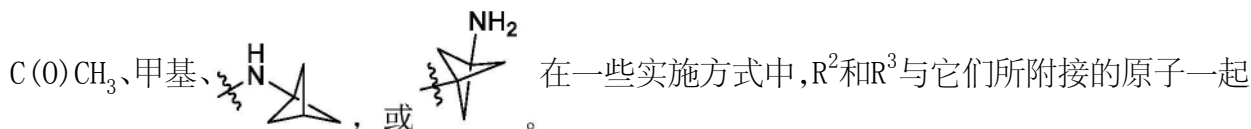
[0144] R^2 为H、烷氧基、全卤代烷基、全卤代烷氧基、卤代烷氧基、卤代烷基、氰基烷基、烷基、氰基、氨基、杂芳基烷氧基、杂烷基、酰胺基、卤代基、烯基或卤代烯基,或 R^1 和 R^2 与它们所附接的原子一起形成5元或6元芳基环或杂芳基环。在一些方面, R^2 的烷基或烷氧基部分为C₁-C₆烷基或烷氧基。例如, R^2 可以是甲氧基、氟代甲氧基或三氟甲氧基。在一些实施方式中, R^2 烷基部分的至少一部分是环烷基,例如环丙基或双环[1.1.1]戊基。所述烷基或烷氧基部分可以被卤化。在某些实施方式中, R^2 是氟化的。示例性 R^2 基团包括但不限于-CH₃、-OCH₃、-



R^1 和 R^2 与它们所附接的原子一起形成5元或6元芳基环或杂芳基环。在一个非限制性实例

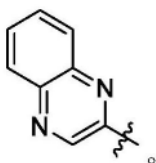


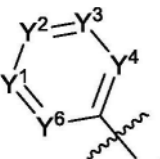
[0145] R^3 是H、氨基、烷基氨基、氨基烷基、烷氧基或-N(H)C(O)R',其中R'是烷基,或 R^2 和 R^3 与它们所附接的原子一起形成5元或6元芳基环或杂芳基环。在某些方面, R^3 是H、-NH₂、-N(H)

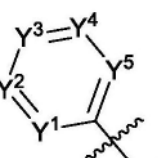


形成5元或6元芳基环或杂芳基环。在一个实例中,环A是

[0146]



[0147] 在一些方面中,环A是  其中Y¹是C(H)或N, Y²是C(R²), Y³是C(R³), Y⁴是N,

并且Y⁶是C(H)。在某些方面中, Y¹和Y⁴是N。在一些方面中,环A是  其中Y¹是C(H)

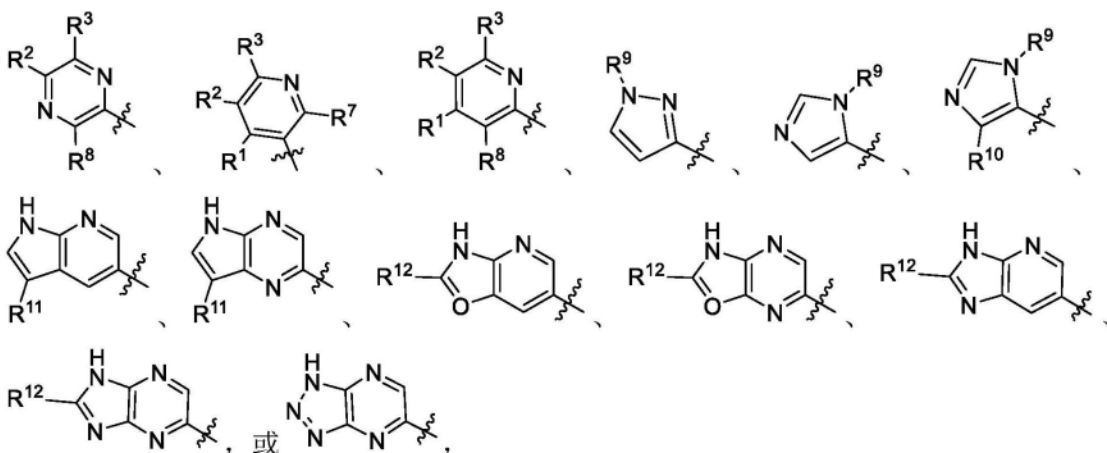
或N, Y²是C(R²), Y³是C(R³), Y⁴是N, 并且Y⁵为C(H)。在一些实施方式中, R²是烷基、H、烷氧基、全卤代烷基、全卤代烷氧基、卤代烷氧基、卤代烷基、氰基或氰基烷基, 并且R³是H、氨基、烷基氨基或氨基烷基。在具体的实例中, 卤素是氟。

[0148] R⁶-R⁸独立地是H、烷基、烷氧基、全卤代烷基、全卤代烷氧基或氰基。在一些方面, R⁶-R⁸是H、甲基、-OCH₃、-CF₃、-OCF₃或-CN。在某些实施方式中, R⁶-R⁸是H。在一些实施方式中, Y⁴是N, 因此R⁶不存在。环A通过Y⁵或Y⁶与所述化合物的其余部分结合。因此, R⁷或R⁸将不存在。

[0149] 每个R⁹独立地是H或烷基。在一些方面, 每个R⁹独立地是H或甲基。每个R¹⁰独立地是H、烷基或氰基。在一些实施方式中, R¹⁰独立地是H、甲基或氰基。

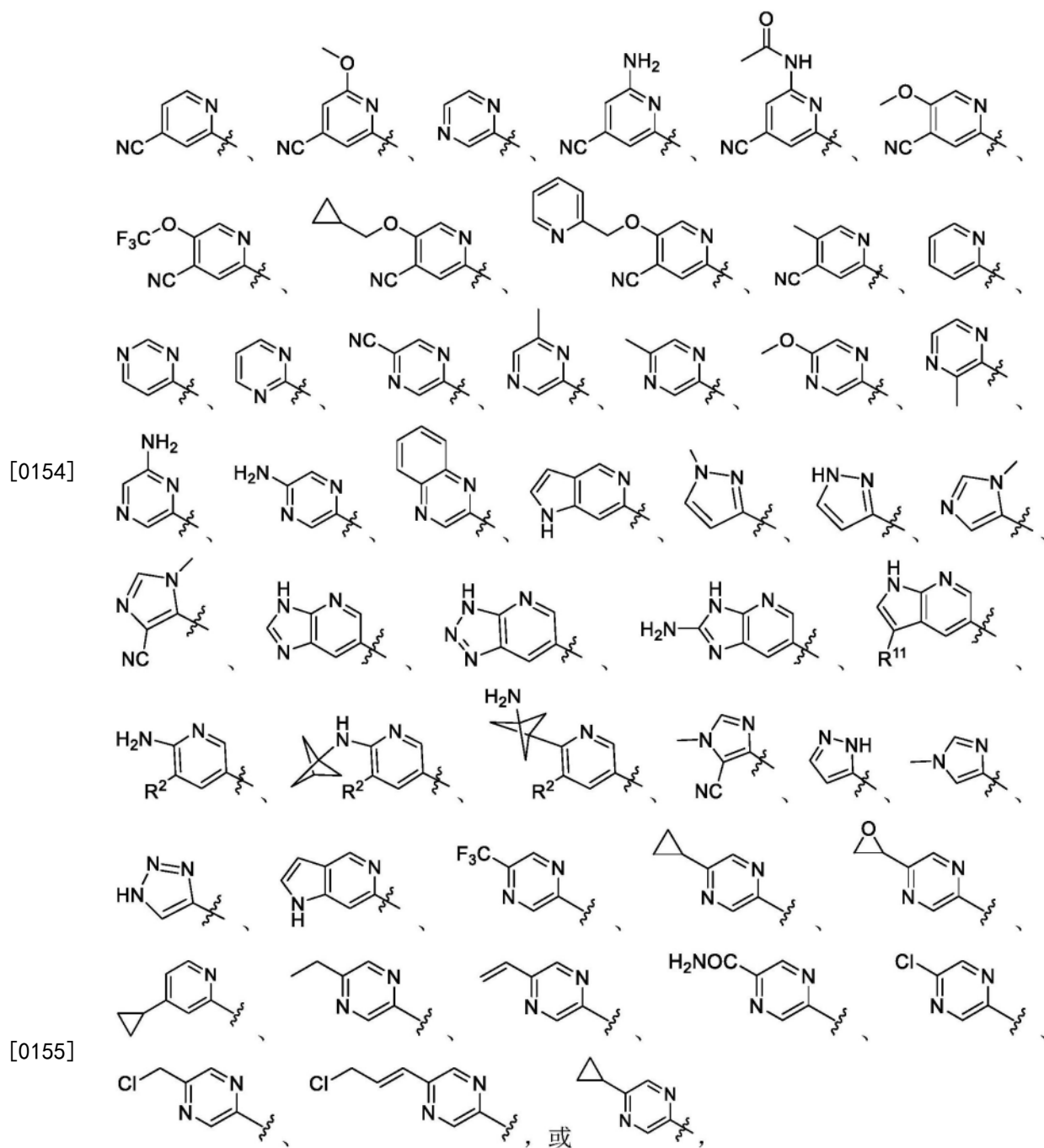
[0150] 在前述或以下任一方面中, 除非另有说明, 所述脂族基、杂脂族基或氮杂烷基基团可以是直链的、支链的、环状的或它们的任意组合。在某些方面, 环A是:

[0151]



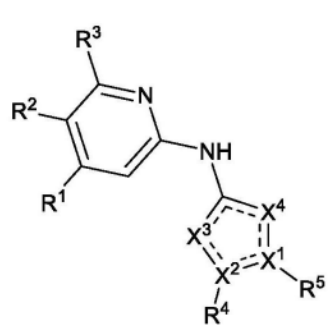
[0152] 其中R¹¹和R¹²是H、烷基、全卤代烷基、烷氧基、全卤代烷氧基、氰基或氨基。

[0153] 在某些实例中, 环A是:

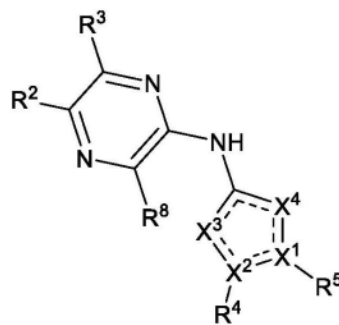


[0156] 其中 R^2 为 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CN}$ 或 $-\text{H}$ ，并且 R^{11} 为 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{CN}$ 或 $-\text{H}$ 。

[0157] 在一些实施方式中，所述化合物具有根据式IC、ID、IE或IF的结构：

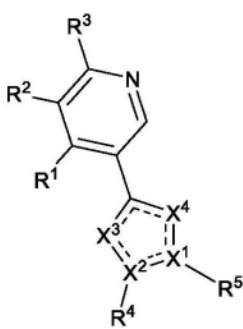


(IC) 、

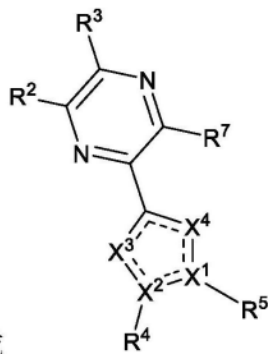


(ID) 、

[0158]



(IE), 或



(IF)。

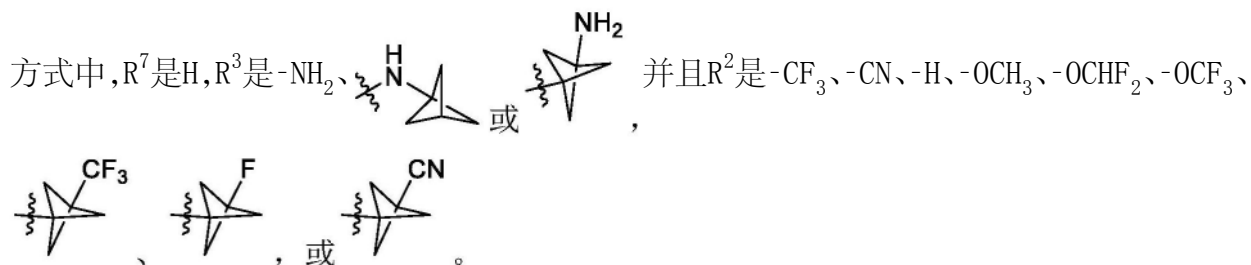
[0159] 在前述或以下任一方面中, $-X^1(R^5)-$ 是 $-C(R^5)-$ 、 $-C(R^5)-C(H)-$ 、 $-C(H)-C(R^5)-$ 、 $-C(R^5)-N-$ 、 $-N-C(R^5)-$ 、或 $-N(R^5)-$ 。在一些方面中, $-X^1(R^5)-$ 是 $-C(H)-C(R^5)-$ 。

[0160] 在一些方面, 所述化合物具有式 IC, R^1 是氰基或全卤代烷基, 并且 R^2 和 R^3 是 H。 R^1 可以是氰基或三氟甲基。在某些方面, R^1 是氰基。在某些实施方式中, 所述化合物具有式 IC, R^1 为 H, 并且 R^1 和 R^2 与它们所结合的原子一起形成 5 元或 6 元芳基环或杂芳基环。

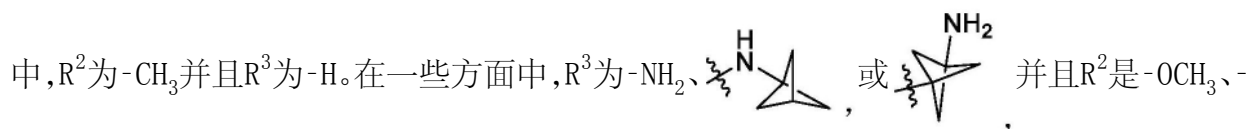
[0161] 在一些方面, 所述化合物具有式 ID, R^3 是 H, R^2 不是 H, 在一些方面, 所述化合物具有式 ID, 并且 R^2 和 R^3 不是 H。在一些方面, 所述化合物具有式 ID, R^2 是 H, 并且 R^3 不是 H。在某些实施方式中, 所述化合物具有式 ID, 并且 R^2 和 R^3 与它们所结合的原子一起形成 5 元或 6 元芳基环或杂芳基环。

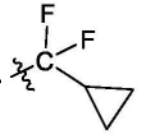
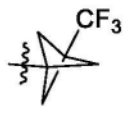
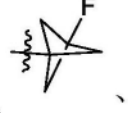
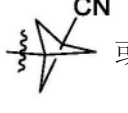
[0162] 在一些方面, 所述化合物具有式 IE, R^2 为 H、烷基、烷氧基、氨基或氰基, R^3 为 H、氨基或烷基, 并且 R^8 为 H 或烷基。在一些实例中, 所述烷基或烷氧基分别为甲基或甲氧基。

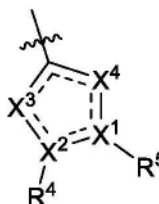
[0163] 在一些方面, 所述化合物具有式 IF, R^2 是卤代烷基、全卤代烷基、烷氧基、卤代烷氧基、全卤代烷氧基、氰基或 H, R^3 是氨基、氨基烷基或烷基氨基, 并且 R^7 是 H 或烷基。在某些实施

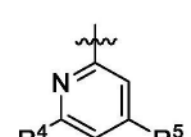
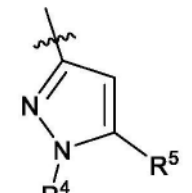
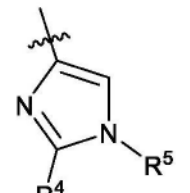
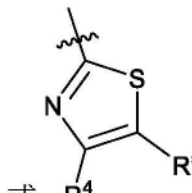


[0164] 在任意前述或以下实施方案中, R^3 可以是 H、氨基、氨基烷基或烷基氨基, 并且 R^2 可以是烷基、烷氧基、卤代烷氧基、全卤代烷氧基、全卤代烷基、卤代烷基或氰基。在某些实例



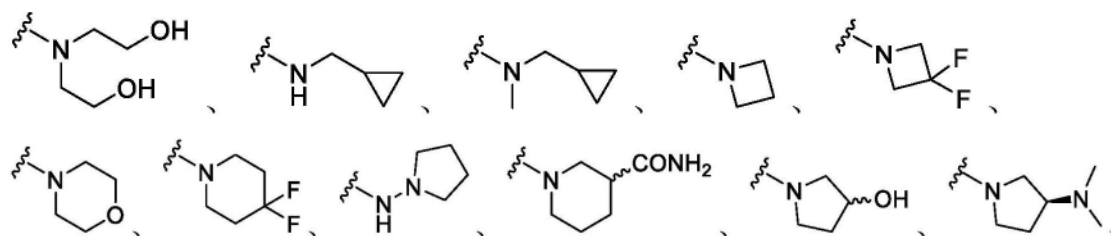
OCF_3 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、、、、 或 H。在某些实例中， R^2 是 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_3$ ，或 $-\text{CN}$ 。

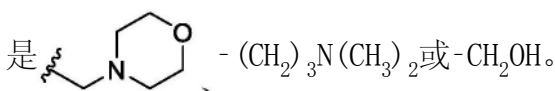
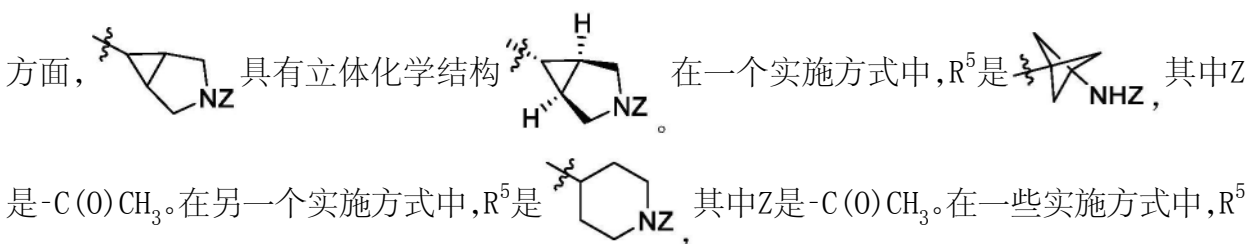
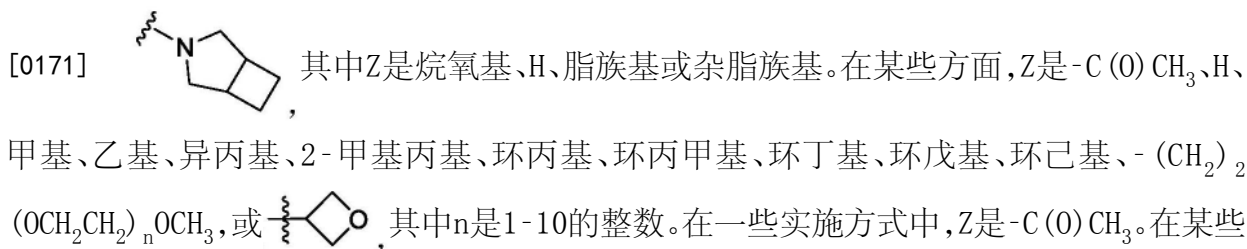
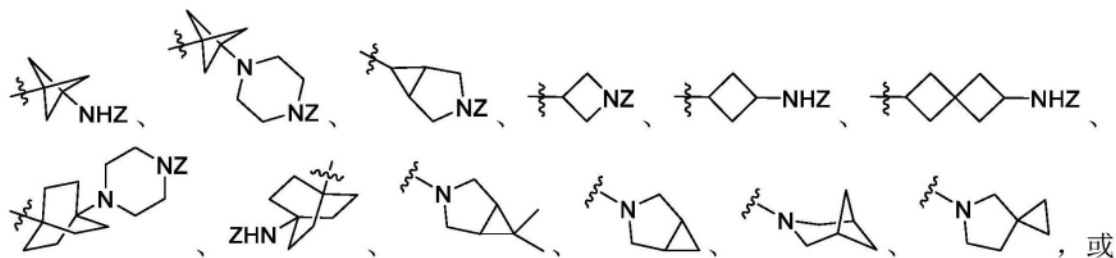
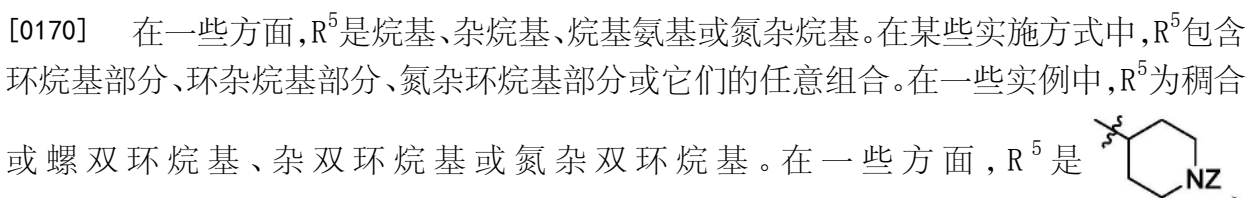
[0165] 在前述或以下任一方面中， 可以是：

[0166] 、、，或 ，

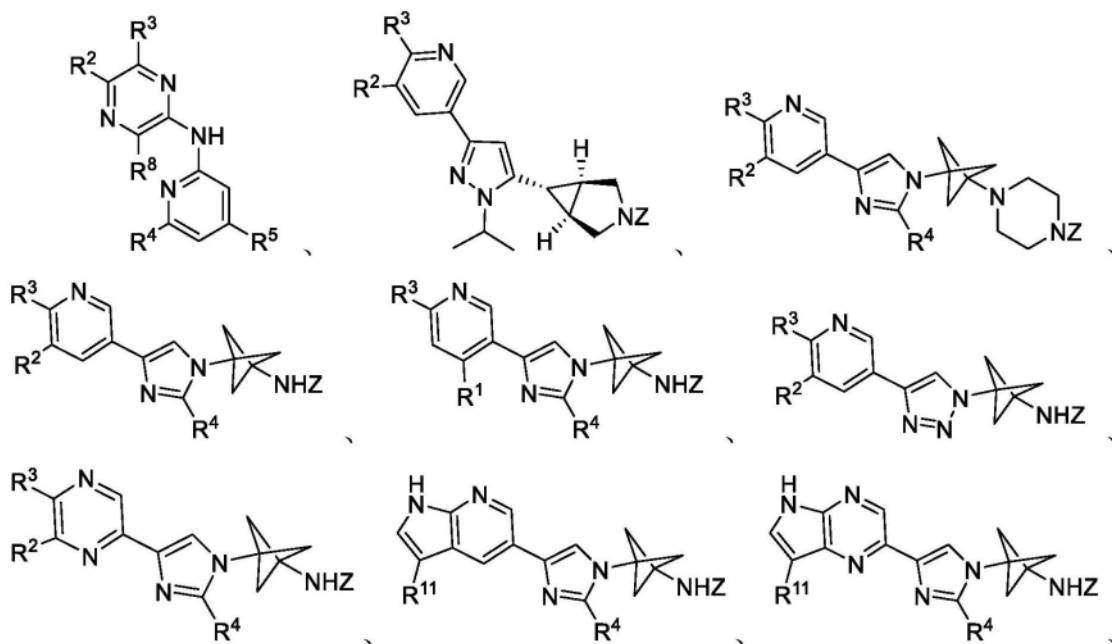
[0167] 其中 R^4 是脂族基、氮杂烷基、芳基或氨基。 R^5 是脂族基、杂脂族基、氨基烷基或烷基氨基。

[0168] 在一些方面， R^4 是 C_1 - C_5 烷基、氮杂环烷基、杂环烷基或 $-\text{N}(\text{R})\text{R}'$ ，其中 R 和 R' 独立地是氢、烷基或杂烷基。在一些实施方式中，所述氮杂环烷基或杂环烷基是稠合或螺-氮杂双环烷基或杂双环烷基。例如，所述氮杂双环烷基可以是氮杂双环[3.2.0]庚烷-3-基或氮杂双环[3.1.0]己烷-3-基。在某些实施方式中， R^4 是 3,3-二氟-1-吡咯烷基、异丙基、2-甲基丙基、环丙甲基或 $-\text{C}(\text{H})(\text{OH})-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、环丙基、、 $-\text{N}(\text{H})(\text{CH}_2)_4\text{OH}$ 、 $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ 、

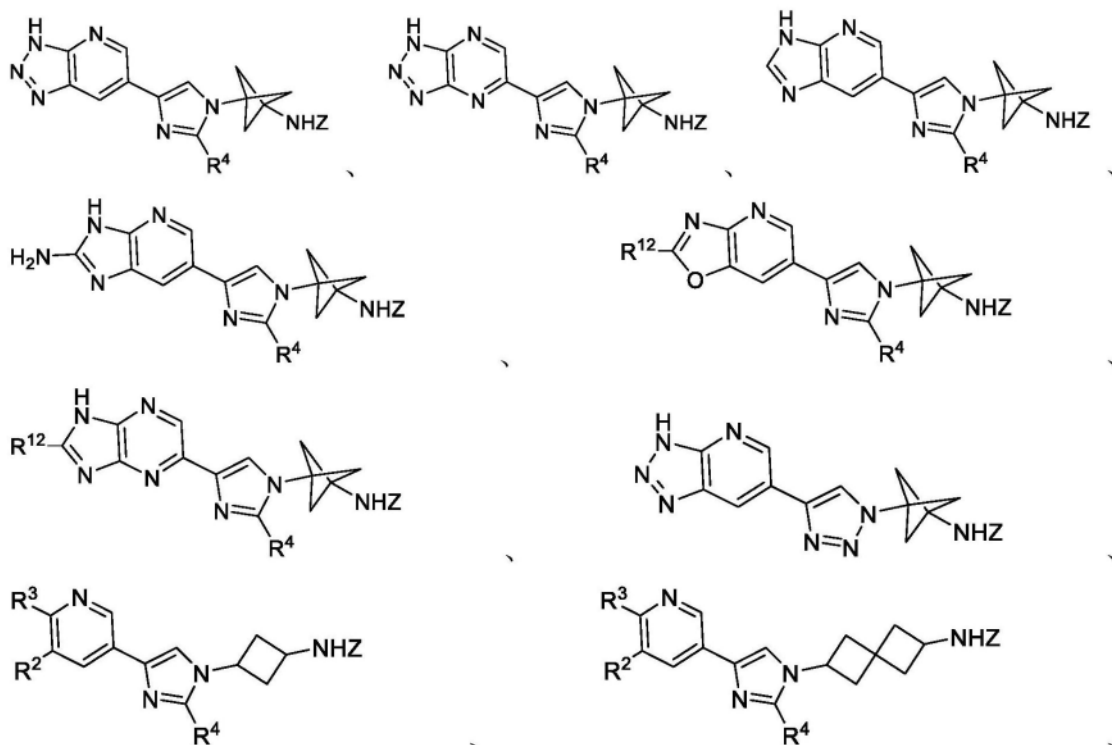




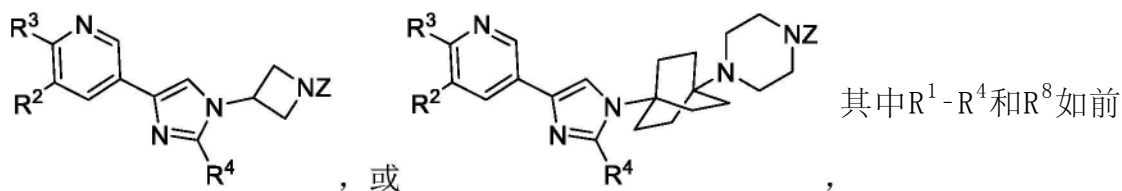
[0172] 在某些方面,所述化合物是:



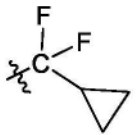
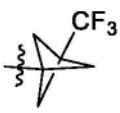
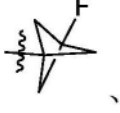
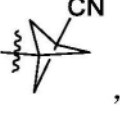
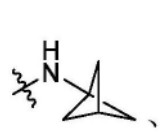
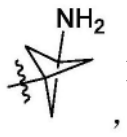
[0173]



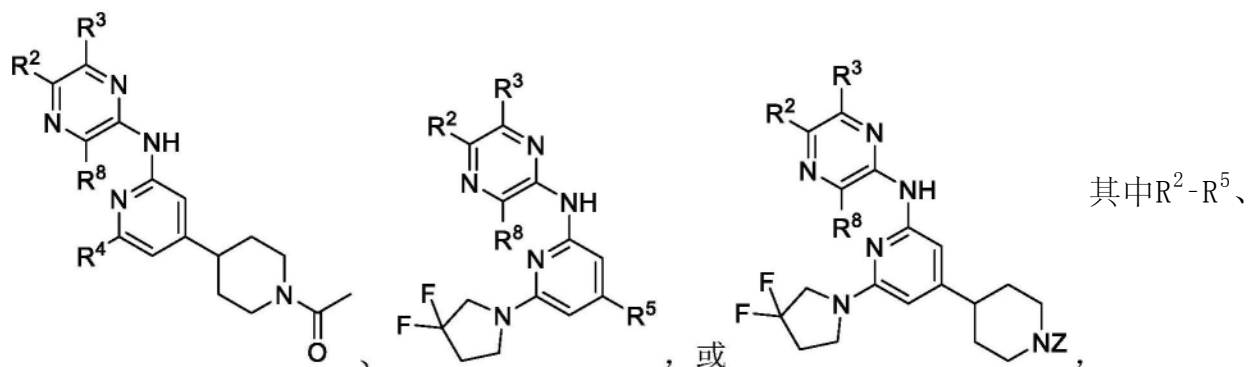
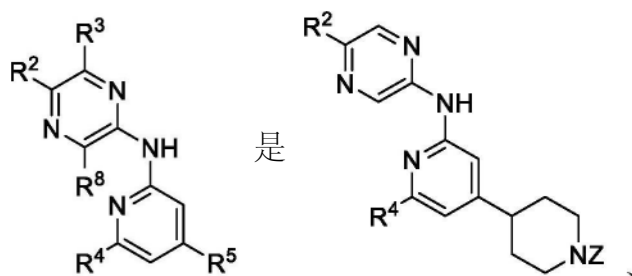
[0174]



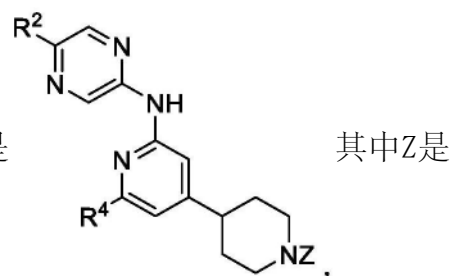
所定义的,并且R¹¹和R¹²是H、烷基、全卤代烷基、烷氧基、全卤代烷氧基或氰基。在一些方面, R⁴是异丙基、-C(H)(OH)-C(CH₃)₂、环丙基或 。在某些实施方式中,R¹是-CN或-CF₃;R²

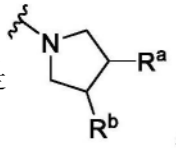
是 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、、、、，或 H ； R^3 是 $-\text{NH}_2$ 、、，或 H ； R^8 是 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{CH}_3$ 或 H ； R^{11} 和 R^{12} 独立地是 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{H}$ 、 $-\text{OCH}_3$ 或 $-\text{OCF}_3$ 。

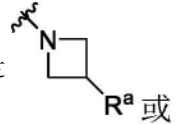
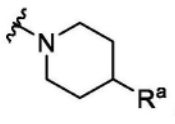
[0175] 在某些方面，所述化合物



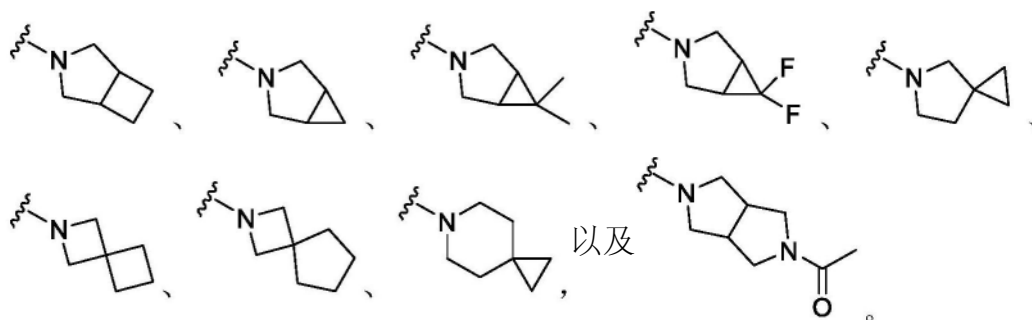
R^8 和 Z 如前所定义的。在特定的实施方式中，所述化合物是



脂族基；并且 R^4 是 ，其中 R^a 和 R^b 与它们所结合的原子一起形成稠合的环脂族基环

或杂环脂族基环，或 R^a 是环脂族基且 R^b 是 $-\text{H}$ ，或 R^4 是  或 ，其中 R^a 是环脂族基或杂环脂族基。

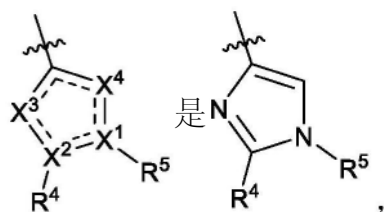
在一些实施方式中， R^2 是烷基，例如甲基。示例性的环脂族基和杂环脂族基 R^4 基团包括但不限于稠合和螺氮杂双环脂族基基团，例如



[0176] 在一些方面中,如果环A是 且 R^5 是 或 则 (i) X^5

为N(H),或(ii) R^3 是H、氨基烷基、烷氧基、 或 $R'C(O)N(H)-$, 其中 R' 是烷基,或(iii) R^2 是烷氧基、氰基烷基、氨基或杂芳基烷氧基,或(iv) R^1 和 R^7 中的一个不是-H,或(v) X^1-X^4 中仅有一个包含N,或(vi) X^3 是C(H),或(vii) X^4 是S,或(vi) $-X^1(R^5)-$ 是 $-C(R^5)-C(H)-$ 、 $-C(H)-C(R^5)-$ 、 $-C(R^5)-N-$ 、或 $-N-C(R^5)-$,或(viii) R^1 和 R^2 与它们所附接的原子一起形成5元或6元芳基环或杂芳基环。

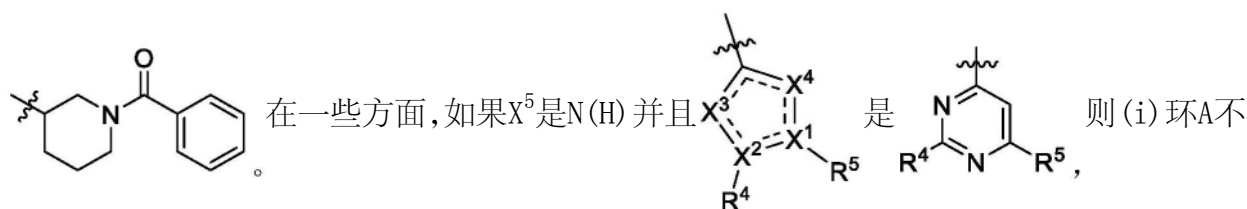
[0177] 在一些方面中,如果环A是 其中 R^3 是氨基或烷基氨基并且



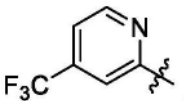
则 (i) X^5 是N(H),或(ii) R^1 是氰基、全卤代烷基或全卤代烷氧基,

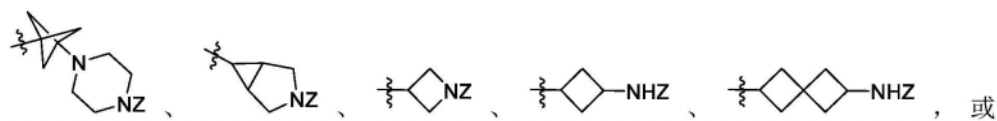
或(iii) R^2 是氰基、氰基烷基、氨基或杂烷基烷氧基,或(iv) R^7 是全卤代烷基、全卤代烷氧基或氰基,或(v) R^4 是芳基,或(vi) R^1 和 R^2 与它们所附接的原子一起形成5元或6元芳基环或杂芳基环,或(viii) R^2 和 R^3 与它们所附接的原子一起形成5元或6元芳基环或杂芳基环。

[0178] 在一些方面中,如果 X^5 是N(H) 并且 是 则 R^5 不是

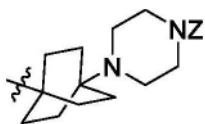


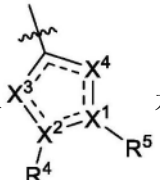
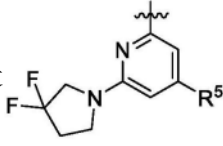
在一些方面,如果 X^5 是N(H) 并且 是 则 (i) 环A不

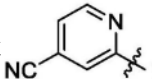
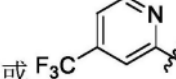
是  或 (ii) R^4 不是甲基或氮杂环烷基, 或 (iii) R^5 是  NHZ、

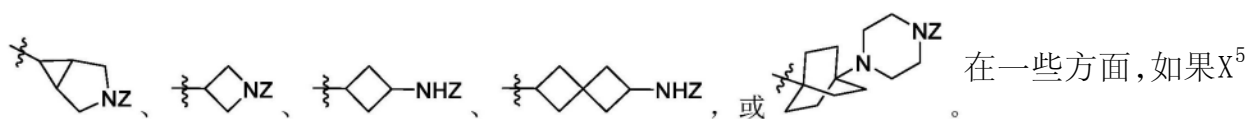


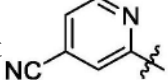
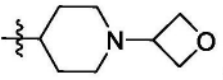
[0179]



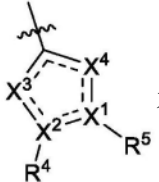
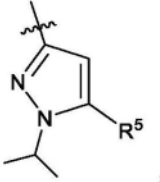
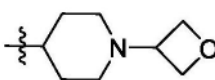
在一些方面中, 如果 X^5 是 N(H) 并且  是 ,

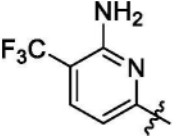
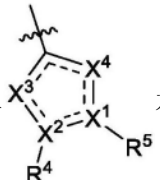
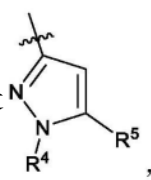
则 (i) 环 A 不是  或 , 或 (ii) R^5 是 、、

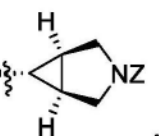
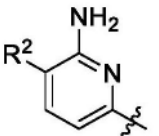


是 N(H), 并且环 A 是 , 则 R^5 不是 .

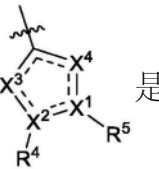
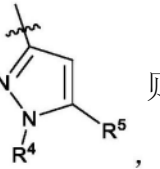
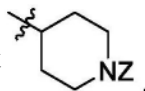
[0180]

在一些方面, 如果 X^5 不存在并且  是 , 则 R^5 是 ,

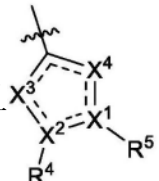
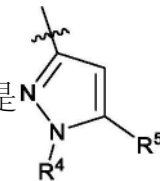
或环 A 不是  在一些方面中, 如果 X^5 不存在并且  是 , 则 (i)

R^5 不是 , 或 (ii) 环 A 不是 .

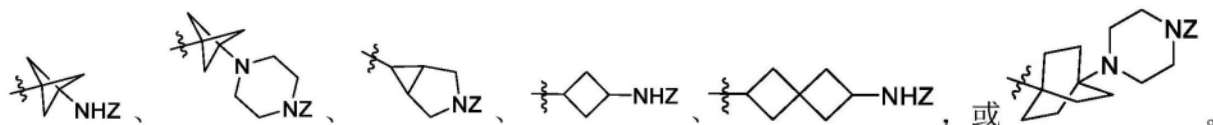
[0181]

在一些方面中, 如果 X^5 是 N(H) 并且  是 , 则 (i) R^5 不是 ,

或 (ii) Y^4 不是 N, 或 (iii) R^2 不是 -H、-CN 或 -CF₃, 或 (iv) R^1 不是 -H、-CN 或 -CF₃。在一些方面, 如

果 X^5 是 N(H) 并且  是 , 则 (i) R^4 不是环烷基或杂环烷基, 或 (ii) Y^4 不是 N,

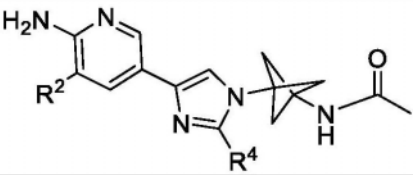
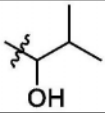
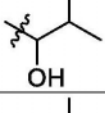
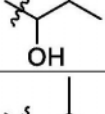
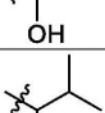
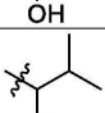
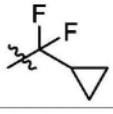
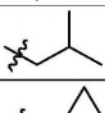
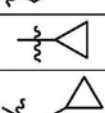
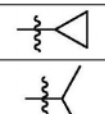
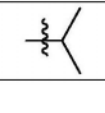
或 (iii) R^1 不是 $-\text{CN}$, 或 (iv) R^2 、 R^3 和 R^8 中的一个不是 H , 或 (v) R^5 是烷基、



在一些方面中, 如果环A是 并且 X^5 是 $\text{N}(\text{H})$, 则 R^5 不是 。

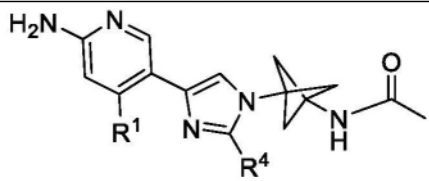
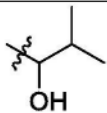
[0182] 示例性MLK抑制剂包括表1-17中所示的化合物, 以及所述化合物的其他立体异构体、互变异构体及药学上可接受的盐。

[0183] 表1

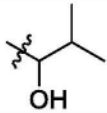
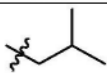
		
化合物	R^2	R^4
1	$-\text{CF}_3$	
2	$-\text{CN}$	
3	$-\text{H}$	
4	$-\text{OCH}_3$	
5	$-\text{OCHF}_2$	
6		
7	$-\text{OCF}_3$	
8	$-\text{OCF}_3$	
9	$-\text{OCF}_3$	
10	$-\text{CF}_3$	
11	$-\text{CF}_3$	
12	$-\text{OCF}_3$	
13	$-\text{CF}_3$	

[0185] 表2

[0186]

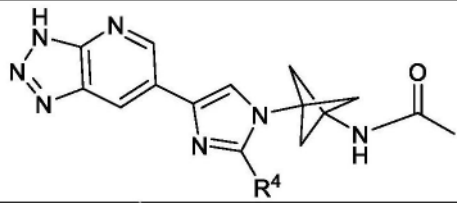
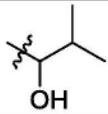
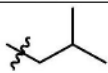
		
化合物	R ¹	R ⁴
14	-OCF ₃	

[0187]

15	-CN	
16	-CN	

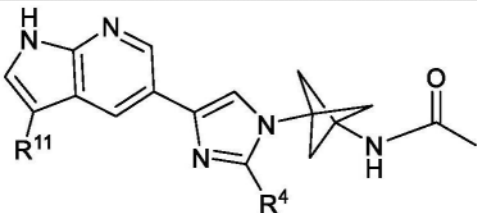
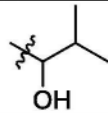
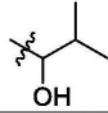
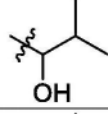
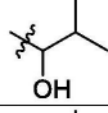
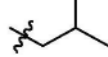
[0188] 表3

[0189]

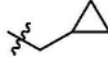
	
化合物	R ⁴
17	
18	
19	
20	
21	

[0190] 表4

[0191]

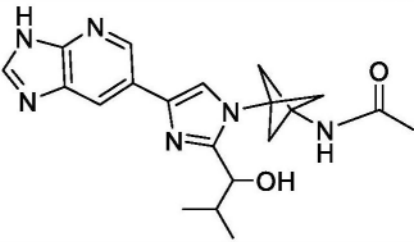
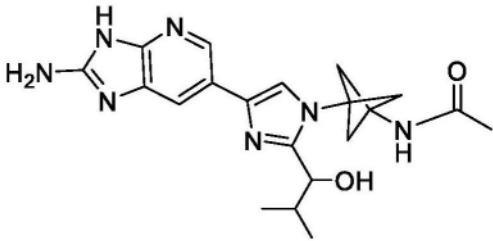
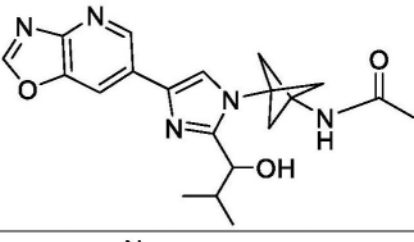
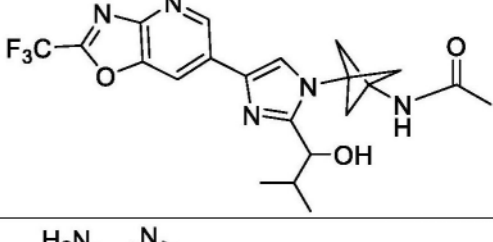
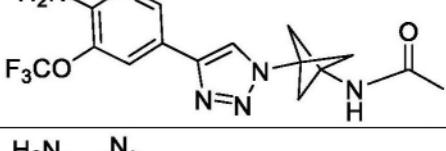
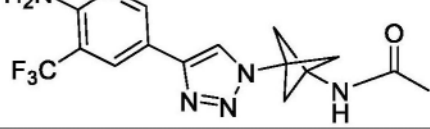
		
化合物	R ¹¹	R ⁴
22	-CF ₃	
23	-CN	
24	-H	
25	-OCH ₃	
26	-OCF ₃	
27	-OCF ₃	

[0192]

28	-OCF ₃	
29	-CF ₃	
30	-CF ₃	
31	-OCF ₃	
32	-CF ₃	

[0193] 表5

[0194]

化合物	
33	
34	
35	
36	
37	
38	

[0195]

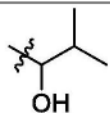
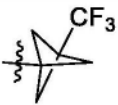
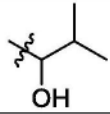
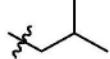
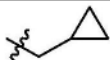
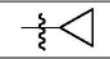
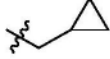
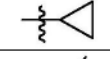
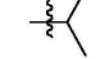
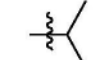
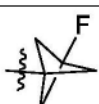
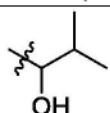
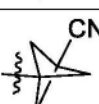
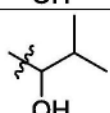
39	
40	
41	
42	
43	

[0196] 表6

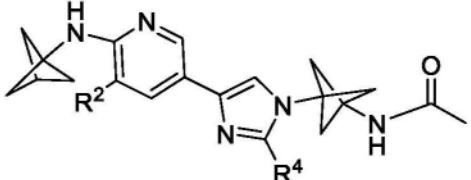
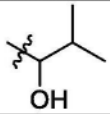
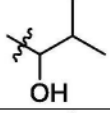
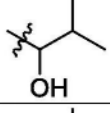
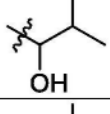
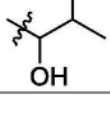
化合物	R ²	R ⁴
44	-CF ₃	
45	-CN	
46	-H	
47	-OCH ₃	

[0197]

[0198]

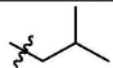
48	-OCHF ₂	
49		
50	-OCF ₃	
51	-OCF ₃	
52	-OCF ₃	
53	-CF ₃	
54	-CF ₃	
55	-OCF ₃	
56	-CF ₃	
57		
58		

[0199] 表7

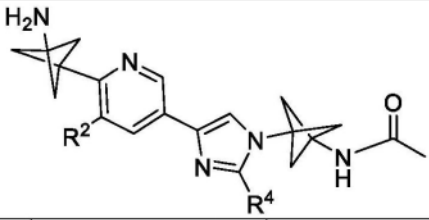
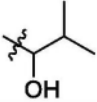
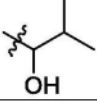
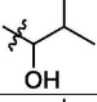
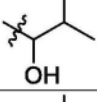
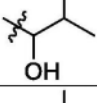
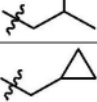
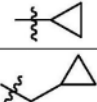
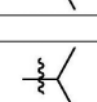
		
化合物	R ²	R ⁴
59	-CF ₃	
60	-CN	
61	-H	
62	-OCH ₃	
63	-OCHF ₂	

[0200]

[0201]

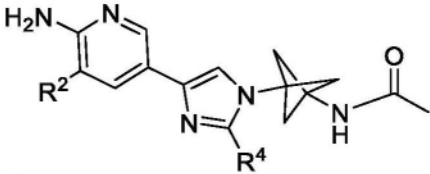
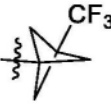
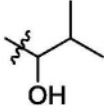
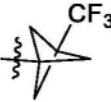
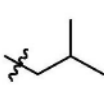
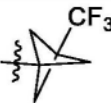
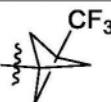
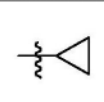
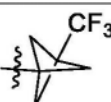
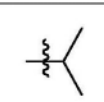
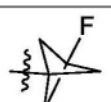
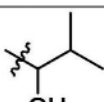
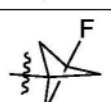
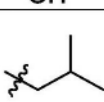
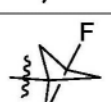
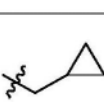
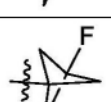
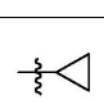
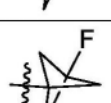
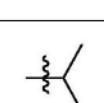
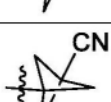
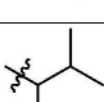
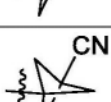
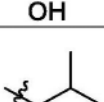
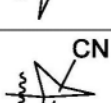
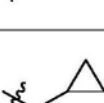
64	-OCF ₃	
65	-OCF ₃	
66	-OCF ₃	
67	-CF ₃	
68	-CF ₃	
69	-OCF ₃	
70	-CF ₃	

[0202] 表8

		
化合物	R ²	R ⁴
71	-CF ₃	
72	-CN	
73	-H	
74	-OCH ₃	
75	-OCHF ₂	
76	-OCF ₃	
77	-OCF ₃	
78	-OCF ₃	
79	-CF ₃	
80	-CF ₃	
81	-OCF ₃	
82	-CF ₃	

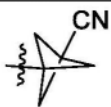
[0204]

[0205] 表9

		
化合物	R ²	R ⁴
83		
84		
85		
86		
87		
88		
89		
90		
91		
92		
93		
94		
95		

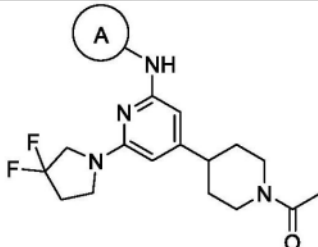
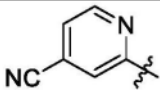
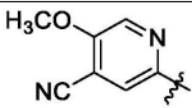
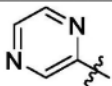
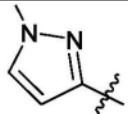
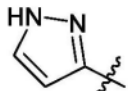
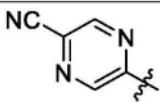
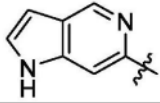
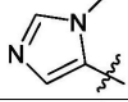
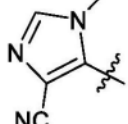
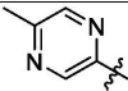
[0206]

[0207]

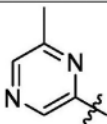
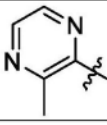
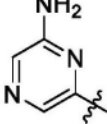
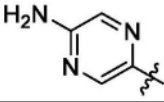
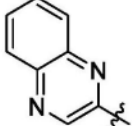
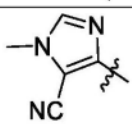
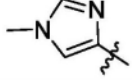
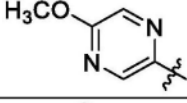
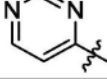
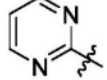
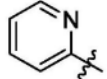
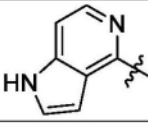
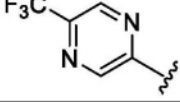
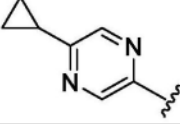
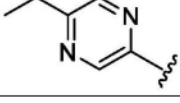
96		
97		

[0208] 表10

[0209]

	
化合物	环 A
98	
99	
100	
101	
102	
103	
104	
105	
106	
107	

[0210]

108	
109	
110	
111	
112	
113	
114	
115	
116	
117	
118	
119	
149	
150	
151	

[0211]

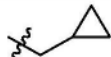
152	
153	
154	
155	
157	
158	
159	

[0212] 表11

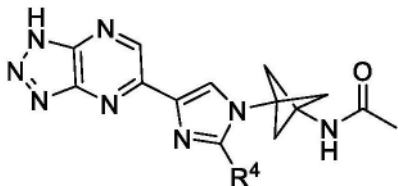
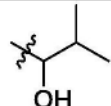
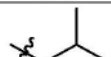
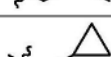
化合物	R ⁴	R ¹¹
120		-CF ₃
121		-CN
122		-H
123		-OCH ₃
124		-OCHF ₂
125		-OCF ₃
126		-OCF ₃

[0213]

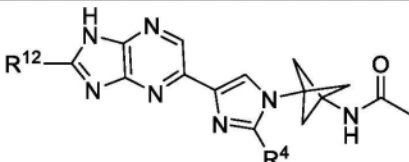
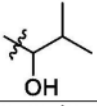
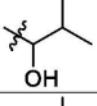
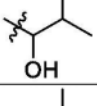
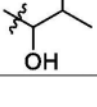
[0214]

127		-OCF ₃
128		-CF ₃
129		-CF ₃
130		-OCF ₃
131		-CF ₃

[0215] 表12

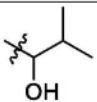
	
化合物	R ⁴
132	
133	
134	
135	
136	

[0217] 表13

		
化合物	R ⁴	R ¹²
137		-CF ₃
138		-CN
139		-H
140		-OCH ₃

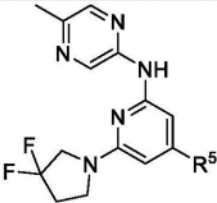
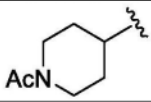
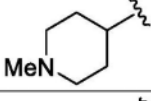
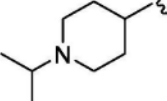
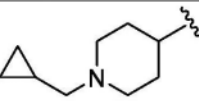
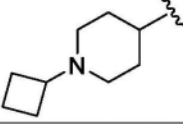
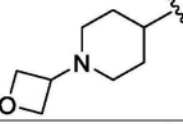
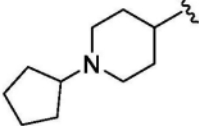
[0218]

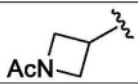
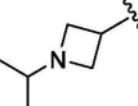
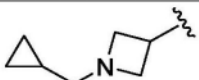
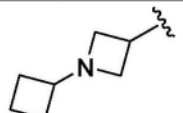
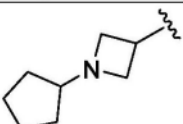
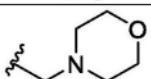
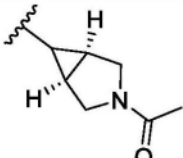
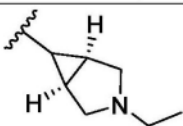
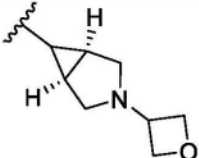
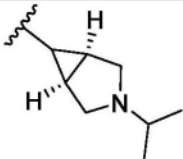
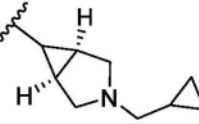
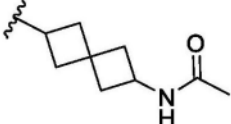
[0219]

141		-OCHF ₂
142		-OCF ₃
143		-OCF ₃
144		-OCF ₃
145		-CF ₃
146		-CF ₃
147		-OCF ₃
148		-CF ₃

[0220] 表14

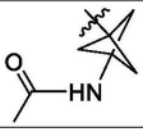
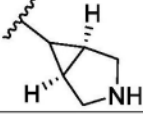
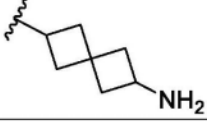
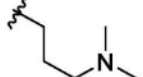
[0221]

	
化合物	R ⁵
107	
159	
160	
161	
162	
163	
164	

165	
166	
167	
168	
169	
170	-CH ₃
171	-CF ₃
172	
173	
174	
175	
176	
177	
178	
179	

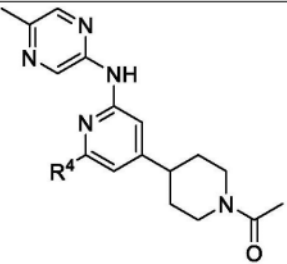
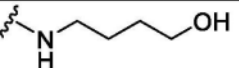
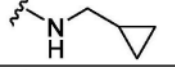
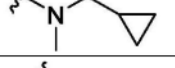
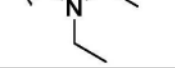
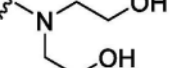
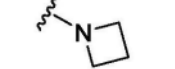
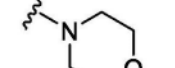
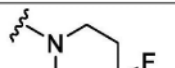
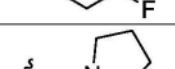
[0222]

[0223]

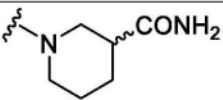
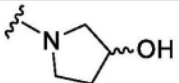
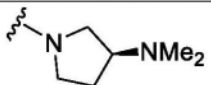
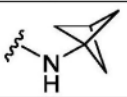
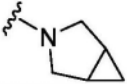
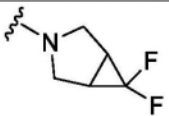
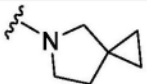
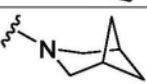
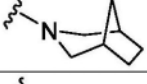
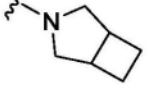
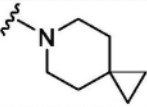
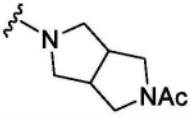
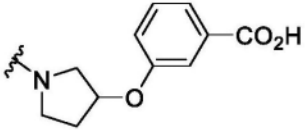
180	
181	
182	
183	

[0224] 表15

[0225]

	
化合物	R ⁴
184	
185	
186	
187	
188	
189	
190	
191	
192	
193	

[0226]

194	
195	
196	
197	
198	
199	
200	
201	
202	
203	
204	
205	
206	
207	
208	
209	
210	

[0227]

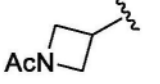
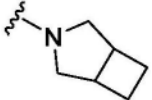
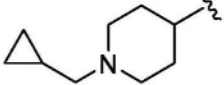
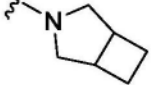
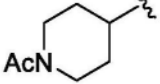
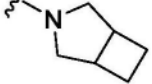
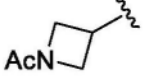
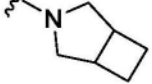
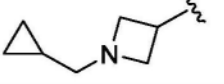
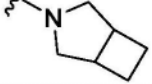
211	
212	
213	

[0228] 表16

[0229]

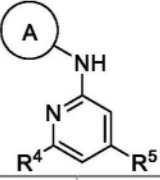
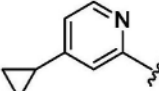
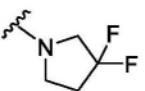
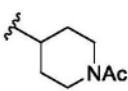
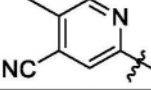
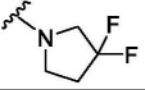
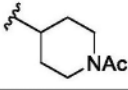
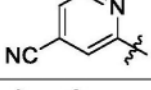
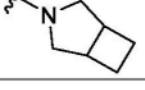
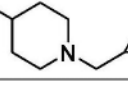
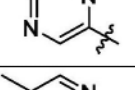
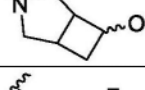
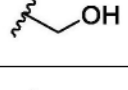
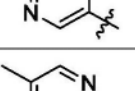
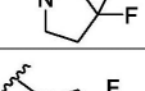
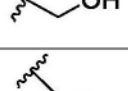
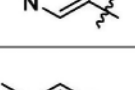
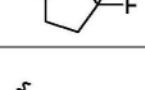
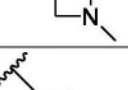
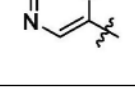
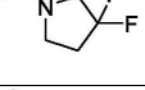
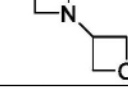
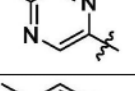
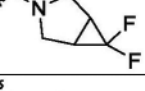
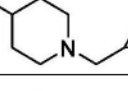
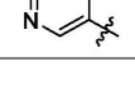
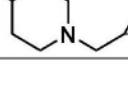
化合物	R ²	R ⁵	R ⁴
214	Me		
215			
216			
217			
218			
219			
220	Me		
221	Me		
222	Me		
223	Me		

[0230]

224	Me		
225			
226			
227			
228			

[0231] 表17

[0232]

			
化合物	环 A	R ⁴	R ⁵
229			
230			
231			
232			
233			
234			
235			
236			
237			

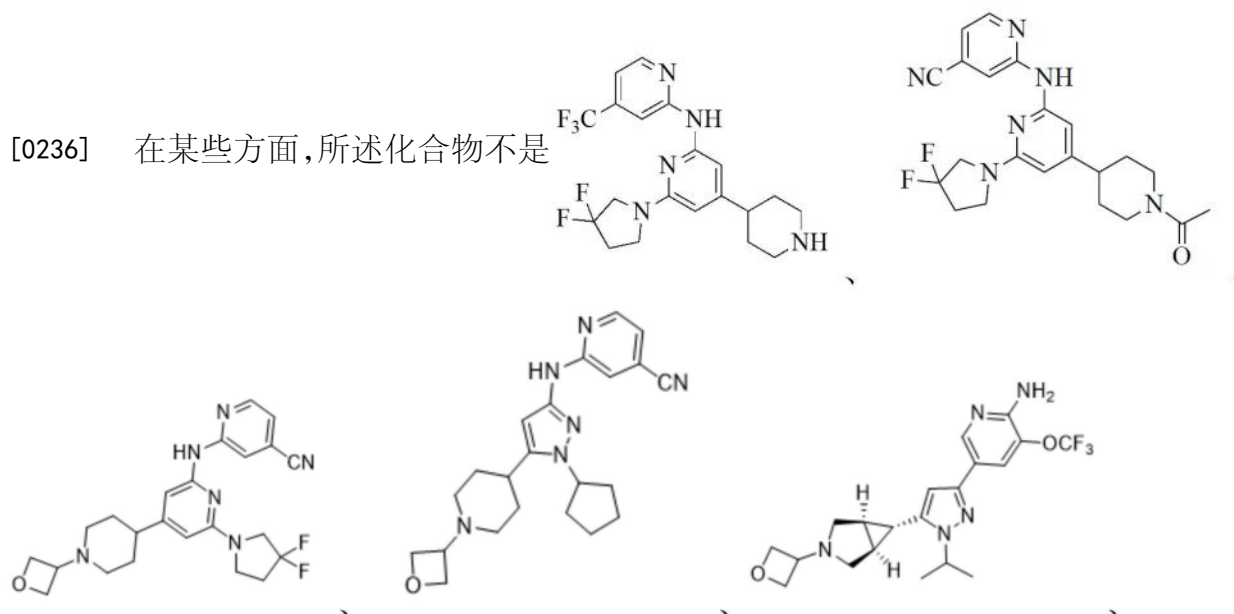
[0233]

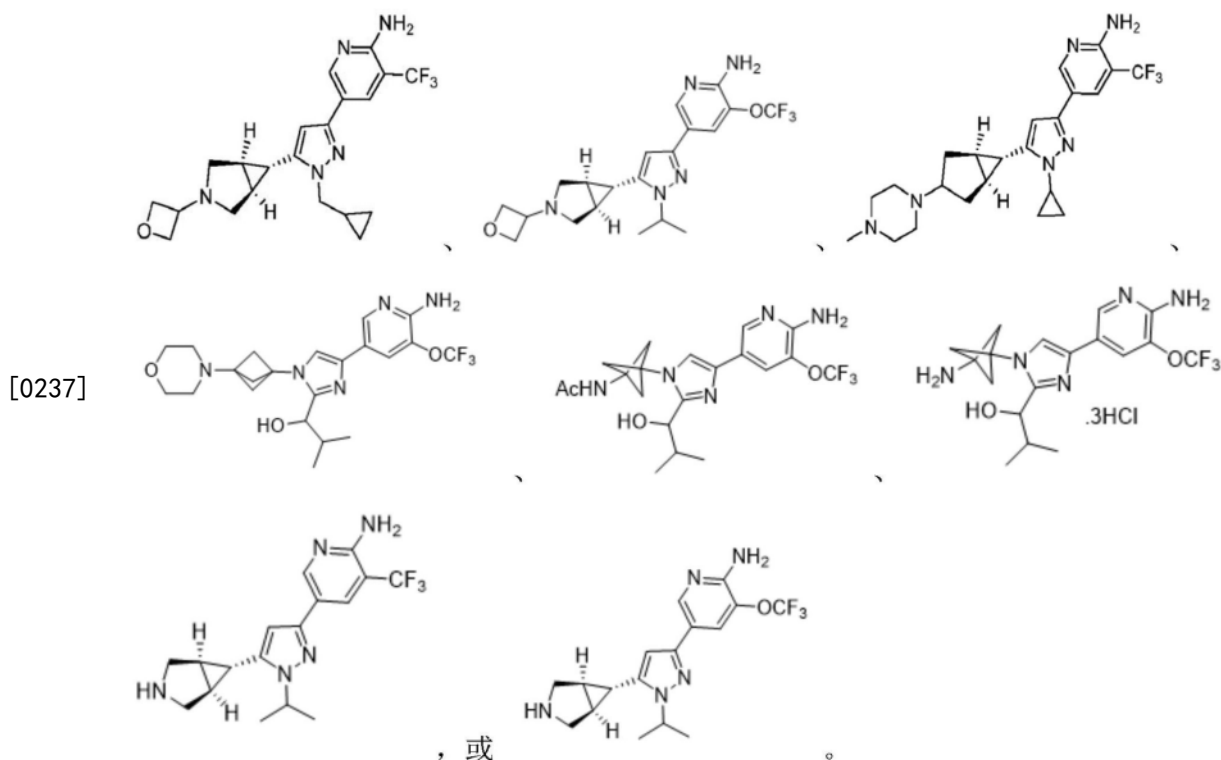
238			
239			

[0234] 在任何前述或以下实施方式中,所述MLK抑制剂可以表现出膜渗透性和/或水溶性。渗透性和水溶性与所述MLK抑制剂的拓扑极性表面积(TPSA)和分子量有关。 $TPSA \geq 0.1 \times MW$ (或 $TPSA/MW$ 比值 ≥ 0.1)的分子可以提供所需的水溶性(例如,参见Maple et al., Med Chem Commun 2019,10:1755-1764)。在一些方面,通过形成所述MLK抑制剂作为普通盐(例如,乙酸盐、草酸盐、甲磺酸盐)或由普通酸(例如盐酸或硫酸)形成所述MLK抑制增强水溶性。有利的是,由于一些所述MLK抑制剂实例本质上具有催化性,因此相对低的水溶性可能并不构成阻碍。 $TPSA < 140$ (同前所述)的分子可以提供所需的渗透性。因此,在某些方面,所述MLK抑制剂的TPSA为 $0.1 \times MW$ 至140。

[0235] 在前述或以下任一方面中,所述MLK抑制剂的MLK解离常数 K_D 可以低于200nM、低于150nM、低于100nM、低于75nM、低于50nM、低于25nM、低于10nM或甚至低于5nM。在前述或以下任一方面中,所述MLK抑制剂可以是相对于双亮氨酸拉链激酶(DLK)选择性结合LZK的LZK抑制剂。例如,如所述LZK和DLK解离常数 K_D 的比值所证明的那样,所述LZK抑制剂对LZK表现出的选择性可以是对DLK的至少2倍。在一些方面,所述LZK抑制剂对LZK表现出相对于DLK至少2倍的选择性、至少3倍的选择性、至少5倍的选择性、至少10倍的选择性、至少25倍的选择性、至少50倍的选择性、至少100倍的选择性,甚至至少150倍的选择性。例如,化合物207的LZK K_D 是~1nM,并且对LZK表现出相对于DLK 180倍的选择性。

[0236] 在某些方面,所述化合物不是





[0238] III. 药物组合物

[0239] 本公开还涵盖包含一种或更多种所公开的MLK抑制剂的药物组合物。药物组合物包含本文公开的化合物和药学上可接受的赋形剂。

[0240] 本文所述的化合物可用于制备治疗性药物组合物。所述化合物可以以盐或溶剂化物的形式加入到所述组合物中。例如，在化合物的碱性或酸性足以形成稳定的无毒酸盐或碱盐的情况下，将所述化合物作为盐施用可能是合适的。药学上可接受的盐的实例是与形成生理上可接受阴离子的酸形成的有机酸加成盐，例如甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、丙二酸盐、酒石酸盐、琥珀酸盐、苯甲酸盐、抗坏血酸盐、 α -酮戊二酸盐和 β -甘油磷酸盐。也可以形成合适的无机盐，包括盐酸盐、卤化物、硫酸盐、硝酸盐、碳酸氢盐和碳酸盐。

[0241] 药学上可接受的盐可以使用本领域普通技术人员已知的程序获得，例如通过使碱性足够的化合物（例如胺）与合适的酸反应以提供生理上可接受离子化合物。羧酸的碱金属（例如钠、钾或锂）或碱土金属（例如钙）盐也可以通过类似的方法制备。

[0242] 本文所述的式的化合物可以配制成药物组合物，并以各种形式施用至哺乳动物宿主，例如人类或动物患者。所述形式可以根据所选择的施用（例如口服或肠胃外施用）途径，通过静脉内、肌内、局部或皮下途径进行专门调整。

[0243] 本文所述的化合物可与药学上可接受的媒介物（例如惰性稀释剂或可同化的可食用载体）组合进行全身施用。对于口服施用，化合物可以封装在硬壳或软壳明胶胶囊中，压制成片剂，或直接掺入患者饮食的食物中。化合物也可以与一种或更多种赋形剂组合，并以可摄入片剂、口腔片剂、锭剂、胶囊、酏剂、悬浮液、糖浆、薄片等形式使用。这样的组合物和制剂通常含有至少0.1%的活性化合物。所述组合物和制剂的百分比可以不同，一般可以占给定单位剂型重量的约2%至约60%。在这种具有治疗作用的组合物中，活性化合物的量可以达到有效的剂量水平。

[0244] 所述片剂、锭剂、丸剂、胶囊等也可含有一种或更多种以下赋形剂：粘合剂，例如黄

薯胶、阿拉伯胶、玉米淀粉或明胶；赋形剂，例如磷酸二钙；崩解剂，例如玉米淀粉、马铃薯淀粉、藻胶酸等；以及润滑剂，例如硬脂酸镁。可以添加甜味剂，例如蔗糖、果糖、乳糖或阿斯巴甜；或调味剂，例如薄荷、冬青油或樱桃香料。当单位剂型是胶囊时，除了上述类型的材料外，它还可以含有液体载体，例如植物油或聚乙二醇。各种其他材料可作为涂层存在或以其他方式改变固体单位剂型的物理形式。例如，片剂、丸剂或胶囊可涂有明胶、蜡、虫胶或糖等。糖浆或酞剂可含有所述活性化合物、作为甜味剂的蔗糖或果糖、作为防腐剂的羟苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯、染料和香料（例如樱桃香精或橙子香精）。用于制备任何单位剂型的任何材料都应该是药学上可接受的，并且在用量上基本无毒。此外，所述活性化合物可以掺入到缓释制剂和装置中。

[0245] 所述活性化合物可以通过输注或注射进行静脉内或腹膜内施用。所述活性化合物或其盐的溶液可以在水中制备，任选地与无毒表面活性剂混合。可以在甘油、液体聚乙二醇、三乙酸甘油酯或它们的混合物中，或在药学上可接受的油中制备分散体。在通常储存和使用条件下，制剂可能含有防腐剂以防止微生物生长。

[0246] 适用于注射或输注的药物剂型可以包括无菌水溶液、分散体或无菌粉末，其包含适用于临时制备无菌可注射或可输注溶液或分散体的活性成分，任选地包封在脂质体中。最终剂型在生产和储存条件下应是无菌、流动且稳定的。液体载体或媒介物可以是溶剂或液体分散介质，包含例如水、乙醇、多元醇（例如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等）、植物油、无毒甘油酯及它们合适的混合物。适当的流动性可以通过例如形成脂质体、在分散体的情况下保持所需的颗粒尺寸或使用表面活性剂来保持。可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂（例如，对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等）来防止微生物的作用。在许多情况下，优选包括等渗剂，例如糖、缓冲剂或氯化钠。延缓吸收的药剂（例如单硬脂酸铝和/或明胶）可实现所述可注射组合物的延长吸收。

[0247] 无菌可注射溶液可通过将所需量的所述活性化合物与上述各种其他成分根据需要加入适当的溶剂中，然后进行过滤灭菌来制备。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下，制备方法可以包括真空干燥技术和冷冻干燥技术，这些技术可获得所述活性成分的粉末，以及先前无菌过滤溶液中存在的任何其他所需成分。

[0248] 本文所述化合物的有效剂量可通过比较其体外活性和动物模型的体内活性来确定。将小鼠和其他动物的有效剂量外推到人类的方法已为本领域所公知；例如参见美国专利4,938,949 (Borch et al.)。治疗所需的化合物或其活性盐或衍生物的量不仅因所选的具体化合物或盐而异，还会因施用途径、所治疗病况的性质以及患者的年龄和状况而异，并且最终由主治医生或临床医生决定。

[0249] IV. 使用方法

[0250] 所公开的化合物是MLK抑制剂。在一些方面，抑制MLK活性的方法包括使表达MLK的细胞与有效量的本文所公开化合物接触，从而抑制MLK的活性。在一些实施方式中，所述MLK是MLK1 (MAP3K9)、MLK2 (MAP3K10)、MLK3 (MAP3K11)、MLK4 (MAP3K21)、DLK (MAP3K12)、LZK (MAP3K13)、ZAK1 (MAP3K20) 或它们的任意组合。在某些实施方式中，所述MLK是LZK、MLK3或MLK4。在特定实例中，所述MLK是LZK。

[0251] 接触可以在体内、体外或以离体的方式进行。在前述或以下任一方面中，抑制MLK活性可进一步抑制细胞周期进程，降低c-MYC表达，抑制c-Jun N末端激酶 (JNK) 通路信号传

导,抑制PI3K/AKT通路信号传导,抑制细胞周期蛋白依赖性激酶2 (CDK2) 活性,抑制细胞外信号调节激酶 (ERK) 通路信号传导、NF- κ B信号传导,或它们的任意组合。在一些方面,在不存在所述MLK抑制剂的情况下,与细胞周期进程、c-MYC表达、JNK通路信号传导、PI3K/AKT通路信号传导、CDK2活性、ERK通路信号转导或NF- κ B信号传导相比,抑制或降低为至少10%、至少25%、至少50%或至少75%。在前述或以下任一方面中,细胞可通过染色体3q的扩增、染色体11q的扩增、丝裂原活化蛋白激酶 (MAP3K) 的过表达或它们的任意组合来表征。在一些实施方式中,所述MAP3K是MAP3K13或MAP3K21。

[0252] 在前述或以下任一方面中,所述细胞可以是癌症细胞。几种癌症是由MLK驱动的。例如,LZK与头颈部鳞状细胞癌 (HNSCC)、肺鳞状细胞癌 (LSCC)、食管鳞状细胞癌 (ESCC)、肝细胞癌、卵巢癌症、小细胞肺癌和神经内分泌前列腺癌症有关。在约10%的携带11q扩增子的头颈癌症中,MLK3是扩增的驱动因子。MLK4已被描述为25%的携带MAP3K21扩增的三阴性乳腺癌的新型驱动因子。在一些方面,所述细胞是HNSCC细胞、LSCC细胞、肝细胞癌细胞、卵巢癌症细胞、小细胞肺癌细胞、神经内分泌前列腺癌症细胞、食管癌症细胞 (例如,食管鳞状细胞癌 (ESCC) 细胞或食管腺癌细胞) 或乳腺癌细胞 (例如三阴性乳腺癌 (TNBC) 细胞)。在某些方面,所述细胞是HNSCC、LSCC、ESCC或TNBC细胞。

[0253] 在任何前述方面中,使所述细胞与所述化合物接触可包含向受试者施用治疗有效量的所述化合物或一定量的包含治疗有效量所述化合物的药物组合物。所述受试者可以被确定为可能受益于MLK抑制的受试者。在一些方面,所述受试者患有至少部分以MLK过表达为特征的疾病或病况。在一些实施方式中,所述MLK是LZK、MLK3或MLK4。在特定实例中,所述MLK是LZK。在某些方面,所述疾病或病况是癌症。在一些实例中,所述癌症是HNSCC、LSCC、肝细胞癌、卵巢癌症、小细胞肺癌、神经内分泌前列腺癌症、食管癌症 (例如,食管鳞状细胞癌或食管腺癌) 或乳腺癌 (例如, TNBC)。在某些方面,所述癌症是HNSCC、LSCC、ESCC或TNBC。在任何前述实施方式中,施用治疗有效量的所述化合物或一定量的所述药物组合物可降低所述癌症细胞的活力,抑制肿瘤生长或它们的组合。在一些方面,与不存在所述MLK抑制剂情况下的活力或肿瘤生长相比,活力降低或肿瘤生长被抑制至少10%、至少25%、至少50%或至少75%。

[0254] 所述化合物或药物组合物可以通过任何合适的途径施用于所述受试者。在一些方面,所述化合物或药物组合物通过口服途径或单次推注递送、通过在延长时间段内连续递送 (例如,连续透皮、粘膜或静脉内递送),或以重复施用方案 (例如,通过每小时、每天或每周的重复施用方案) 施用于所述受试者。在一些方面,所述化合物或药物组合物通过注射施用于所述受试者。治疗有效剂量的药剂可以在长期预防或治疗方案中作为重复剂量提供,所述方案将产生显著的临床效果,以减轻与本文所述靶向病况相关的一种或更多种症状或可检测的病况。在这种情况下,确定有效剂量通常基于动物模型研究,然后进行人体临床试验,并以显著降低所述受试者靶向疾病症状或病况的发生率或严重程度的施用方案为指导。这方面的合适模型包括,例如,小鼠、大鼠、禽类、猪、猫、非人类灵长类动物和本领域已知的其他可接受的动物模型受试者。另外,可以使用体外模型确定有效剂量。使用这样的模型,只需要进行一般的计算和调整就可以确定合适的浓度和剂量来施用治疗有效量的所述化合物 (例如,有效引发所需免疫反应或减轻靶向疾病的一种或更多种症状的量)。在其他方面,有效量或有效剂量的所述药剂可以简单地抑制或增强与如本文所述的疾病或病况相

关的一种或更多种选定的生物活性,用于治疗目的或诊断目的。

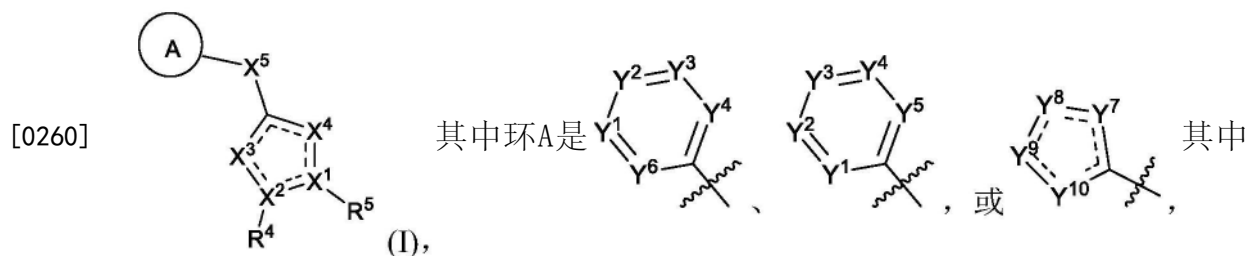
[0255] 所述药剂的实际剂量将根据诸如所述受试者的疾病适应症和特定状态(例如,所述受试者年龄、体型、身体素质、症状程度、易感性因素等)、施用时间和途径、同时施用的其他药物或治疗以及在所述受试者体内引发所需活性或生物反应的药剂的特定药理作用等因素而变化。可以对剂量方案进行调整以提供最佳的预防或治疗反应。治疗有效量也是指所述药剂的任何毒副作用或有害副作用在临床上均超过治疗有益效果的量。在本公开的所述方法和配制物中,根据式I-IV中任一项的化合物的治疗有效量非限制性范围为0.001mg/kg体重至100mg/kg体重,例如0.01mg/kg体重至20mg/kg体重、0.01mg/kg体重至10mg/kg体重、0.05mg/kg体重至5mg/kg体重或0.1mg/kg体重至2mg/kg体重。主治临床医生可以改变剂量,以在靶部位(例如,全身循环)保持所需浓度。可以基于递送模式(例如,经表皮递送或口服递送与静脉内或皮下递送)来选择较高或较低的浓度。剂量也可以基于所施用配制物的释放速率(例如,口服缓释配制物与注射颗粒或透皮递送配制物等的释放速率)来调节。

[0256] 在任何前述或以下实施方式中,所述治疗有效量可在有效提供治疗效果(例如降低癌症细胞活力和/或抑制肿瘤生长)的一段时间内间隔施用。在某些方面,所述间隔是每天一次。在其他实施方式中,所述治疗有效量可分为24小时内间隔施用的两个或更多个剂量。在一些方面,所述有效时间段是从一天至几个月,例如从一天至12个月、从三天至六个月、从七天至三个月、7-30天或7-14天。在某些方面,所述有效时间段甚至可以长于12个月,例如几年的时间段。

[0257] V.代表性方面

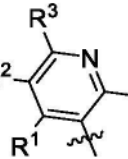
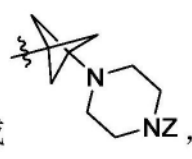
[0258] 某些代表性方面在以下编号的条款中作了举例说明。

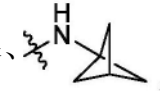
[0259] 1.一种具有通式I的化合物或其立体异构体、互变异构体或药学上可接受的盐:

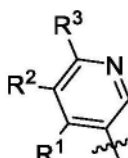
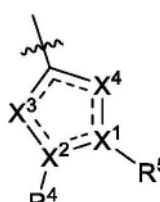


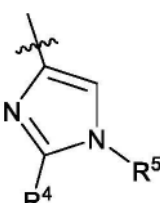
== 所表示的每个键是满足化学价要求所需的单键或双键; $-X^1(R^5)-$ 是 $-C(R^5)-$ 、 $-C(R^5)-C(H)-$ 、 $-C(H)-C(R^5)-$ 、 $-C(R^5)-N-$ 、 $-N-C(R^5)-$ 、或 $-N(R^5)-$; X^2 是 N 或 C; X^3 是 N 或 CH, 其中 X^1-X^3 中的一个或两个包含 N; X^4 是 CH 或 S; X^5 是 $-N(H)-$ 或不存在; Y^1 是 $C(R^1)$ 或 N; Y^2 是 $C(R^2)$ 或 N; Y^3 是 $C(R^3)$ 或 N; Y^4 是 N 或 $C(R^6)$; Y^5 是 $C(R^7)$ 或 N; Y^6 是 $C(R^8)$ 或 N; Y^1-Y^6 中的一个或两个是 N, 并且 Y^1-Y^3 中的至少一个或 Y^6 不是 C(H); Y^7-Y^{10} 中的两个、三个或四个独立地是 N 或 $N(R^9)$, 并且 Y^7-Y^{10} 中的其他是 $C(R^{10})$; R^1 是氰基、全卤代烷基、H、烷基或全卤代烷氧基; R^2 是 H、烷氧基、全卤代烷基、全卤代烷氧基、卤代烷氧基、卤代烷基、氰基、烷基、氰基烷基、氨基或杂芳基烷氧基, 或 R^1 和 R^2 与它们所附接的原子一起形成 5 元或 6 元取代或未取代的芳基环或取代或未取代的杂芳基环; R^3 是 H、氨基、烷基氨基、氨基烷基、烷氧基或 $R'C(O)N(H)-$, 其中 R' 是烷基, 或 R^2 和 R^3 与它们所附接的原子一起形成 5 元或 6 元取代或未取代的芳基环或取代或未取代的杂芳基环; R^4 是取代或未取代的脂族基、取代或未取代的氮杂烷基或芳基; R^5 是取代或未取代的脂族基、取代或未取代的杂脂族基, 或取代或未取代的烷基胺; R^6 和 R^7 独立地是 H、烷基、烷氧基、全卤

代烷基、全卤代烷氧基或氰基; R^8 是H、烷基、烷氧基、全卤代烷基、全卤代烷氧基或氰基, 或 R^8 和 R^1 与它们所附接的原子一起形成5元或6元取代或未取代的芳基环或取代或未取代的杂芳基环; 每个 R^9 独立地是H或烷基; 并且每个 R^{10} 独立地是H、烷基或氰基, 附带条件如下:

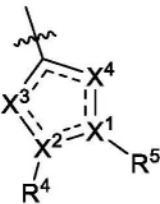
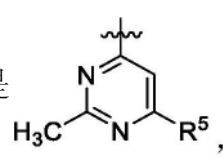
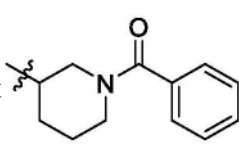
[0261] (a) 如果环A是  并且 R^5 是  NHZ 或  NZ, 则 (i) X^5 是N(H),

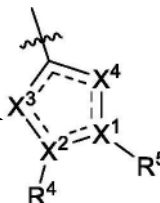
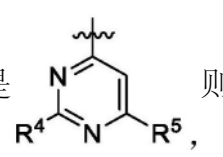
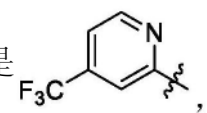
或 (ii) R^3 是H、氨基烷基、烷氧基、 或 $R'C(O)N(H)-$, 其中 R' 是烷基, 或 (iii) R^2 是烷氧基、氰基烷基、氨基或杂芳基烷氧基, 或 (iv) R^1 和 R^7 中的一个不是-H, 或 (v) X^1-X^4 中只有一个包含N, 或 (vi) X^3 是C(H), 或 (vii) X^4 是S, 或 (vi) $-X^1(R^5)-$ 是 $-C(R^5)-C(H)-$ 、 $-C(H)-C(R^5)-$ 、 $-C(R^5)-N-$ 、或 $-N-C(R^5)-$, 或 (viii) R^1 和 R^2 与它们所附接的原子一起形成5元或6元取代或未取代的芳基环或取代或未取代的杂芳基环,

[0262] (b) 如果环A是 , 其中 R^3 是氨基或烷基氨基并且  是

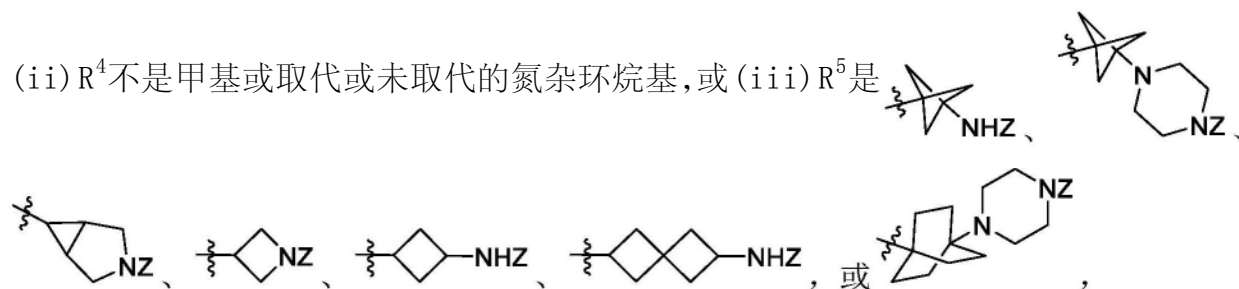
 则 (i) X^5 是N(H), 或 (ii) R^1 是氰基、全卤代烷基或全卤代烷氧基, 或 (iii) R^2 是氰

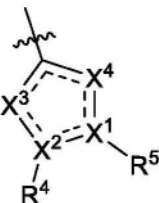
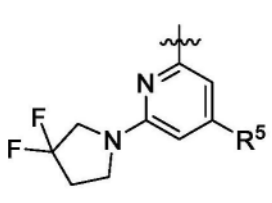
基、氰基烷基、氨基或杂烷基烷氧基, 或 (iv) R^7 是全卤代烷基、全卤代烷氧基或氰基, 或 (v) R^4 是芳基, 或 (vi) R^1 和 R^2 与它们所附接的原子一起形成5元或6元取代或未取代的芳基环或取代或未取代的杂芳基环, 或 (viii) R^2 和 R^3 与它们所附接的原子一起形成5元或6元取代或未取代的芳基环或取代或未取代的杂芳基环,

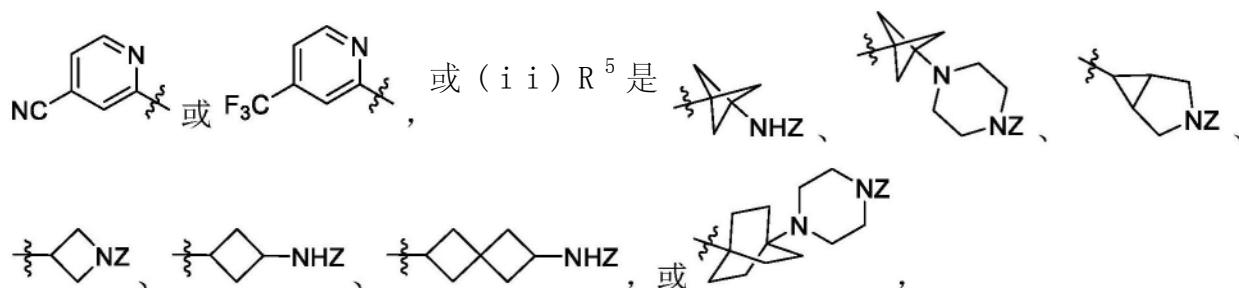
[0263] (c) 如果 X^5 是N(H) 并且  是 , 则 R^5 不是 ,

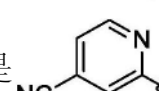
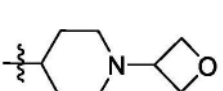
[0264] (d) 如果 X^5 是N(H) 并且  是 , 则 (i) 环A不是 , 或

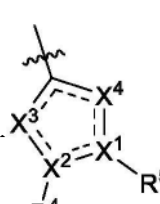
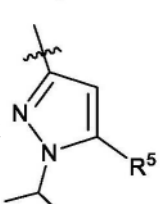
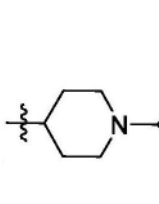
(ii) R^4 不是甲基或取代或未取代的氮杂环烷基, 或 (iii) R^5 是



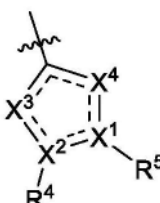
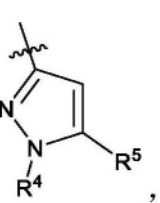
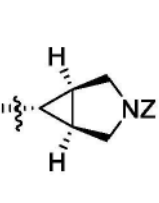
[0265] (e) 如果 X^5 是 N(H) 并且  是  则 (i) 环A不是



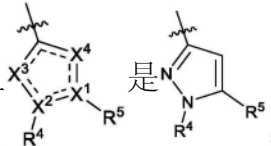
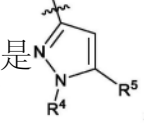
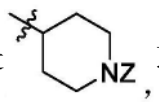
[0266] (f) 如果 X^5 是 N(H), 并且环A是  则 R^5 不是 .

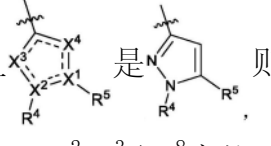
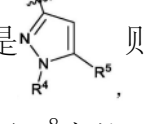
[0267] (g) 如果 X^5 不存在并且  是  则 R^5 不是  或环A

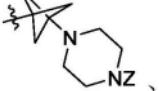
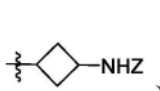
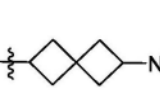
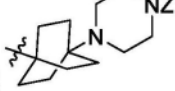


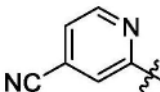
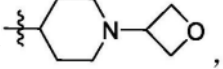
[0268] (h) 如果 X^5 不存在并且  是  则 (i) R^5 不是  或 (ii)



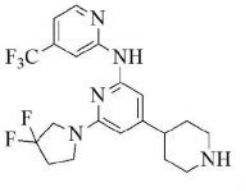
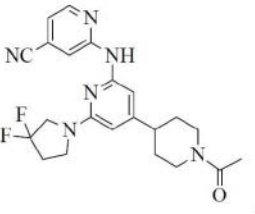
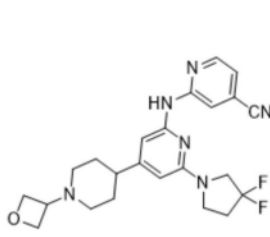
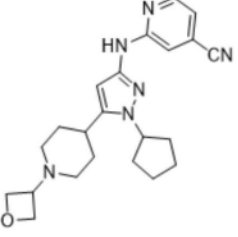
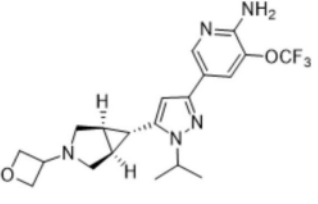
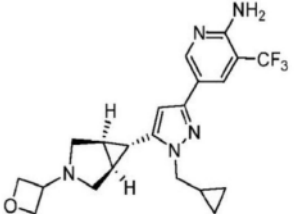
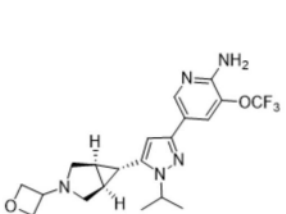
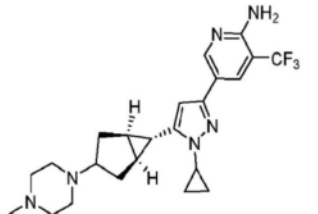
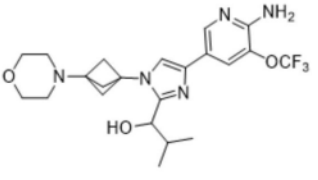
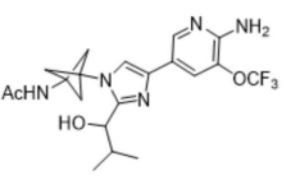
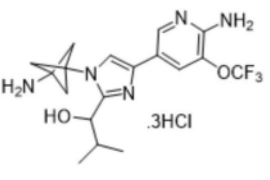
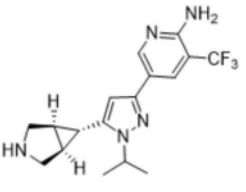
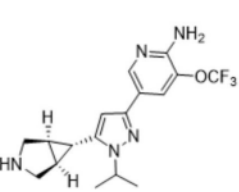
[0269] (i) 如果 X^5 是N(H)并且是，则(i) R^5 不是, 或(ii) Y^4 不是N, 或(iii) R^2 不是-H、-CN或- CF_3 , 或(iv) R^1 不是-H、-CN或- CF_3 ,

[0270] (j) 如果 X^5 是N(H)并且是，则(i) R^4 不是环烷基或杂环烷基, 或(ii) Y^4 不是N, 或(iii) R^1 不是-CN, 或(iv) R^2 、 R^3 和 R^8 中的一个不是H, 或(v) R^5 是取代或未取代的烷基、

, , , , , 或,

[0271] (k) 如果环A是并且 X^5 是N(H), 则 R^5 不是, 并且(1)所述

化合物不是

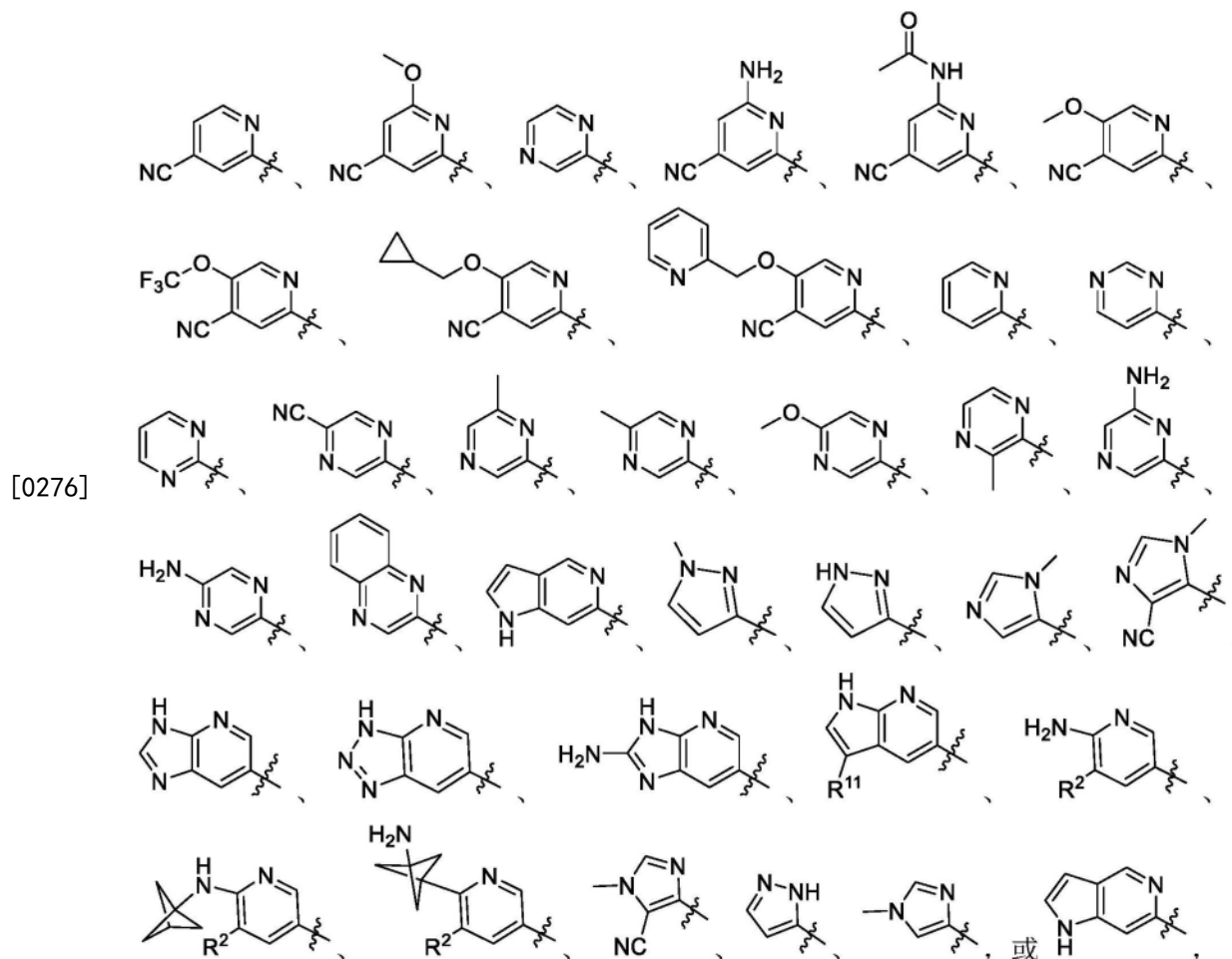
, 或

[0273] 2. 根据条款1所述的化合物, 其中环A是



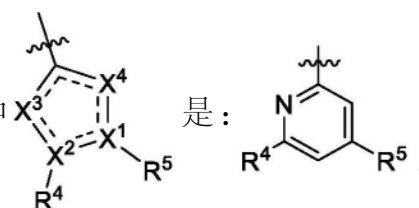
[0274] 其中 R^{11} 和 R^{12} 是H、烷基、全卤代烷基、烷氧基、全卤代烷氧基、氰基或氨基。

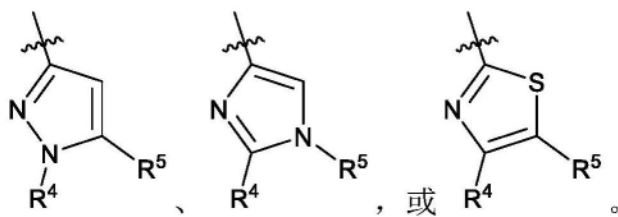
[0275] 3. 根据条款1所述的化合物, 其中环A是:



[0277] 其中 R^2 是 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、 $-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CN}$ 或 $-\text{H}$, 并且 R^{11} 是 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{CN}$ 或 $-\text{H}$ 。

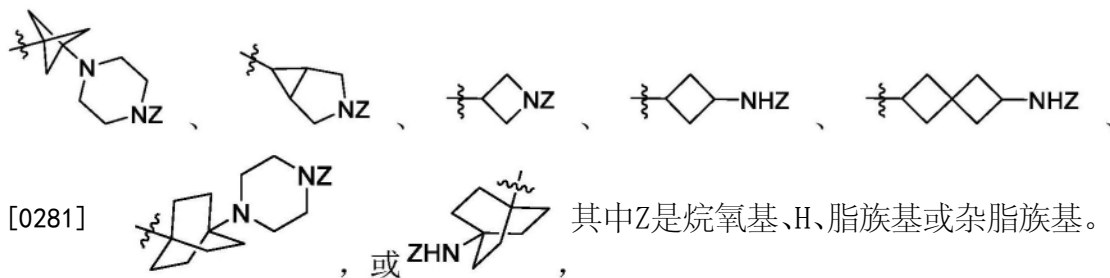
[0278] 4. 根据条款1-3中任一项所述的化合物, 其中





[0279] 5. 根据条款1-4中任一项所述的化合物, 其中R⁴是3,3-二氟-1-吡咯烷基、异丙基、2-甲基丙基、环丙基、环丙甲基或-C(H)(OH)-C(CH₃)₂。

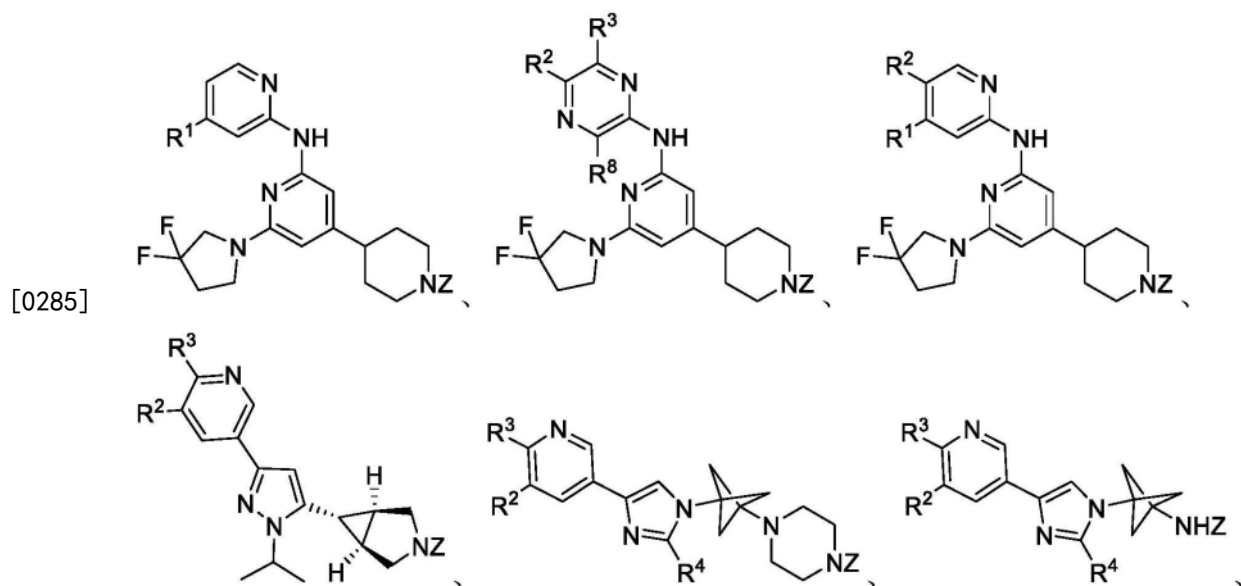
[0280] 6. 根据条款1-5中任一项所述的化合物, 其中R⁵是  

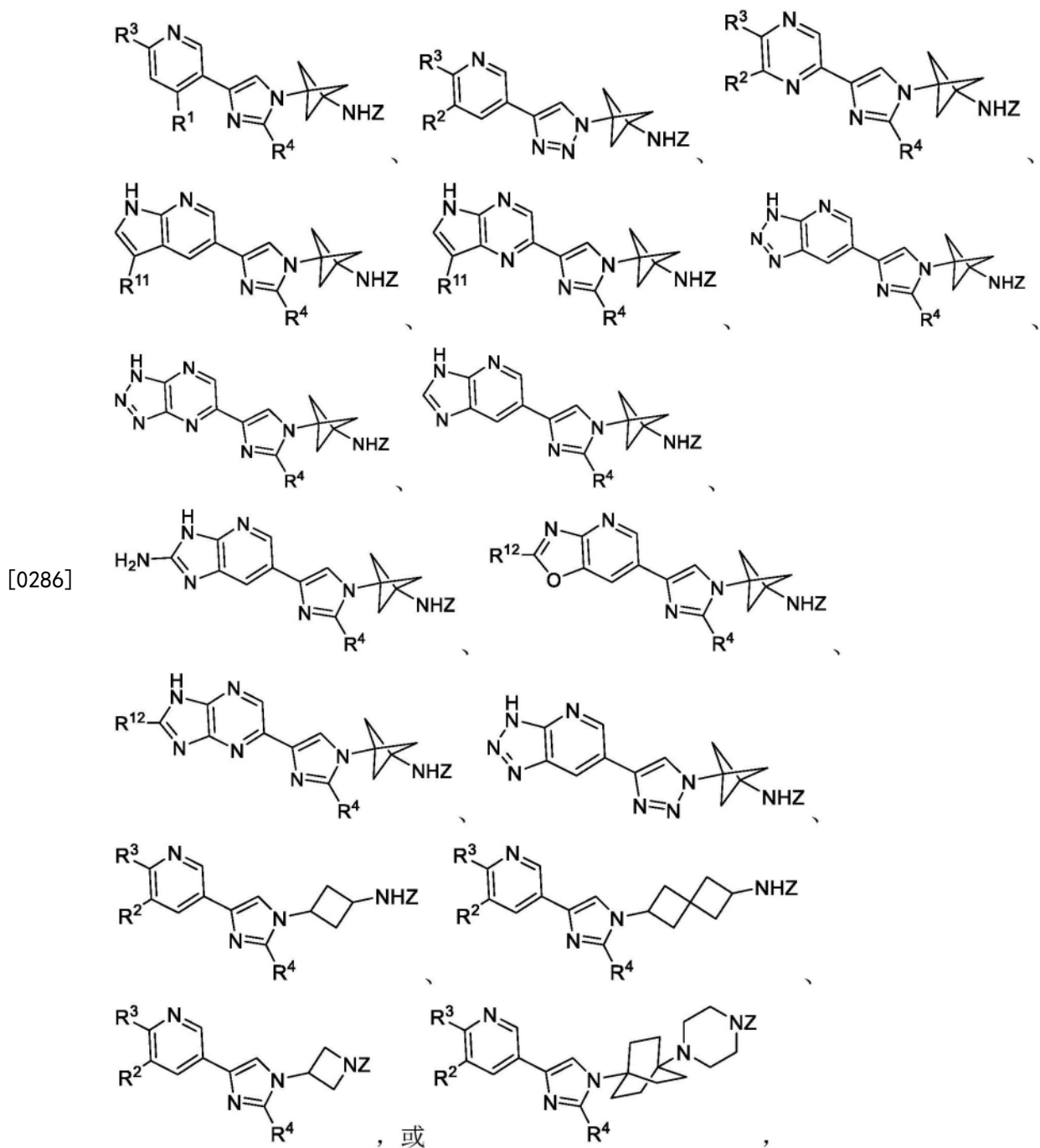


[0282] 7. 根据条款6所述的化合物, 其中Z是C₁-C₃烷氧基、H、C₁-C₆烷基或杂烷基。

[0283] 8. 根据条款6所述的化合物, 其中Z是 $-C(O)CH_3$ 、H、甲基、乙基、异丙基、2-甲基丙基、环丙基、环丙甲基、环丁基、环戊基、环己基、 $-(CH_2)_2(OCH_2CH_2)_nOCH_3$, 或 , 其中n是1-10的整数。

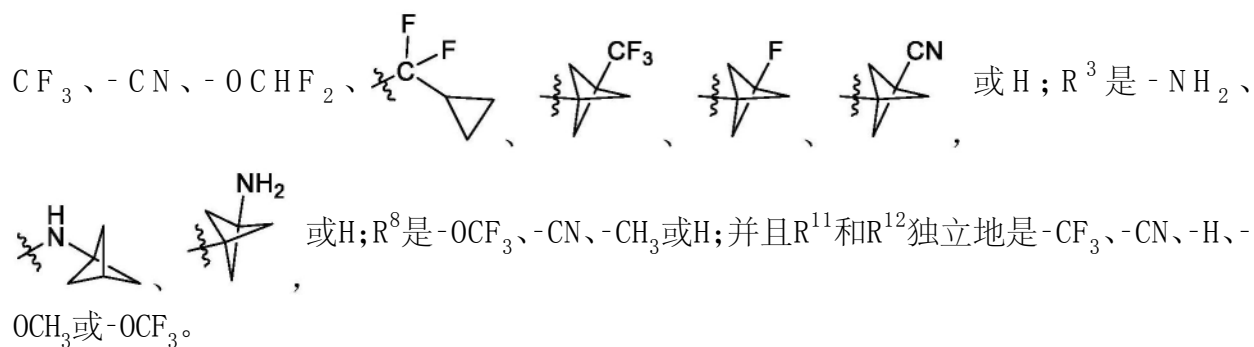
[0284] 9. 根据条款6-8中任一项所述的化合物, 其中所述化合物是:



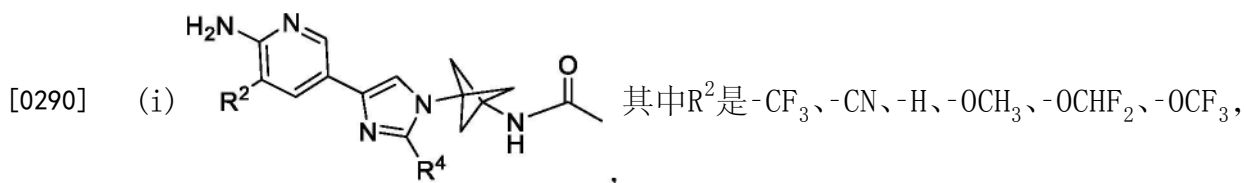


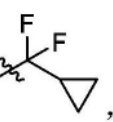
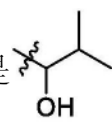
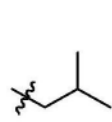
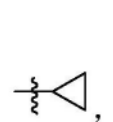
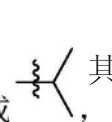
[0287] 其中 R^{11} 和 R^{12} 是H、烷基、全卤代烷基、烷氧基、全卤代烷氧基、氰基或氨基。

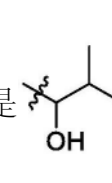
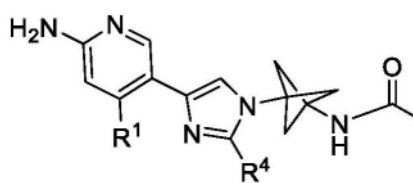
[0288] 10. 根据条款9所述的化合物, 其中: R^1 是-CN、-OCF₃或-CF₃; R^2 是-OCH₃、-OCF₃、-

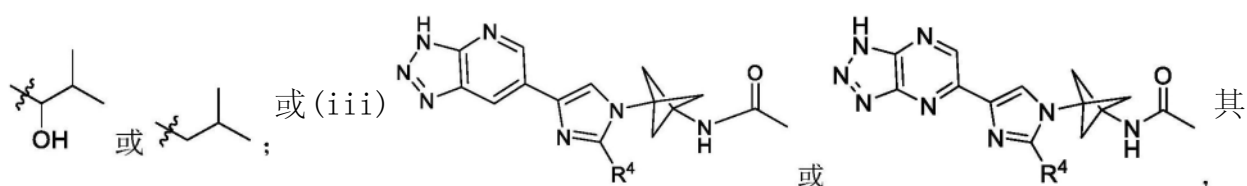


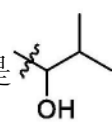
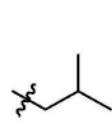
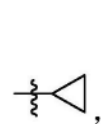
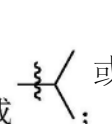
[0289] 11. 根据条款1所述的化合物, 其中所述化合物是:

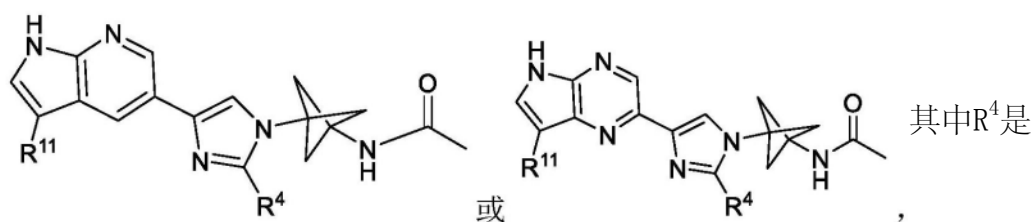


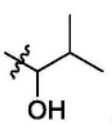
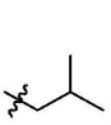
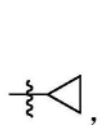
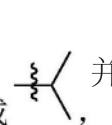
或 , 并且R⁴是 , , , , 或 , 其中如果R²是-OCF₃,

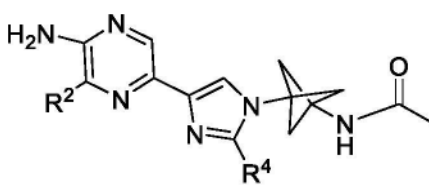
则R⁴不是  或 (ii)  其中R¹是-OCF₃或-CN, 并且R⁴是

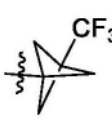
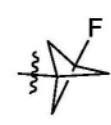
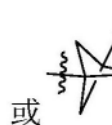
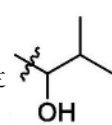
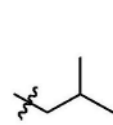
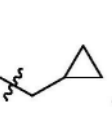
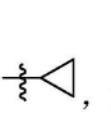
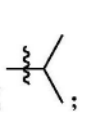


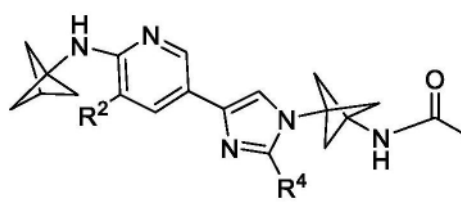
中R⁴是 , , , , 或 ; 或 (iv)

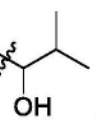


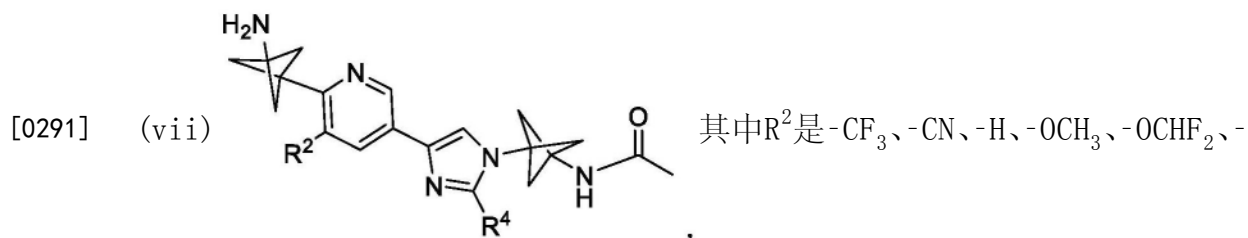
, , , , 或 , 并且R¹¹是-CF₃、-CN、-H、-OCH₃、-OCHF₂或-

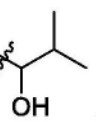
OCF₃; 或 (v)  其中R²是-CF₃、-CN、-H、-OCH₃、-OCHF₂、-OCF₃,

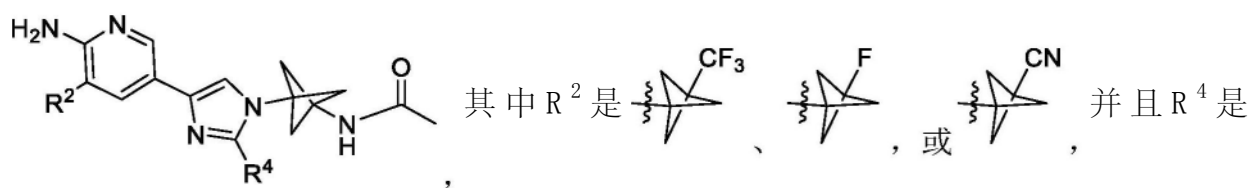
, , 或 , 并且R⁴是 , , , , 或 ;

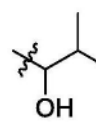
或 (vi)  其中R²是-CF₃、-CN、-H、-OCH₃、-OCHF₂、-OCF₃, 并

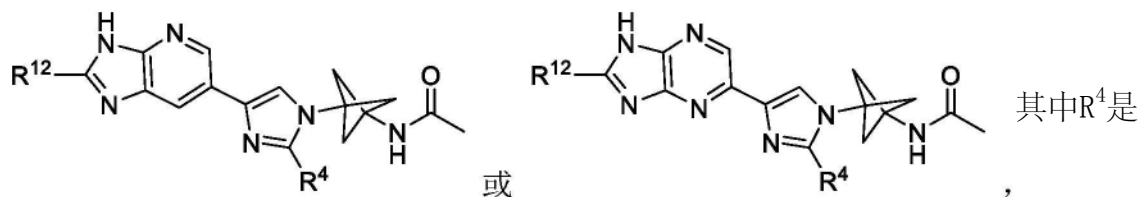
且R⁴是 、、、，或 ；或

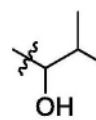


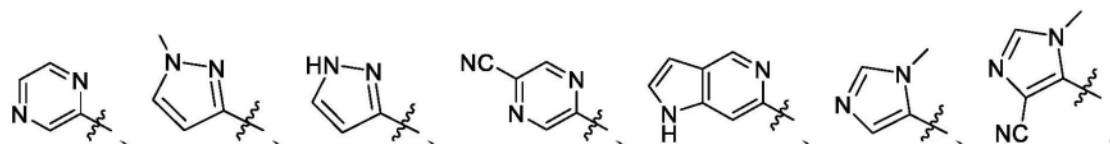
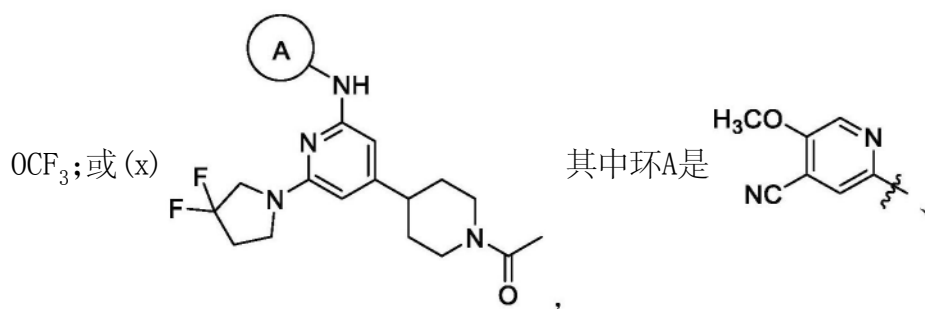
OCH₃，并且R⁴是 、、、，或 ；或(viii)



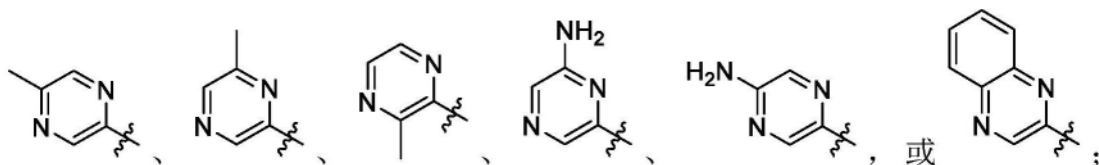
、、、，或 ；或(ix)



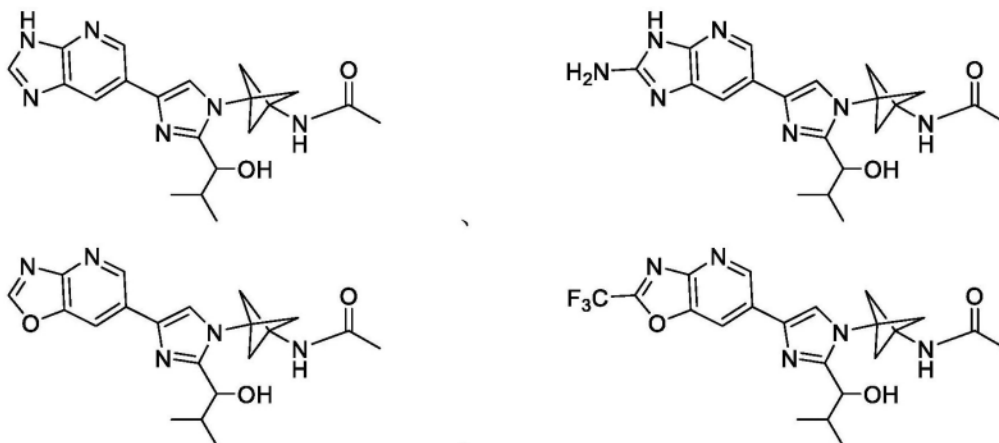
、、、，或 ，并且R¹¹是 -CF₃、-CN、-H、-OCH₃、-OCHF₂或-



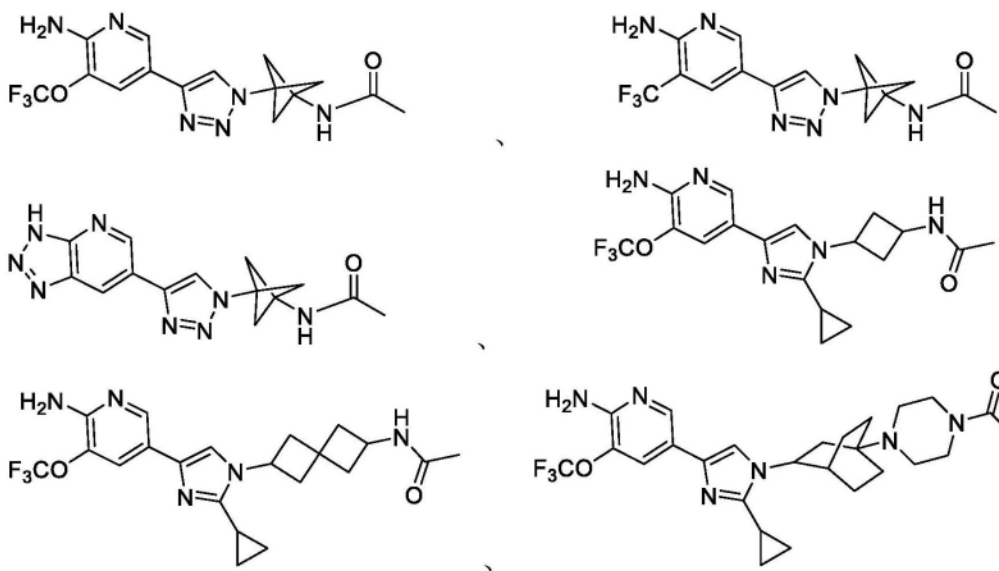
[0292]



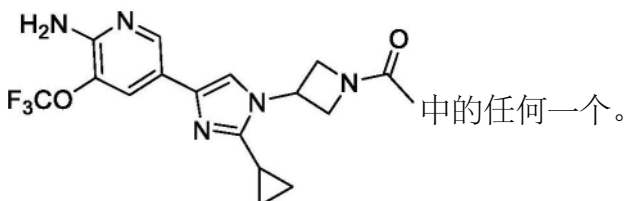
或 (xi)



[0293]



[0294]



[0295] 12. 一种药物组合物, 包含根据条款1-11任一项的化合物和至少一种药学上可接受的载体。

[0296] 13. 一种抑制亮氨酸拉链携带激酶 (LZK) 活性的方法, 包含:

[0297] 使表达LZK的细胞与有效量的根据条款1-11中任一项的化合物接触, 从而抑制LZK活性。

[0298] 14. 根据条款13所述的方法, 其中抑制LZK活性抑制细胞周期进程, 降低c-MYC表达, 抑制c-Jun N末端激酶 (JNK) 通路信号传导, 抑制PI3K/AKT通路信号传导, 抑制细胞周期

蛋白依赖性激酶2 (CDK2) 活性, 或它们的任意组合。

[0299] 15. 根据条款13或条款14所述的方法, 其中所述细胞的特征在于染色体3q的扩增、丝裂原活化蛋白激酶13 (MAP3K13) 的过表达或两者兼有。

[0300] 16. 根据条款13-15中任一项所述的方法, 其中所述细胞是头颈部鳞状细胞癌 (HNSCC) 细胞、肺鳞状细胞癌 (LSCC) 细胞、肝细胞癌细胞、卵巢癌症细胞、小细胞肺癌细胞、神经内分泌前列腺癌症细胞或食管癌症细胞。

[0301] 17. 根据条款13-16中任一项所述的方法, 其中使所述细胞与所述化合物接触包含向受试者施用治疗有效量的所述化合物或一定量的包含治疗有效量所述化合物的药物组合物。

[0302] 18. 根据条款17所述的方法, 其中所述受试者患有至少部分以LZK过表达为特征的疾病或病况。

[0303] 19. 根据条款18所述的方法, 其中所述疾病或病况是癌症。

[0304] 20. 根据条款17所述的方法, 其中所述癌症是HNSCC、LSCC、肝细胞癌、卵巢癌症、小细胞肺癌、神经内分泌前列腺癌症或食管癌症。

[0305] 21. 根据条款20所述的方法, 其中所述癌症是HNSCC或LSCC。

[0306] 22. 根据条款19-21中任一项所述的方法, 其中施用治疗有效量的所述化合物或一定量的所述药物组合物降低癌症细胞的活力, 抑制肿瘤生长或它们的组合。

[0307] 23. 根据条款17-22中任一项所述的方法, 其中施用是通过肠胃外、口服或局部进行的。

[0308] 24. 根据条款1-11中任一项的化合物用于抑制亮氨酸拉链携带激酶 (LZK) 活性的用途, 其中抑制LZK活性包含使表达LZK的细胞与有效量的所述化合物接触, 从而抑制LZK的活性。

[0309] 25. 根据条款1-11中任一项的化合物用于治疗至少部分以亮氨酸拉链携带激酶 (LZK) 过表达为特征的疾病或病况的用途, 其中治疗包含施用治疗有效量的所述化合物或一定量的包含治疗有效量所述化合物的药物组合物至患有至少部分以LZK过表达为特征的疾病或病况的受试者。

[0310] 26. 根据条款1-11中任一项的化合物在制备用于治疗至少部分以亮氨酸拉链携带激酶 (LZK) 过表达为特征的疾病或病况的药物的用途。

[0311] 27. 根据条款25或条款26所述的用途, 其中所述疾病或病况是癌症。

[0312] 28. 根据条款27所述的用途, 其中所述癌症是HNSCC、LSCC、肝细胞癌、卵巢癌症、小细胞肺癌、神经内分泌前列腺癌症或食管癌症。

[0313] VI. 实施例

[0314] 方法

[0315] 质粒和转染

[0316] 从293T细胞中提取的RNA制备LZK cDNA, 通过PCR添加attB侧翼区域, 并使用BP克隆酶反应将LZK插入pDONR221中。在此基础上, 使用Invitrogen Gateway系统克隆到目的载体中。将FLAG标记的 (pReceiver-M12, GeneCopoeia) 目的载体转化为Gateway目的载体, 用于瞬时过表达测定。pLenti6.3/T0/V5-DEST载体用于产生稳定的过表达。LZK的耐药构建体是使用定点突变试剂盒 (Stratagene) 引入的Q240S突变。寡核苷酸如下表18所示。293T细胞

使用Lipofectamine 2000(Invitrogen)按照制造商的方案用OptiMEM(Gibco)进行瞬时转染。在需要时使用pcDNA3.1(+)载体(Invitrogen)作为空载体对照。先前描述了CDK2传感载体CSII-pEF1a-DHB(aa994-1087)-mVenus和核标记载体CSII-pEF1a-H2B-mTurquoise(Spencer et al.,Cell 2013,155:369-383)。

[0317] 表18

SEQ ID NO:	引物	序列
1	LZK Q240S 正向引物 (c718t a719c)	5'- CTGTGCCCCATGGATCACTCTACGAGG -3'
2	LZK Q240S 反向引物 (c718t a719c)	5'- CCTCGTAGAGTGATCCATGGGCACAG -3'
3	LZK K195M 正向引物 (a584t)	5'- GAGGTGGCCATCAAGAAAGTGAGAG -3'
4	LZK K195M 反向引物 (a584t)	5'- CTCTCACTTCTTGATGGCCACCTC -3'
5	XbaI 至 LZK 正向引物起始端	5'- TAATCTAGAATGGCCAACCTTTCAGGAGCACCT -3'
6	NotI 至 LZK 反向引物末端	5'- TTAGCGGCCGCTTACCAGGTAGCAGAGCTGTAGT -3'
7	T7 启动子引物	5'- TAATACGACTCACTATAGGG -3'
8	BGH 反向引物	5'- TAGAAGGCACAGTCGAGG -3'
9	XbaI 至 LZK 激酶结构域正向引物	5'- TAATCTAGAATGCTGGGTAGTGGAGCCCAAGG -3'
10	NotI 至 LZK 末端激酶结构域反向引物	5'- TTAGCGGCCGCTTAGGCAATGTCTAAATGCATGA -3'
11	NotI 至 LZK 末端拉链结构域反向引物	5'- TTAGCGGCCGCTTACACTGCTTGCTCACGCTTAA -3'
12	NotI 至 LZK 末端终止密码子反向引物	5'- TTAGCGGCCGCTTACCAGGTAGCAGAGCTGTAGT -3'

[0319] 细胞培养

[0320] 将CAL33(德国微生物和细胞培养物保藏中心[DSMZ],2012年10月获得)和293T(美国典型培养物保藏中心[ATCC],2012月7月)细胞维持在补充有10%四环素测试的胎牛血清(FBS)(Atlanta Biologicals)、1%青霉素-链霉素(Gibco)和2mM GlutaMAX(Gibco)的DMEM(Sigma-Aldrich)中。BICR56细胞(英国公共卫生部门,2012年11月和2014年4月)在含有10%四环素测试的FBS、1%青霉素-链霉素、0.4μg/mL氢化可的松(Sigma-Aldrich)和2mM GlutaMAX的DMEM中生长。将MSK921(斯隆-凯特林癌症研究所,2014年7月)、BEAS-2B(ATCC,2012年10月)、LK2(日本研究生物资源保藏[JCRB]细胞库,2015年2月)和NCI-H520(ATCC)细胞维持在含有10%四环素测试的FBS、2mM GlutaMAX和1%青霉素-链霉素的RPMI 1640(Quality Biological)中。将Detroit 562细胞(ATCC,2014年11月)维持在含有10%四环素测试的FBS、2mM GlutaMAX和1%青霉素-链霉素的EMEM(Sigma-Aldrich)中。将293FT细胞(Invitrogen,2011年11月)维持在含有10%四环素测试的FBS、4mM GlutaMAX、1mM丙酮酸钠(Gibco)和0.1mM NEAA(Gibco)的DMEM中。将SCC-15细胞(ATCC,2019)维持在含有碳酸氢盐缓冲液(3.7g/L)、10%FBS和1%青霉素-链霉素的DMEM(Gibco)中。将所有细胞在37℃和5%CO₂下培育。常规使用的细胞系每年都要通过短串联重复序列(STR)分析进行鉴定(通过Applied Biosystems AmpFLSTR系统的多重PCR测定进行)。将STR图谱与ATCC和DSMZ数据库

进行比较。但是,MSK921没有可用的图谱。所有HNSCC和永生化对照细胞系的3q状态都在内部得到了验证。在实验中,所有细胞系在解冻后使用不到20代(10周),然后再从冷冻状态中取出新鲜小瓶。使用Visual-PCR支原体检测试剂盒(GM Biosciences)确认所用细胞系为支原体阴性。

[0321] 多西环素诱导型敲低细胞系的生成

[0322] CAL33和BICR56诱导型敲低细胞由SIRION Biotech生成。MSK921是使用SIRION提供的慢病毒颗粒在内部生成的(通过用表达载体和慢病毒包装质粒转染293TN细胞生成)。用8 μ g/mL聚凝胺在MOI 5时发生转导。24小时后,用含有嘌呤霉素(Invitrogen)的新鲜培养基替换培养基以筛选已被有效转导的细胞。shRNA序列为CGGAATGAACCTGTCTCTGAA(sh1)和GATGTAGATTCTTCAGCCATT(sh2)。所述慢病毒表达质粒是pCLVi(3G)-MCS-Puro,其表达多西环素反应性反式活化因子和来自同一载体的shRNA。所述反式活化因子的表达是组成型的,而shRNA表达依赖于多西环素诱导型启动子。将多西环素与所述反式活化因子结合可使其结合所述多西环素诱导型启动子并促进shRNA表达。使用1 μ g/mL的多西环素(Sigma-Aldrich)诱导LZK敲低。

[0323] 四环素诱导型表达细胞系的生成

[0324] 使用ViraPower HiPerform T-REx Gateway Expression System(Invitrogen)生成四环素诱导型LZK表达的细胞。简言之,使用Lipofectamine 2000将野生型(WT)或耐药突变体(Q240S)LZK(克隆到pLenti6.3/T0/V5-DEST载体中)和pLenti.3/TR(用于四环素阻遏物表达)转染到293FT细胞中,生成慢病毒储备液。通过抗生素选择(杀稻瘟素[Gibco]和遗传霉素[Gibco])产生细胞系。使用1 μ g/mL的多西环素(Sigma-Aldrich)诱导LZK表达。

[0325] RNA制备

[0326] 在处理(四环素诱导的过表达或多西环素诱导的敲低)后48小时,使用含有1%v/v 2-巯基乙醇(Bio-Rad)的缓冲液RLT(Qiagen)裂解细胞。去除基因组DNA并根据制造商的方案使用RNeasy试剂盒(Qiagen)制备RNA。使用NanoDropTMOne分光光度计(Thermo Scientific)测定RNA数量。

[0327] RT-PCR

[0328] 使用SuperScript IIIOne-Step RT-PCR试剂盒(Invitrogen)进行RT-PCR。所使用的引物如下:AACTGATTTCGAAGGCGCAGA(LZK正向引物;SEQ ID NO:13)、GGGCGTTTTCCAAGAGAGGA(LZK反向引物;SEQ ID NO:14)、GGCACCACACCTTCTACAATG(β -肌动蛋白正向引物;SEQ ID NO:15)、GTGGTGGTGAAGCTGTAGCC(β -肌动蛋白反向引物;SEQ ID NO:16)、CCATGGAGAAGGCTGGGG(GAPDH正向引物;SEQ ID NO:17)、GTCCACCACCCTGTTGCTGTA(GAPDH反向引物;SEQ ID NO:18)。PCR的循环条件如下:cDNA合成和预变性(进行一个循环:55 $^{\circ}$ C下30分钟,然后94 $^{\circ}$ C下两分钟)、PCR扩增(进行25个循环:94 $^{\circ}$ C下变性15秒、55 $^{\circ}$ C下退火30秒以及68 $^{\circ}$ C下延伸60秒),以及使用C1000 TOUCH CYCLER w/48W FS RM(Bio-Rad)在68 $^{\circ}$ C下最后延伸5分钟。将PCR产物在2%琼脂糖凝胶上解析,并使用ChemiDocTMMP成像系统(Bio-Rad)在紫外光下用Nancy-520(Sigma-Aldrich)DNA凝胶染色进行观察。

[0329] 抑制剂处理

[0330] GNE-3511(#19174)大量购自Cayman Chemical或Synnovator(#SYNNAA108220),用于小鼠研究。MG132(#S2619)购自Selleck Chemicals。Pevonedistat或MLN4924(#HY-

70062) 购自MedChemExpress。将所有化合物溶解在DMSO (Fisher) 中,并在基于细胞的测定中使用DMSO作为媒介物对照。

[0331] 蛋白质裂解液的制备和免疫印迹

[0332] 通常,将细胞接种在6孔或35-mm板中24小时,之后加入多西环素或使用5%FBS培养基进行特异性抑制剂处理48小时。在适当的处理时间后,用不含Ca和Mg的冰冷磷酸盐缓冲盐水(Quality Biological)洗涤细胞,然后在冰上用补充有蛋白酶抑制剂片剂(Sigma-Aldrich)和磷酸酶抑制剂混合物2和3(Sigma-Aldrich)的RIPA缓冲液(50mM NaCl、1.0% IGEPAL®CA-630、0.5%脱氧胆酸钠、0.1%SDS、50mM Tris,pH为8.0)(Sigma-Aldrich)裂解细胞,然后在4℃下以15,000rpm离心10分钟。通过使用660nm蛋白质测定试剂(Pierce)从所述细胞裂解液中测定蛋白质浓度。将细胞提取物变性,进行SDS-PAGE,转移到PVDF膜(Bio-Rad)上,并使用5%牛血清白蛋白(BSA)的磷酸盐缓冲盐水和0.1%吐温®20(PBS-T)封闭2小时。将所述膜与特异性抗体在4℃下于5%BSA/PBST中培育过夜,然后与适当的辣根过氧化物酶缀合的二级抗体培育1小时,并通过化学发光技术(Thermo Fisher)检测信号。所述抗体列于表19中。

[0333] 表19

[0334]

抗体	来源	标识符
兔抗磷酸化-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)(81E11)	Cell Signaling Technology	Cat# 4668, RRID:AB_823588
兔抗SAPK/JNK	Cell Signaling Technology	Cat# 9252, RRID:AB_2250373
兔抗GAPDH (14C10)	Cell Signaling Technology	Cat# 2118, RRID:AB_561053
兔抗磷酸化-MKK7 (Ser271/Thr275)	Cell Signaling Technology	Cat# 4171, RRID:AB_2250408
兔抗MKK7	Cell Signaling Technology	Cat# 4172, RRID:AB_330914
小鼠抗GST (26H1)	Cell Signaling Technology	Cat# 2624, RRID:AB_2189875
兔抗c-Myc (Y69)	Abcam	Cat# ab32072, RRID:AB_731658
兔抗LZK	YenZym Antibodies	Cat# YZ6696
小鼠抗cdc2 (POH1)	Cell Signaling Technology	Cat# 9116, RRID:AB_2074795

[0335]

兔抗CDK2 (78B2)	Cell Signaling Technology	Cat# 2546, RRID:AB_2276129
兔抗CDK4 (D9G3E)	Cell Signaling Technology	Cat# 12790, RRID:AB_2631166
小鼠抗CDK6 (B-10)	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-7961, RRID:AB_627242
小鼠抗细胞周期蛋白A2 (BF683)	Cell Signaling Technology	Cat# 4656, RRID:AB_2071958
兔抗细胞周期蛋白B1	Cell Signaling Technology	Cat# 4138, RRID:AB_2072132
小鼠抗细胞周期蛋白D1 (DCS6)	Cell Signaling Technology	Cat# 2926, RRID:AB_2070400
小鼠抗细胞周期蛋白E1 (HE12)	Cell Signaling Technology	Cat# 4129, RRID:AB_2071200
大鼠抗FLAG (L5)	BioLegend	Cat# 637302, RRID:AB_1134268
兔抗FLAG (D6W5B)	Cell Signaling Technology	Cat# 14793, RRID:AB_2572291
羊抗小鼠IgG, 二级, HRP	GE HealthcareLife Sciences	Cat# NA931, RRID:AB_772210
驴抗兔IgG, 二级, HRP	GE Healthcare Life Sciences	Cat# NA934, RRID:AB_772206

[0336] 反相蛋白质阵列

[0337] 在第二天添加多西环素(以诱导LZK敲低)之前,将细胞接种在10cm的培养皿中,CAL33和BICR56的接种量均为 6×10^5 ,MSK921的接种量为 6.25×10^5 。在用多西环素诱导后48小时,用补充有蛋白酶和磷酸酶抑制剂(Roche Applied Science,分别为#05056489001和04906837001)和1.5mM $MgCl_2$ 的1×Triton X-100细胞裂解缓冲液(#9803,Cell Signaling Technology)在冰上裂解细胞。对细胞裂解液进行离心,并收集上清液。使用660nm蛋白质测定试剂(Pierce)测量蛋白质浓度,并将浓度调节至2mg/mL。然后加入4×还原性十二烷基硫酸钠(SDS)样品缓冲液(40%甘油、8%SDS和0.25M Tris-HCl,pH为6.8,使用前加入10%β-巯基乙醇),并将所述样品在80℃下培育3分钟。将三个独立实验的裂解液送去进行RPPA分析。英国癌症研究爱丁堡中心的宿主和肿瘤特征分析小组(爱丁堡大学MRC遗传学和分子机制研究所)根据既定方案用60种抗体的小组进行了硝化纤维素载玻片形式的RPPA(Sriskandarajah et al.,BMC Cancer 2020,20:269)。将结果与没有dox诱导LZK敲低的样品进行比较。

[0338] MTS细胞活力测定

[0339] 按照制造商的方案,使用Cell Titer 96Aqueous One溶液细胞增殖检测试剂盒(Promega)进行MTS测定。简言之,将5,000个细胞一式三份接种在96孔板中,并在24小时后使用5%FBS培养基通过药物化合物处理。在适当时加入多西环素,并将细胞培育72小时。加入MTS,培养细胞两小时,并使用iMark™微孔板吸光度读取器(Bio-Rad)在490nm处测量吸光度。图形显示了相对于DMSO处理的对照样品的细胞活力百分比。使用GraphPad Prism 8测定 EC_{50} 值。

[0340] 集落形成测定

[0341] 结晶紫测定用于评估用特异性化合物处理后的相对细胞生长和存活。通常,将细胞一式三份接种在12孔板中24小时,然后使用10%FBS培养基进行药物处理。培育所述孔板14天,培养基和药物每48小时更换一次。然后用磷酸盐缓冲盐水洗涤所述细胞并在冰冷的

甲醇中固定,然后用0.5%结晶紫(Sigma-Aldrich)的25%甲醇溶液染色。使用ChemiDoc MP成像系统(Bio-Rad)拍摄图像,为了量化,将结晶紫染色剂溶解在33%的乙酸中,在振荡的情况下培育20分钟,并使用iMark™微孔板吸光度读取器(Bio-Rad)在595nm下读取。图形显示了相对于DMSO处理的对照样品的集落形成百分比。

[0342] 体外激酶测定

[0343] 将100纳克谷胱甘肽S-转移酶(GST)-标记的人类LZK纯蛋白质(Carna Biosciences, #09-114)与100ng GST-标记的人类无活性MKK7纯蛋白质(Carna Bioscience, #07-147-10)在激酶缓冲液(Cell Signaling Technology, #9802)中培育。用100μM ATP在37℃下进行测定30分钟。在加入4×还原性SDS样品缓冲液后,通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)解析蛋白质,并如前所述进行免疫印迹分析。

[0344] ELISA测定

[0345] 按照制造商的方案,将PathScan®Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) Sandwich ELISA试剂盒(Cell Signaling Technology)用于ELISA测定。通常,接种500,000个细胞,并在第二天适当时用多西环素处理,并在37℃下培育48小时。用所述药物化合物或对照在5% FBS培养基中处理细胞1小时。在适当的处理时间后,用补充有磷酸酶和蛋白酶抑制剂(Sigma)的1×细胞裂解缓冲液(Cell Signaling Technology)在冰上裂解细胞。将每种稀释的细胞裂解液加入磷酸化-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) 兔mAb包被的微孔中,一式三份,并在4℃下培育过夜。样品用以下抗体处理,并分别在37℃下培育1小时和30分钟:检测抗体和HRP连接的二级抗体。根据制造商的方案,使用1×洗涤缓冲液在两次处理之间洗涤样品。将TMB底物添加到每个孔中,并在37℃下培育10分钟。随后,将STOP溶液添加到每个孔中,并使用iMark™微孔板吸光度读取器(Bio-Rad)在450nm处测量吸光度。图形显示了磷酸化JNK的相对水平。

[0346] 量化和统计分析

[0347] 所有样品均代表生物学重复。除非另有说明,否则数据以平均值表示,图形上显示的误差条表示±SEM。双尾学生t检验用于评估各组间测定差异的显著性,并用于测量治疗最后一天小鼠肿瘤体积的显著性。 $p < 0.05$ 的值被认为显著不同。

[0348] 人类样品

[0349] HNSCC患者含有扩增的MAP3K13的肿瘤片段得自NIH PDMR, #391396-364-R,或得自Crown Biosciences San Diego, #HN5120。

[0350] PDX小鼠模型

[0351] 按照NIH患者衍生模型存储库(PDMR)的SOP50101植入和低温保存组织以生成PDX的方案,将HNSCC患者、含有扩增的MAP3K13约 $2 \times 2 \times 2\text{mm}^3$ 的肿瘤块与Matrigel (Corning)一起植入小鼠皮下。5只NSG小鼠用于初始植入冷冻保存的肿瘤片段。每周测量两次体重和肿瘤大小。当肿瘤达到约 $1,000\text{mm}^3$ 时收获所述肿瘤,并将其用于生成PDX小鼠模型以测试GNE-3511。对于疗效研究,使用先前所述的方案将新鲜PDX肿瘤片段的第1代植入NSG小鼠体内。使用20只NSG小鼠(10只用于媒介物对照,10只用于GNE-3511治疗)。每周两次测量体重和肿瘤大小,直到肿瘤达到约 $150\text{-}200\text{mm}^3$,此时将所述小鼠随机分配到对照治疗队列或GNE-3511治疗队列,持续约4-8周。研究终点是体重减轻超过20%,肿瘤体积直径超过 2.0cm^3 ,或通过治疗观察到肿瘤显著(大于80%)消退。将GNE-3511用60% PEG 300MW、3当量0.1M

HC1、盐水(媒介物)溶解,并每天通过瘤内注射施用,剂量为50mg/kg。每周两次测量体重和肿瘤大小。在每项研究的终点,对肿瘤进行采集、清洁、称重和拍照分析。

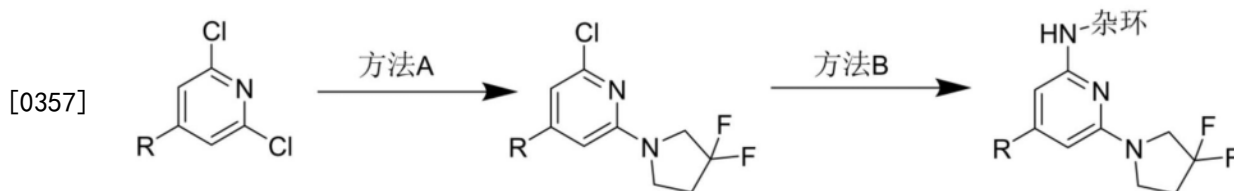
[0352] NCIPDMR HNSCC PDX小鼠模型的生物信息学分析

[0353] 关于核酸提取、文库制备、全外显子组测序和全转录组测序,请参阅NIH PDMR SOP的文件。内部生物信息学管道用于处理WES和RNA-seq数据。使用bcl2fastq工具(Illumina, v2.18)生成FASTQ数据,然后通过FASTQC运行进行质理验证。对于WES,通过Burrows-Wheeler比对工具将读数映射到人类hg19参考基因组。使用GATK最佳实践工作流程(32)处理产生的bam文件。拷贝数数据是通过使用CNVKit算法,以正常HapMap细胞系样品库作为参考(30),从WES数据推断出来的。实施使用STAR比对器的RSEM管道处理RNA-seq数据以获得基因表达数据(Li et al., BMC Bioinformatics 2011, 12(1):323)。在当前队列中,通过WES和RNA-seq生物信息学分析进行了58个PDX头颈部模型。在每个PDX模型中,它包括多个(4个 $\geq$ PDX)样品。对于拷贝数数据,在同一模型的多个PDX样品中,使用多数投票法来决定一致拷贝数状态(2=二倍体, >2和<5=增益, $\geq$ 5=扩增)。对于基因表达数据,取每千个碱基每百万映射读取的片段数(FPKM)的平均值来获得模型水平的基因表达。

[0354] 实施例1

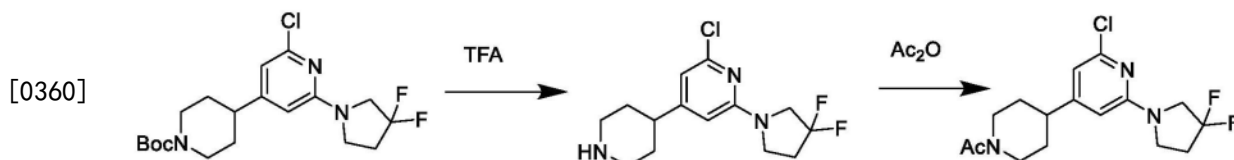
[0355] 化学合成与表征

[0356] 3,3-氟吡咯烷-1-基类似物的一般合成方案如下所示:



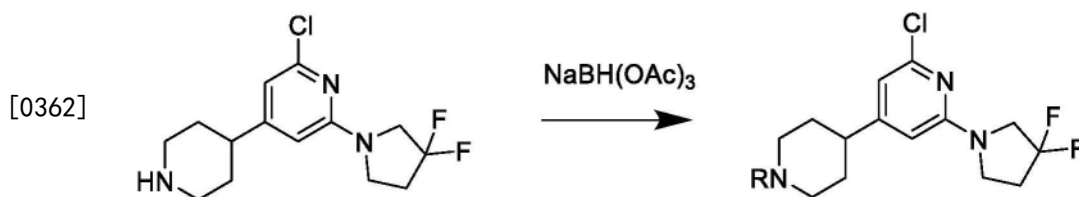
[0358] 方法A.在微波小瓶中将4-取代的2,6-二氯吡啶(3mmol)与5.25mmol(1.75当量)的3,3-二氟吡咯烷盐酸盐的二噁烷溶液(例如8mL)合并。加入二异丙基乙胺(9mmol,3当量),在130℃下搅拌加热密封小瓶16小时。然后用50mL水稀释冷却的反应,并用3 $\times$ 35mL乙酸乙酯萃取。将合并的有机层用Na₂SO₄干燥并在减压下浓缩。所得残留物通过快速色谱法(用乙酸乙酯/二氯甲烷进行梯度洗脱)纯化。

[0359] 方法B.将4-取代的2-(二氟吡咯烷-1-基)-6-氯吡啶(例如145 μ mol)与所需的2-氨基杂环(1.77 μ mol,1.22当量)、2-二环己基膦-2',6'-二异丙氧基-1,1'-联苯钯(II)苯乙胺氯化物(8.5mg,11.6 μ mol,0.08当量)和叔丁醇钾(24.5mg,218 μ mol,1.5当量)合并。将反应小瓶密封,然后抽空并回充氩气3 $\times$ 。加入二噁烷(2mL),并在145℃下加热反应45分钟。将冷却的反应直接吸附在硅藻土上,通过快速色谱法(用甲醇/二氯甲烷进行梯度洗脱)获得所需物料。



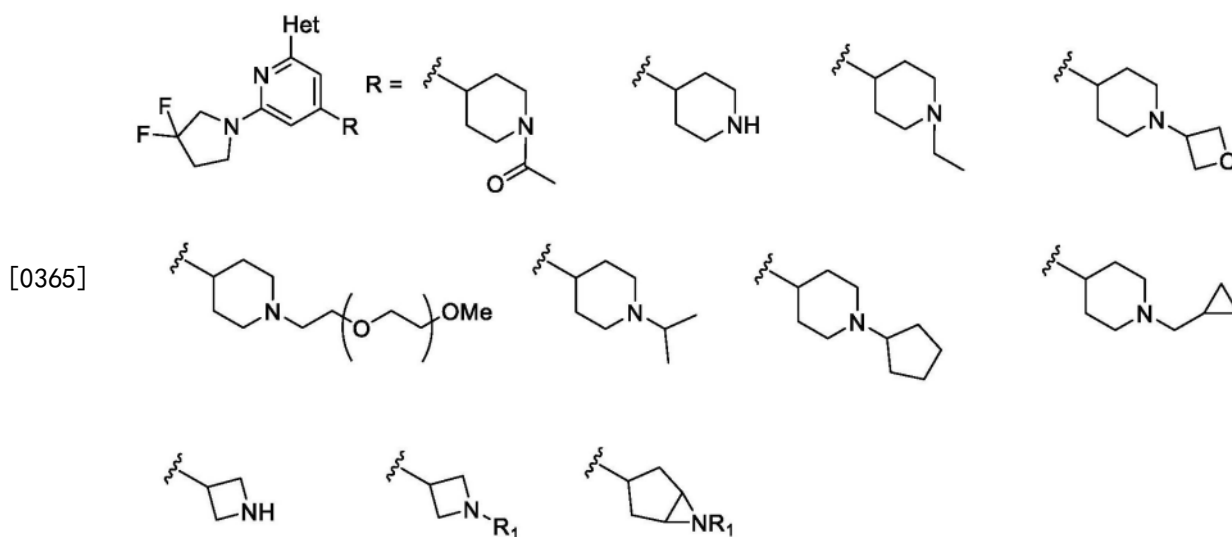
[0361] 2-氯-6-(3,3-二氟吡咯烷-1-基)吡啶-4-(基)吡啶-三氟乙酸酯。将4-(2-氯-6-(3,3-二氟吡咯烷-1-基)吡啶-4-(基)吡啶-1-羧酸叔丁酯(550mg,1.37mmol)溶于3mL二氯甲烷中,并在冰浴中搅拌溶液。加入三氟乙酸(3.0mL),继续搅拌20分钟。然后在减压下除去挥发

物,所得残留物无须进一步纯化即可使用。

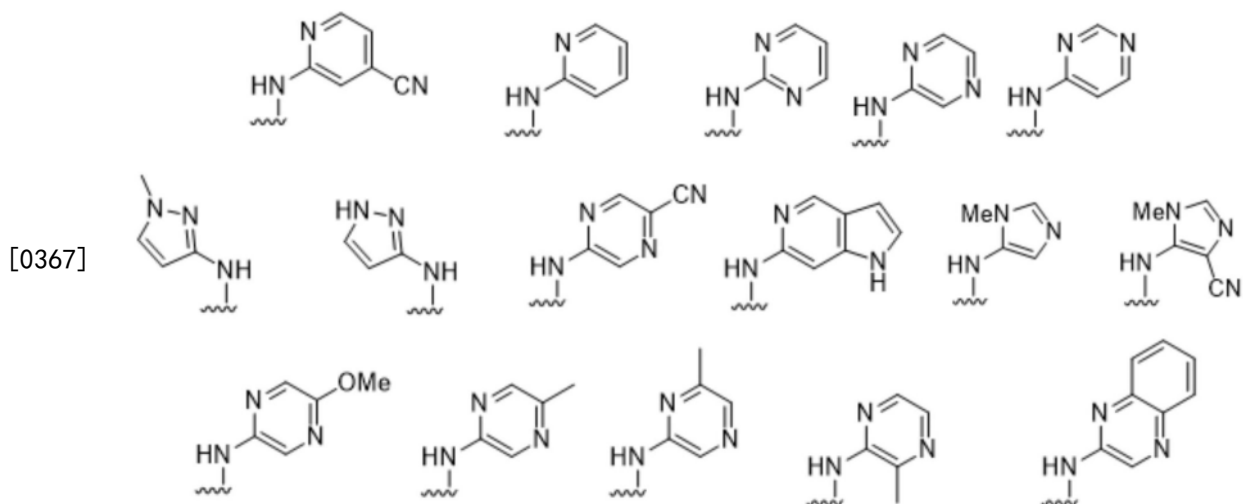


[0363] 将2-氯-6-(3,3-二氟吡咯烷-1-基)哌啶-4-基)吡啶三氟乙酸酯(1mmol)溶于25mL二氯甲烷中,并用50mL饱和 NaHCO_3 洗涤。有机层用 Na_2SO_4 干燥并在减压下浓缩。用5mL四氢呋喃提取所得残余物,并依次用酮或醛(2mmol,2当量)和三乙酰氧基硼氢化钠(371mg,1.75mmol,1.75当量)处理。通过色谱法监测反应。完成后,用25mL乙酸乙酯稀释反应,并用40mL NH_4Cl 洗涤。用 $2 \times 25\text{mL}$ 乙酸乙酯萃取水层;将合并的有机层用 Na_2SO_4 干燥并在减压下浓缩。所需物料通过快速色谱法(用甲醇/二氯甲烷进行梯度洗脱)纯化,并用于方法B。

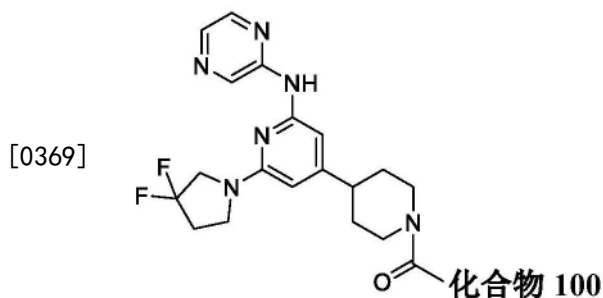
[0364] 示例性的R基团包括但不限于,1-乙酰基哌啶-4-基、哌啶-4-基、1-乙基哌啶-4-基、1-氧杂环丁烷-3-基哌啶-4-基、1-(聚乙二醇)哌啶-4-基、1-异丙基哌啶-4-基、1-环戊基哌啶-4-基、4-(1-环丙甲基)哌啶-4-基、氮杂环丁烷-3-基、1-乙酰基氮杂环丁烷-3-基、1-乙基氮杂环丁烷-3-基、N-氧杂环丁烷-3-基-3-氮杂环丁基、1-(聚乙二醇-氮杂环丁烷-3-基、1-异丙基氮杂环丁烷-3-基、1-环戊基氮杂环丁烷-3-基、1-(环丙甲基)氮杂环丁烷-3-基、(6-氮杂双环[3.1.0]-己烷-3-基)、(6-乙酰基-6-氮杂双环[3.1.0]-环己烷-3-基)、(6-乙基-6-氮杂双环[3.1.0]-己烷-3-基)、(6-氧杂环丁烷-3-基-6-氮杂双环[3.1.0]-己烷-3-基)、(6-聚乙二醇)-6-氮杂双环[3.1.0]-己烷-3-基)、(6-异丙基-6-氮杂双环[3.1.0]-己烷-3-基)、(6-环戊基-6-氮杂双环[3.1.0]-己烷-3-基)、(6-(环丙甲基)-6-氮杂双环[3.1.0]-己烷-3-基)、4-(四氢-2H-吡喃-4-基)：



[0366] 示例性杂环(Het)包括但不限于,吡啶-2-胺、嘧啶-2-胺、嘧啶-4-胺、吡嗪-2-胺、喹啉-2-胺、1H-吡咯并-[3,2-c]吡啶-6-胺、5-甲氧基吡嗪-2-胺、5-甲基吡嗪-2-胺、6-甲基吡嗪-2-胺、3-甲基吡嗪-2-胺、5-氰基吡嗪-2-胺、1-甲基-1H-咪唑-4-基、1-甲基-1H-吡唑-3-基、1H-吡唑-3-基和1-甲基-1H-咪唑-5-基：

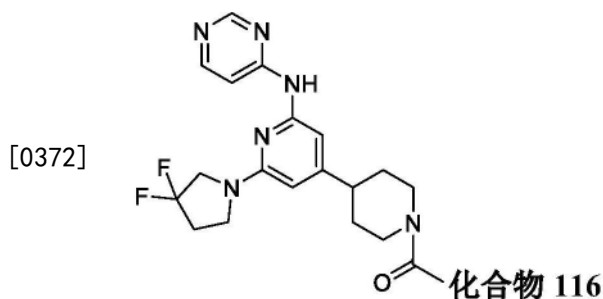


[0368] 1-(4-(2-氯-6-(3,3-二氟吡咯烷-1-基)吡啶-4-基)哌啶-1-基)乙烷-1-酮。将4-(2-氯-6-(3,3-二氟吡咯烷-1-基)吡啶-4-基)哌啶-1-羧酸叔丁酯(0.55g, 1.37mmol)溶于3mL DCM中,将溶液在冰浴中冷却并用3mL TFA处理。20分钟后,在减压下浓缩反应。用15mL DCM提取所得残留物,用N-甲基吗啉(754 μ L, 693mg, 5当量)和乙酸酐(136 μ L, 147mg, 1.05当量)处理,并在室温下搅拌1小时。然后用DCM稀释反应,并用50mL H₂O洗涤。水层用2 $\times$ 40mL DCM萃取,合并的有机层用Na₂SO₄干燥并蒸发,得到所需物料,用于方法B。



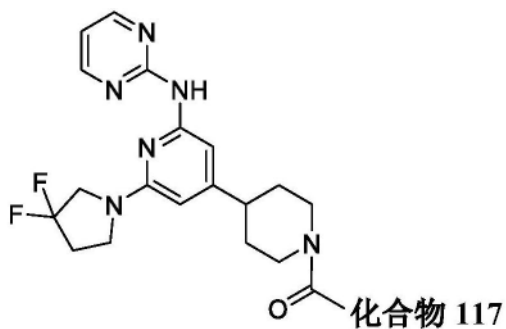
[0370] LCMS: 在254nm处为99.3%; $m/z=403.0$

[0371] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 9.23 (s, 1H), 8.17 (dd, $J=2.7, 1.5$ Hz, 1H), 8.11 (d, $J=2.7$ Hz, 1H), 7.08 (s, 1H), 6.45 (s, 1H), 5.80 (d, $J=1.1$ Hz, 1H), 4.86-4.77 (m, 1H), 3.95 (d, $J=13.8$ Hz, 1H), 3.87 (t, $J=13.1$ Hz, 2H), 3.73 (s, 2H), 3.17 (td, $J=13.1, 2.6$ Hz, 1H), 2.73-2.57 (m, 2H), 2.50 (tt, $J=13.8, 7.2$ Hz, 2H), 2.15 (s, 3H), 1.87 (t, 2H), 1.64 (qd, $J=12.7, 4.3$ Hz, 3H)。



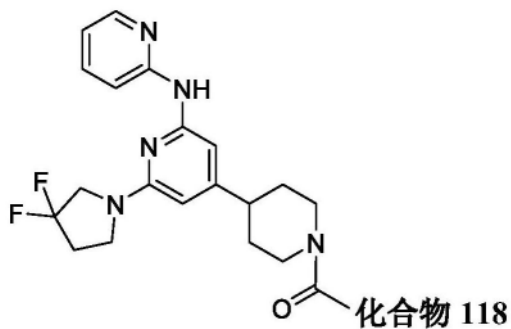
[0373] LCMS: 在254nm处为99.2%; $m/z=403.2$

[0374]



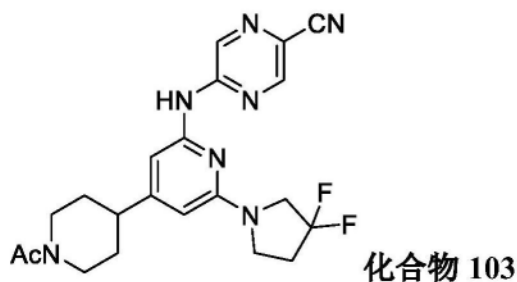
[0375] LCMS: 在254nm处为100%, $m/z=403.2$

[0376]



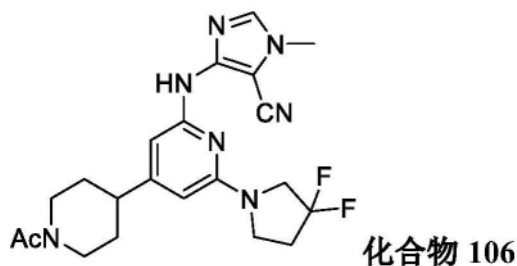
[0377] LCMS:98.7% (254nm)。C₂₁H₂₆F₂N₅O⁺计算值:402.2,实测值:402.2

[0378]



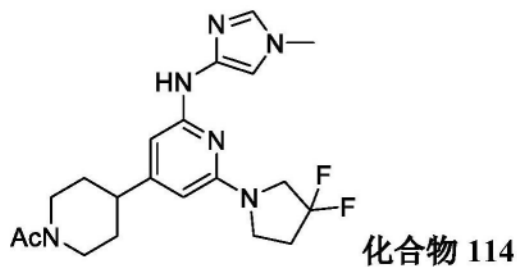
[0379] LCMS:94% (254nm)。C₂₁H₂₄F₂N₇O⁺计算值:428.2;实测值:428.2

[0380]



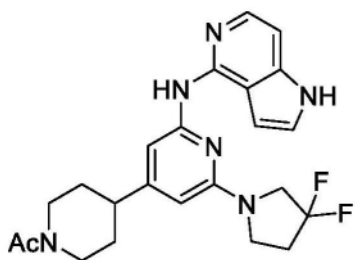
[0381] LCMS:100% (254nm)。C₂₁H₂₆F₂N₇O⁺计算值:430.2;实测值:430.2

[0382]



[0383] LCMS:100% (254nm)。C₂₀H₂₇F₂N₆O⁺计算值:405.2;实测值:405.2

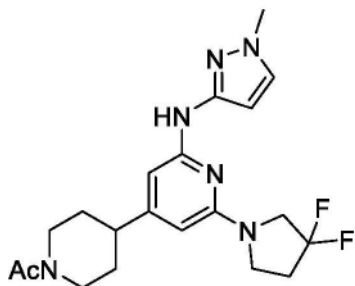
[0384]



化合物 119

[0385] LCMS: 100% (254nm) $\cdot C_{23}H_{27}F_2N_6O^+$ 计算值: 441.2, 实测值: 441.2

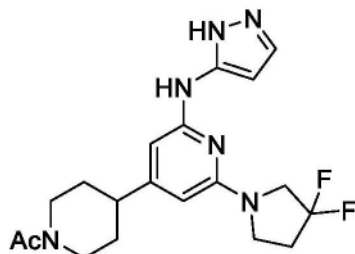
[0386]



化合物 101

[0387] LCMS: 100% (254nm) $\cdot C_{20}H_{27}F_2N_6O^+$ 计算值: 405.2, 实测值: 405.2

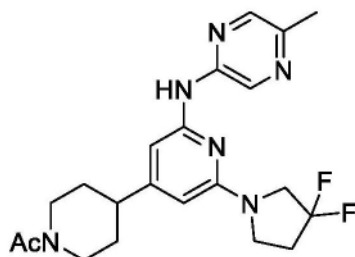
[0388]



化合物 102

[0389] LCMS: 100% (254nm) $\cdot C_{19}H_{25}F_2N_6O^+$ 计算值: 391.2, 实测值: 391.2

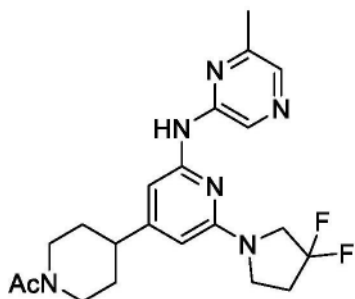
[0390]



化合物 107

[0391] LCMS: 94.9% (254nm) $\cdot C_{21}H_{27}F_2N_6O^+$ 计算值: 417.2, 实测值: 417.2

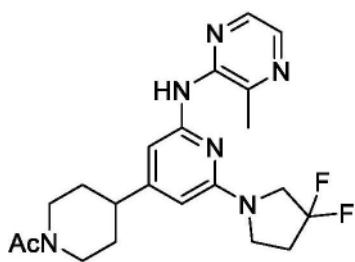
[0392]



化合物 108

[0393] LCMS: 98.5% (254nm) $\cdot C_{21}H_{27}F_2N_6O^+$ 计算值: 417.2, 实测值: 417.2

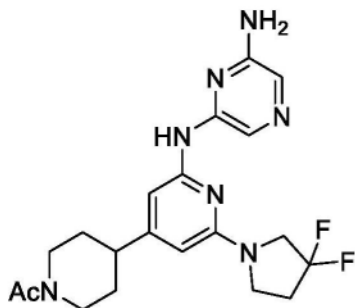
[0394]



化合物 109

[0395] LCMS: 99.2% (254nm)。 $C_{21}H_{27}F_2N_6O^+$ 计算值: 417.2, 实测值: 417.2

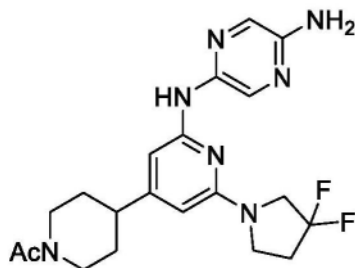
[0396]



化合物 110

[0397] LCMS: 95.0% (254nm)。 $C_{20}H_{26}F_2N_7O^+$ 计算值: 418.2, 实测值: 418.2

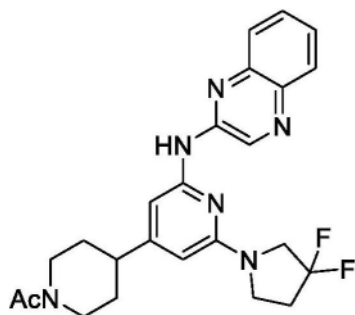
[0398]



化合物 111

[0399] LCMS: 98.7% (254nm)。 $C_{20}H_{26}F_2N_7O^+$ 计算值: 418.2, 实测值: 418.2

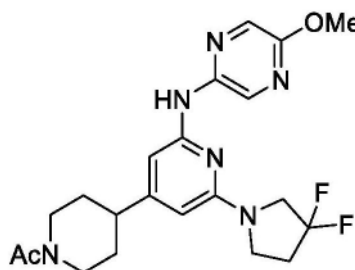
[0400]



化合物 112

[0401] LCMS: 99.4% (254nm)。 $C_{24}H_{27}F_2N_6O^+$ 计算值: 453.2, 实测值: 453.2

[0402]



化合物 115

[0403] LCMS: 98.6% (254nm)。 $C_{21}H_{27}F_2N_6O_2^+$ 计算值: 433.2, 实测值: 433.2

[0404] 实施例2

[0405] 带有3q扩增子的鳞状细胞癌中的LZK抑制作用

[0406] 评估了双亮氨酸拉链激酶 (DLK) 抑制剂GNE-3511对LZK催化活性的抑制作用。LZK和DLK激酶结构域的同源性超过90%，据报道，GNE-3511还能抑制LZK的催化活性 (Patel et al., J Med Chem 2015, 58:401-418)。为了验证GNE-3511 (图1) 会抑制细胞中LZK催化活性，在3q扩增子阳性CAL33 HNSCC细胞系中诱导多西环素 (dox) 诱导型LZK的表达。GNE-3511是细胞中有效的LZK抑制剂，如通过抑制下游JNK通路活化所测量的那样 (图2A-C、图3、图4)。在体外观察到类似的结果 (图5)。

[0407] 用200nM的GNE-3511处理携带扩增的MAP3K13的HNSCC细胞 (CAL33和BICR56) 使得集落形成减少80%或更多，当从这些细胞中去除LZK时观察到了表型模拟的结果 (Edwards et al., Cancer Res 2017, 77:4961-4972)，而在缺少扩增的MAP3K13的细胞 (BEAS-2B和MSK921) 中，集落形成仅略有减少 (图6A和图6B)。量化结果显示CAL33和BICR56细胞系的生长显著降低。 $*p<0.05$ ，学生t检验。

[0408] 为了确定携带所述3q扩增子的其他鳞状细胞癌是否对LZK抑制敏感，用500nM GNE-3511处理LK2和NCI-H520肺鳞状细胞癌 (LSCC) 细胞。观察到集落形成分别减少45%和55%，这表明其他鳞状细胞癌依赖LZK来维持活力 (图7)。在短期MTS测定中，还观察到所述CAL33和BICR56细胞的活力显著降低， IC_{50} 分别为 687.7 ± 114.1 nM和 410.5 ± 59.6 nM (图8)。使用GraphPad Prism 8计算 IC_{50} 值。

[0409] 激酶抑制剂是一种混乱的化合物，通常会靶向额外的激酶，GNE-3511最初是作为DLK抑制剂开发的。为了验证药物诱导的毒性是特异性地由LZK抑制引起的，生成了耐药突变体形式的LZK (Q240S)，这种突变体形式在所述药物存在的情况下保持催化活性，如通过JNK通路活化所评估的那样 (图9、图10)。如图9所示，Q240S在GNE-3511存在的情况下保持催化活性，如通过下游JNK磷酸化所评估的那样。图10显示1小时GNE-3511处理特异性抑制LZK，如通过在293T细胞中过表达LZK^{Q240S}耐药突变体挽回JNK信号传导所观察到的那样。LZK^{Q240S}在CAL33和BICR56细胞中的表达几乎完全挽回了GNE-3511诱导的毒性，表明GNE-3511通过LZK抑制特异性抑制HNSCC细胞活力，并证实LZK是HNSCC中的药物靶点 (图11； $***p<0.001$ ， $**p<0.01$ ，学生t检验)。

[0410] 在患者衍生的3q扩增HNSCC的异种移植小鼠模型中对GNE-3511的评估表明，50mg/kg GNE-3511可以在体内显著抑制HNSCC肿瘤生长，3只小鼠的肿瘤几乎完全消退并且检测不到肿瘤 (图12A-12C； $***p<0.0001$ ，双因素方差分析)。图13A-13D显示，在具有扩增LZK的两个体内HNSCC PDX小鼠模型中，与媒介物对照组 (50mg/kg，每日一次，5天治疗/2天停止) 相比，用GNE-3511 (50mg/kg，每日一次，5天治疗/2天停止) 治疗的小鼠 ($n=10$) 的肿瘤生长显著被抑制 (图13A、图13B)，而在缺少扩增LZK的HNSCC PDX模型中，肿瘤体积没有变小 (图13C、图13D)。图中显示了平均肿瘤体积 $\pm$ SEM。治疗结束时的平均肿瘤体积。平均值 $\pm$ SEM；学生t检验； $*p<0.05$ 。在基于CAL33的HNSCC异种移植小鼠模型中，观察到用100mg/kg GNE-3511治疗的类似结果 (图14；平均值 $\pm$ SEM， $***p<0.0001$ ，双因素方差分析)。

[0411] 免疫组织化学 (IHC) 染色显示，与对照相比，GNE-3511治疗的肿瘤中裂解的半胱天冬酶-3表达增加 (图15A和图15B；平均值 $\pm$ SEM，学生t检验， $*p<0.001$)。由于在该浓度和给药方案 (100mg/kg，每日两次，5天治疗/2天停止) 下的毒性，研究提前终止，并观察到所述抑制剂治疗小鼠的体重下降。在患者衍生的3q扩增HNSCC的异种移植小鼠模型 (PDX模型：

391396-364-R)中,利用每天施用较低剂量(50mg/kg,每日一次),对GNE-3511进行了进一步的体内评估。GNE-3511能明显抑制HNSCC PDX肿瘤在体内的生长,三只小鼠的肿瘤几乎完全消退,检测不到肿瘤(图12A-12C),对所述小鼠体重没有影响。

[0412] 进一步检查了LZK在NCI患者衍生模型存储库(PDMR)的其他HNSCC PDX模型中的表达和扩增。利用58个HNSCC PDX小鼠模型的下一代测序(NGS)和RNA测序数据,揭示了5个样品中MAP3K13扩增,包括PDX 391396-364-R,另外31个样品含有LZK增益。在这些患者样品中,MAP3K13被确定为在3号染色体内扩增最多的基因之一。最后,MAP3K13拷贝数的增加与mRNA表达水平的提升高度相关(图16)。

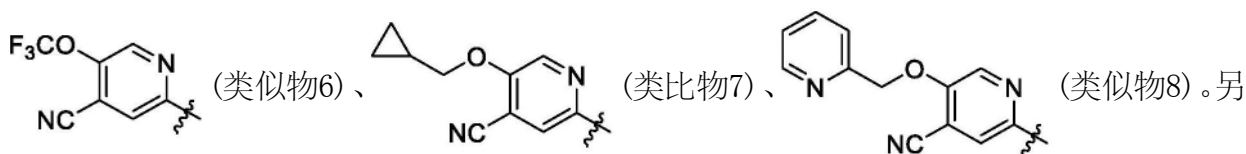
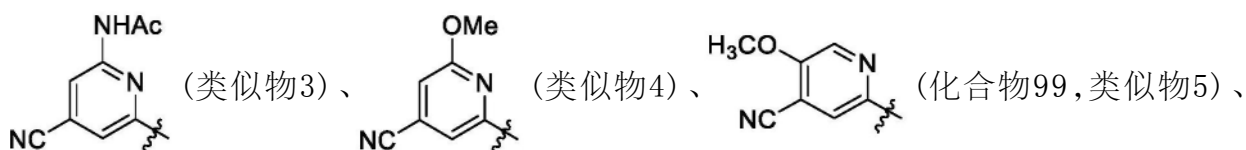
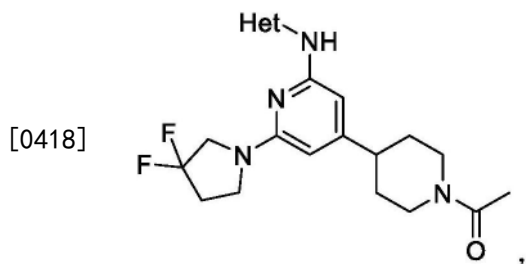
[0413] 进行反相蛋白质阵列(RPPA)以确定扩增的MAP3K13的下游靶标。用两种独特的LZK shRNA在CAL33、BICR56和MSK921细胞系中Dox诱导性去除LZK(例如Edwards et al和图17所述),可降低3q扩增子阳性HNSCC细胞(CAL33和BICR56)中的c-MYC丰度,但不能降低对照细胞(MSK921)中的c-MYC丰度;通过蛋白质印迹分析证实了这一点。图18显示了在从NCIPDMR获得58个HNSCC PDX小鼠模型的3号染色体拷贝数(CN)谱。每一行表示一个PDX模型的拷贝数谱。模型按MAP3K13拷贝数数据(突出显示为黄线)排序。热图颜色表示拷贝数的log2比率。图19显示了MAP3K13拷贝数不同的58个PDX模型中,MAP3K13基因表达的箱线图。X轴表示MAP3K13的拷贝数状态,其中2=二倍体,>2和<5=增益,≥5=扩增。Y轴表示MAP3K13基因表达,以平均每千个碱基每百万映射读取的片段数(FPKM)表示。每个黑点表示一个PDX模型。MAP3K13的拷贝数与基因表达高度相关(ANOVA, $p=1.34e^{-6}$)。图20是RPAA测定结果,证实了缺少LZK的CAL33和BICR56细胞48小时内c-MYC水平降低。图21是缺少LZK的细胞48小时内c-MYC丰度的蛋白质印迹。图22的蛋白质印迹显示了在缺少LZK的CAL33细胞中48小时内几种细胞周期组分(Myc、CDK4、CDK6、细胞周期蛋白D1、CDK2、细胞周期蛋白E1、细胞周期蛋白A2、细胞周期蛋白B1、CDK1、p27和GAPDH)的表达水平。这些结果证实了最近的高通量siRNA筛选,其确认MAP3K13为c-MYC过表达特异性的细胞存活所需的基因(Toyoshima et al., PNAS USA 2012, 109:9545-9550)。c-MYC表达的损失依赖于蛋白酶体介导的降解,因为添加蛋白酶体抑制剂MG132(10μM, 6小时)抑制了这种损失,并挽回了c-MYC水平的降低(图23)。这种观察结果与先前的报道一致,即LZK磷酸化并稳定E3泛素连接酶TRIM25的表达,所述E3泛素连接酶泛素化FBXW7,其是SKP1-Cullin-F-Box(SCF)复合物的亚基,直接调节c-MYC的稳定性(Zhang et al., Cell Death Differ 2020, 27:420-433)。通过LZK的缺失或催化抑制造成TRIM25磷酸化的损失,导致连接酶的降解、FBXW7的稳定性增强和c-MYC的降解(同上)。

[0414] 为了确定LZK催化抑制是否会抑制c-MYC表达,用500nM GNE-3511处理CAL33细胞,并随着时间的变化监测c-MYC的表达。在第一个小时内,所述LZK抑制剂导致c-MYC水平降低,并随后维持72小时(图24)。重要的是,LZK^{Q240S}耐药突变体的表达挽回了c-MYC表达的损失,表明LZK催化活性对于在具有扩增MAP3K13的HNSCC细胞中维持c-MYC稳定性是至关重要的(图25)。因此,LZK既有依赖激酶的功能,也有不依赖激酶的功能,可促进癌症。

[0415] 实施例3

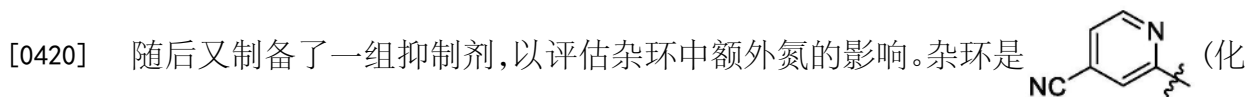
[0416] MLK对HNSCC和LSCC的抑制

[0417] 制备了一组8种抑制剂,并对其疗效进行了评估。所述化合物的一般结构如下:

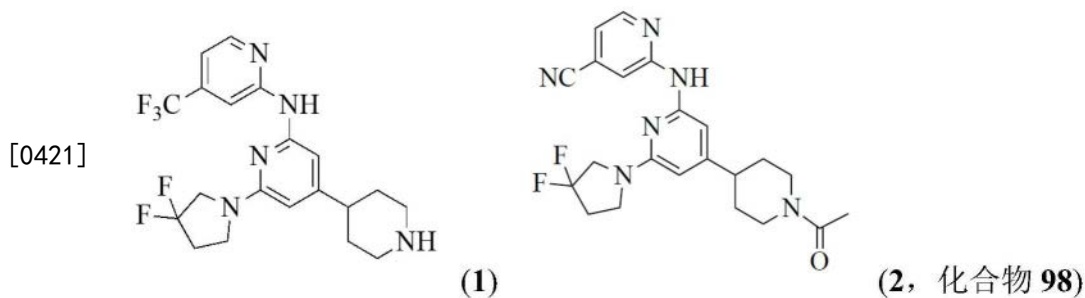


一种抑制剂包括作为杂环的 并且包括代替母体结构的 -N(H)- 基团的 -N

(CH₃) -。类似物1-8对下游JNK通路活化的抑制通过所述的ELISA测定进行评估。结果(图26)显示对氨基吡啶环上取代的耐受性很窄,只有化合物99(类似物5)进行了成功的抑制。连接胺的甲基化是不可耐受的。

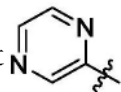
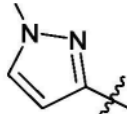
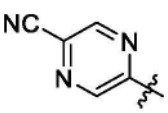
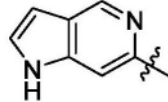
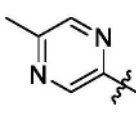
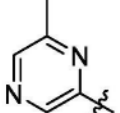
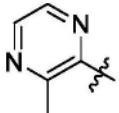
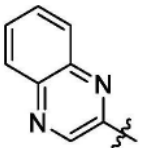
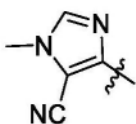
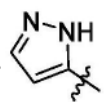
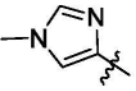
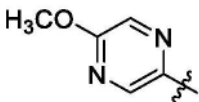
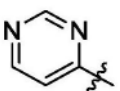
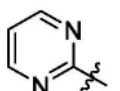
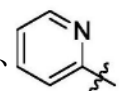


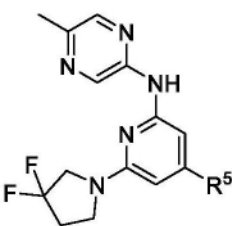
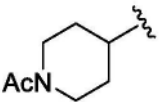
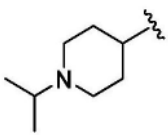
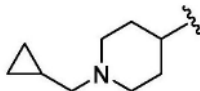
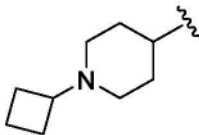
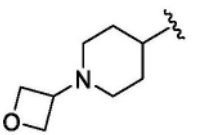
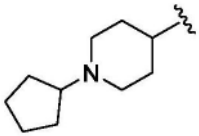
合物98)、、、 (化合物100) 和 。只有化合物100是有效的抑制剂。



[0422] GNE-3511和LZK抑制剂1的比较表明LZK抑制剂1是较差的细胞LZK抑制剂。然而, LZK抑制剂2是有效的LZK抑制剂,在100nM下抑制LZK活性72小时,类似于用GNE-3511处理(图27-30)。此外,LZK抑制剂2抑制3q扩增子阳性HNSCC细胞—CAL33、BICR56和Detroit 562细胞(图31A、图31B),以及LSCC细胞—LK2和NCI-H520细胞(图32)中的集落形成。LZK^{Q240S}耐

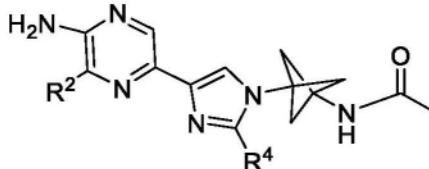
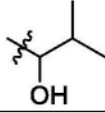
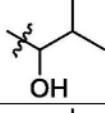
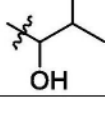
药突变体表达挽回了药物诱导的CAL33细胞活力下降(图33;*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, 学生t检验)。图34显示在用LZK抑制剂2 (250nM) 处理期间LZK^{Q240S}耐药突变体表达也挽回了JNK信号传导。

[0423] 制备了几种其他的LZK抑制剂, 其中杂环是  (100)、 (101)、 (103)、 (104)、 (107)、 (108)、 (109)、 (112)、 (113)、 (114)、 (115)、 (115)、 (116)、 (117)、 (118)。在多西环素诱导的CAL33细胞与1 μ M LZK抑制剂培育1小时后测定磷酸化JNK水平。结果如图35-37所示。化合物107特别有效。

[0424] 根据下式  制备其他的类似物, 其中R⁵为  (159)、 (160)、 (161)、 (162)、 (163)、 (164)。

[0425] 还评估了其他三种类似物:

[0426]

		
化合物	R ²	R ⁴
44	-CF ₃	
45	-CN	
46	-H	

[0427] 在多西环素诱导的CAL33细胞与1 μ M LZK抑制剂培育1小时后测定磷酸化JNK水平。结果如图38和图39所示。化合物164比GNE-3511更有效,而化合物161、化合物162、化合物159的活性相似。Kd值如下:44—94nM、45—440nM和46—>10,000nM、159—7.7nM(比GNE-3511高+4.5)、160—9.6nM、161—3.3nM(比GNE-3511高+0.1)、162—5.8nM(比GNE-3511高+2.6)、163—19nM、164—2.3nM(GNE-3511低-0.9)。图40-42分别显示化合物164、化合物161和化合物162对LZK的剂量依赖性抑制。

[0428] 评估了几种所述化合物对LZK活性以及相对于DLK的LZK特异性。结果汇总在表20中。结果表明,化合物164对LZK的亲合力最高,并且具有相对较强的LZK抑制作用,IC₅₀为~100nM。

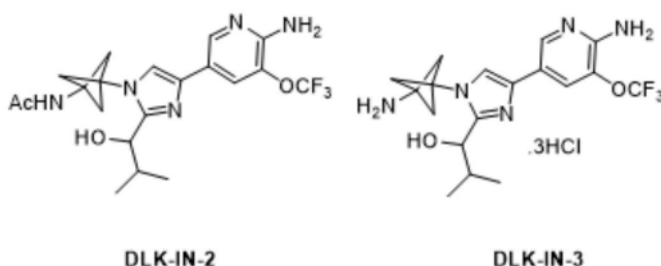
[0429] 表20

[0430]

排名 (LZK)	化合物	LZK Kd (nM)	DLK Kd (nM)	比率 (LZK/DLK)
1	化合物164	2.3	4.5	0.5
2	GNE-3511	3.2	1.1	2.9
3	化合物161	3.3	4.3	0.8
4	化合物162	5.8	9.2	0.6
5	化合物98	5.9	3.1	1.9
6	化合物159	7.7	5.9	1.3
7	化合物160	9.6	11	0.9

[0431] 几种LZK抑制剂(结构见表1-10)的PAMPA(平行人工膜渗透性测定)结果如表21所示。已知化合物DLK-IN2和DLK-IN3的结构(Patel et al., J Med.Chem.2015,58:8182-8199;US2018/0057507 A1;US10,093,664B2)如下所示。

[0432]



[0433] 表21

[0434]

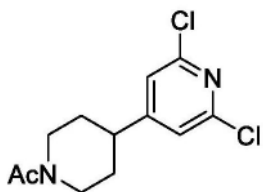
LZK 抑制剂	平均渗透率 (10^{-6} cm/s)	平均渗透率与低渗透率对照 (阿替洛尔) 的比率 ($\times 10^4$ cm/s)
100	16.9436	11413.89
GNE-5311	5.3119	3578.32
98	3.445	2320.34
DLK-IN-3	2.9021	1954.96
99	1.5167	1021.68
DLK-IN-2	0.5352	360.53
阿替洛尔	0.00	低渗透率对照
维拉帕米	16.49	低渗透率对照

[0435] 实施例4

[0436] 其他化合物合成

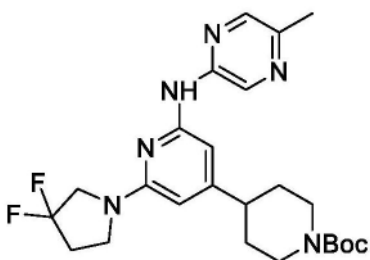
[0437] 从商业来源购买试剂,使用时无须进一步纯化。如前所述制备各种中间体 (Patel et al., J Med.Chem.2015,58:8182-8199)。在Biotage Initiator+上进行微波反应。除非另有说明,否则通过LCMS测定,化合物纯度>95%。在400MHz Varian NMR上获得NMR谱,并使用MestReNova软件进行处理。使用Agilent InfinityLab LC/MS检测器和Poroshell120SB-C18 2.7 μ m色谱柱(4.6 $\times$ 50mm),在Agilent Technologies 1290Infinity HPLC系统上获取LCMS数据。使用Agilent 1200系列系统和30mm $\times$ 150mm Xbridge C18色谱柱(Waters)进行制备型HPLC,用20-80%溶剂B(MeCN,0.05%TFA)/溶剂A(水,0.05%TFA)进行梯度洗脱。在Teledyne Isco Combiflash Rf+上进行快速色谱法。HRMS数据由运行MassLynx 4.1版的Waters XEVO G2-XS QTOF采集。

[0438]



[0439] (Patel et al., J Med.Chem.2015,58:8182-8199)

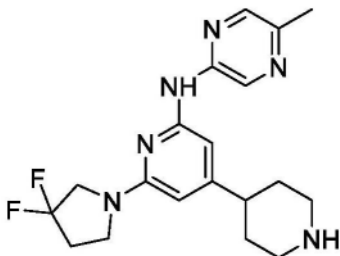
[0440]



[0441] 将4-(2-氯-6-(3,3-二氟吡咯烷-1-基)吡啶-4-基)哌啶-1-羧酸叔丁酯(704mg,

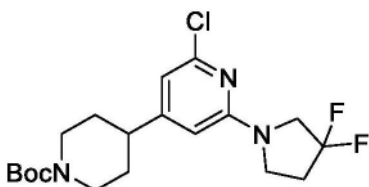
1.75mmol) 与2-氨基-5-甲基吡嗪 (233mg, 2.14mmol, 1.22当量)、Pd-RuPHOS (51mg, 70 μ mol, 0.04当量) 和叔丁醇钾 (590mg, 5.25mmol, 3当量) 在20mL微波小瓶中合并。将所述小瓶密封并排空, 并用回充Ar 3x, 然后加入10mL二噁烷。将反应在微波炉于140℃加热45分钟, 然后冷却至室温并通过硅藻土过滤。用3倍乙酸乙酯洗涤滤垫; 在减压下浓缩合并的滤液并通过快速色谱法 (0->15% MeOH/DCM梯度) 分离产物。734mg黄色固体, 1.55 μ mol, 产率88.3%。

[0442]



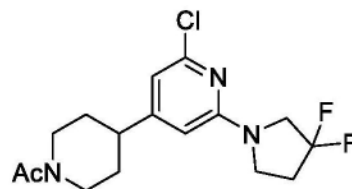
[0443] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 9.29 (d, $J=1.5\text{Hz}$, 1H), 8.06-8.01 (m, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.28 (s, 1H), 5.80 (s, 1H), 3.86 (t, $J=13.2\text{Hz}$, 2H), 3.71 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 3.31 (d, $J=12.0\text{Hz}$, 2H), 2.80 (td, $J=12.1, 2.9\text{Hz}$, 2H), 2.61-2.40 (m, 6H), 1.93-1.69 (m, 4H). TFA脱保护: 萃取物734mg->530mg产物 (游离胺)。

[0444]



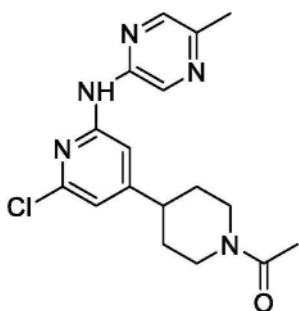
[0445] 4-(2-氯-6-(3,3-二氟吡咯烷-1-基)吡啶-4-基)哌啶-1-羧酸叔丁酯:

[0446] (Patel et al., J Med.Chem.2015,58:8182-8199)



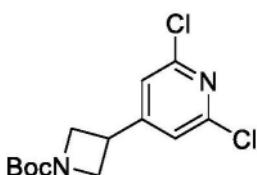
[0447] 向冰冷却的4-(2-氯-6-(3,3-二氟吡咯烷-1-基)吡啶-4-基)哌啶-1-羧酸叔丁酯 (502mg, 1.25mmol) 溶液中加入2mL的TFA。LCMS分析表明反应在20分钟后完成, 在减压下除去挥发物。用50mL的DCM提取所得残留物, 并用100mL饱和 NaHCO_3 洗涤。进行分层; 用另外的2 $\times$ 50mL的DCM萃取水层, 用 Na_2SO_4 干燥合并的有机层并在减压下浓缩。将由此获得的残留物溶解在10mL的DCM中, 并在室温下用N-甲基吗啉 (206 μ L, 1.87mmol, 1.5当量) 和乙酸酐 (130 μ L, 1.37mmol, 1.1当量) 处理。30分钟后, 在减压下浓缩反应, 然后在50mL的DCM提取。溶液用1 $\times$ 50mL水、1 $\times$ 50mL饱和 NH_4Cl 、然后1 $\times$ 50mL饱和 NaHCO_3 洗涤, 然后用 Na_2SO_4 干燥并在减压下浓缩, 得到灰白色泡沫的产物 (413mg, 1.20mmol, 96%)。粗制物料无需进一步提纯即可使用。HRMS: $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{ClF}_2\text{N}_3\text{O}^+$ 计算值为344.1341, 实测值为344.1339。

[0448]



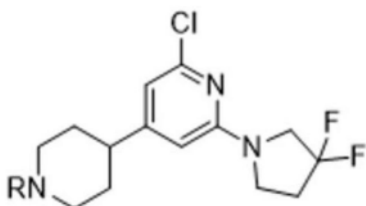
[0449] 313mg, 1.14mmol, 产率78.9%。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ8.67 (d, J=1.4Hz, 1H), 8.09 (dd, J=1.5, 0.7Hz, 1H), 7.54-7.49 (m, 1H), 6.77 (d, J=1.1Hz, 1H), 4.82 (dq, J=13.4, 2.2Hz, 1H), 4.01-3.92 (m, 1H), 3.18 (td, J=13.1, 2.6Hz, 1H), 2.75 (tt, J=12.1, 3.6Hz, 1H), 2.63 (td, J=12.9, 2.7Hz, 1H), 2.51 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 2.01-1.87 (m, 2H), 1.63 (qt, J=12.6, 4.1Hz, 2H)。

[0450]



[0451] (Patel et al., J Med.Chem.2015, 58:8182-8199)

[0452]

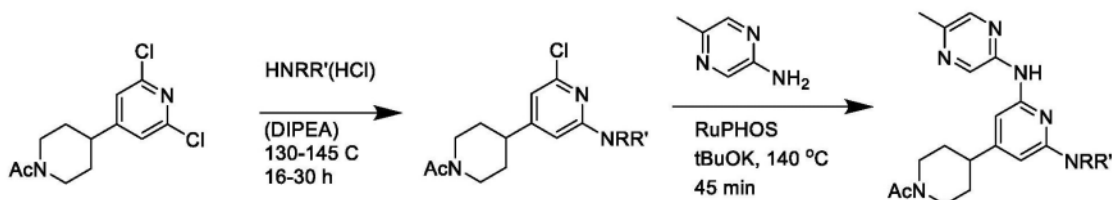


[0453] R=除Boc或氧杂环丁烷以外的任何基团

[0454] 通常,将4-乙酰基哌啶取代的二氯吡啶与3,3'-二氟吡咯烷进行SnAr反应,然后在钌催化下与所选择的氨基取代的杂环进行交叉偶联(途径A)。这一途径有效,但在探究二氟吡咯烷的修饰方面,特别是在挥发性胺方面效率较低。因此,采用替代途径,其中首先安装杂环胺取代基,然后安装脂族基胺(途径B)。用乙酰化哌啶取代基进行初步研究,将该取代基安装在序列的开头。随后,哌啶氮的烷基化通过用NaBH₃CN还原胺化来完成,所述还原胺化可以在首先除去Boc保护基团之后过程中的任何步骤进行。对氮杂环丁烷取代基的处理遵循类似的路径。在SnAr/RuPHOS偶联或Xantphos/RuPHOS途径之前,通常会购买或预先安装中心吡啶4-位上的替代取代基。

[0455] 途径A

[0456]

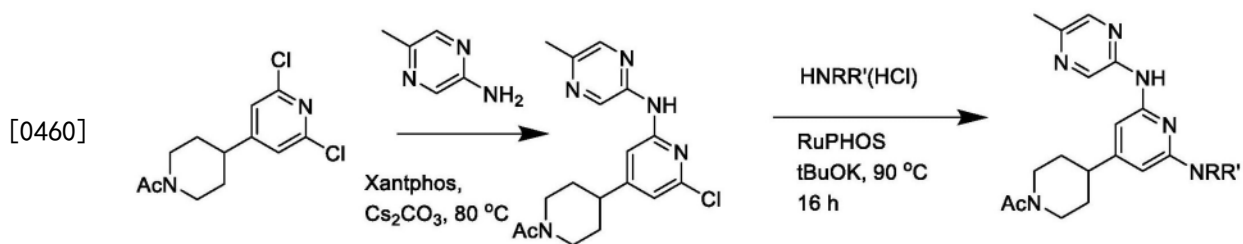


[0457] 1.SnAr一般程序:将4取代的2,6-二氯吡啶(0.366mmol)在微波小瓶中与胺盐酸盐(0.65mmol,1.75当量)和DIPEA(1.10mmol,3当量)的1mL DMA溶液合并。将搅拌的反应在130 °C下加热16小时,然后冷却并在50mL乙酸乙酯和100mL饱和NH₄Cl水溶液之间分配。水层用

另外的2×50mL乙酸乙酯萃取,合并的有机层用Na₂SO₄干燥并在减压下浓缩。将所得残余物进行快速色谱法(己烷:乙酸乙酯梯度),得到所需加合物。

[0458] 2. RuPHOS一般程序:将4,6-取代的2-氯吡啶(72.7μmol)与2-氨基取代的杂环(80μmol, 1.1当量)、氯{[RuPhos][2-(2-氨基乙基苯基)]钯(II)}/[RuPhos]掺合物(摩尔PdP/P=1:1)(2.9μmol, 0.04当量)和叔丁醇钾(109μmol, 1.5当量)在装有搅拌棒的微波小瓶中合并。将所述小瓶密封并排空,并用Ar 3x回充。加入1mL干燥的二噁烷,并将反应于140℃下在微波炉中加热30分钟。冷却后,通过硅藻土过滤反应。残留物用3×5mL乙酸乙酯冲洗,合并的滤液在减压下浓缩。通过制备型HPLC(20→80% MeCN, 0.05% TFA)或快速色谱法(DCM: MeOH梯度)分离所需产物。

[0459] 途径B



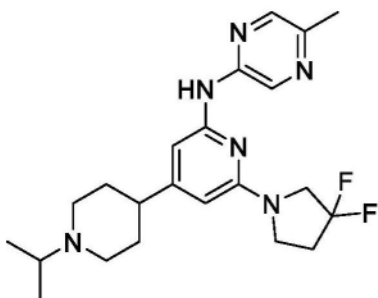
[0461] 1. Xantphos.

[0462] 将1-(4-(2,6-二氯吡啶-4-基)吡啶-1-基)乙烷-1-酮(350mg, 1.28mmol)与2-氨基-5-甲基吡嗪(143mg, 1.31mmol, 1.02当量)、Xantphos(47.5mg, 82μmol, 0.06当量)、三(二亚苺基丙酮)二钯(0)(Pd₂dba₃, 27mg, 29.5μmol)和Cs₂CO₃(585mg, 1.79mmol, 1.4当量)在装有搅拌棒的微波小瓶中合并。密封所述小瓶,然后排空并用Ar 3x回充。加入二噁烷(4mL),并在80℃于微波炉中加热反应20小时。将冷却的反应通过硅藻土过滤,用3×5mL DCM冲洗,并在减压下浓缩合并的滤液。对残留物进行快速色谱法(以0→10% MeOH/DCM进行梯度洗脱),得到319mg(92.5μmol, 72.2%产率)产物1-(4-(2-氯-6-((5-甲基吡嗪-2-基)氨基)吡啶-4-基)吡啶-1-基)乙烷-1-酮,为灰白色固体。

[0463] 2. RuPHOS.

[0464] 1-(4-(2-氯-6-((5-甲基吡嗪-2基)氨基)吡啶-4-基)吡啶-1-基)乙烷-1-酮(25mg, 72.3μmol)与氯{[RuPhos][2-(2-氨基乙基苯基)]-钯(II)}/[RuPhos]掺合物(摩尔PdP/P=1:1)(5.3mg, 7.2μmol, 0.10当量)、3,3'-二氟氮杂环丁烷盐酸盐(28.1mg, 217μmol, 3当量)和叔丁醇钾(48.7mg, 434μmol, 6当量)在装有搅拌棒的微波小瓶中合并。密封所述小瓶,然后排空并用Ar 3x回充。加入干燥的二噁烷(1.5mL),并将反应于微波炉中在90℃下加热20小时。通过硅藻土过滤反应,用3×2mL乙酸乙酯冲洗残留物,并在减压下浓缩滤液。通过制备型HPLC得到35.5mg所需产物1-(4-(2-(3,3-二氟氮杂环丁烷-1-基)-6-((5-甲基吡嗪-2-基)氨基)吡啶-4-基)吡啶-1-基)乙烷-1-酮,作为TFA盐(68.7μmol, 95%产率)。

[0465]

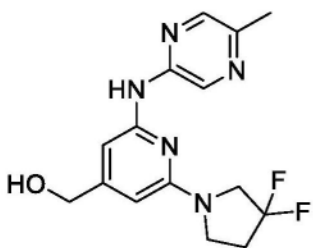


化合物 160

[0466] 还原胺化实例:

[0467] 将N-(6-(3,3-二氟吡咯烷-1-基)-4-(哌啶-4-基)吡啶-2-基)-5-甲基吡嗪-2-胺 (25mg, 66.8 μ mol) 溶于1mL的MeOH中, 并与7.8mg (134 μ mol, 2当量) 丙酮在室温下搅拌3小时。加入NaBH₃CN (8.4mg, 134 μ mol, 2当量), 并通过LCMS监测反应。完成后, 在减压下浓缩反应, 用10mL的饱和NaHCO₃处理残留物, 并用3 $\times$ 5mL DCM萃取。将合并的有机物用Na₂SO₄干燥并浓缩, 并通过快速色谱法 (用0- >40% MeOH/DCM洗脱) 分离产物, 得到13.2mg淡黄色残留物 (31.7 μ mol, 47.5%产率)。

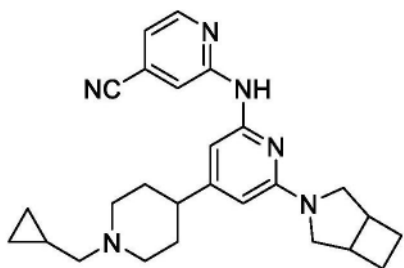
[0468]



化合物 233

[0469] 131mg, 非TFA盐, 408 μ mol, 定量。¹H NMR (400MHz, DMSO) δ 9.48 (s, 1H), 9.20 (d, J = 1.5Hz, 1H), 8.10-8.05 (m, 1H), 6.65 (d, J = 1.0Hz, 1H), 5.98 (d, J = 1.0Hz, 1H), 5.23 (t, J = 5.7Hz, 1H), 4.38 (d, J = 5.7Hz, 2H), 3.82 (t, J = 13.3Hz, 2H), 3.61 (t, J = 7.2Hz, 2H), 2.55 (dt, J = 14.4, 7.2Hz, 2H), 2.36 (s, 3H)。

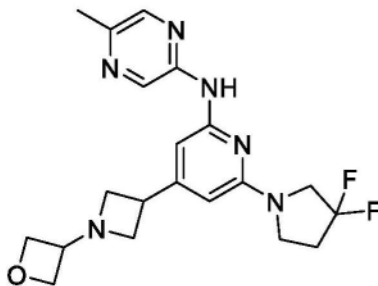
[0470]



化合物 231

[0471] 22.5mg, 41.4 μ mol, 产率87.7%。

[0472]

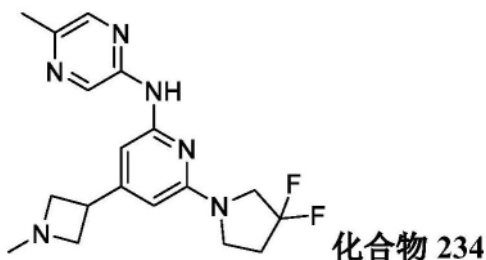


化合物 235

[0473] 3.3mg, 推测为TFA2盐, 5.2 μ mol, 产率7.2%。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.87 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 6.18 (s, 1H), 4.97 (dd, J = 8.6, 6.2Hz, 2H), 4.92-4.85 (m, 2H),

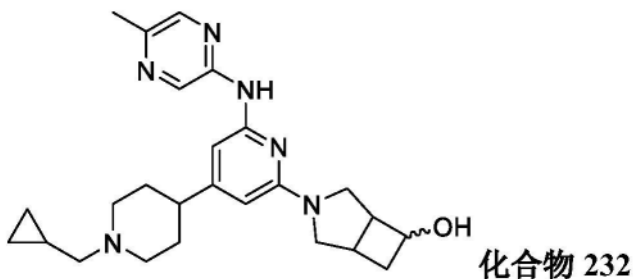
4.65-4.55 (m, 3H) , 4.43 (s, 2H) , 4.32-4.18 (m, 1H) , 3.98 (t, J=12.8Hz, 2H) , 3.84 (t, J=7.3Hz, 2H) , 2.62 (tt, J=13.8, 7.3Hz, 2H) , 2.50 (s, 3H) 。

[0474]



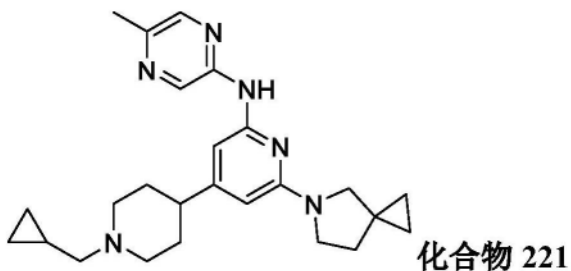
[0475] 还原胺化途径。6.7mg TFA3盐, 9.5 μ mol, 产率13.2%。¹H NMR (400MHz, DMSO+NaOD) δ 9.16 (d, J=1.4Hz, 1H) , 8.10 (d, J=1.8Hz, 1H) , 6.55 (d, J=2.8Hz, 1H) , 6.17-5.95 (m, 1H) , 4.50-4.40 (m, 1H) , 4.31 (dd, J=10.9, 7.2Hz, 1H) , 4.21 (t, J=10.0Hz, 1H) , 4.10-4.01 (m, 2H) , 3.87 (q, J=12.7Hz, 3H) , 3.65 (t, J=7.2Hz, 2H) , 2.96-2.79 (m, 3H) , 2.60-2.51 (m, 1H) , 2.37 (s, 3H) 。

[0476]



[0477] 12.2mg TFA盐, 22.2 μ mol, 主要非对映体产率41.3% , +3.4mg 混合。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.41 (s, 1H) , 8.25 (dd, J=1.4, 0.8Hz, 1H) , 6.37 (s, 2H) , 4.38 (q, J=7.8Hz, 1H) , 4.28 (dd, J=11.1, 3.3Hz, 1H) , 3.82 (d, J=12.2Hz, 2H) , 3.70 (d, J=10.3Hz, 1H) , 3.65-3.56 (m, 2H) , 3.39 (s, 1H) , 3.21-3.05 (m, 4H) , 3.04-2.94 (m, 1H) , 2.89 (p, J=7.3Hz, 1H) , 2.69 (dtd, J=11.8, 8.0, 3.5Hz, 1H) , 2.52 (s, 3H) , 2.21 (d, J=14.2Hz, 2H) , 2.14-1.99 (m, 2H) , 1.71 (dt, J=12.4, 7.8Hz, 1H) , 1.17 (ddd, J=12.5, 8.0, 4.8Hz, 1H) , 0.85-0.76 (m, 2H) , 0.47 (dt, J=6.2, 4.7Hz, 2H) 。

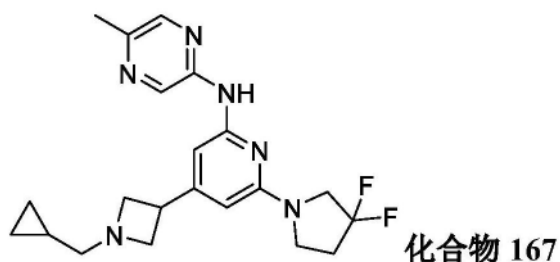
[0478]



[0479] 32mg, TFA盐, 60.1 μ mol, 产率87%。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.37 (d, J=1.5Hz, 1H) , 8.24 (dd, J=1.5, 0.8Hz, 1H) , 6.33 (d, J=1.2Hz, 1H) , 6.27 (s, 1H) , 3.82 (d, J=14.7Hz, 4H) , 3.56 (s, 2H) , 3.20-3.06 (m, 4H) , 2.98 (tt, J=12.2, 3.6Hz, 1H) , 2.53 (s, 3H) , 2.30-1.95 (m, 6H) , 1.17 (ddt, J=10.7, 7.6, 3.8Hz, 1H) , 0.86-0.75 (m, 6H) , 0.47 (dt, J=6.2, 4.7Hz, 2H) 。

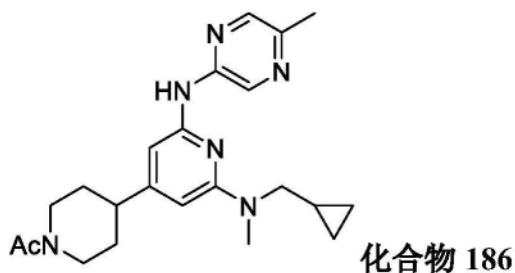
C₂₅H₃₅N₆⁺计算值: 419.2923, 实测值: 419.2925。

[0480]



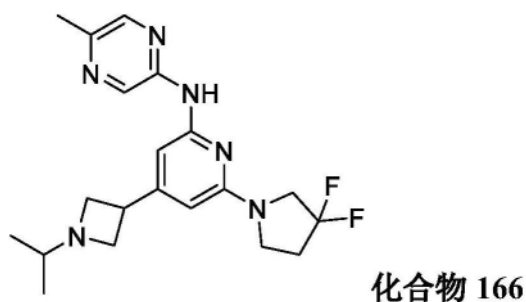
[0481] 5.2mg, 非TFA盐, 13 μ mol, 产率21.9%。还原胺化。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 9.29 (d, $J=1.5\text{Hz}$, 1H), 8.03 (dd, $J=1.5, 0.7\text{Hz}$, 1H), 6.99 (s, 1H), 6.31 (s, 1H), 5.79 (s, 1H), 3.98-3.77 (m, 4H), 3.70 (m, 3H), 3.19 (t, $J=7.4\text{Hz}$, 2H), 2.55-2.41 (m, 5H), 2.38 (d, $J=6.8\text{Hz}$, 2H), 0.90-0.76 (m, 1H), 0.54-0.43 (m, 2H), 0.15 (dt, $J=5.9, 4.5\text{Hz}$, 2H)。 $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{F}_2\text{N}_6^+$ 计算值: 401.2265, 实测值: 401.2263。

[0482]



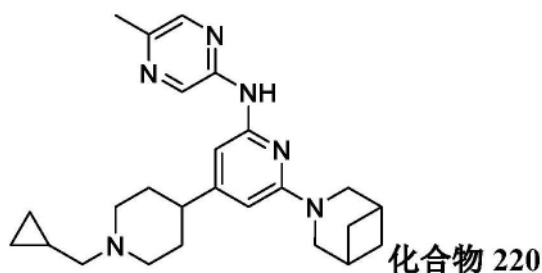
[0483] 12.5mg TFA盐, 24.6 μ mol, 产率46.3%。 ^1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 8.34 (d, $J=1.5\text{Hz}$, 1H), 8.20 (dd, $J=1.5, 0.7\text{Hz}$, 1H), 6.50 (d, $J=1.2\text{Hz}$, 1H), 6.27 (d, $J=1.2\text{Hz}$, 1H), 4.75-4.67 (m, 1H), 4.08 (d, $J=13.8\text{Hz}$, 1H), 3.57 (d, $J=6.8\text{Hz}$, 2H), 3.35 (s, 3H), 3.27-3.19 (m, 1H), 2.96-2.86 (m, 1H), 2.77-2.67 (m, 1H), 2.53 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 1.93 (t, $J=15.2\text{Hz}$, 2H), 1.80-1.54 (m, 2H), 1.21 (dd, $J=9.6, 4.5\text{Hz}$, 1H), 0.70-0.61 (m, 2H), 0.48-0.40 (m, 2H)。 $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{N}_6\text{O}^+$ 计算值: 395.2559, 实测值: 395.2557。

[0484]



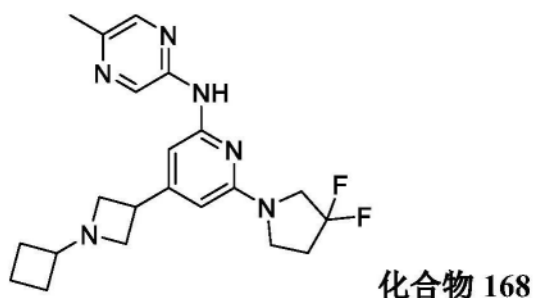
[0485] 8.3mg, TFA盐, 16.5 μ mol, 产率28.6%。 ^1H NMR (400MHz, $\text{CD}_3\text{OD}+10\mu\text{L}$ 40wt% NaOD) δ 9.28 (d, $J=1.5\text{Hz}$, 1H), 8.11 (dd, $J=1.5, 0.7\text{Hz}$, 1H), 6.49 (d, $J=0.9\text{Hz}$, 1H), 5.93 (t, $J=0.9\text{Hz}$, 1H), 3.86 (t, $J=13.2\text{Hz}$, 2H), 3.79-3.66 (m, 4H), 3.58 (p, $J=8.1\text{Hz}$, 1H), 3.24-3.15 (m, 2H), 2.59-2.45 (m, 3H), 2.44 (s, 3H), 0.99 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 6H)。 $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{F}_2\text{N}_6^+$ 计算值: 389.2265, 实测值: 389.2264。

[0486]



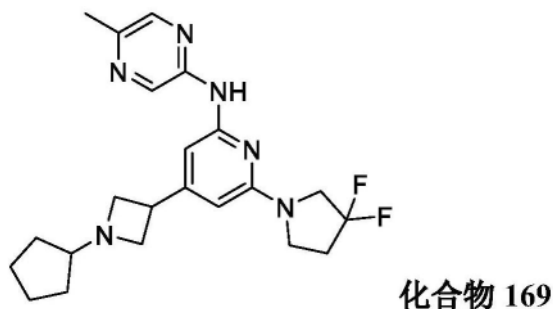
[0487] 9.1mg TFA盐, 17.1 μ mol, 产率36.8%。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.40 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 6.42-6.35 (m, 2H), 3.89-3.79 (m, 6H), 3.22-2.93 (m, 4H), 2.76 (br s, 3H), 2.52 (s, 3H), 2.41 (d, J=7.3Hz, 2H), 2.23 (d, J=14.3Hz, 2H), 2.12-2.01 (m, 2H), 1.56 (dd, J=7.3, 2.9Hz, 2H), 1.26-1.09 (m, 1H), 0.86-0.76 (m, 2H), 0.47 (q, J=4.8Hz, 2H)。C₂₅H₃₅N₆⁺计算值: 419.2923, 实测值: 419.2923。

[0488]



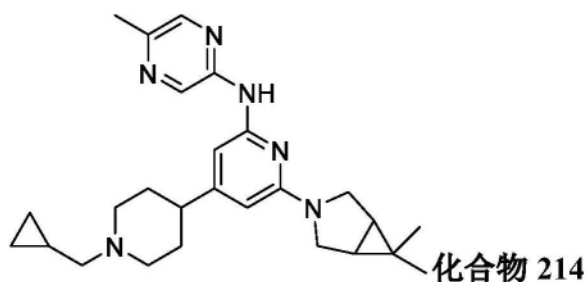
[0489] 3.7mg TFA盐, 7.2 μ mol, 产率24.9%。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 9.00 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 6.56 (m, 1H), 6.21-5.97 (m, 1H), 4.50 (m, 1H), 4.45-4.29 (m, 2H), 4.14 (dt, J=17.5, 9.7Hz, 2H), 3.93 (t, J=13.0Hz, 3H), 3.78 (t, J=7.3Hz, 2H), 2.79 (s, 1H), 2.58 (tt, J=14.1, 7.2Hz, 1H), 2.47 (s, 3H), 2.36 (s, 2H), 2.20-2.11 (m, 2H), 1.95 (br s, 2H)。C₂₁H₂₇F₂N₆⁺计算值: 401.2265, 实测值: 401.2263。

[0490]



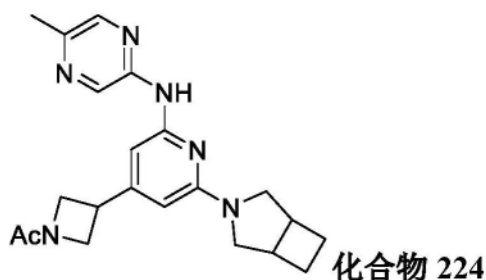
[0491] 2.4mg, TFA盐, 4.5 μ mol, 产率15.8%。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 9.06 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 6.70-6.42 (m, 1H), 6.21-5.96 (m, 1H), 4.52 (t, J=9.5Hz, 1H), 4.44 (d, J=8.2Hz, 1H), 4.23 (t, J=9.9Hz, 1H), 4.17-4.00 (m, 1H), 3.95-3.67 (m, 5H), 2.78 (s, 1H), 2.56 (dt, J=13.9, 7.0Hz, 2H), 2.46 (s, 3H), 2.09 (d, J=16.4Hz, 2H), 1.89-1.68 (m, 4H)*, 1.59 (s, 2H)。C₂₂H₂₉F₂N₆⁺计算值: 415.2422, 实测值: 415.2419。

[0492]



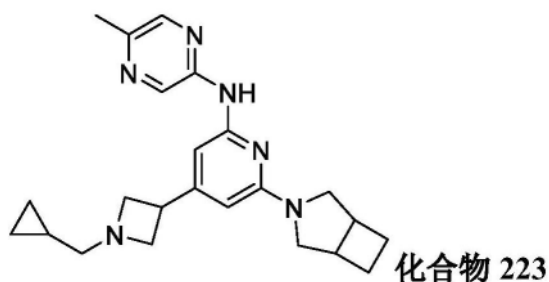
[0493] 62.3mg, TFA2盐, 94.3 μ mol, 产率89.8%。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.37 (s, 1H), 8.28 (dd, J=1.5, 0.7Hz, 1H), 6.33 (d, J=1.3Hz, 1H), 6.22 (t, J=0.8Hz, 1H), 3.81 (d, J=12.7Hz, 3H), 3.60 (s, 2H), 3.15 (d, J=11.5Hz, 2H), 3.08 (d, J=7.5Hz, 2H), 3.02-2.92 (m, 1H), 2.54 (s, 3H), 2.29-1.94 (m, 5H), 1.79 (d, J=3.6Hz, 2H), 1.15 (m, 4H), 0.96 (s, 3H), 0.85-0.76 (m, 2H), 0.51-0.42 (m, 2H)。C₂₆H₃₇N₆⁺计算值: 433.3080, 实测值: 433.3078。

[0494]



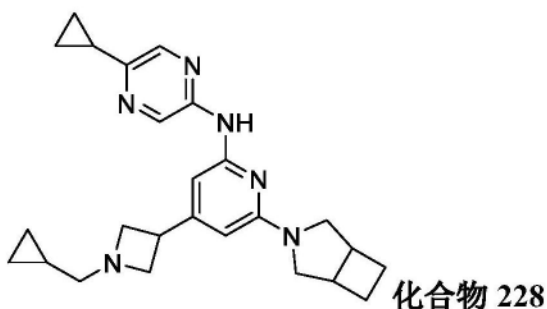
[0495] 5.3mg TFA盐, 10.8 μ mol, 定量。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.36 (d, J=1.4Hz, 1H), 8.28 (dd, J=1.5, 0.7Hz, 1H), 6.49-6.44 (m, 1H), 6.37 (d, J=1.4Hz, 1H), 4.70-4.61 (m, 1H), 4.42 (t, J=9.4Hz, 1H), 4.31 (dd, J=8.9, 5.9Hz, 1H), 4.05 (dd, J=10.0, 6.0Hz, 1H), 3.94 (tt, J=8.8, 5.9Hz, 1H), 3.87-3.79 (m, 2H), 3.74 (dd, J=10.6, 6.8Hz, 2H), 2.53 (d, J=0.6Hz, 3H), 2.45-2.34 (m, 2H), 1.93 (s, 3H), 1.91 (s, 2H)。*一个峰埋在MeOH峰下。C₂₁H₂₇N₆⁺计算值: 379.2246, 实测值: 379.2246。

[0496]



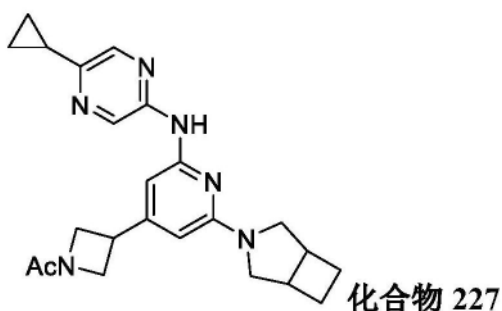
[0497] 10.8mg TFA盐, 21.4 μ mol, 产率78.3%。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.47 (s, 1H), 8.27 (t, J=1.1Hz, 1H), 6.59-6.12 (m, 2H), 4.70-4.43 (m, 4H), 4.27 (td, J=17.1, 9.3Hz, 3H), 3.83 (d, J=11.2Hz, 2H), 3.72 (br s, 2H), 3.17 (d, J=7.4Hz, 1H), 2.53 (s, 3H), 2.45-2.35 (m, 2H), 1.90 (s, 2H), 1.07 (s, 1H), 0.77-0.66 (m, 2H), 0.44 (d, J=5.1Hz, 2H)。C₂₃H₃₁N₆⁺计算值: 391.2610, 实测值: 391.2607。

[0498]



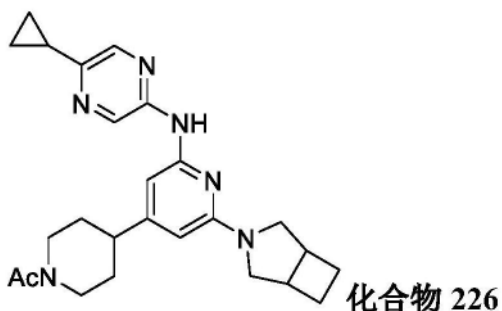
[0499] 17.3mg, TFA盐, 32.6 μ mol, 产率93.7%。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.45 (s, 1H), 8.29 (d, J=1.5Hz, 1H), 6.55-6.19 (m, 2H), 4.61 (s, 2H), 4.52 (s, 2H), 4.28 (dt, J=17.8, 9.7Hz, 3H), 3.84 (d, J=10.9Hz, 2H), 3.71 (br s, 2H), 3.17 (d, J=7.5Hz, 2H), 2.46-2.34 (m, 2H), 2.16 (ddd, J=12.9, 8.2, 4.9Hz, 1H), 1.91 (s, 2H), 1.10-0.95 (m, 4H), 0.78-0.69 (m, 2H), 0.45 (s, 2H)。C₂₅H₃₃N₆⁺计算值:417.2767, 实测值:417.2769。

[0500]



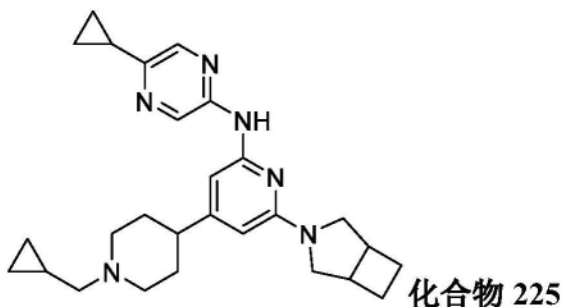
[0501] 11.9mg, TFA2盐, 18.8 μ mol, 产率93.1%。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.30 (s, 2H), 6.43 (d, J=1.4Hz, 1H), 6.35 (d, J=1.3Hz, 1H), 4.64 (t, J=9.0Hz, 1H), 4.41 (t, J=9.4Hz, 1H), 4.30 (dd, J=8.9, 5.8Hz, 1H), 4.04 (dd, J=10.0, 5.9Hz, 1H), 3.99-3.87 (m, 1H), 3.83 (d, J=10.9Hz, 2H), 3.73 (dd, J=10.4, 6.3Hz, 2H), 3.33-3.32 (m, 1H), 2.39 (dt, J=9.9, 6.0Hz, 2H), 2.21-2.10 (m, 1H), 1.93 (s, 3H), 1.92-1.86 (m, 2H), 1.10-0.95 (m, 4H)。C₂₃H₂₉N₆O⁺计算值:405.2403, 实测值:405.2401。

[0502]



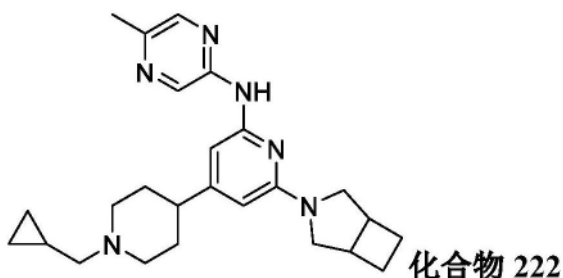
[0503] 19.6mg, TFA2盐, 30 μ mol, 产率84.5%。乙酰化。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.28 (s, 2H), 6.38 (d, J=1.4Hz, 1H), 6.27 (d, J=1.2Hz, 1H), 4.75-4.66 (m, 1H), 4.08 (d, J=13.8Hz, 1H), 3.80 (d, J=11.2Hz, 2H), 3.70 (dd, J=10.7, 7.0Hz, 2H), 3.29-3.20 (m, 1H), 2.90 (ddd, J=12.1, 8.6, 3.6Hz, 1H), 2.78-2.67 (m, 1H), 2.45-2.33 (m, 1H), 2.14 (s, 5H), 2.00-1.86 (m, 5H), 1.80-1.54 (m, 2H), 1.09-0.95 (m, 5H)。C₂₅H₃₃N₆O⁺计算值:433.2716, 实测值:433.2715。

[0504]



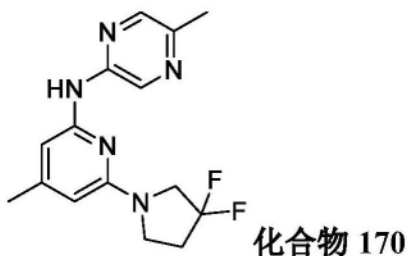
[0505] 5.8mg, TFA盐, 10.4 μ mol, 产率44.6%。还原胺化。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.34-8.27 (m, 2H), 6.39-6.33 (m, 2H), 3.88-3.78 (m, 3H), 3.73 (dd, J=10.4, 6.6Hz, 2H), 3.20-2.90 (m, 6H), 2.46-2.35 (m, 2H), 2.25-2.00 (m, 6H), 1.97-1.87 (m, 3H), 1.18 (ddt, J=12.6, 7.9, 3.9Hz, 1H), 1.10-0.96 (m, 5H), 0.85-0.76 (m, 2H), 0.47 (dt, J=6.3, 4.7Hz, 2H)。C₂₇H₃₇N₆⁺。

[0506]



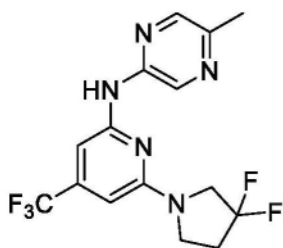
[0507] 还原胺化。11.2mg, TFA盐, 21 μ mol, 产率91.4%。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.38 (d, J=1.4Hz, 1H), 8.27 (dd, J=1.5, 0.7Hz, 1H), 6.41-6.35 (m, 2H), 3.87-3.77 (m, 4H), 3.73 (dd, J=10.5, 6.7Hz, 3H), 3.20-3.11 (m, 2H), 3.09 (d, J=7.3Hz, 2H), 2.99 (ddt, J=12.3, 7.4, 3.8Hz, 1H), 2.53 (s, 3H), 2.46-2.36 (m, 1H), 2.21 (d, J=14.1Hz, 3H), 2.07 (qd, J=13.4, 3.7Hz, 2H), 1.96-1.86 (m, 3H), 1.17 (ddd, J=12.5, 7.9, 4.8Hz, 1H), 0.85-0.76 (m, 2H), 0.47 (dt, J=6.2, 4.7Hz, 2H)。C₂₅H₃₅N₆⁺计算值: 419.2923, 实测值: 419.2921。

[0508]



[0509] 36.7mg, TFA盐, 87.5 μ mol, 产率81.4%。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.39 (d, J=1.5Hz, 1H), 8.27 (dd, J=1.4, 0.7Hz, 1H), 6.34 (s, 1H), 6.32 (s, 1H), 4.06 (t, J=12.3Hz, 2H), 3.94 (t, J=7.4Hz, 2H), 2.70 (tt, J=13.9, 7.4Hz, 2H), 2.54 (d, J=0.7Hz, 3H), 2.42 (d, J=0.6Hz, 3H)。C₁₅H₁₈F₂N₅⁺计算值: 306.1530, 实测值: 306.1532。

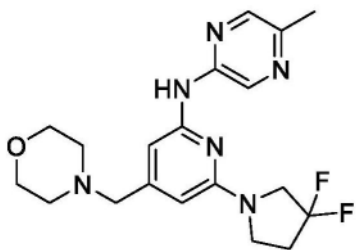
[0510]



化合物 171

[0511] 31.7mg, 尽管进行了制备型HPLC, 但无TFA盐, 产率74.1%, 88.2 μ mol。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 9.12 (d, J=1.5Hz, 1H), 8.17 (dd, J=1.5, 0.7Hz, 1H), 6.97 (s, 1H), 6.21 (s, 1H), 3.91 (t, J=13.1Hz, 2H), 3.74 (t, J=7.3Hz, 2H), 2.56 (tt, J=14.1, 7.3Hz, 2H), 2.46 (d, J=0.6Hz, 3H)。C₁₅H₁₅F₅N₅⁺计算值: 360.1248, 实测值: 360.1248。

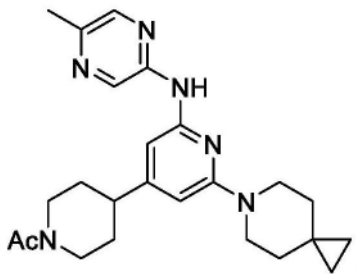
[0512]



化合物 172

[0513] 38.3mg, TFA3盐, 产率57%, 52.3 μ mol。¹H NMR (400MHz, DMSO) δ 10.04 (br s, 1H), 9.80 (s, 1H), 9.14 (d, J=1.5Hz, 1H), 8.14 (dd, J=1.5, 0.7Hz, 1H), 6.76 (d, J=1.1Hz, 1H), 6.16 (d, J=1.1Hz, 1H), 4.22 (s, 2H), 3.97 (d, J=12.7Hz, 2H), 3.87 (t, J=13.1Hz, 2H), 3.66 (dd, J=9.4, 5.1Hz, 4H), 3.32 (m, 2H), 3.15 (m, 2H), 2.59 (tt, J=14.3, 7.2Hz, 2H), 2.42-2.38 (m, 3H)。C₁₉H₂₅F₂N₆O⁺计算值: 391.2058, 实测值: 391.2056。

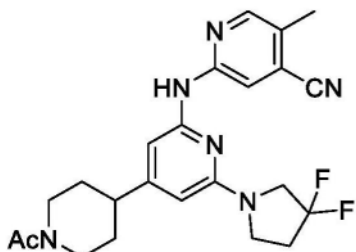
[0514]



化合物 208

[0515] 27.6mg TFA盐, 51.6 μ mol, 产率89.8%。HRMS: C₂₄H₃₃N₆O⁺计算值: 421.2716, 实测值: 421.2716。

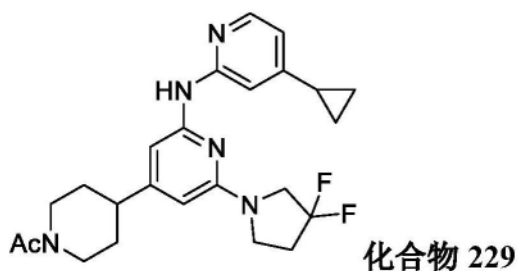
[0516]



化合物 230

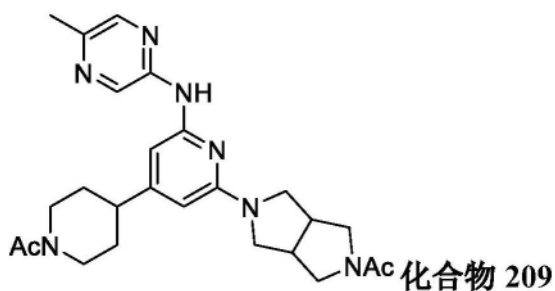
[0517] 32.6mg TFA盐, 58.8 μ mol, 产率80.9%。HRMS: C₂₃H₂₇F₂N₆O⁺计算值: 441.2214, 实测值: 441.2213。

[0518]



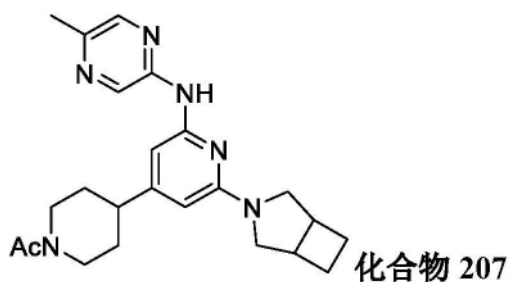
[0519] 34.6mg TFA盐, 62.3 μ mol, 产率85.7%。HRMS: $C_{24}H_{30}F_2N_5O^+$ 计算值: 442.2418, 实测值: 442.2416。

[0520]



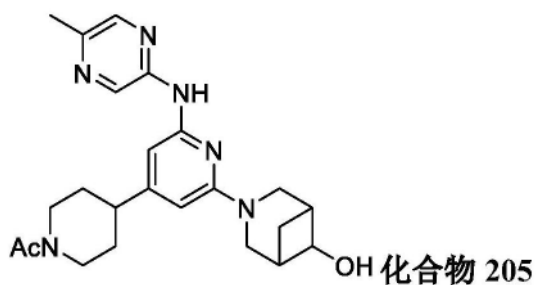
[0521] 5.2mg TFA盐, 9 μ mol, 产率14.2%。 $C_{25}H_{34}N_7O_2^+$ 计算值: 464.2774; 实测值: 464.2772。

[0522]



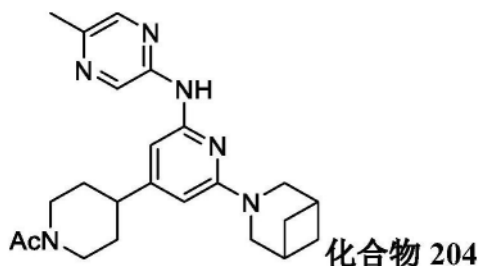
[0523] 6.8mg TFA盐, 13.1 μ mol, 产率18.1%。 1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 8.34 (d, $J=1.5$ Hz, 1H), 8.26 (d, $J=1.0$ Hz, 1H), 6.41 (d, $J=1.3$ Hz, 1H), 6.29 (d, $J=1.3$ Hz, 1H), 4.75-4.67 (m, 1H), 4.09 (d, $J=13.6$ Hz, 1H), 3.80 (d, $J=10.9$ Hz, 2H), 3.71 (dd, $J=10.4, 6.5$ Hz, 2H), 3.28-3.20 (m, 3H), 2.97-2.86 (m, 1H), 2.78-2.68 (m, 1H), 2.53 (s, 3H), 2.45-2.33 (m, 1H), 2.15 (s, 3H), 1.98-1.86 (m, 5H), 1.81-1.55 (m, 2H)。 $C_{23}H_{31}N_6O^+$ 计算值: 407.2559; 实测值: 407.2556。

[0524]



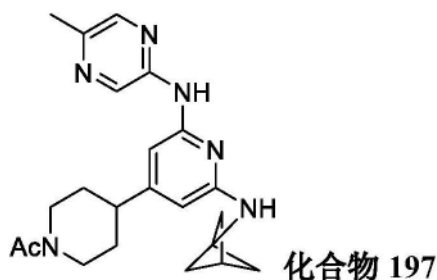
[0525] 21.9mg TFA盐, 40.8 μ mol, 产率56.5%。 $C_{23}H_{31}N_6O_2^+$ 计算值: 423.2508; 实测值: 423.2505。

[0526]



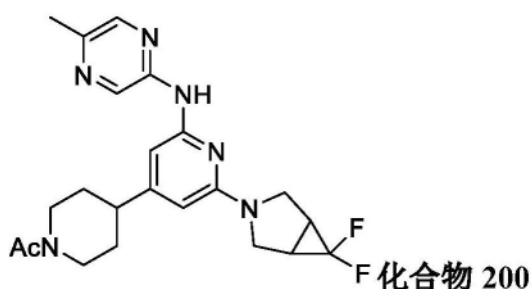
[0527] 8.3mg TFA盐, 15.9 μ mol, 产率22.1%。 ^1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 8.35 (d, $J=1.4\text{Hz}$, 1H), 8.24 (s, 1H), 6.44 (s, 1H), 6.33 (d, $J=1.2\text{Hz}$, 1H), 4.72 (d, $J=13.2\text{Hz}$, 1H), 4.09 (d, $J=13.7\text{Hz}$, 1H), 3.87 (s, 4H), 3.28-3.20 (m, 1H), 2.93 (ddd, $J=12.1, 8.6, 3.6\text{Hz}$, 1H), 2.75 (d, $J=10.3\text{Hz}$, 3H), 2.53 (s, 3H), 2.40 (dt, $J=8.5, 5.8\text{Hz}$, 2H), 2.15 (s, 3H), 1.95 (t, $J=15.2\text{Hz}$, 2H), 1.81-1.60 (m, 2H), 1.55 (dt, $J=7.8, 3.9\text{Hz}$, 2H)。C₂₃H₃₁N₆O 计算值: 407.2559; 实测值: 407.2556。

[0528]



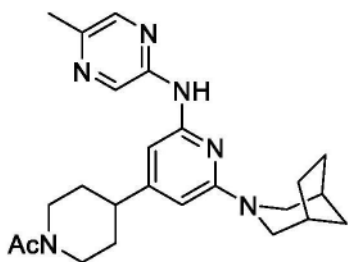
[0529] 2.9mg TFA盐, 5.7 μ mol, 产率7.9%。 ^1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 8.33 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H), 8.23-8.18 (m, 1H), 6.35 (s, 1H), 6.31 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H), 4.70 (d, $J=13.7\text{Hz}$, 1H), 4.08 (d, $J=14.0\text{Hz}$, 1H), 3.24 (d, $J=12.1\text{Hz}$, 1H), 2.98-2.73 (m, 1H), 2.70 (s, 1H), 2.54 (s, 3H), 2.33 (s, 6H), 2.14 (s, 3H), 1.94 (t, $J=15.5\text{Hz}$, 3H), 1.70-1.51 (m, 2H)。C₂₂H₂₉N₆O⁺ 计算值: 393.2403; 实测值: 393.2398。

[0530]



[0531] 1469.3mg, 17 μ mol, 产率23.5%。 ^1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 8.39 (s, 1H), 8.28 (dd, $J=1.5, 0.7\text{Hz}$, 1H), 6.34 (d, $J=1.2\text{Hz}$, 1H), 6.30 (d, $J=1.2\text{Hz}$, 1H), 4.75-4.66 (m, 1H), 4.16-3.87 (m, 5H), 3.29-3.18 (m, 1H), 2.91 (tt, $J=12.1, 3.6\text{Hz}$, 1H), 2.83-2.67 (m, 3H), 2.54 (d, $J=0.7\text{Hz}$, 3H), 2.15 (s, 3H), 1.93 (t, $J=15.3\text{Hz}$, 2H), 1.80-1.54 (m, 2H)。C₂₂H₂₇F₂N₆O⁺ 计算值: 429.2214, 实测值: 429.2211。

[0532]

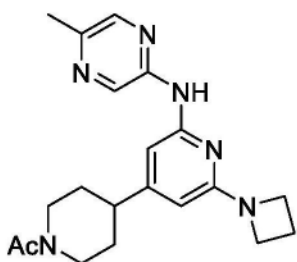


化合物 206

[0533] 30.4mg TFA盐, 56.9 μ mol, 产率54.8%。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.34 (d, J=1.5Hz, 1H), 8.25 (dd, J=1.5, 0.7Hz, 1H), 6.53 (d, J=1.2Hz, 1H), 6.32 (d, J=1.2Hz, 1H), 4.75-4.67 (m, 1H), 4.12-4.04 (m, 1H), 3.77 (dd, J=11.2, 2.6Hz, 2H), 3.37 (dd, J=11.2, 2.6Hz, 2H), 3.30-3.19 (m, 1H), 2.91 (tt, J=12.1, 3.5Hz, 1H), 2.78-2.67 (m, 1H), 2.58 (s, 2H), 2.53 (d, J=0.7Hz, 3H), 2.15 (s, 3H), 1.99-1.85 (m, 4H), 1.82-1.54 (m, 6H)。C₂₄H₃₃N₆O⁺。

[0534] 精确质量: 421.2716, 实测值: 421.2709。

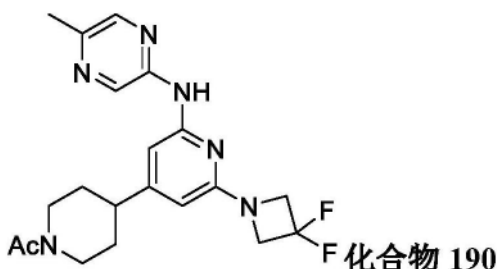
[0535]



化合物 189

[0536] 16.9mg TFA盐, 35.2 μ mol, 产率48.7%。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.33 (d, J=1.4Hz, 1H), 8.22 (dd, J=1.5, 0.7Hz, 1H), 6.25 (d, J=1.3Hz, 1H), 6.13 (d, J=1.6Hz, 1H), 4.74-4.65 (m, 1H), 4.40-4.32 (m, 4H), 4.07 (dd, J=12.2, 2.5Hz, 1H), 3.24 (td, J=13.2, 2.7Hz, 1H), 2.87 (tt, J=12.1, 3.6Hz, 1H), 2.77-2.56 (m, 3H), 2.53 (d, J=0.7Hz, 3H), 2.14 (s, 3H), 1.92 (t, J=15.3Hz, 2H), 1.77-1.51 (m, 2H)。C₂₀H₂₇N₆O⁺。精确质量: 367.2246, 实测值: 367.2241。

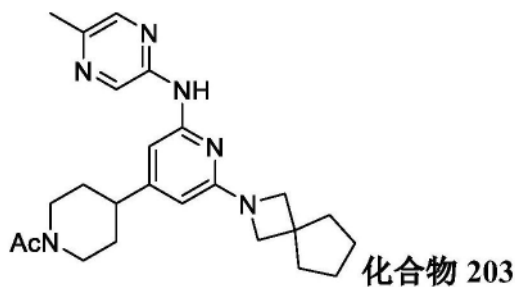
[0537]



化合物 190

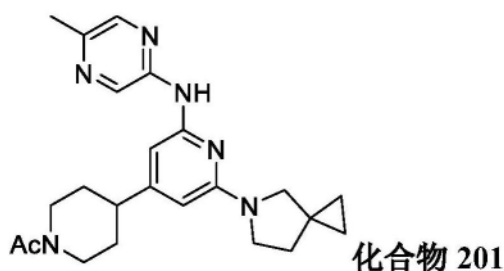
[0538] 35.5mg TFA盐, 68.7 μ mol, 产率95%。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.61 (s, 1H), 8.24 (dd, J=1.5, 0.8Hz, 1H), 6.51 (d, J=1.2Hz, 1H), 6.23 (d, J=1.2Hz, 1H), 4.74-4.60 (m, 5H), 4.07 (d, J=13.8Hz, 1H), 3.30-3.19 (m, 1H), 2.93-2.81 (m, 1H), 2.72 (td, J=13.1, 2.9Hz, 1H), 2.52 (d, J=0.7Hz, 3H), 2.14 (s, 3H), 1.93 (t, J=15.5Hz, 2H), 1.78-1.53 (m, 2H)。C₂₀H₂₅F₂N₆O⁺。精确质量: 403.2058, 实测值: 403.2057。¹⁹F NMR (376MHz, CD₃OD) δ -77.17, -77.43, -77.49, -77.94, -101.62, -101.65, -101.68, -101.71, -101.74。

[0539]



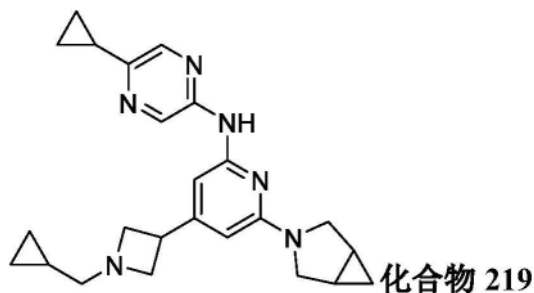
[0540] Xantphos途径。4.2mg。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ8.32 (d, J=1.4Hz, 1H), 8.24 (dd, J=1.4, 0.8Hz, 1H), 6.25 (s, 1H), 6.14 (d, J=1.3Hz, 1H), 4.70 (d, J=12.7Hz, 1H), 4.17 (s, 4H), 4.07 (d, J=13.6Hz, 1H), 3.23 (d, J=12.0Hz, 1H), 2.94-2.81 (m, 1H), 2.70 (td, J=12.4Hz, 2.4Hz, 1H), 2.53 (d, J=0.7Hz, 3H), 2.14 (s, 3H), 2.01-1.93 (m, 5H), 1.90 (d, J=15.2Hz, 2H), 1.79-1.70 (m, 4H), 1.69-1.51 (m, 1H)。C₂₄H₃₃N₆O⁺。精确质量:421.2716, 实测值:421.2713。

[0541]



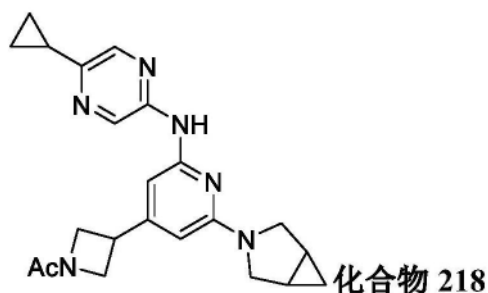
[0542] 21mg TFA盐, 40.3μmol, 产率39.9%。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ8.33 (d, J=1.4Hz, 1H), 8.23 (dd, J=1.5, 0.7Hz, 1H), 6.28 (s, 1H), 6.25 (d, J=1.3Hz, 1H), 4.75-4.66 (m, 1H), 4.12-4.04 (m, 1H), 3.84 (t, J=6.9Hz, 2H), 3.55 (s, 2H), 3.29-3.19 (m, 1H), 2.89 (tt, J=12.2, 3.6Hz, 1H), 2.72 (td, J=13.0, 2.8Hz, 1H), 2.52 (d, J=0.6Hz, 3H), 2.14-2.10 (m, 6H), 2.01-1.86 (m, 1H), 1.79-1.54 (m, 2H), 0.86-0.74 (m, 4H)。C₂₃H₃₁N₆O⁺。精确质量:407.2559, 实测值:407.2553。

[0543]



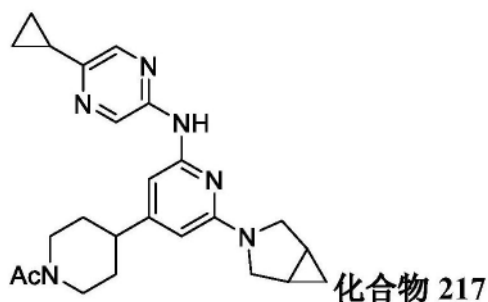
[0544] 还原胺化途径。将22.7mg, 65.1μmol (SM) 与环丙烷甲醛 (9.1mg, 9.7μL, 2当量) 的 1mL MeOH溶液搅拌过夜。加入氰基硼氢化钠 (8.2mg, 2当量), 并在室温下继续搅拌。20小时后, 用DCM (30mL) 稀释反应, 用饱和NaHCO₃洗涤, 用Na₂SO₄干燥并在减压下浓缩。进行制备型 HPLC, 然后冷冻干燥, 得到蓬松黄色固体的产物 (TFA盐, 12.7mg, 23.3μmol, 产率35.8%)。C₂₄H₃₁N₆⁺。精确质量:403.2610, 实测值:403.2606。

[0545]



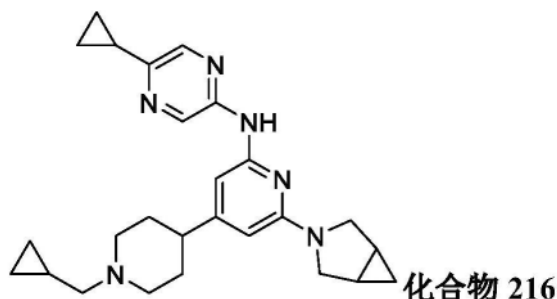
[0546] 21mg TFA盐, 38.6 μ mol, 产率49.4%。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.32 (d, J=1.5Hz, 1H), 8.30 (d, J=1.5Hz, 1H), 6.33 (q, J=1.4Hz, 2H), 4.67-4.58 (m, 1H), 4.39 (t, J=9.4Hz, 1H), 4.27 (dd, J=9.0, 5.9Hz, 1H), 4.02 (dd, J=10.0, 5.9Hz, 1H), 3.97-3.84 (m, 2H), 3.82 (s, 3H), 2.18 (tt, J=8.0, 4.9Hz, 1H), 1.98-1.93 (m, 2H), 1.93 (s, 4H), 1.11-0.94 (m, 6H), 0.35 (q, J=4.4Hz, 1H)。C₂₂H₂₇N₆O⁺。精确质量: 391.2246, 实测值: 391.2242。

[0547]



[0548] 将26.3mg (69.9 μ mol) 起始原料溶于3mL DCM中, 并用乙酸酐 (7.3 μ L, 7.8mg, 1.1当量) 和N-甲基吗啉 (14.1mg, 3当量) 处理。在室温下20分钟后, 通过LCMS判断反应完全。用15mL DCM稀释反应, 并依次用水 (30mL) 和饱和NaHCO₃ (30mL) 洗涤。有机层经Na₂SO₄干燥, 减压浓缩, 并进行快速色谱法 (0-20% MeOH/DCM梯度), 得到黄色残留物 (19.9mg, 47.5 μ mol, 68% 产率)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 9.25-9.20 (m, 1H), 8.04 (d, J=1.5Hz, 1H), 6.90 (s, 1H), 6.14 (s, 1H), 5.72 (s, 1H), 4.79 (d, J=13.6Hz, 1H), 3.93 (d, J=13.5Hz, 1H), 3.72 (d, J=9.8Hz, 2H), 3.45 (d, J=10.0Hz, 2H), 3.20-3.07 (m, 1H), 2.66-2.55 (m, 2H), 2.14 (s, 4H), 2.05-1.97 (m, 1H), 1.88 (t, J=13.7Hz, 3H), 1.62 (tdd, J=16.8, 10.6, 4.5Hz, 3H), 1.05-0.95 (m, 5H), 0.75 (q, J=7.8Hz, 1H), 0.29 (q, J=4.2Hz, 1H)。C₂₄H₃₁N₆O⁺ 计算值: 419.2559, 实测值: 419.2557。

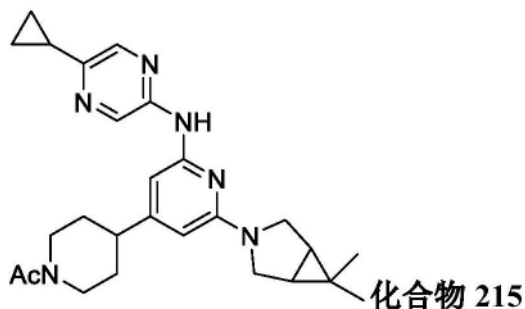
[0549]



[0550] 49.3mg TFA盐, 90.5 μ mol, 产率87.4%。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.31 (s, 2H), 6.34 (d, J=1.3Hz, 1H), 6.24 (d, J=1.4Hz, 1H), 3.81 (d, J=11.9Hz, 7H), 3.18-3.06 (m, 4H), 2.96 (tt, J=12.2, 3.7Hz, 1H), 2.26-1.98 (m, 5H), 1.98-1.92 (m, 1H), 1.24-1.11 (m, 1H), 1.11-0.94 (m, 5H), 0.85-0.74 (m, 2H), 0.47 (dt, J=6.2, 4.7Hz, 2H), 0.35 (q, J=4.5Hz, 1H)。HRMS:

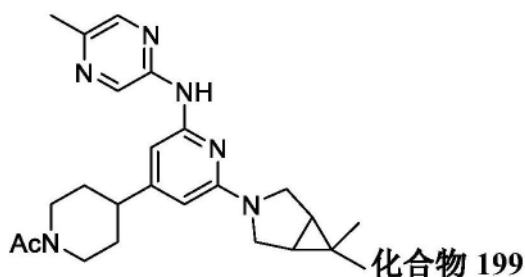
$C_{26}H_{35}N_6^+$: 计算值: 431.2923, 实测值: 431.2924。

[0551]



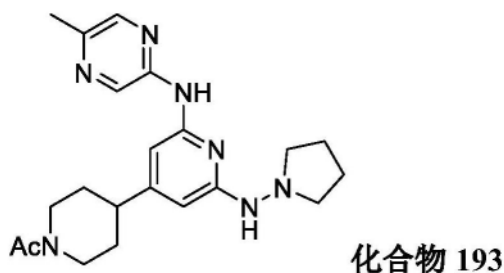
[0552] 33.6mg TFA盐, 63.3 μ mol, 产率76%。 1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 8.30 (d, $J=1.5$ Hz, 1H), 8.28 (d, $J=1.5$ Hz, 1H), 6.24 (t, $J=2.0$ Hz, 2H), 4.76-4.64 (m, 1H), 4.07 (d, $J=14.2$ Hz, 1H), 3.85 (br s, 2H), 3.59 (s, 2H), 2.88 (tt, $J=12.2, 3.8$ Hz, 1H), 2.78-2.61 (m, 1H), 2.22-2.12 (m, 4H), 1.90 (q, $J=16.0$ Hz, 3H), 1.78 (d, $J=3.8$ Hz, 2H), 1.76-1.52 (m, 2H), 1.16 (s, 3H), 1.13-0.97 (m, 4H), 0.97 (s, 3H)。 $C_{26}H_{35}N_6O^+$: 447.2872, 实测值: 447.2868, 220nm处为100%。

[0553]



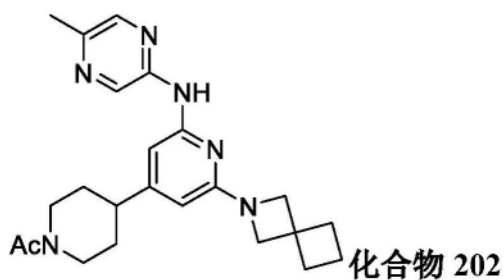
[0554] 43mg TFA盐, 80.5 μ mol, 产率89%。 1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 8.33 (d, $J=1.5$ Hz, 1H), 8.27 (dd, $J=1.5, 0.7$ Hz, 1H), 6.26 (q, $J=1.4$ Hz, 2H), 4.70 (dt, $J=13.2, 2.2$ Hz, 1H), 4.15-4.03 (m, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.59 (d, $J=10.4$ Hz, 2H), 3.24 (td, $J=13.2, 2.7$ Hz, 4H), 2.89 (tt, $J=12.1, 3.6$ Hz, 1H), 2.72 (td, $J=13.0, 2.8$ Hz, 1H), 2.54 (d, $J=0.7$ Hz, 3H), 2.14 (s, 3H), 1.93 (t, $J=15.3$ Hz, 2H), 1.81-1.76 (m, 2H), 1.76-1.53 (m, 2H), 1.15 (s, 3H), 0.96 (s, 3H)。 LCMS: 在220nm处为100%; $C_{25}H_{34}N_5O^+$ + 计算值: 441.2716, 实测值: 421.2711。

[0555]



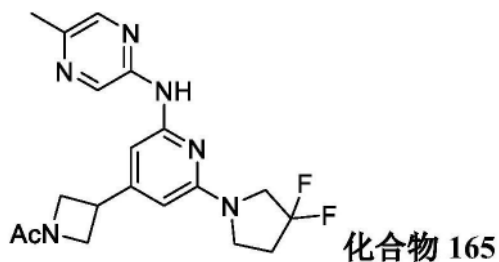
[0556] TFA盐, 8.7mg, 17 μ mol, 产率20.5%。 1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 8.31 (d, $J=1.4$ Hz, 1H), 8.21 (dq, $J=1.3, 0.6$ Hz, 1H), 6.51-6.46 (m, 1H), 6.28 (dd, $J=1.2, 0.4$ Hz, 1H), 4.75-4.66 (m, 1H), 4.16-4.01 (m, 1H), 3.78 (s, 2H), 3.14-3.06 (m, 2H), 2.89 (ddd, $J=12.1, 8.6, 3.5$ Hz, 1H), 2.72 (td, $J=13.1, 2.8$ Hz, 1H), 2.52 (d, $J=0.7$ Hz, 3H), 2.15 (d, $J=0.4$ Hz, 3H), 2.03-1.53 (m, 9H)。 $C_{21}H_{30}N_7O^+$ 。精确质量: 396.2506。

[0557]



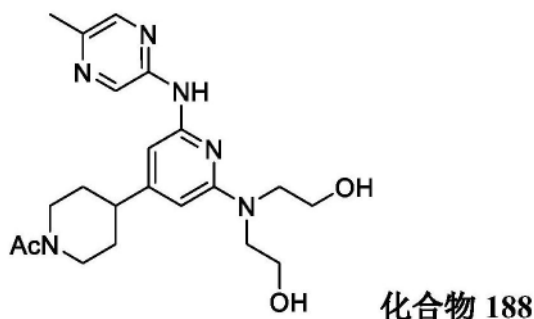
[0558] 10.2mg TFA盐, 19.6 μ mol, 24.9%。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.33 (d, J=1.4Hz, 1H), 8.26 (dq, J=1.5, 0.8Hz, 1H), 6.25 (d, J=1.3Hz, 1H), 6.12 (dd, J=1.4, 0.5Hz, 1H), 4.74-4.65 (m, 1H), 4.29 (s, 4H), 4.11-4.03 (m, 1H), 3.26-3.19 (m, 1H), 2.92-2.81 (m, 1H), 2.77-2.66 (m, 1H), 2.54 (t, J=0.8Hz, 3H), 2.35 (t, J=7.6Hz, 4H), 2.14 (d, J=0.5Hz, 3H), 2.01-1.85 (m, 4H), 1.76-1.51 (m, 2H)。C₂₃H₃₁N₆O⁺。精确质量: 407.2554

[0559]



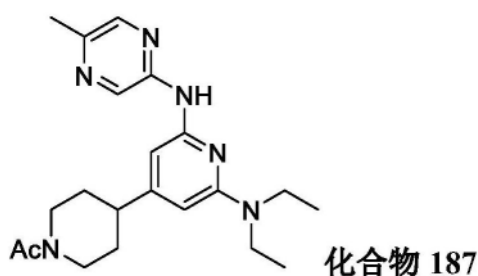
[0560] 39.2mg TFA盐, 78 μ mol, 产率47.8%。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.48 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 6.47 (s, 1H), 6.38 (s, 1H), 4.64 (t, J=8.9Hz, 1H), 4.40 (t, J=9.4Hz, 1H), 4.29 (dd, J=8.9, 5.9Hz, 1H), 4.14-4.00 (m, 3H), 4.00-3.88 (m, 3H), 2.70 (tt, J=14.0, 7.3Hz, 2H), 2.54 (s, 3H), 1.92 (s, 3H)。HRMS: C₁₉H₂₃F₂N₆O⁺计算值: 389.1901, 实测值: 389.1893。

[0561]



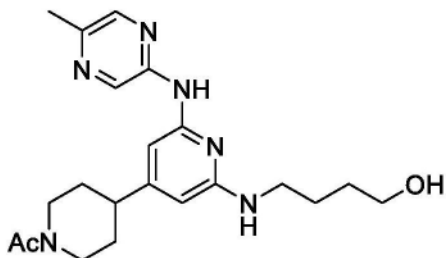
[0562] 快速色谱。26mg, 62.7 μ mol, 产率81.5%。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8.78 (s, 1H), 8.05 (dd, J=1.5, 0.7Hz, 1H), 6.56 (s, 1H), 6.01 (s, 1H), 4.78 (dt, J=13.4, 2.2Hz, 1H), 3.92 (t, J=5.1Hz, 4H), 3.77-3.68 (m, 4H), 3.14 (td, J=13.1, 2.6Hz, 1H), 2.69-2.54 (m, 2H), 2.47 (d, J=0.6Hz, 3H), 2.13 (s, 3H), 1.92-1.80 (m, 1H), 1.68-1.53 (m, 4H)。HRMS: C₂₁H₃₁N₆O₃⁺计算值: 415.2458, 实测值: 415.2454。

[0563]



[0564] DEA。51.9mg TFA盐, 105 μ mol, 产率89.3%。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.35 (d, J=1.4Hz, 1H), 8.21 (dt, J=1.5, 0.7Hz, 1H), 6.45 (dd, J=1.2, 0.5Hz, 1H), 6.26 (dd, J=1.2, 0.4Hz, 1H), 4.71 (ddd, J=13.3, 4.4, 2.3Hz, 1H), 4.13-4.04 (m, 1H), 3.69 (q, J=7.2Hz, 4H), 3.29-3.18 (m, 1H), 2.91 (tt, J=12.1, 3.6Hz, 1H), 2.72 (td, J=13.0, 2.7Hz, 1H), 2.53 (d, J=0.7Hz, 3H), 2.15 (d, J=0.4Hz, 3H), 1.91 (d, J=15.5Hz, 2H), 1.80-1.54 (m, 2H), 1.41-1.33 (m, 6H)。C₂₁H₃₁N₆O⁺计算值: 383.2559, 实测值: 383.2558。

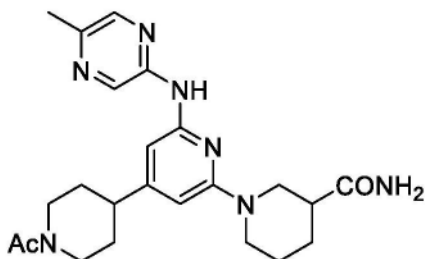
[0565]



化合物 184

[0566] 快速色谱。17.5mg, 43.9 μ mol, 产率55.7%。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 9.13 (d, J=1.5Hz, 1H), 8.04 (dt, J=1.4, 0.6Hz, 1H), 7.27 (s, 2H), 7.10 (s, 1H), 6.35 (s, 1H), 5.82 (dd, J=1.1, 0.5Hz, 1H), 4.83-4.75 (m, 1H), 4.63 (s, 1H), 3.93 (d, J=13.8Hz, 1H), 3.73 (t, J=5.9Hz, 2H), 3.37 (q, J=6.5Hz, 2H), 3.15 (td, J=13.1, 2.6Hz, 1H), 2.61 (td, J=12.1, 5.6Hz, 2H), 2.48 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 1.88 (t, J=14.3Hz, 2H), 1.83-1.53 (m, 6H)。HRMS: C₂₁H₃₁N₆O₂⁺计算值: 399.2508, 实测值: 399.2507。

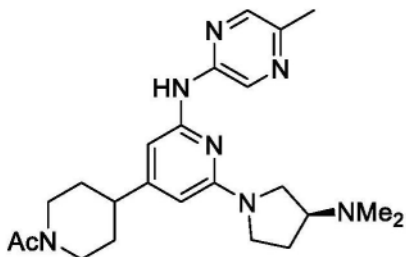
[0567]



化合物 194

[0568] 快速色谱0-30% MeOH/DCM; 20mg, 45.7 μ mol, 53.8%。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 9.00 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.27 (s, 2H), 6.99 (s, 1H), 6.44 (s, 1H), 6.29 (s, 1H), 6.12 (s, 1H), 5.39 (s, 1H), 4.80 (d, J=13.4Hz, 1H), 3.96 (t, J=13.6Hz, 2H), 3.76 (d, J=10.5Hz, 1H), 3.25 (t, J=10.9Hz, 1H), 3.16 (dd, J=13.7, 11.3Hz, 1H), 2.70-2.55 (m, 3H), 2.49 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 2.08-1.83 (m, 5H), 1.77 (s, 1H), 1.63 (q, J=12.4Hz, 5H)。C₂₃H₃₂N₇O₂⁺计算值: 438.2617, 实测值: 438.2613。

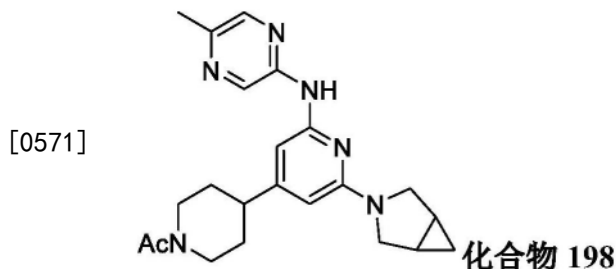
[0569]



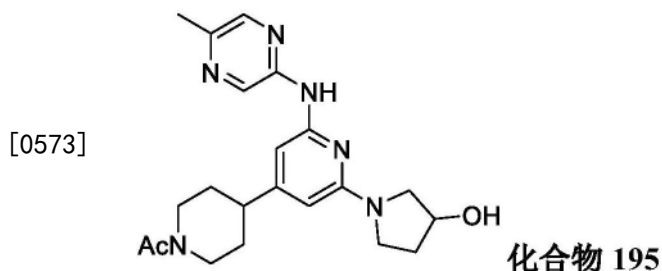
化合物 196

[0570] 快速色谱。24.8mg, 58.5 μ mol, 产率88.9%。快速色谱0-30% MeOH/DCM。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 9.30 (s, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.27 (s, 3H), 6.92 (s, 1H), 6.20 (s, 1H), 5.76 (s, 1H), 4.80 (d, J=13.3Hz, 1H), 3.94 (d, J=13.5Hz, 1H), 3.80-3.66 (m, 2H), 3.49 (q, J=

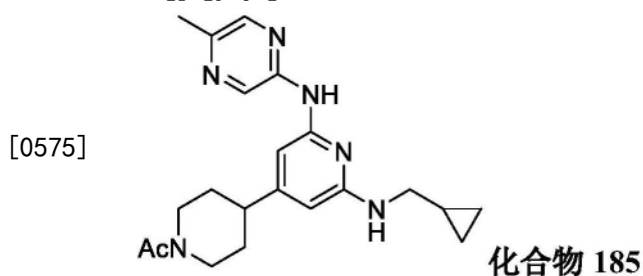
9.5Hz, 1H), 3.27 (s, 1H), 3.21-3.10 (m, 1H), 2.69-2.56 (m, 2H), 2.48 (s, 3H), 2.35 (s, 6H), 2.22 (dt, J=12.5, 6.8Hz, 1H), 2.15 (s, 3H), 1.90 (t, J=14.0Hz, 2H), 1.75-1.56 (m, 4H)。C₂₃H₃₄N₇O⁺计算值:424.2825, 实测值:424.2821。



[0572] ¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ8.34 (d, J=1.5Hz, 1H), 8.28 (dd, J=1.5, 0.8Hz, 1H), 6.29 (d, J=1.4Hz, 1H), 6.27 (d, J=1.3Hz, 1H), 4.75-4.66 (m, 1H), 4.08 (d, J=14.1Hz, 1H), 3.84-3.73 (m, 4H), 3.24 (td, J=13.2, 2.7Hz, 3H), 2.89 (tt, J=12.2, 3.6Hz, 1H), 2.77-2.66 (m, 1H), 2.54 (d, J=0.7Hz, 3H), 2.14 (s, 3H), 1.96-1.86 (m, 2H), 1.78-1.53 (m, 2H), 0.98 (td, J=8.0, 5.2Hz, 1H), 0.34 (q, J=4.4Hz, 1H)。C₂₂H₂₉N₆O⁺计算值:393.2403, 实测值:393.2398。

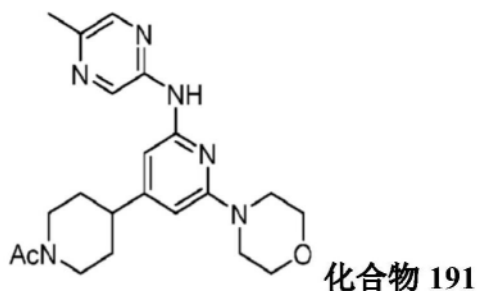


[0574] 快速色谱。24.3mg, 61.2μmol, 产率72.9%。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ9.41 (s, 1H), 8.05-8.00 (m, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.13 (s, 1H), 5.78 (s, 1H), 4.79 (d, J=13.2Hz, 1H), 4.62 (s, 1H), 3.94 (d, J=13.5Hz, 1H), 3.74-3.44 (m, 3H), 3.16 (td, J=13.1, 2.6Hz, 1H), 2.62 (ddd, J=13.4, 9.5, 4.2Hz, 2H), 2.48 (s, 3H), 2.14 (s, 4H), 1.89 (t, J=14.4Hz, 3H), 1.70-1.55 (m, 4H)。HRMS: C₂₁H₂₉N₆O₂⁺计算值:397.2352, 实测值:397.2348。



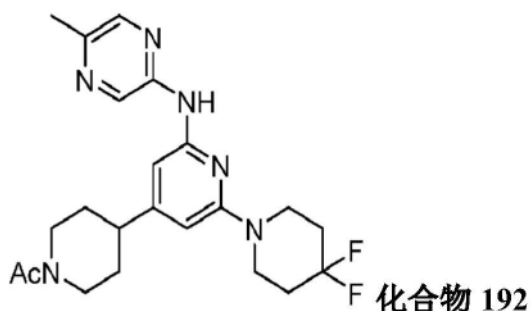
[0576] 快速色谱。12.1mg, 31.8μmol, 产率36%。HRMS: C₂₁H₂₉N₆O⁺计算值:381.2403, 实测值:381.2400。

[0577]



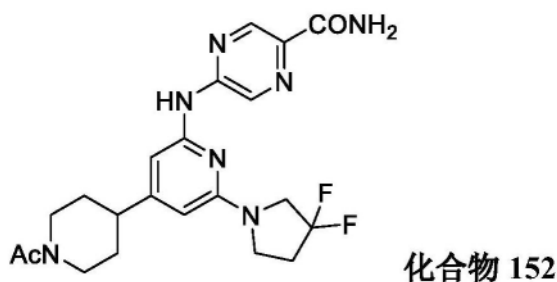
[0578] 快速色谱。59mg, 137 μ mol, 产率89.2%。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 9.10 (d, J=1.5Hz, 1H), 8.05 (dd, J=1.5, 0.7Hz, 1H), 7.02 (s, 1H), 6.39 (t, J=0.6Hz, 1H), 6.06 (d, J=1.0Hz, 1H), 4.84-4.76 (m, 1H), 3.87-3.80 (m, 4H), 3.54-3.46 (m, 5H), 3.16 (td, J=13.0, 2.6Hz, 1H), 2.72-2.56 (m, 3H), 2.49 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 1.90 (t, J=14.0Hz, 2H), 1.63 (qd, J=12.7, 4.3Hz, 2H)。HRMS: C₂₁H₂₉N₆O₂⁺ 计算值: 397.2352, 实测值: 397.2351。

[0579]



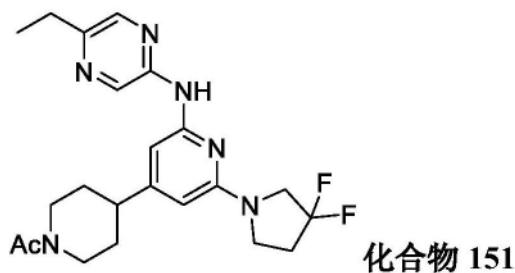
[0580] 快速色谱。23.9mg, 60.3 μ mol, 产率82%。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.46 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 6.68 (d, J=1.2Hz, 1H), 6.43 (d, J=1.3Hz, 1H), 4.71 (d, J=13.4Hz, 1H), 4.15-4.04 (m, 1H), 3.83 (t, J=5.9Hz, 4H), 3.29-3.20 (m, 1H), 2.96-2.86 (m, 1H), 2.78-2.67 (m, 1H), 2.54 (s, 3H), 2.22 (tt, J=13.0, 5.8Hz, 4H), 2.15 (s, 3H), 2.04-1.87 (m, 2H), 1.81-1.55 (m, 2H)。HRMS: C₂₂H₂₉F₂N₆O⁺ 计算值: 431.2371, 实测值: 431.2368。

[0581]



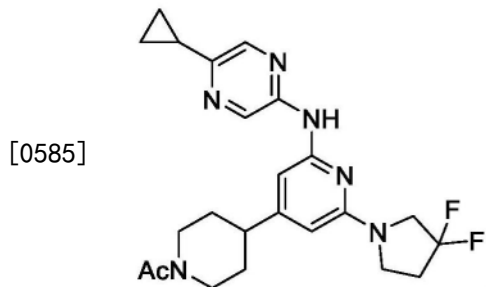
[0582] 15.8mg, 35.5 μ mol, 产率46.7%。HRMS: C₂₁H₂₆F₂N₇O₂⁺ 计算值: 446.2116, 实测值: 446.2109。

[0583]

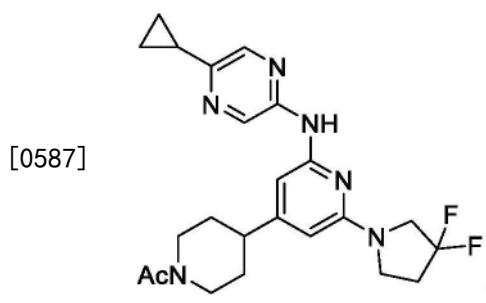


[0584] TFA盐13.8mg, 25.4 μ mol, 产率31%。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.43 (d, J=1.4Hz,

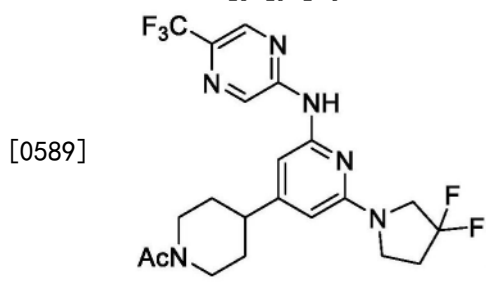
1H), 8.28 (dd, $J=1.4, 0.7\text{Hz}$, 1H), 6.39 (d, $J=1.2\text{Hz}$, 1H), 6.34 (d, $J=1.4\text{Hz}$, 1H), 4.70 (ddd, $J=11.2, 4.4, 2.2\text{Hz}$, 1H), 4.12-4.02 (m, 3H), 3.95 (t, $J=7.4\text{Hz}$, 2H), 3.29-3.20 (m, 1H), 2.92 (tt, $J=12.2, 3.6\text{Hz}$, 1H), 2.84 (q, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 2.70 (ddt, $J=14.7, 13.5, 7.4\text{Hz}$, 3H), 2.14 (s, 3H), 2.00-1.87 (m, 2H), 1.80-1.54 (m, 2H), 1.32 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 3H)。
HRMS: $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_2^+$ 计算值: 431.2371, 实测值: 431.2365。



[0586] TFA盐 30.9mg, 55.6 μmol , 产率 76.4%。 ^1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 8.44 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 6.37 (s, 1H), 6.27 (s, 1H), 4.70 (d, $J=13.7\text{Hz}$, 1H), 4.14-3.99 (m, 3H), 3.91 (t, $J=7.3\text{Hz}$, 2H), 3.23 (d, $J=12.8\text{Hz}$, 1H), 2.88 (s, 1H), 2.77-2.62 (m, 3H), 2.14 (s, 3H), 1.93 (t, $J=15.4\text{Hz}$, 2H), 1.78-1.57 (m, 2H), 1.23 (t, $J=7.1\text{Hz}$, 1H), 1.09-0.94 (m, 4H)。

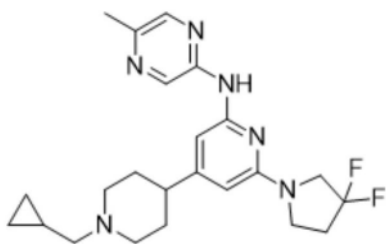


[0588] HRMS: $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}^+$ 计算值: 443.2371, 实测值: 443.2368。



[0590] TFA盐 28.8mg, 49.3 μmol , 产率 66%。 ^1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 8.94 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 6.62 (s, 1H), 6.28 (s, 1H), 4.74-4.66 (m, 1H), 4.07 (d, $J=13.6\text{Hz}$, 1H), 3.99 (t, $J=12.7\text{Hz}$, 2H), 3.85 (t, $J=7.3\text{Hz}$, 2H), 3.29-3.20 (m, 1H), 2.92-2.82 (m, 1H), 2.77-2.71 (m, 1H), 2.71-2.60 (m, 2H), 2.15 (d, $J=0.5\text{Hz}$, 3H), 1.93 (t, $J=15.6\text{Hz}$, 2H), 1.80-1.55 (m, 2H)。
HRMS: $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{F}_5\text{N}_6\text{O}^+$ 计算值: 471.1932, 实测值: 471.1932。

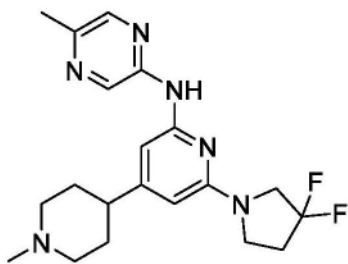
[0591]



化合物 161

[0592] 1.59g TFA3盐, 2.06mmol, 64.9%。(TFA盐的NMR) ^1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 8.61 (s, 1H), 8.25 (d, $J=1.3\text{Hz}$, 1H), 6.52 (d, $J=1.2\text{Hz}$, 1H), 6.24 (s, 1H), 4.04 (t, $J=12.5\text{Hz}$, 2H), 3.91 (t, $J=7.3\text{Hz}$, 2H), 3.80 (s, 1H), 3.20-3.08 (m, 4H), 2.96 (ddt, $J=12.2, 7.4, 3.9\text{Hz}$, 1H), 2.67 (tt, $J=14.0, 7.3\text{Hz}$, 2H), 2.52 (s, 3H), 2.19 (d, $J=14.1\text{Hz}$, 2H), 2.15-2.00 (m, 2H), 1.24-1.10 (m, 1H), 0.85-0.74 (m, 2H), 0.47 (dt, $J=6.4, 4.7\text{Hz}$, 2H) $\cdot\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{F}_2\text{N}_6^+$ 。精确质量: 429.2573。

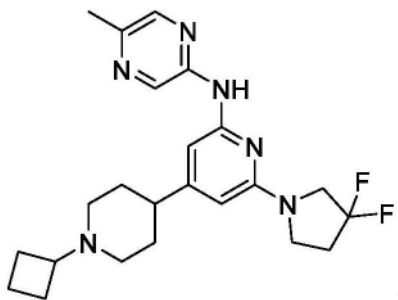
[0593]



化合物 159

[0594] 快速色谱。17.9mg, 46.1 μmol , 产率64.3%。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 9.29 (d, $J=1.5\text{Hz}$, 1H), 8.03 (dd, $J=1.6, 0.7\text{Hz}$, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.28 (d, $J=1.0\text{Hz}$, 1H), 5.81 (dd, $J=1.1, 0.5\text{Hz}$, 1H), 3.85 (t, $J=13.2\text{Hz}$, 2H), 3.70 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 2H), 3.00 (d, $J=11.3\text{Hz}$, 2H), 2.55-2.29 (m, 9H), 2.15-1.98 (m, 2H), 1.83 (s, 4H) $\cdot\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{F}_2\text{N}_6^+$ 。精确质量: 389.2260。

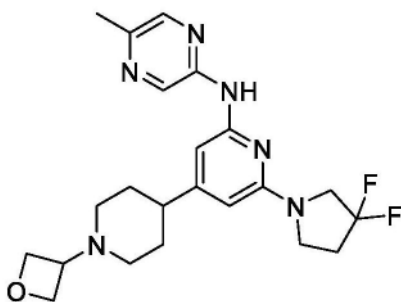
[0595]



化合物 162

[0596] 15.4mg, 36 μmol , 71.4%。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 9.29 (d, $J=1.5\text{Hz}$, 1H), 8.03 (s, 1H), 6.91 (s, 1H), 6.28 (s, 1H), 5.82 (s, 1H), 3.85 (t, $J=13.2\text{Hz}$, 2H), 3.69 (t, $J=7.3\text{Hz}$, 2H), 3.01 (s, 2H), 2.73 (s, 1H), 2.54-2.39 (m, 5H), 2.06 (br s, 2H), 1.91 (br s, 2H), 1.71 (d, $J=9.3\text{Hz}$, 5H), 1.61 (s, 4H) $\cdot\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{F}_2\text{N}_6^+$ 。精确质量: 429.2573。

[0597]

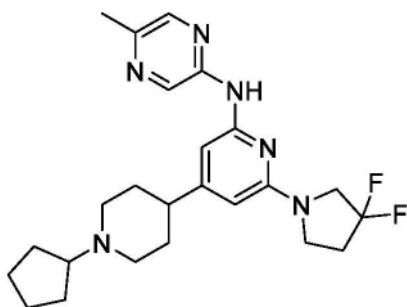


化合物 163

[0598] 快速色谱。17.1mg, 39.8 μ mol, 61.7%。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 9.28 (d, J=1.5Hz, 1H), 8.03 (dd, J=1.5, 0.7Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.29 (d, J=1.0Hz, 1H), 5.81 (dd, J=1.1, 0.4Hz, 1H), 4.72-4.61 (m, 4H), 3.85 (t, J=13.2Hz, 2H), 3.70 (t, J=7.2Hz, 2H), 3.50 (p, J=6.5Hz, 1H), 2.87 (d, J=10.7Hz, 2H), 2.57-2.34 (m, 5H), 1.97-1.74 (m, 7H)。C₂₂H₂₉F₂N₆O⁺。

[0599] 精确质量: 431.2365。

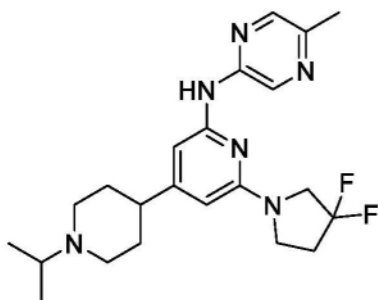
[0600]



化合物 164

[0601] 快速色谱。19.1mg, 43.2 μ mol, 70.3%。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 9.30 (d, J=1.5Hz, 1H), 8.03 (dd, J=1.6, 0.7Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.28 (s, 1H), 5.83 (d, J=1.0Hz, 1H), 3.85 (t, J=13.2Hz, 2H), 3.69 (t, J=7.2Hz, 2H), 3.17 (s, 2H), 2.54-2.39 (m, 5H), 2.15-1.64 (m, 12H), 1.63-1.50 (m, 2H), 1.45 (s, 2H)。HRMS: C₂₄H₃₃F₂N₆⁺ 计算值: 443.2735, 实测值: 443.2729。

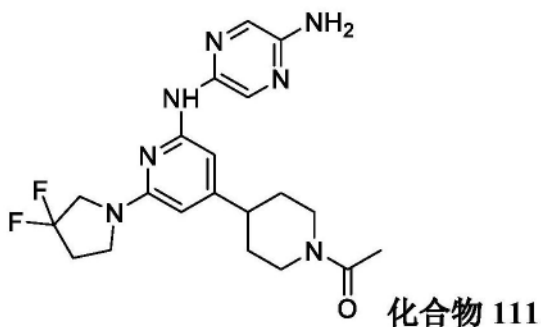
[0602]



化合物 160

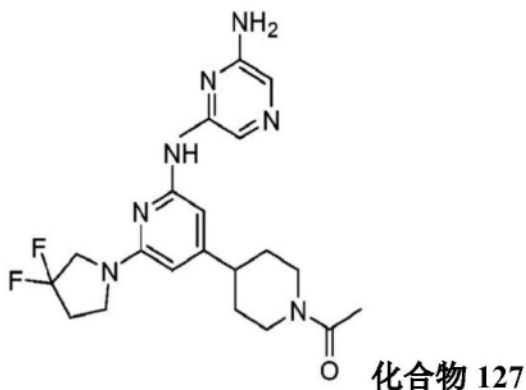
[0603] 快速色谱。29mg, 70 μ mol, 产率88.7%。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 9.30 (d, J=1.5Hz, 1H), 8.02 (dd, J=1.5, 0.7Hz, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.28 (d, J=1.0Hz, 1H), 5.83 (d, J=1.0Hz, 1H), 3.84 (t, J=13.2Hz, 2H), 3.69 (t, J=7.2Hz, 2H), 3.04 (d, J=11.1Hz, 2H), 2.84-2.76 (m, 1H), 2.54-2.35 (m, 5H), 2.26 (br s, 2H), 1.84 (q, J=5.6Hz, 4H), 1.10 (d, J=6.5Hz, 6H)。HRMS: C₂₂H₃₀F₂N₆⁺ 计算值: 417.2578, 实测值: 417.2574。

[0604]



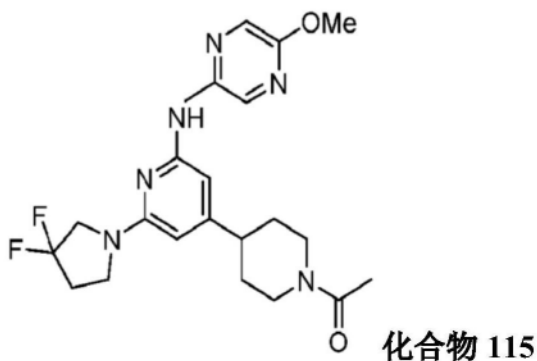
[0605] 交叉偶联,然后对粗制产物进行TFA脱保护。15.8mg,三-TFA盐,18.4 μ mol,产率25.3%。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.79 (t, J=1.5Hz, 1H), 7.71 (d, J=1.6Hz, 1H), 6.21 (s, 1H), 5.81 (s, 1H), 4.70-4.61 (m, 1H), 4.06-3.98 (m, 1H), 3.82 (t, J=13.3Hz, 2H), 3.65 (t, J=7.2Hz, 2H), 3.21 (td, J=13.1, 2.7Hz, 1H), 2.74-2.63 (m, 2H), 2.49 (tt, J=14.1, 7.2Hz, 2H), 2.13 (s, 3H), 1.88 (t, J=15.9Hz, 2H), 1.75-1.51 (m, 2H)。HRMS: C₂₀H₂₆F₂N₇O⁺计算值: 418.2167, 实测值: 418.2160。精确质量: 418.2161。

[0606]



[0607] ¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.38 (s, 1H), 7.38 (s, 1H), 6.49 (s, 1H), 5.95 (s, 1H), 4.71-4.63 (m, 1H), 4.04 (d, J=13.7Hz, 1H), 3.86 (t, J=13.2Hz, 2H), 3.71 (t, J=7.2Hz, 2H), 3.28-3.13 (m, 1H), 2.80-2.65 (m, 1H), 2.52 (tt, J=14.0, 7.2Hz, 2H), 2.13 (d, J=0.5Hz, 3H), 1.90 (t, J=15.4Hz, 2H), 1.77-1.53 (m, 2H)。HRMS: C₂₀H₂₆F₂N₇O⁺计算值: 418.2167, 实测值: 418.2166。

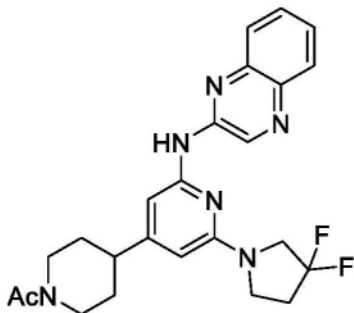
[0608]



[0609] 39.8mg TFA2盐, 60.3 μ mol, 产率82.9%。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.19-8.06 (m, 2H), 6.32 (d, J=1.3Hz, 1H), 6.26 (d, J=1.4Hz, 1H), 4.75-4.66 (m, 1H), 4.14-4.01 (m, 3H), 3.99 (s, 3H), 3.94 (t, J=7.4Hz, 2H), 3.30-3.19 (m, 1H), 2.90 (tt, J=12.1, 3.6Hz, 1H), 2.78-2.62 (m, 3H), 2.15 (s, 3H), 1.94 (t, J=15.7Hz, 2H), 1.80-1.55 (m, 2H)。HRMS:

$C_{21}H_{27}F_2N_6O_2^+$ 计算值:433.2164, 实测值:433.2159。

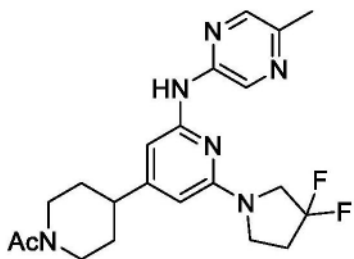
[0610]



化合物 112

[0611] 1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 8.76 (s, 1H), 8.07 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 7.91-7.79 (m, 2H), 7.73 (t, $J=7.3$ Hz, 1H), 6.63 (s, 1H), 6.45 (s, 1H), 4.77-4.69 (m, 1H), 4.23-4.11 (m, 2H), 4.09 (s, 4H), 3.26 (dd, $J=13.4, 2.7$ Hz, 1H), 2.96 (ddd, $J=12.2, 8.6, 3.7$ Hz, 1H), 2.77 (td, $J=13.3, 8.2$ Hz, 3H), 2.16 (s, 3H), 1.98 (t, $J=15.3$ Hz, 2H), 1.84-1.59 (m, 2H)。 $C_{24}H_{27}F_2N_6O^+$ 计算值:453.2214, 实测值:453.2210

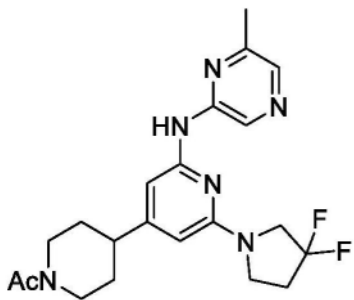
[0612]



化合物 107

[0613] TFA盐, 33.6mg, 63.4 μ mol, 产率87.2%。 1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 8.43 (s, 1H), 8.27 (t, $J=1.2$ Hz, 1H), 6.38 (d, $J=1.2$ Hz, 1H), 6.33 (s, 1H), 4.75-4.67 (m, 1H), 4.07 (t, $J=12.4$ Hz, 3H), 3.94 (t, $J=7.4$ Hz, 2H), 3.29-3.21 (m, 1H), 2.97-2.86 (m, 1H), 2.78-2.62 (m, 3H), 2.54 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 1.94 (t, $J=15.1$ Hz, 2H), 1.81-1.55 (m, 2H)。 $C_{21}H_{27}F_2N_6O^+$ 。精确质量:417.2214, 实测值:417.2211。

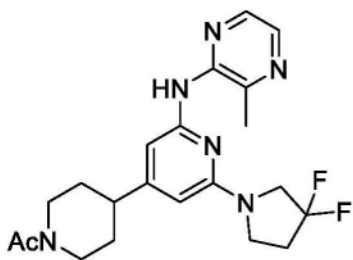
[0614]



化合物 108

[0615] TFA盐, 24.3mg, 45.8 μ mol, 产率63%。 1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 8.29 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 6.39 (d, $J=1.3$ Hz, 1H), 6.38 (d, $J=1.3$ Hz, 1H), 4.75-4.67 (m, 1H), 4.15-4.08 (m, 3H), 4.00 (t, $J=7.4$ Hz, 2H), 3.29-3.21 (m, 1H), 2.98-2.87 (m, 1H), 2.79-2.64 (m, 3H), 2.58 (d, $J=0.7$ Hz, 3H), 2.15 (s, 3H), 1.95 (t, $J=15.3$ Hz, 2H), 1.81-1.55 (m, 2H)。 $C_{21}H_{27}F_2N_6O^+$ 。精确质量:417.2214, 实测值:417.2209。

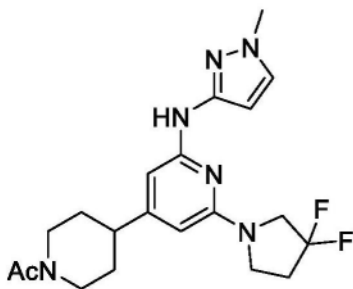
[0616]



化合物 109

[0617] TFA盐, 36mg, 67.9 μ mol, 产率93.4%。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.27-8.21 (m, 2H), 6.81 (d, J=1.3Hz, 1H), 6.42 (d, J=1.3Hz, 1H), 4.72 (d, J=13.4Hz, 1H), 4.08 (t, J=12.3Hz, 3H), 3.96 (t, J=7.4Hz, 2H), 3.29-3.21 (m, 1H), 2.94 (ddd, J=12.2, 8.5, 3.7Hz, 1H), 2.79-2.63 (m, 6H), 2.15 (s, 3H), 1.96 (t, J=15.7Hz, 2H), 1.81-1.56 (m, 2H)。C₂₁H₂₇F₂N₆O⁺。精确质量: 417.2214, 实测值: 417.2208。

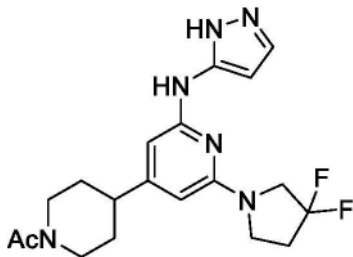
[0618]



化合物 101

[0619] 26.6mg TFA盐, 51.3 μ mol, 产率70.5%。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 7.63 (d, J=2.4Hz, 1H), 6.24 (d, J=1.4Hz, 1H), 6.15 (d, J=1.3Hz, 1H), 5.99 (d, J=2.4Hz, 1H), 4.75-4.66 (m, 1H), 4.11-4.03 (m, 3H), 3.97 (t, J=7.4Hz, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.24 (td, J=13.2, 2.6Hz, 1H), 2.88 (tt, J=12.2, 3.6Hz, 1H), 2.77-2.63 (m, 3H), 2.14 (s, 3H), 1.93 (t, J=15.5Hz, 2H), 1.79-1.54 (m, 2H)。HRMS: C₂₀H₂₇F₂N₆O⁺计算值: 405.2214, 实测值: 405.2212。

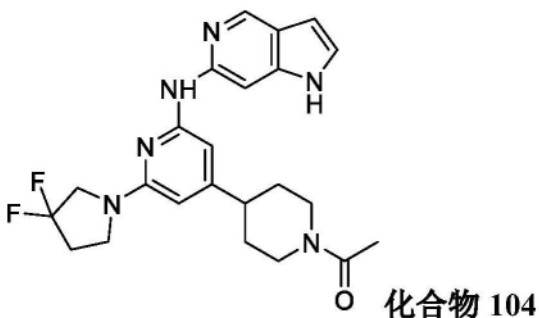
[0620]



化合物 114

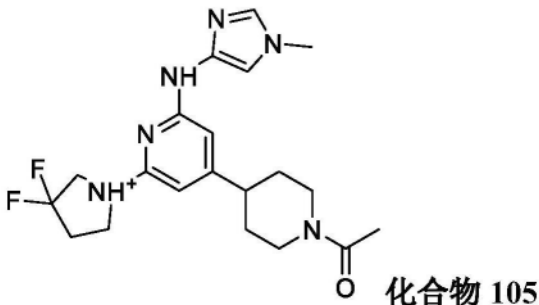
[0621] 9.1mg, 23.3 μ mol, 产率16.3%。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7.46 (d, J=2.3Hz, 1H), 6.14 (d, J=2.2Hz, 1H), 5.66 (s, 1H), 4.78 (d, J=13.4Hz, 1H), 3.89 (q, J=13.8Hz, 3H), 3.78 (s, 2H), 3.71 (br s, J=7.2Hz, 1H), 3.14 (t, J=12.6Hz, 1H), 2.69-2.44 (m, 4H), 2.13 (s, 3H), 2.10 (d, J=3.0Hz, 1H), 1.83 (s, 2H), 1.60 (qd, J=12.7, 4.4Hz, 2H)。C₁₉H₂₅F₂N₆O⁺。精确质量: 391.2052。

[0622]



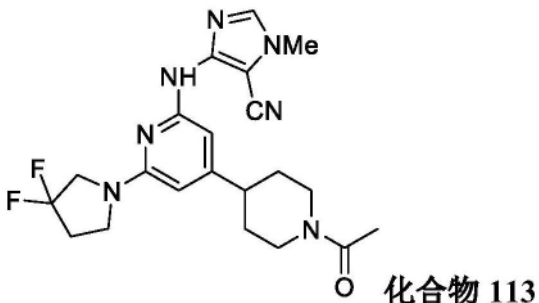
[0623] 9.6mg, 21.8 μ mol, 产率15%。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8.18 (d, J=1.0Hz, 1H), 7.59 (d, J=3.7Hz, 1H), 7.40 (t, J=0.9Hz, 1H), 6.66 (dd, J=3.7, 0.8Hz, 1H), 6.54 (d, J=1.0Hz, 1H), 6.49 (br s, 2H), 6.11 (t, J=0.7Hz, 1H), 4.88-4.79 (m, 1H), 4.02-3.94 (m, 1H), 3.90 (t, J=12.9Hz, 2H), 3.77 (t, J=7.3Hz, 2H), 3.20 (td, J=13.1, 2.6Hz, 1H), 2.78 (tt, J=12.2, 3.6Hz, 1H), 2.70-2.48 (m, 3H), 2.15 (s, 3H), 2.01-1.86 (m, 2H), 1.67 (qd, J=12.7, 4.3Hz, 2H)。C₂₃H₂₇F₂N₆O⁺。精确质量: 441.2209

[0624]



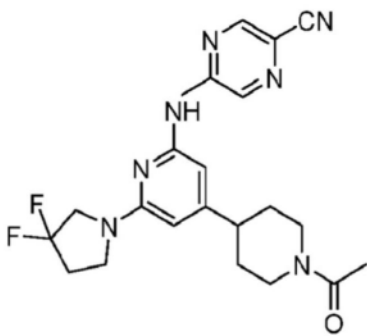
[0625] 17.5mg, 43.3 μ mol, 产率29.7%。C₂₀H₂₇F₂N₆O⁺。精确质量: 405.2209。

[0626]



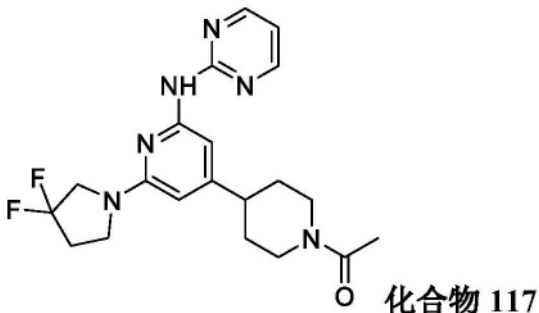
[0627] 34.3mg, 80 μ mol, 产率54.9%。¹H NMR (400MHz, DMSO) δ 9.16 (s, 1H), 7.74 (d, J=0.6Hz, 1H), 6.19 (d, J=1.1Hz, 1H), 5.81 (d, J=1.1Hz, 1H), 4.51 (d, J=12.8Hz, 1H), 3.89 (t, J=13.5Hz, 3H), 3.68 (d, J=0.7Hz, 3H), 3.62 (t, J=7.3Hz, 2H), 3.20-3.03 (m, 1H), 2.64-2.53 (m, 2H), 2.44 (dd, J=14.4, 7.2Hz, 2H), 2.02 (s, 3H), 1.75 (t, J=13.8Hz, 2H), 1.55 (qd, J=12.5, 4.2Hz, 1H), 1.41 (qd, J=12.6, 4.3Hz, 1H)。C₂₁H₂₆F₂N₇O⁺。精确质量: 430.2161。

[0628]



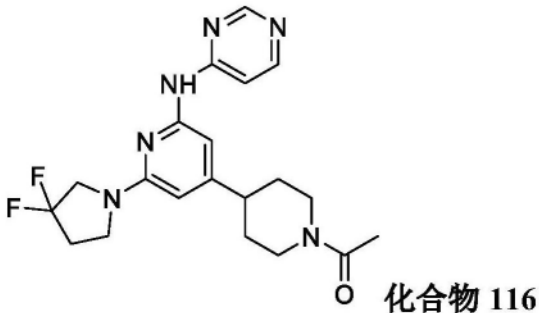
[0629] 20.8mg, 48.7 μ mol, 产率33.5%。¹H NMR (400MHz, DMSO) δ 10.41 (s, 1H), 9.25 (d, J=1.5Hz, 1H), 8.72 (d, J=1.4Hz, 1H), 6.78 (s, 1H), 6.12 (s, 1H), 4.50 (d, J=13.0Hz, 1H), 4.00-3.75 (m, 3H), 3.71-3.51 (m, 2H), 3.21-3.01 (m, 1H), 2.69 (d, J=12.0Hz, 1H), 2.55 (dt, J=14.5, 8.4Hz, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.75 (t, J=13.4Hz, 2H), 1.65-1.35 (m, 1H)。C₂₁H₂₄F₂N₇O⁺。精确质量:428.2005。

[0630]



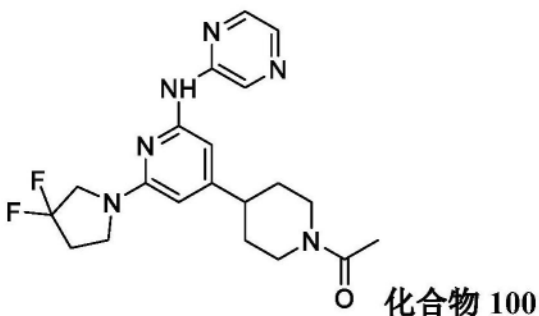
[0631] 39.1mg, 97.1 μ mol, 产率66.8%。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8.48 (d, J=4.8Hz, 2H), 7.68 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 6.78 (t, J=4.8Hz, 1H), 5.85 (d, J=1.1Hz, 1H), 4.85-4.76 (m, 1H), 3.98-3.90 (m, 1H), 3.81 (t, J=13.3Hz, 2H), 3.64 (t, J=7.2Hz, 2H), 3.17 (td, J=13.0, 2.6Hz, 1H), 2.79-2.57 (m, 2H), 2.46 (tt, J=13.9, 7.2Hz, 2H), 2.14 (s, 3H), 1.92 (t, J=14.0Hz, 2H), 1.77-1.59 (m, 3H)。C₂₀H₂₅F₂N₆O⁺。精确质量:403.2052。

[0632]



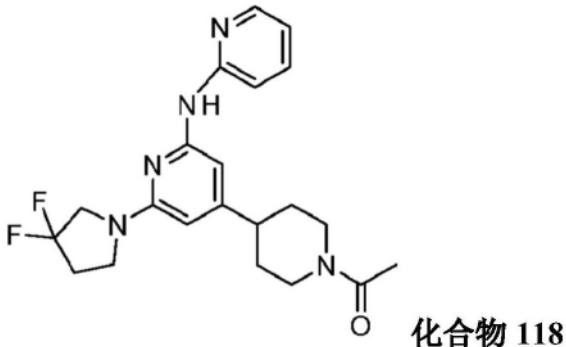
[0633] 31.8mg, 79 μ mol, 产率54.3%。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8.75 (s, 1H), 8.44 (d, J=5.7Hz, 1H), 7.91-7.85 (m, 1H), 6.45 (s, 1H), 5.84 (dd, J=1.0, 0.5Hz, 1H), 4.85-4.76 (m, 1H), 3.99-3.91 (m, 1H), 3.86 (t, J=13.1Hz, 2H), 3.71 (t, J=7.2Hz, 2H), 3.22-3.11 (m, 1H), 2.74-2.58 (m, 2H), 2.58-2.44 (m, 2H), 2.15 (s, 3H), 1.91 (d, J=14.9Hz, 2H), 1.70-1.55 (m, 2H)。C₂₀H₂₅F₂N₆O⁺。精确质量:403.2052。

[0634]



[0635] 45.9mg, 114 μ mol, 产率78.4%。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 9.22 (br s, 1H), 8.16 (dd, J = 2.7, 1.5Hz, 1H), 8.10 (d, J = 2.7Hz, 1H), 7.07 (br s, 1H), 6.44 (br s, 1H), 5.79 (d, J = 1.1Hz, 1H), 4.85-4.76 (m, 1H), 3.94 (d, J = 13.8Hz, 1H), 3.86 (t, J = 13.1Hz, 2H), 3.72 (s, 2H), 3.16 (td, J = 13.1, 2.6Hz, 1H), 2.72-2.56 (m, 2H), 2.49 (tt, J = 13.8, 7.2Hz, 2H), 2.14 (s, 3H), 1.91 (d, J = 14.1Hz, 2H), 1.63 (qd, J = 12.7, 4.3Hz, 2H)。HRMS: C₂₀H₂₅F₂N₆O⁺ 计算值: 403.2058, 实测值: 403.2058。

[0636]



[0637] 30.7mg TFA盐, 59.6 μ mol, 产率81.9%。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.33 (ddd, J = 6.1, 1.7, 0.9Hz, 1H), 8.12 (ddd, J = 8.9, 7.3, 1.8Hz, 1H), 7.29-7.19 (m, 2H), 6.32 (d, J = 1.2Hz, 1H), 6.28 (d, J = 1.1Hz, 1H), 4.74-4.65 (m, 1H), 4.11-3.96 (m, 3H), 3.86 (t, J = 7.3Hz, 2H), 3.29-3.20 (m, 1H), 2.86 (tt, J = 12.1, 3.6Hz, 1H), 2.72 (td, J = 13.2, 3.0Hz, 1H), 2.62 (dq, J = 14.1, 7.0Hz, 2H), 2.15 (s, 3H), 1.99-1.86 (m, 2H), 1.78-1.54 (m, 2H)。HRMS: C₂₁H₂₆F₂N₅O⁺ 计算值: 402.2105, 实测值: 402.2103。

[0638] 实施例5

[0639] 取代基效应

[0640] 改变取代基以提高对LZK的结合亲和力和相对于DLK的选择性。K_d值通过Eurofins DiscoverX使用Kd-Elect系统测量。平行人工膜渗透性测定 (PAMPA) 值通过Cyprotex进行测量。

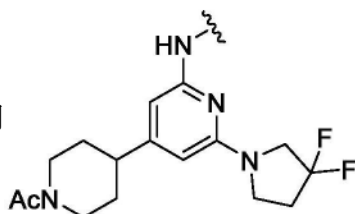
[0641] 对于K_d评估, 在100% DMSO中以100x最终测试浓度制备每种测试化合物的11点3倍系列稀释液, 随后在测定中稀释至1 $\times$ (最终DMSO浓度=1%)。大多数K_d是使用30,000nM的浓度测定的。如果初始K_d<0.5nM, 则从较低的最高浓度开始进行系列稀释, 重复测量。报告的K_d为40,000nM, 表明K_d>30,000nM。使用Hill方程, 用标准剂量反应曲线计算K_d值:

$$[0642] \quad \text{反应} = \text{背景值} + \frac{\text{信号值} - \text{背景值}}{1 + (\text{Kd}^{\text{斜率}} / \text{剂量}^{\text{斜率}})}$$

[0643] 将斜率设置为-1。使用Levenberg-Marquardt算法进行非线性最小二乘法拟合,对曲线进行拟合。

[0644] 最初,评估LZK对GNE-3511的4-氨基嘧啶结构变化的耐受性。如表22所示,无论是将环收缩成五元杂环,还是将环扩展成稠合体系,都没有提供任何优势。相反,这些修饰通常是有害的。回到最初的六元杂环,研究了在环中加入额外氮的可行性。耐人寻味的是,结果指出了一条明晰的前进道路:吡嗪取代基(2-吡嗪100)明显优于嘧啶(2-,4-嘧啶116、117)或未取代的母体吡啶(2-吡啶118)。此外,PAMPA膜渗透性评估表明(100)的渗透率值远远高于母体GNE-3511或中间体乙酰化形式(98)。

[0645] 表22. 各种杂环的影响



[0646]

化合物	取代基	LZK K_D (nM)	DLK K_D (nM)	PAMPA
98		5.9	3.1	3.44
118		450	270	
105		290	160	
113		2400	4600	
114		1500	1200	
101		>10 μ M	>10 μ M	

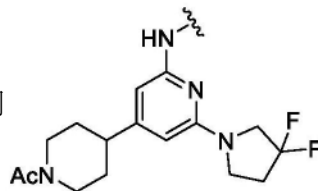
[0647]

104		>10 μ M	>10 μ M	
112		>10 μ M	>10 μ M	
100		110	54	16.94
116		1300	1300	
117		>10 μ M	>10 μ M	

[0648] 接下来,从简单的甲基扫描开始,探究LZK对吡嗪上取代的耐受性(表23)。再次,路

径是明确的:3-取代或6-取代(108、109)是不能耐受的,而5-甲基吡嗪(107)的效力大约是未取代的(100)的两倍。这种模式在胺取代基上再次出现,因为6-氨基(110)的效力是5-氨基(111)的1/11。在确定了取代位置后,研究了吡嗪的5位上各种取代基的效果。在所探究的各种取代基中,只有环丙基(150)的效力显著提高,对LZK和DLK具有亲和力大致相同的额外优势,而之前几乎所有的化合物都表现出对DLK至少轻微的选择性。

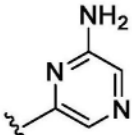
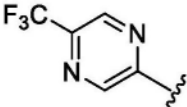
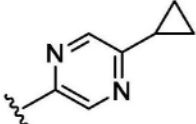
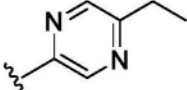
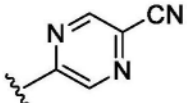
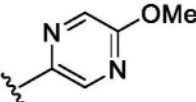
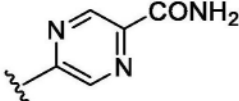
[0649] 表23.2-氨基吡嗪上取代基的影响



[0650]

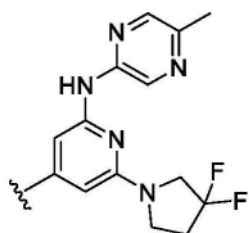
化合物	取代基	LZK K_D (nM)	DLK K_D (nM)
98		5.9	3.1
109		>10 μ M	>10 μ M
107		47	26
108		>10 μ M	>10 μ M
111		670	450

[0651]

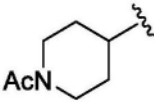
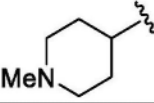
110		7700	6100
149		290	240
150		13	14
151		75	86
103		560	1300
115		300	190
152		9200	8100

[0652] 接下来,对乙酰基哌啶环的修饰进行了探究(表24)。首先,通过还原胺化用各种小型烷基取代基取代乙酰基基团。这些修饰使效力比母体(107)提高了2-10倍。还探究了(165)的环收缩乙酰基氮杂环丁烷取代基,其对LZK结合具有中性作用,但使DLK的K_d比母体(107)显著增加了6倍。烷基氮杂环丁烷取代基(166、167、168、169)对LZK的选择性大约是DLK的三倍,但亲和力略低于相应的哌啶衍生物。将哌啶截短为甲基(170)或三氟甲基(171)并不有利,尽管在甲基(210)上加入吗啉基取代基在一定程度上挽回了结合。

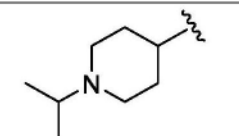
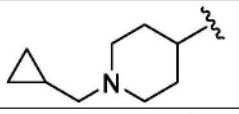
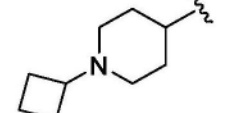
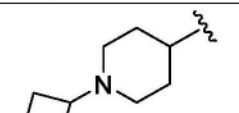
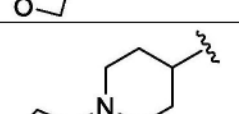
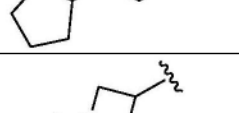
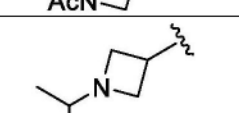
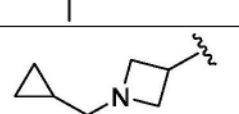
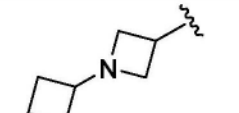
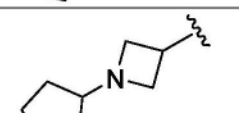
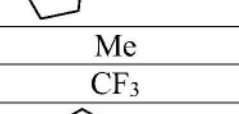
[0653] 表24.



[0654]

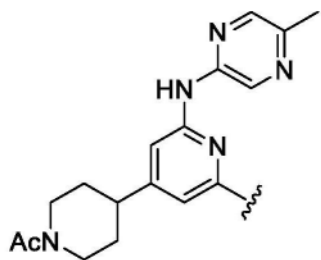
化合物	取代基	LZK K _D (nM)	DLK K _D (nM)
107		47	26
159		7.7	5.9

[0655]

160		9.6	11
161		3.3	4.3
162		5.9	9.2
163		20	19
164		2.3	4.5
165		46	170
166		26	88
167		28	58
168		25	64
169		21	94
170	Me	840	460
171	CF ₃	3700	1900
172		180	190

[0656] 根据这些可用的结果,筛选出了3,3'-二氟吡咯烷取代基的替代物(表25)。通常,研究发现,稠环或缩环体系,特别是通过吡咯烷环连接的环境体系,比开链更受青睐,而氮杂环丁烷或哌啶体系往往不如相应的吡咯烷有效力。极性基团或仲连接胺而非叔连接胺的效力通常较低。有趣的是,无论是对于LZK亲和力还是相对于DLK的选择性,吡咯烷环与双环体系的耦合都是非常优选的。具体而言,3.1.0化合物(198)对LZK的效力不完全是母体(107)的两倍;然而,(198)也证明了对LZK的选择性是对DLK的两倍,是相对于(107)选择性高了四倍。二甲基类似物(199)没有显示出效力特别增强,但对LZK的选择性是对DLK的十倍以上。

[0657] 表25.



[0658]

化合物	取代基	LZK K _D (nM)	DLK K _D (nM)
184		240	180
185		48	41
186		90	110
187		150	89
188		630	280
189		230	310
190		170	210
191		230	170
192		65	120
193		150	120
194		150	160
195		230	310
196		360	490
197		160	110
198		28	57

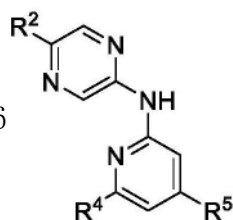
[0659]

199		29	390
200		18	22
201		6.7	20
202		45	140
203		87	180
204		8	44
205		29	100
206		79	270
207		0.97	180
208		22	100
209		260	280

[0660] 在这一点上,探究了结合一些优选取代基的效果(表26)。虽然在氨基吡嗪上用5-环丙基取代甲基曾增强了LZK的亲力和选择性,但其对所述3.1.0二甲基化合物(215)的耐受性不佳,而且对母体3.1.0核的结合没有显著影响(217)。然而,用烷基取代基取代嘧啶环上的乙酰基基团,使得效力显著提高,并且对LZK的总选择性是对DLK的10倍(216)。

[0661]

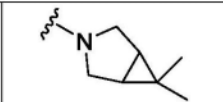
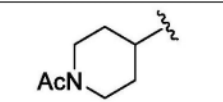
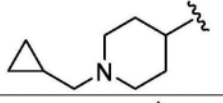
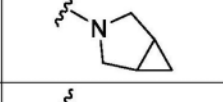
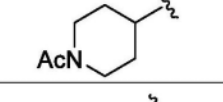
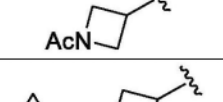
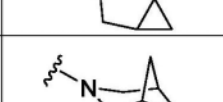
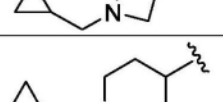
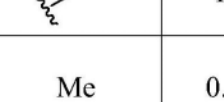
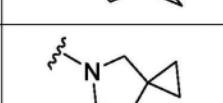
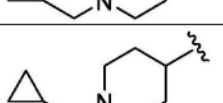
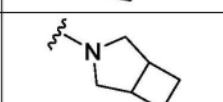
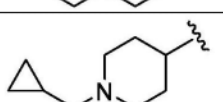
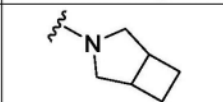
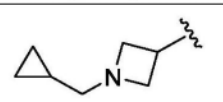
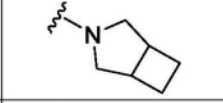
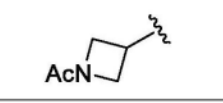
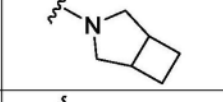
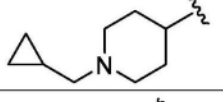
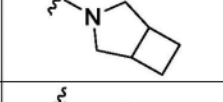
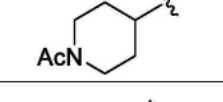
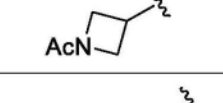
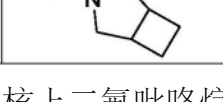
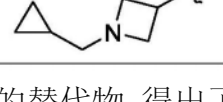
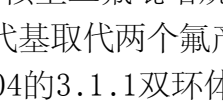
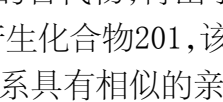
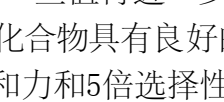
表26



[0662]

化合物	R ⁴	R ⁵	R ²	LZK K _D (nM)	DLK K _D (nM)
214			Me	7.6	29

[0663]

215				180	740
216				0.22	2
217				25	46
218				18	30
219				1.5	5.4
220			Me	0.97	6.3
221			Me	1.8	7.2
222			Me	6.9	17
223			Me	26	150
224			Me	94	310
225				3.3	14
226				24	64
227				69	160
228				7	39

[0664] 继续探究同一核上二氟吡咯烷的替代物,得出了一些值得进一步研究的候选物。具体地,用螺环丙基取代基取代两个氟产生化合物201,该化合物具有良好的结合亲和力和3倍选择性,而化合物204的3.1.1双环体系具有相似的亲和力和5倍选择性。最令人兴奋的是,化合物207的K_d测得在略低于1nM下,并且对LZK的选择性是对DLK的180倍。将该3.2.0双环取代基与各种其他修饰(222、223、224、225、226、227、228)结合起来研究,但不能改善化合物207所表现出的选择性和亲和力组合。令人惊讶的是,即使用N-烷基哌啶取代酰基哌啶,也没有增强结合或选择性,尽管先前看到这一趋势,并在修饰220、221至201和204中得到了验证。

[0665] 结论:从对DLK的特异性大约是对LZK两倍的已知DLK抑制剂开始,系统地改变取代

基以开发出新型LZK抑制剂,其具有亚纳米效力和出色的选择性。并非所有的修饰都有协同作用,修饰的组合在某种程度上是不可预测的。2-吡嗪取代基赋予了意想不到的高膜渗透性,而在中心吡啶4位的N-烷基化哌啶取代基通常增强LZK的结合和相对于DLK的选择性。中心吡啶的2位优选被吡咯烷取代,特别是被稠合的双环或螺环体系取代。这个位置上的3.2.0双环取代基提供了出色的效力和相对于DLK的180倍选择性。

[0666] 实施例6

[0667] MLK对ESCC的抑制作用

[0668] MTS测定(图43)显示,与缺乏扩增的LZK的对照ESCC细胞(KYSE410和OE19细胞)相比,具有3q扩增子的ESCC(OVCAR5、KYSE30和KYSE70细胞)对已知的LZK抑制剂GNE-3511敏感。结果通过软琼脂测定(图44)和集落形成测定(图45)得到了证实。如集落形成测定(图46)中所示,表达LZK耐药突变体形式(LZK^{Q240S})的ESCC细胞对GNE-3511具有耐药性。

[0669] 还评估了几种所公开MLK抑制剂抑制ESCC的能力。如集落形成测定(图47)所示,ESCC细胞(OVCAR5)对化合物161和164敏感。如图48和图49的蛋白质印迹和集落形成测定所示,表达耐药突变体LZK^{Q240S}的ESCC细胞对化合物161具有耐药性。使用化合物207、216和219进行的集落形成测定表明,ESCC细胞(OVCAR5和KYSE70)对使用化合物216和219处理非常敏感(图50)。

[0670] 实施例7

[0671] 治疗用途

[0672] 向被确定为患有至少部分以LZK过表达为特征的疾病或病况的受试者施用治疗有效量的包含本文所公开LZK抑制剂的药物组合物。在一些实例中,所述受试者被确定为患有癌症,例如HNSCC、LSCC、ESCC、肝细胞癌、卵巢癌症、小细胞肺癌、神经内分泌前列腺癌症或食管癌症细胞(例如食管腺癌)。在一个实例中,所述受试者患有癌症,并被确定为LZK表达水平上调。在任何前述实例中,可在有效时间段内以周期性间隔向所述受试者施用治疗有效量的所述药物组合物,以减轻所述疾病或病况的至少一种体征或症状。例如,所述受试者可以每天一次或在一天内以分剂量的形式(例如每天2-3次分剂量)施用治疗有效量的所述药物组合物。所述药物组合物通过任何合适的途径施用,包括但不限于肠胃外(例如,静脉内、肌内、皮下)、口服或局部施用。

[0673] 鉴于所公开发明的原理可以应用于许多可能的方面,应当认识到,所说明的方面仅仅是本发明的优选实例,而不应当被视为对本发明范围的限制。相反,本发明的范围由以下权利要求书限定。因此,我们要求所有落入这些权利要求范围和精神内的内容作为我们的发明。

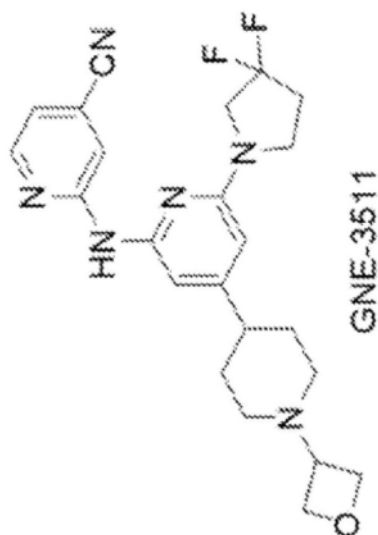


图1

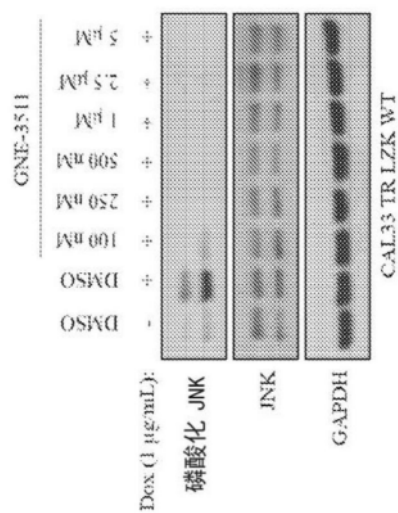


图2A

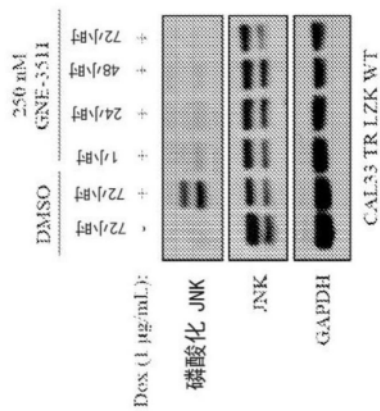


图2B

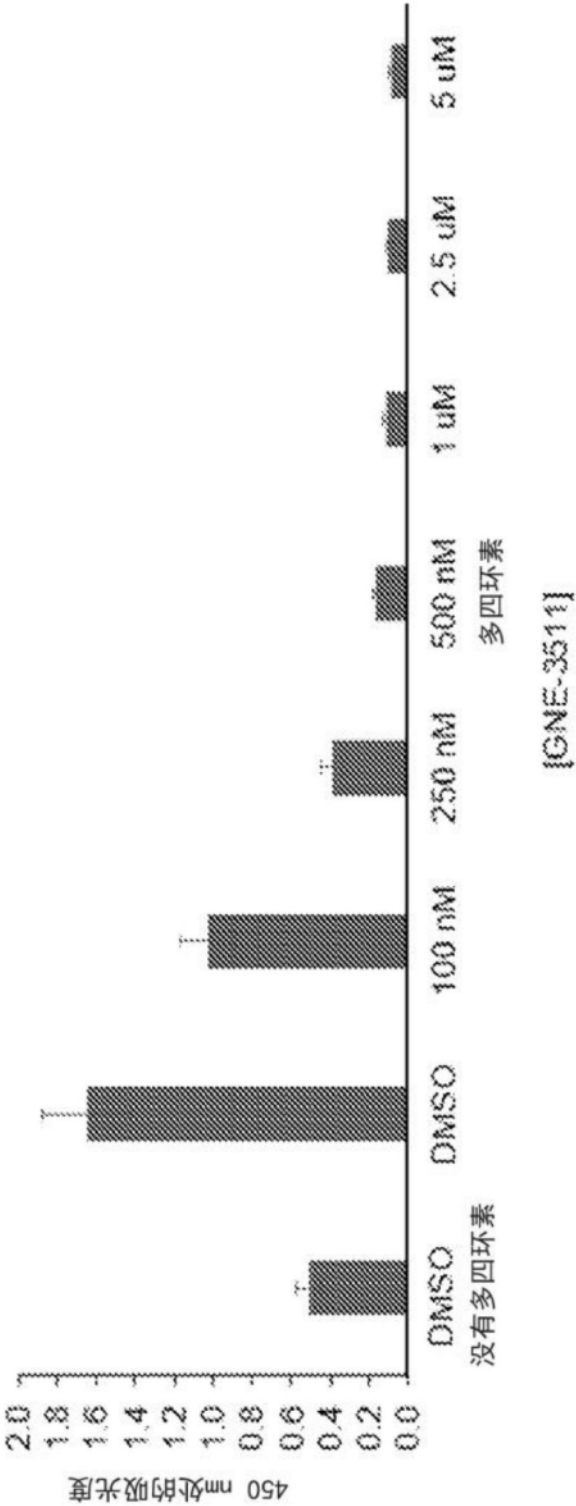


图2C

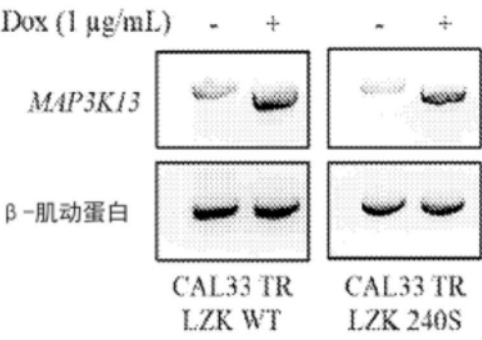


图3

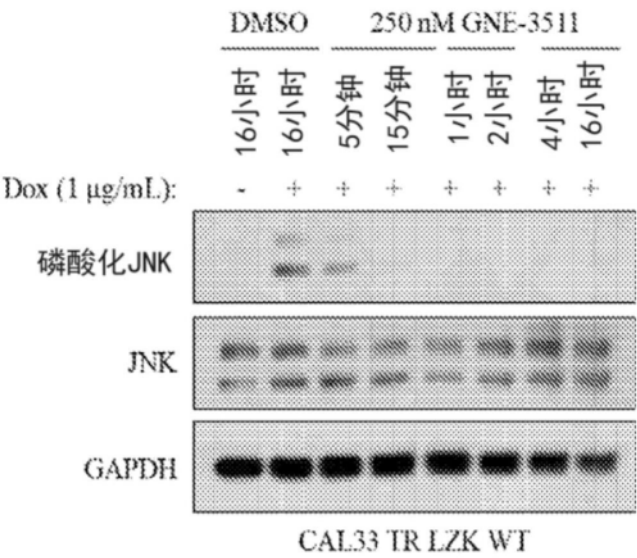


图4

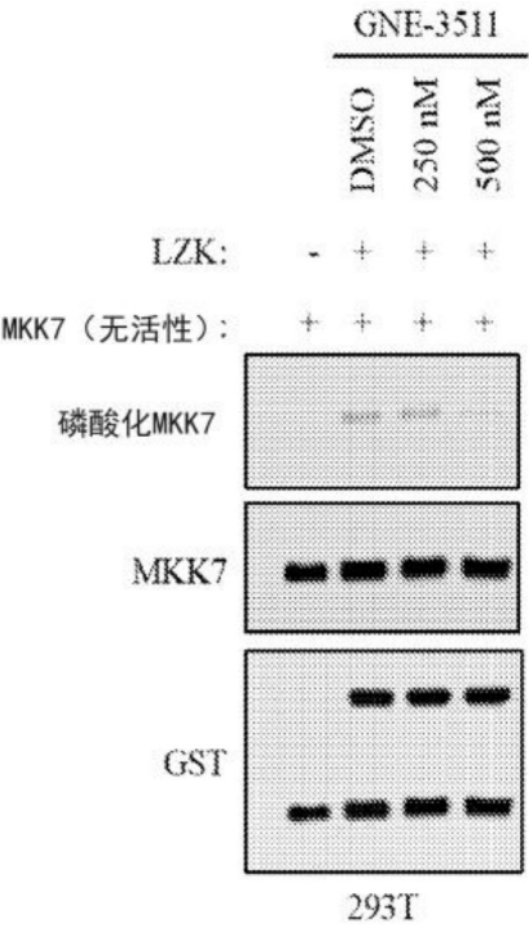


图5

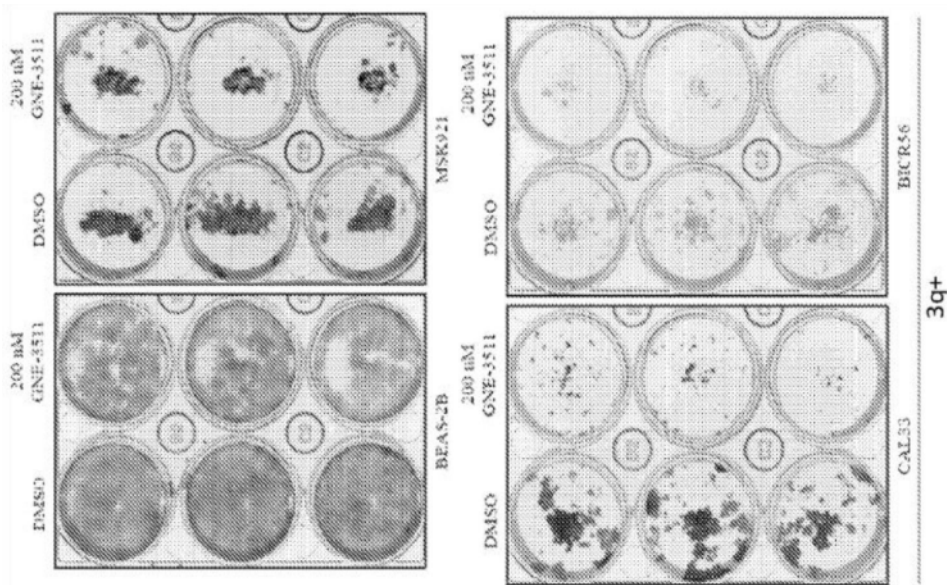


图6A

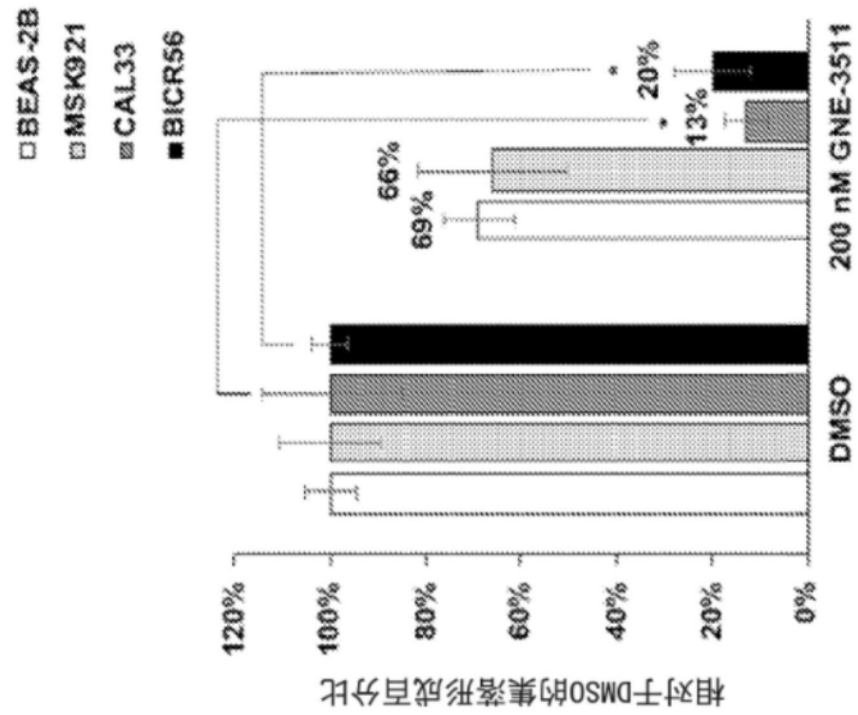


图6B

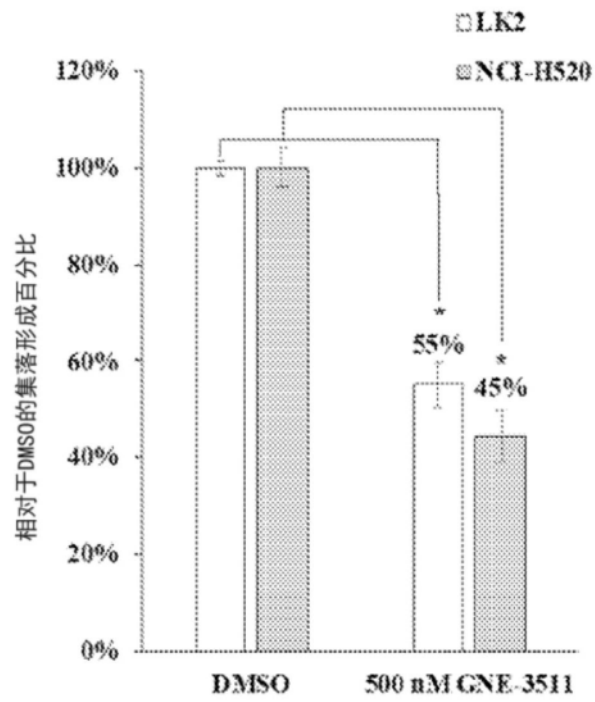


图7A

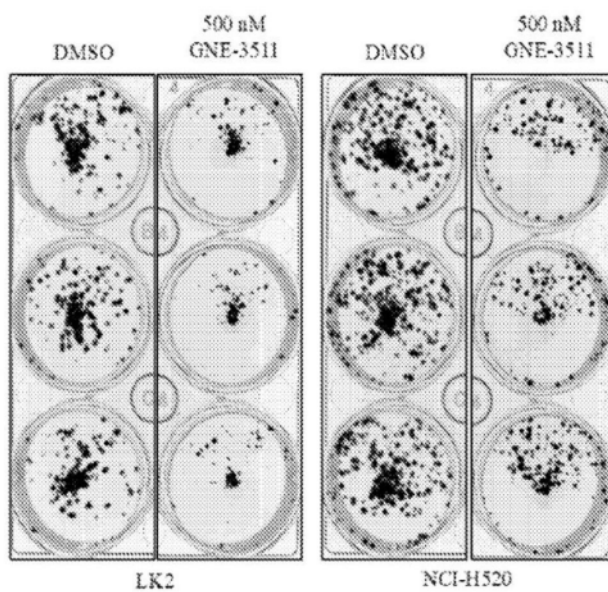


图7B

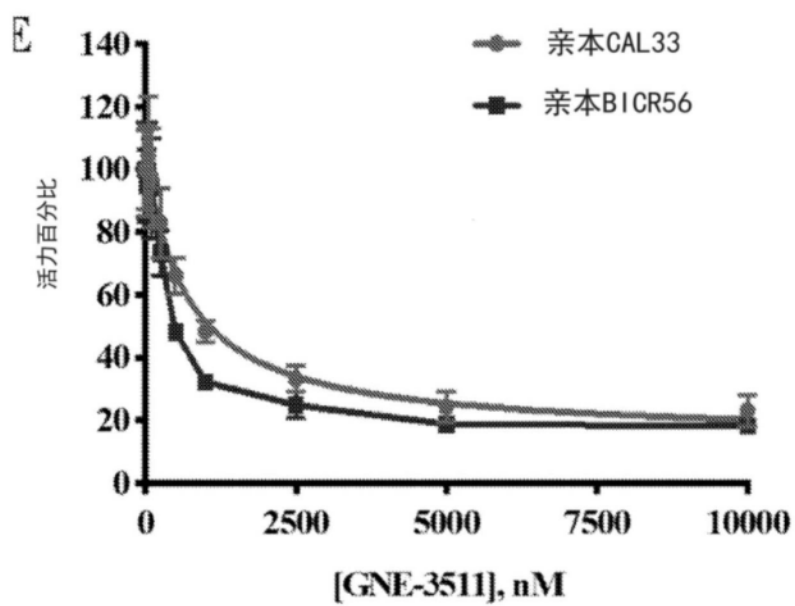


图8

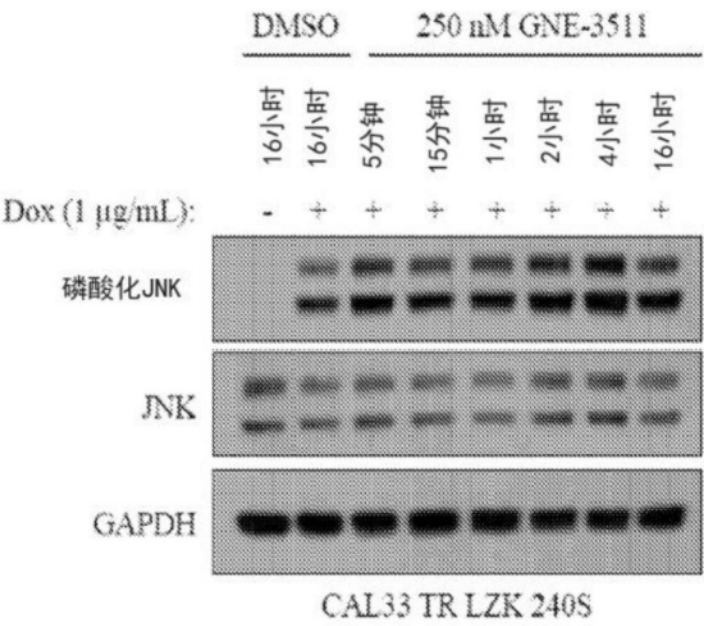


图9

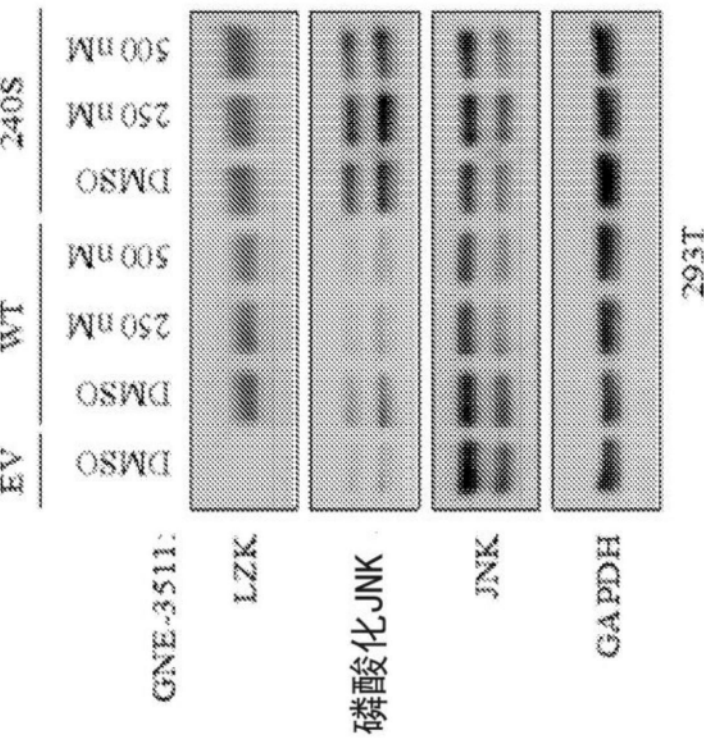


图10

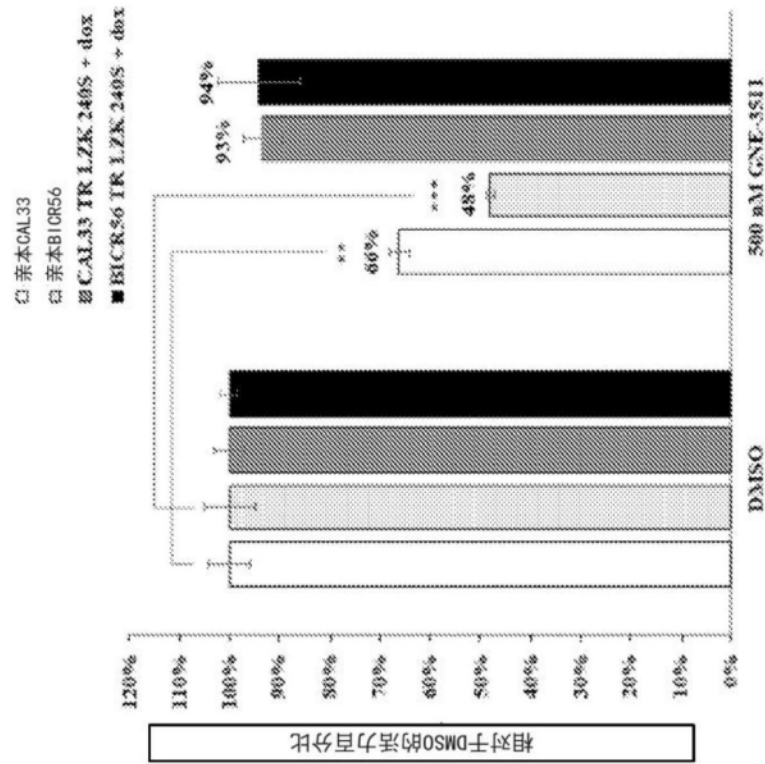


图11

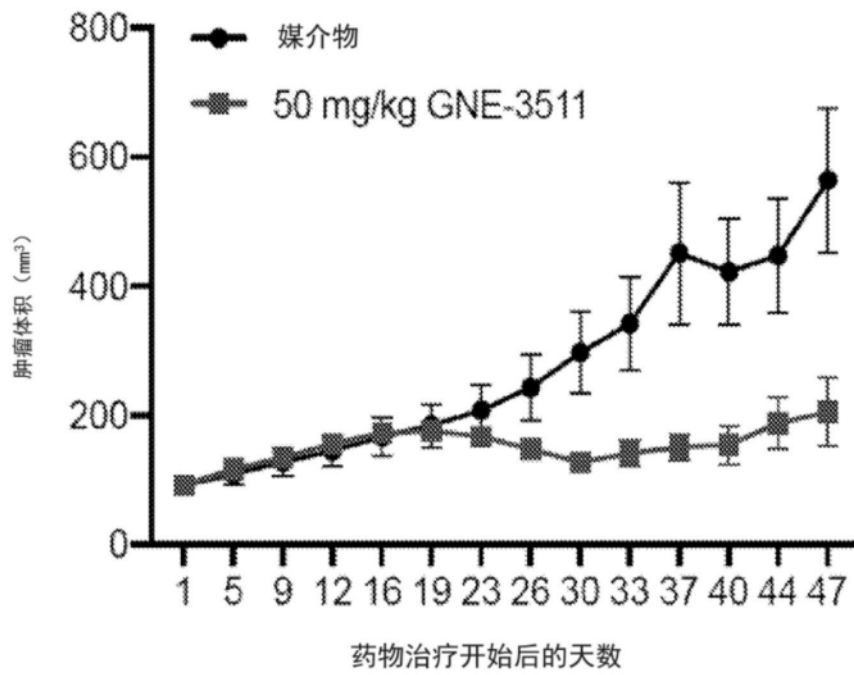


图12A

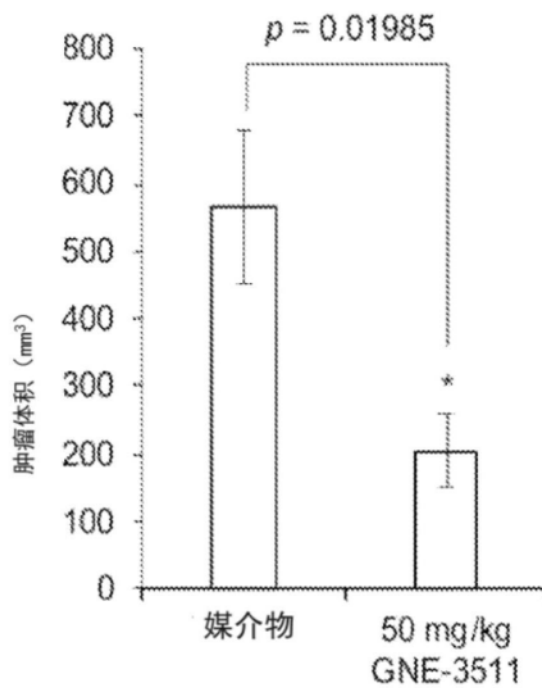


图12B

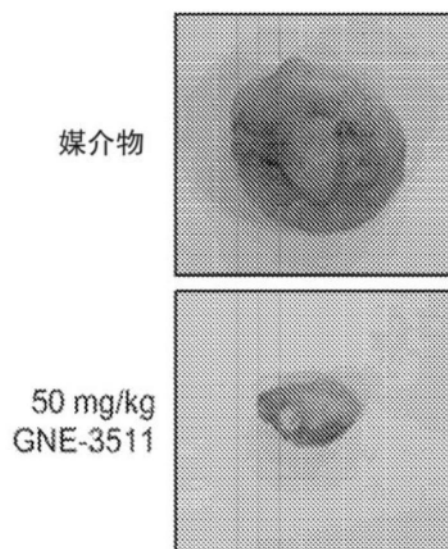
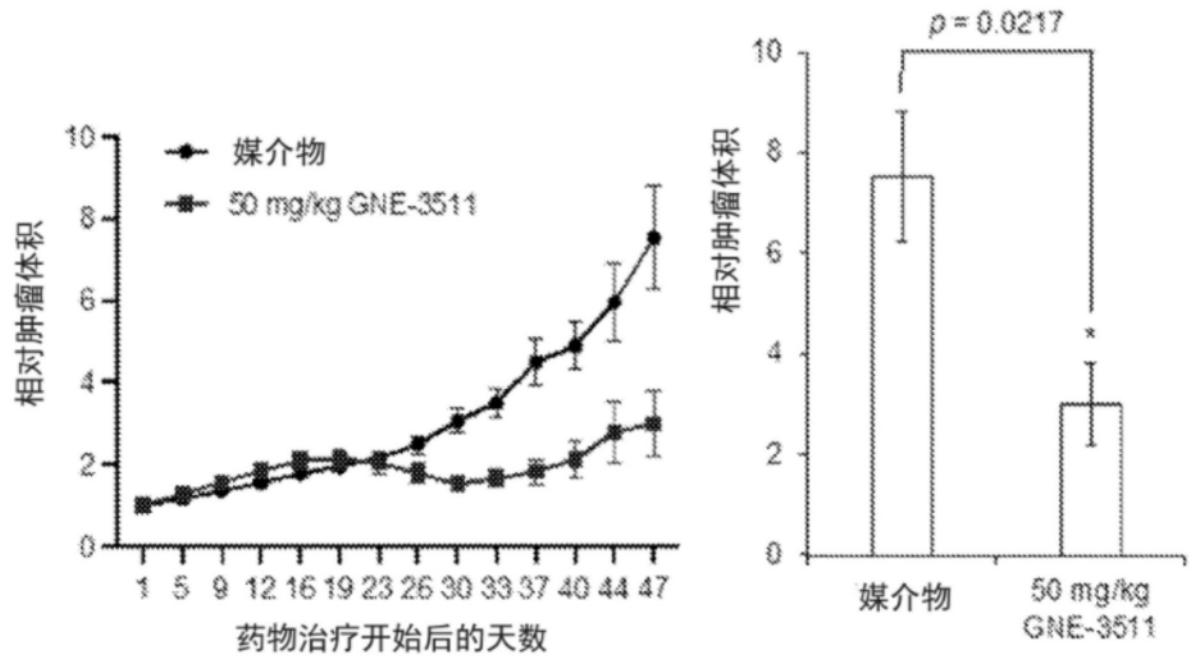
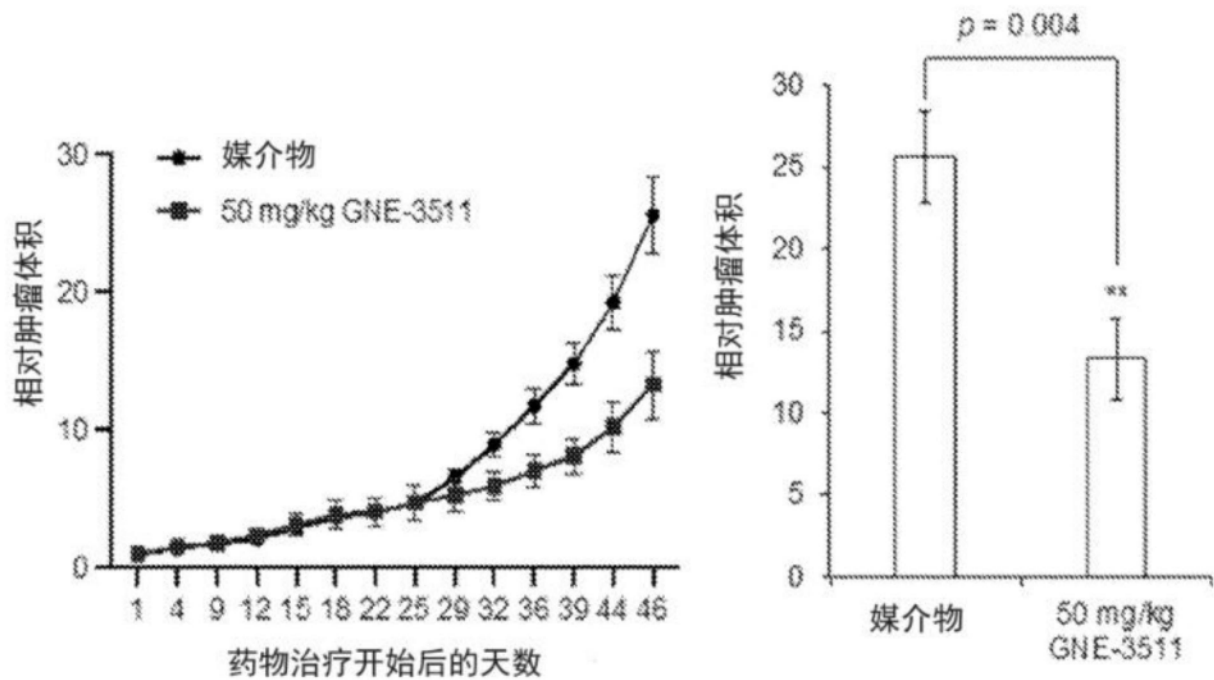


图12C



391396-364-R

图13A



295223-140-R

图13B

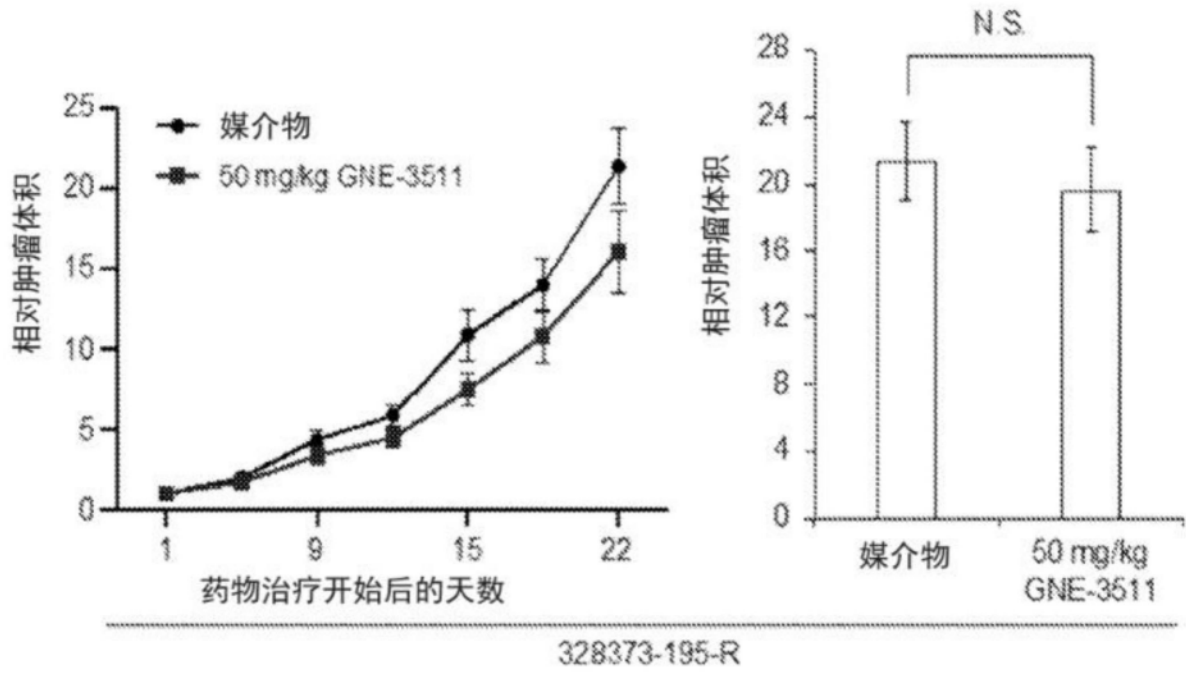


图13C

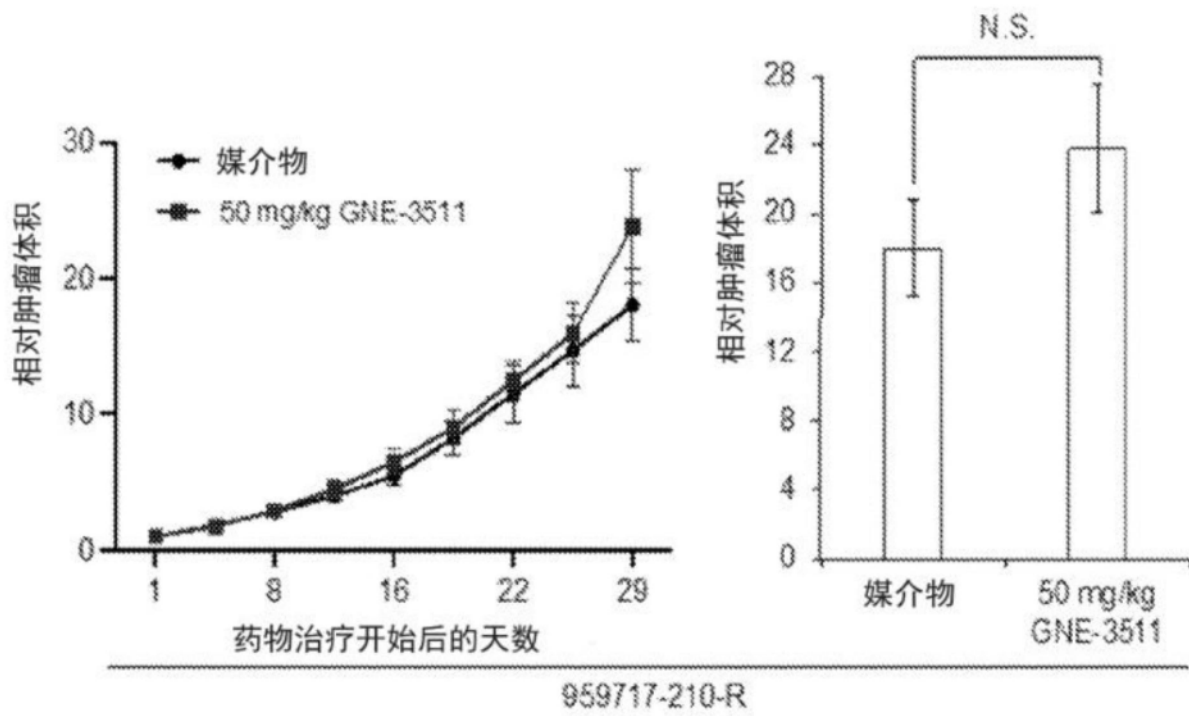


图13D

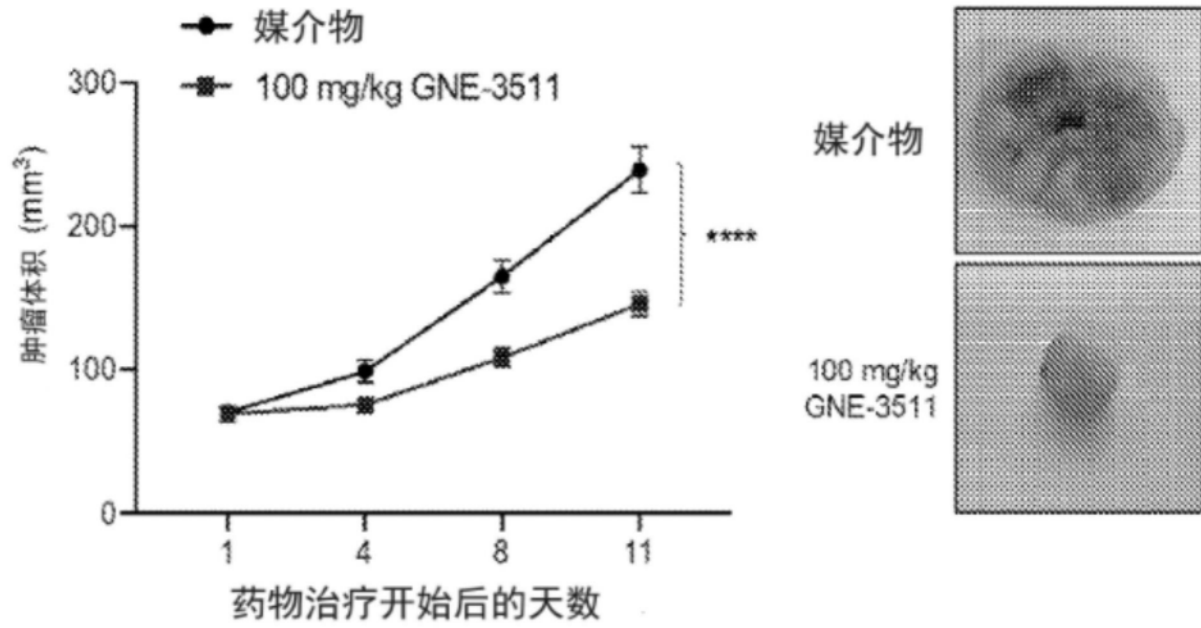


图14

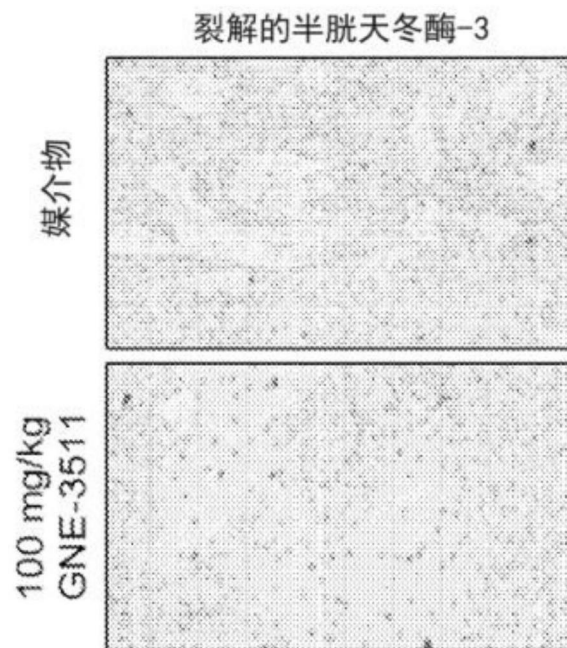


图15A

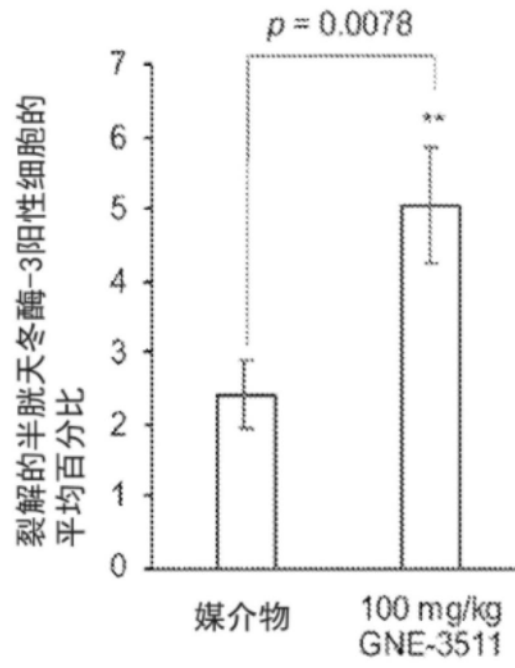


图15B

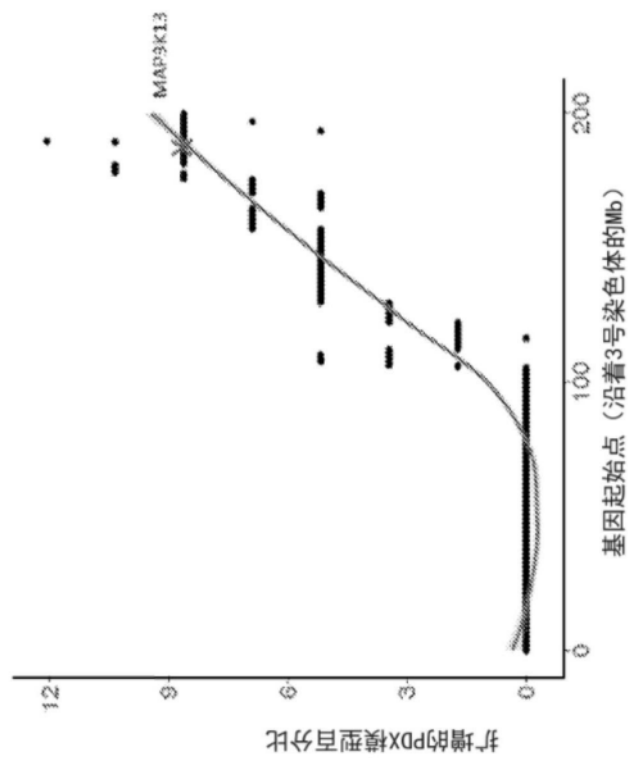


图16

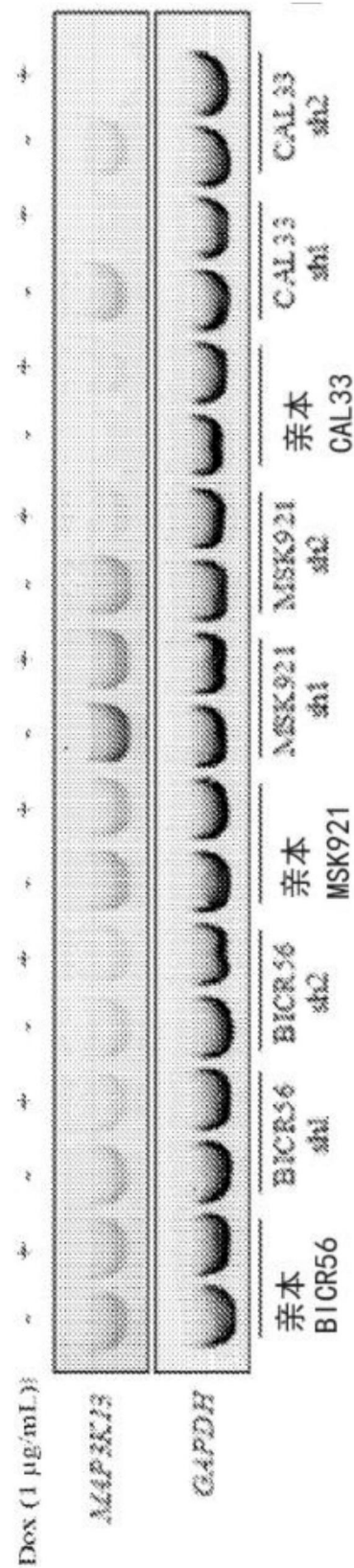


图17

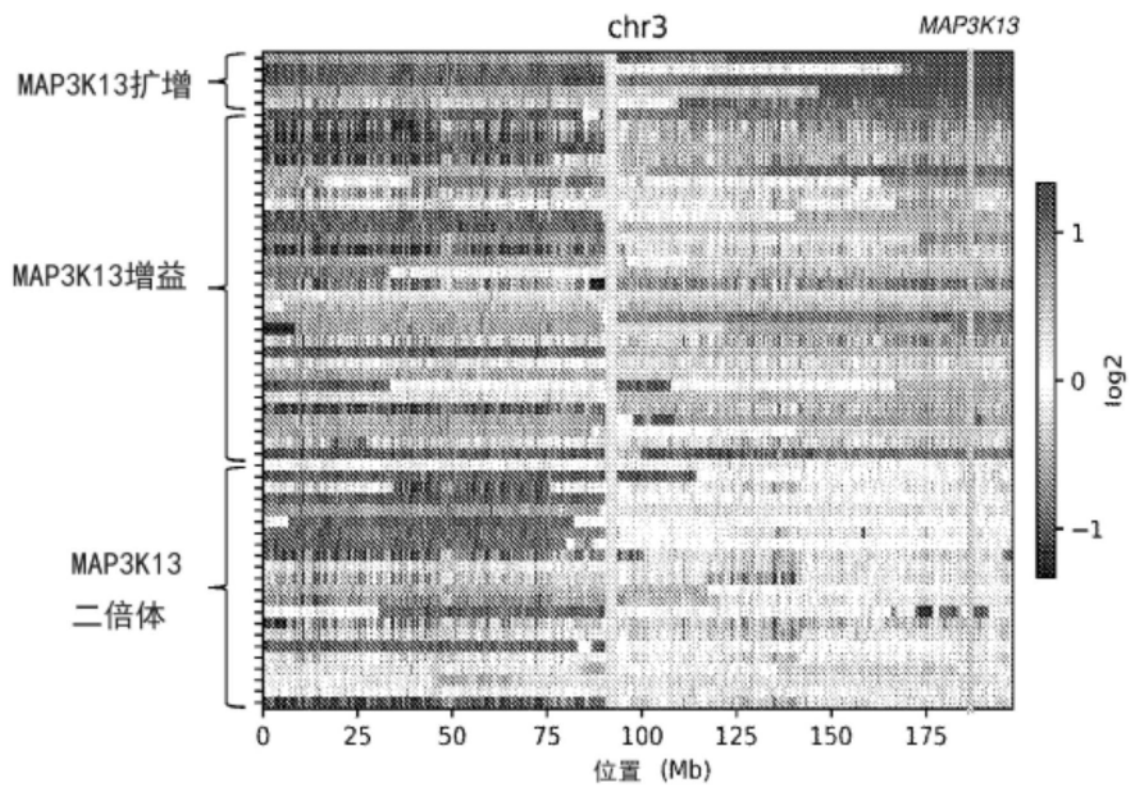


图18

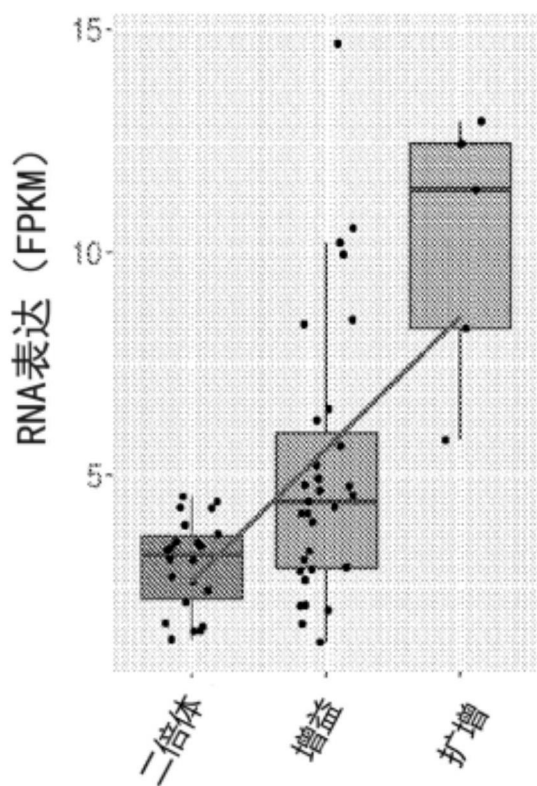


图19

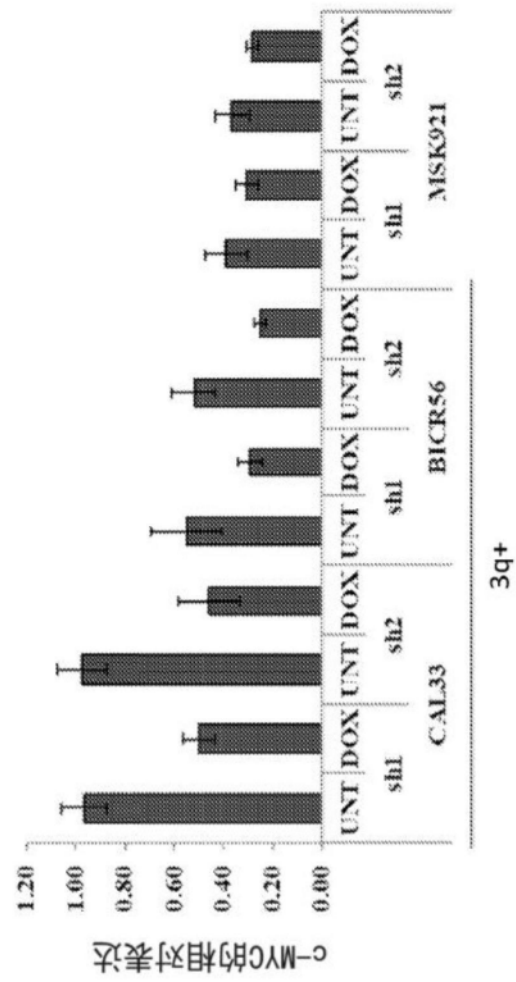


图20

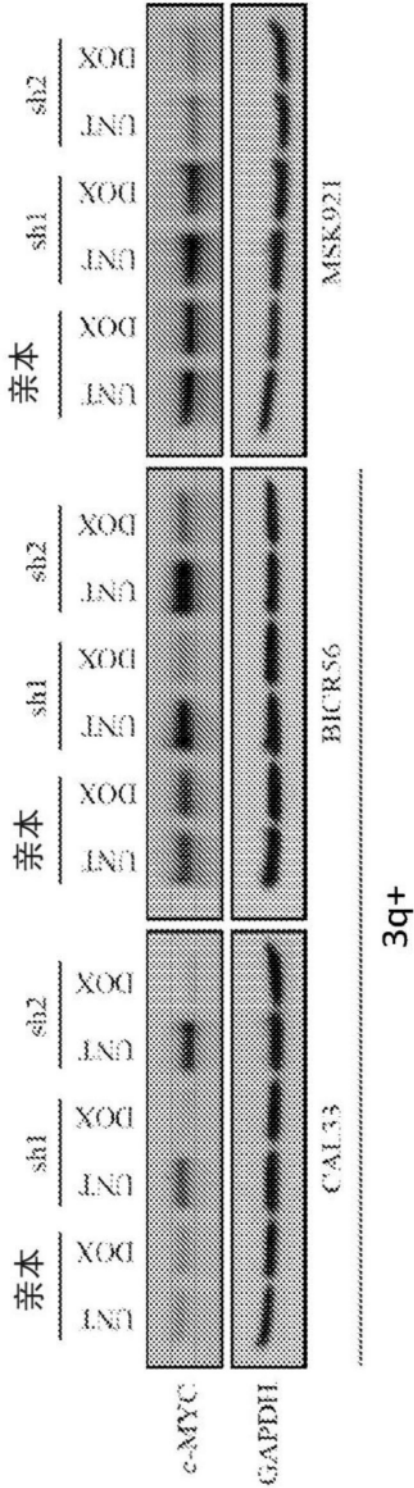


图21

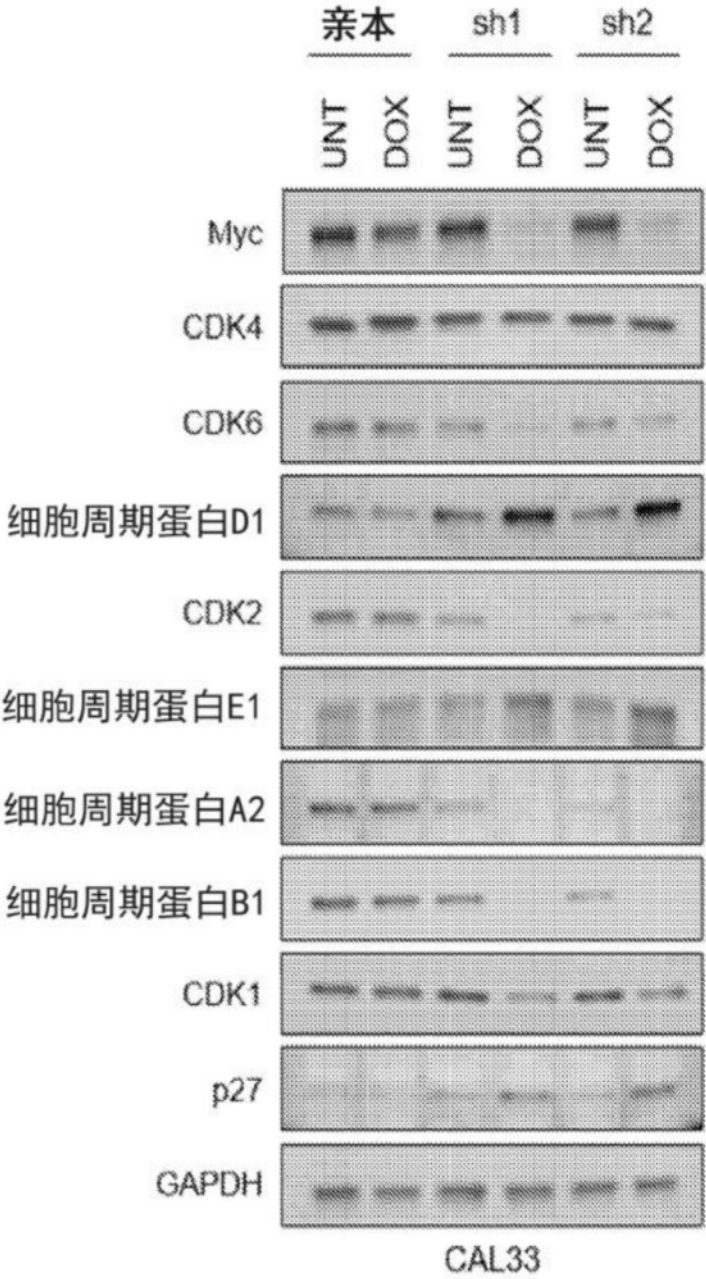


图22

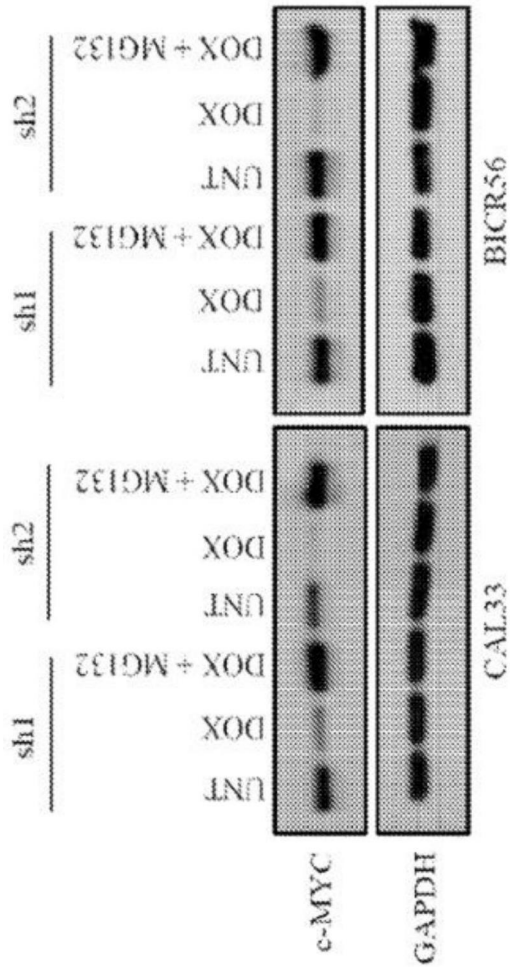


图23

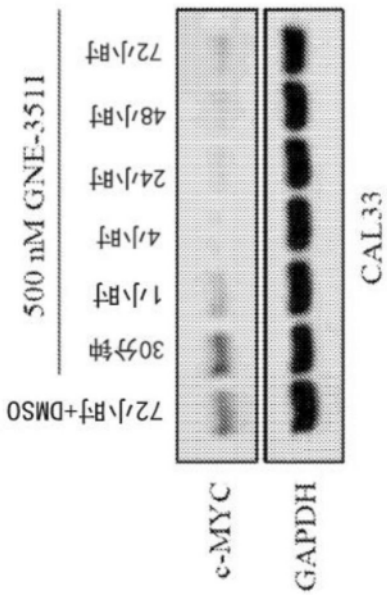


图24

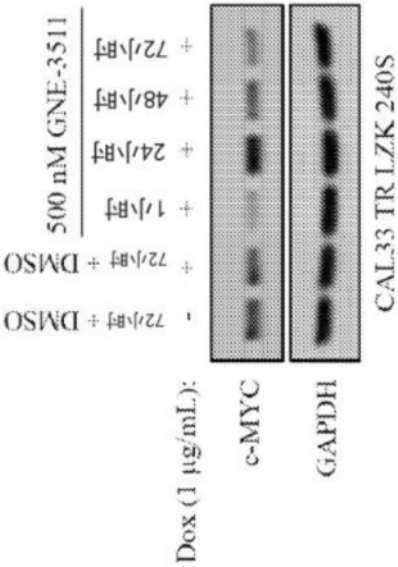


图25

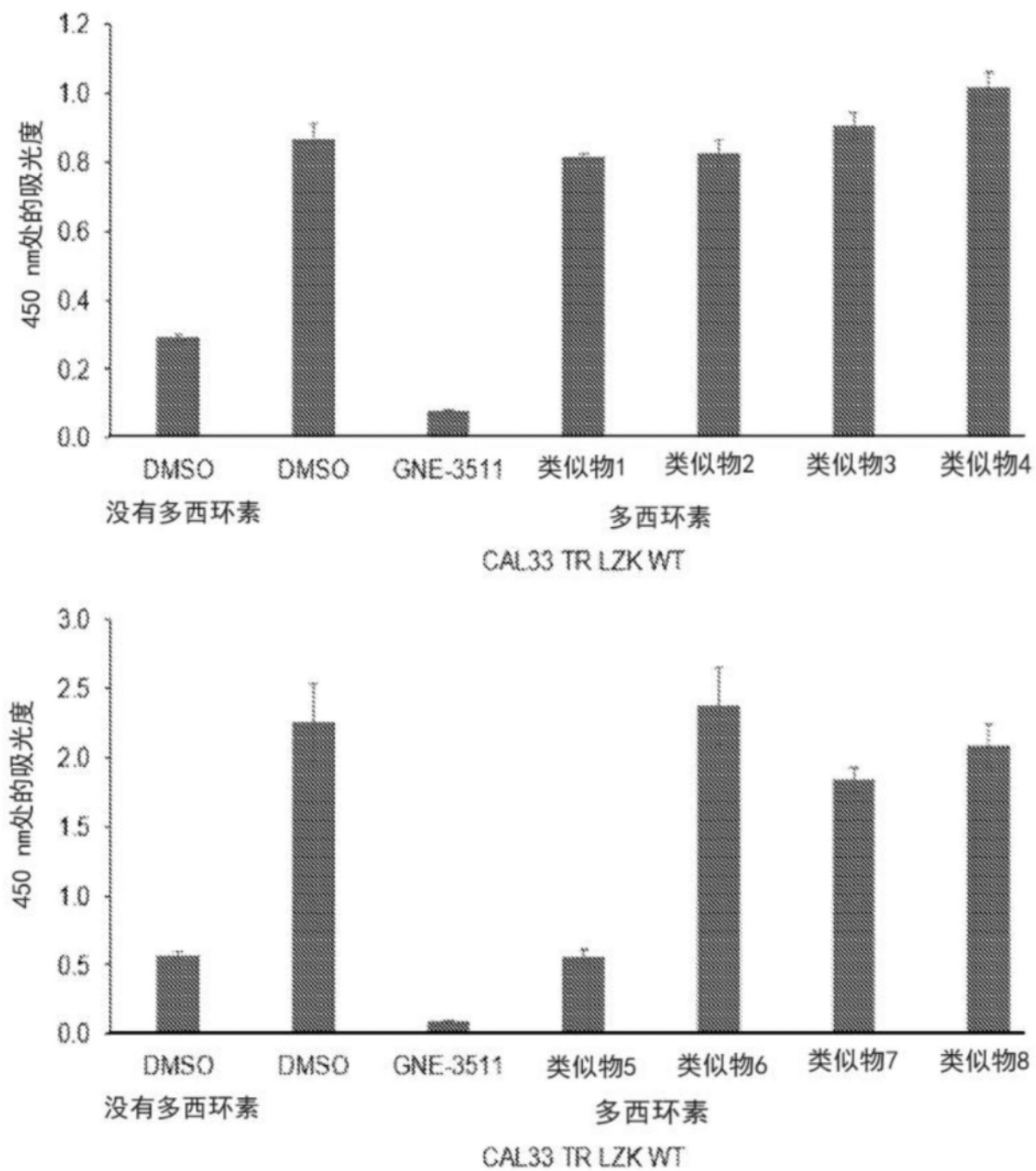


图26

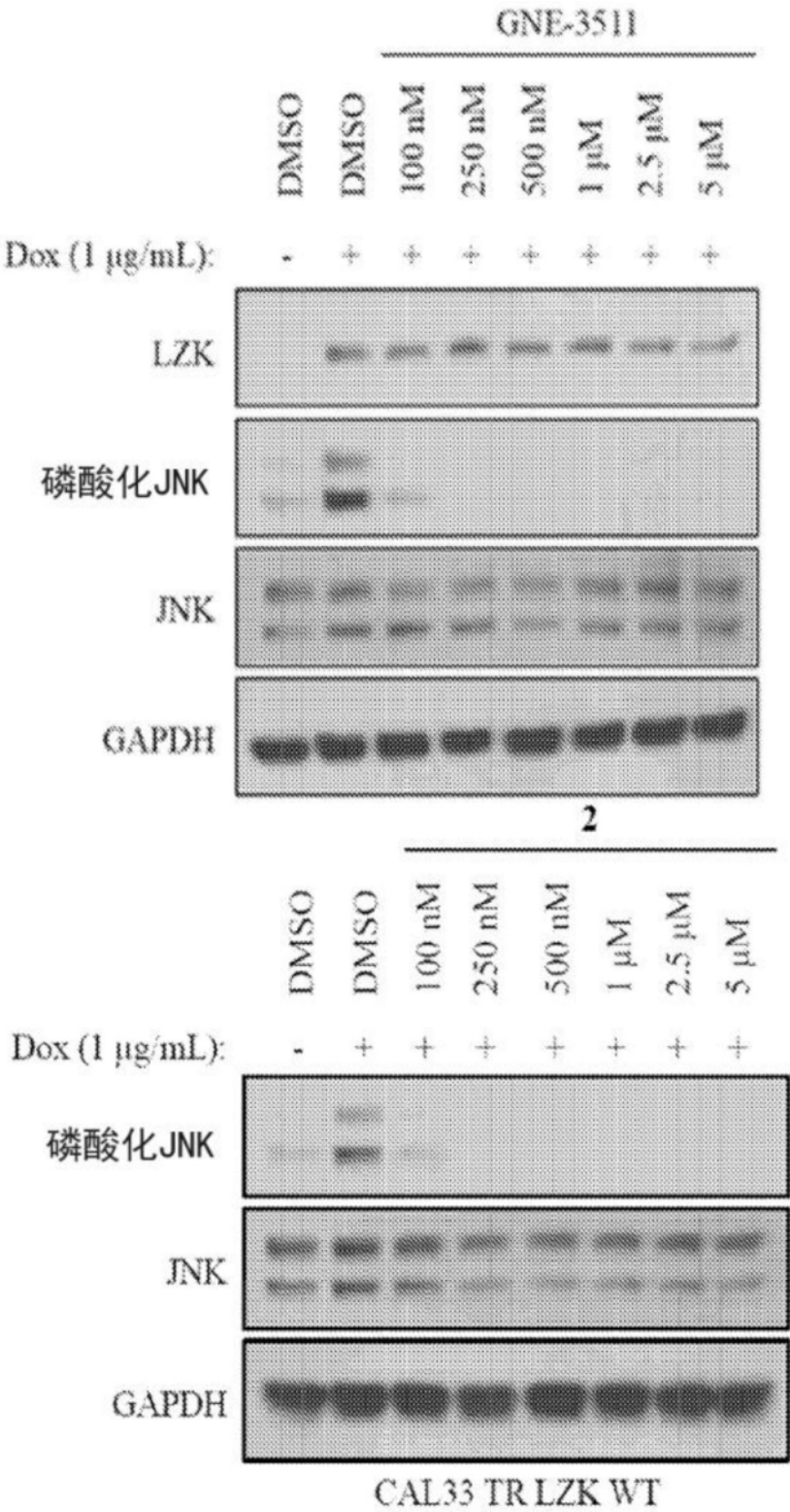


图27

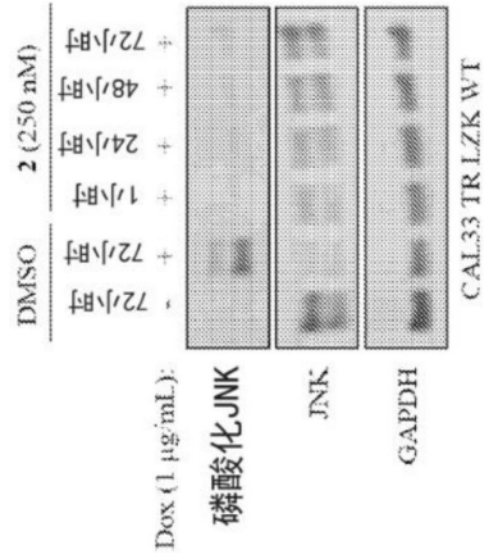


图28

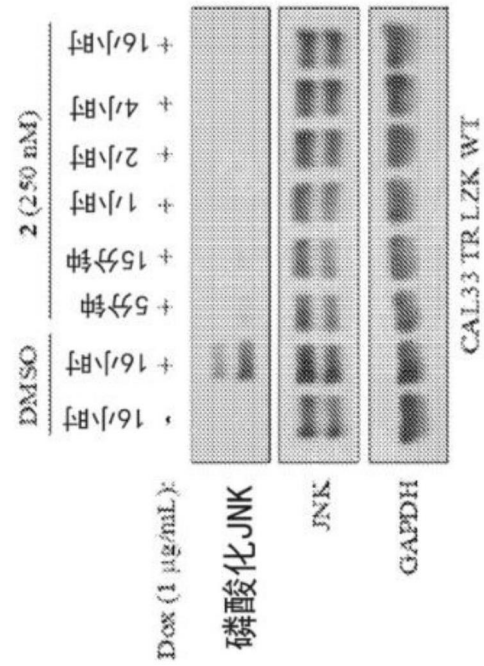


图29

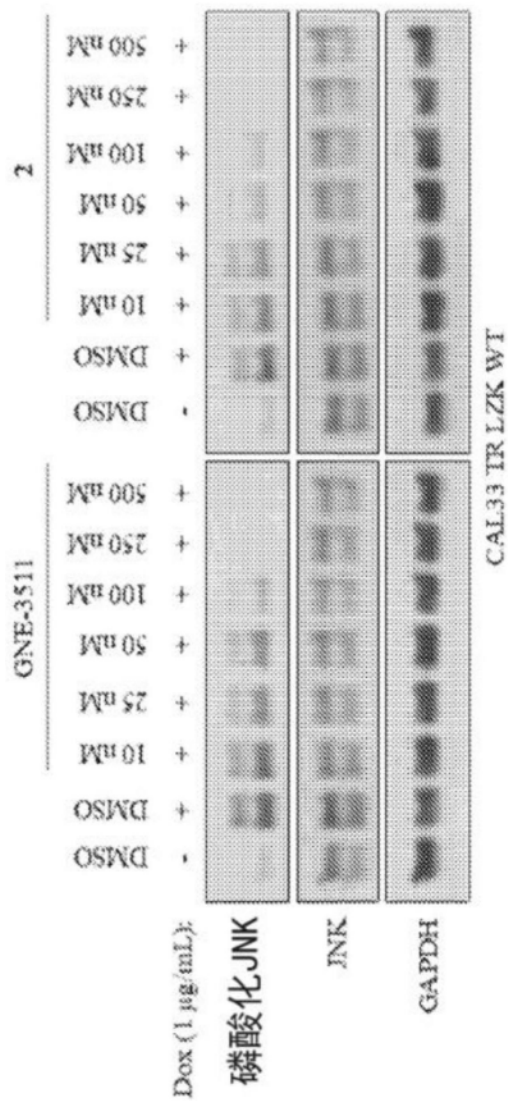


图30

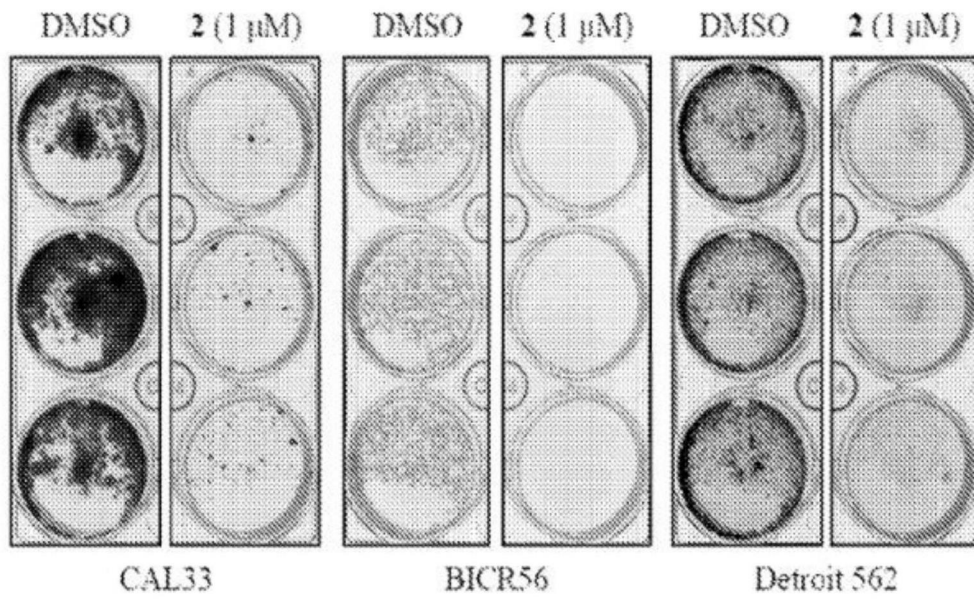


图31A

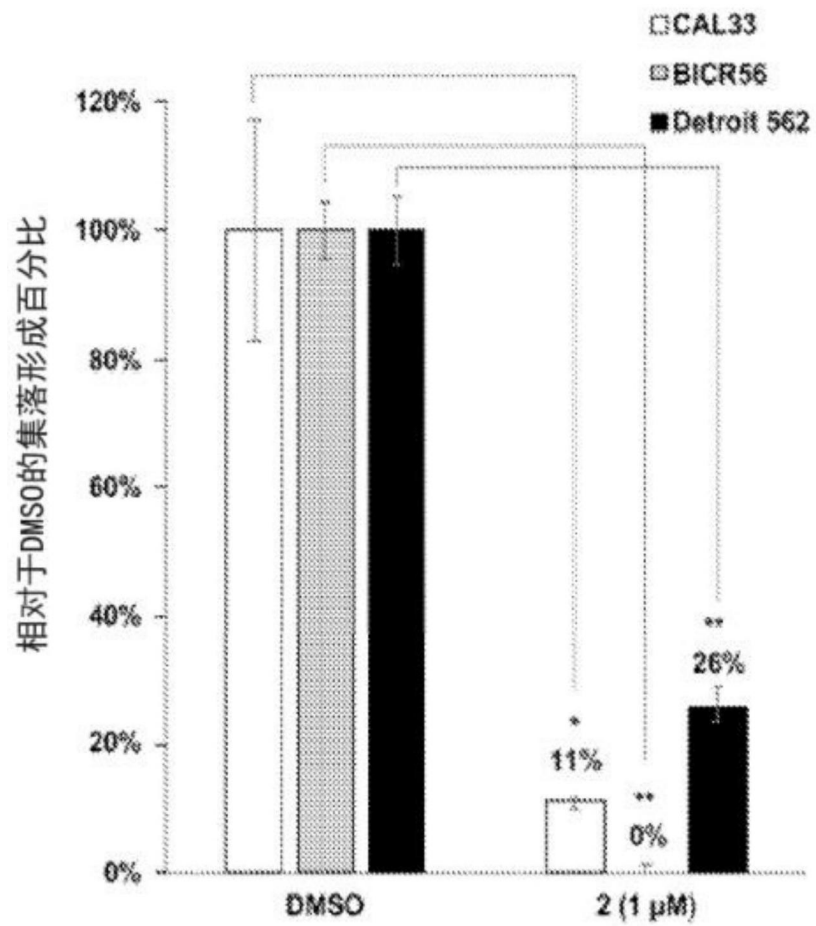


图31B

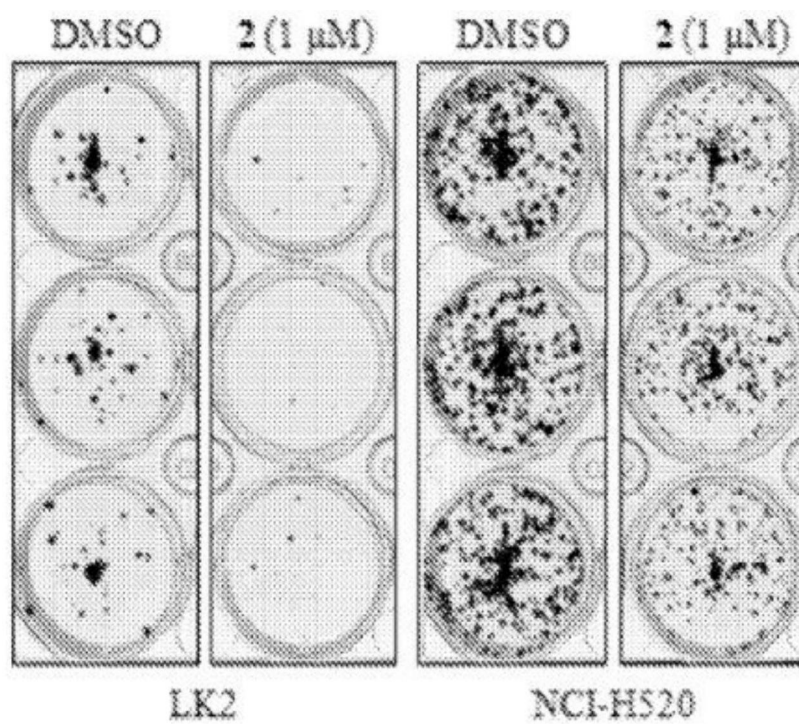


图32

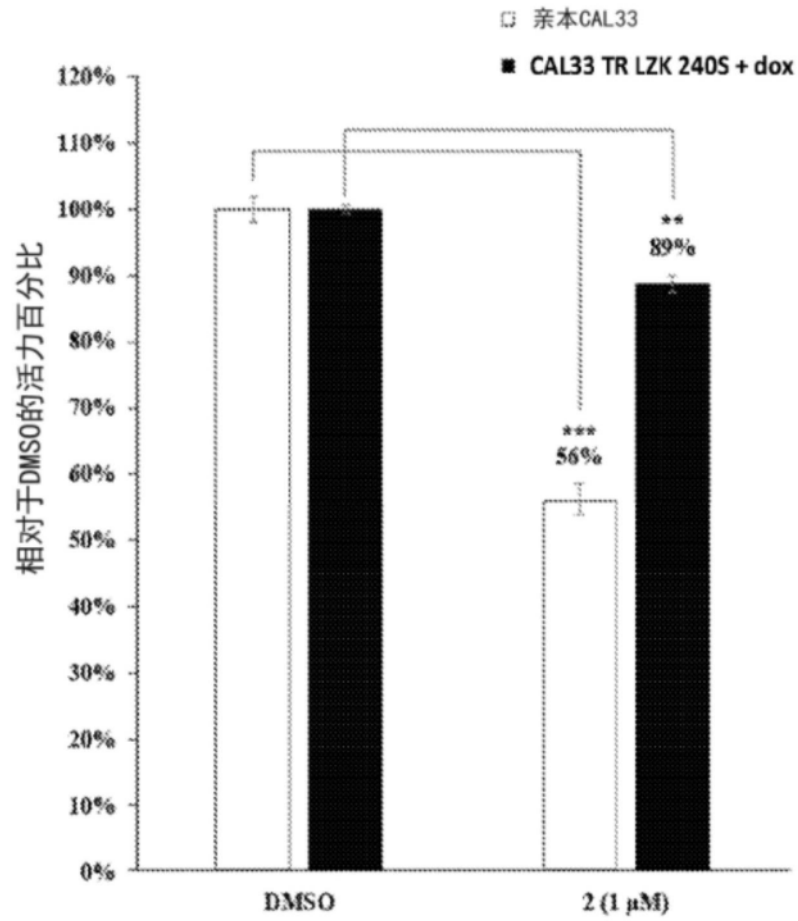


图33

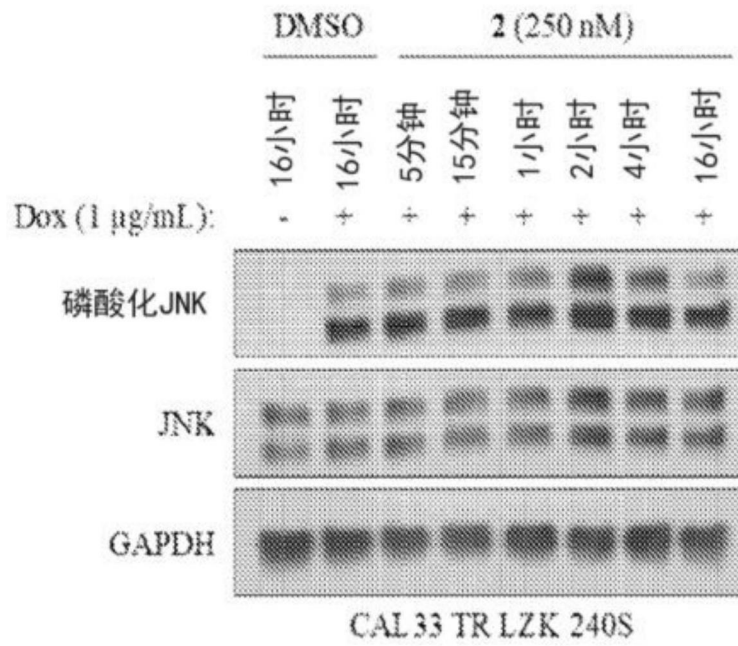


图34

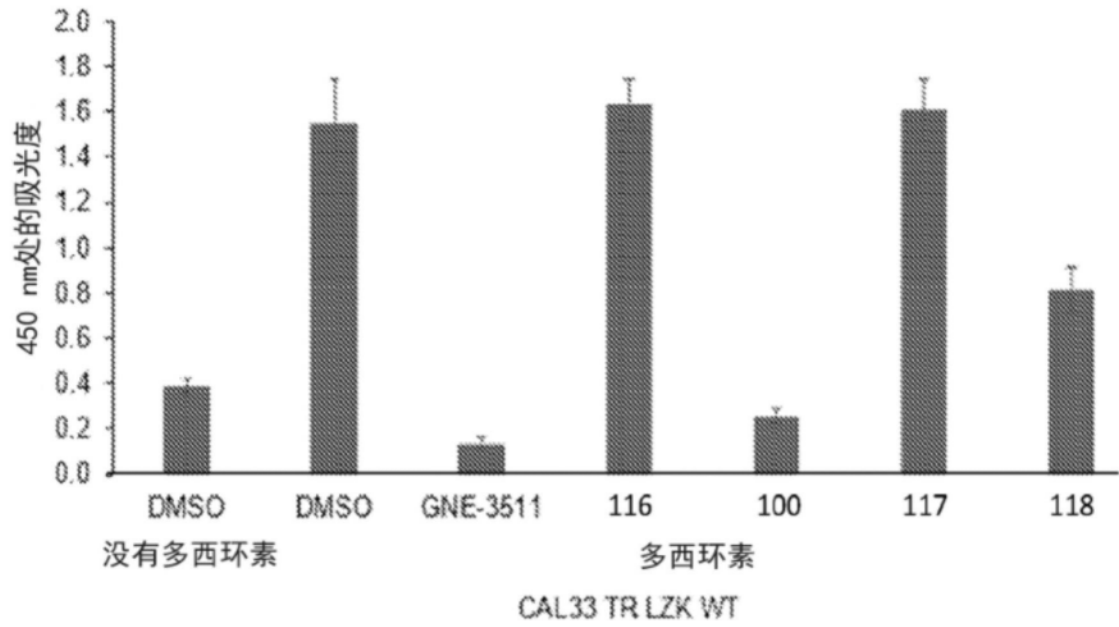


图35

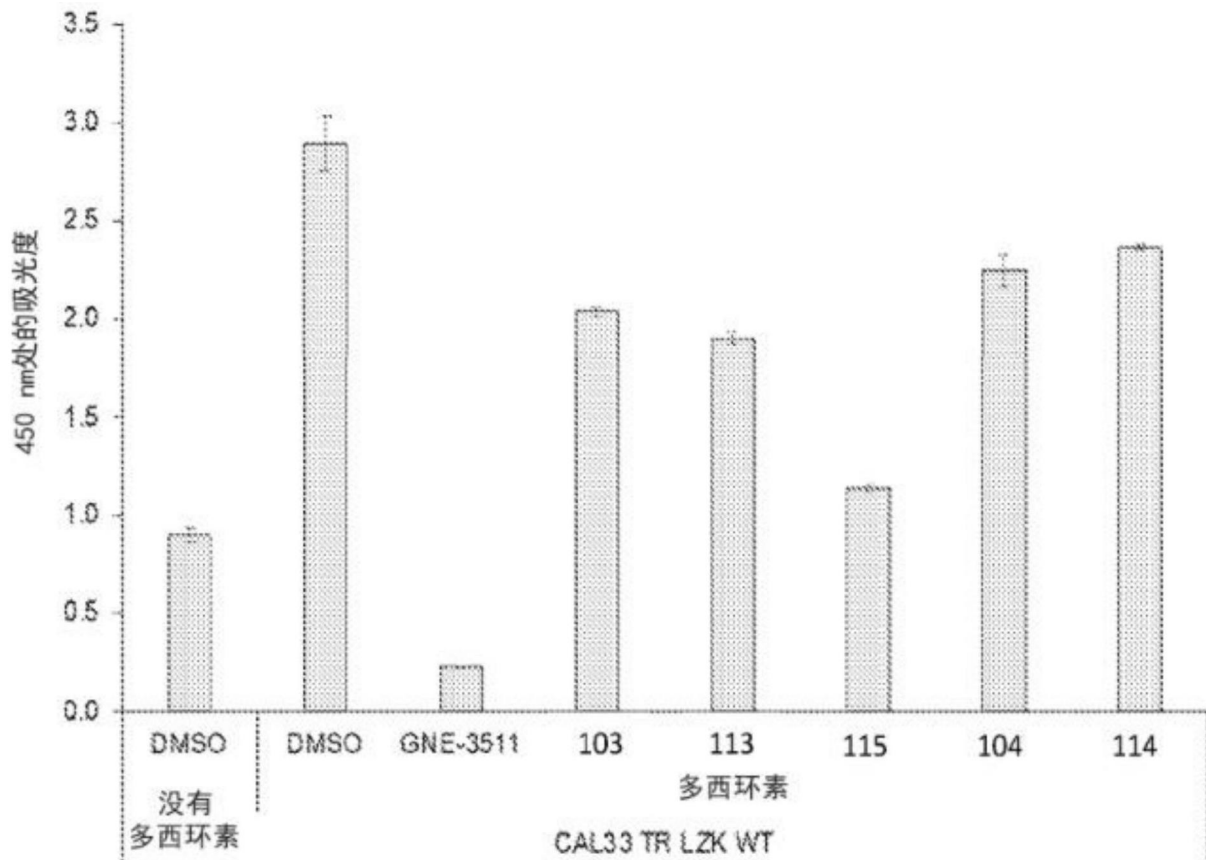


图36

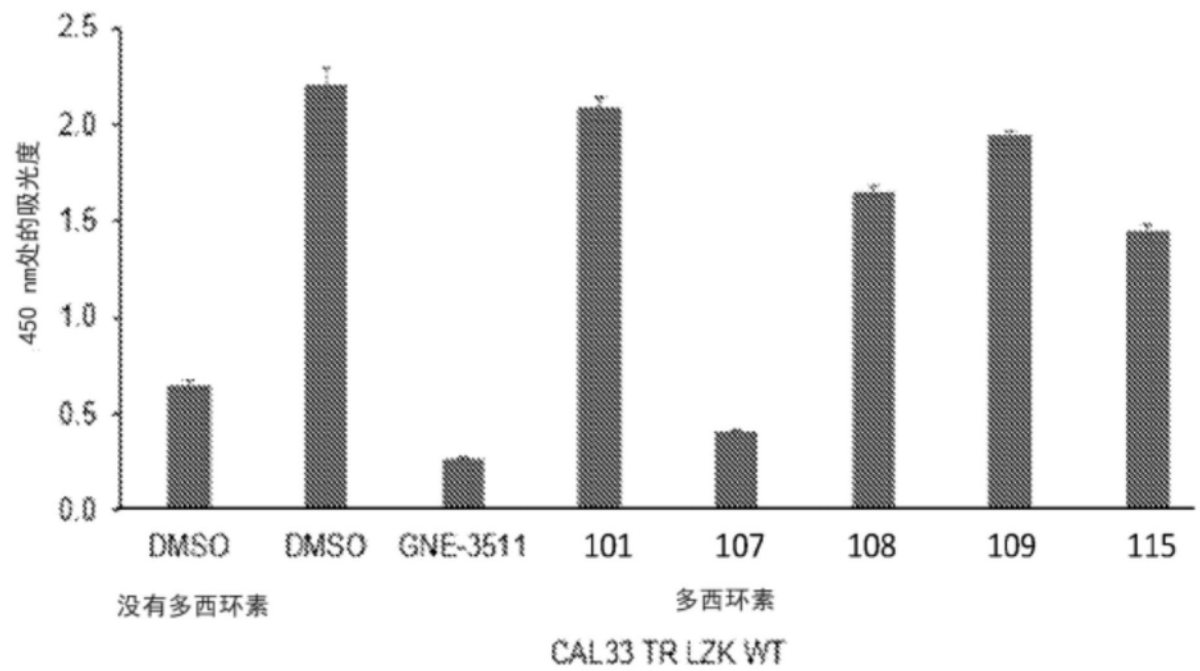


图37

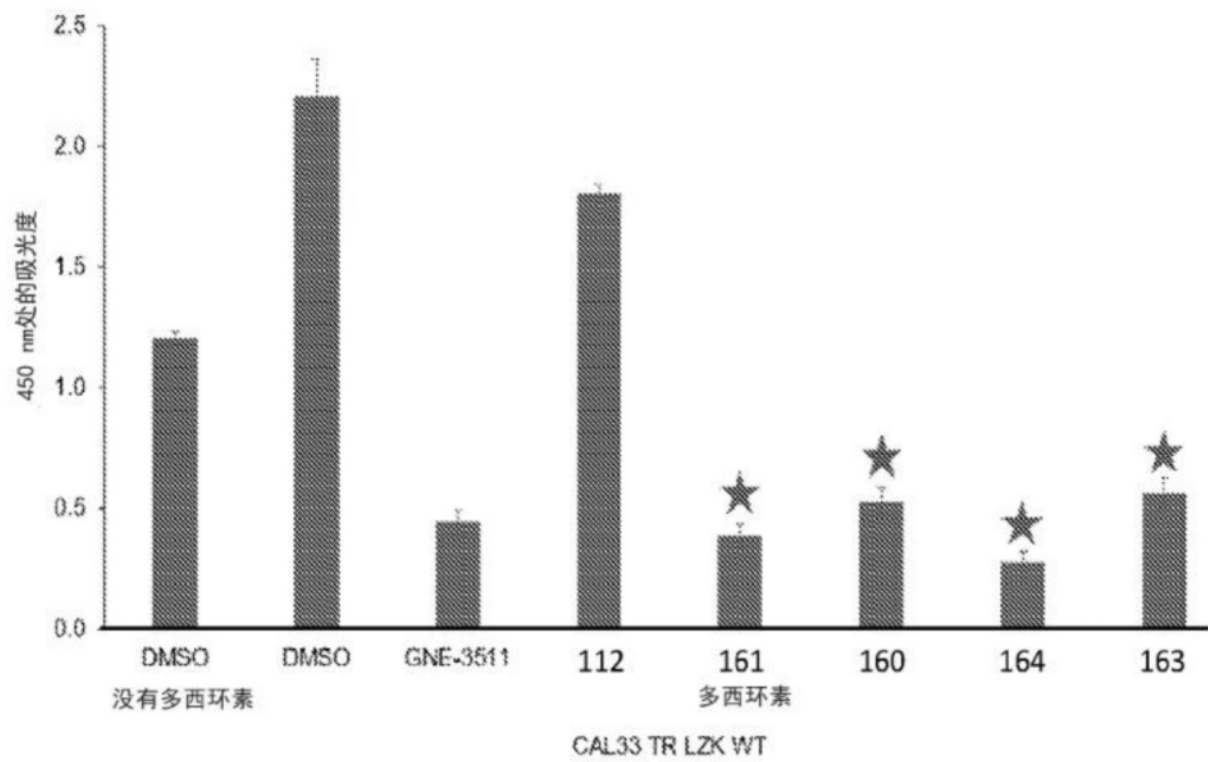


图38

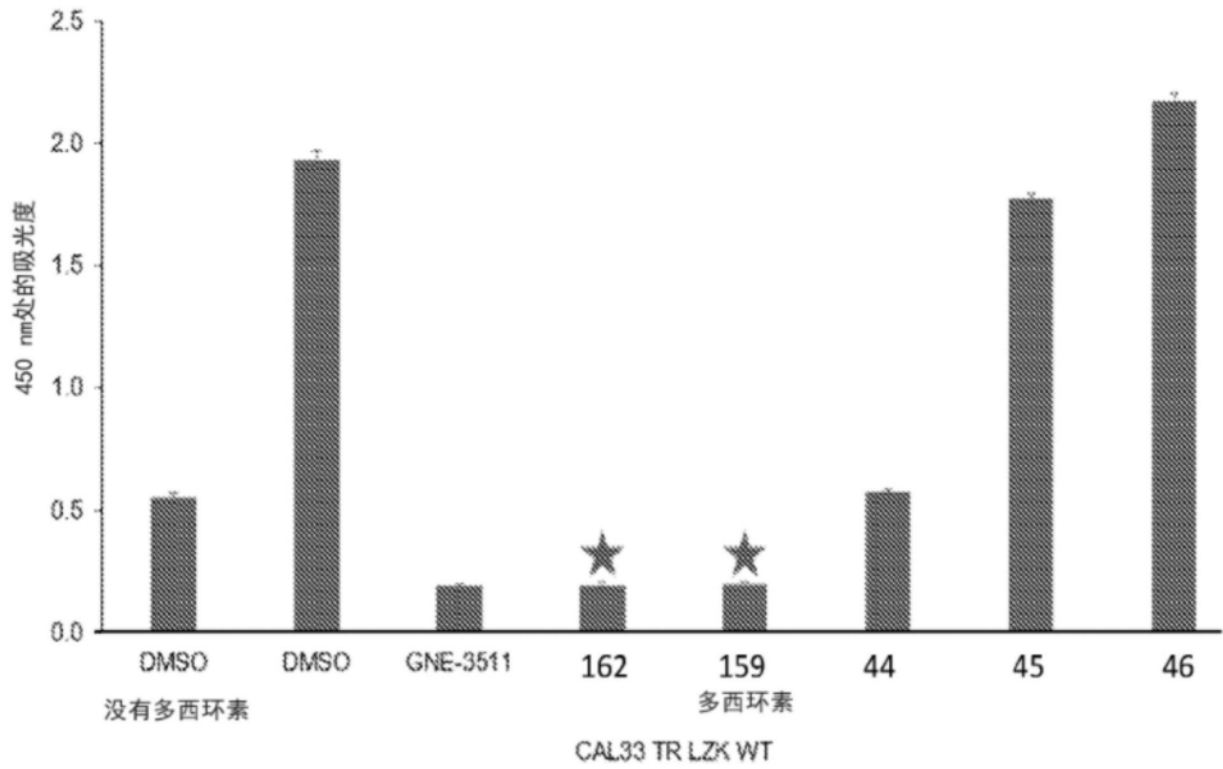


图39

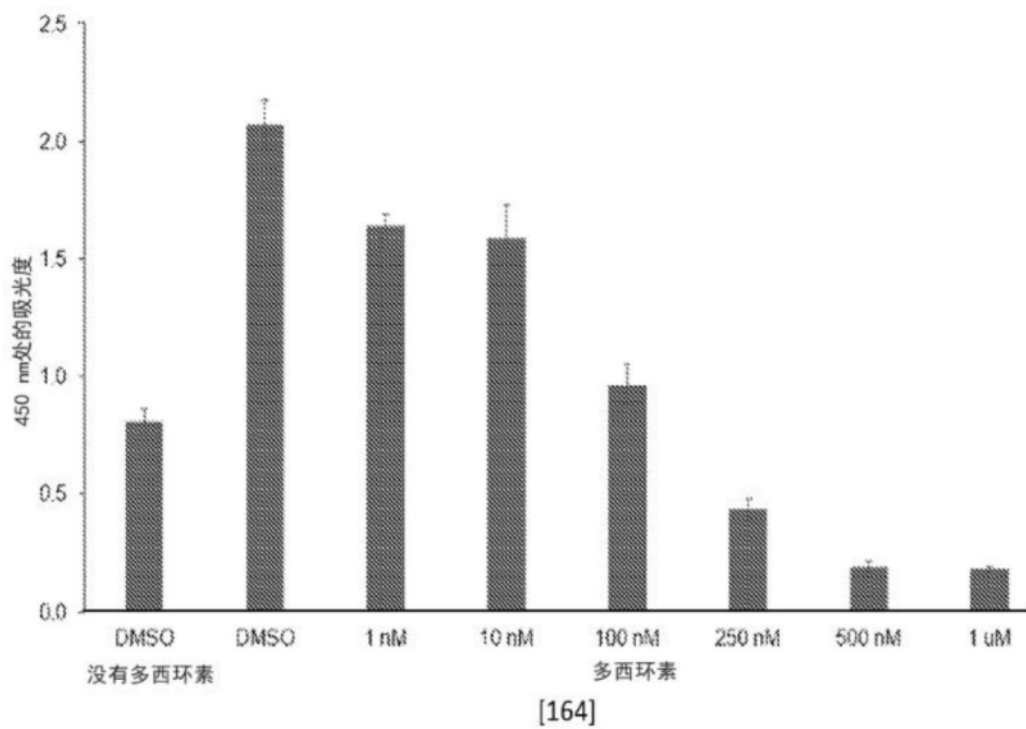


图40

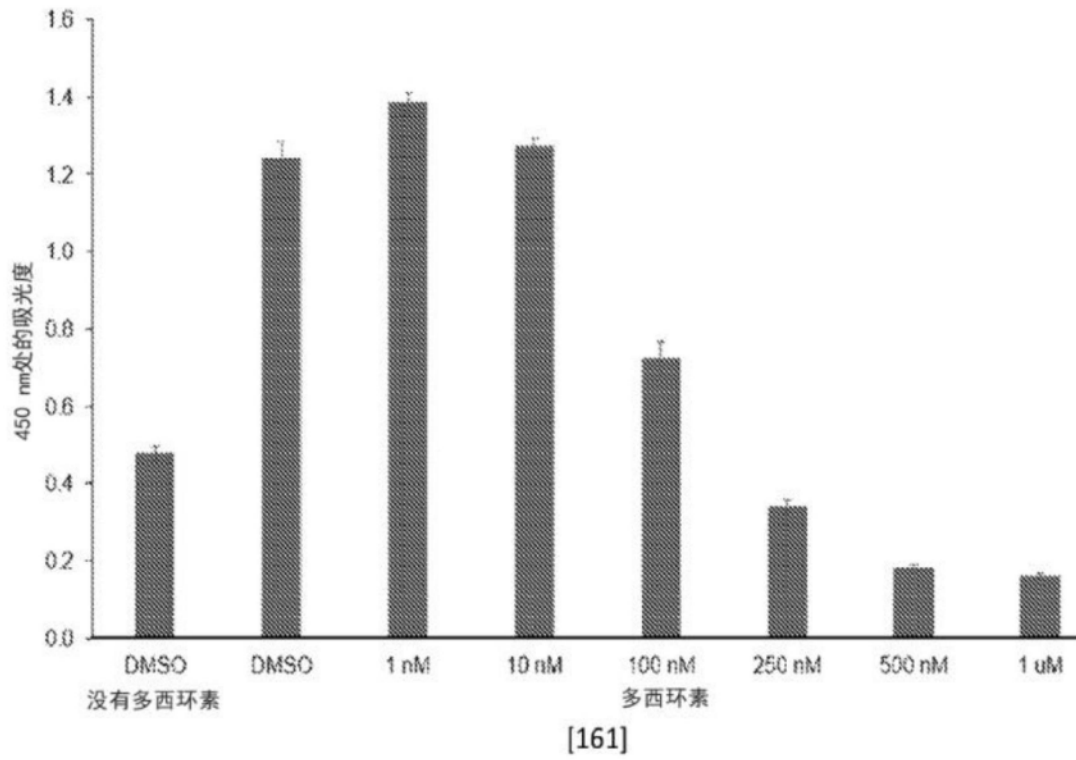


图41

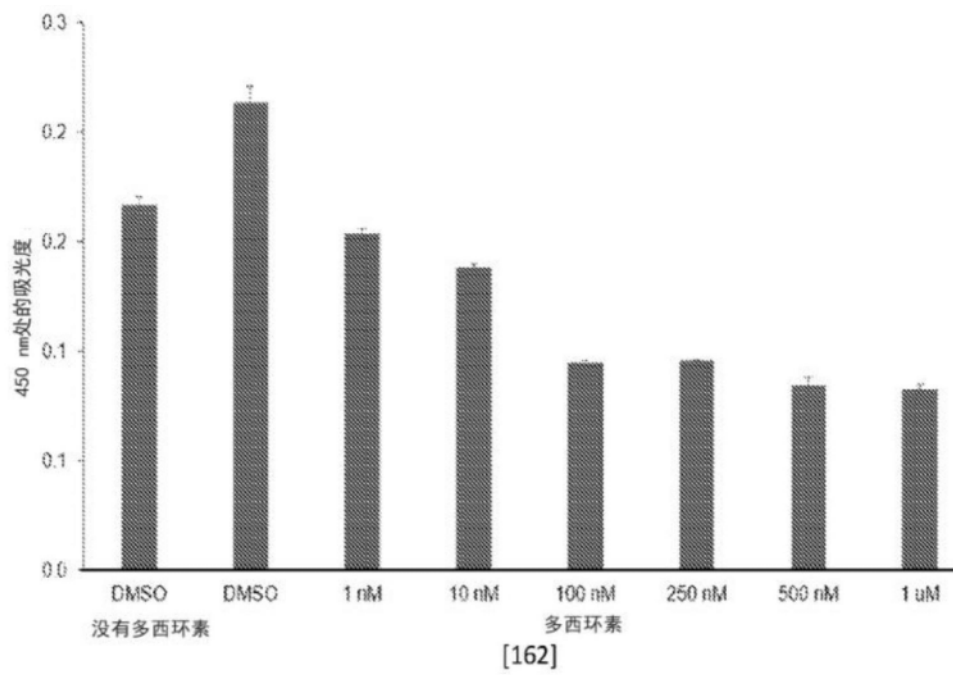


图42

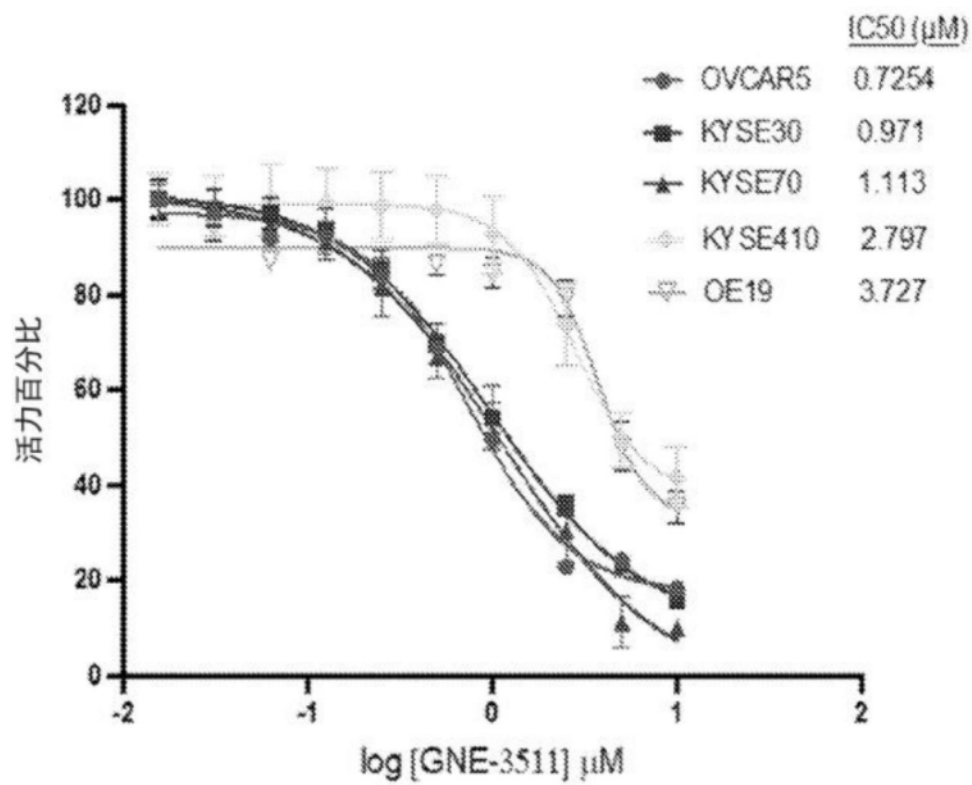


图43

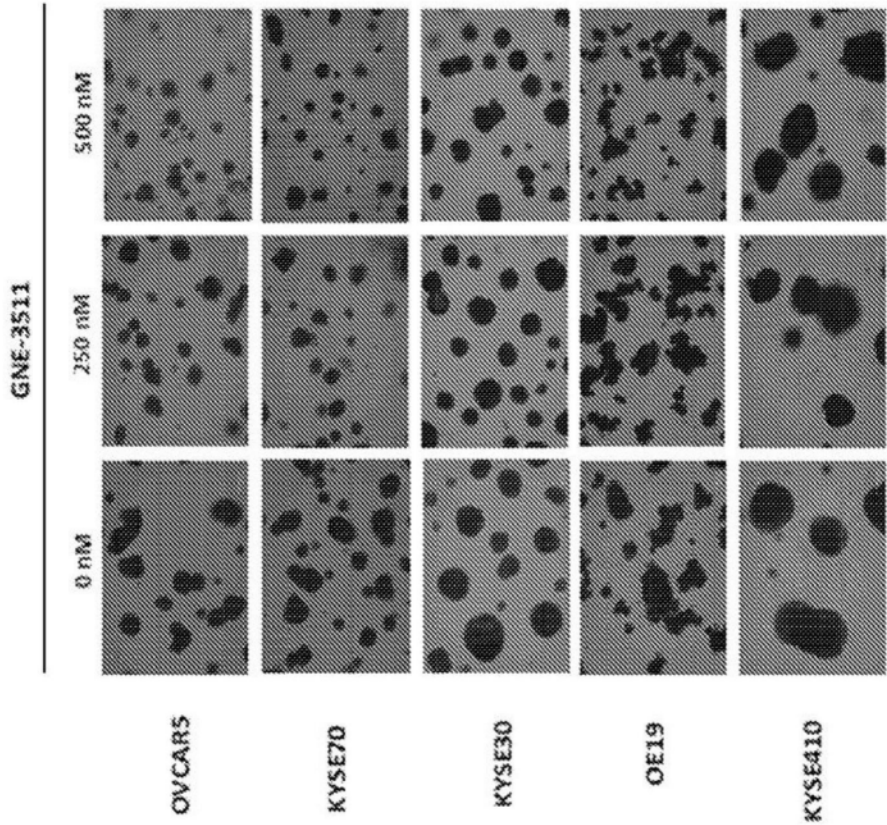


图44

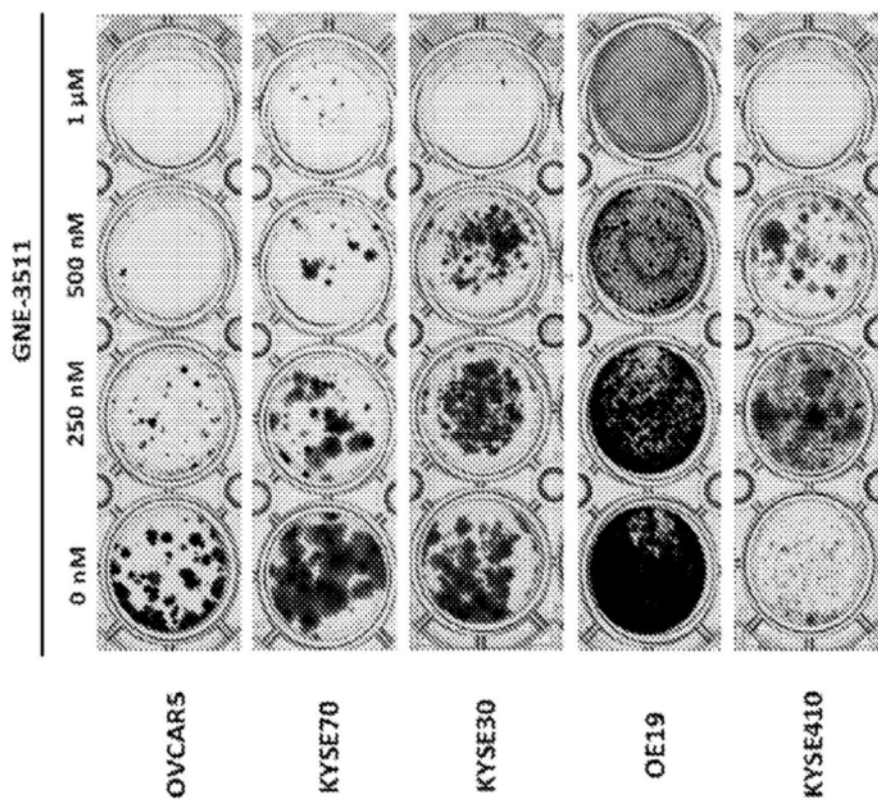


图45

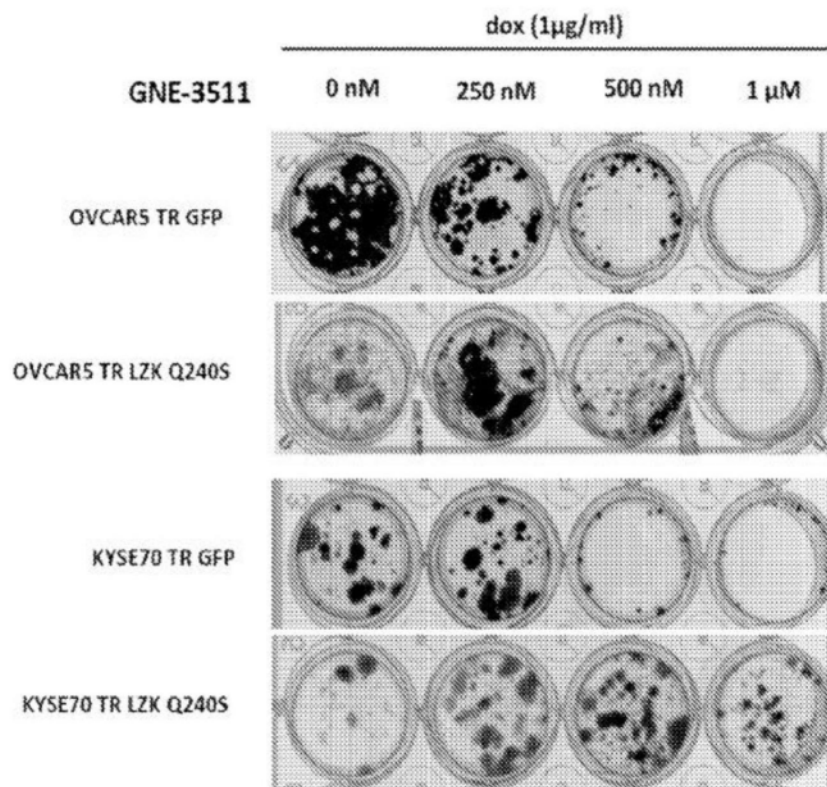


图46

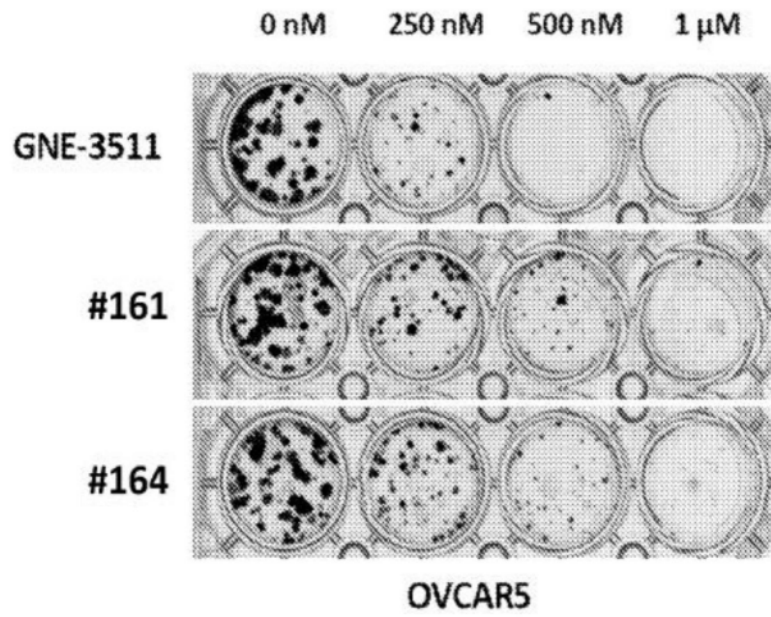


图47

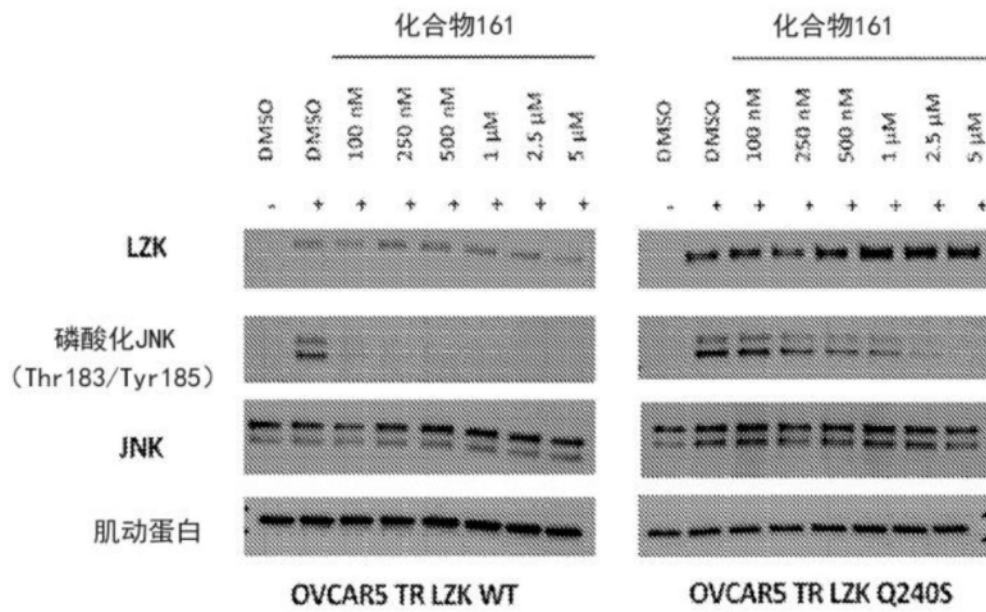


图48

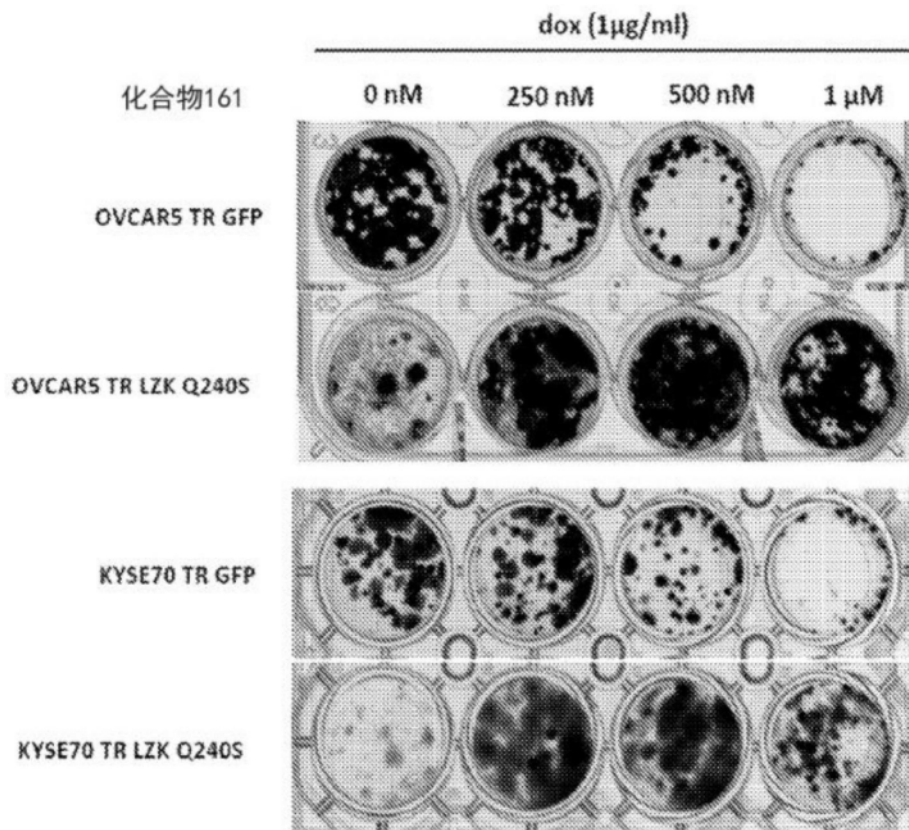


图49

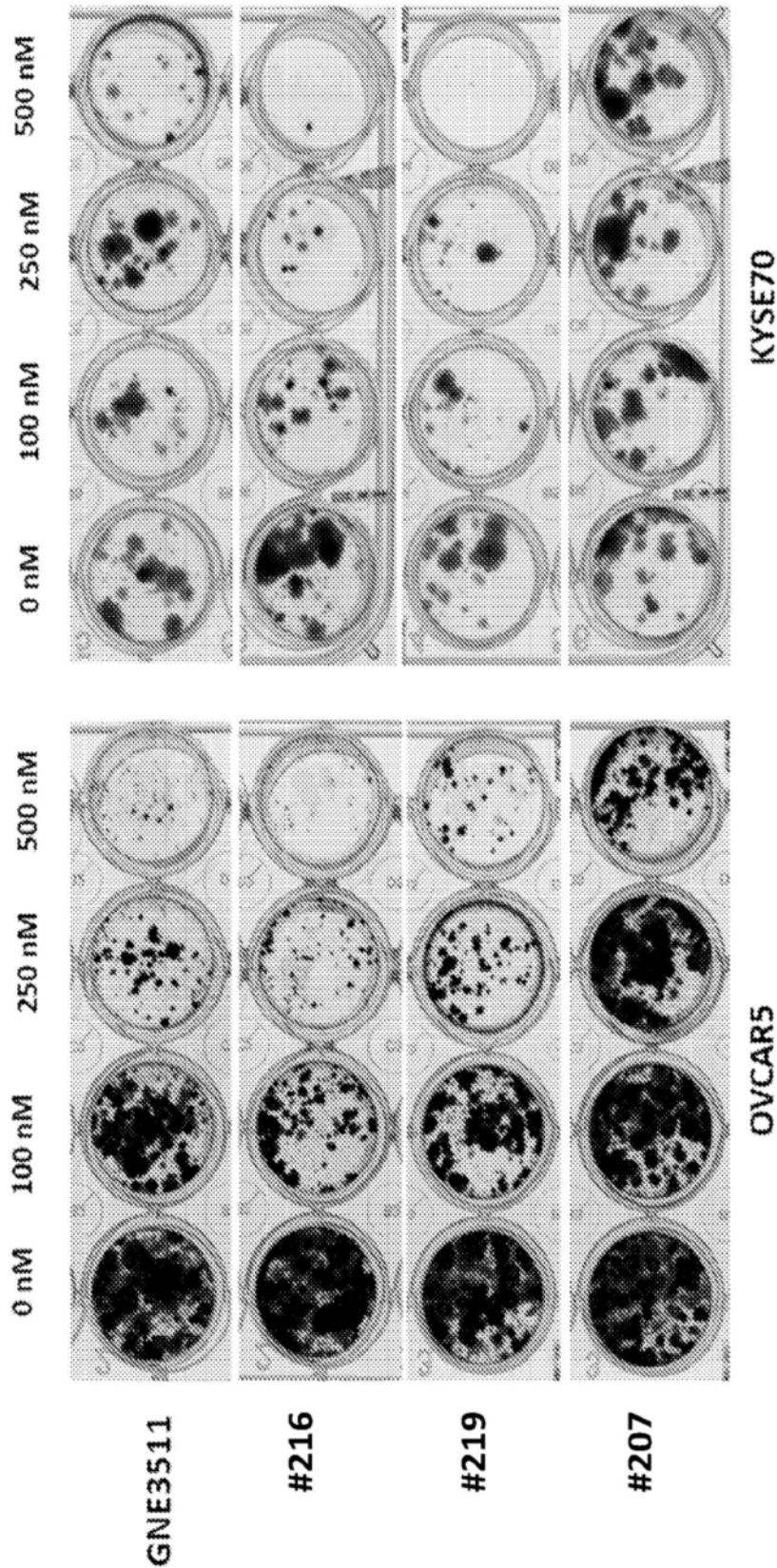


图50