(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 113677341 B
(45)授权公告日 2024.07.05

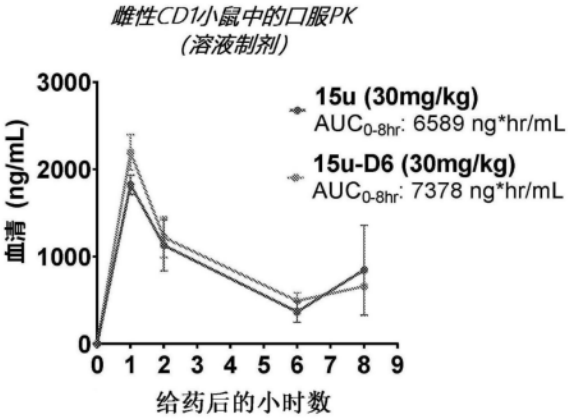
(21)申请号 202080026293.4
(22)申请日 2020.02.03
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113677341 A
(43)申请公布日 2021.11.19
(30)优先权数据
62/800,239 2019.02.01 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.09.29
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/016394 2020.02.03
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/160537 EN 2020.08.06
(73)专利权人 南卡罗莱纳大学
地址 美国南卡罗莱纳
专利权人 申内克斯生物科技公司
(72)发明人 伊戈尔·B·罗宁索恩 陈孟谦 J·李 梁佳欣 张立 C·麦金尼斯
(74)专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713
专利代理师 王思琪 王建秀
(51)Int.Cl.
A61K 31/4365(2006.01)
A61K 31/551(2006.01)
C07D 495/04(2006.01)
(56)对比文件
WO 2017076968 A1,2017.05.11
EP 1764367 A1,2007.03.21
JP 2008260693 A,2008.10.30
US 2016000787 A1,2016.01.07
WO 2015100420 A1,2015.07.02
WO 2016009076 A1,2016.01.21
WO 2014071143 A1,2014.05.08
审查员 周陈林
权利要求书2页 说明书43页 附图26页

(54)发明名称

双环吡啶组合物及其用于癌症治疗的方法

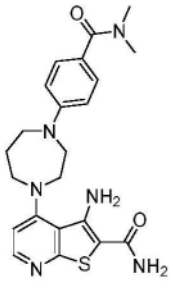
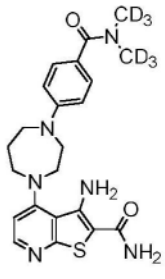
(57)摘要

本文公开了双环吡啶,例如噻吩并吡啶、吡咯并吡啶、呋喃并吡啶化合物,以及用于治疗癌症的方法。所述方法可以包括给予治疗有效量的本文所述的组合物中的任一种。在一些实施方案中,所述癌症是前列腺癌、白血病、乳腺癌、结肠癌、卵巢癌、胰腺癌或黑色素瘤。



CN 113677341 B

1.一种化合物在制备用于治疗患有前列腺癌、乳腺癌或白血病的受试者的药物中的用途,其中所述化合物选自


或

,

或其药学上可接受的盐。

2.权利要求1所述的用途,其中所述癌症为前列腺癌。

3.权利要求2所述的用途,其中所述前列腺癌是去势难治性前列腺癌或对雄激素剥夺治疗有抗性。

4.权利要求3所述的用途,其中在施用所述化合物至所述受试者之前,所述受试者已经经历了所述雄激素剥夺治疗。

5.权利要求3所述的用途,其中在施用所述化合物至所述受试者的同时,所述受试者正在经历所述雄激素剥夺治疗。

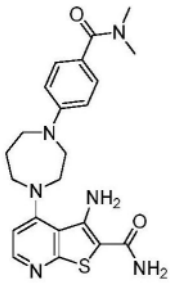
6.权利要求1所述的用途,其中所述癌症是白血病。

7.权利要求6所述的用途,其中所述白血病是急性髓系白血病。

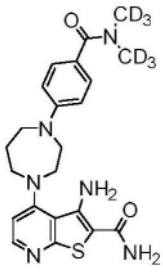
8.权利要求1所述的用途,其中所述癌症是乳腺癌。

9.权利要求8所述的用途,其中所述乳腺癌是转移性乳腺癌或三阴性乳腺癌。

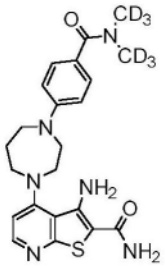
10.权利要求1-9中任一项所述的用途,其中所述化合物是


。

11.权利要求1-9中任一项所述的用途,其中所述化合物是


。

12.下式的化合物



或其药学上可接受的盐。

13.一种药物组合物,其包含治疗有效量的如权利要求12所述的化合物和药学上可接受的载体。

双环吡啶组合物及其用于癌症治疗的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年2月1日提交的申请号为62/800,239的美国临时申请的优先权,其内容通过引用整体并入本文。

背景技术

[0003] CDK8和CDK19是两种密切相关的转录调节激酶,已成为新兴的新型癌症药物靶标(Philip,S.等人,J Med Chem 2018,61,5073-5092)。特别地,CDK8/19抑制剂表现出在去势难治性前列腺癌(CRPC)中(Chen,Roninson,美国专利9,636,342),在急性髓性白血病中(Pelish等人,Nature.2015年10月8日;526(7572):273-276),在结肠癌肝转移瘤中(Liang等人,Cancer Res.2018年12月1日;78(23):6594-6606),与抗雌激素剂组合时在雌激素受体阳性乳腺癌中(McDermott等人,Oncotarget.2017年2月21日;8(8):12558-12575),当与HER2靶向剂组合时在HER2阳性乳腺癌中(McDermott等人,国际专利公开WO 2016/018511)有效。此外,在用常规的DNA损伤化疗剂或辐射治疗的不同肿瘤类型的癌症细胞中,CDK8/19抑制剂防止促进转移和耐药性的基因的诱导(Porter,D.C.等人,Proc Natl Acad Sci U S A 2012,109,13799-804)。在肺癌模型中体内给予CDK8/19抑制剂也改善化疗药阿霉素的效果(Porter等人,同上),表明CDK8/19抑制剂与各种DNA损伤剂组合时对治疗不同癌症的效用。

[0004] 除了癌症以外,CDK8/19抑制剂在炎症相关的疾病(Porter,D.C.的美国专利公开号2014/0309224;Johnannessen,L.等人,Nat Chem Biol 2017,13,1102-1108);心血管疾病(Hall,D.等人,JCI Insight 2017,2;Roninson,I.B.的国际专利公开WO 2016/100782);核糖体病;以造血干细胞和/或祖细胞数目减少为特征的病症;和骨合成代谢障碍(Flygare,J.的国际专利公开号WO 2017/076968)中显示出前景。

[0005] 已经报道了许多CDK8/19抑制剂(Philip等人,J Med Chem.2018年6月28日;61(12):5073-5092.doi:10.1021/acs.jmedchem.7b00901)。这些包括由某些本发明人开发的某些基于喹唑啉的化合物,它们对CDK8/19具有高选择性,例如SNX2-1-53(也称为Senexin A)(Porter,D.C.,等人,Proc Natl Acad Sci U S A 2012,109,13799-804;Porter,D.C.的美国专利8,598,344)和SNX2-1-165(也称为Senexin B)(Roninson,I.B.的美国专利9,321,737),以及高CDK8/19选择性的基于喹啉的化合物[美国专利申请号62/720,774和62/720,776]。最近报道了其他CDK8/19抑制剂(Hatcher,J.M.等人,ACS Med Chem Lett 2018,9,540-545;Nakamura,A.等人,Oncotarget 2018,9,13474-13487;Han,X.,等人,Bioorg Med Chem Lett 2017,27,4488-4492)。

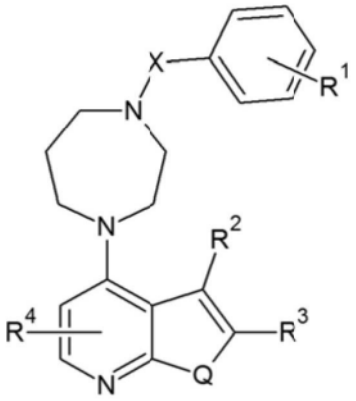
[0006] 噻吩并吡啶是一类具有双环芳环的化合物。已经公开了各种噻吩并吡啶,包括美国专利6,964,956;美国专利公开2007/0219234;国际专利公开WO 2017/076968;Saito,K.等人,Bioorg Med Chem 2013,21,1628-42和Saito等人,Bioorg Med Chem Lett 2019,29,1769-73。美国专利6,964,956公开了几种噻吩并吡啶抑制IKB激酶(IKK)复合物。Saito和美国专利公开2007/021923公开了几种具有潜在的骨合成代谢活性的噻吩并吡啶。化合物15w

在基于细胞的分析中表现出具有最高的骨合成代谢活性(Saito,2013)。激酶组谱分析也显示15w(或DBA-7)和15k(或DBA-6)是CDK8和CDK19的选择性抑制剂(WO 2017/076968)。尽管15w在体外显示高骨合成代谢活性,但15w具有差的药代动力学(PK),C_{max}较低(Saito,2013)。

[0007] CDK8/19抑制剂均未显示出临床功效,这不仅由化合物抑制CDK8/19的能力决定,也由可以有益于治疗或可以导致不良反应的脱靶活性决定,以及由化合物的药代动力学(PK)决定。

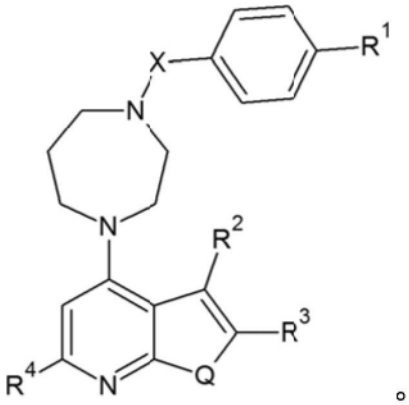
发明内容

[0008] 本文公开了用于治疗癌症的双环吡啶化合物。所述双环吡啶化合物包含式1的化合物

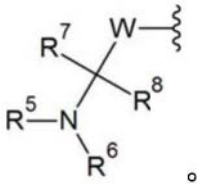
[0009] 

(式1)。

[0010] Q可以选自硫、-NH-或氧。X可以选自-$(CH_2)_n$-,并且n选自0、1或2。R^4可以是氢或饱和或不饱和的、支链或非支链的、取代或未取代的C_1-C_6烷基。R^3可以选自氢、氰基、卤素、取代或未取代的氨基、取代或未取代的酰氨基;或取代或未取代的磺酰氨基。R^2可以选自氢、氰基、卤素、取代或未取代的氨基、取代或未取代的酰氨基;或取代或未取代的磺酰氨基。R^1可以选自氢;氰基;氘代或未氘代的羟基,氘代或未氘代的羧基,卤素,取代或未取代的、氘代或未氘代的氨基;取代或未取代的、氘代或未氘代的酰氨基;取代或未取代的、氘代或未氘代的磺酰胺,饱和或不饱和的、支链或非支链的、取代或未取代的、氘代或未氘代的C_1-C_6烷基;饱和或不饱和的、支链或非支链的、取代或未取代的、氘代或未氘代的C_1-C_6烷氧基。在一些实施方案中,当Q为硫,n为0,R^4为氢,R^3为-C(O)NH_2,且R^2为-NH_2时,R^1选自氘代羟基、氘代羧基、取代或未取代的氘代氨基;取代或未取代的氘代酰氨基;取代或未取代的、氘代或未氘代的磺酰胺,饱和或不饱和的、支链或非支链的、取代或未取代的氘代C_1-C_6烷基;饱和或不饱和的、支链或非支链的、取代或未取代的氘代C_1-C_6烷氧基。在一些实施方案中,当至少一个的Q不为硫,n不为0,R^4不为氢,R^3不为-C(O)NH_2,且R^2不为-NH_2时,R^1选自氰基;氘代或未氘代的羟基,氘代或未氘代的羧基,卤素,取代或未取代的、氘代或未氘代的氨基;取代或未取代的、氘代或未氘代的酰氨基;取代或未取代的、氘代或未氘代的磺酰胺,饱和或不饱和的、支链或非支链的、取代或未取代的、氘代或未氘代的C_1-C_6烷基;饱和或不饱和的、支链或非支链的、取代或未取代的、氘代或未氘代的C_1-C_6烷氧基。在具体的实施方案中,化合物具有式

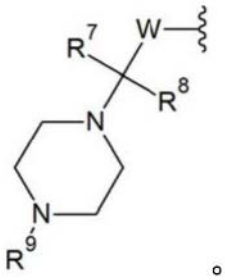
[0011] 

[0012] 在一些实施方案中,R^1为

[0013] 

[0014] W可以选自-$(CH_2)_m$-或-$(CD_2)_m$-,并且m可以选自0、1或2。R^5和R^6可以独立地选自氢,氘,氘代或未氘代的、饱和或不饱和的、支链或非支链的、取代或未取代的C_1-C_6烷基。R^7和R^8可以是氢,R^7和R^8可以是氘,或R^7连同R^8可以是氧代基。在具体的实施方案中,当Q为硫,n为0,R^4为氢,R^3为-C(O)NH_2,且R^2为-NH_2时,R^1包含至少一个氘。

[0015] 在一些实施方案中,R^1为

[0016] 

[0017] W可以选自-$(CH_2)_m$-或-$(CD_2)_m$-,并且m可以选自0、1或2。R^9可以选自氢,氘,或氘代或未氘代的、饱和或不饱和的、支链或非支链的、取代或未取代的C_1-C_6烷基。R^7和R^8可以是氢,R^7和R^8可以是氘,或R^7连同R^8可以是氧代基。在一些实施方案中,C_4N_2杂环是氘代的。

[0018] 本发明的另一方面是一种治疗患有癌症的受试者的方法。所述方法可以包括给予治疗有效量的本文所述的组合物中的任一种。在一些实施方案中,癌症为前列腺癌、白血病、乳腺癌、结肠癌、卵巢癌、胰腺癌或黑色素瘤。在具体的实施方案中,癌症为前列腺癌,例如去势难治性前列腺癌或对雄激素剥夺治疗有抗性的前列腺癌。在其他实施方案中,癌症为白血病,例如急性髓系白血病。在再其他实施方案中,癌症为乳腺癌,例如转移性乳腺癌或三阴性乳腺癌。

附图说明

[0019] 将参考附图通过实例的方式描述本发明的非限制性实施方案,附图是示意性的,并且不旨在按比例绘制。在图中,示出的每个相同或几乎相同的组件通常由单一数字表示。

出于清楚的目的,并非每个组件都标记在每幅图中,并且在使得本领域普通技术人员理解本发明来说没有必要解释的地方,也未显示本发明的每个实施方案的每个组件。

[0020] 图1A和1B显示了不同浓度的15u(图1A)和15w(图1B)在亲代和CDK8/19双敲除报告基因细胞(reporter cell)的NFκB报告基因分析中的效果。图1C将在源自亲代293的报告基因细胞系的NFκB报告基因分析中测量的不同的噻吩并吡啶的IC50值与由Saito(2013)在小鼠骨髓基质细胞系ST2中基于对碱性磷酸酶(ALP酶)的作用针对相同的化合物测量的基于细胞的活性值进行比较。

[0021] 图2A-2D显示了以每种化合物0.5mg/kg静脉内(i.v.)给予小鼠的15k(图2A)、15v(图2B)、15u(图2C)和Senexin B(图2D)在雌性FVB小鼠中的PK曲线和计算的参数。

[0022] 图3A-3E显示了以每种化合物1mg/kg口服给予小鼠的15k(图3A)、15v(图3B)、15u(图3C)、15w(图3D)和Senexin B(图3E)的PK曲线和计算的参数。

[0023] 图4A和4B显示了以每种化合物30mg/kg给予雌性CD1小鼠的15u(图4A)和15w(图4B)的混合物的PK曲线和计算的参数。

[0024] 图5A显示了以每种化合物30mg/kg给予雌性CD-1小鼠的氘代15u_D6和非氘代15u的PK曲线。图5B显示了以每种化合物16或18mg/kg给予雌性CD-1小鼠的氘代15w_D2和15w_D6以及非氘代15w的PK曲线。

[0025] 图6A-6C显示了不同浓度的噻吩并吡啶衍生物15u(图6A)和15w(图6B)以及Senexin B(图6C)对CRPC细胞系C4-2的细胞培养物上清液中PSA表达的影响。

[0026] 图6D-6F显示了在以每种化合物30mg/kg q.d.处理4天后,15u和15w的混合物对携带C4-2异种移植物的雄性NSG小鼠中PSA血清蛋白倍数变化(图6D)和肿瘤样品PSA mRNA表达(图6E和图6F)的影响。

[0027] 图7A显示了15u对CRPC细胞系22rv1异种移植肿瘤生长的影响(P值类型:(*)0.05-0.01;(**)0.01-0.001;(***)<0.001)。

[0028] 图7B显示了在同一研究结束时的肿瘤重量。

[0029] 图7C显示同一研究中对照和15u处理的小鼠的体重变化。

[0030] 图8A显示了鼠4T1 TNBC细胞中及其表达CDK8 shRNA的衍生物中CDK8蛋白表达的免疫印迹分析。

[0031] 图8B显示了亲代和CDK8敲低的4T1细胞形成的原发性肿瘤的重量。

[0032] 图8C显示了在去除亲代和CDK8敲低的4T1细胞形成的原发性肿瘤后小鼠的存活。

[0033] 图8D显示了在随后用溶媒或15u(25mg/kg,bid)处理的小鼠组中由亲代4T1细胞形成的原发性肿瘤体积。

[0034] 图8E显示了在去除原发性肿瘤后用溶媒或15u(25mg/kg,bid)处理的小鼠的存活。

[0035] 图8F显示了在随后用溶媒或Senexin B(50mg/kg qd+350ppm SnxB-掺药食物)处理的小鼠组中由亲代4T1细胞形成的原发性肿瘤重量。

[0036] 图8G显示了在去除原发性肿瘤后用溶媒或Senexin B(50mg/kg qd+350ppm SnxB-掺药食物)处理的小鼠的存活。

[0037] 图9A检查了Senexin B(SnxB)或15u与恩杂鲁胺(Enza)的组合对含雄激素培养基中的MYC-CAP-CR细胞生长的影响。上图显示了对细胞生长的影响,作为Enza浓度的函数。中间图显示了对细胞生长的影响,作为SnxB浓度的函数。下图显示了对细胞生长的影响,作为

15u浓度的函数。

[0038] 图9B显示克隆形成分析的结果,比较了用DMSO、1μM Senexin B(SnxB)、1μM 15u、5μM恩杂鲁胺(Enza)、1μM Senexin B和5μM恩杂鲁胺(Enza)的组合以及1μM 15u和5μM恩杂鲁胺(Enza)的组合处理的效果。

[0039] 图9C和9D比较了在用溶媒(veh)、15u、恩杂鲁胺(Enza)或15u与恩杂鲁胺的组合(Comb)处理期间,在完整(未去势的)FVB雄性小鼠中皮下生长的MYC-CaP-CR肿瘤的体积(图9C)和重量(图9D)。

[0040] 图10A显示了如通过生物发光成像检测的各种浓度的15u和Senexin B对表达荧光素酶的MV4-11细胞生长的影响。

[0041] 图10B-10D比较了注射$2x10^6$个表达荧光素酶的MV4-11细胞,接着通过以下方式处理的小鼠中的肿瘤生长:通过灌胃用溶媒处理,通过灌胃每天两次用30mg/kg悬浮在溶媒中的15u处理,和用含有1g/kg的15u的掺药食物处理。图10B显示了被处理的小鼠的体内生物发光图像。图10C以光子/秒(p/s)的总通量显示生物发光信号的线图。图10D显示了被处理小鼠的存活曲线。

[0042] 图11A-11C显示了15u对MDA-MB-468三阴性乳腺癌(TNBC)异种移植物的体内生长的影响。图11A是显示对照和15u处理的小鼠中的肿瘤体积的动态的图。***:$p<0.02$。图11B是显示处理后最终肿瘤重量的条形图。图11C是显示小鼠体重的动态的图。

[0043] 图12A和12B显示了CD-1小鼠中15u的最大耐受剂量(MTD)。图12A显示了用15u的溶液制剂以不同剂量通过每天两次灌胃(b.i.d.)处理2周的雄性和雌性CD-1小鼠的体重的动态。图12B显示了通过掺药饮食在不同剂量强度下用15u处理4-5周的雄性和雌性CD-1小鼠的体重的动态。

[0044] 图13显示了15u、15w、15w_APP、15w_PP、15w_CN与CDK8的结合模式叠加。

[0045] 图14A-14C通过LCMS证实了15u_D6的合成。图14A显示了15u_D6的UV色谱。图14B显示了15u_D6的ES+TIC色谱。图14C显示了15u_D6的母离子,作为对化合物合成的进一步确认。

具体实施方式

[0046] 本文公开了双环吡啶,例如噻吩并吡啶、吡咯并吡啶、呋喃并吡啶化合物,和用于治疗癌症的方法。所述组合物可以选择性地抑制激酶CDK8和CDK19,并且在一些情况下也抑制RIOK2、CSNK1A1和CSNK1E。这些激酶中的每一种的抑制有利于病症例如癌症的治疗。

[0047] 以下实施例显示这些化合物适用于基于药代动力学制备药物组合物和治疗患有癌症的受试者。静脉和口服给予本文公开的化合物导致高AUC和非常缓慢的清除率,使它们适用于制备药物组合物并且用于治疗癌症。15u,氘代化合物15u_D6和15w_D6,以及化合物6304表现出令人惊讶的良好PK。15u具有高AUC和非常缓慢的清除率,因为在后期时间点(8小时)的15u的平均血清浓度为C_{max}的64.4%(实施例3)。氘代类似物15u_D6也具有高的AUC,其与15u相当或更好(实施例4和12)。15w_D6不仅具有比其非氘代对应物15w更强的抑制能力,而且还具有优异的AUC(实施例4和12)。本文公开的化合物还特异性抑制激酶CDK8和CDK19。例如,化合物15u和15u_D6显示出对这些激酶靶标的高特异性(实施例3)。

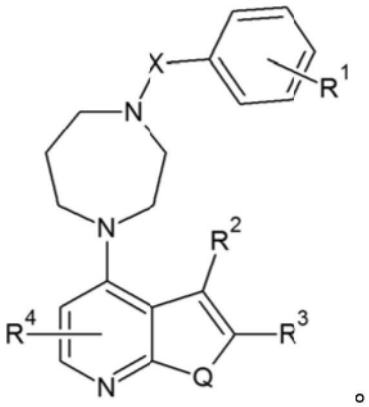
[0048] 本文公开的化合物显示了治疗或抑制各种癌症进展的能力。例如,本文公开的化

合物已显示出对前列腺癌、乳腺癌和白血病的体内功效(实施例5和9)。

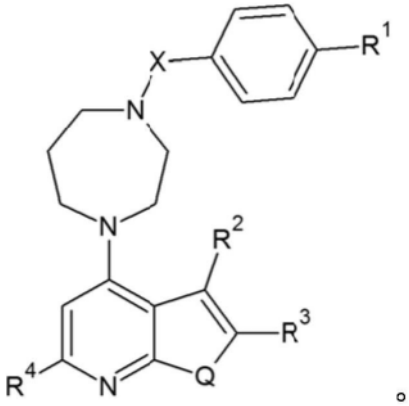
[0049] 由于本文公开的化合物具有有利的PK、对几种不同癌症的体内活性以及有利的激酶组谱,因此所述化合物是用于治疗与CDK8/19活性有关的癌症的有效的CDK8/19抑制剂。

[0050] 双环吡啶化合物

[0051] 本文公开了双环吡啶化合物,例如噻吩并吡啶、吡咯并吡啶和呋喃并吡啶化合物。所述化合物包括式1的化合物:

[0052] 

[0053] 在一些实施方案中,化合物是下式的化合物

[0054] 

[0055] Q可以选自硫,得到噻吩并吡啶;选自-NH-,得到吡咯并吡啶;或选自氧,得到呋喃并吡啶。在一些实施方案中,Q为硫。

[0056] X包括-$(CH_2)_n$-,其中n选自0、1或2。适合地,X为亚甲基(即,n=1)、亚乙基(即,n=2)或七元环和R^1取代的芳基之间的共价键(即,n=0)。在一些实施方案中,n为0。

[0057] R^4为氢或饱和或不饱和的、支链或非支链的、取代或未取代的C_1-C_6烷基。合适地,R^4可以是氢或甲基。

[0058] R^3可以选自氢、氰基、卤素、取代或未取代的氨基、取代或未取代的酰氨基或取代或未取代的磺酰氨基。合适地,R^3可以选自取代或未取代的酰氨基,例如-C(O)NH_2。

[0059] R^2可以选自氢、氰基、卤素、取代或未取代的氨基、取代或未取代的酰氨基或取代或未取代的磺酰氨基。合适地,R^2可以选自取代或未取代的氨基,例如-NH_2。

[0060] R^1可以选自氢;氰基;氘代或未氘代的羟基,氘代或未氘代的羧基,卤素,取代或未取代的、氘代或未氘代的氨基;取代或未取代的、氘代或未氘代的酰氨基;取代或未取代的、氘代或未氘代的磺酰胺,饱和或不饱和的、支链或非支链的、取代或未取代的、氘代或未氘代的C_1-C_6烷基;饱和或不饱和的、支链或非支链的、取代或未取代的、氘代或未氘代的C_1-C_6

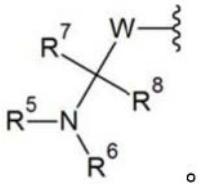
烷氧基。

[0061] 示例性化合物包括但不限于表6中公开的化合物。

[0062] 在一些实施方案中,当Q为硫,n为0,R^4为氢,R^3为-C(O)NH_2,且R^2为-NH_2时,R^1选自氘代羟基,氘代羧基,取代或未取代的氘代氨基;取代或未取代的氘代酰氨基;取代或未取代的、氘代或未氘代的磺酰胺,饱和或不饱和的、支链或非支链的、取代或未取代的氘代C_1-C_6烷基;饱和或不饱和的、支链或非支链的、取代或未取代的氘代C_1-C_6烷氧基。

[0063] 在一些实施方案中,当至少一个的Q不为硫,n不为0,R^4不为氢,R^3不为-C(O)NH_2,且R^2不为-NH_2时,R^1选自氰基;氘代或未氘代的羟基,氘代或未氘代的羧基,卤素,取代或未取代的、氘代或未氘代的氨基;取代或未取代的、氘代或未氘代的酰氨基;取代或未取代的、氘代或未氘代的磺酰胺,饱和或不饱和的、支链或非支链的、取代或未取代的、氘代或未氘代的C_1-C_6烷基;饱和或不饱和的、支链或非支链的、取代或未取代的、氘代或未氘代的C_1-C_6烷氧基。

[0064] 在一些实施方案中,R^1为

[0065] 。

[0066] W可以选自-$(CH_2)_m$-或-$(CD_2)_m$-且m可以选自0、1或2。R^5和R^6可以是独立地选自氢,氘,氘代或未氘代的、饱和或不饱和的、支链或非支链的、取代或未取代的C_1-C_6烷基。R^7和R^8可以是氢,R^7和R^8可以是氘,或R^7连同R^8可以是氧代基。在具体的实施方案中,当Q为硫,n为0,R^4为氢,R^3为-C(O)NH_2,且R^2为-NH_2时,R^1包含至少一个氘。

[0067] 在一些实施方案中,W选自-$(CH_2)_m$-或-$(CD_2)_m$-且m为0。

[0068] 在一些实施方案中,W选自-$(CH_2)_m$-且m为1。在其他实施方案中,W选自-$(CD_2)_m$-且m为1。

[0069] 在一些实施方案中,R^7连同R^8为氧代基。在一些实施方案中,R^7和R^8各自为氢。

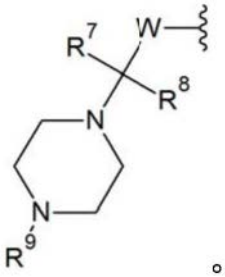
[0070] 在一些实施方案中,R^5和R^6各自为甲基。在其他实施方案中,各自为甲基-d3。

[0071] 在一些实施方案中,R^5和R^6中的一个为氢,并且另一个为甲基。在其他实施方案中,R^5和R^6中的一个为氘,并且另一个为甲基-d3。

[0072] 在一些实施方案中,R^5或R^6中的至少一个为氘代或未氘代的、饱和或不饱和的、支链或非支链的、取代或未取代的C_1-C_6烷基。示例性取代包括但不限于羟基取代、氨基取代或氨基甲酸酯取代。

[0073] 示例性R^1包括但不限于N,N-二(甲基-d3)甲酰胺、N,N-二(甲基-d3)乙酰胺、N,N-二甲基乙酰胺-2,2-d2、N,N-二甲基甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、N-甲基甲酰胺、N-(3-羟丙基)甲酰胺、N-(3-氨基丙基)-N-甲基甲酰胺或(3-(N-甲基甲酰氨基)丙基)氨基甲酸叔丁酯。

[0074] 在一些实施方案中,R^1为

[0075] 

[0076] W可以选自-$(CH_2)_m$-或-$(CD_2)_m$-且m可以选自0、1或2。R^9可以选自氢,氘,或氘代或未氘代的、饱和或不饱和的、支链或非支链的、取代或未取代的C_1-C_6烷基。R^7和R^8可以是氢,R^7和R^8可以是氘,或R^7连同R^8可以是氧代基。在一些实施方案中,C_4N_2杂环是氘代的。

[0077] 在一些实施方案中,W选自-$(CH_2)_m$-或-$(CD_2)_m$-m为0。

[0078] 在一些实施方案中,W选自-$(CH_2)_m$-且m为1。在其他实施方案中,W选自-$(CD_2)_m$-且m为1。

[0079] 在一些实施方案中,R^7连同R^8为氧代基。在其他实施方案中,R^7和R^8各自为氢。

[0080] 在一些实施方案中,R^9为氢、甲基或C(O)OC(CH_3)。

[0081] 示例性R^1包括但不限于(4-甲基哌嗪-1-基)亚甲基、4-甲基哌嗪-1-甲醛、哌嗪-1-甲醛或4-甲酰基哌嗪-1-甲酸叔丁酯。

[0082] 如以下实施例所示,一些双环吡啶化合物具有令人惊讶的良好的PK。例如,噻吩并吡啶15u、15u_D6、15w_D6和604证明了用于制备药物组合物和用于治疗癌症的合适的PK特性。如在实施例中所显示的,这些化合物的静脉内和口服给药在体内小鼠模型中导致高C_0和C_{max}浓度、缓慢消除和大AUC。

[0083] 定义

[0084] 如本文所用,星号"*"或加号"+"可以用于指定任何基团或取代基的连接点。

[0085] 本文考虑的术语"烷基"包括所有异构形式的直链或支链烷基,例如1-12、1-10或1-6个碳原子的直链或支链基团,在本文中分别称为C1-C12烷基、C1-C10-烷基和C1-C6烷基。

[0086] 术语"亚烷基"是指烷基的双基团。示例性亚烷基是-CH_2CH_2-。

[0087] 术语"卤代烷基"是指被至少一个卤素取代的烷基。例如,-CH_2F、-CHF_2、-CF_3、-CH_2CF_3、-CF_2CF_3等。

[0088] 如本文所用的术语"杂烷基"是指"烷基"基团,其中至少一个碳原子已被杂原子(例如,O、N或S原子)替代。合适地,杂烷基可以是"烷氧基"基团、"氨基"基团或"磺酰基"。

[0089] 如本文所用的术语"烯基"是指具有至少一个碳-碳双键的不饱和直链或支链烃,例如2-12、2-10或2-6个碳原子的直线或支链基团,在本文中分别称为C2-C12烯基、C2-C10烯基和C2-C6烯基。

[0090] 如本文所用的术语"炔基"是指具有至少一个碳-碳三键的不饱和直链或支链烃,例如2-12、2-10或2-6个碳原子的直链或支链基团,在本文中分别称为C2-C12炔基、C2-C10炔基和C2-C6炔基。

[0091] 术语"环烷基"是指源自环烷烃的3-12、3-8、4-8或4-6个碳的一价饱和环状、二环或桥环(例如,金刚烷基)烃基,在本文中称为例如"C4-8环烷基"。除非另有说明,否则环烷基任选地在一个或多个环位置处被例如烷酰基、烷氧基、烷基、卤代烷基、烯基、炔基、酰氨

基、脒基、氨基、芳基、芳基烷基、叠氮基、氨基甲酸酯基、碳酸酯基、羧基、氰基、环烷基、酯基、醚基、甲酰基、卤素、卤代烷基、杂芳基、杂环基、羟基、亚氨基、酮基、硝基、磷酸酯基、膦酸酯基、次膦酸酯基、硫酸酯基、硫醚基、磺酰氨基、磺酰基或硫代羰基取代。在某些实施方案中,环烷基未被取代,即,它是未取代的。

[0092] 术语“亚环烷基”是指环烷基的双基团。

[0093] 术语“部分不饱和碳环基”是指一价环状烃,其包含在环原子之间的至少一个双键,其中碳环基的至少一个环不是芳族的。部分不饱和的碳环基可以根据环碳原子的数目表征。例如,部分不饱和碳环基可以包含5-14、5-12、5-8或5-6个环碳原子,因此分别称为5-14、5-12、5-8或5-6元部分不饱和碳环基。部分不饱和碳环基可以是单环碳环、双环碳环、三环碳环、桥接碳环、螺环碳环或其他碳环环系统的形式。示例性的部分不饱和碳环基包括部分不饱和的环烯基和双环碳环基。除非另有说明,否则部分不饱和碳环基团任选地在一个或多个环位置处被例如烷酰基、烷氧基、烷基、卤代烷基、烯基、炔基、酰氨基、脒基、氨基、芳基、芳基烷基、叠氮基、氨基甲酸酯基、碳酸酯基、羧基、氰基、环烷基、酯基、醚基、甲酰基、卤素、卤代烷基、杂芳基、杂环基、羟基、亚氨基、酮基、硝基、磷酸酯基、膦酸酯基、次膦酸酯基、硫酸酯基、硫醚基、磺酰氨基、磺酰基或硫代羰基取代。在某些实施方案中,部分不饱和碳环基未被取代,即,它是未取代的。

[0094] 术语“芳基”是本领域公知的,并且是指碳环芳族基团。代表性芳基包括苯基、萘基、蒽基等。术语“芳基”包括具有两个或更多个碳环的多环环系统,其中两个或更多个碳是两个邻接环共享的(环是“稠环”),其中至少一个环是芳族环,并且例如其他(多个)环可以是环烷基、环烯基、环炔基和/或芳基。除非另有说明,芳环可以在一个或多个环位置处被例如卤素、叠氮基、烷基、芳烷基、烯基、炔基、环烷基、羟基、烷氧基、氨基、硝基、巯基、亚氨基、酰氨基、羧酸、-C(O)烷基、-CO_2烷基、羰基、羧基、烷硫基、磺酰基、磺酰氨基、磺酰胺、酮基、醛基、酯基、杂环基、芳基或杂芳基部分、-CF_3、-CN等取代。在某些实施方案中,芳环在一个或多个环位置处被卤素、烷基、羟基或烷氧基取代。在某些其他实施方案中,芳环未被取代,即,它是未取代的。在某些实施方案中,芳基基团是6-10元环结构。

[0095] 术语“杂环基”和“杂环基团”是本领域公知的,并且是指是饱和、部分不饱和或芳族3至10元环结构,供选择地是3至7元环,其环结构包括一至四个杂原子,例如氮、氧和硫。可以使用5Cx-Cx命名法指定杂环基中的环原子的数目,其中x是指定环原子数目的整数。例如,C3-C7杂环基是指含有一至四个杂原子,例如氮、氧和硫的饱和或部分不饱和的3至7元环结构。指定“C3-C7”表明杂环环总共含有3至7个环原子,包括占据环原子位置的任何杂原子。

[0096] 术语“胺”和“氨基”是本领域公知的,并且是指未取代和取代的胺二者,其中取代基可以包括例如烷基、环烷基、杂环基、烯基和芳基。合适地,氨基可以是未取代的(即,-NH_2)或式-NHR或-NRR’的取代氨基,其中R和R’独立地选自C1-C12烷基或C1-C6烷基,例如甲基或乙基。

[0097] 术语“烷氧基(alkoxyl)”或“烷氧基(alkoxy)”是本领域公知的,并且是指具有与其连接的氧基团的烷基。代表性烷氧基包括甲氧基、乙氧基、叔丁氧基等。

[0098] “醚”是由氧共价连接的两种烃。因此,使得烷基是醚的烷基的取代基是或类似于烷氧基,例如可以由-O-烷基、-O-烯基、-O-炔基等中的一种表示。

[0099] “环氧化物”是具有三原子环的环醚,通常包括两个碳原子,并且其形状近似于等腰三角形。环氧化物可以通过双键的氧化形成,其中双键的碳原子与氧原子形成环氧化物。

[0100] 如本文所用的术语“羰基”是指基团-C(O)-。

[0101] 如本文使用的术语“甲酰氨基”是指基团-C(O)NRR',其中R和R'可以是相同或不同的。R和R'可以独立地为烷基、芳基、芳基烷基、环烷基、甲酰基、卤代烷基、杂芳基或杂环基。合适地,甲酰氨基可以包括-C(O)NRR',其中R和R'独立地选自C1-C12烷基或C1-C6烷基,例如甲基或乙基。

[0102] 如本文所用的术语“羧基”是指基团-COOH或其相应的盐,例如-COONa等。

[0103] 如本文所用的术语“酰胺”或“酰氨基”是指$R^1C(O)N(R^2)-$、$-R^1C(O)N(R^2)R^3-$、$-C(O)NR^2R^3$或$-C(O)NH_2$形式的基团,其中其中R^1、R^2和R^3各自独立地为烷氧基、烷基、烯基、炔基、酰胺、氨基、芳基、芳基烷基、氨基甲酸酯基、环烷基、酯基、醚基、甲酰基、卤素、卤代烷基、杂芳基、杂环基、氢、羟基、酮基或硝基。合适地,酰氨基可以包含$-C(O)NR^2R^3$,其中R^2和R^3独立地选自氢或C1-C12烷基或C1-C6烷基。合适地,R^2和R^3可以独立地选自氢、甲基或乙基。

[0104] 如本文所用的术语“磺酰氨基”是指$-R^1C(S)_2N(R^2)-$、$-R^1C(S)_2N(R^2)R^3-$、$-C(S)_2NR^2R^3$或$-C(S)_2NH_2$形式的基团,其中R^1、R^2和R^3各自独立地为烷氧基、烷基、烯基、炔基、酰胺、氨基、芳基、芳基烷基、氨基甲酸酯基、环烷基、酯基、醚基、甲酰基、卤素、卤代烷基、杂芳基、杂环基、氢、羟基、酮基或硝基。合适地,磺酰氨基可以包括$-C(S)_2NR^2R^3$,其中R^2和R^3独立地选自氢或C1-C12烷基或C1-C6烷基。合适地,R^2和R^3可以独立地选自氢、甲基或乙基。

[0105] 本公开的化合物可以包含一个或多个手性中心和/或双键,因此作为立体异构体,例如几何异构体、对映异构体或非对映异构体存在。当在本文中使用时,术语“立体异构体”由所有几何异构体、对映异构体或非对映异构体组成。这些化合物可以由符号“R”或“S”表示,这取决于手性碳原子周围的取代基的构型。本发明包括这些化合物的各种立体异构体及其混合物。立体异构体包括对映异构体和非对映异构体。对映异构体或非对映异构体的混合物可以在命名法中指定“(±)”,但技术人员将认识到,结构可以隐含地表示手性中心。应当理解,除非另有说明,否则化学结构,例如通用化学结构的图示描绘包括所指定化合物的所有立体异构形式。本文考虑了包含基本上纯化的立体异构体、差向异构体或对映异构体或其类似物或其衍生物的组合物(例如,包含至少约90%、95%或99%纯的立体异构体、差向异构体或对映异构体的组合物)。

[0106] 药物组合物

[0107] 本文公开的方法中使用的化合物可以配制成药物组合物,其包含:(a)治疗有效量的如本文所公开的一种或多种化合物;和(b)一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。药物组合物可以包含约0.1至2000mg(优选约0.5至500mg,更优选约1至100mg)的化合物。可以给予药物组合物,以提供每日剂量为约0.1至100mg/kg体重(优选地约0.5至20mg/kg体重,更优选约0.1至10mg/kg体重)的所述化合物。在一些实施方案中,在将药物组合物给予患者后(例如,在给药后约1、2、3、4、5或6小时之后),在作用部位的化合物的浓度为约1nM到100μM。

[0108] 本文公开的方法中使用的化合物可以配制成固体剂型的药物组合物,尽管可以使用任何药学上可接受的剂型。示例性固体剂型包括但不限于,片剂、胶囊、小药囊、锭剂、散剂、丸剂或颗粒剂,并且固体剂型可以是例如速溶剂型、控释剂型、冻干剂型、延迟释放剂

型、延长释放剂型、脉冲释放剂型、混合速释和控释剂型或其组合。

[0109] 本文公开的方法中使用的化合物可以配制成包含载体的药物组合物。例如，载体可以选自由蛋白质、碳水化合物、糖、滑石、硬脂酸镁、纤维素、碳酸钙和淀粉-明胶糊组成的组。

[0110] 本文公开的方法中使用的化合物可以配制成药物组合物，其包含一种或多种粘合剂、填充剂、润滑剂、助悬剂、甜味剂、调味剂、防腐剂、缓冲剂、润湿剂、崩解剂和发泡剂。填充剂可以包括乳糖一水合物、乳糖无水物和各种淀粉；粘合剂的实例是各种纤维素和交联聚乙烯吡咯烷酮，微晶纤维素，例如Avicel®PH101和Avicel®PH102，微晶纤维素，和硅化微晶纤维素(ProSolv SMCC™)。合适的润滑剂包括对待压缩粉末的流动性起作用的试剂，可以包括胶体二氧化硅，例如Aerosil®200，滑石，硬脂酸，硬脂酸镁，硬脂酸钙和硅胶。甜味剂的实例可以包括任何天然或人造甜味剂，例如蔗糖、木糖醇、糖精钠、甜蜜素、阿斯巴甜和安赛蜜。调味剂的实例是Magnasweet®(MAFCO的商标)、泡泡糖香精和水果香精等。防腐剂的实例可以包括山梨酸钾，对羟基苯甲酸甲酯，对羟基苯甲酸丙酯，苯甲酸及其盐，对羟基苯甲酸的其他酯例如对羟基苯甲酸丁酯，醇例如乙醇或苄醇，酚类化合物例如苯酚，或季铵化合物例如苯扎氯铵。

[0111] 合适的稀释剂包括药学上可接受的惰性填料，例如微晶纤维素、乳糖、二碱式磷酸钙、糖类和任何前述物质的混合物。稀释剂的实例包括微晶纤维素，例如Avicel®PH101和Avicel®PH102；乳糖，例如乳糖一水合物，乳糖无水物，和Pharmatose®DCL21；二碱式磷酸钙，例如Emcompress®；甘露醇；淀粉；山梨糖醇；蔗糖；和葡萄糖。

[0112] 合适的崩解剂包括轻度交联的聚乙烯吡咯烷酮、玉米淀粉(corn starch)、马铃薯淀粉、玉米淀粉(maize starch)和改性淀粉、交联羧甲纤维素钠、交联聚维酮、羧基乙酸淀粉钠及其混合物。

[0113] 发泡剂的实例是泡腾对(effervescent couple)，例如有机酸和碳酸盐或碳酸氢盐。合适的有机酸包括例如，柠檬酸、酒石酸、苹果酸、富马酸、己二酸、琥珀酸和藻酸和酸酐和酸盐。合适的碳酸盐和碳酸氢盐包括，例如，碳酸钠、碳酸氢钠、碳酸钾、碳酸氢钾、碳酸镁、甘氨酸钠碳酸盐、L-赖氨酸碳酸盐和精氨酸碳酸盐。供选择地，可以仅存在泡腾对的碳酸氢钠组分。

[0114] 本文公开的方法中使用的化合物可以配制成通过任何合适的途径递送的药物组合物。例如，药物组合物可以通过口服、静脉内、肌肉内、皮下、局部和肺部途径给药。口服给药的药物组合物的实例包括胶囊、糖浆、浓缩物、粉末和颗粒。

[0115] 本文公开的方法中使用的化合物可以通过根据本领域熟知的常规程序将活性成分与标准药物载体或稀释剂组合制备的常规剂型给药。这些程序可以涉及视情况将成分混合、制粒和压缩，或溶解成期望的制剂。

[0116] 包含所述化合物的药物组合物可以适于通过任何适宜的途径给药，例如通过口服(包括颊或舌下)、直肠、鼻、局部(包括颊、舌下或透皮)、阴道或肠胃外(包括皮下、肌肉内、静脉内或皮内)途径。这样的制剂可以通过药物领域已知的任何方法制备，例如通过将活性成分与载体或赋形剂联合来制备。

[0117] 适用于口服给药的药物组合物可以作为离散单元提供，例如胶囊或片剂；粉末或

颗粒;水或非水液体中的溶液或悬浮液;可食用泡沫(foam)或泡沫(whip);或水包油液体乳液或油包水液体乳液。

[0118] 适用于透皮给药的药物组合物可以作为旨在与接受者的表皮保持长时间段的紧密接触的离散贴片提供。例如,活性成分可以通过离子电渗疗法从贴片递送。

[0119] 适用于局部给药的药物组合物可以配制为软膏剂、乳膏剂、混悬剂、洗剂、散剂、溶液剂、糊剂、凝胶剂、浸渍的敷料、喷雾剂、气溶胶或油,并且可以包含适宜的常规添加剂,例如防腐剂、帮助药物渗透的溶剂以及软膏剂和乳膏剂中的润肤剂。

[0120] 对于眼睛或其他外部组织,例如口腔和皮肤的应用,药物组合物优选作为局部软膏剂或乳膏剂施用。当配制在软膏剂中时,所述化合物可以与石蜡或水混溶性软膏基质一起使用。供选择地,所述化合物可以配制在具有水包油乳膏基质或油包水基质的乳膏中。适于向眼睛局部给药的药物组合物包括滴眼剂,其中活性成分溶解或悬浮在合适的载体,尤其是水性溶剂中。

[0121] 适于在口腔中局部给药的药物组合物包括锭剂、糖锭剂和漱口水。

[0122] 适于直肠给药的药物组合物可以作为栓剂或灌肠剂提供。

[0123] 当载体是固体时,适于经鼻给药的药物组合物包括具有一定粒度(例如,在20至500微米的范围内)的粗粉末,其以吸鼻烟的方式(即通过从靠近鼻子的粉末容器快速吸入通过鼻腔通道)给药。用于作为鼻喷雾或作为滴鼻剂给药的、其中载体是液体的合适制剂包括活性成分的水或油溶液。

[0124] 适用于通过吸入给药的药物组合物包括细颗粒粉尘或雾,其可以通过各种类型的计量剂量加压喷雾器、雾化器或吹药器产生。

[0125] 适用于阴道给药的药物组合物可以作为子宫托、卫生棉条、乳膏剂、凝胶剂、糊剂、泡沫或喷雾制剂提供。

[0126] 适用于肠胃外给药的药物组合物包括:水性和非水性无菌注射液,其可以包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使制剂与预期接受者的血液等渗的溶质;和水性和非水性无菌混悬剂,其可以包含助悬剂和增稠剂。制剂可以以单位剂量或多剂量容器提供,例如密封的安瓿和小瓶,并且可以储存在冷冻干燥的(冻干的)条件下,仅需要在使用前即刻加入无菌液体载体,例如注射用水。即用注射液和混悬剂可以由无菌粉末、颗粒和片剂制备。

[0127] 用于口服给药的片剂和胶囊剂可以是单位剂量呈现形式,并且可以包含常规赋形剂,例如粘合剂,例如糖浆、阿拉伯树胶、明胶、山梨醇、黄蓍胶或聚乙烯吡咯烷酮;填充剂,例如乳糖、糖、玉米淀粉、磷酸钙、山梨醇或甘氨酸;压片润滑剂,例如硬脂酸镁、滑石、聚乙二醇或二氧化硅;崩解剂,例如土豆淀粉;或可接受的湿润剂,例如十二烷基硫酸钠。可以根据正常药物实践中众所周知的方法对片剂包衣。口服液体制剂可以是例如水性或油性混悬剂、溶液剂、乳剂、糖浆剂或酏剂的形式,或者可以作为干燥产品提供,用于在使用前用水或其他合适的溶媒重构。这样的液体制剂可以包含常规添加剂,例如助悬剂,例如山梨醇、甲基纤维素、葡萄糖浆、明胶、羟乙基纤维素、羧甲基纤维素、硬脂酸铝凝胶或氢化可食用脂肪,乳化剂,例如卵磷脂、山梨醇单油酸酯或阿拉伯树胶;非水性溶媒(其可以包含食用油),例如杏仁油,油酯,例如甘油、丙二醇或乙醇;防腐剂,例如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯,或山梨酸;以及如果期望,常规的调味剂或着色剂。

[0128] 本文公开的组合物和方法中使用的化合物可以作为药物组合物给药,因此,包含

所述化合物的药物组合物被视为本文公开的组合物的实施方案。这样的组合物可以采用任何药学上可接受的物理形式;说明性地,它们可以是口服给药的药物组合物。这样的药物组合物包含有效量的公开的化合物,所述有效量与待给药的化合物的每日剂量相关。每个剂量单位可以包含给定化合物的每日剂量,或每个剂量单位可以包含每日剂量的部分,例如剂量的一半或三分之一。在每个剂量单位中包含的每种化合物的量可以部分取决于选择用于治疗的特定化合物的特性和其他因素,例如其所用于的适应症。可以配制本文公开的药物组合物,以便于在通过采用熟知的程序施用至患者后提供活性成分的快速、持续或延迟释放。

[0129] 根据本文公开的方法使用的化合物可以作为单一化合物或化合物的组合给药。例如,治疗癌症活性的化合物可以作为单一化合物或与治疗癌症或具有不同药理活性的另一种化合物组合给药。

[0130] 如上所述,考虑化合物的药学上可接受的盐,并且还可以在公开的方法中使用所述盐。本文所用的术语“药学上可接受的盐”是指对存活生物体基本上无毒的化合物的盐。典型的药学上可接受的盐包括通过如本文所公开的化合物与药学上可接受的矿物或有机酸或有机或无机碱的反应制备的那些盐。这样的盐被称为酸加成和碱加成盐。本领域技术人员将理解,如本文所公开的大多数或所有化合物都能够形成盐,并且药物的盐形式是常用的,通常是因为它们比游离酸或碱更容易结晶和纯化。

[0131] 通常用于形成酸加成盐的酸可以包括无机酸,例如盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、磷酸等,和有机酸,例如对甲苯磺酸、甲磺酸、草酸、对溴苯基磺酸、碳酸、琥珀酸、柠檬酸、苯甲酸、乙酸等。合适的药学上可接受的盐的实例可以包括硫酸盐、焦硫酸盐、硫酸氢盐、亚硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、磷酸一氢盐、磷酸二氢盐、偏磷酸盐、焦磷酸盐、溴化物、碘化物、乙酸盐、丙酸盐、癸酸盐、辛酸盐、丙烯酸盐、甲酸盐、盐酸盐、二盐酸盐、异丁酸盐、己酸盐、庚酸盐、丙炔酸盐、草酸盐、丙二酸盐、琥珀酸盐、辛二酸盐、癸二酸盐、富马酸盐、马来酸盐、丁炔-1,4-二酸盐、己炔-1,6-二酸盐、苯甲酸盐、氯苯甲酸盐、甲基苯甲酸盐、羟基苯甲酸盐、甲氧基苯甲酸盐、邻苯二甲酸盐、二甲苯磺酸盐、苯基乙酸盐、苯基丙酸盐、苯基丁酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、α-羟基丁酸盐、乙醇酸盐、酒石酸盐、甲磺酸盐、丙磺酸盐、萘-1-磺酸盐、萘-2-磺酸盐、扁桃酸盐等。

[0132] 碱加成盐包括衍生自无机碱的盐,例如氨或碱金属或碱土金属氢氧化物、碳酸盐、碳酸氢盐等。可用于制备这样的盐的碱包括氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、碳酸钾、碳酸钠、碳酸氢钠、碳酸氢钾、氢氧化钙、碳酸钙等。

[0133] 形成本文公开的化合物的任何盐的一部分的特定反离子对于化合物的活性不是至关重要的,只要作为整体的盐是药理学上可接受的,并且只要反离子不对作为整体的盐贡献不期望的特性即可。不期望的特性可以包括不期望的溶解性或毒性。

[0134] 化合物的药学上可接受的酯和酰胺也可以用于本文公开的组合物和方法中。合适的酯的实例包括烷基、芳基和芳烷基酯,例如甲酯、乙酯、丙酯、十二烷基酯、苄酯等。合适的酰胺的实例包括未取代的酰胺、单取代酰胺和二取代酰胺,例如甲酰胺、二甲基酰胺、甲基乙基酰胺等。

[0135] 另外,本文公开的方法可以使用化合物或其盐、酯和/或酰胺的溶剂化物形式来实施。溶剂化物形式可以包括乙醇溶剂化物、水合物等。

[0136] 治疗方法

[0137] 描述的组合物可用于治疗受试者。如本文所用,术语“治疗(treating)”或“治疗(to treat)”各自是指减轻症状,在临时或永久的基础上消除产生的症状的病因,和/或防止或减慢指定疾病或障碍的出现,或逆转指定疾病或障碍的进程或产生的症状的严重程度。因此,本文公开的方法包括治疗性和预防性给药。

[0138] 如本文所用,“受试者”可以与“患者”或“个体”互换,并且是指需要治疗的动物,其可以是人类或非人类动物。“需要治疗的受试者”可以包括患有疾病、障碍或病症的受试者,其对使用本文公开的吡啶化合物的治疗有反应。例如,“需要治疗的受试者”可以包括患有CDK8/19相关的疾病、障碍或病症的受试者,例如癌症、炎症相关的疾病、心血管疾病、核糖体病、特征在于造血干细胞和/或祖细胞的数目减少的病症和骨合成代谢障碍。CDK8/19相关的疾病、障碍或病症包括可以通过抑制CDK8或CDK19治疗受试者的任何疾病、障碍或病症。

[0139] 如本文所用,术语“有效量”是指化合物在单剂量或多剂量给予受试者时的量或剂量,其在诊断或治疗下在受试者中提供希望的作用。所公开的方法可以包括给予有效量的公开的化合物(例如,在药物组合物中存在),用于治疗CDK8/19相关的疾病。

[0140] 通过使用已知技术并通过观察在类似情况下获得的结果,作为本领域技术人员的主治诊断医师可以容易地确定有效量。在确定所施用化合物的有效量或剂量时,主治诊断医师可以考虑许多因素,例如:受试者的物种;其大小、年龄和一般健康状况;涉及的疾病或障碍的受累或严重程度;个体受试者的反应;施用的特定化合物;给药方式;施用的制剂的生物利用度特征;选择的剂量方案;伴随药物的使用;和其他相关情况。

[0141] 典型的每日剂量可以包含约0.01mg/kg至约100mg/kg(例如约0.05mg/kg至约50mg/kg和/或约0.1mg/kg至约25mg/kg)的用于本发明的治疗方法的每种化合物。

[0142] 组合物可以配制成单位剂型,每个剂量包含单独的或在单一单位剂型中约1至约500mg的每种化合物,例如约5至约300mg,约10至约100mg,和/或约25mg。术语“单位剂型”是指适合作为患者的单一剂量的物理离散单位,每个单位包含经计算产生期望的治疗效果的预定量的活性材料,联合合适的药物载体、稀释剂或赋形剂。

[0143] 在一些实施方案中,CDK8/19相关的疾病是前列腺癌,合适地,是去势难治性前列腺癌或对雄激素剥夺治疗有抗性的前列腺癌。如本文所用,“去势难治性前列腺癌”或“去势抗性前列腺癌”或“CRPC”是即使当体内的睾酮量降低到非常低的水平时也保持生长的前列腺癌。许多早期前列腺癌需要基本正常水平的睾酮来生长,而CRPC不需要。

[0144] 雄激素剥夺治疗(或雄激素抑制治疗)是前列腺癌激素治疗。雄激素剥夺治疗可以包括降低雄激素水平的治疗,例如手术或化学去势,或抑制雄激素的促进癌症活性的活性的治疗。降低雄激素水平或抑制雄激素活性可以导致前列腺肿瘤的生长减慢,并且在某些情况下导致肿瘤收缩。抑制促进癌症的雄激素的活性的合适的治疗包括给予抗雄激素,所述抗雄激素可以与雄激素受体结合。抗雄激素包括但不限于醋酸环丙孕酮、醋酸甲地孕酮、醋酸氯地孕酮、螺内酯、奥生多龙、氟他米特、比卡鲁胺、尼鲁米特、托匹芦胺(topilutamide)、恩杂鲁胺、阿比特龙或阿帕他胺(apalutamide)。

[0145] 本发明公开的方法可以用于治疗对雄激素剥夺治疗无反应的受试者。一些前列腺癌,例如CRPC,可能对雄激素剥夺治疗不反应或变得有抗性。如实施例中所示,15u有效地抑

制CRPC的前列腺肿瘤生长。因此,15u可以施用给先前已经经历雄激素剥夺治疗的受试者或对雄激素剥夺治疗无反应的受试者。

[0146] 本发明公开的方法也可用于治疗当前正在经历雄激素剥夺治疗的受试者。如实施例中所示,15u在与抗雄激素共同给药时抑制CRPC的前列腺肿瘤生长。因此,15u可以施用给目前正在经历雄激素剥夺治疗的受试者。

[0147] 在一些实施方案中,CDK8/19相关的疾病是白血病,合适地是急性髓系白血病。

[0148] 在一些实施方案中,CDK8/19相关的疾病是乳腺癌,合适地是转移性乳腺癌。

[0149] 抑制CDK8或CDK19的方法

[0150] 描述的组合物可用于抑制CDK8和/或CDK19。如本文所用,“抑制CDK8”或“抑制CDK19”是指通过任何合适的机制,包括竞争性结合,分别抑制CDK8或CDK18的活性。抑制CDK8和/或CDK19的方法可以包括使本文所述的化合物或组合物中的任一种与CDK8或CDK19接触。抑制程度可以通过本说明书中的实施例中教导的分析来测量,包括本文使用的服务提供者采用的分析条件。这些分析的结果在本文中一般表示为对照的百分比(POC),其中对照为不存在化合物。供选择地,结果可以表示为IC50。在一些实施方案中,对于本文所述组合物的化合物的任一种的有效量,POC小于35%,合适地小于30%、25%、20%、15%、10%、5%或1%。在一些实施方案中,IC50小于2000nM、1500nM、1000nM、750nM、500nM、250nM、200nM、150nM、100nM、75nM、50nM、40nM、30nM或25nM。

[0151] 在一些实施方案中,本文公开的化合物和组合物特异性抑制CDK8或CDK19。如本文所用,“特异性抑制CDK8”或“特异性抑制CDK19”的化合物或组合物是这样的化合物或组合物,其分别抑制一种或多种CDK8或CDK19至比其抑制某些其他CDK更高的程度。在一些实施方案中,这样的化合物还抑制CDK8和/或CDK19至比以下更高的程度:CDK2、CDK3、CDK4、CDK5、CDK7、CDK9、CDK11A、CDK11B、CDK13、CDK14、CDK15、CDK16、CDK17、CDK18、CDKL1、CDKL3或CDKL5更高。在优选的实施方案中,这样的更高的程度是CDK2、CDK3、CDK4、CDK5、CDK7、CDK9、CDK11A、CDK11B、CDK13、CDK14、CDK15、CDK16、CDK17、CDK18、CDKL1、CDKL3或CDKL5的至少2倍,或者至少3倍。

[0152] 其它

[0153] 除非另有规定或由上下文指定,否则术语“一(a)”、“一(an)”和“所述(the)”是指“一个或多个”。例如,“分子”应该被解释为意指“一个或多个分子”。

[0154] 如本文所用,“约(about)”、“大约(approximately)”、“基本上(substantially)”和“显著地(significantly)”将由本领域普通技术人员所理解,并且将在其所使用的上下文中在某种程度上变化。如果存在本领域普通技术人员不清楚的术语的使用,则考虑到它使用的上下文,“约”和“大约”将意味着加上或减去特定术语的≤10%,“基本上”和“显著地”将意味着加上或减去特定术语的>10%。

[0155] 如本文所用,术语“包括(include)”和“包括(including)”具有与术语“包含(comprise)”和“包含(comprising)”相同的含义。术语“包含(comprise)”和“包含(comprising)”应被解释为“开放式”过渡术语,其允许包含除了在权利要求中所述的那些组分以外的另外的组分。术语“由……组成(consist)”和“由……组成(consisting of)”应被解释为“封闭式”的过渡术语,其不允许包含除了在权利要求中所述的组分以外的另外的组分。术语“基本上由……组成(consisting essentially of)”应该被解释为部分封闭并

允许仅包含不从根本上改变所要求保护的主题的性质的另外的组分。

[0156] 除非在本文另有说明或以其他方式与上下文矛盾,否则可以以任何合适的顺序进行本文所述的所有方法。本文提供的任何和所有实例或示例性语言(例如,“例如”)的使用仅仅是为了更好地阐明本发明,并且除非另有说明,不会对本发明的范围产生限制。本说明书中没有语言应被解释为表示任何非要求保护的要素对于本发明的实践是至关重要的。

[0157] 本文引用的所有参考文献,包括出版物、专利申请和专利,通过引用并入本文,其程度如同每个参考文献单独且具体地被指示通过引用并入并在本文中整体阐述。

[0158] 本文描述了本发明的优选方面,包括用于实施本发明的发明人已知的最佳方式。在阅读前述说明后,那些优选的方面的变化可以变得对本领域普通技术人员来说是明显的。发明人期望本领域普通技术人员视情况使用这样的变化,并且发明人预期本发明以不同于本文具体描述的另外的方式实施。因此,本发明包括适用法律所允许的所附权利要求中所述的主题的所有修改和等同方案。此外,除非本文另有说明或以其他方式与上下文明显矛盾,否则本发明包括所有可能变化中的上述要素的任何组合。

[0159] 实施例

[0160] 实施例1.噻吩并吡啶衍生物在基于细胞的分析中抑制CDK8/19活性。

[0161] NFκB活性分析。我们使用基于细胞的分析来测量噻吩并吡啶衍生物对CDK8/19活性的抑制。该分析基于CDK8/19在NFκB驱动的转录中的作用(Li等人,Characterizing CDK8/19 Inhibitors through a NFκB-Dependent Cell-Based Assay,Cells 2019,8(10),1208),测量CDK8/19对来自293细胞中NFκB依赖性启动子的萤火虫荧光素酶报告基因的表达的影响。将慢病毒载体pHAGE-NFKB-TA-LUC-UBC-dTomato-W(Addgene#49335)引入293细胞,建立了在TNFα处理时显示荧光素酶表达的最强诱导的克隆细胞系,并用作报告基因细胞系。作为NFκB抑制的CDK8/19依赖性的对照,我们还将相同的报告基因构建体引入具有CDK8和CDK19二者的CRISPR/CAS9敲除的293细胞中。

[0162] NFκB活性结果。图1A和1B显示不同浓度的15u和15w在亲代293和在CDK8/19缺陷(双敲除)的报告基因细胞中对NFκB报告基因活性的影响。虽然这些化合物分别以10和4nM的IC50值抑制报告基因诱导,但它们对CDK8/19缺陷细胞的NFκB活化没有影响,表明两种化合物的抑制作用取决于CDK8/19的存在,而不是NFκB活性的其他决定因素,例如IKK。

[0163] 图1C和表1将在源自亲代293的报告基因细胞系的NFκB报告基因分析中测量的不同的噻吩并吡啶的IC50值与由Saito(2013)对于同样的化合物基于它们对碱性磷酸酶(ALP酶)的作用测量的基于细胞的活性值进行比较,所述碱性磷酸酶(ALP酶)是在小鼠骨髓基质细胞系ST2中分化为成骨细胞的指标。后一种作用表示为EC_{200},将ALP酶活性增强至对照的200%的浓度。CDK8/19NFkB分析中的IC50值与ALP酶EC_{200}值非常强相关(图1B),表明ALP酶作用最有可能通过CDK8/19抑制介导。

[0164] 表1:ALP和NFκB活性的比较

[0165]

	ALP 活性分析 EC200（nM）	NFκB 活性分析 IC50（nM）
15k	138.8	50.6
15q	115.4	43.1
15n	88.1	37.8
15u	31.9	10.3
15v	54.2	23.1
15w	6.6	4.1

[0166] 实施例2.噻吩并吡啶衍生物的激酶组谱分析。

[0167] 表2显示通过KINOMEscan™定点竞争结合分析在2000nM浓度下测量的15u_D6和15u的激酶组谱。结合激酶活性位点和直接(空间)或间接(别构)地防止激酶结合到固定化配体的化合物将减少固体载体上捕获的激酶量。相反,不结合激酶的测试分子对固体载体捕获的激酶量没有影响。通过使用检测相关的DNA标记的定量、精确和超敏qPCR方法测量测试样品与对照样品中捕获的激酶的量来确定筛选“命中(hit)”。以类似的方式,通过测量作为测试化合物浓度的函数的固体载体上捕获的激酶的量来计算用于测试化合物-激酶相互作用的解离常数(Kd)。分析技术的详细描述可以见于Fabian,M.A.等人.A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors.Nat.Biotechnol.23,329-336(2005)。

[0168] 百分比对照(%对照)。在10nM浓度下筛选化合物,并将初步筛选结合相互作用的结果报告为“%对照”或“POC”,其中较小的数表明基质中的较强命中。%对照被定义为(等式1):

[0169] %对照＝100x(TS-CPOS)/(CNEG-CPOS) (等式1)

[0170] 其中TS是测试化合物信号,CPOS是阳性对照信号(0%对照),CNEG是DMSO阴性对照(100%对照)。

[0171] 结果。表2比较了15u和15u_D6之间的激酶组谱分析的结果。15u和15u_D6二者都对CDK8和CDK19具有高度选择性。虽然15u_D6对大多数脱靶激酶显示出稍微更大的抑制作用,但15u_D6对CDK8和CDK19的作用远大于15u的作用。15u对CDK8和CDK19的%对照分别为2.6和13。15u_D6对CDK8和CDK19的%对照分别为0.25和0。因此,15u和15u_D6之间的结构差异导致目标选择性的主要差异。

[0172] 表2:在2000nM下的15u和15u_D6的ScanMAX组

[0173]

Entrez 基因符号	15u (%对照)	15u_D6 (%对照)	Entrez 基因符号	15u (%对照)	15u_D6 (%对照)
AAK1	94	90	MAK	100	91
ABL1(E255K)-磷酸化	100	82	MAP3K1	84	90
ABL1(F317I)-非磷酸化	100	93	MAP3K15	97	92
ABL1(F317I)-磷酸化	88	84	MAP3K2	98	86
ABL1(F317L)-非磷酸化	99	100	MAP3K3	100	72
ABL1(F317L)-磷酸化	97	82	MAP3K4	90	100
ABL1(H396P)-非磷酸化	100	76	MAP4K2	84	66
ABL1(H396P)-磷酸化	94	77	MAP4K3	91	95
ABL1(M351T)-磷酸化	100	77	MAP4K4	100	93
ABL1(Q252H)-非磷酸化	94	83	MAP4K5	100	97
ABL1(Q252H)-磷酸化	94	75	MAPKAPK2	91	99
ABL1(T315I)-非磷酸化	100	85	MAPKAPK5	100	64
ABL1(T315I)-磷酸化	90	78	MARK1	100	100
ABL1(Y253F)-磷酸化	100	81	MARK2	100	96
ABL1-非磷酸化	95	78	MARK3	98	100
ABL1-磷酸化	90	77	MARK4	100	98

[0174]

ABL2	85	91	MAST1	92	92
ACVR1	100	100	MEK1	93	83
ACVR1B	100	99	MEK2	88	82
ACVR2A	95	92	MEK3	68	47
ACVR2B	100	86	MEK4	69	74
ACVRL1	99	100	MEK5	86	65
ADCK3	90	100	MEK6	100	96
ADCK4	95	83	MELK	75	84
AKT1	100	100	MERTK	89	100
AKT2	86	99	MET	99	92
AKT3	97	100	MET(M1250T)	100	96
ALK	81	78	MET(Y1235D)	100	100
ALK(C1156Y)	100	78	MINK	100	87
ALK(L1196M)	96	92	MKK7	100	85
AMPK-α1	100	100	MKNK1	94	79
AMPK-α2	80	95	MKNK2	83	69
ANKK1	100	91	MLCK	96	100
ARK5	57	77	MLK1	95	92
ASK1	100	100	MLK2	100	95
ASK2	90	88	MLK3	99	100
AURKA	98	99	MRCKA	94	100
AURKB	91	90	MRCKB	96	100
AURKC	100	100	MST1	100	98
AXL	99	96	MST1R	97	99
BIKE	100	96	MST2	100	84
BLK	100	92	MST3	97	84
BMPR1A	100	100	MST4	95	89
BMPR1B	100	62	MTOR	88	97
BMPR2	79	88	MUSK	94	82
BMX	93	100	MYLK	74	71
BRAF	100	96	MYLK2	100	100
BRAF(V600E)	100	84	MYLK4	100	94
BRK	100	99	MYO3A	100	100
BRSK1	86	97	MYO3B	87	100
BRSK2	100	100	NDR1	100	80
BTK	81	77	NDR2	99	36
BUB1	88	80	NEK1	80	96
CAMK1	83	95	NEK10	93	61
CAMK1B	100	70	NEK11	90	86
CAMK1D	87	93	NEK2	95	95
CAMK1G	99	99	NEK3	100	76

[0175]

CAMK2A	90	100	NEK4	100	95
CAMK2B	92	87	NEK5	94	100
CAMK2D	99	92	NEK6	92	100
CAMK2G	100	100	NEK7	100	86
CAMK4	96	79	NEK9	100	89
CAMKK1	96	100	NIK	100	97
CAMKK2	100	87	NIM1	56	78
CASK	71	96	NLK	98	98
CDC2L1	63	100	OSR1	100	88
CDC2L2	100	100	p38-α	93	99
CDC2L5	71	80	p38-β	100	97
CDK11 (CDK19)	**13**	**0**	p38-δ	96	97
CDK2	100	99	p38-γ	98	100
CDK3	92	97	PAK1	96	92
CDK4	73	71	PAK2	91	94
CDK4-细胞周期蛋白 D1	94	96	PAK3	80	40
CDK4-细胞周期蛋白 D3	95	97	PAK4	87	100
CDK5	84	94	PAK6	82	99
CDK7	100	78	PAK7	100	80
CDK8	**2.6**	**0.25**	PCTK1	92	64
CDK9	66	100	PCTK2	62	100
CDKL1	100	92	PCTK3	100	100
CDKL2	86	96	PDGFRA	70	65
CDKL3	100	100	PDGFRB	100	93
CDKL5	100	84	PDPK1	100	96
CHEK1	94	100	PFCDPK1（恶性疟原虫）	94	61
CHEK2	92	92	PFPK5（恶性疟原虫）	68	67
CIT	51	65	PFTAIRE2	100	80
CLK1	88	68	PFTK1	96	100
CLK2	75	83	PHKG1	94	97
CLK3	100	95	PHKG2	86	83
CLK4	59	66	PIK3C2B	89	87
CSF1R	98	95	PIK3C2G	94	82
CSF1R-自抑制	88	83	PIK3CA	100	79
CSK	86	92	PIK3CA(C420R)	100	86
CSNK1A1	**33**	**12**	PIK3CA(E542K)	92	74
CSNK1A1L	67	37	PIK3CA(E545	100	92

[0176]

			A)		
CSNK1D	**20**	**22**	PIK3CA(E545K)	96	91
CSNK1E	**25**	**12**	PIK3CA(H1047L)	94	80
CSNK1G1	90	80	PIK3CA(H1047Y)	79	100
CSNK1G2	77	69	PIK3CA(I800L)	97	74
CSNK1G3	95	80	PIK3CA(M1043I)	96	95
CSNK2A1	100	59	PIK3CA(Q546K)	66	72
CSNK2A2	92	100	PIK3CB	100	95
CTK	92	100	PIK3CD	94	71
DAPK1	92	88	PIK3CG	79	76
DAPK2	75	85	PIK4CB	65	33
DAPK3	81	83	PIKFYVE	91	98
DCAMKL1	100	89	PIM1	88	100
DCAMKL2	100	100	PIM2	85	89
DCAMKL3	91	100	PIM3	89	98
DDR1	82	90	PIP5K1A	100	100
DDR2	80	52	**PIP5K1C**	**64**	**25**
DLK	93	89	PIP5K2B	92	95
DMPK	97	97	PIP5K2C	80	64
DMPK2	93	94	PKAC-α	95	100
DRAK1	100	100	PKAC-β	83	100
DRAK2	100	87	PKMYT1	91	94
DYRK1A	**50**	**22**	PKN1	96	100
DYRK1B	69	100	PKN2	100	100
DYRK2	100	97	PKNB（结核分支杆菌）	100	90
EGFR	100	87	PLK1	95	89
EGFR(E746-A750del)	100	100	PLK2	100	86
EGFR(G719C)	97	100	PLK3	86	90
EGFR(G719S)	100	100	PLK4	95	92
EGFR(L747-E749del, A750P)	99	100	PRKCD	100	92
EGFR(L747-S752del, P753S)	99	100	PRKCE	93	97
EGFR(L747-T751del,Sins)	87	100	PRKCH	80	96

[0177]

EGFR(L858R)	99	93	PRKCI	100	100
EGFR(L858R,T790M)	100	87	PRKCQ	90	87
EGFR(L861Q)	78	100	PRKD1	88	92
EGFR(S752-I759del)	86	100	PRKD2	56	90
EGFR(T790M)	98	87	PRKD3	94	100
EIF2AK1	93	78	PRKG1	88	100
EPHA1	92	95	PRKG2	98	90
EPHA2	95	100	PRKR	100	100
EPHA3	100	87	PRKX	94	95
EPHA4	100	100	PRP4	100	88
EPHA5	89	96	PYK2	97	84
EPHA6	100	100	QSK	89	97
EPHA7	92	81	RAF1	97	100
EPHA8	94	83	RET	93	86
EPHB1	88	88	RET(M918T)	98	98
EPHB2	99	95	RET(V804L)	100	100
EPHB3	96	94	RET(V804M)	100	100
EPHB4	100	100	RIOK1	100	100
EPHB6	95	89	**RIOK2**	**35**	**3.9**
ERBB2	100	89	RIOK3	100	95
ERBB3	100	88	RIPK1	99	100
ERBB4	85	100	RIPK2	100	93
ERK1	100	97	RIPK4	89	68
ERK2	78	92	RIPK5	100	72
ERK3	88	94	ROCK1	77	67
ERK4	72	100	ROCK2	100	80
ERK5	59	98	ROS1	95	100
ERK8	98	99	RPS6KA4(激酶结构域 1-N-末端)	96	100
ERN1	100	80	RPS6KA4(激酶结构域 2-C-末端)	100	74
FAK	100	96	RPS6KA5(激酶结构域 1-N-末端)	75	100
FER	99	100	RPS6KA5(激酶结构域 2-C-末端)	95	100
FES	100	100	RSK1(激酶结	98	96

[0178]

			构域 1-N-末端)		
FGFR1	98	92	RSK1(激酶结构域 2-C-末端)	100	86
FGFR2	99	98	RSK2(激酶结构域 1-N-末端)	90	64
FGFR3	98	99	RSK2(激酶结构域 2-C-末端)	94	92
FGFR3(G697C)	95	100	RSK3(激酶结构域 1-N-末端)	99	77
FGFR4	100	96	RSK3(激酶结构域 2-C-末端)	100	89
FGR	100	100	RSK4(激酶结构域 1-N-末端)	78	80
FLT1	100	100	RSK4(激酶结构域 2-C-末端)	94	79
FLT3	94	86	S6K1	95	89
FLT3(D835H)	63	76	SBK1	100	83
FLT3(D835V)	**33**	**14**	SGK	86	83
FLT3(D835Y)	46	100	SgK110	95	100
FLT3(ITD)	82	72	SGK2	100	81
FLT3(ITD,D835V)	41	34	SGK3	79	80
FLT3(ITD,F691L)	95	75	SIK	84	79
FLT3(K663Q)	96	91	SIK2	96	100
FLT3(N841I)	90	86	SLK	56	54
FLT3(R834Q)	100	68	SNARK	100	78
FLT3-自抑制	72	77	SNRK	100	75
FLT4	92	98	SRC	100	96
FRK	100	97	SRMS	81	93
FYN	99	97	SRPK1	100	97
GAK	88	94	SRPK2	93	100
GCN2(激酶结构域 2,S808G)	73	88	SRPK3	65	96
GRK1	98	81	STK16	80	87
GRK2	88	70	STK33	100	100
GRK3	99	87	STK35	87	93
GRK4	62	98	STK36	100	100
GRK7	100	92	STK39	93	94
GSK3A	31	34	SYK	95	100
GSK3B	79	77	TAK1	93	62
HASPIN	**20**	**8.9**	TAOK1	100	73

[0179]

HCK	96	96	TAOK2	92	93
HIPK1	86	71	TAOK3	98	73
HIPK2	100	81	TBK1	99	97
HIPK3	77	81	TEC	91	81
HIPK4	100	100	TESK1	83	100
HPK1	98	100	TGFBR1	100	100
HUNK	99	100	TGFBR2	100	100
ICK	84	66	TIE1	90	96
IGF1R	92	91	TIE2	72	100
IKK-α	77	90	TLK1	97	85
IKK-β	89	71	TLK2	100	97
IKK-ε	100	100	TNIK	100	91
INSR	97	80	TNK1	100	100
INSRR	99	89	TNK2	100	100
IRAK1	94	84	TNNI3K	100	100
IRAK3	93	89	TRKA	93	78
IRAK4	89	78	TRKB	88	78
ITK	88	87	TRKC	91	85
JAK1(JH1 结构域-催化)	57	82	TRPM6	100	80
JAK1(JH2 结构域-假激酶)	89	89	TSSK1B	80	99
JAK2(JH1 结构域-催化)	100	93	TSSK3	93	100
JAK3(JH1 结构域-催化)	83	80	TTK	83	80
JNK1	68	30	TXK	93	100
JNK2	99	54	TYK2(JH1 结构域-催化)	95	82
JNK3	91	44	TYK2(JH2 结构域-假激酶)	73	59
KIT	95	95	TYRO3	100	100
KIT(A829P)	97	51	ULK1	96	72
KIT(D816H)	91	66	ULK2	90	83
KIT(D816V)	93	79	ULK3	96	79
KIT(L576P)	96	75	VEGFR2	67	84
KIT(V559D)	98	91	VPS34	85	65
KIT(V559D,T670I)	100	96	VRK2	84	56
KIT(V559D,V654A)	100	100	WEE1	100	88
KIT-自抑制	90	90	WEE2	97	88
LATS1	89	97	WNK1	100	93
LATS2	94	31	WNK2	96	94
LCK	91	100	WNK3	97	100

[0180]

LIMK1	100	100	WNK4	60	98
LIMK2	91	98	YANK1	89	97
LKB1	100	87	YANK2	89	84
LOK	84	69	YANK3	81	97
LRRK2	94	70	YES	99	100
LRRK2(G2019S)	90	76	YSK1	76	98
LTK	90	77	YSK4	74	53
LYN	100	98	ZAK	94	100
LZK	100	87	ZAP70	95	87

[0181] 然后通过在DiscoverX分析中测量15u的Kd值,进一步研究在该筛选中显示被2,000nM 15u对于所有激酶>65％抑制的作用(CDK8、CDK19、RIOK2、CSNK1A1、CSNK1E、SCNK1D、HASPIN、GSK3A)。重复进行Kd分析,结果显示在表3中。该表也显示了15w对CDK8、CDK19和RIOK2的Kd测定结果。

[0182] 表3.在与敏感激酶的Kd Elect结合分析中,对于15u和15w的Kd值。

[0183]

化合物名称	DiscoveRx 基因符号	Entrez 基因符号	K_d (nM)
15u	CDK11	CDK19	65
15u	CDK8	CDK8	78
15u	RIOK2	RIOK2	240
15u	CSNK1A1	CSNK1A1	230
15u	CSNK1D	CSNK1D	860
15u	CSNK1E	CSNK1E	280
15u	HASPIN	GSG2	1100
15u	GSK3A	GSK3A	5600
15w	CDK11	CDK19	18
15w	CDK8	CDK8	55
15w	RIOK2	RIOK2	130

[0184] 值得注意的是,15u和15w的CDK8和CDK19 K_d值几乎比其基于细胞的分析中的CDK8/19抑制的IC50值高一个数量级(图1A和1B),表明对ATP类似物结合的竞争不完全反映这些化合物的抑制活性。被15u以以小于4倍高于CDK8的K_d值抑制的主要其他激酶是RIOK2(也被15w强抑制)。CSNK1A1和CSNK1E未针对15w进行测试。

[0185] 显著地,报道的证据表明,抑制这三种激酶对癌症治疗可以是有益的而不是有害的。因此,RIOK2,一种调节核糖体生物发生的非典型激酶,被确定为选择性地抑制携带在许多前列腺癌中激活ERG基因的致癌基因融合的前列腺癌细胞系生长的化合物的靶标。相同的RIOK2结合化合物对正常前列腺或内皮细胞或ERG阴性肿瘤细胞系仅有最小的影响(Mohamed,AA等人,Cancer Res.2018Jul 1;78(13):3659-3671.doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-2949)。CSNK1A1已被认为多种白血病和实体瘤中的致癌因素(Mannis,S.等人J Hematol Oncol.2017Oct 2;10(1):157.doi:10.1186/s13045-017-0529-5;Richter,J.等人,BMC Cancer.2018Feb 6;18(1):140.doi:10.1186/s12885-018-4019-0),并且CSNK1A1抑制剂与亲溶酶体剂协同作用,在KRAS驱动的癌症中抑制生长和促进肿瘤细胞死亡(Cheong,J.K.等人,J Clin Invest.2015Apr;125(4):1401-18.doi:10.1172/

JCI78018)。据报道,CSNK1E抑制在若干类型的肿瘤细胞中具有选择性抗增殖活性(Yang,WS,等人,Genome Biol.2008;9(6):R92.doi:10.1186/gb-2008-9-6-r92;Kim,S.Y.等人,PLoS One.2010Feb 1;5(2):e8979.doi:10.1371/journal.pone.0008979;Toyoshima,M.,等人,Proc Natl Acad Sci U S A.2012Jun 12;109(24):9545-50.doi:10.1073/pnas.1121119109;Varghese,R.T.,等人,Sci Rep.2018Sep 11;8(1):13621.doi:10.1038/s41598-018-31864-x.)。因此,除了CDK8/19抑制外,15u对癌症治疗还具有意想不到的活性。

[0186] 实施例3.噻吩并吡啶衍生物的药代动力学

[0187] 药代动力学(PK)分析。为了测量小鼠药代动力学(PK),将噻吩并吡啶衍生物溶于5%葡萄糖中,并在不同给药条件下给予雌性FVB小鼠;在不同时间点收集血液样品,通过LC/MS/MS测量血清中的化合物浓度。

[0188] PK结果。图2A-2D和表4显示了15k、15v和15u的PK曲线和计算的参数,15k、15v和15u被混合并以每种化合物0.5mg/kg静脉内(i.v.)施用给小鼠。在该分析中,如曲线下面积(AUC)和消除半衰期($t_{1/2}$)的值所示,15u显示了最高的i.v.利用度,15k显示了最低的i.v.利用度。

[0189] 表4:静脉内给予15k、15v和15u的药代动力学的比较

[0190]

	15k	15v	15u
C_0(ng/mL)	168.0	233.9	328.3
V_d(L/kg)	2.98	2.14	1.52
消除率(hr^{-1})	4.59	4.33	4.03
$t_{1/2}$(hr)	0.15	0.16	0.17
AUC(ng*hr/mL)	40.81	61.23	92.13

[0191] 图3A-3C和表5显示了以每种化合物1mg/kg口服(灌胃)施用的15k、15v和15u的同样的混合物的PK曲线和计算的参数。在图3D中显示的单独的研究中,也以1mg/kg口服施用了15w。在这些分析中,15u显示了迄今为止最高的利用度(AUC值),接着是15w、15v和15k。SnxB显示了与15w类似的AUC(图3E)。

[0192] 表5.口服施用15k、15v、15u和15w的药代动力学的比较

[0193]

	15k	15v	15u	15w
C_{max}(ng/mL)	6.7	7.2	35.1	35.0
$t_{1/2}$(hr)	0.3	1.2	1.3	0.3
AUC(ng*hr/mL)	7.6	21.8	79.3	29.2
生物利用度(F%)	9%	18%	43%	

[0194] 还在更高剂量下确定口服PK,其接近预期的治疗剂量,对于两种活性最好的化合物15w和15u的混合物,在0.5%羧甲基纤维素中以每种化合物30mg/kg施用给雌性CD1小鼠。图4A和4B中显示的结果证明15u(而不是15w)显示了优异的PK,具有高AUC(是15w的AUC的6.9倍)和非常慢的清除,因为在最后的时间点(8小时),15u的平均血清浓度为C_{max}的64.4%(相比之下,15w为11.5%)。

[0195] 该PK分析表明,测试的噻吩吡啶衍生物中的单独的15u显示出高度引人注意的PK性质,口服给药后具有非常高的生物利用度和稳定性。

[0196] 实施例4. 15u和15w的氘代衍生物的药代动力学曲线

[0197] 为了确定15u和15w的氘代衍生物的PK,用30mg/kg的15u或15u-D6,或16或18mg/kg的15w、15w-D2、15w-D6在溶液中通过口服灌胃处理八至十二周龄的雌性CD-1小鼠。在不同时间点(给药后1、2、6、8小时),用肝素化的微量红细胞比容毛细管从麻醉的动物的眼眶后静脉中将血液样品(70～100μL)收集到BD Microtainer血液收集管中,用于血清分离。处理血清样品用于LCMSMS,使用化合物特异性的MRM(15u:439-394;15u-D6:445-394;15w:453-436;15w-D2:455-438;15w-D6:459-442)确定药物浓度。用GraphPad软件将药物浓度对时间点作图以生成PK曲线,并用Excel软件计算给药后的前8小时内的AUC(曲线下面积),以比较未氘代和氘代化合物的PK曲线。这两个PK研究表明,用氘替代二甲胺基团的氢(D6衍生物)略微改善了15u的PK(图5A),并较大改善了15w的PK(图5B)。与D6相比,D2衍生物没有改善15w的PK(图5B)。

[0198] 实施例5. 15u在去势难治性前列腺癌症中的体内作用。

[0199] CDK8/19抑制降低了特定雄激素受体(AR)可诱导基因的表达,包括前列腺癌最常见的标志物PSA,以及去势-难治性前列腺癌(CRPC)生长。图6A-6C显示了不同浓度的三种CDK8/19抑制剂,噻吩并吡啶衍生物15u和15w以及Senexin B,对在补充FBS的常规介质中处理4天的CRPC细胞系C4-2的细胞培养上清液中PSA表达的影响。所有3种抑制剂均抑制PSA表达,其中15u的IC50值为27.6nM,15w为15.7nM,Senexin B为255nM。

[0200] 以30mg/kg每天口服给药4天,处理携带C4-2异种移植物的雄性NSG小鼠(基于初始血清PSA水平分组)4天后,分析15u和15w的混合物(用于实施例3中PK研究的相同混合物)对C4-2细胞的PSA表达的体内作用。通过用15u和15w的混合物处理,血清中PSA蛋白水平和肿瘤中PSA mRNA水平都强烈降低(图6D-6F)。鉴于15u和15w的截然不同的PK(实施例3),似乎对PSA的作用可能是由15u介导的。

[0201] 在另一个体内研究中,CRPC细胞系22rv1作为异种移植物在阉割的雄性裸鼠中生长。当肿瘤达到平均尺寸为150-200mm^3时,将小鼠随机分为两组(n＝13),并通过每天口服给予溶媒(0.5％羧甲基纤维素)对照或50mg/kg 15u进行处理。如图7A所示,15u处理强烈抑制肿瘤生长,也如研究结束时肿瘤重量所示(图7B)。值得注意的是,15u处理没有显示出明显的不良反应,并且小鼠体重未降低(图7C)。

[0202] 实施例6. 15u对乳腺癌转移的影响

[0203] 4T1是鼠三阴性乳腺癌(TNBC)细胞系,其对肺部具有高度转移性。CDK8对该模型中肺转移的影响示于图8A-8C中所显示的研究中。靶向CDK8的shRNA用于在4T1细胞中几乎完全敲低CDK8表达(图8A;这些细胞不表达可检测的CDK19蛋白)。亲代和CDK8敲低的4T1细胞(n＝10)在乳腺脂肪垫中原位注射,并在17天后去除原发性肿瘤。手术后,所有小鼠最终都死于肺转移。原发性肿瘤的重量显示CDK8敲低对肿瘤生长没有显著影响(图8B)。然而,CDK8的缺失与小鼠存活的强烈增加有关(图8C)。

[0204] 在类似的研究中,在将原发性肿瘤去除之后,将小鼠分成三组(图8D,n＝8),然后用溶媒(5％葡萄糖)或15u(25mg/kg,在5％羧基甲基纤维素中,口服,b.i.d.)处理。15u显著提高了转移性疾病的小鼠存活(图8E),其作用类似于CDK8敲低的作用(图8C)。

[0205] 在该模型的另一个研究中,去除由亲代4T1细胞形成的肿瘤,并将小鼠随机分为两组(图8F,n＝8),用Senexin B处理(如(Liang,2018)所述在掺药食物(350ppm)中与一个口

服剂量50mg/kg组合施用)或接受对照食物和溶媒。Senexin B处理提供了统计学显著但适度增加的存活(图8G)。

[0206] 总之,15u的有利的PK(实施例3)及其体内活性(实施例4、5)以及其有利的激酶组谱曲线(实施例2)表明15u是用于治疗与CDK8/19活性相关的癌症的有效的CDK8/19抑制剂和组合物。

[0207] 实施例7. 15u和恩杂鲁胺组合治疗在去势难治性前列腺癌中的体内作用

[0208] 在小鼠MYC-Cap-CR模型中分析了15u和抗雄激素恩杂鲁胺在CRPC中的组合效果。针对去势抗性从由AR响应性启动子表达MYC的基因工程化MYC-CaP细胞(Watson PA,等人,2005.Cancer Res 65(24):11565-11571)中选择MYC-CaP-CR细胞(Ellis L.等人,2012.Prostate 72(6):587-591)。这些细胞中的去势抗性与全长AR的过表达相关,而不与AR变体,例如22rv1中的AR-V7相关(Olson BM,等人,2017.Cancer immunology research 5(12):1074-1085)。在短期细胞增殖分析中,CDK8/19抑制剂Senexin B和15u对在含雄激素介质中的MYC-CAP-CR细胞生长显示很小的作用,而恩杂鲁胺反常地刺激这些细胞的生长(图9A)。然而,当恩杂鲁胺与CDK8/19抑制剂中的任一个组合时强烈抑制MYC-CAP-CR细胞生长(图9A),表明CDK8/19抑制可以克服恩杂鲁胺抗性。在长期克隆形成分析中,恩杂鲁胺和CDK8/19抑制剂二者均降低MYC-CaP-CR集落形成,并且它们的组合产生了明显的协同作用(图9B)。在完整(未去势的)FVB雄性小鼠中皮下生长的MYC-CaP-CR肿瘤中,测试15u与恩杂鲁胺组合的体内作用。当单独使用时,单独的恩杂鲁胺和15u二者对肿瘤体积(图9C)和重量(图9D)具有适度作用,但它们的组合产生显著(p=0.02)的肿瘤抑制。

[0209] 这些结果表明,15u可以有利地与恩杂鲁胺(或其他抗雄激素剂)组合治疗CRPC。在表达AR-V7的22rv1细胞中观察到在CRPC中作为单一药剂的15u的最强体内活性,表明表达AR-V7和可能的其他不依赖雄激素的AR变体的前列腺癌可以在体内对CDK8/19抑制特别敏感。

[0210] 实施例8.噻吩并吡啶衍生物的抗白血病作用

[0211] 在急性髓系白血病(AML)细胞系MV4-11中研究了15u的抗白血病性能,该细胞系之前显示在体外和体内对CDK8/19抑制敏感(Pelish HE,等人,2015.Nature 526(7572):273-276)。通过用pHIV-Luc-ZsGreen的慢病毒感染,使用于体内研究的MV4-11细胞群体表达荧光素酶和ZsGreen,以通过生物发光成像(BLI)进行白血病生长分析。用荧光激活细胞分选,分选ZsGreen阳性的初始荧光素酶-ZsGreen转导的细胞群。测试该MV4-11细胞群对15u的敏感性。15u强烈抑制MV4-11增殖,并被视为是抗增殖的,其中IC50值为25nM(图10A)。

[0212] 分析方案。对于体内研究,7周龄雌性NSG小鼠(Jackson实验室)在尾静脉中注射了$2x10^6$个表达荧光素酶的MV4-11细胞。移植后,在细胞接种后5天后对接种小鼠进行BLI。在BLI之后,将小鼠分成10只小鼠的两个匹配群组和一个5只小鼠的群组。使用IVIS Lumina II系列硬件进行BLI检测,用任选的XFOV镜头和活体图像软件进行体内成像。用于将小鼠分类为群组的IVIS设置被设定为高灵敏度:Bin 8,F1.2,180秒。为增加的分辨率设定后续曝光(第1-5周):Bin 4,F1.2,120秒。

[0213] 在细胞接种后第6天开始处理,并持续23天。10只小鼠通过灌胃(200μl)仅接受溶媒(5%羧基甲基纤维素)。10只小鼠通过每天两次灌胃(200μl)接受30mg/kg悬浮在溶媒中的15u。在由Envigo((Madison,Wi)制备的定制Teklad饮食中,用含有1g/kg的15u的掺药食

物(食物(chow))处理5只小鼠。除了添加的染料和15u以外,该饮食与用于普通小鼠喂养的饮食相匹配。对照MV4-11异种移植的小鼠(溶媒)发展出如BLI所检测的巨大肿瘤群(图10B-10C)。15u灌胃处理组显示出显著的响应,具有白血病生长的94%的生长抑制,p=0.001。15u食物处理组显示出甚至更显著的白血病抑制,具有白血病生长的99.7%的抑制,p=0.002。监测处理后小鼠的存活。

[0214] 结果。如图10D所示,通过口服灌胃15u处理的小鼠显示出优异的存活率。

[0215] 实施例9. 15u对MDA-MB-468三阴性乳腺癌(TNBC)异种移植物体内生长的作用

[0216] 人MDA-MB-468三阴性乳腺癌(TNBC)细胞被发现在体外长期处理后对15u和其他CDK8/19抑制剂具有响应性。为了评价CDK8/19抑制对MDA-MB-468异种移植物的体内生长的作用,将100万个细胞与40%基质胶(Matrigel)(100ml总体积)皮下注射到免疫缺陷NSG雌性小鼠(9周龄)的右侧腹中。接种后11天后,通过肿瘤尺寸将小鼠随机分成两组(n=9),每组中的平均肿瘤体积为115mm^3。第一组(对照)中的小鼠接受常规饮食,第二组(处理)中的小鼠接受含有250ppm 15u的掺药饮食。处理开始后13天,在处理组中对掺药饮食补充提供5mg/kg的15u溶液的每日口服灌胃,或单独补充溶媒(对照组)。处理开始后37天,处理组中的灌胃剂量增加至8mg/kg;继续处理总共66天。每周两次用卡尺测量肿瘤体积(图11A),显示在15u处理组中肿瘤体积显著降低。在研究结束时,对小鼠进行了安乐死,解剖肿瘤并称重;在15u处理组中肿瘤重量显著较低(图11B)。小鼠体重(图11C)显示长期15u处理没有不利影响。

[0217] 实施例10.CD-1小鼠中15u的最大耐受剂量(MTD)的确定

[0218] 为了确定最大耐受剂量(MTD),将8周龄的雄性或雌性CD-1小鼠随机分配给不同剂量组,并通过在溶液口服灌胃或掺药食物,用升级剂量的15u处理。在一个MTD体内研究中,通过每天两次(b.i.d.)灌胃处理雌性CD-1小鼠,提供5、10、15、30、60或120mg/kg的15u,并且通过灌胃b.i.d.处理雄性CD-1小鼠,提供60或120mg/kg,持续14天。在任何处理组(60和120mg/kg b.i.d.)的雄性小鼠中,和用剂量高达60mg/kg b.i.d的15u处理的组的雌性小鼠中,没有观察到不利影响(图12A)。在处理7-10天后,最高剂量(120mg/kg b.i.d.)在雌性小鼠中引起约10%的体重减轻,但直到其余的处理期未观察到进一步恶化(图12A)。

[0219] 在另一个长期MTD体内分析中,用常规饮食(对照)或15u掺药饮食(500ppm或1000ppm)饲养雄性和雌性CD-1小鼠组4或5周(图12B)。基于每日饮食消耗,估计500ppm和1000ppm组的每日剂量分别为约50-100mg/kg和100-200mg/kg。在第一周内,只有最高剂量(1000ppm)导致雌性小鼠的重量显著减轻(5-10%),而在其余的处理期没有观察到进一步的不利影响。

[0220] 考虑到可以在各种小鼠异种移植模型中以30mg/kg的每日剂量实现最大治疗作用,这两种MTD分析表明15u的高治疗指数。

[0221] 实施例11.噻吩并吡啶和和吡咯并吡啶与CDK8结合的计算机建模

[0222] 使用薛定谔诱导契合对接产生用于化合物15u、15w、15w_APP、15_PP和15u_CN与CDK8结合的对接模型。诱导契合方案用Glide对接活性配体,然后生成配体姿态的多样化集合,该程序使用减少的范德华半径和增加的库伦-vdW截止值,在对接步骤期间暂时去除高度柔性的侧链。对于每种姿态,随后使用Prime结构预测通过重新定向附近的侧链来容纳配体。然后最小化这些残基和配体。最后,每种配体被重新对接到其相应的低能量蛋白质结构

中,并根据Glide得分排序产生的复合物。该模型用于指导以下预测的新颖结构的设计。

[0223] 图13显示了15u、15w、15w_APP、15w_PP和15w_CN与CDK8的结合模式的叠加。结果表明不同噻吩并吡啶和吡咯并吡啶之间的结合的相似性。15u和15w与15w_APP的比较表明替换硫的-NH-基团不会改变结合模式。此外,15w_App为CDK8的铰链区提供额外的H键给体。PP化合物显示与APP类似物类似的结合相互作用。对接模型预测-NH-为CDK8的铰链区提供额外的H键供体,增加了效力,同时补偿3-氨基基团的损失。15u_CN与15u和15w的比较表明甲腈产生与酰胺相似的相互作用。

[0224] 实施例12.构效关系

[0225] 表6总结了本文所述的组合物的构效关系。为了确定抑制效力,进行如实施例1中描述的NFκB活性分析(HEK238-NFκB-Luc分析)和如实施例8中描述的MV4-11分析(MV4-11-Luc分析)。为了确定PK,用指定剂量(15～30mg/kg)的测试抑制剂在溶液制剂(10％N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)、27％丙二醇(PG)、63％聚乙二醇400(PEG-400))中通过口服灌胃处理八至十二周龄雌性CD-1小鼠。在不同时间点(给药后1、2、6、8小时),用肝素化的微量红细胞比容毛细管从麻醉的动物的眼眶后静脉中将血液样品(70～100μL)收集到BD Microtainer血液收集管中,用于血清分离。处理血清样品用于LCMSMS,使用化合物特异性的MRM(15u:439-394;15u-D6:445-394;15w:453-436;15w-D2:455-438;15w-D6:459-442;6264:483-394;6300:480-380;6304:453-408)确定药物浓度。用GraphPad软件将药物浓度对时间点作图以生成PK曲线,并用Excel软件计算给药后的前8小时内的AUC(曲线下面积),以比较不同化合物的PK曲线。

[0226]

表 6. 构效关系

其中 X 是—$(CH_2)_n$—

名称	Q	R^3	R^2	n	R^1	R^4	抑制效力		口服 PK 剂量	AUC (0-8 小时)
							HEK238-NFkB-Luc 分析	MV4-11-Luc 分析		
15k	S	$CONH_2$	NH_2	0	H	H	50.6 nM			
15n	S	$CONH_2$	NH_2	0	CH_3	H	43.1 nM			
15q	S	$CONH_2$	NH_2	0	OCH_3	H	37.8 nM			
15u	S	$CONH_2$	NH_2	0	N,N-二甲基甲酰胺	H	10.3 nM	30 nM	30 mg/kg	6.6 μg*hr/mL
15u_D6	S	$CONH_2$	NH_2	0	N,N-二(甲基-d3)甲酰胺	H	7.7nM		30 mg/kg	7.4 μg*hr/mL

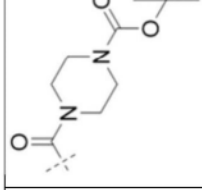
[0227]

15v	S	$CONH_2$	NH_2	0	N-甲基甲酰胺	H	23.1 nM		16 mg/kg	0.40 μg *hr/mL
15w	S	$CONH_2$	NH_2	0	N,N-二甲基乙酰胺	H	4.1 nM		18 mg/kg	0.38 μg *hr/mL
15w_D2	S	$CONH_2$	NH_2	0	N,N-二甲基乙酰胺-2,2-d2	H	8.8 nM		16 mg/kg	0.77 μg *hr/mL
15w_D6	S	$CONH_2$	NH_2	0	N,N-二(甲基-d3)乙酰胺	H	3.8 nM			
6263	S	$CONH_2$	NH_2	0	N-(3-羟丙基)甲酰胺	H	169 nM	83 nM	25 mg/kg	0.47 μg *hr/mL
6264	S	$CONH_2$	NH_2	0	N-(3-羟丙基)-N-甲	H	37 nM	31 nM		

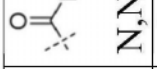
[0228]

6293	S	$CONH_2$	NH_2	0	N-(3-氨基丙基)-N-甲基甲酰胺	H	50 nM			
6292	S	$CONH_2$	NH_2	0	(3-(N-甲基甲酰氨基)丙基)氨基甲酸叔丁酯	H	594 nM		30 mg/kg	0.21 μg *hr/mL
6300	S	$CONH_2$	NH_2	0	(4-甲基哌嗪-1-基)亚甲基	H	4.9 nM			
6268	S	$CONH_2$	NH_2	0	4-甲基哌嗪-1-甲醛	H	31 nM	42 nM		
6269	S	$CONH_2$	NH_2	1	N,N-二甲基甲酰胺	H	1 uM	683 nM		

[0229]

6270	S	$CONH_2$	NH_2	0	 4-甲酰基哌嗪-1-甲酸叔丁酯	H		40 nM	
6271	S	$CONH_2$	NH_2	0	哌嗪-1-甲醛	H	233 nM	79 nM	
6296	S	$CONH_2$	H	0	N,N-二甲基甲酰胺	H	>1000 nM		
6284	N	$CONH_2$	H	0	N,N-二甲基甲酰胺	H	>1000 nM		
6307	N	$CONH_2$	NH_2	0	N,N-二甲基甲酰胺	H	>1000 nM		
6318	O	$CONH_2$	NH_2	0	N,N-二甲基甲酰胺	H	>1000 nM		

[0230]

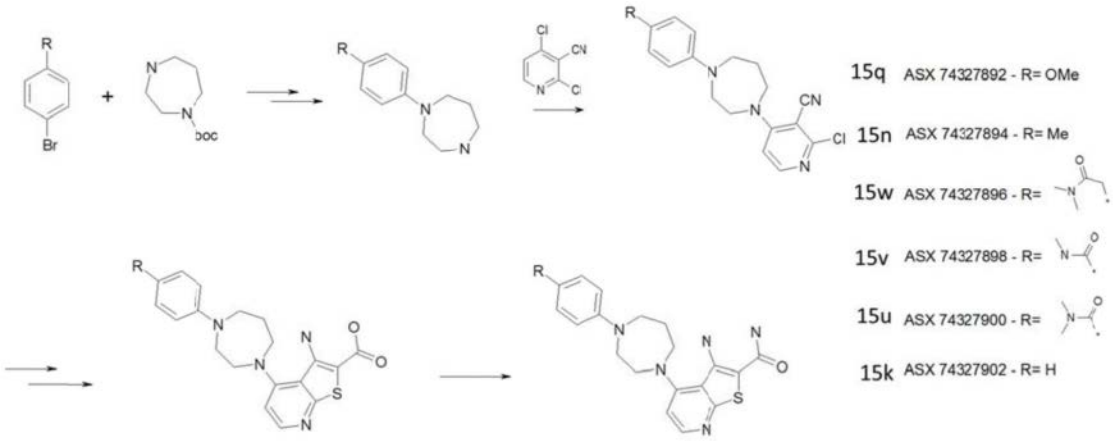
6304	S	$CONH_2$	NH_2	0	 N,N-二甲基甲酰胺	CH_3	13.6 nM		16 mg/kg	2.2 μg*hr/mL
6298	S	CN	NH_2	0	N,N-二甲基甲酰胺	H	379 nM			

[0231] 实施例13.合成方案

[0232] 方案1显示了用于制备本文公开的化合物的通用合成程序。下面提供具体化合物

的制备。

[0233] 方案1.噻吩并吡啶衍生物的小规模合成。

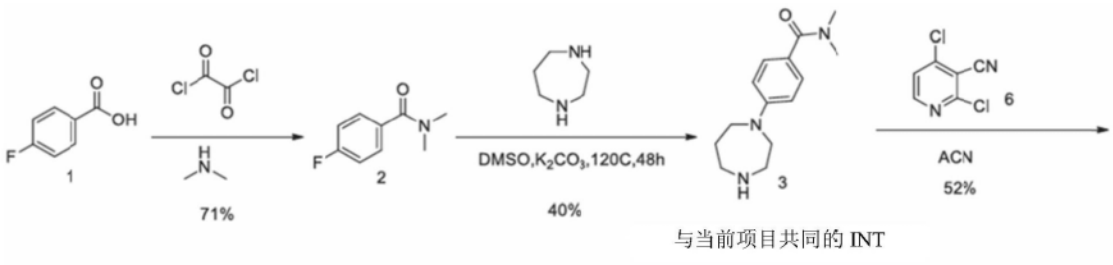


[0234]

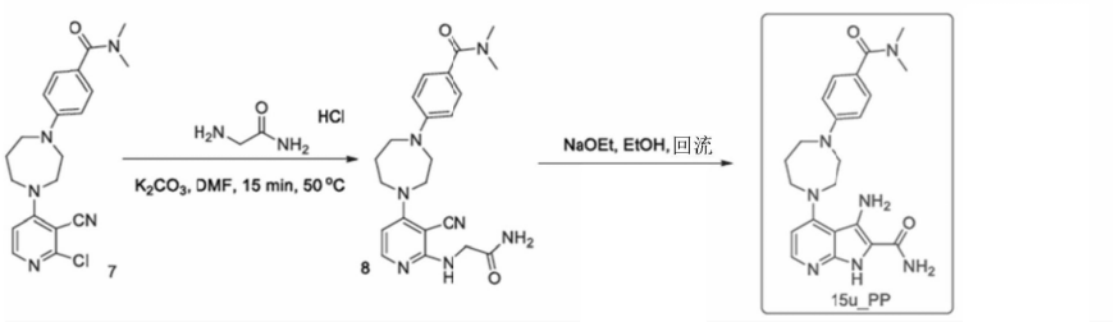
[0235] 制备噻吩并吡啶化合物的供选择的方案公开于Saito,K.等人,Bioorg Med Chem 2013,21,1628-42。

[0236] 方案2显示了用于制备吡咯并吡啶的合成方案,例如15u_PP。本领域技术人员可以改变方案1和2以制备呋喃并吡啶。

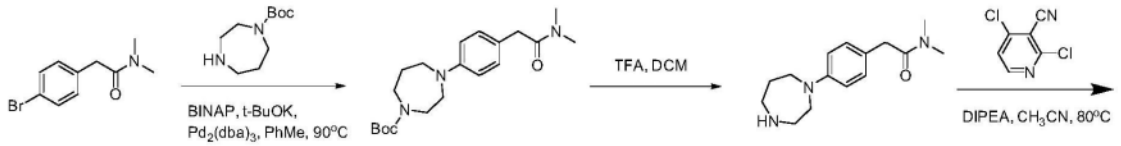
[0237] 方案2. 15u_PP的合成



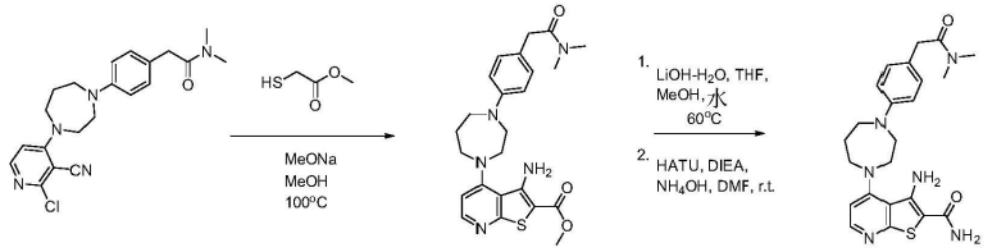
[0238]



[0239] 3-氨基-4-(4-(4-(2-(二甲氨基)-2-氧代乙基)苯基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-2-甲酰胺(15w)的合成

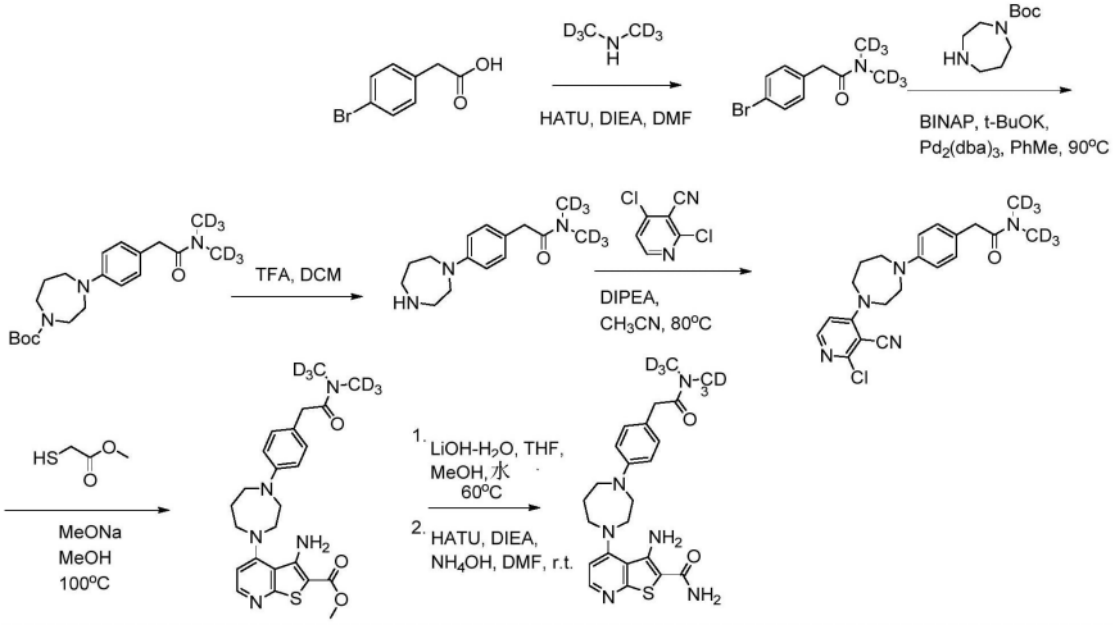


[0240]



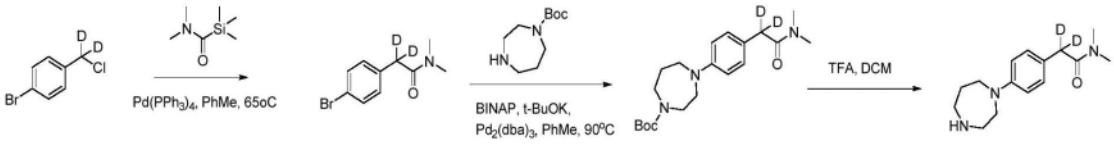
[0241] 向2-(4-溴苯基)-N,N-二甲基-乙酰胺(1当量)和1,4-二氮杂环庚烷-1-甲酸叔丁酯(1.2当量)于t-BuOH和1,4-二氧六环的溶液中加入2-二环己基膦基-2′-(N,N-二甲氨基)联苯(0.15当量)、t-BuONa(1.4当量)和三(二亚苄基丙酮)二钯(0.05当量)。将混合物脱气,用氮气保护,然后回流1h。之后,将混合物冷却至室温(r.t.),加入水,用EA萃取混合物,用盐水洗有机层,用Na_2SO_4干燥,浓缩,用快速柱纯化得到4-[4-[2-(二甲氨基)-2-氧代-乙基]苯基]-1,4-二氮杂环庚烷-1-甲酸叔丁酯(产率92%),ESI-MS m/z:362([M+H]$^+$);然后向4-[4-[2-(二甲氨基)-2-氧代-乙基]苯基]-1,4-二氮杂环庚烷-1-甲酸叔丁酯(1当量)的DCM溶液中加入TFA(5当量),并在室温下搅拌混合物3h,之后,浓缩混合物以除去TFA,产生的2-(4-(1,4-二氮杂环庚烷-1-基)苯基)-N,N-二甲基乙酰胺不经进一步纯化即可使用,ESI-MS m/z:262([M+H]$^+$).;向2-(4-(1,4-二氮杂环庚烷-1-基)苯基)-N,N-二甲基乙酰胺(1当量)的乙腈溶液中加入2,4-二氯烟氰(1当量)和DIPEA(2当量)。然后将混合物在80℃下搅拌过夜。之后,将混合物冷却至室温并浓缩,然后将混合物溶于DCM,加入水,用DCM萃取混合物,收集有机层,用盐水洗,用Na_2SO_4干燥,浓缩,用快速柱纯化得到2-(4-(4-(2-氯-3-氰基吡啶-4-基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)苯基)-N,N-二甲基乙酰胺(产率55%),ESI-MS m/z:398([M+H]$^+$);向2-(4-(4-(2-氯-3-氰基吡啶-4-基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)苯基)-N,N-二甲基乙酰胺(1当量)的MeOH溶液中加入MeONa(2当量)和巯基乙酸甲酯(2当量),然后将混合物在100℃下搅拌过夜。之后,将混合物冷却至室温,浓缩,用快速柱纯化得到3-氨基-4-(4-(4-(2-(二甲氨基)-2-氧代乙基)苯基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-2-甲酸甲酯(产率72%),ESI-MS m/z:468([M+H]$^+$);然后向3-氨基-4-(4-(4-(2-(二甲氨基)-2-氧代乙基)苯基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-2-甲酸甲酯(1当量)于THF和水的溶液中加入LiOH(2当量),并将混合物在60℃下搅拌过夜。之后,将混合物冷却至室温,浓缩,并溶于DMF,然后加入HATU(1.5当量)和DIPEA(2当量),将混合物在室温下搅拌15min,然后将NH_4OH(6当量)加到上述混合物中,在室温下再搅拌2h。之后,加入水,用DCM萃取混合物,合并有机层,用Na_2SO4干燥,浓缩,用快速柱纯化得到3-氨基-4-(4-(4-(2-(二甲氨基)-2-氧代乙基)苯基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-2-甲酰胺(产率45%),为浅黄色固体,ESI-MS m/z:453([M+H]$^+$)。

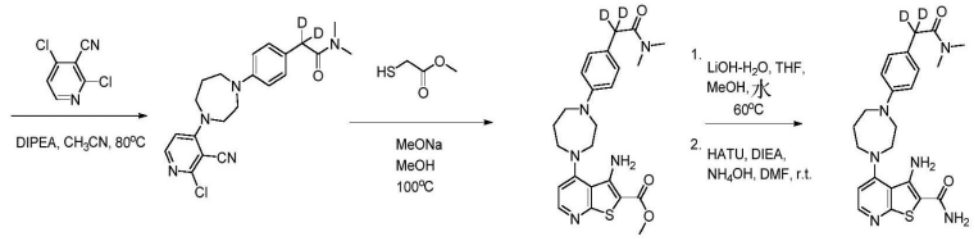
[0242] 3-氨基-4-(4-(4-(2-(二(甲基-d3)氨基)-2-氧代乙基)苯基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-2-甲酰胺(15w_D6)的合成

[0243] 

[0244] 关于实验程序见上述15w。ESI-MS m/z:459([M+H]$^+$)。

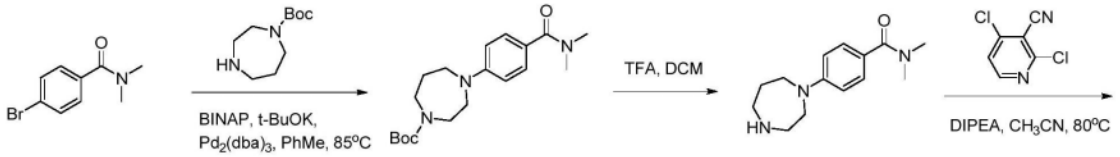
[0245] 3-氨基-4-(4-(4-(2-(二甲氨基)-2-氧代乙基-1,1-d2)苯基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-2-甲酰胺(15w_D2)的合成



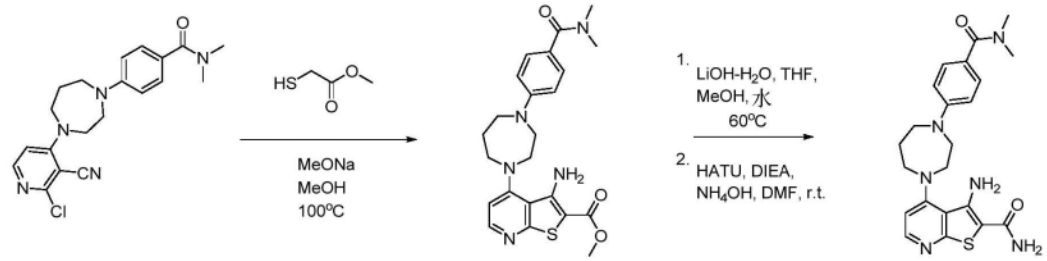
[0246] 

[0247] 关于实验程序见上述15w。ESI-MS m/z:455([M+H]$^+$)。

[0248] 3-氨基-4-(4-(4-(二甲基氨基甲酰基)苯基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-2-甲酰胺(15u)的合成



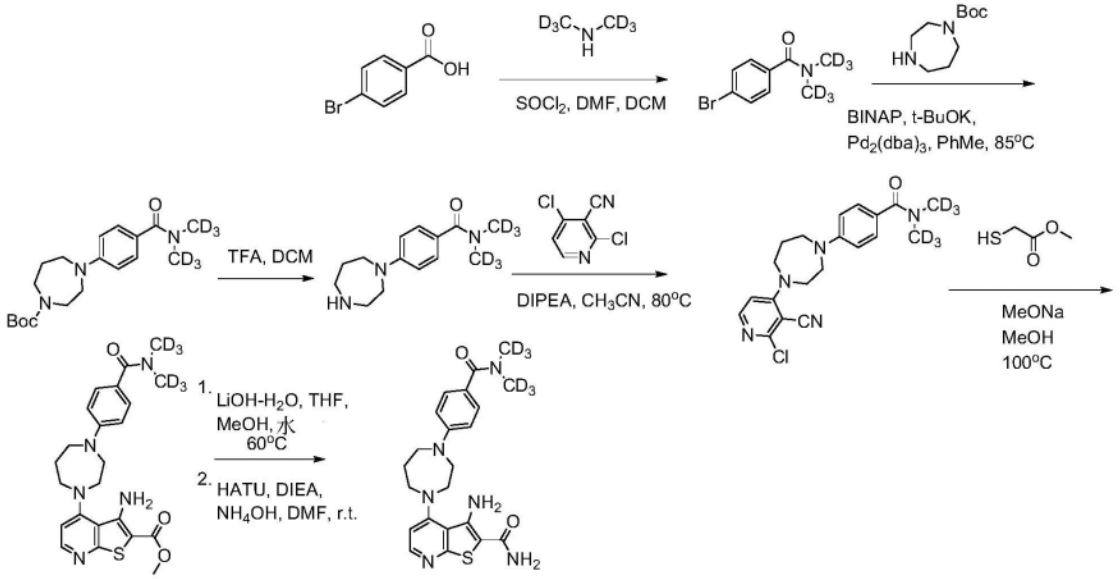
[0249]



[0250] 关于实验程序见上述15w。得到浅黄色固体。ESI-MS m/z:439([M+H]$^+$)。

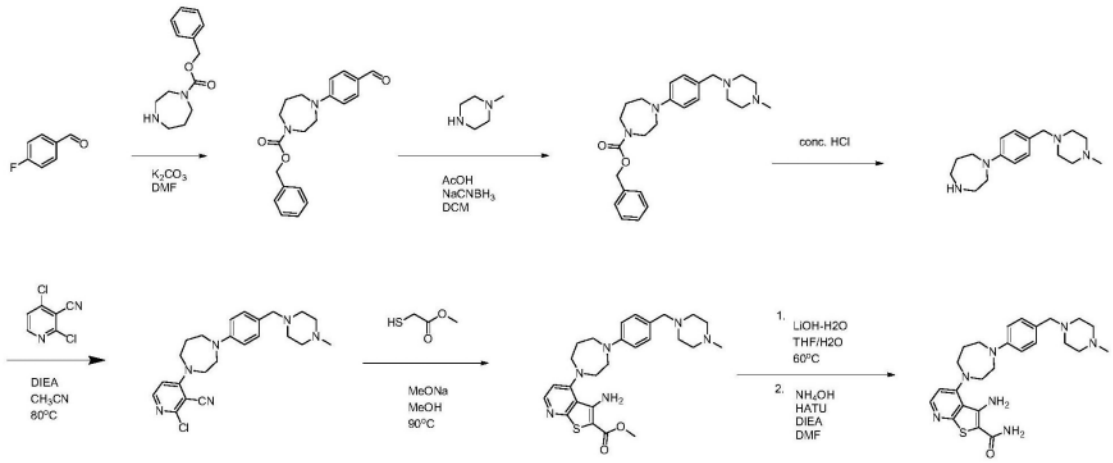
[0251] 3-氨基-4-(4-(4-(二(甲基-d3)氨基甲酰基)苯基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-2-甲酰胺(15u_D6)的合成

[0252]



[0253] 关于实验程序见上述15w。通过在Waters HPLC-MS(LCA-232SQ MS检测器)上分析证实15u_D6的合成。保留时间为21.40分钟(5-95%TFA,0.1%甲酸),在445.1919处观察到母离子(M+1)。图14A显示了在约21分钟洗脱的化合物15u_D6的UV色谱。图14B显示在约21分钟洗脱的化合物15u_D6的ESI色谱。图14C证实了15u_D6的合成,ESI-MS m/z:445([M+H]$^+$)。

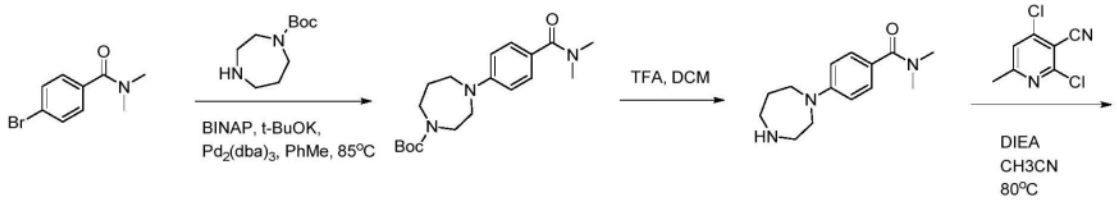
[0254] 3-氨基-4-(4-(4-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)苯基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-2-甲酰胺(6300)的合成

[0255] 

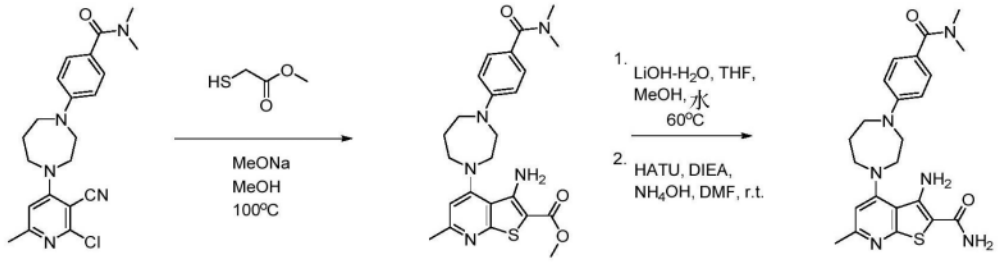
[0256] 向4-氟苯甲醛(1当量)和1,4-二氮杂环庚烷-1-甲酸苄酯(1.1当量)的DMF溶液中加入K_2CO_3(3当量)。将混合物在90℃下搅拌过夜。之后,将混合物冷却至室温,加入水,用DCM萃取混合物,合并有机层,用盐水洗,用Na_2SO_4干燥,浓缩,用快速柱纯化得到4-(4-甲酰基苯基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-甲酸苄酯(产率32%),ESI-MS m/z:339([M+H]$^+$);4-(4-甲酰基苯基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-甲酸苄酯(1当量)和1-甲基哌嗪(2当量)的DCM溶液,用乙酸将该溶液调节至pH 5,然后加入$NaBH_3CN$(1.5当量),并将混合物在室温下搅拌过夜。之后,加入饱和$NaHCO_3$水溶液,用DCM萃取混合物,合并有机层,用盐水洗,用Na_2SO_4干燥,浓缩,用快速柱纯化得到4-[4-[(4-甲基哌嗪-1-基)甲基]苯基]-1,4-二氮杂环庚烷-1-甲酸苄酯(产率66%),ESI-MS m/z:423([M+H]$^+$);将4-[4-[(4-甲基哌嗪-1-基)甲基]苯基]-1,4-二氮杂环庚烷-1-甲酸苄酯(1当量)的溶液溶于浓HCl,并在室温下搅拌2h,然后浓缩,得到1-(4-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)苯基)-1,4-二氮杂环庚烷,其不经进一步纯化即可使用,ESI-MS m/z:289([M+H]$^+$);向1-(4-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)苯基)-1,4-二氮杂环庚烷(1当量)的乙腈溶液中加入2,4-二氯烟氰(1当量)和DIPEA(2当量)。然后将混合物在80℃下搅拌过夜。之后,将混合物冷却至室温,浓缩,然后将混合物溶于DCM,加入水,用DCM萃取混合物,收集有机层,用盐水洗,用Na_2SO_4干燥,浓缩,用快速柱纯化得到2-氯-4-(4-(4-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)苯基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)烟氰(产率44%),ESI-MS m/z:425([M+H]$^+$);向2-氯-4-(4-(4-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)苯基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)烟氰(1当量)的MeOH溶液中加入MeONa(2当量)和巯基乙酸甲酯(2当量),然后将混合物在90℃下搅拌过夜。之后,将混合物冷却至室温,浓缩,用快速柱纯化得到3-氨基-4-(4-(4-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)苯基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-2-甲酸甲酯(产率79%),ESI-MS m/z:495([M+H]$^+$);然后向3-氨基-4-(4-(4-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)苯基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-2-甲酸甲酯(1当量)于THF和水的溶液中加入LiOH(2当量),并将混合物在60℃下搅拌过夜。之后,将混合物冷却至室温,浓缩,并溶于DMF,然后加入HATU(1.5当量)和DIPEA(2当量),将混合物在室温下搅拌15min,然后将NH_4OH(6当量)加入上述混合物中,并在室温下再搅拌2h。之后,加入水,用DCM萃取混合物,合并有机层,用Na_2SO4干燥,浓缩,并用快速柱纯化得到3-氨基-4-(4-(4-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)苯基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-2-甲酰胺(产率30%)。^{1}H NMR(300MHz,DMSO-d6)δ:8.39(d,J=5.2Hz,1H),7.08(d,J=9.6Hz,3H),7.07(s,2H),6.97(s,2H),6.71(d,J=8.4Hz,2H),3.75(m,2H),3.52(t,J=6.1Hz,2H),3.32(s,2H),3.29(m,2H),

2.33(m,8H),2.16(s,3H),2.13(m,2H);^{13}C NMR(300MHz,DMSO-d6)δ:167.07,160.35,159.35,150.53,147.59,146.38,130.06,130.06,124.87,119.21,111.74,111.34,111.34,94.99,61.68,55.83,54.76,54.66,54.66,52.30,52.30,47.99,47.99,45.63,27.39;ESI-MS m/z:480([M+H]$^+$)。

[0257] 3-氨基-4-(4-(4-(二甲基氨基甲酰基)苯基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)-6-甲基噻吩并[2,3-b]吡啶-2-甲酰胺(6304)的合成



[0258]

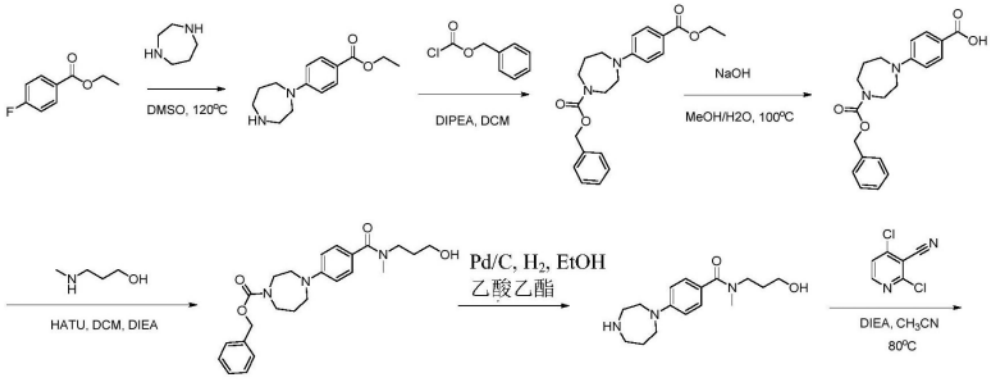


[0259] 向4-溴-N,N-二甲基苯甲酰胺(1当量)和1,4-二氮杂环庚烷-1-甲酸叔丁酯(1.2当量)于t-BuOH和1,4-二氧六环的溶液中加入2-二环己基膦基-2′-(N,N-二甲氨基)联苯(0.15当量)、t-BuONa(1.4当量)和三(二亚苄基丙酮)二钯(0.05当量)。将混合物脱气,用氮气保护,然后回流1h。之后,将混合物冷却至室温,加入水,用EA萃取混合物,用盐水洗有机层,用Na_2SO_4干燥,浓缩,并用快速柱纯化得到4-(4-(二甲基氨基甲酰基)苯基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-甲酸叔丁酯(产率94%),ESI-MS m/z:348([M+H]$^+$);然后向4-(4-(二甲基氨基甲酰基)苯基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-甲酸叔丁酯(1当量)的DCM溶液中加入TFA(5当量),将混合物在室温下搅拌3h,之后,浓缩混合物以除去TFA,得到4-(1,4-二氮杂环庚烷-1-基)-N,N-二甲基苯甲酰胺,其不经进一步纯化而使用,ESI-MS m/z:248([M+H]$^+$);向4-(1,4-二氮杂环庚烷-1-基)-N,N-二甲基苯甲酰胺(1当量)的乙腈溶液中加入2,4-二氯-6-甲基烟氰(1当量)和DIPEA(2当量)。然后将混合物在80℃下搅拌过夜。之后,将混合物冷却至室温,浓缩,然后将混合物溶于DCM,加入水,用DCM萃取混合物,收集有机层并用盐水洗,用Na_2SO_4干燥,浓缩,用快速柱纯化得到4-(4-(2-氯-3-氰基-6-甲基吡啶-4-基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)-N,N-二甲基苯甲酰胺(产率66%),ESI-MS m/z:398([M+H]$^+$);向4-(4-(2-氯-3-氰基-6-甲基吡啶-4-基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)-N,N-二甲基苯甲酰胺(1当量)的MeOH溶液中加入MeONa(2当量)和巯基乙酸甲酯(2当量),然后将混合物在100℃下搅拌过夜。之后,将混合物冷却至室温,浓缩,用快速柱纯化得到3-氨基-4-(4-(4-(二甲基氨基甲酰基)苯基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)-6-甲基噻吩并[2,3-b]吡啶-2-甲酸甲酯(产率77%),ESI-MS m/z:468([M+H]$^+$);然后向3-氨基-4-(4-(4-(二甲基氨基甲酰基)苯基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)-6-甲基噻吩并[2,3-b]吡啶-2-甲酸甲酯(1当量)于THF和水的溶液中加入LiOH(2当量),并将混合物在60℃下搅拌过夜。之后,将混合物冷却至室温,浓缩,并溶于DMF,然后加入HATU(1.5当量)和DIPEA(2当量),将混合物在室温下搅拌15min,然后将NH_4OH(6当

量)加入到上述混合物中,在室温下再搅拌2h。之后,加入水,用DCM萃取混合物,合并有机层,用Na_2SO4干燥,浓缩,用快速柱纯化得到3-氨基-4-(4-(4-(二甲基氨基甲酰基)苯基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)-6-甲基噻吩并[2,3-b]吡啶-2-甲酰胺(产率33%),为浅黄色固体,^1H NMR(300MHz,DMSO-d6)δ:7.30(d,J=8.9Hz,2H),7.02(s,2H),6.96(s,3H),6.77(d,J=8.9Hz,2H),3.81(m,2H)3.58(m,2H),3.27(m,2H),3.16(m,2H),2.97(s,6H),2.45(s,3H),2.14(m,2H);^{13}C NMR(300MHz,DMSO-d6)δ:170.50,167.18,160.03,159.94,159.39,149.42,146.46,129.35,129.35,122.56,117.13,111.78,110.45,110.45,94.25,55.52,54.93,47.88,47.75,39.52,39.52,27.23,24.22;ESI-MS m/z:453($[M+H]^+$)。

[0260] 3-氨基-4-(4-(4-((3-羟丙基)(甲基)氨基甲酰基)苯基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-2-甲酰胺(6264)的合成

[0261]



[0262] 加入4-氟苯甲酸乙酯(1当量)和1,4-二氮杂环庚烷(2当量)的DMSO溶液,在120℃下搅拌过夜。之后,将混合物冷却至室温,加入水,用DCM萃取混合物,合并有机层,用盐水洗,用Na_2SO_4干燥,浓缩,并用快速柱纯化得到4-(1,4-二氮杂环庚烷-1-基)苯甲酸乙酯(产率83%),ESI-MS m/z:249($[M+H]^+$);向4-(1,4-二氮杂环庚烷-1-基)苯甲酸乙酯(1当量)和氯甲酸苄酯(1.5当量)的DCM溶液中加入DIPEA(2当量),然后将混合物在室温下搅拌过夜。之后,加入饱和$NaHCO_3$水溶液,用DCM萃取混合物,合并有机层,用盐水洗,用Na_2SO_4干燥,浓缩,并用快速柱纯化得到4-(4-(乙氧基羰基)苯基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-甲酸苄酯(产率80%),ESI-MS m/z:383($[M+H]^+$);然后将4-(4-(乙氧基羰基)苯基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-甲酸苄酯(1当量)溶于MeOH和水的溶液中,加入NaOH(2.5当量),并将混合物回流2h,然后将混合物冷却至室温,浓缩,加入水,用1N HCl将混合物酸化至pH=4,用DCM萃取三次,合并有机层,用Na_2SO_4干燥并浓缩得到4-(4-((苄氧基)羰基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)苯甲酸,其不经进一步纯化而使用,ESI-MS m/z:355($[M+H]^+$);向4-(4-((苄氧基)羰基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)苯甲酸的DCM溶液中加入HATU(1.5当量)和DIPEA(3当量),然后将混合物在室温下搅拌20min,之后,加入3-(甲基氨基)丙-1-醇(1.5当量),并将混合物在室温下再搅拌4h。之后,加入水,用DCM萃取混合物,合并有机层,用Na_2SO4干燥,浓缩,并用快速柱纯化得到4-(4-((3-羟丙基)(甲基)氨基甲酰基)苯基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-甲酸苄酯(产率

85%),ESI-MS m/z:426([M+H]$^+$),向4-(4-((3-羟丙基)(甲基)氨基甲酰基)苯基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-甲酸苄酯(1当量)于EtOH和乙酸乙酯的溶液中加入Pd/C,然后用氢气饱和该溶液,并在室温下搅拌过夜。之后,过滤混合物,用甲醇洗残留物,收集溶液,合并,浓缩得到4-(1,4-二氮杂环庚烷-1-基)-N-(3-羟丙基)-N-甲基苯甲酰胺(产率90%),ESI-MS m/z:292([M+H]$^+$);向4-(1,4-二氮杂环庚烷-1-基)-N-(3-羟丙基)-N-甲基苯甲酰胺(1当量)的乙腈溶液中加入2,4-二氯烟氰(1当量)和DIPEA(2当量)。然后将混合物在80℃下搅拌过夜。之后,将混合物冷却至室温,浓缩,然后将混合物溶于DCM,加入水,用DCM萃取混合物,收集有机层,用盐水洗,用Na_2SO_4干燥,浓缩,并用快速柱纯化得到4-(4-(2-氯-3-氰基吡啶-4-基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)-N-(3-羟丙基)-N-甲基苯甲酰胺(产率47%),ESI-MS m/z:428([M+H]$^+$);向4-(4-(2-氯-3-氰基吡啶-4-基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)-N-(3-羟丙基)-N-甲基苯甲酰胺(1当量)的MeOH溶液中加入MeONa(2当量)和巯基乙酸甲酯(2当量),然后将混合物在90℃下搅拌过夜。之后,混合物冷却至室温,浓缩,用快速柱纯化得到3-氨基-4-(4-(4-((3-羟丙基)(甲基)氨基甲酰基)苯基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-2-甲酸甲酯(产率78%),ESI-MS m/z:498([M+H]$^+$);然后向3-氨基-4-(4-(4-((3-羟丙基)(甲基)氨基甲酰基)苯基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-2-甲酸甲酯(1当量)于THF和水的溶液中加入LiOH(2当量),并将混合物在60℃下搅拌过夜。之后,将混合物冷却至室温,浓缩,溶于DMF,然后加入HATU(1.5当量)和DIPEA(2当量),并将混合物在室温下搅拌15min,然后将NH_4OH(6当量)加入到上述混合物中,在室温下再搅拌2h。之后,加入水,用DCM萃取混合物,合并有机层,用Na_2SO4干燥,浓缩,并用快速柱纯化得到3-氨基-4-(4-(4-((3-羟丙基)(甲基)氨基甲酰基)苯基)-1,4-二氮杂环庚烷-1-基)噻吩并[2,3-b]吡啶-2-甲酰胺(产率51%),为黄色固体,^{1}H NMR(300MHz,DMSO-d6)δ:8.40(d,J=5.6Hz,1H),7.27(d,J=8.7Hz,2H),7.10(s,2H),7.08(d,J=5.6Hz,1H),7.00(s,2H),6.78(d,J=8.7Hz,2H),4.47(t,J=5.4Hz,1H),3.81(m,2H),3.59(t,J=6.5Hz,2H),3.41(m,4H),3.30(m,2H),3.20(m,2H),2.95(s,3H),2.16(m,2H),1.70(m,2H);^{13}C NMR(300MHz,DMSO-d6)δ:170.69,167.08,160.35,159.23,150.55,149.36,146.38,129.03,129.03,123.02,119.19,111.70,110.50,110.50,95.13,58.36,58.36,55.72,54.82,47.82,47.82,39.53,39.53,27.21;ESI-MS m/z:483([M+H]$^+$)。

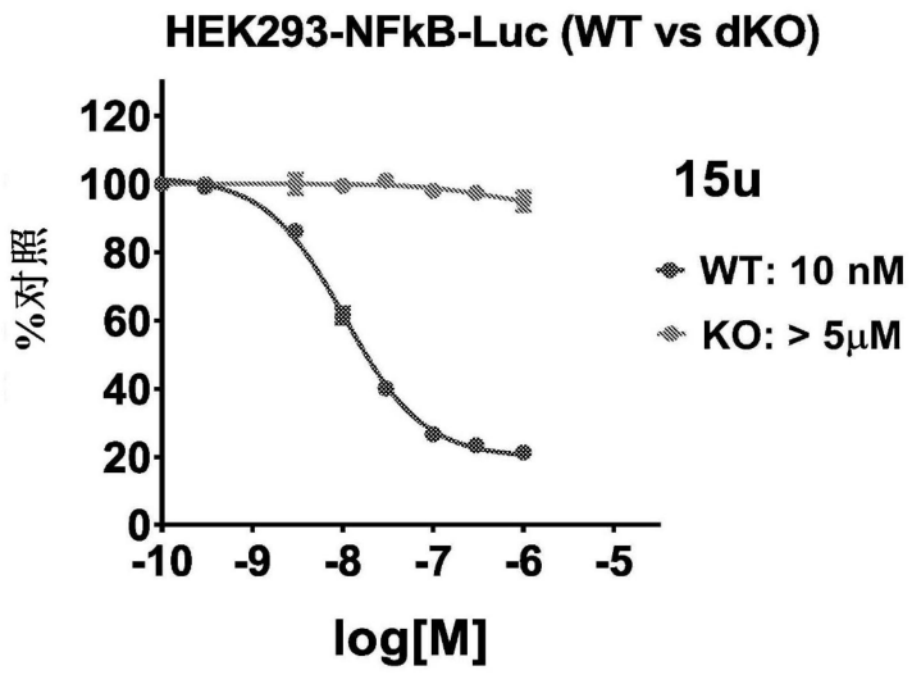

HEK293-NFkB-Luc (WT vs dKO)
%对照
120
100
80
60
40
20
0
-10
-9
-8
-7
-6
-5
log[M]
15u
WT: 10 nM
KO: > 5μM

图1A

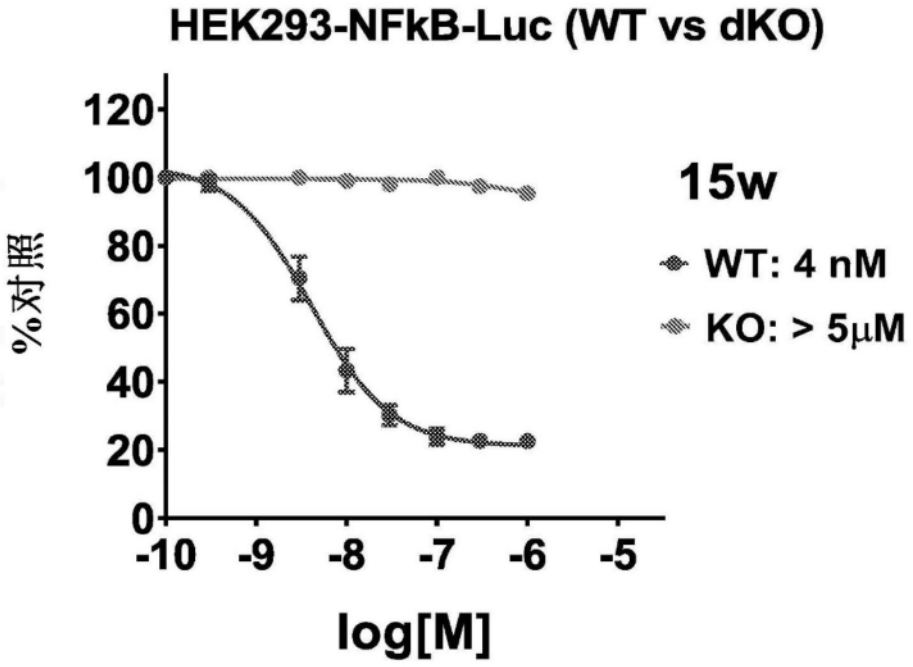

HEK293-NFkB-Luc (WT vs dKO)
%对照
120
100
80
60
40
20
0
-10
-9
-8
-7
-6
-5
log[M]
15w
WT: 4 nM
KO: > 5μM

图1B

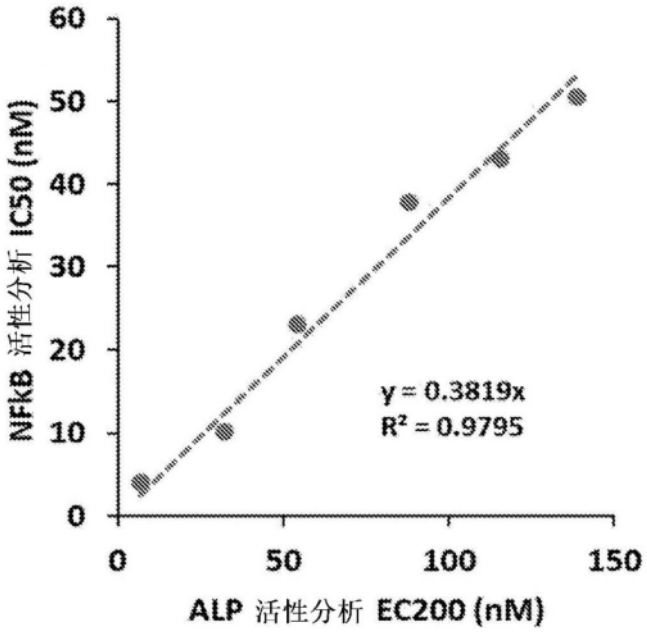

NFkB 活性分析 IC50 (nM)
ALP 活性分析 EC200 (nM)
y = 0.3819x
R² = 0.9795
0
10
20
30
40
50
60
0
50
100
150

图1C

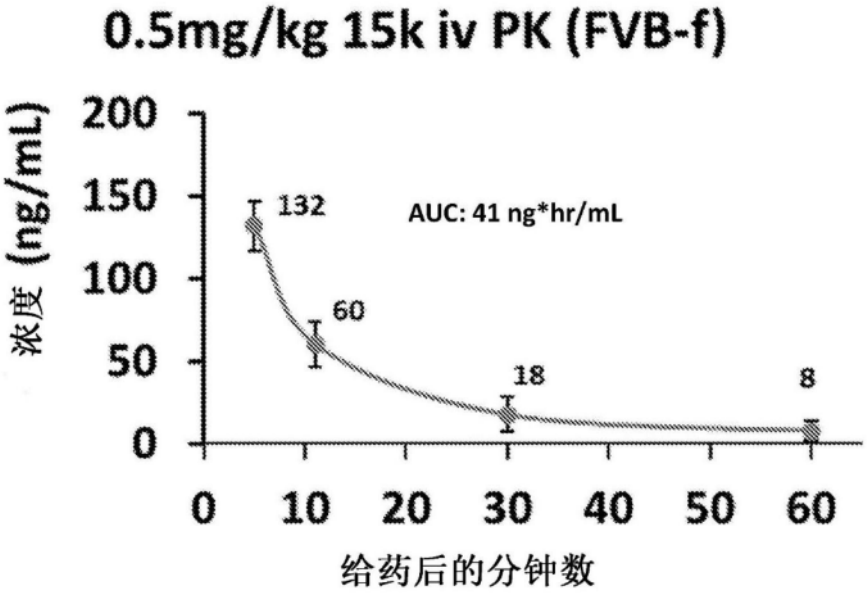

0.5mg/kg 15k iv PK (FVB-f)
浓度 (ng/mL)
给药后的分钟数
AUC: 41 ng*hr/mL
132
60
18
8
0
50
100
150
200
0
10
20
30
40
50
60

图2A

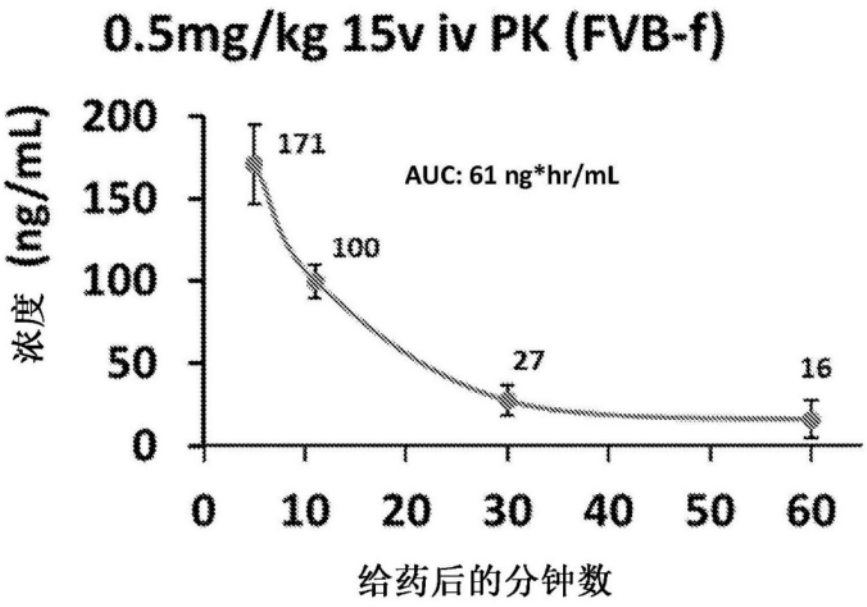

0.5mg/kg 15v iv PK (FVB-f)
浓度 (ng/mL)
200
150
100
50
0
171
100
27
16
AUC: 61 ng*hr/mL
0
10
20
30
40
50
60
给药后的分钟数

图2B

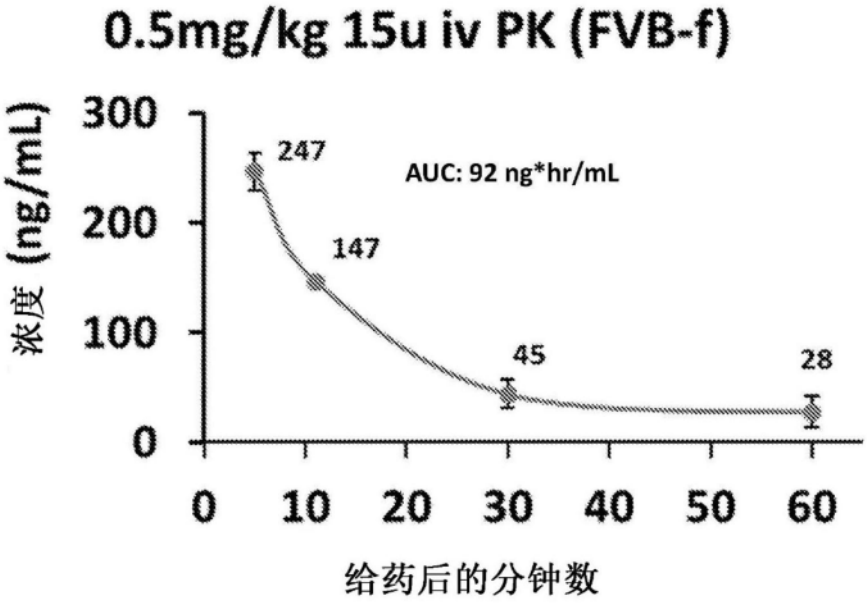

0.5mg/kg 15u iv PK (FVB-f)
浓度 (ng/mL)
300
200
100
0
247
147
45
28
AUC: 92 ng*hr/mL
0
10
20
30
40
50
60
给药后的分钟数

图2C

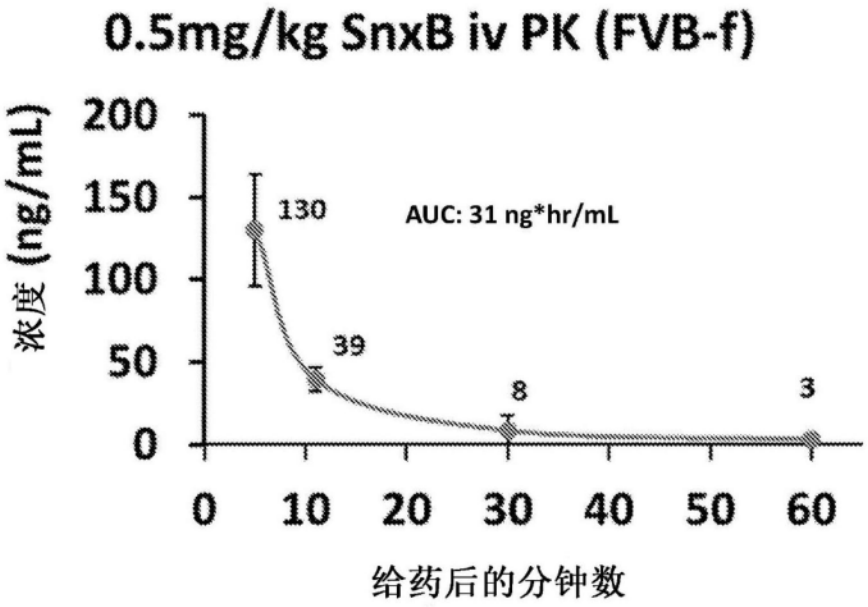

0.5mg/kg SnxB iv PK (FVB-f)
浓度 (ng/mL)
200
150
100
50
0
130
AUC: 31 ng*hr/mL
39
8
3
0 10 20 30 40 50 60
给药后的分钟数

图2D

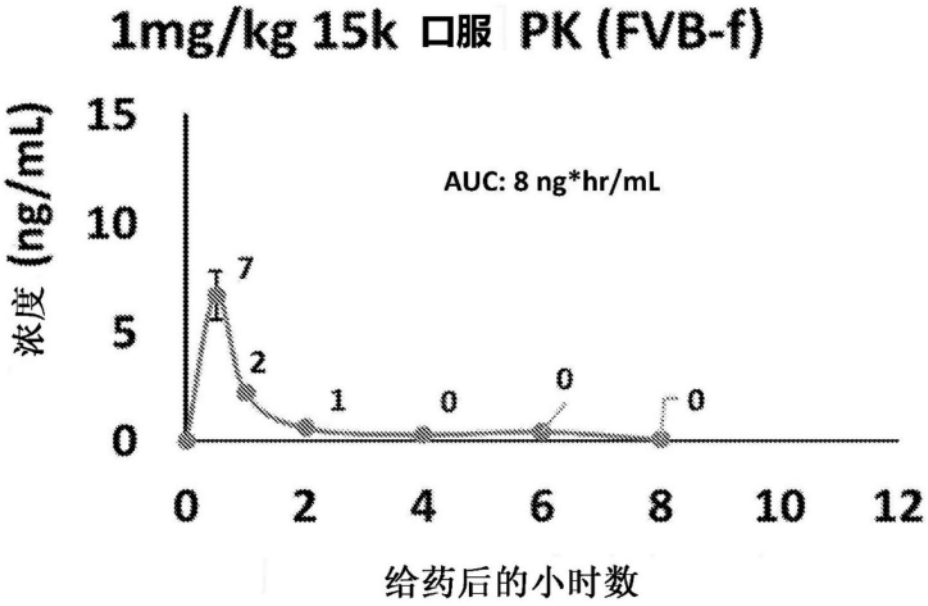

1mg/kg 15k 口服 PK (FVB-f)
浓度 (ng/mL)
15
10
5
0
AUC: 8 ng*hr/mL
7
2
1
0
0
0
0 2 4 6 8 10 12
给药后的小时数

图3A

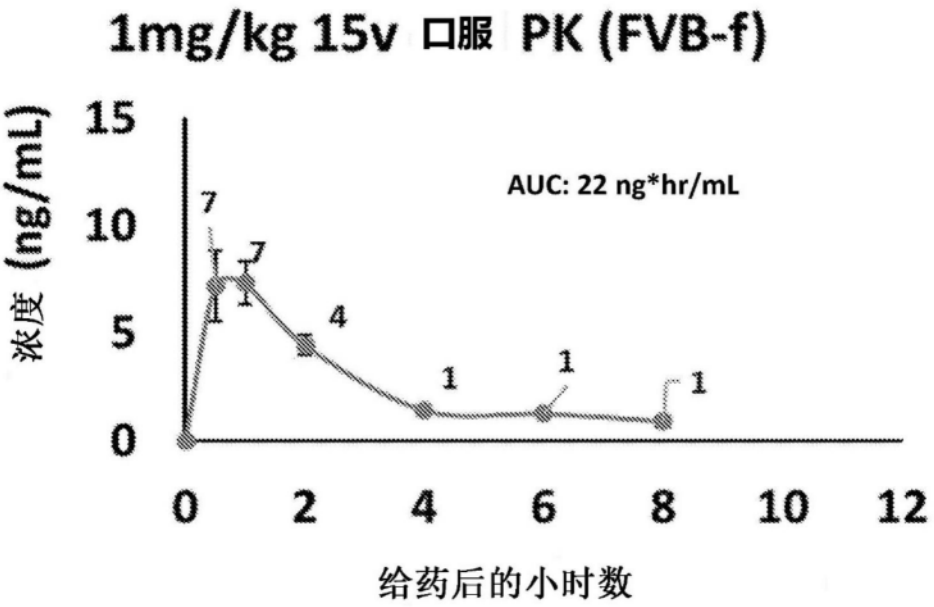

1mg/kg 15v 口服 PK (FVB-f)
浓度 (ng/mL)
15
10
5
0
AUC: 22 ng*hr/mL
7
7
4
1
1
1
0
2
4
6
8
10
12
给药后的小时数

图3B

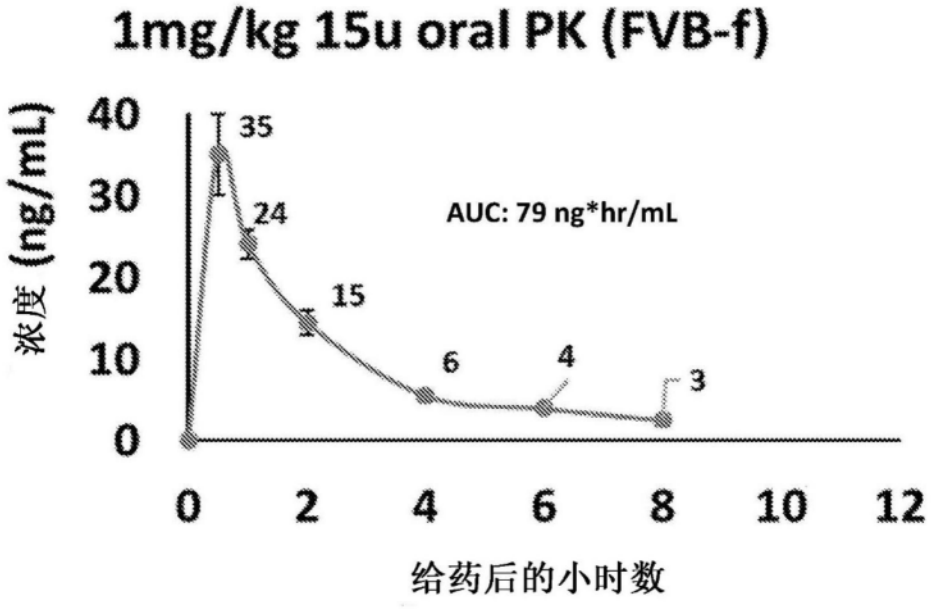

1mg/kg 15u oral PK (FVB-f)
浓度 (ng/mL)
40
30
20
10
0
AUC: 79 ng*hr/mL
35
24
15
6
4
3
0
2
4
6
8
10
12
给药后的小时数

图3C

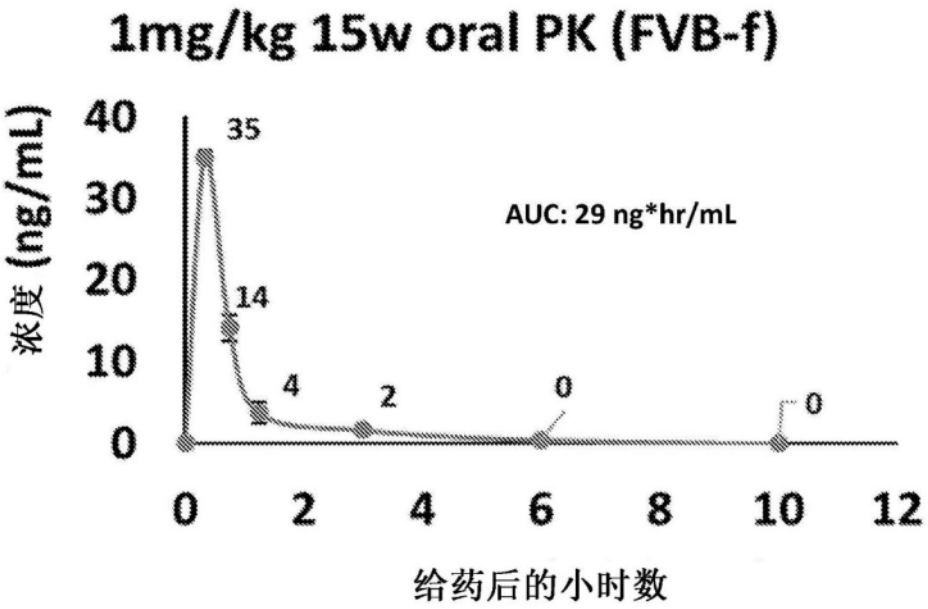

1mg/kg 15w oral PK (FVB-f)
浓度 (ng/mL)
40
30
20
10
0
35
14
4
2
0
0
AUC: 29 ng*hr/mL
0
2
4
6
8
10
12
给药后的小时数

图3D

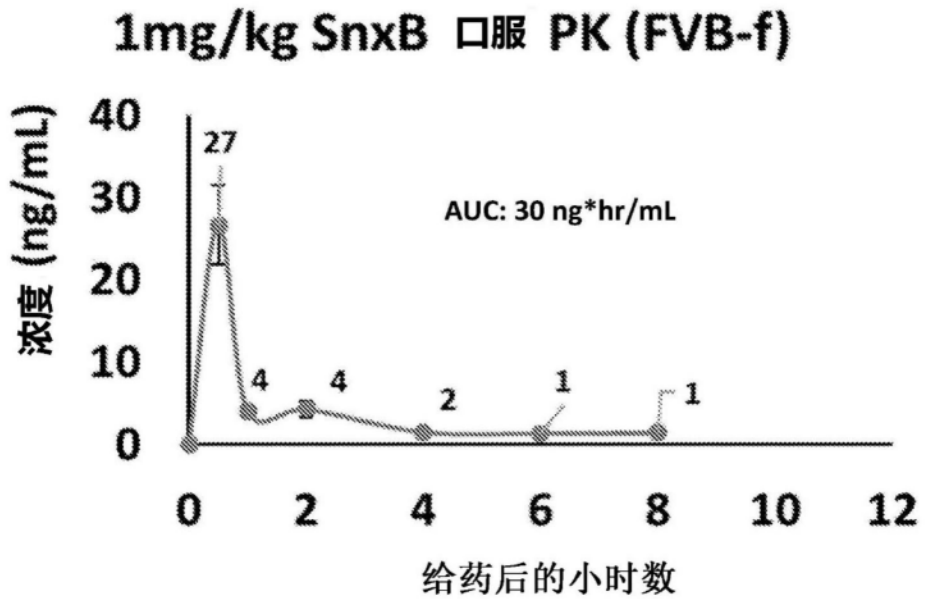

1mg/kg SnxB 口服 PK (FVB-f)
浓度 (ng/mL)
40
30
20
10
0
27
4
4
2
1
1
AUC: 30 ng*hr/mL
0
2
4
6
8
10
12
给药后的小时数

图3E

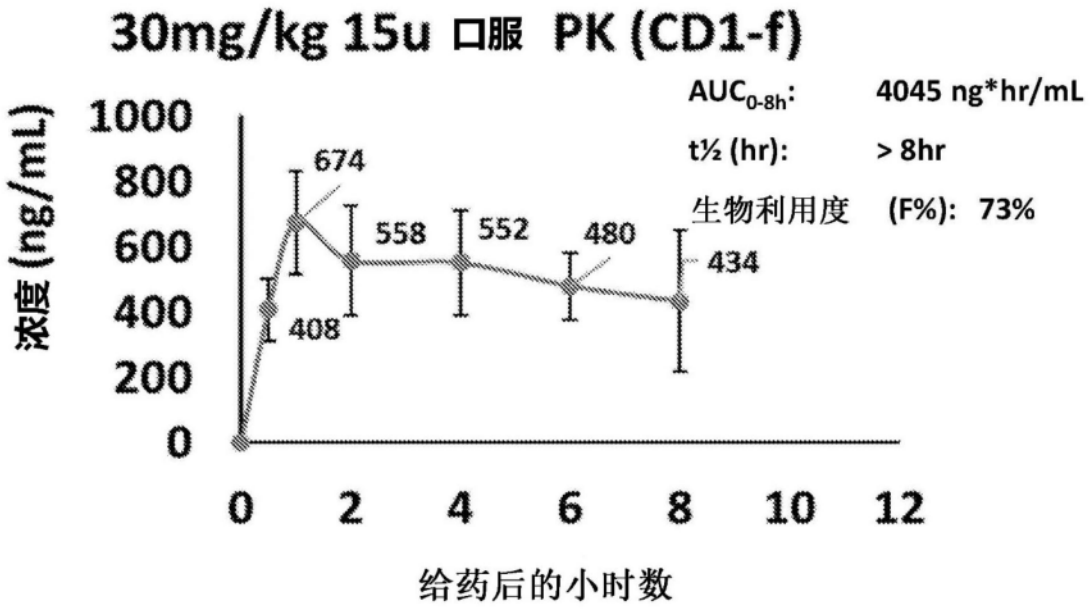

30mg/kg 15u 口服 PK (CD1-f)
AUC0-8h: 4045 ng*hr/mL
t½ (hr): > 8hr
生物利用度 (F%): 73%
浓度 (ng/mL)
1000
800
600
400
200
0
674
558
552
480
434
408
0 2 4 6 8 10 12
给药后的小时数

图4A

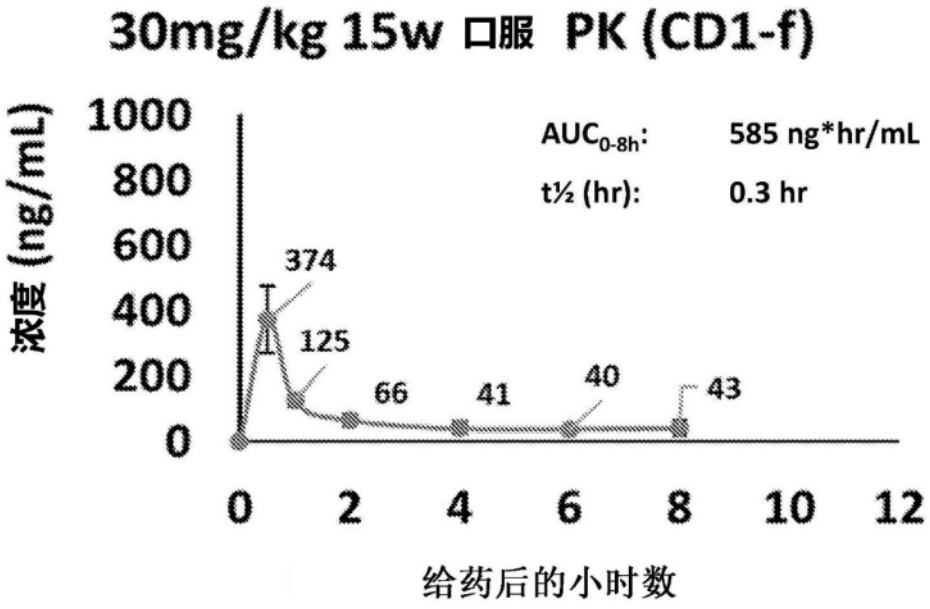

30mg/kg 15w 口服 PK (CD1-f)
AUC0-8h: 585 ng*hr/mL
t½ (hr): 0.3 hr
浓度 (ng/mL)
1000
800
600
400
200
0
374
125
66
41
40
43
0 2 4 6 8 10 12
给药后的小时数

图4B

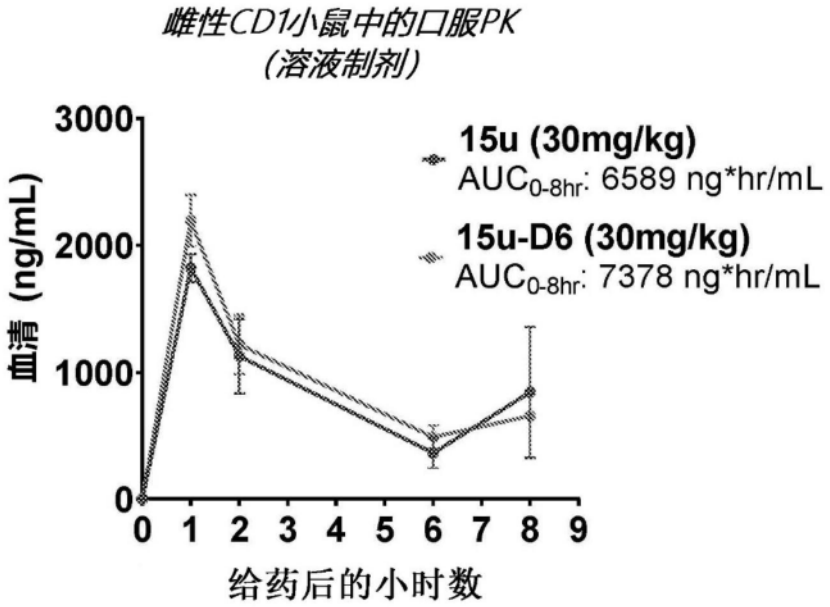

雌性CD1小鼠中的口服PK
（溶液制剂）
血清 (ng/mL)
3000
2000
1000
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
给药后的小时数
15u (30mg/kg)
AUC0-8hr: 6589 ng*hr/mL
15u-D6 (30mg/kg)
AUC0-8hr: 7378 ng*hr/mL

图5A

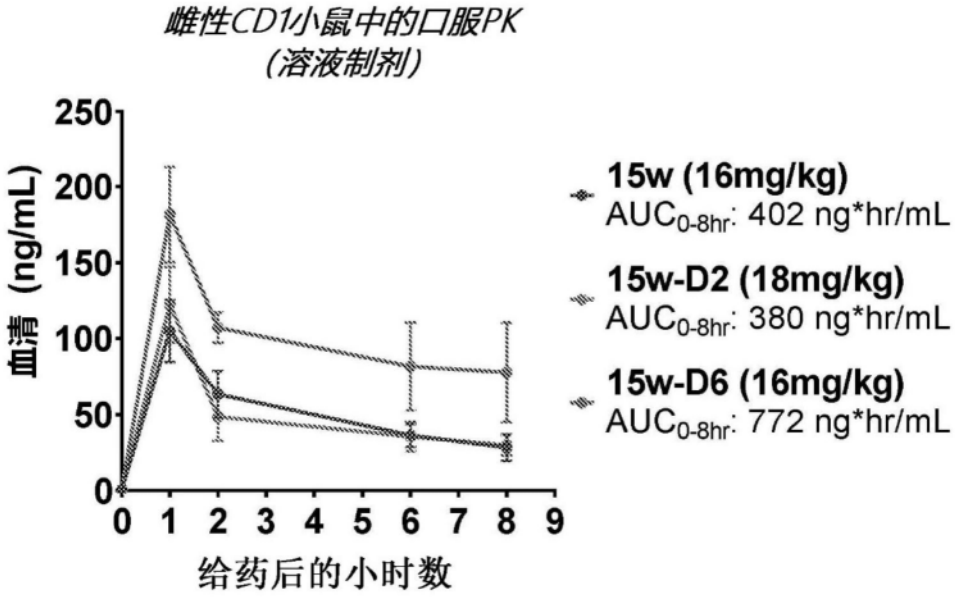

雌性CD1小鼠中的口服PK
（溶液制剂）
血清 (ng/mL)
250
200
150
100
50
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
给药后的小时数
15w (16mg/kg)
AUC0-8hr: 402 ng*hr/mL
15w-D2 (18mg/kg)
AUC0-8hr: 380 ng*hr/mL
15w-D6 (16mg/kg)
AUC0-8hr: 772 ng*hr/mL

图5B

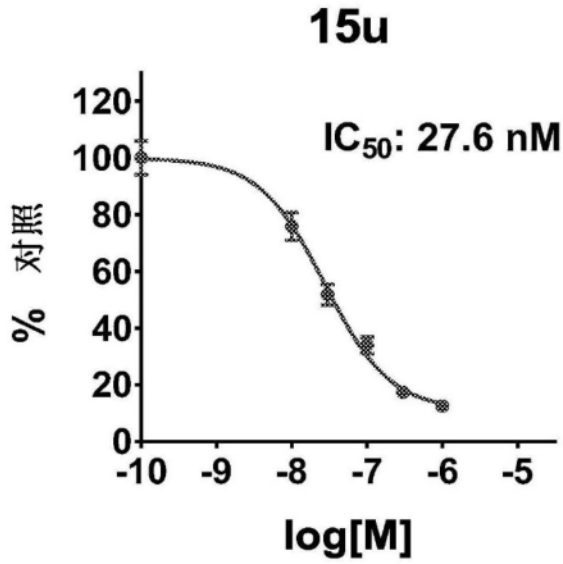

15u
IC50: 27.6 nM
% 对照
120
100
80
60
40
20
0
-10 -9 -8 -7 -6 -5
log[M]

图6A

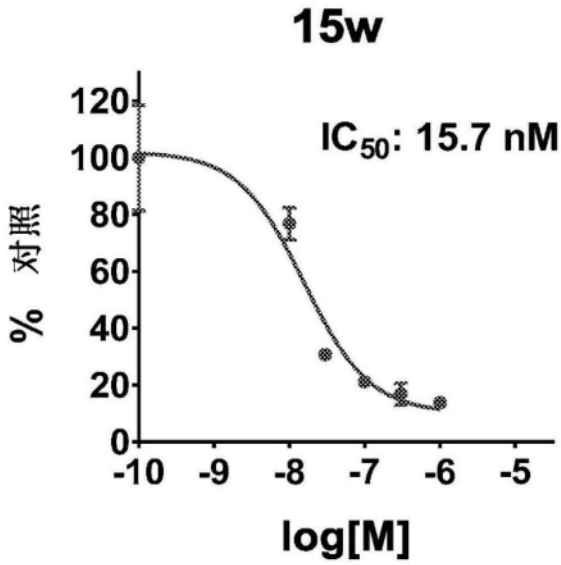

15w
IC50: 15.7 nM
% 对照
120
100
80
60
40
20
0
-10 -9 -8 -7 -6 -5
log[M]

图6B

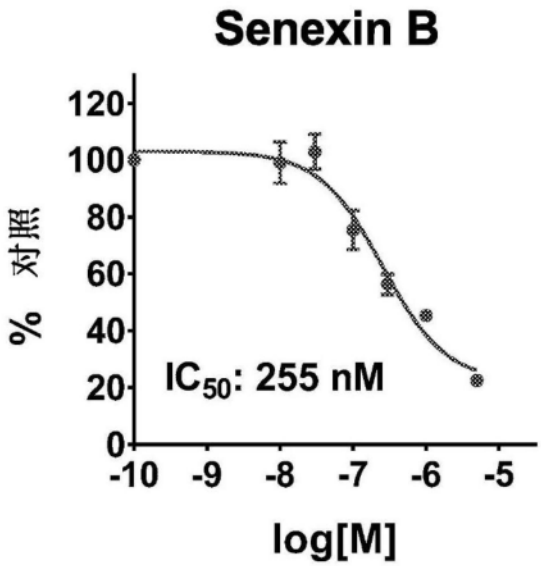

Senexin B
IC50: 255 nM
% 对照
120
100
80
60
40
20
0
-10 -9 -8 -7 -6 -5
log[M]

图6C

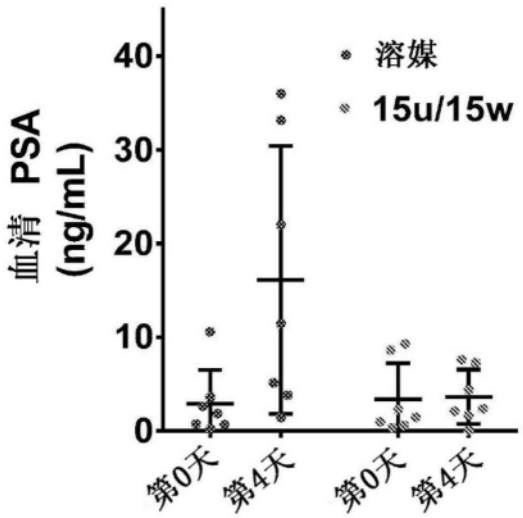

溶媒
15u/15w
血清 PSA (ng/mL)
40
30
20
10
0
第0天
第4天
第0天
第4天

图6D

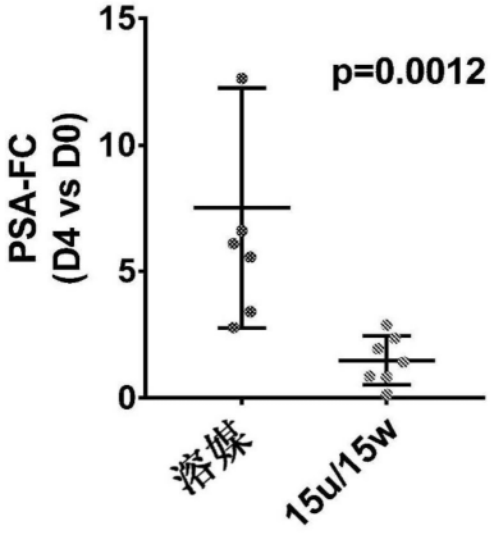

p=0.0012
PSA-FC (D4 vs D0)
15
10
5
0
溶媒
15u/15w

图6E

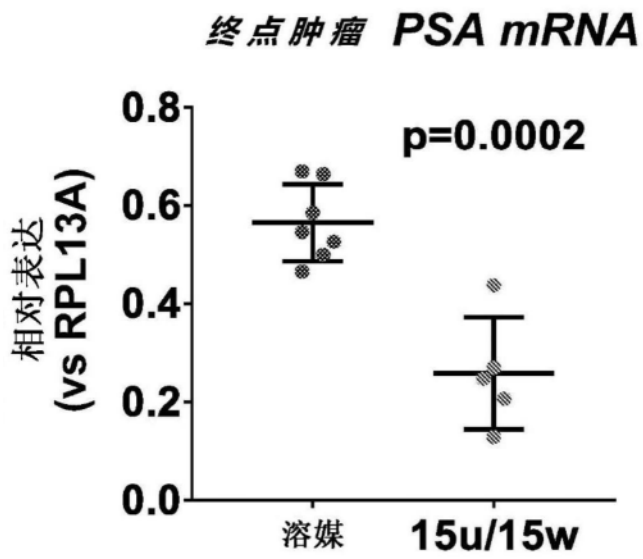


图6F

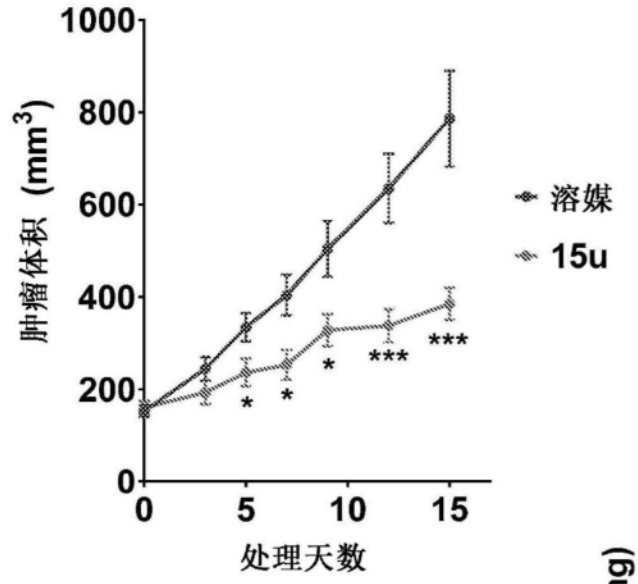

肿瘤体积 (mm3)
1000
800
600
400
200
0
0
5
10
15
处理天数
溶媒
15u
*
*
*
***
***

图7A

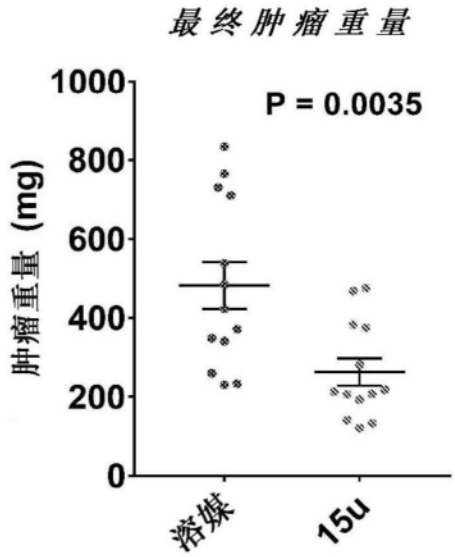

最终肿瘤重量
肿瘤重量 (mg)
1000
800
600
400
200
0
P = 0.0035
溶媒
15u

图7B

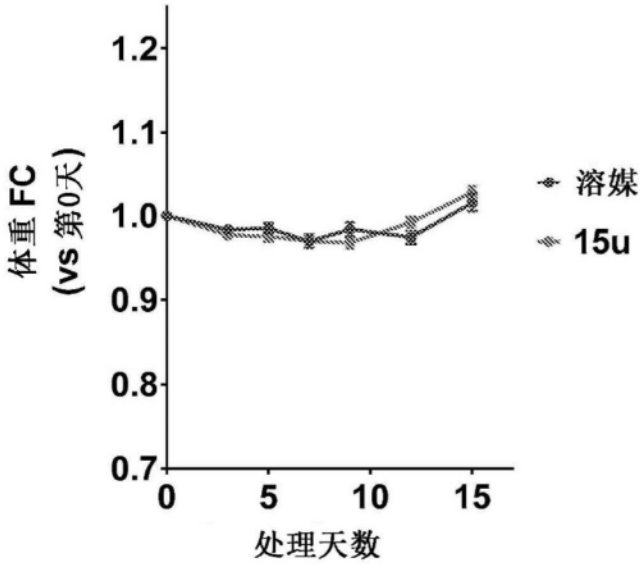

体重 FC
(vs 第0天)
1.2
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0
5
10
15
处理天数
溶媒
15u

图7C

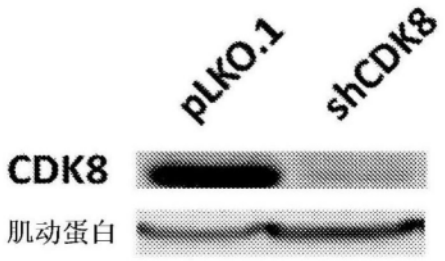


图8A

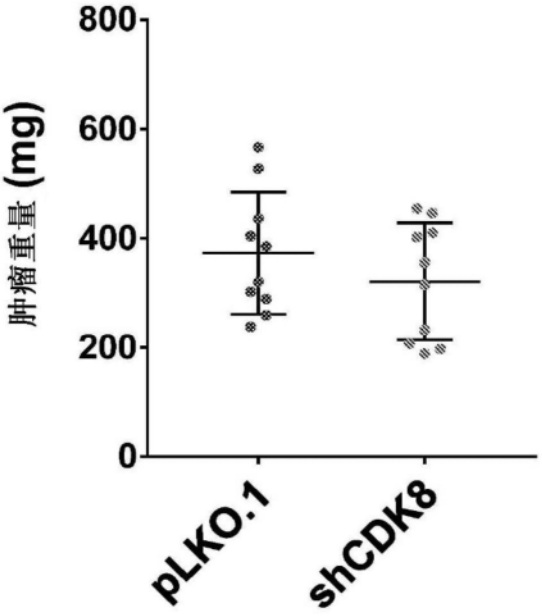


图8B

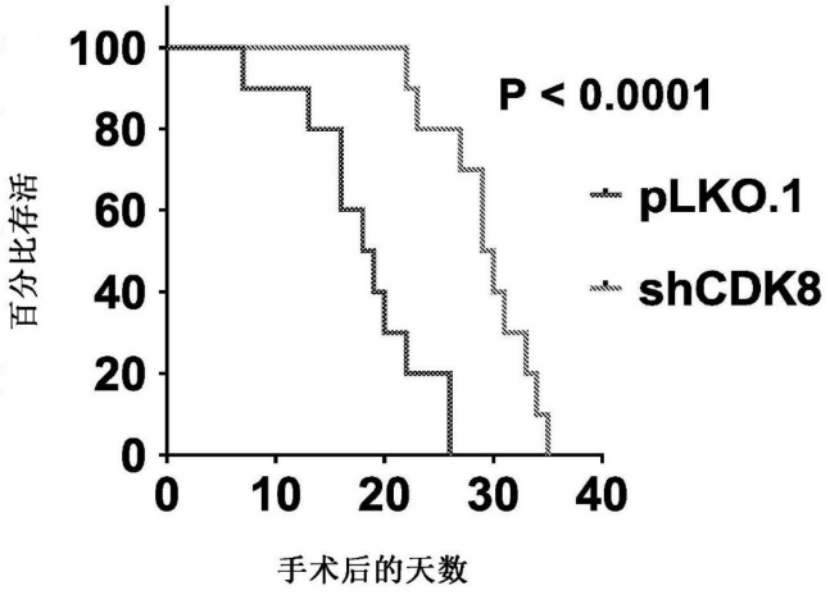

100
80
60
40
20
0
百分比存活
0
10
20
30
40
手术后的天数
P < 0.0001
pLKO.1
shCDK8

图8C

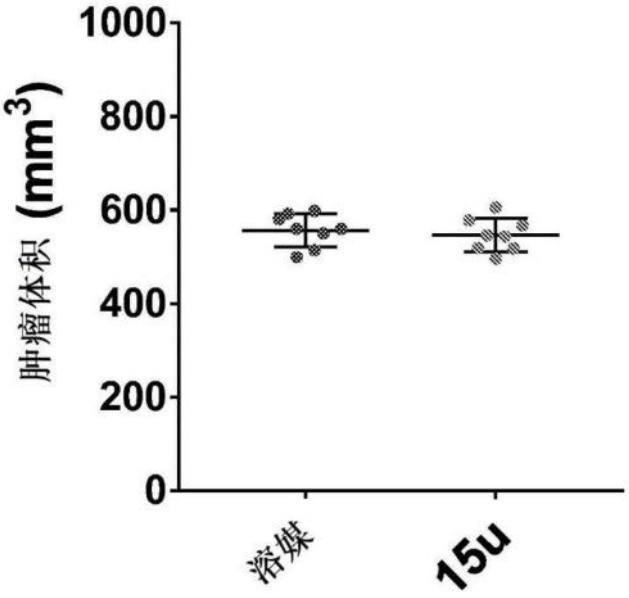

1000
800
600
400
200
0
肿瘤体积 (mm3)
溶媒
15u

图8D

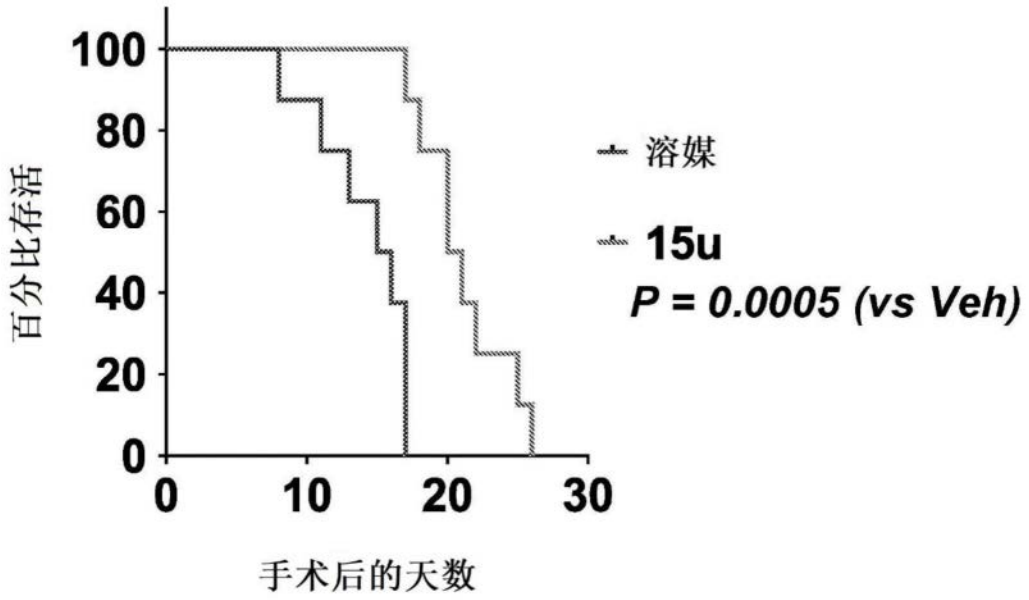

100
80
60
40
20
0
百分比存活
0
10
20
30
手术后的天数
溶媒
15u
P = 0.0005 (vs Veh)

图8E

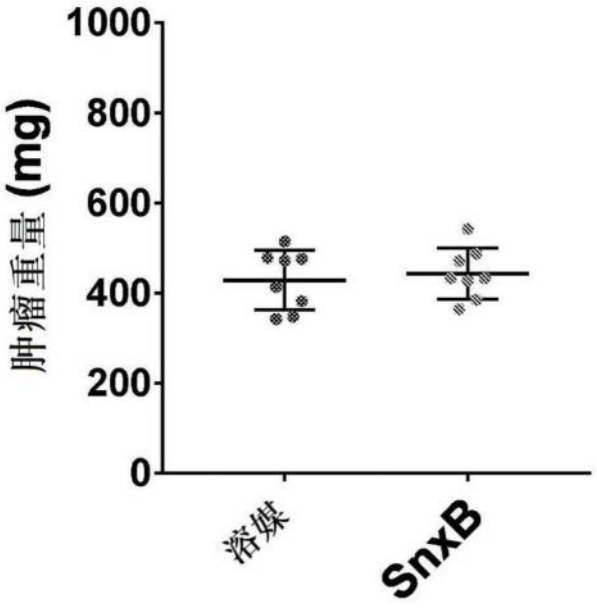

1000
800
600
400
200
0
肿瘤重量 (mg)
溶媒
SnxB

图8F

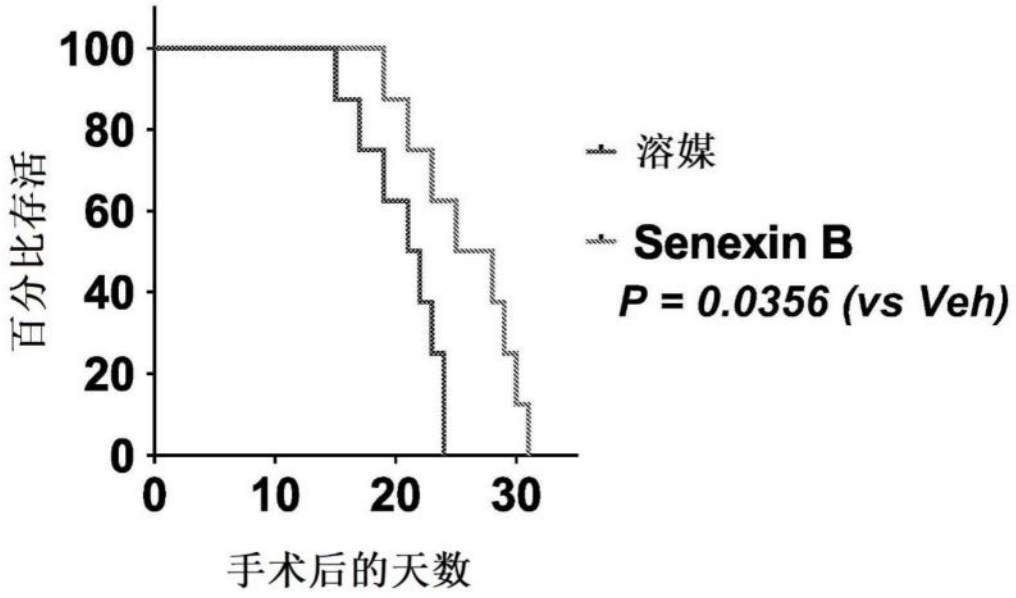

100
80
60
40
20
0
百分比存活
0
10
20
30
手术后的天数
溶媒
Senexin B
P = 0.0356 (vs Veh)

图8G

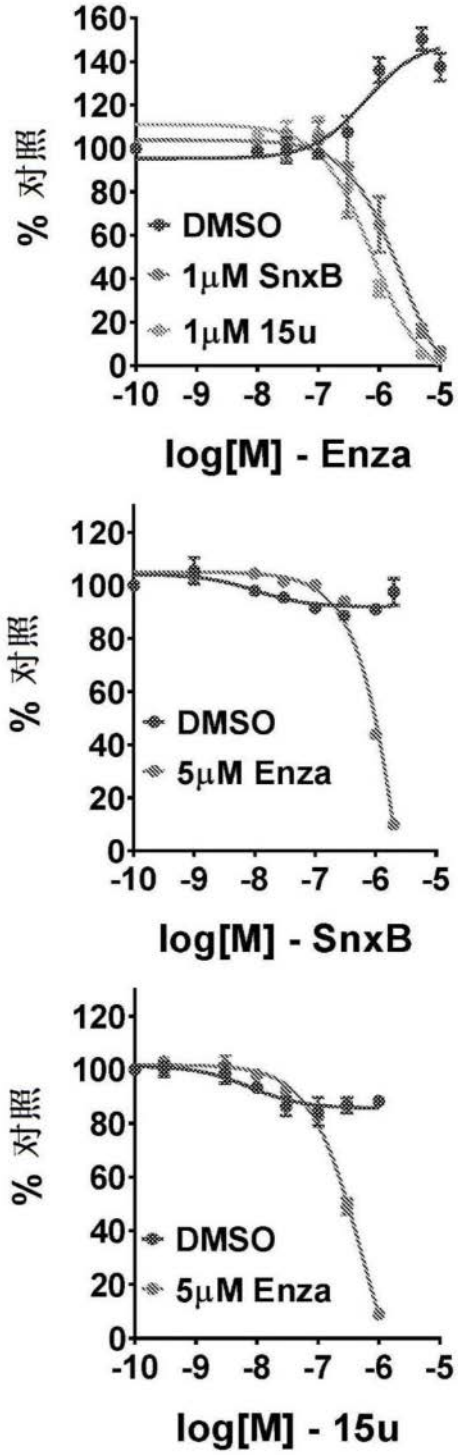

% 对照
DMSO
1μM SnxB
1μM 15u
log[M] - Enza
% 对照
DMSO
5μM Enza
log[M] - SnxB
% 对照
DMSO
5μM Enza
log[M] - 15u

图9A

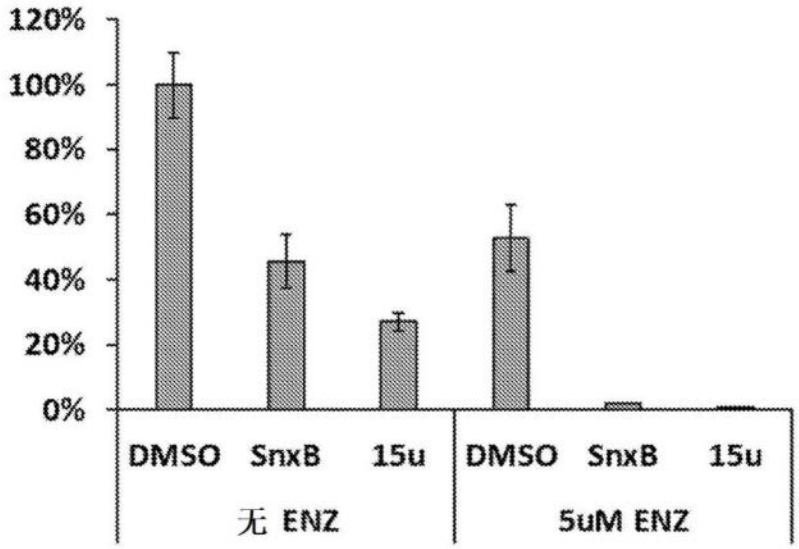

120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
DMSO
SnxB
15u
DMSO
SnxB
15u
无 ENZ
5uM ENZ

图9B

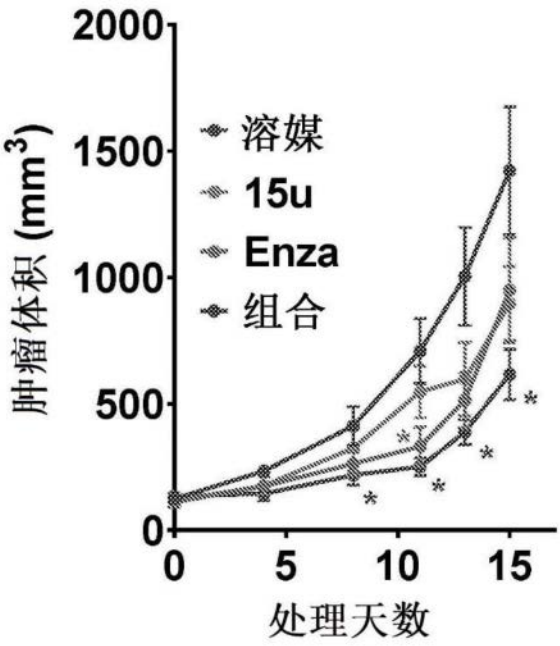

2000
1500
1000
500
0
肿瘤体积 (mm3)
溶媒
15u
Enza
组合
0
5
10
15
处理天数

图9C

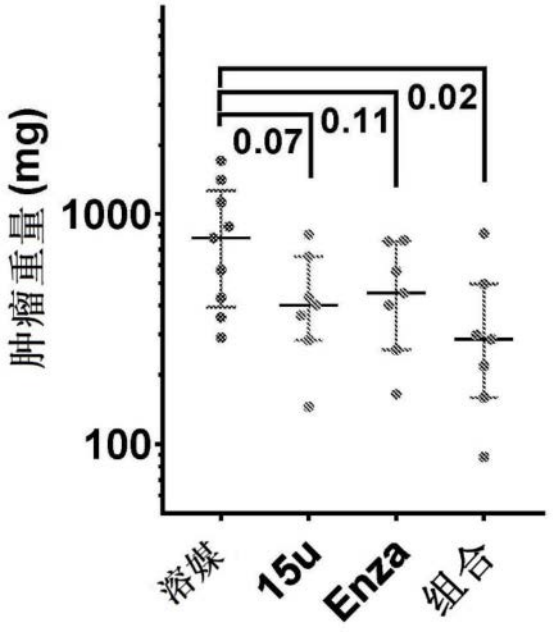

肿瘤重量 (mg)
1000
100
0.07
0.11
0.02
溶媒
15u
Enza
组合

图9D

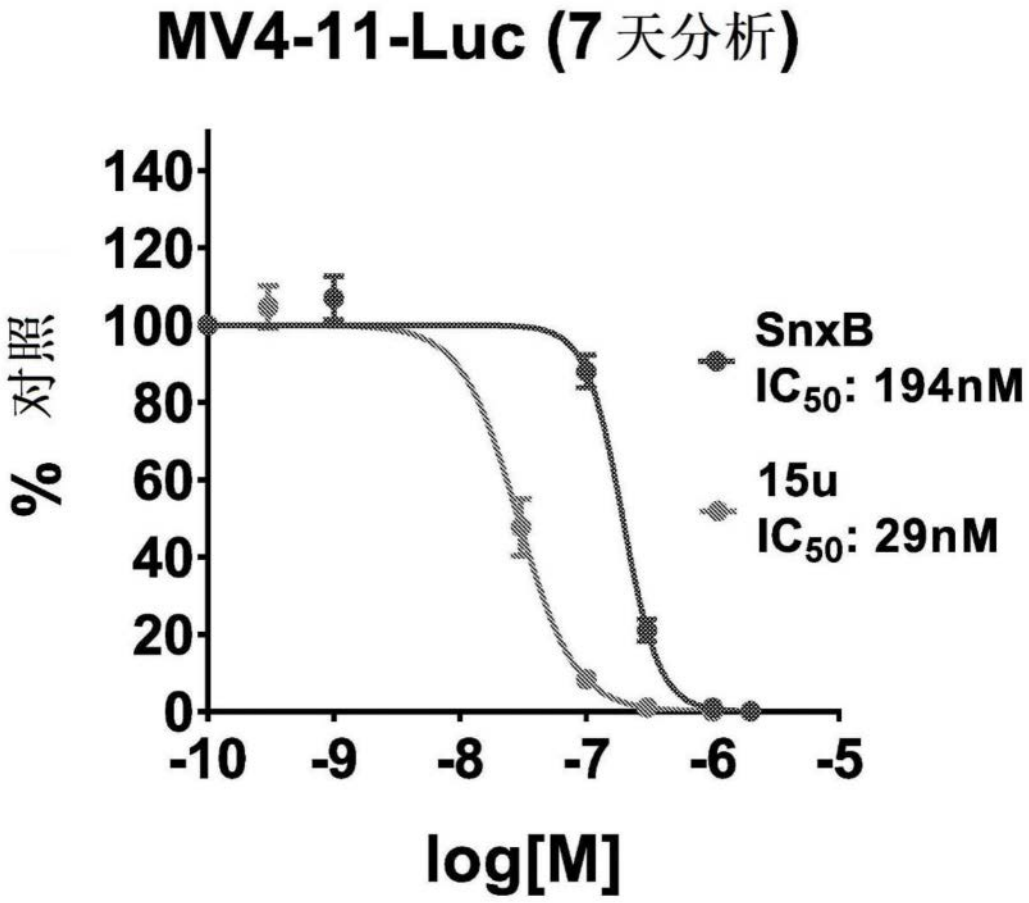

MV4-11-Luc (7 天分析)
% 对照
140
120
100
80
60
40
20
0
-10
-9
-8
-7
-6
-5
log[M]
SnxB
IC50: 194nM
15u
IC50: 29nM

图10A

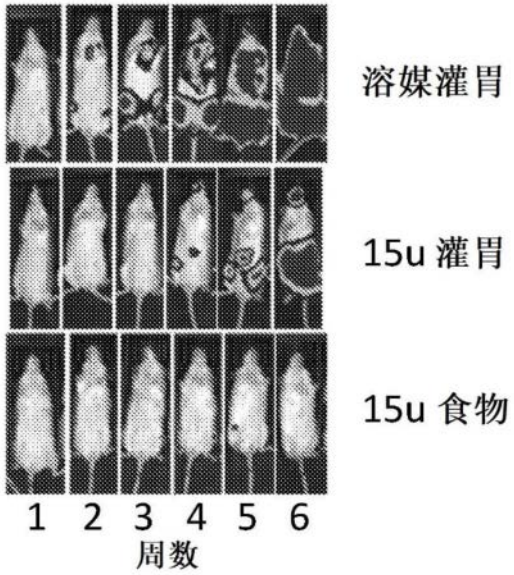

溶媒灌胃
15u 灌胃
15u 食物
1 2 3 4 5 6
周数

图10B

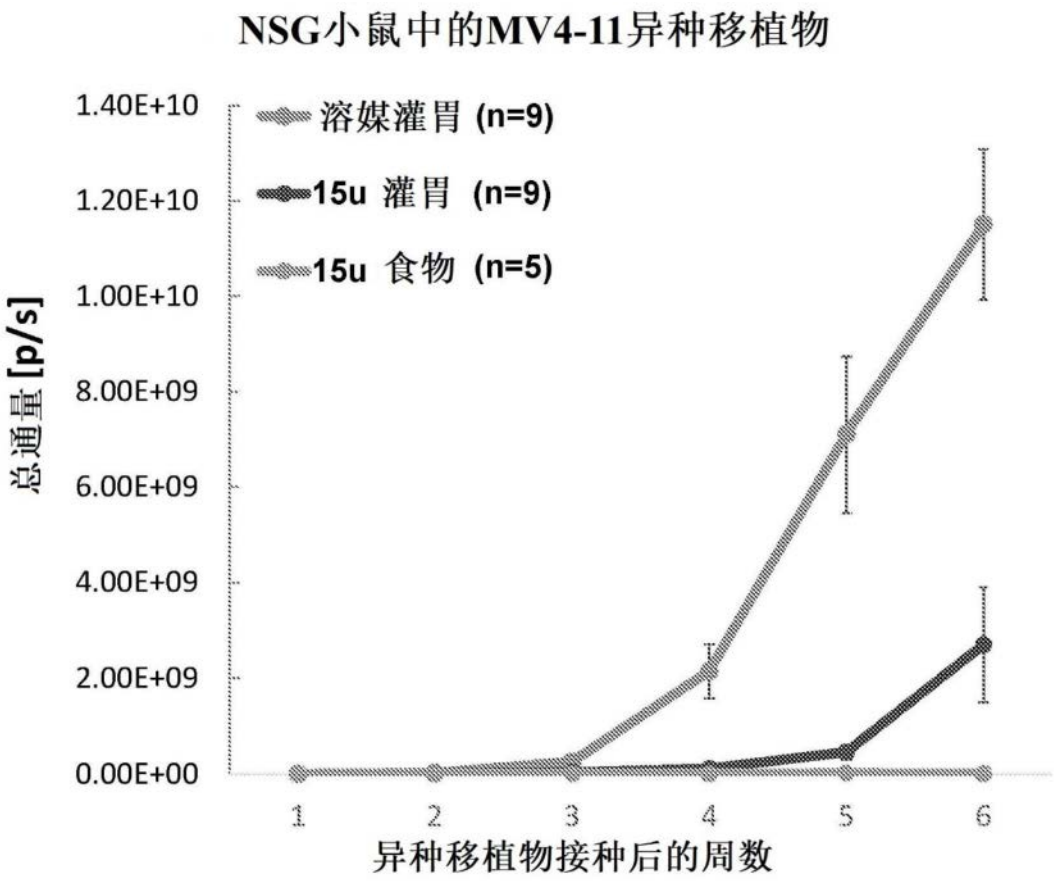

NSG小鼠中的MV4-11异种移植物
溶媒灌胃 (n=9)
15u 灌胃 (n=9)
15u 食物 (n=5)
总通量 [p/s]
1.40E+10
1.20E+10
1.00E+10
8.00E+09
6.00E+09
4.00E+09
2.00E+09
0.00E+00
1
2
3
4
5
6
异种移植物接种后的周数

图10C

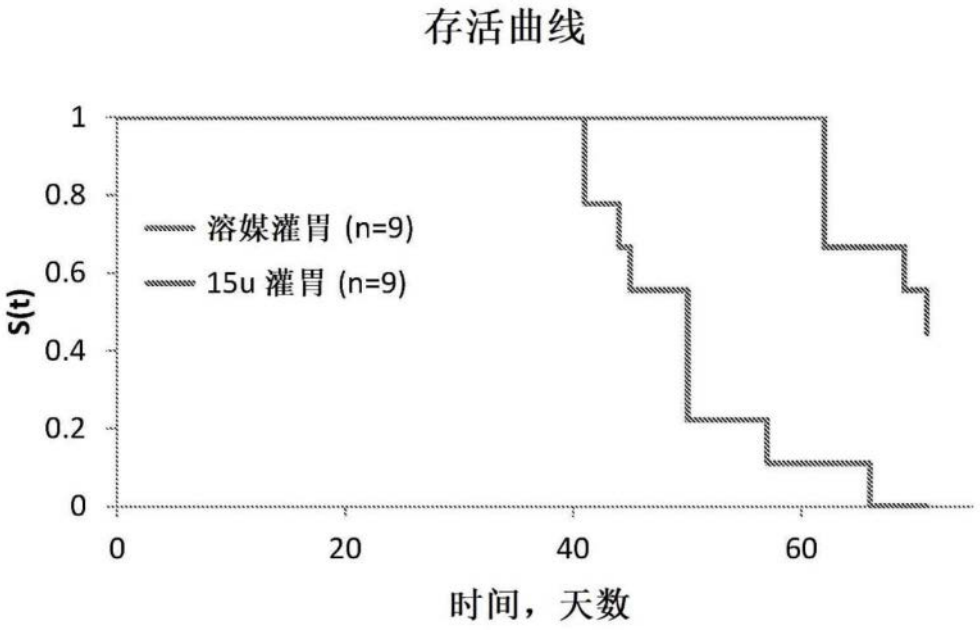

存活曲线
S(t)
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
溶媒灌胃 (n=9)
15u 灌胃 (n=9)
0
20
40
60
时间，天数

图10D

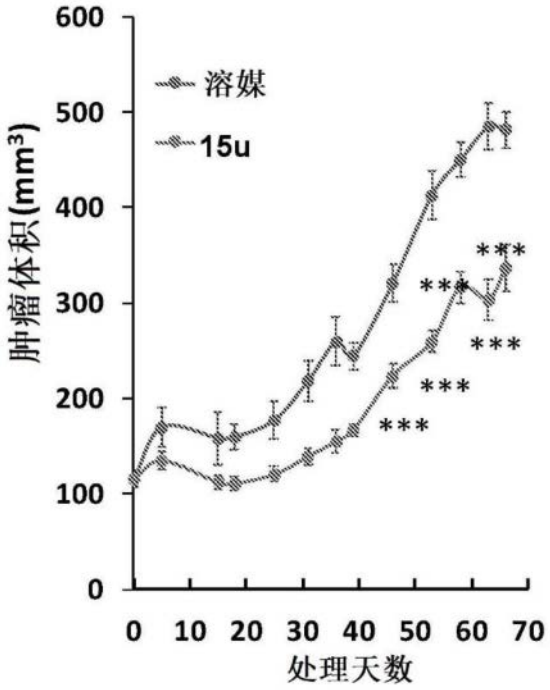

肿瘤体积(mm³)
600
500
400
300
200
100
0
溶媒
15u
***
***
***
***
***
0 10 20 30 40 50 60 70
处理天数

图11A

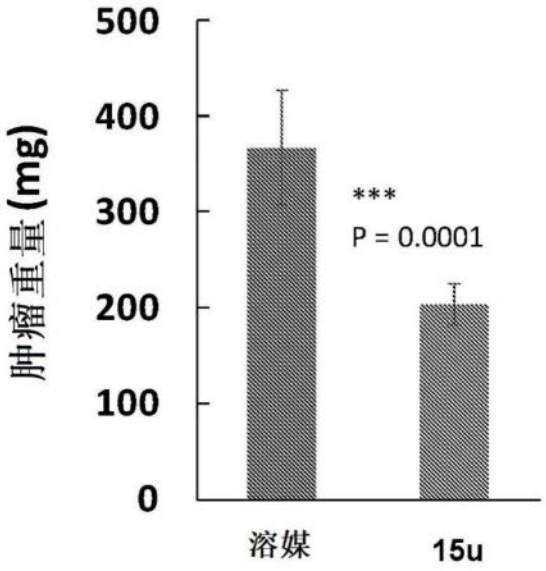

500
400
300
200
100
0
肿瘤重量(mg)
***
P = 0.0001
溶媒
15u

图11B

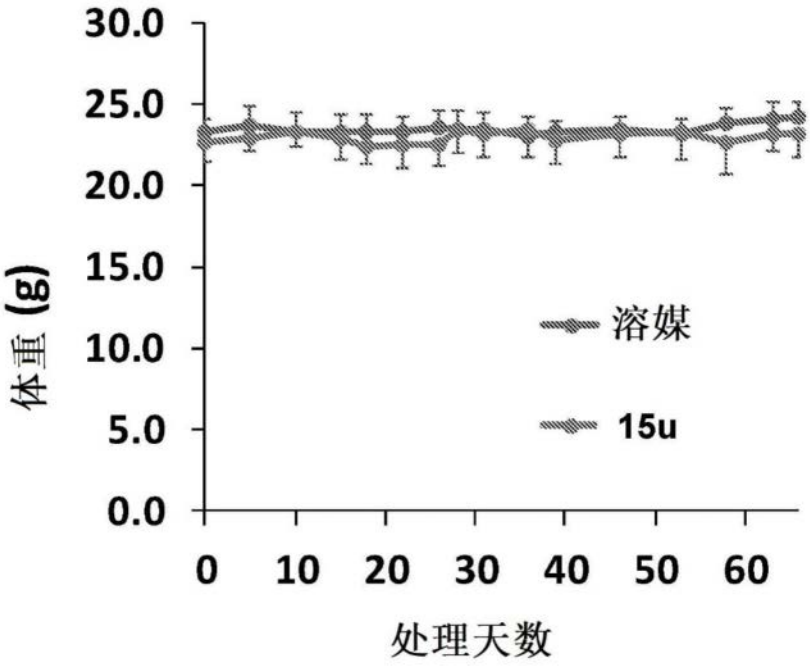

30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
体重(g)
溶媒
15u
0
10
20
30
40
50
60
处理天数

图11C

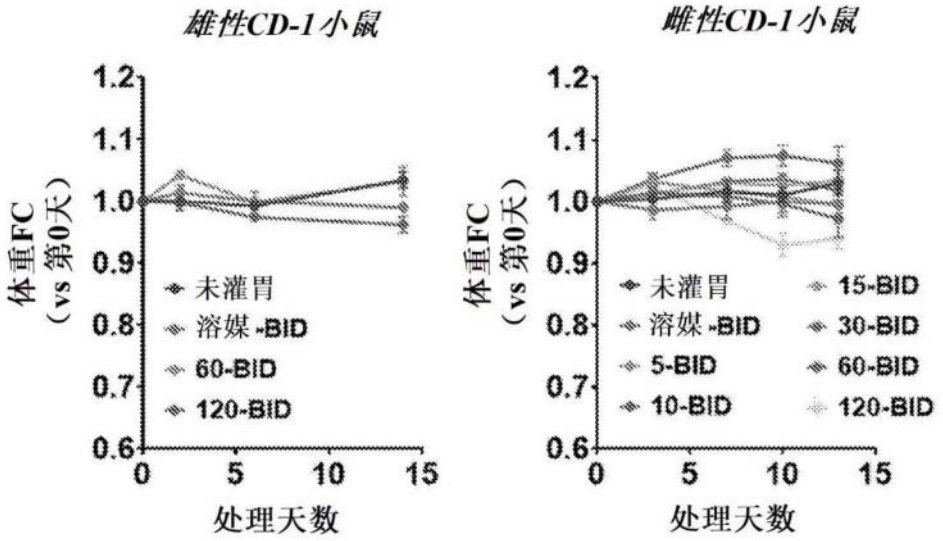

雄性CD-1小鼠
雌性CD-1小鼠
体重FC
（vs 第0天）
1.2
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0
5
10
15
处理天数
未灌胃
溶媒-BID
60-BID
120-BID
5-BID
10-BID
15-BID
30-BID

图12A

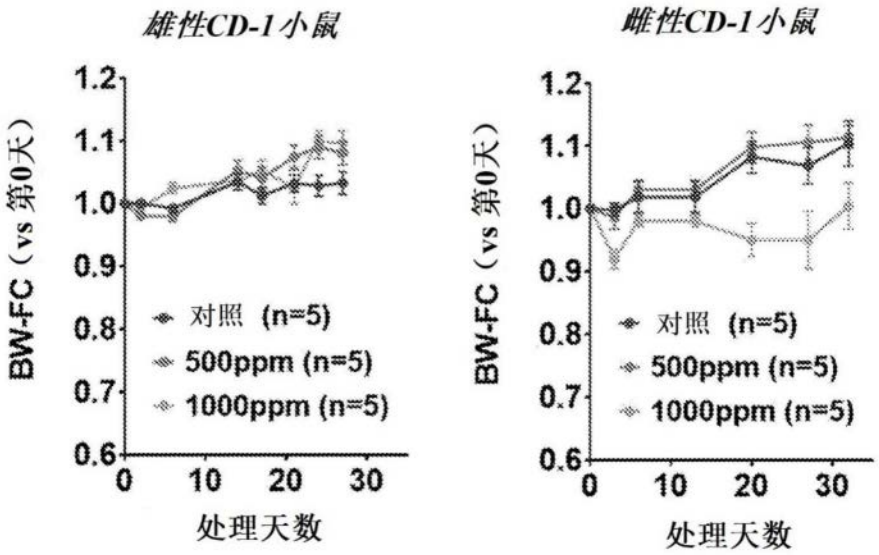

雄性CD-1小鼠
雌性CD-1小鼠
BW-FC（vs 第0天）
1.2
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0
10
20
30
处理天数
对照 (n=5)
500ppm (n=5)
1000ppm (n=5)

图12B



图13

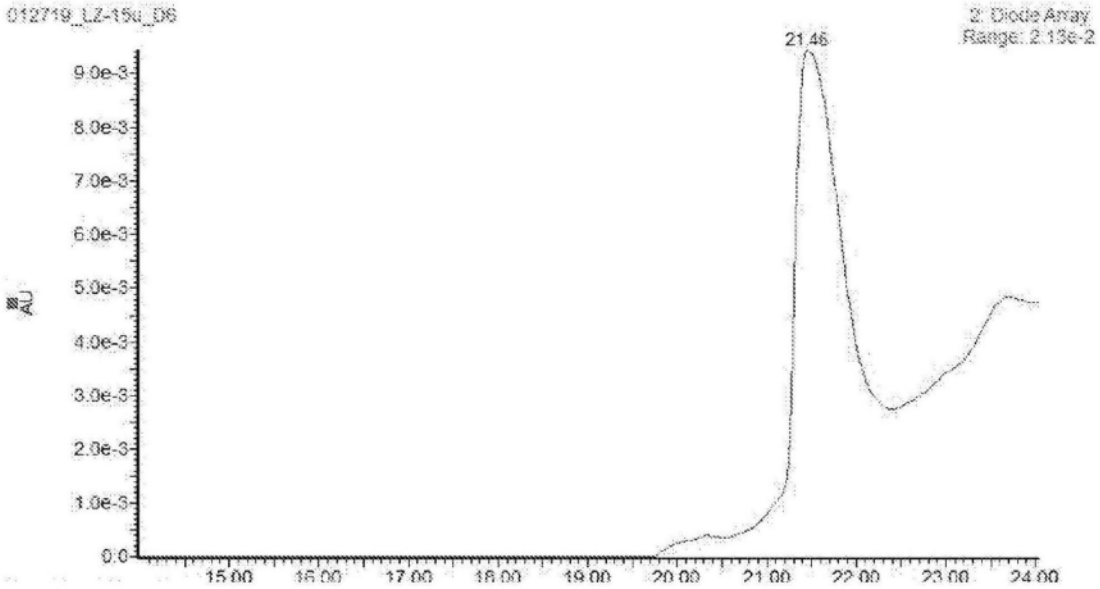

012719_LZ-15u_D6
2: Diode Array
Range: 2.13e-2
21.46
9.0e-3
8.0e-3
7.0e-3
6.0e-3
5.0e-3
4.0e-3
3.0e-3
2.0e-3
1.0e-3
0.0
AU
15.00
16.00
17.00
18.00
19.00
20.00
21.00
22.00
23.00
24.00

图14A

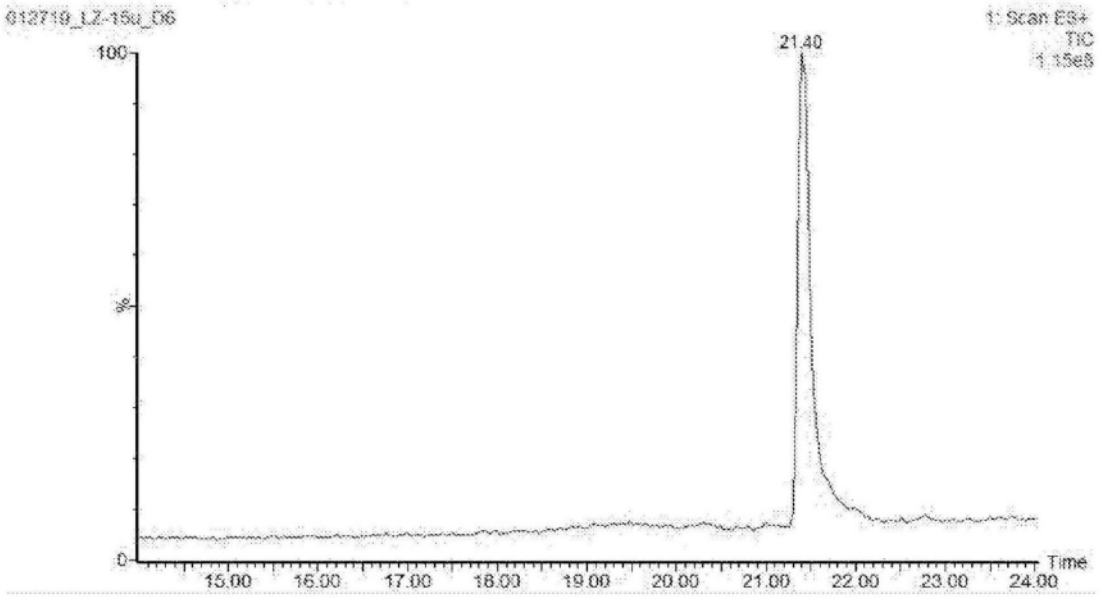

012719_LZ-15u_D6
1: Scan ES+
TIC
1.15e8
21.40
100
%
0
Time
15.00
16.00
17.00
18.00
19.00
20.00
21.00
22.00
23.00
24.00

图14B

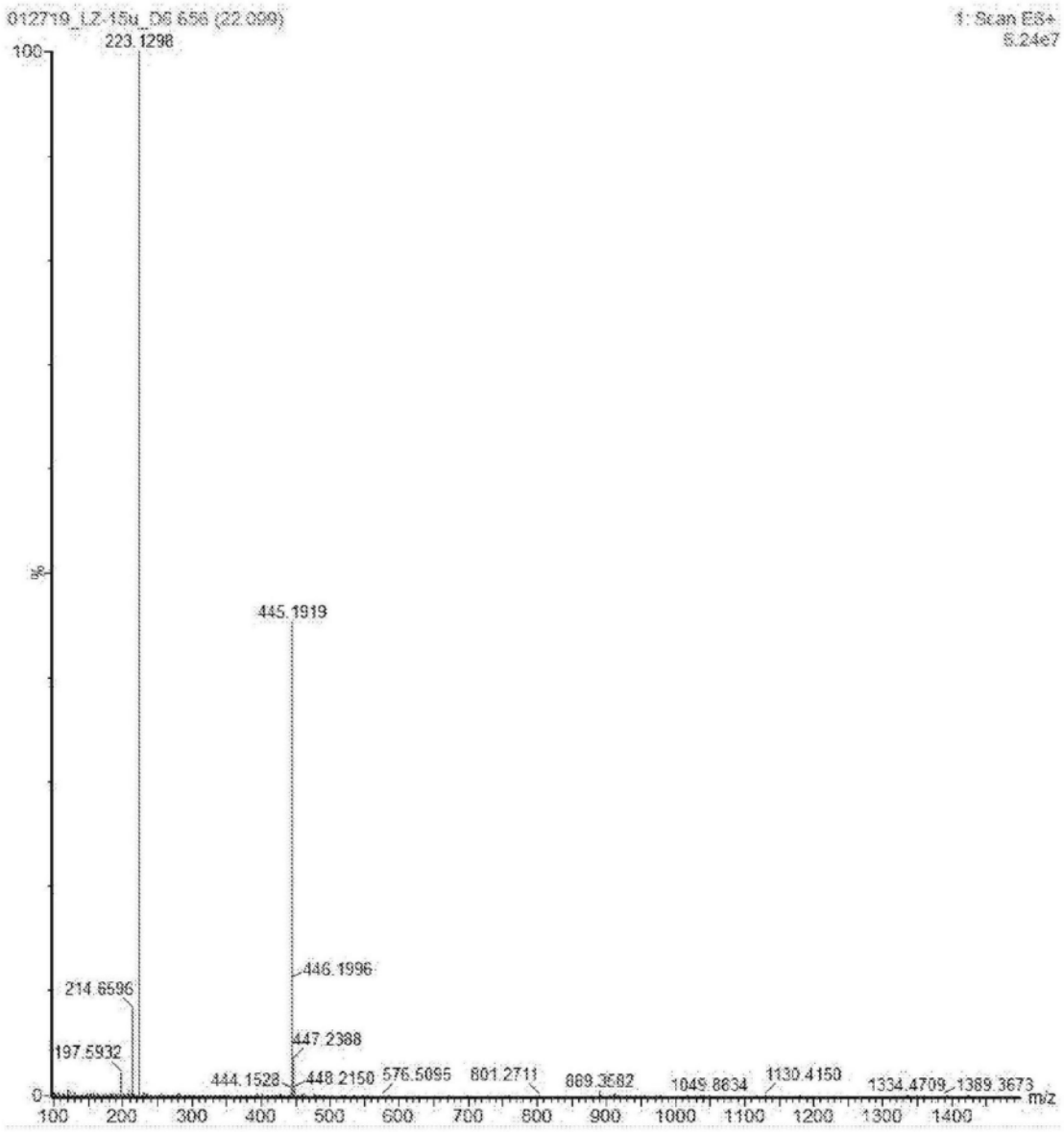

012719_LZ-15u_D6 656 (22.099)
1: Scan ES+
6.24e7
100
%
0
223.1298
445.1919
446.1996
214.6596
447.2388
197.5932
444.1528
448.2150
576.5095
801.2711
889.3582
1049.8634
1130.4150
1334.4709
1389.3673
m/z
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
1100
1200
1300
1400

图14C