



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I849048 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 07 月 21 日

(21)申請案號：109103117

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 01 月 31 日

(51)Int. Cl.：

*C07D215/46 (2006.01)**C07D241/54 (2006.01)**A61K31/4375 (2006.01)**A61K31/517 (2006.01)**A61K31/662 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2019/02/01 美國

62/800,283

2019/03/06 美國

62/814,745

(71)申請人：李蘭 史丹佛學院理事會 (美國) THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (US)

美國

(72)發明人：李 令音 LI, LINGYIN (US)；史密斯 馬克 SMITH, MARK (US)；卡羅莎 賈桂琳 安 CAROZZA, JACQUELINE ANN (US)；博納 沃爾克 BOEHNERT, VOLKER (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

WO 2013096680A1

期刊 Kunio Hiroi, Yoshio Suzuki, Ikuko Abe, Ryoko Kawagishi. New Chiral Sulfoxide Ligands Possessing a Phosphano or Phosphanoamino Functionality in Palladium-Catalyzed Asymmetric Allylic Nucleophilic Substitution Reactions. Tetrahedron 2000/06/01

期刊 Wang S, Li J, Miao T, Wu W, Li Q, Zhuang Y, Zhou Z, Qiu L. Highly efficient synthesis of a class of novel chiral-bridged atropisomeric monophosphine ligands via simple desymmetrization and their applications in asymmetric Suzuki-Miyaura coupling reaction. Org Lett. 2012/04/06

審查人員：藍昇軒

申請專利範圍項數：80 項 圖式數：22 共 237 頁

(54)名稱

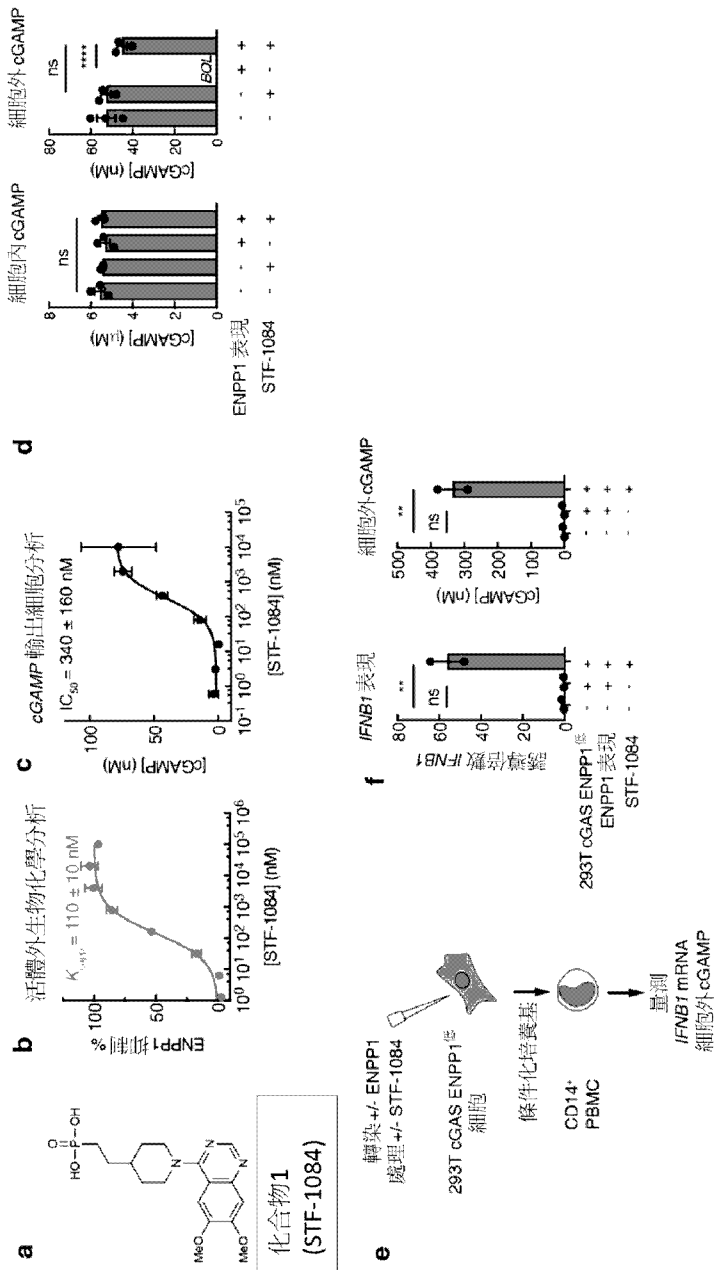
ENPP1 抑制劑及調節免疫反應之方法

(57)摘要

提供用於抑制 ENPP1 之化合物、組合物及方法。標的方法之態樣包括使樣品與 ENPP1 抑制劑化合物接觸以抑制 ENPP1 之 cGAMP 水解活性。在一些情況下，該 ENPP1 抑制劑化合物係細胞不可滲透的。ENPP1 抑制劑化合物可在細胞外用於阻斷 cGAMP 之降解。亦提供用於治療癌症之醫藥組合物及方法。該等方法之態樣包括向個體投與治療有效量之 ENPP1 抑制劑來治療該個體之癌症。在某些情況下，癌症係實體腫瘤癌症。亦提供向個體投與放射療法與向該個體投與 ENPP1 抑制劑相結合之方法。該放射療法在標的方法中可以有效地減少對該個體之放射損傷、但仍引發免疫反應之劑量及/或頻率投與。

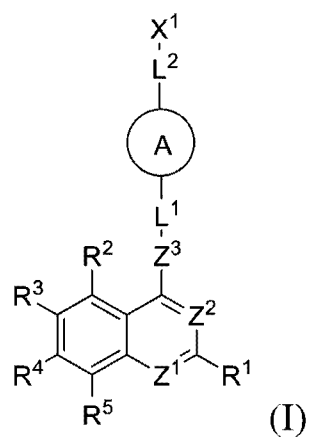
Compounds, compositions and methods are provided for the inhibition of ENPP1. Aspects of the subject methods include contacting a sample with an ENPP1 inhibitor compound to inhibit the cGAMP hydrolysis activity of ENPP1. In some cases, the ENPP1 inhibitor compound is cell impermeable. ENPP1 inhibitor compounds can act extracellularly to block the degradation of cGAMP. Also provided are pharmaceutical compositions and methods for treating cancer. Aspects of the methods include administering to a subject a therapeutically effective amount of an ENPP1 inhibitor to treat the subject for cancer. In certain cases, the cancer is a solid tumor cancer. Also provided are methods of administering radiation therapy to a subject in conjunction with administering an ENPP1 inhibitor to the subject. The radiation therapy can be administered in the subject methods at a dosage and/or frequency effective to reduce radiation damage to the subject, but still instigate an immune response.

指定代表圖：



【圖 3】

特徵化學式：





I849048

【發明摘要】**【中文發明名稱】** ENPP1 抑制劑及調節免疫反應之方法**【英文發明名稱】** ENPP1 INHIBITORS AND METHODS OF MODULATING
IMMUNE RESPONSE**【中文】**

提供用於抑制 ENPP1 之化合物、組合物及方法。標的方法之態樣包括使樣品與 ENPP1 抑制劑化合物接觸以抑制 ENPP1 之 cGAMP 水解活性。在一些情況下，該 ENPP1 抑制劑化合物係細胞不可滲透的。ENPP1 抑制劑化合物可在細胞外用於阻斷 cGAMP 之降解。亦提供用於治療癌症之醫藥組合物及方法。該等方法之態樣包括向個體投與治療有效量之 ENPP1 抑制劑來治療該個體之癌症。在某些情況下，癌症係實體腫瘤癌症。亦提供向個體投與放射療法與向該個體投與 ENPP1 抑制劑相結合之方法。該放射療法在標的方法中可以有效地減少對該個體之放射損傷、但仍引發免疫反應之劑量及/或頻率投與。

【英文】

Compounds, compositions and methods are provided for the inhibition of ENPP1. Aspects of the subject methods include contacting a sample with an ENPP1 inhibitor compound to inhibit the cGAMP hydrolysis activity of ENPP1. In some cases, the ENPP1 inhibitor compound is cell impermeable. ENPP1 inhibitor compounds can act extracellularly to block the degradation of cGAMP. Also provided are pharmaceutical compositions and methods for treating cancer. Aspects of the methods include administering to a subject a therapeutically effective amount of an ENPP1 inhibitor to treat the subject for cancer. In certain cases, the cancer is a solid tumor cancer. Also provided are methods of administering radiation therapy to a subject in conjunction

with administering an ENPP1 inhibitor to the subject. The radiation therapy can be administered in the subject methods at a dosage and/or frequency effective to reduce radiation damage to the subject, but still instigate an immune response.

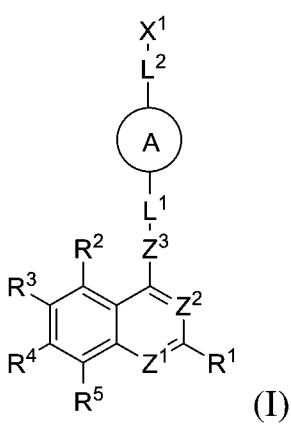
【指定代表圖】

圖 3a - 圖 3f

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】



【發明說明書】

【中文發明名稱】 ENPP1 抑制劑及調節免疫反應之方法

【英文發明名稱】 ENPP1 INHIBITORS AND METHODS OF MODULATING
IMMUNE RESPONSE

【技術領域】

【先前技術】

【0001】 環單磷酸鳥苷-單磷酸腺苷(cGAMP)活化干擾素基因刺激物(STING)路徑，該路徑係重要的抗癌先天免疫路徑。由於微生物感染或病理生理條件，包括癌症及自體免疫病症，在細胞質 DNA 存在時，cGAS-cGAMP-STING 路徑得到活化。環 GMP-AMP 合成酶(cGAS)屬於核苷酸轉移酶家族且係通用之 DNA 感測器，其在與胞質 dsDNA 結合時活化，產生信號傳導分子(2'-5'、3'-5')環 GMP-AMP (或 2',3'-cGAMP 或環單磷酸鳥苷-單磷酸腺苷，cGAMP)。在微生物感染過程中，作為第二信使，2',3'-cGAMP 結合並活化 STING，使得產生 I 型干擾素(IFN)及其他共刺激分子，從而觸發免疫反應。除了在傳染病中之作用外，STING 路徑已經成為癌症免疫療法及自體免疫疾病之靶標。

【0002】 外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶 1 (ENPP1)係 cGAMP 之主要水解酶，其可降解 cGAMP。ENPP1 係外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶(ENPP)家族之成員，並且係包含兩個相同二硫鍵鍵結之次單元之 II 型跨膜糖蛋白。ENPP1 對裂解多種受質(包括核苷酸及核苷酸糖之磷酸二酯鍵，以及核苷酸及核苷酸糖之焦磷酸鍵)具有廣泛特異性。ENPP1 可以將核苷 5'三磷酸水解成其相應之單磷酸，且亦可水解二腺苷多磷酸。

【發明內容】

【0003】 提供用於抑制 ENPP1 之化合物、組合物及方法。標的方法之態樣包

括使樣品與 ENPP1 抑制劑化合物接觸以抑制 ENPP1 之 cGAMP 水解活性。在一些情況下，ENPP1 抑制劑化合物係細胞不可滲透的。ENPP1 抑制劑化合物可用於細胞外阻斷 cGAMP 之降解。亦提供用於治療癌症之醫藥組合物及方法。該等方法之態樣包括向個體投與治療有效量之 ENPP1 抑制劑來治療個體之癌症。在某些情況下，癌症係實體腫瘤癌症。亦提供向個體投與放射療法與向個體投與 ENPP1 抑制劑相結合之方法。放射療法可以在標的方法中以有效減少放射對個體之損傷、但仍能引發免疫反應之劑量及/或頻率投與。

【0004】 熟習此項技術者在閱讀下文更全面闡述之組合物及使用方法之細節後，本揭示案之該等及其他優點及特徵將變得顯而易見。

【圖式簡單說明】

【0005】 當結合附圖閱讀時，從以下詳細描述中可以最好地理解本發明。專利或申請檔含有至少一個彩繪圖形。需要強調的是，根據慣例，該等圖之各種特徵並非按比例繪製。相反，為了清楚起見，各種特徵之尺寸係任意擴大或縮小的。圖中包括以下各圖。應當理解，下文所述之圖僅用於說明目的。該等圖並不欲以任何方式限制本教示之範圍。

【0006】 圖 1 之圖 A 至 J，顯示證明 cGAMP 作為可溶性因子自 293T cGAS ENPP1^{-/-}細胞輸出之實驗結果。

【0007】 圖 2 之圖 A 至 C，顯示證明 ENPP1 可調節細胞外 cGAMP 之實驗結果。

【0008】 圖 3 之圖 A 至 F，圖解說明例示性 ENPP1 抑制劑(化合物 1)之結構及在多種細胞分析中之活性。

【0009】 圖 4 之圖 A 至 E，顯示表明癌細胞表現 cGAS 並在培養物中連續輸出 cGAMP 之實驗結果。

【0010】 圖 5 之圖 A 至 I，顯示表明細胞外 cGAMP 之隔離以腫瘤 cGAS 及宿主 STING 依賴性方式減少腫瘤相關之樹突細胞之實驗結果。

【0011】 圖 6 之圖 A 至 D，顯示表明 ENPP1^{-/-}腫瘤動員先天免疫浸潤、侵襲性較低且對 IR 及抗 CTLA-4 (細胞毒性 T 淋巴球相關抗原 4)療法更敏感之實驗結果。

【0012】 圖 7 之圖 A 至 C，顯示表明 ENPP1 抑制與 IR 處理及抗 CTLA-4 協同作用以發揮抗腫瘤效應之實驗結果。

【0013】 圖 8 之圖 A 至 D，圖解說明使用 LC-MS/MS 方法及 293T cGAS ENPP1^低及 293T cGAS ENPP1^{-/-}細胞株來評價 ENPP1 水解活性及 cGAMP 水準。

【0014】 圖 9 之圖 A 至 B，顯示圖解說明 CD14⁺原代人類外周血單核細胞 (PBMC)對細胞外 cGAMP 有反應之實驗示意圖及結果。

【0015】 圖 10 之圖 A 至 B，顯示比較化合物 1 與化合物 QS1 之 ENPP1 抑制活性且顯示 QS1 在細胞分析中之活性之實驗結果。

【0016】 圖 11 之圖 A 至 F，顯示表明例示性 ENPP1 抑制劑化合物 1 (STF-1084)為細胞不可滲透的、對 ENPP1 有特異性且無毒之實驗結果。

【0017】 圖 12 之圖 A 至 E，顯示表明癌細胞在培養物中連續輸出 cGAMP 之實驗結果。

【0018】 圖 13 之圖 A 至 D，顯示表明細胞外 cGAMP 之隔離以腫瘤 cGAS 及宿主 STING 依賴性方式減少腫瘤相關樹突細胞之實驗結果。

【0019】 圖 14 之圖 A 至 F，顯示表明已建立之 ENPP1^{-/-}腫瘤導致腫瘤相關樹突細胞增加、侵襲性較低且對 IR 及抗 CTLA-4 療法更敏感之實驗結果。

【0020】 圖 15 顯示證明 ENPP1 抑制(例如，使用化合物 1；STF-1084)與 IR 處理協同作用以增加腫瘤相關樹突細胞之數據之圖。

【0021】 圖 16 顯示圖解說明 cGAMP 自合成細胞傳遞至靶細胞之不同模式之示意圖。

【0022】 圖 17 顯示圖解說明 cGAMP 為活體內癌細胞分泌之癌症危險信號之示意圖。

【0023】 圖 18A 至圖 18C 顯示圖解說明例示性 ENPP1 抑制劑(化合物 1)可增加細胞系統中存在之細胞外 cGAMP 之量之數據。

【0024】 圖 19A 至圖 19B 顯示圖解說明例示性 ENPP1 抑制劑(化合物 1)可增加 cGAMP 刺激之干擾素轉錄之實驗示意圖及結果。

【0025】 圖 20A 至圖 20B 顯示圖解說明例示性 ENPP1 抑制劑(化合物 1)可增加小鼠腫瘤模型中腫瘤相關樹突細胞之數量之數據。

【0026】 圖 21A 至圖 21C 顯示圖解說明 ENPP1 抑制與 IR 處理及抗 CTLA-4 協同作用以發揮抗腫瘤效應之實驗結果。

【0027】 圖 22 顯示圖解說明 ENPP1 係調節免疫遞質 cGAMP 之先天免疫檢查點之示意圖。

【實施方式】

相關申請案

【0028】 本申請案主張於 2019 年 2 月 1 日提出申請之美國臨時專利申請案第 62/800,283 號及於 2019 年 3 月 6 日提出申請之美國臨時專利申請案第 62/814,745 號之優先權及權益，該等申請案中每一者之全部內容皆以引用方式併入。

政府權利

【0029】 本發明係在美國國家衛生研究院(National Institutes of Health)授予之合同 CA190896 及 CA228044 以及美國國防部(Department of Defense)授予之合同 W81XWH-18-1-0041 之政府支持下完成。政府對本發明有一定的權利。

定義

【0030】 在進一步描述本揭示案之實施例之前，應當理解，本揭示案並不限於所述之特定實施例，因此當然可以發生變化。亦應當理解，本文使用之術語僅僅係出於描述特定實施例之目的，而非意欲進行限制，此乃因本揭示案之範圍將僅由所附申請專利範圍來限定。

【0031】 除非另有定義，否則本文使用之所有技術及科學術語皆具有與熟習本揭示案所屬領域之技術者通常所理解相同之含義。類似于或等效于本文所述之任何方法及材料亦可以用於本揭示案實施例之實踐或測試中。

【0032】 必須注意的是，除非上下文另有明確規定，否則如本文及隨附申請專利範圍中所用，單數形式「一」、「及」及「該」包括複數個指代物。因此，例如，提及「一種化合物」不僅包括單一化合物，而且亦包括兩種或更多種化合物之組合，提及「一個取代基」包括單一取代基以及兩個或更多個取代基及諸如此類。

【0033】 在描述及要求保護本發明時，將根據下文所述之定義使用某些術語。應當理解，本文提供之定義並不欲相互排斥。因此，一些化學部分可能在一個以上術語之定義內。

【0034】 片語「例如(for example)」、「例如(for instance)」、「例如(such as)」或「包括」意欲引入進一步闡明更一般標的物之實例。提供該等實例僅僅係為了幫助理解本揭示案，並不欲以任何方式進行限制。

【0035】 提供本文討論之出版物僅用於在本申請案之提出申請日之前揭示。本文中之任何內容皆不應理解為承認本發明無權先於先前發明之此種出版物。此外，所提供之出版日期可能與實際出版日期不同，實際出版日期可能需要獨立確認。

【0036】 術語「活性劑」、「拮抗劑」、「抑制劑」、「藥物」及「藥理學活性劑」在本文中可互換使用且係指當投與生物體(人類或動物)時，藉由局部及/或全身作用誘導期望之藥理學及/或生理學效應之化學物質或化合物。

【0037】 術語「治療(treatment)」、「治療(treating)」及諸如此類係指獲得期望之藥理學及/或生理學效應，例如減少腫瘤負荷。就完全或部分預防疾病或其症狀而言，該效應可以係預防性的，及/或就部分或完全治癒疾病及/或歸因於疾病之副作用而言，該效應可以係治療性的。「治療」意欲涵蓋哺乳動物、尤其人類之疾病之任何治療，並且包括：(a)預防可能易患疾病但尚未診斷為患有該疾病之個體發生該疾病或疾病症狀(例如，包括可能與原發性疾病相關或由原發性疾病引起之疾病(如可導致慢性 HCV 感染之肝纖維化)；(b)抑制疾病，即阻止其發展；及(c)緩解疾病，即引起疾病之消退(例如減少腫瘤負荷)。

【0038】 術語「醫藥學上可接受之鹽」意指對患者(例如哺乳動物)之投與為可接受之鹽(對於給定劑量方案，具有可接受之哺乳動物安全性之抗衡離子之鹽)。該等鹽可以衍生自醫藥學上可接受之無機或有機鹼以及醫藥學上可接受之無機或有機酸。「醫藥學上可接受之鹽」係指化合物之醫藥學上可接受之鹽，該等鹽衍生自此項技術眾所周知之多種有機及無機抗衡離子，且僅舉例而言包括鈉、鉀、鈣、鎂、銨、四烷基銨及諸如此類；且當分子含有鹼性官能基時，有機或無機酸之鹽，例如鹽酸鹽、氫溴酸鹽、甲酸鹽、酒石酸鹽、苯磺酸鹽、甲磺酸鹽、乙酸鹽、馬來酸鹽、草酸鹽及諸如此類。

【0039】 術語「個體(individual)」、「宿主」、「個體(subject)」及「患者」在本文中可互換使用，且係指動物，包括(但不限於)人類及非人類靈長類動物，包括猿猴及人類；齧齒類動物，包括大鼠及小鼠；牛；馬；綿羊；貓；犬；及諸如此類。「哺乳動物」意指任何哺乳動物物種之一或多個成員，且舉例而言

包括犬；貓；馬；牛；綿羊；嚙齒目動物等，及靈長類動物，例如非人類靈長類動物及人類。非人類動物模型(例如哺乳動物，例如非人類靈長類動物、鼠類、兔形目動物等)可用於實驗研究。

【0040】 術語「測定」、「量測」、「評價」及「分析」可互換使用且包括定量及定性測定二者。

【0041】 術語「多肽」及「蛋白質」在本文中可互換使用且係指任何長度之胺基酸之聚合形式，其可包括編碼及非編碼胺基酸、化學或生物化學修飾或衍生之胺基酸以及具有修飾之肽骨架之多肽。該術語包括融合蛋白，包括(但不限於)具有異源胺基酸序列之融合蛋白、具有異源及天然前導序列之融合蛋白，具或不具 N-末端甲硫胺酸殘基；免疫標記之蛋白質；具有可偵測融合配偶體之融合蛋白，例如，包括作為融合配偶體之螢光蛋白、 β -半乳糖苷酶、螢光素酶等之融合蛋白；及諸如此類。

【0042】 術語「核酸分子」及「多核苷酸」可互換使用且係指任何長度之核苷酸(去氧核糖核苷酸或核糖核苷酸)之聚合形式或其類似物。多核苷酸可以具有任何三維結構，並且可以實施任何已知或未知之功能。多核苷酸之非限制性實例包括基因、基因片段、外顯子、內含子、信使 RNA (mRNA)、轉移 RNA、核糖體 RNA、核酶、cDNA、重組多核苷酸、分支多核苷酸、質體、載體、任何序列之經分離 DNA、控制區、任何序列之經分離 RNA、核酸探針及引子。核酸分子可為線性或環形的。

【0043】 「治療有效量」或「有效量」意指當向哺乳動物或其他個體投與用於治療疾病、病狀或病症時，足以實現該疾病、病狀或病症之此種治療之化合物之量。「治療有效量」將端視化合物、疾病及其嚴重程度以及欲治療個體之年齡、體重等而變化。

【0044】 如本文所用之術語「單位劑型」係指適合作為人類及動物個體之單位劑量之物理離散單位，每個單位含有預定量之化合物(例如，如本文所述之胺基嘧啶化合物)，其量經計算足以產生與醫藥學上可接受之稀釋劑、載劑或媒劑相關之期望效應。單位劑型之規格端視所用之特定化合物及欲達成之效應以及與宿主中每種化合物相關之藥效學而定。

【0045】 術語「醫藥學上可接受之賦形劑」、「醫藥學上可接受之稀釋劑」、「醫藥學上可接受之載劑」及「醫藥學上可接受之佐劑」係指可用於製備醫藥組合物之賦形劑、稀釋劑、載劑或佐劑，該等醫藥組合物通常係安全、無毒的，既非生物學亦非其他方面不合意的，並且包括為獸醫用途以及人類醫藥用途可接受之賦形劑、稀釋劑、載劑及佐劑。如本說明書及申請專利範圍中使用之「醫藥學上可接受之賦形劑、稀釋劑、載劑及佐劑」包括一種及一種以上之該賦形劑、稀釋劑、載劑及佐劑。

【0046】 術語「醫藥組合物」意欲涵蓋適於投與個體(例如哺乳動物，尤其人類)之組合物。通常，「醫藥組合物」係無菌的，並且較佳不含能夠在個體內引起不期望反應之污染物(例如，醫藥組合物中之化合物為藥物級)。醫藥組合物可以經設計以經由多種不同之投與途徑投與有需要之個體或患者，該等不同之投與途徑包括經口、經頰、直腸、非經腸、腹膜內、真皮內、氣管內、肌內、皮下及諸如此類。

【0047】 片語「具有式」或「具有結構」並不欲具有限制性，且其使用方式與術語「包含」通常使用之方式相同。術語「獨立地選自」在本文中用於指示所列舉要素(例如 R 基團或諸如此類)可以相同或不同。

【0048】 術語「可以」、「視情況存在之」、「視情況」或「可以視情況」意指隨後描述之情況可能發生或可能不發生，以使得該描述包括情況發生之情

形及情況不發生之情形。例如，片語「視情況取代之」意指給定原子上可以存在或可以不存在非氫取代基，且因此，該描述包括其中存在非氫取代基之結構及其中不存在非氫取代基之結構。

【0049】 「醯基」係指基團 H-C(O)-、烷基-C(O)-、經取代烷基-C(O)-、烯基-C(O)-、經取代烯基-C(O)-、炔基-C(O)-、經取代炔基-C(O)-、環烷基-C(O)-、經取代環烷基-C(O)-、環烯基-C(O)-、經取代環烯基-C(O)-、芳基-C(O)-、經取代芳基-C(O)-、雜芳基-C(O)-、經取代雜芳基-C(O)-、雜環基-C(O)-及經取代雜環基-C(O)-，其中烷基、經取代烷基、烯基、經取代烯基、炔基、經取代炔基、環烷基、經取代環烷基、環烯基、經取代環烯基、芳基、經取代芳基、雜芳基、經取代雜芳基、雜環及經取代雜環係如本文所定義。例如，醯基包括「乙醯基」CH₃C(O)-

【0050】 術語「烷基」係指通常但不一定含有 1 至約 24 個碳原子之具支鏈或不具支鏈之飽和烴基(即，單基團)，例如甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、異丁基、第三丁基、辛基、癸基及諸如此類以及環烷基，例如環戊基、環己基及諸如此類。通常但不一定，本文之烷基可含有 1 至約 18 個碳原子，且該等基團可含有 1 至約 12 個碳原子。術語「低碳數烷基」係指 1 至 6 個碳原子之烷基。

「經取代烷基」係指經一或多個取代基取代之烷基，且此包括烷基取代基中來自相同碳原子之兩個氫原子經替代之情況，例如在羰基中(即，經取代烷基可以包括-C(=O)-部分)。術語「含雜原子之烷基」及「雜烷基」係指其中至少一個碳原子經雜原子替代之烷基取代基，如下文進一步詳細描述。若未另外指示，術語「烷基」及「低碳數烷基」分別包括直鏈、具支鏈、環狀、未經取代、經取代及/或含雜原子之烷基或低碳數烷基。

【0051】 術語「經取代烷基」意欲包括如本文所定義之烷基，其中烷基鏈中

之一或多個碳原子已視情況經雜原子(例如-O-、-N-、-S-、-S(O)_n- (其中 n 為 0 至 2)、-NR- (其中 R 係氫或烷基))替代且具有 1 至 5 個選自由以下組成之群之取代基：烷氧基、經取代烷氧基、環烷基、經取代環烷基、環烯基、經取代環烯基、醯基、醯基胺基、醯基氧基、胺基、胺基醯基、胺基醯基氧基、氧基胺基、醯基、疊氮基、氰基、鹵素、羥基、側氧基、硫酮基、羧基、羧基烷基、硫芳基氧基、硫雜芳基氧基、硫雜環氧基、硫醇基、硫代烷氧基、經取代之硫代烷氧基、芳基、芳基氧基、雜芳基、雜芳基氧基、雜環基、雜環氧基、羥基胺基、烷氧基胺基、硝基、-SO-烷基、-SO-芳基、-SO-雜芳基、-SO₂-烷基、-SO₂-芳基、-SO₂-雜芳基及-NRaRb，其中 R'及 R''可以相同或不同且係選自氫、視情況經取代之烷基、環烷基、烯基、環烯基、炔基、芳基、雜芳基及雜環。

【0052】 術語「烯基」係指含有至少一個雙鍵之 2 至約 24 個碳原子之直鏈、具支鏈或環狀烴基，例如乙烯基、正丙烯基、異丙烯基、正丁烯基、異丁烯基、辛烯基、癸烯基、十四烯基、十六烯基、二十烯基、二十四碳烯基及諸如此類。通常且亦不一定，本文之烯基可含有 2 至約 18 個碳原子，且例如可含有 2 至 12 個碳原子。術語「低碳數烯基」係指 2 至 6 個碳原子之烯基。術語「經取代烯基」係指經一或多個取代基取代之烯基，且術語「含雜原子之烯基」及「雜烯基」係指其中至少一個碳原子經雜原子替代之烯基。若未另外指示，術語「烯基」及「低碳數烯基」分別包括直鏈、具支鏈、環狀、未經取代、經取代及/或含雜原子之烯基及低碳數烯基。

【0053】 術語「炔基」係指含有至少一個三鍵之 2 至 24 個碳原子之直鏈或具支鏈烴基，例如乙炔基、正丙炔基及諸如此類。通常且亦不一定，本文之炔基可以含有 2 至約 18 個碳原子，並且該等基團可以進一步含有 2 至 12 個碳原子。術語「低碳數炔基」係指 2 至 6 個碳原子之炔基。術語「經取代炔基」係指經一

或多個取代基取代之炔基，且術語「含雜原子之炔基」及「雜炔基」係指其中至少一個碳原子經雜原子替代之炔基。若未另外指示，術語「炔基」及「低碳數炔基」分別包括直鏈、具支鏈、未經取代、經取代及/或含雜原子之炔基及低碳數炔基。

【0054】 術語「烷氧基」係指經由單個末端醚鍵聯結合之烷基；亦即，「烷氧基」可以表示為-O-烷基，其中烷基係如上文所定義。「低碳數烷氧基」係指含有 1 至 6 個碳原子之烷氧基，且包括例如甲氧基、乙氧基、正丙氧基、異丙氧基、第三丁氧基等。本文中鑒定為「C1-C6 烷氧基」或「低碳數烷氧基」之取代基可以例如含有 1 至 3 個碳原子，並且作為另一實例，該等取代基可以含有 1 或 2 個碳原子(即，甲氧基及乙氧基)。名稱「-OMe」及「MeO-」係指甲氧基。

【0055】 術語「經取代烷氧基」係指基團經取代烷基-O-、經取代烯基-O-、經取代環烷基-O-、經取代環烯基-O-及經取代炔基-O-，其中經取代烷基、經取代烯基、經取代環烷基、經取代環烯基及經取代炔基係如本文所定義。

【0056】 除非另有說明，否則術語「芳基」係指芳族取代基，其通常但不一定含有 5 至 30 個碳原子，並且含有單個芳族環或多個稠合在一起、直接連接或間接連接(使得不同之芳族環結合到共同之基團，例如亞甲基或伸乙基部分)之芳族環。芳基可例如含有 5 至 20 個碳原子，且作為另一實例，芳基可含有 5 至 12 個碳原子。例如，芳基可含有一個芳族環或兩個或更多個稠合或連接之芳族環(即，聯芳基、芳基-經取代芳基等)。實例包括苯基、萘基、聯苯、二苯基醚、二苯基胺、二苯甲酮及諸如此類。「經取代芳基」係指經一或多個取代基取代之芳基部分，且術語「含雜原子之芳基」及「雜芳基」係指其中至少一個碳原子經雜原子替代之芳基取代基，如將在下文中進一步詳細描述。芳基意欲包括穩定的環狀、雜環、多環及多雜環不飽和 C₃-C₁₄ 部分，例如(但不限於)苯基、聯

苯、萘基、吡啶基、呋喃基、噻吩基、咪唑基、嘧啶基及噁唑基；其可以進一步經 1 至 5 個選自由以下組成之群之成員取代：羥基、 C_1 - C_8 烷氧基、 C_1 - C_8 具支鏈或直鏈烷基、醯基氧基、胺甲醯基、胺基、N-醯基胺基、硝基、鹵素、三氟甲基、氰基及羧基(參見例如 Katritzky, Handbook of Heterocyclic Chemistry)。若未另外指示，術語「芳基」包括未經取代、經取代及/或含雜原子之芳族取代基。

【0057】 術語「芳烷基」係指具有芳基取代基之烷基，且術語「烷芳基」係指具有烷基取代基之芳基，其中「烷基」及「芳基」係如上文所定義。通常，本文之芳烷基及烷芳基含有 6 至 30 個碳原子。芳烷基及烷芳基可例如含有 6 至 20 個碳原子，且作為另一實例，該等基團可含有 6 至 12 個碳原子。

【0058】 術語「伸烷基」係指二基團烷基。除非另外指示，否則該等基團包括含有 1 至 24 個碳原子之飽和烴鏈，其可經取代或未經取代，可含有一或多個脂環族基團，且可含有雜原子。「低碳數伸烷基」係指含有 1 至 6 個碳原子之伸烷基鍵聯。實例包括亞甲基($--CH_2--$)、伸乙基($--CH_2CH_2--$)、伸丙基($--CH_2CH_2CH_2--$)、2-甲基伸丙基($--CH_2--CH(CH_3)--CH_2--$)、伸己基($--(CH_2)_6--$)及諸如此類。

【0059】 類似地，術語「伸烯基」、「伸炔基」、「伸芳基」、「伸芳烷基」及「伸烷芳基」分別係指二基團烯基、炔基、芳基、芳烷基及烷芳基。

【0060】 術語「胺基」係指基團-NRR'，其中 R 及 R'獨立地係氫或非氫取代基，其中非氫取代基包括例如烷基、芳基、烯基、芳烷基及其經取代及/或含雜原子之變異體。

【0061】 術語「鹵基」及「鹵素」在習用意義上係指係指氯、溴、氟或碘取代基。

【0062】 「羧基(carboxyl)」、「羧基(carboxy)」或「羧酸根(carboxylate)」係

指-CO₂H 或其鹽。

【0063】 「環烷基」係指具有單個環或多個環(包括稠合、橋接及螺環系統)之 3 至 10 個碳原子之環狀烷基。合適之環烷基之實例包括例如金剛烷基、環丙基、環丁基、環戊基、環辛基及諸如此類。該等環烷基包括例如單個環結構，例如環丙基、環丁基、環戊基、環辛基及諸如此類，或多個環結構，例如金剛烷基及諸如此類。

【0064】 術語「經取代環烷基」係指具有 1 至 5 個取代基或 1 至 3 個取代基之環烷基，該等取代基選自烷基、經取代烷基、烷氧基、經取代烷氧基、環烷基、經取代環烷基、環烯基、經取代環烯基、醯基、醯基胺基、醯基氧基、胺基、經取代胺基、胺基醯基、胺基醯基氧基、氧基胺基醯基、疊氮基、氰基、鹵素、羥基、側氧基、硫酮基、羧基、羧基烷基、硫芳基氧基、硫雜芳基氧基、硫雜環氧基、硫醇基、硫代烷氧基、經取代硫代烷氧基、芳基、芳基氧基、雜芳基、雜芳基氧基、雜環基、雜環氧基、羥基胺基、烷氧基胺基、硝基、-SO-烷基、-SO-經取代烷基、-SO-芳基、-SO-雜芳基、-SO₂-烷基、-SO₂-經取代烷基、-SO₂-芳基及-SO₂-雜芳基。

【0065】 術語「含雜原子」如在「含雜原子之烷基」(亦稱為「雜烷基」)或「含雜原子之芳基」(亦稱為「雜芳基」)中係指其中一或多個碳原子經除碳以外之原子(例如氮、氧、硫、磷或矽，通常係氮、氧或硫)替代之分子、鍵聯或取代基。類似地，術語「雜烷基」係指含雜原子之烷基取代基，術語「雜環烷基」係指含雜原子之環烷基取代基，術語「雜環(heterocyclic)」或「雜環(heterocycle)」係指含雜原子之環狀取代基，術語「雜芳基」及「雜芳族」分別係指含雜原子之「芳基」及「芳族」取代基，及諸如此類。雜烷基之實例包括烷氧基芳基、烷基硫烷基-經取代烷基、N-烷化胺基烷基及諸如此類。雜芳基取代基之實例包括

吡咯基、吡咯啉基、吡啉基、喹啉基、吲哚基、呋喃基、嘧啶基、咪唑基、1,2,4-三唑基、四唑基等，且含雜原子之脂環族基團之實例係吡咯啉基、嗎啉基、六氫吡嗪基、六氫吡啉基、四氫呋喃基等。

【0066】 「雜芳基」係指環內具有 1 至 15 個碳原子、例如 1 至 10 個碳原子及 1 至 10 個選自由氧、氮及硫組成之群之雜原子之芳族基團。該等雜芳基可以在環系統中具有單個環(例如吡啉基、咪唑基或呋喃基)或多個縮合環(例如，如在諸如吲哚基、喹啉基、苯并呋喃基、苯并咪唑基或苯并噻吩基之基團中)，其中環系統內之至少一個環係芳族，條件係連接點係經由芳族環之原子。在某些實施例中，雜芳基之氮及/或硫環原子視情況經氧化以提供 N-氧化物(N→O)、亞磺醯基或磺醯基部分。此術語包括例如吡啉基、吡咯基、吲哚基、噻吩基及呋喃基。除非雜芳基取代基之定義另有限制，否則該等雜芳基可視情況經 1 至 5 個取代基或 1 至 3 個取代基取代，該等取代基選自醯基氧基、羥基、硫醇基、醯基、烷基、烷氧基、烯基、炔基、環烷基、環烯基、經取代烷基、經取代烷氧基、經取代烯基、經取代炔基、經取代環烷基、經取代環烯基、胺基、經取代胺基、胺基醯基、醯基胺基、烷芳基、芳基、芳基氧基、疊氮基、羧基、羧基烷基、氰基、鹵素、硝基、雜芳基、雜芳基氧基、雜環基、雜環氧基、胺基醯基氧基、氧基醯基胺基、硫代烷氧基、經取代硫代烷氧基、硫芳基氧基、硫雜芳基氧基、-SO-烷基、-SO-經取代烷基、-SO-芳基、-SO-雜芳基、-SO₂-烷基、-SO₂-經取代烷基、-SO₂-芳基及-SO₂-雜芳基及三鹵甲基。

【0067】 術語「雜環(heterocycle)」、「雜環(heterocyclic)」及「雜環基」係指具有單個環或多個縮合環(包括稠合橋接及螺環系統)、且具有 3 至 15 個環原子(包括 1 至 4 個雜原子)之飽和或不飽和基團。該等環雜原子係選自氮、硫及氧，其中，在稠合環系統中，一或多個環可為環烷基、雜環烷基、芳基或雜芳基，

條件係連接點係經由非芳族環。在某些實施例中，雜環基團之氮及/或硫原子視情況經氧化以提供 N-氧化物、-S(O)-或-SO₂-部分。

【0068】 雜環及雜芳基之實例包括(但不限於)氮雜環丁烷、吡咯、咪唑、吡唑、吡啶、吡嗪、嘧啶、嗒嗪、𪔐嗪、異𪔐嗪、𪔐嗪、二氫𪔐嗪、𪔐唑、嘌呤、喹嗪、異喹啉、喹啉、𪔐嗪、萘基吡啶、喹啉、喹唑啉、噌啉、喋啶、𪔐唑、𪔐啉、菲啶、𪔐啶、啡啉、異噻唑、啡嗪、異噻唑、啡𪔐嗪、啡噻嗪、咪唑啶、咪唑啉、六氫吡啶、六氫吡嗪、𪔐嗪啉、肽醯亞胺、1,2,3,4-四氫異喹啉、4,5,6,7-四氫苯并[b]噻吩、噻唑、噻唑啶、噻吩、苯并[b]噻吩、嗎啉基、硫嗎啉基(亦稱為硫代嗎啉基)、1,1-二側氧基硫嗎啉基、六氫吡啶基、吡咯啶、四氫呋喃基及諸如此類。

【0069】 除非雜環取代基之定義另有限制，否則該等雜環基團可視情況經 1 至 5 個或 1 至 3 個取代基取代，該等取代基選自烷氧基、經取代烷氧基、環烷基、經取代環烷基、環烯基、經取代環烯基、醯基、醯基胺基、醯基氧基、胺基、經取代胺基、胺基醯基、胺基醯基氧基、氧基胺基醯基、疊氨基、氰基、鹵素、羥基、側氧基、硫酮基、羧基、羧基烷基、硫芳基氧基、硫雜芳基氧基、硫雜環氧基、硫醇基、硫代烷氧基、經取代硫代烷氧基、芳基、芳基氧基、雜芳基、雜芳基氧基、雜環基、雜環氧基、羥基胺基、烷氧基胺基、硝基、-SO-烷基、-SO-經取代烷基、-SO-芳基、-SO-雜芳基、-SO₂-烷基、-SO₂-經取代烷基、-SO₂-芳基、-SO₂-雜芳基及稠合雜環。

【0070】 「烴基」係指含有 1 至約 30 個碳原子、包括 1 至約 24 個碳原子、進一步包括 1 至約 18 個碳原子、且進一步包括約 1 至 12 個碳原子之單價烴基，包括直鏈、具支鏈、環狀、飽和及不飽和種類，例如烷基、烯基、芳基及諸如此類。烴基可經一或多個取代基取代。術語「含雜原子之烴基」係指其中至少

一個碳原子經雜原子替代之烴基。除非另外表明，否則術語「烴基」應解釋為包括經取代及/或含雜原子之烴基部分。

【0071】 如在「經取代烴基」、「經取代烷基」、「經取代芳基」及諸如此類中之「經取代」，如在一些前述定義中所暗示，意指在烴基、烷基、芳基或其他部分中，至少一個與碳(或其他)原子結合之氫原子經一或多個非氫取代基替代。該等取代基之實例包括(但不限於)官能基及烴基部分 C1-C24 烷基(包括 C1-C18 烷基，進一步包括 C1-C12 烷基，且進一步包括 C1-C6 烷基)、C2-C24 烯基(包括 C2-C18 烯基，進一步包括 C2-C12 烯基，且進一步包括 C2-C6 烯基)、C2-C24 炔基(包括 C2-C18 炔基，進一步包括 C2-C12 炔基，且進一步包括 C2-C6 炔基)、C5-C30 芳基(包括 C5-C20 芳基，且進一步包括 C5-C12 芳基)及 C6-C30 芳烷基(包括 C6-C20 芳烷基，且進一步包括 C6-C12 芳烷基)。上述烴基部分可進一步經一或多個官能基或其他烴基部分(例如具體列舉之彼等烴基部分)取代。除非另外表明，否則本文所述之任一基團應解釋為除未經取代之基團以外亦包括經取代及/或含雜原子之部分。

【0072】 「磺醯基」係指基團 SO₂-烷基、SO₂-經取代烷基、SO₂-烯基、SO₂-經取代烯基、SO₂-環烷基、SO₂-經取代環烷基、SO₂-環烯基、SO₂-經取代環烯基、SO₂-芳基、SO₂-經取代芳基、SO₂-雜芳基、SO₂-經取代雜芳基、SO₂-雜環及 SO₂-經取代雜環，其中烷基、經取代烷基、烯基、經取代烯基、炔基、經取代炔基、環烷基、經取代環烷基、環烯基、經取代環烯基、芳基、經取代芳基、雜芳基、經取代雜芳基、雜環及經取代雜環係如本文所定義。磺醯基包括例如甲基-SO₂-、苯基-SO₂-及 4-甲基苯基-SO₂-。

【0073】 術語「官能基」意指化學基團，例如鹵基、羥基、硫氫基、C1-C24 烷氧基、C2-C24 烯基氧基、C2-C24 炔基氧基、C5-C20 芳基氧基、醯基(包括

C2-C24 烷基羰基(-CO-烷基)及 C6-C20 芳基羰基(-CO-芳基)、醯基氧基(-O-醯基)、C2-C24 烷氧基羰基(-(CO)-O-烷基)、C6-C20 芳基氧基羰基(-(CO)-O-芳基)、鹵代羰基(-CO)-X，其中 X 係鹵基)、C2-C24 烷基碳酸根基(-O-(CO)-O-烷基)、C6-C20 芳基碳酸根基(-O-(CO)-O-芳基)、羧基(-COOH)、羧酸根基(-COO-)、胺甲醯基(-(CO)-NH₂)、單取代之 C1-C24 烷基胺甲醯基(-(CO)-NH(C1-C24 烷基))、二取代之烷基胺甲醯基(-(CO)-N(C1-C24 烷基)₂)、單取代之芳基胺甲醯基(-(CO)-NH-芳基)、硫代胺甲醯基(-(CS)-NH₂)、脲基(-NH-(CO)-NH₂)、氰基(-C≡N)、異氰基(-N⁺=C-)、氰醯基(-O-C≡N)、異氰醯基(-O-N⁺=C-)、異硫氰醯基(-S-C≡N)、疊氮基(-N=N⁺=N-)、甲醯基(-(CO)-H)、硫代甲醯基(-(CS)-H)、胺基(-NH₂)、單-及二-(C1-C24 烷基)-取代之胺基、單-及二-(C5-C20 芳基)-取代之胺基、C2-C24 烷基醯胺基(-NH-(CO)-烷基)、C5-C20 芳基醯胺基(-NH-(CO)-芳基)、亞胺基(-CR=NH，其中 R=氫、C1-C24 烷基、C5-C20 芳基、C6-C20 烷芳基、C6-C20 芳烷基等)、烷基亞胺基(-CR=N(烷基)，其中 R=氫、烷基、芳基、烷芳基等)、芳基亞胺基(-CR=N(芳基)，其中 R=氫、烷基、芳基、烷芳基等)、硝基(-NO₂)、亞硝基(-NO)、磺基(-SO₂-OH)、磺酸根基(-SO₂-O-)、C1-C24 烷基硫烷基(-S-烷基；亦稱為「烷基硫基」)、芳基硫烷基(-S-芳基；亦稱為「芳基硫基」)、C1-C24 烷基亞磺醯基(-(SO)-烷基)、C5-C20 芳基亞磺醯基(-(SO)-芳基)、C1-C24 烷基磺醯基(-SO₂-烷基)、C5-C20 芳基磺醯基(-SO₂-芳基)、磷醯基(-P(O)(OH)₂)、磷酸根基(-P(O)(O-)₂)、亞磷酸根基(-P(O)(O-))、二氧磷基(-PO₂)及磷基(-PH₂)、單-及二-(C1-C24 烷基)-取代之磷基、單-及二-(C5-C20 芳基)-取代之磷。另外，若特定基團允許，則上述官能基可進一步經一或多個其他官能基或經一或多個烴基部分(例如上文具體列舉之彼等烴基部分)取代。

【0074】 「連接」或「連接體」如在「連接基團」、「連接體部分」等中意

指經由共價鍵連接兩個基團之連接部分。連接體可為直鏈、具支鏈、環狀或單個原子。該等連接基團之實例包括烷基、伸烯基、伸炔基、伸芳基、伸烷芳基、伸芳烷基及含有包括(但不限於)以下之官能基之連接部分：醯胺基(-NH-CO-)、伸脲基(-NH-CO-NH-)、醯亞胺(-CO-NH-CO-)、環氧基(-O-)、環硫基(-S-)、環二氧基(-O-O-)、羰基二氧基(-O-CO-O-)、烷基二氧基(-O-(CH₂)_n-O-)、環氧基亞胺基(-O-NH-)、環氧基亞胺基(-NH-)、羰基(-CO-)等。在某些情況下，連接體骨架之一個、兩個、三個、四個或五個或更多個碳原子可視情況經硫、氮或氧雜原子取代。骨架原子之間之鍵可為飽和或不飽和的，通常不超過一個、兩個或三個不飽和鍵將存在於連接體骨架中。連接體可包括一或多個取代基，例如烷基、芳基或烯基。連接體可包括(但不限於)聚(乙二醇)單元(例如-(CH₂-CH₂-O)-)；醚、硫醚、胺、烷基(例如(C₁-C₁₂)烷基)，其可為直鏈或具支鏈，例如甲基、乙基、正丙基、1-甲基乙基(異丙基)、正丁基、正戊基、1,1-二甲基乙基(第三丁基)及諸如此類。連接體骨架可包括環狀基團，例如芳基、雜環或環烷基，其中環狀基團之 2 個或更多個原子(例如 2 個、3 個或 4 個原子)包括在骨架中。連接體可為可裂解或不可裂解的。可以使用連接體與所連接基團之任何方便之定向及/或連接。

【0075】 當術語「經取代」出現在一系列可能取代之基團之前時，該等術語意欲適用於該基團之每個成員。例如，片語「經取代之烷基及芳基」應解釋為「經取代之烷基及經取代之芳基」。

【0076】 除了本文之揭示內容之外，術語「經取代」當用於修飾指定基團(group)或基團(radical)時，亦可以意指指定基團(group)或基團(radical)之一或多個氫原子各自彼此獨立地經相同或不同之如下文所定義之取代基替代。

【0077】 除非另有說明，否則除了本文中個別術語所揭示之基團之外，用於

取代指定基團(group)或基團(radical)中之飽和碳原子上之一或多個氫(單個碳上之任何兩個氫可經=O、=NR⁷⁰、=N-OR⁷⁰、=N₂或=S替代)之取代基團係-R⁶⁰、鹵基、=O、-OR⁷⁰、-SR⁷⁰、-NR⁸⁰R⁸⁰、三鹵甲基、-CN、-OCN、-SCN、-NO、-NO₂、=N₂、-N₃、-SO₂R⁷⁰、-SO₂O⁻M⁺、-SO₂OR⁷⁰、-OSO₂R⁷⁰、-OSO₂O⁻M⁺、-OSO₂OR⁷⁰、-P(O)(O⁻)₂(M⁺)₂、-P(O)(OR⁷⁰)O⁻M⁺、-P(O)(OR⁷⁰)₂、-C(O)R⁷⁰、-C(S)R⁷⁰、-C(NR⁷⁰)R⁷⁰、-C(O)O⁻M⁺、-C(O)OR⁷⁰、-C(S)OR⁷⁰、-C(O)NR⁸⁰R⁸⁰、-C(NR⁷⁰)NR⁸⁰R⁸⁰、-OC(O)R⁷⁰、-OC(S)R⁷⁰、-OC(O)O⁻M⁺、-OC(O)OR⁷⁰、-OC(S)OR⁷⁰、-NR⁷⁰C(O)R⁷⁰、-NR⁷⁰C(S)R⁷⁰、-NR⁷⁰CO₂⁻M⁺、-NR⁷⁰CO₂R⁷⁰、-NR⁷⁰C(S)OR⁷⁰、-NR⁷⁰C(O)NR⁸⁰R⁸⁰、-NR⁷⁰C(NR⁷⁰)R⁷⁰及-NR⁷⁰C(NR⁷⁰)NR⁸⁰R⁸⁰，其中 R⁶⁰ 係選自由視情況經取代烷基、環烷基、雜烷基、雜環烷基烷基、環烷基烷基、芳基、芳基烷基、雜芳基及雜芳基烷基組成之群，每一 R⁷⁰ 獨立地係氫或 R⁶⁰；每一 R⁸⁰ 獨立地係 R⁷⁰ 或替代地，兩個 R⁸⁰ 與其所鍵結之氮原子一起形成 5 員、6 員或 7 員雜環烷基，其可視情況包括 1 至 4 個相同或不同的選自由 O、N 及 S 組成之群之其他雜原子，其中 N 可具有-H 或 C₁-C₃ 烷基取代；且每個 M⁺ 係具有淨單正電荷之抗衡離子。每個 M⁺ 可獨立地係例如鹼離子，例如 K⁺、Na⁺、Li⁺；銨離子，例如⁺N(R⁶⁰)₄；或鹼土離子，例如[Ca²⁺]_{0.5}、[Mg²⁺]_{0.5}或[Ba²⁺]_{0.5}(「下標 0.5」意指該等二價鹼土離子之一個抗衡離子可為本發明化合物之離子化形式，且另一種典型之抗衡離子(例如氯離子)或者本文揭示之兩種離子化化合物可以用作該等二價鹼土離子之抗衡離子，或者本發明之雙離子化化合物可以用作該等二價鹼土離子之抗衡離子)。作為特定實例，-NR⁸⁰R⁸⁰ 意欲包括-NH₂、-NH-烷基、N-吡咯啉基、N-六氫吡嗪基、4N-甲基-六氫吡嗪-1-基及 N-嗎啉基。

【0078】 除本文之揭示內容之外，除非另有說明，否則「經取代」烯烴、炔烴、芳基及雜芳基中之不飽和碳原子上之氫之取代基係-R⁶⁰、鹵基、-O⁻M⁺、

-OR⁷⁰、-SR⁷⁰、-S⁻M⁺、-NR⁸⁰R⁸⁰、三鹵甲基、-CF₃、-CN、-OCN、-SCN、-NO、-NO₂、-N₃、-SO₂R⁷⁰、-SO₃⁻M⁺、-SO₃R⁷⁰、-OSO₂R⁷⁰、-OSO₃⁻M⁺、-OSO₃R⁷⁰、-PO₃⁻²(M⁺)₂、-P(O)(OR⁷⁰)O⁻M⁺、-P(O)(OR⁷⁰)₂、-C(O)R⁷⁰、-C(S)R⁷⁰、-C(NR⁷⁰)R⁷⁰、-CO₂⁻M⁺、-CO₂R⁷⁰、-C(S)OR⁷⁰、-C(O)NR⁸⁰R⁸⁰、-C(NR⁷⁰)NR⁸⁰R⁸⁰、-OC(O)R⁷⁰、-OC(S)R⁷⁰、-OCO₂⁻M⁺、-OCO₂R⁷⁰、-OC(S)OR⁷⁰、-NR⁷⁰C(O)R⁷⁰、-NR⁷⁰C(S)R⁷⁰、-NR⁷⁰CO₂⁻M⁺、-NR⁷⁰CO₂R⁷⁰、-NR⁷⁰C(S)OR⁷⁰、-NR⁷⁰C(O)NR⁸⁰R⁸⁰、-NR⁷⁰C(NR⁷⁰)R⁷⁰及-NR⁷⁰C(NR⁷⁰)NR⁸⁰R⁸⁰，其中 R⁶⁰、R⁷⁰、R⁸⁰及 M⁺係如前文所定義，條件係在經取代烯烴或炔烴之情況下，取代基不為-O⁻M⁺、-OR⁷⁰、-SR⁷⁰或-S⁻M⁺。

【0079】 除本文之個別術語揭示之基團之外，除非另有說明，否則「經取代」雜烷基及雜環烷基中之氮原子上之氫之取代基係-R⁶⁰、-O⁻M⁺、-OR⁷⁰、-SR⁷⁰、-S⁻M⁺、-NR⁸⁰R⁸⁰、三鹵甲基、-CF₃、-CN、-NO、-NO₂、-S(O)₂R⁷⁰、-S(O)₂O⁻M⁺、-S(O)₂OR⁷⁰、-OS(O)₂R⁷⁰、-OS(O)₂O⁻M⁺、-OS(O)₂OR⁷⁰、-P(O)(O⁻)₂(M⁺)₂、-P(O)(OR⁷⁰)O⁻M⁺、-P(O)(OR⁷⁰)(OR⁷⁰)、-C(O)R⁷⁰、-C(S)R⁷⁰、-C(NR⁷⁰)R⁷⁰、-C(O)OR⁷⁰、-C(S)OR⁷⁰、-C(O)NR⁸⁰R⁸⁰、-C(NR⁷⁰)NR⁸⁰R⁸⁰、-OC(O)R⁷⁰、-OC(S)R⁷⁰、-OC(O)OR⁷⁰、-OC(S)OR⁷⁰、-NR⁷⁰C(O)R⁷⁰、-NR⁷⁰C(S)R⁷⁰、-NR⁷⁰C(O)OR⁷⁰、-NR⁷⁰C(S)OR⁷⁰、-NR⁷⁰C(O)NR⁸⁰R⁸⁰、-NR⁷⁰C(NR⁷⁰)R⁷⁰及-NR⁷⁰C(NR⁷⁰)NR⁸⁰R⁸⁰，其中 R⁶⁰、R⁷⁰、R⁸⁰及 M⁺係如前文所定義。

【0080】 除本文之揭示內容之外，在某一實施例中，經取代基團具有 1 個、2 個、3 個或 4 個取代基、1 個、2 個或 3 個取代基、1 或 2 個取代基或 1 個取代基。

【0081】 除非另外表明，否則本文中未明確定義之取代基之命名係藉由命名官能基之末端部分，然後命名靠近連接點之相鄰官能基來實現。例如，取代基

「芳基烷基氧基羰基」係指基團(芳基)-(烷基)-O-C(O)-。

【0082】 至於本文揭示之含有一或多個取代基之任一基團，當然應該理解，該等基團不含空間上不切實際及/或合成上不可行之任何取代或取代模式。此外，標的化合物包括由該等化合物之取代產生之所有立體化學異構物。

【0083】 在某些實施例中，取代基可能促成化合物之光學異構性及/或立體異構性。化合物之鹽、溶劑合物、水合物及前藥形式亦係令人感興趣的。所有該等形式皆包含在本揭示案中。因此，本文描述之化合物包括其鹽、溶劑合物、水合物、前藥及異構物形式，包括其醫藥學上可接受之鹽、溶劑合物、水合物、前藥及異構物。在某些實施例中，化合物可以代謝成醫藥活性衍生物。

【0084】 除非另有說明，否則提及原子意欲包括該原子之同位素。例如，提及 H 意欲包括 ^1H 、 ^2H (即，D) 及 ^3H (即，T)，且提及 C 意欲包括 ^{12}C 及碳之所有同位素 (例如 ^{13}C)。

【0085】 如熟習此項技術者將明了，在閱讀本揭示案後，在不脫離本發明之範圍或精神之情況下，本文描述及說明之每個個別實施例皆具有離散之組分及特徵，該等組分及特徵可以容易地與其他若干實施例中任一者之特徵分離或組合。任何列舉之方法可以按照列舉之事件之順序或邏輯上可能之任何其他順序來進行。

【0086】 儘管為語法流暢性及功能解釋起見，已經或者將要描述裝置及方法，但應當清楚地理解，除非根據 35 U.S.C. §112 明確提出，否則申請專利範圍不應當解釋為必須以任何方式受到「組分(means)」或「步驟」限制之構造之限制，而是應當給予申請專利範圍在等效之司法原則下提供之定義之含義及等效物之全部範圍，並且在申請專利範圍係根據 35 U.S.C. §112 明確提出之情況下，將根據 35 U.S.C. §112 給予完全之法定等效物。

【0087】 其他術語及概念之定義出現在整個詳細描述中。

【0088】 如上文所匯總，本揭示案之態樣包括用於抑制 ENPP1 之化合物、組合物及方法。該等方法之態樣包括使樣品與 ENPP1 抑制劑化合物接觸以抑制 ENPP1 之 cGAMP 水解活性。該等化合物、組合物及方法可用於其中期望抑制 ENPP1 之多種應用中。

【0089】 亦提供使用標的 ENPP1 抑制劑化合物治療癌症之醫藥組合物及方法。該等方法之態樣包括向個體投與治療有效量之 ENPP1 抑制劑化合物以抑制 cGAMP 之水解及治療個體之癌症。

ENPP1 抑制劑化合物

【0090】 標的 ENPP1 抑制劑化合物可包括基於連接至親水頭基之芳基或雜芳基環系統(例如喹唑啉基或喹啉基)之核心結構。芳基或雜芳基環系統與親水頭基之間之連接體可包括單環芳基、雜芳基、碳環或雜環及一或多個無環連接部分。喹唑啉或喹啉核心結構可在 4 位經連接體取代。芳基或雜芳基環系統視情況進一步經取代。本揭示案包括具有喹啉核心結構之化合物，該喹啉核心結構在 4 位經連接體且在 3 位經氰基取代。在一些情況下，連接體包括 1,4-二取代之 6 員芳基或雜芳基環狀基團，例如苯基或經取代苯基。在某些情況下，連接體包括 1,4-二取代之 6 員飽和雜環或碳環，例如 N1,4-二取代之六氫吡啶環或 N1,N4-二取代之六氫吡嗪環。標的 ENPP1 抑制劑化合物之其他態樣描述於下文及於 2018 年 9 月 7 日提出申請之 Li 等人之 PCT 申請第 PCT/US2018/050018 號中，該 PCT 申請之揭示內容之全文皆以引用方式併入本文中。

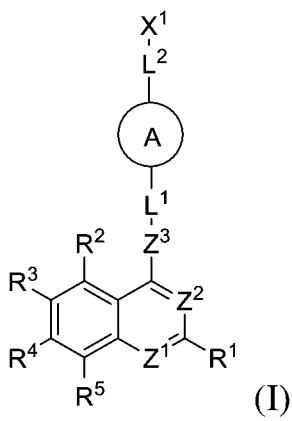
【0091】 術語「親水頭基」係指連接至核心芳基或雜芳基環系統之基團，該基團具有親水性且在水性環境(例如生理條件)中充分溶劑合，且具有低細胞膜滲透性。在一些情況下，低細胞膜滲透性意指滲透係數為 10^{-4} cm/s 或更小，例如

10^{-5} cm/s 或更小、 10^{-6} cm/s 或更小、 10^{-7} cm/s 或更小、 10^{-8} cm/s 或更小、 10^{-9} cm/s 或更小或甚至更小，如經由經分離親水頭基穿過膜(例如細胞單層，例如結腸直腸 Caco-2 或腎 MDCK 細胞株)被動擴散之任何方便方法所量測。參見例如 Yang 及 Hinner, *Methods Mol Biol.* 2015; 1266: 29-53。親水頭基可以賦予其所連接之分子改善之水溶性及降低之細胞滲透性。親水頭基可為任何方便之親水基團，其在水性環境中充分溶劑合，並且具有低膜滲透性。在某些情況下，親水基團係離散之官能基(例如，如本文所述)或其經取代型式。通常，帶電基團或較大之不帶電極性基團或具有低滲透性。在一些情況下，親水頭基係帶電的，例如帶正電或負電。在一些實施例中，親水頭基本身並非細胞可滲透的，並賦予標的化合物細胞不可滲透性。應當理解，可以選擇親水頭基或其前藥形式，以提供標的化合物所期望之細胞滲透性。在某些情況下，親水頭基係中性親水基團。在一些情況下，親水頭基以前藥形式納入且因此包括可在活體內去除的前部分。在某些情況下，標的化合物係細胞可滲透的。

【0092】 親水頭基可為能夠結合或螯合鋅離子之任何方便之基團或其前藥形式。在某些情況下，親水頭基係含磷基團。可用于標的 ENPP1 抑制劑之相關含磷基團包括(但不限於)磷酸或磷酸鹽、磷酸酯、磷酸鹽、磷酸酯、硫代磷酸鹽、硫代磷酸酯、胺基磷酸酯及硫代胺基磷酸酯或其鹽或其前藥形式(例如，如本文所述)。

【0093】 包括喹唑啉及異喹啉環系統之相關例示性 ENPP1 抑制劑化合物闡述於式(I)-(XVb)及表 1-2 之化合物結構中。

【0094】 在一些情況下，本發明 ENPP1 抑制劑化合物具有式(I)：



其中，

X¹ 係親水頭基(例如如本文所述)；

A 係選自以下之環系統：芳基、經取代芳基、雜芳基、經取代雜芳基、環烷基、經取代環烷基、雜環及經取代雜環；

L¹ 及 L² 獨立地係共價鍵或連接體；

Z³ 不存在或選自 NR²²、O 及 S；

Z² 係 CR¹² 或 N；

Z¹ 係 CR¹¹ 或 N；

R¹ 係選自 H、烷基、經取代烷基、烯基、經取代烯基、烷基芳基、經取代烷基芳基、烷基雜芳基、經取代烷基雜芳基、烯基芳基(例如乙烯基芳基)、經取代烯基芳基、烯基雜芳基(例如乙烯基雜芳基)、經取代烯基雜芳基、芳基、經取代芳基、雜芳基、經取代雜芳基、雜環及經取代雜環；

R¹¹ 及 R¹² 係獨立地選自 H、氰基、三氟甲基、鹵素、烷基及經取代烷基；

R²² 係選自 H、烷基及經取代烷基；且

R² 至 R⁵ 係獨立地選自 H、OH、烷基、經取代烷基、烯基、經取代烯基、烷氧基、經取代烷氧基、-OCF₃、鹵素、氰基、胺、經取代胺、醯胺、雜環及經取代雜環；
或其中 R² 及 R³、R³ 及 R⁴ 或 R⁴ 及 R⁵ 與其所連接之碳原子一起提供選自雜環、經取代雜環、環烷基、經取代環烷基、芳基及經取代芳基之稠合環(例如 5 員或 6

員單環)；

或其前藥、醫藥學上可接受之鹽或溶劑合物。

【0095】 在式(I)之某些實施例中， Z^3 不存在。在式(I)之某些實施例中， Z^3 係 NR^{22} ，其中 R^{22} 係選自 H、 $C_{(1-6)}$ 烷基及經取代之 $C_{(1-6)}$ 烷基。在某些情況下， Z^3 係 NH。在某些情況下， Z^3 係 NR^{22} 且 R^{22} 係 $C_{(1-6)}$ 烷基，例如甲基、乙基、丙基、戊基或己基。在某些情況下， Z^3 係 NR^{22} 且 R^{22} 係經取代之 $C_{(1-6)}$ 烷基。在式(I)之某些情況下， Z^3 係 O。在式(I)之某些情況下， Z^3 係 S。

【0096】 在式(I)之一些情況下， Z^1 係 CR^{11} 且 R^{11} 係選自氫、氰基、三氟甲基、鹵素、烷基及經取代之烷基氫。在一些情況下，烷基或經取代烷基係 C_{1-5} 烷基。在式(I)之一些情況下， Z^1 係 CR^{11} 且 R^{11} 係氫。在一些情況下， R^{11} 係氰基。在一些情況下， R^{11} 係三氟甲基。在一些情況下， R^{11} 係鹵素，例如 Br、I、Cl 或 F。在一些情況下， R^{11} 係烷基，例如 C_{1-5} 烷基。在一些情況下， R^{11} 係經取代烷基，例如經取代之 C_{1-5} 烷基。

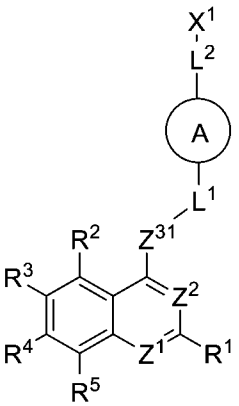
【0097】 在式(I)之一些情況下， Z^2 係 CR^{12} 且 R^{12} 係選自氫、氰基、三氟甲基、鹵素、烷基及經取代之烷基氫。在一些情況下，烷基或經取代烷基係 C_{1-5} 烷基。在式(I)之一些情況下， Z^2 係 CR^{12} 且 R^{12} 係氫。在一些情況下， R^{12} 係氰基。在一些情況下， R^{12} 係三氟甲基。在一些情況下， R^{12} 係鹵素，例如 Br、I、Cl 或 F。在一些情況下， R^{12} 係烷基，例如 C_{1-5} 烷基。在一些情況下， R^{12} 係經取代烷基，例如經取代之 C_{1-5} 烷基。

【0098】 在式(I)之某些實施例中， Z^1 及 Z^2 中之至少一者係 N。在式(I)之某些實施例中， Z^1 係 CR^{11} 且 Z^2 係 N。在式(I)之某些情況下， Z^1 係 N 且 Z^2 係 CR^{12} 。在式(I)之某些情況下， Z^1 係 CR^{11} 且 Z^2 係 CR^{12} 。在式(I)之某些情況下， Z^1 係 N 且 Z^2 係 N。

【0099】 在式(I)之某些實施例中， L^1 及 L^2 各自係共價鍵。在某些情況下， L^1 及 L^2 各自係連接體。在某些情況下， L^1 係共價鍵且 L^2 係連接體。在某些情況下， L^1 係連接體且 L^2 係共價鍵。可使用任何方便之連接體來連接 A 與 X 及/或 A 與 Z^3 (例如如本文所述)。在一些情況下，A 係經由共價鍵連接至 X。在某些情況下，A 係經由長度為 1-12 個原子、例如長度為 1-10 個、1-8 個或 1-6 個原子、例如長度為 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個或 6 個原子之線性連接體連接至 X。連接體 L^2 可為(C₁₋₆)烷基連接體或經取代之(C₁₋₆)烷基連接體，其視情況經雜原子或連接官能基取代，例如酯(-CO₂-)、醯胺基(CONH)、胺基甲酸酯(OCONH)、醚(-O-)、硫醚(-S-)及/或胺基(-NR-，其中 R 係 H 或烷基)。在一些情況下，A 係經由共價鍵連接至 Z^3 。在某些情況下，A 係經由長度為 1-12 個原子、例如長度為 1-10 個、1-8 個或 1-6 個原子、例如長度為 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個或 6 個原子之線性連接體連接至 Z^3 。連接體 L^1 可為(C₁₋₆)烷基連接體或經取代之(C₁₋₆)烷基連接體，其視情況經雜原子或連接官能基取代，例如酮(CO)、酯(-CO₂-)、醯胺基(CONH)、胺基甲酸酯(OCONH)、醚(-O-)、硫醚(-S-)及/或胺基(-NR-，其中 R 係 H 或烷基)。當 Z^3 係 NR²² 時，連接體 L^1 可包括末端酮(C=O)基，其與 Z^3 一起提供醯胺基(NR²²CO)鍵聯。當 Z^{31} 係 O 或 S 時，連接體 L^1 可包括末端酮(C=O)基，其與 Z^{31} 一起提供酯或硫代酯基鍵聯。

【0100】 在式(I)之某些實施例中， Z^3 係能夠結合鋅離子之含磷基團或其前藥形式。

【0101】 在式(I)之某些情況下， Z^3 係選自 NR²²、O 及 S。因此，式(I)之標的 ENPP1 抑制劑化合物可藉由式(II)描述：



(II)

其中 Z³¹ 係選自 NR²²、O 及 S。

【0102】 在式(II)之某些實施例中，Z³¹ 係 NR²²，其中 R²² 係選自 H、C₍₁₋₆₎烷基及經取代之 C₍₁₋₆₎烷基。在某些情況下，Z³¹ 係 NH。在某些情況下，Z³¹ 係 NR²² 且 R²² 係 C₍₁₋₆₎烷基，例如甲基、乙基、丙基、戊基或己基。在某些情況下，Z³¹ 係 NR²² 且 R²² 係經取代之 C₍₁₋₆₎烷基。在式(I)之某些情況下，Z³¹ 係 O。在式(I)之某些情況下，Z³¹ 係 S。

【0103】 在式(II)之一些情況下，Z¹ 係 CR¹¹ 且 R¹¹ 係選自氫、氰基、三氟甲基、鹵素、烷基及經取代之烷基氫。在一些情況下，烷基或經取代烷基係 C₁₋₅ 烷基。在式(II)之一些情況下，Z¹ 係 CR¹¹ 且 R¹¹ 係氫。在一些情況下，R¹¹ 係氰基。在一些情況下，R¹¹ 係三氟甲基。在一些情況下，R¹¹ 係鹵素，例如 Br、I、Cl 或 F。在一些情況下，R¹¹ 係烷基，例如 C₁₋₅ 烷基。在一些情況下，R¹¹ 係經取代烷基，例如經取代之 C₁₋₅ 烷基。

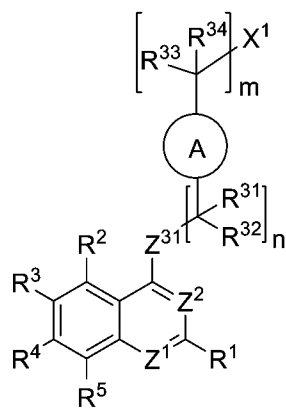
【0104】 在式(II)之一些情況下，Z² 係 CR¹² 且 R¹² 係選自氫、氰基、三氟甲基、鹵素、烷基及經取代之烷基氫。在一些情況下，烷基或經取代烷基係 C₁₋₅ 烷基。在式(II)之一些情況下，Z² 係 CR¹² 且 R¹² 係氫。在一些情況下，R¹² 係氰基。在一些情況下，R¹² 係三氟甲基。在一些情況下，R¹² 係鹵素，例如 Br、I、Cl 或 F。在一些情況下，R¹² 係烷基，例如 C₁₋₅ 烷基。在一些情況下，R¹² 係經取代烷基，

例如經取代之 C_{1-5} 烷基。

【0105】 在式(II)之某些實施例中， Z^1 及 Z^2 中之至少一者係 N。在式(I)之某些實施例中， Z^1 係 CR^{11} 且 Z^2 係 N。在式(I)之某些情況下， Z^1 係 N 且 Z^2 係 CR^{12} 。在式(I)之某些情況下， Z^1 係 CR^{11} 且 Z^2 係 CR^{12} 。在式(I)之某些情況下， Z^1 係 N 且 Z^2 係 N。

【0106】 在式(II)之某些實施例中， L^1 及 L^2 各自係共價鍵。在某些情況下， L^1 及 L^2 各自係連接體。在某些情況下， L^1 係共價鍵且 L^2 係連接體。在某些情況下， L^1 係連接體且 L^2 係共價鍵。可使用任何方便之連接體來連接 A 與 X 及/或 A 與 Z^3 (例如如本文所述)。在一些情況下，A 係經由共價鍵連接至 X。在某些情況下，A 係經由長度為 1-12 個原子、例如長度為 1-10 個、1-8 個或 1-6 個原子、例如長度為 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個或 6 個原子之線性連接體連接至 X。連接體 L^2 可為 (C_{1-6}) 烷基連接體或經取代之 (C_{1-6}) 烷基連接體，其視情況經雜原子或連接官能基取代，例如酮(CO)、酯($-CO_2-$)、醯胺基(CONH)、胺基甲酸酯(OCONH)、醚($-O-$)、硫醚($-S-$)及/或胺基($-NR-$ ，其中 R 係 H 或烷基)。在一些情況下，A 係經由共價鍵連接至 Z^3 。在某些情況下，A 係經由長度為 1-12 個原子、例如長度為 1-10 個、1-8 個或 1-6 個原子、例如長度為 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個或 6 個原子之線性連接體連接至 Z^3 。連接體 L^1 可為 (C_{1-6}) 烷基連接體或經取代之 (C_{1-6}) 烷基連接體，其視情況經雜原子或連接官能基取代，例如酮($C=O$)、酯($-CO_2-$)、醯胺基(CONH)、胺基甲酸酯(OCONH)、醚($-O-$)、硫醚($-S-$)及/或胺基($-NR-$ ，其中 R 係 H 或烷基)。當 Z^{31} 係 NR^{22} 時，連接體 L^1 可包括末端酮($C=O$)基，其與 Z^{31} 一起提供醯胺基($NR^{22}CO$)鍵聯。當 Z^{31} 係 O 或 S 時，連接體 L^1 可包括末端酮($C=O$)基，其與 Z^{31} 一起提供酯或硫代酯基鍵聯。

【0107】 在式(II)之一些情況下，標的 ENPP1 抑制劑化合物具有式(III)：



(III)

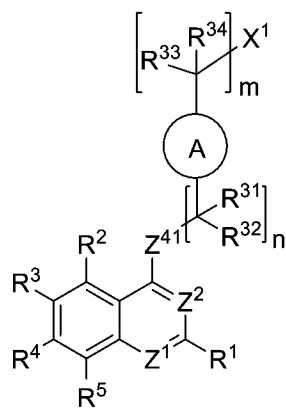
其中：

每一 R^{31} 至 R^{34} 係獨立地選自 H、鹵素、烷基及經取代烷基，或 R^{31} 及 R^{32} 或 R^{33} 及 R^{34} 連接成環並與其所連接之碳原子一起提供環烷基、經取代環烷基、雜環基或經取代雜環基環；且

n 及 m 各自獨立地係 0 至 6 之整數(例如 0-3)。

【0108】 在式(III)之某些實施例中， Z^{31} 係 NR^{22} ，其中 R^{22} 係選自 H、 $C_{(1-6)}$ 烷基及經取代之 $C_{(1-6)}$ 烷基。在某些情況下， Z^{31} 係 NH。在某些情況下， Z^{31} 係 NR^{22} 且 R^{22} 係 $C_{(1-6)}$ 烷基，例如甲基、乙基、丙基、戊基或己基。在某些情況下， Z^{31} 係 NR^{22} 且 R^{22} 係經取代之 $C_{(1-6)}$ 烷基。在式(III)之某些情況下， Z^{31} 係 O。在式(III)之某些情況下， Z^{31} 係 S。

【0109】 在式(II)中，當 Z^{31} 係 NR^{22} 時，連接體 L^1 可包括末端酮($C=O$)基，其與 Z^{31} 一起提供醯胺基($NR^{22}CO$)鍵聯。因此，在式(II)之一些情況下，標的 ENPP1 抑制劑化合物具有式(IIIa)：



(IIIa)

其中：

Z^{41} 係 $-NR^{22}C(=O)-$ ；

每一 R^{31} 至 R^{34} 係獨立地選自 H、鹵素、烷基及經取代烷基，或 R^{31} 及 R^{32} 或 R^{33} 及 R^{34} 連接成環並與其所連接之碳原子一起提供環烷基、經取代環烷基、雜環基或經取代雜環基環；且

n 及 m 各自獨立地係 0 至 6 之整數(例如 0-3)。

【0110】 在式(III)-(IIIa)之一些情況下， Z^1 係 CR^{11} 且 R^{11} 係選自氫、氰基、三氟甲基、鹵素、烷基及經取代之烷基氫。在一些情況下，烷基或經取代烷基係 C_{1-5} 烷基。在式(III)-(IIIa)之一些情況下， Z^1 係 CR^{11} 且 R^{11} 係氫。在一些情況下， R^{11} 係氰基。在一些情況下， R^{11} 係三氟甲基。在一些情況下， R^{11} 係鹵素，例如 Br、I、Cl 或 F。在一些情況下， R^{11} 係烷基，例如 C_{1-5} 烷基。在一些情況下， R^{11} 係經取代烷基，例如經取代之 C_{1-5} 烷基。

【0111】 在式(III)-(IIIa)之一些情況下， Z^2 係 CR^{12} 且 R^{12} 係選自氫、氰基、三氟甲基、鹵素、烷基及經取代之烷基氫。在一些情況下，烷基或經取代烷基係 C_{1-5} 烷基。在式(III)-(IIIa)之一些情況下， Z^2 係 CR^{12} 且 R^{12} 係氫。在一些情況下， R^{12} 係氰基。在一些情況下， R^{12} 係三氟甲基。在一些情況下， R^{12} 係鹵素，例如 Br、I、Cl 或 F。在一些情況下， R^{12} 係烷基，例如 C_{1-5} 烷基。在一些情況下， R^{12}

係經取代烷基，例如經取代之 C_{1-5} 烷基。

【0112】 在式(III)-(IIIa)之某些實施例中， Z^1 及 Z^2 中之至少一者係 N。在式(III)-(IIIa)之某些實施例中， Z^1 係 CR^{11} 且 Z^2 係 N。在式(III)-(IIIa)之某些情況下， Z^1 係 N 且 Z^2 係 CR^{12} 。在式(III)-(IIIa)之某些情況下， Z^1 係 CR^{11} 且 Z^2 係 CR^{12} 。在式(III)-(IIIa)之某些情況下， Z^1 係 N 且 Z^2 係 N。

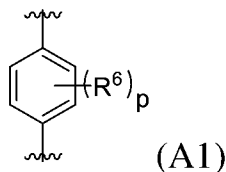
【0113】 在式(III)-(IIIa)之某些實施例中， R^{31} 至 R^{34} 各自係氫。在某些實施例中， R^{31} 至 R^{34} 中之至少一者係鹵素。在某些實施例中， R^{31} 至 R^{34} 中之至少一者係烷基。在某些實施例中， R^{31} 至 R^{34} 中之至少一者係經取代烷基。在某些情況下， R^{31} 至 R^{34} 中之一者係鹵素且其餘各者係選自氫、鹵素、烷基及經取代烷基。在某些情況下， R^{31} 至 R^{34} 中之一者係烷基且其餘各者係選自氫、鹵素、烷基及經取代烷基。在某些情況下， R^{31} 至 R^{34} 中之一者係經取代烷基且其餘各者係選自氫、鹵素、烷基及經取代烷基。在某些情況下， R^{31} 至 R^{34} 中之一者係鹵素且其餘各者係氫。在某些情況下， R^{31} 至 R^{34} 中之一者係烷基且其餘各者係氫。在某些情況下， R^{31} 至 R^{34} 中之一者係經取代烷基且其餘各者係氫。

【0114】 在式(III)-(IIIa)之某些實施例中，n 係 0 至 3 之整數。在某些情況下，n 係 0。在某些情況下，n 係 1。在某些情況下，n 係 2。在某些情況下，n 係 3。在式(III)-(IIIa)之某些實施例中，m 係 0 至 3 之整數。在某些情況下，m 係 0。在某些情況下，m 係 1。在某些情況下，m 係 2。在某些情況下，m 係 3。在某些情況下，n 係 0 且 m 係 1。在某些情況下，n 係 0 且 m 係 2。在某一情況下，n 係 0 且 m 係 3。在某些情況下，n 係 1 且 m 係 0。在某些情況下，n 係 1 且 m 係 1。在某些情況下，n 係 1 且 m 係 2。在某些情況下，n 係 1 且 m 係 3。在某些情況下，n 係 2 且 m 係 0。在某些情況下，n 係 2 且 m 係 1。在某些情況下，n 係 2 且 m 係 2。在某些情況下，n 係 2 且 m 係 3。在某些情況下，n 係 3 且 m 係 0。

在某些情況下， n 係 3 且 m 係 1。在某些情況下， n 係 3 且 m 係 2。在某些情況下， n 係 3 且 m 係 3。在某些情況下， $n+m$ 係 0 至 3 之整數。在某些情況下， $n+m$ 係 0。在某些情況下， $n+m$ 係 1。在某些情況下， $n+m$ 係 2。在某些情況下， $n+m$ 係 3。

【0115】 在式(I)至(IIIa)中任一者之一些實施例中，環系統 A 係選自苯基、經取代苯基、吡啶基、經取代吡啶基、嘧啶、經取代嘧啶、六氫吡啶、經取代之六氫吡啶、六氫吡嗪、經取代之六氫吡嗪、嗒嗪、經取代嗒嗪、環己基及經取代環己基。在某些情況下，環系統 A 係苯基或經取代苯基。在一些情況下，環系統 A 係吡啶基或經取代吡啶基。在一些情況下，環系統 A 係嘧啶或經取代嘧啶。在一些情況下，環系統 A 係六氫吡啶或經取代之六氫吡啶。在一些情況下，環系統 A 係六氫吡嗪或經取代之六氫吡嗪。在一些情況下，環系統 A 係環己基或經取代環己基。

【0116】 在一些實施例中，環系統 A 係藉由式(A1)描述：



其中：

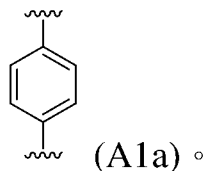
每一 R^6 係選自氫、烷基、經取代烷基、羥基、烷氧基、經取代烷氧基、三氟甲基、鹵素、醯基、經取代醯基、羧基、甲醯胺、經取代甲醯胺、磺醯基、經取代磺醯基、磺醯胺及經取代磺醯胺；且

p 係 0 至 4 之整數。

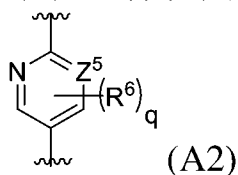
【0117】 在某些情況下，A1 係伸苯基。在某些情況下，A1 係單取代之伸苯基。在某些情況下，A1 係二取代之伸苯基。在某些情況下，A1 係三取代之伸苯基。在某些情況下，A1 係四取代之伸苯基。在某些情況下，伸苯基之取代基係

選自低碳數烷基(例如甲基、乙基、丙基、丁基、戊基及己基)及鹵素(例如 F、Cl、I 或 Br)。

【0118】 在一些實施例中，A1 環係藉由式(A1a)描述：



【0119】 在一些實施例中，環系統 A 係藉由式(A2)描述：



其中：

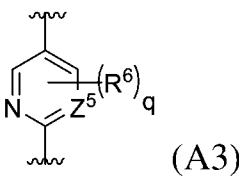
Z^5 係選自 N 及 CR^6 ；

每一 R^6 係選自氫、烷基、經取代烷基、經基、烷氧基、經取代烷氧基、三氟甲基、鹵素、醯基、經取代醯基、羧基、甲醯胺、經取代甲醯胺、磺醯基、經取代磺醯基、磺醯胺及經取代磺醯胺；且

q 係 0 至 2 之整數。

【0120】 在某些情況下，A2 係吡啶基。在某些情況下，A2 係經取代吡啶基。在一些情況下，吡啶基係單取代之吡啶基。在其他情況下，吡啶基係二取代之吡啶基。在其他情況下，吡啶基係三取代之吡啶基。在某些情況下， Z^5 係 N，使得 A2 係嘧啶基。在一些情況下，A2 係經取代之嘧啶基。在一些情況下，嘧啶基經單取代。在一些情況下，嘧啶基經二取代。在 A2 之某些實施例中，取代基係選自低碳數烷基(例如甲基、乙基、丙基、丁基、戊基及己基)、三氟甲基及鹵素(例如 F、Cl、I 或 Br)。

【0121】 在一些實施例中，環系統 A 係藉由式(A3)描述：



其中：

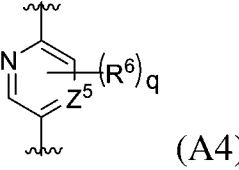
Z^5 係選自 N 及 CR^6 ；

每一 R^6 係選自氫、烷基、經取代烷基、羥基、烷氧基、經取代烷氧基、三氟甲基、鹵素、醯基、經取代醯基、羧基、甲醯胺、經取代甲醯胺、磺醯基、經取代磺醯基、磺醯胺及經取代磺醯胺；且

q 係 0 至 2 之整數。

【0122】 在某些情況下，A3 係吡啶基。在某些情況下，A3 係經取代吡啶基。在一些情況下，吡啶基係單取代之吡啶基。在其他情況下，吡啶基係二取代之吡啶基。在其他情況下，吡啶基係三取代之吡啶基。在某些情況下， Z^5 係 N，使得 A3 係嘧啶基。在一些情況下，A3 係經取代之嘧啶基。在一些情況下，嘧啶基經單取代。在一些情況下，嘧啶基經二取代。在 A3 之某些實施例中，取代基係選自低碳數烷基(例如甲基、乙基、丙基、丁基、戊基及己基)、三氟甲基及鹵素(例如 F、Cl、I 或 Br)。

【0123】 在一些實施例中，環系統 A 係藉由式(A4)描述：



其中：

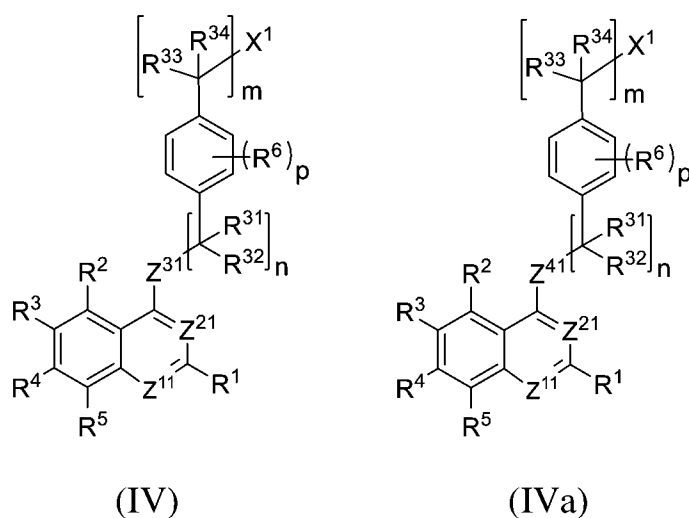
Z^5 係 N；

每一 R^6 係選自氫、烷基、經取代烷基、羥基、烷氧基、經取代烷氧基、三氟甲基、鹵素、醯基、經取代醯基、羧基、甲醯胺、經取代甲醯胺、磺醯基、經取代磺醯基、磺醯胺及經取代磺醯胺；且

q 係 0 至 2 之整數。

【0124】 在一些情況下，A4 係經取代之嘧啶基。在一些情況下，嘧啶基經單取代。在一些情況下，嘧啶基經二取代。在 A4 之某些實施例中，取代基係選自低碳數烷基(例如甲基、乙基、丙基、丁基、戊基及己基)、三氟甲基及鹵素(例如 F、Cl、I 或 Br)。

【0125】 在式(III)-(IIIa)之一些情況下，ENPP1 抑制劑化合物具有式(IV)-(IVa)：



其中：

Z^{31} 係選自 NR^{22} 、O 及 S；

Z^{41} 係 $-NR^{22}C(=O)-$ ；

Z^{11} 及 Z^{21} 係獨立地選自 N 及 C(CN)；

每一 R^{31} 至 R^{34} 係獨立地選自 H、鹵素、烷基及經取代烷基，或 R^{31} 及 R^{32} 或 R^{33} 及 R^{34} 連接成環並與其所連接之碳原子一起提供環烷基、經取代環烷基、雜環基或經取代雜環基環；

每一 R^6 係獨立地選自 H、烷基、經取代烷基、羥基、烷氧基、經取代烷氧基、三氟甲基及鹵素；

p 係 0 至 4 之整數；且

n 及 m 各自獨立地係 0 至 6 之整數(例如 0-3)。

【0126】 在式(IV)-(IVa)之某些實施例中， Z^{31} 係 NR^{22} ，其中 R^{22} 係選自 $H \cdot C_{(1-6)}$ 烷基及經取代之 $C_{(1-6)}$ 烷基。在某些情況下， Z^{31} 係 NH 。在某些情況下， Z^{31} 係 NR^{22} 且 R^{22} 係 $C_{(1-6)}$ 烷基，例如甲基、乙基、丙基、戊基或己基。在某些情況下， Z^{31} 係 NR^{22} 且 R^{22} 係經取代之 $C_{(1-6)}$ 烷基。在式(IV)-(IVa)之某些情況下， Z^{31} 係 O 。在式(IV)-(IVa)之某些情況下， Z^{31} 係 S 。

【0127】 在式(IV)-(IVa)之某些實施例中， Z^{11} 及 Z^{21} 中之至少一者係 N 。在式(IV)-(IVa)之某些實施例中， Z^{11} 係 $C(CN)$ 且 Z^{21} 係 N 。在式(IV)-(IVa)之某些情況下， Z^{11} 係 N 且 Z^{21} 係 $C(CN)$ 。在式(IV)-(IVa)之某些情況下， Z^{11} 係 $C(CN)$ 且 Z^{21} 係 $C(CN)$ 。在式(IV)-(IVa)之某些情況下， Z^{11} 係 N 且 Z^{21} 係 N 。

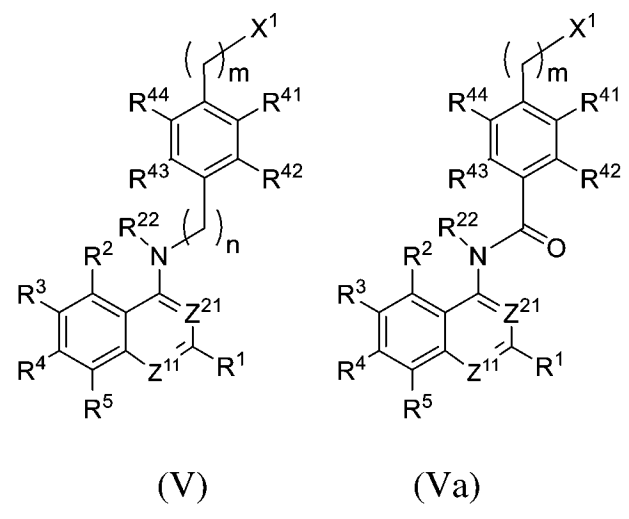
【0128】 在式(IV)-(IVa)之某些實施例中， R^{31} 至 R^{34} 各自係氫。在某些實施例中， R^{31} 至 R^{34} 中之至少一者係鹵素。在某些實施例中， R^{31} 至 R^{34} 中之至少一者係烷基。在某些實施例中， R^{31} 至 R^{34} 中之至少一者係經取代烷基。在某些情況下， R^{31} 至 R^{34} 中之一者係鹵素且其餘各者係選自氫、鹵素、烷基及經取代烷基。在某些情況下， R^{31} 至 R^{34} 中之一者係烷基且其餘各者係選自氫、鹵素、烷基及經取代烷基。在某些情況下， R^{31} 至 R^{34} 中之一者係經取代烷基且其餘各者係選自氫、鹵素、烷基及經取代烷基。在某些情況下， R^{31} 至 R^{34} 中之一者係鹵素且其餘各者係氫。在某些情況下， R^{31} 至 R^{34} 中之一者係烷基且其餘各者係氫。在某些情況下， R^{31} 至 R^{34} 中之一者係經取代烷基且其餘各者係氫。

【0129】 在式(IV)-(IVa)之某些實施例中， n 係 0 至 3 之整數。在某些情況下， n 係 0。在某些情況下， n 係 1。在某些情況下， n 係 2。在某些情況下， n 係 3。在式(IV)-(IVa)之某些實施例中， m 係 0 至 3 之整數。在某些情況下， m 係 0。在某些情況下， m 係 1。在某些情況下， m 係 2。在某些情況下， m 係 3。在某些

情況下，n 係 0 且 m 係 1。在某些情況下，n 係 0 且 m 係 2。在某一情況下，n 係 0 且 m 係 3。在某些情況下，n 係 1 且 m 係 0。在某些情況下，n 係 1 且 m 係 1。在某些情況下，n 係 1 且 m 係 2。在某些情況下，n 係 1 且 m 係 3。在某些情況下，n 係 2 且 m 係 0。在某些情況下，n 係 2 且 m 係 1。在某些情況下，n 係 2 且 m 係 2。在某些情況下，n 係 2 且 m 係 3。在某些情況下，n 係 3 且 m 係 0。在某些情況下，n 係 3 且 m 係 1。在某些情況下，n 係 3 且 m 係 2。在某些情況下，n 係 3 且 m 係 3。在某些情況下，n+m 係 0 至 3 之整數。在某些情況下，n+m 係 0。在某些情況下，n+m 係 1。在某些情況下，n+m 係 2。在某些情況下，n+m 係 3。

【0130】 在式(IVa)之一些情況下，n 係 0 且 m 係 0-2，例如 m 係 1 或 2。

【0131】 在式(IV)-(IVa)之一些情況下，ENPP1 抑制劑化合物具有式(V)-(Va)：



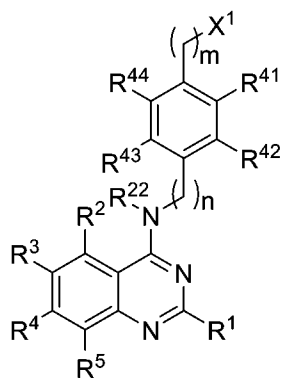
其中：

R⁴¹ 至 R⁴⁴ 係獨立地選自氫、烷基、經取代烷基、羥基、烷氧基、經取代烷氧基、三氟甲基、鹵素、醯基、經取代醯基、羧基、甲醯胺、經取代甲醯胺、磺醯基、經取代磺醯基、磺醯胺及經取代磺醯胺。

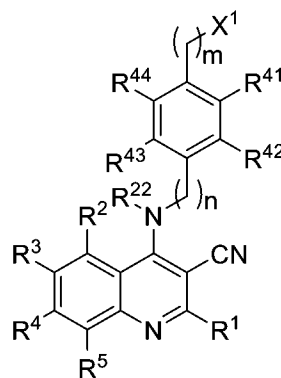
【0132】 在式(V)-(Va)之某些實施例中，Z¹¹ 及 Z²¹ 中之至少一者係 N。在式

(V)-(Va)之某些實施例中， Z^{11} 係 C(CN)且 Z^{21} 係 N。在式(V)-(Va)之某些情況下， Z^{11} 係 N 且 Z^{21} 係 C(CN)。在式(V)-(Va)之某些情況下， Z^{11} 係 C(CN)且 Z^{21} 係 C(CN)。在式(V)-(Va)之某些情況下， Z^{11} 係 N 且 Z^{21} 係 N。

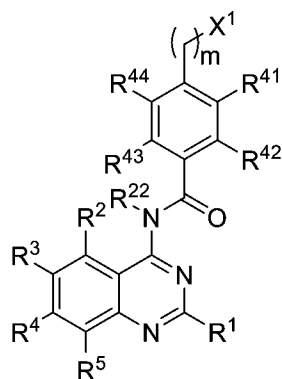
【0133】 在式(V)-(Va)之一些情況下，標的 ENPP1 抑制劑化合物具有式 (VIa)-(VIId)中之一者：



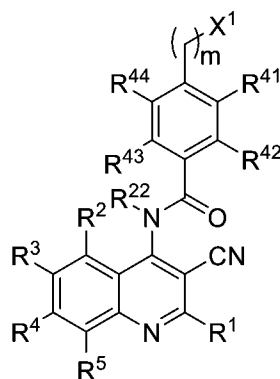
(VIa)



(VIb)



(VIc)



(VIId)。

【0134】 在式(VIa)-(VIId)之某些實施例中， R^{41} 至 R^{44} 各自係氫。在某些實施例中， R^{41} 至 R^{44} 中之至少一者係烷基或經取代烷基。在某些實施例中， R^{41} 至 R^{44} 中之至少一者係經基。在某些實施例中， R^{41} 至 R^{44} 中之至少一者係烷氧基或經取代烷氧基。在某些情況下， R^{41} 至 R^{44} 中之至少一者係三氟甲基。在某些情況下， R^{41} 至 R^{44} 中之至少一者係鹵素。在某些情況下， R^{41} 至 R^{44} 中之至少一者係醯基或經取代醯基。在某些情況下， R^{41} 至 R^{44} 中之至少一者係羧基。在某些情況下， R^{41} 至 R^{44} 中之至少一者係甲醯胺或經取代甲醯胺。在某些情況下， R^{41}

至 R^{44} 中之至少一者係磺醯基或經取代磺醯基。在某些情況下， R^{41} 至 R^{44} 中之至少一者係磺醯胺及經取代磺醯胺。在某些情況下， R^{31} 至 R^{34} 中之一者係氫且其餘各者係選自氫、烷基、經取代烷基、羥基、烷氧基、經取代烷氧基、三氟甲基、鹵素、醯基、經取代醯基、羧基、甲醯胺、經取代甲醯胺、磺醯基、經取代磺醯基、磺醯胺及經取代磺醯胺。在某些情況下， R^{31} 至 R^{34} 中之兩者係氫且其餘各者係選自氫、烷基、經取代烷基、羥基、烷氧基、經取代烷氧基、三氟甲基、鹵素、醯基、經取代醯基、羧基、甲醯胺、經取代甲醯胺、磺醯基、經取代磺醯基、磺醯胺及經取代磺醯胺。在某些情況下， R^{31} 至 R^{34} 中之三者係氫且其餘各者係選自氫、烷基、經取代烷基、羥基、烷氧基、經取代烷氧基、三氟甲基、鹵素、醯基、經取代醯基、羧基、甲醯胺、經取代甲醯胺、磺醯基、經取代磺醯基、磺醯胺及經取代磺醯胺。

【0135】 在式(VIa)-(VIId)之某些實施例中， n 係 0 至 3 之整數。在某些情況下， n 係 0。在某些情況下， n 係 1。在某些情況下， n 係 2。在某些情況下， n 係 3。在式(VIa)-(VIId)中任一者之某些實施例中， m 係 0 至 3 之整數。在某些情況下， m 係 0。在某些情況下， m 係 1。在某些情況下， m 係 2。在某些情況下， m 係 3。在某些情況下， n 係 0 且 m 係 1。在某些情況下， n 係 0 且 m 係 2。在某一情況下， n 係 0 且 m 係 3。在某些情況下， n 係 1 且 m 係 0。在某些情況下， n 係 1 且 m 係 1。在某些情況下， n 係 1 且 m 係 2。在某些情況下， n 係 1 且 m 係 3。在某些情況下， n 係 2 且 m 係 0。在某些情況下， n 係 2 且 m 係 1。在某些情況下， n 係 2 且 m 係 2。在某些情況下， n 係 2 且 m 係 3。在某些情況下， n 係 3 且 m 係 0。在某些情況下， n 係 3 且 m 係 1。在某些情況下， n 係 3 且 m 係 2。在某些情況下， n 係 3 且 m 係 3。在某些情況下， $n+m$ 係 0 至 3 之整數。在某些情況下， $n+m$ 係 0。在某些情況下， $n+m$ 係 1。在某些情況下， $n+m$ 係 2。在某

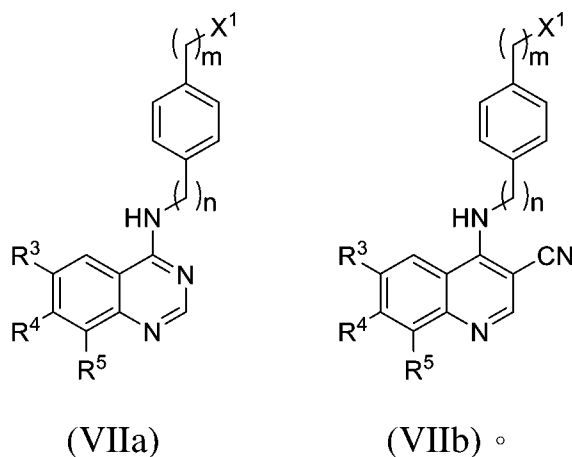
些情況下， $n+m$ 係 3。

【0136】 在式(VIa)-(VIId)中任一者之某些實施例中， R^{22} 係氫。在某些情況下， R^{22} 係烷基。在某些情況下， R^{22} 係經取代烷基。在某些情況下，烷基或經取代烷基係 $C_{(1-6)}$ 烷基。

【0137】 在式(I)-(VIId)中任一者之某些實施例中， R^1 係選自氫、烷基芳基、經取代烷基芳基、烷基雜芳基、經取代烷基雜芳基、烯基芳基(例如乙烯基芳基)、經取代烯基芳基、烯基雜芳基(例如乙烯基雜芳基)、經取代烯基雜芳基、芳基、經取代芳基、雜芳基及經取代雜芳基。

【0138】 在式(I)-(VIId)之某些情況下， R^1 係氫。在某些情況下， R^1 係芳基或經取代芳基。在某些情況下， R^1 係雜芳基或經取代雜芳基。在某些情況下， R^1 係烷基芳基或經取代烷基芳基。在某些情況下， R^1 係烷基雜芳基或經取代烷基雜芳基。在某些情況下， R^1 係烯基芳基或經取代烯基芳基。在某些情況下， R^1 係乙烯基芳基。在某些情況下， R^1 係經取代之乙烯基芳基。在一些情況下， R^1 係乙烯基雜芳基。在某些情況下， R^1 係烯基雜芳基或經取代烯基雜芳基。在一些情況下， R^1 係經取代之乙烯基雜芳基。

【0139】 在式(VIa)-(VIId)之一些情況下，ENPP1 抑制劑化合物具有式(VIIa)-(VIIb)中之一者：



【0140】 在式(I)-(VIIb)中任一者之某些實施例中， R^2 至 R^5 係獨立地選自 H、

第 40 頁(發明說明書)

OH、烷基、經取代烷基、烷氧基、經取代烷氧基、 $-\text{OCF}_3$ 、鹵素、氰基、胺、經取代胺、醯胺、雜環及經取代雜環。

【0141】 在式(I)-(VIIb)中任一者之某些實施例中， R^2 至 R^5 係獨立地選自氫、OH、 $\text{C}_{(1-6)}$ 烷氧基、 $-\text{OCF}_3$ 、 $\text{C}_{(1-6)}$ 烷基胺基、二- $\text{C}_{(1-6)}$ 烷基胺基、F、Cl、Br 及 CN。

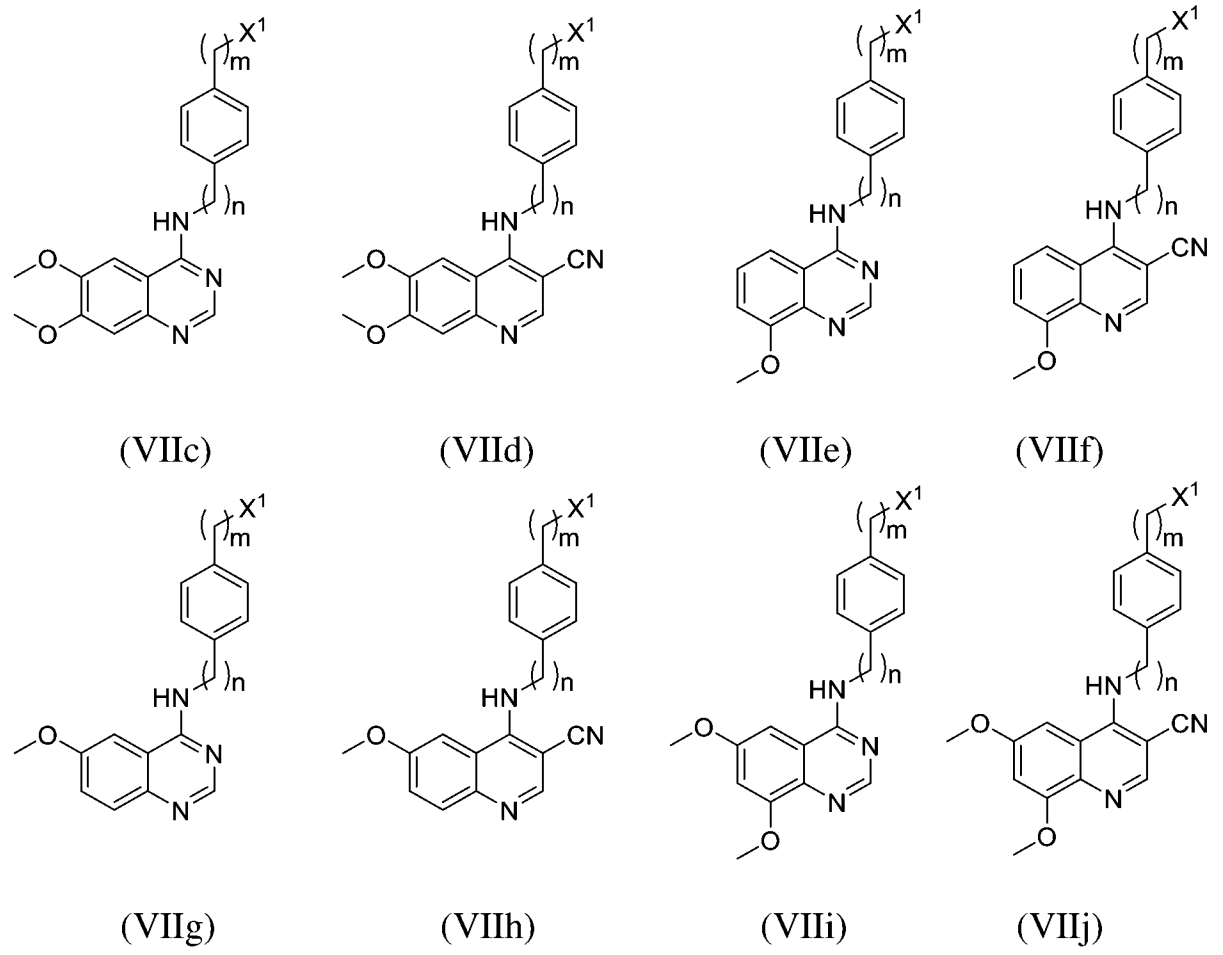
【0142】 在某些情況下， R^2 至 R^5 中之至少一者係氫。在某些情況下， R^2 至 R^5 中之至少兩者係氫。在某些情況下， R^2 至 R^5 中之每一者係氫。在某些情況下， R^2 至 R^5 中之至少一者係羥基。在某些情況下， R^2 至 R^5 中之至少一者係烷基或經取代烷基。在某些情況下， R^2 至 R^5 中之至少一者係烷氧基或經取代烷氧基。在某些情況下，烷氧基或經取代烷氧基係 $\text{C}_{(1-6)}$ 烷氧基，例如甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、戊氧基、己氧基。在某些情況下， R^2 至 R^5 中之至少一者係甲氧基。在某些情況下， R^2 至 R^5 中之至少一者係 $-\text{OCF}_3$ 。在某些情況下， R^2 至 R^5 中之至少一者係鹵素。在某些情況下，鹵素係氟化物。在某些情況下，鹵素係氯化物。在某些情況下，鹵素係溴化物。在某些情況下， R^2 至 R^5 中之至少一者係氰基。在某些情況下， R^2 至 R^5 中之至少一者係胺或經取代胺。在某些情況下， R^2 至 R^5 中之至少一者係 $\text{C}_{(1-6)}$ 烷基胺基。在某些情況下， R^2 至 R^5 中之至少一者係二- $\text{C}_{(1-6)}$ 烷基胺基。在某些情況下， R^2 至 R^5 中之至少一者係醯胺。在某些情況下， R^2 至 R^5 中之至少一者係雜環或經取代雜環。

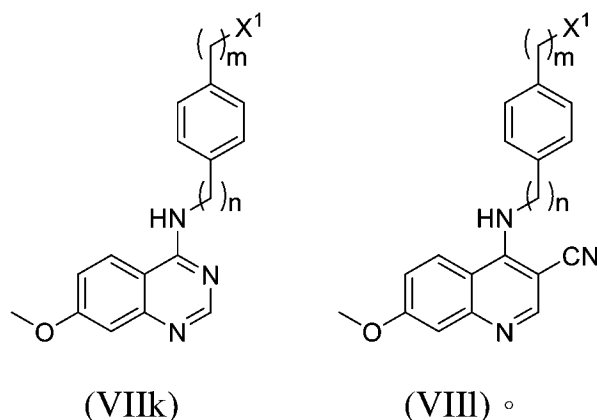
【0143】 在式(I)-(VIIb)之一些情況下， R^3 及 R^4 獨立地係烷氧基；且 R^2 及 R^5 皆為氫。在某些情況下，烷氧基係甲氧基。在一些情況下， R^3 係烷氧基；且 R^2 、 R^4 及 R^5 係氫。在一些情況下， R^4 係烷氧基；且 R^2 、 R^3 及 R^5 各自係氫。在某些情況下， R^2 、 R^3 及 R^4 係氫且 R^5 係烷氧基。在某些情況下，烷氧基係 $\text{C}_{(1-6)}$ 烷氧基。在某些情況下，烷氧基係甲氧基。在某些情況下，烷氧基係乙氧基。在某

些情況下，烷氧基係丙氧基。在某些情況下，烷氧基係丁氧基。在某些情況下，烷氧基係戊氧基。在某些情況下，烷氧基係己基氧基。

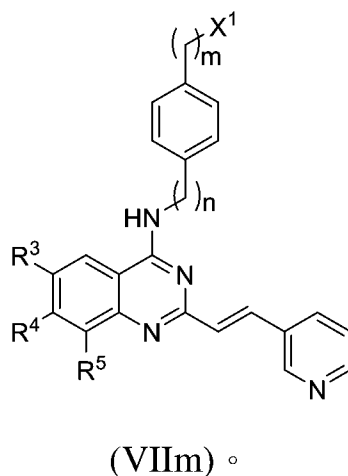
【0144】 在式(VIc)-(VIId)之一些情況下， R^{41} - R^{44} 各自獨立地係 H、鹵素、 $C_{(1-6)}$ 烷基或 $C_{(1-6)}$ 烷氧基。在式(VIc)-(VIId)之一些情況下，m 係 1 或 2。在式(VIc)-(VIId) 之一些情況下，R2 係 H，且 R^3 至 R^5 係獨立地選自氫、 $C_{(1-6)}$ 烷氧基、F、Cl 及 $C_{(1-6)}$ 烷基。

【0145】 在式(VIIa)-(VIIb)之一些情況下，標的 ENPP1 抑制劑化合物具有式 (VIIc)-(VIIj)中之一者：





【0146】 在式(VIa)之一些情況下，ENPP1 抑制劑化合物具有式(VIIIm)：



【0147】 在式(VIIIm)之某些實施例中， R^2 至 R^5 係獨立地選自 H、OH、烷基、經取代烷基、烷氧基、經取代烷氧基、 $-OCF_3$ 、鹵素、氰基、胺、經取代胺、醯胺、雜環及經取代雜環。在式(VIIIm)之某些實施例中， R^2 至 R^5 係獨立地選自氫、OH、 $C_{(1-6)}$ 烷氧基、 $-OCF_3$ 、 $C_{(1-6)}$ 烷基胺基、二- $C_{(1-6)}$ 烷基胺基、F、Cl、Br 及 CN。在式(VIIIm)之某些實施例中， $n+m=1$ 。在式(VIIIm)之某些實施例中， $n+m=2$ 。在式(VIIIm)之某些實施例中， n 係 1 且 m 係 0。

【0148】 在式(VIIIm)之某些情況下， R^3 至 R^5 中之至少一者係氫。在某些情況下， R^3 至 R^5 中之至少兩者係氫。在某些情況下， R^3 至 R^5 中之每一者係氫。在某些情況下， R^3 至 R^5 中之至少一者係羥基。在某些情況下， R^3 至 R^5 中之至少一者係烷基或經取代烷基。在某些情況下， R^3 至 R^5 中之至少一者係烷氧基或經取代烷氧基。在式(VIIIm)之某些情況下，烷氧基或經取代烷氧基係 $C_{(1-6)}$ 烷氧基，

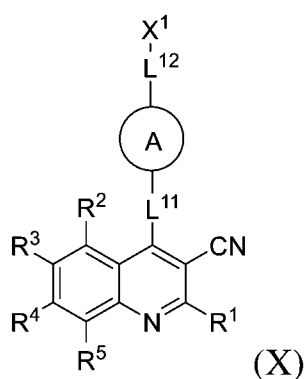
例如甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、戊氧基、己氧基。在某些情況下， R^3 至 R^5 中之至少一者係甲氧基。在式(VIIIm)之某些情況下， R^3 至 R^5 中之至少一者係-OCF₃。在某些情況下， R^3 至 R^5 中之至少一者係鹵素。在某些情況下，鹵素係氟化物。在某些情況下，鹵素係氯化物。在某些情況下，鹵素係溴化物。在某些情況下， R^3 至 R^5 中之至少一者係氰基。在某些情況下， R^3 至 R^5 中之至少一者係胺或經取代胺。在某些情況下， R^3 至 R^5 中之至少一者係 C₍₁₋₆₎ 烷基胺基。在某些情況下， R^3 至 R^5 中之至少一者係二-C₍₁₋₆₎ 烷基胺基。在式(VIIIm)之某些情況下， R^3 至 R^5 中之至少一者係醯胺。在某些情況下， R^3 至 R^5 中之至少一者係雜環或經取代雜環。

【0149】 在式(VIIIm)之一些情況下， R^3 及 R^4 獨立地係烷氧基；且 R^2 及 R^5 皆為氫。在某些情況下，烷氧基係甲氧基。在一些情況下， R^3 係烷氧基；且 R^2 、 R^4 及 R^5 係氫。在一些情況下， R^4 係烷氧基；且 R^2 、 R^3 及 R^5 各自係氫。在式(VIIIm)之某些情況下， R^2 、 R^3 及 R^4 係氫且 R^5 係烷氧基。在某些情況下，烷氧基係 C₍₁₋₆₎ 烷氧基。在某些情況下，烷氧基係甲氧基。在某些情況下，烷氧基係乙氧基。在某些情況下，烷氧基係丙氧基。在某些情況下，烷氧基係丁氧基。在某些情況下，烷氧基係戊氧基。在某些情況下，烷氧基係己基氧基。

【0150】 在式(VIIIm)之某些實施例中，n 係 0-3 且 m 係 0-3。在式(VIIIm)之一些情況下，m 係 0。在某些情況下，m 係 1。在某些情況下，m 係 2。在某些情況下，m 係 3。在某些情況下，n 係 0 且 m 係 1。在某些情況下，n 係 0 且 m 係 2。在某一情況下，n 係 0 且 m 係 3。在某些情況下，n 係 1 且 m 係 0。在某些情況下，n 係 1 且 m 係 1。在某些情況下，n 係 1 且 m 係 2。在某些情況下，n 係 1 且 m 係 3。在某些情況下，n 係 2 且 m 係 0。在某些情況下，n 係 2 且 m 係 1。在某些情況下，n 係 2 且 m 係 2。在某些情況下，n 係 2 且 m 係 3。在某些情況

下， n 係 3 且 m 係 0。在某些情況下， n 係 3 且 m 係 1。在某些情況下， n 係 3 且 m 係 2。在某些情況下， n 係 3 且 m 係 3。在某些情況下， $n+m$ 係 0 至 3 之整數。在某些情況下， $n+m$ 係 0。在某些情況下， $n+m$ 係 1。在某些情況下， $n+m$ 係 2。在某些情況下， $n+m$ 係 3。

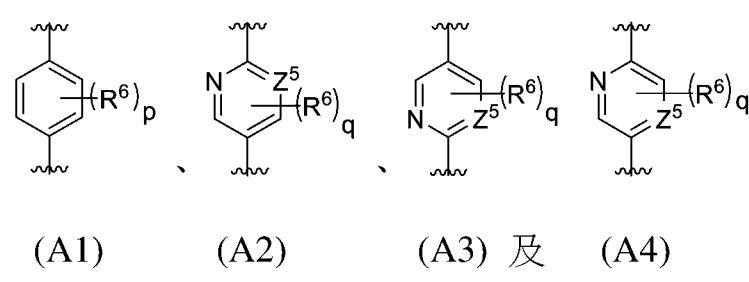
【0151】 在式(I)之 ENPP1 抑制劑化合物之某些情況下， Z^3 不存在。在式(I)之某些實施例中， Z^3 不存在， Z^2 係 CR^{12} ， R^{12} 係氰基，且該化合物係藉由式(X)描述：



其中 L^{11} 及 L^{12} 獨立地係共價鍵或連接體。在式(X)之一些情況下， L^{11} 係共價鍵。

【0152】 在式(X)之一些實施例中，環系統 A 係選自苯基、經取代苯基、吡啶基、經取代吡啶基、嘧啶、經取代嘧啶、六氫吡啶、經取代之六氫吡啶、六氫吡嗪、經取代之六氫吡嗪、嗒嗪、經取代嗒嗪、環己基及經取代環己基。在某些情況下，環系統 A 係苯基或經取代苯基。在一些情況下，環系統 A 係吡啶基或經取代吡啶基。在一些情況下，環系統 A 係嘧啶或經取代嘧啶。在一些情況下，環系統 A 係六氫吡啶或經取代之六氫吡啶。在一些情況下，環系統 A 係六氫吡嗪或經取代之六氫吡嗪。在一些情況下，環系統 A 係環己基或經取代環己基。

【0153】 在一些實施例中，環系統 A 係藉由式(A1)-(A4)中之任一者(例如如本文所述)描述：



其中：

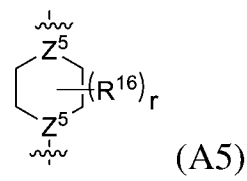
Z^5 係選自 N 及 CR^6 ；

每一 R^6 係選自氫、烷基、經取代烷基、羥基、烷氧基、經取代烷氧基、三氟甲基、鹵素、醯基、經取代醯基、羧基、甲醯胺、經取代甲醯胺、磺醯基、經取代磺醯基、磺醯胺及經取代磺醯胺；

p 係 0 至 4 之整數；且

q 係 0 至 2 之整數。

【0154】 在一些實施例中，A 環係藉由式(A5)描述：



其中：

每一 Z^5 係獨立地選自 N 及 CR^{16} ；

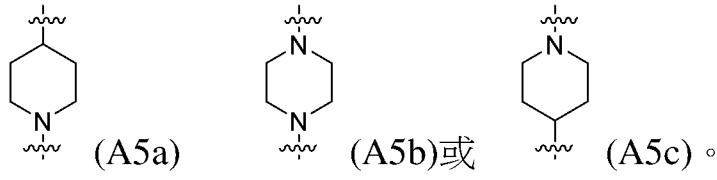
每一 R^{16} 係獨立地選自氫、烷基、經取代烷基、羥基、烷氧基、經取代烷氧基、三氟甲基、鹵素、醯基、經取代醯基、羧基、甲醯胺、經取代甲醯胺、磺醯基、經取代磺醯基、磺醯胺及經取代磺醯胺；且

r 係 0 至 8 之整數。

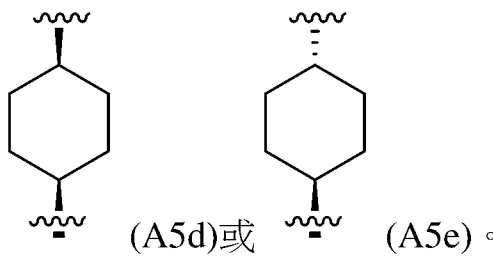
【0155】 在某些情況下，A5 係六氫吡啶或經取代之六氫吡啶。在某些情況下，A5 係六氫吡嗪或經取代之六氫吡嗪。在某些情況下，A5 係環己基或經取代環己基。在 A5 之某些實施例中，r 大於 0，例如 1、2、3、4、5、6、7 或 8。在一些情況下，A5 包括一個 R^{16} 基團。在一些情況下，A5 包括兩個 R^{16} 基團。在

一些情況下，A5 包括三個 R^{16} 基團。在一些情況下，A5 包括四個 R^{16} 基團。在某些實施例中，取代基係選自低碳數烷基(例如甲基、乙基、丙基、丁基、戊基及己基)、三氟甲基及鹵素(例如 F、Cl、I 或 Br)。

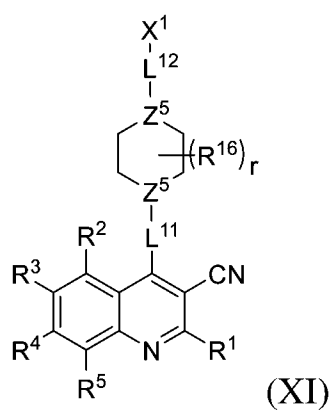
【0156】 在某些實施例中，A 環具有式(A5a)-(A5c)中之任一者：



【0157】 在某些實施例中，A 環係具有式(A5d)或(A5e)之相對構形之環己基：



【0158】 在式(X)之某些情況下，標的 ENPP1 抑制劑化合物具有式(XI)：



其中：

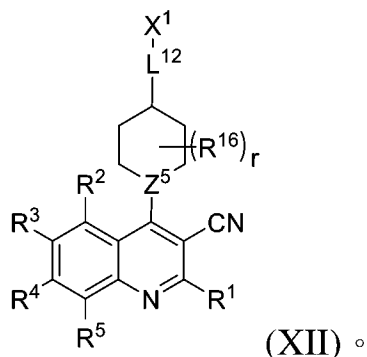
- 每一 Z^5 係獨立地選自 N 及 CR^{16} ；
- 每一 R^{16} 係獨立地選自氫、烷基、經取代烷基、羥基、烷氧基、經取代烷氧基、三氟甲基、鹵素、醯基、經取代醯基、羧基、甲醯胺、經取代甲醯胺、磺醯基、經取代磺醯基、磺醯胺及經取代磺醯胺；且
- r 係 0 至 8 之整數。

【0159】 在式(XI)之某些實施例中，至少一個 Z^5 係 N。在式(XI)之某些實施例

中，一個 Z^5 係 N 且另一個 Z^5 係 CR^{16} 。在式(XI)之某些情況下，兩個 Z^5 基團係 CR^{16} 。在式(XI)之某些情況下，兩個 Z^5 基團係 N。

【0160】 在式(X)-(XI)中任一者之化合物之某些實施例中， L^{11} 及 L^{12} 各自係共價鍵。在某些情況下， L^{11} 及 L^{12} 各自係連接體。在某些情況下， L^{11} 係共價鍵且 L^{12} 係連接體。在某些情況下， L^{11} 係連接體且 L^{12} 係共價鍵。可使用任何方便之連接體作為 L^{11} 及 L^{12} 。在一些情況下， L^{11} 係共價鍵。在某些情況下， L^{11} 係長度為 1-12 個原子、例如長度為 1-10 個、1-8 個或 1-6 個原子、例如長度為 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個或 6 個原子之線性連接體。連接體 L^{11} 可為 (C_{1-6}) 烷基連接體或經取代之 (C_{1-6}) 烷基連接體，其視情況經雜原子或連接官能基取代，例如酯 $(-CO_2-)$ 、醯胺基 $(CONH)$ 、胺基甲酸酯 $(OCONH)$ 、醚 $(-O-)$ 、硫醚 $(-S-)$ 及/或胺基 $(-NR-)$ ，其中 R 係 H 或烷基)。在一些情況下， L^{12} 係共價鍵。在某些情況下， L^{12} 係長度為 1-12 個原子、例如長度為 1-10 個、1-8 個或 1-6 個原子、例如長度為 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個或 6 個原子之連接體。連接體 L^{12} 可為 (C_{1-6}) 烷基連接體或經取代之 (C_{1-6}) 烷基連接體，視情況經雜原子或連接官能基取代，例如酯 $(-CO_2-)$ 、醯胺基 $(CONH)$ 、胺基甲酸酯 $(OCONH)$ 、醚 $(-O-)$ 、硫醚 $(-S-)$ 及/或胺基 $(-NR-)$ ，其中 R 係 H 或烷基)。

【0161】 在式(XI)之一些情況下，標的 ENPP1 抑制劑化合物具有式(XII)：

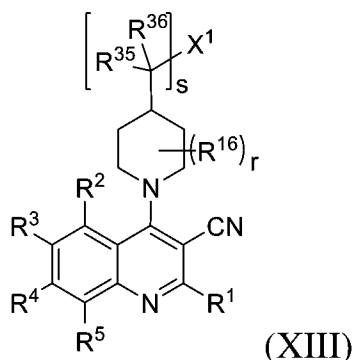


【0162】 在式(XII)化合物之某些實施例中， Z^5 係 CR^{16} ，其中 R^{16} 係選自氫、烷基、經取代烷基、羥基、烷氧基、經取代烷氧基、三氟甲基、鹵素、醯基、

經取代醯基、羧基、甲醯胺、經取代甲醯胺、磺醯基、經取代磺醯基、磺醯胺及經取代磺醯胺。在式(XII)化合物之某些情況下， Z^5 係 N。

【0163】 在式(XII)化合物之某些實施例中， L^{12} 係共價鍵。在某些情況下， L^{12} 係連接體。可使用任何方便之連接體作為 L^{12} 。在某些情況下， L^{12} 係長度為 1-12 個原子、例如長度為 1-10 個、1-8 個或 1-6 個原子、例如長度為 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個或 6 個原子之線性連接體。連接體 L^{12} 可為 (C_{1-6}) 烷基連接體或經取代之 (C_{1-6}) 烷基連接體，視情況經雜原子或連接官能基取代，例如酯 $(-CO_2-)$ 、醯胺基 $(CONH)$ 、胺基甲酸酯 $(OCONH)$ 、醚 $(-O-)$ 、硫醚 $(-S-)$ 及/或胺基 $(-NR-)$ ，其中 R 係 H 或烷基。

【0164】 在式(XII)之一些情況下，標的 ENPP1 抑制劑化合物具有式(XIII)：



其中

R^{35} 及 R^{36} 係各自獨立地選自 H、鹵素、烷基及經取代烷基，或 R^{35} 及 R^{36} 連接成環並與其所連接之碳原子一起提供環烷基、經取代環烷基、雜環基或經取代雜環基環；且

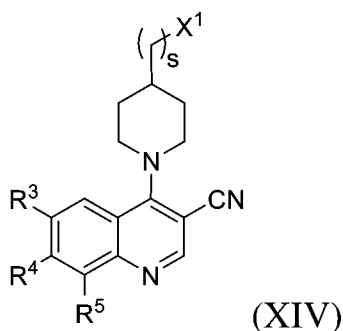
s 係 0 至 6 (例如 0 至 3) 之整數。

【0165】 在式(XIII)之某些實施例中， R^{35} 及 R^{36} 各自係氫。在某些實施例中， R^{35} 或 R^{36} 中之至少一者係鹵素。在某些實施例中， R^{35} 或 R^{36} 中之至少一者係烷基。在某些實施例中， R^{35} 或 R^{36} 中之至少一者係經取代烷基。在某些情況下， R^{35} 係鹵素且 R^{36} 係選自氫、鹵素、烷基及經取代烷基。在某些情況下， R^{35} 係烷

基且 R^{36} 係選自氫、鹵素、烷基及經取代烷基。在某些情況下， R^{35} 係經取代烷基且 R^{36} 係選自氫、鹵素、烷基及經取代烷基。在某些情況下， R^{35} 係鹵素且 R^{36} 係氫。在某些情況下， R^{35} 係烷基且 R^{36} 係氫。在某些情況下， R^{35} 係經取代烷基且 R^{36} 係氫。

【0166】 在式(XIII)之某些實施例中， s 係 0 至 3 之整數。在某些情況下， s 係 0。在某些情況下， s 係 1。在某些情況下， s 係 2。在某些情況下， s 係 3。

【0167】 在式(XIII)之一些情況下，標的 ENPP1 抑制劑化合物具有式(XIV)：



其中 s 係 0 至 6 (例如 0 至 3) 之整數。

【0168】 在式(XIII)之某些實施例中， s 係 0 至 3 之整數。在某些情況下， s 係 0。在某些情況下， s 係 1。在某些情況下， s 係 2。在某些情況下， s 係 3。

【0169】 在式(X)-(XIV)中任一者之某些實施例中， R^2 至 R^5 係獨立地選自 H、OH、烷基、經取代烷基、烷氧基、經取代烷氧基、 $-OCF_3$ 、鹵素、氰基、胺、經取代胺、醯胺、雜環及經取代雜環。

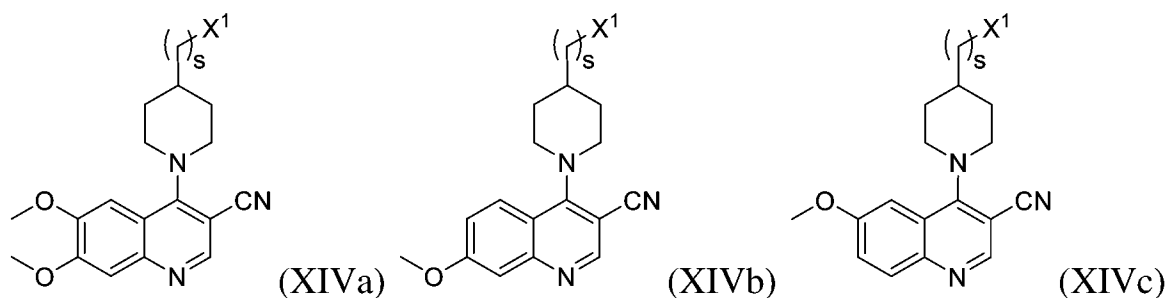
【0170】 在式(X)-(XIV)中任一者之某些實施例中， R^2 至 R^5 係獨立地選自氫、OH、 $C_{(1-6)}$ 烷氧基、 $-OCF_3$ 、 $C_{(1-6)}$ 烷基胺基、二- $C_{(1-6)}$ 烷基胺基、F、Cl、Br 及 CN。

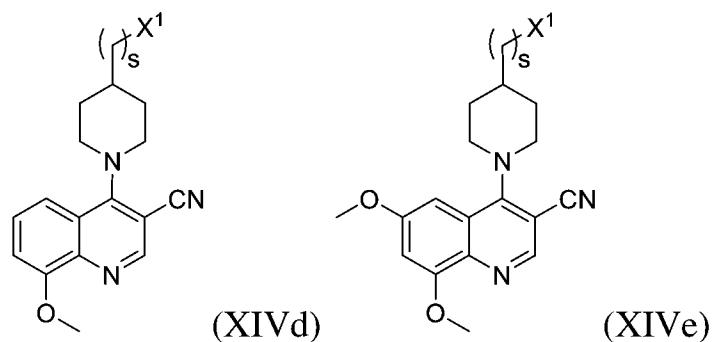
【0171】 在式(X)-(XIV)中任一者之某些情況下， R^2 至 R^5 中之至少一者係氫。在某些情況下， R^2 至 R^5 中之至少兩者係氫。在某些情況下， R^2 至 R^5 中之至少三者係氫。在某些情況下， R^2 至 R^5 中之每一者係氫。在某些情況下， R^2 至 R^5 中之至少一者係羥基。在某些情況下， R^2 至 R^5 中之至少一者係烷基或經取代烷

基。在某些情況下， R^2 至 R^5 中之至少一者係烷氧基或經取代烷氧基。在某些情況下，烷氧基或經取代烷氧基係 $C_{(1-6)}$ 烷氧基，例如甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基、戊氧基、己氧基。在某些情況下， R^2 至 R^5 中之至少一者係甲氧基。在某些情況下， R^2 至 R^5 中之至少一者係 $-OCF_3$ 。在某些情況下， R^2 至 R^5 中之至少一者係鹵素。在某些情況下，鹵素係氟化物。在某些情況下，鹵素係氯化物。在某些情況下，鹵素係溴化物。在某些情況下， R^2 至 R^5 中之至少一者係氰基。在某些情況下， R^2 至 R^5 中之至少一者係胺或經取代胺。在某些情況下， R^2 至 R^5 中之至少一者係 $C_{(1-6)}$ 烷基胺基。在某些情況下， R^2 至 R^5 中之至少一者係二- $C_{(1-6)}$ 烷基胺基。在某些情況下， R^2 至 R^5 中之至少一者係醯胺。在某些情況下， R^2 至 R^5 中之至少一者係雜環或經取代雜環。

【0172】 在式(X)-(XIV)中任一者之一些情況下， R^3 及 R^4 獨立地係烷氧基；且 R^2 及 R^5 皆為氫。在一些情況下， R^3 係烷氧基；且 R^2 、 R^4 及 R^5 係氫。在一些情況下， R^4 係烷氧基；且 R^2 、 R^3 及 R^5 各自係氫。在某些情況下， R^2 、 R^3 及 R^4 係氫且 R^5 係烷氧基。在某些情況下，烷氧基係 $C_{(1-6)}$ 烷氧基。在某些情況下，烷氧基係甲氧基。在某些情況下，烷氧基係乙氧基。在某些情況下，烷氧基係丙氧基。在某些情況下，烷氧基係丁氧基。在某些情況下，烷氧基係戊氧基。在某些情況下，烷氧基係己基氧基。

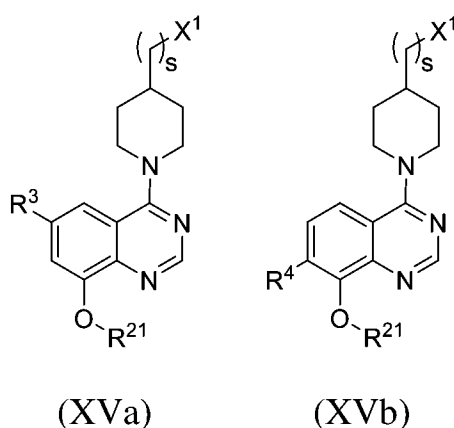
【0173】 在式(XIV)之一些情況下，標的 ENPP1 抑制劑化合物具有式(XIVa)-(XIVe)中之一者：





其中 s 係 0 至 6 (例如 0 至 3) 之整數。

【0174】 在式(I)之一些情況下，標的 ENPP1 抑制劑化合物具有式(XVa)或(XVb)：



其中：

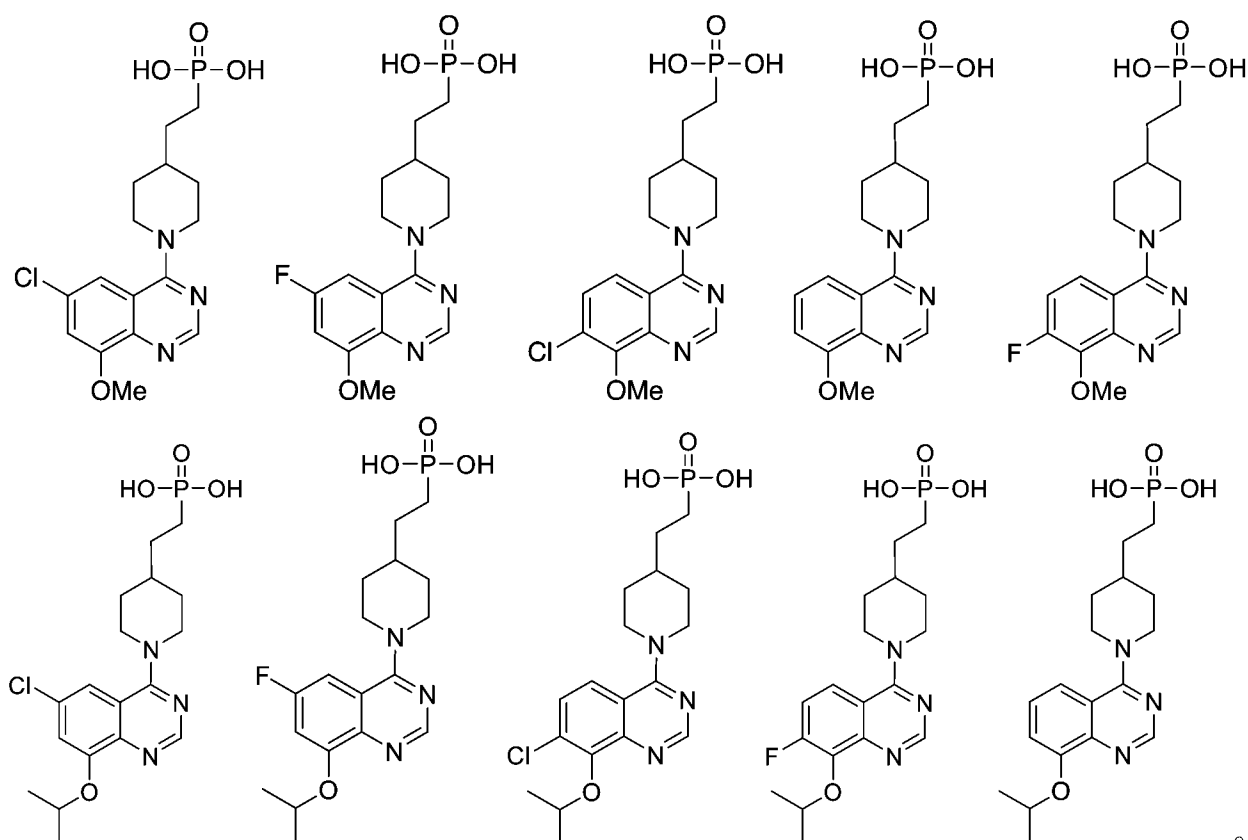
s 為 0 至 3；

R^{21} 係 $C_{(1-6)}$ 烷基或經取代之 $C_{(1-6)}$ 烷基；且

R^3 及 R^4 係選自 Cl 及 F。

【0175】 在式(XVa)-(XVb)之一些情況下， R^{21} 係選自甲基、乙基、正丙基及異丙基。在某些情況下， R^{21} 係甲基。在式(XVa)-(XVb)之一些情況下， R^3 及 R^4 係 Cl。在某些情況下， R^3 及 R^4 係 F。在式(XVa)-(XVb)之一些情況下， s 係 2。在某些情況下， s 係 1。在式(XVa)-(XVb)之一些實施例中， s 係 2； R^{21} 係甲基或異丙基；且 R^3 及 R^4 係選自 Cl 及 F。

【0176】 在式(XVa)-(XVb)之一些情況下，標的 ENPP1 抑制劑化合物具有以下結構或其前藥中之一者(例如如本文所述)：



。

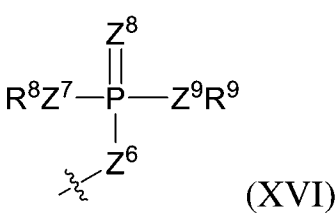
【0177】 如上文所述， X^1 係親水頭基或其前藥形式。本文所述親水頭基之任一實施例可納入本文所述式(I)-(XVb)之任一實施例中。在式(I)-(XVb)之一些實施例中， X^1 係包含能夠結合鋅離子之帶電基團之親水頭基或其前藥形式。在某些情況下，能夠結合鋅離子之親水頭基係含磷官能基(例如如本文所述)。

【0178】 在式(I)-(XVb)之一些實施例中，親水頭基(X^1)係選自膦酸或膦酸鹽、膦酸酯、磷酸鹽、磷酸酯、硫代磷酸鹽、硫代磷酸酯、胺基磷酸酯、硫代胺基磷酸酯、磺酸鹽、磺酸、硫酸鹽、羧酸、酮酸、醯胺及羧酸。在式(I)-(XVb)中任一者之一些實施例中，親水頭基係膦酸、膦酸酯或其鹽。在式(I)-(XVb)中任一者之一些實施例中，親水頭基係磷酸酯或其鹽。在式(I)-(XVb)中任一者之一些實施例中，親水頭基係膦酸酯或磷酸酯。在式(I)-(XVb)中任一者之一些實施例中，親水頭基係硫代磷酸鹽。在式(I)-(XVb)中任一者之一些實施例中，親水頭基係硫代磷酸酯。在式(I)-(XVb)中任一者之一些實施例中，親水頭基係胺基磷酸酯。在式(I)-(XVb)中任一者之一些實施例中，親水頭基係硫代胺基磷酸

酯。

【0179】 可納入本文所述式(I)-(XVb)之任一實施例中之相關親水頭基之特定實例包括(但不限於)包含第一部分之頭基，該第一部分選自磷酸根(RPO₄H⁻)、膦酸根(RPO₃H⁻)、硼酸(RBO₂H₂)、羧酸根(RCO₂⁻)、硫酸根(RSO₄⁻)、磺酸根(RSO₃⁻)、胺(RNH₃⁺)、甘油、糖(例如乳糖)或衍生自玻尿酸、極性胺基酸、聚氧化乙烯及寡乙二醇，該第一部分視情況結合至第二部分之殘基，該第二部分選自膽鹼、乙醇胺、甘油、核酸、糖、肌醇、胺基酸或胺基酸酯(例如絲胺酸)及脂質(例如脂肪酸或烴鏈，例如 C8-C30 飽和或不飽和烴)。頭基可含有多種其他修飾，例如在含有寡乙二醇及聚氧化乙烯(PEG)之頭基之情況下，該 PEG 鏈可經甲基封端或具有遠端官能基用於進一步修飾。親水頭基之實例亦包括(但不限於)硫代磷酸鹽、磷膽鹼、磷甘油、磷乙醇胺、磷絲胺酸、磷肌醇、乙基磷醯膽鹼、聚乙二醇、聚甘油、三聚氰胺、葡萄糖胺、三甲胺、精胺、亞精胺及結合羧酸鹽、硫酸鹽、硼酸、磺酸鹽、硫酸鹽及碳水化合物。

【0180】 在式(I)-(XVb)中任一者之一些情況下，親水頭基 X¹ 具有式(XVI)：



其中：

- Z⁶ 不存在或選自 O 及 CH₂；
- Z⁷ 及 Z⁹ 係各自獨立地選自 O 及 NR¹⁰，其中 R¹⁰ 係 H、烷基或經取代烷基；
- Z⁸ 係選自 O 及 S；且
- R⁸ 及 R⁹ 係各自獨立地選自 H、烷基、經取代烷基、烯基、經取代烯基、芳基、經取代芳基、雜芳基、經取代雜芳基、醯基、經取代醯基、非芳族雜環、經取代之非芳族雜環、環烷基、經取代環烷基及前部分。

【0181】 在式(XVI)之一些實施例中， Z^6 不存在。在其他情況下， Z^6 係 CH_2 。在其他情況下， Z^6 係氧。在式(XVI)之一些實施例中， Z^7 係氧且 Z^9 係 NR^{10} 。在一些情況下， Z^7 係 NR^{10} 且 Z^9 係氧。在一些情況下， Z^7 及 Z^9 皆為氧。在其他情況下， Z^7 及 Z^9 皆為 NR^{10} 。在一些情況下， Z^8 係氧。在其他情況下， Z^8 係硫。

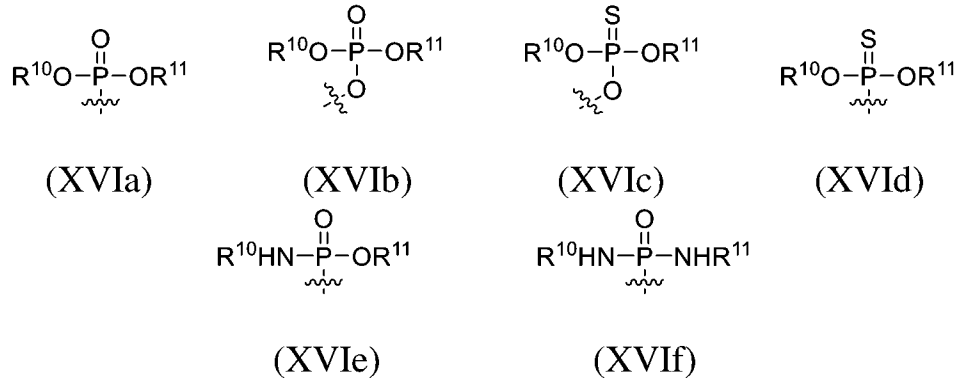
【0182】 在式(XVI)之一些實施例中， Z^7 、 Z^8 及 Z^9 皆為氧原子且 Z^6 係不存在或 CH_2 。在其他情況下， Z^8 係硫原子， Z^7 及 Z^9 皆為氧原子且 Z^6 係不存在或 CH_2 。在其他情況下， Z^8 係硫原子， Z^6 、 Z^7 及 Z^9 皆為氧原子。在一些情況下， Z^8 係氧原子， Z^7 係 NR^{10} ， Z^9 係氧原子且 Z^6 係不存在或 CH_2 。在其他情況下， Z^8 係氧原子， Z^7 係 NR^{10} ， Z^6 及 Z^9 皆為氧原子。在其他情況下， Z^8 係氧原子， Z^7 及 Z^9 各自獨立地係 NR^{10} 且 Z^6 係氧原子。在其他情況下， Z^8 係氧原子， Z^7 及 Z^9 各自獨立地係 NR^{10} 且 Z^6 係不存在或 CH_2 。在一些情況下， Z^7 及 Z^9 各自係相同的。在其他情況下， Z^7 及 Z^9 係不同的。應理解，式(XVI)之基團可包括所繪示結構之一或多種互變異構形式且意欲包括所有該等形式及其鹽。

【0183】 在式(XVI)之一些實施例中， Z^7 及 Z^9 中之至少一者係 NR^{10} 。在一些情況下， R^{10} 係氫。在一些情況下， R^{10} 係烷基。在一些其他情況下， R^{10} 係經取代烷基。在一些情況下， Z^7 及 Z^9 皆為 NR^{10} 。在一些情況下， Z^7 及 Z^9 皆為 NR^{10} 且每一 R^{10} 、 R^8 及 R^9 獨立地係氫。在一些情況下， Z^7 及 Z^9 皆為 NR^{10} ，每一 R^{10} 係烷基，且 R^8 及 R^9 各自係氫。在一些情況下， Z^7 及 Z^9 皆為 NR^{10} ，每一 R^{10} 係經取代烷基(例如經酯或羧基取代之烷基)，且 R^8 及 R^9 各自係氫。

【0184】 在式(XVI)之一些實施例中， R^8 及 R^9 皆為氫原子。在一些情況下， R^8 及 R^9 中之至少一者係除氫以外之取代基。在其他情況下， R^8 及 R^9 皆為除氫以外之取代基。在一些情況下， R^8 及 R^9 中之至少一者係烷基或經取代烷基。在一些情況下， R^8 及 R^9 中之至少一者係烯基或經取代烯基。在一些其他情況下，

R⁸ 及 R⁹ 中之至少一者係芳基或經取代芳基。在一些情況下，R⁸ 及 R⁹ 中之至少一者係鹼基或經取代鹼基。在一些情況下，R⁸ 及 R⁹ 中之至少一者係雜芳基或經取代雜芳基。在一些情況下，R⁸ 及 R⁹ 中之至少一者係環烷基或經取代環烷基。在一些情況下，R⁸ 及 R⁹ 皆為烷基(例如低碳數烷基)。在一些情況下，R⁸ 及 R⁹ 皆為經取代烷基(例如經烷氧基、經取代烷氧基、酯或羧基取代之 C₍₁₋₆₎ 烷基)。在一些情況下，R⁸ 及 R⁹ 中之至少一者包括前部分。在某些情況下，R⁸ 及 R⁹ 皆為苯基。在一些情況下，R⁸ 及 R⁹ 係相同的。在其他情況下，R⁸ 及 R⁹ 係不同的。

【0185】 在式(I)-(XVb)中任一者之一些情況下，親水頭基 X¹ 係選自式(XVIa)至(XVI f)中之任一者：



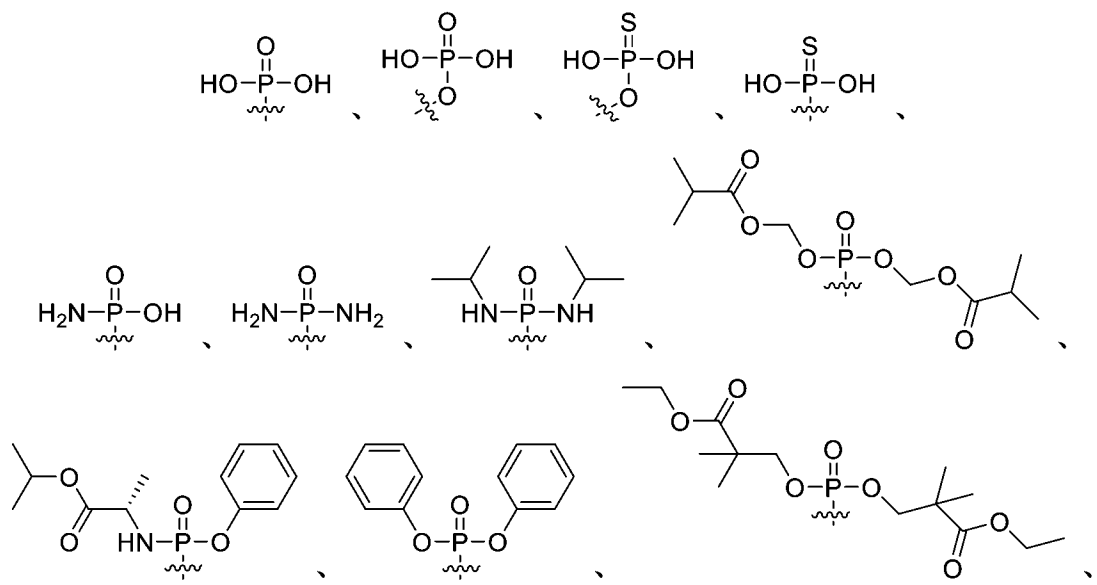
其中：
R¹⁰ 及 R¹¹ 係各自獨立地選自 H、烷基、經取代烷基、烷氧基、經取代烷氧基、芳基、經取代芳基、雜芳基、經取代雜芳基、鹼基、經取代鹼基、羧基、經取代羧基及前部分(例如如本文所述)。

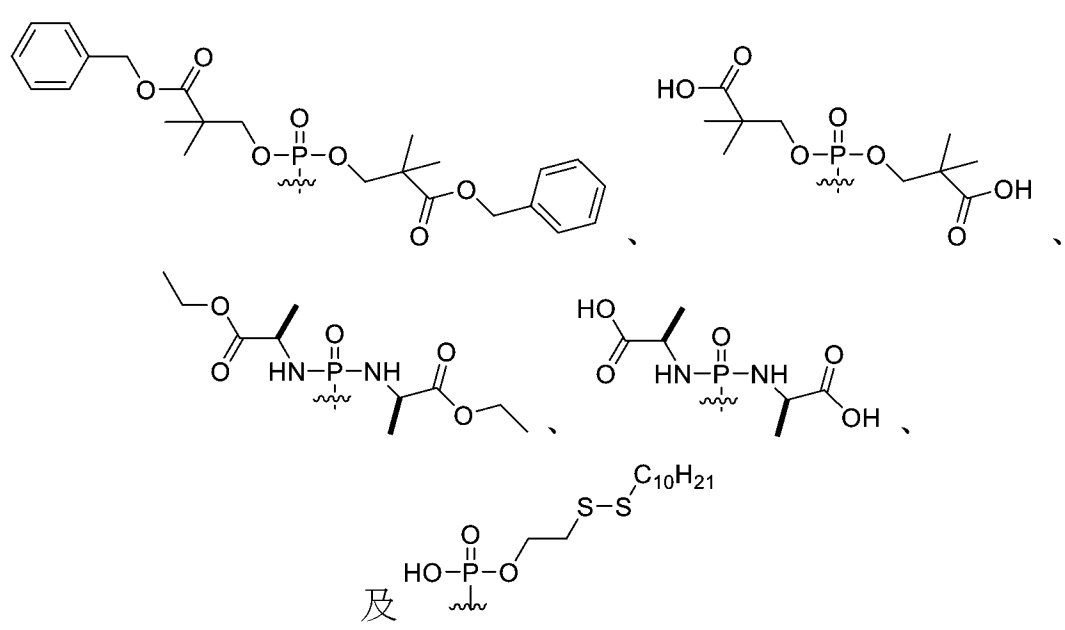
【0186】 在式(XVIa)至(XVI f)之一些實施例中，R¹⁰ 及 R¹¹ 皆為氫原子。在一些情況下，R¹⁰ 及 R¹¹ 中之至少一者係除氫以外之取代基。在其他情況下，R¹⁰ 及 R¹¹ 皆為除氫以外之取代基。在一些情況下，R¹⁰ 及 R¹¹ 係相同的。在其他情況下，R¹⁰ 及 R¹¹ 係不同的。在一些情況下，R¹⁰ 及 R¹¹ 中之至少一者係烷基或經取代烷基。在一些情況下，R¹⁰ 及 R¹¹ 中之至少一者係芳基或經取代芳基。在一些情況下，R¹⁰ 及 R¹¹ 皆為烷基或經取代烷基。在一些情況下，R¹⁰ 及 R¹¹ 皆為芳基或經

取代芳基。在一些情況下， R^{10} 及 R^{11} 皆為醯基或經取代醯基。在一些情況下， R^{10} 及 R^{11} 皆為低碳數烷基。在一些情況下， R^{10} 及 R^{11} 皆為經取代烷基(例如經烷氧基、經取代烷氧基、酯或羧基取代之 $C_{(1-6)}$ 烷基)。在一些情況下， R^{10} 及 R^{11} 中之至少一者包括前部分。在某些情況下， R^{10} 及 R^{11} 皆為苯基。

【0187】 在式(XVIa)至(XVIId)之某些情況下， R^{10} 及 R^{11} 中之至少一者包括可裂解基團或自消性前部分。自消性基團可為二硫鍵連接之前部分或含有自消性酯之前部分。在一些情況下， R^{10} 及/或 R^{11} 包括下式之二硫鍵連接之前部分： $-CH_2CH_2-SS-R^{12}$ ，其中 R^{12} 係烷基或經取代烷基。在某些情況下， R^{12} 係 C8-C30 飽和或不飽和烴鏈。在一些情況下， R^{10} 及/或 R^{11} 包括下式之前部分： $-CH_2OCOR^{13}$ ，其中 R^{13} 係 H、烷基或經取代烷基。在一些情況下， R^{10} 及/或 R^{11} 包括下式之前部分： $-CH_2C(R^{14})_2CO_2R^{14}$ ，其中每一 R^{14} 獨立地係 H、烷基或經取代烷基。

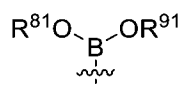
【0188】 在式(I)-(XVb)中任一者之一些情況下，親水頭基 X^1 或其前藥形式係選自：





或其醫藥學上可接受之鹽。

【0189】 在式(I)-(XVb)中任一者之一些情況下，親水頭基 X¹ 具有式(XVI)：



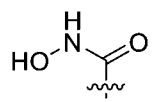
(XVI)

其中：

R⁸¹ 及 R⁹¹ 係各自獨立地選自 H、烷基、經取代烷基、烯基、經取代烯基、烷氧基、經取代烷氧基、芳基、經取代芳基、醯基、酯、醯胺、雜環、經取代雜環、環烷基及經取代環烷基，或 R⁸¹ 及 R⁹¹ 與其所連接之原子一起形成選自雜環及經取代雜環之基團。

【0190】 在式(XVI)之一些實施例中，R⁸¹ 及 R⁹¹ 皆為氫原子。在其他情況下，R⁸¹ 及 R⁹¹ 皆為除氫以外之取代基。

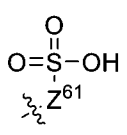
【0191】 在式(I)-(XVb)中任一者之一些情況下，親水頭基 X¹ 具有式(XVII)：



(XVII)

【0192】 在式(I)-(XVb)中任一者之一些情況下，親水頭基 X¹ 具有式

(XVIII) :

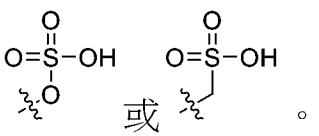


(XVIII)

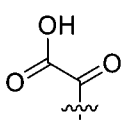
其中 :

Z⁶¹ 不存在或選自 O 及 CH₂ 。

【0193】 在式(XVIII)之一些實施例中，親水頭基係選自以下基團中之一者：

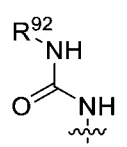


【0194】 在式(I)-(XVb)中任一者之一些情況下，親水頭基 X¹ 具有式(XIX)：



(XIX)

【0195】 在式(I)-(XVb)中任一者之一些情況下，親水頭基 X¹ 具有式(XX)：

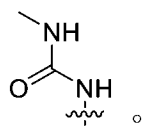


(XX)

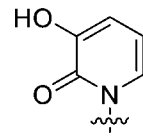
其中 :

R⁹² 係選自 H、烷基、經取代烷基、烯基、經取代烯基、烷氧基、經取代烷氧基、芳基、經取代芳基、醯基、酯、醯胺、雜環、經取代雜環環烷基及經取代環烷基。

【0196】 在式(XX)之一些實施例中，R⁹² 係氫。在其他情況下，R⁹² 係除氫以外之取代基。在某些實施例中，R⁹² 係烷基或經取代烷基。在式(XX)之某些實施例中，親水頭基具有結構：



【0197】 在式(I)-(XVb)中任一者之一些情況下，親水頭基 X¹ 具有式(XXI)：



(XXI)

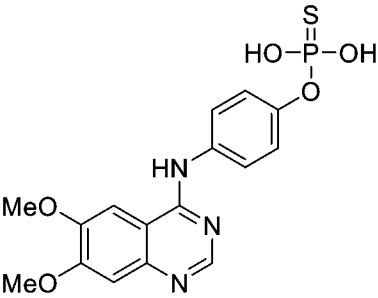
【0198】 應理解，式(I)-(XVb)中任一者之基團 X¹ 中之羥基及胺基中之任一者可視情況進一步經任一方便之基團取代，該任一方便之基團係例如烷基、經取代烷基、苯基、經取代苯基、酯基及諸如此類。應理解，可使用任何方便之替代親水基團作為式(I)-(XVb)中任一者之化合物中之基團 X¹。

【0199】 在某些實施例中，ENPP1 抑制劑化合物係藉由表 1 結構中之一者或其前藥(例如如本文所述)或其醫藥學上可接受之鹽來描述。

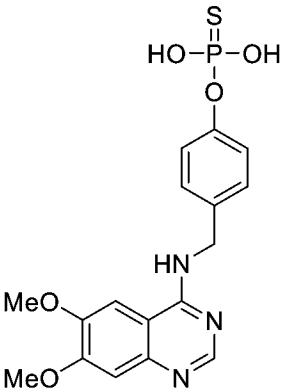
表 1：ENPP1 抑制劑化合物

編號	結構	編號	結構
2		3	
4		5	

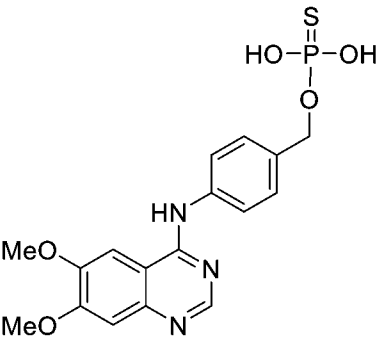
6



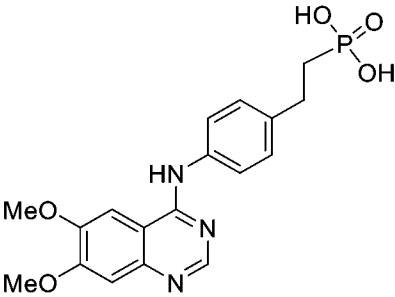
7



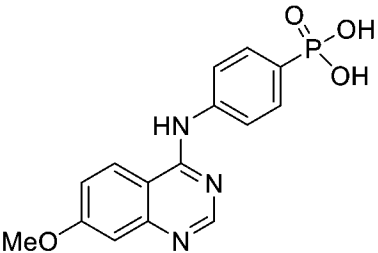
8



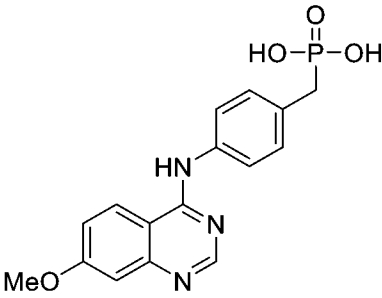
9



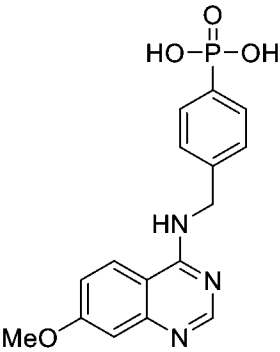
10



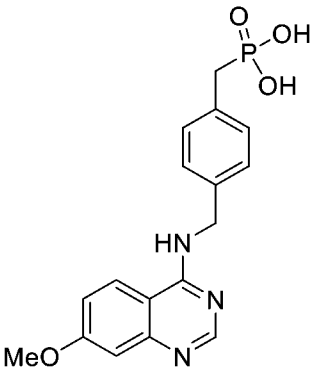
11



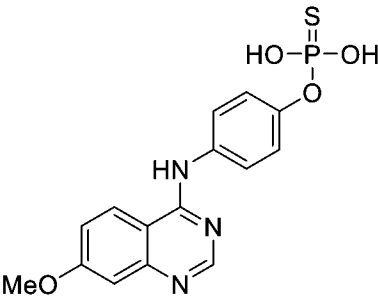
12



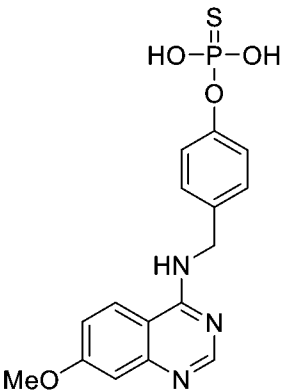
13



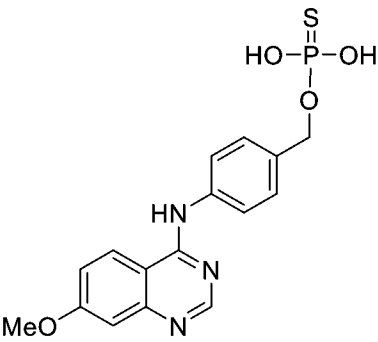
14



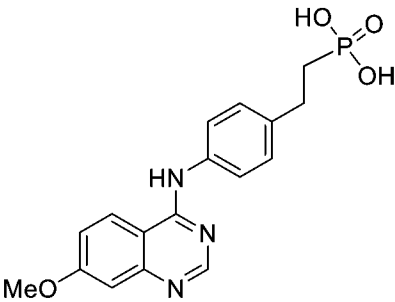
15



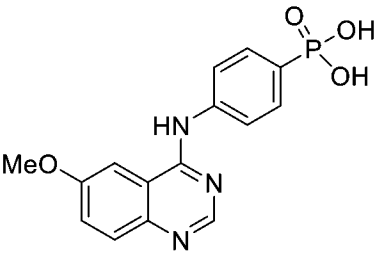
16



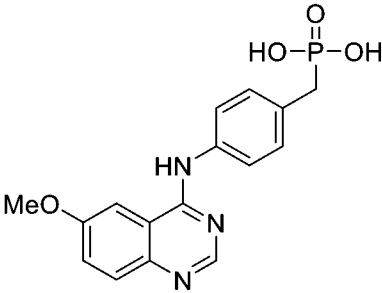
17



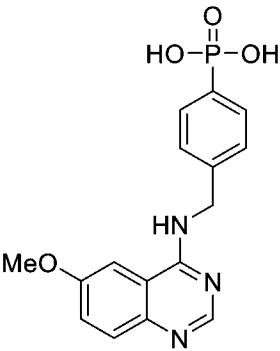
18



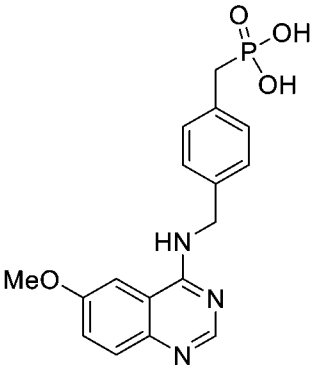
19



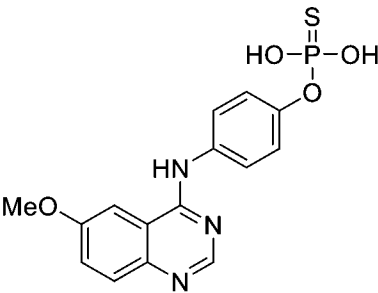
20



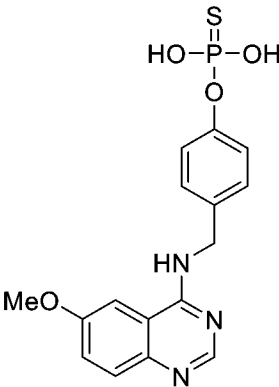
21



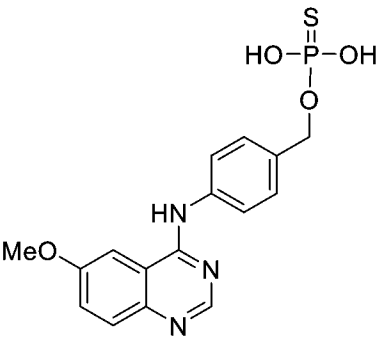
22



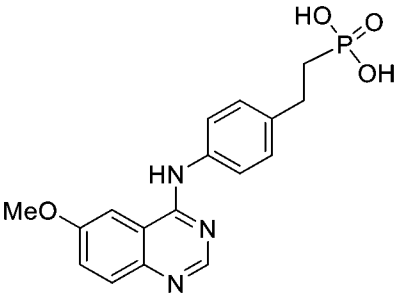
23



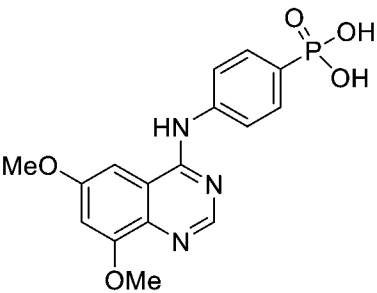
24



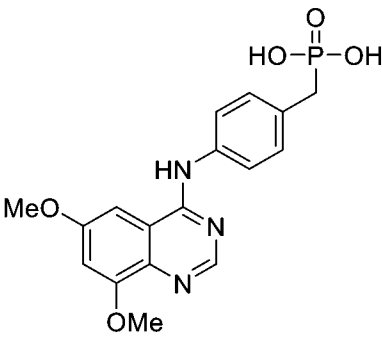
25



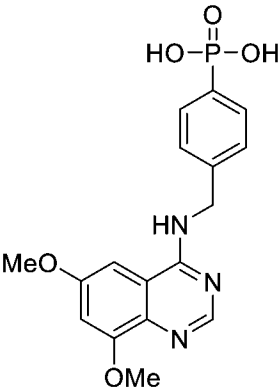
26



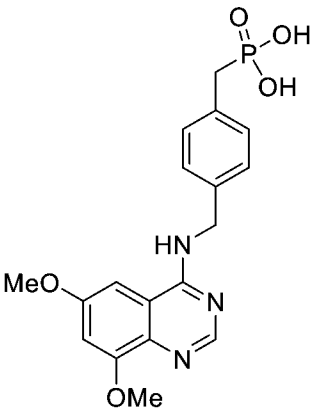
27



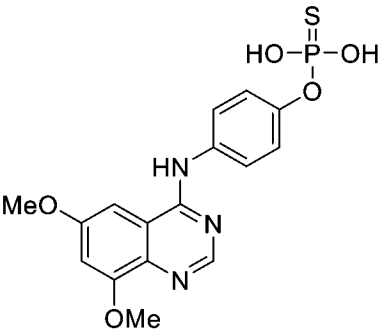
28



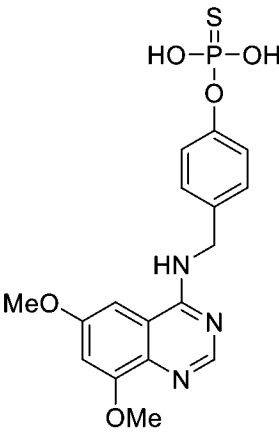
29



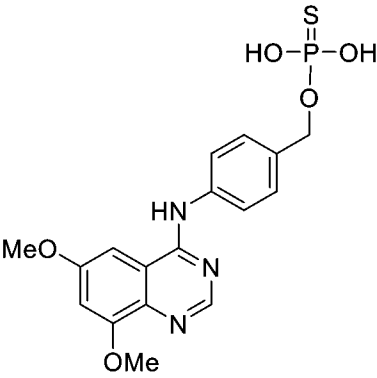
30



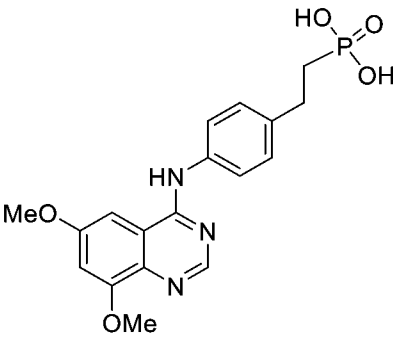
31



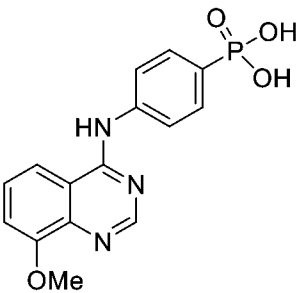
32



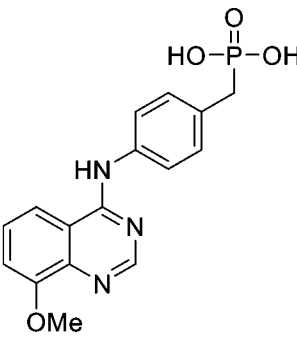
33



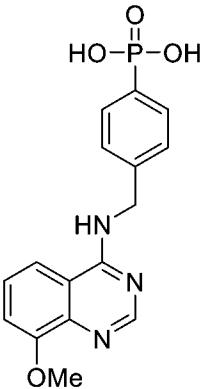
34



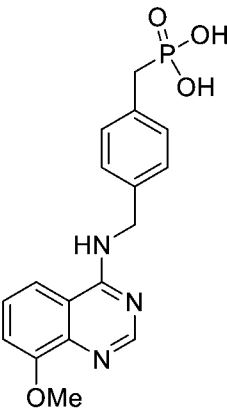
35



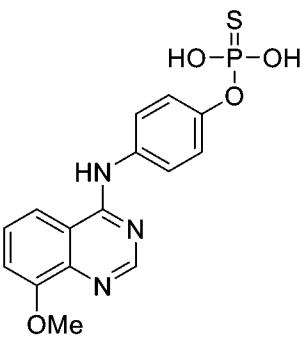
36



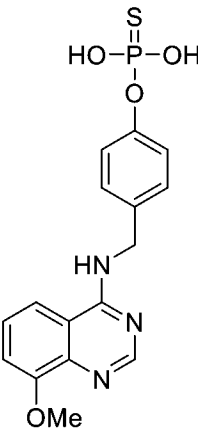
37



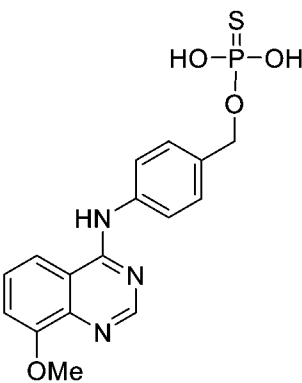
38



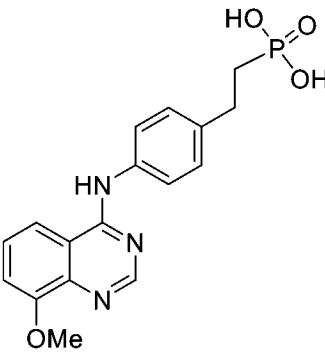
39

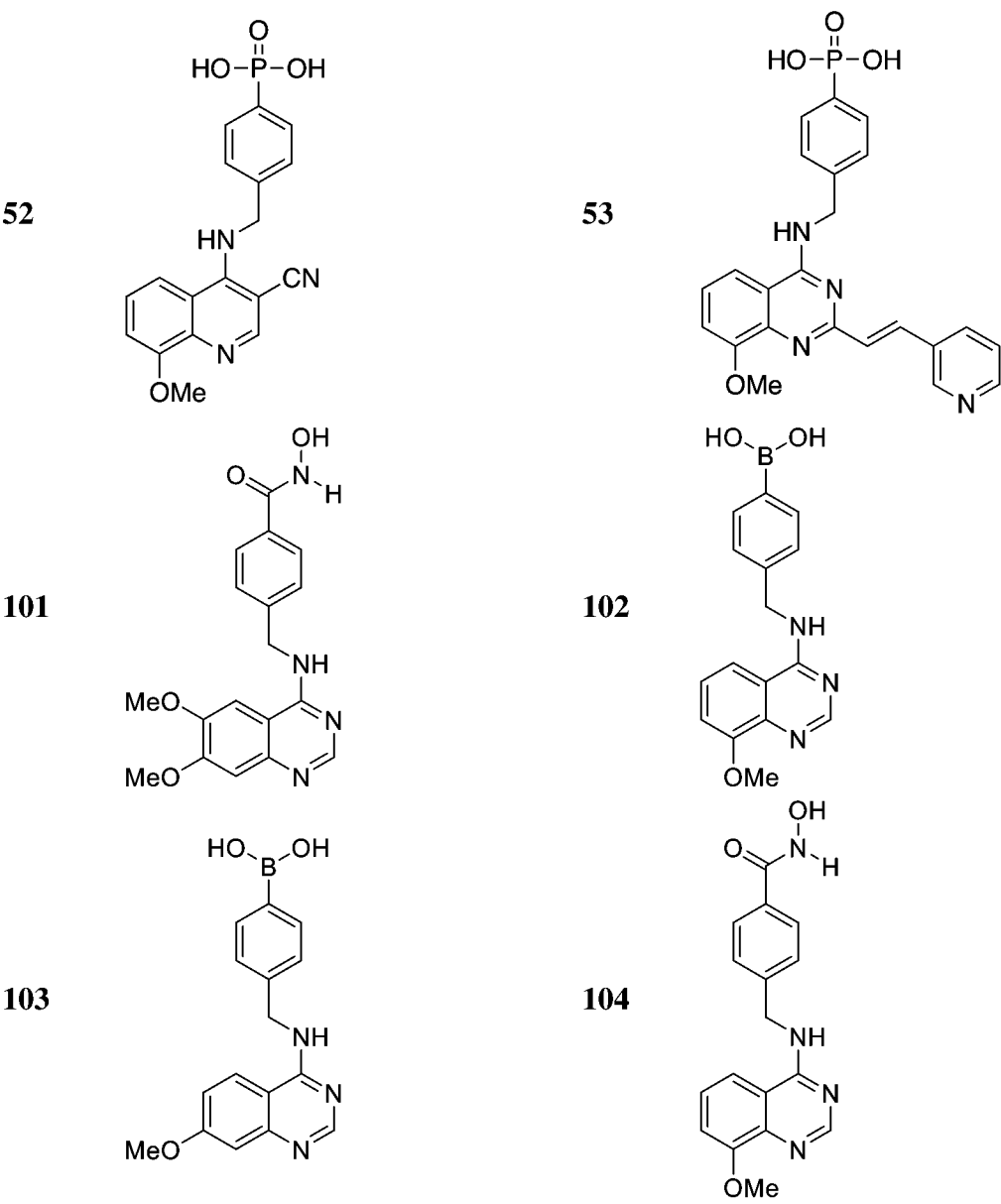


40



41



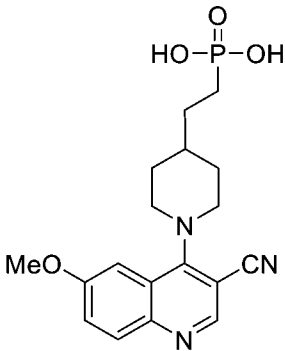


【0200】 在某些實施例中，ENPP1 抑制劑化合物係藉由表 2 結構中之一者或其前藥(例如如本文所述)或其醫藥學上可接受之鹽描述。

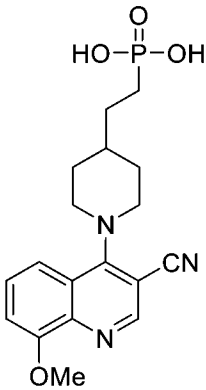
表 2：ENPP1 抑制劑化合物

編號	結構	編號	結構
42	<chem>COc1ccc2c(c1)c(cnc2N3CCCCC3CCOP(=O)(O)O)C#N</chem>	43	<chem>COc1ccc2c(c1)c(cnc2N3CCCCC3CCOP(=O)(O)O)C#N</chem>

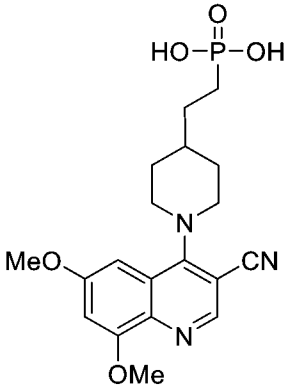
44



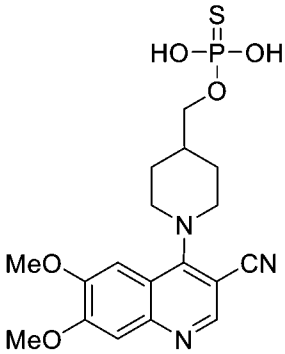
45



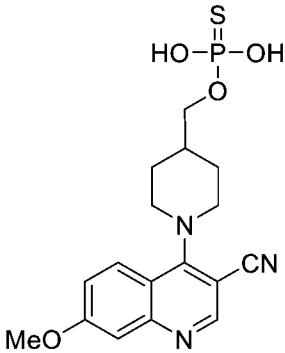
46



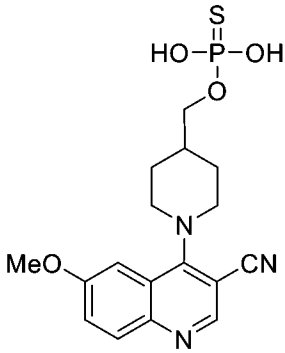
47



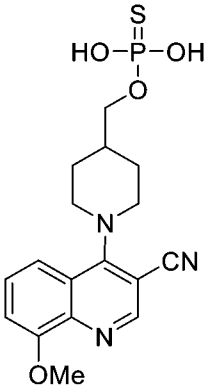
48



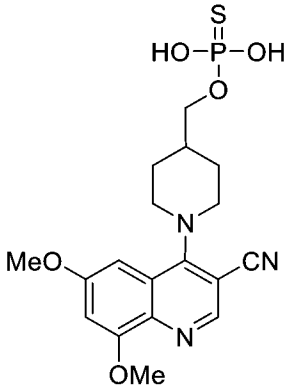
49



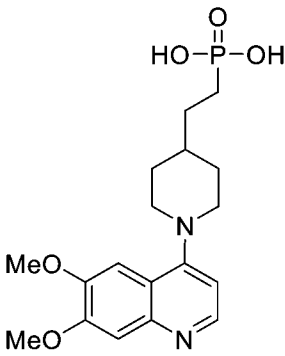
50



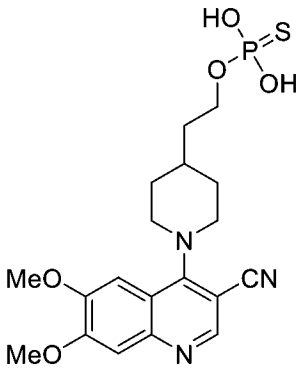
51



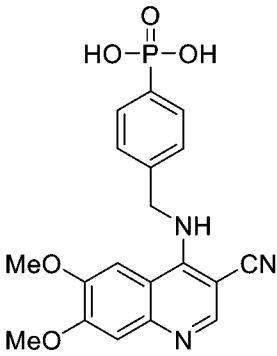
201



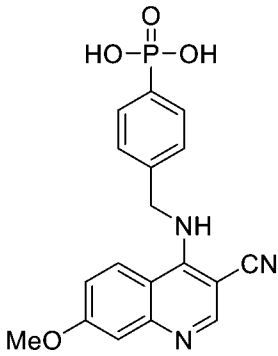
202



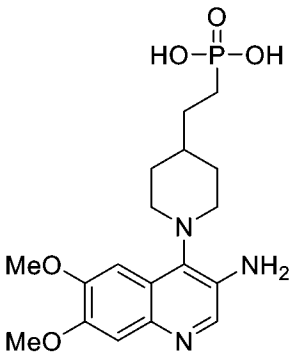
203



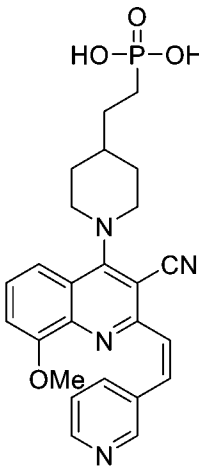
204



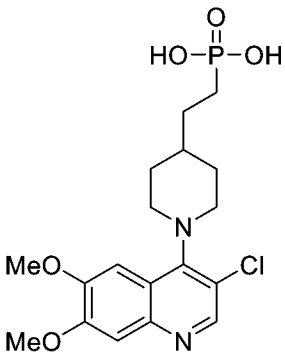
205



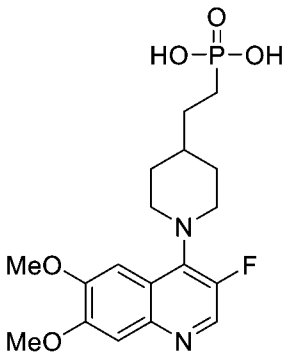
206



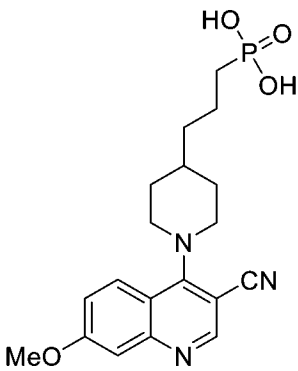
207



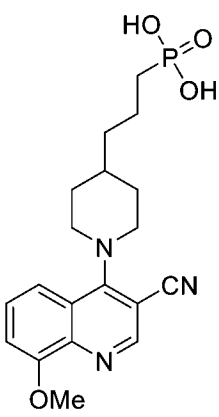
208



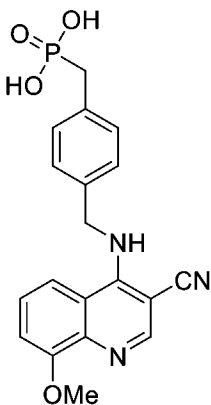
209



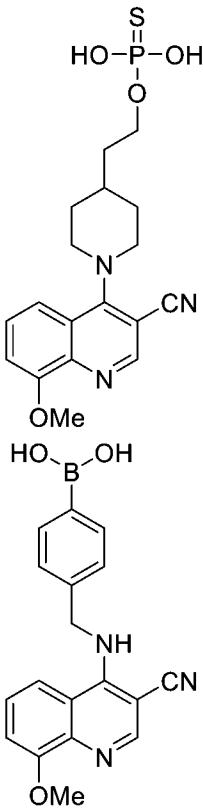
210



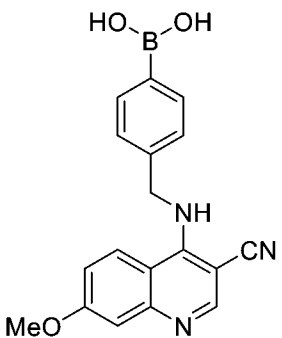
211



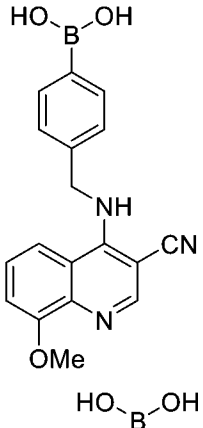
212



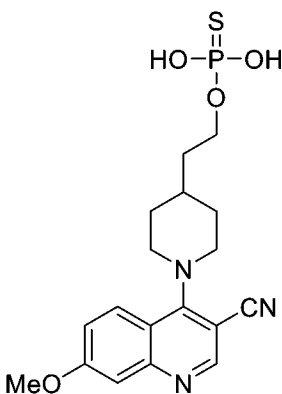
213



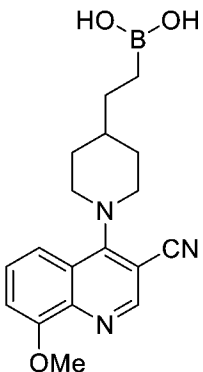
214



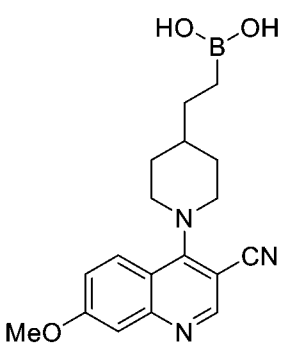
215



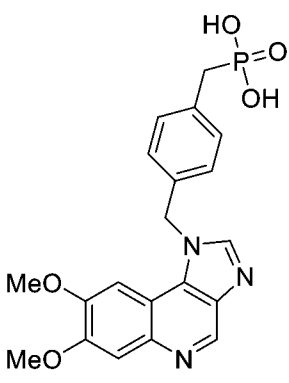
216



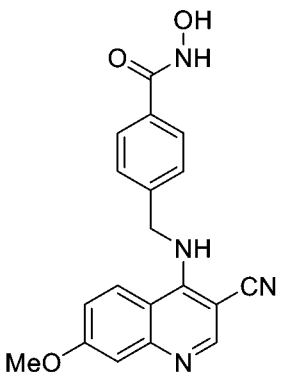
217



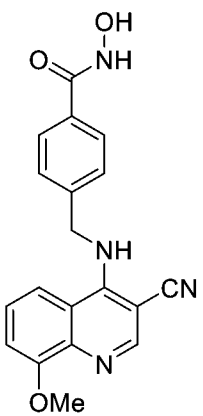
218



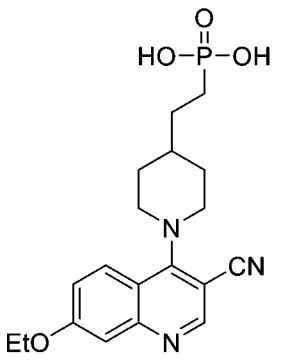
219



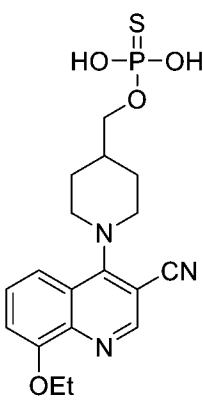
220



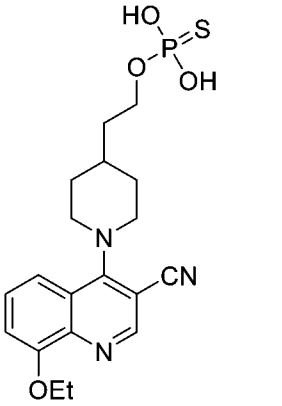
221



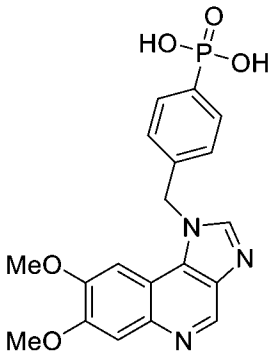
222



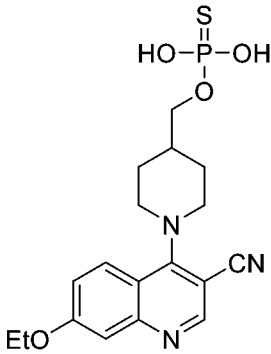
223



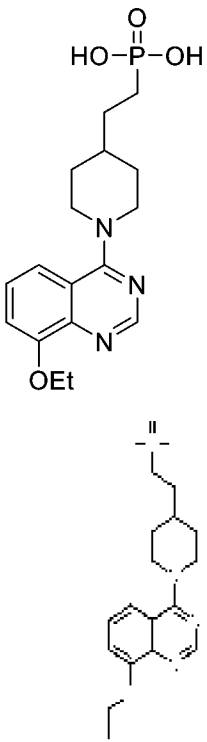
224



225



226



【0201】 在某些實施例中，ENPP1 抑制劑化合物係藉由表 3 結構中之一者或其前藥(例如如本文所述)或其醫藥學上可接受之鹽描述。

表 3：ENPP1 抑制劑化合物

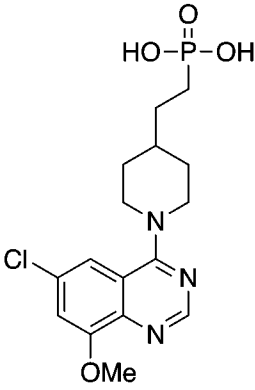
編號

結構

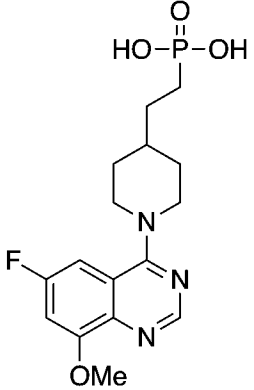
編號

結構

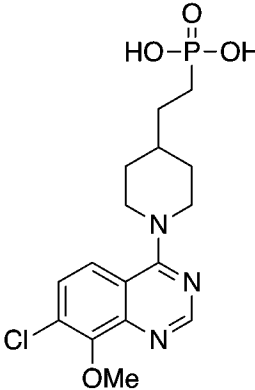
54



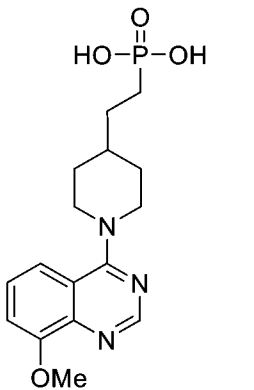
55



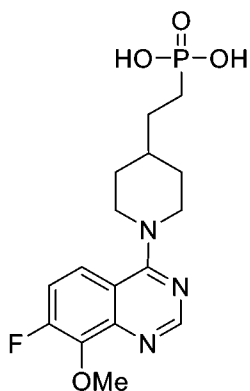
56



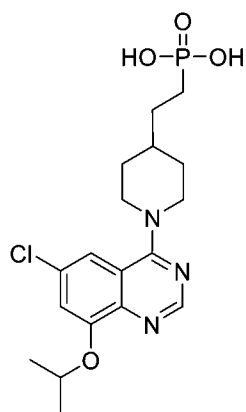
57



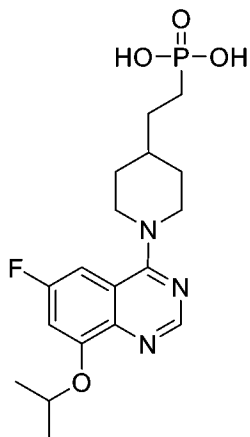
58



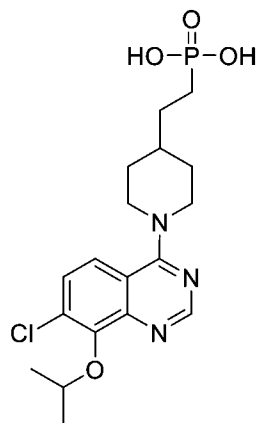
59



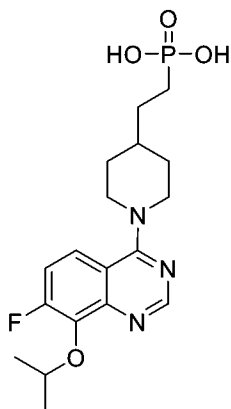
60



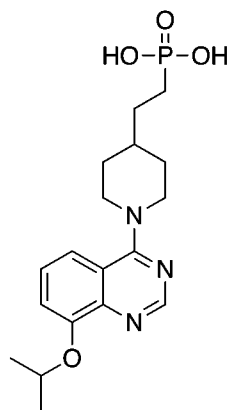
61



62



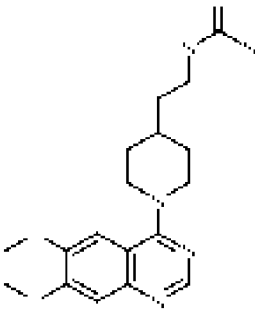
63



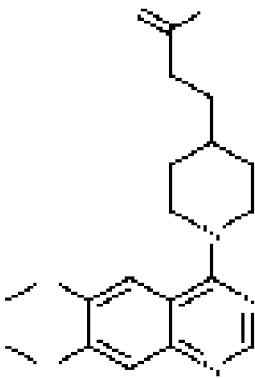
【0202】 在某些實施例中，化合物係藉由表 1-3 化合物中之一者之結構(在本文中，提及表 1-3 包括表 3a)描述。應理解，表 1-3 中所顯示之任一化合物可以鹽形式存在。在一些情況下，化合物之鹽形式係醫藥學上可接受之鹽。應理解，表 1-3 中所顯示之任一化合物可以前藥形式存在。

【0203】 在一些實施例中，化合物係藉由表 3a 化合物中之一者之結構描述。
表 3a

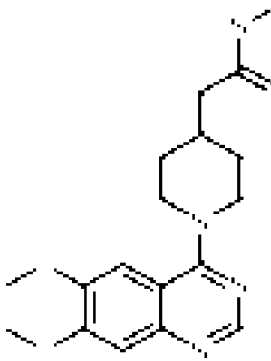
4



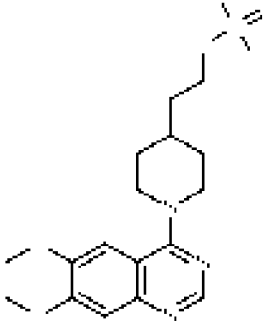
6



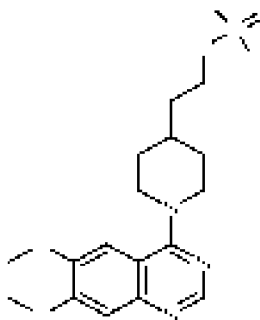
AA



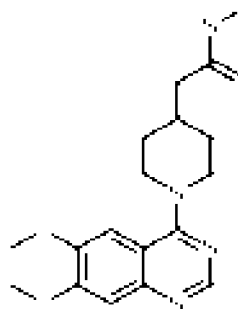
10



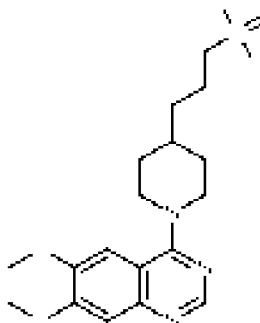
12



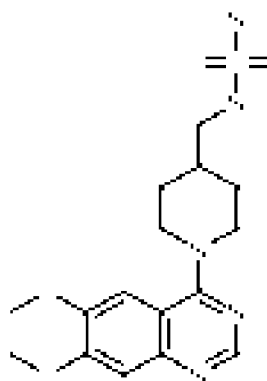
8



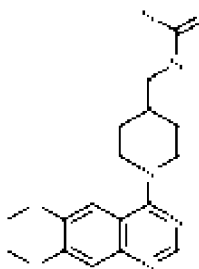
14



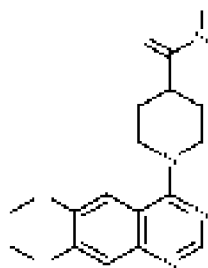
BB



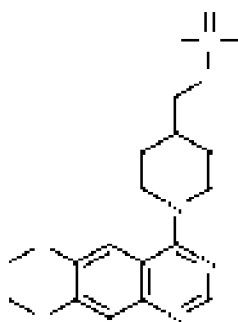
5



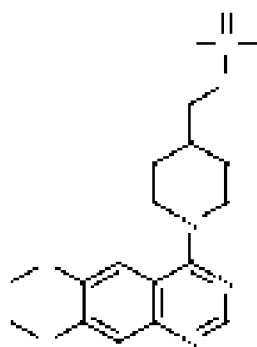
9



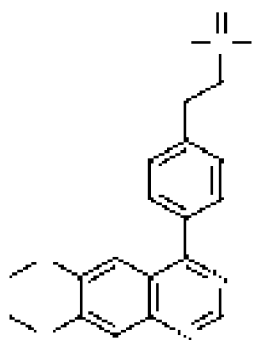
11



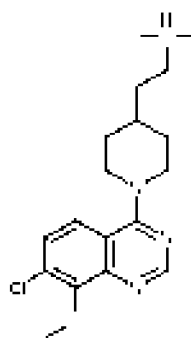
13



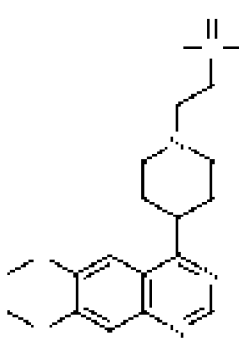
20



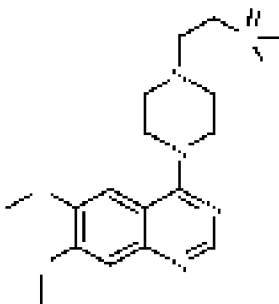
43



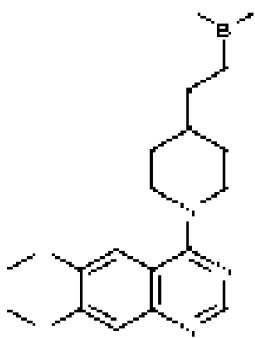
18



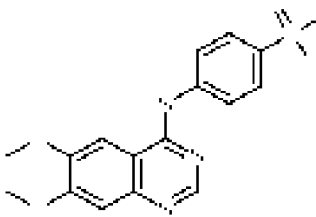
19



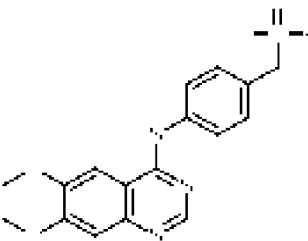
7



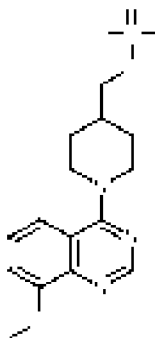
21



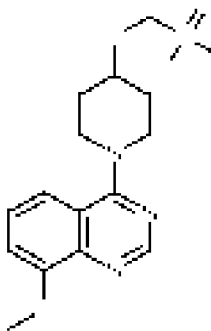
22



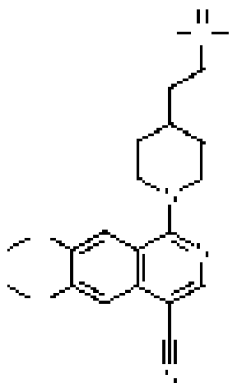
53



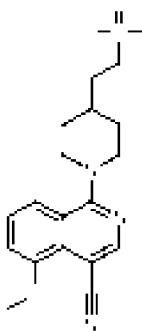
54



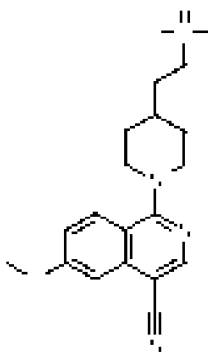
52



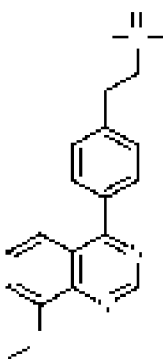
CC



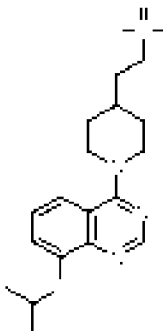
DD



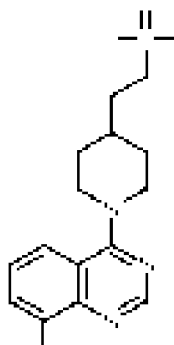
55



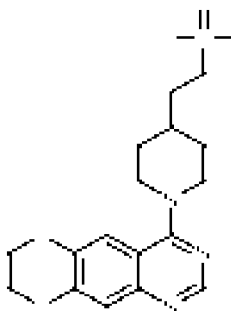
34



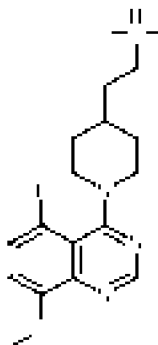
36



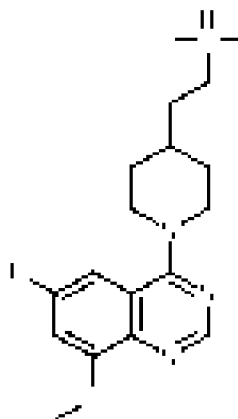
39



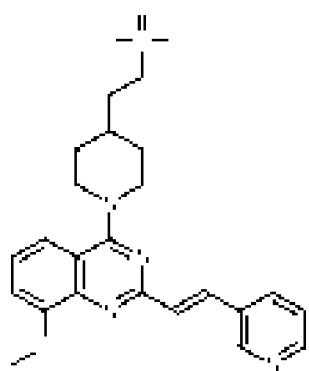
40



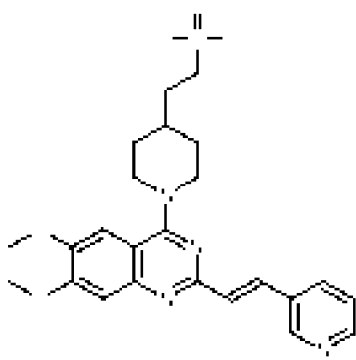
41



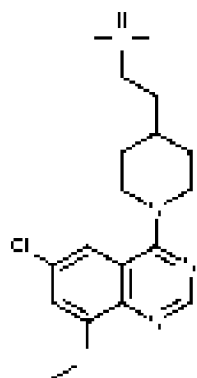
45



44



42



【0204】 本揭示案之態樣包括 ENPP1 抑制劑化合物(例如如本文所述)、其鹽(例如醫藥學上可接受之鹽)及/或其溶劑合物、水合物及/或前藥形式。另外，應當理解，在本文描述之具有一或多個手性中心之任何化合物中，若沒有明確指示絕對立體化學，則每個中心可以獨立地為 **R**-構形或 **S**-構形或其混合物。應當理解，鹽、溶劑合物、水合物、前藥及立體異構物之所有排列意欲涵蓋於本揭示案中。

【0205】 在一些實施例中，標的 ENPP1 抑制劑化合物或其前藥形式以醫藥學上可接受之鹽形式提供。含有胺或含氮雜芳基之化合物本質上可為鹼性的且因

此可以與任何數量之無機及有機酸反應形成醫藥學上可接受之酸加成鹽。通常用於形成該等鹽之酸包括無機酸(例如鹽酸、氫溴酸、氫碘酸、硫酸及磷酸)以及有機酸(例如對甲苯磺酸、甲磺酸、草酸、對溴苯磺酸、碳酸、琥珀酸、檸檬酸、苯甲酸及乙酸)以及相關無機酸及有機酸。因此，該等醫藥學上可接受之鹽包括硫酸鹽、焦硫酸鹽、硫酸氫鹽、亞硫酸鹽、亞硫酸氫鹽、磷酸鹽、磷酸一氫鹽、磷酸二氫鹽、偏磷酸鹽、焦磷酸鹽、氯化物、溴化物、碘化物、乙酸鹽、丙酸鹽、癸酸鹽(decanoate)、辛酸鹽、丙烯酸鹽、甲酸鹽、異丁酸鹽、癸酸鹽(caprate)、庚酸鹽、丙炔酸鹽、草酸鹽、丙二酸鹽、琥珀酸鹽、辛二酸鹽、癸二酸鹽、富馬酸鹽、馬來酸鹽、丁炔-1,4-二酸鹽、己炔-1,6-二酸鹽、苯甲酸鹽、氯苯甲酸鹽、甲基苯甲酸鹽、二硝基苯甲酸鹽、羥基苯甲酸鹽、甲氧基苯甲酸鹽、鄰苯二甲酸鹽、對苯二甲酸鹽、磺酸鹽、二甲苯磺酸鹽、苯基乙酸鹽、苯基丙酸鹽、苯基丁酸鹽、檸檬酸鹽、乳酸鹽、 β -羥基丁酸鹽、乙醇酸鹽、馬來酸鹽、酒石酸鹽、甲磺酸鹽、丙磺酸鹽、萘-1-磺酸鹽、萘-2-磺酸鹽、扁桃酸鹽、馬尿酸鹽、葡萄糖酸鹽、乳糖酸鹽及諸如此類鹽。在某些具體實施例中，醫藥學上可接受之酸加成鹽包括由礦物酸(例如鹽酸及氫溴酸)形成之彼等酸加成鹽，以及由有機酸(例如富馬酸及馬來酸)形成之彼等酸加成鹽。

【0206】 在一些實施例中，標的化合物以前藥形式提供。「前藥」係指需要在體內轉型以釋放活性劑之活性劑衍生物。在某些實施例中，轉型係酶促轉型。前藥在轉化為活性劑之前，通常但不一定在藥理學上係無活性的。「前部分」係指一種形式之保護基團，當用於遮蔽活性劑中之官能基時，將活性劑轉化為前藥。在一些情況下，前部分將經由在活體內以酶或非酶方式裂解之鍵連接至藥物。可以例如根據 Rautio 等人(「Prodrugs: design and clinical applications」, Nature Reviews Drug Discovery 7, 255-270 (2008 年 2 月))所述之策略及方法製備標的化

合物之任何方便之前藥形式。在一些情況下，前部分連接至標的化合物之親水頭基。在一些情況下，前部分連接至標的化合物之羥基或羧酸基團。在某些情況下，前部分係醯基或經取代醯基。在某些情況下，前部分係烷基或經取代烷基，例如，當連接至標的化合物之親水頭基時形成酯官能基，例如膦酸酯、磷酸酯等。

【0207】 在一些實施例中，標的化合物係可轉型為包括膦酸或膦酸酯或磷酸酯頭基之化合物之膦酸酯或磷酸酯前藥。

【0208】 在一些實施例中，標的化合物、前藥、立體異構物或其鹽以溶劑合物(例如水合物)形式提供。如本文所用之術語「溶劑合物」係指由一或多個溶質分子(例如其前藥或醫藥學上可接受之鹽)及一或多個溶劑分子形成之複合物或聚集物。該等溶劑合物通常係具有實質上固定之溶質及溶劑莫耳比之結晶固體。代表性溶劑包括例如水、甲醇、乙醇、異丙醇、乙酸及諸如此類。當溶劑為水時，所形成之溶劑合物係水合物。

【0209】 在一些實施例中，標的化合物係藉由經口給藥提供並吸收至血流中。在一些實施例中，標的化合物之經口生物利用度為 30%或更高。可以使用任何方便之方法對標的化合物或其調配物進行改質，以增加跨腸腔之吸收或其生物利用度。

【0210】 在一些實施例中，標的化合物係代謝穩定的(例如在化合物之半衰期期間在活體內保持實質上完整)。在某些實施例中，化合物具有 5 分鐘或更長、例如 10 分鐘或更長、12 分鐘或更長、15 分鐘或更長、20 分鐘或更長、30 分鐘或更長、60 分鐘或更長、2 小時或更長、6 小時或更長、12 小時或更長、24 小時或更長或甚至更長之半衰期(例如活體內半衰期)。

抑制 ENPP1 之方法

【0211】 如上文所匯總，本揭示案之態樣包括 ENPP1 抑制劑及使用該等 ENPP1 抑制劑之抑制方法。ENPP1 係外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶(ENPP)家族之成員。因此，標的方法之態樣包括抑制 ENPP1 對 cGAMP 之水解酶活性。發明人發現 cGAMP 可以具有顯著之細胞外生物學功能，此可以藉由阻斷 cGAMP 之細胞外降解、例如藉由其降解酶 ENPP1 之水解來增強。在某些情況下，抑制之 ENPP1 靶在細胞外，並且標的 ENPP1 抑制化合物係細胞不可滲透的，且因此不能擴散至細胞中。因此，標的方法可以提供對 ENPP1 水解酶活性之選擇性細胞外抑制及增加之細胞外 cGAMP 水準。因此，在一些情況下，ENPP1 抑制化合物係細胞外抑制 ENPP1 活性之化合物。發明人進行之實驗表明，抑制 ENPP1 之活性會增加細胞外 cGAMP，從而可能加強 STING 路徑。

【0212】 抑制 ENPP1 意指酶之活性降低 10%或更大、例如 20%或更大、30%或更大、40%或更大、50%或更大、60%或更大、70%或更大、80%或更大、90%或更大、95%或更大(例如相對於任何方便之活體外抑制分析中之對照)。在一些情況下，抑制 ENPP1 意指使酶之活性相對於其正常活性(例如相對於如藉由任何方便之分析所量測之對照)降低 2 倍或更大、例如 3 倍或更大、5 倍或更大、10 倍或更大、100 倍或更大或 1000 倍或更大。

【0213】 在一些情況下，該方法係抑制樣品中 ENPP1 之方法。如本文使用之術語「樣品」係指材料或材料之混合物，通常但不一定呈含有一或多種相關組分之流體形式。

【0214】 在一些實施例中，提供抑制 ENPP1 之方法，該方法包括使樣品與細胞不可滲透性 ENPP1 抑制劑接觸以抑制 ENPP1 之 cGAMP 水解活性。在一些情況下，樣品係細胞樣品。在一些情況下，樣品包含 cGAMP。在某些情況下，cGAMP 水準在細胞樣品中升高(例如相對於未與抑制劑接觸之對照樣品)。標的方法可提

供增加的 cGAMP 水準。「增加的 cGAMP 水準」意指與標的化合物接觸之細胞樣品中 cGAMP 之水準，其中相對於未與該劑接觸之對照樣品，樣品中之 cGAMP 水準增加 10%或更大，例如 20%或更大、30%或更大、40%或更大、50%或更大、60%或更大、70%或更大、80%或更大、90%或更大、100%或更大或甚至更大。

【0215】 在某些實施例中，ENPP1 抑制劑係如本文所定義之抑制劑。在一些實施例中，ENPP1 抑制劑係式(I)-(XVb)中任一者之抑制劑(例如如本文所述)。在一些情況下，ENPP1 抑制劑係表 1-3 之任一化合物(例如如本文所述)。在一些情況下，ENPP1 抑制劑係細胞不可滲透的。

【0216】 在一些實施例中，ENPP1 抑制劑經構形以為細胞可滲透的。在一些實施例中，提供抑制 ENPP1 之方法，該方法包括使樣品與細胞可滲透性 ENPP1 抑制劑接觸以抑制 ENPP1。

【0217】 在一些實施例中，標的化合物具有反映對其他酶之活性之 ENPP1 抑制特征。在一些實施例中，標的化合物特異性抑制 ENPP1 而不會不期望地抑制一或多種其他酶。

【0218】 在一些實施例中，本揭示案之化合物干擾 cGAMP 與 ENPP1 之相互作用。例如，標的化合物可以藉由抑制 ENPP1 對 cGAMP 之水解酶活性來增加細胞外 cGAMP。不受任何特定理論之束縛，人們認為增加細胞外 cGAMP 會活化 STING 路徑。

【0219】 在一些實施例中，標的化合物抑制 ENPP1，如藉由抑制分析所測定，例如藉由相對於對照，藉由量測 IC₅₀ 或 EC₅₀ 值分別測定無細胞系統中或用標的化合物處理後之細胞中之酶活性水準之分析所測定。在某些實施例中，標的化合物之 IC₅₀ 值(或 EC₅₀ 值)為 10 μM 或更低，例如 3 μM 或更低、1 μM 或更低、500 nM 或更低、300 nM 或更低、200 nM 或更低、100 nM 或更低、50 nM 或更

低、30 nM 或更低、10 nM 或更低、5 nM 或更低、3 nM 或更低、1 nM 或更低或甚至更低。

【0220】 如上文所匯總，本揭示案之態樣包括抑制 ENPP1 之方法。標的化合物(例如如本文所述)可抑制介於 10%至 100%之範圍內、例如 10%或更大、20%或更大、30%或更大、40%或更大、50%或更大、60%或更大、70%或更大、80%或更大或 90%或更大的 ENPP1 活性。在某些分析中，標的化合物可以 1×10^{-6} M 或更小(例如 1×10^{-6} M 或更小、 1×10^{-7} M 或更小、 1×10^{-8} M 或更小、 1×10^{-9} M 或更小、 1×10^{-10} M 或更小、或 1×10^{-11} M 或更小)之 IC_{50} 抑制其靶。

【0221】 可用於測定 ENPP1 活性之方案有很多，且包括(但不限於)無細胞分析，例如結合分析；使用純化酶之分析，量測細胞表型之細胞分析，例如基因表現分析；及涉及特定動物(在某些實施例中，其可為與靶病原體相關之病狀之動物模型)之活體內分析。

【0222】 在一些實施例中，標的方法係活體外方法，其包括使樣品與特異性抑制 ENPP1 之標的化合物接觸。在某些實施例中，樣品疑似含有 ENPP1 且標的方法進一步包括評估化合物是否抑制 ENPP1。

【0223】 在某些實施例中，標的化合物係包括標記(例如螢光標記)之經修飾化合物，並且標的方法進一步包括例如使用光學偵測來偵測樣品中之標記(若存在)。

【0224】 在某些實施例中，用支撐物或結合至支撐物之親和基團(例如生物素)修飾化合物，使得可以去除(例如藉由洗滌)未結合至該化合物之任何樣品。然後可以使用任何方便之方法、例如使用標記之靶特異性探針之結合或使用螢光蛋白反應試劑偵測特異性結合之 ENPP1 (若存在)。

【0225】 在標的方法之另一實施例中，已知樣品含有 ENPP1。

【0226】 在一些實施例中，方法係減少癌細胞增殖之方法，其中該方法包括使細胞與有效量之標的 ENPP1 抑制劑化合物(例如如本文所述)接觸以減少癌細胞增殖。在某些情況下，標的 ENPP1 抑制劑化合物可在細胞內起作用。該方法可與化學治療劑(例如如本文所述)組合實施。癌細胞可在活體外或活體內。在某些情況下，該方法包括使細胞與 ENPP1 抑制劑化合物(例如如本文所述)接觸及使細胞與化學治療劑接觸。可靶向任何方便之癌細胞。

治療之方法

【0227】 本揭示案之態樣包括抑制 ENPP1 針對 cGAMP 之水解酶活性之方法，提供 cGAMP 水準之增加及/或 STING 路徑之下游調節(例如活化)。發明人已經發現，cGAMP 可以存在於細胞外空間中，並且 ENPP1 可以控制細胞外 cGAMP 之水準。發明人亦已發現，cGAMP 可以在活體內具有顯著之細胞外生物學功能。本文描述及證明之結果表明，根據標的方法之 ENPP1 抑制可以調節活體內 STING 活性，且因此可用於治療多種疾病，例如作為癌症免疫治療之靶。因此，標的方法可以提供對 ENPP1 活性(例如，cGAMP 之水解酶活性)之選擇性細胞外抑制，以增加細胞外 cGAMP 之水準並活化干擾素基因刺激物(STING)路徑。在一些情況下，標的方法係增加個體中 STING 介導之反應之方法。在一些情況下，標的方法係調節個體免疫反應之方法。

【0228】 「STING 介導之反應」係指由 STING 介導之任何反應，包括(但不限於)免疫反應，例如對細菌病原體、病毒病原體及真核病原體之免疫反應。參見例如 Ishikawa 等人，Immunity 29: 538-550 (2008)；Ishikawa 等人，Nature 461: 788-792 (2009)；及 Sharma 等人，Immunity 35: 194-207 (2011)。STING 亦在藉由自身 DNA 之不適當識別起始之某些自體免疫疾病中發揮作用(參見例如 Gall 等人，Immunity 36: 120-131 (2012))，以及誘導因應於 DNA 疫苗之適應性免疫性(參

見例如 Ishikawa 等人，Nature 461: 788-792 (2009))。增加個體中 STING 介導之反應意指與對照個體(例如，未投與標的化合物之個體)相比，個體中 STING 介導之反應增加。在一些情況下，個體係人類且標的化合物及方法提供人類 STING 之活化。在一些情況下，STING 介導之反應包括免疫反應之調節。在一些情況下，標的方法係調節個體免疫反應之方法。

【0229】 在一些情況下，STING 介導之反應包括增加個體中干擾素(例如 I 型干擾素(IFN)、III 型干擾素(IFN))之產生。干擾素(IFN)係具有多種生物活性(例如抗病毒、免疫調節及抗增殖)之蛋白質。IFN 係相對較小之物種特異性單鏈多肽，由哺乳動物細胞在因應於各種誘導物(例如病毒、多肽、有絲分裂原及諸如此類)暴露時產生。干擾素保護動物組織及細胞免受病毒攻擊且係重要之宿主防禦機制。干擾素可分類為 I 型、II 型及 III 型干擾素。相關哺乳動物 I 型干擾素包括 IFN- α (阿爾法)、IFN- β (貝塔)、IFN- κ (卡帕)、IFN- δ (德爾塔)、IFN- ε (艾普西隆)、IFN- τ (陶)、IFN- ω (歐米伽)及 IFN- ζ (澤塔，亦稱為利米汀(limitin))。

【0230】 干擾素可用於治療多種癌症，此乃因該等分子具有在多種層面下起作用之抗癌活性。干擾素蛋白能直接抑制人類腫瘤細胞之增殖。在一些情況下，抗增殖活性亦與多種批准之化學治療劑(例如順鉑(cisplatin)、5FU 及太平洋紫杉醇(paclitaxel))協同作用。干擾素蛋白之免疫調節活性亦能誘導抗腫瘤免疫反應。此反應包括活化 NK 細胞、刺激巨噬細胞活性及誘導 I 類 MHC 表面表現，從而誘導抗腫瘤細胞毒性 T 淋巴球活性。此外，干擾素在免疫系統中抗原之交叉呈遞中發揮作用。此外，一些研究進一步表明 IFN- β 蛋白可能具有抗血管生成活性。血管生成(即新血管形成)對實體瘤之生長至關重要。IFN- β 可能藉由抑制促血管生成因子(例如 bFGF 及 VEGF)之表現來抑制血管生成。干擾素蛋白亦可以藉由調節酶(例如膠原酶及彈性蛋白酶)之表現來抑制腫瘤侵襲性，該等酶在組織

重塑中至關重要。

【0231】 該等方法之態樣包括向患有癌症之個體投與治療有效量之 ENPP1 抑制劑來治療個體之癌症。在一些情況下，個體經診斷患有或疑似患有癌症。任何方便之 ENPP1 抑制劑可用於治療癌症之標的方法中。在某些情況下，ENPP1 抑制劑化合物係如本文所述之化合物。在某些情況下，ENPP1 抑制劑係細胞不可滲透性化合物。在某些情況下，ENPP1 抑制劑係細胞可滲透性化合物。在某些情況下，癌症係實體腫瘤癌症。在某些實施例中，癌症係選自腎上腺腫瘤、肝腫瘤、腎腫瘤、膀胱腫瘤、乳腫瘤、結腸腫瘤、胃腫瘤、卵巢腫瘤、宮頸腫瘤、子宮腫瘤、食管腫瘤、結腸直腸腫瘤、前列腺腫瘤、胰臟腫瘤、肺腫瘤(小細胞腫瘤及非小細胞腫瘤二者)、甲狀腺腫瘤、癌瘤、肉瘤、神經膠母細胞瘤、黑色素瘤及各種頭頸腫瘤。在一些情況下，癌症係乳癌。在一些實施例中，癌症係淋巴瘤。

【0232】 該等方法之態樣包括向個體投與治療有效量之細胞不可滲透性 ENPP1 抑制劑以抑制 cGAMP 之水解及治療個體之癌症。在某些情況下，癌症係實體腫瘤癌症。在某些實施例中，癌症係選自腎上腺腫瘤、肝腫瘤、腎腫瘤、膀胱腫瘤、乳腫瘤、結腸腫瘤、胃腫瘤、卵巢腫瘤、宮頸腫瘤、子宮腫瘤、食管腫瘤、結腸直腸腫瘤、前列腺腫瘤、胰臟腫瘤、肺腫瘤(小細胞腫瘤及非小細胞腫瘤二者)、甲狀腺腫瘤、癌瘤、肉瘤、神經膠母細胞瘤、黑色素瘤及各種頭頸腫瘤。在某些實施例中，癌症係乳癌。在一些情況下，癌症係淋巴瘤。

【0233】 在本文所揭示方法之一些實施例中，細胞不可滲透性 ENPP1 抑制劑係式(I)-(XVb)中任一者之抑制劑(例如如本文所述)。在一些情況下，ENPP1 抑制劑係表 1-3 之化合物或其前藥形式(例如如本文所述)。

【0234】 在本文所揭示方法之一些實施例中，ENPP1 抑制劑係細胞可滲透的。

【0235】 因此，該等方法之態樣包括使樣品與標的化合物(例如如上文所述)在化合物抑制 ENPP1 之條件下接觸。可採用使化合物與樣品接觸之任何方便之方案。所採用之具體方案可端視例如樣品係在活體外抑或活體內而變化。對於活體外方案，樣品與化合物之接觸可使用任何方便之方案來達成。在一些情況下，樣品包括維持在合適培養基中之細胞，且將複合物引入培養基中。對於活體內方案，可採用任何方便之投與方案。端視化合物之效能、目標細胞、投與方式、所存在細胞之數量，可採用各種方案。

【0236】 在一些實施例中，標的方法係治療個體癌症之方法。在一些實施例中，標的方法包括向個體投與有效量之標的化合物(例如如本文所述)或其醫藥學上可接受之鹽。標的化合物可作為醫藥組合物(例如如本文所述)之一部分投與。在該方法之某些情況下，所投與化合物係式(I)-(XVb)中之一者之化合物(例如如本文所述)。在該方法之某些情況下，所投與化合物係藉由表 1-3 化合物中之一者描述。

【0237】 在一些實施例中，「有效量」係與未用該化合物治療之個體之 ENPP1 活性相比，或替代地與用該化合物治療之前或之後個體之 ENPP1 活性相比，在以一或多個劑量、以單一療法或以組合療法投與個體時可有效地抑制約 20% (20%抑制)、至少約 30% (30%抑制)、至少約 40% (40%抑制)、至少約 50% (50%抑制)、至少約 60% (60%抑制)、至少約 70% (70%抑制)、至少約 80% (80%抑制)、或至少約 90% (90%抑制)之 ENPP1 之標的化合物之量。

【0238】 在一些實施例中，「治療有效量」係與未用該化合物治療之個體之腫瘤負荷相比，或替代地與用該化合物治療之前或之後個體之腫瘤負荷相比，在以一或多個劑量、以單一療法或以組合療法投與個體時可有效地使個體之腫瘤負荷減小約 20%、至少約 30%、至少約 40%、至少約 50%、至少約 60%、至

少約 70%、至少約 80%、或至少約 90%之標的化合物之量。如本文所用之術語「腫瘤負荷」係指由患有癌症之個體所攜帶之腫瘤組織之總質量。

【0239】 在一些實施例中，「治療有效量」係與觀察未用化合物治療之個體之腫瘤皺縮所需之放射療法劑量相比，在以一或多個劑量、以單一療法或以組合療法投與個體時可有效地使觀察個體之腫瘤皺縮所需之放射療法劑量減小約 20%、至少約 30%、至少約 40%、至少約 50%、至少約 60%、至少約 70%、至少約 80%、或至少約 90%之標的化合物之量。

【0240】 在一些實施例中，化合物之「治療有效量」係在以一或多個劑量投與患有癌症之個體時，可有效地達成腫瘤大小之 1.5-log、2-log、2.5-log、3-log、3.5-log、4-log、4.5-log 或 5-log 減小之量。

【0241】 在一些實施例中，化合物之有效量係介於約 50 ng/ml 至約 50 µg/ml 範圍內之量(例如約 50 ng/ml 至約 40 µg/ml、約 30 ng/ml 至約 20 µg/ml、約 50 ng/ml 至約 10 µg/ml、約 50 ng/ml 至約 1 µg/ml、約 50 ng/ml 至約 800 ng/ml、約 50 ng/ml 至約 700 ng/ml、約 50 ng/ml 至約 600 ng/ml、約 50 ng/ml 至約 500 ng/ml、約 50 ng/ml 至約 400 ng/ml、約 60 ng/ml 至約 400 ng/ml、約 70 ng/ml 至約 300 ng/ml、約 60 ng/ml 至約 100 ng/ml、約 65 ng/ml 至約 85 ng/ml、約 70 ng/ml 至約 90 ng/ml、約 200 ng/ml 至約 900 ng/ml、約 200 ng/ml 至約 800 ng/ml、約 200 ng/ml 至約 700 ng/ml、約 200 ng/ml 至約 600 ng/ml、約 200 ng/ml 至約 500 ng/ml、約 200 ng/ml 至約 400 ng/ml、或約 200 ng/ml 至約 300 ng/ml)。

【0242】 在一些實施例中，化合物之有效量係介於以下範圍內之量：約 10 pg 至約 100 mg，例如約 10 pg 至約 50 pg、約 50 pg 至約 150 pg、約 150 pg 至約 250 pg、約 250 pg 至約 500 pg、約 500 pg 至約 750 pg、約 750 pg 至約 1 ng、約 1 ng 至約 10 ng、約 10 ng 至約 50 ng、約 50 ng 至約 150 ng、約 150 ng 至約 250 ng、

約 250 ng 至約 500 ng、約 500 ng 至約 750 ng、約 750 ng 至約 1 μ g、約 1 μ g 至約 10 μ g、約 10 μ g 至約 50 μ g、約 50 μ g 至約 150 μ g、約 150 μ g 至約 250 μ g、約 250 μ g 至約 500 μ g、約 500 μ g 至約 750 μ g、約 750 μ g 至約 1 mg、約 1 mg 至約 50 mg、約 1 mg 至約 100 mg、或約 50 mg 至約 100 mg。該量可為單一劑量或可為總日量。總日量可介於 10 pg 至 100 mg 範圍內，或可介於 100 mg 至約 500 mg 範圍內，或可介於 500 mg 至約 1000 mg 範圍內。

【0243】 在一些實施例中，投與化合物之單一劑量。在其他實施例中，投與多個劑量。當在一段時間內投與多個劑量時，化合物可在一段時間內以每天兩次(qid)、每天(qd)、每隔一天(qod)、每三天、每週三次(tiw)或每週兩次(biw)投與。例如，化合物係在 1 天至約 2 年或更長之時段內以 qid、qd、qod、tiw 或 biw 投與。例如，化合物係以任一前述頻率投與達 1 週、2 週、1 個月、2 個月、6 個月、1 年或 2 年或更長時間，此端視多種因素而定。

【0244】 向患有癌症之個體投與治療有效量之標的化合物可以引起以下中之一或多者：1)降低腫瘤負荷；2)減小實現腫瘤皺縮所需之放射療法之劑量；3)減少個體中癌症自一種細胞向另一種細胞擴散；4)降低臨床結果之發病率或死亡率；5)當與其他抗癌劑組合時，縮短治療之總時長；及 6)疾病反應指標之改善(例如，一或多種癌症症狀之減少)。多種方法中之任一者皆可用於確定治療方法是否有效。例如，可以分析自己用標的方法治療之個體獲得之生物樣品。

【0245】 本文所述之任一化合物皆可用於標的治療方法中。在某些情況下，化合物具有式(I)-(XVb)中之一者(例如如本文所述)。在某些情況下，化合物係表 1-3 化合物中之一者或其前藥形式。在一些情況下，用於標的方法中之化合物不為細胞可滲透的。在一些情況下，用於標的方法中之化合物具有較差的細胞滲透性。

【0246】 在一些實施例中，化合物特異性抑制 ENPP1。在一些實施例中，化合物調節 cGAMP 之活性。在一些實施例中，化合物干擾 ENPP1 與 cGAMP 之相互作用。在一些實施例中，化合物可引起 STING 路徑之活化。

【0247】 在一些實施例中，個體係哺乳動物。在某些情況下，個體係人類。其他個體可包括家養寵物(例如，狗及貓)、家畜(例如，牛、豬、山羊、馬及諸如此類)、齧齒類動物(例如，小鼠、豚鼠及大鼠，例如如在疾病之動物模型中)以及非人靈長類動物(例如，黑猩猩及猴)。個體可能需要治療癌症。在一些情況下，標的方法包括診斷癌症，包括本文所述之任一癌症。在一些實施例中，化合物係作為醫藥製劑投與。

【0248】 在某些實施例中，ENPP1 抑制劑化合物係包括標記之經修飾化合物，並且該方法進一步包括偵測個體中之標記。標記之選擇端視偵測方法而定。任何方便之標記及偵測系統皆可以用於標的方法中，參見例如 Baker, 「The whole picture」, Nature, 463, 2010, 第 977-980 頁。在某些實施例中，化合物包括適於光學偵測之螢光標記。在某些實施例中，化合物包括使用正電子發射斷層攝影(PET)或單光子發射電腦斷層攝影(SPECT)進行偵測之放射性標記。在一些情況下，化合物包括適於斷層攝影偵測之順磁性標記。如上所述，可以標記標的化合物，但在一些方法中，化合物係未標記的，並且使用第二標記試劑進行成像。

組合療法

【0249】 標的化合物可單獨或與另一(即，第二)活性劑組合投與個體。組合治療方法，其中標的 ENPP1 抑制劑化合物可與第二種活性劑或另一療法(例如放射療法)組合使用。術語「劑」、「化合物」及「藥物」在本文中可互換使用。例如，ENPP1 抑制劑化合物可以單獨投與或與一或多種其他藥物(例如用於治療相關疾病、包括(但不限於)免疫調節性疾病及病狀以及癌症之藥物)聯合投與。在

一些實施例中，標的方法進一步包括同時或依次共投與第二劑，例如小分子、化學治療劑、抗體、抗體片段、抗體-藥物結合物、適體、蛋白質或檢查點抑制劑。在一些實施例中，該方法進一步包括對個體實施放射療法。

【0250】 術語「共投與」及「與.....組合」包括在沒有特定時間限制之情況下同步、同時或依次投與兩種或更多種治療劑。在一個實施例中，該等劑同時存在於細胞或個體體內，或同時發揮其生物或治療效應。在一個實施例中，該等治療劑處於相同之組合物或單位劑型中。在其他實施例中，該等治療劑處於單獨之組合物或單位劑型中。在某些實施例中，第一劑可在投與第二治療劑之前(例如之前分鐘、15 分鐘、30 分鐘、45 分鐘、1 小時、2 小時、4 小時、6 小時、12 小時、24 小時、48 小時、72 小時、96 小時、1 週、2 週、3 週、4 週、5 週、6 週、8 週、12 週)、與其同時或在其之後(例如之後 5 分鐘、15 分鐘、30 分鐘、45 分鐘、1 小時、2 小時、4 小時、6 小時、12 小時、24 小時、48 小時、72 小時、96 小時、1 週、2 週、3 週、4 週、5 週、6 週、8 週或 12 週)投與。

【0251】 「伴隨投與」已知之治療藥物或另一療法與本揭示案之醫藥組合物意指在已知藥物及本發明之組合物皆具有治療效應時投與化合物及第二劑或另一療法。該伴隨投與可涉及相對於投與標的化合物同時(即在同一時間)、之前或之後投與藥物。兩種劑之投與途徑可能不同，其中代表性之投與途徑將在下文中更詳細地描述。熟習此項技術者將不難確定本揭示案之特定藥物或療法及化合物之適當投與時間、順序及劑量。

【0252】 在一些實施例中，化合物(例如，標的化合物及至少一種額外化合物或療法)係在彼此間隔 24 小時內、例如彼此間隔 12 小時內、彼此間隔 6 小時內、彼此間隔 3 小時內或彼此間隔 1 小時內投與個體。在某些實施例中，化合物在彼此間隔 1 小時內投與。在某些實施例中，化合物實質上同時投與。實質上同時

投與意指在彼此間隔約 10 分鐘或更短時間內、例如彼此間隔 5 分鐘或更短時間或 1 分鐘或更短時間內，將化合物投與個體。

【0253】 亦提供標的化合物及第二活性劑之醫藥製劑。在醫藥劑型中，化合物可以其醫藥學上可接受之鹽形式投與，或其亦可單獨使用或以適當締合以及與其他醫藥學活性化合物組合使用。

【0254】 與任一標的方法結合，ENPP1 抑制劑化合物(例如如本文所述)(或包含該等化合物之醫藥組合物)可與另一藥物組合投與，該另一藥物經設計以減少或預防發炎，治療或預防慢性發炎或纖維化或治療癌症。在每一情況下，ENPP1 抑制劑化合物可在投與另一藥物之前、同時或之後投與。在某些情況下，癌症係選自腎上腺腫瘤、肝腫瘤、腎腫瘤、膀胱腫瘤、乳腫瘤、結腸腫瘤、胃腫瘤、卵巢腫瘤、宮頸腫瘤、子宮腫瘤、食管腫瘤、結腸直腸腫瘤、前列腺腫瘤、胰臟腫瘤、肺腫瘤(小細胞腫瘤及非小細胞腫瘤二者)、甲狀腺腫瘤、癌瘤、肉瘤、神經膠質瘤、神經膠母細胞瘤、黑色素瘤及各種頭頸腫瘤。

【0255】 為治療癌症，ENPP1 抑制劑化合物可與化學治療劑組合投與，該化學治療劑選自由以下組成之群：烷化劑、亞硝基脲、抗代謝物、抗腫瘤抗生素、植物(長春花)生物鹼、類固醇激素、紫杉烷、核苷類似物、類固醇、蔥環、甲狀腺激素替代藥物、胸苷酸靶向藥物、嵌合抗原受體/T 細胞療法、嵌合抗原受體/NK 細胞療法、細胞凋亡調節劑抑制劑(例如 B 細胞 CLL/淋巴瘤 2 (BCL-2) BCL-2 樣 1 (BCL-XL)抑制劑)、CARP-1/CCAR1 (細胞分裂週期及細胞凋亡調節劑 1)抑制劑、群落刺激因子 1 受體(CSF1R)抑制劑、CD47 抑制劑、癌症疫苗(例如誘導 Th17 之樹突細胞疫苗或遺傳修飾之酪胺酸酶，例如 Oncept®)及其他細胞療法。

【0256】 相關特定化學治療劑包括(但不限於)吉西他濱(Gemcitabine)、多西他賽(Docetaxel)、博來黴素(Bleomycin)、埃羅替尼(Erlotinib)、吉非替尼

(Gefitinib)、拉帕替尼(Lapatinib)、伊馬替尼(Imatinib)、達沙替尼(Dasatinib)、尼羅替尼(Nilotinib)、博舒替尼(Bosutinib)、克唑替尼(Crizotinib)、色瑞替尼(Ceritinib)、曲美替尼(Trametinib)、貝伐珠單抗(Bevacizumab)、舒尼替尼(Sunitinib)、索拉菲尼(Sorafenib)、曲妥珠單抗(Trastuzumab)、阿多-曲妥珠單抗美坦辛(Ado-trastuzumab emtansine)、利妥昔單抗(Rituximab)、伊匹單抗(Ipilimumab)、雷帕黴素(Rapamycin)、替西羅莫司(Temsirolimus)、依韋莫司(Everolimus)、胺甲喋呤(Methotrexate)、多柔比星(Doxorubicin)、亞伯杉烷(Abraxane)、氟費瑞諾(Folfirinox)、順鉑、卡鉑(Carboplatin)、5-氟尿嘧啶、Teysumo、太平洋紫杉醇、普賴鬆(Prednisone)、左旋甲狀腺素(Levothyroxine)、培美曲塞(Pemetrexed)、那韋托斯(navitoclax)及 ABT-199。亦可使用肽化合物。相關癌症化學治療劑包括(但不限於)多拉司他汀(dolastatin)及其活性類似物及衍生物；及奧裡斯他汀(auristatin)及其活性類似物及衍生物(例如單甲基奧裡斯他汀 D (MMAD)、單甲基奧裡斯他汀 E (MMAE)、單甲基奧裡斯他汀 F (MMAF)及諸如此類)。參見例如 WO 96/33212、WO 96/14856 及 U.S. 6,323,315。適當之癌症化學治療劑亦包括類美登素(maytansinoid)及其活性類似物及衍生物(參見例如 EP 1391213；及 Liu 等人(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623)；多卡米星(duocarmycin)及其活性類似物及衍生物(例如包括合成類似物，KW-2189 及 CB1-TM1)；及苯并二氮呋及其活性類似物及衍生物(例如吡咯并苯并二氮呋(PBD))。

【0257】 在一些實施例中，ENPP1 抑制劑化合物可與化學治療劑組合投與來治療癌症。在某些情況下，化學治療劑係吉西他濱。在一些情況下，化學治療劑係多西他賽。在一些情況下，化學治療劑係亞伯杉烷。

【0258】 為治療癌症(例如實體腫瘤癌症)，ENPP1 抑制劑化合物可與免疫治

療劑組合投與。免疫治療劑係可用於藉由誘導、增強或抑制免疫反應來治療疾病之任何方便之劑。在一些情況下，免疫治療劑係免疫檢查點抑制劑。例如，圖 21A-4C 圖解說明例示性 ENPP1 抑制劑在小鼠模型中可與免疫檢查點抑制劑協同作用。可使用任何方便之檢查點抑制劑，包括(但不限於)細胞毒性 T 淋巴球相關抗原 4 (CTLA-4)抑制劑、程式化死亡 1 (PD-1)抑制劑及 PD-L1 抑制劑。在某些情況下，檢查點抑制劑係選自細胞毒性 T 淋巴球相關抗原 4 (CTLA-4)抑制劑、程式化死亡 1 (PD-1)抑制劑及 PD-L1 抑制劑。相關例示性檢查點抑制劑包括(但不限於)伊匹單抗、派姆單抗(pembrolizumab)及尼沃魯單抗(nivolumab)。在某些實施例中，為治療癌症及/或發炎性疾病，免疫調節性多肽可與群落刺激因子 1 受體(CSF1R)抑制劑組合投與。相關 CSF1R 抑制劑包括(但不限於)依馬妥珠單抗(emactuzumab)。

【0259】 任何方便之癌症疫苗療法及劑可與標的 ENPP1 抑制劑化合物、組合物及方法組合使用。為治療癌症(例如卵巢癌)，ENPP1 抑制劑化合物可與疫苗接種療法(例如促進 Th1/Th17 免疫性之樹突細胞(DC)疫苗接種劑)組合投與。Th17 細胞浸潤與卵巢癌患者之顯著延長之總存活期相關聯。在一些情況下，ENPP1 抑制劑化合物可與誘導 Th17 之疫苗接種組合用作佐劑治療。

【0260】 亦相關之劑係 CARP-1/CCAR1 (細胞分裂週期及細胞凋亡調節劑 1) 抑制劑，包括(但不限於) Rishi 等人，Journal of Biomedical Nanotechnology，第 11 卷，第 9 期，2015 年 9 月，第 1608-1627(20)頁描述之彼等 CARP-1/CCAR1 抑制劑，及 CD47 抑制劑，包括(但不限於)抗 CD47 抗體劑，例如 Hu5F9-G4。

【0261】 在某些情況下，相對於單獨之任一組分，該組合提供了增強之效應；在一些情況下，相對於組分之組合或加和效應，該組合提供了超加和或協同效應。可以使用標的化合物及化學治療劑之多種組合，依次或同時使用。對於多

個劑量，例如，兩種劑可以直接交替，或一種劑之兩個或更多個劑量可以與另一種劑之單一劑量交替。兩種劑之同時投與亦可以交替進行，或者以其他方式與個別劑之劑量穿插進行。在一些情況下，在開始治療後，劑量之間之時間可以為約 1-6 小時至約 6-12 小時、至約 12-24 小時、至約 1-2 天、至約 1-2 週或更長之時段。

與誘導 cGAMP 之化學治療劑組合

【0262】 本揭示案之態樣包括治療癌症之方法，其中 ENPP1 抑制劑化合物(或包含該等化合物之醫藥組合物)可與能夠誘導活體內 cGAMP 產生之化學治療劑組合投與。當個體暴露於有效量之特定化學治療劑時，可在個體中誘導 2'3'-cGAMP 之產生。cGAMP 之誘導水準可在共投與標的 ENPP1 抑制劑化合物以防止 cGAMP 降解時得以維持及/或增強，例如藉由與用任一單獨劑達成之水準比較增強。可導致 DNA 損傷且可由於過度修復或降解機制而誘導死亡細胞產生 cGAMP 之任何方便之化學治療劑均可用于標的組合治療方法中，例如烷化劑、核酸類似物及嵌入劑。在一些情況下，誘導 cGAMP 之化學治療劑係抗有絲分裂劑。抗有絲分裂劑係藉由損傷 DNA 或結合至微管起作用之劑。在一些情況下，誘導 cGAMP 之化學治療劑係抗瘤劑。

【0263】 可使用標的組合療法治療之相關癌症包括(但不限於)腎上腺腫瘤、肝腫瘤、腎腫瘤、膀胱腫瘤、乳腫瘤、結腸腫瘤、胃腫瘤、卵巢腫瘤、宮頸腫瘤、子宮腫瘤、食管腫瘤、結腸直腸腫瘤、前列腺腫瘤、胰臟腫瘤、肺腫瘤(小細胞腫瘤及非小細胞腫瘤二者)、甲狀腺腫瘤、癌瘤、肉瘤、神經膠質瘤、神經膠母細胞瘤、黑色素瘤及各種頭頸腫瘤。在一些情況下，癌症係乳癌。在某些情況下，癌症係神經膠質瘤或神經膠母細胞瘤。

【0264】 相關化學治療劑包括(但不限於)尿嘧啶類似物、氟尿嘧啶前藥、胸苷

酸合酶抑制劑、去氧胞苷類似物、DNA 合成抑制劑(例如引起 S 期細胞凋亡)、葉酸類似物、去氫葉酸還原酶抑制劑、蔥環、嵌入劑(例如引起雙股斷裂)、拓撲異構酶 IIa 抑制劑、紫杉烷、微管解裝配抑制劑(例如引起 G2/M 期阻滯/細胞凋亡)、微管裝配抑制劑、微管功能穩定劑(例如引起 G2/M 期細胞凋亡)、微管蛋白聚合促進劑、微管蛋白結合劑(例如藉由 M 期阻滯引起細胞凋亡)、埃博黴素(Epothilone) B 類似物、長春花生物鹼、氮芥、亞硝基脲、DNA 烷化劑(例如引起股間交聯、經由 p53 之細胞凋亡)、VEGF 抑制劑、抗血管生成抗體、HER2 抑制劑、喹唑啉 HER2 抑制劑、EGFR 抑制劑、酪胺酸激酶抑制劑、西羅莫司(Sirolimus) 類似物、mTORC1 抑制劑(例如在乳癌中與依西美坦(Exemestane) = 抑制雌激素產生之芳香酶抑制劑組合)、三氮烯、達卡巴嗪(Dacarbazine)前藥、甲基肼。

【0265】 相關例示性乳癌化學治療劑包括(但不限於)卡培他濱(Capecitabine)、卡莫氟(Carmofur)、氟尿嘧啶、替加氟(Tegafur)、吉西他濱、胺甲喋呤、多柔比星、泛艾黴素(Epirubicin)、多西他賽、伊沙匹隆(Ixabepilone)、長春地辛(Vindesine)、長春瑞濱(Vinorelbine)、環磷醯胺、貝伐珠單抗(Bevacicumab)、帕妥珠單抗(Pertuzumab)、曲妥珠單抗、拉帕替尼及依韋莫司。例示性神經膠質瘤/神經膠母細胞瘤相關抗瘤藥物包括(但不限於)卡莫司汀(Carmustine)、洛莫司汀(Lomustine)、替莫唑胺(Temozolomide)、丙卡巴肼(Procarbazine)、長春新鹼(Vincristine)及貝伐珠單抗。相關例示性 DNA 損傷化學治療劑包括(但不限於)美法崙(Melphalan)、順鉑及依託泊苷(Etoposide)、氟尿嘧啶、吉西他濱。

組合放射療法

【0266】 替代地，對於治療癌症之方法，ENPP1 抑制劑化合物(或包含該等化合物之醫藥組合物)可與放射療法組合投與。在某些實施例中，該等方法包括向

個體投與放射療法。另外，ENPP1 抑制劑化合物可在投與放射療法之前或之後投與。因此，標的方法可進一步包括向個體投與放射療法。放射療法及投與標的化合物之組合可提供協同治療效應。當個體在放射療法(RT)期間暴露於適當劑量及/或頻率之放射時，可在個體中誘導 2'3'-cGAMP 之產生。cGAMP 之該等誘導水準可在共投與標的 ENPP1 抑制劑化合物以防止 cGAMP 降解時得以維持及/或增強，例如藉由與用單獨 RT 達成之水準比較增強。例如，圖 21A 圖解說明例示性 ENPP1 抑制劑在小鼠模型中可與放射療法(RT)協同作用以減小腫瘤負荷。因此，標的方法之態樣包括投與劑量及/或頻率/方案與單獨放射治療之治療有效劑量及/或頻率/方案相比減少之放射治療。在一些情況下，放射療法係以可有效地降低個體之放射損傷風險(例如在治療有效劑量及/或頻率/方案之單獨放射治療下預期會發生之放射損傷)之劑量及/或頻率與標的化合物組合投與。

【0267】 在一些情況下，該方法包括在放射療法之前向個體投與 ENPP1 抑制劑。在一些情況下，該方法包括在個體暴露於放射療法後向個體投與 ENPP1 抑制劑。在某些情況下，該方法包括向有需要之個體依次投與放射療法，然後投與 ENPP1 抑制劑，然後投與檢查點抑制劑。

效用

【0268】 本發明之化合物及方法(例如如本文所述)可用於多種應用中。相關應用包括(但不限於)：研究應用及治療應用。本發明之方法可用於多種不同應用中，包括期望抑制 ENPP1 之任何方便之應用。

【0269】 標的化合物及方法可用於多種研究應用中。標的化合物及方法可用於最佳化化合物之生物利用度及代謝穩定性。

【0270】 標的化合物及方法可用於多種治療應用中。相關治療應用包括癌症治療中之彼等應用。因此，標的化合物可用於治療其中期望抑制及/或治療宿主

之癌症之多種不同之病狀。例如，標的化合物及方法可用於治療實體腫瘤癌症(例如如本文所述)。

醫藥組合物

【0271】 本文所討論之化合物可使用任何方便之賦形劑、試劑及方法來調配。組合物以含有醫藥學上可接受之賦形劑之調配物提供。眾多醫藥學上可接受之賦形劑為此項技術已知且無需在本文中詳細討論。醫藥學上可接受之賦形劑已廣泛描述於多種出版物中，包括例如 A. Gennaro (2000) 「Remington: The Science and Practice of Pharmacy」，第 20 版，Lippincott, Williams, & Wilkins；Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999) H.C. Ansel 等人編輯，第 7 版，Lippincott, Williams, & Wilkins；及 Handbook of Pharmaceutical Excipients (2000) A.H. Kibbe 等人編輯，第 3 版，Amer. Pharmaceutical Assoc。

【0272】 公眾可容易地獲得醫藥學上可接受之賦形劑，例如媒劑、佐劑、載劑或稀釋劑。此外，公眾可容易地獲得醫藥學上可接受之輔助物質，例如 pH 調節及緩衝劑、張力調節劑、穩定劑、潤濕劑及諸如此類。

【0273】 在一些實施例中，標的化合物係在水性緩衝液中調配。適當之水性緩衝液包括(但不限於)濃度自 5mM 至 100mM 不等之乙酸鹽、琥珀酸鹽、檸檬酸鹽及磷酸鹽緩衝液。在一些實施例中，水性緩衝液包括提供等滲溶液之試劑。該等試劑包括(但不限於)氯化鈉；及糖，例如甘露醇、右旋糖、蔗糖及諸如此類。在一些實施例中，水性緩衝液進一步包括非離子表面活性劑，例如聚山梨醇酯 20 或 80。視情況地，製劑可進一步包括防腐劑。適當之防腐劑包括(但不限於)苯甲醇、苯酚、氯丁醇、苯扎氯銨(benzalkonium chloride)及諸如此類。在許多情況下，製劑儲存在約 4°C。製劑亦可經凍乾，在該情況下其通常包括低溫保護劑，例如蔗糖、海藻糖、乳糖、麥芽糖、甘露醇及諸如此類。凍乾製劑即便是在環

境溫度下仍可以長時間儲存。在一些實施例中，標的化合物經調配用於持續釋放。

【0274】 在一些實施例中，標的化合物及第二活性劑(例如如本文所述)(例如小分子、化學治療劑、抗體、抗體片段、抗體-藥物結合物、適體或蛋白質等)係以含有醫藥學上可接受之賦形劑之調配物(例如以相同或單獨調配物)投與個體。在一些實施例中，第二活性劑係檢查點抑制劑，例如細胞毒性 T 淋巴球相關抗原 4 (CTLA-4)抑制劑、程式化死亡 1 (PD-1)抑制劑或 PD-L1 抑制劑。

【0275】 在本發明之另一態樣中，提供醫藥組合物，其包含本發明之化合物或其醫藥學上可接受之鹽、異構物、互變異構物或前藥或基本上由其組成，且進一步包含一或多種其他相關活性劑。任何方便之活性劑可與標的化合物聯合用於標的方法中。在一些情況下，該其他劑係檢查點抑制劑。標的化合物及檢查點抑制劑以及如本文所述用於組合療法之其他治療劑可經口、皮下、肌內、鼻內、非經腸或其他途徑投與。標的化合物及第二活性劑(若存在)可藉由相同投與途徑或藉由不同投與途徑投與。治療劑可藉由任何適當之方法投與，包括(但不限於)例如經口、直腸、經鼻、局部(包括經皮、氣溶膠、經頰及舌下)、陰道、非經腸(包括皮下、肌內、靜脈內及真皮內)、膀胱內或注射至受侵襲器官中。在某些情況下，治療劑可鼻內投與。在一些情況下，治療劑可腫瘤內投與。

【0276】 在一些實施例中，標的化合物及化學治療劑係以含有醫藥學上可接受之賦形劑之調配物(例如以相同或單獨調配物)投與個體。化學治療劑包括(但不限於)烷化劑、亞硝基脲、抗代謝物、抗腫瘤抗生素、植物(長春花)生物鹼及類固醇激素。亦可使用肽化合物。適當之癌症化學治療劑包括多拉司他汀及其活性類似物及衍生物；及奧裡斯他汀及其活性類似物及衍生物(例如單甲基奧裡斯他汀 D (MMAD)、單甲基奧裡斯他汀 E (MMAE)、單甲基奧裡斯他汀 F (MMAF)

及諸如此類)。參見例如 WO 96/33212、WO 96/14856 及 U.S. 6,323,315。適當之癌症化學治療劑亦包括類美登素及其活性類似物及衍生物(參見例如 EP 1391213；及 Liu 等人(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623)；多卡米星及其活性類似物及衍生物(例如包括合成類似物 KW-2189 及 CB 1-TM1)；及苯并二氮呋及其活性類似物及衍生物(例如吡咯并苯并二氮呋(PBD))。

【0277】 標的化合物及第二化學治療劑以及如本文所述用於組合療法之其他治療劑可經口、皮下、肌內、非經腸或其他途徑投與。標的化合物及第二化學治療劑可藉由相同投與途徑或藉由不同投與途徑投與。治療劑可藉由任何適當之方法投與，包括(但不限於)例如經口、直腸、經鼻、局部(包括經皮、氣溶膠、經頰及舌下)、陰道、非經腸(包括皮下、肌內、靜脈內及真皮內)、膀胱內或注射至受侵襲器官中。

【0278】 標的化合物可以單位劑型投與，並且可以藉由此項技術熟知之任何方法製備。該等方法包括將標的化合物與構成一或多種輔助成分之醫藥學上可接受之載劑或稀釋劑組合。基於所選投與途徑及標準醫藥實踐選擇醫藥學上可接受之載劑。每種載劑必須係「醫藥學上可接受的」，意味與調配物之其他成分相容，並且對個體無害。此種載劑可為固體或液體且類型通常基於所使用之投與類型來選擇。

【0279】 適當之固體載劑之實例包括乳糖、蔗糖、明膠、瓊脂及散裝粉末。適當之液體載劑之實例包括水、醫藥學上可接受之脂肪及油、醇或其他有機溶劑，包括酯、乳液、糖漿或酞劑、懸浮液、溶液及/或懸浮液以及由非泡騰顆粒復原之溶液及或懸浮液以及由泡騰顆粒復原之泡騰製劑。該等液體載劑可含有例如適當之溶劑、防腐劑、乳化劑、懸浮劑、稀釋劑、甜味劑、增稠劑及融化劑。較佳載劑係食用油，例如玉米油或芥花油。聚乙二醇(例如 PEG)亦係良好之

載劑。

【0280】 可使用提供本揭示案之給藥方案之任何藥物遞送裝置或系統。彼等熟習此項技術者已知眾眾多遞送裝置及系統。

實例

【0281】 提出以下實例係為了向熟習此項技術者提供關於如何製備及使用本揭示案之實施例之完整揭示內容及描述，而不欲限制發明人認為係其發明之範圍，亦不欲表示下文之實驗係全部或唯一進行之實驗。已努力確保所用數值之準確性(例如量、溫度等)，但應該考慮一些實驗誤差及偏差。除非另外表明，否則份數為重量份數，分子量為重量平均分子量，溫度以攝氏度計，且壓力等於或接近大氣壓。

【0282】 儘管已經參照本發明之具體實施例描述了本發明，但熟習此項技術者應該理解，在不脫離本發明之真實精神及範圍之情況下，可以進行各種改變且可以進行等效取代。此外，可以進行許多修改以使特定情況、材料、物質組成、製程、一或多個製程步驟適應本揭示案之目標、精神及範圍。所有該等修改皆欲在所附申請專利範圍之範圍內。

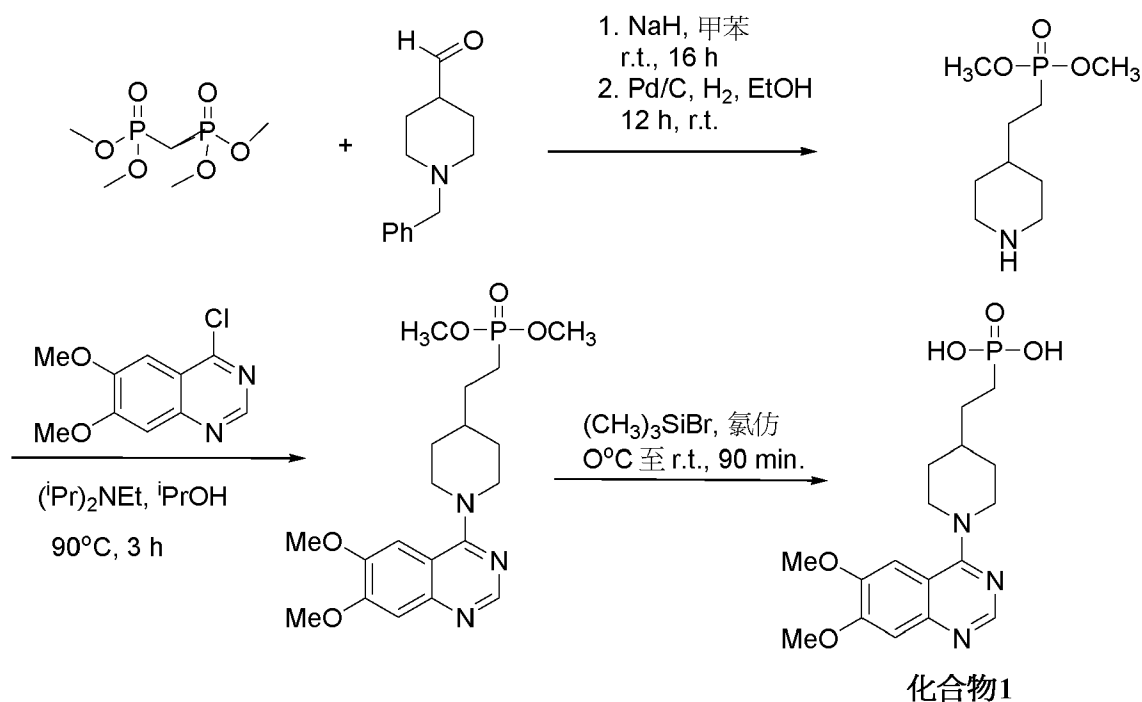
實例 1：化合物之合成

【0283】 化合物可以使用任何方便之方法合成。適用於製備本揭示案之化合物之方法包括實例 1a-1c 中描述之例示性合成方法，以及 Li 等人在於 2018 年 9 月 7 日提出申請之 PCT 申請案第 PCT/US2018/050018 號中描述之彼等方法，該申請案之揭示內容之全文皆以引用方式併入本文中。亦可獲得提供可用於合成所揭示化合物之公知化學合成方案及條件之許多一般參考文獻(參見例如 Smith 及 March, March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure，第 5 版，Wiley-Interscience, 2001；或 Vogel, A Textbook of Practical

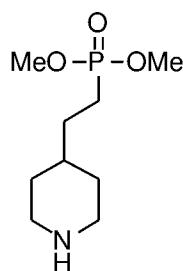
Organic Chemistry, Including Qualitative Organic Analysis, 第 4 版, New York: Longman, 1978)。反應可以藉由薄層層析(TLC)·LC/MS 及藉由 LC/MS 及 ^1H NMR 表徵之反應產物來監測。中間體及最終產物可藉由矽膠層析或 HPLC 來純化。

實例 1a：例示性合成方案化合物 1

【0284】 可能適用於製備本揭示案之化合物之化合物 1 之合成闡述於下文中：



(2-(六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸二甲酯之製備

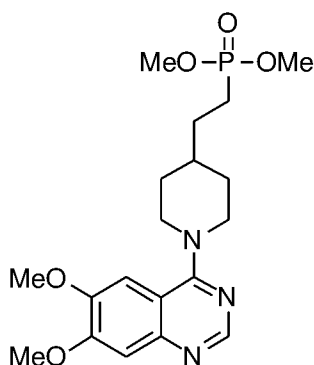


【0285】 在室溫下將氫化鈉(2.16 g, 54.11 mmol)小心地添加至雙(二甲氧基磷醯基)甲烷(11.42 g, 49.19 mmol)於甲苯(100 mL)中之攪拌溶液。然後將反應混合物置於氮氣氛下且緩慢地添加 1-苯甲基六氫吡啶-4-甲醛(10 g, 49.19 mmol)於甲苯(50 mL)中之溶液，同時保持溫度低於 40°C。將所得混合物在室溫下攪拌 16 h 且然後藉由添加飽和氯化銨水溶液淬滅。分離有機相，用鹽水洗滌，乾燥(MgSO₄)

並蒸發至乾燥。層析(120 g SiO₂ ; 5%至 100% EtOAc 於己烷中之梯度)提供無色油狀(*E*)-(2-(1-苯甲基六氫吡啶-4-基)乙烯基)膦酸二甲酯(6.2 g, 16%)。

【0286】 向(*E*)-(2-(1-苯甲基六氫吡啶-4-基)乙烯基)膦酸二甲酯(3.7 g, 12.0 mmol)於乙醇(40 mL)中之混合物中添加 Pd/C (1.1 g, 10.3 mmol)。將混合物置於氫氣氛下且在室溫下攪拌 12 h，過濾並在減壓下蒸發至乾燥以獲得無色油狀(2-(六氫吡啶-4 基)乙基)膦酸二甲酯(2.7 g, 100%)。

(2-(1-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸二甲酯之製備

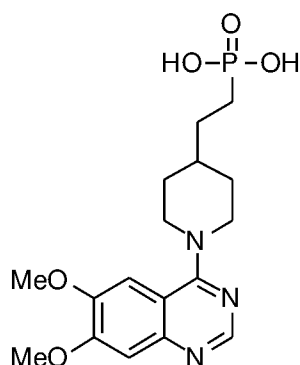


【0287】 將二異丙基乙胺(0.6 g, 8.9 mmol)添加至(2-(六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸二甲酯(1.1 g, 4.9 mmol)及 4-氯-6,7-二甲氧基喹啉(1.0 g, 4.5 mmol)於異丙醇(20 mL)中之混合物。在 90°C 下攪拌 3 h 後，將反應混合物冷卻並蒸發至乾燥。矽膠純化(二氯甲烷中之 5% MeOH)提供油狀(2-(1-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸二甲酯(755 mg, 37%)。

LC-MS: $m/z = 410.25$ $[M+H]^+$

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.65 (s, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.09 (s, 1H), 4.19 (dq, $J = 14.0, 2.9, 2.4$ Hz, 2H), 4.02 (s, 3H), 3.99 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.05 (td, $J = 12.8, 2.3$ Hz, 2H), 1.93 - 1.77 (m, 4H), 1.67 (ddd, $J = 14.1, 9.5, 5.9$ Hz, 3H), 1.46 (qd, $J = 12.2, 3.7$ Hz, 2H)。

二甲基(2-(1-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基)六氫吡啶-4 基)乙基)膦酸(化合物 1)之製備



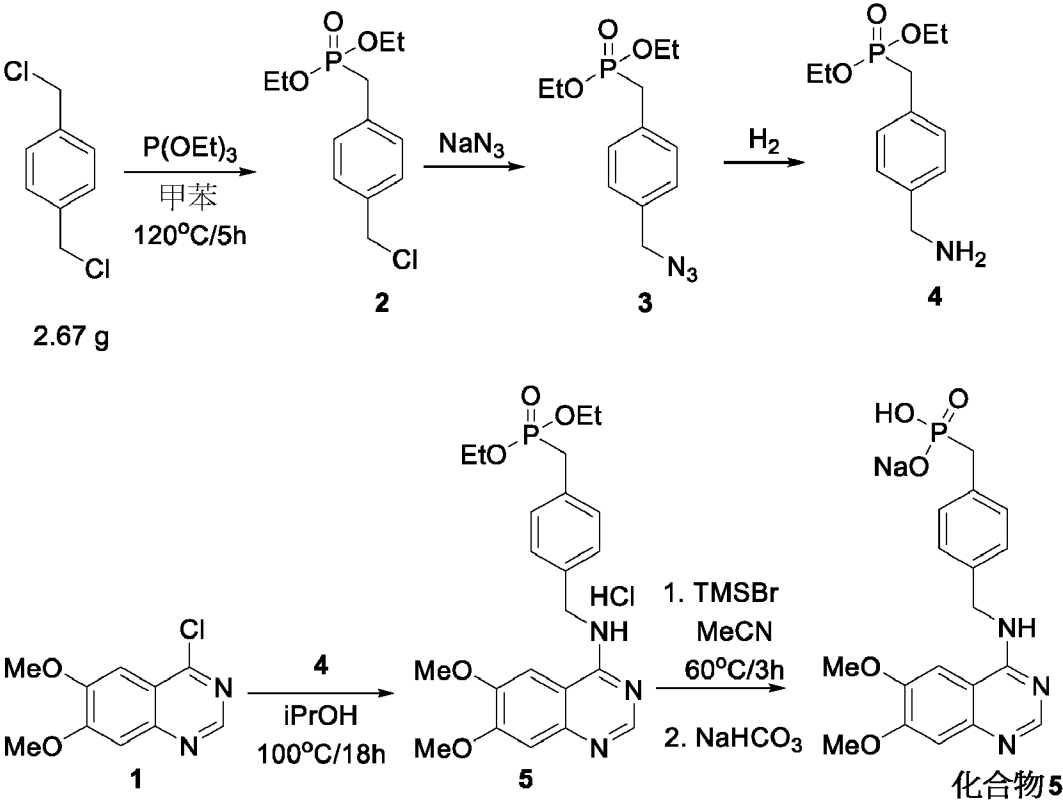
【0288】 將溴三甲基矽烷(3.67 g, 24 mmol)添加至(2-(1-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸二甲酯(3.25 g, 7.94 mmol)於氯仿(60 mL)中之藉由冰浴冷卻之冷卻溶液。將反應混合物升溫至室溫且 90 分鐘後藉由添加甲醇(20 mL)淬滅。將混合物在減壓下蒸發至乾燥且然後於甲醇(100 mL)中溶劑合。將反應混合物濃縮至半體積，過濾以去除沈澱，且然後蒸發至乾燥。用二氯甲烷使殘餘物結晶，過濾並在真空下乾燥以獲得二甲基(2-(1-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸(2.1 g, 69%)。

LC-MS: $m/z = 381.8 [M+H]^+$

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.77 (s, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.23 (s, 1H), 4.71 (d, $J = 13.1$ Hz, 2H), 3.99 (s, 3H), 3.97 (s, 3H), 3.48 (t, $J = 12.7$ Hz, 2H), 3.18 (s, 1H), 1.97-1.90 (m, 2H), 1.62-1.43 (m, 4H), 1.40-1.27 (m, 2H)。

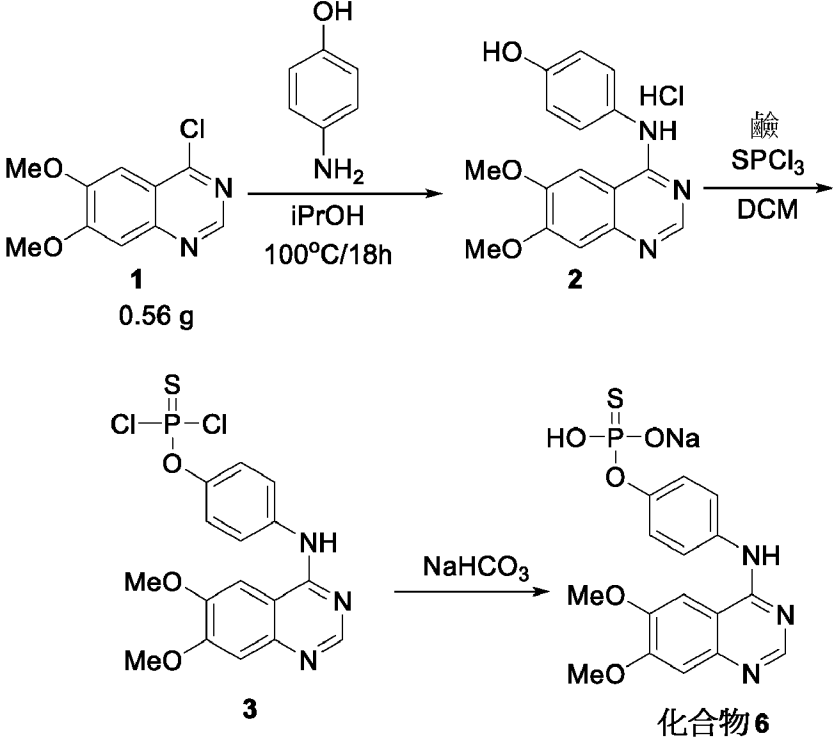
實例 1b：化合物 5 (表 1)之合成

【0289】 使用下文所述之合成方案來製備化合物 5：



實例 1c：化合物 6 (表 1)之合成

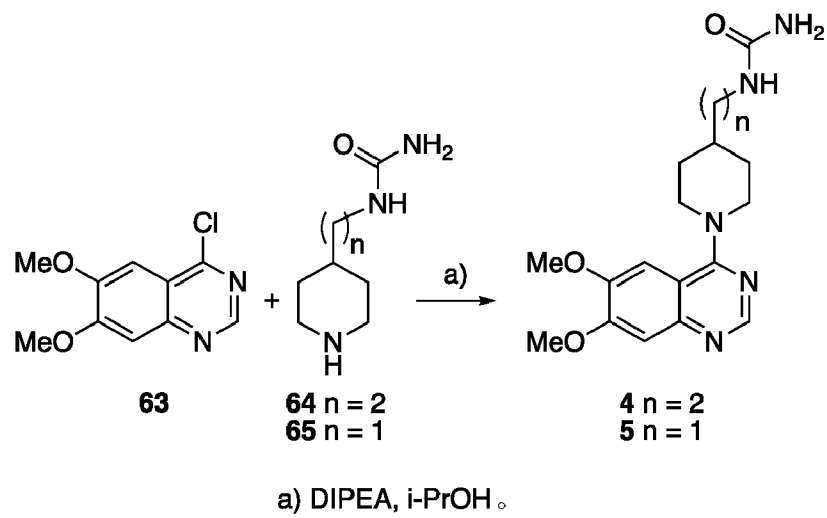
【0290】 使用下文所述之合成方案來製備化合物 6：



【0291】 化學合成：除非另外註明，否則反應係在環境氣氛下進行。定性 TLC

分析係在 250 mm 厚、60 Å、玻璃背襯之 F254 二氧化矽(Silicycle, Quebec City, Canada)上進行。可視化係用 UV 光及暴露於對茴香醛或 KMnO₄ 染色溶液、然後加熱來完成。除非另外註明，否則所有使用之溶劑皆為 ACS 級 Sure-Seal，所有其他試劑皆按收到時之原樣使用。在補充資訊中連同胺建構組元一起描述了在市面上無售之 4-氯喹啉及 4-氯 3-喹啉腈之合成。在 Teledyne Isco 純化系統上使用矽膠急速柱(SiliCycle®, SiliaSep™ 40-63 μm, 60Å)進行急速層析。在 Agilent 1260 Infinity 製備級純化系統上使用 Agilent PrepHT Zorbax Eclipse XDB-C18 反相層析管柱(21.2 × 250 mm)進行 HPLC。使用記錄在 Bruker AV-500 光譜儀上之 ¹H 光譜及收集在 Shimadzu 20-20 ESI LCMS 儀器上之低解析度質譜(ESI-MS)進行結構測定。使用記錄在 Bruker AV-500 或 AV-400 光譜儀上之 ¹H 光譜及收集在 Shimadzu 20-20 ESI LCMS 儀器上之低解析度質譜(ESI-MS)進行結構測定。如藉由 HPLC-MS 所測定，最終化合物純度為>95%。所有最終化合物 ¹H 光譜皆與預期結構一致。

【0292】 脲 4 及 5 之合成。



1-(2-(1-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)脲 4 (在表 3a 中)之製備

【0293】 在氮氣氛下向 1-(2-(六氫吡啶-4-基)乙基)脲 64 (173 mg, 1.01 mmol)於異丙醇(5 mL)中之溶液中添加 4-氯-6,7-二甲氧基喹啉 63 (181 mg, 0.81 mmol)

及 *N,N*-二異丙基乙胺(391 mg, 3.03 mmol)。將混合物在室溫下攪拌 2 h 且然後在減壓下蒸發至乾燥。純化(製備型 HPLC)獲得淺黃色晶體狀標題化合物 **4** (172 mg, 47%)。

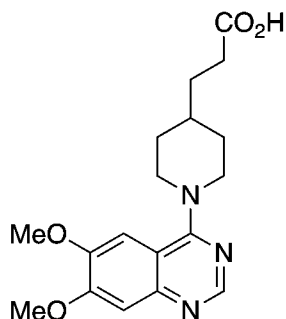
【0294】 LCMS: $[M + H]^+$ m/z 360。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.49 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.07 (s, 1H), 5.92-5.90 (m, 1H), 5.36 (br s, 2H), 4.13-4.09 (m, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.04-2.94 (m, 4H), 1.81-1.78 (m, 2H), 1.62-1.56 (m, 1H) 及 1.38-1.33 (m, 4H)。

1-((1-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-基)六氫吡啶-4-基)甲基)脲 **5** (在表 3a 中)之製備

【0295】 在氮氣氛下向 1-(六氫吡啶-4-基甲基)脲 **65** (155 mg, 0.97 mmol)於異丙醇(10 mL)中之溶液中添加 4-氯-6,7-二甲氧基喹唑啉 **63** (174 mg, 0.78 mmol)及 *N,N*-二異丙基乙胺(394 mg, 2.9 mmol)。將混合物在 10°C 下攪拌 3 h 且然後在減壓下蒸發至乾燥。層析(SiO_2 :二氯甲烷中之 0 至 6% MeOH)以獲得白色固體狀期望產物 **5** (150 mg, 44%)。

【0296】 LCMS: $[M + H]^+$ m/z 346.0 ^1H NMR (400 MHz, 甲醇- d_4) δ 8.44 (s, 1H), 7.14 (s, 1H), 7.12 (s, 1H), 4.28-4.24 (m, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.13-3.07 (m, 4H), 1.94-1.87 (m, 3H) 及 1.50-1.41 (m, 2H)。

3-(1-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-基)六氫吡啶-4-基)丙酸 **6** (在表 3a 中)之製備

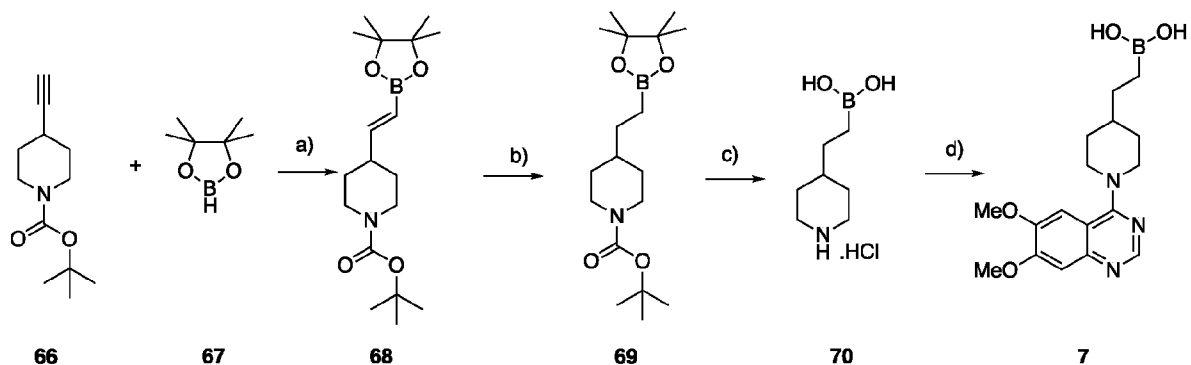


【0297】 將 4-氯-6,7-二甲氧基-喹唑啉 **63** (3.14g, 13.98 mmol)及 3-(4-六氫吡啶基)丙酸(2.0 g, 12.72 mmol)懸浮於異丙醇(100 mL)中且在 90°C 下攪拌 3 h。一旦冷

卻，便立即將混合物在減壓下蒸發至乾燥。然後用 CH_2Cl_2 (20 mL) 研磨殘餘物以獲得白色固體狀標題化合物 **6** (1.87 g, 42%)。

^1H NMR (400 MHz, 甲醇- d_4) δ

(2-(1-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)硼酸 **7** (在表 3a 中) 之製備



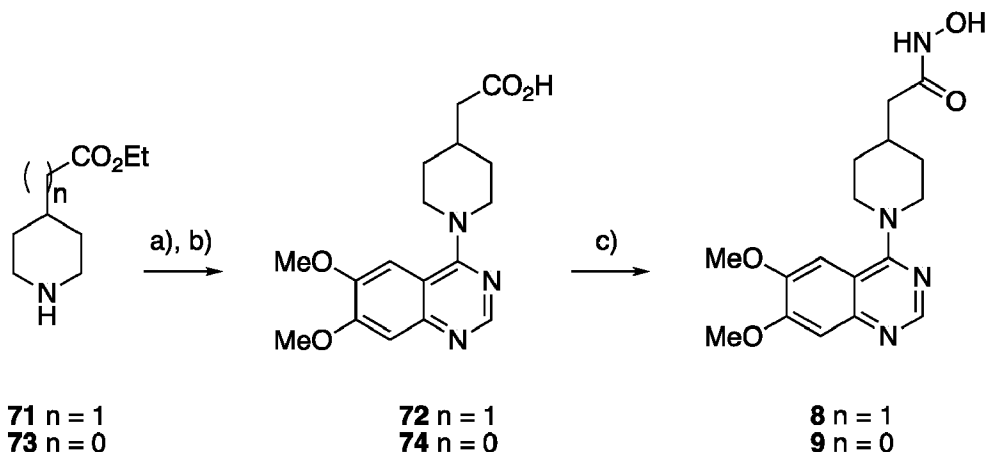
a) Cp_2ZrCl_2 , PhMe 60 °C; b) Pd/C, H_2 , MeOH; c) HCl (aq), MeOH/己烷; d) **63**, DIEA, THF 80 °C。

【0298】 將 4-乙炔基六氫吡啶-1-甲酸第三丁基酯 **66** (2.92 g, 13.95 mmol)、雙(環戊二烯基)氯氫化鋯(150 mg, 0.518 mmol)及 4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧雜硼雜環戊烷 **67** (1.49 g, 11.63 mmol) 於溶劑中之溶液在 60°C 下攪拌 16 h 且然後用醚稀釋並在減壓下蒸發至乾燥。層析(SiO_2 ; 石油醚中之 2-5% 乙酸乙酯)提供 **68** (4.2 g, 89%)。將 (*E*)-4-(2-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧雜硼雜環戊烷-2-基)乙烯基)六氫吡啶-1-甲酸第三丁基酯 **68** (4.2 g, 12.46 mmol) 及碳載鈀(840 mg, 20% w/w) 於 MeOH (500 mL) 中之混合物置於氫氣氛下並在室溫下攪拌 16 h。然後經由 Celite[®] 墊過濾混合物且然後在減壓下蒸發至乾燥以提供 **69** (4.2 g, 92%)。將 1M HCl 水溶液 (4 mL) 添加至 **73** (460 mg, 1.36 mmol) 於 MeOH/己烷 (5 mL/5 mL) 中之冷卻(0°C) 混合物。將混合物升溫至室溫並攪拌 3 h 且然後在減壓下蒸發至乾燥以提供呈鹽酸鹽形式之(2-(六氫吡啶-4-基)乙基)硼酸 **70** (180 mg, 68%)。向 **70** (140 mg, 1.04 mmol) 於 THF (5 mL) 中之溶液中添加 4-氯-6,7-二甲氧基喹啉 **63** (180 mg, 0.935 mmol)，然後添加 *N,N*-二異丙基乙胺 (360 mg, 1.87 mmol)。將混合物在 80°C 下攪拌 16 h 且然後在減壓下蒸發至乾燥。純化(製備型 HPLC)獲得淺黃色固體狀標題

化合物(105 mg; 37%)。

【0299】 LCMS: $[M + H]^+$ m/z 346.3。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.67 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 4.62-4.59 (m, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 3.42-3.36 (m, 4H), 2.46 (s, 1H), 1.88-1.86 (m, 2h), 1.29-1.14 (m, 3H)及 0.60-0.56 (m, 2H)。

【0300】 羧酸 8 及 9 之製備。



a) **63**, *i*-PrOH, 100 °C; b) NaOH, THF, H₂O; c) NH₂OH.HCl, DIPEA, BOP, THF。

2-(1-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)-*N*-羥基乙醯胺 8 (在表 3a 中)之製備

【0301】 將 4-氯-6,7-二甲氧基喹啉 **63** (600 mg, 2.68 mmol)及 2-(六氫吡啶-4-基)乙酸乙酯 **71** (504 mg, 2.95 mmol)於 *i*-PrOH (6 mL)中之混合物在密封管中在 100°C下攪拌 16 h。然後在減壓下濃縮反應混合物並藉由矽膠層析純化殘餘物以獲得 2-(1-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙酸乙酯(750 mg, 77%)。將 H₂O 中之 2M NaOH 溶液(1 mL)添加至 2-(1-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙酸乙酯(250 mg, 0.696 mmol)於 THF (10 mL)中之混合物。將混合物在室溫下攪拌 16 h 且然後藉由添加 1M HCl 溶液淬滅。用乙酸乙酯萃取有機相，用鹽水洗滌，乾燥(Na₂SO₄)並在減壓下蒸發至乾燥以獲得白色固體狀酸 **72** (200 mg, 86%)。

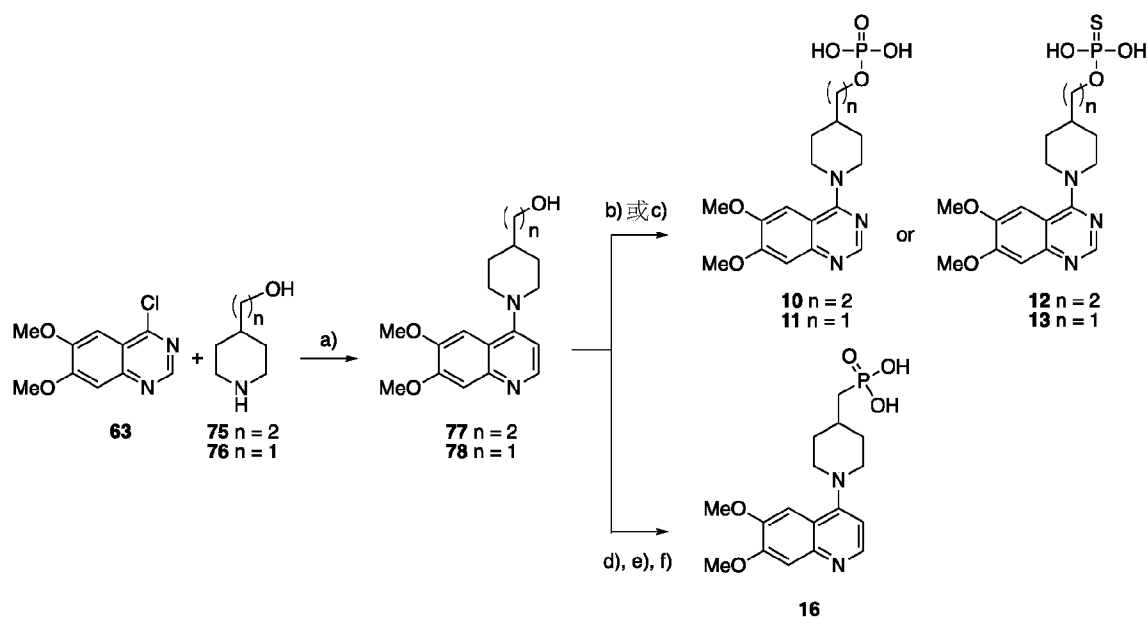
【0302】 向酸 **72** (300 mg, 0.906 mmol) 於 THF (10 mL) 中之混合物中添加 $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (76 mg, 1.09 mmol)、DIEA (468 mg, 3.63 mmol) 及 (苯并三唑-1-基氧基) 叁(二甲基胺基) 磷六氟磷酸鹽 (BOP) (481 mg, 1.09 mmol)。將混合物在室溫下攪拌 16 h 且然後用水稀釋，用乙酸乙酯萃取，用鹽水洗滌溶液，乾燥 (Na_2SO_4) 並在減壓下蒸發至乾燥。層析 (SiO_2 ，溶劑) 以獲得白色固體狀標題產物 **8** (180 mg, 77%)。LCMS: $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z 347.10。 ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 8.42 (s, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.00 (s, 1H), 4.68-4.62 (m, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 3.51-3.45 (m, 2H), 2.21-2.15 (m, 3H), 1.93-1.0 (m, 2H) 及 1.45-1.36 (m, 2H)。

1-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基)-*N*-羥基六氫吡啶-4-甲醯胺 **9** (在表 3a 中) 之製備。

【0303】 係根據 **8** 之程序但使用六氫吡啶-4-甲酸乙酯 **73** 合成。

【0304】 LCMS: $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z 333.25。 ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 8.39 (s, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.94 (s, 1H), 4.62-4.58 (m, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.47-3.41 (m, 2H), 2.65-2.60 (m, 1H), 1.97-1.94 (m, 2H) 及 1.82-1.77 (m, 2H)。

【0305】 化合物 **10**、**11**、**12**、**13** 及 **16** (在表 3a 中) 之一般程序。



a) $i\text{-PrOH}$, 100°C ; b) 吡啶, PSCl_3 然後 H_2O ; 或 c) 吡啶, POCl_3 , 然後 H_2O ; d) PPh_3 , I_2 , 咪唑, CH_2Cl_2 ; e) $\text{PO}(\text{OBn})_2$, DBU, MeCN; f) Pd/C , H_2 , MeOH。

【0306】 2-(1-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙-1-醇 **77** 之製備。

第 111 頁(發明說明書)

【0307】 將 4-氯-6,7-二甲氧基喹啉 **63** (1.0 g, 4.46 mmol) 及六氫吡啶-4-基乙醇 **79** (633 mg, 4.91 mmol) 於異丙醇 (10 mL) 中之混合物在密封管中在 100°C 下攪拌 16 h。冷卻後，在減壓下濃縮反應混合物並藉由矽膠層析(SiO_2 ；石油醚中之 EtOAc) 純化殘餘物以獲得 2-(1-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙-1-醇 **75** (1.3 g, 91%)。

【0308】 (1-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)甲醇 **78** 之製備。

【0309】 將 4-氯-6,7-二甲氧基喹啉 **63** (900 mg, 4.02 mmol) 及六氫吡啶-4-基甲醇 **76** (508 mg, 4.42 mmol) 於 *i*-PrOH (10 mL) 中之混合物在密封管中在 100°C 下攪拌 16 h。冷卻後，將反應混合物在減壓下蒸發至乾燥。藉由層析(SiO_2 ；石油醚中之 10% 至 80% 乙酸乙酯) 純化以獲得 (1-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)甲醇 **78** (1 g, 82%)。

磷酸二氫 2-(1-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙酯 **10** (在表 3a 中) 之製備

【0310】 將 2-(1-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙-1-醇 **77** (340 mg, 1.07 mmol) 溶解於 10 mL 無水吡啶中，然後將其冷卻至 -15°C 並攪拌 10 min。在 N_2 氣氛下逐滴添加 POCl_3 (821 mg, 5.4 mmol)，使反應溫度緩慢升溫至 0°C，然後再攪拌 30 min。在 0°C 下將混合物傾倒至碳酸氫鈉溶液 (800 mg 於 250 mL 水中) 中。用二氯甲烷萃取期望化合物。濃縮有機相並用製備型 HPLC 純化以獲得白色固體狀磷酸二氫 2-(1-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙酯 **10** (52 mg, 12%)。

【0311】 LCMS: $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z 398。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.54 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 4.28-4.16 (m, 2H), 3.93 (s, 8H), 3.13-3.04 (m, 2H), 1.90-1.80 (m, 2H), 1.75 (s, 1H), 1.59 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H) 及 1.44-1.32 (m, 2H)。

(1-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)甲基磷酸二氫酯 **11** (在表 3a 中)之製備

【0312】 將(1-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)甲醇 **78** (100 mg, 0.33 mmol)溶解於無水吡啶(3 mL)中，然後將其冷卻至-15°C並攪拌 10 min。在氮氣氛下逐滴添加 POCl₃ (253 mg, 1.65 mmol)。使反應溫度緩慢升溫至 0°C，然後再攪拌 30 min。在 0°C下將混合物傾倒至 NaHCO₃ 水溶液(160 mg 於 50 mL 水中)中。用二氯甲烷萃取期望化合物且然後在減壓下蒸發至乾燥。藉由製備型 HPLC 純化提供凍乾後呈白色粉末狀之磷酸二氫(1-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)甲酯 **11** (70 mg, 55%)。LCMS: [M + H]⁺ *m/z* 384.20。 ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.74 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.20 (s, 1H), 4.66 (d, *J* = 13.0 Hz, 1H), 3.97 (m, *J* = 12.6, 1.6 Hz, 8H), 3.76 (t, *J* = 6.6 Hz, 3H), 2.19-2.00 (m, 1H), 1.92 (d, *J* = 13.5 Hz, 2H), 1.45 (dd, *J* = 14.2, 10.7 Hz, 1H)。

O,O-硫代磷酸二氫 *O*-(2-(1-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)酯 **12** (在表 3a 中)之製備

【0313】 在-15°C下向 2-(1-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙-1-醇 **77** (150 mg, 0.473 mmol)於無水吡啶(5 mL)中之溶液中添加 P(S)Cl₃ (477 mg, 2.84 mmol)。在 0°C下攪拌 0.5 h 後，將混合物傾倒至 NaHCO₃ (238 mg, 2.84 mmol)於 H₂O (50 mL)中之溶液上。將混合物在 0°C下攪拌 2 h。藉由 LCMS 監測反應混合物之進展。然後在減壓下濃縮混合物並藉由製備型 HPLC 純化殘餘物以提供淺黃色固體狀化合物 **12** (16 mg, 8%)。LCMS: [M + H]⁺ *m/z* 414.05。 ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.62 (s, 1H), 7.19 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 4.45 (d, *J* = 12.3 Hz, 2H), 3.91 (d, *J* = 11.3 Hz, 10H), 1.86 (d, *J* = 12.2 Hz, 3H), 1.56 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 1.34 (d, *J* = 10.7 Hz, 2H)。

【0314】 *O,O*-硫代磷酸二氫 *O*-((1-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)

甲基)酯 13 (在表 3a 中)之製備。

【0315】 在-15°C下向(1-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)甲醇 **78** (100 mg, 0.330 mmol)於無水吡啶(5 mL)中之溶液中添加 P(S)Cl₃ (280 mg, 1.98 mmol)。在 0°C下攪拌 0.5 h 後，將混合物傾倒至 NaHCO₃ (116 mg, 1.98 mmol)於 H₂O (50 mL)中之溶液上。將混合物在 0°C下攪拌 2 h。將混合物在減壓下蒸發至乾燥並藉由製備型 HPLC 純化殘餘物以提供黃色固體狀化合物 **13** (10 mg, 7.6%)。LCMS: [M + H]⁺ *m/z* 400.15。 ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.54 (s, 1H), 7.18 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 4.25 (d, *J* = 13.4 Hz, 2H), 3.89 (d, *J* = 9.1 Hz, 6H), 3.76 (s, 2H), 3.10 (d, *J* = 11.8 Hz, 3H), 1.94 (s, 1H), 1.81 (d, *J* = 12.7 Hz, 2H), 1.39 (d, *J* = 11.4 Hz, 1H)。

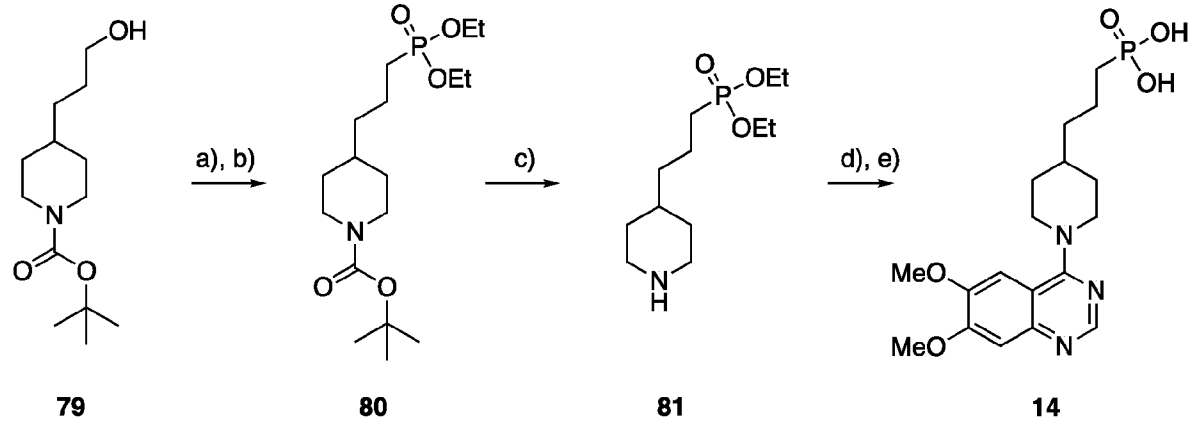
【0316】 ((1-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)甲基)膦酸 **16** 之製備。

【0317】 將無水 CH₂Cl₂ (40 mL)中之 PPh₃ (3.39 g, 15 mmol)及咪唑(1.02 g, 15 mmol)在 0°C中攪拌 10 min 且然後添加 I₂ (3.8g, 15 mmol)。將粗反應混合物置於氮氣氛下並再攪拌 10 min 且然後添加(1-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)甲醇 **78** (3.03 g, 10 mmol)。將反應混合物在室溫下攪拌過夜。藉由添加 Na₂S₂O₃ 水溶液淬滅反應。用 CH₂Cl₂ 萃取粗混合物，用水、鹽水洗滌，乾燥(Na₂SO₄)並在減壓下蒸發至乾燥。自甲醇重結晶獲得淺黃色固體狀 4-(4-(碘甲基)六氫吡啶-1-基)-6,7-二甲氧基喹啉(2.28 g, 56%)。LCMS: [M + H]⁺ *m/z* 414.3。 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.63 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.07 (s, 1H), 4.23 (s, 2H), 4.00 (s, 6H), 3.19 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.08 (s, 2H), 2.11-2.00 (m, 2H), 1.82 (s, 1H), 1.49 (s, 2H), 1.29-1.20 (m, 1H)。將 1,8-二氮雜二環(5.4.0)十一-7-烯(DBU) (9.2 g, 60.5 mmol)添加至雙(苯甲基氧基)(側氧基)-λ⁴-磷烷(9.5 g, 36.3 mmol)於無水 MeCN (40 mL)中之冷卻(0°C)溶液。10 min 後，添加 4-(4-(碘甲基)六氫吡啶-1-基)-6,7-二甲氧基喹啉(5.0 g, 12.1 mmol)。將所得混合物攪拌過夜且然後在減壓

下蒸發至乾燥。將殘餘物溶解於乙酸乙酯中，用水、鹽水洗滌，乾燥(MgSO₄)並在減壓下蒸發至乾燥。用 FCC [CH₂Cl₂:MeOH (50:1)]純化提供無色黏性油狀((1-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-基)六氫吡啶-4-基)甲基)膦酸二苯甲酯(1.1g, 18%)。LCMS: [M + H]⁺ *m/z* 548.20。 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.57 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.39-7.33 (m, 10H), 6.99 (s, 1H), 5.08 (m, 3H), 4.96 (m, 2H), 4.64 (d, *J* = 13.5 Hz, 2H), 4.09 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 3.27 (d, *J* = 12.9 Hz, 2H), 2.05 (d, *J* = 13.9 Hz, 5H), 1.76 (m, 4H), 1.42 (d, *J* = 12.5 Hz, 2H)。

【0318】 將含有((1-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-基)六氫吡啶-4-基)甲基)膦酸二苯甲酯(660 mg, 1.2 mmol)及 Pd/C (132 mg, 20% w/w)於 MeOH (20 mL)中之混合物置於 H₂ 氣氛下並在室溫下攪拌。4 h 後，經由 Celite® 墊過濾粗混合物且將濾液在減壓下蒸發至乾燥。藉由製備型 HPLC 純化提供淺黃色固體狀((1-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-基)六氫吡啶-4-基)甲基)膦酸 **16** (125 mg, 28%)。LCMS: [M + H]⁺ *m/z* 368.10。 ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.72 (s, 1H), 7.29 (s, 2H), 4.60 (d, *J* = 12.8 Hz, 2H), 3.95 (d, *J* = 11.2 Hz, 6H), 3.46 (s, 2H), 2.09 (s, 3H), 1.61 (s, 2H), 1.42 (s, 2H)。

(2-(1-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-基)六氫吡啶-4-基)丙基)膦酸 **14** (在表 3a 中)之製備



a) PPh₃, I₂, 咪唑, CH₂Cl₂; b) P(O)H(OEt)₂, Cs₂CO₃, DMF; c) TFA, CH₂Cl₂; d) **63**, DIPEA, CH₂Cl₂; e) TMSBr, MeCN, 60 °C

【0319】 將碘(1.35 g, 5.34 mmol)添加至 PPh_3 (1.4 g, 5.34 mmol)及咪唑(0.36 g, 5.34 mmol)於 CH_2Cl_2 (20 mL)中之溶液。將混合物在 rt 下攪拌 0.5 h 且然後逐滴添加 **79** (1.0 g, 4.11 mmol)於 CH_2Cl_2 (5 mL)中之溶液。將反應混合物在 rt 下攪拌 4h 且然後用飽和 Na_2SO_3 溶液淬滅，並用 CH_2Cl_2 萃取。用水、鹽水洗滌有機相，乾燥(Na_2SO_4)並在減壓下蒸發至乾燥。層析(SiO_2 ；石油醚中之 5% EtOAc)以提供淺黃色油狀 4-(3-碘丙基)六氫吡啶-1-甲酸第三丁基酯(1.0 g, 68%產率)。

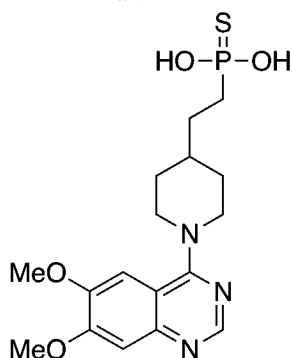
【0320】 向 4-(3-碘丙基)六氫吡啶-1-甲酸第三丁基酯(1.0 g, 2.83 mmol)於 DMF (50 mL)中之混合物中添加磷酸二乙酯(0.58 g, 4.24 mmol)及 Cs_2CO_3 (1.84 g, 5.66 mmol)。將反應混合物在室溫下在氮氣氛下攪拌過夜且然後藉由添加水淬滅。用水、鹽水洗滌有機相，乾燥(Na_2SO_4)並在減壓下蒸發至乾燥。層析(SiO_2 ；石油醚中之 20% EtOAc)獲得淺黃色油狀 **80** (0.78 g, 76%)。LCMS: $[\text{M} + \text{H}]^+ m/z$ 364.30。

【0321】 向 **80** (0.78 g, 2.14 mmol)於 CH_2Cl_2 (8 mL)中之溶液中添加 TFA (1.5 mL, 21.4 mmol)。將混合物在室溫下攪拌 4h 且然後在減壓下蒸發至乾燥。獲得油狀粗 **81**，其未經進一步純化即用於下一步驟中。LCMS: $[\text{M} + \text{H}]^+ m/z$ 264.25。

【0322】 將 DIPEA (1.37 g, 10.63 mmol)添加至磷酸二乙酯(597 mg, 2.65 mmol)及粗 **81** 於 CH_2Cl_2 (10 mL)中之溶液。將混合物在室溫下攪拌過夜且然後用飽和 NH_4Cl 水溶液淬滅並用 CH_2Cl_2 萃取。用水、鹽水洗滌有機相，乾燥(Na_2SO_4)並在減壓下蒸發至乾燥。層析(SiO_2 , CH_2Cl_2 中之 5% MeOH)獲得黃色油狀磷酸二乙酯(0.5 g, 39%)中間體。將此中間體於 MeCN (10 mL)中溶劑合，添加 TMSBr (1.46 mL, 11.07 mmol)。將所得混合物在 60°C 下攪拌 6 h 且然後冷卻至室溫並在減壓下蒸發至乾燥。層析(製備型 HPLC)獲得白色固體狀 **14** (220 mg, 50%)。LCMS: $[\text{M} + \text{H}]^+ m/z$ 396.20。 ^1H NMR (400 MHz, 甲醇- d_4) δ 8.51 (s, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.14 (s,

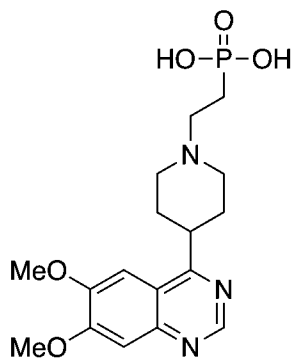
1H), 4.02 (s, 3H), 3.97 (s, 3H), 3.49 (t, $J = 12$ Hz, 2H), 2.00-1.97 (m, 3H), 1.75-1.66 (m, 5H)及 1.45-1.37 (m, 5H)。

【0323】 (2-(1-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)硫代膦 *O,O*-酸 **17** 之製備。



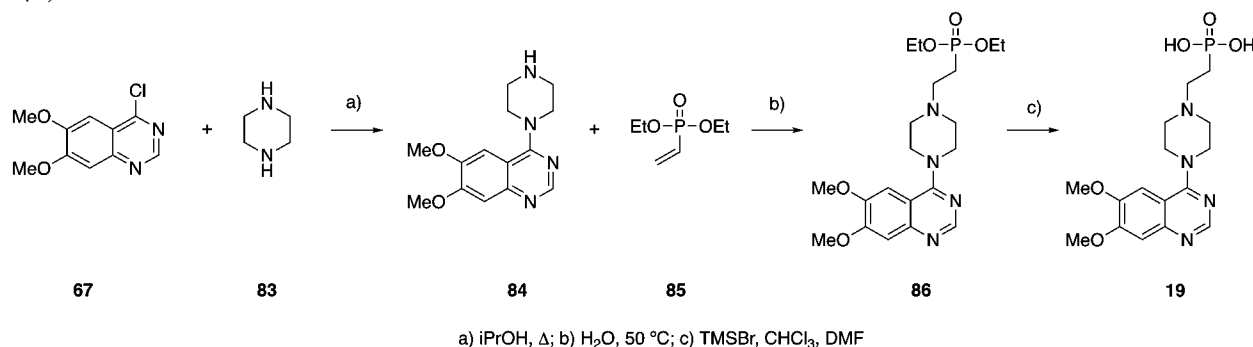
【0324】 向(2-(六氫吡啶-4-基)乙基)硫代膦酸 *O,O*-二乙酯(400 mg, 1.51 mmol)及 DIPEA (927 mg, 7.19 mmol)於 DMSO (10 mL)中之攪拌溶液中添加 4-氯-6,7-二甲氧基-喹唑啉 **66** (403 mg, 1.80 mmol)。將反應混合物置於氮氣氛下且然後在 80°C 下攪拌 16 h。將反應混合物冷卻至室溫，用水稀釋並用乙酸乙酯萃取。乾燥(Na_2SO_4)有機相並在減壓下蒸發至乾燥。純化(SiO_2 ，己烷中之 0-100% EtOAc)提供(2-(1-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)硫代膦酸 *O,O*-二乙酯(380 mg, 46%)。將(2-(1-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)硫代膦酸 *O,O*-二乙酯(45 mg, 0.099 mmol)於 TMSI (7 mL)中之攪拌溶液在 60°C 下攪拌 16 h 且然後冷卻至室溫。用水稀釋混合物並用乙酸乙酯萃取。乾燥(Na_2SO_4)有機相且然後在減壓下蒸發至乾燥。藉由製備型 HPLC 純化提供白色固體狀(2-(1-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)硫代膦 *O,O*-酸 **17** (13 mg, 32%)。LCMS: $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z 396.25。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.51 (s, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.16 (s, 1H), 4.02 (s, 3H), 3.97 (s, 3H), 3.58 (d, $J = 10.4$ Hz, 3H), 3.48 (t, $J = 12.0$ Hz, 2H), 2.00 (d, $J = 11.7$ Hz, 2H), 1.81 (s, 1H), 1.64 (d, $J = 17.9$ Hz, 2H), 1.61-1.51 (m, 2H), 1.45-1.32 (m, 2H)。

(2-(4-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基)六氫吡啶-1-基)乙基)膦酸 **18** (在表 3a 中)



【0325】 LCMS: $[M + H]^+$ m/z 382.25 ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 8.65 (s, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.76 (s, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.30-3.22 (m, 1H), 3.18-3.15 (m, 2H), 2.73-2.66 (m, 2H), 2.37-2.32 (m, 2H) 及 1.79-1.63 (m, 6H)。

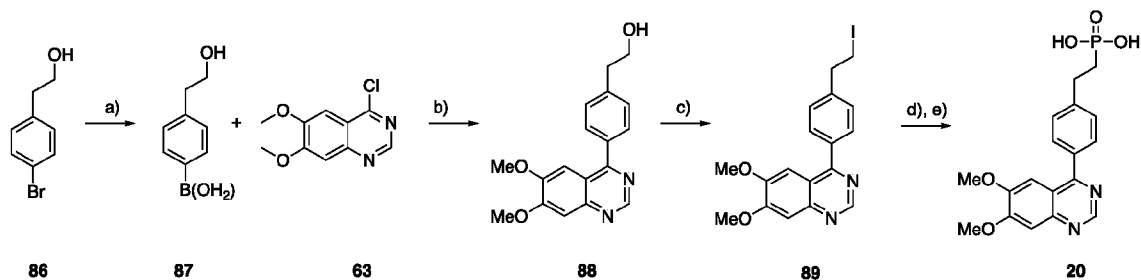
(2-(4-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基)六氫吡嗪-1-基)乙基)膦酸氫溴化物鹽 **19** (在表 3a 中)。



【0326】 將含有吡嗪 **82** 及化合物 **63** 於丙-2-醇中之混合物在回流下加熱 30 min 且然後冷卻至室溫。用水淬滅反應混合物且萃取至氯仿中。分離有機相，用水、鹽水洗滌，乾燥(Na_2SO_4)並在減壓下蒸發至乾燥。自二乙醚結晶獲得白色固體狀 **83** (1.65 g, 84%)。將六氫吡嗪 **83** (0.31 g, 1.1 mmol)溶解於水(20 mL)中且添加膦酸乙烯酯 **84** (0.19 g, 1.2 mmol)。將所得混合物在 50°C 下加熱 1 h 且然後冷卻至室溫。用氯仿萃取，乾燥(Na_2SO_4)並在減壓下蒸發至乾燥。層析(SiO_2 12 g; CH_2Cl_2 中之 15% MeOH)，然後自二乙醚結晶，獲得白色固體狀乙酯 **85** (0.23 g; 49%)。LCMS: $[M + H]^+$ m/z 410.10 ^1H NMR (500 MHz, 氯仿- d) δ 8.67 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.09 (s, 1H), 4.01 (d, $J = 18.8$ Hz, 6H), 3.77 (d, $J = 10.9$ Hz, 6H), 3.68 (t, $J = 4.9$

Hz, 4H), 3.49 (s, 2H), 2.81-2.66 (m, 6H), 2.11-2.00 (m, 2H)。將三甲基溴矽烷(198 mg, 1.3 mmol)添加至 4-[4-(2-二乙氧基磷鹽基乙基)六氫吡嗪-1-基]-6,7-二甲氧基-喹唑啉 **85** (600 mg, 3.8 mmol)於氯仿(20 mL)及 DMF (5 mL)中之溶液。將所得溶液在室溫下攪拌 3 h 且然後藉由添加甲醇淬滅。將混合物在減壓下蒸發至乾燥且自甲醇-二乙醚結晶以獲得呈 HBr 鹽形式之期望產物 **19** (0.23 g, 89%)。LCMS: $[M + H]^+$ m/z 382.8。 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.97 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 4.02 (s, 3H), 4.00 (s, 3H), 3.34 (t, $J = 8.6$ Hz, 2H), 3.17 (s, 2H), 2.90 (s, 2H), 2.74 (s, 2H), 2.20-2.08 (m, 2H)。

(4-(6,7-二甲氧基喹唑啉-4-基)苄基)膦酸 **20** (在表 3a 中)之製備



a) $n\text{BuLi}$, 硼酸三異丙酯, THF; b) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, K_2CO_3 , H_2O , THF, 65°C ; c) PPh_3 , 咪唑, I_2 , CH_2Cl_2 ; d) $(\text{BnO})_2\text{P}(\text{O})\text{H}$, Cs_2CO_3 , DMF; e) Pd/C , H_2 , MeOH。

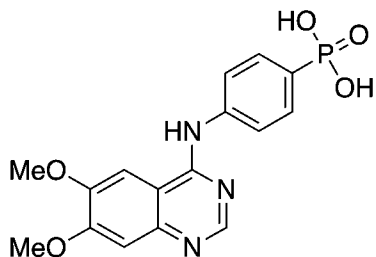
【0327】 在 -78°C 下在氮氣氛下將 2.5M 正丁基鋰(24 mL)添加至 2-(4-溴苯基)乙-1-醇 **86** (5.0 g, 24.8 mmol)於無水 THF (100 mL)中之溶液。攪拌 1 h 後，將硼酸三異丙酯(8.6 mL)添加至混合物。將反應混合物在室溫下攪拌 1 h 且然後藉由添加 2M HCl 溶液(100 mL)淬滅並攪拌 1 h。用二氯甲烷(3×100 mL)萃取混合物，乾燥(Na_2SO_4)並在減壓下蒸發至乾燥。層析(SiO_2 ; 二氯甲烷:甲醇, 1:0 至 20:0)獲得淺黃色固體狀硼酸 **87** (1.34 g, 33%)。然後將此材料溶解於 THF (30 mL)及水 (10 mL)之溶液中。將 4-氯-6,7-二甲氧基喹唑啉 **63** (2.24 g, 10.0 mmol)及碳酸鉀 (2.76 g, 20.0 mmol)添加至溶液，然後添加四(三苯基膦)鈾(0.5 g, 0.43 mmol)。將所得混合物在 65°C 下攪拌 16 h 且然後用乙酸乙酯稀釋，用鹽水洗滌，乾燥(Na_2SO_4)並在減壓下蒸發至乾燥。層析(SiO_2 : (二氯甲烷中之甲醇, 0 至 10%)獲

得淺黃色固體狀 **88** (1.43 g, 60%)。

【0328】 在 0°C 下向三苯基膦(2.36 g, 9.0 mmol)於二氯甲烷(24 mL)中之溶液中添加咪唑(700 mg, 10.28 mmol)。攪拌 10 min 後，添加 I₂ (2.3 g, 9.0 mmol)。再攪拌 10 min 後，化合物 **89** (1.5 g, 4.8 mmol)於二氯甲烷(12 mL)中。將混合物升溫至室溫並攪拌 5 h。然後用二氯甲烷(36 mL)稀釋混合物，用鹽水洗滌，乾燥 (Na₂SO₄)並在減壓下蒸發至乾燥。層析(SiO₂:石油醚:乙酸乙酯 10:1)獲得無色油狀 **89** (4.0 g)。

【0329】 將碳酸銨(1.426 g, 4.4 mmol)添加至粗 **89** (930 mg, 2.2 mmol)及磷酸二苯甲酯(884 mg, 3.37 mmol)於 DMF (20 mL)中之混合物。將混合物置於氮氣氛下且在室溫下攪拌 3 h。一旦完成，便立即將反應混合物過濾並在減壓下蒸發至乾燥。層析(C18 管柱：水:乙腈，1:0 至 80:1)，然後凍乾，獲得灰白色固體狀二苯甲基中間體(750 mg, 79%)。將(4-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基)苯乙基)膦酸二苯甲酯(230 mg, 0.41 mmol)溶解於 MeOH (20 mL)中。添加 Pd/C (46 mg, 20% w/w)並將混合物在室溫下在氮氣氛下攪拌 24 h 且然後經由 Celite[®]過濾。層析(在酸性條件下，製備型 HPLC)獲得黃色固體狀化合物 **20** (55.4 mg, 36%)。LCMS: [M + H]⁺ *m/z* 375.0。 ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9.09 (s, 1H), 7.75-7.73 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.45-7.43 (m, 2H), 7.41 (s, 1H), 7.32 (s, 1H), 4.08 (s, 1H), 3.98 (s, 3H), 3.91 (s, 1H), 3.81 (s, 3H), 2.89-2.87 (m, 3H)及 1.89 (m, 2H)。

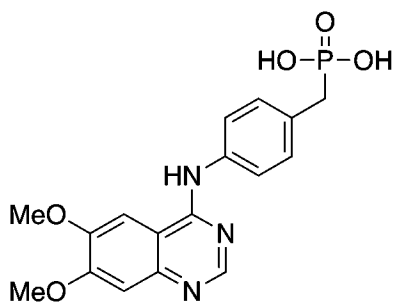
(4-((6,7-二甲氧基喹啉-4-基)胺基)苯基)膦酸鈉鹽 **21** (在表 3a 中)之合成



【0330】 將 4-氯-6,7-二甲氧基-喹啉 **67** (0.67 g, 3.0 mmol)及(4-胺基苯基)膦

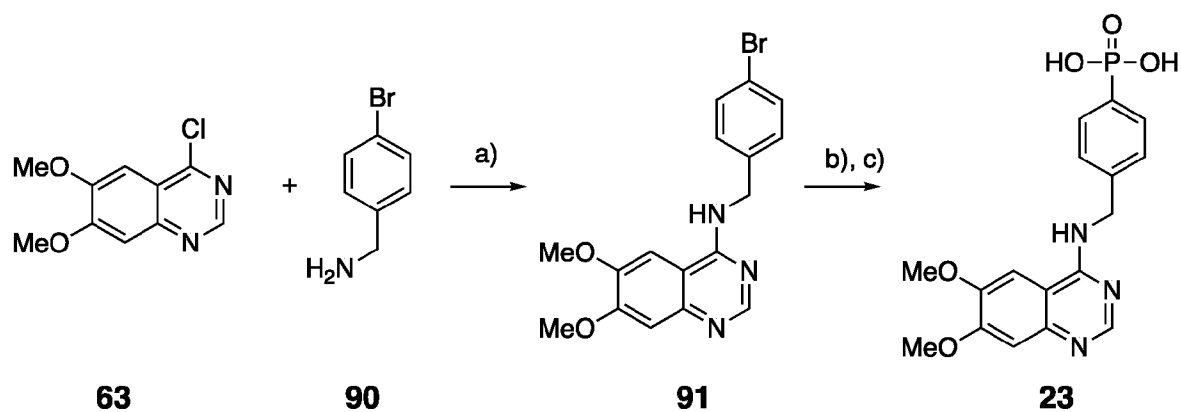
酸二乙酯(0.69 g, 3.0 mmol)於 *i*PrOH (10 mL)中之混合物在回流下加熱過夜。過濾固體沈澱，用 EtOAc 洗滌並乾燥以獲得白色固體狀(4-((6,7-二甲氧基喹啉-4-基)胺基)苯基)磷酸二乙酯(0.92 g, 73%產率)。將產物溶解於 MeCN (20 mL)中且向此中添加三甲基溴矽烷(2.8 mL, 22 mmol)。將所得混合物在 60°C下攪拌 6 h，冷卻且然後在減壓下蒸發至乾燥。藉由添加飽和 NaHCO₃ 水溶液(調節至 pH 8)淬滅粗殘餘物。藉由製備型 HPLC (在中性條件下)純化所得混合物且然後凍乾以獲得灰白色固體狀期望產物 **21** (300 mg, 35%產率)。LCMS: [M + H]⁺ *m/z* 362.10。 ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 7.73 (s, 1H), 7.53 (t, *J* = 9.8 Hz, 2H), 7.22 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 6.39 (s, 1H), 6.16 (s, 1H)及 3.39 (s, 6H)。

(4-((6,7-二甲氧基喹啉-4-基)胺基)苯甲基)磷酸鈉鹽 **22** (在表 3a 中)之合成



【0331】 將 4-氯-6,7-二甲氧基-喹啉 **67** (0.34 g, 1.5 mmol)及(4-胺基苯甲基)磷酸二乙酯(0.36 g, 3.0 mmol)於 *i*PrOH (10 mL)中之混合物在回流下加熱過夜。過濾沈澱，用 EtOAc 洗滌並在減壓下蒸發至乾燥且然後溶解於乙腈(20 mL)中。向此中添加三甲基溴矽烷(0.58 mL, 4.6 mmol)。將混合物在 60°C下攪拌 6 h。濃縮後，用飽和 NaHCO₃ 水溶液處理殘餘物直至溶液達到 pH 8。藉由製備型 HPLC (中性)純化混合物以獲得灰白色固體狀 **22** (104 mg, 57%)。LCMS: [M + H]⁺ *m/z* 376.10。 ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 7.77 (s, 1H), 7.15 (s, 4H), 6.49 (s, 1H), 6.21 (s, 1H), 3.47 (s, 6H)及 2.70 (d, *J* = 19.5 Hz, 2H)。

(4-(((6,7-二甲氧基喹啉-4-基)胺基)甲基)苯基)磷酸鈉鹽 **23** (在表 1 中亦稱為 4)。



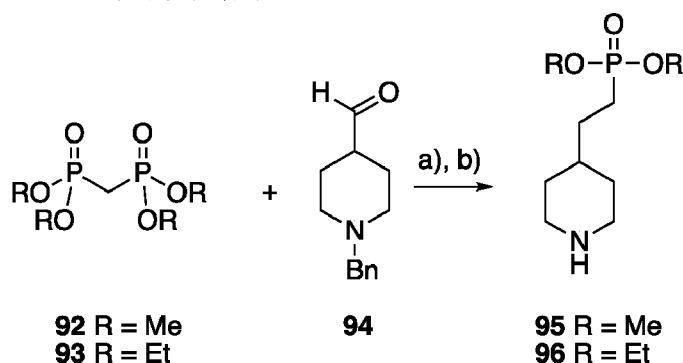
a) iPrOH, Δ ; b) Et₃N, KOAc, Pd(OAc)₂, dppf, (EtO)₂PH, THF; c) TMSBr, MeCN, 60 °C。

【0332】 將 4-氯-6,7-二甲氧基-喹唑啉 **63** (0.93 g, 4.14 mmol) 及 (4-溴苯基) 甲胺 **90** (0.77 g, 4.14 mmol) 於 iPrOH (10 mL) 中之混合物中在回流下加熱過夜。過濾固體沈澱；用乙酸乙酯洗滌並在減壓下蒸發至乾燥以獲得白色固體狀 *N*-(4-溴苯基)-6,7-二甲氧基喹唑啉-4-胺鹽酸鹽 **91** (1.5 g, 88%)。將三乙胺 (0.37 mL, 2.68 mmol) 添加至 KOAc (11 mg, 0.112 mmol)、Pd(OAc)₂ (5.5 mg, 0.025 mmol)、dppf (27 mg, 0.049 mmol) 於 THF (10 mL) 中之混合物，用氮吹掃。添加三乙胺 (0.37 mL, 2.68 mmol)。在 70°C 下攪拌 15 min 後，添加 *N*-(4-溴苯基)-6,7-二甲氧基喹唑啉-4-胺鹽酸鹽 (0.5 g, 1.22 mmol) 及磷酸二乙酯 (0.16 g, 1.22 mmol) 於 THF (10 mL) 中之溶液。將反應物在回流下攪拌 6 h 且然後分配於 EtOAc (30 mL) 與水 (20 mL) 之間。分離有機相，用水、鹽水洗滌，乾燥 (Na₂SO₄) 並在減壓下蒸發至乾燥。藉由管柱層析 (SiO₂；乙酸乙酯中之 50% 石油醚) 純化提供黃色固體狀 (4-(((6,7-二甲氧基喹唑啉-4-基) 胺基) 甲基) 苯基) 磷酸二乙酯 (0.2 g, 38%)。

【0333】 向 (4-(((6,7-二甲氧基喹唑啉-4-基) 胺基) 甲基) 苯基) 磷酸二乙酯 (0.5 g, 1.16 mmol) 於 MeCN (20 mL) 中之溶液中添加 TMSBr (1.45 mL, 11.5 mmol)。將混合物在 60°C 下攪拌 6 h，冷卻至室溫且然後在減壓下蒸發。用飽和 NaHCO₃ 水溶液 (pH 9) 淬滅殘餘物且用製備型 HPLC (中性) 純化所得混合物以提供灰白色固體狀標題產物 **23** (102 mg, 22%)。LCMS: [M- H]⁺ *m/z*: 374.00。 ¹H NMR (400 MHz,

D₂O) δ 8.00 (s, 1H), 7.61 (s, 2H), 7.29 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 6.70 (s, 1H), 6.55 (s, 1H), 4.62 (s, 2H), 3.75 (d, $J = 18.2$ Hz, 6H)。

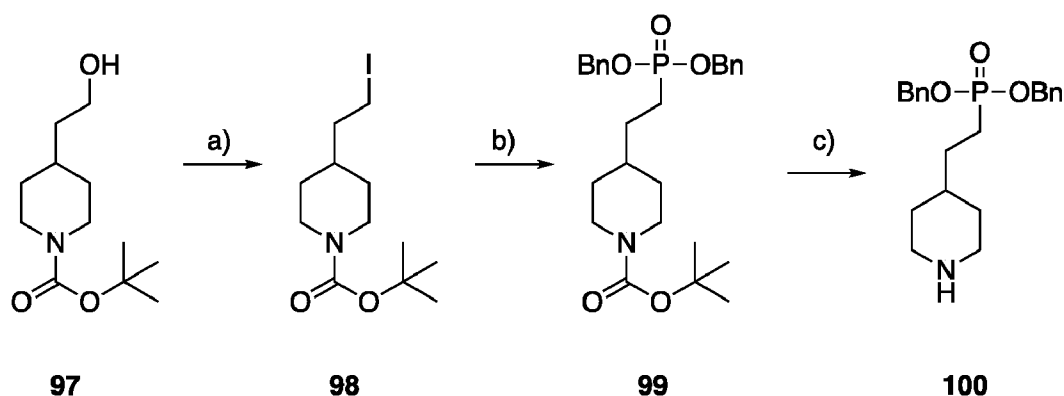
(2-(六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸二甲酯 **92** 及(2-(六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸二乙酯 **93** 之一般程序合成



a) NaH, PhMe; b) Pd/C, H₂, EtOH。

【0334】 在室溫下將氫化鈉(1.1 莫耳當量)小心地添加至雙(二甲氧基磷醯基)甲烷 **92** 或雙(二乙氧基磷醯基)甲烷 **93** (1 莫耳當量)於甲苯中之攪拌溶液。然後將反應混合物置於氮氣氛下且緩慢地添加 1-苯甲基六氫吡啶-4-甲醛 **94** (1 莫耳當量)於甲苯中之溶液，保持溫度低於 40°C。將所得混合物在室溫下攪拌 16 h 且然後藉由添加飽和 NH₄Cl 水溶液淬滅。分離有機相，用鹽水洗滌，乾燥(MgSO₄)並蒸發至乾燥。層析(120 g SiO₂；己烷中之 5%至 100%梯度之 EtOAc)提供無色油狀(E)-2-(1-苯甲基六氫吡啶-4-基)乙烯基)膦酸二甲酯或(E)-2-(1-苯甲基六氫吡啶-4-基)乙烯基)膦酸二乙酯。向(E)-2-(1-苯甲基六氫吡啶-4-基)乙烯基)膦酸二甲酯或(E)-2-(1-苯甲基六氫吡啶-4-基)乙烯基)膦酸二乙酯(1 莫耳當量)於乙醇中之混合物中添加催化 Pd/C。將混合物置於氮氣氛下且在室溫下攪拌 12 h，過濾並在減壓下蒸發至乾燥以獲得無色油狀(2-(六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸二甲酯 **95** 或(2-(六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸二乙酯 **96**。

合成(2-(六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸二苯甲酯 **100** 之一般程序



a) PPh_3 , I_2 , 咪唑, CH_2Cl_2 ; b) $\text{P}(\text{O})(\text{OBn})_3$, DBU, MeCN; c) TFA, CH_2Cl_2

【0335】 將碘(1.5 莫耳當量)添加至 PPh_3 (1.5 莫耳當量)及咪唑(1.5 莫耳當量)於 CH_2Cl_2 中之溶液。攪拌 10 min 後，逐滴添加 **97** (1.0 莫耳當量)於 CH_2Cl_2 中之溶液。將混合物在室溫下攪拌 2 h，經由 Celite[®] 墊過濾且用 5% 硫代硫酸鈉溶液處理。用乙酸乙酯萃取混合物，用鹽水洗滌，乾燥(Na_2SO_4)並在減壓下蒸發至乾燥。層析提供油狀 **98**。

【0336】 在 40°C 下將 DBU (5.0 莫耳當量)添加至化合物 **98** (3.0 莫耳當量)於 MeCN 中之溶液。攪拌 10 min 後，逐滴添加磷酸二苯甲酯(1.0 莫耳當量)於 MeCN 中之溶液。攪拌 2 小時後，將反應混合物在減壓下蒸發至乾燥且藉由層析純化以產生 **99**。

【0337】 將化合物 **99** (1.0 莫耳當量)於 TFA/DCM 中之溶液在室溫下攪拌 1 h 且然後在減壓下蒸發至乾燥以提供油狀 **100**。

【0338】 合成(2-(1-(喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)磷酸、(2-(1-(喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)磷酸及(2-(1-(異喹啉-1-基)六氫吡啶-4-基)乙基)磷酸之一般方法。

方法 A：

【0339】 將二異丙基乙胺(2 莫耳當量)添加至(2-(六氫吡啶-4-基)乙基)磷酸二甲酯 **95** 或(2-(六氫吡啶-4-基)乙基)磷酸二乙酯 **96** (1.1 莫耳當量)及 4-氯喹啉、

4-氯喹啉或 1-氯異喹啉(1 莫耳當量)於異丙醇(0.1 M 反應濃度)中之混合物。在 90°C 下攪拌 3 h 後，將反應混合物冷卻並蒸發至乾燥。矽膠純化(二氯甲烷中之 5% MeOH)提供膦酸二甲酯或膦酸二乙酯。向膦酸酯(1 莫耳當量)於氯仿或二氯甲烷(0.5 M 反應濃度)中之冷卻(0°C)溶液中添加三甲基溴矽烷(3 莫耳當量)。將反應混合物升溫至室溫且在 90 min 後，藉由添加甲醇淬滅。將混合物在減壓下蒸發至乾燥且然後於甲醇中溶劑合。將反應混合物濃縮至半體積，過濾以去除沈澱，且然後蒸發至乾燥。用二氯甲烷使殘餘物結晶，過濾並在減壓下乾燥以獲得呈溴化物鹽形式之期望膦酸。

方法 B：

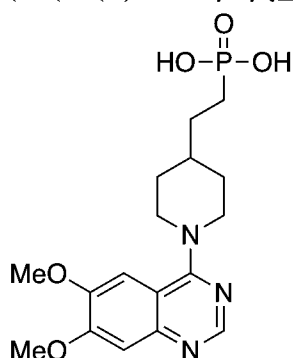
【0340】 將二異丙基乙胺(3 莫耳當量)添加至(2-(六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸二甲酯 **95** 或(2-(六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸二乙酯 **96** (1.1 莫耳當量)及 4-氯喹啉、4-氯喹啉或 1-氯異喹啉(1 莫耳當量)於二氯甲烷(0.1 M 反應濃度)中之混合物。在室溫下攪拌過夜後，藉由添加飽和 NH_4Cl 水溶液淬滅反應混合物。分離有機相且用水及鹽水洗滌，乾燥(Na_2SO_4)並在減壓下蒸發至乾燥。矽膠純化(二氯甲烷中之 5% MeOH)提供膦酸二甲酯或膦酸二乙酯。向膦酸二甲酯或膦酸二乙酯(7 莫耳當量)於乙腈(0.1 M 反應濃度)中之冷卻(0°C)溶液中添加三甲基溴矽烷(3 莫耳當量)。將反應混合物在 60°C 下攪拌 6 h，冷卻並在減壓下蒸發至乾燥且藉由添加飽和 NaHCO_3 水溶液淬滅粗殘餘物(直至觀察到 pH 8~9)。藉由製備型 HPLC (中性)純化粗殘餘物以獲得呈鈉鹽形式之膦酸。

方法 C：

【0341】 將二異丙基乙胺(3 莫耳當量)添加至(2-(六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸二苯甲酯 **100** (1.1 莫耳當量)及 4-氯喹啉、4-氯喹啉或 1-氯異喹啉(1 莫耳當量)於二氯甲烷(0.1 M 反應濃度)中之混合物。在室溫下攪拌過夜後，藉由添加飽和

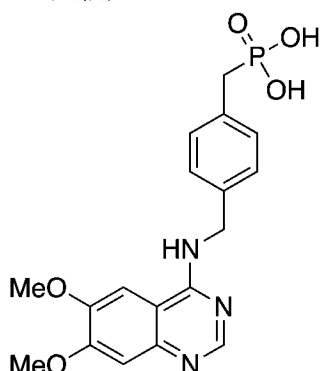
NH_4Cl 水溶液淬滅反應混合物。分離有機相且用水及鹽水洗滌，乾燥(Na_2SO_4)並在減壓下蒸發至乾燥。矽膠純化(二氯甲烷中之 5% MeOH)提供膦酸二苯甲酯。將膦酸二苯甲酯(1 莫耳當量)及 Pd/C 於 MeOH 中之混合物置於氫氣氛下且在室溫下攪拌 2 h。然後經由 Celite[®]過濾混合物並在減壓下蒸發至乾燥以獲得膦酸。

(2-(1-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸(或化合物 1)之製備



【0342】 根據方法 A 製備以獲得灰白色固體狀 **15** (2.1 g, 69%)。LCMS: $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z 381.8。 ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.77 (s, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.23 (s, 1H), 4.71 (d, $J = 13.1$ Hz, 2H), 3.99 (s, 3H), 3.97 (s, 3H), 3.48 (t, $J = 12.7$ Hz, 2H), 3.18 (s, 1H), 1.97-1.90 (m, 2H), 1.62-1.43 (m, 4H), 1.40-1.27 (m, 2H)。

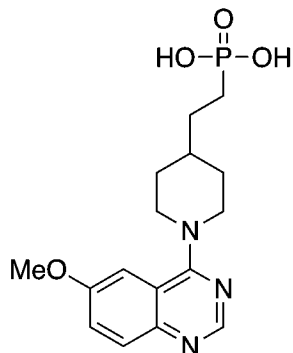
(4-(((6,7-二甲氧基喹啉-4-基)胺基)甲基)苯甲基)膦酸 24 (在本文表中亦稱為 5) 之製備



【0343】 根據方法 B 製備。藉由製備型 HPLC 分離出灰白色固體狀產物(9% 產率)。LCMS: $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z 390.15。 ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 8.12 (s, 1H), 7.22

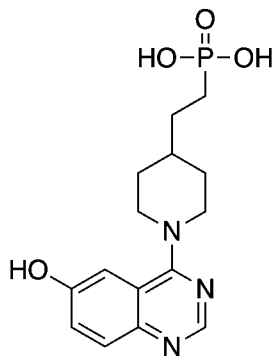
(s, 4H), 7.11 (s, 1H), 6.91 (s, 1H), 4.79 (s, 2H), 4.76 (s, 2H), 3.98 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 2.79 (s, 1H), 2.74 (s, 1H)

(2-(1-(6-甲氧基喹唑啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸 **25** 之製備



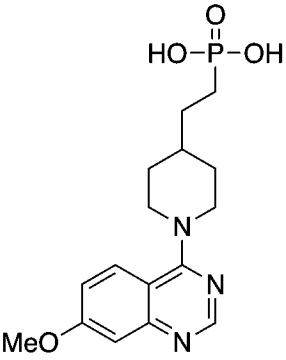
【0344】 根據方法 A 製備以獲得灰白色固體狀 **25** (50%產率)。LCMS: $[M + H]^+$ m/z 352.10。 ^1H NMR (400 MHz, 甲醇- d_4) δ 8.57 (s, 1H), 7.74-7.73 (m, 1H), 7.68-7.66 (m, 1H), 7.46 (d, 1H), 4.96 (br s, 2H), 3.98, (s, 3H), 3.57 (br s, 2H), 2.65 (s, 2H), 2.07-2.04 (m, 2H), 1.81 (m, 1H), 1.79-1.75 (m, 2H), 1.66-1.63 (m, 2H) 及 1.46-1.44 (m, 2H)。

(2-(1-(6-羥基喹唑啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸 **26** 之製備



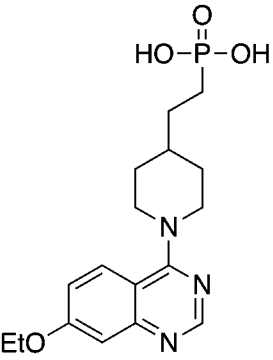
【0345】 根據方法 C 製備以獲得灰白色固體狀 **26** (7%產率)。LCMS: $[M + H]^+$ m/z 338.15。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.48 (s, 1H), 7.65 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.32 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.18 (s, 1H), 4.21-4.17 (m, 2H), 2.99-2.95 (m, 2H), 1.82-1.79 (m, 2H), 1.53-1.49 (m, 5H) 及 1.30-1.19 (m, 2H)。

(2-(1-(7-甲氧基喹唑啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸 **27** 之製備



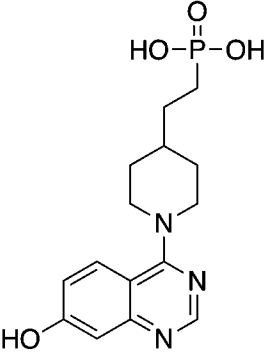
【0346】 根據方法 A 製備以獲得灰白色固體狀 **27** (95%產率)。LCMS: [M + H]⁺ *m/z* 352.0 ¹H NMR (500 MHz, 甲醇-*d*₄) δ 8.55 (s, 1H), 8.10 (d, *J* = 10 Hz, 1H), 7.30 (dd, *J* = 10 Hz 及 5 Hz, 1H), 7.10 (d, *J* = 5 Hz, 1H), 4.01 (s, 3H), 3.57-3.48 (m, 2H), 2.65 (s, 1H), 2.05-2.02 (m, 2H), 1.94-1.90 (m, 1H), 1.80-1.74 (m, 2H), 1.65-1.60 (m, 2H)及 1.46-1.41 (m, 2H)。

【0347】 (2-(1-(7-乙氧基喹唑啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸 **28** 之製備。



【0348】 根據方法 B 製備以獲得灰白色固體狀 **28**。

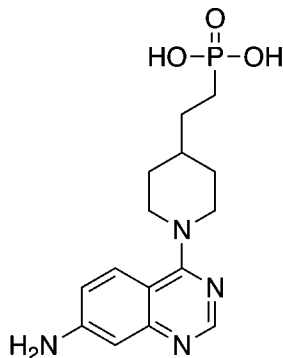
(2-(1-(7-羥基喹唑啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸 **29** 之製備



【0349】 根據方法 B 製備以獲得淡黃色固體狀 **29** (4%產率)。LCMS: [M + H]⁺ *m/z* 338.25。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.49 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 7.96 (d, *J* =

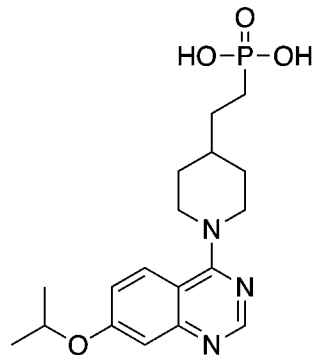
9.2 Hz, 1H), 7.10 (dd, $J = 9.2$ 及 2.2 Hz, 1H), 7.00 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 4.62 (br s, 2H), 3.38 (br s, 2H), 1.87 (d, $J = 12.7$ Hz, 2H), 1.72 (br s, 1H), 1.58-1.38 (m, 4H) 及 1.28-1.22 (m, 2H)。

(2-(1-(7-胺基喹唑啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸 **30** 之製備



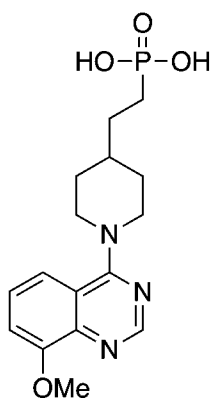
【0350】 根據方法 C 製備以獲得淺黃色固體狀 **30** (32%產率)。LCMS: $[M + H]^+$ m/z 337.10。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.35 (s, 1H), 7.62 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.81 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.61 (br s, 1H), 6.30 (br s, 2H), 4.26-4.20 (m, 2H), 3.10-2.90 (m, 2H), 1.79-1.76 (m, 2H), 1.60-1.30 (m, 5H) 及 1.25-1.20 (m, 2H)。

(2-(1-(7-異丙氧基喹唑啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸 **31** 之製備

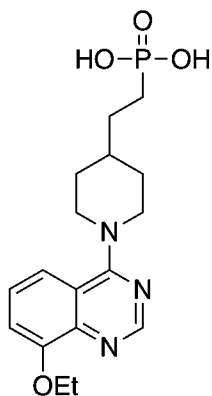


【0351】 根據方法 B 製備以獲得淺黃色固體狀 **31**。LCMS: $[M + H]^+$ m/z 337.10。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.35 (s, 1H), 7.62 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.81 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 6.66 (s, 1H), 6.30 (br s, 2H), 4.25-4.21 (m, 2H), 3.08-2.96 (m, 2H), 1.81-1.75 (m, 2H), 1.65-1.31 (m, 5H) 及 1.27-1.18 (m, 2H)。

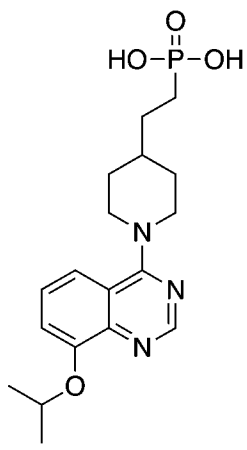
(2-(1-(8-甲氧基喹唑啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸 **32** 之製備



【0352】 根據方法 B 製備以獲得灰白色固體狀 **32** (32%產率)。LCMS: $[M + H]^+$ m/z 352.15。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.92 (s, 1H), 6.92-6.88 (m, 1H), 6.80 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.71 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 3.76-3.70 (m, 2H), 3.71 (s, 3H), 2.72 (t, $J = 12$ Hz, 2H), 1.64 (d, $J = 12$ Hz, 2H), 1.51-1.28 (m, 5H)及 1.02-0.94 (m, 2H)。
(2-(1-(8-乙氧基喹唑啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸 **33** (在本文表中亦稱為 226)之製備

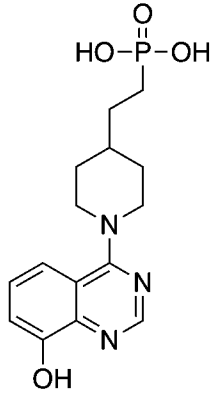


【0353】 根據方法 B 製備以獲得白色固體狀 **33**。LCMS: $[M + H]^+$ m/z 366.20。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ^1H NMR (400 MHz, D $_2$ O) δ 8.17 (s, 1H), 7.21-7.09 (m, 2H), 4.13-3.98 (m, 4H), 2.97 (t, $J = 12.4$ Hz, 2H), 1.82 (d, $J = 13.0$ Hz, 2H), 1.56-1.35 (m, 8H), 1.26 (q, $J = 11.4$ Hz, 2H)。
(2-(1-(8-異丙氧基喹唑啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸 **34** (在表 3a 中)之製備



【0354】 根據方法 B 製備以獲得灰白色固體狀 **34** (43%產率)。LCMS: [M + H]⁺ *m/z* ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 8.10 (s, 1H), 7.11 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.03 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 3.94 (d, *J* = 13.0 Hz, 2H), 2.86 (t, *J* = 12.6 Hz, 2H), 1.67 (d, *J* = 13.1 Hz, 2H), 1.40-1.07 (m, 13H)。

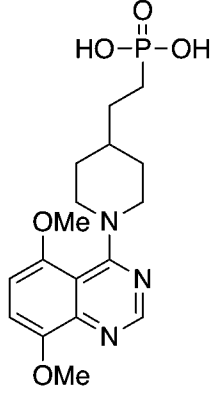
(2-(1-(8-羥基喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸 **36** (在表 3a 中)之製備



【0355】 根據方法 B 製備以獲得灰白色固體狀 **35**。

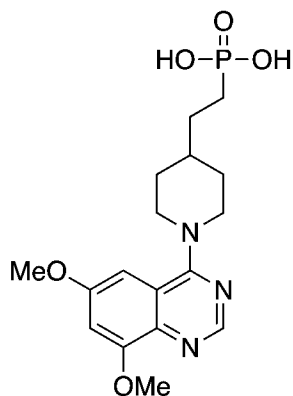
LCMS: [M + H]⁺ *m/z* ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ¹H NMR (400 MHz, D₂O)

(2-(1-(5,8-二甲氧基喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸 **36** 之製備



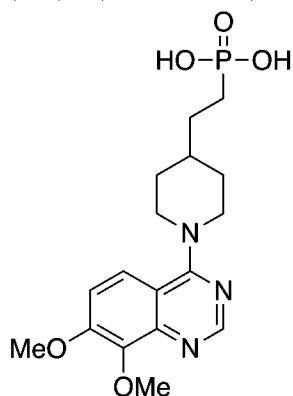
【0356】 根據方法 B 製備以獲得灰白色固體狀 **36**。LCMS: $[M + H]^+$ m/z 382.15。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.47 (s, 1H), 7.54 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.15 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 3.95 (d, $J = 12.0$ Hz, 8H), 1.82 (s, 2H), 1.67 (s, 1H), 1.59-1.30 (m, 6H), 1.21 (s, 2H)。

(2-(1-(6,8-二甲氧基喹唑啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸 **37** 之製備



【0357】 根據方法 C 製備以獲得灰白色固體狀 **37** (15%產率)。LCMS: $[M + H]^+$ m/z 382.15 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.54 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.86-6.82 (m, 1H), 4.50 (d, $J = 12.4$ Hz, 1H), 4.27 (m, 1H), 3.85 (m, 6H), 3.74 (m, 2H), 3.27 (m, 2H), 1.88-1.85 (m, 2H), 1.66 (m, 1H), 1.54-1.48 (m, 4H) 及 1.29 (m, 2H)。

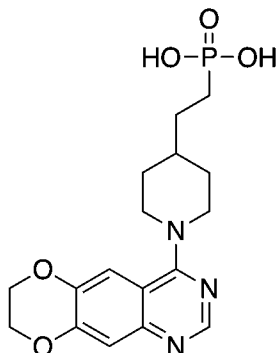
(2-(1-(7,8-二甲氧基喹唑啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸 **38** 之製備



【0358】 根據方法 C 製備以獲得灰白色固體狀 **38** (16%產率)。LCMS: $[M + H]^+$ m/z 382.15 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.60 (s, 1H), 7.90 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 7.49 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 4.69 (m, 2H), 4.02 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.46 (m, 2H),

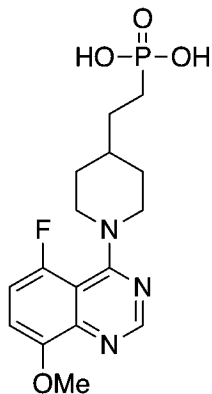
1.90 (d, $J = 12.8$ Hz, 2H), 1.75 (m, 1H), 1.53-1.49 (m, 4 H)及 1.31-1.28 (m, 2H)。

(2-(1-(7,8-二氫-[1,4]二氧雜芑并[2,3-*g*]喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸 **39**
(在表 3a 中)之製備



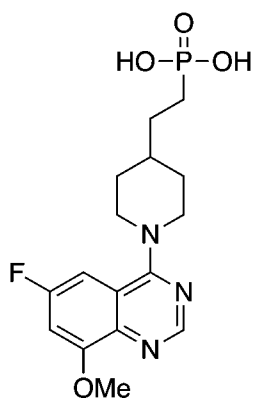
【0359】 根據方法 C 製備以獲得 **39** (7%產率)灰白色固體狀。LCMS: $[M + H]^+$ m/z 380.15。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.64 (s, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.19 (s, 1H), 4.56 (d, $J = 11.8$ Hz, 2H), 4.45 (d, $J = 3.0$ Hz, 2H), 4.38 (d, $J = 3.3$ Hz, 2H), 3.39 (s, 1H), 3.33 (s, 1H), 1.87 (d, $J = 12.2$ Hz, 2H), 1.71 (s, 1H), 1.58-1.38 (m, 4H), 1.26 (d, $J = 10.2$ Hz, 2H)。

(2-(1-(5-氟-8-甲氧基喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸 **40** (在表 3a 中)之製備



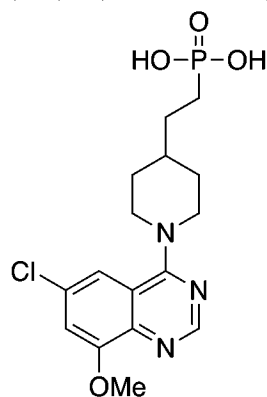
【0360】 根據方法 C 製備以獲得淺黃色固體狀 **40** (7%產率)。LCMS: $[M + H]^+$ m/z 370.10。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.55 (s, 1H), 7.44-7.38 (m, 2H), 4.28-4.23 (m, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.28-3.18 (m, 2H), 1.82-1.78 (m, 2H), 1.70-1.66 (m, 1H), 1.49-1.23 (m, 4H)及 1.26-1.09 (m, 2H)。

(2-(1-(6-氟-8-甲氧基喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸 **41** (在表 3a 中)之製備



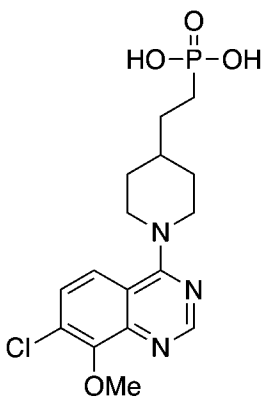
【0361】 根據方法 B 製備以獲得白色固體狀 **41** (44%產率)。LCMS: $[M + H]^+$ m/z 366.15。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.02 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.21 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.04 (s, 1H), 3.93 (s, 3H), 2.49 (s, 3H), 1.91-1.88 (m, 2 H), 1.74(m, 1 H), 1.53-1.49(m, 5 H)及 1.29-1.27 (m, 3 H)。

(2-(1-(6-氯-8-甲氧基喹唑啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸 **42** (在表 3a 中)之製備



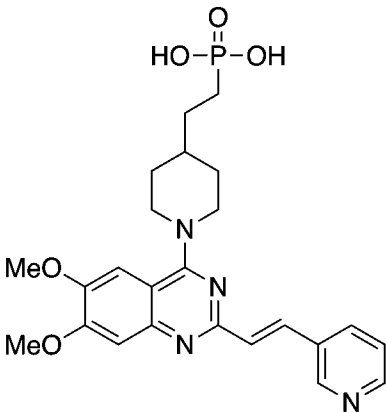
【0362】 根據方法 B 製備以獲得淺黃色固體狀 **42** (42%產率)。LCMS: $[M + H]^+$ m/z 386.10。 ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 8.03 (s, 1H), 6.91-6.88 (m, 2H), 3.92-3.89 (m, 2H), 3.77 (s, 3H), 2.93-2.87 (m, 2H), 1.70-1.67 (m, 2H)及 1.41-1.12 (m, 7H)。

(2-(1-(7-氯-8-甲氧基喹唑啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸 **43** (在表 3a 中)之製備



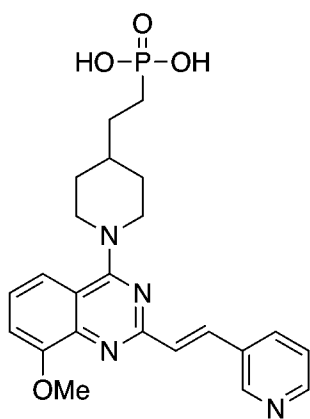
【0363】 根據方法 B 製備以獲得白色固體狀 **43** (50%產率)。LCMS: $[M + H]^+$ m/z 386.05。 ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 8.07 (s, 1H), 7.10-7.06 (m, 2H), 3.95-3.91 (m, 2H), 3.71 (s, 3H), 2.96-2.90 (m, 2H), 1.71-1.68 (m, 2H) 及 1.42-1.01 (m, 7H)。

羧基-次磷酸 2-[1-[6,7-二甲氧基-2-[(*E*)-2-(3-吡啶基)乙烯基]喹唑啉-4-基]-4-六氢吡啶基]乙酯 44 之製備



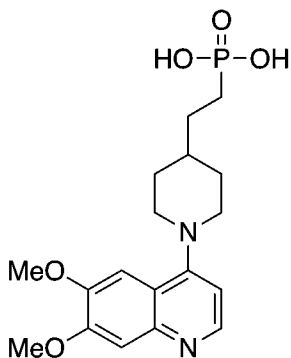
【0364】 根據方法 B 製備以獲得淺黃色固體狀 **44** (49%產率)。LCMS: $[M + H]^+$ m/z 485.25。 ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 8.09 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.36 (d, $J = 8$ Hz, 1H), 7.06 (s, 1H), 6.74 (d, $J = 16.8$ Hz 1H), 6.58 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 6.40 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 6.24 (d, $J = 16.8$ Hz, 1H), 3.94-3.91 (m, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.67 (s, 3H), 2.96-2.90 (m, 2H), 1.96-1.93 (m, 2H) 及 1.56-1.32 (m, 7H)。

(*E*)-(2-(1-(8-甲氧基-2-(2-(吡啶-3-基)乙烯基)喹唑啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)膦
酸 45 之製備



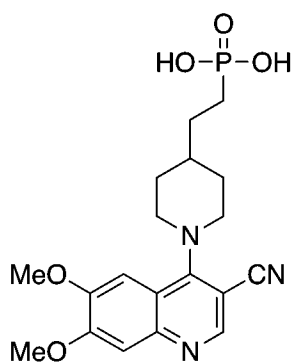
【0365】 根據方法 B 製備以獲得黃色固體狀 **45** (79%產率)。LCMS: $[M + H]^+$ m/z 455.20。 ^1H NMR (400 MHz, 甲醇- d_4) δ 9.07 (br s, 1H), 8.70 (br s, 1H), 8.62-8.60 (m, 1H), 8.31 (d, 1H), 7.89-7.88 (m, 1H), 7.70-7.54 (m, 4H), 5.20-5.00 (m, 2H) 4.13 (s, 3H), 3.58-3.50 (m, 2H), 2.07-2.02 (m, 2H), 1.88-1.82 (m, 1H), 1.78-1.64 (m, 4H) 及 1.51-1.46 (m, 2H)。

【0366】 (2-(1-(6,7-二甲氧基喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸 **46** 之製備



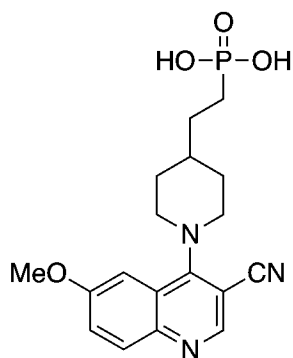
【0367】 根據方法 C 製備以獲得白色固體狀 **46** (22%產率)。LCMS: $[M + H]^+$ m/z 381.30。 ^1H NMR (400 MHz, 甲醇- d_4) δ 8.35 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 7.29-7.27 (m, 2H), 7.11 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 4.27-4.23 (m, 2H), 4.03 (s, 3H), 4.02 (s, 3H), 3.40-3.32 (m, 2H), 2.06-2.03 (m, 4H) 1.82-1.79 (m, 3H) 及 1.62-1.48 (m, 2H)。

(2-(1-(3-氰基-6,7-二甲氧基喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸 **47** (在表 2 中亦稱為 **42**)之製備



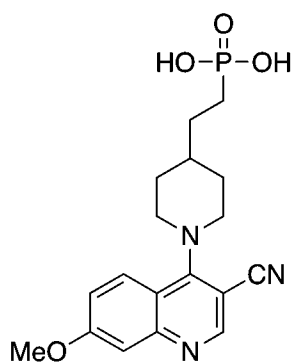
【0368】 根據方法 B 製備以獲得灰白色固體狀 **47** (47%產率)。LCMS: $[M + H]^+$ m/z 406.20。 ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 8.00 (s, 1H), 6.62 (s, 1H), 6.40 (s, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 3.18 (d, $J = 12.3$ Hz, 2H), 2.94 (t, $J = 12.2$ Hz, 2H), 1.72 (d, $J = 12.7$ Hz, 2H), 1.43-1.30 (m, 6H), 1.17-1.04 (m, 2H)。

【0369】 (2-(1-(3-氰基-6-甲氧基喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸 **48** (在表 2 中亦稱為 **44**)之製備



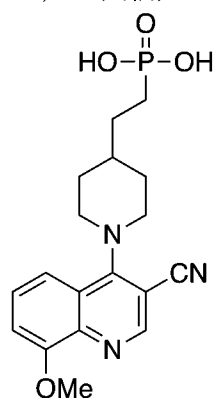
【0370】 根據方法 B 製備以獲得灰白色固體狀 **48** (16%產率)。LCMS: $[M + H]^+$ m/z 376.20。 ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 8.15 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.18 (s, 1H), 6.88 (s, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.60-3.51 (m, 2H), 3.15-3.08 (m, 2H), 1.81-1.74 (m, 2H)及 1.41-1.15 (m, 7H)。

(2-(1-(3-氰基-7-甲氧基喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸 **49** (在表 2 中亦稱為 **43**)之製備



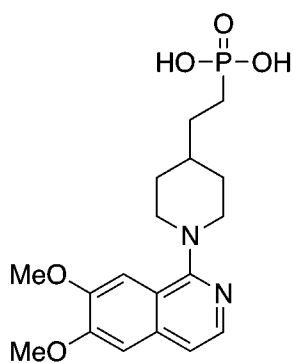
【0371】 根據方法 B 製備以獲得灰白色固體狀 **49** (23%產率)。LCMS: $[M + H]^+$ m/z 376.20。 ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 7.94 (s, 1H), 7.39 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H), 6.84-6.64 (m, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.59 (d, $J = 12.4$ Hz, 2H), 3.22 (t, $J = 12$ Hz, 2H), 1.89 (d, $J = 12.8$ Hz, 2H), 1.62-1.45 (m, 5H)及 1.33-1.25 (m, 2H)。

(2-(1-(3-氰基-8-甲氧基喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸 **50** (在表 1 中亦稱為 45)之製備



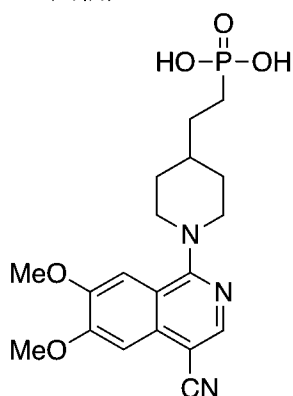
【0372】 根據方法 B 製備以獲得灰白色固體狀 **50**。LCMS: $[M + H]^+$ m/z 376.20。 ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 8.03 (s, 1H), 7.27-7.23 (m, 1H), 7.11-7.09 (m, 1H), 7.04-7.02 (m, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.43 (br d, $J = 12.4$ Hz, 2H), 3.06 (br t, $J = 12$ Hz, 2H), 1.80 (br d, $J = 12.8$ Hz, 2H), 1.50-1.47 (m, 5H)及 1.31-1.24 (m, 2H)。

(2-(1-(6,7-二甲氧基異喹啉-1-基)六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸 **51** 之製備



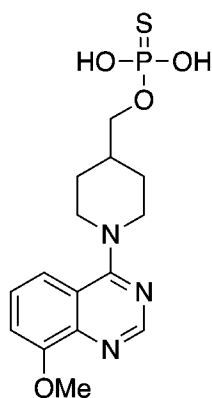
【0373】 根據方法 B 製備以獲得灰白色固體狀 **51** (30%產率)。LCMS: $[M + H]^+$ m/z 381.10。 ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ ^1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ 7.79 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 7.51-7.44 (m, 2H), 7.31 (s, 1H), 3.96 (d, $J = 4.8$ Hz, 6H), 3.23 (m, 4H), 1.88 (m, 2H), 1.55 (m, 2H), 1.48 (m, 1H) 及 1.45 (m, 4 H)。

(2-(1-(4-氰基-6,7-二甲氧基異喹啉-1-基)六氫吡啶-4-基)乙基)膦酸 **52** (在表 3a 中) 之製備



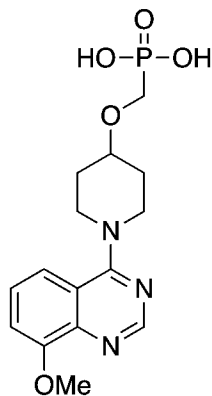
【0374】 根據方法 B 製備以獲得灰白色固體狀 **52** (50%產率)。LCMS: $[M + H]^+$ m/z ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ

O,O-硫代磷酸二氫 *O*-((1-(8-甲氧基喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)甲基)酯 **53** (在表 3a 中) 之製備



【0375】 在 -15°C 下向(1-(8-甲氧基喹唑啉-4-基)六氫吡啶-4-基)甲醇(使用與化合物 **80** 相同之方法製備) (500 mg, 1.83 mmol)於吡啶(5 mL)中之溶液中逐滴添加三氯硫磷(1.6 g, 9.45 mmol)。在 0°C 下攪拌 1 h 後，在 0°C 下將反應混合物添加至碳酸氫鈉(923 mg, 10.98 mmol)於水(20 mL)中之溶液。將所得混合物在 0°C 下攪拌 2 h 且然後在減壓下蒸發至乾燥。純化(製備型 HPLC)獲得白色固體狀 **53** (83 mg, 12%)。LCMS: $[\text{M} + \text{H}]^{+}$ m/z 354.10 ^1H NMR (400 MHz, , DMSO- d_6) δ 8.59 (s, 1H), 7.59-7.50 (m, 2H), 7.45 (dd, $J = 6.5, 2.4$ Hz, 1H), 4.53 (d, $J = 12.7$ Hz, 2H), 3.97 (s, 3H), 3.80-3.74 (m, 4H), 2.03 (s, 1H), 1.86 (d, $J = 13.5$ Hz, 2H), 1.41 (q, $J = 11.8$ Hz, 2H)。

((1-(8-甲氧基喹唑啉-4-基)六氫吡啶-4-基)氧基)甲基)膦酸 **54** (在表 3a 中)之製備

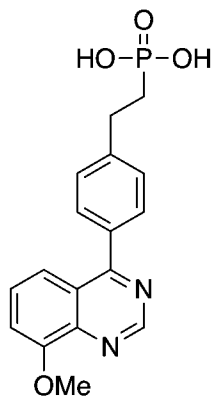


【0376】 使用與化合物 **10** 及 **11** 相同之方法製備。純化(製備型 HPLC 0.1% TFA)混合物以獲得灰白色固體狀 **54**。

【0377】 LCMS: $[\text{M} + \text{H}]^{+}$ m/z 353.3。 ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 8.40 (s, 1H),

7.54 (s, 2H), 7.40 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 4.37 (s, 3H), 4.01-3.88 (m, 9H), 3.71 (d, $J = 9.3$ Hz, 4H), 3.63 (s, 1H), 2.11 (s, 2H), 1.81 (s, 2H)。

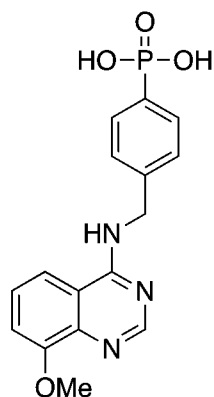
(4-(8-甲氧基喹啉-4-基)苯乙基)膦酸 **55** (在表 3a 中)之製備



【0378】 使用與白色固體狀化合物 **20** 相同之方法製備。

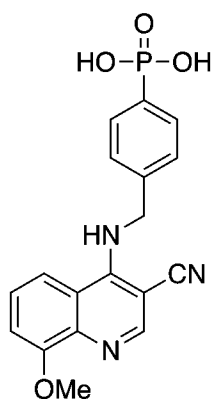
LCMS: $[M + H]^+$ m/z 345.10。 ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ

(4-(((8-甲氧基喹啉-4-基)胺基)甲基)苯基)膦酸 **56** 之製備



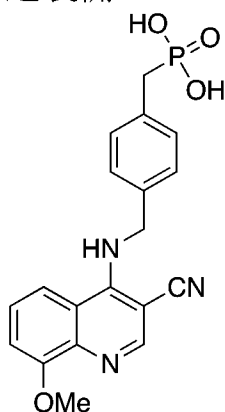
【0379】 根據與化合物 **23** 相同之方法製備。LCMS: $[M + H]^+$ m/z 346.10。 ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 8.20 (s, 1H), 7.62-7.57 (m, 2H), 7.43-7.41 (m, 2H), 7.31-7.28 (m, 2H), 7.23-7.21 (m, 1H)及 2.93 (s, 3H)。

(4-(((3-氰基-8-甲氧基喹啉-4-基)胺基)甲基)苯基)膦酸 **57** (在表 1 中亦稱為 **52**)之製備



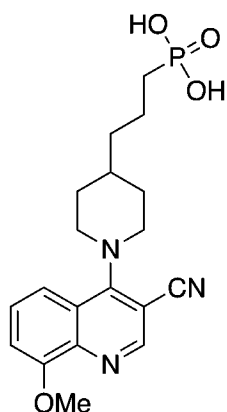
【0380】 根據與化合物 **23** 相同之方法製備以獲得灰白色固體狀 **57**。LCMS: $[M + H]^+$ m/z 370.10。 ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 8.02 (s, 1H), 7.48-7.43 (m, 2H), 7.36-7.30 (m, 2H), 7.15-7.09 (m, 3H), 4.77 (s, 2H) 及 3.81 (s, 3H)。

(4-(((3-氰基-8-甲氧基喹啉-4-基)胺基)甲基)苯甲基)膦酸 **58** (在表 2 中亦稱為 211) 之製備



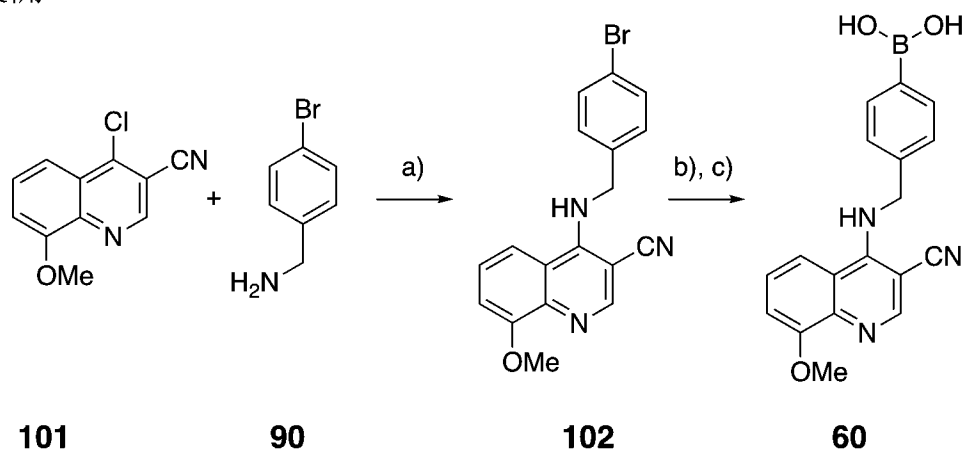
【0381】 根據與化合物 **23** 相同之方法製備以獲得白色固體狀 **58**。LCMS: $[M + H]^+$ m/z 384.15。 ^1H NMR (400 MHz, 甲醇- d_4) δ 8.32 (s, 1H), 7.77 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.50 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.35-7.33 (m, 2H), 7.26 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.20 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 5.02 (s, 2H), 3.99 (s, 3H) 及 2.85 (d, $J = 20$ Hz, 2H)。

(3-(1-(3-氰基-8-甲氧基喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)丙基)膦酸 **59** (在表 2 中亦稱為 210) 之製備



【0382】 根據與化合物 **14** 相同之方法製備以獲得白色固體狀 **59**。LCMS: $[M + H]^+$ m/z 390.20。 ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 8.30 (s, 1H), 7.39 (br s, 2H), 7.19 (br s, 1H), 3.98 (s, 3H), 3.73-3.70 (m, 2H), 3.30 (t, $J = 12$ Hz, 2H), 1.92-1.88 (m, 2H), 1.70-1.45 (m, 3H) 及 1.40-1.27 (m, 6H)。

(4-(((3-氰基-8-甲氧基喹啉-4-基)胺基)甲基)苯基)硼酸 **60** (在表 2 中亦稱為 **214**) 之製備

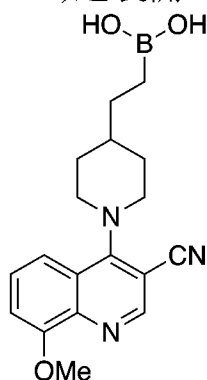


a) Et_3N , $CH_3OCH_2CH_2OH$; b) $PdCl_2(dppf)$, $KOAc$, B_2Pin_2 , $DMSO$, $80^\circ C$; c) HCl , $EtOAc$

【0383】 向化合物 **101** (0.97 g, 5.0 mmol) 於 2-甲氧基乙醇 (10 mL) 中之溶液中添加 (4-溴苯基) 甲胺 **90** (1.74 g, 10.0 mmol) 及 Et_3N (1.51 g, 15 mmol)。將混合物在 $100^\circ C$ 下加熱過夜，冷卻至 rt 且然後在減壓下蒸發至乾燥。層析 (石油醚中之 35% $EtOAc$) 獲得白色固體狀 **102** (1.5 g, 88%)。向化合物 **102** (69 mg, 0.2 mmol) 於 $DMSO$ (3 mL) 中之溶液中添加雙(頻哪醇)二硼 (61.0 mg, 0.24 mmol)、乙酸鉀 (58.8 mg, 3.0 mmol)、 $Pd(dppf)Cl_2$ (7.4 mg, 0.05 mmol)。藉由用氮吹掃將反應物脫氣且然後在

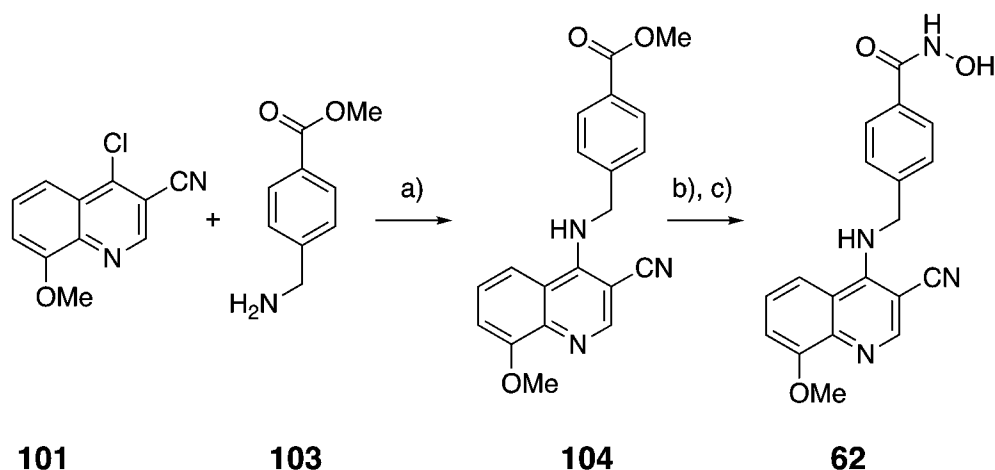
80°C下加熱 48 h。將混合物冷卻至 rt，並用乙酸乙酯稀釋且然後經由 Celite® 墊過濾。在減壓下將濾液蒸發至乾燥。將殘餘物溶解於 EtOAc (10 mL) 中且添加 HCl (4M, 0.2 mL, 4.0 mmol) 於 EtOAc 中之溶液。將混合物在 rt 下攪拌過夜且然後在減壓下蒸發至乾燥。層析[製備型 HPLC (TFA)]獲得白色固體狀 **60** (40.5 mg, 65%，經兩步)。LCMS: $[M + H]^+$ m/z 334.15。 ^1H NMR (400 MHz, 甲醇- d_4) δ 8.69 (s, 1H), 7.90 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.73 (t, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.61 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.41 (dd, $J = 17.3, 7.8$ Hz, 2H), 5.05 (s, 2H), 4.13 (s, 3H)。

(2-(1-(3-氰基-8-甲氧基喹啉-4-基)六氫吡啶-4-基)乙基)硼酸 **61** (在表 2 中亦稱為 216)之製備



【0384】 遵循與化合物 **7** 相同之程序製備。分離出黃色固體狀化合物 **61**。LCMS: $[M + H]^+$ m/z 340.20。 ^1H NMR (400 MHz, 甲醇- d_4) δ 8.81 (s, 1H), 7.83 (d, $J = 12$ Hz, 1H), 7.72 (t, $J = 8$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J = 8$ Hz, 1H), 4.51 (d, $J = 12$ Hz, 2H), 3.81 (t, $J = 12$ Hz, 2H), 3.31 (s, 3H), 2.66 (s, 1H)。2.05 (br d, $J = 12$ Hz, 2H), 1.72-1.30 (m, 4H) 及 0.91-0.85 (m, 2H)。

4-(((3-氰基-8-甲氧基喹啉-4-基)胺基)甲基)-*N*-羥基苯甲醯胺 **62** (在表 2 中亦稱為 220)之製備



a) $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$; b) NaOH , $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$; c) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, BOP , DIPEA , THF

【0385】 將 **101** (2.0 g, 8.9 mmol) 及 **103** (1.5 g 8.9 mmol) 於 2-甲氧基乙醇(40 mL)中之溶液加熱至回流過夜且然後冷卻至 rt。將反應混合物在減壓下蒸發至乾燥且然後用 EtOAc 研磨，過濾並乾燥以獲得淺黃色固體狀粗化合物 **104** (1.7 g)。

【0386】 向化合物 **104** (0.5 g, 1.55 mmol) 於 THF (20 mL) 中之溶液中添加 NaOH (0.17 g, 4.65 mmol，溶解於 2 mL 水中)。將混合物加熱至 45°C 過夜。在減壓下濃縮冷卻溶液且用 HCl 水溶液(2N)處理殘餘物直至實現 pH 5.5。將所得沈澱過濾並乾燥以獲得淺黃色固體狀粗酸中間體(0.3 g, 62%產率)。將粗酸溶解於 DMF (10 mL) 中且然後冷卻至 0°C 並置於氮下。添加 BOP (0.48 g, 1.06 mmol) 及 DIPEA (0.50 g, 3.88 mmol)，然後添加 $\text{HONH}_2\cdot\text{HCl}$ (0.09 g, 1.26 mmol)。將混合物在 rt 下攪拌過夜，用水(50 mL)淬滅並用 EtOAc 萃取。用水及鹽水洗滌有機相且乾燥(Na_2SO_3)並在減壓下蒸發至乾燥。層析(CH_2Cl_2 中之 5% MeOH)且然後製備型 HPLC (H^+ , 0.1% TFA)獲得灰白色固體狀 **62** (34 mg, 10%)。LCMS: $[\text{M} + \text{H}]^+$ ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 11.19 (s, 1H), 9.06 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 8.45 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.72 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.39 (dd, $J = 4.6, 2.9$ Hz, 2H), 7.29 (dd, $J = 12.3, 5.0$ Hz, 2H), 5.11 (s, 2H), 3.93 (s, 3H)。

實例 2：評價化合物活性

【0387】 製備表 1-3 之所選化合物及其他衍生物，並在 ENPP1 活性分析中使

第 145 頁(發明說明書)

用胸苷單磷酸對硝基苯酚(TMP-pNP)作為受質評價。在室溫下在 100 mM Tris、150 mM NaCl、2mM CaCl₂、200 μM ZnCl₂ (pH 7.5)中用 TMP-pNP (2 μM)、ENPP1 抑制劑之 5 倍稀釋液及純化之重組小鼠 ENPP1 (0.5 nM)製備酶反應物。藉由量測由反應 20 分鐘產生之 400 nm 對硝基苯酚鹽之吸光度來監測反應進展。可使用 Graphpad Prism 7.03 提取、繪製並擬合產物形成之斜率以獲得 IC₅₀ 值。

【0388】 亦在 ENPP1 酶活性分析中使用 cGAMP 作為受質來評價化合物。可用於評價標的化合物之方法包括 Li 等人於 2018 年 9 月 7 日提出申請之 PCT 申請案第 PCT/US2018/050018 號中描述之彼等方法。下文闡述了例示性方法。

材料：

【0389】 小鼠 ENPP1：根據 Kato 等人，PNAS (2012) 109(42):16876-8 進行表現及純化。cGAMP：根據 Li 等人，Nat. Chem. Biol. (2014) 10:1043-8 進行合成及純化。聚磷酸鹽:AMP 磷酸基轉移酶(PAP)：將 PAP 基因(GenBank: AB092983.1) 合成(Integrated DNA Technologies)並選殖至具有 His-SUMO C 末端標籤之 pTB146 載體中。使經質體轉型之 BL21(DE3)細胞生長並在在 16°C 用 0.75 mM IPTG 以 OD₆₀₀ = 1 誘導過夜。將細胞重懸浮於含有 50 mM Tris pH 7.5、400 mM NaCl、10 mM 咪唑、2 mM DTT、蛋白酶抑制劑(Roche)之緩衝液中並用兩個冷凍-解凍循環及音波處理來溶解。在 4°C 下實施所有後續步驟。藉由在 40,000 rcf 下離心 1 小時使溶解物澄清並將上清液與 HisPur 鈷樹脂(Thermo Fisher Scientific) 一起培育 2 小時。用 30 mL 含有 50 mM Tris pH 7.5、150 mM NaCl 之緩衝液將樹脂洗滌兩次且用 50 mM Tris pH 7.5、150 mM NaCl、600 mM 咪唑溶析蛋白質。實施陰離子交換層析(HiTrap Q HP)。肌激酶(MilliporeSigma)。CellTiterGlo (Promega)

ENPP1 酶活性分析之例示性程序：

【0390】 將 3 nM 小鼠 ENPP1 與 5 uM cGAMP 及化合物於含有 50 mM Tris pH 7.6、250 nM NaCl、500 uM CaCl₂ 及 1 uM ZnCl₂ 之緩衝液中之 5 倍連續稀釋液(總反應體積= 10 μL)在室溫下一起培育 3 小時，然後將反應物在 95°C下熱不活化 10 分鐘。AMP 降解產物轉化成 ATP，使用螢光素酶偵測 ATP。為達成此，根據 Goueli 等人，EP2771480 製備聚磷酸鹽:AMP 磷酸基轉移酶(PAP)及肌激酶之酶混合物。簡言之，將 PAP 於含有 50 mM Tris pH 7.5、0.1% NP-40 之緩衝液中稀釋至 2 mg/mL。將肌激酶於含有 3.2 mM 硫酸銨 pH 6.0、1 mM EDTA 及 4 mM 聚磷酸鹽之緩衝液中稀釋至 2 KU/mL。將熱不活化 ENPP1 反應物與 PAP (0.01 μg/μL)及肌激酶(0.0075 U/μL)於含有 40 mM Tris pH 7.5、0.05 mg/mL Prionex、5 mM MgCl₂、20 μM 聚磷酸鹽及 0.15 g/L 酚紅(便於移液)之緩衝液中一起培育 3 小時(總反應體積= 20 μL)。根據製造商之方案將 CellTiterGlo (20 uL)添加至反應並量測螢光。將數據正規化至 100%酶活性(無化合物)及 0%酶活性(無酶)，然後擬合至函數 $100 / (1 + ([\text{化合物}] / \text{IC}_{50}))$ 。

【0391】 IC₅₀ 值在由字母 A-C 指示之範圍內，其中 A 代表小於 50 nM 之 IC₅₀ 值，B 代表介於 50 nM 與 100 nM 之間之 IC₅₀ 值，且 C 代表大於 100 nM 之 IC₅₀ 值。

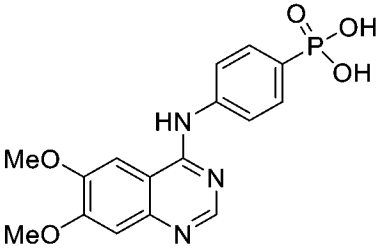
表 4：ENPP1 酶活性。IC₅₀ 值：A (<50 nM)；B (50 nM - 100 nM)；C (> 100 nM)。

化合物編號

結構

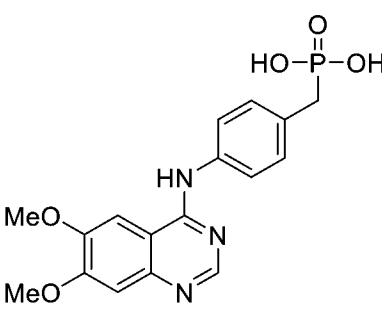
IC₅₀

2



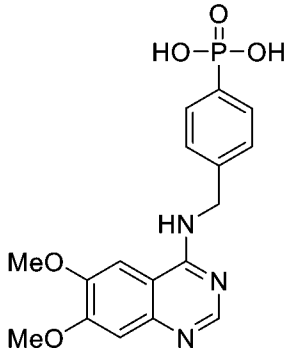
C

3



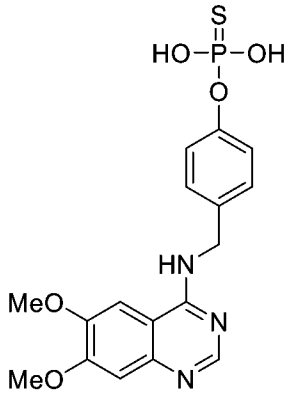
B

4



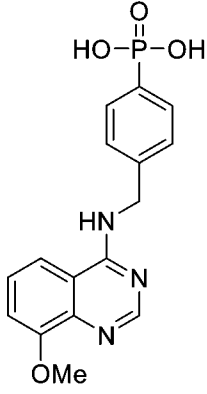
A

7



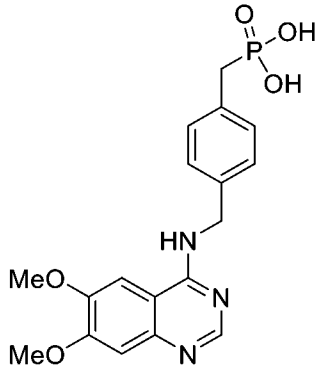
B

36



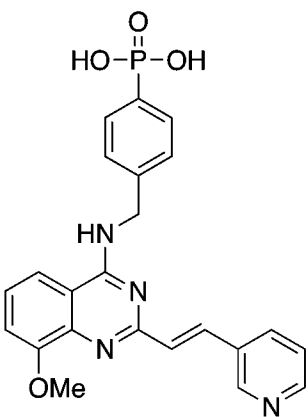
A

5



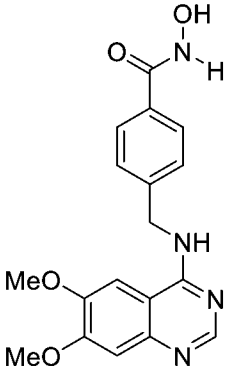
A

53



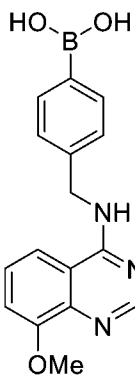
A

101



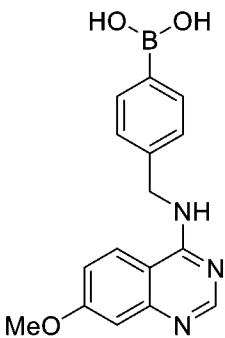
C

102



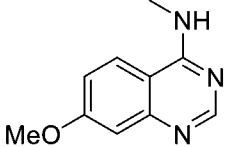
A

103



C

104



C

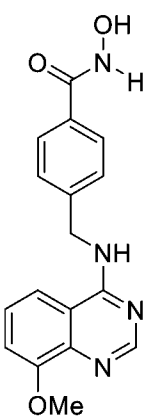
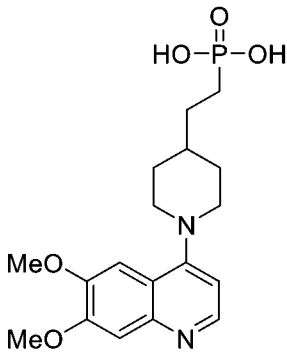


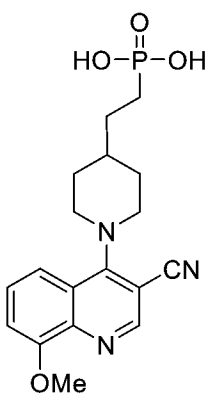
表 2 化合物

201



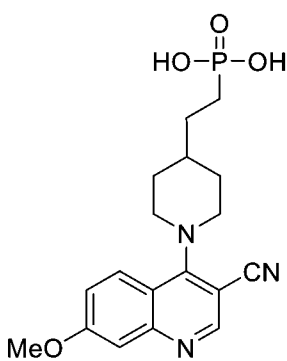
C

45



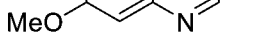
A

43



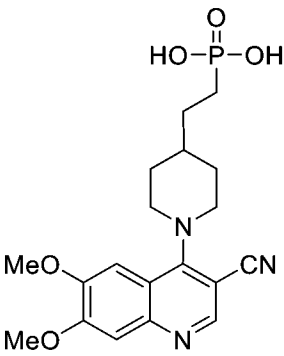
A

42



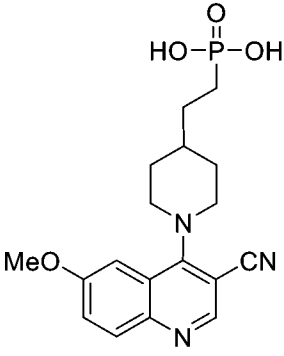
A

44



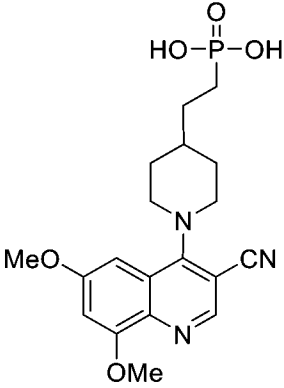
B

46



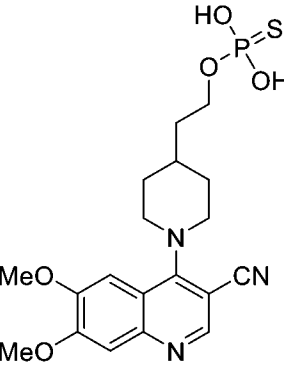
C

202



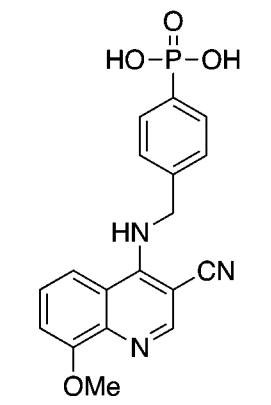
B

52



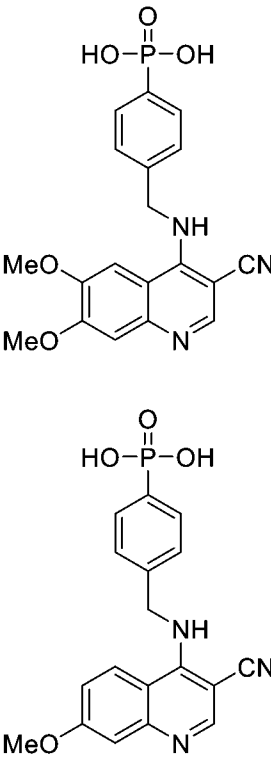
A

203



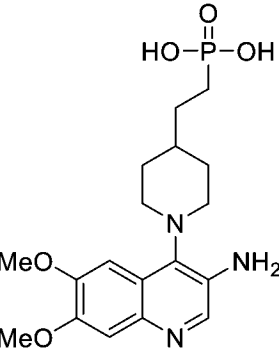
A

204



A

205

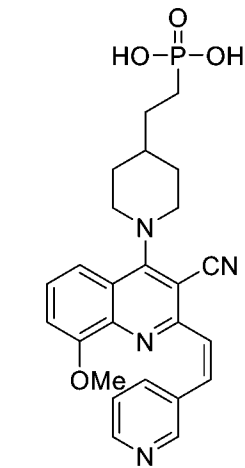


A

206

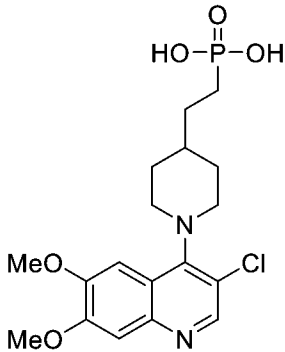
C

207



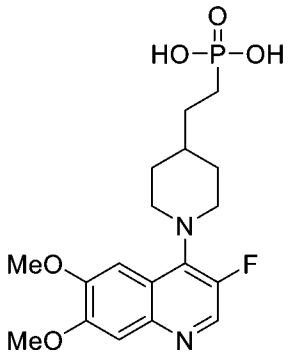
C

208



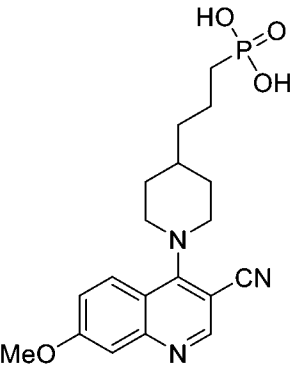
C

209



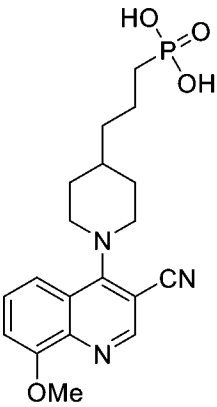
A

210



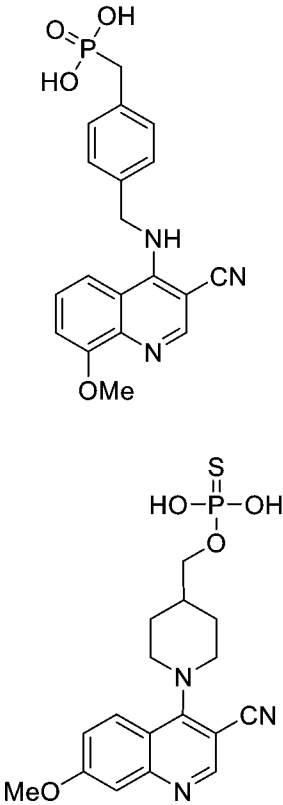
A

211



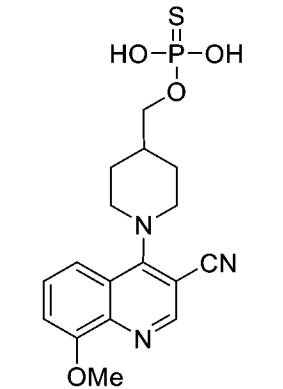
A

48



C

50

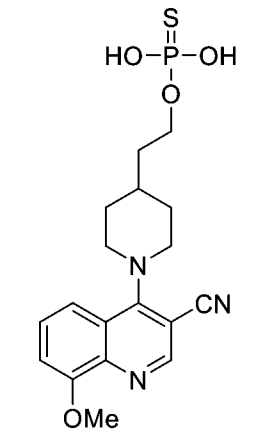


C

212

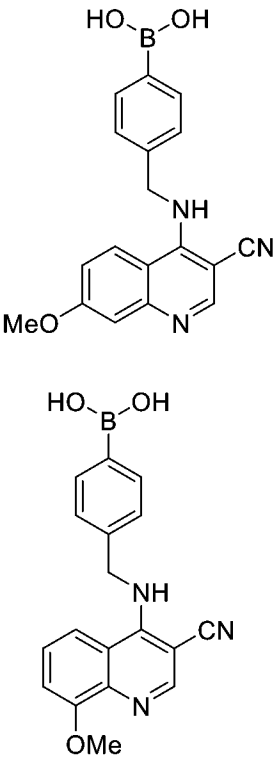
C

213



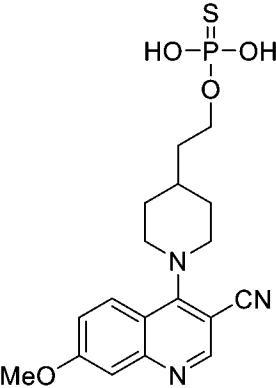
C

214



C

215

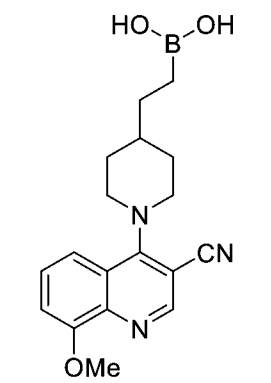


C

216

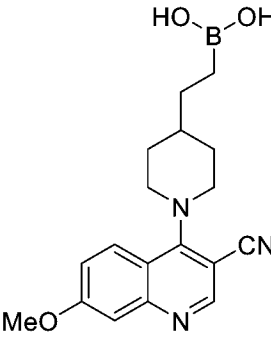
C

217



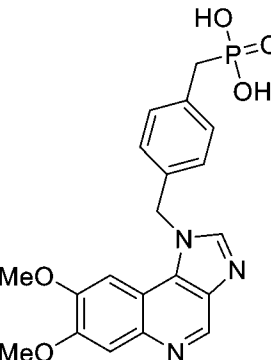
C

218



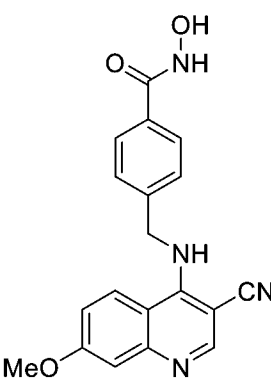
C

219

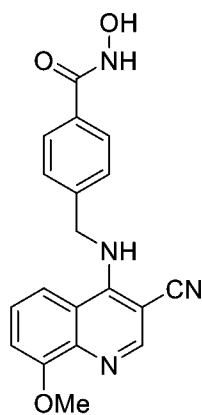


C

220



C



實例 3：細胞外 ENPP1 之展示及細胞外 ENPP1 之抑制

【0392】 參照圖 18A 至圖 18C，觀察到 ENPP1 控制 cGAMP 之細胞外水準，並且 cGAMP 水準可以藉由用 ENPP1 抑制劑(例如，化合物 1)處理細胞來恢復。

【0393】 用人類 *ENPP1* 表現質體轉染 293T cGAS *ENPP1*^{-/-}細胞且確認全細胞溶解物中之 cGAMP 水解酶活性(圖 18A)。293T 細胞係購自 ATCC 且經病毒轉染以穩定表現小鼠 cGAS。藉由病毒轉染靶向人類 *ENPP1* (5' CACCGCTGGTTCTATGCACGTCTCC-3') (SEQ ID NO:1)之 CRISPR sgRNA 產生 293T mcGAS *ENPP1*^{-/-}。將 293T mcGAS *ENPP1*^{-/-}細胞平鋪於組織培養物處理之板中，該等板包被有 DMEM (Corning Cellgro)中之 PurCol (Advanced BioMatrix)，該 DMEM 補充有 10% FBS (Atlanta Biologics) (v/v)及 100 U/mL 青黴素(penicillin)-鏈黴素(streptomycin) (ThermoFisher)。平鋪後 12-24 小時，根據製造商之說明書用 Eugene 6 (Promega)加所指示濃度之 pcDNA3 質體 DNA (空白或含有人類 *ENPP1*)轉染細胞。轉染後 24 小時，使細胞溶解以藉由西方印跡(western blotting) (使用抗體兔抗 *ENPP1* (L520, 1:1000)及小鼠抗微管蛋白(DM1A, 1:2,000), Cell Signaling Technologies)分析 *ENPP1* 表現。藉由將 1×10^6 個細胞溶解於 10 mM Tris、150 mM NaCl、1.5 mM MgCl₂、1% NP-40 (pH 9.0)中產生全細胞溶解物。將 ³²P-cGAMP (5 μM)與全細胞溶解物一起培育並如上文實例 2 所述監測降解(圖 18A)。

【0394】 在完整細胞中，ENPP1 表現耗盡細胞外 cGAMP，但不會影響細胞內 cGAMP 濃度(圖 18B)。用 pcDNA3 (空白或含有人類 *ENPP1*)轉染 293T mcGAS *ENPP1*^{-/-}後 24 小時，去除培養基且更換為補充有 1%胰島素-轉鐵蛋白-硒-丙酮酸鈉(ThermoFisher)及 100 U/mL 青黴素-鏈黴素之無血清 DMEM。更換培養基後 12-24 小時，去除培養基且用冷 PBS 將細胞自板洗掉。將培養基及細胞二者在 4°C 下在 1000 rcf 下離心 10 分鐘且準備藉由液相層析-串聯質譜(LC-MS/MS)量測 cGAMP 濃度。將細胞溶解於 30 μ L 至 100 μ L 之補充有 500 nM 環狀 GMP-¹³C₁₀, ¹⁵N₅-AMP 作為內標之 50:50 乙腈:水中並在 4°C 下以 15,000 rcf 離心 20 分鐘以去除不溶性部分。去除培養基，補充 500 nM 環狀 GMP-¹³C₁₀, ¹⁵N₅-AMP (作為內標)及 20%甲酸。在 Shimadzu HPLC (San Francisco, CA)上分析樣品之 cGAMP、ATP 及 GTP 含量，且自動取樣器設定為 4°C 並連接至 AB Sciex 4000 QTRAP (Foster City, CA)。將 10 μ L 體積注射至 Biobasic AX LC 管柱 5 μ m, 50 $\times$ 3 mm (Thermo Scientific)上。流動相係由 100 mM 碳酸銨(A)及乙腈中之 0.1%甲酸(B)組成。起始條件係 90% B，維持 0.5 min。使流動相自 0.5 min 至 2.0 min 斜升至 30% A，自 2.0 min 至 3.5 min 維持在 30% A，自 3.5 min 至 3.6 min 斜升至 90% B，且自 3.6 min 至 5 min 維持在 90% B。流速設定為 0.6 mL/min。以電極噴霧正離子模式操作質譜儀，且源溫度設定為 500°C。使用氮氣達成解聚簇及碰撞誘導之解離。藉由直接輸註標準物來最佳化去簇勢能及碰撞能。對於每一分子，MRM 躍遷(*m/z*)、DP (V)及 CE (V)如下：ATP (508 > 136、341、55)、GTP (524 > 152、236、43)、cGAMP (675 > 136、121、97；675 > 312、121、59；675 > 152、121、73)、內標環狀 GMP-¹³C₁₀, ¹⁵N₅-AMP (690 > 146、111、101；690 > 152、111、45；690 > 327、111、47)、提取標準環狀 ¹³C₁₀, ¹⁵N₅-GMP-¹³C₁₀, ¹⁵N₅-AMP (705 > 156、66、93；705 > 162、66、73)。

【0395】 抑制 ENPP1 阻斷細胞外 cGAMP 之降解(圖 18C)。實施與上文相同之實驗，此次亦包括在更換培養基時 50 μ M 之 ENPP1 抑制劑(化合物 1)。使用抑制劑，培養基中之細胞外 cGAMP 濃度返回至先前水準。

【0396】 圖 18A 顯示用空載體及含有人類 ENPP1 之載體轉染 293T cGAS ENPP1^{-/-}細胞並在 24 h 後使用西方墨點法分析 ENPP1 蛋白表現(頂部)、使用薄層層析(TLC)分析 ENPP1 ³²P-cGAMP 水解活性(底部)。圖 18B 顯示使用 LC-MS/MS 之細胞內及細胞外 cGAMP 濃度。*BQL*=定量下限。平均值 $\pm$ SEM ($n=2$)。*** $P=0.005$ (司徒頓 t 測試(Student's t test))。圖 18C 顯示在 50 μ M 化合物 1 存在或不存在下用空載體或含有人類 ENPP1 之載體轉染之 293T cGAS ENPP1^{-/-}細胞之細胞內及細胞外 cGAMP 濃度。*BQL*=定量下限。平均值 $\pm$ SEM ($n=2$)。*** $P=0.0013$ (司徒頓 t 測試)。

實例 4：ENPP1 抑制增加原代 CD14⁺單核球之 cGAMP 活化

【0397】 使用 ENPP1 抑制劑(化合物 1)，測試由 293T cGAS ENPP1^低細胞株輸出之 cGAMP 是否可藉由抗原呈遞細胞(APC) (例如人類 CD14⁺單核球)偵測(圖 1 9A)。用 pcDNA (空白或含有人類 ENPP1)轉染 293T cGAS ENPP1^低細胞。藉由使來自全血之富集膚色血球層經受 Percoll 密度梯度來分離原代人類外周血單核球細胞(PBMC)。使用 CD14⁺微珠(Miltenyi)分離 CD14⁺單核球。將 CD14⁺單核球培養於補充有 2%人類血清及 100 U/mL 青黴素-鏈黴素之 RMPI 中。轉染 293T cGAS ENPP1^低細胞後 8 小時，將培養基更換為補充有 2%人類血清及 100 U/mL 青黴素-鏈黴素之 RMPI (含或不含例示性 ENPP1 抑制劑化合物 1)。更換培養基後 24 小時，將來自 293T cGAS ENPP1^低細胞之上清液轉移至 CD14⁺單核球(圖 1 9A)。在上清液轉移後 24-26 小時，使用 Trizol (Thermo Fisher Scientific)提取總 RNA 且用 Maxima H Minus 反轉錄酶(Thermo Fisher Scientific)反轉錄。在 7900HT

快速實時 PCR 系統(Applied Biosystems)上使用 AccuPower 2X Greenstar qPCR 主混合物(Bioneer)實施一式兩份實時 RT-PCR。將每一樣品之數據正規化至 CD14 表現。使用 $\Delta\Delta C_t$ 計算誘導倍數。用於人類 *IFNB1* 之引子：fwd (5'-AAACTCAT GAGCAGTCTGCA-3') (SEQ ID NO:2), rev (5'-AGGAGATCTTTCAGTTTCGGAG G-3') (SEQ ID NO:3)；用於人類 *CD14* 之引子：fwd (5'-GCCTTCCGTGTCCCCA CTGC-3') (SEQ ID NO:4), rev (5'-TGAGGGGGCCCTCGACG-3') (SEQ ID NO:5)。

【0398】 來自表現 cGAS 之 293T cGAS ENPP1^低細胞而非 cGAS 空 293T 細胞之上清液誘導 CD14⁺ *IFNB1* 表現，此表明由癌細胞輸出之細胞外 cGAMP 可作為信號傳導因子藉由 CD14⁺細胞來偵測(圖 19B)。ENPP1 在 293T cGAS ENPP1^低細胞上之瞬時過表現引起細胞外 cGAMP 降解及 CD14⁺ *IFNB1* 表現減少，但添加化合物 1 會降低細胞外 cGAMP 水準並誘導 CD14⁺ *IFNB1* 表現(圖 19B)。

【0399】 參照圖 19A，顯示上清液轉移實驗之示意圖。圖 19B 顯示用 DNA 轉染並在化合物 1 存在或不存在下培育之 cGAS 空 293T 細胞或 293T cGAS ENPP1^低細胞。將來自該等細胞之上清液轉移至原代 CD14⁺人類 PBMC。將 *IFNB1* mRNA 水準正規化至 CD14 且計算相對於未經處理之 CD14⁺細胞之誘導倍數。平均值± SEM ($n = 2$)。* $P < 0.05$ ，*** $P < 0.001$ (單因子 ANOVA)。

實例 5：ENPP1 抑制與電離輻射(IR)處理協同作用以增加腫瘤相關樹突細胞。

【0400】 測試癌細胞株是否輸出 cGAMP 以及電離輻射(IR)是否影響所產生細胞外 cGAMP 之水準。已顯示在腫瘤細胞中電離輻射(IR)增加胞質 DNA 並活化 cGAS 依賴性 IFN- β 產生(Bakhoun 等人，*Nat. Commun.* (2015) 6:1-10；及 Vanpouille *Nat. Commun.* (2017) 8:15618)。平鋪後 24 小時，使用銻源用 20 Gy IR 處理 4T1 細胞並更換培養基，補充有 50 μ M 之 ENPP1 抑制劑(化合物 1)以抑制存在於細胞培養物中之 ENPP1。在所指示時間收集培養基，以 1000 $\times$ g 離心以

去除殘餘細胞，用 0.5% 乙酸酸化，且補充環狀- $^{13}\text{C}_{10}$, ^{15}GMP - $^{13}\text{C}_{10}$, $^{15}\text{N}_5$ -AMP 作為提取標準(適用於最終濃度為 100 μL 中之 2 μM 之量)。將培養基施加至 HyperSep 胺基丙基 SPE 管柱(ThermoFisher Scientific)以富集 cGAMP，如前文所述(Gao 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2015) 112:E5699-705)。將溶析劑蒸發至乾燥並於補充有 500 nM 內標之 50:50 乙腈:水中復原。使培養基進行 cGAMP 之質譜定量。

【0401】 在 4T1 細胞中在 48 小時內偵測到連續之 cGAMP 輸出。48 小時時，經 IR 處理之細胞比未經處理之細胞具有顯著更高之細胞外 cGAMP 水準。

【0402】 隨後，研究了與例示性 ENPP1 抑制劑化合物 1 組合之 IR 對小鼠 4T1 腫瘤模型中之腫瘤相關樹突細胞數量之效應(圖 20B)。向 7 至 9 週齡之雌性 Balb/c 小鼠(Jackson Laboratories)之乳腺脂肪墊中接種懸浮於 50 μL PBS 中之 1×10^6 個 4T1 螢光素酶腫瘤細胞。注射後兩天，使用經 0.5 mm Cu 過濾之 225 kVp 機櫃式 X 射線照射器(IC 250, Kimtron Inc., CT)，用 20 Gy 照射腫瘤。用 3.2 mm 之鉛遮罩罩住麻醉之動物，該鉛遮罩具有 15 $\times$ 20 mm 之小孔，腫瘤置於該小孔處。向小鼠腫瘤內注射 100 μL 之於 PBS 中之 1 mM 化合物 1 或單獨 PBS。第二天，提取腫瘤並在 RPMI + 10% FBS 中與 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ IV 型 DNase I (Sigma-Aldrich)及 1 mg/mL 溶組織梭菌(*Clostridium histolyticum*)膠原酶(Sigma-Aldrich)在 37°C 一起培育 30 min。使腫瘤通過 100 μm 細胞濾器(Sigma-Aldrich)，並在室溫下使用紅細胞溶解緩衝液(155 mM NH_4Cl 、12 mM NaHCO_3 、0.1 mM EDTA)溶解紅血球達 5 min。用活/死可固定之近 IR 死細胞染色套組(Thermo Fisher Scientific)對細胞染色，使用 TruStain fcX 進行 Fc 封閉達 10 min，且隨後用 CD11c、CD45 及 I-A/I-E (皆來自 Biolegend)進行抗體染色。使用 SH800S 細胞分選儀(Sony)或 LSR II (BD Biosciences)分析細胞。使用 FlowJo V10 軟體(Treestar)及 Prism 7.04 軟體

(Graphpad)分析數據進行統計分析，並使用未配對 *t* 測試及韋爾奇校正(Welch's correction)評價統計顯著性。

【0403】 與 PBS 對照相比，腫瘤內注射化合物 1 沒有改變腫瘤相關之白血球組成(圖 20B)，此表明在此腫瘤模型中，ENPP1 在清除基底水準細胞外 cGAMP 中沒有發揮重要作用。然而，當用 IR 預處理腫瘤時，觀察到化合物 1 增加了腫瘤相關之 CD11c⁺群體(圖 20B)。

【0404】 結果圖解說明於圖 20A 及圖 20B 中。圖 20A 顯示 4T1 細胞在 48 小時內產生之細胞外 cGAMP。在時間 0 時，細胞未經處理或用 20 Gy IR 處理，並用補充有 50 μ M 化合物 1 之培養基復蘇。平均值 $\pm$ SEM ($n = 2$)。*** $P = 0.004$ (司徒頓 *t* 測試)。圖 20B 顯示在第 0 天原位注射至 BALB/cJ 小鼠中之 4T1 細胞 (1×10^6)。在第 2 天，腫瘤未經處理或用 20 Gy IR 處理且腫瘤內注射 PBS (對於 IR (0 Gy) $n = 5$ ；對於 IR (20 Gy) $n = 4$)或化合物 1 ($n = 5$)。在第 3 天收穫腫瘤並藉由 FACS 分析。* $P = 0.047$ (韋爾奇 *t* 測試)。

實例 6：ENPP1 抑制與 IR 處理及抗 CTLA-4 協同作用以發揮抗腫瘤效應

【0405】 使用電離輻射(IR)及例示性 ENPP1 抑制劑(例如化合物 1)研究了是否可藉由在活體內進一步增加細胞外 cGAMP 來增加腫瘤之免疫偵測及清除。

【0406】 向 7 至 9 週齡之雌性 Balb/c 小鼠(Jackson Laboratories)之乳腺脂肪墊中接種懸浮於 50 μ L PBS 中之 5×10^4 個 4T1 螢光素酶細胞。當腫瘤體積(測定長度² $\times$ 寬度/2)達到 80 mm³ 至 120 mm³ 時，使用經 0.5 mm Cu 過濾之 225 kVp 機櫃式 X 射線照射器(IC 250, Kimtron Inc., CT)，用 20 Gy 照射腫瘤。用 3.2 mm 之鉛遮罩罩住麻醉之動物，該鉛遮罩具有 15 $\times$ 20 mm 之小孔，腫瘤置於該小孔處。在 IR 後第 2 天、第 4 天及第 7 天，在腫瘤內注射 100 μ L 之 100 μ M 化合物 1 及/或 PBS 中之 10 μ g cGAMP 或單獨 PBS。替代地，在 IR 後第 2 天、第 5 天及第 7

天，在腫瘤內注射 PBS 中之 1 mM 化合物 1 或單獨 PBS，並在腹膜內注射 200 μ g 之抗 CTLA-4 抗體或敘利亞(Syrian)倉鼠 IgG 抗體(均來自 BioXCell)。將來自不同治療組之小鼠共同圈養於每個籠子中以消除籠子效應。在整個研究過程中，實驗者皆係盲化的。每隔一天記錄腫瘤體積。在廣義估計方程中分析腫瘤體積以解釋小鼠內相關性。使用其中調整 Tukey 用於多重比較之事後測試對每個時間點之治療組進行成對比較。在卡普蘭邁耶曲線(Kaplan Meier curve)中使用 Graphpad Prism 7.03 對動物死亡進行繪圖並使用對數秩曼特爾-考克斯測試(Logrank Mantel-Cox test)評價統計顯著性。所有動物程序皆由實驗動物護理管理小組批准。

【0407】 化合物 1 之投與增強了 IR 處理之腫瘤皺縮效應，但並不顯著(圖 21A)。儘管腫瘤內注射 cGAMP 對 IR 處理沒有效應，但除 cGAMP 外，注射化合物 1 可使腫瘤協同皺縮，延長存活期，並達成 10%之治癒率(圖 21A 及圖 21B)。

【0408】 亦測試了與適應性免疫檢查點阻斷劑抗 CTLA-4 之協同效應。在沒有 IR 之情況下，用抗 CTLA-4 及化合物 1 治療對延長存活期沒有效應(圖 21C)。然而，將 IR 預處理與化合物 1 及抗 CTLA-4 組合發揮了顯著之協同作用，並達成 10%之治癒率。總之，該等結果展示，藉由將 IR 處理與 ENPP1 抑制組合來增強細胞外 cGAMP 可增加腫瘤免疫原性並發揮抗腫瘤效應。

【0409】 結果圖解說明於圖 21A 中，其顯示化合物 1 與 IR 組合之腫瘤皺縮效應。用 20 Gy IR 處理已建立之腫瘤($100 \pm 20 \text{ mm}^3$)一次，隨後在 IR 後第 2 天、第 4 天及第 7 天進行三次腫瘤內注射 PBS 或治療(每個治療組 $n = 9$)。將來自不同治療組之小鼠共同圈養且使實驗者盲化。在廣義估計方程中分析腫瘤體積以解釋小鼠內相關性。使用其中調整 Tukey 用於多重比較之事後測試對每個時間點之治療組進行成對比較。圖 21B 顯示圖 21A 之卡普蘭邁耶曲線，由對數秩曼特爾-

考克斯測試確定 P 值。圖 21C 顯示，除了與圖 21B 中相同之程序之外，在 IR 後第 2 天、第 5 天及第 7 天腹膜內注射抗 CTLA 4 或 IgG 同型對照抗體(對於 IR (0) + 化合物 1 + CTLA-4 治療組 $n = 8$ ；對於所有其他治療組 $n = 17-19$)。如圖 21B 所示進行統計分析。

【0410】 總之，該等結果表明 cGAMP 存在於細胞外，且標的 ENPP1 抑制劑可以在細胞外發揮作用；因此，表明 ENPP1 之細胞外抑制足以產生治療效應。ENPP1 有資格作為先天免疫檢查點。該等實驗表明，細胞外抑制 ENPP1 使 cGAMP 能夠增強抗癌免疫性，並與已經作為療法之免疫檢查點阻斷藥物協同組合(圖 22)。

實例 7：2'3'-cGAMP 係由癌細胞產生且由 ENPP1 調節之免疫遞質

引言

【0411】 2'3'-環狀 GMP-AMP (cGAMP) 表征為細胞內第二信使，其係因應胞質 dsDNA 合成並活化先天免疫 STING 路徑。其細胞外水解酶 ENPP1 暗示細胞外 cGAMP 之存在。使用質譜，偵測到 cGAMP 作為可溶性因子由經改造細胞株連續輸出，但隨後由 ENPP1 高效清除。藉由開發有效、特異性且細胞不可滲透性 ENPP1 抑制劑，在常用於小鼠腫瘤模型之癌細胞株中偵測到 cGAMP 輸出。在腫瘤中，使用中和蛋白耗盡細胞外 cGAMP 減少了腫瘤相關樹突細胞。藉由基因剔除及對 ENPP1 之藥理學抑制促進細胞外 cGAMP 會增加腫瘤相關之樹突細胞，使腫瘤皺縮，並與電離輻射及抗 CTLA-4 協同作用來治愈腫瘤。總之，cGAMP 係由腫瘤釋放並藉由宿主先天免疫性偵測之抗癌免疫遞質。

【0412】 第二信使 2'3'-環狀 GMP-AMP (cGAMP) 在抗病毒及抗癌先天免疫性中起關鍵作用。其係由環狀-GMP-AMP 合酶(cGAS)因應胞質溶膠中之雙股 DNA (dsDNA) 合成，此係細胞內病原體及受損或癌細胞之危險信號。cGAMP 結合並

活化其內質網(ER)表面受體干擾素基因刺激物(STING)，從而活化 1 型干擾素 (IFN)之產生。該等有效之細胞介素觸發下游先天及適應性免疫反應來清除威脅。

【0413】 除了活化其來源細胞內之 STING 外，cGAMP 可以經由上皮細胞之間隙連結擴散至旁觀細胞。此種細胞-細胞通信機制提醒受損細胞之鄰近細胞，不幸的是，此亦係藥物誘發之肝毒性及腦轉移擴散之原因。此外，胞質 cGAMP 可以包裝成出芽之病毒顆粒，並在下一輪感染中傳遞。在兩種傳遞模式下，cGAMP 從不暴露於細胞外空間。

【0414】 負責唯一可偵測之 cGAMP 水解酶活性之酶係外核苷酸焦磷酸酯酶磷酸二酯酶 1 (ENPP1) (參見例如 Li, L.等人, Hydrolysis of 2'3'-cGAMP by ENPP1 and design of nonhydrolyzable analogs. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 1043-8 (2014))。此係令人驚訝的，原因在於 ENPP1 注釋為細胞外酶，既作為由單次跨膜結構域錨定之膜結合形式，亦作為血清中裂解之可溶性蛋白。具有兩個負電荷且大概不能被動地跨過細胞膜之 cGAMP 可以進入細胞以活化 STING (參見例如 Gao, P.等人, Structure-function analysis of STING activation by c[G(2',5') pA(3',5')p] and targeting by antiviral DMXAA. *Cell* **154**, 748-762 (2013)；及 Corrales, L.等人, Direct Activation of STING in the Tumor Microenvironment Leads to Potent and Systemic Tumor Regression and Immunity. *Cell Rep.* **11**, 1018-1030 (2015))，此表明存在 cGAMP 之運輸通道。由於 cGAMP 類似物可以進入細胞，目前正在臨床試驗中測試 cGAMP 類似物，以經由腫瘤內注射治療轉移性實體腫瘤。已知細胞外 cGAMP 可以輸入並具有抗癌效應，並且優勢 cGAMP 水解酶在細胞外，假設 cGAMP 輸出至細胞外空間以向其他細胞發出信號並由細胞外降解調節。

【0415】 本文展示癌症之 cGAMP 輸出以及細胞外 cGAMP 在抗癌免疫偵測中之作用。使用基因剔除及藥理學抑制，亦研究了 ENPP1 在控制細胞外 cGAMP

濃度、免疫浸潤及腫瘤進展中之作用。總之，cGAMP 表征為由 ENPP1 調節之免疫遞質。

材料及方法

試劑、抗體及細胞株

【0416】 [α -³²P]ATP (800 Ci/mmol, 10 mCi/mL, 250 μ Ci)及[³⁵S]ATP α S (1250 Ci/mmol, 12.5 mCi/mL, 250 μ Ci)係購自 Perkin Elmer。三磷酸腺苷、三磷酸鳥苷、腺苷-¹³C₁₀, ¹⁵N₅, 5'-三磷酸、鳥苷-¹³C₁₀, ¹⁵N₅-三磷酸、磷酸 4-硝基苯基酯及磷酸雙(4-硝基苯基)酯係購自 Sigma-Aldrich 且為>98%原子純的。2'3'-cGAMP 係購自 Invivogen。Caco-2 分析係購自 Cyprotex。Kinome 篩選由 Eurofins 實施。PAMPA 及 MDCK 滲透性分析由 Quintara Discovery 實施。使用 BCA 分析(ThermoFisher)對總蛋白質含量進行定量。使用 CellTiterGlo 分析(Promega)對細胞活力進行定量。將全長人類 *ENPP1* 選殖至 pcDNA3 載體中。一組 4 ON-TARGETplus *ENPP1* siRNA (LQ-003809-00-0002)係購自 Dharmacon。如前文所述²⁵合成 QS1。將以下單株抗體用於西方印跡：兔抗 cGAS (D1D3G Cell Signaling, 1:1,000)、兔抗小鼠 cGAS (D2O8O Cell Signaling, 1:1,000)、小鼠抗微管蛋白(DM1A Cell Signaling, 1:2,000)及兔抗 STING (D2P2F Cell Signaling, 1:1,000)、IRDye 800CW 山羊抗兔 (LI-COR, 1:15,000)及 IRDye 680RD 山羊抗小鼠(LI-COR, 1:15,000)。

【0417】 293T 細胞係購自 ATCC 且經病毒轉染以穩定表現小鼠 cGAS。藉由病毒轉染靶向人類 *ENPP1* (5'-CACCGCTGGTTCTATGCACGTCTCC-3')之 CRISPR sgRNA 來產生 293T cGAS *ENPP1*^低細胞，且在自此庫選殖單細胞後選擇 293T mcGAS *ENPP1*^{-/-}細胞。藉由病毒轉染靶向小鼠 *Mb21d1* (5'-CACCGGAAGGGGCGCGCTCCACC-3')之 CRISPR sgRNA (使用 lentiCRISPRv2-blast, Addgene 質體編號 83480)來產生 4T1 及 E0771 *cGAS*^{-/-}細胞。

在單細胞選殖後選擇細胞。藉由病毒轉染靶向小鼠 *ENPP1* (5'-GCTCGCGCCCATGGACCT-3'及 5'-ATATGACTGTACCCTACGGG-3')或錯義序列之 CRISPR sgRNA (使用 lentiCRISPRv2-blast) (Sanjana, N. E.、Shalem, O.及 Zhang, F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat. Methods* **11**, 783-784 (2014))來產生 4T1-Luc *ENPP1*^{-/-}細胞。藉由使用質體 pGH188 病毒轉染 shRNA (5'-CAGGATTGAGCTACAAGAATAT-3')來產生 4T1-Luc shcGAS 細胞。用殺稻瘟菌素(blasticidin)選擇含有 shRNA 之細胞且進行分選用於 GFP 表現，且用作實驗之庫。MDA-MB-231 係購自 ATCC，E0771 係購自 CH3 BioSystems，獲得 4T1-螢光素酶及表現所分泌 mENPP1 之 HEK293S GnT1^{-/-}細胞。

細胞培養

【0418】 將細胞株維持於補充有 10% FBS (Atlanta Biologics) (v/v)及 100 U/mL 青黴素-鏈黴素(ThermoFisher)之 DMEM (Corning Cellgro) (293T, MC38)或 RPMI (Corning Cellgro) (4T1-Luc, E0771, MDA-MD-231)中。藉由使來自全血之富集膚色血球層經受 Percoll 密度梯度來分離原代人類外周血單核細胞(PBMC)。使用 CD14⁺微珠(Miltenyi)分離 CD14⁺ PBMC。將 CD14⁺ PBMC 培養於補充有 2%人類血清及 100 U/mL 青黴素-鏈黴素之 RMPI 中。

重組蛋白之表現及純化

【0419】 *sscGAS*：使用引子對 fwd：(5'-CTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCC CATATGGGCGCCTGGAAGCTCCAGAC-3')及 rev：(5'-GATCTCAGTGGTGG TGGTGGTGGTGGCTCGAGCCAAAAAAGTGGAAATCCATTGT-3')自豬 cDNA 文庫擴增編碼豬 cGAS (殘基 135-497)之 DNA 序列。經由 Gibson assembly 將 PCR 產物插入 pDB-His-MBP 中且在 Rosetta 細胞中表現。使細胞生長於含有康黴素

(kanamycin) (100 µg/ml)之 2xYT 培養基中，當 OD₆₀₀ 達到 1 時用 0.5 mM IPTG 誘導，且使其在 16°C 下生長過夜。涉及蛋白質及細胞溶解物之所有以下程序皆係在 4°C 下實施。使細胞沈澱並溶解於 20 mM HEPES pH 7.5、400 mM NaCl、10 %甘油、10 mM 咪唑、1 mM DTT 及蛋白酶抑制劑混合劑(cOmplete 不含 EDTA 之錠劑，Roche)中。藉由以 50,000 × g 超離心 1 h 使細胞提取物澄清。將澄清上清液與 HisPur 鈷樹脂(ThermoFisher Scientific；1 mL 樹脂/公升細菌培養物)一起培育。用 20 mM HEPES pH 7.5、1 M NaCl、10%甘油、10 mM 咪唑、1 mM DTT 洗滌鈷樹脂。用 20 mM HEPES (pH 7.5)中之 300 mM 咪唑、1 M NaCl、10%甘油及 1 mM DTT 自樹脂溶析蛋白質。將含有 His-MBP-sscGAS 之流份匯集，濃縮並針對 20 mM HEPES pH 7.5、400 mM NaCl、1 mM DTT 透析。將蛋白質快速冷凍成多個等份試樣以備將來使用。

【0420】 STING：將小鼠 STING (殘基 139-378)插入 pTB146 His-SUMO 載體中並在 Rosetta 細胞中表現。使細胞生長於含有 100 µg/mL 胺苄青黴素 (ampicillin)之 2xYT 培養基中並在 OD₆₀₀ 達到 1 時用 0.75 mM IPTG 在 16°C 下誘導過夜。在 4°C 下實施使用蛋白質及細胞溶解物之所有後續程序。使細胞沈澱並溶解於 50 mM Tris pH 7.5、400 mM NaCl、10 mM 咪唑、2 mM DTT 及蛋白酶抑制劑(cOmplete，不含 EDTA 之蛋白酶抑制劑混合劑，Roche)中。藉由音波處理溶解細胞且藉由以 50,000 rcf 超離心 1 小時使溶解物澄清。將澄清上清液與 HisPur 鈷樹脂(ThermoFisher Scientific；1 mL 樹脂/1 L 細菌培養物)一起培育 30 分鐘。用 50 管柱體積之 50 mM Tris pH 7.5、150 mM NaCl、2% triton X-114、50 CV 之 50 mM Tris pH 7.5、1 M NaCl (每次洗滌設定為 1 滴/2-3 秒之滴速且耗時 2-3 小時)及 20 CV 之 50 mM Tris pH 7.5、150 mM NaCl 洗滌樹脂結合之蛋白質。用 50 mM Tris (pH 7.5)中之 600 mM 咪唑、150 mM NaCl 自樹脂溶析蛋白質。匯集含有

His-SUMO-STING 之流份，濃縮，並針對 50 mM Tris pH 7.5、150 mM NaCl 透析，同時與 SUMOlase 酶 His-ULP1 一起培育過夜以去除 His-SUMO 標籤。將溶液與 HisPur 鈷樹脂再一起培育以去除 His-SUMO 標籤，且自流過物收集 STING。針對 50 mM Tris pH 7.5 透析蛋白質，裝載至使用 Äkta FPLC (GE Healthcare) 之 HitrapQ 陰離子交換管柱(GE Healthcare)上，並用 NaCl 梯度溶析。匯集含有 STING 之流份且緩衝液交換至 PBS 中並儲存在 4°C 下直至使用。

【0421】 ENPP1 :mENPP1 係如 Kato, K.等人所述產生(Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of Enpp1. Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun. 68, 778-782 (2012)；及 Crystal structure of Enpp1, an extracellular glycoprotein involved in bone mineralization and insulin signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109, 16876-81 (2012))。

液相層析-串聯質譜

【0422】 使用環狀 GMP-¹³C₁₀, ¹⁵N₅-AMP 作為內標且使用環狀 ¹³C₁₀, ¹⁵N₅-GMP-¹³C₁₀, ¹⁵N₅-AMP 作為提取標準。藉由將 1 mM ATP (同位素標記)、1 mM GTP (同位素標記)、20 mM MgCl₂、0.1 mg/mL 鯡魚睪丸 DNA (Sigma) 及 2 μM sscGAS 於 100 mM Tris (pH 7.5) 中培育過夜來合成同位素標記之 cGAMP 標準物。將反應物在 95°C 下加熱並經由 3 kDa 離心過濾器過濾。在旋轉蒸發器上去除水。在連接至 UV-vis 偵測器(ProStar; Agilent Technologies)及流份收集器(440-LC; Agilent Technologies)之製備型 HPLC (1260 Infinity LC 系統；Agilent Technologies)上使用 PLRP-S 聚合反相製備型管柱(100 Å, 8 μm, 300 × 25 mm; Agilent Technologies)自粗反應混合物純化 cGAMP。流速設定為 25 mL/min。流動相係由水中之 10 mM 三乙基乙酸銨及乙腈組成。流動相起始於 2% 乙腈持續第一個 5 min。然後使乙腈自 5-20 min 斜升至 30%，自 20-22 min 斜升至 90%，

自 22-25 min 維持在 90%，且然後自 25-28 min 斜降至 2%。將含有 cGAMP 之部分凍乾並重懸浮於水中。藉由量測 280 nm 之吸光度來確定濃度。在 Shimadzu HPLC (San Francisco, CA)上分析樣品之 cGAMP、ATP 及 GTP 含量，且自動取樣器設定在 4°C下並連接至 AB Sciex 4000 QTRAP (Foster City, CA)。將 10 µL 之體積注入至 Biobasic AX LC 管柱, 5 µm, 50 × 3 mm (Thermo Scientific)上。流動相係由 100 mM 碳酸銨(A)及乙腈中之 0.1%甲酸(B)組成。起始條件係 90% B，維持 0.5 min。使流動相自 0.5 min 至 2.0 min 斜升至 30% A，自 2.0 min 至 3.5 min 維持在 30% A，自 3.5 min 至 3.6 min 斜升至 90% B，且自 3.6 min 至 5 min 維持在 90% B。流速設定為 0.6 mL/min。以電極噴霧正離子模式操作質譜儀，且源溫度設定為 500°C。使用氮氣達成去簇及碰撞誘導之解離。藉由直接輸註標準物來最佳化去簇勢能及碰撞能。對於每一分子，MRM 躍遷(*m/z*)、DP (V)及 CE (V)如下：ATP (508 > 136、341、55)、GTP (524 > 152、236、43)、cGAMP (675 > 136、121、97；675 > 312、121、59；675 > 152、121、73)、內標環狀 GMP-¹³C₁₀, ¹⁵N₅-AMP (690 > 146、111、101；690 > 152、111、45；690 > 327、111、47)、提取標準環狀 ¹³C₁₀, ¹⁵N₅-GMP-¹³C₁₀, ¹⁵N₅-AMP (705 > 156、66、93；705 > 162、66、73)。

293T cGAS ENPP1^{-/-}細胞中之輸出分析

【0423】 將 293T cGAS ENPP1^{-/-}細胞平鋪於組織培養物處理之經 PurCol (Advanced BioMatrix)包被之板中。24 小時後，輕輕地去除培養基且更換為補充有 1%胰島素-轉鐵蛋白-硒-丙酮酸鈉(ThermoFisher)及 100 U/mL 青黴素-鏈黴素之無血清 DMEM。在所指示時間，去除培養基且用冷 PBS 將細胞自板洗掉。將培養基及細胞二者在 4°C下以 1000 rcf 離心 10 分鐘。將細胞溶解於 30 µL 至 100 µL 之補充有 500 nM 內標之 50:50 乙腈:水中，並在 4°C下以 15,000 rcf 離心 20 分鐘以去除不溶性部分。若不需要濃縮，則取出一等份培養基，補充 500 nM 之內

標及 20% 甲酸。若需要濃縮，則用 0.5% 乙酸酸化培養基且補充提取標準(適用於最終濃度為 100 μL 中之 2 μM 之量)。將培養基施加至 HyperSep 胺基丙基 SPE 管柱(ThermoFisher Scientific)以富集 cGAMP，如 Gao, D. 等人((Activation of cyclic GMP-AMP synthase by self-DNA causes autoimmune diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E5699-705 (2015))所述。將溶析劑蒸發至乾燥並於補充有 500 nM 內標之 50:50 乙腈:水中復原。使培養基及細胞提取物進行 cGAMP、ATP 及 GTP 之質譜定量。

293T cGAS ENPP1^{-/-}細胞之轉染刺激

【0424】 用 Fugene 6 (Promega) 根據製造商之說明書加所指示濃度之 pcDNA3 質體 DNA (空白或含有人類 *ENPP1*) 轉染 293T cGAS ENPP1^{-/-}細胞。轉染後 24 小時，如上文所述實施輸出分析。

條件化培養基轉移

【0425】 如上文所述將 293T cGAS ENPP1^低細胞平鋪且用質體 DNA 轉染。轉染後 24 小時，將培養基更換為 RPMI + 2% 人類血清 + 1% 青黴素-鏈黴素、+/- 2 μM cGAMP、+/- 20 nM 重組 mENPP1 或 +/- 50 μM 化合物 1。更換培養基後 24 小時，自 293T cGAS ENPP1^低細胞去除條件化培養基且與剛分離之 CD14⁺ PBMC 一起培育。14-16 h 後分析 CD14⁺ PBMC 之基因表現。

RT-PCR 分析

【0426】 使用 Trizol (Thermo Fisher Scientific) 提取總 RNA 且用 Maxima H Minus 反轉錄酶(Thermo Fisher Scientific)反轉錄。在 7900HT 快速實時 PCR 系統(Applied Biosystems)上用 AccuPower 2X Greenstar qPCR 主混合物(Bioneer)實施一式兩份實時 RT-PCR。將每一樣品之數據正規化至 *CD14*、*ACTB* 或 *GAPDH* 表現。使用 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 計算誘導倍數。用於人類 *IFNBI* 之引子：fwd (5'-AAACTCATGAGC

AGTCTGCA-3'), rev (5'-AGGAGATCTTCAGTTTCGGAGG-3'); 用於人類 *CD14* 之引子: fwd (5'-GCCTTCCGTGTCCCCACTGC-3'), rev (5'-TGAGGGGGGCCCTC GACG-3'); 用於人類 *ACTB* 之引子: fwd (5'-GGCATCCTCACCTGAAGTA-3'), rev (5'-AGAGGCGTACAGGGATAGCA-3'); 用於人類 *GAPDH* 之引子: fwd (5'-CCAAGGTCATCCATGACAAC-3'); rev (5'-CAGTGAGCTTCCCGTTCAG-3')。

³²P-cGAMP 降解 TLC 分析

【0427】 藉由將未經標記之 ATP (1 mM) 及摻雜有 ³²P-ATP 之 GTP (1 mM) 與 2 μM 純化之重組豬 cGAS 於 20 mM Tris pH 7.5、2 mM MgCl₂、100 μg/mL 鯡魚睪丸 DNA 中在室溫下一起培育過夜來合成放射性標記之 ³²P cGAMP, 且在 37°C 下用鹼性磷酸酶降解剩餘核苷酸起始材料達 4 h。藉由將 1×10⁶ 個細胞(293T)或 10×10⁶ 個細胞(4T1-Luc、E0771 及 MDA-MB-231)刮取並溶解於 100 μL 之 10 mM Tris、150 mM NaCl、1.5 mM MgCl₂、1% NP-40 (pH 9.0) 中來產生細胞溶解物。對於 4T1-Luc、E0771 及 MDA-MB-231, 使用 BCA 分析(Pierce, Thermo Fisher)量測溶解物之總蛋白質濃度, 且將樣品正規化以將相同量之蛋白質用於每一溶解反應。將探針 ³²P-cGAMP (5 μM) 與 mENPP1 (20 nM) 或全細胞溶解物於 100 mM Tris、150 mM NaCl、2 mM CaCl₂、200 μM ZnCl₂ (pH 7.5 或 pH 9.0) 中一起培育所指示時間量。為產生抑制曲線, 將 ENPP1 抑制劑之 5 倍稀釋液納入反應中。藉由 TLC 評估降解(參見例如 Li, L. 等人, Hydrolysis of 2'3'-cGAMP by ENPP1 and design of nonhydrolyzable analogs. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 1043-8 (2014))。將板於磷光體螢幕(Molecular Dynamics)上曝光且在 Typhoon 9400 上成像並使用 ImageJ 對 ³²P 信號定量。使用 Graphpad Prism 7.03 擬合抑制曲線以獲得 IC₅₀ 值。使用鄭-普魯薩福方程(Cheng-Prusoff equation) $K_{i,app} = IC_{50}/(1 + [S]/K_m)$ 將 IC₅₀ 值轉化成 K_{i,app} 值。

ALPL 及 ENPP2 抑制分析

【0428】 藉由將反應組分於 96 孔板格式中在室溫下培育並藉由在讀板器 (Tecan) 中量測 400 nM 之吸光度監測 4-硝基苯酚鹽之產生來進行其他外核苷酸酶之抑制分析。ALPL：0.1 nM ALPL、2 μ M 磷酸 4-硝基苯基酯及不同濃度之抑制劑，於含有 50 mM Tris、20 μ M ZnCl_2 、1 mM MgCl_2 之緩衝液(pH 9.0)中，在室溫下。ENPP2：2 nM ENPP2、500 μ M 磷酸雙(4-硝基苯基)酯及不同濃度之抑制劑，於含有 100 mM Tris、150 mM NaCl、200 μ M ZnCl_2 、2 mM CaCl_2 之緩衝液(pH 9.0)中。

癌細胞株中之輸出分析

【0429】 對 4T1-Luc、E0771 及 MC38 細胞更換補充有 50 μ M 化合物 1 之新培養基。在所指示時間，收集培養基；用 PBS 自板刮掉細胞，以 1000 rcf 沈澱，用 4 mL 50:50 乙腈:水溶解，且以 15,000 rcf 離心。如上文所述使用 HyperSep 胺基丙基 SPE 管柱自培養基及細胞上清液富集 cGAMP 且使其進行質譜定量。

4T1-Luc 腫瘤小鼠模型

【0430】 向 7 至 9 週齡之雌性 BALB/c 小鼠(Jackson Laboratories)之乳腺脂肪墊中接種懸浮於 50 μ L PBS 中之 5×10^4 或 5×10^5 個 4T1-Luc-螢光素酶細胞。當腫瘤體積(測定長度² $\times$ 寬度/ 2)達到 80 mm³ 至 120 mm³ 時，使用經 0.5 mm Cu (IC-250, Kimtron Inc., CT)過濾之 225 kVp 機櫃式 X 射線照射器，用 20 Gy 照射腫瘤。用 3.2 mm 之鉛遮罩罩住麻醉之動物，該鉛遮罩具有 15 $\times$ 20 mm 之小孔，腫瘤置於該小孔處。在 IR 後第 2 天、第 4 天及第 7 天，在腫瘤內注射 100 μ L 之 100 μ M 化合物 1 及/或 PBS 中之 10 μ g cGAMP 或單獨 PBS。替代地，在 IR 後第 2 天、第 5 天及第 7 天，在腫瘤內注射 PBS 中之 1 mM 化合物 1 或單獨 PBS，並在腹膜內注射 200 μ g 之抗 CTLA-4 抗體或敘利亞倉鼠 IgG 抗體(均來自

BioXCell)。將來自不同治療組之小鼠共同圈養於每個籠子中以消除籠子效應。在整個研究過程中，實驗者皆係盲化的。每隔一天記錄腫瘤體積。在廣義估計方程中分析腫瘤體積以解釋小鼠內相關性。使用調整 Tukey 用於多重比較之事後測試對每個時間點之治療組進行成對比較。在卡普蘭邁耶曲線中使用 Graphpad Prism 7.03 對動物死亡進行繪圖並使用對數秩曼特爾-考克斯測試評價統計顯著性。所有小鼠均在斯坦福大學(Stanford University)按照斯坦福大學動物保護及使用委員會規定(Stanford University Institutional Animal Care and Use Committee regulation)進行維持，且程序由斯坦福大學實驗動物護理管理小組批准。

腫瘤之 FACS 分析

【0431】 向 7 至 9 週齡之雌性 BALB/c WT (4T1-Luc 腫瘤)或 C57BL/6 (E0771 腫瘤) WT、cGAS^{-/-}或 STING^{g^ug^t}(稱為 STING^{-/-})小鼠(Jackson Laboratories)之乳腺脂肪墊中接種懸浮於 50 μ L PBS 中之 1×10^6 個腫瘤細胞。在注射後兩天，如所述照射腫瘤且腫瘤內注射 100 μ L 之於 PBS 中之 1 mM 化合物 1 或單獨 PBS。對於使用 STING 及 mENPP1 之實驗，腫瘤內注射 100 μ L 之 100 μ M 中和性 STING 或非結合性 STING (R237A)或 700 nM mENPP1 或 PBS。第二天，提取腫瘤且於 RPMI + 10% FBS 中與 20 μ g/mL VI 型 DNase I (Sigma-Aldrich)及 1 mg/mL 溶組織梭菌膠原酶(Sigma-Aldrich)在 37°C 下一起培育 30 min。使腫瘤通過 100 μ m 細胞濾器(Sigma-Aldrich)，並在室溫下使用紅血球溶解緩衝液(155 mM NH₄Cl、12 mM NaHCO₃、0.1 mM EDTA)溶解紅血球達 5 min。用活/死可固定之近 IR 死細胞染色套組(Thermo Fisher Scientific)對細胞染色，使用 TruStain fcX 進行 Fc 封閉達 10 min，且隨後用 CD11c、CD45 及 I-A/I-E (皆來自 Biolegend)進行抗體染色。使用 SH800S 細胞分選儀(Sony)或 LSR II (BD Biosciences)分析細胞。使用 FlowJo

V10 軟體(Treestar)及 Prism 7.04 軟體(Graphpad)分析數據進行統計分析，並使用未配對 t 測試及韋爾奇校正評價統計顯著性。

活體內成像

【0432】 向小鼠注射 200 μ l 水中之 3mg XenoLight D-螢光素(Perkin-Elmer)且在活體內成像系統(Spectral Instruments Imaging)中使用 Lago X 成像。將物體高度設定為 1.5cm，像素合併(binning)設定為 4，FStop 設定為 1.2，且曝光時間為 120s。使用 aura 2.0.1 軟體(Spectral Instruments Imaging)分析影像。

結果

cGAMP 作為可溶性因子自 293T cGAS ENPP1^{-/-}細胞輸出

【0433】 為測試 cGAMP 存在於細胞外之假說，吾人首先開發出液相層析-串聯質譜(LC-MS/MS)方法來偵測來自複合混合物之 cGAMP。使用兩種同位素標記之 cGAMP 標準物(圖 1 之圖 A)，吾人可將基礎細胞培養基及含血清培養基二者中之 cGAMP 濃度最低定量至 0.5 nM，且吾人可對來自同一實驗中之細胞提取物之細胞內 cGAMP 濃度進行定量(圖 1 之圖 B 及圖 8 之圖 A 及圖 B)。吾人選擇使用不表現 cGAS 或 STING 之 293T 細胞。藉由穩定表現小鼠 cGAS 並使用 CRISPR 剔除 ENPP1，吾人建立了 293T cGAS ENPP1^低細胞株(圖 8 之圖 C)。然後吾人分離單純系以建立 293T cGAS ENPP1^{-/-}細胞株(圖 8 之圖 C)。吾人亦使用無血清培養基，此乃因血清含有 ENPP1 之蛋白水解裂解之可溶形式。使用此無 ENPP1 細胞培養系統，吾人在無任何刺激之 293T cGAS ENPP1^{-/-}細胞中偵測到恆定低微莫耳濃度之基底細胞內 cGAMP 濃度(圖 1 之圖 C)。此並不令人驚訝，原因在於在癌細胞中因錯誤 DNA 分離存在豐富的胞質 dsDNA (參見例如 Mackenzie, K. J.等人，cGAS surveillance of micronuclei links genome instability to innate immunity. *Nature* **548**, 461-465 (2017)；Harding, S. M. Mitotic progression

following DNA damage enables pattern recognition within micronuclei. *Nature* **548**, 466-470 (2017)；及 Bakhoun, S. F.等人，Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response. *Nature* **553**, 467-472 (2018))。在向細胞補充新鮮培養基後，吾人量測到 30 h 後細胞外 cGAMP 濃度線性增加至 100 nM (圖 1 之圖 D)。30 h 時，細胞外 cGAMP 分子之數量等於細胞內之數量(圖 1 之圖 E)。基於細胞外乳糖去氫酶(LDH)活性，吾人偵測到可忽略不計量之細胞死亡，此表明培養基中之 cGAMP 由活細胞輸出(圖 1 之圖 E)。吾人計算出輸出速率($v_{\text{輸出}}$)為 220 個分子細胞⁻¹ s⁻¹ (圖 1 之圖 F)。最後，培養基中之 cGAMP 可以通過 10 kDa 過濾器而無任何滯留，此應該保留細胞外小泡及蛋白質，表明 cGAMP 作為游離可溶性分子輸出(圖 1 之圖 H)。

【0434】 為了進一步確認 293T 細胞分泌之細胞外 cGAMP 主要呈可溶形式而非細胞外小泡形式，吾人使用 CD14⁺人類外周血單核細胞(PBMC)作為報導基因。先前已顯示該等細胞吸收可溶性 cGAMP，從而產生 IFN- β ¹⁷。吾人觀察到 CD14⁺ PBMC 藉由上調 *IFNB1* 對亞微莫耳濃度之可溶性 cGAMP 有反應(圖 9)。來自經 DNA 轉染之表現 cGAS 之 293T cGAS ENPP1^低細胞而非經 DNA 轉染之 cGAS 空 293T 細胞之條件化培養基誘導 CD14⁺細胞中之 *IFNB1* 表現，表明該活性係由 293T 細胞產生之細胞外 cGAMP 之結果(圖 1 之圖 H 及圖 I)。在條件化培養基中添加純化之可溶性重組小鼠 ENPP1 (mENPP1) (圖 8 之圖 D)耗盡可偵測到之 cGAMP，且亦除去此活性(圖 1 之圖 H 及圖 J)。由於可溶性 ENPP1 (MW = 約 100 kDa)不能透過膜，因此僅能進入可溶性細胞外 cGAMP，吾人得出結論，293T 細胞分泌可溶性 cGAMP。總之，吾人之資料展示，此人工癌細胞株藉由將其作為可溶性因子輸出至細胞外介質中，使其細胞內 cGAMP 保持穩態。

【0435】 圖 1 之圖 A 至圖 J：cGAMP 作為可溶性因子自 293T cGAS ENPP1^{-/-}

細胞輸出。**a**，cGAMP 及單一同位素標記之 cGAMP 之化學結構。**b**，藉由 LC-MS/MS 偵測 cGAMP，定量下限= 4 nM。(左圖) 0 nM、4 nM 及 10 nM 之 cGAMP 以及作為內標之 500 nM 單一同位素標記之 cGAMP (重 15 Da)之液相層析跡線；(右圖) cGAMP 之外部標準曲線， $R^2 = 0.996$ 。數據代表> 10 次獨立實驗。**c-d**，使用 LC-MS/MS 量測之無外源刺激之 293T cGAS ENPP1^{-/-}細胞之 cGAMP 之細胞內及細胞外濃度。在時間 0 時，向細胞補充無血清培養基。平均值± SEM ($n = 2$) 且一些誤差條因太小而無法可視化。數據代表三次獨立實驗。**e**，與細胞外/總乳糖去氫酶(LDH)活性之分數(右圖 y 軸)相比，根據(c)及(d)中之數據計算之細胞外/總 cGAMP 分子之分數(左圖 y 軸)。**f**，根據(d)中之數據計算之每個細胞隨時間輸出之 cGAMP 之量。使用線性回歸得到輸出速率。**g**，在使培養基通過 10 kDa 過濾器之前及之後量測之由 293T cGAS ENPP1^{-/-}細胞產生之細胞內及細胞外 cGAMP 濃度。平均值± SEM ($n = 2$)。數據代表兩次獨立實驗。**h**，用於(i)及(j)之條件化培養基轉移實驗之示意圖。用空 pcDNA 載體及經處理之+/- 20 nM 重組小鼠 ENPP1 (mENPP1)轉染 cGAS 空 293T 或 293T cGAS ENPP1^低細胞。將該等細胞之條件化培養基轉移至原代 CD14⁺人類 PBMC。**i**，將 *IFNB1* mRNA 水準正規化至 *CD14* 並計算相對於未經處理之 CD14⁺細胞之誘導倍數。平均值± SEM ($n = 4$)。*** $P = 0.0003$ (單因子 ANOVA)。在條件化培養基中量測 cGAMP 濃度。平均值± SEM ($n = 2$)。*** $P = 0.0002$ (單因子 ANOVA)。數據代表兩次獨立實驗。**j**，將 *IFNB1* mRNA 水準正規化至 *CD14* 並計算相對於未經處理之 CD14⁺細胞之誘導倍數。平均值± SEM ($n = 2$)。* $P = 0.04$ (單因子 ANOVA)。在條件化培養基中量測 cGAMP 濃度。平均值± SEM ($n = 2$)。** $P = 0.002$ (單因子 ANOVA)。數據代表兩次獨立實驗。

【0436】 圖 8 之圖 A 至 D：開發 LC-MS/MS 方法並構建 293T cGAS ENPP1^低

及 293T cGAS ENPP1^{-/-}細胞株。**a**，0 nM、20 nM 及 80 nM 之 cGAMP 之液相層析跡線；500 nM 之單一同位素標記之內標 cGAMP (重 15 Da)；及 2 μ M 之雙同位素標記之提取標準 cGAMP (重 30 Da) 的液相層析跡線。所有分析物之化學結構。**b**，藉由 LC-MS/MS 量測之細胞數對 ATP 濃度之校準。平均值 $\pm$ SEM ($n = 2$)。**c**，藉由西方墨點法分析之 293T、293T cGAS ENPP1^{-/-}及 293T cGAS ENPP1^低細胞株之 cGAS 表現(左圖)。來自各自 1 百萬個 293T cGAS、293T cGAS ENPP1^{-/-}及 293T cGAS ENPP1^低細胞之全細胞溶解物中 ³²P-cGAMP 之 ENPP1 水解活性，藉由 TLC 及放射自顯影量測(右圖)。溶解物數據代表兩次獨立實驗。**d**，自培養基純化之重組小鼠 ENPP1 之考馬斯凝膠(Coomassie gel)；在使用前匯集溶析部分(左圖)。藉由 TLC 分析之小鼠 ENPP1 之 ³²P-cGAMP 降解(右圖)。

【0437】 圖 9 之圖 A：CD14⁺ PBMC 對細胞外 cGAMP 有反應。**a**，用細胞外 cGAMP 刺激 CD14⁺ PBMC 之示意圖。**b**，用遞增濃度之細胞外 cGAMP 刺激人類 CD14⁺ PMBC 16 h，藉由 RT-qPCR 量測之 *IFNB1* 誘導。平均值 $\pm$ SEM ($n = 2$ 個技術性 qPCR 重複)。

ENPP1 僅調節細胞外 cGAMP

【0438】 由於當吾人自 293T 細胞中剔除 ENPP1 並在不含 ENPP1 之培養基中培養它們時，吾人第一次能夠觀察到細胞外 cGAMP，故吾人隨後研究了是否僅細胞外 cGAMP 受 ENPP1 調節。儘管有細胞外注釋，但 ENPP1 仍有可能在膜上翻轉定向，就酶 CD38 而言如此(參見例如 Zhao, Y. J.、Lam, C. M. C. 及 Lee, H. C. The membrane-bound enzyme CD38 exists in two opposing orientations. *Sci. Signal.* **5**, ra67 (2012))，或當其在 ER 腔中合成時可能具有活性，並且 cGAMP 可以跨過 ER 膜(圖 2 之圖 A)。為了研究 ENPP1 活性之定位，吾人用人類 *ENPP1* 表現質體轉染 293T cGAS ENPP1^{-/-}細胞，並確認其在全細胞裂解物中之活性(圖 2 之圖 B)。

在完整細胞中，ENPP1 表現耗盡細胞外 cGAMP，但不影響細胞內 cGAMP 濃度 (圖 2 之圖 C)。因此，在該等細胞中，細胞外而非細胞內 cGAMP 受 ENPP1 調節。

【0439】 圖 2 之圖 A 至 C：ENPP1 僅調節細胞外 cGAMP。a，ENPP1 活性之三個可能之細胞位置。b，用空載體或含有人類 *ENPP1* 之載體轉染 293T cGAS *ENPP1*^{-/-}細胞並在 24 h 後使用西方墨點法分析 ENPP1 蛋白質表現(頂部)及使用薄層層析(TLC)分析 ENPP1 ³²P-cGAMP 水解活性(底部)。數據代表兩次獨立實驗。c，使用 LC-MS/MS 量測之細胞內及細胞外 cGAMP 濃度。BQL = 定量下限。平均值 ± SEM (*n* = 2)。***P* = 0.002 (司徒頓 *t* 測試)。數據代表三次獨立實驗。

細胞不可滲透性 ENPP1 抑制劑之開發

【0440】 為了研究細胞外 cGAMP 之生理相關性以及其需要由特定水解酶調節之原因，吾人試圖藉由藥理學抑制 ENPP1 來操縱其濃度。吾人首先測試了非特異性 ENPP1 抑制劑 QS1 (圖 10 之圖 A) (Patel, S. D. 等人，Quinazolin-4-piperidin-4-methyl sulfamide PC-1 inhibitors: Alleviating hERG interactions through structure based design. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 19, 3339-3343 (2009)；及 Shayhidin, E. E. 等人，Quinazoline-4-piperidine sulfamides are specific inhibitors of human NPP1 and prevent pathological mineralization of valve interstitial cells. *Br. J. Pharmacol.* 172, 4189-4199 (2015))。儘管 QS1 可以抑制過表現 ENPP1 之細胞中之細胞外 cGAMP 降解，但其亦部分阻斷了 ENPP1 基因剔除細胞中之 cGAMP 輸出(圖 10 之圖 B)。QS1 處理之細胞具有升高之細胞內 cGAMP，此再次展示輸出係維持癌細胞中之 cGAMP 穩態之重要機制。在吾人之輸出研究中，輸出阻斷活性不包括 QS1 作為研究細胞外 cGAMP 之工具。膦酸鹽類似物化合物 1 經設計以在 ENPP1 催化位點螯合 Zn²⁺，並最小化細胞滲透性及避免細胞內脫靶(圖 3 之圖 A)。化合物 1 之 *K_{i,app}* 為 110 ± 10 nM (圖 3 之圖

B)，為 QS1 之效力之約 60 倍(圖 10 之圖 A)。

【0441】 吾人藉由進行三種獨立之滲透性分析來確認化合物 1 係細胞不可滲透的：平行人工膜滲透性分析(PAMPA)(圖 11 之圖 A)；腸細胞 Caco-2 滲透性分析(圖 11 之圖 B)；及上皮細胞 MDCK 滲透性分析(圖 11 之圖 C)。與具有高細胞滲透性及低細胞滲透性之對照化合物相比，化合物 1 在所有三種分析中皆屬於不可滲透化合物之類別。此外，其對密切相關之外核苷酸酶鹼性磷酸酶($K_{i,app} > 100 \mu\text{M}$)及 ENPP2 ($K_{i,app} = 5.5 \mu\text{M}$)具有低活性(圖 11 之圖 D)。儘管吾人不期望化合物 1 由於其低細胞滲透性而具有細胞內脫靶，但吾人測試了其與一組 468 種激酶之結合，以進一步確定其特異性。儘管其結構與 AMP 相似，化合物 1 在 $1 \mu\text{M}$ 下僅結合兩種激酶(圖 11 之圖 E)。化合物 1 在人類及小鼠肝微粒體中亦顯示高穩定性($t_{1/2} > 159 \text{ min}$)。總之，吾人展示化合物 1 係有效、細胞不可滲透、特異性且穩定之 ENPP1 抑制劑。

【0442】 接著，吾人量測了化合物 1 在維持過表現 ENPP1 之 293T cGAS 細胞之細胞外 cGAMP 濃度方面之功效，並獲得 $340 \pm 160 \text{ nM}$ 之 IC_{50} 值(圖 3 之圖 C)，其中 $10 \mu\text{M}$ 足以完全阻斷細胞外 cGAMP 降解(圖 3 之圖 D)。與 QS1 不同，化合物 1 對細胞內 cGAMP 無效應，此表明其不影響 cGAMP 輸出(圖 3 之圖 D)。因此，化合物 1 係可特異性增加細胞外 cGAMP 濃度之極好之 ENPP1 抑制劑工具化合物。

【0443】 最後，吾人測試了化合物 1 在加強 CD14^+ PBMC 可偵測到之細胞外 cGAMP 信號方面之功效。吾人首先確認了化合物 1 在所用濃度下對 PBMC 無毒性(圖 11 之圖 F)。來自過表現 ENPP1 之 293T cGAS 細胞之條件化培養基未能在 CD14^+ 細胞中誘導 *IFNB1* 表現(圖 3 之圖 E 及圖 F)。然而，化合物 1 拯救了培養基中之細胞外 cGAMP 水準及 CD14^+ 細胞中 *IFNB1* 表現之誘導(圖 3 之圖 F)。該

等結果展示，ENPP1 之酶活性而非作為跨膜蛋白之潛在支架效應抑制了 CD14⁺ PBMC 對胞外 cGAMP 之反應。總之，吾人之數據表明細胞外 cGAMP 水準可以因 ENPP1 表現而降低且因 ENPP1 抑制而升高，此影響活體外 CD14⁺ PBMC 之活化。

【0444】 圖 3 之圖 A 至 F：細胞不可滲透性 ENPP1 抑制劑之活性。**a**，化合物 1 之化學結構。**b**，在 pH 7.5 下使用 ³²P-cGAMP 作為受質，化合物 1 對純化之小鼠 ENPP1 之抑制活性($K_{i,app} = 110 \pm 10$ nM)。平均值 $\pm$ SEM ($n = 3$ 次獨立實驗)，且一些誤差條因太小而無法可視化。**c**，化合物 1 對在 293T cGAS ENPP1^{-/-}細胞中瞬時表現之人類 ENPP1 之抑制活性(IC₅₀ = 340 $\pm$ 160 nM)。平均值 $\pm$ SEM ($n = 2$)。**d**，在 10 μ M 化合物 1 存在或不存在下用空 pcDNA 載體或含有人類 ENPP1 之載體轉染之 293T cGAS ENPP1^{-/-}細胞之細胞內及細胞外 cGAMP 濃度。BQL = 定量下限。平均值 $\pm$ SEM ($n = 3$)。**** $P < 0.0001$ (單因子 ANOVA)。數據代表兩次獨立實驗。**e**，條件化培養基實驗之示意圖。用含有人類 ENPP1 之載體轉染 293T cGAS ENPP1^低細胞並在化合物 1 存在或不存在下培育。將來自該等細胞之條件化培養基轉移至原代 CD14⁺人類 PBMC。**f**，將 IFNB1 mRNA 水準正規化至 CD14 並計算相對於未經處理之 CD14⁺細胞之誘導倍數。平均值 $\pm$ SEM ($n = 2$)。** $P = 0.007$ (單因子 ANOVA)。在條件化培養基中量測 cGAMP 濃度。平均值 $\pm$ SEM ($n = 2$)。** $P = 0.006$ (單因子 ANOVA)。數據代表兩次獨立實驗。

【0445】 圖 10 之圖 A 至 B：化合物 1 相對於 QS1 之改良。

【0446】 **a**，QS1 之結構及在 pH 7.5 下使用 ³²P-cGAMP 作為受質，其對純化之小鼠 ENPP1 之抑制活性(與化合物 1 相比)(QS1 $K_{i,app} = 6.4 \pm 3.2$ μ M)。平均值 $\pm$ SEM ($n = 2$ 次獨立實驗)。**b**，在 QS1 存在或不存在下用空載體或含有人類 ENPP1 之載體轉染之 293T cGAS ENPP1^{-/-}細胞之細胞內、細胞外及總 cGAMP。平均值

± SEM ($n = 2$)。* $P < 0.05$ 。** $P < 0.01$ (單因子 ANOVA)。

【0447】 圖 11 之圖 A 至 F：化合物 1 係細胞不可滲透的、對 ENPP1 具有特異性且無毒性。**a**，在人工膜滲透性分析(PAMPA)中化合物 1 之滲透性。

【0448】 **b**，在腸細胞 Caco-2 分析中化合物 1 之滲透性。PA = 峰面積，IS = 內標。將化合物(包括化合物 1、阿替洛爾(atenolol，低被動滲透性陰性對照)及普萘洛爾(propranolol，高被動滲透性陽性對照))在 Caco-2 單層之頂端培育 2 小時。藉由 LC-MS/MS 監測基底外側之化合物濃度。根據斜率計算表觀滲透率(P_{app})。數據代表兩次獨立實驗。**c**，在上皮細胞 MDCK 滲透性分析中化合物 1 之滲透性。**d**，化合物 1 對鹼性磷酸酶(ALPL)及 ENPP2 之抑制活性。平均值± SEM ($n = 2$)。**e**，化合物 1 之 Kinome 相互作用圖(測試了 468 種激酶)，將激酶抑制繪示為對照之百分比。使用 TREEspot™軟體工具產生影像並用 DiscoveRx 公司旗下 ©DiscoveRX Corporation 2010 之 KINOMEscan®許可後再版。**f**，藉由 CellTiterGlo 量測之細胞活力。將總 PBMC 及 CD14⁺ PBMC 與化合物 1 一起培育 16 小時且然後使用 CellTiterGlo 分析 ATP 水準。將數據歸正規化至無化合物 1 以計算細胞活力%。

癌細胞表現 cGAS 且在培養物中連續輸出 cGAMP

【0449】 為了確定細胞外 cGAMP 是否能在活體內作為癌細胞分泌之危險信號發揮作用，吾人首先試圖鑒定輸出 cGAMP 之腫瘤模型。吾人在培養物中測試了一種人類癌細胞株(MDA-MB-231)及三種小鼠癌細胞株(E0771、MC38 及 4T1-Luc，其係用於活體內成像之表現螢光素酶之 4T1 細胞株)，該等癌細胞株皆表現 cGAS (圖 4 之圖 A)。該等細胞中之細胞內 cGAMP 濃度難以偵測。然而，藉由額外濃縮及純化步驟，吾人能夠在 4T1-Luc 細胞中偵測到 5.8×10^{-10} nmol/細胞(約 150 nM)細胞內 cGAMP (圖 4 之圖 B)。使用 shRNA 敲低 cGAS 使得 cGAS

蛋白水準降低及細胞內 cGAMP 水準降低，此展示 cGAS 表現控制 4T1-Luc 細胞中存在之 cGAMP 之量(圖 12 之圖 A 及圖 B)。使用化合物 1 抑制細胞表面及細胞培養基中之可溶性 ENPP1，吾人在所有該等細胞株中偵測到連續 cGAMP 輸出，並且細胞外 cGAMP 水準在 48 h 內達到約 6×10^{-9} nmol/細胞(稀釋至培養基中時為約 10 nM)(圖 4 之圖 C 及圖 D 以及圖 12 之圖 C 及圖 D)。值得注意的是，此係細胞內存在之 cGAMP 量之約 10 倍，表明癌細胞藉由輸出高效地清除其 cGAMP。在腫瘤細胞中，電離輻射(IR)可增加胞質 DNA 並活化 cGAS 依賴性 IFN- β 產生(參見例如，Bakhoun, S. F.等人，Numerical chromosomal instability mediates susceptibility to radiation treatment. *Nat. Commun.* **6**, 1-10 (2015)；及 Vanpouille-Box, C.等人，DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity. *Nat. Commun.* **8**, 15618 (2017))。事實上，在 2 天后，IR 處理亦增加了 4T1-Luc 細胞中之細胞外 cGAMP 產生(圖 4 之圖 E 及圖 12 之圖 E)。總之，吾人之數據展示該等癌細胞株不斷產生並高效地輸出 cGAMP，並且可以用 IR 刺激以產生更多之細胞外 cGAMP。

【0450】 圖 4 之圖 A 至 E: 癌細胞表現 cGAS 並在培養物中連續輸出 cGAMP。**a**，藉由西方墨點法分析之 4T1-Luc、E0771、MDA-MB-231 及 MC38 之 cGAS 表現。**b**，在沒有外源刺激之情況下，對 4T1-Luc 細胞中之細胞內 cGAMP 濃度之估計。平均值 $\pm$ SEM ($n = 2$)。**c**，在 48 小時內由 MC38 細胞產生之細胞外 cGAMP。在時間 0 時，用補充有 50 μ M 化合物 1 之培養基來復蘇細胞。平均值 $\pm$ SEM ($n = 2$)。數據代表兩次獨立實驗。**d**，在 50 μ M 化合物 1 存在下在 48 h 後量測之 4T1-Luc、E0771 及 MDA-MB-231 細胞產生之細胞外 cGAMP。*BQL* = 定量下限。平均值 $\pm$ SEM ($n = 2$)。**e**，在 48 小時內由 4T1-Luc 細胞產生之細胞外 cGAMP。在時間 0 時，細胞未經處理或用 20 Gy IR 處理，並用補充有 50 μ M 化

合物 1 之培養基復蘇。平均值 $\pm$ SEM ($n = 2$)。* $P = 0.04$ (司徒頓 t 測試)。

【0451】 圖 12 之圖 A 至 E：癌細胞在培養物中連續輸出 cGAMP。**a**，藉由西方墨點法分析之 4T1-Luc WT 及 4T1-Luc shcGAS 細胞株之 cGAS 表現。**b**，在無外源刺激之情況下 4T1-Luc WT 及 4T1-Luc shcGAS 細胞株之細胞內 cGAMP。平均值 $\pm$ SEM ($n = 2$)。自圖 4 之圖 b 重複 4T1-Luc WT 數據以進行比較。**c**，圖 4 之圖 c 中所顯示實驗之細胞外 cGAMP (以培養基濃度單位繪示)。**d**，圖 4 之圖 d 中所顯示實驗之細胞外 cGAMP (以培養基濃度單位繪示)。 BQL = 定量下限。平均值 $\pm$ SEM ($n = 2$)。**e**，圖 4 之圖 c 中所顯示實驗之細胞外 cGAMP (以培養基濃度單位繪示)。平均值 $\pm$ SEM ($n = 2$)。** $P = 0.004$ (司徒頓 t 測試)。

細胞外 cGAMP 之隔離依賴於腫瘤 cGAS 及宿主 STING 減少腫瘤相關樹突細胞

【0452】 在腫瘤中，細胞外空間經估計為細胞內空間體積之 0.3-0.8 倍²⁸。然而，在細胞培養中，細胞外空間之體積為細胞內空間體積之約 250-1000 倍。吾人每 1×10^6 個細胞使用 1 mL 培養基且估計細胞體積為約 1-4 pL 來進行此計算。因此，與腫瘤微環境相比，吾人之細胞培養系統將細胞外空間稀釋了 300-3000 倍。鑒於此稀釋係數及吾人對癌細胞活體外輸出之奈莫耳之細胞外 cGAMP 之量測，吾人預測腫瘤微環境中之細胞外 cGAMP 可以達到微莫耳範圍，此可能導致腫瘤細胞之先天免疫識別。認識到吾人活體外細胞實驗之局限性，吾人轉向活體內實驗來研究細胞外 cGAMP 之作用(圖 5 之圖 A)。首先，吾人藉由剔除腫瘤細胞中之 cGAS (圖 13 之圖 A)並利用 C57BL/6 背景中之 $cGAS^{-/-}$ 及 $STING^{-/-}$ 小鼠來測定腫瘤對宿主 cGAMP 之重要性。吾人亦開發了中和劑作為特異性隔離細胞外 cGAMP 之工具(圖 5 之圖 A)。吾人利用了 STING 之可溶性胞質結構域(圖 5 之圖 B)，其結合 cGAMP 且 K_d 為 73 ± 14 nM (圖 5 之圖 C)。吾人亦產生了 R237A 突變體 STING (參見例如 Gao, P.等人，*Cell* **154**, 748-762 (2013))作為非結合

STING 對照(圖 5 之圖 B-D)。為了測試該等蛋白在細胞培養中之中和功效，吾人使用 CD14⁺ PBMC。野生型(WT) STING (中和性 STING)能夠以預測之 2:1 化學計量中和細胞外 cGAMP，而非結合 STING 即使在 200 倍之濃度下亦無效應(圖 5 之圖 E)。

【0453】 吾人在小鼠中建立了 E0771 原位腫瘤，隨後腫瘤內注射中和性 STING 以耗盡細胞外 cGAMP，並切除腫瘤以對腫瘤相關白血球染色。在 WT E0771 腫瘤中，中和性 STING 顯著降低了總 CD45⁺/MHC-II⁺腫瘤相關抗原呈遞細胞(APC)群體中之 CD11c⁺樹突細胞群體，此表明細胞外 cGAMP 可藉由免疫系統偵測到(圖 5 之圖 F 及圖 G 以及圖 13 之圖 B)。當腫瘤在 cGAS^{-/-}小鼠中生長時，細胞外 cGAMP 耗盡亦減少了 CD11c⁺群體，表明宿主細胞對細胞外 cGAMP 產生沒有顯著貢獻(圖 5 之圖 G 以及圖 13 之圖 B)。相比之下，當使用 cGAS^{-/-} E0771 細胞(匯集多個純系以達成充分之剔除但使純系效應最小化)或 STING^{-/-}小鼠時，細胞外 cGAMP 耗盡不影響 CD11c⁺群體。此展示腫瘤細胞而非宿主細胞係細胞外 cGAMP 之主要產生者，該細胞外 cGAMP 接著由宿主 STING 感知(圖 5 之圖 G 及圖 13 之圖 B)。吾人亦在 BALB/c 背景下測試了原位 4T1-Luc 腫瘤模型。儘管 cGAS 及 STING 剔除品系尚未在此背景下建立，吾人剔除了 4T1-Luc 腫瘤中之 cGAS。將中和性 STING 腫瘤內注射至 WT 4T1-Luc 腫瘤中顯著降低 CD45⁺/MHC II⁺群體中之腫瘤相關 CD11c⁺群體(圖 5 之圖 H 及圖 13 之圖 C)。相比之下，細胞外 cGAMP 耗盡在 cGAS^{-/-} 4T1-Luc 腫瘤中無效應(圖 5 之圖 H 及圖 13 之圖 C)。吾人亦藉由腫瘤內注射 mENPP1 蛋白耗盡細胞外 cGAMP (圖 8 之圖 D)，並再次觀察到 CD45⁺/MHC II⁺群體中之 CD11c⁺細胞減少(圖 5 之圖 I 及圖 13 之圖 D)。吾人之 E0771 及 4T1-Luc 模型之結果共同展示腫瘤細胞產生之細胞外 cGAMP 以依賴於宿主 STING 但獨立於宿主 cGAS 之方式活化先天免疫反應。總

之，吾人之數據展示，癌細胞產生之細胞外 cGAMP 係引發先天免疫反應之危險信號。

【0454】 圖 5 之圖 A 至 I:細胞外 cGAMP 之隔離以腫瘤 cGAS 及宿主 STING 依賴性方式減少腫瘤相關樹突細胞。**a**，評價細胞外 cGAMP 在活體內之作用之實驗設置。**b**，重組小鼠 WT STING 及 R237A STING 之考馬斯凝膠。**c**，小鼠 WT STING(中和)及 R237A STING (非結合)之胞質結構域之結合曲線(藉由使用放射性標記之 ^{35}S -cGAMP 作為探針之膜結合分析來確定)。平均值 $\pm$ SEM ($n = 2$ ，來自兩次獨立實驗)。**d**，小鼠 WT STING 與 cGAMP 複合物之晶體結構，R237 以粉色突出顯示(PDB ID 4LOJ)。**e**，在中和性或非結合性 STING ($2\ \mu\text{M}$ 至 $100\ \mu\text{M}$ ，2.5 倍稀釋)存在下，用 $2\ \mu\text{M}$ cGAMP 處理之 CD14^+ PBMC 中之 *IFNB1* mRNA 誘導倍數。平均值 $\pm$ SEM ($n = 2$ 個技術性 qPCR 重複)。**f**，在第 0 天，將 WT 或 $\text{cGAS}^{-/-}$ E0771 細胞(1×10^6)原位注射至 WT、 $\text{cGAS}^{-/-}$ 或 $\text{STING}^{-/-}$ C57BL/6J 小鼠中。在第 2 天腫瘤內注射中和性 STING (WT 小鼠 $n = 5$ ； $\text{cGAS}^{-/-}$ 小鼠 $n = 5$ ； $\text{STING}^{-/-}$ 小鼠 $n = 4$)或非結合性 STING (WT 小鼠 $n = 5$ ； $\text{cGAS}^{-/-}$ 小鼠 $n = 4$ ； $\text{STING}^{-/-}$ 小鼠 $n = 5$)。在第 3 天收穫腫瘤並藉由 FACS 分析。針對 FSC-A/SSC-A、單重態 (FSC-W)、活細胞、 CD45^+ 、 MHC II^+ 及 CD11c^+ 群體中之細胞對樣品設門。**g**，總 APC 中 CD11c^+ 細胞之百分比。平均值 $\pm$ SD。 $*P = 0.015$ 。 $**P = 0.008$ (韋爾奇 t 測試)。**h**，在 WT BALB/cJ 小鼠中用 WT (中和性 STING $n = 3$ ；非結合性 STING $n = 2$)或 $\text{cGAS}^{-/-}$ 4T1-Luc 細胞($n = 5$)實施與(f)及(g)中相同之程序。平均值 $\pm$ SD。 $*P = 0.011$ 。(韋爾奇 t 測試)。**i**，在第 0 天，將 4T1-Luc 細胞(1×10^6)原位注射至 WT BALB/cJ 小鼠中。在第 2 天腫瘤內注射 PBS ($n = 5$)或重組小鼠 ENPP1 (mENPP1) ($n = 6$)。在第 3 天收穫腫瘤並藉由 FACS 分析。平均值 $\pm$ SD。 $*P = 0.033$ 。(韋爾奇 t 測試)。

【0455】 圖 13 之圖 A 至 D: 細胞外 cGAMP 之隔離以腫瘤 cGAS 及宿主 STING 依賴性方式減少腫瘤相關樹突細胞。a, 自 CRISPR 剔除匯集物亞選殖之 E0771 (左圖) 及 4T1-Luc (右圖) cGAS^{-/-}細胞。將 E0771 cGAS^{-/-}亞純系 1、2、4、6、8 及 9 彙集, 然後注射至小鼠中。將 4T1-Luc cGAS^{-/-}亞純系 4、7 及 8 彙集, 然後注射至小鼠中。b, 圖 5g 所顯示實驗之幾何平均值。平均值 $\pm$ SD。* $P = 0.049$ (WT 腫瘤/WT 宿主)。* $P = 0.015$ (WT 腫瘤/cGAS^{-/-}宿主)。(韋爾奇 t 測試)。c, 圖 5h 所顯示實驗之幾何平均值。平均值 $\pm$ SD。** $P = 0.009$ (韋爾奇 t 測試)。d, 圖 5i 所顯示實驗之幾何平均值。平均值 $\pm$ SD。* $P < 0.015$ (韋爾奇 t 測試)。

【0456】 藉由降低 ENPP1 活性增加細胞外 cGAMP 會增加樹突細胞浸潤並使乳房腫瘤更易治療。

【0457】 ENPP1 在一些乳癌中高度表現且其水準與較差預後相關(參見例如 Lau, W. M.等人, Enpp1: A Potential Facilitator of Breast Cancer Bone Metastasis. *PLoS One* **8**, 1-5 (2013); Takahashi, R. U.等人, Loss of microRNA-27b contributes to breast cancer stem cell generation by activating ENPP1. *Nat. Commun.* **6**, 1-15 (2015); 及 Umar, A.等人, Identification of a Putative Protein Profile Associated with Tamoxifen Therapy Resistance in Breast Cancer. *Mol. Cell. Proteomics* **8**, 1278-1294 (2009))。高 ENPP1 表現可能係乳癌用於耗盡細胞外 cGAMP 及抑制免疫偵測之機制。吾人量測了三種三陰性乳癌細胞 4T1-Luc、E0771 及 MDA-MB-231 中之 ENPP1 活性, 其中 MDA-MB-231 及 4T1-Luc 展現高 ENPP1 活性(圖 14 之圖 A)。因此, 吾人選擇三陰性、轉移性及原位 4T1-Luc 小鼠模型來探測 ENPP1 對腫瘤免疫偵測、生長及治療反應之效應。

【0458】 吾人首先測試了 ENPP1 對腫瘤浸潤樹突狀細胞之效應。吾人在 4T1-Luc 細胞中剔除 ENPP1, 藉由其缺乏酶活性來驗證純系(市售 ENPP1 抗體的

靈敏性不足以驗證剔除)，並彙集多個純系以最小化純系效應(圖 14 之圖 B)。在 4T1-Luc 植入後，吾人用 20 Gy IR 之劑量處理腫瘤以誘導 cGAMP 產生，並在 24 小時後切除腫瘤以分析其腫瘤相關白血球組成。ENPP1^{-/-}腫瘤具有比 WT 腫瘤更大之腫瘤相關 CD11c⁺群體(圖 6 之圖 A 及圖 14 之圖 C)。然後吾人測試了 ENPP1 對 4T1-Luc 腫瘤之免疫排斥之效應。此係侵襲性腫瘤模型，其通常在腫瘤植入後兩週內轉移至肺中(Pulaski, B. A. 及 Ostrand-Rosenberg, S. Reduction of Established Spontaneous Mammary Carcinoma Metastases following Immunotherapy with Major Histocompatibility Complex Class II and B7.1 Cell-based Tumor Vaccines. *Cancer Res.* **58**, 1486-1493 (1998))。ENPP1^{-/-}腫瘤在達到 100 mm³之前之初始腫瘤生長速率與 WT 腫瘤相同，此表明吾人沒有選擇生長緩慢之純系(圖 14 之圖 D)。然而，已建立之 ENPP1^{-/-}腫瘤之侵襲性較低(圖 6 之圖 B)，並且對 IR 之反應性較大(圖 6 之圖 B)。在沒有 IR 之情況下，適應性免疫檢查點阻斷劑抗 CTLA-4 在皺縮腫瘤中不與 ENPP1^{-/-}協同作用(圖 14 之圖 E 及圖 F)。引人注目的是，當吾人使用 IR 誘導 cGAMP 產生時，抗 CTLA-4 治癒了 40%之 ENPP1^{-/-}腫瘤，但未治愈一例 WT 腫瘤(圖 6 之圖 C)。直接腫瘤內注射細胞外 cGAMP 在 ENPP1^{-/-}腫瘤中比在 WT 腫瘤中更有效，並且在不存在抗 CTLA-4 之情況下與 IR 協同作用治愈 30%之小鼠(圖 6 之圖 D)。總之，ENPP1 抑制細胞外 cGAMP，即 4T1-Luc 腫瘤之先天免疫偵測，並對其對 IR 及適應性免疫檢查點阻斷之反應產生負面影響。

【0459】 圖 6 之圖 A 至 D：ENPP1^{-/-}腫瘤動員先天免疫浸潤，侵襲性較低，對 IR 及抗 CTLA-4 療法更敏感。**a**，在第 0 天，將 WT 或 ENPP1^{-/-} 4T1-Luc 細胞(1×10^6)原位注射至 WT BALB/cJ 小鼠中(每組 $n = 5$)。在第 2 天，用 20 Gy 之 IR 處理腫瘤。在第 3 天收穫腫瘤並藉由 FACS 分析。在注射前將多個 ENPP1^{-/-} 4T1-Luc 細

胞純系匯集，以使純系效應最小化。 $**P = 0.008$ (韋爾奇 t 測試)。**b**，用 0 Gy 或 20 Gy IR 處理已建立之 WT 或 ENPP1^{-/-} 4T1-Luc 腫瘤($100 \pm 20 \text{ mm}^3$)一次，然後在 IR 後第 2 天、第 5 天及第 7 天腹膜內注射三次 IgG。(對於 WT 4T1-Luc, $n = 9$ ，對於 ENPP1^{-/-} 4T1-Luc $n = 10$)。顯示腫瘤體積及卡普蘭邁耶曲線。 P 值係藉由使用在第 20 天進行 Tukey 調整之事後測試達成之成對比較(腫瘤體積)及對數秩曼特爾-考克斯測試(卡普蘭-邁耶)來確定。 $****P < 0.0001$ 。**c**，用 0 Gy 或 20 Gy IR 處理已建立之 WT 或 ENPP1^{-/-} 4T1-Luc 腫瘤($100 \pm 20 \text{ mm}^3$)一次，然後在 IR 後第 2 天、第 5 天及第 7 天腹膜內注射三次抗 CTLA-4 (對於所有組 $n = 10$)。顯示腫瘤體積及卡普蘭邁耶曲線。 P 值係藉由使用在第 20 天進行 Tukey 調整之事後測試達成之成對比較(腫瘤體積)及對數秩曼特爾-考克斯測試(卡普蘭邁耶)來確定。 $****P < 0.0001$ 。在 ENPP1^{-/-} 4T1-Luc + IR (20) + 抗 CTLA-4 治療組中，4/10 (40%)之小鼠係藉由生物發光成像驗證之無腫瘤存活者。**d**，用 20 Gy IR 處理用錯義 sgRNA 序列感染之已建立之 4T1-Luc 腫瘤或 ENPP1^{-/-} 4T1-Luc 腫瘤($100 \pm 20 \text{ mm}^3$)一次，隨後在 IR 後第 2 天、第 4 天及第 7 天腫瘤內注射三次 $10 \mu\text{g}$ cGAMP (對於兩組 $n = 10$)。顯示腫瘤體積及卡普蘭邁耶曲線。 P 值係藉由使用在第 20 天進行 Tukey 調整之事後測試達成之成對比較(腫瘤體積)及對數秩曼特爾-考克斯測試(卡普蘭邁耶)來確定。 $*P < 0.05$ ， $****P < 0.0001$ 。在 ENPP1^{-/-} 4T1-Luc + IR (20) cGAMP 治療組中，3/10 (30%)之小鼠係藉由生物發光成像驗證之無腫瘤存活者。將來自 **b-d** 中不同治療組之小鼠共同圈養且使實驗者盲化。

【0460】 圖 14 之圖 A 至 F：已建立之 ENPP1^{-/-}腫瘤導致腫瘤相關樹突細胞增加，侵襲性較低，且對 IR 及抗 CTLA-4 療法更敏感。**a**，使用 ^{32}P -cGAMP 降解分析測得之在 4T1-Luc、E0771 及 MDA-MB231 細胞中之 ENPP1 活性。數據代表三次獨立實驗。**b**，使用 ^{32}P -cGAMP 降解分析驗證 ENPP1^{-/-} 4T1-Luc 純系。根

據蛋白質濃度將不同純系之溶解物正規化。將 ENPP1^{-/-} 4T1-Luc 純系 2-6 及 13-18 匯集，然後注射至小鼠中。**c**，圖 6a 所顯示實驗之幾何平均值。平均值 $\pm$ SD。 $*P = 0.012$ (韋爾奇 *t* 測試)。**d**，(左圖)治療當天 WT ($n = 55$)對 ENPP1^{-/-} ($n = 55$) 4T1-Luc 細胞之腫瘤體積；(右圖)初始腫瘤生長速率，表示為達到 $100 \text{ mm}^3 \pm 20 \text{ mm}^3$ 大小所需之腫瘤體積/天。平均值 $\pm$ SD (韋爾奇 *t* 測試)。**e**，帶有腫瘤之小鼠之生物發光影像。**f**，圖 6a、6b 中所顯示數據之重繪，以突出顯示 IgG 治療組與抗 CTLA-4 治療組之間之比較。在腫瘤達到所需大小後之第 2 天、第 5 天及第 7 天，用三次腹膜內注射 IgG 或抗 CTLA-4 來處理已建立之 WT 或 ENPP1^{-/-} 4T1-Luc 腫瘤($100 \pm 20 \text{ mm}^3$)。(對於 WT 4T1-Luc + IgG $n = 9$ ，對於所有其他組 $n = 10$)。顯示腫瘤體積及卡普蘭邁耶曲線。*P* 值係藉由使用在第 20 天進行 Tukey 調整之事後測試達成之成對比較(腫瘤體積)及對數秩曼特爾-考克斯測試(卡普蘭邁耶)來確定。

【0461】 吾人之遺傳結果表明，ENPP1 係藥理學抑制之潛在靶。吾人開發之 ENPP1 抑制劑化合物 1 在腫瘤內注射時展現快速清除。在沒有對投與途徑進行廣泛研究且沒有對製藥公司通常在藥物開發後期進行之相應配方最佳化的情況下，吾人詢問化合物 1 在活體內是否有效應。吾人在 IR 處理後立即向腫瘤注射化合物 1，並在 24 小時後觀察到腫瘤相關之 CD11c⁺群體之增加(圖 7 之圖 A 及圖 15)。值得注意的是，化合物 1 與 IR 及抗 CTLA-4 協同作用以達成 10%之治愈率(圖 7 之圖 B)。最後，觀察到化合物 1 與 IR 及 cGAMP 協同作用以使腫瘤皺縮，延長存活期，並達成 10%之治愈率(圖 7 之圖 C)。總之，該等結果展示 ENPP1 可經藥理學靶向以增強癌症之先天免疫識別。

【0462】 圖 7 之圖 A 至 C：ENPP1 抑制與 IR 處理及抗 CTLA-4 協同作用以發揮抗腫瘤效應。**a**，在第 0 天，將 4T1-Luc 細胞(1×10^6)原位注射至 WT BALB/cJ 小鼠中。在第 2 天，用 20 Gy IR 處理腫瘤並腫瘤內注射 PBS ($n = 4$)或化合物 1 (n

= 5)。在第 3 天收穫腫瘤並藉由 FACS 分析。 $*P = 0.047$ (韋爾奇 t 測試)。**b**，用 20 Gy IR 處理已建立之 4T1-Luc 腫瘤($100 \pm 20 \text{ mm}^3$)一次，然後在第 2 天、第 4 天及第 7 天腫瘤內注射三次 PBS 或化合物 1，並在第 2 天、第 5 天及第 7 天腹膜內注射抗 CTLA-4 (對於所有治療組 $n = 17-19$)。顯示腫瘤體積及卡普蘭邁耶曲線。 P 值係藉由使用在第 40 天進行 Tukey 調整之事後測試達成之成對比較(腫瘤體積)及對數秩曼特爾-考克斯測試(卡普蘭邁耶)來確定。**c**，用 20 Gy IR 處理已建立之 4T1-Luc 腫瘤($100 \pm 20 \text{ mm}^3$)一次，隨後在 IR 後第 2 天、第 4 天及第 7 天腫瘤內注射三次單獨 cGAMP 或 cGAMP + 化合物 1 (每個治療組 $n = 9$)。顯示腫瘤體積及卡普蘭邁耶曲線。 P 值係藉由使用在第 40 天進行 Tukey 調整之事後測試達成之成對比較(腫瘤體積)及對數秩曼特爾-考克斯測試(卡普蘭邁耶)來確定。

【0463】 圖 15 顯示顯示 ENPP1 抑制與 IR 處理協同作用以增加腫瘤相關樹突細胞。圖 7 之圖 a 中所顯示實驗之幾何平均值。平均值 $\pm$ SD。 $*P < 0.05$ (韋爾奇 t 測試)。

【0464】 圖 16：自合成細胞至靶細胞之 cGAMP 傳遞之不同模式。(1)經由間隙連結擴散；(2)包裝成出芽病毒顆粒並在下一輪感染中傳遞；及(3)輸出至細胞外空間中。

【0465】 圖 17：cGAMP 係癌症危險信號。APC 可以經由不同之 cGAS 依賴機制來感知腫瘤細胞：(1)藉由腫瘤源性 dsDNA 活化 APC cGAS，(2) APC 感知腫瘤細胞分泌之 I 型 IFN，及(3) APC 感知腫瘤細胞組成性產生及輸出之 cGAMP。

討論

【0466】 本揭示案之結果提供了 cGAMP 輸出之證據。細胞-細胞 cGAMP 轉移可經由間隙連結及病毒顆粒發生。本揭示案提供 cGAMP 可以穿行細胞外空間之活體外及活體內證據(參見例如圖 16)。cGAMP 輸出係癌細胞之標誌，此乃因

吾人測試之所有細胞株在沒有外部刺激之情況下合成並輸出 cGAMP。由於染色體不穩定性及異常之胞質 dsDNA 視為腫瘤固有之特性，並且腫瘤細胞很少使 cGAS 不活化(參見例如 Bakhoun, S. F.等人，Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response. *Nature* **553**, 467-472 (2018))，吾人推斷恒定之 cGAMP 產生及輸出亦可能係腫瘤細胞固有之特性。由於尚未鑒定出胞質 cGAMP 水解酶且 ENPP1 不能降解細胞內 cGAMP，因此目前輸出係自胞質液移除 cGAMP 之唯一機制且代表了除泛素介導之 STING 降解外關閉細胞內 STING 信號傳導之另一種方式(參見例如 Konno, H.、Konno, K.及 Barber, G. N. Cyclic dinucleotides trigger ULK1 (ATG1) phosphorylation of STING to prevent sustained innate immune signaling. *Cell* **155**, 688-698 (2013))。然而，此種清除機制使癌細胞暴露於免疫偵測下。

【0467】事實上，吾人之結果展示癌細胞輸出之 cGAMP 係藉由免疫系統偵測到之危險信號。來自癌細胞之新抗原由 APC 呈遞以交叉引發細胞毒性 CD8⁺ T 細胞，最終進行癌症特異性殺傷。然而，較難理解 APC 最初偵測癌細胞之方式。免疫原性腫瘤將 dsDNA 作為危險信號釋放至 CD11c⁺樹突細胞，此係 APC 之重要類型(參見例如 Xu, M. M.等人，Dendritic Cells but Not Macrophages Sense Tumor Mitochondrial DNA for Cross-priming through Signal Regulatory Protein a Signaling. *Immunity* **47**, 363-373 (2017))。此外，癌細胞對輻射誘導之自身胞質 dsDNA 有反應並產生 IFN 作為危險信號(Vanpouille-Box, C.等人，DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity. *Nat. Commun.* **8**, 15618 (2017))。在 B16 黑素瘤模型中，腫瘤 cGAS 之催化活性以宿主 STING 依賴性方式與腫瘤免疫性相關聯(參見例如 Marcus, A.等人，Tumor-Derived cGAMP Triggers a STING-Mediated Interferon Response in Non-tumor Cells to Activate the

NK Cell Response. *Immunity* **49**, 754-763.e4 (2018)), 表明 cGAMP 可以自腫瘤細胞轉移至宿主細胞, 其機制未知。在本文中, 吾人提供了癌細胞產生可溶性細胞外 cGAMP 作為危險信號之直接證據, 此導致腫瘤微環境中之樹突細胞之數量增加(圖 17)。cGAMP 輸出係沒有物理連接但非常接近之細胞之間 cGAMP 通信之重要模式。與細胞介素不同, cGAMP 不能在細胞外空間中長距離移行而不發生降解及/或稀釋至其有效濃度以下。此特性與神經遞質係相同的, 並使 cGAMP 有資格成為第一種鑒定出之免疫遞質。

【0468】 因此, 若癌症不能迅速清除 cGAMP, 將 cGAMP 釋放至細胞外空間中係該等癌症之致命弱點。吾人展示 ENPP1 在活體外負調節細胞外 cGAMP 信號傳導並在小鼠中負調節其下游抗癌免疫活化。由於腫瘤源性可溶性 cGAMP 係可自由擴散的, 故在一個細胞表面上過表現 ENPP1 肯定能清除附近微環境中之 cGAMP, 並為其鄰域提供適應性。在人類中, 乳癌中之 ENPP1 表現水準與耐藥性(參見例如 Umar, A.等人, *Mol. Cell. Proteomics* **8**, 1278-1294 (2009))、骨轉移(參見例如 Lau, W. M.等人, *PLoS One* **8**, 1-5 (2013)及較差預後(Takahashi, R. U.等人, *Nat. Commun.* **6**, 1-15 (2015))相關聯。ENPP1 可作為癌症免疫療法應用之先天免疫檢查點進行靶向抑制。

【0469】 儘管出於清楚理解之目的, 已經藉助圖解說明及實例對前述發明進行了相當詳細之描述, 但根據本發明之教示, 熟習此項技術者容易地明了, 在不脫離所附申請專利範圍之精神或範圍之情況下, 可以對本發明進行某些改變及修改。

【0470】 因此, 前文僅說明了本發明之原理。應當理解, 熟習此項技術者將能夠設計各種佈置, 該等佈置儘管在本文中沒有明確描述或顯示, 但其體現了本發明之原理, 並且包括在本發明之精神及範圍內。此外, 本文所列舉之所有

實例及條件語言主要意欲幫助讀者理解本發明之原理及發明人對推進此項技術所貢獻之概念，並且應解釋為(但不限於)該等具體列舉之實例及條件。此外，本文列舉本發明之原理、態樣及實施例以及其具體實例之所有陳述皆意欲涵蓋其結構及功能等效物二者。此外，該等等效物意欲包括當前已知之等效物及將來開發之等效物，即開發之實施相同功能之任何要素，而不管其結構如何。因此，本發明之範圍不欲限於本文顯示及描述之例示性實施例。相反，本發明之範圍及精神由以下內容體現。

【0471】 因此，本發明之範圍不欲限於本文顯示及描述之例示性實施例。相反，本發明之範圍及精神由所附申請專利範圍體現。在申請專利範圍中，35 U.S.C. §112(f)或 35 U.S.C. §112(6)明確定義為僅在申請專利範圍中之限制之開頭列舉確切之片語「用於……之組分」或確切之片語「用於……之步驟」時，才在申請專利範圍中被援引用於該限制；若在申請專利範圍之限制中沒有使用該確切片語，則不援引 35 U.S.C. § 112 (f)或 35 U.S.C. §112(6)。

【序列表】

<110> 李蘭．史丹佛學院理事會 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY)

<120> ENPP1抑制劑及調節免疫反應之方法

<130> STAN-1591WO

<140> 109103117

<141> 2020-01-31

<150> US 62/800,283

<151> 2019-02-01

<150> US 62/814,745

<151> 2019-03-06

<160> 5

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 1

caccgctggt tctatgcacg tctcc 25

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 2

aaactcatga gcagtctgca 20

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 3

aggagatctt cagtttcgga gg 22

<210> 4

<211> 20

<212> DNA
<213> 人工序列

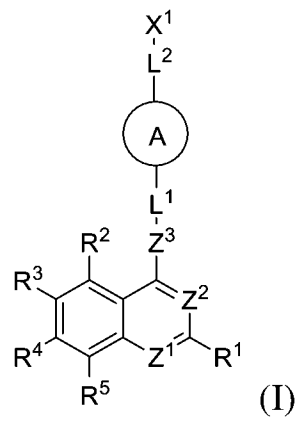
<220>
<223> 合成序列
<400> 4
gccttccgtg tccccactgc 20

<210> 5
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列
<400> 5
tgagggggcc ctcgacg 17

【發明申請專利範圍】

【請求項 1】 一種式(I)化合物，



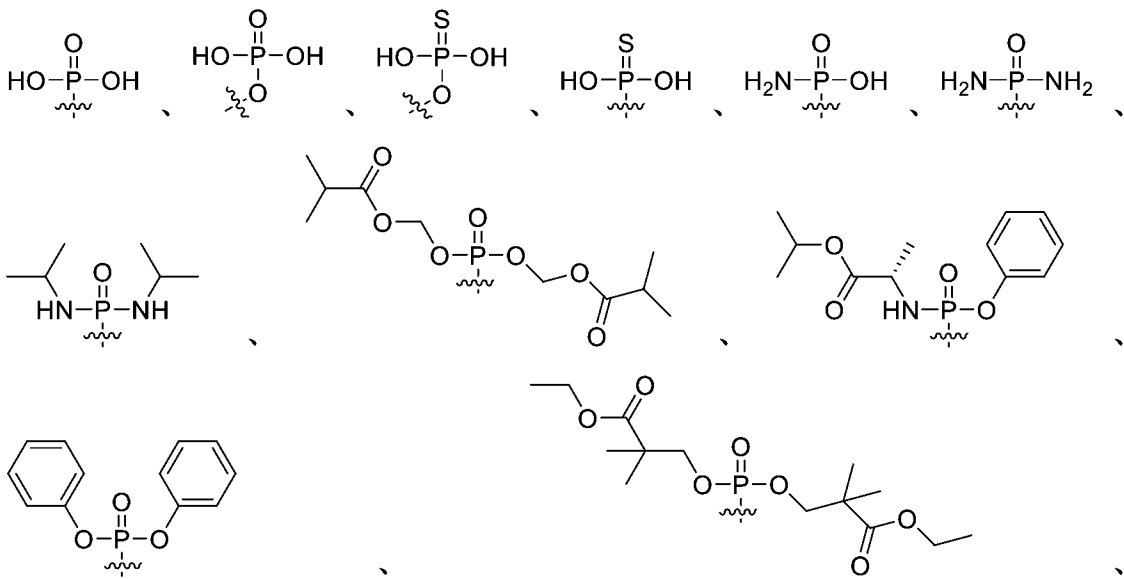
其中，

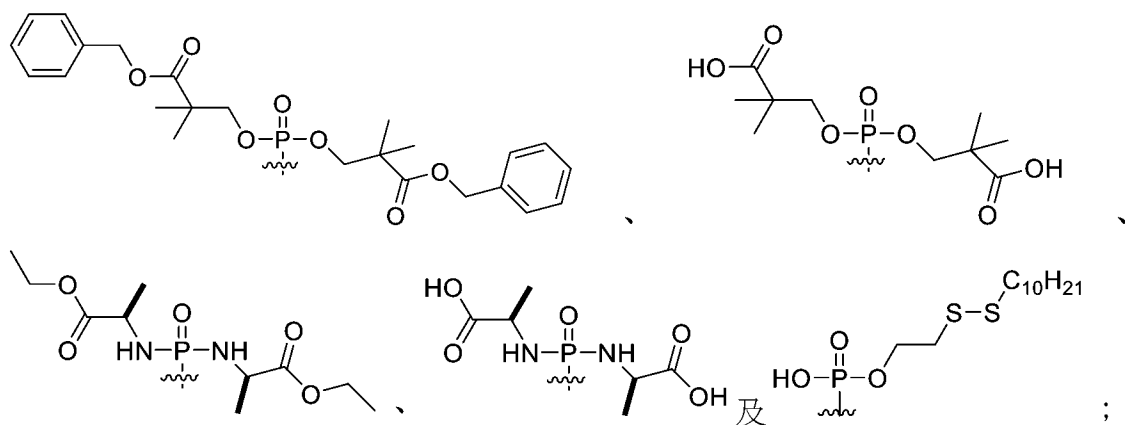
X¹ 係親水頭基，其係選自

(a) 以下所組成之群：

磷酸、磷酸鹽、磷酸酯、磷酸鹽、磷酸酯、硫代磷酸鹽、硫代磷酸酯、
胺基磷酸酯及硫代胺基磷酸酯；或

(b) 以下所組成之群：





A 係選自以下之環系統：芳基、經取代芳基、雜芳基、經取代雜芳基、環烷基、經取代環烷基、雜環及經取代雜環；

L^1 及 L^2 獨立地係共價鍵或連接體，其係選自 C_{1-6} 烷基及經取代 C_{1-6} 烷基；

Z^3 不存在或選自 NR^{22} 、O 及 S；

Z^2 係 CR^{12} ；

Z^1 係 CR^{11} 或 N；

R^1 係選自 H、烷基、經取代烷基、烯基、經取代烯基、烷基芳基、經取代烷基芳基、烷基雜芳基、經取代烷基雜芳基、烯基芳基、經取代烯基芳基、烯基雜芳基、經取代烯基雜芳基、芳基、經取代芳基、雜芳基、經取代雜芳基、雜環及經取代雜環；

R^{11} 係選自 H、氰基、三氟甲基、鹵素、烷基及經取代烷基；

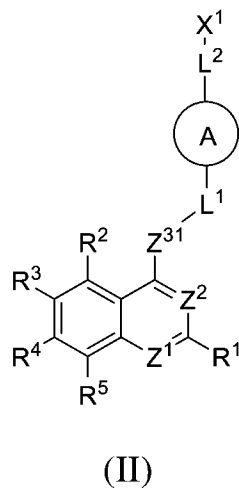
R^{12} 係氰基；

R^{22} 係選自 H、烷基及經取代烷基；且

R^2 至 R^5 係各自獨立地選自 H、OH、烷基、經取代烷基、烯基、經取代烯基、烷氧基、經取代烷氧基、 $-OCF_3$ 、鹵素、氰基、胺、經取代胺、醯胺、雜環及經取代雜環；或其中 R^2 及 R^3 、 R^3 及 R^4 或 R^4 及 R^5 與其所連接之碳原子一起提供選自以下之稠合環：雜環、經取代雜環、環烷基、經取代環烷基、芳基及經取代芳基；

或其醫藥學上可接受之鹽、水合物或立體異構物。

【請求項 2】 如請求項 1 之化合物，其中該化合物具有式(II)：



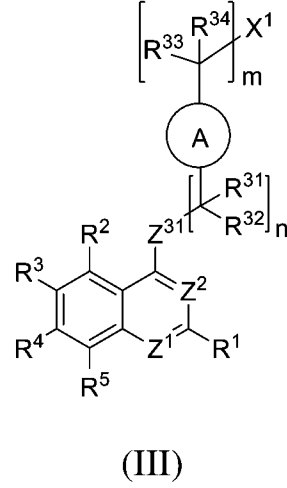
其中 Z³¹ 係選自 NR²²、O 及 S。

【請求項 3】 如請求項 2 之化合物，其中：

Z³¹ 係 NR²²；且

R²² 係選自 H、C₍₁₋₆₎烷基及經取代之 C₍₁₋₆₎烷基。

【請求項 4】 如請求項 2 或 3 之化合物，其中該化合物具有式(III)：



其中每一 R³¹ 至 R³⁴ 係獨立地選自 H、鹵素、烷基及經取代烷基；且

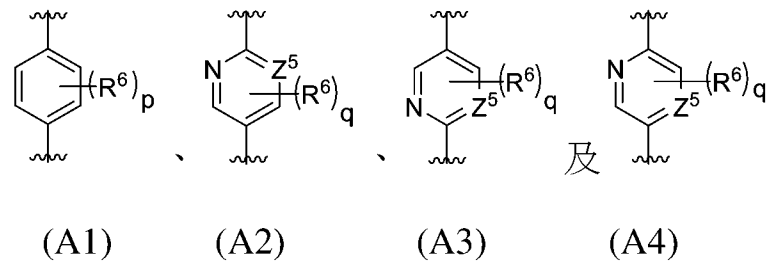
n 及 m 各自獨立地係 0 至 6 之整數。

【請求項 5】 如請求項 4 之化合物，其中 n+m 為 0 至 3。

【請求項 6】 如請求項 1 至 3 中任一項之化合物，其中該環系統 A 係選自苯

基、經取代苯基、吡啶基、經取代吡啶基、嘧啶、經取代嘧啶、六氫吡啶、經取代之六氫吡啶、六氫吡嗪、經取代之六氫吡嗪、嗒嗪、經取代嗒嗪、環己基及經取代環己基。

【請求項 7】 如請求項 6 之化合物，其中該環系統 A 係選自：



其中：

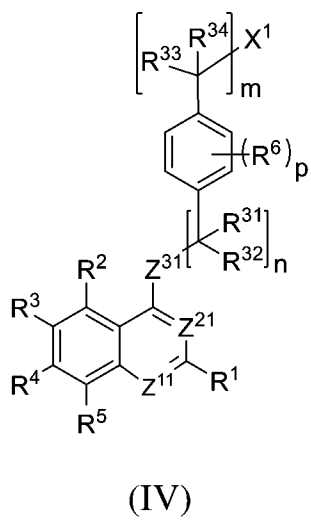
Z⁵ 係選自 N 及 CR⁶；

每一 R⁶ 係選自氫、烷基、經取代烷基、羥基、烷氧基、經取代烷氧基、三氟甲基、鹵素、醯基、經取代醯基、羧基、甲醯胺、經取代甲醯胺、磺醯基、經取代磺醯基、磺醯胺及經取代磺醯胺；

p 係 0 至 4 之整數；且

q 係 0 至 2 之整數。

【請求項 8】 如請求項 4 之化合物，其中該化合物具有式(IV)：



其中：

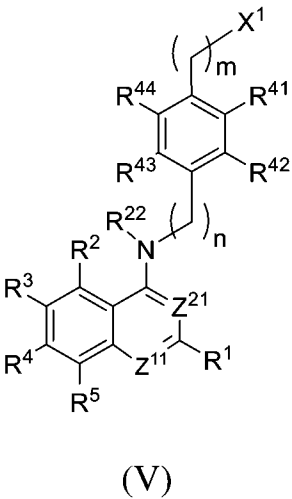
Z¹¹ 係選自 N 及 C(CN)；

Z^{21} 係 C(CN)；

每一 R^6 係獨立地選自 H、烷基、經取代烷基、羥基、烷氧基、經取代烷氧基、三氟甲基及鹵素；且

p 係 0 至 4 之整數。

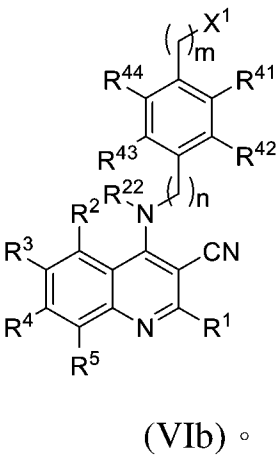
【請求項 9】 如請求項 8 之化合物，其中該化合物具有式(V)：



其中：

R^{41} 至 R^{44} 係獨立地選自氫、烷基、經取代烷基、羥基、烷氧基、經取代烷氧基、三氟甲基、鹵素、醯基、經取代醯基、羧基、甲醯胺、經取代甲醯胺、磺醯基、經取代磺醯基、磺醯胺及經取代磺醯胺。

【請求項 10】 如請求項 9 之化合物，其中該化合物具有式(VIb)：

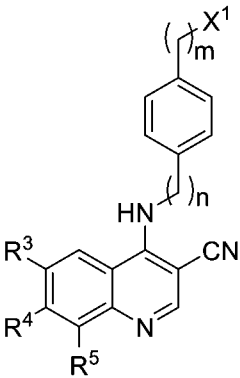


【請求項 11】 如請求項 1 至 3 中任一項之化合物，其中 R^1 係選自 H、烷基芳

基、經取代烷基芳基、烷基雜芳基、經取代烷基雜芳基、烯基芳基、經取代
烯基芳基、烯基雜芳基、經取代烯基雜芳基、芳基、經取代芳基、雜芳基及
經取代雜芳基。

【請求項 12】 如請求項 11 之化合物，其中 R¹ 係選自 H、乙烯基芳基、經取代
之乙烯基芳基、乙烯基雜芳基及經取代之乙烯基雜芳基。

【請求項 13】 如請求項 10 之化合物，其中該化合物具有式(VIIb)：



(VIIb)。

【請求項 14】 如請求項 1 至 3 中任一項之化合物，其中 R² 至 R⁵ 係各自獨立地
選自 H、OH、烷基、經取代烷基、烷氧基、經取代烷氧基、-OCF₃、鹵素、
氰基、胺、經取代胺、醯胺、雜環及經取代雜環。

【請求項 15】 如請求項 14 之化合物，其中 R² 至 R⁵ 係各自獨立地選自 H、OH、
C₍₁₋₆₎烷氧基、-OCF₃、C₍₁₋₆₎烷基胺基、二-C₍₁₋₆₎烷基胺基、F、Cl、Br 及 CN。

【請求項 16】 如請求項 14 之化合物，其中：

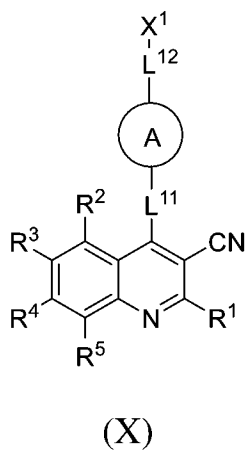
R³ 及 R⁴ 獨立地係烷氧基；且
R² 及 R⁵ 係氫。

【請求項 17】 如請求項 14 之化合物，其中：

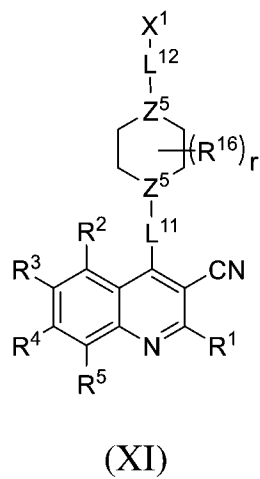
R³ 係烷氧基；且
R²、R⁴ 及 R⁵ 係氫。

【請求項 18】 如請求項 14 之化合物，其中：

- R^4 係烷氧基；且
- R^2 、 R^3 及 R^5 係氫。
- 【請求項 19】 如請求項 14 之化合物，其中：
- R^2 、 R^3 及 R^4 係 H；且
- R^5 係烷氧基。
- 【請求項 20】 如請求項 4 之化合物，其中 n 係 0 且 m 係 1。
- 【請求項 21】 如請求項 4 之化合物，其中 n 係 1 且 m 係 0。
- 【請求項 22】 如請求項 4 之化合物，其中 n 及 m 皆為 1。
- 【請求項 23】 如請求項 4 之化合物，其中 n 及 m 皆為 0。
- 【請求項 24】 如請求項 1 之化合物，其中 Z^3 不存在且 Z^2 係 CR^{12} ，其中 R^{12} 係
氰基，其中該化合物具有式(X)：



- 其中 L^{11} 及 L^{12} 獨立地係共價鍵或連接體，其係選自 C_{1-6} 烷基及經取代 C_{1-6} 烷基。
- 【請求項 25】 如請求項 24 之化合物，其中該環系統 A 係選自苯基、經取代苯基、吡啶基、經取代吡啶基、嘧啶、經取代嘧啶、六氫吡啶、經取代之六氫吡啶、六氫吡嗪、經取代之六氫吡嗪、嗒嗪、經取代嗒嗪、環己基及經取代環己基。
- 【請求項 26】 如請求項 24 或 25 之化合物，其中該化合物具有式(XI)：

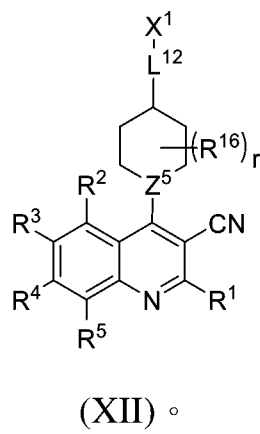


其中：

每一 Z^5 係獨立地選自 N 及 CR^{16} ；

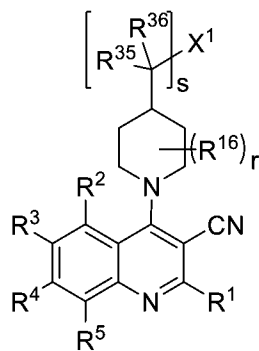
每一 R^{16} 係獨立地選自氫、烷基、經取代烷基、羥基、烷氧基、經取代烷氧基、三氟甲基、鹵素、醯基、經取代醯基、羧基、甲醯胺、經取代甲醯胺、磺醯基、經取代磺醯基、磺醯胺及經取代磺醯胺；且
 r 係 0 至 8 之整數。

【請求項 27】 如請求項 26 之化合物，其中該化合物具有式(XII)：



【請求項 28】 如請求項 27 之化合物，其中 Z^5 係 N。

【請求項 29】 如請求項 28 之化合物，其中該化合物具有式(XIII)：

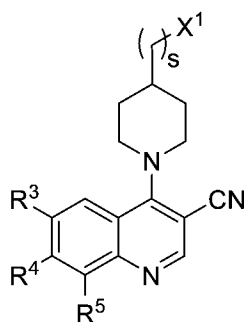


(XIII)

R^{35} 及 R^{36} 係各自獨立地選自 H、鹵素、烷基及經取代烷基，或 R^{35} 及 R^{36} 連接成環並與其所連接之碳原子一起提供環烷基、經取代環烷基、雜環基或經取代雜環基環；且

其中 s 係 0 至 6 之整數。

【請求項 30】 如請求項 29 之化合物，其中該化合物具有式(XIV)：



(XIV)。

【請求項 31】 如請求項 24 或 25 之化合物，其中 R^2 至 R^5 係各自獨立地選自 H、OH、烷基、經取代烷基、烷氧基、經取代烷氧基、 $-OCF_3$ 、鹵素、氰基、胺、經取代胺、醯胺、雜環及經取代雜環。

【請求項 32】 如請求項 31 之化合物，其中 R^2 至 R^5 係各自獨立地選自 H、OH、 $C_{(1-6)}$ 烷氧基、 $-OCF_3$ 、 $C_{(1-6)}$ 烷基胺基、二- $C_{(1-6)}$ 烷基胺基、F、Cl、Br 及 CN。

【請求項 33】 如請求項 31 之化合物，其中：

R^3 及 R^4 獨立地係烷氧基；且

R^2 及 R^5 係氫。

【請求項 34】 如請求項 31 之化合物，其中：

R³ 係烷氧基；且
R²、R⁴ 及 R⁵ 係氫。

【請求項 35】 如請求項 31 之化合物，其中：

R⁴ 係烷氧基；且
R²、R³ 及 R⁵ 係氫。

【請求項 36】 如請求項 31 之化合物，其中：

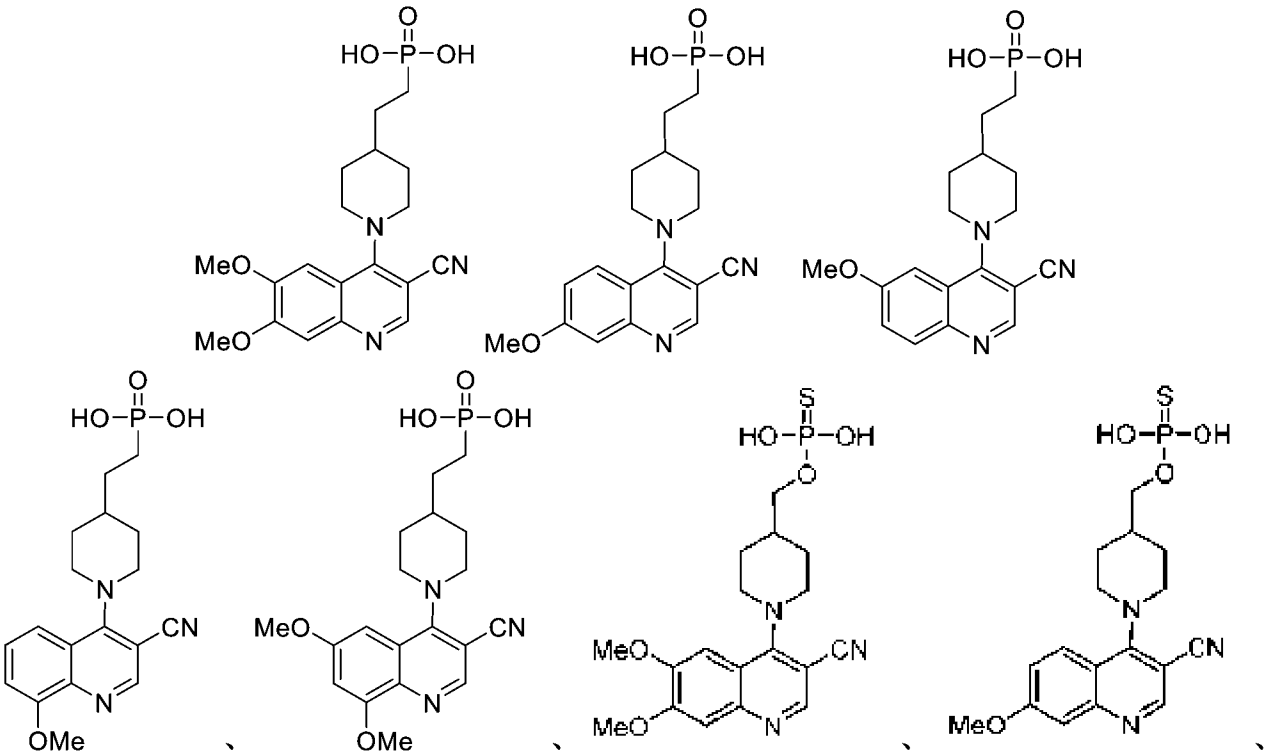
R²、R³ 及 R⁴ 係 H；且
R⁵ 係烷氧基。

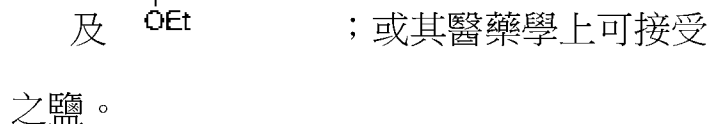
【請求項 37】 如請求項 29 之化合物，其中 s 係 1。

【請求項 38】 如請求項 29 之化合物，其中 s 係 2。

【請求項 39】 如請求項 29 之化合物，其中 s 係 3。

【請求項 40】 如請求項 1 之化合物，其中該化合物係選自以下所組成之群：





【請求項 41】 一種醫藥組合物，其包含：

用於抑制 ENPP1 功能之組分(means)，其中該用於抑制 ENPP1 功能之組分係根據請求項 1 至 40 中任一項之 ENPP1 抑制劑；及
醫藥學上可接受之賦形劑。

【請求項 42】 一種用於治療癌症之醫藥組合物，其包含：

根據請求項 1 至 40 中任一項之 ENPP1 抑制劑；及
醫藥學上可接受之賦形劑。

【請求項 43】 一種抑制 ENPP1 之方法，該方法包括：

使包含 ENPP1 之樣品與根據請求項 1 至 40 中任一項之 ENPP1 抑制劑接觸以抑制該 ENPP1 之 cGAMP 水解活性。

【請求項 44】 如請求項 43 之方法，其中該 ENPP1 抑制劑係細胞不可滲透的。

【請求項 45】 如請求項 43 之方法，其中該 ENPP1 抑制劑係細胞可滲透的。

【請求項 46】 如請求項 43 至 45 中任一項之方法，其中該樣品係細胞樣品。

【請求項 47】 如請求項 46 之方法，其中該樣品包含 cGAMP。

【請求項 48】 如請求項 47 之方法，其中相對於未與該 ENPP1 抑制劑接觸之對照樣品，該細胞樣品中之 cGAMP 水準升高。

【請求項 49】 一種如請求項 1 至 40 中任一項之 ENPP1 抑制劑之用途，其係用於製備治療癌症之藥物。

【請求項 50】 如請求項 49 之用途，其中該癌症係實體腫瘤癌症。

【請求項 51】 如請求項 49 之用途，其中該癌症係選自腎上腺腫瘤、肝腫瘤、腎腫瘤、膀胱腫瘤、乳腫瘤、結腸腫瘤、胃腫瘤、卵巢腫瘤、宮頸腫瘤、子宮腫瘤、食管腫瘤、結腸直腸腫瘤、前列腺腫瘤、胰臟腫瘤、肺腫瘤(小細胞腫瘤及非小細胞腫瘤二者)、甲狀腺腫瘤、癌瘤、肉瘤、神經膠母細胞瘤、

黑色素瘤及各種頭頸腫瘤。

【請求項 52】 如請求項 51 之用途，其中該癌症係乳癌。

【請求項 53】 如請求項 49 之用途，其中該癌症係淋巴瘤。

【請求項 54】 如請求項 51 之用途，其中該癌症係神經膠母細胞瘤。

【請求項 55】 如請求項 49 之用途，其中該藥物係與一或多種其他活性劑投與該個體。

【請求項 56】 如請求項 55 之用途，其中該一或多種其他活性劑係化學治療劑或免疫治療劑。

【請求項 57】 如請求項 55 之用途，其中該一或多種其他活性劑係小分子、抗體、抗體片段、抗體-藥物結合物、適體或蛋白質。

【請求項 58】 如請求項 55 之用途，其中該一或多種其他活性劑包含檢查點抑制劑。

【請求項 59】 如請求項 58 之用途，其中該檢查點抑制劑係選自細胞毒性 T 淋巴球相關抗原 4 (CTLA-4)抑制劑、程式化死亡 1 (PD-1)抑制劑及 PD-L1 抑制劑。

【請求項 60】 如請求項 55 之用途，其中該一或多種其他活性劑包含化學治療劑。

【請求項 61】 如請求項 60 之用途，其中該化學治療劑係誘導 cGAMP 之化學治療劑。

【請求項 62】 如請求項 61 之用途，其中誘導 cGAMP 之化學治療劑係以有效誘導該個體中之 cGAMP 產生之量投與之抗有絲分裂劑或抗瘤劑。

【請求項 63】 如請求項 49 之用途，其中該藥物係與放射療法投與該個體。

【請求項 64】 如請求項 49 之用途，其中該藥物係在放射療法之前投與該個體。

【請求項 65】 如請求項 49 之用途，其中該藥物係在使該個體暴露於放射療法後投與。

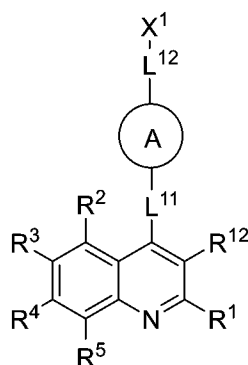
【請求項 66】 如請求項 63 之用途，其中該放射療法係以有效地減少放射對該個體之損傷之劑量及/或頻率投與。

【請求項 67】 如請求項 49 之用途，其中該 ENPP1 抑制劑係細胞不可滲透的。

【請求項 68】 如請求項 49 之用途，其中該 ENPP1 抑制劑係細胞可滲透的。

【請求項 69】 一種如請求項 1 至 40 中任一項之 ENPP1 抑制劑之用途，其係用於製備治療發炎疾患之藥物。

【請求項 70】 如請求項 1 之化合物，其中 Z^3 不存在且 Z^2 係 CR^{12} ，其中 R^{12} 係氰基，其中該化合物具有式(X)：

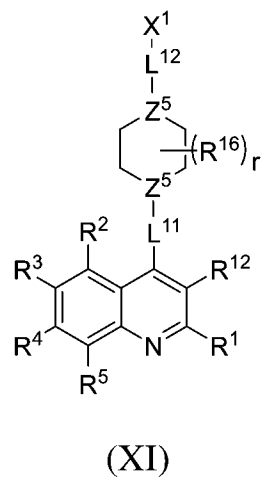


(X)

其中 L^{11} 及 L^{12} 獨立地係共價鍵或連接體，其係選自 C_{1-6} 烷基及經取代 C_{1-6} 烷基。

【請求項 71】 如請求項 70 之化合物，其中該環系統 A 係選自苯基、經取代苯基、吡啶基、經取代吡啶基、嘧啶、經取代嘧啶、六氫吡啶、經取代之六氫吡啶、六氫吡嗪、經取代之六氫吡嗪、嗒嗪、經取代嗒嗪、環己基及經取代環己基。

【請求項 72】 如請求項 70 或 71 之化合物，其中該化合物具有式(XI)：

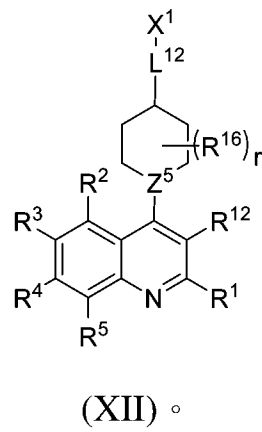


其中：

每一 Z^5 係獨立地選自 N 及 CR^{16} ；

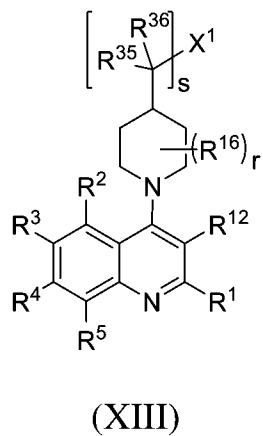
每一 R^{16} 係獨立地選自氫、烷基、經取代烷基、羥基、烷氧基、經取代烷氧基、三氟甲基、鹵素、醯基、經取代醯基、羧基、甲醯胺、經取代甲醯胺、磺醯基、經取代磺醯基、磺醯胺及經取代磺醯胺；且
 r 係 0 至 8 之整數。

【請求項 73】 如請求項 70 之化合物，其中該化合物具有式(XII)：



【請求項 74】 如請求項 73 之化合物，其中 Z^5 係 N。

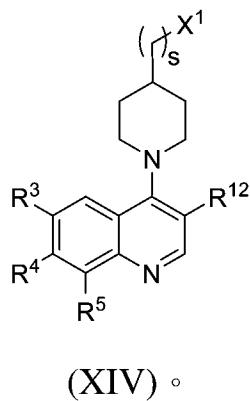
【請求項 75】 如請求項 72 之化合物，其中該化合物具有式(XIII)：



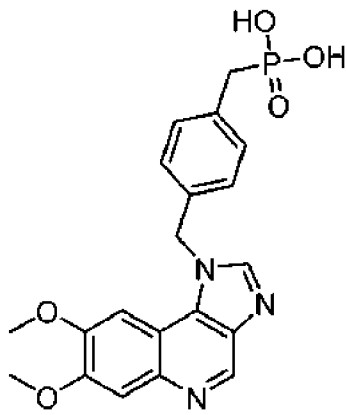
R^{35} 及 R^{36} 係各自獨立地選自 H、鹵素、烷基及經取代烷基，或 R^{35} 及 R^{36} 連接成環並與其所連接之碳原子一起提供環烷基、經取代環烷基、雜環基或經取代雜環基環；且

其中 s 係 0 至 6 之整數。

【請求項 76】 如請求項 72 之化合物，其中該化合物具有式(XIV)：

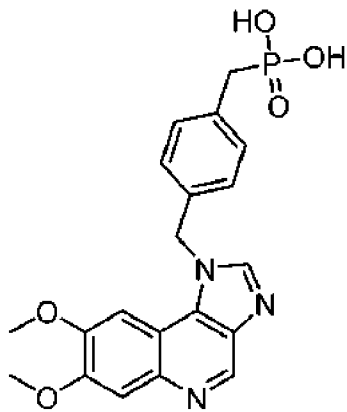


- 【請求項 77】 如請求項 70、71、73 及 74 中任一項之化合物，其中 R^2 至 R^5 係各自獨立地選自 H、OH、烷基、經取代烷基、烷氧基、經取代烷氧基、 $-OCF_3$ 、鹵素、氰基、胺、經取代胺、醯胺、雜環及經取代雜環。
- 【請求項 78】 如請求項 77 之化合物，其中 R^2 至 R^5 係各自獨立地選自 H、OH、 $C_{(1-6)}$ 烷氧基、 $-OCF_3$ 、 $C_{(1-6)}$ 烷基胺基、二- $C_{(1-6)}$ 烷基胺基、F、Cl、Br 及 CN。
- 【請求項 79】 一種化合物，其係由下列結構式所表示，

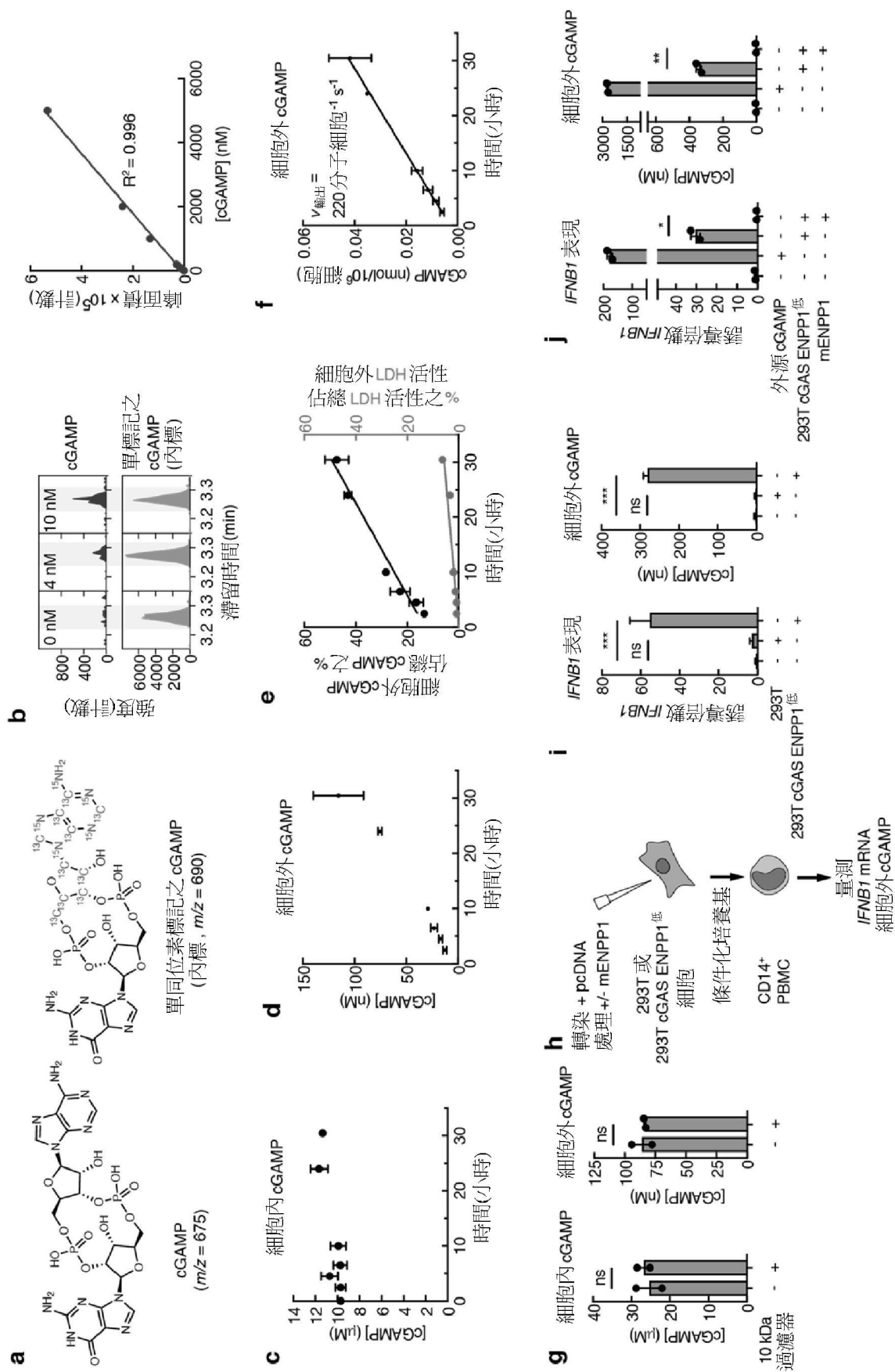


，或其醫藥學上可接受之鹽。

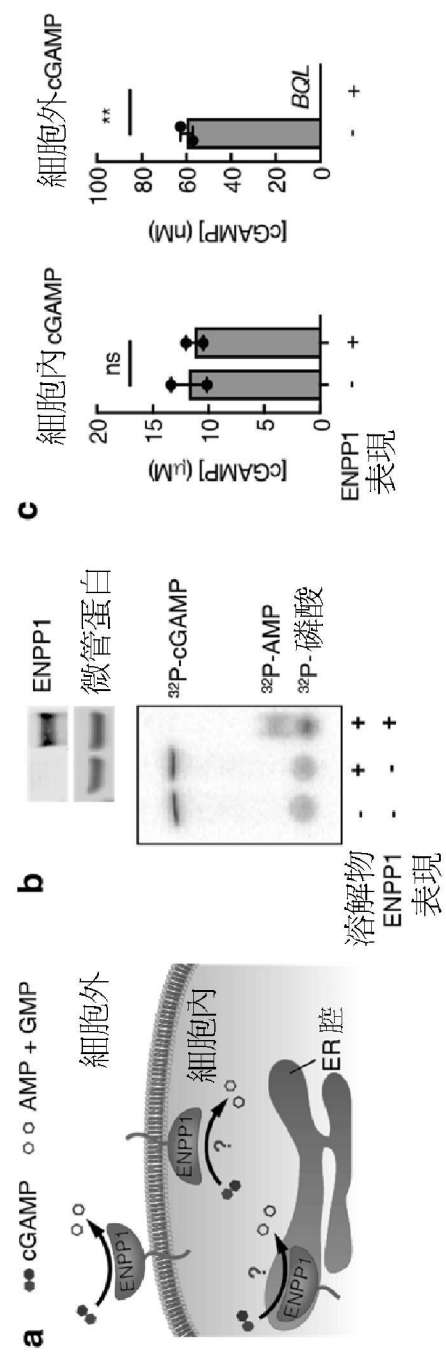
【請求項 80】 一種化合物，其係由下列結構式所表示，



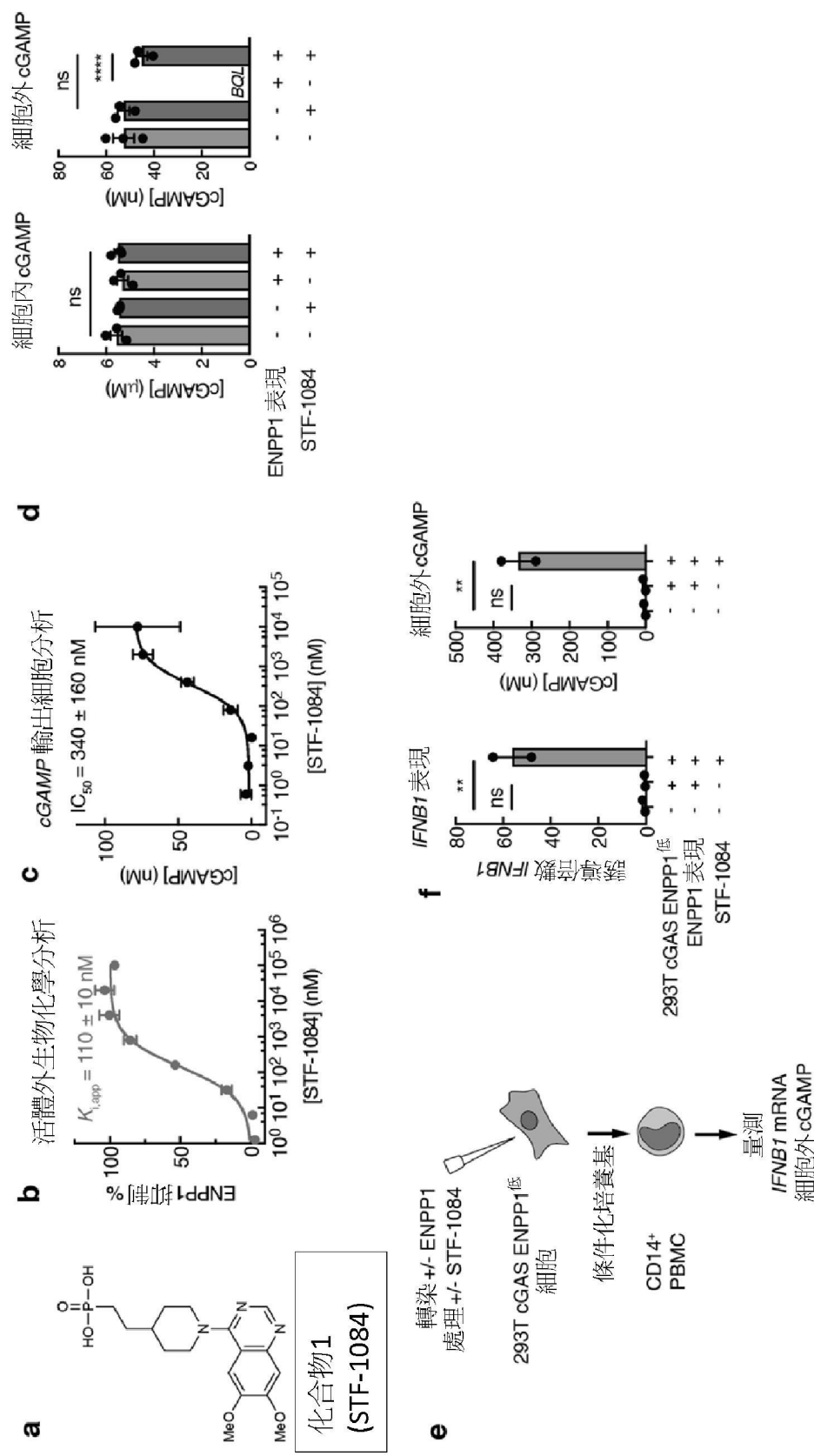
。



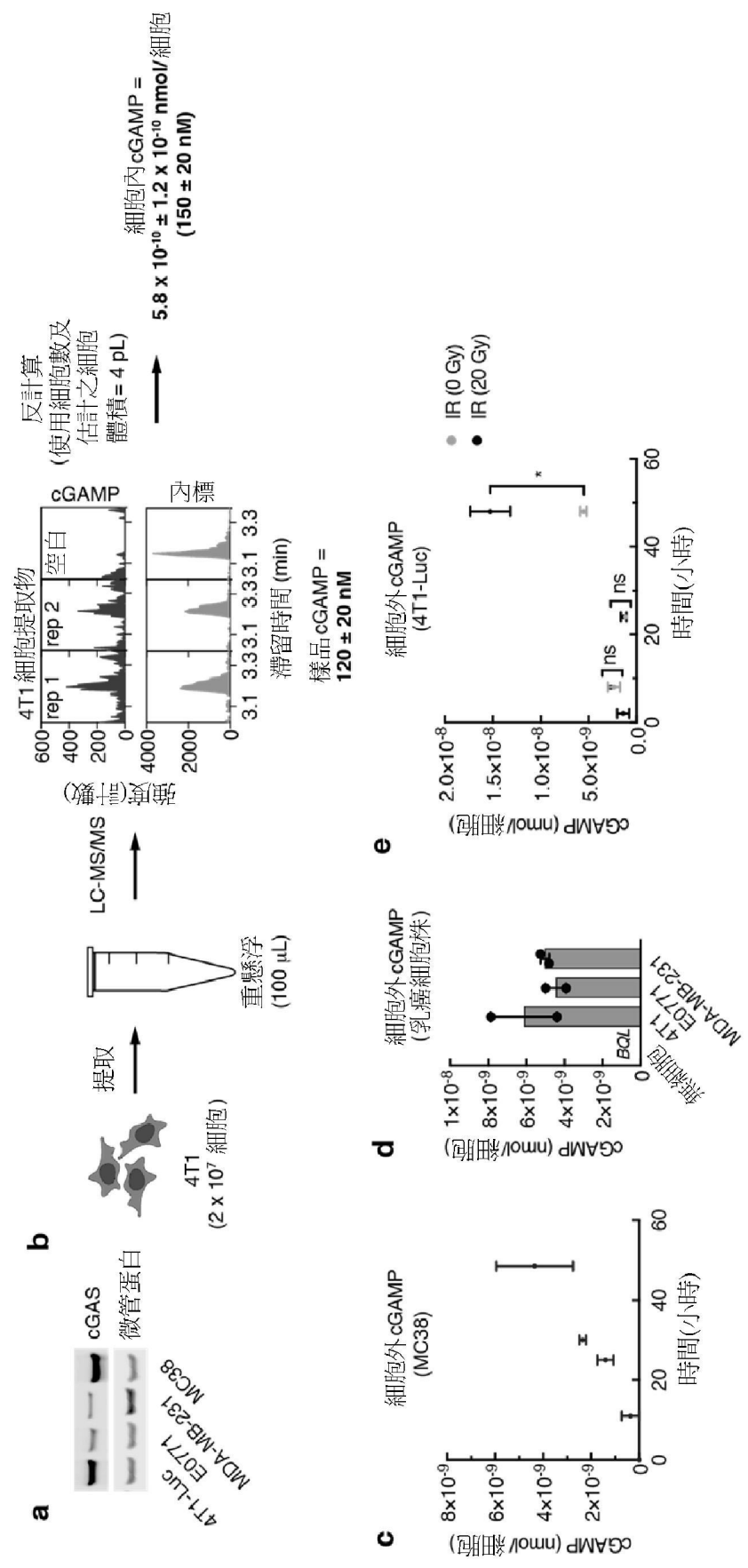
【圖 1】



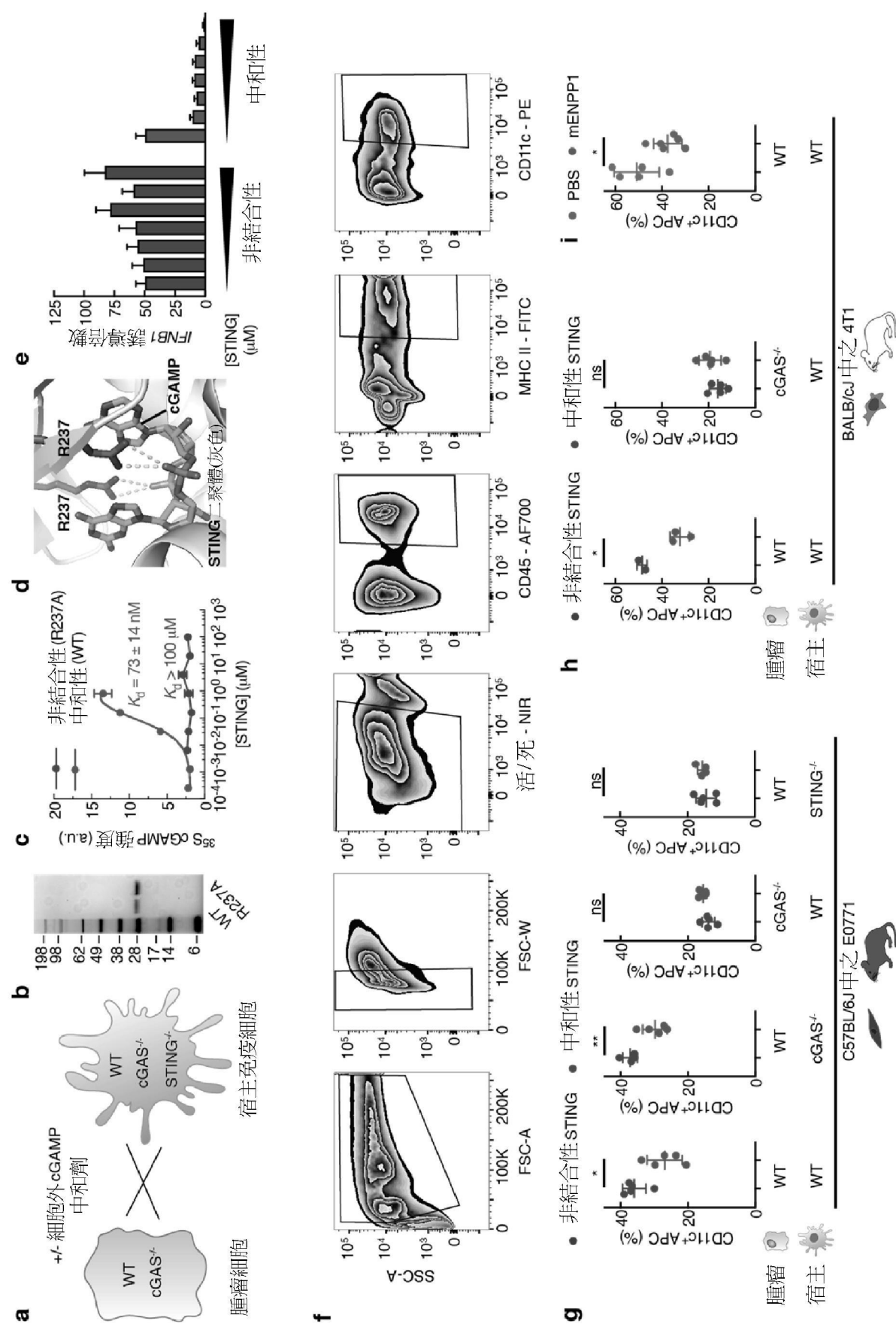
【圖 2】



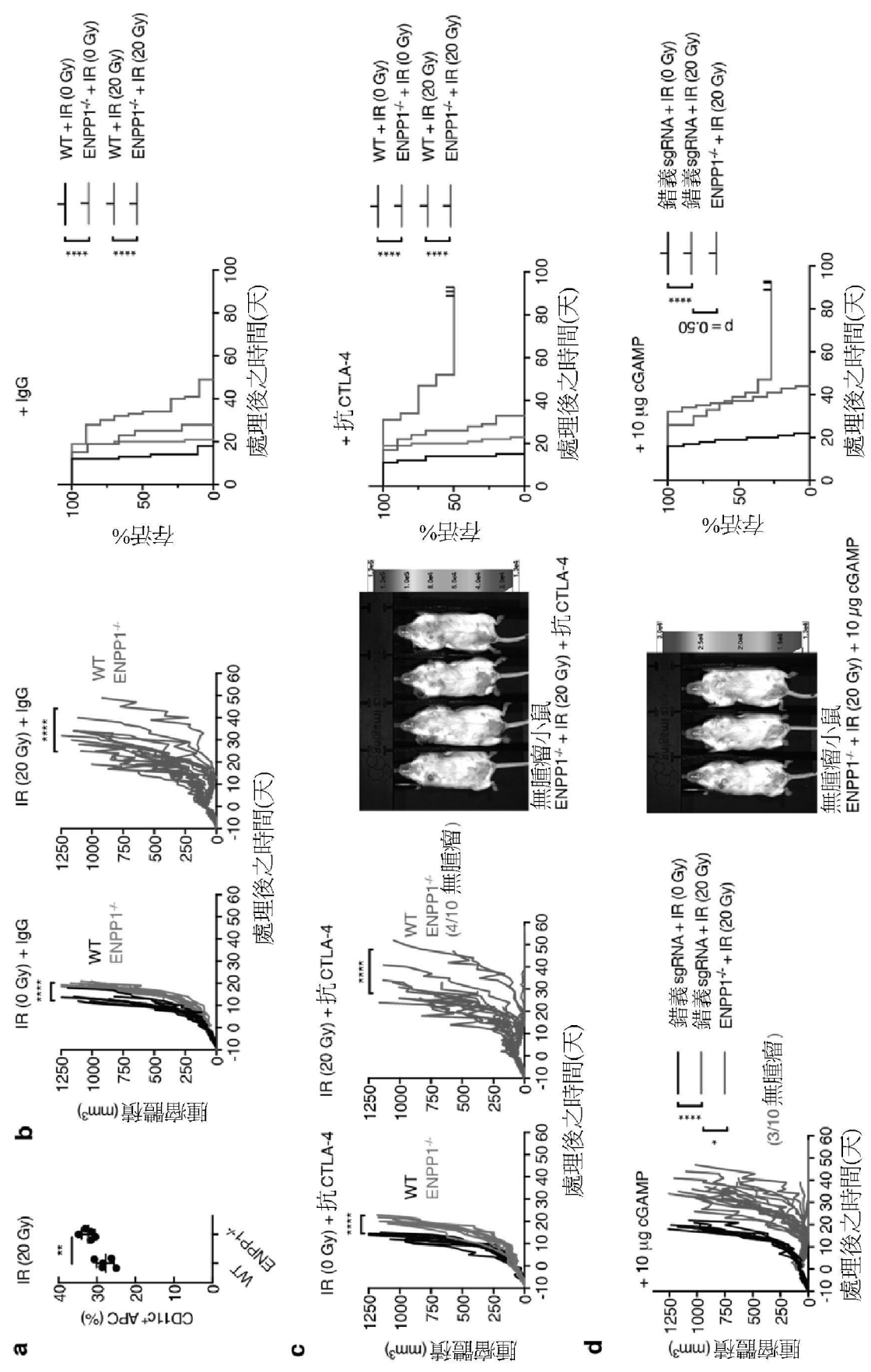
【圖 3】



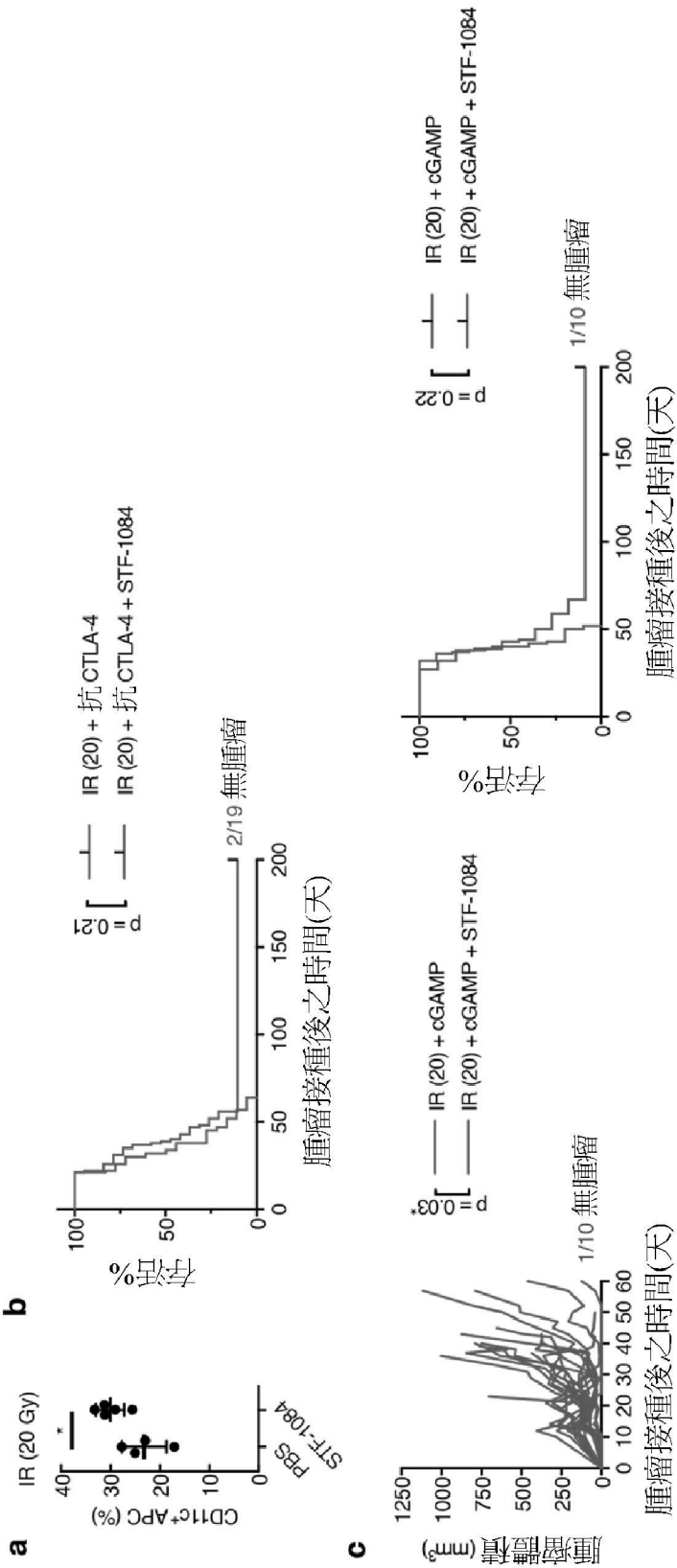
【圖 4】



【圖 5】

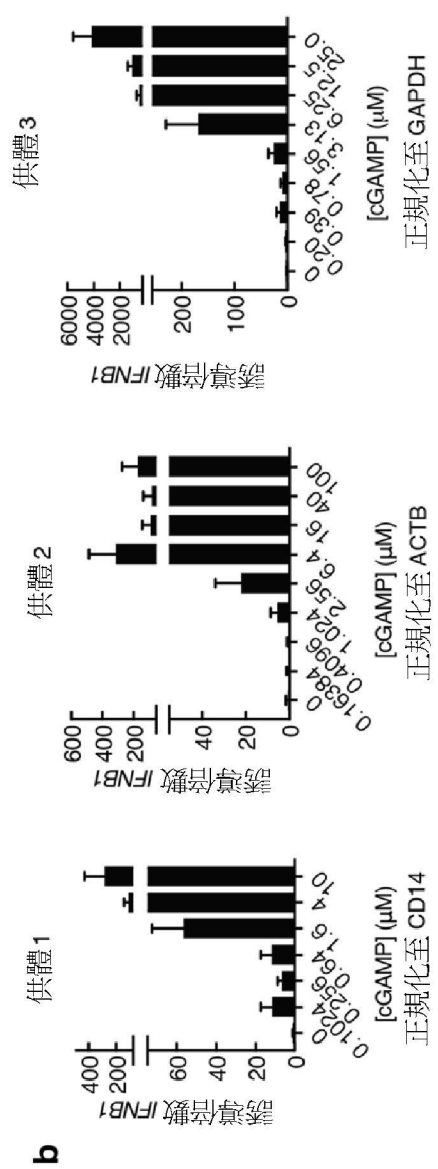


【圖 6】

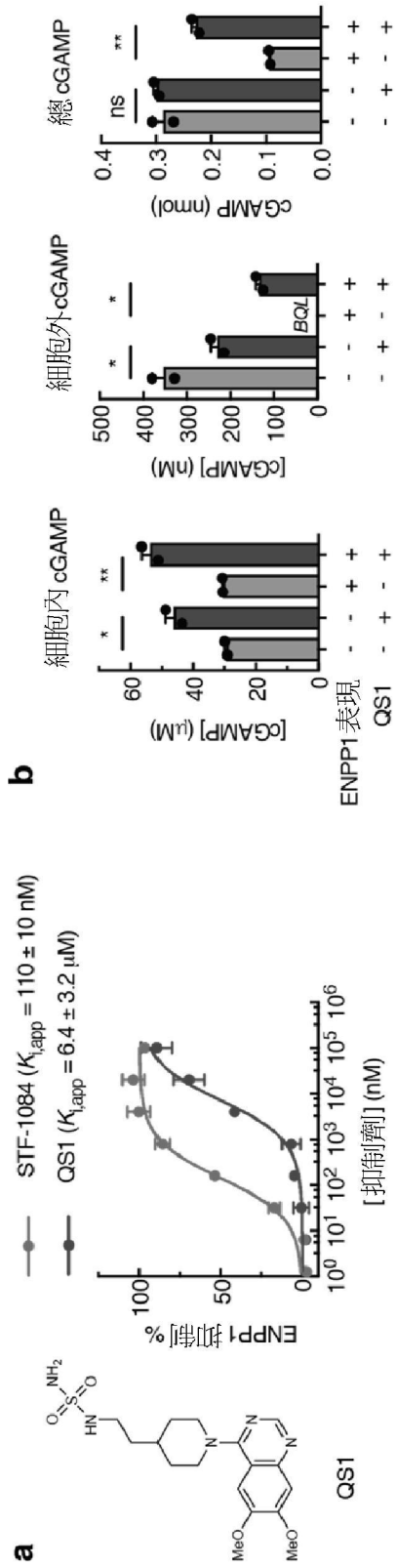


【圖 7】

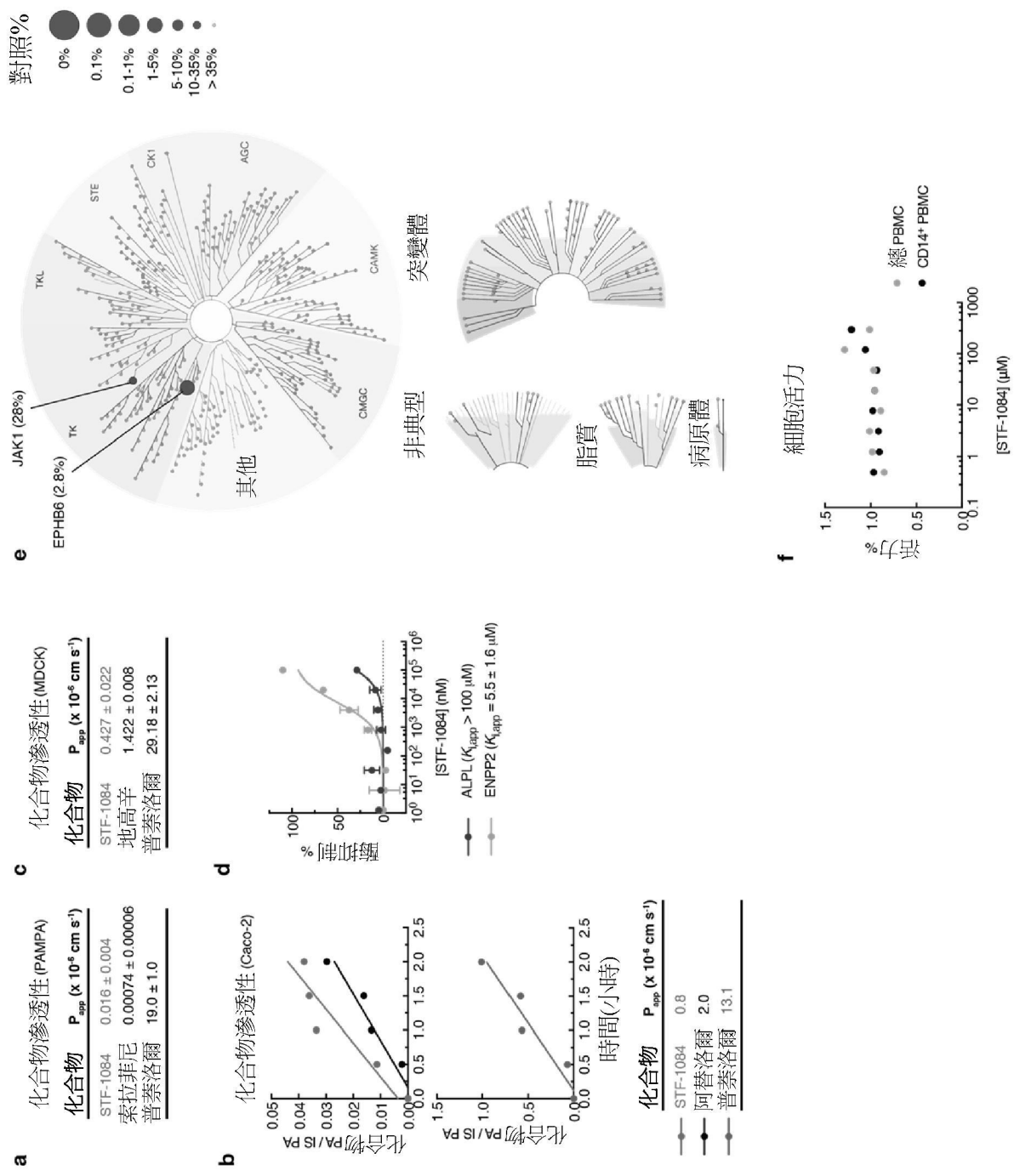




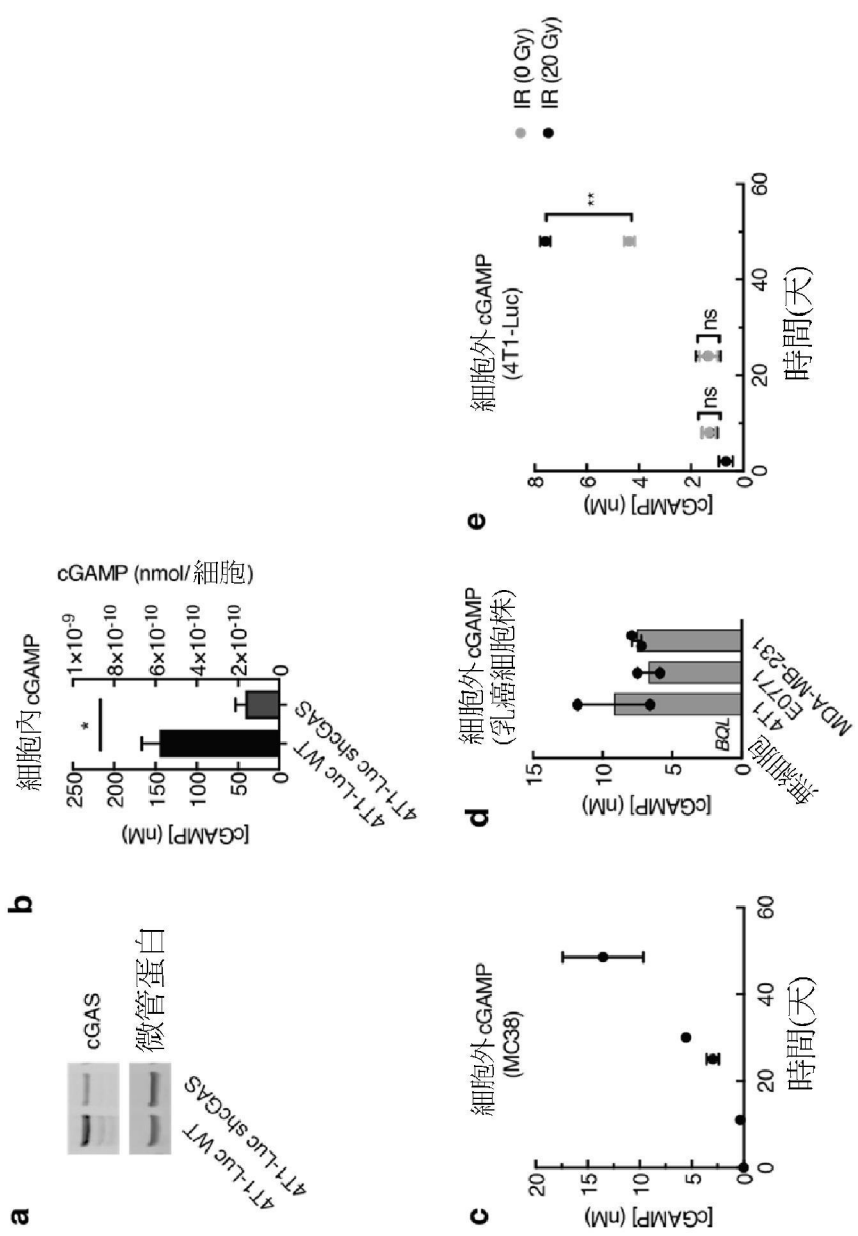
【圖 9】



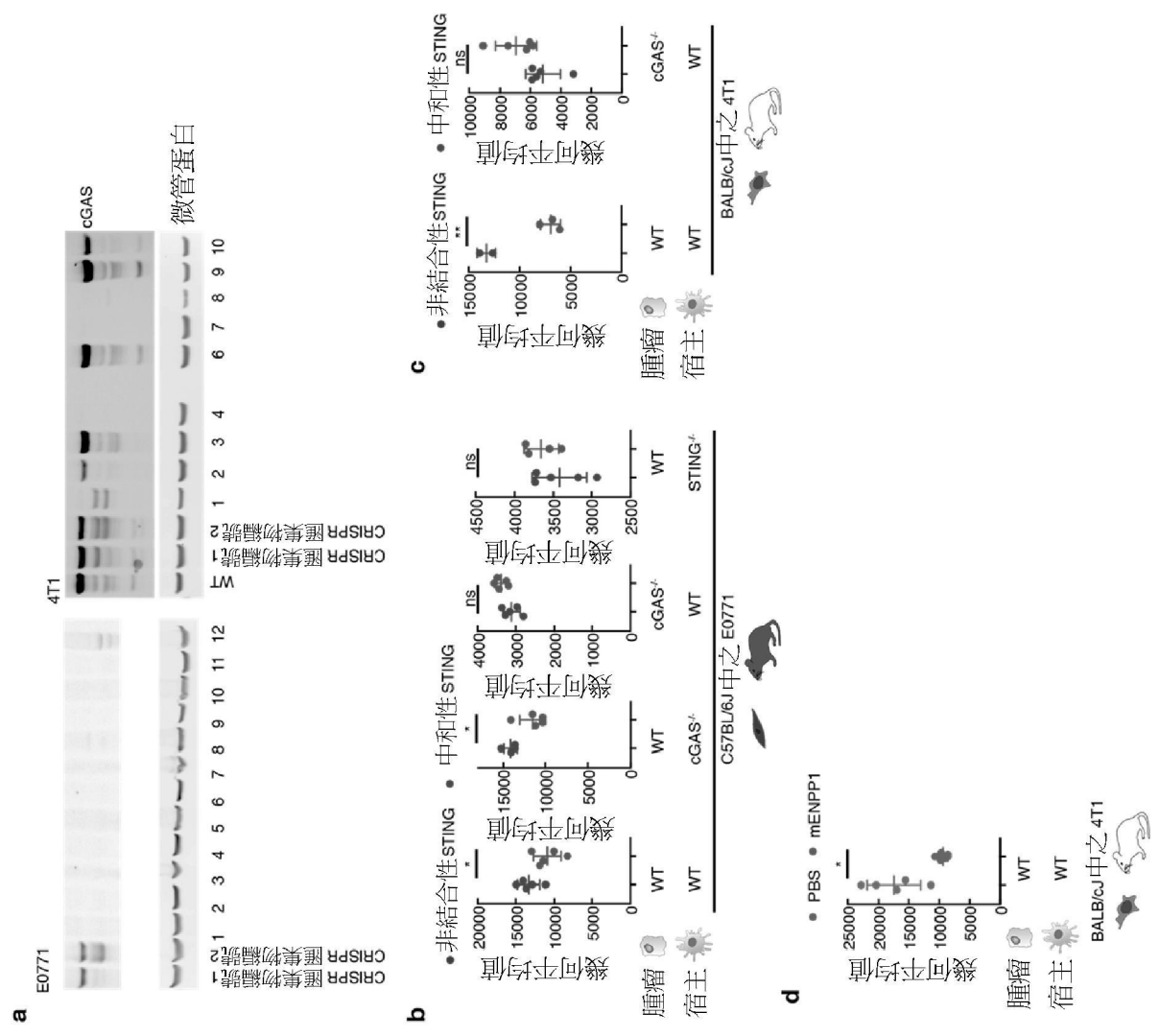
【圖 10】



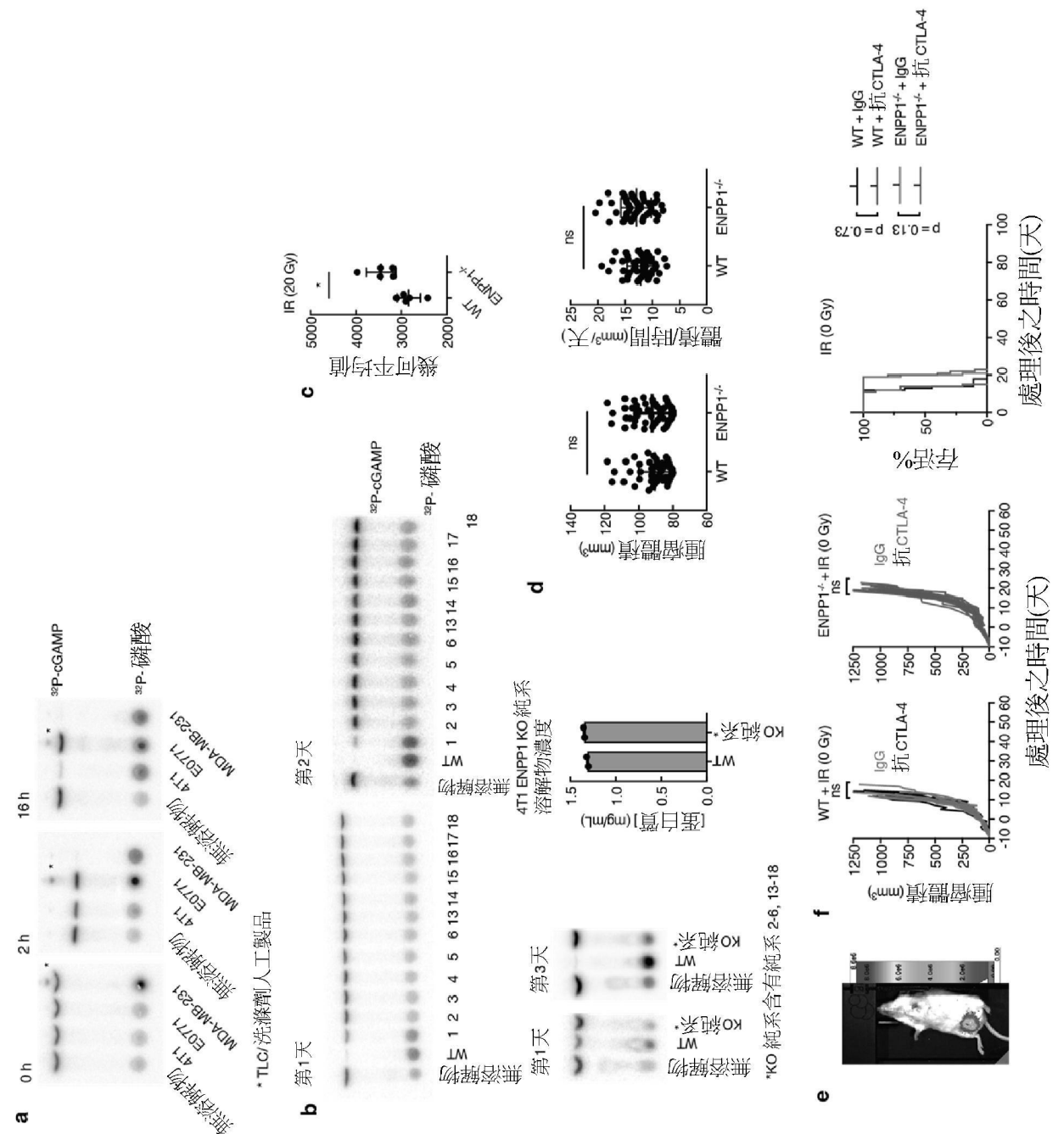
【圖 11】



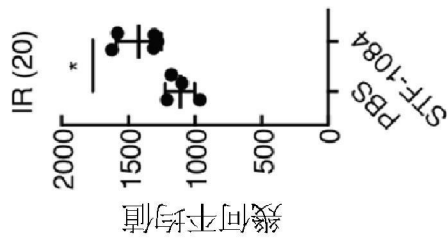
【圖 12】



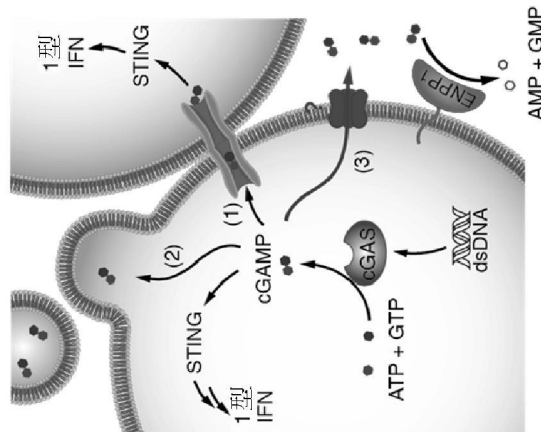
【圖 13】



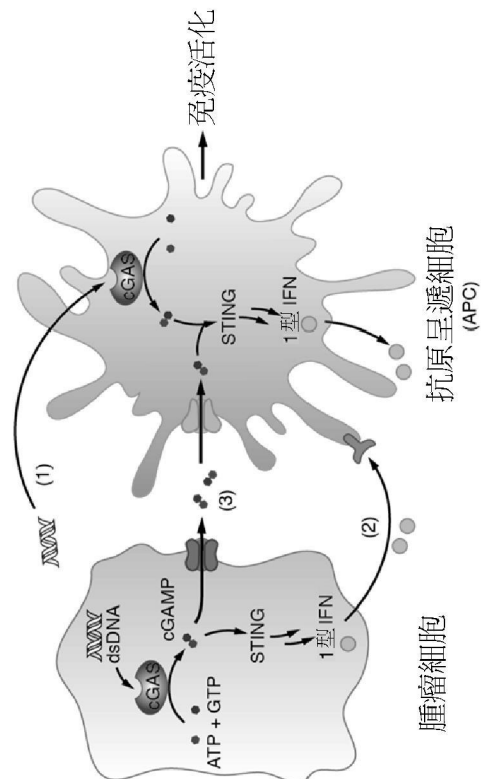
【圖 14】



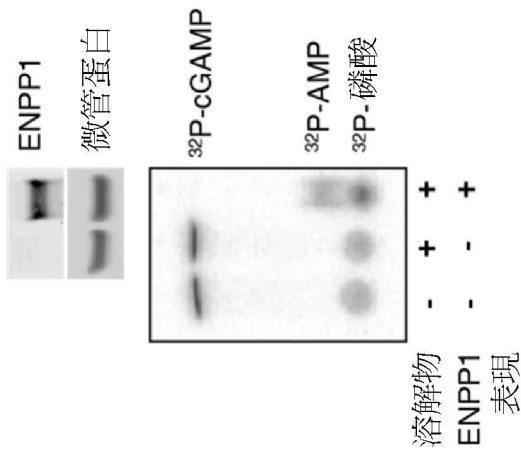
【圖 15】



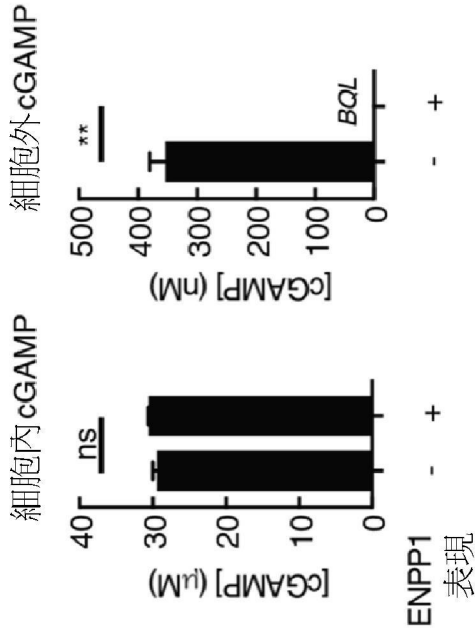
【圖 16】



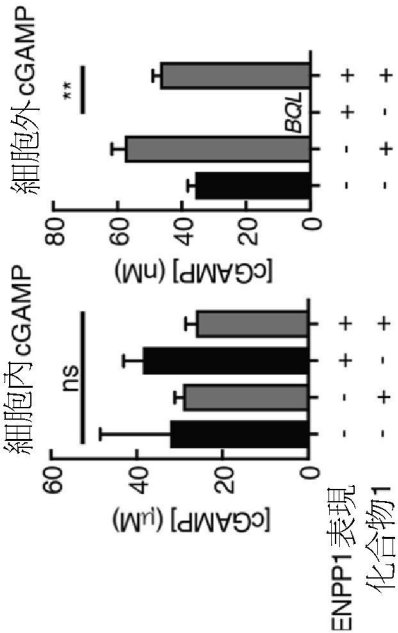
【圖 17】



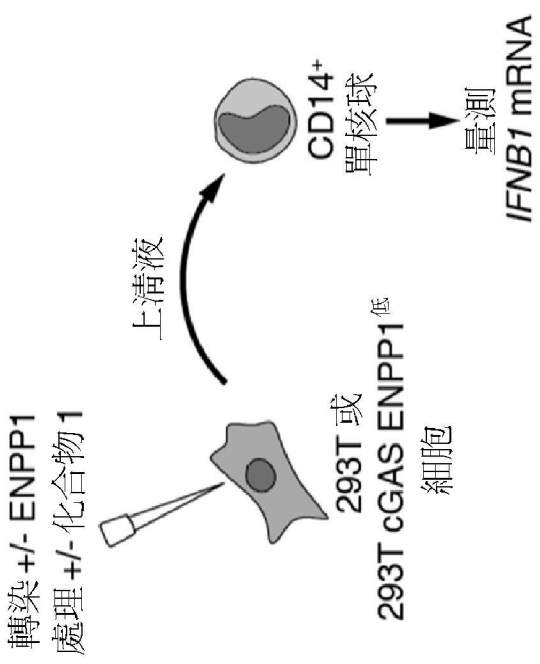
【圖 18A】



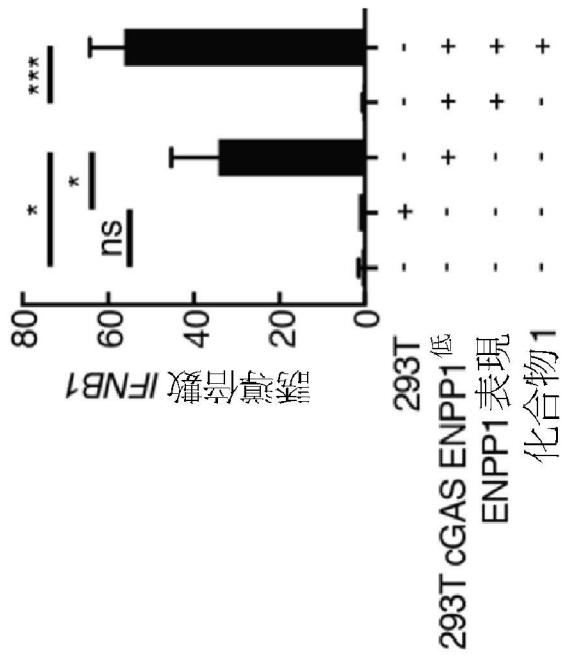
【圖 18B】



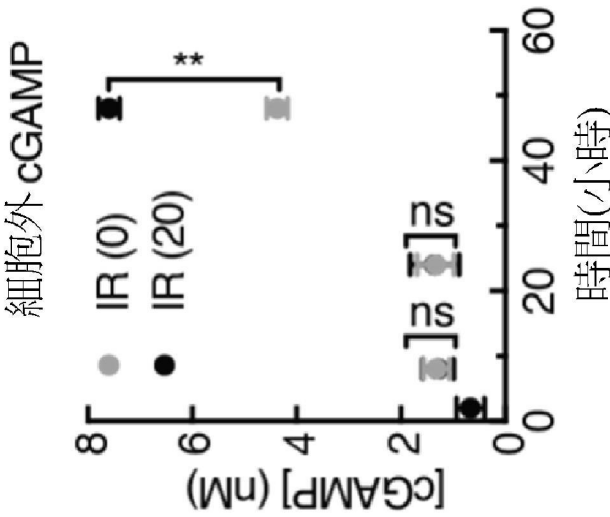
【圖 18C】



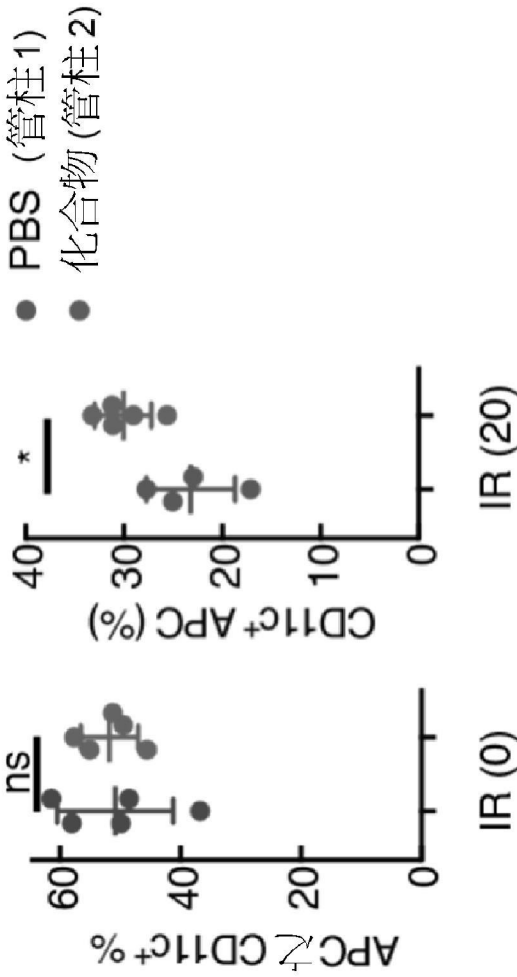
【圖 19A】



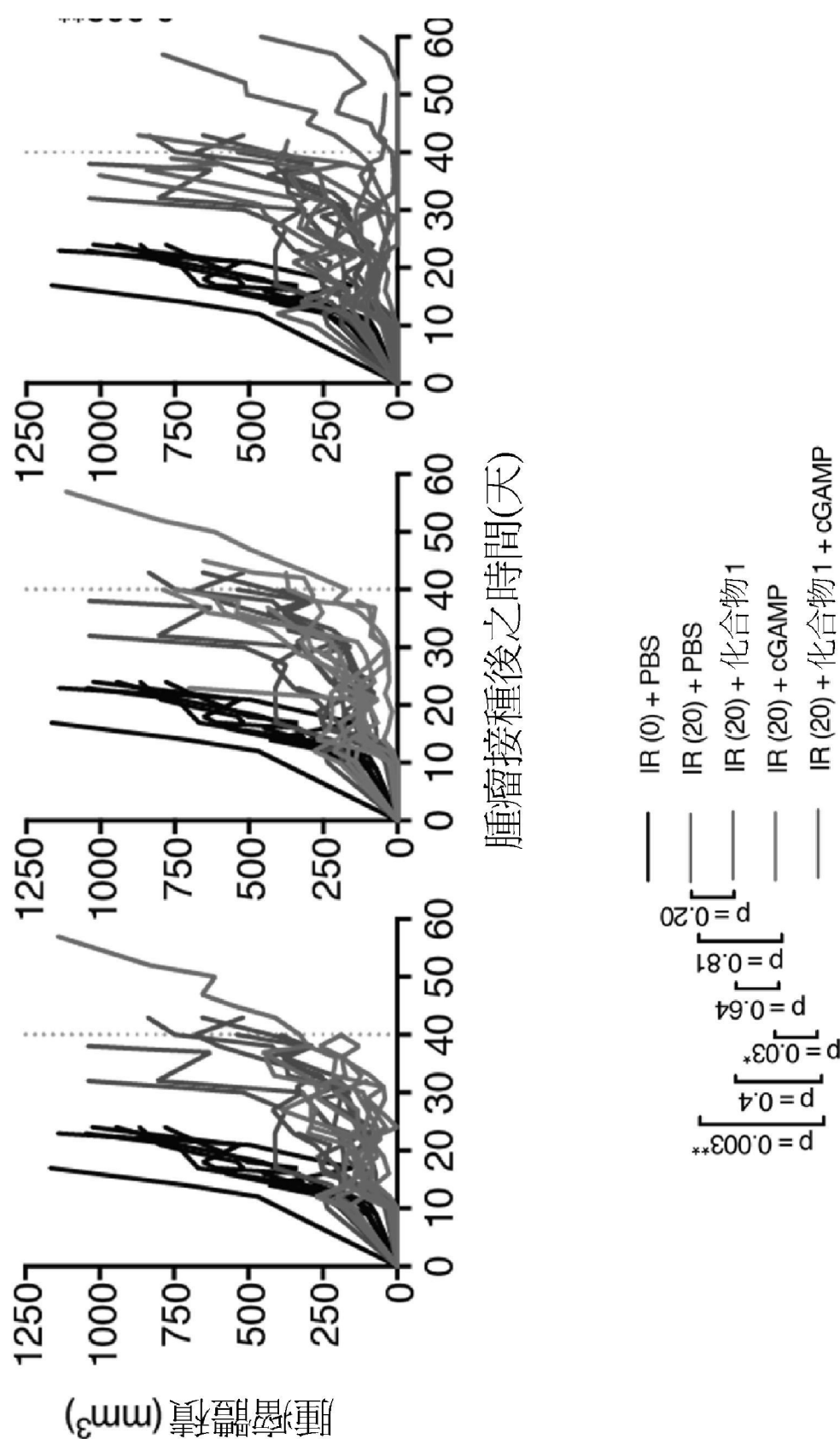
【圖 19B】



【圖 20A】

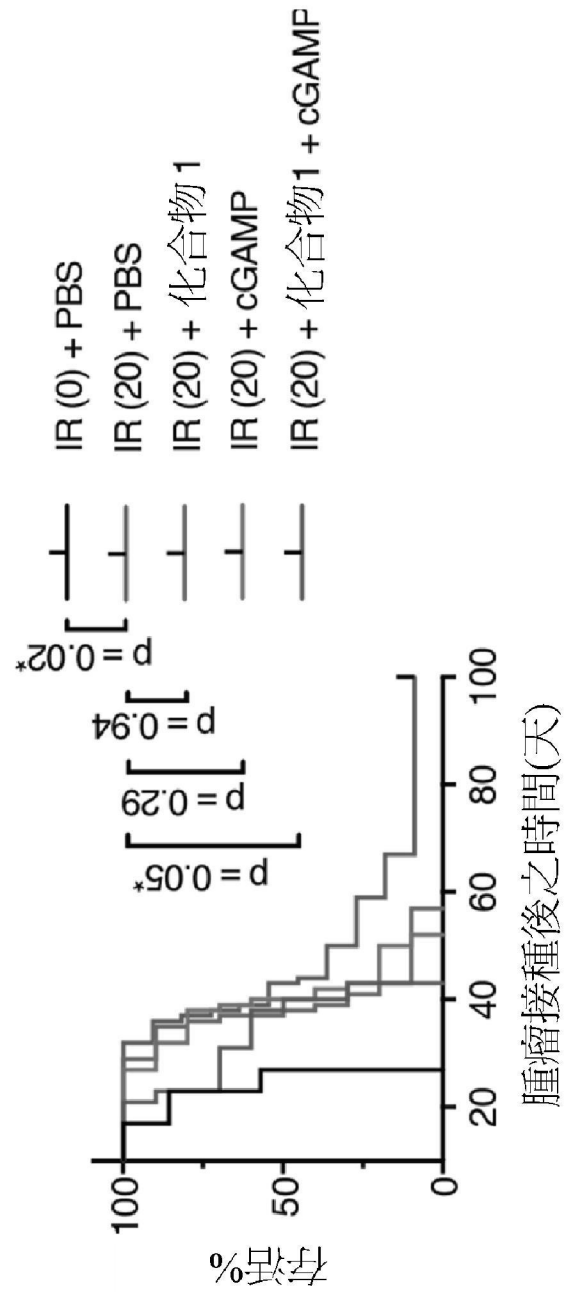


【圖 20B】

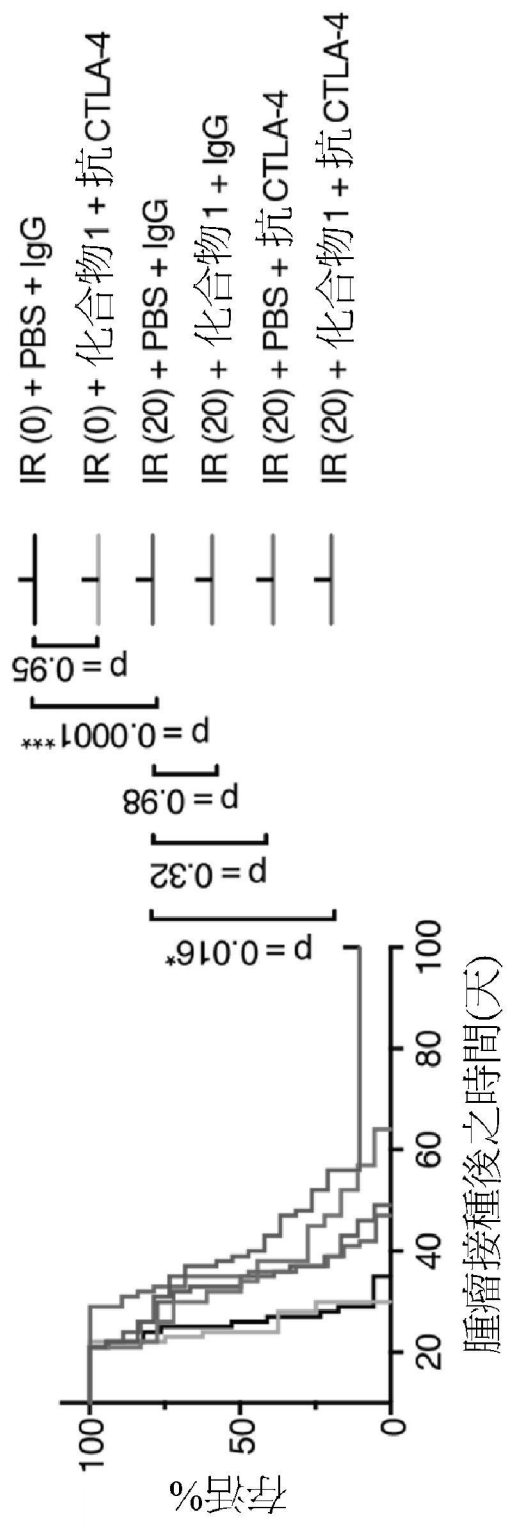


【圖 21A】

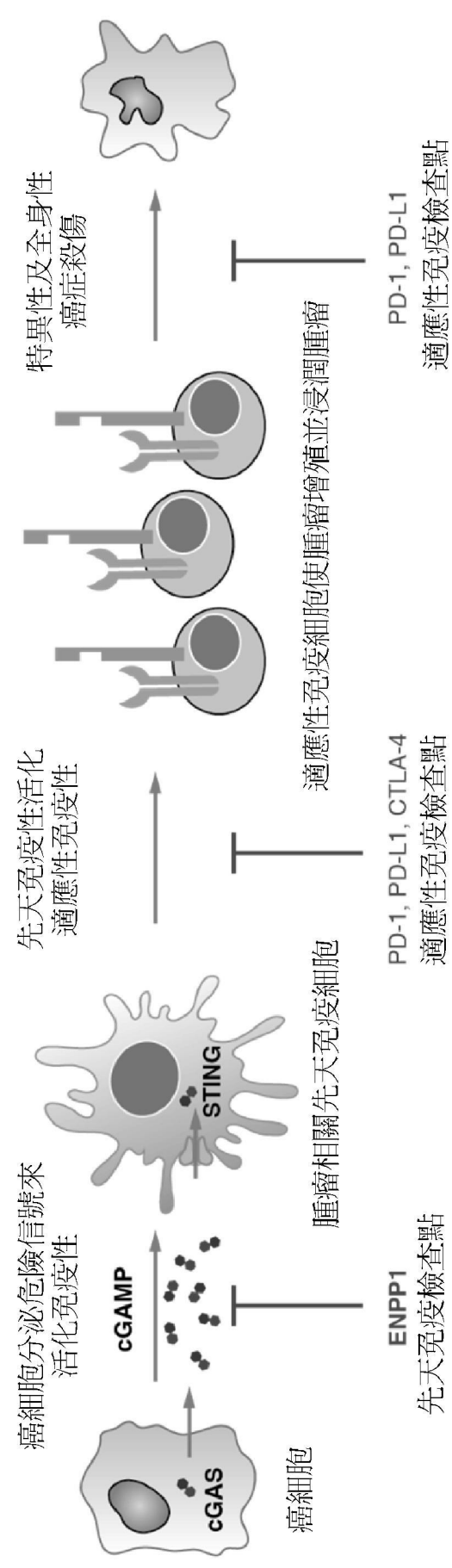
第40天之顯著性測試



【圖 21B】



【圖 21C】



【圖 22】