



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110573511 B

(45) 授权公告日 2023.04.25

(21) 申请号 201880027586.7

(22) 申请日 2018.04.26

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110573511 A

(43) 申请公布日 2019.12.13

(30) 优先权数据

62/491,475 2017.04.28 US

62/491,484 2017.04.28 US

62/491,526 2017.04.28 US

62/491,573 2017.04.28 US

62/650,232 2018.03.29 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2019.10.25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2018/052919 2018.04.26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02018/198077 EN 2018.11.01

(73) 专利权人 诺华股份有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 D·本克 F·贝伦斯特恩 郝学士

T·霍夫曼 金其辉 A·拉科斯特

C·李 刘峻 Y·刘

J·K·麦鲍姆 T·莫 J·潘

X·屈 J·特霍兹 谢云峰

S·闫 邹叶芬

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

专利代理师 杨春刚 黄革生

(51) Int.Cl.

C07D 487/04 (2006.01)

C07D 519/00 (2006.01)

A61K 35/30 (2015.01)

C12N 5/079 (2010.01)

A61P 27/02 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2011319409 A1, 2011.12.29

WO 2015148597 A1, 2015.10.01

EP 2733201 A1, 2014.05.21

YaweiHao等.Tumor Suppressor LATS1 Is a Negative Regulator of Oncogene YAP.《Journal of Biological Chemistry》.2008,第5496-5509页.

(续)

审查员 黄清昌

权利要求书6页 说明书306页

序列表26页 附图28页

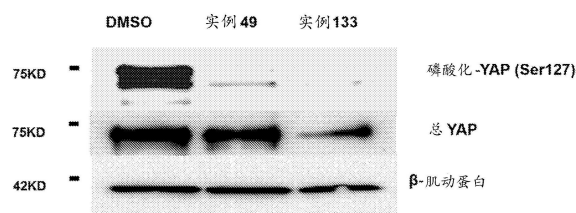
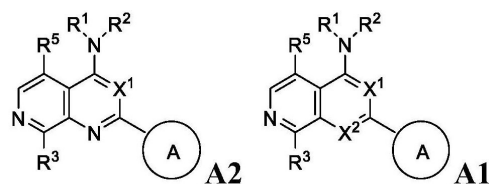
(54) 发明名称

6-6稠合双环杂芳基化合物及其作为LATS抑制剂的用途

(57) 摘要

本发明涉及具有式A2或A1的6-6稠合双环杂芳基化合物及其作为LATS抑制剂的用途,或其盐、立体异构体或药物组合物;其中变量如本文中所定义(A1&A2)。本发明进一步涉及使用具有式A1的化合物或其盐、立体异构体或药物组合物在细胞群中抑制LATS的方法。本发明进一步提供了制备本发明化合物的方法及其治疗用途。本发明进一步提供了用于本发明化合物的制备的方法、本发明化合物的医疗使用的方法、本发明化

合物在疾病或障碍的治疗和管理中的用途。



[转续页]

[接上页]

**(56) 对比文件**

Peng Wang等.Selective inhibition of ROCK kinase isoforms to promote neuroregeneration after brain surgery.《Medicinal Chemistry Research》.2015,第40-50页.

Paolo Rama等.Limbal Stem-Cell Therapy and Long-Term Corneal Regeneration.《The New England Journal of Medicine》.2010,第147-155页.

Renata Ruoco loureiro.Comparison of

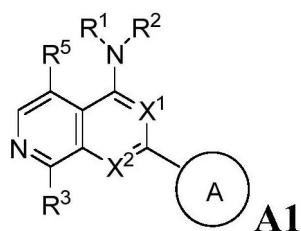
culture media for ex vivo cultivation of limbal epithelial progenitor cells.《Molecular Vision》.2013,第69-77页.

Mohit Parekh等.Concise Review: An Update on the Culture of Human Corneal Endothelial Cells for Transplantation.《STEM CELLS Translational Medicine》.2015,第258-264页.

Matthias Fuest等.Advances in corneal cell therapy.《Regenerative Medicine》.2016,第601-615页.



1. 一种培养细胞的方法,其中所述方法包括在LATS抑制剂存在下培养包含眼细胞的细胞群,且其中所述LATS抑制剂是式A1的化合物或其盐



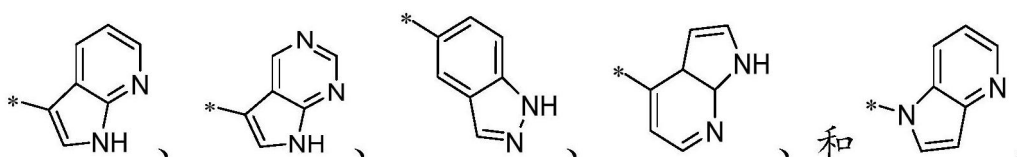
其中

$X^1$ 和 $X^2$ 各自独立地是CH或N;

环A是

(a) 5或6元单环杂芳基,其通过碳环成员与分子的其余部分连接,并包含1至4个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员,条件是所述杂原子环成员中至少一个是在5元杂芳基的相对于连接碳环成员的3位或4位的或在6元杂芳基的对位环位置上的未经取代的氮(-N=);或

(b) 选自以下的9元稠合双环杂芳基



其中“\*”代表环A与分子其余部分的附接点;

其中环A未经取代或经1至2个独立地选自卤素、氰基、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $-NH_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $C_{3-6}$ 环烷基和苯基磺酰基的取代基取代;

$R^0$ 是羟基或 $C_{1-6}$ 烷氧基;

$R^1$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基;

$R^2$ 选自

(a) 未经取代的或经1至3个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{1-8}$ 烷基

(i) 卤素;

(ii) 氰基;

(iii) 氧代;

(iv)  $C_2$ 烯基;

(v)  $C_2$ 炔基;

(vi)  $C_{1-6}$ 卤代烷基;

(vii)  $-OR^6$ , 其中 $R^6$ 选自氢、未经取代或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;

(viii)  $-NR^{7a}R^{7b}$ , 其中 $R^{7a}$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基, 并且 $R^{7b}$ 选自氢、 $-C(O)R^0$ 、未经取代的或经 $-C$

(O)  $R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;

(ix)  $-C(O)R^8$ , 其中 $R^8$ 是 $R^0$ 或 $-NH-C_{1-6}$ 烷基 $-C(O)R^0$ ;

(x)  $-S(O)_2C_{1-6}$ 烷基;

(xi) 单环 $C_{3-6}$ 环烷基或多环 $C_{7-10}$ 环烷基,其各自未经取代或经1至2个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、羟基 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $-NH_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基和二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基的取代基

取代；

(xii) 6元杂环烷基，其包含1至2个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员并且未经取代或经1至2个独立地选自羟基、卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 烷基氨基和二- ( $C_{1-6}$ 烷基) 氨基的取代基取代；

(xiii) 未经取代的或经卤素取代的苯基；

(xiv) 5或6元单环杂芳基，其包含1至4个独立地选自N和O的杂原子作为环成员；以及

(xv) 9或10元稠合双环杂芳基，其包含1至2个独立地选自N和O的杂原子作为环成员；

(b)  $-S(O)_2C_{1-6}$ 烷基；

(c) 未经取代的或经1至2个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基和 $R^0$ 的取代基取代的苯基；

(d) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{3-6}$ 环烷基： $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- ( $C_{1-6}$ 烷基) 氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；以及

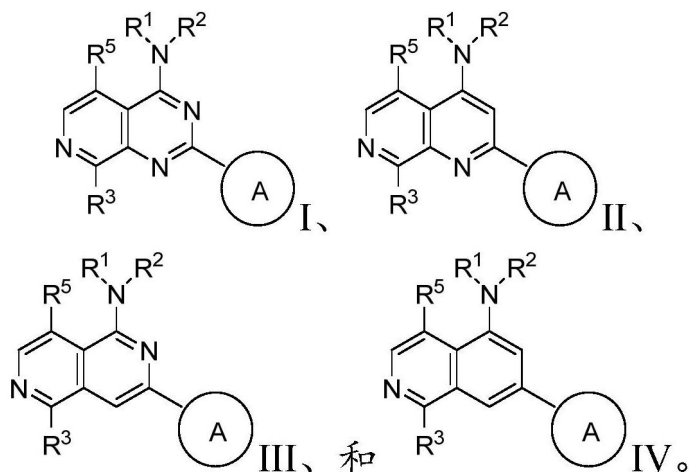
(e) 4元杂环烷基，其包含1至2个选自N、O和S的杂原子作为环成员，并且未经取代或经1至2个独立地选自以下的取代基取代： $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- ( $C_{1-6}$ 烷基) 氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；

或 $R^1$ 和 $R^2$ 可以与两者都结合的氮原子一起形成4至6元杂环烷基，所述杂环烷基可以包含1至2个独立地选自N、O和S的其他杂原子作为环成员，其中由 $R^1$ 和 $R^2$ 与两者都结合的氮原子一起形成的4至6元杂环烷基未经取代或经1至3个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基以及 $R^0$ 的取代基取代；

$R^3$ 选自氢、卤素和 $C_{1-6}$ 烷基；并且

$R^5$ 选自氢、卤素和 $-NH-$  (3至8元杂烷基)，其中 $-NH-$  (3至8元杂烷基) 的3至8元杂 $C_{3-8}$ 烷基包含1至2个氧原子作为链成员且未经取代或经 $R^0$ 取代。

2. 根据权利要求1的方法，其中所述式A1化合物具有选自式I至IV的式：



3. 根据权利要求2所述的方法，其中所述式A1化合物选自3- (吡啶-4-基) -N- (1- (三氟甲基) 环丙基) -2,6-萘啶-1-胺；N- (1-甲基环丙基) -7- (吡啶-4-基) 异喹啉-5-胺；2- (吡啶-4-基) -4- (3- (三氟甲基) 哌嗪-1-基) 吡啶并[3,4-d]嘧啶；N- (叔-丁基) -2- (吡啶-4-基) -1,7-萘啶-4-胺；和N-甲基-2- (吡啶-4-基) -N- [ (2S) -1,1,1-三氟丙-2-基] 吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺。

4. 根据权利要求2所述的方法，其中所述式A1化合物选自3- (吡啶-4-基) -N- (1- (三氟

甲基)环丙基)-2,6-萘啶-1-胺;N-(1-甲基环丙基)-7-(吡啶-4-基)异喹啉-5-胺;和2-(吡啶-4-基)-4-(3-(三氟甲基)哌嗪-1-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶。

5. 根据权利要求2所述的方法,其中所述式A1化合物选自:N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-甲基-1-(2-甲基-2-{{2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基}氨基}丙氧基)丙-2-醇;2,4-二甲基-4-{{2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基}氨基}戊-2-醇;N-叔-丁基-2-(嘧啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;2-(吡啶-4-基)-N-[1-(三氟甲基)环丁基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-丙基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;3-(吡啶-4-基)-N-(1-(三氟甲基)环丙基)-2,6-萘啶-1-胺;2-(3-甲基-1H-吡唑-4-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-甲基-2-{{2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基}氨基}丙-1-醇;2-(吡啶-4-基)-4-(3-(三氟甲基)哌嗪-1-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶;N-环戊基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-丙基-2-(3-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(2-甲基环戊基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-氯吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟-2-甲基丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(2-甲基-2-{{2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基}氨基}丙氧基)乙-1-醇;N-(1-甲基环丙基)-7-(吡啶-4-基)异喹啉-5-胺;(1S,2S)-2-{{2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基}氨基}环戊-1-醇;N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-[(2S)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-甲基-N-(丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;3-(吡啶-4-基)-N-(1-(三氟甲基)环丙基)-2,6-萘啶-1-胺和N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-[(2R)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺。

6. 根据权利要求2所述的方法,其中所述式A1化合物选自:N-(叔-丁基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;和N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-[(2S)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺。

7. 根据权利要求2所述的方法,其中所述式A1化合物是N-(叔-丁基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述眼细胞是角膜缘干细胞或角膜内皮细胞。

9. 根据权利要求7所述的方法,其中所述眼细胞是角膜缘干细胞或角膜内皮细胞。

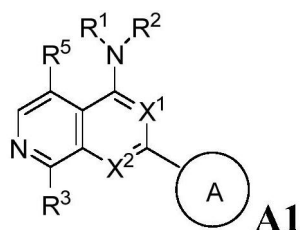
10. 权利要求2的方法,其中所述LATS抑制剂以0.5至100微摩尔的浓度存在。

11. 权利要求10的方法,其中所述LATS抑制剂以0.5至25微摩尔的浓度存在。

12. 权利要求10的方法,其中所述LATS抑制剂以1至20微摩尔的浓度存在。

13. 权利要求10的方法,其中所述LATS抑制剂以3至10微摩尔的浓度存在。

14. 一种使用LATS抑制剂在包含离体的眼细胞的细胞群中抑制LATS的方法,其中所述LATS抑制剂是式A1的化合物或其盐:



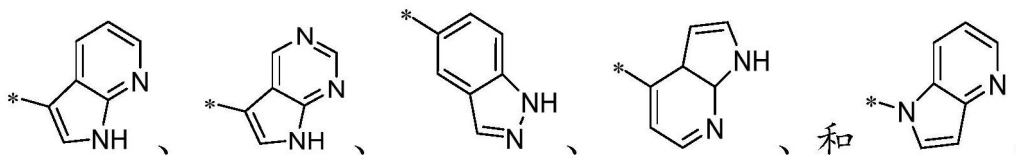
其中

$X^1$ 和 $X^2$ 各自独立地是CH或N;

环A是

(a) 5或6元单环杂芳基,其通过碳环成员与分子的其余部分连接,并包含1至4个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员,条件是所述杂原子环成员中至少一个是在5元杂芳基的相对于连接碳环成员的3位或4位的或在6元杂芳基的对位环位置上的未经取代的氮(-N=);或

(b) 选自以下的9元稠合双环杂芳基



其中“\*”代表环A与分子其余部分的附接点;

其中环A未经取代或经1至2个独立地选自卤素、氰基、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $-NH_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二-( $C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $C_{3-6}$ 环烷基和苯基磺酰基的取代基取代;

$R^0$ 是羟基或 $C_{1-6}$ 烷氧基;

$R^1$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基;

$R^2$ 选自

(a) 未经取代的或经1至3个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{1-8}$ 烷基

(i) 卤素;

(ii) 氰基;

(iii) 氧代;

(iv)  $C_2$ 烯基;

(v)  $C_2$ 炔基;

(vi)  $C_{1-6}$ 卤代烷基;

(vii)  $-OR^6$ , 其中 $R^6$ 选自氢、未经取代或经 $R^0$ 或-C(O) $R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;

(viii)  $-NR^{7a}R^{7b}$ , 其中 $R^{7a}$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基, 并且 $R^{7b}$ 选自氢、-C(O) $R^0$ 、未经取代的或经-C

(O) $R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;

(ix) -C(O) $R^8$ , 其中 $R^8$ 是 $R^0$ 或-NH- $C_{1-6}$ 烷基-C(O) $R^0$ ;

(x) -S(O) $_2C_{1-6}$ 烷基;

(xi) 单环 $C_{3-6}$ 环烷基或多环 $C_{7-10}$ 环烷基, 其各自未经取代或经1至2个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、羟基 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $-NH_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基和二-( $C_{1-6}$ 烷基)氨基的取代基取代;

(xii) 6元杂环烷基, 其包含1至2个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员并且未经取代或经1至2个独立地选自羟基、卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 烷基氨基和二-( $C_{1-6}$ 烷基)氨基的取代基取代;

(xiii) 未经取代的或经卤素取代的苯基;

(xiv) 5或6元单环杂芳基, 其包含1至4个独立地选自N和O的杂原子作为环成员; 以及

(xv) 9或10元稠合双环杂芳基, 其包含1至2个独立地选自N和O的杂原子作为环成员;

(b) -S(O) $_2C_{1-6}$ 烷基;

(c) 未经取代的或经1至2个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基和 $R^0$ 的取代基取代的苯基；

(d) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{3-6}$ 环烷基： $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；以及

(e) 4元杂环烷基，其包含1至2个选自N、O和S的杂原子作为环成员，并且未经取代或经1至2个独立地选自以下的取代基取代： $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；

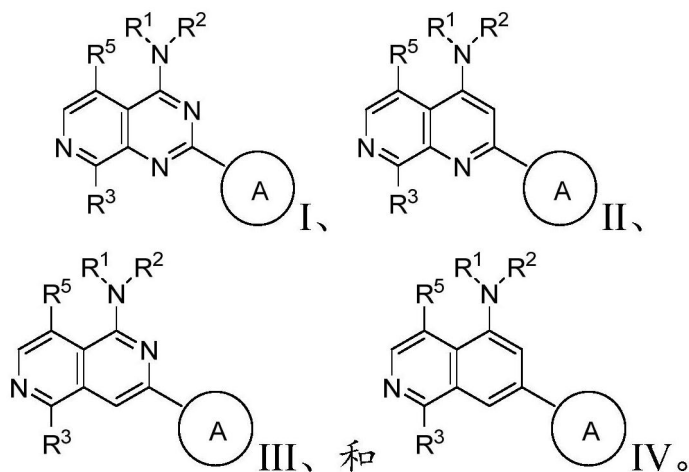
或 $R^1$ 和 $R^2$ 可以与两者都结合的氮原子一起形成4至6元杂环烷基，所述杂环烷基可以包含1至2个独立地选自N、O和S的其他杂原子作为环成员，其中由 $R^1$ 和 $R^2$ 与两者都结合的氮原子一起形成的4至6元杂环烷基未经取代或经1至3个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基以及 $R^0$ 的取代基取代；

$R^3$ 选自氢、卤素和 $C_{1-6}$ 烷基；并且

$R^5$ 选自氢、卤素和 $-NH-$  (3至8元杂烷基)，其中 $-NH-$  (3至8元杂烷基) 的3至8元杂 $C_{3-8}$ 烷基包含1至2个氧原子作为链成员且未经取代或经 $R^0$ 取代。

15. 根据权利要求14所述的方法，其中所述眼细胞是角膜缘干细胞或角膜内皮细胞。

16. 根据权利要求14所述的方法，其中所述式A1化合物具有选自式I至IV的式：



17. 根据权利要求16所述的方法，其中所述式A1化合物选自3-(吡啶-4-基)-N-(1-(三氟甲基)环丙基)-2,6-萘啶-1-胺；N-(1-甲基环丙基)-7-(吡啶-4-基)异喹啉-5-胺；2-(吡啶-4-基)-4-(3-(三氟甲基)哌嗪-1-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶；N-(叔-丁基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺；和N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-[(2S)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺。

18. 根据权利要求16所述的方法，其中所述式A1化合物选自3-(吡啶-4-基)-N-(1-(三氟甲基)环丙基)-2,6-萘啶-1-胺；N-(1-甲基环丙基)-7-(吡啶-4-基)异喹啉-5-胺；和2-(吡啶-4-基)-4-(3-(三氟甲基)哌嗪-1-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶。

19. 根据权利要求16所述的方法，其中所述式A1化合物选自：N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺；2-甲基-1-(2-甲基-2-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丙氧基)丙-2-醇；2,4-二甲基-4-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}戊-2-醇；N-叔-丁基-2-(嘧啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺；2-(吡啶-4-基)-N-[1-(三氟甲基)环丁基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺；N-丙基-2-(吡啶-4-基)吡

啉并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啉并[3,4-d]嘧啶-4-胺;3-(吡啶-4-基)-N-(1-(三氟甲基)环丙基)-2,6-萘啶-1-胺;2-(3-甲基-1H-吡啶-4-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啉并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-甲基-2-{{2-(吡啶-4-基)吡啉并[3,4-d]嘧啶-4-基}氨基}丙-1-醇;2-(吡啶-4-基)-4-(3-(三氟甲基)哌嗪-1-基)吡啉并[3,4-d]嘧啶;N-环戊基-2-(吡啶-4-基)吡啉并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-丙基-2-(3-(三氟甲基)-1H-吡啶-4-基)吡啉并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(2-甲基环戊基)-2-(吡啶-4-基)吡啉并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-氯吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟-2-甲基丙-2-基)吡啉并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(2-甲基-2-{{2-(吡啶-4-基)吡啉并[3,4-d]嘧啶-4-基}氨基}丙氧基)乙-1-醇;N-(1-甲基环丙基)-7-(吡啶-4-基)异喹啉-5-胺;(1S,2S)-2-{{2-(吡啶-4-基)吡啉并[3,4-d]嘧啶-4-基}氨基}环戊-1-醇;N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-[(2S)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啉并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-甲基-N-(丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啉并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啉并[3,4-d]嘧啶-4-胺;3-(吡啶-4-基)-N-(1-(三氟甲基)环丙基)-2,6-萘啶-1-胺和N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-[(2R)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啉并[3,4-d]嘧啶-4-胺。

20. 根据权利要求16所述的方法,其中所述式A1化合物选自:N-(叔-丁基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;和N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-[(2S)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啉并[3,4-d]嘧啶-4-胺。

21. 根据权利要求16所述的方法,其中所述式A1化合物是N-(叔-丁基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述眼细胞是角膜缘干细胞或角膜内皮细胞。

23. 根据权利要求1-22中任何一项所述的方法,其中所述方法还包括遗传修饰所述眼细胞,所述遗传修饰通过降低或消除与促进宿主抗移植免疫应答相关的基因的表达和/或功能进行。

24. 权利要求23的方法,其中所述宿主抗移植免疫应答相关的基因是B2M、HLA-A、HLA-B或HLA-C。

## 6-6稠合双环杂芳基化合物及其作为LATS抑制剂的用途

[0001] 序列表

[0002] 本申请包含按ASCII格式以电子方式提交并特此通过引用以其全文并入的序列表。所述ASCII副本创建于2018年4月23日,名称为PAT057699-W0-PCT\_SL.txt并且大小为35,778字节。

[0003] 引言

[0004] 本发明涉及LATS(大肿瘤抑制激酶)抑制剂。本发明进一步涉及6-6稠合双环杂芳基化合物和包含此类化合物的组合物。

[0005] 本发明还涉及这些化合物离体用于产生用于细胞疗法/移植的细胞材料的用途。本发明进一步涉及产生扩增的细胞群的方法,例如扩增的眼细胞群例如包含角膜缘干细胞(LSC)或角膜内皮细胞(CEC)(涉及使用LATS抑制剂),以及细胞群例如眼细胞(包括角膜缘干细胞(LSC)或角膜内皮细胞(CEC))群,和包含所述细胞的制剂、用途和疗法方法。

[0006] 本发明还涉及6-6稠合双环杂芳基化合物,包含此类化合物的组合物,及其在促进伤口愈合中的用途,特别是用于治疗烧伤、急性和慢性皮肤溃疡,包括血管性、糖尿病性和压力性溃疡,例如静脉小腿溃疡、糖尿病性足溃疡,压力性溃疡。

[0007] 本发明还涉及6-6稠合双环杂芳基化合物,包含此类化合物的组合物,及其在肝脏再生和肝脏再生长中以及在有或没有灌注装置情况下预防离体器官损害和维持或改善离体器官功能中的用途。

### 背景技术

[0008] 器官再生和/或愈合是治疗许多严重健康问题的关键问题。

[0009] 例如在眼中,已知角膜失明是全世界失明的第三大主要原因。全世界所有角膜移植中大约有一半是针对角膜内皮功能障碍的治疗。

[0010] 角膜是透明的组织,包括不同的层:角膜上皮、前弹力膜(Bowman's membrane)、基质、后弹力膜(Descemet's Membrane)和内皮。角膜内皮还包括人角膜内皮细胞的单层,并通过其屏障和离子泵功能帮助维持角膜透明性。它在维持角膜基质和房水之间的液体、营养和盐的平衡中起着至关重要的作用。为了保持透明性,必须保持内皮细胞密度,但是由于创伤、疾病或内皮营养不良,内皮细胞密度可以显著降低。细胞的密度也随着老化而降低。人角膜内皮在体内增殖的倾向有限。如果细胞密度降低得太低,则屏障功能可能会受到损害。内皮屏障功能的丧失导致角膜水肿和视力丧失。大疱性角膜病变的临床状况可能是导致的一种并发症。

[0011] 目前,由角膜内皮功能障碍引起的失明的唯一治疗方法是角膜移植。尽管角膜移植是最常见的器官移植形式之一,但所需供体角膜的可用性却极为有限。2012年至2013年的一项全球调查对角膜移植组织的严重短缺进行了量化,发现每70个需求中只有一个角膜可用(Gain等人,(2016)Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking[角膜移植和眼库全球调查].JAMA Ophthalmol[JAMA眼科学].134:167-173)。

[0012] 因此,非常需要新的治疗方法以提供用于治疗角膜内皮功能障碍的角膜内皮细

胞。

[0013] 角膜上皮也需要在眼中维持。角膜上皮由一层基底细胞和多层非角质化的、分层的鳞状上皮构成。这对于维持角膜的清晰度和规则的折射表面至关重要。它充当角膜基质上的透明、可更新的保护层,并由位于角膜缘的干细胞群补充。在角膜缘干细胞缺陷(角膜缘干细胞患病或缺失的病症)中,健康的角膜缘干细胞数量减少会导致角膜上皮更新能力降低。

[0014] 角膜缘干细胞缺陷可能是由于化学或热灼伤、紫外线和电离辐射造成的伤害的结果引起的,甚至是由于接触透镜的磨损;遗传性障碍(如无虹膜)和免疫性障碍(如史蒂文斯约翰逊综合征(Stevens Johnson syndrome)和眼瘢痕性天疱疮)的结果引起的。角膜缘干细胞的损失可以是部分或全部;并且可以是单侧的或双侧的。角膜缘干细胞缺陷的症状包括疼痛、畏光、无法治愈的疼痛性角膜上皮缺陷、角膜新血管形成、结膜上皮置换角膜上皮、最终可能导致失明的角膜透明度丧失和视力降低。

[0015] 一种用于治疗角膜缘干细胞缺陷的产品(名称为Holoclar®)于2015年在欧盟获得了有条件的销售许可,使其成为欧洲首个包含干细胞的先进治疗药物(ATMP)。Holoclar是包含干细胞的自体人角膜上皮细胞的离体扩增制剂。从患者取健康的角膜缘组织活检,离体扩大并冷冻直至手术。为了向患者施用,将解冻的细胞在包含血纤蛋白的膜上生长,然后通过手术植入到患者的眼上。所述疗法旨在用于因物理或化学性眼灼伤而导致中度至重度角膜缘干细胞缺陷的成年人。(Rama P,Matuska S,Paganoni G,Spinelli A,De Luca M,Pellegrini G.(2010) Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration[肢体干细胞疗法和长期角膜再生].N Engl J Med.[新英格兰医药杂志] 363:147-155)。然而,所述方法的局限性在于它仅用于自体使用,并且一只眼中必须有足够的存活角膜缘,以允许从患者中取出至少1-2平方毫米的未受损组织。对于每个特定患者,也有可能无法成功培养他/她的细胞以及患者无法接受这种治疗的风险。此外,鼠源的饲养细胞也被用于制备Holoclar细胞制剂,由于疾病传播的风险和潜在的免疫原性,其将潜在的安全隐患引入了用于人类的制剂。此外,Holoclar细胞制剂仅含有约5%的角膜缘干细胞,如p63 $\alpha$ 染色所鉴定的。

[0016] 因此,迫切需要新的治疗方法来供应角膜缘干细胞以治疗角膜缘干细胞缺陷。

[0017] 稳态和疾病状态下的功能性肝再生对于维持必要的生理过程至关重要。尽管肝脏具有显著的再生潜力,但在严重的急性或慢性肝损伤后,这一过程可能会受到损害。肝损伤和肝再生受损通常会导致严重的发病率和死亡率,因此需要挽救生命的肝移植。遗憾的是,目前对肝移植的需求远远超过了可用供体器官的供应。结果,许多患者不断在等待挽救生命的移植手术期间死亡。死体供体的剖肝移植或活体供体的部分肝移植的用途受移植物大小限制。移植物与受体重量比(GRWR)不足的部分肝脏的移植会增加移植物功能障碍和衰竭的发生率。增加肝脏再生长的疗法可能允许部分肝脏的移植,否则根据大小,这些部分肝脏将被认为不足以进行移植。可替代地,通过抑制肝细胞死亡、改善肝功能和修复异常的肝结构来再生肝脏可以使肝功能正常化,从而避免了移植的必要性(Forbes SJ and Newsome PN(2016)Liver regeneration-mechanisms and models to clinical application[肝再生-机制和临床应用模型].Nature Reviews Gastroenterology&Hepatology[自然评论,胃肠病和肝病],13(8):473-485;Dutkowski P,Linecker M,DeOliveira ML,Müllhaupt B,



Clavien PA(2015)Challenges to Liver Transplantation and Strategies to Improve Outcomes[肝移植的挑战和改善结果的策略].Gastroenterology[胃肠病学],148(2):307-323)。

[0018] 因此,迫切需要更有效的疗法来促进肝脏再生长。

[0019] 包括血管性、糖尿病性和压力性溃疡在内的慢性皮肤溃疡构成主要的公共卫生问题。对伤口护理的需求增加反映在伤口与合并症、死亡率增加和患者生活质量的关联上(Demidova-Rice TN,Hamblin MR,&Herman IM(2012)Acute and impaired wound healing:pathophysiology and current methods for drug delivery,part 1:normal and chronic wounds:biology,causes,and approaches to care[急性和受损的伤口愈合:病理生理学和目前的药物递送方法,第1部分:正常和慢性伤口:生物学、病因和护理方法].Advances in skin&wound care[皮肤和伤口护理进展]25(7):304-314;Demidova-Rice TN,Hamblin MR,&Herman IM(2012)Acute and impaired wound healing:pathophysiology and current methods for drug delivery,part2:role of growth factors in normal and pathological wound healing:therapeutic potential and methods of delivery[急性和受损的伤口愈合:病理生理学和目前的药物递送方法,第2部分:生长因子在正常和病理性伤口愈合中的作用:治疗潜力和递送方法].Advances in skin&wound care[皮肤和伤口护理进展]25(8):349-370)。仅在美国,慢性伤口患者的医疗保健费用每年约为250亿美元。自1997年Regranex(PDGF)批准以来,没有新的化学实体被FDA批准,Regranex药效有限(Eaglststein WH,Kirsner RS,和Robson MC(2012)Food and Drug Administration(FDA)drug approval end points for chronic cutaneous ulcer studies[美国食品药品监督管理局(FDA)针对慢性皮肤溃疡研究的药物批准终点].Wound repair and regeneration:official publication of the Wound Healing Society [and]the European Tissue Repair Society[伤口修复和再生:伤口愈合协会[和]欧洲组织修复协会的正式出版物]20(6):793-796)。本质上,生长因子在伤口床的蛋白水解环境中不稳定。如临床患者样品中所示,生长因子疗法也可能受累于在伤口中其相应受体的低表达(Demidova-Rice TN,Hamblin MR,&Herman IM(2012)Acute and impaired wound healing:pathophysiology and current methods for drug delivery,part 2:role of growth factors in normal and pathological wound healing:therapeutic potential and methods of delivery[急性和受损的伤口愈合:病理生理学和目前的药物递送方法,第2部分:生长因子在正常和病理性伤口愈合中的作用:治疗潜力和递送方法].Advances in skin&wound care[皮肤和伤口护理进展]25(8):349-370)。

[0020] 因此,迫切需要更有效的疗法来促进慢性伤口患者的伤口愈合。

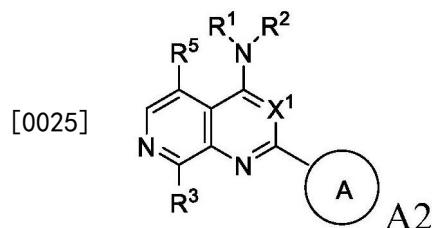
[0021] 因此,对于影响整个身体的一系列器官(例如眼、肝脏和皮肤)的病症,迫切需要新的治疗方法来促进细胞增殖。

## 发明内容

[0022] 本发明涉及化合物、其盐和其组合物,其中所述化合物是LATS(大肿瘤抑制激酶)抑制剂。这些化合物可用于上述病症和目的的治疗中。

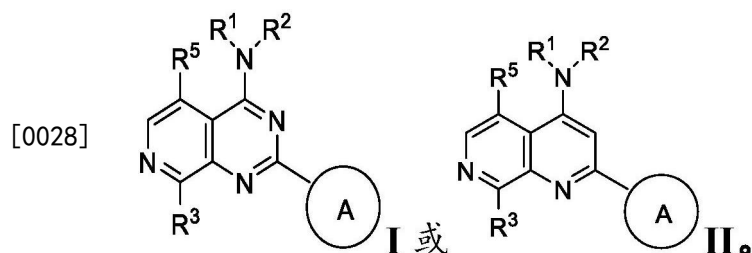
[0023] 本文描述了本发明的各个方面。

[0024] 本发明涉及具有式A2或其子式的化合物,或其盐或立体异构体,



[0026] 其中X<sup>1</sup>,环A、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>和R<sup>5</sup>如下文详细说明中所定义。

[0027] 在一个优选的实施例中,化合物是根据式I或式II或其子式的化合物或其盐:



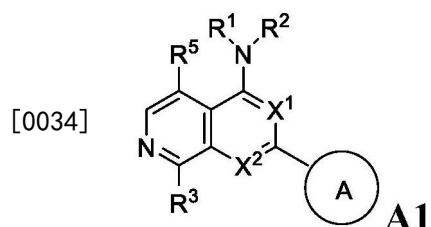
[0029] 其中环A、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>和R<sup>5</sup>如下文详细说明中所定义。

[0030] 在另一方面,本发明涉及药物组合物,其包含治疗有效量的根据式A2或其子式的定义的化合物,或其药学上可接受的盐,或其子式,和一种或多种药学上可接受的载体。

[0031] 在另一方面,本发明涉及一种组合,特别是药物组合,其包含治疗有效量的根据式A2或其子式的定义的化合物,或其药学上可接受的盐,和一种或多种治疗活性剂。

[0032] 在另一方面,本发明涉及可用于疗法的化合物和组合物。

[0033] 在一个实施例中,本发明涉及使用式A1或其子式的化合物或其盐或其立体异构体在细胞或细胞群中抑制LATS的方法:



[0035] 其中X<sup>1</sup>、X<sup>2</sup>、环A、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>和R<sup>5</sup>如下文详细说明中所定义。优选地,所述盐是药学上可接受的盐。根据本发明在细胞群中抑制LATS的方法的具体实施例中,所述化合物或其盐选自3-(吡啶-4-基)-N-(1-(三氟甲基)环丙基)-2,6-萘啶-1-胺;N-(1-甲基环丙基)-7-(吡啶-4-基)异喹啉-5-胺;2-(吡啶-4-基)-4-(3-(三氟甲基)哌嗪-1-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶。根据本发明在细胞群中抑制LATS的方法的另一个具体实施方案中,所述化合物或其盐选自N-(叔-丁基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;和N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-[(2S)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺。

[0036] 在另一个实施例中,本发明涉及使用式A1或其子式的化合物或其盐或其立体异构体在眼细胞群中抑制LATS的方法。在又一个实施例中,本发明涉及使用式A1或其子式的化合物或其盐或其立体异构体在包含角膜缘干细胞的细胞群中抑制LATS的方法。在又一个实施例中,本发明涉及使用式A1或其子式的化合物或其盐或其立体异构体在包含角膜内皮细胞的细胞群中抑制LATS的方法。

[0037] 还优选地,离体进行细胞群中抑制LATS的方法。在又一个优选的实施例中,所述化合物以0.5至100微摩尔,优选0.5至25微摩尔,更优选1至20微摩尔,特别优选约3至10微摩尔的浓度存在。在包含角膜缘干细胞的细胞群中LATS抑制方法的一个优选实施例中,所述化合物存在12至16天,特别优选所述化合物存在14天。在包含角膜内皮细胞的细胞群中抑制LATS的方法的另一个实施例中,化合物存在一到两周,然后在不补充所述化合物的生长培养基中培养细胞一段时间,优选地,其中所述时间为一到两周。在细胞群中抑制LATS的方法的本发明的一个实施例中,LATS抑制剂抑制LATS1或LATS2,或LATS1和LATS2。在更优选的实施例中,LATS抑制剂抑制LATS1和LATS2。在包含角膜缘干细胞的细胞群中抑制LATS的方法的另一个优选实施例中,所述方法进一步包括遗传修饰所述角膜缘干细胞。在包含角膜内皮细胞的细胞群中抑制LATS的方法的另一个优选实施例中,所述方法进一步包括遗传修饰所述角膜内皮细胞。优选地,所述遗传修饰包括将基因编辑系统引入所述细胞,所述基因编辑系统特异性地靶向与促进宿主抗移植免疫应答相关的基因。在又一个优选的实施例中,在细胞群中抑制LATS的方法,所述方法包括在产生扩增的细胞群后漂洗这些细胞以基本上除去根据本发明的化合物的另一步骤。在一方面,本发明涉及通过根据本发明的在包含角膜缘干细胞的细胞群中抑制LATS的方法可获得的包含角膜缘干细胞的扩增的细胞群。在另一方面,本发明涉及通过根据本发明的在包含角膜缘干细胞的细胞群中抑制LATS的方法获得的包含角膜缘干细胞的扩增的细胞群。在一方面,本发明涉及通过根据本发明的在包含角膜内皮细胞的细胞群中抑制LATS方法可获得的角膜内皮细胞群。在另一方面,本发明涉及通过根据本发明的抑制LATS的方法获得的角膜内皮细胞群。在另一方面,本发明涉及眼细胞递送制剂,其包含通过根据本发明的抑制LATS的方法可获得或获得的细胞群以及适合用于眼递送的作为定位剂的组合物。在一个具体的实施例中,定位剂是GelMa (其是甲基丙烯酰胺修饰的明胶,也称为甲基丙烯酸明胶)。在另一个具体的实施例中,定位剂是纤维蛋白或纤维蛋白胶。优选地,角膜缘干细胞的细胞递送制剂具有多于20%的角膜缘干细胞。还优选角膜缘干细胞的细胞递送制剂具有多于20%的p63 $\alpha$ 阳性细胞。在某些优选的方面,通过本发明的抑制LATS的方法可获得或获得的细胞群或根据本发明的细胞递送制剂仅具有痕量水平的根据本发明的化合物。优选地,在角膜内皮细胞的细胞递送制剂中,角膜内皮细胞在细胞递送制剂中的密度大于500个细胞/mm<sup>2</sup> (面积)。在某些优选的方面,通过本发明的抑制LATS的方法可获得或获得的细胞群或根据本发明的细胞递送制剂仅具有痕量水平的根据本发明的化合物。

[0038] 在另一方面,本发明涉及培养细胞的方法,所述方法包括在LATS抑制剂存在下培养细胞群。细胞可以是本文所述和/或本文提供的细胞群。优选地,细胞是眼细胞或肝细胞。在优选的实施例中,细胞是眼细胞。在另一方面,本发明涉及培养细胞的方法,所述方法包括在LATS抑制剂存在下培养包含角膜缘干细胞的细胞群。在另一方面,本发明涉及培养细胞的方法,所述方法包括在LATS抑制剂存在下培养包含角膜内皮细胞的细胞群。在一个优选的实施例中,本发明涉及培养细胞的方法,所述方法包括培养包含角膜缘干细胞的细胞群,其中LATS抑制剂是根据本发明的具有式A1或其子式的化合物或其盐。在另一个优选的实施例中,本发明涉及培养细胞的方法,所述方法包括培养包含角膜内皮细胞的群,其中LATS抑制剂是根据本发明的具有式A1或其子式的化合物或其盐。优选地,所述盐是药学上可接受的盐。在优选的实施例中,所述化合物以0.5至100微摩尔,优选0.5至25微摩尔,更优

选1至20微摩尔,特别优选约3至10微摩尔的浓度存在。在培养细胞的方法(包括培养包含角膜缘干细胞的细胞群)的一个优选实施例中,所述化合物存在12至16天,特别优选所述化合物存在14天。在培养细胞的方法(包括培养包含角膜内皮细胞的细胞群)的一个优选实施例中,化合物存在一到两周,然后在不补充所述化合物的生长培养基中培养细胞一段时间,优选地,其中所述时间为一到两周。在本发明的一个实施例中,LATS抑制剂抑制LATS1或LATS2,或LATS1和LATS2。在更优选的实施例中,LATS抑制剂抑制LATS1和LATS2。在一个实施例中,所述方法还包括遗传修饰细胞。优选地,所述遗传修饰包括将基因编辑系统引入所述细胞,所述基因编辑系统特异性地靶向与促进宿主抗移植免疫应答相关的基因。优选地,细胞是眼细胞。在一个实施例中,所述方法还包括遗传修饰角膜缘干细胞。在另一个优选实施例中,所述方法还包括遗传修饰角膜内皮细胞。在又一个优选的实施例中,培养细胞的方法包括在产生扩增的细胞群后漂洗这些细胞以基本上除去根据本发明的化合物的另一步骤。在一方面,本发明涉及通过根据本发明的培养细胞的方法可获得的扩增的细胞群。在另一方面,本发明涉及通过根据本发明的培养细胞的方法获得的扩增的细胞群。优选地,细胞是眼细胞。

[0039] 在一方面,本发明涉及通过根据本发明的培养包含角膜缘干细胞的细胞的方法可获得的包含角膜缘干细胞的扩增的细胞群。在另一方面,本发明涉及通过根据本发明的培养包含角膜缘干细胞的细胞的方法获得的包含角膜缘干细胞的扩增的细胞群。在一方面,本发明涉及通过根据本发明的培养包含角膜内皮细胞的细胞的方法可获得的角膜内皮细胞群。在另一方面,本发明涉及通过根据本发明的培养包含角膜内皮细胞的细胞的方法获得的角膜内皮细胞群。在另一方面,本发明涉及眼细胞递送制剂,其包含通过根据本发明的培养细胞的方法可获得或获得的细胞群以及适合用于眼递送的作为定位剂的组合物。在具体的实施例中,定位剂是GelMa。在另一个具体的实施例中,定位剂是纤维蛋白或纤维蛋白胶。优选地,角膜缘干细胞的细胞递送制剂具有多于20%的角膜缘干细胞。还优选角膜缘干细胞的细胞递送制剂具有多于20%的p63 $\alpha$ 阳性细胞。优选地,角膜内皮细胞以大于500个细胞/mm<sup>2</sup>(面积)的密度存在于角膜内皮细胞的细胞递送制剂中。在某些优选的方面,通过根据本发明的培养细胞的方法可获得或获得的细胞群或根据本发明的细胞递送制剂仅具有痕量水平的根据本发明的化合物。

[0040] 在另一方面,本发明涉及细胞群扩增方法,所述方法包括以下步骤:a)在LATS抑制剂存在下培养接种细胞群以产生扩增的细胞群。在优选的实施例中,细胞群扩增方法离体进行。优选地,细胞是眼细胞或肝细胞。在优选的实施例中,细胞是眼细胞。在又另一方面,本发明涉及细胞群扩增方法,所述方法包括以下步骤:a)在LATS抑制剂存在下培养包含角膜缘干细胞的接种细胞群,以产生包含角膜缘干细胞的扩增的细胞群。优选地,LATS抑制剂是根据本发明的具有式A1或其子式的化合物或其盐。在另一方面,本发明涉及细胞群扩增方法,所述方法包括以下步骤:a)在具有式A1或其子式的化合物或其盐的存在下,培养包含角膜缘干细胞的接种细胞群,以产生包含角膜缘干细胞的扩增的细胞群。在本发明的另一个实施例中,所述化合物选自式A2或其子式或其盐。在另一方面,本发明涉及细胞群扩增方法,所述方法包括以下步骤:a)在LATS抑制剂存在下培养包含角膜内皮细胞的接种细胞群,以产生包含角膜内皮细胞的扩增的细胞群。优选地,LATS抑制剂是根据本发明的具有式A1或其子式的化合物或其盐。在另一方面,本发明涉及细胞群扩增方法,所述方法包括以下步

骤:a)在具有式A1或其子式的化合物或其药学上可接受的盐存在下,培养包含角膜内皮细胞的接种细胞群,以产生包含角膜内皮细胞的扩增的细胞群。优选地,所述化合物选自式A2或其子式。还优选地,所述盐是药学上可接受的盐。优选地,所述化合物选自下组化合物,所述组化合物由以下组成:N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-甲基-1-(2-甲基-2-((2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)丙氧基)丙-2-醇;2,4-二甲基-4-((2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)戊-2-醇;N-(叔-丁基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;2-(吡啶-4-基)-N-(1-(三氟甲基)环丁基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-丙基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-异丙基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;3-(吡啶-4-基)-N-(1-(三氟甲基)环丙基)-2,6-萘啶-1-胺;2-甲基-2-((2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)丙-1-醇;2-(吡啶-4-基)-4-(3-(三氟甲基)哌嗪-1-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶;N-环戊基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;

[0041] N-丙基-2-(3-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(2-甲基环戊基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-氯吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟-2-甲基丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(2-甲基-2-((2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)丙氧基)乙-1-醇;N-(1-甲基环丙基)-7-(吡啶-4-基)异喹啉-5-胺;和2-(3-甲基-1H-吡唑-4-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺。

[0042] 还优选地,所述化合物或其盐选自N-(叔-丁基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺和(S)-N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺。

[0043] 在细胞群扩增方法的优选的实施例中,所述化合物以0.5至100微摩尔,优选0.5至25微摩尔,更优选1至20微摩尔,特别优选约3至10微摩尔的浓度存在。在步骤a)中的涉及角膜缘干细胞的细胞群扩增方法的一个优选实施例中,所述化合物存在12至16天,特别优选所述化合物存在14天。在步骤a)中的涉及角膜内皮细胞的细胞群扩增方法的一个优选实施例中,化合物存在一到两周,然后进行步骤b),其中在不补充所述化合物的生长培养基中培养细胞一段时间,优选地,其中所述时间为一到两周。在涉及角膜缘干细胞的细胞群扩增方法的具体实施例中,根据式A1或其子式的化合物产生接种量的细胞的大于30倍的扩增。在涉及角膜缘干细胞的细胞群扩增方法的另一个具体实施例中,根据式A1及其子式的化合物产生接种量的细胞的100倍至2200倍扩增,优选600倍至2200倍扩增。在涉及角膜缘干细胞的细胞群扩增方法的一个实施例中,根据本发明的方法产生具有多于20%角膜缘干细胞的细胞群。在涉及角膜缘干细胞的细胞群扩增方法的另一个实施例中,根据本发明的方法产生具有多于50%角膜缘干细胞的细胞群。在另一方面,根据本发明的涉及角膜缘干细胞的细胞群扩增方法产生具有多于20%的表达p63 $\alpha$ 的细胞群。在另一方面,根据本发明的涉及角膜缘干细胞的细胞群扩增方法产生具有多于50%的表达p63 $\alpha$ 的细胞群。在涉及角膜内皮细胞的细胞群扩增方法的具体实施例中,根据式A1或其子式的化合物产生接种量的细胞的大于10倍的扩增。在涉及角膜内皮细胞的细胞群扩增方法的另一个具体实施例中,根据式A1及其子式的化合物产生接种量的细胞的15倍至600倍扩增,优选20倍至550倍扩增。在本发明的一个实施例中,LATS抑制剂抑制LATS1或LATS2,或LATS1和LATS2。在更优选的实施例中,LATS抑制剂抑制LATS1和LATS2。在另一个优选的实施例中,所述细胞群扩增方法还包括使用基因编辑系统。优选地,所述方法包括使用基因编辑,所述基因编辑系统特异性地靶向

与促进宿主抗移植免疫应答相关的基因。还优选地,细胞是眼细胞或肝细胞。在优选的实施例中,细胞是眼细胞。在另一个优选的实施例中,所述细胞群扩增方法还包括遗传修饰角膜缘干细胞,优选地,其中所述遗传修饰包括将基因编辑系统引入所述细胞中,所述基因编辑系统特异性地靶向与促进宿主抗移植免疫应答相关的基因。在另一个优选实施例中,所述方法还包括遗传修饰角膜内皮细胞,优选地,其中所述遗传修饰包括将基因编辑系统引入所述细胞,所述基因编辑系统特异性地靶向与促进宿主抗移植免疫应答相关的基因。在又一个优选的实施例中,细胞群扩增方法还包括步骤c)漂洗扩增的细胞群以基本上除去根据本发明的化合物。

[0044] 一方面,本发明涉及试剂盒,其包含LATS抑制剂、生长培养基和细胞群扩增的说明书。在另一方面,本发明涉及通过根据本发明的细胞群扩增方法可获得的细胞群。在另一方面,本发明涉及通过根据本发明的细胞群扩增方法获得的细胞群。在另一方面,本发明涉及通过根据本发明的细胞群扩增方法可获得的眼细胞群。在另一方面,本发明涉及通过根据本发明的细胞群扩增方法获得的眼细胞群。在一个方面,本发明涉及细胞群,其包含通过根据本发明的涉及角膜缘干细胞的细胞群扩增方法可获得的角膜缘干细胞。在另一个方面,本发明涉及细胞群,其包含通过根据本发明的涉及角膜缘干细胞的细胞群扩增方法获得的角膜缘干细胞。在一个方面,本发明涉及细胞群,其包含通过根据本发明的涉及角膜内皮细胞的细胞群扩增方法可获得的角膜内皮细胞。在另一个方面,本发明涉及细胞群,其包含通过根据本发明的涉及角膜内皮细胞的细胞群扩增方法获得的角膜内皮细胞。在另一方面,本发明涉及眼细胞递送制剂,其包含通过根据本发明的细胞群扩增方法可获得或获得的细胞群以及适合用于眼递送的作为定位剂的组合物。在具体的实施例中,定位剂是GelMa。在另一个具体的实施例中,定位剂是纤维蛋白或纤维蛋白胶。优选地,角膜缘干细胞的细胞递送制剂具有多于20%的角膜缘干细胞。还优选角膜缘干细胞的细胞递送制剂具有多于20%的p63 $\alpha$ 阳性细胞。优选地,角膜内皮细胞以大于500个细胞/mm<sup>2</sup> (面积) 的密度存在于角膜内皮细胞的细胞递送制剂中。在某些优选的方面,通过根据本发明的细胞群扩增方法可获得或获得的细胞群或根据本发明的细胞递送制剂仅具有痕量水平的根据本发明的化合物。

[0045] 在细胞群扩增方法的一些方面,所述方法还包括使用基因编辑系统。优选地,基因编辑系统用于遗传修饰细胞。在根据本发明的方法的实施例中,遗传修饰包括减少或消除与促进宿主抗移植免疫应答相关的基因的表达和/或功能。还优选地,基因编辑系统特异性地靶向与促进宿主抗移植免疫应答相关的基因。优选地,所述基因编辑系统选自下组,该组由以下组成:CRISPR基因编辑系统、TALEN基因编辑系统、锌指核酸酶基因编辑系统、大范围核酸酶基因编辑系统、AAV载体驱动的同源重组和基于慢病毒载体的基因组编辑技术。

[0046] 在一方面,本发明涉及分离的细胞群,其中多于10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的细胞是角膜缘干细胞。优选地,多于20%是角膜缘干细胞。更优选地,多于50%是角膜缘干细胞。在另一个优选的实施例中,多于70%是角膜缘干细胞。特别优选地,多于90%是角膜缘干细胞。在一实施例中,细胞已经被基因编辑。

[0047] 在另一方面,本发明涉及分离的细胞群,其中多于10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的细胞是表达p63 $\alpha$ 的细胞。优选地,多于20%是p63 $\alpha$ 阳性。更优选地,多于50%是p63 $\alpha$ 阳性。在另一个优选的实施例中,多于70%是p63 $\alpha$ 阳性。特别优选地,多于90%是p63 $\alpha$ 阳性。在一实施例中,细胞已经被基因编辑。

[0048] 在另一方面,本发明涉及包含角膜缘干细胞的细胞群或根据本发明的细胞群,其中所述细胞中的一个或多个包含与促进宿主抗移植免疫应答相关的基因的一个或多个核酸残基的非天然发生的插入或缺失,其中插入和/或缺失导致所述基因的表达或功能降低或消除。在一个优选的实施例中,所述基因选自自由以下组成的组:B2M、HLA-A、HLA-B和HLA-C。在具体的实施例中,细胞具有遗传修饰水平的B2M表达。

[0049] 在另一方面,本发明涉及包含角膜内皮细胞的细胞群或根据本发明的细胞群,其中所述细胞中的一个或多个包含与促进宿主抗移植免疫应答相关的基因的一个或多个核酸残基的非天然发生的插入或缺失,其中插入和/或缺失导致所述基因的表达或功能降低或消除。在一个优选的实施例中,所述基因选自自由以下组成的组:B2M、HLA-A、HLA-B和HLA-C。在具体的实施例中,细胞具有遗传修饰水平的B2M表达。

[0050] 在另一方面,本发明涉及包含已经被基因编辑的角膜缘干细胞或角膜内皮细胞的细胞群。在另一方面,本发明涉及包含已经被基因编辑的角膜缘干细胞的细胞群。优选地,基因编辑由CRISPR进行。优选地,还编辑了B2M基因。

[0051] 在一方面,本发明涉及细胞生长促进剂,其包含LATS抑制剂。在一个实施例中,本发明涉及眼细胞生长促进剂,其包含LATS抑制剂。一方面,本发明涉及角膜缘干细胞生长促进剂,其包含LATS抑制剂。优选地,LATS抑制剂是具有式A1或其子式的化合物或其盐。在另一方面,本发明涉及角膜缘干细胞生长促进剂,其包含具有式A1或其子式的化合物或其盐。一方面,本发明涉及角膜内皮细胞生长促进剂,其包含LATS抑制剂。优选地,LATS抑制剂是具有式A1或其子式的化合物或其盐。在另一方面,本发明涉及角膜内皮细胞生长促进剂,其包含具有式A1或其子式的化合物或其盐。

[0052] 在一个方面,本发明涉及一种药物组合物,其包含根据本发明的具有式A2或其子式的化合物或其药学上可接受的盐或立体异构体以及至少一种药学上可接受的赋形剂。优选地,所述组合物还包含保存溶液或冷冻保存溶液。

[0053] 在另一方面,本发明涉及包含LATS抑制剂和生长培养基的细胞增殖培养基。优选地,LATS抑制剂是根据本发明的具有式A1或其子式的化合物。一方面,本发明涉及细胞增殖培养基(其包含根据本发明的具有式A1或其子式的化合物)和生长培养基。在一个实施例中,细胞增殖培养基另外包含本文提供的细胞。优选地,细胞增殖培养基还包含眼细胞。在另一个实施例中,细胞增殖培养基另外包含角膜缘干细胞。优选地,角膜缘干细胞处于悬浮液中。在又一个实施例中,细胞增殖培养基包含角膜内皮细胞。优选地,角膜内皮细胞处于悬浮液中。

[0054] 在一个方面,本发明涉及细胞制剂,其包含LATS抑制剂和本文所述和/或所提供的细胞群的细胞。在另一方面,本发明涉及包含LATS抑制剂和眼细胞的细胞制剂。在另一方面,本发明涉及包含LATS抑制剂和角膜缘干细胞的细胞制剂。在又另一方面,本发明涉及包含LATS抑制剂和角膜内皮细胞的细胞制剂。优选地,LATS抑制剂是根据本发明的具有式A1或其子式的化合物。在另一方面,本发明涉及包含根据本发明的具有式A1的化合物和角膜缘干细胞的细胞制剂。在可替代的方面,本发明涉及细胞制剂,其包含根据本发明的具有式A1的化合物和角膜内皮细胞。优选地,细胞制剂还包含生长培养基。特别优选地,细胞制剂还包含保存溶液或冷冻保存溶液。

[0055] 在另一方面,本发明涉及眼细胞递送制剂,其包含根据本发明的细胞制剂以及适

合用于眼递送的作为定位剂的组合物。在具体的实施例中，定位剂是GelMa。在另一个具体的实施例中，定位剂是纤维蛋白或纤维蛋白胶。在另一方面，本发明涉及眼细胞递送制剂，其包含根据本发明的细胞制剂以及适合用于眼递送的作为定位剂的组合物。在具体的实施例中，定位剂是GelMa。在另一个具体的实施例中，定位剂是纤维蛋白或纤维蛋白胶。在某些优选的方面，根据本发明的细胞制剂仅具有痕量水平的根据本发明的化合物。在又一个具体的实施例中，细胞递送制剂中多于20%的细胞是角膜缘干细胞。在另一个具体的实施例中，细胞递送制剂中多于20%的细胞是表达p63 $\alpha$ 的细胞。

[0056] 在又另一方面，本发明涉及眼细胞递送制剂，其包含根据本发明的细胞制剂以及适合用于眼递送的作为定位剂的组合物。在具体的实施例中，定位剂是GelMa。优选地，角膜内皮细胞处于悬浮液中。在可替代的实施例中，角膜内皮细胞以大于500个细胞/mm<sup>2</sup> (面积) 的密度存在于细胞递送制剂中。特别优选地，角膜内皮细胞以1000至3500个细胞/mm<sup>2</sup> (面积)，更优选2000至约3000个细胞/mm<sup>2</sup> (面积) 的密度存在。在某些优选的方面，根据本发明的细胞制剂仅具有痕量水平的根据本发明的化合物。

[0057] 优选地，在根据本发明的方法或细胞制备中的生长培养基选自自由以下组成的组：补充胎牛血清 (FBS) 的杜氏改良伊戈尔培养基 (DMEM)、具有人血清的无人内皮血清 (SF) 培养基、X-VIVO15培养基和任选地补充氯化钙的DMEM/F12；优选X-VIVO15培养基。

[0058] 优选地，根据本发明的保存溶液或冷冻保存溶液包括Optisol或PBS (磷酸盐缓冲盐水) 溶液，并且冷冻保存溶液另外包含甘油、二甲基亚砷、丙二醇或乙酰胺。

[0059] 在另一方面，本发明涉及试剂盒，其包含适合于眼递送的组合物和LATS抑制剂。优选地，LATS抑制剂是根据本发明的具有式A2或其子式的化合物。在另一方面，本发明涉及试剂盒，其包含适合于眼递送的组合物和根据本发明的具有式A2或其子式的化合物。优选地，试剂盒具有使用说明书。在一个实施例中，适合于眼递送的组合物是定位剂或局部滴眼剂。优选地，适合于眼递送的组合物是定位剂。在特定的实施例中，试剂盒还包含角膜缘干细胞。在试剂盒的另一个具体实施例中，适合于眼递送的组合物是定位剂，其为GelMa。在试剂盒的可替代的具体实施例中，适合于眼递送的组合物是定位剂，其是纤维蛋白或纤维蛋白胶。在又一个具体的实施例中，试剂盒中多于20%的细胞是角膜缘干细胞。在另一个具体的实施例中，试剂盒中多于20%的细胞是表达p63 $\alpha$ 的细胞。在可替代的具体实施例中，试剂盒包含角膜内皮细胞。在另一个具体的实施例中，适合于眼递送角膜内皮细胞的组合物是定位剂，其为GelMa。在又一个具体的实施例中，角膜内皮细胞以单层存在。优选地，角膜内皮细胞以大于500个细胞/mm<sup>2</sup> (面积) 的密度存在。特别优选地，角膜内皮细胞以1000至3500个细胞/mm<sup>2</sup> (面积)，更优选2000至约3000个细胞/mm<sup>2</sup> (面积) 的密度存在。

[0060] 在根据本发明的优选实施例中，适合于眼递送的组合物是定位剂，其是生物基质。优选地，根据本发明的适合于眼递送的组合物是选自自由以下组成的组的定位剂：纤维蛋白、胶原、明胶、纤维素、羊膜、纤维蛋白胶、聚乙烯 (乙二醇) 二丙烯酸酯 (PEGDA)、GelMA、包含以下的定位剂：聚合物、交联聚合物、或包含以下中的一种或多种的水凝胶：透明质酸、聚乙二醇、聚丙二醇、聚环氧乙烷、聚环氧丙烷、泊洛沙姆、聚乙烯醇、聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸、聚乙烯吡咯烷酮、聚 (丙交酯-共-乙交酯)、海藻酸盐、明胶、胶原、纤维蛋白原、纤维素、甲基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟丙基瓜尔胶、吉兰糖胶、瓜尔胶、黄原胶和羧甲基纤维素、以及其衍生物、其共聚物、及其组合。在根据本发明的优选实施例



中,适合于眼递送的组合物是定位剂,其为GelMa、纤维蛋白或纤维蛋白胶。在根据本发明的具体实施例中,适合于眼递送的组合物是定位剂,其为GelMa。在根据本发明的其他具体实施例中,适合于眼递送的组合物是定位剂,其为纤维蛋白或纤维蛋白胶。优选地,定位剂是纤维蛋白胶。纤维蛋白胶在本领域中是已知的,包括例如,TISSEEL VH纤维蛋白密封剂(Baxter AG公司,维也纳,奥地利)(Panda等人,2009,Indian J Ophthalmol.[印度眼科杂志]九月-十月;57(5):371-379)。在一个实施例中,使用纤维蛋白胶来递送角膜缘干细胞。在另一个实施例中,GelMa用于递送角膜内皮细胞。

[0061] 在根据本发明的更优选的实施例(其中角膜缘干细胞与定位剂组合存在)中,多于10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的细胞是角膜缘干细胞。优选地,多于20%是角膜缘干细胞。更优选地,多于50%是角膜缘干细胞。在另一个优选的实施例中,多于70%是角膜缘干细胞。特别优选地,多于90%是角膜缘干细胞。

[0062] 在根据本发明的另外优选的实施例(其中细胞与定位剂组合存在)中,多于10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的细胞是表达p63 $\alpha$ 的细胞。优选地,多于20%是p63 $\alpha$ 阳性细胞。更优选地,多于50%是p63 $\alpha$ 阳性细胞。在另一个优选的实施例中,多于70%是p63 $\alpha$ 阳性细胞。特别优选地,多于90%是p63 $\alpha$ 阳性细胞。

[0063] 在根据本发明的更优选的实施例中,角膜内皮细胞与定位剂组合存在。优选地,角膜内皮细胞处于单层。更优选地,角膜内皮细胞以大于500个细胞/mm<sup>2</sup>(面积)的密度存在。特别优选地,角膜内皮细胞以1000至3500个细胞/mm<sup>2</sup>(面积),更特别优选2000至约3000个细胞/mm<sup>2</sup>(面积)的密度存在。

[0064] 在本发明的另外特别优选的实施例中,LATS抑制剂抑制LATS1或LATS2,或LATS1和LATS2。在根据本发明的更特别优选的实施例中,LATS抑制剂抑制LATS1和LATS2。

[0065] 在根据本发明的优选实施例中,化合物选自下组,该组由以下组成:2-甲基-1-(2-甲基-2-((2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)丙氧基)丙-2-醇;N-(叔-丁基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;(S)-N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2,4-二甲基-4-((2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)戊-2-醇;N-异丙基-N-甲基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(吡啶-4-基)-N-(1-(三氟甲基)环丁基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-异丙基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-丙基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;3-(吡啶-4-基)-N-(1-(三氟甲基)环丙基)-2,6-萘啶-1-胺;2-甲基-2-((2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)丙-1-醇;2-(3-甲基-1H-吡唑-4-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-丙基-2-(3-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(吡啶-4-基)-4-(3-(三氟甲基)哌嗪-1-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶;N-环戊基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(2-甲基环戊基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-氯吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟-2-甲基丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(1-甲基环丙基)-7-(吡啶-4-基)异喹啉-5-胺;2-(2-甲基-2-((2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)丙氧基)乙-1-醇;和(R)-N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺。

[0066] 还优选地,所述化合物或其盐选自N-(叔-丁基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺和(S)-N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺。优选

地,所述化合物或其盐是N-(叔-丁基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺。

[0067] 在根据本发明的特别优选的实施例中,根据本发明的化合物以0.5至100微摩尔,优选0.5至25微摩尔,更优选1至20微摩尔,特别优选约3至10微摩尔的浓度存在。

[0068] 在一方面,本发明涉及将细胞群移植至受试者的方法,所述方法包括施用通过根据本发明的细胞群扩增方法或培养细胞的方法或LATS抑制方法可获得或获得的细胞群。

[0069] 本发明还涉及将眼细胞群移植到受试者的眼上的方法,所述方法包括施用通过根据本发明的细胞群扩增方法或培养细胞的方法或LATS抑制方法可获得或获得的细胞群,其中这些细胞是眼细胞。眼细胞优选是角膜缘干细胞或角膜内皮细胞。在另一方面,本发明涉及将眼细胞群移植到受试者的角膜上的方法,所述方法包括施用根据本发明的细胞递送制剂。

[0070] 在另一方面,本发明涉及将包含角膜缘干细胞的细胞群移植到受试者的角膜上的方法,所述方法包括施用通过根据本发明的细胞群扩增方法或培养细胞的方法或LATS抑制方法可获得或获得的包含角膜缘干细胞的细胞群。在另一方面本发明涉及将包含角膜缘干细胞的细胞群移植到受试者的角膜上的方法,所述方法包括施用根据本发明的细胞递送制剂。

[0071] 在另一方面,本发明提供了一种将包含角膜缘干细胞的细胞群移植到受试者的角膜上的方法,所述方法包括通过用包含根据本发明的LATS抑制剂的细胞增殖培养基培养包含角膜缘干细胞的细胞群来扩增所述群,优选地漂洗扩增的细胞群以基本上除去LATS抑制剂,并将所述细胞施用到所述受试者的角膜上。优选地,在所述施用之前,所述细胞群与生物基质组合。在具体的实施例中,在所述施用之前,将所述细胞群与作为GelMA的生物基质组合。在另一个具体的实施例中,在所述施用之前,将所述细胞群与纤维蛋白胶组合。在一个实施例中,所述细胞群与作为接触透镜的载体组合。在具体的实施例中,将包含角膜缘干细胞的细胞群与作为GelMA的生物基质组合,并且使GelMA在作为接触透镜的载体上聚合。在另一个具体的实施例中,将包含角膜缘干细胞的细胞群与纤维蛋白胶和接触透镜组合。

[0072] 在一方面,本发明涉及将角膜内皮细胞群移植到受试者的角膜上的方法,所述方法包括施用通过根据本发明的细胞群扩增方法或培养细胞的方法或LATS抑制方法可获得或获得的角膜内皮细胞群。在另一方面,本发明涉及将角膜内皮细胞群移植到受试者的角膜上的方法,所述方法包括施用根据本发明的细胞递送制剂。

[0073] 在另一方面,本发明涉及将包含角膜内皮细胞的细胞群移植到受试者的角膜上的方法,所述方法包括通过用包含根据本发明的LATS抑制剂的细胞增殖培养基培养包含角膜内皮细胞的细胞群来扩增所述细胞群,漂洗扩增的细胞群以基本上除去LATS抑制剂,并将所述细胞施用到所述受试者的角膜上。优选地,在所述施用之前,所述细胞与生物基质组合。在具体的实施例中,在所述施用之前,将所述细胞与作为GelMA的生物基质组合。在更具体的实施例中,所述角膜内皮细胞与生物基质组合,所述生物基质被生物印刷在眼表面上。特别优选地,所述角膜内皮细胞与作为GelMA的生物基质组合,并通过光触发反应使GelMA聚合而生物印刷在眼表面上。

[0074] 在另一方面,本发明涉及一种将细胞群移植到受试者的眼中的方法,所述方法包括将细胞与生物基质组合以形成细胞/生物基质混合物,将混合物注射到受试者的眼中或将混合物施加到受试者眼表面上,并通过使用诸如紫外线A或白光光源的光源引导和固定

细胞(例如在角膜上)将细胞生物印刷在眼中或眼上。在某些实施例中,光源产生波长为至少350nm的光。在某些实施例中,光源产生在350nm至420nm范围内的光。例如,LED光源可用于产生波长为365nm或405nm或350nm以上的任何其他波长的光,或者具有带通滤波器的水银灯可用于产生波长为350nm至700nm的波长,例如波长为365nm或405nm的光。在另一个实施例中,光源产生可见的白光,所述白光具有例如在400nm至700nm范围内的波长。在某些实施例中,细胞是眼细胞,例如角膜细胞,例如角膜内皮细胞。

[0075] 在另一方面,本发明涉及一种将角膜内皮细胞群移植到受试者的眼的方法,所述方法包括在包含LATS抑制剂的细胞增殖培养基中培养角膜内皮细胞群,将角膜内皮细胞与生物基质组合以形成细胞/生物基质混合物,将混合物注入受试者的眼中,并通过使用光源(例如UVA或LED或可见光源)将细胞引导并固定在角膜上,从而将细胞生物印刷在眼中。

[0076] 在另一方面本发明涉及使用LATS抑制剂预防或治疗眼疾病或障碍的方法。优选地,LATS抑制剂是根据本发明的具有式A1或其子式的化合物。在又另一方面本发明涉及使用根据本发明的具有式A2或其子式的化合物预防或治疗眼疾病或障碍的方法。在优选的具体实施例中,预防或治疗眼疾病或障碍的方法进一步包括根据本发明的在细胞群中抑制LATS的方法或细胞群扩增方法,其中所述细胞是眼细胞。优选地,预防或治疗眼疾病或障碍的方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的通过根据本发明的细胞群扩增方法可获得或获得的细胞群,其中所述细胞是眼细胞。在另一个优选的实施例中,预防或治疗眼疾病或障碍的方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的根据本发明的细胞递送制剂,其中所述细胞是眼细胞。在又一个优选的实施例中,预防或治疗眼疾病或障碍的方法包括根据本发明的将包含眼细胞的细胞群移植到受试者的眼的方法的步骤。眼细胞优选是角膜缘干细胞或角膜内皮细胞。在又一个优选的实施例中,预防或治疗眼疾病或障碍的方法包括根据本发明的将包含角膜缘干细胞的细胞群移植到受试者的角膜上的方法的步骤。在可替代的优选实施例中,预防或治疗眼疾病或障碍的方法包括根据本发明的将角膜内皮细胞群移植到受试者的角膜上的方法的步骤。在根据本发明的预防或治疗眼疾病或障碍的方法的特定实施例中,根据本发明的细胞群扩增方法可获得或获得的细胞群或根据本发明的细胞递送制剂与选自由地塞米松、环孢菌素、妥布霉素和头孢唑林组成的组中的一种或多种药物同时或依次使用。

[0077] 在一方面,本发明涉及用于将细胞群移植到受试者的方法中的YAP(yes相关蛋白)调节剂,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的根据本发明的细胞群扩增方法可获得或获得的细胞群或根据本发明的细胞递送制剂。优选地,所述YAP调节剂是LATS抑制剂。优选地,细胞是眼细胞。

[0078] 一方面,本发明涉及用于将包含角膜缘干细胞的细胞群移植到受试者的角膜上的方法中的YAP(yes相关蛋白)调节剂,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的根据本发明的细胞群扩增方法可获得或获得的细胞群或根据本发明的细胞递送制剂。优选地,所述YAP调节剂是LATS抑制剂。

[0079] 在另一方面,本发明涉及用于治疗角膜缘干细胞缺陷的方法中的YAP调节剂,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的根据本发明的细胞群扩增方法可获得或获得的细胞群或根据本发明的细胞递送制剂。优选地,所述YAP调节剂是LATS抑制剂。

[0080] 一方面,本发明涉及用于将角膜内皮细胞群移植到受试者的角膜上的方法中的

YAP (yes相关蛋白) 调节剂,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的根据本发明的细胞群扩增方法可获得或获得的细胞群或根据本发明的细胞递送制剂。优选地,所述YAP调节剂是LATS抑制剂。

[0081] 在另一方面,本发明涉及用于治疗角膜内皮功能障碍的方法中的YAP调节剂,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的根据本发明的细胞群扩增方法可获得或获得的细胞群或根据本发明的细胞递送制剂。优选地,所述YAP调节剂是LATS抑制剂。

[0082] 在又一个实施例中,本发明涉及治疗疾病或障碍的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用细胞群,其中所述群已经在能够抑制LATS1和LATS2激酶活性的试剂存在下生长;从而诱导YAP易位并驱动下游基因表达以促进细胞增殖。在另一个实施例中,所述试剂是具有式A1或其子式的化合物,或其药学上可接受的盐。优选地,细胞是眼细胞。

[0083] 在一方面,本发明涉及根据本发明根据式A2或其子式的化合物,或其药学上可接受的盐,用于在疗法中使用或用作药物。优选地,所述化合物用于眼疾病或障碍。

[0084] 在另一方面,本发明涉及用于眼疾病或障碍的LATS抑制剂,优选其中LATS抑制剂是化合物。优选地,所述化合物是根据本发明的具有式A1或其子式的化合物,或其药学上可接受的盐。

[0085] 在又一方面,本发明涉及根据本发明的具有式A2或其子式的化合物、或其药学上可接受的盐在制备药物中的用途。在另一方面,本发明涉及根据本发明的具有式A1或其子式的化合物、或其药学上可接受的盐在制备用于治疗眼疾病或障碍的药物中的用途。

[0086] 在根据本发明使用的化合物或根据本发明使用的LATS抑制剂或化合物在制备根据本发明的药物中的用途的优选的具体实施例中,所述用途还包括根据本发明的在细胞群中抑制LATS的方法或细胞群扩展方法。

[0087] 在根据本发明使用的化合物或根据本发明使用的LATS抑制剂或化合物在制备根据本发明的药物中的用途的另一个优选的具体实施例中,所述用途包括向有需要的受试者施用治疗有效量的根据本发明的细胞群扩增方法可获得或获得的细胞群。在根据本发明使用的化合物或根据本发明使用的LATS抑制剂或化合物在制备根据本发明的药物中的用途的再另一个优选的具体实施例中,所述用途包括向有需要的受试者施用治疗有效量的根据本发明的细胞递送制剂。在根据本发明使用的化合物或根据本发明使用的LATS抑制剂或化合物在制备根据本发明的药物中的用途的一个优选实施例中,所述用途包括根据本发明的将包含眼细胞的细胞群移植到受试者的角膜上的方法的步骤。在根据本发明使用的化合物或根据本发明使用的LATS抑制剂或化合物在制备根据本发明的药物中的用途的再更优选实施例中,所述用途包括根据本发明的将包含角膜缘干细胞的细胞群移植到受试者的角膜上的方法的步骤。在根据本发明使用的化合物或根据本发明使用的LATS抑制剂或化合物在制备根据本发明的药物中的用途的再更优选实施例中,所述用途包括根据本发明的将包含角膜内皮细胞的细胞群移植到受试者的角膜上的方法的步骤。在根据本发明使用的化合物或根据本发明使用的LATS抑制剂或化合物在制备根据本发明的药物中的用途的具体实施例中,根据本发明的细胞群扩增方法可获得或获得的细胞群或根据本发明的细胞递送制剂与选自由地塞米松、环孢菌素、妥布霉素和头孢唑林组成的组中的一种或多种药物同时或依次使用。

[0088] 在根据本发明的优选实施例中,眼疾病或障碍与角膜缘干细胞缺陷有关。在更优

选的实施例中,所述眼疾病或障碍是角膜缘干细胞缺陷。更优选地,所述眼疾病或障碍是:由选自下组的损伤或障碍引起角膜缘干细胞缺陷,该组由以下组成:化学灼伤、热灼伤、放射损伤、无虹膜、硬化性角膜、多发性内分泌肿瘤、史蒂文斯约翰逊综合征、眼部疤痕性类天疱疮、胶原血管病、接触透镜使用引起的慢性非自身免疫性炎症性障碍、干眼病、酒渣鼻、葡萄球菌边缘、角膜炎(包括细菌性、真菌性和病毒性角膜炎)、翼状胬肉或肿瘤,多次眼手术、翼状胬肉或肿瘤切除或冷冻疗法后引起的角膜缘干细胞缺陷;以及由选自下组的药物引起的药物毒性导致的角膜缘干细胞缺陷,该组由以下组成:防腐剂(硫柳汞、苯甲羟铵)、局部麻醉药、毛果芸香碱、 $\beta$ 受体阻滞剂、丝裂霉素、5-氟脲嘧啶、硝酸银和引起史蒂文斯约翰逊综合征的口服药物。特别优选地,所述眼疾病或障碍是由选自下组的损伤或障碍引起角膜缘干细胞缺陷,该组由以下组成:化学灼伤、无虹膜、史蒂文斯约翰逊综合征和接触透镜使用。

[0089] 在根据本发明的优选实施例中,眼疾病或障碍与角膜内皮细胞密度降低有关。在更优选的实施例中,眼疾病或障碍是角膜内皮功能障碍。更优选地,眼疾病或障碍是角膜内皮功能障碍,其选自由以下组成的组:Fuchs角膜内皮营养不良、大疱性角膜病变(包括假晶状体大疱性角膜病和无晶状体大疱性角膜病)、角膜移植失败、后部多态性角膜营养不良、先天性遗传性内皮营养不良、X连锁内皮角膜营养不良、无虹膜和角膜内皮炎。在一个具体的实施例中,眼疾病或障碍选自下组,该组由以下组成:Fuchs角膜内皮营养不良、大疱性角膜病变(包括假晶状体大疱性角膜病和无晶状体大疱性角膜病)和角膜移植失败。

[0090] 本发明进一步涉及促进伤口愈合的方法,特别是用于治疗或改善烧伤、急性和慢性皮肤溃疡的症状,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的LATS抑制剂。

[0091] 在某些其他方面,本发明涉及一种促进伤口愈合的方法,所述方法包括施用治疗有效量的具有式A1或其子式的化合物或其药学上可接受的盐或立体异构体。

[0092] 在另一方面,本发明涉及可用于促进伤口愈合的化合物和组合物。在另一方面,本发明涉及可用于制备促进伤口愈合的药物的化合物和组合物。

[0093] 本发明还涉及促进伤口愈合的方法,特别是用于治疗或改善烧伤、急性皮肤溃疡和慢性皮肤溃疡的症状的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的具有式A1或其子式的化合物以及任选地第二治疗剂,所述第二治疗剂是本发明的另一种化合物或一种其他类型的治疗剂。

[0094] 本发明还涉及促进眼伤口愈合的方法,所述方法包括将治疗有效量的本发明的化合物施用于受试者的眼。在一个实施例中,眼伤口是角膜伤口。在其他实施例中,眼伤口是损伤或手术伤口。

[0095] 在另一方面,本发明涉及可用于肝再生和肝再生长的化合物和组合物。在某些其他方面,本发明涉及一种促进肝再生和肝再生长的方法,所述方法包括施用治疗有效量的具有式A1或其子式的化合物或其药学上可接受的盐或其立体异构体。在另一方面,本发明涉及可用于制备促进肝再生和肝再生长的药物的化合物和组合物。

[0096] 本发明还涉及用于以下的方法:肝再生和肝再生长,特别是用于治疗边缘移植(marginal graft)移植后肝再生长不足;用于支持广泛肝切除术后剩余肝脏块的增强的再生长;用于病毒性肝炎、药物引起的肝损伤、自身免疫性肝炎、缺血性和充血性肝病引起的急性肝衰竭后患者肝的再生;用于治疗具有由非酒精性脂肪性肝炎、酒精性脂肪性肝炎、慢性乙型和丙型病毒性肝炎、血色素沉着症、 $\alpha$ -1抗胰蛋白酶缺乏症、威尔逊氏病和药物诱导

的肝纤维化导致的慢性肝损伤和潜在肝纤维化的患者以增强再生能力并加速纤维化消退,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的根据本发明的化合物以及任选地第二治疗剂,所述第二治疗剂是本发明的另一种化合物或一种其他类型的治疗剂。

[0097] 在某些实施例中,本发明涉及产生用于细胞治疗和/或移植的细胞材料的方法,所述方法包括离体使用具有式A1或其子式的化合物或其药学上可接受的盐或其立体异构体。所述细胞材料可以包括眼、肝或皮肤细胞。

[0098] 此外,在某些实施例中,本发明涉及促进肝再生和肝再生长的方法,所述方法包括离体使用具有式A1或其子式的化合物或其药学上可接受的盐或其立体异构体。

[0099] 本发明还涉及用于肝细胞群扩增的离体方法,所述方法包括使用本发明的化合物或其药学上可接受的盐或其立体异构体。

[0100] 本发明的其他特征和优点从以下详细说明和权利要求书将是清楚的。

## 附图说明

[0101] 图1:如蛋白质印迹所示,LATS抑制剂(化合物实例49和实例133)在处理的1小时内诱导LSC中的YAP脱磷酸化。

[0102] 图2:在角膜缘干细胞培养物中p63- $\alpha$ 的免疫标记表明,当LSC群维持在包含LATS抑制剂(化合物实例49和实例133)的培养基中时,它可以被扩增。图2A:在存在生长培养基和DMSO的情况下,只有少数分离的细胞附着在培养皿上,并且最多可以存活6天。大多数细胞表达人核标志物,但很少表达p63 $\alpha$ 。图2B和2C:相反,在存在LATS抑制剂化合物实例编号49和实例编号133的情况下,细胞形成集落并表达p63 $\alpha$ 。所述结果表明,LATS抑制剂促进具有p63 $\alpha$ 阳性表型的细胞群的扩增。图2D:使细胞传代并在LATS抑制剂化合物实例编号49的存在下培养它们两周使得细胞群扩增并形成表达p63 $\alpha$ 的汇合培养物。

[0103] 图3:sirRNA敲低LATS1和LATS2可激活培养物中的LSC增殖,如EdU阳性细胞的百分比所示。

[0104] 图4:LSC标志物 $\delta$ N-p63 $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ 、ABCG2和C/EBP $\delta$ 的免疫标记表明,维持在含有LATS抑制剂(化合物实例49和实例133)的培养基中的LSC表达了LSC的典型标志物。结果表明,在DMSO中培养的细胞通常不表达LSC正常表达的标志物,例如 $\delta$ N-p63 $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ 、ABCG2和C/EBP $\delta$ 。相反,在存在LATS抑制剂的情况下培养的细胞表达LSC正常表达的标记物,例如 $\delta$ N-p63 $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ 、ABCG2和C/EBP $\delta$ 。

[0105] 图5:未分化的LSC标志物p63 $\alpha$ 和角膜上皮细胞标志物角蛋白12的免疫标记显示,使用包含LATS抑制剂(图5A:化合物实例49,图5B:化合物实例47,图5C:化合物实例12,图5D:化合物实例261)的培养基扩增的LSC群当转移到能实现分化的条件下时可以分化为角膜上皮细胞。显示的是发生从p63 $\alpha$ 阳性细胞身份向角蛋白12身份过渡的视图。

[0106] 图6:使用荧光蛋白标记LSC,以确认使用GelMA聚合法附接至接触透镜的LSC可以离体递送至兔眼表面。箭头表示LSC的附接位置。

[0107] 图7:图7A:移植的眼,角蛋白12染色;图7B:移植的眼,角蛋白19染色;图7C:非移植的对照眼,角蛋白12染色;图7D:非移植的对照眼,角蛋白19染色。这些图表明,在兔角膜缘干细胞缺陷模型中,在包含化合物实例编号12的培养基中扩增的LSC群与GelMA组合并通过接触透镜在体内递送到兔角膜表面,这导致角蛋白12阳性角膜上皮的再生(图7A),并阻止

移植的眼中角蛋白19阳性的结膜细胞的结膜化。图7B:箭头指不存在角蛋白19染色。相反,未移植的兔眼显示不存在角蛋白12阳性角膜上皮修复。图7C:箭头指不存在角蛋白12染色。相反,观察到结膜化的迹象,如角蛋白19染色的存在所示。图7D:箭头指阳性角蛋白19染色区域。

[0108] 图8:图8A:移植人LSC的兔眼;图8B:对照兔眼,未移植人LSC。这些图表明,如人线粒体蛋白的存在所证实的那样(箭头表示存在人线粒体标志物),恢复了移植的眼的角膜上皮的细胞是人的(图8A)。相反,未移植的眼的眼表面未显示出人线粒体蛋白染色(图8B:不存在人类线粒体标志物)。

[0109] 图9:通过TISSEEL递送至胶原蛋白包被的24孔板的LSC的显微图像显示,细胞在2周内群体恢复覆盖培养表面。

[0110] 图10:CellTracker Green CMFDA标记的LSC离体递送至人角膜,并覆盖保护性接触透镜。

[0111] 图11:将红色和绿色染料标记的HEK-293细胞在离体兔角膜顶部生物印刷成阴阳图案(显示为深灰色和浅灰色图案)。

[0112] 图12:通过CRISPR/Cas9介导的LSC中 $\beta$ -2-微球蛋白(B2M)基因的缺失降低免疫排斥:FACS分析显示21%的LSC中存在CRISPR介导的B2M缺失以及随后的HLA A、HLA B和HLA C消除。

[0113] 图13:B2M阴性/HLA A、HLA B、HLA C阴性LSC的群使用化合物实例编号48a进行扩增,以产生一种细胞制剂,其中97%的细胞不表达HLA A、HLA B、HLA C。

[0114] 图14:LATS抑制剂(化合物实例133和实例49)诱导YAP易位到角膜内皮细胞(CEC)的核中。

[0115] 图15:LATS抑制剂(化合物实例133和实例49)在处理的1小时内诱导CEC中的YAP脱磷酸化。如以下所示:图15a中通过蛋白质印迹;图15b:显示针对 $\beta$ -肌动蛋白标准化的磷酸化YAP水平的图;图15c:显示针对总YAP标准化的磷酸化YAP水平的图。

[0116] 图16:在存在或不存在LATS抑制剂的情况下生长的CEC。Incucyte系统(埃森生物科学公司(Essen Biosciences))用于通过经时间过程的实时定量活细胞分析来测量CEC汇合。化合物实例49(黑色正方形)和实例133(浅灰色正方形)诱导强烈的CEC增殖;而媒介物(DMSO,深灰色正方形)中的CEC增殖极少。

[0117] 图17:siRNA敲低LATS1和LATS2激活培养物中的角膜内皮细胞增殖,如EdU阳性细胞的百分比所示。

[0118] 图18:封闭小带-1(ZO-1)免疫标记表明CEC在LATS抑制剂化合物实例49(图18b)存在下增殖,形成紧密连接,内皮结构,并保留功能CEC的正常细胞大小和形态特征。在仅有媒介物(DMSO)存在下增殖的CEC表现出功能异常的CEC的多发性(polymegatism)特征(图18a)。

[0119] 图19:定量RT-PCR分析表明,用LATS抑制剂化合物实例49扩增的角膜内皮细胞表达体内角膜内皮细胞正常表达的基因,包括胶原蛋白8a2、AQP1、SLC4A11。这些细胞不表达眼中存在的其他上皮的标志物,包括RPE65(视网膜色素上皮的标志物)和CD31(血管上皮的标志物)。

[0120] 图20:免疫组织化学分析表明,用LATS抑制剂化合物实例49扩增的角膜内皮细胞

表达体内角膜内皮细胞正常表达的基因,包括Na/KATP酶(图20a)和胶原8a2(图20b)。

[0121] 图21:LATS抑制剂化合物实例47存在下扩增的角膜内皮细胞群和LATS抑制剂不存在下培养的CEC的FACS分析。在LATS抑制剂存在下扩增的细胞群表达低水平的CD73(图21a,灰色线)、CD44(图21b,灰色线)、CD166(图21c,灰色线)和CD105(图21d,灰色线);而在无LATS抑制剂情况下培养的细胞群则表达高水平的CD44、CD73、CD105和CD166(黑色线)。

[0122] 图22:气泡抑制方法,其描述了在“生物印刷部分”下进一步描述的方法1,其中将生物基质施用于眼以递送根据本发明的细胞制剂。图22a.注入大剂量生物基质;图22b在生物基质下方注入气泡以在角膜上扩散;图22c用UV或蓝光光源的固化生物基质;图22d除去气泡并用平衡盐溶液代替。

[0123] 图23:使用飞秒(FS)激光的消减法,其描述了在“生物印刷部分”下进一步描述的方法2,其中将生物基质施用于眼以递送根据本发明的细胞制剂。图23a用FS清除功能异常的内皮;图23b将生物基质注入前房;图23c使用UV或蓝光光源固化生物基质;图23d使用FS脱离不需要的生物基质;图23e用镊子去除脱离的生物基质。

[0124] 图24:染料掩模方法(Dye mask method),其描述了在“生物印刷部分”下进一步描述的方法3,其中将生物基质施用于眼以递送根据本发明的细胞制剂。图24a用染料(例如台盼蓝)染色内皮;图24b剥离功能异常的内皮;图24c注入染色的生物基质;图24d用UV或蓝光光源固化生物基质;图24e冲洗未固化的生物基质。

[0125] 图25:染料分配方法(Dye dispense method),其描述了在“生物印刷部分”下进一步描述的方法4,其中将生物基质施用于眼以递送根据本发明的细胞制剂。图25a引流前房;图25b使用柔软的尖端/刷子套管向后角膜分配生物基质;图25c使用UV或蓝光光源固化生物基质;图25d用平衡的盐溶液充填眼。

[0126] 图26示意地示出了如实例C11中进一步描述的生物印刷装置。

[0127] 图27结果显示,可以使用手持设备(其投射365nm UVA光通过角膜),将细胞生物印刷在角膜的后侧。漂洗未聚合和未附接的材料后,荧光蛋白标记的细胞的圆形图案保留在角膜的后侧。

[0128] 图28在角膜内皮营养不良的兔模型中,生物印刷在角膜后侧的CEC可以重建角膜内皮。结果表明,在实验兔中,可以使用ZO-1免疫组织化学检测角膜内皮结构(图28A)。在通过外科手术去除角膜内皮并且没有CEC被生物印刷的兔的右眼中,不存在ZO-1染色,表明不存在正常的角膜内皮结构(图28B)。在通过手术去除角膜内皮并进行CEC印刷的兔的右眼中,存在ZO-1染色,表明角膜内皮结构已经重建(图28C)。图28D和图28E显示在没有接受任何人CEC的眼中不存在人核抗原免疫染色。相反,人核抗原阳性细胞覆盖其中生物印刷人CEC的眼中的成像区域(图28F),这表明图28C所示的ZO-1标记的角膜内皮结构是由生物印刷在兔角膜后侧的人CEC构成。

[0129] 图29:将红色荧光蛋白标记的HEK-293细胞生物印刷到离体人角膜后侧上的不同字母的结构中。

[0130] 图30:载体图显示了用于在LSC和CEC中表达CRISPR系统的AAV2载体的设计。(图30披露SEQ ID NO:f28)。

[0131] 图31:AAV介导的CRISPR系统(其使得能够缺失B2M,并随后消除LSC中的HLA A、HLA B和HLA C)表达的FACS分析。



[0132] 图32: AAV介导的CRISPR系统(其使得能够缺失B2M,并随后消除CEC中的HLA A、HLA B和HLA C)表达的FACS分析。

[0133] 图33A:图33A是未经处理的或用分别针对MST1/2或LATS1/2的40pM siRNA处理的人HaCaT细胞的裂解物中pYAP的蛋白质印迹;肌动蛋白用作对照。

[0134] 图33B:图33B是未经处理的或用9μM实例133处理的人HaCaT细胞的裂解物中pYAP的蛋白质印迹;肌动蛋白用作对照。

[0135] 图33C:图33C是针对LATS1的相对抑制活性相比于范围为约 $10^{-4}$ μm至1μm的实例133浓度的图。实例133针对LATS1的计算的IC<sub>50</sub>为1.3 nM。

[0136] 图34:是相对Cyr61/Gapdh表达水平相比于0、0.2mg/mL和2mg/mL的实例133浓度的柱状图。

[0137] 图35A:图35A显示了用媒介物或实例133局部处理的小鼠皮肤的显微照片。

[0138] 图35B:图35B是散点图,比较了用媒介物或实例133处理的小鼠皮肤中Ki67+细胞的百分比。

## 具体实施方式

### [0139] LATS

[0140] LATS是大肿瘤抑制激酶的缩写。如本文所使用的LATS是指LATS1和/或LATS2。如本文所使用的,LATS1是指大肿瘤抑制激酶1,并且LATS2是指大肿瘤抑制激酶2。LATS1和LATS2都具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性。LATS1和LATS2已获得人基因组组织(HUGO)基因命名委员会标识符:分别是HGNC ID 6514和HGNC ID 6515。LATS1在本领域中有时也称为WARTS或wts,并且LATS2在本领域中有时也称为KPM。代表性的LATS序列包括但不限于可从美国国家生物技术信息中心蛋白质数据库以如下所示登录号NP\_004681.1 (LATS1) 和NP\_001257448.1 (LATS1) 和NP\_055387.2 (LATS 2) 可获得的蛋白序列。

[0141] LATS1:NP\_004681.1 (丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶LATS1同种型1,智人) (SEQ ID NO: 1)

[0142] 1 mkrsekpegy rqrmpktpa snytvssrqm lqeiresslrn lskpsdaaka ehnmkskmste

61 dprqvrnppk fgthhkalqe irnslpfan etnssrstse vnpqmlqdlq aagfdedmvi  
121 qalqktnnrs ieaiefisk msyqdprrreq maaaaarpin asmkpognvqq svnrkqswkg  
181 skeslvpprh gpplgesvay hsespnsqtd vgrplsgsgi safvqahpsn gqrvnppppp  
241 qvrsvtpppp prgqtppprg tppppswep nsqtkrysgn meyvrisp vppgawqegy  
301 pppplntspm nppnqgqrgi ssvpvgqpi imqssskfnf psgrpgmqng tgqtdfmihq  
361 nvvpagtvnr qpppppylta angqspsalq tggsaapssy tngsipqsmm vprnshnme  
421 lynisvpglq tnwpqsssap aqsspssghe iptwqpnipv rsnsfnplg nrashsansq  
481 psattvtait papiqqpvks mrvlkelqt alaphpswi ppiqtvqps pfpegtasnv  
541 tvmpvaeap nyqgppppyp khllhqnpv ppyesiskps kedqpslpke deseksyenv  
[0143] 601 dsgdkekkqi ttspitvrkn kkdeerresr iqsypqafk ffmeqhvenv lkshqqrllr  
661 kkqlenemmr vglsqdaqdq mrkmlcques nyirkrakm dksmfvkikt lgigafgevc  
721 larkvdtkal yatklrkkd vllrnqvahv kaerdilaea dnevvvrlly sfqdkdnlyf  
781 vmdyipggdm mslirmgif peslarfyia eltcavesvh kmgfihrdik pdnilidrdg  
841 hikltdfgle tgfrwthdsk yyqsgdhprq dsmdfsnewg dpsscrgdr lkplerraar  
901 qhqrelahsl vgtpnyiape vllrtgytql cdwwsvgvil femlvqpppf laqtpletqm  
961 kvinwqtslh ippqaklspe asdliikler gpedrlgkng adeikahpff ktidfssdlr  
1021 qqsasyipki thptdtsnfd pvdpdklwsd dneenvndt lngwykngkh pehafyeff  
1081 rrfddngyp ynypkpieye yinsqgseqq sdeddntgs eiknrdlvyy

[0144] LATS1:丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶LATS1同种型2[智人]

[0145] NCBI参考序列:NP\_001257448.1 (SEQ ID NO:2)

1 mkrsekpegy rqrmpktfpa snytvssrqm lqiereslrn lskpsdaaka ehnmksmste  
61 dprqvrnppk fgthhkalqe irnslpfan etnssrstse vnpqmlqdlq aagfdedmvi  
121 qalqktnnrs ieaiefisk msyqdprrreq maaaaarpin asmkpognvqq svnrkqswkg  
181 skeslvpprh gpplgesvay hsespnsqtd vgrplsgsgi safvqahpsn gqrvnppppp  
[0146] 241 qvrsvtpppp prgqtppprg tppppswep nsqtkrysgn meyvrisp vppgawqegy  
301 pppplntspm nppnqgqrgi ssvpvgqpi imqssskfnf psgrpgmqng tgqtdfmihq  
361 nvvpagtvnr qpppppylta angqspsalq tggsaapssy tngsipqsmm vprnshnme  
421 lynisvpglq tnwpqsssap aqsspssghe iptwqpnipv rsnsfnplg nrashsansq

481 psattvtait papiqqpvks mrvlkelqt alaphpswi ppiqtvqps pfpegstasnv  
 [0147] 541 tvmpvvaep nyqgppppyp khllhqnpv ppyesiskps kedqpslpke deseksyenv  
 601 dsqdekkqi ttpitvrkn kkdeerresr iqsypqafk ffmeqhvenv lkshqqrllr  
 661 kkqlenemmr vkpfkmsifi lnhlfawelf  
 [0148] LATS 2:NP\_055387.2丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶LATS2[智人]。(SEQ ID NO:3)  
 1 mrpktpatt ysgnsrqlq eireglkqps kssvqglpag pnsdtsldak vlgsdatraq  
 61 qqqrnatpkf gpyqkalrei rysllpfane sgtsaaaevn rqmlqelvna gcdqemagra  
 121 lkqtgsrsie aaleyiskmg yldprneqiv rvikqtspgk glmptpvtrr psfegtgsdf  
 181 asyhlsgtp yegpsfgadg ptaleemprp yvdylfpgvg phgpgghqhqh ppkggyasve  
 241 aagahfplqg ahygrphllv pgeplgygvq rpsfsqsktp petggyaslp tkqgggppga  
 301 glafpppaag lyvphphhkq agpaahqlhv lgsrsqvfes dsppqsltp srnslnvdly  
 361 elgstsvqqw paatlarrds lqkpgleapp rahvafpdc pvpsrtnsfn shqprgppg  
 421 kaepslpapn tvtaavahi lhpvksrvl rpepqtavgp shpawvpapa papapapapa  
 481 aegldakeeh alalggagaf pldveyggpd rrcppppypk hlllrskseq yldslcagm  
 [0149] 541 eqslragpne peggdkrks akgdkggkdk kqiqtspvpv rknsrdeekr esriksyspy  
 601 afkffmeqhv enviktyqqk vnrrlqleqe makaglceae qeqmrkilyq kesnynrlkr  
 661 akmdksmfvk iktlgigafg evclackvdt halyamktlr kkdvlnrnqv ahvkaerdil  
 721 aeadnewvkv lyysfqdkds lyfvmdyipg gdmmsllirm evfpehlarf yiaeltlaie  
 781 svhkmgfihl dikpdnilid ldghikltdf glctgfrwth nskyyqkgsh vrqdsmepps  
 841 lwddvsncrc gdrkltleqr arkqhqrcla hslvgtpnyi apevllrkgy tqldwswvg  
 901 vilfemlvqg ppflaptpte tqkvinwen tlhipaqvkl speardlitk lccsadhrlg  
 961 rngaddlkah pffsaidfss dirkqpapyv ptishpmdts nfdpvdeesp wndasegstk  
 1021 awdtltspnn khpehfyef tfrffddng ypfrcpkpsg aeasqaessd lessdlvdqt  
 1081 egcqpvyv

[0150] LATS被认为负向调节YAP1活性。“YAP1”是指是yes相关蛋白1,也称为YAP或YAP65,其是一种蛋白质,可作为参与细胞增殖的基因的转录调节剂。LATS激酶是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,已显示其可直接磷酸化YAP,这导致YAP胞质保留和失活。在没有被LATS磷酸化的情况下,YAP易位到细胞核中,与DNA结合蛋白TEAD形成复合物,并导致下游基因表达。(Barry ER&Camargo FD(2013)The Hippo superhighway:signaling crossroads converging on the Hippo/Yap pathway in stem cells and development.[Hippo高速公路:在干细胞和发育中趋于汇合在Hippo/Yap途径上的信号传导十字路口]Current opinion in cell

biology[细胞生物学的最新观点]25(2):247-253.;Mo JS,Park HW,&Guan KL(2014) The Hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer.[干细胞生物学和癌症中的Hippo信号传导通路]EMBO reports[EMBO报道]15(6):642-656;Pan D(2010) The hippo signaling pathway in development and cancer.[发育与癌症中的hippo信号传导通路]Developmental cell[发育细胞]19(4):491-505.)

[0151] Hippo/YAP途径涉及哺乳动物系统中的多种细胞类型和组织,包括各种癌症。特别是,Hippo途径明显涉及肠、胃和食道、胰腺、唾液腺、皮肤、乳腺、卵巢、前列腺、脑和神经系统、骨骼、软骨细胞、脂肪细胞、肌细胞、T淋巴细胞、B淋巴细胞、髓样细胞、肾脏和肺。参见Nishio等人,2017,Genes to Cells[细胞的基因]22:6-31。

[0152] LATS1和LATS2抑制

[0153] 游离形式或盐形式的具有式A1或其子式的化合物是LATS1和/或LATS2的有效抑制剂。

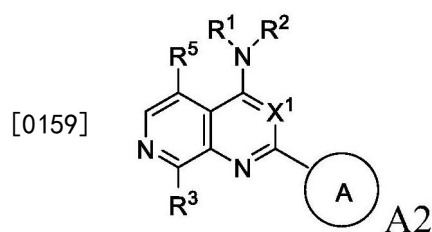
[0154] 在优选的实施例中,游离形式或盐形式的具有式A2或其子式的化合物是LATS1和LATS2的有效抑制剂。

[0155] 通过如下文实例A1所述的LATS1生化HTRF测定法测定化合物对LATS1的抑制效力。在所述试验中本发明化合物对LATS1的抑制效力(以微摩尔的LATS1IC<sub>50</sub>)报道于表1A。应所述注意的是,IC<sub>50</sub>大于1微摩尔的化合物在此分析中被认为是无活性的。

[0156] 通过如下文实例A3所述的LATS2生化卡尺测定法测定选择的化合物对LATS2的抑制效力。在所述试验中本发明化合物对LATS2的抑制效力(以微摩尔的LATS2IC<sub>50</sub>)也报道于表1A。应所述注意的是,IC<sub>50</sub>大于1微摩尔的化合物在此分析中被认为是无活性的。

[0157] LATS抑制剂

[0158] 因此,本发明涉及具有式A2的化合物:



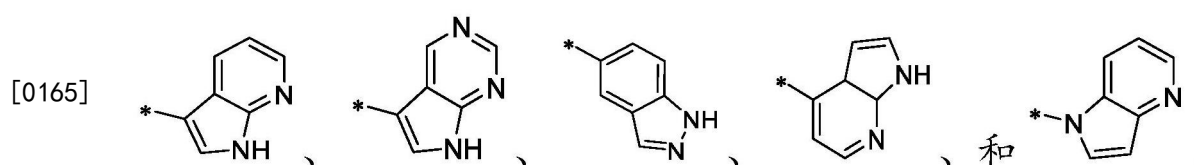
[0160] 或其盐或立体异构体,其中

[0161] X<sup>1</sup>是CH或N;

[0162] 环A是

[0163] (a) 5或6元单环杂芳基,其通过碳环成员与分子的其余部分连接,并包含1至4个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员,条件是所述杂原子环成员中至少一个是在5元杂芳基的相对于连接碳环成员的3位或4位的或在6元杂芳基的对位环位置上的未经取代的氮(-N=);或

[0164] 选自以下的9元稠合双环杂芳基



- [0166] 其中“\*”代表环A与分子其余部分的附接点；并且
- [0167] 其中环A未经取代或经1至2个独立地选自卤素、氰基、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $-NH_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $C_{3-6}$ 环烷基和苯基磺酰基的取代基取代；
- [0168]  $R^0$ 是羟基或 $C_{1-6}$ 烷氧基；
- [0169]  $R^1$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基；
- [0170]  $R^2$ 选自
- [0171] (a) 未经取代的或经1至3个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{1-8}$ 烷基
- [0172] (i) 卤素；
- [0173] (ii) 氰基；
- [0174] (iii) 氧代；
- [0175] (iv)  $C_2$ 烯基；
- [0176] (v)  $C_2$ 炔基；
- [0177] (vi)  $C_{1-6}$ 卤代烷基；
- [0178] (vii)  $-OR^6$ ，其中 $R^6$ 选自氢、未经取代或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；
- [0179] (viii)  $-NR^{7a}R^{7b}$ ，其中 $R^{7a}$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基，并且 $R^{7b}$ 选自氢、 $-C(O)R^0$ 、未经取代的或经 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；
- [0180] (ix)  $-C(O)R^8$ ，其中 $R^8$ 是 $R^0$ 或 $-NH-C_{1-6}$ 烷基- $C(O)R^0$ ；
- [0181] (x)  $-S(O)_2C_{1-6}$ 烷基；
- [0182] (xi) 单环 $C_{3-6}$ 环烷基或多环 $C_{7-10}$ 环烷基，其各自未经取代或经1至2个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、羟基 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $-NH_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基和二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基的取代基取代；
- [0183] (xii) 6元杂环烷基，其包含1至2个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员并且未经取代或经1至2个独立地选自羟基、卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 烷基氨基和二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基的取代基取代；
- [0184] (xiii) 未经取代的或经卤素取代的苯基；
- [0185] (xiv) 5或6元单环杂芳基，其包含1至4个独立地选自N和O的杂原子作为环成员；以及
- [0186] (xv) 9或10元稠合双环杂芳基，其包含1至2个独立地选自N和O的杂原子作为环成员；
- [0187] (b)  $-S(O)_2C_{1-6}$ 烷基；
- [0188] (c) 未经取代的或经1至2个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基和 $R^0$ 的取代基取代的苯基；
- [0189] (d) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{3-6}$ 环烷基： $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；以及
- [0190] (e) 4元杂环烷基，其包含1至2个选自N、O和S的杂原子作为环成员，并且未经取代或经1至2个独立地选自以下的取代基取代： $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；
- [0191] 或，条件是当 $X^1$ 是CH时， $R^1$ 和 $R^2$ 可以与两者都结合的氮原子一起形成4至6元杂环烷基，所述杂环烷基可以包含1至2个独立地选自N、O和S的其他杂原子作为环成员，其中由 $R^1$

和 $R^2$ 与两者都结合的氮原子一起形成的4至6元杂环烷基未经取代或经1至3个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基以及 $R^0$ 的取代基取代；

[0192]  $R^3$ 选自氢、卤素和 $C_{1-6}$ 烷基；并且

[0193]  $R^5$ 选自氢、卤素和-NH- (3至8元杂烷基)，其中-NH- (3至8元杂烷基) 的3至8元杂 $C_{3-8}$ 烷基包含1至2个氧原子作为链成员且未经取代或经 $R^0$ 取代；

[0194] 条件是：

[0195] (1) 当 $X^1$ 是N，环A是4-嘧啶基或3-氟-4-嘧啶基， $R^1$ 是H或甲基， $R^3$ 是H或Cl，并且 $R^5$ 是H时；那么 $R^2$ 不是经选自-NH<sub>2</sub>、 $C_{1-6}$ 烷基氨基或叔-丁基-氨基甲酰基-氨基的取代基取代并且任选地进一步经未经取代的苯基取代的 $C_{2-4}$ 烷基；以及

[0196] (2) 当 $X^1$ 是N，环A是吡啶-5-基， $R^1$ 、 $R^3$ 和 $R^5$ 是H时；那么 $R^2$ 不是经-NH<sub>2</sub>取代的 $C_4$ 烷基。

[0197] 除非另有说明，否则术语“本发明的化合物”是指具有式A2或其子式的化合物、或其盐，以及所有立体异构体(包括非对映立体异构体和对映异构体)、旋转异构体、互变异构体和同位素标记的化合物(包括氘取代)，以及固有形成的部分。

[0198] 本文描述了本发明的各种(列举的)实施例。应认识到，每个实施例中指定的特征可以与其他指定特征组合以提供本发明的另外实施例。当实施例被描述为“根据”先前实施例时，先前实施例包括其子实施例，例如使得当实施例20被描述为“根据”实施例1至19时，实施例1至19包括实施例19和19A。

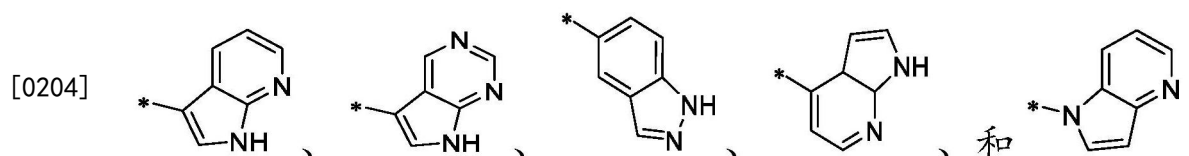
[0199] 实施例1. 如上所述的具有式A2的化合物或其盐。

[0200] 实施例2. 根据实施例1所述的具有式A2的化合物或其盐，其中

[0201] 环A是

[0202] (a) 5或6元单环杂芳基，其通过碳环成员与分子的其余部分连接，并包含1至2个选自N的杂原子作为环成员，条件是氮原子环成员中至少一个是在5元杂芳基的相对于连接碳环成员的3位或4位的或在6元杂芳基的对位环位置上的未经取代的氮(-N=)；或

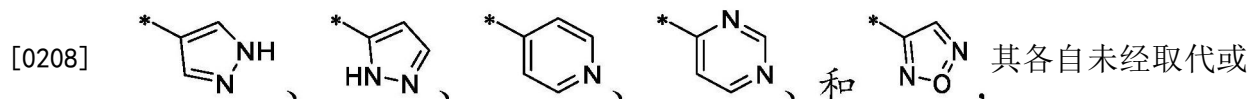
[0203] (b) 选自以下的9元稠合双环杂芳基



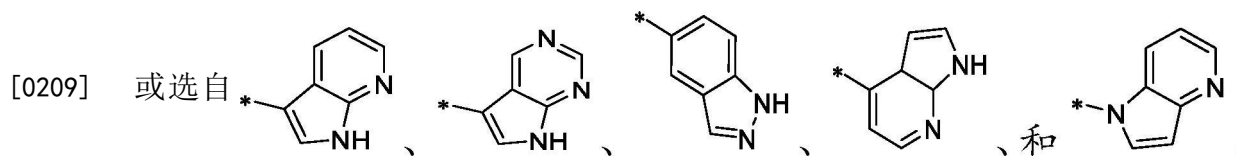
[0205] 其中“\*”代表环A与分子其余部分的附接点；并且

[0206] 其中环A未经取代或经1至2个独立地选自卤素、氰基、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、-NH<sub>2</sub>和 $C_{3-6}$ 环烷基的取代基取代。

[0207] 实施例3. 根据实施例1所述的具有式A2的化合物或其盐，其中环A选自



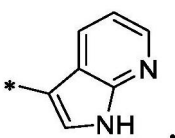
经1至2个独立地选自氰基、卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、NH<sub>2</sub>、和 $C_{3-6}$ 环烷基的取代基取代；



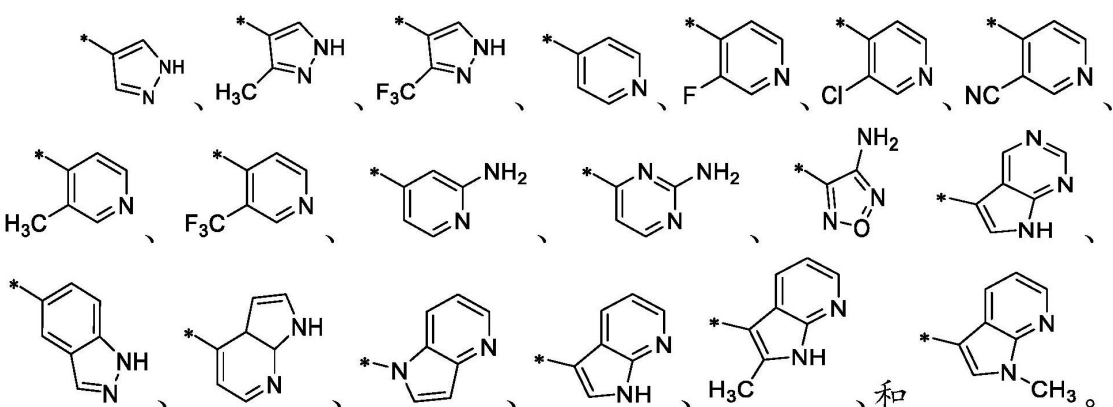
其各自未经取代或经C<sub>1-6</sub>烷基取代。

[0210] 实施例4.根据实施例1至3中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐,其中环A选自

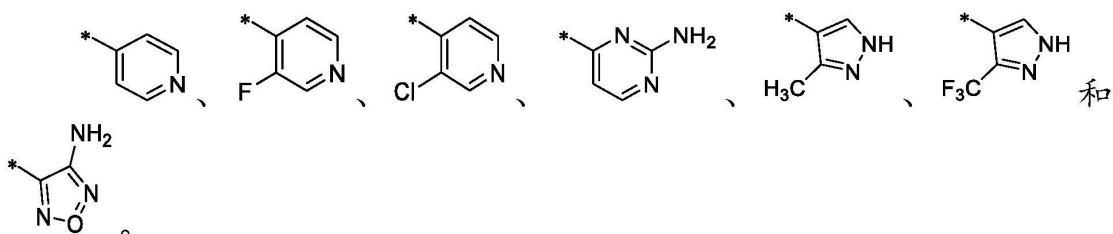
[0211]  其各自未经取代或经选自卤素、氰基、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基和-NH<sub>2</sub>的取代基取代;

[0212] 或是  其未经取代或经C<sub>1-6</sub>烷基取代。

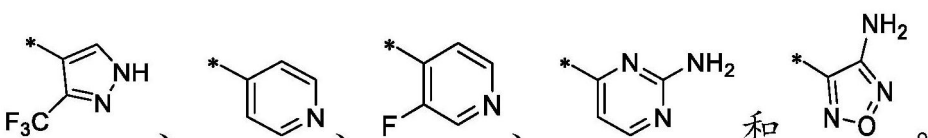
[0213] 实施例5.根据实施例1至3中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐,其中环A选自

[0214]  。

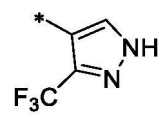
[0215] 实施例6.根据实施例1至5中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐,其中环A选自

[0216]  。

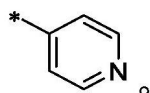
[0217] 实施例7.根据实施例1至6中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐,其中环A选自

[0218]  。

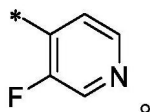
[0219] 实施例8.根据实施例1至7中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐,其中环A是

 。

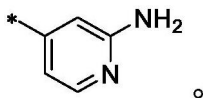
[0220] 实施例9.根据实施例1至7中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐,其中环A是



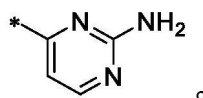
[0221] 实施例10.根据实施例1至7中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐,其中环A是



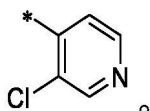
[0222] 实施例11.根据实施例1至7中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐,其中环A是



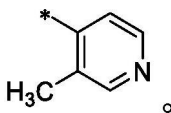
[0223] 实施例12.根据实施例1至7中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐,其中环A是



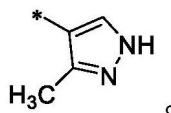
[0224] 实施例13.根据实施例1至5中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐,其中环A是



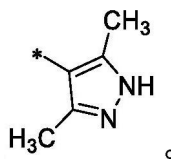
[0225] 实施例14.根据实施例1至5中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐,其中环A是



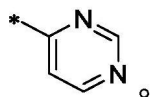
[0226] 实施例15.根据实施例1至6中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐,其中环A是



[0227] 实施例16.根据实施例1至3中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐,其中环A是



[0228] 实施例17.根据实施例1至4中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐,其中环A是

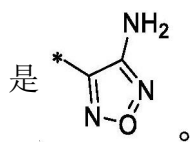


[0229] 实施例18.根据实施例1至5中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐,其中环A是

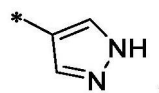
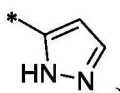
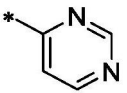


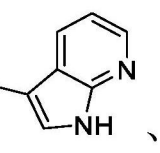
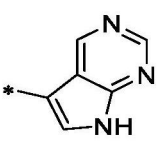
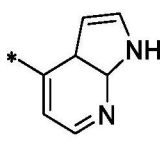
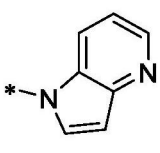
[0230] 实施例18A.根据实施例1至5中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐,其中环A





[0231] 实施例19. 根据实施例1至3中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐, 其中环A选自

[0232] 、、和 , 其各自未经取代或经1至2个独立地选自氰基、卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $NH_2$ 、和 $C_{3-6}$ 环烷基的取代基取代;

[0233] 或选自 、、、和 , 其各自未经取代或经 $C_{1-6}$ 烷基取代。

[0234] 实施例20. 根据实施例1至19中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐, 其中 $R^1$ 选自氢、甲基和乙基。

[0235] 实施例21. 根据实施例1至20中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐, 其中 $R^1$ 是甲基。

[0236] 实施例22. 根据实施例1至20中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐, 其中 $R^1$ 是氢。

[0237] 实施例23. 根据实施例1至22中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐, 其中

[0238]  $R^2$ 选自

[0239] (a) 未经取代的或经1至3个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{1-8}$ 烷基

[0240] (i) 氰基;

[0241] (ii)  $C_2$ 炔基;

[0242] (iii)  $C_{1-6}$ 卤代烷基;

[0243] (iv)  $-OR^6$ , 其中 $R^6$ 选自氢、未经取代或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;

[0244] (v)  $-NR^{7a}R^{7b}$ , 其中 $R^{7a}$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基, 并且 $R^{7b}$ 选自氢、 $-C(O)R^0$ 、未经取代的或经 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;

[0245] (vi)  $-C(O)R^8$ , 其中 $R^8$ 是 $R^0$ ;

[0246] (vii)  $-S(O)_2C_{1-6}$ 烷基;

[0247] (viii) 未经取代的或经选自 $C_{1-6}$ 烷基、羟基 $C_{1-6}$ 烷基和 $R^0$ 的取代基取代的单环 $C_{3-6}$ 环烷基;

[0248] (ix) 6元杂环烷基, 其包含1至2个独立地选自N和O的杂原子作为环成员并且未经取代或经 $C_{1-6}$ 烷基取代; 以及

[0249] (x) 未经取代的或经卤素取代的苯基;

[0250] (b) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{3-6}$ 环烷基:  $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基; 以及

[0251] (c) 4元杂环烷基, 其包含选自N和O的杂原子作为环成员, 并且未经取代或经1至2个独立地选自以下的取代基取代:  $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或

经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基。

[0252] 实施例24. 根据实施例1至22中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐, 其中

[0253]  $R^2$ 选自

[0254] (a) 未经取代的或经1至3个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{1-8}$ 烷基

[0255] (i) 氰基;

[0256] (ii)  $C_2$ 炔基;

[0257] (iii)  $C_{1-6}$ 卤代烷基;

[0258] (iv)  $-OR^6$ , 其中 $R^6$ 选自氢、未经取代或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;

[0259] (v)  $-NR^{7a}R^{7b}$ , 其中 $R^{7a}$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基, 并且 $R^{7b}$ 选自氢、 $-C(O)R^0$ 、未经取代的或经 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;

[0260] (vi)  $-C(O)R^8$ , 其中 $R^8$ 是 $R^0$ ;

[0261] (vii)  $-S(O)_2C_{1-6}$ 烷基;

[0262] (viii) 未经取代的或经选自 $C_{1-6}$ 烷基、羟基 $C_{1-6}$ 烷基和 $R^0$ 的取代基取代的单环 $C_{3-6}$ 环烷基;

[0263] (ix) 6元杂环烷基, 其包含1至2个独立地选自N和O的杂原子作为环成员并且未经取代或经 $C_{1-6}$ 烷基取代; 以及

[0264] (x) 未经取代的或经卤素取代的苯基;

[0265] 并且其中 $C_{1-8}$ 烷基的C原子未经取代或经1至3个取代基(i)至(x)取代, 是 $R^2$ 与分子的不是 $-CH_2-$ 基团的其余部分的附接点;

[0266] (b) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{3-6}$ 环烷基:  $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基; 以及

[0267] (c) 4元杂环烷基, 其包含选自N和O的杂原子作为环成员, 并且未经取代或经1至2个独立地选自以下的取代基取代:  $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基。

[0268] 实施例25. 根据实施例1至23中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐, 其中

[0269]  $R^2$ 选自

[0270] (a) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{1-8}$ 烷基

[0271] (i) 氰基;

[0272] (ii)  $C_2$ 炔基;

[0273] (iii)  $C_{1-6}$ 卤代烷基;

[0274] (iv)  $-OR^6$ , 其中 $R^6$ 选自氢、未经取代或经羟基或 $-C(O)H$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;

[0275] (v)  $-NR^{7a}R^{7b}$ , 其中 $R^{7a}$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基, 并且 $R^{7b}$ 选自氢、 $-C(O)-C_{1-6}$ 烷氧基、和未经取代的或经 $-C(O)OH$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基; 以及

[0276] (vi) 未经取代或经羟基取代的单环 $C_{3-6}$ 环烷基; 以及

[0277] (b) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{3-6}$ 环烷基:  $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、和未经取代的或经羟基或 $-C(O)-C_{1-6}$ 烷氧基取代的 $C_{1-6}$ 烷基。

[0278] 实施例26. 根据实施例1至25中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐, 其中

[0279]  $R^2$ 选自

[0280] (a) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{1-8}$ 烷基

[0281] (i)  $C_{1-6}$  卤代烷基;

[0282] (ii)  $-OR^6$ , 其中  $R^6$  选自氢、和未经取代的或经羟基取代的  $C_{1-6}$  烷基; 以及

[0283] (iii) 未经取代或经羟基取代的单环  $C_{3-6}$  环烷基; 以及

[0284] (b) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的  $C_{3-6}$  环烷基:  $C_{1-6}$  卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$  烷基氨基、和未经取代的或经羟基取代的  $C_{1-6}$  烷基。

[0285] 实施例27. 根据实施例1至26中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐, 其中  $R^2$  是未经取代的或经1至2个独立地选自  $C_{1-6}$  卤代烷基和  $-OR^6$  的取代基取代的  $C_{1-8}$  烷基, 其中  $R^6$  选自氢、和未经取代的或经羟基取代的  $C_{1-6}$  烷基。

[0286] 实施例28. 根据实施例1至27中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐, 其中  $R^2$  是未经取代的或经羟基取代的  $C_{1-8}$  烷基。

[0287] 实施例29. 根据实施例1至27中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐, 其中  $R^2$  是未经取代的或经  $C_{1-6}$  卤代烷基取代的  $C_{1-6}$  烷基。

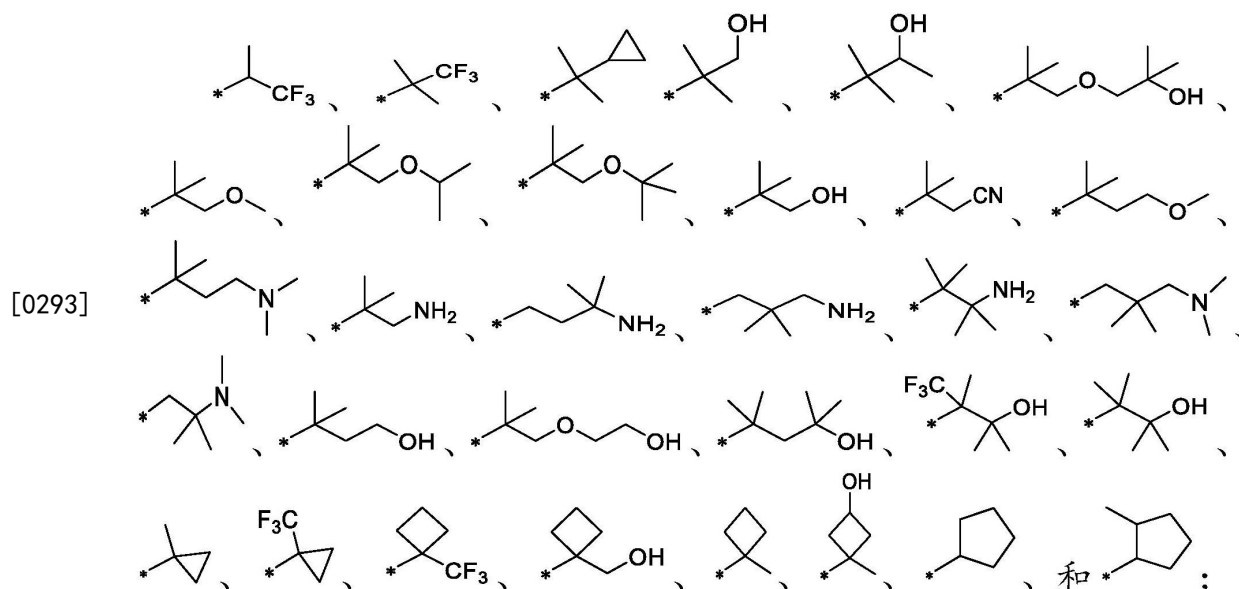
[0288] 实施例30. 根据实施例1至27中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐, 其中  $R^2$  是未经取代的或经  $-O-C_{1-6}$  烷基- $OH$  取代的  $C_{1-6}$  烷基。

[0289] 实施例31. 根据实施例1至26中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐, 其中  $R^2$  是未经取代的或经选自以下的取代基取代的  $C_{3-6}$  环烷基:  $C_{1-6}$  卤代烷基、 $C_{1-6}$  烷基氨基、 $R^0$  和未经取代的或经羟基取代的  $C_{1-6}$  烷基。

[0290] 实施例32. 根据实施例1至26和31中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐, 其中  $R^2$  是未经取代的  $C_{3-6}$  环烷基。

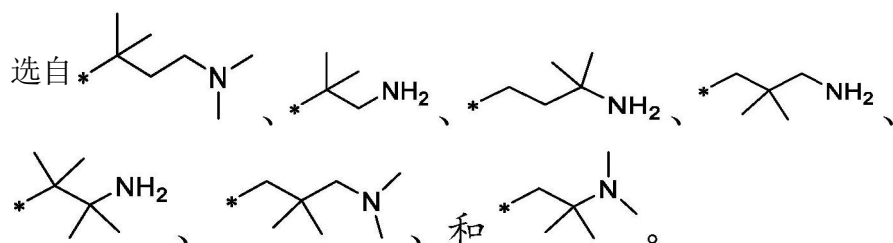
[0291] 实施例33. 根据实施例1至26和31中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐, 其中  $R^2$  是经  $C_{1-6}$  烷基或  $C_{1-6}$  卤代烷基取代的  $C_{3-6}$  环烷基。

[0292] 实施例34. 根据实施例1至25中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐, 其中  $R^2$  选自异丙基、仲丁基、叔丁基、2-甲基-丁-2-基、2,4,4-三甲基戊-2-基、

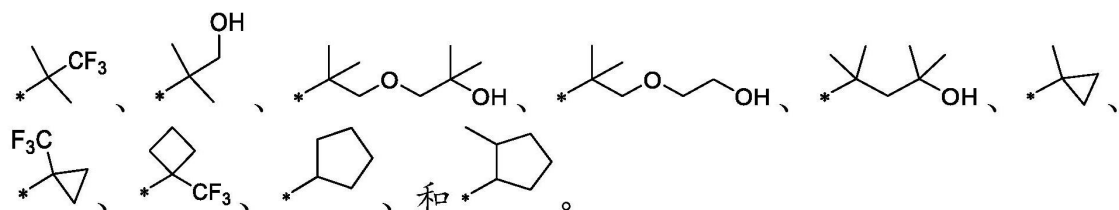
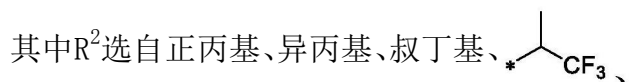


[0294] 其中“\*”代表  $R^2$  与分子其余部分的附接点。

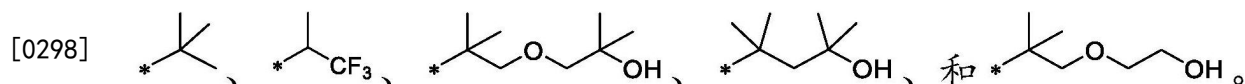
[0295] 实施例34A. 根据实施例1至25中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐, 其中  $R^2$

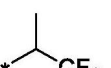


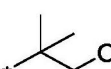
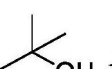
[0296] 实施例35. 根据实施例1至23和25至27中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐,

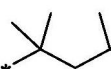



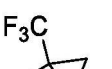
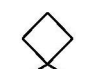


[0297] 实施例36. 根据实施例1至27、34和35中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐, 其中R<sup>2</sup>选自

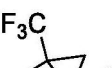



[0299] 实施例37. 根据实施例1至27、29和34至36中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐, 其中R<sup>2</sup>是 。

[0300] 实施例38. 根据实施例1至27、30和34至36中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐, 其中R<sup>2</sup>是  或 。

[0301] 实施例39. 根据实施例1至27、31和34至36中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐, 其中R<sup>2</sup>是 。

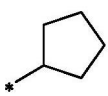
[0302] 实施例40. 根据实施例1至26、31、34和35中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐, 其中R<sup>2</sup>选自 、、、、和 。

[0303] 实施例41. 根据实施例1至26、31、33至35和40中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐, 其中R<sup>2</sup>选自  或 。

[0304] 实施例42. 根据实施例1至26、31、33至35和40中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐, 其中R<sup>2</sup>是



[0306] 实施例43. 根据实施例1至26、31、32、34、35和40中任一项所述的具有式A2的化合

物或其盐,其中 $R^2$ 是 .

[0307] 实施例44.根据实施例1至23、25至30和35中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐,其中 $R^2$ 选自正丙基、异丙基和叔丁基。

[0308] 实施例45.根据实施例1至23、25至30、35、和44中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐,其中 $R^2$ 是正丙基。

[0309] 实施例46.根据实施例1至30、35和44中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐,其中 $R^2$ 是异丙基。

[0310] 实施例47.根据实施例1至30、35和44中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐,其中 $R^2$ 是叔丁基。

[0311] 实施例48.根据实施例1至19中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐,其中

[0312]  $X^1$ 是CH;并且

[0313]  $R^1$ 和 $R^2$ 可以与两者都结合的氮原子一起形成4至6元杂环烷基,所述杂环烷基可以包含1至2个独立地选自N、O和S的其他杂原子作为环成员,其中由 $R^1$ 和 $R^2$ 与两者都结合的氮原子一起形成的4至6元杂环烷基未经取代或经1至3个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基以及 $R^0$ 的取代基取代。

[0314] 实施例49.根据实施例1至19和48中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐,其中

[0315]  $X^1$ 是CH;并且

[0316]  $R^1$ 和 $R^2$ 与两者都结合的氮原子一起形成5或6元杂环烷基,所述杂环烷基可以包含1至2个选自N、O和S的其他杂原子作为环成员,其中由 $R^1$ 和 $R^2$ 与两者都结合的氮原子一起形成的5或6元杂环烷基未经取代或经1至3个独立地选自羟基、 $C_{1-4}$ 烷基、和 $C_{1-4}$ 卤代烷基的取代基取代。

[0317] 实施例50.根据实施例1至19、48和49中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐,其中

[0318]  $X^1$ 是CH;并且

[0319]  $R^1$ 和 $R^2$ 与两者都结合的氮原子一起形成6元杂环烷基,所述杂环烷基可以包含选自N和O的其他杂原子作为环成员,其中由 $R^1$ 和 $R^2$ 与两者都结合的氮原子一起形成的6元杂环烷基未经取代或经1至3个独立地选自羟基、 $C_{1-6}$ 烷基、和 $C_{1-6}$ 卤代烷基的取代基取代。

[0320] 实施例51.根据实施例1至19和48至50中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐,其中

[0321]  $X^1$ 是CH;并且

[0322]  $R^1$ 和 $R^2$ 与两者都结合的氮原子一起形成选自哌啶基、哌嗪基和吗啉基的6-元杂环烷基,其中所述哌啶基、哌嗪基或吗啉基未经取代或经1至3个独立地选自羟基和 $C_{1-6}$ 烷基的取代基取代。

[0323] 实施例52.根据实施例1至51中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐,其中 $R^3$ 选自氢、氯和甲基。

[0324] 实施例53.根据实施例1至52中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐,其中 $R^3$ 是氢。

[0325] 实施例53A.根据实施例1至52中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐,其中 $R^3$

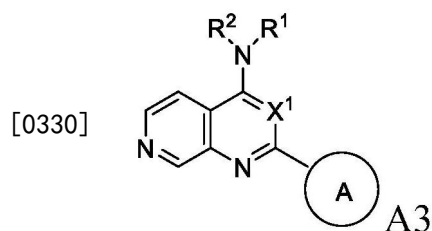
是氯。

[0326] 实施例53B. 根据实施例1至52中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐, 其中R<sup>3</sup>是甲基。

[0327] 实施例54. 根据实施例1至53中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐, 其中R<sup>5</sup>选自氢和氯。

[0328] 实施例55. 根据实施例1至54中任一项所述的具有式A2的化合物或其盐, 其中R<sup>5</sup>是氢。

[0329] 实施例56. 根据实施例1所述的具有式A2的化合物或其盐, 其中所述化合物具有式A3:



[0331] 其中

[0332] X<sup>1</sup>是CH或N;

[0333] 环A是 , 其各自未经取代或经选自卤素、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基和-NH<sub>2</sub>的取代基取代;

[0334] R<sup>1</sup>是氢或未经取代的C<sub>1-6</sub>烷基; 并且

[0335] R<sup>2</sup>是

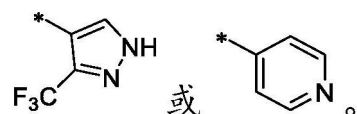
[0336] (a) 未经取代的或经1个选自以下的取代基取代的C<sub>1-8</sub>烷基

[0337] (i) C<sub>1-4</sub>卤代烷基和

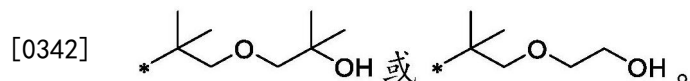
[0338] (ii) -OR<sup>6</sup>, 其中R<sup>6</sup>选自氢、和未经取代的或经羟基取代的C<sub>1-6</sub>烷基; 或

[0339] (b) 未经取代的或经C<sub>1-6</sub>烷基或C<sub>1-6</sub>卤代烷基取代的单环C<sub>3-6</sub>环烷基。

[0340] 实施例57. 根据实施例56所述的具有式A2的化合物或其盐, 其中环A是



[0341] 实施例58. 根据实施例56或实施例57所述的具有式A2的化合物或其盐, 其中R<sup>2</sup>是



[0343] 实施例59. 根据实施例56或实施例57所述的具有式A2的化合物或其盐, 其中R<sup>2</sup>是未经取代的或经三氟甲基取代的正丙基或叔丁基。

[0344] 实施例60. 根据实施例1所述的具有式A2的化合物或其盐, 选自N-(2-环丙基丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; N,N-二乙基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; N-乙基-N-(丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; 2-(吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; N-甲基-N-(丙-2-基)-2-(吡啶-4-

基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(1-甲氧基-2-甲基丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(4-甲氧基-2-甲基丁-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-丁基-N-甲基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-乙基-N-甲基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(2-甲基-2-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]丙氧基)乙-1-醇;2-甲基-1-(2-甲基-2-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]丙氧基)丙-2-醇;N-乙基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-丙基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(2-环己基丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(3-甲基氧杂环丁烷-3-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(2-甲基环戊基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;3-甲基-3-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]丁-2-醇;N-丁基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(2-甲基-4-苯基丁-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-环丙基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(4-甲磺酰基-2-甲基丁-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-甲基-2-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]丙烷-1,3-二醇;3-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]丁-2-醇;2-(2-甲基-2-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]丙氧基)乙酸;(1R,2S)-2-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]环戊-1-醇;4,4,4-三氟-3-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]丁-1-醇;N-(1-甲磺酰基-2-甲基丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;(2S)-3,3,3-三氟-2-甲基-2-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]丙酸;2-[(2-甲基-2-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]丙基)氨基]乙酸;(2R)-3,3,3-三氟-2-甲基-2-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]丙酸;甲基2-甲基-2-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]丙酸酯;(1S,2S)-2-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]环戊-1-醇;2-甲基-2-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]丙酸;2-(2-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]乙氧基)乙-1-醇;2-(羟基甲基)-2-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]丙烷-1,3-二醇;3-甲基-3-(3-甲基-3-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]丁酰胺)丁酸;2-(吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟-3-苯基丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-[[4-(二甲基氨基)环氧乙烷-4-基]甲基]-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;3-甲基-3-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]丁酸;N-(2-甲磺酰基乙基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-[2-(金刚烷-1-基)丙-2-基]-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-甲基-N-[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]丙酰胺;4,4,4-三氟-3-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]丁酸;N-[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]丙烷-2-磺酰胺;2-(吡啶-4-基)-N-[3-(1H-1,2,3,4-四唑-5-基)丙基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-[1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-[(2S)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-[(2R)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2,4-二甲基-4-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]戊-2-醇;4,4,4-三氟-2,3-二甲基-3-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]丁-2-醇;(1-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]环戊基)甲醇;N-(3-甲氧基环丁基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;

(1R,2R)-1-N,2-N-二甲基-1-N-[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]环己烷-1,2-二胺;甲基(1s,3s)-3-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]环丁烷-1-甲酸酯;乙基1-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]环丁烷-1-甲酸酯;1-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]环丁烷-1-甲酸;(1s,3s)-3-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]环丁烷-1-甲酸;2-(吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟-2-甲基丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-叔-丁基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(1-甲基环丁基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;3-甲基-3-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]丁-1-醇;2-(吡啶-4-基)-N-[1-(三氟甲基)环丁基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(2-甲基丁-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(吡啶-4-基)-N-[1-(三氟甲基)环丙基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-环戊基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-甲基-2-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]丙-1-醇;3,3,3-三氟-2-甲基-2-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]丙-1-醇;N-(丁-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(2-甲基丁-3-炔-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;(1r,3s)-3-甲基-3-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]环丁-1-醇;2,3-二甲基-3-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]丁-2-醇;2-(吡啶-4-基)-N-(2,4,4-三甲基戊-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(戊-3-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-[2-甲基-1-(吗啉-4-基)丙-2-基]-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-[1-(叔-丁氧基)-2-甲基丙-2-基]-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;4,4,4-三氟-2-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]丁-1-醇;N-戊基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]丁-1-醇;N-[1-(1H-吡啶-3-基)-2-甲基丙-2-基]-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-[1-(4-氟苯基)-2-甲基丙-2-基]-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(2-苯基丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(2-氟苯基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-[2-(4-氟苯基)丙-2-基]-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;3,3,3-三氟-2-甲基-2-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]丙酸;2-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]乙-1-醇;N-甲基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;1-([2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基)甲基)环戊-1-醇;N,N-二甲基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(2-甲基苯基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(4-甲基苯基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(4-甲氧基苯基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-苯基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(3-甲基苯基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;6-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]己酸;N-(3-氟苯基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(4-氟苯基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;4-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]丁酸;N-(1-苯基乙基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(1-甲基环丙基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;叔-丁基N-(2-甲基-2-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]丙基)氨基甲酸酯;(1-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]环丁基)甲醇;甲基2-(1-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]环丙基)乙酸酯;N-(2-甲基丙基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;3-甲基-3-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-



4-基]氨基}丁腈;N-(6-氨基己基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(4-氨基丁基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-甲基-2-([2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基)丙腈;N-[2-甲基-1-(2-甲基哌啶-1-基)丙-2-基]-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;二甲基(3-甲基-3-([2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基)丁基)胺;N-(1-氨基-2-甲基丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-环戊基-2-[3-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;4-[4-(叔-丁基氨基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-2-基]吡啶-2-胺;2-[1-(苯磺酰基)-2-甲基-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基]-N-叔-丁基吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-叔-丁基-2-{2-甲基-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基}吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-叔-丁基-2-[3-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-叔-丁基-2-(3-氯吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-叔-丁基-2-(3-甲基吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-氯吡啶-4-基)-N-(2-甲基丁-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2,4-二甲基-4-([2-[3-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基)戊-2-醇;N-乙基-2-(3-氟吡啶-4-基)-N-(丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-甲基-1-[2-甲基-2-([2-[3-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基)丙氧基]丙-2-醇;2-(3-氟吡啶-4-基)-N-甲基-N-(丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-乙基-2-(3-甲基吡啶-4-基)-N-(丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-氯吡啶-4-基)-N-(1-甲氧基-2-甲基丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;4-{[2-(3-氯吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}-2,4-二甲基戊-2-醇;2-(3-氯吡啶-4-基)-N-环戊基吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;1-(2-{[2-(3-氯吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}-2-甲基丙氧基)-2-甲基丙-2-醇;N-甲基-2-(3-甲基吡啶-4-基)-N-(丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-氯吡啶-4-基)-N-(4-甲磺酰基-2-甲基丁-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-叔-丁基-2-[3-(三氟甲基)吡啶-4-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-叔-丁基-2-[2-氯-5-(三氟甲基)吡啶-4-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-氯吡啶-4-基)-N-[3-(1H-1,2,3,4-四唑-5-基)丙基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-甲基-1H-吡唑-4-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-氟吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟-2-甲基丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-甲基-1H-吡唑-4-基)-N-(1,1,1-三氟-2-甲基丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-氟吡啶-4-基)-N-甲基-N-[(2S)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-氟吡啶-4-基)-N-甲基-N-[(2R)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;4-{4-[(1-甲基环丙基)氨基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-2-基}吡啶-2-胺;2-(3-氯吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟-2-甲基丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2,4-二甲基-4-{[2-(3-甲基-1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}戊-2-醇;4-{4-[(1-甲基环丙基)氨基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-2-基}吡啶-3-甲腈;2-{2-甲基-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基}-N-丙基吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(1H-吡唑-5-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3,5-二甲基-1H-吡唑-4-基)-N-(1,1,1-三氟-2-甲基丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(1,1,1-三氟-2-甲基丙-2-基)-2-[3-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;4-{4-[(4-羟基-2,4-二甲基戊-2-基)氨基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-2-基}吡啶-3-甲腈;2-(3,5-二氟吡啶-4-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(2,3-二氟吡啶-4-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(1-甲基环丙基)-2-(1,3-噻唑-5-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(1-甲基环丙基)-2-[2-

(三氟甲基)吡啶-4-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;4-{4-[(1-甲基环丙基)氨基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-2-基}吡啶-2-甲腈;N-(1-甲基环丙基)-2-(1,2-噁唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(二甲基-1,2-噁唑-4-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(1-甲基环丙基)-2-{1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-4-基}吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-丙基-2-{1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基}吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-丙基-2-{1H-吡咯并[3,2-b]吡啶-1-基}吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-甲基吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟-2-甲基丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(1-甲基环丁基)-2-(1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(1-甲基环丙基)-2-(嘧啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;4-{[2-(3,5-二甲基-1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}-2,4-二甲基戊-2-醇;N-丙基-2-{7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基}吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-氯吡啶-4-基)-N-丙基吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-环丙基-1H-吡唑-4-基)-N-丙基吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-甲基吡啶-4-基)-N-丙基吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-{1-甲基-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基}-N-丙基吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2,4-二甲基-4-{[2-(1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}戊-2-醇;N-[(1R)-1-苯基乙基]-2-(1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(5-甲基-1H-吡唑-4-基)-N-[(1R)-1-苯基乙基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-甲基-2-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)-N-[(1R)-1-苯基乙基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-甲基-N-(1-甲基环丙基)-2-(1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(1-乙基-1H-吡唑-5-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(1-甲基环丙基)-2-(哒嗪-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(1-甲基环丙基)-2-(1,3-噁唑-5-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(1-甲基环丙基)-2-(1H-吡唑-5-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(1H-咪唑-5-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(1-甲基-1H-咪唑-5-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(1-甲基环丙基)-2-{1H-吡咯并[3,2-b]吡啶-1-基}吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(1-甲基环丙基)-2-(1H-1,2,3-三唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-甲基-1,2-噁唑-5-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(1-甲基环丙基)-2-(2H-1,2,3,4-四唑-5-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(1H-吡唑-4-基)-N-[1-(吡啶-4-基)乙基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-叔-丁基-2-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;(1-{[2-(3-甲基-1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}环丁基)甲醇;2-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)-N-(1-甲基环丁基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;(1-{[2-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}环丁基)甲醇;2-(1H-吡唑-4-基)-N-[1-(三氟甲基)环丙基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)-N-[1-(三氟甲基)环丙基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-甲基-1H-吡唑-4-基)-N-[1-(吡啶-4-基)乙基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;(1-{[2-(1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}环丁基)甲醇;(1-{[2-(1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}环丙基)甲醇;2-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)-N-[1-(吡啶-4-基)乙基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(1-甲基环丙基)-2-(1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(1-乙基-1H-吡唑-4-基)-N-(2-甲基丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(1-氨基-2-甲基丙-2-基)-2-(1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;8-氯-N-(1-甲基环丙基)-

2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;8-甲基-N-(1-甲基环丙基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-叔-丁基-5-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;5-氯-N-(1-甲基环丙基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(2-{[4-(叔-丁基氨基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-5-基]氨基}乙氧基)乙-1-醇;N-(4-甲氧基-2-甲基丁-2-基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;N-[2-甲基-1-(丙-2-基氧基)丙-2-基]-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;N-[(2S)-丁-2-基]-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;N-[(2R)-丁-2-基]-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;N-(1-甲氧基-2-甲基丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;N-甲基-N-(丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;3-甲基-3-{[2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-基]氨基}丁-1-醇;N-叔-丁基-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;2,2-二甲基-1-[2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-基]哌啶-4-醇;2,4-二甲基-4-{[2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-基]氨基}戊-2-醇;N-环戊基-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;二甲基(3-甲基-3-{[2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-基]氨基}丁基)胺;N,N-二乙基-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;2-甲基-1-(2-甲基-2-{[2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-基]氨基}丙氧基)丙-2-醇;N-丙基-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;N-叔-丁基-2-(3-甲基-1H-吡唑-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;N-叔-丁基-2-(嘧啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;2-(2-氨基嘧啶-4-基)-N-叔-丁基-1,7-萘啶-4-胺;N-叔-丁基-2-{1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-4-基}-1,7-萘啶-4-胺;N-叔-丁基-2-(呋喃-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;2-(2-氨基吡啶-4-基)-N-叔-丁基-1,7-萘啶-4-胺;N,N-二乙基-2-(3-氟吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;3-{[2-(3-氟吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-基]氨基}-3-甲基丁基)二甲基胺;2-(3-氟吡啶-4-基)-N-甲基-N-(丙-2-基)-1,7-萘啶-4-胺;2-(3-氟吡啶-4-基)-4-(哌啶-1-基)-1,7-萘啶;2-(3-氟吡啶-4-基)-4-(吗啉-4-基)-1,7-萘啶;N-叔-丁基-2-(3-氟吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;2-(3-氟吡啶-4-基)-N-(2-甲基丁-2-基)-1,7-萘啶-4-胺;2-{[2-(3-氟吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-基]氨基}-2-甲基丙-1-醇;1-[2-(3-氯吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-基]-2,2-二甲基哌啶-4-醇;2-(3-氟吡啶-4-基)-N-[2-甲基-1-(吗啉-4-基)丙-2-基]-1,7-萘啶-4-胺;4-(4-甲基哌嗪-1-基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶;4-(哌嗪-1-基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶;4-(2-甲基哌啶-1-基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶;2-(吡啶-4-基)-N-(1-(三氟甲基)环丁基)-1,7-萘啶-4-胺;2-甲基-N1-(2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-基)丙烷-1,2-二胺;N-(氧杂环丁烷-3-基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;N-(1-甲基环丙基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;4-(3,3-二甲基哌嗪-1-基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶;2,2-二甲基-4-(2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-基)吗啉;N-(1-甲基环丁基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;2,2-二甲基-N1-(2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-基)丙烷-1,3-二胺;N<sup>2</sup>,N<sup>2</sup>,2-三甲基-N<sup>1</sup>-(2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-基)丙烷-1,2-二胺;4-(2-甲基哌嗪-1-基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶;2-甲基-N<sup>1</sup>-(2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-基)丙烷-1,3-二胺;(R)-2-(吡啶-4-基)-4-(3-(三氟甲基)哌嗪-1-基)-1,7-萘啶;N-(叔-丁基)-N-甲基-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;N-(1-甲基环丁基)-2-(嘧啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;N<sup>1</sup>,N<sup>1</sup>,3-三甲基-N<sup>3</sup>-(2-(嘧啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丁烷-1,3-二胺;N<sup>1</sup>,N<sup>1</sup>,3-三甲基-N<sup>3</sup>-(2-(3-甲基-1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丁烷-1,3-二胺;叔-丁基(2-甲基-1-((2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)丙-2-基)氨基甲酸酯;叔-丁基(2-((2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)乙基)氨基甲酸酯;2-甲基-N<sup>1</sup>-(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丙烷-1,2-二胺;

$N^1$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)乙烷-1,2-二胺;N,N,2-三甲基-2-(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)丙酰胺; $N^1$ ,3-二甲基- $N^1$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丁烷-1,3-二胺;叔-丁基(2,2-二甲基-3-(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)丙基)氨基甲酸酯;2,2-二甲基- $N^1$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丙烷-1,3-二胺;3-甲基-3-(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)丁酰胺;(R)-2-(吡啶-4-基)-4-(3-(三氟甲基)哌嗪-1-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶;2,3-二甲基- $N^2$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丁烷-2,3-二胺;(S)-2-(吡啶-4-基)-4-(3-(三氟甲基)哌嗪-1-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶;乙基2-甲基-2-(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)丙酸酯; $N^1$ , $N^1$ ,2,2-四甲基- $N^3$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丙烷-1,3-二胺;4-(4-(叔-丁基氨基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-2-基)-1,2,5-噁二唑-3-胺; $N^2$ , $N^2$ ,2-三甲基- $N^1$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丙烷-1,2-二胺;2-甲基-2-(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)丙酰胺;(S)-1,1,1-三氟-2-甲基-3-(2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-基)氨基)丙-2-醇;N-叔-丁基-2-(3-氯吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;2-(3-氯吡啶-4-基)-N,N-二乙基-1,7-萘啶-4-胺;N-((1R,2S)-2-甲基环戊基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;(S)-N-(仲-丁基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-((1S,2R)-2-甲基环戊基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;(R)-N-(仲-丁基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-((1S,2S)-2-甲基环戊基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-((1R,2R)-2-甲基环戊基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(叔-丁基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;N-丙基-2-(3-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;叔-丁基(3-甲基-3-(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)丁基)氨基甲酸酯; $N^1$ , $N^1$ , $N^3$ ,2,2-五甲基- $N^3$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丙烷-1,3-二胺; $N^1$ , $N^1$ -二乙基-3-甲基- $N^3$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丁烷-1,3-二胺; $N^3$ -(2-(2-氟吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)- $N^1$ , $N^1$ ,3-三甲基丁烷-1,3-二胺; $N^3$ -(2-(3,5-二甲基-1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)- $N^1$ , $N^1$ ,3-三甲基丁烷-1,3-二胺; $N^1$ , $N^1$ ,3-三甲基- $N^3$ -(2-(3-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丁烷-1,3-二胺; $N^3$ -(2-(2-氨基吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)- $N^1$ , $N^1$ ,3-三甲基丁烷-1,3-二胺;和3-甲基- $N^1$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丁烷-1,3-二胺。

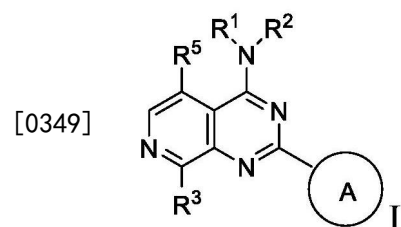
[0345] 实施例60A.根据实施例1所述的具有式A2的化合物或其盐,选自N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-甲基-1-(2-甲基-2-{{2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基}氨基}丙氧基)丙-2-醇;2,4-二甲基-4-{{2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基}氨基}戊-2-醇;N-叔-丁基-2-(嘧啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;2-(吡啶-4-基)-N-[1-(三氟甲基)环丁基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-丙基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;3-(吡啶-4-基)-N-(1-(三氟甲基)环丙基)-2,6-萘啶-1-胺;2-(3-甲基-1H-吡唑-4-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-甲基-2-{{2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基}氨基}丙-1-醇;2-(吡啶-4-基)-4-(3-(三氟甲基)哌嗪-1-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶;N-环戊基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-丙基-2-(3-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(2-甲基环戊基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧

啉-4-胺;2-(3-氯吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟-2-甲基丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;  
2-(2-甲基-2-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丙氧基)乙-1-醇;N-(1-甲基环丙基)-7-(吡啶-4-基)异喹啉-5-胺;(1S,2S)-2-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}环戊-1-醇;N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-[(2S)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-甲基-N-(丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;3-(吡啶-4-基)-N-(1-(三氟甲基)环丙基)-2,6-萘啶-1-胺;N-(叔-丁基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;和N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-[(2R)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺。

[0346] 实施例60B.根据实施例1所述的具有式A2的化合物或其盐,选自N-(叔-丁基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;和N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-[(2S)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺。

[0347] 实施例60C.根据实施例1所述的具有式A2的化合物或其盐,其中所述化合物是N-(叔-丁基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺。

[0348] 实施例61.一种具有式I的化合物或其盐

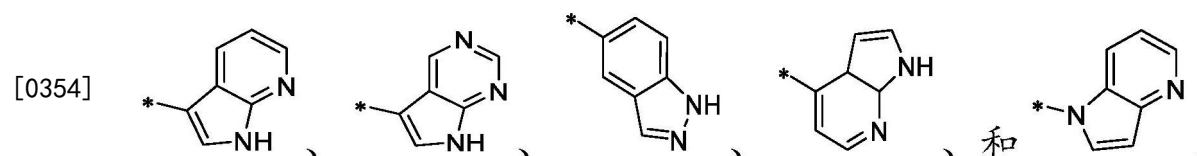


[0350] 其中

[0351] 环A是

[0352] (a) 5或6元单环杂芳基,其通过碳环成员与分子的其余部分连接,并包含1至4个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员,条件是所述杂原子环成员中至少一个是在5元杂芳基的相对于连接碳环成员的3位或4位的或在6元杂芳基的对位环位置上的未经取代的氮(-N=);或

[0353] (b) 选自以下的9元稠合双环杂芳基



[0355] 其中“\*”代表环A与分子其余部分的附接点;

[0356] 其中环A未经取代或经1至2个独立地选自卤素、氰基、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、-NH<sub>2</sub>、C<sub>1-6</sub>烷基氨基、二-(C<sub>1-6</sub>烷基)氨基、C<sub>3-6</sub>环烷基和苯基磺酰基的取代基取代;

[0357] R<sup>0</sup>是羟基或C<sub>1-6</sub>烷氧基;

[0358] R<sup>1</sup>是氢或C<sub>1-6</sub>烷基;

[0359] R<sup>2</sup>选自

[0360] (a) 未经取代的或经1至3个独立地选自以下的取代基取代的C<sub>1-8</sub>烷基

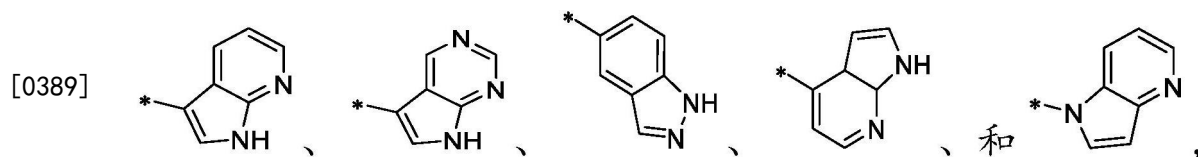
[0361] (i) 卤素;

[0362] (ii) 氰基;

- [0363] (iii) 氧代;
- [0364] (iv)  $C_2$ 烯基;
- [0365] (v)  $C_2$ 炔基;
- [0366] (vi)  $C_{1-6}$ 卤代烷基;
- [0367] (vii)  $-OR^6$ , 其中 $R^6$ 选自氢、未经取代或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;
- [0368] (viii)  $-NR^{7a}R^{7b}$ , 其中 $R^{7a}$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基, 并且 $R^{7b}$ 选自氢、 $-C(O)R^0$ 、未经取代的或经 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;
- [0369] (ix)  $-C(O)R^8$ , 其中 $R^8$ 是 $R^0$ 或 $-NH-C_{1-6}$ 烷基- $-C(O)R^0$ ;
- [0370] (x)  $-S(O)_2C_{1-6}$ 烷基;
- [0371] (xi) 单环 $C_{3-6}$ 环烷基或多环 $C_{7-10}$ 环烷基, 其各自未经取代或经1至2个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、羟基 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $-NH_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基和二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基的取代基取代;
- [0372] (xii) 6元杂环烷基, 其包含1至2个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员并且未经取代或经1至2个独立地选自羟基、卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 烷基氨基和二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基的取代基取代;
- [0373] (xiii) 未经取代的或经卤素取代的苯基;
- [0374] (xiv) 5或6元单环杂芳基, 其包含1至4个独立地选自N和O的杂原子作为环成员; 以及
- [0375] (xv) 9或10元稠合双环杂芳基, 其包含1至2个独立地选自N和O的杂原子作为环成员;
- [0376] (b)  $-S(O)_2C_{1-6}$ 烷基;
- [0377] (c) 未经取代的或经1至2个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基和 $R^0$ 的取代基取代的苯基;
- [0378] (d) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{3-6}$ 环烷基:  $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基; 以及
- [0379] (e) 4元杂环烷基, 其包含1至2个选自N、O和S的杂原子作为环成员, 并且未经取代或经1至2个独立地选自以下的取代基取代:  $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;
- [0380]  $R^3$ 选自氢、卤素和 $C_{1-6}$ 烷基; 以及
- [0381]  $R^5$ 选自氢、卤素和 $-NH-$ (3至8元杂烷基), 其中 $-NH-$ (3至8元杂烷基)的3至8元杂 $C_{3-8}$ 烷基包含1至2个氧原子作为链成员且未经取代或经 $R^0$ 取代;
- [0382] 条件是:
- [0383] (1) 当环A是4-嘧啶基或3-氟-4-嘧啶基,  $R^1$ 是H或甲基,  $R^3$ 是H或Cl, 并且 $R^5$ 是H时; 那么 $R^2$ 不是经选自 $-NH_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基或叔-丁基-氨基甲酰基-氨基的取代基取代并且任选地进一步经未经取代的苯基取代的 $C_{2-4}$ 烷基; 以及
- [0384] (2) 当环A是吡啶-5-基,  $R^1$ 、 $R^3$ 和 $R^5$ 是H时; 那么 $R^2$ 不是经 $-NH_2$ 取代的 $C_4$ 烷基。
- [0385] 实施例62. 根据实施例61所述的具有式I的化合物或其盐, 其中
- [0386] 环A是
- [0387] (a) 5或6元单环杂芳基, 其通过碳环成员与分子的其余部分连接, 并包含1至2个选

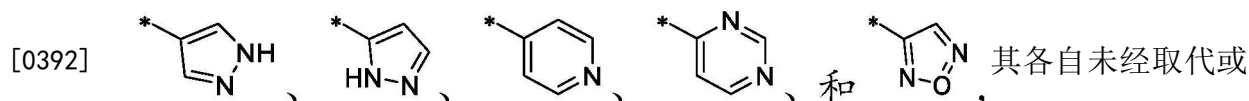
自N的杂原子作为环成员,条件是氮原子环成员中至少一个是在相对于5元杂芳基的连接碳环成员的3位或5位的或在6元杂芳基的对位环位置上的未经取代的氮(-N=);或

[0388] (b) 选自以下的9元耦合双环杂芳基

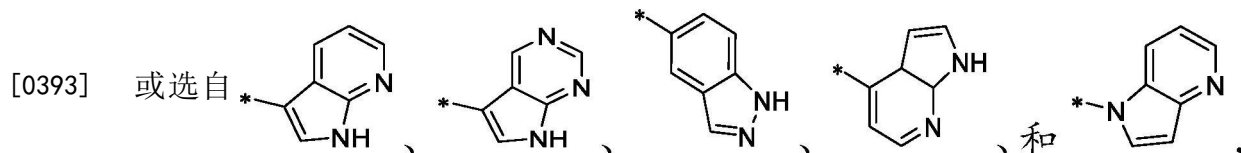


[0390] 其中“\*”代表环A与分子其余部分的附接点并且环A未经取代或经1至2个独立地选自卤素、氰基、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $-NH_2$ 和 $C_{3-6}$ 环烷基的取代基取代。

[0391] 实施例63. 根据实施例61或实施例62所述的具有式I的化合物或其盐,其中环A选自

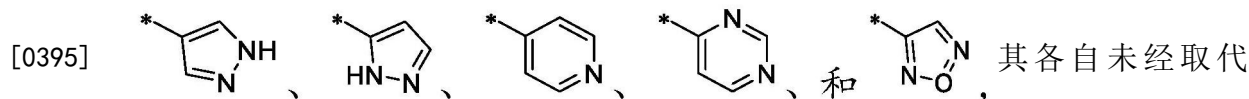


经1至2个独立地选自氰基、卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $NH_2$ 、和 $C_{3-6}$ 环烷基的取代基取代;



其各自未经取代或经 $C_{1-6}$ 烷基取代。

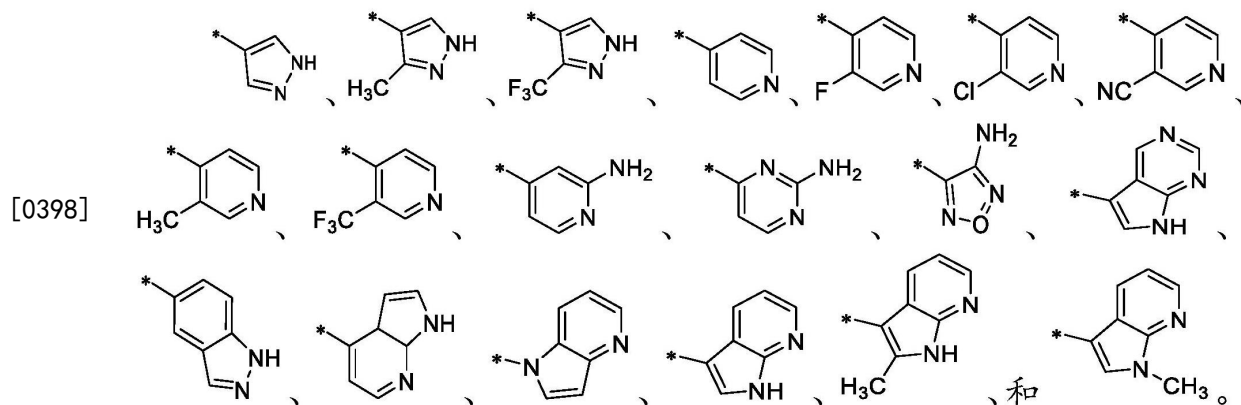
[0394] 实施例64. 根据实施例61至63中任一项所述的具有式I的化合物或其盐,其中环A选自



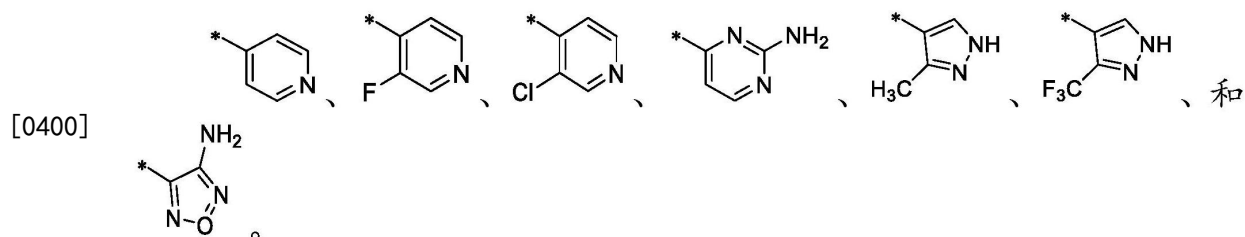
或经选自卤素、氰基、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基和 $-NH_2$ 的取代基取代;



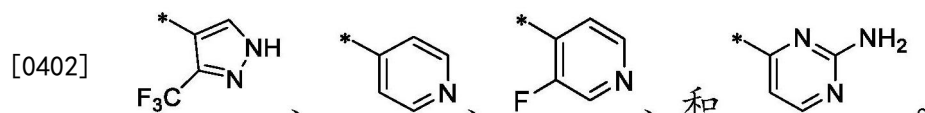
[0397] 实施例65. 根据实施例61至63中任一项所述的具有式I的化合物或其盐,其中环A选自



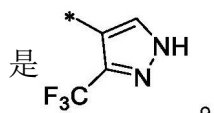
[0399] 实施例66. 根据实施例61至65中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中环A选自



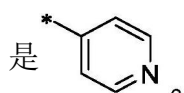
[0401] 实施例67. 根据实施例61至66中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中环A选自



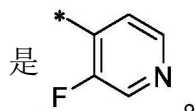
[0403] 实施例68. 根据实施例61至67中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中环A



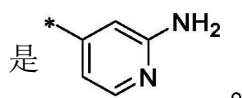
[0404] 实施例69. 根据实施例61至67中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中环A



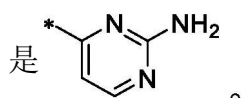
[0405] 实施例70. 根据实施例61至67中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中环A



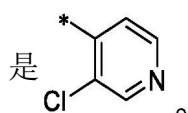
[0406] 实施例71. 根据实施例61至67中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中环A



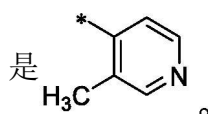
[0407] 实施例72. 根据实施例61至67中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中环A



[0408] 实施例73. 根据实施例61至65中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中环A

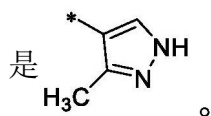


[0409] 实施例74. 根据实施例61至65中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中环A



[0410] 实施例75. 根据实施例61至66中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中环A

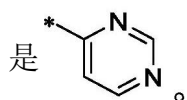




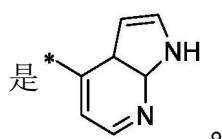
[0411] 实施例76. 根据实施例61至63中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中环A



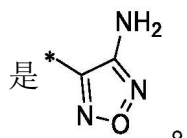
[0412] 实施例77. 根据实施例61至64中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中环A



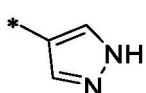
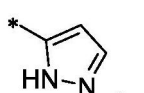
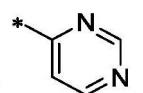
[0413] 实施例78. 根据实施例61至65中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中环A

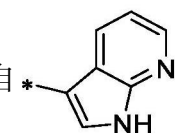
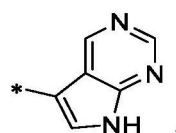
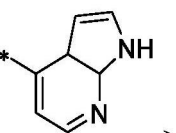
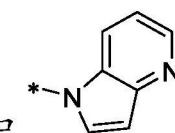


[0414] 实施例78A. 根据实施例61至65中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中环A



[0415] 实施例79. 根据实施例61至63中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中环A选自

[0416] 、、和 ，其各自未经取代或经1至2个独立地选自氰基、卤素、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、NH<sub>2</sub>、和C<sub>3-6</sub>环烷基的取代基取代；

[0417] 或选自 、、、和 ，其各自未经取代或经C<sub>1-6</sub>烷基取代。

[0418] 实施例80. 根据实施例61至79中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中R<sup>1</sup>选自氢、甲基和乙基。

[0419] 实施例81. 根据实施例61至80中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中R<sup>1</sup>是甲基。

[0420] 实施例82. 根据实施例61至80中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中R<sup>1</sup>是氢。

[0421] 实施例83. 根据实施例61至82中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中

[0422] R<sup>2</sup>选自

[0423] (a) 未经取代的或经1至3个独立地选自以下的取代基取代的C<sub>1-8</sub>烷基

[0424] (i) 氰基；

- [0425] (ii)  $C_2$ 炔基;
- [0426] (iii)  $C_{1-6}$ 卤代烷基;
- [0427] (iv)  $-OR^6$ , 其中 $R^6$ 选自氢、未经取代或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;
- [0428] (v)  $-NR^{7a}R^{7b}$ , 其中 $R^{7a}$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基, 并且 $R^{7b}$ 选自氢、 $-C(O)R^0$ 、未经取代的或经 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;
- [0429] (vi)  $-C(O)R^8$ , 其中 $R^8$ 是 $R^0$ ;
- [0430] (vii)  $-S(O)_2C_{1-6}$ 烷基;
- [0431] (viii) 未经取代的或经选自 $C_{1-6}$ 烷基、羟基 $C_{1-6}$ 烷基和 $R^0$ 的取代基取代的单环 $C_{3-6}$ 环烷基;
- [0432] (ix) 6元杂环烷基, 其包含1至2个独立地选自N和O的杂原子作为环成员并且未经取代或经 $C_{1-6}$ 烷基取代; 以及
- [0433] (x) 未经取代的或经卤素取代的苯基;
- [0434] (b) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{3-6}$ 环烷基:  $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基; 以及
- [0435] (c) 4元杂环烷基, 其包含选自N和O的杂原子作为环成员, 并且未经取代或经1至2个独立地选自以下的取代基取代:  $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基。
- [0436] 实施例84. 根据实施例61至82中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中
- [0437]  $R^2$ 选自
- [0438] (a) 未经取代的或经1至3个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{1-8}$ 烷基
- [0439] (i) 氰基;
- [0440] (ii)  $C_2$ 炔基;
- [0441] (iii)  $C_{1-6}$ 卤代烷基;
- [0442] (iv)  $-OR^6$ , 其中 $R^6$ 选自氢、未经取代或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;
- [0443] (v)  $-NR^{7a}R^{7b}$ , 其中 $R^{7a}$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基, 并且 $R^{7b}$ 选自氢、 $-C(O)R^0$ 、未经取代的或经 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;
- [0444] (vi)  $-C(O)R^8$ , 其中 $R^8$ 是 $R^0$ ;
- [0445] (vii)  $-S(O)_2C_{1-6}$ 烷基;
- [0446] (viii) 未经取代的或经选自 $C_{1-6}$ 烷基、羟基 $C_{1-6}$ 烷基和 $R^0$ 的取代基取代的单环 $C_{3-6}$ 环烷基;
- [0447] (ix) 6元杂环烷基, 其包含1至2个独立地选自N和O的杂原子作为环成员并且未经取代或经 $C_{1-6}$ 烷基取代; 以及
- [0448] (x) 未经取代的或经卤素取代的苯基;
- [0449] 并且其中 $C_{1-8}$ 烷基的C原子未经取代或经1至3个取代基(i)至(x)取代, 是 $R^2$ 与分子的不是 $-CH_2-$ 基团的其余部分的附接点。
- [0450] (b) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{3-6}$ 环烷基:  $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基; 以及
- [0451] (c) 4元杂环烷基, 其包含选自N和O的杂原子作为环成员, 并且未经取代或经1至2个独立地选自以下的取代基取代:  $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或

经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基。

[0452] 实施例85. 根据实施例61至83中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中

[0453]  $R^2$ 选自

[0454] (a) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{1-8}$ 烷基

[0455] (i) 氰基;

[0456] (ii)  $C_2$ 炔基;

[0457] (iii)  $C_{1-6}$ 卤代烷基;

[0458] (iv)  $-OR^6$ , 其中 $R^6$ 选自氢、未经取代或经羟基或 $-C(O)H$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;

[0459] (v)  $-NR^{7a}R^{7b}$ , 其中 $R^{7a}$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基, 并且 $R^{7b}$ 选自氢、 $-C(O)-C_{1-6}$ 烷氧基、和未经取代的或经 $-C(O)OH$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基; 以及

[0460] (vi) 未经取代的或经一个羟基取代的单环 $C_{3-6}$ 环烷基; 以及

[0461] (b) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{3-6}$ 环烷基:  $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、和未经取代的或经羟基或 $-C(O)-C_{1-6}$ 烷氧基取代的 $C_{1-6}$ 烷基。

[0462] 实施例86. 根据实施例61至85中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中

[0463]  $R^2$ 选自

[0464] (a) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{1-8}$ 烷基

[0465] (i)  $C_{1-6}$ 卤代烷基;

[0466] (ii)  $-OR^6$ , 其中 $R^6$ 选自氢、和未经取代的或经羟基取代的 $C_{1-6}$ 烷基; 以及

[0467] (iii) 未经取代或经羟基取代的单环 $C_{3-6}$ 环烷基; 以及

[0468] (b) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{3-6}$ 环烷基:  $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、和未经取代的或经羟基取代的 $C_{1-6}$ 烷基。

[0469] 实施例87. 根据实施例61至86中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中 $R^2$ 是未经取代的或经1至2个独立地选自 $C_{1-6}$ 卤代烷基和 $-OR^6$ 的取代基取代的 $C_{1-6}$ 烷基, 其中 $R^6$ 选自氢、和未经取代的或经羟基取代的 $C_{1-6}$ 烷基。

[0470] 实施例88. 根据实施例61至87中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中 $R^2$ 是未经取代的或经羟基取代的 $C_{1-6}$ 烷基。

[0471] 实施例89. 根据实施例61至87中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中 $R^2$ 是未经取代的或经 $C_{1-6}$ 卤代烷基取代的 $C_{1-6}$ 烷基。

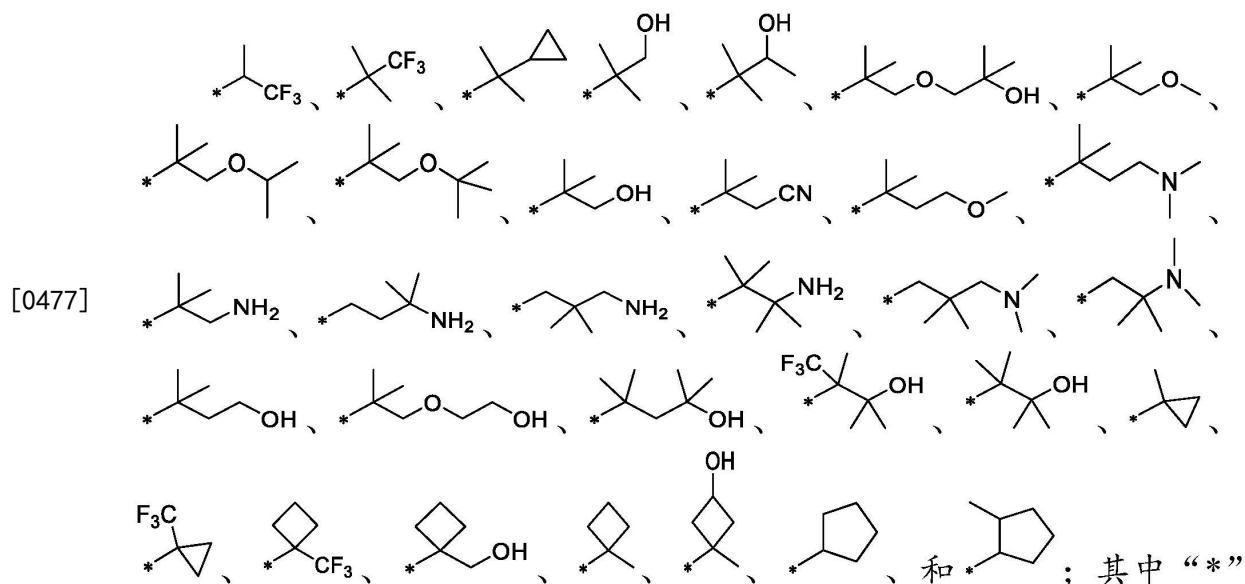
[0472] 实施例90. 根据实施例61至87中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中 $R^2$ 是未经取代的或经 $-O-C_{1-6}$ 烷基- $OH$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基。

[0473] 实施例91. 根据实施例61至86中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中 $R^2$ 是未经取代的或经选自以下的取代基取代的 $C_{3-6}$ 环烷基:  $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、 $R^0$ 和未经取代的或经羟基取代的 $C_{1-6}$ 烷基。

[0474] 实施例92. 根据实施例61至86和91中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中 $R^2$ 是未经取代的 $C_{3-6}$ 环烷基。

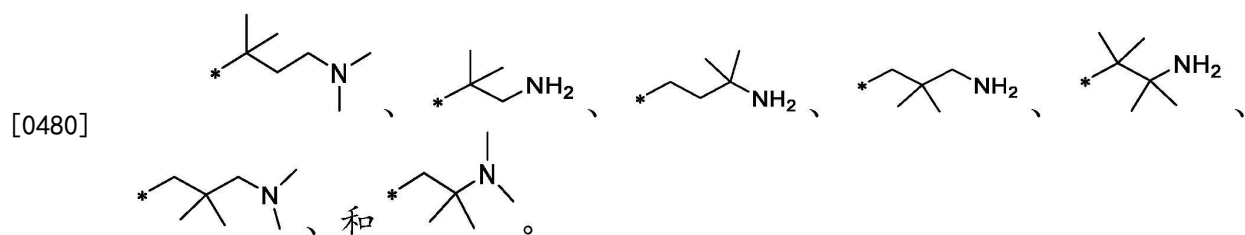
[0475] 实施例93. 根据实施例61至86和91中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中 $R^2$ 是经 $C_{1-6}$ 烷基或 $C_{1-6}$ 卤代烷基取代的 $C_{3-6}$ 环烷基。

[0476] 实施例94. 根据实施例61至85中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中 $R^2$ 选自正丙基、异丙基、仲丁基、叔丁基、2-甲基-丁-2-基、2,4,4-三甲基戊-2-基、

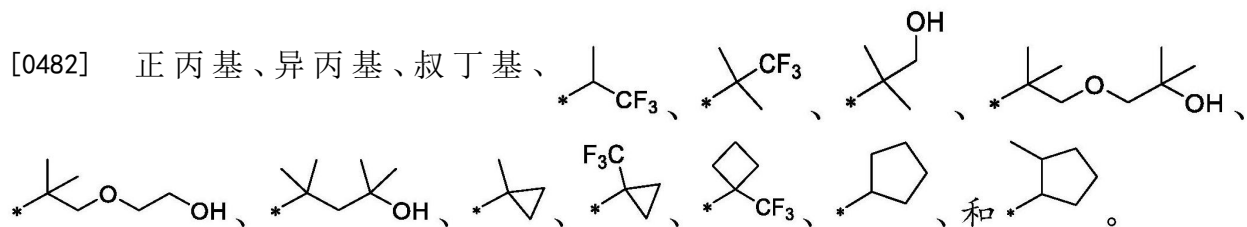


[0478] 代表R<sup>2</sup>与分子其余部分的附接点。

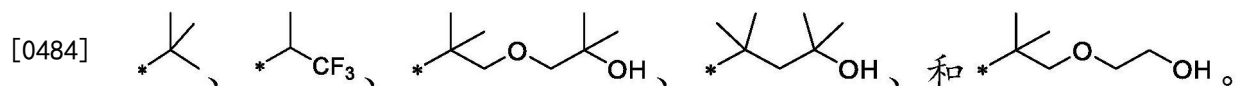
[0479] 实施例94A. 根据实施例61至85中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中R<sup>2</sup>选自

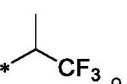


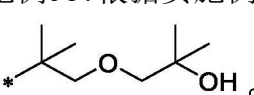
[0481] 实施例95. 根据实施例61至83和85至87中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中R<sup>2</sup>选自



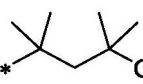
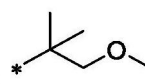
[0483] 实施例96. 根据实施例61至87、94和95中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中R<sup>2</sup>选自



[0485] 实施例97. 根据实施例61至87、89和94至96中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中R<sup>2</sup>是.

[0486] 实施例98. 根据实施例61至87、90和94至96中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中R<sup>2</sup>是.

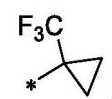
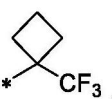
[0487] 实施例99. 根据实施例61至87、91和94至96中任一项所述的具有式I的化合物或其

盐,其中 $R^2$ 是  或 。

[0488] 实施例100.根据实施例61至86、91、94和95中任一项所述的具有式I的化合物或其

盐,其中 $R^2$ 选自 、、、、和 。

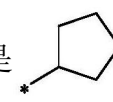
[0489] 实施例101.根据实施例61至86、91、93至95和100中任一项所述的具有式I的化合物或其盐,其中 $R^2$ 是

[0490]  或 。

[0491] 实施例102.根据实施例61至86、91、93至95和100中任一项所述的具有式I的化合物或其盐,其中 $R^2$ 是

[0492]  或 。

[0493] 实施例103.根据实施例61至86、91至95、100和102中任一项所述的具有式I的化合物或其盐,其中 $R^2$ 是

。

[0494] 实施例104.根据实施例61至83、85至90和95中任一项所述的具有式I的化合物或其盐,其中 $R^2$ 选自正丙基、异丙基和叔丁基。

[0495] 实施例105.根据实施例61至83、85至90、95、和104中任一项所述的具有式I的化合物或其盐,其中 $R^2$ 是正丙基。

[0496] 实施例106.根据实施例61至90、95和104中任一项所述的具有式I的化合物或其盐,其中 $R^2$ 是异丙基。

[0497] 实施例107.根据实施例61至90、95和104中任一项所述的具有式I的化合物或其盐,其中 $R^2$ 是叔丁基。

[0498] 实施例108.根据实施例61至107中任一项所述的具有式I的化合物或其盐,其中 $R^3$ 选自氢、氯和甲基。

[0499] 实施例109.根据实施例61至108中任一项所述的具有式I的化合物或其盐,其中 $R^3$ 是氢。

[0500] 实施例109A.根据实施例61至108中任一项所述的具有式I的化合物或其盐,其中 $R^3$ 是氯。

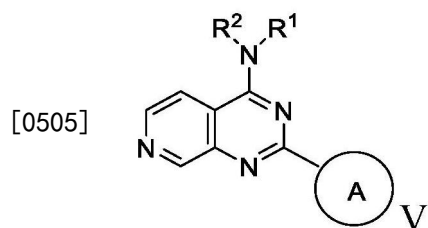
[0501] 实施例109B.根据实施例61至108中任一项所述的具有式I的化合物或其盐,其中 $R^3$ 是甲基。

[0502] 实施例110.根据实施例61至109中任一项所述的具有式I的化合物或其盐,其中 $R^5$ 选自氢和氯。

[0503] 实施例111.根据实施例61至110中任一项所述的具有式I的化合物或其盐,其中 $R^5$ 是氢。

[0504] 实施例112.根据实施例61所述的具有式I的化合物或其盐,其中所述化合物具有

式V:



[0506] 其中

[0507] 环A是 、 或 ，其各自未经取代或经选自卤素、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基和-NH<sub>2</sub>的取代基取代；

[0508] R<sup>1</sup>是氢或未经取代的C<sub>1-6</sub>烷基；并且

[0509] R<sup>2</sup>是

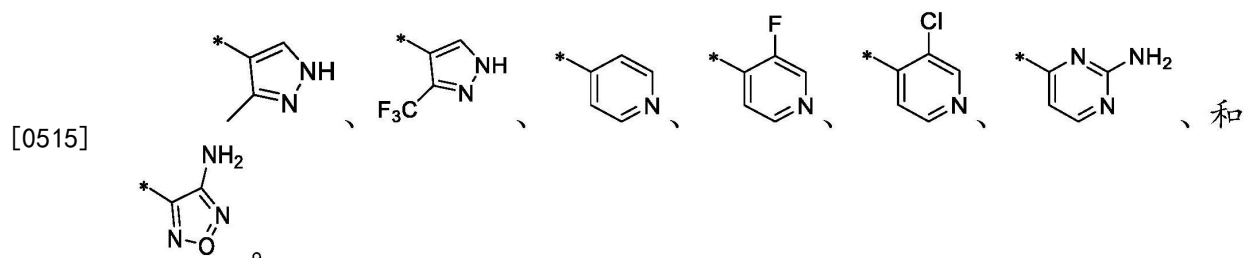
[0510] (a) 未经取代的或经1个选自以下的取代基取代的C<sub>1-8</sub>烷基

[0511] (i) C<sub>1-4</sub>卤代烷基或

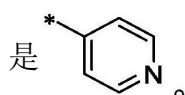
[0512] (ii) -OR<sup>6</sup>，其中R<sup>6</sup>选自氢、和未经取代的或经羟基取代的C<sub>1-6</sub>烷基；或

[0513] (b) 未经取代的或经C<sub>1-6</sub>烷基或C<sub>1-6</sub>卤代烷基取代的单环C<sub>3-6</sub>环烷基。

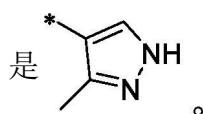
[0514] 实施例113. 根据实施例112所述的具有式I的化合物或其盐，其中环A选自



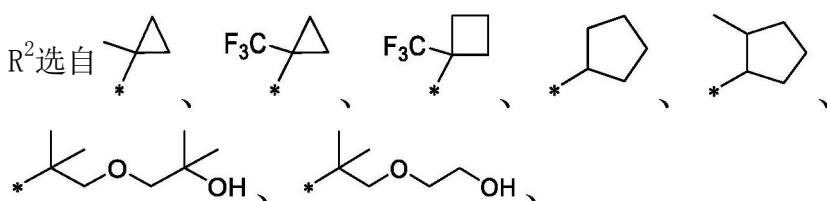
[0516] 实施例114. 根据实施例112或实施例113所述的具有式I的化合物或其盐，其中环A



[0517] 实施例115. 根据实施例112或实施例113所述的具有式I的化合物或其盐，其中环A



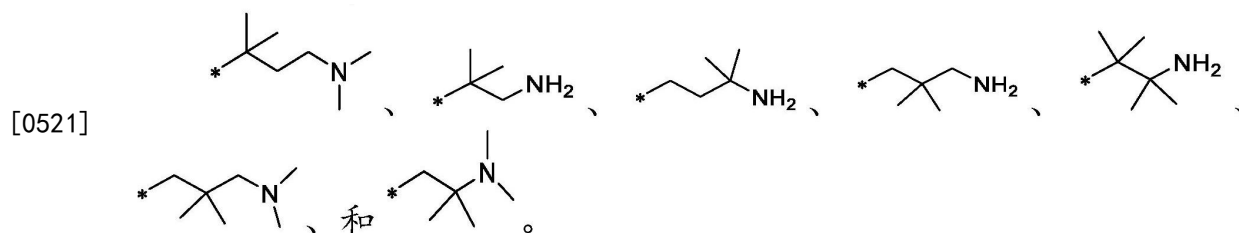
[0518] 实施例116. 根据实施例112至115中任一项所述的具有式I的化合物或其盐，其中



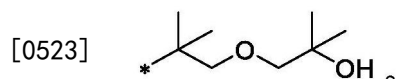
[0519] 、、、、、、和 。

[0520] 实施例116A. 根据实施例112至115中任一项所述的具有式I的化合物或其盐，其中

R<sup>2</sup>选自



[0522] 实施例117. 根据实施例112至116中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中R<sup>2</sup>是



[0524] 实施例118. 根据实施例112至116中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中R<sup>2</sup>是

[0525] 实施例119. 根据实施例112至116中任一项所述的具有式I的化合物或其盐, 其中R<sup>2</sup>是

[0526] 实施例120. 根据实施例61所述的具有式I的化合物或其盐, 选自N-(2-环丙基丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; N,N-二乙基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; N-乙基-N-(丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; 2-(吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; N-甲基-N-(丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; N-(丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; N-(1-甲氧基-2-甲基丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; N-(4-甲氧基-2-甲基丁-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; N-丁基-N-甲基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; N-乙基-N-甲基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; 2-(2-甲基-2-{{2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基}氨基}丙氧基)乙-1-醇; 2-甲基-1-(2-甲基-2-{{2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基}氨基}丙氧基)丙-2-醇; N-乙基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; N-丙基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; N-(2-环己基丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; N-(3-甲基氧杂环丁烷-3-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; N-(2-甲基环戊基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; 3-甲基-3-{{2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基}氨基}丁-2-醇; N-丁基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; N-(2-甲基-4-苯基丁-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; N-环丙基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; N-(4-甲磺酰基-2-甲基丁-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; 2-甲基-2-{{2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基}氨基}丙烷-1,3-二醇; 3-{{2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基}氨基}丁-2-醇; 2-(2-甲基-2-{{2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基}氨基}丙氧基)乙酸; (1R,2S)-2-{{2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基}氨基}环戊-1-醇; 4,4,4-三氟-3-{{2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基}氨基}丁-1-醇; N-(1-甲磺酰基-2-甲基丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; (2S)-3,3,3-三氟-

2-甲基-2- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丙酸;2-[(2-甲基-2- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丙基)氨基]乙酸;(2R)-3,3,3-三氟-2-甲基-2- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丙酸;甲基-2-甲基-2- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丙酸酯;(1S,2S)-2- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}环戊-1-醇;2-甲基-2- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丙酸;2-(2- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}乙氧基)乙-1-醇;2-(羟基甲基)-2- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丙烷-1,3-二醇;3-甲基-3- (3-甲基-3- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丁酰胺)丁酸;2-(吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟-3-苯基丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N- {[4-(二甲基氨基)环氧乙烷-4-基]甲基}-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;3-甲基-3- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丁酸;N-(2-甲磺酰基乙基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-[2-(金刚烷-1-基)丙-2-基]-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-甲基-N-[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]丙酰胺;4,4,4-三氟-3- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丁酸;N-[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]丙烷-2-磺酰胺;2-(吡啶-4-基)-N-[3-(1H-1,2,3,4-四唑-5-基)丙基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-[1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-[(2S)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-[(2R)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2,4-二甲基-4- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}戊-2-醇;4,4,4-三氟-2,3-二甲基-3- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丁-2-醇;(1- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}环戊基)甲醇;N-(3-甲氧基环丁基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;(1R,2R)-1-N,2-N-二甲基-1-N-[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]环己烷-1,2-二胺;甲基(1s,3s)-3- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}环丁烷-1-甲酸酯;乙基1- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}环丁烷-1-甲酸酯;1- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}环丁烷-1-甲酸;(1s,3s)-3- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}环丁烷-1-甲酸;2-(吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟-2-甲基丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-叔-丁基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(1-甲基环丁基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;3-甲基-3- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丁-1-醇;2-(吡啶-4-基)-N-[1-(三氟甲基)环丁基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(2-甲基丁-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(吡啶-4-基)-N-[1-(三氟甲基)环丙基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-环戊基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-甲基-2- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丙-1-醇;3,3,3-三氟-2-甲基-2- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丙-1-醇;N-(丁-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(2-甲基丁-3-炔-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;(1r,3s)-3-甲基-3- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}环丁-1-醇;2,3-二甲基-3- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丁-2-醇;2-(吡啶-4-基)-N-(2,4,4-三甲基戊-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(戊-3-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-[2-甲基-1-(吗啉-4-基)丙-2-基]-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-[1-(叔-丁氧基)-2-甲基丙-2-基]-2-(吡啶-4-



基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;4,4,4-三氟-2- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丁-1-醇;N-戊基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丁-1-醇;N-[1-(1H-吡啶-3-基)-2-甲基丙-2-基]-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-[1-(4-氟苯基)-2-甲基丙-2-基]-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(2-苯基丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(2-氟苯基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-[2-(4-氟苯基)丙-2-基]-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;3,3,3-三氟-2-甲基-2- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丙酸;2- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}乙-1-醇;N-甲基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;1- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}甲基)环戊-1-醇;N,N-二甲基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(2-甲基苯基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(4-甲基苯基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(4-甲氧基苯基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-苯基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(3-甲基苯基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;6- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}己酸;N-(3-氟苯基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(4-氟苯基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;4- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丁酸;N-(1-苯基乙基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(1-甲基环丙基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;叔-丁基N-(2-甲基-2- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丙基)氨基甲酸酯;(1- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}环丁基)甲醇;甲基2-(1- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}环丙基)乙酸酯;N-(2-甲基丙基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;3-甲基-3- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丁腈;N-(6-氨基己基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(4-氨基丁基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-甲基-2- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丙腈;N-[2-甲基-1-(2-甲基哌啶-1-基)丙-2-基]-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;二甲基(3-甲基-3- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丁基)胺;N-(1-氨基-2-甲基丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-环戊基-2-[3-(三氟甲基)-1H-吡啶-4-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;4-[4-(叔-丁基氨基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-2-基]吡啶-2-胺;2-[1-(苯磺酰基)-2-甲基-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基]-N-叔-丁基吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-叔-丁基-2-{2-甲基-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基}吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-叔-丁基-2-[3-(三氟甲基)-1H-吡啶-4-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-叔-丁基-2-(3-氯吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-叔-丁基-2-(3-甲基吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-氯吡啶-4-基)-N-(2-甲基丁-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2,4-二甲基-4-({2-[3-(三氟甲基)-1H-吡啶-4-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基}氨基)戊-2-醇;N-乙基-2-(3-氟吡啶-4-基)-N-(丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-甲基-1-[2-甲基-2-({2-[3-(三氟甲基)-1H-吡啶-4-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基}氨基)丙氧基]丙-2-醇;2-(3-氟吡啶-4-基)-N-甲基-N-(丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-乙基-2-(3-甲基吡啶-4-基)-N-(丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-氯吡啶-4-基)-N-(1-甲氧基-2-甲基丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;4- {[2-(3-氯吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}-2,4-二甲基戊-2-醇;2-(3-氯吡啶-4-基)-N-环戊

基吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;1-(2-{[2-(3-氯吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}-2-甲基丙氧基)-2-甲基丙-2-醇;N-甲基-2-(3-甲基吡啶-4-基)-N-(丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-氯吡啶-4-基)-N-(4-甲磺酰基-2-甲基丁-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-叔-丁基-2-[3-(三氟甲基)吡啶-4-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-叔-丁基-2-[2-氯-5-(三氟甲基)吡啶-4-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-氯吡啶-4-基)-N-[3-(1H-1,2,3,4-四唑-5-基)丙基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-甲基-1H-吡唑-4-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-氟吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟-2-甲基丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-甲基-1H-吡唑-4-基)-N-(1,1,1-三氟-2-甲基丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-氟吡啶-4-基)-N-甲基-N-[(2S)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-氟吡啶-4-基)-N-甲基-N-[(2R)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;4-{4-[(1-甲基环丙基)氨基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-2-基}吡啶-2-胺;2-(3-氯吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟-2-甲基丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2,4-二甲基-4-{[2-(3-甲基-1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}戊-2-醇;4-{4-[(1-甲基环丙基)氨基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-2-基}吡啶-3-甲腈;2-{2-甲基-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基}-N-丙基吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(1H-吡唑-5-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3,5-二甲基-1H-吡唑-4-基)-N-(1,1,1-三氟-2-甲基丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(1,1,1-三氟-2-甲基丙-2-基)-2-[3-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;4-{4-[(4-羟基-2,4-二甲基戊-2-基)氨基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-2-基}吡啶-3-甲腈;2-(3,5-二氟吡啶-4-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(2,3-二氟吡啶-4-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(1-甲基环丙基)-2-(1,3-噁唑-5-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(1-甲基环丙基)-2-[2-(三氟甲基)吡啶-4-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;4-{4-[(1-甲基环丙基)氨基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-2-基}吡啶-2-甲腈;N-(1-甲基环丙基)-2-(1,2-噁唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(二甲基-1,2-噁唑-4-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(1-甲基环丙基)-2-{1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-4-基}吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-丙基-2-{1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基}吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-丙基-2-{1H-吡咯并[3,2-b]吡啶-1-基}吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-甲基吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟-2-甲基丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(1-甲基环丁基)-2-(1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(1-甲基环丙基)-2-(嘧啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;4-{[2-(3,5-二甲基-1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}-2,4-二甲基戊-2-醇;N-丙基-2-{7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基}吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-氯吡啶-4-基)-N-丙基吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-环丙基-1H-吡唑-4-基)-N-丙基吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-甲基吡啶-4-基)-N-丙基吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-{1-甲基-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基}-N-丙基吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2,4-二甲基-4-{[2-(1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}戊-2-醇;N-[(1R)-1-苯基乙基]-2-(1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(5-甲基-1H-吡唑-4-基)-N-[(1R)-1-苯基乙基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-甲基-2-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)-N-[(1R)-1-苯基乙基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-甲基-N-(1-甲基环丙基)-2-(1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)-N-(1-甲基环丙基)

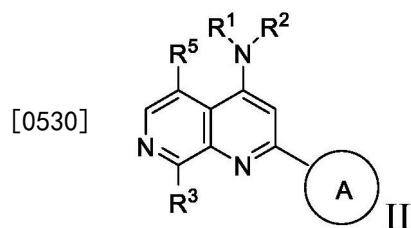
吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(1-乙基-1H-吡啶-5-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(1-甲基环丙基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(1-甲基环丙基)-2-(1,3-噁唑-5-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(1-甲基环丙基)-2-(1H-吡啶-5-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(1H-咪唑-5-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(1-甲基-1H-咪唑-5-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(1-甲基环丙基)-2-{1H-吡咯并[3,2-b]吡啶-1-基}吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(1-甲基环丙基)-2-(1H-1,2,3-三唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-甲基-1,2-噁唑-5-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(1-甲基环丙基)-2-(2H-1,2,3,4-四唑-5-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(1H-吡啶-4-基)-N-[1-(吡啶-4-基)乙基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-叔-丁基-2-(1-甲基-1H-吡啶-5-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;(1-{[2-(3-甲基-1H-吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}环丁基)甲醇;2-(1-甲基-1H-吡啶-5-基)-N-(1-甲基环丁基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;(1-{[2-(1-甲基-1H-吡啶-5-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}环丁基)甲醇;2-(1H-吡啶-4-基)-N-[1-(三氟甲基)环丙基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(1-甲基-1H-吡啶-5-基)-N-[1-(三氟甲基)环丙基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-甲基-1H-吡啶-4-基)-N-[1-(吡啶-4-基)乙基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;(1-{[2-(1H-吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}环丁基)甲醇;(1-{[2-(1H-吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}环丙基)甲醇;2-(1-甲基-1H-吡啶-5-基)-N-[1-(吡啶-4-基)乙基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(1-甲基环丙基)-2-(1H-吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(1-乙基-1H-吡啶-4-基)-N-(2-甲基丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(1-甲基-1H-吡啶-4-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(1-氨基-2-甲基丙-2-基)-2-(1H-吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;8-氯-N-(1-甲基环丙基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;8-甲基-N-(1-甲基环丙基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-叔-丁基-5-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; $N^1, N^1, 3$ -三甲基- $N^3$ -(2-(嘧啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丁烷-1,3-二胺; $N^1, N^1, 3$ -三甲基- $N^3$ -(2-(3-甲基-1H-吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丁烷-1,3-二胺;叔-丁基(2-甲基-1-((2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)丙-2-基)氨基甲酸酯;叔-丁基(2-((2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)乙基)氨基甲酸酯;2-甲基- $N^1$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丙烷-1,2-二胺; $N^1$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)乙烷-1,2-二胺;N,N,2-三甲基-2-((2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)丙酰胺; $N^1, 3$ -二甲基- $N^1$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丁烷-1,3-二胺;叔-丁基(2,2-二甲基-3-((2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)丙基)氨基甲酸酯;2,2-二甲基- $N^1$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丙烷-1,3-二胺;3-甲基-3-((2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)丁酰胺;(R)-2-(吡啶-4-基)-4-(3-(三氟甲基)哌嗪-1-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶;2,3-二甲基- $N^2$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丁烷-2,3-二胺;(S)-2-(吡啶-4-基)-4-(3-(三氟甲基)哌嗪-1-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶;乙基2-甲基-2-((2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)丙酸酯; $N^1, N^1, 2, 2$ -四甲基- $N^3$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丙烷-1,3-二胺;4-(4-(叔-丁基氨基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-2-基)-1,2,5-噁二唑-3-胺; $N^2, N^2, 2$ -三甲基- $N^1$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丙烷-1,2-二胺;2-甲基-2-((2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]

嘧啶-4-基)氨基)丙酰胺;(S)-1,1,1-三氟-2-甲基-3-((2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-基)氨基)丙-2-醇;5-氯-N-(1-甲基环丙基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(2-{[4-(叔-丁基氨基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-5-基]氨基}乙氧基)乙-1-醇;N-((1R,2S)-2-甲基环戊基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;(S)-N-(仲-丁基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-((1S,2R)-2-甲基环戊基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;(R)-N-(仲-丁基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-((1S,2S)-2-甲基环戊基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-((1R,2R)-2-甲基环戊基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-丙基-2-(3-(三氟甲基)-1H-吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;叔-丁基(3-甲基-3-((2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)丁基)氨基甲酸酯; $N^1, N^1, N^3, 2, 2$ -五甲基- $N^3$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丙烷-1,3-二胺; $N^1, N^1$ -二乙基-3-甲基- $N^3$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丁烷-1,3-二胺; $N^3$ -(2-(2-氟吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)- $N^1, N^1, 3$ -三甲基丁烷-1,3-二胺; $N^3$ -(2-(3,5-二甲基-1H-吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)- $N^1, N^1, 3$ -三甲基丁烷-1,3-二胺; $N^1, N^1, 3$ -三甲基- $N^3$ -(2-(3-(三氟甲基)-1H-吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丁烷-1,3-二胺; $N^3$ -(2-(2-氨基吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)- $N^1, N^1, 3$ -三甲基丁烷-1,3-二胺;和3-甲基- $N^1$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丁烷-1,3-二胺。

[0527] 实施例120A.根据实施例61所述的具有式I的化合物或其盐,选自N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-甲基-1-(2-甲基-2-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丙氧基)丙-2-醇;2,4-二甲基-4-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}戊-2-醇;2-(吡啶-4-基)-N-[1-(三氟甲基)环丁基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-丙基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-甲基-1H-吡啶-4-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-甲基-2-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丙-1-醇;2-(吡啶-4-基)-4-(3-(三氟甲基)哌嗪-1-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶;N-环戊基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-丙基-2-(3-(三氟甲基)-1H-吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(2-甲基环戊基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-氯吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟-2-甲基丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(2-甲基-2-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丙氧基)乙-1-醇;N-(1-甲基环丙基)-7-(吡啶-4-基)异喹啉-5-胺;(1S,2S)-2-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}环戊-1-醇;N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-[(2S)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-甲基-N-(丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;和N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-[(2R)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺。

[0528] 实施例120B.根据实施例61所述的具有式I的化合物或其盐,其中所述化合物是N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-[(2S)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺。

[0529] 实施例121.一种具有式II的化合物或其盐

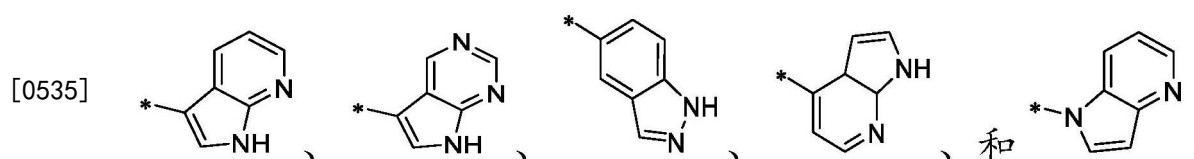


[0531] 其中

[0532] 环A是

[0533] (a) 5或6元单环杂芳基,其通过碳环成员与分子的其余部分连接,并包含1至4个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员,条件是所述杂原子环成员中至少一个是在5元杂芳基的相对于连接碳环成员的3位或4位的或在6元杂芳基的对位环位置上的未经取代的氮(-N=);或

[0534] (b) 选自以下的9元稠合双环杂芳基



[0536] 其中“\*”代表环A与分子其余部分的附接点;

[0537] 其中环A未经取代或经1至2个独立地选自卤素、氰基、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、-NH<sub>2</sub>、C<sub>1-6</sub>烷基氨基、二-(C<sub>1-6</sub>烷基)氨基、C<sub>3-6</sub>环烷基和苯基磺酰基的取代基取代;

[0538] R<sup>0</sup>是羟基或C<sub>1-6</sub>烷氧基;

[0539] R<sup>1</sup>是氢或C<sub>1-6</sub>烷基;

[0540] R<sup>2</sup>选自

[0541] (a) 未经取代的或经1至3个独立地选自以下的取代基取代的C<sub>1-8</sub>烷基

[0542] (i) 卤素;

[0543] (ii) 氰基;

[0544] (iii) 氧代;

[0545] (iv) C<sub>2</sub>烯基;

[0546] (v) C<sub>2</sub>炔基;

[0547] (vi) C<sub>1-6</sub>卤代烷基;

[0548] (vii) -OR<sup>6</sup>,其中R<sup>6</sup>选自氢、未经取代或经R<sup>0</sup>或-C(O)R<sup>0</sup>取代的C<sub>1-6</sub>烷基;

[0549] (viii) -NR<sup>7a</sup>R<sup>7b</sup>,其中R<sup>7a</sup>是氢或C<sub>1-6</sub>烷基,并且R<sup>7b</sup>选自氢、-C(O)R<sup>0</sup>、未经取代的或经-C(O)R<sup>0</sup>取代的C<sub>1-6</sub>烷基;

[0550] (ix) -C(O)R<sup>8</sup>,其中R<sup>8</sup>是R<sup>0</sup>或-NH-C<sub>1-6</sub>烷基-C(O)R<sup>0</sup>;

[0551] (x) -S(O)<sub>2</sub>C<sub>1-6</sub>烷基;

[0552] (xi) 单环C<sub>3-6</sub>环烷基或多环C<sub>7-10</sub>环烷基,其各自未经取代或经1至2个独立地选自卤素、C<sub>1-6</sub>烷基、羟基C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、R<sup>0</sup>、-NH<sub>2</sub>、C<sub>1-6</sub>烷基氨基和二-(C<sub>1-6</sub>烷基)氨基的取代基取代;

[0553] (xii) 6元杂环烷基,其包含1至2个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员并且未经取代或经1至2个独立地选自羟基、卤素、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>烷基氨基和二-(C<sub>1-6</sub>烷基)氨基的取

代基取代；

[0554] (xiii) 未经取代的或经卤素取代的苯基；

[0555] (xiv) 5或6元单环杂芳基，其包含1至4个独立地选自N和O的杂原子作为环成员；以及

[0556] (xv) 9或10元稠合双环杂芳基，其包含1至2个独立地选自N和O的杂原子作为环成员；

[0557] (b)  $-S(O)_2C_{1-6}$ 烷基；

[0558] (c) 未经取代的或经1至2个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基和 $R^0$ 的取代基取代的苯基；

[0559] (d) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{3-6}$ 环烷基： $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；以及

[0560] (e) 4元杂环烷基，其包含1至2个选自N、O和S的杂原子作为环成员，并且未经取代或经1至2个独立地选自以下的取代基取代： $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；或

[0561] 或 $R^1$ 和 $R^2$ 可以与两者都结合的氮原子一起形成4至6元杂环烷基，所述杂环烷基可以包含1至2个独立地选自N、O和S的其他杂原子作为环成员，其中由 $R^1$ 和 $R^2$ 与两者都结合的氮原子一起形成的4至6元杂环烷基未经取代或经1至3个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基以及 $R^0$ 的取代基取代；

[0562]  $R^3$ 选自氢、卤素和 $C_{1-6}$ 烷基；以及

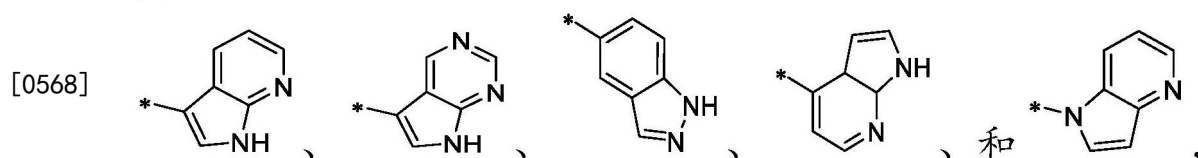
[0563]  $R^5$ 选自氢、卤素和 $-NH-$  (3至8元杂烷基)，其中 $-NH-$  (3至8元杂烷基)的3至8元杂 $C_{3-8}$ 烷基包含1至2个氧原子作为链成员且未经取代或经 $R^0$ 取代。

[0564] 实施例122. 根据实施例121所述的具有式II的化合物或其盐，其中

[0565] 环A是

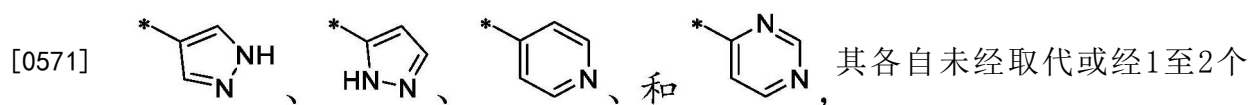
[0566] (a) 5或6元单环杂芳基，其通过碳环成员与分子的其余部分连接，并包含1至2个选自N的杂原子作为环成员，条件是氮原子环成员中至少一个是在5元杂芳基的相对于连接碳环成员的3位或4位的或在6元杂芳基的对位环位置上的未经取代的氮 ( $-N=$ )；或

[0567] (b) 9元稠合双环杂芳基，所述9元稠合双环杂芳基选自

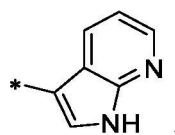
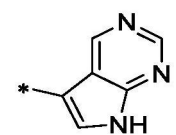
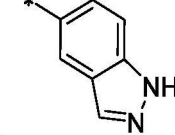
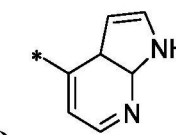
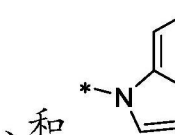


[0569] 其中“\*”代表环A与分子其余部分的附接点并且所述9元稠合双环杂芳基未经取代或经1至2个独立地选自卤素、氰基、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $-NH_2$ 和 $C_{3-6}$ 环烷基的取代基取代。

[0570] 实施例123. 根据实施例121或实施例122所述的具有式II的化合物或其盐，其中环A选自

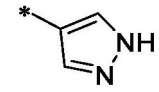
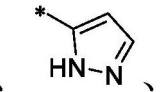
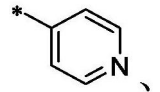
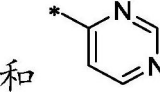


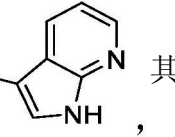
其各自未经取代或经1至2个独立地选自氰基、卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $NH_2$ 和 $C_{3-6}$ 环烷基的取代基取代；

[0572] 或选自 , , , , 和 ,

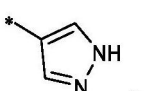
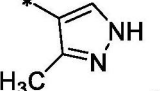
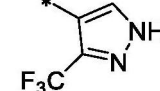
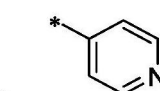
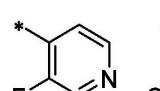
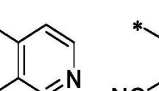
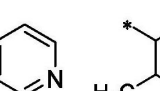
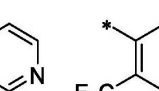
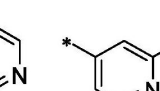
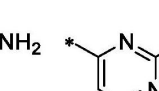

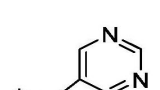
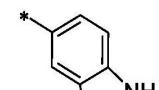
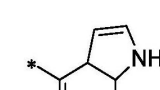
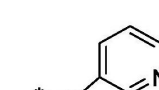
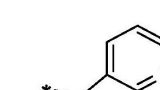
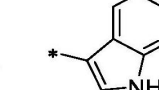

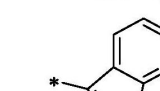

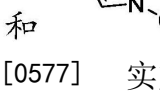
其各自未经取代或经C<sub>1-6</sub>烷基取代。

[0573] 实施例124. 根据实施例121至123中任一项所述的具有式II的化合物或其盐, 其中环A选自

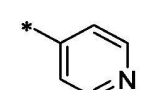
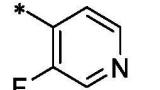
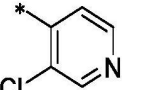
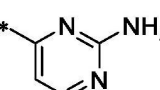
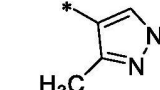
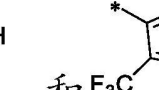
[0574] , , , 和 , 其各自未经取代或经选自卤素、氰基、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基和-NH<sub>2</sub>的取代基取代;

[0575] 或是 , 其未经取代或经C<sub>1-6</sub>烷基取代。

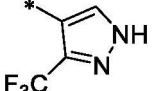
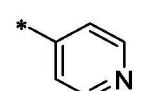
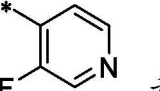
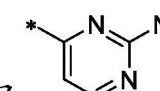
[0576] 实施例125. 根据实施例121至123中任一项所述的具有式II的化合物或其盐, 其中

环A选自 , , , , , , , , , , , , , , , , , , , , 和 .

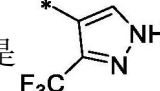
[0577] 实施例126. 根据实施例121至125中任一项所述的具有式II的化合物或其盐, 其中环A选自

[0578] , , , , , 和 .

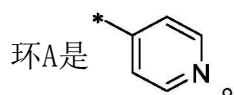
[0579] 实施例127. 根据实施例121至126中任一项所述的具有式II的化合物或其盐, 其中

环A选自 , , , 和 .

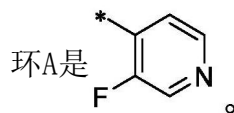
[0580] 实施例128. 根据实施例121至127中任一项所述的具有式II的化合物或其盐, 其中

环A是 .

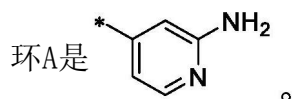
[0581] 实施例129.根据实施例121至127中任一项所述的具有式II的化合物或其盐,其中



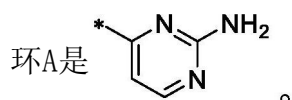
[0582] 实施例130.根据实施例121至127中任一项所述的具有式II的化合物或其盐,其中



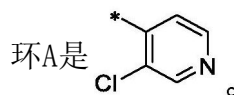
[0583] 实施例131.根据实施例121至127中任一项所述的具有式II的化合物或其盐,其中



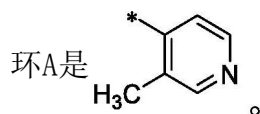
[0584] 实施例132.根据实施例121至127中任一项所述的具有式II的化合物或其盐,其中



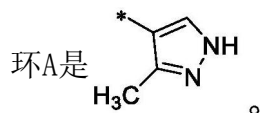
[0585] 实施例133.根据实施例121至125中任一项所述的具有式II的化合物或其盐,其中



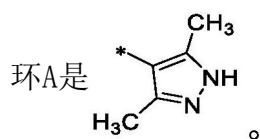
[0586] 实施例134.根据实施例121至125中任一项所述的具有式II的化合物或其盐,其中



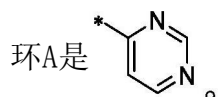
[0587] 实施例135.根据实施例121至126中任一项所述的具有式II的化合物或其盐,其中



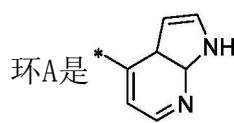
[0588] 实施例136.根据实施例121至123中任一项所述的具有式II的化合物或其盐,其中



[0589] 实施例137.根据实施例121至124中任一项所述的具有式II的化合物或其盐,其中

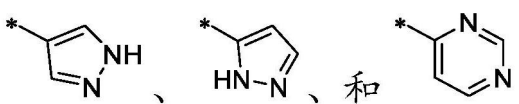


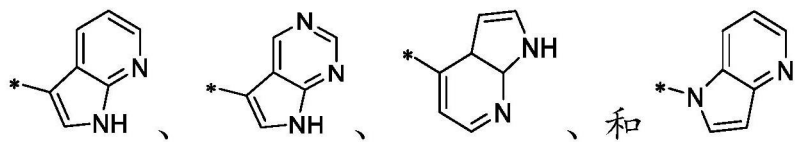
[0590] 实施例138.根据实施例121至125中任一项所述的具有式II的化合物或其盐,其中



[0591] 实施例139.根据实施例121至123中任一项所述的具有式II的化合物或其盐,其中  
环A选自



[0592]  其各自未经取代或经1至2个独立地选自氰基、卤素、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、NH<sub>2</sub>、和C<sub>3-6</sub>环烷基的取代基取代；

[0593] 或选自  其各自未经取代或经C<sub>1-6</sub>烷基取代。

[0594] 实施例140. 根据实施例121至139中任一项所述的具有式II的化合物或其盐, 其中R<sup>1</sup>选自氢、甲基和乙基。

[0595] 实施例141. 根据实施例121至140中任一项所述的具有式II的化合物或其盐, 其中R<sup>1</sup>是甲基。

[0596] 实施例142. 根据实施例121至140中任一项所述的具有式II的化合物或其盐, 其中R<sup>1</sup>是氢。

[0597] 实施例143. 根据实施例121至142中任一项所述的具有式II的化合物或其盐, 其中

[0598] R<sup>2</sup>选自

[0599] (a) 未经取代的或经1至3个独立地选自以下的取代基取代的C<sub>1-8</sub>烷基

[0600] (i) 氰基；

[0601] (ii) C<sub>2</sub>炔基；

[0602] (iii) C<sub>1-6</sub>卤代烷基；

[0603] (iv) -OR<sup>6</sup>, 其中R<sup>6</sup>选自氢、未经取代或经R<sup>0</sup>或-C(O)R<sup>0</sup>取代的C<sub>1-6</sub>烷基；

[0604] (v) -NR<sup>7a</sup>R<sup>7b</sup>, 其中R<sup>7a</sup>是氢或C<sub>1-6</sub>烷基, 并且R<sup>7b</sup>选自氢、-C(O)R<sup>0</sup>、未经取代的或经-C(O)R<sup>0</sup>取代的C<sub>1-6</sub>烷基；

[0605] (vi) -C(O)R<sup>8</sup>, 其中R<sup>8</sup>是R<sup>0</sup>；

[0606] (vii) -S(O)<sub>2</sub>C<sub>1-6</sub>烷基；

[0607] (viii) 未经取代的或经选自C<sub>1-6</sub>烷基、羟基C<sub>1-6</sub>烷基和R<sup>0</sup>的取代基取代的单环C<sub>3-6</sub>环烷基；

[0608] (ix) 6元杂环烷基, 其包含1至2个独立地选自N和O的杂原子作为环成员并且未经取代或经C<sub>1-6</sub>烷基取代；以及

[0609] (x) 未经取代的或经卤素取代的苯基；

[0610] (b) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的C<sub>3-6</sub>环烷基: C<sub>1-6</sub>卤代烷基、R<sup>0</sup>、C<sub>1-6</sub>烷基氨基、-C(O)R<sup>0</sup>和未经取代的或经R<sup>0</sup>或-C(O)R<sup>0</sup>取代的C<sub>1-6</sub>烷基；以及

[0611] (c) 4元杂环烷基, 其包含选自N和O的杂原子作为环成员, 并且未经取代或经1至2个独立地选自以下的取代基取代: C<sub>1-6</sub>卤代烷基、R<sup>0</sup>、C<sub>1-6</sub>烷基氨基、-C(O)R<sup>0</sup>和未经取代的或经R<sup>0</sup>或-C(O)R<sup>0</sup>取代的C<sub>1-6</sub>烷基。

[0612] 实施例144. 根据实施例121至142中任一项所述的具有式II的化合物或其盐, 其中

[0613] R<sup>2</sup>选自

[0614] (a) 未经取代的或经1至3个独立地选自以下的取代基取代的C<sub>1-8</sub>烷基

[0615] (i) 氰基；

- [0616] (ii)  $C_2$ 炔基;
- [0617] (iii)  $C_{1-6}$ 卤代烷基;
- [0618] (iv)  $-OR^6$ , 其中 $R^6$ 选自氢、未经取代或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;
- [0619] (v)  $-NR^{7a}R^{7b}$ , 其中 $R^{7a}$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基, 并且 $R^{7b}$ 选自氢、 $-C(O)R^0$ 、未经取代的或经 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;
- [0620] (vi)  $-C(O)R^8$ , 其中 $R^8$ 是 $R^0$ ;
- [0621] (vii)  $-S(O)_2C_{1-6}$ 烷基;
- [0622] (viii) 未经取代的或经选自 $C_{1-6}$ 烷基、羟基 $C_{1-6}$ 烷基和 $R^0$ 的取代基取代的单环 $C_{3-6}$ 环烷基;
- [0623] (ix) 6元杂环烷基, 其包含1至2个独立地选自N和O的杂原子作为环成员并且未经取代或经 $C_{1-6}$ 烷基取代; 以及
- [0624] (x) 未经取代的或经卤素取代的苯基;
- [0625] 其中 $C_{1-8}$ 烷基的C原子未经取代或经1至3个取代基(i)至(x)取代, 是 $R^2$ 与分子的不是 $-CH_2-$ 基团的其余部分的附接点;
- [0626] (b) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{3-6}$ 环烷基:  $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基; 以及
- [0627] (c) 4元杂环烷基, 其包含选自N和O的杂原子作为环成员, 并且未经取代或经1至2个独立地选自以下的取代基取代:  $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基。
- [0628] 实施例145. 根据实施例121至143中任一项所述的具有式II的化合物或其盐, 其中
- [0629]  $R^2$ 选自
- [0630] (a) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{1-8}$ 烷基
- [0631] (i) 氰基;
- [0632] (ii)  $C_2$ 炔基;
- [0633] (iii)  $C_{1-6}$ 卤代烷基;
- [0634] (iv)  $-OR^6$ , 其中 $R^6$ 选自氢、未经取代或经羟基或 $-C(O)H$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;
- [0635] (v)  $-NR^{7a}R^{7b}$ , 其中 $R^{7a}$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基, 并且 $R^{7b}$ 选自氢、 $-C(O)-C_{1-6}$ 烷氧基、和未经取代的或经 $-C(O)OH$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基; 以及
- [0636] (vi) 未经取代或经羟基取代的单环 $C_{3-6}$ 环烷基; 以及
- [0637] (b) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{3-6}$ 环烷基:  $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、和未经取代的或经羟基或 $-C(O)-C_{1-6}$ 烷氧基取代的 $C_{1-6}$ 烷基。
- [0638] 实施例146. 根据实施例121至145中任一项所述的具有式II的化合物或其盐, 其中
- [0639]  $R^2$ 选自
- [0640] (a) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{1-8}$ 烷基
- [0641] (i)  $C_{1-6}$ 卤代烷基;
- [0642] (ii)  $-OR^6$ , 其中 $R^6$ 选自氢、和未经取代的或经羟基取代的 $C_{1-6}$ 烷基; 以及
- [0643] (iii) 未经取代或经羟基取代的单环 $C_{3-6}$ 环烷基; 以及
- [0644] (b) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{3-6}$ 环烷基:  $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、和未经取代的或经羟基取代的 $C_{1-6}$ 烷基。

[0645] 实施例147.根据实施例121至146中任一项所述的具有式II的化合物或其盐,其中 $R^2$ 是未经取代的或经1至2个独立地选自 $C_{1-6}$ 卤代烷基和 $-OR^6$ 的取代基取代的 $C_{1-6}$ 烷基,其中 $R^6$ 选自氢、和未经取代的或经羟基取代的 $C_{1-6}$ 烷基。

[0646] 实施例148.根据实施例121至147中任一项所述的具有式II的化合物或其盐,其中 $R^2$ 是未经取代的或经羟基取代的 $C_{1-6}$ 烷基。

[0647] 实施例149.根据实施例121至147中任一项所述的具有式II的化合物或其盐,其中 $R^2$ 是未经取代的或经 $C_{1-6}$ 卤代烷基取代的 $C_{1-6}$ 烷基。

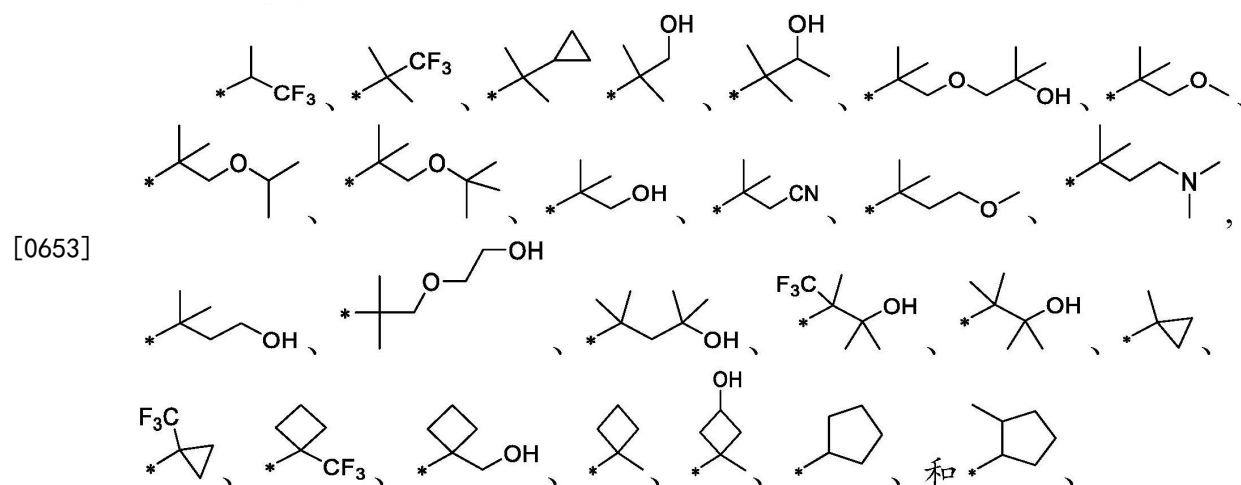
[0648] 实施例150.根据实施例121至147中任一项所述的具有式II的化合物或其盐,其中 $R^2$ 是未经取代的或经 $-O-C_{1-6}$ 烷基 $-OH$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基。

[0649] 实施例151.根据实施例121至146中任一项所述的具有式II的化合物或其盐,其中 $R^2$ 是未经取代的或经选自以下的取代基取代的 $C_{3-6}$ 环烷基: $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、 $R^0$ 和未经取代的或经羟基取代的 $C_{1-6}$ 烷基。

[0650] 实施例152.根据实施例121至146和151中任一项所述的具有式II的化合物或其盐,其中 $R^2$ 是未经取代的 $C_{3-6}$ 环烷基。

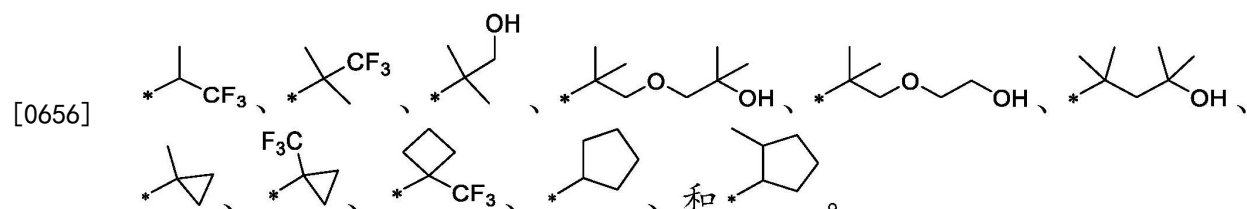
[0651] 实施例153.根据实施例121至146和151中任一项所述的具有式II的化合物或其盐,其中 $R^2$ 是经 $C_{1-6}$ 烷基或 $C_{1-6}$ 卤代烷基取代的 $C_{3-6}$ 环烷基。

[0652] 实施例154.根据实施例121至145中任一项所述的具有式II的化合物或其盐,其中 $R^2$ 选自正丙基、异丙基、仲丁基、叔丁基、2-甲基-丁-2-基、2,4,4-三甲基戊-2-基、

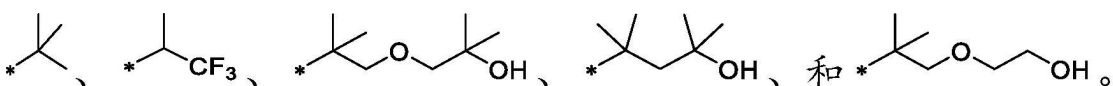


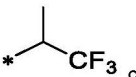
[0654] 其中“\*”代表 $R^2$ 与分子其余部分的附接点。


[0655] 实施例155.根据实施例121至143和145至147中任一项所述的具有式II的化合物或其盐,其中 $R^2$ 选自正丙基、异丙基、叔丁基、

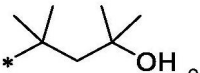


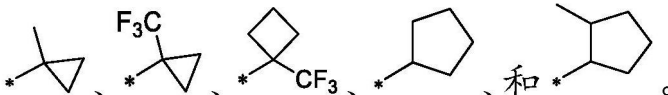
[0657] 实施例156.根据实施例121至147、154和155中任一项所述的具有式II的化合物或其盐,其中 $R^2$ 选自


[0658] 。


[0659] 实施例157.根据实施例121至147、149和154至156中任一项所述的具有式II的化合物或其盐,其中R<sup>2</sup>是 。

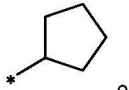
[0660] 实施例158.根据实施例121至147、150和154至156中任一项所述的具有式II的化合物或其盐,其中R<sup>2</sup>是 。

[0661] 实施例159.根据实施例121至147、151和154至156中任一项所述的具有式II的化合物或其盐,其中R<sup>2</sup>是 。

[0662] 实施例160.根据实施例121至146、151、154和155中任一项所述的具有式II的化合物或其盐,其中R<sup>2</sup>选自 。

[0663] 实施例161.根据实施例121至146、151、153至155和160中任一项所述的具有式II的化合物或其盐,其中R<sup>2</sup>是 。

[0664] 实施例162.根据实施例121至136、151、153至155和160中任一项所述的具有式II的化合物或其盐,其中R<sup>2</sup>是 。

[0665] 实施例163.根据实施例121至136、151、152、154、155和160中任一项所述的具有式II的化合物或其盐,其中R<sup>2</sup>是 。

[0666] 实施例164.根据实施例121至133、135至150、和155中任一项所述的具有式II的化合物或其盐,其中R<sup>2</sup>选自正丙基、异丙基和叔丁基。

[0667] 实施例165.根据实施例121至143、145至150、155、和164中任一项所述的具有式II的化合物或其盐,其中R<sup>2</sup>是正丙基。

[0668] 实施例166.根据实施例121至150、155和164中任一项所述的具有式II的化合物或其盐,其中R<sup>2</sup>是异丙基。

[0669] 实施例167.根据实施例121至150、155和164中任一项所述的具有式II的化合物或其盐,其中R<sup>2</sup>是叔丁基。

[0670] 实施例168.根据实施例121至139中任一项所述的具有式II的化合物或其盐,其中R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>与两者都结合的氮原子一起形成4至6元杂环烷基,所述杂环烷基可以包含1至2个独立地选自N、O和S的其他杂原子作为环成员,其中由R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>与两者都结合的氮原子一起形成的4至6元杂环烷基未经取代或经1至3个独立地选自卤素、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基以及R<sup>0</sup>的取代基取代。

[0671] 实施例169. 根据实施例121至139和168中任一项所述的具有式II的化合物或其盐, 其中 $R^1$ 和 $R^2$ 与两者都结合的氮原子一起形成5或6元杂环烷基, 所述杂环烷基可以包含1至2个选自N、O和S的其他杂原子作为环成员, 其中由 $R^1$ 和 $R^2$ 与两者都结合的氮原子一起形成的5或6元杂环烷基未经取代或经1至3个独立地选自羟基、 $C_{1-4}$ 烷基、和 $C_{1-4}$ 卤代烷基的取代基取代。

[0672] 实施例170. 根据实施例121至139、168和169中任一项所述的具有式II的化合物或其盐, 其中 $R^1$ 和 $R^2$ 与两者都结合的氮原子一起形成6元杂环烷基, 所述杂环烷基可以包含选自N和O的其他杂原子作为环成员, 其中由 $R^1$ 和 $R^2$ 与两者都结合的氮原子一起形成的6元杂环烷基未经取代或经1至3个独立地选自羟基、 $C_{1-6}$ 烷基、和 $C_{1-6}$ 卤代烷基的取代基取代。

[0673] 实施例171. 根据实施例121至139和168至170中任一项所述的具有式II的化合物或其盐, 其中 $R^1$ 和 $R^2$ 与两者都结合的氮原子一起形成选自哌啶基、哌嗪基和吗啉基的6-元杂环烷基, 其中所述哌啶基、哌嗪基或吗啉基未经取代或经1至3个独立地选自羟基和 $C_{1-6}$ 烷基的取代基取代。

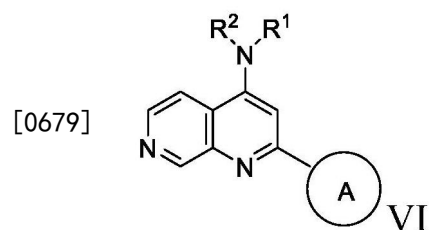
[0674] 实施例172. 根据实施例121至171中任一项所述的具有式II的化合物或其盐, 其中 $R^3$ 选自氢、氯和甲基。

[0675] 实施例173. 根据实施例121至172中任一项所述的具有式II的化合物或其盐, 其中 $R^3$ 是氢。

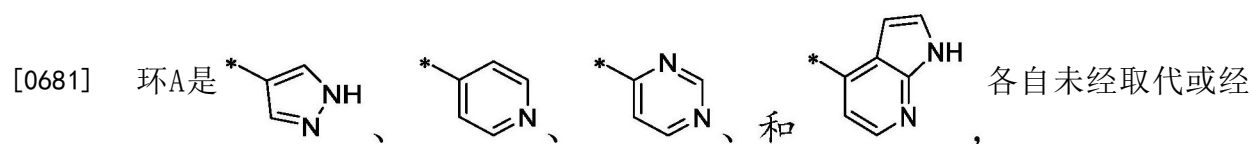
[0676] 实施例174. 根据实施例121至173中任一项所述的具有式II的化合物或其盐, 其中 $R^5$ 选自氢和氯。

[0677] 实施例175. 根据实施例121至174中任一项所述的具有式II的化合物或其盐, 其中 $R^5$ 是氢。

[0678] 实施例176. 根据实施例121所述的具有式II的化合物或其盐, 其中所述化合物具有式VI:



[0680] 其中



选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基和 $-NH_2$ 的取代基取代;

[0682]  $R^1$ 是氢或未经取代的 $C_{1-6}$ 烷基; 并且

[0683]  $R^2$ 是

[0684] (a) 未经取代的或经选自以下的取代基取代的 $C_{1-8}$ 烷基

[0685] (i) 二- $C_{1-6}$ 烷基氨基;

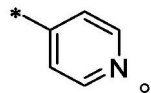
[0686] (ii)  $C_{1-6}$ 卤代烷基;

[0687] (iii)  $-OR^6$ , 其中  $R^6$  选自氢、未经取代的或经  $R^0$  取代的  $C_{1-6}$  烷基; 或

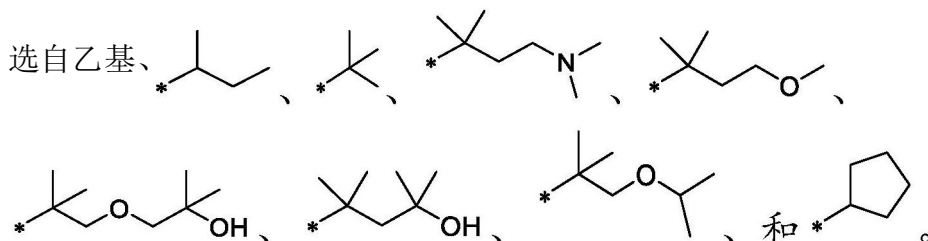
[0688] (b) 未经取代的或经  $C_{1-6}$  烷基或  $C_{1-6}$  卤代烷基取代的单环  $C_{3-6}$  环烷基;

[0689] 或  $R^1$  和  $R^2$  可以与它们结合的氮一起形成6元杂环烷基, 所述6元杂环烷基未经取代或经选自  $C_{1-6}$  烷基和羟基的1至3个取代基取代。

[0690] 实施例177. 根据实施例176所述的具有式II的化合物或其盐, 其中环A是



[0691] 实施例178. 根据实施例176或实施例177所述的具有式II的化合物或其盐, 其中  $R^2$



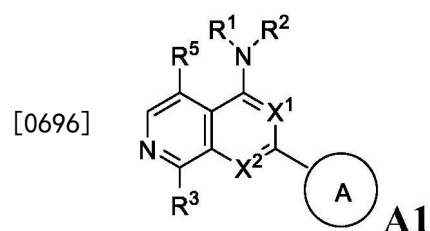
[0692] 实施例179. 根据实施例176至178中任一项所述的具有式II的化合物或其盐, 其中  $R^2$  是叔丁基。

[0693] 实施例180. 根据实施例121所述的具有式II的化合物或其盐, 选自N-(4-甲氧基-2-甲基丁-2-基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺; N-[2-甲基-1-(丙-2-基氧基)丙-2-基]-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺; N-[(2S)-丁-2-基]-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺; N-[(2R)-丁-2-基]-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺; N-(1-甲氧基-2-甲基丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺; N-甲基-N-(丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺; 3-甲基-3-[[2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-基]氨基]丁-1-醇; N-叔-丁基-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺; 2,2-二甲基-1-[2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-基]哌啶-4-醇; 2,4-二甲基-4-[[2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-基]氨基]戊-2-醇; N-环戊基-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺; 二甲基(3-甲基-3-[[2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-基]氨基]丁基)胺; N,N-二乙基-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺; 2-甲基-1-(2-甲基-2-[[2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-基]氨基]丙氧基)丙-2-醇; N-丙基-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺; N-叔-丁基-2-(3-甲基-1H-吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺; N-叔-丁基-2-(嘧啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺; 2-(2-氨基嘧啶-4-基)-N-叔-丁基-1,7-萘啶-4-胺; N-叔-丁基-2-{1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-4-基}-1,7-萘啶-4-胺; N-叔-丁基-2-(哒嗪-4-基)-1,7-萘啶-4-胺; 2-(2-氨基吡啶-4-基)-N-叔-丁基-1,7-萘啶-4-胺; N,N-二乙基-2-(3-氟吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺; (3-[[2-(3-氟吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-基]氨基]-3-甲基丁基)二甲基胺; 2-(3-氟吡啶-4-基)-N-甲基-N-(丙-2-基)-1,7-萘啶-4-胺; 2-(3-氟吡啶-4-基)-4-(哌啶-1-基)-1,7-萘啶; 2-(3-氟吡啶-4-基)-4-(吗啉-4-基)-1,7-萘啶; N-叔-丁基-2-(3-氟吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺; 2-(3-氟吡啶-4-基)-N-(2-甲基丁-2-基)-1,7-萘啶-4-胺; 2-[[2-(3-氟吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-基]氨基]-2-甲基丙-1-醇; 1-[2-(3-氯吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-基]-2,2-二甲基哌啶-4-醇; 2-(3-氟吡啶-4-基)-N-[2-甲基-1-(吗啉-4-基)丙-2-基]-1,7-萘啶-4-胺; N-叔-丁基-2-(嘧啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺; 2-(吡啶-4-基)-N-[1-(三氟甲基)环丁基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; N-叔-丁基-2-(3-氯吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺; 和2-(3-氯吡啶-4-基)-N,N-二乙

基-1,7-萘啶-4-胺。

[0694] 实施例180a. 根据实施例121所述的具有式II的化合物或其盐, 其中所述化合物是N-(叔-丁基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺。

[0695] 实施例181. 一种具有式A1的化合物或其盐,



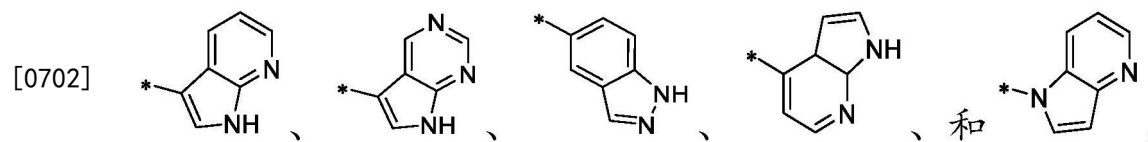
[0697] 用于在眼疾病或障碍中使用, 其中

[0698]  $X^1$ 和 $X^2$ 各自独立地是CH或N;

[0699] 环A是

[0700] (a) 5或6元单环杂芳基, 其通过碳环成员与分子的其余部分连接, 并包含1至4个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员, 条件是所述杂原子环成员中至少一个是在5元杂芳基的相对于连接碳环成员的3位或4位的或在6元杂芳基的对位环位置上的未经取代的氮(-N=); 或

[0701] (b) 选自以下的9元稠合双环杂芳基



[0703] 其中“\*”代表环A与分子其余部分的附接点;

[0704] 其中环A未经取代或经1至2个独立地选自卤素、氰基、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $-NH_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $C_{3-6}$ 环烷基和苯基磺酰基的取代基取代;

[0705]  $R^0$ 是羟基或 $C_{1-6}$ 烷氧基;

[0706]  $R^1$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基;

[0707]  $R^2$ 选自

[0708] (a) 未经取代的或经1至3个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{1-8}$ 烷基

[0709] (i) 卤素;

[0710] (ii) 氰基;

[0711] (iii) 氧代;

[0712] (iv)  $C_2$ 烯基;

[0713] (v)  $C_2$ 炔基;

[0714] (vi)  $C_{1-6}$ 卤代烷基;

[0715] (vii)  $-OR^6$ , 其中 $R^6$ 选自氢、未经取代或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;

[0716] (viii)  $-NR^{7a}R^{7b}$ , 其中 $R^{7a}$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基, 并且 $R^{7b}$ 选自氢、 $-C(O)R^0$ 、未经取代的或经 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;

[0717] (ix)  $-C(O)R^8$ , 其中 $R^8$ 是 $R^0$ 或 $-NH-C_{1-6}$ 烷基- $C(O)R^0$ ;

[0718] (x)  $-S(O)_2C_{1-6}$ 烷基;

[0719] (xi) 单环 $C_{3-6}$ 环烷基或多环 $C_{7-10}$ 环烷基,其各自未经取代或经1至2个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、羟基 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $-NH_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基和二- ( $C_{1-6}$ 烷基) 氨基的取代基取代;

[0720] (xii) 6元杂环烷基,其包含1至2个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员并且未经取代或经1至2个独立地选自羟基、卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 烷基氨基和二- ( $C_{1-6}$ 烷基) 氨基的取代基取代;

[0721] (xiii) 未经取代的或经卤素取代的苯基;

[0722] (xiv) 5或6元单环杂芳基,其包含1至4个独立地选自N和O的杂原子作为环成员;以及

[0723] (xv) 9或10元稠合双环杂芳基,其包含1至2个独立地选自N和O的杂原子作为环成员;

[0724] (b)  $-S(O)_2C_{1-6}$ 烷基;

[0725] (c) 未经取代的或经1至2个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基和 $R^0$ 的取代基取代的苯基;

[0726] (d) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{3-6}$ 环烷基: $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- ( $C_{1-6}$ 烷基) 氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;以及

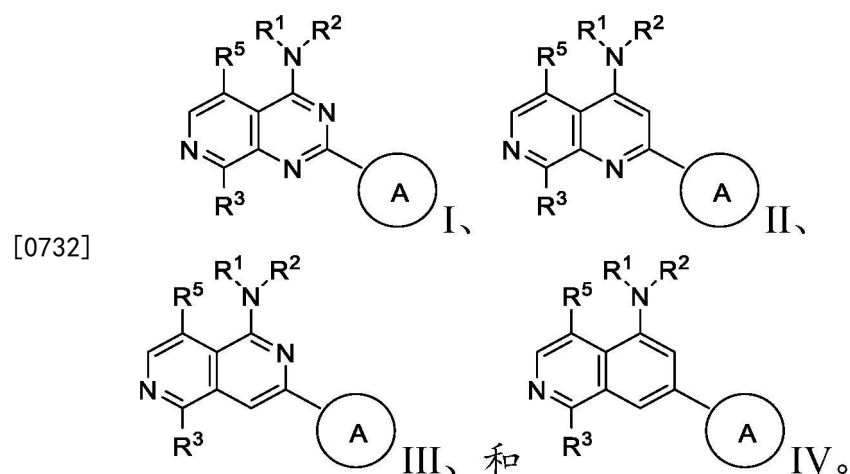
[0727] (e) 4元杂环烷基,其包含1至2个选自N、O和S的杂原子作为环成员,并且未经取代或经1至2个独立地选自以下的取代基取代: $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- ( $C_{1-6}$ 烷基) 氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;

[0728] 或 $R^1$ 和 $R^2$ 可以与两者都结合的氮原子一起形成4至6元杂环烷基,所述杂环烷基可以包含1至2个独立地选自N、O和S的其他杂原子作为环成员,其中由 $R^1$ 和 $R^2$ 与两者都结合的氮原子一起形成的4至6元杂环烷基未经取代或经1至3个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基以及 $R^0$ 的取代基取代;

[0729]  $R^3$ 选自氢、卤素和 $C_{1-6}$ 烷基;并且

[0730]  $R^5$ 选自氢、卤素和 $-NH-$  (3至8元杂烷基),其中 $-NH-$  (3至8元杂烷基) 的3至8元杂 $C_{3-8}$ 烷基包含1至2个氧原子作为链成员且未经取代或经 $R^0$ 取代。

[0731] 实施例182.一种具有式A1的化合物或其盐,用于在根据实施例181所述的眼疾病或障碍中使用,其中所述化合物具有选自式I至IV的式:



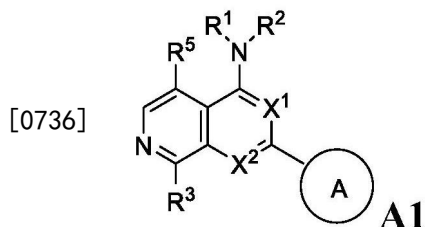
[0733] 实施例183.一种具有式A1的化合物或其盐,用于在根据实施例181所述的眼疾病



或障碍中使用,其中所述化合物选自3-(吡啶-4-基)-N-(1-(三氟甲基)环丙基)-2,6-萘啶-1-胺;N-(1-甲基环丙基)-7-(吡啶-4-基)异喹啉-5-胺;2-(吡啶-4-基)-4-(3-(三氟甲基)哌嗪-1-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶;N-(叔-丁基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;和N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-[(2S)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺。

[0734] 实施例184.一种具有式A1的化合物或其盐,用于在根据实施例181所述的眼疾病或障碍中使用,其中所述化合物是根据实施例1至180中任一项所述的化合物。

[0735] 实施例185.具有式A1的化合物或其盐



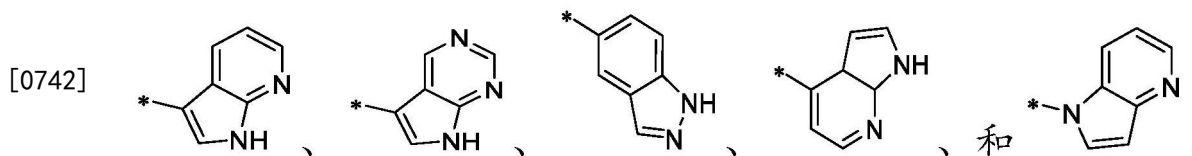
[0737] 在产生、优选离体产生扩增的角膜缘干细胞群的方法中的用途,其中

[0738]  $X^1$ 和 $X^2$ 各自独立地是CH或N;

[0739] 环A是

[0740] (a) 5或6元单环杂芳基,其通过碳环成员与分子的其余部分连接,并包含1至4个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员,条件是所述杂原子环成员中至少一个是在5元杂芳基的相对于连接碳环成员的3位或4位的或在6元杂芳基的对位环位置上的未经取代的氮(-N=);或

[0741] (b) 选自以下的9元稠合双环杂芳基



[0743] 其中“\*”代表环A与分子其余部分的附接点;

[0744] 其中环A未经取代或经1至2个独立地选自卤素、氰基、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $-NH_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二-( $C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $C_{3-6}$ 环烷基和苯基磺酰基的取代基取代;

[0745]  $R^0$ 是羟基或 $C_{1-6}$ 烷氧基;

[0746]  $R^1$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基;

[0747]  $R^2$ 选自

[0748] (a) 未经取代的或经1至3个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{1-8}$ 烷基

[0749] (i) 卤素;

[0750] (ii) 氰基;

[0751] (iii) 氧代;

[0752] (iv)  $C_2$ 烯基;

[0753] (v)  $C_2$ 炔基;

[0754] (vi)  $C_{1-6}$ 卤代烷基;

[0755] (vii)  $-OR^6$ ,其中 $R^6$ 选自氢、未经取代或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;

[0756] (viii)  $-NR^{7a}R^{7b}$ ,其中 $R^{7a}$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基,并且 $R^{7b}$ 选自氢、 $-C(O)R^0$ 、未经取代的或

经-C(O)R<sup>0</sup>取代的C<sub>1-6</sub>烷基;

[0757] (ix) -C(O)R<sup>8</sup>, 其中R<sup>8</sup>是R<sup>0</sup>或-NH-C<sub>1-6</sub>烷基-C(O)R<sup>0</sup>;

[0758] (x) -S(O)<sub>2</sub>C<sub>1-6</sub>烷基;

[0759] (xi) 单环C<sub>3-6</sub>环烷基或多环C<sub>7-10</sub>环烷基, 其各自未经取代或经1至2个独立地选自卤素、C<sub>1-6</sub>烷基、羟基C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、R<sup>0</sup>、-NH<sub>2</sub>、C<sub>1-6</sub>烷基氨基和二-(C<sub>1-6</sub>烷基)氨基的取代基取代;

[0760] (xii) 6元杂环烷基, 其包含1至2个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员并且未经取代或经1至2个独立地选自羟基、卤素、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>烷基氨基和二-(C<sub>1-6</sub>烷基)氨基的取代基取代;

[0761] (xiii) 未经取代的或经卤素取代的苯基;

[0762] (xiv) 5或6元单环杂芳基, 其包含1至4个独立地选自N和O的杂原子作为环成员; 以及

[0763] (xv) 9或10元稠合双环杂芳基, 其包含1至2个独立地选自N和O的杂原子作为环成员;

[0764] (b) -S(O)<sub>2</sub>C<sub>1-6</sub>烷基;

[0765] (c) 未经取代的或经1至2个独立地选自卤素、C<sub>1-6</sub>烷基和R<sup>0</sup>的取代基取代的苯基;

[0766] (d) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的C<sub>3-6</sub>环烷基: C<sub>1-6</sub>卤代烷基、R<sup>0</sup>、C<sub>1-6</sub>烷基氨基、二-(C<sub>1-6</sub>烷基)氨基、-C(O)R<sup>0</sup>和未经取代的或经R<sup>0</sup>或-C(O)R<sup>0</sup>取代的C<sub>1-6</sub>烷基; 以及

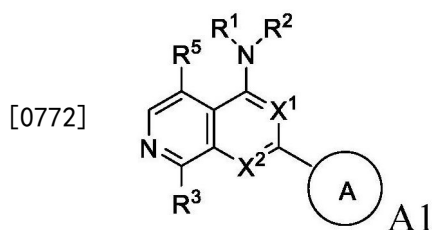
[0767] (e) 4元杂环烷基, 其包含1至2个选自N、O和S的杂原子作为环成员, 并且未经取代或经1至2个独立地选自以下的取代基取代: C<sub>1-6</sub>卤代烷基、R<sup>0</sup>、C<sub>1-6</sub>烷基氨基、二-(C<sub>1-6</sub>烷基)氨基、-C(O)R<sup>0</sup>和未经取代的或经R<sup>0</sup>或-C(O)R<sup>0</sup>取代的C<sub>1-6</sub>烷基;

[0768] 或R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>可以与两者都结合的氮原子一起形成4至6元杂环烷基, 所述杂环烷基可以包含1至2个独立地选自N、O和S的其他杂原子作为环成员, 其中由R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>与两者都结合的氮原子一起形成的4至6元杂环烷基未经取代或经1至3个独立地选自卤素、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基以及R<sup>0</sup>的取代基取代;

[0769] R<sup>3</sup>选自氢、卤素和C<sub>1-6</sub>烷基; 以及

[0770] R<sup>5</sup>选自氢、卤素和-NH-(3至8元杂烷基), 其中-NH-(3至8元杂烷基)的3至8元杂C<sub>3-8</sub>烷基包含1至2个氧原子作为链成员且未经取代或经R<sup>0</sup>取代。

[0771] 实施例186. 具有式A1的化合物或其盐



[0773] 在产生、优选离体产生扩增的角膜内皮细胞群的方法中的用途, 其中

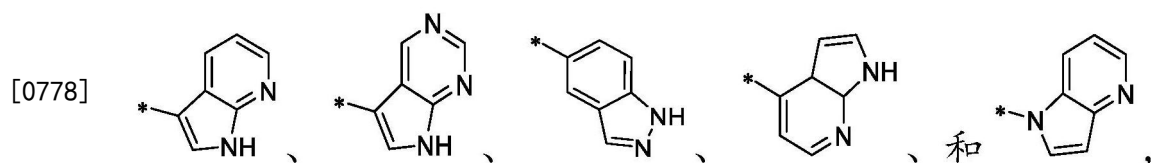
[0774] X<sup>1</sup>和X<sup>2</sup>各自独立地是CH或N;

[0775] 环A是

[0776] (a) 5或6元单环杂芳基, 其通过碳环成员与分子的其余部分连接, 并包含1至4个独

立地选自N、O和S的杂原子作为环成员,条件是所述杂原子环成员中至少一个是在5元杂芳基的相对于连接碳环成员的3位或4位的或在6元杂芳基的对位环位置上的未经取代的氮(-N=);或

[0777] (b) 选自以下的9元稠合双环杂芳基



[0779] 其中“\*”代表环A与分子其余部分的附接点;

[0780] 其中环A未经取代或经1至2个独立地选自卤素、氰基、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $-NH_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $C_{3-6}$ 环烷基和苯基磺酰基的取代基取代;

[0781]  $R^0$ 是羟基或 $C_{1-6}$ 烷氧基;

[0782]  $R^1$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基;

[0783]  $R^2$ 选自

[0784] (a) 未经取代的或经1至3个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{1-8}$ 烷基

[0785] (i) 卤素;

[0786] (ii) 氰基;

[0787] (iii) 氧代;

[0788] (iv)  $C_2$ 烯基;

[0789] (v)  $C_2$ 炔基;

[0790] (vi)  $C_{1-6}$ 卤代烷基;

[0791] (vii)  $-OR^6$ , 其中 $R^6$ 选自氢、未经取代或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;

[0792] (viii)  $-NR^{7a}R^{7b}$ , 其中 $R^{7a}$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基, 并且 $R^{7b}$ 选自氢、 $-C(O)R^0$ 、未经取代的或经 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;

[0793] (ix)  $-C(O)R^8$ , 其中 $R^8$ 是 $R^0$ 或 $-NH-C_{1-6}$ 烷基- $-C(O)R^0$ ;

[0794] (x)  $-S(O)_2C_{1-6}$ 烷基;

[0795] (xi) 单环 $C_{3-6}$ 环烷基或多环 $C_{7-10}$ 环烷基, 其各自未经取代或经1至2个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、羟基 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $-NH_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基和二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基的取代基取代;

[0796] (xii) 6元杂环烷基, 其包含1至2个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员并且未经取代或经1至2个独立地选自羟基、卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 烷基氨基和二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基的取代基取代;

[0797] (xiii) 未经取代的或经卤素取代的苯基;

[0798] (xiv) 5或6元单环杂芳基, 其包含1至4个独立地选自N和O的杂原子作为环成员; 以及

[0799] (xv) 9或10元稠合双环杂芳基, 其包含1至2个独立地选自N和O的杂原子作为环成员;

[0800] (b)  $-S(O)_2C_{1-6}$ 烷基;

[0801] (c) 未经取代的或经1至2个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基和 $R^0$ 的取代基取代的苯基;

[0802] (d) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{3-6}$ 环烷基： $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- ( $C_{1-6}$ 烷基) 氨基、-C(O) $R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或-C(O) $R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；以及

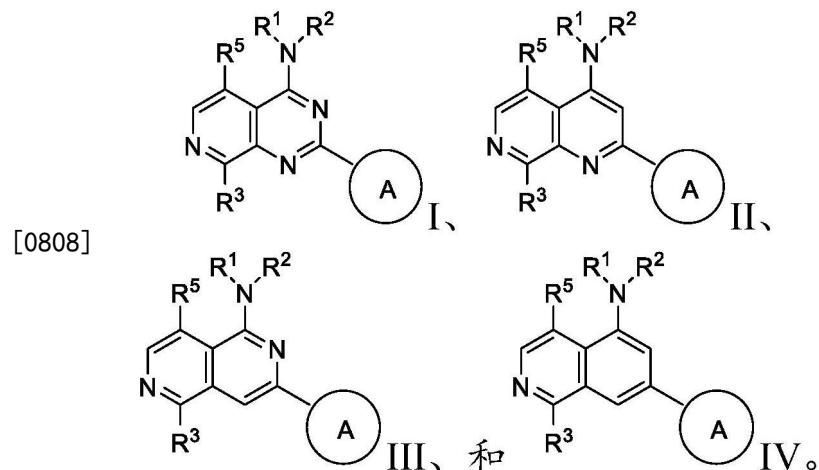
[0803] (e) 4元杂环烷基，其包含1至2个选自N、O和S的杂原子作为环成员，并且未经取代或经1至2个独立地选自以下的取代基取代： $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- ( $C_{1-6}$ 烷基) 氨基、-C(O) $R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或-C(O) $R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；

[0804] 或 $R^1$ 和 $R^2$ 可以与两者都结合的氮原子一起形成4至6元杂环烷基，所述杂环烷基可以包含1至2个独立地选自N、O和S的其他杂原子作为环成员，其中由 $R^1$ 和 $R^2$ 与两者都结合的氮原子一起形成的4至6元杂环烷基未经取代或经1至3个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基以及 $R^0$ 的取代基取代；

[0805]  $R^3$ 选自氢、卤素和 $C_{1-6}$ 烷基；以及

[0806]  $R^5$ 选自氢、卤素和-NH- (3至8元杂烷基)，其中-NH- (3至8元杂烷基) 的3至8元杂 $C_{3-8}$ 烷基包含1至2个氧原子作为链成员且未经取代或经 $R^0$ 取代。

[0807] 实施例187. 根据实施例185或186所述的具有式A1的化合物或其盐的用途，其中所述化合物具有选自式I至IV的式：



[0809] 实施例188. 根据实施例185或186所述的具有式A1的化合物或其盐的用途，其中所述化合物选自3- (吡啶-4-基) -N- (1- (三氟甲基) 环丙基) -2,6-萘啶-1-胺；N- (1-甲基环丙基) -7- (吡啶-4-基) 异喹啉-5-胺；和2- (吡啶-4-基) -4- (3- (三氟甲基) 哌嗪-1-基) 吡啶并[3,4-d]嘧啶。

[0810] 实施例188A. 根据实施例185或186所述的具有式A1的化合物或其盐的用途，其中所述化合物选自：N-甲基-2- (吡啶-4-基) -N- (1,1,1-三氟丙-2-基) 吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺；2-甲基-1- (2-甲基-2- { [2- (吡啶-4-基) 吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基] 氨基} 丙氧基) 丙-2-醇；2,4-二甲基-4- { [2- (吡啶-4-基) 吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基] 氨基} 戊-2-醇；N-叔-丁基-2- (嘧啶-4-基) -1,7-萘啶-4-胺；2- (吡啶-4-基) -N- [1- (三氟甲基) 环丁基] 吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺；N-丙基-2- (吡啶-4-基) 吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺；N- (丙-2-基) -2- (吡啶-4-基) 吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺；3- (吡啶-4-基) -N- (1- (三氟甲基) 环丙基) -2,6-萘啶-1-胺；2- (3-甲基-1H-吡唑-4-基) -N- (1-甲基环丙基) 吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺；2-甲基-2- { [2- (吡啶-4-基) 吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基] 氨基} 丙-1-醇；2- (吡啶-4-基) -4- (3- (三氟甲基) 哌嗪-1-基) 吡啶并[3,4-d]嘧啶；N-环戊基-2- (吡啶-4-基) 吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺；N-丙

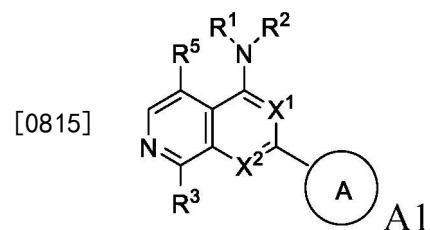
基-2-(3-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(2-甲基环戊基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-氯吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟-2-甲基丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(2-甲基-2-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]丙氧基)乙-1-醇;N-(1-甲基环丙基)-7-(吡啶-4-基)异喹啉-5-胺;(1S,2S)-2-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]环戊-1-醇;N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-[(2S)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-甲基-N-(丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;3-(吡啶-4-基)-N-(1-(三氟甲基)环丙基)-2,6-萘啶-1-胺和N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-[(2R)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺。

[0811] 实施例188B.根据实施例185或186所述的具有式AI的化合物或其盐的用途,其中所述化合物选自:N-(叔-丁基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;和N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-[(2S)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺。

[0812] 实施例188C.根据实施例185或186所述的具有式AI的化合物或其盐的用途,其中所述化合物是N-(叔-丁基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺。

[0813] 实施例189.根据实施例185或186所述的具有式AI的化合物或其盐的用途,其中所述化合物是根据实施例1至180中的任一个。

[0814] 实施例190.一种治疗眼疾病或障碍的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用细胞群,其中所述细胞群已经在具有式AI的化合物或其盐的存在下生长,



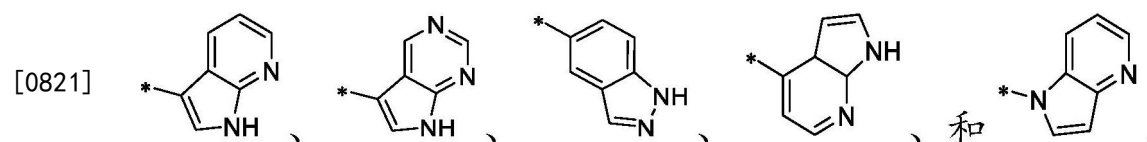
[0816] 其中

[0817]  $X^1$ 和 $X^2$ 各自独立地是CH或N;

[0818] 环A是

[0819] (a) 5或6元单环杂芳基,其通过碳环成员与分子的其余部分连接,并包含1至4个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员,条件是所述杂原子环成员中至少一个是在5元杂芳基的相对于连接碳环成员的3位或4位的或在6元杂芳基的对位环位置上的未经取代的氮(-N=);或

[0820] (b) 选自以下的9元稠合双环杂芳基



[0822] 其中“\*”代表环A与分子其余部分的附接点;

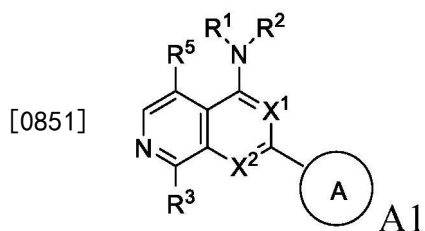
[0823] 其中环A未经取代或经1至2个独立地选自卤素、氰基、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $-NH_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二-( $C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $C_{3-6}$ 环烷基和苯基磺酰基的取代基取代;

[0824]  $R^0$ 是羟基或 $C_{1-6}$ 烷氧基;

- [0825]  $R^1$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基；
- [0826]  $R^2$ 选自
- [0827] (a) 未经取代的或经1至3个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{1-8}$ 烷基
- [0828] (i) 卤素；
- [0829] (ii) 氰基；
- [0830] (iii) 氧代；
- [0831] (iv)  $C_2$ 烯基；
- [0832] (v)  $C_2$ 炔基；
- [0833] (vi)  $C_{1-6}$ 卤代烷基；
- [0834] (vii)  $-OR^6$ ，其中 $R^6$ 选自氢、未经取代或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；
- [0835] (viii)  $-NR^{7a}R^{7b}$ ，其中 $R^{7a}$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基，并且 $R^{7b}$ 选自氢、 $-C(O)R^0$ 、未经取代的或经 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；
- [0836] (ix)  $-C(O)R^8$ ，其中 $R^8$ 是 $R^0$ 或 $-NH-C_{1-6}$ 烷基 $-C(O)R^0$ ；
- [0837] (x)  $-S(O)_2C_{1-6}$ 烷基；
- [0838] (xi) 单环 $C_{3-6}$ 环烷基或多环 $C_{7-10}$ 环烷基，其各自未经取代或经1至2个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、羟基 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $-NH_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基和二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基的取代基取代；
- [0839] (xii) 6元杂环烷基，其包含1至2个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员并且未经取代或经1至2个独立地选自羟基、卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 烷基氨基和二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基的取代基取代；
- [0840] (xiii) 未经取代的或经卤素取代的苯基；
- [0841] (xiv) 5或6元单环杂芳基，其包含1至4个独立地选自N和O的杂原子作为环成员；以及
- [0842] (xv) 9或10元稠合双环杂芳基，其包含1至2个独立地选自N和O的杂原子作为环成员；
- [0843] (b)  $-S(O)_2C_{1-6}$ 烷基；
- [0844] (c) 未经取代的或经1至2个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基和 $R^0$ 的取代基取代的苯基；
- [0845] (d) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{3-6}$ 环烷基： $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；以及
- [0846] (e) 4元杂环烷基，其包含1至2个选自N、O和S的杂原子作为环成员，并且未经取代或经1至2个独立地选自以下的取代基取代： $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；
- [0847] 或 $R^1$ 和 $R^2$ 可以与两者都结合的氮原子一起形成4至6元杂环烷基，所述杂环烷基可以包含1至2个独立地选自N、O和S的其他杂原子作为环成员，其中由 $R^1$ 和 $R^2$ 与两者都结合的氮原子一起形成的4至6元杂环烷基未经取代或经1至3个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基以及 $R^0$ 的取代基取代；
- [0848]  $R^3$ 选自氢、卤素和 $C_{1-6}$ 烷基；以及
- [0849]  $R^5$ 选自氢、卤素和 $-NH-$  (3至8元杂烷基)，其中 $-NH-$  (3至8元杂烷基)的3至8元杂 $C_{3-8}$

烷基包含1至2个氧原子作为链成员且未经取代或经R<sup>0</sup>取代。

[0850] 实施例190A. 一种治疗眼疾病或障碍的方法, 所述方法包括向有需要的受试者施用角膜缘干细胞群, 其中所述群已经在具有式A1的化合物或其盐的存在下生长,



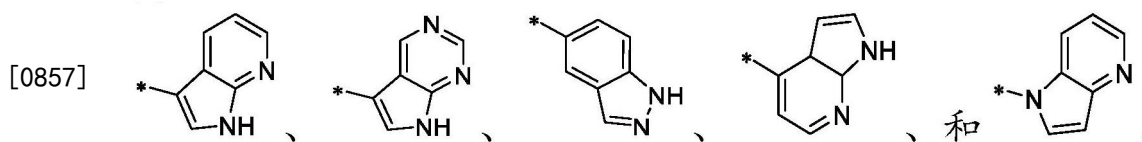
[0852] 其中

[0853] X<sup>1</sup>和X<sup>2</sup>各自独立地是CH或N;

[0854] 环A是

[0855] (a) 5或6元单环杂芳基, 其通过碳环成员与分子的其余部分连接, 并包含1至4个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员, 条件是所述杂原子环成员中至少一个是在5元杂芳基的相对于连接碳环成员的3位或4位的或在6元杂芳基的对位环位置上的未经取代的氮(-N=); 或

[0856] (b) 选自以下的9元稠合双环杂芳基



[0858] 其中“\*”代表环A与分子其余部分的附接点;

[0859] 其中环A未经取代或经1至2个独立地选自卤素、氰基、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>卤代烷基、-NH<sub>2</sub>、C<sub>1-6</sub>烷基氨基、二-(C<sub>1-6</sub>烷基)氨基、C<sub>3-6</sub>环烷基和苯基磺酰基的取代基取代;

[0860] R<sup>0</sup>是羟基或C<sub>1-6</sub>烷氧基;

[0861] R<sup>1</sup>是氢或C<sub>1-6</sub>烷基;

[0862] R<sup>2</sup>选自

[0863] (a) 未经取代的或经1至3个独立地选自以下的取代基取代的C<sub>1-8</sub>烷基

[0864] (i) 卤素;

[0865] (ii) 氰基;

[0866] (iii) 氧代;

[0867] (iv) C<sub>2</sub>烯基;

[0868] (v) C<sub>2</sub>炔基;

[0869] (vi) C<sub>1-6</sub>卤代烷基;

[0870] (vii) -OR<sup>6</sup>, 其中R<sup>6</sup>选自氢、未经取代的或经R<sup>0</sup>或-C(O)R<sup>0</sup>取代的C<sub>1-6</sub>烷基;

[0871] (viii) -NR<sup>7a</sup>R<sup>7b</sup>, 其中R<sup>7a</sup>是氢或C<sub>1-6</sub>烷基, 并且R<sup>7b</sup>选自氢、-C(O)R<sup>0</sup>、未经取代的或经-C(O)R<sup>0</sup>取代的C<sub>1-6</sub>烷基;

[0872] (ix) -C(O)R<sup>8</sup>, 其中R<sup>8</sup>是R<sup>0</sup>或-NH-C<sub>1-6</sub>烷基-C(O)R<sup>0</sup>;

[0873] (x) -S(O)<sub>2</sub>C<sub>1-6</sub>烷基;

[0874] (xi) 单环C<sub>3-6</sub>环烷基或多环C<sub>7-10</sub>环烷基, 其各自是未取代的或被1-2个独立地选自

卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、羟基 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $-NH_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基和二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基的取代基取代；

[0875] (xii) 6元杂环烷基，其包含1至2个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员并且未经取代或经1至2个独立地选自羟基、卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 烷基氨基和二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基的取代基取代；

[0876] (xiii) 未经取代的或经卤素取代的苯基；

[0877] (xiv) 5或6元单环杂芳基，其包含1至4个独立地选自N和O的杂原子作为环成员；以及

[0878] (xv) 9或10元稠合双环杂芳基，其包含1至2个独立地选自N和O的杂原子作为环成员；

[0879] (b)  $-S(O)_2C_{1-6}$ 烷基；

[0880] (c) 未经取代的或经1至2个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基和 $R^0$ 的取代基取代的苯基；

[0881] (d) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{3-6}$ 环烷基： $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；以及

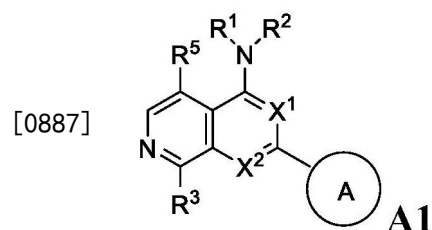
[0882] (e) 4元杂环烷基，其包含1至2个选自N、O和S的杂原子作为环成员，并且未经取代或经1至2个独立地选自以下的取代基取代： $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；

[0883] 或 $R^1$ 和 $R^2$ 可以与两者都结合的氮原子一起形成4至6元杂环烷基，所述杂环烷基可以包含1至2个独立地选自N、O和S的其他杂原子作为环成员，其中由 $R^1$ 和 $R^2$ 与两者都结合的氮原子一起形成的4至6元杂环烷基未经取代或经1至3个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基以及 $R^0$ 的取代基取代；

[0884]  $R^3$ 选自氢、卤素和 $C_{1-6}$ 烷基；以及

[0885]  $R^5$ 选自氢、卤素和 $-NH-$  (3至8元杂烷基)，其中 $-NH-$  (3至8元杂烷基)的3至8元杂 $C_{3-8}$ 烷基包含1至2个氧原子作为链成员且未经取代或经 $R^0$ 取代。

[0886] 实施例191. 一种治疗眼疾病或障碍的方法，所述方法包括向有需要的受试者施用角膜内皮细胞群，其中所述群已经在具有式A1的化合物或其盐的存在下生长，



[0888] 其中

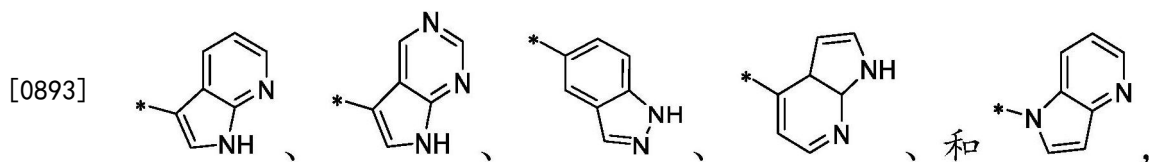
[0889]  $X^1$ 和 $X^2$ 各自独立地是CH或N；

[0890] 环A是

[0891] (a) 5或6元单环杂芳基，其通过碳环成员与分子的其余部分连接，并包含1至4个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员，条件是所述杂原子环成员中至少一个是在5元杂芳基的相对于连接碳环成员的3位或4位的或在6元杂芳基的对位环位置上的未经取代的氮( $-N=$ )；或



[0892] (b) 选自以下的9元稠合双环杂芳基



[0894] 其中“\*”代表环A与分子其余部分的附接点；

[0895] 其中环A未经取代或经1至2个独立地选自卤素、氰基、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $-NH_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $C_{3-6}$ 环烷基和苯基磺酰基的取代基取代；

[0896]  $R^0$ 是羟基或 $C_{1-6}$ 烷氧基；

[0897]  $R^1$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基；

[0898]  $R^2$ 选自

[0899] (a) 未经取代的或经1至3个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{1-8}$ 烷基

[0900] (i) 卤素；

[0901] (ii) 氰基；

[0902] (iii) 氧代；

[0903] (iv)  $C_2$ 烯基；

[0904] (v)  $C_2$ 炔基；

[0905] (vi)  $C_{1-6}$ 卤代烷基；

[0906] (vii)  $-OR^6$ ，其中 $R^6$ 选自氢、未经取代或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；

[0907] (viii)  $-NR^{7a}R^{7b}$ ，其中 $R^{7a}$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基，并且 $R^{7b}$ 选自氢、 $-C(O)R^0$ 、未经取代的或经 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；

[0908] (ix)  $-C(O)R^8$ ，其中 $R^8$ 是 $R^0$ 或 $-NH-C_{1-6}$ 烷基- $C(O)R^0$ ；

[0909] (x)  $-S(O)_2C_{1-6}$ 烷基；

[0910] (xi) 单环 $C_{3-6}$ 环烷基或多环 $C_{7-10}$ 环烷基，其各自未经取代或经1至2个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、羟基 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $-NH_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基和二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基的取代基取代；

[0911] (xii) 6元杂环烷基，其包含1至2个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员并且未经取代或经1至2个独立地选自羟基、卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 烷基氨基和二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基的取代基取代；

[0912] (xiii) 未经取代的或经卤素取代的苯基；

[0913] (xiv) 5或6元单环杂芳基，其包含1至4个独立地选自N和O的杂原子作为环成员；以及

[0914] (xv) 9或10元稠合双环杂芳基，其包含1至2个独立地选自N和O的杂原子作为环成员；

[0915] (b)  $-S(O)_2C_{1-6}$ 烷基；

[0916] (c) 未经取代的或经1至2个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基和 $R^0$ 的取代基取代的苯基；

[0917] (d) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{3-6}$ 环烷基： $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；以及

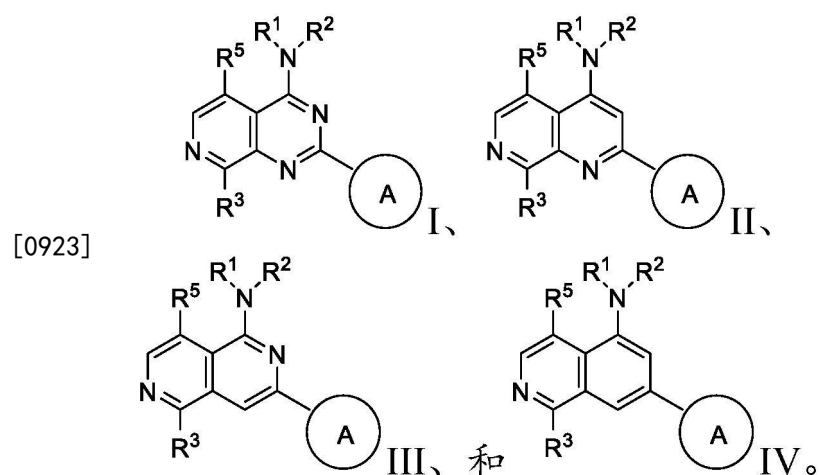
[0918] (e) 4元杂环烷基,其包含1至2个选自N、O和S的杂原子作为环成员,并且未经取代或经1至2个独立地选自以下的取代基取代: $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- ( $C_{1-6}$ 烷基)氨基、-C(O) $R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或-C(O) $R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;

[0919] 或 $R^1$ 和 $R^2$ 可以与两者都结合的氮原子一起形成4至6元杂环烷基,所述杂环烷基可以包含1至2个独立地选自N、O和S的其他杂原子作为环成员,其中由 $R^1$ 和 $R^2$ 与两者都结合的氮原子一起形成的4至6元杂环烷基未经取代或经1至3个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基以及 $R^0$ 的取代基取代;

[0920]  $R^3$ 选自氢、卤素和 $C_{1-6}$ 烷基;以及

[0921]  $R^5$ 选自氢、卤素和-NH- (3至8元杂烷基),其中-NH- (3至8元杂烷基)的3至8元杂 $C_{3-8}$ 烷基包含1至2个氧原子作为链成员且未经取代或经 $R^0$ 取代。

[0922] 实施例192.根据实施例190或191所述的治疗眼疾病或障碍的方法,其中所述化合物具有选自式I至IV的式:



[0924] 实施例193.根据实施例190或191所述的治疗眼疾病或障碍的方法,其中所述化合物选自3-(吡啶-4-基)-N-(1-(三氟甲基)环丙基)-2,6-萘啶-1-胺;N-(1-甲基环丙基)-7-(吡啶-4-基)异喹啉-5-胺;2-(吡啶-4-基)-4-(3-(三氟甲基)哌嗪-1-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶;N-(叔-丁基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;和N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-[(2S)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺。

[0925] 实施例193A.根据实施例190或191所述的治疗眼疾病或障碍的方法,其中所述化合物选自:N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-甲基-1-(2-甲基-2-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丙氧基)丙-2-醇;2,4-二甲基-4-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}戊-2-醇;N-叔-丁基-2-(嘧啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;2-(吡啶-4-基)-N-[1-(三氟甲基)环丁基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-丙基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;3-(吡啶-4-基)-N-(1-(三氟甲基)环丙基)-2,6-萘啶-1-胺;2-(3-甲基-1H-吡啶-4-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-甲基-2-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丙-1-醇;2-(吡啶-4-基)-4-(3-(三氟甲基)哌嗪-1-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶;N-环戊基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-丙基-2-(3-(三氟甲基)-1H-吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(2-甲基环戊基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(3-氯吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟-2-甲基丙-2-基)吡啶

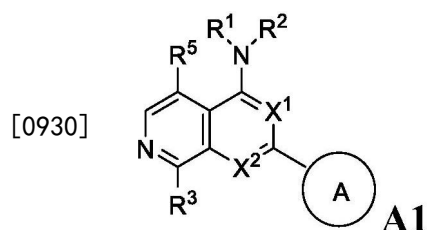
并[3,4-d]嘧啶-4-胺;2-(2-甲基-2-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]丙氧基)乙-1-醇;N-(1-甲基环丙基)-7-(吡啶-4-基)异喹啉-5-胺;(1S,2S)-2-[[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基]环戊-1-醇;N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-[(2S)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-甲基-N-(丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;N-(丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;3-(吡啶-4-基)-N-(1-(三氟甲基)环丙基)-2,6-萘啶-1-胺和N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-[(2R)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺。

[0926] 实施例193B.根据实施例190或191所述的治疗眼疾病或障碍的方法,其中所述化合物选自:N-(叔-丁基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;和N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-[(2S)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺。

[0927] 实施例193C.根据实施例190或191所述的治疗眼疾病或障碍的方法,其中所述化合物是N-(叔-丁基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺。

[0928] 实施例194.根据实施例190或191所述的促进细胞增殖的方法,其中所述化合物是根据实施例1至180中的任一个。

[0929] 实施例195.具有式A1的化合物或其盐,



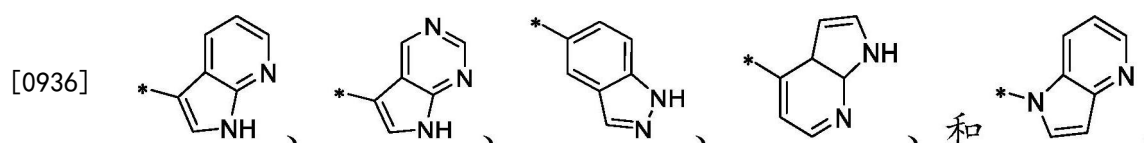
[0931] 在制造用于眼疾病或障碍的药物中的用途,其中

[0932]  $X^1$ 和 $X^2$ 各自独立地是CH或N;

[0933] 环A是

[0934] (a) 5或6元单环杂芳基,其通过碳环成员与分子的其余部分连接,并包含1至4个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员,条件是所述杂原子环成员中至少一个是在5元杂芳基的相对于连接碳环成员的3位或4位的或在6元杂芳基的对位环位置上的未经取代的氮(-N=);或

[0935] (b) 选自以下的9元稠合双环杂芳基



[0937] 其中“\*”代表环A与分子其余部分的附接点;

[0938] 其中环A未经取代或经1至2个独立地选自卤素、氰基、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $NH_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $C_{3-6}$ 环烷基和苯基磺酰基的取代基取代;

[0939]  $R^0$ 是羟基或 $C_{1-6}$ 烷氧基;

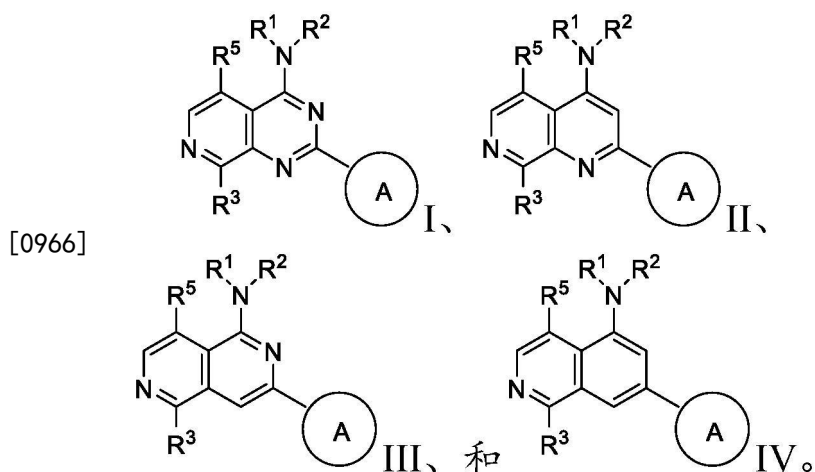
[0940]  $R^1$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基;

[0941]  $R^2$ 选自

[0942] (a) 未经取代的或经1至3个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{1-8}$ 烷基

[0943] (i) 卤素;

- [0944] (ii) 氰基;
- [0945] (iii) 氧代;
- [0946] (iv)  $C_2$ 烯基;
- [0947] (v)  $C_2$ 炔基;
- [0948] (vi)  $C_{1-6}$ 卤代烷基;
- [0949] (vii)  $-OR^6$ , 其中 $R^6$ 选自氢、未经取代或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;
- [0950] (viii)  $-NR^{7a}R^{7b}$ , 其中 $R^{7a}$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基, 并且 $R^{7b}$ 选自氢、 $-C(O)R^0$ 、未经取代的或经 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;
- [0951] (ix)  $-C(O)R^8$ , 其中 $R^8$ 是 $R^0$ 或 $-NH-C_{1-6}$ 烷基- $C(O)R^0$ ;
- [0952] (x)  $-S(O)_2C_{1-6}$ 烷基;
- [0953] (xi) 单环 $C_{3-6}$ 环烷基或多环 $C_{7-10}$ 环烷基, 其各自未经取代或经1至2个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、羟基 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $-NH_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基和二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基的取代基取代;
- [0954] (xii) 6元杂环烷基, 其包含1至2个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员并且未经取代或经1至2个独立地选自羟基、卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 烷基氨基和二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基的取代基取代;
- [0955] (xiii) 未经取代的或经卤素取代的苯基;
- [0956] (xiv) 5或6元单环杂芳基, 其包含1至4个独立地选自N和O的杂原子作为环成员; 以及
- [0957] (xv) 9或10元稠合双环杂芳基, 其包含1至2个独立地选自N和O的杂原子作为环成员;
- [0958] (b)  $-S(O)_2C_{1-6}$ 烷基;
- [0959] (c) 未经取代的或经1至2个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基和 $R^0$ 的取代基取代的苯基;
- [0960] (d) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{3-6}$ 环烷基:  $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基; 以及
- [0961] (e) 4元杂环烷基, 其包含1至2个选自N、O和S的杂原子作为环成员, 并且未经取代或经1至2个独立地选自以下的取代基取代:  $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;
- [0962] 或 $R^1$ 和 $R^2$ 可以与两者都结合的氮原子一起形成4至6元杂环烷基, 所述杂环烷基可以包含1至2个独立地选自N、O和S的其他杂原子作为环成员, 其中由 $R^1$ 和 $R^2$ 与两者都结合的氮原子一起形成的4至6元杂环烷基未经取代或经1至3个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基以及 $R^0$ 的取代基取代;
- [0963]  $R^3$ 选自氢、卤素和 $C_{1-6}$ 烷基; 以及
- [0964]  $R^5$ 选自氢、卤素和 $-NH-$  (3至8元杂烷基), 其中 $-NH-$  (3至8元杂烷基) 的3至8元杂 $C_{3-8}$ 烷基包含1至2个氧原子作为链成员且未经取代或经 $R^0$ 取代。
- [0965] 实施例196. 根据实施例195所述的具有式A1的化合物或其盐在制造用于眼疾病或障碍的药物中的用途, 其中所述化合物具有选自式I至IV的式:



[0967] 实施例197. 根据实施例195所述的具有式A1的化合物或其盐在制造用于眼疾病或障碍的药物中的用途, 其中所述化合物选自3-(吡啶-4-基)-N-(1-(三氟甲基)环丙基)-2,6-萘啶-1-胺; N-(1-甲基环丙基)-7-(吡啶-4-基)异喹啉-5-胺; 和2-(吡啶-4-基)-4-(3-(三氟甲基)哌嗪-1-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶。

[0968] 实施例197A. 根据实施例195所述的具有式AI的化合物或其盐在制造用于眼疾病或障碍的药物中的用途, 其中所述化合物选自: N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; 2-甲基-1-(2-甲基-2-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丙氧基)丙-2-醇; 2,4-二甲基-4-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}戊-2-醇; N-叔-丁基-2-(嘧啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺; 2-(吡啶-4-基)-N-[1-(三氟甲基)环丁基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; N-丙基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; N-(丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; 3-(吡啶-4-基)-N-(1-(三氟甲基)环丙基)-2,6-萘啶-1-胺; 2-(3-甲基-1H-吡唑-4-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; 2-甲基-2-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丙-1-醇; 2-(吡啶-4-基)-4-(3-(三氟甲基)哌嗪-1-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶; N-环戊基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; N-丙基-2-(3-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; N-(2-甲基环戊基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; 2-(3-氯吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟-2-甲基丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; 2-(2-甲基-2-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丙氧基)乙-1-醇; N-(1-甲基环丙基)-7-(吡啶-4-基)异喹啉-5-胺; (1S,2S)-2-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}环戊-1-醇; N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-[(2S)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; N-甲基-N-(丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; N-(丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺; 3-(吡啶-4-基)-N-(1-(三氟甲基)环丙基)-2,6-萘啶-1-胺和N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-[(2R)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺。

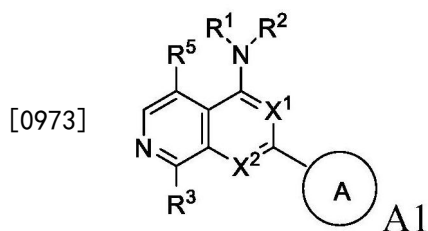
[0969] 实施例197B. 根据实施例195所述的具有式AI的化合物或其盐在制造用于眼疾病或障碍的药物中的用途, 其中所述化合物选自: N-(叔-丁基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺; 和N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-[(2S)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺。

[0970] 实施例197C. 根据实施例195所述的具有式AI的化合物或其盐在制造用于眼疾病或障碍的药物中的用途, 其中所述化合物是N-(叔-丁基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺。

[0971] 实施例198. 根据实施例195所述的具有式A1的化合物或其盐在制造用于眼疾病或

障碍的药物中的用途,其中所述化合物是根据实施例1至180中的任一个。

[0972] 实施例199.一种具有式A1的化合物或其药学上可接受的盐,



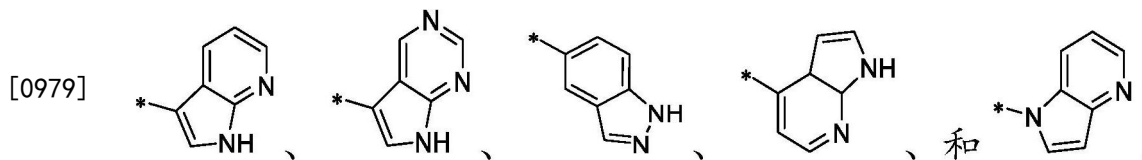
[0974] 用于促进肝再生和肝再生长,其中

[0975]  $X^1$ 和 $X^2$ 各自独立地是CH或N;

[0976] 环A是

[0977] (a) 5或6元单环杂芳基,其通过碳环成员与分子的其余部分连接,并包含1至4个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员,条件是所述杂原子环成员中至少一个是在5元杂芳基的相对于连接碳环成员的3位或4位的或在6元杂芳基的对位环位置上的未经取代的氮(-N=);或

[0978] (b) 选自以下的9元稠合双环杂芳基



[0980] 其中“\*”代表环A与分子其余部分的附接点;

[0981] 其中环A未经取代或经1至2个独立地选自卤素、氰基、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $-NH_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二-( $C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $C_{3-6}$ 环烷基和苯基磺酰基的取代基取代;

[0982]  $R^0$ 是羟基或 $C_{1-6}$ 烷氧基;

[0983]  $R^1$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基;

[0984]  $R^2$ 选自

[0985] (a) 未经取代的或经1至3个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{1-8}$ 烷基

[0986] 卤素;

[0987] 氰基;

[0988] 氧代;

[0989]  $C_2$ 烯基;

[0990]  $C_2$ 炔基;

[0991]  $C_{1-6}$ 卤代烷基;

[0992]  $-OR^6$ ,其中 $R^6$ 选自氢、未经取代或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;

[0993]  $-NR^{7a}R^{7b}$ ,其中 $R^{7a}$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基,并且 $R^{7b}$ 选自氢、 $-C(O)R^0$ 、未经取代的或经 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;

[0994]  $-C(O)R^8$ ,其中 $R^8$ 是 $R^0$ 或 $-NH-C_{1-6}$ 烷基- $C(O)R^0$ ;

[0995]  $-S(O)_2C_{1-6}$ 烷基;

[0996] 单环 $C_{3-6}$ 环烷基或多环 $C_{7-10}$ 环烷基,其各自未经取代或经1至2个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、羟基 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $-NH_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基和二-( $C_{1-6}$ 烷基)氨基的取代基

取代；

[0997] 6元杂环烷基，其包含1至2个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员并且未经取代或经1至2个独立地选自羟基、卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 烷基氨基和二- ( $C_{1-6}$ 烷基) 氨基的取代基取代；

[0998] 未经取代的或经卤素取代的苯基；

[0999] 5或6元单环杂芳基，其包含1至4个独立地选自N和O的杂原子作为环成员；以及

[1000] 9或10元稠合双环杂芳基，其包含1至2个独立地选自N和O的杂原子作为环成员；

[1001] (b)  $-S(O)_2C_{1-6}$ 烷基；

[1002] (c) 未经取代的或经1至2个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基和 $R^0$ 的取代基取代的苯基；

[1003] (d) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{3-6}$ 环烷基： $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- ( $C_{1-6}$ 烷基) 氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；以及

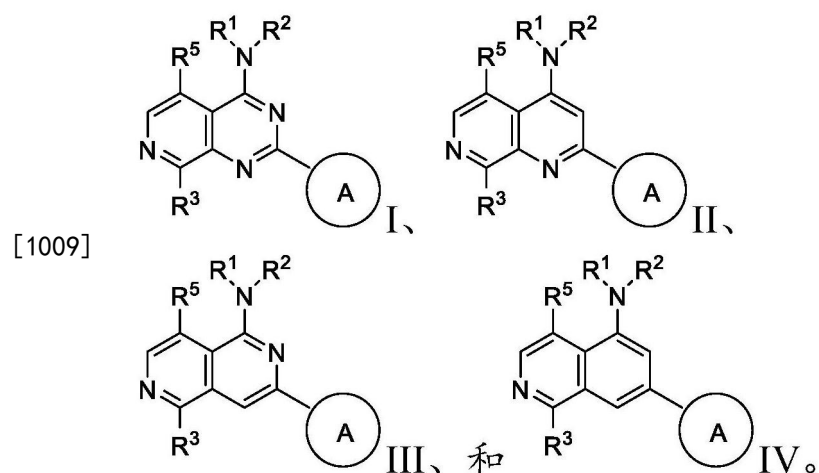
[1004] (e) 4元杂环烷基，其包含1至2个选自N、O和S的杂原子作为环成员，并且未经取代或经1至2个独立地选自以下的取代基取代： $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- ( $C_{1-6}$ 烷基) 氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；

[1005] 或 $R^1$ 和 $R^2$ 可以与两者都结合的氮原子一起形成4至6元杂环烷基，所述杂环烷基可以包含1至2个独立地选自N、O和S的其他杂原子作为环成员，其中由 $R^1$ 和 $R^2$ 与两者都结合的氮原子一起形成的4至6元杂环烷基未经取代或经1至3个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基以及 $R^0$ 的取代基取代；

[1006]  $R^3$ 选自氢、卤素和 $C_{1-6}$ 烷基；以及

[1007]  $R^5$ 选自氢、卤素和 $-NH-$  (3至8元杂烷基)，其中 $-NH-$  (3至8元杂烷基) 的3至8元杂 $C_{3-8}$ 烷基包含1至2个氧原子作为链成员且未经取代或经 $R^0$ 取代。

[1008] 实施例200. 根据实施例199所述的用于促进肝再生和肝再生长的具有式A1的化合物或其药学上可接受的盐，其中所述化合物具有选自式I至IV的式：

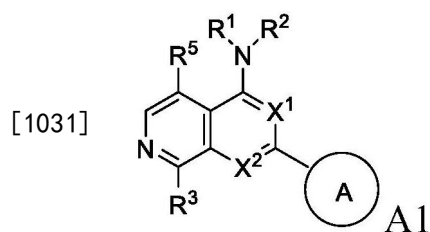


[1010] 实施例201. 根据实施例199所述的用于促进肝再生和肝再生长的具有式A1的化合物或其药学上可接受的盐，其中所述化合物选自：

[1011] 2-甲基-1- (2-甲基-2- {[2- (吡啶-4-基) 吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基} 丙氧基) 丙-2-醇；

[1012] 二甲基 (3-甲基-3- {[2- (吡啶-4-基) 吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基} 丁基) 胺；

- [1013] N-(1-氨基-2-甲基丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;
- [1014] 8-氯-N-(1-甲基环丙基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;
- [1015] 8-甲基-N-(1-甲基环丙基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;
- [1016] N-(叔-丁基)-5-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;
- [1017] 5-氯-N-(1-甲基环丙基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;
- [1018] N-叔-丁基-2-(嘧啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;
- [1019] N-叔-丁基-2-(3-甲基-1H-吡唑-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;
- [1020] N-叔-丁基-2-(嘧啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;
- [1021] 2-(2-氨基嘧啶-4-基)-N-叔-丁基-1,7-萘啶-4-胺;
- [1022]  $N^1, N^1, 3$ -三甲基- $N^3$ -(2-(3-甲基-1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丁烷-1,3-二胺;
- [1023]  $N^1, N^1, 3$ -三甲基- $N^3$ -(2-(3-甲基-1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丁烷-1,3-二胺;
- [1024] 2,2-二甲基- $N^1$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丙烷-1,3-二胺;
- [1025] 2,3-二甲基- $N^2$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丁烷-2,3-二胺;
- [1026]  $N^1, N^1, 2, 2$ -四甲基- $N^3$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丙烷-1,3-二胺;
- [1027] 4-(4-(叔-丁基氨基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-2-基)-1,2,5-噁二唑-3-胺;以及
- [1028]  $N^2, N^2, 2$ -三甲基- $N^1$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丙烷-1,2-二胺。
- [1029] 实施例202.根据实施例199所述的用于促进肝再生和肝再生长的具有式A1的化合物或其药学上可接受的盐,其中所述化合物是根据实施例1至180中的任一个。
- [1030] 实施例203.具有式A1的化合物或其药学上可接受的盐



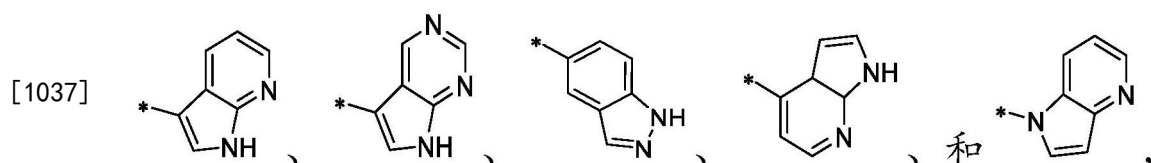
[1032] 用于促进肝再生和肝再生长的用途,其中

[1033]  $X^1$ 和 $X^2$ 各自独立地是CH或N;

[1034] 环A是

[1035] (a) 5或6元单环杂芳基,其通过碳环成员与分子的其余部分连接,并包含1至4个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员,条件是所述杂原子环成员中至少一个是在5元杂芳基的相对于连接碳环成员的3位或4位的或在6元杂芳基的对位环位置上的未经取代的氮(-N=);或

[1036] (b) 选自以下的9元耦合双环杂芳基



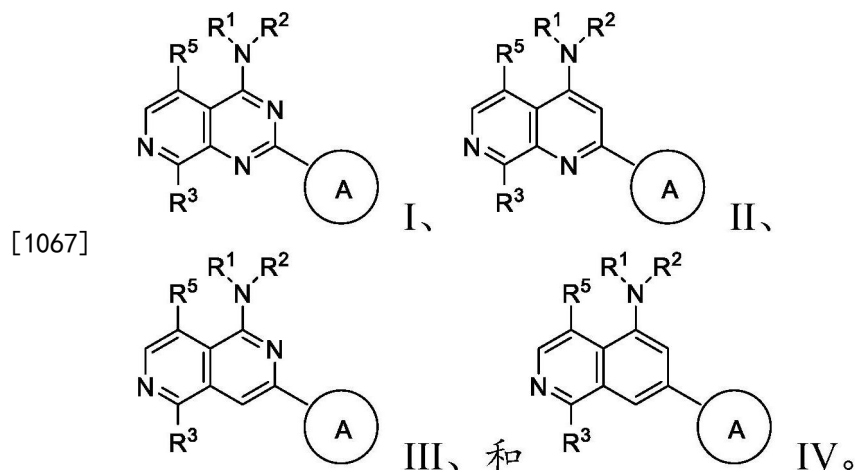


- [1038] 其中“\*”代表环A与分子其余部分的附接点；
- [1039] 其中环A未经取代或经1至2个独立地选自卤素、氰基、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $-NH_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $C_{3-6}$ 环烷基和苯基磺酰基的取代基取代；
- [1040]  $R^0$ 是羟基或 $C_{1-6}$ 烷氧基；
- [1041]  $R^1$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基；
- [1042]  $R^2$ 选自
- [1043] (a) 未经取代的或经1至3个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{1-8}$ 烷基
- [1044] 卤素；
- [1045] 氰基；
- [1046] 氧代；
- [1047]  $C_2$ 烯基；
- [1048]  $C_2$ 炔基；
- [1049]  $C_{1-6}$ 卤代烷基；
- [1050]  $-OR^6$ ，其中 $R^6$ 选自氢、未经取代或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；
- [1051]  $-NR^{7a}R^{7b}$ ，其中 $R^{7a}$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基，并且 $R^{7b}$ 选自氢、 $-C(O)R^0$ 、未经取代的或经 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；
- [1052]  $-C(O)R^8$ ，其中 $R^8$ 是 $R^0$ 或 $-NH-C_{1-6}$ 烷基- $C(O)R^0$ ；
- [1053]  $-S(O)_2C_{1-6}$ 烷基；
- [1054] 单环 $C_{3-6}$ 环烷基或多环 $C_{7-10}$ 环烷基，其各自未经取代或经1至2个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、羟基 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $-NH_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基和二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基的取代基取代；
- [1055] 6元杂环烷基，其包含1至2个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员并且未经取代或经1至2个独立地选自羟基、卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 烷基氨基和二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基的取代基取代；
- [1056] 未经取代的或经卤素取代的苯基；
- [1057] 5或6元单环杂芳基，其包含1至4个独立地选自N和O的杂原子作为环成员；以及
- [1058] 9或10元稠合双环杂芳基，其包含1至2个独立地选自N和O的杂原子作为环成员；
- [1059] (b)  $-S(O)_2C_{1-6}$ 烷基；
- [1060] (c) 未经取代的或经1至2个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基和 $R^0$ 的取代基取代的苯基；
- [1061] (d) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{3-6}$ 环烷基： $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；以及
- [1062] (e) 4元杂环烷基，其包含1至2个选自N、O和S的杂原子作为环成员，并且未经取代或经1至2个独立地选自以下的取代基取代： $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；
- [1063] 或 $R^1$ 和 $R^2$ 可以与两者都结合的氮原子一起形成4至6元杂环烷基，所述杂环烷基可以包含1至2个独立地选自N、O和S的其他杂原子作为环成员，其中由 $R^1$ 和 $R^2$ 与两者都结合的氮原子一起形成的4至6元杂环烷基未经取代或经1至3个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基以及 $R^0$ 的取代基取代；

[1064]  $R^3$ 选自氢、卤素和 $C_{1-6}$ 烷基；并且

[1065]  $R^5$ 选自氢、卤素和-NH- (3至8元杂烷基)，其中-NH- (3至8元杂烷基) 的3至8元杂 $C_{3-8}$ 烷基包含1至2个氧原子作为链成员且未经取代或经 $R^0$ 取代。

[1066] 实施例204. 根据实施例203所述的具有式A1的化合物或其药学上可接受的盐用于促进肝再生和肝再生长的用途，其中所述化合物具有选自式I至IV的式：



[1068] 实施例205. 根据实施例203所述的具有式A1的化合物或其药学上可接受的盐用于促进肝再生和肝再生长的用途，其中所述化合物选自：

[1069] 2-甲基-1-(2-甲基-2-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丙氧基)丙-2-醇；

[1070] 二甲基(3-甲基-3-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丁基)胺；

[1071] N-(1-氨基-2-甲基丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺；

[1072] 8-氯-N-(1-甲基环丙基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺；

[1073] 8-甲基-N-(1-甲基环丙基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺；

[1074] N-(叔-丁基)-5-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺；

[1075] 5-氯-N-(1-甲基环丙基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺；

[1076] N-叔-丁基-2-(嘧啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺；

[1077] N-叔-丁基-2-(3-甲基-1H-吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺；

[1078] N-叔-丁基-2-(嘧啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺；

[1079] 2-(2-氨基嘧啶-4-基)-N-叔-丁基-1,7-萘啶-4-胺；

[1080]  $N^1, N^1, 3$ -三甲基- $N^3$ -(2-(3-甲基-1H-吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丁烷-1,3-二胺；

[1081]  $N^1, N^1, 3$ -三甲基- $N^3$ -(2-(3-甲基-1H-吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丁烷-1,3-二胺；

[1082] 2,2-二甲基- $N^1$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丙烷-1,3-二胺；

[1083] 2,3-二甲基- $N^2$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丁烷-2,3-二胺；

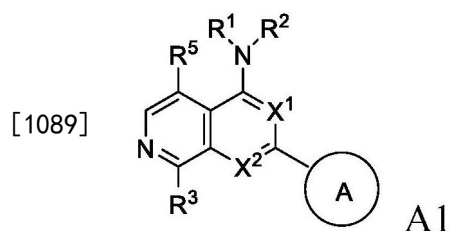
[1084]  $N^1, N^1, 2, 2$ -四甲基- $N^3$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丙烷-1,3-二胺；

[1085] 4-(4-(叔-丁基氨基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-2-基)-1,2,5-噁二唑-3-胺；以及

[1086]  $N^2, N^2, 2$ -三甲基- $N^1$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丙烷-1,2-二胺。

[1087] 实施例206. 根据实施例203所述的具有式A1的化合物或其药学上可接受的盐用于促进肝再生和肝再生长的用途, 其中所述化合物是根据实施例1至180中的任一个。

[1088] 实施例207. 一种促进肝再生和肝再生长的方法, 所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的具有式A1的化合物或其药学上可接受的盐,



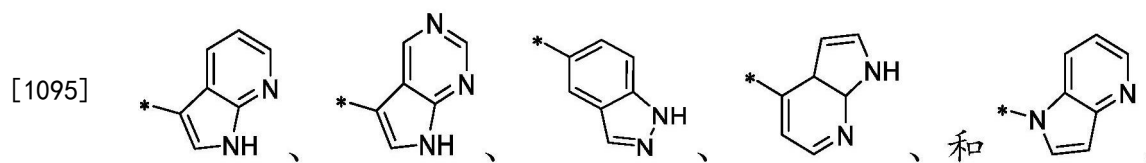
[1090] 其中

[1091]  $X^1$ 和 $X^2$ 各自独立地是CH或N;

[1092] 环A是

[1093] (a) 5或6元单环杂芳基, 其通过碳环成员与分子的其余部分连接, 并包含1至4个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员, 条件是所述杂原子环成员中至少一个是在5元杂芳基的相对于连接碳环成员的3位或4位的或在6元杂芳基的对位环位置上的未经取代的氮(-N=); 或

[1094] (b) 选自以下的9元稠合双环杂芳基



[1096] 其中“\*”代表环A与分子其余部分的附接点;

[1097] 其中环A未经取代或经1至2个独立地选自卤素、氰基、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $-NH_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $C_{3-6}$ 环烷基和苯基磺酰基的取代基取代;

[1098]  $R^0$ 是羟基或 $C_{1-6}$ 烷氧基;

[1099]  $R^1$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基;

[1100]  $R^2$ 选自

[1101] (a) 未经取代的或经1至3个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{1-8}$ 烷基

[1102] 卤素;

[1103] 氰基;

[1104] 氧代;

[1105]  $C_2$ 烯基;

[1106]  $C_2$ 炔基;

[1107]  $C_{1-6}$ 卤代烷基;

[1108]  $-OR^6$ , 其中 $R^6$ 选自氢、未经取代或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;

[1109]  $-NR^{7a}R^{7b}$ , 其中 $R^{7a}$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基, 并且 $R^{7b}$ 选自氢、 $-C(O)R^0$ 、未经取代的或经 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;

[1110]  $-C(O)R^8$ , 其中 $R^8$ 是 $R^0$ 或 $-NH-C_{1-6}$ 烷基- $C(O)R^0$ ;

[1111]  $-S(O)_2C_{1-6}$ 烷基;

[1112] 单环 $C_{3-6}$ 环烷基或多环 $C_{7-10}$ 环烷基,其各自未经取代或经1至2个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、羟基 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $-NH_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基和二- ( $C_{1-6}$ 烷基) 氨基的取代基取代;

[1113] 6元杂环烷基,其包含1至2个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员并且未经取代或经1至2个独立地选自羟基、卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 烷基氨基和二- ( $C_{1-6}$ 烷基) 氨基的取代基取代;

[1114] 未经取代的或经卤素取代的苯基;

[1115] 5或6元单环杂芳基,其包含1至4个独立地选自N和O的杂原子作为环成员;以及

[1116] 9或10元稠合双环杂芳基,其包含1至2个独立地选自N和O的杂原子作为环成员;

[1117] (b)  $-S(O)_2C_{1-6}$ 烷基;

[1118] (c) 未经取代的或经1至2个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基和 $R^0$ 的取代基取代的苯基;

[1119] (d) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{3-6}$ 环烷基: $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- ( $C_{1-6}$ 烷基) 氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;以及

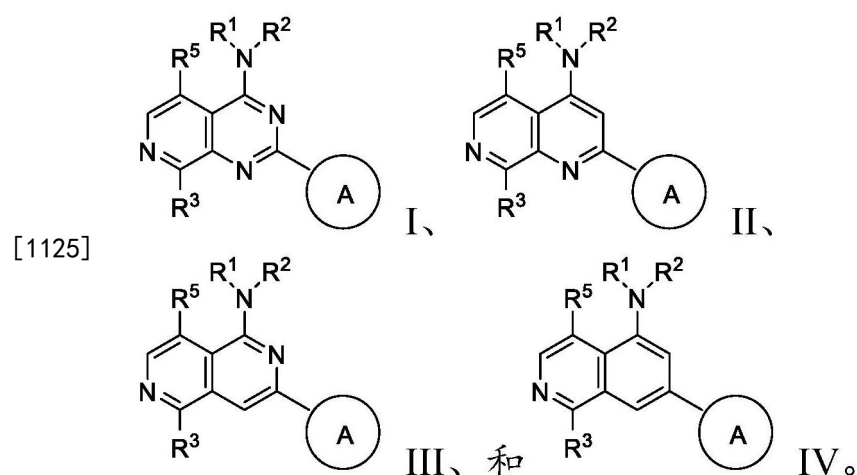
[1120] (e) 4元杂环烷基,其包含1至2个选自N、O和S的杂原子作为环成员,并且未经取代或经1至2个独立地选自以下的取代基取代: $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- ( $C_{1-6}$ 烷基) 氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;

[1121] 或 $R^1$ 和 $R^2$ 可以与两者都结合的氮原子一起形成4至6元杂环烷基,所述杂环烷基可以包含1至2个独立地选自N、O和S的其他杂原子作为环成员,其中由 $R^1$ 和 $R^2$ 与两者都结合的氮原子一起形成的4至6元杂环烷基未经取代或经1至3个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基以及 $R^0$ 的取代基取代;

[1122]  $R^3$ 选自氢、卤素和 $C_{1-6}$ 烷基;并且

[1123]  $R^5$ 选自氢、卤素和 $-NH-$  (3至8元杂烷基),其中 $-NH-$  (3至8元杂烷基) 的3至8元杂 $C_{3-8}$ 烷基包含1至2个氧原子作为链成员且未经取代或经 $R^0$ 取代。

[1124] 实施例208.根据实施例207所述的促进肝再生和肝再生长的方法,其中所述化合物具有选自式I至IV的式:



[1126] 实施例209.根据实施例207所述的促进肝再生和肝再生长的方法,其中所述化合物选自:

[1127] 2-甲基-1-(2-甲基-2-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丙氧基)

丙-2-醇;

[1128] 二甲基(3-甲基-3-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丁基)胺;

[1129] N-(1-氨基-2-甲基丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;

[1130] 8-氯-N-(1-甲基环丙基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;

[1131] 8-甲基-N-(1-甲基环丙基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;

[1132] N-(叔-丁基)-5-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;

[1133] 5-氯-N-(1-甲基环丙基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;

[1134] N-叔-丁基-2-(嘧啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;

[1135] N-叔-丁基-2-(3-甲基-1H-吡唑-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;

[1136] N-叔-丁基-2-(嘧啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;

[1137] 2-(2-氨基嘧啶-4-基)-N-叔-丁基-1,7-萘啶-4-胺;

[1138]  $N^1, N^1, 3$ -三甲基- $N^3$ -(2-(3-甲基-1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丁烷-1,3-二胺;

[1139]  $N^1, N^1, 3$ -三甲基- $N^3$ -(2-(3-甲基-1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丁烷-1,3-二胺;

[1140] 2,2-二甲基- $N^1$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丙烷-1,3-二胺;

[1141] 2,3-二甲基- $N^2$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丁烷-2,3-二胺;

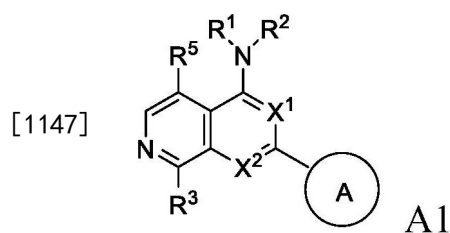
[1142]  $N^1, N^1, 2, 2$ -四甲基- $N^3$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丙烷-1,3-二胺;

[1143] 4-(4-(叔-丁基氨基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-2-基)-1,2,5-噁二唑-3-胺;以及

[1144]  $N^2, N^2, 2$ -三甲基- $N^1$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丙烷-1,2-二胺。

[1145] 实施例210.根据实施例207所述的促进肝再生和肝再生长的方法,其中所述化合物是根据实施例1至180中的任一个。

[1146] 实施例211.具有式A1的化合物或其药学上可接受的盐



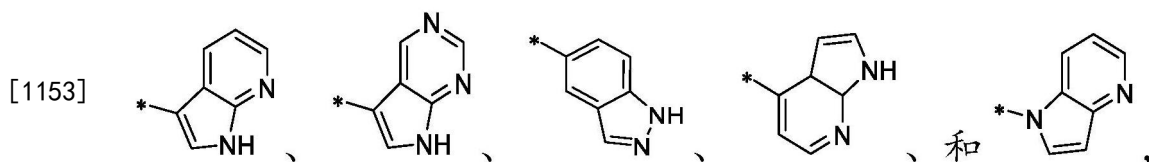
[1148] 在制造用于促进肝再生和肝再生长的药物中的用途,其中

[1149]  $X^1$ 和 $X^2$ 各自独立地是CH或N;

[1150] 环A是

[1151] (a) 5或6元单环杂芳基,其通过碳环成员与分子的其余部分连接,并包含1至4个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员,条件是所述杂原子环成员中至少一个是在5元杂芳基的相对于连接碳环成员的3位或4位的或在6元杂芳基的对位环位置上的未经取代的氮(-N=);或

[1152] (b) 选自以下的9元稠合双环杂芳基



[1154] 其中“\*”代表环A与分子其余部分的附接点；

[1155] 其中环A未经取代或经1至2个独立地选自卤素、氰基、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $-NH_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $C_{3-6}$ 环烷基和苯基磺酰基的取代基取代；

[1156]  $R^0$ 是羟基或 $C_{1-6}$ 烷氧基；

[1157]  $R^1$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基；

[1158]  $R^2$ 选自

[1159] (a) 未经取代的或经1至3个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{1-8}$ 烷基

[1160] 卤素；

[1161] 氰基；

[1162] 氧代；

[1163]  $C_2$ 烯基；

[1164]  $C_2$ 炔基；

[1165]  $C_{1-6}$ 卤代烷基；

[1166]  $-OR^6$ ，其中 $R^6$ 选自氢、未经取代或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；

[1167]  $-NR^{7a}R^{7b}$ ，其中 $R^{7a}$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基，并且 $R^{7b}$ 选自氢、 $-C(O)R^0$ 、未经取代的或经 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；

[1168]  $-C(O)R^8$ ，其中 $R^8$ 是 $R^0$ 或 $-NH-C_{1-6}$ 烷基- $C(O)R^0$ ；

[1169]  $-S(O)_2C_{1-6}$ 烷基；

[1170] 单环 $C_{3-6}$ 环烷基或多环 $C_{7-10}$ 环烷基，其各自未经取代或经1至2个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、羟基 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $-NH_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基和二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基的取代基取代；

[1171] 6元杂环烷基，其包含1至2个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员并且未经取代或经1至2个独立地选自羟基、卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 烷基氨基和二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基的取代基取代；

[1172] 未经取代的或经卤素取代的苯基；

[1173] 5或6元单环杂芳基，其包含1至4个独立地选自N和O的杂原子作为环成员；以及

[1174] 9或10元稠合双环杂芳基，其包含1至2个独立地选自N和O的杂原子作为环成员；

[1175] (b)  $-S(O)_2C_{1-6}$ 烷基；

[1176] (c) 未经取代的或经1至2个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基和 $R^0$ 的取代基取代的苯基；

[1177] (d) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{3-6}$ 环烷基： $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；以及

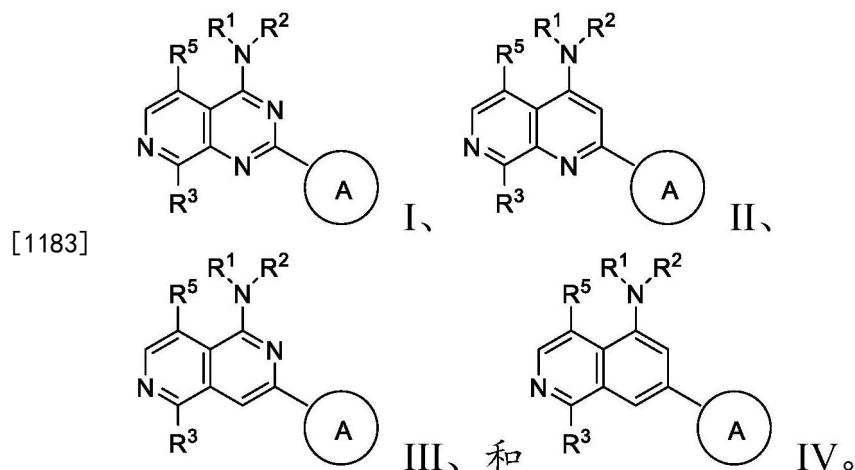
[1178] (e) 4元杂环烷基，其包含1至2个选自N、O和S的杂原子作为环成员，并且未经取代或经1至2个独立地选自以下的取代基取代： $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；

[1179] 或 $R^1$ 和 $R^2$ 可以与两者都结合的氮原子一起形成4至6元杂环烷基,所述杂环烷基可以包含1至2个独立地选自N、O和S的其他杂原子作为环成员,其中由 $R^1$ 和 $R^2$ 与两者都结合的氮原子一起形成的4至6元杂环烷基未经取代或经1至3个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基以及 $R^0$ 的取代基取代;

[1180]  $R^3$ 选自氢、卤素和 $C_{1-6}$ 烷基;并且

[1181]  $R^5$ 选自氢、卤素和-NH- (3至8元杂烷基),其中-NH- (3至8元杂烷基)的3至8元杂 $C_{3-8}$ 烷基包含1至2个氧原子作为链成员且未经取代或经 $R^0$ 取代。

[1182] 实施例212.根据实施例211所述的具有式A1的化合物或其药学上可接受的盐在制造用于促进肝再生和肝再生长的药物中的用途,其中所述化合物具有选自式I至IV的式:



[1184] 实施例213.根据实施例211所述的具有式A1的化合物或其药学上可接受的盐在制造用于促进肝再生和肝再生长的药物中的用途,其中所述化合物选自:

[1185] 2-甲基-1-(2-甲基-2-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丙氧基)丙-2-醇;

[1186] 二甲基(3-甲基-3-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丁基)胺;

[1187] N-(1-氨基-2-甲基丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;

[1188] 8-氯-N-(1-甲基环丙基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;

[1189] 8-甲基-N-(1-甲基环丙基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;

[1190] N-(叔-丁基)-5-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;

[1191] 5-氯-N-(1-甲基环丙基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺;

[1192] N-叔-丁基-2-(嘧啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;

[1193] N-叔-丁基-2-(3-甲基-1H-吡唑-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;

[1194] N-叔-丁基-2-(嘧啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺;

[1195] 2-(2-氨基嘧啶-4-基)-N-叔-丁基-1,7-萘啶-4-胺;

[1196]  $N^1, N^1, 3$ -三甲基- $N^3$ -(2-(3-甲基-1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丁烷-1,3-二胺;

[1197]  $N^1, N^1, 3$ -三甲基- $N^3$ -(2-(3-甲基-1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丁烷-1,3-二胺;

[1198] 2,2-二甲基- $N^1$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丙烷-1,3-二胺;

[1199] 2,3-二甲基- $N^2$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丁烷-2,3-二胺;

[1200]  $N^1, N^1, 2, 2$ -四甲基- $N^3$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丙烷-1,3-二胺;

[1201] 4-(4-(叔-丁基氨基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-2-基)-1,2,5-噁二唑-3-胺;以及

[1202]  $N^2, N^2, 2$ -三甲基- $N^1$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丙烷-1,2-二胺。

[1203] 实施例214.根据实施例211所述的具有式A1的化合物或其药学上可接受的盐在制造用于促进肝再生和肝再生长的药物中的用途,其中所述化合物是根据实施例1至180中的任一个。

[1204] 在另一个实施例中,本发明涉及包含至少一种本发明的化合物或其药学上可接受的盐的药物组合物。

[1205] 在另一个实施例中,本发明涉及药物组合物,其包含至少一种本发明的化合物或其药学上可接受的盐和至少一种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[1206] 在另一个实施例中,本发明涉及用作药物的本发明的化合物或其药学上可接受的盐或药物组合物。

[1207] 在另一个实施例中,本发明涉及用于促进肝再生和肝再生长的药物组合物,其包含具有式A1或其子式的化合物或其药学上可接受的盐。

[1208] 在另一个实施例中,本发明还涉及具有式A1或其子式的化合物或其药学上可接受的盐单独地或任选地与另一种具有式A1或其子式的化合物或其药学上可接受的盐和/或至少一种其他类型的治疗剂组合地在制备用于促进肝再生和肝再生长的药物中的用途。

[1209] 在另一个实施例中,本发明涉及一种促进肝再生和肝再生长的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的具有式A1或其子式的化合物或其药学上可接受的盐。

[1210] 在另一个实施例中,本发明涉及用于以下的方法:促进肝再生和肝再生长,特别是用于治疗边缘移植植物移植后肝再生长不足;用于支持广泛肝切除术后剩余肝脏块的增强的再生长;用于病毒性肝炎、药物引起的肝损伤、自身免疫性肝炎、缺血性和充血性肝病引起的急性肝衰竭后患者肝的再生;用于治疗具有由非酒精性脂肪性肝炎、酒精性脂肪性肝炎、慢性乙型和丙型病毒性肝炎、血色素沉着症、 $\alpha$ -1抗胰蛋白酶缺乏症、威尔逊氏病和药物诱导的肝纤维化导致的慢性肝损伤和潜在肝纤维化的患者以增强再生能力并加速纤维化消退。

[1211] 在另一个实施例中,本发明涉及促进肝再生和肝再生长的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的能够抑制LATS1和LATS2激酶活性的试剂;从而诱导YAP易位并驱动下游基因表达以促进细胞增殖。在另一个实施例中,所述试剂是具有式A1或其子式的化合物,或其药学上可接受的盐。

[1212] 在另一个实施例中,本发明涉及促进肝再生和肝再生长的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的能够抑制LATS激酶活性的试剂;从而诱导YAP易位并驱动下游基因表达以促进细胞增殖。在优选实施例中,所述试剂是根据实施例1至180中任一项所述的化合物。

[1213] 在另一个实施例中,本发明涉及用于离体扩增肝细胞群的方法,所述方法包括使肝细胞与根据实施例1至180中任一项所述的化合物接触。在优选的实施例中,所述方法进一步包括基因编辑所述肝细胞。优选地,所述基因编辑靶向与宿主抗移植免疫应答相关的



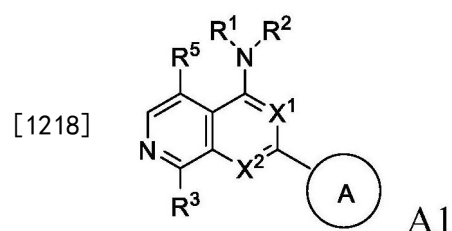
基因。

[1214] 在另一个实施例中,本发明涉及用于离体扩增肝祖细胞群的方法,所述方法包括使肝祖细胞与根据实施例1至180中任一项所述的化合物接触。在优选的实施例中,所述方法进一步包括基因编辑所述肝祖细胞。优选地,所述基因编辑靶向与宿主抗移植免疫应答相关的基因。

[1215] 在另一个实施例中,本发明涉及通过使肝细胞与根据实施例1至180中任一项所述的化合物接触而获得的肝细胞群。在优选的实施例中,通过使肝细胞与根据实施例1至180中任一项所述的化合物接触而获得的肝细胞已经被基因编辑。优选地,所述基因编辑靶向与宿主抗移植免疫应答相关的基因。

[1216] 在另一个实施例中,本发明涉及通过使肝祖细胞与根据实施例1至180中任一项所述的化合物接触而获得的肝祖细胞群。在优选的实施例中,通过使肝祖细胞与根据实施例1至180中任一项所述的化合物接触而获得的肝祖细胞已经被基因编辑。优选地,所述基因编辑靶向与宿主抗移植免疫应答相关的基因。

[1217] 实施例215.一种具有式A1的化合物或其药学上可接受的盐,



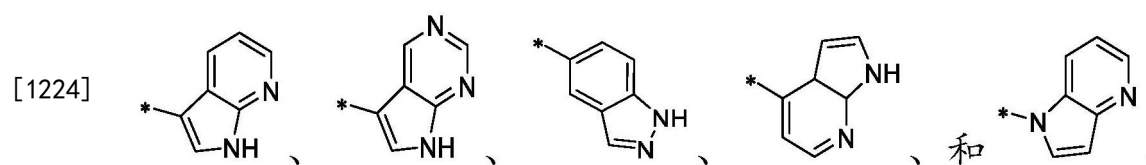
[1219] 用于促进伤口愈合,其中

[1220]  $X^1$ 和 $X^2$ 各自独立地是CH或N;

[1221] 环A是

[1222] (a) 5或6元单环杂芳基,其通过碳环成员与分子的其余部分连接,并包含1至4个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员,条件是所述杂原子环成员中至少一个是在5元杂芳基的相对于连接碳环成员的3位或4位的或在6元杂芳基的对位环位置上的未经取代的氮(-N=);或

[1223] (b) 选自以下的9元稠合双环杂芳基



[1225] 其中“\*”代表环A与分子其余部分的附接点;

[1226] 其中环A未经取代或经1至2个独立地选自卤素、氰基、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $-NH_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二-( $C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $C_{3-6}$ 环烷基和苯基磺酰基的取代基取代;

[1227]  $R^0$ 是羟基或 $C_{1-6}$ 烷氧基;

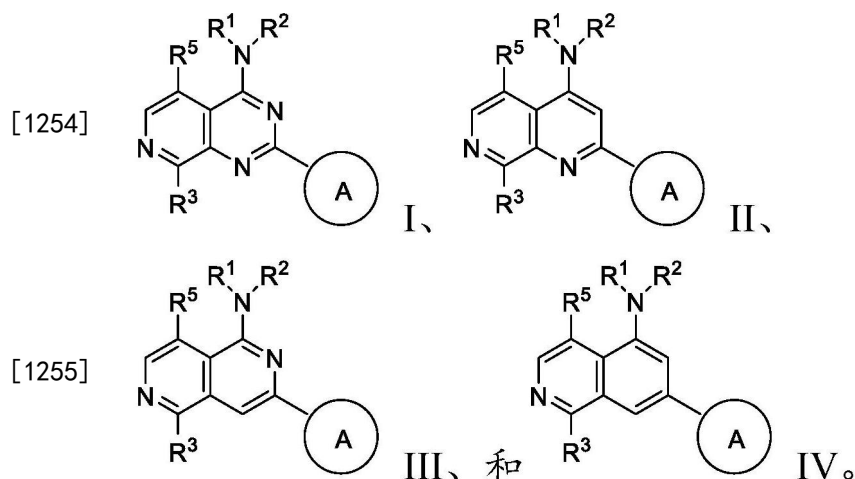
[1228]  $R^1$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基;

[1229]  $R^2$ 选自

[1230] (a) 未经取代的或经1至3个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{1-8}$ 烷基

[1231] 卤素;

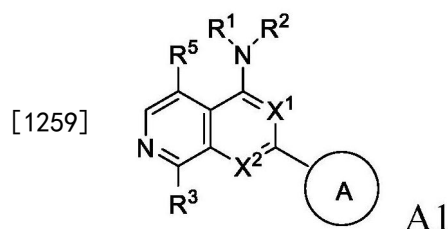
- [1232] 氰基;
- [1233] 氧代;
- [1234]  $C_2$ 烯基;
- [1235]  $C_2$ 炔基;
- [1236]  $C_{1-6}$ 卤代烷基;
- [1237]  $-OR^6$ , 其中 $R^6$ 选自氢、未经取代或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;
- [1238]  $-NR^{7a}R^{7b}$ , 其中 $R^{7a}$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基, 并且 $R^{7b}$ 选自氢、 $-C(O)R^0$ 、未经取代的或经 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;
- [1239]  $-C(O)R^8$ , 其中 $R^8$ 是 $R^0$ 或 $-NH-C_{1-6}$ 烷基 $-C(O)R^0$ ;
- [1240]  $-S(O)_2C_{1-6}$ 烷基;
- [1241] 单环 $C_{3-6}$ 环烷基或多环 $C_{7-10}$ 环烷基, 其各自未经取代或经1至2个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、羟基 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $-NH_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基和二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基的取代基取代;
- [1242] 6元杂环烷基, 其包含1至2个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员并且未经取代或经1至2个独立地选自羟基、卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 烷基氨基和二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基的取代基取代;
- [1243] 未经取代的或经卤素取代的苯基;
- [1244] 5或6元单环杂芳基, 其包含1至4个独立地选自N和O的杂原子作为环成员; 以及
- [1245] 9或10元稠合双环杂芳基, 其包含1至2个独立地选自N和O的杂原子作为环成员;
- [1246] (b)  $-S(O)_2C_{1-6}$ 烷基;
- [1247] (c) 未经取代的或经1至2个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基和 $R^0$ 的取代基取代的苯基;
- [1248] (d) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{3-6}$ 环烷基:  $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基; 以及
- [1249] (e) 4元杂环烷基, 其包含1至2个选自N、O和S的杂原子作为环成员, 并且未经取代或经1至2个独立地选自以下的取代基取代:  $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基;
- [1250] 或 $R^1$ 和 $R^2$ 可以与两者都结合的氮原子一起形成4至6元杂环烷基, 所述杂环烷基可以包含1至2个独立地选自N、O和S的其他杂原子作为环成员, 其中由 $R^1$ 和 $R^2$ 与两者都结合的氮原子一起形成的4至6元杂环烷基未经取代或经1至3个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基以及 $R^0$ 的取代基取代;
- [1251]  $R^3$ 选自氢、卤素和 $C_{1-6}$ 烷基; 并且
- [1252]  $R^5$ 选自氢、卤素和 $-NH-$  (3至8元杂烷基), 其中 $-NH-$  (3至8元杂烷基) 的3至8元杂 $C_{3-8}$ 烷基包含1至2个氧原子作为链成员且未经取代或经 $R^0$ 取代。
- [1253] 实施例216. 根据实施例215所述的用于促进伤口愈合的具有式A1的化合物或其药学上可接受的盐, 其中所述化合物具有选自式I至IV的式:



[1256] 实施例217. 根据实施例215所述的用于促进伤口愈合的具有式A1的化合物或其药学上可接受的盐, 其中所述化合物选自3-(吡啶-4-基)-N-(1-(三氟甲基)环丙基)-2,6-萘啶-1-胺; N-(1-甲基环丙基)-7-(吡啶-4-基)异喹啉-5-胺; 2-(吡啶-4-基)-4-(3-(三氟甲基)哌嗪-1-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶; N-(叔-丁基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺; 和N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-[(2S)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺。

[1257] 实施例218. 根据实施例215所述的用于促进伤口愈合的具有式A1的化合物或其药学上可接受的盐, 其中所述化合物是根据实施例1至180中的任一个。

[1258] 实施例219. 具有式A1的化合物或其药学上可接受的盐



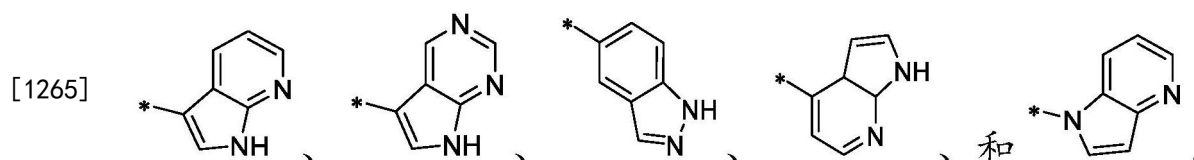
[1260] 用于促进伤口愈合的用途, 其中

[1261]  $X^1$ 和 $X^2$ 各自独立地是CH或N;

[1262] 环A是

[1263] (a) 5或6元单环杂芳基, 其通过碳环成员与分子的其余部分连接, 并包含1至4个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员, 条件是所述杂原子环成员中至少一个是在5元杂芳基的相对于连接碳环成员的3位或4位的或在6元杂芳基的对位环位置上的未经取代的氮(-N=); 或

[1264] (b) 选自以下的9元稠合双环杂芳基



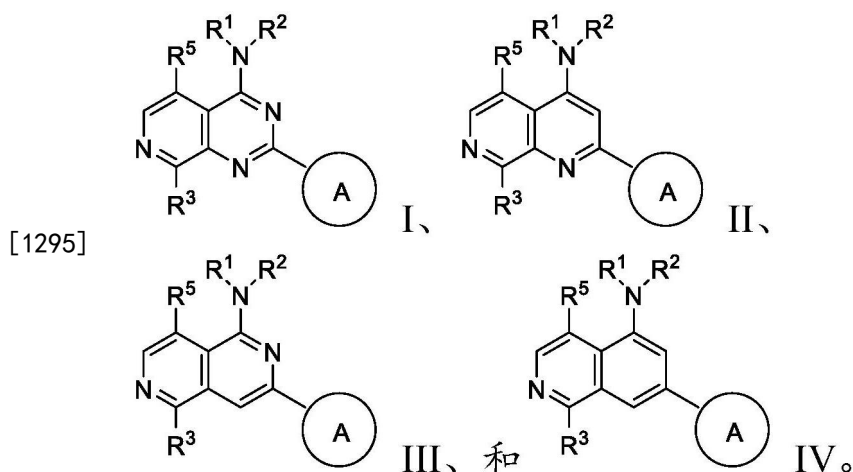
[1266] 其中“\*”代表环A与分子其余部分的附接点;

[1267] 其中环A未经取代或经1至2个独立地选自卤素、氰基、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $-NH_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $C_{3-6}$ 环烷基和苯基磺酰基的取代基取代;

[1268]  $R^0$ 是羟基或 $C_{1-6}$ 烷氧基;

- [1269]  $R^1$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基；
- [1270]  $R^2$ 选自
- [1271] (a) 未经取代的或经1至3个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{1-8}$ 烷基
- [1272] 卤素；
- [1273] 氰基；
- [1274] 氧代；
- [1275]  $C_2$ 烯基；
- [1276]  $C_2$ 炔基；
- [1277]  $C_{1-6}$ 卤代烷基；
- [1278]  $-OR^6$ ，其中 $R^6$ 选自氢、未经取代或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；
- [1279]  $-NR^{7a}R^{7b}$ ，其中 $R^{7a}$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基，并且 $R^{7b}$ 选自氢、 $-C(O)R^0$ 、未经取代的或经 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；
- [1280]  $-C(O)R^8$ ，其中 $R^8$ 是 $R^0$ 或 $-NH-C_{1-6}$ 烷基- $C(O)R^0$ ；
- [1281]  $-S(O)_2C_{1-6}$ 烷基；
- [1282] 单环 $C_{3-6}$ 环烷基或多环 $C_{7-10}$ 环烷基，其各自未经取代或经1至2个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、羟基 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $-NH_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基和二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基的取代基取代；
- [1283] 6元杂环烷基，其包含1至2个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员并且未经取代或经1至2个独立地选自羟基、卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 烷基氨基和二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基的取代基取代；
- [1284] 未经取代的或经卤素取代的苯基；
- [1285] 5或6元单环杂芳基，其包含1至4个独立地选自N和O的杂原子作为环成员；以及
- [1286] 9或10元稠合双环杂芳基，其包含1至2个独立地选自N和O的杂原子作为环成员；
- [1287] (b)  $-S(O)_2C_{1-6}$ 烷基；
- [1288] (c) 未经取代的或经1至2个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基和 $R^0$ 的取代基取代的苯基；
- [1289] (d) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{3-6}$ 环烷基： $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；以及
- [1290] (e) 4元杂环烷基，其包含1至2个选自N、O和S的杂原子作为环成员，并且未经取代或经1至2个独立地选自以下的取代基取代： $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；
- [1291] 或 $R^1$ 和 $R^2$ 可以与两者都结合的氮原子一起形成4至6元杂环烷基，所述杂环烷基可以包含1至2个独立地选自N、O和S的其他杂原子作为环成员，其中由 $R^1$ 和 $R^2$ 与两者都结合的氮原子一起形成的4至6元杂环烷基未经取代或经1至3个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基以及 $R^0$ 的取代基取代；
- [1292]  $R^3$ 选自氢、卤素和 $C_{1-6}$ 烷基；并且
- [1293]  $R^5$ 选自氢、卤素和 $-NH-$  (3至8元杂烷基)，其中 $-NH-$  (3至8元杂烷基)的3至8元杂 $C_{3-8}$ 烷基包含1至2个氧原子作为链成员且未经取代或经 $R^0$ 取代。
- [1294] 实施例220. 根据实施例219所述的具有式A1的化合物或其药学上可接受的盐用于

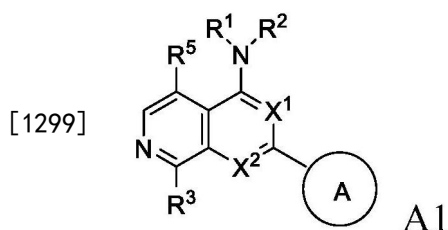
促进伤口愈合的用途,其中所述化合物具有选自式I至IV的式:



[1296] 实施例221.根据实施例219所述的具有式A1的化合物或其药学上可接受的盐用于促进伤口愈合的用途,其中所述化合物选自3-(吡啶-4-基)-N-(1-(三氟甲基)环丙基)-2,6-萘啶-1-胺;N-(1-甲基环丙基)-7-(吡啶-4-基)异喹啉-5-胺;和2-(吡啶-4-基)-4-(3-(三氟甲基)哌嗪-1-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶。

[1297] 实施例222.根据实施例219所述的具有式A1的化合物或其药学上可接受的盐用于促进伤口愈合的用途,其中所述化合物是根据实施例1至180中的任一个。

[1298] 实施例223.一种促进伤口愈合的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的具有式A1的化合物或其药学上可接受的盐,



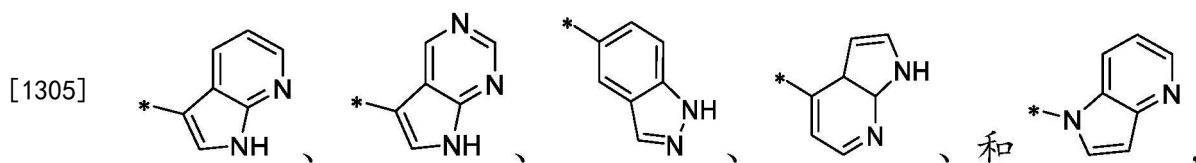
[1300] 其中

[1301]  $X^1$ 和 $X^2$ 各自独立地是CH或N;

[1302] 环A是

[1303] (a) 5或6元单环杂芳基,其通过碳环成员与分子的其余部分连接,并包含1至4个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员,条件是所述杂原子环成员中至少一个是在5元杂芳基的相对于连接碳环成员的3位或4位的或在6元杂芳基的对位环位置上的未经取代的氮(-N=);或

[1304] (b) 选自以下的9元耦合双环杂芳基

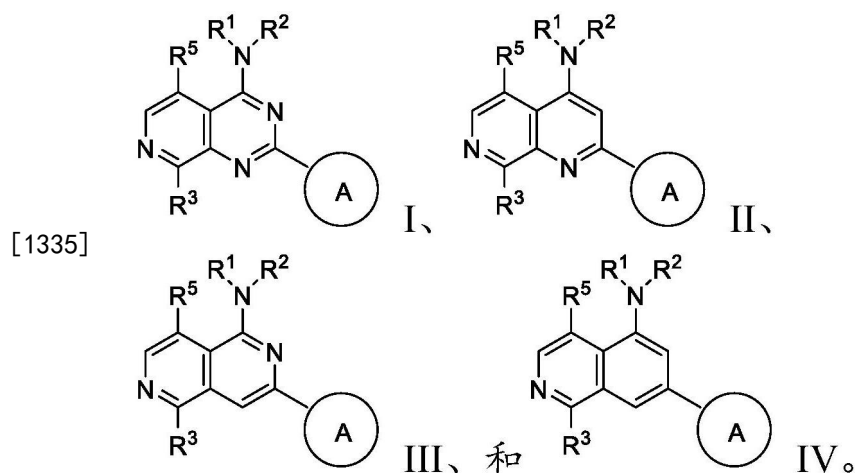


[1306] 其中“\*”代表环A与分子其余部分的附接点;

[1307] 其中环A未经取代或经1至2个独立地选自卤素、氰基、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $NH_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二-( $C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $C_{3-6}$ 环烷基和苯基磺酰基的取代基取代;

- [1308]  $R^0$ 是羟基或 $C_{1-6}$ 烷氧基；
- [1309]  $R^1$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基；
- [1310]  $R^2$ 选自
- [1311] (a) 未经取代的或经1至3个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{1-8}$ 烷基
- [1312] 卤素；
- [1313] 氰基；
- [1314] 氧代；
- [1315]  $C_2$ 烯基；
- [1316]  $C_2$ 炔基；
- [1317]  $C_{1-6}$ 卤代烷基；
- [1318]  $-OR^6$ ，其中 $R^6$ 选自氢、未经取代或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；
- [1319]  $-NR^{7a}R^{7b}$ ，其中 $R^{7a}$ 是氢或 $C_{1-6}$ 烷基，并且 $R^{7b}$ 选自氢、 $-C(O)R^0$ 、未经取代的或经 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；
- [1320]  $-C(O)R^8$ ，其中 $R^8$ 是 $R^0$ 或 $-NH-C_{1-6}$ 烷基 $-C(O)R^0$ ；
- [1321]  $-S(O)_2C_{1-6}$ 烷基；
- [1322] 单环 $C_{3-6}$ 环烷基或多环 $C_{7-10}$ 环烷基，其各自未经取代或经1至2个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、羟基 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $-NH_2$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基和二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基的取代基取代；
- [1323] 6元杂环烷基，其包含1至2个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员并且未经取代或经1至2个独立地选自羟基、卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 烷基氨基和二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基的取代基取代；
- [1324] 未经取代的或经卤素取代的苯基；
- [1325] 5或6元单环杂芳基，其包含1至4个独立地选自N和O的杂原子作为环成员；以及
- [1326] 9或10元稠合双环杂芳基，其包含1至2个独立地选自N和O的杂原子作为环成员；
- [1327] (b)  $-S(O)_2C_{1-6}$ 烷基；
- [1328] (c) 未经取代的或经1至2个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基和 $R^0$ 的取代基取代的苯基；
- [1329] (d) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的 $C_{3-6}$ 环烷基： $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；以及
- [1330] (e) 4元杂环烷基，其包含1至2个选自N、O和S的杂原子作为环成员，并且未经取代或经1至2个独立地选自以下的取代基取代： $C_{1-6}$ 卤代烷基、 $R^0$ 、 $C_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(C_{1-6}$ 烷基)氨基、 $-C(O)R^0$ 和未经取代的或经 $R^0$ 或 $-C(O)R^0$ 取代的 $C_{1-6}$ 烷基；
- [1331] 或 $R^1$ 和 $R^2$ 可以与两者都结合的氮原子一起形成4至6元杂环烷基，所述杂环烷基可以包含1至2个独立地选自N、O和S的其他杂原子作为环成员，其中由 $R^1$ 和 $R^2$ 与两者都结合的氮原子一起形成的4至6元杂环烷基未经取代或经1至3个独立地选自卤素、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基以及 $R^0$ 的取代基取代；
- [1332]  $R^3$ 选自氢、卤素和 $C_{1-6}$ 烷基；并且
- [1333]  $R^5$ 选自氢、卤素和 $-NH-$  (3至8元杂烷基)，其中 $-NH-$  (3至8元杂烷基)的3至8元杂 $C_{3-8}$ 烷基包含1至2个氧原子作为链成员且未经取代或经 $R^0$ 取代。

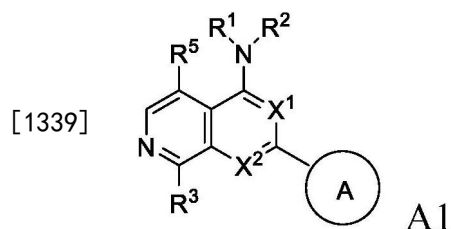
[1334] 实施例224. 根据实施例223所述的促进伤口愈合的方法, 其中所述化合物具有选自式I至IV的式:



[1336] 实施例225. 根据实施例223所述的促进伤口愈合的方法, 其中所述化合物选自3-(吡啶-4-基)-N-(1-(三氟甲基)环丙基)-2,6-萘啶-1-胺; N-(1-甲基环丙基)-7-(吡啶-4-基)异喹啉-5-胺; 2-(吡啶-4-基)-4-(3-(三氟甲基)哌嗪-1-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶; N-(叔-丁基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺; 和N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-[(2S)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺。

[1337] 实施例226. 根据实施例223所述的促进伤口愈合的方法, 其中所述化合物是根据实施例1至180中的任一个。

[1338] 实施例227. 具有式A1的化合物或其药学上可接受的盐



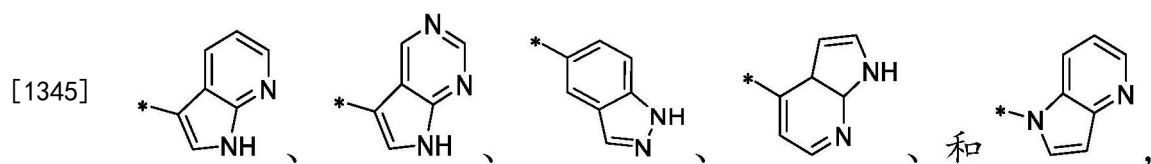
[1340] 在制造用于促进伤口愈合的药物中的用途, 其中

[1341]  $X^1$ 和 $X^2$ 各自独立地是CH或N;

[1342] 环A是

[1343] (a) 5或6元单环杂芳基, 其通过碳环成员与分子的其余部分连接, 并包含1至4个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员, 条件是所述杂原子环成员中至少一个是在5元杂芳基的相对于连接碳环成员的3位或4位的或在6元杂芳基的对位环位置上的未经取代的氮(-N=); 或

[1344] (b) 选自以下的9元稠合双环杂芳基



[1346] 其中“\*”代表环A与分子其余部分的附接点;

[1347] 其中环A未经取代或经1至2个独立地选自卤素、氰基、 $C_{1-6}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 卤代烷基、-

$\text{NH}_2$ 、 $\text{C}_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(\text{C}_{1-6}$ 烷基)氨基、 $\text{C}_{3-6}$ 环烷基和苯基磺酰基的取代基取代；

[1348]  $\text{R}^0$ 是羟基或 $\text{C}_{1-6}$ 烷氧基；

[1349]  $\text{R}^1$ 是氢或 $\text{C}_{1-6}$ 烷基；

[1350]  $\text{R}^2$ 选自

[1351] (a) 未经取代的或经1至3个独立地选自以下的取代基取代的 $\text{C}_{1-8}$ 烷基

[1352] 卤素；

[1353] 氰基；

[1354] 氧代；

[1355]  $\text{C}_2$ 烯基；

[1356]  $\text{C}_2$ 炔基；

[1357]  $\text{C}_{1-6}$ 卤代烷基；

[1358]  $-\text{OR}^6$ ，其中 $\text{R}^6$ 选自氢、未经取代或经 $\text{R}^0$ 或 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^0$ 取代的 $\text{C}_{1-6}$ 烷基；

[1359]  $-\text{NR}^{7a}\text{R}^{7b}$ ，其中 $\text{R}^{7a}$ 是氢或 $\text{C}_{1-6}$ 烷基，并且 $\text{R}^{7b}$ 选自氢、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^0$ 、未经取代的或经 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^0$ 取代的 $\text{C}_{1-6}$ 烷基；

[1360]  $-\text{C}(\text{O})\text{R}^8$ ，其中 $\text{R}^8$ 是 $\text{R}^0$ 或 $-\text{NH}-\text{C}_{1-6}$ 烷基- $\text{C}(\text{O})\text{R}^0$ ；

[1361]  $-\text{S}(\text{O})_2\text{C}_{1-6}$ 烷基；

[1362] 单环 $\text{C}_{3-6}$ 环烷基或多环 $\text{C}_{7-10}$ 环烷基，其各自未经取代或经1至2个独立地选自卤素、 $\text{C}_{1-6}$ 烷基、羟基 $\text{C}_{1-6}$ 烷基、 $\text{C}_{1-6}$ 卤代烷基、 $\text{R}^0$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $\text{C}_{1-6}$ 烷基氨基和二- $(\text{C}_{1-6}$ 烷基)氨基的取代基取代；

[1363] 6元杂环烷基，其包含1至2个独立地选自N、O和S的杂原子作为环成员并且未经取代或经1至2个独立地选自羟基、卤素、 $\text{C}_{1-6}$ 烷基、 $\text{C}_{1-6}$ 烷基氨基和二- $(\text{C}_{1-6}$ 烷基)氨基的取代基取代；

[1364] 未经取代的或经卤素取代的苯基；

[1365] 5或6元单环杂芳基，其包含1至4个独立地选自N和O的杂原子作为环成员；以及

[1366] 9或10元稠合双环杂芳基，其包含1至2个独立地选自N和O的杂原子作为环成员；

[1367] (b)  $-\text{S}(\text{O})_2\text{C}_{1-6}$ 烷基；

[1368] (c) 未经取代的或经1至2个独立地选自卤素、 $\text{C}_{1-6}$ 烷基和 $\text{R}^0$ 的取代基取代的苯基；

[1369] (d) 未经取代的或经1至2个独立地选自以下的取代基取代的 $\text{C}_{3-6}$ 环烷基： $\text{C}_{1-6}$ 卤代烷基、 $\text{R}^0$ 、 $\text{C}_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(\text{C}_{1-6}$ 烷基)氨基、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^0$ 和未经取代的或经 $\text{R}^0$ 或 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^0$ 取代的 $\text{C}_{1-6}$ 烷基；以及

[1370] (e) 4元杂环烷基，其包含1至2个选自N、O和S的杂原子作为环成员，并且未经取代或经1至2个独立地选自以下的取代基取代： $\text{C}_{1-6}$ 卤代烷基、 $\text{R}^0$ 、 $\text{C}_{1-6}$ 烷基氨基、二- $(\text{C}_{1-6}$ 烷基)氨基、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^0$ 和未经取代的或经 $\text{R}^0$ 或 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^0$ 取代的 $\text{C}_{1-6}$ 烷基；

[1371] 或 $\text{R}^1$ 和 $\text{R}^2$ 可以与两者都结合的氮原子一起形成4至6元杂环烷基，所述杂环烷基可以包含1至2个独立地选自N、O和S的其他杂原子作为环成员，其中由 $\text{R}^1$ 和 $\text{R}^2$ 与两者都结合的氮原子一起形成的4至6元杂环烷基未经取代或经1至3个独立地选自卤素、 $\text{C}_{1-6}$ 烷基、 $\text{C}_{1-6}$ 卤代烷基以及 $\text{R}^0$ 的取代基取代；

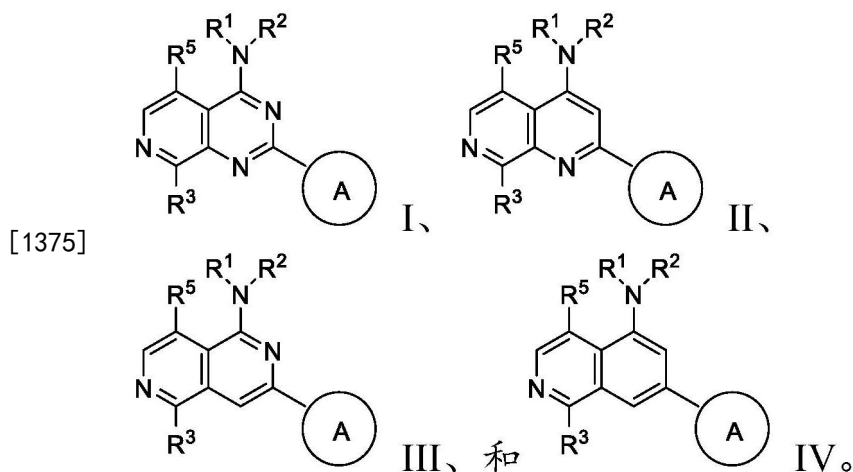
[1372]  $\text{R}^3$ 选自氢、卤素和 $\text{C}_{1-6}$ 烷基；并且

[1373]  $\text{R}^5$ 选自氢、卤素和 $-\text{NH}-$  (3至8元杂烷基)，其中 $-\text{NH}-$  (3至8元杂烷基)的3至8元杂 $\text{C}_{3-8}$



烷基包含1至2个氧原子作为链成员且未经取代或经R<sup>0</sup>取代。

[1374] 实施例228. 根据实施例227所述的具有式A1的化合物或其药学上可接受的盐在制造用于促进伤口愈合的药物中的用途, 其中所述化合物具有选自式I至IV的式:



[1376] 实施例229. 根据实施例227所述的具有式A1的化合物或其药学上可接受的盐在制造用于促进伤口愈合的药物中的用途, 其中所述化合物选自3-(吡啶-4-基)-N-(1-(三氟甲基)环丙基)-2,6-萘啶-1-胺; N-(1-甲基环丙基)-7-(吡啶-4-基)异喹啉-5-胺; 和2-(吡啶-4-基)-4-(3-(三氟甲基)哌嗪-1-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶。

[1377] 实施例230. 根据实施例227所述的具有式A1的化合物或其药学上可接受的盐在制造用于促进伤口愈合的药物中的用途, 其中所述化合物是根据实施例1至180中的任一个。

[1378] 在另一个实施例中, 本发明涉及包含至少一种具有式A2或其子式的化合物或其药学上可接受的盐的组合物。

[1379] 在另一个实施例中, 本发明涉及药物组合物, 其包含至少一种具有式A2或其子式的化合物或其药学上可接受的盐和至少一种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[1380] 在另一个实施例中, 本发明涉及用作药物的具有式A2或其子式的化合物或其药学上可接受的盐或药物组合物。

[1381] 在另一个实施例中, 本发明涉及用于促进肝再生和肝再生长的药物组合物, 其包含具有式A1或其子式的化合物或其药学上可接受的盐。

[1382] 在另一个实施例中, 本发明还涉及具有式A1或其子式的化合物或其药学上可接受的盐单独地或任选地与另一种具有式A1或其子式的化合物或其药学上可接受的盐和/或至少一种其他类型的治疗剂组合地在制备用于促进肝再生和肝再生长的药物中的用途。

[1383] 在另一个实施例中, 本发明涉及一种促进肝再生和肝再生长的方法, 所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的具有式A1或其子式的化合物或其药学上可接受的盐。

[1384] 在另一个实施例中, 本发明涉及用于以下的方法: 促进肝再生和肝再生长, 特别是用于治疗边缘移植植物移植后肝再生长不足; 用于支持广泛肝切除术后剩余肝脏块的增强的再生长; 用于病毒性肝炎、药物引起的肝损伤、自身免疫性肝炎、缺血性和充血性肝病引起的急性肝衰竭后患者肝的再生; 用于治疗具有由非酒精性脂肪性肝炎、酒精性脂肪性肝炎、慢性乙型和丙型病毒性肝炎、血色素沉着症、 $\alpha$ -1抗胰蛋白酶缺乏症、威尔逊氏病和药物诱导的肝纤维化导致的慢性肝损伤和潜在肝纤维化的患者以增强再生能力并加速纤维化消

退。

[1385] 在另一个实施例中,本发明涉及促进肝再生和肝再生长的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的能够抑制LATS1和LATS2激酶活性的试剂;从而诱导YAP易位并驱动下游基因表达以促进细胞增殖。在另一个实施例中,所述试剂是具有式A1或其子式的化合物,或其药学上可接受的盐。

[1386] 在另一个实施例中,本发明涉及用于促进伤口愈合的药物组合物,其包含具有式A1或其子式的化合物或其药学上可接受的盐。

[1387] 在另一个实施例中,本发明还涉及具有式A1或其子式的化合物或其药学上可接受的盐单独地或任选地与另一种具有式A1或其子式的化合物或其药学上可接受的盐和/或至少一种其他类型的治疗剂组合地在制备用于促进伤口愈合的药物中的用途。

[1388] 在另一个实施例中,本发明涉及一种促进伤口愈合的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的具有式A1或其子式的化合物或其药学上可接受的盐。

[1389] 在另一个实施例中,本发明涉及促进伤口愈合的方法,所述方法包括治疗或改善烧伤、急性和慢性皮肤溃疡的症状,其中皮肤溃疡包括但不限于血管性溃疡,糖尿病性溃疡和压力性溃疡。

[1390] 在另一个实施例中,本发明涉及促进伤口愈合的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的能够抑制LATS1和LATS2激酶活性的试剂;从而诱导YAP易位并驱动下游基因表达以促进细胞增殖。在另一个实施例中,所述试剂是具有式A1或其子式的化合物,或其药学上可接受的盐。

[1391] 在另一个实施例中,本发明涉及治疗眼疾病或障碍的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用细胞群,其中所述群已经在能够抑制LATS1和LATS2激酶活性的试剂存在下生长;从而诱导YAP易位并驱动下游基因表达以促进细胞增殖。在另一个实施例中,所述试剂是具有式A1或其子式的化合物,或其盐。

[1392] 在另一个实施例中,本发明涉及治疗眼疾病或障碍的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用角膜缘干细胞群,其中所述群已经在能够抑制LATS1和LATS2激酶活性的试剂存在下生长;从而诱导YAP易位并驱动下游基因表达以促进细胞增殖。在另一个实施例中,所述试剂是具有式A1或其子式的化合物,或其盐。

[1393] 在另一个实施例中,本发明涉及治疗眼疾病或障碍的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用角膜内皮细胞群,其中所述群已经在能够抑制LATS1和LATS2激酶活性的试剂存在下生长;从而诱导YAP易位并驱动下游基因表达以促进细胞增殖。在另一个实施例中,所述试剂是具有式A1或其子式的化合物,或其药学上可接受的盐。

[1394] 在另一个实施例中,本发明涉及促进眼伤口愈合的方法,所述方法包括将治疗有效量的本发明的化合物施用于受试者的眼。在一个实施例中,眼伤口是角膜伤口。在其他实施例中,眼伤口是损伤或手术伤口。

[1395] 定义

[1396] 除非另有说明,否则上文和下文中使用的通用术语优选在本发明的上下文中具有以下含义,其中无论在什么情况下使用的更通用的术语可以彼此独立地由更具体的定义代替或保留,从而定义本发明的更详细实施例。

[1397] 在本文描述的所有方法能够以任何合适顺序进行,除非本文另外指明或另外与上

下文明显相矛盾。本文提供的任何和所有实例或示例性语言(例如“如”)的使用仅旨在更好地说明本发明,而不对另外要求保护的本发明范围做出限制。

[1398] 术语“一个/种(a/an)”、“所述(the)”以及在本发明的上下文中使用的类似术语(特别是在权利要求的上下文中)应被解释为涵盖单数和复数二者,本文中除非另外指示或与上文文明明显相矛盾。

[1399] 如本文所使用的,术语“ $C_{1-8}$ 烷基”是指仅由碳和氢原子组成的直链或支链烃链基团,所述基团中不存在不饱和,具有从一至八个碳原子,并且通过单键连接到分子的其余部分。术语“ $C_{1-4}$ 烷基”应相应地解释。如本文所使用的,术语正烷基是指如本文所定义的直链(无支链)烷基。 $C_{1-8}$ 烷基的实例包括但不限于甲基、乙基、正丙基、1-甲基乙基(异丙基)、正丁基、正戊基、1,1-二甲基乙基(叔丁基)、 $-C(CH_3)_2CH_2CH(CH_3)_2$ 和 $-C(CH_3)_2CH_3$ 。

[1400] 如本文所使用的,术语“ $C_{2-6}$ 烯基”是指仅由碳和氢原子组成的直链或支链烃链基团,所述基团包含至少一个双键,具有从两个至六个碳原子,通过单键连接到分子的其余部分。术语“ $C_{2-4}$ 烯基”应相应地解释。 $C_{2-6}$ 烯基的实例包括但不限于乙烯基、丙-1-烯基、丁-1-烯基、戊-1-烯基、戊-4-烯基和戊-1,4-二烯基。

[1401] 术语“亚烷基”是指二价烷基基团。例如,术语“ $C_{1-6}$ 亚烷基”或“ $C_1$ 至 $C_6$ 亚烷基”是指含有1至6个碳原子的二价、直链或支链脂族基团。亚烷基的实例包括但不限于亚甲基( $-CH_2-$ )、亚乙基( $-CH_2CH_2-$ )、正亚丙基( $-CH_2CH_2CH_2-$ )、异亚丙基( $-CH(CH_3)CH_2-$ )、正亚丁基、仲亚丁基、异亚丁基、叔亚丁基、正亚戊基、异亚戊基、新亚戊基和正亚己基。

[1402] 如本文所使用的,术语“ $C_{2-6}$ 炔基”是指仅由碳和氢原子组成的直链或支链烃链基团,所述基团包含至少一个三键,具有从两个至六个碳原子,并且通过单键连接到分子的其余部分。术语“ $C_{2-4}$ 炔基”应相应地解释。 $C_{2-6}$ 炔基的实例包括但不限于乙炔基、丙-1-炔基、丁-1-炔基、戊-1-炔基、戊-4-炔基和戊-1,4-二炔基。

[1403] 如本文所使用的,术语“ $C_{1-6}$ 烷氧基”是指式 $-OR_a$ 的基团,其中 $R_a$ 是如以上通常所定义的 $C_{1-6}$ 烷基基团。“ $C_{1-6}$ 烷氧基”或“ $C_1$ 至 $C_6$ 烷氧基”旨在包括 $C_1$ 、 $C_2$ 、 $C_3$ 、 $C_4$ 、 $C_5$ 和 $C_6$ 烷氧基(即烷基链中的1至6个碳原子)。 $C_{1-6}$ 烷氧基的实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、丁氧基、异丁氧基、戊氧基和己氧基。

[1404] 如本文所使用的,术语“ $C_{1-6}$ 烷基氨基”是指式 $-NH-R_a$ 的基团,其中 $R_a$ 是如以上所定义的 $C_{1-4}$ 烷基基团。

[1405] 如本文所使用的,术语“二- ( $C_{1-6}$ 烷基) 氨基”是指式 $-N(R_a)-R_a$ 的基团,其中 $R_a$ 是如以上所定义的可以相同或不同的 $C_{1-4}$ 烷基基团。

[1406] 如本文所使用的,术语“氰基”是指基团 $-C\equiv N$ 。

[1407] 术语“环烷基”是指作为完全氢化的环的非芳香族碳环,包括单环-、双环-或多环-系统。“ $C_{3-10}$ 环烷基”或“ $C_3$ 至 $C_{10}$ 环烷基”旨在包括具有3至10个碳环成员的 $C_3$ 、 $C_4$ 、 $C_5$ 、 $C_6$ 、 $C_7$ 、 $C_8$ 、 $C_9$ 和 $C_{10}$ 环烷基基团。环烷基基团的实例包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、环己基和降茛基。

[1408] 如本文所使用的,“稠合环”是指多环组件,其中包含所述环组件的环如此连接,使得两个环共有的环原子彼此直接键合。稠合环组件可以是饱和的、部分饱和的、芳香族的、碳环的、杂环的等。常见稠合环的非排他性实例包括十氢化萘、萘、蒽、菲、吲哚、苯并呋喃、嘌呤、喹啉等。

[1409] “卤素”是指溴、氯、氟、或碘；优选氟、氯或溴。

[1410] 如本文所使用的，术语“卤代烷基”旨在包括具有指定碳原子数的、经一个或多个卤素取代的、如上述定义的支链和直链饱和烷基。例如，“C<sub>1-6</sub>卤代烷基”或“C<sub>1</sub>至C<sub>6</sub>卤代烷基”旨在包括C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>、C<sub>5</sub>和C<sub>6</sub>烷基链。卤代烷基的实例包括但不限于氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、三氯甲基、五氟乙基、五氯乙基，2,2,2-三氟乙基、1,3-二溴丙-2-基、3-溴-2-氟丙基和1,4,4-三氟丁-2-基、七氟丙基和七氯丙基。

[1411] 如本文所使用的“杂烷基”是指如本文所定义的烷基，其中烷基链内的一个或多个碳原子被独立地选自N、O和S的杂原子替代。在如本文所使用的C<sub>x-y</sub>杂烷基或x至y元杂烷基中，x-y描述了杂烷基上的链原子（碳和杂原子）的数目。例如，C<sub>3-8</sub>杂烷基是指具有3至8个链原子的烷基链。此外，如本文所定义的杂烷基，使基团与分子的其余部分连接的原子必须是碳。3至8元杂烷基的代表性实例包括但不限于-(CH<sub>2</sub>)<sub>0</sub>OCH<sub>3</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OH和-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-(O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-OH。

[1412] 术语“杂芳基”是指在5至10元芳香族环系统中包含至少一个杂原子（例如，氧、硫、氮或其组合）的芳香族部分。杂芳基的实例包括但不限于吡咯基、吡啶基、吡唑基、咪唑基、呋喃基、噻吩基、呋喃基、苯并呋喃基、噻唑基、异噻唑基、咪唑基、三唑基、四唑基、三嗪基、嘧啶基、吡嗪基、噻唑基、嘌呤基、苯并咪唑基、喹啉基、异喹啉基、喹啉基、苯并吡喃基、苯并噻吩基、苯并咪唑基、苯并噻唑基和1H-苯并[d][1,2,3]三唑基。杂芳香族部分可以由单环或稠合环系统组成。典型的单杂芳基环是含有一至四个独立地选自N、O和S的杂原子的5至6元环并且典型的稠合杂芳基环系统是含有一至四个独立地选自N、O和S的杂原子的9至10元环系统。稠合杂芳基环系统可以由两个稠合在一起的杂芳基环或稠合至芳基（例如苯基）的杂芳基组成。

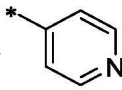
[1413] 如本文所使用的，术语“杂原子”是指氮(N)，氧(O)或硫(S)原子。除非另有说明，否则任何具有不满足的化合价的杂原子均假定具有足以满足化合价的氢原子，并且当杂原子是硫时，其可以被未氧化(S)或被氧化为S(O)或S(O)<sub>2</sub>。


[1414] 如本文所使用的术语“羟基”是指基团-OH。

[1415] 术语“杂环烷基”意指如本申请中所定义的环境基，条件是所指示的环碳中的一个或多个被选自以下的部分替代：-O-、-N=、-NH-、-S-、-S(O)-和-S(O)<sub>2</sub>-。3至8元杂环烷基的实例包括但不限于：环氧乙烷基、氮丙啶基、氮杂环丁烷基、咪唑烷基、吡唑烷基、四氢呋喃基、四氢噻吩基、四氢噻吩基1,1-二氧化物、噻唑烷基、噻唑烷基、吡咯烷基、吡咯烷基-2-酮、吗啉基、哌嗪基、哌啶基、吡啶烷基、六氢嘧啶基、1,4-二氧杂-8-氮杂-螺[4.5]十-8-基、硫吗啉基、亚磺酰吗啉基、磺酰吗啉基和八氢吡咯并[3,2-b]吡咯基。

[1416] 如本文所使用的术语“氧代”是指二价基团=O。

[1417] 如本文所指，术语“经取代的”是指至少一个氢原子被非氢基团替代，条件是维持正常的化合价并且取代产生稳定的化合物。在取代基是氧代（即，=O）时，那么原子上的2个氢被替代。在本发明的化合物中存在氮原子（例如胺）的情况下，可以通过用氧化剂（例如，mCPBA和/或过氧化氢）处理将其转化为N-氧化物以提供本发明的其他化合物。

[1418] 如本文所使用的术语“未经取代的氮”是指由于其通过双键和单键（-N=）与其相邻的环原子的键合而没有取代能力的氮环原子。例如，在4-吡啶基  的对位的氮是

“未经取代的”氮,以及相对于连接的C环原子,在1H-吡唑-4-基  位的氮是“未经取代的”氮。

[1419] 如本领域普通技术人员将能够理解,例如,分子中的酮(-CH-C(=O)-)基团可以互变异构成其烯醇形式(-C=C(OH)-)。因此,本发明旨在覆盖所有可能的互变异构体,即使当结构仅描述其中之一时也是如此。

[1420] 如本文所使用的,“ $x-\ast$ ”和“ $x-\text{X}$ ”是表示X与分子的其他部分的附接点的符号。

[1421] 当任何变量在化合物的任何成分或化学式中出现不止一次时,则每次出现时其定义独立于其他每次出现时的其定义。因此,例如,如果显示一个基团经0-3个R基团取代,则所述基团可以未经取代或经至多三个R基团取代,并且在每次出现时,R是独立于R的定义选择的。

[1422] 除非另有说明,否则术语“本发明的化合物(compound of the present invention或compounds of the present invention)”是指具有式A2及其子式的化合物,以及异构体,例如立体异构体(包括非对映异构体、对映异构物和外消旋体)、几何异构体、构象异构体(包括旋转异构体和阻转异构体)、互变异构体、同位素标记的化合物(包括氘取代)、和固有形成的部分(例如,多晶型物、溶剂化物和/或水合物)。当存在能够形成盐的部分时,则也包括盐,特别是药学上可接受的盐。

[1423] 本领域普通技术人员将认识到,本发明的化合物可以含有手性中心,因此可以不同的异构体形式存在。如本文所使用的,术语“异构体”是指具有相同分子式但原子的排列和构型不同的不同化合物。

[1424] “对映异构体”是彼此为不能重叠镜像的一对立体异构体。对映异构体对的1:1混合物是“外消旋”混合物。所述术语用于在适当的情况下表示外消旋混合物。当指定本发明化合物的立体化学时,使用常规的RS系统指定具有两个手性中心的已知相对和绝对构型的单一立体异构体(例如(1S,2S));具有已知相对构型但绝对构型未知的单一立体异构体用星号表示(例如(1R\*,2R\*));和具有两个字母的外消旋体(例如(1RS,2RS)是(1R,2R)和(1S,2S)的外消旋混合物;(1RS,2SR)是(1R,2S)和(1S,2R)的外消旋混合物)。“非对映异构体”是具有至少两个非对称原子,但其彼此非镜像的立体异构体。绝对立体化学是根据Cahn-Ingold-Prelog R-S系统规定。当化合物是纯对映异构体时,每个手性碳处的立体化学可以通过R或S表示。未知绝对构型的拆分化合物可以取决于其使波长为钠D线的平面偏振光旋转的方向(右旋或左旋)来指定(+)或(-)。可替代地,可以通过手性HPLC通过相应的对映异构体/非对映异构体的各自保留时间来定义拆分的化合物。

[1425] 本文所述的某些化合物含有一个或多个不对称中心或不对称轴,并且因此可以生成对映异构体、非对映异构体、以及其他立体异构形式,可以根据绝对立体化学将其定义为(R)-或(S)-。

[1426] 当化合物包含双键或一些其他赋予分子一定量的结构刚性的特征时,可能出现几何异构体。如果所述化合物含有双键,取代基可以是E或Z构型。如果所述化合物含有二取代的环烷基,环烷基取代基可以具有顺式-或反式-构型。

[1427] 构象的异构体(或构象异构体)是可以绕一个或多个键旋转而不同的异构体。旋转

异构体是通过仅绕一个键旋转而不同的构象异构体。

[1428] 术语“阻转异构体”是指基于分子中受限制的旋转而产生的轴向或平面手性的结构异构体。

[1429] 除非另有说明,否则本发明的化合物意指包括所有此类可能的异构体,包括外消旋混合物、光学纯形式以及中间体混合物。光学活性(R)-和(S)-异构体可使用手性合成子或手性试剂制备,或使用常规技术(例如使用适当的溶剂或溶剂混合物在手性SFC或HPLC色谱柱(例如大赛璐公司(DAICEL Corp.)提供的CHIRALPAK®和CHIRALCEL®)上分离以实现良好分离)拆分。

[1430] 本发明化合物可以光学活性或外消旋形式来分离。光学活性形式可以通过拆分外消旋形式或由光学活性起始材料合成来制备。用于制备本发明化合物和其中制备的中间体的所有方法均被认为是本发明的一部分。当制备对映异构体或非对映异构体产物时,它们可以通过常规方法分离,例如通过色谱法或分步结晶法。

[1431] 如本文所使用的术语“LATS”是大肿瘤抑制蛋白激酶的缩写。如本文所使用的LATS是指LATS1和/或LATS2。如本文所使用的,LATS1是指大肿瘤抑制激酶1,并且LATS2是指大肿瘤抑制激酶2。LATS1和LATS2都具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性。

[1432] 如本文所使用的术语“YAP1”是指是yes相关蛋白1,也称为YAP或YAP65,其是一种蛋白质,可作为参与细胞增殖的基因的转录调节剂。

[1433] 如本文所使用的术语“MST1/2”是指哺乳动物不育20样激酶-1和-2。

[1434] 如本文所使用的,术语“药物组合物”是指本发明的化合物、或其药学上可接受的盐与至少一种药学上可接受的载体一起。在一个实施例中,药物组合物是适合于局部、肠胃外或注射施用的形式。

[1435] 术语“治疗有效量”的本发明的化合物是指将引起受试者的生物或医学响应(例如,酶或蛋白活性的减小或抑制,或改善症状、缓解病症、减缓或延迟疾病进展或预防疾病等)的本发明的化合物的量。在一个非限制性实施例中,术语“治疗有效量”是指本发明化合物在施用至受试者时有效(1)至少部分缓解、抑制、预防和/或改善(i)由LATS活性介导的,或(ii)以LATS的活性(正常或异常)为特征的病症、或障碍或疾病;或(2)降低或抑制LATS活性;或(3)降低或抑制LATS的表达的量。在另一个非限制性实施例中,术语“治疗有效量”是指当被施用至细胞、或组织、或非细胞生物材料、或介质时有效地至少部分降低或抑制LATS活性;或至少部分地降低或抑制LATS的表达的量。

[1436] 术语“受试者”包括人和非人动物。非人动物包括脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,例如非人灵长类、绵羊、猫、马、牛、鸡、狗、小鼠、大鼠、山羊、兔和猪。优选地,受试者是人。除非另有说明,否则术语“患者”或“受试者”在本文中可互换使用。

[1437] 如本文所使用的术语“IC<sub>50</sub>”是指产生50%抑制作用的抑制剂的摩尔浓度。

[1438] 如本文所使用的,术语任何疾病或障碍的“治疗(treat、treating或treatment)”是指缓解或改善疾病或障碍(即,减慢或阻止疾病或其至少一种临床症状的发展);或缓解或改善与所述疾病或障碍相关的至少一种物理参数或生物标记,包括患者可能无法辨别的那些物理参数或生物标记。

[1439] 如本文所使用的,术语任何疾病或障碍的“预防(prevent、preventing或prevention)”是指疾病或障碍的预防性治疗;或延迟疾病或障碍的发作或进展。

[1440] 如本文所使用的,如果受试者将在生物学上、在医学上或在生活质量上从治疗中获益,则这类受试者是“需要”这种治疗的。

[1441] 取决于工艺条件,本发明的化合物以游离(中性)或盐形式获得。这些化合物的游离形式和盐形式,特别是“药学上可接受的盐”均在本发明的范围内。

[1442] 如本文所使用的,术语“盐”是指本发明的化合物的酸加成盐或碱加成盐。“盐”特别包括“药学上可接受的盐”。术语“药学上可接受的盐”是指保留本发明化合物的生物有效性和特性,并且通常不是生物学上或其他方面不需要的盐。在许多情况下,由于氨基和/或羧基基团或与其类似的基团的存在,本发明的化合物能够形成酸盐和/或碱盐。

[1443] 可以用无机酸和有机酸形成药学上可接受的酸加成盐。

[1444] 可以衍生出盐的无机酸包括例如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等。

[1445] 可以衍生盐的有机酸包括,例如,乙酸、丙酸、乙醇酸、草酸、马来酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、甲苯磺酸、磺基水杨酸等。

[1446] 可以用无机碱和有机碱形成药学上可接受的碱加成盐。

[1447] 可以衍生出盐的无机碱包括例如铵盐和来自元素周期表第I至XII列的金属。在某些实施例中,盐衍生自钠、钾、铵、钙、镁、铁、银、锌和铜;特别合适的盐包括铵盐、钾盐、钠盐、钙盐和镁盐。

[1448] 可以衍生出盐的有机碱包括例如伯胺、仲胺和叔胺;取代的胺(包括天然存在的取代的胺);环胺;碱性离子交换树脂等。某些有机胺包括异丙胺、苄星、胆碱盐、二乙醇胺、二乙胺、赖氨酸、葡甲胺、哌嗪和氨丁三醇。

[1449] 在另一个方面,本发明提供了呈以下形式的具有式A2的化合物:乙酸盐、抗坏血酸盐、己二酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、溴化物/氢溴酸盐、碳酸氢盐/碳酸盐、硫酸氢盐/硫酸盐、樟脑磺酸盐、癸酸盐、氯化物/盐酸盐、氯脲鎓酸盐(chlorthephyllonate)、柠檬酸盐、乙二磺酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、葡萄糖酸盐、葡萄糖醛酸盐、谷氨酸盐、戊二酸盐、乙醇酸、马尿酸盐、氢碘酸盐/碘化物、羟乙基磺酸盐、乳酸盐、乳糖醛酸盐、十二烷基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、扁桃酸盐、甲磺酸盐、甲基硫酸盐、黏酸盐、萘甲酸盐、萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、十八烷酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、磷酸盐/磷酸氢盐/磷酸二氢盐、聚半乳糖醛酸盐、丙酸盐、癸二酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、磺基水杨酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、甲苯磺酸盐三氟甲磺酸盐、三氟乙酸盐或昔萘酸盐形式。

[1450] 本文给出的任何式也旨在表示未标记的形式以及化合物的同位素标记形式。同位素标记的化合物具有由本文给出的式表示的结构,除了一个或多个原子被具有所选择的原子质量或质量数的原子取代。可以掺入本发明的化合物中的同位素包括例如氢的同位素。

[1451] 此外,掺入某些同位素,特别是氘(即<sup>2</sup>H或D)可提供更高代谢稳定性导致的某些治疗优势,例如增加的体内半衰期或减少的剂量要求或治疗指数或耐受性的改善。应理解,在此上下文中的氘被认为是具有式A1或其子式的化合物的取代基。氘的浓度可以由同位素富集因子来定义。如本文所使用的,术语“同位素富集因子”是指同位素丰度与特定同位素的天然丰度之间的比率。如果本发明的化合物中的取代指示氘,这样的化合物具有针对每个指定的氘原子的同位素富集因子为至少3500(在每个指定的氘原子上52.5%氘掺入)、至少4000(60%氘掺入)、至少4500(67.5%氘掺入)、至少5000(75%氘掺入)、至少5500(82.5%氘掺入)、至少6000(90%氘掺入)、至少6333.3(95%氘掺入)、至少6466.7(97%氘掺入)、至

少6600 (99%氘掺入) 或至少6633.3 (99.5%氘掺入)。应理解,术语“同位素富集因子”可以以针对氘的描述相同的方式施用于任何同位素。

[1452] 可以掺入本发明的化合物的同位素的其他实例包括氢、碳、氮、氧、磷、氟和氯的同位素,如分别是 $^3\text{H}$ 、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{31}\text{P}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{36}\text{Cl}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 。因此,应理解,本发明包括掺入一种或多种任何上述同位素(包括例如放射性同位素(如 $^3\text{H}$ 和 $^{14}\text{C}$ ))的化合物,或其中存在非放射性同位素(如 $^2\text{H}$ 和 $^{13}\text{C}$ )的化合物。这种同位素标记的化合物可用于代谢研究(用 $^{14}\text{C}$ )、反应动力学研究(例如,用 $^2\text{H}$ 或 $^3\text{H}$ )、包括药物或底物组织分布测定的检测或成像技术(例如正电子发射断层扫描(PET)或单光子发射型计算机断层成像(SPECT)),或可用于患者的放射性治疗。特别地, $^{18}\text{F}$ 或标记的化合物对于PET或SPECT研究可能是特别期望的。同位素标记的具有式A2的化合物通常可以通过本领域技术人员已知的常规技术或通过与所附实例和制备中所述的那些类似的方法,使用适当的同位素标记的试剂代替未标记的先前使用的试剂来制备。

[1453] 本发明的化合物的任何非对称原子(例如,碳或类似物)可以外消旋或对映异构体上富集的形式存在,例如,(R)-、(S)-或(R,S)-构型。在某些实施例中,每个不对称的原子在(R)-或(S)-构型中具有至少50%对映异构体过量、至少60%对映异构体过量、至少70%对映异构体过量、至少80%对映异构体过量、至少90%对映异构体过量、至少95%对映异构体过量或至少99%对映异构体过量。如果可能,在具有不饱和双键的原子上的取代可以按顺式-(Z)-或反式-(E)-形式存在。

[1454] 因此,如本文所使用的,本发明的化合物可以呈可能的立体异构体、旋转异构体、阻转异构体、互变异构体或其混合物之一的形式,例如,作为基本上纯的几何(顺式或反式)立体异构体、非对映异构体、光学异构体(对映体)、外消旋体或其混合物。

[1455] 可以基于组分的物理化学差异,例如通过色谱法和/或分级结晶法将任何所得的立体异构体混合物分离成纯的或基本上纯的几何或光学异构体、非对映异构体、外消旋体。

[1456] 可以通过已知方法将任何所得的终化合物或中间体的外消旋体拆分成旋光对映体,例如通过分离用光学活性酸或碱得到的其非对映异构体盐,并释放出光学活性的酸性或碱性化合物。特别地,因此可以采用碱性部分将本发明的化合物拆分成它们的旋光对映体,例如通过用光学活性酸形成的盐的分级结晶,例如酒石酸、联苯甲酰酒石酸、二乙酰酒石酸、二-0,0'-对甲苯甲酰酒石酸、扁桃酸、苹果酸或樟脑-10-磺酸。外消旋产物也可以通过手性色谱法分离,例如使用手性吸附剂的高压液相色谱法(HPLC)。

[1457] “序列同一性”的百分比通过比较窗口上比较两个最佳比对的序列来确定,其中所述比较窗口中的多核苷酸序列的部分与用于这两个序列的最佳比对的参考序列(例如本发明的多核苷酸)相比可以包含添加或缺失(即,缺口),所述参考序列不包含添加或缺失。可以通过以下方法计算所述百分比:测定在这两个序列中出现相同核酸碱基或氨基酸残基的位置的数目以产生匹配位置数,将所述匹配位置数除以所述比较窗口中的位置总数,并将结果乘以100,从而得到序列同一性百分比。

[1458] 在两个或更多个核酸或多肽序列的上下文中,术语“相同”或“同一性”百分比是指两个或更多个作为相同序列的序列或子序列。当在比较窗口或指定区域内进行比较和比对以寻求使用以下序列比较算法之一或通过手动比对和目视检查所测量的最大对应时,如果两个序列具有规定百分比的相同的氨基酸残基或核苷酸(即,在规定区域上或当没有规定



时则在参考序列的整个序列上,至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性),则两个序列是“基本上相同的”。本发明提供分别与本文举例说明的多肽或多核苷酸基本上相同的多肽或多核苷酸。

[1459] 术语“分离的”意指从天然状态改变的或去除的。例如,天然存在于活体动物中的核酸或肽或细胞不是“分离的”,但是与其天然状态的共存材料部分或完全分开的相同核酸或肽或细胞是“分离的”。

[1460] 术语“核酸”或“多核苷酸”是指单链或双链形式的脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)及其聚合物。除非特别限定,否则所述术语涵盖含有已知的天然核苷酸类似物的核酸,这些核酸具有与参考核酸类似的结合特性并且以与天然存在的核苷酸类似的方式进行代谢。除非另外指出,否则特定的核酸序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体(例如,简并密码子取代)、等位基因、直向同源物、SNP和互补序列以及明确指明的序列。具体地,简并密码子取代可以通过产生如下序列而获得,在这些序列中,一个或多个所选的(或全部)密码子的第三位被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代(Batzer等人,Nucleic Acid Res.[核酸研究]19:5081(1991);Ohtsuka等人,J.Biol.Chem.[生物化学杂志]260:2605-2608(1985);和Rossolini等人,Mol.Cell.Probes[分子与细胞探针]8:91-98(1994))。

[1461] 如本文所使用的,“细胞群”或“细胞的群”包括在体内或离体存在LATS1和/或LATS2抑制剂的情况下增殖的细胞。在此类细胞中,Hippo信号传导通常抑制细胞生长,但是当所述途径被LATS抑制所破坏时会增殖。在某些实施例中,可用于本发明的方法、制剂、培养基、试剂或试剂盒的细胞群包括来自上述组织的细胞或本文所述或提供的细胞。此类细胞包括但不限于眼细胞(例如,角膜缘干细胞,角膜内皮细胞)、上皮细胞(例如,来自皮肤)、神经干细胞、间充质干细胞、肺的基底干细胞、胚胎干细胞、成体干细胞、诱导多能干细胞和肝祖细胞。

#### [1462] 药理学及效用

[1463] 在一个实施例中,本发明涉及用于所有适应症(其中细胞增殖在体内和/或离体是有利的)的小分子LATS激酶抑制剂。

[1464] 离体细胞疗法通常涉及从患者或健康供体分离的细胞群的扩增,所述细胞群有待移植至患者以建立扩增的细胞的瞬时或稳定移植。离体细胞疗法可用于将基因或生物治疗分子递送给患者,其中在分离的细胞中实现基因转移或生物治疗分子的表达。离体细胞疗法的非限制性实例包括但不限于干细胞移植(例如,造血干细胞移植、自体干细胞移植或脐带血干细胞移植)、组织再生、细胞免疫疗法和基因疗法。例如,参见Naldini,2011,Nature Reviews Genetics[自然评论遗传学]第12卷,第301-315页。

[1465] 在一个特定方面,本发明涉及小分子LATS抑制剂,其能够激活YAP途径以促进皮肤细胞增殖,从而可用于促进伤口愈合。

[1466] 本发明的化合物用途的其他实例尤其是

[1467] 1) 边缘移植物(感觉不适当并且常常出于包括但不限于脂肪过多、体型小和供体年龄大的原因丢弃的器官)移植后肝再生长不足的治疗;

[1468] 2) 支持广泛的肝切除术后剩余肝脏块的增强的再生长,例如在肝原发性和转移性肿瘤、创伤性肝损伤以及切除其他占位性肝病(例如血管畸形和肝脓肿)的情况下;

[1469] 3) 促进培养(离体扩增)中肝细胞(例如,肝祖细胞(HPC))的生长和可能的后续移

植;

[1470] 4) 使具有由病毒性肝炎、药物诱导的肝损伤、自身免疫性肝炎、缺血性和充血性肝病引起的急性肝衰竭的患者肝的再生;

[1471] 5) 支持治疗具有由非酒精性脂肪性肝炎、酒精性脂肪性肝炎、慢性乙型和丙型病毒性肝炎、血色素沉着症、 $\alpha$ -1抗胰蛋白酶缺乏症、威尔逊氏病和药物诱导的肝纤维化导致的慢性肝损伤和潜在肝纤维化的患者以增强再生能力并加速纤维化消退;或

[1472] 6) 在有或没有灌注装置的情况下,预防离体器官损伤并维持或改善离体器官的功能。

[1473] YAP/Hippo途径调节皮肤和其他组织中的组织生长和再生。Hippo (MST) 激酶级联(其中以LATS为终末激酶) 负调节YAP活性。LATS激酶是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,已显示其可直接磷酸化YAP,这导致YAP胞质保留和失活。在没有被LATS磷酸化的情况下,YAP易位至细胞核,与TEAD形成复合物,并驱动下游基因表达以促进细胞增殖和存活。

[1474] 根据本发明的化合物的活性可借由下列活体外及活体内方法进行评估。

[1475] LATS1和LATS2抑制

[1476] 游离形式或药学上可接受的盐形式的具有式A1或其子式的化合物是LATS1和LATS2的有效抑制剂。

[1477] 通过如下文实例部分A所述的LATS1生化HTRF测定法测定化合物对LATS1的抑制效力。本发明的化合物对LATS1的抑制效力(以 $\mu\text{M}$ 的LATS1IC<sub>50</sub>) 报道于表1A。

[1478] 化合物的LATS1IC<sub>50</sub>的范围从 $>10\mu\text{M}$ 到小于 $1\text{nM}$ ,大多数化合物具有低于 $1\mu\text{M}$ 的IC<sub>50</sub>。应所述注意的是,IC<sub>50</sub>大于 $1\mu\text{M}$ 的化合物在此分析中被认为是无活性的。

[1479] 通过如下文实例部分A所述的LATS2生化卡尺测定法测定选择的化合物对LATS2的抑制效力。本发明的化合物对LATS2的抑制效力(以 $\mu\text{M}$ 的LATS2IC<sub>50</sub>) 也报道于表1A。

[1480] pYAP抑制 (HaCaT细胞)

[1481] 通过抑制LATS1和LATS2激酶,具有式A1的化合物抑制YAP的磷酸化。如实施例中所所述,通过pYAP HTRF测定法测量化合物减少人HaCaT细胞(角质形成细胞系)中YAP磷酸化的能力。测定结果报告在表1C中。数据表明,用具有式A1的化合物处理减少YAP磷酸化。

[1482] 可以在JHH-5细胞中以类似的方式证明具有式A1的化合物减少YAP磷酸化的能力(Fujise等人,Hepatogastroenterology[肝肠胃病学].1990年十月;37(5):457-60)。

[1483] YAP核易位 (HaCaT细胞)

[1484] 在没有被LATS磷酸化情况下,YAP易位至细胞核。如实例部分A中所述,通过YAP核易位测定法评估具有式A1或其子式的化合物对人HaCaT细胞中YAP易位的影响。表1C报道了所得的EC<sub>50</sub>值。核易位EC<sub>50</sub>的范围从 $>20\mu\text{M}$ 到 $0.3\mu\text{M}$ ,并且选择的化合物具有约为 $1\mu\text{M}$ 或更低的EC<sub>50</sub>值。数据支持通过选择的具有式A1的化合物的处理激活了YAP从细胞质到核的易位。

[1485] 可以在JHH-5细胞中以类似方式证明具有式A1或其子式的化合物对YAP易位的作用(Fujise等人,Hepatogastroenterology[肝肠胃病学].1990年十月;37(5):457-60)。

[1486] 靶标鉴定

[1487] 具有式A1或其子式的化合物相比于MST1/2激酶选择性地靶向LATS1/2。为了从YAP易位测定筛选中鉴定命中的靶标,进行了如实例部分A中所述的靶标鉴定测定。测定的结果在图33A至33C中描述。

[1488] 图33A显示了在用媒介物处理的或转染了针对MST1/2或LATS1/2的40pM siRNA的人HaCaT细胞的裂解物中pYAP (Ser127) 的蛋白质印迹分析。针对LATS1/2的siRNA消除了pYAP信号,而针对MST1/2的siRNA影响最小。LATS负责YAP磷酸化与所述领域的共识一致。

[1489] 图33B显示了人HaCaT细胞的细胞裂解物的蛋白质印迹分析,所述人HaCaT细胞未经处理或在0.5 $\mu$ M冈田酸存在下用9 $\mu$ M实例133处理1小时。pYAP被显著抑制。所述结果类似于针对LATS和MST1/2的siRNA的研究(图33A),这表明实例133靶向LATS激酶。

[1490] 图33C显示了应答于在约 $10^{-4}$ 至1 $\mu$ M范围内的实例133浓度,LATS1活性的抑制(相对于DMSO对照)。数据显示实例133在所述测定中以1.3nM的IC<sub>50</sub>强烈抑制LATS1。结果进一步证实了本发明的化合物是LATS激酶的有效抑制剂。

[1491] 小鼠体内药效学(PD):在伤口愈合中的用途

[1492] 本发明的化合物还体内激活YAP途径。如在实例部分A的体内PD测定中所述,在体内小鼠模型中进行了YAP途径靶基因表达的研究。用媒介物或0.2mg/mL和2mg/mL的实例133局部处理麻醉小鼠的背部上的两个全层切除伤口。两个日剂量后,收集伤口边缘周围的皮肤样品,并使用Cyr61和Gapdh探针进行Taqman分析。将靶基因的mRNA表达水平针对Gapdh mRNA水平标准化,并相对于图34中实例133的浓度作图。数据表明,与媒介物相比,实例133以剂量依赖性方式显著上调YAP靶基因Cyr61。所述结果与用于激活YAP途径的已知LATS生物学一致。

[1493] 体内皮肤细胞增殖

[1494] 此外,当局部施用,本发明的化合物在体内增加皮肤细胞增殖。如实例部分A中所述的“体内组织学和Ki67染色测定”进行所述研究。将实例133或运载体施用于完整的小鼠背侧皮肤。每天两次给药三天后,收集皮肤样品并进行Ki67免疫组织学染色。可视地评估切片的细胞增殖和Ki67阳性细胞的丰度。研究结果记录在图35A和35B中。

[1495] 图35A显示了用媒介物或实例133处理的Ki67染色的小鼠皮肤的代表性显微照片。与媒介物相比,实例133处理的小鼠皮肤显示出基底细胞增殖和表皮厚度的显著增加。图35B比较了未处理的和处理的小鼠皮肤中Ki67阳性细胞的丰度。数据显示通过实例133处理的皮肤中的Ki67阳性细胞丰度高10%,这表明Ki67阳性细胞在统计学上显著诱导。

[1496] 因此,实例133显著增加小鼠体内皮肤细胞增殖。

[1497] 总之,从基于高含量成像的表型HTS中,本发明的化合物已显示为有效的LATS抑制剂,这通过细胞和生化LATS测定得到证实。同样,通过使用siRNA敲低LATS1和LATS2两者,LATS作为YAP途径的负调节剂也得到了验证。

[1498] 此外,体外显示,实例133激活YAP途径,促进人角质形成细胞(HaCaT)中的细胞增殖。LATS抑制剂在受伤的小鼠PD模型中诱导YAP靶基因表达。如通过Ki67染色所证实的,实例133在小鼠中的局部治疗诱导YAP靶基因表达并增加基底层皮肤细胞生长。因此,实例133可用于促进皮肤再生。

[1499] 因此,游离形式或药学上可接受的盐形式的具有式A1或其子式的化合物可以用作可得益于本文所述的细胞增殖的疾病或病症的疗法。例如,受伤或患病的组织和器官(包括但不限于皮肤、肝和角膜)的再生将使受试者受益的情况。另外,具有式A2或其子式的化合物也可以用作研究化学品,例如作为工具化合物。

[1500] 因此,在另一方面,本发明提供了具有式A2或其子式的化合物或其药学上可接受

的盐或其立体异构体在疗法中的用途。

[1501] 在一个实施例中,本发明提供了具有式A1或其子式的化合物或其药学上可接受的盐或其立体异构体在治疗和改善烧伤、急性皮肤溃疡和慢性皮肤溃疡的症状中的用途。在一个实施例中,慢性皮肤溃疡选自血管性、糖尿病性和压力性溃疡。在另一个实施例中,慢性皮肤溃疡选自下肢静脉溃疡、糖尿病足溃疡和褥疮。

[1502] 在另一方面,本发明提供了治疗疾病或病症的方法,所述疾病或病症通过抑制LATS激酶被治疗,所述方法包括施用治疗上可接受量的具有式A2或其子式的化合物或其药学上可接受的盐或其立体异构体。

[1503] 在一实施例中,所述疾病或病症选自烧伤、急性皮肤溃疡或慢性皮肤溃疡。在另一个实施例中,慢性皮肤溃疡选自血管性、糖尿病性和压力性溃疡。在另一个实施例中,慢性皮肤溃疡选自下肢静脉溃疡、糖尿病足溃疡和褥疮。

[1504] 因此,在另一方面,本发明提供了具有式A2或其子式的化合物或其药学上可接受的盐或其立体异构体在制造药物中的用途。

[1505] 在另一个实施例中,本发明提供了具有式A1或其子式的化合物或其药学上可接受的盐或其立体异构体用于制造促进伤口愈合的药物的用途或用于治疗可通过抑制LATS激酶治疗的疾病的用途。在另一个实施例中,所述疾病是烧伤、急性或慢性皮肤溃疡。在另一个实施例中,慢性皮肤溃疡选自糖尿病性溃疡、压力性溃疡和血管性溃疡。在另一个实施例中,慢性皮肤溃疡选自下肢静脉溃疡、糖尿病足溃疡和褥疮。

[1506] 因此,在另一方面,本发明提供了具有式A2或其子式的化合物或其药学上可接受的盐或其立体异构体,用于用作药物。

[1507] 在另一个实施例中,本发明提供了具有式A1或其子式的化合物或其药学上可接受的盐或其立体异构体,用于用作促进伤口愈合的药物或用于治疗可通过抑制LATS激酶治疗的疾病。在另一个实施例中,所述疾病是烧伤、急性皮肤溃疡或慢性皮肤溃疡。在另一个实施例中,慢性皮肤溃疡选自糖尿病性溃疡、压力性溃疡和血管性溃疡。在另一个实施例中,慢性皮肤溃疡选自下肢静脉溃疡、糖尿病足溃疡和褥疮。

[1508] 小鼠的体内治疗:在肝中的用途图

[1509] 通过用如下文生物测定部分中所述的体内测定中所述的化合物处理小鼠来测量具有式A1的化合物诱导肝再生和肝再生长的能力。测定结果报告在表1C中。

[1510] 结果表明,与媒介物对照治疗的小鼠相比,所测试的化合物可降低小鼠肝中的pYAP水平,这表明给药后2小时在体内在肝中的LATS激酶抑制。YAP靶基因Cyr61和Ctgf的mRNA表达增加表明给药后2小时YAP信号传导的激活。增殖标志物Ki67的免疫组织化学染色进一步表明给药后24小时肝细胞增殖增加。

[1511] 因此,在另一方面,本发明提供了具有式A2或其子式的化合物或其药学上可接受的盐或其立体异构体在疗法中的用途。

[1512] 在一个实施例中,本发明提供了具有式A1或其子式的化合物或其药学上可接受的盐或其立体异构体的以下用途:用于促进肝再生和肝再生长,特别是用于边缘移植物移植后肝再生长不足的治疗;用于支持广泛肝切除术后剩余肝脏块的增强的再生长;用于病毒性肝炎、药物引起的肝损伤、自身免疫性肝炎、缺血性和充血性肝病引起的急性肝衰竭后患者肝的再生;用于治疗具有由非酒精性脂肪性肝炎、酒精性脂肪性肝炎、慢性乙型和丙型病

毒性肝炎、血色素沉着症、 $\alpha$ -1抗胰蛋白酶缺乏症、威尔逊氏病和药物诱导的肝纤维化导致的慢性肝损伤和潜在肝纤维化的患者以增强再生能力并加速纤维化消退。

[1513] 在另一方面,本发明提供了治疗疾病的方法,所述疾病或病症通过抑制LATS激酶被治疗,所述方法包括施用治疗上可接受量的具有式A1或其子式的化合物或其药学上可接受的盐或其立体异构体。

[1514] 在另一个实施例中,本发明提供用于以下的方法:促进肝再生和肝再生长,特别是用于治疗边缘移植物移植后肝再生长不足;用于支持广泛肝切除术后剩余肝脏块的增强的再生长;用于病毒性肝炎、药物引起的肝损伤、自身免疫性肝炎、缺血性和充血性肝病引起的急性肝衰竭后患者肝的再生;用于治疗具有由非酒精性脂肪性肝炎、酒精性脂肪性肝炎、慢性乙型和丙型肝炎、血色素沉着症、 $\alpha$ -1抗胰蛋白酶缺乏症、威尔逊氏病和药物诱导的肝纤维化导致的慢性肝损伤和潜在肝纤维化的患者以增强再生能力并加速纤维化消退,所述方法包括施用治疗上可接受量的具有式A1或其子式的化合物或其药学上可接受的盐或其立体异构体。

[1515] 因此,在另一方面,本发明提供了具有式A2或其子式的化合物或其药学上可接受的盐或其立体异构体在制造药物中的用途。

[1516] 在另一个实施例中,所述药物用于促进肝再生和肝再生长,特别是用于治疗边缘移植物移植后肝再生长不足;用于支持广泛肝切除术后剩余肝脏块的增强的再生长;用于病毒性肝炎、药物引起的肝损伤、自身免疫性肝炎、缺血性和充血性肝病引起的急性肝衰竭后患者肝的再生;用于治疗具有由非酒精性脂肪性肝炎、酒精性脂肪性肝炎、慢性乙型和丙型肝炎、血色素沉着症、 $\alpha$ -1抗胰蛋白酶缺乏症、威尔逊氏病和药物诱导的肝纤维化导致的慢性肝损伤和潜在肝纤维化的患者以增强再生能力并加速纤维化消退。

[1517] 因此,在另一方面,本发明提供了具有式A2或其子式的化合物或其药学上可接受的盐或其立体异构体,用于用作药物。在另一个实施例中,所述药物用于促进肝再生和肝再生长,特别是用于治疗边缘移植物移植后肝再生长不足;用于支持广泛肝切除术后剩余肝脏块的增强的再生长;用于病毒性肝炎、药物引起的肝损伤、自身免疫性肝炎、缺血性和充血性肝病引起的急性肝衰竭后患者肝的再生;用于治疗具有由非酒精性脂肪性肝炎、酒精性脂肪性肝炎、慢性乙型和丙型肝炎、血色素沉着症、 $\alpha$ -1抗胰蛋白酶缺乏症、威尔逊氏病和药物诱导的肝纤维化导致的慢性肝损伤和潜在肝纤维化的患者以增强再生能力并加速纤维化消退。

[1518] 在另一方面,本发明提供了具有式A1或其子式的化合物或其盐或其立体异构体在促进供体外(离体扩增)培养物中肝细胞生长的用途或用于诱导离体肝再生的用途。

[1519] 在另一方面,本发明提供了使用具有式A1或其子式的化合物或其盐或其立体异构体促进供体外(离体扩增)培养物中肝细胞生长或诱导离体肝再生的方法。

[1520] 药物组合物和施用

[1521] 在另一个方面,在与体内用途有关的本发明的实施例中,本发明提供了药物组合物,所述药物组合物包含本发明的化合物或其药学上可接受的盐、和药学上可接受的载体。在另外的实施例中,组合物包含至少两种药学上可接受的载体(例如本文描述的那些)。在与本发明化合物的局部使用有关的本发明的实施例中,药物组合物以适合于局部施用的方式配制,例如水溶液、悬浮液、软膏、乳膏、凝胶或可喷雾配制品(例如用于通过气溶胶或类

似物递送),其包含活性成分以及本领域技术人员已知的增溶剂、稳定剂、渗透压增强剂、缓冲液和防腐剂中的一种或多种。

[1522] 在与体内用途有关的本发明的实施例中,本发明的化合物通产配制成药物剂型以提供容易控制的药物剂量并且为患者提供简洁并且易于操作的产品。当然,本发明的化合物的剂量方案将根据已知因素而变化,例如特定试剂的药效学特征及其施用方式和途径;接受者的物种、年龄、性别、健康、医疗状况和体重;症状的性质和程度;并行治疗的种类;治疗频率;施用途径、患者的肾和肝功能以及所需的效果。在与体内用途有关的本发明的实施例中,本发明的化合物以单个日剂量施用,或总日剂量可以每日以两次、三次或四次分开的剂量施用。

[1523] 在与体内用途有关的本发明的实施例中,本发明的药物组合物或组合能以对于约50kg-70kg的受试者约1mg-1000mg的一种或多种活性成分的单位剂量。化合物、药物组合物、或其组合的治疗有效剂量取决于所述受试者的物种、体重、年龄及治疗中的个别病状、病症或疾病或其严重性。具有普通技能的医师、临床医生或兽医可以容易地确定预防、治疗或抑制病症或疾病进展所必需的每种活性成分的有效量。

[1524] 本发明的化合物能以水溶液、悬浮液、软膏、乳膏、洗剂、凝胶或可喷雾配制品(例如,用于通过气溶胶递送)等形式局部施用。剂量可以在约 $10^{-3}$ 摩尔浓度和 $10^{-9}$ 摩尔浓度之间的范围内。体内治疗有效量可取决于施用途径在约1mg/kg至100mg/kg之间的范围内变化。

[1525] 在某些情况下,将本发明的化合物与至少一种另外的药物试剂(或治疗剂)例如止痛药及其组合联合施用可以是有利的。具体而言,组合物可以作为组合治疗剂配制在一起或分开施用。

[1526] 在某些情况下,将本发明的化合物与至少一种另外的药物试剂(或治疗剂)联合施用可能是有利的,所述药物试剂(或治疗剂)例如是免疫抑制剂,例如皮质类固醇、环孢霉素、他克莫司和免疫抑制剂的组合。具体而言,组合物可以作为组合治疗剂配制在一起或分开施用。

[1527] 本发明的化合物可以与一种或多种其他的治疗剂同时施用或在所述治疗剂之前或之后施用。本发明的化合物可以通过相同或不同的施用途径分开施用,或在与其他药剂相同的药物组合物中一起施用。治疗剂是,例如,化学化合物、肽、抗体、抗体片段或核酸,当将所述治疗剂与本发明的化合物组合施用患者时,所述治疗剂具有治疗活性或增强治疗活性。

[1528] 在一个实施例中,本发明提供了包含具有式A1或其子式的化合物和至少一种其他的治疗剂的产品,作为组合制剂用于在疗法中同时的、分开的或顺序的使用。在一个实施例中,所述疗法是治疗由LATS1/2介导的疾病或病症。作为组合制剂提供的产品包括组合物,所述组合物包含具有式A1的化合物和一起在相同的药物组合物中的一种或多种其他治疗剂,或具有式A1的化合物和呈分开形式(例如,呈试剂盒的形式)的一种或多种其他治疗剂。

[1529] 在一个实施例中,本发明提供了药物组合物,所述药物组合物包含具有式A2或其子式的化合物和一种或多种其他治疗剂。任选地,所述药物组合物可以包含如上所述的可药用载体。

[1530] 在与体内用途有关的一个实施例中,本发明提供了试剂盒,所述试剂盒包含两种

或更多种分开的药物组合物,其中至少一种药物组合物含有具有式A2或其子式的化合物。在一个实施例中,所述试剂盒包含用于分别保留所述组合物的装置(例如容器、分开的瓶子、分开的管或分开的箔包)。这种试剂盒的实例是如通常用于递送凝胶或软膏的箔包等。

[1531] 在与体内用途有关的本发明的实施例中的试剂盒可以用于施用活性剂的不同剂型(例如,口服和局部),用于以不同剂量间隔施用单独组合物或用于相对彼此滴定单独组合物。为了有助于依从性,本发明的试剂盒典型地包含用于施用的用法说明书。

[1532] 在本发明的组合疗法中,本发明的化合物和其他治疗剂可以由相同或不同的制造商制造和/或配制。此外,对于与体内用途有关的本发明的实施例,可以将本发明的化合物和另一种治疗剂放在一起进行联合治疗:(i)在将组合产物释放给医师之前(例如,在包含本发明的化合物和其他治疗剂的试剂盒的情况下);(ii)在施用之前不久,由医师自身(或在医师的指导下);(iii)例如,在顺序施用本发明的化合物和其他治疗剂的过程中在患者本身中。

[1533] 因此,本发明涉及具有式A1或其子式的化合物在治疗由LATS的抑制介导的疾病或病症中的用途,其中制备药物用于连同另一种治疗剂施用。本发明还涉及另一种治疗剂在治疗由LATS的抑制介导的疾病或病症中的用途,其中将药物连同具有式A1或其子式的化合物施用。

[1534] 本发明还涉及在治疗由LATS的抑制介导的疾病或病症的方法中使用的具有式A1或其子式的化合物,其中制备具有式A1或其子式的化合物用于连同另一种治疗剂施用。本发明还涉及在治疗由LATS的抑制介导的疾病或病症的方法中使用的另一种治疗剂,其中制备所述另一种治疗剂用于连同具有式A1或其子式的化合物施用。

[1535] 本发明还涉及在治疗由LATS的抑制介导的疾病或病症的方法中使用的具有式A1或其子式的化合物,其中所述化合物连同另一种治疗剂施用。本发明还提供了在治疗由LATS的抑制介导的疾病或病症的方法中使用的另一种治疗剂,其中所述另一种治疗剂连同具有式A1或其子式的化合物施用。

[1536] 本发明还涉及具有式A1或其子式的化合物用于治疗由LATS1/2介导的疾病或病症的用途,其中患者先前(例如在24小时内)已经用另一种治疗剂治疗。本发明还提供了另一种治疗剂用于治疗由LATS介导的疾病或病症的用途,其中患者先前(例如在24小时内)已经用具有式A1或其子式的化合物治疗。

[1537] 化合物的制备

[1538] 考虑到本文提供的方法、反应方案和实例,可以以有机合成领域的技术人员已知的多种方式制备本发明的化合物。本发明的化合物可以使用下文所述的方法、以及合成有机化学领域中已知的合成方法或本领域技术人员所理解的其变体来合成。优选的方法包括但不限于下文所述的那些。所述反应在适合于所用试剂和材料并且适于实现转化的溶剂或溶剂混合物中进行。有机合成领域的技术人员将理解,分子上存在的官能团应与所提出的转化一致。这有时将需要判断以修改合成步骤的顺序或选择一种特定的工艺方案而不是另一种,以便获得本发明所希望的化合物。

[1539] 起始材料通常可从商业来源获得,例如奥尔德里奇化学公司(Aldrich Chemicals)(威斯康星州密尔沃基(Milwaukee,Wis.))或使用本领域技术人员众所周知的方法容易地制备(例如通过一般描述于以下中的方法制备:Louis F.Fieser和Mary

Fieser, Reagents for Organic Synthesis[用于有机合成的试剂], 第1-19卷, Wiley, 纽约 (1967-1999编辑), Larock, R.C., Comprehensive Organic Transformations[有机官能团转换], 第2版, Wiley-VCH Weinheim, 德国 (1999), 或 Beilsteins Handbuch der organischen Chemie[贝尔斯坦有机化学手册], 4, Aufl. 编辑 Springer-Verlag[斯普林格出版社], 柏林, 包括增刊(也可以经由 Beilstein 在线数据库获得)。

[1540] 为了说明的目的, 下面描述的反应方案提供了合成本发明化合物以及关键中间体的潜在途径。有关各个反应步骤的详细说明, 请参见下面的实例部分。本领域技术人员将理解, 可以使用其他合成路线来合成本发明的化合物。尽管在方案中描述了具体的原料和试剂, 并在下面进行了讨论, 但是可以容易地替换其他起始材料和试剂以提供各种衍生物和/或反应条件。另外, 根据本披露, 可以使用本领域技术人员熟知的常规化学进一步修饰通过下述方法制备的许多化合物。

[1541] 在本发明的化合物的制备中, 可能需要保护中间体的远端官能性。对这种保护的需要根据远端官能性的性质和制备条件的条件而变化。对这种保护的需要是本领域技术人员容易确定的。有关保护基及其使用的一般说明, 参见 Greene, T.W. 等人, Protecting Groups in Organic Synthesis[有机合成中的保护基], 第4版., 威利出版社 (Wiley) (2007)。在本发明化合物的制备中引入的保护基, 例如三苯甲基保护基, 可以显示为一个区域异构体, 但是也可以作为区域异构体的混合物存在。

#### [1542] 缩写

[1543] 如本文所使用的缩写定义如下: “1x”表示一次, “2x”表示两次, “3x”表示三次, “°C”表示摄氏度, “aq”表示水性, “Col”表示柱, “eq”表示当量 (equivalent 或 equivalents), “g”表示克 (gram 或 grams), “mg”表示毫克 (milligram 或 milligrams), “nm”表示纳米 (nanometer 或 nanometers), “L”表示升 (liter 或 liters), “mL”或 “ml”表示毫升 (milliliter 或 milliliters), “ul”、“uL”、“μl”、或 “μL”表示微升 (microliter 或 microliters), “nL”或 “nl”表示纳升 (nanoliter 或 nanoliters), “N”表示正常, “uM”或 “μM”表示微摩尔, “nM”表示纳摩尔, “mol”表示摩尔 (mole 或 moles), “mmol”表示毫摩尔 (millimole 或 millimoles), “min”表示分钟 (minute 或 minutes), “h”或 “hrs”表示小时 (hour 或 hours), “RT”表示室温, “ON”表示过夜, “atm”表示大气压, “psi”表示每平方英寸磅数, “conc.”表示浓度, “aq”表示水性, “sat”或 “sat’d”表示饱和的, “MW”表示分子量, “mw”或 “μwave”表示微波, “mp”表示熔点, “Wt”表示重量, “MS”或 “Mass Spec”表示质谱分析法, “ESI”表示电喷雾质谱, “HR”表示高分辨率, “HRMS”表示高分辨质谱法, “LCMS”表示液相色谱质谱, “HPLC”表示高效液相色谱, “RP HPLC”表示反相 HPLC, “TLC”或 “tlc”表示薄层色谱, “NMR”表示核磁共振光谱, “nOe”表示核欧沃豪斯效应谱, “1H”表示质子, “δ”表示 δ (delta), “s”表示单峰, “d”表示双重峰, “t”表示三重峰, “q”表示四重峰, “m”表示多重峰, “br”表示宽峰, “Hz”表示赫兹, “ee”表示“对映异构体过量”以及 “α”、“β”、“R”、“r”、“S”、“s”、“E”、和 “Z”是本领域技术人员熟悉的立体化学指定。

[1544] 以下本文中使用的下列缩写具有相应的含义:

[1545] AC 活性对照

[1546] AIBN 偶氮二异丁腈

[1547] ATP 三磷酸腺苷



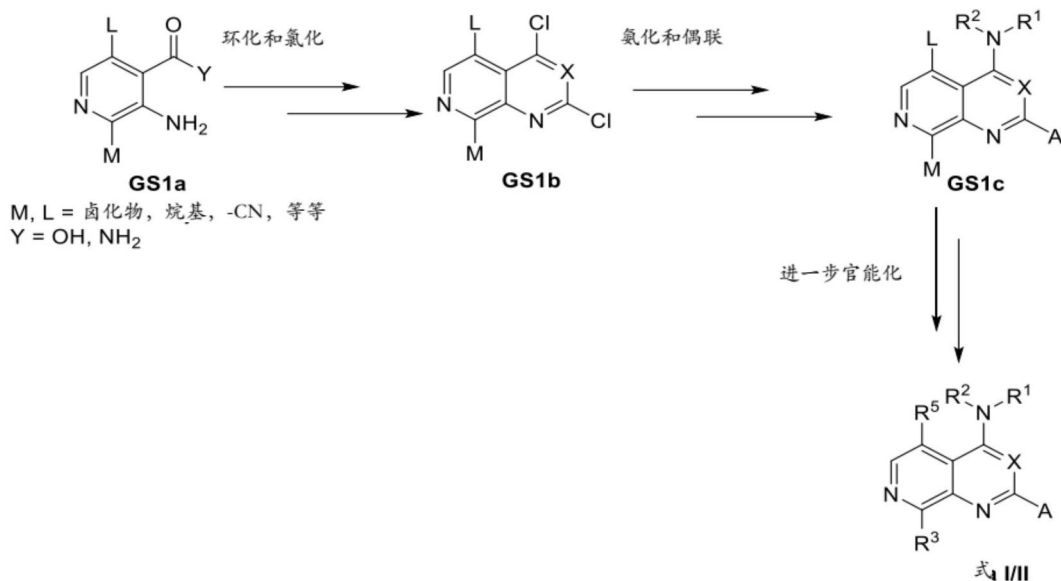
[1548]	Bn	苄基
[1549]	Boc	叔丁氧基羰基
[1550]	Boc <sub>2</sub> O	二碳酸二叔丁酯
[1551]	BSA	牛血清白蛋白
[1552]	Bu	丁基
[1553]	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	无水碳酸铯
[1554]	CHCl <sub>3</sub>	氯仿
[1555]	DAST	二乙基氨基三氟化硫
[1556]	DBU	2,3,4,6,7,8,9,10-八氢嘧啶并[1,2-a]氮环庚三烯
[1557]	DCM	二氯甲烷
[1558]	DMAP	4-二甲基氨基吡啶
[1559]	DMEM	杜氏改良伊戈尔培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium)
[1560]	DMF	二甲基甲酰胺
[1561]	DMSO	二甲亚砜
[1562]	DPPA	二苯基磷酰基叠氮化物
[1563]	DTT	二硫苏糖醇
[1564]	EA	乙酸乙酯
[1565]	EDTA	乙二胺四乙酸
[1566]	Equiv.	等量
[1567]	Et	乙基
[1568]	Et <sub>2</sub> O	乙醚
[1569]	EtOH	乙醇
[1570]	EtOAc	乙酸乙酯
[1571]	FBS	胎牛血清
[1572]	HATU	2-(7-氮杂-1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脒鎓六氟磷酸盐
[1573]	HCl	盐酸
[1574]	HEPES	(4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪)乙磺酸
[1575]	HPMC	(羟丙基)甲基纤维素
[1576]	HTRF	均匀时间分辨荧光
[1577]	i-Bu	异丁基
[1578]	i-Pr	异丙基
[1579]	KOAc	乙酸钾
[1580]	LiAlH <sub>4</sub>	氢化铝锂
[1581]	Me	甲基
[1582]	mCPBA	3-氯过氧苯甲酸
[1583]	MeCN	乙腈
[1584]	MnO <sub>2</sub>	二氧化锰
[1585]	N <sub>2</sub>	氮
[1586]	NaBH <sub>4</sub>	硼氢化钠

- [1587]  $\text{NaHCO}_3$  碳酸氢钠  
 [1588]  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  硫酸钠  
 [1589] NBS N-溴代琥珀酰亚胺  
 [1590] NC 中性对照  
 [1591] PBS 磷酸盐缓冲盐水  
 [1592] PFA 多聚甲醛  
 [1593] Ph 苯基  
 [1594]  $\text{PPh}_3$  三苯基膦  
 [1595]  $\text{Ph}_3\text{P}=\text{O}$  三苯基氧化膦  
 [1596] pYAP 磷酸化YAP  
 [1597]  $\text{R}_f$  保留因子  
 [1598] RT 室温 ( $^{\circ}\text{C}$ )  
 [1599] Ser 丝氨酸;  
 [1600] t-Bu或 $\text{Bu}^t$  叔丁基  
 [1601] **T3P<sup>®</sup>** 丙烷膦酸酐  
 [1602] TEA 三乙胺  
 [1603] TFA 三氟乙酸  
 [1604] THF 四氢呋喃  
 [1605] UVA 紫外线A  
 [1606] YAP Yes相关蛋白 (NCBI基因ID:10413;官方符号: (YAP1))

[1607] I. 一般合成路线

[1608] 具有式I至VI的化合物可以如一般方案I至III中以及更详细地以下方案1至6中所示制备。下面还披露了中间体和示例性化合物的合成的详细描述。

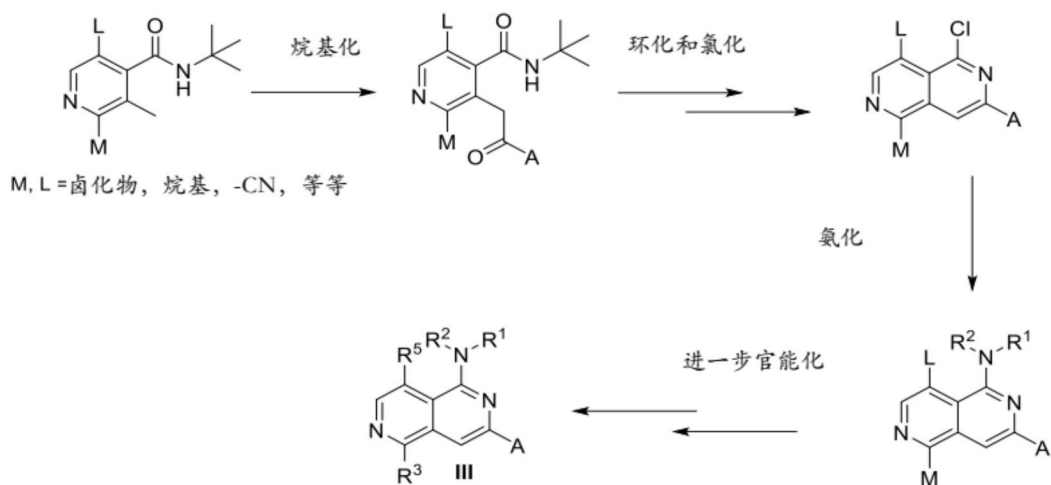
[1609] 用于制备具有式I或II的化合物的一般方案I



[1611] 双环二氯化物GS1b可以商购获得(当 $\text{X}=\text{C}$ 时),或者可以通过环化和氯化由氨基异烟酸/酰胺GS1a制备。可以将GS1b的二氯化物胺化并与适当的试剂偶联以形成GS1c,将其通

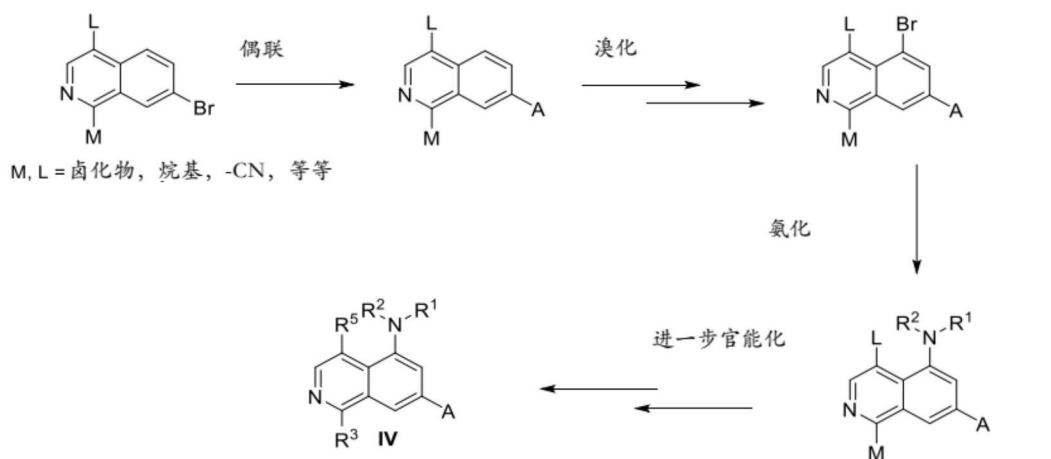
过任何必要的官能化(例如但不限于保护和脱保护步骤、还原、水解、烷基化、胺化、偶联等)进一步官能化以产生式I或式II。

[1612] 用于制备具有式III的化合物的一般方案II



[1613]

[1614] 用于制备具有式IV的化合物的一般方案III

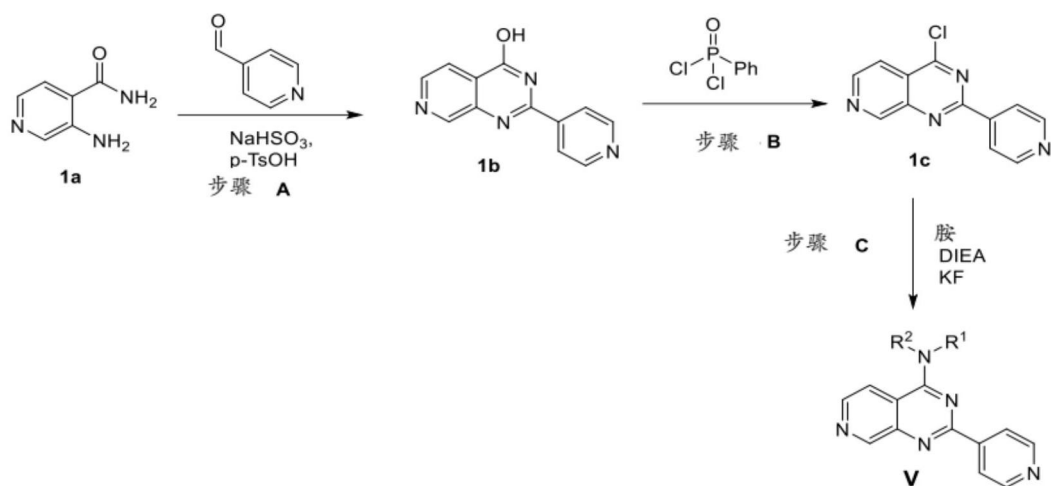


[1615]

[1616] 方案1.

[1617] 可以如以下方案1中所示制备具有式V的化合物。步骤C可以包括胺化和任何必要的官能化,例如但不限于保护和脱保护步骤、还原、水解、烷基化等。

[1618] 方案1

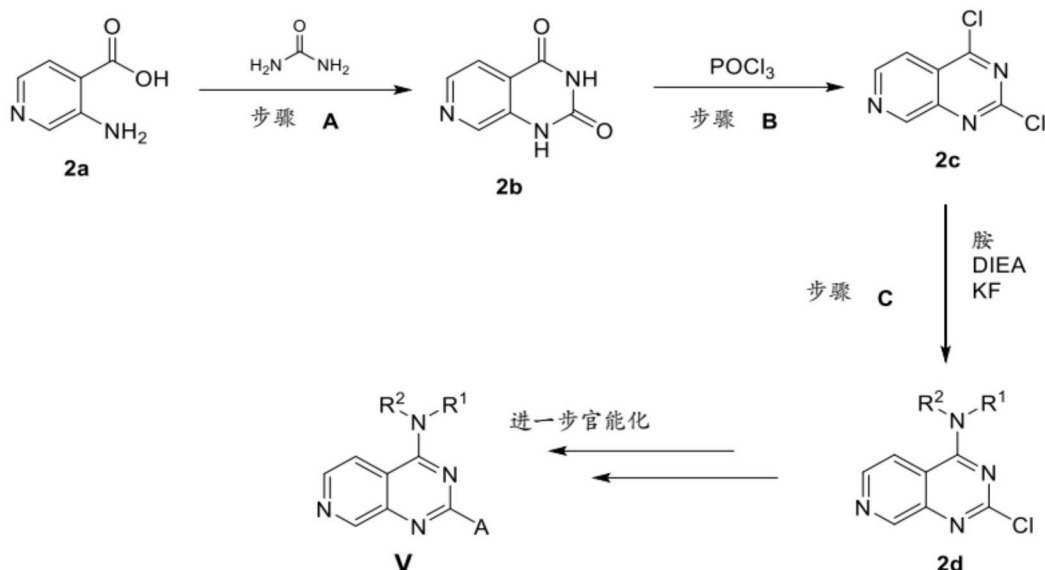


[1619]

## [1620] 方案2.

[1621] 可替代地,可以如方案2中所示制备具有式V的化合物。步骤C可以包括胺化和任何必要的官能化,例如但不限于保护和脱保护步骤、还原、水解、烷基化等。通过但不限于金属介导的偶联,胺化,烷基化等以及必要的保护和脱保护步骤,将一氯化物中间体2d进一步官能化,得到具有式V的化合物。

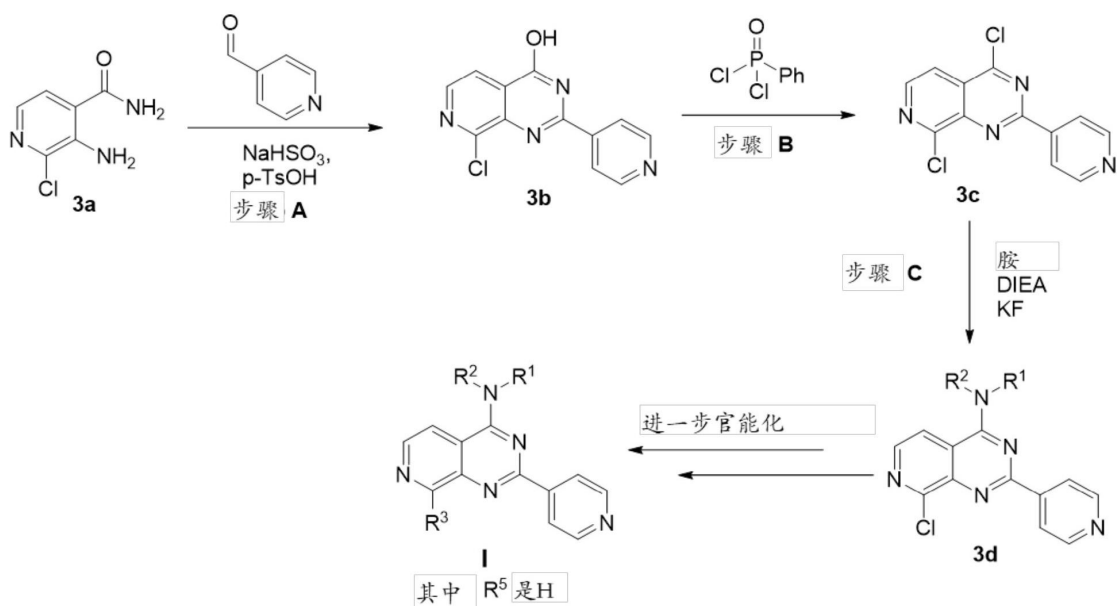
## [1622] 方案2



## [1624] 方案3.

[1625] 可以如方案3所示制备其中R<sup>5</sup>是氢的具有式I的化合物。步骤C可以包括胺化和任何必要的官能化,例如但不限于保护和脱保护步骤、还原、水解、烷基化等。通过但不限于金属介导的偶联,胺化,烷基化等以及必要的保护和脱保护步骤,将一氯化物中间体3d进一步官能化,得到具有式(I)的化合物(其中R<sup>5</sup>是氢)。

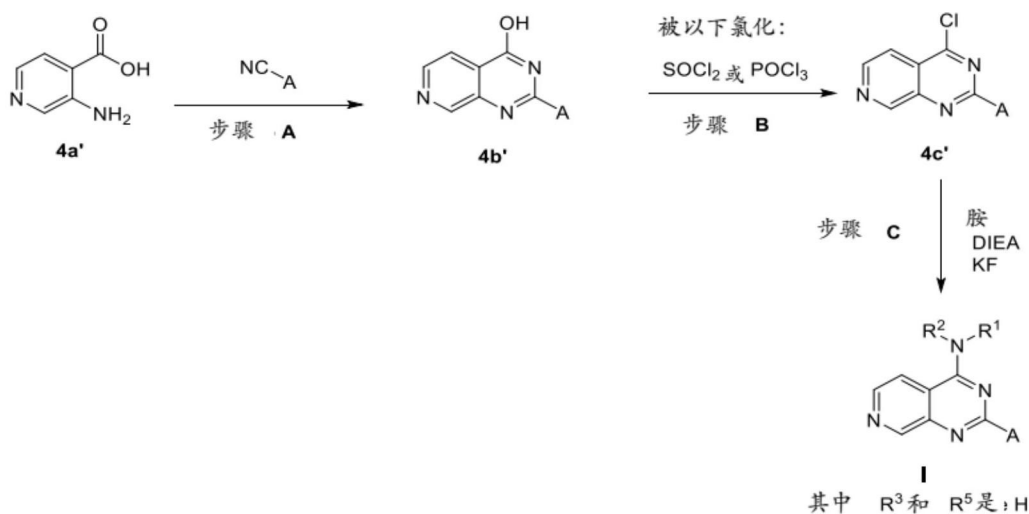
## [1626] 方案3



## [1628] 方案4.

[1629] 可以如方案4所示制备其中 $R^3$ 和 $R^5$ 都是氢的具有式I的化合物。步骤C可以包括胺化和任何必要的官能化,例如但不限于保护和脱保护步骤、还原、水解、烷基化等,这得到具有式I的化合物(其中 $R^3$ 和 $R^5$ 都是氢)。

[1630] 方案4

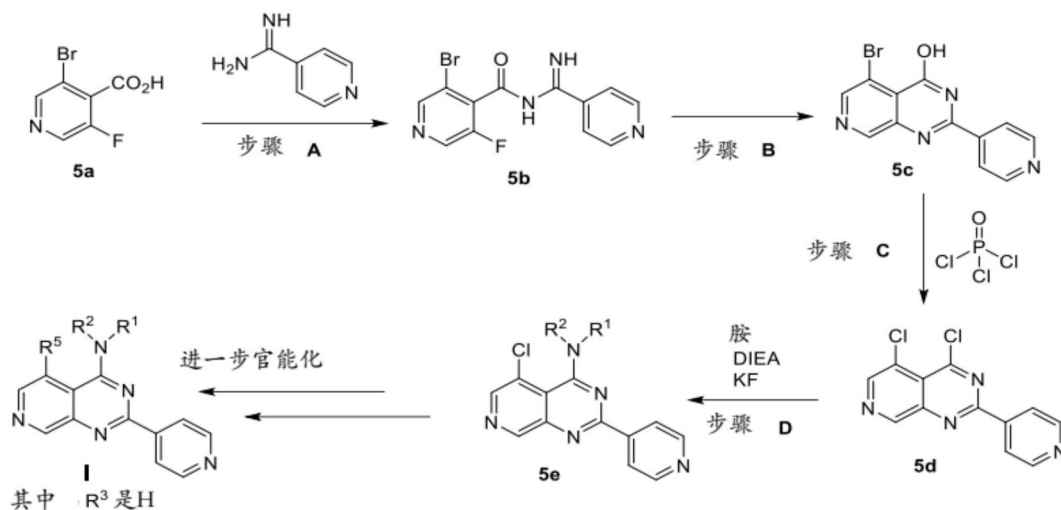


[1631]

[1632] 方案5.

[1633] 可以如方案5所示制备其中 $R^3$ 是氢的具有式I的化合物。步骤D可以包括胺化和任何必要的官能化,例如但不限于保护和脱保护步骤、还原、水解、烷基化等。通过但不限于金属介导的偶联,胺化,烷基化等以及必要的保护和脱保护步骤,将一氯化物中间体5d进一步官能化,得到具有式I的化合物(其中 $R^3$ 是氢),

[1634] 方案5

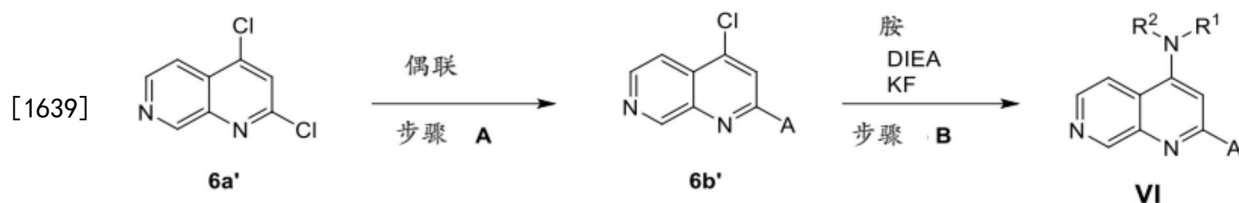


[1635]

[1636] 方案6.

[1637] 可以如方案6所示,由市售的二氯化物6a' (2,4-二氯-1,7-萘啶,阿奎拉制药公司(Aquila Pharmatech))制备具有式VI的化合物。步骤A可以包括金属介导的偶联和任何必要的官能化,例如但不限于保护和脱保护步骤、环化、还原、水解、烷基化等。步骤B可以包括胺化和任何必要的官能化,例如但不限于保护和脱保护步骤、还原、水解、烷基化等。

[1638] 方案6



[1640] 示例性实例的制备

[1641] 已经使用本文披露的方法制备、分离和表征了以下实例。下列实例说明了本发明的部分范围,并不意味着限制本发明的范围。

[1642] 除非另有说明,否则起始材料通常可从非排他性商业来源获得,例如TCI精细化学品公司(TCI Fine Chemicals)(日本)、上海凯米有限公司(Shanghai Chemhere Co.,Ltd.)(上海,中国)、奥罗拉精细化学品公司(Aurora Fine Chemicals LLC(圣地亚哥,加利福尼亚州)、FCH集团(FCH Group)(乌克兰)、奥尔德里奇化学公司(Aldrich Chemicals Co.)(密尔沃基,威斯康星州)、兰斯特合成公司(Lancaster Synthesis, Inc.)(温厄姆,新罕布什尔州)、阿克洛斯有机公司(Acros Organics)(费尔劳恩,新泽西州)、美桥化工有限公司(Maybridge Chemical Company, Ltd.)(康沃尔,英格兰)、泰格科学公司(Tyger Scientific)(普林斯顿,新泽西州)、阿斯利康制药公司(AstraZeneca Pharmaceuticals)(伦敦,英国)、康桥公司(Chembridge Corporation)(美国)、美奇丝科学公司(Matrix Scientific)(美国)、卡耐儿化学制药公司(Conier Chem&Pharm Co., Ltd)(中国)、安娜敏公司(Enamine Ltd)(乌克兰)、Combi-Blocks公司(Combi-Blocks, Inc.)(圣地亚哥,美国)、奥克伍德公司(Oakwood Products, Inc.)(美国)、阿波罗科学公司(Apollo Scientific Ltd.)(英国)、艾莉化学公司(Allichem LLC.)(美国)和乌克兰公司(Ukrorgsyntez Ltd)(拉脱维亚)。

[1643] 实例1-290的表征中使用的LCMS方法

[1644] 使用化学工作站(ChemStation)软件在安捷伦(Agilent)系统上进行分析型LC/MS。所述系统由以下组成:

- [1645] • 安捷伦G1312二元泵
- [1646] • 安捷伦G1367孔板自动进样器
- [1647] • 安捷伦G1316柱温箱
- [1648] • 安捷伦G1315二极管阵列检测器
- [1649] • 安捷伦6140/6150质谱仪
- [1650] • SOFTA蒸发光散射检测器

[1651] 典型的方法条件如下:

- [1652] • 流速:0.9mL/min
- [1653] • 柱:1.8微米2.1x50mm沃特斯(Waters)Acquity HSS T3C18柱
- [1654] • 流动相A:水+0.05%TFA
- [1655] • 流动相B:乙腈+0.035%TFA
- [1656] • 运行时间:2.25分钟

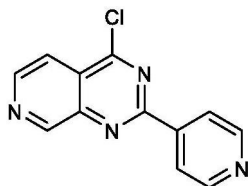
[1657] • 系统在1.35分钟内运行从10%B到90%B的梯度。所述梯度后,在100%B下进行0.6分钟的洗涤。所述方法的剩余持续时间将系统恢复到初始条件。

- [1658] • 典型的质谱仪扫描范围是100amu到1000amu。
- [1659] 实例291-335的表征中使用的LCMS方法
- [1660] LC-MS (方法1):
- [1661] 系统:带沃特斯SQ检测器的沃特斯Acquity UPLC。
- [1662] 柱:Acquity HSS T3 1.8 $\mu$ m 2.1x 50mm。
- [1663] 流速:1.0ml/min。柱温:60℃。
- [1664] 梯度:1.4分钟内从5%B到98%B,A=水+0.05%甲酸+3.75mM乙酸铵,B=乙腈+0.04%甲酸。
- [1665] LC-MS (方法2):
- [1666] 系统:带沃特斯SQ检测器的沃特斯Acquity H-级别UPLC。
- [1667] 柱:BEH C18 1.7 $\mu$ m 2.1x 50mm
- [1668] 流速:3.0ml/min。柱温:30℃。
- [1669] 梯度:在2.7分钟内从2%B到100%B,A=2mM乙酸铵/水+0.1%甲酸,B=乙腈+0.1%甲酸。
- [1670] 实例1-290的表征中使用的NMR
- [1671] 除非另有说明,否则质子光谱是在带有5mm QNP低温探头的Bruker AVANCE II 400MHz或带有5mm QNP探头的Bruker AVANCEIII 500MHz上记录的。相对于二甲亚砜( $\delta$  2.50)、氯仿( $\delta$ 7.26)、甲醇( $\delta$ 3.34)或二氯甲烷( $\delta$ 5.32),化学位移以ppm报告。将少量干燥样品(2mg至5mg)溶于适当的氘代溶剂(1mL)中。
- [1672] 实例291-335的表征中使用的NMR
- [1673] 质子光谱是在配备有低温探头的Bruker Avance 400NMR光谱仪(400MHz)或配备有低温探头的Bruker Avance 600NMR光谱仪(600MHz)上记录的。将化学位移( $\delta$ 值)以四甲基硅烷的低场ppm报告,光谱分裂模式被指定为,单信号(s)、双信号(d)、三重信号(t)、四重信号(q)、五重信号(p)多重信号、未解析的或更多重叠信号(m)、宽信号(br)。溶剂在括号中给出。
- [1674] 试剂和材料
- [1675] 溶剂和试剂购自供应商,无需进一步纯化即可使用。碱性离子交换树脂柱PoraPakTM Rxn CX 20cc (2g)从沃特斯公司购买。相分离器盒(Isolute相分离器)购自拜泰齐公司(Biotage)。Isolute吸收剂(IsoluteHM-N)购自拜泰齐公司。
- [1676] 实例的纯化中使用的ISCO方法
- [1677] ISCO快速色谱是在装有预填的二氧化硅**RediSep®**柱的特利丹公司(TELEDYNE)**COMBIFLASH®**系统上进行的。
- [1678] 实例的纯化中使用的制备型HPLC方法
- [1679] 制备型HPLC在沃特斯公司Autoprep系统上使用MassLynx和FractionLynx软件进行。所述系统由以下组成:
- [1680] • 沃特斯2767自动进样器/分部收集器
- [1681] • 沃特斯2525二元泵
- [1682] • 沃特斯515补给泵
- [1683] • 沃特斯2487双波长UV检测器

- [1684] • 沃特斯ZQ质谱仪
- [1685] 典型的方法条件如下:
- [1686] • 流速:100mL/min
- [1687] • 柱:10微米19x 50mm沃特斯Atlantis T3C18柱
- [1688] • 注射体积:0-1000微升
- [1689] • 流动相A:水+0.05%TFA
- [1690] • 流动相B:乙腈+0.035%TFA
- [1691] • 运行时间:4.25分钟
- [1692] 在初始条件下保持0.25分钟后,系统在3分钟内运行针对实例适当的从x%B到y%B的梯度。所述梯度后,在100%B下进行0.5分钟的洗涤。所述方法的剩余持续时间将系统恢复到初始条件。
- [1693] 通过FractionLynx软件的质量检测触发级分收集。
- [1694] 实例的纯化中使用的手性制备型HPLC方法
- [1695] SFC手性筛选在与沃特斯ZQ质谱仪连接的泰尔仪器公司制备型观察仪(Thar Instruments Prep Investigator)系统上进行。泰尔仪器公司制备型观察仪系统由以下组成:
- [1696] • Leap HTC PAL自动进样器
- [1697] • 泰尔仪器公司流体递送模块(0mL/min至10mL/min)
- [1698] • 泰尔仪器公司SFC 10位柱箱
- [1699] • 沃特斯2996PDA
- [1700] • 分光公司(Jasco)CD-2095手性检测器
- [1701] • 泰尔仪器公司自动背压调节器。
- [1702] 泰尔仪器公司的所有组件都是SuperPure Discovery系列产品线的一部分。
- [1703] 所述系统以2mL/min(WhelkO-1柱为4mL/min)流动,并保持在30摄氏度。系统背压设置为125巴。通过具有六个3微米柱的组对每个样品进行筛选:
- [1704] • 3微米4.6x 50mm ChiralPak AD
- [1705] • 3微米4.6x 50mm ChiralCel OD
- [1706] • 3微米4.6x 50mm ChiralCel OJ
- [1707] • 3微米4.6x 250mm Whelk O-1
- [1708] • 3微米4.6x 50mm ChiralPak AS
- [1709] • 3微米4.6x 50mm Lux-纤维素-2
- [1710] 系统在5分钟内运行从5%助溶剂到50%助溶剂的梯度,然后在50%助溶剂下保持0.5分钟,切换回5%助溶剂并在初始条件下保持0.25分钟。在每个梯度之间有4分钟的平衡方法,使5%助溶剂流过下一个有待筛选的柱。筛选的典型溶剂为MeOH、MeOH+20mM NH<sub>3</sub>、MeOH+0.5%DEA、IPA和IPA+20mM NH<sub>3</sub>。
- [1711] 一旦使用这些梯度方法之一检测到分离,就会开发出等度方法,并在必要时扩大规模,以在泰尔仪器公司Prep80系统上进行纯化。
- [1712] 中间体的合成
- [1713] 中间体1c(方案1):4-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶



[1714]



[1715] 步骤A: 在20mL微波小瓶中添加在DMA (体积: 5mL) 中的3-氨基异烟酰胺 (1a, 2g, 14.58mmol)、异烟碱醛 (1.521mL, 16.04mmol)、亚硫酸氢钠 (1.821g, 17.50mmol) 和4-甲基苯磺酸水合物 (0.277g, 1.458mmol), 得到橙色悬浮液。将反应充分搅拌并在微波中在160℃加热12分钟。将反应混合物用水稀释并过滤。将固体用水、MeOH和醚洗涤, 得到2.03g白色固体, 为产物1b (59%)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.18 (d, J=0.9Hz, 1H), 8.88-8.78 (m, 2H), 8.73 (d, J=5.2Hz, 1H), 8.16-8.08 (m, 2H), 8.03 (dd, J=5.2, 0.9Hz, 1H)。

[1716] 步骤B: 在5mL微波反应器中, 是2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-醇 (1b, 500mg, 2.230mmol) 和苯基膦酰二氯 (1564微升, 11.15mmol) 以得到棕色悬浮液。当LCMS表明完全转化时, 将反应混合物在170℃搅拌30min。将反应混合物用冰/水猝灭, 并用饱和Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>中和, 然后用DCM x 3萃取, 并且得到产物1c (74%)。<sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.65 (d, J=1.0Hz, 1H), 8.96 (d, J=5.6Hz, 1H), 8.87 (s, 2H), 8.47-8.30 (m, 2H), 8.18 (dd, J=5.6, 1.0Hz, 1H)。LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 243.1。

[1717] 中间体2c (方案2): 2,4-二氯吡啶并[3,4-d]嘧啶

[1718]



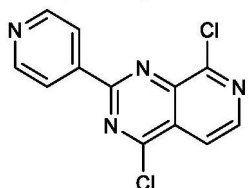
[1719] 步骤A: 将尿素 (40.00g, 666.00mmol) 和3-氨基异烟碱酸 (2a, 18.40g, 133.20mmol) 的混合物在210℃加热1小时 (注意: 不使用溶剂)。添加NaOH (2N, 320mL), 并将混合物在90℃下搅拌1h。通过过滤收集固体, 并用水洗涤。将如此获得的粗产物悬浮于HOAc (400mL) 中, 并在100℃下搅拌1h。将混合物冷却至室温, 过滤, 并将固体用大量水洗涤, 然后在真空下干燥, 得到吡啶并[3,4-d]嘧啶-2,4 (1H, 3H)-二酮 (2b, 17.00g, 产率78%), 其无需进一步纯化。LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 164.0。

[1720] 步骤B: 向吡啶并[3,4-d]嘧啶-2,4 (1H, 3H)-二酮 (2b, 20.00g, 122.60mmol) 和POCl<sub>3</sub> (328.03g, 2.14mol) 在甲苯 (200mL) 中混合物中滴加DIEA (31.69g, 245.20mmol), 并将所述反应混合物在25℃下搅拌过夜 (18hr), 得到悬浮液。

[1721] 真空除去溶剂和POCl<sub>3</sub>, 用DCM (50mL) 稀释, 在-20℃下用DIEA中和至pH=7, 然后再次浓缩, 将残余物通过柱 (20%-50% EA/PE) 纯化, 得到呈黄色固体的产物 (2c, 20.00g, 99.99mmol, 82%产率)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, 氯仿-d) δ 9.52 (s, 1H), 8.92 (d, J=5.6Hz, 1H), 8.04 (d, J=5.6Hz, 1H)。LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 200.0。

[1722] 中间体3c (方案3): 4,8-二氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶

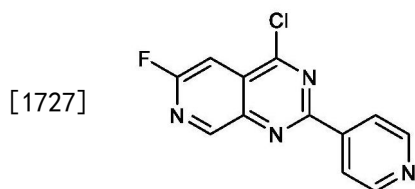
[1723]



[1724] 步骤A:在20mL微波反应器中,添加在DMA (体积:10mL) 中的3-氨基异烟酰胺 (3a, 650mg, 3.79mmol) 和异烟碱醛 (487mg, 4.55mmol)、亚硫酸氢钠 (788mg, 7.58mmol), 得到黄色悬浮液。将反应混合物在160℃微波下搅拌10min。将反应混合物用水稀释, 过滤, 并用MeOH和醚洗涤。收集固体, 得到产物3b (8-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-醇, 300mg, 29%)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ8.86-8.80 (m, 2H), 8.45 (d, J=5.1Hz, 1H), 8.18-8.12 (m, 2H), 8.00 (d, J=5.1Hz, 1H)。

[1725] 步骤B:在20mL微波反应器中混合8-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-醇 (3b, 300mg, 1.160mmol) 和苯基膦二氯化物 (1mL, 7.13mmol), 得到黄色悬浮液。将反应混合物在微波下在170℃下搅拌60分钟。将反应混合物用水稀释并过滤。将固体用水、MeOH和醚洗涤, 得到标题产物3c (78%)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ9.05-8.96 (m, 2H), 8.52 (d, J=5.1Hz, 1H), 8.46-8.38 (m, 2H), 8.05 (d, J=5.1Hz, 1H)。(向NMR样品中添加1滴TFA, 否则, 观察到两组峰)。LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 277.0。

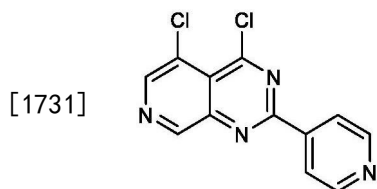
[1726] 中间体4c (方案4, 中间体4c, 其中X是F, A是4-吡啶基): 4-氯-6-氟-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶



[1728] 步骤A:将异烟腈 (800mg, 7.69mmol) 在MeOH (30ml) 中的溶液在室温下用甲醇钠 (0.474ml, 5.4M, 2.56mmol) 处理1小时。然后添加5-氨基-2-氟异烟酸 (1.0g, 6.41mmol), 并将所得混合物回流24小时。冷却至室温后, 通过过滤收集固体产物。将其用EtOAc洗涤, 然后真空干燥, 得到6-氟-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-醇 (4b, 756mg, 48.7%)。<sup>1</sup>H NMR (600MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ8.89 (s, 1H), 8.81 (d, J=5.6Hz, 2H), 8.14-8.06 (m, 2H), 7.74 (d, J=2.3Hz, 1H)。LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 243.10。

[1729] 步骤B:向6-氟-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-醇 (4b, 750mg, 3.1mmol) 在DCE (40ml) 中的混合物中添加亚硫酸酐 (1.81ml, 24.8mmol) 和DMF (0.1ml)。然后将混合物在85℃下搅拌3小时。将反应混合物在减压下浓缩, 并在真空下干燥过夜。粗产物 (950mg) 无需进一步处理或纯化即可用于下一步反应。LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 261.10。

[1730] 中间体5d (方案5): 4,5-二氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶



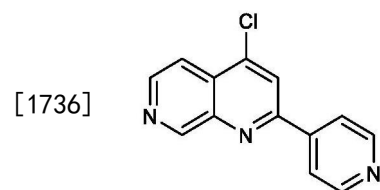
[1732] 步骤A:向3-溴-5-氟异烟酸 (5a, 1.87g, 8.5mmol) 和HATU (4.85g, 12.75mmol) 在DMF (30ml) 中的混合物中添加DIEA (4.5ml), 并将混合物在室温下搅拌20分钟, 然后添加异烟酰胺 (1.236g, 10.2mmol)。在室温下继续搅拌另外15小时。将反应混合物在减压下浓缩。然后将浅棕色浆粗混合物溶解在DCM中, 并通过硅胶色谱 (用0-10% MeOH/溶剂A洗脱, 溶剂A是4升DCM和在MeOH中的8ml 7N氨的混合物) 纯化, 将级分66-80池化并浓缩, 得到所需产物

3-溴-5-氟-N-(亚氨基(吡啶-4-基)甲基)异烟酰胺5b (566mg, 20.6%)。<sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ 10.27 (s, 1H), 10.09 (s, 1H), 8.79-8.73 (m, 2H), 8.71 (s, 2H), 7.95-7.89 (m, 2H)。LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 323.0。

[1733] 步骤B: 将3-溴-5-氟-N-(亚氨基(吡啶-4-基)甲基)异烟酰胺(5b, 600mg, 1.857mmol), DIEA (0.33ml, 1.857mmol), 碳酸钾 (257mg, 1.857mmol) 和DBU (0.28ml, 1.857mmol) 在DMA (8ml) 中的混合物在20ml微波反应容器中在150℃下加热45分钟(微波照射)。将反应混合物用水 (20ml) 稀释, 用EtOAc (3x60ml) 萃取, 所需产物保留在水相中。然后通过反相ISCO (10%-50%CH<sub>3</sub>CN/水) 纯化水相, 得到所需产物5-溴-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-醇5c (520mg, 80%纯度, 74%)。LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 303.0。

[1734] 步骤C: 将5-溴-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-醇 (5c, 150mg, 0.495mmol) 溶于无水CH<sub>3</sub>CN (2ml) 中, 然后添加POCl<sub>3</sub> (759mg, 4.95mmol)。然后将反应混合物在100℃加热16小时。LCMS显示反应完成。将反应冷却至室温, 并蒸发溶剂。将残余物用冰水 (40ml) 稀释, 然后用EtOAc (3x40ml) 萃取。将合并的有机层经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并蒸发至干, 得到所需产物4,5-二氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶5d (86%)。所述产物直接用于下一步, 无需进一步纯化。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ 9.05 (s, 1H), 8.87 (s, 2H), 8.68 (s, 1H), 8.16 (d, J=4.9Hz, 2H)。LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 277.0。

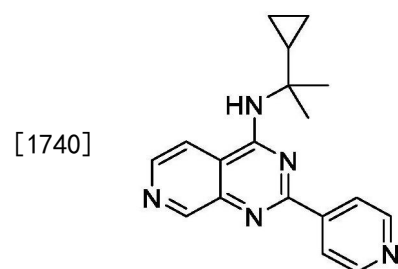
[1735] 中间体6b (方案6, 中间体6b', 其中A是4-吡啶基): 4-氯-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶



[1737] 步骤A: 在20mL微波反应器中, 添加在乙腈 (2mL) 中的钯四 (58.1mg, 0.050mmol)、碳酸钾 (1.256mL, 2.51mmol) 和2,4-二氯-1,7-萘啶 (6a, 200mg, 1.005mmol) 和吡啶-4-基硼酸 (130mg, 1.055mmol), 得到橙色悬浮液。将反应混合物在微波下于120℃搅拌60分钟。将粗混合物用DCM、H<sub>2</sub>O稀释, 分离并用DCMx3萃取。将有机层合并并经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并浓缩。将残余物通过在COMBIFLASH®系统 (ISCO) 上的快速色谱 (使用0-10%MeOH/DCM) 进行纯化, 得到产物 (62%)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ 9.58 (d, J=0.9Hz, 1H), 8.85-8.78 (m, 4H), 8.32-8.29 (m, 2H), 8.11 (dd, J=5.8, 0.9Hz, 1H)。LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 242.1。

[1738] 具有式A1的化合物的合成

[1739] 实例1: N-(2-环丙基丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺 (化合物1)



[1741] 使用方案1中的步骤C, 由4-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶 (中间体1c) 制

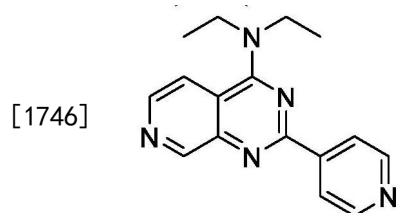
备标题化合物。

[1742] 步骤C: 在20mL小瓶中, 将4-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶(30mg, 0.12mmol)在DMF(0.7mL)中在室温下搅拌, 并用N<sub>2</sub>脱气。添加TEA(19μL, 0.14mmol)并搅拌5分钟, 然后添加KF(7mg, 0.12mmol)。将所述混合物在室温搅拌15分钟, 然后添加2-环丙基丙-2-胺(0.013mL, 0.12mmol)并脱气, 然后在80℃搅拌2小时。然后将反应浓缩, 并通过在COMBIFLASH®系统(ISCO)上的快速色谱(使用0%-10%MeOH/DCM)进行纯化, 得到产物N-(2-环丙基丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺(50%)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ9.19(d, J=0.8Hz, 1H), 8.80(d, J=6.1Hz, 2H), 8.64(d, J=5.6Hz, 1H), 8.40(dd, J=5.7, 0.9Hz, 1H), 8.29(m, 2H), 7.74(s, 1H), 1.94(m, 1H), 1.52(s, 6H), 0.49(m, 4H)。LCMS(m/z [M+H]<sup>+</sup>): 306.2。

[1743] 实例2-110:

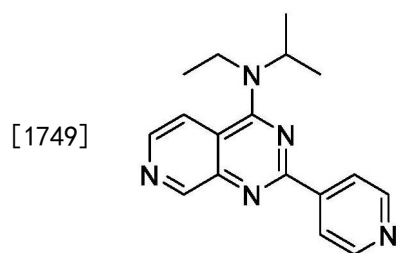
[1744] 根据实例1所述的方案, 分别使用4-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶(中间体1c)和各种的胺合成下述实例2-110, 除非特别说明。

[1745] 实例2:N-(2-环丙基丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



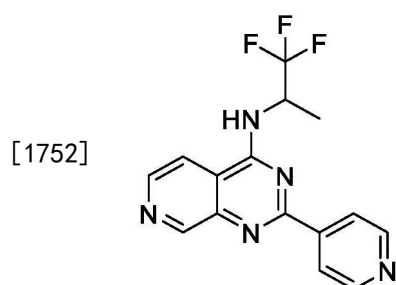
[1747] <sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ9.21(d, J=0.8Hz, 1H), 8.78(m, 2H), 8.58(d, J=5.9Hz, 1H), 8.31(m, 2H), 7.89(dd, J=5.9, 0.9Hz, 1H), 3.90(q, J=7.0Hz, 4H), 1.40(t, J=7.0Hz, 6H)。LCMS(m/z [M+H]<sup>+</sup>): 280.1。

[1748] 实例3:N-乙基-N-(丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



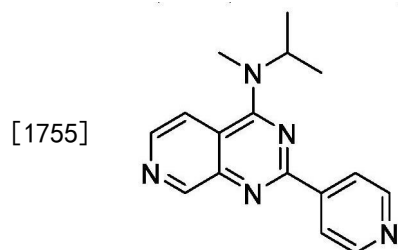
[1750] <sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ9.22(d, J=0.8Hz, 1H), 8.78(m, 2H), 8.58(d, J=5.8Hz, 1H), 8.30(m, 2H), 7.88(dd, J=5.8, 0.8Hz, 1H), 4.95-4.90(m, 1H), 3.81(q, J=6.9Hz, 2H), 1.40(s, 3H), 1.38(s, 3H), 1.35(m, 3H)。LCMS(m/z [M+H]<sup>+</sup>): 294.2。

[1751] 实例4:2-(吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



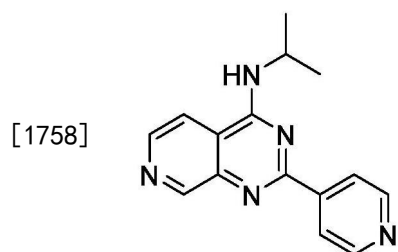
[1753]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.45 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.83 (m, 2H), 8.78 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 8.70-8.60 (m, 2H), 7.63 (s, 1H), 5.98-5.92 (m, 1H), 5.80-5.75 (m, 1H), 1.81 (d,  $J=7.0\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $m/z$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ ): 320.1。

[1754] 实例5: N-甲基-N-(丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



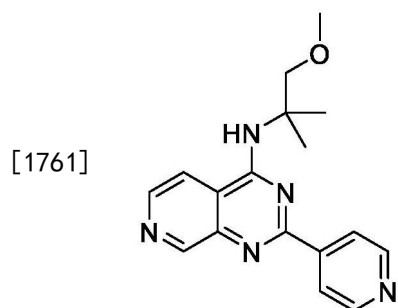
[1756]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  9.20 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.78 (m, 2H), 8.55 (d,  $J=5.8\text{Hz}$ , 1H), 8.31 (m, 2H), 8.03 (dd,  $J=5.8, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 5.15-5.10 (m, 1H), 3.34 (s, 3H), 1.35 (d,  $J=6.6\text{Hz}$ , 6H). LCMS ( $m/z$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ ): 280.2。

[1757] 实例6: N-(丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



[1759]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  9.18 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.76 (m, 2H), 8.64 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.50 (d,  $J=7.5\text{Hz}$ , 1H), 8.32 (m, 2H), 8.28 (dd,  $J=5.7, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 4.74-4.67 (d,  $J=6.7\text{Hz}$ , 1H), 1.36 (d,  $J=6.6\text{Hz}$ , 6H). LCMS ( $m/z$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ ): 266.1。

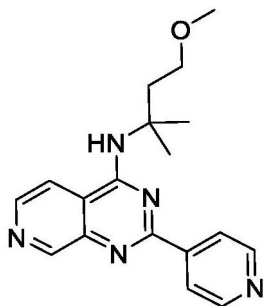
[1760] 实例7: N-(1-甲氧基-2-甲基丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



[1762]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  9.19 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.80 (m, 2H), 8.64 (d,  $J=5.8\text{Hz}$ , 1H), 8.40 (dd,  $J=5.7, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.29 (m, 2H), 7.74 (s, 1H), 3.85 (s, 2H), 3.28 (s, 3H), 1.60 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ ): 310.2。

[1763] 实例8: N-(4-甲氧基-2-甲基丁-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

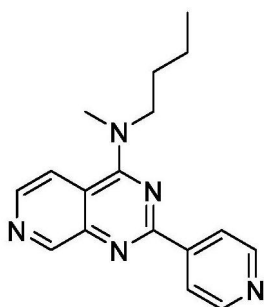
[1764]



[1765]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.19 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.80 (m, 2H), 8.65 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.30 (m, 2H), 8.28 (m, 1H), 7.85 (s, 1H), 3.48 (t,  $J=6.7\text{Hz}$ , 2H), 3.20 (s, 3H), 2.35 (t,  $J=6.8\text{Hz}$ , 2H), 1.64 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 324.2。

[1766] 实例9: N-丁基-N-甲基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

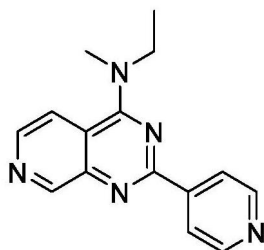
[1767]



[1768]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.21 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.77 (m, 2H), 8.55 (d,  $J=5.9\text{Hz}$ , 1H), 8.31 (m, 2H), 8.08 (dd,  $J=5.8, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 3.92 (m, 2H), 3.54 (s, 3H), 1.82-1.75 (m, 2H), 1.48-1.36 (m, 2H), 0.98 (t,  $J=7.4\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 294.2。

[1769] 实例10: N-乙基-N-甲基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

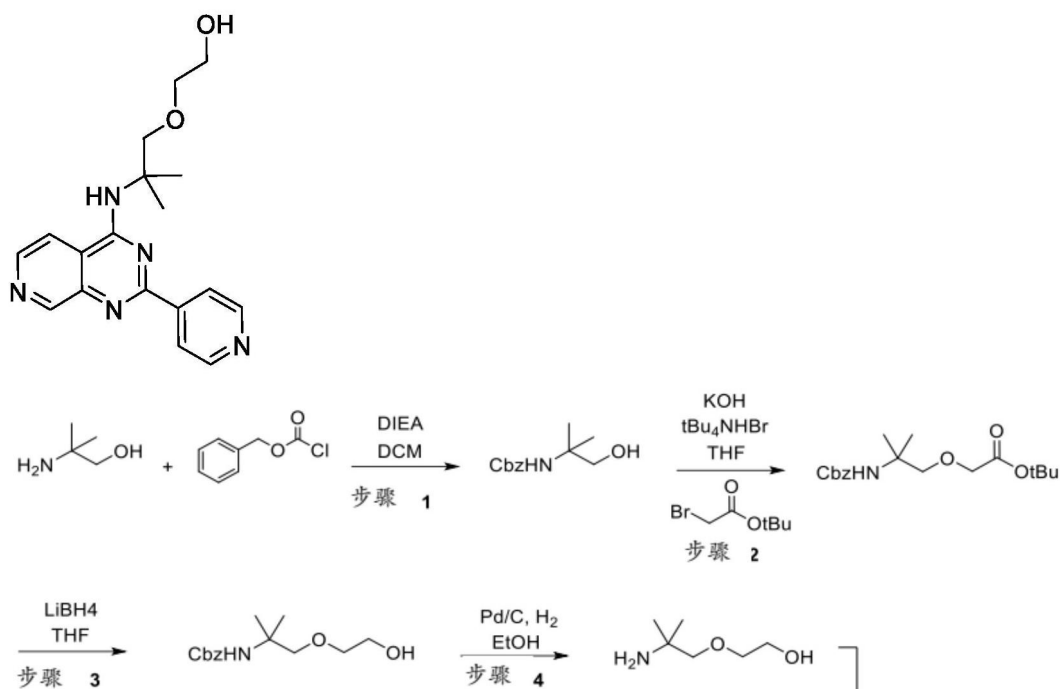
[1770]



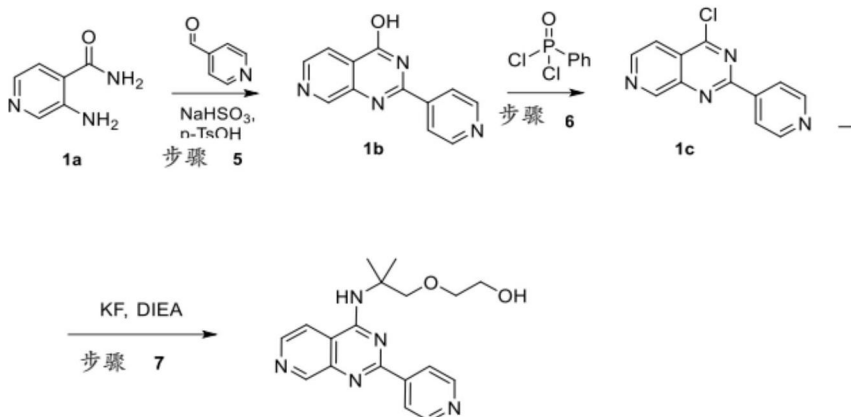
[1771]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.21 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.78 (m, 2H), 8.55 (d,  $J=5.8\text{Hz}$ , 1H), 8.31 (m, 2H), 8.05 (dd,  $J=5.9, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 3.94 (q,  $J=7.1\text{Hz}$ , 2H), 3.50 (s, 3H), 1.39 (t,  $J=7.0\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 266.1。

[1772] 实例11: 2-(2-甲基-2-{{2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基}氨基}丙氧基)乙-1-醇

[1773]



[1774]



[1775] 步骤1:在0℃的40mL小瓶中,添加在8mL干DCM中的2-氨基-2-甲基丙-1-醇(1.5g, 16.8mmol)。添加DIEA(3.2mL, 18.5mmol),然后分批添加碳酰氯苄酯(2.37mL, 16.8mmol)。将反应混合物搅拌两小时,缓慢升温至室温。在空气流下蒸发溶剂。将残余物通过在 **COMBIFLASH®** 系统(ISC0)上的快速色谱(使用0-50%EtOAc/己烷)进行纯化,得到产物苄基-(1-羟基-2-甲基丙-2-基)氨基甲酸酯(90%)。LCMS ( $m/z$  [M+H]<sup>+</sup>):224.3。

[1776] 步骤2:在20mL小瓶中,添加在5mL干THF中的苄基-(1-羟基-2-甲基丙-2-基)氨基甲酸酯(0.63g, 2.8mmol)。将氢氧化钾(0.16g, 2.8mmol)添加到0.5mL的H<sub>2</sub>O中,然后添加叔丁基2-溴乙酸酯(0.62mL, 4.2mmol)和四丁基溴化铵(90mg, 0.28mmol)。将反应混合物在30℃下搅拌过夜。在空气流下蒸发溶剂。将残余物通过在 **COMBIFLASH®** 系统(ISC0)上的快速色谱(使用0-40%EtOAc/己烷)进行纯化,得到叔-丁基2-(2-(((苄基氧基)羰基)氨基)-2-甲基丙氧基)乙酸酯(35%)。LCMS ( $m/z$  [M+H]<sup>+</sup>):338.4。

[1777] 步骤3:在0℃下在20mL的小瓶中,添加在1mL的干DMF中的叔-丁基2-(2-(((苄基氧基

基) 羰基) 氨基) -2-甲基丙氧基) 乙酸酯 (0.14g, 0.17mmol)。分批添加硼氢化锂 (0.45mL, 0.91mmol), 并在室温下搅拌4小时, 然后用水猝灭。使用DCM萃取, 并在空气流下蒸发溶剂。将残余物通过在COMBIFLASH® 系统 (ISCO) 上的快速色谱 (使用0-70% EtOAc/己烷) 进行纯化, 得到苄基-(1-(2-羟基乙氧基)-2-甲基丙-2-基) 氨基甲酸酯 (35%)。LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ]<sup>+</sup>): 268.3。

[1778] 步骤4: 在20mL隔膜密封的小瓶中, 添加在1.2mL EtOH中的苄基-(1-(2-羟基乙氧基)-2-甲基丙-2-基) 氨基甲酸酯 (0.03g, 0.11mmol)。在室温下用N<sub>2</sub>强烈吹扫小瓶。小心地添加一小勺Pd/C (30%, 催化剂量), 并将反应保持在N<sub>2</sub>下。然后使用H<sub>2</sub>气囊彻底冲洗反应容器, 然后在H<sub>2</sub>压力下搅拌4小时。从反应中除去H<sub>2</sub>, 然后用N<sub>2</sub>吹扫容器。然后将所述物质通过Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>和硅藻土过滤, 并在空气流下蒸发溶剂。无需进一步纯化残余物。2-(2-氨基-2-甲基丙氧基) 乙醇 (95%)。1H NMR (500MHz, 氯仿-d)  $\delta$  3.76-3.73 (m, 2H), 3.62-3.59 (m, 2H), 3.26 (s, 2H), 1.27 (s, 2H), 1.20 (d, J=4.6Hz, 1H), 1.11 (s, 6H)。LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ]<sup>+</sup>): 134.2。

[1779] 步骤5: 在20mL微波小瓶中添加在DMA (体积: 5mL) 中的3-氨基异烟酰胺 (1a, 2g, 14.58mmol)、异烟碱醛 (1.521mL, 16.04mmol)、亚硫酸氢钠 (1.821g, 17.50mmol) 和4-甲基苯磺酸水合物 (0.277g, 1.458mmol), 得到橙色悬浮液。将反应充分搅拌并在微波中于160℃加热12分钟。将反应混合物用水稀释并过滤。将固体用水、MeOH和醚洗涤, 得到2.03g白色固体, 为产物1b (59%)。1H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  9.18 (d, J=0.9Hz, 1H), 8.88-8.78 (m, 2H), 8.73 (d, J=5.2Hz, 1H), 8.16-8.08 (m, 2H), 8.03 (dd, J=5.2, 0.9Hz, 1H)。

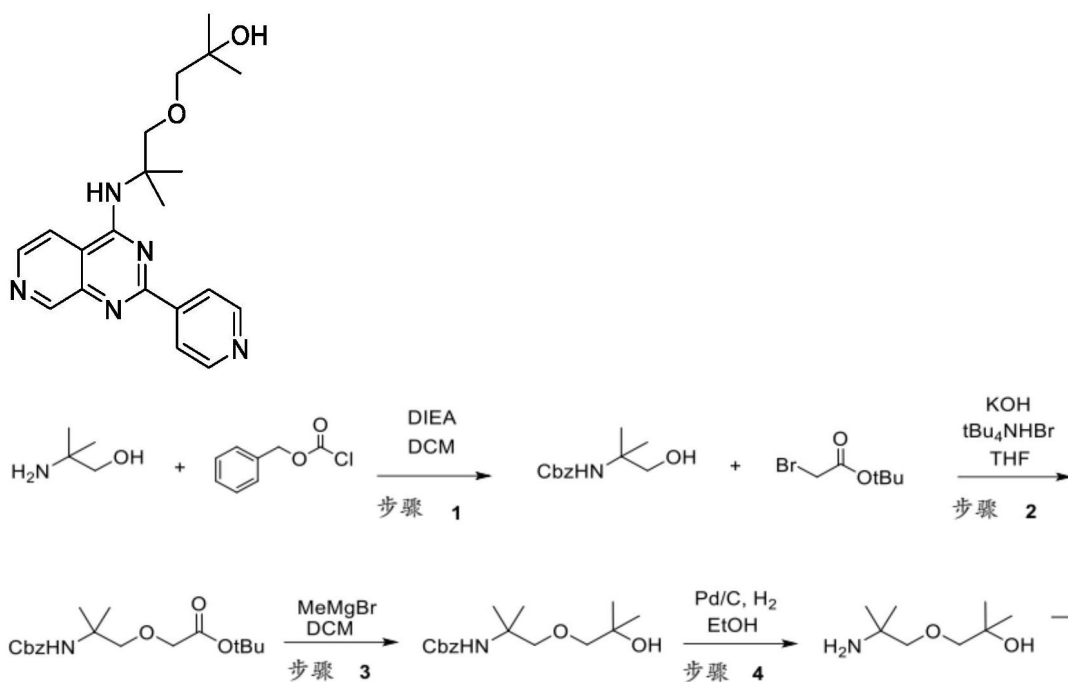
[1780] 步骤6: 在5mL微波反应器中, 是2-(吡啶-4-基) 吡啶并[3, 4-d]嘧啶-4-醇 (1b, 500mg, 2.230mmol) 和苯基膦酰二氯 (1564微升, 11.15mmol) 以得到棕色悬浮液。将反应混合物在170℃搅拌30分钟, 此时LCMS显示完全转化。将反应混合物用冰/水猝灭, 并用饱和Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>中和, 然后用DCM x 3萃取, 并且得到产物1c (74%)。1H NMR (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  9.65 (d, J=1.0Hz, 1H), 8.96 (d, J=5.6Hz, 1H), 8.87 (s, 2H), 8.47-8.30 (m, 2H), 8.18 (dd, J=5.6, 1.0Hz, 1H)。LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ]<sup>+</sup>): 243.1。

[1781] 步骤7: 在20mL的小瓶中, 在室温下于DMSO (1.5mL) 中搅拌4-氯-2-(吡啶-4-基) 吡啶并[3, 4-d]嘧啶 (中间体1c) (150mg, 0.618mmol) 并用N<sub>2</sub>脱气。添加DIEA (324微升, 1.85mmol) 并搅拌5分钟, 然后添加KF (36mg, 0.618mmol)。将所述混合物在室温搅拌15分钟, 然后添加2-(2-氨基-2-甲基丙氧基) 乙醇 (99mg, 0.74mmol) 并脱气, 然后在60℃搅拌30分钟。然后将反应浓缩, 并通过在COMBIFLASH® 系统 (ISCO) 上的快速色谱 (使用0-10% MeOH/DCM) 进行纯化, 得到标题化合物 (25%)。1H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  9.19 (d, J=0.8Hz, 1H), 8.80 (m, 2H), 8.64 (d, J=5.6Hz, 1H), 8.35 (m, 1H), 8.29 (m, 2H), 7.76 (s, 1H), 4.64-4.59 (m, 1H), 3.90 (s, 2H), 3.50-3.44 (m, 4H), 1.61 (s, 6H)。LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ]<sup>+</sup>): 340.2

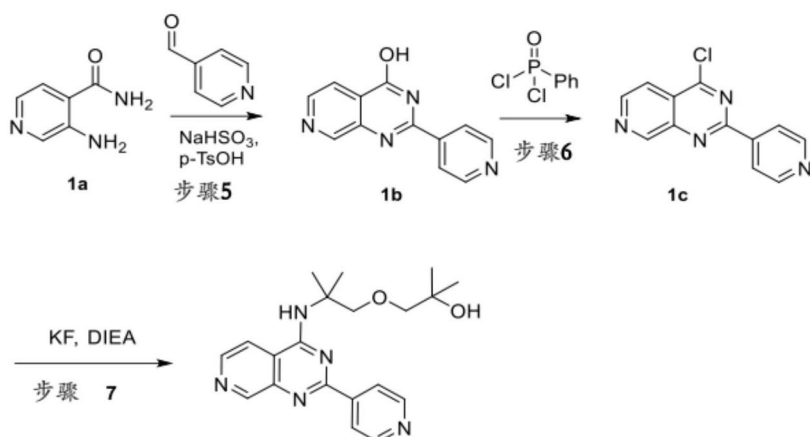
[1782] 实例12: 2-甲基-1-(2-甲基-2-[[2-(吡啶-4-基) 吡啶并[3, 4-d]嘧啶-4-基]氨基]丙氧基) 丙-2-醇



[1783]



[1784]



[1785] 步骤1:在0℃下在40ml小瓶中,添加在8mL干DCM中的2-氨基-2-甲基丙烷-1-醇(1.5g,16.8mmol)。添加DIEA(3.2mL,18.5mmol),然后分批添加碳酸氯苄酯(2.37mL,16.8mmol)。将反应混合物搅拌两小时,缓慢升温至室温。在空气流下蒸发溶剂。将残余物通过在**COMBIFLASH®**系统(ISCO)上的快速色谱(使用0-50%EtOAc/己烷)进行纯化,得到产物苄基-(1-羟基-2-甲基丙-2-基)氨基甲酸酯(90%)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,氯仿-d) $\delta$ 7.41-7.29(m,5H),5.06(s,2H),4.97-4.83(m,1H),4.70(s,1H),3.62(s,2H),1.34-1.19(m,6H)。LCMS( $m/z$ [M+H]<sup>+</sup>):224.3。

[1786] 步骤2:在20mL的小瓶中,添加在5mL的干THF中的苄基-(1-羟基-2-甲基丙-2-基)氨基甲酸酯(0.63g,2.8mmol)。将氢氧化钾(0.16g,2.8mmol)加入0.5mL的H<sub>2</sub>O中,然后添加叔丁基2-溴乙酸酯(0.62mL,4.2mmol)和四丁基溴化铵(90mg,0.28mmol)。将反应混合物在30℃下搅拌过夜。在空气流下蒸发溶剂。将残余物通过在**COMBIFLASH®**系统(ISCO)上的快速色谱(使用0-40%EtOAc/己烷)进行纯化,得到叔-丁基2-(2-((苄基氧基)羰基)氨基)-2-甲基丙氧基)乙酸酯(35%)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz,氯仿-d) $\delta$ 7.39-7.28(m,5H),5.52(s,

1H), 5.06 (s, 2H), 3.96 (s, 2H), 3.45 (s, 2H), 1.48 (s, 9H), 1.36 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [M+H]<sup>+</sup>): 338.4。

[1787] 步骤3: 将叔-丁基-2-(2-((苄基氧基)羰基)氨基)-2-甲基丙氧基)乙酸酯(700mg, 4.15mmol)在冰浴中的DCM(5mL)中搅拌10分钟。分批缓慢添加甲基溴化镁(30mL, 42mmol), 然后搅拌, 同时经两个小时升温至室温。然后将反应用水猝灭, 并用DCM萃取三次。将有机层合并, 浓缩, 并通过在 COMBIFLASH® 系统 (ISCO) 上的快速色谱 (使用0-50% EtOAc/己烷) 进行纯化, 得到产物苄基(1-(2-羟基-2-甲基丙氧基)-2-甲基丙-2-基)氨基甲酸酯(55%)。LCMS [M+H]<sup>+</sup> = 296.4。

[1788] 步骤4: 在20mL隔膜密封的小瓶中, 添加在1.2mL EtOH中的苄基(1-(2-羟基-2-甲基丙氧基)-2-甲基丙-2-基)氨基甲酸酯(0.03g, 0.11mmol)。在室温下用N<sub>2</sub>强烈吹扫小瓶。小心地添加一小勺Pd/C(30%, 催化剂量), 并将反应保持在N<sub>2</sub>下。然后使用H<sub>2</sub>气囊彻底冲洗反应容器, 然后在H<sub>2</sub>压力下搅拌4小时。从反应中除去H<sub>2</sub>, 然后用N<sub>2</sub>吹扫容器。然后将所述物质通过Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>和硅藻土过滤, 并在空气流下蒸发溶剂。无需进一步纯化残余物即可得到(1-(2-氨基-2-甲基丙氧基)-2-甲基丙-2-醇)(95%)。1H NMR(500MHz, 氯仿-d)  $\delta$  3.32 (s, 2H), 3.26 (s, 2H), 1.22 (s, 6H), 1.12 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [M+H]<sup>+</sup>): 162.2。

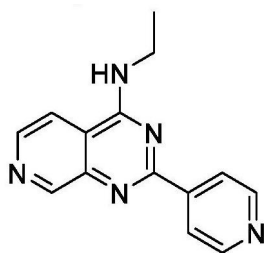
[1789] 步骤5: 在20mL微波小瓶中添加在DMA(体积: 5mL)中的3-氨基异烟酰胺(1a, 2g, 14.58mmol)、异烟碱醛(1.521mL, 16.04mmol)、亚硫酸氢钠(1.821g, 17.50mmol)和4-甲基苯磺酸水合物(0.277g, 1.458mmol), 得到橙色悬浮液。将反应充分搅拌并在微波中在160℃加热12分钟。将反应混合物用水稀释并过滤。将固体用水、MeOH和醚洗涤, 得到2.03g白色固体, 为产物1b(59%)。1H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  9.18 (d, J=0.9Hz, 1H), 8.88-8.78 (m, 2H), 8.73 (d, J=5.2Hz, 1H), 8.16-8.08 (m, 2H), 8.03 (dd, J=5.2, 0.9Hz, 1H)。

[1790] 步骤6: 在5mL微波反应器中, 是2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-醇(1b, 500mg, 2.230mmol)和苯基膦酰二氯(1564微升, 11.15mmol)以得到棕色悬浮液。将反应混合物在170℃搅拌30分钟, 此时LCMS显示完全转化。将反应混合物用冰/水猝灭, 并用饱和Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>中和, 然后用DCM x 3萃取, 并且得到产物1c(74%)。1H NMR(500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  9.65 (d, J=1.0Hz, 1H), 8.96 (d, J=5.6Hz, 1H), 8.87 (s, 2H), 8.47-8.30 (m, 2H), 8.18 (dd, J=5.6, 1.0Hz, 1H). LCMS ( $m/z$  [M+H]<sup>+</sup>): 243.1。

[1791] 步骤7: 在20mL小瓶中, 在室温下于DMSO(0.7mL)中搅拌4-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶(中间体1c)(25mg, 0.10mmol), 并使用N<sub>2</sub>进行脱气。添加DIEA(43 $\mu$ L, 0.25mmol)并搅拌5分钟, 然后添加KF(6mg, 0.10mmol)。将所述混合物在室温搅拌15分钟, 然后添加2-(1-(2-氨基-2-甲基丙氧基)-2-甲基丙-2-醇)(0.013mL, 0.12mmol)并脱气, 然后在60℃搅拌30分钟。然后将反应浓缩, 并通过在 COMBIFLASH® 系统 (ISCO) 上的快速色谱 (使用0-10% MeOH/DCM) 进行纯化, 得到标题化合物(50%)。1H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  9.18 (d, J=0.8Hz, 1H), 8.79 (m, 2H), 8.64 (d, J=5.6Hz, 1H), 8.37 (dd, J=5.7, 0.9Hz, 1H), 8.30 (m, 2H), 7.80 (s, 1H), 4.40 (s, 1H), 3.90 (s, 2H), 3.17 (s, 2H), 1.61 (s, 6H), 0.99 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [M+H]<sup>+</sup>): 368.2。

[1792] 实例13: N-乙基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

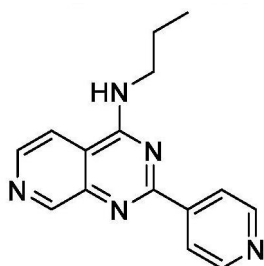
[1793]



[1794]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.19 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.84 (m, 1H), 8.76 (m, 2H), 8.65 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.34 (m, 2H), 8.18 (dd,  $J=5.6, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 3.77-3.69 (qd,  $J=7.2, 5.4\text{Hz}$ , 2H), 1.31 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 252.1。

[1795] 实例14: N-丙基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

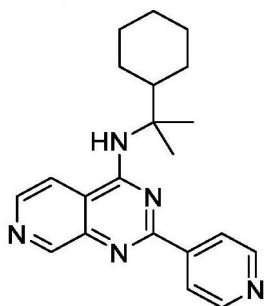
[1796]



[1797]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.19 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.82 (t,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 8.78 (m, 2H), 8.64 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 8.33 (m, 2H), 8.19 (dd,  $J=5.6, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 3.70-3.62 (td,  $J=7.0, 5.7\text{Hz}$ , 2H), 1.80-1.70 (m, 2H), 1.00 (t,  $J=7.4\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 266.1。

[1798] 实例15: N-(2-环己基丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

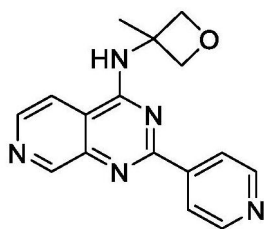
[1799]



[1800]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.16 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.80 (m, 2H), 8.62 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.40 (dd,  $J=5.7, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.28 (m, 2H), 7.62 (s, 1H), 1.76-1.70 (m, 4H), 1.62-1.59 (m, 1H), 1.52 (s, 6H), 1.18-1.04 (q,  $J=11.8, 10.9\text{Hz}$ , 6H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 348.2。

[1801] 实例16: N-(3-甲基氧杂环丁烷-3-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

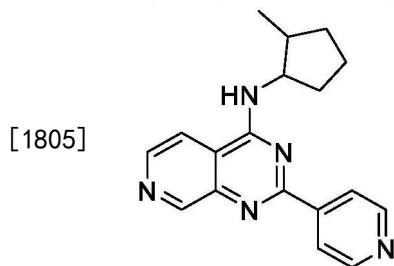
[1802]



[1803]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.21 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 9.14 (s, 1H), 8.76 (m, 2H), 8.68 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 8.25 (m, 2H), 8.16 (dd,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 4.90 (d,  $J=6.3\text{Hz}$ , 2H), 4.64 (d,  $J$

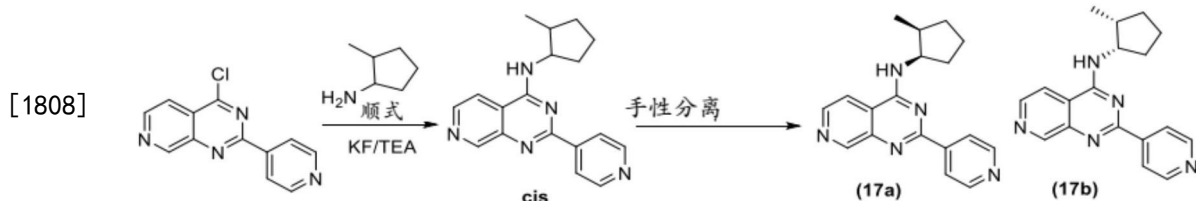
$=6.5\text{Hz}$ ,  $2\text{H}$ ),  $1.82\text{ (s, }3\text{H)}$ ). LCMS ( $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 294.1。

[1804] 实例17: N-(2-甲基环戊基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



[1806]  $^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  9.19 (d,  $J=1.0\text{Hz}$ , 1H), 8.78 (m, 2H), 8.66 (m, 1H), 8.33 (m, 2H), 8.32 (m, 1H), 7.91 (m, 1H), 4.45-4.42 (m, 1H), 2.20-2.14 (m, 1H), 1.98-1.82 (m, 2H), 1.80-1.72 (m, 2H), 1.70-1.62 (m, 1H), 1.50-1.42 (m, 1H), 0.91 (d,  $J=7.0\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 306.2。

[1807] 实例17b: N-((1R,2S)-2-甲基环戊基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺 (17a) 和 N-((1S,2R)-2-甲基环戊基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺 (17b)



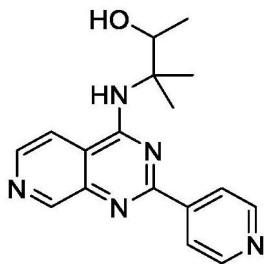
[1809] 向4-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶 (130mg, 0.536mmol) 在DMF (10ml) 中的溶液中添加TEA (0.23ml, 1.61mmol) 和KF (32.7mg, 0.56mmol)。将混合物搅拌5分钟, 然后添加顺式-2-甲基环戊胺盐酸盐 (72.7mg, 0.536mmol)。然后将得到的混合物在50℃下搅拌2小时。然后将粗混合物通过硅胶色谱纯化, 得到109mg产物。将100mg所述物质进行手性分离, 得到两种顺式异构体, 峰1 ( $T_R=1.46$ 分钟) 异构体35mg, 峰2 ( $T_R=1.95$ 分钟) 异构体46mg。手性中心指定是暂定的, 手性分离条件: 溶剂A  $\text{CO}_2$  (80%), 溶剂B  $\text{MeOH}+0.1\%\text{NH}_4\text{Cl}$  (20%), 流速2ml/min, 柱21x 250mm AD-H, 运行时间6分钟叠式注射, 10分钟洗脱时间。

[1810] 峰1 ( $T_R=1.46$ 分钟) 异构体:  $^1\text{H NMR}$  (500MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  9.19 (s, 1H), 8.77 (d,  $J=5.8\text{Hz}$ , 2H), 8.66 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.40 (dd,  $J=5.7, 0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.36-8.29 (m, 3H), 4.86 (p,  $J=7.5\text{Hz}$ , 1H), 2.09 (dtd,  $J=11.7, 8.1, 3.4\text{Hz}$ , 1H), 1.89 (dddq,  $J=29.7, 12.7, 8.4, 3.8\text{Hz}$ , 3H), 1.66-1.53 (m, 1H), 1.51-1.41 (m, 1H), 0.83 (d,  $J=7.1\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 306.2。

[1811] 峰2 ( $T_R=1.95$ 分钟) 异构体:  $^1\text{H NMR}$  (500MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  9.19 (d,  $J=0.7\text{Hz}$ , 1H), 8.80-8.74 (m, 2H), 8.66 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.40 (dd,  $J=5.7, 0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.36-8.29 (m, 3H), 4.86 (p,  $J=7.6\text{Hz}$ , 1H), 2.09 (dp,  $J=12.4, 4.6, 4.2\text{Hz}$ , 1H), 1.98-1.79 (m, 3H), 1.66-1.54 (m, 1H), 1.50-1.41 (m, 1H), 0.83 (d,  $J=7.1\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 306.2。

[1812] 实例18: 3-甲基-3-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丁-2-醇

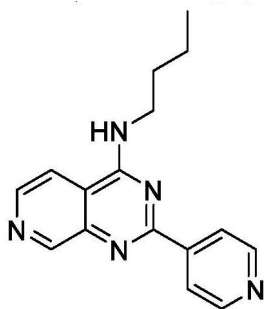
[1813]



[1814]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.17 (d,  $J=5.4\text{Hz}$ , 1H), 8.79 (m, 2H), 8.63 (m, 1H), 8.33 (m, 1H), 8.28 (dd,  $J=5.4, 0.8\text{Hz}$ , 2H), 7.58 (s, 1H), 5.00 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 4.30-4.26 (m, 1H), 1.29 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.05 (d,  $J=6.7\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 310.2。

[1815] 实例19: N-丁基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

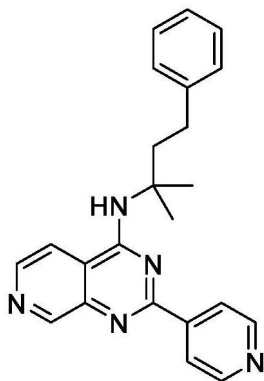
[1816]



[1817]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.19 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.82 (m, 1H), 8.78 (m, 2H), 8.65 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.34 (m, 2H), 8.20 (dd,  $J=5.6, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 3.75-3.68 (td, 7.2, 5.6Hz, 2H), 1.78-1.69 (m, 2H), 1.50-1.40 (m, 2H), 0.98 (t,  $J=7.4\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 280.2。

[1818] 实例20: N-(2-甲基-4-苯基丁-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

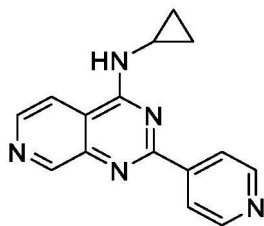
[1819]



[1820]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.19 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.78 (m, 2H), 8.63 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.40 (dd,  $J=5.7, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.30 (m, 2H), 7.79 (s, 1H), 7.13-7.04 (m, 5H), 2.61-2.56 (dd,  $J=10.7, 6.0\text{Hz}$ , 2H), 2.48-2.43 (m, 2H), 1.65 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 370.2。

[1821] 实例21: N-环丙基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

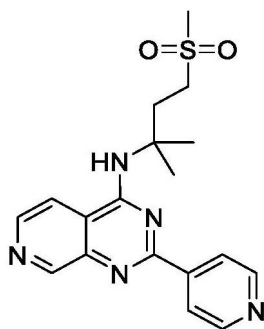
[1822]



[1823]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.21 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.83 (m, 1H), 8.78 (m, 2H), 8.64 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.40 (m, 2H), 8.18 (dd,  $J=5.6, 1.0\text{Hz}$ , 1H), 3.30-3.22 (m, 1H), 0.98-0.94 (m, 2H), 0.80-0.76 (m, 2H). LCMS ( $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 264.1。

[1824] 实例22: N-(4-甲磺酰基-2-甲基丁-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

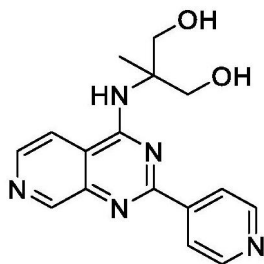
[1825]



[1826]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.20 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.79 (m, 2H), 8.65 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.39 (dd,  $J=5.7, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.30 (m, 2H), 7.76 (s, 1H), 3.15-3.10 (m, 2H), 2.90 (s, 3H), 2.65-2.60 (m, 2H), 1.61 (s, 6H). LCMS ( $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 372.1。

[1827] 实例23: 2-甲基-2-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丙烷-1,3-二醇

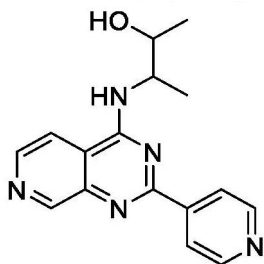
[1828]



[1829]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.18 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.79 (m, 2H), 8.63 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.32 (dd,  $J=5.7, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.29 (m, 2H), 7.38 (s, 1H), 4.81 (t,  $J=6.0\text{Hz}$ , 2H), 3.97-3.94 (dd,  $J=10.8, 6.0\text{Hz}$ , 2H), 3.90-3.82 (dd,  $J=10.9, 6.2\text{Hz}$ , 2H), 1.52 (s, 3H). LCMS ( $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 312.1。

[1830] 实例24: 3-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丁-2-醇

[1831]



[1832]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.18 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.77 (m, 2H), 8.64 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.38 (m, 1H), 8.32 (m, 2H), 8.30 (s, 1H), 4.80 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 4.76-4.72 (m, 1H), 3.93-3.88 (m, 1H), 1.31 (d,  $J=6.7\text{Hz}$ , 3H), 1.19 (d,  $J=6.3\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 296.2。

[1833] 实例25: 2-(2-甲基-2-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丙氧基)乙酸

[1834]

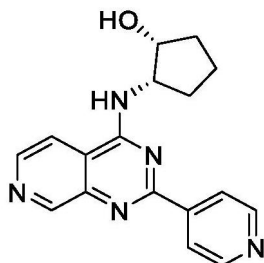


[1835] 由叔-丁基2-(2-氨基-2-甲基丙氧基)乙酸酯和4-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶根据实例1步骤C中所述,然后将叔丁酯脱保护来制备标题化合物。

[1836] 脱保护: 将叔-丁基2-(2-甲基-2-((2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)丙氧基)基)氨基)丙氧基)乙酸酯 (25mg, 0.061mmol) 在TFA于DCM中的40%混合物中在室温下搅拌两小时。通过TLC或LCMS未观察到起始原料。将反应用DCM稀释, 并使用 $N_2$ 和温和的热浓缩, 然后重复三遍, 并在高真空下放置过夜。在这些条件下的中间体通常无需进一步纯化即可使用。然后还通过快速色谱纯化在这些条件下的标题化合物。 $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.20 (d, 0.8Hz, 1H), 8.80 (m, 2H), 8.63 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.33 (ddd,  $J=10.8, 5.1, 1.2\text{Hz}$ , 2H), 8.30 (m, 1H), 8.19 (s, 1H), 4.14 (s, 2H), 3.80 (s, 2H), 3.16 (s, 1H), 1.62 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 354.2。

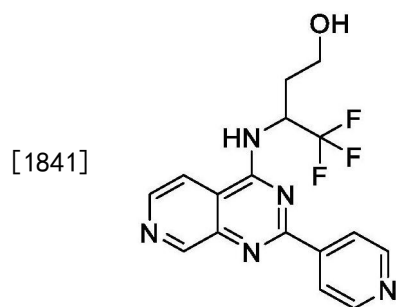
[1837] 实例26: (1R,2S)-2-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}环戊-1-醇

[1838]



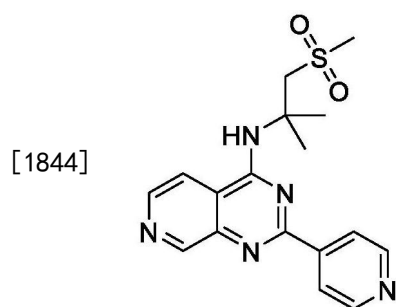
[1839]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.19 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.78 (m, 1H), 8.65 (m, 1H), 8.40 (m, 1H), 8.37 (m, 1H), 8.32 (m, 2H), 4.72 (d,  $J=3.7\text{Hz}$ , 1H), 4.60-4.52 (ddd,  $J=15.9, 9.2, 4.4\text{Hz}$ , 1H), 4.44-4.40 (m, 1H), 2.04-1.98 (m, 3H), 1.90-1.82 (m, 1H), 1.74-1.56 (m, 2H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 308.1。

[1840] 实例27:4,4,4-三氟-3- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基} 丁-1-醇



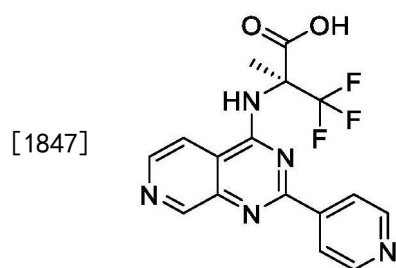
[1842]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.30 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.85 (m, 1H), 8.80 (m, 2H), 8.74 (m, 1H), 8.39 (d,  $J=4.3\text{Hz}$ , 1H), 8.33 (dd,  $J=5.7, 0.9\text{Hz}$ , 2H), 5.76-5.70 (m, 1H), 4.77-4.70 (m, 1H), 3.61-3.55 (m, 2H), 2.11-2.08 (m, 2H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 350.1。

[1843] 实例28:N-(1-磺酰基-2-甲基丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



[1845]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.20 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.79 (m, 2H), 8.67 (dd,  $J=5.9, 4.7\text{Hz}$ , 1H), 8.40 (dd,  $J=5.7, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.30 (m, 2H), 8.08 (s, 1H), 4.13 (s, 2H), 2.90 (s, 3H), 1.80 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 358.1。

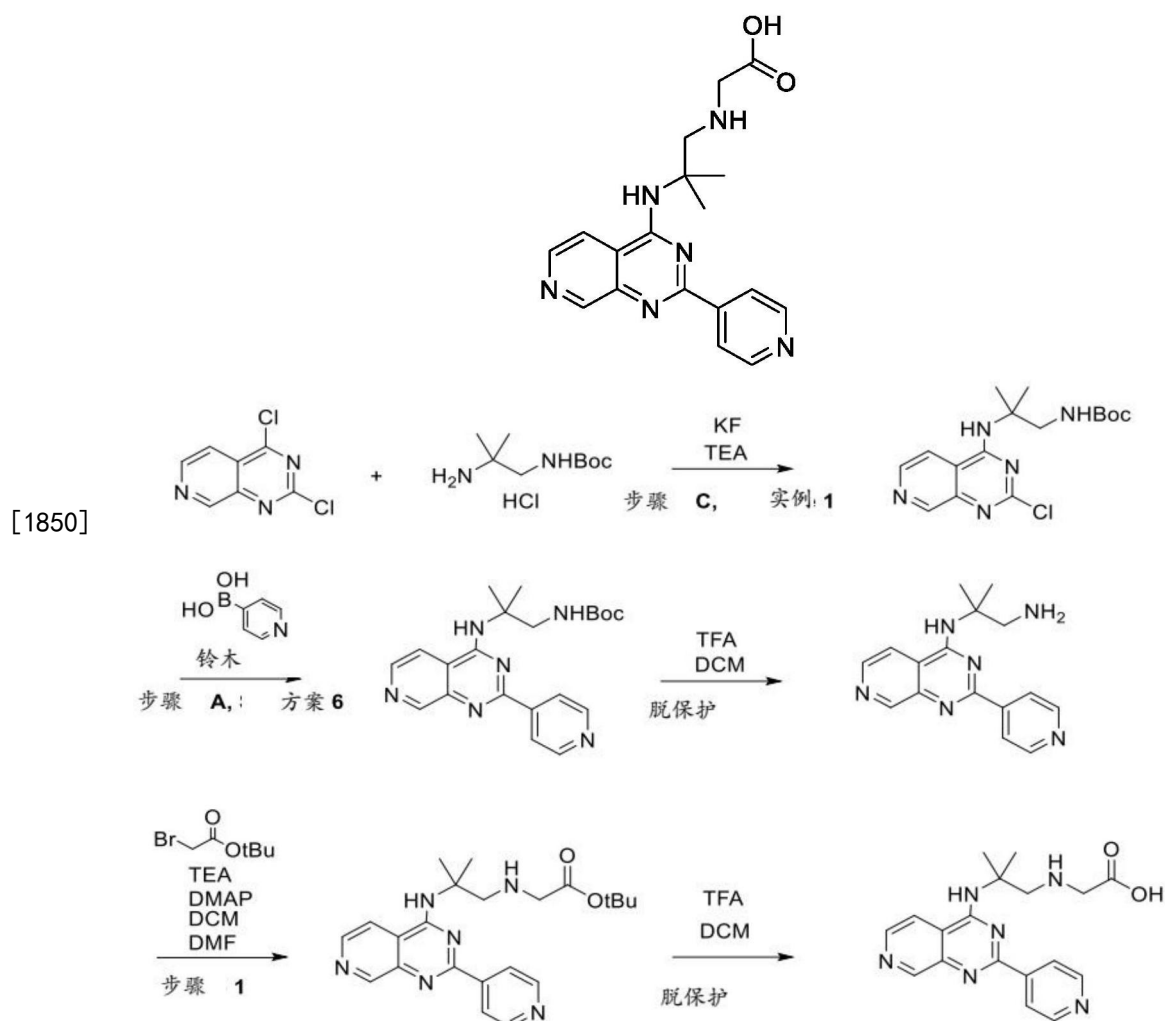
[1846] 实例29:(2S)-3,3,3-三氟-2-甲基-2- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基} 丙酸



[1848]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.23 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.79 (m, 2H), 8.76 (m, 1H), 8.70 (m, 1H), 8.30 (dd,  $J=5.6, 0.8\text{Hz}$ , 2H), 7.81 (s, 1H), 2.02 (s, 3H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 364.1。

[1849] 实例30:2-[ (2-甲基-2- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基} 丙基) 氨基] 乙酸



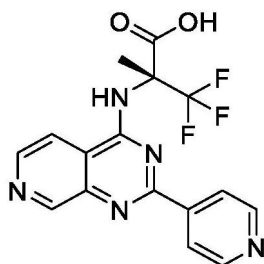


[1851] 使用叔-丁基2-((2-甲基-2-((2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)丙基)氨基)乙酸酯如以上方案中所述制备标题化合物。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.25 (m, 1H), 8.82 (m, 2H), 8.70 (m, 1H), 8.40 (m, 1H), 8.35 (m, 2H), 7.84 (d, J=9.4Hz, 1H), 3.89-3.80 (d, J=6.2Hz, 1H), 3.60-3.56 (d, J=11.0Hz, 4H), 1.70 (s, 6H). LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 353.2。

[1852] 步骤1: 将2-甲基-N2-(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丙烷-1,2-二胺 (20mg, 0.068mmol) 在DCM/DMF中于室温搅拌。添加21微升TEA (21微升, 0.149mmol) 并搅拌3分钟。然后添加叔丁基2-溴乙酸酯 (11微升, 0.071mmol) 和催化量的DMAP, 并在室温下搅拌四小时。然后将反应浓缩, 并通过在COMBIFLASH®系统 (ISCO) 上的快速色谱 (使用0-10% MeOH/DCM) 进行纯化, 得到产物叔-丁基2-((2-甲基-2-((2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)丙基)氨基)乙酸酯 (35%)。LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 409.5。

[1853] 实例31: (2R)-3,3,3-三氟-2-甲基-2-{{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丙酸

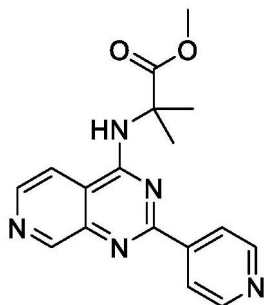
[1854]



[1855]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.23 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.79 (m, 2H), 8.77 (m, 1H), 8.70 (m, 1H), 8.30 (m, 2H), 7.83 (s, 1H), 2.02 (s, 3H). LCMS ( $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 364.1。

[1856] 实例32: 甲基2-甲基-2-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丙酸酯

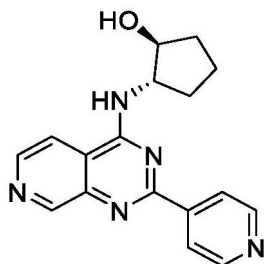
[1857]



[1858]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.24 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.85 (s, 1H), 8.79 (m, 2H), 8.70 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 8.39 (dd,  $J=5.7, 1.0\text{Hz}$ , 1H), 8.25 (m, 2H), 3.51 (s, 3H), 1.69 (s, 6H). LCMS ( $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 324.1。

[1859] 实例33: (1S,2S)-2-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}环戊-1-醇

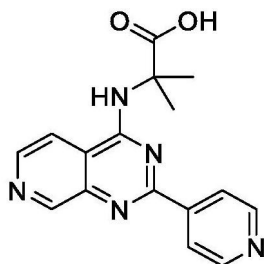
[1860]



[1861]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.19 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.78 (m, 2H), 8.65 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.51 (d,  $J=7.0\text{Hz}$ , 1H), 8.38 (m, 1H), 8.36 (m, 1H), 8.31 (dd,  $J=5.6, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 4.92 (d,  $J=4.6\text{Hz}$ , 1H), 4.60-4.54 (d,  $J=7.0\text{Hz}$ , 1H), 4.26-4.20 (m, 1H), 2.32-2.22 (ddt,  $J=13.2, 8.2, 4.3\text{Hz}$ , 1H), 2.00-1.92 (m, 1H), 1.85-1.72 (m, 2H), 1.70-1.56 (m, 2H). LCMS ( $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 308.1。

[1862] 实例34: 2-甲基-2-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丙酸

[1863]



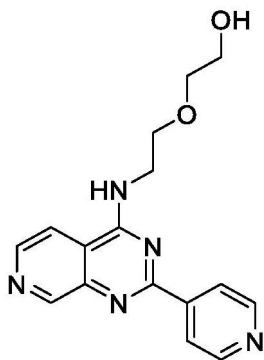
[1864] 通过将甲基2-甲基-2-((2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)丙酸酯

如实例25步骤A中所述脱保护基来制备标题化合物。

[1865]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ 12.61 (s, 1H), 9.20 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.86-8.80 (s, 1H), 8.75 (m, 2H), 8.67 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.30 (m, 2H), 8.28 (m, 1H), 1.66 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 310.1。

[1866] 实例35: 2-(2-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}乙氧基)乙-1-醇

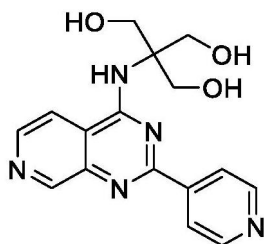
[1867]



[1868]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ 9.20 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.89 (t,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 8.76 (m, 2H), 8.65 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 8.32 (m, 2H), 8.20 (dd,  $J=5.7, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 4.60-4.57 (m, 1H), 3.89 (q,  $J=5.7\text{Hz}$ , 2H), 3.78 (t,  $J=5.8\text{Hz}$ , 2H), 3.51-3.48 (d,  $J=2.9\text{Hz}$ , 4H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 312.1。

[1869] 实例36: 2-(羟基甲基)-2-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丙烷-1,3-二醇

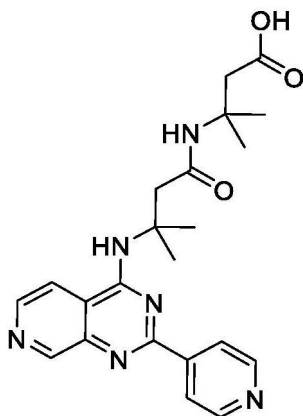
[1870]



[1871]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ 9.20 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.80 (m, 2H), 8.65 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.30 (ddd,  $J=19.4, 5.1, 1.3\text{Hz}$ , 1H), 8.26 (m, 2H), 7.19 (s, 1H), 4.72 (t,  $J=6.0\text{Hz}$ , 3H), 4.00 (d,  $J=6.0\text{Hz}$ , 6H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 328.1。

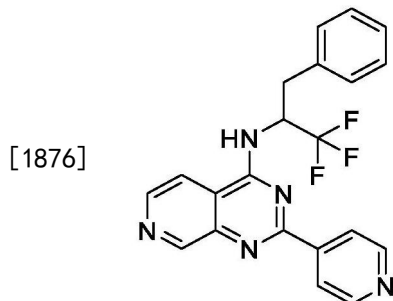
[1872] 实例37: 3-甲基-3-(3-甲基-3-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丁酰胺)丁酸

[1873]



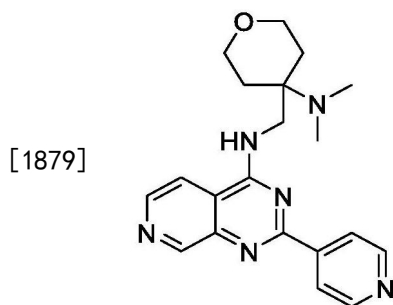
[1874]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.20 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.80 (dt,  $J=4.5, 1.1\text{Hz}$ , 2H), 8.64 (m, 1H), 8.33 (m, 2H), 8.30 (m, 1H), 7.90 (s, 1H), 1.72 (s, 6H), 1.70 (s, 2H), 1.30 (s, 2H), 1.00 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 423.2。

[1875] 实例38: 2-(吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟-3-苯基丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



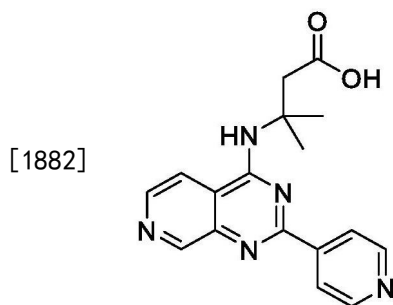
[1877]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.21 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.99 (d,  $J=9.0\text{Hz}$ , 1H), 8.75 (m, 2H), 8.71 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.33 (m, 1H), 8.30 (m, 2H), 7.41 (m, 2H), 7.11 (m, 2H), 7.02 (m, 1H), 5.95-5.86 (t,  $J=8.2\text{Hz}$ , 1H), 3.38-3.34 (m, 1H), 3.24-3.17 (ddt,  $J=13.8, 11.7, 0.7\text{Hz}$ , 1H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 396.1。

[1878] 实例39: N-{[4-(二甲基氨基)环氧乙烷-4-基]甲基}-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



[1880]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.20 (s, 1H), 8.78 (m, 2H), 8.67 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 8.52 (s, 1H), 8.33 (m, 2H), 8.28 (m, 1H), 3.62 (t,  $J=10.6\text{Hz}$ , 2H), 3.53 (d,  $J=10.7\text{Hz}$ , 2H), 3.27 (d,  $J=5.3\text{Hz}$ , 2H), 2.41 (s, 6H), 1.80 (d,  $J=14.1\text{Hz}$ , 2H), 1.63 (t,  $J=11.5\text{Hz}$ , 2H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 365.2。

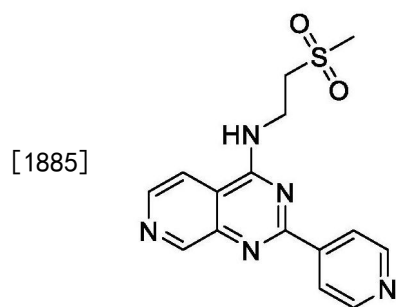
[1881] 实例40: 3-甲基-3-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丁酸



[1883]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.02 (s, 1H), 9.20 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.80 (m, 2H), 8.66 (m, 1H), 8.40 (m, 1H), 8.30 (m, 2H), 7.99 (m, 1H), 3.12-3.08 (q,  $J=7.3\text{Hz}$ , 2H), 1.70 (s,

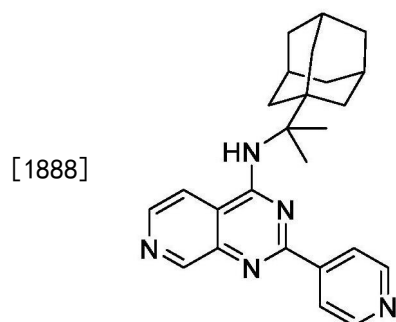
6H).LCMS ( $m/z$   $[M+H]^+$ ):324.1。

[1884] 实例41:N-(2-甲磺酰基乙基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



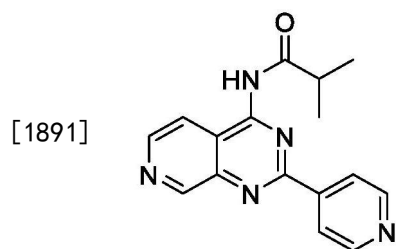
[1886]  $^1H$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ 9.23 (s, 1H), 9.10 (t,  $J=5.6$ Hz, 1H), 8.78 (m, 2H), 8.69 (d,  $J=5.7$ Hz, 1H), 8.39 (m, 2H), 8.14 (d,  $J=5.7$ Hz, 1H), 4.13-4.09 (q,  $J=6.4$ Hz, 2H), 3.62 (t,  $J=6.7$ Hz, 2H), 3.09 (s, 3H).LCMS ( $m/z$   $[M+H]^+$ ):330.1。

[1887] 实例42:N-[2-(金刚烷-1-基)丙-2-基]-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



[1889]  $^1H$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ 9.16 (d,  $J=0.8$ Hz, 1H), 8.78 (m, 2H), 8.63 (d,  $J=5.6$ Hz, 1H), 8.45 (m, 1H), 8.25 (m, 2H), 7.06 (s, 1H), 1.99-1.96 (d,  $J=7.5$ Hz, 3H), 1.80-1.76 (m, 6H), 1.67-1.64 (m, 6H), 1.64-1.60 (m, 6H).LCMS ( $m/z$   $[M+H]^+$ ):400.2。

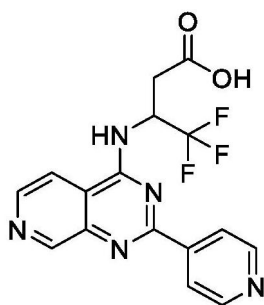
[1890] 实例43:2-甲基-N-[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]丙酰胺



[1892]  $^1H$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ 11.08 (s, 1H), 9.49 (m, 1H), 8.84 (m, 2H), 8.80 (m, 1H), 8.40 (m, 2H), 8.25 (dd,  $J=5.8, 1.0$ Hz, 1H), 3.29-3.18 (m, 1H), 1.26 (d,  $J=6.8$ Hz, 6H).LCMS ( $m/z$   $[M+H]^+$ ):294.1。

[1893] 实例44:4,4,4-三氟-3-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丁酸

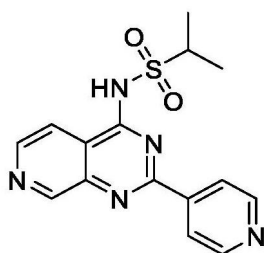
[1894]



[1895]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.29 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.80 (m, 2H), 8.71 (t,  $J=4.9\text{Hz}$ , 1H), 8.34 (m, 2H), 8.23 (d,  $J=5.7\text{Hz}$ , 1H), 5.84-5.79 (m, 1H), 3.65-3.55 (d,  $J=4.8\text{Hz}$ , 1H), 2.45-2.41 (d,  $J=4.7\text{Hz}$ , 1H), 2.32-2.26 (m, 1H). LCMS ( $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 364.1。

[1896] 实例45: N-[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]丙烷-2-磺酰胺

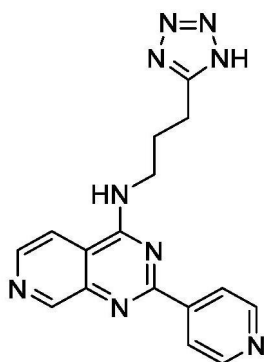
[1897]



[1898]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.38 (s, 1H), 8.88 (m, 2H), 8.76 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.40-8.30 (m, 3H), 4.20-4.10 (q,  $J=7.1\text{Hz}$ , 1H), 1.40 (d,  $J=6.9\text{Hz}$ , 6H). LCMS ( $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 330.1。

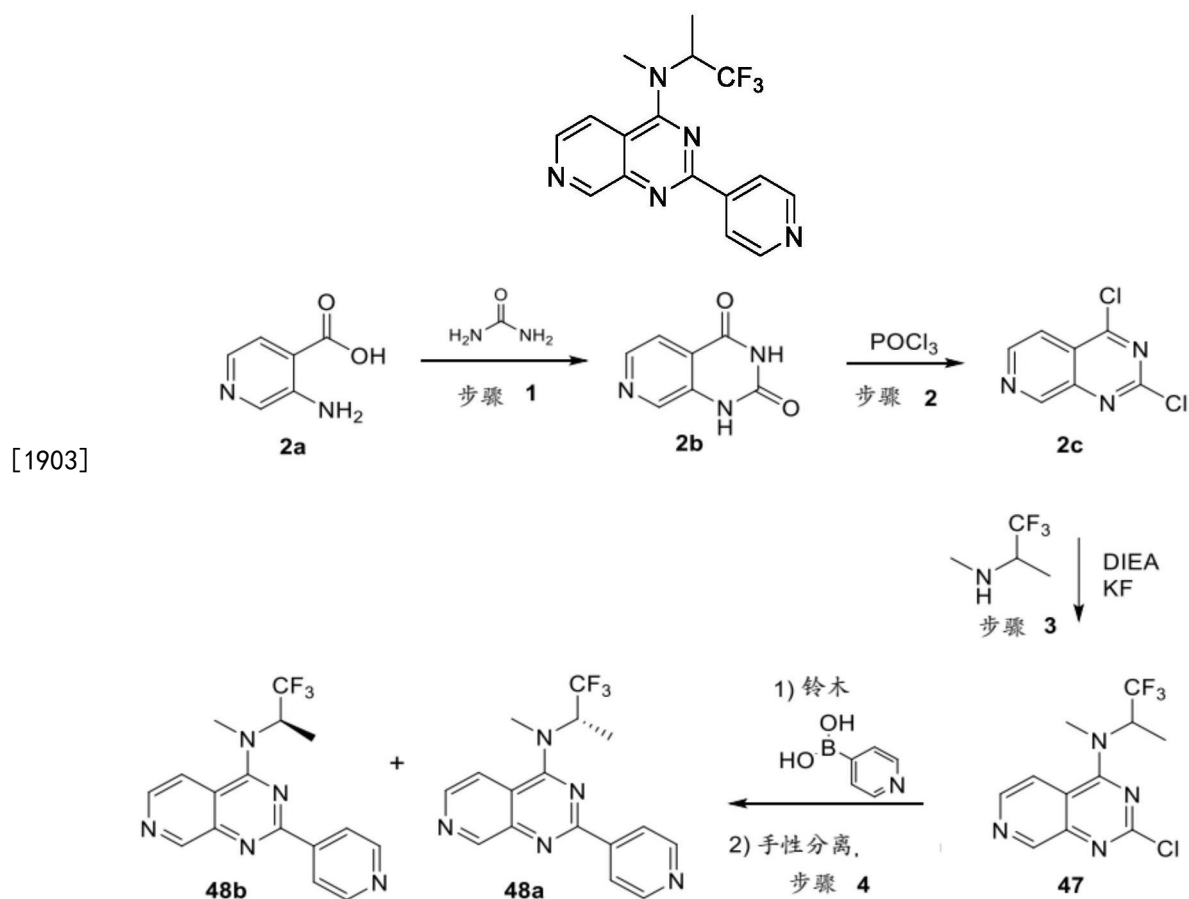
[1899] 实例46: 2-(吡啶-4-基)-N-[3-(1H-1,2,3,4-四唑-5-基)丙基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

[1900]



[1901]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.21 (m, 1H), 9.18 (s, 1H), 8.75 (m, 2H), 8.64 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.30 (m, 2H), 8.21 (dd,  $J=5.6, 1.0\text{Hz}$ , 1H), 3.81-3.75 (td,  $J=6.9, 5.3\text{Hz}$ , 2H), 2.95 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 2H), 2.18-2.10 (m, 2H). LCMS ( $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 334.2。

[1902] 实例47: N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



[1904] 步骤1:将尿素(40.00g,666.00mmol)和3-氨基异烟碱酸(2a,18.40g,133.20mmol)的混合物在210℃加热1小时(注意:不使用溶剂)。添加NaOH(2N,320mL),并将混合物在90℃下搅拌1h。通过过滤收集固体,并用水洗涤。将如此获得的粗产物悬浮于HOAc(400mL)中,并在100℃下搅拌1h。将混合物冷却至室温,过滤,并将固体用大量水洗涤,然后在真空下干燥,得到吡啶并[3,4-d]嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(2b,17.00g,产率78%),其无需进一步纯化。LCMS( $m/z$  [M+H]<sup>+</sup>):164.0。

[1905] 步骤2:向吡啶并[3,4-d]嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(2b,20.00g,122.60mmol)和POCl<sub>3</sub>(328.03g,2.14mol)在甲苯(200mL)中的混合物中滴加DIEA(31.69g,245.20mmol),并将所述反应混合物在25℃下搅拌过夜(18hr),得到悬浮液。

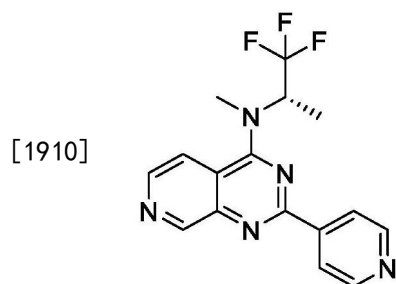
[1906] 真空除去溶剂和POCl<sub>3</sub>,用DCM(50mL)稀释,在-20℃下用DIEA中和至pH=7,然后再次浓缩,将残余物通过柱(20%-50%EA/PE)纯化,得到呈黄色固体的2,4-二氯吡啶并[3,4-d]嘧啶(2c,20.00g,99.99mmol,82%产率)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,氯仿-d) $\delta$ 9.52(s,1H),8.92(d,J=5.6Hz,1H),8.04(d,J=5.6Hz,1H)。LCMS( $m/z$  [M+H]<sup>+</sup>):200.0。

[1907] 步骤3:在室温下,在20mL小瓶中,在DMSO(0.7mL)中搅拌2,4-二氯吡啶并[3,4-d]嘧啶(600mg,3.0mmol),并用N<sub>2</sub>脱气。添加DIEA(1mL,6mmol)并搅拌5分钟,然后添加KF(174mg,3mmol)。将所述混合物在室温搅拌15分钟,然后添加外消旋1,1,1-三氟-N-甲基丙-2-胺(419mg,3.3mmol)并脱气,然后在60℃搅拌4小时。然后将反应浓缩并通过在COMBIFLASH®系统(ISC0)上的快速色谱(使用0-10%MeOH/DCM)纯化,得到2-氯-N-甲基-N-(1,1,1-三氟丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺(680mg,74%)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz,丙

酮-d6)  $\delta$ 9.09 (d,  $J=0.9$ Hz, 1H), 8.59 (d,  $J=5.9$ Hz, 1H), 8.22 (dd,  $J=5.9, 0.9$ Hz, 1H), 5.93 (dddd,  $J=15.3, 8.3, 7.0, 1.2$ Hz, 1H), 3.61 (q,  $J=1.0$ Hz, 3H), 1.63 (d,  $J=7.0$ Hz, 3H). LCMS ( $m/z$  [M+H]<sup>+</sup>): 291.7。

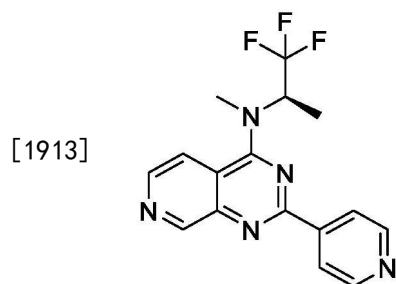
[1908] 步骤4: 在20mL微波反应器中添加在乙腈(8mL)中的钼四(99mg, 0.086mmol)、碳酸钾(2.15mL, 4.3mmol)和2-氯-N-甲基-N-(1,1,1-三氟丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺(500mg, 1.72mmol)和吡啶-4-基硼酸(233mg, 1.89mmol), 得到黄色悬浮液。将反应混合物在微波下于130℃搅拌30分钟。将粗混合物用DCM、H<sub>2</sub>O稀释, 分离并用DCMx3萃取。将有机层合并并经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并浓缩。通过在 COMBIFLASH® 系统 (ISCO) 上的快速色谱(使用0-10% MeOH/DCM) 纯化残余物, 得到实例47, 外消旋产物, 然后通过手性HPLC (21x250mm OJ-H柱, A相为85% CO<sub>2</sub>, B相为15% MeOH, 流速2mL/min, 30℃, 洗脱时间3.5分钟) 分离对映异构体, 得到实例4ba和48b。

[1909] 实例48a: N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-[(2S)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



[1911] <sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ 9.33 (d,  $J=0.8$ Hz, 1H), 8.86-8.75 (m, 2H), 8.63 (d,  $J=5.9$ Hz, 1H), 8.38-8.30 (m, 2H), 8.20 (dd,  $J=6.0, 0.9$ Hz, 1H), 6.11 (qt,  $J=8.5, 7.4$ Hz, 1H), 3.50 (d,  $J=1.1$ Hz, 3H), 1.61 (d,  $J=7.0$ Hz, 3H). LCMS ( $m/z$  [M+H]<sup>+</sup>): 334.1. 手性HPLC  $T_R$  = 1.73分钟。通过X射线晶体结构证实了绝对立体化学。

[1912] 实例48b: N-甲基-2-(吡啶-4-基)-N-[(2R)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

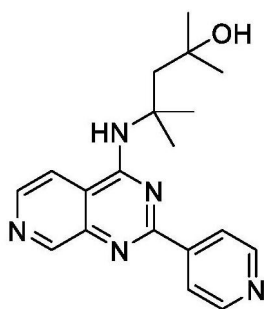


[1914] <sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ 9.33 (d,  $J=0.8$ Hz, 1H), 8.86-8.75 (m, 2H), 8.63 (d,  $J=5.9$ Hz, 1H), 8.38-8.30 (m, 2H), 8.20 (dd,  $J=6.0, 0.9$ Hz, 1H), 6.11 (qt,  $J=8.5, 7.4$ Hz, 1H), 3.50 (d,  $J=1.1$ Hz, 3H), 1.61 (d,  $J=7.0$ Hz, 3H). LCMS ( $m/z$  [M+H]<sup>+</sup>): 334.1. 手性HPLC  $T_R$  = 1.25分钟。通过X射线晶体结构证实了绝对立体化学。

[1915] 实例49: 2,4-二甲基-4-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}戊-2-醇



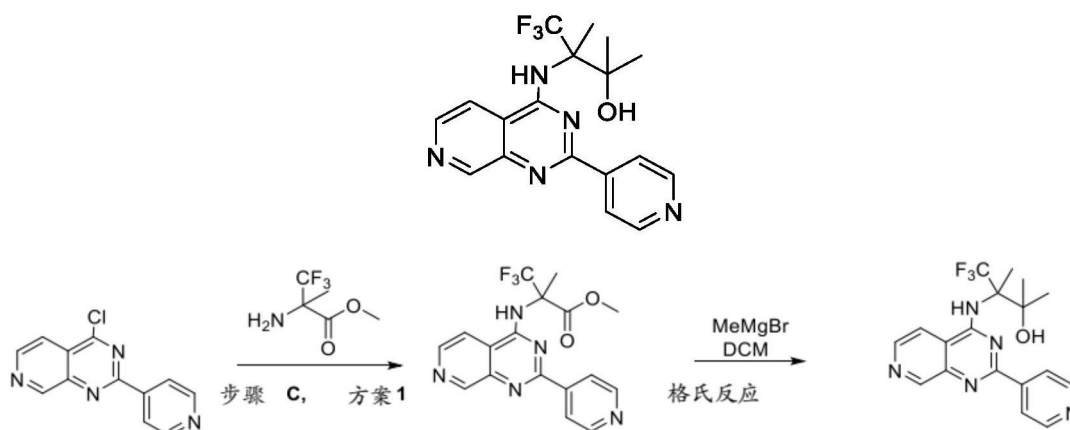
[1916]



[1917]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, 丙酮- $d_6$ )  $\delta$  9.57 (s, 1H), 9.15 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.82-8.72 (m, 2H), 8.56 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.44-8.37 (m, 2H), 7.69 (dd,  $J=5.6, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 2.08 (s, 2H), 1.87 (s, 6H), 1.48 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 6H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 338.2。

[1918] 实例50: 4,4,4-三氟-2,3-二甲基-3-{{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丁-2-醇

[1919]

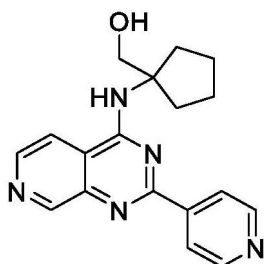


[1920] 由甲基2-氨基-3,3,3-三氟-2-甲基丙酸酯盐酸盐和4-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶如实例1步骤C所述,然后与甲基溴化镁进行格氏反应来制备标题化合物。

[1921] 格氏反应: 将甲基3,3,3-三氟-2-甲基-2-((2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)丙酸酯(7mg, 0.019mmol)与甲基溴化镁(1.4M在己烷中, 0.133mL)在DCM中在0℃下搅拌1小时。通过TLC或LCMS未观察到起始原料。将反应用MeOH猝灭并浓缩。将残余物通过在 COMBIFLASH® 系统 (ISCO) 上的快速色谱(使用0-10% MeOH/DCM)进行纯化,得到标题化合物(66%)。  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, 甲醇- $d_4$ )  $\delta$  9.28 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.77-8.71 (m, 2H), 8.67 (d,  $J=5.7\text{Hz}$ , 1H), 8.44-8.38 (m, 2H), 7.85 (dd,  $J=5.7, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 2.09 (d,  $J=1.4\text{Hz}$ , 3H), 1.55 (t,  $J=2.2\text{Hz}$ , 3H), 1.37 (s, 3H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 378.2。

[1922] 实例51: (1-{{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}环戊基}甲醇

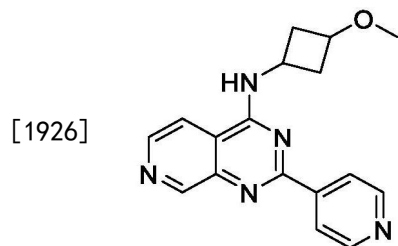
[1923]



[1924]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, 氯仿- $d$ )  $\delta$  9.35 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.82-8.75 (m, 2H), 8.65 (d,  $J=$

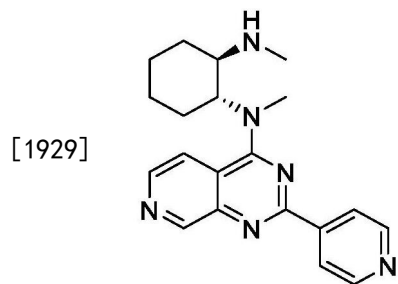
5.6Hz, 1H), 8.30-8.24 (m, 2H), 7.49 (dd,  $J=5.8, 0.9$ Hz, 1H), 3.99 (d,  $J=4.0$ Hz, 2H), 2.19 (td,  $J=7.3, 6.7, 2.5$ Hz, 4H), 1.94-1.78 (m, 4H). LCMS ( $m/z$   $[M+H]^+$ ): 322.2。

[1925] 实例52: N-(3-甲氧基环丁基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



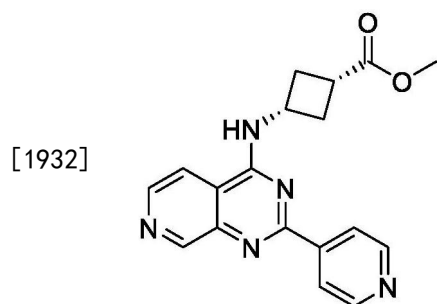
[1927]  $^1H$  NMR (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.19 (d,  $J=0.9$ Hz, 1H), 8.87 (d,  $J=6.4$ Hz, 1H), 8.80-8.72 (m, 2H), 8.66 (d,  $J=5.5$ Hz, 1H), 8.37-8.32 (m, 2H), 8.25 (dd,  $J=5.6, 0.9$ Hz, 1H), 4.53-4.42 (m, 1H), 3.84-3.74 (m, 1H), 3.20 (s, 3H), 2.89-2.79 (m, 2H), 2.11 (tdd,  $J=9.0, 7.5, 2.8$ Hz, 2H). LCMS ( $m/z$   $[M+H]^+$ ): 308.1。

[1928] 实例53: (1R,2R)-1-N,2-N-二甲基-1-N-[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]环己烷-1,2-二胺



[1930]  $^1H$  NMR (500MHz, 甲醇- $d_4$ )  $\delta$  9.23 (d,  $J=0.8$ Hz, 1H), 8.73-8.68 (m, 2H), 8.53 (d,  $J=5.9$ Hz, 1H), 8.46-8.41 (m, 2H), 8.22 (dd,  $J=5.8, 0.9$ Hz, 1H), 3.47 (s, 3H), 2.91 (dd,  $J=13.0, 9.0$ Hz, 1H), 2.39 (s, 3H), 2.30 (dtt,  $J=12.6, 5.1, 2.5$ Hz, 1H), 2.04 (dp,  $J=12.4, 3.1$ Hz, 1H), 1.90 (dddd,  $J=23.1, 13.0, 5.6, 3.0$ Hz, 2H), 1.84-1.74 (m, 1H), 1.58 (qt,  $J=12.7, 3.5$ Hz, 1H), 1.42 (qt,  $J=13.2, 3.3$ Hz, 1H), 1.33-1.23 (m, 1H). LCMS ( $m/z$   $[M+H]^+$ ): 349.2。

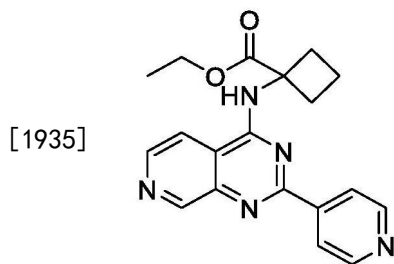
[1931] 实例54: 甲基(1s,3s)-3-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}环丁烷-1-甲酸酯



[1933]  $^1H$  NMR (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.20 (d,  $J=0.9$ Hz, 1H), 8.95 (d,  $J=6.0$ Hz, 1H), 8.82-8.72 (m, 2H), 8.67 (d,  $J=5.5$ Hz, 1H), 8.34-8.28 (m, 2H), 8.25 (dd,  $J=5.6, 1.0$ Hz, 1H), 4.95 (h,  $J=7.3$ Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.27-3.21 (m, 1H), 2.72 (dddd,  $J=10.7, 8.2, 4.3, 2.5$ Hz,

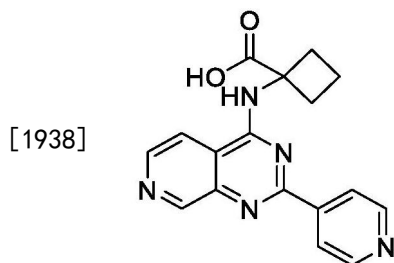
2H), 2.62-2.51 (m, 2H). LCMS ( $m/z$   $[M+H]^+$ ): 336.1。

[1934] 实例55: 乙基1- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基} 环丁烷-1-甲酸酯



[1936]  $^1H$  NMR (400MHz, 氯仿- $d$ )  $\delta$  9.27 (dd,  $J=12.0, 4.4$ Hz, 1H), 8.83-8.74 (m, 2H), 8.54-8.40 (m, 1H), 8.40-8.31 (m, 2H), 7.56-7.49 (m, 1H), 4.32-4.16 (m, 2H), 3.03-2.85 (m, 2H), 2.49 (dddd,  $J=11.8, 9.4, 7.1, 2.3$ Hz, 2H), 2.31-2.11 (m, 2H), 1.22 (dt,  $J=9.6, 7.5, 7.0, 1.8$ Hz, 3H). LCMS ( $m/z$   $[M+H]^+$ ): 350.2。

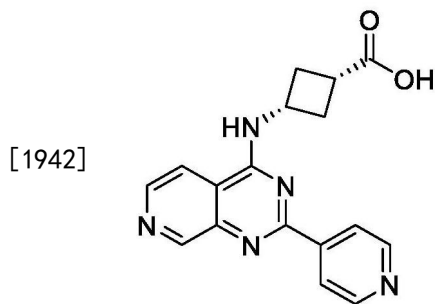
[1937] 实例56: 1- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基} 环丁烷-1-甲酸



[1939] 通过实例55的乙酯的水解制备标题化合物。

[1940] 水解: 将实例55 (27mg, 0.077mmol) 和氢氧化锂 (0.077mL, 0.077mmol) 在MeOH (2mL) 中的悬浮液在90℃下搅拌3小时, 直到LCMS表明没有剩余原料。将反应混合物用2mL 1M HCl中和。用DCM x 5反萃取水层。将合并的有机层用盐水洗涤, 干燥并浓缩。将残余物用DCM/醚洗涤, 得到标题化合物 (92%)。  $^1H$  NMR (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.49 (s, 1H), 9.35 (s, 1H), 9.23 (d,  $J=0.9$ Hz, 1H), 8.80-8.72 (m, 2H), 8.70 (d,  $J=5.5$ Hz, 1H), 8.34 (dd,  $J=5.6, 1.0$ Hz, 1H), 8.32-8.21 (m, 2H), 2.82 (ddd,  $J=13.3, 8.8, 4.9$ Hz, 2H), 2.49-2.43 (m, 2H), 2.12-1.96 (m, 2H). LCMS ( $m/z$   $[M+H]^+$ ): 322.1。

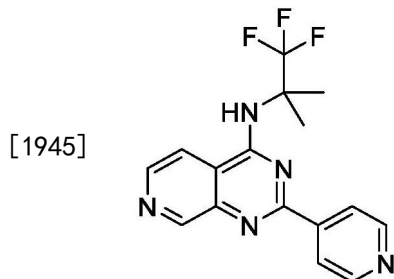
[1941] 实例57: (1s, 3s)-3- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基} 环丁烷-1-甲酸



[1943] 使用实例56中所述的程序, 通过实例54的乙酯的水解来制备标题化合物。  $^1H$  NMR (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.26 (d,  $J=0.9$ Hz, 1H), 9.21 (d,  $J=6.0$ Hz, 1H), 9.02-8.93 (m, 2H), 8.73

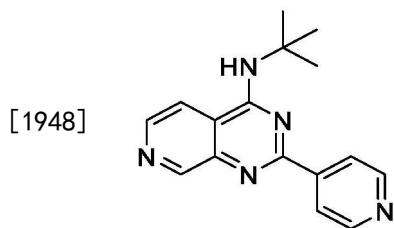
(d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.66 (d,  $J=5.7\text{Hz}$ , 2H), 8.38 (dd,  $J=5.7, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 4.92 (q,  $J=7.4\text{Hz}$ , 1H), 3.19-3.11 (m, 1H), 2.76-2.68 (m, 2H), 2.56 (ddd,  $J=12.9, 6.5, 2.7\text{Hz}$ , 2H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 322.1。

[1944] 实例58: 2-(吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟-2-甲基丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



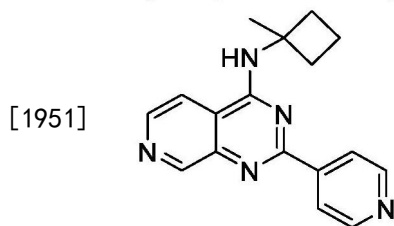
[1946]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.27 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.84-8.77 (m, 2H), 8.72 (d,  $J=5.7\text{Hz}$ , 1H), 8.51 (dd,  $J=5.7, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.30-8.24 (m, 2H), 7.98 (s, 1H), 1.91 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 334.1。

[1947] 实例59: N-叔-丁基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



[1949]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.18 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.82-8.77 (m, 2H), 8.64 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.39 (dd,  $J=5.7, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.34-8.29 (m, 2H), 7.88 (s, 1H), 1.66 (s, 9H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 280.2。

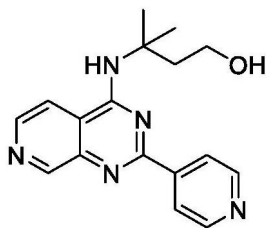
[1950] 实例60: N-(1-甲基环丁基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



[1952]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.17 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.77 (dd,  $J=6.3, 1.9\text{Hz}$ , 2H), 8.63 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.33-8.29 (m, 2H), 8.27 (dd,  $J=5.7, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 2.70-2.64 (m, 1H), 2.58-2.53 (m, 1H), 2.35-2.26 (m, 2H), 2.04-1.81 (m, 2H), 1.71 (s, 3H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 292.2。

[1953] 实例61: 3-甲基-3-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丁-1-醇

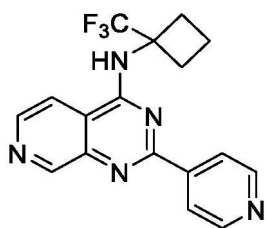
[1954]



[1955]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.19 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.83-8.77 (m, 2H), 8.65 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.34-8.29 (m, 2H), 8.17 (s, 1H), 8.12 (dd,  $J=5.7, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 4.86 (s, 1H), 3.68-3.61 (m, 2H), 2.19 (t,  $J=6.6\text{Hz}$ , 2H), 1.66 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 310.2。

[1956] 实例62: 2-(吡啶-4-基)-N-[1-(三氟甲基)环丁基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

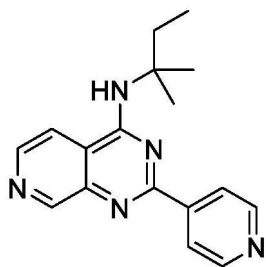
[1957]



[1958]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.26 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.98 (s, 1H), 8.81-8.76 (m, 2H), 8.71 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.39 (dd,  $J=5.8, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.30-8.25 (m, 2H), 2.91-2.76 (m, 4H), 2.11-1.96 (m, 2H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 346.1。

[1959] 实例63: N-(2-甲基丁-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

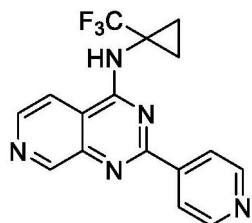
[1960]



[1961]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, 甲醇- $d_4$ )  $\delta$  9.19-9.12 (m, 1H), 8.72 (ddt,  $J=6.3, 4.7, 1.6\text{Hz}$ , 2H), 8.57 (dd,  $J=5.8, 2.6\text{Hz}$ , 1H), 8.43 (tt,  $J=7.3, 3.4\text{Hz}$ , 2H), 8.24-8.17 (m, 1H), 2.23 (qd,  $J=6.7, 6.0, 2.6\text{Hz}$ , 2H), 1.66 (s, 6H), 0.94 (td,  $J=7.4, 1.6\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 294.2。

[1962] 实例64: 2-(吡啶-4-基)-N-[1-(三氟甲基)环丙基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

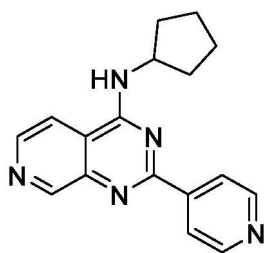
[1963]



[1964]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.40 (s, 1H), 9.29 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.83-8.78 (m, 2H), 8.71 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.40-8.35 (m, 2H), 8.27 (dd,  $J=5.7, 1.0\text{Hz}$ , 1H), 1.65-1.55 (m, 2H), 1.41-1.37 (m, 2H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 332.1。

[1965] 实例65: N-环戊基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

[1966]



[1967] 在20mL小瓶中,在室温下于DCM(5mL)中搅拌4-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶(中间体1c)(200mg,0.82mmol),并用N<sub>2</sub>脱气。添加DIEA(324微升,1.85mmol)并搅拌5分钟,然后添加KF(48mg,0.82mmol)。将所述混合物在室温搅拌15分钟,然后添加环戊胺(84mg,0.99mmol)并脱气,然后在25℃搅拌16小时。然后将反应浓缩,并通过在 **COMBIFLASH®** 系统(ISC0)上的快速色谱(使用0-10%MeOH/DCM)进行纯化,得到标题化合物(51%)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) 9.20(s,1H),8.78(d,2H),8.55(d,1H),8.31(d,2H),8.03(d,1H),5.15-5.10(m,1H),3.34(s,3H),1.35(s,6H)。LCMS(m/z[M+H]<sup>+</sup>):292.2。

[1968] 实例66:2-甲基-2-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丙-1-醇

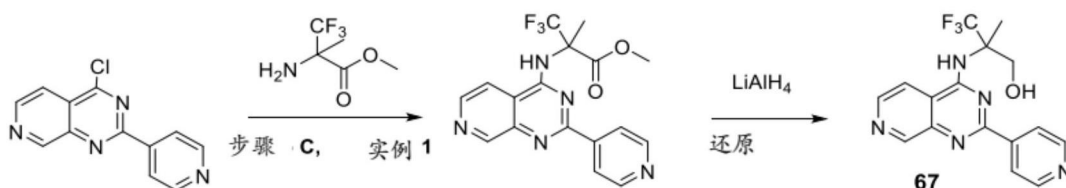
[1969]



[1970] <sup>1</sup>H NMR(500MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) 9.18(d,J=0.8Hz,1H),8.82-8.77(m,2H),8.64(d,J=5.6Hz,1H),8.38(dd,J=5.7,0.9Hz,1H),8.30(dt,J=4.5,1.7Hz,2H),7.62(s,1H),4.95-4.89(m,1H),3.86(d,J=6.1Hz,2H),1.57(s,5H)。LCMS(m/z[M+H]<sup>+</sup>):296.1。

[1971] 实例67:3,3,3-三氟-2-甲基-2-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丙-1-醇

[1972]



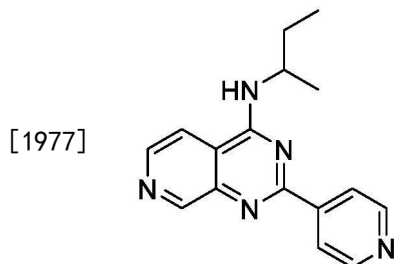
[1973] 由甲基2-氨基-3,3,3-三氟-2-甲基丙酸酯盐酸盐和4-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶如实例1步骤C所述,然后用氢化锂铝将甲酯还原为醇来制备标题化合物。

[1974] 还原:将甲基3,3,3-三氟-2-甲基-2-((2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)丙酸酯(12mg,0.032mmol)与氢化锂铝(4.8mg,0.127mmol)在THF中在0℃下搅拌25小时。通过TLC或LCMS未观察到起始原料。将反应混合物用DCM/MeOH稀释,用H<sub>2</sub>O和盐水洗涤,然后浓缩。将残余物通过在 **COMBIFLASH®** 系统(ISC0)上的快速色谱(使用0-10%MeOH/DCM)进行纯化,得到标题化合物(17%)。

[1975] <sup>1</sup>H NMR(500MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) 8.37(d,J=1.0Hz,1H),7.86-7.81(m,2H),7.74(d,J=5.7Hz,1H),7.54-7.49(m,2H),7.32(dt,J=5.7,1.3Hz,1H),3.77(d,J=11.6Hz,1H),3.19-

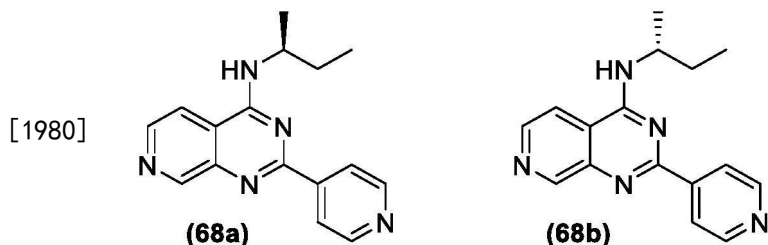
3.12 (m, 1H), 1.02 (d,  $J=1.2\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $m/z$   $[M+H]^+$ ): 350.1。

[1976] 实例68: N-(丁-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



[1978]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.18 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.80-8.74 (m, 2H), 8.65 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 8.43 (d,  $J=7.8\text{Hz}$ , 1H), 8.36-8.27 (m, 3H), 4.56 (七重峰,  $J=6.4\text{Hz}$ , 1H), 1.83-1.63 (m, 2H), 1.33 (d,  $J=6.6\text{Hz}$ , 3H), 0.97 (t,  $J=7.4\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $m/z$   $[M+H]^+$ ): 280.2。

[1979] 实例68a: (S)-N-(仲-丁基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺 (68a) 和 (R)-N-(仲-丁基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺 (68b)

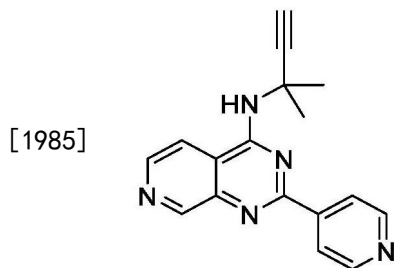


[1981] 使化合物N-(丁-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺 (26.7mg) (实例68) 进行手性分离, 得到两个对映异构体, 峰1 ( $T_R=1.44$ 分钟) 异构体 (11.7mg) 和峰2 ( $T_R=1.94$ 分钟) 异构体 11.6mg。手性中心指定是暂定的。手性分离条件: 溶剂A  $\text{CO}_2$  (85%), 溶剂B MeOH (15%), 流速 2ml/min, 温度  $30^\circ\text{C}$ , 柱 21x 250mm AD-H, 运行时间 3.5分钟叠式注射, 7分钟洗脱时间。

[1982] 峰1 ( $T_R=1.44$ 分钟) 异构体:  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.18 (s, 1H), 8.77 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 2H), 8.65 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.43 (d,  $J=7.8\text{Hz}$ , 1H), 8.36-8.31 (m, 2H), 8.29 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 4.56 (p,  $J=7.2\text{Hz}$ , 1H), 1.85-1.62 (m, 2H), 1.33 (d,  $J=6.6\text{Hz}$ , 3H), 0.97 (t,  $J=7.4\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $m/z$   $[M+H]^+$ ): 280.2。

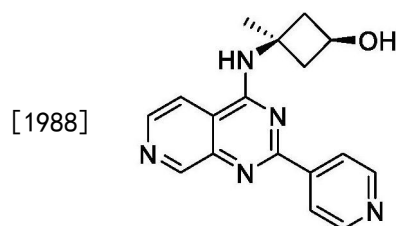
[1983] 峰2 ( $T_R=1.94$ 分钟) 异构体:  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.18 (s, 1H), 8.80-8.72 (m, 2H), 8.65 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.43 (d,  $J=7.8\text{Hz}$ , 1H), 8.35-8.31 (m, 2H), 8.30 (dd,  $J=5.6, 0.8\text{Hz}$ , 1H), 4.57 (七重峰,  $J=6.7\text{Hz}$ , 1H), 1.82-1.63 (m, 2H), 1.33 (d,  $J=6.6\text{Hz}$ , 3H), 0.97 (t,  $J=7.4\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $m/z$   $[M+H]^+$ ): 280.2。

[1984] 实例69: N-(2-甲基丁-3-炔-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



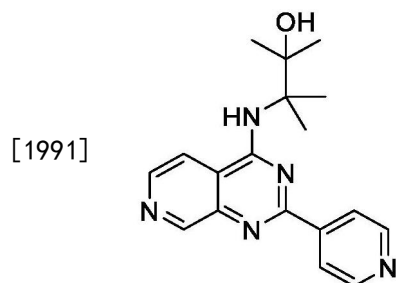
[1986]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, 甲醇- $d_4$ )  $\delta$  9.25 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.77-8.71 (m, 2H), 8.64-8.58 (m, 3H), 8.23 (dd,  $J=5.7, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 2.81 (s, 1H), 1.93 (s, 6H). LCMS ( $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 290.1。

[1987] 实例70: (1r, 3s)-3-甲基-3-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}环丁-1-醇



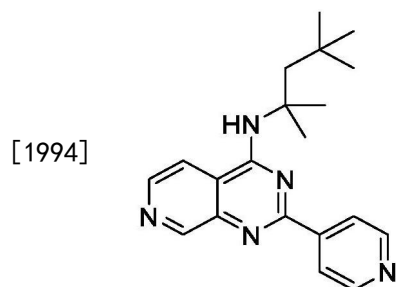
[1989]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.21 (s, 1H), 8.78 (d, 2H), 8.55 (d, 1H), 8.31 (d, 2H), 8.05 (d, 1H), 3.94 (q, 2H), 3.50 (s, 3H), 1.39 (t, 3H). LCMS ( $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 308.1。

[1990] 实例71: 2,3-二甲基-3-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丁-2-醇



[1992]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.20 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.82-8.77 (m, 2H), 8.67 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.28-8.23 (m, 2H), 8.07 (dd,  $J=5.8, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 7.49 (s, 1H), 1.64 (s, 6H), 1.27 (s, 6H). LCMS ( $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 324.2。

[1993] 实例72: 2-(吡啶-4-基)-N-(2,4,4-三甲基戊-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

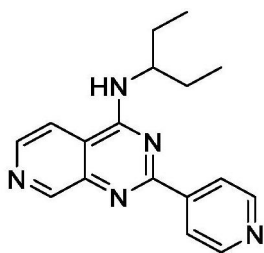


[1995]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, 甲醇- $d_4$ )  $\delta$  9.19 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.78-8.72 (m, 2H), 8.58 (d,  $J=5.7\text{Hz}$ , 1H), 8.50-8.45 (m, 2H), 8.22 (dd,  $J=5.8, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 2.33 (d,  $J=1.2\text{Hz}$ , 2H), 1.77 (s, 6H), 1.01 (s, 9H). LCMS ( $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 336.2。

[1996] 实例73: N-(戊-3-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



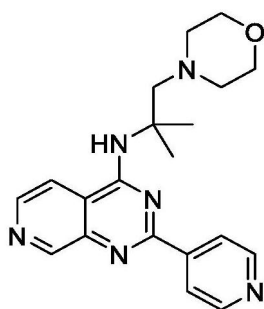
[1997]



[1998] <sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ9.18 (d, J=0.8Hz, 1H), 8.79-8.74 (m, 2H), 8.65 (d, J=5.6Hz, 1H), 8.37-8.30 (m, 4H), 4.47 (dtd, J=13.2, 8.2, 5.1Hz, 1H), 1.83-1.63 (m, 4H), 0.95 (t, J=7.4Hz, 6H). LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 294.2。

[1999] 实例74: (N-[2-甲基-1-(吗啉-4-基)丙-2-基]-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

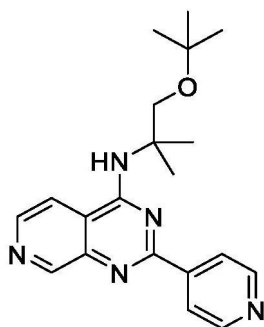
[2000]



[2001] <sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ9.18 (d, J=0.8Hz, 1H), 8.83-8.77 (m, 2H), 8.65 (d, J=5.6Hz, 1H), 8.35 (dd, J=5.8, 0.9Hz, 1H), 8.32-8.28 (m, 2H), 7.79 (s, 1H), 3.55-3.49 (m, 4H), 2.99 (s, 2H), 2.51-2.45 (m, 4H), 1.62 (s, 6H). LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 365.2。

[2002] 实例75: N-[1-(叔-丁氧基)-2-甲基丙-2-基]-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

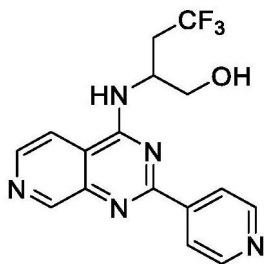
[2003]



[2004] <sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ9.18 (d, J=0.8Hz, 1H), 8.82-8.77 (m, 2H), 8.65 (d, J=5.6Hz, 1H), 8.38 (dd, J=5.7, 0.9Hz, 1H), 8.33-8.28 (m, 2H), 7.66 (s, 1H), 3.84 (s, 2H), 1.60 (s, 6H), 1.05 (s, 9H). LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 352.2。

[2005] 实例76: 4,4,4-三氟-2-{{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丁-1-醇

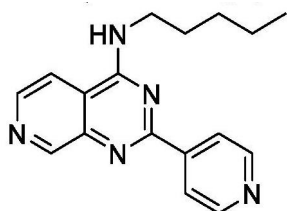
[2006]



[2007]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.23 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.81-8.76 (m, 2H), 8.70 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 8.62 (d,  $J=8.2\text{Hz}$ , 1H), 8.36-8.31 (m, 2H), 8.22 (dd,  $J=5.7, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 5.19 (dd,  $J=6.3, 5.4\text{Hz}$ , 1H), 4.98 (tq,  $J=9.6, 5.9\text{Hz}$ , 1H), 3.72 (dt,  $J=10.9, 5.5\text{Hz}$ , 1H), 3.61 (dt,  $J=11.0, 6.3\text{Hz}$ , 1H), 2.87-2.71 (m, 2H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 350.1。

[2008] 实例77: N-戊基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

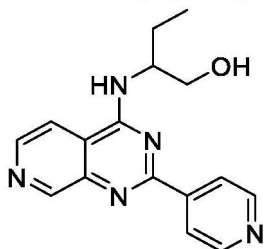
[2009]



[2010]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.18 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.83 (t,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.79-8.73 (m, 2H), 8.64 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 8.36-8.29 (m, 2H), 8.18 (dd,  $J=5.6, 1.0\text{Hz}$ , 1H), 3.70 (td,  $J=7.2, 5.6\text{Hz}$ , 2H), 1.81-1.68 (m, 2H), 1.47-1.30 (m, 4H), 0.93-0.86 (m, 3H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 294.2。

[2011] 实例78: 2-([2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基)丁-1-醇

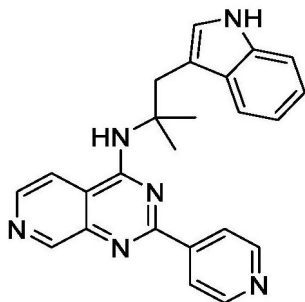
[2012]



[2013]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.19 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.80-8.74 (m, 2H), 8.65 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.40-8.30 (m, 4H), 4.83 (t,  $J=5.7\text{Hz}$ , 1H), 4.54 (td,  $J=8.4, 4.9\text{Hz}$ , 1H), 3.72-3.56 (m, 2H), 1.84 (ddd,  $J=14.0, 7.4, 5.1\text{Hz}$ , 1H), 1.68 (ddd,  $J=13.8, 8.8, 7.3\text{Hz}$ , 1H), 0.96 (t,  $J=7.4\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 296.1。

[2014] 实例79: N-[1-(1H-吡啶-3-基)-2-甲基丙-2-基]-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

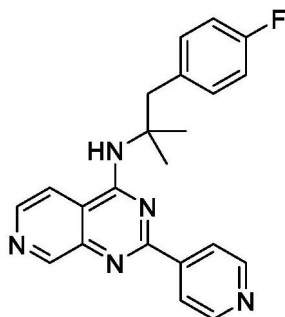
[2015]



[2016]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.78 (d,  $J=2.6\text{Hz}$ , 1H), 9.21 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.86-8.78 (m, 2H), 8.60 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.42-8.36 (m, 2H), 8.30 (dd,  $J=5.7, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 7.68 (s, 1H), 7.47-7.40 (m, 1H), 7.29 (dt,  $J=8.2, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 7.00 (ddd,  $J=8.1, 7.0, 1.1\text{Hz}$ , 1H), 6.91-6.82 (m, 2H), 3.59 (s, 2H), 1.66 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 395.2.

[2017] 实例80: N-[1-(4-氟苯基)-2-甲基丙-2-基]-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

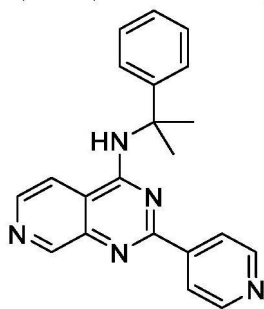
[2018]



[2019]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, 甲醇- $d_4$ )  $\delta$  9.23 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.80-8.75 (m, 2H), 8.58-8.51 (m, 3H), 8.13 (dd,  $J=5.7, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 7.11-7.04 (m, 2H), 6.95-6.87 (m, 2H), 3.56 (s, 2H), 1.69 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 374.2.

[2020] 实例81: N-(2-苯基丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

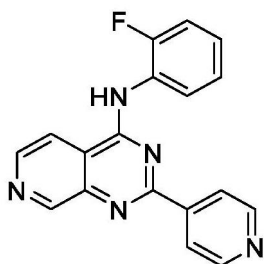
[2021]



[2022]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.16 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.69 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.66 (s, 1H), 8.61-8.56 (m, 2H), 8.53 (dd,  $J=5.6, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 7.80-7.75 (m, 2H), 7.55-7.48 (m, 2H), 7.35-7.28 (m, 2H), 7.20-7.12 (m, 1H), 1.89 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 342.2.

[2023] 实例82: N-(2-氟苯基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

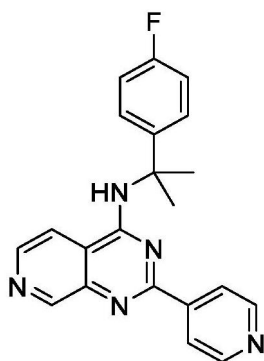
[2024]



[2025]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, 甲醇- $\text{d}_4$ )  $\delta$  9.33 (d,  $J=1.0\text{Hz}$ , 1H), 8.71 (d,  $J=5.7\text{Hz}$ , 1H), 8.68-8.64 (m, 2H), 8.32 (ddd,  $J=9.5, 5.1, 1.3\text{Hz}$ , 3H), 7.81 (td,  $J=8.0, 2.0\text{Hz}$ , 1H), 7.41 (d,  $J=1.1\text{Hz}$ , 1H), 7.38-7.31 (m, 2H). LCMS ( $m/z$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ ): 318.1。

[2026] 实例83: N-[2-(4-氟苯基)丙-2-基]-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

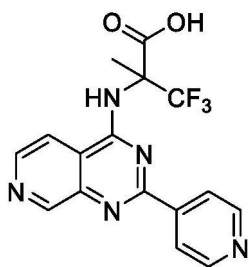
[2027]



[2028]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, 甲醇- $\text{d}_4$ )  $\delta$  9.18 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.63 (d,  $J=5.7\text{Hz}$ , 1H), 8.59-8.53 (m, 2H), 8.36 (dd,  $J=5.7, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 7.97-7.92 (m, 2H), 7.61-7.53 (m, 2H), 7.11-7.02 (m, 2H), 1.96 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ ): 360.2。

[2029] 实例84: 3,3,3-三氟-2-甲基-2-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丙酸

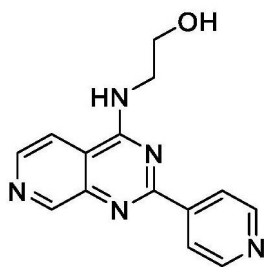
[2030]



[2031]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz,  $\text{DMSO}-\text{d}_6$ )  $\delta$  9.38 (s, 1H), 9.24 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.81-8.75 (m, 2H), 8.71 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 8.34-8.29 (m, 2H), 7.84 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 7.07 (s, 1H), 2.03 (s, 3H). LCMS ( $m/z$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ ): 364.1。

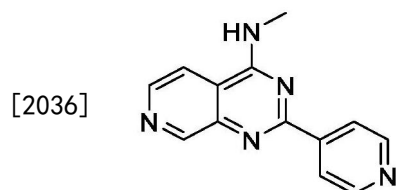
[2032] 实例85: 2-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}乙-1-醇

[2033]



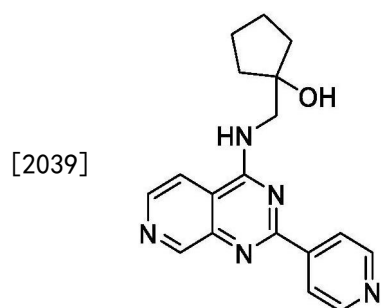
[2034]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.20 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.88 (t,  $J=5.3\text{Hz}$ , 1H), 8.82-8.73 (m, 2H), 8.65 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.38-8.31 (m, 2H), 8.21 (dd,  $J=5.6, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 4.90 (t,  $J=5.3\text{Hz}$ , 1H), 3.76 (ttt,  $J=7.9, 5.5, 2.5\text{Hz}$ , 4H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 268.1。

[2035] 实例86: N-甲基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



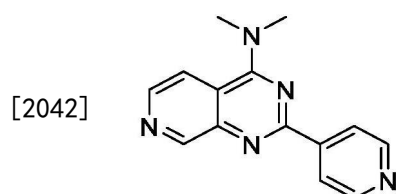
[2037]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.19 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.88 (q,  $J=4.4\text{Hz}$ , 1H), 8.80-8.73 (m, 2H), 8.65 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 8.40-8.33 (m, 2H), 8.12 (dd,  $J=5.6, 1.0\text{Hz}$ , 1H), 3.18 (d,  $J=4.5\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 238.1。

[2038] 实例87: 1-({[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}甲基)环戊-1-醇



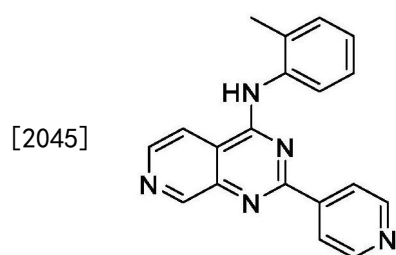
[2040]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.19 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.81-8.74 (m, 2H), 8.67 (dd,  $J=11.8, 5.8\text{Hz}$ , 2H), 8.37-8.33 (m, 2H), 8.30 (dd,  $J=5.6, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 4.70 (s, 1H), 3.89 (d,  $J=5.9\text{Hz}$ , 2H), 1.78-1.50 (m, 8H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 322.2。

[2041] 实例88: N,N-二甲基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



[2043]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.22 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.80-8.73 (m, 2H), 8.57 (d,  $J=5.8\text{Hz}$ , 1H), 8.38-8.31 (m, 2H), 8.15 (dd,  $J=5.8, 0.8\text{Hz}$ , 1H), 3.53 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 252.1。

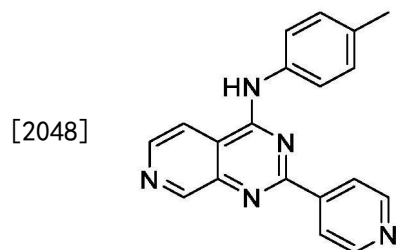
[2044] 实例89: N-(2-甲基苯基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



[2046]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.22 (s, 1H), 9.29 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.76 (d,  $J=$

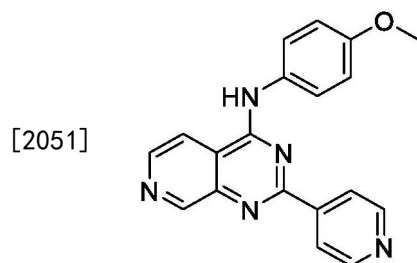
5.5Hz, 1H), 8.72-8.67 (m, 2H), 8.42 (dd,  $J=5.7, 1.0$ Hz, 1H), 8.09-8.04 (m, 2H), 7.50 (dd,  $J=7.7, 1.5$ Hz, 1H), 7.43 (dd,  $J=7.1, 1.8$ Hz, 1H), 7.40-7.29 (m, 2H), 2.27 (s, 3H). LCMS ( $m/z$   $[M+H]^+$ ): 314.1。

[2047] 实例90: N-(4-甲基苯基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



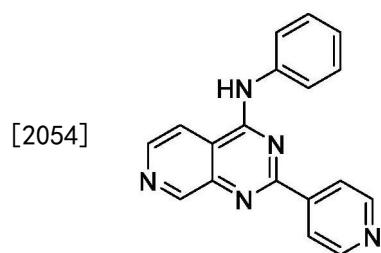
[2049]  $^1H$  NMR (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.25 (s, 1H), 9.29 (d,  $J=0.8$ Hz, 1H), 8.81-8.73 (m, 3H), 8.49 (dd,  $J=5.7, 1.0$ Hz, 1H), 8.30-8.25 (m, 2H), 7.87-7.80 (m, 2H), 7.36-7.30 (m, 2H), 2.38 (s, 3H). LCMS ( $m/z$   $[M+H]^+$ ): 314.1。

[2050] 实例91: N-(4-甲氧基苯基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



[2052]  $^1H$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.24 (s, 1H), 9.27 (d,  $J=0.8$ Hz, 1H), 8.80-8.72 (m, 3H), 8.46 (dd,  $J=5.8, 1.0$ Hz, 1H), 8.29-8.23 (m, 2H), 7.88-7.79 (m, 2H), 7.14-7.05 (m, 2H), 3.83 (s, 3H). LCMS ( $m/z$   $[M+H]^+$ ): 330.1。

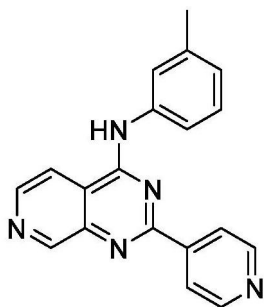
[2053] 实例92: N-苯基-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



[2055]  $^1H$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.31 (s, 1H), 9.30 (d,  $J=0.8$ Hz, 1H), 8.82-8.74 (m, 3H), 8.51 (dd,  $J=5.8, 1.0$ Hz, 1H), 8.31-8.24 (m, 2H), 8.00-7.92 (m, 2H), 7.58-7.48 (m, 2H), 7.26 (tt,  $J=7.3, 1.2$ Hz, 1H). LCMS ( $m/z$   $[M+H]^+$ ): 300.1。

[2056] 实例93: N-(3-甲基苯基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

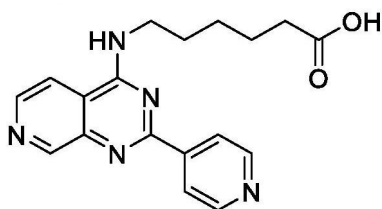
[2057]



[2058]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.24 (s, 1H), 9.30 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.82-8.75 (m, 3H), 8.51 (dd,  $J=5.8, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.31-8.26 (m, 2H), 7.83-7.76 (m, 2H), 7.41 (t,  $J=7.8\text{Hz}$ , 1H), 7.08 (ddt,  $J=7.6, 1.7, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 2.43 (s, 3H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 314.1。

[2059] 实例94: 6- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}己酸

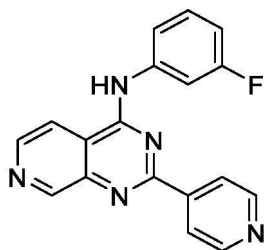
[2060]



[2061]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.02 (s, 1H), 9.19 (s, 1H), 8.84 (t,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.80-8.73 (m, 2H), 8.65 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.37-8.31 (m, 2H), 8.18 (dd,  $J=5.6, 1.0\text{Hz}$ , 1H), 3.76-3.66 (m, 2H), 2.23 (t,  $J=7.3\text{Hz}$ , 2H), 1.81-1.69 (m, 2H), 1.61 (p,  $J=7.3\text{Hz}$ , 2H), 1.43 (tt,  $J=9.6, 6.1\text{Hz}$ , 2H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 338.2。

[2062] 实例95: N-(3-氟苯基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

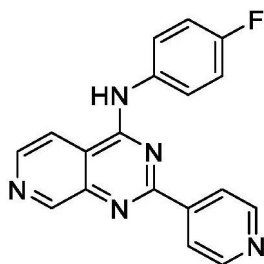
[2063]



[2064]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.39 (s, 1H), 9.34 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.84-8.78 (m, 3H), 8.51 (dd,  $J=5.8, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.31-8.26 (m, 2H), 7.96 (dt,  $J=11.7, 2.3\text{Hz}$ , 1H), 7.81 (ddd,  $J=8.2, 2.0, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 7.56 (td,  $J=8.2, 6.8\text{Hz}$ , 1H), 7.08 (tdd,  $J=8.5, 2.6, 0.9\text{Hz}$ , 1H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 318.1。

[2065] 实例96: N-(4-氟苯基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

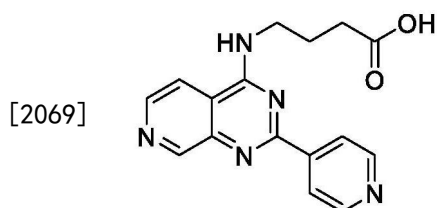
[2066]



[2067]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.34 (s, 1H), 9.31 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.81-8.75 (m,

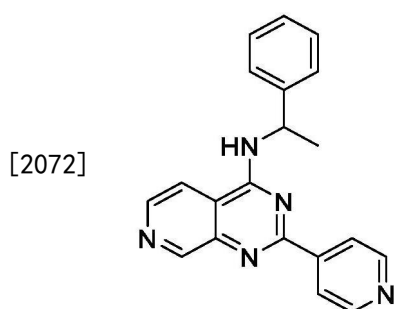
3H), 8.47 (dd,  $J=5.7, 0.9$  Hz, 1H), 8.31-8.24 (m, 2H), 7.99-7.92 (m, 2H), 7.41-7.33 (m, 2H). LCMS ( $m/z$   $[M+H]^+$ ): 318.1。

[2068] 实例97: 4- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丁酸



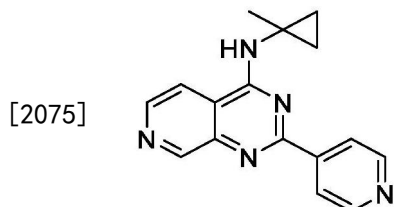
[2070]  $^1H$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.43 (s, 1H), 9.16 (s, 1H), 8.79-8.72 (m, 2H), 8.62 (d,  $J=5.5$  Hz, 1H), 8.39-8.32 (m, 2H), 8.19 (dd,  $J=5.6, 1.0$  Hz, 1H), 3.67 (q,  $J=6.0$  Hz, 2H), 2.33 (t,  $J=6.5$  Hz, 2H), 1.94 (p,  $J=6.6$  Hz, 2H). LCMS ( $m/z$   $[M+H]^+$ ): 365.2。

[2071] 实例98: N-(1-苯基乙基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



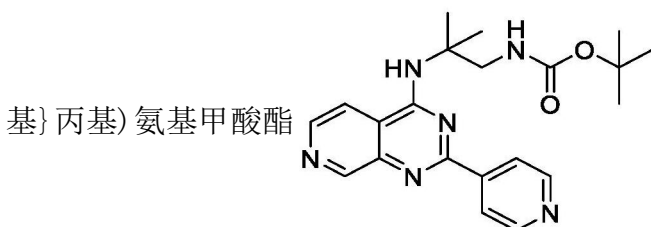
[2073]  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.67 (d,  $J=6.8$  Hz, 3H), 5.73 (m, 1H), 7.22 (m, 1H), 7.47 (m, 2H), 7.55 (m, 2H), 8.26 (d,  $J=5$  Hz, 2H), 8.41 (d,  $J=5.6$  Hz, 1H), 8.69 (d,  $J=5.6$  Hz, 1H), 8.74 (d,  $J=5$  Hz, 1H), 9.08 (d,  $J=7.2$  Hz, 1H), 9.19 (s, 1H). LCMS ( $m/z$   $[M+H]^+$ ): 328.2。

[2074] 实例99: N-(1-甲基环丙基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



[2076]  $^1H$  NMR (400MHz, 甲醇- $d_4$ )  $\delta$  9.19 (s, 1H), 8.73 (d,  $J=5.7$  Hz, 2H), 8.55 (m, 3H), 8.01 (dd,  $J=5.7, 0.7$  Hz, 1H), 1.64 (s, 3H), 0.99 (m, 2H), 0.93 (m, 2H). LCMS ( $m/z$   $[M+H]^+$ ): 278.1。

[2077] 实例100: 叔-丁基N-(2-甲基-2- {[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丙基)氨基甲酸酯

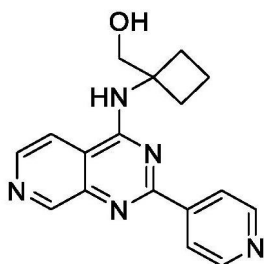


[2078]  $^1H$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.21 (s, 1H), 8.87 (s, 2H), 8.67 (d,  $J=5.6$  Hz, 1H), 8.49 (d,  $J=4.6$  Hz, 2H), 8.24 (d,  $J=5.6$  Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.33 (t,  $J=6.4$  Hz, 1H), 3.54 (d,  $J=6.4$  Hz, 2H), 1.57 (s, 6H), 1.36 (s, 9H). LCMS ( $m/z$   $[M+H]^+$ ): 395.2。



[2079] 实例101: (1- {[2- (吡啶-4-基) 吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基} 环丁基) 甲醇

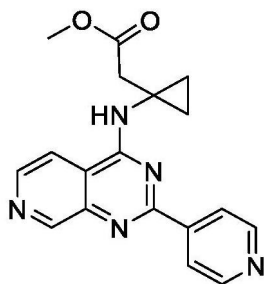
[2080]



[2081]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.16 (s, 1H) , 8.78-8.72 (m, 2H) , 8.68 (s, 1H) , 8.62 (d,  $J$  = 5.6Hz, 1H) , 8.36 (d,  $J$  = 5.7Hz, 1H) , 8.31-8.20 (m, 2H) , 4.94 (t,  $J$  = 6.0Hz, 1H) , 3.96 (d,  $J$  = 6.0Hz, 2H) , 2.41 (dt,  $J$  = 12.5, 7.2Hz, 4H) , 1.89 (p,  $J$  = 8.0Hz, 2H) . LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ) : 308.1。

[2082] 实例102: 甲基2- (1- {[2- (吡啶-4-基) 吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基} 环丙基) 乙酸酯

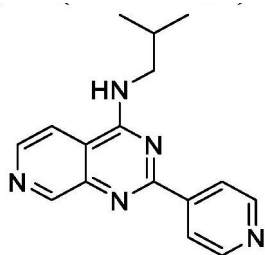
[2083]



[2084]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ ) 9.25 (s, 1H) , 9.05 (t, 1H) , 8.90 (d, 2H) , 8.70 (d, 1H) , 8.60 (d, 2H) , 8.24 (d, 1H) , 3.90 (m, 2H) , 3.79 (t, 2H) , 3.59 (m, 2H) , 3.55-3.49 (m, 4H) , 3.45 (m, 2H) , 3.41 (m, 2H) , 2.40 (t, 2H) . LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ) : 336.1。

[2085] 实例103: N- (2-甲基丙基) -2- (吡啶-4-基) 吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

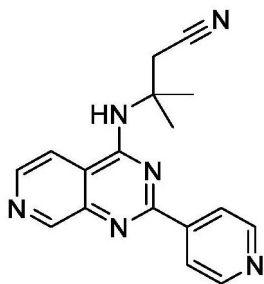
[2086]



[2087]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.35 (d,  $J$  = 0.8Hz, 1H) , 8.79 (d,  $J$  = 5.6Hz, 2H) , 8.64 (d,  $J$  = 5.6Hz, 1H) , 8.39 (d,  $J$  = 5.6Hz, 2H) , 7.52 (dd,  $J$  = 5.6, 0.8Hz, 1H) , 6.00 (t,  $J$  = 6.0Hz, 1H) , 3.66 (dd,  $J$  = 6.8, 6.0Hz, 2H) , 2.09 (九重峰,  $J$  = 6.8Hz, 1H) , 1.12 (d,  $J$  = 6.8Hz, 6H) . LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ) : 280.1。

[2088] 实例104: 3-甲基-3- {[2- (吡啶-4-基) 吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基} 丁腈

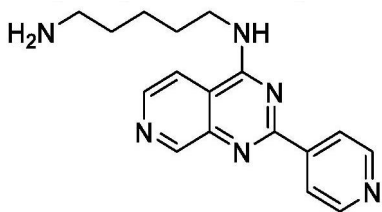
[2089]



[2090]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, 丙酮- $d_6$ )  $\delta$  9.23 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.82-8.75 (m, 2H), 8.63 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.42-8.33 (m, 2H), 8.17 (dd,  $J=5.7, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 3.64 (s, 2H), 1.83 (s, 6H). LCMS ( $M/Z[M+H]^+$ ): 305.1。

[2091] 实例105: N-(6-氨基己基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

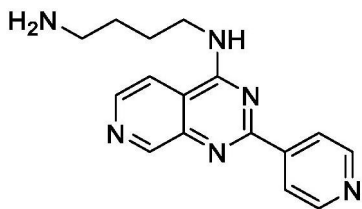
[2092]



[2093]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.19 (s, 1H), 8.88-8.80 (m, 1H), 8.82-8.73 (m, 2H), 8.68-8.61 (m, 1H), 8.37-8.31 (m, 2H), 8.19 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 3.71 (q,  $J=6.5\text{Hz}$ , 2H), 2.53 (d,  $J=1.6\text{Hz}$ , 2H), 1.75 (dt,  $J=14.2, 7.1\text{Hz}$ , 2H), 1.47-1.32 (m, 6H). LCMS ( $M/Z[M+H]^+$ ): 323.2。

[2094] 实例106: N-(4-氨基丁基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

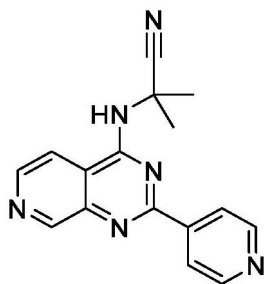
[2095]



[2096]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.23 (s, 1H), 8.96 (t,  $J=5.7\text{Hz}$ , 1H), 8.88-8.82 (m, 2H), 8.70 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 8.51-8.44 (m, 2H), 8.20 (dd,  $J=5.6, 1.0\text{Hz}$ , 1H), 7.65 (s, 2H), 3.80-3.72 (m, 2H), 2.86 (td,  $J=7.5, 5.5\text{Hz}$ , 2H), 1.85-1.73 (m, 2H), 1.67 (ddt,  $J=12.8, 9.9, 5.8\text{Hz}$ , 2H). LCMS ( $M/Z[M+H]^+$ ): 295.2。

[2097] 实例107: 2-甲基-2-([2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基)丙腈

[2098]

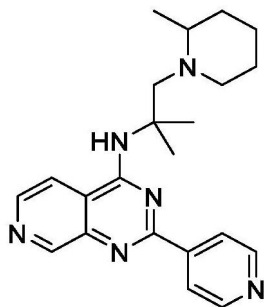


[2099]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.31 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.85-8.80 (m, 2H), 8.78-8.72 (m, 2H), 8.45-8.40 (m, 2H), 8.37 (dd,  $J=5.7, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 1.93 (s, 6H). LCMS ( $M/Z[M+H]^+$ ):

291.1。

[2100] 实例108:N-[2-甲基-1-(2-甲基哌啶-1-基)丙-2-基]-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

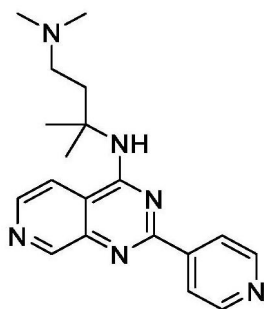
[2101]



[2102]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, 甲醇- $d_4$ )  $\delta$ 9.08 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.65-8.58 (m, 2H), 8.50 (d,  $J=5.7\text{Hz}$ , 1H), 8.37-8.29 (m, 2H), 7.94 (dd,  $J=5.8, 1.0\text{Hz}$ , 1H), 3.18 (d,  $J=14.7\text{Hz}$ , 1H), 3.00-2.92 (m, 2H), 2.66 (s, 1H), 2.44 (dq,  $J=12.3, 5.9, 5.1\text{Hz}$ , 1H), 1.86 (s, 1H), 1.69-1.43 (m, 10H), 1.38-1.25 (m, 2H), 0.97 (d,  $J=6.4\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $M/Z[M+H]^+$ ): 377.2。

[2103] 实例109:二甲基(3-甲基-3-{[2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}丁基)胺

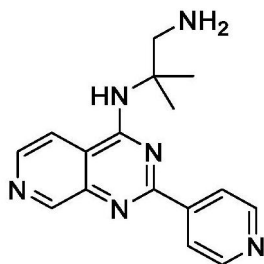
[2104]



[2105]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ 9.23 (s, 1H), 8.96 (t,  $J=5.7\text{Hz}$ , 1H), 8.88-8.82 (m, 2H), 8.70 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 8.51-8.44 (m, 2H), 8.20 (dd,  $J=5.6, 1.0\text{Hz}$ , 1H), 7.65 (s, 2H), 3.80-3.72 (m, 2H), 2.86 (td,  $J=7.5, 5.5\text{Hz}$ , 2H), 1.85-1.73 (m, 2H), 1.67 (ddt,  $J=12.8, 9.9, 5.8\text{Hz}$ , 2H). LCMS ( $M/Z[M+H]^+$ ): 295.2。

[2106] 实例110:N-(1-氨基-2-甲基丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

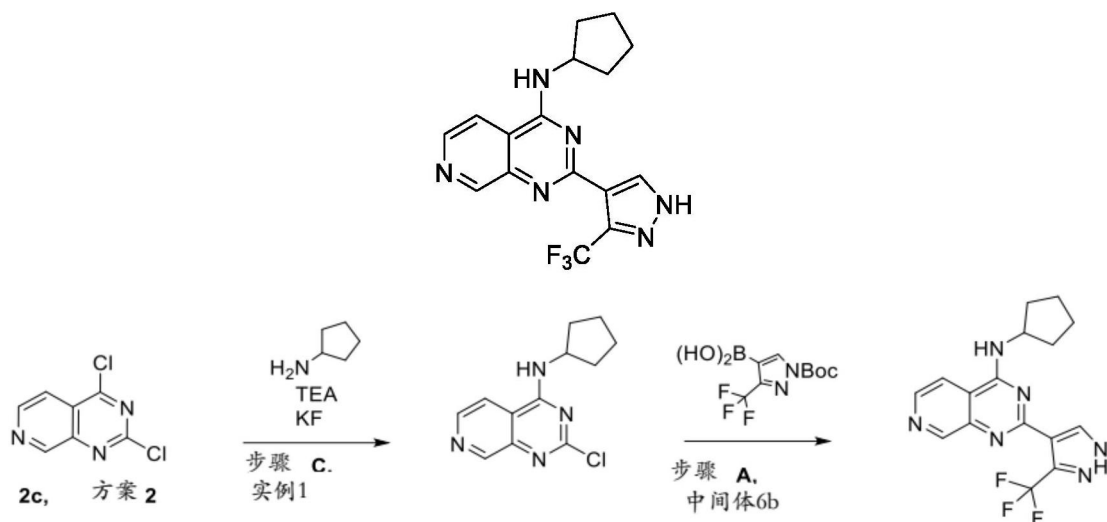
[2107]



[2108]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ 9.25 (s, 1H), 8.88 (s, 2H), 8.72 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.45 (d,  $J=5.7\text{Hz}$ , 1H), 8.39 (d,  $J=4.9\text{Hz}$ , 2H), 7.87 (s, 1H), 7.79 (s, 2H), 3.67 (d,  $J=5.9\text{Hz}$ , 2H), 1.64 (s, 6H). LCMS ( $M/Z[M+H]^+$ ): 295.2。

[2109] 实例111:N-环戊基-2-[3-(三氟甲基)-1H-吡啶-4-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

[2110]



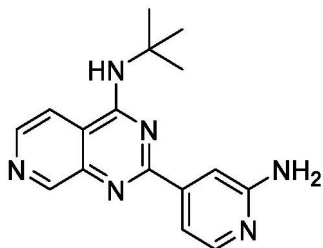
[2111] 如方案2中那样使用实例1的步骤C和针对中间体6b的步骤A由2,4-二氯吡啶并[3,4-d]嘧啶(中间体2c)来制备标题化合物。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ9.10 (d, J=0.8Hz, 1H), 8.60 (d, J=5.6Hz, 1H), 8.36 (dd, J=5.8, 0.9Hz, 1H), 8.09 (dd, J=5.3, 0.8Hz, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.50 (dd, J=1.5, 0.8Hz, 1H), 7.42 (dd, J=5.3, 1.5Hz, 1H), 6.10 (s, 2H), 1.60 (s, 9H). LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 349.1。

[2112] 实例112-197:

[2113] 这些化合物根据上述方案分别使用2,4-二氯吡啶并[3,4-d]嘧啶(中间体2c)以及各种胺和偶联伴侣进行合成,除非特别说明。

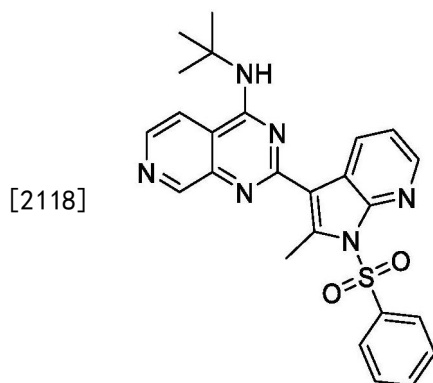
[2114] 实例112:4-[4-(叔-丁基氨基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-2-基]吡啶-2-胺

[2115]



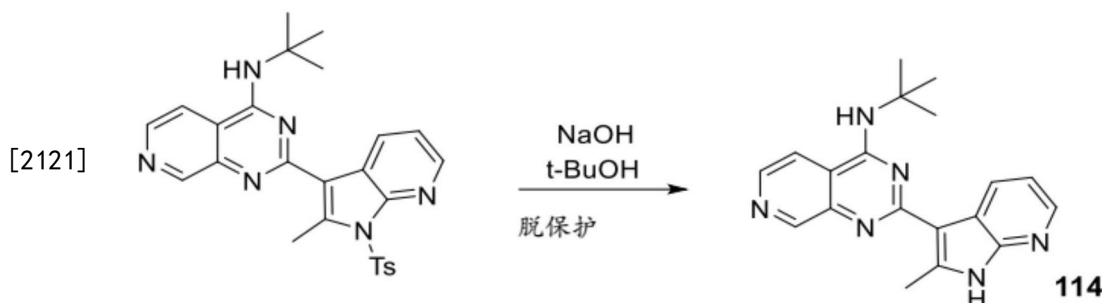
[2116] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ9.10 (d, J=0.8Hz, 1H), 8.60 (d, J=5.6Hz, 1H), 8.36 (dd, J=5.8, 0.9Hz, 1H), 8.09 (dd, J=5.3, 0.8Hz, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.50 (dd, J=1.5, 0.8Hz, 1H), 7.42 (dd, J=5.3, 1.5Hz, 1H), 6.10 (s, 2H), 1.60 (s, 9H). LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 295.2

[2117] 实例113:2-[1-(苯磺酰基)-2-甲基-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基]-N-叔-丁基吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



[2119]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.12 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.70 (dd,  $J=7.9, 1.7\text{Hz}$ , 1H), 8.58 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.20 (m, 2H), 7.71 (m, 1H), 7.66-7.59 (m, 5H), 7.35 (dd,  $J=7.9, 4.7\text{Hz}$ , 1H), 3.24 (s, 3H), 1.59 (s, 9H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 473.2.

[2120] 实例114: N-叔-丁基-2- {2-甲基-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基} 吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

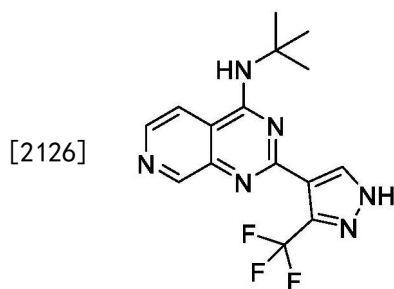


[2122] 通过实例113的甲苯磺酰基的脱保护来制备标题化合物。

[2123] 脱保护: 将N-(叔-丁基)-2-(2-甲基-1-(苯基磺酰基)-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺 (32mg, 0.068mmol) 在室温下在1mL叔丁醇中搅拌。然后添加氢氧化钠 (270微升 (5M), 1.35mmol), 并将反应在室温下搅拌两个小时, 此时消耗所有起始原料。将材料浓缩成灰白色油, 并通过COMBIFLASH®系统 (ISCO) 上的快速色谱 (使用0-20% MeOH/DCM) 进行纯化, 得到标题产物N-叔-丁基-2- {2-甲基-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基} 吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺 (55%)。

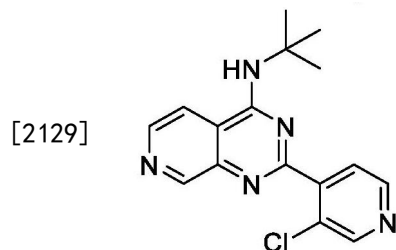
[2124]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.01 (s, 1H), 9.05 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.97 (dd,  $J=8.0, 1.7\text{Hz}$ , 1H), 8.45 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 8.25 (ddd,  $J=23.7, 5.2, 1.3\text{Hz}$ , 1H), 8.19 (m, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.15 (dd,  $J=7.9, 4.7\text{Hz}$ , 1H), 2.96 (s, 3H), 1.63 (s, 9H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 333.2.

[2125] 实例115: N-叔-丁基-2-[3-(三氟甲基)-1H-吡啶-4-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



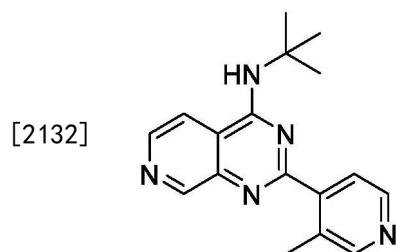
[2127]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.95 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.54 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.46 (s, 1H), 8.30 (dd,  $J=5.7, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 7.62 (s, 1H), 1.58 (s, 9H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 337.1。

[2128] 实例116: N-叔-丁基-2-(3-氯吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



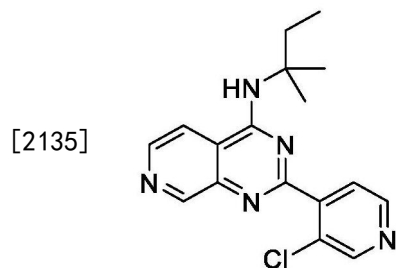
[2130]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.12 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.79 (d,  $J=0.5\text{Hz}$ , 1H), 8.68 (m, 2H), 8.41 (dd,  $J=5.8, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 7.92 (s, 1H), 7.77 (dd,  $J=4.9, 0.6\text{Hz}$ , 1H), 1.55 (s, 9H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 314.1。

[2131] 实例117: N-叔-丁基-2-(3-甲基吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



[2133]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.11 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.63 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.55 (m, 2H), 8.39 (dd,  $J=5.7, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 7.79 (m, 1H), 7.76 (m, 1H), 2.59 (s, 3H), 1.58 (s, 9H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 294.2。

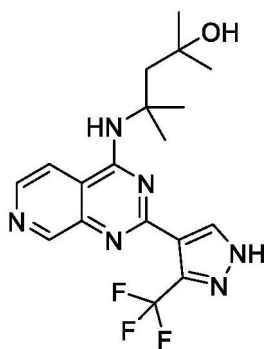
[2134] 实例118: 2-(3-氯吡啶-4-基)-N-(2-甲基丁-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



[2136]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.12 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.78 (d,  $J=0.6\text{Hz}$ , 1H), 8.68 (dd,  $J=5.3, 2.2\text{Hz}$ , 1H), 8.66 (m, 2H), 8.41 (dd,  $J=5.7, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 7.74 (m, 1H), 2.00 (q,  $J=7.3\text{Hz}$ , 2H), 1.49 (s, 6H), 0.80 (t,  $J=7.4\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 328.1。

[2137] 实例119: 2,4-二甲基-4-({2-[3-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基}氨基)戊-2-醇

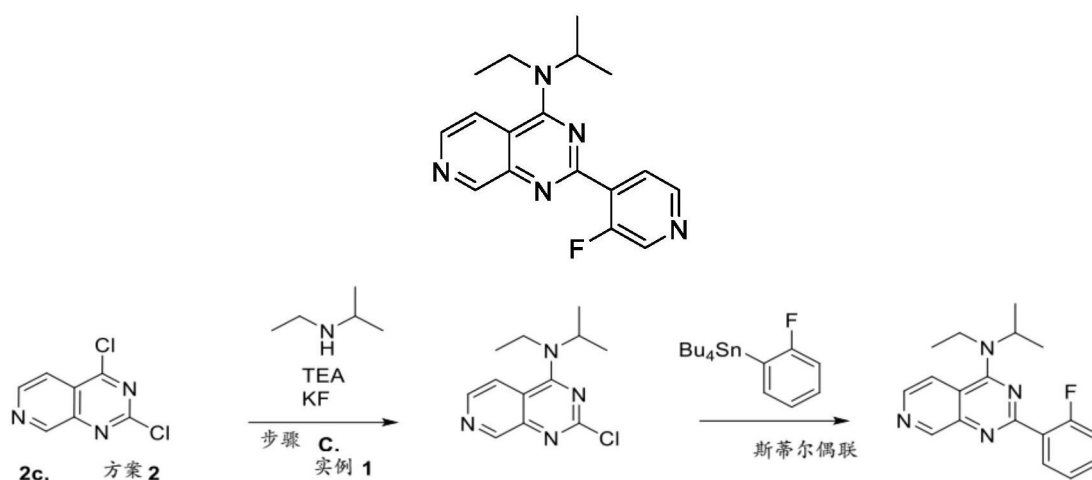
[2138]



[2139]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.29 (s, 1H), 8.99 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.55 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.49 (s, 1H), 7.73 (dd,  $J=5.7, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 5.61 (s, 1H), 1.97 (s, 2H), 1.70 (s, 6H), 1.30 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 395.2。

[2140] 实例120: N-乙基-2-(3-氟吡啶-4-基)-N-(丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

[2141]

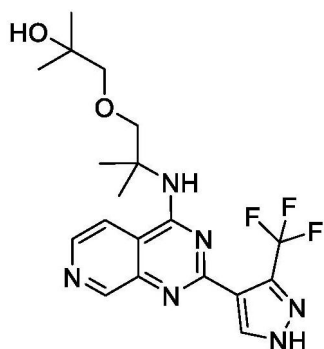


[2142] 类似于实例111中所述,除了在第二步骤中使用斯蒂尔偶联,由2,4-二氯吡啶并[3,4-d]嘧啶(中间体2c)制备标题化合物。

[2143] 斯蒂尔偶联:将2-氯-N-乙基-N-异丙基吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺(30mg, 0.12mmol)在干DMF(1mL)中于室温搅拌。添加3-氟-4-(三丁基甲锡烷基)吡啶(50.8mg, 0.13mmol),然后添加PdCl<sub>2</sub>(dppf)·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>加合物(9.8mg, 0.012mmol)和CuI(2.3mg, 0.012mmol)。将反应在130℃下搅拌1小时。然后将反应浓缩并通过在COMBIFLASH®系统(ISCO)上的快速色谱(使用0-10%MeOH/DCM)进行纯化,得到标题化合物。 $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.20 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.72 (d,  $J=2.9\text{Hz}$ , 1H), 8.61 (m, 1H), 8.59 (m, 1H), 8.08 (dd,  $J=6.7, 4.9\text{Hz}$ , 1H), 7.90 (m, 1H), 4.92-4.88 (m, 1H), 3.79 (q,  $J=7.0\text{Hz}$ , 2H), 1.37 (m, 6H), 1.32 (dd,  $J=23.7, 6.8\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 312.2。

[2144] 实例121: 2-甲基-1-[2-甲基-2-({2-[3-(三氟甲基)-1H-吡啶-4-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基}氨基)丙氧基]丙-2-醇

[2145]

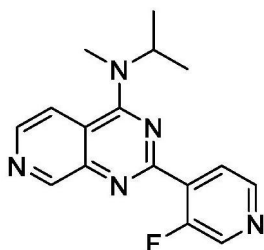


[2146] 使用实例111中所述的程序和实例12中所述的胺制备标题化合物。

[2147]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13.80 (s, 1H), 8.99 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.55 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.44 (s, 1H), 8.25 (dd,  $J=5.8, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 7.53 (s, 1H), 4.35 (s, 1H), 3.82 (s, 2H), 3.17 (s, 2H), 1.54 (s, 6H), 1.00 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 425.2。

[2148] 实例122: 2-(3-氟吡啶-4-基)-N-甲基-N-(丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

[2149]

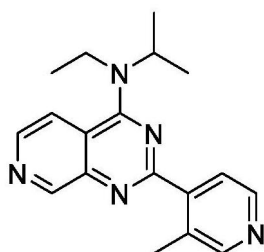


[2150] 使用实例120中所述的程序制备标题化合物。

[2151]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.21 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.74 (d,  $J=2.9\text{Hz}$ , 1H), 8.60 (m, 2H), 8.11 (m, 1H), 8.09 (m, 1H), 5.11-5.06 (d,  $J=6.6\text{Hz}$ , 1H), 3.37 (s, 3H), 1.34 (d,  $J=6.7\text{Hz}$ , 6H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 298.1。

[2152] 实例123: N-乙基-2-(3-甲基吡啶-4-基)-N-(丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

[2153]

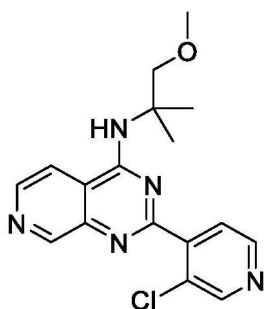


[2154]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.20 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.59 (m, 1H), 8.56 (m, 1H), 8.54 (m, 1H), 7.89 (m, 1H), 7.85 (m, 1H), 4.95-4.90 (d,  $J=6.6\text{Hz}$ , 1H), 3.79 (q,  $J=7.0\text{Hz}$ , 2H), 2.60 (s, 3H), 1.36 (d,  $J=6.6\text{Hz}$ , 6H), 1.30 (t,  $J=7.0\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 308.2。

[2155] 实例124: 2-(3-氯吡啶-4-基)-N-(1-甲氧基-2-甲基丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



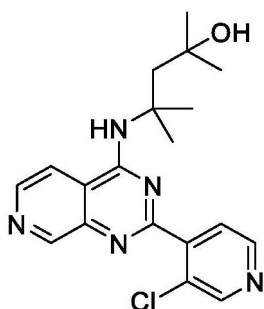
[2156]



[2157]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.12 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.69 (dd,  $J=5.2, 1.8\text{Hz}$ , 2H), 8.40 (dd,  $J=5.8, 1.0\text{Hz}$ , 1H), 7.78 (s, 1H), 7.75 (m, 1H), 3.73 (s, 2H), 3.22 (s, 3H), 1.50 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 344.1。

[2158] 实例125: 4- {[2- (3-氯吡啶-4-基) 吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基} -2,4-二甲基戊-2-醇

[2159]



[2160]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.45 (s, 1H), 9.13 (d,  $J=0.7\text{Hz}$ , 1H), 8.79 (s, 1H), 8.68 (dd,  $J=5.3, 3.4\text{Hz}$ , 1H), 8.66 (m, 1H), 7.83 (dd,  $J=5.7, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 7.77 (dd,  $J=4.9, 0.6\text{Hz}$ , 1H), 5.57 (s, 1H), 1.96 (s, 2H), 1.65 (s, 6H), 1.29 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 372.2。

[2161] 实例126: 2- (3-氯吡啶-4-基) -N-环戊基吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

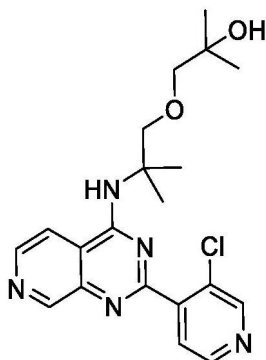
[2162]



[2163]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.14 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.78 (d,  $J=0.6\text{Hz}$ , 1H), 8.69 (dd,  $J=9.4, 5.2\text{Hz}$ , 1H), 8.67 (d,  $J=6.9\text{Hz}$ , 1H), 8.61 (d,  $J=6.8\text{Hz}$ , 1H), 8.32 (dd,  $J=5.7, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 7.81 (m, 1H), 4.61-4.57 (m, 1H), 2.10-2.01 (m, 2H), 1.80-1.54 (m, 6H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 326.1。

[2164] 实例127: 1- (2- {[2- (3-氯吡啶-4-基) 吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基} -2-甲基丙氧基) -2-甲基丙-2-醇

[2165]

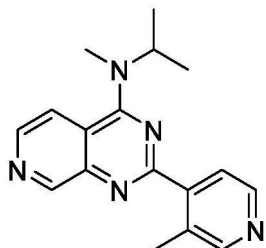


[2166] 使用实例111中所述的程序和实例12中所述的胺制备标题化合物。

[2167]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.13 (m, 1H), 8.80 (d,  $J=0.6\text{Hz}$ , 1H), 8.69 (m, 2H), 8.40 (dd,  $J=5.8, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 7.83 (dd,  $J=4.9, 0.6\text{Hz}$ , 1H), 7.76 (dd,  $J=4.9, 0.6\text{Hz}$ , 1H), 4.38 (s, 1H), 3.80 (s, 2H), 3.16 (s, 2H), 1.51 (s, 6H), 1.00 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 402.2。

[2168] 实例128: N-甲基-2-(3-甲基吡啶-4-基)-N-(丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

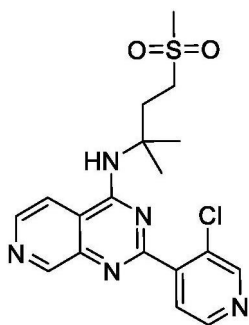
[2169]



[2170]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.19 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.58 (m, 2H), 8.53 (m, 1H), 8.03 (dd,  $J=5.8, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 7.87 (d,  $J=5.0\text{Hz}$ , 1H), 5.09-5.00 (m, 1H), 3.29 (s, 3H), 2.60 (s, 3H), 1.31 (d,  $J=6.7\text{Hz}$ , 6H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 294.2。

[2171] 实例129: 2-(3-氯吡啶-4-基)-N-(4-甲磺酰基-2-甲基丁-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

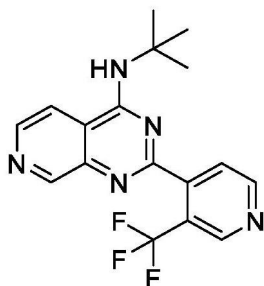
[2172]



[2173]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.15 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.79 (d,  $J=0.6\text{Hz}$ , 1H), 8.69 (dd,  $J=21.3, 5.3\text{Hz}$ , 1H), 8.65 (m, 1H), 8.40 (dd,  $J=5.8, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 7.80 (m, 1H), 7.78 (m, 1H), 3.12-3.08 (m, 2H), 2.87 (s, 3H), 2.49-2.46 (m, 2H), 1.53 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 406.1。

[2174] 实例130: N-叔-丁基-2-[3-(三氟甲基)吡啶-4-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

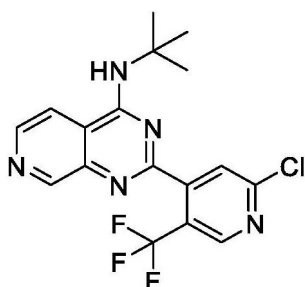
[2175]



[2176]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.92 (m, 1H), 8.89 (m, 1H), 8.08 (d,  $J=4.9\text{Hz}$ , 1H), 7.76 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 7.70 (m, 1H), 7.67 (m, 1H), 7.56 (dd,  $J=5.0, 0.8\text{Hz}$ , 1H), 1.49 (s, 9H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 348.1。

[2177] 实例131: N-叔-丁基-2-[2-氯-5-(三氟甲基)吡啶-4-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

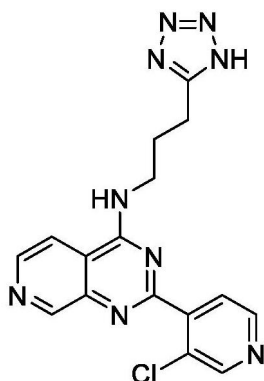
[2178]



[2179]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.08 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.87 (s, 1H), 8.61 (d,  $J=5.8\text{Hz}$ , 1H), 8.22 (dd,  $J=5.8, 1.0\text{Hz}$ , 1H), 7.83 (s, 1H), 1.20 (s, 9H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 382.1。

[2180] 实例132: 2-(3-氯吡啶-4-基)-N-[3-(1H-1,2,3,4-四唑-5-基)丙基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

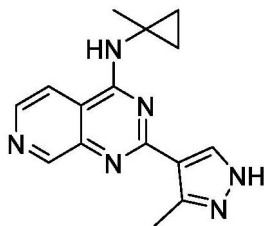
[2181]



[2182]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.30 (s, 1H), 9.15 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.77 (s, 1H), 8.70 (dd,  $J=18.4, 5.2\text{Hz}$ , 1H), 8.65 (m, 1H), 8.25 (dd,  $J=5.7, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 7.81 (d,  $J=4.9\text{Hz}$ , 1H), 3.70-3.65 (td,  $J=6.8, 5.1\text{Hz}$ , 2H), 2.90 (t,  $J=7.4\text{Hz}$ , 2H), 2.12-2.07 (m, 2H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 368.1。

[2183] 实例133: 2-(3-甲基-1H-吡唑-4-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

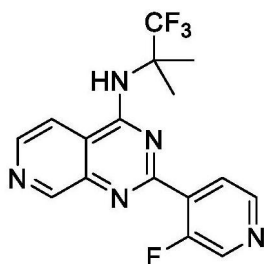
[2184]



[2185]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, 甲醇- $\text{d}_4$ )  $\delta$  9.01 (s, 1H), 8.41 (d,  $J=5.7\text{Hz}$ , 1H), 8.26 (s, 1H), 7.91 (dd,  $J=5.7, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 2.83 (s, 3H), 1.60 (s, 3H), 1.05-0.94 (m, 2H), 0.91-0.82 (m, 2H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 281.1。

[2186] 实例134: 2-(3-氟吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟-2-甲基丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

[2187]

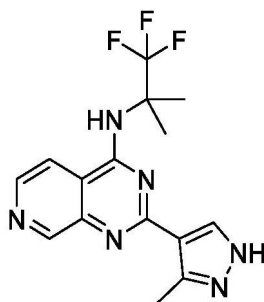


[2188] 使用实例120中所述的程序制备标题化合物。

[2189]  $^1\text{H}$  NMR (600MHz,  $\text{DMSO}-\text{d}_6$ )  $\delta$  9.24 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.77-8.73 (m, 2H), 8.62 (dd,  $J=4.9, 0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.52 (dd,  $J=5.8, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.04 (dd,  $J=6.7, 4.9\text{Hz}$ , 1H), 7.99 (s, 1H), 1.86 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 352.1。

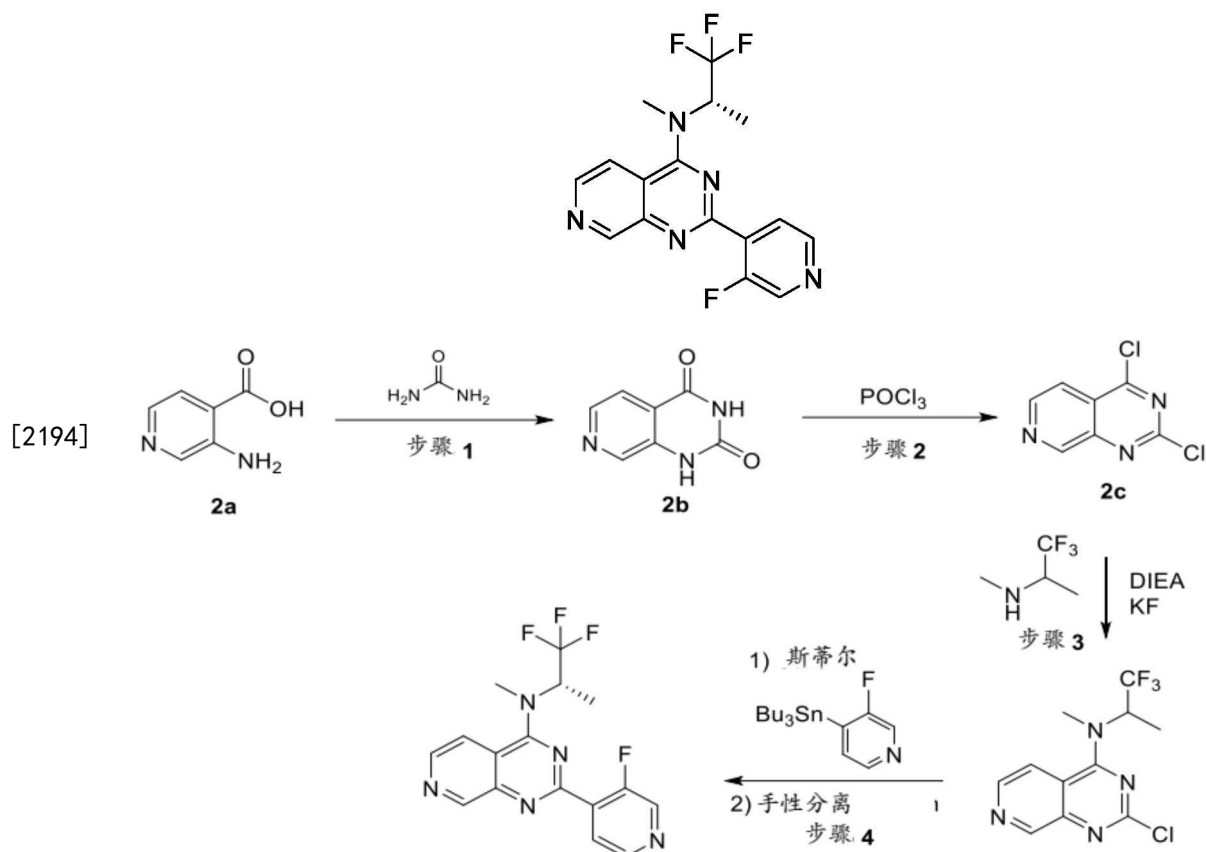
[2190] 实例135: 2-(3-甲基-1H-吡唑-4-基)-N-(1,1,1-三氟-2-甲基丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

[2191]



[2192]  $^1\text{H}$  NMR (600MHz, 甲醇- $\text{d}_4$ )  $\delta$  9.06 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.47 (d,  $J=5.7\text{Hz}$ , 1H), 8.16 (dd,  $J=5.7, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.11 (s, 1H), 2.74 (d,  $J=34.7\text{Hz}$ , 3H), 1.92 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 337.1。

[2193] 实例136: 2-(3-氟吡啶-4-基)-N-甲基-N-[(2S)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



[2195] 步骤1:将尿素(40.00g,666.00mmol)和3-氨基异烟碱酸(2a,18.40g,133.20mmol)的混合物在210℃加热1小时(注意:不使用溶剂)。添加NaOH(2N,320mL),并将混合物在90℃下搅拌1h。通过过滤收集固体,并用水洗涤。将如此获得的粗产物悬浮于HOAc(400mL)中,并在100℃下搅拌1h。将混合物冷却至室温,过滤,并将固体用大量水洗涤,然后在真空下干燥,得到吡啶并[3,4-d]嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(2b,17.00g,产率78%),其无需进一步纯化。LCMS( $m/z$  [M+H]<sup>+</sup>):164.0。

[2196] 步骤2:向吡啶并[3,4-d]嘧啶-2,4(1H,3H)-二酮(2b,20.00g,122.60mmol)和POCl<sub>3</sub>(328.03g,2.14mol)在甲苯(200mL)中混合物中滴加DIEA(31.69g,245.20mmol),并将所述反应混合物在25℃下搅拌过夜(18hr),得到悬浮液。

[2197] 真空除去溶剂和POCl<sub>3</sub>,用DCM(50mL)稀释,在-20℃下用DIEA中和至pH=7,然后再次浓缩,将残余物通过柱(20%-50%EA/PE)纯化,得到呈黄色固体的2,4-二氯吡啶并[3,4-d]嘧啶(2c,20.00g,99.99mmol,82%产率)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,氯仿-d)<sup>+</sup>δ9.52(s,1H),8.92(d,J=5.6Hz,1H),8.04(d,J=5.6Hz,1H)。LCMS( $m/z$  [M+H]<sup>+</sup>):200.0。

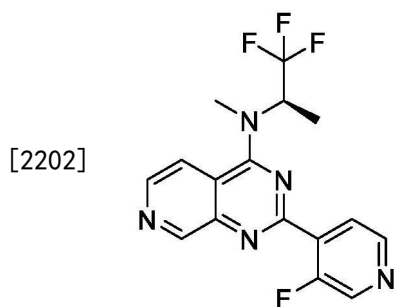
[2198] 步骤3:在室温下,在20mL小瓶中,在DMSO(0.7mL)中搅拌2,4-二氯吡啶并[3,4-d]嘧啶(600mg,3.0mmol),并用N<sub>2</sub>脱气。添加DIEA(1mL,6mmol)并搅拌5分钟,然后添加KF(174mg,3mmol)。将所述混合物在室温搅拌15分钟,然后添加外消旋1,1,1-三氟-N-甲基丙-2-胺(419mg,3.3mmol)并脱气,然后在60℃搅拌4小时。然后将反应浓缩并通过在COMBIFLASH®系统(ISCO)上的快速色谱(使用0-10%MeOH/DCM)纯化,得到2-氯-N-甲基-N-(1,1,1-三氟丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺(680mg,74%)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz,丙酮-d6)<sup>+</sup>δ9.09(d,J=0.9Hz,1H),8.59(d,J=5.9Hz,1H),8.22(dd,J=5.9,0.9Hz,1H),5.93

(dddd,  $J=15.3, 8.3, 7.0, 1.2\text{Hz}$ , 1H), 3.61 (q,  $J=1.0\text{Hz}$ , 3H), 1.63 (d,  $J=7.0\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $m/z$  [M+H]<sup>+</sup>): 291.7。

[2199] 步骤4: 在20mL小瓶中, 将2-氯-N-甲基-N-(1,1,1-三氟丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺(100mg, 0.34mmol)在室温下在干DMF(1mL)中搅拌。添加3-氟-4-(三丁基甲锡烷基)吡啶(133mg, 0.34mmol), 然后添加PdCl<sub>2</sub>(dppf)·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>加合物(28.1mg, 0.034mmol)和CuI(6.55mg, 0.034mmol)。将反应在130℃下搅拌0.5小时。将粗混合物用DCM、H<sub>2</sub>O稀释, 分离并用DCM x 3萃取。将有机层合并并经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并浓缩。将残余物通过在COMBIFLASH®系统(ISCO)上的快速色谱(使用0-10% MeOH/DCM)进行纯化, 得到外消旋产物, 然后通过手性HPLC(21x250mm OJ-H柱, A相为85% CO<sub>2</sub>, B相为15% MeOH, 流速2mL/min, 30℃, 2.75分钟洗脱时间)分离对映异构体, 得到实例136和137。

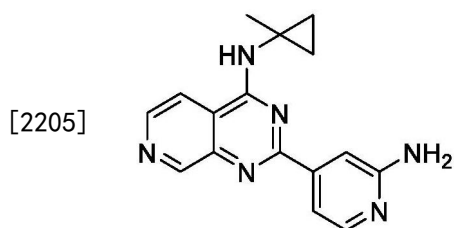
[2200] 实例136: <sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.30 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.75 (d,  $J=3.0\text{Hz}$ , 1H), 8.66 (d,  $J=5.9\text{Hz}$ , 1H), 8.62 (dd,  $J=4.9, 0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.24 (dd,  $J=5.9, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.15 (dd,  $J=6.8, 4.9\text{Hz}$ , 1H), 6.12-5.98 (m, 1H), 3.51 (d,  $J=1.1\text{Hz}$ , 3H), 1.57 (d,  $J=7.0\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $m/z$  [M+H]<sup>+</sup>): 352.1. 手性HPLC  $T_R=0.88$ 分钟。。

[2201] 实例137: 2-(3-氟吡啶-4-基)-N-甲基-N-[(2R)-1,1,1-三氟丙-2-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



[2203] <sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.30 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.75 (d,  $J=3.0\text{Hz}$ , 1H), 8.66 (d,  $J=5.9\text{Hz}$ , 1H), 8.62 (dd,  $J=4.9, 0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.24 (dd,  $J=5.9, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.15 (dd,  $J=6.8, 4.9\text{Hz}$ , 1H), 6.12-5.98 (m, 1H), 3.51 (d,  $J=1.1\text{Hz}$ , 3H), 1.57 (d,  $J=7.0\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $m/z$  [M+H]<sup>+</sup>): 352.1. 手性HPLC  $T_R=0.70$ 分钟。

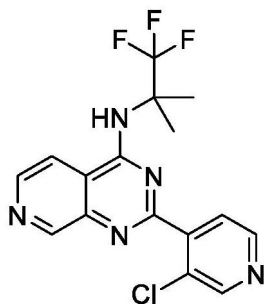
[2204] 实例138: 4-{4-[(1-甲基环丙基)氨基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-2-基}吡啶-2-胺



[2206] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, 丙酮-d<sub>6</sub>) δ 9.15 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.55 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.17-8.09 (m, 2H), 7.98 (dd,  $J=5.6, 1.0\text{Hz}$ , 1H), 7.81-7.70 (m, 2H), 1.61 (s, 3H), 1.00-0.94 (m, 2H), 0.91-0.84 (m, 2H). LCMS ( $m/z$  [M+H]<sup>+</sup>): 293.1。

[2207] 实例139: 2-(3-氯吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟-2-甲基丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

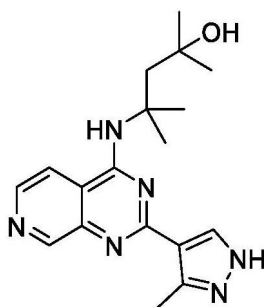
[2208]



[2209]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, 甲醇- $d_4$ )  $\delta$ 9.20 (s, 1H) , 8.74 (s, 1H) , 8.68 (d,  $J=5.8\text{Hz}$ , 1H) , 8.63 (d,  $J=5.0\text{Hz}$ , 1H) , 8.33 (dd,  $J=5.8, 0.9\text{Hz}$ , 1H) , 7.79 (d,  $J=4.9\text{Hz}$ , 1H) , 1.88 (d,  $J=1.0\text{Hz}$ , 6H) .LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ) : 368.1。

[2210] 实例140: 2,4-二甲基-4- {[2- (3-甲基-1H-吡唑-4-基) 吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基] 氨基} 戊-2-醇

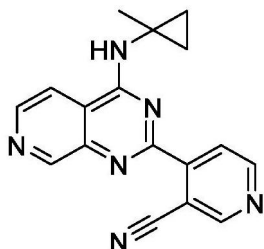
[2211]



[2212]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, 氯仿- $d$ )  $\delta$ 9.14 (s, 1H) , 8.80 (s, 1H) , 8.37 (t,  $J=5.8\text{Hz}$ , 2H) , 7.50-7.38 (m, 1H) , 2.81 (s, 3H) , 1.99 (s, 2H) , 1.81 (s, 6H) , 1.49 (s, 6H) .LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ) : 341.2。

[2213] 实例141: 4- {4- [ (1-甲基环丙基) 氨基] 吡啶并[3,4-d]嘧啶-2-基} 吡啶-3-甲腈

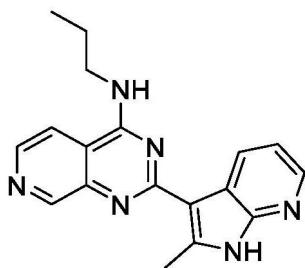
[2214]



[2215]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, 丙酮- $d_6$ )  $\delta$ 9.23 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H) , 9.09 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H) , 8.99 (d,  $J=5.2\text{Hz}$ , 1H) , 8.65 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H) , 8.59-8.53 (m, 1H) , 8.42 (s, 1H) , 8.07 (dd,  $J=5.7, 0.9\text{Hz}$ , 1H) , 1.62 (s, 3H) , 1.04-0.97 (m, 2H) , 0.90-0.81 (m, 2H) .LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ) : 303.1。

[2216] 实例142: 2- {2-甲基-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基} -N-丙基吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

[2217]

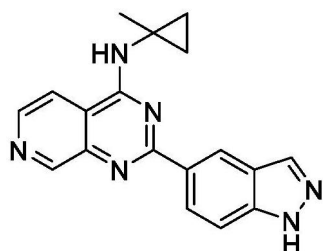


[2218] 使用实例114中所述的程序制备标题化合物。

[2219]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.02 (s, 1H), 9.06 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.98 (dd,  $J=7.9, 1.7\text{Hz}$ , 1H), 8.50 (t,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 8.46 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 8.19 (dd,  $J=4.7, 1.7\text{Hz}$ , 1H), 8.06 (dd,  $J=5.6, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 7.16 (dd,  $J=7.9, 4.7\text{Hz}$ , 1H), 3.62 (dt,  $J=8.1, 6.0\text{Hz}$ , 2H), 2.96 (s, 3H), 1.90-1.69 (m, 2H), 1.00 (t,  $J=7.4\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 319.2。

[2220] 实例143: 2-(1H-吡唑-5-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

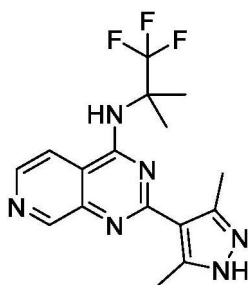
[2221]



[2222]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.12 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 9.00 (dd,  $J=1.5, 0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.85 (s, 1H), 8.61 (dd,  $J=8.9, 1.5\text{Hz}$ , 1H), 8.52 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 8.26 (s, 1H), 8.11 (dd,  $J=5.6, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 7.65 (d,  $J=8.8\text{Hz}$ , 1H), 1.62 (s, 3H), 0.97-0.81 (m, 4H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 317.1。

[2223] 实例144: 2-(3,5-二甲基-1H-吡唑-4-基)-N-(1,1,1-三氟-2-甲基丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

[2224]

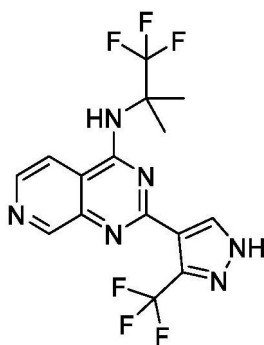


[2225]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, 甲醇- $d_4$ )  $\delta$  9.06 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.50 (d,  $J=5.8\text{Hz}$ , 1H), 8.17 (dd,  $J=5.8, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 2.58 (s, 6H), 1.91 (d,  $J=1.1\text{Hz}$ , 6H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 351.1。

[2226] 实例145: N-(1,1,1-三氟-2-甲基丙-2-基)-2-[3-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



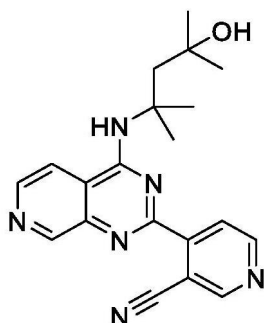
[2227]



[2228]  $^1\text{H}$  NMR (600MHz, 甲醇- $d_4$ )  $\delta$ 9.06 (d,  $J=1.0\text{Hz}$ , 1H), 8.54 (d,  $J=5.7\text{Hz}$ , 1H), 8.38-8.36 (m, 1H), 8.20 (dd,  $J=5.7, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 1.90 (d,  $J=1.1\text{Hz}$ , 6H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 391.1。

[2229] 实例146: 4- {4- [ (4-羟基-2,4-二甲基戊-2-基) 氨基] 吡啶并 [3,4-d] 嘧啶-2-基} 吡啶-3-甲腈

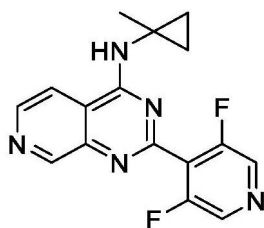
[2230]



[2231]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, 氯仿- $d$ )  $\delta$ 9.55 (s, 1H), 9.38 (s, 1H), 9.07 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.95 (d,  $J=5.2\text{Hz}$ , 1H), 8.62 (d,  $J=5.9\text{Hz}$ , 1H), 8.27 (dd,  $J=5.2, 0.8\text{Hz}$ , 1H), 7.86-7.80 (m, 1H), 2.02 (s, 2H), 1.84 (s, 6H), 1.53 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 363.2。

[2232] 实例147: 2- (3,5-二氟吡啶-4-基) -N- (1-甲基环丙基) 吡啶并 [3,4-d] 嘧啶-4-胺

[2233]



[2234] 使用实例120中所述的程序制备标题化合物。

[2235]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ 9.16 (s, 1H), 9.14 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.71 (s, 2H), 8.68 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.19 (dd,  $J=5.7, 1.0\text{Hz}$ , 1H), 1.45 (s, 3H), 0.87-0.77 (m, 2H), 0.75-0.64 (m, 2H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 314.1。

[2236] 实例148: 2- (2,3-二氟吡啶-4-基) -N- (1-甲基环丙基) 吡啶并 [3,4-d] 嘧啶-4-胺

[2237]

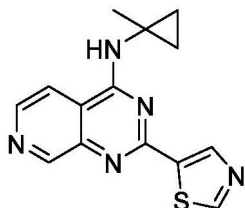


[2238] 使用实例120中所述的程序制备标题化合物。

[2239]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, 氯仿- $d$ )  $\delta$  9.36 (s, 1H), 8.90 (dd,  $J=5.0, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.85 (dd,  $J=1.6, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.69 (dd,  $J=5.1, 1.6\text{Hz}$ , 1H), 8.66 (d,  $J=5.7\text{Hz}$ , 1H), 7.64-7.52 (m, 1H), 1.64 (s, 3H), 1.04-0.94 (m, 4H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 314.1。

[2240] 实例149: N-(1-甲基环丙基)-2-(1,3-噻唑-5-基)吡啶并[3,4- $d$ ]嘧啶-4-胺

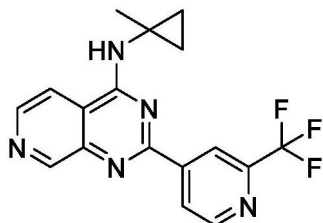
[2241]



[2242]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.22 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 9.08 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 9.01 (s, 1H), 8.69-8.62 (m, 1H), 8.56 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 8.10 (dd,  $J=5.7, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 1.55 (s, 3H), 0.92-0.86 (m, 2H), 0.86-0.76 (m, 2H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 284.1。

[2243] 实例150: N-(1-甲基环丙基)-2-[2-(三氟甲基)吡啶-4-基]吡啶并[3,4- $d$ ]嘧啶-4-胺

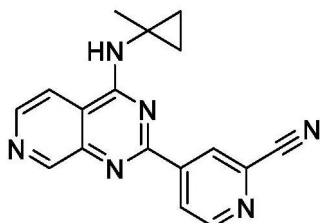
[2244]



[2245]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, 氯仿- $d$ )  $\delta$  9.41 (s, 1H), 8.97-8.89 (m, 1H), 8.88 (dd,  $J=1.5, 0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.70-8.66 (m, 1H), 8.66-8.61 (m, 1H), 7.89-7.77 (m, 1H), 6.95-6.80 (m, 1H), 1.65 (s, 3H), 1.07-1.01 (m, 2H), 1.01-0.92 (m, 2H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 346.1。

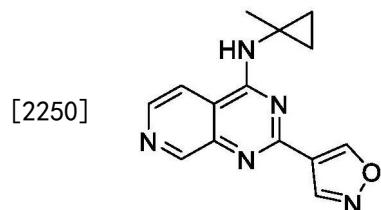
[2246] 实例151: 4-{4-[(1-甲基环丙基)氨基]吡啶并[3,4- $d$ ]嘧啶-2-基}吡啶-2-甲腈

[2247]



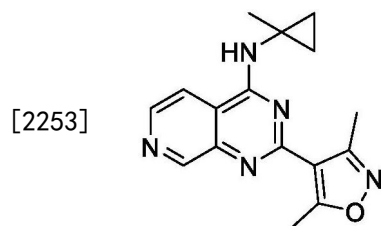
[2248]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, 氯仿- $d$ )  $\delta$  9.36 (s, 1H), 8.90 (dd,  $J=5.0, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.85 (dd,  $J=1.6, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.69 (dd,  $J=5.1, 1.6\text{Hz}$ , 1H), 8.66 (d,  $J=5.7\text{Hz}$ , 1H), 7.64-7.52 (m, 1H), 1.64 (s, 3H), 1.04-0.94 (m, 4H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 303.1。

[2249] 实例152:N-(1-甲基环丙基)-2-(1,2-噁唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



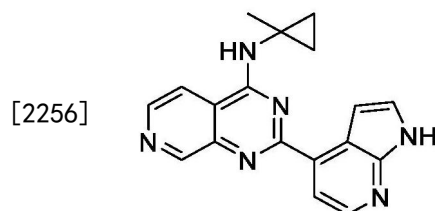
[2251]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, 氯仿-d)  $\delta$ 9.25 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 8.54 (dd,  $J=6.0, 0.7\text{Hz}$ , 1H), 7.94-7.88 (br s, 1H), 7.32-7.27 (br s, 1H), 6.61 (dd,  $J=6.0, 0.7\text{Hz}$ , 1H), 0.91 (s, 3H), 0.85-0.73 (m, 4H). LCMS ( $m/z$  [M+H]<sup>+</sup>): 268.1。

[2252] 实例153:2-(二甲基-1,2-噁唑-4-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



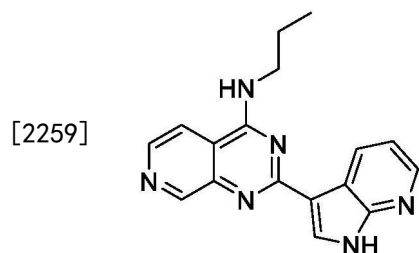
[2254]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ 9.05 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.89 (s, 1H), 8.54 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.10 (dd,  $J=5.7, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 2.90 (s, 3H), 2.65 (s, 3H), 1.51 (s, 3H), 0.96-0.84 (m, 2H), 0.83-0.71 (m, 2H). LCMS ( $m/z$  [M+H]<sup>+</sup>): 296.1。

[2255] 实例154:N-(1-甲基环丙基)-2-{1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-4-基}吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



[2257]  $^1\text{H}$  NMR (600MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ 11.77 (s, 1H), 9.23 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.92 (s, 1H), 8.59 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 8.38 (d,  $J=5.0\text{Hz}$ , 1H), 8.22 (d,  $J=5.0\text{Hz}$ , 1H), 8.16 (dd,  $J=5.7, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 7.69 (dd,  $J=3.4, 2.0\text{Hz}$ , 1H), 7.61 (t,  $J=2.9\text{Hz}$ , 1H), 1.61 (s, 3H), 0.99-0.94 (m, 2H), 0.92-0.87 (m, 2H). LCMS ( $m/z$  [M+H]<sup>+</sup>): 317.1。

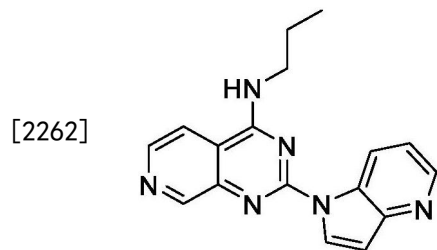
[2258] 实例155:N-丙基-2-{1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基}吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



[2260]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ 12.18 (s, 1H), 9.07 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.96 (dd,  $J=7.9, 1.6\text{Hz}$ , 1H), 8.51 (dd,  $J=16.1, 5.5\text{Hz}$ , 2H), 8.35-8.27 (m, 2H), 8.09 (dd,  $J=5.7, 1.0\text{Hz}$ ,

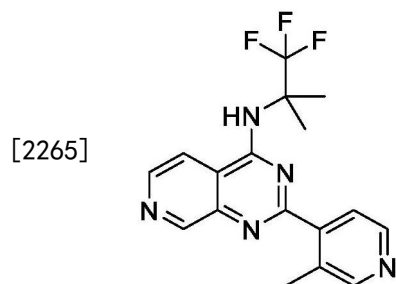
1H), 7.25 (dd, J=7.9, 4.6Hz, 1H), 3.67 (dt, J=7.7, 5.9Hz, 2H), 1.78 (h, J=7.4Hz, 2H), 1.03 (t, J=7.4Hz, 3H). LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 305.1。

[2261] 实例156: N-丙基-2-{1H-吡咯并[3,2-b]吡啶-1-基}吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



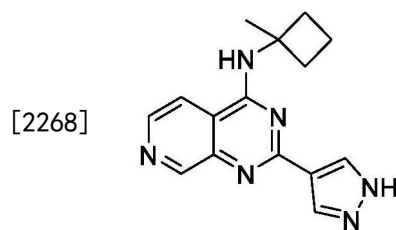
[2263] <sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.19 (ddd, J=8.4, 1.5, 0.8Hz, 1H), 9.13 (d, J=0.9Hz, 1H), 9.02 (t, J=5.5Hz, 1H), 8.65 (d, J=3.7Hz, 1H), 8.55 (d, J=5.5Hz, 1H), 8.48 (dd, J=4.6, 1.5Hz, 1H), 8.16 (dd, J=5.5, 0.9Hz, 1H), 7.35 (dd, J=8.4, 4.6Hz, 1H), 6.88 (dd, J=3.8, 0.8Hz, 1H), 3.71-3.63 (m, 2H), 1.85-1.74 (m, 2H), 1.04 (t, J=7.4Hz, 3H). LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 305.1。

[2264] 实例157: 2-(3-甲基吡啶-4-基)-N-(1,1,1-三氟-2-甲基丙-2-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



[2266] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.22 (d, J=0.8Hz, 1H), 8.73 (d, J=5.7Hz, 1H), 8.58 (d, J=5.8Hz, 2H), 8.52 (dd, J=5.8, 1.0Hz, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.75 (d, J=5.0Hz, 1H), 2.59 (s, 3H), 1.85 (s, 6H). LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 348.1。

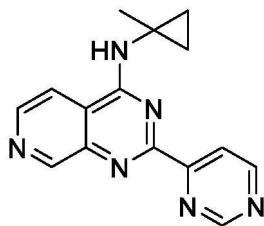
[2267] 实例158: N-(1-甲基环丁基)-2-(1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



[2269] <sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 13.11 (s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.47 (d, J=5.5Hz, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.14 (d, J=5.5Hz, 1H), 8.07 (s, 1H), 2.48-2.41 (m, 2H), 2.25 (td, J=9.0, 4.3Hz, 2H), 1.99-1.81 (m, 2H), 1.67 (s, 3H). LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 281.1。

[2270] 实例159: N-(1-甲基环丙基)-2-(嘧啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

[2271]

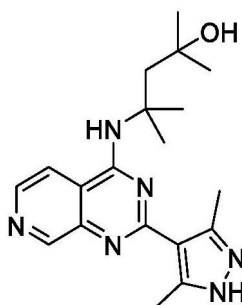


[2272] 使用实例120中所述的程序制备标题化合物

[2273]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, 丙酮- $d_6$ )  $\delta$  9.15 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.55 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.17-8.09 (m, 2H), 7.98 (dd,  $J=5.6, 1.0\text{Hz}$ , 1H), 7.81-7.70 (m, 2H), 1.61 (s, 3H), 1.00-0.94 (m, 2H), 0.91-0.84 (m, 2H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 279.1。

[2274] 实例160: 4- { [2- (3,5-二甲基-1H-吡唑-4-基) 吡啶并 [3,4-d] 嘧啶-4-基] 氨基} -2,4-二甲基戊-2-醇

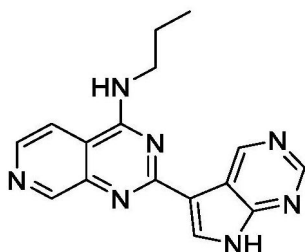
[2275]



[2276]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.43 (s, 1H), 9.15 (s, 1H), 8.96 (s, 1H), 8.46 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 7.69 (dd,  $J=5.7, 1.0\text{Hz}$ , 1H), 5.61 (s, 1H), 2.61 (s, 3H), 2.55 (s, 3H), 1.95 (s, 2H), 1.70 (s, 6H), 1.32 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 355.2。

[2277] 实例161: 4N-丙基-2- {7H-吡咯并 [2,3-d] 嘧啶-5-基} 吡啶并 [3,4-d] 嘧啶-4-胺

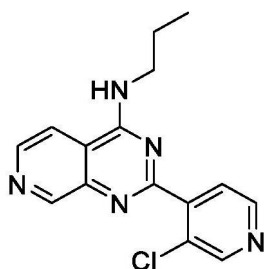
[2278]



[2279]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.59 (d,  $J=2.5\text{Hz}$ , 1H), 9.87 (s, 1H), 9.12 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.86 (s, 1H), 8.60 (t,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.53 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 8.36 (d,  $J=2.6\text{Hz}$ , 1H), 8.11 (dd,  $J=5.6, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 3.72-3.64 (m, 2H), 1.85-1.72 (m, 2H), 1.03 (t,  $J=7.4\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 306.1。

[2280] 实例162: 2- (3-氯吡啶-4-基) -N-丙基吡啶并 [3,4-d] 嘧啶-4-胺

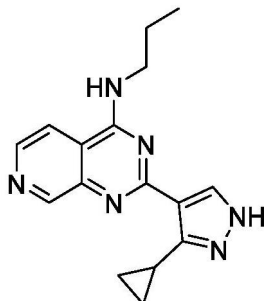
[2281]



[2282]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.15 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.89 (t,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 8.78 (d,  $J=0.6\text{Hz}$ , 1H), 8.68 (dd,  $J=12.2, 5.2\text{Hz}$ , 2H), 8.22 (dd,  $J=5.6, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 7.82 (dd,  $J=4.9, 0.6\text{Hz}$ , 1H), 3.60-3.52 (m, 2H), 1.76-1.65 (m, 2H), 0.95 (t,  $J=7.4\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 300.1。

[2283] 实例163: 2-(3-环丙基-1H-吡唑-4-基)-N-丙基吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

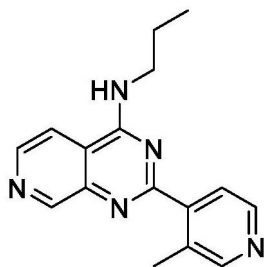
[2284]



[2285]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.47 (s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.54 (t,  $J=5.4\text{Hz}$ , 1H), 8.48 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 8.06 (dd,  $J=5.6, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 3.55 (dt,  $J=7.8, 5.9\text{Hz}$ , 2H), 3.24 (t,  $J=7.1\text{Hz}$ , 1H), 3.17 (d,  $J=5.1\text{Hz}$ , 1H), 1.77-1.63 (m, 2H), 0.93 (m, 7H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 295.2。

[2286] 实例164: 2-(3-甲基吡啶-4-基)-N-丙基吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

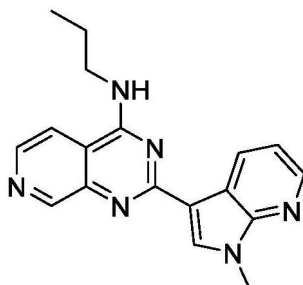
[2287]



[2288]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.14 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.79 (t,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.65 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 8.58-8.52 (m, 2H), 8.20 (dd,  $J=5.6, 1.0\text{Hz}$ , 1H), 7.85 (d,  $J=5.0\text{Hz}$ , 1H), 3.62-3.54 (m, 2H), 2.60 (s, 3H), 1.77-1.66 (m, 2H), 0.97 (t,  $J=7.4\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 280.2。

[2289] 实例165: 2-{1-甲基-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基}-N-丙基吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

[2290]

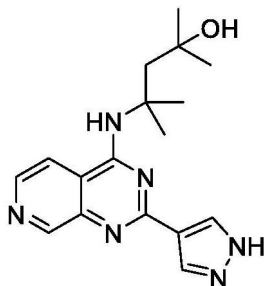


[2291]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.06 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.97 (dd,  $J=7.9, 1.7\text{Hz}$ , 1H), 8.48 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 2H), 8.44 (s, 1H), 8.36 (dd,  $J=4.7, 1.7\text{Hz}$ , 1H), 8.09 (dd,  $J=5.7, 1.0\text{Hz}$ , 1H), 7.29 (dd,  $J=7.9, 4.6\text{Hz}$ , 1H), 3.94 (s, 3H), 3.72-3.64 (m, 2H), 1.85-1.73 (m, 2H), 1.04

(t, J=7.4Hz, 3H). LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 319.2。

[2292] 实例166: 2,4-二甲基-4-{[2-(1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}戊-2-醇

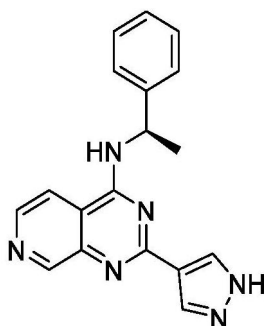
[2293]



[2294] <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 1.29 (s, 6H), 1.72 (s, 6H), 1.98 (s, 2H), 5.5 (s, 1H, NH), 7.69 (d, J=3.6Hz, 1H), 8.09 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.48 (d, J=3.6Hz, 1H), 8.99 (s, 1H), 9.13 (s, 1H). LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 327.2。

[2295] 实例167: N-[(1R)-1-苯基乙基]-2-(1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

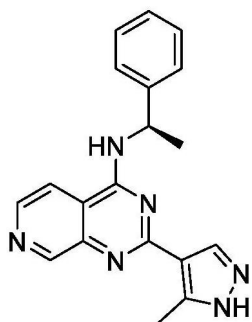
[2296]



[2297] <sup>1</sup>H NMR (MeOH-d<sub>4</sub>) δ 1.70 (d, J=6.8Hz, 3H), 5.63 (m, 1H), 7.21 (m, 1H), 7.32 (m, 2H), 7.49 (m, 2H), 8.17 (d, J=5.6Hz, 1H), 8.20-8.23 (2H), 8.48 (d, J=5.6Hz, 1H), 9.00 (s, 1H). LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 317.2。

[2298] 实例168: 2-(5-甲基-1H-吡唑-4-基)-N-[(1R)-1-苯基乙基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

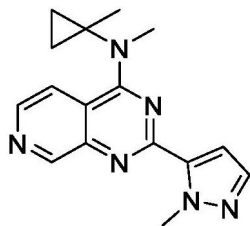
[2299]



[2300] <sup>1</sup>H NMR (MeOH-d<sub>4</sub>) δ 1.70 (d, J=6.8Hz, 3H), 2.54 (s, 3H), 5.65 (m, 1H), 7.20 (m, 1H), 7.32 (m, 2H), 7.44 (m, 2H), 8.14-8.18 (2H), 8.46 (s, 1H), 9.00 (s, 1H). LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 331.2。

[2301] 实例169: N-甲基-2-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

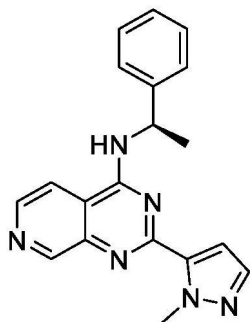
[2302]



[2303]  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  0.95 (s, 4H), 1.70 (s, 3H), 3.38 (s, 3H), 4.35 (s, 3H), 7.04 (d,  $J=2.0\text{Hz}$ , 1H), 7.51 (d,  $J=2.0\text{Hz}$ , 1H), 8.16 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.56 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 9.16 (s, 1H). LCMS ( $m/z$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ ): 295.2.

[2304] 实例170: 2-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)-N-[(1R)-1-苯基乙基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

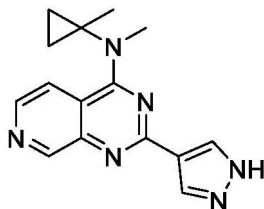
[2305]



[2306]  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{MeOH}-d_4$ )  $\delta$  1.60 (d,  $J=7.2\text{Hz}$ , 3H), 4.02 (s, 3H), 5.46 (m, 1H), 6.86 (d,  $J=2\text{Hz}$ , 1H), 7.10 (m, 1H), 7.22 (m, 2H), 7.33 (m, 2H), 8.11 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.44 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.96 (s, 1H). LCMS ( $m/z$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ ): 331.2.

[2307] 实例171: N-甲基-N-(1-甲基环丙基)-2-(1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

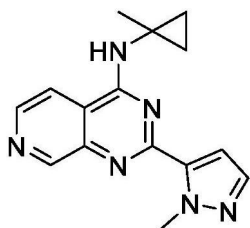
[2308]



[2309]  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  0.92 (s, 4H), 1.68 (s, 3H), 3.37 (s, 3H), 8.10 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.13 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.45 (m, 1H), 9.05 (s, 1H). LCMS ( $m/z$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ ): 281.1.

[2310] 实例172: 2-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

[2311]

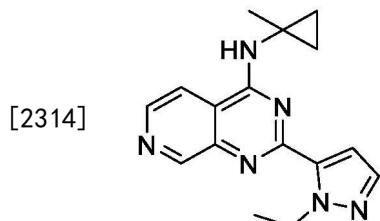


[2312]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, 甲醇- $d_4$ )  $\delta$  8.99 (s, 1H), 8.43 (d,  $J=5.7\text{Hz}$ , 1H), 7.87 (dd,  $J=5.7$ , 0.8Hz, 1H), 7.48 (d,  $J=2.0\text{Hz}$ , 1H), 7.08 (d,  $J=2.0\text{Hz}$ , 1H), 4.42 (s, 3H), 1.55 (s, 3H), 0.98-



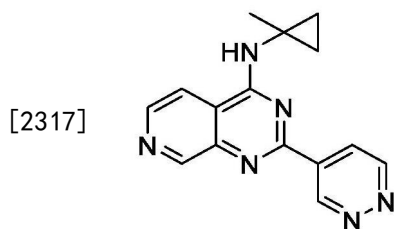
0.93 (m, 2H), 0.85-0.80 (m, 2H). LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 281.1。

[2313] 实例173: 2-(1-乙基-1H-吡唑-5-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



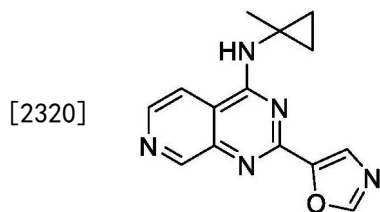
[2315] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, 甲醇-d<sub>4</sub>) δ 9.10 (s, 1H), 8.52 (s, 1H), 7.98 (d, J=5.5Hz, 1H), 7.56 (d, J=2.0Hz, 1H), 7.15 (d, J=2.0Hz, 1H), 5.07 (q, J=7.1Hz, 2H), 1.59 (s, 3H), 1.49 (t, J=7.1Hz, 3H), 1.04-0.95 (m, 2H), 0.93-0.76 (m, 2H). LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 295.2。

[2316] 实例174: N-(1-甲基环丙基)-2-(吡嗪-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



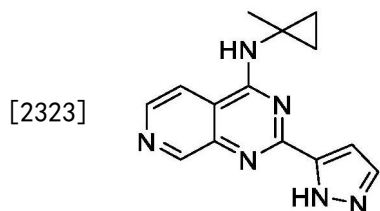
[2318] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, 甲醇-d<sub>4</sub>) δ 10.19 (dd, J=2.1, 1.3Hz, 1H), 9.39 (dd, J=5.3, 1.2Hz, 1H), 9.20 (d, J=0.8Hz, 1H), 8.70 (dd, J=5.3, 2.2Hz, 1H), 8.57 (d, J=5.7Hz, 1H), 8.01 (dd, J=5.7, 0.8Hz, 1H), 1.64 (s, 3H), 1.04-0.98 (m, 2H), 0.97-0.91 (m, 2H). LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 279.1。

[2319] 实例175: N-(1-甲基环丙基)-2-(1,3-噁唑-5-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



[2321] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, 甲醇-d<sub>4</sub>) δ 9.12 (s, 1H), 8.53 (d, J=5.7Hz, 1H), 8.46 (s, 1H), 7.99-7.95 (m, 1H), 7.95 (s, 1H), 1.60 (s, 3H), 0.96 (m, 2H), 0.88 (m, 2H). LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 268.1。

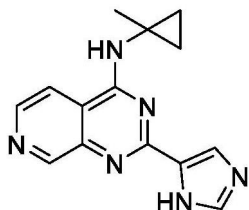
[2322] 实例176: N-(1-甲基环丙基)-2-(1H-吡唑-5-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



[2324] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, 甲醇-d<sub>4</sub>) δ 9.09 (d, J=0.8Hz, 1H), 8.44 (s, 1H), 7.94 (dd, J=5.7, 0.8Hz, 1H), 7.69 (d, J=2.1Hz, 1H), 7.11 (d, J=2.1Hz, 1H), 1.60 (s, 3H), 0.94 (m, 2H), 0.90-0.84 (m, 2H). LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 267.1。

[2325] 实例177:2-(1H-咪唑-5-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

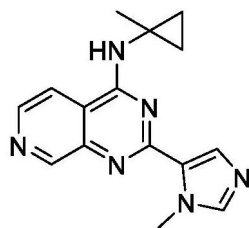
[2326]



[2327]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, 甲醇- $d_4$ )  $\delta$ 9.06 (s, 1H), 8.44 (d,  $J=5.7\text{Hz}$ , 1H), 8.16 (s, 1H), 7.98-7.90 (m, 2H), 1.60 (s, 3H), 0.95 (m, 2H), 0.92-0.84 (m, 2H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 267.1。

[2328] 实例178:2-(1-甲基-1H-咪唑-5-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

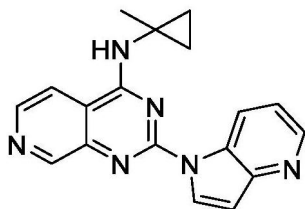
[2329]



[2330]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, 甲醇- $d_4$ )  $\delta$ 9.03 (s, 1H), 8.41 (d,  $J=5.7\text{Hz}$ , 1H), 7.90 (dd,  $J=5.7$ , 0.8Hz, 1H), 7.70 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 2H), 4.25 (s, 3H), 1.57 (s, 3H), 0.99-0.94 (m, 2H), 0.85-0.79 (m, 2H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 281.1。

[2331] 实例179:N-(1-甲基环丙基)-2-{1H-吡咯并[3,2-b]吡啶-1-基}吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

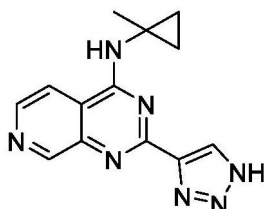
[2332]



[2333]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ 9.69 (d,  $J=8.3\text{Hz}$ , 1H), 9.39 (s, 1H), 9.18 (s, 1H), 8.88 (d,  $J=3.5\text{Hz}$ , 1H), 8.72 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.18 (d,  $J=5.4\text{Hz}$ , 1H), 7.71 (s, 1H), 7.10-7.02 (m, 1H), 1.59 (s, 3H), 0.99 (m, 2H), 0.98-0.95 (m, 2H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 317.1。

[2334] 实例180:N-(1-甲基环丙基)-2-(1H-1,2,3-三唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

[2335]



[2336]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ 9.19 (s, 1H), 8.64 (d,  $J=5.0\text{Hz}$ , 1H), 8.51 (s, 1H), 8.16 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 1.55 (s, 3H), 0.90 (m, 2H), 0.87 (m, 2H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 268.1。

[2337] 实例181:2-(3-甲基-1,2-噁唑-5-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

[2338]



[2339]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, 氯仿- $d$ )  $\delta$  9.41 (s, 1H), 8.63 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 7.43 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 6.98 (s, 1H), 2.44 (s, 3H), 1.60 (s, 3H), 0.99-0.93 (m, 2H), 0.93-0.85 (m, 2H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 282.1。

[2340] 实例182: N-(1-甲基环丙基)-2-(2H-1,2,3,4-四唑-5-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

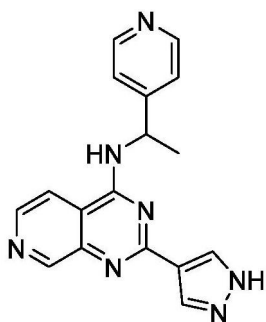
[2341]



[2342]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.21 (s, 2H), 8.69 (s, 1H), 8.21 (d,  $J=5.2\text{Hz}$ , 1H), 1.57 (s, 3H), 0.89 (m, 2H), 0.85 (m, 2H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 269.1。

[2343] 实例183: 2-(1H-吡唑-4-基)-N-[1-(吡啶-4-基)乙基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

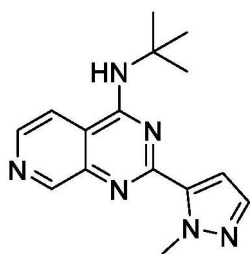
[2344]



[2345]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, 甲醇- $d_4$ )  $\delta$  9.17 (s, 1H), 8.75 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 3H), 8.37 (d,  $J=4.8\text{Hz}$ , 1H), 8.32 (d,  $J=1.6\text{Hz}$ , 2H), 8.14-8.09 (m, 2H), 5.89 (q,  $J=7.3\text{Hz}$ , 1H), 1.84 (d,  $J=7.2\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 318.1。

[2346] 实例184: N-叔-丁基-2-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

[2347]

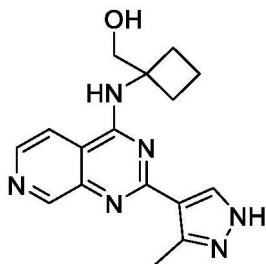


[2348]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.13 (d,  $J=2.5\text{Hz}$ , 1H), 8.61 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.38 (t,  $J=5.2\text{Hz}$ , 1H), 7.85 (d,  $J=7.9\text{Hz}$ , 1H), 7.53 (d,  $J=1.9\text{Hz}$ , 1H), 6.97 (d,  $J=1.9\text{Hz}$ , 1H), 4.37 (s, 3H), 1.59 (s, 9H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 283.1。

[2349] 实例185: (1-{[2-(3-甲基-1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}环丁

基) 甲醇

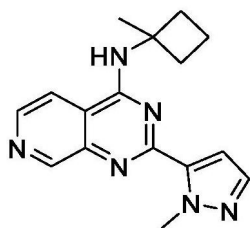
[2350]



[2351]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.07 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.38 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.25-8.12 (m, 1H), 3.93 (s, 2H), 2.62 (s, 3H), 2.39 (t,  $J=7.8\text{Hz}$ , 4H), 1.85 (dq,  $J=12.0$ , 8.4Hz, 2H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 311.2。

[2352] 实例186: 2-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)-N-(1-甲基环丁基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

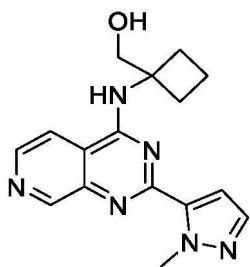
[2353]



[2354]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.12 (s, 1H), 8.78 (s, 1H), 8.62 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.31-8.24 (m, 1H), 7.53-7.46 (m, 1H), 6.97 (d,  $J=1.9\text{Hz}$ , 1H), 4.38-4.31 (m, 3H), 2.48-2.41 (m, 2H), 2.22 (tt,  $J=8.4, 3.2\text{Hz}$ , 2H), 1.98-1.78 (m, 2H), 1.65 (s, 3H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 295.2。

[2355] 实例187: (1-{[2-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}环丁基) 甲醇

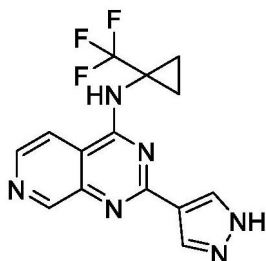
[2356]



[2357]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.19-9.11 (m, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.63 (d,  $J=5.7\text{Hz}$ , 1H), 8.40 (dd,  $J=5.7, 0.7\text{Hz}$ , 1H), 7.54-7.47 (m, 1H), 6.95 (d,  $J=1.9\text{Hz}$ , 1H), 4.32 (s, 3H), 3.90 (s, 2H), 2.35 (t,  $J=7.2\text{Hz}$ , 4H), 1.92-1.76 (m, 2H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 311.2。

[2358] 实例188: 2-(1H-吡唑-4-基)-N-[1-(三氟甲基)环丙基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

[2359]



[2360]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.21 (s, 1H), 9.10 (s, 1H), 8.56 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.27 (s, 2H), 8.16 (d,  $J=5.7\text{Hz}$ , 1H), 1.61-1.53 (m, 2H), 1.33 (d,  $J=6.0\text{Hz}$ , 2H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 321.1。

[2361] 实例189: 2-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)-N-[1-(三氟甲基)环丙基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

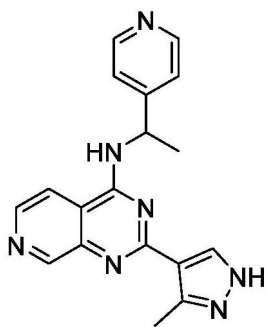
[2362]



[2363]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.32 (s, 1H), 9.19 (d,  $J=0.7\text{Hz}$ , 1H), 8.65 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.23 (dd,  $J=5.7, 0.8\text{Hz}$ , 1H), 7.58-7.47 (m, 1H), 7.07 (d,  $J=1.9\text{Hz}$ , 1H), 4.37 (s, 3H), 1.64-1.49 (m, 2H), 1.37 (d,  $J=5.8\text{Hz}$ , 2H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 335.1。

[2364] 实例190: 2-(3-甲基-1H-吡唑-4-基)-N-[1-(吡啶-4-基)乙基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

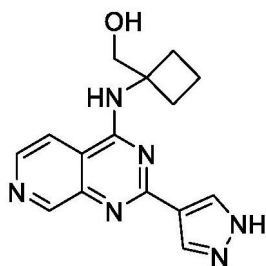
[2365]



[2366]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.00 (d,  $J=0.7\text{Hz}$ , 1H), 8.77 (s, 1H), 8.54 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.51-8.47 (m, 2H), 8.30 (dd,  $J=5.6, 0.8\text{Hz}$ , 1H), 7.99 (s, 1H), 7.50-7.40 (m, 2H), 5.54 (d,  $J=6.6\text{Hz}$ , 1H), 2.48 (s, 3H), 1.63 (d,  $J=7.1\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 332.2。

[2367] 实例191: (1-{[2-(1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基}环丁基)甲醇

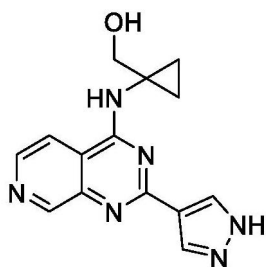
[2368]



[2369]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.11 (m, 2H), 8.69 (m, 2H), 8.39 (s, 2H), 3.92 (s, 2H), 2.39 (t,  $J=7.3\text{Hz}$ , 4H), 1.87 (p,  $J=7.7, 6.6\text{Hz}$ , 2H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 297.1.

[2370] 实例192: (1-([2-(1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基]氨基)环丙基)甲醇

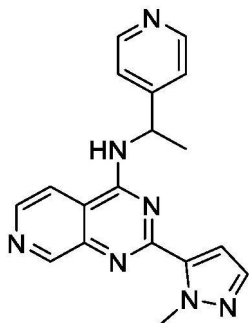
[2371]



[2372]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.65 (s, 1H), 9.12 (s, 1H), 8.65 (d,  $J=5.4\text{Hz}$ , 1H), 8.41 (s, 2H), 8.26 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 3.73 (m, 2H), 1.06-0.96 (m, 2H), 0.94-0.77 (m, 2H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 283.1.

[2373] 实例193: 2-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)-N-[1-(吡啶-4-基)乙基]吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

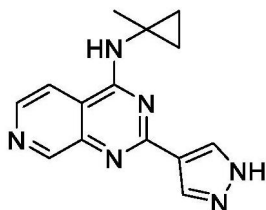
[2374]



[2375]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.37 (s, 1H), 7.93 (d,  $J=6.4\text{Hz}$ , 2H), 7.85 (d,  $J=5.7\text{Hz}$ , 1H), 7.51 (d,  $J=5.7\text{Hz}$ , 1H), 7.31 (d,  $J=6.6\text{Hz}$ , 2H), 6.63 (d,  $J=2.0\text{Hz}$ , 1H), 6.01 (d,  $J=2.0\text{Hz}$ , 1H), 4.89 (q,  $J=7.2\text{Hz}$ , 1H), 3.43 (s, 3H), 1.00 (d,  $J=7.2\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $m/z$  [M+H] $^+$ ): 332.2.

[2376] 实例194: N-(1-甲基环丙基)-2-(1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺

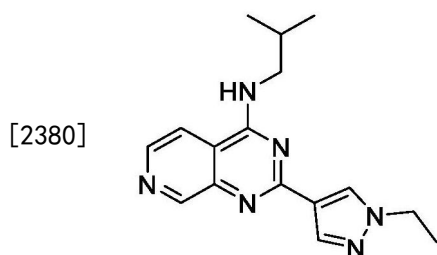
[2377]



[2378]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, CD $_3$ OD)  $\delta$  9.03 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.43 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.24 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.20 (s, 1H), 7.93 (dd,  $J=5.6, 0.8\text{Hz}$ , 1H), 1.61 (s, 3H), 0.99-0.95 (m, 2H),

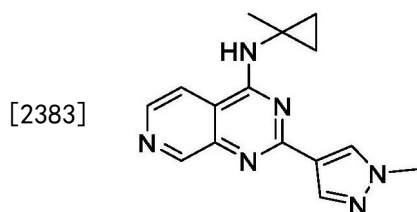
0.90-0.85 (m, 2H) .LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>) :267.1。

[2379] 实例195:2-(1-乙基-1H-吡唑-4-基)-N-(2-甲基丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



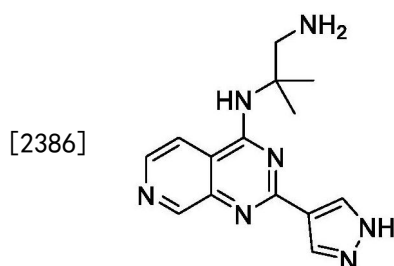
[2381] <sup>1</sup>HNMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.20 (s, 1H) , 8.50 (d, J=5.6Hz, 1H) , 8.24 (s, 1H) , 8.20 (s, 1H) , 7.43 (d, J=5.6Hz, 1H) , 5.87 (br s, 1H) , 4.25 (q, J=7.2Hz, 2H) , 3.58 (dd, J=6.8, 6.0Hz, 2H) , 2.11 (九重峰, J=6.8Hz, 1H) , 1.56 (t, J=7.2Hz, 3H) , 1.06 (d, J=6.8Hz, 6H) .LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>) :297.2。

[2382] 实例196:2-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)-N-(1-甲基环丙基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



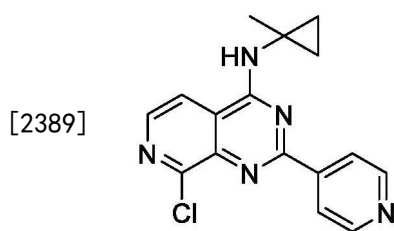
[2384] <sup>1</sup>HNMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.99 (s, 1H) , 8.72 (s, 1H) , 8.46 (d, J=5.6Hz, 1H) , 8.33 (s, 1H) , 8.05 (s, 1H) , 8.03 (d, J=5.6Hz, 1H) , 3.93 (s, 3H) , 1.54 (s, 3H) , 0.90-0.80 (m, 4H) .LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>) :281.1。

[2385] 实例197:N-(1-氨基-2-甲基丙-2-基)-2-(1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



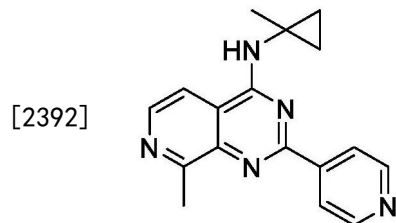
[2387] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.05 (s, 1H) , 8.56 (d, J=5.4Hz, 1H) , 8.32 (d, J=5.6Hz, 1H) , 8.28 (m, 1H) , 7.76 (m, 3H) , 3.63 (d, J=5.9Hz, 2H) , 1.59 (s, 6H) .LCMS (M/Z [M+H]<sup>+</sup>) :284.2。

[2388] 实例198:8-氯-N-(1-甲基环丙基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



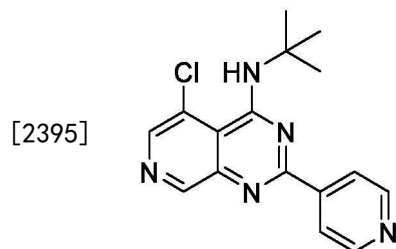
[2390] 如方案3使用实例1中的程序使用1-甲基环丙胺由4-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶(中间体3c)来制备标题化合物。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, 甲醇-d<sub>4</sub>) δ8.78-8.66 (m, 2H), 8.61-8.49 (m, 2H), 8.30 (d, J=5.6Hz, 1H), 7.94 (d, J=5.6Hz, 1H), 1.63 (s, 3H), 1.04-0.96 (m, 2H), 0.95-0.86 (m, 2H). LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 312.1。

[2391] 实例199: 8-甲基-N-(1-甲基环丙基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



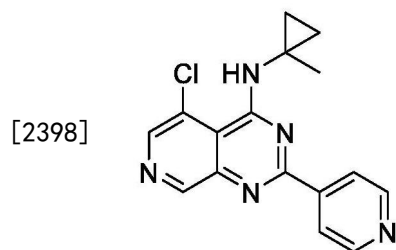
[2393] 使用针对中间体6b的程序使用2,4,6-三甲基-1,3,5,2,4,6-三氧杂三硼杂环己烷代替4-吡啶硼酸,由实例198制备标题化合物。<sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ8.79 (d, J=5.1Hz, 2H), 8.44 (d, J=5.6Hz, 1H), 8.41 (d, J=5.0Hz, 2H), 7.98 (dd, J=5.8, 0.8Hz, 1H), 2.91 (s, 3H), 1.57 (s, 3H), 0.97-0.75 (m, 4H). LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 292.2。

[2394] 实例251: N-(叔-丁基)-5-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



[2396] 如方案5使用实例1的步骤C使用叔丁胺由4,5-二氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶(中间体5d)制备标题化合物。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, 甲醇-d<sub>4</sub>) δ9.07 (s, 1H), 8.73 (s, 2H), 8.55 (s, 1H), 8.46-8.39 (m, 2H), 1.72 (s, 9H). LCMS (M/Z [M+H]<sup>+</sup>): 314.1。

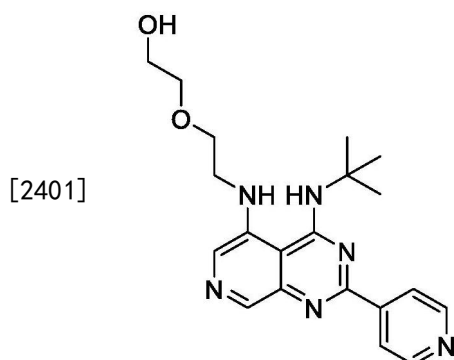
[2397] 实例252: 5-氯-N-(1-甲基环丙基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



[2399] 如实例251使用4,5-二氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶(中间体5d)和1-甲基环丙-1-胺制备标题化合物。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.18 (s, 1H), 8.81 (br s, 2H), 8.50 (s, 1H), 8.42 (d, J=4.8Hz, 2H), 8.00 (br s, 1H), 1.64 (s, 3H), 1.00-0.90 (m, 4H). LCMS (M/Z [M+H]<sup>+</sup>): 312.1。

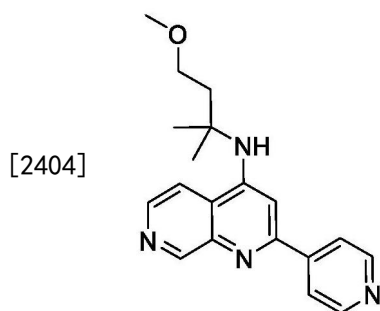
[2400] 实例253: 5-氯-N-(1-甲基环丙基)-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺





[2402] 将N-(叔-丁基)-5-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺(实例251,10mg,0.032mmol)和2-(2-氨基乙氧基)乙醇(670mg,6.37mmol)溶于2ml微波反应器中的NMP(1mL)中。将反应在160℃下加热1小时(微波照射)。将反应冷却至室温,并用水(20mL)稀释,用EtOAc(3x 20mL)萃取。将合并的有机层经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并蒸发。将残余物通过质量触发HPLC纯化,得到标题化合物(40%)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,甲醇-d<sub>4</sub>) δ8.63(s,1H),8.23(d,J=5.7Hz,2H),8.18(d,J=5.7Hz,2H),8.08(s,1H),3.4-3.8(m,8H),1.72(s,9H)。LCMS(M/Z[M+H]<sup>+</sup>):383.2。

[2403] 实例254:N-(4-甲氧基-2-甲基丁-2-基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺



[2405] 使用方案6中的步骤B,由4-氯-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶(中间体6b)制备标题化合物。

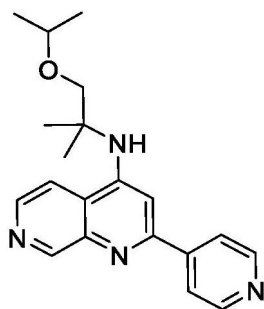
[2406] 步骤B:在20ml的小瓶中添加在DMSO(1mL)中的三乙胺(0.044mL,0.25mmol)、氟化钾(7.2mg,0.124mmol)、4-氯-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶(中间体6b,30mg,0.124mmol)和4-甲氧基-2-甲基丁-2-胺(16mg,0.137mmol),得到黄色悬浮液。将反应混合物在130℃下搅拌24小时。在空气流下蒸发溶剂。将残余物通过在COMBIFLASH®系统(ISCO)上的快速色谱(使用0-10%MeOH/DCM)进行纯化,得到标题化合物(21%)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ9.20(d,J=0.7Hz,1H),8.71(m,2H),8.48(d,J=5.8Hz,1H),8.09(ddd,J=12.9,5.2,1.3Hz,2H),8.05(m,1H),7.26(s,1H),6.81(s,1H),3.50(t,J=6.5Hz,2H),3.22(s,3H),2.11(t,J=6.5Hz,2H),1.52(s,6H)。LCMS(M/Z[M+H]<sup>+</sup>):323.2。

[2407] 实例255-268:

[2408] 根据实例1描述的方案,分别使用4-氯-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶(中间体6b)和各种胺合成这些化合物,除非特别说明。

[2409] 实例255:N-[2-甲基-1-(丙-2-基氧基)丙-2-基]-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺

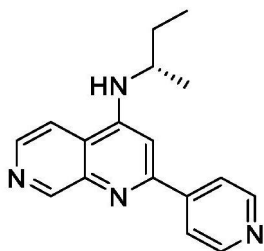
[2410]



[2411]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.18 (dd,  $J=7.4, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.80 (m, 2H), 8.64 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.39 (dd,  $J=5.7, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.29 (d,  $J=6.1\text{Hz}$ , 2H), 7.70 (s, 1H), 3.90 (s, 2H), 3.55-3.50 (m, 1H), 1.61 (s, 6H), 1.00 (s, 6H). LCMS ( $M/Z[M+H]^+$ ): 337.2.

[2412] 实例256: N-[(2S)-丁-2-基]-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺

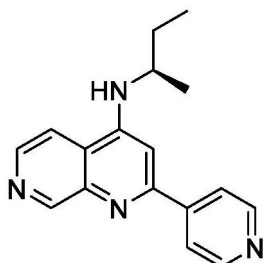
[2413]



[2414]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.21 (d,  $J=7.4, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.73 (m, 2H), 8.49 (m, 1H), 8.29 (d,  $J=6.1\text{Hz}$ , 1H), 8.20 (m, 2H), 7.24 (s, 1H), 7.19 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 4.02-3.99 (m, 1H), 1.79-1.75 (m, 1H), 1.69-1.65 (m, 1H), 1.29 (m, 3H), 0.09 (t,  $J=4.9\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $M/Z[M+H]^+$ ): 279.1.

[2415] 实例257: N-[(2R)-丁-2-基]-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺

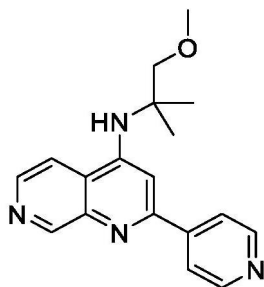
[2416]



[2417]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.21 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.73 (m, 2H), 8.49 (d,  $J=5.8\text{Hz}$ , 1H), 8.29 (dd,  $J=5.9, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.20 (m, 2H), 7.24 (s, 1H), 7.19 (d,  $J=8.3\text{Hz}$ , 1H), 4.02-3.99 (dt,  $J=13.6, 6.5\text{Hz}$ , 1H), 1.79-1.75 (dq,  $J=14.4, 7.2\text{Hz}$ , 1H), 1.69-1.65 (m, 1H), 1.29 (d,  $J=6.4\text{Hz}$ , 3H), 0.09 (t,  $J=7.4\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $M/Z[M+H]^+$ ): 279.3.

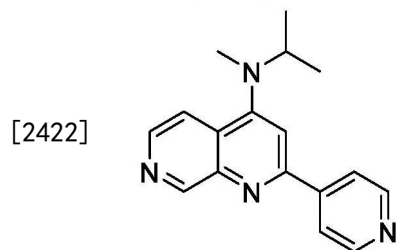
[2418] 实例258: N-(1-甲氧基-2-甲基丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺

[2419]



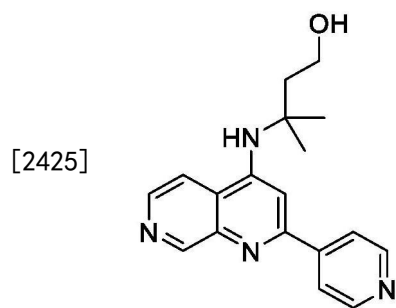
[2420]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.25 (dd,  $J=6.6, 0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.77 (m, 2H), 8.75 (s, 1H), 8.24 (dt,  $J=4.5, 1.9\text{Hz}$ , 2H), 8.21 (s, 1H), 8.11 (m, 1H), 7.52 (s, 1H), 3.62 (s, 2H), 3.34 (s, 3H), 1.52 (s, 6H). LCMS ( $M/Z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 309.4。

[2421] 实例259: N-甲基-N-(丙-2-基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺



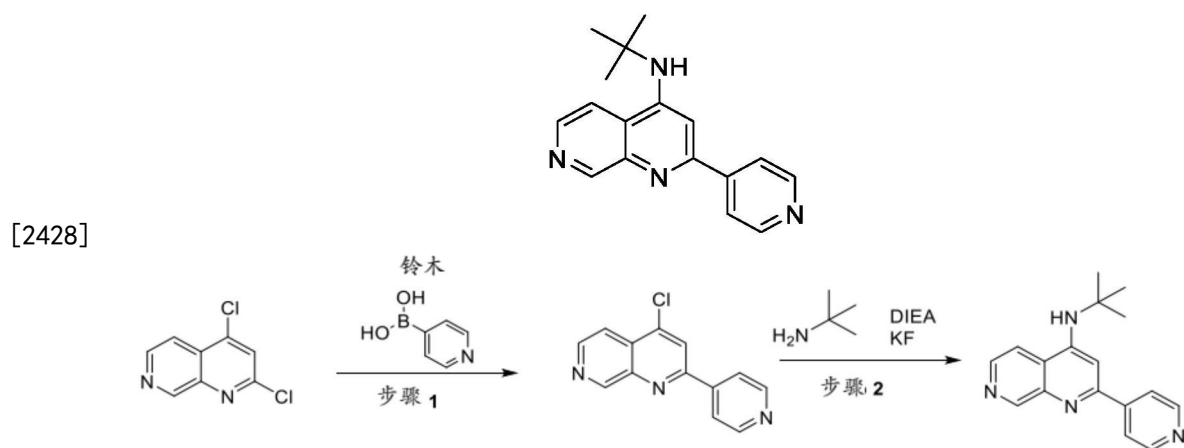
[2423]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.34 (dd,  $J=5.2, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.77 (ddd,  $J=6.2, 4.4, 1.7\text{Hz}$ , 2H), 8.50 (dd,  $J=6.5, 5.8\text{Hz}$ , 1H), 8.20 (m, 2H), 7.80 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 4.20-4.14 (m, 1H), 2.97 (s, 3H), 1.25 (s, 6H). LCMS ( $M/Z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 279.4。

[2424] 实例260: 3-甲基-3-{[2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-基]氨基}丁-1-醇



[2426]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.40 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.79 (m, 2H), 8.60 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.26 (m, 2H), 7.95 (dd,  $J=5.6, 1.0\text{Hz}$ , 1H), 7.89 (s, 1H), 4.55 (t,  $J=6.8\text{Hz}$ , 2H), 4.08-4.04 (q,  $J=5.2\text{Hz}$ , 1H), 1.95 (t,  $J=6.9\text{Hz}$ , 2H), 1.14 (s, 6H). LCMS ( $M/Z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 309.3。

[2427] 实例261: N-(叔-丁基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺

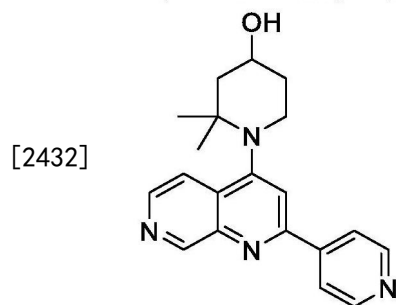


[2429] 步骤1: 在20mL微波反应器中添加在乙腈(体积:2mL)中的钯四(58.1mg, 0.050mmol), 碳酸钾(1.256mL, 2.51mmol)和2,4-二氯-1,7-萘啶(200mg, 1.005mmol)和吡啶-4-基硼酸(130mg, 1.055mmol), 得到橙色悬浮液。将反应混合物在微波下于120℃搅拌60分钟。将粗混合物用DCM、 $\text{H}_2\text{O}$ 稀释, 分离并用DCM $\times 3$ 萃取。将有机层合并并经 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥, 过滤

并浓缩。将残余物通过在COMBIFLASH®系统 (ISCO) 上的快速色谱 (使用0-10%MeOH/DCM) 进行纯化,得到产物 (62%)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ9.58 (d, J=0.9Hz, 1H), 8.85-8.78 (m, 4H), 8.32-8.29 (m, 2H), 8.11 (dd, J=5.8, 0.9Hz, 1H)。LCMS [M+H]<sup>+</sup>=242。

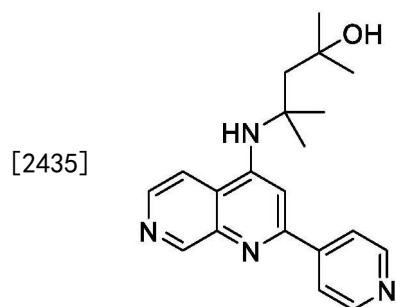
[2430] 步骤2: 在40ml小瓶中, 添加在DMSO (体积: 2mL) 中的氟化钾 (11.54mg, 0.199mmol)、4-氯-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶 (40mg, 0.166mmol) 和2-甲基丙-2-胺 (0.035mL, 0.331mmol), 得到黄色悬浮液。将反应混合物在130℃下搅拌24小时。在空气流下蒸发溶剂。将残余物通过在COMBIFLASH®系统 (ISCO) 上的快速色谱 (使用0-10%MeOH/DCM) 进行纯化, 得到产物 (82%)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ9.22 (d, J=0.7Hz, 1H), 8.78-8.72 (m, 2H), 8.48 (d, J=5.8Hz, 1H), 8.30 (dd, J=6.0, 0.9Hz, 1H), 8.15-8.06 (m, 2H), 7.28 (s, 1H), 6.73 (s, 1H), 1.56 (s, 9H)。LCMS [M+H]<sup>+</sup>=279.2。

[2431] 实例262: 2,2-二甲基-1-[2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-基]哌啶-4-醇



[2433] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, 丙酮-d<sub>6</sub>) δ9.41 (d, J=0.9Hz, 1H), 8.80-8.75 (m, 2H), 8.60 (d, J=5.7Hz, 1H), 8.23-8.20 (m, 2H), 8.18-8.14 (m, 1H), 8.11 (s, 1H), 4.15-3.99 (m, 1H), 3.52 (d, J=16.1Hz, 1H), 3.16 (s, 1H), 1.86-1.68 (m, 2H), 1.46 (d, J=16.0Hz, 3H), 1.16-1.00 (m, 3H), 0.87 (d, J=6.8Hz, 2H)。LCMS (M/Z [M+H]<sup>+</sup>): 335.2。

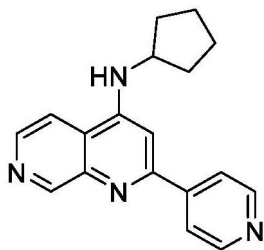
[2434] 实例263: 2,4-二甲基-4-{[2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-基]氨基}戊-2-醇



[2436] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, 丙酮-d<sub>6</sub>) δ9.22 (d, J=0.8Hz, 1H), 8.78-8.67 (m, 2H), 8.63 (s, 1H), 8.40 (d, J=5.8Hz, 1H), 8.19-8.09 (m, 2H), 7.81 (dd, J=5.9, 0.9Hz, 1H), 7.36 (s, 1H), 2.08 (s, 2H), 1.75 (s, 6H), 1.47 (d, J=0.7Hz, 6H)。LCMS (M/Z [M+H]<sup>+</sup>): 337.2。

[2437] 实例264: N-环戊基-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺

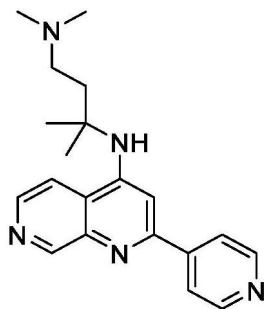
[2438]



[2439]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, 丙酮- $d_6$ )  $\delta$  9.26 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.77-8.66 (m, 2H), 8.44 (d,  $J=5.8\text{Hz}$ , 1H), 8.23-8.15 (m, 2H), 8.06 (dd,  $J=5.8, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 7.34 (s, 1H), 6.70 (d,  $J=6.6\text{Hz}$ , 1H), 4.40-4.25 (m, 1H), 2.29-2.19 (m, 2H), 1.86-1.68 (m, 6H). LCMS ( $M/Z[M+H]^+$ ): 279.1。

[2440] 实例265: 二甲基 (3-甲基-3-{[2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-基]氨基} 丁基) 胺

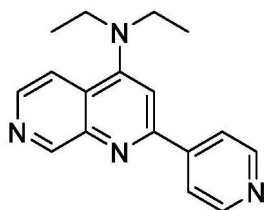
[2441]



[2442]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, 甲醇- $d_4$ )  $\delta$  9.40 (s, 1H), 8.91 (s, 2H), 8.62 (d,  $J=3.5\text{Hz}$ , 1H), 8.48 (s, 2H), 8.40 (d,  $J=6.0\text{Hz}$ , 1H), 7.46 (d,  $J=2.8\text{Hz}$ , 1H), 3.28-3.23 (m, 2H), 2.92-2.81 (m, 6H), 2.48 (dd,  $J=8.3, 5.1\text{Hz}$ , 2H), 1.71 (d,  $J=2.7\text{Hz}$ , 6H). LCMS ( $M/Z[M+H]^+$ ): 336.2。

[2443] 实例266: N,N-二乙基-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺

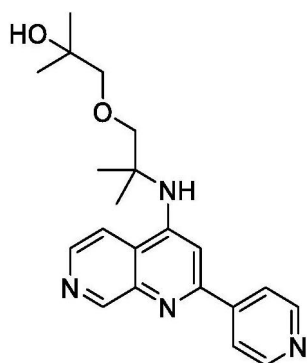
[2444]



[2445]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, 丙酮- $d_6$ )  $\delta$  9.35 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.78-8.74 (m, 2H), 8.51 (d,  $J=5.8\text{Hz}$ , 1H), 8.23-8.19 (m, 2H), 7.90 (dd,  $J=5.8, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 7.69 (s, 1H), 3.62 (q,  $J=7.1\text{Hz}$ , 4H), 1.29 (t,  $J=7.1\text{Hz}$ , 6H). LCMS ( $M/Z[M+H]^+$ ): 279.2。

[2446] 实例267: 2-甲基-1-(2-甲基-2-{[2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-基]氨基} 丙氧基) 丙-2-醇

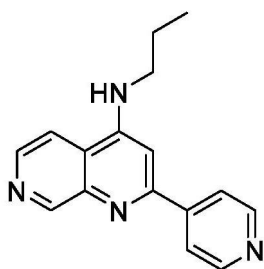
[2447]



[2448]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, 甲醇- $d_4$ )  $\delta$  9.25 (s, 1H), 8.73 (d,  $J=5.2\text{Hz}$ , 2H), 8.45 (d,  $J=5.9\text{Hz}$ , 1H), 8.14-8.08 (m, 3H), 7.40 (s, 1H), 3.73 (s, 2H), 3.39 (s, 2H), 1.63 (s, 6H), 1.18 (s, 6H). LCMS ( $M/Z[M+H]^+$ ): 367.2。

[2449] 实例268: N-丙基-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺

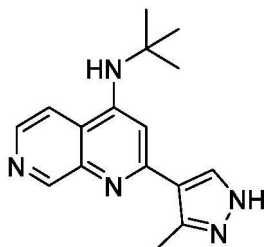
[2450]



[2451]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.22 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.77-8.70 (m, 2H), 8.48 (d,  $J=5.8\text{Hz}$ , 1H), 8.22-8.16 (m, 3H), 7.60 (t,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 7.21 (s, 1H), 3.43 (ddd,  $J=7.6, 6.6, 5.5\text{Hz}$ , 2H), 1.79-1.67 (m, 2H), 1.01 (t,  $J=7.4\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $M/Z[M+H]^+$ ): 265.1。

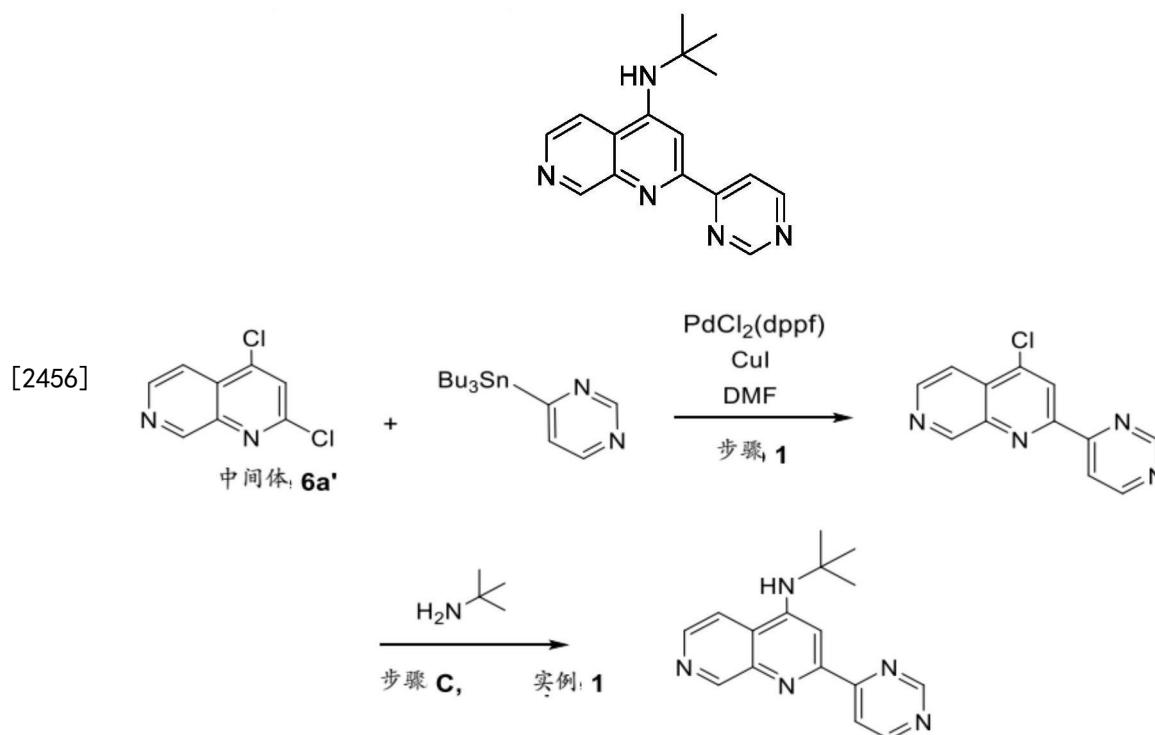
[2452] 实例269: N-叔-丁基-2-(3-甲基-1H-吡唑-4-基)-1,7-萘啶-4-胺

[2453]



[2454] 如方案6使用叔-丁基3-甲基-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-1H-吡唑-1-甲酸酯和叔-丁基胺由2,4-二氯-1,7-萘啶(中间体6a')制备标题化合物。  
 $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ ) 12.81 (s, 1H), 9.00 (d,  $J=0.7\text{Hz}$ , 1H), 8.31 (d,  $J=5.8\text{Hz}$ , 1H), 8.14 (dd,  $J=5.9, 0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.00 (s, 1H), 6.97 (s, 1H), 6.36 (s, 1H), 2.65 (s, 3H), 1.51 (s, 9H). LCMS ( $M/Z[M+H]^+$ ): 282.4。

[2455] 实例270: N-叔-丁基-2-(嘧啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺

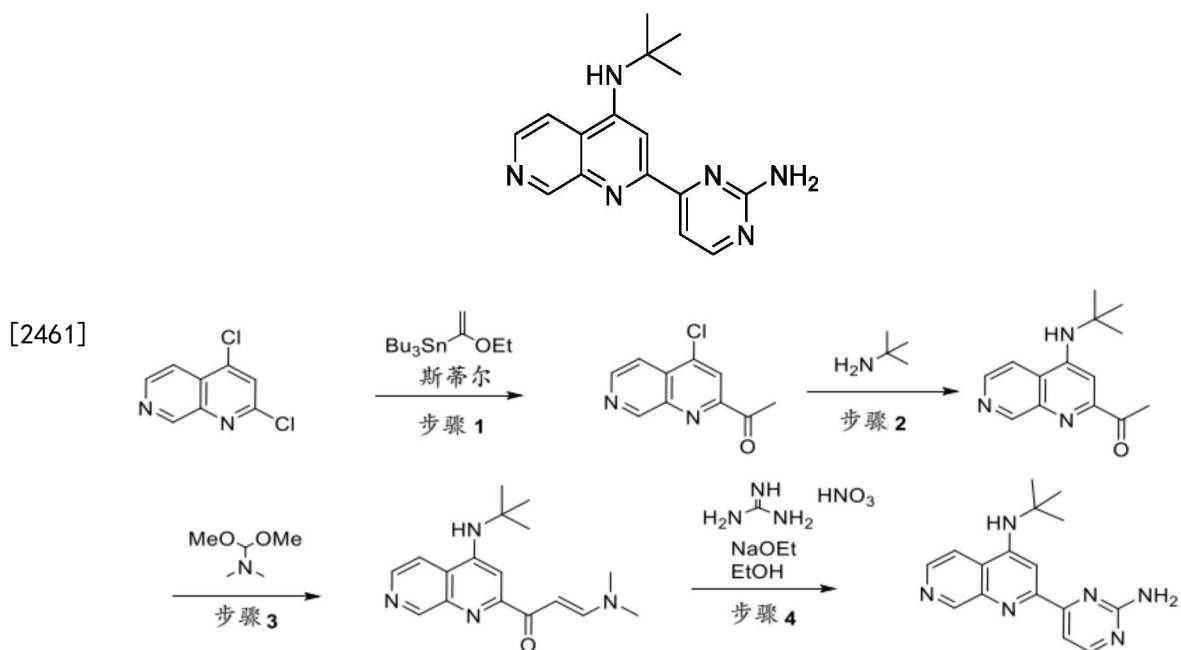


[2457] 步骤1:将2,4-二氯-1,7-萘啶 (**6a**, 100mg, 0.502mmol) 在干DMF中于室温搅拌。添加4-(三丁基甲锡烷基)嘧啶 (165uL, 0.502mmol), 然后添加41mg的PdCl<sub>2</sub>(dppf)·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>加合物 (41mg, 0.05mmol, 橙色固体), 最后添加CuI (10mg, 0.05mmol, 米色固体)。将反应在130℃下搅拌1小时。然后将反应浓缩, 并通过在COMBIFLASH®系统 (ISCO) 上的快速色谱 (使用0-10% MeOH/DCM) 进行纯化, 得到产物4-氯-2-(嘧啶-4-基)-1,7-萘啶 (30%)。LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 243.6。

[2458] 标题化合物: 然后使用实例1步骤C中详述的程序, 用4-氯-2-(嘧啶-4-基)-1,7-萘啶制备。

[2459] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.48 (d, J=1.4Hz, 1H), 9.25 (d, J=0.8Hz, 1H), 9.00 (d, J=5.3Hz, 1H), 8.54 (m, 1H), 8.50 (m, 1H), 8.31 (dd, J=6.1, 0.9Hz, 1H), 8.01 (s, 1H), 6.80 (s, 1H), 1.56 (s, 9H)。LCMS (M/Z [M+H]<sup>+</sup>): 280.3。

[2460] 实例271: 2-(2-氨基嘧啶-4-基)-N-叔-丁基-1,7-萘啶-4-胺



[2462] 步骤1:在室温下,将2,4-二氯-1,7-萘啶 (6a', 400mg, 2mmol)、Pd(dba)<sub>3</sub> (58mg, 0.1mmol) 和PPh<sub>3</sub> (53mg, 0.2mmol) 在3mL甲苯中搅拌15分钟。然后添加在1.5mL甲苯中的680微升三丁基(1-乙氧基乙烯基)锡烷 (680微升, 2mmol), 并将反应在110℃下搅拌1小时。将反应冷却至室温。添加4mL的1N HCl, 并将混合物搅拌过夜。然后将反应用NaOH中和并用醚萃取。然后将粗残余物通过在 **COMBIFLASH®** 系统 (ISCO) 上的快速色谱 (使用0-70% EtOAc/己烷) 进行纯化, 得到产物1-(4-氯-1,7-萘啶-2-基)乙酮 (40%)。LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 207.5。

[2463] 步骤2:将1-(4-氯-1,7-萘啶-2-基)乙酮 (38mg, 0.18mmol) 在室温下于DMF (2mL) 中搅拌, 并用N<sub>2</sub>脱气。添加TEA (37微升, 0.27mmol) 并搅拌5分钟, 然后添加14mg KF (14mg, 0.27mmol)。将所述混合物在室温搅拌15分钟, 然后添加2-甲基丙-2-胺 (28微升, 0.27mmol) 并脱气, 然后在80℃搅拌两小时。然后将反应浓缩并通过在 **COMBIFLASH®** 系统 (ISCO) 上的快速色谱 (使用0-100% EtOAc/己烷) 进行纯化, 得到产物1-(4-(叔-丁基氨基)-1,7-萘啶-2-基)乙酮 (60%)。LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 244.3。

[2464] 步骤3:将1-(4-(叔-丁基氨基)-1,7-萘啶-2-基)乙酮 (25mg, 0.1mmol) 在0.8mL的DMF/DMA中于110℃搅拌6小时。然后将反应浓缩, 并通过在 **COMBIFLASH®** 系统 (ISCO) 上的快速色谱 (使用0-100% EtOAc/己烷) 进行纯化, 得到产物(E)-1-(4-(叔-丁基氨基)-1,7-萘啶-2-基)-3-(二甲基氨基)丙-2-烯-1-酮 (30%)。LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 299.4。

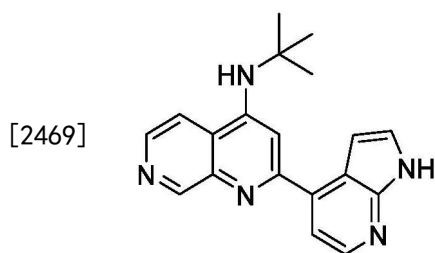
[2465] 步骤4:将(E)-1-(4-(叔-丁基氨基)-1,7-萘啶-2-基)-3-(二甲基氨基)丙-2-烯-1-酮 (8mg, 0.027mmol) 在室温下在EtOH (0.7mL) 中搅拌。添加硝酸胍 (4mg, 0.034mmol), 并将反应在100℃下搅拌20分钟。然后添加乙醇钠 (在EtOH中, 20微升, 0.054mmol), 并在回流下搅拌过夜。然后将反应浓缩, 并通过在 **COMBIFLASH®** 系统 (ISCO) 上的快速色谱 (使用0-20% MeOH/DCM) 进行纯化, 得到标题化合物 (30%)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.20 (d, J=0.8Hz, 1H), 8.48 (m, 1H), 8.41 (m, 1H), 8.29 (dd, J=6.0, 0.9Hz, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.62 (d, J=5.0Hz, 1H), 6.74 (s, 2H), 6.65 (s, 1H), 1.56 (s, 9H)。LCMS (M/Z [M+H]<sup>+</sup>): 295.4。



[2466] 实例272-274:

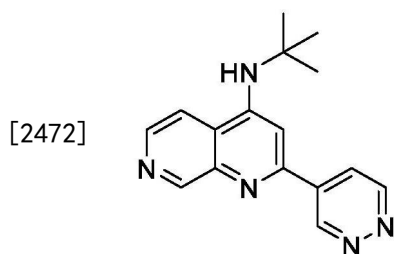
[2467] 根据用于制备实例269的方案,分别使用2,4-二氯-1,7-萘啶(6a')和各种硼酸或酯合成这些化合物。

[2468] 实例272:N-叔-丁基-2-{1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-4-基}-1,7-萘啶-4-胺



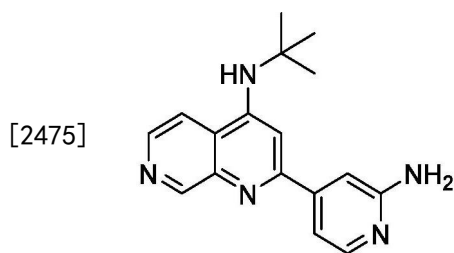
[2470]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ ) 11.86 (s, 1H), 9.23 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.50 (d,  $J=5.8\text{Hz}$ , 1H), 8.39 (d,  $J=4.9\text{Hz}$ , 1H), 8.30 (m, 1H), 7.63 (m, 1H), 7.61 (m, 1H), 7.32 (s, 1H), 6.96 (dd,  $J=3.4, 1.9\text{Hz}$ , 1H), 6.67 (s, 1H), 1.56 (s, 9H). LCMS ( $M/Z[M+H]^+$ ): 318.4。

[2471] 实例273:N-叔-丁基-2-(吡嗪-4-基)-1,7-萘啶-4-胺



[2473]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.97 (s, 1H), 9.40 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 9.24 (s, 1H), 8.50 (d,  $J=4.6\text{Hz}$ , 1H), 8.36 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.31 (m, 1H), 7.35 (s, 1H), 6.80 (s, 1H), 1.58 (s, 9H). LCMS ( $M/Z[M+H]^+$ ): 280.3。

[2474] 实例274:2-(2-氨基吡啶-4-基)-N-叔-丁基-1,7-萘啶-4-胺



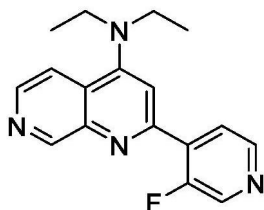
[2476]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.18 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.45 (d,  $J=5.8\text{Hz}$ , 1H), 8.26 (m, 1H), 8.05 (dd,  $J=5.30.7\text{Hz}$ , 1H), 7.20 (m, 1H), 7.17 (m, 1H), 7.14 (m, 1H), 6.63 (s, 1H), 6.09 (s, 2H), 1.55 (s, 9H). LCMS ( $M/Z[M+H]^+$ ): 294.4。

[2477] 实例275-286:

[2478] 根据用于制备实例270的方案,分别使用2,4-二氯-1,7-萘啶(中间体6a', 方案6)以及各种有机锡试剂和胺来合成这些化合物。

[2479] 实例275:N,N-二乙基-2-(3-氟吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺

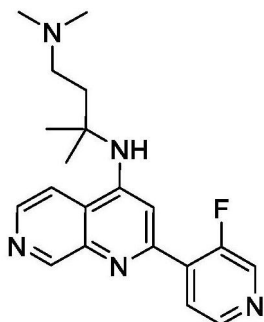
[2480]



[2481]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.33 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.78 (d,  $J=2.7\text{Hz}$ , 1H), 8.62 (dd,  $J=4.9, 1.1\text{Hz}$ , 1H), 8.55 (d,  $J=5.9\text{Hz}$ , 1H), 8.02 (dd,  $J=6.8, 4.9\text{Hz}$ , 1H), 7.88 (dd,  $J=5.8, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 7.42 (d,  $J=1.5\text{Hz}$ , 1H), 3.50 (q,  $J=7.0\text{Hz}$ , 4H), 1.21 (t,  $J=7.0\text{Hz}$ , 6H). LCMS ( $M/Z[M+H]^+$ ): 297.1。

[2482] 实例276: (3- {[2- (3-氟吡啶-4-基) -1,7-萘啶-4-基]氨基} -3-甲基丁基) 二甲基胺

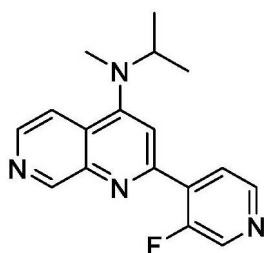
[2483]



[2484]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.20 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.74 (d,  $J=2.8\text{Hz}$ , 1H), 8.60 (dd,  $J=4.9, 1.1\text{Hz}$ , 1H), 8.53 (d,  $J=5.8\text{Hz}$ , 1H), 8.04 (dd,  $J=6.9, 4.9\text{Hz}$ , 1H), 7.91-7.83 (s, 1H), 7.25 (d,  $J=1.4\text{Hz}$ , 1H), 2.60-2.54 (m, 2H), 2.33-2.24 (m, 6H), 1.96-1.88 (m, 2H), 1.51 (s, 6H). LCMS ( $M/Z[M+H]^+$ ): 354.2。

[2485] 实例277: 2- (3-氟吡啶-4-基) -N-甲基-N- (丙-2-基) -1,7-萘啶-4-胺

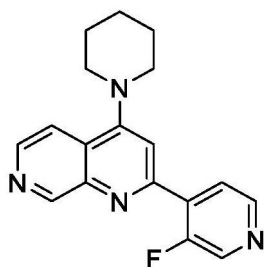
[2486]



[2487]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.33 (m, 1H), 8.78 (d,  $J=2.7\text{Hz}$ , 1H), 8.61 (dd,  $J=4.9, 1.1\text{Hz}$ , 1H), 8.55 (dd,  $J=5.9, 2.5\text{Hz}$ , 1H), 8.05-8.01 (dd,  $J=6.8, 4.9\text{Hz}$ , 1H), 7.85 (dd,  $J=5.8, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 7.41 (d,  $J=1.4\text{Hz}$ , 1H), 4.20-4.14 (m, 1H), 2.93 (s, 3H), 1.28 (m, 6H). LCMS ( $M/Z[M+H]^+$ ): 297.1。

[2488] 实例278: 2- (3-氟吡啶-4-基) -4- (哌啶-1-基) -1,7-萘啶

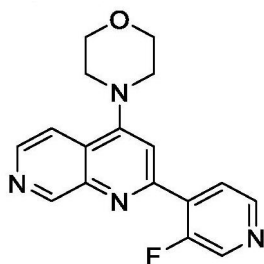
[2489]



[2490]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.39 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.78 (d,  $J=2.7\text{Hz}$ , 1H), 8.63 (m, 1H), 8.60 (m, 1H), 8.03 (dd,  $J=6.8, 4.9\text{Hz}$ , 1H), 7.85 (dd,  $J=5.8, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 7.50 (d,  $J=1.5\text{Hz}$ , 1H), 3.32-3.28 (m, 4H), 1.87-1.79 (m, 4H), 1.72-1.65 (m, 2H). LCMS ( $M/Z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 309.4.

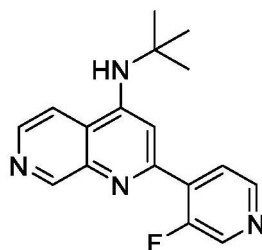
[2491] 实例279: 2-(3-氟吡啶-4-基)-4-(吗啉-4-基)-1,7-萘啶

[2492]

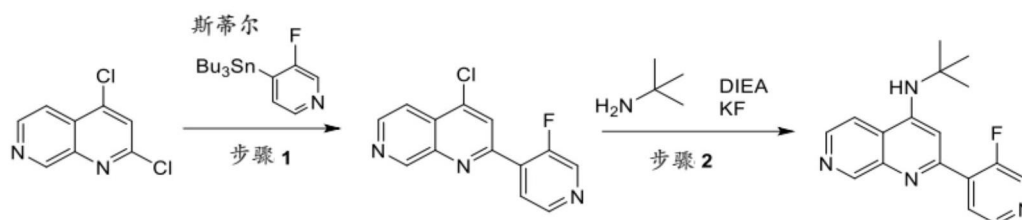


[2493]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.40 (d,  $J=0.8\text{Hz}$ , 1H), 8.79 (d,  $J=2.6\text{Hz}$ , 1H), 8.62 (m, 1H), 8.60 (m, 1H), 8.03 (dd,  $J=6.8, 4.9\text{Hz}$ , 1H), 7.95 (dd,  $J=5.8, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 7.54 (d,  $J=1.4\text{Hz}$ , 1H), 3.91-3.86 (m, 4H), 3.36-3.33 (m, 4H). LCMS ( $M/Z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 311.1.

[2494] 实例280: N-叔-丁基-2-(3-氟吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺



[2495]

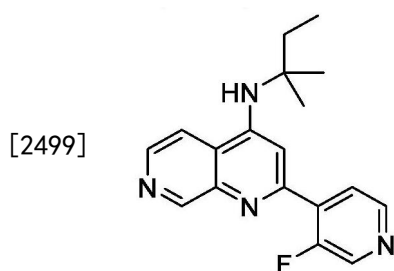


[2496] 步骤1: 在20mL微波反应器中, 将2,4-二氯-1,7-萘啶 (6a, 100mg, 0.502mmol) 于室温下在干DMF (1mL) 中搅拌。添加3-氟-4-(三丁基甲锡烷基)吡啶 (194mg, 0.502mmol), 然后添加PdCl<sub>2</sub>(dppf)·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>加合物 (41.0mg, 0.050mmol) 和CuI (9.6mg, 0.050mmol)。将反应在130℃下搅拌0.5小时。将粗混合物用DCM、H<sub>2</sub>O稀释, 分离并用DCM×3萃取。将有机层合并并经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并浓缩。将残余物通过在 COMBIFLASH® 系统 (ISCO) 上的快速色谱 (使用0-10% MeOH/DCM) 进行纯化, 得到产物4-氯-2-(3-氟吡啶-4-基)-1,7-萘啶 (71%)。  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, 丙酮- $d_6$ )  $\delta$  9.56 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.83 (d,  $J=5.8\text{Hz}$ , 1H), 8.74 (d,  $J=2.9\text{Hz}$ ,

1H), 8.67 (dd, J=5.0, 1.2Hz, 1H), 8.44 (d, J=1.4Hz, 1H), 8.18 (dd, J=6.7, 4.9Hz, 1H), 8.14 (dd, J=5.8, 0.9Hz, 1H)。LCMS [M+H]<sup>+</sup>=260。

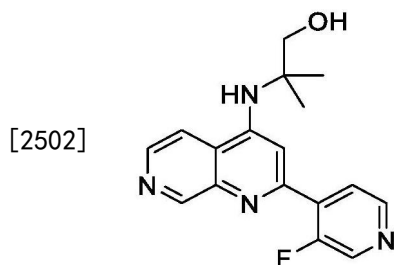
[2497] 步骤2: 在40mL小瓶中添加在DMSO (体积: 1mL) 中的氟化钾 (7mg, 0.12mmol)、4-氯-2-(3-氟吡啶-4-基)-1,7-萘啶 (26mg, 0.10mmol) 和2-甲基丙-2-胺 (0.035mL, 0.331mmol), 得到黄色悬浮液。将反应混合物在130℃下搅拌24小时。在空气流下蒸发溶剂。将残余物通过在 COMBIFLASH® 系统 (ISCO) 上的快速色谱 (使用0-10% MeOH/DCM) 进行纯化, 得到产物 (42%)。1H NMR (400MHz, 丙酮-d<sub>6</sub>) δ 9.24 (d, J=0.8Hz, 1H), 8.65 (d, J=3.0Hz, 1H), 8.59 (dd, J=4.9, 1.2Hz, 1H), 8.46 (d, J=5.9Hz, 1H), 8.15 (dd, J=6.8, 4.9Hz, 1H), 8.06 (dd, J=5.9, 0.9Hz, 1H), 7.48 (d, J=1.4Hz, 1H), 6.30 (s, 1H), 1.61 (s, 9H)。LCMS (M/Z [M+H]<sup>+</sup>): 297.1。

[2498] 实例281: 2-(3-氟吡啶-4-基)-N-(2-甲基丁-2-基)-1,7-萘啶-4-胺



[2500] 1H NMR (500MHz, 丙酮-d<sub>6</sub>) δ 9.24 (d, J=0.9Hz, 1H), 8.64 (d, J=3.0Hz, 1H), 8.58 (dd, J=4.9, 1.2Hz, 1H), 8.47 (d, J=5.9Hz, 1H), 8.15 (dd, J=6.8, 4.9Hz, 1H), 8.07 (dd, J=5.9, 0.9Hz, 1H), 7.47 (d, J=1.4Hz, 1H), 6.12 (s, 1H), 2.03-1.98 (m, 2H), 1.56 (s, 6H), 0.94 (t, J=7.5Hz, 3H)。LCMS (M/Z [M+H]<sup>+</sup>): 311.2。

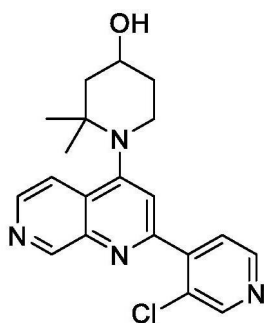
[2501] 实例282: 2-{[2-(3-氟吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-基]氨基}-2-甲基丙-1-醇



[2503] 1H NMR (400MHz, 丙酮-d<sub>6</sub>) δ 9.24 (d, J=0.8Hz, 1H), 8.59 (dd, J=4.9, 1.2Hz, 1H), 8.49 (d, J=5.9Hz, 1H), 8.15 (dd, J=6.8, 4.9Hz, 1H), 7.97 (dt, J=5.8, 1.3Hz, 1H), 7.50 (d, J=1.4Hz, 1H), 6.29 (s, 1H), 3.78 (d, J=5.6Hz, 2H), 1.56 (s, 6H)。LCMS (M/Z [M+H]<sup>+</sup>): 313.1。

[2504] 实例283: 1-[2-(3-氯吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-基]-2,2-二甲基哌啶-4-醇

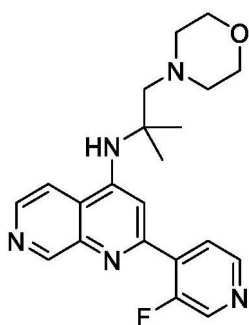
[2505]



[2506]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.40 (s, 1H), 8.79 (d, 1H), 8.62 (d, 1H), 8.60 (d, 1H), 8.03 (dd, 1H), 7.95 (d, 1H), 7.54 (s, 1H), 3.91-3.86 (m, 4H), 3.36-3.33 (m, 4H). LCMS (M/Z [M+H]<sup>+</sup>): 311.3。

[2507] 实例284: 2-(3-氟吡啶-4-基)-N-[2-甲基-1-(吗啉-4-基)丙-2-基]-1,7-萘啶-4-胺

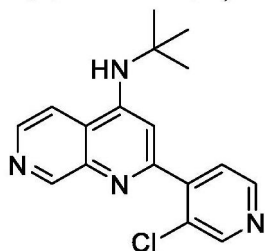
[2508]



[2509]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, 丙酮- $d_6$ )  $\delta$  9.25 (d, J=0.9Hz, 1H), 8.64 (d, J=3.0Hz, 1H), 8.59 (dd, J=4.9, 1.2Hz, 1H), 8.52 (d, J=5.8Hz, 1H), 8.15 (dd, J=6.8, 4.9Hz, 1H), 7.89 (dd, J=5.9, 0.8Hz, 1H), 7.54 (d, J=1.4Hz, 1H), 6.77 (s, 1H), 3.70-3.64 (m, 4H), 2.75 (s, 2H), 2.69-2.62 (m, 4H), 1.60 (s, 6H). LCMS (M/Z [M+H]<sup>+</sup>): 382.2。

[2510] 实例285: N-叔-丁基-2-(3-氯吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺

[2511]



[2512]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, 丙酮- $d_6$ )  $\delta$  9.20 (d, J=0.9Hz, 1H), 8.78-8.69 (m, 1H), 8.65 (d, J=4.9Hz, 1H), 8.47 (d, J=5.9Hz, 1H), 8.06 (dt, J=5.9, 1.0Hz, 1H), 7.79-7.70 (m, 1H), 7.25 (s, 1H), 1.60 (s, 9H). LCMS (M/Z [M+H]<sup>+</sup>): 313.1。

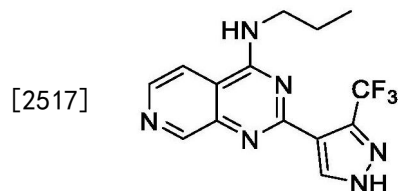
[2513] 实例286: 2-(3-氯吡啶-4-基)-N,N-二乙基-1,7-萘啶-4-胺

[2514]



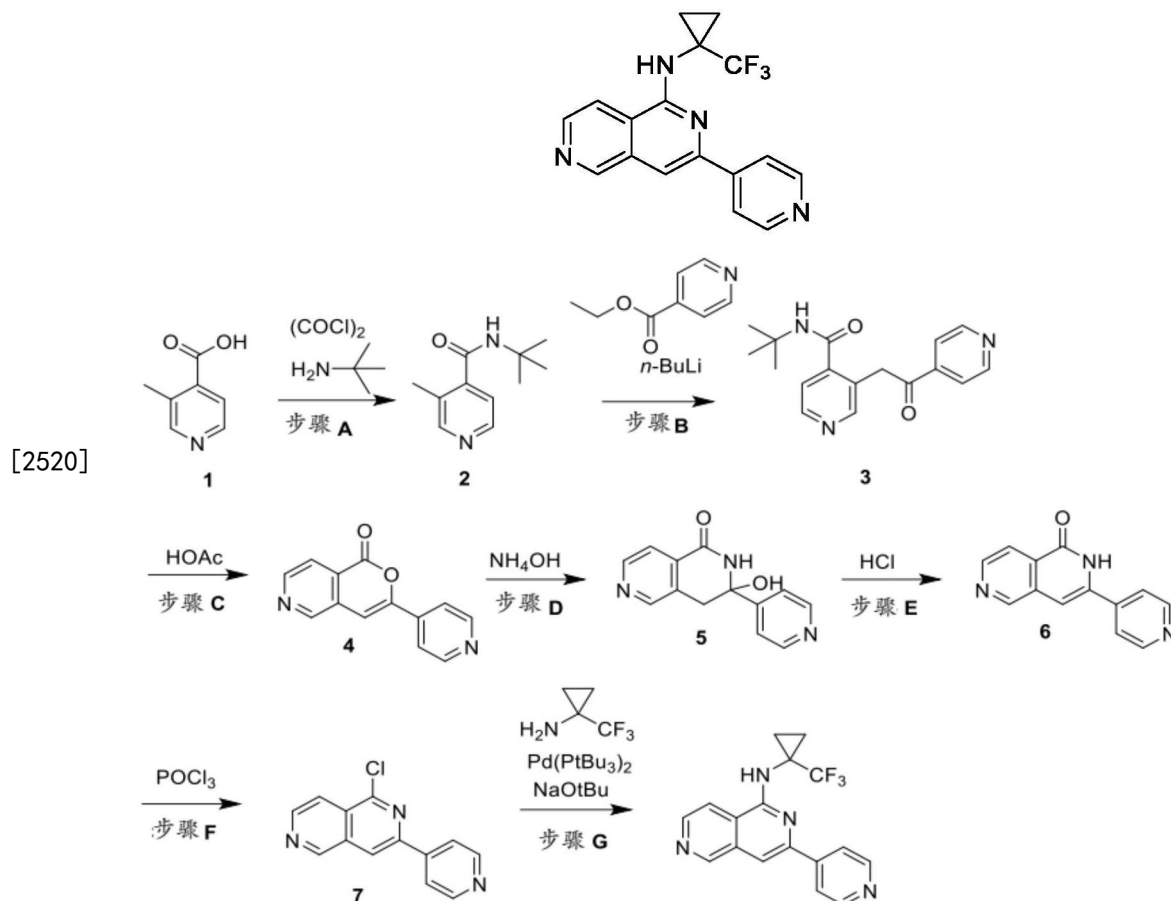
[2515]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, 丙酮- $d_6$ )  $\delta$  9.31 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.75 (d,  $J=0.6\text{Hz}$ , 1H), 8.67 (d,  $J=4.9\text{Hz}$ , 1H), 8.54 (d,  $J=5.9\text{Hz}$ , 1H), 7.93 (dd,  $J=5.8, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 7.76 (dd,  $J=4.9, 0.6\text{Hz}$ , 1H), 7.39 (s, 1H), 3.58 (q,  $J=7.1\text{Hz}$ , 4H), 1.29 (t,  $J=7.1\text{Hz}$ , 6H). LCMS ( $M/Z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 313.1。

[2516] 实例287: N-丙基-2-(3-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-胺



[2518] 根据实例111所述的方案,使用2,4-二氯吡啶并[3,4-d]嘧啶(中间体2c)和丙-1-胺和叔-丁基4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-3-(三氟甲基)-1H-吡唑-1-甲酸酯合成标题化合物。 $^1\text{H}$  NMR (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13.81 (s, 1H), 9.01 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.64 (t,  $J=5.7\text{Hz}$ , 1H), 8.61-8.57 (m, 1H), 8.55 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 8.11 (dd,  $J=5.6, 1.0\text{Hz}$ , 1H), 3.64-3.56 (m, 2H), 1.73-1.62 (m, 2H), 0.96 (t,  $J=7.4\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $M/Z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 323.1。

[2519] 实例288: 3-(吡啶-4-基)-N-(1-(三氟甲基)环丙基)-2,6-萘啶-1-胺



[2521] 步骤A: 在 $0^\circ\text{C}$ 下向3-甲基异烟酸(1) (10g, 72.9mmol) 在二氯甲烷(200mL)中的悬浮液中添加DMF (200mL)。在 $0^\circ\text{C}$ 下经10分钟滴加氯甲酸乙酯(8.6mL, 12.5g, 98.4mmol), 得到混合物, 将其在 $0^\circ\text{C}$ 下搅拌15分钟。在 $0^\circ\text{C}$ 下经15分钟将叔-丁胺(35.0mL, 24.2g, 330.0mmol)

滴加到反应混合物中,并且将反应混合物减压浓缩,得到残余物,将其经受色谱(己烷:EtOAc),得到2(11.6g,83%)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ8.46(s,1H),8.43(d,J=5.0Hz,1H),7.20(d,J=5.0Hz,1H),2.29(s,3H),1.37(s,9H)。LCMS(m/z[M+H]<sup>+</sup>):193。

[2522] 步骤B:在-45℃下在N<sub>2</sub>下经15分钟向2(11.6g,60.3mmol)在THF(440mL)中溶液中逐滴添加n-BuLi(58.0mL,145.0mmol,2.5M在己烷中),得到混合物,将其在-45℃下搅拌45分钟。然后在-45℃下经15分钟滴加异烟酸乙酯(10.0g,66.3mmol)在THF(20mL)中的溶液。使反应混合物经2小时升温至室温,并倒入饱和NH<sub>4</sub>Cl水溶液(1000mL)中。分离有机层,并用EtOAc(3×400mL)萃取水层。将合并的有机层用饱和NaCl水溶液(100mL)洗涤,经MgSO<sub>4</sub>干燥,并在减压下蒸发,得到粗品3。LCMS(m/z[M+H]<sup>+</sup>):298。粗产物无需纯化即可用于下一步。

[2523] 步骤C:将步骤B的粗品3在乙酸(200mL)中的溶液在100℃下加热16小时,冷却至室温,并在减压下浓缩至约80mL。添加水(120mL),并将混合物过滤以得到白色沉淀,将其用水(2×50mL)洗涤,并在减压下干燥以提供粗品4(8.08g)。LCMS(m/z[M+H]<sup>+</sup>):225。粗产物无需纯化即可用于下一步。

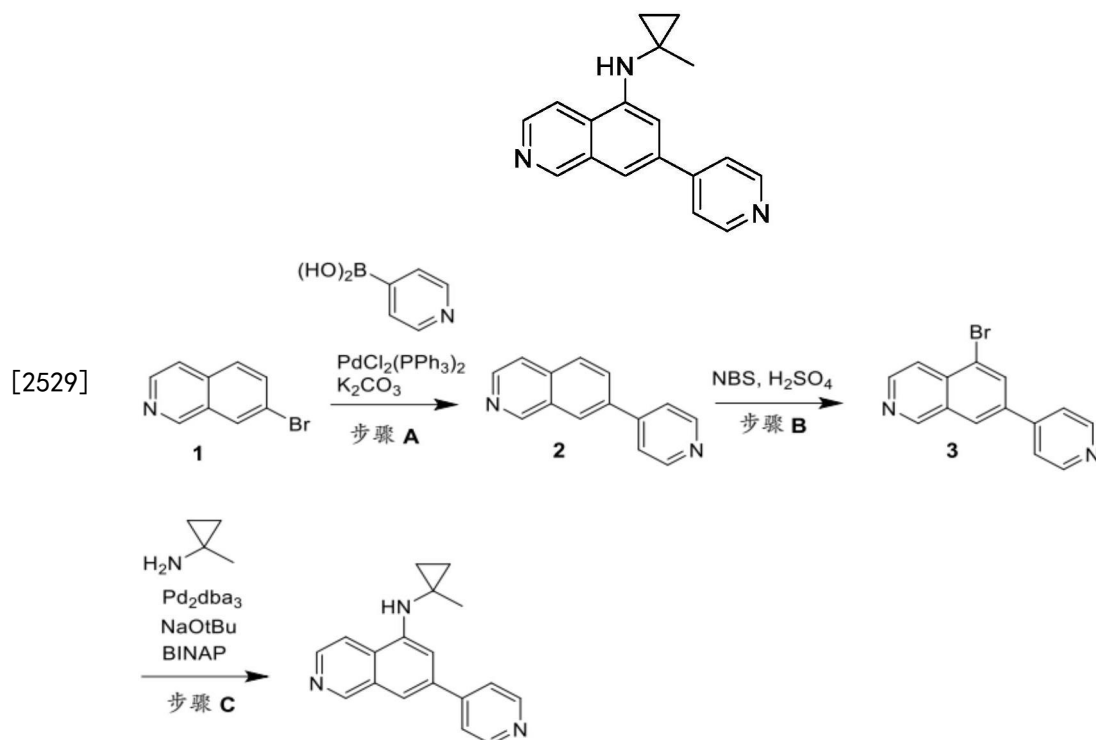
[2524] 步骤D:在室温下,向粗品4(8.08g)在EtOH(100mL)中的悬浮液中添加NH<sub>4</sub>OH水溶液(80mL,28.5%),得到混合物,将其搅拌2.5h,蒸发,得到粗品5。LCMS(m/z[M+H]<sup>+</sup>):242。粗产物无需纯化即可用于下一步。

[2525] 步骤E:在0℃下向步骤D的粗品5在EtOH(100mL)中的悬浮液中添加水(20mL),然后添加HCl水溶液(12M,25mL)。将反应混合物在室温搅拌19h,并过滤以得到白色固体,将其在减压下干燥以提供粗品6(10.2g)。LCMS(m/z[M+H]<sup>+</sup>):224。粗产物无需纯化即可用于下一步。

[2526] 步骤F:将在开口ChemGlass重壁圆底压力容器(350mL)中的粗品6(10.2g)在POCl<sub>3</sub>(75mL)中的悬浮液非常缓慢地加热直到温度达到100℃,并在100℃搅拌30分钟。然后密封压力容器,并将反应混合物在135℃下加热14h。减压除去POCl<sub>3</sub>,并将残余物与冰水(50g冰和50mL水)混合。用NaOH水溶液(1M)将混合物的pH调节至约7,并且然后用饱和Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>水溶液调节至约10。过滤混合物得到白色固体,将其在减压下干燥以提供7(7.1g,从2起5步的产率为49%)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ9.59(s,1H),8.94(s,1H),8.89(d,J=5.6Hz,1H),8.78(d,J=4.8Hz,2H),8.15(d,J=4.8Hz,2H),8.14(d,J=5.6Hz,1H)。LCMS(m/z[M+H]<sup>+</sup>):242。

[2527] 步骤G:向中间体7(60.0mg,0.25mmol)和1-(三氟甲基)环丙-1-胺(93.0mg,0.74mmol)在二噁烷(1.0mL)中的溶液中添加双(三-叔-丁基膦)钯(13.0mg,0.2微摩尔)和叔丁醇钠(71.0mg,0.74mmol)。将反应混合物在N<sub>2</sub>下于130℃加热过夜,并浓缩,得到残余物,将其经受色谱(MeOH/DCM),得到标题化合物。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ9.35(s,1H),8.95(d,J=8.0Hz,2H),8.75(d,J=4.0Hz,1H),8.71(s,1H),8.57(d,J=8.0Hz,2H),8.34(s,1H),8.31d,J=4.0Hz,1H),1.57(m,2H),1.31(m,2H)。LCMS(m/z[M+H]<sup>+</sup>):331。

[2528] 实例289:N-(1-甲基环丙基)-7-(吡啶-4-基)异喹啉-5-胺



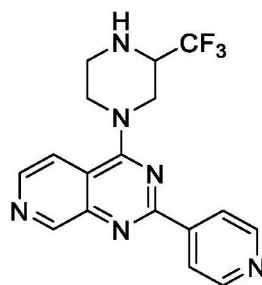
[2530] 步骤A:将7-溴异喹啉 (1) (300mg, 1.44mmol)、吡啶-4-基硼酸 (213mg, 1.73mmol)、双(三苯基膦)钯(II)二氯化物( $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ , 98mg, 0.14mmol)和碳酸钾(2N, 4.3ml)在DMF (7mL)中的悬浮液搅拌,并在 $100^\circ\text{C}$ 加热3小时。将反应混合物通过硅藻土过滤。将所述溶液用水稀释并用EtOAc x 3萃取。将合并的有机层用饱和NaCl水溶液洗涤,经 $\text{MgSO}_4$ 干燥,并在减压下蒸发。将得到的粗产物通过在 COMBIFLASH® 系统 (ISCO) 上的快速色谱(使用0-10%MeOH/DCM)进行纯化,得到呈浅棕色油的7-(吡啶-4-基)异喹啉 (2, 282mg)。LCMS ( $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 207。

[2531] 步骤B:在 $0^\circ\text{C}$ 下,向7-(吡啶-4-基)异喹啉 (2) (282mg, 1.37mmol)在浓 $\text{H}_2\text{SO}_4$  (3mL)中的溶液中添加N-溴琥珀酰亚胺(NBS, 488mg, 2.74mmol)。使反应混合物经2小时升温至室温,并倒入冰水(20mL)中,并添加饱和 $\text{NaHCO}_3$ 水溶液至pH约8。将水层用EtOAc x 3萃取。将合并的有机层用饱和NaCl水溶液洗涤,经 $\text{MgSO}_4$ 干燥,并在减压下蒸发。将得到的粗产物通过在 COMBIFLASH® 系统 (ISCO) 上的快速色谱(使用0-10%MeOH/DCM)进行纯化,得到5-溴-7-(吡啶-4-基)异喹啉 (3, 110mg)。LCMS ( $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 285/287。

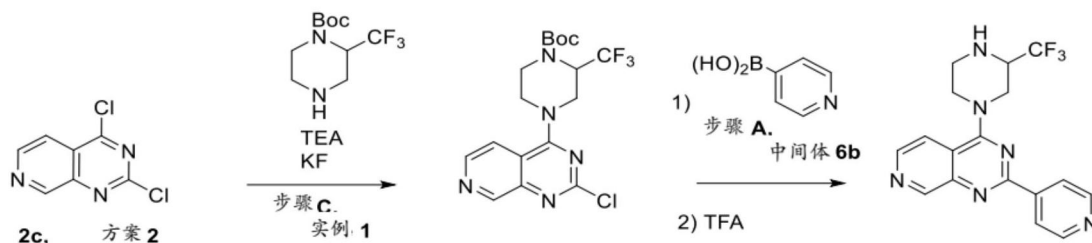
[2532] 步骤C:将5-溴-7-(吡啶-4-基)异喹啉 (3) (30mg, 0.105mmol)、1-甲基环丙-1-胺盐酸盐(28.3mg, 0.263mmol)、三(二苯亚甲基丙酮)二钯(0) ( $\text{Pd}_2\text{dba}_3$ , 9.7mg, 0.0105mmol)、2,2'-双(二苯基膦基)-1,1'-联萘基(BINAP, 6.5mg, 0.0105mmol)和叔丁醇钠(44.3mg, 0.462)在甲苯中(1.5mL)中的悬浮液在 $\text{N}_2$ 下于 $90^\circ\text{C}$ 加热16小时,冷却至室温并浓缩。将残余物在MeOH中稀释并过滤,然后通过质量触发的制备型反相HPLC(用10%-90%乙腈/水)进行纯化,得到标题化合物(6mg)。 $^1\text{H}$  NMR (400MHz, 氯仿-d)  $\delta$  9.24 (s, 1H), 8.74 (s, 2H), 8.49 (s, 1H), 7.69-7.60 (m, 2H), 7.59-7.56 (m, 1H), 7.52-7.46 (m, 1H), 7.39-7.36 (m, 1H), 1.52 (s, 3H), 0.98-0.92 (m, 2H), 0.88-0.81 (m, 2H)。LCMS ( $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 276。

[2533] 实例290:2-(吡啶-4-基)-4-(3-(三氟甲基)吡嗪-1-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶





[2534]

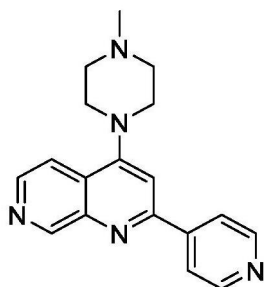


[2535] 使用2,4-二氯吡啶并[3,4-d]嘧啶(中间体2c)与叔-丁基2-(三氟甲基)哌嗪-1-甲酸酯和吡啶-4-基硼酸根据例如111所述的方案、然后用TFA对N-Boc基团进行脱保护来合成标题化合物。

[2536]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, 氯仿- $d$ )  $\delta$  9.46 (d,  $J=0.9\text{Hz}$ , 1H), 8.83-8.78 (m, 2H), 8.63 (d,  $J=5.8\text{Hz}$ , 1H), 8.35-8.30 (m, 2H), 7.74 (dd,  $J=5.8, 0.9\text{Hz}$ , 1H), 5.80-5.67 (m, 1H), 4.07 (dt,  $J=24.3, 12.4\text{Hz}$ , 2H), 3.65 (d,  $J=14.2\text{Hz}$ , 1H), 3.34 (d,  $J=14.6\text{Hz}$ , 1H), 3.18 (d,  $J=13.5\text{Hz}$ , 1H), 2.89 (t,  $J=11.0\text{Hz}$ , 1H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 361.1。

[2537] 实例291: 4-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶

[2538]



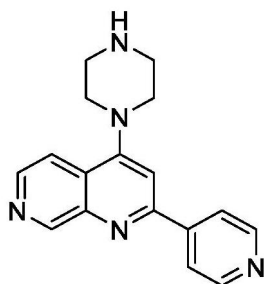
[2539] 如下所述,由4-氯-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶(中间体6b)和1-甲基哌嗪合成标题化合物:

[2540] 将4-氯-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶(中间体6b, 30mg, 0.124mmol)、1-甲基哌嗪(50mg, 0.499mmol)、磷酸钾(132mg, 0.621mmol)、RuPhos Pd G3(16mg, 0.019mmol)和RuPhos(13mg, 0.028mmol)在二噁烷(2mL)中的溶液在微波瓶中在氩气下于130℃加热10分钟。减压蒸发溶剂。将残余物通过快速色谱(使用20%-100%乙酸乙酯/环己烷,然后2%-30%甲醇/二氯甲烷)进行纯化,得到标题化合物(21%)。

[2541]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.38 (s, 1H), 8.76 (d,  $J=4.8\text{Hz}$ , 2H), 8.55 (d,  $J=5.7\text{Hz}$ , 1H), 8.23 (d,  $J=4.8\text{Hz}$ , 2H), 7.85 (d,  $J=5.7\text{Hz}$ , 1H), 7.70 (s, 1H), 3.37 (s, 4H), 2.63 (s, 4H), 2.30 (s, 3H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 306.3,  $R_{t1}=0.38\text{min}$ 。

[2542] 实例292: 4-(哌嗪-1-基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶

[2543]



[2544] 由4-氯-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶(中间体6b)和叔丁基哌嗪-1-甲酸酯(步骤1)和Boc脱保护(使用在二乙醚中的HCl)(步骤2)类似于实例291以两步来合成标题化合物。

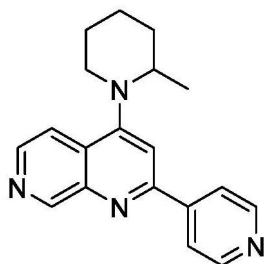
[2545] 步骤2(Boc脱保护):

[2546] 向叔-丁基4-(2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-基)哌嗪-1-甲酸酯(24mg, 0.061mmol)的二氯甲烷(5mL)中的溶液中添加在二乙醚(2mL, 12mmol)中的6M HCl。将得到的黄色悬浮液在室温搅拌1小时。滤出黄色沉淀物,并用二氯甲烷洗涤。将盐酸盐溶解在MeOH中,并将溶液提供在PoraPak Rxn CX 20cc(2g)色谱柱上。然后将柱用5mL MeOH洗涤两次。最后,将化合物用在MeOH中的7N NH<sub>3</sub>洗脱。减压蒸发滤液,得到标题化合物(76%)。

[2547] <sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.37(s, 1H), 8.76(d, J=4.7Hz, 2H), 8.55(d, J=5.8Hz, 1H), 8.22(d, J=4.8Hz, 2H), 7.86(d, J=5.7Hz, 1H), 7.67(s, 1H), 3.28(s, 4H), 2.99(s, 4H). LCMS(m/z [M+H]<sup>+</sup>): 292.3, Rt<sub>1</sub>=0.38min。

[2548] 实例293: 4-(2-甲基哌啶-1-基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶

[2549]

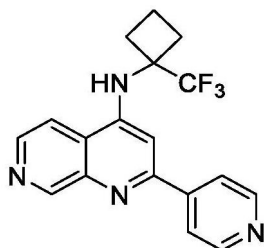


[2550] 类似于实例291由4-氯-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶(中间体6b)和2-甲基哌啶合成标题化合物。

[2551] <sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.48-9.32(m, 1H), 8.86-8.74(m, 2H), 8.56(d, J=5.7Hz, 1H), 8.30-8.16(m, 2H), 7.86(d, J=5.8Hz, 1H), 7.72(s, 1H), 4.10(d, J=6.3Hz, 1H), 3.53-3.41(m, 1H), 3.21(d, J=12.4Hz, 1H), 2.05(s, 1H), 1.86-1.74(m, 3H), 1.62(s, 2H), 1.06(d, J=6.5Hz, 3H). LCMS(m/z [M+H]<sup>+</sup>): 305.3, Rt<sub>1</sub>=0.98min。

[2552] 实例294: 2-(吡啶-4-基)-N-(1-(三氟甲基)环丁基)-1,7-萘啶-4-胺

[2553]

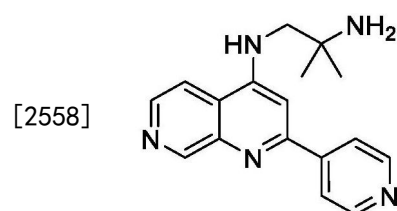


[2554] 如下所述,由4-氯-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶(中间体6b)和1-(三氟甲基)环丁烷-1-胺合成标题化合物:

[2555] 将4-氯-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶(中间体6b,100mg,0.414mmol)、1-(三氟甲基)环丁-1-胺(115mg,0.828mmol)、叔丁酸钾(139mg,1.241mmol)、Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>·CHCl<sub>3</sub>(43mg,0.042mmol)和PhCPhos(36mg,0.085mmol)在二噁烷(5mL)中的溶液在氩气中于微波小瓶中在100℃下加热30分钟。减压蒸发溶剂。将残余物通过快速色谱(使用20%-100%乙酸乙酯/环己烷,然后2%-10%甲醇/二氯甲烷)进行纯化,得到标题化合物(9%)。

[2556] <sup>1</sup>H NMR (600MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ9.30 (s, 1H), 8.78-8.74 (m, 2H), 8.57 (d, J=5.8Hz, 1H), 8.40 (d, J=5.8Hz, 1H), 8.08-8.04 (m, 2H), 7.89 (s, 1H), 6.94 (s, 1H), 2.85-2.78 (m, 2H), 2.74 (d, J=11.6Hz, 2H), 2.04 (dd, J=18.6, 9.7Hz, 2H). LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 345.3, Rt<sub>1</sub>=0.84min。

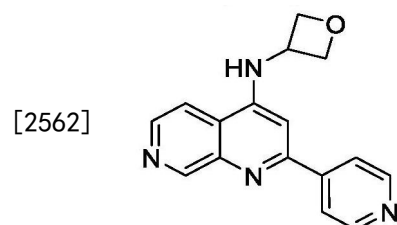
[2557] 实例295: 2-甲基-N1-(2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-基)丙烷-1,2-二胺



[2559] 由4-氯-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶(中间体6b)和叔-丁基(1-氨基-2-甲基丙-2-基)氨基甲酸酯(步骤1)和Boc脱保护(使用在二乙醚中的HCl)(步骤2,在实例292中描述)类似于实例254以2步合成标题化合物。

[2560] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ9.24 (s, 1H), 8.75 (d, J=5.14Hz, 2H), 8.51 (d, J=5.75Hz, 1H), 8.26 (d, J=5.75Hz, 1H), 8.21 (d, J=5.26Hz, 2H), 7.40 (s, 1H), 7.29 (br s, 1H), 3.38 (br s, 2H), 1.63-2.22 (m, 2H), 1.16 (s, 6H). LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 294.4, Rt<sub>1</sub>=0.37min。

[2561] 实例296: N-(氧杂环丁烷-3-基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺

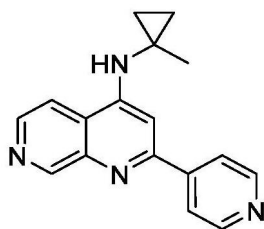


[2563] 类似于实例254由4-氯-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶(中间体6b)和氧杂环丁烷-3-胺合成标题化合物。

[2564] <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ9.28 (s, 1H), 8.76 (d, J=5.99Hz, 2H), 8.57 (d, J=5.75Hz, 1H), 8.29 (d, J=5.75Hz, 1H), 8.21 (d, J=5.99Hz, 2H), 8.11 (br d, J=5.75Hz, 1H), 7.03 (s, 1H), 4.99-5.17 (m, 3H), 4.73 (t, J=5.93Hz, 2H). LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 279.3, Rt<sub>1</sub>=0.49min。

[2565] 实例297: N-(1-甲基环丙基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺

[2566]

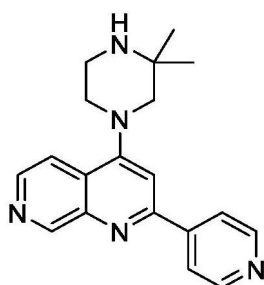


[2567] 类似于实例254由4-氯-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶(中间体6b)和1-甲基环丙-1-胺合成标题化合物。

[2568]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.34 (s, 1H), 8.78 (d,  $J=5.75\text{Hz}$ , 2H), 8.48 (d,  $J=5.87\text{Hz}$ , 1H), 8.20 (d,  $J=5.87\text{Hz}$ , 2H), 8.07 (d,  $J=5.87\text{Hz}$ , 1H), 7.69 (s, 1H), 3.29 (s, 3H), 3.14-3.20 (m, 1H), 0.89-0.97 (m, 2H), 0.52-0.61 (m, 2H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 277.3,  $R_{t_1}=0.73\text{min}$ .

[2569] 实例298: 4-(3,3-二甲基哌嗪-1-基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶

[2570]

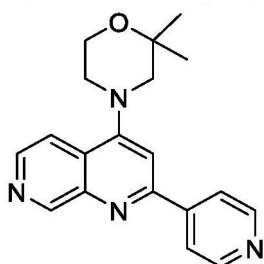


[2571] 由4-氯-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶(中间体6b)和叔-丁基2,2-二甲基哌嗪-1-甲酸酯(步骤1)和Boc脱保护(使用在二乙醚中的HCl)(步骤2,在实例292中描述)类似于实例291以2步合成标题化合物。

[2572]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.41 (s, 1H), 8.79 (d,  $J=6.0\text{Hz}$ , 2H), 8.59 (d,  $J=5.7\text{Hz}$ , 1H), 8.26 (d,  $J=6.0\text{Hz}$ , 2H), 7.90 (d,  $J=5.8\text{Hz}$ , 1H), 7.70 (s, 1H), 3.31 (s, 1H), 3.25 (d,  $J=4.9\text{Hz}$ , 2H), 3.10 (s, 4H), 1.26 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 320.3,  $R_{t_1}=0.45\text{min}$ .

[2573] 实例299: 2,2-二甲基-4-(2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-基)吗啉

[2574]

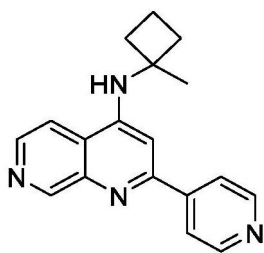


[2575] 类似于实例291由4-氯-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶(中间体6b)和2,2-二甲基吗啉合成标题化合物。

[2576]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.43 (s, 1H), 8.80 (d,  $J=5.9\text{Hz}$ , 2H), 8.61 (d,  $J=5.8\text{Hz}$ , 1H), 8.27 (d,  $J=6.0\text{Hz}$ , 2H), 7.93 (d,  $J=5.8\text{Hz}$ , 1H), 7.75 (s, 1H), 4.01-3.94 (m, 2H), 3.31 (s, 2H), 3.21 (s, 2H), 1.39 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 321.3,  $R_{t_1}=0.81\text{min}$ .

[2577] 实例300: N-(1-甲基环丁基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺

[2578]

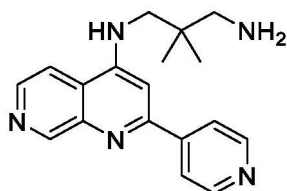


[2579] 类似于实例254由4-氯-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶(中间体6b)和1-甲基环丁-1-胺合成标题化合物。

[2580]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.23 (s, 1H), 8.75 (d,  $J=5.9\text{Hz}$ , 2H), 8.49 (d,  $J=5.8\text{Hz}$ , 1H), 8.26 (d,  $J=5.8\text{Hz}$ , 1H), 8.08 (d,  $J=5.9\text{Hz}$ , 2H), 7.64 (s, 1H), 6.83 (s, 1H), 2.45 (t,  $J=10.4\text{Hz}$ , 2H), 2.32 (t,  $J=9.2\text{Hz}$ , 2H), 1.97 (ddd,  $J=25.6, 20.0, 9.7\text{Hz}$ , 2H), 1.62 (s, 3H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 291.3,  $R_{t1}=0.70\text{min}$ .

[2581] 实例301: 2,2-二甲基-N<sup>1</sup>-(2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-基)丙烷-1,3-二胺

[2582]

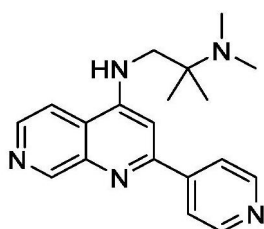


[2583] 由4-氯-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶(中间体6b)和叔-丁基(3-氨基-2,2-二甲基丙基)氨基甲酸酯(步骤1)和Boc脱保护(使用在二乙醚中的HCl)(步骤2,在实例292中描述)类似于实例254以2步合成标题化合物。

[2584]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.20 (s, 1H), 8.72 (d,  $J=5.9\text{Hz}$ , 2H), 8.47 (d,  $J=5.7\text{Hz}$ , 1H), 8.17 (d,  $J=6.0\text{Hz}$ , 2H), 8.01 (d,  $J=5.8\text{Hz}$ , 1H), 7.31 (s, 1H), 3.36 (s, 2H), 3.27 (s, 2H), 2.60 (s, 2H), 0.97 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 308.3,  $R_{t1}=0.41\text{min}$ .

[2585] 实例302: N<sup>2</sup>,N<sup>2</sup>,2-三甲基-N<sup>1</sup>-(2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-基)丙烷-1,2-二胺

[2586]

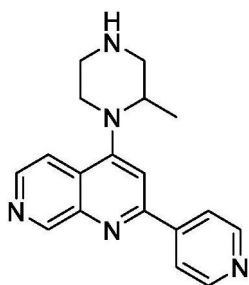


[2587] 类似于实例254由4-氯-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶(中间体6b)和N<sup>2</sup>,N<sup>2</sup>,2-三甲基丙烷-1,2-二胺合成标题化合物。

[2588]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.27 (s, 1H), 8.76 (d,  $J=5.9\text{Hz}$ , 2H), 8.54 (d,  $J=5.7\text{Hz}$ , 1H), 8.23 (d,  $J=5.7\text{Hz}$ , 2H), 8.05 (s, 1H), 7.33 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 3.42 (s, 2H), 2.29 (d,  $J=15.6\text{Hz}$ , 6H), 1.16 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 322.3,  $R_{t1}=0.39\text{min}$ .

[2589] 实例303: 4-(2-甲基哌嗪-1-基)-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶

[2590]

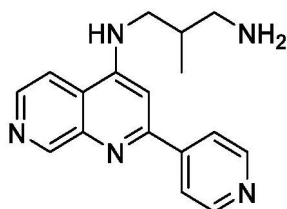


[2591] 由4-氯-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶(中间体6b)和叔-丁基3-甲基哌嗪-1-甲酸酯(步骤1)和Boc脱保护(使用在二乙醚中的HCl)(步骤2,在实例292中描述)类似于实例291以2步合成标题化合物。

[2592]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.44 (s, 1H), 8.80 (d,  $J=5.9\text{Hz}$ , 2H), 8.60 (d,  $J=5.7\text{Hz}$ , 1H), 8.28 (d,  $J=5.9\text{Hz}$ , 2H), 7.98 (d,  $J=5.7\text{Hz}$ , 1H), 7.84 (s, 1H), 4.08 (d,  $J=5.9\text{Hz}$ , 1H), 3.60 (t,  $J=9.6\text{Hz}$ , 1H), 3.42 (dd,  $J=12.3, 2.9\text{Hz}$ , 1H), 3.29-3.17 (m, 2H), 3.12 (t,  $J=9.3\text{Hz}$ , 1H), 2.98 (dd,  $J=12.3, 4.1\text{Hz}$ , 1H), 1.10 (d,  $J=6.5\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 306.3,  $R_{t1}=0.43\text{min}$ .

[2593] 实例304: 2-甲基- $N^1$ -(2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-基)丙烷-1,3-二胺

[2594]

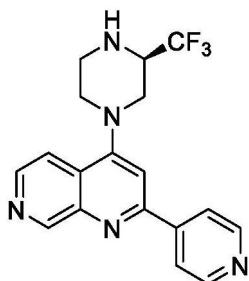


[2595] 由4-氯-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶(中间体6b)和叔-丁基(3-氨基-2-甲基丙基)氨基甲酸酯(步骤1)和Boc脱保护(使用在二乙醚中的HCl)(步骤2,在实例292中描述)类似于实例254以2步合成标题化合物。

[2596]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.25 (s, 1H), 8.76 (d,  $J=5.9\text{Hz}$ , 2H), 8.51 (d,  $J=5.7\text{Hz}$ , 1H), 8.24-8.16 (m, 3H), 7.96 (s, 1H), 7.27 (s, 1H), 5.14 (s, 2H), 3.50 (dd,  $J=13.4, 6.8\text{Hz}$ , 1H), 3.40 (dd,  $J=13.8, 6.8\text{Hz}$ , 1H), 2.80 (dd,  $J=12.6, 6.0\text{Hz}$ , 1H), 2.70 (dd,  $J=12.5, 6.4\text{Hz}$ , 1H), 2.11 (dq,  $J=13.2, 6.6\text{Hz}$ , 1H), 1.04 (d,  $J=6.7\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 294.3,  $R_{t1}=0.37\text{min}$ .

[2597] 实例305: (R)-2-(吡啶-4-基)-4-(3-(三氟甲基)哌嗪-1-基)-1,7-萘啶

[2598]

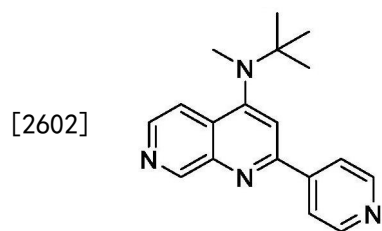


[2599] 类似于实例291由4-氯-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶(中间体6b)和(R)-2-(三氟甲基)哌嗪合成标题化合物。

[2600]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.40 (s, 1H), 8.84-8.71 (m, 2H), 8.58 (d,  $J=5.7\text{Hz}$ ,

1H), 8.35-8.18 (m, 2H), 7.88 (d, J=5.8Hz, 1H), 7.79 (s, 1H), 3.79 (s, 1H), 3.66 (d, J=11.9Hz, 1H), 3.53 (d, J=10.3Hz, 1H), 3.23-2.94 (m, 5H). LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 360.3, Rt<sub>1</sub>=0.71min。

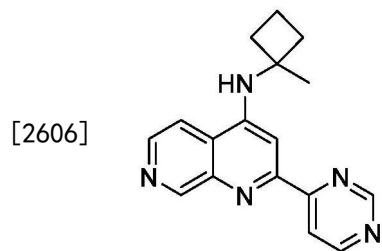
[2601] 实例306: N-(叔-丁基)-N-甲基-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺



[2603] 类似于实例254由4-氯-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶(中间体6b)和N,2-二甲基丙-2-胺合成标题化合物。

[2604] 1H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.43 (s, 1H), 8.81 (d, J=5.6Hz, 2H), 8.61 (d, J=5.7Hz, 1H), 8.24 (d, J=5.7Hz, 2H), 8.13 (d, J=6.2Hz, 2H), 2.97 (s, 3H), 1.30 (s, 9H). LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 293.3, Rt<sub>1</sub>=1.01min。

[2605] 实例307: N-(1-甲基环丁基)-2-(嘧啶-4-基)-1,7-萘啶-4-胺

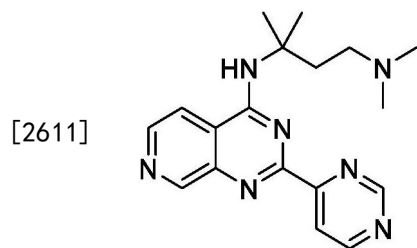


[2607] 由2,4-二氯-1,7-萘啶(中间体6a')和4-(三丁基甲锡烷基)嘧啶(步骤1)以及由4-氯-2-(嘧啶-4-基)-1,7-萘啶和1-甲基环丁-1-胺(步骤2)类似于实例270以2步合成标题化合物。

[2608] 1H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9.37 (s, 1H), 9.27 (s, 1H), 9.01 (dd, J=5.2, 1.5Hz, 1H), 8.59-8.48 (m, 2H), 8.29 (d, J=5.9Hz, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.58 (d, J=1.5Hz, 1H), 2.46 (s, 2H),

[2609] 2.27 (t, J=9.8Hz, 2H), 1.98 (dq, J=31.9, 10.6, 10.2Hz, 2H), 1.62 (s, 3H). LCMS (m/z [M+H]<sup>+</sup>): 292.4, Rt<sub>1</sub>=0.82min。

[2610] 实例308: N<sup>1</sup>, N<sup>1</sup>, 3-三甲基-N<sup>3</sup>-(2-(嘧啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丁烷-1, 3-二胺

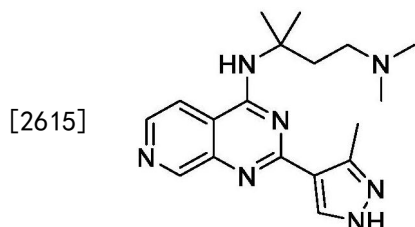


[2612] 由2,4-二氯吡啶并[3,4-d]嘧啶(中间体2c)和N<sup>1</sup>, N<sup>1</sup>, 3-三甲基丁烷-1,3-二胺(步骤1)以及由N<sup>3</sup>-(2-氯吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)-N<sup>1</sup>, N<sup>1</sup>, 3-三甲基丁烷-1,3-二胺和4-(三丁

基甲锡烷基)嘧啶(步骤2)类似于实例159以2步合成标题化合物。

[2613]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ ppm 9.29-9.48 (m, 2H), 9.22 (s, 1H), 9.05 (br d,  $J=5.01\text{Hz}$ , 1H), 8.70 (br d,  $J=5.50\text{Hz}$ , 1H), 8.38 (br d,  $J=5.01\text{Hz}$ , 1H), 7.91 (br d,  $J=4.89\text{Hz}$ , 1H), 2.21-2.43 (m, 8H), 2.05 (br s, 2H), 1.66 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 338.3,  $R_{t1}=0.47\text{min}$ 。

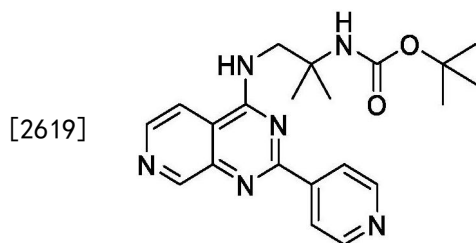
[2614] 实例309:  $N^1, N^1, 3$ -三甲基- $N^3$ -(2-(3-甲基-1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丁烷-1,3-二胺



[2616] 由2,4-二氯吡啶并[3,4-d]嘧啶(中间体2c)和 $N^1, N^1, 3$ -三甲基丁烷-1,3-二胺(步骤1)以及由 $N^3$ -(2-氯吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)- $N^1, N^1, 3$ -三甲基丁烷-1,3-二胺和叔-丁基3-甲基-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-1H-吡唑-1-甲酸酯(CAS号1009071-34-4,步骤2)类似于实例111以2步合成标题化合物。

[2617]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ ppm 12.57-12.95 (m, 1H), 8.89-9.00 (m, 2H), 8.48 (d,  $J=5.50\text{Hz}$ , 1H), 7.93-8.29 (m, 1H), 7.75 (br d,  $J=5.38\text{Hz}$ , 1H), 2.55-2.84 (m, 5H), 2.25 (s, 6H), 1.99 (br s, 2H), 1.61 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 340.3,  $R_{t1}=0.48\text{min}$ 。

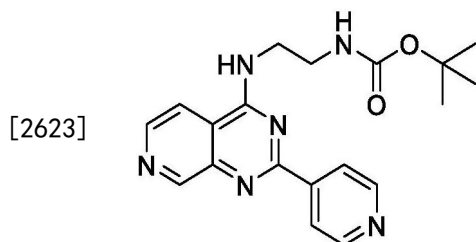
[2618] 实例310: 叔-丁基(2-甲基-1-((2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)丙-2-基)氨基甲酸酯



[2620] 类似于实例1由4-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶(中间体1c)和叔-丁基(1-氨基-2-甲基丙-2-基)氨基甲酸酯合成标题化合物。

[2621]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ 9.21 (s, 1H), 8.78 (dd,  $J=8.9, 4.9\text{Hz}$ , 3H), 8.68 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 8.44-8.34 (m, 2H), 8.22 (d,  $J=5.7\text{Hz}$ , 1H), 6.88 (s, 1H), 3.90 (d,  $J=6.1\text{Hz}$ , 2H), 1.35 (s, 6H), 1.27 (d,  $J=6.1\text{Hz}$ , 9H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 395.2,  $R_{t1}=0.97\text{min}$ 。

[2622] 实例311: 叔-丁基(2-((2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)乙基)氨基甲酸酯

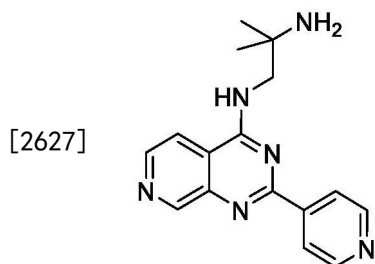




[2624] 类似于实例1由4-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶(中间体1c)和叔-丁基(2-氨基乙基)氨基甲酸酯合成标题化合物。

[2625]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.19 (s, 1H), 8.93-8.81 (m, 1H), 8.79-8.68 (m, 2H), 8.64 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 8.39 (d,  $J=5.1\text{Hz}$ , 2H), 8.13 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 7.03 (t,  $J=6.0\text{Hz}$ , 1H), 3.73 (q,  $J=6.2\text{Hz}$ , 2H), 3.40-3.32 (m, 2H), 1.33 (s, 9H). LCMS ( $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 367.2,  $\text{Rt}_1=0.78\text{min}$ 。

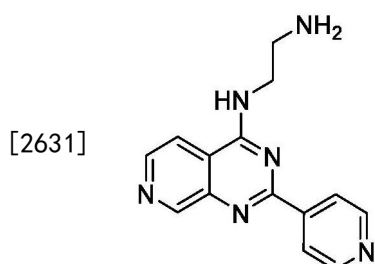
[2626] 实例312: 2-甲基- $\text{N}^1$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丙烷-1,2-二胺



[2628] 由4-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶(中间体1c)和叔-丁基(1-氨基-2-甲基丙-2-基)氨基甲酸酯(步骤1)以及Boc脱保护(使用TFA)(步骤2)类似于实例1以2步合成标题化合物。

[2629]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.18 (s, 1H), 8.83-8.74 (m, 2H), 8.65 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 8.38-8.33 (m, 2H), 8.31 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 3.70 (s, 2H), 1.13 (s, 6H). LCMS ( $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 295.2,  $\text{Rt}_1=0.41\text{min}$ 。

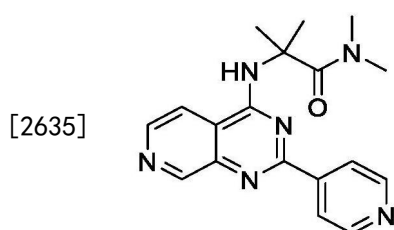
[2630] 实例313:  $\text{N}^1$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)乙烷-1,2-二胺



[2632] 由4-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶(中间体1c)和叔-丁基(2-氨基乙基)氨基甲酸酯(步骤1)以及Boc脱保护(使用TFA)(步骤2)类似于实例1以2步合成标题化合物。

[2633]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.18 (s, 1H), 8.81-8.71 (m, 2H), 8.64 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 8.43-8.30 (m, 2H), 8.20 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 3.73 (t,  $J=6.4\text{Hz}$ , 2H), 2.94 (t,  $J=6.4\text{Hz}$ , 2H). LCMS ( $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ ): 267.2,  $\text{Rt}_1=0.38\text{min}$ 。

[2634] 实例314: N,N,2-三甲基-2-((2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)丙酰胺

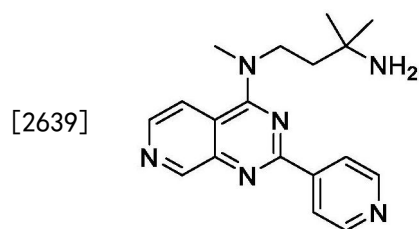


[2636] 类似于实例1由4-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶(中间体1c)和2-氨基-N,

N,2-三甲基丙酰胺合成标题化合物。

[2637]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.22 (s, 1H), 8.74 (dd,  $J=6.9, 2.4\text{Hz}$ , 3H), 8.68 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.38 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.36-8.31 (m, 2H), 2.95-2.69 (m, 6H), 1.6 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 337.2,  $R_{t1}=0.58\text{min}$ 。

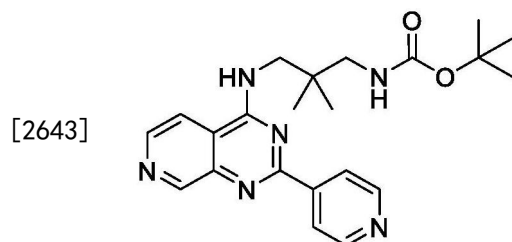
[2638] 实例315:  $N^1, 3$ -二甲基- $N^1$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丁烷-1,3-二胺



[2640] 类似于实例1由4-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶(中间体1c)和 $N^1, 3$ -二甲基丁烷-1,3-二胺合成标题化合物。

[2641]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.20 (s, 1H), 8.83-8.69 (m, 2H), 8.55 (d,  $J=5.8\text{Hz}$ , 1H), 8.40-8.29 (m, 2H), 8.12 (d,  $J=5.9\text{Hz}$ , 1H), 4.04-3.92 (m, 2H), 3.52 (s, 3H), 1.87-1.74 (m, 2H), 1.56 (s, 2H), 1.15 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 323.2,  $R_{t1}=0.49\text{min}$ 。

[2642] 实例316: 叔-丁基(2,2-二甲基-3-((2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)丙基)氨基甲酸酯



[2644] 类似于实例1由4-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶(中间体1c)和叔-丁基(3-氨基-2,2-二甲基丙基)氨基甲酸酯合成标题化合物。

[2645]  $^1\text{H}$  NMR (600MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.20 (s, 1H), 8.77 (d,  $J=4.9\text{Hz}$ , 2H), 8.68 (d,  $J=5.4\text{Hz}$ , 1H), 8.61 (t,  $J=6.4\text{Hz}$ , 1H), 8.43-8.30 (m, 2H), 8.17 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 7.01 (t,  $J=6.6\text{Hz}$ , 1H), 3.62 (d,  $J=6.2\text{Hz}$ , 2H), 2.93 (d,  $J=6.3\text{Hz}$ , 2H), 1.38 (s, 9H), 0.92 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 409.3,  $R_{t1}=1.06\text{min}$ 。

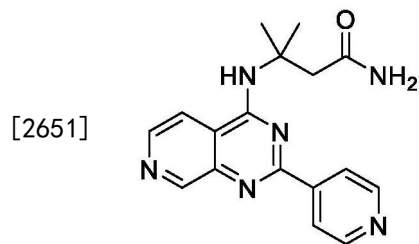
[2646] 实例317: 2,2-二甲基- $N^1$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丙烷-1,3-二胺



[2648] 由4-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶(中间体1c)和叔-丁基(3-氨基-2,2-二甲基丙基)氨基甲酸酯(步骤1)以及Boc脱保护(使用TFA)(步骤2)类似于实例1以2步合成标题化合物。

[2649]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.18 (s, 1H), 8.81-8.71 (m, 2H), 8.65 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.39-8.29 (m, 2H), 8.16 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 3.67 (s, 2H), 0.95 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 309.2,  $R_{t1}=0.43\text{min}$ .

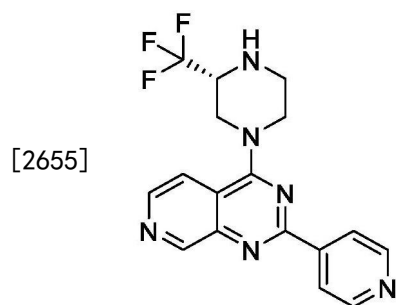
[2650] 实例318: 3-甲基-3-((2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)丁酰胺



[2652] 类似于实例1由4-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶(中间体1c)和3-氨基-3-甲基丁酰胺合成标题化合物。

[2653]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.21 (s, 1H), 8.94-8.80 (m, 2H), 8.77-8.60 (m, 2H), 8.48-8.35 (m, 2H), 8.10 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 7.59 (s, 1H), 7.12 (s, 1H), 2.76 (s, 2H), 1.71 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 323.3,  $R_{t1}=0.57\text{min}$ .

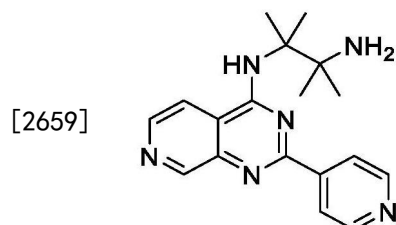
[2654] 实例319: (R)-2-(吡啶-4-基)-4-(3-(三氟甲基)哌嗪-1-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶



[2656] 类似于实例1由4-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶(中间体1c)和(R)-2-(三氟甲基)哌嗪合成标题化合物。

[2657]  $^1\text{H}$  NMR (600MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.31 (s, 1H), 8.79 (d,  $J=5.3\text{Hz}$ , 2H), 8.63 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.31 (d,  $J=4.9\text{Hz}$ , 2H), 7.97 (d,  $J=5.7\text{Hz}$ , 1H), 4.60-4.49 (m, 1H), 4.28-4.21 (m, 1H), 3.82-3.74 (m, 1H), 3.71-3.64 (m, 1H), 3.63-3.56 (m, 1H), 3.20-3.12 (m, 1H), 3.12-3.04 (m, 1H), 2.96-2.87 (m, 1H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 361.1,  $R_{t1}=0.72\text{min}$ .

[2658] 实例320: 2,3-二甲基- $N^2$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丁烷-2,3-二胺

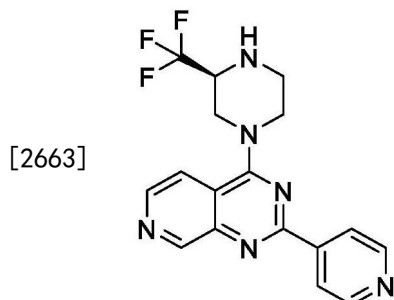


[2660] 类似于实例1由4-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶(中间体1c)和2,3-二甲基丁烷-2,3-二胺合成标题化合物。

[2661]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.18 (s, 1H), 8.88-8.74 (m, 2H), 8.66 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H),

8.40-8.19 (m, 2H), 7.74 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 1.63 (s, 6H), 1.21 (s, 6H). LCMS ( $m/z$   $[M+H]^+$ ): 323.2,  $R_{t1}=0.48\text{min}$ .

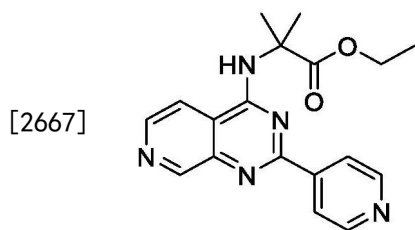
[2662] 实例321: (S)-2-(吡啶-4-基)-4-(3-(三氟甲基)哌嗪-1-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶



[2664] 类似于实例1由4-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶(中间体1c)和(S)-2-(三氟甲基)哌嗪合成标题化合物。

[2665]  $^1\text{H}$  NMR (600MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  9.31 (s, 1H), 8.81-8.77 (m, 2H), 8.63 (d,  $J=5.7\text{Hz}$ , 1H), 8.34-8.29 (m, 2H), 7.97 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 4.57-4.52 (m, 1H), 4.28-4.21 (m, 1H), 3.83-3.74 (m, 1H), 3.71-3.65 (m, 1H), 3.63-3.57 (m, 1H), 3.20-3.14 (m, 1H), 3.11-3.05 (m, 1H), 2.95-2.88 (m, 1H). LCMS ( $m/z$   $[M+H]^+$ ): 361.1,  $R_{t1}=0.72\text{min}$ .

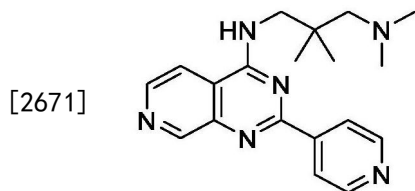
[2666] 实例322: 乙基2-甲基-2-((2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)丙酸酯



[2668] 类似于实例1由4-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶(中间体1c)和乙基2-氨基-2-甲基丙酸酯合成标题化合物。

[2669]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  9.23 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 8.80-8.74 (m, 2H), 8.69 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.39 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.28-8.23 (m, 2H), 3.99 (q,  $J=7.1\text{Hz}$ , 2H), 1.69 (s, 6H), 0.91 (t,  $J=7.1\text{Hz}$ , 3H). LCMS ( $m/z$   $[M+H]^+$ ): 338.2,  $R_{t1}=0.78\text{min}$ .

[2670] 实例323:  $N^1, N^1, 2, 2$ -四甲基- $N^3$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丙烷-1,3-二胺

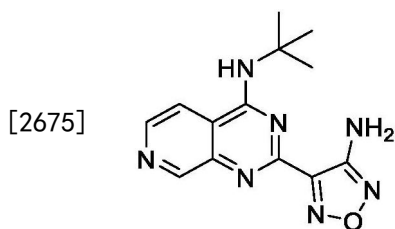


[2672] 类似于实例1由4-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶(中间体1c)和 $N^1, N^1, 2, 2$ -四甲基丙烷-1,3-二胺合成标题化合物。

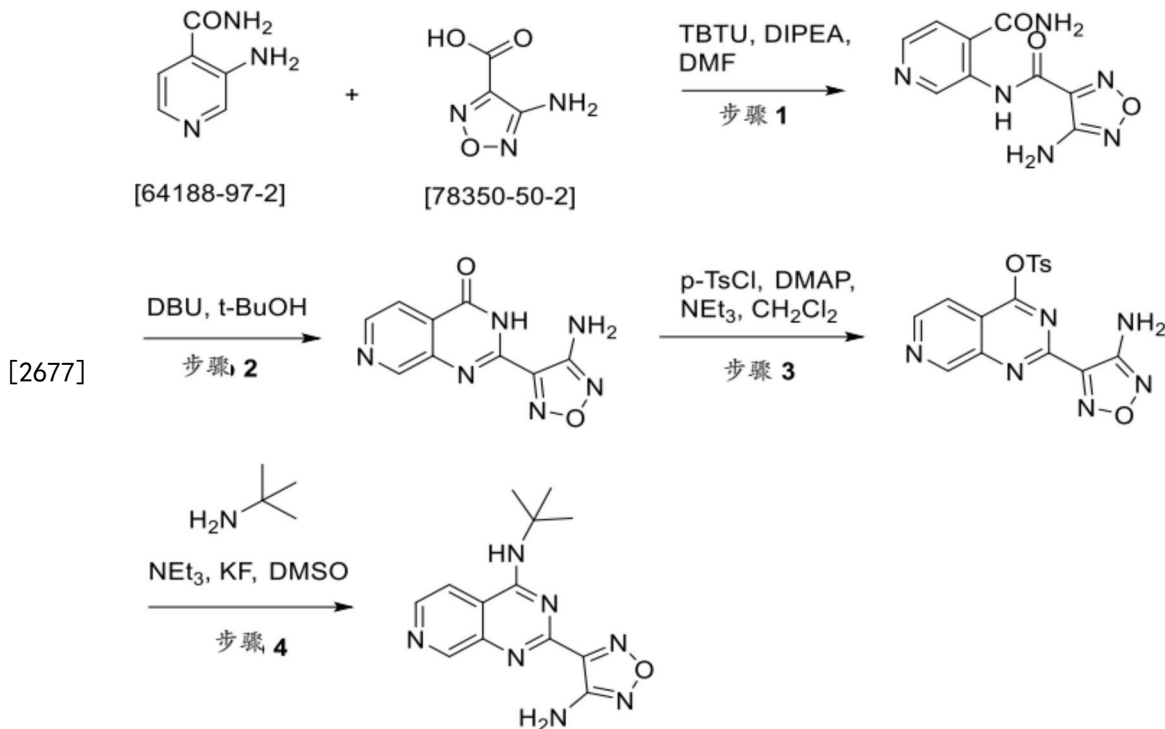
[2673]  $^1\text{H}$  NMR (600MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  9.20-9.17 (m, 1H), 9.04 (t,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.80-8.74 (m, 2H), 8.68-8.63 (m, 1H), 8.38-8.31 (m, 2H), 8.13-8.08 (m, 1H), 3.72-3.65 (m, 2H), 2.36-

2.28 (m, 8H), 0.99 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [M+H]<sup>+</sup>): 337.2,  $R_{t1}$  = 0.46 min.

[2674] 实例324: 4-(4-(叔-丁基氨基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-2-基)-1,2,5-噁二唑-3-胺



[2676] 根据以下方案, 由3-氨基异烟酰胺和4-氨基-1,2,5-噁二唑-3-甲酸合成标题化合物。



[2678] 步骤1: 4-氨基-N-(4-氨基甲酰基吡啶-3-基)-1,2,5-噁二唑-3-甲酰胺

[2679] 在配备温度计口袋和氮气入口的两颈R.B.烧瓶中, 在25℃-30℃将TBTU (4.75g, 14.8mmol) 和N,N-二异丙基乙胺 (2.6mL, 14.8mmol) 添加到3-氨基异烟酰胺 (1.7g, 12.4mmol) 和4-氨基-1,2,5-噁二唑-3-甲酸 (1.92g, 14.8mmol) 在DMF (40mL) 中的搅拌溶液中。将所得反应混合物在25℃-30℃下搅拌72h。将反应混合物倒在水 (200mL) 上, 并通过过滤收集沉淀的固体。用水 (100mL) 洗涤。通过使用在正己烷中的20%乙酸乙酯研磨进行纯化, 得到呈灰白色固体的4-氨基-N-(4-氨基甲酰基吡啶-3-基)-1,2,5-噁二唑-3-甲酰胺 (0.84g, 27.45%)。

[2680] <sup>1</sup>H-NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 12.60 (s, 1H, 可与D<sub>2</sub>O互换), 9.70 (s, 1H), 8.64 (s, 1H, 可与D<sub>2</sub>O互换), 8.52 (d, J=4.4Hz, 1H), 8.81 (s, 1H, 可与D<sub>2</sub>O互换), 7.80 (d, J=4.8Hz, 1H), 6.25 (s, 2H, 可与D<sub>2</sub>O互换). LCMS ( $m/z$  [M+H]<sup>+</sup>): 249.1,  $R_{t2}$  = 1.312 min.

[2681] 步骤2: 2-(4-氨基-1,2,5-噁二唑-3-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4(3H)-酮

[2682] 在密封管中, 将DBU (0.98g, 6.45mmol) 添加到4-氨基-N-(4-氨基甲酰基吡啶-3-基)-1,2,5-噁二唑-3-甲酰胺 (0.8g, 3.22mmol) 在叔丁醇 (8.0mL) 中的搅拌悬浮液中。密封

盖,并将反应混合物加热至100℃,持续16h。蒸发溶剂,将所得残余物用水(20mL)稀释,并在25℃-30℃下搅拌0.5h。通过过滤收集沉淀的固体,用水(2x 10mL)和正己烷(10mL)洗涤固体。将获得的固体在旋转烧瓶中在55℃下干燥,以获得呈灰白色固体的2-(4-氨基-1,2,5-噁二唑-3-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4(3H)-酮(0.421g,56.73%)。

[2683]  $^1\text{H-NMR}$  (400MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$ 13.31 (s, 1H, 可与 $\text{D}_2\text{O}$ 互换), 9.36 (s, 1H), 8.74 (d,  $J=5.2\text{Hz}$ , 1H), 8.01 (d,  $J=5.2\text{Hz}$ , 1H), 6.95 (s, 2H, 可与 $\text{D}_2\text{O}$ 互换)。LCMS ( $m/z$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ ): 231.2,  $\text{Rt}_2=1.279\text{min}$ 。

[2684] 步骤3: 2-(4-氨基-1,2,5-噁二唑-3-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基4-甲基苯磺酸酯

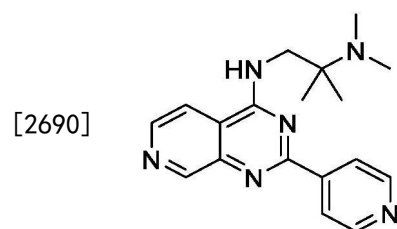
[2685] 在配备温度计口袋和氮气入口的两颈R.B.烧瓶中,在0℃将DMAP (0.015g, 0.116mmol) 添加到2-(4-氨基-1,2,5-噁二唑-3-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4(3H)-酮(0.27g, 1.168mmol) 和三乙胺 (0.245mL, 1.752mmol) 在二氯甲烷 (10mL) 中的搅拌溶液中。添加p-TsCl (0.245g, 1.168mmol), 并将所得反应混合物搅拌0.5h。通过除去冰浴使反应混合物升温至25℃-30℃,并在25℃-30℃下搅拌1.5h。将混合物用DCM (20mL) 稀释,用水 (2x 20mL) 和盐水 (20mL) 洗涤。经无水硫酸钠干燥有机层并过滤。将滤液在旋转蒸发仪上浓缩,得到呈粗品的2-(4-氨基-1,2,5-噁二唑-3-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基4-甲基苯磺酸酯 (0.285g, 63.21%)。粗品未经纯化即用于下一步。LCMS ( $m/z$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ ): 385.1,  $\text{Rt}_2=1.779\text{min}$ 。

[2686] 步骤4: 4-(4-(叔-丁基氨基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-2-基)-1,2,5-噁二唑-3-胺

[2687] 在配备温度计口袋和氮气入口的两颈R.B.烧瓶中,在25℃-30℃下将叔丁胺 (0.0714g, 0.976mmol) 添加到2-(4-氨基-1,2,5-噁二唑-3-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基4-甲基苯磺酸酯 (0.25g, 0.651mmol) 在DMSO (2.5mL) 中的搅拌溶液中,然后添加KF (0.0566g, 0.976mmol) 和三乙胺 (0.18mL, 1.304mmol)。在室温搅拌45分钟后,将反应混合物倒在水 (25mL) 上。通过过滤收集沉淀的固体。用水 (25mL) 和正己烷 (10mL) 洗涤固体。通过在正己烷:二乙醚1:1 (5mL) 中研磨进行纯化,得到呈灰白色固体的4-(4-(叔-丁基氨基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-2-基)-1,2,5-噁二唑-3-胺 (0.135g, 72.75%)。

[2688]  $^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ ppm 9.30 (s, 1H), 8.67 (d,  $J=5.57\text{Hz}$ , 1H), 8.39 (d,  $J=5.58\text{Hz}$ , 1H), 8.00 (s, 1H), 6.89 (s, 2H), 1.60 (s, 9H)。LCMS ( $m/z$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ ): 286.1,  $\text{Rt}_1=0.92\text{min}$ 。

[2689] 实例325:  $\text{N}^2, \text{N}^2, 2$ -三甲基- $\text{N}^1$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丙烷-1,2-二胺

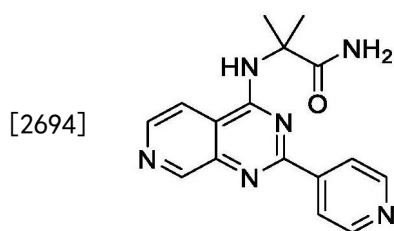


[2691] 类似于实例1由4-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶(中间体1c)和 $\text{N}^2, \text{N}^2, 2$ -三甲基丙烷-1,2-二胺合成标题化合物。

[2692]  $^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ 9.19 (s, 1H), 8.85-8.72 (m, 2H), 8.65 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.36-8.31 (m, 2H), 8.27 (t,  $J=6.4\text{Hz}$ , 2H), 3.79 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 2H), 2.27 (s, 6H), 1.09

(s, 6H). LCMS ( $m/z$   $[M+H]^+$ ): 323.2,  $R_{t1}=0.44\text{min}$ 。

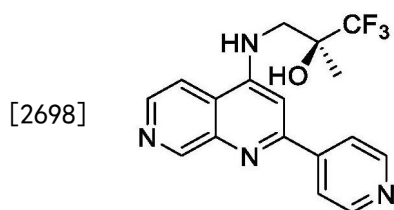
[2693] 实例326: 2-甲基-2-((2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)丙酰胺



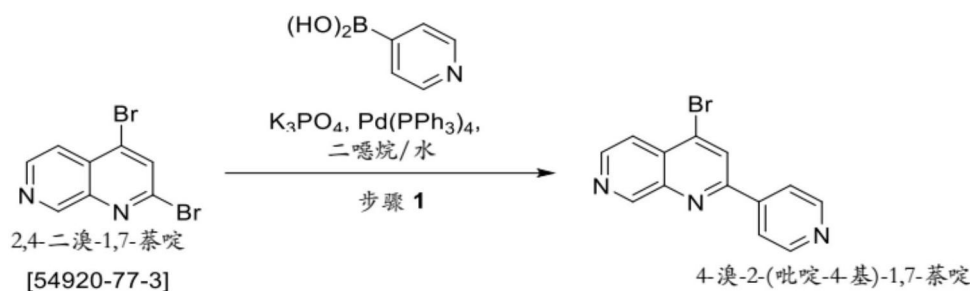
[2695] 类似于实例1由4-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶(中间体1c)和2-氨基-2-甲基丙酰胺合成标题化合物。

[2696]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.20 (s, 1H), 8.77-8.71 (m, 2H), 8.67 (d,  $J=5.5\text{Hz}$ , 1H), 8.49 (s, 1H), 8.39 (d,  $J=5.7\text{Hz}$ , 1H), 8.36-8.30 (m, 2H), 7.29 (s, 1H), 6.84 (s, 1H), 1.63 (s, 6H). LCMS ( $m/z$   $[M+H]^+$ ): 309.2,  $R_{t1}=0.50\text{min}$ 。

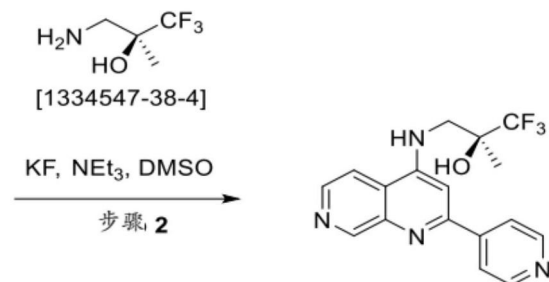
[2697] 实例327: (S)-1,1,1-三氟-2-甲基-3-((2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶-4-基)氨基)丙-2-醇



[2699] 根据以下方案由2,4-二溴-1,7-萘啶合成标题化合物。



[2700]

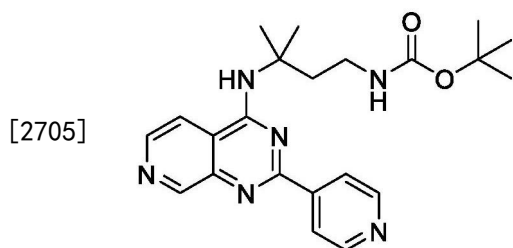


[2701] 步骤1: 将2,4-二溴-1,7-萘啶(350mg, 1.22mmol)、4-吡啶基硼酸(194mg, 1.58mmol)、磷酸钾(1032mg, 4.86mmol)和 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (140mg, 0.122mmol)在二噁烷(6mL)/水(1.5mL)中的溶液在微波瓶中的氩气下于110℃加热60分钟。在室温下添加水并将反应混合物用二氯甲烷萃取3次。将合并的有机相用盐水洗涤,用硫酸钠干燥,并在减压下蒸发溶剂。将残余物通过快速色谱(使用0-100%乙酸乙酯/环己烷)进行纯化,得到4-溴-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶(44%)。LCMS ( $m/z$   $[M+H]^+$ ): 286.0/288.0,  $R_{t1}=0.83\text{min}$ 。

[2702] 步骤2:类似于实例254由4-溴-2-(吡啶-4-基)-1,7-萘啶和(S)-3-氨基-1,1,1-三氟-2-甲基丙-2-醇[1334547-38-4]合成标题化合物。

[2703]  $^1\text{H}$  NMR (600MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ ppm 9.26 (s, 1H), 8.77 (d,  $J=5.69\text{Hz}$ , 2H), 8.53 (d,  $J=5.87\text{Hz}$ , 1H), 8.20 (d,  $J=5.69\text{Hz}$ , 1H), 8.14-8.18 (m, 2H), 7.48-7.55 (m, 2H), 6.34 (s, 1H), 3.82 (dd,  $J=14.58, 6.33\text{Hz}$ , 1H), 3.69-3.76 (m, 1H), 1.40 (s, 3H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 349.3,  $R_t=0.62\text{min}$ 。

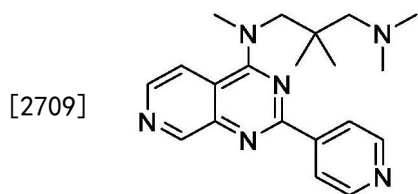
[2704] 实例328:叔-丁基(3-甲基-3-((2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)丁基)氨基甲酸酯



[2706] 类似于实例1由4-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶(中间体1c)和叔-丁基(3-氨基-3-甲基丁基)氨基甲酸酯合成标题化合物。

[2707]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ 9.18 (s, 1H), 8.88-8.73 (m, 2H), 8.64 (d,  $J=5.6\text{Hz}$ , 1H), 8.37 (d,  $J=5.7\text{Hz}$ , 1H), 8.33-8.25 (m, 2H), 7.73 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 2.97 (t,  $J=7.6\text{Hz}$ , 2H), 2.31-2.19 (m, 2H), 1.60 (s, 6H), 1.25 (s, 9H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 409.2,  $R_{t1}=0.96\text{min}$ 。

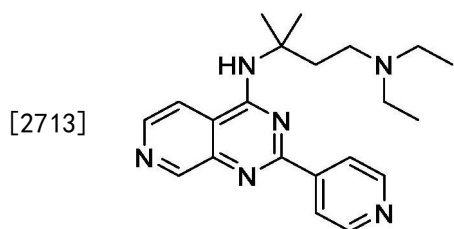
[2708] 实例329: $N^1, N^1, N^3, 2, 2$ -五甲基- $N^3$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丙烷-1,3-二胺



[2710] 类似于实例1由4-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶(中间体1c)和 $N^1, N^1, N^3, 2, 2$ -五甲基丙烷-1,3-二胺合成标题化合物。

[2711]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ 9.18 (s, 1H), 8.76 (d, 2H), 8.54 (d,  $J=5.9\text{Hz}$ , 1H), 8.34 (d, 2H), 8.23 (d,  $J=5.9\text{Hz}$ , 1H), 4.11 (s, 2H), 3.66 (s, 3H), 2.30 (s, 6H), 2.23 (s, 2H), 0.96 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 351.2,  $R_{t1}=0.50\text{min}$ 。

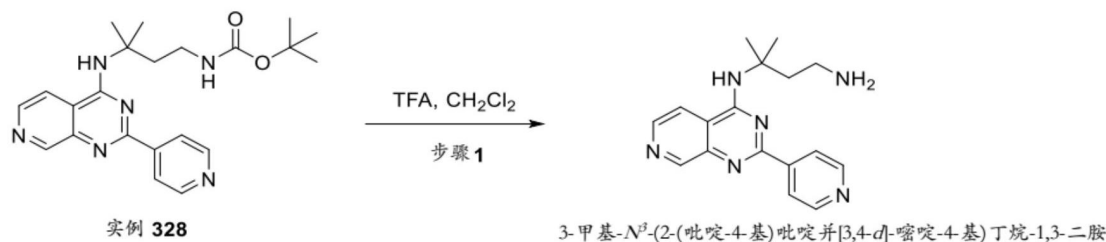
[2712] 实例330: $N^1, N^1$ -二乙基-3-甲基- $N^3$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丁烷-1,3-二胺



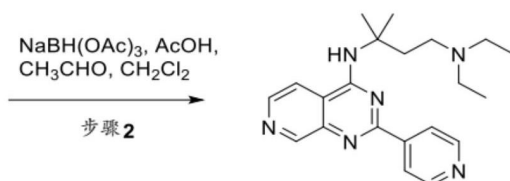
[2714] 根据以下方案由实例328(叔-丁基(3-甲基-3-((2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧



啉-4-基)氨基)丁基)氨基甲酸酯)合成标题化合物。



[2715]

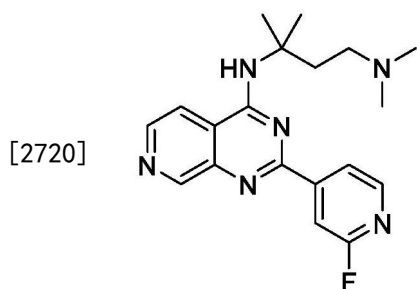


[2716] 步骤1:向在二氯甲烷(2mL)中的叔-丁基(3-甲基-3-((2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)氨基)丁基)氨基甲酸酯(80mg,0.196mmol)添加TFA(0.377mL,4.90mmol),并将所得黄色溶液在室温搅拌2h。然后将溶液蒸发至干。将残余物溶解在MeOH中,并将溶液提供在PoraPak Rxn CX 20cc(2g)色谱柱上。然后将柱用5mL MeOH洗涤两次。最后,将化合物用在MeOH中的7N  $\text{NH}_3$ 洗脱。减压蒸发滤液,得到3-甲基- $N^3$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丁烷-1,3-二胺(66%)。LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ):309.1,  $R_{t1}$ =0.53min。

[2717] 步骤2:将3-甲基- $N^3$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丁烷-1,3-二胺(40mg,0.130mmol)、乙酸(0.037mL,0.649mmol)和乙醛(57mg,1.297mmol)二氯甲烷(5mL)中的溶液在室温下搅拌1小时。然后添加 $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (137mg,0.649mmol),并将混合物在室温搅拌另外1小时。添加饱和 $\text{NaHCO}_3$ -溶液,并将水相用二氯甲烷(3x 20mL)萃取3次。将合并的有机相用盐水洗涤,用硫酸钠干燥,并在减压下蒸发溶剂。将残余物通过快速色谱(使用12%-100%乙酸乙酯/环己烷的梯度,然后用2%-30%甲醇(+10%7N  $\text{NH}_3$ 的甲醇溶液)/二氯甲烷的梯度)进行纯化,得到黄色油。将所述油溶于二氯甲烷(2mL)中,并添加在二噁烷中的4N HCl(0.2mL)。滤出沉淀物并用戊烷洗涤,得到呈HCl盐的标题化合物(17%)。

[2718]  $^1\text{H}$  NMR(400MHz, 甲醇- $d_4$ )  $\delta$ 9.52(s, 1H), 9.22-9.02(m, 4H), 8.82(d,  $J$ =6.2Hz, 1H), 8.74(dd,  $J$ =6.2, 0.9Hz, 1H), 3.27(dd,  $J$ =8.4, 4.7Hz, 2H), 3.21(q,  $J$ =7.3Hz, 4H), 2.84-2.70(m, 2H), 1.79(s, 6H), 1.23(t,  $J$ =7.3Hz, 6H)。LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ):365.2,  $R_{t1}$ =0.59min。

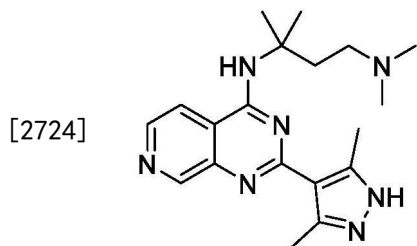
[2719] 实例331: $N^3$ -(2-(2-氟吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)- $N^1, N^1$ ,3-三甲基丁烷-1,3-二胺



[2721] 由2,4-二氯吡啶并[3,4-d]嘧啶(中间体2c)和 $N^1,N^1,3$ -三甲基丁烷-1,3-二胺(步骤1)以及由 $N^3$ -(2-氯吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)- $N^1,N^1,3$ -三甲基丁烷-1,3-二胺和(2-氟吡啶-4-基)硼酸(CAS号401815-98-3,步骤2)类似于实例111以2步合成标题化合物。

[2722]  $^1H$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.53 (s, 1H), 9.18 (s, 1H), 8.69 (d,  $J=5.5$ Hz, 1H), 8.46 (d,  $J=5.2$ Hz, 1H), 8.26 (dd,  $J=4.7, 2.0$ Hz, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.85 (d,  $J=5.6$ Hz, 1H), 2.26 (s, 6H), 2.00 (t,  $J=6.4$ Hz, 2H), 1.66 (s, 6H), 注释: 一个CH<sub>2</sub>信号与DMSO信号重叠。LCMS ( $m/z$  [M+H]<sup>+</sup>): 355.2,  $R_{t1}=0.67$ min。

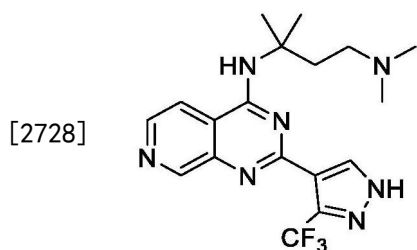
[2723] 实例332:  $N^3$ -(2-(3,5-二甲基-1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)- $N^1,N^1,3$ -三甲基丁烷-1,3-二胺



[2725] 由2,4-二氯吡啶并[3,4-d]嘧啶(中间体2c)和 $N^1,N^1,3$ -三甲基丁烷-1,3-二胺(步骤1)以及由 $N^3$ -(2-氯吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)- $N^1,N^1,3$ -三甲基丁烷-1,3-二胺和叔-丁基3,5-二甲基-4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-1H-吡唑-1-甲酸酯(CAS号1073354-70-7,步骤2)类似于实例111以2步合成标题化合物。

[2726]  $^1H$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.41 (s, 1H), 9.11 (s, 1H), 8.95 (s, 1H), 8.49 (d,  $J=5.5$ Hz, 1H), 7.68 (d,  $J=5.6$ Hz, 1H), 2.56 (s, 6H), 2.27 (s, 6H), 1.92 (t,  $J=6.1$ Hz, 2H), 1.61 (s, 6H). 注释: 一个CH<sub>2</sub>信号与DMSO信号重叠。LCMS ( $m/z$  [M+H]<sup>+</sup>): 354.2,  $R_{t1}=0.50$ min。

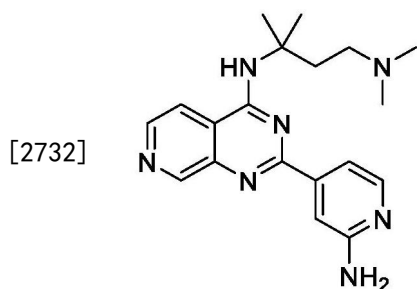
[2727] 实例333:  $N^1,N^1,3$ -三甲基- $N^3$ -(2-(3-(三氟甲基)-1H-吡唑-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丁烷-1,3-二胺



[2729] 由2,4-二氯吡啶并[3,4-d]嘧啶(中间体2c)和 $N^1,N^1,3$ -三甲基丁烷-1,3-二胺(步骤1)以及由 $N^3$ -(2-氯吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)- $N^1,N^1,3$ -三甲基丁烷-1,3-二胺和4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)-3-(三氟甲基)-1H-吡唑(CAS号1218790-40-9,步骤2)类似于实例111以2步合成标题化合物。

[2730]  $^1H$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13.80 (s, 1H), 9.25 (s, 1H), 8.96 (s, 1H), 8.57 (d,  $J=5.5$ Hz, 1H), 8.46 (s, 1H), 7.75 (d,  $J=5.6$ Hz, 1H), 2.25 (s, 6H), 1.93 (t,  $J=6.3$ Hz, 2H), 1.60 (s, 6H). 注释: 一个CH<sub>2</sub>信号与DMSO信号重叠。LCMS ( $m/z$  [M+H]<sup>+</sup>): 394.3,  $R_{t1}=0.62$ min。

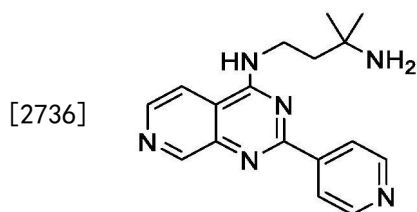
[2731] 实例334:  $N^3$ -(2-(2-氨基吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)- $N^1,N^1,3$ -三甲基丁烷-1,3-二胺



[2733] 由2,4-二氯吡啶并[3,4-d]嘧啶(中间体2c)和 $N^1,N^1,3$ -三甲基丁烷-1,3-二胺(步骤1),由 $N^3$ -(2-氯吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)- $N^1,N^1,3$ -三甲基丁烷-1,3-二胺和叔-丁基(4-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊硼烷-2-基)吡啶-2-基)氨基甲酸酯CAS号1095708-32-9(步骤2)和Boc脱保护(使用TFA)(步骤3)类似于实例111以3步合成标题化合物。

[2734]  $^1H$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.30 (s, 1H), 9.11 (s, 1H), 8.62 (d,  $J=5.6$ Hz, 1H), 8.07 (d,  $J=5.3$ Hz, 1H), 7.82 (d,  $J=5.6$ Hz, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.43 (dd,  $J=5.3, 1.4$ Hz, 1H), 6.11 (s, 2H), 2.47 (d,  $J=8.1$ Hz, 2H), 2.24 (s, 6H), 1.99 (t,  $J=6.4$ Hz, 2H), 1.66 (s, 6H). LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 352.2,  $R_{t_1}=0.48$ min。

[2735] 实例335: 3-甲基- $N^1$ -(2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶-4-基)丁烷-1,3-二胺



[2737] 由4-氯-2-(吡啶-4-基)吡啶并[3,4-d]嘧啶(中间体1c)和叔-丁基(4-氨基-2-甲基丁-2-基)氨基甲酸酯(步骤1)以及Boc脱保护(使用TFA)(步骤2)类似于实例1以2步合成标题化合物。

[2738]  $^1H$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.18 (s, 1H), 8.80-8.71 (m, 2H), 8.63 (d,  $J=5.5$ Hz, 1H), 8.37-8.31 (m, 2H), 8.07 (d,  $J=5.5$ Hz, 1H), 3.83-3.73 (m, 2H), 1.80-1.68 (m, 2H), 1.15 (s, 6H), 3个可互换的质子. LCMS ( $m/z$  [ $M+H$ ] $^+$ ): 309.2,  $R_{t_1}=0.45$ min。

[2739] 离体细胞群扩增及在治疗中的用途

[2740] 用于制备扩增的细胞群的起始材料:

[2741] 自体方法

[2742] 可以从接受者本人获得用于细胞群扩增方法以获得扩增的细胞群的细胞的接种群。在部分存在组织、器官或细胞缺陷(例如存在健康细胞)的患者中,可以从未受影响的组织或器官或细胞来源获得细胞的接种群。例如,在单侧眼细胞缺陷的情况下,可以从未受影响的眼的活检中获得接种群。它也可以从部分受损的器官中剩余的健康组织中获得。

[2743] 同种异体法

[2744] 在优选的实施例中,用于细胞群扩增方法以获得扩增的细胞群的细胞的接种群可以从最初衍生自供体组织(例如人、兔、猴等,优选人)的细胞获得。

[2745] 例如,人组织的来源是尸体供体或来自活体供体(包括活体亲属)的组织。

[2746] 在自体或同种异体方法下从已从体内移出的如上所述衍生的自体或同种异体组

织,可按以下来提取和制备细胞:例如,可以使用手术刀解剖所需区域,然后将细胞解离(例如,使用胶原酶、分散酶、胰蛋白酶、accutase或TripLE;例如在37℃下1mg/ml的胶原酶),直到45分钟至3小时通过显微镜观察(例如使用Zeiss Axiovert倒置显微镜)细胞明显脱离为止。

[2747] 为了用于根据本发明的细胞群扩增方法中,然后例如通过移液将分离的细胞添加到培养基中,如下文“细胞群扩增”部分所述。

[2748] 在根据本发明的优选实施例中,对从供体收获的细胞材料的质量进行评估。例如,在收获细胞并开始在培养基(如下所述的生长或细胞增殖培养基)中培养后约24小时,在明场显微镜下进行目测评估以寻找存在的漂浮细胞(作为死细胞的指示)。理想地,所述评估是要表明,对于适于用于产生根据本发明的扩增的细胞群的材料而言,漂浮细胞约少于10%。

[2749] 不限制适用于根据本发明的细胞群扩增方法的细胞数量,但是作为出于说明目的的实例,适合用于根据本发明的细胞群扩增方法的接种细胞群可以包含约1000个细胞。

[2750] 如果需要测量接种细胞群中的细胞数,这可以例如根据本领域众所周知的标准方案通过使用光学显微镜、免疫组织化学或FACS的手动或自动细胞计数来完成。

[2751] 离体眼细胞群扩增及在治疗中的用途

[2752] 以下更详细地描述与应用于眼细胞的眼细胞群扩增有关的方法(起始材料的制备,随后是细胞群扩增阶段,细胞的储存),其中以角膜缘干细胞和角膜内皮细胞为具体实例。

[2753] 用于制备扩增的角膜缘干细胞群的起始材料:角膜上皮细胞和角膜缘细胞

[2754] 自体方法

[2755] 可以从接受者本人获得用于细胞群扩增方法以获得扩增的角膜缘干细胞群的细胞的接种群。在角膜缘干细胞部分缺陷的患者中,可以从角膜缘的未受影响部分获得接种细胞群。例如,在单侧角膜缘干细胞缺陷的情况下,可以从未受影响的眼的活检中获得接种群。它也可以从部分受损的角膜缘中剩余的健康组织中获得。

[2756] 同种异体法

[2757] 在优选的实施例中,用于细胞群扩增方法以获得扩增的角膜缘干细胞群的细胞的接种群可以从最初衍生自供体哺乳动物角膜组织(例如人、兔、猴等,优选人)的细胞获得。

[2758] 例如,人角膜组织的来源是尸体供体(例如,通过眼库来源)或来自活体供体(包括活体亲属)的组织。一定范围的供体角膜缘组织适合于根据本发明的用途。在一个优选的实施例中,角膜组织获自具有相容的HLA谱的活着的亲属或供体。

[2759] 用于获得LSC的组织可以是例如宽度约4mm,高度约1mm的角膜缘组织的环。

[2760] 在自体或同种异体方法下从已从体内移出的如上所述的角膜组织,可按以下来提取和制备细胞:例如,可以使用手术刀解剖角膜缘上皮区域,然后将细胞解离(例如,使用胶原酶、分散酶、胰蛋白酶、accutase或TripLE;例如在37℃下1mg/ml的胶原酶),直到45分钟至3小时通过显微镜观察(例如使用Zeiss Axiovert倒置显微镜)细胞明显脱离为止。

[2761] 为了用于根据本发明的细胞群扩增方法中,然后例如通过移液将分离的细胞添加到培养基中,如下文“细胞群扩增”部分所述。

[2762] 在根据本发明的优选实施例中,对从供体角膜收获的细胞材料的质量进行评估。

例如,在收获细胞并开始在培养基(如下所述的生长或细胞增殖培养基)中培养后约24小时,在明场显微镜下进行目测评估以寻找存在的漂浮细胞(作为死细胞的指示)。理想地,所述评估是要表明,对于适于用于产生根据本发明的扩增的细胞群的材料而言,漂浮细胞约少于10%。

[2763] 不限制适用于根据本发明的细胞群扩增方法的细胞数量,但是作为出于说明目的的实例,适合用于根据本发明的细胞群扩增方法的接种细胞群可以包含约1000个角膜缘干细胞。

[2764] 如果需要测量接种细胞群中的细胞数,这可以例如根据本领域众所周知的标准方案通过使用光学显微镜、免疫组织化学或FACS的手动或自动细胞计数来完成。

[2765] 用于制备扩增的角膜内皮细胞群的起始材料:

[2766] 用于细胞群扩增方法的角膜内皮细胞(CEC)的接种群可以获得自最初衍生自哺乳动物角膜组织(例如人、兔、猴等,优选人)的细胞。例如,人角膜组织的来源是尸体人供体(可能通过眼库来源的)。

[2767] 供体的年龄范围可以是例如从婴儿期到70岁。优选地还合适的供体是那些没有角膜疾病或外伤史的供体。在根据本发明的一个实施例中,优选的供体角膜是那些角膜内皮细胞计数高于2000个细胞/ $\text{mm}^2$ (面积)的那些。在根据本发明的更优选的实施例中,角膜内皮细胞计数为2000至3500个细胞/ $\text{mm}^2$ (面积)。例如通过按照本领域已知的标准眼库技术在直接光显微镜或角膜内皮显微镜下检查供体材料的角膜以评估供在移植到患者之前的供体组织(参见Tran等人(2016) Comparison of Endothelial Cell Measurements by Two Eye Bank Specular Microscopes[两个眼库角膜内皮显微镜对内皮细胞的测量的比较]; International Journal of Eye Banking[国际眼库杂志];第4卷.,第2期;1-8,其通过引用并入本文)。

[2768] 用于获得CEC的角膜表面不受限制,但是可以是例如大约8mm-10mm直径的面积。

[2769] 例如,可以从供体角膜组织中提取和制备CEC,如下所示:例如使用手术级反向Sinsky内皮剥离器,对角膜内皮细胞层和后弹力膜和(DM)评分。将DM内皮细胞层从角膜基质上剥离,并将细胞从DM解离(例如在37°C下使用1mg/ml胶原酶)直到通过显微镜观察(例如使用Zeiss Axiovert倒置显微镜)观察到细胞脱离变得明显(从45分钟到3小时)。由于在角膜中DM仅携带角膜内皮细胞,因此以这种方式分离的细胞群是CEC群,其适合用作根据本发明的接种细胞群。

[2770] 为了在根据本发明的细胞群扩增方法中使用,可以如下文“细胞群扩增”部分中所述将分离的角膜内皮细胞添加到培养基中。

[2771] 在根据本发明的优选实施例中,对从供体角膜收获的细胞材料的质量进行评估。例如,在收获细胞并开始在培养基(如下所述的生长或细胞增殖培养基)中培养后约24小时,在明场显微镜下进行目测评估以寻找存在的漂浮细胞(作为死细胞的指示)。理想地,所述评估是要表明,对于适于用于产生根据本发明的扩增的细胞群的材料而言,漂浮细胞约少于10%。

[2772] 不限制适用于根据本发明的细胞群扩增方法的细胞起始数量,但是作为出于说明目的的实例,适合用于根据本发明的细胞群扩增方法的角膜内皮细胞接种细胞群可以是100 000至275 000个细胞。

[2773] 如果需要测量接种细胞群中的细胞数,这可以例如通过取等分样品并进行免疫细胞化学(例如,计数被Sytox Orange染色的细胞核)或通过在明场显微镜下进行活细胞成像来计数细胞数来进行。

[2774] Sytox Orange测定可根据本领域已知的标准方案进行。简而言之,在细胞附着于细胞培养皿后(通常在细胞铺板后24小时),将细胞固定在多聚甲醛中。然后使细胞透化(例如,使用0.3%Triton X-100的溶液),然后将其在Sytox Orange的溶液中标记(例如,使用在PBS的中的0.5微摩尔Sytox Orange)。然后在Zeiss落射荧光显微镜下计数每表面面积被Sytox Orange染色的核的数目。

#### [2775] 细胞群扩增

[2776] 在本发明的一个实施例中,包含来自患者或供体的细胞的细胞群可以在本领域已知的培养容器中的培养基中生长,所述培养容器例如板、多孔板和细胞培养瓶。例如,可以使用未涂覆或涂覆胶原、synthemax、明胶或纤连蛋白的培养皿。合适的培养容器的优选实例是无涂覆的板。也可以使用本领域已知的用于工业用途的标准培养容器和设备,例如生物反应器。

[2777] 使用的培养基可以是生长培养基或细胞增殖培养基。通常,生长培养基是支持细胞群生长和维持的培养基。本领域技术人员可以容易地为特定类型的细胞群确定合适的生长培养基。用于干细胞培养或上皮细胞培养的合适的生长培养基是本领域已知的,例如:补充了FBS(胎牛血清)的DMEM(杜氏改良伊戈尔培养基)(英杰公司(Invitrogen))、补充了人血清的人内皮SF(无血清)培养基(英杰公司(Invitrogen))、X-VIVO15培养基(龙沙集团(Lonza))、或DMEM/F12(赛默飞世尔科学公司(Thermo Fischer Scientific))(任选地补充氯化钙)。这些可以另外补充有生长因子(例如bFGF)和/或抗生素如青霉素和链霉素。

[2778] 可替代地,可以首先将分离的细胞添加到根据本发明的细胞增殖培养基中。本文所定义的细胞增殖培养基包含生长培养基和根据本发明的LATS抑制剂。

[2779] 在某些实施例中,本发明的细胞增殖培养基包含生长培养基和根据本发明的LATS抑制剂。LATS抑制剂优选地选自包含根据式A1或其子式并且如在“LATS抑制剂”部分下进一步描述的化合物的组。

[2780] 在一个优选的实施例中,以约0.5至100微摩尔,优选约0.5至25微摩尔,更优选约1至20微摩尔的浓度添加根据式A1或其子式的LATS抑制剂。在一个具体的实施例中,以约3至10微摩尔的浓度添加根据式A1或其子式的LATS抑制剂。

[2781] 在一个实施例中,可以通过将化合物粉末在DMSO中溶解至储备浓度为10mM来制备根据式A1或其子式的化合物的储备溶液。

[2782] 在本发明的一个方面,根据本发明的LATS抑制剂抑制细胞群中LATS1和/或LATS2活性。在一个优选的实施例中,所述LATS抑制剂抑制LATS1和LATS2。

[2783] 细胞可以经历一轮或多轮新鲜生长培养基和/或细胞增殖培养基的添加。无需传代细胞即可添加新鲜培养基,但传代细胞也是添加新鲜培养基的一种方式。

[2784] 也可以使用一系列培养基,以各种顺序组合:例如,细胞增殖培养基,然后添加生长培养基(其未补充有根据本发明的LATS抑制剂,并且可以不同于用作细胞增殖培养基基础的生长培养基)。

[2785] 根据本发明的细胞群扩增阶段发生在细胞暴露于细胞增殖培养基的时期。

[2786] 可以使用本领域已知的用于培养细胞的标准温度条件,例如优选地约30℃至40℃。特别优选地,细胞生长以及细胞群扩增阶段在约37℃下进行。可以使用具有5%-10% CO<sub>2</sub>水平的常规细胞培养箱。优选地,将细胞暴露于5% CO<sub>2</sub>。

[2787] 在培养期间,根据需要可以在生长或细胞增殖培养基中传代细胞。细胞在亚汇合或汇合时可以传代。优选地,当细胞达到约90%-100%汇合时使细胞传代,尽管也可以在较低的汇合百分比水平进行。细胞的传代是根据本领域已知的标准方案进行的。例如,简而言之,通过以下来传代细胞:用Accutase处理培养物(例如10分钟),通过离心漂洗细胞悬浮液,并根据需要将细胞铺板在新鲜的生长培养基或细胞增殖培养基中。细胞分裂比的范围例如为1:2至1:5。

[2788] 对于根据本发明的细胞群扩增方法的细胞群扩增阶段,可以进行接种细胞群在细胞增殖培养基中的扩增,直到获得所需量的细胞材料。

[2789] 可将细胞暴露于细胞增殖培养基一段时间,以扩增细胞群。

[2790] 在一个优选的实施例中,在从患者或供体组织中分离细胞后,将接种细胞群直接暴露于根据本发明的LATS抑制剂(例如根据式A1或其子式的那些化合物)并维持细胞增殖所需的整个时间,例如12至16天。

[2791] 在根据本发明的一个实施例中,可以任选地执行基因编辑技术以遗传修饰细胞和/或表达生物治疗化合物。例如,可以修饰细胞以降低或消除介导免疫应答的基因的表达和/或功能,否则当将细胞群递送给患者时,其可能有助于免疫排斥。基因编辑技术在根据本发明的细胞群扩增方法中的应用是任选的,并且如果希望减轻患者体内被移植材料的免疫排斥问题,可以替代的向患者施用局部免疫抑制剂和/或抗炎剂(如在免疫抑制剂和抗炎剂部分下进一步描述)。

[2792] 根据本发明的一方面,遗传修饰包括降低或消除与促进宿主抗移植免疫应答有关的基因的表达和/或功能。在一个优选的实施例中,遗传修饰包括将基因编辑系统引入分离的干细胞或干细胞群中,所述基因编辑系统特异性靶向与促进宿主抗移植免疫应答相关的基因。在一个具体的实施例中,所述基因编辑系统选自下组,该组由以下组成:CRISPR (CRISPR:成簇规律间隔短回文重复序列,也称为CRISPR/Cas系统)、ZFN(锌指核酸酶)、TALEN(基于转录激活样效应子的核酸酶)、工程化的大范围核酸酶(例如ARCUS核酸酶、例如ARC核酸酶)、AAV载体(腺相关病毒)和基于慢病毒载体的基因组编辑技术。

[2793] 基因编辑技术(如果使用)可以在不同的点进行,例如(1)在组织上,细胞分离之前或(2)在细胞分离时或(3)在体外细胞群扩增阶段(在细胞在体外暴露于本发明的LATS抑制剂时)或(4)在体外在细胞群扩增阶段结束时(在细胞体外暴露于本发明的LATS抑制剂之后)。在一个具体实施例中,在根据本发明的LATS抑制剂存在下细胞体外扩增两周后使用CRISPR。

[2794] 在“降低免疫排斥”部分中进一步描述了适用于细胞群扩增方法的基因编辑技术。

[2795] 在根据本发明的细胞群扩增方法中,优选为化合物的LATS抑制剂产生接种细胞群的大于2倍的扩增。

[2796] 在根据本发明的细胞群扩增方法的一个方面,根据式A1或其子式的化合物产生分离细胞(即,从患者或供体获得的细胞)的接种群的大于30倍扩增。在根据本发明的细胞群扩增方法的一个具体的实施例中,根据式A1或其子式的LATS抑制剂产生分离细胞的接种群

的100倍至2200倍扩增。在根据本发明的细胞群扩增方法的一个更具体的实施例中,根据式A1或其子式的LATS抑制剂产生分离细胞的接种群的600倍至2200倍扩增。通过根据本发明的细胞群扩增方法获得的倍数扩增系数可以在细胞的一次或多次传代中实现。在本发明的另一个方面,通过根据本发明的细胞群扩增方法获得的倍数扩增系数可以在暴露于根据式A1或其子式的化合物约12至16天、优选地约14天后实现。

[2797] 如果需要测量细胞数或细胞群的扩增,可以例如通过取等分样品并进行免疫细胞化学(例如,计数被Sytox Orange染色的细胞核)或通过在明场显微镜下进行活细胞成像来计数细胞数来完成或通过在根据本发明的方法的细胞群扩增阶段的各个时间点对细胞汇合进行实时定量活细胞分析来完成。

[2798] Sytox Orange测定可根据本领域已知的标准方案进行。简而言之,在细胞附着于细胞培养皿后(通常在细胞铺板后24小时),将细胞固定在多聚甲醛中。然后使细胞透化(例如,使用0.3% Triton X-100的溶液),然后将其在Sytox Orange的溶液中标记(例如,使用在PBS的中的0.5微摩尔Sytox Orange)。然后在Zeiss落射荧光显微镜下计数每表面面积被Sytox Orange染色的核的数目。

[2799] 可以将通过根据本发明的细胞群扩增方法扩增的细胞群添加至溶液中,然后例如在保存溶液或冷冻保存溶液(例如下文所述的那些)中进行存储,或直接添加至适合于递送至患者的组合物中。适用于眼递送的保存溶液、冷冻保存溶液或组合物可以任选地包含根据本发明的LATS抑制剂。

[2800] 在根据本发明的更优选的实施例中,递送给患者的细胞群制剂包含非常低至可忽略的水平的LATS抑制剂化合物。因此,在一个具体的实施例中,根据本发明的细胞群扩增的方法包括进一步漂洗的步骤,以基本上除去根据本发明的化合物(例如根据式A1或其子式的化合物)。这可以包括在根据本发明的细胞群扩增阶段之后漂洗细胞。为了漂洗细胞,将细胞与培养皿中脱离(例如,通过用Accutase处理),然后离心脱离的细胞,并在PBS或根据本发明的生长培养基中制备细胞悬浮液。所述步骤可以进行多次,例如1至10次,以漂洗出细胞。最后,可以根据需要将细胞重悬于保存溶液、冷冻保存溶液、适合于眼递送的组合物、生长培养基或其组合中。

[2801] 通过细胞群扩增方法和漂洗包含根据本发明的LATS抑制剂的细胞增殖培养基制备的扩增的细胞群可以被转移到适于递送给患者的组合物中,例如定位剂。任选地,将细胞群在添加到适于递送给患者的定位剂之前存储一段时间。在一个优选的实施例中,可以首先将扩增的细胞群添加至适合于保存或冷冻保存的溶液中,所述溶液优选不包含LATS抑制剂,并且在添加至适合于递送给患者的定位剂之前存储(任选地冷冻)的细胞群优选也不含LATS抑制剂。

[2802] 适用于冷冻保存的典型溶液、甘油、二甲基亚砷、丙二醇或乙酰胺可用于本发明的冷冻保存溶液。冷冻保存的细胞制剂通常保持在-20℃或-80℃。

[2803] 细胞群扩增:以制备扩增的角膜缘干细胞群

[2804] 在本发明的一个实施例中,包括例如角膜上皮细胞和角膜缘细胞(包括角膜缘干细胞的细胞群(例如如在“用于制备扩增的角膜缘干细胞群的起始材料:角膜上皮细胞和角膜缘细胞”部分中所述获得的)可以在本领域已知的培养容器(例如板、多孔板和细胞培养瓶)中的培养基中生长。例如,可以使用未涂覆或涂覆胶原、synthemax、明胶或纤连蛋白



的培养皿。合适的培养容器的优选实例是无涂覆的板。也可以使用本领域已知的用于工业用途的标准培养容器和设备,例如生物反应器。

[2805] 使用的培养基可以是生长培养基或细胞增殖培养基。本文将生长培养基定义为支持细胞群生长和维持的培养基。用于干细胞培养或上皮细胞培养的合适的生长培养基是本领域已知的,例如:补充了FBS(胎牛血清)的DMEM(杜氏改良伊戈尔培养基)(英杰公司(Invitrogen))、补充了人血清的人内皮SF(无血清)培养基(英杰公司(Invitrogen))、X-VIV015培养基(龙沙集团(Lonza))、或DMEM/F12(赛默飞世尔科学公司(Thermo Fischer Scientific))(任选地补充氯化钙)。这些可以另外补充有生长因子(例如bFGF)和/或抗生素如青霉素和链霉素。根据本发明的优选的生长培养基是X-VIV015培养基(其没有另外补充生长因子)。

[2806] 可替代地,可以首先将分离的细胞添加到根据本发明的细胞增殖培养基中。本文所定义的细胞增殖培养基包含生长培养基和根据本发明的LATS抑制剂。在根据本发明的细胞增殖培养基中,生长培养基组分选自下组,该组由以下组成:补充了FBS(胎牛血清)的DMEM(杜氏改良伊戈尔培养基)(英杰公司(Invitrogen))、补充了人血清的人内皮SF(无血清)培养基(英杰公司(Invitrogen))、X-VIV015培养基(龙沙集团(Lonza))、或DMEM/F12(赛默飞世尔科学公司(Thermo Fischer Scientific))(任选地补充氯化钙)。这些可以另外补充有生长因子(例如bFGF)和/或抗生素如青霉素和链霉素。

[2807] 根据本发明的优选的细胞增殖培养基是具有根据本发明的LATS抑制剂的X-VIV015培养基(龙沙集团)。这种细胞增殖培养基的优点是不需要另外的生长因子或饲养细胞来促进LSC的增殖。X-VIV0培养基尤其包括药物级人白蛋白、重组人胰岛素和巴氏灭菌的人转铁蛋白。任选地,可以将抗生素添加到X-VIV015培养基中。在一个优选的实施例中,使用X-VIV015培养基而不添加抗生素。

[2808] 细胞增殖培养基包含生长培养基和根据本发明的LATS抑制剂。LATS抑制剂优选地选自包含根据式A1或其子式并且如在“LATS抑制剂”部分下进一步描述的化合物的组。

[2809] 在一个优选的实施例中,以约0.5至100微摩尔,优选约0.5至25微摩尔,更优选约1至20微摩尔的浓度添加根据式A1或其子式的LATS抑制剂。在一个具体的实施例中,以约3至10微摩尔的浓度添加根据式A1或其子式的LATS抑制剂。

[2810] 在一个实施例中,可以通过将化合物粉末在DMSO中溶解至储备浓度为10mM来制备根据式A1或其子式的化合物的储备溶液。

[2811] 在本发明的一个方面,根据本发明的LATS抑制剂抑制角膜缘细胞中LATS1和/或LATS2活性。在一个优选的实施例中,所述LATS抑制剂抑制LATS1和LATS2。

[2812] 细胞可以经历一轮或多轮新鲜生长培养基和/或细胞增殖培养基的添加。无需传代细胞即可添加新鲜培养基,但传代细胞也是添加新鲜培养基的一种方式。

[2813] 也可以使用一系列培养基,以各种顺序组合:例如,细胞增殖培养基,然后添加生长培养基(其未补充有根据本发明的LATS抑制剂,并且可以不同于用作细胞增殖培养基基础的生长培养基)。

[2814] 根据本发明的细胞群扩增阶段发生在细胞暴露于细胞增殖培养基的时期。

[2815] 可以使用本领域已知的用于培养细胞的标准温度条件,例如优选地约30℃至40℃。特别优选地,细胞生长以及细胞群扩增阶段在约37℃下进行。可以使用具有5%-10%

CO<sub>2</sub>水平的常规细胞培养箱。优选地,将细胞暴露于5%CO<sub>2</sub>。

[2816] 在培养期间,根据需要可以在生长或细胞增殖培养基中传代细胞。细胞在亚汇合或汇合时可以传代。优选地,当细胞达到约90%-100%汇合时使细胞传代,尽管也可以在较低的汇合百分比水平进行。细胞的传代是根据本领域已知的标准方案进行的。例如,简而言之,通过以下来传代细胞:用Accutase处理培养物(例如10分钟),通过离心漂洗细胞悬浮液,并根据需要将细胞铺板在新鲜的生长培养基或细胞增殖培养基中。细胞分裂比的范围例如为1:2至1:5。

[2817] 对于根据本发明的细胞群扩增方法的细胞群扩增阶段,可以进行接种细胞群在细胞增殖培养基中的扩增,直到获得所需量的细胞材料。

[2818] 可将细胞暴露于细胞增殖培养基一段时间,以扩增细胞群。例如,这可以包括在培养基中培养LSC的全部时间,或者LSC分离后的第一周,或者从角膜分离角膜缘后的24小时。

[2819] 在一个优选的实施例中,在从角膜中分离细胞后,将接种细胞群直接暴露于根据本发明的LATS抑制剂(例如根据式A1或其子式的那些化合物)并维持LSC增殖所需的整个时间,例如12至16天。

[2820] 在根据本发明的一个实施例中,可以任选地执行基因编辑技术以遗传修饰细胞,以降低或消除介导免疫应答的基因的表达和/或功能,否则当将细胞群递送给患者时,其可能有助于免疫排斥。基因编辑技术在根据本发明的细胞群扩增方法中的应用是任选的,并且如果希望减轻患者体内被移植材料的免疫排斥问题,可以替代的向患者施用局部免疫抑制剂和/或抗炎剂(如在免疫抑制剂和抗炎剂部分下进一步描述)。

[2821] 根据本发明的一方面,遗传修饰包括降低或消除与促进宿主抗移植免疫应答有关的基因的表达和/或功能。在一个优选的实施例中,遗传修饰包括将基因编辑系统引入角膜缘干细胞中,所述基因编辑系统特异性靶向与促进宿主抗移植免疫应答相关的基因。在一个具体的实施例中,所述基因编辑系统选自下组,该组由以下组成:CRISPR(CRISPR:成簇规律间隔短回文重复序列,也称为CRISPR/Cas系统)、ZFN(锌指核酸酶)、TALEN(基于转录激活样效应子的核酸酶)、工程化的大范围核酸酶(例如ARCUS核酸酶、例如ARC核酸酶)、AAV载体(腺相关病毒)基因编辑(例如,AAV载体驱动的同源重组)和基于慢病毒载体的基因组编辑技术。AAV载体驱动的基因递送(例如通过同源重组驱动的基因递送)可以通过选自下组的AAV实现,该组由以下组成:AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9或其衍生物。

[2822] 基因编辑技术(如果使用)可以在不同的点进行,例如(1)在角膜缘上皮组织上,LSC分离之前或(2)在细胞分离时或(3)在体外细胞群扩增阶段(在细胞在体外暴露于本发明的LATS抑制剂时)或(4)在体外在细胞群扩增阶段结束时(在细胞体外暴露于本发明的LATS抑制剂之后)。在一个具体实施例中,在根据本发明的LATS抑制剂存在下细胞体外扩增两周后使用CRISPR。

[2823] 在“降低免疫排斥”部分中进一步描述了适用于细胞群扩增方法的基因编辑技术。

[2824] 在根据本发明的细胞群扩增方法中,优选为化合物的LATS抑制剂产生接种细胞群的大于2倍的扩增。

[2825] 在根据本发明的细胞群扩增方法的一个方面,根据式A1或其子式的化合物产生角膜缘细胞的接种群的大于30倍扩增。在根据本发明的细胞群扩增方法的一个具体的实施例中,根据式A1或其子式的LATS抑制剂产生角膜缘细胞的接种群的100倍至2200倍扩增。在根

据本发明的细胞群扩增方法的一个更具体的实施例中,根据式A1或其子式的LATS抑制剂产生角膜缘细胞的接种群的600倍至2200倍扩增。通过根据本发明的细胞群扩增方法获得的倍数扩增系数可以在细胞的一次或多次传代中实现。在本发明的另一个方面,通过根据本发明的细胞群扩增方法获得的倍数扩增系数可以在暴露于根据式A1或其子式的化合物约12至16天、优选地约14天后实现。

[2826] 在根据本发明的细胞群扩增方法的一个方面,根据式A1或其子式的LATS抑制剂产生相较于细胞总数,其中p63 $\alpha$ 阳性细胞多于6%的细胞群。在根据本发明的细胞群扩增方法的一个具体的实施例中,根据式A1或其子式的LATS抑制剂产生相较于细胞总数,其中p63 $\alpha$ 阳性细胞多于20%的细胞群。在根据本发明的细胞群扩增方法的另一个具体的实施例中,根据式A1或其子式的LATS抑制剂产生相较于细胞总数,其中p63 $\alpha$ 阳性细胞多于70%的细胞群。在根据本发明的细胞群扩增方法的又一个具体的实施例中,根据式A1或其子式的LATS抑制剂产生相较于细胞总数,其中p63 $\alpha$ 阳性细胞多于95%的细胞群。通过根据本发明的细胞群扩增方法获得的p63 $\alpha$ 阳性细胞的百分比的增加可以在细胞的一次或多次传代中实现。在本发明的另一个方面,通过根据本发明的细胞群扩增方法获得的p63 $\alpha$ 阳性细胞的百分比的增加可以在暴露于根据式A1或其子式的化合物约12至16天、优选地约14天后实现。

[2827] 如果需要测量细胞数或细胞群的扩增,可以例如通过取等分样品并进行免疫细胞化学(例如,计数被Sytox Orange染色的细胞核)或通过在明场显微镜下进行活细胞成像来计数细胞数来完成或通过在根据本发明的方法的细胞群扩增阶段的各个时间点对细胞汇合进行实时定量活细胞分析来完成。

[2828] Sytox Orange测定可根据本领域已知的标准方案进行。简而言之,在细胞附着于细胞培养皿后(通常在细胞铺板后24小时),将细胞固定在多聚甲醛中。然后使细胞透化(例如,使用0.3% Triton X-100的溶液),然后将其在Sytox Orange的溶液中标记(例如,使用在PBS的中的0.5微摩尔Sytox Orange)。然后在Zeiss落射荧光显微镜下计数每表面面积被Sytox Orange染色的核的数目。

[2829] 在根据本发明的一个方面,通过根据本发明的细胞群扩增方法可获得的或获得的LSC群优选显示以下特征中的至少一个。更优选地,其显示以下特征中的两个或更多个,更优选地,其显示以下特征中的全部。

[2830] (1) 所述细胞制剂对p63 $\alpha$ 细胞呈阳性。p63 $\alpha$ 的表达可以通过本领域已知的标准技术来估计,例如免疫组织化学和定量RT-PCR。

[2831] (2) 所述细胞制剂包含超过6%的p63 $\alpha$ 阳性细胞。优选地,所述细胞制剂包含超过10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的p63 $\alpha$ 阳性细胞。在一个优选的实施例中,所述细胞制剂包含超过95%的p63 $\alpha$ 阳性细胞。p63 $\alpha$ 细胞的百分比可以通过免疫组织化学或FACS测量。

[2832] (3) 所述细胞表达ABCB5、ABCG2和C/EBP $\delta$ 中的一种或多种。ABCB5、ABCG2、和C/EBP $\delta$ 的表达可以通过本领域已知的标准技术来估计,例如免疫组织化学和定量RT-PCR。

[2833] (4) 通过角蛋白-12表达观察到,所述细胞可以分化为角膜上皮细胞。这些特征可以通过免疫组织化学或FACS观察到。

[2834] 可以将通过根据本发明的细胞群扩增方法扩增的细胞群添加至溶液中,然后例如

在保存溶液或冷冻保存溶液(例如下文所述的那些)中进行存储,或直接添加至适合于眼递送的组合物中。适用于眼递送的保存溶液、冷冻保存溶液或组合物可以任选地包含根据本发明的LATS抑制剂。

[2835] 在根据本发明的更优选的实施例中,递送给眼的细胞群制剂包含非常低至可忽略的水平LATS抑制剂化合物。因此,在一个具体的实施例中,根据本发明的细胞群扩增的方法包括进一步漂洗的步骤,以基本上除去根据本发明的化合物(例如根据式A1或其子式的化合物)。这可以包括在根据本发明的细胞群扩增阶段之后漂洗细胞。为了漂洗细胞,将细胞与培养皿中脱离(例如,通过用Accutase处理),然后离心脱离的细胞,并在PBS或根据本发明的生长培养基中制备细胞悬浮液。所述步骤可以进行多次,例如1至10次,以漂洗出细胞。最后,可以根据需要将细胞重悬于保存溶液、冷冻保存溶液、适合于眼递送的组合物、生长培养基或其组合中。

[2836] 通过细胞群扩增方法和漂洗包含根据本发明的LATS抑制剂的细胞增殖培养基制备的扩增的细胞群可以被转移到适于眼递送的组合物中,例如定位剂。任选地,将细胞群在添加到适于眼递送的定位剂之前存储一段时间。在一个优选的实施例中,可以首先将扩增的细胞群添加至适合于保存或冷冻保存的溶液中,所述溶液优选不包含LATS抑制剂,并且在添加至适合于眼递送的定位剂之前存储(任选地冷冻)的细胞群优选也不含LATS抑制剂。

[2837] 适用于保存LSC的典型溶液是Optisol或PBS,优选是Optisol。Optisol是包含硫酸软骨素和葡聚糖的角膜存储介质,以增强存储过程中的角膜脱水(参见例如Kaufman等人,(1991)Optisol corneal storage medium[Optisol角膜存储介质];Arch Ophthalmol[眼科学文献]6月;109(6):864-8)。为了冷冻保存,在本发明的冷冻保存溶液中可以使用甘油、二甲基亚砷、丙二醇或乙酰胺。冷冻保存的细胞制剂通常保持在-20℃或-80℃。

[2838] 在一个方面,本发明涉及通过根据本发明的细胞群扩增方法可获得的角膜缘干细胞的保存的或冷冻保存的制剂。在一个可替代的方面,本发明涉及一种新鲜细胞制剂,其中通过本发明的细胞群扩增方法可获得的角膜缘干细胞悬浮在PBS和/或生长培养基中或与定位剂组合。新鲜细胞制剂通常保持在约15℃至37℃。本领域已知的标准细胞培养容器例如小瓶或烧瓶可用于储存细胞。

[2839] 在根据本发明的优选实施例中,在用于眼之前,将冷冻保存的细胞制剂解冻(例如,通过在培养箱或水浴中在约37℃的温度下培养)。优选地,可以添加10体积的PBS或生长培养基以从冷冻保存液中漂洗掉细胞。然后可以在与用于眼递送的定位剂组合之前将细胞通过离心漂洗,并且可以在PBS和/或生长培养基中制成细胞悬浮液,所述定位剂还优选地不包含LATS抑制剂。

[2840] 在本发明的一个方面,将通过细胞群扩增方法制备的扩增的细胞群制备为悬浮液(例如在PBS和/或生长培养基,例如X-VIVO培养基中)并与适合眼递送的定位剂(例如生物基质,如GelMA)组合使用。在根据本发明的治疗方法的一个具体的实施例中,细胞、PBS和/或生长培养基以及生物基质的这种组合经由载体(例如接触透镜)被递送至眼。在又一个具体的实施例中,细胞、PBS和/或生长培养基以及生物基质的这种组合最多仅包含痕量水平的LATS抑制剂。

[2841] 如本文所使用的术语“痕量水平”意指少于5%w/v(例如,不超过5%w/v、4%w/v、3%w/v、2%w/v、或1%w/v)、和优选地少于0.01%w/v(例如,不超过0.01%w/v、0.009%w/v、

v、0.008%w/v、0.007%w/v、0.006%w/v、0.005%w/v、0.004%w/v、0.003%w/v、0.002%w/v、或0.001%w/v),其可以被测量,例如使用如在本文实例中所述的高分辨率色谱。在某些实施例中,本发明的LATS抑制剂化合物的痕量水平是在一个或多个洗涤步骤之后存在的残余化合物的水平,其总地低于此类化合物的细胞效力,因此它们在体内不诱导生物学作用。因此,化合物的残余水平低于预期对细胞培养物中或受试者中的细胞群扩增具有生物学作用的量(例如,在将扩增的细胞群移植至受试者之后)。可以例如作为洗涤效率来测量痕量水平,其可以如下计算:洗涤效率=100-(洗涤后沉淀的平均浓度 $\times$ 沉淀体积 $\times$ 分子量)/(化合物浓度 $\times$ 培养基体积 $\times$ 分子量)。如本文所使用的,“漂洗以基本上从细胞中去除”本发明的LATS抑制剂化合物是指用于建立痕量水平的LATS抑制剂化合物的步骤。

[2842] 可替代地,可以培养细胞并且细胞群增殖阶段可以在适合于细胞递送至眼表面的定位剂(例如纤维蛋白、胶原蛋白)上的细胞增殖培养基中发生。

[2843] 细胞群扩增:制备扩增的角膜内皮细胞群:

[2844] 在本发明的一个优选的实施例中,角膜内皮细胞(例如如在“用于制备扩增的角膜内皮细胞群的起始材料”部分中所述分离的和可获得的)可以在本领域已知的培养容器例如板、多孔板和细胞培养瓶中的培养基中生长。例如,可以使用未涂覆或涂覆胶原、synthemax、明胶或纤连蛋白的培养皿。合适的培养容器的优选实例是无涂覆的板。也可以使用本领域已知的用于工业用途的标准培养容器和设备,例如生物反应器。

[2845] 使用的培养基可以是生长培养基或细胞增殖培养基。本文将生长培养基定义为支持细胞群生长和维持的培养基。用于角膜内皮细胞培养的合适的生长培养基是本领域已知的,例如:补充了FBS(胎牛血清)的DMEM(杜氏改良伊戈尔培养基)(英杰公司(Invitrogen))、补充了人血清的人内皮SF(无血清)培养基(英杰公司(Invitrogen))、X-VIVO15培养基(龙沙集团(Lonza))或间充质干细胞条件培养基。这些可以另外补充有生长因子(例如bFGF)和/或抗生素如青霉素和链霉素。根据本发明的优选的生长培养基是X-VIVO15培养基(其没有另外补充生长因子)。

[2846] 可替代地,可以首先将分离的细胞添加到根据本发明的细胞增殖培养基中。本文所定义的细胞增殖培养基包含生长培养基和根据本发明的LATS抑制剂。在根据本发明的细胞增殖培养基中,生长培养基组分选自下组,该组由以下组成:补充了FBS(胎牛血清)的DMEM(杜氏改良伊戈尔培养基)(英杰公司(Invitrogen))、补充了人血清的人内皮SF(无血清)培养基(英杰公司(Invitrogen))、X-VIVO15培养基(龙沙集团(Lonza))或间充质干细胞条件培养基。这些可以另外补充有生长因子(例如bFGF)和/或抗生素如青霉素和链霉素。

[2847] 根据本发明的优选的细胞增殖培养基是具有根据本发明的LATS抑制剂的X-VIVO15培养基(龙沙集团)。这种细胞增殖培养基的优点是不需要另外的生长因子或饲养细胞来促进CEC的增殖。X-VIVO培养基尤其包括药物级人白蛋白、重组人胰岛素和巴氏灭菌的人转铁蛋白。任选地,可以将抗生素添加到X-VIVO15培养基中。在一个优选的实施例中,使用X-VIVO15培养基而不添加抗生素。

[2848] 细胞增殖培养基包含生长培养基和根据本发明的LATS抑制剂。LATS抑制剂优选地选自包含根据式A1或其子式并且如在“LATS抑制剂”部分下进一步描述的化合物的组。

[2849] 在一个优选的实施例中,以约0.5至100微摩尔,优选约0.5至25微摩尔,更优选约1至20微摩尔的浓度添加根据式A1或其子式的LATS抑制剂。在一个具体的实施例中,以约3至

10微摩尔的浓度添加根据式A1或其子式的LATS抑制剂。

[2850] 在一个实施例中,可以通过将化合物粉末在DMSO中溶解至储备浓度为10mM来制备根据式A1或其子式的化合物的储备溶液。

[2851] 在本发明的一个方面,根据本发明的LATS抑制剂抑制角膜内皮细胞中LATS1和/或LATS2活性。在一个优选的实施例中,所述LATS抑制剂抑制LATS1和LATS2。

[2852] 细胞可以经历一轮或多轮新鲜生长培养基和/或细胞增殖培养基的添加。无需传代细胞即可添加新鲜培养基,但传代细胞也是添加新鲜培养基的一种方式。

[2853] 也可以使用一系列培养基,以各种顺序组合:例如,细胞增殖培养基,然后添加生长培养基(其未补充有根据本发明的LATS抑制剂,并且可以不同于用作细胞增殖培养基基础的生长培养基)。

[2854] 根据本发明的细胞群扩增阶段发生在细胞暴露于细胞增殖培养基的时期。

[2855] 可以使用本领域已知的用于培养细胞的标准温度条件,例如优选地约30℃至40℃。特别优选地,细胞生长以及细胞群扩增阶段在约37℃下进行。可以使用具有5%-10% CO<sub>2</sub>水平的常规细胞培养箱。优选地,将细胞暴露于5% CO<sub>2</sub>。

[2856] 在培养期间,根据需要可以在生长或细胞增殖培养基中传代细胞。细胞在亚汇合或汇合时可以传代。优选地,当细胞达到约90%-100%汇合时使细胞传代,尽管也可以在较低的汇合百分比水平进行。细胞的传代是根据本领域已知的标准方案进行的。例如,简而言之,例如使用胶原酶将细胞从培养容器中脱离。然后将细胞离心并在PBS或根据本发明的细胞生长培养基中漂洗,并根据需要以例如1:2至1:4的稀释度接种在新鲜的生长或细胞增殖培养基中。

[2857] 对于根据本发明的细胞群扩增方法的细胞群扩增阶段,可以进行接种细胞群在细胞增殖培养基中的扩增,直到获得所需量的细胞材料。

[2858] 可将细胞暴露于细胞增殖培养基一段时间,以扩增细胞群。例如,这可能包括在培养基中培养CEC的全部时间,或者仅CEC分离后的第一至两周,或者仅从角膜分离后的24小时。

[2859] 在一个优选的实施例中,在从角膜中分离细胞后,将角膜内皮细胞直接暴露于根据本发明的LATS抑制剂(例如根据式A1或其子式的那些化合物)并维持CEC增殖所需的整个时间,例如一至两周。

[2860] 在本发明的一个更优选的实施例中,在体外细胞群扩增阶段之后(即,在将细胞暴露于根据本发明的LATS抑制剂一段时间以扩增细胞群之后),根据本发明的细胞群扩增方法包括另外的步骤,其中可以在不补充LATS抑制剂的情况下使细胞在生长培养基中生长一段时间(例如两周),以使得能够形成成熟的角膜内皮。成熟的角膜内皮在本文中被定义为具有六边形形态、ZO-1阳性紧密连接和Na/K ATP酶表达的CEC的单层。在一个优选的实施例中,当形成成熟的角膜内皮时,细胞不传代。

[2861] 在根据本发明的一个实施例中,可以任选地执行基因编辑技术以遗传修饰细胞,以降低或消除介导免疫应答的基因的表达和/或功能,否则当将细胞群递送给患者时,其可能有助于免疫排斥。基因编辑技术在根据本发明的细胞群扩增方法中的应用是任选的,并且如果希望减轻患者体内被移植材料的免疫排斥问题,可以替代的向患者施用局部免疫抑制剂和/或抗炎剂(如在免疫抑制剂和抗炎剂部分下进一步描述)。

[2862] 根据本发明的一个方面,对于使用基因编辑技术的情形,遗传修饰包括降低或消除与促进宿主抗移植免疫应答有关的基因的表达和/或功能。在一个优选的实施例中,遗传修饰包括将基因编辑系统引入角膜内皮细胞中,所述基因编辑系统特异性靶向与促进宿主抗移植免疫应答相关的基因。在一个具体的实施例中,所述基因编辑系统选自下组,该组由以下组成:CRISPR (CRISPR:成簇规律间隔短回文重复序列,也称为CRISPR/Cas系统)、ZFN (锌指核酸酶)、TALEN (基于转录激活样效应子的核酸酶)、工程化的大范围核酸酶 (例如ARCUS核酸酶、例如ARC核酸酶)、AAV载体 (腺相关病毒) 基因编辑 (例如,AAV载体驱动的同源重组) 和基于慢病毒载体的基因组编辑技术。AAV载体驱动的基因递送 (例如通过同源重组驱动的基因递送) 可以通过选自下组的AAV实现,该组由以下组成:AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9或其衍生物。

[2863] 基因编辑技术 (如果使用) 可以在不同的点进行,例如 (1) 在角膜组织上,CEC分离之前或 (2) 在细胞分离时或 (3) 在体外细胞群扩增阶段 (在细胞在体外暴露于本发明的LATS抑制剂时) 或 (4) 在体外在细胞群扩增阶段结束时 (在细胞体外暴露于本发明的LATS抑制剂之后)。

[2864] 在“降低免疫排斥”部分中进一步描述了适用于细胞群扩增方法的基因编辑技术。

[2865] 在根据本发明的细胞群扩增方法中,优选为化合物的LATS抑制剂产生接种细胞群的大于2倍的扩增。

[2866] 在根据本发明的细胞群扩增方法的一个方面,根据式A1或其子式的化合物产生角膜内皮细胞的接种群的大于10倍扩增。在根据本发明的细胞群扩增方法的一个具体的实施例中,根据式A1或其子式的LATS抑制剂产生角膜内皮细胞的接种群的15倍至600倍扩增。在根据本发明的细胞群扩增方法的一个更具体的实施例中,根据式A1或其子式的LATS抑制剂产生角膜内皮细胞的接种群的20倍至550倍扩增。通过根据本发明的细胞群扩增方法获得的倍数扩增系数可以在细胞的一次或多次传代中实现。在本发明的另一个方面,通过根据本发明的细胞群扩增方法获得的倍数扩增系数可以在暴露于根据式A1或其子式的化合物一至两周后实现,优选地约10天后。

[2867] 如果需要测量细胞数或细胞群的扩增,可以例如通过取等分样品并进行免疫细胞化学 (例如,计数被Sytox Orange染色的细胞核) 或通过明场显微镜下进行活细胞成像来计数细胞数来完成或通过在根据本发明的方法的细胞群扩增阶段的各个时间点对细胞汇合进行实时定量活细胞分析来完成。

[2868] 在根据本发明的一个方面,通过根据本发明的细胞群扩增方法可获得的或获得的CEC群优选显示以下特征中的至少一个。更优选地,其显示以下特征中的两个或更多个,特别优选地,其显示以下特征中的全部。

[2869] (1) 所述细胞表达Na/K ATP酶。Na/K ATP酶的表达可以通过本领域已知的标准技术来估计,例如免疫组织化学、定量RT-PCR或通过FACS分析。

[2870] (2) 所述细胞表达胶原8a2、AQP1 (水通道1) 和SLC4A11 (溶质载体家族4成员11) 中的一个或多个。优选地,相对表达水平高于通常不表达胶原蛋白8a2、AQP1和SLC4A11的细胞,例如在真皮成纤维细胞中。胶原蛋白8a2、AQP1或SLC4A11的表达可以通过本领域已知的标准技术来估计,例如免疫组织化学、定量RT-PCR或通过FACS分析。

[2871] (3) 所述细胞不表达 (或至多表达相对低水平的) RPE65 (视网膜色素上皮的标志



物)和/或CD31(血管内皮的标志物)。相对表达水平类似于通常不表达RPE65、CD31的细胞,例如在真皮成纤维细胞中。RPE65和CD31的表达可以通过本领域已知的标准技术来估计,例如定量RT-PCR、免疫组织化学或FACS分析。

[2872] (4)所述细胞表达相对较低水平的CD73。相对表达水平低于经历了内皮向间质转化的细胞。CD73的表达可以通过本领域已知的标准技术来估计,例如FACS分析或免疫组织化学。

[2873] 在根据本发明的另一个方面,当在层中时,例如当在板上培养时,通过根据本发明的细胞群扩增方法可获得的CEC群优选显示以下特征中的至少一个。更优选地,其显示以下特征中的两个或更多个,特别优选地,其显示以下特征中的全部:

[2874] (1)所述细胞能够形成单层结构。这是体内角膜内皮细胞层的特征之一。这可以通过核染色(例如,用核染料如Sytox、Hoechst)然后显微镜检查来观察。

[2875] (2)所述细胞能够形成紧密连接。这可以通过本领域已知的标准技术紧密连接标志物封闭小带-1(ZO-1)的免疫荧光染色进行检查。

[2876] (3)所述细胞能够规则地布置在细胞层中。这可以通过本领域已知的标准技术紧密连接标志物封闭小带-1(ZO-1)的免疫荧光染色进行检查。在体内健康的角膜内皮细胞层中,构成所述层的细胞规则地排列,因此认为角膜内皮细胞维持正常功能和高透明度,并且角膜被认为适当地表现出水控制功能。

[2877] 可以将通过根据本发明的细胞群扩增方法扩增的细胞群添加至溶液中,然后例如在保存溶液或冷冻保存溶液(例如下文所述的那些)中进行存储,或直接添加至适合于眼递送的组合物中。适用于眼递送的保存溶液、冷冻保存溶液或组合物可以任选地包含根据本发明的LATS抑制剂。

[2878] 在根据本发明的更优选的实施例中,递送给眼的细胞群制剂包含非常低至可忽略的水平的LATS抑制剂化合物。因此,在一个具体的实施例中,根据本发明的细胞群扩增的方法包括进一步漂洗的步骤,以基本上除去根据本发明的化合物(例如根据式A1或其子式的化合物)。这可以包括在根据本发明的细胞群扩增阶段之后(直接在细胞群扩增阶段之后和/或在已经培养细胞以在未补充LATS抑制剂的生长培养基中形成成熟的角膜内皮之后)漂洗细胞。为了漂洗细胞,将细胞离心,并在PBS或根据本发明的生长培养基中制备细胞悬浮液。所述步骤可以进行多次,例如1至10次,以漂洗出细胞。最后,可以根据需要将细胞重悬于保存溶液、冷冻保存溶液、适合于眼递送的组合物、生长培养基或其组合中。

[2879] 通过细胞群扩增方法和漂洗包含根据本发明的LATS抑制剂的细胞增殖培养基制备的扩增的细胞群可以被转移到适于眼递送的组合物中,例如定位剂。任选地,将细胞群在添加到适于眼递送的定位剂之前存储一段时间。在一个优选的实施例中,可以首先将扩增的细胞群添加至适合于保存或冷冻保存的溶液中,所述溶液优选不包含LATS抑制剂,并且在添加至适合于眼递送的定位剂之前存储(任选地冷冻)的细胞群优选也不含LATS抑制剂。

[2880] 适用于保存CEC的典型溶液是Optisol或PBS,优选是Optisol。Optisol是包含硫酸软骨素和葡聚糖的角膜存储介质,以增强存储过程中的角膜脱水(参见例如Kaufman等人,(1991)Optisol corneal storage medium[Optisol角膜存储介质];Arch Ophthalmol[眼科学文献]6月;109(6):864-8)。为了冷冻保存,在本发明的冷冻保存溶液可以使用甘油、二甲基亚砷、丙二醇或乙酰胺。冷冻保存的细胞制剂通常保持在-20℃或-80℃。



[2881] 在一个方面,本发明涉及通过根据本发明的细胞群扩增方法可获得的角膜内皮细胞的保存的或冷冻保存的制剂。在一个可替代的方面,本发明涉及一种新鲜细胞制剂,其中通过本发明的细胞群扩增方法可获得的角膜内皮细胞悬浮在PBS和/或生长培养基中或与定位剂组合。新鲜细胞制剂通常保持在约37℃。本领域已知的标准细胞培养容器例如小瓶或烧瓶可用于储存细胞。

[2882] 在根据本发明的优选实施例中,在用于眼之前,将冷冻保存的细胞制剂解冻(例如,通过在培养箱或水浴中在约37℃的温度下培养)。优选地,可以添加10体积的PBS或生长培养基以从冷冻保存液中漂洗掉细胞。然后可以在与用于眼递送的定位剂组合之前将细胞通过离心漂洗,并且可以在PBS和/或生长培养基中制成细胞悬浮液,所述定位剂还优选地不包含LATS抑制剂。

[2883] 在本发明的一个方面,将通过细胞群扩增方法(优选还包括在不补充LATS抑制剂的情况下在培养基中生长以形成成熟角膜内皮的步骤)制备的扩增的细胞群制备为悬浮液(例如在PBS和/或生长培养基,例如X-VIVO培养基中)并与适合眼递送的定位剂(例如生物基质,如GelMA)组合使用。在根据本发明的治疗方法的具体的实施例中,细胞、PBS和/或生长培养基以及生物基质的这种组合作为悬浮液被递送至眼。在又一个具体的实施例中,细胞、PBS和/或生长培养基以及生物基质的这种组合最多仅包含痕量水平的LATS抑制剂。

[2884] 可替代地,可以培养细胞并且细胞群增殖阶段可以在适合于细胞递送至眼表面的定位剂上的细胞增殖培养基中发生。

[2885] 在本发明的一个实施例中,可以使用本领域已知的方法(例如,参见Kim等人,JSM Biotechnol.Bioeng.[JSM生物技术与生物工程],2016,第1047页)将根据本发明扩增的细胞群分离为连续的细胞片,以递送至角膜。细胞片可以机械地支撑在一种或多种材料上以递送至角膜。

#### [2886] 降低免疫排斥

[2887] 移植后,同种异体角膜缘干细胞有被接受者免疫系统排斥的风险。免疫抑制方案可用于降低移植细胞如LSC的免疫排斥风险。

[2888] 用于同种异体LSC接受者的合适的全身性免疫抑制剂包括他克莫司、霉酚酸酯、泼尼松和预防性缬更昔洛韦和甲氧苄啶/磺胺甲噁唑。(参见:Holland EJ、Mogilishetty G、Skeens HM、Hair DB、Neff KD、Biber JM、Chan CC (2012) Systemic immunosuppression in ocular surface stem cell transplantation:results of a 10-year experience.[眼表干细胞移植的全身免疫抑制:10年经验的结果]Cornea.[角膜]2012年6月;31(6):655-61)。

[2889] 由于根据本发明的细胞群扩增方法提供了细胞群的高扩增能力,因此任选地,基因编辑技术可以用于去除免疫排斥的驱动因子或添加降低接受者免疫应答的基因。

[2890] 在本发明的一方面,对细胞群“离体”进行基因编辑。在本发明的另一个方面,基因编辑技术可以任选地用于降低或消除与促进宿主抗移植免疫应答有关的基因的表达。在优选的实施例中,所述基因选自由以下组成的组:B2M、HLA-A、HLA-B和HLA-C。在一个具体的实施例中,所述基因是B2M。B2M是β2微球蛋白,是I类主要组织相容性复合物(MHC)的组分。它具有HUGO基因命名委员会(HGNC)标识符914。HLA-A是主要的组织相容性复合物,I级,A(HGNC ID 4931)。HLA-B是主要的组织相容性复合物,I级,B(HGNC ID 4932)。HLA-C是主要

的组织相容性复合物,I级,C(HGNC ID 4933)。

[2891] 可以使用若干种基因编辑方法,其包括但不限于选自下组的方法,该组由以下组成:CRISPR(CRISPR:成簇规律间隔短回文重复序列,也称为CRISPR/Cas系统)、ZFN(锌指核酸酶)、TALEN(基于转录激活样效应子的核酸酶)、工程化的大范围核酸酶(例如ARCUS核酸酶、例如ARC核酸酶)、AAV载体(腺相关病毒)基因递送(例如,AAV载体驱动的同源重组)和基于慢病毒载体的基因组编辑技术。AAV载体驱动的基因递送(例如通过同源重组驱动的基因递送)可以通过选自下组的AAV实现,该组由以下组成:AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9或其衍生物。

[2892] 在本发明的一方面,对细胞群“离体”进行基因编辑。

#### [2893] 基因编辑系统

[2894] 如本文所使用的,术语“基因编辑系统”是指包含一个或多个DNA结合结构域或组分和一个或多个DNA修饰结构域或组分、或编码所述DNA结合和DNA修饰结构域或组分的分离的核酸(例如,一个或多个载体)的系统。基因编辑系统可用于修饰靶基因的核酸和/或可用于调节靶基因的表达。在已知的基因编辑系统中,例如,所述一个或多个DNA结合结构域或组分与所述一个或多个DNA修饰结构域或组分缔合,使得所述一个或多个DNA结合结构域将所述一个或多个DNA修饰结构域或组分靶向特定的核酸位点。如本文所述,基因编辑可以离体进行。

#### [2895] AAV基因编辑系统

[2896] 使用衍生自AAV的载体在体外和体内转移基因是本领域众所周知的(例如,参见美国专利号9,707,304)。使用病毒载体编辑细胞中的基因已经描述于例如Chen等人,2016, *Molecular Therapy* [分子疗法],24:447-457;Gornalusse等人., *Nature Biotechnology* [自然生物技术],2017,35(8):765-772;和WO 2017087961。

[2897] 可以使用本领域已知的方法制备AAV载体。此类方法已经描述于例如Flotte T R. Adeno-associated virus-based gene therapy for inherited disorders [针对遗传性疾病的基于腺相关病毒的基因疗法]. *Pediatr Res.* [儿科研究]2005年十二月;58(6):1143-7;Goncalves M A. Adeno-associated virus:from defective virus to effective vector [腺相关病毒:从缺陷病毒到有效载体], *Virology* [病毒杂志]2005年五月6;2:43;Surace E M, Auricchio A. Adeno-associated viral vectors for retinal gene transfer [视网膜基因转移的腺相关病毒载体]. *Prog Retin Eye Res.* [视网膜与眼科研究进展]2003年十一月;22(6):705-19;Mandel R J, Manfredsson F P, Foust K D, Rising A, Reimsnider S, Nash K, Burger C. Recombinant adeno-associated viral vectors as therapeutic agents to treat neurological disorders [重组腺相关病毒载体作为治疗神经系统疾病的治疗剂]. *Mol Ther.* [分子疗法]2006年三月;13(3):463-83。

#### [2898] CRISPR基因编辑系统

[2899] 如本文所使用的“CRISPR”是指一组规律间隔成簇短回文重复、或包含一组这种重复的系统。如本文所使用的,“Cas”是指CRISPR相关蛋白。多种CRISPR-Cas系统可以根据其效应模块的配置分为两类:1类CRISPR系统利用若干种Cas蛋白和crRNA以形成效应复合物,而2类CRISPR系统使用与crRNA结合的大的单组分Cas蛋白介导干扰。2类CRISPR-Cas系统的一个实例使用Cpf1(来自普氏菌属和弗朗西斯氏菌属的CRISPR 1)。参见例如,Zetsche等

人,Cell[细胞]163:759-771(2015),将其内容通过引用以其整体并入本文。如本文所使用的术语“Cpf1”包括可用于CRISPR系统的所有直向同源物、和变体。

[2900] 在大约40%的测序的真细菌基因组和90%的测序的古细菌中发现了天然存在的CRISPR系统。Grissa等人(2007) BMC Bioinformatics[BMC生物信息学]8:172。此系统是赋予对外来遗传元件(如质粒和噬菌体)的抗性并提供获得性免疫的形式原核免疫系统。Barrangou等人(2007) Science[科学]315:1709-1712;Marragini等人(2008) Science[科学]322:1843-1845。

[2901] 已经修饰CRISPR系统用于真核生物(如小鼠、灵长类动物和人类)的基因编辑(沉默、增强或改变特定基因)。Wiedenheft等人(2012) Nature[自然]482:331-8。这通过例如向真核细胞中引入一种或多种编码特异性工程化的指导RNA(gRNA)(例如,包含与真核基因组的序列互补的序列的gRNA)的载体和一种或多种适当的RNA指导的核酸酶(例如,Cas蛋白)来实现。RNA引导的核酸酶与gRNA形成复合物,所述复合物然后通过gRNA的序列与真核基因组的互补序列的杂交定向至靶DNA位点,其中所述RNA引导的核酸酶随后诱导DNA中的双链或单链断裂。在链断裂处或附近插入或缺失核苷酸产生修饰的基因组。

[2902] 由于这些天然存在于许多不同类型的细菌中,因此CRISPR的确切排列,和Cas基因的结构、功能和数量及其产物在物种之间略有不同。Haft等人(2005) PLoS Comput. Biol. [公共科学图书馆医学杂志第一版]1:e60;Kunin等人(2007) Genome Biol. [基因组生物学]8:R61;Mojica等人(2005) J. Mol. Evol. [分子进化杂志]60:174-182;Bolotin等人(2005) Microbiol. [微生物学]151:2551-2561;Pourcel等人(2005) Microbiol. [微生物学]151:653-663;和Stern等人(2010) Trends. Genet. [遗传学趋势]28:335-340。例如,Cse(Cas亚型,大肠杆菌)蛋白质(例如,CasA)形成功能性复合物Cascade,其将CRISPR RNA转录物处理成保留Cascade的间隔子重复单元。Brouns等人(2008) Science[科学]321:960-964。在其他原核生物中,Cas6加工CRISPR转录物。大肠杆菌中基于CRISPR的噬菌体失活需要Cascade和Cas3,但不需要Cas1或Cas2。强烈火球菌(Pyrococcus furiosus)和其他原核生物中的Cmr(Cas RAMP模块)蛋白形成具有小CRISPR RNA的功能性复合物,其识别和切割互补的靶RNA。

[2903] 更简单的CRISPR系统依赖于蛋白质Cas9,其是具有两个活性切割位点的核酸酶,各自对应于双螺旋的每条链。将Cas9和修饰的CRISPR基因座RNA组合可用于基因编辑系统。Pennisi(2013) Science[科学]341:833-836。

[2904] 在一些实施例中,RNA引导的核酸酶是Cas分子,例如,Cas9分子。“Cas9分子”可以与gRNA分子(例如tracr的结构域序列,也称为tracrRNA或反式激活CRISPR RNA)相互作用,并与gRNA分子协同定位(例如,靶向或归巢)在含有靶序列和PAM(原型间隔子相邻基序)序列的位点。

[2905] 根据本发明,多个物种的Cas9蛋白的Cas9分子、衍生自多个物种的Cas9蛋白的Cas9分子或基于多个物种的Cas9蛋白的Cas9分子可以用于本文所述的方法和组合物中。例如,例如酿脓链球菌、嗜热链球菌、金黄色葡萄球菌和/或脑膜炎奈瑟氏菌的Cas9分子、衍生自其的Cas9分子或基于其的Cas9分子可用于本文所述的系统、方法和组合物中。另外的Cas9物种包括:燕麦食酸菌(Acidovorax avenae)、胸膜肺炎放线杆菌(Actinobacillus pleuropneumoniae)、产琥珀酸放线杆菌(Actinobacillus succinogenes)、猪放线杆菌(Actinobacillus suis)、放线菌属物种、cyclophilus denitrificans、少食氨基酸单胞菌

(*Aminomonas paucivorans*)、蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、史密斯氏芽孢杆菌 (*Bacillus smithii*)、苏云金芽孢杆菌、拟杆菌属物种、*Blastopirellula marina*、慢生根瘤菌属物种、侧孢短芽孢杆菌 (*Brevibacillus latemsporus*)、结肠弯曲菌 (*Campylobacter coli*)、空肠弯曲菌 (*Campylobacter jejuni*)、拉德弯曲菌 (*Campylobacter lad*)、*Candidatus Puniceispirillum*、解纤维梭菌 (*Clostridium cellulolyticum*)、产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*)、拥挤棒杆菌 (*Corynebacterium accolens*)、白喉棒杆菌 (*Corynebacterium diphtheria*)、马氏棒杆菌 (*Corynebacterium matruchotii*)、*Dinoroseobacter sliibae*、细长真杆菌 (*Eubacterium dolichum*)、 $\gamma$  变形杆菌、固氮葡萄糖醋杆菌 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*)、副流感嗜血杆菌 (*Haemophilus parainfluenzae*)、生痰嗜血杆菌 (*Haemophilus sputorum*)、加拿大螺杆菌 (*Helicobacter canadensis*)、同性恋螺杆菌 (*Helicobacter cinaedi*)、鼬鼠螺杆菌 (*Helicobacter mustelae*)、多营养泥杆菌 (*Ilyobacter polytropus*)、金氏金氏菌 (*Kingella kingae*)、卷曲乳杆菌 (*Lactobacillus crispatus*)、伊氏李斯特菌 (*Listeria ivanovii*)、单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)、李斯特氏菌科细菌、甲基孢囊菌属物种、甲基弯菌 (*Methylosinus trichosporium*)、羞怯动弯杆菌 (*Mobiluncus mulieris*)、杆菌状奈瑟氏菌 (*Neisseria bacilliformis*)、灰色奈瑟氏菌 (*Neisseria cinerea*)、浅黄奈瑟氏菌 (*Neisseria flavescens*)、乳糖奈瑟氏菌 (*Neisseria lactamica*)、奈瑟氏菌属物种、瓦茨瓦尔西奈瑟氏菌 (*Neisseria wadsworthii*)、亚硝化单胞菌属物种、*Parvibaculum lavamentivorans*、多杀巴斯德菌 (*Pasteurella multocida*)、琥珀酸考拉杆菌 (*Phascolarctobacterium succinatutens*)、丁香罗尔斯通菌 (*Ralstonia syzygii*)、沼泽红假单胞菌 (*Rhodopseudomonas palustris*)、小红卵菌属物种、穆氏西蒙斯氏菌 (*Simonsiella muelleri*)、鞘氨醇单胞菌属物种、维尼芽孢乳杆菌 (*Sporolactobacillus vineae*)、路邓葡萄球菌 (*Staphylococcus lugdunensis*)、链球菌属物种、罕见小球菌属物种 (*Subdoligranulum* sp.)、*Tisliella mobilis*、密螺旋体属物种、或 *Verminephrobacter eiseniae*。

[2906] 在一些实施例中，活性Cas9分子与靶核酸相互作用并切割靶核酸的能力是PAM序列依赖性的。PAM(原型间隔子相邻基序)序列是靶核酸中的序列。它通常很短，例如2至7个碱基对长。在一个实施例中，靶核酸的切割发生在PAM序列的上游。来自不同细菌物种的活性Cas9分子可以识别不同的序列基序(例如PAM序列)。在一个实施例中，酿脓链球菌的活性Cas9分子识别序列基序NGG并指导靶核酸序列的在所述序列上游1至10个(例如3至5个)碱基对的切割。参见例如，Mali等人，SCIENCE[科学]2013;339(6121):823-826。在一个实施例中，嗜热链球菌的活性Cas9分子识别序列基序NGGNG(SEQ ID NO:4)和NNAG AAW(SEQ ID NO:5)(W=A或T并且N是任何核碱基)并指导核心靶核酸序列的在这些序列上游1至10个(例如3至5个)碱基对的切割。参见例如，Horvath等人，SCIENCE[科学]2010;327(5962):167-170;以及Deveau等人，J BACTERIOL[细菌学杂志]2008;190(4):1390-1400。在一个实施例中，变形链球菌的活性Cas9分子识别序列基序NGG或NAAR(R=A或G)并指导核心靶核酸序列的在所述序列上游1至10个(例如3至5个)碱基对的切割。参见例如，Deveau等人，J BACTERIOL[细菌学杂志]2008;190(4):1390-1400。

[2907] 在一个实施例中，金黄色葡萄球菌的活性Cas9分子识别序列基序NNGRR(SEQ ID

NO:6) (R=A或G) 并指导靶核酸序列的在所述序列上游1至10个(例如3至5个) 碱基对的切割。参见例如,Ran F. 等人,NATURE[自然],第520卷,2015,第186-191页。在一个实施例中,脑膜炎奈瑟氏菌的活性Cas9分子识别序列基序NNNNGATT (SEQ ID NO:7) 并指导靶核酸序列的在所述序列上游1至10个(例如3至5个) 碱基对的切割。参见例如,Hou等人,PNAS EARLY EDITION[美国国家科学院院刊早期版本]2013,1-6。可以例如使用Jinek等人,SCIENCE[科学]2012,337:816中描述的转化测定来确定Cas9分子识别PAM序列的能力。

[2908] 示例性天然存在的Cas9分子描述于Chylinski等人,RNA Biology[RNA生物学]2013;10:5,727-737中。此类Cas9分子包括簇1细菌家族、簇2细菌家族、簇3细菌家族、簇4细菌家族、簇5细菌家族、簇6细菌家族、簇7细菌家族、簇8细菌家族、簇9细菌家族、簇10细菌家族、簇11细菌家族、簇12细菌家族、簇13细菌家族、簇14细菌家族、簇15细菌家族、簇16细菌家族、簇17细菌家族、簇18细菌家族、簇19细菌家族、簇20细菌家族、簇21细菌家族、簇22细菌家族、簇23细菌家族、簇24细菌家族、簇25细菌家族、簇26细菌家族、簇27细菌家族、簇28细菌家族、簇29细菌家族、簇30细菌家族、簇31细菌家族、簇32细菌家族、簇33细菌家族、簇34细菌家族、簇35细菌家族、簇36细菌家族、簇37细菌家族、簇38细菌家族、簇39细菌家族、簇40细菌家族、簇41细菌家族、簇42细菌家族、簇43细菌家族、簇44细菌家族、簇45细菌家族、簇46细菌家族、簇47细菌家族、簇48细菌家族、簇49细菌家族、簇50细菌家族、簇51细菌家族、簇52细菌家族、簇53细菌家族、簇54细菌家族、簇55细菌家族、簇56细菌家族、簇57细菌家族、簇58细菌家族、簇59细菌家族、簇60细菌家族、簇61细菌家族、簇62细菌家族、簇63细菌家族、簇64细菌家族、簇65细菌家族、簇66细菌家族、簇67细菌家族、簇68细菌家族、簇69细菌家族、簇70细菌家族、簇71细菌家族、簇72细菌家族、簇73细菌家族、簇74细菌家族、簇75细菌家族、簇76细菌家族、簇77细菌家族、或簇78细菌家族的Cas9分子。

[2909] 示例性天然存在的Cas9分子包括簇1细菌家族的Cas9分子。实例包括以下的Cas9分子:酿脓链球菌(例如,菌株SF370、MGAS 10270、MGAS 10750、MGAS2096、MGAS315、MGAS5005、MGAS6180、MGAS9429、NZ131和SSI-1)、嗜热链球菌(例如,菌株LMD-9)、假猪链球菌(*S.pseudoporcinus*) (例如,菌株SPIN 20026)、变形链球菌(例如,菌株UA 159、NN2025)、猴链球菌(*S.macacae*) (例如,菌株NCTC1 1558)、解没食子酸链球菌(*S.gallolyticus*) (例如,菌株UCN34、ATCC BAA-2069)、马链球菌(*S.equines*) (例如,菌株ATCC 9812、MGCS 124)、停乳链球菌(*S.dysgalactiae*) (例如,菌株GGS 124)、牛链球菌(*S.bovis*) (例如,菌株ATCC 700338)、*S.cmginosus* (例如,菌株F021 1)、无乳链球菌(*S.agalactia*\*) (例如,菌株NEM316、A909)、单核细胞增多性李斯特菌(例如,菌株F6854)、无害李斯特菌(*L.innocua*,例如,菌株Clip 11262)、意大利肠球菌(*Enterococcus italicus*) (例如,菌株DSM 15952)、或屎肠球菌(*Enterococcus faecium*) (例如,菌株1、23、408)。另外的示例性Cas9分子是脑膜炎奈瑟氏菌的Cas9分子(Hou等人PNAS Early Edition[美国国家科学院院刊早期版本]2013,1-6) 和金黄色葡萄球菌Cas9分子。

[2910] 在一个实施例中,Cas9分子(例如活性Cas9分子) 包含与以下具有60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同源性的氨基酸序列;当与以下相比时,相差不超过1%、2%、5%、10%、15%、20%、30%或40%的氨基酸残基的氨基酸序列;与以下相差至少1、2、5、10或20个氨基酸但相差不超过100、80、70、60、50、40或30个氨基酸的氨基酸序列;或与以下相同的氨基酸序列:本文所述的任何Cas9分子序列或天然存在





诱导的分裂Cas9的活化或二聚化Zetsche (2015) Nature Biotechnol. [自然生物技术] 33 (2) :139-142, Nihongaki等人 (2015) Nature Biotechnol. [自然生物技术] 33 (7) :755-760, Polstein和Gersbach (2015) Nat. Chem. Biol. [自然化学生物学] 11:198-200, 和SMASH标签药物诱导的降解Chung等人 (2015) Nat. Chem. Biol. [自然化学生物学] 11:713-720。

[2928] 通常, CRISPR-Cas或CRISPR系统指涉及CRISPR相关(“Cas”)基因的表达或指导其活性的转录物和其他元件, 包括编码Cas基因的序列、tracr(反式激活CRISPR)序列(例如tracrRNA或活性部分tracrRNA)、tracr-配对序列(在内源CRISPR系统的上下文中包含“直接重复”和tracrRNA处理的部分直接重复)、指导序列(在内源CRISPR系统的上下文中也称为“间隔子”)、或一种或多种如本文中使用的术语“RNA”(例如, 用于指导Cas9的一种或多种RNA, 例如CRISPR RNA和反式激活(tracr)RNA或单指导RNA(sgRNA)(嵌合RNA))或来自CRISPR基因座的其他序列和转录物。总的来说, CRISPR系统特征在于在靶序列的位点处促进CRISPR复合物形成的元件(也称之为内源性CRISPR系统情况下的原型间隔子)。在形成CRISPR复合物的情况下, “靶序列”是指指导序列被设计为与其具有互补性的序列, 其中靶序列与指导序列之间的杂交促进CRISPR复合物的形成。靶序列可以包含任何多核苷酸, 例如DNA或RNA多核苷酸。在一些实施例中, 靶序列位于细胞核或细胞质中。在一些实施例中, 在CRISPR复合物中优选的是: tracr序列具有一个或多个发夹并且具有30个或更多个核苷酸的长度, 40或更多个核苷酸的长度, 或50个或更多个核苷酸的长度; 指导序列的长度在10到30个核苷酸之间, CRISPR/Cas酶是II型Cas9酶。在本发明的实施例中, 术语指导序列和指导RNA可互换使用。总的来说, 指导序列是与靶多核苷酸序列具有足够互补性以与靶序列杂交并引导CRISPR复合物与靶序列的序列特异性结合的任何多核苷酸序列。在一些实施例中, 当使用适合比对算法进行最佳比对时, 指导序列与其相应靶序列之间的互补程度是约或超过约50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%、或更大。最佳比对可以通过使用用于比对序列的任何适合的算法来确定, 这些算法的非限制性实例包括史密斯-沃特曼(Smith-Waterman)算法、尼德曼-温施算法(Needleman-Wunsch algorithm)、基于巴罗斯-惠勒(Burrows-Wheeler)转换的算法(例如, 巴罗斯-惠勒比对仪)、ClustalW、Clustal X、BLAT、诺沃比对(Novoalign)(诺沃克拉夫特技术公司(Novocraft Technologies)); ELAND(依诺米那公司(Illumina), 圣地亚哥, 加利福尼亚州), 和SOAP。在一些实施例中, 指导序列的长度是约或超过约5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、75、或更多个核苷酸。在一些实施例中, 指导序列的长度是小于约75、50、45、40、35、30、25、20、15、12、或更少个核苷酸。优选指导序列是10-30个核苷酸长。指导序列引导CRISPR复合物与靶序列的序列特异性结合的能力可以通过任何适合的测定来评估。例如, 足以形成CRISPR复合物的CRISPR系统的组分(包括有待测试的指导序列)可以诸如通过用编码CRISPR序列组分的载体进行转染来提供给具有相应靶序列的宿主细胞, 随后诸如通过Surveyor测定评估靶序列内的优先切割。类似地, 靶多核苷酸序列的切割可以在试管中通过以下方式进行评估: 通过提供靶序列、CRISPR复合物的组分(包括有待测试的指导序列)和不同于测试指导序列的对照指导序列并且在测试指导序列反应与对照指导序列反应之间比较靶序列处的结合或切割速率。其他测定是可能的, 并且是本领域技术人员能够想到的。指导序列可以被选择为靶向任何靶序列。在一些实施例中, 靶序列是细胞基因组中的序列。示例性靶序列包括靶基因组中独特的那些。例如, 对于酿脓链球菌Cas9, 基



基因组中的独特靶序列可以包括MM M MMMNNNNNNNNNNXGG (SEQ ID NO:13) 形式的Cas9靶位点,其中NNN NNN NN XGG (N是A、G、T、或C;并且X可以是任何)在基因组中只出现一次。基因组中的独特靶序列可以包括MMM MMMNNNNNNNNNNXGG (SEQ ID NO:14) 形式的酿脓链球菌Cas9靶位点,其中N N N N XGG (N是A、G、T、或C;并且X可以是任何)在基因组中只出现一次。对于嗜热链球菌CRISPR1 Cas9,基因组中的独特靶序列可以包括MMMMMMNN N N NN XXAGAAW (SEQ ID NO:15) 形式的Cas9靶位点,其中NNN NN N XXAGAAW (SEQ ID NO:29) (N是A、G、T、或C;X可以是任何;并且W是A或T)在基因组中只出现一次。基因组中的独特靶序列可以包括MMMMMM MN N NNN NNXXAGAAW (SEQ ID NO:16) 形式的嗜热链球菌CRISPR1 Cas9靶位点,其中NNNNNNNNNNXXAGAAW (SEQ ID NO:30) (N是A、G、T、或C;X可以是任何;并且W是A或T)在基因组中只出现一次。对于酿脓链球菌Cas9,基因组中的独特靶序列可以包括MMMMMMNNNN NNNNNXGGXG (SEQ ID NO:17) 形式的Cas9靶位点,其中NNNNNNNNNNXGGXG (N是A、G、T、或C;并且X可以是任何)在基因组中只出现一次。基因组中的独特靶序列可以包括MMMMMMNNNNNNNNNNNNXGGXG (SEQ ID NO:31) 形式的酿脓链球菌Cas9靶位点,其中NNNNNNNNNNXGGXG (SEQ ID NO:18) (N是A、G、T、或C;并且X可以是任何)在基因组中只出现一次。在这些序列的每一个中,N是任何核碱基,并且“M”可以是A、G、T或C并且在将序列鉴定为独特序列时无需考虑。在一些实施例中,指导序列被选择为减小所述指导序列内的二级结构程度。在一些实施例中,当进行最佳折叠时,指导序列的约或小于约75%、50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、1%,或更少的核苷酸参与自互补碱基配对。最佳折叠可以通过任何适合的多核苷酸折叠算法来确定。一些程序是基于计算最小吉布斯自由能。一种这样的算法的实例是mFold,如通过朱克 (Zuker) 和施蒂格勒 (Stiegler) (Nucleic Acids Res.[核酸研究]9(1981),133-148) 所描述。另一个示例性折叠算法是使用质心结构预测算法的在线网站服务器RNAfold,它是维也纳大学的理论化学研究所 (Institute for Theoretical Chemistry at the University of Vienna) 开发的 (例如,参见A.R.Gruber 等人,2008,Cell[细胞]106(1):23-24;以及PA Carr和GM Church,2009,Nature Biotechnology[自然生物技术]27(12):1 151-62)。

#### [2929] 设计gRNA分子的方法

[2930] 提供了选择、设计和验证用于在本文所述gRNA中使用的靶向结构域的方法。本文还提供了用于掺入gRNA的示例性靶向结构域。

[2931] 已经描述了用于选择和验证靶序列以及脱靶分析的方法 (参见,例如,Mali 2013; Hsu 2013;Fu 2014;Heigwer 2014;Bae 2014;和Xiao 2014)。例如,可以通过鉴定针对Cas9分子的PAM序列 (例如相关的PAM,例如酿脓链球菌的NGG PAM,脑膜炎奈瑟氏菌的NNNGATT (SEQ ID NO:19) 或NNNGCTT PAM (SEQ ID NO:20),以及金黄色葡萄球菌的NNGRRT (SEQ ID NO:21) 或NNGRRV PAM (SEQ ID NO:22)),并将相邻序列鉴定为使用所述Cas9分子的CRISPR系统的靶序列来选择靶序列。软件工具可用于进一步优化与用户的靶序列相对应的潜在靶向结构域的选择,例如以最小化整个基因组中的总脱靶活性。候选靶向结构域和包含那些靶向结构域的gRNA可以通过使用本领域已知的和/或本文所述的方法进行功能评估。

[2932] 作为非限制性实例,使用DNA序列搜索算法鉴定用于与酿脓链球菌、脑膜炎奈瑟氏菌和金黄色葡萄球菌的Cas9一起使用的gRNA中使用的靶向结构域。针对每个Cas9设计17-mer、18-mer、19-mer、20-mer、21-mer、22-mer、23-mer和/或24-mer靶向结构域。关于酿脓链

球菌Cas9,优选地,靶向结构域是20-mer。使用基于公共工具cas-offinder (Bae 2014)的定制gRNA设计软件进行gRNA设计。所述软件可在计算指导RNA的全基因组脱靶倾向后对指导RNA进行评分。

[2933] 候选分子的功能分析

[2934] 候选Cas9分子、候选gRNA分子、候选Cas9分子/gRNA分子复合物可以通过本领域已知的方法或如本文所述的进行评估。例如,先前已经描述了用于评估Cas9分子的核酸内切酶活性的示例性方法(Jinek 2012)。本文所述的每种技术可以单独使用或与一种或多种技术组合使用以评估候选分子。本文披露的技术可以用于多种方法,包括但不限于确定Cas9分子/gRNA分子复合物的稳定性的方法,确定促进稳定的Cas9分子/gRNA分子复合物的条件的方法,筛选对于稳定的Cas9分子/gRNA分子复合物的方法,鉴定形成稳定的Cas9分子/gRNA分子复合物的最佳gRNA的方法,以及选择用于施用于受试者的Cas9/gRNA复合物的方法。

[2935] 结合和切割测定:测试Cas9分子的核酸内切酶活性。可以在质粒切割试验中评估Cas9分子/gRNA分子复合物结合和切割靶核酸的能力。在所述测定中,通过加热至95℃并缓慢冷却至室温,将合成的或体外转录的gRNA分子在反应前进行预退火。将天然或限制性消化线性化的质粒DNA(300ng(约8nM))与纯化的Cas9蛋白分子(50nM-500nM)和gRNA(50nM-500nM,1:1)在含或不含10mM MgCl<sub>2</sub>的Cas9质粒切割缓冲液(20mM HEPES pH 7.5、150mM KCl、0.5mM DTT,0.1mM EDTA)中在37℃孵育60分钟。将反应用5X DNA上样缓冲液(30%甘油、1.2% SDS、250mM EDTA)终止,通过0.8%或1%琼脂糖凝胶电泳分离,并通过溴化乙锭染色观察。所得的切割产物表明Cas9分子切割两条DNA链,或仅切割两条链之一。例如,线性DNA产物指示两条DNA链的切割。带切口的开环产物表示两条链中只有一条被切割。

[2936] 可替代地,可以在寡核苷酸DNA切割试验中评估Cas9分子/gRNA分子复合物结合和切割靶核酸的能力。在所述测定中,通过与5个单位的T4多核苷酸激酶和-3-6pmol(-20-40mCi)[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP在IX T4多核苷酸激酶反应缓冲液中以在50微升反应于37℃孵育30分钟来对DNA寡核苷酸(10pmol)进行放射性标记。热灭活后(65℃加热20分钟),将反应物通过柱纯化以去除未结合的标记。通过在95℃下将标记的寡核苷酸与等摩尔量的未标记的互补寡核苷酸退火3分钟,然后缓慢冷却至室温,生成双链体定位剂(100nM)。对于切割测定,通过加热至95℃持续30s,然后缓慢冷却至室温,使gRNA分子退火。将Cas9(终浓度为500nM)与退火的gRNA分子(500nM)在切割测定缓冲液(20mM HEPES pH 7.5、100mM KCl,5mM MgCl<sub>2</sub>,1mM DTT,5%甘油)中以9微升的总体积进行预孵育。通过添加1微升靶DNA(10nM)引发反应,并在37℃下孵育1小时。通过添加20微升上样染料(5mM EDTA、0.025% SDS、甲酰胺中的5%甘油)并加热至95℃5分钟猝灭反应。切割产物在含有7M尿素的12%变性聚丙烯酰胺凝胶上分离,并通过磷光成像观察。产生的切割产物表明互补链、非互补链或两者是否被切割。

[2937] 这些测定中的一种或两种均可用于评估候选gRNA分子或候选Cas9分子的适用性。

[2938] Indel检测和鉴定。靶向的基因组修饰也可以通过桑格测序或深度测序来检测。对于前者,可以用位于gRNA靶序列侧翼的任一引物扩增来自修饰区的基因组DNA。可以将扩增子亚克隆到用于转化的质粒(如pUC19)中,并且应所述对单个菌落进行测序以揭示克隆的基因型。

[2939] 可替代地,深度测序适用于对大量样品或靶位点进行采样。NGS引物设计用于较短的扩增子,通常在100bp-200bp大小范围内。对于indel的检测,重要的是设计距离Cas9靶位点至少50bp的引物,以允许检测更长的indel。可以使用市售仪器,例如依诺米那系统来评估扩增子。NGS优化和故障排除的详细说明可以在依诺米那用户手册中找到。

#### [2940] TALEN基因编辑系统

[2941] 通过将TAL效应子DNA结合结构域与DNA切割域进行融合来人工产生TALEN。可以工程化转录活化因子样作用(TALE)以结合任何所希望的DNA序列,例如靶基因。通过将工程化的TALE与DNA切割结构域组合,可以产生对任何所希望的DNA序列具有特异性的限制酶。然后将这些引入细胞中,其中它们可以用于基因组编辑。Boch(2011)Nature Biotech.[自然生物技术]29:135-6;和Boch等人(2009)Science[科学]326:1509-12;Moscou等人(2009)Science[科学]326:3501。

[2942] TALE是由黄单胞菌属(Xanthomonas)细菌分泌的蛋白质。DNA结合结构域含有重复的、高度保守的33-34个氨基酸序列,但第12和第13氨基酸除外。这两个位置高度变化,显示出与特定核苷酸识别的强相关性。因此,它们可以被工程化以结合所希望的DNA序列。

[2943] 为了产生TALEN,将TALE蛋白与核酸酶(N)融合,所述核酸酶是例如野生型或突变的FokI核酸内切酶。针对其在TALEN中的用途已经对FokI作出若干突变;这些例如,改进切割特异性或活性。Cermak等人(2011)Nucl.Acids Res.[核酸研究]39:e82;Miller等人(2011)Nature Biotech.[自然生物技术]29:143-8;Hockemeyer等人(2011)Nature Biotech.[自然生物技术]29:731-734;Wood等人(2011)Science[科学]333:307;Doyon等人(2010)Nature Methods[自然方法]8:74-79;Szczepek等人(2007)Nature Biotech.[自然生物技术]25:786-793;和Guo等人(2010)J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]200:96。

[2944] FokI结构域作为二聚体起作用,这需要两个具有独特DNA结合结构域的构建体,用于靶基因组中具有适当方向和间距的位点。TALE DNA结合结构域与FokI切割域之间的氨基酸残基的数量和两个单独TALEN结合位点之间的碱基的数量似乎都是实现高水平活性的重要参数。Miller等人(2011)Nature Biotech.[自然生物技术]29:143-8。

[2945] 可以在细胞内使用TALEN(或TALEN对)以产生双链断裂(DSB)。如果修复机制经由非同源末端连接不正确地修复断裂,则可以在断裂位点引入突变。例如,不正确的修复可以引入移码突变。可替代地,可以将外来DNA与TALEN一起引入细胞中,例如编码转基因的DNA,并且取决于外来DNA的序列和染色体序列,这一过程可以用于将转基因整合在由TALEN靶向的位点处或附近。可以使用本领域已知的任何方法构建对靶基因特异的TALEN,这些方法包括使用模块组分各种方案。Zhang等人(2011)Nature Biotech.[自然生物技术]29:149-53;Geibler等人(2011)PLoS ONE[公共科学图书馆综合]6:e19509;US 8,420,782;US 8,470,973,这些文献的内容特此通过引用以其全文并入)。

#### [2946] 锌指核酸酶(ZFN)基因编辑系统

[2947] “ZFN”或“锌指核酸酶”是指锌指核酸酶,一种可用于修饰例如,使所希望的核酸序列的一个或多个核酸缺失的人工核酸酶。

[2948] 像TALEN一样,ZFN包含与DNA结合结构域融合的FokI核酸酶域(或它的衍生物)。就ZFN而言,DNA结合结构域包含一个或多个锌指。Carroll等人(2011)Genetics Society of America[美国遗传学学会]188:773-782;和Kim等人(1996)Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国

国家科学院院刊]93:1156-1160。

[2949] 锌指是被一种或多种锌离子稳定的小蛋白质结构基序。锌指可包含例如 Cys2His2, 并且可识别大约3-bp序列。可以将已知特异性的各种锌指组合以产生识别约6、9、12、15或18-bp序列的多指多肽。各种选择和模块组装技术可用于产生识别特定序列的锌指(及其组合), 包括噬菌体展示、酵母单杂交系统、细菌单杂交和双杂交系统、以及哺乳动物细胞。

[2950] 像TALEN一样,ZFN必须二聚化以切割DNA。因此,需要一对ZFN来靶向非回文DNA位点。两个单独的ZFN必须与DNA的相反链结合,其中它们的核酸酶适当地间隔开。Bitinaite等人(1998)Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]95:10570-5。

[2951] 也像TALEN一样,ZFN可以在DNA中产生双链断裂,所述双链断裂如果不正确地修复则可以产生移码突变,从而导致细胞中靶基因的表达和量的减少。ZFN还可以与同源重组一起使用以使靶基因或基因座突变,或者在靶向序列处或附近的位点引入编码所希望的转基因的核酸。

[2952] 可以使用本领域中已知的任何方法来构建对靶基因中的序列具有特异性的ZFN。参见例如,Provasi (2011) Nature Med.[自然医学]18:807-815;Torikai (2013) Blood[血液]122:1341-1349;Cathomen等人(2008) Mol.Ther.[分子疗法]16:1200-7;和Guo等人(2010) J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]400:96;美国专利公开2011/0158957;以及美国专利公开2012/0060230,这些文献的内容特此通过引用以其全文并入。在实施例中,ZFN基因编辑系统还可以包含编码ZFN基因编辑系统的一种或多种组分的核酸。

[2953] 大范围核酸酶基因编辑系统

[2954] “大范围核酸酶”是指大范围核酸酶,一种可用于编辑靶基因的人工核酸酶。

[2955] 大范围核酸酶衍生自一组识别15-40个碱基对切割位点的核酸酶。大范围核酸酶基于其影响核酸酶活性和/或DNA识别的结构基序被分为多个家族。LAGLIDADG (SEQ ID NO: 23) 家族的成员的特征在于具有保守的LAGLIDADG基序 (SEQ ID NO:23) 的一个或两个拷贝(参见Chevalier等人(2001),Nucleic Acids Res.[核酸研究]29(18):3757-3774)。具有单拷贝的LAGLIDADG基序 (SEQ ID NO:23) 的LAGLIDADG (SEQ ID NO:23) 大范围核酸酶形成同源二聚体,而具有两个拷贝的LAGLIDADG基序 (SEQ ID NO:23) 的成员被发现是单体。GIY-YIG家族成员具有GIY-YIG模块,其长度为70-100个残基并且包括四个或五个带有四个不变残基(其中两个是活性所必需的)的保守序列基序(参见,Van Roey等人(2002),Nature Struct.Biol.[自然结构生物学]9:806-811)。His-Cys盒大范围核酸酶的特征在于在包含数百个氨基酸残基的区域上的一系列高度保守的组氨酸和半胱氨酸(参见Chevalier等人(2001),Nucleic Acids Res.[核酸研究]29(18):3757-3774)。NHN家族的成员由包含两对被天冬酰胺残基包围的保守组氨酸的基序定义(参见Chevalier等人(2001),Nucleic Acids Res.[核酸研究]29(18):3757-3774)。

[2956] 用于工程改造具有改变的DNA结合特异性(例如与预定核酸序列结合)的大范围核酸酶的策略是本领域已知的。E.g.,Chevalier等人(2002),Mol.Cell.[分子和细胞],10:895-905;Epinat等人(2003)Nucleic Acids Res[核酸研究]31:2952-62;Silva等人(2006) J Mol Biol[分子生物学杂志]361:744-54;Seligman等人(2002)Nucleic Acids Res[核酸研究]30:3870-9;Sussman等人(2004) J Mol Biol[分子生物学杂志]342:31-41;Rosen等人

(2006) *Nucleic Acids Res* [核酸研究]; Doyon 等人 (2006) *J. Am Chem Soc* [美国化学学会杂志] 128:2477-84; Chen 等人 (2009) *Protein Eng Des Sel* [蛋白质工程改造设计与选择] 22:249-56; Arnould S (2006) *J Mol Biol* [分子生物学杂志]. 355:443-58; Smith (2006) *Nucleic Acids Res* [核酸研究]. 363 (2):283-94。

[2957] 大范围核酸酶可以在DNA中产生双链断裂,所述双链断裂如果不正确地修复(例如通过非同源末端连接)则可以产生移码突变,从而导致细胞中靶基因的表达的减少。可替代地,可以将外源DNA与大范围核酸酶一起引入细胞中;取决于外源DNA的序列和染色体序列,所述过程可用于修饰靶基因,例如纠正靶基因中的缺陷,从而引起修复的靶基因的表达,或例如将这种缺陷引入wt基因,因此降低靶基因的表达,例如,如Silva等人(2011) *Current Gene Therapy* [当今基因疗法] 11:11-27所述。

#### [2958] 扩增的细胞群的眼施用

[2959] 在本发明的一方面,通过如上所述的根据本发明的方法可获得的扩增的细胞群被递送至眼。递送在无菌条件下进行。

[2960] 在涉及在360°角膜缘周膜切开术之后用于角膜缘干细胞疗法的一个实施例中,可以将纤维血管角膜血管翳从表面小心地去除。

[2961] 在本发明的一方面,将细胞群与适合于眼递送的定位剂组合(如下文进一步描述)并递送至眼。在一个优选的实施例中,将适于眼递送的细胞和定位剂组合并经由载体例如治疗性接触透镜或羊膜向眼施用。在替代实施例中,将适合在眼中使用的细胞和定位剂,例如可光固化的生物基质例如GelMA,经由生物印刷递送到眼。

[2962] 在一个实施例中,本发明提供了一种将包含角膜内皮细胞的细胞群移植到受试者的角膜上的方法,所述方法包括通过用包含根据本发明的LATS抑制剂的细胞增殖培养基培养包含角膜内皮细胞的细胞群来扩增所述细胞群,漂洗扩增的细胞群以基本上除去LATS抑制剂,并将所述细胞施用到所述受试者的角膜上。优选地,在所述施用之前,所述细胞与生物基质组合。在具体的实施例中,在所述施用之前,将所述细胞与作为GelMA的生物基质组合。在更具体的实施例中,所述角膜内皮细胞与生物基质组合,所述生物基质被生物印刷在眼表面上。特别优选地,所述角膜内皮细胞与作为GelMA的生物基质组合,并通过光触发反应使GelMA聚合而生物印刷在眼表面上。

[2963] 在另一个实施例中,本发明提供了一种将细胞群移植到受试者的眼中的方法,所述方法包括将细胞与生物基质组合以形成细胞/生物基质混合物,将混合物注射到受试者的眼中或将混合物施加到受试者眼表面上,并通过使用诸如紫外线A或白光光源的光源引导和固定细胞(例如在角膜上)将细胞生物印刷在眼中或眼上。在某些实施例中,光源产生波长为至少350nm的光。在某些实施例中,光源产生在350nm至420nm范围内的光。例如,LED光源可用于产生波长为365nm或405nm或350nm以上的任何其他波长的光,或者具有带通滤波器的水银灯可用于产生波长为365nm的光。在另一个实施例中,光源产生可见的白光,所述白光具有例如在400nm至700nm范围内的波长。在某些实施例中,所述细胞是眼细胞,例如角膜细胞(例如角膜内皮细胞)、晶状体细胞、小梁网状细胞或在前房中发现的细胞。在具体的实施例中,所述细胞是角膜内皮细胞。此类方法的某些实施例包括:

[2964] 实施例x1. 一种将分离的细胞群移植到受试者眼中的方法,所述方法包括将细胞与生物基质组合以形成细胞/生物基质混合物,将混合物注射到受试者眼中(例如,前房

中),并通过使用光源在眼中引导和固定细胞将细胞生物印刷在眼中。

[2965] 实施例x2.如实施例x1所述的方法,其中将分离的细胞与作为GelMA的生物基质组合,并通过光触发反应使GelMA聚合而生物印刷在角膜上。

[2966] 实施例x3.如实施例x1或实施例x2所述的方法,其中光源产生波长在350nm至700nm范围内的光。

[2967] 实施例x4.如实施例x1至x3中任一项所述的方法,其中波长是350nm至420nm。

[2968] 实施例x5.如实施例x1至x4中任一项所述的方法,其中波长是365nm。

[2969] 实施例x6.如实施例x1至x5中任一项所述的方法,其中所述分离的细胞是角膜内皮细胞。

[2970] 实施例x7.一种将分离的细胞的群移植到受试者眼中的方法,所述方法包括将所述细胞与生物基质组合以形成细胞/生物基质混合物,将所述混合物施用到所述受试者眼上,并通过使用光源在眼上引导和固定所述细胞将所述细胞生物印刷在眼上。

[2971] 实施例x8.如实施例x7所述的方法,其中将分离的细胞与作为GelMA的生物基质组合,并通过光触发反应使GelMA聚合而生物印刷在眼表面上。

[2972] 实施例x9.如实施例x7或实施例x8所述的方法,其中光源产生波长在350nm至700nm范围内的光。

[2973] 实施例x10.如实施例x7至x9中任一项所述的方法,其中波长是350nm至420nm。

[2974] 实施例x11.如实施例x7至x10中任一项所述的方法,其中波长是365nm。

[2975] 实施例x12.如实施例x7至x11中任一项所述的方法,其中所述分离的细胞是角膜缘干细胞。

[2976] 在一个可替代实施例中,经由治疗性接触透镜将通过如上所述的根据本发明的方法可获得的扩增的细胞群直接递送至眼,而无需使用适用于眼递送的定位剂(例如GelMA)。

[2977] 适用于眼递送的定位剂

[2978] 在本发明的一个实施例中,可以将细胞制剂经由适合眼用的定位剂递送至眼。细胞可以包埋在定位剂内或粘附到定位剂的表面,或两者。

[2979] 定位剂的类型不受限制,只要它能够携带LSC或CEC并适合在眼中使用即可。在一个优选的实施例中,定位剂是可降解的并且是生物相容的。在递送CEC的情况下,优选地,定位剂可以在手术递送至眼表面之后促进CEC附着于角膜。

[2980] 在一个优选的实施例中,细胞仅在细胞群扩增后与定位剂组合。在一个特别优选的实施例中,在漂洗细胞群以基本上除去本发明的LAT抑制剂的存在后,将扩增的细胞群与适合于眼递送的定位剂组合。在一个实施例中,将LSC或CEC与定位剂组合并以适合眼用的形式储存。在另一个实施例中,将LSC或CEC和定位剂分开储存并在眼用前立即组合。

[2981] 定位剂优选地选自由以下组成的列表:纤维蛋白、胶原、明胶、纤维素、羊膜、纤维蛋白胶、聚乙烯(乙二醇)二丙烯酸酯(PEGDA)、GelMA、(其为甲基丙烯酰胺改性的明胶,也称为甲基丙烯酸明胶)、包含以下的定位剂:聚合物、交联聚合物、或包含以下中的一种或多种的水凝胶:透明质酸、聚乙二醇、聚丙二醇、聚环氧乙烷、聚环氧丙烷、泊洛沙姆、聚乙烯醇、聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸、聚乙烯吡咯烷酮、聚(丙交酯-共-乙交酯)、海藻酸盐、明胶、胶原、纤维蛋白原、纤维素、甲基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟丙基瓜尔胶、吉兰糖胶、瓜尔胶、黄原胶和羧甲基纤维素、以及其衍生物、其共聚物、及其组合。

[2982] 在一个更优选的实施例中,定位剂选自由以下组成的列表:纤维蛋白、胶原、明胶、羊膜、纤维蛋白胶、聚乙烯(乙二醇)二丙烯酸酯(PEGDA)、GelMA、包含以下的定位剂:聚合物、交联聚合物、或包含以下中的一种或多种的水凝胶:透明质酸、聚乙二醇、聚丙二醇、聚环氧乙烷、聚环氧丙烷、泊洛沙姆、聚丙烯酸、聚(丙交酯-共-乙交酯)、海藻酸盐、明胶、胶原、纤维蛋白原、羟丙基甲基纤维素和羟丙基瓜尔胶、以及其衍生物、其共聚物、及其组合。

[2983] 在一个优选的实施例中,可以经由作为生物基质的定位剂将根据本发明的扩增的细胞群递送至接受者。在更优选的实施例中,定位剂是可光固化的,可降解的生物基质。优选地,它能够被注射至眼。生物基质的具体实例是GelMA,它是甲基丙烯酸酰胺修饰的明胶,也称为甲基丙烯酸明胶。

[2984] GelMA可以根据本领域已知的标准方案来制备(Van Den Bulcke等人,Biomacromolecules[生物大分子],2000,第31-38页;Yue等人,Biomaterials[生物材料],2015,第254-271页)。例如,将来自猪皮肤的明胶(凝胶强度为300g Bloom,A型)溶解在不含钙和镁的PBS中(杜氏PBS),然后在强烈搅拌下将甲基丙烯酸酐添加到明胶溶液中以达到所需浓度(例如,8%(体积/体积)。可以在添加另外的DPBS之前和之后搅拌混合物。可以使用透析管经由Milli-Q水透析纯化稀释混合物,以除去甲基丙烯酸。纯化的样品可以任选地冻干,并将固体储存在-80℃、-20℃或4℃下直至进一步使用。

[2985] 通过将冻干的GelMA溶解在包含药学上可接受的赋形剂的适合眼用的配制品中来制备GelMA储备溶液。为了制备GelMA储备溶液,可以将冻干的GelMA溶解在DPBS中。GelMA完全溶解后,可以将光引发剂(例如,苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次膦酸锂)引入GelMA溶液中。为了将pH值调节至中性,可以在使用0.22微米无菌膜过滤之前,向溶液中添加NaOH。可以将最终滤液分成等分试样,并保存在4℃下直至进一步使用。

[2986] 在根据本发明的一个方面,使用光引发剂聚合生物基质(优选为GelMa)将细胞包裹在生物基质内。合适的光引发剂是Irgacure 2959、苯基-2,4,6-三甲基甲酰基次膦酸锂、苯基-2,4,6-三甲基甲酰基次膦酸钠、双(2,4,6-三甲基甲酰基)次膦酸锂、双(2,4,6-三甲基甲酰基)次膦酸钠、二苯基(2,4,6-三甲基甲酰基)氧化膦、伊红Y、磷酸核黄素、樟脑醌、Quantacure BPQ、Irgacure 819、Irgacure 1850、和Darocure 1173。在一个优选的实施例中,光引发剂是苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次膦酸锂、苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次膦酸钠、磷酸核黄素。在另一个实施例中,光引发剂是苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次膦酸锂。

[2987] 在聚合之前,将可光固化的生物基质与合适的光引发剂在适合眼用的包含药学上可接受的赋形剂的配制品中在本领域已知的合适容器中例如小瓶中混合。在与细胞混合之前,可以将光引发剂与生物基质组合;可替代地,在与细胞混合之后,可以将光引发剂与生物基质组合;可替代地,可以先将光引发剂添加到细胞,然后与生物基质组合。生物基质和光引发剂的浓度取决于所用的特定生物基质和特定光引发剂,但是选择其以在方便的光暴露时间内提供聚合,所述时间通常少于约5分钟;优选地少于约2分钟;更优选地少于约1分钟。在一个实施例中,光引发剂是苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次膦酸锂,其在用于细胞递送至眼的配制品中的浓度为约0.01%w/v至约0.15%w/v。在另一个方面,苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次膦酸锂在用于细胞递送至眼的配制品中的浓度为约0.05%w/v或约0.075%w/v。可以使用公开的程序(Biomaterials[生物材料]2009,30,6702-6707)合成LAP,也可以从TCI(产品号L0290)和Biobots(BioKey)获得。

[2988] 可以在本领域已知的合适容器例如小瓶或试管中将细胞添加到GelMA中。例如,可以通过移液到GelMA中并通过上下轻轻移液混合来添加细胞。在一个实施例中,适合于眼递送的组合物中的GelMA浓度为约10至约200mg/mL、或约25至约150mg/mL、或约25至约75mg/mL。在一个优选的实施例中,适合于眼递送的组合物中的GelMA浓度为约25mg/mL、约50mg/mL或约75mg/mL。

[2989] 为了聚合可光固化的生物基质,如上所述,将生物基质、光引发剂和细胞暴露于光源持续优选的持续时间。用于聚合的光的波长将取决于所使用的特定光引发剂的光化学性质。例如,Irgacure 2959的光引发聚合反应将发生在波长为300nm-370nm的光下;苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次膦酸锂的光引发聚合反应将发生在波长为300nm-420nm的光下;核黄素-5'-磷酸的光引发聚合反应将发生在300nm-500nm波长的光下。所使用的光源可能会发出一定范围的波长,例如白炽灯、气体放电灯或金属蒸气灯所能达到的波长;可替代地,所使用的光源可以发射窄范围的波长,如通过滤光器或通过发光二极管(LED)实现的那样。优选地,所使用的光源不发射波长小于315nm的光,以避免UV辐射对细胞的破坏作用。在一个实施例中,光源是光谱范围为415nm-700nm的白光源。在另一个实施例中,光源是具有约 $365 \pm 5$ nm、约 $375 \pm 5$ nm、约 $385 \pm 5$ nm、约 $395 \pm 5$ nm、约 $405 \pm 5$ nm、约 $415 \pm 5$ nm、约 $425 \pm 5$ nm、约 $435 \pm 5$ nm、约 $445 \pm 5$ nm、约 $455 \pm 5$ nm、或约 $465 \pm 5$ nm的光谱范围的LED光源。选择光的强度以使光毒性最小化并在方便的光暴露时间内提供聚合,所述时间通常少于约5分钟;优选地少于约2分钟;更优选地少于约1分钟。聚合反应的一种指示是溶液粘度的增加。聚合反应的另一种指示是开始胶凝。

[2990] 生物基质的聚合可以经由生物印刷技术在眼表面上发生,或者可替代地在随后移植到眼表面上的载体上发生。任选地,生物基质的聚合可以发生在前房的角膜表面上,或者可替代地发生在随后被移植到前房的角膜表面的载体上。

#### [2991] 载体

[2992] 适用于眼递送的细胞和定位剂优选地经由例如接触透镜或羊膜的载体来递送。

[2993] 适合根据本发明使用的接触透镜优选是那些符合患者角膜曲率并且能够在临床实践中被患者很好地耐受以作为条带接触透镜连续使用若干天的接触透镜。

[2994] 根据本发明的合适类型的接触透镜的实例与已经针对与1型波士顿人工角膜一起使用的长期条带接触透镜(也可以用于患有角膜缘干细胞缺陷的患者)在临床使用上广泛验证的一致并描述于:Thomas,Merina M.D.;Shorter,Ellen O.D.;Joslin,Charlotte E.O.D.,Ph.D.;McMahon,Timothy J.O.D.;Cortina,M.Soledad M.D.Contact Lens Use in Patients With Boston Keratoprosthesis Type 1:Fitting,Management,and Complications.[带有1型波士顿人工角膜的患者的接触透镜使用:贴合、处理和并发症]Eye Contact Lens.[接触透镜]2015年11月;41(6):334-40。

[2995] 接触透镜可以具有本领域中已知的或后来开发的任何适当材料,并且可以是软性透镜、硬性透镜或混合透镜,优选为软性透镜,更优选为常规水凝胶透镜或硅酮水凝胶(SiHy)透镜。

[2996] “常规水凝胶接触透镜”是指包含水凝胶块状(芯)材料的接触透镜,所述水凝胶块状(芯)材料是水不溶的、交联的聚合物材料,理论上不含硅酮,并且在完全水合后在其聚合物基质内可包含至少10重量%的水。常规的水凝胶接触透镜通常是通过将本领域技术人员



已知的常规的水凝胶透镜配制品(即,可聚合的组合物)共聚合而获得的,所述配制品包含无硅酮的亲水性的可聚合组分。

[2997] 用于制备商业水凝胶接触透镜的常规水凝胶眼镜配制品的实例包括但不限于,alfafilcon A、acofilcon A、deltafilcon A、etafilcon A、focofilcon A、helfilcon A、helfilcon B、hilafilcon B、hioxifilcon A、hioxifilcon B、hioxifilcon D、methafilcon A、methafilcon B、nelfilcon A、nesofilcon A、ocufilcon A、ocufilcon B、ocufilcon C、ocufilcon D、omafilcon A、phemfilcon A、polymacon、samfilcon A、telfilcon A、tetrafilcon A、和vifilcon A。

[2998] “SiHy接触透镜”是指包含硅酮水凝胶块状(芯)材料的接触透镜,所述材料是水不溶的、交联的聚合物材料,含有硅酮,并且在完全水合后在其聚合物基质内可包含至少10重量%的水。硅氧烷水凝胶接触透镜通常是通过硅酮水凝胶透镜配制品的共聚合而获得的,所述配制品至少包含本领域技术人员已知的含硅酮的可聚合组分和亲水性可聚合组分。

[2999] 用于制造商业SiHy接触透镜的SiHy透镜配制品的实例包括但不限于asmofilcon A、balafilcon A、comfilcon A、delefilcon A、efrofilcon A、enfilcon A、fanfilcon A、galyfilcon A、lotrafilcon A、lotrafilcon B、narafilcon A、narafilcon B、senofilcon A、senofilcon B、senofilcon C、smafilcon A、somofilcon A、和stenfilcon A。

[3000] 在一个优选的实施例中,载体是选自下组的接触透镜,该组由以下组成:Balafilcon A、Lotrafilcon A、Lotrafilcon B、Senofilcon A和methafilcon A。

[3001] 在特别优选的实施例中,载体是接触透镜,其为Lotrafilcon B。

[3002] 可以使用纤维蛋白胶或缝合线将载体固定在眼表面上的适当位置,以防止眼球运动使结构体移位。

[3003] 与生物基质和细胞组合的载体可以在眼上停留一段时间以递送细胞,例如几天至一周,优选一周。

[3004] 其他递送方法:

[3005] 在一个可替代的实施例中,LSC可以作为细胞悬浮液递送至眼表面(没有定位剂例如生物基质有或没有载体例如接触透镜)。配制品中可包括本领域已知的改善组织粘附性的化合物和赋形剂,例如粘膜粘附剂、粘度增强剂或反向热凝胶剂。

[3006] 生物印刷步骤

[3007] 可以将按照根据本发明的细胞群扩增方法可获得的眼细胞(例如角膜内皮细胞)群移植到受试者的眼,例如受试者的角膜上。

[3008] 根据本发明的细胞群可以经由适合眼用的定位剂递送,所述定位剂是可光固化的、可降解的生物基质,例如GelMA。以下方法描述了用于控制向角膜内壁的递送的过程。

[3009] 方法1. 气泡压抑法(如图22所示)

[3010] 功能障碍的内皮细胞可首先通过剥离/刮擦或以受控方式使用飞秒激光进行光致破裂而从角膜内壁脱离。然后将一小团载有细胞的生物基质注入角膜的内表面附近。这可以使用标准注射器或定制涂药器手动完成。也可以通过外科手术系统(例如constellation仪器)或注射泵进行控制。然后将气泡注入到团的下方。气泡将团压向后角膜,形成薄涂层。然后,使用UV或近UV光源或固化生物基质所需的任何其他光谱带固化整个凝胶。可替代地,可以保留功能障碍的组织,并在其上方固化生物基质。可以使用其他光学聚焦方法将光源

聚焦为不同大小,以控制固化区域。剩余的未固化区域可以使用冲洗/抽吸套管冲洗掉。

[3011] 方法2.使用飞秒激光的消减法(如图23所示)

[3012] 功能障碍的内皮细胞可首先通过剥离/刮擦或以受控方式使用飞秒激光进行光致破裂而从角膜内壁脱离。可替代地,它们可以留在原地。然后将载有细胞的生物基质注射到角膜的内表面上,覆盖去除组织的空隙或覆盖在功能障碍组织上。这可以使用标准注射器或定制涂药器手动完成。也可以通过外科手术系统(例如constellation仪器)或注射泵进行控制。然后,使用UV或近UV光源或固化生物基质所需的任何其他光谱带固化生物基质。飞秒激光然后用于脱离多余的材料,将厚度和面积控制为所需的分布。然后用镊子通过角膜切口去除多余的材料。

[3013] 方法3.染色掩模和基于吸收的厚度控制(如图24所示)

[3014] 首先使用生物相容性染料(台盼蓝,亮蓝等)对角膜的内表面进行染色。然后通过剥离/刮擦将功能障碍的内皮细胞从角膜的内壁上脱离。然后将载有细胞的含有细胞相容性染料的生物基质注射到角膜的内表面上,覆盖去除组织的空隙。然后,使用UV或近UV光源或固化生物基质所需的任何其他光谱带固化生物基质。角膜组织中的染料增加了光吸收(起掩模的作用),以控制固化的生物基质的面积。类似地,生物基质中的染色增加了光的吸收,从而控制固化的材料的深度/厚度。然后使用冲洗/抽吸套管从前房冲洗未固化的凝胶材料。

[3015] 方法4.干前房施用(如图25所示)

[3016] 功能障碍的内皮细胞可首先通过剥离/刮擦或以受控方式使用飞秒激光进行光致破裂而从角膜内壁脱离。可替代地,其可以留在原地。然后将前节的前房的水排干,并用气体(例如空气)代替。然后将载有细胞的生物基质以受控的小液滴形式施用到角膜的内表面(允许表面张力以分散液滴),或使用刷子或柔软的尖端套管进行涂布。可以将透明质酸施用于生物基质以改变其粘性性质,并能够更好地控制分配/施用。然后,使用UV或近UV光源或固化生物基质所需的任何其他光谱带固化整个生物基质。最后,然后用平衡的盐溶液再次填充前房。

[3017] 方法5.天然浮力配制品

[3018] 功能障碍的内皮细胞可首先通过剥离/刮擦或以受控方式使用飞秒激光进行光致破裂而从角膜内壁脱离。然后将一小团载有细胞的生物基质注入角膜的内表面附近。生物基质被配制为相对于房水是天然浮力的,或者被充气以达到相同的效果。这导致生物基质自然升至角膜后部,形成薄涂层。然后,使用UV或近UV光源或固化生物基质所需的任何其他光谱带固化整个生物基质。可替代地,可以保留功能障碍的组织,并在其上方固化生物基质。可以使用光学聚焦方法将UV光源聚焦为不同大小,以控制固化区域。剩余的未固化区域可以使用抽吸套管冲洗掉。

[3019] 其他递送方法

[3020] 在一个可替代实施例中,可以将扩增的细胞群(例如本文所述的CEC)作为细胞悬浮液(不包含定位剂,例如可光固化、可降解的生物基质)递送,并通过使患者向下看3小时而通过重力使其附着。配制品中可包括本领域已知的改善组织粘附性的化合物和赋形剂,例如粘附剂、粘度增强剂或反向热凝胶剂。

[3021] 在又一个替代实施例中,还可通过使用磁珠递送扩增的细胞群,例如本文所述

的CEC。制备CEC/珠粒在适合于眼递送的介质中的悬浮液,然后将其注射到眼中。通过施用于眼上的磁铁促进细胞附着。(Magnetic field-guided cell delivery with nanoparticle-loaded human corneal endothelial cells.[纳米载人角膜内皮细胞的磁场引导细胞递送]Moysidis SN,Alvarez-Delfin K,Peschansky VJ,Salero E,Weisman AD,Bartakova A,Raffa GA,Merkhofer RM Jr,Kador KE,Kunzevitzky NJ,Goldberg JL.Nanomedicine.[纳米医学]2015年4月;11(3):499-509.doi:10.1016/j.nano.2014.12.002。)

[3022] 使用根据本发明的LATS抑制剂的其他方法

[3023] 在根据本发明的一方面,直接将根据本发明的LATS抑制剂直接添加到眼的表面以实现细胞群扩增是可能的。例如,如果细胞损失不是全部并且有剩余的待扩增的接种细胞群,则可以这样做。例如,如果患者的眼中有剩余的角膜缘干细胞,或者如果患者的角膜中有剩余的角膜内皮细胞,则可以是这种情况。例如,这可以通过以下实现:以适合于眼使用的包含药学上可接受的赋形剂的配制品形式制备本文披露的化合物并通过滴眼剂施用于眼。可替换地,以适合于眼使用的包含药学上可接受的赋形剂的配制品的本文披露的化合物可以眼内(例如,前房内)施用。

[3024] 药学上可接受的赋形剂使组合物强化或稳定,或促进组合物的制备。药学上可接受的赋形剂包括溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等,其是生理相容性的。

[3025] 根据本发明的LATS抑制剂可以与眼科学上可接受的以下试剂组合以形成水性眼用悬浮液或溶液,所述试剂包括:防腐剂、助溶剂、表面活性剂、粘度增强剂、渗透增强剂、缓冲剂、氯化钠、或水。局部眼科产品可以例如以多剂量形式包装。因此可能需要防腐剂来防止使用过程中的微生物污染。合适的防腐剂包括:氯丁醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯乙醇、乙二胺四乙酸二钠、山梨酸、聚季铵盐-1或本领域技术人员已知的其他试剂。这些防腐剂通常以0.001%至1.0%w/v的水平使用。

[3026] 在本发明的一个实施例中,根据本发明的LATS抑制剂可以用于保存细胞(例如角膜上皮和角膜缘细胞)直至移植。眼库专家对尸体进行解剖后,将角膜保存在介质(例如Optisol或PBS)中直至移植。在本发明的特定实施例中,可以将LATS抑制剂添加至通常用于角膜移植的溶液(例如Optisol或PBS)。保存溶液中LATS抑制剂的浓度优选为0.5至100微摩尔,更优选为0.5至25微摩尔,特别优选为1至20微摩尔。在具体实施例中,根据式I将LATS抑制剂以约3至10微摩尔的浓度添加。

[3027] 免疫抑制剂、抗炎剂和抗生素剂

[3028] 除了对细胞群使用体外进行的基因编辑技术(如针对角膜缘干细胞或角膜内皮细胞所述)以减轻移植的细胞对患者免疫排斥的风险之外,或者作为其替代,还可以将本发明的细胞群与免疫抑制剂和/或抗炎剂或多种试剂同时或相继施用。可以使用用于免疫抑制的标准试剂或抗炎剂或多种试剂,包括但不限于地塞米松或环孢霉素。

[3029] 也可以将抗生素(例如抗生素头孢唑林和妥布霉素)与扩增的细胞群(例如本文所述的角膜缘干细胞或角膜内皮细胞)联合施用给患者。

[3030] 当将本发明的细胞群与另一种试剂或多种试剂一起施用时,可以将所述细胞群和一种或多种试剂以任何顺序施用或同时施用。在一些实施例中,将根据本发明的扩增的细

胞群与外科手术治疗联合施用。在其他实施方案中,将根据本发明的角膜缘干细胞群与外科手术治疗联合施用。在其他实施方案中,将根据本发明的角膜内皮细胞群与外科手术治疗联合施用。

**[3031] 治疗用途**

[3032] 可以根据本发明的眼细胞群用于治疗或预防眼疾病或障碍的方法,所述方法包括向有此需要的受试者治疗施用有效量的包含眼细胞的细胞群。

[3033] 可以根据本发明的角膜缘干细胞群用于治疗或预防眼疾病或障碍的方法,所述方法包括向有此需要的受试者施用治疗有效量的包含角膜缘干细胞的细胞群。优选地,眼疾病或障碍与角膜缘干细胞缺陷有关。

[3034] 角膜缘干细胞缺陷可能是由多种多样的情况引起的,包括但不限于:

[3035] -化学或热灼伤或辐射损伤造成的直接干细胞损伤;

[3036] -先天性疾病,如无虹膜、硬化性角膜、多发性内分泌肿瘤;

[3037] -自身免疫性障碍,例如史蒂文斯约翰逊综合征或眼部瘢痕性天疱疮或胶原血管病;

[3038] -慢性非自身免疫性炎性障碍,例如接触透镜使用、干眼疾病、酒渣鼻、葡萄球菌边缘角膜炎(细菌性、真菌性和病毒性)、翼状胬肉或肿瘤;

[3039] -医源性,例如经过多次眼科手术、翼状胬肉或肿瘤切除、冷冻疗法;

[3040] -药物毒性的结果,例如防腐剂(硫柳汞、苯甲羟铵)、局部麻醉药、毛果芸香碱、 $\beta$ 受体阻滞剂、丝裂霉素、5-氟脲嘧啶、硝酸银和引起史蒂文斯约翰逊综合征的口服药物。

[3041] (参见:Dry Eye:a practical guide to ocular surface disorders and stem cell surgery.[干眼症:有关眼表面障碍和干细胞手术的实用指南。]SLACK2006-Rzany B, Mockenhaupt M,Baur S等人J.Clin.Epidemiol.[临床流行病学杂志]49,769-773(1996))。

[3042] 在临床实践中,最常见的角膜缘干细胞缺陷的原因是化学烧伤、无虹膜、史蒂文斯约翰逊综合征和接触透镜使用。

[3043] 更优选地,所述眼疾病或障碍是:由选自下组的损伤或障碍引起角膜缘干细胞缺陷,该组由以下组成:化学灼伤、热灼伤、放射损伤、无虹膜、硬化性角膜、多发性内分泌肿瘤、史蒂文斯约翰逊综合征、眼部疤痕性类天疱疮、胶原血管病、接触透镜使用引起的慢性非自身免疫性炎性障碍、干眼疾病、酒渣鼻、葡萄球菌边缘角膜炎(包括细菌性、真菌性和病毒性角膜炎)、翼状胬肉或肿瘤、多次眼科手术或翼状胬肉或肿瘤切除或冷冻疗法引起的角膜缘干细胞缺陷;以及由选自下组的药物引起的药物毒性导致的角膜缘干细胞缺陷,该组由以下组成:防腐剂(硫柳汞、苯甲羟铵)、局部麻醉药、毛果芸香碱、 $\beta$ 受体阻滞剂、丝裂霉素、5-氟脲嘧啶、硝酸银和引起史蒂文斯约翰逊综合征的口服药物。

[3044] 在一个具体的实施例中,本发明提供了通过向有此需要的受试者施用有效量的根据本发明的细胞群扩增方法可获得的角膜缘干细胞群来治疗角膜缘干细胞缺陷的方法。

[3045] 在一个更具体的实施例中,本发明提供了一种治疗以下的方法:由损伤或障碍引起的角膜缘干细胞缺陷,所述损伤或障碍选自下组,该组由以下组成:化学灼伤、热灼伤、放射损伤、无虹膜、硬化性角膜、多发性内分泌肿瘤、史蒂文斯约翰逊综合征、眼部疤痕性类天疱疮、胶原血管病、接触透镜使用引起的慢性非自身免疫性炎性障碍、干眼疾病、酒渣鼻、葡萄球菌边缘角膜炎(包括细菌性、真菌性和病毒性角膜炎)、翼状胬肉或肿瘤、多次眼科手术

或翼状胬肉或肿瘤切除或冷冻疗法引起的角膜缘干细胞缺陷;以及由选自下组的药物引起的药物毒性导致的角膜缘干细胞缺陷,所述组自由以下组成:防腐剂(硫柳汞、苯甲羟铵)、局部麻醉药、毛果芸香碱、 $\beta$ 受体阻滞剂、丝裂霉素、5-氟脲嘧啶、硝酸银和引起史蒂文斯约翰逊综合征的口服药物,所述治疗是通过向有此需要的受试者施用治疗有效量的通过根据本发明的细胞群扩增方法可获得的角膜缘干细胞群。

[3046] 在又一个更具体的实施例中,本发明提供了通过向有此需要的受试者施用治疗有效量的根据本发明的细胞群扩增方法可获得的角膜缘干细胞群来治疗角膜缘干细胞缺陷的方法,所述角膜缘干细胞缺陷由选自下组的损伤、疾病或障碍引起,该组由以下组成:化学灼伤、无虹膜、史蒂文斯约翰逊综合征和接触透镜使用。

[3047] 当成人是接受者(移植接受者)时,在根据本发明的治疗方法中可以向患者施用优选大于1 000个表达p63 $\alpha$ 的细胞。在优选的实施例中,在根据本发明的治疗方法中可以向患者施用1 000至100 000个表达p63 $\alpha$ 的细胞。

[3048] 根据本发明的角膜内皮细胞群可以用于治疗或预防眼疾病或障碍的方法,所述方法包括向有此需要的受试者施用治疗有效量的包含角膜内皮细胞的细胞群。优选地,眼疾病或障碍与角膜内皮细胞密度降低有关。在优选的实施例中,眼疾病或障碍是角膜内皮功能障碍。

[3049] 更优选地,眼疾病或障碍是角膜内皮功能障碍,其选自由以下组成的组:Fuchs角膜内皮营养不良、大疱性角膜病变(包括假晶状体大疱性角膜病和无晶状体大疱性角膜病)、角膜移植失败、后部多态性角膜营养不良、先天性遗传性内皮营养不良、X连锁内皮角膜营养不良、无虹膜和角膜内皮炎。在一个具体的实施例中,眼疾病或障碍选自下组,该组由以下组成:Fuchs角膜内皮营养不良、大疱性角膜病变(包括假晶状体大疱性角膜病和无晶状体大疱性角膜病)和角膜移植失败。

[3050] 在一个具体的实施例中,本发明提供了通过向有此需要的受试者施用有效量的根据本发明的细胞群扩增方法可获得的角膜内皮细胞群来治疗角膜内皮功能障碍的方法。

[3051] 在一个更具体的实施例中,本发明提供了通过向有此需要的受试者施用有效量的根据本发明的细胞群扩增方法可获得的角膜内皮细胞群来治疗角膜内皮功能障碍的方法,所述角膜内皮功能障碍选自由以下组成的组:Fuchs角膜内皮营养不良、大疱性角膜病变(包括假晶状体大疱性角膜病和无晶状体大疱性角膜病)、角膜移植失败、后部多态性角膜营养不良、先天性遗传性内皮营养不良、X连锁内皮角膜营养不良、无虹膜和角膜内皮炎。

[3052] 在又一个更具体的实施例中,本发明提供了通过向有此需要的受试者施用有效量的根据本发明的细胞群扩增方法可获得的角膜内皮细胞群来治疗角膜内皮功能障碍的方法,所述角膜内皮功能障碍选自由以下组成的组:Fuchs角膜内皮营养不良、大疱性角膜病变(包括假晶状体大疱性角膜病和无晶状体大疱性角膜病)和角膜移植失败。

[3053] 当成人是接受者(移植接受者)时,可以在根据本发明的治疗方法中使用的角膜内皮细胞层在眼中的最终细胞密度优选为约至少500个细胞/ $\text{mm}^2$ (面积)、优选1000至3500个细胞/ $\text{mm}^2$ (面积)、更优选2000至约4000个细胞/ $\text{mm}^2$ (面积)。

[3054] 实例部分A-C

[3055] 提供以下实例以进一步说明本发明,但不限制其范围。本发明的其他变型对于本领域普通技术人员来说是容易清楚的,并且由所附权利要求涵盖。

[3056] 除非另外定义,否则本文使用的技术术语和科学术语具有与熟悉本披露所属领域的技术人员通常理解的含义。

[3057] 实例A1:LATS1生化测定均匀时间分辨荧光 (HTRF) 测定 (化合物实例1-290)

[3058] 根据制造商的说明,使用HTRF KinEASE-STK S1试剂盒 (CisBio公司,产品编号62ST1PEC) 进行LATS1生化HTRF测定。人LATS1激酶结构域蛋白购自Carnabio公司 (产品编号01-123),所述蛋白具有589-1130位氨基酸催化结构域,并与人His标记的MOBK1A (NP\_775-739) 共纯化。通过ECHO液体处理器 (Labcyte公司) 将化合物添加到384孔板中。然后将5微升以下溶液添加至孔中 (50mM HEPES、0.01%BSA、100nM原钒酸盐 (Orthovanadate)、1mM MgCl<sub>2</sub>、1mM DTT、0.6ng/微升LATS1酶 (Carnabio公司,01-123)、2微摩尔STK1定位助剂 (CisBio公司)),随后添加在激酶缓冲液 (50mM HEPES、0.01%BSA、100nM钒酸盐、1mM MgCl<sub>2</sub>、1mM DTT) 中的5微升2mM ATP,并在室温下孵育30分钟。将10微升的检测混合物 (50mM HEPES、0.01%BSA、100nM原钒酸盐、1mM MgCl<sub>2</sub>、1mM DTT、STK抗体-穴合物 (Antibody-Cryptate) (CisBio公司)、链霉亲和素XL665 (CisBio公司)、500微摩尔氟化钾、50nM EDTA) 添加到每个孔中,并在室温下孵育1小时。在Pherastar (BMG Labtech公司) 上针对HTRF读取 (665nm/620nm) 板。当化合物的作用将HTRF信号降低50%时,测量IC<sub>50</sub>。表1A中示出了示例化合物的LATS1IC<sub>50</sub>值。

[3059] 实例A2:LATS1生化卡尺测定

[3060] 人LATS1激酶结构域蛋白购自Carnabio公司 (产品编号01-123),所述蛋白具有589-1130位氨基酸催化结构域,并与人His标记的MOBK1A (NP\_775-739) 共纯化。将5微升的酶缓冲液,100nL的化合物和5微升的定位助剂缓冲液添加到384孔板中。最终的测定反应混合物包含100mM HEPES pH7.5、0.1%BSA、0.01%Triton X-100、1mM DTT、10mM MgCl<sub>2</sub>、10微摩尔原钒酸钠、10微摩尔β-甘油磷酸酯、400微摩尔ATP、1%DMSO、1.1nM LATS1酶 (Carnabio公司,01-123)、FAM-KKLRRTLSVA-COOH (SEQ ID NO:24) (NanoSyn公司) 的1微摩尔定位助剂。将板在25℃孵育3小时。将具有25mM EDTA (NanoSyn公司) 的40微升终止缓冲液添加到每个孔中以终止反应。使用基于微流体的卡尺实验室芯片3000药物发现系统 (卡尺生命科学公司 (Caliper Life Sciences)),通过电泳分离定位助剂和产物。使用蓝色激光激发和绿色荧光检测读取板,并通过荧光强度定量。当化合物的作用将产物荧光信号降低50%时,测量IC<sub>50</sub>。根据此测定,下列化合物的LATS1IC<sub>50</sub>微摩尔值是:

[3061] 实例49:0.012,实例14:0.034,实例65:0.022,实例139:0.028,实例133:0.004。

[3062] 实例A3:LATS2生化卡尺测定 (化合物实例1-290)

[3063] 人LATS2激酶结构域蛋白购自Carnabio公司 (产品编号01-124),所述蛋白具有553-1088位氨基酸催化结构域,并与人His标记的MOBK1A (NP\_775-739) 共纯化。将5微升的酶缓冲液,100nL的化合物和5微升的定位助剂缓冲液添加到384孔板中。最终的测定反应混合物包含100mM HEPES pH7.5、0.1%BSA、0.01%Triton X-100、1mM DTT、10mM MgCl<sub>2</sub>、10微摩尔原钒酸钠、10微摩尔β-甘油磷酸酯、400微摩尔ATP、1%DMSO、1.1nM LATS2酶 (Carnabio公司,01-124)、FAM-KKLRRTLSVA-COOH (SEQ ID NO:24) (NanoSyn公司) 的1微摩尔定位助剂。将板在25℃孵育3小时。将具有25mM EDTA (NanoSyn公司) 的40微升终止缓冲液添加到每个孔中以终止反应。使用基于微流体的卡尺实验室芯片3000药物发现系统 (卡尺生命科学公司 (Caliper Life Sciences)),通过电泳分离定位助剂和产物。使用蓝色激光激发和绿色

荧光检测读取板,并通过荧光强度定量。当化合物的作用将产物荧光信号降低50%时,测量 $IC_{50}$ 。表1A中示出了示例化合物1-290的LATS2 $IC_{50}$ 值。

[3064] 表1A:针对LATS1和LATS2的抑制活性

[3065]	实例编号	LATS1 $IC_{50}$ ( $\mu M$ )	LATS2 $IC_{50}$ ( $\mu M$ )		实例编号	LATS1 $IC_{50}$ ( $\mu M$ )	LATS2 $IC_{50}$ ( $\mu M$ )
	1	0.001	n.d.		117	0.004	n.d.

[3066]

2	0.001	n.d.	118	0.005	n.d.
3	0.001	n.d.	119	0.009	n.d.
4	0.001	0.001	120	0.01	n.d.
5	0.002	n.d.	121	0.014	n.d.
6	0.001	0.008	122	0.015	n.d.
7	0.002	n.d.	123	0.018	n.d.
8	0.003	n.d.	124	0.022	n.d.
9	0.003	n.d.	125	0.023	n.d.
10	0.003	n.d.	126	0.053	n.d.
11	0.003	0.012	127	0.055	n.d.
12	0.004	0.015	128	0.077	n.d.
13	0.004	n.d.	129	0.187	n.d.
14	0.002	0.05	130	1.153	n.d.
15	0.004	n.d.	131	> 0.833	n.d.
16	0.005	n.d.	132	> 2.5	n.d.
17	0.005	n.d.	133	0.002	0.004
17a	0.003	n.d.	134	0.001	n.d.
17b	0.0009	n.d.	135	0.002	n.d.
17c	0.003	n.d.	136	0.002	n.d.
17d	0.001	n.d.	137	0.022	n.d.
18	0.006	n.d.	138	0.002	n.d.
19	0.006	n.d.	139	0.003	0.02
20	0.006	n.d.	140	0.004	n.d.
21	0.007	n.d.	141	0.004	n.d.
22	0.007	n.d.	142	0.006	n.d.
23	0.01	n.d.	143	0.007	n.d.
24	0.017	n.d.	144	0.01	n.d.
25	0.03	n.d.	145	0.012	n.d.
26	0.031	n.d.	146	0.033	n.d.
27	0.035	n.d.	147	0.069	n.d.
28	0.036	n.d.	148	0.168	n.d.
29	0.036	n.d.	149	0.171	n.d.
30	0.039	n.d.	150	4.27	n.d.
31	0.041	n.d.	151	> 10	n.d.
32	0.047	n.d.	152	> 2.5	n.d.
33	0.071	n.d.	153	> 5	n.d.
34	0.095	n.d.	154	0.0	n.d.
35	0.118	n.d.	155	0.001	n.d.
36	0.199	n.d.	156	0.006	n.d.
37	0.233	n.d.	157	0.006	n.d.



[3067]

38	0.24	n.d.	158	0.008	n.d.
39	0.244	n.d.	159	0.016	n.d.
40	0.328	n.d.	160	0.024	n.d.
41	0.708	n.d.	161	0.025	n.d.
42	0.711	n.d.	162	0.049	n.d.
43	> 1.97	n.d.	163	0.051	n.d.
44	> 2.5	n.d.	164	0.159	n.d.
45	> 2.5	n.d.	165	> 2.5	n.d.
46	> 2.5	n.d.	166	0.014	n.d.
47	0.002	0.006	167	0.143	n.d.
48a	0.002	0.002	168	0.028	n.d.
48b	0.006	0.018	169	0.098	n.d.
49	0.001	0.021	170	1.28	n.d.
50	0.005	n.d.	171	0.054	n.d.
51	0.006	n.d.	172	0.017	n.d.
52	0.012	n.d.	173	0.061	n.d.
53	0.04	n.d.	174	0.197	n.d.
54	0.078	n.d.	175	0.324	n.d.
55	0.46	n.d.	176	> 2.5	n.d.
56	1.16	n.d.	177	> 2.5	n.d.
57	1.44	n.d.	178	> 2.5	n.d.
58	0.001	0.17	179	0.002	n.d.
59	0.001	0.004	180	0.322	n.d.
60	0.001	n.d.	181	9.0	n.d.
61	0.001	n.d.	182	> 10	n.d.
62	0.001	0.002	183	0.797	n.d.
63	0.001	n.d.	184	0.004	n.d.
64	0.001	n.d.	185	0.009	n.d.
65	0.002	0.03	186	0.009	0.05
66	0.002	0.011	187	0.016	n.d.
67	0.002	n.d.	188	0.017	n.d.
68	0.002	n.d.	189	0.083	n.d.
68a	0.001	n.d.	190	0.099	n.d.
68b	0.002	n.d.	191	0.189	n.d.
69	0.003	n.d.	192	0.201	n.d.
70	0.003	n.d.	193	> 10	n.d.
71	0.004	n.d.	194	0.005	n.d.
72	0.004	n.d.	195	> 10	n.d.
73	0.006	n.d.	196	> 2.5	n.d.
74	0.006	n.d.	197	0.023	n.d.

[3068]

75	0.008	n.d.	198	0.001	n.d.
76	0.009	n.d.	199	0.001	n.d.
77	0.009	n.d.	251	0.004	n.d.
78	0.011	n.d.	252	0.002	n.d.
79	0.011	n.d.	253	0.085	n.d.
80	0.011	n.d.	254	0.005	n.d.
81	0.011	n.d.	255	0.008	n.d.
82	0.013	n.d.	256	0.008	n.d.
83	0.017	n.d.	257	0.022	n.d.
84	0.021	n.d.	258	0.023	n.d.
85	0.025	n.d.	259	0.061	n.d.
86	0.026	n.d.	260	0.459	n.d.
87	0.03	n.d.	261	0.001	0.004
88	0.037	n.d.	262	0.003	n.d.
89	0.044	n.d.	263	0.007	n.d.
90	0.126	n.d.	264	0.007	n.d.
91	0.148	n.d.	265	0.008	n.d.
92	0.304	n.d.	266	0.009	n.d.
93	0.809	n.d.	267	0.013	n.d.
94	1.15	n.d.	268	0.018	n.d.
95	> 1.44	n.d.	269	0.001	n.d.
96	> 1.70	n.d.	270	0.002	n.d.
97	> 2.5	n.d.	271	0.002	n.d.
98	1.35	n.d.	272	0.002	n.d.
99	0.001	n.d.	273	0.463	n.d.
100	0.004	n.d.	274	0.013	n.d.
101	0.005	0.03	275	0.011	n.d.
102	0.126	n.d.	276	0.017	n.d.
103	0.002	n.d.	277	0.065	n.d.
104	0.005	n.d.	278	0.09	n.d.
105	0.001	n.d.	279	> 2.5	n.d.
106	0.003	n.d.	280	0.003	n.d.
107	0.008	n.d.	281	0.004	n.d.
108	0.027	n.d.	282	0.01	n.d.
109	0.001	n.d.	283	0.02	n.d.
110	0.002	n.d.	284	0.03	n.d.
111	0.001	n.d.	285	0.19	n.d.
112	0.002	n.d.	286	0.56	n.d.
113	0.235	n.d.	287	0.002	0.015
114	0.002	n.d.	288	0.004	0.034

[3069]	115	0.002	n.d.		289	0.004	n.d.
	116	0.003	n.d.		290	0.004	0.008

[3070] n.d.表示未确定

[3071] 实例A4:LATS1生化卡尺测定(化合物实例291-335)

[3072] LATS1生化卡尺测定如下进行。

[3073] 人LATS1激酶结构域蛋白购自Carnabio公司(产品编号01-123;批号15CBS-0098D)。使用杆状病毒表达系统,将人LATS1催化结构域[589-1130(末端)氨基酸,登录号NP\_004681.1]与人His标记的MOBK1A[1-216(末端)氨基酸,登录号NP\_775739.1]共表达为N末端GST融合蛋白(90kDa)。通过使用谷胱甘肽琼脂糖凝胶色谱将GST-LATS1纯化。底物(Fluo-SGKtide;用于LATS1的肽;批号BS-41067)具有以下序列:5-Fluo-Nva-KKRNRRLSVA-酰胺(SEQ ID NO:27) x TFA并且购自Biosyntan公司。

[3074] 反应在含有以下的反应缓冲液中进行:50mM Hepes pH 7,5;0.02%Tween20;0.02%BSA;1mM DTT;10uM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 和10mM $\beta$ -甘油磷酸盐和新鲜添加的1mM  $\text{MgCl}_2$ 和qsp  $\text{H}_2\text{O}$ 。

[3075] 反应缓冲液中的底物溶液(2x浓度)含有300 $\mu\text{M}$  ATP和4 $\mu\text{M}$ Fluo-SGKtide。

[3076] 反应缓冲液中的激酶溶液(2x浓度)含有20nM LATS1激酶。

[3077] 将4.5 $\mu\text{L}$  2x浓度激酶溶液、50nL的1,8mM化合物和4.5 $\mu\text{L}$ 的底物溶液添加到来自Greiner公司的黑色小体积的384孔板中,并在32 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育1小时。将15 $\mu\text{L}$ 终止缓冲液(包含100mM Hepes pH 7,5);5%DMSO;0.1%包衣试剂;10mM EDTA和0.02%Brij35和qsp  $\text{H}_2\text{O}$ 添加至每个孔中以终止反应。

[3078] 使用基于微流体的电泳分离底物和产物。

[3079] 使用12吸嘴芯片(目录号760404)的卡尺EZ读取器系统(卡尺生命科学公司)。分离在含有0.1%包衣试剂CR3和0.5%包衣试剂CR8(珀金埃尔默公司(Perkin Elmer))的包衣缓冲液(同前终止缓冲液)中进行。

[3080] 使用LED在488nm激发和520nm检测下读取板,以定量荧光强度。当化合物的作用将产物荧光信号降低50%时,测量 $\text{IC}_{50}$ 。表1B中示出了示例化合物291-335的LATS1 $\text{IC}_{50}$ 值。

[3081] 表1B.针对LATS1的抑制活性

[3082]

实例编号	LATS1 IC <sub>50</sub> (μM)
291	0.4570
292	0.0433
293	0.0160
294	0.0045
295	0.0100
296	0.2089
297	0.0075
298	0.0590
299	0.0971
300	0.0012
301	0.0052
302	0.0595
303	0.0102
304	0.0096
305	0.6629
306	0.0012
307	0.0019
308	0.0687
309	0.0008
310	0.1639
311	1.0336
312	0.0024
313	0.0038
314	0.4667
315	0.0050
316	0.0425
317	0.0008
318	0.0018
319	0.0581
320	0.0007
321	0.0038
322	0.0292

[3083]	<b>323</b>	0.0045
	<b>324</b>	0.0104
	<b>325</b>	0.0037
	<b>326</b>	0.0572
	<b>327</b>	0.1251
	<b>328</b>	0.0189
	<b>329</b>	0.0030
	<b>330</b>	0.0031
	<b>331</b>	0.0105
	<b>332</b>	0.0076
	<b>333</b>	0.0023
	<b>334</b>	0.0061
	<b>335</b>	n.t.

[3084] n.t.:未测试

[3085] 实例A5:小鼠肝祖细胞增殖测定

[3086] 增殖测定由以下组成:通过高含量成像方法测量化合物诱导的肝祖细胞 (HPC) 三维生长成小的类器官。从C57Bl/6野生型小鼠分离祖细胞,并按照描述进行扩增 (Lu, W.Y. 等人, Nat. Cell Biol. [自然细胞生物学] 17, 971-983 (2015))。将细胞储存在液氮中,根据需要解冻并使用以下方案进行测试:

[3087] 将HPC从其胶原I包被的培养容器 (康宁公司 (Corning); 目录号354487) 收获,使用CEDEX细胞计数器 (罗氏公司 (Roche)) 进行计数并评估其生存力。离心后,将1200万个细胞重悬于2ml补充有以下的William E培养基 (生命技术公司 (Life Technologies); 目录号22551089) 中:10%胎牛血清 (Amimed公司; 目录号2-01F10-1); 1%青霉素/链霉素 (西格玛公司 (Sigma); 目录号15140-122); 17.6mM NaHCO<sub>3</sub> (西格玛公司; 目录号S8761); 20mM HEPES (吉博科公司 (Gibco); 目录号H3375); 10mM烟酰胺 (西格玛公司; 目录号N0636-100); 14mM葡萄糖 (西格玛公司; 目录号G7021); 1mM丙酮酸钠 (西格玛公司; 目录号TMS-005); 从储备溶液中稀释100倍的胰岛素转铁蛋白硒 (ITS) (西格玛公司; 目录号13148); 100nM地塞米松 (西格玛公司; 目录号D4902); 0.2mM抗坏血酸 (西格玛公司; 目录号A7506-100G); 10ng/ml重组人IL-6 (派普泰克公司 (Preprotech) 目录号200-06); 10ng/ml鼠HGF (派普泰克公司目录号315-23; 批号0711S527); 10ng/ml鼠EGF (派普泰克公司目录号315-09; 批号0217179-1)。将六毫升的基质胶 (康宁公司; 目录号354277; 批号:5187006) 添加到细胞/培养基溶液中,因此在25%的培养基和75%的基质胶中,最终的细胞浓度为150万个HPC/毫升。使用星分配器 (Star dispenser) (汉密尔顿公司 (Hamilton)) 将5微升 (μl) 的细胞/基质胶悬浮液转移到透明底96孔测定板的每个孔中 (康宁公司; 目录号356649)。在37°C和5%CO<sub>2</sub>孵育20分钟以允许基质胶聚合后,将45μl细胞培养基分配在上面。

[3088] 在化合物源板上,将300μl细胞培养基分配到溶于90%DMSO的1.2μl化合物上。适当混合后,使用CyBi Well (CyBio公司) 将50μl化合物溶液转移至测定板。以8点浓度曲线 (每个浓度之间的稀释系数为3.16) 来测试每种化合物。测试的最大化合物浓度为20μM,最

低为9nM。将测定板在37℃和5%CO<sub>2</sub>下孵育4天。

[3089] 孵育后,用储液稀释1/5000的磷酸盐缓冲盐水(PBS)(Gibco公司;目录号10010-015)固定类器官,以染色核,所述磷酸盐缓冲盐水包含4%多聚甲醛(电子显微镜科学公司(Electron Microscopy Sciences);目录号15714-S)和Hoechst 33342(生命技术公司;目录号H3570)。将板在室温下孵育90分钟,并用含1%青霉素/链霉素的300μl PBS洗涤一次。

[3090] 使用CV7000成像仪(横河电机公司(Yokogawa))以10倍放大使用明场灯(灯功率:10%;曝光时间:20ms)和405纳米激光(激光功率:100%;曝光时间200ms)对板成像。采集四个不同的图像/孔,并使用横河电机公司图像分析软件(YAS)进行分析。用于确定类器官大小的输出特征是取孔中平均值的平均核数目/类器官。使用以下计算,将平均核数目/类器官(x)标准化为中性对照处理(DMSO): $[x_n = +100(x - NC) / NC]$ 。中性对照标准化的数据用于自动曲线拟合,以得出每种化合物的曲线参数,包括EC<sub>50</sub>值。

[3091] 小鼠肝祖细胞增殖测定可以容易地用于测试化合物是否有效诱导肝祖细胞增殖。将本发明的某些化合物在小鼠肝祖细胞增殖测定中进行了测试,并且发现具有小于20μM的EC<sub>50</sub>值,例如,发现实例48a和实例58分别具有0.26μM和0.84μM的EC<sub>50</sub>值。将本发明的某些其他化合物在小鼠肝祖细胞增殖测定中进行了测试,并且发现具有大于20μM的EC<sub>50</sub>值,例如实例303。

#### [3092] 实例A6:pYAPHTRF测定(HaCaT细胞)

[3093] 根据制造商的说明,使用Phospho-YAP(SER127)10000测试试剂盒(CisBio公司,目录号64YAPPEH)进行pYAP HTRF测定。简而言之,将HaCaT细胞以 $1.1 \times 10^6$ 细胞/mL的浓度悬浮在DMEM(无酚红)+10%FBS(具有青霉素-链霉素-谷氨酰胺)中。将5μL细胞分配到1536孔白色固体底部,经组织培养处理的板(5500个细胞/孔)中,并且于37℃孵育48小时。使用Pintool(GNF)将50nL测试化合物转移至含有HaCaT细胞的测定板中,并孵育2小时。将裂解缓冲液(CisBio公司)添加到测定孔中,并在室温下孵育5分钟,然后添加2μL检测抗体(每种pYAP d2ab和pYAP穴合物抗体储液的1:40稀释)。在室温下在盖有金属盖下将板孵育过夜(20小时)。在Pherastar(BMG Labtech公司)上针对HTRF读取(665nm/620nm)板。当化合物的作用将HTRF信号降低50%时,测量IC<sub>50</sub>。结果示于表1C中。

#### [3094] 实例A7:YAP易位测定(HaCaT细胞)

[3095] 将HaCaT细胞以 $0.4 \times 10^6$ 细胞/ml的浓度悬浮在DMEM+10%FBS(具有青霉素-链霉素-谷氨酰胺)中。将50μl细胞分配到384孔透明底测定板(20,000个细胞/孔)中,并在37℃下孵育过夜。使用ECHO(Labcyte公司)将100nL测试化合物转移至含有HaCaT细胞的测定孔中。在37℃下孵育24小时后,将7μL 32%PFA分配到每个孔中,并在室温下孵育45分钟。将板用PBS洗涤3次,每孔留下20μL的PBS,然后在室温下用0.1%Triton和1.5%BSA的PBS溶液处理45分钟。将板用PBS洗涤5次,每孔留下20μL的PBS。向每个孔中添加20μL 1:1000第一YAP ab(圣克鲁兹生物技术公司(Santa Cruz Biotechnology),目录号63.7)和在含1.5%BSA的PBS中的1:1500Draq5,并在室温下孵育4小时。PBS洗涤3次后,每孔保留20μL PBS,然后将每孔与20μL的1:2000AlexaFluor 488\_A21202第二抗体(分子探针公司(MolecularProbes))在室温下孵育4小时。将板进一步用PBS洗涤3次,密封并在高含量Opera成像系统(珀金埃尔默公司)上成像。结果示于表1C中。

[3096] 表1C.YAP磷酸化的抑制剂和YAP核易位

[3097]

实 例 编 号	HaCaT pYAP IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	HaCaT 核 易 位 EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	实 例 编 号	HaCaT pYAP IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	HaCaT 核 易 位 EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
1	0.019	0.326	117	2.31	4.47
2	0.067	0.584	118	2.05	5.01
3	0.853	0.641	119	n.d.	5.18
4	1.15	2.53	120	2.14	2.93
5	2.19	2.48	121	n.d.	8.17
6	1.24	1.70	122	7.4	5.8
7	0.165	0.733	123	9.45	9.2
8	0.198	1.20	124	8.01	12.0
9	2.10	2.42	125	n.d.	8
10	2.96	3.55	126	n.d.	> 20
11	0.646	1.43	127	n.d.	> 20
12	1.15	1.75	128	n.d.	> 20
13	13.45	8.51	129	n.d.	> 20
14	7.31	4.25	130	n.d.	> 20
15	0.66	3.48	131	n.d.	> 20
16	9.79	15.8	132	n.d.	> 20
17	0.606	2.63	133	0.414	1.67
17a	4.95	4.1	134	0.539	1.19
17b	0.765	1.22	135	0.488	0.85
17c	4.28	4.68	136	1.14	2.96
17d	0.402	1.72	137	35.5	> 17.8
18	1.52	3.46	138	3.37	9.07
19	24.8	17.6	139	0.38	2.66
20	1.77	5.18	140	1.24	2.26
21	19.2	8.81	141	13.56	> 10
22	11.4	13.0	142	> 100	> 28.02

[3098]

23	9.58	11.8	143	> 10	> 20
24	34.7	33.1	144	0.606	4.44
25	n.d.	> 20	145	> 100	9.31
26	54.6	> 100	146	n.d.	> 20
27	n.d.	> 14.4	147	> 10	> 20
28	n.d.	> 20	148	n.d.	> 20
29	n.d.	> 20	149	> 10	> 20
30	n.d.	> 20	150	n.d.	n.d.
31	n.d.	> 20	151	n.d.	n.d.
32	> 10	> 20	152	n.d.	> 20
33	> 20	> 20	153	> 10	> 20
34	n.d.	> 20	154	2.53	1.06
35	n.d.	> 20	155	1.58	1.05
36	n.d.	> 20	156	> 100	90.1
37	n.d.	> 6.67	157	4.05	3.78
38	> 10	> 20	158	11.2	6.29
39	n.d.	> 11.6	159	> 10	> 20
40	> 10	> 20	160	6.8	> 20
41	> 10	> 20	161	> 100	> 20
42	n.d.	11.6	162	n.d.	> 20
43	n.d.	> 20	163	n.d.	> 20
44	> 10	> 20	164	n.d.	> 20
45	n.d.	> 20	165	n.d.	> 20
46	n.d.	> 20	166	n.d.	8.45
47	0.55	1.31	167	n.d.	> 20
48a	0.37	0.80	168	26.5	11.6
48b	7.25	7.22	169	n.d.	n.d.
49	0.607	1.17	170	> 10	> 20
50	17.0	3.81	171	n.d.	17.2
51	57.8	4.39	172	> 10	> 20
52	11.3	> 20	173	n.d.	> 20
53	n.d.	> 20	174	> 10	> 20
54	n.d.	> 20	175	> 10	> 20
55	> 10	> 20	176	n.d.	> 20
56	> 10	> 20	177	n.d.	> 20
57	n.d.	> 20	178	n.d.	> 20
58	0.185	0.302	179	> 10	> 20
59	0.019	0.341	180	> 10	> 20
60	n.d.	0.44	181	n.d.	> 10
61	0.141	0.517	182	n.d.	> 20



[3099]

62	0.040	0.538	183	n.d.	> 20
63	0.131	0.338	184	2.51	2.81
64	0.063	0.479	185	n.d.	11.5
65	0.895	1.99	186	n.d.	> 20
66	0.534	1.01	187	> 100	> 20
67	n.d.	0.685	188	> 100	12.0
68	1.23	3.39	189	n.d.	> 10
68a	1.43	1.68	190	n.d.	> 20
68b	4.27	2.92	191	n.d.	n.d.
69	4.72	11.5	192	> 10	> 20
70	0.422	1.68	193	n.d.	n.d.
71	0.026	1.57	194	11.3	4.24
72	1.17	3.65	195	n.d.	n.d.
73	9.07	8.26	196	> 10	> 20
74	3.4	12.7	197	n.d.	n.d.
75	3.8	6.91	198	2.18	3.23
76	6.42	9.41	199	n.d.	9.1
77	> 100	13.4	251	1.96	10.87
78	12.1	14.3	252	6.98	> 10
79	0.765	3.87	253	16.67	> 20
80	21.6	12.9	254	2.91	4.63
81	42.8	17.0	255	3.18	5.39
82	> 100	> 20	256	11.07	15.6
83	42.1	28.2	257	n.d.	> 20
84	65.2	> 20	258	n.d.	9.92
85	31.0	9.81	259	n.d.	17.31
86	56.0	> 20	260	n.d.	> 20
87	51.6	> 20	261	0.202	1.22
88	69.8	29.3	262	n.d.	0.311
89	> 100	> 100	263	3.22	5.99
90	n.d.	> 20	264	14.8	11.2
91	> 10	> 20	265	22.3	> 20
92	n.d.	> 20	266	n.d.	5.35
93	n.d.	> 20	267	7.19	9.75
94	n.d.	> 20	268	n.d.	> 20
95	> 10	> 20	269	0.294	0.438
96	n.d.	> 20	270	0.423	0.873
97	n.d.	> 20	271	0.187	1.07
98	n.d.	n.d.	272	3.51	5.97
99	0.113	0.606	273	> 100	> 20

[3100]	100	11.6	4.83	274	n.d.	17.3
	101	5.4	> 20	275	n.d.	15.1
	102	n.d.	n.d.	276	n.d.	> 20
	103	2.64	2.27	277	n.d.	> 20
	104	2.6	5.19	278	n.d.	> 20
	105	19.9	> 20	279	n.d.	> 20
	106	14.2	> 20	280	0.476	2.73
	107	31.2	20.0	281	0.656	2.89
	108	11.8	> 19.3	282	8.27	11.32
	109	0.977	4.71	283	8.25	14.19
	110	2.97	15.29	284	46.46	> 41.19
	111	0.33	2.70	285	n.d.	> 20
	112	1.21	3.52	286	n.d.	> 20
	113	n.d.	> 20	287	2.99	3.88
	114	0.565	1.33	288	18.3	7.42
	115	1.05	1.66	289	34.1	6.50
	116	0.782	2.18	290	n.d.	1.39

[3101] n.d.表示未确定

[3102] 实例A8:靶标鉴定

[3103] 将针对MST1/2或LATS1/2的siRNA转染到人HaCaT细胞中。四十八小时后,用1 $\mu$ M冈田酸对细胞处理2小时以增强pYAP信号。对细胞裂解物进行如下所述的针对pYAP (Ser127)的蛋白质印迹分析。实验结果报告在图33A至图33C中。

[3104] 蛋白质印迹分析

[3105] 将细胞裂解物(每泳道25 $\mu$ g)与XT样品缓冲液和还原剂(伯乐公司)混合,用4%-12%梯度SDS Criterion预制凝胶(伯乐公司)进行分离,并将其转移至硝酸纤维素膜(伯乐公司)。通过使用增强的化学发光试剂盒(赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific)),用第一抗体和辣根过氧化物酶缀合的第二抗体检测蛋白质。使用的第一抗体是抗pYAP抗体(细胞传导公司(Cell Signaling),目录号13008S)和抗ACTIN抗体(艾博抗公司(Abcam),目录号ab8227)

[3106] 实例A9:体内药效学(PD)

[3107] 将8-10周大的雄性C57BL6小鼠(Envigo公司)用于体内PD研究。使用无菌的外科手术用的6毫米打孔活检工具在被麻醉的小鼠背部上创建两个全厚度切除伤口。LATS抑制剂以49.5%丙二醇/0.5%Tween80/49%PBS/1%HPMC配制,并以3 $\mu$ L的给药体积局部施用。用黏性敷料(Tegaderm公司)覆盖伤口区域。然后用自粘性绷带包裹动物。两个日剂量后,在最后一次给药后7小时,用剪刀收集伤口边缘周围的皮肤样品(2毫米环形样品)。

[3108] 根据制造商的说明,使用RNeasy试剂盒(凯杰公司(Qiagen))对收获的样品进行RNA提取。在PTC-200peltier热循环仪(MJ研究公司(MJ Research))和ABI PRISM 7900HT序列检测系统(应用生物系统公司(Applied Biosystems))上进行两步TaqMan RT-PCR分析。根据制造商的说明使用高容量cDNA库试剂盒(应用生物系统公司)合成cDNA。根据制造商的说明,使用TaqMan通用主混合物(应用生物系统公司)以及Cyr61和Gapdh探针(应用生物系

统公司)进行TaqMan分析。将靶基因的mRNA表达水平针对使用SDS 2.0软件(应用生物系统公司)分析的Gapdh mRNA水平和数据进行标准化以计算相对RNA量。

[3109] 所有动物研究均在诺华研究基金会(Novartis Research Foundation,GNF)的基因组学研究院进行。实验方案符合动物福利法规,并由GNF的机构动物护理和使用委员会批准。

[3110] 相对Cyr61/Gapdh表达水平针对测试化合物浓度以柱状图绘制在图34中。

[3111] 实例A10:体内组织学和Ki67染色

[3112] 将7周大的雄性C57BL6小鼠用于体内组织学研究。LATS抑制剂以70%PG/30%EtOH配制,并以25μL(每剂250μg)的给药体积局部施用到剃过的背部表面。每天两次给药,3天后,收集皮肤样品,进行Ki67(赛默飞世尔科技公司,目录号RM-9106)免疫组织学染色。肉眼观察切片,并通过内部成像算法对Ki67阳性细胞进行计数。Ki67染色的代表性显微照片如图35A所示。将未处理和处理的皮肤细胞中Ki67阳性细胞的丰度以散点图绘制在图35B中。

[3113] 实例A11:pYAPHTRF测定(JHH-5细胞)

[3114] 使用化合物处理的JHH-5细胞进行pYAP HTRF测定(Fujise等人., Hepatogastroenterology[肝肠胃病学].1990十月;37(5):457-60),根据制造商的说明,使用磷酸化YAP(Ser127)50000检测试剂盒(CisBio公司目录号64YAPPEI)对所述细胞进行分析。简而言之,将JHH-5细胞以 $0.48 \times 10^6$ 个细胞/ml悬浮在不含酚红的威廉姆E培养基(William's E medium)(赛默飞世尔科技公司Gibco目录号A1217601)中,所述培养基补充有10%(v/v)热灭活的胎牛血清(赛默飞世尔科技公司Gibco目录号16140071)和青霉素-链霉素(每个100U/ml)(赛默飞世尔科技公司Gibco目录号15140122)。将细胞分配到384孔透明底培养板(50ul/孔,每孔24000个细胞,Greiner公司目录号781091)中,并在37℃下于细胞培养箱中孵育24小时。使用Echo550(Labcyte公司)声波分配器将测试化合物转移到含有JHH-5细胞的培养板中(50nl/孔),然后在37℃下孵育2小时。将裂解缓冲液(CisBio公司试剂盒目录号64YAPPEI的一部分)以四倍浓缩液(相当于16ul/孔)添加到测定板中,并在室温下搅拌孵育30分钟。将裂解物从培养板转移到白色低容量384孔测定板(12ul/孔,Greiner公司目录号784075)中,然后添加3ul/孔的检测抗体(CisBio公司试剂盒目录号64YAPPEI的一部分:每个pYAP d2抗体和pYAP穴状化合物抗体储液以1:40稀释)。将板密封并在室温下避光孵育过夜(18小时)。在EnVision读板器(珀金埃尔默公司(Perkin Elmer))上以665nm和620nm的发射波长对板进行读取。按照制造商的说明书规定,每孔的HTRF信号比x计算为 $[x = \text{信号}(665\text{nm}) / \text{信号}(620\text{nm}) \times 10000]$ 。将每个孔的信号比x针对活性对照和中性对照治疗(DMSO)进行标准化,将中值NC评分为0%及中值AC评分为-100%,以将每个孔的标准化信号比xn计算为 $[xn = \pm 100 (x - NC) / (AC - NC)]$ 。对照标准化的数据用于自动化曲线拟合,以得出每种化合物的曲线参数,包括IC<sub>50</sub>值。表1D显示了列举化合物的JHH-5细胞中pYAP IC<sub>50</sub>值。

[3115] 表1D.JHH5细胞中YAP磷酸化的抑制

[3116]

实例编号	JHH-5 pYAP IC <sub>50</sub> (μM)	实例编号	JHH-5 pYAP IC <sub>50</sub> (μM)
1		150	n.d.
2	> 10	151	n.d.
3	1.0	152	n.d.
4	> 10	153	n.d.
5	2.3	154	n.d.
6	2.6	155	2.6
7	1.6	156	n.d.
8	1.9	157	9.2
9	n.d.	158	n.d.
10	8.7	159	n.d.
11	n.d.	160	n.d.
12	2.9	161	n.d.
13	n.d.	162	n.d.
14	> 10	163	n.d.
15	4.1	164	n.d.
16	n.d.	165	n.d.
17	n.d.	166	n.d.
18	n.d.	167	n.d.
19	n.d.	168	n.d.
20	n.d.	169	n.d.
21	n.d.	170	n.d.
22	n.d.	171	n.d.
23	n.d.	172	n.d.
24	n.d.	173	n.d.
25	n.d.	174	n.d.
26	n.d.	175	n.d.
27	n.d.	176	n.d.
28	n.d.	177	n.d.
29	n.d.	178	n.d.
30	> 10	179	n.d.
31	n.d.	180	n.d.
32	n.d.	181	n.d.
33	n.d.	182	n.d.
34	n.d.	183	n.d.
35	n.d.	184	6.5
36	n.d.	185	n.d.
37	n.d.	186	n.d.

[3117]

<b>38</b>	n.d.	<b>187</b>	n.d.
<b>39</b>	n.d.	<b>188</b>	n.d.
<b>40</b>	> 10	<b>189</b>	n.d.
<b>41</b>	n.d.	<b>190</b>	n.d.
<b>42</b>	n.d.	<b>191</b>	n.d.
<b>43</b>	n.d.	<b>192</b>	n.d.
<b>44</b>	n.d.	<b>193</b>	n.d.
<b>45</b>	n.d.	<b>194</b>	n.d.
<b>46</b>	n.d.	<b>195</b>	n.d.
<b>47</b>	n.d.	<b>196</b>	n.d.
<b>48a</b>	0.6	<b>197</b>	n.d.
<b>48b</b>	n.d.	<b>198</b>	1.3
<b>49</b>	1.6	<b>199</b>	3.2
<b>50</b>	> 10	<b>251</b>	1.5
<b>51</b>	n.d.	<b>252</b>	n.d.
<b>52</b>	n.d.	<b>253</b>	n.d.
<b>53</b>	n.d.	<b>254</b>	1.3
<b>54</b>	n.d.	<b>255</b>	7.1
<b>55</b>	n.d.	<b>256</b>	> 10
<b>56</b>	n.d.	<b>257</b>	> 10
<b>57</b>	n.d.	<b>258</b>	> 10
<b>58</b>	0.6	<b>259</b>	n.d.
<b>59</b>	1.1	<b>260</b>	n.d.
<b>60</b>	n.d.	<b>261</b>	0.6
<b>61</b>	1.4	<b>262</b>	n.d.
<b>62</b>	0.6	<b>263</b>	> 10
<b>63</b>	n.d.	<b>264</b>	> 10
<b>64</b>	2.1	<b>265</b>	> 10
<b>65</b>	5.8	<b>266</b>	n.d.
<b>66</b>	6.2	<b>267</b>	5.9
<b>67</b>	n.d.	<b>268</b>	> 10
<b>68</b>	3.5	<b>269</b>	0.8
<b>69</b>	n.d.	<b>270</b>	0.8
<b>70</b>	4.0	<b>271</b>	0.8
<b>71</b>	> 10	<b>272</b>	8.1
<b>72</b>	4.6	<b>273</b>	> 10
<b>73</b>	n.d.	<b>274</b>	> 10
<b>74</b>	n.d.	<b>275</b>	> 10
<b>75</b>	n.d.	<b>276</b>	> 10
<b>76</b>	n.d.	<b>277</b>	n.d.

[3118]

<b>77</b>	n.d.	<b>278</b>	n.d.
<b>78</b>	n.d.	<b>279</b>	n.d.
<b>79</b>	2.1	<b>280</b>	3.8
<b>80</b>	n.d.	<b>281</b>	5.9
<b>81</b>	n.d.	<b>282</b>	n.d.
<b>82</b>	n.d.	<b>283</b>	> 10
<b>83</b>	n.d.	<b>284</b>	n.d.
<b>84</b>	> 10	<b>285</b>	n.d.
<b>85</b>	> 10	<b>286</b>	n.d.
<b>86</b>	n.d.	<b>287</b>	9.0
<b>87</b>	n.d.	<b>288</b>	n.d.
<b>88</b>	n.d.	<b>289</b>	n.d.
<b>89</b>	n.d.	<b>290</b>	3.0
<b>90</b>	n.d.	<b>291</b>	n.d.
<b>91</b>	n.d.	<b>292</b>	n.d.
<b>92</b>	n.d.	<b>293</b>	n.d.
<b>93</b>	n.d.	<b>294</b>	1.1
<b>94</b>	n.d.	<b>295</b>	> 10
<b>95</b>	n.d.	<b>296</b>	n.d.
<b>96</b>	n.d.	<b>297</b>	> 10
<b>97</b>	n.d.	<b>298</b>	n.d.
<b>98</b>	n.d.	<b>299</b>	n.d.
<b>99</b>	5.7	<b>300</b>	0.9
<b>100</b>	n.d.	<b>301</b>	> 10
<b>101</b>	3.3	<b>302</b>	n.d.
<b>102</b>	n.d.	<b>303</b>	> 10
<b>103</b>	n.d.	<b>304</b>	> 10
<b>104</b>	n.d.	<b>305</b>	n.d.
<b>105</b>	n.d.	<b>306</b>	1.0
<b>106</b>	n.d.	<b>307</b>	1.3
<b>107</b>	n.d.	<b>308</b>	> 10
<b>108</b>	n.d.	<b>309</b>	2.0
<b>109</b>	1.5	<b>310</b>	n.d.
<b>110</b>	1.5	<b>311</b>	n.d.
<b>111</b>	2.4	<b>312</b>	7.7
<b>112</b>	3.2	<b>313</b>	7.8
<b>113</b>	n.d.	<b>314</b>	n.d.
<b>114</b>	n.d.	<b>315</b>	5.7
<b>115</b>	3.4	<b>316</b>	n.d.
<b>116</b>	2.2	<b>317</b>	3.2

[3119]	<b>117</b>	> 10	<b>318</b>	3.1
	<b>118</b>	4.0	<b>319</b>	> 10
	<b>119</b>	n.d.	<b>320</b>	1.0
	<b>120</b>	n.d.	<b>321</b>	n.d.
	<b>121</b>	n.d.	<b>322</b>	n.d.
	<b>122</b>	8.0	<b>323</b>	n.d.
	<b>123</b>	n.d.	<b>324</b>	n.d.
	<b>124</b>	n.d.	<b>325</b>	n.d.
	<b>125</b>	n.d.	<b>326</b>	n.d.
	<b>126</b>	n.d.	<b>327</b>	n.d.
	<b>127</b>	n.d.	<b>328</b>	n.d.
	<b>128</b>	n.d.	<b>329</b>	n.d.
	<b>129</b>	n.d.	<b>330</b>	n.d.
	<b>130</b>	n.d.	<b>331</b>	n.d.
	<b>131</b>	n.d.	<b>332</b>	n.d.
	<b>132</b>	n.d.	<b>333</b>	n.d.
	<b>133</b>	1.7	<b>334</b>	n.d.
	<b>134</b>	1.0	<b>335</b>	n.d.
	<b>135</b>	n.d.		
	<b>136</b>	1.3		
	<b>137</b>	n.d.		
	<b>138</b>	n.d.		
	<b>139</b>	1.7		
	<b>140</b>	2.2		
	<b>141</b>	n.d.		
	<b>142</b>	n.d.		
	<b>143</b>	n.d.		
	<b>144</b>	n.d.		
	<b>145</b>	n.d.		
	<b>146</b>	n.d.		
	<b>147</b>	n.d.		
	<b>148</b>	n.d.		
	<b>149</b>	n.d.		

[3120] n.d.表示未确定

[3121] 实例A12:YAP核转位测定(JHH-5细胞)

[3122] 使用经化合物处理的JHH-5细胞进行YAP核转位测定(Fujise等人., Hepatogastroenterology[肝肠胃病学].1990十月;37(5):457-60),在抗YAP1抗体染色后通过高含量成像对所述细胞进行分析。简而言之,将JHH-5细胞以 $0.48 \times 10^6$ 个细胞/ml悬浮在不含酚红的威廉姆E培养基(William's E medium)(赛默飞世尔科技公司Gibco目录号A1217601)中,所述培养基补充有10%(v/v)热灭活的胎牛血清(赛默飞世尔科技公司Gibco目录号16140071)和青霉素-链霉素(每个100U/ml)(赛默飞世尔科技公司Gibco目录号

15140122)。将细胞分配到384孔透明底培养板(50 $\mu$ l/孔,每孔24000个细胞,Greiner公司目录号781091)中,并在37 $^{\circ}$ C下于细胞培养箱中孵育24小时。使用Echo550(Labcyte公司)声波分配器将测试化合物转移到含有JHH-5细胞的培养板中(50 $\mu$ l/孔)。在37 $^{\circ}$ C下孵育4小时后,将12.5 $\mu$ l 20%PFA储备溶液(电子显微镜科学公司(Electron Microscopy Sciences)目录号15713S)分配到每个孔中,使其最终浓度为4%(v/v),并在室温下孵育20分钟。用TBS(由十倍浓缩物制备,西格玛-奥德里奇公司(Sigma Aldrich)目录号T5912)洗涤板,然后用DPBS中0.1%(v/v)Triton X-100溶液(西格玛-奥德里奇公司目录号93443)在室温下透化15分钟。再次用TBS洗涤板,然后将抗YAP1抗体(诺伟司生物公司(Novus Biologics)目录号NB110-58358)(所述抗体以1:500稀释于DPBS(由35%储备溶液制备,西格玛-奥德里奇公司目录号A7979)中的3%(w/v)BSA中)添加到每个孔中,并在4 $^{\circ}$ C孵育过夜。除去第一抗体溶液并用TBS洗涤后,用1:1000稀释的缀合Alexa Fluor 647(赛默飞世尔科技公司目录号A-21244)的山羊抗兔第二抗体(所述第二抗体以1:10000稀释于DPBS(由35%的原液制备,西格玛-奥德里奇公司目录号A7979)中的3%(w/v)BSA(补充有Hoechst 33342溶液(赛默飞世尔科技公司目录号3570))中)在室温下孵育每个孔2小时。再次用TBS洗涤板,然后将其密封并在IN细胞分析仪高含量分析系统(通用健康医疗生命科学公司(GE Healthcare Life Sciences))上成像。通过使用CellProfiler图像分析软件(Carpenter等人.,Genome Biol[基因组生物学].2006;7(10):R100)将Hoechst核染色与总细胞内YAP Alexa Fluor 647染色进行比较,可以得出对应于核YAP的信号。将核YAP信号 $x$ 针对活性对照和中性对照处理(DMSO)进行标准化,将中值NC评分为0%及中值AC评分为+100%,以将每个孔的标准化核YAP信号 $x_n$ 计算为 $[x_n = \pm 100(x - NC) / (AC - NC)]$ 。对照标准化的数据用于自动曲线拟合,以得出每种化合物的曲线参数,包括 $EC_{50}$ 值。

#### [3123] 实例A13:小鼠的体内治疗

[3124] 所有动物研究均根据联邦、州、地方和机构的管理实验室动物在研究中的使用的指南进行。雄性C57BL/6J小鼠(8-10周龄)购自杰克森实验室(Jackson Labs)(巴尔港,缅因州)。在甲基纤维素:Tween80:水(0.5:0.5:99)的悬浮液中,配制实例46用于以3mg/ml口服给药,以及配制实例261用于以1mg/ml口服给药。任一化合物的单次口服给药均以10mL/kg体重。在给药后2小时(用于mRNA分析)或给药后24小时(用于免疫组织化学),在深度麻醉(异氟醚)下收集血液和肝组织。

#### [3125] 肝组织中的磷酸化YAP(pYAP)HTRF

[3126] 将冷冻的肝组织转移到Lysing Matrix管(所述管中添加有在Phosphosafe提取缓冲液(诺维根公司(Novagen),目录号71296-3)中的1:50的蛋白酶抑制剂(西格玛-奥德里奇公司,目录号P8340))(MP,目录号6913-500)中,并用FastPrep-24(MP生物医疗公司(MP biomedical))均质化。将混合物在冰上放置20min,然后以14000rpm离心20min。将上清液转移至新管中。按照制造商的说明书,使用BCA蛋白质测定试剂盒(Pierce公司目录号23227)对蛋白浓度进行测量。在总体积为180 $\mu$ l的Phosphosafe中,将所有样品均针对终浓度5 $\mu$ g/ $\mu$ l进行标准化,并铺板在96孔板中用于HTRF分析。使用磷酸化YAP(SER127)50000检测试剂盒(Cisbio公司,目录号64YAPPEI)通过HTRF测定pYAP。在384孔测定板的一式两份孔中(12 $\mu$ L/孔),对仅在提取缓冲液(Phosphosafe)或在Phosphosafe与HTRF裂解缓冲液(Cisbio)的1:1混合物中的小鼠肝裂解物进行测定。基于总蛋白质含量(每个样品每孔30-



60ug), 每个样品使用相同的输入量。添加各自在检测缓冲液 (Cisbio公司) 中以1:40稀释的检测抗体磷酸化YAP d2和磷酸化YAP穴状化合物 (3μL/孔, 每种抗体最终为1:200的稀释度), 然后将板密封并在室温下避光孵育过夜 (18小时)。在EnVision (珀金埃尔默 (PerkinElmer)) 上以665nm和620nm的发射波长对板进行读取。HTRF信号比按照制造商的说明书中所指定以信号 (665nm) / 信号 (620nm) ) x10000计算。在处理组的图中, 每个裂解物样品使用一个HTRF信号比 (重复孔的平均值)。

#### [3127] 定量RT-PCR

[3128] 按照制造商的说明 (生命技术公司 (Life Technologies)) 使用TRIzol方法, 将组织储存在RNAlater试剂 (凯杰公司) 中后, 从组织中分离出总肝RNA。根据标准方案 (应用生物系统公司), 使用TaqMan基因表达测定和试剂通过定量RT-PCR测量相对mRNA丰度。针对YAP靶基因的小鼠探针为CTGF (Mm01192933\_g1) 和Cyr61 (Mm00487498\_m1)。小鼠GAPDH用作内部对照 (探针4351309)。mRNA的相对变化通过  $\Delta \Delta Ct$  方法计算。将使用化合物处理的基因表达的变化表示为相对于媒介物组的倍数变化。

#### [3129] Ki67的免疫组织化学 (IHC)

[3130] 将肝组织在10%中性缓冲福尔马林中固定24-48小时。按照标准程序处理和包埋在石蜡中。将切片切成5微米的厚度, 并使用Ventana自动系统染色。小鼠Ki67的第一抗体是兔IgG (波尼斯实验室 (Bethyl Labs))。使用HALO平台通过图像分析对Ki67阳性肝细胞进行定量。每只动物至少分析了3个切片 (从内侧叶的中间)。

#### [3131] 表1E. 小鼠化合物治疗的结果

	pYAP (对照 的%)	CTGF mRNA (倍数变化)	Cyr61 mRNA (倍数变化)	Ki67 IHC (倍数变化)
[3132] 实例 46 30 mg/kg	64	2.1 (+/- 0.4)	3.5 (+/- 0.5)	3.3 (+/- 0.2)
实例 261 10 mg/kg	60	2.5 (+/- 0.2)	3.9 (+/- 0.6)	3.1 (+/- 0.5)

[3133] 单次口服LATS激酶抑制剂后2小时, YAP靶基因CTGF和Cyr61的mRNA增加, 而且

[3134] 单次口服LATS激酶抑制剂后24小时, Ki67免疫组织化学 (IHC) 所指示的增殖作用增加。值表示为相对于媒介物组的倍数变化 (平均值 +/- SEM)。

#### [3135] 实例B1: 人角膜缘上皮细胞分离

[3136] 研究同意的尸体人角膜是从眼库获得的。解剖角膜缘边缘, 并在1.2mg/ml的分散酶溶液于37℃进行2小时的部分解离, 然后在TrypLE (生命技术公司 (Life Technologies)) 中进行10分钟的解离。然后小心地从部分解离的角膜缘边缘切下角膜隐窝片, 并通过离心漂洗)。在以下实例B2-B11中使用以这种方式获得的细胞。

#### [3137] 实例B2: 将细胞暴露于LATS抑制剂并测量细胞内YAP分布

[3138] 将按照实例B1所述获得的细胞接种在玻璃底黑壁24孔培养皿中的角膜缘上皮细胞培养基 (补充有10%人血清和1.3mM氯化钙的DMEMF12) 中, 所述培养基补充有LATS抑制剂化合物实例编号133或49, 浓度为10微摩尔, 或补充DMSO作为阴性对照。在这些条件下, 将细胞在5%CO2中在37℃下培养24小时。

[3139] 为了测量LATS抑制剂对下游靶标YAP的作用,通过免疫组织化学分析了细胞内YAP的分布。将细胞培养物用4%PFA固定20分钟,透化并在0.3%Triton X-100(西格玛-奥德里奇公司(Sigma-Aldrich))和3%驴血清于PBS中的封闭溶液中封闭30分钟。然后在封闭溶液中于4℃用第一抗体标记细胞12小时。使用的第一抗体是来自圣克鲁斯生物技术公司(Santa Cruz Biotechnology)的抗YAP。将样品在PBS中洗涤3次,然后在室温下施加1:500稀释度的驴产生的第二抗体Alexa Fluor488(分子探针公司(Molecular Probes))30分钟。阴性对照省略了第一抗体(数据未显示)。使用Zeiss LSM 880共聚焦显微镜观察荧光。

[3140] 在没有LATS抑制剂的情况下(DMSO对照)培养的LSC的细胞核中仅观察到了弱的YAP免疫染色。在暴露于LATS抑制剂化合物实例编号133或49的LSC核中,YAP免疫染色较强(数据未显示)。

[3141] 实例B3:将细胞暴露于LATS抑制剂并测量YAP磷酸化

[3142] 如实例B1中所述获得的细胞在37℃下用Accutase与培养皿脱离10分钟,通过离心漂洗细胞悬浮液,并铺板于6孔板(康宁公司(Corning))中的补充有10%人血清和1.3mM氯化钙的DMEM F12中,并在没有LATS抑制剂化合物的情况下培养2-4天。

[3143] 然后用新鲜角膜缘上皮细胞培养基(补充有10%人血清和1.3mM氯化钙的DMEM F12)更换培养基,所述新鲜培养基补充有LATS抑制剂化合物实例编号133或49,浓度为10微摩尔,或补充DMSO作为阴性对照。在这些条件下,将细胞在5%CO<sub>2</sub>中在37℃下培养1小时。

[3144] 为了测量LATS抑制剂对下游靶标YAP的作用,通过蛋白质印迹法如下测量YAP磷酸化水平。通过胰蛋白酶解离和离心获得细胞沉淀,并用PBS洗涤。用含有蛋白酶抑制剂混合物(生命技术公司(LifeTechnologies))的30微升RIPA裂解缓冲液裂解沉淀30分钟,每10分钟涡旋振荡一次。然后将细胞碎片在4℃下以14k rpm沉淀15分钟,并收集蛋白质裂解物。使用微型BCA试剂盒(皮尔斯公司(Pierce))定量蛋白质浓度。在4%-20%TGX凝胶(伯乐公司(BioRad))的每个孔中填充十五微克总蛋白,并根据制造商的说明进行蛋白质印迹。用磷酸化YAP(ser127)(CST,1:500)或总Yap(Abnova,1:500)抗体探测膜,并用肌动蛋白(艾博抗公司(Abcam))标记作为上样对照。膜用缀合了HRP的第二抗体染色,漂洗并用ChemiDoc系统(伯乐公司(Biorad))按照制造商的说明进行成像。

[3145] 蛋白质印迹分析(见图1)显示化合物实例编号图133和49均导致人LSC中YAP磷酸化水平的降低。这些结果表明,LATS抑制剂化合物实例编号133和49可以激活人LSC中的YAP信号传导。

[3146] 实例B4:人角膜缘干细胞群扩增及细胞表型的免疫组织化学观察

[3147] 将按照实例B1所述获得的细胞接种在24孔板(康宁公司(Corning))中的角膜缘上皮细胞培养基(补充有10%人血清和1.3mM氯化钙的DMEM F12)中,所述培养基补充有LATS抑制剂化合物实例编号133或49,浓度为10微摩尔,或补充DMSO作为阴性对照。分离后不传代,首先将细胞在5%CO<sub>2</sub>中于37℃培养6天(图2A、2B和2C)。

[3148] 为了评估化合物能够使两次传代后的LSC扩增的能力,在化合物实例49的存在下使LSC传代并培养两周以使其能够扩增(图2D)。通过在37℃下用Accutase处理培养物10分钟来传代角膜缘干细胞(LSC),通过离心漂洗细胞悬浮液并将细胞铺板在补充了LATS抑制剂化合物实例49的新鲜LSC培养基中。

[3149] 为了观察扩增的细胞群表达p63 $\alpha$ ,通过免疫组织化学如下测量。将细胞培养物用

4%PFA固定20分钟,透化并在0.3%Triton X-100(西格玛-奥德里奇公司(Sigma-Aldrich))和3%驴血清于PBS中的封闭溶液中封闭30分钟。然后在封闭溶液中于4℃用第一抗体标记细胞12小时。使用的第一抗体是来自细胞信号传导公司(Cell Signalling)的p63 $\alpha$ 。将样品在PBS中洗涤3次,然后在室温下施加1:500稀释度的驴产生的第二抗体Alexa Fluor 488(分子探针公司(Molecular Probes))30分钟。用人核抗原抗体(密理博公司(Millipore))以1:500的稀释度对细胞进行复染,以标记培养物中的所有细胞并确认其身份。阴性对照省略了第一抗体(数据未显示)。使用Zeiss LSM 880共聚焦显微镜观察荧光。

[3150] 图2A显示在存在生长培养基和DMSO的情况下,只有少数分离的细胞附着在培养皿上,并且最多可以存活6天。大多数细胞表达人核标志物,但很少表达p63 $\alpha$ 。相反,在存在LATS抑制剂化合物实例编号133(图2B)和化合物实例编号49(图2C)的情况下,细胞形成集落并表达p63 $\alpha$ 。所述结果表明,LATS抑制剂促进具有p63 $\alpha$ 阳性表型的细胞群的扩增。图2D:使细胞传代并在LATS抑制剂化合物实例编号49的存在下培养它们两周使得细胞群扩增并形成表达p63 $\alpha$ 的汇合培养物。

#### [3151] 实例B5:人角膜缘干细胞群扩增及其测量

[3152] 将按实例B1所述获得的细胞铺板于48孔板(康宁公司(Corning)中的XVIV015培养基(龙沙集团(Lonza))中,所述培养基补充有浓度为10微摩尔的LATS抑制剂(如在下表2和3中列出的)或补充有DMSO中作为对照。将细胞在37℃在5%CO<sub>2</sub>中培养。

[3153] 对于每种化合物,产生了两组培养物。在从角膜分离的细胞已附着于细胞培养皿上后(通常在细胞铺板后24小时),在室温下将第一组培养物在4%PFA中固定20分钟。在培养两次传代后,在室温下将第二组培养物在4%PFA中固定20分钟。当细胞达到90%-100%汇合时传代。

[3154] 为了观察扩增的细胞群表达p63 $\alpha$ ,通过免疫组织化学如下测量。透化固定的细胞培养物并在0.3%Triton X-100(西格玛-奥德里奇公司(Sigma-Aldrich))和3%驴血清于PBS中的封闭溶液中封闭30分钟。然后在封闭溶液中于4℃用第一抗体标记细胞12小时。使用的第一抗体是来自细胞信号传导公司(Cell Signalling)的p63 $\alpha$ 。将样品在PBS中洗涤3次,然后在室温下施加1:500稀释度的驴产生的第二抗体Alexa Fluor 488(分子探针公司(Molecular Probes))30分钟。然后在室温下在0.5微摩尔Sytox Orange(赛默飞世尔公司(ThermoFisher))的PBS溶液中标记细胞核5分钟。

[3155] 为了评估p63 $\alpha$ 阳性细胞的百分比,计数被抗p63 $\alpha$ 抗体标记的细胞数目,并通过计数被Sytox Orange染色的细胞核的数目来确定细胞总数。然后通过计算也表达p63 $\alpha$ 的Sytox-orange阳性核的百分比来确定p63 $\alpha$ 阳性细胞的比例。

[3156] 为了评估细胞扩增比率,使用Zeiss LSM 880共聚焦显微镜对细胞核进行计数。然后通过计算细胞的扩增群与接种细胞的群的比率来确定扩增系数。

[3157] 下表中的结果表明,LATS抑制剂能够实现细胞群扩增。在存在LATS抑制剂的情况下,57%至97%的细胞表达p63 $\alpha$ 阳性表型。

[3158] 表2

[3159]	化合物实	扩增系数	化合物实	扩增系数
--------	------	------	------	------

[3160]	<b>例编号</b>		<b>例编号</b>	
	实例 47	2137	实例 290	1051
	实例 12	2087	实例 65	1048
	实例 49	2029	实例 287	991
	实例 261	1717	实例 17	976
	实例 62	1712	实例 139	961
	实例 14	1423	实例 11	705
	实例 6	1275	实例 289	681
	实例 288	1241	实例 33	39
	实例 133	1205	DMSO	35
	实例 66	1160		

[3161] 表3

[3162]	<b>化合物实例编号</b>	<b>p63a 阳性细胞百分比</b>	<b>化合物实例编号</b>	<b>p63a 阳性细胞百分比</b>
	实例 47	97	实例 290	90
	实例 12	95	实例 65	87
	实例 49	92	实例 287	86
	实例 261	93	实例 17	86
	实例 62	95	实例 139	87
	实例 14	93	实例 11	86
	实例 6	93	实例 289	80
	实例 288	95	实例 33	6
	实例 133	89	DMSO	3
	实例 66	89		

[3163] 实例B6:人角膜缘细胞中LATS1和LATS2的siRNA敲低

[3164] 将如实例B1所述获得的细胞在24孔板(康宁公司(Corning))中接种至XVIVO15培养基(龙沙集团(Lonza))。将细胞在37℃在5%CO<sub>2</sub>中培养。通过转染(脂转染,使用RNAiMax,赛默飞世尔公司(Thermofisher))敲低LATS1和LATS2。将细胞培养板的每个孔用具有靶向每个基因的4个siRNA的0.5微克池进行转染。本研究使用的siRNA是凯杰公司的LATS1 siRNA SI00067172和LATS2 siRNA SI00106925。根据制造商的方案(凯杰公司),将杂乱的siRNA用作阴性对照。

[3165] 为了测量细胞增殖,在用LATS1和LATS2 siRNA或杂乱的siRNA对照转染后48小时,根据制造商的说明(生命技术公司)进行EdU染色。用Sytox Orange标记细胞核。使用Zeiss LSM 880共聚焦显微镜观察EdU和Sytox Orange荧光,以测量EdU阳性细胞核的百分比。

[3166] 图3显示,在敲低LATS1和LATS2后,EdU阳性细胞的百分比增加,表明敲低LATS会导致细胞增殖。

[3167] 实例B7:人角膜缘干细胞群扩增和标志物 $\delta$ N-p63 $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ 、ABCG2和C/EBP $\delta$ 的免疫组织化学观察

[3168] 将按实例B1所述获得的细胞铺板于48孔板(康宁公司(Corning)中的XVIVO15培养基(龙沙集团(Lonza))中,所述培养基补充有浓度为10微摩尔的LATS抑制剂(化合物实例49和化合物实例133)或补充有DMSO中作为对照。将细胞在37℃下在5%CO<sub>2</sub>中培养8至10天。

[3169] 为了观察扩增的细胞群表达正常情况下由角膜缘干细胞表达的标志物,通过免疫组织化学如下测量细胞表达 $\delta$ N-p63 $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ 、ABCG2和C/EBP $\delta$ 的能力。将细胞培养物用4%PFA固定20分钟,透化并在0.3%Triton X-100(西格玛-奥德里奇公司(Sigma-Aldrich))和3%驴血清于PBS中的封闭溶液中封闭30分钟。然后在封闭溶液中于4℃用第一抗体标记细胞12小时。使用的第第一抗体体是p63 $\alpha$ (细胞信号传导公司(Cell Signaling Technology))、ABCG2(EMD Millipore公司)和C/EBP $\delta$ (艾博抗公司(Abcam))、细胞角蛋白15、细胞角蛋白12(艾博抗公司)。将样品在PBS中洗涤3次,然后在室温下施加1:500稀释度的驴产生的第二抗体Alexa Fluor 488(分子探针公司(Molecular Probes))30分钟。然后在室温下在0.5微摩尔Sytox Orange(赛默飞世尔公司(ThermoFisher))的PBS溶液中标记细胞核5分钟。然后使用Zeiss LSM 880共聚焦显微镜观察样品。

[3170] 结果表明(见图4),在仅补充有DMSO(没有LATS抑制剂化合物)的XVIVO培养基中培养的细胞典型地不表达正常由LSC表达的标志物。相反,在存在LATS抑制剂的情况下培养的细胞表达正常由LSC表达的标志物。

[3171] 实例B8:人角膜缘干细胞分化为角膜上皮细胞

[3172] 将按实例B1所述获得的细胞铺板在48孔板(康宁公司(Corning))中的XVIVO15培养基中,所述培养基补充有LATS抑制剂化合物实例编号49、47、12或261(浓度为10微摩尔),或补充DMSO作为阴性对照。将细胞在37℃下在5%CO<sub>2</sub>中培养8至10天。

[3173] 然后进行分析以确定在存在LATS抑制剂的情况下扩增的p63 $\alpha$ 阳性LSC群是否保留了分化为角蛋白12阳性角膜上皮细胞的能力,这对于修复接受LSC移植的患者的角膜清晰度是必需的。

[3174] 为了促进LSC分化为角膜上皮细胞,将培养基更改为不含血清或LATS抑制剂的DMEM(英杰公司(Invitrogen)),并将细胞培养4-8天。为了观察LSC分化为角膜上皮细胞,将细胞培养物用4%PFA固定20分钟,透化并在0.3%Triton X-100(西格玛-奥德里奇公司(Sigma-Aldrich))和3%驴血清于PBS中的封闭溶液中封闭30分钟。然后在封闭溶液中于4℃用第一抗体标记细胞12小时。使用的第第一抗体体是p63 $\alpha$ (细胞信号传导技术公司(Cell Signaling Technology))和细胞角蛋白12(艾博抗公司(Abcam))。将样品在PBS中洗涤三次,然后在室温下施加1:500稀释度的驴产生的缀合Alexa Fluor 488或Alexa Fluor 647的第二抗体(分子探针公司(Molecular Probes))30分钟。然后使用Zeiss LSM 880共聚焦显微镜观察样品。

[3175] 结果表明,培养物在存在LATS抑制剂的情况下得以维持,然后被诱导分化,包含p63 $\alpha$ 阳性细胞簇与p63 $\alpha$ 阴性、但角蛋白12阳性的细胞簇相邻的区域(图5)。因此,在适当条件下,存在LATS抑制剂的情况下扩增的角膜缘细胞可以分化为角蛋白12阳性细胞。

[3176] 实例B9:向兔眼递送LSC-生物基质制剂

[3177] 角膜缘干细胞缺陷的兔模型

[3178] 通过用1M氢氧化钠溶液浸泡的Whatman纸清除上皮细胞并消融角膜缘干细胞(LSC),在NZA兔的右眼单侧产生角膜缘干细胞缺陷(LSCD)。角膜缘结膜用丝裂霉素C处理以减少角膜新血管生成。左眼保持完好。将在LATS抑制剂化合物实例编号12中扩增的细胞群如下所述递送。细胞递送后,兔接受镇痛治疗(在前2周曲马多10mg/kg PO BID,在前2周(或只要动物出现眼不适症状)美洛昔康0.3mg/kg PO SID)、抗炎治疗(术后立即给予Ancef®(头孢唑啉)50mg,在第1周Tobrex®眼液t.i.d和之后b.i.d,第一周氨苄青霉素80mg/kg/(40mg BID)SQ和免疫抑制(在第1周环孢菌素A(0.5%)眼顶部(top oc.)t.i.d和之后b.i.d,Gentocin®-durafilm®(在第1周硫酸庆大霉素和倍他米松,MERCK)眼顶部t.i.d和之后b.i.d,在第1周环孢素A(5mg/kg/天)SQ,接着之后1/2的剂量)。

[3179] 生物基质制备。

[3180] 根据先前公开的说明书合成甲基丙烯酸酯化明胶(GelMA)。(Nichol,J.W.等人.Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels[载有细胞的微工程化甲基丙烯酸明胶水凝胶].Biomaterials[生物材料]31,5536-5544,doi:10.1016/j.biomaterials.2010.03.064(2010)。简而言之,将20克猪衍生的明胶(目录号G2500,西格玛公司(Sigma))在50℃下在200ml不含钙和镁的PBS(DPBS,目录号21-031,康宁公司(Corning))中溶解过夜。在强力搅拌下,将甲基丙烯酸酐(Cat#276685,西格玛公司(Sigma))滴加(约1ml/min)到明胶溶液中以达到8%(体积/体积)的浓度。将混合物在60℃在油浴中搅拌3小时,之后添加200ml DPBS,然后再充分混合15分钟。通过使用透析管(15kDa MWCO,Spetrua/Por)用Milli-Q水在45℃进行透析1周以去除甲基丙烯酸来对稀释的混合物进行纯化。将纯化的样品冻干并储存在-80℃直至进一步使用。

[3181] 为了制备15%的GelMA储备溶液,将1.5克的冻干GelMA泡沫在37℃下溶解于10ml预热的DPBS中。将GelMA泡沫完全溶解后,通过向GelMA溶液中添加15mg苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次膦酸锂(LAP)引入光引发剂。将500微升1N NaOH(目录号BDH-7222-1,VWR)添加到溶液中以调节pH至中性,然后使用0.22微米无菌膜(Millipore公司)过滤溶液。将最终滤液分为500微升等分样品并储存在4℃下直至进一步使用。

[3182] 体内LSC移植。

[3183] 将按实例B1所述获得的细胞铺板在6孔板(康宁公司(Corning))中的XVIV015培养基中,所述培养基补充有LATS抑制剂化合物实例编号12(浓度为10微摩尔)。将细胞在37℃下在5%CO<sub>2</sub>中培养两代(两周)。

[3184] 用于移植的细胞悬浮液如下制备。在37℃下使用Accutase将细胞与培养皿中脱离10分钟。然后通过离心漂洗细胞,并将其重悬于16微升不含LATS抑制剂的XVIV015培养基中。

[3185] 通过以下来制备5%GelMA溶液:将16微升的LSC悬浮液或生理盐水对照与8微升的15%GelMA储备溶液混合,然后将所有混合物添加至支撑的载玻片上的治疗性接触透镜(视康舒视氧月抛(Lotrafalcon B),爱尔康公司(Alcon))。最终溶液包含300000个细胞和5%GelMA。将UV LED光源(365nm,浜松光电公司(Hamamatsu))的功率调整为15%,UV强度读数为30mW/cm<sup>2</sup>。将25秒的短UVA暴露用于光聚合过程,以将人LSC生物印刷到接触透镜的内表

面。在聚合过程之后,将载有LSC的接触透镜离体应用于解剖的兔眼或体内应用于兔眼。

[3186] 对于离体应用负载LSC的接触透镜的实验,在Zeiss落射荧光显微镜下两个小时之内观察样品。

[3187] 对于体内实验,将负载LSC的接触透镜应用于上述LSCD兔模型的右眼,并进行睑缘缝合术以使接触透镜在眼表面保持1周。一周后,去除接触透镜,保持兔再活4周。

[3188] 细胞递送五周后处死兔,解剖角膜并在4%PFA中固定。将样品包埋在石蜡中并切片。进行免疫组织化学以检测角蛋白12(角膜上皮细胞标志物)和角蛋白19(结膜细胞标志物)的存在。抗角蛋白12和抗角蛋白19第一抗体来自艾博抗公司(Abcam)。将人线粒体蛋白用于确认细胞的人来源。抗人线粒体蛋白第一抗体来自诺伟司公司(Novus)。然后将样品用HRP缀合的第二抗体(赛默飞世尔公司(ThermoFisher))染色,并在Zeiss显微镜下观察。

[3189] 结果表明,使用GelMA聚合法附接至隐形眼镜的LSC可以离体递送至兔眼表面(图6)。

[3190] 图7显示,在角膜缘干细胞缺陷的兔模型中,在存在LATS抑制剂(化合物实例12)的情况下扩增的LSC群,使用GelMA聚合法附接到接触透镜上,并体内递送到兔的角膜表面,导致角蛋白12阳性角膜上皮的再生,并防止移植的眼中通过角蛋白19阳性结膜细胞的结膜化(分别为图7A和图7B)。相反,未移植的兔眼显示不存在角蛋白12阳性角膜上皮修复。相反,观察到结膜化的迹象,如角蛋白19染色的存在所示(分别为图7C和图7D)。

[3191] 图8表明,如人线粒体蛋白的存在所证实的那样,恢复了移植的眼的角膜上皮的细胞是人的(图8A)。相反,未移植的眼的眼表面未显示出人线粒体蛋白染色(图8B)。

[3192] 实例B10:使用TISSEEL离体递送LSC

[3193] 为了制备TISSEEL(Baxter,目录号NDC 0944-4301-02)工作溶液,遵循制造商的说明来将所提供的成分重构。可以通过添加无菌水以达到所需的纤维蛋白原浓度来进行重构的纤维蛋白原溶液的进一步稀释。将凝血酶工作溶液用杜氏磷酸盐缓冲盐水(DPBS,GIBCO,赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific),沃尔瑟姆,马萨诸塞州)稀释500倍,以获得1单位/ml溶液。

[3194] LSC体外递送至培养物表面。

[3195] 将按实例B1所述获得的细胞铺板在6孔板(康宁公司(Corning))中的XVIV015培养基中,所述培养基补充有LATS抑制剂化合物实例编号12(浓度为10微摩尔)。将细胞在37℃下在5%CO<sub>2</sub>中培养两代(两周)。

[3196] 用于移植的细胞悬浮液如下制备。在37℃下使用Accutase将细胞与培养皿中脱离10分钟。然后通过离心漂洗细胞并将其重悬于上述凝血酶工作溶液中,并通过连续稀释将最终细胞密度调节至十万/ml至三千万/ml之间。

[3197] 将细胞悬浮液与纤维蛋白原溶液混合后,立即将10μl混合物铺板在胶原蛋白包被的24孔板的中央,并在室温下孵育5分钟以固化纤维蛋白。在向每个孔中补充不含LATS抑制剂的XVIV015培养基后,对所有样品进行2周的纤维蛋白降解和细胞增殖的监测。结果(图9)表明,TISSEEL成功用于递送LSC,并且在样品中,与人角膜大小相似的培养区域可在1周至2周内被最初递送的100k和300k LSC覆盖。

[3198] LSC离体递送至人角膜。

[3199] 将按实例B1所述获得的细胞铺板在6孔板(康宁公司(Corning))中的XVIV015培养基中,所述培养基补充有LATS抑制剂化合物实例编号12(浓度为10微摩尔)。将细胞在37℃下在5% CO<sub>2</sub>中培养两代(两周)。在递送实验的前一天,根据制造商的说明书,用CellTracker绿CMFDA染料(赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific),沃尔瑟姆,马萨诸塞州)标记细胞。

[3200] 用于移植的细胞悬浮液如下制备。在37℃下使用Accutase将细胞与培养皿中脱离10分钟。然后通过离心漂洗细胞,并将其重悬于上述凝血酶工作溶液中,以达到最终细胞密度为3千万/ml。

[3201] 将细胞悬浮液与纤维蛋白原溶液混合后,立即将10ul混合物铺板在人角膜中央,并在室温下孵育5分钟以固化纤维蛋白。使用LotraB接触透镜(日夜型空气Optix(Air Optix Night and Day),爱尔康公司(Alcon))覆盖人角膜上的LSC-纤维蛋白构建体,以模仿实际的临床程序。通过尼康公司(Nikon)荧光立体显微镜拍摄荧光图像。数据(图10)表明,TISSEEL成功用于离体将大量LSC递送至角膜表面,并且LSC-纤维蛋白构建体表现出可以很强耐受进一步操作,例如应用保护性接触透镜。

[3202] 实例B11:通过生物印刷将多个细胞群递送至眼表面成为指定图案

[3203] 基于先进材料公司(Advanced Materials)(2015,DOI:10.1002/adma.201202024)中公开的DOPsL技术构建了定制的生物印刷机。

[3204] 用于生物印刷的细胞悬浮液如下制备。收获前,用Celltracker绿CMFDA染料或红CMTPX染料(赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific),沃尔瑟姆,马萨诸塞州)对HEK-293细胞进行预标记。将25μl细胞悬浮液与25μl的15%GelMA储备溶液混合,以达到最终细胞密度为2亿个细胞/ml。

[3205] 将兔眼球放在充满1%低熔点琼脂糖的培养皿上,并在生物印刷过程之前立即用手术刀仔细清理上皮。然后用置于角膜缘上的聚二甲基硅氧烷(PDMS)O形圈(专业硅酮产品公司(Specialty Silicone Products, Inc.),鲍尔斯顿斯帕(Ballston Spa),纽约州)将细胞-GelMA混合物应用于角膜顶部,以防止细胞-GelMA混合物从弯曲的眼表面滴落。

[3206] 在漂洗掉未聚合的混合物之前,将定制的光图案(即阴阳图案的一半)投射到兔眼顶部上的细胞(绿色)-GelMA混合物持续4秒钟。在将新的细胞(红色)-GelMA混合物应用于同一兔角膜的顶部后,将另一种光图案(即阴阳图案的另一半)投射到样品持续4秒钟。成像前用PBS漂洗若干次。参见图11。

[3207] 实例B12:通过CRISPR/Cas9介导的LSC中β-2-微球蛋白基因的缺失减少免疫排斥

[3208] 在以下示例中,通过CRISPR介导的β-2-微球蛋白基因缺失,从LSC表面消除了HLA I类表达。

[3209] 细胞转染:将按实例B1所述获得的LSC在补充有LATS抑制剂化合物实例编号48a的X-VIV015培养基中培养至LSC分离后八天在35mm皮氏培养皿中50%-60%汇合。用tracrRNA-crRNA-Cas9mRNA的混合物转染LSC。为了获得用于35mm皮氏培养皿大小的混合物,将12.5微升的10微摩尔tracrRNA(Dharmacon,目录号U-002000-20)、12.5微升的10微摩尔的靶向人B2M的crRNA(Dharmacon,目录号CR-004366-01)、50微升的0.1微克/微升Cas9mRNA(Dharmacon,目录号CAS11195)、和15微升DharmaFECT Duo转染试剂(Dharmacon,目录号T-2010-02)组合并在室温下孵育20分钟。将所述混合物逐滴加入培养皿中的2.5ml



培养基(补充有LATS抑制剂化合物实例编号48a的XVIV015)(含有/或不含抗生素)中。为了降低mRNA的细胞毒性,将0.2微克/ml B18R(eBioscience公司,目录号34-8185-81)加入培养基中。单独的转染试剂代表转染阴性对照。

[3210] 在37℃下在5%CO<sub>2</sub>中孵育6小时后,将培养基替换为新鲜的补充有化合物实例编号48a的X-VIV015培养基(含有/或不含抗生素),所述X-VIV015培养基包含化合物和B18R。在5%CO<sub>2</sub>培养箱中72小时后,将细胞1:2传代,并在Synthemax包被的皮氏培养皿上的LSC培养基(含有/或不含抗生素)(包含化合物和B18R)中再扩增72小时,以获得更多用于FACS分选的细胞。

[3211] FACS分析:将LSC细胞用Accutase(赛默飞世尔公司(ThermoFisher),目录号A1110501)在5%CO<sub>2</sub>中在37℃下处理20分钟。刮下细胞后,通过使用含有10%血清的细胞培养基终止反应,并转移至falcon管中进行离心步骤(1000rpm,5分钟)。吸出培养基后,将细胞重悬于200微升FACS缓冲液(PBS/10%FBS)中。

[3212] 为了分析B2M和HLA-ABC的表达,分别将5微升APC小鼠抗人β2-微球蛋白抗体(博奇公司(Biolegend),目录号316312)和20微升PE小鼠抗人类HLA-ABC抗体(BD生物科学公司(BD Biosciences),目录号560168)添加至细胞悬浮液中,并在冰上孵育30分钟。在进行抗体标记后用FACS缓冲液将细胞洗涤3次,并重悬于500微升的FACS缓冲液中。在FACS分选之前,将细胞通过70微米的过滤器过滤,并保存在冰上直至分选。

[3213] 为了防止细胞粘附在壁上,在分选之前,将收集管充满血清30分钟。使用包含化合物和B18R的人血清富集的LSC培养基,在BD FACSAria II仪器上将细胞分选到准备好的收集管中。使用BD FACSDiva软件分析FACS数据。

[3214] 图12中显示的结果表明,21%的LSC中存在CRISPR介导的B2M缺失以及随后的HLA A、HLA B和HLA C消除。由于补充了LATS抑制剂化合物实例编号48a的XVIV015培养基能够有效扩增LSC,因此可以扩增21%的B2M阴性/HLA A、HLA B、HLA C阴性LSC群以产生细胞制剂,所述细胞制剂中97%所述细胞不表达免疫排斥的HLA I类驱动子(图13)。

[3215] 实例B13:残留化合物估算研究

[3216] 标准曲线制备

[3217] 制备标准品储备液的一系列稀释,浓度为100微摩尔、10微摩尔、1微摩尔、500nM、100nM和0微摩尔。将复合物实例编号48a(在DMSO中为10mM)储备液掺入50%乙腈50%水中,以制出掺杂标准品。使用掺杂标准品以掺入空白培养基样品。将10微升的掺杂标准品添加到90微升的培养基中,以创建掺杂培养基标准品。使用10,000nM、1000nM、100nM、50nM、10nM和0nM培养基标准品生成化合物实例编号48a的标准曲线。

[3218] 将50微升的每种培养基样品用400微升的萃取溶液处理。所述萃取溶液由乙腈/甲醇(3:1)组成。使用与未知培养基样品相同的体积和条件萃取标准曲线样品。将萃取的样品在10,000rpm离心5分钟。离心后,将200微升的每种样品上清液转移至干净的96孔板中。通过高分辨率LC-MS分析萃取的样品。使用Thermo Xcalibur软件和Quan Browser生成标准曲线并计算浓度值。使用外部校准方法来计算化合物实例编号48a在培养基样品中的浓度。

[3219] LC-MS分析

[3220] 使用Thermo Ultimate UPLC和Kinetex 2.1X 50mM C18RP柱(2.6微米颗粒)进行高分辨率色谱。流动相由缓冲液A(H<sub>2</sub>O中的5mM乙酸铵)和缓冲液B(乙腈中的0.1%甲酸)组

成。标准的二元线性梯度用于反相色谱。本研究使用Thermo Q Exactive质谱仪。将UPLC流出物导入配备有ESI离子源的Q Exactive质谱仪。将质谱仪编程为在高分辨率全扫描模式和MS2模式下执行。

[3221] 测试系统

[3222] 用于LSC洗脱的细胞制备：一式三份进行洗脱实验，其中每个样品包含50万个细胞。在实验期间，将所有样品（仅培养基，带有细胞的培养基，补充有化合物实例编号48a，以及在补充有化合物实例编号48a的培养基中的细胞）在37度培养箱中培养。实验所用的培养基是X-VIVO 15。

[3223] 在补充有3微摩尔化合物实例编号48a的X-VIVO-15培养基中将细胞培养至第2代。当培养物达到70%汇合时，通过抽吸除去培养基，并用补充有3微摩尔实例编号48a的新鲜培养基代替；将细胞再培养六天。在第七天，生成了以下样品：

[3224] 1.2ml “空白”培养基（不补充化合物）

[3225] 2.2ml在化合物存在下培养的培养基（洗前）

[3226] 3.2ml用于每个洗涤样品1-10的培养基

[3227] 4.细胞沉淀（洗后）

[3228] 通过使用细胞提升器（科斯塔公司（Costar），目录号3008）收集细胞。

[3229] 使用高分辨率LC-MS对培养基和细胞沉淀样品进行分析和定量。

[3230] 为了估计化合物实例编号48a的残留量，收集细胞沉淀和上清液。化合物实例编号48a的量通过LC-MS确定。将洗前培养基、洗涤培养基（表4）和细胞沉淀（表5）中的化合物实例编号48a浓度的估算进行总结。洗前培养基样品具有最高水平的化合物实例编号48a（约9,830nM至10,837nM范围）。洗后的沉淀具有较低、但可检测到的水平的化合物实例编号48a（纳摩尔）。

[3231] 表4：化合物实例编号48a在洗前培养基和洗涤培养基中的浓度估算

[3232]

样品	体积 (mL)	化合物实例 编号 48a (nM) 一式三份#1	化合物实例 编号 48a (nM) 一式三份#2	化合物实例 编号 48a (nM) 一式三份#3
洗前培养基	2	9829.547	10374.463	10837.706
洗涤培养基 1	2	461.271	401.058	354.547
洗涤培养基 2	2	31.933	38.721	18.400
洗涤培养基 3	2	BLQ	BLQ	BLQ
洗涤培养基 4	2	BLQ	BLQ	BLQ
洗涤培养基 5	2	BLQ	BLQ	BLQ
洗涤培养基 6	2	BLQ	BLQ	BLQ
洗涤培养基 7	2	BLQ	BLQ	BLQ
洗涤培养基 8	2	BLQ	BLQ	BLQ
洗涤培养基 9	2	BLQ	BLQ	BLQ
洗涤培养基 10	2	BLQ	BLQ	BLQ

[3233] BLQ=低于定量限

[3234] 表5:化合物实例编号48a在细胞沉淀中的浓度估算

[3235]

样品	化合物 实例编 号 48a (nM)	化合物 实例编 号 48a (pg/细 胞)	化合物 实例编 号 48a 的平均 值 (pg/ 细胞)	沉淀 中的 细胞 数	总的化合 物实例编 号 48a (pg)
洗涤后沉淀 1	20.342	0.00068	0.00068	0.5 × 10 <sup>6</sup>	340
洗涤后沉淀 2	19.908	0.00066			
洗涤后沉淀 3	20.787	0.00069			

[3236] 化合物实例编号48a在来自三个孵育的洗前培养基中的数量范围为9,830nM-10,838nM。化合物实例编号48a在洗涤后细胞沉淀中的浓度在19.9nM-20.8nM的范围内。

[3237] 洗脱后其他化合物实例的残留量

[3238] 对于化合物实例编号12、261和5,使用与化合物实例编号48a相同的方法测量扩增的LSC中的残留量。

[3239] 表6化合物实例12在细胞沉淀中的浓度估算

[3240]	样品	化合物实例 12 (nM)	化合物实例 12 (pg/细胞)	化合物实例 12 的平均值 (pg/细胞)	沉淀中的细胞数	总的化合物实例 12 (pg)
	洗涤后沉淀 1	7.370	0.000136	0.000178	$1 \times 10^6$	178
	洗涤后沉淀 2	14.443	0.000264			
	洗涤后沉淀 3	7.319	0.000134			

[3241] 表7:化合物实例编号261在细胞沉淀中的浓度估算

[3242]	样品	化合物实例编号 261 (nM)	化合物实例编号 261 (pg/细胞)	化合物实例编号 261 的平均值 (pg/细胞)	沉淀中的细胞数	总的化合物实例编号 261 (pg)
	洗涤后沉淀 1	0.315	0.0000043	0.000083	$1 \times 10^6$	83
	洗涤后沉淀 2	6.941	0.000095			
	洗涤后沉淀 3	11.008	0.00015			

[3243] 表8:化合物实例编号5在细胞沉淀中的浓度估算

[3244]	样品	化合物实例编号 5 (nM)	化合物实例编号 5 (pg/细胞)	化合物实例编号 5 的平均值 (pg/细胞)	沉淀中的细胞数	总的化合物实例编号 5 (pg)
	洗涤后沉淀 1	21.733	0.00061	0.00083	$0.5 \times 10^6$	415
	洗涤后沉淀 2	13.454	0.00038			
	洗涤后沉淀 3	46.529	0.0015			

[3245] 实例C1:人角膜内皮细胞分离

[3246] 研究同意的尸体人角膜是从眼库获得的。使用手术级反向Sinsky内皮剥离器,对角膜内皮细胞(CEC)层和后弹力膜和(DM)评分。小心地将DM内皮细胞层从角膜基质上剥离,并在37℃下使用1mg/ml胶原酶将细胞从DM解离,直到通过显微镜观察到细胞脱离变得明显(45分钟到3小时)。在以下实例C1-C17中使用以这种方式获得的细胞。

[3247] 实例C2:将细胞暴露于LATS抑制剂并测量细胞内YAP分布

[3248] 将按实例C1所述获得的细胞铺板在玻璃底黑壁24孔培养皿中的角膜内皮细胞培养基(具有人血清的人内皮SF(无血清)培养基(英杰公司(Invitrogen)))中,所述培养基补

充有LATS抑制剂化合物实例编号133或化合物实例编号49,浓度为10微摩尔,或补充DMSO作为阴性对照。在这些条件下,将细胞在5%CO<sub>2</sub>中在37℃下培养24小时。

[3249] 为了测量LATS抑制剂对下游靶标YAP的作用,通过免疫组织化学分析了细胞内YAP的分布。将细胞培养物用4%PFA固定20分钟,透化并在0.3%Triton X-100(西格玛-奥德里奇公司(Sigma-Aldrich))和3%驴血清于PBS中的封闭溶液中封闭30分钟。然后在封闭溶液中于4℃用第一抗体标记细胞12小时。使用的第一抗体是来自圣克鲁斯生物技术公司(Santa Cruz Biotechnology)的抗YAP。将样品在PBS中洗涤3次,然后在室温下施加1:500稀释度的驴产生的第二抗体Alexa Fluor 488(分子探针公司(Molecular Probes))30分钟。阴性对照省略了第一抗体(数据未显示)。使用Zeiss LSM 880共聚焦显微镜观察荧光。

[3250] 在暴露于细胞增殖培养基(具有LATS抑制剂化合物实例编号133或编号49)的CEC中,YAP免疫染色更强,如通过YAP的免疫荧光染色所指示的,如图14所示。因此这些化合物对下游靶标YAP的细胞内定位具有影响。

[3251] 实例C3:将细胞暴露于LATS抑制剂并测量YAP磷酸化

[3252] 将按实例C1所述获得的细胞在37℃下用1mg/ml胶原酶与培养皿脱离15分钟,通过离心漂洗细胞悬浮液,并铺板在6孔板(康宁公司(Corning))中的角膜内皮细胞培养基(具有人血清的人内皮SF培养基(英杰公司(Invitrogen)))中并且培养2到4天。然后用补充有LATS抑制剂(化合物实例编号133或实例编号49(在DMSO中稀释),浓度为10微摩尔)的或仅补充不含化合物的DMSO作为阴性对照的新鲜角膜内皮细胞培养基(具有人血清的人内皮SF培养基(英杰公司(Invitrogen)))代替所述培养基。在这些条件下,将细胞在5%CO<sub>2</sub>中在37℃下培养1小时。

[3253] 通过胰蛋白酶解离和离心获得细胞沉淀,并用PBS洗涤。用含有蛋白酶抑制剂混合物(生命技术公司(Life Technologies))的30微摩尔RIPA裂解缓冲液裂解沉淀30分钟,每10分钟涡旋振荡一次。然后将细胞碎片在4℃下以14k rpm沉淀15分钟,并收集蛋白质裂解物。使用微型BCA试剂盒(皮尔斯公司(Pierce))定量蛋白质浓度。在4%-20%TGX凝胶(伯乐公司(BioRad))的每个孔中填充十五(15)微克总蛋白,并根据制造商的说明进行蛋白质印迹。用磷酸化YAP(ser127)(CST,1:500)或总Yap(Abnova,1:500)抗体探测膜,并用肌动蛋白(艾博抗公司(Abcam))标记作为上样对照。膜用缀合了HRP的第二抗体染色,漂洗并用ChemiDoc系统(伯乐公司(Biorad))按照制造商的说明进行成像。

[3254] 蛋白质印迹分析表明两种化合物实例编号133和实例编号49均引起人CEC中YAP磷酸化水平的降低。用化合物实例编号133和实例编号49处理1小时后观察到显著差异,如图15a中的蛋白质印迹所示。图15b通过图表表示了针对β-肌动蛋白标准化的磷酸化YAP水平,以及图15c显示了针对总YAP标准化的磷酸化YAP水平。

[3255] 这些结果表明,LATS抑制剂化合物实例编号133和实例编号49可以激活人CEC中的YAP信号传导。

[3256] 实例C4:人角膜内皮细胞群扩增和细胞密度的测量

[3257] 如实例C1所述获得的细胞在37℃下用100微升Accutase(赛默飞世尔公司(ThermoFisher))与培养皿脱离10分钟,通过离心漂洗细胞悬液并铺板在6孔板(康宁公司(Corning))中的角膜内皮细胞培养基(具有人血清的人内皮SF培养基(英杰公司(Invitrogen)))中,所述角膜内皮细胞培养基补充有浓度为10微摩尔的LATS抑制剂化合物

实例编号133或实例编号49(在DMSO中稀释),或补充有不含化合物的单独的DMSO作为阴性对照。将细胞在37℃在5%CO<sub>2</sub>中培养。

[3258] 为了测量细胞增殖,按照制造商的说明(埃森生物科学公司(Essen Biosciences))使用Incucyte机器,每3小时对细胞汇合进行实时定量活细胞分析,持续10天。

[3259] 图16显示了暴露于LATS抑制剂或仅DMSO后,细胞群随时间的汇合百分比。尽管人CEC通常是非增殖性的,但结果表明这两种LATS抑制剂实例编号133和实例编号49均可以激活这些细胞的增殖。

[3260] 实例C5:人角膜内皮细胞群扩增和细胞密度的测量

[3261] 将按实例C1所述获得的细胞铺板在48孔板(康宁公司(Corning))中的X-VIVO15培养基中,所述培养基补充有浓度为10微摩尔的如在下表9和表10中列出的LATS抑制剂(在DMSO中稀释)或补充不含化合物的仅DMSO作为阴性对照。将细胞在37℃在5%CO<sub>2</sub>中培养。

[3262] 对于每种化合物,产生了两组培养物。在从角膜分离的细胞已附着于细胞培养皿上后(通常在细胞铺板后24小时),在室温下将第一组培养物在4%PFA中固定20分钟。在第一组培养物固定后10天,在室温下将第二组培养物在4%PFA中固定20分钟。

[3263] 为了测量所有固定的培养物中的细胞密度,如下对每表面积的用Sytox Orange(赛默飞世尔公司(ThermoFisher))染色的核数进行计数:固定的固定细胞培养物在0.3% Triton X-100(西格玛-奥德里奇公司(Sigma-Aldrich))的溶液中透化。然后在室温下在0.5微摩尔Sytox Orange的PBS溶液中标记细胞5分钟。在Zeiss落射荧光显微镜下计数核。然后通过计算细胞的扩增群与接种细胞的群的比率来确定扩增系数。

[3264] 下表9和表10显示了用测试的化合物实现的细胞群扩增。

[3265] 表9:细胞扩增倍数

[3266]	化合物实例编号	扩增系数	化合物实例编号	扩增系数
	实例 12	521	实例 133	273
	实例 261	461	实例 287	237
	实例 47	449	实例 290	221
	实例 48a	446	实例 65	203
	实例 49	426	实例 17	187
	实例 5	408	实例 139	107
	实例 62	402	实例 289	84
	实例 6	391	实例 11	79
	实例 14	337	实例 48b	21
	实例 288	302	实例 33	12
	实例 66	280	DMSO	7

[3267] 表10:体外内皮细胞密度(细胞/mm<sup>2</sup>面积)

[3268]	化合物实例编号	细胞密度: 细胞/mm <sup>2</sup>	化合物实例编号	细胞密度: 细胞/mm <sup>2</sup>
	实例 12	4226	实例 133	2028
	实例 261	4308	实例 287	1893
	实例 47	4294	实例 290	2071
	实例 48a	4021	实例 65	1702
	实例 49	3873	实例 17	1628
	实例 5	3911	实例 139	1179
	实例 62	3301	实例 289	1421
	实例 6	3378	实例 11	1121
	实例 14	3271	实例 48b	869
	实例 288	2779	实例 33	25
	实例 66	2503	DMSO	13

[3269] 实例C6:人角膜内皮细胞中LATS1和LATS2的siRNA敲低

[3270] 将如实例C1所述获得的细胞在24孔板(康宁公司(Corning))中接种至X-VIVO15培养基(龙沙集团(Lonza))。将细胞在37℃在5%CO<sub>2</sub>中培养。通过转染(脂转染,使用RNAiMax,赛默飞世尔公司(ThermoFisher))敲低LATS1和LATS2。将细胞培养板的每个孔用具有靶向每个基因的4个siRNA的0.5微克池进行转染。本研究使用的siRNA是凯杰公司的LATS1 siRNA SI00067172和LATS2 siRNA SI00106925。根据制造商的方案(凯杰公司),将杂乱的siRNA用作阴性对照。

[3271] 为了测量细胞增殖,在根据制造商的说明(生命技术公司(Life Technologies))用LATS1和LATS2 siRNA或杂乱的siRNA对照转染后48小时进行EdU染色。用Sytox Orange标记细胞核。使用Zeiss LSM 880共聚焦显微镜观察EdU和Sytox Orange荧光,以测量EdU阳性细胞核的百分比。

[3272] 图17显示,在敲低LATS1和LATS2后,EdU阳性CEC的百分比增加,表明敲低LATS会导致CEC增殖。

[3273] 实例C7:人角膜内皮细胞群扩增及细胞形态的免疫组织化学观察

[3274] 如实例C1所述获得的细胞在24孔板(康宁公司(Corning))中接种至角膜内皮细胞培养基(具有人血清的人内皮SF培养基(英杰公司(Invitrogen))),所述角膜内皮细胞培养基补充有浓度为10微摩尔的LATS抑制剂化合物实例编号49(在DMSO中稀释)或补充有不含化合物的DMSO阴性对照。将细胞在37℃在5%CO<sub>2</sub>中培养10天。

[3275] 为了观察扩增的细胞群具有体内使用所需的细胞形态,通过如下的免疫组织化学测量细胞形成紧密连接的能力。将细胞培养物用4%PFA固定20分钟,透化并在0.3%Triton X-100(西格玛-奥德里奇公司(Sigma-Aldrich))和3%驴血清于PBS中的封闭溶液中封闭30分钟。然后在封闭溶液中于4℃用第一抗体标记细胞12小时。使用的第一抗体是来自英杰公司(Invitrogen)的ZO-1。将样品在PBS中洗涤3次,然后在室温下施加1:500稀释度的驴产生的第二抗体Alexa Fluor 488(分子探针公司(Molecular Probes))30分钟。将细胞在PBS中

洗涤3次,并用Sytox Orange (567nm, 生命技术公司 (Life Technologies)) 将细胞核 (DNA) 染色。阴性对照省略了第一抗体 (数据未显示)。使用Zeiss LSM 880共聚焦显微镜观察荧光。

[3276] 在培养基和DMSO对照存在下增殖的CEC表现出功能异常的CEC的多发性特征 (图18A)。暴露于具有LATS抑制剂实施例编号49的细胞增殖培养基的CEC保留了正常的角膜内皮细胞形态和形成紧密连接的能力,这如紧密连接标志物封闭小带-1 (ZO-1) 的免疫荧光染色所表明,如图18B所示。正常的角膜内皮细胞形态和形成紧密连接的能力对于维持角膜内皮功能都至关重要。

[3277] 实例C8:人角膜内皮细胞群扩增和标志物胶原8a2、AQP1、SLC4A11、RPE65、CD31和Na/K ATP酶的测量。

[3278] 为了验证扩增的角膜内皮细胞群在体内表达正常情况下由角膜内皮细胞表达的基因,将细胞进行培养,然后进行RT-PCR分析以测量胶原8a2、AQP1、SLC4A11、RPE65和CD31的表达水平。还进行如下免疫组织化学分析以分析Na/K ATP酶和胶原8a2的水平。

[3279] 如实例C1所述获得的细胞在24孔板 (康宁公司 (Corning)) 中接种至角膜内皮细胞培养基 (具有人血清的人内皮SF培养基 (英杰公司 (Invitrogen))), 所述角膜内皮细胞培养基补充有浓度为10微摩尔的LATS抑制剂化合物实例编号49 (在DMSO中稀释) 或补充有不含化合物的DMSO阴性对照。将细胞在37℃在5%CO<sub>2</sub>中培养10天。对于阴性对照,在没有LATS抑制剂的DMEM-F12 (生命技术公司 (Life Technologies)) 中培养真皮成纤维细胞 (龙沙集团 (Lonza))。

[3280] 为了进行RT-PCR分析,根据制造商的方案,使用Trizol (英杰公司 (Invitrogen))、RNeasy Mini和QIA Shredder (凯杰公司) 提取总RNA。使用Nanodrop 100 (赛默飞世尔科学公司 (Thermo-Fisher Scientific)) 和生物分析仪2100 (安捷伦技术公司 (Agilent Technologies)) 测量RNA的质量和数量。通过逆转录制备cDNA,并使用7900HT系统 (应用生物系统公司 (Applied Biosystems)) 通过定量RT-PCR评估相对mRNA表达。使用以下循环参数:

[3281] 1) 50℃持续2分钟;2) 95℃持续10分钟;3) 95℃持续15秒4) 60℃持续1分钟。步骤3-4重复40次。

[3282] 测量肌动蛋白mRNA水平,并将其用作内源对照以标准化基因表达水平,并根据公式 $dCt = \text{目标基因的} Ct - \text{内源对照的} Ct$ 计算 $\Delta Ct$ 值。引物获自应用生物系统公司 (Applied Biosystems)。

[3283] 如图19所示的RT-PCR分析表明,用LATS抑制剂化合物实例49扩增的角膜内皮细胞表达体内角膜内皮细胞正常表达的基因,包括胶原蛋白8a2、AQP1、SLC4A11。这些细胞不表达眼中存在的其他上皮的标志物,包括RPE65 (视网膜色素上皮的标志物) 和CD31 (血管上皮的标志物)。

[3284] 为了通过免疫组织化学检查Na/K ATP酶和胶原8a2的表达,将细胞培养物用4% PFA固定20分钟,透化并在0.3% Triton X-100 (西格玛-奥德里奇公司 (Sigma-Aldrich)) 和3% 驴血清于PBS中的封闭溶液中封闭30分钟。然后在封闭溶液中于4℃用第一抗体标记细胞12小时。使用的第一抗体是Na/K ATP酶和胶原8a2 (圣克鲁兹生物技术公司 (Santa Cruz Biotechnology))。将样品在PBS中洗涤3次,然后在室温下施加1:500稀释度的驴产生的第



二抗体Alexa Fluor 488或647 (分子探针公司 (Molecular Probes)) 30分钟。将细胞在PBS中洗涤3次,并用Sytox Orange (567nm, 生命技术公司 (Life Technologies)) 将细胞核 (DNA) 染色。阴性对照省略第一抗体或同种型对照抗体 (数据未显示)。使用Zeiss LSM 880 共聚焦显微镜观察荧光。

[3285] 如图20所示的免疫组织化学分析表明,用LATS抑制剂化合物实例49扩增的角膜内皮细胞表达体内角膜内皮细胞正常表达的基因,包括Na/K ATP酶 (图20a) 和胶原8a2 (图20b)。

[3286] 实例C9:人角膜内皮细胞群扩增和标志物CD44、CD105、CD166和CD73的测量

[3287] 为了证实扩增的细胞群不经历内皮向间充质转化,如下培养CEC,然后进行FACS分析以分析CD44、CD105、CD166和CD73的水平。

[3288] 为了产生成熟的CEC培养物,将如实例C1中所述获得的细胞铺板在补充有浓度为3微摩尔的LATS抑制剂化合物实例编号48a (在DMSO中稀释) 的X-VIVO15中。将细胞在37℃在5%CO<sub>2</sub>的48孔板中 (康宁公司 (Corning)) 培养两周。期间通过在37℃用1mg/ml胶原酶脱离细胞15分钟,将细胞传代两次,通过离心漂洗细胞悬浮液并铺板在新鲜培养基中。然后将这些细胞在不含LATS抑制剂的XVIVO培养基中培养另外2周。

[3289] 为了通过FACS测量CD44、CD105、CD166和CD73的水平,将CEC在37℃在5%CO<sub>2</sub>中用Accutase (赛默飞世尔公司 (ThermoFisher), 目录号A1110501) 处理20分钟。通过使用含有10%血清的细胞培养基终止反应,并转移至falcon管中进行离心步骤 (1000rpm, 5分钟)。吸出培养基后,将细胞重悬于200微升FACS缓冲液 (PBS/10%FBS) 中。

[3290] 将针对CD44、CD105、CD166和CD73 (BD生物科学公司 (BD Biosciences)) 的抗体添加到细胞悬浮液中,并在冰上孵育30分钟。在进行抗体标记后用FACS缓冲液将细胞洗涤3次,并重悬于500微升的FACS缓冲液中。在FACS分选之前,将细胞通过70微米的过滤器过滤,并保存在冰上直至分选。在BD FACSAria II仪器上分选细胞。使用BD FACSDiva软件分析FACS数据。

[3291] 如图21所示的FACS分析表明,在存在LATS抑制剂的情况下扩增的细胞群的FACS标志物表达谱与经历了内皮向间充质转化的细胞的FACS标志物表达谱不同。具体地,与不存在LATS抑制剂的情况下生长的细胞相比,在存在LATS抑制剂的情况下培养的细胞表达较低水平的CD44、CD73、CD105和CD166。重要的是,CD73是内皮向间充质转化的标志物,因此,这些结果表明,在存在LATS抑制剂的情况下培养的CEC不经历内皮向间充质转化。

[3292] 实例C10:细胞生物印刷:GelMA制备

[3293] GelMA的合成

[3294] 根据先前公开的方案 (Nichol, J.W. 等人, Biomaterials [生物材料], 2010, 第5536-5544页) 合成具有约100%Lys残基甲基丙烯酸酯化的甲基丙烯酸酯明胶 (GelMA)。将20克猪衍生的明胶 (目录号G2500, 西格玛公司 (Sigma)) 在50℃下在200ml不含钙和镁的PBS (DPBS, 目录号21-031, 康宁公司 (Corning)) 中溶解过夜。在强力搅拌下,将甲基丙烯酸酐 (Cat#276685, 西格玛公司 (Sigma)) 滴加 (约1ml/min) 到明胶溶液中以达到8% (体积/体积) 的浓度。将混合物在60℃在油浴中搅拌3小时,之后添加200ml DPBS,然后再充分混合15分钟。稀释的混合物通过在45℃下用Milli-Q水透析 (使用15kDa MWC0 Spectra/Por透析管) 1周进行纯化,以除去甲基丙烯酸。将纯化的样品冻干并储存在-80℃直至进一步使用。

[3295] 使用<sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O, 35℃) 确定15mg/mL GelMA溶液的甲基丙烯酸化程度。通过比较在7.25ppm-7.50ppm处的多重峰面积(假设为Phe质子, GelMA中5H/Phe) 与在5.47ppm、5.51ppm、5.71ppm和5.76ppm处四个单重峰面积之和(假设为乙烯基质子, GelMA中2H/甲基丙烯酰胺), 发现Phe与甲基丙烯酰胺的峰面积比为1.00:0.82。通过氨基酸分析确定用于所述反应的明胶中的Phe:Lys摩尔比为1.00:2.06。因此, GelMA中Phe:Lys:甲基丙烯酰胺的摩尔比为1.00:2.06:2.05。假设明胶甲基丙烯酸化的主要位点是Lys残基, <sup>1</sup>H NMR分析表明甲基丙烯酸化度为~100% (2.05/2.06x 100%=99.5%)。

[3296] 在DPBS中制备GelMA和LAP的储备溶液, 调节pH值, 无菌过滤, 并在4℃下储存, 直至如下所述进一步使用。以下方案举例说明了15%w/v GelMA和0.15%w/v LAP储备的制备, 但其它强度是按照相同的步骤制备的。为了制备15%w/v的GelMA储备溶液, 将1.5克如上所述制备的冻干的GelMA在37℃下溶解于10ml预热的DPBS中。将GelMA完全溶解后, 通过向GelMA溶液中添加15mg苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基次膦酸锂(LAP) 引入光引发剂, 得到含15%w/v GelMA和0.15%w/v LAP的储备溶液。使用公开的方案(Biomaterials[生物材料] 2009, 30, 6702-6707) 合成LAP。将500微升1N NaOH(目录号BDH-7222-1, VWR) 添加到溶液中以调节pH至中性, 然后使用0.22微米无菌膜(Millipore公司) 过滤溶液。将最终滤液分为500ul等分样品并储存在4℃下直至进一步使用。

[3297] 实例C11:生物印刷机:设计与操作

[3298] 为了开发可精确控制细胞递送位置的细胞疗法, 使用生物印刷技术将CEC精确定位在角膜的后侧。

[3299] 使用HEK293细胞在玻璃盖玻片上进行生物印刷实验。将红色荧光蛋白标记的HEK293细胞在6孔培养板中在含有5%胎牛血清的DMEM-F12中培养至汇合。然后在37℃下用100微升TripLE(英杰公司(Invitrogen)) 将细胞与培养皿脱离10分钟, 通过离心漂洗细胞悬浮液, 并以8000万个细胞/ml的浓度重悬于DMEM-F12中。

[3300] 基于动态光投影(DLP) 技术设计了第一台生物印刷机, 所述系统的原理图如图26所示。所述系统包含五个主要组件:1. UVA光源(365nm, S2000, EXPO); 2. 数字微镜阵列设备(DMD, DLP-07 XGA; Texas Instruments), 用于调制光以生成光图案; 3. 光学系统, 将光图案投射到样品上; 4. 自动化的平台, 可以与DMD生成的相应光图案同步地在所有三个轴上移动; 5. 提供DMD芯片图像流并控制所有组件的计算机。

[3301] 对于生物印刷, HEK293细胞/生物基质混合物通过将50微升含0.15%LAP的15% GelMA储备溶液与相同体积的HEK293细胞悬液混合以达到4000万/ml的最终细胞密度来制备。然后将细胞/GelMA混合物添加到玻璃盖玻片的中心, 并通过施加365nm UVA光掩模持续30秒, 以字母“e”的形状聚合。然后使用Zeiss LSM 880共聚焦显微镜采集图像。

[3302] 结果表明, 载有细胞的构建体可以以字母“e”的形式精确地进行生物印刷(实际结果显示在图26的左下角:“e”)。这表明所述生物印刷技术可以实现细胞递送位置的精确控制。

[3303] 为了促进体内动物工作, 将上述生物印刷机的核心技术按如下方式转换为紧凑的便携式手持设计。发光头由高功率LED发射器(365nm, LED工程公司(LED Engin)) 和非球面透镜组成, 以提供准直光束。所述发光头内置在定制的铝制外壳中, 以实现更好的散热。可充电电池、电源开关和其它电子设备容纳在3D印刷的塑料手柄中, 所述手柄通过枢轴与发

光头组装在一起,从而可以更自由的转动发光头。3D印刷的适配器允许连接到不同尺寸的头光导上,以控制照明区域的大小。受基于DMD的系统的启发,所述手持设备可使用印在连接到头光导正面的透明纸上的掩模来生成自定义的光图案,以控制光聚合。

[3304] 实例C12:离体在人角膜的后侧生物印刷载有细胞的构建体

[3305] 为了确定所述便携式手持式生物印刷装置是否能够将细胞精确定位在人角膜的后侧,使用HEK293细胞和从眼库获得的人角膜在离体进行了生物印刷实验。将红色荧光蛋白标记的HEK293细胞在6孔培养板中在含有5%胎牛血清的DMEM-F12中培养至汇合。然后在37℃下用100微升TripLE (英杰公司 (Invitrogen)) 将细胞与培养皿脱离10分钟,通过离心漂洗细胞悬浮液,并以8000万个细胞/ml的浓度重悬于DMEM-F12中。

[3306] 对于生物印刷,HEK293细胞/生物基质混合物通过将50微升含0.15%LAP的15%GelMA储备溶液与相同体积的HEK293细胞悬液混合以达到4000万/ml的最终细胞密度来制备。

[3307] 然后将细胞/GelMA混合物添加到玻璃盖玻片的中心,并通过施加365nm UVA光掩模持续30秒,以字母“e”的形状聚合。然后使用ZeissLSM 880共聚焦显微镜采集图像。

[3308] 从眼库获得的人供体角膜从其储存溶液 (Optisol) 中取出,并用DPBS短暂漂洗。在解剖显微镜下,小心刮下角膜后界膜,然后再用DPBS漂洗角膜。然后将一个角膜放置在35mm皮氏培养皿的塑料盖(内表面朝上)上。细胞/生物基质混合物通过将50微升含0.15%LAP的15%GelMA储备溶液与相同体积的HEK-293-RFP细胞悬液混合以达到4000万/ml的最终细胞密度来新鲜制备。然后将细胞/GelMA混合物添加到角膜中央,然后使用凸形塑料支架以形成模拟眼前房的封闭腔。然后小心地翻转整个构建体,并使用所述手持式生物印刷设备将直径为5.5-mm的365nm UVA光的圆形图案投射通过角膜,持续30秒。预期这种UV光图案会以附着在角膜后侧的盘状形式聚合细胞/GelMA混合物。为了确定是否发生这种情况,我们将角膜从盖子上分离,通过在角膜后侧吸移DPBS漂洗任何未聚合和未附着材料,并使用Zeiss LSM 880共聚焦显微镜获取图像。

[3309] 结果表明,漂洗未聚合和未附接的材料后,红色荧光蛋白标记的细胞的圆形图案保留在角膜的后侧(图27)。这证实了可以使用手持设备(其投射365nm UVA光通过角膜),将细胞生物印刷在角膜的后侧。

[3310] 实例C13:体内在兔角膜后侧进行生物印刷载有细胞的构建体

[3311] CEC制备

[3312] 如实例C1中所述获得的细胞在37℃下用100微升Accutase (赛默飞世尔公司 (ThermoFisher)) 与培养皿脱离10分钟,通过离心漂洗细胞悬浮液,并铺板在补充有浓度为3微摩尔的LATS抑制剂化合物实例编号48(在DMSO中稀释)的X-VIVO15中。将细胞在37℃在5%CO<sub>2</sub>的6孔板中(康宁公司 (Corning)) 培养两周。期间通过在37℃用1mg/ml胶原酶脱离细胞15分钟,将细胞传代两次,通过离心漂洗细胞悬浮液并铺板在新鲜培养基中。然后将这些细胞在不含LATS抑制剂的XVIVO培养基中培养另外2周,以形成成熟的CEC。

[3313] 为了制备在兔眼内进行生物印刷的CEC,细胞/生物基质混合物通过将15微升含0.15%LAP的15%GelMA储备溶液与30微升CEC悬浮液混合以达到62.5万/ml至2500万/ml的最终细胞密度来生成。然后将细胞/GelMA混合物添加至角膜中央。

[3314] 角膜内皮细胞缺陷的兔模型

[3315] 通过使用硅尖针刮除整个角膜内皮,可在NZA兔的右眼单侧地造成角膜内皮细胞缺陷。使用抽吸套管漂洗前房,以去除漂浮的碎屑。将40微升新鲜制备的细胞/GelMA混合物注入前房,然后使用配备有3mm光导的手持生物印刷机距眼表面约1cm在365nm UVA暴露30秒。使用小型插管进行柔和漂洗,以注入500微升补充肝素的平衡盐溶液,以去除未聚合的物质和漂浮细胞。每只兔的左眼保持完整并用作对照。细胞递送后,兔接受镇痛治疗(在前2周曲马多10mg/kg PO BID,在前2周(或只要动物出现眼不适症状)美洛昔康0.3mg/kg PO SID)、抗炎治疗(术后立即给予Ancef®(头孢唑啉)50mg,在第1周Tobrex®眼液t.i.d和之后b.i.d,第一周氨苄青霉素80mg/kg/(40mg BID)SQ和免疫抑制(在第1周环孢菌素A(0.5%)眼顶部t.i.d和之后b.i.d,Gentocin®-durafilm®(在第1周硫酸庆大霉素和倍他米松,MERCK)眼顶部t.i.d和之后b.i.d,在第1周环孢素A(5mg/kg/天)SQ,接着之后1/2的剂量)。

[3316] 细胞递送三周后处死兔,解剖角膜并在4%PFA中固定。进行免疫组织化学以检测人核抗原(Millipore公司)的存在,以确认人细胞和ZO-1(英杰公司(Invitrogen))的存在,以确定生物印刷的CEC是否可以形成在正常的角膜内皮中观察到的紧密连接。然后使用Zeiss LSM 880共聚焦显微镜采集图像。

[3317] 结果表明,在实验兔中,可以使用ZO-1免疫组织化学检测角膜内皮结构(图28的图A)。在通过外科手术去除角膜内皮并且没有CEC被生物印刷的兔的右眼中,不存在ZO-1染色,表明不存在正常的角膜内皮结构(图28的图B)。在通过手术去除角膜内皮并进行CEC印刷的兔的右眼中,存在ZO-1染色,表明角膜内皮结构已经重建(图28,图C)。

[3318] 使用人核抗原染色来确认图28的图C中重建角膜内皮的细胞是通过生物印刷递送的人CEC。图28的图D和图E显示在没有接受任何人CEC的眼中不存在人核抗原免疫染色。相反,人核抗原阳性细胞覆盖其中生物印刷人CEC的眼中的成像区域(图28的图F),这表明图28的图C所示的ZO-1标记的角膜内皮结构是由生物印刷在兔角膜后侧的人CEC构成。

[3319] 实例C14:离体在人角膜的后侧生物印刷高度可定制形状的载有细胞的构建体

[3320] 从眼库获得的人供体角膜从其储存溶液(Optisol)中取出,并用DPBS短暂漂洗。在解剖显微镜下,小心刮下角膜后界膜,然后再用DPBS漂洗角膜。然后将一个角膜放置在35mm皮氏培养皿的塑料盖(内表面朝上)上。

[3321] 细胞/生物基质混合物通过将50μl含0.15%LAP的15%GelMA储备溶液与相同体积的HEK-293-RFP细胞悬液混合以达到4000万/ml的最终细胞密度来新鲜制备。然后将细胞/GelMA混合物添加到角膜中央,然后使用凸形塑料支架以形成模拟眼前房的封闭腔。然后小心地翻转整个构建体,并使用实例C11中提到的DLP生物印刷设备将365nm UVA光的可定制图案投射通过角膜,持续7.5秒。然后用DPBS在角膜后侧漂洗任何未聚合和未附着材料,并使用Zeiss荧光立体显微镜获取图像。

[3322] 为了证明我们的生物印刷技术的可重复性和可定制性,将以不同字母设计的光图案(所述图案是易于识别的)投射到样品上。结果(图29)显示,由通过角膜的光图案确定,具有高精度的定制的载有细胞的构建体可以生物印刷到角膜的后侧。

[3323] 实例C15:残留化合物估算研究

[3324] 标准曲线制备

[3325] 制备标准品储备液的一系列稀释,浓度为30微摩尔、3微摩尔、300nM、30nM、3nM、

0.3nM和0微摩尔。将化合物实例48a(在DMSO中10mM)储备液掺入到50%乙腈50%水中,制成掺杂标准品。使用掺杂标准品以掺入空白培养基样品。将10微升的掺杂标准品添加到90微升的培养基中,以创建掺杂培养基标准品。使用3000nM、300nM、30nM、3nM、300pM、30pM和0nM培养基标准品生成化合物实例编号48a的标准曲线。

[3326] 将50微升的每种培养基样品用300微升的萃取溶液处理。所述萃取溶液由乙腈/甲醇(3:1)组成。使用与未知培养基样品相同的体积和条件萃取标准曲线样品。将萃取的样品在10,000rpm离心5分钟。离心后,将200微升的每种样品上清液转移至干净的96孔板中。通过高分辨率LC-MS分析萃取的样品。使用Thermo Xcalibur软件和Quan Browser生成标准曲线并计算浓度值。使用线性对数-对数标度的外部校准方法来计算化合物实例编号48a在培养基样品中的浓度。

#### [3327] LC-MS分析

[3328] 使用Thermo Ultimate UPLC和Kinetex 2.1X 50mM C18RP柱(2.6微米颗粒)进行高分辨率色谱。流动相由缓冲液A(H<sub>2</sub>O中的5mM乙酸铵)和缓冲液B(乙腈中的0.1%甲酸)组成。标准的二元线性梯度用于反相色谱。本研究使用Thermo Q Exactive质谱仪。将UPLC流出物导入配备有ESI离子源的Q Exactive质谱仪。将质谱仪编程为在高分辨率全扫描模式下执行。提取的离子色谱图用于色谱积分。

#### [3329] 测试系统

[3330] 用于CEC洗脱的细胞制备:一式三份进行洗脱实验,其中每个样品包含50万个细胞。在实验期间,将所有样品(仅培养基,带有细胞的培养基,补充有化合物实例编号48a,以及在补充有化合物实例编号48a的培养基中的细胞)在37度培养箱中培养。实验所用的培养基是X-VIVO 15(龙沙集团(Lonza),目录号04-744Q)。

[3331] 在补充有3微摩尔化合物实例编号48a的X-VIVO-15培养基中将细胞培养至第2代。达到汇合后,通过抽吸除去培养基,并用未补充化合物实例编号48a的新鲜培养基代替。在没有化合物实例48a编号的情况下将细胞再培养一周。在不存在化合物的情况下培养一周之后,通过抽吸除去培养基,用没有化合物的培养基进行更换,并且细胞培养在不存在化合物的情况下继续另外六天。在第7天,生成了以下样品:

[3332] 5.2ml“空白”培养基(不补充化合物)

[3333] 6.2ml在化合物存在下培养的培养基(洗前)

[3334] 7.2ml用于每个洗涤样品1-10的培养基

[3335] 8.细胞沉淀(洗后)

[3336] 通过使用细胞提升器(科斯塔公司(Costar),目录号3008)收集细胞。

[3337] 使用高分辨率LC-MS对培养基和细胞沉淀样品进行分析和定量。

[3338] 为了估计化合物实例编号48a的残留量,收集细胞沉淀和上清液。化合物实例编号48a的量通过LC-MS确定。将洗前培养基、洗涤培养基(表11)和细胞沉淀(表12)中的化合物实例编号48a浓度的估算进行总结。洗前培养基样品具有最高水平的化合物实例编号48a(约35nM至122nM范围)。洗后的沉淀具有较低、但可检测到的水平的化合物实例编号48a(皮摩尔级)。

[3339] 表11:化合物实例编号48a在洗前培养基和洗涤培养基中的浓度估算

[3340]	样品	体积 (mL)	化合物实例 编号 48a (nM) 一式三份#1	化合物实例 编号 48a (nM) 一式三份#2	化合物实例 编号 48a (nM) 一式三份#3
	洗前培养基	2	35.344	66.248	121.863
	洗涤培养基 1	2	0.408	0.614	0.712
	洗涤培养基 2	2	BLQ	0.003	0.002
	洗涤培养基 3	2	BLQ	BLQ	BLQ
	洗涤培养基 4	2	BLQ	BLQ	BLQ
	洗涤培养基 5	2	BLQ	BLQ	BLQ
	洗涤培养基 6	2	BLQ	BLQ	BLQ
	洗涤培养基 7	2	BLQ	BLQ	BLQ
	洗涤培养基 8	2	BLQ	BLQ	BLQ
	洗涤培养基 9	2	BLQ	BLQ	BLQ
	洗涤培养基 10	2	BLQ	BLQ	BLQ

[3341] 表12:细胞沉淀中的化合物实例编号48a的浓度估算

[3342]	样品	化合物 实例编 号 48a (nM)	化合物实 例编号 48a (pg/细 胞)	化合物 实例编 号 48a 的平均 值 (pg/ 细胞)	沉淀中 的细胞 数	总的化 合物实 例编号 48a (pg)
	洗涤后沉淀 1	0.004	$0.13 \times 10^{-6}$	$1.5 \times 10^{-6}$	$0.5 \times 10^6$	0.75
[3343]	洗涤后沉淀 2	0.071	$2.3 \times 10^{-6}$			
	洗涤后沉淀 3	0.065	$2.1 \times 10^{-6}$			

[3344] 化合物实例编号48a在来自三个孵育的洗前培养基中的数量范围为35.344nM-121.863nM。对于500,000个细胞,化合物实例编号48a在细胞沉淀中的平均量为0.75皮克。

[3345] 实例C16:通过AAV介导的LSC中 $\beta$ -2-微球蛋白基因的缺失降低免疫排斥

[3346] AAV载体设计:

[3347] 图30所示的载体图提供了用于在LSC中表达CRISPR系统的AAV载体的设计。所述载体表达了金黄色葡萄球菌Cas9 (Ran等人, Nature [自然]. 2015年四月9; 520 (7546): 186-191) 并且B2M特异性指导RNA插入在Aar I限制性位点。

[3348] 细胞转导:如实例B1所述获得的LSC在补充有LATS抑制剂化合物实例编号48a的X-VIV015培养基中培养。将LSC从人角膜分离后立即在悬浮液中转导,或在LSC分离后八天在分离、附着和在LATS抑制剂化合物中扩增以在35mm皮氏培养皿中达到50%-60%汇合后来转导LSC。LSC以10K、50K、100K或200K的MOI进行转导。将载体颗粒在由1xPBS+0.001% Pluronic构成的缓冲液中稀释,然后移液到培养皿中。单独的病毒颗粒存储缓冲液代表转

导阴性对照。在进行FACS分析和分选之前,将细胞在5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养72小时。

[3349] FACS分析:

[3350] 将LSC细胞用Accutase(赛默飞世尔公司(ThermoFisher),目录号A1110501)在5%CO<sub>2</sub>中在37℃下处理20分钟。刮下细胞后,通过使用含有10%血清的细胞培养基终止反应5,并转移至falcon管中进行离心步骤(1000rpm,5分钟)。吸出培养基后,将细胞重悬于200微升FACS缓冲液(PBS/10%FBS)中。

[3351] 为了分析B2M和HLA-ABC的表达,分别将5微升APC小鼠抗人Beta2-微球蛋白抗体(博奇公司(Biolegend),目录号316312)和20微升PE小鼠抗人类HLA-ABC抗体(BD生物科学公司(BD Biosciences),目录号560168)添加至细胞悬浮液中,并在冰上孵育30分钟。在进行抗体标记后用FACS缓冲液将细胞洗涤3次,并重悬于500微升的FACS缓冲液中。

[3352] 在FACS分选之前,将细胞通过70微米的过滤器过滤,并保存在冰上直至分选。为了防止细胞粘附在壁上,在分选之前,将收集管充满血清30分钟。使用人血清富集的LSC培养基,在BD FACSAria II仪器上将细胞分选到20个准备好的收集管中。使用BD FACSDiva软件分析FACS数据。

[3353] 图31中显示的结果表明,在MOI为200K时,AAV介导的CRISPR系统表达使B2M缺失并且随后HLA A、HLA B和HLA C的消除发生在24.9%的LSC中(当附着的细胞被转导时)以及20.0%的LSC中(当悬浮液中的细胞被转导时)。

[3354] 实例C17:通过AAV介导的CEC中β-2-微球蛋白基因的缺失降低免疫排斥

[3355] AAV载体设计:

[3356] 图30所示的载体图提供了用于在CEC中表达CRISPR系统的AAV载体的设计。所述载体表达了金黄色葡萄球菌Cas9(Ran等人,Nature[自然].2015年四月9;520(7546):186-191)并且B2M特异性指导RNA插入在Aar I限制性位点。

[3357] 细胞转导:

[3358] 如实例C1所述获得的细胞在37℃下用100微升Accutase(赛默飞世尔公司(ThermoFisher))与培养皿脱离10分钟,通过离心漂洗细胞悬液并铺板在6孔板(康宁公司(Corning))10中的角膜内皮细胞培养基(具有人血清的人内皮SF培养基(英杰公司(Invitrogen)))中,所述角膜内皮细胞培养基补充有浓度为10微摩尔的LATS抑制剂化合物实例编号133或实例编号49(在DMSO中稀释),或补充有不含化合物的单独的DMSO作为阴性对照。将细胞在37℃在5%CO<sub>2</sub>中培养。

[3359] 将CEC在6孔板(康宁公司(Corning))中的角膜内皮细胞培养基(具有人血清的人内皮SF培养基(英杰公司(Invitrogen)))中培养,所述角膜内皮细胞培养基补充有浓度为10微摩尔的LATS抑制剂化合物实例编号133或实例编号49(在DMSO中稀释)。在CEC分离后八天,在分离、附着和在LATS抑制剂化合物中扩增达到在6孔板中50%-60%汇合后转导CEC。CEC以0.1K、1K、5K、10K、20K或40K的MOI进行转导。将载体颗粒在由1xPBS+0.001%Pluronic构成的缓冲液中稀释,然后移液到培养皿中。单独的病毒颗粒存储缓冲液代表转导阴性对照。在进行FACS分析和分选之前,将细胞在5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养72小时。

[3360] FACS分析:

[3361] 将CEC细胞用Accutase(赛默飞世尔公司(ThermoFisher),目录号A1110501)在5%CO<sub>2</sub>中在37℃下处理20分钟。刮下细胞后,通过使用含有10%血清的细胞培养基终止反应5,

并转移至falcon管中进行离心步骤(1000rpm,5分钟)。吸出培养基后,将细胞重悬于200微升FACS缓冲液(PBS/10%FBS)中。

[3362] 为了分析B2M和HLA-ABC的表达,分别将5微升APC小鼠抗人Beta2-微球蛋白抗体(博奇公司(Biolegend),目录号316312)和20微升PE小鼠抗人类HLA-ABC抗体(BD生物科学公司(BD Biosciences),目录号560168)添加至细胞悬浮液中,并在冰上孵育30分钟。在进行抗体标记后用FACS缓冲液将细胞洗涤3次,并重悬于500微升的FACS缓冲液中。

[3363] 在FACS分选之前,将细胞通过70微米的过滤器过滤,并保存在冰上直至分选。为了防止细胞粘附在壁上,在分选之前,将收集管充满血清30分钟。使用人血清富集的CEC培养基,在BD FACSAria II仪器上将细胞分选到20个准备好的收集管中。使用BD FACSDiva软件分析FACS数据。

[3364] 图32中显示的结果显示,AAV介导的CRISPR系统(其使得能够缺失B2M,并随后消除HLA A、HLA B和HLA C)的表达。在MOI为40K时,B2M缺失发生在17%的CEC中。

[3365] 除非另外指明,否则没有详细地具体描述的所有方法、步骤、技术和操作可以并且已经按照本身已知的方式进行,这应是技术人员所清楚的。再次对例如本文提及的标准手册和普通背景技术和其中引用的另外的参考文献进行引用。除非另外指明,否则本文引用的每个参考文献都通过引用以其整体而并入。

[3366] 本发明的权利要求是非限制性的并且提供于下文中。尽管在此已经详细披露了具体实施例和权利要求,但是这仅是出于说明的目的以举例方式来进行的,并且这并不旨在对所附权利要求的范围或任何相应的未来申请的权利要求主题的范围加以限制。具体而言,本发明人考虑到,在不脱离如由权利要求定义的本披露的精神和范围的情况下,可以对本披露进行多种替代、改变和修饰。核酸起始材料、感兴趣的克隆或文库类型的选择被认为对于具有在此所述的实施例的知识的本领域普通技术人员而言是常规的。其他实施例、优点和修饰被认为落入下列权利要求的范围内。本领域的技术人员仅使用常规实验就将认识到或能够确定本文所述的本发明这些具体实施例的许多等效形式。



## 序列表

<110> 诺华股份有限公司 (NOVARTIS AG)

<120> 6-6稠合双环杂芳基化合物及其作为LATS抑制剂的用途

<130> PAT057699-WO-PCT

<140>

<141>

<150> 62/650, 232

<151> 2018-03-29

<150> 62/491, 475

<151> 2017-04-28

<150> 62/491, 484

<151> 2017-04-28

<150> 62/491, 573

<151> 2017-04-28

<150> 62/491, 526

<151> 2017-04-28

[0001] <160> 31

<170> PatentIn 版本3.5

<210> 1

<211> 1130

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Met Lys Arg Ser Glu Lys Pro Glu Gly Tyr Arg Gln Met Arg Pro Lys  
1 5 10 15

Thr Phe Pro Ala Ser Asn Tyr Thr Val Ser Ser Arg Gln Met Leu Gln  
20 25 30

Glu Ile Arg Glu Ser Leu Arg Asn Leu Ser Lys Pro Ser Asp Ala Ala  
35 40 45

Lys Ala Glu His Asn Met Ser Lys Met Ser Thr Glu Asp Pro Arg Gln  
50 55 60

Val Arg Asn Pro Pro Lys Phe Gly Thr His His Lys Ala Leu Gln Glu  
65 70 75 80

Ile Arg Asn Ser Leu Leu Pro Phe Ala Asn Glu Thr Asn Ser Ser Arg  
85 90 95

Ser Thr Ser Glu Val Asn Pro Gln Met Leu Gln Asp Leu Gln Ala Ala  
100 105 110

Gly Phe Asp Glu Asp Met Val Ile Gln Ala Leu Gln Lys Thr Asn Asn  
115 120 125

Arg Ser Ile Glu Ala Ala Ile Glu Phe Ile Ser Lys Met Ser Tyr Gln  
130 135 140

Asp Pro Arg Arg Glu Gln Met Ala Ala Ala Ala Arg Pro Ile Asn  
145 150 155 160

Ala Ser Met Lys Pro Gly Asn Val Gln Gln Ser Val Asn Arg Lys Gln  
165 170 175

Ser Trp Lys Gly Ser Lys Glu Ser Leu Val Pro Gln Arg His Gly Pro  
180 185 190

[0002]

Pro Leu Gly Glu Ser Val Ala Tyr His Ser Glu Ser Pro Asn Ser Gln  
195 200 205

Thr Asp Val Gly Arg Pro Leu Ser Gly Ser Gly Ile Ser Ala Phe Val  
210 215 220

Gln Ala His Pro Ser Asn Gly Gln Arg Val Asn Pro Pro Pro Pro Pro  
225 230 235 240

Gln Val Arg Ser Val Thr Pro Pro Pro Pro Pro Arg Gly Gln Thr Pro  
245 250 255

Pro Pro Arg Gly Thr Thr Pro Pro Pro Pro Ser Trp Glu Pro Asn Ser  
260 265 270

Gln Thr Lys Arg Tyr Ser Gly Asn Met Glu Tyr Val Ile Ser Arg Ile  
275 280 285

Ser Pro Val Pro Pro Gly Ala Trp Gln Glu Gly Tyr Pro Pro Pro Pro  
290 295 300

Leu Asn Thr Ser Pro Met Asn Pro Pro Asn Gln Gly Gln Arg Gly Ile  
305 310 315 320

Ser Ser Val Pro Val Gly Arg Gln Pro Ile Ile Met Gln Ser Ser Ser  
325 330 335

Lys Phe Asn Phe Pro Ser Gly Arg Pro Gly Met Gln Asn Gly Thr Gly  
340 345 350

Gln Thr Asp Phe Met Ile His Gln Asn Val Val Pro Ala Gly Thr Val  
355 360 365

Asn Arg Gln Pro Pro Pro Pro Tyr Pro Leu Thr Ala Ala Asn Gly Gln  
370 375 380

Ser Pro Ser Ala Leu Gln Thr Gly Gly Ser Ala Ala Pro Ser Ser Tyr  
385 390 395 400

Thr Asn Gly Ser Ile Pro Gln Ser Met Met Val Pro Asn Arg Asn Ser  
405 410 415

[0003]

His Asn Met Glu Leu Tyr Asn Ile Ser Val Pro Gly Leu Gln Thr Asn  
420 425 430

Trp Pro Gln Ser Ser Ser Ala Pro Ala Gln Ser Ser Pro Ser Ser Gly  
435 440 445

His Glu Ile Pro Thr Trp Gln Pro Asn Ile Pro Val Arg Ser Asn Ser  
450 455 460

Phe Asn Asn Pro Leu Gly Asn Arg Ala Ser His Ser Ala Asn Ser Gln  
465 470 475 480

Pro Ser Ala Thr Thr Val Thr Ala Ile Thr Pro Ala Pro Ile Gln Gln  
485 490 495

Pro Val Lys Ser Met Arg Val Leu Lys Pro Glu Leu Gln Thr Ala Leu  
500 505 510

Ala Pro Thr His Pro Ser Trp Ile Pro Gln Pro Ile Gln Thr Val Gln  
515 520 525

Pro Ser Pro Phe Pro Glu Gly Thr Ala Ser Asn Val Thr Val Met Pro  
530 535 540

Pro Val Ala Glu Ala Pro Asn Tyr Gln Gly Pro Pro Pro Pro Tyr Pro  
545 550 555 560

Lys His Leu Leu His Gln Asn Pro Ser Val Pro Pro Tyr Glu Ser Ile  
565 570 575

Ser Lys Pro Ser Lys Glu Asp Gln Pro Ser Leu Pro Lys Glu Asp Glu  
580 585 590

Ser Glu Lys Ser Tyr Glu Asn Val Asp Ser Gly Asp Lys Glu Lys Lys  
595 600 605

Gln Ile Thr Thr Ser Pro Ile Thr Val Arg Lys Asn Lys Lys Asp Glu  
610 615 620

Glu Arg Arg Glu Ser Arg Ile Gln Ser Tyr Ser Pro Gln Ala Phe Lys  
625 630 635 640

[0004]

Phe Phe Met Glu Gln His Val Glu Asn Val Leu Lys Ser His Gln Gln  
645 650 655

Arg Leu His Arg Lys Lys Gln Leu Glu Asn Glu Met Met Arg Val Gly  
660 665 670

Leu Ser Gln Asp Ala Gln Asp Gln Met Arg Lys Met Leu Cys Gln Lys  
675 680 685

Glu Ser Asn Tyr Ile Arg Leu Lys Arg Ala Lys Met Asp Lys Ser Met  
690 695 700

Phe Val Lys Ile Lys Thr Leu Gly Ile Gly Ala Phe Gly Glu Val Cys  
705 710 715 720

Leu Ala Arg Lys Val Asp Thr Lys Ala Leu Tyr Ala Thr Lys Thr Leu  
725 730 735

Arg Lys Lys Asp Val Leu Leu Arg Asn Gln Val Ala His Val Lys Ala  
740 745 750

Glu Arg Asp Ile Leu Ala Glu Ala Asp Asn Glu Trp Val Val Arg Leu  
755 760 765

Tyr Tyr Ser Phe Gln Asp Lys Asp Asn Leu Tyr Phe Val Met Asp Tyr  
770 775 780

Ile Pro Gly Gly Asp Met Met Ser Leu Leu Ile Arg Met Gly Ile Phe  
785 790 795 800

Pro Glu Ser Leu Ala Arg Phe Tyr Ile Ala Glu Leu Thr Cys Ala Val  
805 810 815

Glu Ser Val His Lys Met Gly Phe Ile His Arg Asp Ile Lys Pro Asp  
820 825 830

Asn Ile Leu Ile Asp Arg Asp Gly His Ile Lys Leu Thr Asp Phe Gly  
835 840 845

Leu Cys Thr Gly Phe Arg Trp Thr His Asp Ser Lys Tyr Tyr Gln Ser  
850 855 860

[0005]

Gly Asp His Pro Arg Gln Asp Ser Met Asp Phe Ser Asn Glu Trp Gly  
865 870 875 880

Asp Pro Ser Ser Cys Arg Cys Gly Asp Arg Leu Lys Pro Leu Glu Arg  
885 890 895

Arg Ala Ala Arg Gln His Gln Arg Cys Leu Ala His Ser Leu Val Gly  
900 905 910

Thr Pro Asn Tyr Ile Ala Pro Glu Val Leu Leu Arg Thr Gly Tyr Thr  
915 920 925

Gln Leu Cys Asp Trp Trp Ser Val Gly Val Ile Leu Phe Glu Met Leu  
930 935 940

Val Gly Gln Pro Pro Phe Leu Ala Gln Thr Pro Leu Glu Thr Gln Met  
945 950 955 960

Lys Val Ile Asn Trp Gln Thr Ser Leu His Ile Pro Pro Gln Ala Lys  
965 970 975

Leu Ser Pro Glu Ala Ser Asp Leu Ile Ile Lys Leu Cys Arg Gly Pro  
980 985 990

Glu Asp Arg Leu Gly Lys Asn Gly Ala Asp Glu Ile Lys Ala His Pro  
995 1000 1005

Phe Phe Lys Thr Ile Asp Phe Ser Ser Asp Leu Arg Gln Gln Ser  
1010 1015 1020

Ala Ser Tyr Ile Pro Lys Ile Thr His Pro Thr Asp Thr Ser Asn  
1025 1030 1035

Phe Asp Pro Val Asp Pro Asp Lys Leu Trp Ser Asp Asp Asn Glu  
1040 1045 1050

Glu Glu Asn Val Asn Asp Thr Leu Asn Gly Trp Tyr Lys Asn Gly  
1055 1060 1065

Lys His Pro Glu His Ala Phe Tyr Glu Phe Thr Phe Arg Arg Phe  
1070 1075 1080

[0006]

Phe Asp Asp Asn Gly Tyr Pro Tyr Asn Tyr Pro Lys Pro Ile Glu  
1085 1090 1095

Tyr Glu Tyr Ile Asn Ser Gln Gly Ser Glu Gln Gln Ser Asp Glu  
1100 1105 1110

Asp Asp Gln Asn Thr Gly Ser Glu Ile Lys Asn Arg Asp Leu Val  
1115 1120 1125

Tyr Val  
1130

<210> 2  
<211> 690  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 2  
Met Lys Arg Ser Glu Lys Pro Glu Gly Tyr Arg Gln Met Arg Pro Lys  
1 5 10 15

Thr Phe Pro Ala Ser Asn Tyr Thr Val Ser Ser Arg Gln Met Leu Gln

	20	25	30
	Glu Ile Arg Glu Ser Leu Arg Asn Leu Ser Lys Pro Ser Asp Ala Ala 35 40 45		
	Lys Ala Glu His Asn Met Ser Lys Met Ser Thr Glu Asp Pro Arg Gln 50 55 60		
	Val Arg Asn Pro Pro Lys Phe Gly Thr His His Lys Ala Leu Gln Glu 65 70 75 80		
	Ile Arg Asn Ser Leu Leu Pro Phe Ala Asn Glu Thr Asn Ser Ser Arg 85 90 95		
	Ser Thr Ser Glu Val Asn Pro Gln Met Leu Gln Asp Leu Gln Ala Ala 100 105 110		
	Gly Phe Asp Glu Asp Met Val Ile Gln Ala Leu Gln Lys Thr Asn Asn 115 120 125		
[0007]	Arg Ser Ile Glu Ala Ala Ile Glu Phe Ile Ser Lys Met Ser Tyr Gln 130 135 140		
	Asp Pro Arg Arg Glu Gln Met Ala Ala Ala Ala Arg Pro Ile Asn 145 150 155 160		
	Ala Ser Met Lys Pro Gly Asn Val Gln Gln Ser Val Asn Arg Lys Gln 165 170 175		
	Ser Trp Lys Gly Ser Lys Glu Ser Leu Val Pro Gln Arg His Gly Pro 180 185 190		
	Pro Leu Gly Glu Ser Val Ala Tyr His Ser Glu Ser Pro Asn Ser Gln 195 200 205		
	Thr Asp Val Gly Arg Pro Leu Ser Gly Ser Gly Ile Ser Ala Phe Val 210 215 220		
	Gln Ala His Pro Ser Asn Gly Gln Arg Val Asn Pro Pro Pro Pro Pro 225 230 235 240		
	Gln Val Arg Ser Val Thr Pro Pro Pro Pro Pro Arg Gly Gln Thr Pro		

	245					250					255				
	Pro	Pro	Arg	Gly	Thr	Thr	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	Trp	Glu	Pro	Asn Ser
				260					265					270	
	Gln	Thr	Lys	Arg	Tyr	Ser	Gly	Asn	Met	Glu	Tyr	Val	Ile	Ser	Arg Ile
			275					280					285		
	Ser	Pro	Val	Pro	Pro	Gly	Ala	Trp	Gln	Glu	Gly	Tyr	Pro	Pro	Pro Pro
		290					295					300			
	Leu	Asn	Thr	Ser	Pro	Met	Asn	Pro	Pro	Asn	Gln	Gly	Gln	Arg	Gly Ile
	305					310					315				320
	Ser	Ser	Val	Pro	Val	Gly	Arg	Gln	Pro	Ile	Ile	Met	Gln	Ser	Ser Ser
					325					330					335
	Lys	Phe	Asn	Phe	Pro	Ser	Gly	Arg	Pro	Gly	Met	Gln	Asn	Gly	Thr Gly
				340					345					350	
[0008]	Gln	Thr	Asp	Phe	Met	Ile	His	Gln	Asn	Val	Val	Pro	Ala	Gly	Thr Val
			355					360					365		
	Asn	Arg	Gln	Pro	Pro	Pro	Pro	Tyr	Pro	Leu	Thr	Ala	Ala	Asn	Gly Gln
		370					375					380			
	Ser	Pro	Ser	Ala	Leu	Gln	Thr	Gly	Gly	Ser	Ala	Ala	Pro	Ser	Ser Tyr
	385					390					395				400
	Thr	Asn	Gly	Ser	Ile	Pro	Gln	Ser	Met	Met	Val	Pro	Asn	Arg	Asn Ser
					405					410					415
	His	Asn	Met	Glu	Leu	Tyr	Asn	Ile	Ser	Val	Pro	Gly	Leu	Gln	Thr Asn
				420					425					430	
	Trp	Pro	Gln	Ser	Ser	Ser	Ala	Pro	Ala	Gln	Ser	Ser	Pro	Ser	Ser Gly
			435					440					445		
	His	Glu	Ile	Pro	Thr	Trp	Gln	Pro	Asn	Ile	Pro	Val	Arg	Ser	Asn Ser
		450					455					460			
	Phe	Asn	Asn	Pro	Leu	Gly	Asn	Arg	Ala	Ser	His	Ser	Ala	Asn	Ser Gln



	465			470				475					480			
	Pro	Ser	Ala	Thr	Thr	Val	Thr	Ala	Ile	Thr	Pro	Ala	Pro	Ile	Gln	Gln
				485						490					495	
	Pro	Val	Lys	Ser	Met	Arg	Val	Leu	Lys	Pro	Glu	Leu	Gln	Thr	Ala	Leu
			500						505					510		
	Ala	Pro	Thr	His	Pro	Ser	Trp	Ile	Pro	Gln	Pro	Ile	Gln	Thr	Val	Gln
			515					520					525			
	Pro	Ser	Pro	Phe	Pro	Glu	Gly	Thr	Ala	Ser	Asn	Val	Thr	Val	Met	Pro
		530					535					540				
	Pro	Val	Ala	Glu	Ala	Pro	Asn	Tyr	Gln	Gly	Pro	Pro	Pro	Pro	Tyr	Pro
	545					550					555					560
	Lys	His	Leu	Leu	His	Gln	Asn	Pro	Ser	Val	Pro	Pro	Tyr	Glu	Ser	Ile
				565						570					575	
[0009]	Ser	Lys	Pro	Ser	Lys	Glu	Asp	Gln	Pro	Ser	Leu	Pro	Lys	Glu	Asp	Glu
			580						585					590		
	Ser	Glu	Lys	Ser	Tyr	Glu	Asn	Val	Asp	Ser	Gly	Asp	Lys	Glu	Lys	Lys
			595					600					605			
	Gln	Ile	Thr	Thr	Ser	Pro	Ile	Thr	Val	Arg	Lys	Asn	Lys	Lys	Asp	Glu
		610					615					620				
	Glu	Arg	Arg	Glu	Ser	Arg	Ile	Gln	Ser	Tyr	Ser	Pro	Gln	Ala	Phe	Lys
	625					630					635					640
	Phe	Phe	Met	Glu	Gln	His	Val	Glu	Asn	Val	Leu	Lys	Ser	His	Gln	Gln
				645						650					655	
	Arg	Leu	His	Arg	Lys	Lys	Gln	Leu	Glu	Asn	Glu	Met	Met	Arg	Val	Lys
			660						665					670		
	Pro	Phe	Lys	Met	Ser	Ile	Phe	Ile	Leu	Asn	His	Leu	Phe	Ala	Trp	Cys
			675					680					685			
	Leu	Phe														

690

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1088

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 3

Met Arg Pro Lys Thr Phe Pro Ala Thr Thr Tyr Ser Gly Asn Ser Arg  
1 5 10 15

Gln Arg Leu Gln Glu Ile Arg Glu Gly Leu Lys Gln Pro Ser Lys Ser  
20 25 30

Ser Val Gln Gly Leu Pro Ala Gly Pro Asn Ser Asp Thr Ser Leu Asp  
35 40 45

Ala Lys Val Leu Gly Ser Lys Asp Ala Thr Arg Gln Gln Gln Gln Met  
50 55 60

Arg Ala Thr Pro Lys Phe Gly Pro Tyr Gln Lys Ala Leu Arg Glu Ile  
65 70 75 80

[0010]

Arg Tyr Ser Leu Leu Pro Phe Ala Asn Glu Ser Gly Thr Ser Ala Ala  
85 90 95

Ala Glu Val Asn Arg Gln Met Leu Gln Glu Leu Val Asn Ala Gly Cys  
100 105 110

Asp Gln Glu Met Ala Gly Arg Ala Leu Lys Gln Thr Gly Ser Arg Ser  
115 120 125

Ile Glu Ala Ala Leu Glu Tyr Ile Ser Lys Met Gly Tyr Leu Asp Pro  
130 135 140

Arg Asn Glu Gln Ile Val Arg Val Ile Lys Gln Thr Ser Pro Gly Lys  
145 150 155 160

Gly Leu Met Pro Thr Pro Val Thr Arg Arg Pro Ser Phe Glu Gly Thr  
165 170 175

Gly Asp Ser Phe Ala Ser Tyr His Gln Leu Ser Gly Thr Pro Tyr Glu  
180 185 190

Gly Pro Ser Phe Gly Ala Asp Gly Pro Thr Ala Leu Glu Glu Met Pro  
195 200 205

Arg Pro Tyr Val Asp Tyr Leu Phe Pro Gly Val Gly Pro His Gly Pro  
210 215 220

Gly His Gln His Gln His Pro Pro Lys Gly Tyr Gly Ala Ser Val Glu  
225 230 235 240

Ala Ala Gly Ala His Phe Pro Leu Gln Gly Ala His Tyr Gly Arg Pro  
245 250 255

His Leu Leu Val Pro Gly Glu Pro Leu Gly Tyr Gly Val Gln Arg Ser  
260 265 270

Pro Ser Phe Gln Ser Lys Thr Pro Pro Glu Thr Gly Gly Tyr Ala Ser  
275 280 285

Leu Pro Thr Lys Gly Gln Gly Gly Pro Pro Gly Ala Gly Leu Ala Phe  
290 295 300

[0011]

Pro Pro Pro Ala Ala Gly Leu Tyr Val Pro His Pro His His Lys Gln  
305 310 315 320

Ala Gly Pro Ala Ala His Gln Leu His Val Leu Gly Ser Arg Ser Gln  
325 330 335

Val Phe Ala Ser Asp Ser Pro Pro Gln Ser Leu Leu Thr Pro Ser Arg  
340 345 350

Asn Ser Leu Asn Val Asp Leu Tyr Glu Leu Gly Ser Thr Ser Val Gln  
355 360 365

Gln Trp Pro Ala Ala Thr Leu Ala Arg Arg Asp Ser Leu Gln Lys Pro  
370 375 380

Gly Leu Glu Ala Pro Pro Arg Ala His Val Ala Phe Arg Pro Asp Cys  
385 390 395 400

Pro Val Pro Ser Arg Thr Asn Ser Phe Asn Ser His Gln Pro Arg Pro  
405 410 415

Gly Pro Pro Gly Lys Ala Glu Pro Ser Leu Pro Ala Pro Asn Thr Val  
420 425 430

Thr Ala Val Thr Ala Ala His Ile Leu His Pro Val Lys Ser Val Arg  
435 440 445

Val Leu Arg Pro Glu Pro Gln Thr Ala Val Gly Pro Ser His Pro Ala  
450 455 460

Trp Val Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala  
465 470 475 480

Ala Glu Gly Leu Asp Ala Lys Glu Glu His Ala Leu Ala Leu Gly Gly  
485 490 495

Ala Gly Ala Phe Pro Leu Asp Val Glu Tyr Gly Gly Pro Asp Arg Arg  
500 505 510

Cys Pro Pro Pro Pro Tyr Pro Lys His Leu Leu Leu Arg Ser Lys Ser  
515 520 525

[0012]

Glu Gln Tyr Asp Leu Asp Ser Leu Cys Ala Gly Met Glu Gln Ser Leu  
530 535 540

Arg Ala Gly Pro Asn Glu Pro Glu Gly Gly Asp Lys Ser Arg Lys Ser  
545 550 555 560

Ala Lys Gly Asp Lys Gly Gly Lys Asp Lys Lys Gln Ile Gln Thr Ser  
565 570 575

Pro Val Pro Val Arg Lys Asn Ser Arg Asp Glu Glu Lys Arg Glu Ser  
580 585 590

Arg Ile Lys Ser Tyr Ser Pro Tyr Ala Phe Lys Phe Phe Met Glu Gln  
595 600 605

His Val Glu Asn Val Ile Lys Thr Tyr Gln Gln Lys Val Asn Arg Arg  
610 615 620

Leu Gln Leu Glu Gln Glu Met Ala Lys Ala Gly Leu Cys Glu Ala Glu  
625 630 635 640

Gln Glu Gln Met Arg Lys Ile Leu Tyr Gln Lys Glu Ser Asn Tyr Asn  
645 650 655

Arg Leu Lys Arg Ala Lys Met Asp Lys Ser Met Phe Val Lys Ile Lys  
660 665 670

Thr Leu Gly Ile Gly Ala Phe Gly Glu Val Cys Leu Ala Cys Lys Val  
675 680 685

Asp Thr His Ala Leu Tyr Ala Met Lys Thr Leu Arg Lys Lys Asp Val  
690 695 700

Leu Asn Arg Asn Gln Val Ala His Val Lys Ala Glu Arg Asp Ile Leu  
705 710 715 720

Ala Glu Ala Asp Asn Glu Trp Val Val Lys Leu Tyr Tyr Ser Phe Gln  
725 730 735

Asp Lys Asp Ser Leu Tyr Phe Val Met Asp Tyr Ile Pro Gly Gly Asp  
740 745 750

[0013]

Met Met Ser Leu Leu Ile Arg Met Glu Val Phe Pro Glu His Leu Ala  
755 760 765

Arg Phe Tyr Ile Ala Glu Leu Thr Leu Ala Ile Glu Ser Val His Lys  
770 775 780

Met Gly Phe Ile His Arg Asp Ile Lys Pro Asp Asn Ile Leu Ile Asp  
785 790 795 800

Leu Asp Gly His Ile Lys Leu Thr Asp Phe Gly Leu Cys Thr Gly Phe  
805 810 815

Arg Trp Thr His Asn Ser Lys Tyr Tyr Gln Lys Gly Ser His Val Arg  
820 825 830

Gln Asp Ser Met Glu Pro Ser Asp Leu Trp Asp Asp Val Ser Asn Cys  
835 840 845

Arg Cys Gly Asp Arg Leu Lys Thr Leu Glu Gln Arg Ala Arg Lys Gln  
850 855 860

His Gln Arg Cys Leu Ala His Ser Leu Val Gly Thr Pro Asn Tyr Ile  
865 870 875 880

Ala Pro Glu Val Leu Leu Arg Lys Gly Tyr Thr Gln Leu Cys Asp Trp  
885 890 895

Trp Ser Val Gly Val Ile Leu Phe Glu Met Leu Val Gly Gln Pro Pro  
900 905 910

Phe Leu Ala Pro Thr Pro Thr Glu Thr Gln Leu Lys Val Ile Asn Trp  
915 920 925

Glu Asn Thr Leu His Ile Pro Ala Gln Val Lys Leu Ser Pro Glu Ala  
930 935 940

Arg Asp Leu Ile Thr Lys Leu Cys Cys Ser Ala Asp His Arg Leu Gly  
945 950 955 960

Arg Asn Gly Ala Asp Asp Leu Lys Ala His Pro Phe Phe Ser Ala Ile  
965 970 975

[0014]

Asp Phe Ser Ser Asp Ile Arg Lys Gln Pro Ala Pro Tyr Val Pro Thr  
980 985 990

Ile Ser His Pro Met Asp Thr Ser Asn Phe Asp Pro Val Asp Glu Glu  
995 1000 1005

Ser Pro Trp Asn Asp Ala Ser Glu Gly Ser Thr Lys Ala Trp Asp  
1010 1015 1020

Thr Leu Thr Ser Pro Asn Asn Lys His Pro Glu His Ala Phe Tyr  
1025 1030 1035

Glu Phe Thr Phe Arg Arg Phe Phe Asp Asp Asn Gly Tyr Pro Phe  
1040 1045 1050

Arg Cys Pro Lys Pro Ser Gly Ala Glu Ala Ser Gln Ala Glu Ser  
1055 1060 1065

Ser Asp Leu Glu Ser Ser Asp Leu Val Asp Gln Thr Glu Gly Cys  
1070 1075 1080

Gln Pro Val Tyr Val  
1085

<210> 4  
<211> 5  
<212> DNA  
<213> 未知

<220>  
<221> 来源  
<223> /注释= “未知的描述：  
靶序列”

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (1).. (1)  
<223> a, c, t, g, 未知或其他

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (4).. (4)  
<223> a, c, t, g, 未知或其他

<400> 4  
nggng

5

[0015]

<210> 5  
<211> 7  
<212> DNA  
<213> 未知

<220>  
<221> 来源  
<223> /注释= “未知的描述：  
靶序列”

<220>  
<221> 修饰的碱基  
<222> (1).. (2)  
<223> a, c, t, g, 未知或其他

<400> 5  
nnagaaw

7

<210> 6  
<211> 5  
<212> DNA  
<213> 未知

<220>

	<p>&lt;221&gt; 来源 &lt;223&gt; /注释= “未知的描述： 靶序列”</p>	
	<p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; 修饰的碱基 &lt;222&gt; (1).. (2) &lt;223&gt; a, c, t, g, 未知或其他</p>	
	<p>&lt;400&gt; 6 nngrr</p>	5
	<p>&lt;210&gt; 7 &lt;211&gt; 8 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; 未知</p>	
	<p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; 来源 &lt;223&gt; /注释= “未知的描述： 靶序列”</p>	
[0016]	<p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; 修饰的碱基 &lt;222&gt; (1).. (4) &lt;223&gt; a, c, t, g, 未知或其他</p>	
	<p>&lt;400&gt; 7 nnnngatt</p>	8
	<p>&lt;210&gt; 8 &lt;211&gt; 7 &lt;212&gt; PRT &lt;213&gt; 猿猴病毒 40</p>	
	<p>&lt;400&gt; 8 Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val 1 5</p>	
	<p>&lt;210&gt; 9 &lt;211&gt; 42 &lt;212&gt; RNA &lt;213&gt; 人工序列</p>	
	<p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; 来源 &lt;223&gt; /注释= “人工序列的描述：合成的 寡核苷酸”</p>	
	<p>&lt;220&gt;</p>	



	<221> 修饰的碱基 <222> (1).. (20) <223> a, c, u, g, 未知或其他	
	<400> 9 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uaugcuguuu ug	42
	<210> 10 <211> 86 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <221> 来源 <223> /注释= “人工序列的描述：合成的寡核苷酸”	
	<220> <221> 尚未归类的特征 <222> (80).. (86) <223> /注释= “该区可以包含1-7个核苷酸”	
[0017]	<220> <221> 尚未归类的特征 <222> (80).. (86) <223> /注释= “该区可以存在或可以不存在”	
	<220> <221> 来源 <223> /注释= “有关取代和优选实施例的详细说明，请参见所提交的说明书”	
	<400> 10 aacuuaccaa ggaacagcau agcaaguuaa aaauaggcua guccguuauc aacuugaaaa	60
	aguggcaccg agucggugcu uuuuuu	86
	<210> 11 <211> 74 <212> RNA <213> 人工序列	
	<220> <221> 来源 <223> /注释= “人工序列的描述：合成的寡核苷酸”	
	<220> <221> 尚未归类的特征 <222> (68).. (74) <223> /注释= “该区可以包含1-7个核苷酸”	
	<220>	

	<221> 尚未归类的特征	
	<222> (68).. (74)	
	<223> /注释="该区可以存在或可以不存在"	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="有关取代和优选实施例的详细说明, 请参见所提交的说明书"	
	<400> 11	
	aacagcauag caaguuaaaa uaaggcuagu ccguuaucua cuugaaaaag uggcaccgag	60
	ucggugcuuu uuuu	74
	<210> 12	
	<211> 102	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成的多核苷酸"	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
[0018]	<222> (1).. (19)	
	<223> a, c, u, g, 未知或其他	
	<220>	
	<221> 尚未归类的特征	
	<222> (96).. (102)	
	<223> /注释="该区可以包含1-7个核苷酸"	
	<220>	
	<221> 尚未归类的特征	
	<222> (96).. (102)	
	<223> /注释="该区可以存在或可以不存在"	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="有关取代和优选实施例的详细说明, 请参见所提交的说明书"	
	<400> 12	
	nnnnnnnnnn nnnnnnnnng uuuuagagcu agaaauagca aguuaaaaua aggcuagucc	60
	guuaucaacu ugaaaaagug gcaccgaguc ggugcuuuuu uu	102
	<210> 13	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 未知	
	<220>	

	<p>&lt;221&gt; 来源 &lt;223&gt; /注释= “未知的描述： 靶序列”</p>	
	<p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; 修饰的碱基 &lt;222&gt; (1).. (18) &lt;223&gt; a, c, t, 或g</p>	
	<p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; 修饰的碱基 &lt;222&gt; (19).. (19) &lt;223&gt; a, c, t, g, 未知或其他</p>	
	<p>&lt;400&gt; 13 nnnnnnnnnn nnnnnnnng g</p>	21
	<p>&lt;210&gt; 14 &lt;211&gt; 19 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; 未知</p>	
[0019]	<p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; 来源 &lt;223&gt; /注释= “未知的描述： 靶序列”</p>	
	<p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; 修饰的碱基 &lt;222&gt; (1).. (16) &lt;223&gt; a, c, t, 或g</p>	
	<p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; 修饰的碱基 &lt;222&gt; (17).. (17) &lt;223&gt; a, c, t, g, 未知或其他</p>	
	<p>&lt;400&gt; 14 nnnnnnnnnn nnnnnnngg</p>	19
	<p>&lt;210&gt; 15 &lt;211&gt; 21 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; 未知</p>	
	<p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; 来源 &lt;223&gt; /注释= “未知的描述： 靶序列”</p>	
	<p>&lt;220&gt;</p>	

	<p>&lt;221&gt; 修饰的碱基 &lt;222&gt; (1)..(14) &lt;223&gt; a, c, t, 或g</p> <p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; 修饰的碱基 &lt;222&gt; (15)..(16) &lt;223&gt; a, c, t, g, 未知或其他</p> <p>&lt;400&gt; 15 nnnnnnnnnn nnnnnnagaa w</p>	21
	<p>&lt;210&gt; 16 &lt;211&gt; 21 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; 未知</p> <p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; 来源 &lt;223&gt; /注释= “未知的描述: 靶序列”</p> <p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; 修饰的碱基 &lt;222&gt; (1)..(14) &lt;223&gt; a, c, t, 或g</p>	
[0020]	<p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; 修饰的碱基 &lt;222&gt; (15)..(16) &lt;223&gt; a, c, t, g, 未知或其他</p> <p>&lt;400&gt; 16 nnnnnnnnnn nnnnnnagaa w</p>	21
	<p>&lt;210&gt; 17 &lt;211&gt; 23 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; 未知</p> <p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; 来源 &lt;223&gt; /注释= “未知的描述: 靶序列”</p> <p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; 修饰的碱基 &lt;222&gt; (1)..(18) &lt;223&gt; a, c, t, 或g</p> <p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; 修饰的碱基</p>	

	<p>&lt;222&gt; (19).. (19) &lt;223&gt; a, c, t, g, 未知或其他</p> <p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; 修饰的碱基 &lt;222&gt; (22).. (22) &lt;223&gt; a, c, t, g, 未知或其他</p> <p>&lt;400&gt; 17 nnnnnnnnnnn nnnnnnnnng gng</p>	23
	<p>&lt;210&gt; 18 &lt;211&gt; 16 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; 未知</p> <p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; 来源 &lt;223&gt; /注释= “未知的描述: 靶序列”</p> <p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; 修饰的碱基 &lt;222&gt; (1).. (11) &lt;223&gt; a, c, t, 或g</p>	
[0021]	<p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; 修饰的碱基 &lt;222&gt; (12).. (12) &lt;223&gt; a, c, t, g, 未知或其他</p> <p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; 修饰的碱基 &lt;222&gt; (15).. (15) &lt;223&gt; a, c, t, g, 未知或其他</p> <p>&lt;400&gt; 18 nnnnnnnnnnn nnggng</p>	16
	<p>&lt;210&gt; 19 &lt;211&gt; 8 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; 未知</p> <p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; 来源 &lt;223&gt; /注释= “未知的描述: 靶序列”</p> <p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; 修饰的碱基 &lt;222&gt; (1).. (4)</p>	

	<p>&lt;223&gt; a, c, t, g, 未知或其他</p> <p>&lt;400&gt; 19 nnnngatt</p>	8
	<p>&lt;210&gt; 20 &lt;211&gt; 8 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; 未知</p> <p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; 来源 &lt;223&gt; /注释= “未知的描述: 靶序列”</p> <p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; 修饰的碱基 &lt;222&gt; (1).. (4) &lt;223&gt; a, c, t, g, 未知或其他</p> <p>&lt;400&gt; 20 nnnngctt</p>	8
[0022]	<p>&lt;210&gt; 21 &lt;211&gt; 6 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; 未知</p> <p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; 来源 &lt;223&gt; /注释= “未知的描述: 靶序列”</p> <p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; 修饰的碱基 &lt;222&gt; (1).. (2) &lt;223&gt; a, c, t, g, 未知或其他</p> <p>&lt;400&gt; 21 nngrrt</p>	6
	<p>&lt;210&gt; 22 &lt;211&gt; 6 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; 未知</p> <p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; 来源 &lt;223&gt; /注释= “未知的描述: 靶序列”</p>	

	<220>		
	<221>	修饰的碱基	
	<222>	(1).. (2)	
	<223>	a, c, t, g, 未知或其他	
	<400>	22	
	nngrrv		6
	<210>	23	
	<211>	9	
	<212>	PRT	
	<213>	未知	
	<220>		
	<221>	来源	
	<223>	/注释= “未知的描述: 'LAGLIDADG' 家族肽基序序列”	
	<400>	23	
	Leu Ala Gly Leu Ile Asp Ala Asp Gly		
	1 5		
	<210>	24	
	<211>	10	
	<212>	PRT	
[0023]	<213>	人工序列	
	<220>		
	<221>	来源	
	<223>	/注释= “人工序列的描述: 合成的 肽”	
	<400>	24	
	Lys Lys Leu Arg Arg Thr Leu Ser Val Ala		
	1 5 10		
	<210>	25	
	<211>	6	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<221>	来源	
	<223>	/注释= “人工序列的描述: 合成的 6xHis 标签”	
	<400>	25	
	His His His His His His		
	1 5		
	<210>	26	

- <211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列
- <220>  
<221> 来源  
<223> /注释= “人工序列的描述：合成的  
8xHis 标签”
- <400> 26  
His His His His His His His His  
1 5
- <210> 27  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工序列
- <220>  
<221> 来源  
<223> /注释= “人工序列的描述：合成的  
肽”
- [0024] <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> 正缬氨酸
- <400> 27  
Xaa Lys Lys Arg Asn Arg Arg Leu Ser Val Ala  
1 5 10
- <210> 28  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列
- <220>  
<221> 来源  
<223> /注释= “人工序列的描述：合成的  
肽”
- <400> 28  
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
1 5
- <210> 29  
<211> 13  
<212> DNA  
<213> 未知
- <220>



	<p>&lt;221&gt; 来源 &lt;223&gt; /注释= “未知的描述： 靶序列”</p>	
	<p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; 修饰的碱基 &lt;222&gt; (1).. (6) &lt;223&gt; a, c, t, 或g</p>	
	<p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; 修饰的碱基 &lt;222&gt; (7).. (8) &lt;223&gt; a, c, t, g, 未知或其他</p>	
	<p>&lt;400&gt; 29 nnnnnnnnag aaw</p>	13
	<p>&lt;210&gt; 30 &lt;211&gt; 18 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; 未知</p>	
[0025]	<p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; 来源 &lt;223&gt; /注释= “未知的描述： 靶序列”</p>	
	<p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; 修饰的碱基 &lt;222&gt; (1).. (11) &lt;223&gt; a, c, t, 或g</p>	
	<p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; 修饰的碱基 &lt;222&gt; (12).. (13) &lt;223&gt; a, c, t, g, 未知或其他</p>	
	<p>&lt;400&gt; 30 nnnnnnnnnn nnnagaaw</p>	18
	<p>&lt;210&gt; 31 &lt;211&gt; 25 &lt;212&gt; DNA &lt;213&gt; 未知</p>	
	<p>&lt;220&gt; &lt;221&gt; 来源 &lt;223&gt; /注释= “未知的描述： 靶序列”</p>	
	<p>&lt;220&gt;</p>	

	<221> 修饰的碱基	
	<222> (1).. (20)	
	<223> a, c, t, 或g	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (21).. (21)	
[0026]	<223> a, c, t, g, 未知或其他	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (24).. (24)	
	<223> a, c, t, g, 未知或其他	
	<400> 31	
	nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nggng	25

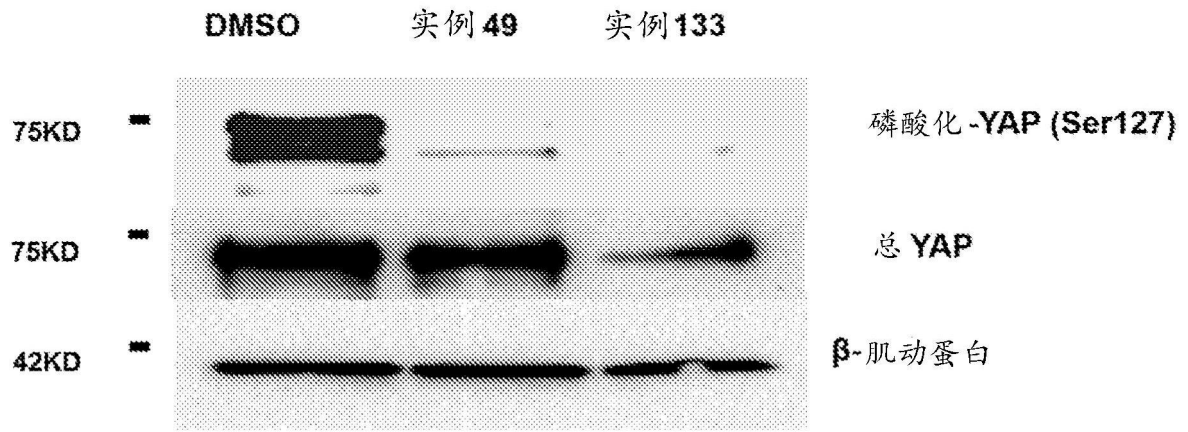


图1

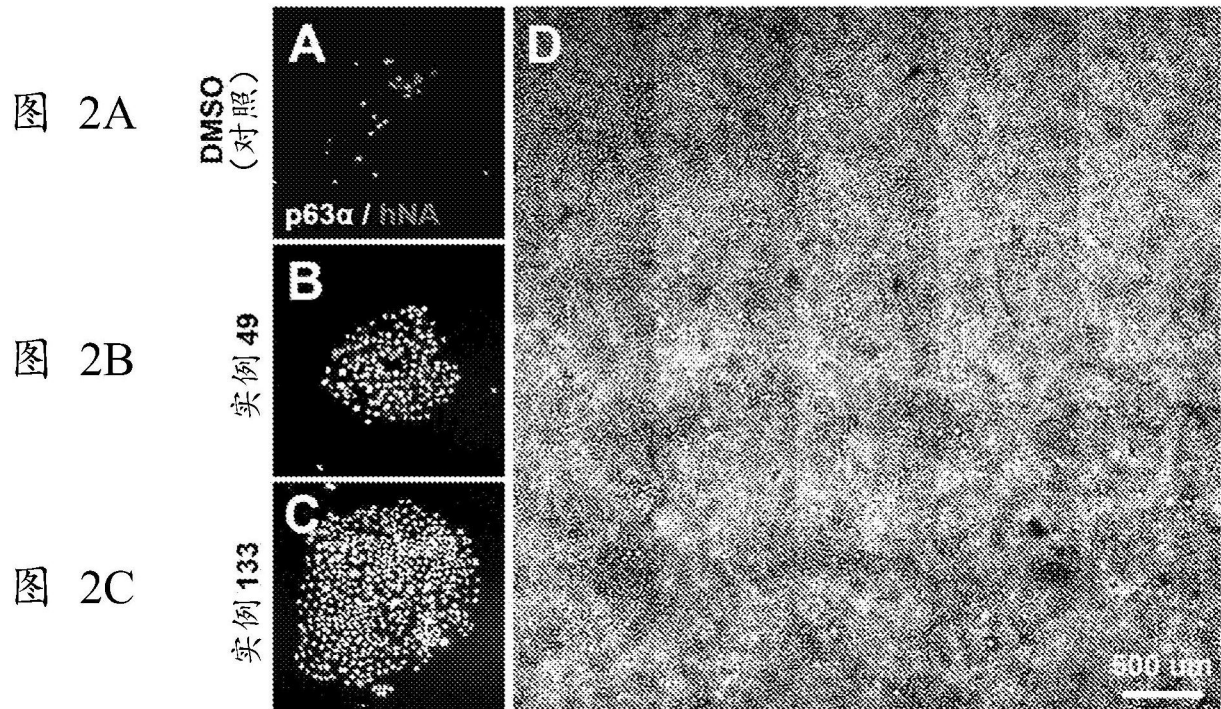


图 2D

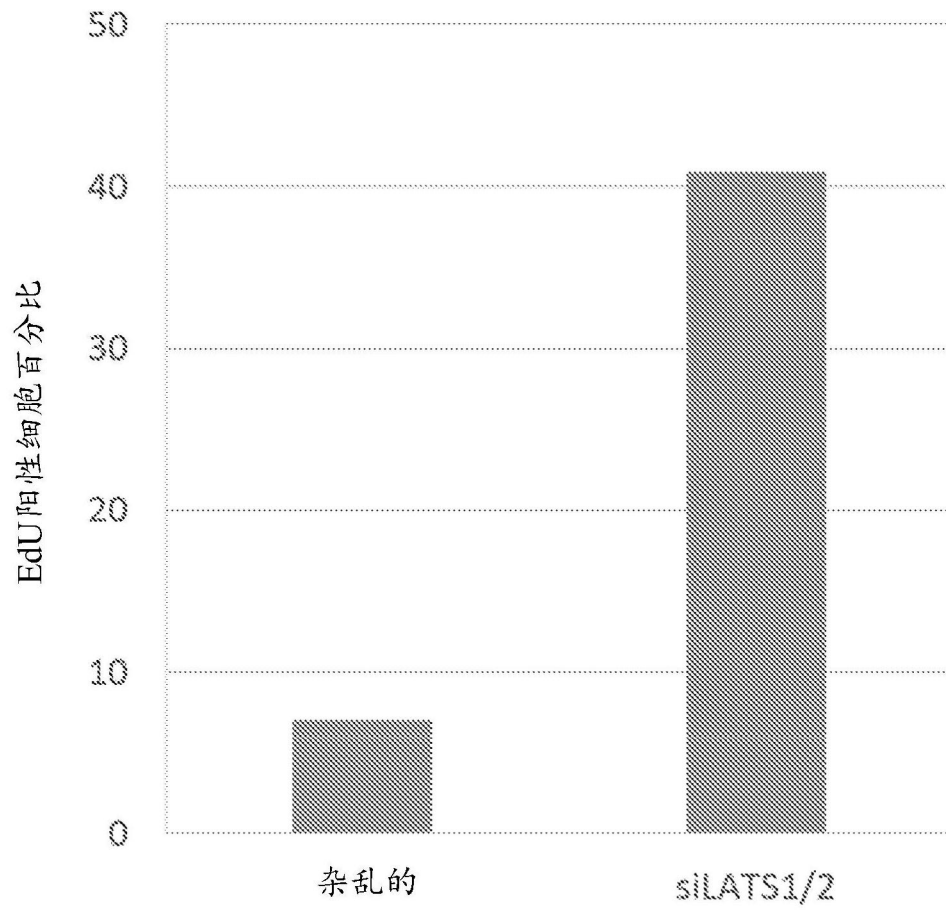


图3

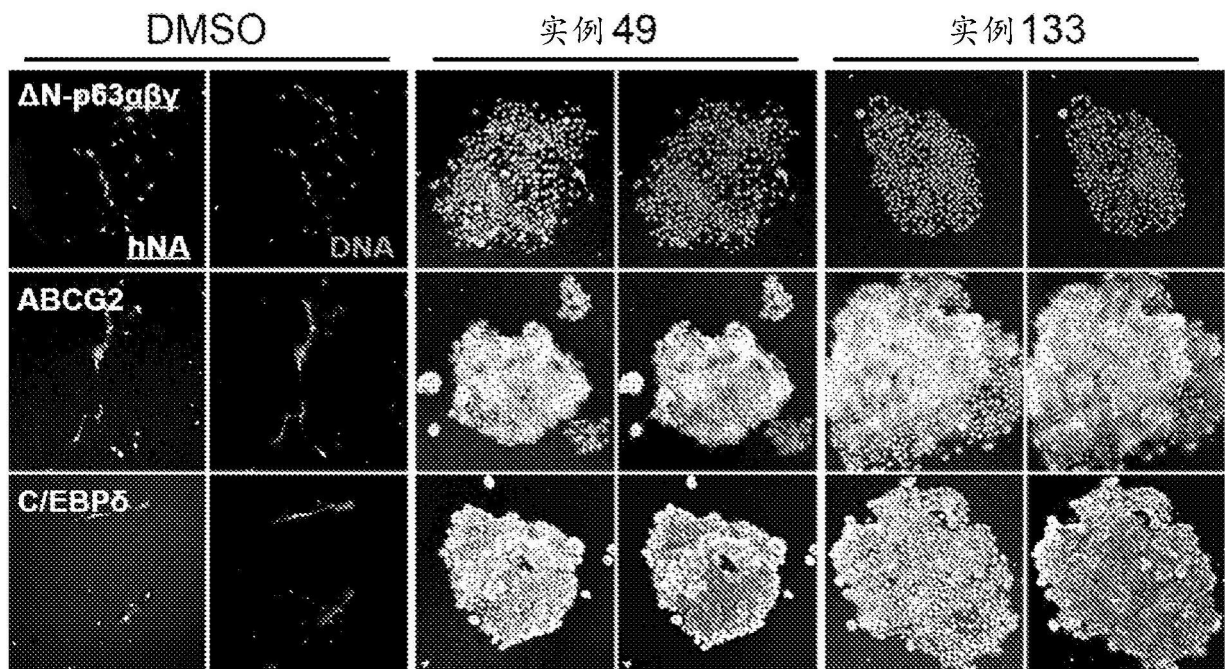


图4

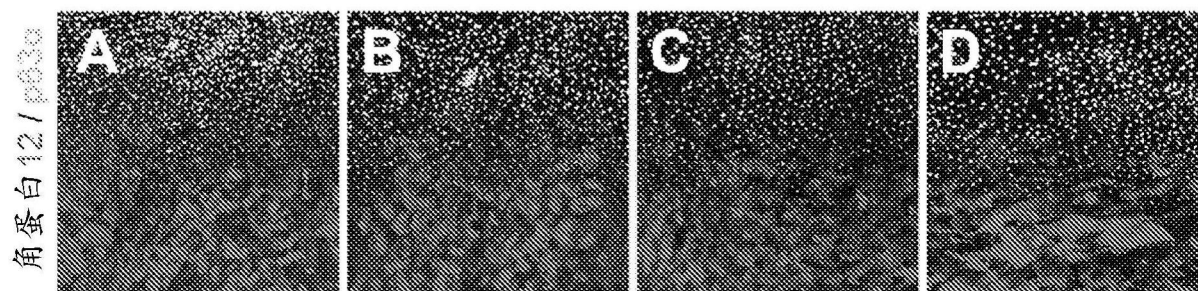


图 5A

图 5B

图 5C

图 5D

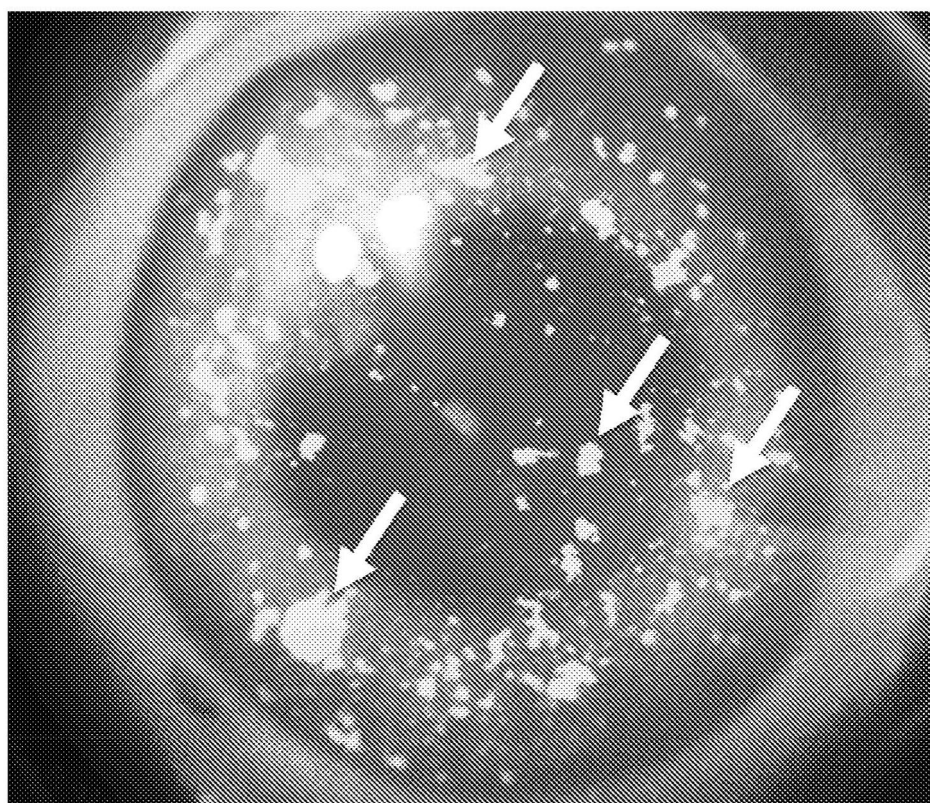


图6

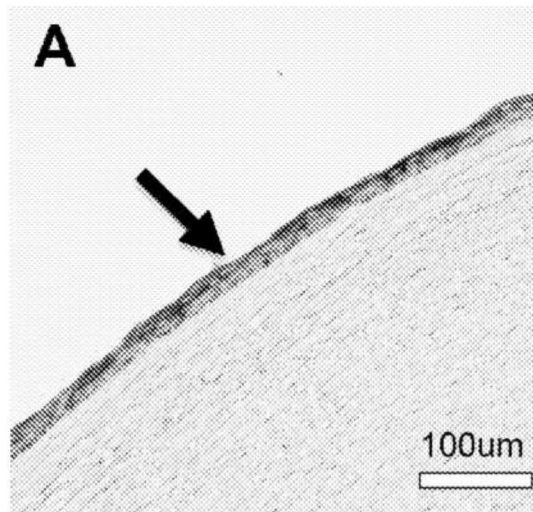


图7A

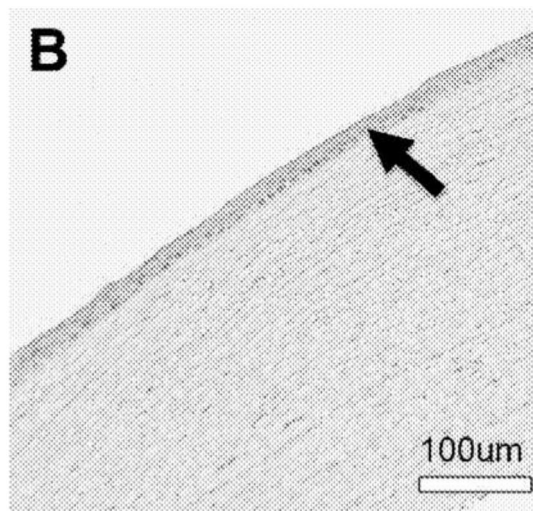


图7B

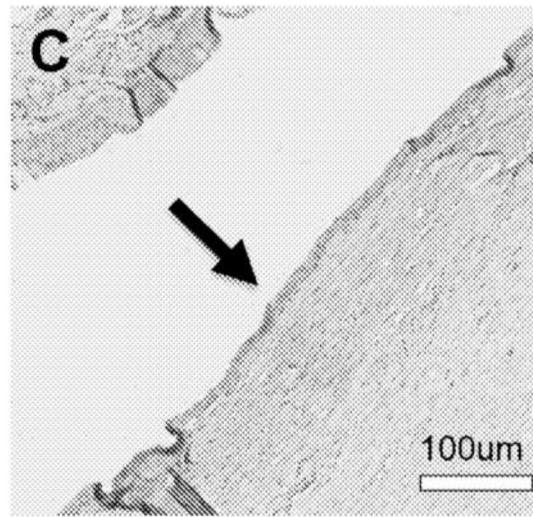


图7C

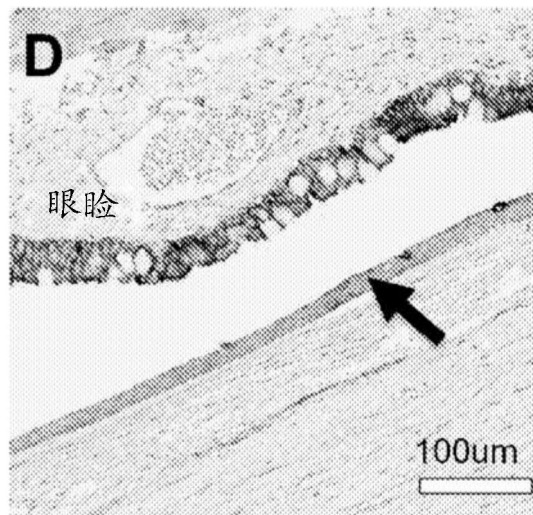


图7D

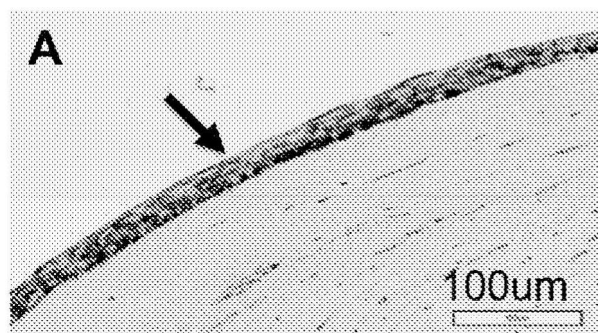


图8A



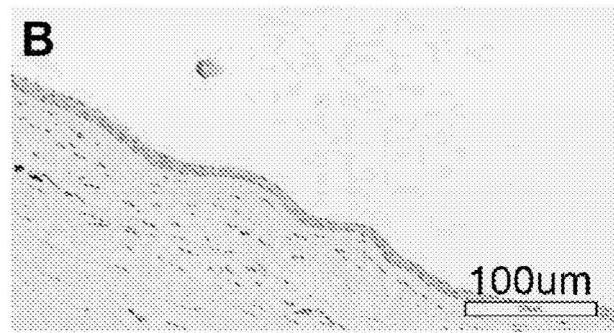


图8B

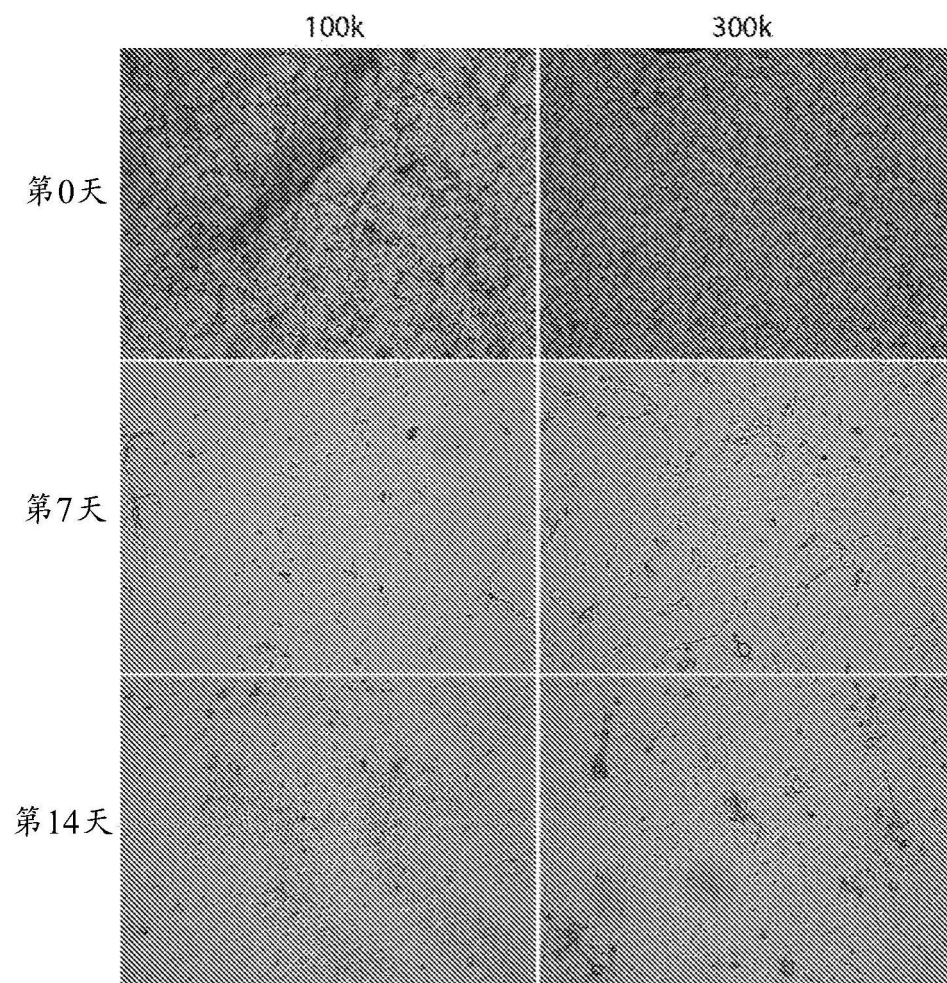


图9



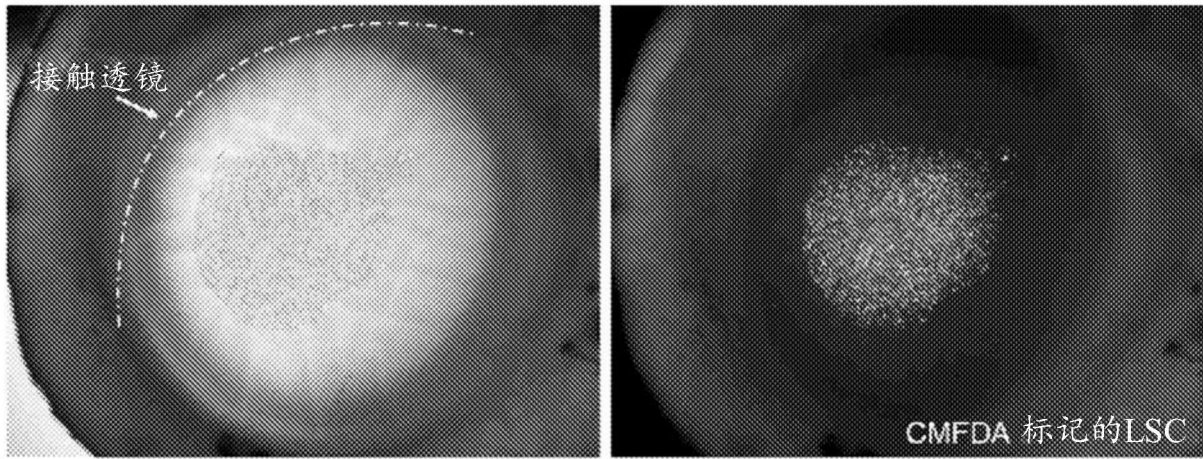


图10

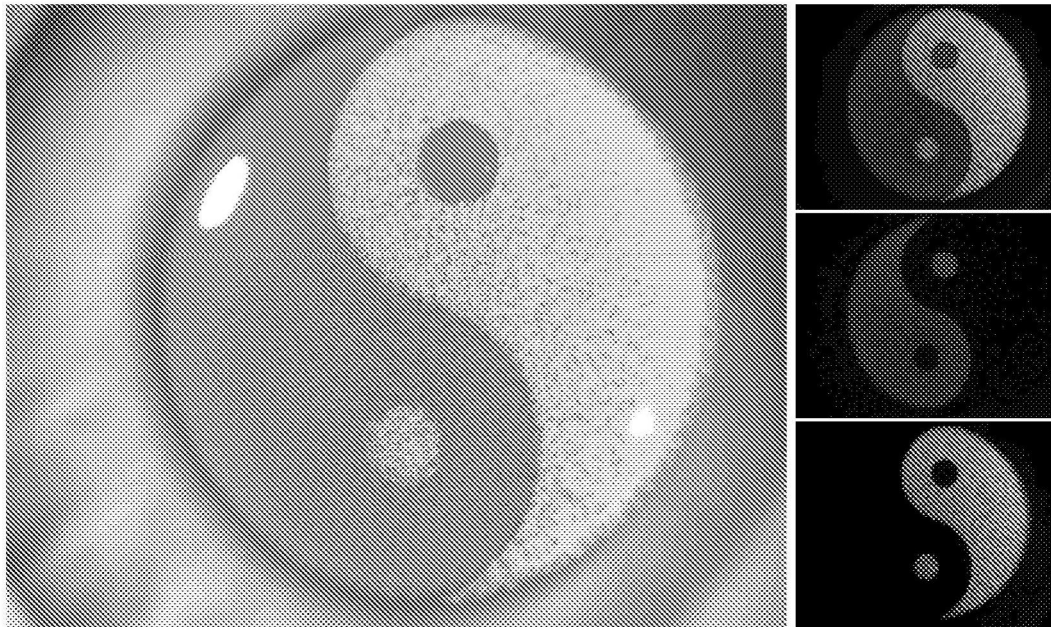


图11

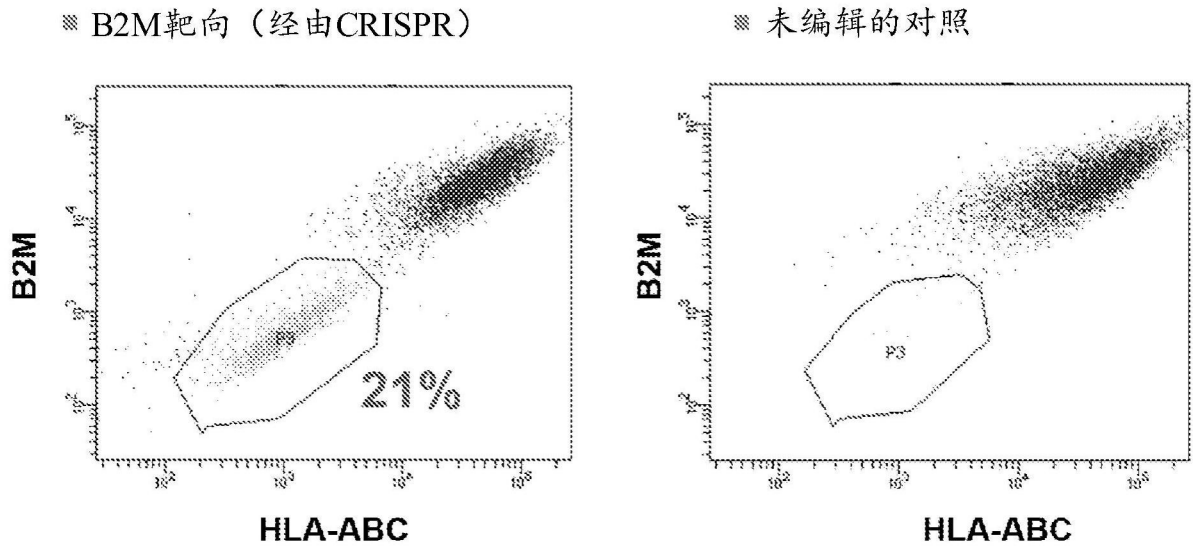


图12

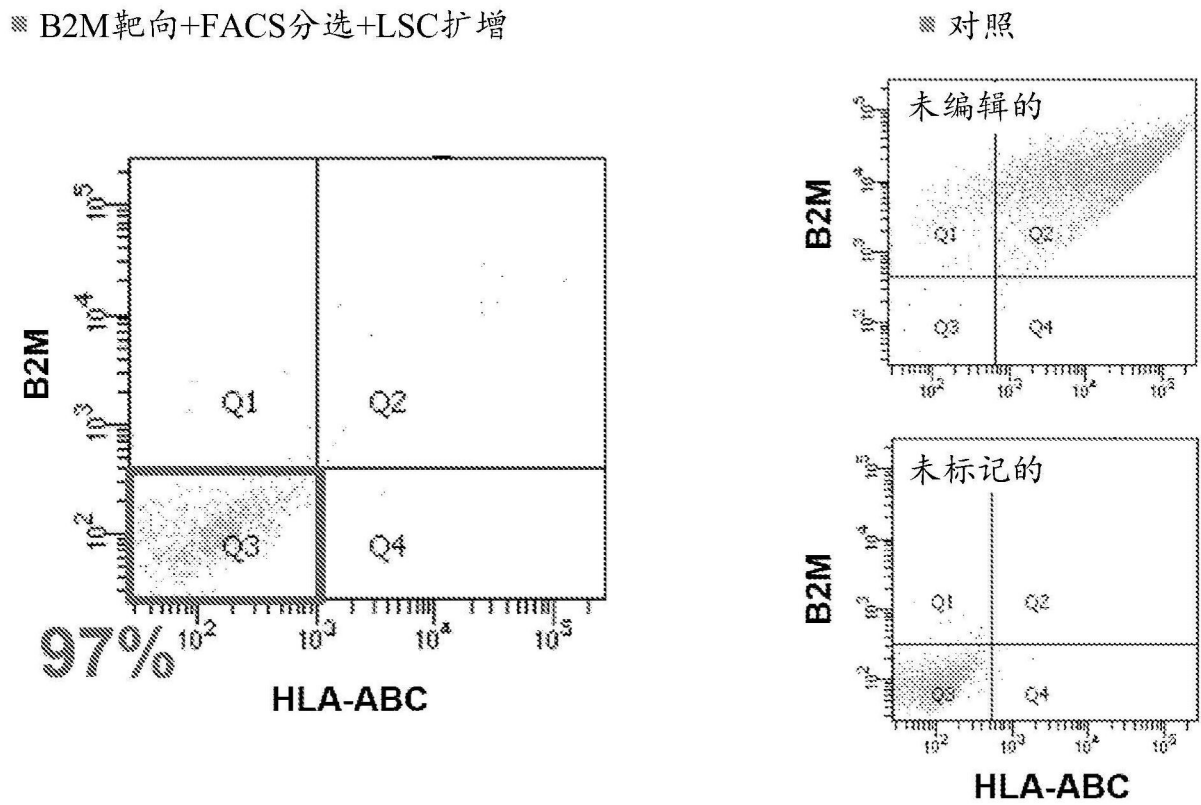


图13

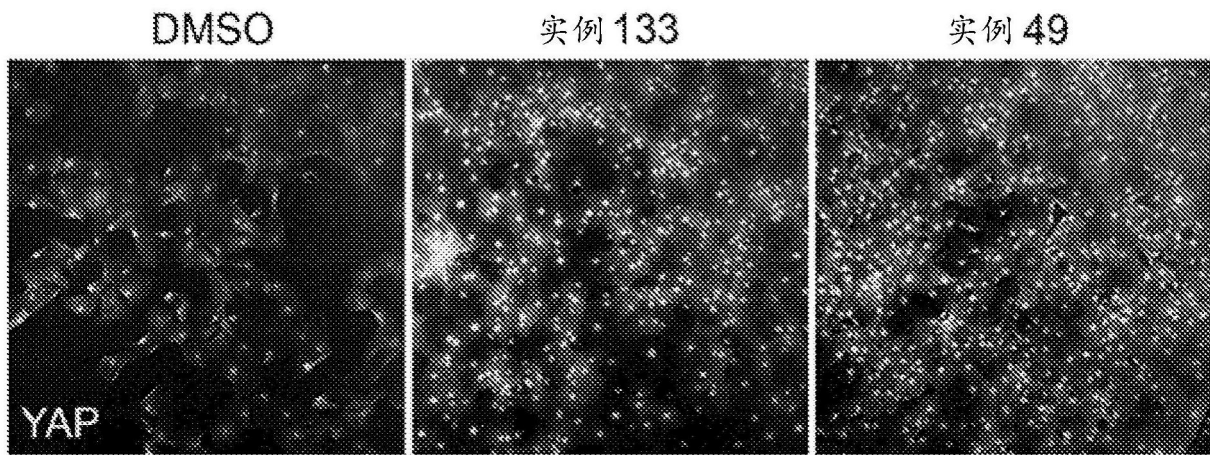


图14

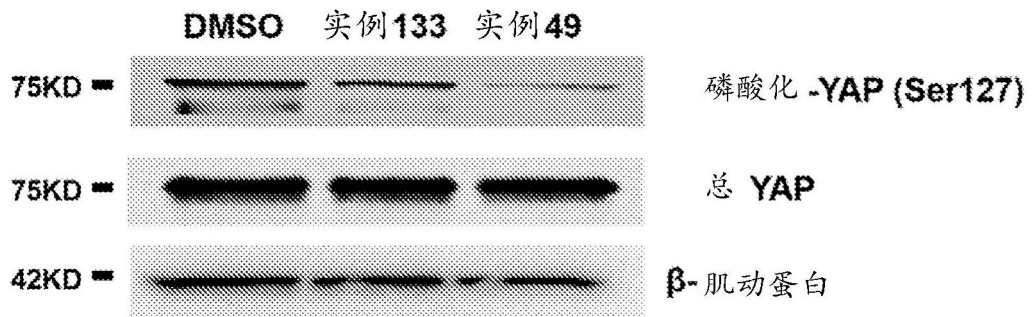


图15A

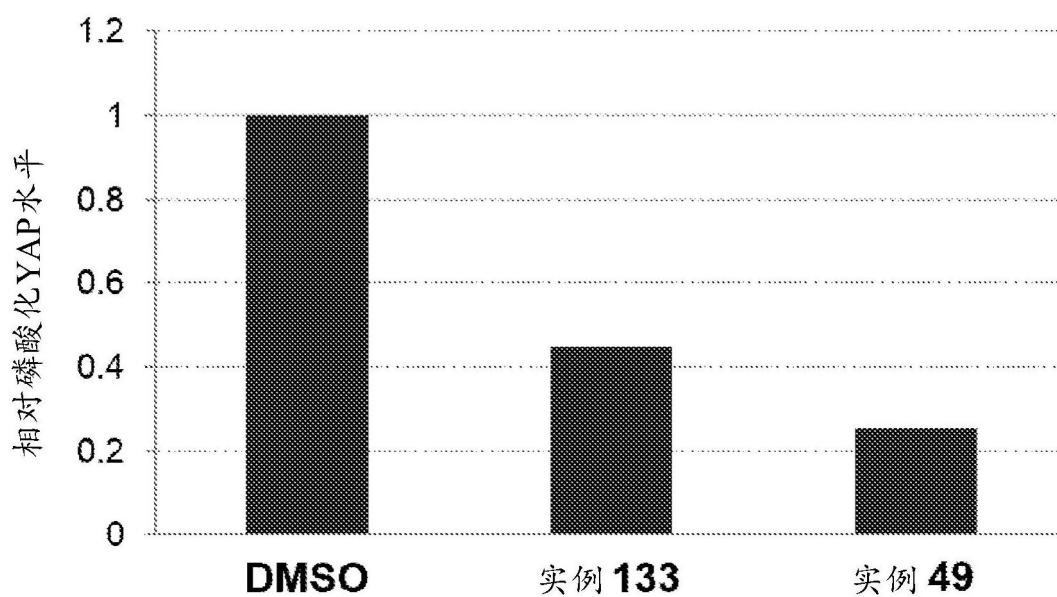
针对 $\beta$ -肌动蛋白标准化的磷酸化YAP水平

图15B

针对总YAP标准化的磷酸化YAP水平

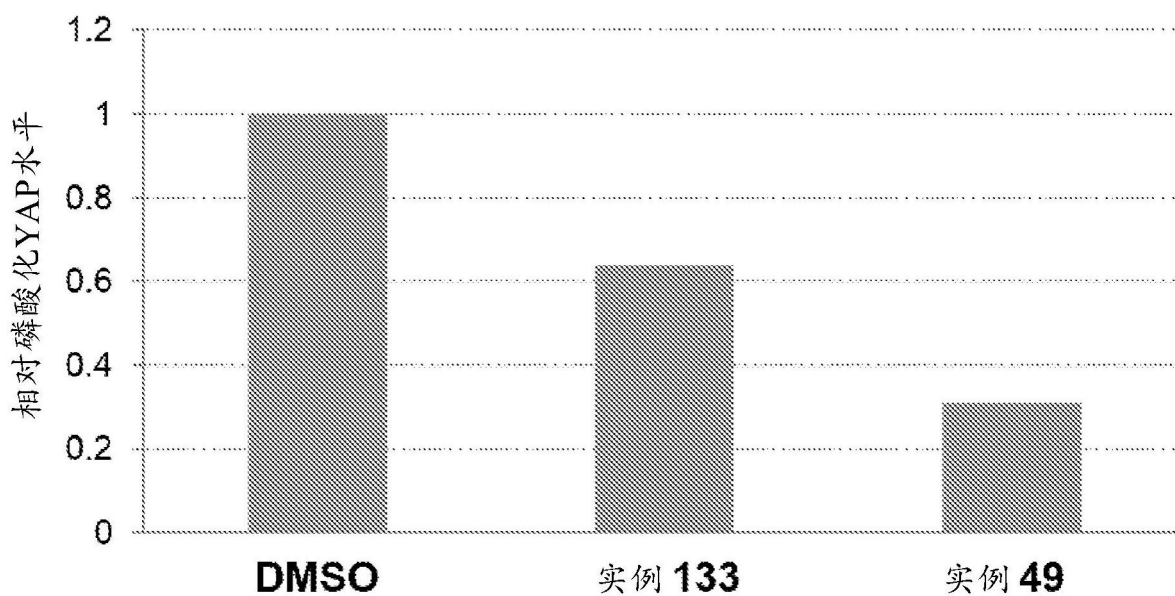


图15C

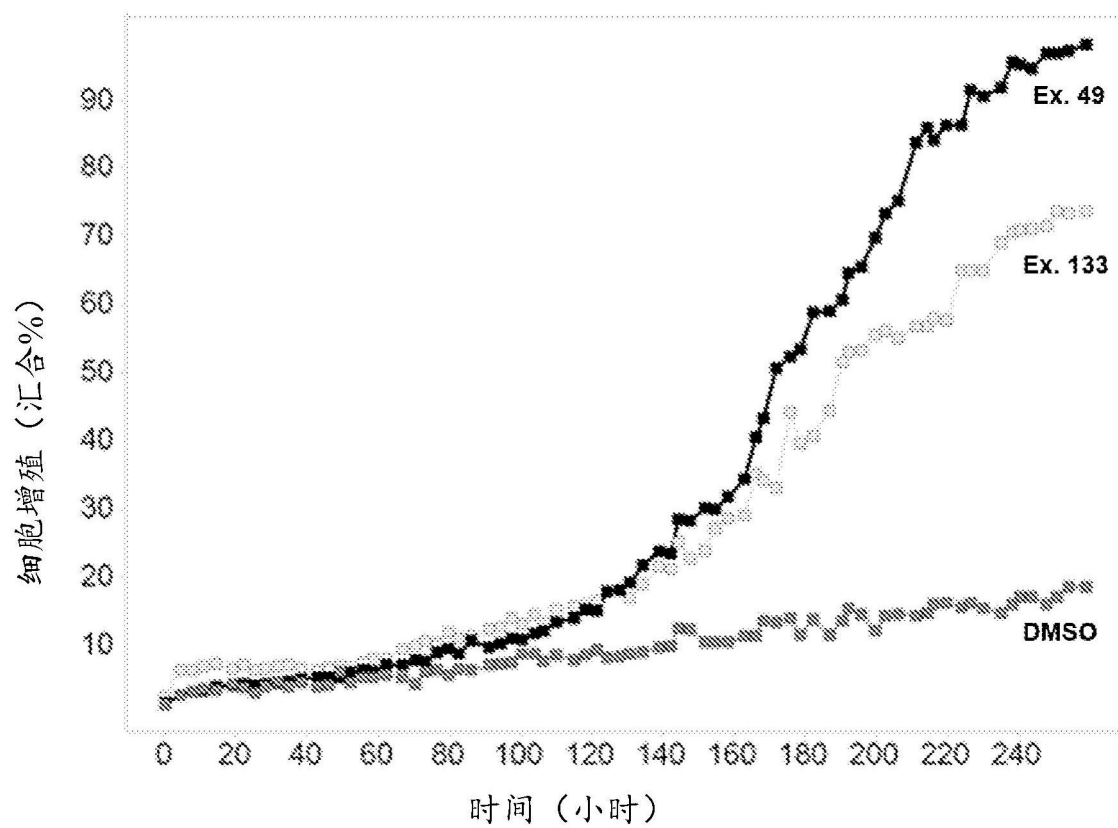


图16

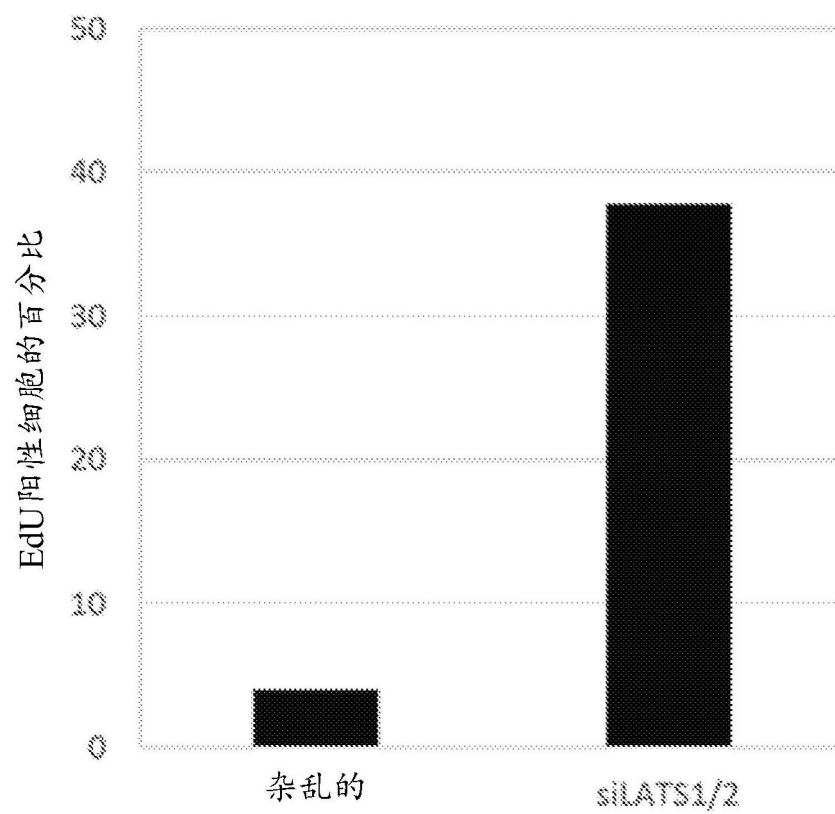


图17

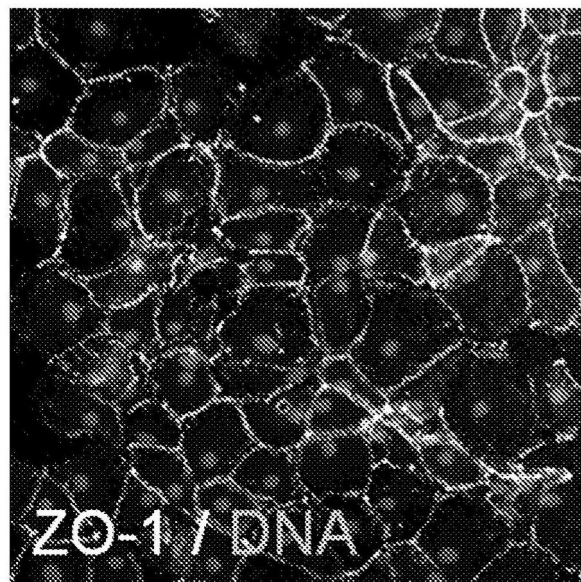


图18A

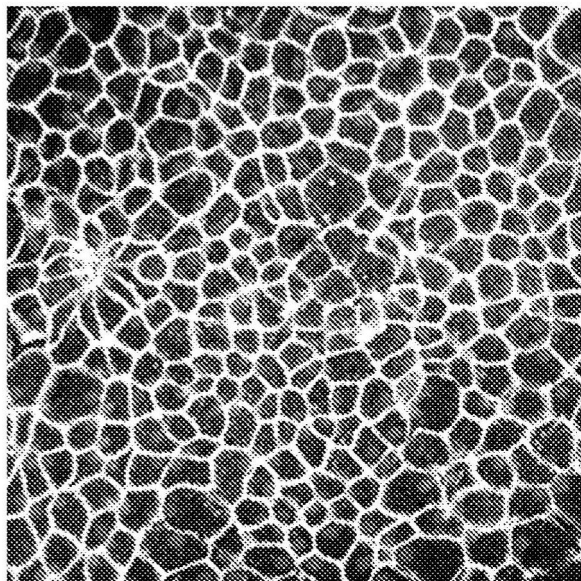


图18B

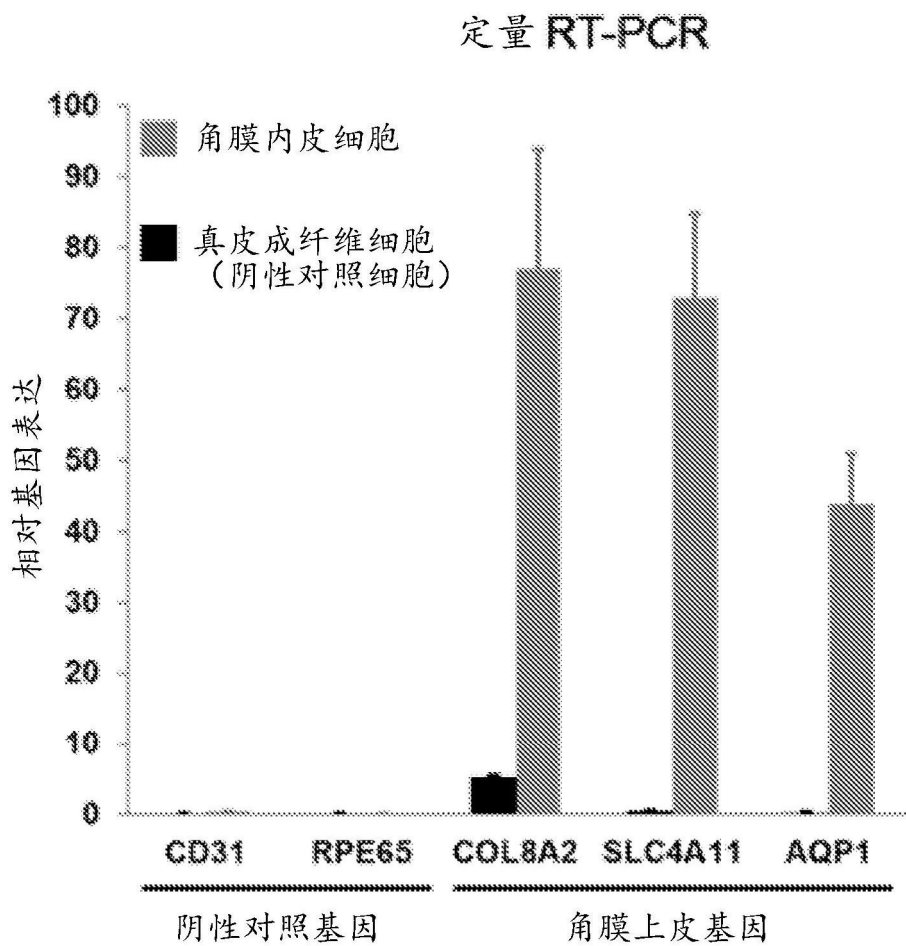


图19

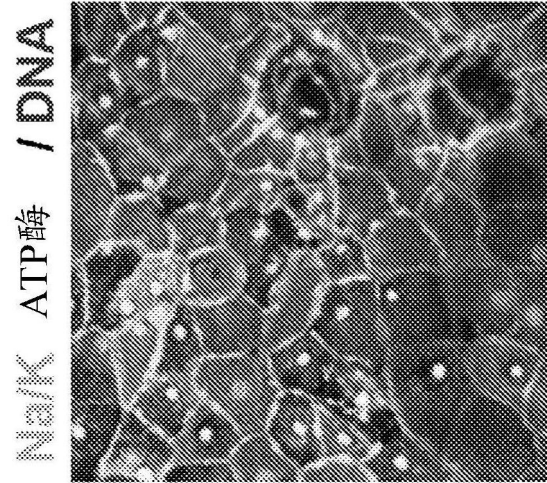


图20A

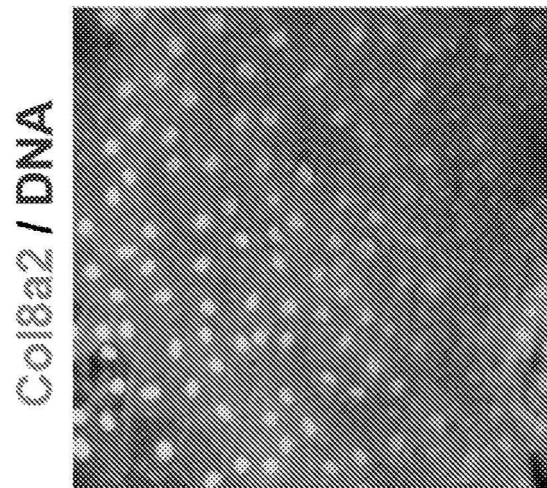


图20B



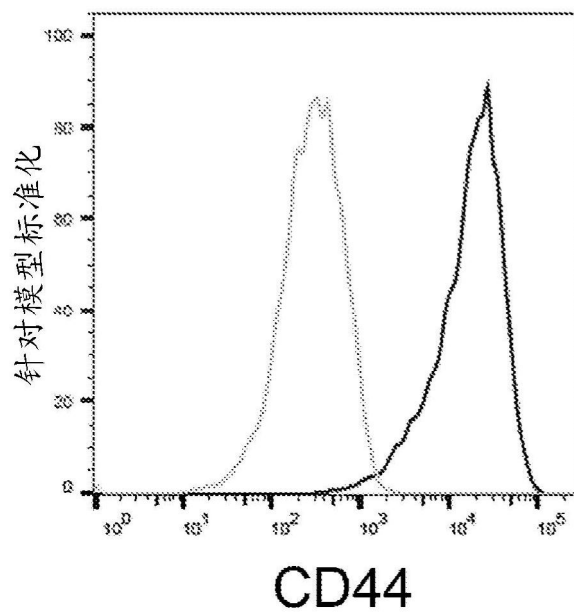


图21A

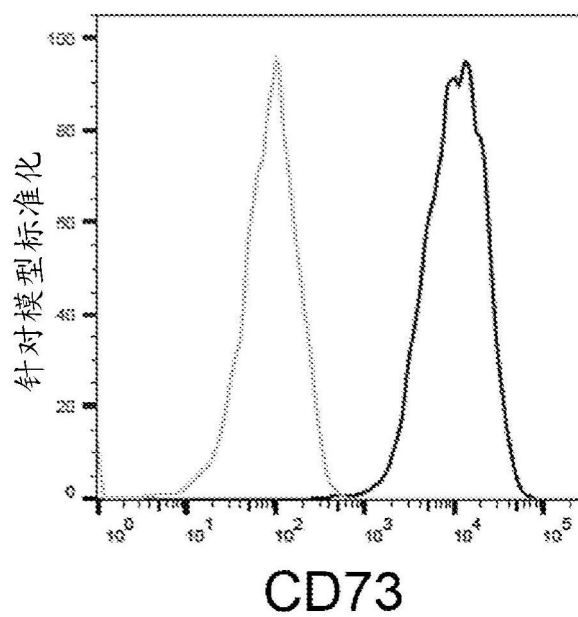


图21B

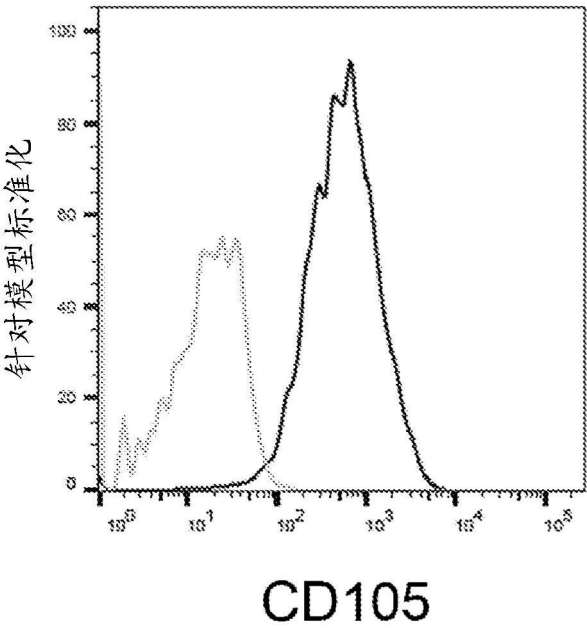


图21C

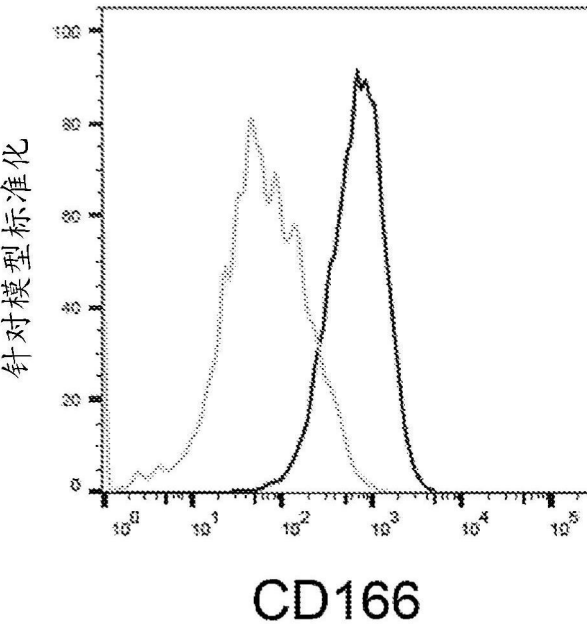


图21D

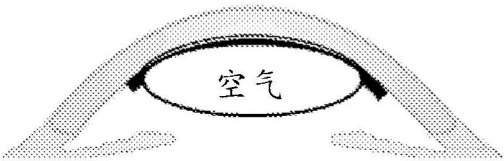


图22A

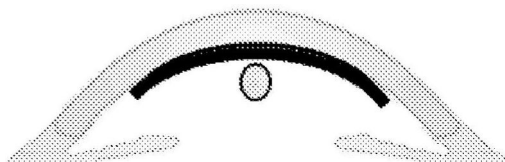


图22B

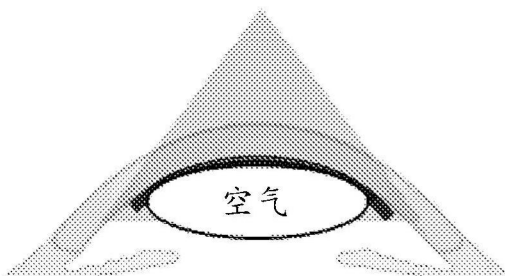


图22C

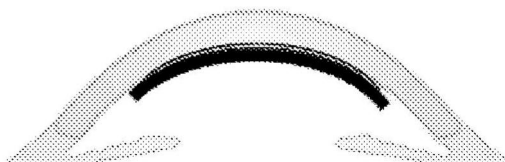


图22D

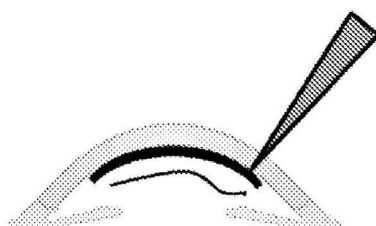


图23A

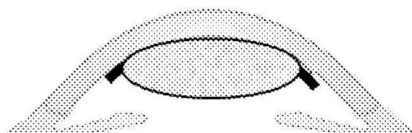


图23B

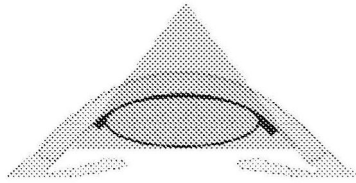


图23C

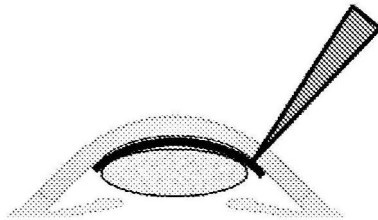


图23D

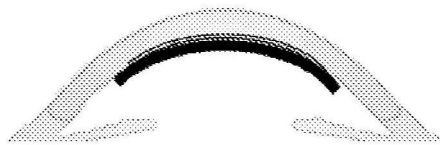


图23E

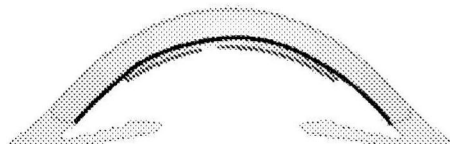


图24A

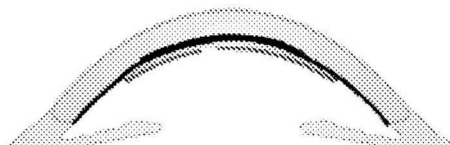


图24B

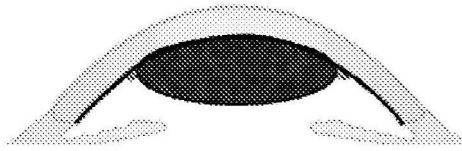


图24C

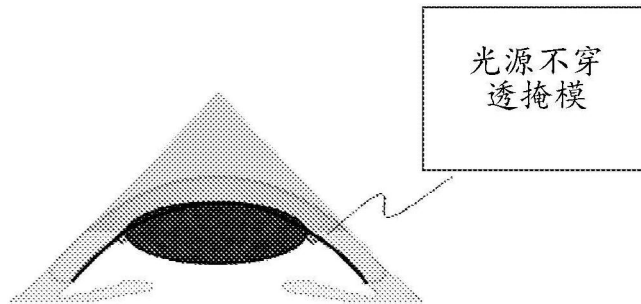


图24D

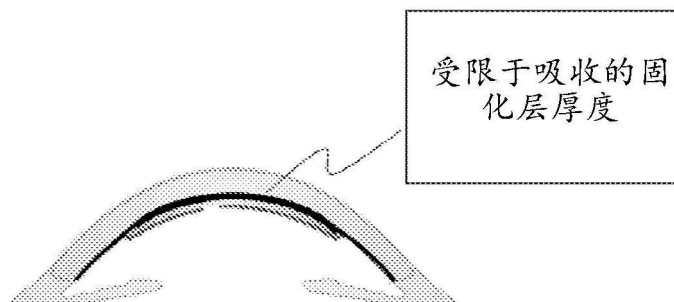


图24E



图25A



图25B

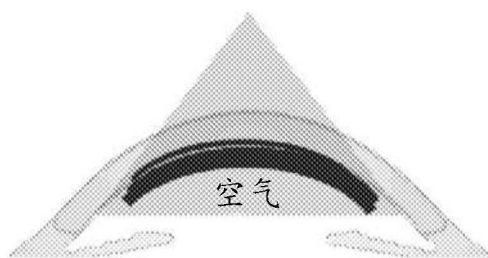


图25C

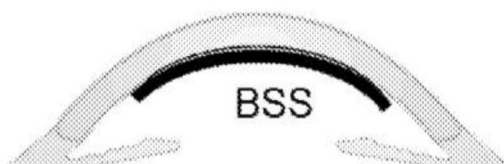


图25D

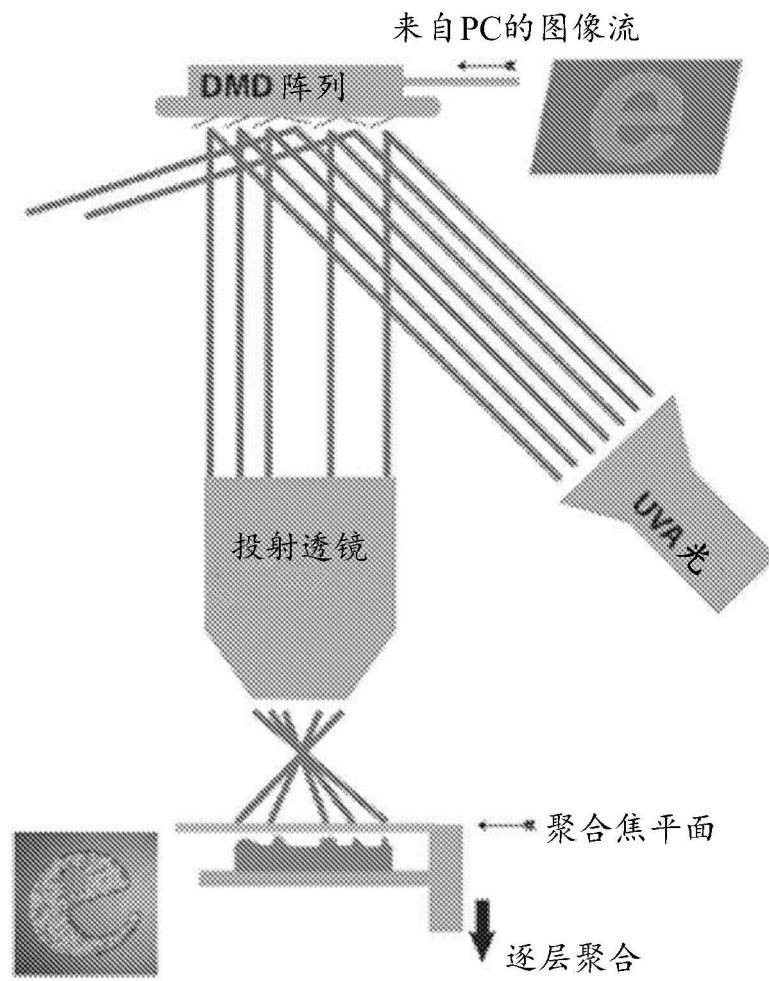


图26

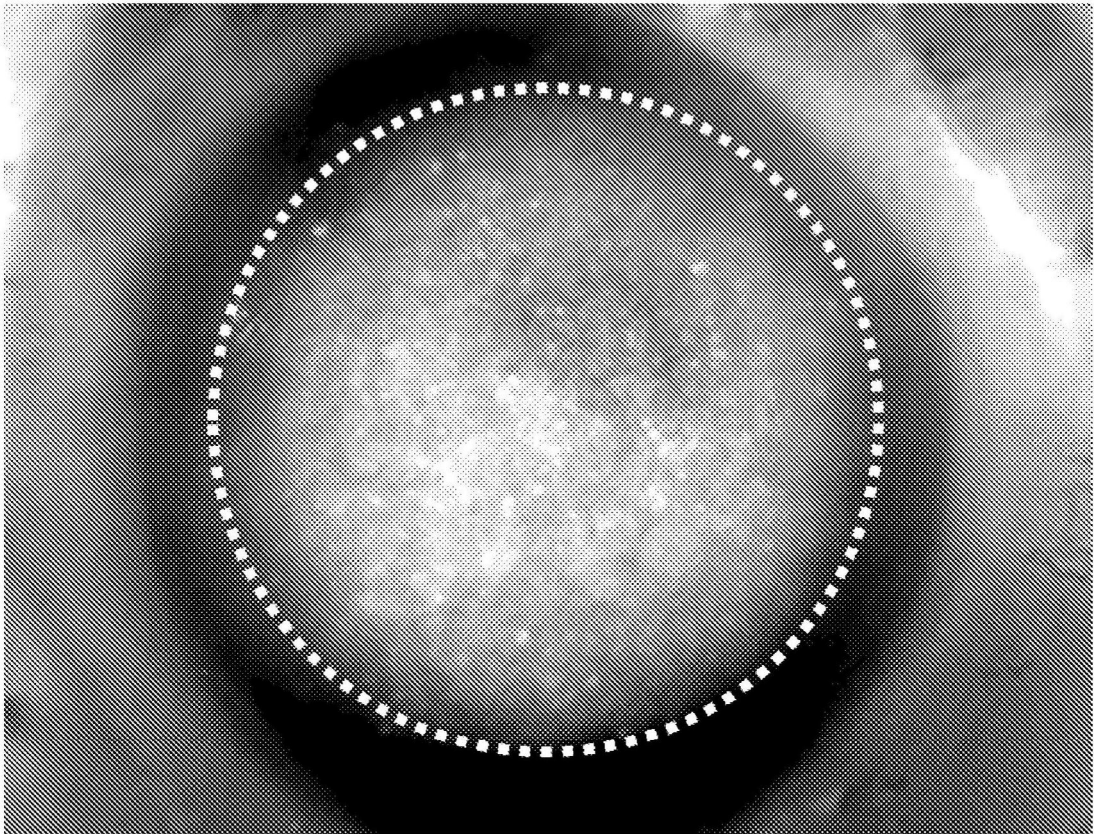


图27



图 28A

图 28B

图 28C

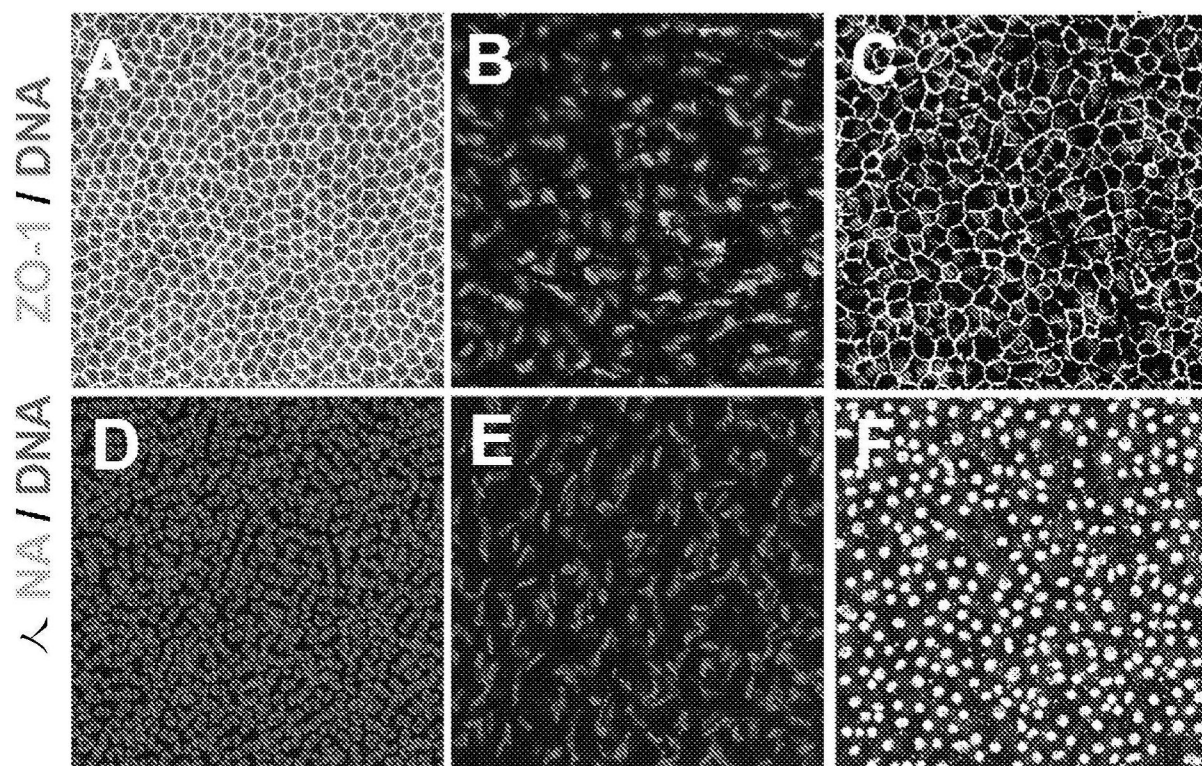


图 28D

图 28E

图 28F

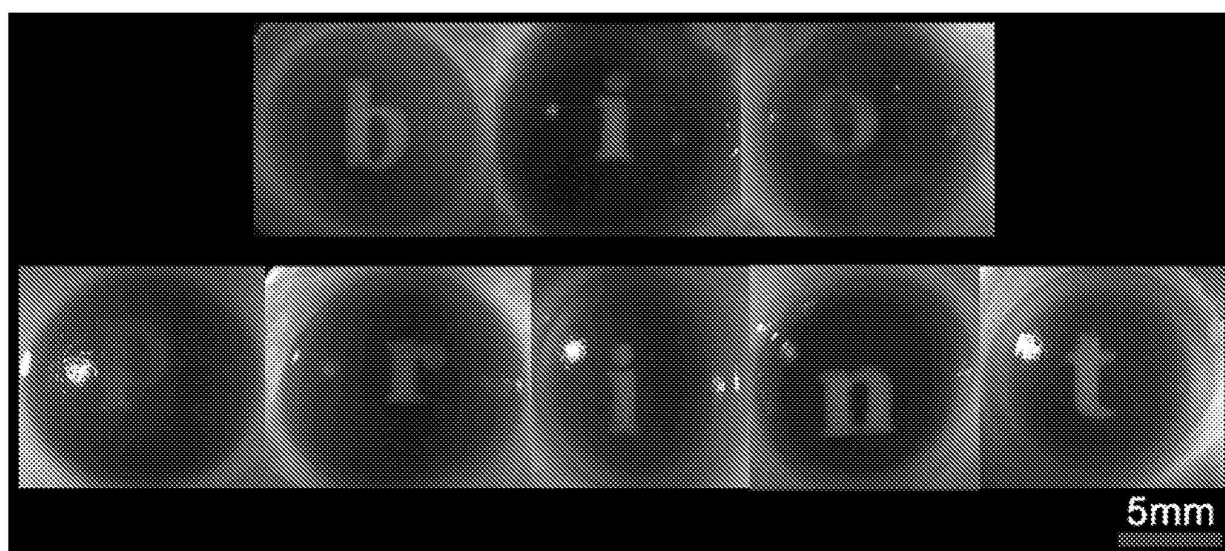


图29

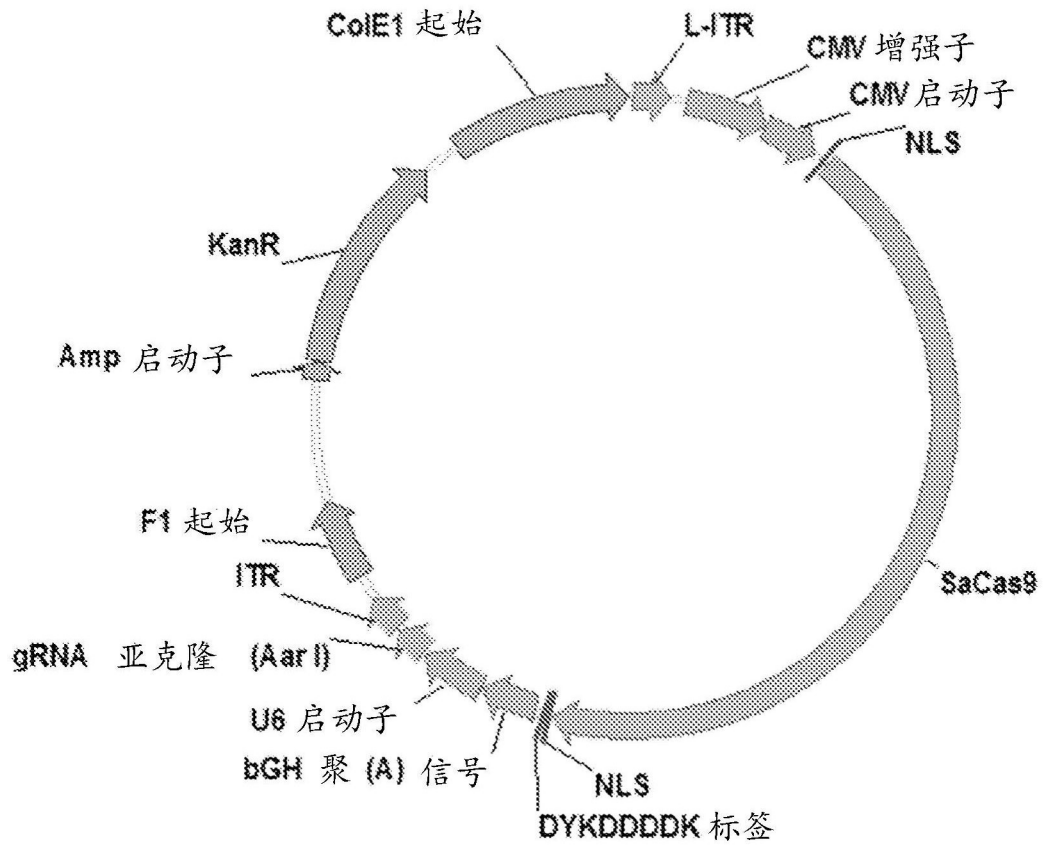


图30

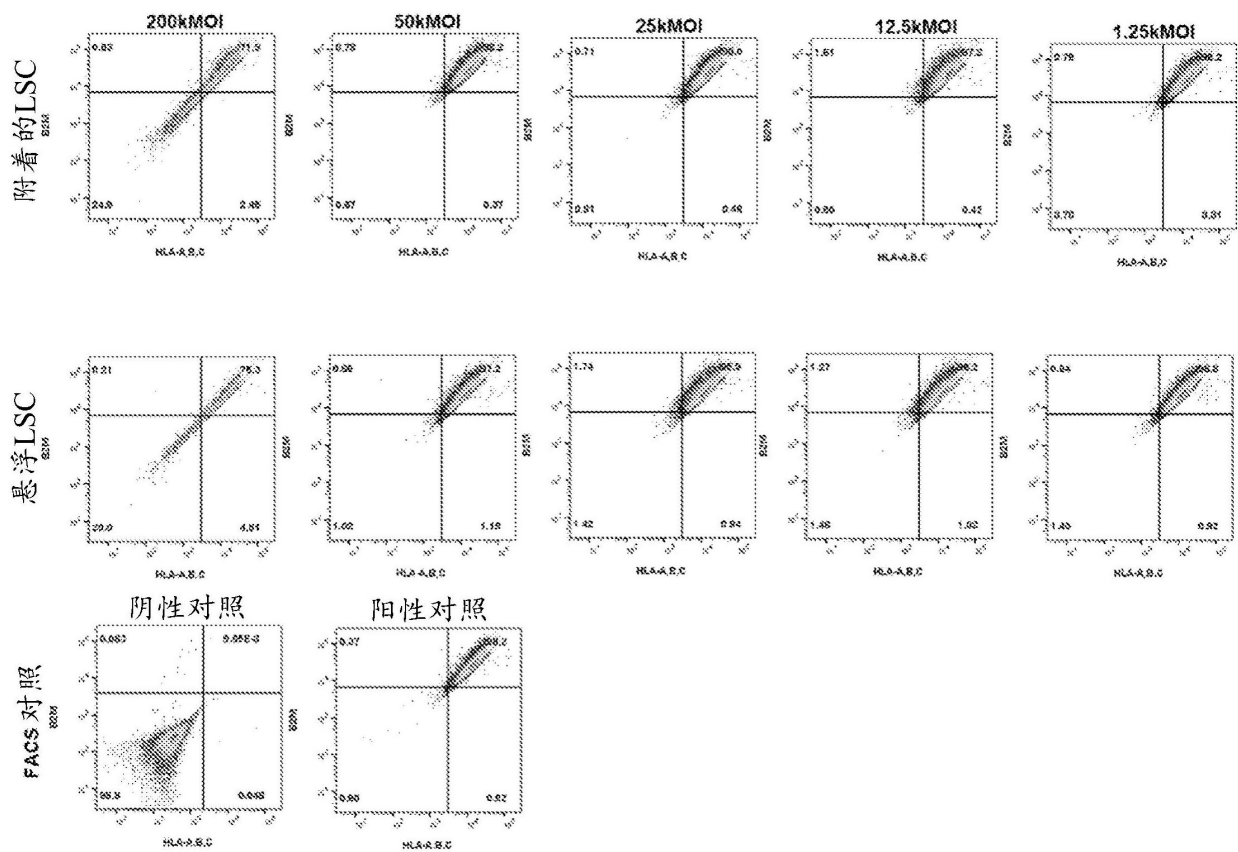


图31

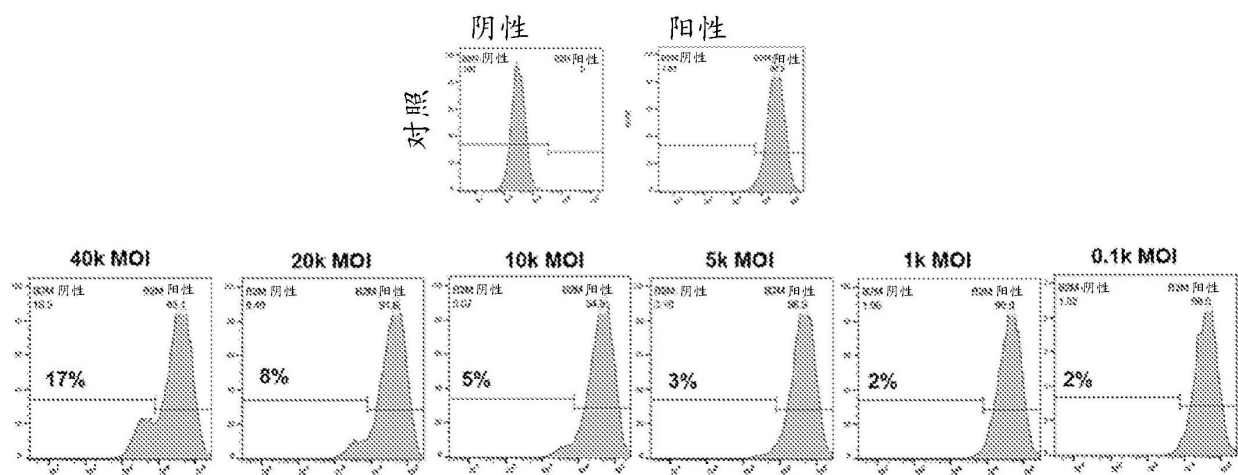


图32

## siRNA 验证

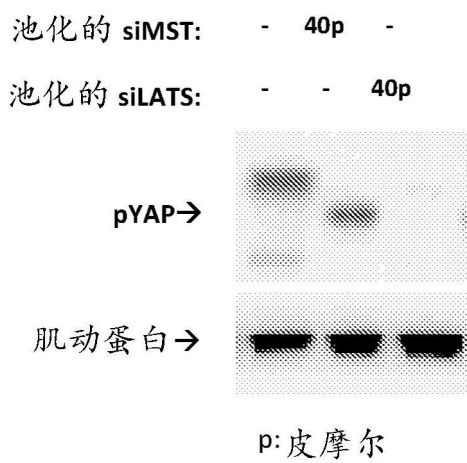


图33A

实例133细胞的

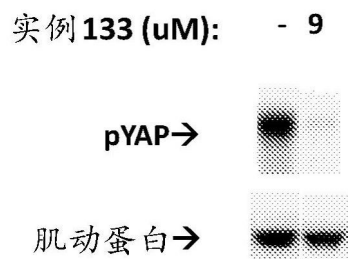


图33B

## 实例133生物化学的

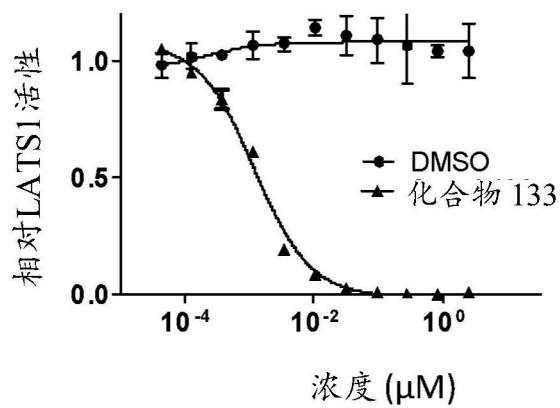
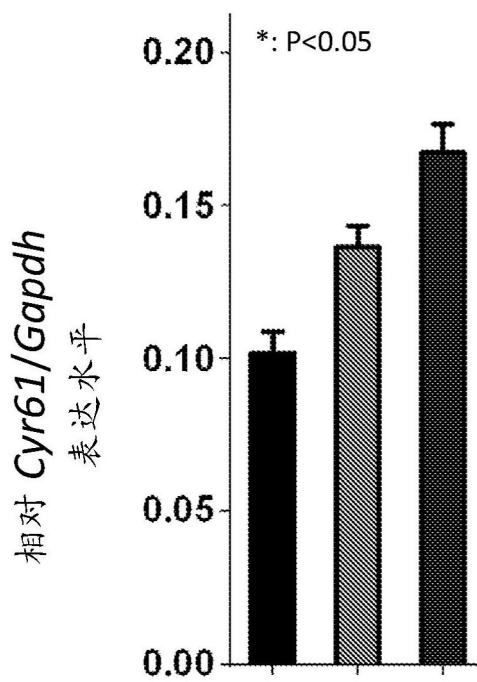


图33C



媒介物 0.2 2  
实例 133  
(mg/mL)

图34

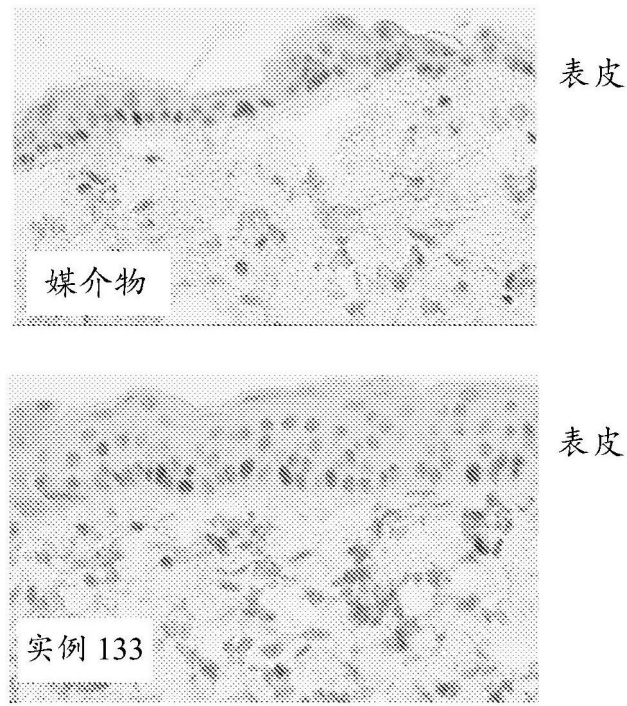


图35A

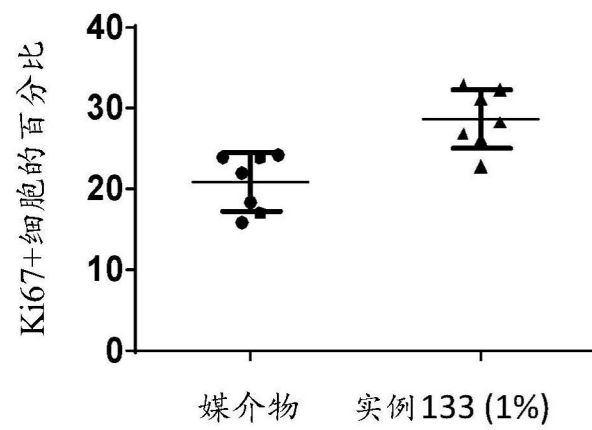


图35B