



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109803660 A

(43)申请公布日 2019.05.24

(21)申请号 201780062812.0

(22)申请日 2017.08.09

(30)优先权数据

62/373,263 2016.08.10 US

62/468,424 2017.03.08 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.04.10

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/046098 2017.08.09

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/031658 EN 2018.02.15

(71)申请人 细胞基因公司

地址 美国新泽西州

(72)发明人 徐江春 罗伯特·卓

亚伦·恩古耶

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 李敏春 郑霞

(51)Int.Cl.

A61K 31/513(2006.01)

C07D 239/32(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

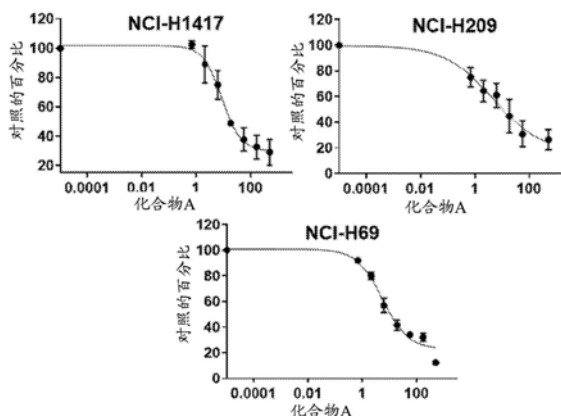
权利要求书2页 说明书222页 附图28页

(54)发明名称

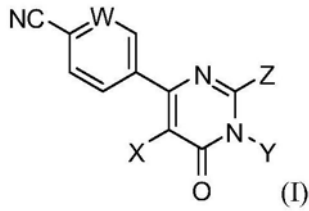
复发性和/或难治性实体瘤和非霍奇金淋巴瘤的治疗

(57)摘要

提供了使用取代的杂环衍生化合物和包含可用于抑制赖氨酸特异性脱甲基酶-1(LSD-1)的化合物的药物组合物治疗复发性和/或难治性实体瘤(包括神经内分泌癌(NEC)和非霍奇金淋巴瘤(NHL))等方法。



1. 一种用于治疗癌症和赘生性疾病的方法,包括向有相应需要的患者施用有效量的具有式(I)结构的化合物或其药学上可接受的盐,



其中,

W是N、C-H或C-F;

X是氢、卤素、-CN、任选地被取代的烷基、任选地被取代的炔基、任选地被取代的碳环基炔基、任选地被取代的芳基或任选地被取代的杂芳基;

Y是氢、任选地被取代的烷基、任选地被取代的环烷基或任选地被取代的环烷基烷基;

Z是任选地被取代的基团,其选自烷基、碳环基、C-附接的杂环基、N-附接的杂环基、杂环基烷基、杂环基烯基、-O-杂环基、-N(R)-杂环基、-O-杂环基烷基、-N(R)-杂环基烷基、-N(R)(C₁-C₄亚烷基)-NR₂、-O(C₁-C₄亚烷基)-NR₂;并且

R是氢或C₁-C₄烷基。

2. 根据权利要求1所述的方法,或其药学上可接受的盐,其中W是C-H。

3. 根据权利要求1所述的方法,或其药学上可接受的盐,其中W是C-F。

4. 根据权利要求1所述的方法,或其药学上可接受的盐,其中X选自由氢、卤素、任选地被取代的炔、任选地被取代的碳环基炔基、任选地被取代的芳基和任选地被取代的杂芳基组成的组。

5. 根据权利要求4所述的方法,或其药学上可接受的盐,其中X是任选地被取代的芳基。

6. 根据权利要求5所述的方法,或其药学上可接受的盐,其中所述任选地被取代的芳基是任选地被取代的苯基。

7. 根据权利要求4所述的方法,或其药学上可接受的盐,其中X是任选地被取代的杂芳基。

8. 根据权利要求7所述的方法,或其药学上可接受的盐,其中X选自由任选地被取代的吡啶基、任选地被取代的吡唑基和任选地被取代的咪唑基组成的组。

9. 根据权利要求1所述的方法,或其药学上可接受的盐,其中Z是选自由以下组成的组的杂环基烷基:任选地被取代的-O-杂环基烷基、任选地被取代的-N(H)-杂环基烷基,和任选地被取代的-N(Me)-杂环基烷基。

10. 根据权利要求9所述的方法,或其药学上可接受的盐,其中所述杂环基烷基基团具有式-R^c杂环基,其中R^c是任选地被取代的C₁-C₃亚烷基链或任选地被取代的C₁亚烷基链。

11. 根据权利要求9所述的方法,或其药学上可接受的盐,其中所述杂环基烷基基团具有式-R^c-杂环基,其中杂环基是任选地被取代的含氮的4、5、6或7元杂环基。

12. 根据权利要求1所述的方法,或其药学上可接受的盐,其中Z是任选地被取代的N-附接的杂环基。

13. 根据权利要求12所述的方法,或其药学上可接受的盐,其中所述任选地被取代的N-附接的杂环基是4、5、6或7元N-附接的杂环基。

14. 根据权利要求13所述的方法,或其药学上可接受的盐,其中所述任选地被取代的N-附接的杂环基是6-元N-附接的杂环基。

15. 根据权利要求12所述的方法,或其药学上可接受的盐,其中所述任选地被取代的N-附接的杂环基是任选地被取代的哌啶。

16. 根据权利要求15所述的方法,或其药学上可接受的盐,其中所述任选地被取代的哌啶是4-氨基哌啶。

17. 根据权利要求1所述的方法,或其药学上可接受的盐,其中Y是选自由任选地被取代的C₁-C₃烷基、任选地被取代的C₁烷基和甲基基团组成的组的任选地被取代的烷基。

18. 一种用于治疗癌症和赘生性疾病的方法,包括向人类患者施用与依托泊苷联合的治疗有效量的具有权利要求1的式(I)的结构化合物。

19. 一种用于治疗前列腺癌的方法,包括向人类患者施用治疗有效量的具有权利要求1的式(I)的结构化合物联合雄激素受体配体二羟基睾酮和照射。

20. 一种用于治疗前列腺癌的方法,包括向人类患者施用治疗有效量的具有权利要求1的式(I)的结构化合物联合雷帕霉素。

21. 一种确定具有权利要求1的式(I)的结构化合物抑制赖氨酸特异性脱甲基酶-1的效力的方法,包括在向人类患者施用治疗有效量的所述化合物之前和之后测量ST18和FREM2的基因表达变化。

复发性和/或难治性实体瘤和非霍奇金淋巴瘤的治疗

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2016年8月10日提交的美国临时专利申请第62/373,263号和2017年3月8日提交的美国临时专利申请第62/468,424号的优先权权益,这两个专利申请出于所有目的通过引用全文并入本文。

[0003] 领域

[0004] 本文描述的实施方案提供用于治疗癌症和赘生性疾病的组合物、制剂和方法;其中此类治疗包括包含施用赖氨酸特异性脱甲基酶-1 (LSD-1) 抑制剂的疗法。

[0005] 背景

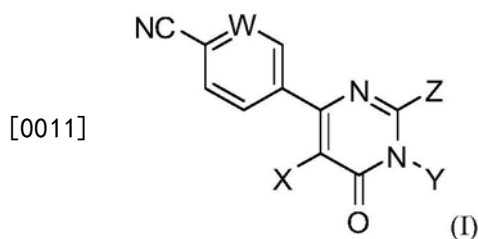
[0006] 对用于治疗患有癌症诸如例如基底细胞癌、复发性或难治性非霍奇金淋巴瘤(NHL)、多形性胶质母细胞瘤、间变性星形细胞瘤或其他晚期实体瘤的受试者的组合物、制剂和方法仍然存在需求。

[0007] 例如,基底细胞癌(BCC)是全世界常见的癌症,并且其发病率正在增加。仅在美国,每年就有超过350万新患者被诊断患有非黑色素瘤皮肤癌。大多数BCC可通过局部治疗、手术、放射治疗或其组合来治愈。然而,晚期BCC常常导致严重的毁容和发病以及相关的身体和心理后遗症,因为BCC通常发生在暴露于阳光的区域诸如面部。此外,这些癌症中的一小部分是转移性的并且不顺从于典型的治疗。几乎所有BCC都与刺激不受调节的细胞生长的异常刺猬因子(Hh)信号传导相关,并且已证明几种治疗性Hh抑制剂可用于治疗BCC。不幸的是,大约20%的BCC通常经由突变引起的Hh途径再激活,对目前的Hh抑制剂产生耐药性,该突变干扰药物结合口袋,增加Hh信号传导活性或通过抑制基因的同时改变拷贝数起作用。患者将受益于通过例如靶向相关信号传导途径下游的蛋白质来克服这些耐药性途径的良好耐受试剂的开发。

[0008] 发明概述

[0009] 本公开内容的方面和实施方案提供了用于治疗患有癌症和赘生性疾病的受试者的方法和药物组合物;所述受试者诸如患有晚期实体瘤、复发性或难治性实体瘤(包括神经内分泌癌(NEC)和非霍奇金淋巴瘤)、多形性胶质母细胞瘤、间变性星形细胞瘤、基底细胞癌或其他癌症的那些受试者。至少一个实施方案提供用于治疗癌症和赘生性疾病的方法,包括向有相应需要的受试者施用治疗有效量的至少一种LSD-1抑制剂。

[0010] 一个实施方案提供涉及具有式(I)结构的化合物或其药学上可接受的盐的治疗方法,



[0012] 其中,

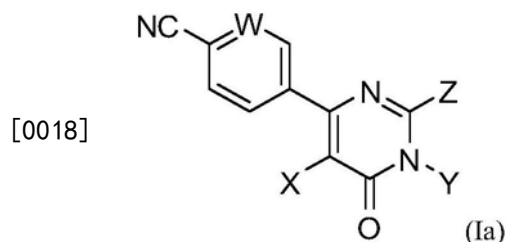
[0013] W是N、C-H或C-F;

[0014] X是氢、卤素、-CN、任选地被取代的烷基、任选地被取代的炔基、任选地被取代的碳环基炔基、任选地被取代的芳基或任选地被取代的杂芳基；

[0015] Y是氢、任选地被取代的烷基、任选地被取代的环烷基或任选地被取代的环烷基烷基；

[0016] Z是任选地被取代的基团，其选自烷基、碳环基、C-附接的杂环基、N-附接的杂环基、杂环基烷基、杂环基烯基、-O-杂环基、-N(R)-杂环基、-O-杂环基烷基、-N(R)-杂环基烷基、-N(R)(C₁-C₄亚烷基)-NR₂、-O(C₁-C₄亚烷基)-NR₂，并且R是氢或C₁-C₄烷基。

[0017] 一个实施方案提供涉及具有式(Ia)结构的化合物或其药学上可接受的盐的治疗方法，



[0019] 其中，

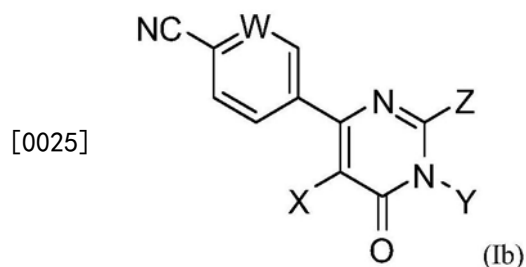
[0020] W是N、C-H或C-F；

[0021] X是氢、卤素、-CN、任选地被取代的炔基、任选地被取代的碳环基炔基、任选地被取代的芳基或任选地被取代的杂芳基；

[0022] Y是氢、任选地被取代的烷基、任选地被取代的环烷基或任选地被取代的环烷基烷基；并且

[0023] Z是任选地被取代的基团，其选自N-附接的杂环基、-O-杂环基烷基、-N(H)-杂环基、-N(Me)-杂环基、-N(H)-杂环基烷基或-N(Me)-杂环基烷基。

[0024] 一个实施方案提供涉及具有式(Ib)结构的化合物或其药学上可接受的盐的治疗方法，



[0026] 其中，

[0027] W是N、C-H或C-F；

[0028] X是氢、卤素、任选地被取代的炔基、任选地被取代的碳环基炔基、任选地被取代的芳基或任选地被取代的杂芳基；

[0029] Y是氢、任选地被取代的烷基或任选地被取代的环烷基；并且

[0030] Z是任选地被取代的基团，其选自N-杂环基、-O-杂环基烷基、-N(H)-杂环基烷基或-N(Me)-杂环基烷基。

[0031] 一个实施方案提供涉及药物组合物的治疗方法，所述药物组合物包含式(I)化合物或其药学上可接受的盐和药学上可接受的赋形剂。一个实施方案提供涉及药物组合物的

治疗方法,所述药物组合物包含式 (Ia) 化合物或其药学上可接受的盐和药学上可接受的赋形剂。一个实施方案提供涉及药物组合物的治疗方法,所述药物组合物包含式 (Ib) 化合物或其药学上可接受的盐和药学上可接受的赋形剂。

[0032] 一个实施方案提供涉及细胞中基因转录调节的治疗方法,所述方法包括通过将赖氨酸特异性脱甲基酶1酶暴露于式 (I) 的化合物来抑制赖氨酸特异性脱甲基酶1活性。一个实施方案提供涉及细胞中基因转录调节的治疗方法,所述方法包括通过将赖氨酸特异性脱甲基酶1酶暴露于式 (Ia) 的化合物来抑制赖氨酸特异性脱甲基酶1活性。一个实施方案提供涉及细胞中基因转录调节的治疗方法,所述方法包括通过将赖氨酸特异性脱甲基酶1酶暴露于式 (Ib) 的化合物来抑制赖氨酸特异性脱甲基酶1活性。

[0033] 一个实施方案提供治疗有相应需要的患者的癌症的方法,所述方法包括向患者施用式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐。一个实施方案提供治疗有相应需要的患者的癌症的方法,所述方法包括向患者施用式 (Ia) 化合物或其药学上可接受的盐。一个实施方案提供治疗有相应需要的患者的癌症的方法,所述方法包括向患者施用式 (Ib) 化合物或其药学上可接受的盐。

附图说明

[0034] 图1示出在NCI-H1417、NCI-H209和NCI-H69细胞中化合物A对胃泌素释放肽信使核糖核酸表达的影响。DMSO=二甲基亚砜;GRP=胃泌素释放肽;IC50=半最大抑制浓度;mRNA=信使核糖核酸;RNA=核糖核酸。数据呈现为NCI-H1417和NCI-H209的三次独立实验的平均百分比活性和NCI-H69的两次独立实验的平均百分比活性,并且误差棒代表标准偏差。

[0035] 图2示出与NCI-H69和NCI-H209细胞的脱氧核糖核酸结合的赖氨酸特异性脱甲基酶1的染色质免疫沉淀和测序分析。Chr=染色体;GRP=胃泌素释放肽;H3K4me1=单甲基组蛋白H3赖氨酸4;LSD1=赖氨酸特异性脱甲基酶1;SCLC=小细胞肺癌;来自两种LSD1抗体(抗KDM1/LSD1抗体[**abcam**®,Cambridge,MA目录号ab17721]和抗BHC110/LSD1抗体[Bethyl Laboratories, Montgomery, TX目录号A300-215A]) 和H3K4me1抗体 (**abcam**®,Cambridge, MA目录号ab8895) 的结果在浏览器轨迹中示出为归一化读数/百万。每条轨迹下方的黑条表示相对于背景而富含(即,结合)的区域。红色椭圆表示LSD1和H3K4me1共同占据的调节区域。显示了GRP基因在人18号染色体上的位置。框表示通过线连接的外显子,其中箭头表示转录方向,第一个外显子在左侧。GRP的相邻基因以灰色示出。示出每个细胞系的输入对照的读数(背景)。

[0036] 图3示出在NCI-H1417小细胞肺癌异种移植物模型中化合物A对人胃泌素释放肽信使核糖核酸表达的影响。ANOVA=方差分析;ns=无统计学意义。图表示出如所述计算的单个 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值,其中水平线为平均值±标准差;使用单向方差分析计算p值,然后进行Dunnett多重比较检验(化合物A对比对照)。

[0037] 图4是示出施用化合物A或媒介物对照对SCLC异种移植物的肿瘤生长抑制的图。将肿瘤体积绘制为平均值±平均值的标准误差(SEM)。

[0038] 图5是示出施用化合物A或媒介物对照对SCLC异种移植物的肿瘤生长抑制的图。BID是每天两次;PO是口服给药;QDX28是每天一次,持续28天;将肿瘤体积绘制为平均值±

平均值的标准误差 (SEM)。

[0039] 图6是来自LU2514研究的肿瘤组织的苏木精和伊红染色图像。

[0040] 图7是示出施用化合物A或媒介物对照对SCLC异种移植物的肿瘤生长抑制的图。BID是每天两次;PO是口服给药;QDX21是每天一次,持续21天;将肿瘤体积绘制为平均值±平均值的标准误差 (SEM)。

[0041] 图8是示出施用化合物A或媒介物对照对SCLC异种移植物的肿瘤生长抑制的图。将肿瘤体积绘制为平均值±平均值的标准误差 (SEM)。

[0042] 图9是示出施用化合物A或媒介物对照对SCLC异种移植物的肿瘤生长抑制的图。将肿瘤体积绘制为平均值±平均值的标准误差 (SEM)。

[0043] 图10是示出施用化合物A或媒介物对照对SCLC异种移植物的肿瘤生长抑制的图。将肿瘤体积绘制为平均值±平均值的标准误差 (SEM)。

[0044] 图11是示出LU2527研究的第46天的平均净肿瘤体积差异的图。空心符号代表由于肿瘤移植不良而被删除的数据;在第21天退出研究的另一个对照动物的数据(未示出)由于可能由于口喂错误导致的意外死亡而被删除。

[0045] 图12是示出LU2527的平均肿瘤生长的图。将肿瘤体积绘制为平均值±标准误差 (SEM)。第46天的垂直线表示TGI分析日。

[0046] 图13是示出LU2527的平均体重变化百分比的图。将体重绘制为%平均值±标准误差 (SEM)。第46天的垂直线表示TGI分析日,并且水平线为在0%和-10%的平均体重变化。

[0047] 图14是示出GA0087研究的第53天的平均净肿瘤体积差异的图。空心符号表示由于肿瘤移植不良而被删除的数据。

[0048] 图15是示出GA0087的平均肿瘤生长的图。将肿瘤体积绘制为平均值±标准误差 (SEM)。第53天的垂直线表示TGI分析日。

[0049] 图16是示出GA0087的平均体重变化百分比的图。将体重绘制为%平均值±标准误差 (SEM)。第53天的垂直线表示TGI分析日,并且水平线为在0%和-10%的平均体重变化。

[0050] 图17是示出化合物A对hMCC细胞系的增殖抑制的图。对照的百分比=归一化为活的阴性对照细胞平均数的活的经化合物A处理的细胞的数目,以百分比表示,如数据分析部分中所述;对于每个图,数据表示为对照的平均百分比±生物学重复的标准偏差。

[0051] 图18是示出第15天的MKL-1净肿瘤体积的图。符号表示净肿瘤体积。示出化合物A治疗组和媒介物对照组之间的平均净肿瘤体积差异的百分比 (%) TGI和统计结果,如虚线所示。

[0052] 图19是示出MKL-1平均肿瘤生长的图。将肿瘤体积绘制为平均值±标准误差 (SEM)。在第15天即TGI分析日示出垂直虚线。

[0053] 图20是示出MKL-1的平均体重变化百分比的图。将体重绘制为%平均值±标准误差 (SEM)。在第15天即TGI分析日示出垂直虚线且水平虚线示出在0%的平均体重变化。

[0054] 图21是示出第36天的MS-1净肿瘤体积的图。符号表示净肿瘤体积,水平虚线为 0mm^3 净肿瘤体积。示出化合物A治疗组和媒介物对照组之间的平均净肿瘤体积差异的百分比 (%) TGI和统计结果,如虚线所示。

[0055] 图22是示出MS-1平均肿瘤生长的图。将肿瘤体积绘制为平均值±标准误差 (SEM)。在第36天即TGI分析日示出垂直线。

[0056] 图23是示出MS-1的平均体重变化百分比的图。将体重绘制为%平均值±标准误差(SEM)。在第36天即TGI分析日示出垂直虚线,且水平虚线示出在0%的平均体重变化。

[0057] 图24是示出通过RNA-seq鉴定的化合物A调节基因表达的图。文氏图(Venn Diagram)示出两种hMCC细胞系MKL-1和MS-1中响应于10nM和/或100nM化合物A而下调(顶部)或上调(底部)的基因。

[0058] 图25是示出体外和体内药效学生物标志物基因表达的化合物A剂量响应的图。滴定曲线示出体外细胞培养物的剂量响应和EC50值(左),其中带有“x”的空心圆符号是删除的数据点。相应的箱须图示出异种移植研究中的体内剂量响应(右)。虚线表示最大平均响应。

[0059] 图26是示出LSD1占有率(occupancy)和H3K4me2状态的ChIP-seq分析的图。在hMCC细胞系MKL-1和MS-1中在ST18和FREM2基因处LSD1和H3K4me2富集的基因组浏览器视图(genome browser view)。LSD1峰轨迹(绿色)展示LSD1富集区域与背景相比的位置。H3K4me2ChIP-seq轨迹(蓝色)示出媒介物或化合物A处理的样品中的H3K4me2结合。输入轨迹示出为对照。RefSeq轨迹表示基因的位置和方向。

[0060] 图27是示出Kaplan-Meier曲线图的图。没有*的p值为与对照进行对数秩比较,而带有*的值为与依托泊苷单一疗法进行对数秩比较。执行15次比较,得到 $p \leq 0.003$ 的显著性水平($\alpha = [0.05/15]$)。

[0061] 图28是示出平均肿瘤生长的图。将肿瘤体积绘制为平均值±标准误差(SEM)。当一组中超过50%的可评估动物退出研究时,曲线图被截短。

[0062] 图29是示出平均体重变化百分比的图。将体重绘制为%平均值±标准误差(SEM)。水平线为在0%的平均体重变化。当一组中超过50%的可评估动物退出研究时,曲线图被截短。

[0063] 图30是示出平均肿瘤生长的图。QDx 3=每日一次给药,持续三天;5on/2off=给药5天,然后停药2天。将肿瘤体积绘制为平均值±标准误差(SEM)。当一组中超过50%的可评估动物退出研究时,曲线图被截短。

[0064] 图31是示出Kaplan-Meier曲线图的图。QDx 3=每日一次给药,持续三天;5on/2off=给药5天,然后停药2天。没有*的P值为与对照进行对数秩比较,有*的p值为与依托泊苷单一疗法进行比较,并且有**的p值为与化合物A单一疗法进行比较。执行六次比较,得到 $p \leq 0.008$ 的显著性水平($\alpha = [0.05/6]$)。

[0065] 图32是示出平均体重变化百分比的图。QDx 3=每日一次给药,持续三天;5on/2off=给药5天,然后停药2天。将体重绘制为%平均值±标准误差(SEM)。水平线为在0%和-10%的平均体重变化。当一组中超过50%的可评估动物退出研究时,曲线图被截短。

[0066] 图33是示出在10nM DHT、10nM DHT加2Gy照射、10nM DHT加100nM化合物A、以及10nM DHT加100nM化合物A和2Gy照射处理的情况下LNCaP细胞增殖测定随时间的结果的图。

[0067] 图34是示出在10nM DHT、10nM DHT加2Gy照射、10nM DHT加100nM化合物A、以及10nM DHT加100nM化合物A和2Gy照射处理的情况下LNCaP细胞增殖测定结果的图。

[0068] 图35是示出在未经任何处理或在EtOH、DMSO、100nM雷帕霉素、100nM化合物A或100nM雷帕霉素和100nM化合物A的组合处理的情况下LNCaP细胞增殖测定随时间的结果的图。

[0069] 图36是示出在未经任何处理或在EtOH、DMSO、100nM雷帕霉素、100nM化合物A或100nM雷帕霉素和100nM化合物A的组合处理的情况下LNCaP细胞增殖测定随时间的结果的图。

[0070] 图37是概述用于展示药物组合物的安全性或功效的总体研究设计的示意图。

[0071] 图38是示出用于处理治疗诱导的腹泻的所公布建议的策略 (Benson等人, 22J.Clin.Oncol.2918 (2004)), 其被修改以与研究协议一致。

[0072] 通过引用并入

[0073] 出于本文所指出的具体目的, 本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请均通过引用并入本文。

[0074] 发明详述

[0075] 除非上下文另外清楚地规定, 否则如在本文和在所附的权利要求中所使用的, 单数形式“一 (a/an)”、和“所述 (the)”包括复数的指示物。因此, 例如, 对“试剂 (an agent)”的提及包括多种此类试剂, 并且对“所述/该细胞 (the cell)”的提及包括对一个或多个细胞 (或多个细胞) 及本领域技术人员已知的其等同物的提及, 等等。当范围在本文被用于物理性质诸如分子量或化学性质诸如化学式时, 意图包括范围的所有组合和子组合以及其中的特定实施方案。术语“约”在指数字或数值范围时意指, 所指的数字或数值范围是在实验变异性内 (或在统计学实验误差内) 的近似值, 并且因此该数字或数值范围在一些情形中将在陈述的数字或数值范围的1%和15%之间变化。术语“包括 (comprising)” (和有关术语, 例如“包括 (comprise/comprises)”或具有 (having)”或“包含 (including)”) 不意图排除在其他某些实施方案例如任何的物质组合物的实施方案中, 本文描述的组合物、方法或工艺等“由描述的特征组成”或“基本上由描述的特征组成”。

[0076] 定义

[0077] 如在本说明书和所附的权利要求书中所使用的, 除非相反地指定, 否则以下术语具有下文指定的含义。

[0078] “氨基”指的是-NH₂基团。

[0079] “氰基”指的是-CN基团。

[0080] “硝基”指的是-NO₂基团。

[0081] “氧杂”指的是-O-基团。

[0082] “氧代”指的是=O基团。

[0083] “硫代”指的是=S基团。

[0084] “亚氨基”指的是=N-H基团。

[0085] “肟基”指的是=N-OH基团。

[0086] “胼基”指的是=N-NH₂基团。

[0087] “烷基”指的是单独地由碳原子和氢原子组成的、不包含不饱和度的、具有从一个至十五个碳原子的直链的或支链的烃链基团 (例如, C₁-C₁₅烷基)。在某些实施方案中, 烷基包含一个至十三个碳原子 (例如, C₁-C₁₃烷基)。在某些实施方案中, 烷基包含一个至八个碳原子 (例如, C₁-C₈烷基)。在其他实施方案中, 烷基包含一个至五个碳原子 (例如, C₁-C₅烷基)。在其他实施方案中, 烷基包含一个至四个碳原子 (例如, C₁-C₄烷基)。在其他实施方案中, 烷基包含一个至三个碳原子 (例如, C₁-C₃烷基)。在其他实施方案中, 烷基包含一个至两

个碳原子(例如, C₁-C₂烷基)。在其他实施方案中, 烷基包含一个碳原子(例如, C₁烷基)。在其他实施方案中, 烷基包含五个至十五个碳原子(例如, C₅-C₁₅烷基)。在其他实施方案中, 烷基包含五个至八个碳原子(例如, C₅-C₈烷基)。在其他实施方案中, 烷基包含两个至五个碳原子(例如, C₂-C₅烷基)。在其他实施方案中, 烷基包含三个至五个碳原子(例如, C₃-C₅烷基)。在其他实施方案中, 烷基基团选自甲基、乙基、1-丙基(正丙基)、1-甲基乙基(异丙基)、1-丁基(正丁基)、1-甲基丙基(仲丁基)、2-甲基丙基(异丁基)、1,1-二甲基乙基(叔丁基)、1-戊基(正戊基)。烷基通过单键被附接至分子的其余部分。除非说明书中另有特别说明, 否则烷基基团任选地被一个或更多个以下取代基取代: 卤素、氰基、硝基、氧代、硫代、亚氨基、肟基、三甲基硅烷基、-OR^a、-SR^a、-OC(O)-R^a、-N(R^a)₂、-C(O)R^a、-C(O)OR^a、-C(O)N(R^a)₂、-N(R^a)C(O)OR^a、-OC(O)-N(R^a)₂、-N(R^a)C(O)R^a、-N(R^a)S(O)_tR^a (其中t是1或2)、-S(O)_tOR^a (其中t是1或2)、-S(O)_tR^a (其中t是1或2) 和 -S(O)_tN(R^a)₂ (其中t是1或2), 其中每个R^a独立地为氢、烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、氟烷基、碳环基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、碳环基烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、芳基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、芳烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、杂环基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、杂环基烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、杂芳基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代), 或杂芳基烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)。

[0088] “烷氧基”指的是通过式-O-烷基的氧原子键合的基团, 其中烷基是如上定义的烷基链。

[0089] “烯基”指的是单独地由碳原子和氢原子组成的、包含至少一个碳-碳双键、并且具有从两个至十二个碳原子的直链的或支链的烃链基团(radical group)。在某些实施方案中, 烯基包含两个至八个碳原子。在其他实施方案中, 烯基包含两个至四个碳原子。烯基通过单键被附接至分子的其余部分, 例如乙烯基(ethenyl)(即, 乙烯基(vinyl))、丙-1-烯基(即, 烯丙基)、丁-1-烯基、戊-1-烯基、戊-1,4-二烯基等。除非说明书中另有特别说明, 否则烯基基团任选地被下列取代基中的一个或更多个取代: 卤素、氰基、硝基、氧代、硫代、亚氨基、肟基、三甲基硅烷基、-OR^a、-SR^a、-OC(O)-R^a、-N(R^a)₂、-C(O)R^a、-C(O)OR^a、-C(O)N(R^a)₂、-N(R^a)C(O)OR^a、-OC(O)-N(R^a)₂、-N(R^a)C(O)R^a、-N(R^a)S(O)_tR^a (其中t是1或2)、-S(O)_tOR^a (其中t是1或2)、-S(O)_tR^a (其中t是1或2) 和 -S(O)_tN(R^a)₂ (其中t是1或2), 其中每个R^a独立地为氢、烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、氟烷基、碳环基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、碳环基烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、芳基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、芳烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、杂环基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、杂环基烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、杂芳基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、或杂芳基烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)。

[0090] “炔基”指的是单独地由碳原子和氢原子组成的、包含至少一个碳-碳三键、具有从两个至十二个碳原子的直链的或支链的烃链基团。在某些实施方案中, 炔基包含两个至八个碳原子。在其他实施方案中, 炔基包含两个至六个碳原子。在其他实施方案中, 炔基包含两个至四个碳原子。炔基通过单键被附接至分子的其余部分, 例如乙炔基、丙炔基、丁炔基、戊炔基、己炔基等。除非在本说明书中另有特别说明, 否则炔基基团任选地被一个或更多个

下列取代基取代:卤素、氰基、硝基、氧代、硫代、亚氨基、胍基、三甲基硅烷基、 $-OR^a$ 、 $-SR^a$ 、 $-OC(O)R^a$ 、 $-N(R^a)_2$ 、 $-C(O)R^a$ 、 $-C(O)OR^a$ 、 $-C(O)N(R^a)_2$ 、 $-N(R^a)C(O)OR^a$ 、 $-OC(O)N(R^a)_2$ 、 $-N(R^a)C(O)R^a$ 、 $-N(R^a)S(O)_tR^a$ (其中t是1或2)、 $-S(O)_tOR^a$ (其中t是1或2)、 $-S(O)_tR^a$ (其中t是1或2)和 $-S(O)_tN(R^a)_2$ (其中t是1或2),其中每个 R^a 独立地为氢、烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、氟烷基、碳环基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、碳环基烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、芳基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、芳烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、杂环基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、杂环基烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、杂芳基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、或杂芳基烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)。

[0091] “亚烷基”或“亚烷基链”指的是将分子的其余部分连接至基团(radical group)的直链的或支链的二价烃链,其单独地由碳和氢组成、不含不饱和度并且具有从一至十二个碳原子,例如,亚甲基、亚乙基、亚丙基、正亚丁基等。亚烷基链通过单键被附接至分子的其余部分并且通过单键被附接至基团。亚烷基链与分子的其余部分和基团的一个或更多个附接点是通过亚烷基链中的一个碳或链内的任何两个碳。在某些实施方案中,亚烷基包含一个至八个碳原子(例如, C_1-C_8 亚烷基)。在其他实施方案中,亚烷基包含一个至五个碳原子(例如, C_1-C_5 亚烷基)。在其他实施方案中,亚烷基包含一个至四个碳原子(例如, C_1-C_4 亚烷基)。在其他实施方案中,亚烷基包含一个至三个碳原子(例如, C_1-C_3 亚烷基)。在其他实施方案中,亚烷基包含一个至两个碳原子(例如, C_1-C_2 亚烷基)。在其他实施方案中,亚烷基包含一个碳原子(例如, C_1 亚烷基)。在其他实施方案中,亚烷基包含五个至八个碳原子(例如, C_5-C_8 亚烷基)。在其他实施方案中,亚烷基包含两个至五个碳原子(例如, C_2-C_5 亚烷基)。在其他实施方案中,亚烷基包含三个至五个碳原子(例如, C_3-C_5 亚烷基)。除非在本说明书中另有特别说明,否则亚烷基链任选地被一个或更多个以下取代基取代:卤素、氰基、硝基、氧代、硫代、亚氨基、胍基、三甲基硅烷基、 $-OR^a$ 、 $-SR^a$ 、 $-OC(O)R^a$ 、 $-N(R^a)_2$ 、 $-C(O)R^a$ 、 $-C(O)OR^a$ 、 $-C(O)N(R^a)_2$ 、 $-N(R^a)C(O)OR^a$ 、 $-OC(O)N(R^a)_2$ 、 $-N(R^a)C(O)R^a$ 、 $-N(R^a)S(O)_tR^a$ (其中t是1或2)、 $-S(O)_tOR^a$ (其中t是1或2)、 $-S(O)_tR^a$ (其中t是1或2)和 $-S(O)_tN(R^a)_2$ (其中t是1或2),其中每个 R^a 独立地为氢、烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、氟烷基、碳环基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、碳环基烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、芳基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、芳烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、杂环基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、杂环基烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、杂芳基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、或杂芳基烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)。

[0092] “亚炔基”或“亚炔基链”指的是将分子的其余部分连接至基团的直链的或支链的二价烃链,其单独地由碳和氢组成、包含至少一个碳-碳三键并且具有从两个至十二个碳原子。亚炔基链通过单键被附接至分子的其余部分并且通过单键被附接至基团。在某些实施方案中,亚炔基包含两个至八个碳原子(例如, C_2-C_8 亚炔基)。在其他实施方案中,亚炔基包含两个至五个碳原子(例如, C_2-C_5 亚炔基)。在其他实施方案中,亚炔基包含两个至四个碳原子(例如, C_2-C_4 亚炔基)。在其他实施方案中,亚炔基包含两个至三个碳原子(例如, C_2-C_3 亚炔基)。在其他实施方案中,亚炔基包含两个碳原子(例如, C_2 亚炔基)。在其他实施方案中,

亚炔基包含五个至八个碳原子(例如, C₅-C₈亚炔基)。在其他实施方案中,亚炔基包含三个至五个碳原子(例如, C₃-C₅亚炔基)。除非在说明书中另有特别说明,否则亚炔基链任选地被一个或更多个以下取代基取代: 卤素、氰基、硝基、氧代、硫代、亚氨基、胍基、三甲基硅烷基、-OR^a、-SR^a、-OC(O)-R^a、-N(R^a)₂、-C(O)R^a、-C(O)OR^a、-C(O)N(R^a)₂、-N(R^a)C(O)OR^a、-OC(O)-N(R^a)₂、-N(R^a)C(O)R^a、-N(R^a)S(O)_tR^a (其中t是1或2)、-S(O)_tOR^a (其中t是1或2)、-S(O)_tR^a (其中t是1或2)和-S(O)_tN(R^a)₂ (其中t是1或2), 其中每个R^a独立地为氢、烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、氟烷基、碳环基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、碳环基烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、芳基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、芳烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、杂环基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、杂环基烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、杂芳基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、或杂芳基烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)。

[0093] “芳基”指的是通过从环碳原子中除去氢原子而衍生自芳香族的单环的或多环的烃环体系的基团。芳香族的单环的或多环的烃环体系仅包含氢和从五个至十八个碳原子的碳, 其中环体系中的至少一个环是完全不饱和的, 即根据休克尔理论(Hückel theory), 它包含环状的、离域化的(4n+2)π电子体系。芳基基团衍生自其的环体系包括但不限于, 例如苯、茚、茚满、茚、四氢萘以及萘的基团。除非在本说明书中另有特别说明, 否则术语“芳基”或前缀“芳-(ar-)” (例如在“芳烷基”中) 意指包括任选地被一个或更多个独立地选自以下的取代基取代的芳基基团: 烷基、烯基、炔基、卤素、氟代烷基、氰基、硝基、任选地被取代的芳基、任选地被取代的芳烷基、任选地被取代的芳烯基、任选地被取代的芳炔基、任选地被取代的碳环基、任选地被取代的碳环基烷基、任选地被取代的杂环基、任选地被取代的杂环基烷基、任选地被取代的杂芳基、任选地被取代的杂芳基烷基、-R^b-OR^a、-R^b-OC(O)-R^a、-R^b-OC(O)-OR^a、-R^b-OC(O)-N(R^a)₂、-R^b-N(R^a)₂、-R^b-C(O)R^a、-R^b-C(O)OR^a、-R^b-C(O)N(R^a)₂、-R^b-O-R^c-C(O)N(R^a)₂、-R^b-N(R^a)C(O)OR^a、-R^b-N(R^a)C(O)R^a、-R^b-N(R^a)S(O)_tR^a (其中t是1或2)、-R^b-S(O)_tR^a (其中t是1或2)、-R^b-S(O)_tOR^a (其中t是1或2)和-R^b-S(O)_tN(R^a)₂ (其中t是1或2), 其中每个R^a独立地为氢、烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、氟烷基、环烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、环烷基烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、芳基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、芳烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、杂环基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、杂环基烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、杂芳基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、或杂芳基烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代), 每个R^b独立地是直接键或直链的或支链的亚烷基或亚烯基链, 并且R^c是直链的或支链的亚烷基或亚烯基链, 并且其中除非另有说明, 否则上述取代基中的每个是未被取代的。

[0094] “芳烷基”指的是式-R^c-芳基的基团, 其中R^c是如上文定义的亚烷基链, 例如亚甲基、亚乙基等。芳烷基基团的亚烷基链部分如上文关于亚烷基链所描述的任选地被取代。芳烷基基团的芳基部分如上文关于芳基基团所描述的任选地被取代。

[0095] “芳烯基”指的是式-R^d-芳基的基团, 其中R^d是如上文定义的亚烯基链。芳烯基基团的芳基部分如上文关于芳基基团所描述的任选地被取代。芳烯基基团的亚烯基链部分如上文关于亚烯基基团定义的任选地被取代。

[0096] “芳炔基”指的是式 $-R^e$ -芳基的基团,其中 R^e 是如上文定义的亚炔基链。芳炔基基团的芳基部分如上文关于芳基基团描述的任选地被取代。芳炔基基团的亚炔基链部分如上文关于亚炔基链定义的任选地被取代。

[0097] “芳烷基氧基”指的是通过式 $-O-R_c$ -芳基的氧原子键合的基团,其中 R_c 是如上文定义的亚烷基链,例如亚甲基、亚乙基等。芳烷基基团的亚烷基链部分如上文关于亚烷基链所描述的任选地被取代。芳烷基基团的芳基部分如上文关于芳基基团所描述的任选地被取代。

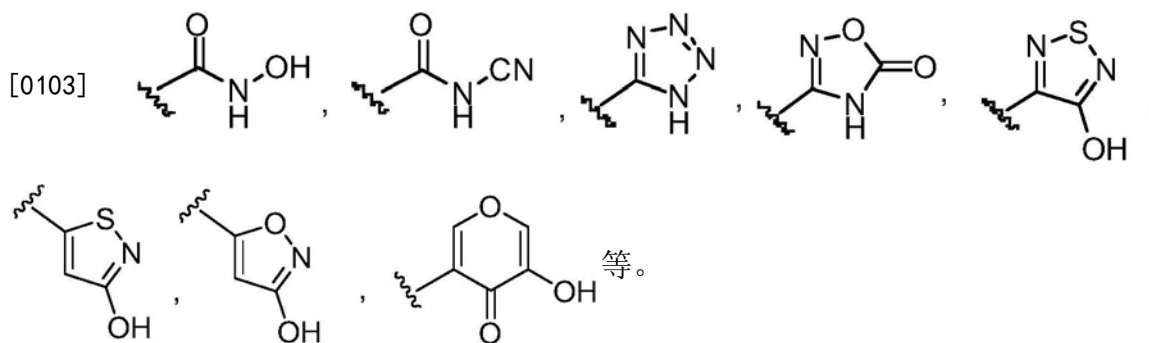
[0098] “碳环基”指的是单独地由碳原子和氢原子组成的、包括稠合的或桥接的环体系、具有从三个至十五个碳原子的稳定的非芳香族的单环或多环烷基。在某些实施方案中,碳环基包含三个至十个碳原子。在其他实施方案中,碳环基包含五个至七个碳原子。碳环基通过单键被附接至分子的其余部分。碳环基是饱和的(即,仅包含C-C单键)或不饱和的(即,包含一个或更多个双键或三键)。完全饱和的碳环基基团还被称为“环烷基”。单环的环烷基的实例包括,例如环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基和环辛基。不饱和的碳环基还被称为“环烯基”。单环的环烯基的实例包括,例如环戊烯基、环己烯基、环庚烯基和环辛烯基。多环的碳环基基团包括,例如金刚烷基、降冰片烷基(即,双环[2.2.1]庚基)、降冰片烯基、十氢萘基、7,7-二甲基-双环[2.2.1]庚基等。除非在说明书中另有特别说明,否则术语“碳环基”意指包括碳环基基团,所述碳环基基团任选地被一个或更多个独立地选自以下的取代基取代:烷基、烯基、炔基、卤素、氟烷基、氧代、硫代(thioxo)、氰基、硝基、任选地被取代的芳基、任选地被取代的芳烷基、任选地被取代的芳烯基、任选地被取代的芳炔基、任选地被取代的碳环基、任选地被取代的碳环基烷基、任选地被取代的杂环基、任选地被取代的杂环基烷基、任选地被取代的杂芳基、任选地被取代的杂芳基烷基、 $-R^b-OR^a$ 、 $-R^b-OC(O)-R^a$ 、 $-R^b-OC(O)-OR^a$ 、 $-R^b-OC(O)-N(R^a)_2$ 、 $-R^b-N(R^a)_2$ 、 $-R^b-C(O)R^a$ 、 $-R^b-C(O)OR^a$ 、 $-R^b-C(O)N(R^a)_2$ 、 $-R^b-O-R^c-C(O)N(R^a)_2$ 、 $-R^b-N(R^a)C(O)OR^a$ 、 $-R^b-N(R^a)C(O)R^a$ 、 $-R^b-N(R^a)S(O)_tR^a$ (其中t是1或2)、 $-R^b-S(O)_tR^a$ (其中t是1或2)、 $-R^b-S(O)_tOR^a$ (其中t是1或2)和 $-R^b-S(O)_tN(R^a)_2$ (其中t是1或2),其中每个 R^a 独立地为氢、烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、氟烷基、环烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、环烷基烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、芳基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、芳烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、杂环基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、杂环基烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、杂芳基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、或杂芳基烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代),每个 R^b 独立地是直接键或直链的或支链的亚烷基或亚烯基链,并且 R^c 是直链的或支链的亚烷基或亚烯基链,并且其中除非另有说明,否则上述取代基中的每个是未取代的。

[0099] “碳环基烷基”指的是式 $-R^c$ -碳环基的基团,其中 R^c 是如上文定义的亚烷基链。亚烷基链和碳环基基团如上文所定义的任选地被取代。

[0100] “碳环基炔基”指的是式 $-R^c$ -碳环基的基团,其中 R^c 是如上文定义的亚炔基链。亚炔基链和碳环基基团如上文所定义的任选地被取代。

[0101] “碳环基烷基氧基”指的是通过式 $-O-R^c$ -碳环基的氧原子键合的基团,其中 R^c 是如上文定义的亚烷基链。亚烷基链和碳环基基团如上所定义的任选地被取代。

[0102] 如本文所使用的,“羧酸生物电子等排体”指的是呈现出与羧酸部分类似的物理性质、生物性质和/或化学性质的官能团或部分。羧酸生物电子等排体的实例包括但不限于



[0104] “卤素 (halo)”或“卤素 (halogen)”指的是溴取代基、氯取代基、氟取代基或碘取代基。

[0105] “氟烷基”指的是被如上文定义的一个或多个氟基团取代的如上文定义的烷基基团,例如三氟甲基、二氟甲基、氟甲基、2,2,2-三氟乙基、1-氟甲基-2-氟乙基等。在一些实施方案中,氟烷基基团的烷基部分如上文关于烷基基团所定义的任选地被取代。

[0106] “杂环基”指的是包含两个至十二个碳原子和从一个至六个选自氮、氧和硫的杂原子的稳定的3元至18元非芳香族环基团。除非在本说明书中另外特别说明,否则杂环基基团是单环的、双环的、三环的或四环的环体系,该环体系任选地包括稠合的或桥接的环体系。杂环基基团中的杂原子任选地被氧化。一个或多个氮原子(如果存在)任选地被季铵化。杂环基基团是部分地或完全地饱和的。杂环基通过环的任何原子被附接至分子的其余部分。这样的杂环基基团的实例包括但不限于二氧杂戊环基、噻吩基[1,3]二噻烷基、十氢异喹啉基、咪唑啉基、咪唑烷基、异噻唑烷基、异噁唑烷基、吗啉基、八氢吲哚基、八氢异吲哚基、2-氧代哌嗪基、2-氧代哌啶基、2-氧代吡咯烷基、噁唑烷基、哌啶基、哌嗪基、4-哌啶酮基、吡咯烷基、吡唑烷基、奎宁环基、噻唑烷基、四氢呋喃基、三噻烷基(trithianyl)、四氢吡喃基、硫代吗啉基(thiomorpholinyl)、硫杂吗啉基(thiamorpholinyl)、1-氧代-硫代吗啉基以及1,1-二氧代-硫代吗啉基。除非在本说明书中另有特别说明,否则术语“杂环基”意指包括如上文定义的杂环基基团,其任选地被一个或多个选自以下的取代基取代:烷基、烯基、炔基、卤素、氟烷基、氧代、硫代、氰基、硝基、任选地被取代的芳基、任选地被取代的芳烷基、任选地被取代的芳烯基、任选地被取代的芳炔基、任选地被取代的碳环基、任选地被取代的碳环基烷基、任选地被取代的杂环基、任选地被取代的杂环基烷基、任选地被取代的杂芳基、任选地被取代的杂芳基烷基、 $-R^b-OR^a$ 、 $-R^b-OC(O)-R^a$ 、 $-R^b-OC(O)-OR^a$ 、 $-R^b-OC(O)-N(R^a)_2$ 、 $-R^b-N(R^a)_2$ 、 $-R^b-C(O)R^a$ 、 $-R^b-C(O)OR^a$ 、 $-R^b-C(O)N(R^a)_2$ 、 $-R^b-O-R^c-C(O)N(R^a)_2$ 、 $-R^b-N(R^a)C(O)OR^a$ 、 $-R^b-N(R^a)C(O)R^a$ 、 $-R^b-N(R^a)S(O)_tR^a$ (其中t是1或2)、 $-R^b-S(O)_tR^a$ (其中t是1或2)、 $-R^b-S(O)_tOR^a$ (其中t是1或2)和 $-R^b-S(O)_tN(R^a)_2$ (其中t是1或2),其中每个 R^a 独立地为氢、烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、氟烷基、环烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、环烷基烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、芳基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、芳烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、杂环基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、杂环基烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、杂芳基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、或杂芳基烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代),每个 R^b 独立地是直接键或直链的或支链的亚烷基或亚烯基链,并且 R^c 是直链的或支链的亚烷基或亚烯基链,并且

其中除非另有说明,否则上述取代基中的每个是未取代的。

[0107] “N-杂环基”或“N-附接的杂环基”指的是如上文所定义的杂环基基团,其包含至少一个氮并且其中杂环基基团与分子的其余部分的附接点是通过杂环基基团中的氮原子。N-杂环基基团如上文关于杂环基基团所描述的任选地被取代。这样的N-杂环基基团的实例包括但不限于1-吗啉基、1-哌啶基、1-哌嗪基、1-吡咯烷基、吡唑烷基、咪唑啉基和咪唑烷基。

[0108] “C-杂环基”或“C-附接的杂环基”指的是如上文所定义的杂环基基团,其包含至少一个杂原子并且其中杂环基基团与分子的其余部分的附接点是通过杂环基基团中的碳原子。C-杂环基基团如上文关于杂环基基团所描述的任选地被取代。这样的C-杂环基基团的实例包括但不限于2-吗啉基、2-或3-或4-哌啶基、2-哌嗪基、2-或3-吡咯烷基等。

[0109] “杂环基烷基”指的是式 R^c -杂环基的基团,其中 R^c 是如上文定义的亚烷基链。如果杂环基是含氮杂环基,则杂环基任选地在氮原子处被附接至烷基基团。杂环基烷基基团的亚烷基链如上文关于亚烷基链所定义的任选地被取代。杂环基烷基基团的杂环基部分如上文关于杂环基基团所定义的任选地被取代。

[0110] “杂环基烷氧基”指的是通过式 $O-R^c$ -杂环基的氧原子键合的基团,其中 R^c 是如上文定义的亚烷基链。如果杂环基是含氮杂环基,则杂环基任选地在氮原子处被附接至烷基基团。杂环基烷氧基基团的亚烷基链如上文关于亚烷基链所定义的任选地被取代。杂环基烷氧基基团的杂环基部分如上文关于杂环基基团所定义的任选地被取代。

[0111] “杂芳基”指的是衍生自包含两个至十七个碳原子以及从一个至六个选自氮、氧和硫的杂原子的3元至18元芳香族环基团的基团。如本文所使用的,杂芳基基团可以是单环的、双环的、三环的或四环的环体系,其中环体系中的至少一个环是完全不饱和的,即根据休克尔理论,它包含环状的、离域的 $(4n+2)$ π 电子体系。杂芳基包括稠合的或桥接的环体系。杂芳基基团中的杂原子任选地被氧化。一个或多个氮原子(如果存在)任选地被季铵化。杂芳基通过环的任何原子被附接至分子的其余部分。杂芳基的实例包括但不限于氮杂苄基(azepinyl)、吡啶基、苯并咪唑基、苯并吡啶基、1,3-苯并二氧杂环基、苯并呋喃基、苯并噁唑基、苯并[d]噻唑基、苯并噻二唑基、苯并[b][1,4]二氧杂七环基(dioxepinyl)、苯并[b][1,4]噁嗪基、1,4-苯并二噁烷基、苯并萘并呋喃基(benzonaphthofuranyl)、苯并噁唑基、苯并二氧杂环戊烯基(benzodioxolyl)、苯并二氧杂环基(benzodioxinyl)、苯并吡喃基、苯并吡喃酮基、苯并呋喃基、苯并呋喃酮基、苯并噻吩基(苯并噻吩基)、苯并噻吩并[3,2d]嘧啶基、苯并三唑基、苯并[4,6]咪唑并[1,2-a]吡啶基、咪唑基、噁唑基、环戊二烯并[d]嘧啶基、6,7-二氢-5H-环戊二烯并[4,5]噻吩并[2,3-d]嘧啶基、5,6-二氢苯并[h]喹唑啉基、5,6-二氢苯并[h]噁唑基、6,7-二氢-5H-苯并[6,7]环庚[1,2-c]吡嗪基、二苯并呋喃基、二苯并噻吩基、呋喃基、呋喃酮基、呋喃并[3,2-c]吡啶基、5,6,7,8,9,10-六氢环辛[d]嘧啶基、5,6,7,8,9,10-六氢环辛[d]吡嗪基、5,6,7,8,9,10-六氢环辛[d]吡啶基、异噻唑基、咪唑基、吡啶基、吡啶基、吡啶基、异吡啶基、二氢吡啶基、异吡啶基、异喹啉基、吡啶基、异噻唑基、5,8-甲醇-5,6,7,8-四氢喹唑啉基、萘啶基、1,6-萘啶酮基、噁二唑基、2-氧代吡啶基(oxoazepinyl)、噁唑基、环氧乙烷基、5,6,6a,7,8,9,10,10a-八氢苯并[h]喹唑啉基、1-苯基-1H-吡咯基、吩嗪基、吩噻嗪基、吩噻嗪基、酞嗪基、蝶啶基、嘌呤基、吡咯基、吡唑基、吡唑并[3,4-d]-嘧啶基、吡啶基、吡啶并[3,2-d]嘧啶基、吡啶并[3,4-d]嘧啶基、吡嗪基、嘧啶基、吡嗪基、吡咯基、喹唑啉基、喹啉基、喹啉基、异喹啉基、四氢喹啉基、5,6,7,8-四氢喹

唑啉基、5,6,7,8-四氢苯并[4,5]噻吩并[2,3-d]嘧啶基、6,7,8,9四氢-5H-环庚[4,5]噻吩并[2,3-d]嘧啶基、5,6,7,8-四氢吡啶并-[4,5-c]哒嗪基、噻唑基、噻二唑基、三唑基、四唑基、三嗪基、噻吩并[2,3-d]嘧啶基、噻吩并[3,2-d]吡啶基、噻吩并[2,3-c]哌啶基和噻吩基(即噻吩基(thienyl))。除非在本说明书中另有特别说明,否则术语“杂芳基”意指包括如上文定义的杂芳基基团,其任选地被选自以下的一个或多个取代基取代:烷基、烯基、炔基、卤素、氟烷基、卤代烯基、卤代炔基、氧代、硫代、氰基、硝基、任选地被取代的芳基、任选地被取代的芳烷基、任选地被取代的芳烯基、任选地被取代的芳炔基、任选地被取代的碳环基、任选地被取代的碳环基烷基、任选地被取代的杂环基、任选地被取代的杂环基烷基、任选地被取代的杂芳基、任选地被取代的杂芳基烷基、 $-R^b-OR^a$ 、 $-R^b-OC(O)-R^a$ 、 $-R^b-OC(O)-OR^a$ 、 $-R^b-OC(O)-N(R^a)_2$ 、 $-R^b-N(R^a)_2$ 、 $-R^b-C(O)R^a$ 、 $-R^b-C(O)OR^a$ 、 $-R^b-C(O)N(R^a)_2$ 、 $-R^b-O-R^c-C(O)N(R^a)_2$ 、 $-R^b-N(R^a)C(O)OR^a$ 、 $-R^b-N(R^a)C(O)R^a$ 、 $-R^b-N(R^a)S(O)_tR^a$ (其中t是1或2)、 $-R^b-S(O)_tR^a$ (其中t是1或2)、 $-R^b-S(O)_tOR^a$ (其中t是1或2)和 $-R^b-S(O)_tN(R^a)_2$ (其中t是1或2),其中每个 R^a 独立地为氢、烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、氟烷基、环烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、环烷基烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、芳基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、芳烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、杂环基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、杂环基烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、杂芳基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代)、或杂芳基烷基(任选地被卤素、羟基、甲氧基或三氟甲基取代),每个 R^b 独立地是直接键或直链的或支链的亚烷基或亚烯基链,并且 R^c 是直链或支链的亚烷基或亚烯基链,并且其中除非另有说明,否则上述取代基中的每个是未取代的。

[0112] “N-杂芳基”指的是如上文所定义杂芳基基团,其包含至少一个氮并且其中杂芳基基团与分子的其余部分的附接点是通过在杂芳基基团中的氮原子。N-杂芳基基团如上文关于杂芳基基团所描述的任选地被取代。

[0113] “C-杂芳基”指的是如上文定义的并且其中杂芳基基团与分子的其余部分的附接点是通过在杂芳基基团中的碳原子的杂芳基基团。C-杂芳基基团如上文关于杂芳基基团所描述的任选地被取代。

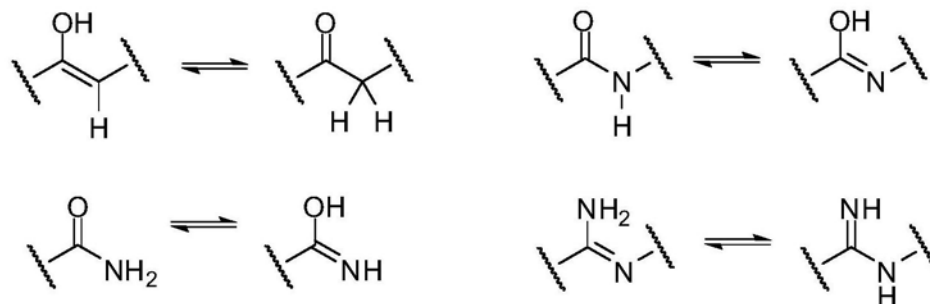
[0114] “杂芳基烷基”指的是式 $-R^c-$ 杂芳基的基团,其中 R^c 是如上文定义的亚烷基链。如果杂芳基是含氮杂芳基,则杂芳基任选地在氮原子处被附接至烷基基团。杂芳基烷基基团的亚烷基链如上文关于亚烷基链所定义的任选地被取代。杂芳基烷基基团的杂芳基部分如上文关于杂芳基基团所定义的任选地被取代。

[0115] “杂芳基烷氧基”指的是通过式 $-O-R^c-$ 杂芳基的氧原子键合的基团,其中 R^c 是如上文定义的亚烷基链。如果杂芳基是含氮杂芳基,则杂芳基任选地在氮原子处被附接至烷基基团。杂芳基烷氧基基团的亚烷基链如上文关于亚烷基链所定义的任选地被取代。杂芳基烷氧基基团的杂芳基部分如上文关于杂芳基基团所定义的任选地被取代。

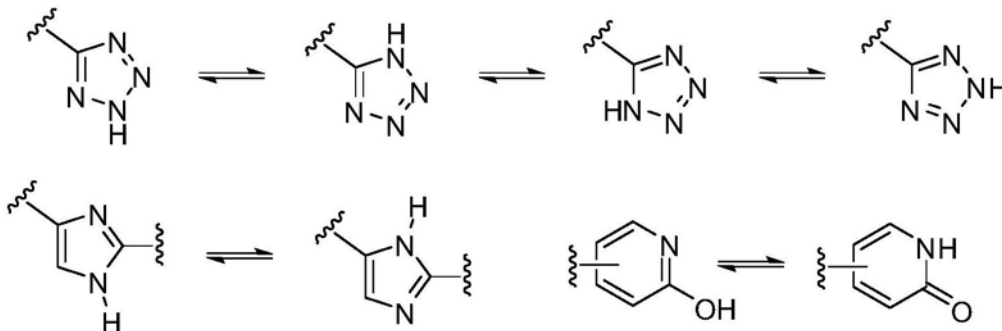
[0116] 在一些实施方案中,本文公开的化合物包含一个或多个不对称中心,并且因此产生对映异构体、非对映异构体和其他立体异构形式,该形式就绝对立体化学而言被定义为(R)-或(S)-。除非另有说明,否则意图的是本文公开的化合物的所有立体异构形式被本公开内容预期。当本文所描述的化合物包含烯烃双键时,并且除非另有说明,否则意图的是本公开内容包括E和Z几何异构体(例如,顺式或反式)。同样地,还意图包括所有可能的异构

体,以及它们的外消旋和光学纯形式,以及所有互变异构形式。术语“几何异构体”指的是烯烃双键的E或Z几何异构体(例如,顺式或反式)。术语“位置异构体”指的是围绕中心环的结构异构体,诸如围绕苯环的邻-、间-和对-异构体。

[0117] “互变异构体”指的是其中从分子的一个原子到相同分子的另一个原子的质子迁移是可能的分子。在某些实施方案中,本文提供的化合物以互变异构体存在。在其中互变异构化是可能的情况下,互变异构体的化学平衡将存在。互变异构体的精确比率取决于若干因素,包括物理状态、温度、溶剂和pH。互变异构平衡的某些实例包括:



[0118]



[0119] “药学上可接受的盐”包括酸加成盐和碱加成盐两者。本文描述的被取代的杂环衍生化合物中的任一种的药学上可接受的盐意图涵盖任何和所有药学上合适的盐形式。本文描述的化合物的优选的药学上可接受的盐是药学上可接受的酸加成盐和药学上可接受的碱加成盐。

[0120] “药学上可接受的酸加成盐”指的是保持游离碱的生物效力和性质的那些盐,该盐在生物学上或以其他方式不是不合意的并且与以下无机酸形成:诸如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、氢碘酸、氢氟酸、亚磷酸等。还包括与有机酸形成的盐,所述有机酸例如脂肪族单羧酸和脂肪族二羧酸、苯基取代的链烷酸、羟基链烷酸、链烷双酸、芳香族酸、脂肪族酸以及芳香族磺酸等,并且包括例如乙酸、三氟乙酸、丙酸、乙醇酸、丙酮酸、草酸、马来酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲烷磺酸、乙烷磺酸、对甲苯磺酸、水杨酸等。因此,示例性的盐包括硫酸盐、焦硫酸盐、硫酸氢盐、亚硫酸盐、亚硫酸氢盐、硝酸盐、磷酸盐、磷酸一氢盐、磷酸二氢盐、偏磷酸盐、焦磷酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、乙酸盐、三氟乙酸盐、丙酸盐、辛酸盐、异丁酸盐、草酸盐、丙二酸盐、琥珀酸盐、辛二酸盐、癸二酸盐、富马酸盐、马来酸盐、扁桃酸盐、苯甲酸盐、氯苯甲酸盐、甲基苯甲酸盐、二硝基苯甲酸盐、邻苯二甲酸盐、苯磺酸盐、甲苯磺酸盐、苯乙酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、苹果酸盐、酒石酸盐、甲烷磺酸盐等。还预期的是氨基酸的盐,诸如精氨酸盐、葡萄糖酸盐和半乳糖醛酸盐(参见,例如Berge S.M.等人,Pharmaceutical Salts,J.Pharma.Sci.66:1-19

(1997)]。在一些实施方案中,碱性化合物的酸加成盐可以根据技术人员所熟悉的方法和技术通过使游离碱形式与足够量的期望的酸接触以产生盐来制备。

[0121] “药学上可接受的碱加成盐”指的是保持游离酸的生物效力和性质的那些盐,该盐在生物学上或以其他方式不是不合意的。这些盐由将无机碱或有机碱添加至游离酸中来制备。在一些实施方案中,药学上可接受的碱加成盐用金属或胺(诸如碱金属和碱土金属或有机胺)来形成。衍生自无机碱的盐包括但不限于钠盐、钾盐、锂盐、铵盐、钙盐、镁盐、铁盐、锌盐、铜盐、锰盐、铝盐等。衍生自有机碱的盐包括但不限于以下的盐:伯胺、仲胺、和叔胺、被取代的胺(包括天然存在的被取代的胺、环胺、和碱性离子交换树脂),例如异丙胺、三甲胺、二乙胺、三乙胺、三丙胺、乙醇胺、二乙醇胺、2-二甲基氨基乙醇、2-二乙基氨基乙醇、二环己基胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、咖啡因、普鲁卡因、N,N-二苄基乙二胺、氯普鲁卡因、海巴明(hydrabamine)、胆碱、甜菜碱、乙二胺、亚乙基二苯胺、N-甲基葡萄糖胺、葡萄糖胺、甲基葡萄糖胺、可可碱、嘌呤、哌嗪、哌啶、N-乙基哌啶、多胺树脂等。参见Berge等人,上文。

[0122] 如本文使用的,“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”或“缓和(palliating)”或“减轻(ameliorating)”在本文可互换地使用。这些术语指的是用于获得有益的或期望的结果(包括但不限于治疗性益处和/或预防性益处)的方法。“治疗性益处”意指正在被治疗的潜在紊乱的根除或减轻。而且,治疗性益处以根除或减轻与潜在紊乱相关的一种或更多种生理症状来实现,使得在患者中观察到改善,尽管患者仍然被潜在紊乱折磨。对于预防性益处,在一些实施方案中,组合物可以被施用至处于发展特定的疾病的风险的患者、或施用至报告疾病的一种或更多种生理症状的患者,尽管此疾病的诊断未曾做出。

[0123] 在一些实施方案中,“前药”意指指示在生理状况下或通过溶剂分解被转化成本文描述的生物学活性化合物的化合物。因此,术语“前药”指的是药学上可接受的生物学活性化合物的前体。前药当被施用至受试者时典型地是无活性的,但在体内例如通过水解被转化成活性化合物。前药化合物经常在哺乳动物有机体中提供溶解性、组织相容性或延迟释放的优点(参见例如,Bundgard,H.,DESIGN OF PRODRUGS(1985),第7-9页,第21-24页(Elsevier,Amsterdam))。

[0124] 前药的讨论在Higuchi,T.,等人的Pro-drugs as Novel Delivery Systems, A.C.S.Symposium Series,第14卷中和在Bioreversible Carriers in Drug Design, ed.Edward B.Roche,American Pharmaceutical Association and Pergamon Press,1987中被提供。

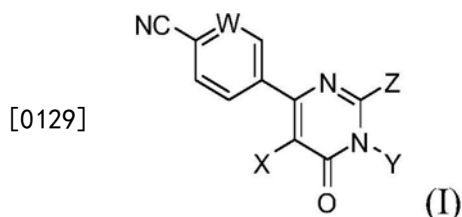
[0125] 术语“前药”还意指包括任何共价地键合的载体,当这样的前药被施用至哺乳动物受试者时,所述载体在体内释放活性化合物。如本文描述的活性化合物的前药通过以使得修饰在常规的操作中或在体内被裂解成母体活性化合物的方式修饰存在于活性化合物中的官能团来制备。前药包括其中羟基、氨基或巯基基团被结合至任何基团的化合物,当活性化合物的前药被施用至哺乳动物受试者时,该任何基团裂解以分别形成游离的羟基、游离的氨基或游离的巯基基团。前药的实例包括但不限于活性化合物中的醇官能团或胺官能团的乙酸酯衍生物、甲酸酯衍生物和苯甲酸酯衍生物等。

[0126] 被取代的杂环衍生物化合物

[0127] 本文提供了使用被取代的杂环衍生物化合物和包含可用于抑制赖氨酸特异性脱甲基酶-1(LSD-1)的化合物的药物组合物来治疗复发性和/或难治性实体瘤(包括神经内分

泌癌 (NEC) 和非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 等的方法。可用于抑制 LSD-1 的合适的被取代的杂环衍生物化合物包括在以下中描述的那些杂环衍生物化合物: 2015 年 4 月 30 日提交的美国专利申请序列第 14/701,304 号 (现在为美国专利第 9,255,097 号)、2016 年 1 月 5 日提交的美国专利申请序列第 14/988,022 号、2016 年 2 月 8 日提交的美国专利申请序列第 15/018,814 号和国际专利申请第 PCT/US2015/028635 号, 所有这些专利申请请求 2014 年 5 月 1 日提交的美国专利申请序列第 61/987,354 号的优先权权益; 以及 2015 年 11 月 5 日提交的美国专利申请序列第 62/251,507 号中描述的那些杂环衍生物化合物。这些申请中的每一个的内容出于所有目的据此以其整体通过引用并入。

[0128] 一个实施方案提供了具有式 (I) 的结构化合物或其药学上可接受的盐,



[0130] 其中,

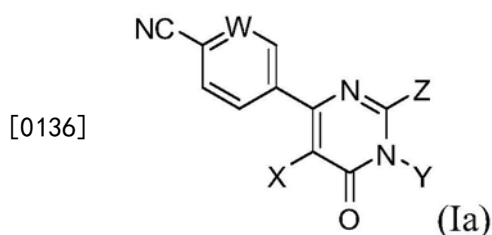
[0131] W 是 N、C-H 或 C-F;

[0132] X 是氢、卤素、-CN、任选地被取代的烷基、任选地被取代的炔基、任选地被取代的碳环基炔基、任选地被取代的芳基或任选地被取代的杂芳基;

[0133] Y 是氢、任选地被取代的烷基、任选地被取代的环烷基或任选地被取代的环烷基烷基;

[0134] Z 是任选地被取代的基团, 其选自烷基、碳环基、C-附接的杂环基、N-附接的杂环基、杂环基烷基、杂环基烯基、-O-杂环基、-N(R)-杂环基、-O-杂环基烷基、-N(R)-杂环基烷基、-N(R)(C₁-C₄亚烷基)-NR₂、-O(C₁-C₄亚烷基)-NR₂, 并且 R 是氢或 C₁-C₄ 烷基。

[0135] 一种实施方案提供了具有式 (Ia) 的结构化合物或其药学上可接受的盐,



[0137] 其中,

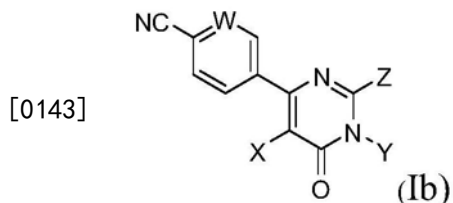
[0138] W 是 N、C-H 或 C-F;

[0139] X 是氢、卤素、-CN、任选地被取代的炔基、任选地被取代的碳环基烷基、任选地被取代的芳基或任选地被取代的杂芳基;

[0140] Y 是氢、任选地被取代的烷基、任选地被取代的环烷基或任选地被取代的环烷基烷基; 并且

[0141] Z 是任选地被取代的基团, 其选自 N-附接的杂环基、-O-杂环基烷基、-N(H)-杂环基、-N(Me)-杂环基、-N(H)-杂环基烷基或 -N(Me)-杂环基烷基。

[0142] 一种实施方案提供了具有式 (Ib) 的结构式 (I) 或式 (Ia) 的化合物或其药学上可接受的盐,



[0144] 其中，

[0145] W是N、C-H或C-F；

[0146] X是氢、卤素、任选地被取代的炔基、任选地被取代的碳环基炔基、任选地被取代的芳基或任选地被取代的杂芳基；

[0147] Y是氢、任选地被取代的烷基或任选地被取代的环烷基；并且

[0148] Z是任选地被取代的基团，其选自N-杂环基、-O-杂环基烷基、-N(H)-杂环基烷基或-N(Me)-杂环基烷基。

[0149] 另一个实施方案提供了式(Ib)的化合物或其药学上可接受的盐，其中W为C-H。另一个实施方案提供了式(Ib)的化合物或其药学上可接受的盐，其中W为C-F。另一个实施方案提供了式(Ib)的化合物或其药学上可接受的盐，其中W为N。

[0150] 另一个实施方案提供了式(Ib)的化合物或其药学上可接受的盐，其中X为氢。另一个实施方案提供了式(Ib)的化合物或其药学上可接受的盐，其中X为卤素。另一个实施方案提供了式(Ib)的化合物或其药学上可接受的盐，其中X为任选地被取代的炔基。另一个实施方案提供了式(Ib)的化合物或其药学上可接受的盐，其中X为任选地被取代的碳环基炔基。

[0151] 另一个实施方案提供了式(Ib)的化合物或其药学上可接受的盐，其中X是任选地被取代的芳基或任选地被取代的杂芳基。另一个实施方案提供了式(Ib)的化合物或其药学上可接受的盐，其中X为任选地被取代的芳基。另一个实施方案提供了式(Ib)的化合物或其药学上可接受的盐，其中X是任选地被取代的苯基。另一个实施方案提供了式(Ib)的化合物或其药学上可接受的盐，其中X是任选地被取代的杂芳基。另一个实施方案提供了式(Ib)化合物或其药学上可接受的盐，其中X选自任选地被取代的吡啶基、任选地被取代的吡唑基或任选地被取代的咪唑基。

[0152] 另一个实施方案提供了式(Ib)的化合物或其药学上可接受的盐，其中Y为氢。另一个实施方案提供了式(Ib)的化合物或其药学上可接受的盐，其中Y是任选地被取代的环烷基。另一个实施方案提供了式(Ib)的化合物或其药学上可接受的盐，其中Y为任选地被取代的烷基。另一个实施方案提供了式(Ib)的化合物或其药学上可接受的盐，其中Y为任选地被取代的C₁-C₃烷基。另一个实施方案提供了式(Ib)的化合物或其药学上可接受的盐，其中Y为任选地被取代的C₁烷基。另一个实施方案提供了式(Ib)的化合物或其药学上可接受的盐，其中Y为甲基基团。

[0153] 另一个实施方案提供了式(Ib)的化合物或其药学上可接受的盐，其中Z为任选地被取代的-O-杂环基烷基。另一个实施方案提供了式(Ib)的化合物或其药学上可接受的盐，其中Z为任选地被取代的-N(H)-杂环基烷基。另一个实施方案提供了式(Ib)的化合物或其药学上可接受的盐，其中Z为任选地被取代的-N(Me)-杂环基烷基。

[0154] 另一个实施方案提供了式(Ib)的化合物或其药学上可接受的盐，其中Z为任选地被取代的-O-杂环基烷基，并且所述杂环基烷基基团具有式-R^c-杂环基且R^c为任选地被取代

的C₁-C₃亚烷基链。另一个实施方案提供了式 (Ib) 的化合物或其药学上可接受的盐,其中Z为任选地被取代的-O-杂环基-烷基,并且所述杂环基烷基基团具有式-R^c-杂环基且R^c为任选地被取代的C₁亚烷基链。

[0155] 另一个实施方案提供了式 (Ib) 的化合物或其药学上可接受的盐,其中Z为任选地被取代的-O-杂环基烷基,并且所述杂环基烷基基团具有式-R^c-杂环基且所述杂环基为任选地被取代的含氮的4元、5元、6元或7元杂环基。

[0156] 另一个实施方案提供了式 (Ib) 的化合物或其药学上可接受的盐,其中Z为任选地被取代的-N(H)-杂环基烷基,并且所述杂环基烷基基团具有式-R^c-杂环基且R^c为任选的取代的C₁-C₃亚烷基链。另一个实施方案提供了式 (Ib) 的化合物或其药学上可接受的盐,其中Z为任选地被取代的-N(H)-杂环基-烷基,并且所述杂环基烷基基团具有式-R^c-杂环基且R^c为任选地被取代的C₁亚烷基链。

[0157] 另一个实施方案提供了式 (Ib) 的化合物或其药学上可接受的盐,其中Z为任选地被取代的-N(H)-杂环基烷基,并且所述杂环基烷基基团具有式-R^c-杂环基且所述杂环基为任选地被取代的含氮4元、5元、6元或7元杂环基。

[0158] 另一个实施方案提供了式 (Ib) 的化合物或其药学上可接受的盐,其中Z为任选地被取代的-N(Me)-杂环基烷基,并且所述杂环基烷基基团具有式-R^c-杂环基且R^c为任选地被取代的C₁-C₃亚烷基链。另一个实施方案提供了式 (Ib) 的化合物或其药学上可接受的盐,其中Z为任选地被取代的N(Me)杂环烷基,并且所述杂环基烷基基团具有式-R^c-杂环基且R^c为任选地被取代的C₁亚烷基链。

[0159] 另一个实施方案提供了式 (Ib) 的化合物或其药学上可接受的盐,其中Z为任选地被取代的-N(Me)-杂环基烷基,并且所述杂环基烷基基团具有式-R^c-杂环基且所述杂环基为任选地被取代的含氮4元、5元、6元或7元杂环基。

[0160] 另一个实施方案提供了式 (Ib) 的化合物或其药学上可接受的盐,其中Z为任选地被取代的N-杂环基。另一个实施方案提供了式 (Ib) 的化合物或其药学上可接受的盐,其中Z为4元、5元、6元或7元N-杂环基。另一个实施方案提供了式 (Ib) 的化合物或其药学上可接受的盐,其中Z为6元N-杂环基。另一个实施方案提供了式 (Ib) 的化合物或其药学上可接受的盐,其中Z为任选地被取代的哌啶。另一个实施方案提供了式 (Ib) 的化合物或其药学上可接受的盐,其中Z为任选地被取代的4-氨基哌啶。

[0161] 在一些实施方案中,式 (I)、式 (Ia) 或式 (Ib) 中描述的取代的杂环衍生物化合物具有表1中提供的结构。

表 1		
化学合成实例	结构	名称
1		4-(2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-6-氧代-5-对甲苯基-1,6-二氢嘧啶-4-基)-苯甲腈
[0162] 2		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢-嘧啶-4-基]-苯甲腈
3		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(6-甲氧基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈

表 1		
化学合成实例	结构	名称
4		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-5-(6-甲基吡啶-3-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈
5		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈
[0163] 6		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
7		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
8		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(6-甲氧基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈

表 1		
化学合成实例	结构	名称
9		4-[2-(4-氨基吡啶-1-基)-5-(6-甲氧基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
10		4-[2-(4-氨基吡啶-1-基)-5-(6-乙基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈
[0164] 11		2-氟-4-[5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-2-(4-甲基氨基吡啶-1-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈
12		2-氟-4-[5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-2-(4-甲基氨基吡啶-1-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈
13		4-[2-(4-氨基吡啶-1-基)-1-乙基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈

表 1		
化学合成实例	结构	名称
14		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-环戊基乙炔基-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
15		[2-(4-氨基哌啶-1-基)-4-(4-氟基-3-氟苯基)-5-(4-甲氧基苯基)-6-氧代-6H-嘧啶-1-基]-乙酸
[0165] 16		2-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-4-(4-氟基-3-氟苯基)-5-(4-甲氧基苯基)-6-氧代-6H-嘧啶-1-基]-乙酰胺
17		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-(3-羟基丙基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
18		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-苯并呋喃-5-基-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈

表 1		
化学合成实例	结构	名称
19		2-(4-氨基哌啶-1-基)-4-(4-氟基-3-氰苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-5-甲脞
20		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-氟-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脞
21		2-氟-4-[1-甲基-2-(4-甲基氨基哌啶-1-基)-5-(6-甲基吡啶-3-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲脞
22		4-[2-(2,8-二氮杂-螺[4.5]癸-8-基)-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脞

[0166]

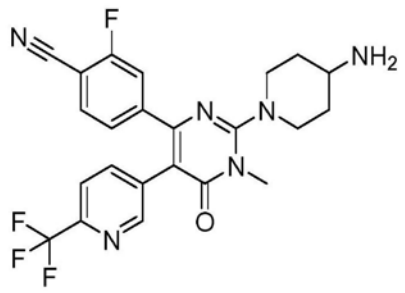
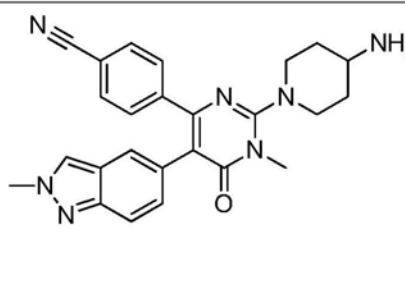
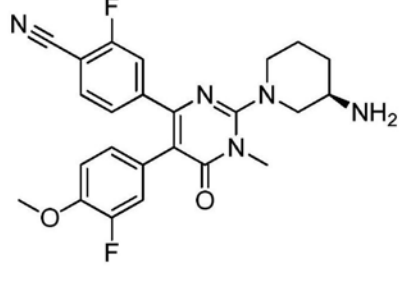
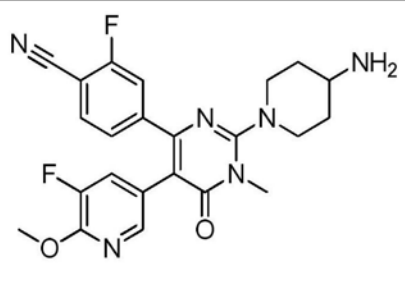
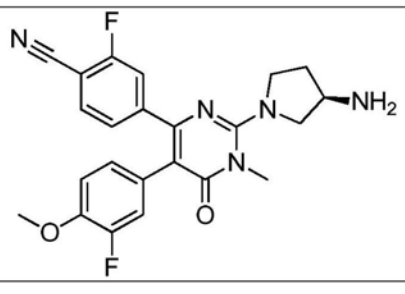
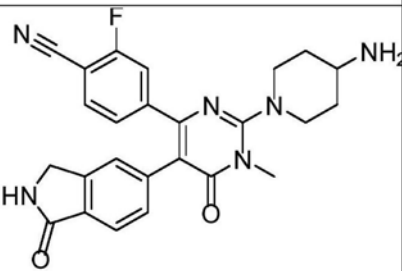
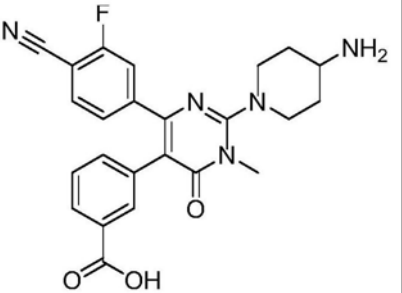
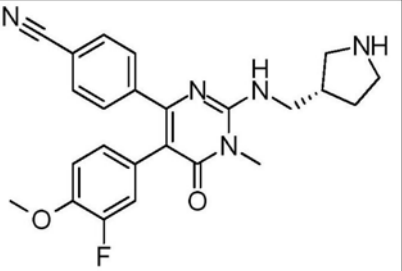
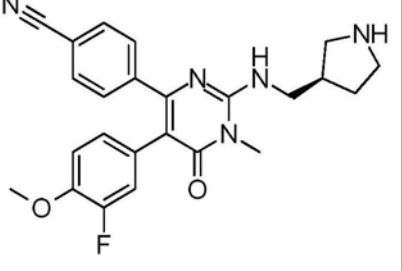
表 1		
化学合成实例	结构	名称
23		4-[2-(4-氨基哌啶基)-1-甲基-6-氧代-5-[6-(三氟甲基)(3-吡啶基)]氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
24		4-[2-(4-氨基哌啶基)-1-甲基-5-(2-甲基(2H-咪唑-5-基))-6-氧代氢嘧啶-4-基]苯甲腈
[0167] 25		4-[2-((3R)-3-氨基哌啶基)-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
26		4-[2-(4-氨基哌啶基)-5-(5-氟-6-甲氧基(3-5,6-二氢吡啶))-1-甲基-6-氧代氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
27		4-[2-((3R)-3-氨基吡咯烷基)-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈

表 1		
化学合成实例	结构	名称
28		4-[2-((3S)-3-氨基哌啶-1-基)-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
29		4-[2-((3S)-3-氨基吡咯烷-1-基)-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
30		4-[2-((3R)-3-氨基哌啶基)-5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
31		4-[2-((3S)-3-氨基哌啶-1-基)-5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈

[0168]

表 1		
化学合成实例	结构	名称
32		4-[2-(4-氨基-4-甲基哌啶-1-基)-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
33		4-[2-(4-氨基哌啶基)-1-甲基-5-(1-甲基-1H-吡唑-5-基))-6-氧代氢嘧啶-4-基]苯甲腈
[0169] 34		4-{2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-6-氧代-5-[1-(2,2,2-三氟乙基)-1H-吡唑-4-基]-1,6-二氢嘧啶-4-基}-2-氟苯甲腈
35		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-5-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
36		4-{2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-6-氧代-5-[1-(2,2,2-三氟乙基)-1H-吡唑-4-基]-1,6-二氢嘧啶-4-基}-苯甲腈

表 1		
化学合成实例	结构	名称
37		4-[2-(4-氨基吡啶基)-1-甲基-5-(2-甲基(2H-咪唑-5-基))-6-氧代氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
38		4-[2-(4-氨基吡啶基)-5-(3,5-二氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代氢嘧啶-4-基]苯甲腈
[0170] 39		4-[2-(4-氨基吡啶基)-6-(4-氟基-3-氟苯基)-3-甲基-4-氧代-3-氢嘧啶-5-基]苯甲酸
40		{4-[2-(4-氨基吡啶基)-6-(4-氟基苯基)-3-甲基-4-氧代(3-氢嘧啶-5-基)]-2-氟苯基}-N-二甲基甲酰胺
41		4-[2-(4-氨基吡啶基)-6-(4-氟基苯基)-3-甲基-4-氧代(3-氢嘧啶-5-基)]-2-氟苯甲酰胺

表 1		
化学合成实例	结构	名称
42		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-6-氧代-5-(1-氧代-2,3-二氢-1H-异吲哚-5-基)-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
43		3-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-4-(4-氟基-3-氟苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-5-基]-苯甲酸
44		4-{5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-2-[(3S)-(吡咯烷-3-基甲基)-氨基]-1,6-二氢嘧啶-4-基}-苯甲腈
45		4-{5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-2-[(3R)-(吡咯烷-3-基甲基)-氨基]-1,6-二氢嘧啶-4-基}-苯甲腈

[0171]

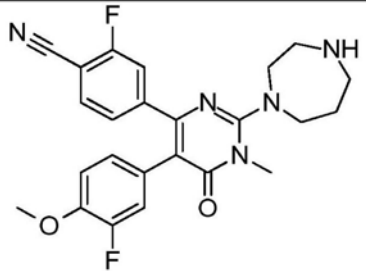
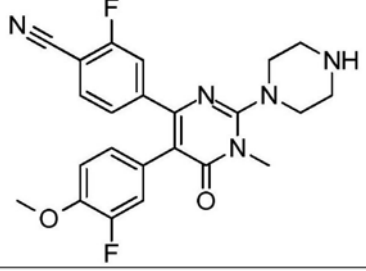
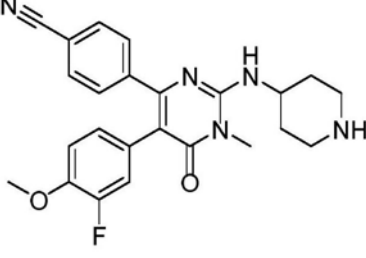
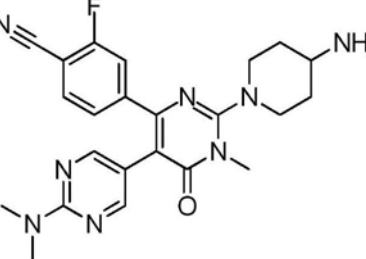
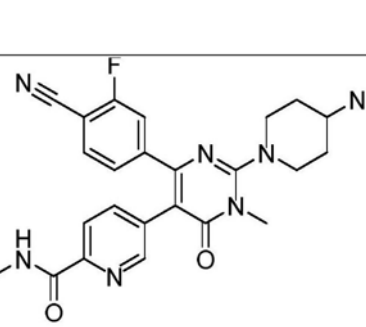
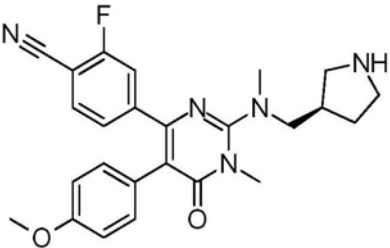
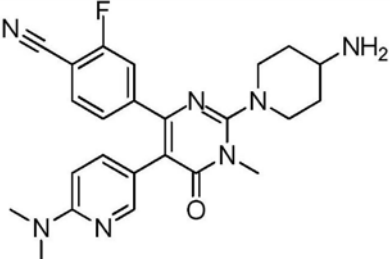
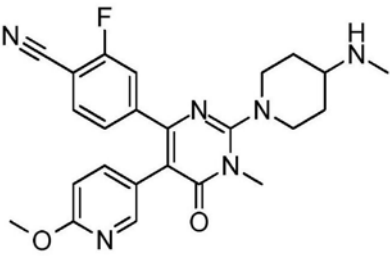
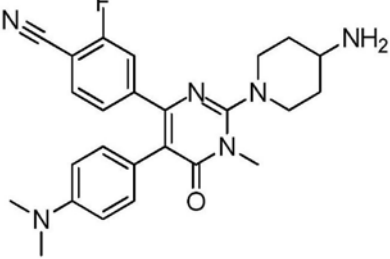
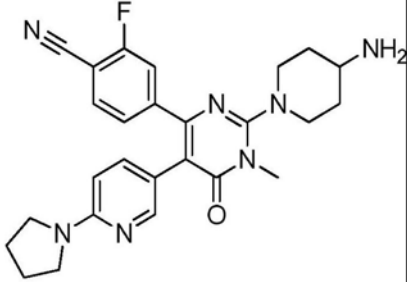
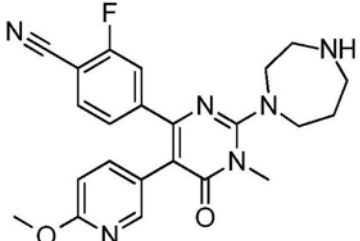
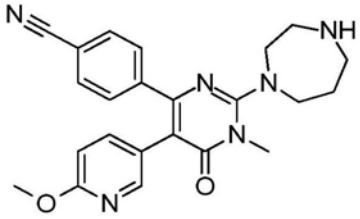
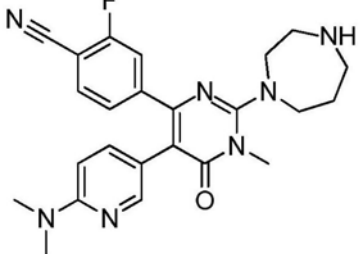
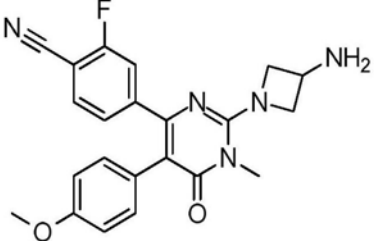
表 1		
化学合成实例	结构	名称
46		4-[2-[1,4]二氮杂环庚烷(diazepam)-1-基-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
47		2-氟-4-[5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-2-哌嗪-1-基-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈
[0172] 48		4-[5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-2-(哌啶-4-基氨基)-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈
49		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-2'-二甲基氨基-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢-[5,5']双嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
50		5-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-4-(4-氟基-3-氟苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-5-基]-吡啶-2-羧酸甲基酰胺

表 1		
化学合成实例	结构	名称
51		2-氟-4-[5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-2-[(1S)-(吡咯烷-3-基甲基)-氨基]-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈
52		2-氟-4-[5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-2-[(1R)-(吡咯烷-3-基甲基)-氨基]-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈
[0173] 53		2-氟-4-[5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-2-(哌啶-4-基氨基)(哌啶-4-基氨基)-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈
54		2-氟-4-[5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-2-(甲基-(1S)-吡咯烷-3-基甲基-氨基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈
55		2-氟-4-[5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-2-(甲基哌啶-4-基-氨基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈

表 1		
化学合成实例	结构	名称
56		2-氟-4-[5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-2-(甲基-吡咯烷-3-基甲基-氨基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈
57		4-[2-(4-氨基吡啶-1-基)-5-(6-二甲基氨基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
58		2-氟-4-[5-(6-甲氧基吡啶-3-基)-1-甲基-2-(4-甲基氨基吡啶-1-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈
59		4-[2-(4-氨基吡啶-1-基)-5-(4-二甲基氨基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈

[0174]

表 1		
化学合成实例	结构	名称
60		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-6-氧代-5-(6-吡咯烷-1-基-吡啶-3-基)-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
61		4-[2-[1,4]二氮杂环庚烷-1-基-5-(6-甲氧基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
62		4-[2-[1,4]二氮杂环庚烷-1-基-5-(6-甲氧基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
63		4-[2-[1,4]二氮杂环庚烷-1-基-5-(6-二甲基氨基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
64		4-[2-(3-氨基-氮杂环丁烷-1-基)-5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈

[0175]

[0176]

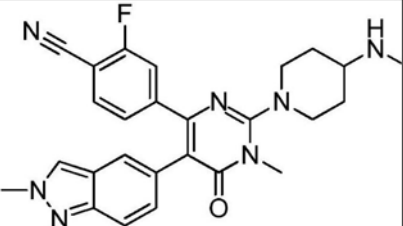
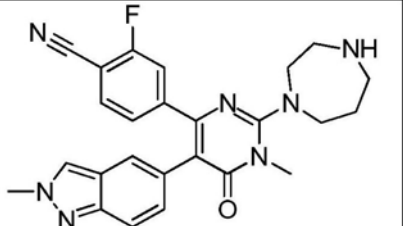
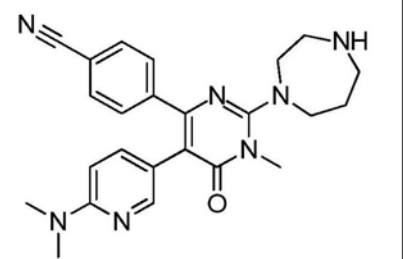
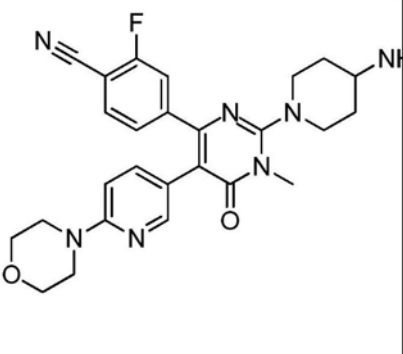
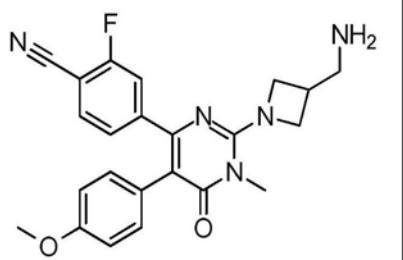
表 1		
化学合成实例	结构	名称
65		2-氟-4-[1-甲基-2-(4-甲基氨基哌啶-1-基)-5-(2-甲基-2H-咪唑-5-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈
66		4-[2-[1,4]二氮杂环庚烷-1-基-1-甲基-5-(2-甲基-2H-咪唑-5-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
67		4-[2-[1,4]二氮杂环庚烷-1-基-5-(6-二甲基氨基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈
68		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-5-(6-吗啉-4-基-吡啶-3-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
69		4-[2-(3-氨基甲基氮杂环丁烷-1-基)-5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈

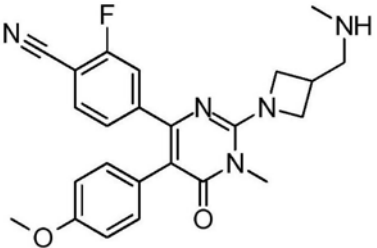
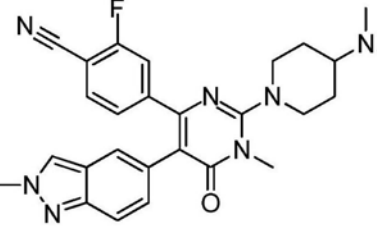
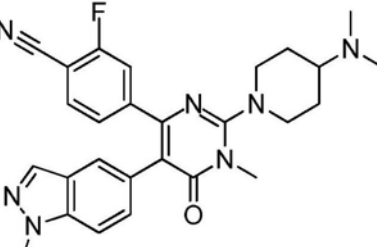
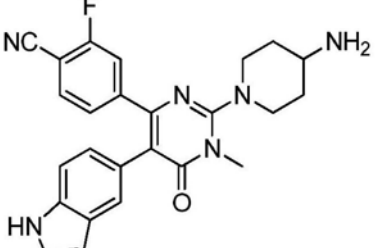
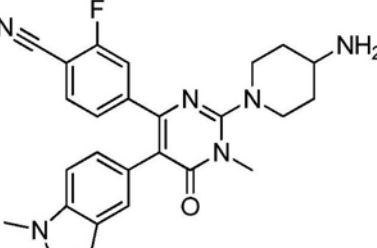
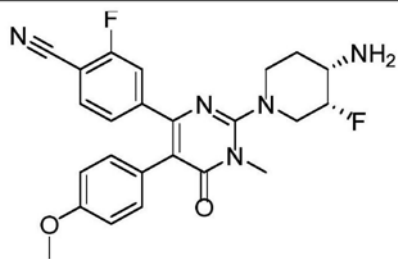
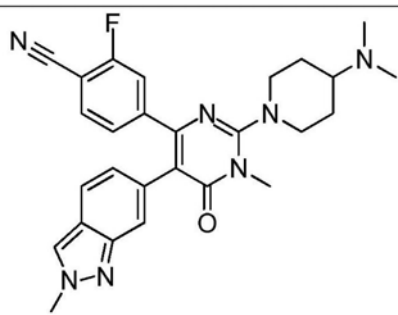
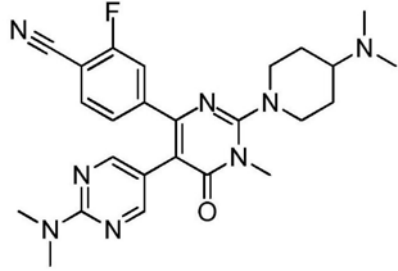
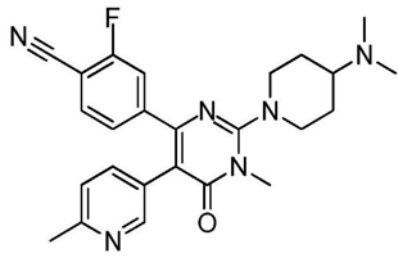
表 1		
化学合成实例	结构	名称
70		2-氟-4-[5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-2-(3-甲基氨基甲基氮杂环丁烷-1-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈
71		4-[2-(4-二甲基氨基哌啶-1-基)-1-甲基-5-(2-甲基-2H-咪唑-5-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
[0177] 72		4-[2-(4-二甲基氨基哌啶-1-基)-1-甲基-5-(1-甲基-1H-咪唑-5-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
73		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(1H-咪唑-5-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
74		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-5-(1-甲基-1H-咪唑-5-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈

表 1		
化学合成实例	结构	名称
75		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(1H-吡啶-6-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
76		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-5-(1-甲基-1H-吡啶-6-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
77		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(1H-吡唑-6-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
78		4-[2-((4R, 3S)-4-氨基-3-氟哌啶-1-基)-5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈

[0178]

表 1		
化学合成实例	结构	名称
79		4-[2-((4S, 3R)-4-氨基-3-氟哌啶-1-基)-5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
80		4-[2-(4-二甲基氨基哌啶-1-基)-1-甲基-5-(2-甲基-2H-咪唑-6-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
81		4-[2'-二甲基氨基-2-(4-二甲基氨基哌啶-1-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢-[5,5']双嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
82		4-[2-(4-二甲基氨基哌啶-1-基)-1-甲基-5-(6-甲基吡啶-3-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈

[0179]

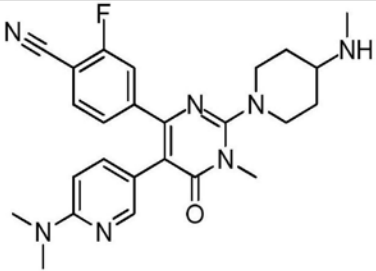
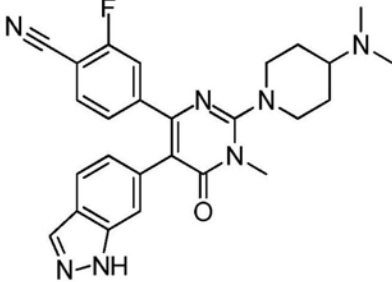
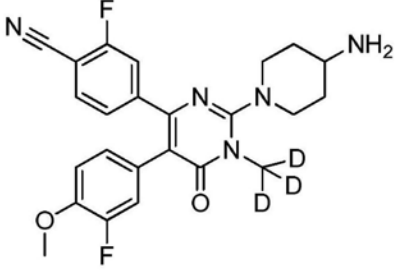
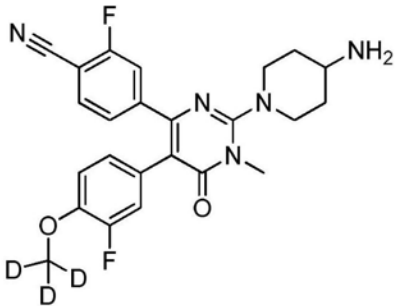
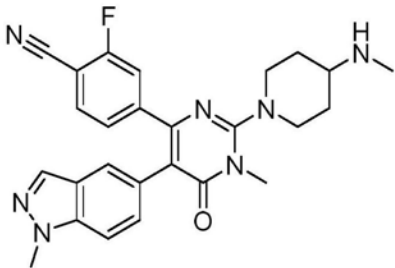
表 1		
化学合成实例	结构	名称
83		4-[5-(6-二甲基氨基吡啶-3-基)-1-甲基-2-(4-甲基氨基吡啶-1-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
84		4-[2-(4-二甲基氨基吡啶-1-基)-5-(2H-咪唑-6-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
[0180] 85		4-[2-(4-氨基吡啶-1-基)-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-氘代甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
86		4-[2-(4-氨基吡啶-1-基)-5-(3-氟-4-氘代甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
87		2-氟-4-[1-甲基-2-[4-(甲基氨基)吡啶-1-基]-5-(1-甲基咪唑-5-基)-6-氧代嘧啶-4-基]苯甲腈

表 1		
化学合成实例	结构	名称
88		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(1H-吡唑-5-基)-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脒
89		4-[5-(4-氨基苯基)-2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脒
[0181] 90		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-5-[4-(甲基氨基)苯基]-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脒
91		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-[3-氟-4-(甲基氨基)苯基]-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脒
92		4-[2-[4-(二甲基氨基)哌啶-1-基]-5-(6-甲氧基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脒

表 1		
化学合成实例	结构	名称
93		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(6-乙氧基-5-氟吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代咪唑-4-基]-2-氟苯甲腈
94		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(6-乙氧基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代咪唑-4-基]-2-氟苯甲腈
95		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(4-乙氧基苯基)-1-甲基-6-氧代咪唑-4-基]-2-氟苯甲腈
96		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-[4-(2-羟基乙氧基)苯基]-1-甲基-6-氧代咪唑-4-基]-2-氟苯甲腈
97		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-[4-(2-羟基乙氧基)苯基]-1-甲基-6-氧代咪唑-4-基]苯甲腈

[0182]

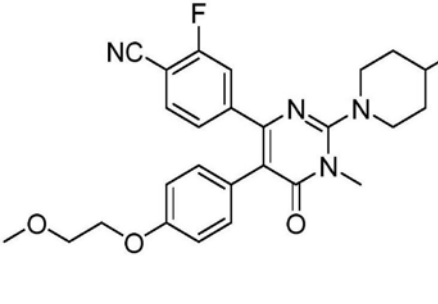
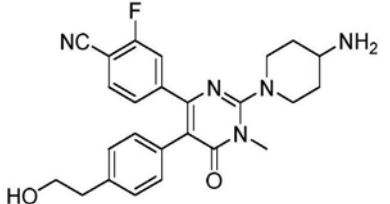
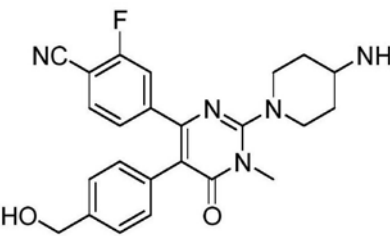
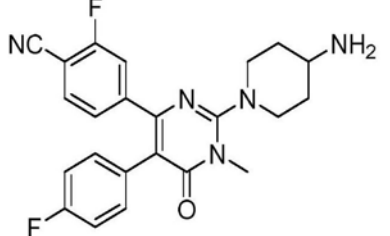
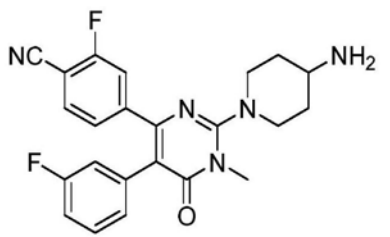
化学合成实例	结构	名称
98		4-[2-(4-氨基吡啶-1-基)-5-[4-(2-甲氧基乙氧基)苯基]-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脞
99		4-[2-(4-氨基吡啶-1-基)-5-[4-(2-羟基乙基)苯基]-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脞
[0183] 100		4-[2-(4-氨基吡啶-1-基)-5-[4-(羟基甲基)苯基]-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脞
101		4-[2-(4-氨基吡啶-1-基)-5-(4-氟苯基)-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脞
102		4-[2-(4-氨基吡啶-1-基)-5-(3-氟苯基)-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脞

表 1		
化学合成实例	结构	名称
103		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(3,5-二氟苯基)-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脞
104		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(3,4-二氟苯基)-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脞
[0184] 105		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-5-(4-甲磺酰基苯基)-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脞
106		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(4-氯苯基)-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脞
107		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-[4-(甲氧基甲基)苯基]-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脞

表 1		
化学合成实例	结构	名称
108		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
109		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-环丙基甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
[0185] 110		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-环丙基甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈
111		2-(4-氨基哌啶-1-基)-6-(4-氯-3-氟苯基)-5-(4-甲氧基苯基)-3-甲基-3H-嘧啶-4-酮
112		2-(4-氨基哌啶-1-基)-6-(4-羟基-苯基)-3-甲基-5-(1-甲基-1H-咪唑-5-基)-3H-嘧啶-4-酮

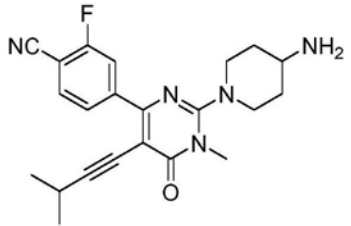
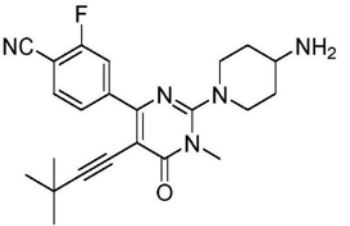
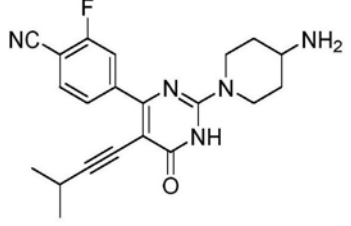
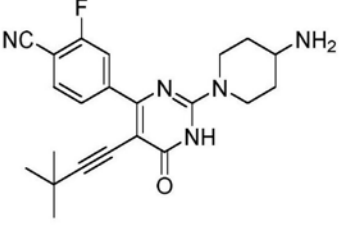
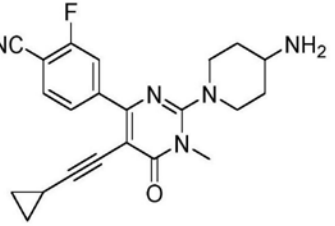
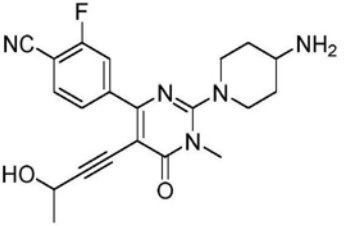
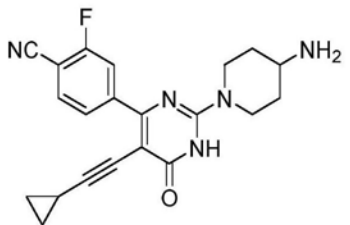
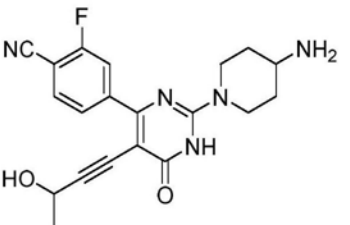
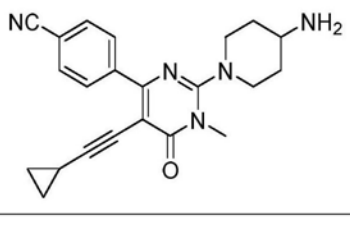
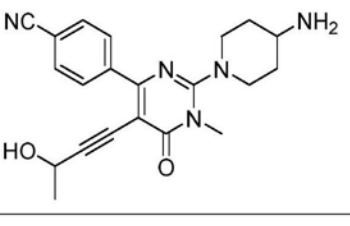
[0186]

表 1		
化学合成实例	结构	名称
113		2-(4-氨基哌啶-1-基)-6-(4-氟苯基)-3-甲基-5-(1-甲基-1H-吲哚-5-基)-3H-嘧啶-4-酮
114		2-(4-氨基哌啶-1-基)-3-甲基-5-(1-甲基-1H-吲哚-5-基)-6-苯基-3H-嘧啶-4-酮
115		2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-3-甲基-6-吡啶-4-基-3H-嘧啶-4-酮
116		2-(4-氨基哌啶-1-基)-3-甲基-5-(1-甲基-1H-吲哚-5-基)-6-吡啶-4-基-3H-嘧啶-4-酮
117		2-(4-氨基哌啶-1-基)-6-(4-甲氧基苯基)-3-甲基-5-(1-甲基-1H-吲哚-5-基)-3H-嘧啶-4-酮

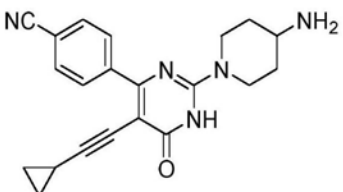
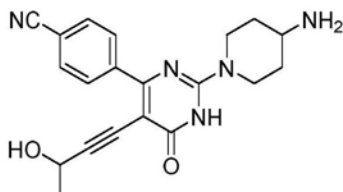
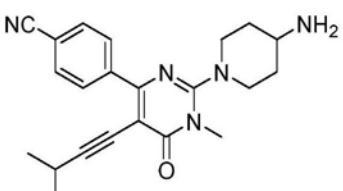
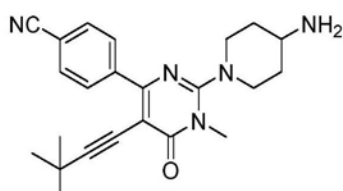
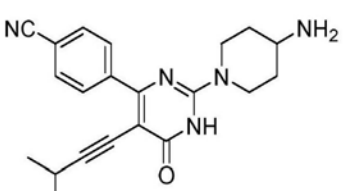
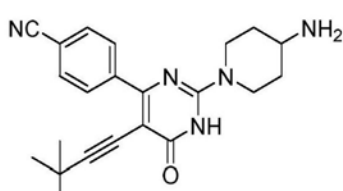
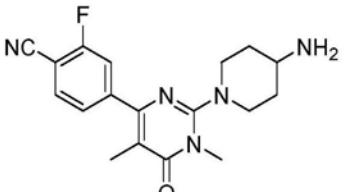
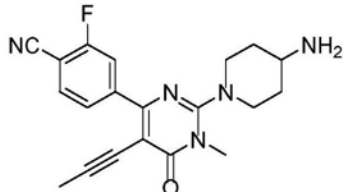
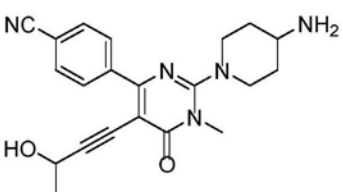
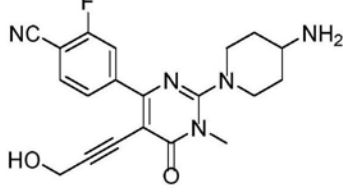
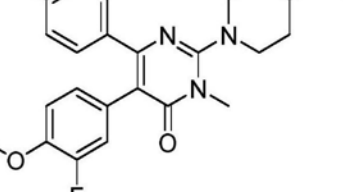
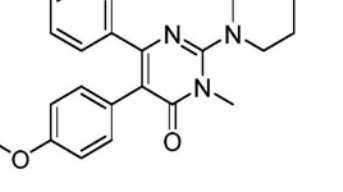
表 1		
化学合成实例	结构	名称
118		3-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]苯甲腈
119		2-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]苯甲腈
[0187] 120		2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-甲腈
121		2-(4-氨基哌啶-1-基)-4-(4-氟基-3-氟苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-5-甲腈
122		4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(4-甲氧基苯基)-6-氧代-1H-嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈

[0188] 在一些实施方案中,本文所述的取代的杂环衍生物化合物具有表2中提供的结构。

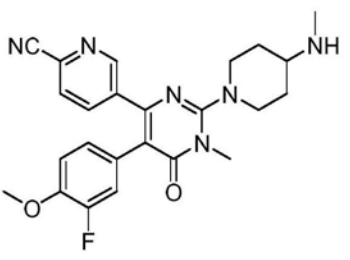
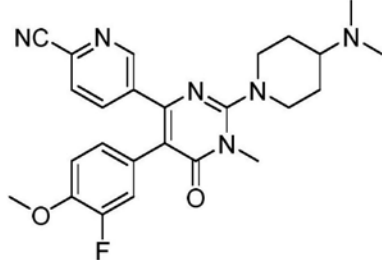
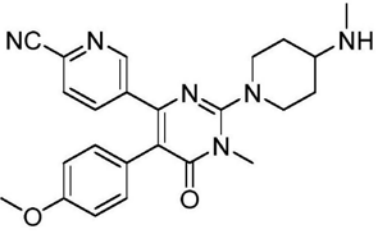
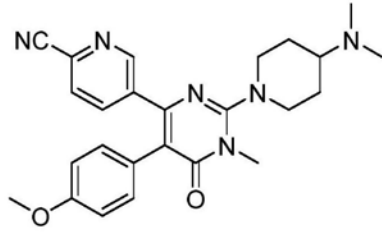
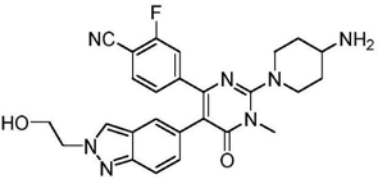
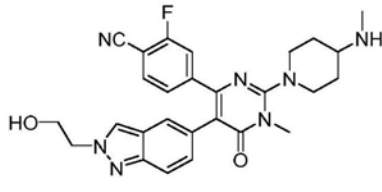
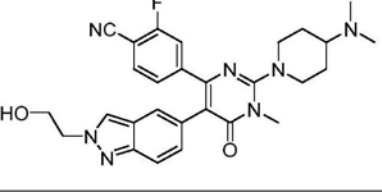
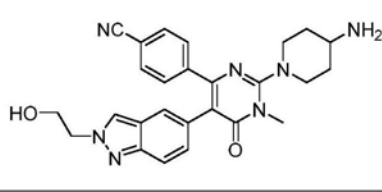
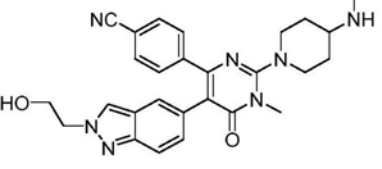
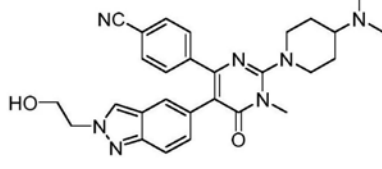
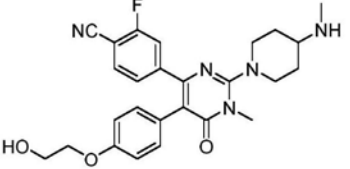
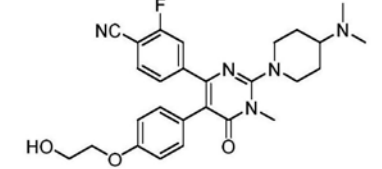
[0189]

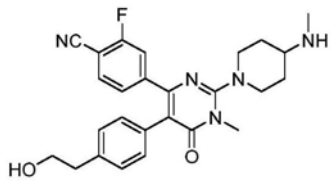
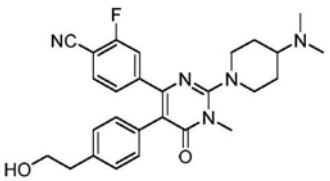
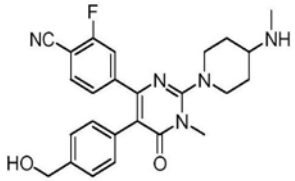
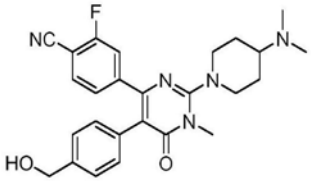
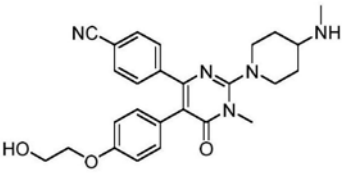
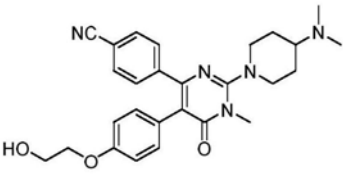
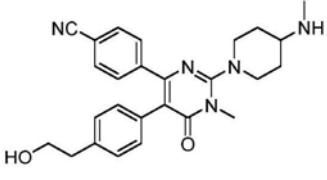
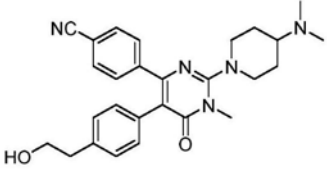
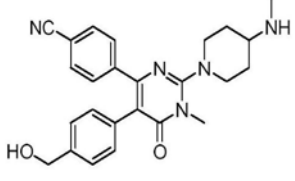
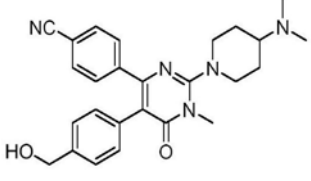
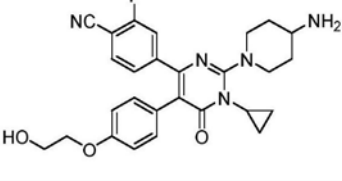
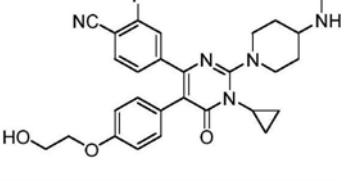
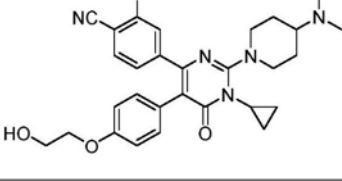
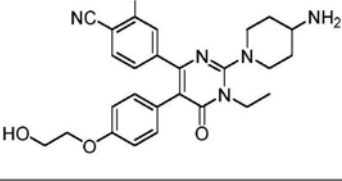
[0190]

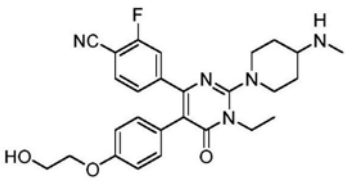
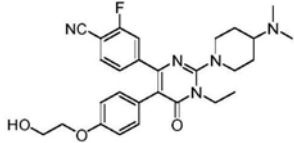
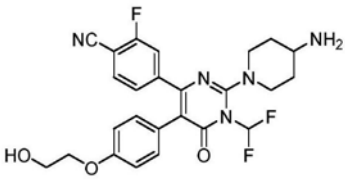
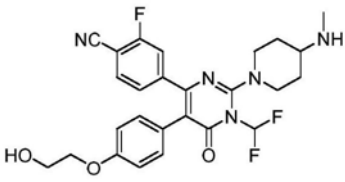
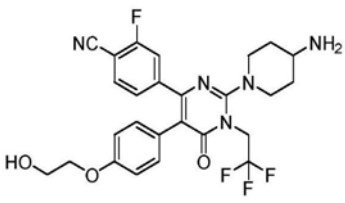
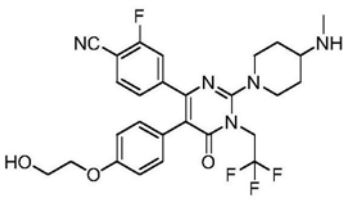
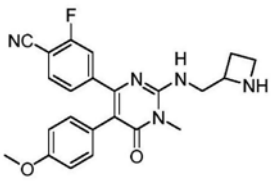
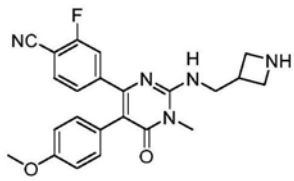
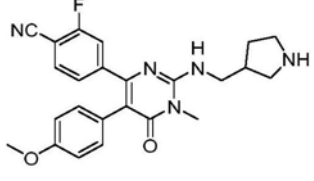
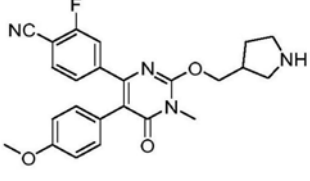
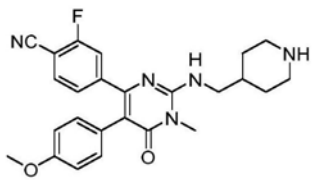
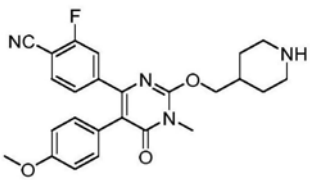
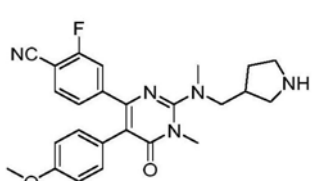
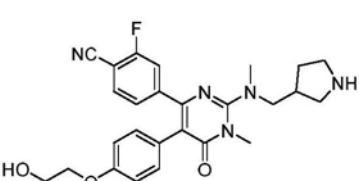
[0191]

[0192]

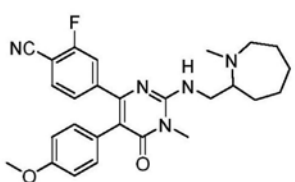
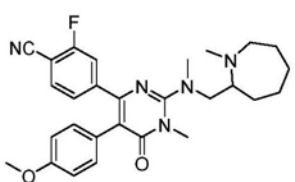
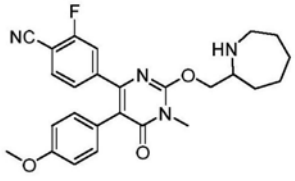
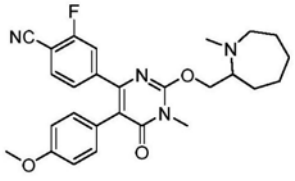
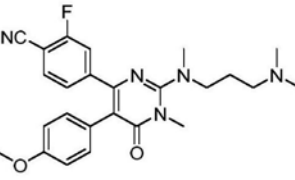
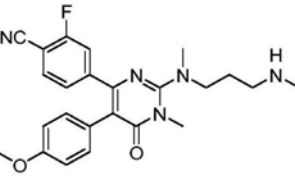
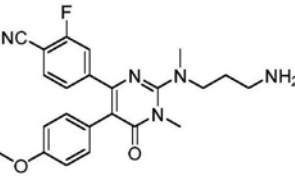
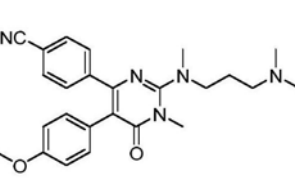
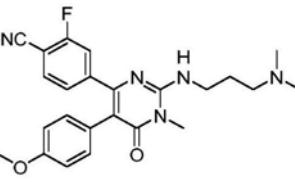
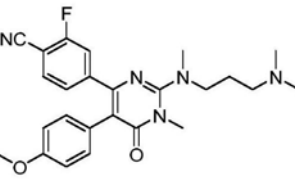
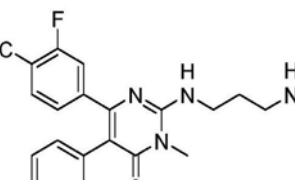
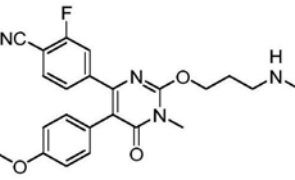
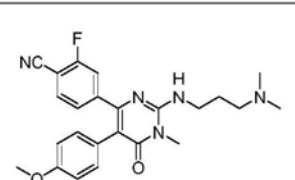
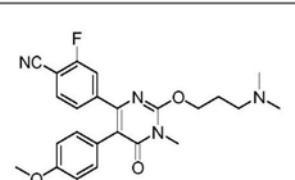
[0193]

表 2	
	
	
	
	
	
	
	

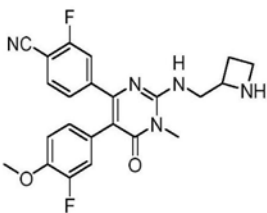
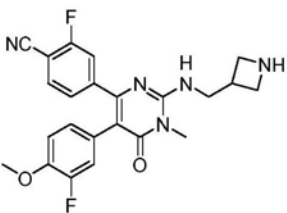
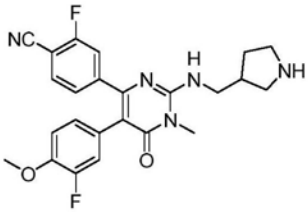
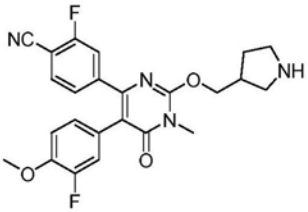
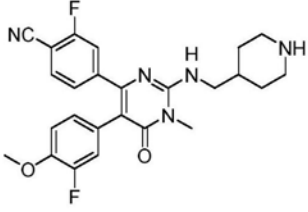
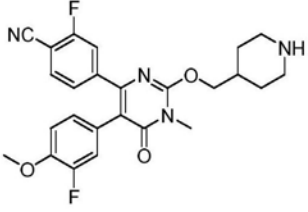
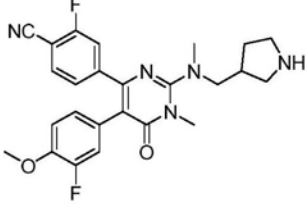
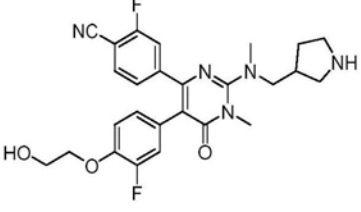
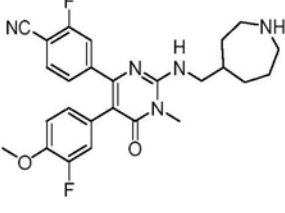
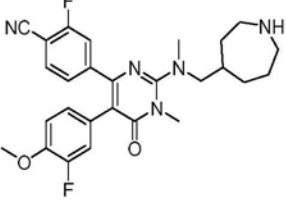
[0194]

[0195]

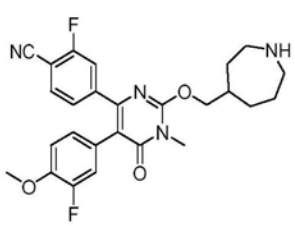
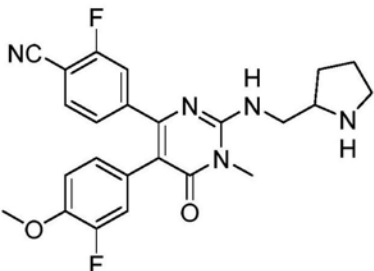
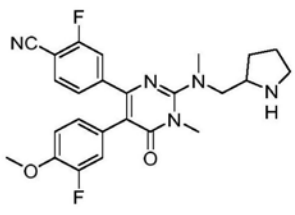
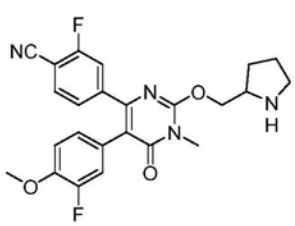
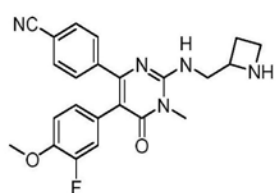
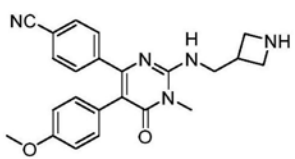
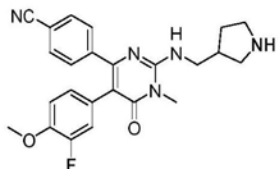
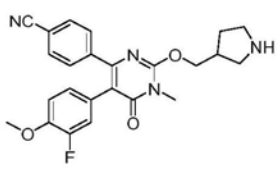
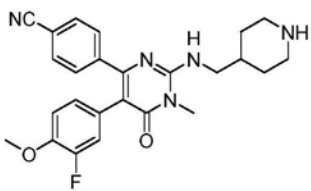
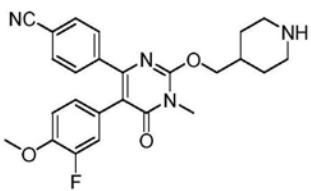
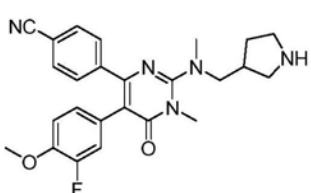
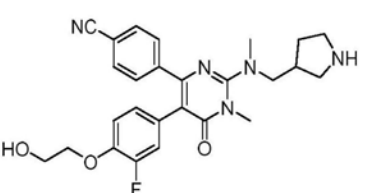
[0196]

[0197]

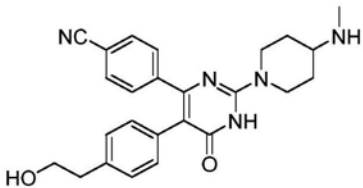
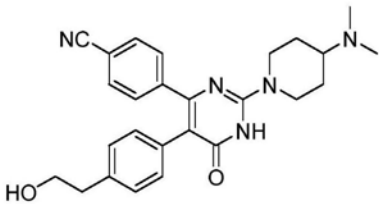
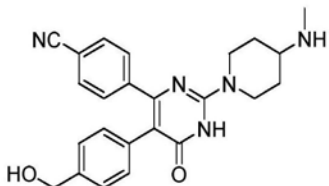
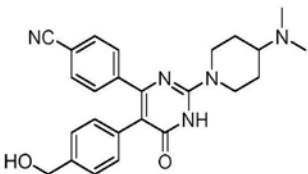
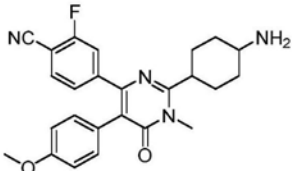
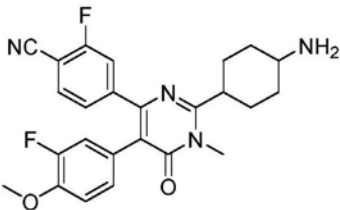
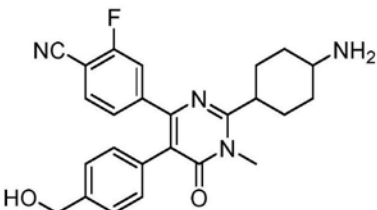
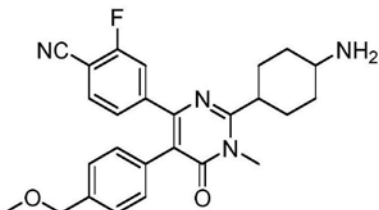
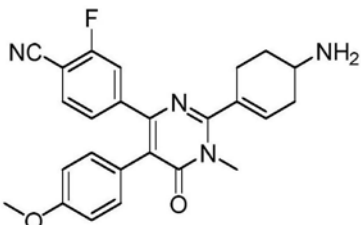
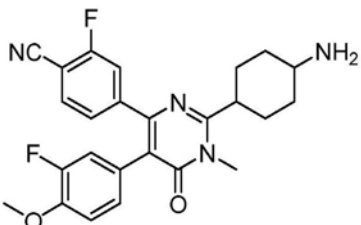
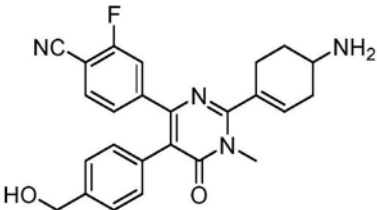
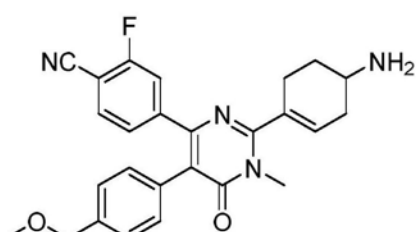
[0198]

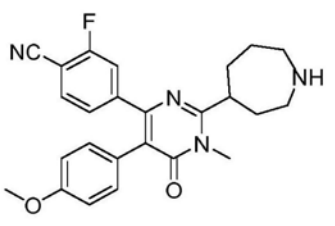
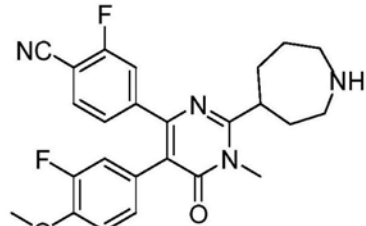
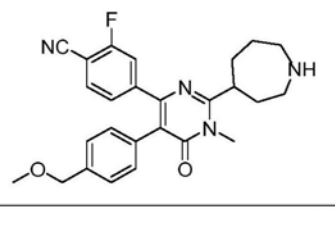
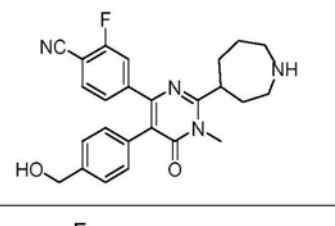
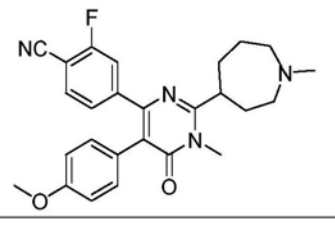
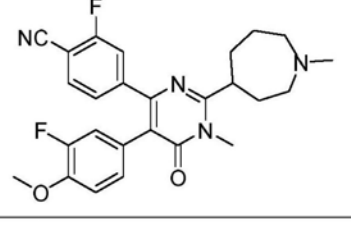
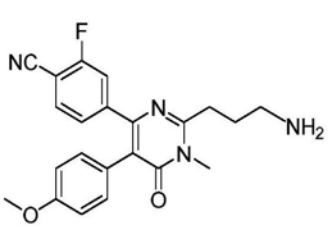
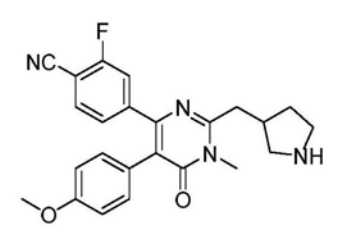
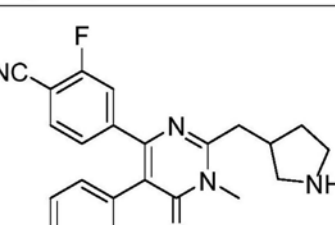
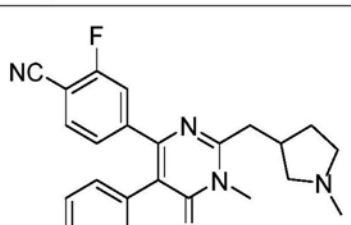
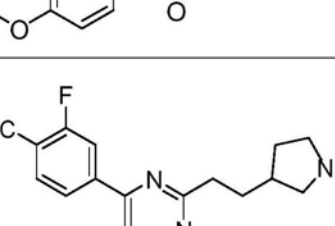
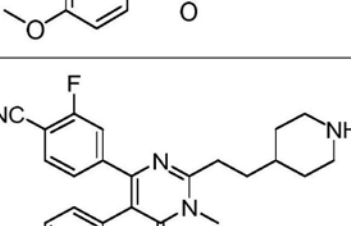
[0199]

[0200]

[0201]

[0202]

[0203]

表 2	

[0204] 取代的杂环衍生物化合物的制备

[0205] 用于本文描述的反应的化合物根据本领域技术人员已知的有机合成技术,从可商购的化学品和/或从化学文献中描述的化合物开始来制备。“可商购的化学品”获自标准商业来源,包括Acros Organics (Pittsburgh,PA),Aldrich Chemical (Milwaukee,WI, including Sigma Chemical and Fluka),Apin Chemicals Ltd. (Milton Park,UK),Avocado Research (Lancashire,U.K.),BDH Inc. (Toronto,Canada),Bionet (Cornwall,U.K.),Chemservice Inc. (West Chester,PA),Crescent Chemical Co. (Hauppauge,NY),Eastman Organic Chemicals,Eastman Kodak Company (Rochester,NY),Fisher Scientific Co. (Pittsburgh,PA),Fisons Chemicals (Leicestershire,UK),Frontier Scientific (Logan,UT),ICN Biomedicals,Inc. (Costa Mesa,CA),Key Organics (Comwall,U.K.),Lancaster Synthesis (Windham,NH),Maybridge Chemical Co.Ltd. (Comwall,U.K.),Parish Chemical Co. (Orem,UT),Pfaltz&Bauer,Inc. (Waterbury,CN),Polyorganix (Houston,TX),Pierce Chemical Co. (Rockford,IL),Riedel de Haen AG (Hanover,Gennany),Spectrum Quality Product,Inc. (New Brunswick,NJ),TCI America (Portland,OR),Trans World Chemicals,Inc. (Rockville,MD),and Wako Chemicals USA,Inc. (Richmond,VA)。

[0206] 详述可用于制备本文描述的化合物的反应物的合成或提供描述该制备的论文的参考资料的合适的参考书和专著包括例如,SYNTHETIC ORGANIC CHEMISTRY,John Wiley&Sons, Inc.,New York;S.R.Sandler等人,ORGANIC FUNCTIONAL GROUP PREPARATIONS,第二版,Academic Press,New York,1983;H.O.House,MODERN SYNTHETIC REACTIONS,第二版,W.A.Benjamin, Inc.Menlo Park,Calif.1972;T.L.Gilchrist,HETEROCYCLIC CHEMISTRY,第二版,John Wiley& Sons,New York,1992;J.March,ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY:REACTIONS,MECHANISMS&STRUCTURE,第四版,Wiley-Interscience,New York,1992。详述可用于制备本文描述的化合物的反应物的合成或提供描述该制备的论文的参考资料的另外的合适的参考书和专著包括例如,Fuhrhop,J.

[0213] 在某些实施方案中,如本文描述的取代的杂环衍生物化合物作为纯的化学品被施用。在其他实施方案中,本文所述的取代的杂环衍生物化合物与药学上合适的或可接受的载体(在本文中也被称为药学上合适的(或可接受的)赋形剂、生理学上合适的(或可接受的)赋形剂或生理学上合适的(或可接受的)载体)组合,所述载体基于所选的施用途径和标准药学实践选择,如例如在REMINGTON:THE SCIENCE&PRACTICE OF PHARMACY (Gennaro,第21卷.Mack Pub.Co.,Easton,PA(2005))中描述的。

[0214] 本文提供了药物组合物,其包含至少一种被取代的杂环衍生物化合物或其立体异构体、药学上可接受的盐、水合物、溶剂化物或N-氧化物,以及一种或更多种药学上可接受的载体。如果载体与组合物的其他成分相容并且对组合物的受体(即,受试者)无害,则载体(或赋形剂)是可接受的或合适的。

[0215] 一个实施方案提供了药物组合物,其包含式(I)的化合物或其药学上可接受的盐和药学上可接受的赋形剂。一个实施方案提供了药物组合物,其包含式(Ia)的化合物或其药学上可接受的盐和药学上可接受的赋形剂。一个实施方案提供了药物组合物,其包含式(Ib)的化合物或其药学上可接受的盐和药学上可接受的赋形剂。

[0216] 在某些实施方案中,如由式(I)所描述的取代的杂环衍生物化合物基本上是纯的,因为其含有少于约5%,或少于约1%,或少于约0.1%的其他有机小分子,诸如例如在合成方法的一个或更多个步骤中产生的未反应的中间体或合成副产物。

[0217] 合适的口服剂型包括例如片剂,丸剂,袋剂,或硬明胶或软明胶、甲基纤维素或易于溶解在消化道中的另一种合适材料的胶囊。在一些实施方案中,使用合适的无毒固体载体,其包括例如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、蔗糖、碳酸镁等。(参见,例如,REMINGTON:THE SCIENCE&PRACTICE OF PHARMACY (Gennaro,第21版.Mack Pub.Co.,Easton,PA(2005))。

[0218] 包含至少一种如本文描述的取代的杂环衍生物化合物的组合物的剂量取决于患者(例如人)的状况(即疾病的阶段)、一般健康状况、年龄和其他因素而不同。

[0219] 药物组合物以适合于待治疗(或预防)的疾病的方式施用。适当的剂量和合适的施用的持续时间和频率将通过诸如患者的病状况、患者的疾病的类型和严重程度、活性成分的特定形式和施用的方法的因素来确定。通常,适当的剂量和治疗方案提供一定量的组合物,所述量足以提供治疗和/或预防益处(例如,改善的临床结果,诸如更频繁的完全或部分缓解,或更长的无疾病和整体存活,或症状严重程度减轻)。最佳剂量通常使用实验模型和/或临床试验来确定。最佳剂量取决于患者的身体质量、重量或血容量。

[0220] 口服剂量典型地在从约1.0mg至约1000mg的范围内,每天一次至四次或更多次。

[0221] 取代的杂环衍生物化合物的用途

[0222] 表观遗传学是对由除了基础的DNA序列之外的机制引起的基因表达的可遗传变化的研究。在表观遗传调控中起作用的分子机制包括DNA甲基化和染色质/组蛋白修饰。

[0223] 真核生物的基因组在细胞核内高度组织化。需要进行大规模的压实以将人类基因组的30亿个核苷酸包装到细胞核中。染色质是构成染色体的DNA和蛋白质的复合物。组蛋白是染色质的主要蛋白质成分,充当DNA围绕其缠绕的线轴。染色质结构的变化受组蛋白的共价修饰和非组蛋白结合蛋白的影响。在各个位点处修饰组蛋白的若干类别的酶是已知的。

[0224] 存在总计六类组蛋白(H1、H2A、H2B、H3、H4和H5),该六类组蛋白组织化成两组:核

心组蛋白 (H2A、H2B、H3和H4) 和连接组蛋白 (linkerhistone) (H1和H5)。染色质的基本单元是核小体,该核小体由约147个围绕核心组蛋白八聚体缠绕的DNA的碱基对组成,该核心组蛋白八聚体由两个拷贝的核心组蛋白H2A、H2B、H3和H4的每个组成。

[0225] 然后,基本的核小体单元通过核小体的聚集和折叠被进一步组织化和凝聚以形成高度凝聚的染色质结构。一系列不同的凝聚状态是可能的,并且染色质结构的紧度 (tightness) 在细胞周期期间变化,在细胞分裂过程期间是最紧密的。

[0226] 染色质结构在调节基因转录中起重要作用,基因转录不能从高度凝聚的染色质有效发生。染色质结构受组蛋白蛋白质 (特别是组蛋白H3和H4) 的一系列翻译后修饰控制,并且最常见于组蛋白尾部,其延伸超出核心核小体结构。这些修饰是乙酰化、甲基化、磷酸化、核糖基化、类泛素化 (sumoylation)、泛素化、瓜氨酸化、去亚胺化 (deimination) 和生物素化。组蛋白H2A和H3的核心也可以被修饰。组蛋白修饰是多种生物过程 (诸如基因调控、DNA修复和染色体凝聚) 的组成部分。

[0227] 组蛋白甲基化是最重要的染色质标志的一种;这些在转录调控、DNA损伤反应、异染色质形成和维持以及X染色体失活中起重要作用。最近的发现还揭示,组蛋白甲基化通过影响剪接调节物的补充而影响前-mRNA (pre-mRNA) 的剪接结果。组蛋白甲基化包括赖氨酸的单甲基化、二甲基化和三甲基化,以及精氨酸的单甲基化、对称的二甲基化和不对称的二甲基化。取决于甲基化的位点和程度,这些修饰可以是活化的或抑制的标志。

[0228] 组蛋白脱甲基酶

[0229] 如被本文所称的“脱甲基酶”或“蛋白脱甲基酶”指的是从多肽中除去至少一个甲基基团的酶。脱甲基酶包含JmJc结构域,并且可以是甲基-赖氨酸脱甲基酶或甲基-精氨酸脱甲基酶。某些脱甲基酶作用于组蛋白,例如,充当组蛋白H3或H4脱甲基酶。例如,H3脱甲基酶可以使H3K4、H3K9、H3K27、H3K36和/或H3K79中的一种或更多种脱甲基化。可选择地,H4脱甲基酶可以使组蛋白H4K20脱甲基化。已知脱甲基酶可以使单甲基化底物、二甲基化底物和/或三甲基化底物脱甲基化。另外,组蛋白脱甲基酶可以作用于甲基化的核心组蛋白底物、单核小体底物、双核小体底物和/或寡核小体底物、肽底物和/或染色质 (例如,在基于细胞的测定中)。

[0230] 首先被发现的赖氨酸脱甲基酶是赖氨酸特异性脱甲基酶1 (LSD1/KDM1),其使用黄素作为辅因子使单甲基化的和二甲基化的H3K4或H3K9脱甲基化。包含Jumonji C (JmJc) 结构域的第二类别的组蛋白脱甲基酶被预测,并且当使用甲醛释放测定法发现H3K36脱甲基酶时被证实,其被命名为包含JmJc结构域的组蛋白脱甲基酶1 (JHDM1/KDM2A)。

[0231] 随后,更多的含JmJc结构域的蛋白被鉴定出来,并且它们可以系统发育地群集成七个亚家族:JHDM1、JHDM2、JHDM3、JMJD2、JARID、PHF2/PHF8、UTX/UTY和仅JmJc结构域。

[0232] LSD-1

[0233] 赖氨酸特异性脱甲基酶1 (LSD-1) 是组蛋白赖氨酸脱甲基酶,其特异性地在K4处使单甲基化和二甲基化的组蛋白H3脱甲基化,并且还在K9处使二甲基化组蛋白H3脱甲基化。尽管LSD-1的主要靶标表现出是单甲基化和二甲基化组蛋白赖氨酸,特别是H3K4和H3K9,但文献中有证据表明LSD-1可使非组蛋白蛋白如p53、E2F1、Dnmt1和STAT3上的甲基化赖氨酸脱甲基化。

[0234] LSD-1具有与多胺氧化酶和单胺氧化酶相当程度的结构相似性和氨基酸同一性/

同源性,所有这些(即MAO-A、MAO-B和LSD-1)都是黄素依赖性胺氧化酶,其催化氮-氢键和/或氮-碳键的氧化。LSD-1还包括N末端SWRIM结构域。存在通过选择性剪接产生的LSD-1的两种转录变体。

[0235] 在某些实施方案中,本文公开的化合物能够通过使生物样品与本文公开的被取代的杂环化合物接触来抑制生物样品中的LSD-1活性。在某些实施方案中,如本文中公开的被取代的杂环化合物能够调节生物样品中组蛋白-4赖氨酸-3甲基化的水平。在某些实施方案中,如本文中公开的被取代的杂环化合物能够调节生物样品中的组蛋白-3赖氨酸-9甲基化水平。

[0236] 本文公开的被取代的杂环化合物缺乏显著的MAO-A或MAO-B抑制活性。在某些实施方案中,如本文所公开的被取代的杂环化合物将LSD-1抑制活性抑制至比MAO-A和/或MAO-B抑制活性更大的程度。

[0237] 一个实施方案提供调节细胞中基因转录的方法,包括通过将赖氨酸特异性脱甲基酶1酶暴露于式(I)化合物来抑制赖氨酸特异性脱甲基酶1活性。一个实施方案提供调节细胞中基因转录的方法,包括通过将赖氨酸特异性脱甲基酶1酶暴露于式(Ia)化合物来抑制赖氨酸特异性脱甲基酶1活性。一个实施方案提供调节细胞中基因转录的方法,包括通过将赖氨酸特异性脱甲基酶1酶暴露于式(Ib)化合物来抑制赖氨酸特异性脱甲基酶1活性。

[0238] 治疗方法

[0239] 本文公开了一般性地或针对一种或多种特定靶基因,调节细胞或受试者中的脱甲基化的方法。调节脱甲基化以控制多种细胞功能,包括但不限于:分化;增殖;细胞凋亡;肿瘤发生,白血病发生或其他致癌转化事件;脱发;或性别分化。

[0240] 一个实施方案提供治疗有相应需要的患者的癌症的方法,包括向患者施用式(I)化合物或其药学上可接受的盐。一个实施方案提供治疗有相应需要的患者的癌症的方法,包括向患者施用式(Ia)化合物或其药学上可接受的盐。一个实施方案提供治疗有相应需要的患者的癌症的方法,包括向患者施用式(Ib)化合物或其药学上可接受的盐。

[0241] 在另一个实施方案中,提供了使用被取代的杂环衍生化合物和包含用于抑制赖氨酸特异性脱甲基酶-1(LSD-1)的化合物的药物组合物治疗复发性和/或难治性实体瘤(包括神经内分泌癌(NEC))和非霍奇金淋巴瘤(NHL)等的方法。复发指的是经过一段时间的改善后疾病或疾病的体征和症状再次出现。难治性指的是对治疗无响应的疾病或状况。难治性癌症指的是对治疗无响应的癌症,并且包括其中癌症在治疗开始时可具有耐药性或癌症在治疗期间变得耐药的情况。

[0242] 神经内分泌肿瘤始于身体神经内分泌系统的激素产生细胞,其由在传统激素产生内分泌细胞和神经细胞之间杂交的细胞组成。神经内分泌细胞遍布全身器官,诸如肺和胃肠道,包括胃和肠。它们执行特定的功能,诸如调节通过肺部的空气和血液流动以及控制食物移动通过胃肠道的速度。存在许多类型的神经内分泌肿瘤,包括三种特定类型:嗜铬细胞瘤、Merkel细胞癌和神经内分泌癌。

[0243] 嗜铬细胞瘤是一种罕见的肿瘤,其起始于肾上腺的嗜铬细胞。这些特化细胞在压力期间释放激素肾上腺素。嗜铬细胞瘤最常发生在肾上腺髓质,即肾上腺内的区域。这种类型的肿瘤会增加激素肾上腺素和去甲肾上腺素的产生,从而增加血压和心率。尽管嗜铬细胞瘤通常是良性的,但它仍可危及生命,因为肿瘤可在受伤后释放大量的肾上腺素进入血

液。百分之八十(80%)的嗜铬细胞瘤患者仅在一个肾上腺上有肿瘤,10%的患者在两个肾上腺上都有肿瘤,并且10%的患者在肾上腺外有肿瘤。

[0244] Merkel细胞癌,也称为皮肤的神经内分泌癌或小叶癌(trabular cancer),是一种高度侵袭性(快速生长)的罕见癌症。它始于皮肤下方和毛囊中的激素产生细胞,并且它见于头颈部。

[0245] 大约60%的神经内分泌肿瘤不能被描述为除神经内分泌癌之外的特定类型癌症。神经内分泌癌可以在身体的许多部位开始,包括肺、脑和胃肠道。

[0246] 神经内分泌癌的症状可包括:高血糖症(血液中的糖过多);低血糖症(血液中的糖分太少);腹泻;特定区域的持续性疼痛;食欲不振/体重减轻;持续咳嗽或声音嘶哑;身体任何部位增厚或肿块;肠道或膀胱习惯的变化;不明原因的体重增加或减少;黄疸(皮肤发黄);异常出血或排泄;持续发烧或盗汗;头痛;焦虑;和胃溃疡病。

[0247] 非霍奇金淋巴瘤(NHL)是其中在淋巴系统中形成恶性(癌)细胞的疾病。存在由不同类型白细胞(B细胞、T细胞、NK细胞)形成的许多不同类型的NHL。大多数类型的NHL由B细胞形成。NHL可为惰性的(缓慢增长的)或侵袭性的(快速增长)。成人中最常见的NHL类型是弥漫性大B细胞淋巴瘤和滤泡性淋巴瘤,弥漫性大B细胞淋巴瘤通常是侵袭性的,滤泡性淋巴瘤通常是惰性的。蕈样真菌病和Sézary综合征是从皮肤白细胞中开始的NHL类型。原发性中枢神经系统淋巴瘤是罕见类型的NHL,其开始于大脑、脊髓或眼睛的白细胞。

[0248] 非霍奇金淋巴瘤以不同的速率生长和扩散,并且可以是惰性或侵袭性的。惰性淋巴瘤倾向于生长和缓慢扩散,并且几乎没有体征和症状。侵袭性淋巴瘤生长并迅速扩散,并且有可能严重的体征和症状。

[0249] 惰性NHL可包括滤泡性淋巴瘤、淋巴浆细胞性淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、单核细胞样B细胞淋巴瘤、胃粘膜相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤、胃外MALT淋巴瘤、地中海腹腔淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤和原发性皮肤间变性大细胞淋巴瘤。侵袭性NHL可包括弥漫性大B细胞淋巴瘤、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤、滤泡性大细胞淋巴瘤、III期、间变性大细胞淋巴瘤(包括皮肤间变性大细胞淋巴瘤和全身间变性大细胞淋巴瘤)、结外NK-/T细胞淋巴瘤、淋巴瘤样肉芽肿病、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤、外周T细胞淋巴瘤、肝脾T细胞淋巴瘤、皮下脂膜炎样T细胞淋巴瘤、肠病型肠T细胞淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、Burkitt淋巴瘤、淋巴母细胞淋巴瘤、成人T细胞白血病/淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、移植后淋巴组织增生性紊乱、真性组织细胞性淋巴瘤、原发性积液淋巴瘤(primary effusion lymphoma)和浆母细胞性淋巴瘤。

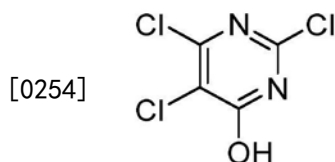
[0250] 鉴于本公开内容,其他实施方案和用途对于本领域技术人员而言将是明显的。提供以下实施例仅用于说明各种实施方案,并且不应解释为以任何方式限制本发明。

实施例

[0251] I. 化学合成

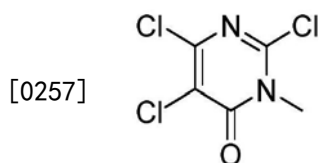
[0252] 除非另有说明,否则如从商业供应商处接收的使用试剂和溶剂。无水溶剂和烘箱干燥的玻璃器皿用于对水分和/或氧气敏感的合成转化。产率未被优化。反应时间是近似值并且未被优化。除非另有说明,否则柱色谱法和薄层色谱法(TLC)在硅胶上进行。光谱以ppm(δ)给出,并且耦合常数J以赫兹报告。对于质子光谱,使用溶剂峰作为参考峰。

[0253] 制备1A:2,5,6-三氯嘧啶-4-醇



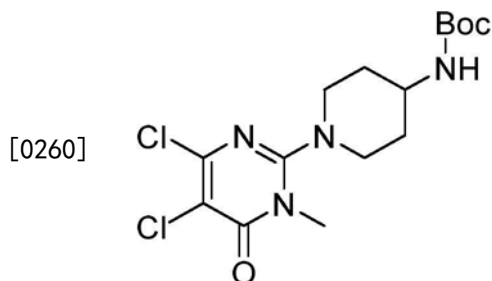
[0255] 向在THF (50mL) 中的2,4,5,6-四氯嘧啶 (5g, 22.9mmol) 的溶液中逐滴加入1N NaOH (31mL, 31.2mmol), 并且将混合物在室温搅拌过夜。将溶液用1N HCl酸化, 并用DCM (3x) 提取。将有机物合并、干燥并且在真空中浓缩。将固体在Et₂O中在室温浆化持续30分钟, 过滤, 用Et₂O洗涤, 并且干燥, 以给出3.0g (66%) 的标题化合物。关于C₄HCl₃N₂O计算的[M+H]为201; 实测值为201。

[0256] 制备1B: 2,5,6-三氯-3-甲基-3-氢嘧啶-4-酮



[0258] 在0°C向在THF (50mL) 中的2,5,6-三氯嘧啶-4-醇 (1g, 5.0mmol) 和K₂CO₃ (759mg, 5.5mmol) 的混合物中逐滴加入碘甲烷 (714mg, 5.0mmol), 并且将反应在室温搅拌过夜。将反应混合物用乙酸乙酯 (EA) 稀释。将有机相用盐水洗涤, 干燥并在真空中浓缩。残余物通过二氧化硅色谱法 (10:1, PE:EA) 来纯化, 以给出760mg (71%) 的标题化合物。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 3.74 (s, 3H). 关于C₅H₃Cl₃N₂O计算的[M+H]为213; 实测值为213。

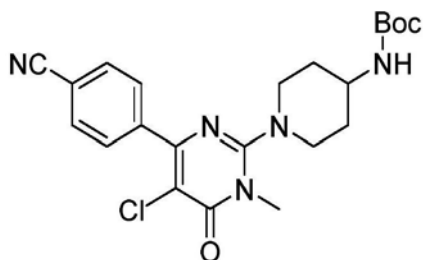
[0259] 制备1C: N-[1-(5,6-二氯-3-甲基-4-氧代(3-氢嘧啶-2-基))(4-哌啶基)](叔丁氧基)甲酰胺



[0261] 将在DMF (10mL) 中的2,5,6-三氯-3-甲基-3-氢嘧啶-4-酮 (426mg, 2.0mmol)、DIEA (536mg, 4.0mmol) 和哌啶-4-基氨基甲酸叔丁酯 (400mg, 2mmol) 的溶液在120°C加热持续1小时。在真空中除去溶剂, 并且将残余物通过二氧化硅色谱法 (1:1, PE:EA) 纯化, 以给出550mg (73%) 的标题化合物。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 1.45 (s, 9H), 1.50-1.58 (m, 2H), 2.06-2.10 (m, 2H), 2.98-3.05 (m, 2H), 3.48 (s, 3H), 3.53-3.56 (m, 2H), 3.70 (s, 1H), 4.52 (s, 1H). 关于C₁₅H₂₂Cl₂N₄O₃计算的[M+H]为213; 实测值为213。

[0262] 制备1D: 1-(5-氯-4-(4-氰基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-2-基)哌啶-4-基氨基甲酸叔丁酯

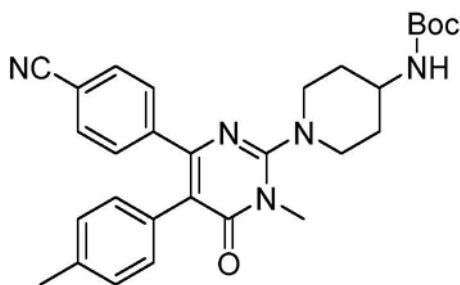
[0263]



[0264] 在DMF (10mL) 中的N-[1-(5,6-二氯-3-甲基-4-氧代(3-氢嘧啶-2-基))(4-哌啶基)](叔丁氧基)甲酰胺(500mg, 1.3mmol)、4-氰基苯基硼酸(195mg, 1.3mmol)、[1,1'-双(二叔丁基膦基)二茂铁]氯化钡(II) (81mg, 0.13mmol) 和 K_2CO_3 (359mg, 2.6mmol) 的混合物用氮气冲洗并在85℃搅拌持续2小时。加入水, 并且用EA (3x) 提取混合物。将有机物合并, 用水洗涤, 用盐水洗涤, 干燥并且在真空中浓缩。残余物通过二氧化硅色谱法(1:1, PE:EA) 纯化, 以给出250mg (40%) 的标题化合物。 1H NMR (400MHz, $CDCl_3$): δ 1.45 (s, 9H), 1.54-1.61 (m, 2H), 2.05-2.10 (m, 2H), 2.99-3.05 (m, 2H), 3.48-3.56 (s, 5H), 3.70 (s, 1H), 4.56 (s, 1H), 7.73 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.93 (d, $J=8.0$ Hz, 2H)。关于 $C_{22}H_{26}ClN_5O_3$ 的计算的[M+H]为, 444; 实测值为444。

[0265] 制备1E:1-(4-(4-氰基苯基)-1-甲基-6-氧代-5-对甲苯基-1,6-二氢嘧啶-2-yl)哌啶-4-基氨基甲酸叔丁酯

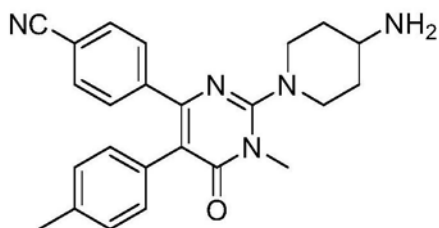
[0266]



[0267] 将在DMF (10mL) 中的1-(5-氯-4-(4-氰基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-2-基)哌啶-4-基氨基甲酸叔丁酯(200mg), 0.45mmol、对甲苯基硼酸(123mg, 0.90mmol)、[1,1'-双(二叔丁基膦基)二茂铁]氯化钡(II) (28mg, 0.045mol) 和 K_2CO_3 (124mg, 0.90mmol) 的混合物用氮气冲洗并在85℃搅拌持续2小时。加入水, 并用EA (3x) 提取混合物。将有机物合并, 用水洗涤, 用盐水洗涤, 干燥并在真空中浓缩。将残余物通过二氧化硅色谱法(1:1, EA:PE) 纯化, 以给出50mg (22%) 的标题化合物。关于 $C_{29}H_{33}N_5O_3$ 计算的[M+H]为500; 实测值为500。

[0268] 实施例1:4-(2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-6-氧代-5-对甲苯基-1,6-二氢嘧啶-4-基)苯甲腈, HCl 盐

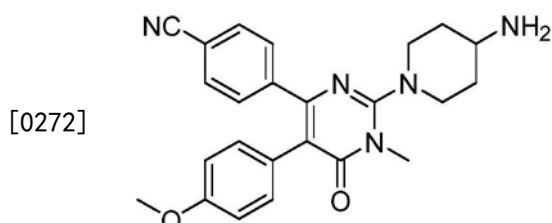
[0269]



[0270] 向在EA (10mL) 中的1-(4-(4-氰基苯基)-1-甲基-6-氧代-5-对甲苯基-1,6-二氢嘧啶-2-基)哌啶-4-基氨基甲酸叔丁酯(50mg, 0.1mmol) 的溶液中加入在EA (5mL) 中的4N HCl

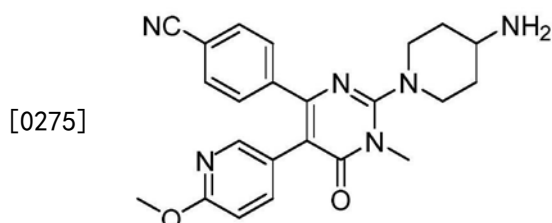
溶液,并且将混合物在室温搅拌持续2小时。将溶剂在真空中浓缩,并且将残余物通过制备型HPLC来纯化,以给出20mg (46%)的作为盐酸盐的标题化合物。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 1.74-1.79 (m, 2H), 2.00-2.04 (m, 2H), 2.21 (s, 3H), 2.96-3.03 (m, 2H), 3.29-3.03 (m, 1H), 3.48 (s, 3H), 3.71-3.74 (m, 2H), 6.89 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 2H), 6.99 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 2H), 7.38 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 2H), 7.44 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H)。关于 $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}$ 计算的 $[\text{M}+\text{H}]$ 为400;实测值为400。

[0271] 实施例2:4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈



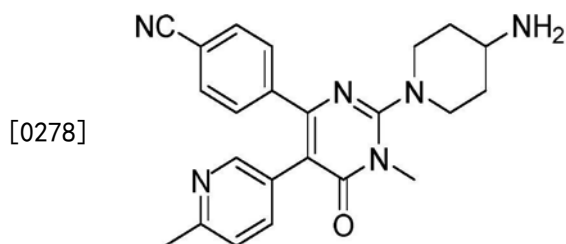
[0273] 根据用于制备实施例1的一般程序,以5%总收率制备作为盐酸盐的标题化合物。 ^1H NMR (400MHz, CD_3OD): δ 1.74-1.78 (m, 2H), 2.00-2.03 (m, 2H), 2.98-3.02 (m, 2H), 3.26-3.00 (m, 1H), 3.48 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 3.70-3.73 (m, 2H), 6.72 (d, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 6.93 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 7.39 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 2H), 7.46 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 2H)。关于 $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_2$ 计算的 $[\text{M}+\text{H}]$ 为416;实测值为416。

[0274] 实施例3:4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(6-甲氧基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈



[0276] 根据用于制备实施例1的一般程序,以11%总收率制备作为盐酸盐的标题化合物。 ^1H NMR (400MHz, CD_3OD): δ 1.87-1.95 (m, 2H), 2.14-2.17 (m, 2H), 3.15-3.24 (m, 2H), 3.43-3.48 (m, 1H), 3.62 (s, 3H), 3.93-3.98 (m, 2H), 4.23 (s, 3H), 7.46 (d, $J=9.2\text{Hz}$, 1H), 7.63 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 2H), 7.71 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 8.12 (dd, $J=8.8, 1.6\text{Hz}$, 1H), 8.28 (d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H)。关于 $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_2$ 计算的 $[\text{M}+\text{H}]$ 为417;实测值为417。

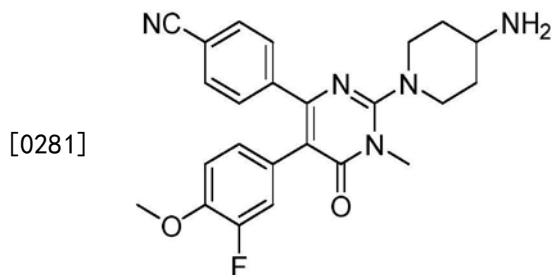
[0277] 实施例4:4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-5-(6-甲基吡啶-3-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈



[0279] 根据用于制备实施例1的一般程序,以4%总收率制备作为盐酸盐的标题化合物。 ^1H NMR (400MHz, CD_3OD): δ 1.79-1.80 (m, 2H), 2.03-2.05 (m, 2H), 2.66 (s, 3H), 3.04-3.09 (m,

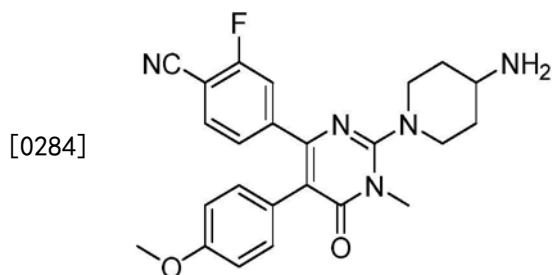
2H), 3.30-3.34 (m, 1H), 3.50 (s, 3H), 3.83-3.88 (m, 2H), 7.48 (d, J=8.4Hz, 2H), 7.58 (d, J=8.4Hz, 2H), 7.64 (d, J=8.4Hz, 1H), 8.00 (dd, J=8.4, 2.0Hz, 1H), 8.54 (d, J=8.0Hz, 1H)。关于 $C_{23}H_{24}N_6O$ 计算的[M+H]为401;实测值为401。

[0280] 实施例5: 4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈



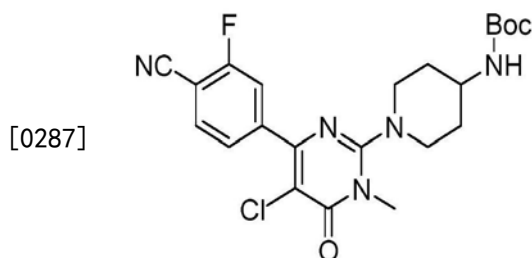
[0282] 根据用于制备实施例1的一般程序,以7%总收率制备作为盐酸盐的标题化合物。 1H NMR (400MHz, CD_3OD): δ 1.89-1.95 (m, 2H), 2.15-2.18 (m, 2H), 3.14-3.18 (m, 2H), 3.44-3.46 (m, 1H), 3.60 (s, 3H), 3.88-3.90 (m, 5H), 6.79 (d, J=8.4Hz, 1H), 6.96-7.02 (m, 2H), 7.54 (d, J=8.0Hz, 2H), 7.64 (d, J=8.0Hz, 2H)。关于 $C_{24}H_{24}FN_5O_2$ 计算的[M+H]为434;实测值为434。

[0283] 实施例6: 4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈



[0285] 根据用于制备实施例1的一般程序,以5%总收率制备作为盐酸盐的标题化合物。 1H NMR (400MHz, CD_3OD): δ 1.83-1.89 (m, 2H), 2.10-2.13 (m, 2H), 3.05-3.11 (m, 2H), 3.35-3.38 (m, 1H), 3.55 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.77-3.82 (m, 2H), 6.84 (d, J=8.8Hz, 2H), 7.04 (d, J=8.8Hz, 2H), 7.21 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.35 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.53-7.56 (m, 1H)。关于 $C_{24}H_{24}FN_5O_2$ 计算的[M+H]为434;实测值为434。

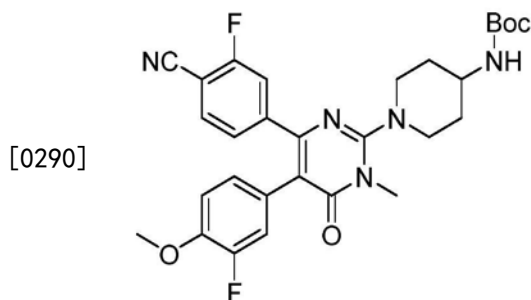
[0286] 制备7A: 1-(5-氯-4-(3-氟-4-氰基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-2-基)哌啶-4-基氨基甲酸叔丁酯



[0288] 将在ACN (4L) 中的N-[1-(5,6-二氯-3-甲基-4-氧代(3-氢嘧啶-2-基))(4-哌啶基)](叔丁氧基)甲酰胺 (150g, 0.40mol)、3-氟-4-氰基苯硼酸 (65.8g, 0.40mol)、Pd (Ph₃P) 4

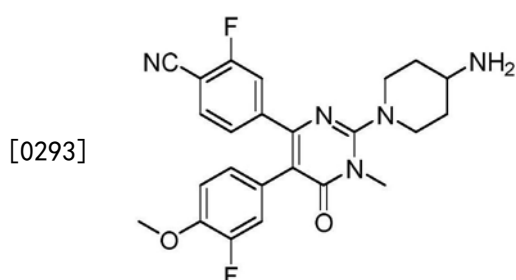
(9.3g, 8mmol) 和 0.4N Na_2CO_3 (2L, 0.80mol) 的混合物用氮气冲洗并在 85°C 搅拌持续 2 小时。加入水, 并且用 EA (3x) 提取混合物。将有机物合并, 用水洗涤, 用盐水洗涤, 干燥并在真空下浓缩。将残余物通过二氧化硅色谱法 (1:1, EA:PE) 纯化, 以给出 95g (57%) 的标题化合物。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ 1.45 (s, 9H), 1.54-1.61 (m, 2H), 2.05-2.13 (m, 2H), 2.99-3.08 (m, 2H), 3.53-3.58 (s, 5H), 3.70 (s, 1H), 4.54 (d, $J=6.0\text{Hz}$, 1H), 7.68-7.80 (m, 3H)。

[0289] 制备 7B: N-[1-[4-(4-氰基-3-氟苯基)-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代嘧啶-2-基]哌啶-4-基]氨基甲酸叔丁酯



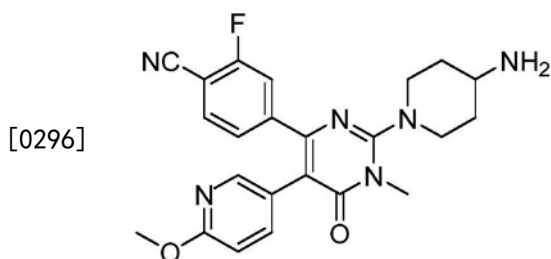
[0291] 将在二噁烷: H_2O (3:1, 15mL) 中的 (叔丁氧基)-N-{1-[5-氯-6-(4-氰基-3-氟苯基)-3-甲基-4-氧代(3-氢嘧啶-2-基)](4-哌啶基)}甲酰胺 (1g, 2.169mmol)、3-氟-4-甲氧基苯硼酸 (740mg, 4.338mmol)、Pd(dppf) Cl_2 (480mg, 0.651mmol) 和 Na_2CO_3 (690mg, 6.51mmol) 的混合物用氮气中冲洗, 盖上盖子并在 145°C 在微波中搅拌持续 2 小时。将反应混合物浓缩, 并且将残余物通过 FC (1:1, EA:PE) 纯化, 以给出 800mg (71%) 的标题化合物。关于 $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{F}_2\text{N}_5\text{O}_4$ 计算的 [M+H] 为 552; 实测值为 552。 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3): δ ppm 1.46 (s, 9H), 1.60 (d, $J=10.11\text{Hz}$, 2H), 2.11 (d, $J=11.62\text{Hz}$, 2H), 3.06 (t, $J=12.00\text{Hz}$, 2H), 3.54 (s, 3H), 3.60 (d, $J=13.64\text{Hz}$, 2H), 3.72 (br. s., 1H), 3.88 (s, 3H), 4.52 (br. s., 1H), 6.79-6.89 (m, 2H), 6.97 (d, $J=12.38\text{Hz}$, 1H), 7.13 (d, $J=8.34\text{Hz}$, 1H), 7.31 (d, $J=9.85\text{Hz}$, 1H), 7.42 (br. s., 1H)。

[0292] 实施例 7: 4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈 (化合物 A)



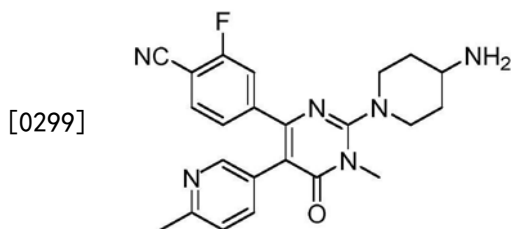
[0294] 向在 EA (20mL) 中的 N-[1-[4-(4-氰基-3-氟苯基)-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代嘧啶-2-基]哌啶-4-基]氨基甲酸叔丁酯 (5.2g, 9.44mmol) 的溶液中加入在 EA (30mL) 中的 1N HCl。将混合物在室温搅拌持续 2 小时。将溶剂在真空中浓缩, 以给出作为 HCl 盐的标题产物 (4.05g, 88%)。 ^1H NMR (400MHz, CD_3OD): δ 1.77-1.79 (m, 2H), 2.02-2.04 (m, 2H), 2.99-3.04 (m, 2H), 3.26-3.00 (m, 1H), 3.38 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.73-3.75 (m, 2H), 6.67-6.68 (m, 1H), 6.84-6.95 (m, 2H), 7.12-7.14 (m, 1H), 7.24-7.36 (m, 1H), 7.46-7.50 (m, 1H)。关于 $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{F}_2\text{N}_5\text{O}_2$ 计算的 [M+H] 为 452; 实测值为 452。

[0295] 实施例8:4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(6-甲氧基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈



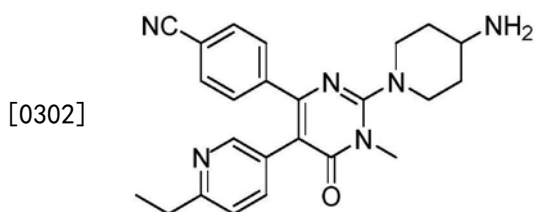
[0297] 根据用于制备实施例1的一般程序,以6%总收率制备作为盐酸盐的标题化合物。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) : δ1.79-1.83 (m, 2H) , 2.02-2.06 (m, 2H) , 3.04-3.11 (m, 2H) , 3.21-3.22 (m, 1H) , 3.49 (s, 3H) , 3.81-3.85 (m, 2H) , 4.12 (s, 3H) , 7.22-7.24 (m, 1H) , 7.38 (d, J=9.2Hz, 1H) , 7.49 (d, J=9.2Hz, 1H) , 7.57-7.61 (m, 1H) , 8.04-8.07 (m, 1H) , 8.21 (s, 1H) 。关于C₂₃H₂₃FN₆O₂计算的[M+H]为435;实测值为435。

[0298] 实施例9:4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(6-甲氧基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈



[0300] 根据用于制备实施例1的一般程序,以8%总收率制备作为盐酸盐的标题化合物。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) : δ1.92-1.96 (m, 2H) , 2.16-2.19 (m, 2H) , 2.80 (s, 3H) , 3.19-3.25 (m, 2H) , 3.45-3.49 (m, 1H) , 3.62 (s, 3H) , 3.96-3.99 (m, 2H) , 7.34 (d, J=8.0Hz, 1H) , 7.60 (d, J=7.2Hz, 1H) , 7.71 (t, J=7.6Hz, 1H) , 7.80 (d, J=8.4Hz, 1H) , 8.18 (d, J=8.4Hz, 1H) , 8.71 (s, 1H) 。关于C₂₃H₂₃FN₆O计算的[M+H]为419;实测值为419。

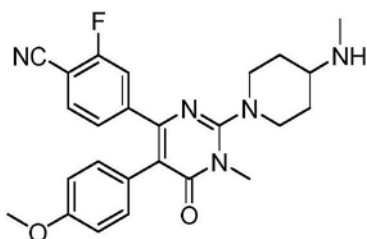
[0301] 实施例10:4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(6-乙基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈



[0303] 根据用于制备实施例1的一般程序,以7%总收率制备作为盐酸盐的标题化合物。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) : δ1.30 (t, J=4.0Hz, 3H) , 1.83-1.88 (m, 2H) , 2.06-2.09 (m, 2H) , 2.96-2.99 (m, 2H) , 3.09-3.16 (m, 2H) , 3.26-3.31 (m, 1H) , 3.51 (s, 3H) , 3.86-3.89 (m, 2H) , 7.35 (d, J=8.0Hz, 2H) , 7.61 (d, J=8.0Hz, 2H) , 7.71 (d, J=8.4Hz, 1H) , 8.08 (d, J=8.4Hz, 1H) , 8.57 (s, 1H) 。关于C₂₄H₂₆N₆O计算的[M+H]为415;实测值为415。

[0304] 实施例11:2-氟-4-[5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-2-(4-甲基氨基哌啶-1-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈

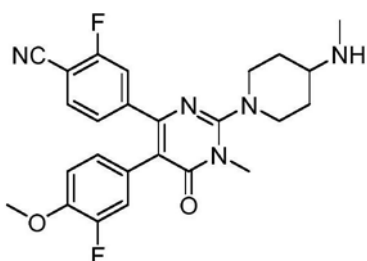
[0305]



[0306] 根据用于制备实施例1的一般程序,以7%总收率制备作为盐酸盐的标题化合物。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) : δ 1.80-1.90 (m, 2H) , 2.19-2.23 (m, 2H) , 2.75 (s, 3H) , 3.06-3.12 (m, 2H) , 3.32-3.36 (m, 1H) , 3.56 (s, 3H) , 3.76 (s, 3H) , 3.84-3.87 (m, 2H) , 6.84 (d, J=8.4Hz, 2H) , 7.04 (d, J=8.4Hz, 2H) , 7.22 (d, J=8.0Hz, 1H) , 7.36 (d, J=10.8Hz, 1H) , 8.54-7.58 (m, 1H)。关于C₂₅H₂₆FN₅O₂计算的[M+H]为448;实测值为448。

[0307] 实施例12: 2-氟-4-[5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-2-(4-甲氨基哌啶-1-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈

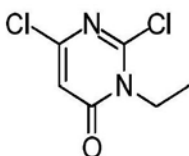
[0308]



[0309] 根据用于制备实施例1的一般程序,以7%总收率制备作为盐酸盐的标题化合物。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) : δ 1.78-1.88 (m, 2H) , 2.17-2.20 (m, 2H) , 2.73 (s, 3H) , 3.05-3.11 (m, 2H) , 3.30-3.35 (m, 1H) , 3.54 (s, 3H) , 3.82 (s, 3H) , 3.83-3.86 (m, 2H) , 6.76 (d, J=8.4Hz, 1H) , 6.93-6.99 (m, 2H) , 7.20 (d, J=8.4Hz, 1H) , 7.38 (d, J=10.4Hz, 1H) , 8.55-7.589 (m, 1H)。关于C₂₅H₂₅F₂N₅O₂计算的[M+H]为466;实测值为466。

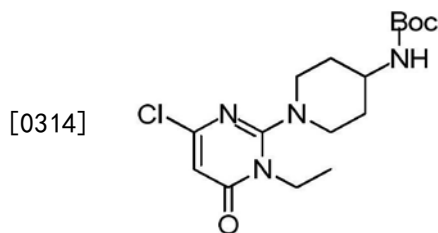
[0310] 制备13A: 2,6-二氯-3-乙基-3H-嘧啶-4-酮

[0311]



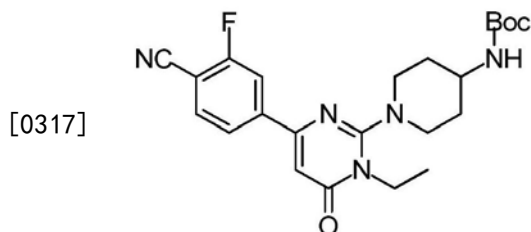
[0312] 将在DMF (10mL) 中的2,6-二氯-嘧啶-4-醇 (1.0g, 6.1mmol) 和K₂CO₃ (1.1g, 7.9mmol) 的溶液在室温搅拌持续15分钟。将反应混合物冷却至0℃, 并且逐滴加入碘乙烷 (1.1mL, 6.7mmol)。在室温搅拌过夜后, 将反应混合物用EA稀释, 用盐水洗涤, 干燥 (Na₂SO₄) 并在真空中浓缩。将残余物通过二氧化硅色谱法 (20:1, EA:PE) 纯化, 以给出330mg (28%) 的标题化合物。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) : δ 1.37 (t, J=7.6Hz, 3H) , 4.76 (q, J=6.8Hz, 2H) , 6.67 (s, 1H)。关于C₆H₆Cl₂N₂O计算的[M+H]为193, 195, 197; 实测值为193, 195, 197。

[0313] 制备13B: [1-(4-氯-1-乙基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-2-基)-哌啶-4-基]-氨基甲酸叔丁酯



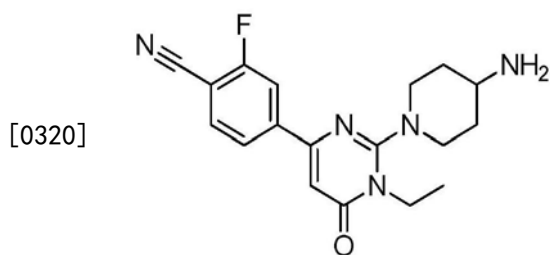
[0315] 将在DMF (10mL) 中的2,6-二氯-3-乙基-3H-嘧啶-4-酮 (320mg, 1.64mmol)、DIEA (423mg, 3.28mmol) 和(叔丁氧基)-N-(4-哌啶基)甲酰胺 (328mg, 1.64mmol) 的溶液加热至120℃持续1小时。将溶剂在真空中浓缩,并且将残余物通过二氧化硅色谱法(1:5,EA:PE)纯化,以给出210mg (36%) 的作为黄色固体的标题化合物。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ1.25-1.32 (m, 2H), 1.35 (t, J=7.2Hz, 3H), 1.96-2.02 (m, 2H), 2.98-3.06 (m, 2H), 3.70 (br, 1H), 4.30 (q, J=5.2Hz, 2H), 4.44 (br, 1H), 4.57-4.61 (m, 2H), 5.95 (s, 1H)。关于C₁₆H₂₅ClN₄O₃计算的[M+H]为357, 359;实测值为357, 359。

[0316] 制备13C: {1-[4-(4-氰基-3-氟苯基)-1-乙基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-2-基]-哌啶-4-基}-氨基甲酸叔丁酯



[0318] 将在CH₃CN (10mL) 中的[1-(4-氯-1-乙基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-2-基)-哌啶-4-基]-氨基甲酸叔丁酯 (210mg, 0.59mmol)、3-氟-4-氰基苯基硼酸 (126mg, 0.77mmol)、Pd (PPh)₄ (14mg, 0.012mmol) 和0.4M Na₂CO₃ (4.5mL, 1.77mmol) 的混合物在N₂气氛下在90℃搅拌过夜。将有机物在真空中浓缩,并将水层用DCM (2x) 提取。将合并的有机物用盐水洗涤,干燥 (Na₂SO₄) 并浓缩。将残余物通过二氧化硅色谱法(1:2,EA:PE)纯化,以给出185mg (64%) 的作为黄色固体的标题化合物。关于C₂₃H₂₈FN₅O₃计算的[M+H]为442;实测值为442。

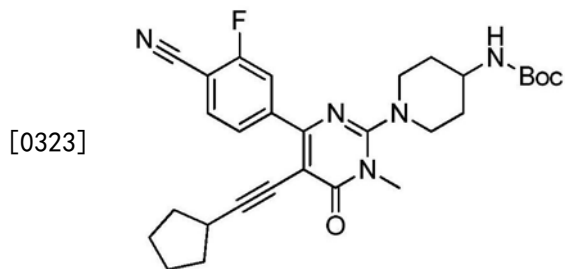
[0319] 实施例13:4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-乙基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈



[0321] 向在EA (5mL) 中的{1-[4-(4-氰基-3-氟苯基)-1-乙基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-2-基]-哌啶-4-基}-氨基甲酸叔丁酯 (180mg, 0.41mmol) 的混合物中加入在EA (3mL) 中的4M HCl的溶液。将反应混合物搅拌持续30分钟。在真空中蒸发溶剂,以给出150mg的作为黄色固体 (HCl盐) 的标题化合物 (97%)。¹H NMR (400MHz, CD₃OD): δ1.28 (t, J=7.2Hz, 1H), 1.48-1.52 (m, 2H), 1.99-2.02 (m, 2H), 2.94-3.01 (m, 2H), 3.33-3.38 (m, 1H), 6.81 (q, J=6.8Hz, 2H), 4.85-4.88 (m, 2H), 6.95 (s, 1H), 7.73 (t, J=8.0Hz, 1H), 7.90-7.95 (m, 2H)。关于C₁₈H₂₀FN₅O计

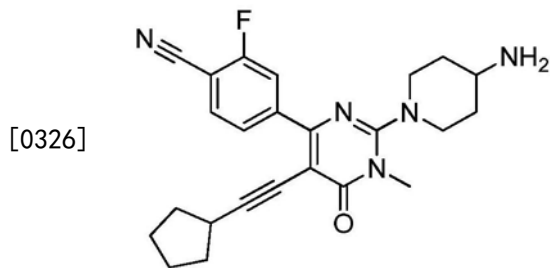
算的[M+H]为342;实测值为342。

[0322] 制备14A: {1-[4-(4-氰基-3-氟苯基)-5-环戊基乙炔基-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-2-基]-哌啶-4-基}-氨基甲酸叔丁酯



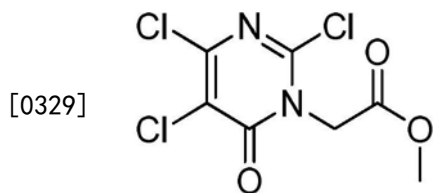
[0324] 将在ACN (15mL) 中的1-(5-氯-4-(3-氟-4-氰基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-2-基)哌啶-4-基氨基甲酸叔丁酯 (200mg, 0.43mmol)、乙炔基-环戊烷 (82mg, 0.87mmol)、Pd (MeCN)₂Cl₂ (4.5mg, 0.017mmol)、X-Phos (10mg, 0.022mmol) 和K₂CO₃ (120mg, 0.87mmol) 的混合物在95°C在密封管中搅拌过夜。将反应混合物冷却至室温并将溶剂在真空中浓缩。将残余物通过二氧化硅色谱法 (1:2, EA:PE) 纯化, 以给出100mg (45%) 的标题化合物。关于C₂₉H₃₄FN₅O₃计算的[M+H]为519;实测值为519。

[0325] 实施例14: 4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-环戊基乙炔基-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈



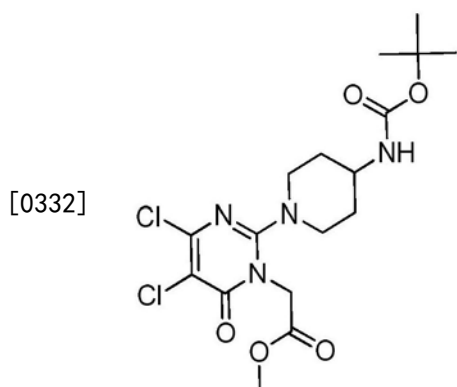
[0327] 根据用于制备实施例1的一般程序, 以70%总收率制备作为盐酸盐的标题化合物。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ1.50-1.74 (m, 8H), 1.94-1.99 (m, 4H), 2.88-3.01 (m, 4H), 3.51 (s, 3H), 3.60 (d, J=13.2Hz, 2H), 7.63-7.67 (m, 1H), 8.07-8.11 (m, 2H)。关于C₂₄H₂₆FN₅O计算的[M+H]为419;实测值为419。

[0328] 制备15A: (2,4,5-三氯-6-氧代-6H-嘧啶-1-基)-乙酸甲酯



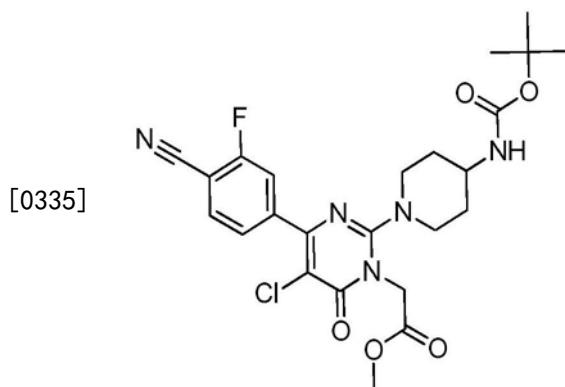
[0330] 在0°C向在DMF (150mL) 中的2,5,6-三氯-3H-嘧啶-4-酮 (20.0g, 0.1mol) 的溶液中分批加入NaH (在矿物油中的60%, 6.0g, 0.12mol), 并且将混合物搅拌持续30分钟。然后加入溴乙酸甲酯 (18.3g, 0.12mol), 并且将反应混合物在室温搅拌过夜。将溶液用水 (800mL) 稀释, 并用EA (200mL, 3x) 提取。将合并的有机物用水 (800mL, 3x) 洗涤, 用盐水 (500mL) 洗涤, 干燥 (Na₂SO₄) 并浓缩。将残余物通过二氧化硅色谱法 (1:50, EA:PE) 纯化, 以给出6.0g的标题产物 (22%)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ3.80 (s, 3H), 5.04 (s, 2H)。关于C₇H₅Cl₃N₂O₃计算的[M+H]为271;实测值为271。

[0331] 制备15B: [2-(4-叔丁氧基羰基氨基哌啶-1-基)-4,5-二氯-6-氧代-6H-嘧啶-1-基]-乙酸甲酯



[0333] 在室温向在DMF (50mL) 中的 (2,4,5-三氯-6-氧代-6H-嘧啶-1-基)-乙酸甲酯 (6.0g, 22.4mmol) 和哌啶-4-基-氨基甲酸叔丁酯 (4.9g, 24.4mmol) 的溶液中逐滴加入DIPEA (5.7g, 44.3mmol), 并将混合物搅拌过夜。将反应混合物用水 (500mL) 稀释, 并且固体通过过滤来收集。然后将固体溶解在DCM (100mL) 中, 用水 (100mL, 3x) 洗涤, 用盐水 (100mL) 洗涤, 干燥 (Na₂SO₄) 并浓缩。将残余物通过二氧化硅色谱法 (1:2至1:1, DCM:PE) 纯化, 以给出6.3g的标题产物 (64%)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 1.22-1.34 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.97-2.03 (m, 2H), 2.96-3.09 (m, 2H), 3.68-3.69 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 4.42-4.44 (m, 3H), 4.84 (s, 2H)。关于C₁₇H₂₄Cl₂N₄O₅计算的[M+H]为435; 实测值为435。

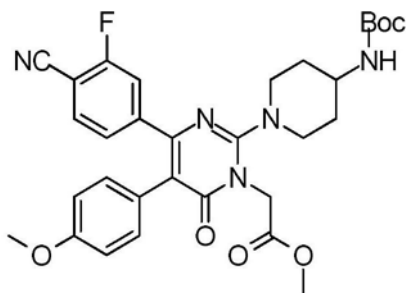
[0334] 制备15C: [2-(4-叔丁氧基羰基氨基哌啶-1-基)-5-氯-4-(4-氰基-3-氟苯基)-6-氧代-6H-嘧啶-1-基]-乙酸甲酯



[0336] 将在DMF:H₂O (50mL:10mL) 中的 [2-(4-叔丁氧基羰基氨基哌啶-1-基)-4,5-二氯-6-氧代-6H-嘧啶-1-基]-乙酸甲酯 (5.76g, 13.2mmol)、4-氰基-3-氟苯硼酸 (2.24g, 16.1mmol)、Pd(PPh₃)₄ (306mmol, 0.26mmol) 和Na₂CO₃ (2.8g, 26.5mmol) 的混合物在氮气氛下在65℃搅拌过夜。将反应混合物浓缩, 并且残余物通过二氧化硅色谱法 (1:20至1:0, EA:PE) 纯化, 以给出2.4g的标题产物 (43%)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 1.27-1.37 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.99-2.02 (m, 2H), 2.99-3.06 (m, 2H), 3.68-3.76 (m, 1H), 3.78 (s, 3H), 4.42-4.52 (m, 3H), 4.90 (s, 2H), 7.63-7.66 (m, 1H), 7.67-7.71 (m, 2H)。关于C₂₄H₂₇ClFN₅O₅计算的[M+H]为520; 实测值为520。

[0337] 制备15D: [2-(4-叔丁氧基羰基氨基哌啶-1-基)-4-(4-氰基-3-氟苯基)-5-(4-甲氧基苯基)-6-氧代-6H-嘧啶-1-基]-乙酸甲酯

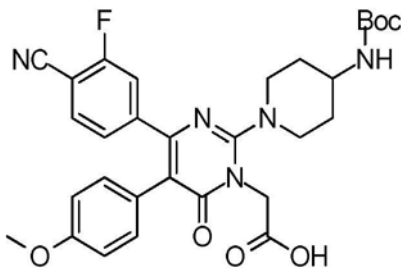
[0338]



[0339] 将在DMF (50mL) 中的 [2-(4-叔丁氧基羰基氨基哌啶-1-基)-5-氯-4-(4-氰基-3-氟苯基)-6-氧代-6H-嘧啶-1-基] 乙酸甲酯 (2.2g, 4.2mmol)、对甲氧基硼酸 (1.9g, 12.7mmol)、Pd-118 (274mg, 0.42mmol) 和 K_2CO_3 (1.2g, 8.4mmol) 的溶液在氮气氛下在 $145^\circ C$ 搅拌持续6小时。将反应混合物用水稀释并用EA (3x) 提取。将合并的有机物用水洗涤, 用盐水洗涤, 干燥 (Na_2SO_4) 并浓缩。将残余物通过制备型HPLC纯化, 以给出600mg的标题产物 (24%)。关于 $C_{31}H_{34}FN_5O_6$ 计算的 $[M+H]$ 为592; 实测值为592。

[0340] 制备15E: 4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-环丙基甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈

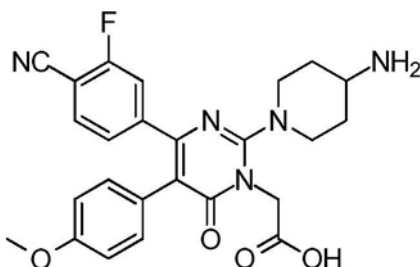
[0341]



[0342] 向在MeOH (10mL) 中的 [2-(4-叔丁氧基羰基氨基哌啶-1-基)-4-(4-氰基-3-氟苯基)-5-(4-甲氧基苯基)-6-氧代-6H-嘧啶-1-基]-乙酸甲酯 (600mg, 1.02mmol) 的溶液中加入2N NaOH溶液 (5mL)。在反应完成后, 将溶液用1N HCl酸化并用EA (3x) 提取。将合并的有机物用盐水洗涤, 干燥 (Na_2SO_4) 并浓缩。将残余物通过制备型HPLC纯化, 以给出240mg的作为黄色固体的标题产物 (41%)。关于 $C_{30}H_{32}FN_5O_6$ 计算的 $[M+H]$ 为578; 实测值为578。

[0343] 实施例15: [2-(4-氨基哌啶-1-基)-4-(4-氰基-3-氟苯基)-5-(4-甲氧基苯基)-6-氧代-6H-嘧啶-1-基]-乙酸

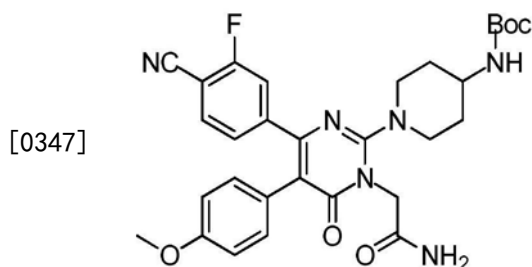
[0344]



[0345] 向在EA (10mL) 中的 [2-(4-叔丁氧基羰基氨基哌啶-1-基)-4-(4-氰基-3-氟苯基)-5-(4-甲氧基苯基)-6-氧代-6H-嘧啶-1-基]-乙酸 (100mg, 0.15mmol) 的溶液中加入在EA (5mL) 中的5N HCl溶液。将反应混合物在室温搅拌持续2小时, 并且将溶剂在真空中浓缩。将残余物通过制备型HPLC纯化, 以给出25mg的作为HCl盐的标题产物 (32%)。 1H NMR (400MHz, CD_3OD): δ 1.53-1.56 (m, 2H), 2.00-2.03 (m, 2H), 3.00-3.07 (m, 2H), 3.35-3.39 (m, 1H), 3.67 (s, 3H), 4.70 (s, 2H), 4.76-4.77 (m, 2H), 6.74 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 6.96 (d, $J=8.8$ Hz, 2H),

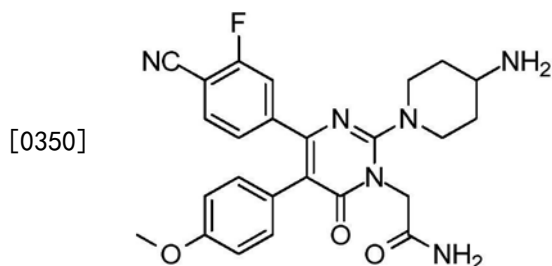
7.17 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 7.26 (d, $J=10.0\text{Hz}$, 1H), 7.50 (dd, $J=7.2, 8.0\text{Hz}$, 1H)。关于 $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{FN}_5\text{O}_4$ 计算的 $[\text{M}+\text{H}]$ 为 478; 实测值为 478。

[0346] 制备 16A: {1-[1-氨基甲酰基甲基-4-(4-氰基-3-氟苯基)-5-(4-甲氧基苯基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-2-基]-哌啶-4-基}-氨基甲酸叔丁酯



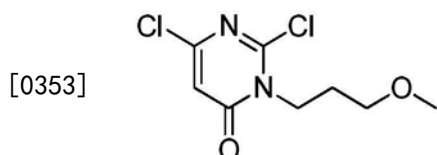
[0348] 向在 DMF (5mL) 中的 [2-(4-叔丁氧基羰基氨基哌啶-1-基)-4-(4-氰基-3-氟苯基)-5-(4-甲氧基苯基)-6-氧代-6H-嘧啶-1-基]-乙酸 (120mg, 0.2mmol) 的溶液中加入 NH_4Cl (17mg, 0.3mmol)、HATU (95mg, 0.25mmol) 和 DIEA (25mg, 0.4mmol)。在反应完成后, 将溶液用 H_2O 稀释并用 DCM 提取持续 (3x)。将合并的有机物干燥 (Na_2SO_4) 并浓缩。将残余物通过制备型 HPLC 纯化, 以给出 50mg 的作为黄色固体的标题产物 (43%)。关于 $\text{C}_{30}\text{H}_{33}\text{FN}_6\text{O}_5$ 计算的 $[\text{M}+\text{H}]$ 为 577; 实测值 577。

[0349] 实施例 16: 2-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-4-(4-氰基-3-氟苯基)-5-(4-甲氧基苯基)-6-氧代-6H-嘧啶-1-基]-乙酰胺



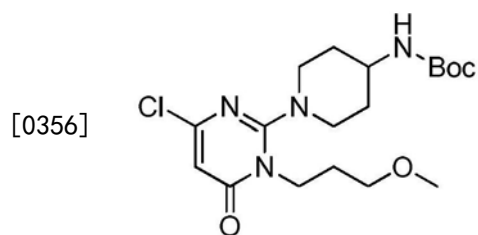
[0351] 根据用于制备实施例 15 的程序, 以 96% 收率制备作为盐酸盐的标题化合物。 ^1H NMR (400MHz, CD_3OD): δ 1.49-1.53 (m, 2H), 1.98-2.01 (m, 2H), 2.97-3.04 (m, 2H), 3.33-3.36 (m, 1H), 3.68 (s, 3H), 4.69 (s, 2H), 4.75-4.78 (m, 2H), 6.75 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 6.99 (d, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 7.16 (dd, $J=1.2, 8.0\text{Hz}$, 1H), 7.25 (dd, $J=0.8, 10.4\text{Hz}$, 1H), 7.49 (dd, $J=7.2, 8.0\text{Hz}$, 1H)。关于 $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{FN}_6\text{O}_3$ 计算的 $[\text{M}+\text{H}]$ 为 477; 实测值为 477。

[0352] 制备 17A: 2,6-二氯-3-(3-甲氧基丙基)-3H-嘧啶-4-酮



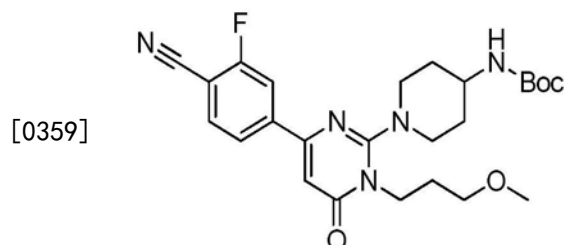
[0354] 向在 DMF (10mL) 中的 2,6-二氯-3H-嘧啶-4-酮 (600mg, 3.65mmol) 的溶液中加入 K_2CO_3 (1.0g, 7.3mmol) 并且将混合物在室温搅拌持续 10 分钟。然后在 0°C 逐滴加入 1-溴-3-甲氧基丙烷 (101mg, 7.3mmol), 并将混合物在室温搅拌过夜。将 DMF 在真空中浓缩, 并且将残余物通过二氧化硅色谱法纯化, 以给出 400mg 的标题化合物 (47%)。关于 $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2$ 计算的 $[\text{M}+\text{H}]$ 为 237; 实测值为 237。

[0355] 制备17B: {1-[4-氯-1-(3-甲氧基丙基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-2-基]-哌啶-4-基}-氨基甲酸叔丁酯



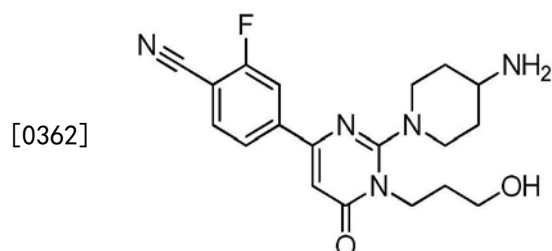
[0357] 将在DMF (20mL) 中的2,6-二氯-3-(3-甲氧基丙基)-3H-嘧啶-4-酮 (400mg, 1.68mmol)、哌啶-4-基-氨基甲酸叔丁酯 (405mg, 2mmol) 和DIEA (260mg, 2.0mmol) 的溶液在85°C 搅拌持续2小时。将溶剂浓缩, 并且将残余物通过二氧化硅色谱法纯化, 以给出500mg的标题化合物 (75%)。关于C₁₈H₂₉ClN₄O₄计算的[M+H]为400; 实测值为400。

[0358] 制备17C: {1-[4-(4-氰基-3-氟苯基)-1-(3-甲氧基丙基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-2-基]-哌啶-4-基}-氨基甲酸叔丁酯



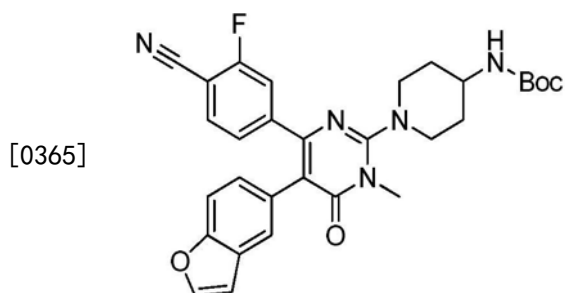
[0360] 将在ACN中的{1-[4-氯-1-(3-羟基丙基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-2-基]-哌啶-4-基}-氨基甲酸叔丁酯 (200mg, 0.5mmol)、4-氰基-3-氟苯基硼酸 (107mg, 0.65mmol)、Pd(PPh₃)₄ (12mg, 0.01mmol) 和0.4M Na₂CO₃溶液 (4mL) 的混合物在85°C 搅拌过夜。将反应混合物用水稀释并用EA (3x) 提取。将反应混合物在室温搅拌持续2小时, 并且将溶剂在真空中浓缩。将残余物通过二氧化硅色谱法纯化, 以给出240mg的标题产物 (99%)。关于C₂₅H₃₂FN₅O₄计算的[M+H]为485; 实测值为485。

[0361] 实施例17: 4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-(3-羟基丙基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈



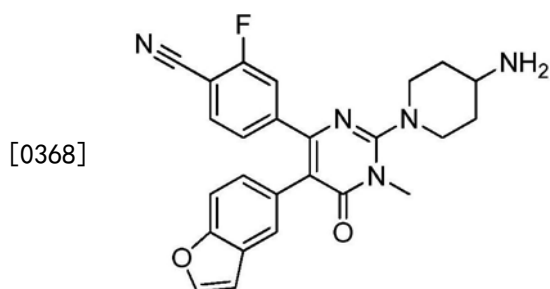
[0363] 在-78°C, 向在DCM中的{1-[4-(4-氰基-3-氟苯基)-1-(3-甲氧基丙基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-2-基]哌啶-4-基}-氨基甲酸叔丁酯 (200mg, 0.41mmol) 的溶液中加入1M BBr₃ (4mL)。将混合物在室温搅拌持续2小时, 并且在0°C 用MeOH淬灭。将溶液用含水的饱和NaHCO₃洗涤。将有机层干燥并浓缩。将残余物通过制备型HPLC纯化, 以给出35mg的作为盐酸盐的标题产物 (23%)。¹H NMR (400MHz, CD₃OD): 1.65-1.69 (m, 2H), 1.97-2.19 (m, 4H), 3.13-3.22 (m, 2H), 3.48-3.55 (m, 1H), 3.73 (t, J=8.0Hz, 2H), 4.55 (t, J=8.0Hz, 2H), 4.94-4.95 (m, 2H), 6.71 (s, 1H), 7.88-8.05 (m, 3H)。关于C₁₉H₂₂FN₅O₂计算的[M+H]为371; 实测值371。

[0364] 制备18A: {1-[5-苯并呋喃-5-基-4-(4-氰基-3-氟苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-2-基]-哌啶-4-基}-氨基甲酸叔丁酯



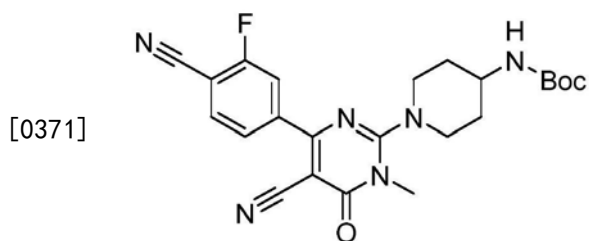
[0366] 将在1,4-二噁烷(200mL)中的{1-[5-氯-4-(4-氰基-3-氟苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-2-基]-哌啶-4-基}-氨基甲酸叔丁酯(200mg,0.45mmol)、苯并呋喃-5-硼酸(120mg,0.68mmol)、Pd(PPh₃)₄(26mg,0.05mmol)和2MNa₂CO₃(0.9mL)的混合物在N₂气氛下回流过夜。将反应混合物用水稀释并用EA(3x)提取。将合并的有机物用盐水洗涤,干燥(Na₂SO₄)并浓缩。将残余物通过二氧化硅色谱法纯化,以给出100mg的标题产物(42%)。关于C₃₀H₃₀FN₅O₄计算的[M+H]为543;实测值为543。

[0367] 实施例18:4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-苯并呋喃-5-基-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2氟苯甲腈



[0369] 向制品18A(60mg,0.11mmol)在EA(20mL)中的溶液中加入在EA(10mL)中的4M HCl溶液。将混合物在室温搅拌持续2小时。将溶剂在真空中浓缩,以给出43mg的作为盐酸盐的标题产物(53%)。¹H NMR(400MHz,CD₃OD):1.85-1.92(m,2H),2.13-2.18(m,2H),3.10(t,J=4.0Hz,2H),3.31-3.33(m,1H),3.61(s,3H),3.87(d,J=13.2Hz,2H),6.65-7.21(m,3H),7.38-7.76(m,4H),7.76(s,1H)。关于C₂₅H₂₂FN₅O₂计算的[M+H]为443;实测值为443。

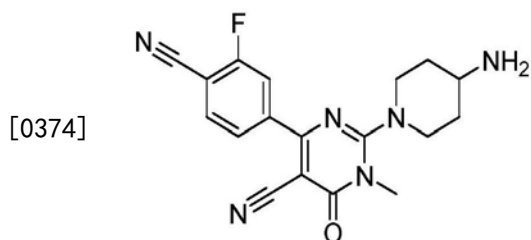
[0370] 制备19A: {1-[5-氰基-4-(4-氰基-3-氟苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-2-基]-哌啶-4-基}-氨基甲酸叔丁酯



[0372] 将在DMF(5mL)中的{1-[5-氯-4-(4-氰基-3-氟苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-2-基]-哌啶-4-基}-氨基甲酸叔丁酯(460mg,1mmol)、Zn(CN)₂(175mg,1.5mmol)和Pd(PPh₃)₄(116mg,0.01mmol)的混合物在N₂气氛下在150℃搅拌持续4小时。将反应混合物冷却至室温并过滤。将滤液在真空中浓缩,并且将残余物通过制备型HPLC纯化,以给出150mg

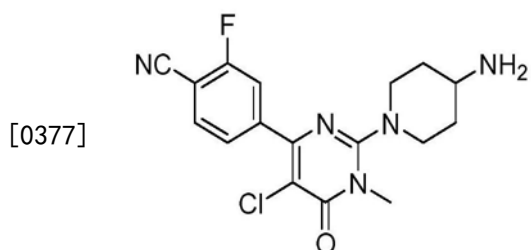
的作为黄色固体的标题产物 (33%)。关于 $C_{23}H_{25}FN_6O_3$ 计算的[M+H]为453;实测值为453。

[0373] 实施例19:2-(4-氨基哌啶-1-基)-4-(4-氰基-3-氟苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-5-甲腈



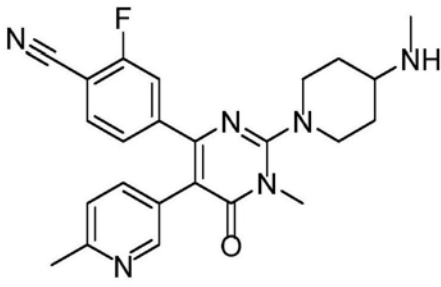
[0375] 向在EA (5mL) 中的 {1-[5-氰基-4-(4-氰基-3-氟苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-2-基]-哌啶-4-基}-氨基甲酸叔丁酯 (150mg, 0.33mmol) 的溶液中加入在EA (5mL) 中的5N HCl溶液。将反应混合物在室温搅拌持续2小时,并且将溶剂在真空中浓缩,以给出120mg的作为HCl盐的标题产物 (94%)。 1H NMR (400MHz, CD_3OD): δ 1.67-1.72 (m, 2H), 2.02-2.06 (m, 2H), 3.13-3.16 (m, 2H), 3.34-3.38 (m, 1H), 3.42 (s, 3H), 3.98-4.02 (m, 2H), 7.82-7.90 (m, 3H)。关于 $C_{18}H_{17}FN_6O$ 计算的[M+H]为353;实测值为353。

[0376] 实施例20:4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-氯-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]2-氟苯甲腈

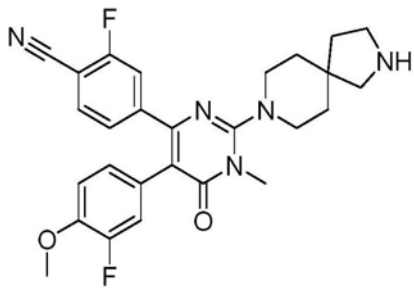
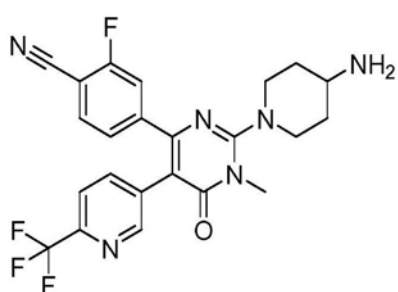
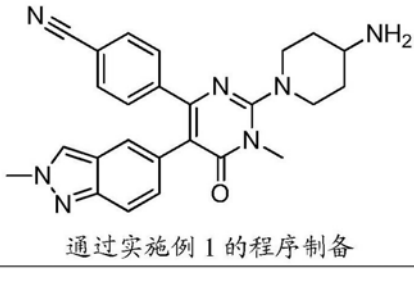
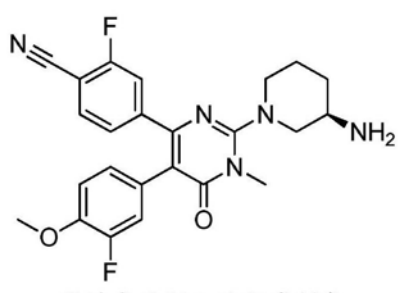


[0378] 向在EA (5mL) 中的 {1-[5-氯-4-(4-氰基-3-氟苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-2-基]-哌啶-4-基}-氨基甲酸叔丁酯 (150mg, 0.33mmol) 的溶液中加入在EA (5mL) 中的5N HCl溶液。将反应混合物在室温搅拌持续2小时,并且将溶剂在真空中浓缩,以给出120mg的作为HCl盐的标题产物 (94%)。 1H NMR (400MHz, CD_3OD): δ 1.67-1.72 (m, 2H), 2.02-2.06 (m, 2H), 3.13-3.16 (m, 2H), 3.34-3.38 (m, 1H), 3.42 (s, 3H), 3.98-4.02 (m, 2H), 7.82-7.90 (m, 3H)。关于 $C_{18}H_{17}FN_6O$ 计算的[M+H]为353;实测值为353。 1HNMR (400MHz, 甲醇- d_4): δ ppm 1.73-1.91 (m, 2H), 2.18 (d, $J=12.13Hz$, 2H), 3.06 (t, $J=12.76Hz$, 2H), 3.33-3.40 (m, 1H), 3.57 (s, 3H), 3.83 (d, $J=13.14Hz$, 2H), 7.75-7.93 (m, 3H)。

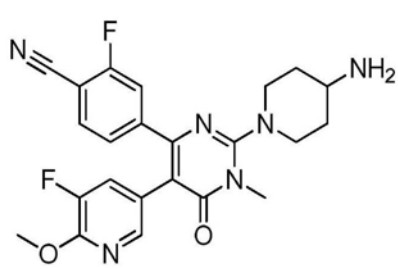
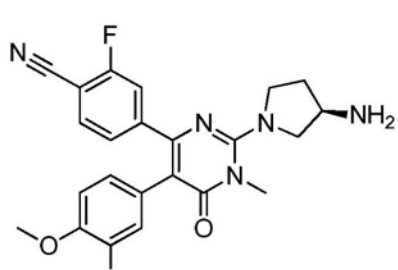
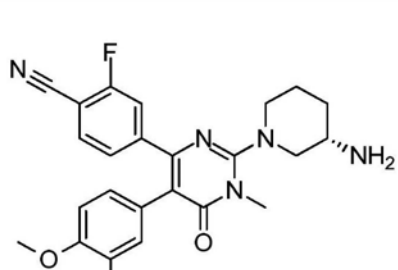
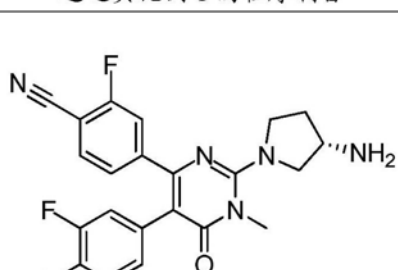
[0379]

表 3			
化学合成 实施例	结构 (通过所引用的实施例的程序制备)	MS (ESI) <i>m/z</i>	NMR谱数据
21	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	433	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.89-1.93 (m, 2H), 2.18-2.21 (m, 2H), 2.73 (s, 3H), 2.74 (s, 3H), 3.11-3.17 (m, 2H), 3.33-3.39 (m, 1H), 3.57 (s, 3H), 3.4-3.97 (m, 2H), 7.28 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 7.55 (d, <i>J</i> = 10.0 Hz, 1H), 7.63-7.67 (m, 1H), 7.74 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 8.12 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 8.65 (s, 1H).

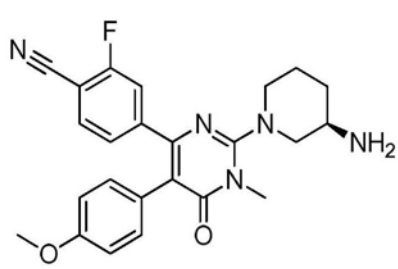
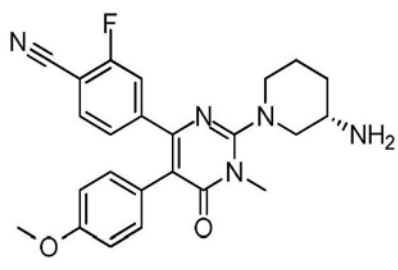
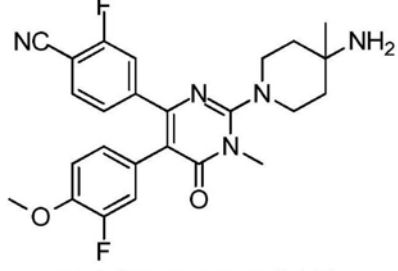
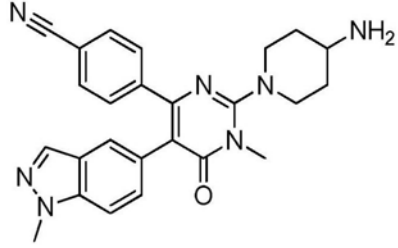
[0380]

表 3			
化学合成 实施例	结构 (通过所引用的实施例的程序制备)	MS (ESI) <i>m/z</i>	NMR谱数据
22	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	492	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃): δ 1.74-1.80 (m, 4H), 1.93-1.97 (m, 2H), 3.11 (s, 2H), 3.26-3.35 (m, 6H), 3.47 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 6.68 (dd, <i>J</i> = 1.2, 8.4 Hz, 1H), 6.86-6.72 (m, 2H), 7.11 (dd, <i>J</i> = 1.2, 8.0 Hz, 1H), 7.30 (dd, <i>J</i> = 1.2, 10.8 Hz, 1H), 7.46 (dd, <i>J</i> = 6.8, 7.6 Hz, 1H).
23	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	472	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): 1.75-1.82 (m, 2H), 2.03-2.06 (m, 2H), 3.06-3.12 (m, 2H), 3.22-3.34 (m, 1H), 3.49 (s, 3H), 3.1 (d, <i>J</i> = 13.6 Hz, 2H), 7.07-7.09 (m, 1H), 7.36-7.38 (m, 1H), 7.51-7.55 (m, 1H), 7.66 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 7.79-7.82 (m, 1H), 8.33 (s, 1H).
24	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	439	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): 1.96-2.01 (m, 2H), 2.20-2.22 (m, 2H), 3.23-3.32 (m, 2H), 3.46-3.49 (m, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.94-3.97 (m, 2H), 4.39 (s, 3H), 7.55-7.77 (m, 7H), 8.76 (s, 1H).
25	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	452	¹ H NMR (300 MHz, CD ₃ OD): δ 1.72-1.93 (m, 3H), 1.97-2.23 (m, 1H), 3.16-3.30 (m, 2H), 3.50-3.55 (m, 2H), 3.60 (s, 3H), 3.83-3.84 (m, 1H), 3.86 (s, 3H), 6.82 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H), 6.97-7.05 (m, 2H), 7.25 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H), 7.44 (d, <i>J</i> = 10.8 Hz, 1H), 7.62 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H).

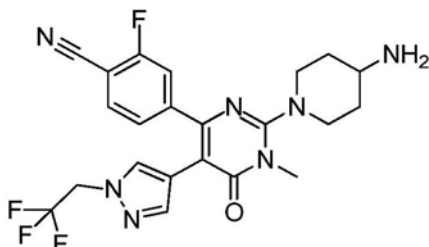
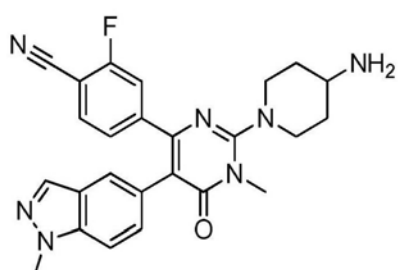
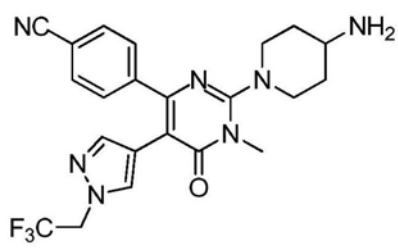
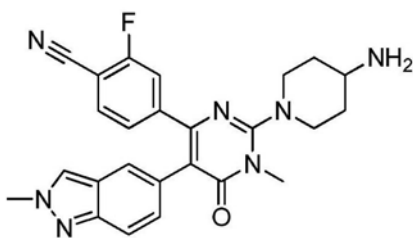
[0381]

表 3			
化学合成 实施例	结构 (通过所引用的实施例的程序制备)	MS (ESI) <i>m/z</i>	NMR谱数据
26	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	453	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): 1.64-1.69 (m, 2H), 1.89-1.92 (m, 2H), 2.85-2.91 (m, 2H), 3.15-3.20 (m, 1H), 3.34 (s, 3H), 3.62 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H), 3.71 (s, 3H), 6.99 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.20-7.40 (m, 4H).
27	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	438	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 2.19-2.22 (m, 1H), 2.49-2.51 (m, 1H), 3.63 (s, 3H), 3.75-3.81 (m, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.87-3.93 (m, 1H), 4.02-4.06 (m, 2H), 6.80 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.00 (t, <i>J</i> = 10.8 Hz, 2H), 7.25 (d, <i>J</i> = 9.6 Hz, 1H), 7.44 (d, <i>J</i> = 10.8 Hz, 1H), 7.61 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz,
28	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	452	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.69-1.99 (m, 3H), 2.14-2.19 (m, 1H), 3.09-3.24 (m, 2H), 3.43-3.46 (m, 1H), 3.56-3.60 (m, 4H), 3.77-3.80 (m, 1H), 3.82 (s, 3H), 6.77 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 6.94-7.00 (m, 2H), 7.21 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 7.39 (d, <i>J</i> = 10.4 Hz, 1H), 8.56-7.60 (m, 1H).
29	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	438	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 2.25-2.29 (m, 1H), 2.50-2.55 (m, 1H), 3.69 (s, 3H), 3.89-3.84 (m, 5H), 3.99-4.03 (m, 1H), 5.05-4.16 (m, 2H), 6.80 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 6.97-7.03 (m, 2H), 7.29 (dd, <i>J</i> = 2.4, 8.0 Hz, 1H), 7.47 (d, <i>J</i> = 10.4 Hz, 1H), 7.64 (dd, <i>J</i> = 6.8, 8.0 Hz, 1H).

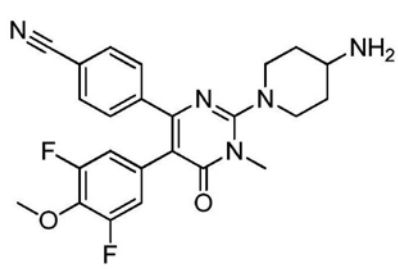
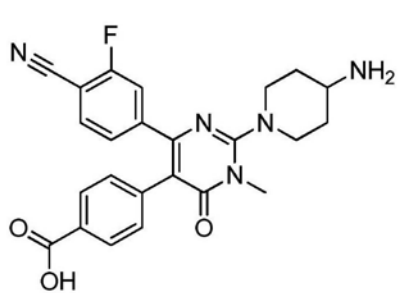
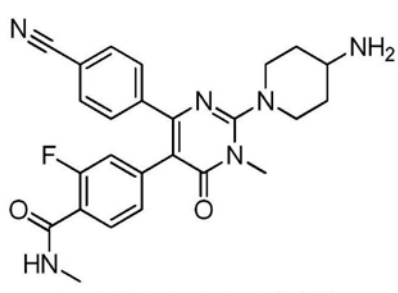
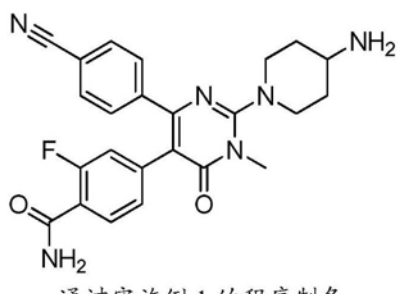
[0382]

表 3			
化学合成 实施例	结构 (通过所引用的实施例的程序制备)	MS (ESI) <i>m/z</i>	NMR谱数据
30	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	434	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.73-2.02 (m, 3H), 2.19-2.23 (m, 1H), 3.13-3.26 (m, 2H), 3.49-3.52 (m, 2H), 3.60 (s, 3H), 3.77-3.85 (m, 1H), 3.85 (s, 3H), 6.89 (d, <i>J</i> = 11.6 Hz, 2H), 7.08-7.10 (d, <i>J</i> = 11.6 Hz, 2H), 7.24 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 7.41 (d, <i>J</i> = 10.8 Hz, 1H), 7.57-7.61 (m, 1H).
31	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	434	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.69-1.99 (m, 3H), 2.07-2.10 (m, 1H), 3.09-3.24 (m, 2H), 3.43-3.46 (m, 1H), 3.56-3.60 (m, 4H), 3.68 (s, 3H), 3.76-3.79 (m, 1H), 6.75 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H), 6.96 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 2H), 7.13 (dd, <i>J</i> = 2.0, 8.0 Hz, 1H), 7.27 (dd, <i>J</i> = 0.8, 10.4 Hz, 1H), 7.47 (dd, <i>J</i> = 6.8, 8.0 Hz, 1H).
32	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	466	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.41 (s, 3H), 1.82-1.85 (m, 2H), 1.91-1.99 (m, 2H), 3.22-3.25 (m, 2H), 3.47 (s, 3H), 3.50-3.57 (m, 2H), 3.75 (s, 3H), 6.69 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 6.86-6.92 (m, 2H), 7.14 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.32 (d, <i>J</i> = 10.8 Hz, 1H), 7.47-7.51 (m, 1H).
33	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	439	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.95-1.99 (m, 2H), 2.19-2.22 (m, 2H), 3.20-3.26 (m, 2H), 3.45-3.50 (m, 1H), 3.63 (s, 3H), 3.90 (d, <i>J</i> = 12.8 Hz, 2H), 4.06 (s, 3H), 7.21 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.48-7.57 (m, 6H), 7.96 (s, 1H).

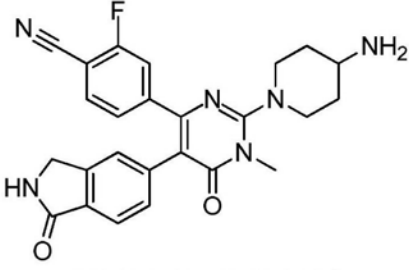
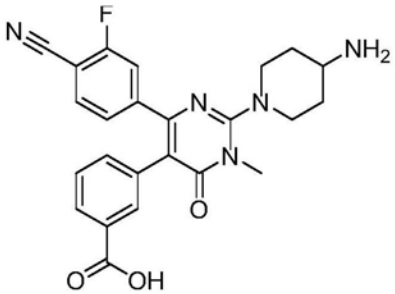
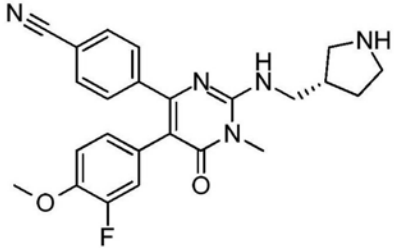
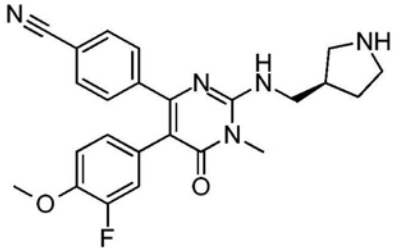
[0383]

表 3			
化学合成 实施例	结构 (通过所引用的实施例的程序制备)	MS (ESI) <i>m/z</i>	NMR谱数据
34	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	476	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.75-1.79 (m, 2H), 2.02-2.05 (m, 2H), 3.00-3.06 (m, 2H), 3.21-3.31 (m, 1H), 3.48 (s, 3H), 3.72-3.75 (m, 2H), 4.77-4.81 (m, 2H), 7.22 (s, 1H), 7.31 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 7.39 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H), 7.60-7.64 (m, 2H).
35	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	457	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): 1.85-1.99 (m, 2H), 2.18-2.20 (m, 2H), 3.19-3.24 (m, 2H), 3.46-3.50 (m, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.86-3.92 (m, 2H), 4.10 (s, 3H), 7.21-7.25 (m, 2H), 7.40-7.53 (m, 4H), 8.01 (s, 1H).
36	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	458	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.79-1.82 (m, 2H), 2.04-2.07 (m, 2H), 3.09-3.15 (m, 2H), 3.32-3.38 (m, 1H), 3.50 (s, 3H), 3.76-3.79 (m, 2H), 4.74-4.78 (m, 2H), 7.12 (s, 1H), 7.55 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H), 7.62 (s, 1H), 7.67 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H).
37	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	458	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.98-2.04 (m, 2H), 2.21-2.24 (m, 2H), 3.27-3.30 (m, 2H), 3.50-3.52 (m, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.98 (d, <i>J</i> = 12.8 Hz, 2H), 4.42 (s, 3H), 7.33 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 7.49 (d, <i>J</i> = 10.0 Hz, 1H), 7.60-7.73 (m, 3H), 7.84 (s, 1H), 8.85 (s, 1H).

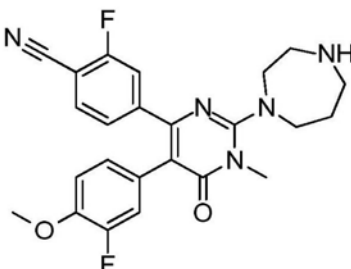
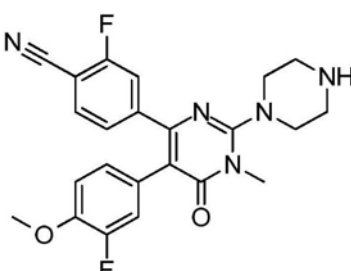
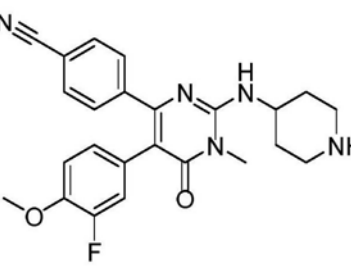
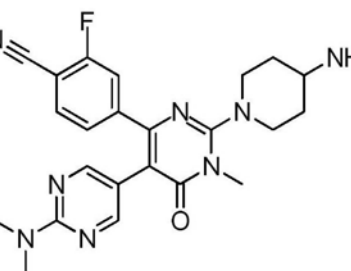
[0384]

表 3			
化学合成 实施例	结构 (通过所引用的实施例的程序制备)	MS (ESI) <i>m/z</i>	NMR谱数据
38	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	452	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): 1.87-1.94 (m, 2H), 2.15 (d, <i>J</i> = 12.0 Hz, 2H), 3.13 (t, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H), 3.39-3.43 (m, 1H), 3.59 (s, 3H), 3.87 (d, <i>J</i> = 12.8 Hz, 2H), 3.97 (s, 3H), 6.79 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H), 7.55 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H), 7.70 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H).
39	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	448	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.91-1.94 (m, 2H), 2.16-2.19 (m, 2H), 3.15-3.21 (m, 2H), 3.50-3.52 (m, 1H), 3.61 (s, 3H), 3.90 (d, <i>J</i> = 12.4 Hz, 2H), 7.22 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 7.30 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H), 7.43 (d, <i>J</i> = 10.8 Hz, 1H), 7.59 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 7.86 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H).
40	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	461	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.88-1.91 (m, 2H), 2.12-2.13 (m, 2H), 2.94 (s, 3H), 3.13-3.15 (m, 2H), 3.30-3.34 (m, 1H), 3.61 (s, 3H), 3.89 (d, <i>J</i> = 14.4 Hz, 2H), 7.00 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 7.11 (d, <i>J</i> = 12.0 Hz, 1H), 7.53 (d, <i>J</i> = 12.0 Hz, 2H), 7.61-7.64 (m, 3H).
41	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	447	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.87-1.91 (m, 2H), 2.14-2.16 (m, 2H), 3.15 (t, <i>J</i> = 12.0 Hz, 2H), 3.30-3.40 (m, 1H), 3.61 (s, 3H), 3.89 (d, <i>J</i> = 14.0 Hz, 2H), 7.01 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 7.13 (d, <i>J</i> = 12.0 Hz, 1H), 7.52-7.77 (m, 5H).

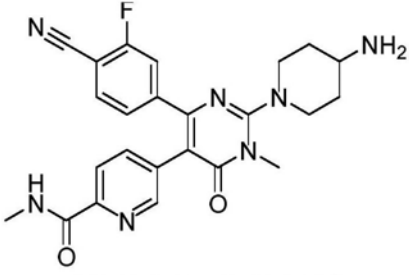
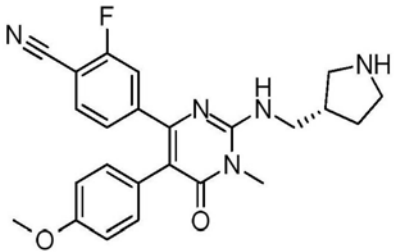
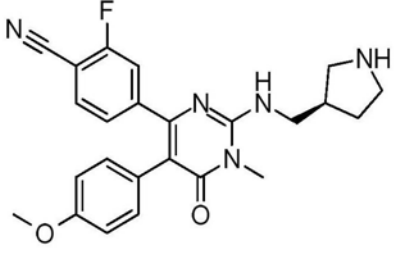
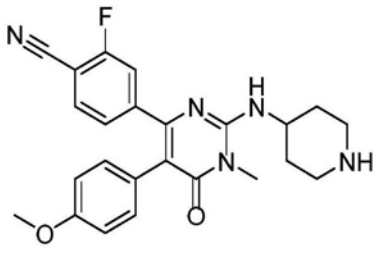
[0385]

表 3			
化学合成 实施例	结构 (通过所引用的实施例的程序制备)	MS (ESI) <i>m/z</i>	NMR谱数据
42	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	459	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.78-1.79 (m, 2H), 2.03-2.05 (m, 2H), 3.00-3.06 (m, 2H), 3.21-3.31 (m, 1H), 3.49 (s, 3H), 3.75-3.78 (m, 2H), 4.32 (s, 2H), 7.06 (dd, <i>J</i> = 1.2, 8.0 Hz, 1H), 7.12 (dd, <i>J</i> = 1.2, 8.0 Hz, 1H), 7.31-7.36 (m, 2H), 7.42 (dd, <i>J</i> = 6.4, 7.6 Hz, 1H), 7.58 (d, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H).
43	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	448	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.77-1.80 (m, 2H), 2.02-2.05 (m, 2H), 3.01-3.05 (m, 2H), 3.35-3.36 (m, 1H), 3.49 (s, 3H), 3.74-3.98 (m, 2H), 7.07 (dd, <i>J</i> = 1.6, 8.4 Hz, 1H), 7.27-7.32 (m, 3H), 7.44 (dd, <i>J</i> = 6.8, 8.0 Hz, 1H), 7.73 (d, <i>J</i> = 1.2 Hz, 1H), 7.84 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H).
44	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	434	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.87-1.91 (m, 1H), 2.25-2.28 (m, 1H), 2.87-2.92 (m, 1H), 3.11-3.17 (m, 1H), 3.30-3.32 (m, 1H), 3.41-3.56 (m, 5H), 3.69-3.71 (m, 2H), 3.84 (s, 3H), 6.75 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 6.92-6.96 (m, 2H), 7.53 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H), 7.66 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H).
45	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	434	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.74-1.80 (m, 1H), 2.14-2.19 (m, 1H), 2.77-2.81 (m, 1H), 3.01-3.06 (m, 1H), 3.31-3.34 (m, 1H), 3.36-3.45 (m, 5H), 3.59-3.60 (m, 2H), 3.71 (s, 3H), 6.63 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 6.80-6.84 (m, 2H), 7.44 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H), 7.60 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H).

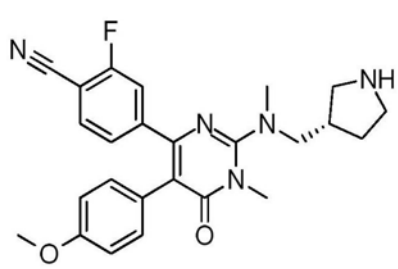
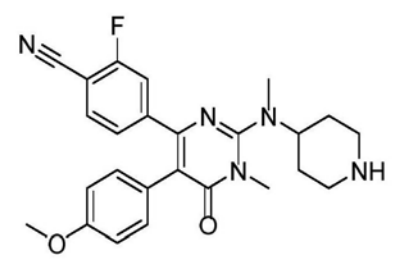
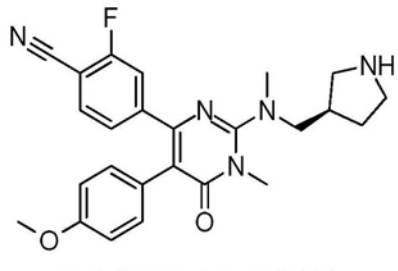
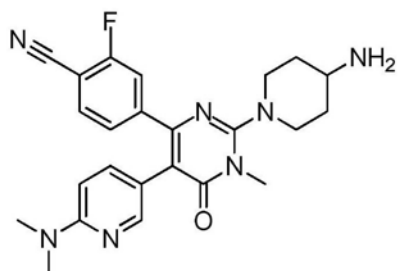
[0386]

表 3			
化学合成 实施例	结构 (通过所引用的实施例的程序制备)	MS (ESI) <i>m/z</i>	NMR谱数据
46	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	452	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 2.15-2.18 (m, 2H), 3.31-3.34 (m, 2H), 3.46-3.51 (m, 5H), 3.56-3.59 (m, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.78-3.81 (m, 2H), 6.68 (dd, <i>J</i> = 1.2, 8.4 Hz, 1H), 6.85-6.89 (m, 2H), 7.12 (dd, <i>J</i> = 1.2, 7.6 Hz, 1H), 7.28 (dd, <i>J</i> = 1.6, 10.8 Hz, 1H), 7.47 (dd, <i>J</i> = 6.8, 8.0 Hz, 1H).
47	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	438	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ 3.27-3.34 (m, 4H), 3.45 (s, 3H), 3.51-3.53 (m, 4H), 3.81 (s, 3H), 6.78 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.02-7.08 (m, 2H), 7.18 (dd, <i>J</i> = 1.6, 8.4 Hz, 1H), 7.45 (dd, <i>J</i> = 1.6, 10.8 Hz, 1H), 7.80 (dd, <i>J</i> = 7.2, 8.0 Hz, 1H), 9.41 (br, 1H).
48	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	434	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.84-1.94 (m, 2H), 2.20-2.23 (m, 2H), 3.00-3.07 (m, 2H), 3.38-3.42 (m, 5H), 3.72 (s, 3H), 4.22-4.27 (m, 1H), 6.61 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H), 6.79-6.83 (m, 2H), 7.39 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H), 7.51 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H).
49	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	449	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.82-1.87 (m, 2H), 2.04-2.07 (m, 2H), 3.06-3.12 (m, 2H), 3.25 (s, 6H), 3.28-3.39 (m, 1H), 3.49 (s, 3H), 3.81-3.84 (m, 2H), 7.37 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 7.56 (d, <i>J</i> = 9.6 Hz, 1H), 7.42 (t, <i>J</i> = 6.8 Hz, 1H), 8.31 (s, 2H).

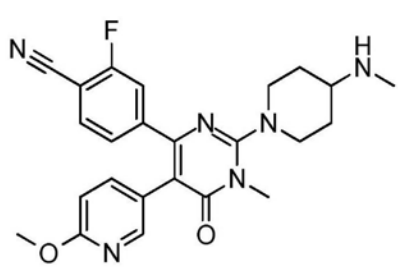
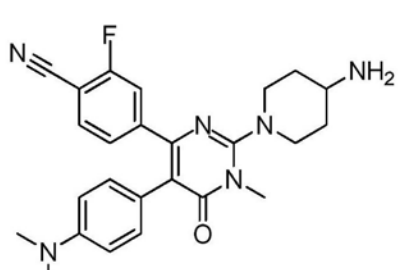
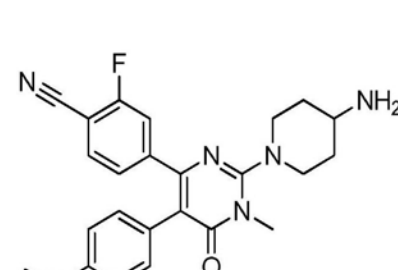
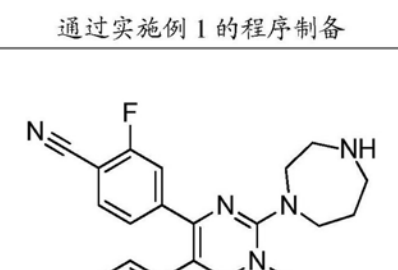
[0387]

表 3			
化学合成 实施例	结构 (通过所引用的实施例的程序制备)	MS (ESI) <i>m/z</i>	NMR谱数据
50	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	462	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.93-1.97 (m, 2H), 2.17-2.20 (m, 2H), 3.03 (s, 3H), 3.20-3.26 (m, 2H), 3.47-3.53 (m, 1H), 3.62 (s, 3H), 3.98-4.02 (m, 2H), 7.32 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 7.60 (d, <i>J</i> = 10.0 Hz, 1H), 7.67 (t, <i>J</i> = 6.4 Hz, 1H), 8.32 (s, 2H), 8.83 (s, 1H).
51	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	434	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.89-1.91 (m, 1H), 2.26-2.28 (m, 1H), 2.91-2.93 (m, 1H), 3.12-3.15 (m, 1H), 3.30-3.32 (m, 1H), 3.42-3.55 (m, 5H), 3.70-3.72 (m, 2H) 3.84 (s, 3H), 6.84 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H), 7.03 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H), 7.29 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 7.39 (d, <i>J</i> = 10.0 Hz, 1H), 7.64 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H).
52	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	434	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.86-1.91 (m, 1H), 2.22-2.28 (m, 1H), 2.97-2.91 (m, 1H), 3.10-3.13 (m, 1H), 3.29-3.32 (m, 1H), 3.40-3.51 (m, 5H), 3.67-3.69 (m, 2H) 3.82 (s, 3H), 6.84 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H), 7.02 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H), 7.27 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 7.35 (d, <i>J</i> = 10.4 Hz, 1H), 7.64 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H).
53	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	434	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 2.03-2.06 (m, 2H), 2.32-2.35 (m, 2H), 3.14-3.21 (m, 2H), 3.51-3.56 (m, 5H), 3.78 (s, 3H), 4.37-4.39 (m, 1H), 6.84 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H), 7.02 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H), 7.27 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 7.38 (d, <i>J</i> = 10.4 Hz, 1H), 7.62 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H).

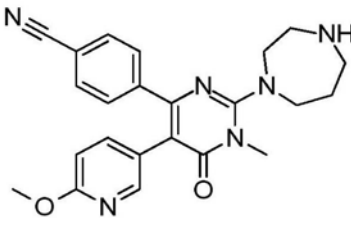
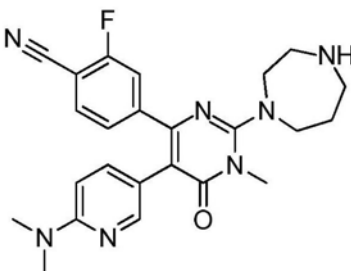
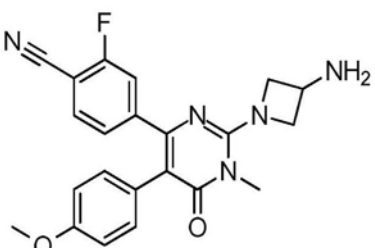
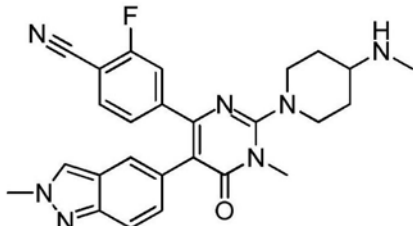
[0388]

表 3			
化学合成 实施例	结构 (通过所引用的实施例的程序制备)	MS (ESI) <i>m/z</i>	NMR谱数据
54	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	448	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.66-1.71 (m, 1H), 2.11-2.16 (m, 1H), 2.77-2.81 (m, 1H), 2.93-2.97 (m, 4H), 3.16-3.20 (m, 1H), 3.30-3.38 (m, 2H), 3.43-3.50 (m, 5H), 3.69 (s, 3H), 6.75 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H), 6.95 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H), 7.16 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.28 (d, <i>J</i> = 10.8 Hz, 1H), 7.50 (dd, <i>J</i> = 6.8, 8.0 Hz, 1H).
55	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	448	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 2.03-2.13 (m, 4H), 2.84 (s, 3H), 3.01-3.05 (m, 2H), 3.39-3.43 (m, 2H), 3.48 (s, 3H), 3.67 (s, 3H), 3.87-3.92 (m, 1H), 6.74 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H), 6.95 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H), 7.13 (dd, <i>J</i> = 1.2, 8.0 Hz, 1H), 7.21 (dd, <i>J</i> = 1.6, 10.4 Hz, 1H), 7.45 (dd, <i>J</i> = 6.8, 7.6 Hz, 1H).
56	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	448	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.77-1.80 (m, 1H), 2.22-2.26 (m, 1H), 2.90-2.92 (m, 1H), 3.03-3.07 (m, 4H), 3.27-3.30 (m, 1H), 3.39-3.41 (m, 2H), 3.44-3.46 (m, 5H), 3.77 (s, 3H), 6.86 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H), 7.06 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H), 7.29 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.36 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.58 (dd, <i>J</i> = 6.8, 7.6 Hz, 1H).
57	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	448	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.77-1.85 (m, 2H), 2.03-2.06 (m, 2H), 3.03-3.09 (m, 2H), 3.18 (s, 6H), 3.31-3.38 (m, 1H), 3.48 (s, 3H), 3.78-3.81 (m, 2H), 7.03 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 7.28 (d, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H), 7.46 (d, <i>J</i> = 10.0 Hz, 1H), 7.59-7.63 (m, 2H), 7.71 (s, 1H).

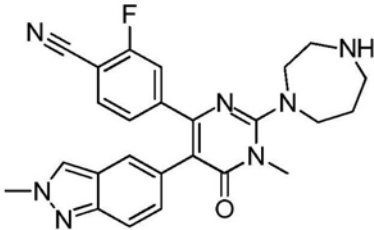
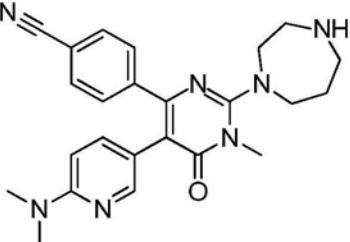
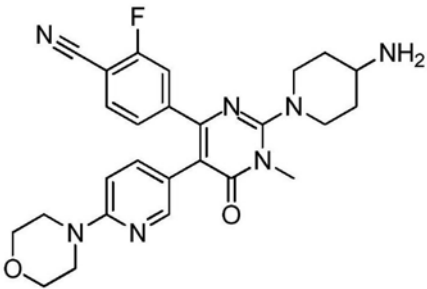
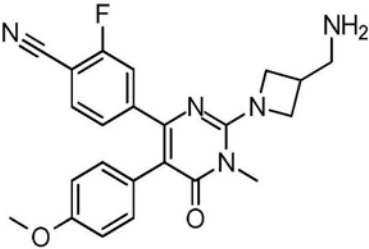
[0389]

表 3			
化学合成 实施例	结构 (通过所引用的实施例的程序制备)	MS (ESI) <i>m/z</i>	NMR谱数据
58	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	449	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.83-1.88 (m, 2H), 2.21-2.24 (m, 2H), 2.77 (s, 3H), 3.06-3.14 (m, 2H), 3.31-3.32 (m, 1H), 3.58 (s, 3H), 3.87-3.91 (m, 5H), 6.83 (d, <i>J</i> = 11.2 Hz, 1H), 7.22 (dd, <i>J</i> = 2.0, 10.8 Hz, 1H), 7.42 (dd, <i>J</i> = 2.0, 14.4 Hz, 1H), 7.59-7.65 (m, 2H), 7.84 (d, <i>J</i> = 3.2 Hz, 1H).
59	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	447	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.88-1.89 (m, 2H), 2.14-2.19 (m, 2H), 3.13-3.19 (m, 2H), 3.28 (s, 6H), 3.41-3.46 (m, 1H), 3.60 (s, 3H), 3.87-3.91 (m, 2H), 7.24 (d, <i>J</i> = 10.8 Hz, 1H), 7.39-7.44 (m, 3H), 7.59-7.67 (m, 3H).
60	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	474	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.91-1.97 (m, 2H), 2.16-2.20 (m, 6H), 3.14-3.20 (m, 2H), 3.47-3.49 (m, 1H), 3.60-3.63 (m, 7H), 3.89-3.92 (m, 2H), 7.31 (d, <i>J</i> = 9.6 Hz, 1H), 7.01 (d, <i>J</i> = 9.6 Hz, 1H), 7.41 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 7.58 (d, <i>J</i> = 10.0 Hz, 1H), 7.68-7.75 (m, 2H), 7.79 (s, 1H).
61	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	435	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 2.27-2.30 (m, 2H), 3.44-3.47 (m, 2H), 3.60-3.64 (m, 5H), 3.70-3.73 (m, 2H), 3.91-3.94 (m, 5H), 6.83 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.24 (dd, <i>J</i> = 1.6, 8.0 Hz, 1H), 7.43 (dd, <i>J</i> = 1.2, 10.4 Hz, 1H), 7.59-7.66 (m, 2H), 7.84 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz, 1H).

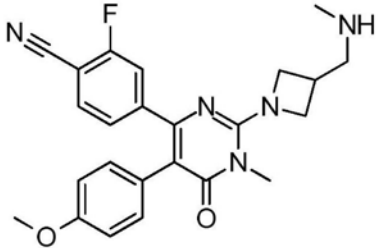
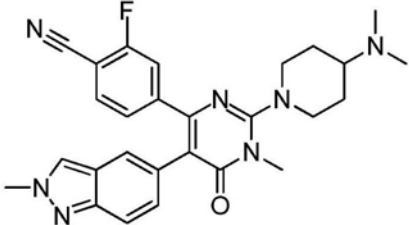
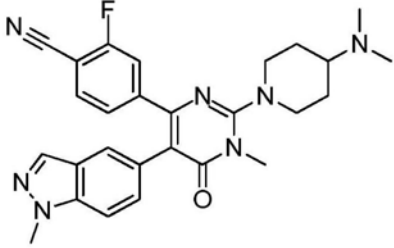
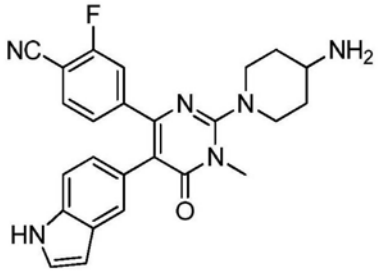
[0390]

表 3			
化学合成 实施例	结构 (通过所引用的实施例的程序制备)	MS (ESI) <i>m/z</i>	NMR谱数据
62	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	417	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 2.27-2.31 (m, 2H), 3.44-3.47 (m, 2H), 3.60-3.64 (m, 5H), 3.70-3.73 (m, 2H), 3.91-3.94 (m, 5H), 6.81 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.53 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H), 7.58 (dd, <i>J</i> = 2.4, 8.8 Hz, 1H), 7.64 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H), 7.84 (d, <i>J</i> = 1.2 Hz, 1H).
63	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	448	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 2.31-2.33 (m, 2H), 3.27 (s, 6H), 3.44-3.47 (m, 2H), 3.60-3.67 (m, 5H), 3.73-3.76 (m, 2H), 3.96-3.99 (m, 2H), 6.81 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.53 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.58 (dd, <i>J</i> = 2.4, 8.8 Hz, 1H), 7.64 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H), 7.84 (d, <i>J</i> = 1.2 Hz, 1H).
64	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	406	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 3.39 (s, 3H), 3.67 (s, 3H), 4.09-4.10 (m, 1H), 4.17-4.21 (m, 2H), 4.55-4.59 (m, 2H), 6.74 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H), 6.96 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H), 7.10 (dd, <i>J</i> = 1.6, 8.4 Hz, 1H), 7.23 (dd, <i>J</i> = 1.6, 10.8 Hz, 1H), 7.45 (dd, <i>J</i> = 6.8, 8.0 Hz, 1H).
65	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	472	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.85-1.98 (m, 2H), 2.23-2.27 (m, 2H), 2.78 (s, 3H), 3.38-3.40 (m, 1H), 3.62 (s, 3H), 3.90-3.95 (m, 2H), 4.41 (s, 3H), 7.26 (d, <i>J</i> = 10.8 Hz, 1H), 7.40 (d, <i>J</i> = 13.6 Hz, 1H), 7.49-7.57 (m, 2H), 7.65 (dd, <i>J</i> = 6.8, 11.6 Hz, 1H), 7.73 (s, 1H), 8.66 (s, 1H).

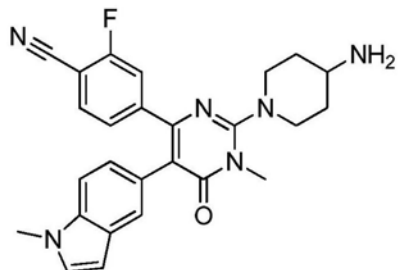
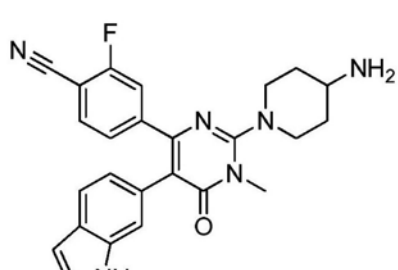
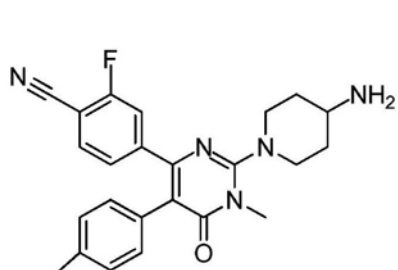
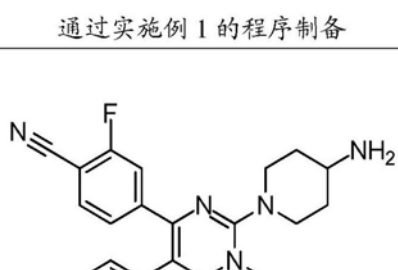
[0391]

表 3			
化学合成 实施例	结构 (通过所引用的实施例的程序制备)	MS (ESI) <i>m/z</i>	NMR谱数据
66	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	458	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 2.19-2.20 (m, 2H), 3.33-3.36 (m, 2H), 3.50-3.53 (m, 5H), 3.60-3.63 (m, 2H), 3.83-3.85 (m, 2H), 4.42 (s, 3H), 7.13 (d, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H), 7.28 (d, <i>J</i> = 10.4 Hz, 1H), 7.34 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 7.40 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 7.52 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H), 7.58 (s, 1H), 8.48 (s, 1H).
67	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	430	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 2.33-2.35 (m, 2H), 3.27 (s, 6H), 3.46-3.49 (m, 2H), 3.62-3.66 (m, 5H), 3.75-3.78 (m, 2H), 3.98-4.02 (m, 2H), 6.73 (d, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 7.67-7.72 (m, 5H), 7.80 (s, 1H).
68	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	490	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.89-1.97 (m, 2H), 2.15-2.18 (m, 2H), 3.15-3.21 (m, 2H), 3.43-3.49 (m, 1H), 3.61 (s, 3H), 3.69-3.71 (m, 4H), 3.86-3.94 (m, 6H), 7.31 (d, <i>J</i> = 9.6 Hz, 1H), 7.41 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 7.59 (d, <i>J</i> = 10.0 Hz, 1H), 7.72-7.80 (m, 2H), 7.91 (s, 1H).
69	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	420	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 2.99-3.06 (m, 1H), 3.30-3.32 (m, 2H), 3.49 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 4.10-4.15 (m, 2H), 4.46-4.52 (m, 2H), 6.83 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H), 7.01 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H), 7.19 (dd, <i>J</i> = 2.0, 10.8 Hz, 1H), 7.33 (dd, <i>J</i> = 2.0, 14.4 Hz, 1H), 7.45 (dd, <i>J</i> = 8.8, 10.8 Hz, 1H).

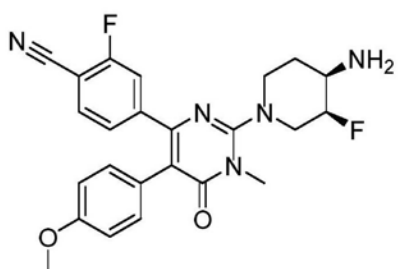
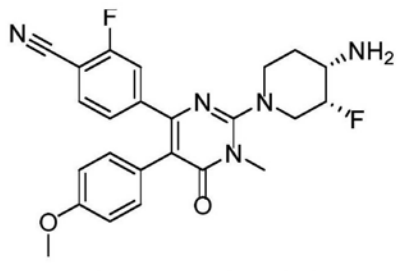
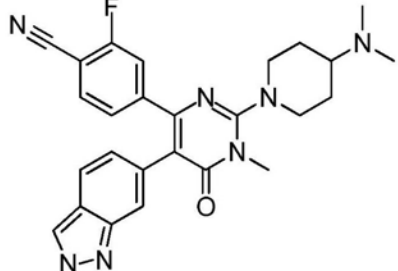
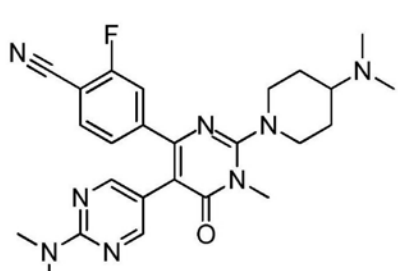
[0392]

表 3			
化学合成 实施例	结构 (通过所引用的实施例的程序制备)	MS (ESI) <i>m/z</i>	NMR谱数据
70	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	434	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 2.78 (s, 3H), 3.07-3.10 (m, 1H), 3.37-3.39 (m, 2H), 3.48 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 4.12-4.15 (m, 2H), 4.47-4.52 (m, 2H), 6.84 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H), 7.01 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H), 7.20 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 7.33 (d, <i>J</i> = 10.4 Hz, 1H), 7.45 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H).
71	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	486	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.67-1.73 (m, 2H), 2.02-2.06 (m, 2H), 2.33 (s, 6H), 2.41-2.45 (m, 1H), 2.95-3.03 (m, 2H), 3.59 (s, 3H), 3.79-3.84 (m, 2H), 4.18 (s, 3H), 7.10 (dd, <i>J</i> = 2.0, 12.0 Hz, 1H), 7.23 (dd, <i>J</i> = 1.6, 10.8 Hz, 1H), 7.37 (dd, <i>J</i> = 2.0, 14.4 Hz, 1H), 7.46-7.56 (m, 3H), 8.11 (s, 1H).
72	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	486	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ 1.50-1.63 (m, 2H), 1.85-1.89 (m, 2H), 2.18 (s, 6H), 2.21-2.27 (m, 1H), 2.85-2.92 (m, 2H), 3.45 (s, 3H), 3.67-3.71 (m, 2H), 4.00 (s, 3H), 7.09-7.17 (m, 2H), 7.39 (dd, <i>J</i> = 1.6, 14.4 Hz, 1H), 7.51-7.54 (m, 2H), 7.69 (t, <i>J</i> = 9.2 Hz, 1H), 7.97 (s, 1H).
73	 <p>通过实施例 18 的程序制备</p>	443	¹ H NMR (300 MHz, CD ₃ OD): δ 1.85-1.91 (m, 2H), 2.11-2.16 (m, 2H), 3.06-3.14 (m, 2H), 3.36-3.40 (m, 1H), 3.57 (s, 3H), 3.81-3.85 (m, 2H), 6.85 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H), 7.22 (d, <i>J</i> = 3.0 Hz, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.33-7.48 (m, 4H).

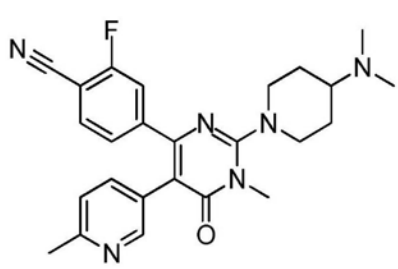
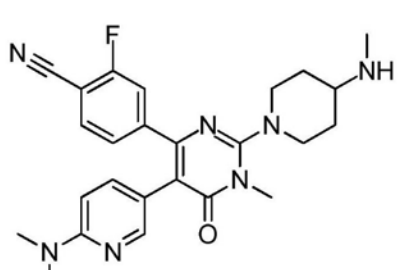
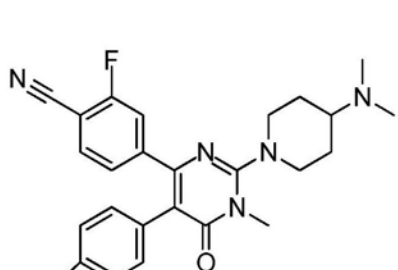
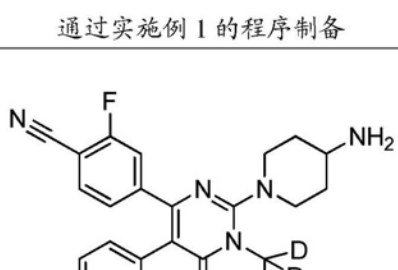
[0393]

表 3			
化学合成 实施例	结构 (通过所引用的实施例的程序制备)	MS (ESI) <i>m/z</i>	NMR谱数据
74	 <p>通过实施例 18 的程序制备</p>	456	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.53-1.56 (m, 2H), 1.88-1.91 (m, 2H), 2.87-2.95 (m, 3H), 3.49 (s, 3H), 3.62 (d, <i>J</i> = 13.6 Hz, 2H), 3.69 (s, 3H), 6.26 (s, 1H), 6.81 (d, <i>J</i> = 4.0 Hz, 1H), 7.04-7.35 (m, 6H).
75	 <p>通过实施例 18 的程序制备</p>	442	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.88-1.94 (m, 2H), 2.13-2.16 (m, 2H), 3.05-3.16 (m, 2H), 3.33-3.42 (m, 1H), 3.60 (s, 3H), 3.84-3.86 (m, 2H), 6.74-6.77 (m, 1H), 7.20-7.50 (m, 7H).
76	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	457	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.51-1.54 (m, 2H), 1.88-1.91 (m, 2H), 2.84-2.97 (m, 3H), 3.49 (s, 3H), 3.62-3.65 (m, 5H), 6.31 (d, <i>J</i> = 2.8 Hz, 1H), 6.61 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 7.06 (d, <i>J</i> = 3.2 Hz, 1H), 7.13-7.18 (m, 3H), 7.27 (d, <i>J</i> = 10.8 Hz, 1H), 7.33-7.37 (m, 2H).
77	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	444	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.65-1.68 (m, 2H), 2.01-2.04 (m, 2H), 2.98-3.12 (m, 3H), 3.63 (s, 3H), 3.78-3.82 (m, 2H), 6.94 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.24 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 7.43-7.45 (m, 2H), 7.50 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 7.72 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 8.06 (s, 1H).

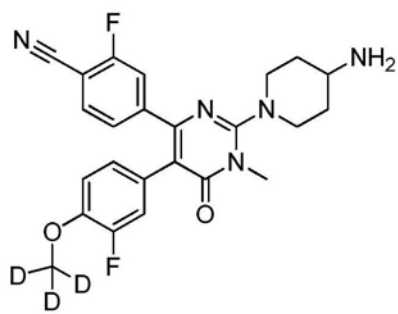
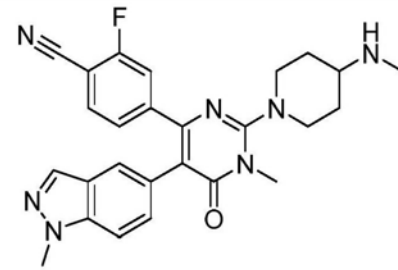
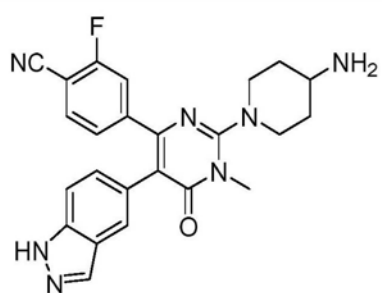
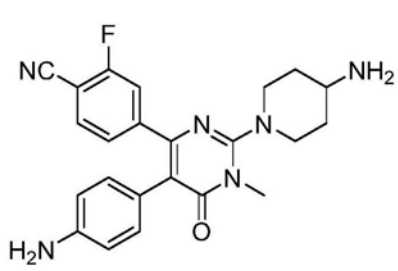
[0394]

表 3			
化学合成 实施例	结构 (通过所引用的实施例的程序制备)	MS (ESI) <i>m/z</i>	NMR谱数据
78	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	452	¹ H NMR (300 MHz, CD ₃ OD): δ 1.84-1.91 (m, 1H), 2.01-2.06 (m, 1H), 3.00-3.08 (m, 2H), 3.16-3.21 (m, 1H), 3.58 (s, 3H), 3.75-3.82 (m, 4H), 3.93-4.01 (m, 1H), 4.70-4.82 (m, 1H), 6.86 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 2H), 7.06 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 2H), 7.24 (dd, <i>J</i> = 0.9, 8.1 Hz, 1H), 7.34 (dd, <i>J</i> = 1.5, 10.8 Hz, 1H), 7.54-7.58 (m, 1H).
79	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	452	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.87-1.91 (m, 1H), 2.03-2.07 (m, 1H), 3.02-3.08 (m, 2H), 3.19-3.29 (m, 1H), 3.59 (s, 3H), 3.77-3.83 (m, 4H), 3.95-4.01 (m, 1H), 4.73-4.85 (m, 1H), 6.87 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H), 7.07 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 2H), 7.26 (dd, <i>J</i> = 1.2, 8.4 Hz, 1H), 7.36 (dd, <i>J</i> = 1.2, 10.8 Hz, 1H), 7.56 (t, <i>J</i> = 6.8 Hz, 1H).
80	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	486	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.71-1.77 (m, 2H), 2.05-2.08 (m, 2H), 2.38 (s, 6H), 2.45-2.48 (m, 1H), 2.98-3.05 (m, 2H), 3.61 (s, 3H), 3.83-3.86 (m, 2H), 4.20 (s, 3H), 6.93 (dd, <i>J</i> = 1.2, 8.8 Hz, 1H), 7.27 (dd, <i>J</i> = 1.2, 7.6 Hz, 1H), 7.36-7.41 (m, 2H), 7.49-7.53 (m, 1H), 7.66 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H), 8.18 (s, 1H).
81	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	477	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 2.03-2.06 (m, 2H), 2.25-2.27 (m, 2H), 2.98 (s, 6H), 3.14-3.20 (m, 2H), 3.36 (s, 6H), 3.56-3.60 (m, 1H), 3.62 (s, 3H), 4.01-4.04 (m, 2H), 7.49 (d, <i>J</i> = 4.4 Hz, 1H), 7.67 (d, <i>J</i> = 10.0 Hz, 1H), 7.75-7.78 (m, 1H), 8.43 (s, 2H).

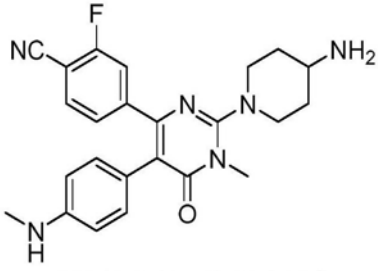
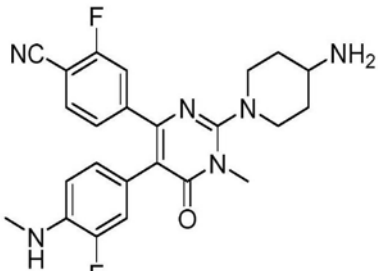
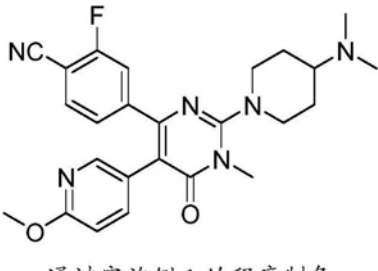
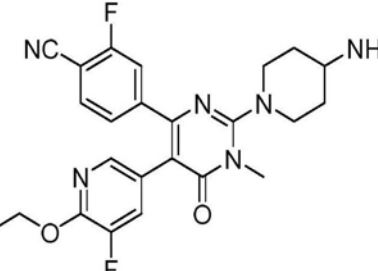
[0395]

表 3			
化学合成 实施例	结构 (通过所引用的实施例的程序制备)	MS (ESI) <i>m/z</i>	NMR谱数据
82	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	447	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.56-1.62 (m, 2H), 1.91-1.94 (m, 2H), 2.25 (s, 6H), 2.31-2.37 (m, 1H), 2.41 (s, 3H), 2.87-2.93 (m, 2H), 3.47 (s, 3H), 3.72-3.76 (m, 2H), 7.10 (dd, <i>J</i> = 1.2, 8.0 Hz, 1H), 7.15 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 7.28-7.31 (m, 1H), 7.49-7.52 (m, 2H), 7.80 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H).
83	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	462	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.92-2.04 (m, 2H), 2.24-2.26 (m, 2H), 2.79 (s, 3H), 3.14-3.20 (m, 2H), 3.30 (s, 6H), 3.37-3.40 (m, 1H), 3.61 (s, 3H), 3.94-3.98 (m, 2H), 7.16 (d, <i>J</i> = 9.6 Hz, 1H), 7.42 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 7.61 (d, <i>J</i> = 10.0 Hz, 1H), 7.71-7.76 (m, 2H), 7.84 (d, <i>J</i> = 1.2 Hz, 1H).
84	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	472	¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃): δ 1.61-1.69 (m, 2H), 1.98-2.01 (m, 2H), 2.32 (s, 6H), 2.32-2.33 (m, 1H), 2.88-2.94 (m, 2H), 3.53 (s, 3H), 3.65-3.69 (m, 2H), 6.73 (dd, <i>J</i> = 1.2, 8.8 Hz, 1H), 7.00 (dd, <i>J</i> = 1.2, 8.0 Hz, 1H), 7.19-7.30 (m, 2H), 7.37 (s, 1H), 7.52 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.90 (s, 1H), 10.65 (br, 1H).
85	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	455	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.88-1.92 (m, 2H), 2.15-2.18 (m, 2H), 3.12-3.18 (m, 2H), 3.40-3.46 (m, 1H), 3.85-3.88 (m, 5H), 6.81 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 6.98-7.05 (m, 2H), 7.25 (dd, <i>J</i> = 1.2, 8.4 Hz, 1H), 7.42 (d, <i>J</i> = 11.2 Hz, 1H), 7.61 (t, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H).

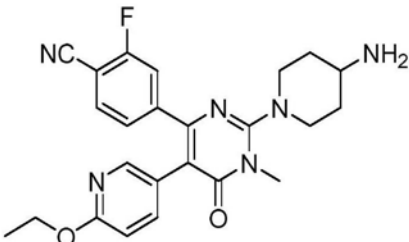
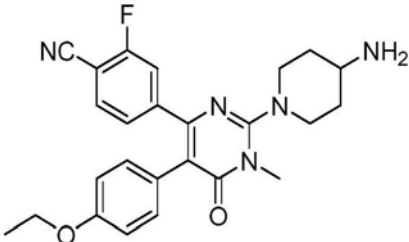
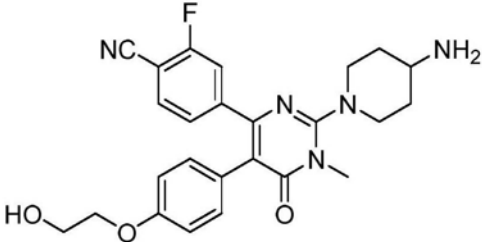
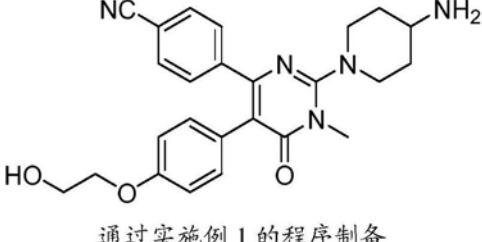
[0396]

表 3			
化学合成 实施例	结构 (通过所引用的实施例的程序制备)	MS (ESI) <i>m/z</i>	NMR谱数据
86	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	455	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.88-1.92 (m, 2H), 2.14-2.17 (m, 2H), 3.11-3.17 (m, 2H), 3.42-3.47 (m, 1H), 3.59 (s, 3H), 3.85-3.88 (m, 2H), 6.81 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 6.98-7.05 (m, 2H), 7.25 (dd, <i>J</i> = 1.2, 8.0 Hz, 1H), 7.42 (d, <i>J</i> = 10.4 Hz, 1H), 7.60 (dd, <i>J</i> = 0.8, 7.6 Hz, 1H).
87	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	472	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ ppm 1.79 (br. s., 2 H) 2.11 (br. s., 2 H) 2.97 (br. s., 2 H) 3.10 - 3.31 (m, 1 H) 3.46 (br. s., 3 H) 3.74 (d, <i>J</i> =18.19 Hz, 2 H) 4.03 (br. s., 3 H) 7.12 (d, <i>J</i> =13.39 Hz, 1 H) 7.40 - 7.61 (m, 4 H) 7.71 (br. s., 1 H) 7.87 - 8.07 (m, 1 H) 9.15 (br. s., 2 H).
88	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	444	¹ H NMR (400 MHz, 甲醇- <i>d</i> ₄): δ ppm 1.84 (d, <i>J</i> =13.39 Hz, 2 H) 2.11 (d, <i>J</i> =13.14 Hz, 2 H) 3.05 - 3.17 (m, 2 H) 3.35 - 3.40 (m, 1 H) 3.59 (s, 3 H) 3.83 (d, <i>J</i> =14.40 Hz, 2 H) 7.17 (d, <i>J</i> =8.08 Hz, 2 H) 7.41 (d, <i>J</i> =10.61 Hz, 1 H) 7.44 - 7.52 (m, 2 H) 7.57 (s, 1 H) 7.98 (s, 1 H) 8.54 (br. s., 1 H).
89	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	419	¹ H NMR (400 MHz, 甲醇- <i>d</i> ₄): δ ppm 1.74 - 1.96 (m, 2 H) 2.11 (d, <i>J</i> =12.13 Hz, 2 H) 3.08 (q, <i>J</i> =11.54 Hz, 2 H) 3.38 (br. s., 1 H) 3.57 (br. s., 3 H) 3.71 - 3.93 (m, 2 H) 6.64 (d, <i>J</i> =8.08 Hz, 2 H) 6.86 (d, <i>J</i> =8.08 Hz, 2 H) 7.07 - 7.17 (m, 1 H) 7.18 - 7.30 (m, 1 H) 7.31 - 7.43 (m, 1 H).

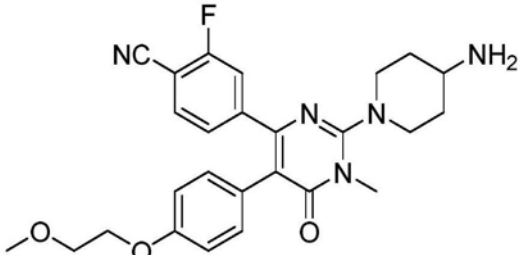
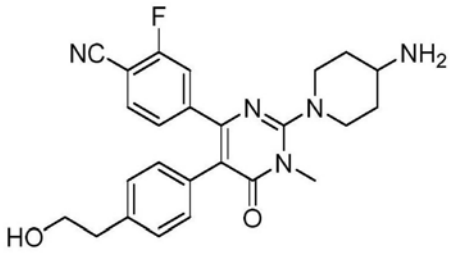
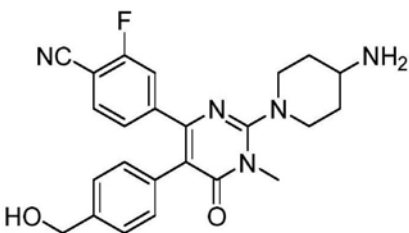
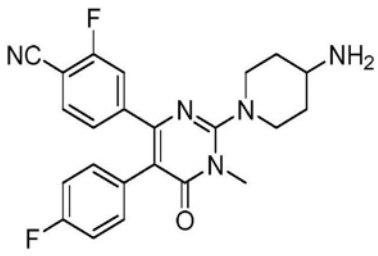
[0397]

表 3			
化学合成 实施例	结构 (通过所引用的实施例的程序制备)	MS (ESI) <i>m/z</i>	NMR谱数据
90	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	433	¹ H NMR (400 MHz, 甲醇- <i>d</i> ₄): δ ppm 1.72 - 1.93 (m, 2 H) 2.09 (d, <i>J</i> =11.62 Hz, 2 H) 2.75 (s, 3 H) 2.99 - 3.14 (m, 2 H) 3.36 - 3.43 (m, 1 H) 3.56 (s, 3 H) 3.78 (d, <i>J</i> =12.38 Hz, 2 H) 6.54 (d, <i>J</i> =7.83 Hz, 2 H) 6.89 (d, <i>J</i> =7.83 Hz, 2 H) 7.27 (d, <i>J</i> =8.34 Hz, 1 H) 7.32 - 7.43 (m, 1 H) 7.48 - 7.62 (m, 1 H).
91	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	451	¹ H NMR (400 MHz, 甲醇- <i>d</i> ₄): δ ppm 1.86 (d, <i>J</i> =11.87 Hz, 2 H) 2.12 (d, <i>J</i> =11.12 Hz, 2 H) 2.96 (s, 3 H) 3.11 (t, <i>J</i> =12.25 Hz, 2 H) 3.40 (br. s., 1 H) 3.57 (s, 3 H) 3.84 (d, <i>J</i> =12.38 Hz, 2 H) 6.90 (d, <i>J</i> =8.59 Hz, 1 H) 7.05 (t, <i>J</i> =8.46 Hz, 1 H) 7.12 (d, <i>J</i> =12.38 Hz, 1 H) 7.26 (d, <i>J</i> =8.34 Hz, 1 H) 7.40 (d, <i>J</i> =10.61 Hz, 1 H) 7.60 (t, <i>J</i> =7.20 Hz, 1 H).
92	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	463	¹ H NMR (400 MHz, 氯仿- <i>d</i>): δ ppm 1.71 (m, <i>J</i> =11.37 Hz, 2 H) 1.74 (br. s., 1 H) 2.04 (d, <i>J</i> =11.87 Hz, 2 H) 2.38 (br. s., 6 H) 2.96 (t, <i>J</i> =12.76 Hz, 2 H) 3.55 (s, 3 H) 3.71 (d, <i>J</i> =12.88 Hz, 2 H) 3.91 (s, 3 H) 6.73 (d, <i>J</i> =8.59 Hz, 1 H) 7.12 (d, <i>J</i> =7.83 Hz, 1 H) 7.34 (d, <i>J</i> =10.11 Hz, 1 H) 7.43 (t, <i>J</i> =7.07 Hz, 1 H) 7.53 (d, <i>J</i> =8.34 Hz, 1 H) 7.81 (br. s., 1 H).
93	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	467	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ ppm 1.32 (td, <i>J</i> =7.01, 1.39 Hz, 3 H) 1.58 (d, <i>J</i> =11.62 Hz, 2 H) 1.92 (d, <i>J</i> =11.62 Hz, 2 H) 2.80 (s, 3 H) 2.91 - 3.03 (m, 2 H) 3.08 (br. s., 1 H) 3.69 (d, <i>J</i> =10.36 Hz, 2 H) 4.29 - 4.40 (m, 2 H) 6.86 (s, 1 H) 6.89 (d, <i>J</i> =8.08 Hz, 1 H) 7.21 (d, <i>J</i> =8.08 Hz, 1 H) 7.56 (d, <i>J</i> =1.77 Hz, 1 H) 7.81 - 7.86 (m, 1 H) 8.33 (s, 3 H).

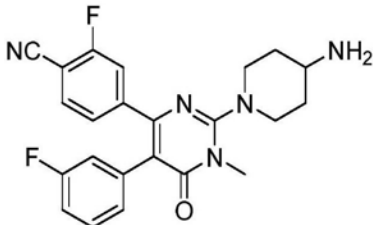
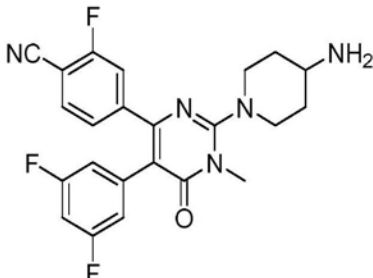
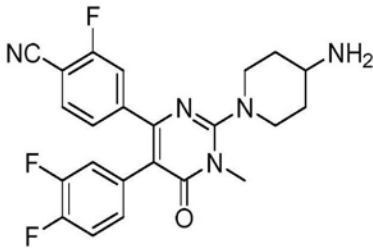
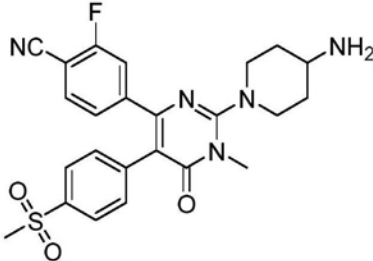
[0398]

表 3			
化学合成 实施例	结构 (通过所引用的实施例的程序制备)	MS (ESI) <i>m/z</i>	NMR谱数据
94	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	449	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 1.28 (td, <i>J</i> =7.01, 2.40 Hz, 3 H) 1.58 (br. s., 2 H) 1.89 (br. s., 2 H) 2.92 - 3.02 (m, 2 H) 3.07 (br. s., 1 H) 3.43 (s, 3 H) 3.68 (d, <i>J</i> =13.39 Hz, 2 H) 4.21 - 4.29 (m, 2 H) 6.73 (d, <i>J</i> =3.79 Hz, 1 H) 6.80 (s, 1 H) 6.93 (d, <i>J</i> =7.83 Hz, 1 H) 7.20 (d, <i>J</i> =8.59 Hz, 1 H) 7.54 (d, <i>J</i> =8.08 Hz, 1 H) 7.80 - 7.85 (m, 1 H) 8.31 (s, 3 H).
95	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	448	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ ppm 1.31 (t, <i>J</i> =6.69 Hz, 3 H) 1.73 (d, <i>J</i> =9.09 Hz, 2 H) 2.00 (d, <i>J</i> =12.13 Hz, 2 H) 2.99 (t, <i>J</i> =12.51 Hz, 2 H) 3.28 (br. s., 1 H) 3.43 (s, 3 H) 3.71 (d, <i>J</i> =12.38 Hz, 2 H) 3.95 - 4.06 (m, 2 H) 6.83 (d, <i>J</i> =8.08 Hz, 2 H) 7.01 (d, <i>J</i> =8.59 Hz, 2 H) 7.18 (d, <i>J</i> =8.59 Hz, 1 H) 7.41 (d, <i>J</i> =10.86 Hz, 1 H) 7.61 (m, 1 H) 7.79 (t, <i>J</i> =7.83 Hz, 1 H) 8.07 (br. s., 3 H).
96	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	464	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 1.74 (d, <i>J</i> =10.36 Hz, 2 H) 2.00 (d, <i>J</i> =11.62 Hz, 2 H) 2.99 (t, <i>J</i> =12.25 Hz, 2 H) 3.43 (s, 3 H) 3.64 (br. s., 2 H) 3.71 (d, <i>J</i> =11.87 Hz, 2 H) 4.07 (br. s., 2 H) 6.85 (d, <i>J</i> =8.34 Hz, 2 H) 7.01 (d, <i>J</i> =8.34 Hz, 2 H) 7.18 (d, <i>J</i> =8.08 Hz, 1 H) 7.41 (d, <i>J</i> =10.36 Hz, 1 H) 7.58 - 7.67 (m, 1 H) 7.79 (t, <i>J</i> =7.45 Hz, 1 H) 8.14 (br. s., 3 H).
97	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	446	¹ H NMR (400 MHz, 甲醇- <i>d</i> ₄): δ ppm 1.87 (d, <i>J</i> =11.12 Hz, 2 H) 2.13 (d, <i>J</i> =12.13 Hz, 2 H) 3.04 - 3.21 (m, 2 H) 3.38 (d, <i>J</i> =10.61 Hz, 1 H) 3.57 (s, 3 H) 3.77 - 3.88 (m, 4 H) 4.02 (br. s., 2 H) 6.86 (d, <i>J</i> =7.83 Hz, 2 H) 7.04 (d, <i>J</i> =8.34 Hz, 2 H) 7.47 - 7.53 (m, 2 H) 7.57 (d, <i>J</i> =7.58 Hz, 2 H).

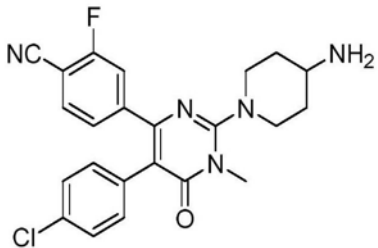
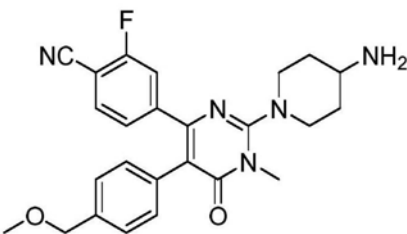
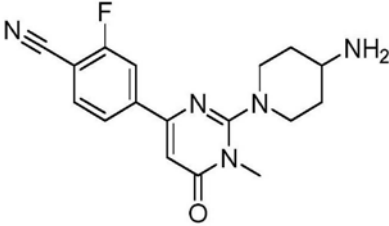
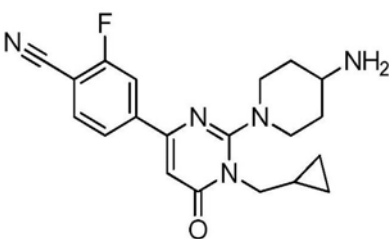
[0399]

表 3			
化学合成 实施例	结构 (通过所引用的实施例的程序制备)	MS (ESI) <i>m/z</i>	NMR谱数据
98	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	478	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm: 1.74 (d, <i>J</i> =11.87 Hz, 2 H) 2.00 (d, <i>J</i> =12.38 Hz, 2 H) 2.99 (t, <i>J</i> =12.25 Hz, 2 H) 3.28 (br. s., 1 H) 3.43 (s, 3 H) 3.44 - 3.54 (m, 2 H) 3.70 (m, 5 H) 3.90 - 4.05 (m, 2 H) 6.85 (d, <i>J</i> =8.34 Hz, 2 H) 7.01 (d, <i>J</i> =7.83 Hz, 2 H) 7.18 (d, <i>J</i> =8.08 Hz, 1 H) 7.42 (d, <i>J</i> =10.61 Hz, 1 H) 7.79 (t, <i>J</i> =7.20 Hz, 1 H) 8.11 (br. s., 3 H).
99	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	448	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ ppm 1.73 (d, <i>J</i> =11.37 Hz, 2 H) 2.00 (d, <i>J</i> =12.63 Hz, 2 H) 2.64 - 2.76 (m, 2 H) 3.00 (t, <i>J</i> =12.13 Hz, 2 H) 3.29 (br. s., 1 H) 3.43 (br. s., 3 H) 3.48 (d, <i>J</i> =9.85 Hz, 2 H) 3.69 - 3.77 (m, 2 H) 7.00 (d, <i>J</i> =7.33 Hz, 2 H) 7.13 (d, <i>J</i> =7.83 Hz, 2 H) 7.18 (d, <i>J</i> =8.34 Hz, 1 H) 7.34 - 7.42 (m, 1 H) 7.75 - 7.80 (m, 1 H) 8.06 (br. s., 3 H).
100	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	434	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ ppm 1.73 (d, <i>J</i> =12.13 Hz, 2 H) 1.94 - 2.03 (m, 2 H) 3.00 (br. s., 2 H) 3.29 (br. s., 1 H) 3.44 (s, 3 H) 3.48 (d, <i>J</i> =9.60 Hz, 2 H) 3.70 (br. s., 2 H) 7.06 (d, <i>J</i> =7.33 Hz, 2 H) 7.16 - 7.25 (m, 3 H) 7.41 (d, <i>J</i> =10.86 Hz, 1 H) 7.75 - 7.82 (m, 1 H) 8.05 (br. s., 3 H).
101	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	422	¹ H NMR (400 MHz, 甲醇- <i>d</i> ₄): δ ppm 1.78 - 1.94 (m, 2 H) 2.13 (d, <i>J</i> =11.87 Hz, 2 H) 3.10 (t, <i>J</i> =12.51 Hz, 2 H) 3.39 (d, <i>J</i> =12.13 Hz, 1 H) 3.57 (s, 3 H) 3.73 - 3.93 (m, 2 H) 6.99 - 7.09 (m, 2 H) 7.12 - 7.25 (m, 3 H) 7.37 (d, <i>J</i> =10.36 Hz, 1 H) 7.57 (t, <i>J</i> =6.95 Hz, 1 H).

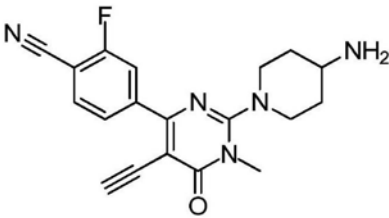
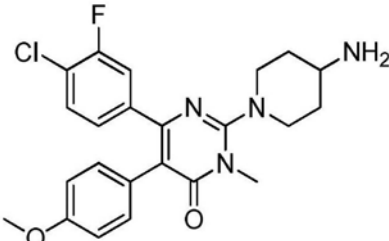
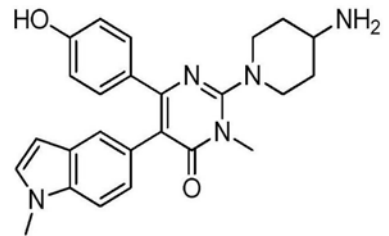
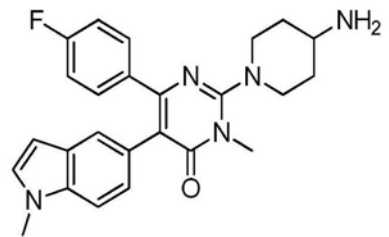
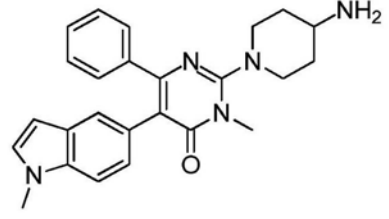
[0400]

表 3			
化学合成 实施例	结构 (通过所引用的实施例的程序制备)	MS (ESI) <i>m/z</i>	NMR谱数据
102	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	422	¹ H NMR (400 MHz, 甲醇- <i>d</i> ₄): δ ppm 1.79 - 1.93 (m, 2 H) 2.13 (d, <i>J</i> =12.38 Hz, 2 H) 3.11 (t, <i>J</i> =12.63 Hz, 2 H) 3.39 (d, <i>J</i> =11.62 Hz, 1 H) 3.57 (s, 3 H) 3.85 (d, <i>J</i> =13.64 Hz, 2 H) 6.89 (d, <i>J</i> =7.83 Hz, 1 H) 6.96 - 7.07 (m, 2 H) 7.23 (d, <i>J</i> =8.34 Hz, 1 H) 7.25 - 7.33 (m, 1 H) 7.38 (d, <i>J</i> =10.36 Hz, 1 H) 7.58 (t, <i>J</i> =7.20 Hz, 1 H).
103	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	440	¹ H NMR (400 MHz, 甲醇- <i>d</i> ₄): δ ppm 1.77 - 1.95 (m, 2 H) 2.13 (d, <i>J</i> =11.62 Hz, 2 H) 3.12 (t, <i>J</i> =12.76 Hz, 2 H) 3.36 - 3.45 (m, 1 H) 3.55 (s, 3 H) 3.86 (d, <i>J</i> =13.64 Hz, 2 H) 6.78 (d, <i>J</i> =6.57 Hz, 2 H) 6.89 (t, <i>J</i> =9.22 Hz, 1 H) 7.24 (d, <i>J</i> =8.08 Hz, 1 H) 7.43 (d, <i>J</i> =10.11 Hz, 1 H) 7.62 (t, <i>J</i> =7.07 Hz, 1 H).
104	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	440	¹ H NMR (400 MHz, 甲醇- <i>d</i> ₄): δ ppm 1.79 - 1.93 (m, 2 H) 2.12 (d, <i>J</i> =11.62 Hz, 2 H) 3.11 (t, <i>J</i> =12.63 Hz, 2 H) 3.33 - 3.49 (m, 1 H) 3.57 (s, 3 H) 3.85 (d, <i>J</i> =13.64 Hz, 2 H) 6.87 (br. s., 1 H) 7.11 - 7.25 (m, 3 H) 7.42 (d, <i>J</i> =10.36 Hz, 1 H) 7.60 (t, <i>J</i> =7.20 Hz, 1 H).
105	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	482	¹ H NMR (400 MHz, 甲醇- <i>d</i> ₄): δ ppm 1.79 - 1.92 (m, 2 H) 2.12 (d, <i>J</i> =11.62 Hz, 2 H) 3.05 - 3.29 (m, 5 H) 3.40 (br. s., 1 H) 3.58 (s, 3 H) 3.80 - 3.94 (m, 2 H) 7.16 (d, <i>J</i> =7.58 Hz, 1 H) 7.36 - 7.48 (m, 3 H) 7.58 (t, <i>J</i> =7.20 Hz, 1 H) 7.87 (d, <i>J</i> =8.08 Hz, 2 H).

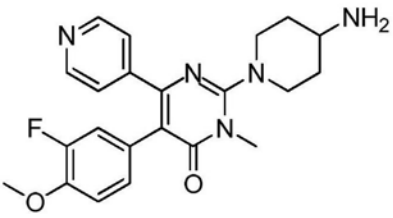
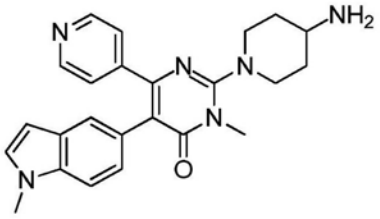
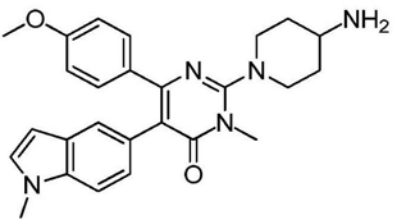
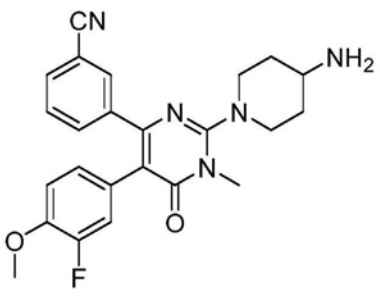
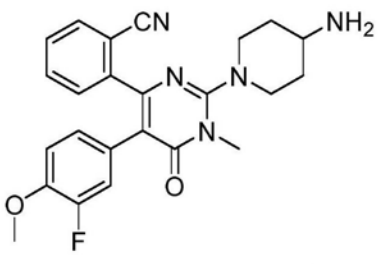
[0401]

表 3			
化学合成 实施例	结构 (通过所引用的实施例的程序制备)	MS (ESI) <i>m/z</i>	NMR谱数据
106	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	438	¹ H NMR (400 MHz, 氯仿- <i>d</i>): δ ppm 1.89 (d, <i>J</i> =11.12 Hz, 2 H) 2.16 (d, <i>J</i> =10.86 Hz, 2 H) 3.05 (t, <i>J</i> =11.87 Hz, 2 H) 3.28 (br. s., 1 H) 3.55 (s, 3 H) 3.71 (d, <i>J</i> =12.13 Hz, 2 H) 7.04 (d, <i>J</i> =8.34 Hz, 1 H) 7.10 (d, <i>J</i> =8.08 Hz, 2 H) 7.27 - 7.30 (m, 1 H) 7.33 - 7.44 (m, 2 H) 8.31 (br. s., 1 H).
107	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	448	¹ H NMR (400 MHz, 甲醇- <i>d</i> ₄): δ ppm 1.81 - 1.94 (m, 2 H) 2.13 (d, <i>J</i> =12.13 Hz, 2 H) 3.12 (t, <i>J</i> =12.38 Hz, 2 H) 3.36 (s, 3 H) 3.41 (br. s., 1 H) 3.58 (s, 3 H) 3.84 (d, <i>J</i> =12.63 Hz, 2 H) 4.45 (s, 2 H) 7.14 (d, <i>J</i> =7.58 Hz, 2 H) 7.23 (d, <i>J</i> =7.83 Hz, 1 H) 7.28 (d, <i>J</i> =7.83 Hz, 2 H) 7.34 (d, <i>J</i> =10.61 Hz, 1 H) 7.55 (t, <i>J</i> =7.20 Hz, 1 H).
108	 <p>通过实施例 13 的程序制备</p>	328	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ ppm 1.62 - 1.78 (m, 2 H) 2.00 (d, <i>J</i> =11.87 Hz, 2 H) 3.02 (t, <i>J</i> =12.00 Hz, 2 H) 3.32 (s, 3 H) 3.76 (d, <i>J</i> =12.88 Hz, 2 H) 6.87 (s, 1 H) 7.95 (br. s., 3 H) 8.01 - 8.08 (m, 1 H) 8.08 - 8.12 (m, 1 H) 8.16 (d, <i>J</i> =11.12 Hz, 1 H).
109	 <p>通过实施例 13 的程序制备</p>	368	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 0.37-0.39 (m, 2H), 0.60-0.65 (m, 2H), 1.29-1.32 (m, 1H), 1.59-1.64 (m, 2H), 2.10-2.14 (m, 2H), 3.07-3.14 (m, 2H), 3.43-3.47 (m, 1H), 6.81 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H), 4.92-4.95 (m, 2 H), 6.66 (s, 1H), 7.84-7.88 (m, 1H), 7.99-8.05 (m, 2H).

[0402]

表 3			
化学合成 实施例	结构 (通过所引用的实施例的程序制备)	MS (ESI) <i>m/z</i>	NMR谱数据
110	 <p>通过实施例 14 的程序制备</p>	352	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.40-1.41 (m, 2H), 1.81-1.84 (m, 2H), 2.75-2.78 (m, 1H), 2.89-2.95 (m, 2H), 3.37 (s, 3H), 3.65-3.68 (m, 2H), 3.77 (s, 1H), 7.66 (t, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 7.89 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 7.96 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H).
111	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	442	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): 1.75-1.83 (m, 2H), 2.06 (d, <i>J</i> = 10.8 Hz, 2H), 2.99 (t, <i>J</i> = 11.6 Hz, 2H), 3.28-3.30 (m, 1H), 3.42 (s, 3H), 3.68-3.74 (m, 5H), 6.85 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 2H), 7.02-7.08 (m, 3H), 7.28-7.45 (m, 2H), 8.38-8.44 (m, 2H).
112	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	429	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): 1.09-1.17 (m, 2H), 1.57-1.62 (m, 2H), 2.46-2.56 (m, 3H), 2.96-3.03 (m, 2H), 3.35 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 6.02 (s, 1H), 6.37 (s, 1H), 6.79-6.97 (m, 3H), 7.13-7.27 (m, 2H), 7.42-7.52 (m, 2H).
113	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	431	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): 1.06-1.17 (m, 2H), 1.57-1.62 (m, 2H), 2.49-2.56 (m, 3H), 2.96-3.09 (m, 2H), 3.36 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 6.07 (s, 1H), 6.40 (s, 1H), 6.97-7.20 (m, 4H), 7.27 (d, <i>J</i> = 11.8 Hz, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.61-7.66 (m, 1H).
114	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	414	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.52-1.55 (m, 2H), 1.87-1.90 (m, 2H), 2.83-3.95 (m, 3H), 3.49 (s, 3H), 3.59-3.67 (m, 5H), 6.23 (s, 1H), 6.81 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 6.98-7.08 (m, 4H), 8.14 (t, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 7.24 (m, 3H).

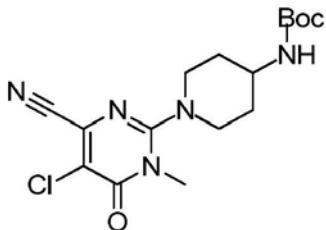
[0403]

表 3			
化学合成 实施例	结构 (通过所引用的实施例的程序制备)	MS (ESI) <i>m/z</i>	NMR谱数据
115	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	410	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.90-2.05 (m, 2H), 2.16-2.19 (m, 2H), 3.12-3.20 (m, 2H), 3.44-3.49 (m, 1H), 3.62 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.90-3.92 (m, 2H), 6.88-6.90 (m, 1H), 7.02-7.06 (m, 1H), 7.08-7.13 (m, 1H), 8.07 (d, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H), 8.79 (d, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H).
116	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	415	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.50-1.53 (m, 2H), 1.86-1.89 (m, 2H), 2.82-3.95 (m, 3H), 3.48 (s, 3H), 3.60-3.69 (m, 5H), 6.24 (s, 1H), 6.81 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.03 (s, 1H), 7.18-7.24 (m, 4H), 8.17 (t, <i>J</i> = 4.4 Hz, 1H).
117	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	444	¹ H NMR (400 MHz, CD ₃ OD): δ 1.62-1.68 (m, 2H), 2.01-2.03 (m, 2H), 2.96-3.06 (m, 3H), 3.55 (s, 3H), 3.71-3.74 (m, 5H), 3.81 (s, 3H), 6.36 (d, <i>J</i> = 3.2 Hz, 1H), 6.65 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H), 6.93 (t, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H), 7.13 (d, <i>J</i> = 3.2 Hz, 1H), 7.29-7.38 (m, 4H).
118	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	434	¹ H NMR (300 MHz, CD ₃ OD): δ 1.84-1.89 (m, 2H), 2.12-2.16 (m, 2H), 3.13 (t, <i>J</i> = 12.0 Hz, 2H), 3.31-3.41 (m, 1H), 3.57 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.84-3.86 (m, 2H), 6.79-6.82 (m, 1H), 6.93-7.00 (m, 2H), 7.38 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 7.54 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.64 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 7.78 (s, 1H).
119	 <p>通过实施例 1 的程序制备</p>	434	¹ H NMR (300 MHz, DMSO-d ₆): δ 1.70-1.74 (m, 2H), 1.99-2.03 (m, 2H), 2.95 (t, <i>J</i> = 12.0 Hz, 2H), 3.23-3.24 (m, 1H), 3.44 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.84-3.86 (m, 2H), 6.68-6.70 (m, 1H), 6.91-6.96 (m, 2H), 7.31-7.34 (m, 1H), 7.40-7.59 (m, 2H), 7.77-7.80 (m, 1H), 8.34 (m, 3H).

[0404] 制备120A: [1-(5-氯-4-氰基-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-2-基)-哌啶-4-基]-

氨基甲酸叔丁酯

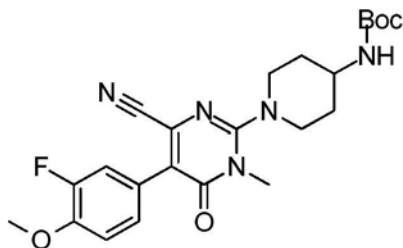
[0405]



[0406] 将在DMF (20mL) 中的N-[1-(5,6-二氯-3-甲基-4-氧代(3-氢嘧啶-2-基))(4-哌啶基)](叔丁氧基)甲酰胺(2.4g, 6.38mmol)、Zn(CN)₂(388mg, 3.32mmol)和Pd(PPh₃)₄(740mg, 0.64mmol)的溶液在N₂气氛下在130℃搅拌持续5小时。将反应混合物冷却至室温并过滤。将滤液在真空中浓缩,并且将残余物通过制备型HPLC纯化,以给出200mg的标题产物(9%)。关于C₁₆H₂₂ClN₅O₃计算的[M+H]为368;实测值为368。

[0407] 制备120B: {1-[4-氰基-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-2-基]-哌啶-4-基}-氨基甲酸叔丁酯

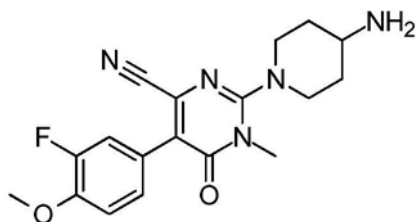
[0408]



[0409] 将在二噁烷(5mL)和H₂O(1mL)中的[1-(5-氯-4-氰基-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-2-基)-哌啶-4-基]-氨基甲酸叔丁酯(200mg, 0.54mmol)、3-氟-4-甲氧基苯硼酸(278mg, 1.63mmol)、Pd(dppf)₂Cl₂(119mg, 0.16mmol)和Na₂CO₃(173mg, 1.63mmol)的混合物用N₂脱气并在145℃在微波中搅拌持续2小时。将反应混合物冷却至室温并过滤。将滤液在真空中浓缩,并且将残余物通过制备型HPLC纯化,以给出110mg的期望的产物(45%)。关于C₂₃H₂₈FN₅O₄计算的[M+H]为458;实测值为458。

[0410] 实施例120: 2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-甲腈

[0411]

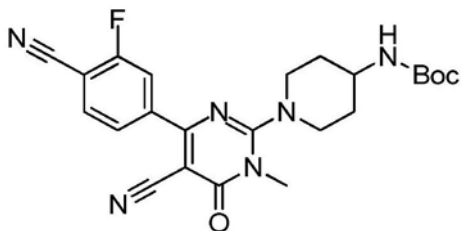


[0412] 向在EA(5mL)中的{1-[4-氰基-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-2-基]-哌啶-4-基}-氨基甲酸叔丁酯(100mg, 0.23mmol)的混合物中加入在EA(5mL)中的5N HCl溶液,在室温搅拌持续2小时。将溶剂在真空中浓缩,以给出85mg的作为HCl盐的标题产物(93%)。¹H NMR(400MHz, CD₃OD): δ1.71-1.75(m, 2H), 1.89-2.03(m, 2H), 2.96-3.02(m, 2H), 3.27-3.31(m, 1H), 3.42(s, 3H), 3.69-3.73(m, 2H), 3.83(s, 3H), 7.06(t, J=8.0Hz, 1H), 7.17-2.01(m, 2H)。关于C₁₈H₂₀FN₅O₂计算的[M+H]为358;实测值为358。

[0413] 制备121A: {1-[5-氰基-4-(4-氰基-3-氟苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-2-

基)-哌啶-4-基}-氨基甲酸叔丁酯

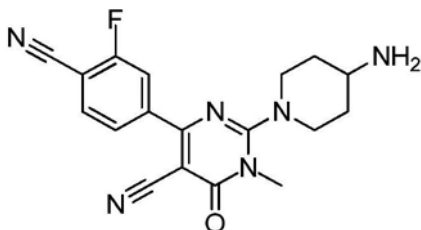
[0414]



[0415] 将在DMF (5mL) 中的 {1-[5-氯-4-(4-氰基-3-氟苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-2-基]-哌啶-4-基}-氨基甲酸叔丁酯 (460mg, 1mmol)、Zn(CN)₂ (175mg, 1.5mmol) 和 Pd(PPh₃)₄ (116mg, 0.0.1mmol) 的混合物在N₂气氛下在150℃搅拌4小时。将混合物冷却至室温并过滤。将滤液在真空中浓缩,并且将残余物通过制备型HPLC纯化,以给出150mg的作为黄色固体的标题产物(33%)。关于C₂₃H₂₅FN₆O₃计算的[M+H]为453;实测值为453。

[0416] 实施例121:2-(4-氨基哌啶-1-基)-4-(4-氰基-3-氟苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-5-甲腈

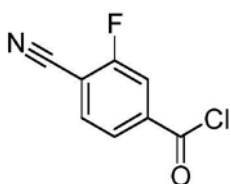
[0417]



[0418] 向在EA (5mL) 中的 {1-[5-氰基-4-(4-氰基-3-氟苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-2-基]-哌啶-4-基}-氨基甲酸叔丁酯 (150mg, 0.33mmol) 的混合物中加入在EA (5mL) 中的5N HCl溶液,并将该混合物在室温搅拌持续2小时。将溶剂在真空中浓缩,以给出120mg的作为HCl盐的标题产物(94%)。¹HNMR (400MHz, CD₃OD): δ 1.67-1.72 (m, 2H), 2.02-2.06 (m, 2H), 3.13-3.16 (m, 2H), 3.34-3.38 (m, 1H), 3.42 (s, 3H), 3.98-4.02 (m, 2H), 7.82-7.90 (m, 3H)。关于C₁₈H₁₇FN₆O计算的[M+H]为353;实测值为353。

[0419] 制备122A:4-氰基-3-氟-苯甲酰氯

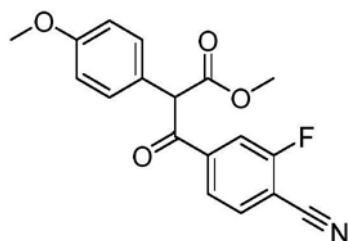
[0420]



[0421] 将4-氰基-3-氟-苯甲酸 (2.0g, 12.12mmol) 在SOCl₂ (20mL) 中的混合物回流2小时,并真空除去SOCl₂,得到4-氰基-3-氟代苯甲酰氯 (2.2g, 99%)。粗产物无需进一步纯化即可进行下一步。

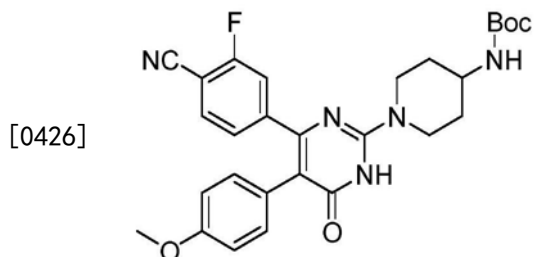
[0422] 制备122B:3-(4-氰基-3-氟苯基)-2-(4-甲氧基苯基)-3-氧代-丙酸甲酯

[0423]



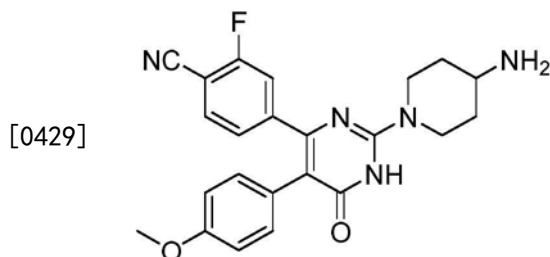
[0424] 在-78℃向(4-甲氧基苯基)-乙酸(2.18g,12.12mmol)的THF(20mL)溶液中加入LiHMDS(18.2mL,18.18mmol)并将混合物搅拌30分钟。在-78℃逐滴加入4-氰基-3-氟苯甲酰氯(2.2g,12mmol)的THF溶液;并将反应混合物温热至室温并搅拌过夜。加入NH₄Cl水溶液,用EA(3x)提取水层。将合并的有机物真空浓缩,并且将残余物通过硅胶柱色谱法(1:5,EA:PE)纯化,得到1.8g(45%)标题化合物。C₁₈H₁₄FN₂O₄的[M+H]计算值为328;实测值为328。

[0425] 制备122C: {1-[4-(4-氰基-3-氟苯基)-5-(4-甲氧基苯基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-2-基]-哌啶-4-基}-氨基甲酸叔丁酯



[0427] 将3-(4-氰基-3-氟苯基)-2-(4-甲氧基苯基)-3-氧代-丙酸甲酯(1.8g,5.5mmol)、(1-脒基哌啶-4-基)-氨基甲酸叔丁酯(2.6g,9.2mmol)、DIEA(2.4g,18.3mmol)的甲苯(50mL)溶液回流过夜。将溶剂真空浓缩。将残余物悬浮在MeOH中,并过滤固体,得到100mg(4%)标题化合物。C₂₈H₃₀FN₅O₄的[M+H]计算值为520;实测值为520。

[0428] 实施例122:4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(4-甲氧基苯基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈



[0430] 向在EA(10mL)中的{1-[4-(4-氰基-3-氟苯基)-5-(4-甲氧基苯基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-2-基]-哌啶-4-基}-氨基甲酸叔丁酯(50mg,0.096mmol)的溶液中加入在EA中的5M HCl溶液,并且将混合物在室温搅拌持续2小时。将溶剂在真空中除去,并且将残余物通过制备型HPLC纯化,以给出18mg(40%)的作为盐酸盐的标题化合物。¹H NMR(400MHz,CD₃OD):δ1.81-1.87(m,2H),2.22-2.25(m,2H),3.34-3.38(m,2H),3.56-3.60(m,1H),3.78(s,3H),4.61-4.64(m,2H),6.86(d,J=7.2Hz,2H),7.08(d,J=8.4Hz,2H),7.37-7.38(m,1H),7.51-7.53(m,1H),7.74(s,1H)。关于C₂₃H₂₂FN₅O₂计算的[M+H]为420;实测值为420。

[0431] II.生物学评价

[0432] 实施例1a:体外酶抑制测定-LSD-1

[0433] 此测定确定测试化合物抑制LSD-1脱甲基化酶活性的能力。大肠杆菌表达的全长人LSD-1(登记号060341)购自Active Motif(Cat#31334)。

[0434] LSD-1活性的酶促测定是基于时间分辨荧光共振能量转移(TimeResolved-Fluorescence Resonance Energy Transfer)(TR-FRET)检测。在以下反应条件下,以384孔板形式确定化合物对LSD-1的抑制性质:0.1-0.5nM的LSD-1,50nM的H3K4me1生物素标记的

肽 (Anaspec cat#64355), 在50mM HEPES, pH 7.3, 10mM NaCl, 0.005% Brij35, 0.5mM TCEP, 0.2mg/ml BSA的测定缓冲液中的2 μ M FAD。在LANCE检测缓冲液 (PerkinElmer) 中的LSD-1抑制剂诸如1.8mM的盐酸反苯环丙胺 (2-PCPA) 的存在下加入检测试剂Phycolink链霉亲和素-别藻蓝素 (Streptavidin-allophycocyanin) (Prozyme) 和铈-抗-未被修饰的组蛋白H3赖氨酸4 (H3K4) 抗体 (PerkinElmer) 分别至12.5nM和0.25nM的最终浓度之后, 反应产物通过TR-FRET定量确定。

[0435] 根据以下程序执行测定反应: 将2 μ L在3%DMSO中的150nMH3K4me1-生物素标记的肽与2 μ L 11-点连续稀释的测试化合物的混合物加入到板的每个孔中, 然后加入2 μ L 0.3nM LSD-1和6 μ M FAD以引发反应。然后将反应混合物在室温孵育一小时, 并通过在含有25nM Phycolink链霉亲和素-别藻蓝素和0.5nM铈-抗-未修饰的抗体的LANCE检测缓冲液中的6 μ L 1.8mM 2-PCPA来终止。如果在板中使用0.5LSD-1酶, 则酶促反应在15分钟内终止。在室温孵育1小时后, 通过EnVision MultilabelReader以TR-FRET模式 (在320nm激发, 在615nm和665nm发射) 读板。计算每个孔的比率 (665/615) 并拟合以确定抑制常数 (IC₅₀)。

[0436] 定量本文公开的化合物抑制LSD-1活性的能力, 并确定各自的IC₅₀值。表4提供本文公开的各种取代的杂环化合物的IC₅₀值。

[0437]

[0438]

化学合成实例	名称	LSD-1 IC ₅₀ (M)
1	4-(2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-6-氧代-5-对甲苯基-1,6-二氢嘧啶-4-基)苯甲腈	A
2	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈	A
3	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(6-甲氧基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈	A
4	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-5-(6-甲基吡啶-3-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈	A
5	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈	A
6	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
7	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
8	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(6-甲氧基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
9	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(6-甲氧基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
10	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(6-乙基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈	A
11	2-氟-4-[5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-2-(4-甲基氨基哌啶-1-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈	A

[0439]

化学合成实例	名称	LSD-1 IC ₅₀ (M)
12	2-氟-4-[5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-2-(4-甲基氨基哌啶-1-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈	A
13	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-乙基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	B
14	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-环戊基乙炔基-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
15	[2-(4-氨基哌啶-1-基)-4-(4-氟基-3-氟苯基)-5-(4-甲氧基苯基)-6-氧代-6H-嘧啶-1-基]-乙酸	A
16	2-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-4-(4-氟基-3-氟苯基)-5-(4-甲氧基苯基)-6-氧代-6H-嘧啶-1-基]-乙酰胺	A
17	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-(3-羟基丙基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	B
18	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-苯并咪唑-5-基-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
19	2-(4-氨基哌啶-1-基)-4-(4-氟基-3-氟苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-5-甲腈	A
20	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-氟-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
21	2-氟-4-[1-甲基-2-(4-甲基氨基哌啶-1-基)-5-(6-甲基吡啶-3-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈	A
22	4-[2-(2,8-二氮杂-螺[4.5]癸-8-基)-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
23	4-{2-(4-氨基哌啶基)-1-甲基-6-氧代-5-[6-(三氟甲基)(3-吡啶基)]氢嘧啶-4-基}-2-氟苯甲腈	A

[0440]

化学合成实例	名称	LSD-1 IC ₅₀ (M)
24	4-[2-(4-氨基哌啶基)-1-甲基-5-(2-甲基(2H-吡唑-5-基))-6-氧代氢嘧啶-4-基]苯甲腈	A
25	4-[2-((3R)-3-氨基哌啶基)-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
26	4-[2-(4-氨基哌啶基)-5-(5-氟-6-甲氧基(3-5,6-二氢吡啶))-1-甲基-6-氧代氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
27	4-[2-((3R)-3-氨基吡咯烷基)-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
28	4-[2-((3S)-3-氨基哌啶-1-基)-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
29	4-[2-((3S)-3-氨基吡咯烷-1-基)-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
30	4-[2-((3R)-3-氨基哌啶基)-5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
31	4-[2-((3S)-3-氨基哌啶-1-基)-5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
32	4-[2-(4-氨基-4-甲基哌啶-1-基)-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
33	4-[2-(4-氨基哌啶基)-1-甲基-5-(1-甲基(1H-吡唑-5-基))-6-氧代氢嘧啶-4-基]苯甲腈	A
34	4-{2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-6-氧代-5-[1-(2,2,2-三氟乙基)-1H-吡唑-4-基]-1,6-二氢嘧啶-4-基}-2-氟苯甲腈	A

[0441]

化学合成实例	名称	LSD-1 IC ₅₀ (M)
35	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-5-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)-6-氧代-1,6-二氢 嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脒	A
36	4-{2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-6-氧代-5-[1-(2,2,2-三氟乙基)-1H-吡唑-4- 基]-1,6-二氢嘧啶-4-基}-苯甲脒	A
37	4-[2-(4-氨基哌啶基)-1-甲基-5-(2-甲基(2H-吡唑-5-基))-6-氧代氢嘧啶-4- 基]-2-氟苯甲脒	A
38	4-[2-(4-氨基哌啶基)-5-(3,5-二氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代氢嘧啶-4- 基]苯甲脒	A
39	4-[2-(4-氨基哌啶基)-6-(4-氟基-3-氟苯基)-3-甲基-4-氧代-3-氢嘧啶-5-基] 苯甲酸	B
40	{4-[2-(4-氨基哌啶基)-6-(4-氟基苯基)-3-甲基-4-氧代(3-氢嘧啶-5-基)]-2- 氟苯基}-N-二甲基甲酰胺	A
41	4-[2-(4-氨基哌啶基)-6-(4-氟基苯基)-3-甲基-4-氧代(3-氢嘧啶-5-基)]-2-氟 苯甲酰胺	A
42	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-6-氧代-5-(1-氧代-2,3-二氢-1H-异吡啶-5- 基)-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脒	A
43	3-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-4-(4-氟基-3-氟苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶 -5-基]-苯甲酸	C
44	4-{5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-2-[(3S)-(吡咯烷-3-基甲基)-氮 基]-1,6-二氢嘧啶-4-基}-苯甲脒	A
45	4-{5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-2-[(3R)-(吡咯烷-3-基甲基)-氮 基]-1,6-二氢嘧啶-4-基}-苯甲脒	A

[0442]

化学合成实例	名称	LSD-1 IC ₅₀ (M)
46	4-[2-[1,4]二氮杂环庚烷-1-基-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
47	2-氟-4-[5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-2-哌嗪-1-基-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈	A
48	4-[5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-2-(哌啶-4-基氨基)-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈	A
49	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-2'-二甲基氨基-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢-[5,5']双嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
50	5-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-4-(4-氟基-3-氟苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-5-基]-吡啶 e-2-羧酸甲基酰胺	A
51	2-氟-4-{5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-2-[(3S)-(吡咯烷-3-基甲基)-氨基]-1,6-二氢嘧啶-4-基}-苯甲腈	A
52	2-fluoro-4-{5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-2-[(3R)-(吡咯烷-3-基甲基)-氨基]-1,6-二氢嘧啶-4-基}-苯甲腈	A
53	2-氟-4-[5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-2-(哌啶-4-基氨基)-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈	A
54	2-氟-4-[5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-2-(甲基-(3S)-吡咯烷-3-基甲基-氨基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈	A
55	2-氟-4-[5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-2-(甲基哌啶-4-基-氨基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈	A
56	2-氟-4-[5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-2-(甲基-吡咯烷-3-基甲基-氨基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈	A

[0443]

化学合成实例	名称	LSD-1 IC ₅₀ (M)
57	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(6-二甲基氨基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
58	2-氟-4-[5-(6-甲氧基吡啶-3-基)-1-甲基-2-(4-甲基氨基哌啶-1-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈	A
59	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(4-二甲基氨基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
60	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-6-氧代-5-(6-吡咯烷-1-基-吡啶-3-基)-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
61	4-[2-[1,4]二氮杂环庚烷-1-基-5-(6-甲氧基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
62	4-[2-[1,4]二氮杂环庚烷-1-基-5-(6-甲氧基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
63	4-[2-[1,4]二氮杂环庚烷-1-基-5-(6-二甲基氨基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
64	4-[2-(3-氨基杂氮环丁烷-1-基)-5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
65	2-氟-4-[1-甲基-2-(4-甲基氨基哌啶-1-基)-5-(2-甲基-2H-吡唑-5-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈	A
66	4-[2-[1,4]二氮杂环庚烷-1-基-1-甲基-5-(2-甲基-2H-吡唑-5-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
67	4-[2-[1,4]二氮杂环庚烷-1-基-5-(6-二甲基氨基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈	A

[0444]

化学合成实例	名称	LSD-1 IC ₅₀ (M)
68	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-5-(6-吗啉-4-基-吡啶-3-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
69	4-[2-(3-氨基甲基氮杂环丁烷-1-基)-5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
70	2-氟-4-[5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-2-(3-氨基氨基甲基氮杂环丁烷-1-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈	A
71	4-[2-(4-二甲基氨基哌啶-1-基)-1-甲基-5-(2-甲基-2H-吡唑-5-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
72	4-[2-(4-二甲基氨基哌啶-1-基)-1-甲基-5-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
73	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(1H-吡唑-5-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
74	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-5-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
75	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(1H-吡唑-6-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
76	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-5-(1-甲基-1H-吡唑-6-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
77	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(1H-吡唑-6-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
78	4-[2-((4R,3S)-4-氨基-3-氟哌啶-1-基)-5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A

[0445]

化学合成实例	名称	LSD-1 IC ₅₀ (M)
79	4-[2-((4S,3R)-4-氨基-3-氟哌啶-1-基)-5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
80	4-[2-(4-二甲基氨基哌啶-1-基)-1-甲基-5-(2-甲基-2H-吡唑-6-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
81	4-[2'-二甲基氨基-2-(4-二甲基氨基哌啶-1-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢-[5,5']双嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
82	4-[2-(4-二甲基氨基哌啶-1-基)-1-甲基-5-(6-甲基吡啶-3-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
83	4-[5-(6-二甲基氨基吡啶-3-基)-1-甲基-2-(4-甲基氨基哌啶-1-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
84	4-[2-(4-二甲基氨基哌啶-1-基)-5-(2H-吡唑-6-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
85	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-氘代甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
86	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(3-氟-4-氘代甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
87	2-氟-4-[1-甲基-2-[4-(甲基氨基)哌啶-1-基]-5-(1-甲基吡唑-5-基)-6-氧代嘧啶-4-基]苯甲腈	A
88	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(1H-吡唑-5-基)-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
89	4-[5-(4-氨基苯基)-2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A

[0446]

化学合成实例	名称	LSD-1 IC ₅₀ (M)
90	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-5-[4-(甲基氨基)苯基]-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
91	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-[3-氟-4-(甲基氨基)苯基]-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
92	4-[2-[4-(二甲基氨基)哌啶-1-基]-5-(6-甲氧基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
93	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(6-乙氧基-5-氟吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
94	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(6-乙氧基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
95	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(4-乙氧基苯基)-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
96	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-[4-(2-羟基乙氧基)苯基]-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
97	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-[4-(2-羟基乙氧基)苯基]-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]苯甲腈	A
98	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-[4-(2-甲氧基乙氧基)苯基]-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
99	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-[4-(2-羟基乙基)苯基]-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
100	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-[4-(羟基甲基)苯基]-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A

[0447]

化学合成实例	名称	LSD-1 IC ₅₀ (M)
101	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(4-氟苯基)-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
102	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(3-氟苯基)-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
103	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(3,5-二氟苯基)-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
104	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(3,4-二氟苯基)-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
105	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-5-(4-甲磺酰基苯基)-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
106	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(4-氯苯基)-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
107	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-[4-(甲氧基甲基)苯基]-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
108	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
109	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-环丙基甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	B
110	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-环丙基甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
111	2-(4-氨基哌啶-1-基)-6-(4-氯-3-氟苯基)-5-(4-甲氧基苯基)-3-甲基-3H-嘧啶-4-酮	B
112	2-(4-氨基哌啶-1-基)-6-(4-羟基-苯基)-3-甲基-5-(1-甲基-1H-吡啶-5-基)-3H-嘧啶-4-酮	D

[0448]

化学合成实例	名称	LSD-1 IC ₅₀ (M)
113	2-(4-氨基哌啶-1-基)-6-(4-氟苯基)-3-甲基-5-(1-甲基-1H-吡啶-5-基)-3H-咪啶-4-酮	B
114	2-(4-氨基哌啶-1-基)-3-甲基-5-(1-甲基-1H-吡啶-5-基)-6-苯基-3H-咪啶-4-酮	D
115	2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-3-甲基-6-吡啶-4-基-3H-咪啶-4-酮	C
116	2-(4-氨基哌啶-1-基)-3-甲基-5-(1-甲基-1H-吡啶-5-基)-6-吡啶-4-基-3H-咪啶-4-酮	B
117	2-(4-氨基哌啶-1-基)-6-(4-甲氧基苯基)-3-甲基-5-(1-甲基-1H-吡啶-5-基)-3H-咪啶-4-酮	C
118	3-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代咪啶-4-基]苯甲腈	D
119	2-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代咪啶-4-基]苯甲腈	D
120	2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢咪啶-4-甲腈	C
121	2-(4-氨基哌啶-1-基)-4-(4-氟基-3-氟苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢咪啶-5-甲腈	B
122	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(4-甲氧基苯基)-6-氧代-1H-咪啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A

[0449] 注:生化测定IC₅₀数据指定在以下范围内:A:≤0.10μM;B:>0.10μM至≤1.0μM;C:>1.0μM至≤10μM;D:>10μM

[0450] 使用LSD1或LSD1-CoREST复合物(Report QC6688 Pharm 1001)评估化合物A对赖氨酸特异性脱甲基酶1A的酶抑制作用。用合适的底物通过连续稀释法确定化合物A对抑制LSD1和LSD1-CoREST诱导的H3K4me1/2脱甲基化的IC₅₀。化合物A是单独的LSD1或呈与CoREST

的复合物的LSD1的有效和选择性抑制剂,产生各自为 0.25 ± 0.04 nM和 3.5 ± 0.55 nM的平均 $IC_{50} \pm SD$ 值。与LSD1蛋白预孵育不影响观察到的 IC_{50} ,表明化合物A与LSD1的结合是可逆的。由于LSD1-CoREST复合物的平均 IC_{50} 值处于测定方法的检测下限,因此不可能确定 IC_{50} 的表观差异是否代表游离形式和复合物形式的LSD1之间的抑制的实际差异(表5)。

[0451] 表5:化合物A对赖氨酸特异性脱甲基酶1A和赖氨酸(K)特异性脱甲基酶1A-RE1沉默转录因子的辅阻遏物的抑制作用。

[0452]

酶	平均 IC_{50} (nM) [重复次数]	SD
LSD1	0.25 [4]	0.04
LSD1-CoREST	3.5 [6] ^a	0.55

[0453] CoREST=RE1沉默转录因子的辅阻遏物;LSD1=赖氨酸特异性脱甲基酶1A;平均 IC_{50} = (n)次独立实验的平均半最大抑制浓度;SD=标准偏差。

[0454] ^a下限 IC_{50} (~50%LSD1-CoREST浓度)。

[0455] 使用各种浓度的H3K4me1底物研究化合物A对LSD1的抑制机制。 IC_{50} 值与底物浓度之间的线性相关性表明化合物A是LSD1的竞争性抑制剂, K_i 为0.12nM。

[0456] 实施例2:体外酶抑制测定-MAO选择性

[0457] 获得人类重组单胺氧化酶蛋白MAO-A和MAO-B。MAO催化伯胺、仲胺和叔胺的氧化脱氨。为了监测MAO酶活性和/或其被目标抑制剂的抑制率,执行基于荧光的(抑制剂)筛查测定。选择一种非荧光化合物3-(2-氨基苯基)-3-氧代丙胺(犬尿胺二氢溴酸盐, Sigma Aldrich)作为底物。犬尿胺是两种MAO活性的非特异性底物。在通过MAO活性进行氧化脱氨作用的同时,将犬尿胺转化为所得的荧光产物4-羟基喹啉(4-HQ)。

[0458] 通过测量犬尿胺向4-羟基喹啉的转化来估计单胺氧化酶活性。在具有透明底部的96孔黑色板(Corning)中进行测定,最终体积为100 μ l。测定缓冲液是100mM HEPES, pH 7.5。每个实验在相同实验中一式三份进行。

[0459] 简而言之,在各种浓度的本文公开的化合物(例如,0至50 μ M,取决于抑制剂强度)的不存在和/或存在下,将固定量的MAO(对于MAO-A为0.25 μ g,对于MAO-B为0.5 μ g)在反应缓冲液中在冰上孵育15分钟。反苯环丙胺(Biomol International)用作抑制对照。

[0460] 在使酶与测试化合物相互作用后,分别向每个反应中加入60至90 μ M的犬尿胺用于MAO-B和MAO-A测定,并将反应在37 $^{\circ}$ C在黑暗中放置1小时。通过加入50 μ l 2N NaOH来停止底物的氧化脱氨。使用酶标仪(Infinite200, Tecan)通过荧光(在320nm激发,在360nm发射)监测犬尿胺向4-羟基喹啉的转化。任意单位用于测量在不存在和/或存在测试化合物时产生的荧光水平。

[0461] 氧化脱氨活性的最大值通过在测试化合物的不存在下测量从犬尿胺脱氨形成的4-羟基喹啉的量并且针对背景荧光校正来获得。每种抑制剂的 K_i (IC_{50}) 在 $V_{max}/2$ 确定。在上述测定中测试化学合成实施例1-94、101-106、108-117和120-122,并发现他们具有大于2微摩尔的 IC_{50} 。

[0462] 在使用密切相关的含FAD的酶:LSD2、MAO-A和MAO-B的筛查测定中进一步确定化合物A对LSD1抑制的选择性。实验确定的化合物A抑制LSD2的平均 IC_{50} 值为 $16,550 \pm 6,378$ nM。化合物A对MAO-A和MAO-B的抑制的平均 IC_{50} 值 $>20,000$ nM。这些结果表明,与LSD2、MAO-A或

MAO-B相比,化合物A对LSD1的选择性超过60,000倍(表6)。

[0463] 表6:对比赖氨酸特异性脱甲基酶1B、单胺氧化酶A和单胺氧化酶B,化合物A对赖氨酸特异性脱甲基酶1A的选择性

[0464]

酶	平均IC ₅₀ (nM) [重复次数]	SD	LSD1相对选择性
LSD2	16550 [4]	6378	66200
MAO-A	>20000 [2]	NC	>80000
MAO-B	>20000 [3]	NC	>80000
LSD1	0.25 [4]	0.04	1
LSD1-CoREST	3.5 [6] ^a	0.55	14

[0465] CoREST=RE1沉默转录因子的辅阻遏物;LSD1(2)=赖氨酸特异性脱甲基酶1A(1B);平均IC₅₀=跨多个化合物A批次执行的(n)个独立实验的平均半最大抑制浓度;MAO-A(B)=单胺氧化酶A(B);NC=未计算;SD=标准偏差。

[0466] ^a下限IC₅₀(~50%LSD1-CoREST浓度)。

[0467] 实施例3:LSD-1CD11b细胞测定

[0468] 为了分析细胞中LSD-1抑制剂的功效,执行CD11b流式细胞术测定。LSD-1抑制诱导THP-1(AML)细胞中的CD11b表达,其通过流式细胞术测量。将THP-1细胞以100,000细胞/孔接种在24孔板中的、包含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中,每个孔最终体积为500μL。将LSD-1测试化合物在DMSO中连续稀释。相应地将稀释液加入每个孔中,使最终浓度为0.2% DMSO。将细胞在37摄氏度,5%CO₂中培养4天。将每孔250μL转移到96孔圆底板中的孔中。将板在Beckman Coulter Alegria 6KR离心机中在4°C以1200rpm离心5分钟。除去培养基,将细胞留在孔的底部。将细胞在100μL加有2%BSA(牛血清白蛋白)的冷HBSS(Hank平衡盐溶液)溶液中洗涤,并在4摄氏度以1200rpm离心5分钟。除去洗涤液。将细胞重悬于加有2%BSA的含有APC缀合的小鼠抗CD11b抗体(BD Pharmingen Cat#555751)的1:15稀释液的100μL HBSS中,并在冰上培养25分钟。将细胞离心并在加有2%BSA的100μL HBSS中洗涤两次。最后一次旋转后,将细胞重悬于含有1μg/mL DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吲哚)的加2%BSA的100μL HBSS中。然后在BD FACSAria机器中通过流式细胞术分析细胞。分析细胞的CD11b表达。针对每种抑制剂浓度的CD11b表达细胞的百分比用于确定所分析的每种化合物的IC₅₀曲线。

[0469] 表7提供了本文公开的各种取代的杂环化合物的细胞IC₅₀值。

[0470]

化学合成实施例	名称	THP-1 IC ₅₀ (M)
1	4-(2-(4-氨基吡啶-1-基)-1-甲基-6-氧代-5-对甲苯基-1,6-二氢嘧啶-4-基)苯甲腈	A
2	4-[2-(4-氨基吡啶-1-基)-5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈	A

[0471]

化学合成实例	名称	THP-1 IC ₅₀ (M)
3	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(6-甲氧基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈	A
4	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-5-(6-甲基吡啶-3-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈	A
5	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈	A
6	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
7	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
8	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(6-甲氧基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
9	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(6-甲氧基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
10	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(6-乙基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈	B
11	2-氟-4-[5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-2-(4-甲基氨基哌啶-1-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈	A
12	2-氟-4-[5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-2-(4-甲基氨基哌啶-1-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈	A
14	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-环戊基乙炔基-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A

[0472]

化学合成实例	名称	THP-1 IC ₅₀ (M)
15	[2-(4-氨基哌啶-1-基)-4-(4-氟基-3-氟苯基)-5-(4-甲氧基苯基)-6-氧代-6H-咪啶-1-基]-乙酸	C
16	2-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-4-(4-氟基-3-氟苯基)-5-(4-甲氧基苯基)-6-氧代-6H-咪啶-1-基]-乙酰胺	A
18	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-苯并咪喃-5-基-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢咪啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
20	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-氟-1-甲基-6-氧代咪啶-4-基]-2-氟苯甲腈	B
22	4-[2-(2,8-二氮杂-螺[4.5]癸-8-基)-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢咪啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
23	4-{2-(4-氨基哌啶基)-1-甲基-6-氧代-5-[6-(三氟甲基)-(3-吡啶基)]氢咪啶-4-基}-2-氟苯甲腈	A
24	4-[2-(4-氨基哌啶基)-1-甲基-5-(2-甲基(2H-吡唑-5-基))-6-氧代氢咪啶-4-基]苯甲腈	A
25	4-[2-((3R)-3-氨基哌啶基)-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代氢咪啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
26	4-[2-(4-氨基哌啶基)-5-(5-氟-6-甲氧基(3-5,6-二氢吡啶))-1-甲基-6-氧代氢咪啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
27	4-[2-((3R)-3-氨基吡咯烷基)-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代氢咪啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
29	4-[2-((3S)-3-氨基吡咯烷-1-基)-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢咪啶-4-基]-2-氟苯甲腈	B
30	4-[2-((3R)-3-氨基哌啶基)-5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代氢咪啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A

[0473]

化学合成实例	名称	THP-1 IC ₅₀ (M)
31	4-[2-((3S)-3-氨基哌啶-1-基)-5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脒	A
32	4-[2-(4-氨基-4-甲基哌啶-1-基)-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脒	A
33	4-[2-(4-氨基哌啶基)-1-甲基-5-(1-甲基(1H-吡唑-5-基))-6-氧代氢嘧啶-4-基]苯甲脒	A
34	4-{2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-6-氧代-5-[1-(2,2,2-三氟乙基)-1H-吡唑-4-基]-1,6-二氢嘧啶-4-基}-2-氟苯甲脒	A
35	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-5-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脒	A
36	4-{2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-6-氧代-5-[1-(2,2,2-三氟乙基)-1H-吡唑-4-基]-1,6-二氢嘧啶-4-基}-苯甲脒	A
37	4-[2-(4-氨基哌啶基)-1-甲基-5-(2-甲基(2H-吡唑-5-基))-6-氧代氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脒	A
38	4-[2-(4-氨基哌啶基)-5-(3,5-二氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代氢嘧啶-4-基]苯甲脒	A
40	{4-[2-(4-氨基哌啶基)-6-(4-氟基苯基)-3-甲基-4-氧代(3-氢嘧啶-5-基)]-2-氟苯基}-N-二甲基甲酰胺	B
41	4-[2-(4-氨基哌啶基)-6-(4-氟基苯基)-3-甲基-4-氧代(3-氢嘧啶-5-基)]-2-氟苯甲酰胺	B
42	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-6-氧代-5-(1-氧代-2,3-二氢-1H-异吡唑-5-基)-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脒	B

[0474]

表 7		
化学合成实例	名称	THP-1 IC ₅₀ (M)
44	4-{5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-2-[(3S)-(吡咯烷-3-基甲基)-氨基]-1,6-二氢嘧啶-4-基}-苯甲腈	B
45	4-{5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-2-[(3R)-(吡咯烷-3-基甲基)-氨基]-1,6-二氢嘧啶-4-基}-苯甲腈	B
46	4-[2-[1,4]二氮杂环庚烷-1-基-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
47	2-氟-4-[5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-2-哌嗪-1-基-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈	B
48	4-[5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-2-(哌啶-4-基氨基)-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈	B
49	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-2'-二甲基氨基-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢-[5,5']双嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
50	5-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-4-(4-氟基-3-氟苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-5-基]-吡啶 e-2-羧酸甲基酰胺	A
51	2-氟-4-{5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-2-[(3S)-(吡咯烷-3-基甲基)-氨基]-1,6-二氢嘧啶-4-基}-苯甲腈	B
52	2-氟-4-{5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-2-[(3R)-(吡咯烷-3-基甲基)-氨基]-1,6-二氢嘧啶-4-基}-苯甲腈	B
53	2-氟-4-[5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-2-(哌啶-4-基氨基)-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈	B
54	2-氟-4-[5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-2-(甲基-(3S)-吡咯烷-3-基甲基-氨基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈	A
55	2-氟-4-[5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-2-(甲基哌啶-4-yl-氨基)-6-氧代-1,6-二	B

[0475]

化学合成实例	名称	THP-1 IC ₅₀ (M)
	氢嘧啶-4-基]-苯甲腈	
56	2-氟-4-[5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-2-(甲基-吡咯烷-3-基甲基-氨基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈	A
57	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(6-二甲基氨基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
58	2-氟-4-[5-(6-甲氧基吡啶-3-基)-1-甲基-2-(4-甲基氨基哌啶-1-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈	A
59	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(4-二甲基氨基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
60	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-6-氧代-5-(6-吡咯烷-1-基-吡啶-3-基)-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
61	4-[2-[1,4]二氮杂环庚烷-1-基-5-(6-甲氧基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
62	4-[2-[1,4]二氮杂环庚烷-1-基-5-(6-甲氧基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	B
63	4-[2-[1,4]二氮杂环庚烷-1-基-5-(6-二甲基氨基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
64	4-[2-(3-氨基杂氮环丁烷-1-基)-5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	B
65	2-氟-4-[1-甲基-2-(4-甲基氨基哌啶-1-基)-5-(2-甲基-2H-吡唑-5-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈	A
66	4-[2-[1,4]二氮杂环庚烷-1-基-1-甲基-5-(2-甲基-2H-吡唑-5-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A

[0476]

化学合成实例	名称	THP-1 IC ₅₀ (M)
67	4-[2-[1,4]二氮杂环庚烷-1-基-5-(6-二甲基氨基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈	A
68	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-5-(6-吗啉-4-基-吡啶-3-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
69	4-[2-(3-氨基甲基氮杂环丁烷-1-基)-5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	B
70	2-氟-4-[5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-2-(3-氨基甲基氮杂环丁烷-1-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈	A
71	4-[2-(4-二甲基氨基哌啶-1-基)-1-甲基-5-(2-甲基-2H-吡唑-5-yl)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
72	4-[2-(4-二甲基氨基哌啶-1-基)-1-甲基-5-(1-甲基-1H-吡唑-5-yl)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
73	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(1H-吡唑-5-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
74	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-5-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
75	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(1H-吡唑-6-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
76	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-5-(1-甲基-1H-吡唑-6-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
77	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(1H-吡唑-6-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A

[0477]

化学合成实例	名称	THP-1 IC ₅₀ (M)
78	4-[2-((4R,3S)-4-氨基-3-氟吡啶-1-基)-5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
79	4-[2-((4S,3R)-4-氨基-3-氟吡啶-1-基)-5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
80	4-[2-(4-二甲基氨基吡啶-1-基)-1-甲基-5-(2-甲基-2H-吡唑-6-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
81	4-[2'-二甲基氨基-2-(4-二甲基氨基吡啶-1-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢-[5,5']双嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	B
82	4-[2-(4-二甲基氨基吡啶-1-基)-1-甲基-5-(6-甲基吡啶-3-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	B
83	4-[5-(6-二甲基氨基吡啶-3-基)-1-甲基-2-(4-氨基吡啶-1-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
84	4-[2-(4-二甲基氨基吡啶-1-基)-5-(2H-吡唑-6-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
85	4-[2-(4-氨基吡啶-1-基)-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-氘代甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
86	4-[2-(4-氨基吡啶-1-基)-5-(3-氟-4-氘代甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
87	2-氟-4-[1-甲基-2-[4-(甲基氨基)吡啶-1-基]-5-(1-甲基吡唑-5-基)-6-氧代嘧啶-4-基]苯甲腈	A
88	4-[2-(4-氨基吡啶-1-基)-5-(1H-吡唑-5-基)-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
89	4-[5-(4-氨基苯基)-2-(4-氨基吡啶-1-基)-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯	A

[0478]

表 7		
化学合成实例	名称	THP-1 IC ₅₀ (M)
	甲脞	
90	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-5-[4-(甲基氨基)苯基]-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脞	A
91	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-[3-氟-4-(甲基氨基)苯基]-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脞	A
92	4-[2-[4-(二甲基氨基)哌啶-1-基]-5-(6-甲氧基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代-嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脞	A
93	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(6-乙氧基-5-氟吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脞	A
94	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(6-乙氧基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脞	A
95	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(4-乙氧基苯基)-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脞	A
96	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-[4-(2-羟基乙氧基)苯基]-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脞	A
97	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-[4-(2-羟基乙氧基)苯基]-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]苯甲脞	A
98	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-[4-(2-甲氧基乙氧基)苯基]-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脞	A
99	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-[4-(2-羟基乙基)苯基]-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脞	A
100	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-[4-(羟基甲基)苯基]-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脞	A

[0479]

化学合成实例	名称	THP-1 IC ₅₀ (M)
101	4-[2-(4-氨基吡啶-1-基)-5-(4-氟苯基)-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
102	4-[2-(4-氨基吡啶-1-基)-5-(3-氟苯基)-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
103	4-[2-(4-氨基吡啶-1-基)-5-(3,5-二氟苯基)-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
104	4-[2-(4-氨基吡啶-1-基)-5-(3,4-二氟苯基)-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
105	4-[2-(4-氨基吡啶-1-基)-1-甲基-5-(4-甲磺酰基苯基)-6-氧代-嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
106	4-[2-(4-氨基吡啶-1-基)-5-(4-氯苯基)-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
107	4-[2-(4-氨基吡啶-1-基)-5-[4-(甲氧基甲基)苯基]-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
108	4-[2-(4-氨基吡啶-1-基)-1-甲基-6-氧代-嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	B
110	4-[2-(4-氨基吡啶-1-基)-1-环丙基甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	B
111	2-(4-氨基吡啶-1-基)-6-(4-氯-3-氟苯基)-5-(4-甲氧基苯基)-3-甲基-3H-嘧啶-4-酮	B
122	4-[2-(4-氨基吡啶-1-基)-5-(4-甲氧基苯基)-6-氧代-1H-嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A

[0480] 注:细胞测定IC₅₀数据指定在以下范围内:A:≤0.10μM;B:>0.10μM至≤1.0μM;C:>1.0μM至≤10μM;D:>10μM

[0481] 实施例4:Kasumi-1AML细胞系增殖测定(细胞-MTS测定)

[0482] 比色细胞测定以评估LSD-1小分子抑制剂影响已建立的AML癌细胞系Kasumi-1的

增殖的能力。

[0483] 测定背景

[0484] 已经示出LSD-1蛋白在包括SCLC和AML的多种癌症类型的生物学中起关键作用。为了证明LSD-1的小分子抑制为潜在的抗癌疗法,实施了测量在已建立的AML癌细胞系中的增殖抑制的程度的测定。

[0485] 测定原理

[0486] 此细胞-MTS测定是基于7天板的比色测定,其将在测试化合物的存在和不存在下新产生的NADH的量定量。这些NADH水平被用作用于癌细胞增殖的定量的代表。

[0487] 测定方法

[0488] 具有经验证的p53突变的已建立的癌细胞系Kasumi-1购自美国典型培养物保藏中心(ATCC),并根据ATCC公布的方案常规传代。对于常规测定,将这些细胞以每96-孔(per 96-well) 20,000个细胞的密度接种。铺板后24小时,细胞接受11点稀释的测试化合物,终浓度范围为100 μ M至2.0nM。将细胞在化合物存在下于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂孵育168小时。在该化合物孵育期结束时,除去80 μ l培养基并加入20 μ L CellTiter 96[®]Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay溶液(Promega)。培养细胞直至OD490>0.6。使用IDBS XLfit软件包计算IC₅₀值,并包括减去背景的OD490值和对DMSO对照归一化。

[0489] 表8提供本文公开的多种被取代的杂环化合物的Kasumi-1细胞IC₅₀值。

[0490]

表 8		
化学合成实例	名称	Kasumi-1 IC ₅₀ (M)
1	4-(2-(4-氨基吡啶-1-基)-1-甲基-6-氧代-5-对甲苯基-1,6-二氢嘧啶-4-基)	A

[0491]

表 8		
化学合成实例	名称	Kasumi-1 IC ₅₀ (M)
	苯甲脒	
3	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(6-甲氧基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲脒	A
4	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-5-(6-甲基吡啶-3-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲脒	B
5	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲脒	A
6	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脒	A
7	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(3-氟-4-甲氧基苯基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脒	A
8	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(6-甲氧基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脒	A
9	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(6-甲氧基吡啶-3-基)-1-甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脒	A
24	4-[2-(4-氨基哌啶基)-1-甲基-5-(2-甲基(2H-吡唑-5-基))-6-氧代氢嘧啶-4-基]苯甲脒	A
34	4-{2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-6-氧代-5-[1-(2,2,2-三氟乙基)-1H-吡唑-4-基]-1,6-二氢嘧啶-4-基}-2-氟苯甲脒	A
35	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-5-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲脒	A

[0492]

表 8		
化学合成实例	名称	Kasumi-1 IC ₅₀ (M)
36	4-{2-(4-氨基哌啶-1-基)-1-甲基-6-氧代-5-[1-(2,2,2-三氟乙基)-1H-吡唑-4-基]-1,6-二氢嘧啶-4-基}-苯甲腈	A
65	2-氟-4-[1-甲基-2-(4-甲基氨基哌啶-1-基)-5-(2-甲基-2H-吡唑-5-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-苯甲腈	A
66	4-[2-[1,4]二氮杂环庚烷-1-基-1-甲基-5-(2-甲基-2H-吡唑-5-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
71	4-[2-(4-二甲基氨基哌啶-1-基)-1-甲基-5-(2-甲基-2H-吡唑-5-基)-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A
88	4-[2-(4-氨基哌啶-1-基)-5-(1H-吡唑-5-基)-1-甲基-6-氧代嘧啶-4-基]-2-氟苯甲腈	A

[0493] 实施例5:体内异种移植研究-MCF-7异种移植

[0494] 将含有0.72mg 17-β雌二醇的定时释放小丸皮下植入nu/nu小鼠中。将MCF-7细胞在含有10%FBS的RPMI中于5%CO₂、37°C生长。将细胞离心并以1×10⁷个细胞/mL重悬于50%RPMI(无血清)和50%基质胶中。在小丸植入后2-3天,在右侧腹部皮下注射MCF-7细胞(100μL/动物),并且每两周监测肿瘤体积(长度×宽度²/2)。当肿瘤达到~200mm³的平均体积时,将动物随机化并开始治疗。每天用媒介物或化合物治疗动物,持续4周。在整个研究中每两周监测肿瘤体积和体重。在治疗期结束时,分别采集血浆和肿瘤样品用于进行药代动力学和药效学分析。

[0495] 实施例6:体内异种移植研究-LNCaP异种移植

[0496] 通过皮下注射(诸如100μl的50%RPMI 1640/BD基质胶中的3×10⁶个细胞)将具有稳定敲低LSD-1(shLSD-1细胞)的LNCaP细胞或对照细胞(诸如shNTC细胞)接种在裸小鼠的背侧。每周测量一次小鼠体重和肿瘤大小,并使用式(7i/6)(LxW)估计肿瘤体积,其中L=肿瘤长度,并且W=肿瘤宽度。执行双样品t检验以确定两组之间平均肿瘤体积的统计学差异。

[0497] 通过皮下注射将未修饰的LNCaP细胞接种到裸小鼠的背侧(诸如100μl的50%RPMI 1640/BD基质胶中的3×10⁶个细胞)。三周后,小鼠每天一次用水(对照)、帕吉林(0.53mg或1.59mg;1或3mM终浓度,假设70%生物利用度)或XB154(4或20μg;1或5mM最终浓度,假设70%生物利用度)腹膜内注射,或者用测试化合物(每周5mg/kg或每周10mg/kg)治疗。治疗持续三周,在此期间如上测量小鼠体重和肿瘤体积。

[0498] 如上,将shLSD-1LNCaP细胞或对照细胞注射到裸小鼠中。在三周之后,小鼠用2.6μ

g丝裂霉素C (预测最终浓度为1 μ M,假定40%生物利用度)、奥拉帕尼(olaparib) (例如,约0.5mg/kg至25mg/kg)或媒介物腹膜内地治疗,每天一次,持续三周。在其他实例中,如上将未修饰的LNCaP细胞注射到裸小鼠中。

[0499] 三周后,如上所述用测试化合物或媒介物,加上MMC或奥拉帕尼治疗小鼠。治疗持续三周,在此期间如上测量小鼠体重和肿瘤体积。

[0500] 在注射shLSD-1细胞的小鼠中与对照相比肿瘤体积减小,表明LSD-1抑制降低体内肿瘤生长。

[0501] 类似地,在注射LNCaP细胞并用本文公开的化合物治疗的小鼠中与照相比肿瘤体积的减少表明,LSD-1抑制降低体内肿瘤生长。最后,与仅用本文公开的化合物治疗的小鼠相比,注射LNCaP细胞并用本文公开的化合物加奥拉帕尼治疗的小鼠中的肿瘤体积减少表明,LSD-1的抑制加PARP的抑制降低体内肿瘤生长。

[0502] 检查收获的异种移植组织的LSD-1抑制的证据。这一情况用蛋白质印迹来评估以检查2MK4和2MK9组蛋白标志的总体水平、FA/BRCA基因的表达、FANCD2泛素化和shRNA细胞情况下的LSD-1蛋白水平。这些参数中的一个或多个的降低表明LSD-1的有效抑制。另外,通过对H2AX灶的染色评估对DNA损伤修复的影响。

[0503] 实施例7:正常人成纤维细胞和小细胞肺癌细胞中的抗增殖活性

[0504] 在各种已建立的NCI SCLC细胞系(Report QC6688-Pharm-1002)中调查化合物A对细胞活力的影响。在化合物A的0.17至10,000nM和0.7至500nM的各自浓度范围内测量正常人成纤维细胞系IMR-90和一组6种SCLC细胞系的半最大抑制浓度值。化合物A展示在测试的6种SCLC细胞系中的5种中具有有效抗增殖活性。在NCI-H69、NCI-H146、NCI-H209、NCI-H526和NCI-H1417细胞系中,化合物A分别显现出7.0 \pm 2.5nM、9.9 \pm 9.6nM、3.9 \pm 0.2nM、36.4 \pm 28.8nM和14.6 \pm 12.6nM的平均IC₅₀ \pm SD值。化合物A对NCI-H841SCLC细胞系中的细胞增殖具有有限的影响,产生>500nM的IC₅₀值。在测试浓度,化合物A对IMR-90正常人成纤维细胞系中的细胞增殖没有影响(IC₅₀值>10,000nM)(表9)。

[0505] 表9:正常人成纤维细胞和小细胞肺癌细胞系的化合物A半最大抑制值

[0506]

细胞系	平均 C ₅₀ (nM)	SD	n	pIC ₅₀	格式	读出器
IMR-90	>10000	NC	1	<5.0	2D 测定 a	CellTiter 96® AQueous
NCI-H69	7.0	2.5	3	8.2	3D 测定 b	Calcein AM
NCI-H146	9.9	9.6	3	8.0	3D 测定 b	Calcein AM
NCI-H209	3.9	0.2	2	8.4	3D 测定 b	Calcein AM
NCI-H526	36.4	28.8	3	7.4	3D 测定 b	Calcein AM
NCI-H1417	14.6	12.6	2	7.8	2D 测定 a	CellTiter-Glo®
NCI-H841	>500	NC	3	<6.3	3D 测定 b	Calcein AM

[0507] 2(或3)D=2(或3)维;平均IC₅₀=(n)次独立实验的平均半最大抑制浓度;NC=未计算;pIC₅₀=-log₁₀(平均IC₅₀),单位为mol/L;SD=标准偏差。

[0508] a 2D测定=在细胞附着于二维固体表面情况下的测定。

[0509] b 3D测定=在细胞悬浮在三维细胞外基质中的情况下的测定。

[0510] 实施例8:对小细胞肺癌细胞中药效学生物标志物胃泌素释放肽的影响

[0511] 示出赖氨酸特异性脱甲基酶1A的抑制调节SCLC细胞系中神经内分泌肿瘤相关基因诸如人类GRP的表达。使用定量逆转录聚合酶链式反应(qRT-PCR)评价化合物A介导的LSD1抑制对人SCLC细胞系NCI-H1417、NCI-H209和NCI-H69中GRP表达的影响。在孵育时段后,提取总RNA,并通过使用qRT-PCR测量GRP mRNA水平的倍数变化。化合物A抑制GRP表达的IC₅₀通过计算GRP mRNA表达相对于相应化合物A浓度(相对于DMSO对照)的百分比变化来确定。对照的百分比=100×2^{-ΔΔCt},处理后GRP mRNA水平针对管家基因转录物归一化。用化合物A处理引起NCI-H1417、NCI-H209和NCI-H69细胞中GRP信使核糖核酸(mRNA)水平的浓度依赖性下调,产生8.9±4.6nM、7.2±4.7nM和6.0±3.8nM的各自IC₅₀±SD值(图1)。

[0512] 另外,使用ChIP-seq在SCLC细胞系NCI-H69和NCI-H209中调查LSD1与GRP基因座的结合。染色质免疫沉淀和测序结果示出,LSD1共同占据增强子元件(鉴定为H3K4me1阳性区),其在GRP基因座的100千碱基内。这些结果表明,LSD1在GRP基因座的可能调节位点处结合,并且LSD1可以直接调节GRP基因表达,从而支持GRP作为用于SCLC中LSD1抑制的药效学(PD)生物标志物(图2)。

[0513] 实施例9:化合物A的赖氨酸特异性脱甲基酶1A抑制作用对NCI-H1417小细胞肺癌异种移植模型中人类胃泌素释放肽信使核糖核酸表达的影响

[0514] 为了将体外观察到的化合物A介导的LSD1抑制的影响转化为体内环境,在几种SCLC体内模型中测量化合物A治疗后的TGI和靶基因表达变化。在无胸腺裸小鼠中的人NCI-H1417SCLC异种移植模型中评价化合物A的LSD1抑制作用后的人GRP表达的调节。携带SC植入的NCI-H1417SCLC肿瘤的雌性小鼠用化合物A以2.5、5或10mg基质(base)/kg QD口服治疗4天,并确定GRP表达水平。如通过qRT-PCR确定的,与经媒介物治疗的对照动物相比,用化合物A治疗引起治疗的荷瘤小鼠中GRPMRNA水平的剂量相关下调。比较平均表达值,相对于对照动物,2.5、5和10mg基质/kg的化合物A分别使GRP基因表达减少44%、53%和56%。对于化合物A的剂量≥5mg基质/kg,GRP基因表达的降低是统计学显著的(p≤0.05)(图3)。

[0515] 实施例10. 化合物A在NCI-H1417小细胞肺癌异种移植模型中的功效

[0516] 在雌性无胸腺裸小鼠中的人NCI-H1417SCLC异种移植SC模型中评价化合物A的功效和耐受性。携带NCI-H1417SCLC肿瘤的雌性小鼠口服给药,QD连续65天(QDx65),用2.5或5mg基质/kg化合物A或10mL/kg0.5%甲基纤维素媒介物作为对照。第65天的肿瘤生长抑制分析证明,化合物A治疗在NCI-H1417模型中是有效的,引起在2.5mg基质/kg剂量159%的TGI(p≤0.001),和在5mg基质/kg剂量178%的TGI(p≤0.0001)(表10)。在研究结束时,七只对照动物中的六只显现出净肿瘤体积的增加。相反,除1个肿瘤以外,来自化合物A治疗的动物的所有肿瘤(15个中的14个)均净体积减少(regress)。对照动物中的平均肿瘤生长在研究过程中进展,而2个化合物A治疗组中的肿瘤在第14天后下降(图4)。化合物A表现出被良好地耐受,并且接受2.5或5mg基质/kg剂量的动物在研究结束时显现出各自平均体重增加1%和7.5%。所有动物在研究持续时间存活。

[0517] 表10.NCI-H1417研究的响应总结

[0518]

组	n	治疗方案				中值肿瘤体积(mm ³)				统计显著性
		试剂	剂量(mg基质/kg)	途径	时间表	第0天	第65天	Diff	%TGI	
1	7	媒介物	0	PO	QDx65	105.3	223.6	118.3	NC	NC
2	7	化合物A	2.5	PO	QDx65	109.2	39.3	-69.9	159%	p≤0.001
3	8	化合物A	5	PO	QDx65	108.2	15.9	-92.3	178%	p≤0.0001

[0519] ANOVA=方差分析;Diff.=差异;NC=未计算;PO=口服给药;QD=每日一次给药;TGI=肿瘤生长抑制。

[0520] 注意:使用单因素方差分析计算P值,然后进行Dunnett多重比较检验(化合物A对比媒介物)。

[0521] 实施例11:化合物A在LU2514和LU1480 HuPrime®小细胞肺癌患者来源的异种移植模型中的功效

[0522] 在患者来源的HuPrime SCLC模型LU2514和LU1480(其被SC植入雌性BALB/c裸小鼠中)中评价化合物A。

[0523] 在LU2514研究中,治疗的雌性小鼠接受10mg基质/kg(n=10)或5mg基质/kg(n=8)的化合物A,口服,QD持续28天(QDx28)。在治疗后第28天(给药的最后一天)执行肿瘤生长抑制分析。化合物A是有效的,分别在10mg基质/kg和5mg基质/kg引起61%的TGI和43%的TGI(p≤0.01)(表11)。相对于对照动物,化合物A治疗组中的肿瘤生长均减少(图5)。

[0524] 表11:QC-TR-L021(LU2514)研究的响应总结

[0525]

组	n	治疗方案				中值肿瘤体积(mm ³)				统计显著性
		试剂	剂量(mg基质/kg)	途径	时间表	第1天	第28天	Diff.	%TGI	
1	10	媒介物 ^a	0	PO	BIDx28	166.6	2046.5	1879.9	NC	NC
2	10	化合物A	10	PO	QDx28	173.7	906.0	732.3	61%	p≤0.01
3	8	化合物A	5	PO	QDx28	173.2	1244.8	1071.6	43%	p≤0.01

[0526] BID=每天两次;Diff.=差异;NC=未计算;PO=口服给药;QD=每日一次给药;TGI=肿瘤生长抑制。

[0527] ^a媒介物每天两次给药,以匹配此表中未包括的额外给药方案。研究时间=70天,在第28天即给药的最后一天确定TGI。

[0528] 在LU2514研究中,以10mg基质/kg口服给药化合物A,持续22天,产生62%的TGI。相对于对照动物,化合物A治疗组中的平均肿瘤生长减少。组织学分析揭示,来自对照动物的肿瘤示出典型低分化的圆细胞形态和颗粒染色质。来自化合物A治疗的动物的肿瘤显示出具有“更松散”结构,细胞核与细胞质比率降低和凋亡小体数量更多的细胞(图6)。在使用LU2514动物模型的两项研究中,化合物A表现出被良好地耐受,其中平均体重减轻<10%。

[0529] 在LU1480研究中,口服施用化合物A持续21天是有效的,在10mg基质/kg剂量达到72%的TGI(p≤0.001),并且在5mg基质/kg剂量达到53%的TGI(p≤0.01)(表12)。相对于对照动物,化合物A治疗组中的平均肿瘤生长减少(图7)。在LU1480实验中,以10mg基质/kg口

服给药15天的化合物A产生46%的TGI。在这些LU1480研究中,报告可能由于LU1480模型的固有恶病质性质导致的全身和持续体重减轻。

[0530] 表12:LU1480研究的响应总结

[0531]

组	n	治疗方案				中值肿瘤体积(mm ³)				统计显著性
		试剂	剂量 (mg 基质/kg)	途径	时间表	第1天	第21天	Diff.	%TGI	
1	10	媒介物 ^a	0	PO	BIDx21	89.1	934.5	845.4	NC	NC
2	10	化合物A	10	PO	QDx21	87.1	321.4	234.3	72%	p≤0.001

[0532]

3	8	化合物A	5	PO	QDx21	89.5	490.1	400.6	53%	p≤0.01
---	---	------	---	----	-------	------	-------	-------	-----	--------

[0533] BID=每天两次;Diff.=差异;NC=未计算;PO=口服给药;QD=每日一次给药;TGI=肿瘤生长抑制。

[0534] ^a媒介物每天两次给药以匹配此表中未包括的额外给药方案。

[0535] 研究时间=66天;在21个剂量后,在每个研究组中至少8只动物仍然在的最后一天确定TGI。

[0536] 总之,当以5或10mg基质/kg口服施加时,化合物A示出在SCLC的LU2514和LU1480PDX模型中是有效的。化合物A治疗的动物对比对照动物的剂量相关性TGI (43%至72%) 在除LU2514之外的所有研究中均是统计学显著性的,其中样品大小较小。

[0537] 实施例12:化合物A在LXFS 573、LXFS 615、LXFS 1129和LXFS 2156小细胞肺癌患者来源的异种移植物模型中的功效

[0538] 口服施用的化合物A的抗肿瘤效果还在4种不同SCLC PDX模型(LXFS 573、LXFS 615、LXFS 1129和LXFS 2156)中被评价,这些模型被SC移植入雌性免疫缺陷NMRI-Foxn1nu小鼠中。用化合物A治疗在SCLC的LXFS 573 PDX模型中是有效的,在研究结束(第28天),在5mg基质/kg剂量达到为78%的TGI (p≤0.001),在7.5mg基质/kg剂量达到58%的TGI (p≤0.01),在10mg/kg剂量达到71%的TGI (p≤0.001) (表13)。在第10天后,相对于对照动物,化合物A治疗组中的平均肿瘤生长减少(图8)。化合物A表现出被良好地耐受,其中平均体重减轻≤3%。

[0539] 表13:LXFS 573实验的响应总结

[0540]

组	n	治疗方案				中值肿瘤体积(mm ³)				统计显著性
		试剂	剂量 (mg 基质/kg)	途径	时间表	第0天	第28天	Diff.	%TGI	
1	8	媒介物	0	PO	QDx28	117.2	1037.3	920.1	NC	NC
2	8	化合物A	5	PO	QDx28	108.4	308.3	199.9	78%	p≤0.001
3	8	化合物A	7.5	PO	QDx28	113.2	496.6	383.4	58%	p≤0.01
4	8	化合物A	10	PO	QDx28	113.8	376.8	263.0	71%	p≤0.001

[0541] ANOVA=方差分析;Diff=差异;NC=未计算;PO=口服给药;QD=每日一次给药;

TGI = 肿瘤生长抑制。

[0542] 注意：单向方差分析，其次是Dunnett多重比较检验用于两组以上实验，并且非配对t检验用于比较两组的实验，评价化合物A治疗组对比对照动物的肿瘤体积分布的差异。

[0543] 在LXFS 615 PDX模型中，以5mg基质/kg口服施用化合物A持续30天引起78%的TGI ($p \leq 0.001$)。相对于对照动物，化合物A治疗组中的平均肿瘤生长减少(图9)。化合物A表现出被良好地耐受，其中平均体重减轻 $<1\%$ 。对最终剂量后收集的血浆样品执行的药代动力学分析展示，5mg基质/kg的化合物A在AUC₀₋₂₄为1,617ng·hr/mL。

[0544] 施用化合物A，QD持续30天，在SCLC的LXFS 1129 PDX模型中是有效的，在研究结束时在5mg基质/kg剂量达到89%的TGI ($p \leq 0.001$)，并且在1.5mg基质/kg剂量达到55%的TGI ($p \leq 0.05$)。在第12天后，相对于对照动物，化合物A治疗组中的平均肿瘤生长均减少(图10)。化合物A表现出被良好地耐受，其中平均体重减轻 $<6\%$ 。1.5和5mg基质/kg的化合物A的AUC₀₋₂₄值分别为243和1,262ng·hr/mL，并且因此，相对于1.5mg基质/kg剂量，在5mg基质/kg剂量观察到大于暴露比例的增加。

[0545] 当以5mg基质/kg，QDx23，口服给药时，化合物A在LXFS 2156 PDX模型中无效，产生-7%的TGI。

[0546] 总之，口服施用化合物A在SCLC的LXFS 573、LXFS 615和LXFS 1129 PDX模型中是有效的。化合物A治疗的动物对比对照动物的TGI水平(55%至89%)是显著的。在所有4种测试模型中，化合物A表现出被良好地耐受，其中体重减轻 $<6\%$ 。

[0547] 实施例13. 化合物A在雌性BALB/c裸小鼠中在分别为HuPrime®皮下肺和胃神经内分泌癌患者来源的异种移植物模型LU2527和GA0087中的体内功效

[0548] 使用在雌性免疫缺陷的BALB/c裸小鼠中建立的分别为HuPrime®皮下肺和胃神经内分泌癌(NEC)患者来源的异种移植物(PDX)模型LU2527和GA0087，以每日一次(QD)给药时间表临床前评价化合物A的体内功效和耐受性。LU2527和GA0087分别被表征为肺的非典型性良性肿瘤和胃贲门的良性肿瘤。基于肿瘤生长抑制百分比(%TGI)和在治疗动物与对照动物之间在TGI分析当天的平均净肿瘤体积的差异和在研究过程中平均肿瘤生长来确定功效。基于治疗动物和对照动物之间的平均体重差异来评估耐受性。

[0549] 在原种小鼠(stock mice)的连续传代(R3P6)中从异种移植物获得LU2527肿瘤片段。从供体小鼠取出后，将肿瘤切成片段(直径2至3mm)并皮下接种于受体雌性免疫缺陷BALB/c小鼠的右肋腹。使肿瘤生长50天，直至它们达到 $\sim 159\text{mm}^3$ 。然后将荷瘤小鼠(11-12周龄)随机分成三组，每组八只小鼠，其中平均肿瘤体积为 $159.7 \pm 13.6\text{mm}^3$ 、 $159.7 \pm 13.9\text{mm}^3$ 和 $159.7 \pm 13.5\text{mm}^3$ 。将此日表示为第0天，并根据表14中所示的预定方案开始给药。

[0550] 表14. LU2527的治疗计划

组	n	治疗方案			
		试剂	剂量 (mg/kg)	途径	时间表
[0551] 1 ^{a)}	8	媒介物	-	PO ^{b)}	QD ^{c)} x57
2	8	化合物 A	1.5	PO	QDx57
3	8	化合物 A	5	PO	QDx57

[0552] ^{a)} 对照组单独给药10mL/kg媒介物,并且以10mL/kg (作为mg/kg游离基质当量) 给药化合物A;

[0553] ^{b)} 口服给药 (PO); ^{c)} 每日一次给药 (QD)

[0554] 在原种小鼠的连续传代 (R15P7) 中从异种移植物获得GA0087肿瘤片段。从供体小鼠取出后,将肿瘤切成片段 (直径2至3mm) 并皮下接种于受体雌性免疫缺陷BALB/c小鼠的右胁腹。使肿瘤生长24天,直至它们达到~133mm³。然后将荷瘤小鼠 (13-14周龄) 随机分成三组,每组八只小鼠,其中平均肿瘤体积为133.2±7.6mm³、133.0±7.8mm³和133.1±8.5mm³。将此日表示为第0天,并根据15中所示的预定方案开始给药。

[0555] 表15.GA0087的治疗计划

组	n	治疗方案			
		试剂	剂量 (mg/kg)	途径	时间表
[0556] 1 ^{a)}	8	媒介物	-	PO ^{b)}	QD ^{c)} x62
2	8	化合物 A	1.5	PO	QDx62
[0557] 3	8	化合物 A	5	PO	QDx62

[0558] ^{a)} 对照组单独给药10mL/kg媒介物,并且以10mL/kg (作为mg/kg游离基质当量) 给药化合物A;

[0559] ^{b)} 口服给药 (PO); ^{c)} 每日一次给药 (QD)

[0560] 使用卡尺在两个维度上每周两次测量个体肿瘤,并且使用下式计算以mm³为单位的肿瘤体积 (TV): TV=0.5a×b²,其中a和b分别是以毫米为单位的长和短直径。每周对动物称重两次。构建作为从第0天的变化百分比的平均肿瘤生长曲线和平均体重曲线图。

[0561] 根据下式使用中值肿瘤体积计算TGI百分比:

$$[0562] \quad TGI_x [\%] = \left(1 - \frac{T_x - T_0}{C_x - C_0}\right) \times 100$$

[0563] 其中T₀和C₀是在开始给药之前化合物A治疗组和对照组中各自的中值肿瘤体积,并且T_x和C_x是在TGI分析当天的第“x”天的相应中值肿瘤体积。

[0564] LU2527和GA0087研究中的TGI分别在第46天和第53天计算,第46天和第53天是肿瘤体积测量可用于所有化合物A治疗的动物的最后一天。在两项研究中,每个对照组中的一只动物由于肿瘤移植不良而被删除,并且在LU2527研究中,在第21天退出研究的第二只对

照动物由于可能由于口喂错误导致的意外死亡而被删除。在GA0087研究中,一只接受1.5mg/kg化合物A的动物在第53天达到肿瘤体积终点($\geq 3000\text{mm}^3$),但直到第57天才被处死。结果,第56天测量结果被删除,确定第53天作为TGI分析日。

[0565] 表和表总结LU2527和GA0087研究的相应治疗计划。对于每种肿瘤类型,将测试动物分成三组,每组八只小鼠,并且在第0天开始治疗,此时平均肿瘤大小满足随机化标准。如所示,对照小鼠接受通过口喂(PO)以每日一次(QD)时间表施用10mL/kg体重的0.5%甲基纤维素媒介物。治疗小鼠以如所示的0D时间表以PO方式接受10mL/kg给药的作为mg/kg游离基质当量的化合物A。每项研究中的两只动物接受给药假期,这对结果没有影响。每天制备测试制品化合物A,其为悬浮在媒介物中的盐(74%活性化合物)。

[0566] LU2527研究的结果示出在表16中。当口服QD给药达46天时,化合物A在肺癌的LU2527 PDX模型中在1.5mg/kg产生51%的剂量依赖性TGI,并且在5mg/kg产生84%的剂量依赖性TGI。如图11所示,对于5mg/kg化合物A治疗的动物对比对照动物,在TGI分析当天的平均净肿瘤体积的差异是显著的($p=0.0001$)。如图12所示,相对于对照动物,5mg/kg化合物A治疗组中的平均肿瘤生长显著减少。如图13所示,化合物A表现出被可接受地耐受,显现出与媒介物对照的平均体重变化没有显著不同的平均体重变化。在TGI分析日之后,所有组(包括媒介物对照组)中发生进展性平均体重减轻,表明体重减轻可与肿瘤负荷有关。

[0567] 表16. 第46天时LU2527的响应总结

[0568]

组	n	治疗方案				中值肿瘤体积(mm^3)				统计显著性
		试剂	剂量(mg/kg)	途径	时间表	第0天	Day46	Diff	%TGI	
1 ^{a)}	6	媒介物	-	PO ^{b)}	QD ^{c)} x46	148.7	1269.8	1121.2	--	--
2	8	化合物A	1.5	PO	QDx46	148.2	698.5	550.3	51	$p=0.0542$
3	8	化合物A	5	PO	QDx46	151.8	329.7	177.9	84	$p=0.0001$

[0569] ^{a)}对照组单独给药10mL/kg的媒介物,并且以10mL/kg(作为mg/kg游离基质当量)给药化合物A;

[0570] ^{b)}口服给药(PO);^{c)}每日一次给药(QD)

[0571] GA0087研究的结果在表17中示出。在胃癌的GA0087 PDX模型中,当QD口服给药达53天时,化合物A在1.5mg/kg产生53%的TGI,并且在5mg/kg产生56%的TGI。如图14所示,化合物A治疗的动物对比对照动物在TGI分析当天的平均净肿瘤体积的差异不显著($p>0.05$)。如图15所示,相对于对照动物,化合物A治疗组中的平均肿瘤生长减少。如图16所示,化合物A表现出被可接受地耐受,显现出与媒介物对照的平均体重变化没有显著不同的平均体重变化。在第49天左右开始,在所有组(包括媒介物对照组)中均发生进展性平均体重减轻,表明体重减轻可与肿瘤负荷有关。一只接受1.5mg/kg化合物A的动物在第53天达到肿瘤体积终点($\geq 3000\text{mm}^3$),但直到第57天才被处死。因此,第56天的测量结果被删除了平均肿瘤生长和平均体重分析。

[0572] 表17. 第53天时E0288-U1604-GA0087的响应总结

[0573]

组	n	治疗方案				中值肿瘤体积(mm ³)				统计显著性
		试剂	剂量(mg/kg)	途径	时间表	第0天	第53天	差异	%TGI	
1 ^{a)}	7	媒介物	-	PO ^{b)}	QD ^{c)} x53	125.6	1364.9	1239.3	--	--
2	8	化合物 A	1.5	PO	QDx53	128.9	706.4	956.7	53	p=0.4090
3	8	化合物 A	5	PO	QDx53	127.6	673.2	863.3	56	p=0.3070

[0574] ^{a)}对照组单独给药10mL/kg媒介物,并且以10mL/kg (作为mg/kg游离基质当量) 给药化合物A;

[0575] ^{b)}口服给药(PO); ^{c)}每日一次给药(QD)

[0576] 每日给药的口服化合物A在肺癌的LU2527 PDX模型中是有效的。响应是剂量依赖性的,在1.5mg/kg产生51%的TGI,并且在5mg/kg产生84%的TGI。5mg/kg化合物A治疗的动物对比对照动物,在TGI分析当天平均净肿瘤体积的差异是显著的,并且相对于对照动物,平均肿瘤生长显著减少。

[0577] 每日给药的口服化合物A在胃癌的GA0087 PDX模型中中度有效。响应在1.5mg/kg产生53%的TGI,并且在5mg/kg产生56%的TGI,并且治疗动物对比对照动物,在TGI分析当天平均净肿瘤体积的差异不显著。相对于对照动物,治疗动物的平均肿瘤生长中度减少。

[0578] 在两项研究中,化合物A表现出被可接受地耐受。所有组均显现出晚期进展性平均体重减轻,这意味着体重减轻与治疗无关。

[0579] 实施例14:化合物A在两种人merkel细胞癌模型MKL-1和MS-1中的体外和体内功效

[0580] 人Merkel细胞癌被分类为表达LSD1的侵袭性皮肤神经内分泌肿瘤。这些肿瘤比SCLC肿瘤更容易接近,并且可对人类研究中的药效学努力有用。有效的hMCC治疗是高度未满足的需求,其可以为化合物A提供另外的适应症。在目前非良好实验室规范(GLP)临床前研究中,执行体外细胞增殖抑制测定以确定培养的用化合物A处理的MKL-1和MS-1细胞系的IC₅₀值。此外,在雌性NSG小鼠中建立的两个hMCC异种移植物模型MKL-1和MS-1中评价化合物A在单一疗法时的体内功效和耐受性。

[0581] 此研究的目的是,在雌性NSG小鼠中建立的MKL-1和MS-1异种移植物模型中,使用体外细胞增殖抑制测定法来确定培养的用化合物A处理的MKL-1和MS-1细胞的IC₅₀值,并确定化合物A(按单一疗法以间歇时间表以5mg/kg口服给药)的体内功效和耐受性。

[0582] 雌性NSG小鼠(NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)用于此研究。在肿瘤移植当天测试小鼠为7至9周龄。在肿瘤移植前使动物适应环境一周。

[0583] 动物随意喂食水(反渗透,酸化)和由20%粗蛋白、5.6%脂肪(酸水解)和4.7%粗纤维组成的PicoLab® Rodent Diet。将小鼠圈养在ALPHA-dri®上的屏障设施中,在72±2°F和30-70%湿度进行12小时光照循环。

[0584] Celgene Quanticel Research具体遵守实验室动物护理和使用指南(美国国家科学院)(Guide for Care and Use of Laboratory Animals(National Academy of

Sciences))关于限制、饲养、外科手术、饲料和液体调节以及兽医护理的建议。在CQR的动物护理和使用计划符合由Celgene Quanticel研究机构动物护理和使用委员会批准的相关监管标准,该委员会确保遵守公认的实验室动物护理和使用标准。

[0585] 将MKL-1hMCC细胞在RPMI-1640培养基(Life Technologies,Carlsbad,CA)中体外培养,所述培养基含有100单位/mL青霉素G钠和100 μ g/mL硫酸链霉素(cRPMI),补充有10%胎牛血清(FBS)。将MS-1hMCC细胞在补充有20%FBS的cRPMI中体外培养。将两种细胞系在37 $^{\circ}$ C在潮湿培养箱中,在5%二氧化碳和95%空气的气氛中培养。

[0586] 对于体外细胞增殖抑制研究,在二甲基亚砜(DMSO)中制备化合物A储备溶液并将其在培养基中连续稀释。对于体内异种移植研究,将化合物A以10mL/kg的给药体积悬浮在水中的0.5%甲基纤维素中,并施用。

[0587] 将MKL-1和MS-1hMCC细胞接种到含有二维(2D)测定形式的生长培养基的多孔板中。然后将细胞用化合物A处理预定天数。定量每种细胞系的细胞活力并且计算IC₅₀值。

[0588] 将携带可触知的hMCC MKL-1和MS-1肿瘤(各自平均肿瘤体积 \sim 63和 \sim 45mm³)的雌性NSG小鼠随机各分成两组。一组小鼠按间歇时间表(5天给药,然后2天无给药[5on/2off])在单一疗法口服施用5mg/kg化合物A,而另一组小鼠按相同时间表口服施用媒介物作为对照。

[0589] 基于治疗动物对比对照动物的TGI和平均肿瘤生长的差异的统计学评估来确定功效。通过监测每只个体动物的健康状况来评估耐受性。

[0590] 使用在黑壁96孔多孔板中执行的2D测定形式评估MKL-1和MS-1细胞系的存活力。每个测试孔接收悬浮于100 μ L补充有10%FBS的RPMI 1640的5,000个MKL-1细胞或悬浮于100 μ L补充有20%FBS的RPMI 1640中的7,500个MS-1细胞。将化合物A在DMSO中连续稀释,并且然后在RPMI 1640中稀释(1:1000)以制备一系列50x储备液。每个测试孔接受2 μ L储备液中的一种或2 μ L在RPMI 1640中的DMSO作为阴性对照,以得到化合物A的最终浓度为0.0、0.7、2.1、6.2、18.5、55.5、166.7和500nM。每种浓度执行四至六次重复。将多孔板培养7天,并使用CellTiter-Glo[®]Luminescent Cell Viability Assay根据制造商的说明书评估每个测试孔中的活细胞的数量,并用发光计(FilterMax F3,Molecular Devices)读数。CellTiter-Glo[®]Luminescent Cell Viability Assay基于ATP的定量测量活细胞的数量。

[0591] 在肿瘤细胞接种当天,收获对数期生长期间的MKL-1和MS-1细胞,并以 2×10^8 个细胞/mL的浓度重悬于100%Matrigel[®](BD Biosciences, San Jose, CA)中。每只测试小鼠接受皮下移植在右侧腹部中的0.1mL细胞悬浮液(2×10^7 个细胞)。使MKL-1和MS-1肿瘤生长14天,直至它们达到 \sim 63mm³和 \sim 45mm³的相应平均肿瘤体积。然后将携带MKL-1肿瘤的小鼠随机分成两组,每组八只小鼠,其中平均肿瘤体积为 63.0 ± 12.4 mm³和 62.9 ± 12.4 mm³。将携带MS-1肿瘤的小鼠随机分成两组,每组八只小鼠,其中平均肿瘤体积为 43.4 ± 9.7 mm³和 48.1 ± 15.9 mm³。随机化日表示为第-3天,并且根据表18中所示的预定方案在第1天开始给药。

[0592] 表18.MKL-1或MS-1的治疗计划

[0593]	组	n	治疗方案			
			试剂	剂量 (mg/kg)	途径	时间表
	1	8	媒介物	---	PO	5 on / 2 off
	2	8	化合物 A	5	PO	5 on / 2 off

[0594] n=动物数量;PO=口服给药;5on/2off=给药5天,然后停药2天;---=无测试制品施用。将10mL/kg的给药体积针对个体动物的重量按比例调整,并将化合物A按mg/kg游离基质当量给药。

[0595] 如表18中所示,对照小鼠接受水性的0.5%甲基纤维素介物(PO)按照5on/2off口服给药,重复至研究结束。化合物A单一疗法组接受5mg/kg化合物A,PO,5on/2off。每天将测试制品化合物A制备为悬浮在媒介物中的苯磺酸盐(74%活性化合物)并以mg/kg游离基质当量给药。在所有组中,10mL/kg的给药体积针对个体动物的体重按比例调整。

[0596] 使用卡尺每周两次在三个维度上测量个体肿瘤,并且使用下式计算以mm³为单位的肿瘤体积(TV): $TV=0.5 \times l \times w \times h$,其中l、w和h分别是长度、宽度和高度,单位为毫米。这些研究的肿瘤体积终点为2000mm³。同时,对动物进行称重,并通过身体检查监测每个个体动物的健康状况的体重减轻和嗜睡体征。

[0597] 当动物在到肿瘤体积终点时退出研究时,记录的该动物最终肿瘤体积被包括在用于计算在后续时间点的平均体积的数据中。绘制肿瘤生长曲线,示出作为时间的函数的组平均肿瘤体积(平均值±标准误差[SEM]),并且平均体重绘制为从第1天的变化百分比。

[0598] 使用每个测试孔中的各自读数,将活细胞的数量归一化至用DMSO处理的孔中的活细胞的平均数,并表示为百分比。将活细胞百分比相对于相应的化合物A浓度作图,并且使用等式251(ID Business Solutions Ltd.,UK)通过由用于Microsoft Excel的IDBS XL fit程序插件生成的四参数逻辑(4PL)非线性回归曲线确定IC₅₀值。将IC₅₀值计算为抑制为半最大值的浓度。每种细胞系的抑制测定以四至六个生物学重复进行,并报告为IC₅₀±标准偏差(SD)。

[0599] 在MKL-1和MS-1研究中,在第15天和第36天(一只或更多只对照动物达到终点的第一天)执行相应TGI分析。根据下式使用中值肿瘤体积计算TGI百分比:

$$[0600] \quad TGI_x [\%] = \left(1 - \frac{T_x - T_0}{C_x - C_0}\right) \times 100$$

[0601] 其中T₀和C₀是在开始给药之前(第-3天)在治疗组和对照组中各自的中值肿瘤体积,并且T_x和C_x是在第“x”天(TGI分析当天)时相应的中值肿瘤体积。

[0602] TGI分析当天的个体肿瘤体积相对于在开始给药之前它们的体积进行校正,并且在箱须图上绘制每组的所得净肿瘤体积。使用t检验统计评价治疗动物对比对照动物的净肿瘤体积分布的差异。计算概率(p)≤0.05被认为是统计学显著的。t检验是统计学显著性的检验,并不提供组间差异大小的估计或临床或生物学意义的量度。

[0603] 在表19中总结用于2D细胞增殖抑制测定的经实验确定的IC₅₀值。在0.0至500nM化合物A的浓度范围内测量MKL-1和MS-1hMCC细胞系的IC₅₀值,并且使用4PL非线性回归从得到的滴定曲线确定IC₅₀值。测定包括建立用于100%细胞增殖的基线的DMSO阴性对照。如表18

和图17所示,对于2D形式测定的培养的MKL1和MS-1细胞系,化合物A产生分别为 18.4 ± 4.8 nM和 19.7 ± 0.7 nM的 $IC_{50} \pm SD$ 值。

[0604] 表19.用于hMCC细胞增殖的半最大抑制。

[0605]

细胞系	IC_{50} (nM)	SD	[n]
MKL-1	18.4	4.8	6
MS-1	19.7	0.7	4

[0606] IC_{50} = 半最大抑制浓度; [n] = 生物学重复的数量; SD = 标准偏差

[0607] 根据表18中的协议治疗在此研究中的测试动物,并且分别在第15天和第36天(一个或多个对照动物达到终点的第一天)执行MKL-1和MS-1研究的TGI分析。

[0608] 如表20所示,化合物A单一疗法在体内在MKL-1hMCC模型中有效,在第15天引起肿瘤生长抑制为52%。如图18所示,在第15天治疗动物对比媒介物对照动物的平均净肿瘤体积的差异是显著的($p=0.0002$)。如图19所示,对照组中平均肿瘤生长稳定进展。在化合物A单一疗法组中,平均肿瘤进展与对照组中观察到的相比稍慢。如图20所示,接受媒介物或化合物A单一疗法的组在研究的第15天之前表现出进展性平均体重增加,之后两组示出净体重增加的类似降低。

[0609] 表20.MKL-1的TGI响应总结

[0610]

组	n	治疗方案	中值肿瘤体积(mm^3)				统计显著性(p)
			第-3天	第15天	Diff	%TGI	
1	7	媒介物	65	1767	1702	--	--
2	8	5 mg/kg 化合物 A, 5 on / 2 off	65	880	815	52%	0.0002

[0611] TGI = 肿瘤生长抑制; Diff = 差异; n = 动物数量; 5on/2off = 给药5天,然后停药2天; -- = 不适用。将10mL/kg的给药体积针对个体动物的重量按比例调整,并将化合物A按mg/kg游离基质当量施加;使用t检验计算p值。

[0612] 如表21所示,化合物A单一疗法在体内在MS-1hMCC模型中有效,在第36天引起95%的肿瘤生长抑制。如图21所示,治疗动物对比媒介物对照动物在第36天平均净肿瘤体积的差异是显著的($p < 0.0001$)。在对照组中平均肿瘤生长迅速进展,如图6所示。在化合物A单一疗法组中,平均肿瘤进展直至第18天几乎是静止的,然后逐渐增加。如图22的插图所示,化合物A治疗的三个肿瘤首先退化并且在第25天两个反弹。如图23所示,接受媒介物或化合物A单一疗法的组在研究过程中显现出平均体重增加。

[0613] 表21.MS-1的TGI响应总结

[0614]

组	n	治疗方案	中值肿瘤体积(mm^3)				统计显著性(p)
			第-3天	第36天	Diff	%TGI	
1	7	媒介物	44	1723	1679	--	--

[0615]	2	8	5 mg/kg 化合物 A5 on / 2 off	49	129	80	95%	<0.0001
--------	---	---	------------------------------	----	-----	----	-----	---------

[0616] TGI = 肿瘤生长抑制; Diff = 差异; n = 动物数量; 5on/2off = 给药5天, 然后停药2天; -- = 不适用。将10mL/kg的给药体积针对个体动物的重量按比例调整, 并将化合物A按mg/kg游离基质当量施加; 使用t检验计算p值。

[0617] 在体外执行的细胞增殖抑制测定中, 化合物A在培养的MKL-1和MS-1细胞系中展示有效活性, 产生分别为 18.4 ± 4.8 nM和 19.7 ± 0.7 nM的 $IC_{50} \pm SD$ 值。

[0618] 化合物A单一疗法在体内在MKL-1hMCC模型中有效, 引起治疗动物对比媒介物对照动物在第15天肿瘤生长抑制为52%和显著差异的平均净肿瘤体积 ($p=0.0002$)。在化合物A单一疗法组中, 与平均肿瘤进展对照中观察到的相比稍慢。

[0619] 化合物A单一疗法在体内在MS-1hMCC模型中有效, 引起治疗动物对比媒介物对照动物在第36天肿瘤生长抑制为95%, 和显著差异的平均净肿瘤体积 ($p<0.0001$)。在化合物A单一疗法组中, 平均肿瘤进展直至第18天几乎是静止的, 并且然后逐渐增加。

[0620] 在这些研究过程中接受媒介物或化合物A单一疗法的组显现出平均体重增加。在MKL-1和MS-1异种移植物研究中认为化合物A被可接受地耐受。

[0621] 实施例15. 化合物A对Merkel细胞癌中药效学生物标志物的体外和体内影响

[0622] 人Merkel细胞癌被分类为表达LSD1的侵袭性皮肤神经内分泌肿瘤。这些肿瘤比SCLC肿瘤更容易接近, 并且可对人类研究中的PD努力有用。有效的hMCC治疗是极度未被满足的需求, 其可以为化合物A提供另外的适应症。

[0623] 在目前的非良好实验室规范 (GLP) 临床前研究中, 在在体外作为细胞培养物并且在体内作为异种移植物的两种hMCC模型MKL-1和MS-1中, 使用RNA-seq和qRT-PCR评价在通过化合物A抑制LSD1后人mRNA表达的调节。此外, 使用ChIP-seq在MKL-1和MS-1细胞系中调查LSD1与ST18和FREM2基因座的直接结合以及在化合物A处理后H3K4me2状态的变化。

[0624] 此研究的目的是确定在人hMCC细胞系MKL-1和MS-1中, 化合物A介导的LSD1抑制在体外和体内对基因表达的影响。另外, 使用ChIP-seq在MKL-1和MS-1细胞系中调查LSD1与ST18和FREM2基因座的直接结合以及在化合物A处理后H3K4me2状态的变化。

[0625] 对于体外细胞培养研究, 在二甲基亚砜 (DMSO) 中制备化合物A储备溶液, 并将其在培养基中连续稀释。对于体内异种移植物研究, 将化合物A悬浮于在水中的0.5%甲基纤维素中, 并以10mL/kg的给药体积施用。

[0626] 在含有100单位/mL青霉素G钠和100 μ g/mL硫酸链霉素 (cRPMI)、补充有10%胎牛血清 (FBS) 的RPMI-1640培养基 (Life Technologies, Carlsbad, CA) 中体外培养MKL-1hMCC细胞。在补充有20%FBS的cRPMI中体外培养MS-1hMCC细胞。将两种细胞系在潮湿培养箱中在37 $^{\circ}$ C, 在5%二氧化碳和95%空气的气氛中孵育。

[0627] 通过在0、10或100nM化合物A的存在下培养MKL-1或MS-1细胞 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 三天并且提取总RNA用于通过RNA-seq进行评估来确定化合物A对一组人基因的基因表达的调节。进一步评价在两种hMCC系中在两种浓度都下调或上调的基因。然后, 将在两种hMCC系中在两种浓度均显现出至少2倍的剂量依赖性基因表达变化的基因鉴定为候选PD生物标志物基因。

[0628] 接下来,在后续研究中进一步评价候选PD生物标志物基因。在体外研究中,使用qRT-PCR确定对于培养的MKL-1或MS-1细胞系中的候选PD生物标记基因,化合物A调节基因表达的EC₅₀值。在体内异种移植物剂量-响应研究中,携带可触知的MKL-1或MS-1肿瘤的雌性非肥胖糖尿病严重联合免疫缺陷(NOD-SCID) γ (NSG) 小鼠被以1、2.5或5mg/kg每日两次(BID)口服施用媒介物或化合物A单一疗法,持续5天。在接受最后一次剂量后4小时,收集肿瘤并提取总RNA用于候选PD生物标志物的基因表达变化的qRT-PCR评估。在最终研究中,候选PD生物标志物通过ChIP-seq来分析在化合物A存在下LSD1占有率和H3K4me₂状态的变化。

[0629] 从这些分析中,将这样的基因鉴定为hMCC模型中化合物A抑制LSD1的潜在PD生物标志物:该基因显现出与用于化合物A抑制细胞增殖的IC₅₀值相关的EC₅₀值,在体外和体内剂量响应之间的强相关性,以及在化合物A存在下LSD1占有率和H3K4me₂调节。

[0630] RNA-seq和qRT-PCR测定在多孔培养板中一式三份地执行,所述多孔培养板接种有悬浮在分别补充有10%或20%FBS的cRPMI中的MKL-1或MS-1细胞。将化合物A在DMSO中稀释,并且然后再次稀释到补充的cRPMI中以制备储备溶液。每个测试孔接受等份的DMSO作为媒介物对照或化合物A,以得到用于RNA-seq分析的0、10或100nM的最终浓度的化合物A或用于qRT-PCR分析的0、2.5、7.4、22、66或200nM的最终浓度的化合物A。将培养板在潮湿的培养箱中在37°C,5%CO₂和95%空气的气氛中孵育3天。孵育时段后,将培养的MKL-1或MS-1细胞收获,并使用RNeasy Mini Kit (QIAGEN,Valencia,CA)根据制造商说明来纯化总RNA。

[0631] 将携带可触知的hMCC MKL-1和MS-1肿瘤的雌性NSG小鼠随机分成四组,每组三只小鼠。三个组被以1、2.5或5mg/kg,按每日两次给药时间表,共9个剂量(BIDx4.5)口服施用化合物A作为单一疗法。第四组按BID时间表口服施用媒介物作为对照。最后一次给药后4小时,将肿瘤收集到RNAlater中并冷冻保存。

[0632] 解冻肿瘤样品,并使用RNeasy Mini Kit根据制造商的说明纯化总RNA。使用RNase Free DNase Set (QIAGEN,Valencia,CA)按照制造商的说明使用柱上DNA酶处理来除去残留的脱氧核糖核酸(DNA)。将总RNA在不含RNA酶的水中洗脱并通过qRT-PCR分析。

[0633] 按照制造商的说明,使用用于Illumina®平台的KAPA Stranded mRNA-Seq Kit (KapaBiosystems,Wilmington,MA)将从处理的和对照MKL-1或MS-1培养细胞提取的经纯化的总RNA(1 μ g)转化成测序文库。使用75碱基配对末端RNA测序,在Illumina NextSeq® 500System(Illumina,SanDiego,CA)上对文库进行测序。将测序的读段映射于hg19人类基因组构建体(build),并通过分析所有重复相对于媒介物对照的方差来确定差异表达。

[0634] 使用High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(Life Technologies,Grand Island,NY),按照制造商的说明,在逆转录反应中从处理的和对照的MKL-1或MS-1培养细胞或肿瘤样品提取的经纯化的总RNA生成互补(c)DNA。制备含有脱氧核糖核苷酸、随机引物、逆转录酶、RNA酶抑制剂和逆转录缓冲液的1.5x逆转录主混合物,并将20 μ L加入96孔多孔板的每个测试孔中。然后每个测试孔接收10 μ L总RNA,并密封多孔板以防止蒸发。逆转录在使用由试剂盒制造商提供的优化的参数进行编程的T100™热循环仪(Bio-Rad,Hercules,CA)中执行。

[0635] 通过qPCR一式两份地测量响应于化合物A处理的mRNA的表达水平。使用针对人基因ST18、FREM2和肌动蛋白 β (ACTB)的引物组作为用于归一化目标基因的绝对读数的参考序列,对从处理的和对照的MKL-1或MS-1培养细胞或肿瘤样品提取的总RNA制备的cDNA执行

TaqMan[®]qPCR。将mRNA转录物的总水平针对ACTB参考转录物归一化。通过计算化合物A处理后基因表达相对于媒介物处理的对照的倍数变化来定量mRNA表达的变化。

[0636] 用在分别补充有10%或20%FBS的cRPMI中悬浮生长的MKL-1或MS-1细胞执行ChIP-seq测定。将化合物A稀释在DMSO中,然后再次稀释到补充的cRPMI中以制备储备溶液。每个测试孔接收等份的DMSO作为媒介物对照,或化合物A,以得到0或100nM的化合物A的最终浓度。将培养板在潮湿的培养箱中在37°C在5%CO₂和95%空气的气氛中孵育3天。孵育时段后,将培养的MKL-1或MS-1细胞收获并在环境温度通过向每个孔中加入十分之一体积的新鲜11%甲醛溶液进行交联,然后培养20分钟。通过加入1/20体积的2.5M甘氨酸猝灭交联反应。然后,将交联后的细胞收获并用冰冷的磷酸盐缓冲盐水(PBS)冲洗两次。通过离心沉淀细胞,并将含有 6×10^6 个MS-1细胞或 4.5×10^6 个MKL-1细胞的等分试样在液氮中快速冷冻,并在-80°C储存。

[0637] 将含有甲醛固定的细胞的冷冻细胞沉淀物裂解并经超声处理以溶解和剪切交联的染色质(**Bioruptor[®]**,Diagenode,Denville,NJ)。根据制造商的说明,使用用于转录因子的iDeal ChIP-seq试剂盒(Diagenode,Denville,NJ)制备染色质。使用用于转录因子的iDeal ChIP-seq试剂盒,用抗LSD1抗体(Abcam,Cambridge,MA)将LSD1缔合的染色质免疫沉淀。使用用于组蛋白的iDeal ChIP-seq试剂盒(Diagenode,Denville,NJ),用H3K4me2多克隆抗体(Millipore,Billerica,MA)将H3K4me2缔合的染色质免疫沉淀。将从每个样品制备但未经受任何免疫沉淀的染色质用作输入对照,并与ChIPed样品平行处理。将每个样品处理以用于交联逆转,并通过用RNA酶A、蛋白酶K和苯酚:氯仿:异戊醇提取,然后乙醇沉淀处理来纯化DNA。使用MicroPlex文库制备试剂盒(Library Preparation Kit)v2(Diagenode,Denville,NJ)根据制造商的说明制备ChIP文库。在使用75个碱基的单端读段长度在Illumina **NextSeq[®] 500System**上测序之前,根据制造商的说明使用AMPure XP珠(BeckmanCoulter,Indianapolis,IN)对ChIP文库进行尺寸选择。

[0638] 使用Spliced Transcripts Alignment to a Reference(STAR)软件工具(©Alexander Dobin,2009-2016)将测序的读段映射至hg19人类基因组构建提,并使用Empirical Analysis of Digital Gene Expression Data in R(edgeR)对转录物计数进行归一化,并且基于负二项分布(DESeq2)软件工具(©Bioconductor,2003-2017)进行差异基因表达分析。通过分析所有重复相对于媒介物对照的方差来确定差异表达。

[0639] 在qPCR表达分析中,循环阈值(Ct)定义为PCR信号超过背景所需的循环数。Delta Ct(ΔCt)对应于针对ACTB参考序列的Ct值归一化的ST18或FREM2靶基因的Ct值,其中

$$[0640] \quad \Delta Ct_{\text{靶}} = Ct_{\text{靶}} - Ct_{\text{ACTB}}$$

[0641] 通过比较Ct方法计算相对靶表达的定量。比较Ct方法涉及计算每个处理样品和对照样品的 $\Delta Ct_{\text{靶}}$ 与对照样品的平均 $\Delta Ct_{\text{靶}}$ 之间的差异,如下所示:

$$[0642] \quad \Delta \Delta Ct_{\text{靶}} = \Delta Ct_{\text{处理的靶或对照靶}} - \text{平均} \Delta Ct_{\text{靶,对照}}$$

[0643] 对于测试的每种化合物A浓度,计算靶mRNA表达对比化合物A浓度(相对于对照)的倍数变化(计算为 $2^{-\Delta \Delta Ct}$)。然后,使用用于Microsoft Excel的IDBS XLfit程序插件和等式251(ID Business Solutions Ltd.,UK),从拟合至所述数据的4PL非线性回归曲线确定EC50。

[0644] 使用Bowtie 2短读段比对软件 (Langmead,2012) 将ChIP文库序列与hg19人类基因组构建体比对.,确定MKL-1或MS-1细胞中相对于来自全细胞提取物样品的背景读数的LSD1或H3K4me2富集或“结合”区域。仅使具有至少20分的通过Illumina映射质量 (MAPQ) 过滤器的读段用于后续分析。使用Picard MarkDuplicates工具 (<http://broadinstitute.github.io/picard>,Broad Institute,Cambridge,MA) 除去源自PCR重复的读段。通过随机下采样 (downsampling) 到具有最小读段数的样品的读段总数,在对照样品和处理样品之间归一化每个ChIP-seq的读段的数目。使用基于模型的ChIP-seq分析 (Model-based Analysis of ChIP-seq (MACS)) 调用ChIP峰 (<http://liulab.dfci.harvard.edu/MACS/>;Zhang,2008)。使用deepTools bamCoverage工具 (<http://deeptools.readthedocs.io/en/latest/content/tools/bamCoverage.html>; Ramirez,2016) 生成基因组覆盖轨迹 (genome coverage track)。综合基因组查看器IGV (<http://software.broadinstitute.org/software/igv/>;Robinson,2011; Thorvaldsdottir,2013) 用于将ChIP-seq轨迹可视化。

[0645] 通过在0、10或100nM化合物A存在下培养MKL-1或MS-1细胞三天,并提取总RNA用于通过RNA-seq评估来确定化合物A对一组人类基因的基因表达的调节。如图24所示,在两种浓度,4303个下调基因中的17个 (表22) 和3803个上调基因中的172个 (表23) 在两个hMCC系中都显现出基因表达变化。

[0646] 表22.通过RNA-Seq鉴定的下调基因。

[0647]

	符号	描述
1	CRYBG3	含晶状体蛋白 β - γ 结构域蛋白3 (Crystallin Beta-Gamma Domain Containing 3)
2	ADRA2B	肾上腺素能受体 α 2B
3	AHNAK	AHNAK核蛋白
4	CD44	CD44分子(印度血型)
5	CDKN1C	细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1C
6	CNPY1	冠层FGF信号调节因子1
7	FBLN7	腓骨蛋白7
8	KCNH5	电压-门控钾通道亚家族H成员5
9	MARVELD3	含MARVEL结构域蛋白3 (MARVEL Domain Containing 3)
10	MEGF10	多个EGF样域10
11	NID1	巢蛋白1
12	PKHD1L1	多囊肾和肝病1 (常染色体隐性)-样1
13	PLD5	磷脂酶D家族成员5
14	RASSF6	Ras关联结构域家族成员6
15	SEMA3E	脑信号蛋白3E
16	T	T短臂转录因子
17	ZNF215	锌指蛋白215

[0648] 表23.通过RNA-Seq鉴定的上调基因

	符号	描述
1	ABLIM1	肌动蛋白结合LIM蛋白1
2	AC079354.1	未表征蛋白KIAA2012
3	ACVR1	激活素A受体1型
4	ACVR2A	激活素A受体2A型
5	AIM1	黑素瘤缺乏因子1 (Absent In Melanoma 1)
6	AMER2	APC膜招募蛋白2
7	AMOTL2	血管动蛋白样2
8	ANK3	锚蛋白 3
9	ANTXR1	炭疽毒素受体1
10	ARHGEF26	Rho鸟嘌呤核苷酸交换因子26
11	ARPP21	CAMP调节磷蛋白21
12	ATOH8	无调BHLH转录因子8
13	AUTS2	自闭症易感性候选2
14	B3GALT5	β -1,3-半乳糖基转移酶5
15	BACH2	BTB结构域和CNC同系物2
16	BASP1	脑富含膜附着信号蛋白1
17	BCL11A	B-细胞CLL/淋巴瘤11A
18	BICD1	BICD货物衔接子1
19	BRINP2	BMP /维甲酸诱导性神经特异性2
20	C11orf87	染色体11开放阅读框87
21	CA10	碳酸酐酶10
22	CACNA2D1	钙电压门控通道辅助亚基 α 2 Δ 1
23	CADM1	细胞粘附分子1
24	CADPS	钙依赖性分泌激活剂
25	CAMK4	钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶IV
26	CAMSAP2	钙调蛋白调节的血影蛋白相关蛋白家族成员2
27	CBLB	Cbl原癌基因B.
28	CDC14B	细胞分裂周期14B
29	CDC42EP3	CDC42效应蛋白3
30	CDH10	钙粘蛋白 10
31	CDH11	钙粘蛋白 11
32	CDHR1	钙粘蛋白相关家庭成员1
33	CLIP3	含有CAP-Gly结构域的接头蛋白3
34	CLVS1	Clavesin 1
35	CMIP	C-Maf诱导蛋白
36	CNN3	调宁蛋白3
37	COL1A2	胶原蛋白I型 α 2链
38	CRB1	Crumbs 1, 细胞极性复杂组分
39	CREB5	CAMP响应元件结合蛋白5
40	CRISPLD2	含有富含半胱氨酸分泌蛋白LCCL结构域蛋白2 (Cysteine Rich Secretory Protein LCCL Domain Containing 2)
41	CTTNBP2NL	CTTNBP2 N-末端样
42	CYP27C1	细胞色素P450家族27亚家族C成员1
43	DCN	核心蛋白聚糖
44	DCX	双皮质素
45	DFNA5	DFNA5, 耳聋相关肿瘤抑制因子
46	DISP1	调度RND转运蛋白家族成员1
47	DLL1	δ 样规范Notch配体1
48	DNAJB5	DnaJ热休克蛋白家族 (Hsp40) 成员B5
49	DYNC1H1	动力蛋白细胞质1中间链1
50	EBF2	早期B细胞因子2

[0649]

[0650] 进一步评估后,在两种hMCC系中在两种浓度均显现出剂量依赖性基因表达变化至少2倍的两种上调基因ST18和FREM2被鉴定为候选PD生物标志物基因,如表24所示。已示出ST18在乳腺癌中起到肿瘤抑制剂的作用(Jandrig,2004)并且在成纤维细胞中调节促凋亡和促炎基因表达(Yang,2008)。在被诊断患有肺腺癌的患者中经常发生远端转移。最近的研究展示,FREM2通过下调粘着斑激酶信号传导来调节非小细胞肺癌A549细胞系的迁移和侵袭而不是增殖(Zhan,2014)。

[0651] 表24. 候选药效学生物标志物基因

	基因	描述
[0652] Up_Reg	ST18	ST18, C2H2C型锌指
	FREM2	FRAS1相关细胞外基质蛋白2

[0653] Up_Reg = 上调

[0654] 如图25所示,在0、2.5、7.4、22、66或200nM化合物A存在下培养3天的MKL-1或MS-1细胞系中,通过qRT-PCR确定针对候选PD生物标记基因,化合物A调节基因表达的EC50值。ST18和FREM2显现出与化合物A在这些细胞系中抑制细胞增殖的IC₅₀值(<20nM,数据未示出)相关的EC50值。

[0655] 在体内异种移植剂量-响应研究中,三只携带肿瘤的雌性NSG小鼠的组以1、2.5或5mg/kg BIDx4.5经PO施用媒介物或化合物A。在接受最后一次剂量后4小时,收集肿瘤并提取总RNA用于候选PD生物标志物的基因表达变化的qRT-PCR评估。如图25所示,ST18和FREM2示出基因表达的 ≥ 2 倍变化,并且在两种模型中均显现出体内剂量依赖性响应。

[0656] 如图26所示,ChIP-seq分析展示在培养的MKL-1和MS-1细胞中LSD1结合在ST18和FREM2基因处。与ST18基因中H3K4甲基化的LSD1依赖性调节一致,化合物A处理引起MKL-1和MS-1模型中在LSD1结合位点处H3K4me₂增加。此外,化合物A处理引起在MKL-1中而非MS-1模型中在FREM2基因处的LSD1结合位点处的H3K4me₂增加。这些结果与作为LSD1的直接靶基因的ST18和可能的FREM2一致,从而支持它们作为hMCC中由化合物A抑制LSD1的潜在PD生物标志物。

[0657] 在两个hMCC模型MKL-1和MS-1中评价通过化合物A抑制LSD1后一组基因的mRNA表达的调节。选择两个基因ST18和FREM2用于进一步评价化合物A介导的LSD1抑制对体外和体内基因表达的影响和在MKL-1和MS-1模型中LSD1和LSD1依赖性H3K4甲基化调节在它们基因座处的直接结合。

[0658] 对在培养的MKL-1或MS-1细胞中通过RNA-seq评估的化合物A对一组人类基因的基因表达的调节发现,4303个下调基因中的17个和3803个上调基因中的172个显现出在两种浓度在两种hMCC系中的表达变化。在进一步评价后,两种上调基因ST18和FREM2显现出至少2倍的剂量依赖性基因表达变,并被鉴定为候选PD生物标志物基因。

[0659] 使用qRT-PCR确定在培养的MKL-1或MS-1细胞系中化合物A调节ST18和FREM2基因表达的EC50值。两种基因都显现出与化合物A在这些细胞系中抑制细胞增殖的IC₅₀值(<20nM,数据未示出)相关的EC50值。

[0660] 在体内异种移植剂量-响应研究中,ST18和FREM2基因表达在两种hMCC模型中示出 ≥ 2 倍的变化,并且显现出剂量依赖性响应。

[0661] ChIP-seq分析展示在培养的MKL-1和MS-1细胞中LSD1结合在ST18和FREM2基因座处。与在ST18基因座处的H3K4甲基化的LSD1依赖性调节一致,在两种模型中,化合物A处理引起在LSD1结合位点处的H3K4me₂增加。此外,化合物A处理引起在MKL-1中而非MS-1模型中在FREM2基因的LSD1结合位点处H3K4me₂增加。这些结果与作为LSD1的直接靶基因的ST18和可能的FREM2一致,从而支持它们作为在hMCC中化合物A抑制LSD1的潜在PD生物标志物。

[0662] 实施例16. 化合物A单独和与依托泊苷组合在雌性裸小鼠中的皮下小细胞肺癌患者来源的异种移植模型LXFS 573的体内功效

[0663] 使用在雌性免疫缺陷Foxn1nu小鼠中建立的皮下小细胞肺癌(SCLC)患者来源的异

种移植物 (PDX) 模型 LXFS 573 来临床前评价化合物 A 单独和与依托泊苷组合的体内功效和耐受性。基于在研究过程中治疗动物对比 (vs.) 对照动物的肿瘤生长延迟 (TGD)、研究生存期和平均肿瘤生长的差异来确定功效。基于治疗动物和对照动物之间的平均体重差异评估耐受性。

[0664] 在裸小鼠中从连续传代的异种移植物获得 LXFS 573 肿瘤片段。从供体小鼠取出后,将肿瘤切成片段(边缘长度为3至4mm)并置于含有10%青霉素和链霉素溶液的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。通过吸入异氟烷麻醉受体雌性免疫缺陷型Foxn1nu小鼠,并在侧腹皮下接受单侧肿瘤移植物。使肿瘤生长35天,直至肿瘤达到~132mm³。然后将荷瘤小鼠随机分成六组,每组八只小鼠,其中平均肿瘤体积为134.3±68.2mm³、130.7±68.9mm³、132.4±66.3mm³、133.1±64.9mm³、132.1±62.6mm³和132.4±63.2mm³。将该日表示为第0天,并根据表25中所示的预定方案开始给药。

[0665] 表25. 治疗计划

组	N	治疗方案			
		试剂	剂量 (mg/kg/天)	途径	时间表 (天数)
1	8	媒介物	-	PO	1-133
2	8	化合物 A	5	PO	1-133
3	8	依托泊苷	24	SC	1-3
		媒介物	-	PO	4-133
4	8	依托泊苷	24	SC	1-3
		化合物 A	1	PO	4-133
5	8	依托泊苷	24	SC	1-3
		化合物 A	2.5	PO	4-133
6	8	依托泊苷	24	SC	1-3
		化合物 A	5	PO	4-133

[0667] 媒介物以10mL/kg给药并且化合物A以mg/kg游离基质当量施加;PO=口服给药;SC=皮下给药。

[0668] 使用卡尺在两个维度上每周两次测量个体肿瘤,并且使用下式计算以mm³为单位的肿瘤体积(TV): $TV=0.5a \times b^2$,其中a和b分别是以毫米为单位的长直径和短直径。肿瘤生长曲线绘制成组平均肿瘤体积(±平均值的标准误差[SEM])与时间的函数。针对比较次数校正的多重t检验评估作为单一疗法或与依托泊苷组合施用的5mg/kg化合物A在每个时间点的平均肿瘤体积差异的显著性。当动物在已经达到肿瘤体积终点(2000mm³)退出研究时或由于濒死而被安乐死,该动物所记录的最终肿瘤体积被包括,其中所述数据用于计算在后续时间点时平均体积。每周称重动物两次,并构建作为第0天的变化百分比的平均体重图。当一组中超过50%的可评估动物退出研究时,两个图都被截短。如果在测试期间平均体重减轻小于20%并且不超过一只动物由于治疗相关原因而退出研究,则认为方案被可接受

地耐受。

[0669] 当其肿瘤达到2000mm³的终点体积或在研究的最后一天(第133天)时,对每只测试动物实施安乐死,以先到者为准。每个小鼠的到达终点时间(TTE)由以下等式计算:

$$[0670] \quad TTE(\text{天}) = \frac{\log_{10}(2000\text{mm}^3) - b}{m}$$

[0671] 其中b是截距,并且m是通过log₁₀转化的肿瘤体积的线性回归获得的线的斜率,所述log₁₀转化的肿瘤体积包括超过2000mm³的首次观察结果和之前三次测量结果。未达到终点的动物被分配等于研究的最后一天的TTE值。将由于濒死安乐死的动物分配等于其处死日的TTE值。

[0672] 治疗结果由肿瘤生长延迟(TGD)确定,其定义为相对于媒介物对照组,治疗组中的中值TTE的变化:

$$[0673] \quad TGD = T - C,$$

[0674] 其以天数表示,或表示为媒介物对照组的中值TTE的百分比:

$$[0675] \quad \%TGD = \frac{T - C}{C} \times 100$$

[0676] 其中:

[0677] T=用于治疗组的中值TTE,和

[0678] C=用于媒介物对照组的中值TTE。

[0679] 还根据SS(MTV)确定治疗功效,所述SS(MTV)定义为在第133天携带具有指示的中值肿瘤体积(MTV)的肿瘤的研究幸存者(SS)的数目。

[0680] 构建Kaplan-Meier曲线图,示出随着时间变化在研究中剩余的动物百分比。Log-秩(Mantel-Cox)检验用于评估组间Kaplan-Meier曲线图的差异的显著性。针对多重比较调整的经计算的p值≤(0.05/比较次数)被认为是统计学上显著的。Log-秩检验是统计学显著性的检验,并且不提供组间差异大小的估计或临床或生物学意义的量度。

[0681] 表24总结用于P380E4_R400_LXFS 573研究的治疗计划。将测试动物分成六组,每组八只小鼠,并在第0天开始治疗,此时平均肿瘤大小符合随机化标准。如图所示,对照小鼠接受通过口喂(PO)按每日一次的时间表施用的0.5%甲基纤维素媒介物。治疗小鼠以所示的每日一次的时间表接受单独的口服化合物A或与皮下(SC)依托泊苷组合。每天将测试物质化合物A制备为悬浮在媒介物中的苯磺酸盐(74%活性化合物)并以mg/kg游离基质当量计量来给药。在所有组中,将10mL/kg的给药体积针对个体动物的重量按比例调整,并且继续计划给药,直至动物退出研究。两只动物接受给药假期,这对结果没有影响。

[0682] 按照表19中的协议治疗测试动物,并在第133天终止研究。表26总结TGD响应,并且图27示出所有组的Kaplan-Meier曲线图。Log-秩检验用于评估组间Kaplan-Meier曲线图的差异的显著性。针对多重比较调整的经计算的p值≤0.003(0.05/15)被认为是统计学上显著的。图28呈现六组测试动物的平均肿瘤生长曲线。图29呈现从第0天的组平均体重变化百分比。由于没有方案在测试期间导致平均体重减轻>20%并且没有报告治疗相关的死亡,所以所有方案被认为被可接受地耐受。

[0683] 表26.TGD响应总结

[0684]

组	N	治疗方案	中值 TTE (天)	T-C (天)	% TGD	SS(MTV)
1	8	10 mL/kg/天的媒介物	42	---	---	0 (na)
2	8	5 mg/kg/天的化合物 A	133	91	217	7 (1064)
3	8	24 mg/kg/天的依托泊苷+媒介物	63	21	50	0 (na)
4	8	1 mg/kg/天的依托泊苷, 然后化合物 A	59	16	38	1 (1430)
5	8	2.5 mg/kg/天的依托泊苷, 然后化合物 A	121	79	188	3 (1121)
6	8	5 mg/kg/天的依托泊苷, 然后化合物 A	133	91	217	8 (121)

[0685] 媒介物以10mL/kg 0.5%甲基纤维素施加并且化合物A以10mL/kg (以mg/kg游离基质当量) 给药;N=每组评价的动物数量;TTE=达到终点的时间;T-C=治疗组对比对照组的中值数TTE (天) 之间的差异;%TGD = (T-C) / C × 100;最大可能TGD=91天 (217%TGD);SS (MTV) =携带具有中值肿瘤体积 (mm³) (MTV) 的肿瘤的研究幸存者 (SS) 的数量,na=不适用。

[0686] 如表26和图27中所示,对照小鼠中的8个肿瘤在21.2至55.3天生长至2000mm³终点。如表26所报告,对照小鼠的中值TTE为42天,从而为此研究确定了91天的最大可能TGD (217%TGD)。平均肿瘤生长迅速进展,如图28所示。如图29所示,媒介物对照组在第45天显现出平均体重增加4%,第45天是至少一半的动物仍然在研究中的最后一天。

[0687] 如表26中所报告的5mg/kg的化合物A单一疗法产生133天的中值TTE,对应于最大可能TGD (91天,217%)。如表26和图27所示,一只动物在第117天达到终点,并且7只动物在研究中存活,它们携带MTV为1064mm³的肿瘤。如图27中所注释,当与对照组相比时,Log-秩检验发现总体生存期的显著差异 (p<0.0001)。与对照中观察到的平均肿瘤进展相比,平均肿瘤进展显著延迟,如图28所示。化合物A单一疗法组在研究结束时显现出0.4%的平均体重减轻,如图29所示。

[0688] 24mg/kg的依托泊苷单一疗法产生63天的中值TTE,对应于21天或50%TGD。八只测试动物中的肿瘤在45.1至72.5天生长至终点。Log-秩检验发现,与对照组相比,总体生存期存在显著差异 (p=0.0007),并且与5mg/kg化合物A单一疗法组相比,功效显著降低 (p<0.0001)。平均肿瘤体积减少持续~17天,然后反弹至与对照动物体内肿瘤类似的生长速率。依托泊苷单一疗法组在第66天显现出平均体重增加6.3%,第66天是一半动物仍然在研究中的最后一天。

[0689] 与依托泊苷组合施用1、2.5或5mg/kg的化合物A产生59、121和133天的相应剂量依赖性中值TTE,对应于16天 (38%)、79天 (188%) 和91天 (217%,最大可能) 的TGD。

[0690] 在接受1mg/kg化合物A组合治疗的组中,七只测试动物中的肿瘤在45.3至79.8天生长至终点,并且一只动物在研究中存活,其携带体积为1430mm³的肿瘤。Log-秩检验发现,与对照组相比,总体生存率存在显著差异 (p=0.0015),与依托泊苷单一疗法组相比无差异 (p=0.4408),并且与5mg/kg化合物A单一疗法组相比,功效显著降低 (p=0.0008)。平均肿瘤体积减少持续~17天,然后反弹至与对照动物中的肿瘤类似的生长速率。平均肿瘤进展与依托泊苷单一疗法观察到的进展相似。1mg/kg化合物A组合治疗组在第59天显现出平均

体重增加5.5%，第59天是至少一半的动物仍然在研究中的最后一天。

[0691] 在接受2.5mg/kg化合物A组合治疗的组中，五只测试动物中的肿瘤在89.6至125.6天生长至终点，并且三只动物在研究中存活，其携带MTV为1121mm³的肿瘤。Log-秩检验发现，与对照组和依托泊苷单一疗法组相比，总体生存率存在显著差异 ($p < 0.0001$)，并且与5mg/kg化合物A单一疗法组 ($p = 0.0351$) 或1mg/kg化合物A组合治疗组 ($p = 0.0132$) 相比，功效无差异。平均肿瘤体积减少持续~17天，然后逐渐反弹到比对照动物中的肿瘤观察到的生长速率慢的生长速率。2.5mg/kg化合物A组合治疗组在第126天显现出平均体重增加3.8%，第126天是动物的一半仍然在研究中的最后一天。

[0692] 在接受5mg/kg化合物A组合治疗的组中，八只动物在研究中存活，其携带MTV为121mm³的肿瘤。在第91天，一个肿瘤消退到低于可触知限值，其中该肿瘤在研究结束时仍然存在。Log-秩检验发现，与对照组和依托泊苷单一疗法组 ($p < 0.0001$) 和1mg/kg化合物A组合治疗组 ($p = 0.0004$) 相比，总体生存率存在显著差异，并且与5mg/kg化合物A单一疗法组 ($p = 0.3173$) 或2.5mg/kg化合物A组合治疗组 ($p = 0.0085$) 相比，功效无差异。平均肿瘤体积减少持续~17天，然后在研究过程中保持几乎静止。多重t检验发现，与单一疗法相比，作为组合治疗施用的5mg/kg化合物A在每个时间点的平均肿瘤体积的差异在第7天测量结果开始显著，并且至研究结束仍然是显著 ($p \leq 0.01$)。在研究结束时，5mg/kg化合物A组合治疗组表现的平均体重增加为0.6%。

[0693] 使用在雌性免疫缺陷Foxn1nu小鼠中建立的SCLC PDX模型LXFS 573，临床前评价化合物A (1、2.5或5mg/kg) 单独和与依托泊苷 (24mg/kg) 组合时的体内功效和耐受性。

[0694] 24mg/kg的依托泊苷单一疗法产生63天的中值TTE，对应于21天或50%TGD。八只测试动物的肿瘤在45.1至72.5天生长至终点。Log-秩检验发现，与对照组相比，总体生存期存在显著差异 ($p = 0.0007$)，并且与5mg/kg化合物A单一疗法组相比，功效显著降低 ($p < 0.0001$)。

[0695] 在第4-133天 (研究结束) 每天施加1、2.5或5mg/kg的口服化合物A与第1-3天每天施加的24mg/kg依托泊苷的组合在SCLC的LXFS 573 PDX模型中有效。肿瘤生长延迟是剂量依赖性的，产生59、121和133天的相应中值TTE，对应于16天 (38%)、79天 (188%) 和91天 (217%，针对此研究而言最大可能的TGD) 的TGD。研究生存期也显现出剂量依赖性，分别在第133天产生1、3和8名幸存者，并且与对照组相比，总体生存期存在显著差异 ($p \leq 0.0015$)。依托泊苷加5mg/kg化合物A组的平均肿瘤体积减少持续~17天，然后在研究过程中保持几乎静止，其中在第133天MTV为121mm³。

[0696] 在第1-133天每天施加5mg/kg的口服化合物A单一疗法也引起最大响应，其中中值TTE为133天，对应于91天或217%的TGD，并且当与对照组相比，产生总体生存率显著差异 ($p = 0.0001$)。在第133天，平均肿瘤进展明显延迟，其中MTV为1064mm³。中值TTE、研究幸存者数量、平均肿瘤生长和研究中剩余的动物百分比随时间的差异的评估发现，对单独施用或与依托泊苷组合施用5mg/kg化合物A的响应优于所有其他治疗方案。虽然接受5mg/kg化合物A单一疗法对比组合治疗的动物的总体生存期没有显著差异 ($p = 0.9998$)，但是与单独接受5mg/kg化合物A的动物相比，接受依托泊苷然后5mg/kg化合物A的测试动物，在第7-133天时平均肿瘤体积显著减少 ($p \leq 0.01$)。

[0697] 所有治疗方案表现出被可接受地耐受，在测量的第一天和最后一天之间产生组平

均体重的最小变化,并且没有归类为治疗相关的死亡。

[0698] 实施例17. 化合物A单独或与依托泊苷组合在NCI-H1417小细胞肺癌异种移植模型中的功效

[0699] 此研究的目的是确定化合物A在雌性NSG小鼠中建立的NCI-H1417SCLC异种移植模型中的功效和耐受性,该化合物A作为单一疗法或与24mg/kg依托泊苷组合按5on/2off的间歇时间表以5mg/kg口服施加。

[0700] 雌性NSG小鼠(NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)用于此研究。在肿瘤移植当天测试小鼠为9周龄。在肿瘤移植前使动物适应环境一周。

[0701] 动物随意喂食水(反渗透,酸化)和由20%粗蛋白、5.6%脂肪(酸水解)和4.7%粗纤维组成的PicoLab® Rodent Diet。将小鼠圈养在ALPHA-dri®上的屏障设施中,在72±2°F和30-70%湿度进行12小时光照循环。

[0702] 在补充有10%胎牛血清(cRPMI)、100单位/mL青霉素G钠和100µg/mL硫酸链霉素的RPMI-1640培养基中培养NCI-H1417细胞。将细胞在潮湿的培养箱中于37°C,5%二氧化碳和95%空气的气氛中培养。

[0703] 在0.5%甲基纤维素水溶液中配制化合物A,给药体积为10mL/kg。

[0704] 将携带可触知的NCI-H1417SCLC肿瘤(平均肿瘤体积~230mm³)的雌性NSG小鼠随机分成四组。两组按5on/2off的间歇时间表方式作为单一疗法口服施用5mg/kg化合物A或在24mg/kg依托泊苷的初始3天治疗后口服施用5mg/kg化合物A。该研究包括依托泊苷单一疗法和媒介物对照组。

[0705] 基于在研究过程中治疗动物对比对照动物的TGD差异和TTE值以及平均肿瘤生长的差异的统计学评估来确定功效。通过监测每个个体动物的体重和健康状况来评估耐受性。

[0706] 在肿瘤细胞接种当天,收获对数期生长期间的人NCI-H1417细胞,并将其以7.5×10⁷个细胞/mL的浓度重悬于100% Matrigel®中。然后每只测试小鼠接受在右侧腹皮下植入的0.1mL细胞悬浮液(7.5×10⁶个细胞)。使肿瘤生长43天,直至它们达到~230mm³。然后将荷瘤小鼠随机分成四组,每组7只小鼠,其中平均肿瘤体积为241.7±29.4mm³、220.4±33.2mm³、222.7±35.9mm³和232.4±41.1mm³。将此日表示为第1天,并根据表27中所示的预定方案开始给药。

[0707] 表27. 治疗计划

组	n	治疗方案			
		试剂	剂量 (mg/kg)	途径	时间表
[0708] 1	7	媒介物	---	PO	5 on / 2 off
2	7	化合物 A	5	PO	5 on / 2 off
3	7	依托泊苷	24	SC	QDx3
[0709] 4	7	依托泊苷, 然后 化合物 A	24 5	SC PO	QDx3 5 on / 2 off

[0710] n = 动物数量; P0 = 口服给药; SC = 皮下给药; 5on/2off = 给药五天, 然后二天不给药, 直至研究结束; QD \times 3 = 每日一次给药, 持续三天; --- = 没有测试制品施用。将10mL/kg的给药体积针对个体动物的重量按比例调整, 并将化合物A按mg/kg游离基质当量施加。

[0711] 如表27所示, 对照小鼠接受口服 (P0) 给药的0.5%甲基纤维素水溶液媒介物, 持续5天, 然后两天不给药, 重复至研究结束 (5on/2off)。化合物A单一疗法组接受5mg/kg化合物A, P0, 5on/2off。依托泊苷单一疗法组接受皮下施用的24mg/kg依托泊苷 (SC), 每天一次, 连续三天 (QD \times 3)。依托泊苷后接化合物A的组合治疗组接受24mg/kg依托泊苷, SC, QD \times 3, 然后5mg/kg化合物A, P0, 5on/2off。每天将测试物质化合物A制备为悬浮在媒介物中的苯磺酸盐 (74%活性化合物) 并以mg/kg游离基质当量施加。在所有组中, 10mL/kg的给药体积针对个体动物的体重按比例调整。

[0712] 使用卡尺在三个维度上每周两次测量个体肿瘤, 并且使用下式计算以mm³为单位的肿瘤体积 (TV): $TV = 0.5 \times l \times w \times h$, 其中 l 、 w 和 h 分别是以毫米为单位的长度、宽度和高度。同时, 对动物进行称重, 并且通过身体检查监测每个个体动物的健康状况的体重减轻超过20%和嗜睡迹象。该研究于第195天终止。

[0713] 当其肿瘤达到2000mm³的终点体积或当其体重减轻超过20%时, 对每只测试动物实施安乐死。对于体重减轻>10%的动物, 每天监测体重。当体重减轻>20%或其显现出嗜睡时, 处死动物。当动物被实施安乐死或被发现在笼中死亡 (FDIC) 时, 记录的该动物最终肿瘤体积被包括, 其中该数据用于计算在随后时间点的平均体积。然后绘制肿瘤生长曲线, 示出作为时间的函数的组平均肿瘤体积 (\pm 平均值的标准误差 [SEM]), 并且平均体重被绘制为从第1天的变化百分比。当组中超过50%的可评估的动物退出研究时, 两个曲线图都被截断。针对比较次数校正的多重t检验评估化合物A单一疗法对比组合治疗在肿瘤生长曲线上绘制的每个时间点的平均肿瘤体积的显著的显著性。

[0714] 每只小鼠的TTE由以下等式计算:

$$[0715] \quad TTE \text{ (天数)} = \frac{\log_{10} (2000 \text{ mm}^3) - b}{m}$$

[0716] 其中 b 是截距, 并且 m 是通过log10转化的肿瘤体积的线性回归获得的线的斜率, 该肿瘤体积包括超过2000mm³的第一次观察结果和之前三次测量结果。发现死亡或由于体重减轻而被安乐死的动物被指定与其处死日相等的TTE值。在研究中存活的动物被分配等于研究的最后一天的TTE值。

[0717] 治疗结果由TGD确定, TGD定义为治疗组中相对于媒介物对照组的中值TTE的变化:

$$[0718] \quad TGD = T - C,$$

[0719] 其表示为天数, 或表示为媒介物对照组的中值数TTE的百分比:

$$[0720] \quad \%TGD = \frac{T - C}{C} \times 100$$

[0721] 其中:

[0722] T = 治疗组的中值TTE, 和

[0723] C = 媒介物对照组的中值TTE。

[0724] 构建Kaplan-Meier曲线图, 其示出随时间推移在研究中剩余的动物的百分比。Log-秩 (Mantel-Cox) 检验用于评估组间Kaplan-Meier曲线图的显著的显著性。经计算的 p

值 \leq (0.05/比较次数)被认为是统计学上显著的。Log-秩检验是统计学显著性的检验,并不提供组间差异大小的估计或临床或生物学显著性的量度。

[0725] 根据表21中的方案治疗在研究中的测试动物,并且在第195天终止研究。表28总结所有组的TGD响应。图30示出平均肿瘤生长曲线,并且图31示出用于所指示组的Kaplan-Meier曲线图。图32呈现从第1天的组平均体重变化百分比。

[0726] 表28.TGD响应总结

[0727]

组	n	治疗方案	中值 TTE (天)	T-C (天)	% TGD
1	7	媒介物	26	---	---
2	7	5 mg/kg 化合物 A 5 on / 2 off	113	87	335
3	7	24 mg/kg 依托泊苷 QDx3	50	24	92
4	6	依托泊苷, 然后化合物 A	139	113	435

[0728] TGD=肿瘤生长延迟;5on/2off=给药五天,然后二天不给药,直至研究结束;QDx3=每日一次给药,持续三天。将10mL/kg的给药体积针对个体动物的重量按比例调整,并且将化合物A以5mg/kg游离基质当量施加;n=每组评价的动物数量;TTE=达到终点的时间;T-C=治疗组对比对照组的中值数TTE(天)之间的差异;%TGD=(T-C)/C \times 100;最大可能TGD=169天(650%TGD)。

[0729] 如图31所示,对照小鼠中的七个肿瘤在25.8至35.7天生长至2000mm³终点。如表23所报告,对照小鼠的中值TTE为26天,针对此研究确定最大可能的TGD为169天(650%TGD)。平均肿瘤生长迅速发展,如图30所示。

[0730] 如表28中所报告的,5mg/kg的化合物A单一疗法产生113天的中值TTE,对应于87天或335%TGD。如图31所示,七只动物在91至140天退出研究。如图31中所注释,Log-秩检验发现与对照组相比,总体生存期存在显著差异(p=0.0001)。平均肿瘤进展最初不受限直至第8天,然后减慢,在第28天后变得几乎静止,如图30可见。

[0731] 24mg/kg的依托泊苷单一疗法产生50天的中值TTE,对应于24天或92%TGD。七只测试动物中的肿瘤在45.5至77.3天生长至终点。Log-秩检验发现,与对照组相比,总体生存期存在显著差异(p=0.0001),并且与5mg/kg化合物A单一疗法组相比,功效显著降低(p=0.0001)。与对照中观察到的平均肿瘤进展相比,平均肿瘤进展延迟。

[0732] 24mg/kg的依托泊苷后接5mg/kg的化合物A产生139天的中值TTE,对应于113天或435%的TGD。七只动物在120至195天退出研究。Log-秩检验发现,与对照组和依托泊苷单一疗法组相比,总体生存率存在显著差异(p=0.0001),但与化合物A单一疗法组相比无差异(p=0.1677)。平均肿瘤进展最初缓慢,然后在第28天后变得几乎静止。多重t检验发现,依托泊苷+化合物A组合治疗在每个时间点时的平均肿瘤体积差异与化合物A单一疗法相比在第8-113天是显著的(p \leq 0.004)。

[0733] 如图32所示,接受媒介物或依托泊苷单一疗法的组显现出平均体重增加,其中单独接受化合物A或在依托泊苷之后接受化合物A的组在该研究的大约前100天经历平均体重的几乎无变化。在化合物A单一疗法组中,发现七只动物死亡或由于在91至140天体重减轻>20%而被安乐死,并且在依托泊苷接着化合物A组,发现六只动物死亡或由于在126至195天

体重减轻而被安乐死。

[0734] 在可能排除恶病质情况下对个体动物的检查未能建立肿瘤负荷和体重减轻之间的关系。此外,未记录到与化合物A治疗相关的毒性(嗜睡、缺乏食欲和瘀点)一致的临床观察结果。基于这些观察结果,在此研究中认为化合物A被可接受地耐受。

[0735] 以5on/2off的间歇时间表作为单一疗法或在用24mg/kg依托泊苷初始3天治疗后以5mg/kg口服施加的化合物A在雌性NOD scid γ (NSG)小鼠中建立的NCI-H1417SCLC异种移植模型中有效且被可接受地耐受。

[0736] 5mg/kg的口服化合物A单一疗法产生113天的中值TTE,对应于87天或335%TGD,并且与对照组相比,通过Log-秩检验,总体生存期显著差异($p=0.0001$)。24mg/kg的依托泊苷单一疗法产生50天的中值TTE,对应于24天或92%TGD,并且与对照组相比,通过Log-秩检验,总体生存期显著差异($p=0.0001$)。Log-秩检验发现,与5mg/kg化合物A单一疗法组相比,依托泊苷单一疗法组的功效显著降低($p=0.0001$)。依托泊苷后接5mg/kg的化合物A产生中值TTE为139天,对应于113天或435%TGD。Log-秩检验发现,与对照组和依托泊苷单一疗法组相比,依托泊苷化合物A组合组的总体生存率存在显著差异($p=0.0001$),但与化合物A单一疗法组相比无差异($p=0.1677$)。在研究过程中平均肿瘤生长与TGD结果一致。中值TTE、平均肿瘤生长和随时间推移研究中剩余的动物百分比的评估发现,对单独或在依托泊苷后施用5mg/kg化合物A的响应优于所有其他治疗方案。虽然接受5mg/kg化合物A单一疗法对比组合治疗的动物的总体生存期没有显著差异($p=0.1677$),但是相比于单独接受5mg/kg的化合物的测试动物,接受依托泊苷然后5mg/kg化合物A的测试动物,在第8-113天时平均肿瘤体积显著减少($p\leq 0.004$)。

[0737] 接受媒介物或依托泊苷单一疗法的动物显现出平均体重增加并且当它们的肿瘤达到肿瘤体积终点时退出研究。单独接受化合物A或在依托泊苷之后接受化合物A的动物在研究的大约前100天内经历很少乃至没有的平均体重变化。在两组中的动物被发现死亡或由于在91至195天体重减轻 $>20\%$ 而被安乐死。对个体动物的检查未能在可能排除恶病质的情况下确定肿瘤负荷和体重减轻之间的关系。此外,未记录到与化合物A治疗相关的毒性(嗜睡、缺乏食欲和瘀点)一致的临床观察结果。基于这些观察结果,在此研究中认为化合物A被可接受地耐受。

[0738] 实施例18. 化合物A增加前列腺癌细胞LNCaP对照射的敏感性

[0739] LNCaP细胞是雄激素敏感的人前列腺腺癌细胞。LNCaP细胞在有或没有照射(2Gy)或LSD1抑制剂化合物A(100nM)的情况下用雄激素受体配体二羟基睾酮(DHT;10nM)处理。在220小时内监测LNCaP细胞的增殖。图33示出,与DHT和照射相比,DHT、化合物A和照射的组合显示出对LNCaP细胞增殖的更好抑制。图34示出,与DHT组合照射或DHT组合化合物A相比,DHT、化合物A和照射的组合显著抑制LNCaP细胞增殖。这些发现表明,化合物A在2Gy照射后在雄激素受体配体DHT的存在下有效减缓LNCaP细胞的细胞增殖。

[0740] 实施例19. 化合物A增强前列腺癌细胞LNCaP对雷帕霉素处理的敏感性。

[0741] 用单独100nM的雷帕霉素、单独100nM化合物A或100nM的雷帕霉素与100nM的化合物A的组合来处理LNCaP细胞。在90小时内监测LNCaP细胞的增殖。图35和图36示出,与单独的雷帕霉素相比,雷帕霉素与化合物A的组合显示出对LNCaP细胞增殖的更强抑制。这些数据表明,化合物A增强前列腺癌细胞LNCaP对雷帕霉素处理的敏感性。

[0742] III. 次要药效学

[0743] 实施例1: 化合物A对受体、离子通道、神经递质转运蛋白、激酶和非激酶的体外药理学组的影响

[0744] 在一系列CEREP研究报告中, 针对受体、离子通道、神经递质转运蛋白、激酶和非激酶的组, 以10 μ M评估化合物A介导的配体或底物结合的抑制。仅对毒蕈碱M1受体(76%抑制)和Na⁺通道(位点2)(62%抑制)观察到大于50%的抑制。针对化合物A对毒蕈碱M1受体和Na⁺通道(位点2)确定的K_i值分别为1.6 μ M和11 μ M。这些测量的K_i值比针对LSD1观察到的K_i高10,000多倍。这些数据展示, 与测试的140个靶标相比, 化合物A以高度特异性与LSD1结合, 并且化合物A是LSD1的选择性抑制剂。

[0745] IV. 安全药理学

[0746] 实施例1: 化合物A对心血管和呼吸系统的体外作用

[0747] 评价化合物A对hERG钾通道(IK_r的替代物, 快速激活的延迟整流心脏钾电流)的体外作用。在稳定表达hERG通道的人胚肾细胞(HEK293)中以0.3、1、3和10 μ M的浓度测试化合物A。化合物A在0.3 μ M抑制hERG电流(平均值 \pm 平均值的标准误差)5.9 \pm 1.3% (n=3), 在1 μ M抑制17.8 \pm 0.3% (n=4), 在3 μ M抑制47.0 \pm 1.9% (n=4), 并且在10 μ M抑制77.3 \pm 0.2% (n=3)。化合物A对hERG电流的抑制作用的IC₅₀值确定为3.4 μ M(希尔系数=1.2)。

[0748] 实施例2: 化合物A对雄性Dunkin Hartley豚鼠中的血液动力学和心电图参数的影响

[0749] 在麻醉的雄性Dunkin Hartley豚鼠中检查化合物A对血液动力学和ECG参数的影响。雄性豚鼠静脉施用单独的媒介物(10%二甲基亚砷、30%聚乙二醇400水溶液; n=4只动物)或化合物A(n=4只动物, 其中每只动物被施用5、10、15和20mg基质/kg)通过10分钟输注进入颈静脉。使用逐步增加的剂量设计, 其中以20分钟的间隔顺序施用剂量。在整个实验过程中监测动物。

[0750] 平均动脉压(MAP)及其组分在媒介物输注期间趋于降低。在监测期结束时, 与基线相比, MAP降低24%。在单独输注媒介物的情况下, 在监测期结束时也观察到HR减少23%, 以及PR间期增加26%。

[0751] 与时间匹配的媒介物相比, 在施用化合物A的情况下未观察到对MAP或其组分的显著效果。在20mg基质/kg, 与媒介物相比, 化合物A引起HR的轻微降低, 其中在10分钟输注期间在9分钟时观察到最大抑制19%。在监测期结束时, 心率保持下降18%。在10、15和20mg基质/kg剂量的化合物A, 观察到QT和QTcB间期的显著剂量依赖性增加。与时间匹配的媒介物相比, 在化合物A分别在10、15和20mg基质/kg剂量情况下, 在输注开始后10至18分钟时, QTcB间期的最大增加约9%、13%和16%被观察到。在监测期结束时, QTcB间期保持增加10%。在每次输注结束时(10分钟), 对于5、10、15和20mg基质/kg, 平均血浆浓度分别为1166、2362、4269和6707ng/mL。不存在对动脉压、PR间期、QRS持续时间或定性ECG参数的显著化合物A相关影响。基于这些结果, IV施用后, 血液动力学和ECG终点的NOAEL为10mg基质/kg。

[0752] 实施例3: 在狗中的具有4周恢复期的4周口喂关键毒性研究

[0753] 以剂量水平0.375、0.75和1.5mg基质/kg/剂QW通过口喂将化合物A施用至5组雄性和雌性纯种比格犬(4或6只/性别/组), 持续最多4周; 或以0.375mg基质/kg/剂BIW口喂, 持

续最多4周。媒介物对照动物(反渗透水中0.5%w/v甲基纤维素)也被以BIW给药并用作同时对照。在最后一次剂量后,除了0.375mg基质/kg/剂组之外,其余两只动物/性别/组被安排进行4周无治疗恢复期。

[0754] 在研究的第13至23天,每周口服施用化合物A引起11只动物的濒死安乐死(以0.375mg基质/kg/剂QW施用的1只雄性,0.75mg基质/kg/剂的2只雄性和1只雌性,1.5mg基质/kg/剂的3只雄性和4只雌性)。这些动物的濒死状况归因于化合物A相关的胃粘膜溃疡和/或急性炎症。所有其他动物存活至它们被计划的尸检。由于1.5mg基质/kg/剂的严重毒性,针对其余3只雄性和2只雌性,此组的给药在第15天暂停;这些动物仍然在研究中并且在最后一次剂量后经历至少4周的恢复。

[0755] 对于被给药的所有动物,在给药阶段的第22天,在服药前阶段和服药前和服药后约3小时记录心电图一次。使用八个导联记录心电图,并且在单个导联上进行ECG的常规定量测量。使用Fridericia方法计算QTc间期。对所收集ECG的节律异常和扰动进行定性审核。

[0756] 在评价的任何剂量水平(即,<1.5mg基质/kg/剂),未发现化合物A相关的节律或波形形态异常或关于HR、RR间期、PR间期、QRS持续时间、QT间期或QTc间期的化合物A相关的异常。因此,用于CV和呼吸变化的NOEL为0.75mg基质/kg/剂QW和0.375mg基质/kg/剂BIW,评价具有CV和呼吸终点的最高剂量水平。在0.75mg基质/kg/剂QW稳态C_{max}值为36.2ng/mL(雄性)和40.8ng/mL(雌性);并且在0.375mg基质/kg/剂BIW稳态C_{max}值为17.7ng/mL(雄性)和19.0ng/mL(雌性)。

[0757] V. 非临床药代动力学和代谢

[0758] 进行体外和体内研究以表征化合物A的吸收、PK、分布、排泄和代谢。化合物A是游离基质的苯磺酸盐,并且所有浓度和PK参数均指游离基质。用于确定化合物A游离基质浓度的稳健且可重复的生物分析方法被开发并用于PK和TK研究。在小鼠、大鼠、狗和猴中评价化合物A的药代动力学和口服生物利用度。使用异速生长标度预测人PK参数和暴露。小鼠和狗是用于非临床毒理学评估的物种。进行体外研究以评估化合物A的吸收、代谢、血浆蛋白结合、CYP反应表型分析以及用于CYP酶的抑制和诱导潜力。在大鼠中研究非放射性标记的化合物A的排泄。

[0759] 实施例1:吸收和药代动力学

[0760] 在IV和口服施用后,在CD-1小鼠、Sprague Dawley大鼠,比格犬和食蟹猴(Report QC6688-ADME-2004)中评价化合物A的PK。通过液相色谱与质谱检测(LC-MS/MS)确定化合物A的血浆浓度。IV或口服施用化合物A后的平均PK参数示于表29和表30中。

[0761] 表29:给予动物单次静脉剂量化合物A后的平均血浆药代动力学参数

[0762]

物种 ^a	性别	剂量 (mg 基质)	AUC _{最后} (ng·hr/mL)	AUC _∞ (ng·hr/mL)	CL (mL/min/kg)	V _{ss} (mL/kg)	t _{1/2,z} (hr)
小鼠	雌性	5	2215	2664	32	7510	3.8
大鼠	雌性	5	680 (56)	733 (74)	115 (12)	26250 (2442)	3.6 (0.5)
狗	雄性	1	1302 (250)	1944 (519)	9 (3)	11058 (1183)	15.5 (1.3)

[0763]

猴	雄性	1	912 (191)	983 (228)	18 (5)	17119 (1696)	12.0 (1.6)
---	----	---	--------------	--------------	-----------	-----------------	---------------

[0764] AUC_{最后}=从时间零到最后可测量浓度的血浆浓度-时间曲线下的面积;AUC_∞=从时间0到无穷大外推的血浆浓度-时间曲线下的面积;CL=清除;

[0765] hr=小时;PK=药代动力学;SD=标准差;t_{1/2,z}=浓度-时间曲线的末期的表现半衰期;V_{ss}=稳态时的分布体积。

[0766] ^a在小鼠中,从n=3只动物/时间点获得复合PK取样。在其他物种体内,PK参数来自n=3只动物,并且示出的值是平均值和SD(括号中)。

[0767] 表30.给予动物单次口服剂量后化合物A的平均血浆药代动力学参数

[0768]

物种 ^a	性别	剂量 ^a (mg 基质/kg)	t _{最大} (hr)	C _{最大} (ng/mL)	AUC _{最后} (ng·hr/mL)	t _{1/2,z} (hr)	%F
小鼠	雌性	10	0.5	510	2007	1.7	38
大鼠	雌性	5	2.0 (2.0-4.0)	47 (14)	222 (52)	3.0 (0.7)	33 (10)
	雌性	15	2.0 (0.25-2.0)	123 (70)	570 (246)	2.9 (0.3)	28 (14)
	雌性	50	6.0 (2.0-8.0)	621 (215)	4652 (1672)	3.0	74 (34)
狗	雄性	1	2.0 (1.0-6.0)	69 (18)	1089 (245)	15.0 (3.0)	84 (41)
	雄性	3	1.0 (0.5-1.0)	298 (63)	3792 (674)	19.4 (4.5)	100 (80)
	雄性	6	1.0 (1.0-2.0)	627 (84)	8792 (512)	17.8 (2.4)	100 (46)
猴	雄性	5	6.0 (6.0-6.0)	187 (49)	3618 (1537)	12.9 (2.7)	82 (70)

[0769] AUC_{最后}=从时间零到最后可测量浓度的时间的血浆浓度-时间曲线下面积;C_{max}=

最大血浆浓度;F=口服生物利用度;hr=小时;PK=药代动力学;SD=标准差; $t_{1/2z}$ =浓度-时间曲线末期的表现半衰期; t_{max} = C_{max} 的时间。在小鼠中,使用从 $n=3$ 只动物/时间点获得的复合血浆样品确定PK参数。在其他物种中,PK参数来自 $n=3$ 只动物,并且示出的值是平均值和SD(在括号内)

[0770] 在IV给药后,化合物A的全身清除在小鼠、狗和猴中是中度的(肝脏血流量的约30%至40%)并且在大鼠中高(大于肝血流量)。跨物种的分布体积范围为总体内水体积的约12至43倍,表明广泛分布到组织中。在啮齿动物和非啮齿动物之间注意到不同的半衰期,其中在啮齿动物中数值范围为2至4小时,而在非啮齿动物中数值范围为12至20小时。

[0771] 化合物A在MDR1(人P-gp)-MDCK细胞中的渗透性在A→B方向为 0.5×10^{-6} cm/s,并且在B→A方向为 16.5×10^{-6} cm/s,其中外排比率为33,表明化合物A是P-gp底物。

[0772] 口服给药后,化合物A在小鼠、大鼠、狗和猴中迅速且良好地吸收,其中达到血浆浓度峰值的中值时间(t_{max})在服药后0.5至6小时范围内,并且啮齿动物的口服生物利用度范围为28%至74%,而在狗和猴中口服生物利用度范围为82%到100%。

[0773] 由于小鼠和狗之间的不同半衰期,在每天给药后(每周连续5个给药日,持续4周)进行小鼠的毒理学研究,而在狗中进行的研究在QW、BIW或Q2W给药方案持续4周之后。在给予小鼠多次口服剂量的化合物A后,全身暴露以大于剂量成比例的方式从5至15mg基质/kg增加,并且以剂量成比例的方式从15至45mg基质/kg增加(Report QC6688-TOX-3001),而在狗中,化合物A暴露以剂量成比例的方式增加(Report QC6688-TOX-3002, Report-QC6688-TOX-3006)。在毒理学研究中使用的给药时间表中,在重复施用之后,在两种物种中均未观察到积累,并且在两种物种中均未发现TK的性别差异。

[0774] 实施例2:分布

[0775] 在小鼠、大鼠、狗和猴中的分布体积非常高(总体水体积的约12至43倍),表明化合物A在组织中的广泛分布。化合物A与血浆蛋白高度结合(人血浆中为83%,而在动物血浆中为83%至92%),没有显著的种间差异。尚未评价化合物A在组织中的分布和化合物A跨胎盘屏障的转运。

[0776] 实施例3:代谢

[0777] 使用雄性小鼠、大鼠、狗和猴的冷冻保存的原代肝细胞和混合性别人(Report QC6688-ADME-2006)来评价化合物A的代谢。化合物A的代谢稳定性在大鼠和狗中更大,其次是人和猴,而在小鼠肝细胞中最不稳定。在除了小鼠外的所有研究物种中都鉴定出单一代谢物(M1;氧化脱氨代谢物),并且在人肝细胞中形成的M1的定性水平与在狗肝细胞中形成的那些相当,狗肝细胞是用于临床前安全性测试的物种之一并且表明人肝细胞不形成任何独特的代谢产物。

[0778] 使用重组人CYP酶的研究示出,CYP3A4表现出主要负责化合物A的氧化代谢,其中来自其他CYP酶的贡献很小(Report QC6688-ADME-2006)。非CYP酶在化合物A代谢中的作用尚未查明。

[0779] 实施例4:排泄

[0780] 在胆道插管的大鼠中,在静脉内施用非放射性标记的化合物A后,平均26.3%的剂量(尿液中剂量为8.5%和胆汁中剂量为17.8%)在给药后的24小时时间段内完整地排泄,指示代谢可在消除化合物A中起重要作用,并且完整的化合物A的排泄不是主要的消除方

式。尚未评价化合物A或其相关组分向母乳中的排泄。

[0781] 实施例5:体外药物-药物相互作用

[0782] 使用汇集的 (pooled) 人肝微粒体评价化合物A对主要CYP同工酶 (CYP 1A2、2C9、2C19、2D6和3A4) 的细胞色素P450抑制潜力。化合物A (高达50 μ M) 对CYP 1A2、2C9和2D6几乎没有直接抑制影响,并且示出对CYP2C19和CYP3A4的最小抑制,其中IC₅₀值>50 μ M。因此,在临床相关浓度,预期化合物A不会由于CYP抑制而引起任何药物-药物相互作用。

[0783] 使用冷冻保存的人肝细胞的培养物并在培养至多3天后来评价化合物A (0.03至10 μ M) 的细胞色素P450诱导潜力。确定诱导CYP 1A2、2B6和3A4的mRNA表达的能力 (Report QC6688-ADME-2007)。化合物A没有引起mRNA的增加 (相对于媒介物对照<2倍),指示化合物A不是CYP1A2、2B6和3A4的诱导物。

[0784] 总之,化合物A与作为CYP底物的共同施用的药物引起药物-药物相互作用的可能性最小。

[0785] 实施例6. 化合物A预测的人体药代动力学

[0786] 在肿瘤学受试者中,基于动物模型中化合物A的PK参数并使用异速生长标度,预测化合物A具有中度清除率 (9.4mL/min/kg) 和高分布体积 (17.6L/kg, 总体内水体积的约31倍)。使用异速生长衍生的PK参数和80%口服生物利用度的假设,在60kg人中在QW施用1.25mg口服剂量后化合物A的预测稳态全身暴露 (AUC_t) 为29ng·hr/mL。

[0787] VI. 毒理学

[0788] 对小鼠和狗进行至多4周的一系列探索性和关键性毒性研究,并且进行体外遗传毒性研究以表征化合物A的毒性特征。使用口服途径进行体内研究,因为口服是临床试验中的预期施用途径。使用在小鼠中以QDx5/周或QODx3/周给药时间表和在狗中以QW、BIW或Q2W给药施用的化合物A进行关键毒性研究 (4周口服重复剂量,其中恢复期为4周;小鼠和狗)。根据美国FDA GLP非临床实验室研究规定 (21CFR Part 58), OECD GLP原则、ENV/MC/CHEM (98) 17 (1997年修订,1998年1月发布) 和ICH S9指南2009年的要求进行关键毒性研究。

[0789] 实施例1:在小鼠中具有4周恢复期的4周毒性研究

[0790] 以0、5、15和45mg基质/kg/剂或25mg基质/千克/剂的剂量水平通过口喂将化合物A施用至雄性和雌性Cr1:CD1 (ICR) 小鼠 (10或15个/性别/组)。一个给药时间表是QDx5/周,总共4周 (剂量水平为5、15和45mg基质/kg/剂)。在施用第四周期的最终剂量后第二天使动物终止。另一组动物被施用25mg基质/kg/剂QODx3/周,持续共4周,并在最终剂量后第二天被终止。给药之后是4周恢复期 (5个/性别/组,剂量水平为0、15、45或25mg基质/kg/剂)。

[0791] 用于TK评价的另外动物 (对照组中的6个/性别和测试制品组中的36个/性别/组) 以与毒性动物相同的时间表给药长达26天。

[0792] 毒性评价基于死亡率、临床观察、体重、食物消耗、眼科评估以及临床和解剖学病理学。从TK动物收集血样用于TK评价。

[0793] 由于化合物A相关的毒性,早在给药阶段的第7天处死在濒死状况下的施用45mg基质/kg/剂的五只动物 (4只雄性和1只雌性)。所有这些都是TK亚组动物。对这些动物的临床观察包括:瘦、共济失调、驼背、活动减退、斜视眼、粗糙毛发、苍白的耳朵/身体和/或立毛。由于这些是TK亚组动物,因此未进行组织学检查。在给药阶段的第20天处死一个25mg基质/kg/剂的雌性,因为其右后腿的使用有限,这一发现与损伤一致,并且因此,这种非计划的处

死不认为与化合物A相关。在毒性亚组动物中没有与化合物A相关的非计划死亡率。

[0794] 没有与测试制品相关的眼科影响。

[0795] 以下呈现所有其他测试制品相关的发现。化合物A相关的不良发现：

[0796] • 在 ≥ 15 mg基质/kg/剂的粗糙的毛发，在 ≥ 25 mg基质/kg/剂的立毛和驼背外观，和在45mg基质/kg/剂的苍白耳朵/身体和瘦外观。

[0797] • 在45mg基质/kg/剂的血小板和网织红细胞计数显著下降。

[0798] • 在15和45mg基质/kg/剂，在胸骨髓质空间中最小到明显的纤维化，以及在受影响的胸骨节内最小至中度减少的造血组织(细胞减少)。

[0799] • 在15和45mg基质/kg/剂，骨膜、骨内膜和骨小梁骨(骨质增生)的最小至中度增加和成骨细胞活化。

[0800] • 在 ≥ 15 mg基质/kg/剂，胸骨骨髓中的最小至中度骨髓增生。

[0801] • 在45mg基质/kg/剂股骨骨髓的中度纤维化(一个雄性)。

[0802] • 在15mg基质/kg/剂，在雄性脾中，在25mg基质/kg/剂在雌性脾中，以及45mg基质/kg/剂在雄性和雌性脾中，边缘区淋巴细胞最小至明显消耗。

[0803] 化合物A相关的发现由于其在一天内发生而被认为是无害的，是自限性的，没有毒理学结果，幅度小，和/或没有微观相关性，由以下组成：

[0804] • 在45mg基质/kg/剂的平均体重减轻(在第27天，比对照组雄性和雌性分别低8.6%和12.6%)。

[0805] • 在 ≥ 5 mg基质/kg/剂的轻度至中度降低的红细胞量(红细胞计数、血红蛋白和红细胞比容)。

[0806] • 在5和15mg基质/kg/剂的轻度至中度降低的血小板和绝对网织红细胞。

[0807] • 在施用 ≥ 15 mg基质/kg/剂的动物中最小程度至中度降低的平均红细胞血红蛋白、平均红细胞血红蛋白浓度和绝对嗜中性粒细胞计数(也在施用5mg基质/kg/剂的雄性中)，和在施用15或25mg基质/kg/剂的雄性中和在施用 ≥ 5 mg基质/kg/剂的雌性中的最小程度升高的绝对单核细胞计数。

[0808] • 在25mg基质/kg/剂的最小程度总蛋白降低，和在25或45mg基质/kg/剂的最小程度白蛋白降低。

[0809] • 在 ≥ 5 mg基质/kg/剂，胸骨骨髓中巨核细胞的最小或轻度增加(数量和/或大小)。

[0810] • 在 ≥ 15 mg基质/kg/剂的精囊重量减少(无微观相关性)。

[0811] • 在15和45mg基质/kg/剂的子宫重量减少(无微观相关性)。

[0812] • 仅在恢复处死时，在15或45mg基质/kg/剂的睾丸重量减少(没有微观相关性)。

[0813] • 在脾中，在 ≥ 15 mg基质/kg/剂和在一个雌性中5mg基质/kg/剂，增加髓外造血(最小到显著)；与在15或45mg基质/kg/剂绝对和相对脾重量增加相关。

[0814] 所有测试制品相关的发现展示在4周无治疗期后部分至完全可逆。

[0815] 化合物A TK数据总结于表31中。

[0816] 随着剂量水平从5至45mg基质/kg/剂的增加，对化合物A的暴露增加。 C_{max} 和AUC₀₋₂₄值的增加通常大于5至15mg基质/kg/剂成比例的剂量，并且大致剂量与15至45mg基质/kg/剂成比例。未观察到平均化合物A C_{max} 和AUC₀₋₂₄值一致的性别差异。在小鼠中多次

施加化合物A后未观察到化合物A的积累。

[0817] 基于死亡率,毒性、血液学和组织病理学发现的临床体征,在QDx5/周时间表后STD10为>45mg基质/kg/剂(分别对应于值为2,620ng/mL和29,000ng·hr/mL,和为2,130ng/mL和26,500ng·hr/mL的雄性和雌性的平均稳态C_{max}和AUC₀₋₂₄),并且在每周QODx3时间表后,STD10为>25mg基质/kg/剂(分别对应于值为1,450ng/mL和17,800ng·hr/mL,和为1,740ng/mL和17,500ng·hr/mL的雄性和雌性的平均稳态C_{max}和AUC₀₋₂₄)。在QDx5/周时间表后NOAEL为5mg基质/kg/剂(分别对应于值为276ng/mL和2,010ng·hr/mL,以及276ng/mL和2,410ng·hr/mL的雄性和雌性的平均稳态C_{max}和AUC₀₋₂₄)。没有为QODx3/周时间表鉴定NOAEL。

[0818] 表31.口服给药后在小鼠体内化合物A毒代动力学参数的总结

[0819]

区间(天)	剂量水平 (mg基质/kg/剂)	性别	C _{max} (ng/mL)	AUC ₀₋₂₄ (ng·hr/mL)
1	5	M	230	2270
		F	201	1500
	15	M	1020	13000
		F	850	9680
	45	M	3130	35200
		F	3570	36300
25 ^a	M	1530	21900	
	F	1830	20300	
26	5	M	276	2010
		F	276	2410
	15	M	628	7960
		F	769	8640
	45	M	2620	29000
		F	2130	26500
25 ^a	M	1450	17800	
	F	1740	17500	

[0820] AUC₀₋₂₄=从时间0到24小时在血浆浓度曲线下的面积;C_{max}=最大血浆浓度;F=雌性;hr=小时;M=雄性;QOD=每隔一天。

[0821] a施用25mg基质/kg/剂的动物以QODx3/周给药。所有其他剂量群组每周给药5天,然后停药2天。在施用最终剂量后第二天使动物终止。

[0822] 实施例2:在狗中具有4周恢复期的4周毒性研究

[0823] 在初始研究中,以剂量水平0、0.375、0.75或1.5mg基质/kg/剂QW通过口喂将化合物A施用至5组雄性和雌性纯种比格犬(4或6只/性别/组),长达4周;或0.375mg基质/kg/剂BIW,长达4周。在最后一次剂量后,除了0.375mg基质/kg/剂QW组之外的所有2只动物/性别/组被安排进行4周无治疗恢复期。

[0824] 每周口服施用化合物A引起在研究第13至23天11只动物的濒死安乐死(在0.375mg

基质/kg QW 1只雄性,在0.75mg基质/kg 2只雄性和1只雌性,在1.5mg基质/kg 3只雄性和4只雌性)。这些动物的濒死状况归因于化合物A相关的胃粘膜溃疡和/或急性炎症。由于1.5mg基质/kg/剂组的严重毒性,对于存活的3只雄性和2只雌性,在第15天(在安排的第三剂量之前)暂停此组的给药;这些动物仍然在研究中并且在最后一次剂量后经历至少4周的恢复。所有其他动物存活至所它们被安排的尸检。

[0825] 在所有剂量水平和时间表(即, ≥ 0.375 mg基质/kg/剂, QW或BIW)观察到不良发现。主要毒性由粘膜溃疡、急性和/或亚急性炎症以及胃肠道组织的粘膜上皮萎缩组成。

[0826] 被施用 ≥ 0.375 mg基质/kg/剂(QW或BIW)的动物的以下变化被认为是化合物A相关的,在濒死状况下处死的动物和/或存活至被安排的尸检的动物中被注意到,并且被认为是不良的:

[0827] • 活动减退、外观瘦、呕吐、红/黑/液体/不成形/粘液粪便、脱水、体重减轻、食物消耗减少、发热和/或胃肠道不适的证据。

[0828] • 以下项的血液学发现:红细胞量轻度至中度降低,血小板计数轻度至明显降低,网织红细胞计数明显降低,嗜酸性粒细胞轻度至中度降低,绝对单核白细胞和未染色大细胞计数轻度至中度增加,嗜中性粒细胞计数中度至明显降低(2个施用1.5mg基质/kg/剂的雌性)或嗜中性粒细胞计数轻度至中度增加(施用 ≥ 0.375 mg基质/kg/剂的其他动物)。

[0829] • 以下项的临床化学发现:轻度至中度降低的白蛋白和白蛋白:球蛋白比率,轻度降低的钙,轻度至中度降低的无机磷,轻度至中度增加的胆固醇,最小至轻度增加的碱性磷酸酶活性。

[0830] • 胃部轻微至明显粘膜溃疡和/或中度急性炎症。

[0831] • 空肠、回肠、盲肠、结肠和/或直肠中最小至明显的急性或亚急性炎症和溃疡。

[0832] • 空肠和/或回肠中轻微至中度粘膜上皮萎缩。

[0833] • 食道中轻微溃疡(1名施用1.5mg基质/kg/剂的雌性)。

[0834] 以下变化在施用 ≥ 0.375 mg基质/kg/剂(QW或BIW)的存活至它们各自的尸检的动物中注意到并且被认为是化合物A相关的,但是因为它们具有低幅度和/或发生率、没有后果和/或没有微观相关性而不被认为是不良的:

[0835] • 以下项的血液学发现:红细胞量最小程度至轻度减少(施用0.375mg基质/kg/剂QW[仅雄性]或BIW的动物,施用0.75mg基质/kg/剂的雌性,和施用1.5mg基质/kg/剂的雄性),轻度减少的绝对网织红细胞计数(施用1.5mg基质/kg/剂的雌性),轻度至中度增加的血小板计数(施用0.375mg基质/kg/剂QW或BIW的雄性和施用1.5mg基质/kg/剂的动物),轻度增加的白细胞(WBC),绝对嗜中性粒细胞和未染色大细胞计数(施用1.5mg基质/kg/剂的雄性)。

[0836] • 以下项的临床化学发现:最小程度增加的球蛋白(施用0.375mg基质/kg/剂BIW的动物,施用0.75mg基质/kg/剂的雌性,和施用1.5mg基质/kg/剂的动物),轻度增加的胆固醇(施用0.75mg基质/kg/剂的雌性),最小程度增加的碱性磷酸酶活性(施用0.375mg基质/kg/剂BIW或0.75mg基质/kg/剂的雌性和施用1.5mg基质/kg/剂的动物),最小程度降低的钙(施用1.5mg基质/kg/剂的雄性),轻度降低的无机磷(施用0.75mg基质/kg/剂的雌性)。

[0837] 在被濒死安乐死的动物中的其他发现归因于炎症响应(脾中的髓外造血和增加的胸骨骨髓中的骨髓细胞:红细胞系比率),继发于胃肠道粘膜溃疡的败血症(多个淋巴结中

的炎症,SC水肿,或心脏或肝脏中的急性炎症),和/或与濒死状况相关的压力(胸腺中淋巴细胞的消耗)。

[0838] 在以 ≥ 0.375 mg基质/kg/剂存活至它们被安排的尸检的任何动物中,不存在对平均体重、食物消耗、凝血、尿分析、心电图、眼科、肉眼观察或器官重量的化合物A相关影响。

[0839] 所有上述发现示出在4周无治疗期后完全恢复。

[0840] 当每周施加时,暴露于化合物A以剂量依赖性方式在第1天从0.375增加至1.5mg基质/kg/剂和在第22天从0.375增加至0.75mg基质/kg/剂。暴露在雄性和雌性之间是可比较的,并且未观察到TK参数的一致差异。在狗中多次施加化合物A后未观察到化合物A的积累。TK参数的总结在表32中给出。在施用0.375mg基质/kg/剂QW的动物中的浓度-时间曲线类似于在第1天和第22天施用0.375mg基质/kg/剂BIW的动物中的浓度-时间曲线。

[0841] 表32. 在具有4周恢复期的4周毒性研究中口服给药后狗中化合物A的平均毒代动力学参数的总结

[0842]

区间(天)	剂量水平 (mg基质/kg/剂)	性别	C _{max} (ng/mL)	AUC ₀₋₁₆₈ (ng·hr/mL)	AUC ₀₋₇₂ (ng·hr/mL)
1	0.375	M	17.2	503	NC
		F	17.2	435	NC
	0.75	M	34	955	NC
		F	41.6	1180	NC
	1.5 ^a	M	90.6	2530	NC
		F	80.0	2680	NC
	0.375 ^b	M	16.9	NC	420
		F	15.2	NC	383
22	0.375	M	21.9	384	NC
		F	15.5	269	NC
	0.75	M	36.2	645	NC
		F	40.8	719	NC
	0.375 ^b	M	17.7	NC	307
		F	19.0	NC	296

[0843] AUC₀₋₁₆₈=在从时间0到168小时的血浆浓度曲线下的面积;AUC₀₋₇₂=在从时间0到72小时的血浆浓度曲线下的面积;C_{max}=最大血浆浓度;F=雌性;hr=小时;M=雄性;NC=未计算。

[0844] ^a施用1.5mg基质/kg/剂的动物接受两次剂量,并且然后在第15天开始恢复。因此,没有在第22天可获得毒代动力学数据。

[0845] ^b此组中每周给动物给药两次,而所有其他剂量组每周给药一次。

[0846] 基于在QW剂量 ≥ 0.375 mg基质/kg/剂毒性、死亡率、对体重的不利影响、临床病理学和组织病理学的临床体征,未确定用于QN或BIW剂量时间表的HNSTD和NOAEL(即, < 0.375 mg基质/kg/剂)。QW 0.375mg基质/kg/剂对应于在给药阶段的第22天分别为21.9ng/mL和384ng·hr/mL(雄性),和15.5ng/mL和269ng·hr/mL(雌性)的C_{max}和AUC₀₋₁₆₈值;BIW0.375mg基质/kg/剂对应于在给药阶段的第22天分别为17.7ng/mL和307ng·hr/mL(雄性)和19.0ng/mL和296ng·hr/mL(雌性)的平均C_{max}和AUC₀₋₇₂值。

- [0847] 实施例3. 狗中的4周毒性研究(无恢复期)
- [0848] 在第二狗研究中,以剂量水平为0、0.125或0.25mg基质/kg/剂QW(总共5个剂量),或0.5mg基质/kg/剂Q2W(总共3个剂量),通过口喂将化合物A施用至4组雄性和雌性纯种比格犬(4只/性别/组),持续至少4周(ReportQC6688-TOX-3006)。所有动物均存活至终止处死时。
- [0849] 不存在临床观察、体重参数、食物消耗、器官重量、凝血、临床化学、尿分析参数或宏观发现中的化合物A相关变化。
- [0850] 以下变化被认为是化合物A施用的结果:
- [0851] • 治疗相关的不良发现:
- [0852] ——回肠中度急性炎症和盲肠明显急性炎症(施用0.25mg基质/kg/剂QW的单一雌性)
- [0853] ——盲肠中最小急性炎症(施用0.5mg基质/kg/剂Q2W的单一雄性)
- [0854] • 治疗相关但由于低幅度/严重程度和/或没有微观相关性不被认为是不良的:
- [0855] ——绝对血小板计数的最小增加(施加0.5mg基质/kg/剂Q2W)
- [0856] ——绝对单核白细胞计数的最小增加(施用0.25mg基质/kg/剂QW的雌性)
- [0857] ——髓外造血的最小增加(施用0.5mg基质/kg/剂Q2W的4只动物和施用0.25mg基质/kg/剂QW的单一雌性)
- [0858] ——轻微增加胸骨和股骨骨髓中骨髓细胞:红细胞比率(施用0.25mg基质/kg/剂QW的单一雌性)。
- [0859] TK参数的总结呈现在表33中。
- [0860] 表33. 在4周毒性研究(无恢复期)中在口服给药后在狗中化合物A的平均毒代动力学参数的总结

[0861]

区间 (天)	剂量水平 (mg基质/kg/剂)	性别	C _{max} (ng/mL)	AUC ₀₋₉₆ (ng·hr/mL)
1	0.125	M	5.81	114
		F	5.77	127
		组合的性别	5.79	120
	0.25	M	11.9	335
		F	12.1	343
		组合的性别	12.0	339
	0.5 ^a	M	24.0	762
		F	26.6	729
		组合的性别	25.3	746
15	0.125	M	4.89	107
		F	5.54	141
		组合的性别	5.26	127
	0.25	M	10.5	302
		F	11.5	272
		组合的性别	11.0	287
	0.5 ^a	M	22.7	653
		F	21.4	618
		组合的性别	22.0	636

[0862] AUC₀₋₉₆ = 在从时间零到96小时的血浆浓度曲线下的面积; C_{max} = 最大血浆浓度; F = 雌性; hr = 小时; M = 雄性; Q2W = 每两周一次; QW = 每周一次。

[0863] ^a施用0.5mg基质/kg/剂的动物被以Q2W方式给药4周(总共2个剂量)。其他组以QW给药。

[0864] 在第1天,暴露于化合物A随着剂量水平从0.125增加至0.5mg基质/kg/剂而增加,并且平均C_{max}和AUC₀₋₉₆值的增加近似剂量成比例的。在第15天,暴露于化合物A随剂量水平从0.125mg基质/kg/剂QW增加至0.5mg基质/kg/剂Q2W而增加,并且增加是近似剂量成比例的。未观察到平均C_{max}和AUC₀₋₉₆值的一致的性别差异。多次给药后未观察到化合物A的积累。

[0865] 基于在0.25mg基质/kg/剂(QW施用)单个雌性和在0.5mg基质/kg/剂单个雄性(Q2W施用)的不利显微镜发现(回肠和/或盲肠中的炎症),QW施用NOAEL被认为是0.125mg基质/kg/剂,分别对应于5.26ng/mL和127ng·hr/mL的组的第15天平均C_{max}和AUC值。未确定Q2W施用NOAEL(即<0.5mg基质/kg/剂)。对于QW给药,HNSTD为0.25mg基质/kg/剂QW,分别对应于11.0ng/mL和287ng·hr/mL的组的第15天平均C_{max}和AUC值。对于Q2W施用,HNSTD为0.5mg基质/kg/剂,分别对应于22.0ng/mL和636ng·hr/mL的组的第15天平均C_{max}和AUC值。

[0866] 实施例4:体外基因毒性

[0867] 在存在和不存在S9外源性哺乳动物代谢激活系统下,发现化合物A在细菌回复突

变测定(使用鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*) TA98和TA100菌株)中直至最大测试浓度为500µg/mL的致突变性为阴性。

[0868] 实施例5. 在小鼠中的探索性毒性研究

[0869] 此研究的目的是确定化合物A在两种不同剂量时间表中通过口喂施用至雄性和雌性CD-1小鼠时的耐受性和TK。一个时间表由以下组成:连续5天给药,然后是2天给药假期,然后另外连续5天给药(5days on/2days off);并且另一个时间表由以下组成:在第1、3、5、8、10和12天给药(QODx3/周)。在施用最终剂量后第二天将动物处死。

[0870] 将化合物A以5days on/2days off的时间表以0、10、30或60mg/kg/剂的剂量水平施用至6只小鼠/性别/组的组;或以QOD时间表以60mg/kg/剂来施用。包括了额外的动物用于TK评价。

[0871] 除了单个TK动物之外,所有小鼠存活直至被安排的处死。灌胃创伤被证实是TK动物发病的原因;因此,这种早期死亡被认为不是化合物A相关的。

[0872] 在5days on/2days off时间表,在所有剂量水平注意到体重增加或体重减轻的轻微剂量依赖性的减少。在60mg/kg/剂,与5days on/2days off时间表相比,在QOD时间表的体重增加的减少较不严重。在本研究过程中没有注意到与测试制品相关的临床观察结果。

[0873] 在施用化合物A的雄性和雌性小鼠中注意到几种血液学参数的变化。

[0874] 在研究结束时,在所有剂量水平的小鼠中循环血小板减少。相比于60mg/kg/剂5days on/2days off,在施用60mg/kg/剂QOD的小鼠中该影响轻微减少。在10mg/kg/天5days on/2days off,第8天血小板增加>2倍(在2天给药假期后并与第一给药期结束时相比);到第二给药期结束时,血小板水平与其他化合物A治疗组的小鼠血小板水平相似。平均血小板体积的增加(表明再生性血小板生成)通常伴随着研究结束时所有剂量水平的血小板减少,其中在60mg/kg/剂具有最大响应。

[0875] 红细胞参数(RBC计数、血细胞比容和血红蛋白)通常在30和60mg/kg/剂5days on/2days off减少。在5days on/2days off时间表在所有剂量水平通常注意到网织红细胞计数和百分比的剂量依赖性减少。在60mg/kg/剂QOD,对RBC和/或网织红细胞参数的影响不明显。

[0876] 与同时的对照和研究前值相比,在按照5days on/2days off时间表的在所有化合物A治疗组中注意到嗜中性粒细胞计数的剂量依赖性减少,最大减少为约90%。在按照QOD时间表的60mg/kg/剂,与同时对照相比,减少范围从66%(雌性)至83%(雄性)。

[0877] 单核白细胞在所有剂量水平增加,其中在30和60mg/kg/剂,5dayson/2days off具有最大影响。尽管数据是高度可变的,但大多数小鼠的嗜碱性粒细胞计数表现出在60天/kg/剂5days on/2days off增加。

[0878] 化合物A相关的微观变化存在于胸骨(骨和骨髓)、股骨(骨髓)和脾中。

[0879] 在按照5days on/2days off时间表施用化合物A的小鼠胸骨骨髓中,在60mg/kg/剂观察到小鼠的梗塞,并且大多数小鼠在30mg/kg/剂观察到梗塞。受影响动物的发病率和受影响的胸骨节数量均具有剂量响应。受影响的胸骨节也显现出最小到轻度的骨膜编织骨(perosteal woven bone)形成。在以5days on/2days off给药60mg/kg/剂的1只雄性和2只雌性小鼠和给药30mg/kg/剂的1只雄性小鼠的股骨中,干骺端骨干(subphyseal diaphysis)中存在轻度髓质纤维化。在脾中,在30或60mg/kg/剂5days on/2days off,红髓

中存在最小至中等骨髓形成的增加,与这些组中的脾重量增加(高达2倍)相关。在10mg/kg/剂的1只雄性中,注意到最小脾骨髓形成。(在施加60mg/kg/剂5days on/2days off的个体的胸腺皮质中和在施加30mg/kg/剂的单个雌性中注意到轻度或中度淋巴消耗。)淋巴细胞凋亡的最小增加存在于以5days on/2days off施加60mg/kg/剂的偶然雄性的下颌和肠系膜淋巴结的生发滤泡中。胸腺和淋巴结的变化被认为是非特异性的,并且与受影响动物的一般应激反应一致。

[0880] 总之,未观察到TK的一致性别差异。在雄性和雌性中,全身暴露(AUC₀₋₂₄和C_{max})随着剂量在第1天和第12天从10至60mg/kg/剂而增加。重复给药化合物A后,未观察到积累。最小的化合物A相关的影响在10mg/kg/剂(5days on/2days off)的小鼠中被注意到,并且通常包括体重增加减少、循环血小板减少、嗜中性粒细胞减少症、网织红细胞减少以及单个雄性中脾骨髓细胞生成的最小增加。按5days on/2days off给药时间表,30和60mg/kg/剂的化合物A相关的小鼠影响通常包括体重减轻、循环血小板减少、RBC参数(RBC、血细胞比容、血红蛋白、网织红细胞)减少、嗜中性粒细胞减少症、单核白细胞增多和胸骨(骨膜编织骨形成)、胸骨骨髓(梗塞)、股骨(髓质纤维化)和脾(骨髓形成增加)中的微观效应。60mg/kg/剂QOD引起体重增加减少,血小板和嗜中性粒细胞减少以及单核白细胞增加。与5days on/2days off时间表的小鼠相比,这些效应的程度降低。

[0881] 实施例6:狗中的探索性毒性研究

[0882] 此研究的目的是确定化合物A在按照2种不同给药时间表通过口喂施用至首次用于实验的雄性和雌性比格犬时化合物A的耐受性和TK。比较的时间表由以下组成:在第1、3、5、8、10和12天给药(QODx3/周)或连续给药5天,然后是2天给药假期,然后另外连续给药5天(5days on/2days off)(Report SW14-1929)。在施用最终剂量后第二天使动物处死。

[0883] 将化合物A以0、0.25、0.5或1.0mg/kg/剂QOD或0.5mg/kg/剂5dayson/2days off的剂量水平施用于2只狗/性别/组的组。

[0884] 由于不良临床体征(严重活动减退、呼吸率减少、触摸变凉)、体重减轻(10.8%)和食物消耗减少,在第12天傍晚一只以5days on/2days off施加0.5mg/kg/天的雌性狗在濒死状况下被处死。显微镜发现与对明显血小板减少(在此犬的第9天至第12天注意到)的响应基本一致并且包括在各种组织内的出血,包括腋窝、下颌和肠系膜淋巴结、胃固有层和膀胱的粘膜下层。此外,此动物中存在肝细胞萎缩,可能继发于厌食/体重减轻。还存在中等胸腺淋巴消耗,与淋巴细胞减少的血液学观察结果相关,并且可能继发于该动物的一般应激。濒死被认为是化合物A相关的。

[0885] 所有其他狗存活至在第13天被安排的处死。主要在以5days on/2days off以0.5mg/kg/剂的个体狗中注意到化合物A相关的体重减轻。在所有剂量水平和时间表中,食物消耗减少主要在雌性被注意到;在研究的最后两天中,仅在以5days on/2days off施用0.5mg/kg/剂的一个雄性存在食物消耗减少。

[0886] 异常临床观察结果通常在第11天至第13天在以1mg/kg/剂QOD或以5days on/2days off施加0.5mg/kg/剂的动物中被注意到,并且主要由以下组成:在嘴唇、牙龈、阴囊、腹部和乳腺周围的瘀点或瘀斑出血(或挫伤)。

[0887] 在大约第5天,在0.5mg/kg/剂(两种时间表)和1mg/kg/剂观察到血小板计数减少;在这些剂量水平,在大多数狗中计数在研究持续时间继续减少至低于25,000/ μ L(显著的血

小板减少)。在0.25mg/kg/剂血小板计数没有减少。在研究结束时以QOD施用1mg/kg/剂或以5days on/2days off施加0.5mg/kg/剂的一些动物中注意到RBC参数(RBC计数、血细胞比容和血红蛋白)的轻微减少。白细胞计数(主要是嗜中性粒细胞)在研究结束时通常仅在1mg/kg/剂QOD或0.5mg/kg/剂5days on/2days off的雌性中减少。

[0888] 虽然一定程度上可变,但也注意到单核白细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞的一些变化。单核白细胞和嗜碱性粒细胞通常在1mg/kg/剂QOD或0.5mg/kg/剂5days on/2days off减少,并且在个体狗中在0.25和0.5mg/kg/剂QOD减少。在一些狗中,这种影响在研究结束时得以维持;然而,存在在其中注意到反弹影响的若干只狗,在第12天和第13天,单核白细胞计数显著增加。嗜酸性粒细胞数据在雌性中高度可变,但在研究的后半段期间,嗜酸性粒细胞计数的剂量依赖性减少通常在雄性中被注意到。在施用0.5和1mg/kg/剂的大多数狗中也观察到减少的血清钾、钙和磷水平。

[0889] 化合物A相关的显微镜发现主要在0.5和1mg/kg/剂存在。与雌性相比,化合物A相关的显微镜发现通常在雄性的更多的组织中发生,或者更严重。在1mg/kg/剂QOD或0.5mg/kg/剂5days on/2days off,发现存在于胃肠道中(胃/回肠中的出血和/或粘膜溃疡以及盲肠中的亚急性炎症),骨髓(血细胞生成减少),和/或在各种组织(结肠、下颌、肠系膜、宫颈、腹股沟和/或腿弯部淋巴结、附睾、肝、睾丸、胸腺和阴囊皮肤、胸腺纵隔(perithymic mediastinum)和/或乳腺[皮肤])中展现出出血性变化。一个在0.5mg/kg/剂QOD的雄性示出在下颌和肠系膜淋巴结中的出血的迹象。被认为是继发于一般压力和/或厌食的发现在1mg/kg/剂QOD或0.5mg/kg/剂5days on/2days off被注意到,包括肝细胞萎缩、胰腺腺泡细胞萎缩和胸腺皮质淋巴消耗(还在0.5mg/kg/剂QOD注意到)。

[0890] 暴露(AUC₀₋₂₄和C_{max})在第1天和第12天从0.25至1mg/kg/剂的剂量成比例地增加。在雄性和雌性之间暴露是相当的,并且未观察到TK参数一致的性别差异。重复给药后,当使用QOD时间表时未注意到积累,而在QD X 5时间表后注意到约2至3倍的积累。在0.25mg/kg/剂QOD在狗中通常没有化合物A相关的影响。在0.5mg/kg/剂QOD,主要发现是肠系膜和下颌淋巴结中明显的血小板减少和急性出血。在1mg/kg/剂QOD,发现通常由以下组成:明显的血小板减少,RBC参数的轻微减少,单核白细胞和嗜碱性粒细胞水平的改变,以及显微镜发现(包括胃肠道中的出血和/或粘膜溃疡,骨髓中的血细胞生成减少和许多组织(结肠、下颌、肠系膜、宫颈、腹股沟和/或腿弯部淋巴结、附睾和睾丸、肝脏、胸腺、阴囊皮肤、胸腺纵隔和/或乳腺[皮肤])中的出血性变化。在0.5mg/kg/剂5days on/2days off,发现包括在1mg/kg/剂QOD描述的那些以及个体的体重减轻和在第12天一个雌性濒死的处死。

[0891] VII. 药物剂型的制备

[0892] 实施例1:口服胶囊

[0893] 化合物A胶囊可以适当的强度和胶囊大小获得,仅含有不透明的硬壳胶囊中的活性药物成分。胶囊中不使用赋形剂。

[0894] VIII. 用于治疗复发性和/或难治性实体瘤(包括神经内分泌癌(NEC))和非霍奇金淋巴瘤(NHL)的方法

[0895] 实施例1:患者施用

[0896] 研究化合物A-ST-001是化合物A在患有复发性和/或难治性实体瘤(富含NEC)和非霍奇金淋巴瘤(NHL)的受试者中进行的开放标签、1期、剂量递增和扩展、首次人体(FIH)临

床研究。研究的剂量递增部分(A部分)将探讨化合物A的递增的口服剂量以估计化合物A的MTD。利用控制过量的递增(escalation with overdose control, EWOC)的贝叶斯逻辑回归模型(BLRM)将有助于指导化合物A剂量递增决定,其中最终决定由安全性审查委员会(SRC)做出。扩展部分(部分B)将进一步评价在MTD或低于MTD施用的化合物A在各约20个可评价受试者的选定扩展群组中的安全性和功效,以便进一步定义RP2D。可以选择一种或更多种给药方案和/或疾病子集用于群组扩展(B部分)。

[0897] A部分和B部分将由3个时期组成:筛查、治疗和随访。

[0898] 筛查期

[0899] 筛查期在化合物A的第一剂量之前28天(±3天)开始。知情同意书(ICD)必须由受试者和管理人员在任何其他研究程序开始之前签名并注明日期。所有筛查试验和程序必须在化合物A的第一剂量前28天(±3天)内完成。

[0900] 治疗期

[0901] 在治疗期间,化合物A最初可以在每个4周(28天)周期中每周一次口服施用。在A部分和B部分中,化合物A可以每周一次在过夜禁食持续≥6小时后在早晨空腹(即早餐前≥1小时)与至少240mL水一起施用。

[0902] 随访期

[0903] 在随访期,对于安全性,在测试化合物或药物组合物的最后一次给药之后,受试者将被随访28天(±3天)。在安全性随访探视后,所有受试者随后经受每3个月(±2周)的存活随访,直至2年或直至死亡、失访或试验结束,以先发生者为准。

[0904] 受试者标准

[0905] 受试者必须满足以下标准才能在研究中被招募:

[0906] 1. 在签署知情同意书(ICD)时,受试者是≥18岁的男性或女性。

[0907] 2. 在进行任何与研究相关的评估或程序之前,受试者必须理解并自愿签署ICD。

[0908] 3. 受试者愿意并且能够遵守研究探视时间表和其他协议要求。

[0909] 4. 受试者患有组织学或细胞学证实的晚期不可切除的实体瘤(包括小细胞肺癌(SCLC)和其他神经内分泌癌(NEC))或非霍奇金淋巴瘤(NHL)(弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)和惰性非霍奇金淋巴瘤(iNHL))。

[0910] ——根据世界卫生组织(WHO)分类的适当病理特征

[0911] ——神经内分泌标志物(例如,突触素或嗜铬粒蛋白A)的表达

[0912] ——血清胃泌素释放肽前体(Pro-GRP)或嗜铬粒蛋白A(CgA)高于正常范围或对于甲状腺髓样癌(MTC)受试者而言升高的降钙素或对于胰腺或小肠NEC受试者而言升高的胰抑制素。

[0913] 某些NEC肿瘤类型的具体另外的标准如下:

[0914] 小细胞肺癌(SCLC);

[0915] -根据2015年WHO分类的SCLC的组织学或细胞学确认;或

[0916] -SCLC的免疫组织化学提示,诸如AE1/AE3阳性细胞质染色、NCAM(CD56)阳性、嗜铬粒蛋白阳性、突触素阳性、TTF1阳性和如在不确定病例中由Ki-67展示的高增殖活性。准许组合的SCLC。

[0917] 大细胞神经内分泌癌(LCNEC);

- [0918] ——根据2015年WHO分类的LCNEC的组织学确认
- [0919] ——免疫组织化学>10%对CD56、嗜铬粒蛋白或突触素为阳性的肿瘤细胞。准许组合的LCNEC。
- [0920] EGFR突变型肺癌的神经内分泌变体；
- [0921] ——已知的EGFR突变
- [0922] ——在先前表皮生长因子(EGFR)抑制剂时/之后的进展
- [0923] ——根据2015年WHO分类的SCLC的组织学或细胞学确认
- [0924] ——SCLC的免疫组织化学提示,诸如AE1/AE3阳性细胞质染色、NCAM(CD56)阳性、嗜铬粒蛋白阳性、突触素阳性、TTF1阳性和如在不确定病例中由Ki-67展示的高增殖活性。
- [0925] ——如果血清Pro-GRP或CgA高于正常范围,则患有混合性腺神经内分泌癌(MANEC)的受试者(其具有至少30%的腺癌和30%的NEC)是合格的。
- [0926] 甲状腺髓样癌(MTC)；
- [0927] ——先前确认的不可切除、局部晚期或转移性遗传性或散发性MTC的细胞学或组织学诊断
- [0928] ——MTC的免疫化学提示,包括降钙素的阳性染色
- [0929] ——先前用凡德他尼(vandetanib)和/或卡赞替尼(cabozantinib)治疗后记录的疾病进展
- [0930] ——除非没有其他病灶,否则基线处的钙化病灶不应用作在基线处的靶病灶。
- [0931] ——高于正常范围的降钙素水平
- [0932] 神经内分泌前列腺癌(NEPC)；
- [0933] ——由免疫化学支持的转移性前列腺癌和小细胞或神经内分泌前列腺癌的组织学诊断的至少一种。
- [0934] ——前列腺腺癌的组织学诊断加上神经内分泌标志物(嗜铬粒蛋白、突触素、CD56或神经元特异性烯醇化酶(NSE))的>50% IHC染色
- [0935] ——在由PCWG3定义的前列腺特异性抗原(PSA)进展的不存在下肝转移的发展
- [0936] ——具有纯神经内分泌或小细胞癌的组织学证据的患者不需要已经接受先前的雄激素剥夺治疗或睾酮的阉割水平,但是其睾酮状态应在研究持续时间内保持。其他受试者必须已经接受手术或持续的医学阉割,并且基线血清睾酮水平<50ng/dL或<1.73nmol/L。
- [0937] 神经内分泌胰腺癌；
- [0938] ——神经内分泌胰腺癌的病理诊断(Klimstra WHO Classification 2010),具有支持性免疫化学
- [0939] ——在周期1,第1天之前≤12个月,放射学疾病进展的证据
- [0940] ——在周期1,第1天之前≤3个月,没有受体靶向放射性标记治疗
- [0941] ——在周期1,第1天之前≤4周,没有肝脏定向治疗
- [0942] ——如果血清Pro-GRP或CgA或胰抑制素高于正常范围,则患有混合性腺癌的受试者是合格的。
- [0943] 神经内分泌肝细胞癌(NEHCC)
- [0944] ——组织学或细胞学证实的NEHCC,伴随支持性免疫化学
- [0945] ——如果受试者有门静脉高压,血小板计数 $\geq 75 \times 10^9/L$ ($\geq 75,000/mm^3$),否则血

小板计数 $\geq 100 \times 10^9/L$ ($\geq 100,000/mm^3$)

[0946] ——Child-Pugh评分 <7 (即A级肝功能)

[0947] ——BCLCC晚期疾病

[0948] ——从 α -干扰素和/或利巴韦林的最后给药起至少4周

[0949] ——从之前经皮乙醇注射、射频消融、经动脉栓塞或冷冻治疗起至少4周, 伴随记录进展性或复发的疾病。

[0950] ——在肝外按照RECIST 1.1的可测量疾病或在适用于重复测量并示出肿瘤内动脉增强的三阶段相差增强肝脏计算机断层扫描 (CT) 或磁共振成像 (MRI) 上的按照RECIST 1.1的可测量疾病。在肝中划分不良或示出非典型增强的病灶应被记录为非靶病灶。

[0951] ——没有先前的肝移植。

[0952] ——在之前3个月内没有需输血或内镜或手术干预的胃肠道或静脉曲张出血。

[0953] ——无脑病史或当前脑病。

[0954] ——目前没有临床上显著的腹水 (即, 不易用利尿剂控制)。

[0955] 可以登记其他NEC诸如merkel细胞癌、神经内分泌结肠直肠癌和神经内分泌黑色素瘤。此外, 如果他们已经记录生长抑素类似物和雷帕霉素 (mTOR) 抑制剂的先前哺乳动物靶标的先前治疗时或之后的进展, 则可以登记NEN G2 (每10个高倍视野 (HPF) 的有丝分裂计数2-20和/或3%-20% Ki67指数)。然而, 病理学和免疫化学必须确认神经内分泌元素和病理诊断, 并且受试者必须具有高于正常范围的血清胃泌素释放肽前体 (Pro-GRP) 或嗜铬粒蛋白A (CgA)。

[0956] 5. 受试者必须已经在标准抗癌治疗时或之后进展 (或由于医学合并症或不可接受的毒性而无法耐受), 或对于受试者, 没有其他经批准的常规治疗存在或可接受。

[0957] 6. 按照RECIST 1.1具有至少一个可测量疾病部位的具有实体瘤的受试者, 按照IWG标准具有至少一个可测量疾病部位的具有NHL的受试者和按照mRECIST具有至少一个可测量疾病部位的具有神经内分泌肝细胞癌 (NEHCC) 的受试者。

[0958] 7. 受试者同意B部分的强制性肿瘤活检 (筛查和治疗时)。只要安全可行, 肿瘤活检将在A部分收集。

[0959] 8. 受试者的东部肿瘤协作组 (Eastern Cooperative Oncology Group, ECOG) 体能状态为0至1。

[0960] 9. 受试者必须具有以下实验室值:

[0961] ——在无生长因子支持7天 (如果受试者接受pegfilgastrim, 则为14天) 下绝对中性粒细胞计数 (ANC) $\geq 1.5 \times 10^9/L$ 。

[0962] ——血红蛋白 (Hgb) $\geq 10g/dL$ ($\geq 100g/L$ 或 $>6.2mmol/L$)。

[0963] ——对于在未经输血7天情况下具有门静脉高压的NEHCC受试者, 血小板计数 (plt) $\geq 100 \times 10^9/L$ (对于NHL受试者 $\geq 50 \times 10^9/L$) 或 $\geq 75 \times 10^9/L$ 。

[0964] ——血清钾浓度在正常范围内, 或用补充剂可纠正。

[0965] ——血清天冬氨酸氨基转移酶 (SGOT) AST/SGOT和丙氨酸氨基转移酶 (SGPT) ALT/SGPT $\leq 3.0x$ 正常上限 (ULN) 或 $\leq 5.0x$ ULN (如果存在肝转移)。

[0966] ——血清总胆红素 $\leq 1.5x$ ULN。

[0967] ——受试者必须具有血清白蛋白 $\geq 3.5g/dL$

- [0968] 对于患有肝细胞癌(HCC)的患者,足够肝功能包括:
- [0969] ——血清AST和ALT $\leq 5x$ ULN
- [0970] ——血清总胆红素 $\leq 3\text{mg/dL}$ ($\leq 51\mu\text{mol/L}$)
- [0971] ——血清白蛋白 $\geq 3.0\text{g/dL}$
- [0972] ——使用外源过滤标志物诸如碘海醇、菊粉、 ^{51}Cr EDTA或 ^{125}I 碘酞酸盐,血清肌酐 $\leq 1.5 \times \text{ULN}$,或测量的肌酐清除率 $\geq 50\text{mL/min/1.73m}^2$ 。
- [0973] ——在正常范围内的凝血酶原时间(PT)(或国际标准化比率(INR))和活化部分凝血酶原激酶时间(APTT)。
- [0974] 10.有生育潜力的女性(FCBP)1必须:
- [0975] ——在整个研究中从签署ICD起,并持续至在测试化合物或药物组合物的最后一次给药后的90天,承诺真正禁止异性接触(必须每月检查并记录来源)或同意使用并能够遵守至少两种有效的避孕方法(口服、注射或移植式激素避孕药;输卵管结扎;子宫内装置;屏障避孕药与杀精剂;或输精管切除伴侣),其中一个必须是屏障;并且在开始测试化合物或药物组合之前,具有由调查员已经验证的两次阴性妊娠测试:
- [0976] ——在筛查时血清妊娠测试阴性(灵敏度为至少 25mIU/mL)
- [0977] ——在研究治疗的周期1第1天之前72小时内的阴性血清或尿妊娠测试。
- [0978] ——在测试化合物或药物组合物的最后给药后避免怀孕持续90天。
- [0979] ——同意在研究过程中和研究治疗结束后进行持续妊娠测试。即使受试者实行对异性接触的真正禁欲,这也适用。
- [0980] 11.从签署ICD起,在参与研究时,在剂量中止期间,以及在停止施用试验化合物或药物组合物后至少90天,即使他已经成功进行输精管切除术,男性必须实行真正的禁欲(这必须每月审查)或同意在与怀孕女性或FCBP性接触时使用安全套(建议使用乳胶安全套),并避免受孕。
- [0981] 排除标准:
- [0982] 以下任何一项的存在将排除受试者的招募:
- [0983] 1.排除低级别(G1)神经内分泌肿瘤($\leq 2/\text{高倍视野(HPF)}$ 和/或 $\leq 2\% \text{Ki67}$ 指数)诸如良性肿瘤。
- [0984] 2.在签署ICD之前,受试者已接受抗癌治疗(批准或研究性) ≤ 4 周或5个半衰期,以较短者为准。
- [0985] ——对于先前亚硝基脲或丝裂霉素C < 42 天
- [0986] 3.在开始用测试化合物或药物组合物治疗之前,先前全身癌症治疗产生的毒性必须已经恢复至 \leq 美国国家癌症研究所(National Cancer Institute,NCI)不良事件通用术语标准(Common Terminology Criteria for Adverse Events,CTCAE)1级(2级外周神经病和脱发除外)。
- [0987] 4.在第一剂量前的先前ASCT ≤ 3 个月或未恢复。
- [0988] 5.在标准或降低强度的调制下的先前同种异体干细胞移植。
- [0989] 6.受试者在签署ICD之前 ≤ 4 周内接受大手术或 ≤ 2 周内接受小手术或未从手术中恢复。
- [0990] 7.受试者在签署ICD前 < 4 周内完成任何放射治疗,或者对于缓和性骨放射治疗

(单个部分) <2周内完成任何放射治疗。具有>25%的骨髓性BM照射的受试者不被允许在此研究中被招募。

[0991] 8. 受试者因吸收不良综合征(诸如乳糜泻或炎症性肠病) \geq NCI CTCAE2级(尽管有医学管理)或任何其他可影响测试化合物或药物组合物吸收的显著胃肠道疾病而持续性腹泻。

[0992] 9. 有症状或未控制的溃疡(胃或十二指肠)的受试者,特别是那些有穿孔和胃肠道出血历史和/或有穿孔和胃肠道出血风险的受试者。

[0993] 10. 第一剂量前4周内出现任何出血/出血事件>CTCAE2级或咯血>1茶匙的受试者

[0994] 11. 有症状或未治疗或不稳定的中枢神经系统(CNS)转移。

[0995] ——最近用全脑放射或立体定向放射外科手术治疗CNS转移的受试者必须在周期1第1天前至少4周完成治疗,并进行随访脑CT或MRI,其展示在完成放射治疗后4周或更长时间后稳定或改善转移(后者将作为筛查评估的一部分获得)。

[0996] ——受试者必须是无症状和远离类固醇或处于稳定剂量的类固醇至少4周(\leq 10mg/天泼尼松当量)

[0997] 12. 具有间质性肺病(ILD)史或需要口服或静脉内(IV)类固醇的肺炎病史的SCLC受试者

[0998] 13. 受试者患有已知症状性急性或慢性胰腺炎。

[0999] 14. 受试者的心脏功能受损或具有临床上显著的心脏疾病,包括以下任何一种:

[1000] ——通过多门控采集扫描(MUGA)或超声心动图(ECHO)确定的左心室射血分数(LVEF) <45%。

[1001] ——完全左束支或双分支阻滞。

[1002] ——先天性长QT综合征。

[1003] ——持续或临床意义的室性心律失常或心房颤动。

[1004] ——在筛查ECG时QTcF \geq 480msec(一式三份记录的平均值)。

[1005] ——在开始化合物A之前 \leq 6个月的不稳定型心绞痛或心肌梗塞。

[1006] 15. 受试者患有其他临床上显著的心脏病,诸如需要治疗的充血性心力衰竭或不受控制的高血压(血压 \geq 160/95mmHg)。

[1007] 16. 受试者是怀孕或哺乳的女性。

[1008] 17. 受试者患有已知人类免疫缺陷病毒(HIV)感染。

[1009] 18. 受试者患有已知慢性活动性乙型肝炎或丙型肝炎病毒(HBV、HCV)感染。

[1010] ——由于HBV疫苗接种而血清反应阳性的受试者是合格的。

[1011] ——没有活跃的病毒感染并且正在充分预防HBV再激活的受试者是合格的。

[1012] ——患有HCC的受试者不受上述标准的约束

[1013] 19. 进行用慢性治疗剂量的抗凝血剂(例如,华法林、低分子量肝素、因子Xa抑制剂、凝血酶拮抗剂)进行治疗的受试者。通过调查员仔细考虑,对先前PE和DVT的受试者,准许低剂量低分子量肝素用于导管维持和短期预防。

[1014] 20. 受试者患有需要积极持续的全身治疗的并发第二癌症的病史。

[1015] 21. 受试者患有任何重大的医疗状况(例如,活动性或不受控制的感染或肾脏疾病),实验室异常或精神疾病,这些在如果他/她参加研究时将阻止受试者参与研究(或危及

顺应性),或将使受试者处于不可接受的风险中。

[1016] 22. 受试者患有会使解释来自研究的数据的能力混淆的任何状况。

[1017] A部分剂量递增

[1018] 将在每个剂量水平招募最少3名受试者。初始化合物A剂量为每周一次1.25mg。具有EWOC的BLRM将纳入可用的先前安全性信息,并在每个新受试者群组完成周期1后更新模型参数。用于下一次剂量的决定将由SRC基于使用BLRM的风险评估计算和可用的安全性(即DLT和非DLT安全性数据)、PK、PD和初步功效信息做出。此外,可以在评估中使用相关的非临床数据(例如,GLP(良好实验室实践)毒性研究,来自异种移植物模型的体内药理学等)。附录E提供统计方法的详细情况。

[1019] 在所有决定时间点,BLRM准许基于观察到的DLT改变剂量增量;然而,用于下一群组的剂量不会超过先前剂量的100%增加。MTD是其中用化合物A治疗的小于33%的人群(不是来自人群的样品)在第一周期中遭受DLT的最高剂量,其中至少6个可评价的受试者已经以此剂量被治疗。SRC将做出关于用于每个群组的化合物A剂量的最终决定。

[1020] 在剂量递增期间,在满足以下条件后,化合物A剂量可以被宣布为MTD:

[1021] • 至少6名可评价的受试者已在该剂量被治疗,

[1022] • 在该剂量位于目标区间(16-33%)的DLT率的后验概率超过60%或在后验概率接近但不超过60%时足够数量的受试者已进入研究以确保MTD估计的准确度,并且

[1023] • 该剂量根据BLRM被推荐,并经SRC批准。

[1024] SRC可以基于出现的安全问题随时终止剂量递增而不建立MTD。SRC将包括调查员(和/或指定代表)、赞助商的研究医生、安全医生、研究统计员和研究管理者。临时与会者可包括研究药代动力学家、研究生物标志物科学家和研究临床科学家。必要时,SRC可以咨询其他内部和外部专家。

[1025] 在SRC会议上做出的所有决定将被正式记录(经由SRC会议纪要)并以书面形式分发到所有场所。在向各SRC决定的所有参与场所发出书面通知之前,不会开始剂量递增、递减、改变给药时间表或扩展现有剂量群组。

[1026] 还将由SRC基于BLRM评估及其对可用安全性(即DLT和非DLT数据)、PK、PD和初步功效信息的审查来确定评价剂量群组内的另外受试者、更高剂量群组、中间剂量群组、更小剂量增量、替代给药时间表(例如,每隔一周一次)或宣布MTD的决定。最终决定将由SRC做出。

[1027] 在剂量递增期间在任何群组中施用第一剂量后,在下一剂量群组可以开始之前观察每个群组中的受试者28天(周期1,DLT窗口)。在给定的剂量递增群组中,每天不超过一个受试者被招募。对于DLT可评价的受试者定义为这样的受试者:

[1028] • 在周期1期间,已接受化合物A总计划剂量的 $\geq 75\%$ 而不经历DLT,

[1029] 或

[1030] • 在接受至少一个剂量的化合物A后经历DLT。

[1031] 将替换不可评价DLT的受试者。

[1032] 在初始剂量水平期间,患有复发性和难治性实体瘤和NHL的受试者将被招募,直到在周期1中第2次出现 ≥ 2 级研究药物相关毒性。然后招募将限于患有小细胞肺癌(SCLC)和其他神经内分泌癌(NEC)的受试者,其分泌胃泌素释放肽前体(Pro-GRP)或嗜铬粒蛋白A(CgA)或胰抑制素(对于胰腺和小肠NEC)或降钙素(对于甲状腺髓样癌(MTC))。

[1033] 在DLT评估期间将不允许受试者内剂量递增;然而,在 ≥ 3 的周期中,耐受其指定剂量的化合物A的无疾病进展证据的受试者可以(由调查员自行决定并与赞助商的研究医生协商并达成协议)递增至在此研究中示出由至少一个群组的受试者充分地耐受(即基于BLRM评估,过量风险小于25%)的最高剂量水平。

[1034] B部分-群组扩展

[1035] 在完成剂量递增(A部分)之后,可以将选择的肿瘤群组招募至扩展阶段(B部分)中,每个阶段具有约20个可评价的受试者。基于对来自A部分的可用安全性,PK,PD和功效数据的审查,可以在剂量递增阶段建立的MTD和时间表和/或在替代的可耐受剂量和时间表进行扩展。SRC将为群组扩展选择感兴趣的剂量和时间表。可以选择一种或更多种给药方案用于群组扩展。SRC将继续在整个研究过程中定期审查安全性数据,并视情况而提出有关研究继续和剂量调整的建议。

[1036] 该研究将遵循国际协调会议(ICH)/良好临床实践(GCP)(International Conference on Harmonisation(ICH)/Good Clinical Practices(GCPs))进行。

[1037] 研究人群

[1038] 在本研究中招募患有复发性和/或难治性实体瘤(富含NEC)和NHL(DLBCL和iNHL)的18岁或18岁以上的男性和女性。

[1039] 研究时长

[1040] 预计招募需要大约30个月才能完成(对于剂量递增,12至18个月,而对于扩展,9至12个月)。完成积极治疗和治疗后随访预计需要额外的4至28个月。整个研究预计持续约5年。

[1041] 如协议中预先规定的,试验结束被定义为完成治疗后随访的最后一个受试者的最后一次访问的日期,或者从需要初级、中级和/或探索性分析的最后一个受试者接收最后一个数据点的日期,以较晚的日期为准。

[1042] 研究治疗

[1043] Celgene Corporation(Celgene)将提供调查产品,用于口服给药的化合物A(仅含有剂量强度为0.50mg、0.75mg和2.00mg的活性药物成分)胶囊,根据有关国家卫生当局的规定适当地标记用于调查使用。

[1044] 如果存在临床上显著的疾病进展的证据、不可接受的毒性或受试者/医生决定退出,则可以中断研究治疗。

[1045] 关键功效评估概述

[1046] 每2个周期之后针对受试者评价功效直到周期6,然后每3个周期针对受试者评估功效。因疾病进展以外的原因而中断治疗、开始新的抗癌治疗或撤回对整个研究的同意的所有受试者将被追踪,直到新的全身抗癌治疗的进展和/或开始。

[1047] 肿瘤响应将由调查员确定。对于实体瘤,评估将基于实体瘤的响应评价标准(RECIST 1.1)(Eisenhauer,2009)。对于NHL,评估将基于国际工作组修订的恶性淋巴瘤响应标准(International Working Group Revised Response Criteria for Malignant Lymphoma)。需要[18F]氟脱氧葡萄糖(FDG)正电子发射断层扫描(PET)或FDG PET/CT成像来确认患有FDG-avid肿瘤的受试者的完全响应。对于神经内分泌前列腺癌(NEPC),响应评估将基于PCWG3标准。对于神经内分泌肝细胞癌(NEHCC),响应将基于mRECIST标准。神经内分

泌癌将另外具有在基线和研究中评估的神经内分泌标志物水平。

[1048] 关键安全性评估概述

[1049] 该研究的安全性变量包括不良事件,安全性临床实验室变量,12导联心电图,东部肿瘤协作组体能状态,左心室射血分数评估,体格检查,生命体征,研究治疗的暴露,合并用药的评估和对具有生育潜力的女性进行的妊娠测试。化合物A的PK曲线将从连续血液收集物确定。

[1050] 关键药代动力学评估概述

[1051] 针对化合物A确定的血浆PK参数将是观察到的最大血浆浓度 (C_{max}), 血浆浓度时间曲线下的面积 (AUC), 到最大血浆浓度的时间 (T_{max}), 终末半衰期 ($t_{1/2}$), 表观清除率 (CL/F) 和表观分布体积 (V_z/F)。可视情况进行暴露-响应分析,以协助鉴定用于B部分或2期研究的给药方案。

[1052] 统计方法

[1053] 此研究的主要目的是评价用化合物A治疗的安全性和耐受性,包括MTD的确定。用于估计MTD的分析方法是由EWOC原理指导的BLRM。

[1054] 根据需要或适用,通过剂量水平(A部分)和肿瘤群组(B部分)进行统计学分析。所有分析本质上都是描述性的。安全性数据的所有总结将使用接受任何化合物A的受试者(治疗人群)进行。

[1055] 将研究数据总结以用于处置、人口统计学和基线特征、暴露、功效、安全性、PK和PD。分类数据将通过频率分布(受试者的数量和百分比)进行总结,并且连续数据将通过描述性统计(平均值、标准差、中值、最小值和最大值)进行总结。

[1056] 治疗-紧急不良事件 (TEAE) 将由美国国家癌症研究所不良事件等级的常用术语标准 (National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Event grades) 总结。TEAE的频率将由监管活动医学词典 (Medical Dictionary for Regulatory Activities) 系统器官分类和优选术语制成表格。3级或4级TEAE、引起中断使用化合物A的TEAE、研究药物相关的TEAE和SAE将分别制成表格。将总结所选实验室分析物、生命体征、12导联ECG和ECHO/MUGA扫描从基线的变化。所有数据将呈现在逐个受试者列表中。

[1057] A部分的主要功效变量是临床受益率 (CBR)。CBR被定义为完全响应 (CR)、部分响应 (PR) 和持久稳定疾病 (SD) (持续时间 ≥ 4 个月的SD) 的肿瘤响应(由调查员评估)。将报告CBR的点估计值和95%置信区间。客观响应率(被定义为其最佳响应为完全响应或部分响应的受试者的百分比)、响应持续时间/稳定疾病、进展时间、无进展生存期和总生存期将使用分类变量的频率列表或到事件变量的时间的描述性统计进行总结。对受治疗人群和功效可评价人群(接受基线疾病评估评价、周期1中至少75%的指定剂量、以及研究疾病评估评价中的一个的受试者)重复进行功效分析,其中结果使用被认为是初级的治疗人群。

[1058] 在A部分剂量递增期间,将招募约50名受试者。在B部分剂量扩展期间,对于每个肿瘤群组,至少14个功效可评价的受试者将首先形成。如果观察到4个月或更长的响应者或SD,则肿瘤群组将扩展至约20名受试者。

[1059] 研究目标

[1060] 主要目标

[1061] 该研究的主要目标是:

- [1062] • 确定化合物A的安全性和耐受性。
- [1063] • 定义化合物A的最大耐受剂量 (MTD) 和/或推荐的2期剂量 (RP2D)。
- [1064] 次要目标
- [1065] 次要目标是
- [1066] • 提供有关化合物A的初步功效的信息。
- [1067] • 表征化合物A的药代动力学 (PK)。
- [1068] 探索目标
- [1069] 探索目标是：
- [1070] • 评价化合物A对外周血中以及 (如果有的话) 肿瘤样品中基因表达的PD影响。
- [1071] • 评价化合物A对来自NEC和SCLC受试者的血清中分泌的神经肽 (如Pro-GRP、CgA或降钙素) 水平的PD效应。
- [1072] • 探讨化合物A剂量、血浆暴露和选定临床终点 (例如, 毒性、初步活性和/或生物标志物的量度) 之间的关系。
- [1073] • 探讨肿瘤样品 (如果有的话) 中基因表达的基线、治疗中 (on-treatment) 和/或变化与临床响应之间的关系。
- [1074] • 只要足够数据可用, 表征血浆中化合物A的主要代谢物。
- [1075] • 来自探索性目标的数据可被包括在每个SAP的临床研究报告中 (统计分析计划)。
- [1076] 研究终点
- [1077]

终点	名称	描述	时间框架
主要	安全性终点	使用NCI CTCAE标准4.03版评价的DLT和MTD	剂量递增
次要	初步功效	由响应确定的临床受益率(CBR)和由疾病适当响应标准ORR、DOR和PFS确定的稳定疾病率	剂量递增和扩展

[1078]

	总体生存期	从第一剂量到因任何原因的死亡	剂量递增和扩展
	PK终点	化合物A的最大观察血浆浓度(C_{max})、血浆浓度时间曲线下的面积(AUC)、达到最大血浆浓度的时间(T_{max})、终末半衰期($t_{1/2}$)、表观清除率(CL/F)和表观分布体积(V_z/F)	剂量递增
探索的	PD终点	<ul style="list-style-type: none"> •外周血细胞成分中的基因表达 •肿瘤组织(如果有的话)中的基因表达 •来自NEC和SCLC受试者的血清中分泌的神经肽(如Pro-GRP、CgA、降钙素)水平 	剂量递增和扩展
	PK终点	<ul style="list-style-type: none"> •PK参数的临床相关协变量 •血浆中主要化合物A代谢物的鉴定 •暴露-响应关系 	

[1079] 研究设计

[1080] 研究化合物A-ST-001是化合物A在患有复发性和/或难治性实体瘤(包括NEC)和NHL的受试者中的开放标签、1a期、剂量递增和扩展、FIH临床研究。该研究的剂量递增部分(A部分)将探讨化合物A的递增口服剂量以估计化合物A的MTD。利用具有过量控制的递增(EWOC)的贝叶斯逻辑回归模型(BLRM) (Babb, 1998; Neuenschwander, 2008) 将帮助指导化合物A剂量递增决定, 其中最终决定由SRC做出。扩展部分(B部分)将进一步评价在各约20个可评价受试者的选定扩展群组中在MTD或低于MTD施用的化合物A的安全性和功效, 以进一步定义RP2D。可以选择一种或更多种给药方案和/或疾病子集用于群组扩展(B部分)。A部分和B部分将由3个时期组成: 筛查、治疗和随访期(参见图37)。

[1081] 该研究将遵循国际协调会议(ICH)关于人用药物的注册技术要求/良好临床实践(GCP)和适用的法规要求。

[1082] 受试者的研究持续时间

[1083] 预计招募需要大约30个月才能完成(剂量递增12-18个月, 以及扩展9-12个月)。完成积极治疗和治疗后随访预计需要额外的4至28个月。整个研究预计持续约5年。

[1084] 试验结束

[1085] 如协议中预先规定的, 试验结束被定义为完成治疗后随访的最后一个受试者的最后一次访问的日期, 或者从对于主要、次要和/或探索性分析所需的从最后一个受试者接收最后一个数据点的日期, 以较晚的日期为准。

[1086] 关于程序, 关于协议的问题应该针对医学监测员或指定人员。表34列出对在研究中被招募的每个受试者进行的程序:

[1087] 表34. 事件表

[1088]

	治疗期													随访期					
	周期1						周期2-4				周期5+			EOT	安全性 ^b	长期 ^c			
	筛查	WK1			WK 2	WK 3	WK 4	WK 1	WK 2	WK 3	WK 4	WK 1	WK 3						
事件 ^a	D-28至-1	C1	D1	D2	D3	D8	D15	D22	C1	D1	D8	D15	D22	C1	D1	D15	≤28天	28天(2天)	q3mo(:2 Wks)
研究进入																			
知情同意书	X																		
避孕咨询	X	X							X					X			X		
对任选的探索性分析的知情同意	X																		
纳入/排除标准	X																		
医学/肿瘤学历史和治疗	X																		
人口统计学	X																		
IRT登记	X	X	每个周期的第一天。请参考IRT说明手册。													X			
先前/合并用药、程序	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
研究药物																			
按照指定的给药时间表施用口服化合物A ^d		一周一次 注: 可基于SRC决定实施替代给药时间表。																	
提供/审查日记卡		X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
IP可说明性		X						X						X		X			
安全性评估																			

[1089]

	治疗期													随访期		
	周期1				周期2-4				周期5+		EOT	安全性 ^b	长期 ^c			
	筛查	WK1	WK2	WK3	WK4	WK1	WK2	WK3	WK4	WK1				WK3		
事件^a	D-28至-1	C1 D1	D2	D3	D8	D15	D22	C1 D1	D8	D15	D22	C1 D1	D15	≤28天	28天(2天)	q3mo(:2 Wks)
不良事件评价	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
身高	X															
体重	X								X (仅C2)	X	X (仅C2)			X		
生命体征									X (仅C2)	X	X (仅C2)					
身体检查	X	X						X				X				
ECOG PS	X	X						X				X				
B 症状评估 (仅NHL;	X	如临床所示											X			
12 导联 ECG (单次或三次) ^e	X (D1前 ≥72 小时)	X				X (仅D17)		X					X	X		
LVEF (ECHO/MUG A)	X	如临床所示											X (±7d)			
妊娠测试(仅FCBP)	X	X						X				X		X		
血液学实验室	X(D-14至-1)	X	X	X	X	X	X	X	X (仅C2)	X	X (仅C2)	X		X		
用LDH、尿酸测试的化学实验室	X(D-14至-1)	X		X	X	X	X	X	X (仅C2)	X	X (仅C2)	X		X		
甘油三酯和胆固醇(禁食)	X	X						X				X		X		
PTT (或 INR), PTT	X (D-14至-1)	X	如临床所示											X		

[1090]

事件 ^a	治疗期													随访期		
	筛查	周期1			周期2-4				周期5+		EOT	安全性 ^b	长期 ^c			
		WK1	WK 2	WK 3	WK 4	WK 1	WK 2	WK 3	WK 4	WK 1				WK 3		
	D-28至-1	C1 D1	D2	D3	D8	D15	D22	C1 D1	D8	D15	D22	C1 D1	D15	≤28天	28天(2天)	q3mo(:2 Wks)
淀粉酶、脂肪酶、T细胞亚群 (CD4+ 和 CD8+)、TSH		X							X (每2个周期)					X		
尿液分析	X (D-14至-1)	X						X				X	X			
仅对患有HCC的患者的肝炎病毒评估	X							X (仅从周期3开始的奇数周期)				X (仅从周期3开始的奇数周期)				
神经内分泌标志物	X	X						X				X	X ^c			
肿瘤标志物 (用于任何患有NEPC和NEHCC和其他肿瘤 (如果相关)的受试者)	X	X						X				X	X ^c			
骨标志物	十 (D-14至-1)	X (每3个周期)										X ^k				
PK和PD评估																
血, PK	有关详细的收集时间表, 参见表14															
血液(全), PD	有关详细的收集时间表, 参阅章节															

[1091]

	治疗期													随访期		
	周期1				周期2-4				周期5+		EOT	安全性 ^b	长期 ^c			
	筛查	WK1	WK2	WK3	WK4	WK1	WK2	WK3	WK4	WK1				WK3		
事件^a	D-28至-1	C1 D1	D2	D3	D8	D15	D22	C1 D1	D8	D15	D22	C1 D1	D15	≤28天	28天(2天)	q3mo(:2 Wks)
血清PD (仅NEC和SCLC)		X		X	X											
肿瘤活检 ^f	X (服药前 D-28至D1)							X (D16或D17) ^f						X		
档案肿瘤组织(FFPE)	X ^g															
功效																
实体瘤/NHL 评估: CT/MRI 成像 ^h	X											X (D28±7d; C2和C4)	X (C6中D28±7d, 然后q3周期, 即C9、C12等结束时)	X		
NHL特异性: 骨髓评价(如果已知或怀疑骨髓损伤)	X ⁱ												X, 仅当确认CR时	X, 仅当确认CR时		
NHL特异性: FDG PET 或 PET/CT 扫描(如果肿瘤为FDG阴性, 则不需要)	X												X, 当确认CR时			
另外的随访																
随访抗癌治疗															X	X
SAE随访															X	
生存随访																X

[1092] 缩写: AFP=α甲胎蛋白; 抗HBc=乙型肝炎核心抗体; 抗HCV=丙型肝炎表面抗体; 抗HBS=乙型肝炎表面抗体; β-hCG=β人绒毛膜促性腺激素; C=周期; CBC=全血细胞计数; CR=完全响应; CT=计算机断层扫描; D=天; ECHO=超声心动图; ECOG东部肿瘤协作组; FCBP=有生育潜力的女性; FDG PET=18-氟-脱氧葡萄糖正电子发射断层扫描; FFPE=福尔马林固定石蜡包埋; HBsAg=乙型肝炎表面抗原; HCC=肝细胞癌; INR=国际标准化比率; IRT=交互式响应技术; LVEF=左心室射血分数; mo=月; MUGA=多门控采集扫描; NHL=非

霍奇金淋巴瘤;PD=药效学;PK=药代动力学;PS=体能状态;PT=凝血酶原时间;PTH=甲状旁腺激素;PTT=部分促凝血酶原激酶时间;q=每一个;SAE=严重不良事件;TSH=甲状腺刺激激素;WK(s)=周。

[1093] a此安全性随访评估可以通过电话进行(参见第6.3.1节)。长期生存随访最多2年或直至死亡、失访或试验结束,以先发生者为准。可以通过记录审查进行。

[1094] b除非在本表或第6节中另有规定,否则所有研究访问/程序将有 ± 3 天的时间窗口,并且所有实验室血液样品应在服药前抽取。

[1095] c在周期6以及之后仅第1天需要。

[1096] d在第1天给药前 ≥ 72 小时必须执行三次ECG筛查,以便中心读数结果可用于审查。

[1097] e除非先前已记录过PD。

[1098] f配对肿瘤活检对于B部分是强制性的,并且强烈建议用于A部分。筛查活检(服药前D-7至D1)应在所有纳入/排除后获得。标准已经实现。周期1活检可在第16天或第17天(+7天窗口)获得,条件是已施用2次连续化合物A剂量。

[1099] g仅在筛查期间未收集新的活检时为强制的。

[1100] h根据指定的肿瘤评估时间表,因疾病进展、开始新的抗癌治疗或从整个研究中撤回同意的之外的原因中断治疗的所有受试者被追踪,直至进展和/或开始新的全身抗癌治疗。

[1101] i如果受试者最近的历史骨髓活检结果正常,则可以省略。此外,如果在周期1第1天之前的90天内执行先前分析,则可以省略此分析。历史结果将记录在eCRF中。

[1102] j第8天和第22天的访问可以从周期3以及之后省略。

[1103] k如果在前28天执行,可以省略。

[1104] 除非下文或事件表(参见表34)中另有说明,否则所有研究访问将具有 ± 3 天的窗口。除非另有说明,否则应在服药前抽取所有实验室血液样品(例如,PK样品)。

[1105] 研究程序应记录在源文件和电子病例报告表格(eCRF)中。在受试者未能筛查时,根据数据库说明,将在eCRF上记录最少的信息。

[1106] 筛查窗口在化合物A的第一剂量之前28天(± 3 天)开始。关于所执行的程序和时间表的详细信息,参见本节的表34。

[1107] 在任何情况下,在进行该试验期间不会批准对该协议的豁免。

[1108] 安全性实验室分析将在本地进行。筛查实验室值必须证明受试者合格,但如有必要,可在筛查窗口内重复。

[1109] ICD将在由有资格的研究人员对所有受试者在筛查访问时施用。必须在开始任何其他研究程序之前由受试者和管理人员签署并注明日期,并在源文件和eCRF中记录完成。根据表34中所示的时间表,所有筛查测试和程序必须在化合物A的第一剂量之前28天(± 3 天)内完成。

[1110] 在获得知情同意后,将在筛查时执行以下:

[1111] • 纳入和排除标准将在筛查时被评估,并被记录在源文件和eCRF中。

[1112] • 避孕咨询:有资格的医疗保健专业人员将接受由Celgene或指定人员的针对受试者避孕咨询的要求的培训。一旦经过培训,医疗保健人员将在施用化合物A之前为受试者提供咨询,以确保受试者符合所有要求(包括使用避孕措施)并且受试者理解与化合物A相

关的风险。

[1113] • 根据当地法规,将在筛查期间收集医疗、肿瘤和手术史以及人口统计数据(包括每个受试者的出生日期、性别、种族和民族)。肿瘤病史将包括初次诊断和日期、治疗和响应的详细病史。

[1114] • 将收集有关先前和合并用药和程序的信息

[1115] • 在交互式响应技术系统(IRT)中注册。

[1116] • 不良事件监测。

[1117] • 身高和体重测量。

[1118] • 评估生命体征。

[1119] • 体检(仅记录来源)和ECOG体能状态。

[1120] ○对于患有NHL的受试者,将在源文件和eCRF中记录淋巴结的测量结果和脾和/或肝脏的任何扩大的记录。

[1121] • B症状评估(仅NHL受试者):B症状是在没有其他感染证据下的发烧($>100.5^{\circ}\text{F}$ 或 38°C)持续2周或更多周,在没有感染证据下的盗汗超过1个月,和在之前6个月内体重减轻超过10%。

[1122] • 一式三份的12导联ECG将在第一剂量化合物A之前 ≥ 72 小时执行,在给药前接收结果并从中心读数评估以满足合格标准

[1123] • 左心室射血分数(LVEF)评估。

[1124] • 对所有有生育潜力的女性进行的妊娠测试。在筛查期间将与受试者讨论适当的避孕方法和胎儿暴露的潜在风险。用于具有生育潜力的女性的双重避孕方法(其中一种必须是屏障方法)(例如,口服、注射或移植的激素避孕药;子宫内装置;使用杀精子剂的屏障避孕药;或输精管结扎的伴侣)和用于男性的单一避孕方法(安全套)必须从ICD签署时起被使用,贯穿整个研究期间(包括剂量中止)并且持续化合物A的最后剂量后90天。这将在源文件中记录。

[1125] • 临床实验室测试应在第一剂量的化合物A前14天内完成。

[1126] • 功效/肿瘤评估

[1127] • 筛查时(第一剂量的14天内)收集骨标志物(N-端肽和骨特异性碱性磷酸酶)

[1128] • 神经内分泌和肿瘤标志物应在第一剂量的化合物A之前完成

[1129] ——SCLC-Pro-GRP和CgA

[1130] ——NEC-Pro-GRP和CgA

[1131] ——NEPC-PSA、Pro-GRP和CgA

[1132] ——NEHCC- α 甲胎蛋白(AFP)、Pro-GRP和CgA

[1133] ——MTC-CEA、降钙素、Pro-GRP和CgA

[1134] ——NEP胰腺癌-Pro-GRP、CgA和胰抑制素

[1135] ——其他NEC-Pro-GRP和CgA

[1136] ——视情况而定的其他肿瘤标志物,即用于卵巢癌的CA125

[1137] • 新鲜肿瘤活检

[1138] ——只有在筛查期间未收集到新的活检时,才强制要求收集档案肿瘤组织(FFPE)

[1139] • 仅用于HCC受试者:

- [1140] ——AFP
- [1141] ——HBsAg、抗HBS、抗HBc和抗HCV (仅筛查)。
- [1142] ——在HBsAg、HBcAb总量和/或HBcAb IgM中一或多项是阳性的情况下的乙型肝炎病毒载量的测量(通过PCR定量的HBV DNA)。
- [1143] ——在阳性乙型肝炎表面抗原、HBcAb IgM和/或病毒载量的受试者中,需要用针对HBV的适当抗病毒药物确认抗病毒治疗——适当的一线药物包括恩替卡韦、替诺福韦和拉米夫定(注意拉米夫定具有更高耐药率)。
- [1144] ——具有阳性HBV病毒载量、HBcAb IgM和/或HBsAg的受试者如果尚未由肝病专科医生治疗,则应转诊给肝病专科医生。
- [1145] 访问和评估示出在表34中。完成6个治疗周期和继续研究药物的受试者仅需要在每个后续周期(周期6和更高周期)的第1天(±3天)进行临床访问/评估,除非临床上指示更频繁的访问。
- [1146] 在受试者签署ICD开始、整个研究期间和直到化合物A的最后剂量后28天所采取或进行的所有合并用药和程序将记录在源文件和eCRF中。
- [1147] 从受试者签署ICD时直到化合物A的最后剂量后28天,将记录不良事件和严重不良事件(SAE)。
- [1148] 如调查员所确定的,将用相关的临床评估和实验室测试来监测经历AE的受试者。将尽一切努力记录正在进行的AE的解决日期。AE将记录在eCRF的AE页面和受试者的源文件中。应尽可能获得皮疹的照片,匿名并妥善保存以备将来检索。
- [1149] 受试者的体重将记录在表34中列出的访问时的源文件和eCRF中。
- [1150] 生命体征包括体温、血压、脉搏率和呼吸率(仅用于具有肺部肿瘤的受试者),并且将在研究期间在不同时间点记录以进行安全性监测,如表34中所述。
- [1151] 将在源文件和eCRF中捕获记录的测量结果。
- [1152] 将在表34中列出的访问时执行完整的身体检查和东部肿瘤协作组体能状态(ECOG PS;参考附录D)。两者的结果将记录在源文件中。ECOG PS的结果也将收集在eCRF上。
- [1153] 体检发现将被分类为正常或异常。如果异常,将在源文件中提供异常的描述和临床重要性。从基线的临床显著变化将记录在eCRF的AE部分中。
- [1154] 对于患有NHL的受试者,将在源文件和eCRF中记录淋巴结的测量结果和脾和/或肝脏的任何扩大的记录。
- [1155] 对于患有NHL的受试者,将在表13中列出的访问时执行B症状评估,并将结果记录在源文件和eCRF中。
- [1156] B症状是在没有其他感染证据情况下发热(>100.5°F或38°C)持续2周或更长时间,在没有感染证据下盗汗超过1个月,和在之前6个月内体重减轻超过10%。
- [1157] 将在表34中列出的访问时记录一式三份标准12导联心电图(ECG)。如果两者都被安排在相同的标称时间,则应在任何抽血之前收集12导联ECG。将在受试者处于仰卧位至少5分钟后,执行12导联心电图(12导联,在25mm/sec报告节律,心室率,PR间期,QRS波群,QT间期和QTcF间期)。
- [1158] 将在以下时执行三次ECG(在2±1分钟区间内的3次记录):
- [1159] • 筛查

- [1160] • 周期1
- [1161] ——第1天:服药前(给药前30分钟内)和服药后2、4、8、24小时(±10分钟)
- [1162] ——第8、15和22天:服药前(给药前30分钟内)和服药后4小时(±10分钟)
- [1163] • 周期2和更高周期
- [1164] ——第1天:服药前(给药前30分钟内)
- [1165] 将在EOT访问时执行单个ECG。
- [1166] 对于替代的给药时间表,周期1第15天ECG将在周期1中施加化合物A的最后一天执行。
- [1167] 调查员将基于他们对ECG结果的解释立即做出临床决定,并在eCRF中提供他们对ECG的总体评估。从基线的临床显著变化将记录在eCRF的AE部分中。
- [1168] 还将ECG输出上传到中央ECG实验室以进行确定性分析和解释。
- [1169] 左心室射血分数(LVEF), (多门控采集扫描[MUGA]或超声心动图[ECHO])将在筛查时在所有受试者中进行。应按临床指示执行随访评估。随访评估应使用在筛查评估时使用的相同程序。临床显著性降低定义为LVEF绝对减少 $\geq 20\%$ 或降至45%以下。
- [1170] 具有生育潜力的女性(FCBP)被定义为性成熟女性,其:
- [1171] • 未经历子宫切除术或双侧卵巢切除术,以及
- [1172] • 未自然绝经(癌症治疗后的闭经不排除生育潜力)至少连续24个月(例如,在之前连续24个月的任何时间都有过月经)。
- [1173] 调查员将根据该定义将女性受试者分类为FCBP。对于非FCBP受试者,不需要妊娠测试,但必须在eCRF和源文件中记录理由。妊娠测试将由当地实验室进行。
- [1174] 对于FCBP,将在表34中列出的访问时进行妊娠测试
- [1175] • 在筛查时获得灵敏度为至少25mIU/mL的血清妊娠测试和在研究治疗的周期1第1天之前72小时内获得血清或尿液妊娠测试。在调查员确认两次筛查妊娠测试为阴性之前,受试者可不接受化合物A。
- [1176] • 血清或尿液妊娠测试(根据调查员的判断和最低测试灵敏度[25mIU/mL])应在每个周期第1天之前的72小时内和治疗结束(EOT)访问时完成。在调查员确认妊娠测试为阴性之前,受试者可不接受化合物A。
- [1177] • FCBP或其伴侣为FCBP的男性受试者必须避免在接受化合物A时以及化合物A的最后剂量后90天可导致受孕的活动。将每月监测真正戒除性活动的做法并记录来源。
- [1178] 妊娠测试的结果将记录在源文件和eCRF中。
- [1179] 在研究期间将在表34中描述的时间点执行以下实验室评估。除非另有说明,否则所有样品应在服药前抽取。实验室评估将记录在源文件和eCRF中并且为以下:
- [1180] • 血液学:全血细胞计数(CBC),包括血红蛋白、血细胞比容、WBC计数,绝对计数用于WBC参数和血小板计数。
- [1181] ——在周期1,第1天,具有绝对计数的CBC应被执行并在药物施用前根据入选标准检查结果
- [1182] • 血清化学:白蛋白、总蛋白、碳酸氢盐或镁、磷、钙、肌酐、尿素/BUN、葡萄糖(空腹 ≥ 6 小时)、钾、钠、氯、总胆红素(如果超出正常范围则分级)、碱性磷酸酶、AST或血清谷氨酸草酰乙酸转氨酶(SGOT)、ALT或血清谷氨酸丙酮酸转氨酶(SGPT)、LDH和尿酸。

- [1183] • 禁食(≥ 6 小时)的甘油三酯和胆固醇。
- [1184] • 特殊化学:淀粉酶、脂肪酶、T细胞亚群(CD4+和CD8+)、促甲状腺激素(TSH;如果异常则反射回游离T4)。
- [1185] • 凝血:PT(或INR)和APTT
- [1186] • 尿液分析:浸渍片
- [1187] ——在首次出现2+或更多蛋白质或蛋白尿恶化时,显微镜检查和尿白蛋白与肌酐比率。
- [1188] • 如果血清肌酐 $>1.5 \times \text{ULN}$,使用在筛查时需要的外源性过滤标志物(诸如碘海醇、菊粉、 ^{51}Cr EDTA或 ^{125}I 碘酞酸盐)测量的肌酐清除率确定以满足纳入标准(参见第4.2节)。
- [1189] • 每3个周期和在EOT时(除非在之前的28天内完成)收集骨标志物(N-端肽和骨特异性碱性磷酸酶)。
- [1190] • 仅适用于HCC受试者:
- [1191] ——AFP(如果在基线时升高)
- [1192] ——在基线时乙型肝炎病毒载量阳性和/或HBsAg、HBcAb总量和/或HBcAb IgM阳性的受试者中和在EOT时定量的乙型肝炎病毒DNA(在由调查员自行决定下,奇数周期仅在第3周期开始或更频繁地)。
- [1193] • 仅适用于NEPC受试者:
- [1194] ——PSA
- [1195] • 仅如果神经内分泌和肿瘤标志物在基线时升高,则需要监测神经内分泌和肿瘤标志物,NEPC中的PSA为例外。
- [1196] ——SCLC-Pro-GRP和CgA
- [1197] ——NEC-Pro-GRP和CgA
- [1198] ——NEPC-PSA、Pro-GRP和CgA
- [1199] ——NEHCC- α 甲胎蛋白、Pro-GRP和CgA
- [1200] ——MTC-CEA、降钙素、Pro-GRP和CgA
- [1201] ——NE胰腺癌-Pro-GRP、CgA和胰抑制素
- [1202] ——其他NEC-Pro-GRP和CgA
- [1203] 在已经做出永久中断治疗的决定之后,应尽快(≤ 28 天)对因任何原因退出治疗的受试者执行EOT评价(参见表34的程序)。
- [1204] 在化合物A的最后剂量之后,所有受试者将被追踪28天,用于AE报告和合并用药信息。28天(± 3 天)安全性随访联系可以通过电话。此外,将报告随后调查员随时知道的怀疑与化合物A有关的任何SAE。
- [1205] 在安全性随访访问后,所有受试者将在随后每3个月(± 2 周)被追踪以进行生存随访,长达2年或直至死亡、失去随访或试验结束,以先发生者为准。应该在相同时间表收集新的疾病治疗。
- [1206] 可以通过记录审查(包括公共记录)和/或与受试者、家庭或受试者的治疗医生的电话联系来进行生存随访。
- [1207] 肿瘤评估将在筛查时执行,并且将包括胸部、腹部和骨盆的CT,以及对于患有已知或疑似脑部损伤的受试者和患有NEPC的所有受试者的脑部扫描(CT或MRI)。筛查后,将在周

期2、4和6末(第28天±7天)执行放射性肿瘤评估,并且然后使用筛查时使用的相同CT/MRI扫描方式每3个周期执行一次。如果先前扫描在28天内,则不需要获得EOT扫描。

[1208] • 此外,对于NHL受试者,将进行筛查FDG PET或FDG PET/CT扫描,除非已知肿瘤为FDG-avid阴性。将获得后续扫描以确认CR。

[1209] • 对于患有已知或疑似骨髓损伤的NHL受试者,将在筛查时进行流式免疫表型分析的骨髓评估,并确认完全响应(CR)。

[1210] • 对于MTC受试者,将在基线时执行筛查同位素骨扫描。如果这提示骨转移,则应在BL时执行骨病灶的X射线、CT或MRI,并且在每个被安排的功效评估时重复相同技术。

[1211] • 对于MTC受试者,应执行肝脏MRI,或如果不可用,则进行对比增强三相CT扫描。还应执行颈部MRI或CT扫描。这些应在基线时和根据上述规定执行。

[1212] • 对于NEPC受试者,应在筛查和后续所有功效评估时执行^{99m}Tc-亚甲基二膦酸盐放射性核素骨扫描。

[1213] • 对于NEHCC受试者,应在筛查和后续所有功效评估时执行腹部对比增强三相CT/MRI扫描。

[1214] 根据指定的肿瘤评估时间表,因疾病进展、开始新抗癌治疗或从整个研究撤回同意以外的原因而中断治疗的所有受试者被追踪,直至进展和/或开始新的系统性抗癌治疗。

[1215] 在每次筛查后评估时的肿瘤响应将由调查员根据如针对实体瘤在附录B中所述的实体瘤的响应评价标准(RECIST) v1.1,如针对NHL在附录C所述的恶性淋巴瘤的修订响应标准,针对NEPC的PCWG3 2016(附录J)和针对NEHCC的mRECIST(附录I)来确定。

[1216] 肿瘤标志物,即在筛查时、每个周期的第1天和EOT时的用于NEPC的PSA和用于NEHCC的α甲胎蛋白(AFP),除非先前记录了疾病进展。

[1217] 神经内分泌标志物将在表13中列出的访问时进行,并且结果记录在源文件和eCRF中。任何已知在基线时升高的神经内分泌标志物应在每个周期的第1天和治疗结束后被追踪,除非先前记录受试者已经进展。然后,应最低程度追踪以下:

[1218] • SCLC-Pro-GRP和CgA

[1219] • NEC-Pro-GRP和CgA

[1220] • MTC-CEA、降钙素、Pro-GRP和CgA

[1221] • NEPC-Pro-GRP和CgA,

[1222] • NE胰腺或小肠NEC-Pro-GRP、CgA和胰抑制素

[1223] 以下描述用于A部分的PK评估。在此研究的A部分收集到足够的PK数据后,将提供用于B部分的PK评估。

[1224] 为了评价血浆中化合物A的PK,将在表35中列出的时间点从所有受试者收集血液样品。每个样品采集的实际时间将记录在源文件和电子病例报告表格(eCRF)中。可以利用收集用于PK评价的血浆样品执行血浆中化合物A代谢物的探索性分析。

[1225] 表35. 用于A部分、周期1的血液药学采样时间表

[1226]

相对于化合物A 给药的时间(小时)	收集窗户	第1天	第8天	第15天	第22天
0 (服药前)	之前30分钟内	X	X	X	X
1	±5分钟	X			X
2	±10分钟	X			X
4	±10分钟	X			X
6	±10分钟	X			X
8	±10分钟	X			X
11	±1小时	X			X
24	±1小时	X			X
48	±1小时	X			X
72	±2小时	X			X
96	±2小时	X			X

[1227] 赞助商可以对PK样品进行额外的分析,以便追踪研究治疗的安全性或更好地理解疾病的进展或疾病对研究治疗的响应。

[1228] 关于样品收集、处置和处理说明,参见实验室手册和附录G。

[1229] 用于药效学生物标志物的时间表提供如下:

[1230] • 用于PD生物标志物研究的全血

[1231] ——周期1第1天:服药前(≤3小时)

[1232] ——周期1第3天

[1233] ——周期1第5天

[1234] ——周期1第8天:服药前(≤3小时)

[1235] ——周期1第24天:服药前(≤3小时)

[1236] • 用于PD生物标志物研究的血清(仅NEC和SCLC受试者)

[1237] ——周期1第1天:服药前(≤3小时)

[1238] ——周期1第3天

[1239] ——周期1第8天:服药前(≤3小时)

[1240] • 用于PD生物标志物研究的肿瘤组织

[1241] ——筛查:服药前第-28天至第1天(在满足所有纳入和排除标准后)

[1242] ——周期1第16或17天(+7天)

[1243] ——任选的,在EOT访问之前的任何其他时间。

[1244] 赞助商可以对PD样品进行额外的分析,以追踪研究治疗的安全性或更好地理解疾病的进展或疾病对研究治疗的响应。

[1245] 在A部分中安全可行时将收集肿瘤活检。在B部分中肿瘤活检为强制性的。在筛查时和周期1第16天或第17天(+7天),通过手术活检(优选)或芯针(至少3次传代,如果可能)

收集活检。如果研究药物治疗在此时之前中断或减少,则在受试者已经接受连续两次化合物A的计划剂量后,活检应延迟至1至2天(+7天)。如果在筛查期间不收集新鲜活检,则必须提供存档的肿瘤样品。细针抽吸不足以作为肿瘤活检材料的来源。样品应经福尔马林固定的石蜡包埋(FFPE)处理。最佳地,肿瘤组织样品(筛查和治疗时)将从相同的肿瘤部位获得。

[1246] 另外,可以在A部分和B部分中,在后续治疗周期期间或治疗中断后(28天随访期间的任何时间)获得任选的肿瘤活检,以分别阐明长期治疗的影响或耐药性机制。

[1247] 研究治疗的描述

[1248] 化合物A是分子量为609.65的苯磺酸盐。它是白色至淡黄色固体。化合物A将作为不透明的瑞典橙胶囊提供给诊所,其仅含有剂量强度为0.50mg、0.75mg和2.00mg的活性药物成分。这些胶囊将以带有儿童防护帽的HDPE瓶供应,根据相关国家卫生当局的规定进行适当标记以供调查使用。

[1249] 在A部分和B部分中,化合物A将每周一次在过夜禁食持续 ≥ 6 小时后在早晨空腹(即,早餐前 ≥ 1 小时)与至少240mL水一起给药。受试者应该每次剂量后 ≥ 1 小时避免进食或其他药品摄入。受试者将在每4周(28天)周期中每周一次口服施用化合物A。可以基于由SRC对临床安全性和实验室数据的审查来实施替代的给药时间表。在任何服药前评估完成后,化合物A将在诊所中施用。如果存在临床上显著的疾病进展的证据、不可接受的毒性或受试者/医生决定退出,则可中断研究治疗。

[1250] 出于剂量递增决定的目的,将在后续群组中招募至少3名受试者。第一群组将每周一次用1.25mg的起始剂量治疗。为了被认为对于剂量递增决定是可评价的,受试者必须在最低安全性评价和药物暴露下完成至少1个周期的治疗,或者在第一治疗周期内具有DLT。当受试者群组符合这些标准时,剂量递增决定将进行。剂量递增决定将由SRC做出。决定将基于正在进行的研究中评价的所有剂量水平可用的所有相关数据的综合,包括安全性信息、DLT、周期1期间所有治疗相关的CTCAE等级 ≥ 2 毒性数据,以及来自可评价受试者的PK数据。来自受试者的PK数据将在整个研究期间持续可用,并且将相应地调整剂量。用于下一群组受试者的推荐剂量将由BLRM以EWOC原则指导。

[1251] 自适应贝叶斯方法提供不超过MTD的化合物A的剂量水平的估计,并且合并用于此估计的所有剂量水平的所有DLT信息。一般而言,下一推荐剂量将具有DLT率在目标区间内下降的最高概率(真正的DLT率在16–33%)并且将始终满足EWOC原则。根据EWOC,在下一剂量时的DLT率将超过0.33是不可能的($< 25\%$ 后验概率)。在所有情况下,用于下一群组的推荐剂量不会超过从之前剂量起的100%。SRC可以在考虑所有可用的临床数据后推荐剂量的较小增加。

[1252] 用于每个剂量群组中的受试者增加的程序和用于该研究的剂量递增/递减决定的规定如下:

[1253] 1. 此研究将开始于在每个剂量水平的至少3名可评价受试者的群组中评价化合物A。最初,群组之间的剂量增量将是100%。当单个受试者经历DLT,或2个受试者经历 ≥ 2 级治疗相关毒性时,对于当前和后续群组,群组大小可以增加至6个可评价受试者。对于每个后续剂量递增群组,化合物A剂量的增加将 $\leq 50\%$ 。一旦2名受试者经历 ≥ 2 级治疗相关毒性,则招募将限于患有SCLC和其他NEC诸如MTC的受试者,其分泌Pro-GRP或CgA或降钙素(对于MTC受试者)或胰抑制素(用于胰腺或小肠NEC)。

[1254] 2. 在群组中所有可评价受试者完成周期1后,将使用具有EWOC原则的双参数BLRM向SRC提出下一剂量水平的建议,但以下情况除外:

[1255] -如果群组中的前2个受试者经历DLT,则在使用此新信息更新贝叶斯模型之前,不会有附加受试者被招募进入该群组。同样,如果群组中的2名受试者经历DLT,则将重新评价该模型,然后招募任何附加受试者。

[1256] 3. 在每个群组之后, SRC将接触并审查来自BLRM评估和可用安全性(即DLT和非DLT数据)、PK、PD和初步功效信息的数据。最终的剂量递增决定将由SRC做出。

[1257] 在重复上述步骤后,在满足以下条件后,可以将化合物A剂量宣布为MTD:

[1258] • 至少有6名可评价的受试者已被该剂量治疗,

[1259] • 在该剂量处于目标区间(16-33%)的DLT率超过60%的后验概率或在后验概率接近但不超过60%时足够数量的受试者已进入研究以确保MTD估计的精确度,和

[1260] • 根据BLRM建议剂量,并且SRC批准该剂量。

[1261] SRC可以基于出现的安全性问题随时终止剂量递增而不建立MTD。在SRC判定更好地理解化合物A的安全性、耐受性和PK,可以在进一步剂量递增之前或与进一步剂量递增同时以先前剂量水平或中间剂量水平招募附加受试者群组。

[1262] 然而,递增期间的剂量决定不限于这些剂量。基于BLRM关于在递增期间在任何决定点可未被超过的最高剂量的推荐以及由协议允许的剂量的最大增加,可以对后续新受试者群组施用中间剂量。

[1263] SRC还将根据他们对临床和实验室安全性数据的审查来确定评价一个剂量群组内的另外受试者、更高剂量群组、中间剂量群组、更小剂量增量、替代给药时间表或宣布MTD的决定。

[1264] 接受至少化合物A的一个剂量的所有受试者将对于安全性是可评价的。

[1265] 在剂量递增期间在任何群组中施用第一剂量之后,在下一剂量群组可以开始之前观察每个群组中的受试者28天(周期1, DLT窗口)。在给定的剂量递增群组中,每天将招募不超过一个受试者。可评价DLT的受试者被定义为:

[1266] • 在周期1内已接受化合物A总计划剂量的 $\geq 75\%$ 而没有经历DLT,

[1267] 或

[1268] • 在接受至少一剂化合物A后经历DLT。

[1269] 将替换不可评价DLT的受试者。任何剂量群组内的附加受试者可由SRC自行决定招募。在DLT评估期间,将不允许受试者内剂量递增。

[1270] MTD是在该剂量用化合物A治疗的人群(不是人群的样品)的少于33%在第一周期中遭受DLT并且至少6个可评价的受试者已经在该剂量被治疗的最高剂量。

[1271] 可以评价可变剂量群组(例如,较低频率的给药)以在SRC的判断下准确地确定MTD。

[1272] 在剂量递增期间,DLT评估期是周期1(28天)。

[1273] 国家癌症研究所(NCI)不良事件的常用术语标准(CTCAE),版本4.03用作不良事件严重程度分级的指南。DLT被定义为DLT评估中发生以下毒性中的任一个,除非该事件可以明确地被确定为与化合物A无关。剂量限制性毒性描述如下:

[1274] • 任何持续时间的任何4级非血液学毒性

- [1275] • 任何非血液学毒性等级 ≥ 3 ,以下除外:
- [1276] ——持续时间 ≤ 3 天的3级腹泻、恶心或呕吐(在最佳医疗管理下)。
- [1277] ——痤疮、脓疱或斑丘疹类型的3级皮疹,其在研究药物中断的7天内恢复至 ≤ 2 级,并且在相同剂量恢复研究药物时不在相同水平复发(在最佳医疗管理下)。
- [1278] ——3级疲劳,其在研究药物中断的7天内恢复至 ≤ 2 级,并且在相同剂量恢复研究药物时没有在相同水平复发(在最佳医疗管理下)。
- [1279] • 血液毒性,如下:
- [1280] ——发热性嗜中性粒细胞减少症
- [1281] ——4级嗜中性粒细胞减少症持续 >7 天
- [1282] ——4级血小板减少持续 >7 天,伴有临床显著出血的 ≥ 3 级血小板减少
- [1283] • 除非明确确定与研究药物无关,否则任何AE都需要在周期1期间减少剂量水平。
- [1284] • 在安全委员会认为剂量限制的在试验期间的任何其他任何毒性。
- [1285] 此定义中可以不包括没有相关临床体征或症状(例如,低镁血症、高镁血症、低蛋白血症、低磷血症、淋巴细胞计数增加或减少)的离散实验室变化。这些发现将由SRC讨论和审查。
- [1286] 在任何周期中允许剂量减少,包括周期1。在剂量递增期间在周期1中发生的剂量减少将构成DLT,但是将允许受试者以减少的剂量继续化合物A。
- [1287] 当指示剂量调整时,将首先调整剂量频率。在与赞助商的研究医生协商后,允许剂量省略和减少。一旦剂量减少,当毒性达到 ≤ 1 级时,剂量可以递增。如果毒性在较高剂量时再次出现,则剂量将再次减少,但是不允许再次递增。如果任何受试者在两次剂量减少(该剂量水平一次)后继续经历不可接受的毒性,则将永久中断化合物A。
- [1288] 在DLT评估期间将不允许受试者内剂量递增。
- [1289] 满足DLT定义的任何AE将需要剂量频率调整和后续剂量中断(如果没有恢复)。如果任何与治疗相关的 ≥ 2 级毒性在下一剂量时未消退到 ≤ 1 级,则应延迟剂量。应与赞助商的研究医生讨论此类病例,以确定给药延迟的最佳持续时间。
- [1290] 治疗相关的 ≥ 3 级毒性或慢性2级毒性可以保证化合物A的剂量减少。在进行剂量变化之前,应该与赞助者的研究医生讨论这些病例。
- [1291] 在DLT评估期间将不允许受试者内剂量递增,然而,在周期 ≥ 3 中,耐受其指定剂量的化合物A而没有疾病进展证据的受试者(由调查员自行决定并在咨询和与赞助商的研究医生协商)递增到在此研究中被至少一个群组的受试者示出充分耐受的最低剂量水平(即 $\leq 33\%$ 的可评价受试者在所述剂量水平经历过DLT)。
- [1292] 在B部分(扩展阶段)中,不允许超过MTD的剂量递增。
- [1293] 治疗可以中断直至4周,直到毒性(排除秃发)达到 ≤ 1 级或基线水平。调查员可自行决定以相同或减少的剂量重新开始治疗。必须与赞助商的研究医生讨论任何此类治疗中断。
- [1294] 在剂量递增阶段的DLT评估期间,由于除DLT之外的原因,具有化合物A的 >1 级错失剂量的治疗中断将使受试者不能评价DLT并且需要在该给药群组中替换该受试者。必须与赞助商的研究医生讨论任何此类治疗中断。
- [1295] 在研究中以治疗意图而允许造血生长因子或其他血液学支持,诸如促红细胞生成

素、达贝泊汀 (darbepoetin)、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 和RBC-或血小板输注。对于经历3/4级嗜中性粒细胞减少症或任何级别发热性嗜中性粒细胞减少症的受试者,允许在任何时间使用G-CSF的治疗使用。在周期1期间不允许预防性使用粒细胞(或粒细胞-巨噬细胞)生长因子。

[1296] 患有3级或4级嗜中性粒细胞减少症和/或3级或4级血小板减少症的受试者应经常通过实验室测试进行监测,直至恢复至 \leq 1级。应视情况考虑抗微生物、抗真菌和抗病毒预防。

[1297] 肿瘤疼痛或治疗诱导的疼痛可以在临床医生判定下并且由医学需要决定施用阿片类药物和阿片类药物相关的镇痛药诸如可待因、哌替啶、丙氧芬或吗啡来控制。在使用非甾体抗炎药 (NSAID) 和阿司匹林之前,应考虑出血的风险,特别是在血小板减少症的情况下。如果可能,应避免使用NSAID和阿司匹林,而应施用对乙酰氨基酚代替。

[1298] 用于保护食道/胃粘膜的粘膜包衣剂由调查员自行决定以及监测受试者的GI出血来建议。然而,质子泵抑制剂可影响NEC受试者中的神经内分泌标志物,因此如果合适,应优先施用组胺 (H2) 受体拮抗剂。将鼓励受试者报告胃肠道不适或疼痛、食欲减退、粪便变化或便血的所有发作。

[1299] 推荐根据附录F中提供的指南管理经历腹泻的受试者。应该在1-2级腹泻的最早发作时开始使用抗腹泻药品诸如洛哌丁胺。抗腹泻药品可以作为预防和治疗腹泻而被施用。应迅速纠正脱水和电解质紊乱。应考虑改善腹泻的一般措施,诸如低纤维饮食和增加液体消耗,并应密切监测体重。

[1300] 如针对此协议所定义的,过量是指仅化合物A给药。在每剂量的基础上,过量被定义为超过分配给给定受试者的化合物A的协议指定剂量的以下量,不论任何相关的不良事件或后遗症:

[1301] • PO超过协议规定剂量的任何量

[1302] 在时间表或频率的基础上,过量被定义为比协议所需的时间表或频率更频繁的任何事件。

[1303] 应在病例报告表格中报告关于药物施用(包括任何过量)的完整数据,无论过量是偶然的还是有意的。

[1304] 合格受试者将在A部分(剂量递增)中顺序招募。如果适用,B部分(剂量扩展)的招募将根据疾病群组 and 给药时间表进行分层。

[1305] 交互响应技术 (IRT) 系统将用于追踪向A部分中的剂量水平和B部分中的肿瘤群组的受试者分配。

[1306] 用于化合物A的标签将包括但不限于赞助商名称、地址和电话号码、协议号、化合物A、剂型和强度(如果适用)、每个容器的化合物A的量、批号、有效期(在适用的情况下)、药品标识/试剂盒编号、给药说明、储存条件,以及必要的警告声明和/或适用的法规声明。根据当地法规,另外的信息可被包含在标签上。

[1307] Celgene (或指定人员) 将与调查员和相关现场人员一起审查用于记录化合物A的接受的程序,以及用于计数、协调化合物A和记录此过程的程序。Celgene (或指定人员) 还将与调查员和相关现场人员一起审查用于化合物A返回、处置和/或销毁的过程,包括现场对比Celgene (或指定人员) 的责任。

[1308] 只有药剂师或调查员的指定人员将分发化合物A。必须维持被分发至和由每个受试者拿走的化合物A的胶囊数量的记录。药剂师或调查员的指定人员将记录在适当的研究记录中分发/施用的剂量。

[1309] 合并用药和程序

[1310] 在受试者签署ICD时开始服用的所有药品(排除针对所评价肿瘤的先前癌症治疗)并且在研究期间直到治疗中断后28天的所有伴随治疗以及剂量、剂量频率和治疗使用的原因将记录在源文件和合并用药eCRF中。

[1311] 在施用研究药物之前的所有先前化学治疗(生物学、免疫学或放射治疗)和抗癌手术将被记录在eCRF的适当部分中。

[1312] 调查员将指令受试者通知研究人员关于在签署ICD之后服用任何新药品。所有药品和重要非药物治疗(草药、物理治疗等)和现有药品给药的任何变化都将记录在eCRF上。

[1313] 应当使用被认为对于受试者的护理所必需的任何合并用药/治疗的使用。如果对怀疑影响药物吸收或代谢的合并用药进行了变化,则可以进行重复PK评价。以下是准许的合并用药和程序:

[1314] • 患有 ≥ 1 级腹泻的受试者应立即开始用二苯氧基化物/阿托品(Lomotil)或洛哌丁胺(Imodium)或替代的非处方止泻药治疗。对于化合物A的后续剂量而言用止泻药品的前驱施药可为合适的,并且应该与赞助商的研究医生讨论。

[1315] • 在患者经历CTCAE ≥ 1 级恶心或呕吐之前,将禁止使用止吐药。然后受试者可以由调查员自行决定接受预防性止吐药,包括地塞米松。

[1316] • 调查员可自行决定预防性粘膜保护剂可为合适的。然而,质子泵抑制剂可影响NEC受试者中的神经内分泌标志物,因此如果合适,应优先施用组胺(H₂)受体拮抗剂。

[1317] • 在具有乙型肝炎表面抗原、HBcAb IgM和/或病毒载量阳性的HCC受试者中需要借助用于HBV的适当抗病毒剂的抗病毒治疗——适当的一线药剂包括恩替卡韦、替诺福韦和拉米夫定(注意拉米夫定具有更高的耐药率)。当施用化合物A时,不应中断适合于治疗HCV的方案。

[1318] • 对于经历发热性嗜中性粒细胞减少症或3/4级嗜中性粒细胞减少症的受试者,在任何时候都允许粒细胞生长因子的治疗性使用。常规预防借助粒细胞集落刺激因子或粒细胞-巨噬细胞集落刺激

[1319] • 在开始化合物A之前接受稳定剂量的重组促红细胞生成素或达贝泊汀 α 至少4周的受试者可以在整个研究中继续其预治疗剂量。受试者可以在周期2开始用促红细胞生成素刺激剂(ESA)开始重新治疗继发于先前化疗暴露的再生障碍性贫血,条件是不存在贫血的并发原因的临床怀疑(例如,化合物A诱导的)。

[1320] • 准许肠胃外流感疫苗接种。

[1321] • 不需要常规传染病预防。然而,在研究期间,调查员可自行决定实施抗生素、抗病毒、抗肺孢子虫、抗真菌或其他预防措施。

[1322] • 用双膦酸盐(例如帕米膦酸盐、唑来膦酸盐)或其他药剂(例如狄诺塞麦(denosumab))的治疗被准许,以防止或延迟骨转移的进展。建议在整个研究期间维持稳定的给药方案。

[1323] • 由调查员自行决定在研究治疗期间允许用于治疗癌症相关症状(例如,局部骨

痛)的局灶性姑息性放射治疗,条件是这不是疾病进展的指示,在所述疾病进展的指示下应该中断受试者资格。

[1324] • 受试者可以接受生理替代剂量的糖皮质激素(至多每日10mg泼尼松的当量)作为维持治疗。

[1325] • 在具有乳腺癌或前列腺癌病史的受试者中,维持性激素治疗被允许。

[1326] • 生长抑素类似物(SSA)可视情况而用于症状控制。

[1327] 当受试者处于研究中时,不得使用其他调查治疗。

[1328] 在受试者处于研究中时,不得给受试者除研究治疗之外的抗癌治疗(化学治疗、生物学或调查治疗和手术)。如果需要此类治疗,则受试者必须从研究中被中断资格。当受试者处于研究中时,不允许用免疫抑制剂治疗。如果需要此类治疗,则受试者必须从研究中被中断资格。

[1329] 不允许使用抗凝血剂(例如,华法林、低分子量肝素、因子Xa抑制剂、凝血酶拮抗剂)的慢性治疗性给药进行的治疗。如果在调查员的仔细考虑下医学上有指示(例如,住院受试者,在手术后),可在受试者中考虑短期预防性给药抗凝血剂。

[1330] 化合物A可以是CYP3A4的底物。应避免为这些CYP酶的已知强效诱导剂或抑制剂的药物。如果需要使用这些药物中的一种,则在与化合物A同时使用之前,应与赞助商的研究医生讨论风险和益处。

[1331] 这些药物的实例是(未全纳):

[1332] • CYP3A4/5抑制剂:阿扎那韦、克拉霉素、茚地那韦、伊曲康唑、酮康唑、奈法唑酮、奈非那韦、利托那韦、沙奎那韦和泰利霉素

[1333] • CYP3A4/5诱导剂:利福平和卡马西平

[1334] 如果可能,由于对生物标志物可能的影响,应该避免在NEC受试者中使用质子泵抑制剂。如果临床上合适,应在第一剂量前至少7天将受试者改至H2拮抗剂。

[1335] 考虑到血小板减少症的可能性,如果可能的话应该避免NSAID和阿司匹林,而应该替代地施用对乙酰氨基酚。

[1336] Statsotocal考虑因素

[1337] 此研究的主要目的是确定当每周一次口服施用至患有晚期实体瘤(包括NEC)和复发性/难治性NHL的成年受试者持续4周(28天周期)时化合物A的安全性、耐受性和MTD。次要目标是对化合物A的抗肿瘤活性进行初步评估,并确定其PK特征。

[1338] 数据总结/统计分析将通过研究部分(A或B部分),剂量时间表,剂量水平(A部分)和肿瘤群组(B部分)进行(如果适用)。

[1339] 研究人群定义如下:

[1340] • 招募的人群——满足纳入/排除标准的所有受试者。

[1341] • 治疗的人群——所有参加和接受化合物A的至少一个剂量的受试者。

[1342] • 功效可评价(EE)人群——参加研究、满足资格标准、完成化合物A的至少一个周期(服用至少75%的指定剂量),并具有基线和至少一个有效的基线后肿瘤评估的所有受试者。

[1343] • 药代动力学(PK)可评价人群——参加和接受化合物A的至少一个剂量且具有化合物A的至少一种可测量浓度的所有受试者

[1344] • 生物标志物可评价 (BE) 人群——参加、接受研究药物的至少一个剂量并且具有至少一种生物标志物评估 (排除不合格的评估) 的所有受试者。

[1345] 在研究的A部分期间,由伴随过量控制的递增 (EWOC) 原理指导的自适应贝叶斯逻辑回归 (BLR) 模型 (具有2个参数) 将用于剂量递增。未对此研究执行正式统计功效计算来确定样品量。受试者的实际数量将取决于测试的剂量水平/群组的数量。然而,预期的受试者人数将为约50人。

[1346] 在从A部分确定MTD后,B部分将按预定的肿瘤类型招募大约20个另外受试者。

[1347] 对于B部分,样品大小不是基于功效计算确定的,而是基于传统上用于此类探索性研究的临床、经验性和实际考虑因素。在B部分剂量扩展期间,最初将积累用于每个肿瘤群组的至少14个功效可评价受试者。如果观察到4个月或更长的响应者或SD,则肿瘤群组将扩展至约20名受试者。

[1348] 在A部分中,将通过针对所招募人群的剂量群组来总结受试者的基线特征。在B部分中,将通过肿瘤类型来总结受试者的基线特征。将使用描述性统计来总结年龄、体重、身高和其他连续人口统计学和基线变量。将借助频率列表来总结体能状态、性别、种族和其他分类变量。将根据系统器官类别和优选术语而使用频率列表来总结病史数据。

[1349] 将使用频率和百分比来总结来自治疗和研究的受试者处置 (分析人群分配、正在进行、中断以及主要原因)。将提供按场所招募的受试者总结。将使用频率列表来总结协议违反行为。还将提供支持性对应受试者列表。

[1350] 功效分析将基于治疗的人群并且包括临床受益率 (CBR)、客观响应率 (ORR)、响应或稳定疾病的持续时间、无进展生存期 (PFS)、进展时间 (TTP) 和逐个剂量群组和给药时间表 (A部分) 或肿瘤类型和给药时间表 (B部分) 的OS的总结。将由调查员根据实体瘤响应评价标准 (RECIST) 1.1版、用于NEHC的mRECIST、用于NEPC的PCWG23和IWG标准来评估肿瘤响应 (CR、PR、SD、PD或无法评价)。CBR被定义为CR、PR和持久性SD (持续时间 ≥ 4 个月的SD) 的肿瘤响应 (由调查员评估)。ORR被定义为最佳响应为CR或PR的受试者的百分比。当SD是最佳响应时,其必须在研究进入后在距第一剂量为8周的最小时间 (即,与第一次基线后响应评估时间点减去评估窗口一致) 后至少一次地被以放射学方式记录。如果未满足用于SD最佳响应的最短时间,则受试者的最佳响应将取决于后续评估的结果。例如,在第一次评估时显现出SD (其中第一次评估不满足用于SD的最小持续时间标准) 和在第二次评估时显现出PD的受试者将被归类为具有PD的最佳响应。如果未达到用于SD的最短持续时间标准,则在第一次SD评估后失去随访的受试者将被视为不可评价。

[1351] 将为ORR和CBR估计值提供双侧95% Clopper-Pearson精确置信区间。将执行类似的分析以纳入具有确认响应以及用于功效可评价人群的那些受试者。

[1352] 对于具有CR或PR的最佳响应的受试者,从首次满足CR/PR标准的时间 (首先记录的那个) 直到客观记录进展性疾病的第一个日期测量响应持续时间。对于具有最佳SD响应的受试者,从第一剂量日期开始直到满足进展标准测量SD的持续时间。如果在化合物A中断之前未记录进展,则在最后一次充分的肿瘤评估的日期将删除总体响应的持续时间和SD的持续时间。

[1353] 基于调查员的评估的响应/SD的持续时间将通过用于治疗人群的描述性统计 (平均值、标准偏差、中值、最小值和最大值) 来总结。除了使用Kaplan-Meier方法基于观察值和

删除值二者计算的中值外,将仅基于观察值来计算所有其他统计量(平均值、标准差、最小值和最大值)。TTP被定义为从第一剂量直到肿瘤进展的时间。

[1354] 无进展生存期(PFS)被定义为从化合物A的第一剂量到疾病进展的第一次出现或由于任何原因的死亡的时间。在数据截止日期既没有进展也没有死亡的受试者将在他们最后一次充分的肿瘤评估之日被删除。将使用用于治疗人群的描述性统计(平均值、标准偏差、中值、最小值和最大值)来总结PFS。除了使用Kaplan-Meier方法基于观察值和删除值二者计算的中值,所有其他统计量(平均值、标准偏差、最小值和最大值)将仅基于观察值计算。

[1355] 总生存期(OS)被测量为从化合物A的第一剂量到由于任何原因引起的死亡的时间,并且将被以与针对PFS描述的方式类似的方式分析。

[1356] 将总结神经内分泌受试者中血清神经内分泌标志物随时间的评估。

[1357] 将为所治疗人群(通过A部分中的剂量群组 and B部分中的肿瘤类型)总结不良事件,包括治疗引起的不良事件(TEAE)、实验室评估、生命体征、ECG结果、ECOG体能状态、LVEF评估、身体检查、生命体征、研究治疗的暴露、合并用药的评估和对具有生育潜力的女性的妊娠测试。

[1358] 观察到的不良事件将使用监管活动医学词典(Medical Dictionary for Regulatory Activities, MedDRA)(版本18.1或更高),系统器官类别(SOC)和优选术语(PT)进行分类。在逐个受试者分析中,相同AE多于一的受试者将仅被计数一次。所有不良事件也将通过SOC、PT和NCI CTCAE等级(4.0或更高版本)进行总结。导致中断研究治疗的不良事件、分类为3级或4级的不良事件、研究药物相关的AE和SAE(包括死亡)将分别制成表格。将提供所有AE、TEAE、SAE(包括死亡)的逐个受试者列表及其归因。

[1359] 临床实验室结果将通过剂量群组(A部分)或肿瘤类型(B部分)和访问来描述性地概括,其还将包括从基线的变化的显示。展示从基线到最差基线后实验室值的变化(低/正常/高)的转换表将通过剂量群组(A部分)或肿瘤类型(B部分)显示在交叉表中。展示治疗期间NCI CTCAE等级从基线到最差的基线后严重程度等级的变化的类似转换表也将通过剂量群组(A部分)或肿瘤类型(B部分)呈现用于适用分析物。根据NCI CTCAE严重程度等级(如果适用)、异常标志(低或高)以及后者的临床意义的异常临床实验室数据列表将被提供。

[1360] 将为关键实验室分析物提供图形显示(例如,“意大利面条”曲线图或箱形图)。

[1361] 将通过剂量群组(A部分)或肿瘤类型(B部分)和访问来总结用于生命体征的描述性统计(包括观察值和从基线的变化)。展示从基线到最差基线后值的变化转换表将通过剂量群组(A部分)或肿瘤类型(B部分)显示在交叉表中。生命体征测量结果将按受试者和访问列出。

[1362] ECG参数和从基线的变化将通过剂量群组(A部分)或肿瘤类型(B部分)和访问使用描述性统计学来概括。基线后异常QTc(QTcF和QTcB二者)值将使用用于以下5个类别的频率列表进行总结:

[1363] • QTc>450msec

[1364] • QTc>480msec

[1365] • QTc>500msec

[1366] • QTc从基线增加>30msec

[1367] • QTc从基线增加>60msec

[1368] 将通过剂量群组 (A部分) 或肿瘤类型 (B部分) 在交叉列表中示出从基线到异常情况的最差基线后定性评估 (即, “正常”、“异常, 非临床显著”和“异常, 临床显著”或“正常”和“异常”) 的转换。通过受试者、通过访问的ECG参数的列表将被提供。

[1369] 没有计划正式的期中分析。数据将持续进行审查。

[1370] 由借助EWOC原理的递增引导的自适应BLRM将用于进行剂量推荐并估计研究的递增阶段期间的MTD (更多细节参见附录E)。

[1371] 研究的递增部分中的DLT关系将通过以下贝叶斯逻辑回归模型来描述:

$$[1372] \quad \log\left(\frac{p_j}{1-p_j}\right) = \log \alpha + \beta \cdot \log\left(\frac{d_j}{d^*}\right), \alpha > 0, \beta > 0$$

[1373] 其中 p_j 是在剂量的DLT率, d_j 是剂量水平, $d^*=30\text{mg}$ 参考剂量, α 是在 d^* 时DLT的几率。

[1374] 基于来自临床前数据的先前估计 (中值) 和针对在每个剂量DLT概率的宽置信区间, 引出模型参数 ($\log(\alpha)$, $\log(\beta)$) 的模糊双变量正态先验。根据临床前数据, 先验MTD被假定为30mg。假定用于第一剂量的DLT的概率低。如Neuenschwander等 (2015) 所述, 基于构建弱的提供信息的先验的方法来选择模型参数的先验分布的参数, 并将其提供在表36中。

[1375] 表36. 模型参数的双变量正态分布的先验参数

[1376]

参数	平均值	标准偏差	相关性
$\log(\alpha)$, $\log(\beta)$	(-0.693, 0.205)	(2, 0.75)	0

[1377] 临时剂量水平为: 1.25mg、2.5mg、5mg、10mg、15mg、22.5mg、30mg和37.5mg。然而, 基于新出现的安全性信息, 为试验选择的实际剂量水平可能与临时剂量水平不同。

[1378] 在每群组的受试者之后, 获得在不同剂量水平DLT率的概率的后验分布。此分析的结果根据在每个剂量水平DLT的真实率在下列区间中每个中的估计概率来总结:

[1379] • [0, 0.16) 剂量不足

[1380] • [0.16, 0.33) 靶向毒性

[1381] • [0.33, 1.00] 毒性过大

[1382] 遵循借助EWOC的递增的原则, 在受试者的每个群组之后, 推荐剂量是在满足EWOC的剂量中落入目标区间 [16%, 33%) 的DLT率的最高后验概率的推荐剂量, 即, 不太可能 (< 25% 后验概率) 的是, 在所述剂量的DLT率落入过度毒性区间。

[1383] 注意, 使靶向毒性的后验概率最大化的剂量是MTD的最佳估计值, 但是如果数据量不足则根据过量标准, 其可能不是可容许的剂量。如果将模糊先验信息用于DLT的概率, 则在研究的早期阶段, 此递增程序将反映保守策略。

[1384] 自适应贝叶斯逻辑模型推荐的剂量可以被视为待与在确定待调查的下一剂量水平的分析时观察到的毒性特征的临床评估整合在一起的指导和信息。

[1385] 化合物A的血浆PK参数诸如AUC、 C_{\max} 、 T_{\max} 、 $t_{1/2}$ 、CL/F和 V_z/F 将通过非分区分析方法从化合物A的血浆浓度-时间曲线计算。可视情况计算其他PK参数。

[1386] 将通过标称时间点、研究日和剂量群组为化合物A浓度提供总结统计结果, 包括受试者数量 (N)、平均值、标准偏差 (SD)、变异系数 (CV%)、几何平均值、几何CV%、中值、最小

值和最大值。血浆浓度的平均值和个别曲线图将以原始和半对数标度二者呈现。还将通过研究日和剂量群组提供化合物A PK参数的总结统计结果并将其以表格形式呈现。

[1387] 可以进行用于化合物A的群组PK分析以探索血浆药物暴露的个体间变异性和贡献因素(协变量)。将探索化合物A剂量、血浆暴露和所选临床终点(例如,毒性、效力和/或生物标志物的测量结果)之间的关系。人群PK模型以及暴露-响应知识可用于协助鉴定B部分或2期研究的给药方案。

[1388] 将通过剂量群组(A部分)或肿瘤类型(B部分)和访问,为基线、基线后值以及用于生物标志物(包括神经内分泌标志物)从基线的变化或从基线的变化百分比提供描述性统计(N、平均值、SD、中值、最小值和最大值)。

[1389] 将绘制受试者的生物标志物随时间推移的结果。治疗前和治疗期间生物标志物水平的比较将通过Wilcoxon符号秩检验执行。如果可以获得来自生物标志物测定的足够且有效的结果,则将探索生物标志物水平的变化百分比与包括ORR和CBR的临床终点之间的关系。人群PK模型以及暴露-响应知识可用于协助鉴定B部分或2期研究的给药方案。

[1390] 不良事件

[1391] AE是在研究过程中可在受试者中表现出或恶化的任何有害、非计划的或不幸的医学事件。它可为新并发病、恶化的伴随病、损伤或受试者健康的任何伴随受损,包括实验室测试值(无论病因如何)。任何恶化(即,预先存在的状况的频率或强度的任何临床上显著的不利变化)应被视为AE。诊断或综合征应记录在CRF的AE页面上,而不是诊断或综合征的个体体征或症状。

[1392] 对调查产品的滥用、撤回、敏感性或毒性应报告为AE。过量(无意或有意)——无论是否与AE相关——都应在过量CRF上报告。调查产品的意外或故意过量的任何后遗症都应在AECRF上报告为AE。如果过量的后遗症是SAE,则该后遗症必须在SAE报告表格和AECRF上被报告。导致SAE的过量应该被鉴定为SAE报告表格和CRF上事件的原因,但不应该作为SAE本身报告。

[1393] 在过量的事件下,应当视情况监测受试者并且应当根据需要使受试者接受支持性措施。对于化合物A过量,没有已知的特异性解毒剂。实际治疗应取决于临床情况的严重程度以及治疗医生的判断和经验。

[1394] 在研究期间将监测所有受试者的AE。评估可包括监测以下参数中的任一个或所有:受试者的临床症状,实验室、病理、放射学或手术发现,体检发现或来自其他测试和/或程序的发现。

[1395] 调查员从受试者签署知情同意书的时间到化合物A的最后剂量后28天将记录所有AE,以及此后任何时间由调查员知道的那些被怀疑与化合物A相关的SAE。AE和SAE将记录在CRF的AE页面和受试者的源文件中。在调查员了解事件后24小时内,必须使用SAE报告表格或经批准的等效表格将所有SAE通过传真或其他适当方法报告给Celgene Drug Safety。

[1396] 有资格的调查员将关于以下项来评价所有不良事件:

[1397] 严重性

[1398] SAE是在任何剂量发生的任何AE:

[1399] • 导致死亡;

[1400] • 有生命危险(即,在调查员看来,受试者处于死于AE的即刻风险);

- [1401] • 需要住院治疗或延长现有住院时间(住院治疗被定义为住院病人入院,无论住院时间长短);
- [1402] • 导致持续或严重残疾/无行为能力(严重破坏受试者进行正常生活功能的能力);
- [1403] • 是先天性异常/出生缺陷;
- [1404] • 构成重要的医学事件。
- [1405] 重要的医学事件被定义为如下的事件:可不会立即危及生命或导致死亡、住院或残疾,但可危害受试者或需要医学或外科手术干预以防止上面所列其他结果之一。在决定此类AE是否应该被认为是严重时,应该进行医学和科学判断。
- [1406] 不被认为是SAE的事件是由于以下的住院治疗:
- [1407] • 协议治疗管理的标准程序。然而,因治疗施用引起的并发症的住院治疗或延长住院治疗将被报告为SAE。
- [1408] • 与状况的任何恶化无关的研究适应症的常规治疗或监测。
- [1409] • 作为研究适应症的常规治疗的血液或血小板输注的管理。然而,因此类输注并发症的住院治疗或延长住院治疗仍然是可报告的SAE。
- [1410] • 协议/与疾病相关的调查的程序(例如,手术、扫描、内窥镜检查、实验室测试取样、骨髓取样)。然而,因此类程序并发症的住院治疗或延长住院治疗仍是可报告的SAE。
- [1411] • 在没有AE的情况下,出于技术、实践或社会原因的住院治疗或延长住院治疗。
- [1412] • 计划的程序(即,在研究治疗开始前所计划的);必须记录在源文件和CRF中。因并发症的住院治疗或延长住院治疗仍然是一个可报告的SAE。
- [1413] • 对未从基线恶化的已有状况(与所研究适应症无关)的选择性治疗或选择性程序。
- [1414] • 在不满足上述其他严重性标准情况下的不导致入院的紧急门诊治疗或观察。
- [1415] 如果AE被认为严重,则必须完成CRF的AE页面/屏幕和SAE报告表格二者。
- [1416] 对于每个SAE,调查员将提供有关严重程度、开始和停止日期、与IP的关系、对IP采取的行动以及结果的信息。
- [1417] 严重程度/强度
- [1418] 对于AE和SAE二者,调查员必须评估事件的严重程度/强度。
- [1419] AE的严重程度/强度将根据受试者的症状根据不良事件通用术语标准的当前有效次要版本(CTCAE,版本4.0)进行分级;http://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/ctc.htm#ctc_40
- [1420] 应根据以下等级评价CTCAE中未定义的AE的严重程度/强度:
- [1421] • 1级=轻度-短暂或轻微不适;没有活动限制;无需医学干预/治疗
- [1422] • 2级=中等-轻度至中度的活动受限,可需要一些帮助;无需或需要最小医学干预/治疗
- [1423] • 3级=严重-显著活动受限,通常需要一些帮助;需要医学干预/治疗,住院治疗是可能的
- [1424] • 4级=威胁生命-活动受到极大限制,需要大量帮助;需要重大的医学干预/治疗,住院治疗或可能的临终关怀

[1425] • 5级=死亡-事件导致死亡]

[1426] 术语“严重程度 (severe)”通常用于描述特定事件的强度 (如轻度、中度或严重心肌梗死);然而,事件本身可具有相对较小的医学意义 (诸如严重的头痛)。此标准与“严重性 (serious)”不一样,严重性是基于与对受试者的生命或功能行使构成威胁的事件相关的受试者/事件结果或行动标准。

[1427] 严重性而非严重程度作为定义监管职责的指南。

[1428] 因果关系

[1429] 调查员必须确定施用IP与如下定义的未被怀疑或怀疑的AE/SAE的发生之间的关系:

[1430] 未被怀疑:不良事件与IP施用的因果关系不太可能或疏远,或其他药品、治疗干预或潜在条件为观察到的事件提供充分的解释。

[1431] 怀疑:存在IP施用导致不良事件的合理的可能性。“合理的可能性”意指有证据表明IP与不良事件之间存在因果关系。

[1432] 应根据当前可用的信息为每个AE/SAE评估并提供因果关系。随着另外的信息变得可用,将重新评估并提供因果关系。

[1433] 如果事件被评估为怀疑与尚未由Celgene制造或提供的比较物、辅助或另外的CC—90011有关,请在报告该事件时提供制造商的名称。

[1434] 持续时间

[1435] 对于AE和SAE二者,调查员将提供事件开始和停止日期的记录。

[1436] 采取的行动

[1437] 适用时,调查员将报告因AE或SAE而借助IP采取的行动 (例如,视情况而定,中断、中止或减少IP的剂量),并报告是否为事件提供伴随和/或另外的治疗。

[1438] 结果

[1439] 调查员将报告用于AE和SAE的事件的结果。

[1440] 在中断受试者参与研究时尚未恢复的所有SAE必须被追踪,直至恢复 (返回基线)、伴有后遗症地恢复或死亡 (由于SAE)。

[1441] 如果异常具有以下情况,则异常实验室值被认为是AE:

[1442] • 导致从研究中中断;

[1443] • 需要治疗、修改/中止化合物A剂量,或任何其他治疗干预;或

[1444] • 被判断具有重要的临床重要性,例如,指示新疾病过程和/或器官毒性的异常,或者作为现有状况的加重或恶化的异常。

[1445] 无论严重程度等级如何,仅需要将满足严重性标准的实验室异常记录为严重不良事件。

[1446] 如果实验室异常是诊断或综合征的一个组成部分,则只应将诊断或综合征记录在CRF的AE页面/屏幕上。如果异常不是诊断或综合征的一部分,则应将实验室异常记录为AE。如果可能,实验室异常应记录为医学术语,而不仅仅是异常的实验室结果 (例如,记录血小板减少症而不是血小板减少)。

[1447] 在具有生育潜力的女性受试者或男性受试者的有生育潜力的伴侣发生的所有怀孕或疑似怀孕都是可立即报告的事件。任何怀孕女性 (例如,护理人员、药剂师、研究协调员

或监测员)对化合物A的暴露也是可立即报告的事件。

[1448] 当受试者服用化合物A时,或者在受试者的化合物A的最后剂量的90天内发生怀孕和疑似怀孕(包括在具有生育潜力的女性受试者中升高的 β -hCG或阳性妊娠测试,无论疾病状态如何)被认为是可立即报告的事件。调查产品将被立即中断。必须使用怀孕初始报告表格或经批准的等效表格,通过电子邮件、电话或传真或其他适当方法立即向Celgene Drug Safety报告怀孕、疑似怀孕或妊娠测试阳性。

[1449] 应该将女性受试者转诊给产科医生-妇科医生,优选经历生殖毒性的产科医生-妇科医生,以进行进一步的评价和咨询。调查员将追踪女性受试者直至怀孕完成,并且必须使用妊娠随访报告表格或批准的等效表格立即通知Celgene Drug Safety关于妊娠结果(正常或异常结果)。

[1450] 如果妊娠结果异常(例如,自发性流产),则调查员应将异常结果报告为AE。如果异常结果满足任何严重标准,则必须在调查员知道该事件的24小时内使用SAE报告表格或经批准的等效表格通过传真或其他适当方法将其作为SAE报告至Celgene Drug Safety。

[1451] 在出生后28天内发生的所有新生儿死亡应该被作为SAE报告,而不考虑因果关系。此外,调查员怀疑与子宫内暴露于化合物A有关的在28天后的任何婴儿死亡也应在调查员了解事件后24小时内使用SAE报告表格或批准的等效表格通过传真或其他适当方法向Celgene Drug Safety报告。

[1452] 如果服用化合物A的男性受试者的女性伴侣怀孕,则服用化合物A的男性受试者应该通知调查员,并且应该建议怀孕的女性伴侣立即联系她们的医疗保健提供者。在适用的情况下,化合物A可需要在男性受试者中中断,但随后可以由调查员和医学监测员自行决定恢复。

[1453] 满足用于SAE的任何标准的任何AE需要完成SAE报告表格,除了被记录在CRF的AE页面/屏幕上之外。所有SAE必须在调查员知道事件的24小时内使用SAE报告表格或批准的等效表格通过传真或其他适当方法(例如,通过电子邮件)报告至Celgene Drug Safety。此指令适用于初始SAE报告以及任何随访报告。

[1454] 调查员需要确保这些表格上的数据准确且一致。此要求适用于研究期间(从受试者签署知情同意书的时间到化合物A的最后剂量后28天)发生的所有SAE(无论与化合物A的关系如何)或此后任何时间调查员知道的怀疑与化合物A有关的任何SAE。记述在治疗前(签署ICD后)发生的严重不良事件。

[1455] SAE报告应提供SAE的详细描述并且包括医院记录和其他相关文件的简明摘要。如果受试者死亡并已经进行了尸检,尸检报告和死亡证明的副本在它们可用时就立即发送给Celgene Drug Safety。任何随访数据应在后续SAE报告表格或经批准的等效表格中详细说明,并发送至Celgene Drug Safety。

[1456] 在当地立法要求的情况下,调查员负责向SAE的机构审查委员会/道德委员会(IRB/EC)告知并向他们提供有关该事件的所有相关初始和随访信息。调查员必须存档保存所有SAE信息的副本,包括与Celgene和IRB/EC的通信。

[1457] 关于SAE的查询将通过传真或电子邮件从Celgene Drug Safety传送到现场。响应时间预计不会超过五(5)个工作日。可以通过电话进行紧急查询(例如,缺少因果关系评估)。

[1458] 出于监管报告的目的,Celgene Drug Safety将基于调查员手册确定怀疑与化合物A相关的事件的预期性。

[1459] 在美国,将根据21CFR 312.32以加急方式报告所有疑似意外的严重不良反应(SUSAR)。

[1460] 对于欧洲经济区 (EEA) 内的国家,Celgene或其授权代表将根据Directive 2001/20/EC以及关于人用调查产品 (ENTR/CT3) 临床试验产生的不良反应报告的收集、核实和呈现的详细指南并且还根据特定国家要求以加急方式向相关监管机构和道德委员会报告疑似意外严重不良反应(SUSAR)。

[1461] 不良事件诸如疾病进展,与疾病进展相关的死亡(在没有严重的化合物A相关事件的情况下)和由于所研究指征的复发引起的严重事件将不会受到赞助商对监管当局的加急报告的约束。

[1462] Celgene或其授权代表应将以下信息通知调查员:

[1463] • 疑似与本研究中或在其他研究中使用化合物A有关的严重且意外的任何AE(例如SUSAR);

[1464] • 来自实验室动物的测试的表明人类受试者存在重大风险(包括致突变性、致畸性或致癌性的报告)的任何发现。

[1465] 在当地法律要求的情况下,调查员应及时通知他/她的IRB/EC这些新的严重和意外的AE或对受试者的重大风险。

[1466] 调查员必须存档保存所有相关安全性信息的副本,包括与Celgene和IRB/EC的通信。

[1467] 中断

[1468] 以下事件被认为是从调查产品中中断受试者的充分理由:

[1469] • 不良事件

[1470] • 受试者退出

[1471] • 缺乏功效

[1472] • 医生决定

[1473] • 违反协议

[1474] • 进展性疾病

[1475] • 死亡

[1476] • 失去随访

[1477] • 其他(将在CRF上指明)

[1478] 用于中断治疗的原因应记录在CRF和源文件中。在不良事件后中断治疗的情况下,在化合物A的最后剂量后,将尽一切努力追踪受试者28天。

[1479] 中断受试者治疗的决定仍然是治疗医生的责任,赞助商不会延迟或拒绝该决定。然而,在中断受试者之前,调查员可以联系医疗监测员并转发适当的支持文件以供审查和讨论。

[1480] 注意:应当追踪被认为具有临床意义的任何实验室结果,诸如嗜中性粒细胞减少症、血小板减少症、其他异常等,直至返回基线或1级。

[1481] 以下事件被认为是从研究中中断受试者的充分理由:

- [1482] • 筛查失败
- [1483] • 受试者退出
- [1484] • 缺乏功效
- [1485] • 医生决定
- [1486] • 违反协议
- [1487] • 进展性疾病
- [1488] • 死亡
- [1489] • 失去随访
- [1490] • 其他(将在CRF上指明)
- [1491] 研究中断的原因应记录在CRF和源文件中。
- [1492] 紧急程序
- [1493] 在紧急情况下,调查员应以协议的紧急联系信息页面(标题页之后)上列出的号码通过电话联系负责的赞助商的研究医生/医学监测员或指定人员。
- [1494] 在无法联系到赞助商的研究医生/医疗监测员或指定人员时,请以协议的紧急联系信息页面(标题页之后)上列出的号码通过电话联系全球紧急呼叫中心。此全球紧急呼叫中心每周7天,每天24小时提供服务。代表们负责获取您的回拨信息,并联系在线的Celgene/合同研究机构医疗监测员,然后他们会及时与您联系。
- [1495] 注意:只有当您不能联系到赞助商的研究医生或医疗监测员或指定人员时,才应使用备用24小时全球紧急联系呼叫中心进行紧急呼叫。
- [1496] 这是开放标签研究;因此,化合物A将在包装标签上被标明。在此研究中被招募的受试者将被发布一张身份证,示出本研究的名称和紧急联系电话。这可以由医疗保健专业人员使用,以寻求关于参与研究的受试者的紧急信息。
- [1497] 监管考虑因素
- [1498] 本研究协议中阐述的与此研究的实施、评价和记录相关的程序设计为确保,Celgene、其授权代表和调查员遵守良好临床实践(GCP)(如国际协调会议(ICH)指南E6中所述并根据赫尔辛基宣言中概述的一般道德原则)。该研究将在开始前获得来自IRB/EC的批准。调查员将根据相关监管机构的适用国家、州和地方法律进行此研究的所有方面。
- [1499] 调查员职责在ICH良好临床实践指南和当地法规中列出。Celgene员工或授权代表将评价并批准所有调查员,其继而将选择他们的员工。
- [1500] 调查员应确保,所有协助研究的个人被充分告知协议、修订、研究治疗以及与研究相关的职责和功能,包括Celgene信息的保密义务。调查员应保留一份向他或她委派了重要研究相关职责的副调查员和其他具有相关资格的个人的名单。
- [1501] 调查员负责保持签署知情同意书(ICD)并被筛查进入研究的所有受试者的记录。未通过筛查的受试者必须将原因记录在受试者的源文件中。
- [1502] 调查员或调查员员工的指定成员必须在监测访问期间可用于审查数据,解决查询并允许直接访问受试者记录(例如,医疗记录、办公室图表、医院图表和与研究相关的图表)用于源数据验证。调查员必须确保及时准确地完成CRF和查询。
- [1503] 协议和修订中含有的信息(Celgene在公共注册网站上提供的信息除外)被认为是Celgene机密信息。只有Celgene之前在公共注册网站上公开的信息可由调查员或其机构自

由披露,或者如临床试验协定中所概述的。没有来自Celgene的明确书面许可,Celgene协议、修订和IB信息不得公开(例如在调查员或其机构的网站上)。提议在调查员或其机构网站上发布的信息必须提交给Celgene进行审查和批准,提供至少5个工作日用于审查。

[1504] 在该研究的结果向公众提供时,Celgene将向调查员提供为外行人写的结果的摘要。调查员有责任按照受试者的约定与受试者和/或其护理人员分享这些结果。

[1505] 调查员必须在任何研究相关程序之前获得受试者和/或受试者的法定代表的知情同意书。

[1506] 在研究受试者进入研究之前发生的知情同意书的记录和知情同意书过程应记录在研究受试者的源文件中,包括日期。在研究受试者进入研究之前由研究受试者和同意研究受试者的个人签署并注明日期的原始ICD必须保留在调查员的研究文件中并给研究受试者的副本中。此外,如果修改协议并且这影响知情同意书的内容,则必须修订ICD。在实施修改的协议时参与研究的研究受试者必须再次同意ICD的修订版本。由研究受试者和同意研究受试者的人员签署并注明日期的修订后ICD必须保留在调查员的研究文件和给研究受试者的副本中。

[1507] Celgene申明受试者有权防止侵犯隐私并遵守ICH和其他当地法规(以最严格者为准)。Celgene要求调查员准许Celgene的代表,并且(在必要时)准许来自监管当局的代表根据当地法律审查和/或复制与研究相关的任何医疗记录。

[1508] 如果直接访问医疗记录需要与受试者签署的ICD分开的豁免或授权,则调查员有责任从适当的个人以书面形式获得此类许可。

[1509] 对此协议的任何修改必须由赞助商的研究医生/医学监测员批准。修订将提交IRB/EC用于书面批准。必须在实施修改的版本发生之前获得书面批准。来自IRB/EC的书面签署批准应具体地提及调查员的名称、协议编号、研究名称和适用的修改编号。具有行政性质的修改不需要IRB/IEC批准,但将提交给IRB/IEC以供信息目的。

[1510] 在研究中有实质性修改时,相应的修改将提交给每个国家的法定监管机构,并且在批准之前不会被实施。

[1511] 在研究开始之前,研究协议、ICD和任何其他适当的文件将提交给IRB/EC,用附信或表格列出提交的文件、其发布日期和其中批准为本地法律要求的场所(或管辖的地区或区域(如适用的话))。

[1512] 在Celgene或其授权代表收到关于开始研究的所有伦理和法律要求的文件之后,IP仅可由Celgene或其授权代表提供给调查员。此文件还必须包括IRB/EC成员名单及其职业和资格。如果IRB/EC不披露委员会成员的姓名、职业和资格,则应要求其发布声明,确认委员会的组成符合GCP。例如,可以接受IRB一般保险号作为此列表的替代。通过IRB/EC的正式批准应提及协议标题、编号、修订号(如适用)、研究场所(或管辖的地区或区域(如适用的话))以及审查的任何其他文件。必须提到做出决定的日期,并且必须由委员会成员正式签署。在该研究中招募第一个受试者之前,必须满足所有道德和法律要求。

[1513] 必须根据当地法律要求向IRB/EC以及当局(如果适用)告知所有后续的协议修改。必须对修改进行评价,以确定是否必须寻求正式批准以及是否还应修订ICD。

[1514] 调查员必须保持与IRB/EC以及协调调查员和IRB/EC之间(如果适用)的所有通信的记录。此声明也适用于调查员(或协调调查员,如果适用)与监管机构之间的任何通信。

- [1515] 用于招募研究受试者的任何广告必须在使用前由Celgene和IRB/EC审查。
- [1516] 如果立法或IRB/EC要求,调查员必须向IRB/EC提交:
- [1517] • 尽快提供有关严重或意外不良事件的信息;
- [1518] • 定期报告研究进展;
- [1519] • 偏离协议或任何可增加受试者风险的事项。
- [1520] Celgene保留出于合理的医疗或管理原因在任何时间提前终止该研究的权利。任何过早中断都将根据当地要求(例如,IRB/EC、监管机构等)进行适当记录。
- [1521] 此外,调查员或Celgene有权在研究期间的任何时间出于医疗或管理原因中断单个场所,该原因诸如:
- [1522] • 招募不理想;
- [1523] • GCP不合规;
- [1524] • 数据收集不准确或不完整;
- [1525] • 伪造记录;
- [1526] • 未遵守研究协议。
- [1527] 数据处理和记录保存
- [1528] 调查员必须确保,与研究的进行和调查产品的分发有关的记录和文件是完整、准确、存档和留存的。源文件的实例包括:医院记录;诊所和办公室图表;实验室笔记;备忘录;受试者日记或评价清单;分发记录;记录的自动化仪器的数据;作为准确副本的经核实后经核证的副本或抄本;缩微胶片;X光片和报告;和在药房和实验室保存的记录,以及CRF或CD-ROM的副本。
- [1529] 数据将经由CRF收集并且输入每个Celgene SOP的临床数据库。此数据将通过使用临床团队指定的程序化编辑检查进行电子验证。如有必要,数据的矛盾将引起临床团队和调查现场人员的注意。这些问题的解决方案将在数据库中反映。系统内的审计追踪将追踪对数据所做的所有变化。
- [1530] 调查员必须根据临床试验协定中概述的时间段留存基本文件。调查员必须在上述时间段内或根据当地法律或要求(以较长者为准)留存这些文件。基本文件包括但不限于以下:
- [1531] • 所有受试者签署的ICD;
- [1532] • 受试者识别代码列表,筛查日志(如果适用)和招募日志;
- [1533] • 调查员与IRB/EC之间的所有通信的记录;
- [1534] • IRB/EC的组成;
- [1535] • 调查员、Celgene及其授权的代表之间的所有通信的记录;
- [1536] • 调查员向其委派重要的研究相关职责的副调查员和其他有适当资格个人的名单,以及他们在研究中的任务、简历和签名;
- [1537] • 所有受试者的CRF(如果是纸质)和更正文件的副本;
- [1538] • IP可说明性记录;
- [1539] • 留存的任何体液或组织样品的记录;
- [1540] • 所有其他来源文件(受试者记录、医院记录、实验室记录等);
- [1541] • 如ICH综合指南第8节中列出的关于GCP的所有其他文件(进行临床试验的基本

文件)。

[1542] 如果调查员希望将基本文件指派给其他人,将它们移到另一个位置或者在指定时间段内不能留存它们,他/她必须通知Celgene。在销毁任何记录之前,调查员必须获得Celgene的书面批准。如果调查员无法履行此义务,则调查员必须要求Celgene许可做出其他安排。应记录这些安排的细节。

[1543] 如果相关卫生当局要求,应提供所有研究文件。调查员或机构应采取措施防止意外或过早销毁这些文件。

[1544] 质量控制和质量保证

[1545] 研究的所有方面将由Celgene或其授权代表仔细监测以遵守关于当前GCP和SOP的适用政府法规。

[1546] Celgene确保,在研究之前、期间和之后执行适当的监测程序。在研究初始访问和/或调查员会议上,由调查员和工作人员对研究的所有方面进行审查。在招募受试者进入研究之前,Celgene代表将与调查员一起审查协议、CRF、获得知情同意书的程序、记录保存以及AE/SAE的报告。监测将包括与调查员及他/她的工作人员一起进行的现场访问以及通过邮件、电子邮件、传真或电话进行的任何适当通信。在监测访问期间,将由Celgene代表根据研究监测计划对设施、调查产品储存区、CRF、受试者的源文件和所有其他研究文件进行查验/审查。

[1547] 将通过执行源数据验证来检查准确性,该源数据验证直接比较进入CRF的条目与适当的源文件。任何所得矛盾将由调查员和/或其工作人员进行审查。任何必要的更正将直接向CRF提出,或经由通过调查员和/或其工作人员的询问进行。监测程序要求,验证知情同意书、遵守纳入/排除标准和SAE文件及其正确记录。可在特定研究的监测计划中概述其他监测活动。

[1548] 除了常规监测程序之外,Celgene内还存在良好临床实践质量保证单位。此单位的代表将根据Celgene SOP对临床研究活动进行审计,以评价对良好临床实践指南和法规的遵守情况。

[1549] 要求调查员准许直接访问进行研究的设施、源文件、CRF和研究受试者参与的适用支持记录,以供IRB/EC、监管当局(例如FDA、EMA、加拿大卫生部)和公司授权代表进行审计和查验。调查员应尽一切努力进行审计和/或查验。如果任何监管当局联系调查员进行查验,他/她应立即联系Celgene。

[1550] 出版物

[1551] 除了Celgene在公共注册网站上提供的信息之外,所有与协议和修改相关的信息被认为是Celgene机密信息,不得用于任何出版物。建议供用于出版物的Celgene协议相关信息必须提交给Celgene进行审查和批准,并且未经Celgene明确书面许可或临床试验协定中的描述,不得在出版物中使用。

[1552] 无论结果如何,Celgene将确保Celgene赞助的研究被考虑在同行评审期刊的科学文献中发表。至少,这适用于所有3期临床研究的结果,以及重要医学重要性的任何其他研究结果。这还包括与已中断开发项目的调查药物有关的结果。

[1553] 研究结果也可以在一个或更多医学会议上呈现,并且可以用于科学交流和教学目的。此外,根据当地卫生当局的规定,本研究及其结果可以提交以被包含到所有适当的卫

生当局研究登记处,以及卫生当局研究登记网站上的出版物。

[1554] 外部作者的资格以及第一作者的选择将基于若干考虑因素,包括但不限于对协议开发、研究招募、数据质量、参与数据分析、参与研究指导委员会(适用时)的贡献以及对摘要、呈现和/或出版物开发的贡献。

[1555] 附录A:缩略语表

[1556]

缩写或指定术语	解释
ADA	抗药物抗体
ADCC	抗体依赖性细胞毒性
ADL	日常生活活动
AE	不良事件
ALL	急性淋巴性白血病
ALT	丙氨酸氨基转移酶(SGPT)
AML	急性髓系白血病
ANC	绝对中性粒细胞计数
Ara-C	阿糖胞苷
AST	天冬氨酸氨基转移酶(SGOT)
AUC	曲线下面积
β -hCG	人绒毛膜促性腺激素的 β 亚基
BID	一天两次
BM	骨髓
BMI	体重指数
BSA	体表面积
BUN	血尿素氮
C	周期
CBC	全血计数
CD	分化簇
CEBP α	CCAAT/增强子结合蛋白 α
CI	置信区间
c-Kit	肥大/干细胞生长因子受体
CL	清除
C_{max}	药物的最大血浆浓度
CNS	中枢神经系统
CR	完全缓解
CRc	细胞遗传学完全缓解
CRi	完全缓解,其中中性粒细胞恢复不完全
CRp	完全缓解,其中血小板恢复不完全

[1557]

缩写或指定术语	解释
CRP	C 反应蛋白
CRR	完全缓解率
CRO	合同研究机构
CRF	病例报告表格
CRP	临床研究医师
CRS	临床研究科学家
CRT	钙网蛋白
CT	计算机断层扫描
CTCAE	不良事件通用术语标准
CV%	变异系数
DAT	直接抗球蛋白测试
DCR	疾病控制率
DIC	弥散性血管内凝血
DLT	剂量限制性毒性
DMC	数据监测委员会
DOR	响应的持续时间
EC	道德委员会
ECG	心电图
ECHO	心回波图
ECOGPS	东部肿瘤协作组体能状态
eCRF	电子病例报告表格
EEA	欧洲经济区
ELISA	酶联免疫分析
EOI	输注结束
EOT	治疗结束
ESR	红细胞沉降率
FACS	荧光激活细胞分选
FCBP	有生育潜力的女性
FDA	食品与药物管理局
FISH	荧光原位杂交
FLT3	Fms 相关酪氨酸激酶 3
FLT3-ITD	Fms 相关酪氨酸激酶 3 -内部串联重复
FOXP3	叉头框蛋白 P3
GCP	良好临床实践
GVHD	移植物抗宿主病
HBV	乙型肝炎病毒
HCV	丙型肝炎病
HGB	血红蛋白
HIV	人体免疫缺陷病毒
HLA	人类白细胞抗原
HNSTD	最高非严重毒性剂量
HSCT	造血干细胞移植
huCD	人类分化簇
ICD	知情同意书
ICF	知情同意表格
ICH	国际协调会议
ICSH	国际血液标准化理事会

[1558]

缩写或指定术语	解释
IFN	干扰素
IgE	免疫球蛋白 E 亚类
IgG	免疫球蛋白 G 亚类
IL	白介素
IL-1 β	白介素-1 β
IND	调查新药
INR	国际标准化比率
IP	调查产品
IPSS-R	修订的国际预后指数评分系统
IRB	机构审查委员会
IRR	输注相关反应
IRT	综合响应技术
IV	静脉内的
IVIG	静脉内免疫球蛋白
IWG	国际工作组
KC-GRO	角质细胞来源的细胞因子生长调节癌基因
LDH	乳酸盐脱氢酶
LSC	白血病干细胞
LVEF	左心室射血分数
mCR	分子完全缓解
MCP-1	单核细胞趋化蛋白-1
MDR	多重耐药性
MDS	骨髓增生异常综合征
MedDRA	监管活动医学词典 (Medical Dictionary for Regulatory Activity)
MIP-1 α	巨噬细胞炎性蛋白-1 α
MM	多发性骨髓瘤
MRI	磁共振成像
MTD	最大耐受剂量
MUGA	多门控采集
N	数目
NCI	国家癌症研究所
NHL	非霍奇金淋巴瘤
NOD-SCID	非肥胖糖尿病, 严重联合免疫缺陷
NOAEL	没有观察到副作用水平
NOEL	没有观察到作用水平
NPM1	核磷蛋白 1 (Nucleophosmin 1)
NSG	非肥胖糖尿病, 严重联合免疫缺陷 γ
NTD	不耐受剂量
O ₂	氧气
ORR	客观响应率
OS	总生存期
PBMC	外周血单核细胞
PCR	聚合酶链式反应
PD	药效学
PFS	无进展生存期
PK	药物动力学
PLT	血小板

[1559]

缩写或指定术语	解释
PR	部分缓解
PT	凝血酶原时间
PTT	部分凝血活酶时间
Q2W	每两周一次
QD	每天一次
QW	每周一次
QWx2	每周一次,持续两周
QWx4	一周一次,持续四周
RAEB	伴有过量成纤维细胞的难治性贫血
RBC	红细胞计数
RFS	无复发生存期
RP2D	推荐的2期剂量
SAE	严重不良事件
SAP	统计分析计划
SC	指导委员会
SD	标准偏差
SE	标准误差
SGOT	血清谷氨酰草酰乙酸转氨酶
SGPT	血清谷氨酰丙酮酸转氨酶
SIRP α	信号调节蛋白 α
SOP	标准作业程序
SRC	安全性审查委员会
SUSAR	疑似意外严重不良反应
$t_{1/2}$	半衰期
t_{max}	血浆浓度达到峰值的时间
TLS	肿瘤溶解综合征
TNBC	三阴性乳腺癌
TNF α	肿瘤坏死因子- α
ULN	正常上限
US	美国
USP	美国药典
V_{ss}	分配体积
WBC	白细胞计数
WHO	世界卫生组织
Wks	周

[1560] 附录B:RECIST版本1.1

[1561] 以下信息提取/总结自Eisenhauer,2009,New Response Evaluation Criteria in Solid Tumors:Revised RECIST Guideline (Version 1.1)。进一步详细信息,请参考主要参考文献。

[1562] 定义

[1563] 在筛查时,肿瘤病灶/淋巴结将被分类为可测量的或不可测量的。

[1564] 可测量的疾病

[1565] 肿瘤病灶。必须在至少一个维度上(要记录测量平面中的最长直径)精确测量,其中最小尺寸为:

[1566] • 通过CT扫描的10mm(CT扫描切片厚度不大于5mm)

[1567] • 通过临床检查进行的10mm卡尺测量(无法用卡尺精确测量的病灶应记录为不可测量)

[1568] • 通过胸部X光的20mm

[1569] 恶性淋巴结:为了被认为是病理扩大和可测量的,当通过CT扫描(CT扫描切片厚度建议不大于5mm)评估时,淋巴结在短轴上必须 $\geq 15\text{mm}$ 。在基线和随访中,仅测量和追踪短轴。

[1570] 不可测量的疾病

[1571] 所有其他病灶,包括小病灶(最长直径 $< 10\text{mm}$ 或短轴 ≥ 10 至 $< 15\text{mm}$ 的病理性淋巴结)以及真正无法测量的病灶。被认为真正不可测量的病灶包括:软脑膜疾病、腹水、胸膜或心包积液、炎性乳房疾病、皮肤或肺的淋巴管损伤、通过体检鉴定的腹部肿块/腹部器官肿大,其通过可重复的成像技术无法测量。

[1572] 肿瘤响应评价

[1573] 靶病灶:当在基线存在多于一个可测量的肿瘤病灶时,应将代表所有涉及器官的所有病灶、最多总共5个病灶(和每个器官最多2个病灶)鉴定为靶病灶并且将其在基线记录且测量。靶病灶应根据其大小(最长直径的病灶)而被选择,代表所有涉及器官,但另外应该是那些适合可再现性重复测量的病灶。注意,病理结节必须满足通过CT扫描 $\geq 15\text{mm}$ 短轴的可测量标准,并且只有这些结节的短轴将有助于基线总和。所有其他病理结节(短轴 $\geq 10\text{mm}$ 但 $< 15\text{mm}$ 的那些)应视为非靶病灶。短轴 $< 10\text{mm}$ 的结节被认为是非病理性的,且不应被记录或追踪。在基线时,应记录靶病灶的总和(肿瘤病灶的最长直径加上淋巴结的短轴:总体最大值为5)。

[1574] 在基线后,应在eCRF上为每次评估的所有鉴别的靶病灶提供一个值,即使非常小。如果极小且微弱的病灶无法被准确测量但被认为存在,则可以使用默认值5mm。如果病灶太小而无法测量并且事实上被认为不存在,则可以使用默认值0mm。

[1575] 非靶病灶:所有不可测量的病灶(或疾病部位)加上除作为靶病灶列出的那些外的任何可测量病灶都被认为是非靶病灶。不需要进行测量,但应在基线时注意这些病灶,并将其追踪为“存在”、“不存在”或“明确进展”。

[1576] 响应标准:分别评价靶病灶和非靶病灶的响应,并且然后将肿瘤负荷作为总体响应进行评价。

[1577] 靶病灶响应:靶病灶评估如下:

[1578] • 完全响应(CR)。所有靶病灶消失。任何病理性淋巴结(无论是靶还是非靶)必须在短轴上减少至 $< 10\text{mm}$ 。

[1579] • 部分响应(PR)。在以基线总和直径为参考的情况下,靶病灶直径的总和减少至少30%。

[1580] • 进展性疾病(PD)。以研究中的最小总和(这包括基线总和,如果其是研究中最小的)作为参考的情况下,靶病灶直径总和增加至少20%。

[1581] 除了相对增加20%之外,总和还必须展示绝对增加至少5mm。(注意:一个或多个新病灶的出现也被认为是进展)。

[1582] • 稳定疾病(SD)。在将研究中的直径的最小总和作为参考的情况下,既没有足够的收缩以具有PR资格,也没有足够的增加以具有PD资格。

[1583] 非靶病灶响应:非靶病灶将评估如下:

[1584] • 完全响应(CR)。所有非靶病灶消失,和肿瘤标志物水平正常化。所有淋巴结的大小必须是非病理性的(短轴<10mm)。

[1585] • 非CR/非PD。持续存在一种或更多种非靶病灶和/或维持肿瘤标志物水平高于正常限度。

[1586] • 进展性疾病(PD)。现有非靶病灶的明确进展(见下文评论)。(注意:一个或多个新病灶的出现也被认为是进展)。

[1587] 当受试者还具有可测量的疾病时:在这种情况下,对于在非目标疾病的基础上实现“明确的进展”,非目标疾病必须存在实质性恶化的总体水平,使得,即使存在目标疾病的SD或PR,总体肿瘤负荷已经充分增加,值得中断治疗。一个或多个非靶病灶的大小适度“增加”通常不足以达到明确的进展状态的资格。因此,在面对目标疾病的SD或PR时,仅基于非目标疾病的变化来指定总体进展将极为罕见。

[1588] 当受试者仅具有不可测量的疾病时:这种情况在某些3期试验中出现,其中其不是具有可测量疾病的研究进入的标准。如上所述,相同的一般概念在这里适用;然而,在这种情况下,没有可测量的疾病评估来归入不可测量的疾病负荷增加的解释。因为非目标疾病的恶化不容易被定量(根据定义:如果所有病灶都是真正不可测量的),在评估受试者明确进展时可以应用的有用测试是,考虑基于不可测量疾病的变化总体疾病负荷的增加是否在幅度上与针对可测量疾病宣布PD所需的增加相当:即肿瘤负荷增加表示“体积”增加另外的73%(这相当于可测量病灶的直径增加20%)。实例包括胸腔积液从“痕量”增加到“大量”,淋巴管疾病从局部增加到广泛,或者可以在协议中描述为“足以需要改变治疗”。如果看见“明确进展”,则应该认为受试者在那时已经具有总体PD。尽管将客观标准应用于不可测量的疾病是理想的,但所述疾病的本质使得无法这样做:因此,增加必须是实质性的。

[1589] 总体响应:对于具有靶病灶的受试者,应根据表A评估总体响应,并且对于仅具有非靶病灶的受试者,应根据表B评估总体响应。

[1590] 表A:时间点响应:具有靶(±非靶)疾病的受试者

[1591]

靶病灶响应	非靶病灶响应	新病灶	总体响应
CR	CR	否	CR
CR	非CR/非PD	否	PR
CR	未评价	否	PR
PR	非PD或并未全评价	否	PR
SD	非PD或并未全评价	否	SD
并未全评价	非PD	否	NE
PD	任一个	是或否	PD
任一个	PD	是或否	PD
任一个	任一个	是	PD

[1592] CR=完全响应,PR=部分响应,SD=稳定疾病,PD=进展性疾病,NE=不可评价。

[1593] 表B:时间点响应:仅患有非目标疾病的受试者

[1594]

非靶病灶响应	新病灶	总体响应
CR	否	CR
非CR/非PD	否	非CR/非PD ¹⁾
并未全评价	否	NE
明确PD	是或否	PD
任一个	是	PD

[1595] CR=完全响应,PR=部分响应,SD=稳定疾病,PD=进展性疾病,NE=不可评价。

[1596] ^a对于非靶疾病,“非CR/非PD”优于“稳定疾病”,因为SD在一些试验中越来越多地用作功效评估的终点,因此在不能测量病灶时不建议指定此类别。

[1597] 症状恶化

[1598] 具有全身性健康状况恶化、在那时需要中断治疗而没有疾病进展的客观证据的受试者应被报告为“症状恶化”。即使在中断治疗后,也应尽一切努力记录客观进展。症状恶化不是客观响应的描述符:它是停止研究治疗的原因。此类受试者的客观响应状态将通过评价靶疾病和非靶疾病来确定。

[1599] 附录C:恶性淋巴瘤的修订响应标准

[1600] 国际工作组修订的恶性淋巴瘤的响应标准 (Cheson, 2007) 可在线访问:<http://jco.ascopubs.org/cgi/reprint/25/5/579>

[1601] 附录D:体能状态标准

[1602] 表37. 东部肿瘤协作组 (ECOG) 体能状态

[1603]

评分	描述
0	完全活跃,能够不受限制地进行所有疾病前的表现
1	受限于体力紧张的活动,但可以走动,并且能够从事轻度或久坐性质的工作,如轻度家务、办公室工作。
2	能够走动,且能自我护理,但不能从事任何工作活动。达到清醒时间的约50%或约50%以上。
3	50%以上的清醒时间只能进行有限的自我护理,局限在床上或椅子上。
4	完全残疾。不能进行任何自我护理。完全局限于床或椅子
5	死亡

[1604] 附录E:贝叶斯逻辑回归模型的特征

[1605] 用于带有过量控制的剂量递增 (Babb, 1988) 的自适应贝叶斯逻辑回归模型 (Neuenschwander, 1998) 将用于指导此研究中的剂量递增。

[1606] 此附录的目的是呈现性能指标 (操作特性),其说明通过计算机模拟在各种剂量-毒性关系下估算MTD的设计精度。此外,在早期群组中在各种假设结果场景 (为简单起见,假设每个群组中只有3名可评价的患者) 下提供通过具有过量控制原理的BLRM进行的下一剂量水平的推荐,以示出其如何促进研究中的剂量递增决定。

[1607] 模拟研究的说明和结果

[1608] 此节呈现示出在各种假设的真实剂量-毒性关系下估算MTD时设计精度的操作特性。

[1609] 在总共5种真实剂量-DLT关系的场景下对BLRM执行模拟(参见表38)：

[1610] 1. 剂量-DLT关系是陡峭的曲线,并且在早期剂量水平(SE)达到MTD。

[1611] 2. 剂量-DLT关系是陡峭的曲线,并且在中等剂量水平(SM)达到MTD。

[1612] 3. 剂量-DLT关系是陡峭的曲线,并且在晚期剂量水平(SL)达到MTD。

[1613] 4. 剂量-DLT关系是平坦曲线,并且在中等剂量水平(FM)达到MTD。

[1614] 5. 剂量-DLT关系是平坦曲线,并且在晚期剂量水平(FL)达到MTD。

[1615] 表38:五个模拟场景的P(DLT),其中灰色数字指示在目标毒性区间[16%,33%]内在真实P(DLT)的剂量

[1616]

场景	在不同剂量水平的P(DLT)(mg)							
	1.25	2.5	5	10	15	22.5	30	37.5
SE	0.091	0.1699	0.2951	0.4613	0.5655	0.6642	0.7269	0.7702
SM	0.0113	0.031	0.0827	0.2022	0.317	0.4594	0.5663	0.6455
SL	0	0.0002	0.0018	0.0155	0.0522	0.1618	0.3196	0.4836
FM	0.0513	0.0867	0.1428	0.2263	0.289	0.361	0.4165	0.4611
FL	0.0009	0.0033	0.0121	0.0438	0.09	0.176	0.2694	0.3603

[1617] 审查操作特征以调查在每个真实场景下BLRM的整体性能。表39总结来自所执行的模拟的结果。

[1618] 表39:用于BLRM模拟的总结指标和与3+3的比较

[1619]

场景/方法	受试者的平均数	具有DLT的受试者的比例	推荐具有真实P(DLT)的剂量的概率		
			0.16-0.33	≥0.33	<0.16
SE, N-CRM	19.75	0.24	0.80	0.06	0.14
SE, 3+3	14.72	0.24	0.63	0.06	0.31
SM, N-CRM	22.50	0.16	0.72	0.06	0.22
SM, 3+3	20.48	0.16	0.55	0.05	0.40
SL, N-CRM	25.55	0.11	0.75	0.08	0.18
SL, 3+3	26.85	0.11	0.68	0.08	0.24
FM, N-CRM	22.24	0.17	0.48	0.08	0.44
FM, 3+3	20.38	0.18	0.37	0.10	0.52
FL, N-CRM	25.66	0.10	0.57	0.16	0.27
FL, 3+3	26.80	0.11	0.51	0.16	0.33

[1620] 总体而言,具有指定先验的BLRM模型合理地执行。在类似或稍多样品量的情况下,BLRM模型可以更高概率选择目标范围中的MTD,特别是对于场景1、2和4。

[1621] 除了上面研究的总体操作特性外,设计应该基于观察到的毒性在研究期间做出合理的决定。在完成给定的群组后,剂量递增的决定和针对后续群组选择的实际剂量将根据每个EWOC原则的BLRM建议和可用临床和实验室数据的医学审查。

[1622] 使用2-参数BLRM在表40中列出用于说明直至第三剂量群组的剂量递增的一些场景。假设每个群组恰好具有3个可评价的患者。

[1623] 表40:在三个受试者/群组情况下直至第三给药群组的可能场景

[1624]

场景	剂量历史 (mg)	DLT的数量/ 受试者的数量	通过N-CRM的 下一剂量 (mg)
1	1.25	0/3	2.5
2	1.25 2.5	0/3 0/3	2.5 5
3	1.25 2.5	0/3 1/3	2.5 2.5
4	1.25 2.5	0/3 2/3	2.5 1.25
5	1.25 2.5 5	0/3 0/3 0/3	2.5 5 10
6	1.25 2.5	0/3 0/3	2.5 5
7	1.25 2.5	0/3 0/3	2.5 5
8	1.25 2.5	0/3 1/3	2.5 2.5
9	1.25 2.5	0/3 1/3	2.5 2.5

[1625] BLRM模型再次合理地执行用于假设的剂量递增场景。贝叶斯逻辑回归模型使我们能够结合临床前信息,并基于研究中的所有安全性数据更新推荐剂量。通过查看在表中呈现的指标,可以看出模型对不同的真实场景不敏感。通常,由于过量控制标准,此模型是保守的。在所有场景中,推荐在真实P(DLT) $\geq 33\%$ 过度有毒的剂量的概率远小于推荐在真实P(DLT) 在16%和33%之间的剂量为MTD的概率。基于该模型的研究建议与临床决定过程一致,并在决定待测试剂量水平以确定MTD时,应由Celgene临床试验团队和研究调查员与其

他可用的临床信息一起考虑。

[1626] 附录F:用于治疗引起的腹泻管理的建议

[1627] 在图38中提供的公布的指南 (Benson, 2004) 被修改, 以便与研究协议保持一致。

[1628] 附录G:生物标本的管理

[1629] 这是实验室手册的附加物。

[1630] 样品处理和存储

[1631] 作为本研究的一部分的在分析后未耗尽的针对生物标志物和遗传研究收集的所有血液和组织样品将在研究完成后存储用于研究长达5年。在获得受试者同意后, 储存期将延长至研究完成后的20年, 以便在未来的研究中使用, 以了解有关癌症和其他疾病的更多信息。样品将存储在设计用于长期样品存储的安全实验室设施中, 具有适当的访问控制、监控和备用系统。

[1632] 样品编码

[1633] 所有生物标志物和遗传研究样品将仅通过代码 (受试者识别号) 识别。这些样品本身将不会有任何其他个人信息。研究医生将保持代码密钥。样品和代码密钥将保密并分开保存。对样品执行测试的研究员将仅看到代码, 且不会看到任何专门识别受试者的信息。

[1634] 血液&组织样品的研究

[1635] 生物标志物和遗传研究样品将由赞助商或由赞助商签约的公司进行测试, 以用于未来的研究, 以了解有关癌症和其他疾病的更多信息。这包括确定血细胞或肿瘤细胞中的生物标志物是否展示化合物A具有生物活性。

[1636] 生物标志物和遗传结果的报告和可用性

[1637] 生物标志物和遗传研究样品测试结果不会与受试者、保险公司或任何其他未参与上述样品分析的第三方共享。结果不会存档在受试者的医疗记录中。测试结果仅用于研究目的, 并且将不用于关于受试者的常规医疗护理的决定。

[1638] 出版物或报告中将不提及受试者的名称和标识符, 从而最小化对知道此生物标志物和遗传信息可能产生的心理或社会风险的可能性, 诸如对于就业或可保险性的风险或歧视风险。

[1639] 在撤回同意时请求样品销毁的机制

[1640] 如果受试者撤回参与该研究的同意, 他们还可要求销毁其生物标志物和遗传研究样品。在这种情况下, 受试者将告知研究医生已撤回同意并要求销毁任何已存储的、未使用样品。然后, 任何未使用的样品将由赞助商销毁。然而, 如果样品在撤回同意之前被分析, 则赞助商仍可使用已可用的数据。

[1641] 如果受试者同意允许生物标志物和遗传研究样品保留20年用于未来的研究, 他们也可以随时自由地逆转该决定。受试者将告知研究医生, 已经撤回对于样品用于将来研究的准许。然后, 任何未使用的样品将由赞助商销毁。然而, 如果样品在撤回同意之前被分析, 则赞助商仍可使用已可用的数据。

[1642] 附录H:Child-Pugh分类

[1643] 没有肝性脑病的具有Child-Pugh A分类的受试者满足用于该研究的这一个体入选标准。

[1644] 表41:Child-Pugh分类

[1645]

	1点	2点	3点
胆红素(mg/dL)	<2	2-3	>3
白蛋白(g/L)	>3.5	2.8-3.5	<2.8
以秒为单位的凝血酶原时间延长(INR)	1-4(<1.7)	4-6(1.7-2.3)	>6(>2.3)
腹水	无	轻微	中度
肝性脑病	无	1-2级	3-4级
Child A:5-6点; Child B:7-9点; Child C:≥10点			

[1646] 来源:Pugh,1973年。

[1647] INR=国际标准化比率。

[1648] 附录J:前列腺癌临床试验工作组(PCWG23)

[1649] PCWG23关于对于患有进展性前列腺癌和阉割水平睾酮的患者的临床试验设计和终点的建议(Scher,2008-2016)可在线访问:<http://jco.ascopubs.org/content/34/12/1402>。

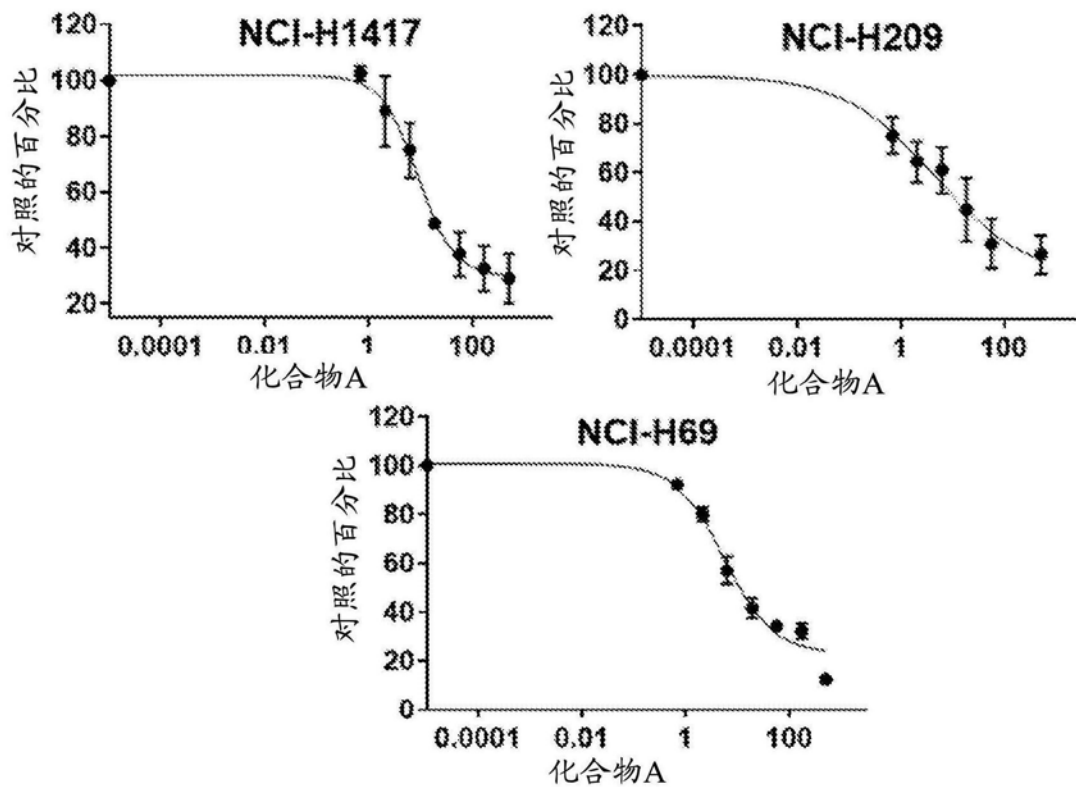


图1

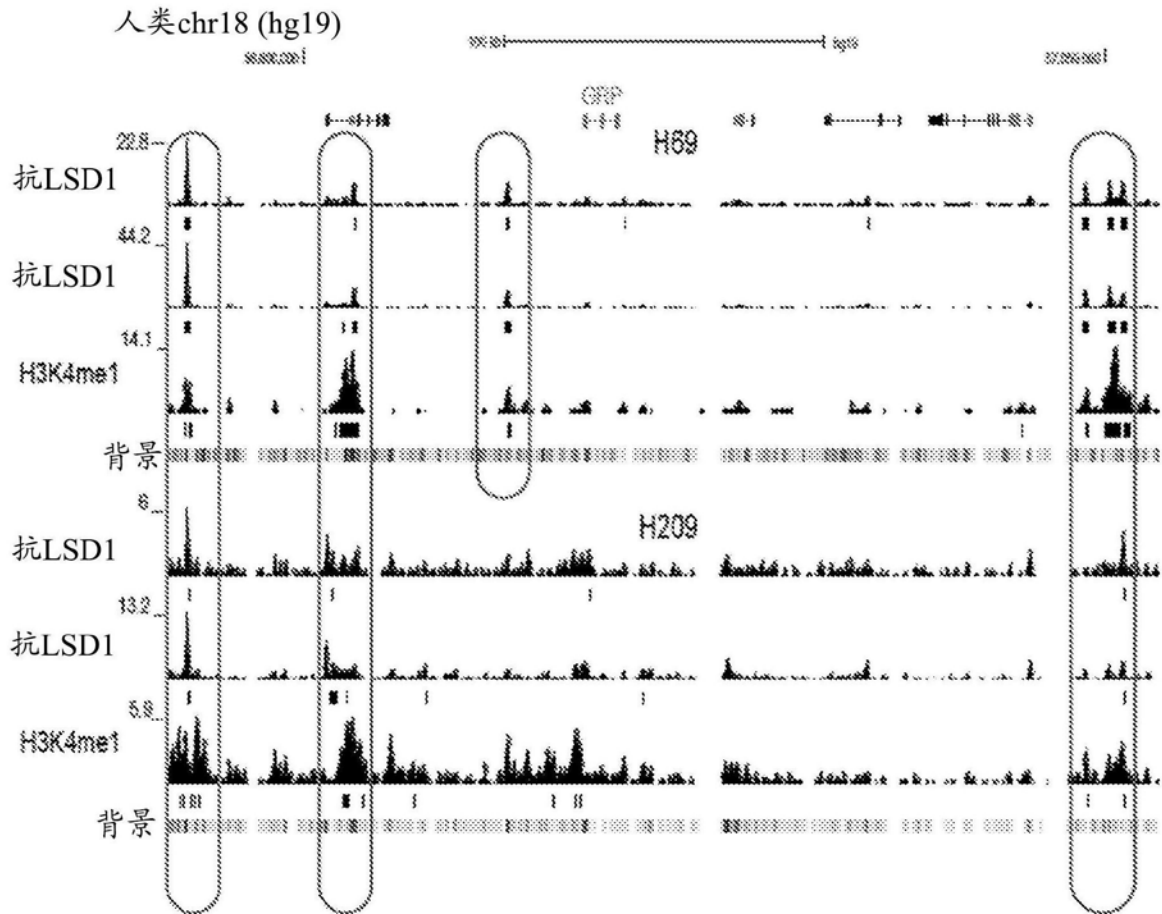


图2

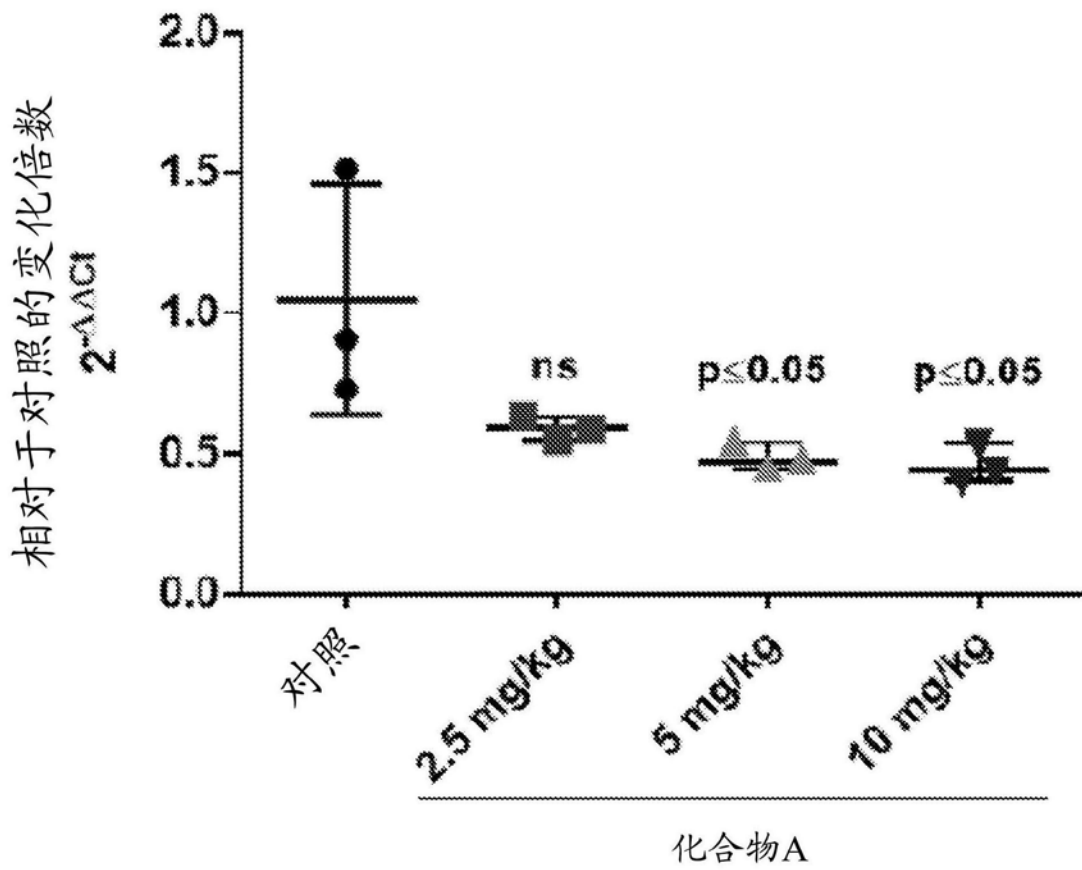


图3

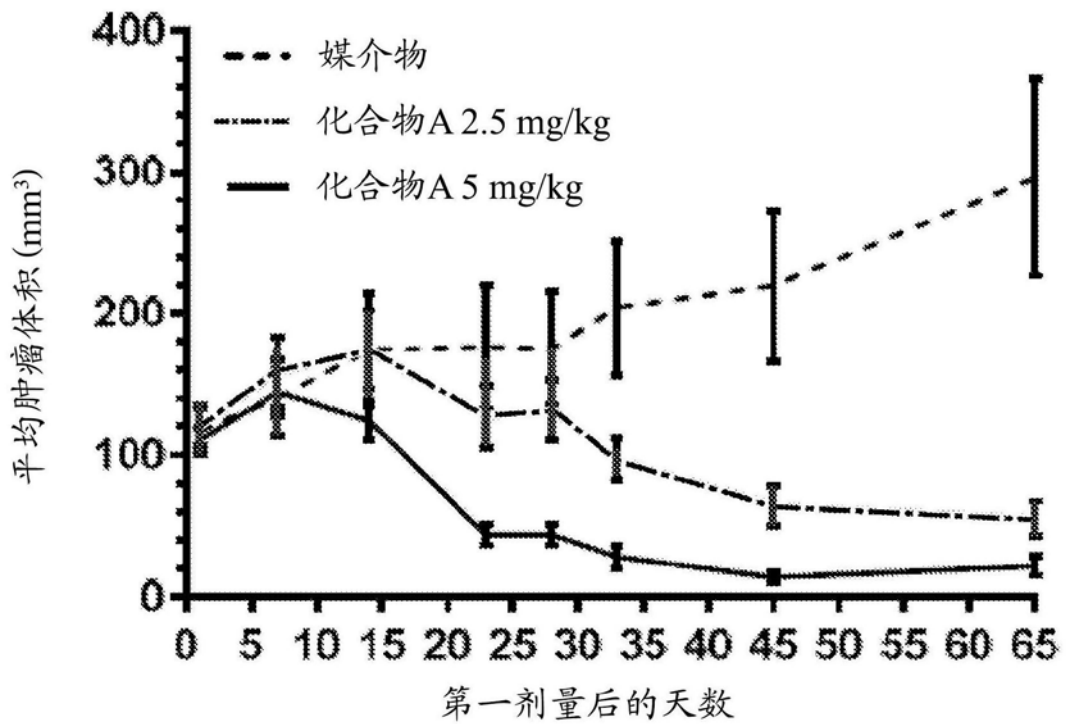


图4

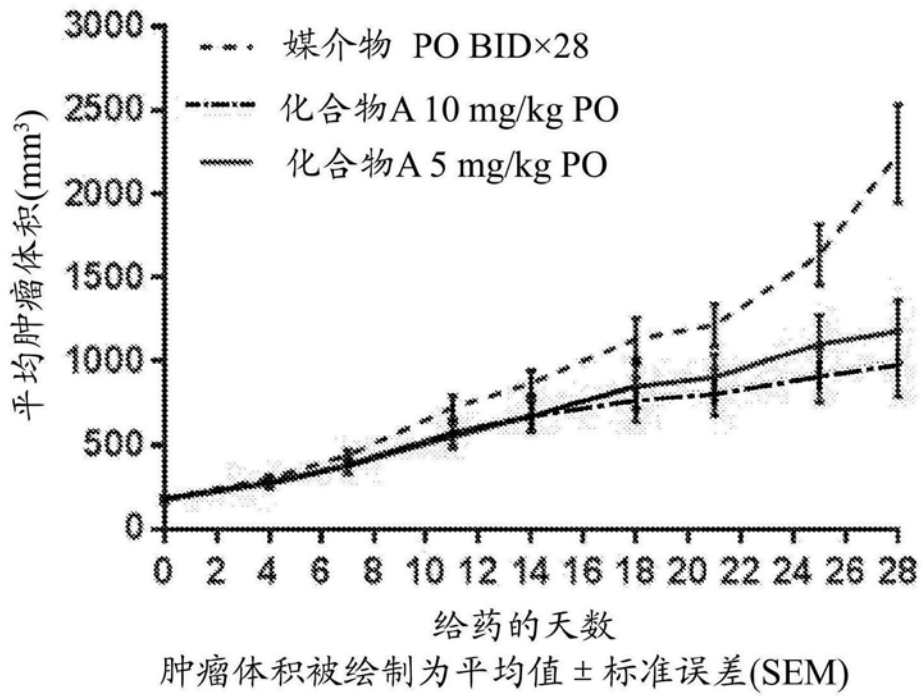


图5

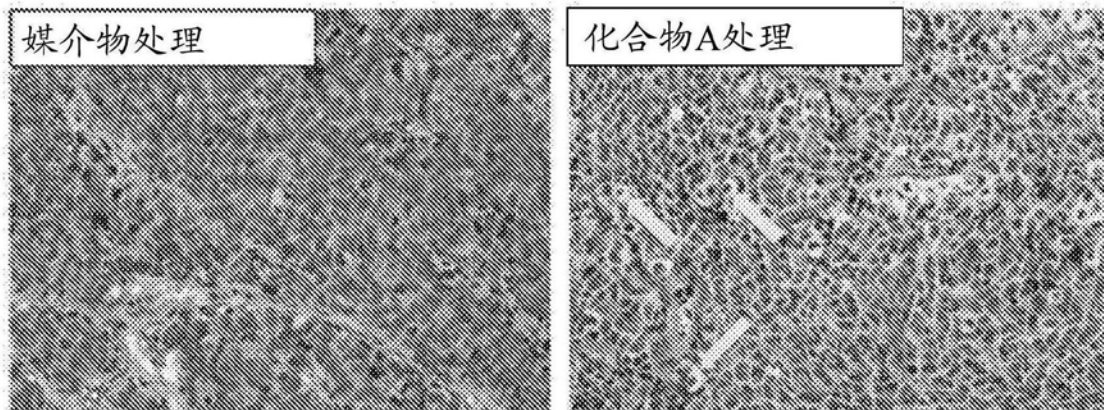


图6

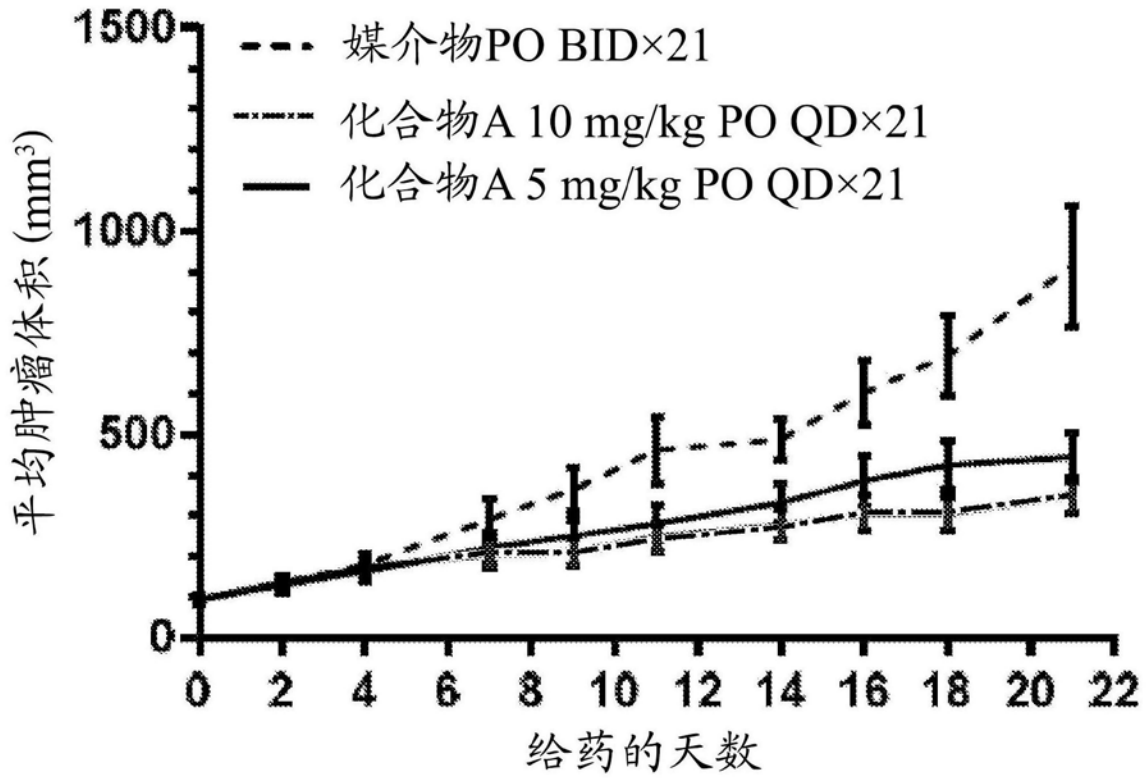


图7

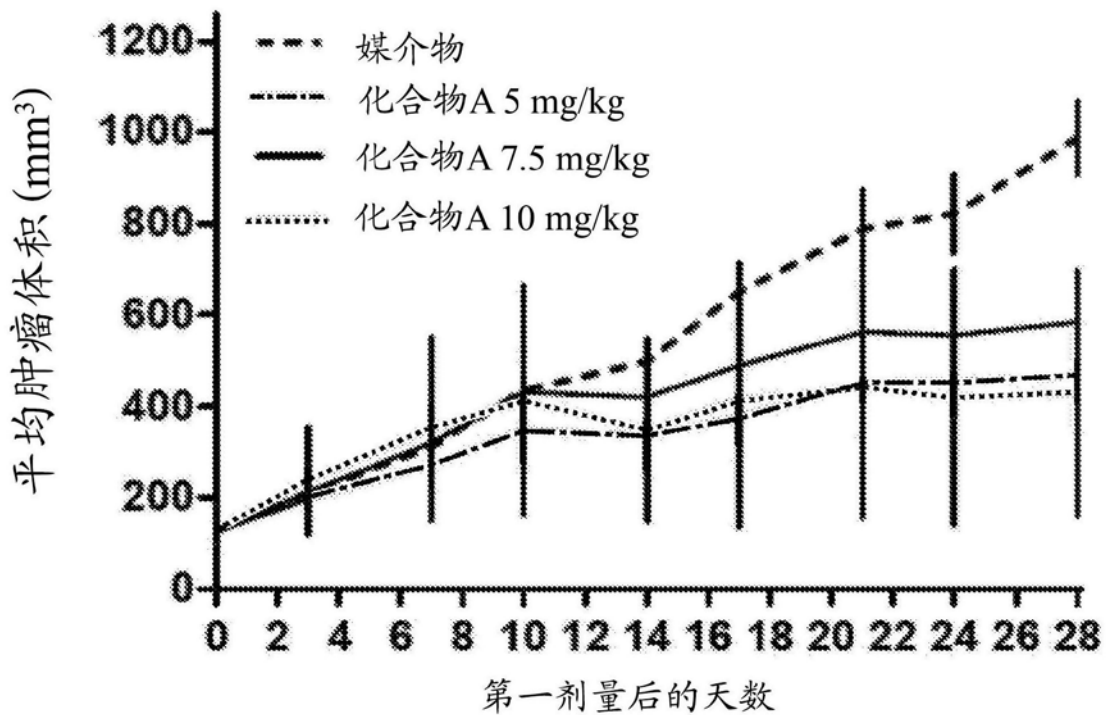


图8

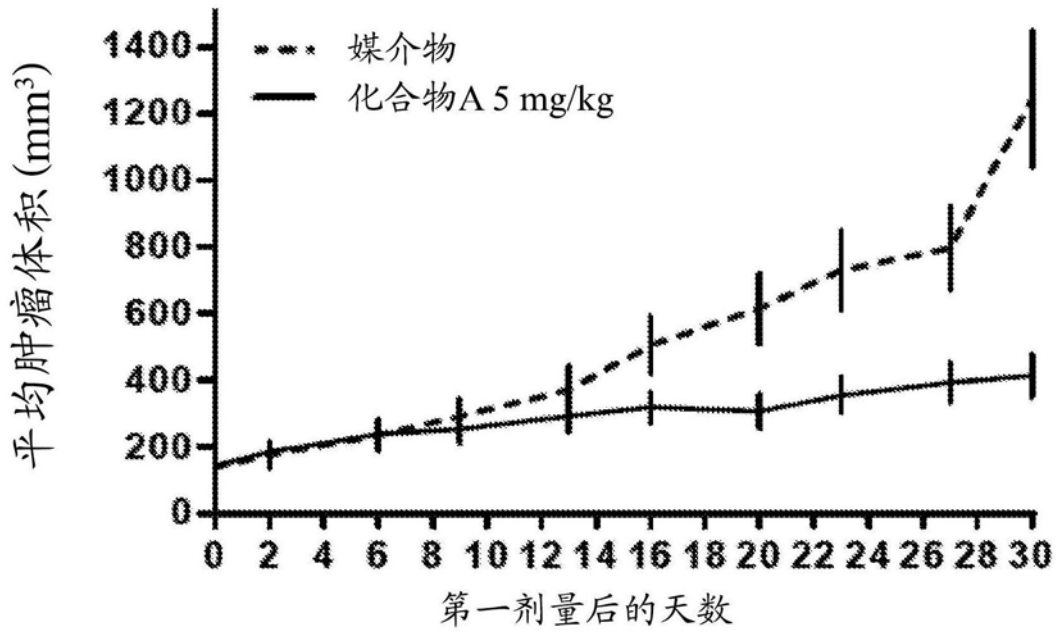


图9

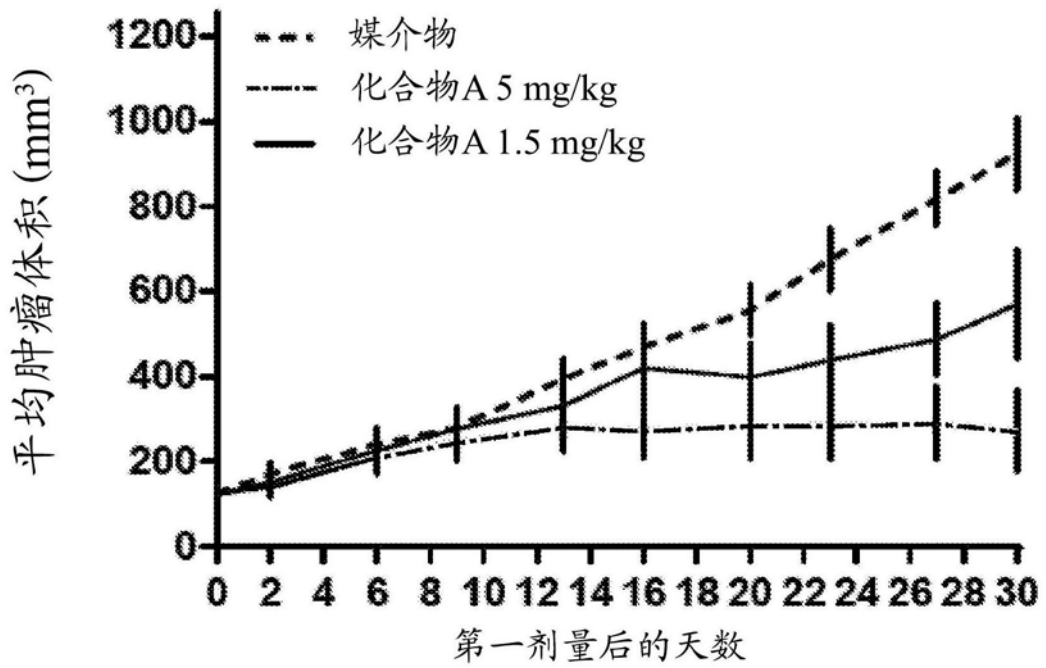


图10

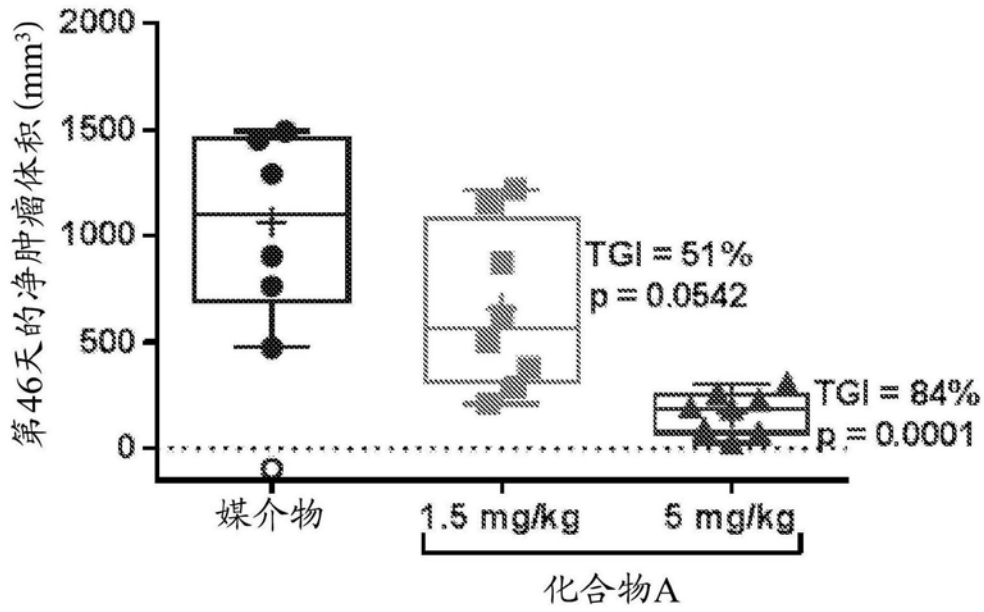


图11

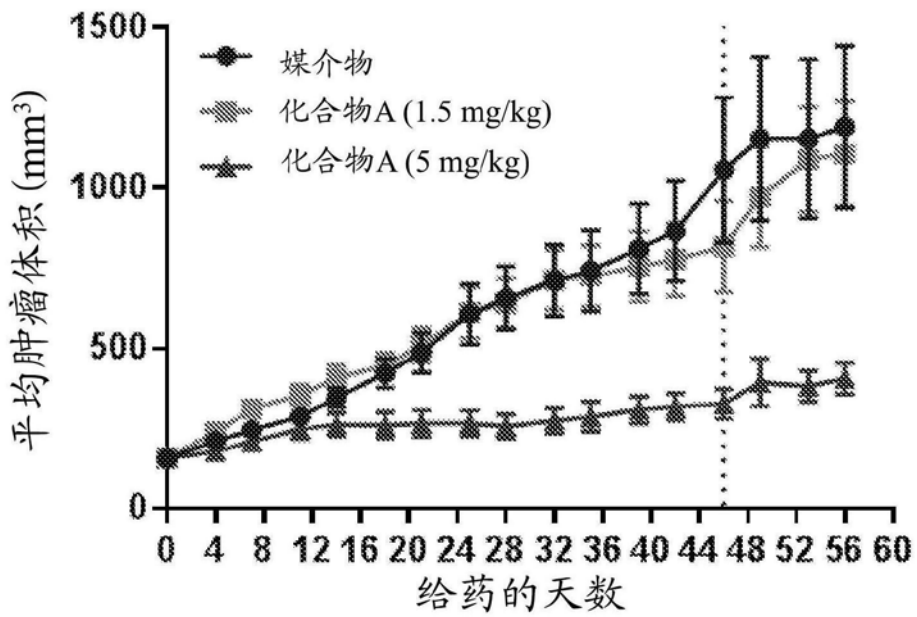


图12

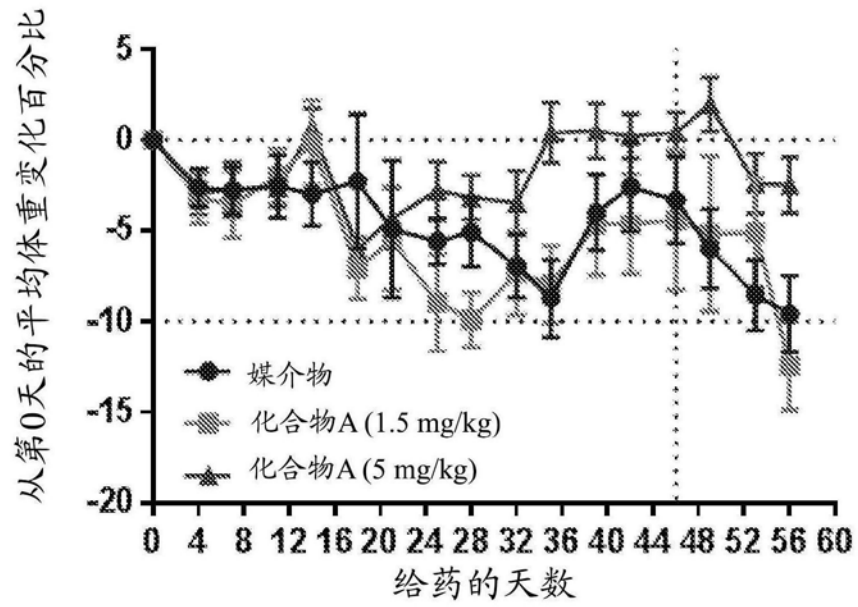


图13

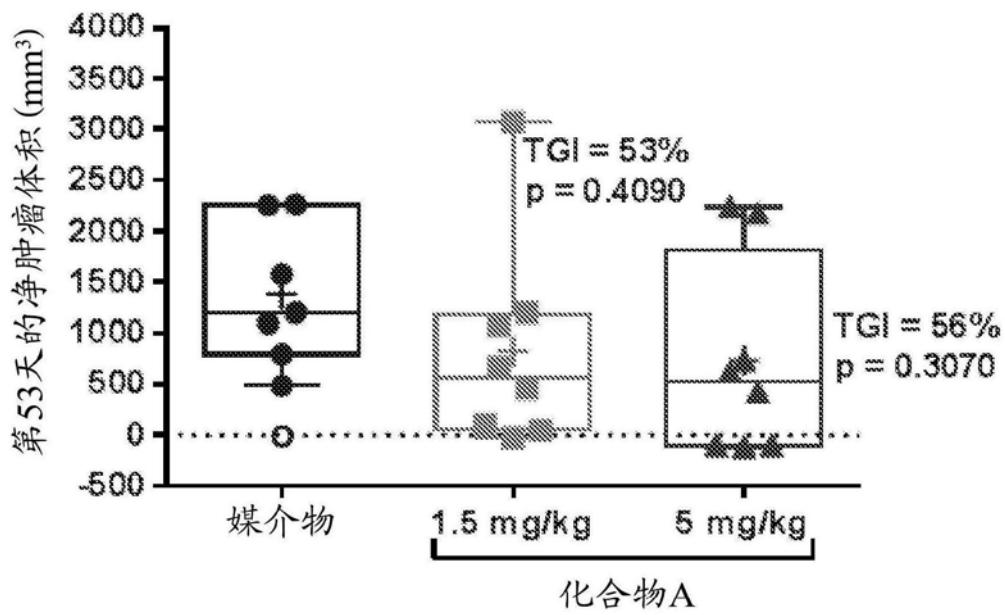


图14

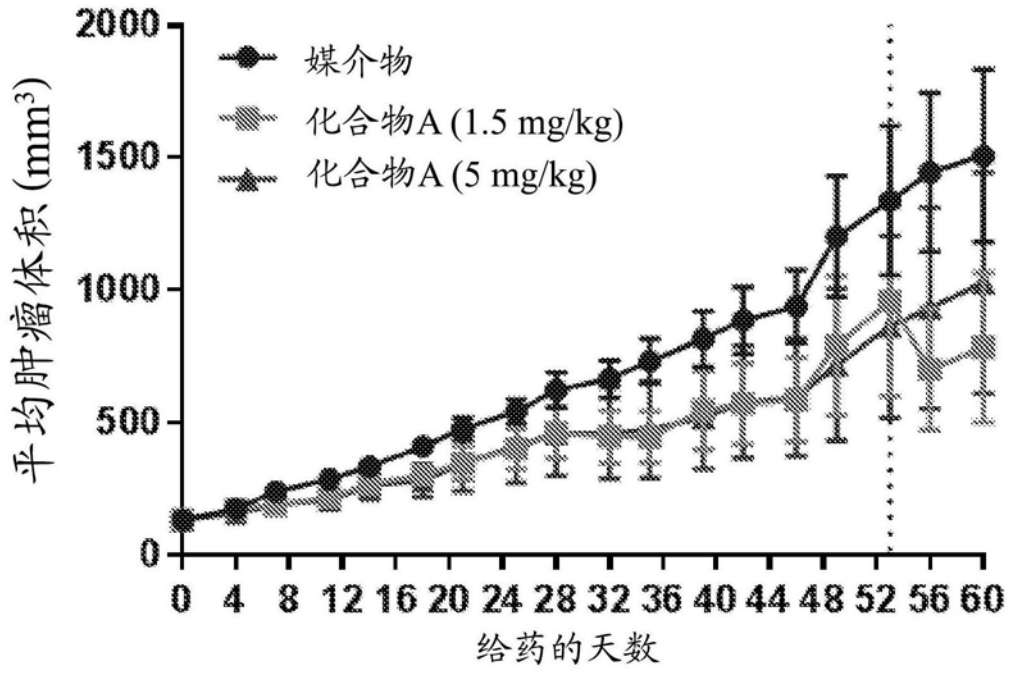


图15

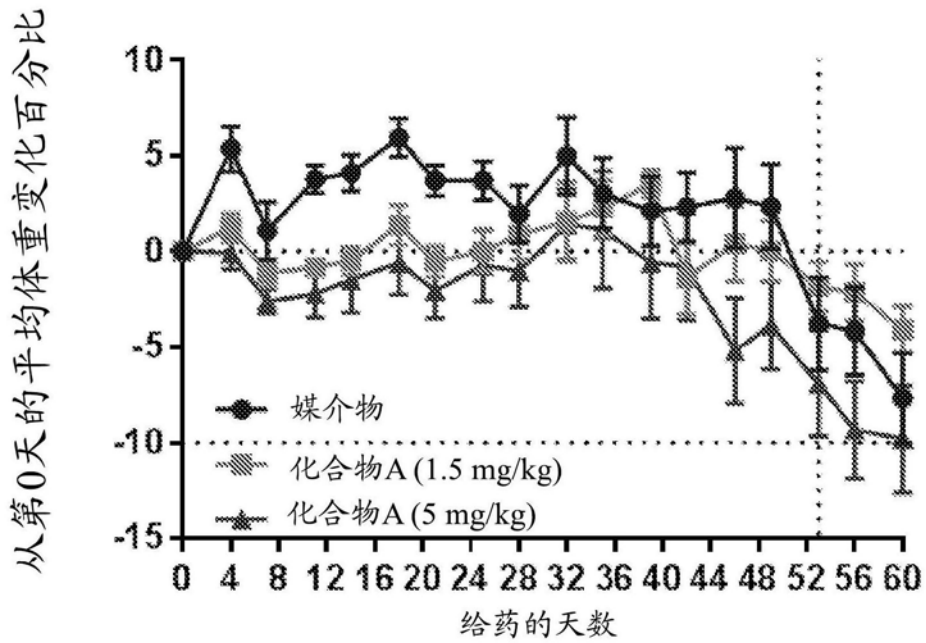


图16

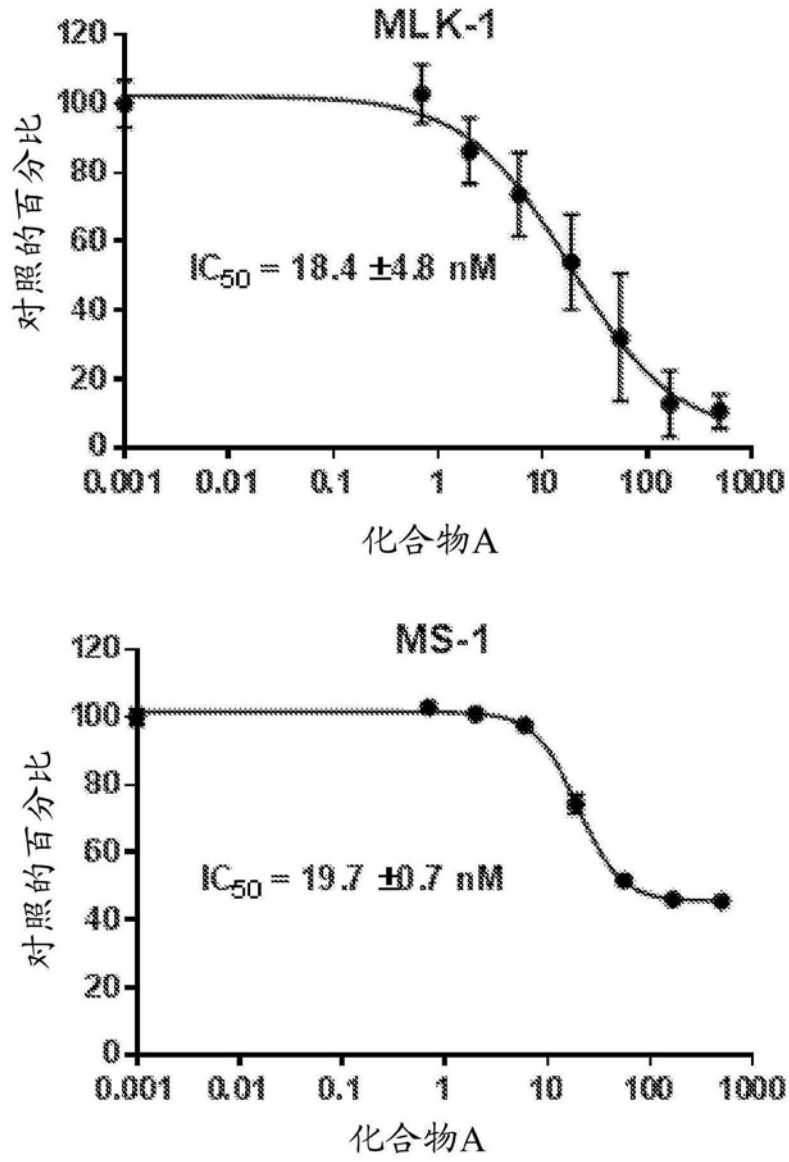


图17

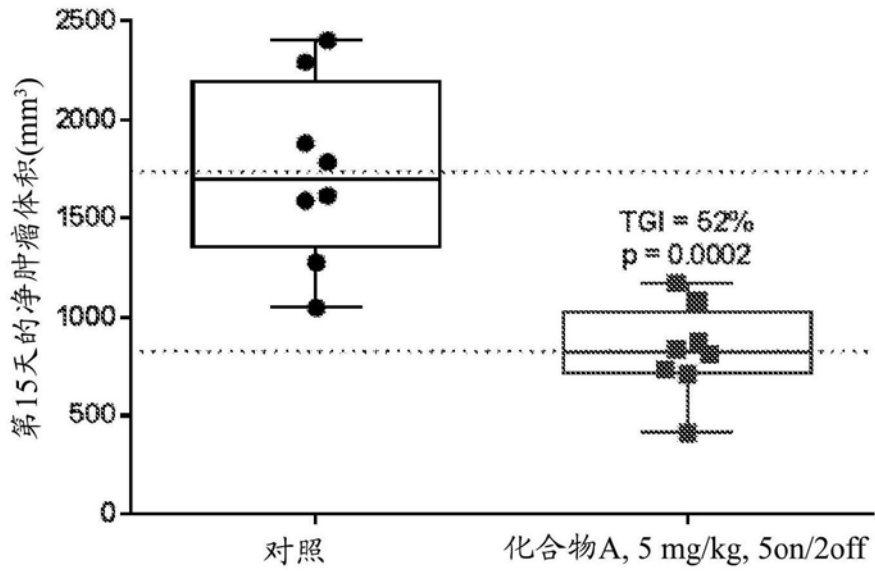


图18

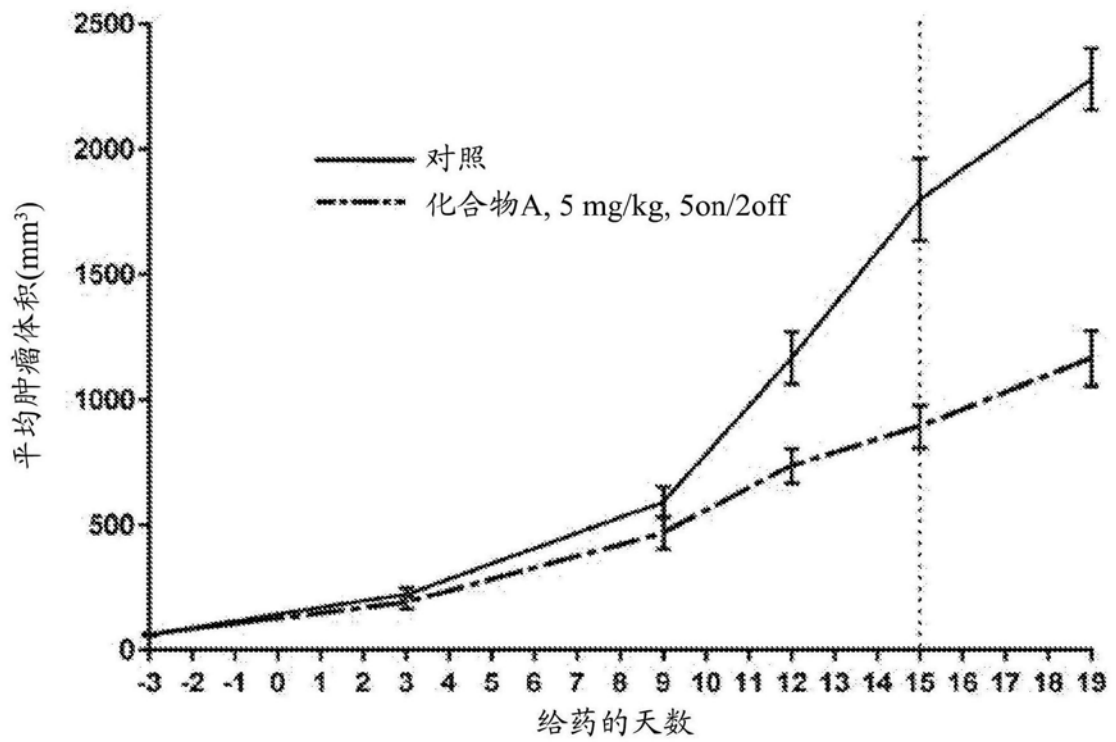


图19

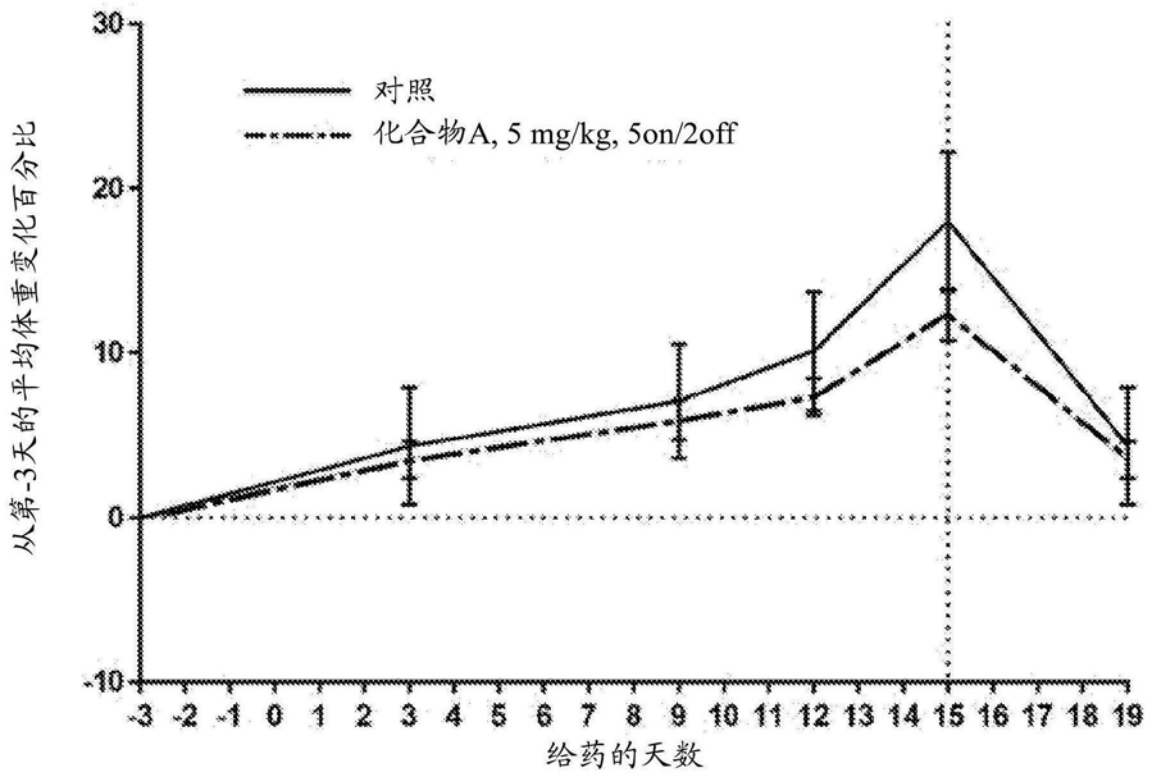


图20

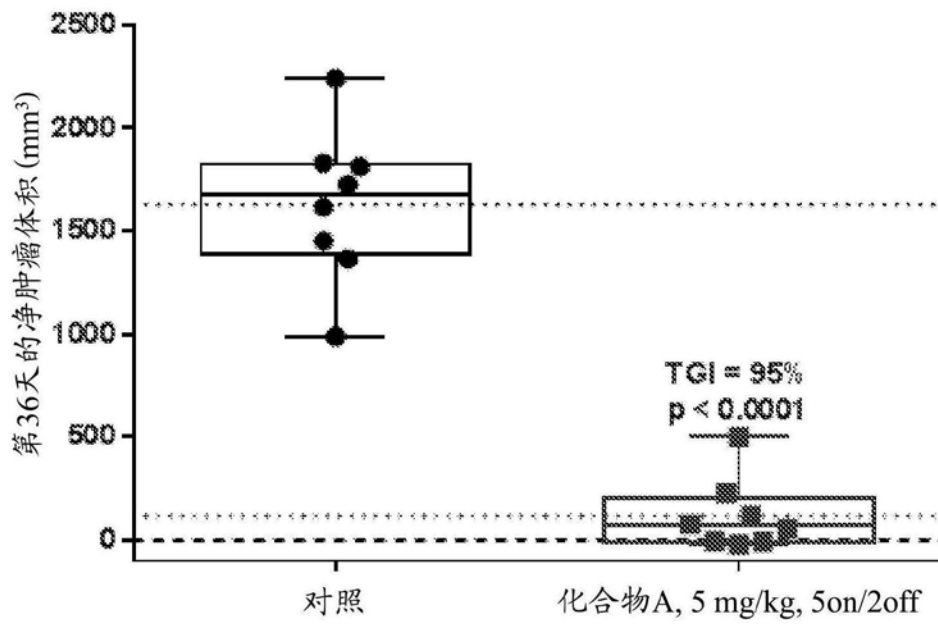


图21

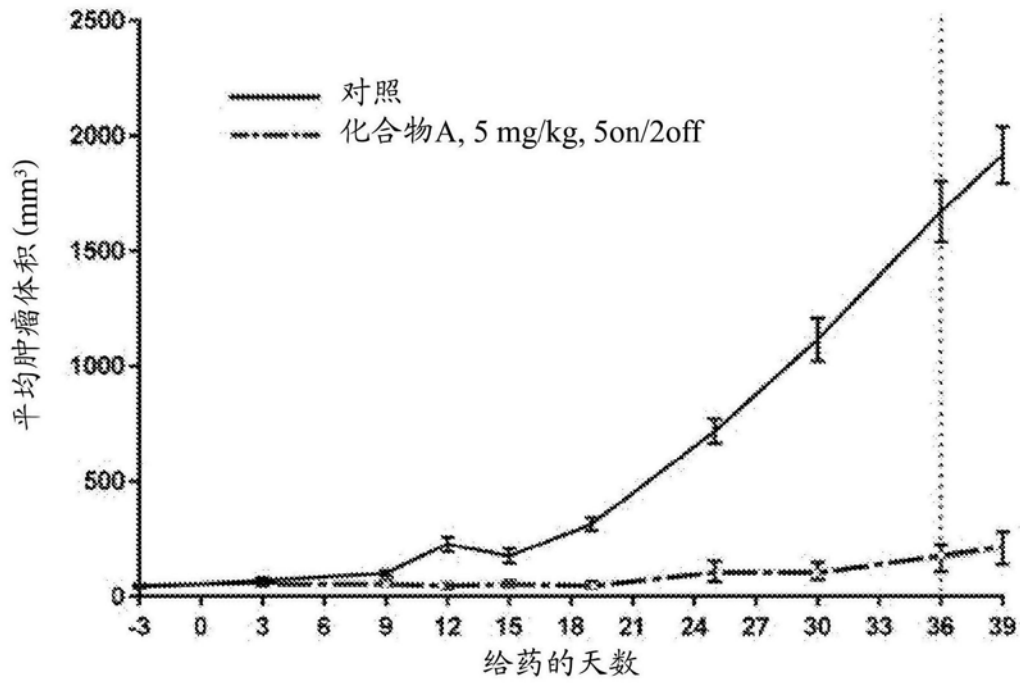


图22

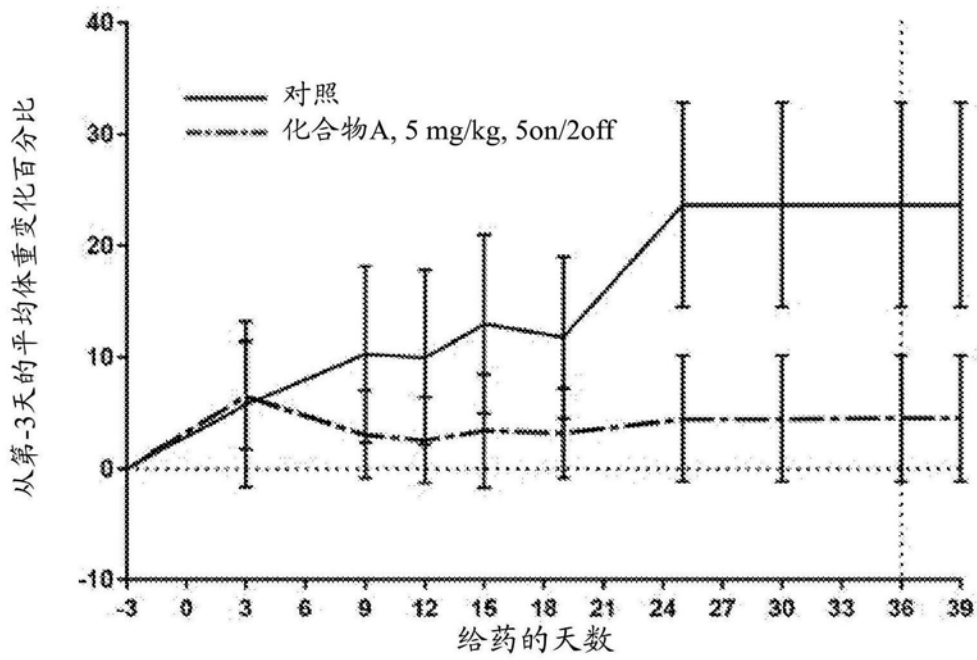


图23

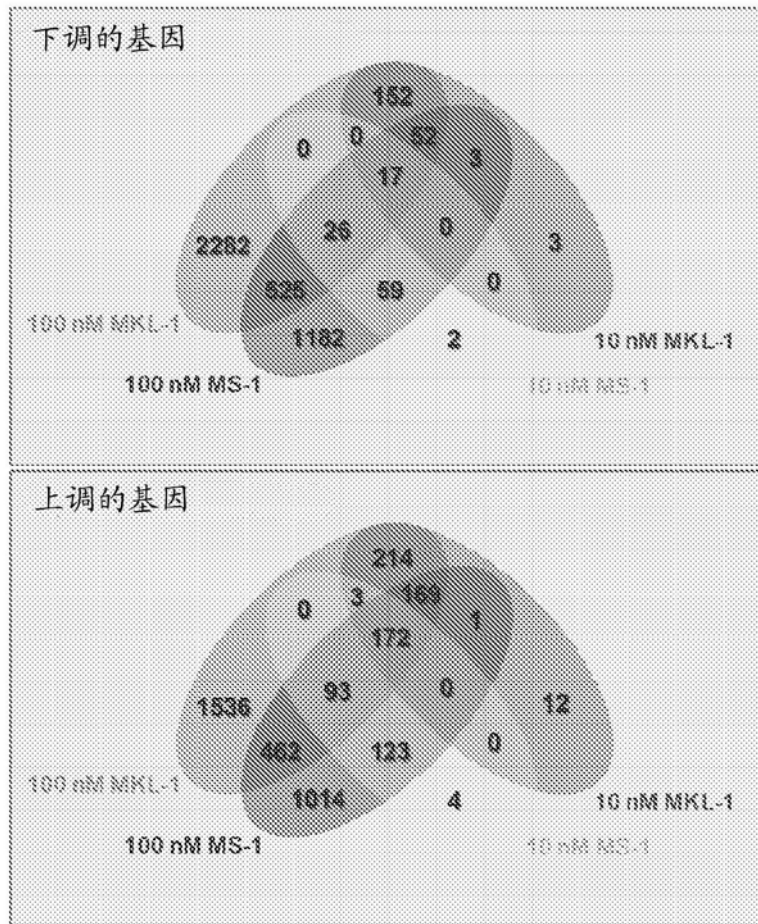


图24

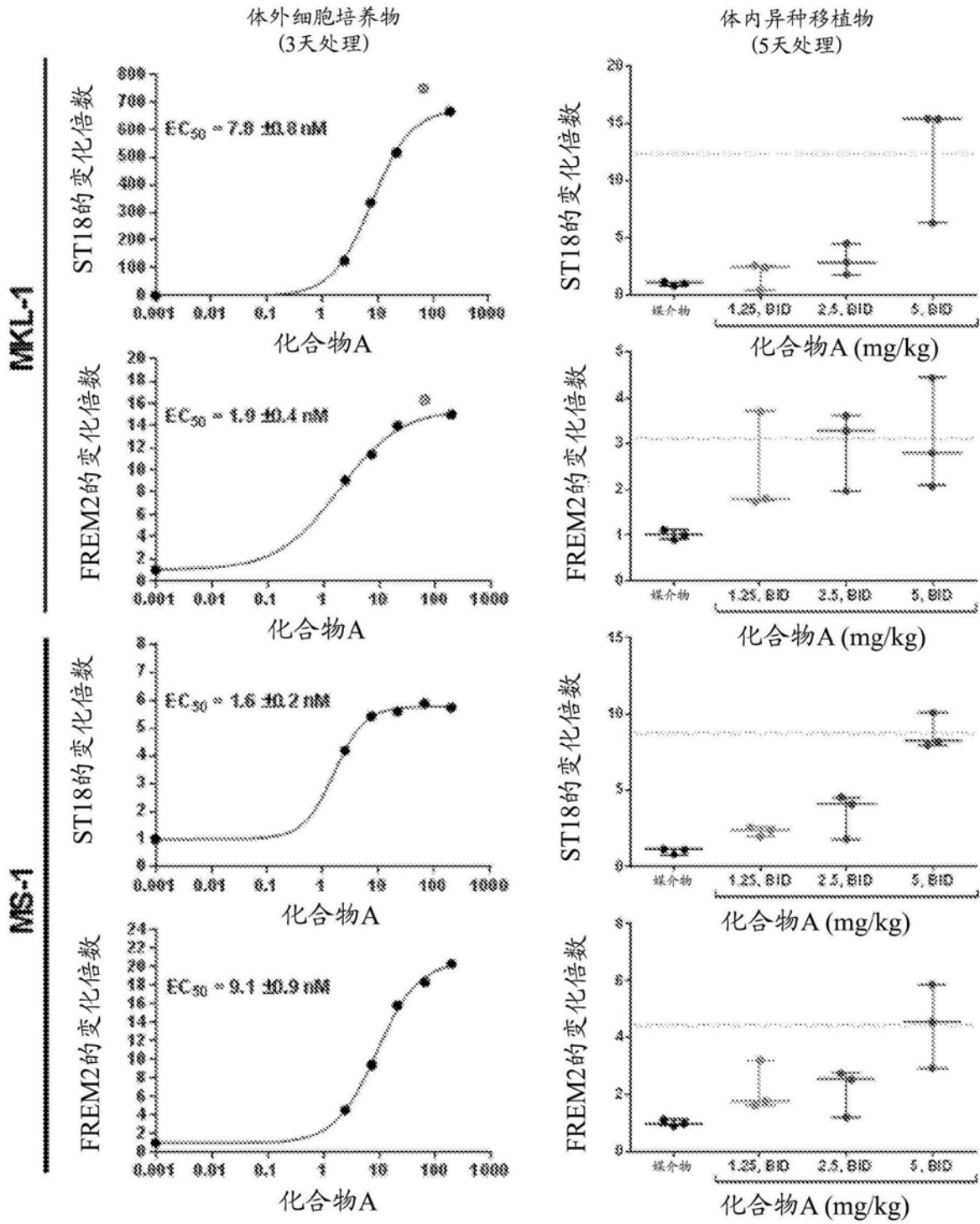


图25

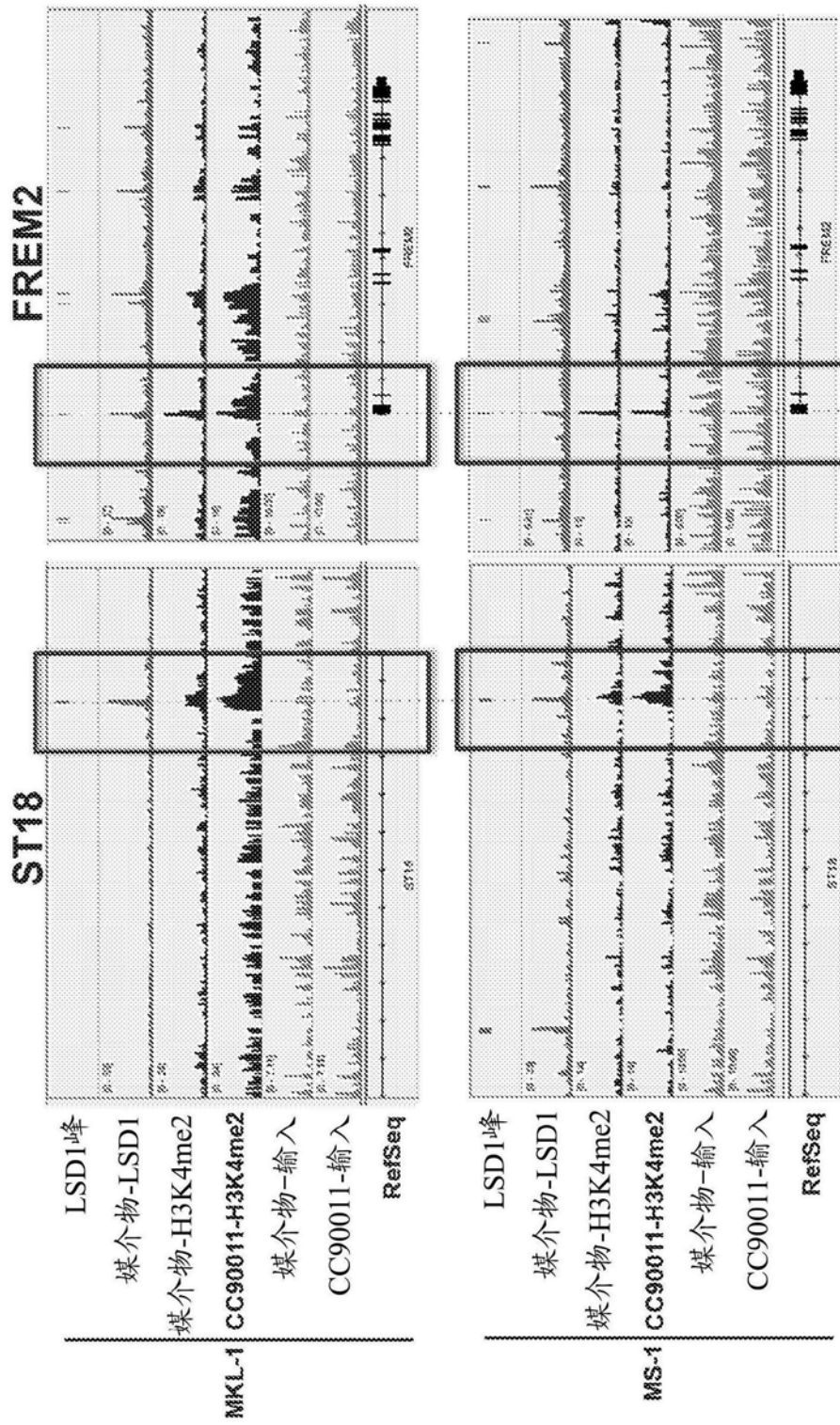


图26

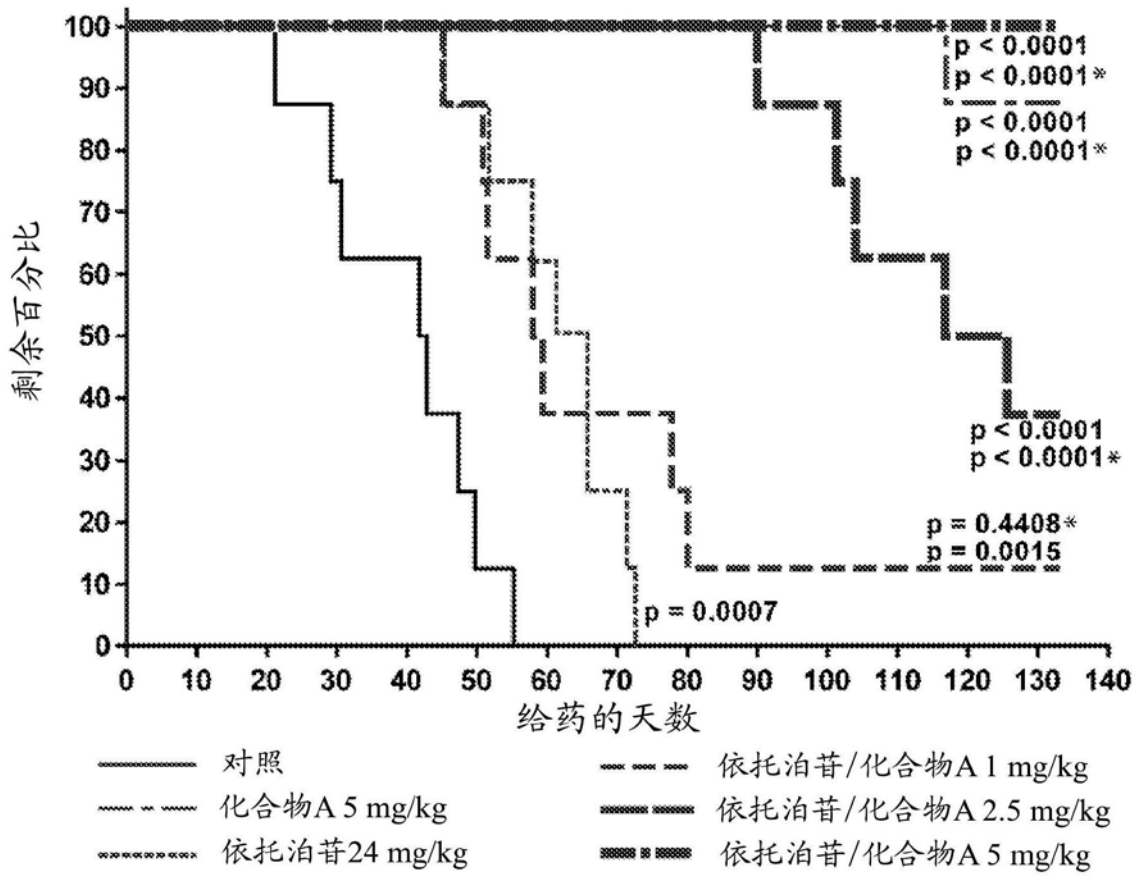


图27

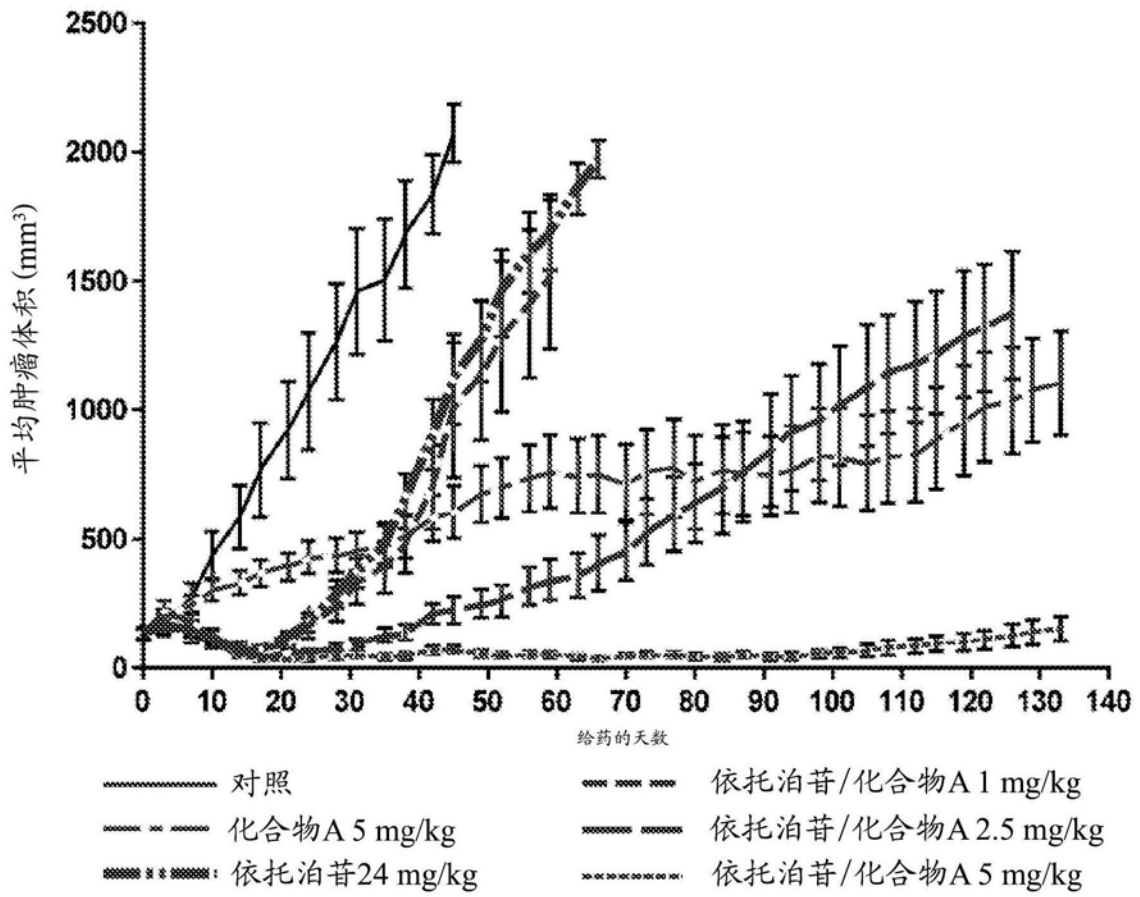


图28

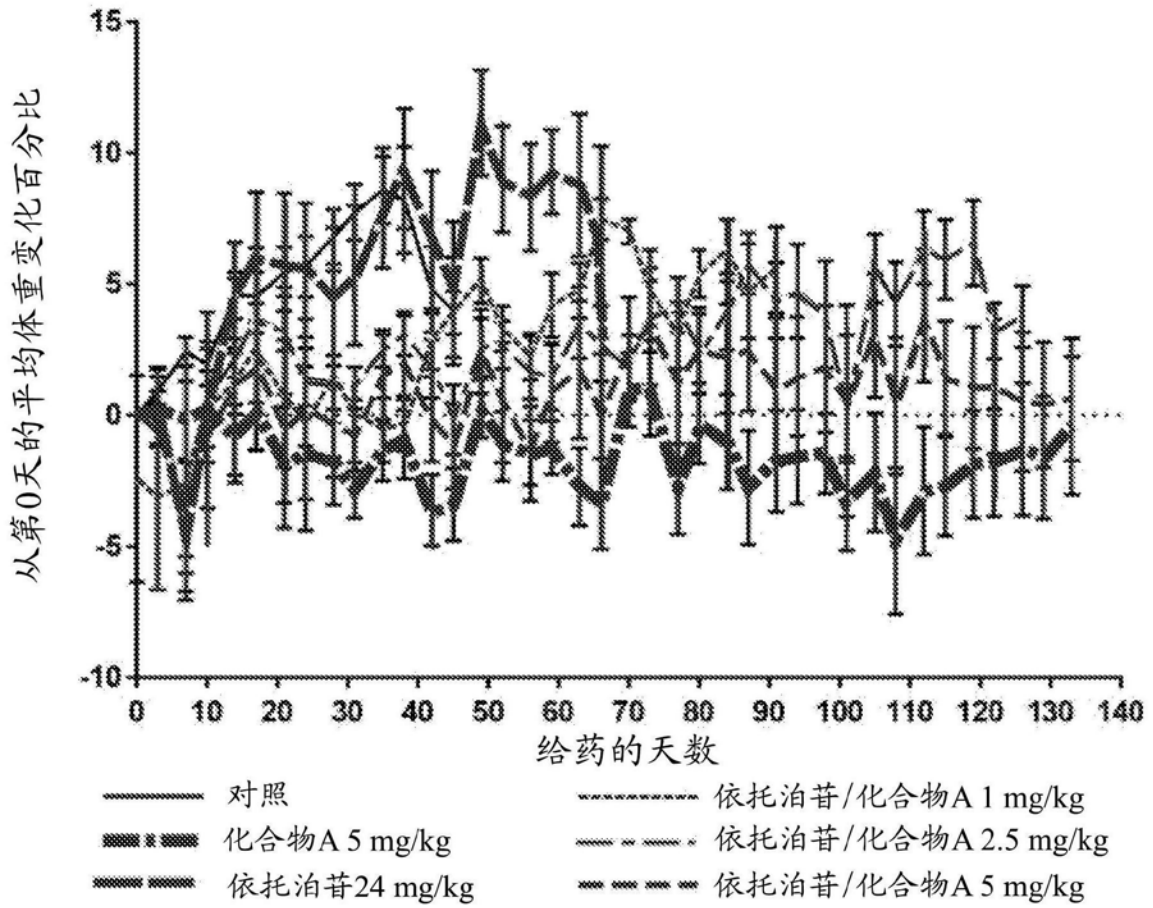


图29

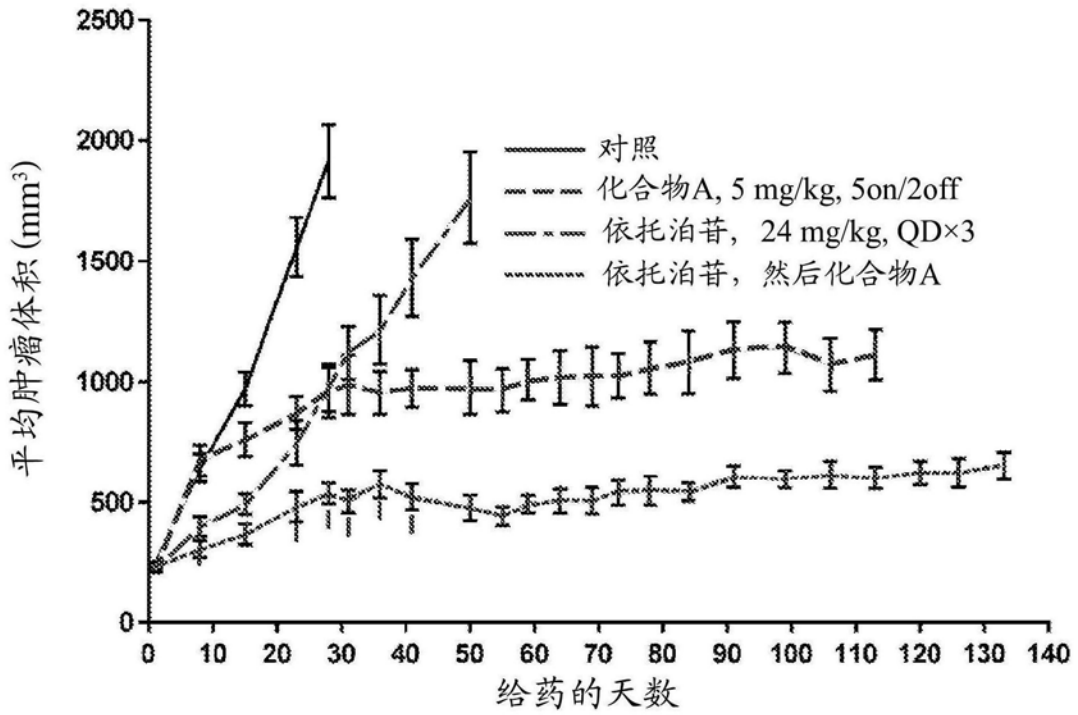


图30

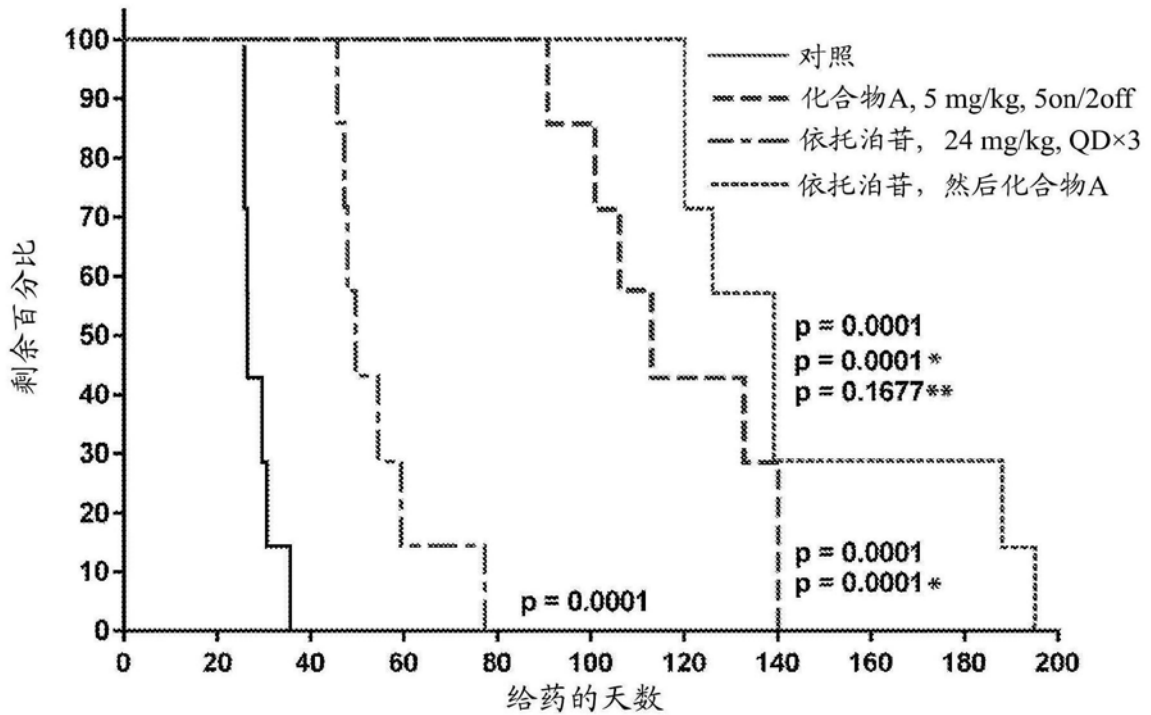


图31

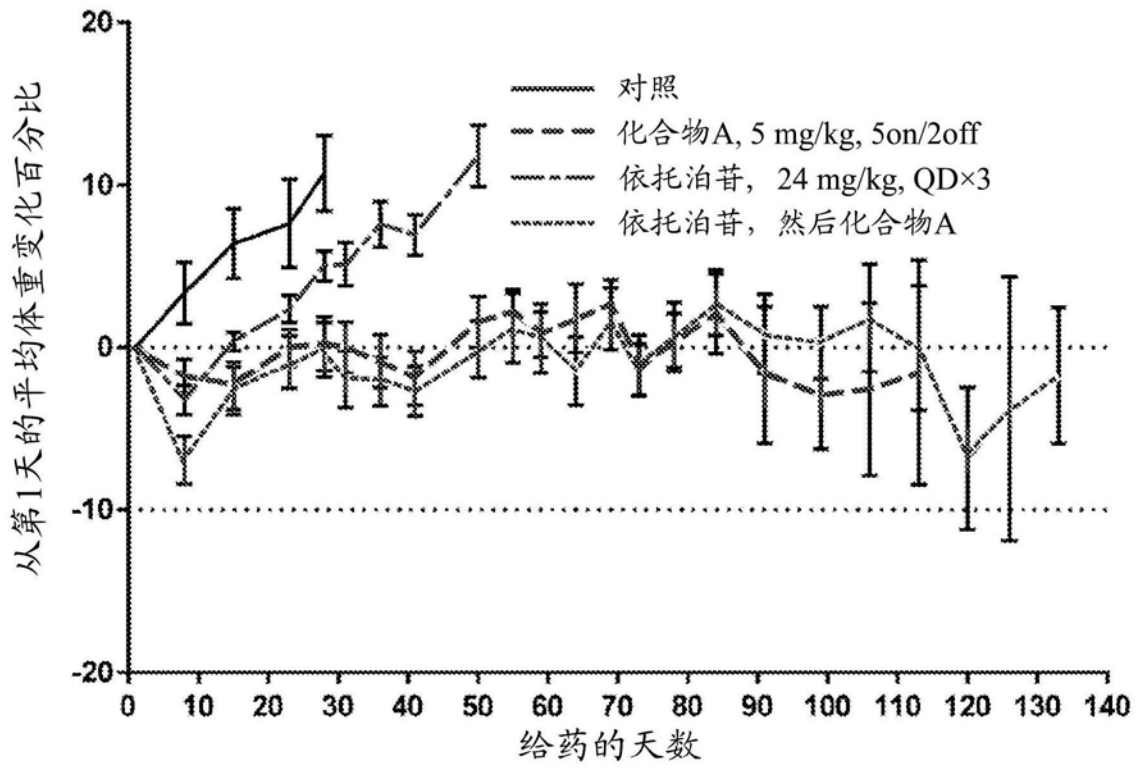


图32

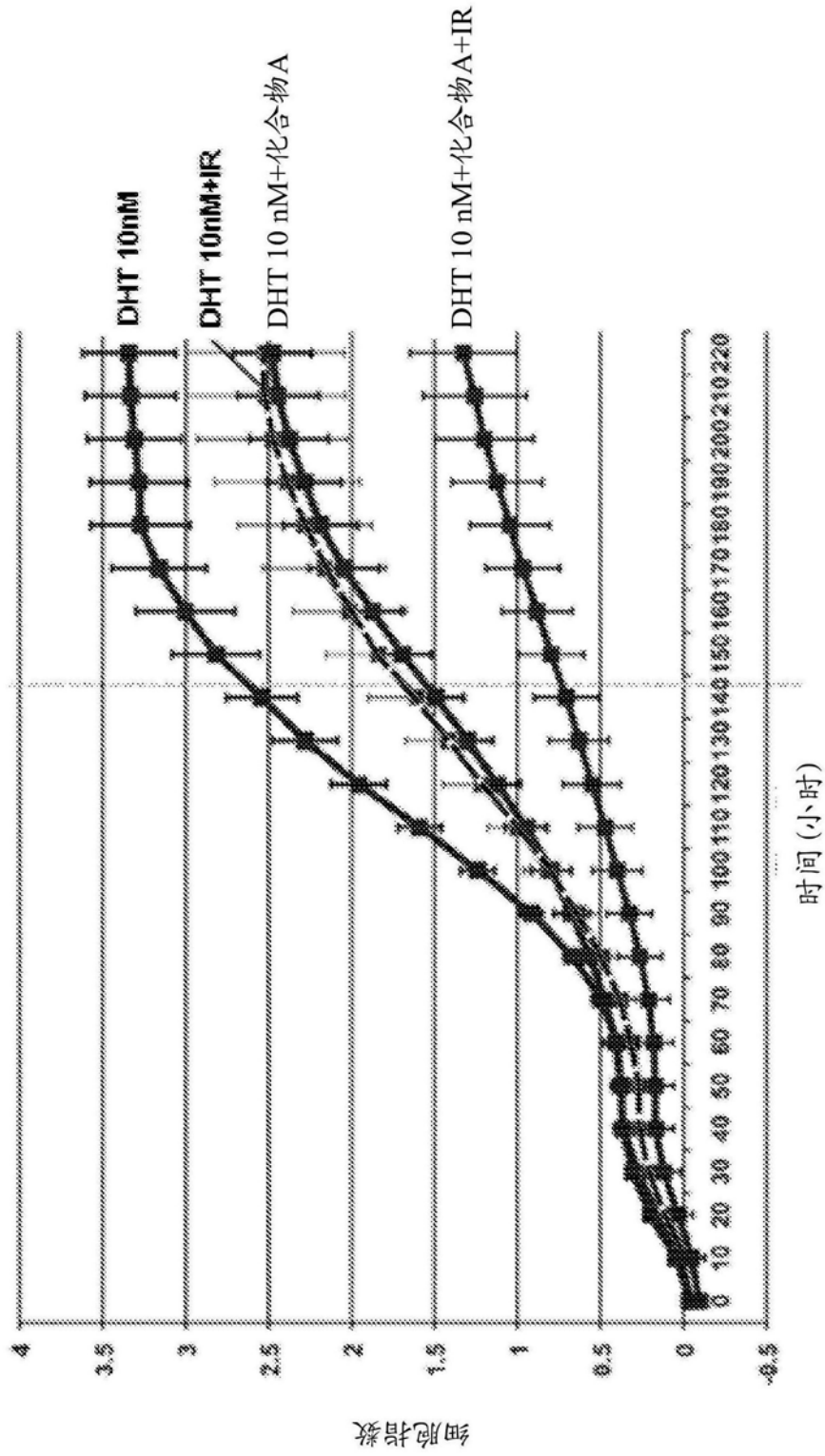


图33

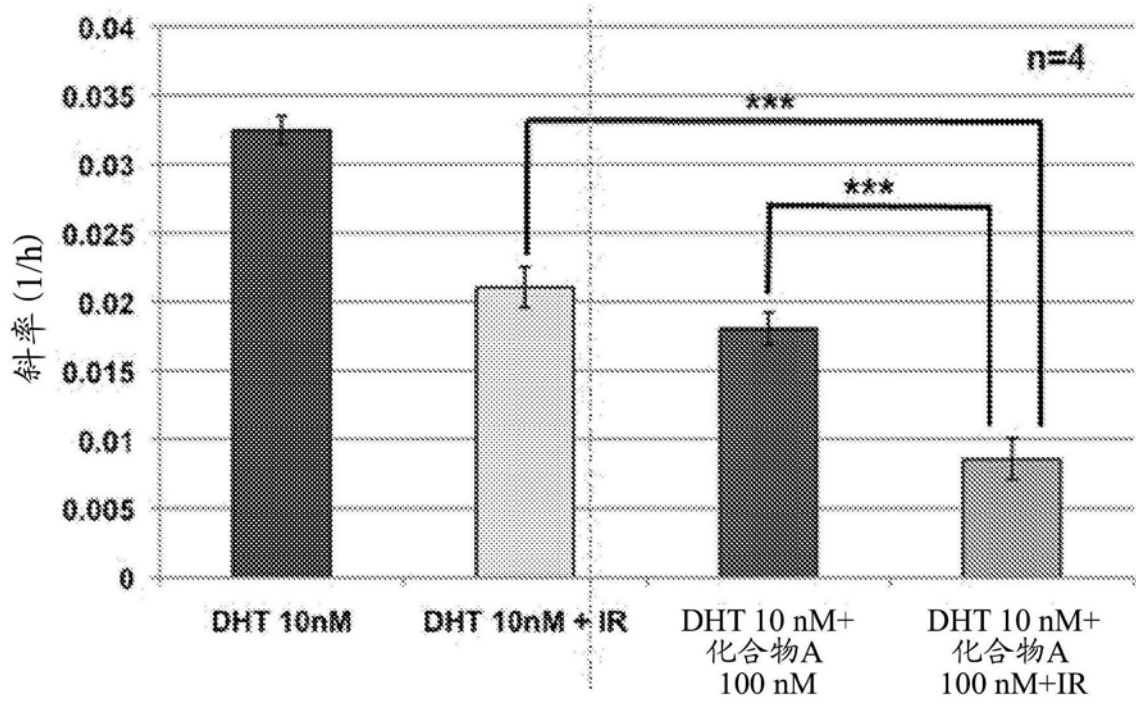


图34

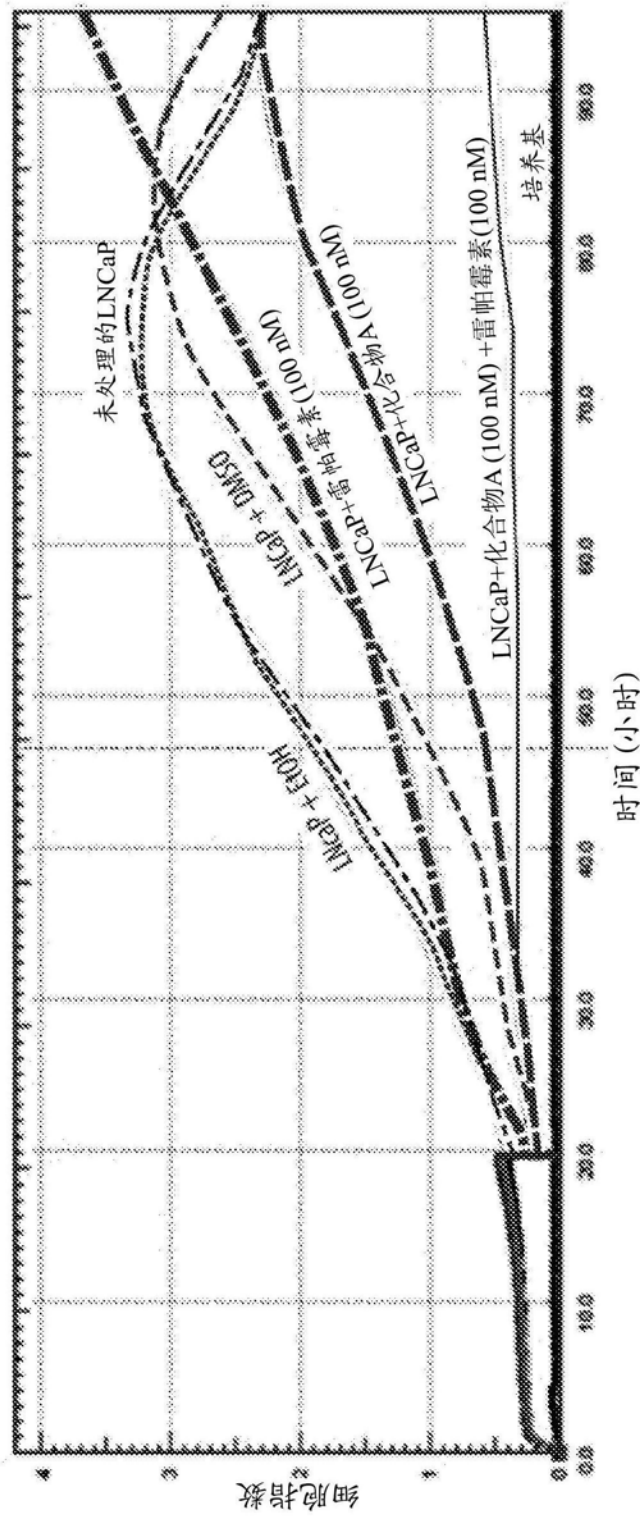


图35

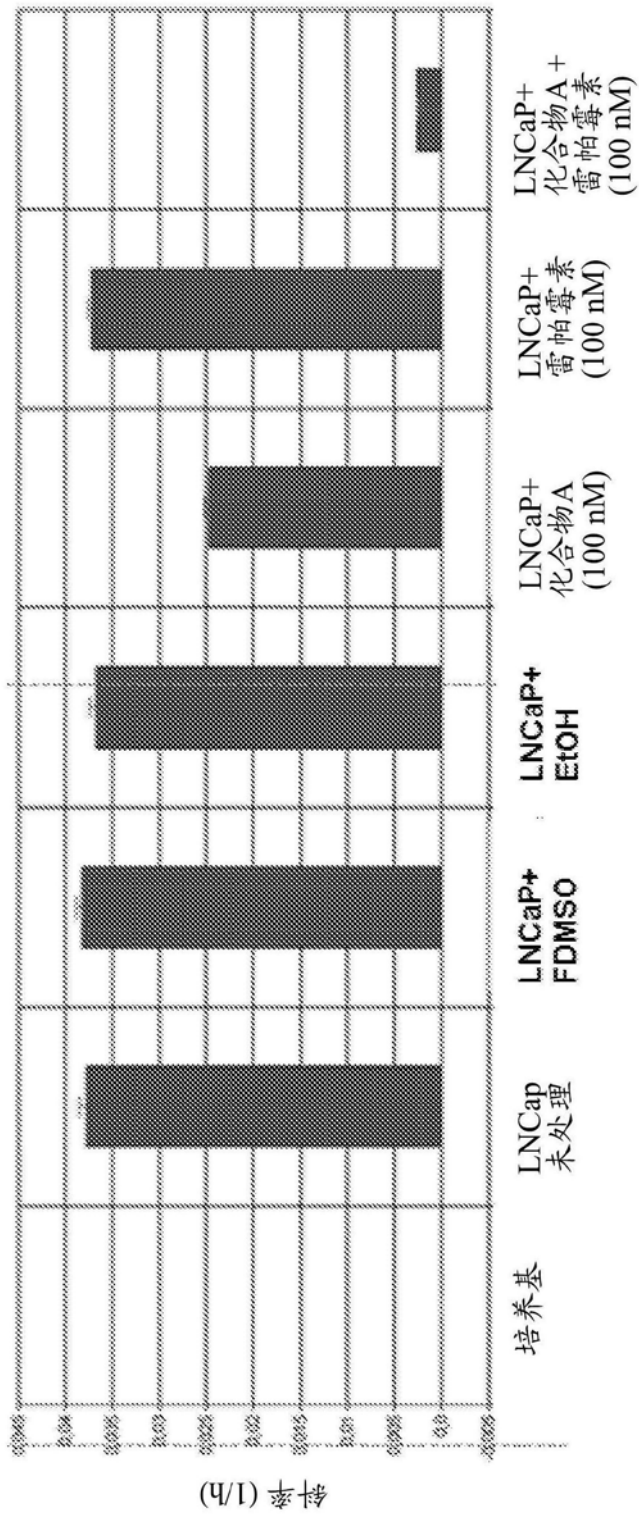


图36

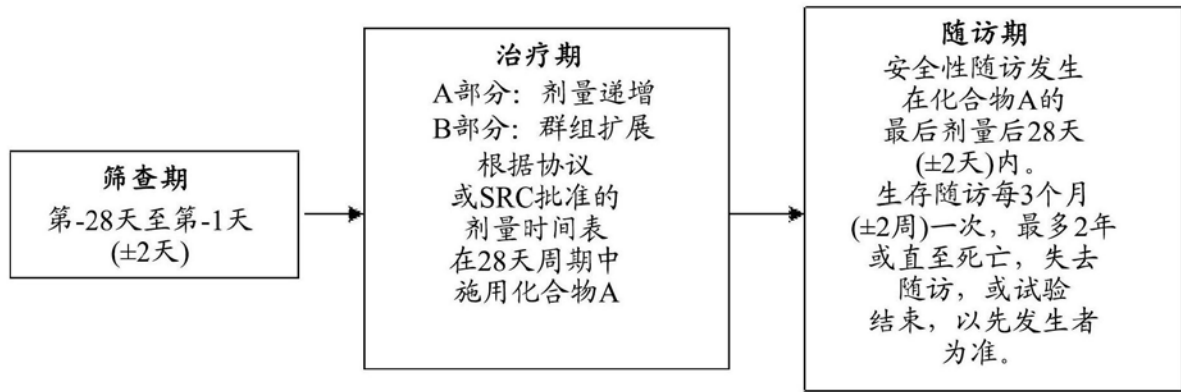


图37

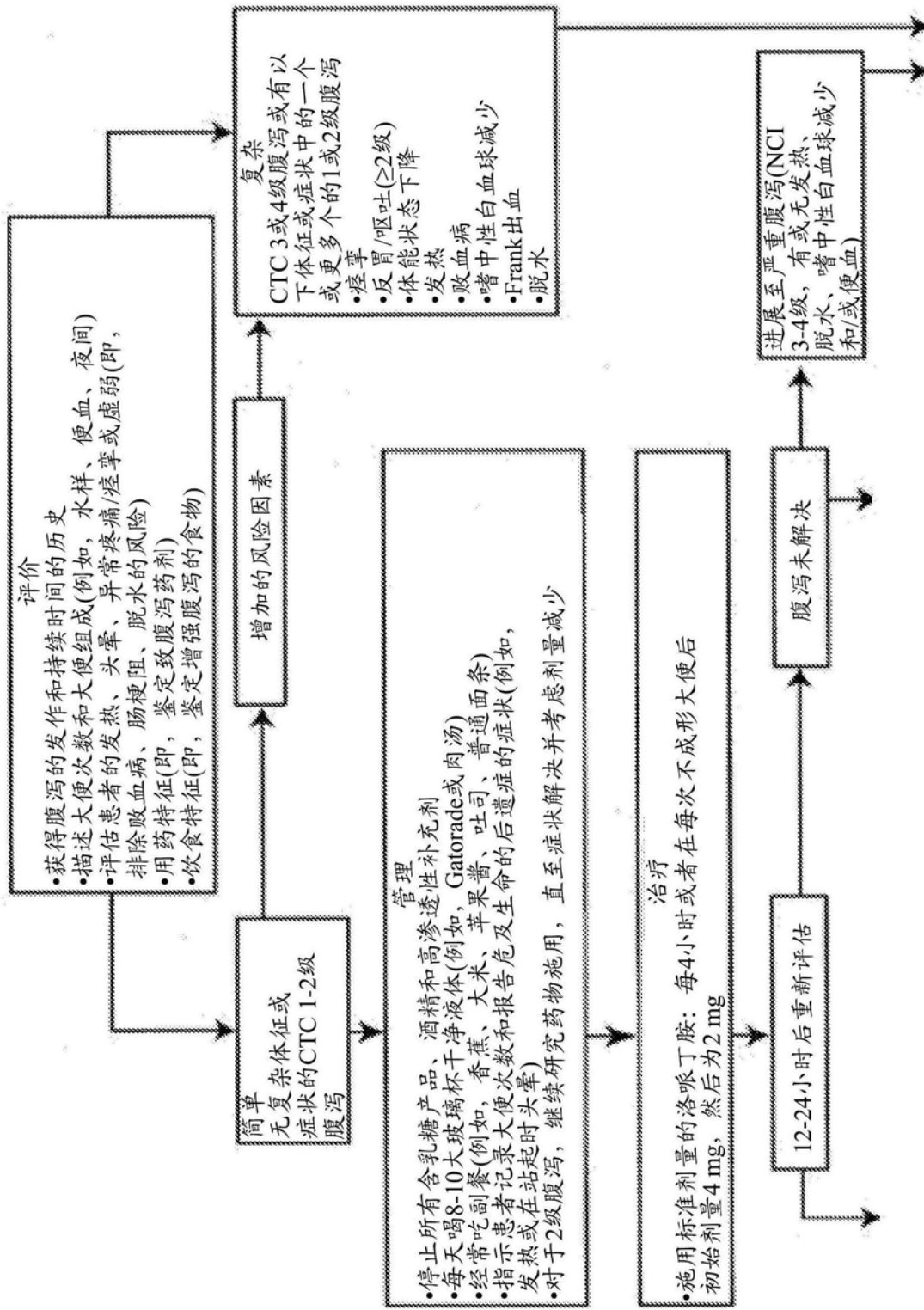


图38

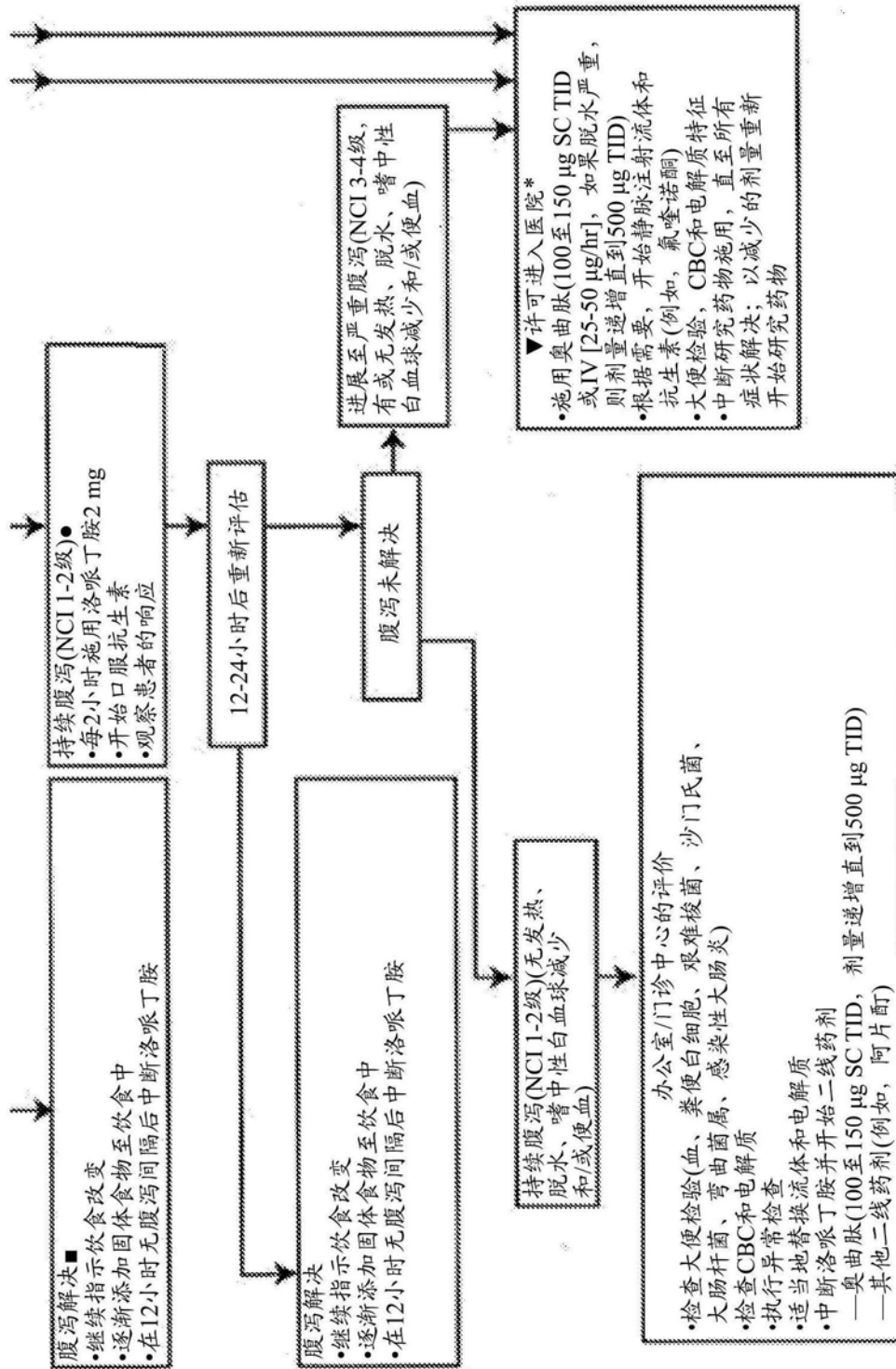


图38续