



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104220053 B

(45)授权公告日 2017.05.03

(21)申请号 201380016295.5

(22)申请日 2013.02.08

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104220053 A

(43)申请公布日 2014.12.17

(30)优先权数据
61/597,369 2012.02.10 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.09.24

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2013/025319 2013.02.08

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/119931 EN 2013.08.15

(73)专利权人 德克萨斯大学系统董事会
地址 美国得克萨斯州

(72)发明人 程晓东 周嘉
塔玛拉·特萨尔科瓦 梅昉
陈海军

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 郑斌 彭鲲鹏

(51)Int.Cl.
A61K 31/136(2006.01)

(56)对比文件
WO 97/09878 A1,1997.03.20,表2,式2.
ALMAHARIQ MUAYAD ET AL.A Novel EPAC-Specific Inhibitor Suppresses Pancreatic Cancer Cell Migration and Invasions.《MOLECULAR PHARMACOLOGY》.2008,第83卷(第1期),第122-128页.

审查员 包宁疆

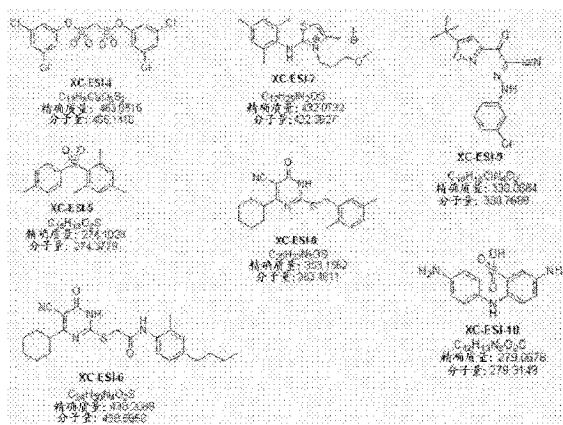
权利要求书2页 说明书61页 附图19页

(54)发明名称

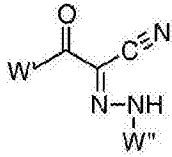
cAMP直接活化交换蛋白(EPAC)的调节剂

(57)摘要

本发明的一些实施方案涉及抑制EPAC蛋白活性的化合物以及使用所述化合物的方法。本发明人开发了目的在于鉴定EPAC特异性抑制剂的灵敏且稳健的高通量筛选(HTS)测定(Tsalkova等.(2012)PLOS ONE7(1):e30441)。



1. cAMP活化交换蛋白 (EPAC) 特异性抑制剂 (ESI), 其具有下式:



式 VII

其中W' 是经取代或未经取代的异噁唑和W'' 是卤素取代的苯基, 所述抑制剂不是其中W' 是叔丁基-异噁唑-3-基并且W'' 是3-氯苯基的3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(3-氯苯基)-亚肼基]-3-氧代-丙腈 (ESI-09) 化合物。

2. 权利要求1的EPAC特异性抑制剂, 其中W' 是经取代的异噁唑。

3. 权利要求2的EPAC特异性抑制剂, 其中所述经取代的异噁唑是经甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、新戊基、正戊基或异戊基取代的异噁唑。

4. 权利要求2的EPAC特异性抑制剂, 其中W' 是5-甲基异噁唑或5-叔丁基异噁唑。

5. 权利要求1的EPAC特异性抑制剂, 其中W'' 是3-氯苯基、2-氯苯基、4-氯苯基、3,6-二氯苯基、3,5-二氯苯基、4-溴苯基、3-溴苯基、2,3-二氯苯基或3-氯-4-羟基苯基。

6. 权利要求1的EPAC特异性抑制剂, 其中所述EPAC特异性抑制剂选自: N-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(3-氯苯基)-亚肼基]-2-氰基乙酰胺 (HJC0683)、2-[(3-氯苯基)-亚肼基]-2-氰基-N-(5-甲基-异噁唑-3-基)-乙酰胺 (HJC0692)、3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(2-氯苯基)-亚肼基]-3-氧代-丙腈 (HJC0693)、3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(4-氯苯基)-亚肼基]-3-氧代-丙腈 (HJC0694)、3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(2,5-二氯苯基)-亚肼基]-3-氧代-丙腈 (HJC0696)、3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(3,5-二氯苯基)-亚肼基]-3-氧代-丙腈 (HJC0726)、2-[(4-溴苯基)-亚肼基]-3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-3-氧代-丙腈 (HJC0742)、2-[(3-溴苯基)-亚肼基]-3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-3-氧代-丙腈 (HJC0743)、3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(2,3-二氯苯基)-亚肼基]-3-氧代-丙腈 (HJC0750)、2-[N'-[2-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-1-氰基-2-氧代-亚乙基]-肼基]-6-氯-苯甲酸 (HJC0759)、3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(3-氯-4-羟基-苯基)-亚肼基]-3-氧代-丙腈 (HJC0760)、2-[(3-氯-苯基)-亚肼基]-3-(5-甲基-异噁唑-3-基)-3-氧代-丙腈 (HJC0768) 或 2-[(3,5-二氯苯基)-亚肼基]-3-(5-甲基-异噁唑-3-基)-3-氧代-丙腈 (HJC0770)。

7. 权利要求1的EPAC特异性抑制剂的可药用盐。

8. EPAC特异性抑制剂在制造用于选择性抑制EPAC之药物中的用途, 其中所述EPAC特异性抑制剂是3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(3-氯苯基)-亚肼基]-3-氧代-丙腈 (ESI-09) 或权利要求1的EPAC特异性抑制剂。

9. EPAC特异性抑制剂在制造用于治疗患有癌症的对象之药物中的用途,其中所述EPAC特异性抑制剂是3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(3-氯苯基)-亚胼基]-3-氧代-丙腈(ESI-09)或权利要求1的EPAC特异性抑制剂。

10. 权利要求9的用途,其中所述EPAC特异性抑制剂选自权利要求1的EPAC特异性抑制剂。

11. EPAC特异性抑制剂在制造用于在有此需要的对象中增强免疫应答之药物中的用途,其中所述EPAC特异性抑制剂是3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(3-氯苯基)-亚胼基]-3-氧代-丙腈(ESI-09)或权利要求1的EPAC特异性抑制剂。

12. 权利要求11的用途,其中所述EPAC特异性抑制剂选自权利要求1的EPAC特异性抑制剂。

13. 权利要求11的用途,其中所述药物还包含抗原或治疗性抗体。

14. EPAC特异性抑制剂在制造用于在具有瘦蛋白抗性的对象中增强瘦蛋白敏感性之药物中的用途,其中所述EPAC特异性抑制剂是3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(3-氯苯基)-亚胼基]-3-氧代-丙腈(ESI-09)或权利要求1的EPAC特异性抑制剂。

15. 权利要求14的用途,其中所述EPAC特异性抑制剂选自权利要求1的EPAC特异性抑制剂。

16. EPAC特异性抑制剂在制造用于在具有微生物感染或处于微生物感染风险下的对象中抑制微生物感染之药物中的用途,其中所述EPAC特异性抑制剂是3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(3-氯苯基)-亚胼基]-3-氧代-丙腈(ESI-09)或权利要求1的EPAC特异性抑制剂。

17. 权利要求16的用途,其中所述微生物是细菌、病毒或真菌。

18. 权利要求16的用途,其中所述EPAC特异性抑制剂选自权利要求1的EPAC特异性抑制剂。

19. 权利要求1的EPAC特异性抑制剂,其中所述EPAC特异性抑制剂是3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(3,5-二氯苯基)-亚胼基]-3-氧代-丙腈(HJC0726)。

20. 权利要求8的用途,其中所述EPAC特异性抑制剂是3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(3-氯苯基)-亚胼基]-3-氧代-丙腈(ESI-09)。

21. 权利要求9的用途,其中所述EPAC特异性抑制剂是3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(3-氯苯基)-亚胼基]-3-氧代-丙腈(ESI-09)。

22. 权利要求11的用途,其中所述EPAC特异性抑制剂是3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(3-氯苯基)-亚胼基]-3-氧代-丙腈(ESI-09)。

23. 权利要求14的用途,其中所述EPAC特异性抑制剂是3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(3-氯苯基)-亚胼基]-3-氧代-丙腈(ESI-09)。

24. 权利要求16的用途,其中所述EPAC特异性抑制剂是3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(3-氯苯基)-亚胼基]-3-氧代-丙腈(ESI-09)。

cAMP直接活化交换蛋白 (EPAC) 的调节剂

[0001] 本发明在国立卫生研究院 (National Institute of Health) 授予的R01GM066170和R21NS066510的政府支持下进行。美国政府在本发明中具有某些权利。

技术领域

[0002] 本发明的一些实施方案涉及药理学、医学和药物化学。某些实施方案涉及调节EPAC1和/或EPAC2的化合物。另一些实施方案涉及使用所述化合物的方法或药物。

背景技术

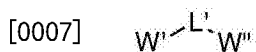
[0003] 鉴定和开发能够选择性靶向细胞中复杂细胞信号传导网络的组分的化合物是现代药理学的主要努力。环腺苷酸(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)——典型的第二信使,是控制许多生物学过程的细胞信号传导网络的重要组成部分。除了其在生理条件下的调节功能之外,cAMP还涉及在多种人类疾病(包括癌症、糖尿病、心力衰竭和神经疾病(例如阿尔兹海默病(AD)))中发挥主要作用。因此,并不出乎意料的是,现在的药理学疗法靶向cAMP信号传导途径比靶向任何其他途径都要多。

[0004] cAMP在哺乳动物细胞中的主要生理作用通过两个广泛表达细胞内cAMP受体家族转导:典型的蛋白激酶A/cAMP依赖性蛋白激酶(PKA/cAPK)和新近发现的cAMP直接活化的交换蛋白/cAMP调节的鸟嘌呤核苷酸交换因子(EPAC/cAMP-GEF)。虽然PKA的多种药理学抑制剂是可用的,但是仅对少数EPAC特异性拮抗剂/抑制剂进行了描述。因此,仍然需要用于选择性调节EPAC1和/或EPAC2的另外的组合物和方法。

发明内容

[0005] 本发明人开发了目的在于鉴定EPAC特异性抑制剂的灵敏且稳健的高通量筛选(HTS)测定(Tsalkova等.(2012) PLOS ONE 7(1):e30441)。使用这种EPAC HTS测定,本发明人成功地鉴定了数种能够阻断生物化学和细胞cAMP诱导之EPAC活化的同种型特异性EPAC抑制剂(Tsalkova等.(2012) Proc. Acad. Natl. Sci. USA. 109:18613-18618)。此外,本发明人合成并表征了这些EPAC特异性抑制剂(EPAC specific inhibitor, ESI)的多种化学类似物(Chen等.(2012) Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters. 22:4038-4043; Chen等.(2013) J. Med. Chem. 出版中; Chen等.(2013) Tetrahedron Lett. 出版中)。这些化学类似物中的一些表现出比母体化合物更强大的EPAC抑制活性和更好的药理学性质。这些EPAC特异性抑制剂将不仅为详细分析EPAC的生理功能和进一步阐明cAMP信号传导的分子机制提供了强有力的药理学工具,而且对设计靶向与cAMP信号传导和EPAC蛋白质有关的疾病中的EPAC的潜在疗法具有重要影响。使用EPAC1敲除小鼠和ESI的研究表明EPAC1在肥胖/糖尿病(Yan等.(2013) Molecular Cellular Biology 33:918-926)、癌症(Almahariq等.(2013) Molecular Pharmacology. 83:122-128)、免疫应答、感染等中发挥着重要作用。

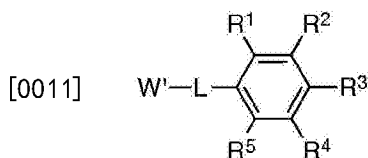
[0006] 某些实施方案涉及分离的cAMP活化交换蛋白(EPAC)调节性化合物,其具有式I的通式:



[0008] 式I

[0009] 其中, L' 是-SO₂-、-NH-或-C(O)-C(CN)=N-NH-; 并且W' 和W'' 独立地是经取代或未经取代的芳基或者经取代或未经取代的杂芳基。

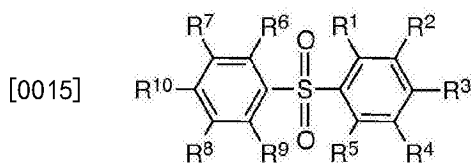
[0010] 另一些实施方案涉及分离的cAMP活化交换蛋白 (EPAC) 调节性化合物, 其具有式II 的通式:



[0012] 式II

[0013] 其中R¹、R²、R³、R⁴和R⁵独立地是氢、羟基、卤素、C₁-C₄烷氧基; 经取代或未经取代的C₁-C₁₀烷基、经取代或未经取代的C₁-C₁₀杂烷基、经取代或未经取代的C₅-C₇环烷基、经取代或未经取代的C₅-C₇杂环基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基或者C₁-C₅烷基胺; L是-SO₂-或-NH-; 并且W' 如上式I所述。在另一个方面中, L是-SO₂-。在某些方面中, W' 是经取代的苯基或含N的杂芳基。在又一个方面中, 含N的杂芳基中的氮与L连接。

[0014] 分离的cAMP活化交换蛋白 (EPAC) 调节性化合物, 其具有式III的通式:



[0016] 式III

[0017] 其中R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹和R¹⁰独立地是氢、羟基、卤素、C₁-C₄烷氧基、经取代或未经取代的C₁-C₁₀烷基、经取代或未经取代的C₁-C₁₀杂烷基、经取代或未经取代的C₅-C₇环烷基、经取代或未经取代的C₅-C₇杂环基、经取代或未经取代的芳基、经取代或未经取代的杂芳基或者C₁-C₅烷基胺。在某些方面中, R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹和R¹⁰独立地是氢或C₁-C₁₀烷基。在另一个方面中, R¹、R³和R⁵是C₁-C₁₀烷基; 并且R²和R⁴是氢。在又一些方面中, R⁷、R⁹和R¹⁰中的一个或更多个是C₁-C₁₀烷基。在再一些方面中, R⁷、R⁹和R¹⁰是C₁-C₁₀烷基。在某些方面中, R¹⁰是经取代或未经取代的C₁-C₄烷基或C₁-C₄烷氧基。在另一些方面中, R¹⁰是卤素或经卤素取代的杂芳基。

[0018] 某些实施方案涉及这样的式III的化合物, 其中R¹、R³和R⁵是甲基; R²和R⁴是氢; 并且 (a) R⁷、R⁹和R¹⁰是C₁-C₁₀烷基且R⁶和R⁸是氢; (b) R¹⁰是C₁-C₁₀烷基且R⁶、R⁷、R⁸、R⁹是氢; (c) R¹⁰是C₁-C₄烷氧基且R⁶、R⁷、R⁸、R⁹是氢; (d) R¹⁰是卤素且R⁶、R⁷、R⁸、R⁹是氢; (e) R¹⁰是羟基且R⁶、R⁷、R⁸、R⁹是氢; 或者 (f) R¹⁰是卤素或经C₁-4烷基取代的吡啶或2-、4-、5-或6-卤代-吡啶且R⁶、R⁷、R⁸、R⁹是氢。

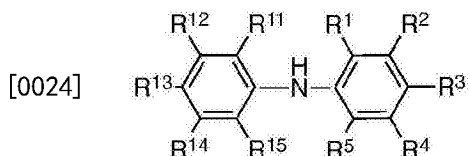
[0019] 某些实施方案涉及这样的式III的化合物, 其中R¹、R³和R⁵是甲基; R²和R⁴是氢; 并且 (a) R⁷、R⁹和R¹⁰是甲基且R⁶和R⁸是氢; (b) R¹⁰是甲基且R⁶、R⁷、R⁸、R⁹是氢; (c) R¹⁰是甲氧基且R⁶、R⁷、R⁸、R⁹是氢; (d) R¹⁰是碘且R⁶、R⁷、R⁸、R⁹是氢; (e) R¹⁰是羟基且R⁶、R⁷、R⁸、R⁹是氢; 或者 (f) R¹⁰是5-氟-吡啶且R⁶、R⁷、R⁸、R⁹是氢。

[0020] 某些实施方案涉及这样的式III的化合物,其中R³是甲基;R¹、R²、R⁴和R⁵是氢;并且(a) R⁷、R⁹和R¹⁰是C₁-C₁₀烷基且R⁶和R⁸是氢;(b) R¹⁰是C₁-C₁₀烷基且R⁶、R⁷、R⁸、R⁹是氢;(c) R¹⁰是C₁-C₄烷氧基且R⁶、R⁷、R⁸、R⁹是氢;(d) R¹⁰是卤素且R⁶、R⁷、R⁸、R⁹是氢;(e) R¹⁰是羟基且R⁶、R⁷、R⁸、R⁹是氢;或者(f) R¹⁰是卤素、经C₁₋₄烷基取代的吡啶或2-、4-、5-或6-卤代-吡啶且R⁶、R⁷、R⁸、R⁹是氢。

[0021] 某些实施方案涉及这样的式III的化合物,其中R³是甲基;R¹、R²、R⁴和R⁵是氢;并且(a) R⁷、R⁹和R¹⁰是甲基且R⁶和R⁸是氢;(b) R¹⁰是甲基且R⁶、R⁷、R⁸、R⁹是氢;(c) R¹⁰是甲氧基且R⁶、R⁷、R⁸、R⁹是氢;(d) R¹⁰是碘且R⁶、R⁷、R⁸、R⁹是氢;(e) R¹⁰是羟基且R⁶、R⁷、R⁸、R⁹是氢;或者(f) R¹⁰是5-氟-吡啶且R⁶、R⁷、R⁸、R⁹是氢。

[0022] 在某些实施方案中,式III的化合物是1,3,5-三甲基-2-(2,4,5-三甲基-苯磺酰基)-苯(HJC-2-71)、2-(4-甲氧基-苯磺酰基)-1,3,5-三甲基-苯(HJC-2-82)、1,3,5-三甲基-2-(甲苯-4-磺酰基)-苯(HJC-2-85)、4-(2,4,6-三甲基-苯磺酰基)-酚(HJC-2-87)、2-(4-碘-苯磺酰基)-1,3,5-三甲基-苯(HJC-2-93)、2-氟-5-[4-(2,4,6-三甲基-苯磺酰基)-苯基]-吡啶(HJC-2-97)或1,2,4-三甲基-5-(甲苯-4-磺酰基)-苯(HJC-2-98)。

[0023] 又一个实施方案涉及分离的cAMP活化交换蛋白(EPAC)调节性化合物,其具有式IV的通式:



[0025] 式IV

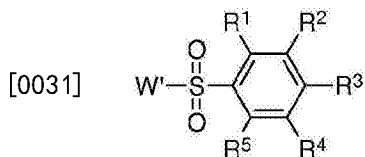
[0026] 其中R¹、R²、R³、R⁴和R⁵如上式III所述;并且R¹¹、R¹²、R¹³、R¹⁴和R¹⁵独立地是氢、卤素、C₁-C₁₀烷基或C₁-C₁₀杂烷基。在某些方面中,R¹、R³和R⁵是C₁-C₁₀烷基;并且R²和R⁴是氢。在另一个方面中,R¹¹、R¹²、R¹³、R¹⁴和R¹⁵独立地是氢、卤素或C₁-C₁₀烷基。

[0027] 某些实施方案涉及这样的式IV的化合物,其中R¹、R³和R⁵是C₁-C₁₀烷基;R²和R⁴是氢;并且(a) R¹¹和R¹⁴是卤素且R¹²、R¹³和R¹⁵是氢;(b) R¹²和R¹⁴是卤素且R¹¹、R¹³和R¹⁵是氢;或者(c) R¹³是C₁-C₁₀烷基且R¹¹、R¹²、R¹⁴和R¹⁵是氢。

[0028] 某些实施方案涉及这样的式IV的化合物,其中R¹、R³和R⁵是甲基;R²和R⁴是氢;并且(a) R¹¹和R¹⁴是氯且R¹²、R¹³和R¹⁵是氢;(b) R¹²和R¹⁴是氯且R¹¹、R¹³和R¹⁵是氢;或者(c) R¹³是甲基且R¹¹、R¹²、R¹⁴和R¹⁵是氢。

[0029] 在某一方面中,式IV的化合物是(3,5-二氯-苯基)-(2,4,6-三甲基-苯基)-胺(HJC-2-83)、对甲苯基-(2,4,6-三甲基-苯基)-胺(HJC-2-89)或(2,5-二氯-苯基)-(2,4,6-三甲基-苯基)-胺(HJC-3-38)。

[0030] 某些实施方案涉及分离的cAMP活化交换蛋白(EPAC)调节性化合物,其具有式V的通式:



[0032] 式V

[0033] 其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 如上式III所述；并且 W' 如上式I所述。在某些方面中， R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 和 R^5 独立地是氢、卤素、 C_1 - C_{10} 烷基或 C_1 - C_{10} 杂烷基。在某些方面中， W' 是经取代或未经取代的吡咯、经取代或未经取代的氮杂吡咯或者经取代或未经取代的吡咯。在某些方面中， W' 是未经取代的吡咯或未经取代的氮杂吡咯。在另一个方面中， W' 是经一个或更多个 C_1 - C_{10} 烷基取代的吡咯。在某些方面中， W' 是1-乙基吡咯或2,4-二甲基吡咯。

[0034] 某些实施方案涉及这样的式V的化合物，其中 R^1 、 R^3 和 R^5 是 C_1 - C_{10} 烷基； R^2 和 R^4 是氢；并且 W' 是经取代或未经取代的吡咯、经取代或未经取代的氮杂吡咯或者经取代或未经取代的吡咯。在某些方面中， W' 是未经取代的吡咯或未经取代的氮杂吡咯。在另一个方面中， W' 是经一个或更多个 C_1 - C_{10} 烷基取代的吡咯。在某些方面中， W' 是1-乙基吡咯或2,4-二甲基吡咯。

[0035] 某些实施方案涉及这样的式V的化合物，其中 R^1 、 R^3 和 R^5 是甲基； R^2 和 R^4 是氢；并且 W' 是经取代或未经取代的吡咯、经取代或未经取代的氮杂吡咯或者经取代或未经取代的吡咯。在某些方面中， W' 是未经取代的吡咯或未经取代的4-、5-、6-或者7-氮杂吡咯。在另一个方面中， W' 是经一个或更多个甲基或乙基取代的吡咯。在某些方面中， W' 是1-乙基吡咯或2,4-二甲基吡咯。

[0036] 某些实施方案涉及这样的式V的化合物，其中 R^1 和 R^3 是 C_1 - C_{10} 烷基； R^2 、 R^4 和 R^5 是氢；并且 W' 是经取代或未经取代的吡咯、经取代或未经取代的氮杂吡咯或者经取代或未经取代的吡咯。在某些方面中， W' 是未经取代的吡咯或未经取代的氮杂吡咯。在另一个方面中， W' 是经一个或更多个 C_1 - C_{10} 烷基取代的吡咯。在某些方面中， W' 是1-乙基吡咯或2,4-二甲基吡咯。

[0037] 某些实施方案涉及这样的式V的化合物，其中 R^1 和 R^3 是甲基； R^2 、 R^4 和 R^5 是氢；并且 W' 是经取代或未经取代的吡咯、经取代或未经取代的氮杂吡咯或者经取代或未经取代的吡咯。在某些方面中， W' 是未经取代的吡咯或未经取代的4-、5-、6-或者7-氮杂吡咯。在另一个方面中， W' 是经一个或更多个甲基或乙基取代的吡咯。在某些方面中， W' 是1-乙基吡咯或2,4-二甲基吡咯。

[0038] 某些实施方案涉及这样的式V的化合物，其中 R^2 和 R^4 是 C_1 - C_{10} 烷基； R^1 、 R^3 和 R^5 是氢；并且 W' 是经取代或未经取代的吡咯、经取代或未经取代的氮杂吡咯或者经取代或未经取代的吡咯。在某些方面中， W' 是未经取代的吡咯或未经取代的氮杂吡咯。在另一个方面中， W' 是经一个或更多个 C_1 - C_4 烷基取代的吡咯。在某些方面中， W' 是1-乙基吡咯或2,4-二甲基吡咯。

[0039] 某些实施方案涉及这样的式V的化合物，其中 R^2 和 R^4 是甲基； R^1 、 R^3 和 R^5 是氢；并且 W' 是经取代或未经取代的吡咯、经取代或未经取代的氮杂吡咯或者经取代或未经取代的吡咯。在某些方面中， W' 是未经取代的吡咯或未经取代的4-、5-、6-或者7-氮杂吡咯。在另一个方面中， W' 是经一个或更多个甲基或乙基取代的吡咯。在某些方面中， W' 是1-乙基吡咯或2,4-二甲基吡咯。

[0040] 某些实施方案涉及这样的式V的化合物，其中 R^3 是 C_1 - C_{10} 烷基； R^1 、 R^2 、 R^4 和 R^5 是氢；并且 W' 是经取代或未经取代的吡咯、经取代或未经取代的氮杂吡咯或者经取代或未经取代的吡咯。在某些方面中， W' 是未经取代的吡咯或未经取代的氮杂吡咯。在另一个方面中， W' 是经一个或更多个 C_1 - C_{10} 烷基取代的吡咯。在某些方面中， W' 是1-乙基吡咯或2,4-二甲基吡

咯。

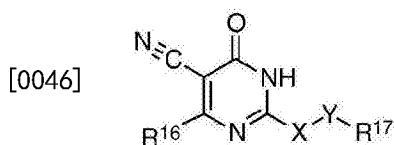
[0041] 某些实施方案涉及这样的式V的化合物,其中R³是甲基;R¹、R²、R⁴和R⁵是氢;并且W'是经取代或未经取代的咪唑、经取代或未经取代的氮杂咪唑或者经取代或未经取代的吡咯。在某些方面中,W'是未经取代的咪唑或未经取代的4-、5-、6-或者7-氮杂咪唑。在另一个方面中,W'是经一个或多个甲基或乙基取代的吡咯。在某些方面中,W'是1-乙基吡咯或2,4-二甲基吡咯。

[0042] 某些实施方案涉及这样的式V的化合物,其中R¹是C₁-C₁₀烷基;R²、R³、R⁴和R⁵是氢;并且W'是经取代或未经取代的咪唑、经取代或未经取代的氮杂咪唑或者经取代或未经取代的吡咯。在某些方面中,W'是未经取代的咪唑或未经取代的氮杂咪唑。在另一个方面中,W'是经一个或多个C₁-C₁₀烷基取代的吡咯。在某些方面中,W'是1-乙基吡咯或2,4-二甲基吡咯。

[0043] 某些实施方案涉及这样的式V的化合物,其中R¹是甲基;R²、R³、R⁴和R⁵是氢;并且W'是经取代或未经取代的咪唑、经取代或未经取代的氮杂咪唑或者经取代或未经取代的吡咯。在某些方面中,W'是未经取代的咪唑或未经取代的4-、5-、6-或者7-氮杂咪唑。在另一个方面中,W'是经一个或多个甲基或乙基取代的吡咯。在某些方面中,W'是1-乙基吡咯或2,4-二甲基吡咯。

[0044] 在某些实施方案中,式V的化合物是1-(2,4,6-三甲基-苯磺酰基)-1H-咪唑(HJC-2-77)、2-乙基-1-(2,4,6-三甲基-苯磺酰基)-1H-吡咯(HJC-2-79)、1-(2,4,6-三甲基-苯磺酰基)-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶(HJC-2-81)、1-(2,4,6-三甲基-苯磺酰基)-1H-吡咯并[2,3-c]吡啶(HJC-3-21)、1-(2,4,6-三甲基-苯磺酰基)-1H-吡咯并[3,2-c]吡啶(HJC-3-22)、1-(2,4,6-三甲基-苯磺酰基)-1H-吡咯并[3,2-b]吡啶(HJC-3-23)、2-乙基-1-(甲苯-4-磺酰基)-1H-吡咯(HJC-3-26)、2,4-二甲基-1-(2,4,6-三甲基-苯磺酰基)-1H-吡咯(HJC-3-50)、2-乙基-1-(甲苯-2-磺酰基)-1H-吡咯(HJC-3-53)、1-(3,5-二甲基-苯磺酰基)-2-乙基-1H-吡咯(HJC-3-54)、1-(2,4-二甲基-苯磺酰基)-2-乙基-1H-吡咯(HJC-3-55)或1-(2,4,6-三甲基-苯磺酰基)-1H-咪唑-5-羧酸(HJC-3-62)。

[0045] 某些实施方案涉及分离的cAMP活化交换蛋白(EPAC)调节性化合物,其具有下式:



[0047] 式VI

[0048] 其中R¹⁶是经取代或未经取代的C₁-C₁₀烷基、经取代或未经取代的C₃-C₆杂烷基、经取代或未经取代的C₃-C₆环烷基、经取代或未经取代的C₃-C₆杂环基、经取代或未经取代的芳基或者经取代或未经取代的杂芳基;R¹⁷是氢、经取代或未经取代的芳基或者经取代或未经取代的杂芳基;X是硫或氮;并且Y是直接键、-CH₂-、-CH₂C(O)O-或-CH₂C(O)N-。式VI代表式I的一个替代实施方案,其中W'是经取代的嘧啶并且L特别地是由-X-Y-表示的接头。

[0049] 某些实施方案涉及这样的式VI的化合物,其中X是硫;Y是-CH₂-;R¹⁶如上式VI所述;并且R¹⁷如上式VI所述。在某些方面中,R¹⁷如上式VI所述;并且R¹⁶是(a) C₃-C₆环烷基、(b) C₆环烷基、(c) C₅环烷基、(d) C₄环烷基、(e) C₃环烷基、(f) 支链或直链的C₁-C₁₀烷基或者(g) 支链的

C₃烷基。在某些方面中，R¹⁷是经取代的苯基。在某些方面中，R¹⁷是经C₁-C₁₀烷基取代的苯基。在另一些方面中，经取代的苯基具有1、2或3个C₁-C₁₀烷基取代基。在某些方面中，C₁-C₁₀烷基取代基在苯基的1、3和5位；2和5位；2和4位；1和3位；或者3位。在另一个方面中，R¹⁷是3,6-二甲基苯基、3,5-二甲基苯基或2,4-二甲基苯基。在又一个方面中，R¹⁷是2,4,6-三甲基苯基。

[0050] 某些实施方案涉及这样的式VI的化合物，其中X是硫；Y是-CH₂C(O)N-；R¹⁶如上式VI所述；并且R¹⁷如上式VI所述。在某些方面中，R¹⁷如上式VI所述；并且R¹⁶是(a) C₃-C₆环烷基、(b) C₆环烷基、(c) C₅环烷基、(d) C₄环烷基、(e) C₃环烷基、(f) 支链或直链的C₁-C₁₀烷基或者(g) 支链的C₃烷基。在某些方面中，R¹⁷是经取代的苯基。在某些方面中，R¹⁷是经C₁-C₁₀烷基取代的苯基。在另一些方面中，经取代的苯基具有1、2或3个C₁-C₁₀烷基取代基。在某些方面中，C₁-C₁₀烷基取代基在苯基的1、3和5位；2和5位；2和4位；1和3位；或者3位。在另一个方面中，R¹⁷是3,6-二甲基苯基、3,5-二甲基苯基或2,4-二甲基苯基。在又一个方面中，R¹⁷是2,4,6-三甲基苯基。

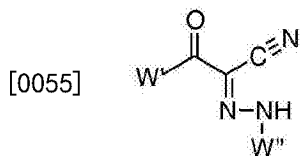
[0051] 某些实施方案涉及这样的式VI的化合物，其中X是氮；Y是-CH₂-；R¹⁶如上式VI所述；并且R¹⁷如上式VI所述。在某些方面中，R¹⁷如上式VI所述；并且R¹⁶是(a) C₃-C₆环烷基、(b) C₆环烷基、(c) C₅环烷基、(d) C₄环烷基、(e) C₃环烷基、(f) 支链或直链的C₁-C₁₀烷基或者(g) 支链的C₃烷基。在某些方面中，R¹⁷是经取代的苯基。在某些方面中，R¹⁷是经C₁-C₁₀烷基取代的苯基。在另一些方面中，经取代的苯基具有1、2或3个C₁-C₁₀烷基取代基。在某些方面中，C₁-C₁₀烷基取代基在苯基的1、3和5位；2和5位；2和4位；1和3位；或者3位。在另一个方面中，R¹⁷是3,6-二甲基苯基、3,5-二甲基苯基或2,4-二甲基苯基。在又一个方面中，R¹⁷是2,4,6-三甲基苯基。

[0052] 某些实施方案涉及这样的式VI的化合物，其中X是氮；Y是直接键；R¹⁶如上式VI所述；并且R¹⁷如上式VI所述。在某些方面中，R¹⁷如上式VI所述；并且R¹⁶是(a) C₃-C₆环烷基、(b) C₆环烷基、(c) C₅环烷基、(d) C₄环烷基、(e) C₃环烷基、(f) 支链或直链的C₁-C₁₀烷基或者(g) 支链的C₃烷基。在某些方面中，R¹⁷是经取代的苯基。在某些方面中，R¹⁷是经C₁-C₁₀烷基取代的苯基。在另一些方面中，经取代的苯基具有1、2或3个C₁-C₁₀烷基取代基。在某些方面中，C₁-C₁₀烷基取代基在苯基的1、3和5位；2和5位；2和4位；1和3位；或者3位。在另一个方面中，R¹⁷是3,6-二甲基苯基、3,5-二甲基苯基或2,4-二甲基苯基。在又一个方面中，R¹⁷是2,4,6-三甲基苯基。

[0053] 在某些实施方案中，式VI的化合物是4-环己基-2-(2,5-二甲基-苄基硫烷基)-6-氧代-1,6-二氢-嘧啶-5-甲腈(HJC-1-65)、4-环己基-2-(4-甲基-苄基硫烷基)-6-氧代-1,6-二氢-嘧啶-5-甲腈(HJC-1-67)、4-环己基-2-(3,5-二甲基-苄基硫烷基)-6-氧代-1,6-二氢-嘧啶-5-甲腈(HJC-1-72)、4-环己基-2-(2,4-二甲基-苄基硫烷基)-6-氧代-1,6-二氢-嘧啶-5-甲腈(HJC-1-74)、2-苄基硫烷基-4-环己基-6-氧代-1,6-二氢-嘧啶-5-甲腈(HJC-1-76)、4-环己基-6-氧代-2-(2,4,6-三甲基-苄基硫烷基)-1,6-二氢-嘧啶-5-甲腈(HJC-1-87)、2-(2,5-二甲基-苄基硫烷基)-4-异丙基-6-氧代-1,6-二氢-嘧啶-5-甲腈(HJC-1-95)、4-环戊基-2-(2,5-二甲基-苄基硫烷基)-6-氧代-1,6-二氢-嘧啶-5-甲腈(HJC-1-97)、4-环丙基-2-(2,5-二甲基-苄基硫烷基)-6-氧代-1,6-二氢-嘧啶-5-甲腈(HJC-1-98)、4-环己基-6-氧代-2-苄基氨基-1,6-二氢-嘧啶-5-甲腈(HJC-1-99)、4-[5-氰基-2-(2,5-二甲基-苄基硫烷基)-6-氧代-1,6-二氢-嘧啶-4-基]-哌啶-1-羧酸叔丁酯(HJC-1-93)、(5-氰基-4-环己基-6-氧代-1,6-二氢-嘧啶-2-基硫烷基)-乙酸(HJC-2-4)、2-(5-氰基-4-环己基-6-氧代-

1,6-二氢-嘧啶-2-基硫烷基)-N-(2,4,6-三甲基-苯基)-乙酰胺 (HJC-3-33) 或 2-(5-氰基-4-环己基-6-氧代-1,6-二氢-嘧啶-2-基硫烷基)-N-对甲苯基-乙酰胺 (HJC-3-35)。

[0054] 某些实施方案涉及分离的cAMP活化交换蛋白 (EPAC) 调节性化合物,其具有下式:



[0056] 式VII

[0057] 在某些方面中,W' 和W'' 如上式I所述。

[0058] 在某些实施方案中,W' 是未经取代或经取代的异噁唑。在某些方面中,异噁唑通过3位连接。在某些方面中,经取代的异噁唑是4-取代异噁唑、5-取代异噁唑或4,5-取代异噁唑。在一个特别的方面中,经取代的异噁唑是5-取代异噁唑。在某些方面中,取代基独立地是支链或非支链的C₁至C₁₀烷基。在某些方面中,烷基是甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、新戊基、正戊基或异戊基。在某些实施方案中,异噁唑是5-甲基异噁唑或5-叔丁基异噁唑。在另一些方面中,W' 是经取代或未经取代的苯基。

[0059] 在某些实施方案中,W'' 是单环或多环的、经取代或未经取代的芳基或杂芳基。在某些方面中,W'' 是经取代的苯基或含N的杂芳基。在另一个方面中,经取代的苯基是2,3,4,5,6,2,3,2,4,2,5,2,6,3,4,3,5,3,6,4,5,4,6或5,6取代的苯基。在又一些方面中,苯基包含一个或更多个选自以下的取代基:溴、氟、氯、碘、C₁-C₄烷基、羟基、硝基、氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、腈、C₁-C₄炔基、乙酰基、C₁-C₄羟基烷基、C₁-C₄烷氧基或羧基。在某些方面中,W'' 是经取代或未经取代的苯并吡啶或者经取代或未经取代的茚满。在某些方面中,W'' 是3-氯苯基、2-氯苯基、4-氯苯基、苯基、3,6-二氯苯基、3-甲基苯基、3-三氟甲基苯基、3-硝基苯基、4-甲基苯基、3,5-二氯苯基、4-溴苯基、3-溴苯基、3,6-二甲基苯基、苯并吡啶、2,3-二氯苯基、3-乙炔基、苯甲酸乙酯、3-苄腈、3-乙酰基苯基、2,3-甲基苯基、3-乙氧基苯基、茚满、3,5-二-三氟甲基苯基、6-氯-苯甲酸或3-氯,4-羟基苯基。

[0060] 在某些方面中,式VII的化合物选自N-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(3-氯苯基)-亚胼基]-2-氰基乙酰胺 (HJC0683)、2-[(3-氯苯基)-亚胼基]-2-氰基-N-(5-甲基-异噁唑-3-基)乙酰胺 (HJC0692)、3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(3-氯苯基)-亚胼基]-3-氧代-丙腈 (HJC0680,ESI-09)、3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(2-氯苯基)-亚胼基]-3-氧代-丙腈 (HJC0693)、3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(4-氯苯基)-亚胼基]-3-氧代-丙腈 (HJC0694)、3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-3-氧代-2-(苯基-亚胼基)-丙腈 (HJC0695)、3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(2,5-二氯苯基)-亚胼基]-3-氧代-丙腈 (HJC0696)、3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-3-氧代-2-(间甲苯基-亚胼基)丙腈 (HJC0712)、3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-3-氧代-2-[(3-三氟甲基-苯基)-亚胼基]丙腈 (HJC0720)、3-(5-叔丁基-异噁

唑-3-基)-2-[(3-硝基苯基)-亚肼基]-3-氧代-丙腈(HJC0721)、3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-3-氧代-2-(对甲苯基-亚肼基)丙腈(HJC0724)、3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(3,5-二氯苯基)-亚肼基]-3-氧代-丙腈(HJC0726)、2-[(4-溴苯基)-亚肼基]-3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-3-氧代-丙腈(HJC0742)、2-[(3-溴苯基)-亚肼基]-3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-3-氧代-丙腈(HJC0743)、3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(2,5-二甲基苯基)-亚肼基]-3-氧代-丙腈(HJC0744)、3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-3-氧代-2-(喹啉-6-基-亚肼基)丙腈(HJC0745)、3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(2,3-二氯苯基)-亚肼基]-3-氧代-丙腈(HJC0750)、3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(3-乙炔基-苯基)-亚肼基]-3-氧代-丙腈(HJC0751)、3-[N'-[2-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-1-氰基-2-氧代-亚乙基]-肼基]苯甲酸乙酯(HJC0752)、3-[N'-[2-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-1-氰基-2-氧代-亚乙基]-肼基]苄腈(HJC0753)、2-[(3-乙酰基-苯基)-亚肼基]-3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-3-氧代-丙腈(HJC0754)、3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(2,3-二甲基苯基)-亚肼基]-3-氧代-丙腈(HJC0755)、3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(3-羟基甲基苯基)-亚肼基]-3-氧代-丙腈(HJC0756)、3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-(茚满-5-基-亚肼基)-3-氧代-丙腈(HJC0757)、2-[(3,5-双-三氟甲基-苯基)-亚肼基]-3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-3-氧代-丙腈(HJC0758)、2-[N'-[2-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-1-氰基-2-氧代-亚乙基]-肼基]-6-氯-苯甲酸(HJC0759)、3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(3-氯-4-羟基-苯基)-亚肼基]-3-氧代-丙腈(HJC0760)、2-[(3-氯-苯基)-亚肼基]-3-(5-甲基-异噁唑-3-基)-3-氧代-丙腈(HJC0768)或2-[(3,5-二氯苯基)-亚肼基]-3-(5-甲基-异噁唑-3-基)-3-氧代-丙腈(HJC0770)。

[0061] 某些实施方案涉及使用一种或更多种EPAC调节剂来治疗或者增强对与EPAC活性相关疾病或病症的治疗。

[0062] 贯穿本申请讨论了本发明的另一些实施方案。关于本发明的一个方面讨论的任何实施方案也适用于本发明的其他一些方面,并且反之亦然。本文中所述的每个实施方案应理解为可应用于本发明所有方面的本发明实施方案。

[0063] 本文中使用的术语“IC₅₀”是指产生所获得的最大应答的50%的抑制剂量。

[0064] 术语半最大有效浓度(EC₅₀)是指在某具体暴露时间之后表现出基线与最大值之间一半的应答的药物浓度。

[0065] 术语“抑制”、“降低”或“防止”或这些术语的任意变化形式,在用于权利要求书和/或说明书时,包括任意可测量的降低或完全抑制以实现期望结果。

[0066] 如本文所使用的,本文中所述的“抑制剂”例如可直接或间接抑制蛋白质的活性。术语“EPAC抑制剂”是指降低细胞中EPAC活性的化合物。在某些方面中,EPAC抑制剂使癌细

胞或癌迁移与不存在所述抑制剂时的所述细胞相比降低任意可测量的量。EPAC抑制剂包括EPAC1抑制剂和/或EPAC2抑制剂。

[0067] 如本文所使用的,本文中所述的“活化剂”例如可提高蛋白质的活性。术语“EPAC活化剂”是指提高细胞中EPAC活性的化合物。EPAC活化剂包括EPAC1活化剂和/或EPAC2活化剂。

[0068] 关于治疗疾病或病症的药剂的“有效量”意指,能够在一定程度上降低病理状况或由病理状况造成之症状的量。该术语包括能够引起癌细胞或肿瘤细胞的生长抑制、细胞抑制和/或细胞毒性作用和/或凋亡的量。

[0069] 短语“治疗癌症”和“癌症治疗”意指降低、降低或抑制癌细胞的复制;降低、降低或抑制癌症的扩散(形成转移);减小肿瘤尺寸;降低肿瘤数目(即,降低肿瘤负荷);减轻或降低身体中癌细胞的数目;防止手术移除或其他抗癌疗法后癌症的复发;或者减轻或减缓由癌症造成的疾病症状。

[0070] 如本文所使用的,术语“患者”或“对象”是指活的哺乳动物生物体,例如人、猴、牛、绵羊、山羊、狗、猫、小鼠、大鼠、豚鼠或其物种。在某些实施方案中,患者或对象是灵长动物。人患者的非限制性实例是成人、青少年、婴儿和胎儿。

[0071] 术语“包含”、“具有”和“包括”是开放式连系动词。这些动词中一个或更多个的任意形式或时态,例如“含有”、“具有”和“包括”,也是开放式的。例如,“包含”、“具有”或“包括”一个或更多个步骤的任何方法都不限于仅具有所述一个或更多个步骤,并且还包括其他未列出的步骤。

[0072] 除非明确地指明仅指替代方案或者替代方案是互斥的,否则权利要求中术语“或”用于意指“和/或”,但是本公开内容支持意思为仅为替代方案以及“和/或”的定义。

[0073] 当在权利要求书和/或说明书中与术语“包含”联合使用时,无数量词修饰的名词可意指“一”,但是其也与“一或更多”、“至少一”和“一或多于一”的意思一致。

[0074] 贯穿本申请,术语“约”用来表明这样的数值:其包括用于测定该数值的装置、方法之误差的固有差异,或者存在于研究对象之间的差异。

附图说明

[0075] 以下附图构成本说明书的一部分,并且被包括在本说明书内以进一步说明本发明的某些方面。通过参考这些附图的一幅或更多幅并结合本文所示的具体实施方案的详细描述可更好地理解本发明。

[0076] 图1.命中物(hit)的化学结构和产生新Epac2探针的一般策略。

[0077] 图2.具有式III的通式的化合物的实例。

[0078] 图3.具有式IV的通式的化合物的实例。

[0079] 图4.具有式V的通式的化合物的实例。

[0080] 图5.具有式VI的通式的化合物的实例。

[0081] 图6.具有式VII的通式的化合物的实例。

[0082] 图7A-7B. EPAC特异性拮抗剂的相对效力。(A) ESI(空心圆形)和cAMP(实心方形)与8-NBD-cAMP在与EPAC2结合中的剂量依赖性竞争。(B)在25 μ M cAMP存在下,ESI-05,ESI-07和ESI-09对EPAC1(实心圆形)或EPAC2(空心圆形)GEF活性的剂量依赖性抑制。

[0083] 图8.ESI-09对I型和II型PKA活性的作用。在100 μ M cAMP+载剂对照、25 μ M H-89、25 μ M ESI-05、25 μ M ESI-07或25 μ M ESI-09存在下相对的I型(实心条)和II型(空心条)PKA全酶活性。数据以平均值和标准偏差的格式表示(n=3)。

[0084] 图9A-9B. EPAC2特异性拮抗剂对007-AM介导的Rap1细胞活化的作用。用10 μ M 007-AM刺激经或未经ESI-05或ESI-07预处理5分钟的血清饥饿的HEK293/EPAC2细胞或HEK293/EPAC1细胞10分钟。通过用Rap-1特异性抗体进行免疫印迹来检测通过Ral-GDSRBD-GST拉下(pull-down)测定获得的GTP结合Rap1 (Rap1GTP) 以及总细胞Rap1。(A) 经ESI-05处理的HEK293/EPAC2细胞。(B) 经ESI-07处理的HEK293/EPAC2细胞。(C) 经ESI-05或ESI-07处理的HEK293/EPAC1细胞。对于每幅图都通过三个独立实验获得类似结果。使用t检验来确定统计显著性(*P<0.05)。

[0085] 图10. ESI-09对HEK293/EPAC1、HEK293/EPAC2和人血管平滑肌(hVSMC)细胞中EPAC介导的PKB磷酸化的作用。用10 μ M 007-AM刺激经或未经10 μ M ESI-09预处理的血清饥饿的HEK293/EPAC1、HEK293/EPAC2和hVSMC细胞。使用抗磷酸化-Ser473特异性(PKB-P473) PKB抗体和抗磷酸化-Thr308特异性(PKB-P308) PKB抗体使细胞裂解物经历如“实验步骤”中所述的Western印迹分析。从三个独立试验中获得类似结果。

[0086] 图11. ESI-09处理对胰腺癌细胞活力的作用。用载剂对照(空心条)或用10 μ M ESI-09(实心条)处理AsPC-1细胞和PANC-1细胞24小时和48小时。通过荧光alamar blue测定来测量细胞活力。条代表平均值 \pm s.d. (n=3)。

[0087] 图12A-12D. EPAC抑制对胰腺癌细胞迁移的作用。分别在跨孔(trans-well)测定(A)和伤口愈合测定(B)中,用10.0 μ M ESI-09将AsPC-1、BxPC-3和PANC-1预处理24小时显著(P<0.05)降低了细胞迁移。黑条:载剂对照;白条:ESI-09。通过shEPAC1-C28而不是shEPAC1-C32抑制EPAC1表达使AsPC-1(C)和PANC-1(D)细胞的转移显著(P<0.02)降低。在任一细胞系中,亲本细胞与shEPAC1-C32横断细胞之间的迁移没有显著差异。黑条:亲本对照;白条:shEPAC1-C28;灰条:shEPAC1-C32。条代表平均值 \pm s.d. (n=3)。

[0088] 图13. ESI-09抑制PDA细胞在I型胶原上的EPAC-1介导粘附。在用指示浓度的ESI-09处理5分钟后,用载剂或10 μ M 007-AM刺激AsPC-1和PANC-1细胞。条代表平均值 \pm s.d. (n=3)。#显著高于载剂组(P<0.03)。*显著低于007-AM刺激组(P<0.02)。

[0089] 图14. ESI-09抑制体内的PDA转移。将稳定表达荧光素酶的MIAPaCa-2同位(orthotopically)移植到无胸腺裸鼠的胰腺中。将小鼠随机分为两组并分别用载剂或ESI-09(50 mg/kg,经口服法)处理。使用IVIS生物发光成像系统通过每周的生物发光成像监测肿瘤的生长和转移。

[0090] 图15. EPAC1缺失的小鼠响应于免疫产生更多的Ova-IgG抗体。在霍乱毒素(cholera toxin,CT)存在或不存在下,经口服卵清蛋白(OVA)使WT和EPAC1^{-/-}C57BL/6小鼠免疫。在免疫后测定血清卵清蛋白(OVA)-IgG1水平。

[0091] 图16. ESI-09施用使血清OVA-IgG1水平提高。每天用载剂或ESI-09(50mg/kg,经口服法)处理WT C57BL/6小鼠。处理后5天,经口服卵清蛋白(OVA)使小鼠免疫,并且继续进行每天的ESI-09处理。在免疫后14天和28天测定血清卵清蛋白(OVA)-IgG1水平。

[0092] 图17A-17B. EPAC的药理学抑制使血浆瘦蛋白降低并且使下丘脑中的瘦蛋白信号传导增强。(A) 在经或未经EPAC特异性抑制剂处理的情况下,经瘦蛋白处理的下丘脑水平上

器官型脑中pSTAT3 Y705、总STAT3、SOCS3、SHP2和 α -微管蛋白的Western印迹。(B)用载剂或ESI-09 (50mg/kg)处理3周的8周龄野生型小鼠的血浆瘦蛋白水平。

[0093] 图18A-18D.保护Epac1^{-/-} (KO)小鼠免受HFD诱导的葡萄糖不耐受。(A)18周龄的喂食普通食物(chow fed)的小鼠的口服葡萄糖耐量试验。(B)18周龄的喂食HFD的小鼠(喂食HFD15周)的口服葡萄糖耐量试验。(C)喂食普通食物的18周小鼠禁食后和葡萄糖施用(1g/kg BW)后15分钟的胰岛素水平。(D)18周龄的喂食HFD的小鼠禁食后和葡萄糖施用(1g/kg BW)后15分钟的胰岛素水平。数据为平均 $631 \pm \text{SEM}$ 。#与野生型禁食相比 $p < 0.05$, *与Epac1^{-/-}禁食相比 $p < 0.05$ 。

[0094] 图19.ESI-09的小鼠血液时间-浓度曲线。在向小鼠(对于每个时间点, $n=5$)单次腹腔内(IP)注射ESI-09化合物(10mg/kg)后,测定到ESI-09的血液水平快速升高,在0.5小时时到达最大值 $42,520 \text{ ng/ml}$ ($128 \mu\text{M}$),并且半衰期为3.5小时。

[0095] 图20.EPAC1的缺失保护小鼠免于R.australia的亚致死感染。用亚致死剂量的R.australia攻击WT和Epac1^{-/-}C57BL/6小鼠。监测疾病的严重度和存活率。

[0096] 图21.ESI-09处理保护小鼠免于R.australia的致死剂量感染。每天用载剂或ESI-09 (10mg/kg, IP)处理WT C57BL/6小鼠。处理后5天,用致死剂量的R.australia攻击小鼠并继续每天的ESI-09处理。监测疾病的严重度和存活率。

[0097] 图22.ESI-09处理抑制R.australia的细胞进入。用R.australia感染经载剂或ESI-09处理的HUVEC细胞。在感染后24小时用免疫荧光染色监测R.australia(红色)和EPAC1(绿色)水平。

[0098] 发明详述

[0099] cAMP介导的信号传导调节生理和病理条件二者下的许多重要的生物过程。在多细胞真核生物体中,cAMP的作用由蛋白激酶A/cAMP依赖性蛋白激酶(PKA/cAPK)和cAMP直接活化的交换蛋白/cAMP调节的鸟嘌呤核苷酸交换因子(EPAC/cAMP-GEF)转导(de Rooij等.(1998) Nature 396:474-477;Kawasaki等.(1998) Science 282:2275-2279)。因为PKA和EPAC在所有组织中均是广泛表达的,所以细胞内cAMP水平的提高会导致PKA和EPAC二者的活化。cAMP的净生理作用引起EPAC依赖性途径和PKA依赖性途径以时空方式整合。根据其相对丰度、分布和定位以及精确的细胞环境,两种细胞内cAMP受体可独立地作用,协同地集中,或者彼此对立地调节特定细胞功能(Cheng等.(2008) Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 40:651-662)。因此,不同模型系统中总体cAMP信号传导内EPAC和PKA的个体作用和相对贡献的仔细分析对于进一步阐明cAMP信号传导的机制是至关重要的,并且对于开发新的靶向特异性cAMP信号传导组分的基于机制的治疗策略是必要的。

[0100] 环状AMP是诱导从生长和分化到激素、神经元和免疫调节的生理反应的第二信使(Tasken和Aandahl (2004) Physiol Rev 84:137-167;Holz (2004) Diabetes 53:5-13)。在脑中,其涉及记忆(Huang等.(1995) Cell 83:1211-1222)和认知功能(Sur和Rubenstein (2005) Science 310:805-810)。EPAC有两种形式(EPAC1和EPAC2),其分别由不同的基因EPAC1和EPAC2编码。EPAC1是广泛表达的,主要在甲状腺、肾、卵巢、骨骼肌和特定的脑区中表达。EPAC2主要在脑和肾上腺中表达(de Rooij等.(1998) Nature 396:474-477;Kawasaki等.(1998) Science 282:2275-2279)。

[0101] 本文中所述的实施方案涉及调节EPAC1和/或EPAC2的化合物。某些实施方案涉及

特异性调节EPAC2或EPAC1的化合物。另一些实施方案涉及用于治疗EPAC相关疾病或病症的方法和药物。

[0102] I. 高通量EPAC测定

[0103] 本发明人开发了用于筛选EPAC特异性拮抗剂的基于荧光的高通量测定 (Tsalkova 等. (2012) PLoS. ONE. 7:e30441)。所述测定是具有高度重现性并且使用“混合和测量 (mix and measure)”的方式简单进行。试验下筛选 (pilot screening) 导致鉴定了能够特异性抑制cAMP诱导的EPAC活化而不影响PKA活性的小化合物,即,EPAC特异性抑制剂 (ESI)。

[0104] 初步筛选测定-与EPAC2复合的8-NBD-cAMP的荧光强度用作初步筛选测定的读出。初步筛选在黑色96孔或384孔微孔板中进行。例如,在包含150mM NaCl、1mM EDTA和1mM DDT的20mM Tris缓冲液,pH 7.5中制备50nM EPAC2溶液。将水中原液中的8-NBD-cAMP添加到EPAC2溶液中直到60nM。将样品分配到板中并从96孔母板中添加受试化合物。添加cAMP和没有添加cAMP的样品用作阳性对照和阴性对照。使用激发/发射波长设定为470/540nm的SpectaMaxM2微板阅读器 (Molecular Devices, Silicon Valley, CA, USA), 在添加受试化合物之前和之后在室温 (rt) 下记录来自8-NBD的荧光强度信号。

[0105] 二次确认测定-EPAC的体外鸟嘌呤核苷酸交换因子 (GEF) 活性的测量改编自公知的使用荧光鸟嘌呤核苷酸类似物进行的基于荧光之测定 (van den Berghe 等. (1997) Oncogene 15:845-850), 并且被用作由初步筛选鉴定的化合物的功能确认测定。简言之,在不同浓度的受试化合物和25 μ M cAMP存在下,将0.2 μ M负载有荧光GDP类似物 (Mant-GDP) 的Rap1B (1-167) 与EPAC在包含50mM NaCl、5mM MgCl₂、1mM DTT和100倍摩尔过量的未标记GDP (20 μ M) 的50mM Tris缓冲液pH 7.5中进行孵育。使用激发/发射波长设定为366/450nm的FluoroMax-3分光荧光计将GDP对Mant-GDP的交换测量为荧光强度随时间的降低。通常,在6000秒的时程中记录荧光强度的衰减,并且每60秒取数据点。

[0106] 逆筛选 (counter screening) 测定-使用如前所述的偶联酶测定在96孔板中通过分光光度法测量I型和II型PKA全酶的激酶活性 (Cook 等. (1982) Biochemistry 21:5794-5799)。在该测定中,因为将ADP的形成与NADH的氧化通过丙酮酸激酶/乳酸脱氢酶反应结合起来,所以可通过追踪NADH的氧化 (通过340nm处吸光度的减小来反映) 来确定反应速率。激酶反应混合物 (100 μ l) 包含50mM Mops (pH 7.0)、10mM MgCl₂、1mM ATP、1mM PEP、0.1mM NADH、8U丙酮酸激酶、15U乳酸脱氢酶、固定量的I型或II型PKA全酶和0.1mM cAMP, 并且没有或含有25 μ M的受试化合物。使反应在室温下预平衡并通过添加肯普肽底物 (终浓度为0.26nM) 起始反应。在25 μ M H89 (选择性PKA抑制剂) 存在下测量的PKA活性用作PKA抑制的阳性对照。

[0107] 一旦化合物被鉴定为具有EPAC调节活性,则设计多种类似物和变化形式以产生具有适当药理学特征的EPAC抑制剂。

[0108] II. 化学定义

[0109] 如下提供了涉及EPAC调节性化合物的多个化学定义。

[0110] 如本文所使用的,“主要为一种对映体”意指化合物包含至少85%的一种对映体,或者更优选地至少90%的一种对映体,或者甚至更优选地至少95%的一种对映体,或者最优选地至少99%的一种对映体。类似地,短语“基本不含其他光学异构体”意指组合体包含至多5%的其他对映体或非对映体,更优选地2%的其他对映体或非对映体,并且最优选地

1%的其他对映体或非对映体。在某些方面中,一种、两种或主要的对映体形式或异构体都包括在内。

[0111] 如本文所使用的,术语“硝基”意指 $-\text{NO}_2$;术语“卤代”或“卤素”指示 $-\text{F}$ 、 $-\text{Cl}$ 、 $-\text{Br}$ 或 $-\text{I}$;术语“巯基”意指 $-\text{SH}$;术语“氰基”意指 $-\text{CN}$;术语“叠氮基”意指 $-\text{N}_3$;术语“甲硅烷基”意指 $-\text{SiH}_3$;并且术语“羟基”意指 $-\text{OH}$ 。

[0112] 除非另有声明,否则术语“烷基”单独或作为其他取代基的一部分时意指1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个碳的直链(即,非支链)或支链碳链,其可以是完全饱和的、单不饱和的或更多不饱和的。不饱和烷基包括具有一个或更多个碳-碳双键的那些(烯基)和具有一个或更多个碳-碳三键的那些(炔基)。基团 $-\text{CH}_3$ (Me,甲基)、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ (Et,乙基)、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ (n-Pr,正丙基)、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (iso-Pr,异丙基)、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ (n-Bu,正丁基)、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ (仲丁基)、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (异丁基)、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ (叔丁基)、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ (新戊基)都是烷基的非限制性实例。

[0113] 除非另有声明,否则术语“杂烷基”单独或与其他术语组合时意指具有至少一个碳原子和至少一个选自O、N、S、P和Si的杂原子的直链或支链。在某些实施方案中,杂原子选自O、S和N。杂原子可位于杂烷基的任何内部位置处或者烷基与分子其余部分连接的位置处。多至两个的杂原子可以是连续的。以下基团都是杂烷基的非限制性实例:三氟甲基、 $-\text{CH}_2\text{F}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{Br}$ 、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{NHCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOC}(\text{O})\text{CH}_3$ 和 $-\text{CH}_2\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ 。

[0114] 术语“环烷基”和“杂环基”单独或与其他术语组合时分别意指“烷基”和“杂烷基”的环状形式。另外,对于杂环基,杂原子可占据杂环与分子其余部分连接的位置。环烷基的实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基和环庚基。杂环基的实例包括吡啶、氮杂环丁烷基、吡咯烷基、吡咯基、吡唑基、氧杂环丁烷基、吡唑啉基、咪唑基、咪唑啉基、咪唑烷基、咪唑基、咪唑啉基、异咪唑啉基、异咪唑基、噁唑基、噁二唑基、噁唑啉基、异噁唑基、异噁唑啉基、呋喃基、四氢呋喃基、噁吩基、噁二唑基、哌啶基、哌嗪基、2-氧代哌嗪基、2-氧代哌啶基、2-氧代吡咯烷基、2-氧代氮杂萘基、氮杂萘基、六氢二氮杂萘基、4-哌啶酮基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、三嗪基、三唑基、四唑基、四氢吡喃基、吗啉基、硫代吗啉基、硫代吗啉基亚砷、硫代吗啉基砷、1,3-二氧戊环、四氢-1,1-二氧代噁吩基等。

[0115] 术语“芳基”意指多不饱和的芳族烃取代基。芳基可以是单环或多环的(例如,稠合在一起或共价连接的2至3个环)。术语“杂芳基”是指包含一至四个选自N、O和S的杂原子的芳基。杂芳基可与分子其余部分通过碳或杂原子连接。芳基和杂芳基的非限制性实例包括苯基、4-氮杂吡啶、5-氮杂吡啶、6-氮杂吡啶、7-氮杂吡啶、1-萘基、2-萘基、4-联苯基、1-吡咯基、2-吡咯基、3-吡咯基、3-吡唑基、2-咪唑基、4-咪唑基、吡嗪基、2-噁唑基、4-噁唑基、2-苯基-4-噁唑基、5-噁唑基、3-异噁唑基、4-异噁唑基、5-异噁唑基、2-噁唑基、4-噁唑基、5-噁唑基、2-呋喃基、3-呋喃基、2-噁吩基、3-噁吩基、2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、2-嘧啶基、4-嘧啶基、5-苯并噁唑基、嘌呤基、2-苯并咪唑基、5-吡啶基、1-异喹啉基、5-异喹啉基、2-喹啉基、5-喹啉基、3-喹啉基和6-喹啉基。对于每一种上述芳基和杂芳基环体系的取代基选自以下所述的可接受的取代基。

[0116] 多个基团在本文中被描述为经取代或未经取代(即,任选地经取代)。任选地经取

代的基团可包含一个或更多个独立地选自以下的取代基：卤素、硝基、氰基、羟基、氨基、巯基、甲酰基、羧基、氧代、氨基甲酰基、经取代或未经取代的烷基、经取代或未经取代的杂烷基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、(烷基)₂氨基、烷基亚磺酰基、烷基磺酰基、芳基磺酰基、经取代或未经取代的环烷基、经取代或未经取代的杂环基、经取代或未经取代的芳基和经取代或未经取代的杂芳基。在某些方面中，任选的取代基可进一步被一个或更多个独立地选自以下的取代基所取代：卤素、硝基、氰基、羟基、氨基、巯基、甲酰基、羧基、氨基甲酰基、未经取代的烷基、未经取代的杂烷基、烷氧基、烷硫基、烷基氨基、(烷基)₂氨基、烷基亚磺酰基、烷基磺酰基、芳基磺酰基、未经取代的环烷基、未经取代的杂环基、未经取代的芳基或未经取代的杂芳基。任选的取代基的实例包括但不限于：-OH、氧代(=O)、-Cl、-F、-Br、C₁₋₄烷基、苯基、苄基、-NH₂、-NH(C₁₋₄烷基)、-N(C₁₋₄烷基)₂、-NO₂、-S(C₁₋₄烷基)、-SO₂(C₁₋₄烷基)、-CO₂(C₁₋₄烷基)和-O(C₁₋₄烷基)。

[0117] 术语“烷氧基”意指具有结构-OR'的基团，其中R'是任选地经取代的烷基或环烷基。术语“杂烷氧基”类似地意指具有结构-OR的基团，其中R是杂烷基或杂环基。

[0118] 术语“氨基”意指具有结构-NR'R''的基团，其中R'和R''独立地是氢或任选地经取代的烷基、杂烷基、环烷基或杂环基。术语“氨基”包括伯胺、仲胺和叔胺。

[0119] 本文所使用的术语“氧代”意指与碳原子双键连接的氧。

[0120] 本文所使用的术语“可药用盐”是指对活生物体基本无毒的本发明化合物的盐。典型的可药用盐包括根据本发明化合物上存在的取代基，通过使本发明化合物与无机酸或有机酸或者有机碱反应制备的那些盐。

[0121] 可用于制备可药用盐的无机酸的非限制性实例包括：盐酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、亚磷酸等。可用于制备可药用盐的有机酸的非限制性实例包括：脂肪族的单羧酸和二羧酸，例如草酸、碳酸、柠檬酸、琥珀酸、经苯基-杂原子取代的烷酸、脂肪族和芳香族硫酸等。因此，由无机酸或有机酸制备的可药用盐包括盐酸盐、氢溴酸盐、硝酸盐、硫酸盐、焦硫酸盐、硫酸氢盐、亚硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、磷酸一氢盐、磷酸二氢盐、偏磷酸盐、焦磷酸盐、氢碘酸盐、氢氟酸盐、乙酸盐、丙酸盐、甲酸盐、草酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、对甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、马来酸盐等。

[0122] 合适的可药用盐也可通过使本发明物质与有机碱反应形成，所述有机碱例如甲胺、乙胺、乙醇胺、赖氨酸、鸟氨酸等。可药用盐包括见于一些本发明化合物上的羧酸基或磺酸基与无机阳离子(例如钠、钾、铵或钙)或有机阳离子(例如异丙基铵、三甲基铵、四甲基铵和咪唑鎓)之间形成的盐。

[0123] 应认识到，形成本发明的任意盐一部分的特别的阴离子或阳离子不是关键的，只要该盐作为整体是可药用的。

[0124] Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Section and Use (2002) 中示出了可药用盐的另一些实例及其制备方法和用途，其通过引用并入本文。

[0125] 第一化合物的“异构体”是其中每个分子包含与第一化合物相同的构成原子但是那些原子的三维构型不同的不同化合物。除非另有说明，否则本文中所述的化合物意指还包括其异构体。“立体异构体”是其中相同原子与相同的其他原子键合但是那些原子的三维结构不同的异构体。“对映体”是彼此为镜像(如左手和右手)的立体异构体。“非对映体”是那些不是对映体的立体异构体。

[0126] 考虑本说明书中所讨论的任何实施方案都可按照本发明的任何方法或组合物实施,并且反之亦然。此外,本发明的组合物可用于实现本发明的方法。

[0127] III. 使用EPAC调节剂的方法

[0128] 环腺苷酸(cAMP)是控制多个生物过程的细胞信号传导网络的重要组分。超过十年的广泛研究现已坚定地确定了很多先前被认为是仅受PKA控制的cAMP相关细胞过程也由EPAC介导(Gloerich和Bos, (2010) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50:355-375)。例如,EPAC蛋白参与调节胞吐和分泌(Ozaki等. (2000) *Nat Cell Biol* 2:805-811; Seino和Shibasaki (2005) *Physiol Rev* 85:1303-1342; Maillet等. (2003) *Nat Cell Biol* 5:633-639; Li等. (2007) *Mol Endocrinol* 21:159-171)、细胞粘附(Enserink等. (2004) *J Biol Chem* 279:44889-44896; Rangarajan等. (2003) *J Cell Biol* 160:487-493)、内皮屏障连接(Cullere等. (2005) *Blood* 105:1950-1955; Kooistra等. (2005) *FEBS Lett* 579:4966-4972)、瘦蛋白信号传导和心脏功能(Metrich等. (2010) *Pflugers Arch* 459:535-546)。除了其在生理条件下的调节功能之外,cAMP还涉及在多种人类疾病(包括癌症、糖尿病、心力衰竭和神经疾病如阿尔兹海默病(AD))中发挥主要作用。本文中所述的EPAC1和/或EPAC2调节性化合物可用于为多种与EPAC活化或抑制相关的疾病或病症提供治疗。

[0129] A. 癌症治疗

[0130] 某些方面涉及通过施用EPAC抑制剂来治疗对象的癌症或癌转移。

[0131] 与PKA一样,EPAC包含进化上保守的cAMP结合域,其充当感知第二信使cAMP的细胞内水平的分子开关并且活化下游信号传导分子小GTP酶Rap1和Rap2(de Rooij等. (1998) *Nature* 396:474-477; Kawasaki等. (1998) *Science* 282:2275-2279)。此外,EPAC蛋白通过在特定细胞位置处与其他细胞伴侣相互作用来发挥其功能。例如,已知EPAC1分别通过与微管蛋白(Qiao等. (2002) *J Biol Chem* 277:26581-26586; Mei和Cheng (2005) *J Biol Chem* 277:11497-11504)、埃兹蛋白-根蛋白-膜突蛋白(ezrin-radixin-moesin,ERM) (Gloerich等. (2010) *Mol Cell Biol* 30:5421-5431; Ross等. (2011) *J Cell Sci* 124:1808-1818)和核孔蛋白RanBP2(Liu等. (2010) *Mol Cell Biol* 30:3956-3969; Gloerich等. (2011) *J Cell Biol* 193:1009-1020)相互作用而与有丝分裂纺锤体、质膜和核膜缔合。另一方面,EPAC2可与Rim(Rab3相互作用分子)和Rim2(Kashima等. (2001) *J Biol Chem* 276:46046-46053; Ozaki等. (2000) *Nat Cell Biol* 2:805-811),以及结构上相关的钙传感器Piccolo(Fujimoto等. (2002) *J Biol Chem* 277:50497-50502)相互作用。在胰岛 β 细胞中,EPAC2、Rim2和Piccolo之间的相互作用对于cAMP介导的胰岛素分泌是至关重要的(Ozaki等. (2000) *Nat Cell Biol* 2:805-811; Kashima等. (2001) *J Biol Chem* 276:46046-46053; Fujimoto等. (2002) *J Biol Chem* 277:50497-50502)。

[0132] 胰腺导管腺癌(PDAC)是最为致命的人类疾病之一,其主要原因是胰腺癌对通常对其他类型癌症有效的治疗具有抗性的事实。急需更好地理解PDAC形成和转移以及有效治疗剂的分子机制。最近,已表明与正常胰腺或周围组织相比,EPAC1在人PDAC细胞中显著升高(Lorenz等. (2008) *Pancreas* 37:102-103)。EPAC1与促进前列腺癌中的细胞增殖(Misra和Pizzo (2009) *J Cell Biochem* 108:998-1011; Misra和Pizzo (2011) *J Cell Biochem* 112(6):1685-95)以及黑素瘤的迁移和转移(Baljinnyam等. (2011) *Pigment Cell Melanoma Res* 24:680-687; Baljinnyam等. (2009) *Am J Physiol Cell Physiol* 297:C802-C813;

Baljinnyam等.(2010) *Cancer Res* 70:5607-5617) 有关。

[0133] 使用EPAC抑制剂ESI-09来证明EPAC1过表达在胰腺癌细胞迁移和侵袭中的功能性作用。这些发现与基于RNAi沉默技术的类似结果相一致,表明EPAC1是PDAC和其他癌症的治疗策略的靶标。

[0134] 在某些实施方案中,可施用EPAC抑制剂用以治疗癌症。在某些方面中,癌症是胰腺癌、前列腺癌、黑色素瘤、膀胱癌、血癌(blood cancer)、骨癌、脑癌、乳腺癌、结肠直肠癌、食道癌、胃肠癌、肝癌、肺癌、鼻咽癌、卵巢癌、胃癌、睾丸癌或子宫癌。在又一个方面中,癌症是胰腺癌,特别地是胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma,PDAC)。在某些方面中,EPAC抑制剂选自本文中所述的EPAC抑制剂。在又一个方面中,EPAC抑制剂是EPAC1抑制剂。

[0135] B. 免疫调节剂

[0136] 某些方法涉及通过施用EPAC调节剂来调节对象的先天性或适应性免疫系统。在另一个方面中,方法包括通过施用EPAC抑制剂来增强对象的免疫应答。免疫应答可针对微生物(真菌、病毒、细菌等);功能异常或反常的细胞,如癌细胞或超敏免疫效应细胞;或者将得益于增强的免疫应答的其他病理状况。免疫调节是治疗多种疾病和病症的一个关键方面。特别地,T细胞在对抗感染中发挥关键作用并且具有识别和破坏癌细胞的能力。增强T细胞介导的应答是增强对多种治疗剂的应答的关键组分。

[0137] 环AMP是T细胞介导免疫的有力的负调节物,因为其抑制T细胞增殖、活化、细胞毒性功能以及Th1促炎症细胞因子的产生(Mosenden和Taskén(2011) *Cell Signal* 23,1009-16;Vang等.(2001) *J Exp Med* 193,497-507;Skålhegg等.(1992) *J Biol Chem* 267,15707-14;Henney等.(1972) *J Immunol* 108,1526-34;Kammer(1988) *Immunol Today* 9,222-9;Hermann-Kleiter等.(2006) *Blood* 107,4841-8)。EPAC1和EPAC2介导数种cAMP免疫调节作用,其最初被归因于蛋白激酶A(Shirshev(2011) *Biochemistry (Mosc)* 76,981-98;Bryce等.(1999) *Immunopharmacology* 41,139-46;Staples等,(2003) *Immunology* 109,527-35;Grandoch等.(2010) *Br J Pharmacol* 159,265-84)。EPAC1效应物Rap1在刺激后的人CD4+CD25+中被活化(Li等.(2005) *Blood* 106,3068-73),表明除了调节T细胞介导免疫的特异性效应物功能之外,EPAC1还对免疫应答施加广泛的控制。

[0138] 多个发现支持这种想法。表达组成型活性Rap1的转基因小鼠具有低水平的促炎症细胞因子和提高分数的CD4+CD103+Treg子集(包括CD4+CD103+CD25+),与其WT对应物相比,其更有力地抑制CD4+CD25-(Tconv)细胞(Li等.(2005) *J Immunol* 175,3133-9)。更最近地,已表明Treg通过间隙连接直接转移cAMP而抑制效应T细胞(Fassbender等.(2010) *Cell Immunol* 265,91-6;Vignali等.(2008) *Nat Rev Immunol* 8,523-32;Somekawa等.(2005) *Circ Res* 97,655-62),所述间隙连接在心肌细胞中的形成因EPAC1而增强,因为其有助于连接子聚集在间隙连接形成的部位(Collison和Vignali(2011) *Methods Mol Biol* 707,21-37)。这些发现表明,EPAC1可在接触依赖性Treg抑制中发挥直接作用。为了研究EPAC1的体内功能,本发明人产生了Epac1敲除(KO)小鼠。用卵清蛋白(OVA)单独或与霍乱毒素(CT)一起对Epac1^{-/-}小鼠进行经口免疫。在每种情况下,Epac1 KO小鼠具有水平显著高于野生型(WT)小鼠的血清OVA-特异性IgG1抗体,如通过ELISA所测定的(图15)。此外,当用OVA单独或与EPAC特异性拮抗剂(ESI-09)一起对WT小鼠进行经口免疫时,接受ESI-09(经口管饲法

50mg/kg) 的小鼠具有水平显著高于经载剂处理的对照组的血清OVA特异性IgG1抗体(图16)。

[0139] 基于经抗原攻击和天然的Epac1 KO小鼠中放大的免疫应答,表明Epac1在介导CD4+CD25+调节性T细胞(Treg)的功能中的作用,Treg是适应性免疫应答和激素免疫应答的已知抑制剂。使用检测CD4+CD25-(Tconv)增殖的体外测定在Treg存在下检测WT和Epac1 KO Treg的抑制效力。在单独培养时,Epac1 KO Tconv和WT Tconv以相同速率增殖。添加WT Treg在相同程度上抑制了两种细胞群体的增殖,而添加Epac1 KO Treg比WT Tconv在小的程度上抑制Epac1 KO Tconv的增殖。为了确定Epac1对Tconv的Treg介导抑制的影响的特异性,在ESI-09存在下重复抑制测定,结果是类似的。综上,这些结果表明,Treg和Tconv中Epac1的存在使后者对通过前者产生的抑制敏感。

[0140] 这些发现表明,EPAC1拮抗剂是有效的佐剂并且可与用于免疫治疗的疫苗和免疫调节剂联合使用。这样的免疫治疗包括用于癌症或其他疾病的那些治疗。EPAC1是免疫调节的可行靶标。特别地,EPAC1抑制剂可用作免疫治疗的疫苗和/或调节剂的佐剂。

[0141] 某些方面涉及向对象施用与抗原联合的EPAC1抑制剂。在某些方面中,在施用抗原之前、期间或之后施用EPAC1抑制剂。在一个实施方案中,抗原是病毒蛋白质。在另一个实施方案中,抗原是细菌蛋白质或其一部分。在又一个实施方案中,抗原是哺乳动物蛋白质或其一部分,例如癌抗原。抗原可在EPAC抑制剂施用之前或之后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24小时或天施用。抗原和/或抑制剂可在不同时间段施用1、2、3、4、5、6、7、8次或更多次。在某些方面中,可施用多于一种的抗原。在某些方面中,对象是人对象。在又一个实施方案中,可施用另外的免疫调节剂。

[0142] 在某些方面中,EPAC抑制剂与抗体治疗联合施用,从而可增强用于治疗癌症或感染性疾病的抗体治疗的功效。EPAC抑制剂可与抗体如利妥昔单抗、赫赛汀或爱必妥联合施用。在一些实施方案中,抗体是抗癌抗体。单克隆抗体(包括人单克隆抗体和人源化单克隆抗体)通过靶向肿瘤特异性抗原起作用,从而增强宿主对肿瘤细胞的免疫应答。另一些抗体治疗包括使用多克隆抗体和使用抗体片段或区域。此类治疗的实例为曲妥单抗(Herceptin)、西妥昔单抗和利妥昔单抗(Rituxan或Mabthera)。

[0143] 可用于免疫调节方法的肿瘤相关抗原包括但不限于:707-AP、膜联蛋白II、AFP、ART-4、BAGE、 β -联蛋白/m、BCL-2、bcr-abl、bcr-abl pI90、bcr-abl p210、BRCA-1、BRCA-2、CAMEL、CAP-1、CASP-8、CDC27/m、CDK-4/m、CEA(Huang等.(2002) Exper Rev. Vaccines1:49-63)、CT9、CT10、Cyp-B、Dek-cain、DAM-6(MAGE-B2)、DAM-10(MAGE-B1)、EphA2(Zantek等.(1999) Cell Growth Differ.10:629-38;Carles-Kinch等.(2002) Cancer Res.62:2840-7)、ELF2M、ETV6-AML1、G250、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7B、GAGE-8、GnT-V、gp100、HAGE、HER2/neu、HLA-A*0201-R170I、HPV-E7、HSP70-2M、HST-2、hTERT、hTRT、iCE、凋亡抑制剂(如,存活素)、KIAA0205、K-ras、LAGE、LAGE-1、LDLR/FUT、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、MAGE-6、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A10、MAGE-A12、MAGE-B5、MAGE-B6、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-D、MART-1、MART-1/Melan-A、MC1R、MDM-2、间皮素、肌球蛋白/m、MUC1、MUC2、MUM-1、MUM-2、MUM-3、neo-polyA聚合酶、NA88-A、NY-ESO-1、NY-ESO-1a(CAG-3)、PAGE-4、PAP、蛋白酶3(Mo11drem等.(1996) Blood 88:2450-7;Mo11drem等.(1997) Blood 90:2529-34)、P15、p190、Pm1/RAR α 、PRAME、PSA、PSM、PSMA、

RAGE、RAS、RCAS1、RU1、RU2、SAGE、SART-1、SART-2、SART-3、SP 17、SPAS-1、TEL/AML 1、TPI//m、酪氨酸酶、TARP、TRP-1 (gp75)、TRP-2、TRP-2/INT2、WT-1、或者经翻译的NY-ESO-ORF2和CAMEL蛋白。

[0144] C. 抗感染剂 (anti-infective)

[0145] 在某些方面中,EPAC特异性抑制剂可用于削弱或防止血管内皮细胞摄入微生物。内皮和上皮细胞-细胞连接和屏障在传播微生物感染方面发挥着关键作用。EPAC及其下游效应物Rap1显示出在与内皮细胞连接和屏障相关的细胞功能方面发挥着重要作用 (Kooistra等. (2005) FEBS Lett 579:4966-4972; Baumer等. (2009) J Cell Physiol. 220:716-726; Noda等. (2010) Mol Biol Cell 21:584-596; Rampersad等. J. Biol Chem. 285:33614-33622; Spindler等 (2011) Am J Pathol 178:2424-2436)。此外,已知EPAC参与吞噬作用 (Yeager等 (2009) Infect Immun 77:2530-2543; Shirshv (2011) Biochemistry (Mosc) 76:981-998)。

[0146] 环AMP是通用第二信使,其在多种形式的生命体 (包括人和病原体如细菌、真菌和原生动动物) 中是进化上保守的。人们已充分认识到cAMP在微生物毒力 (从有力的毒素到毒力基因表达的主要调节子) 中发挥着重要作用 (MaDonough&Rodriguez (2012) Nature Rev Microbiol 10:27-38)。作为主要的细胞内cAMP受体,EPAC蛋白可能是微生物感染的重要细胞靶标。

[0147] 为了确定EPAC1在立克次氏体感染中是否发挥作用,用亚致死剂量的R. australia攻击WT和EPAC1^{-/-}小鼠。如图20所示,所有的WT小鼠在感染后5天病得很严重,并且少数WT小鼠死亡。另一方面,所有的EPAC1^{-/-}C57BL/6小鼠的病都没有变严重。这些结果表明EPAC1缺失保护小鼠免受R. australia感染。

[0148] 为了测试EPAC抑制剂是否能够保护小鼠免受R. australia的致死剂量感染。每天用载体或ESI-09 (10mg/kg, IP) 处理WT C57BL/6小鼠。处理后5天,用致死剂量的R. australia攻击小鼠并继续每日的ESI-09处理。与EPAC1基因缺失类似,EPAC1的药理学抑制也导致了R. australia感染的突出保护 (图21)。对照组的100%病得严重,而处理组的仅10%显示出生病迹象。

[0149] 为了调查对R. australia感染的EPAC1抑制介导的保护机制,用R. australia感染经载体或ESI-09处理的HUVEC细胞。如图22所示,细胞内R. australia的数目在经ESI-09处理的HUVEN细胞中显著降低。这些数据证明,通过ESI-09处理的EPAC抑制抑制了R. australia的细胞进入。

[0150] 某些实施方案涉及抑制微生物感染的方法,其包括向患有微生物感染或处于其风险之下的对象施用EPAC特异性抑制剂。在某些方面中,微生物是细菌、病毒或真菌。在另一些方面中,EPAC特异性抑制剂选自本文中所述的EPAC抑制剂。

[0151] D. 瘦蛋白调节剂

[0152] 在某些方面中,本文中所述的化合物可用于在对象中增强瘦蛋白敏感性和降低肥胖。

[0153] 脂肪细胞激素瘦蛋白在能量稳态中发挥着核心作用。发现在失去血清因子的肥胖小鼠中,其在被替换时使食物摄入和体重降低 (Zhang等. (1994) Nature 372:425-32)。因为这些最初的观察结果,许多在早期使用该激素的治疗尝试被用于治疗肥胖。大多数具有肥

胖的人中的血清瘦蛋白浓度非常高,并且认为存在瘦蛋白抵抗的状态(Mantzoros等.(2000) *J Clin Endocrinol Metab* 85:4000-4002)。迄今为止,除在先天性瘦蛋白缺陷状态下之外,重组人瘦蛋白的作用限于导致肥胖个体的重量减轻(Heysmsfield等.(1999) *Jama* 282:1568-75;Farooqi等.(1999) *N Engl J Med* 341:879-84)。

[0154] EPAC活化显示出削弱瘦蛋白信号传导。EPAC活化剂的中枢输注显示出使瘦蛋白的食欲减退作用钝化(Fukuda等.(2011) *Cell Metab* 13:331-339)。本发明提供了EPAC调节剂用于治疗与瘦蛋白途径异常相关的疾病的用途,所述疾病例如肥胖和脂肪萎缩及其相关的代谢异常(例如,高血糖、血脂异常、高血脂、高胆固醇血症、高甘油三酯血症、动脉粥样硬化、血管再狭窄和胰岛素抗性)。

[0155] *Epac1*敲除(KO)小鼠表现出钝化的体重增长。使用Cre-loxP系统产生全*Epac1*敲除小鼠。一般来说,*Epac1*无效突变小鼠表现健康并且没有任何明显的身体异常。它们在出生时并直到三周龄(当小鼠断奶并开始喂食高脂饮食或标准的啮齿类动物食物(standard rodent chow))都与野生型小鼠具有相似的体重。在大约5周时,喂食标准食物饮食的*Epac1* KO小鼠的体重增长变慢并且与野生型小鼠的体重增长相比显著变慢,最终达到野生型小鼠的约85%。对喂食HFD的小鼠进行类似的观察。*Epac1* KO小鼠的体重在大约第7周显著变慢,并且保持在野生型小鼠的约90%。喂食普通食物饮食的*Epac1* KO小鼠的平均每日摄食量显著低于野生型小鼠。另一方面,虽然喂食HFD的*Epac1* KO小鼠的平均每日摄食量低于喂食HFD的野生型小鼠,但是差异并不是统计显著的。对喂食HFD的小鼠进行全身Micro-CT扫描,并且从C1到L6椎骨测量体长,以确定*Epac1* KO小鼠的体重增长延迟不是总体生长迟缓的结果。

[0156] *Epac1*缺陷使肥胖倾向减小。为了确定*Epac1* KO小鼠中的体重增长为什么减小,检查了动物的肥胖倾向。*Epac1* KO小鼠的附睾脂肪垫目测小于野生型的附睾脂肪垫并且重量显著小于野生型的那些。当通过Micro-CT成像进行分析时,喂食HFD的*Epac1*缺失小鼠的总脂肪重量显著小于野生型。该差异是显著的,即使在将脂肪重量相对于体重进行归一化之后也是如此。事实上,总脂肪重量的差异大于体重的差异,表明*Epac1* KO小鼠减轻的体重主要是因为脂肪重量的减小。脂肪组织重量的减小可以是受损的脂肪细胞分化、脂肪细胞尺寸减小或二者的结果。附睾白色脂肪组织(epididymal white fat tissue,EWAT)的组织学分析显示*Epac1*缺失小鼠的脂肪细胞比野生型相对物的脂肪细胞小得多。另一方面,使用分离自野生型和*Epac1* KO小鼠二者的MEF细胞进行的离体脂肪细胞分化分析显示出,*Epac1* KO MEF在分化成脂肪细胞方面与野生型MEF能力一样,表明*Epac1*缺陷不阻碍正常的脂肪生成。

[0157] 瘦蛋白由脂肪组织分泌并且已知瘦蛋白的血浆水平与脂肪组织重量相关联,而血浆瘦蛋白在人和小鼠体重减轻之后下降(Considine等.(1996) *N.Engl. J. Med.* 441334:292-295;Friedman和Halaas(1998) *Nature* 395:763-770;Maffei等.(1995) *Nat. Med.* 1:1155-1161)。为了研究*Epac1*缺失小鼠中减小的脂肪重量与降低的血浆瘦蛋白是否相关联,分别对标准食物和HFD的*Epac1* KO小鼠和野生型小鼠的血浆瘦蛋白水平进行比较。对于标准食物饮食的小鼠,16周龄的野生型小鼠的平均血浆瘦蛋白水平为约 3.97 ± 0.78 ng/ml,与先前的公开相一致(Bates等.(2003) *Nature* 421:856-859;Kievit等.(2006) *Cell Metab* 4:123-132)。然而,年龄和性别相配的*Epac1* KO小鼠的血浆瘦蛋白水平显著更低,为约 $1.01 \pm$

0.26ng/ml。对于28周龄的HFD小鼠(喂食HFD25周),平均瘦蛋白浓度为约 83.16 ± 5.76 ng/ml,而Epac1 KO小鼠的平均瘦蛋白水平为约 66.15 ± 3.52 ng/ml。这些结果证实了Epac1缺陷使标准食物饮食以及喂食HFD之小鼠的白色脂肪组织肥胖倾向降低的解剖学和形态学观察。

[0158] 为了确定血浆瘦蛋白水平的明显降低是否仅是肥胖倾向减小的结果,在显著体重和肥胖倾向变化之前测量3周龄小鼠的瘦蛋白水平可观察野生型小鼠和Epac1缺失小鼠之间的肥胖倾向差异。与年龄和性别相匹配的野生型小鼠的瘦蛋白水平相比,Epac1 KO小鼠的瘦蛋白水平已显著降低。

[0159] Epac1丢失提高体内的瘦蛋白信号传导活性和敏感性。根据Fukuda等的最近发现,用Epac选择性激动剂8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (8-(4-氯苯硫基)-2'-O-甲基腺苷-3',5'-环单硫代磷酸酯活化Epac-RAP1使下丘脑中的瘦蛋白信号传导钝化并引起中枢瘦蛋白抵抗(Fukuda等.(2011) *Cell Metab* 13:331-339),比较在含有或没有Epac1的情况下弓状核(arcuate nucleus, AN)中pSTAT3 Y705定位和免疫活性,以确定与Epac1丢失有关的血浆瘦蛋白水平降低对体内瘦蛋白敏感性的影响。阿黑皮素原(proopiomelanocortin)神经元是下丘脑中瘦蛋白的直接靶标,并且AN中的瘦蛋白诱导的STAT3 Y705磷酸化和核转位参与体重调节(Bates等.(2003) *Nature* 421:856-859; Cheung等.(1997) *Endocrinology* 138:4489-4492; Hubschle等.(2001) *J. Neurosci.* 21:2413-2424; Schwartz等.(1996) *J. Clin. Invest* 98:1101-1106)。与野生型相比,Epac1 KO AN组织表现出pSTAT3 Y705免疫活性略微增强的基线水平(PBS载剂注射),以及响应于瘦蛋白ICV注射的pSTAT3 Y705显著增强的核免疫染色。为了进一步比较用瘦蛋白刺激后下丘脑中的总pSTAT3 Y705,重复进行ICV瘦蛋白注射并切除下丘脑以进行免疫印迹分析。与我们的免疫荧光研究相一致,Epac1 KO下丘脑组织中的pSTAT3 Y705的基线水平和刺激水平均提高,表明Epac1丢失增强了中枢瘦蛋白信号传导和敏感性,同时降低了体内外周(血浆)瘦蛋白水平。

[0160] 为了调查这种与Epac1丢失相关的提高的瘦蛋白敏感性是否转化为响应于体内瘦蛋白的摄食量和体重降低,向20周龄的小鼠腹膜内注射瘦蛋白。将小鼠各自保留一周以使其适应环境。使用逐步提高的瘦蛋白以包括宽范围的剂量(Heymsfield等.(1999) *JAMA* 282:1568-1575)。由于小鼠的夜行性活动和瘦蛋白的短半衰期(Ahren等.(2000) *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* 24:1579-1585; Hill等.(1998) *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* 22:765-770),所以在暗循环的前4个小时期间测量摄食量,在整个24小时周期期间测量摄食量,并且在每次暗循环开始时测量体重。发现暗循环的前四个小时中的摄食量响应于瘦蛋白施用以剂量依赖性方式降低。在前4个小时的暗循环期间,相对于野生型小鼠,Epac1 KO小鼠在较高剂量的瘦蛋白下表现出摄食量的显著降低。虽然24小时的摄食量也随着瘦蛋白施用而降低,但是降低幅度不是统计显著的。有趣的是,瘦蛋白注射导致野生型小鼠的暂时体重减小,其甚至在施用最高剂量的瘦蛋白时也快速恢复。相比之下,瘦蛋白在Epac1 KO小鼠中诱导了持久性且剂量依赖性的体重减轻。这些结果证明,Epac1缺陷增强了下丘脑中的瘦蛋白信号传导,并且Epac1 KO小鼠在摄食量和体重降低方面对体内瘦蛋白处理更加敏感。

[0161] 为了探索通过使用小分子靶向Epac1提高瘦蛋白敏感性的可行性,由11日龄的野生型C57BL/6小鼠制备了器官型脑片培养物。在7天的离体培养之后,用Epac特异性拮抗剂

ESI-09处理脑组织导致基础状态下和响应于瘦蛋白刺激二者的增强的pSTAT3 Y705水平。而且,如在Epac1KO小鼠中所观察的,Epac特异性抑制剂还使SHP2的细胞水平提高(图17A)。这些药理学数据与使用Epac1 KO小鼠获得的结果相一致,并且进一步确证了Epac1的抑制使下丘脑中的瘦蛋白信号传导增强。为了进一步研究这种小分子的治疗潜力,用ESI-09(50mg/kg)或载剂(玉米油)通过经口管饲法处理野生型小鼠3周。相对于载剂处理,ESI-09处理后血浆瘦蛋白显著降低(图17B)。

[0162] 保护Epac1 KO小鼠免受HFD诱导的葡萄糖不耐受。众所周知,增强的瘦蛋白敏感性赋予了对HFD诱导之肥胖的抗性并且改善葡萄糖耐量(Berglund等.(2012) J.Clin. Invest 122:1000-1009;Howard等.(2004) Nat.Med.10:734-738;Kievit等.(2006) Cell Metab 4:123-132;Mori(2004) Nat.Med.52210:739-743)。使用口服葡萄糖耐量试验(oral glucose tolerance test,OGTT)比较野生型和Epac1 KO小鼠的葡萄糖处理能力。虽然对于标准食物饮食的野生型和Epac1 KO小鼠获得了类似的OGTT结果(图18A),Epac1 KO小鼠在喂食HFD 15周之后表现出显著增强的葡萄糖处理能力。首先,HFD Epac1 KO小鼠的禁食葡萄糖水平显著低于野生型的禁食葡萄糖水平;第二,在施用葡萄糖之后的每个时间点,Epac1 KO小鼠从血液中清除葡萄糖都要显著快于野生型小鼠。Epac1 KO小鼠的血液葡萄糖水平在2小时内降回到基线,而野生型血液葡萄糖水平保持升高(图18B)。平行地,在过夜禁食后和施用葡萄糖后15分钟时监测胰岛素水平。在标准食物饮食的野生型和Epac1 KO小鼠之间没有观察到显著差异:二者均显示出类似的低禁食胰岛素水平,其对葡萄糖激发的响应提高到类似的程度(图18C)。另一方面,虽然野生型Epac KO小鼠显示出略微降低的禁食胰岛素水平,但是HFD野生型和Epac1 KO小鼠均维持响应于血液葡萄糖浓度升高而使血浆胰岛素提高的能力(图18D)。这些数据表明,Epac1 KO小鼠对HFD诱导的胰岛素不敏感性具有如野生型小鼠的情况中的抗性。这些研究表明Epac1 KO突变小鼠在很大程度上收到保护而免受HFD诱导的葡萄糖不耐受和胰岛素抗性。

[0163] 在某些方面中,向瘦蛋白抗性对象施用EPAC抑制剂。施用EPAC抑制剂使对象对内源性瘦蛋白的敏感性提高。在另一个方面中,可将瘦蛋白或瘦蛋白类似物与EPAC抑制剂联合施用以克服瘦蛋白抗性或缺陷。在另一个方面中,向超重对象施用降低对象体重的EPAC抑制剂。在又一个方面中,施用EPAC抑制剂以提高全身性胰岛素敏感性。另一些方面包括向具有厌食或恶病质症状或综合征或者瘦蛋白过敏的对象施用EPAC活化剂。

[0164] IV. 药物制剂和施用

[0165] 在某些实施方案中,本发明还提供了包含一种或更多种EPAC调节剂以及一种或更多种以下物质的组合物:可药用稀释剂、载体、增溶剂、乳化剂、防腐剂 and/或辅料。这样的组合物可含有有效量的至少一种EPAC调节剂。因此,本发明还包括将本文所提供的一种或更多种EPAC调节剂用于制备药物的用途。这样的组合物可用于治疗多种EPAC相关疾病或病症(如癌症)或者瘦蛋白相关疾病或病症。

[0166] 可将EPAC调节剂配制多种剂型的治疗组合物,例如但不限于液体溶液剂或混悬剂、片剂、丸剂、散剂、栓剂、聚合物微囊剂或微泡剂、脂质体以及可注射或可输注溶液。优选形式取决于施用方式和所靶向的具体疾病。组合物还优选地包含本领域公知的可药用载剂、载体或辅料。

[0167] 药物制剂的可接受的制剂组分在所采用剂量和浓度下对接受者是无毒的。除了

EPAC调节剂之外,组合物可包含用于修饰、维持或保留例如组合物的pH、渗量(osmolarity)、粘度、澄明度、颜色、等张性、气味、无菌性、稳定性、溶出或释放速率、吸收或渗透的组分。用于配制药组组合物的合适材料包括但不限于:氨基酸(如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸);抗微生物剂;抗氧化剂(如抗坏血酸、亚硫酸钠或亚硫酸氢钠);缓冲剂(如乙酸盐、硼酸盐、碳酸氢盐、Tris-HCl、柠檬酸盐、磷酸盐或其他有机酸);膨胀剂(如甘露醇或甘氨酸);螯合剂(如乙二胺四乙酸(EDTA));络合剂(如咖啡因、聚乙烯吡咯烷酮、 β -环糊精或羟丙基- β -环糊精);填充剂;单糖;二糖;和其他碳水化合物(如葡萄糖、甘露糖或糊精);蛋白质(如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白);着色剂、调味剂和稀释剂;乳化剂;亲水聚合物(如聚乙烯吡咯烷酮);低分子量多肽;成盐抗衡离子(如钠);防腐剂(如苯扎氯铵、苯甲酸、水杨酸、硫柳汞、苯乙醇、尼泊金甲酯、尼泊金丙酯、氯己定、山梨酸或过氧化氢);溶剂(如甘油、丙二醇或聚乙二醇);糖醇(如甘露醇或山梨醇);助悬剂;表面活性剂或润湿剂(如普朗尼克(pluronics)、PEG、脱水山梨醇酯、聚山梨醇酯(例如聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80)、曲通(triton)、氨丁三醇、卵磷脂、胆固醇、泰洛沙泊(tyloxapal));稳定性增强剂(如蔗糖或山梨醇);张力增强剂(如碱金属卤化物(优选氯化钠或氯化钾)、甘露醇山梨醇);递送载剂;稀释剂;赋形剂和/或药物辅料。(参见Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,(A.R.Gennaro编),1990,Mack Publishing Company,其通过引用并入本文)。

[0168] 制剂组分以施用部位可接受的浓度存在。缓冲剂有利地用于使组合物保持在生理pH或略低的pH下,通常保持在约4.0至约8.5或者约5.0至8.0的pH范围内。药物组合物可包含约pH 6.5至8.5的TRIS缓冲剂,或约pH 4.0至5.5的乙酸盐缓冲剂,其还可包含山梨醇或其合适的替代物。

[0169] 待用于体内施用的药物组合物通常是无菌的。灭菌可通过无菌滤膜过滤来完成。如果组合物是冻干的,则可在冻干和重构之前或之后进行灭菌。用于肠胃外施用的组合物可以以冻干形式存储或在溶液中存储。在某些实施方案中,将肠胃外组合物放置在具有无菌入口的容器中,例如具有皮下注射针可刺破的塞子的静脉内溶液袋或小瓶,或者待用于注射的无菌预填充注射器。

[0170] 以上组合物可使用常规递送模式施用,所述常规递送模式包括但不限于静脉内、腹膜内、经口、淋巴管内、皮下施用、动脉内、肌内、胸膜内、鞘内以及通过局部导管灌注。本发明还考虑局部施用于器官或肿瘤。当通过注射施用组合物时,施用可以是通过连续输注或者通过单次或多次推注进行。对于肠胃外施用,EPAC调节剂可以以可药用载剂中包含期望EPAC调节剂的无热原的肠胃外可接受的水溶液施用。特别适合于肠胃外注射的载剂是无菌蒸馏水,其中一种或更多种EPAC调节剂被配制或适当保存的无菌、等张溶液。

[0171] 在配制了本发明的药物组合物后,可将其作为溶液剂、混悬剂、凝胶、乳剂、固体或者作为脱水或冻干粉末存储在无菌小瓶中。这样的制剂可以以即用形式或者在施用前重构的形式(例如,冻干)存储。

[0172] 如果需要,则可使用药物组合物中常规采用的稳定剂,如蔗糖、海藻糖或甘氨酸。通常,以较小的量添加这样的稳定剂,例如约0.1%至约0.5% (w/v)。也可以以常规量添加表面活性剂稳定剂,如 **TWEEN®-20** 或 **TWEEN®-80** (ICI Americas, Inc., Bridgewater, N.J., USA)。

[0173] 为了确定EPAC抑制剂的生物利用度,开发了这样的IP注射制剂,其中化合物溶解于乙醇中,然后用生理盐溶液中的10% Tween 80以1:10稀释。通过模拟的体内血液稀释测定确定该制剂是合适的。在四周龄的雌性C57BL6/N小鼠中进行体内药代动力学研究。如图19所示,在向小鼠(对于每个时间点,n=5)进行单次腹膜内(IP)注射ESI-09化合物(10mg/kg)后,测定ESI-09的血液水平迅速升高,在0.5小时达到最大值42,520ng/ml(128 μ M),半衰期为3.5小时。这些结果表明ESI-09在体内具有优良生物活性。

[0174] 对于单独的或作为药物组合物一部分的本发明化合物,这样的剂量为约0.001mg/kg至1mg/kg体重,优选约1至100 μ g/kg体重,最优选1至10 μ g/kg体重。

[0175] 本领域技术人员可容易地确定治疗有效剂量,并且其取决于疾病的严重程度和病程,患者健康和对治疗的响应,患者年龄、体重、身高、性别、先前的病史和治疗医师的判断。

[0176] 在本发明的一些方法中,向癌细胞施用EPAC抑制剂。癌细胞可在患者中并且所述患者可具有实体肿瘤。在这样的一些情况下,实施方案还可包括对患者进行手术,例如通过切除全部或部分肿瘤。组合物可在手术之前、之后或与其同时施用于患者。在另一些实施方案中,也可直接地、通过内窥镜、气管内、肿瘤内、静脉内、病变内、肌肉内、腹膜内、局部、经皮、表面、动脉内、膀胱内或皮下向患者进行施用。治疗组合物可施用1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多次,并且其可每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24小时,或者每1、2、3、4、5、6、7天,或者每1、2、3、4、5周,或者每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12个月进行施用。

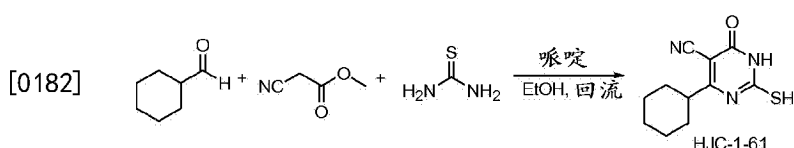
[0177] 治疗癌症的方法还可包括向患者施用化学治疗或放射治疗,其可施用多于一次。化学治疗包括但不限于顺铂(CDDP)、卡铂、丙卡巴肼、氮芥、环磷酰胺、喜树碱、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥、白消安、亚硝基脲、放线菌素D、道诺霉素、多柔比星、博来霉素、普卡霉素(plicomycin)、丝裂霉素、依托泊苷(VP16)、他莫西芬、泰素帝、泰素、反铂(transplatinum)、5-氟尿嘧啶、长春新碱、长春碱、甲氨蝶呤、吉西他滨、奥沙利铂、伊立替康、拓扑替康或者其任意的类似物或衍生变体。放射疗法包括但不限于X射线辐射、UV辐射、 γ 辐射、电子束照射或微波。而且,作为本发明方法的一部分,可向细胞或患者施用微管稳定剂,包括但不限于紫杉烷。具体地,考虑所述化合物或衍生物或类似物的任意一种可与这些联合治疗一起使用。

[0178] V. 实施例

[0179] 本发明包括以下实施例以及附图以示出本发明的优选实施方案。本领域技术人员应理解,实施例或附图中公开的技术代表本发令人所开发的、在本发明实践中很好地运行的技术,并因此可被认为构成其实践的优选模式。然而,按照本公开内容,本领域技术人员应理解,在不偏离本发明的精神和范围的情况下,在所公开的具体实施方案中可进行许多变化,并且仍然获得相似或类似的结果。

[0180] 实施例1

[0181] 4-环己基-2-巯基-6-氧代-1,6-二氢-嘧啶-5-甲腈(HJC-1-61)



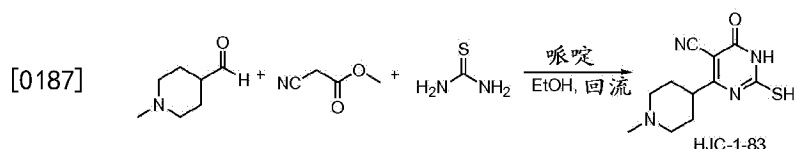
[0183] 向环己基甲醛(1.12g, 10.0mmol)、氰基乙酸甲酯(0.99g, 10mmol)和硫脲(0.76g,

10mmol) 的纯乙醇 (50mL) 溶液中添加哌啶 (1.70g, 20mmol)。将混合物在回流下加热6小时, 然后冷却至室温。将溶液浓缩, 然后用乙酸乙酯 (100mL) 和2N HCl (水溶液) (20mL) 萃取残余物。分离有机层, 用盐水洗涤, 并经无水Na₂SO₄干燥。在减压下蒸发溶剂, 用EtOAc (30mL) 洗涤产物以获得作为白色固体的纯产物 (1.2g, 51%)。

[0184] ¹H NMR (600MHz, DMSO-d₆) δ 13.04 (s, 1H), 12.73 (s, 1H), 2.73-2.71 (m, 1H), 1.86-1.79 (m, 4H), 1.73-1.71 (m, 2H), 1.66-1.63 (m, 1H), 1.29-1.20 (m, 3H)。

[0185] 实施例2

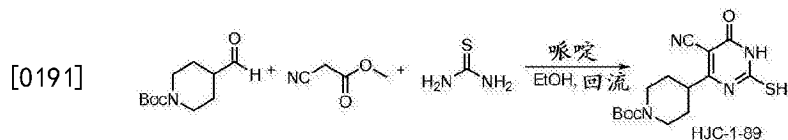
[0186] 2-巯基-4-(1-甲基-哌啶-4-基)-6-氧代-1,6-二氢-嘧啶-5-甲腈 (HJC-1-83)



[0188] 向1-甲基哌啶-4-甲醛 (600mg, 4.72mmol)、氰基乙酸甲酯 (468mg, 4.72mmol) 和硫脲 (359mg, 4.72mmol) 的纯乙醇 (25mL) 溶液中添加哌啶 (803mg, 9.44mmol)。将混合物在回流下加热6小时, 然后冷却至室温。过滤收集沉淀并用DCM (10mL) 和EtOAc (10mL) 洗涤。获得作为淡黄色固体的期望产物 (820mg, 69%), 其直接用于下一步而不进行进一步表征。

[0189] 实施例3

[0190] 4-(5-氰基-2-巯基-6-氧代-1,6-二氢-嘧啶-4-基)-哌啶-1-羧酸叔丁酯 (HJC-1-89)

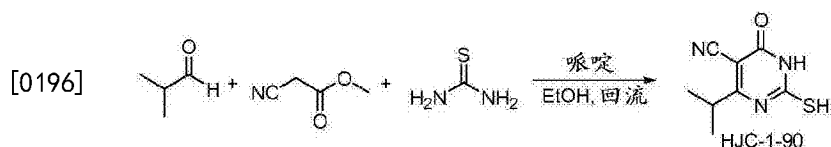


[0192] 向4-甲酰基-哌啶-1-羧酸叔丁酯 (600mg, 2.82mmol)、氰基乙酸甲酯 (280mg, 2.82mmol) 和硫脲 (215mg, 2.82mmol) 的纯乙醇 (25mL) 溶液中添加哌啶 (480mg, 5.63mmol)。将混合物在回流下加热6小时, 然后冷却至室温。将溶液浓缩, 然后用乙酸乙酯 (100mL) 和2N HCl (水溶液) (20mL) 萃取残余物。分离有机层, 用盐水洗涤, 并经无水Na₂SO₄干燥。在减压下蒸发溶剂, 用EtOAc (5mL) 洗涤产物以获得作为白色固体的纯产物 (560mg, 59%)。

[0193] ¹H NMR (600MHz, DMSO-d₆) δ 13.01 (s, 1H), 12.70 (s, 1H), 4.03-3.94 (m, 2H), 2.87-2.84 (m, 1H), 2.71-2.63 (m, 2H), 1.88-1.85 (m, 4H), 1.67-1.60 (m, 2H), 1.37 (s, 9H)。

[0194] 实施例4

[0195] 4-异丙基-2-巯基-6-氧代-1,6-二氢-嘧啶-5-甲腈 (HJC-1-90)



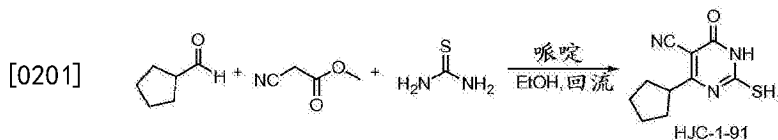
[0197] 向2-甲基-丙醛 (1.0g, 13.9mmol)、氰基乙酸甲酯 (1.37g, 13.9mmol) 和硫脲 (1.06g, 13.9mmol) 的纯乙醇 (45mL) 溶液中添加哌啶 (2.37g, 27.8mmol)。将混合物在回流下加热6小时, 然后冷却至室温。将溶液浓缩, 然后用乙酸乙酯 (100mL) 和2N HCl (水溶液, 20mL) 萃取残余物。分离有机层, 用盐水洗涤, 并经无水Na₂SO₄干燥。在减压下蒸发溶剂, 用

EtOAc (20mL) 洗涤产物以获得作为淡黄色固体的纯产物 (1.5g, 55%)。

[0198] ^1H NMR (600MHz, DMSO-d₆) δ 13.07 (s, 1H), 12.78 (s, 1H), 3.05-3.01 (m, 1H), 1.30 (d, 6H, J=7.2Hz)。

[0199] 实施例5

[0200] 4-环戊基-2-巯基-6-氧代-1,6-二氢-嘧啶-5-甲腈 (HJC-1-91)

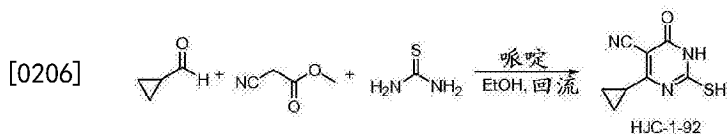


[0202] 向环戊基甲醛 (500mg, 5.1mmol)、氰基乙酸甲酯 (504mg, 5.1mmol) 和硫脲 (388mg, 5.1mmol) 的纯乙醇 (20mL) 溶液中添加吡啶 (868mg, 10.2mmol)。将混合物在回流下加热6小时, 然后冷却至室温。将溶液浓缩, 然后用乙酸乙酯 (100mL) 和2N HCl (水溶液, 20mL) 萃取残余物。分离有机层, 用盐水洗涤, 并经无水Na₂SO₄干燥。在减压下蒸发溶剂, 用EtOAc (10mL) 洗涤产物以获得作为淡黄色固体的纯产物 (700mg, 62%)。

[0203] ^1H NMR (600MHz, DMSO-d₆) δ 13.05 (s, 1H), 12.86 (s, 1H), 3.09-3.06 (m, 1H), 1.99-1.96 (m, 2H), 1.89-1.82 (m, 4H), 1.65-1.62 (m, 2H)。

[0204] 实施例6

[0205] 4-环丙基-2-巯基-6-氧代-1,6-二氢-嘧啶-5-甲腈 (HJC-1-92)

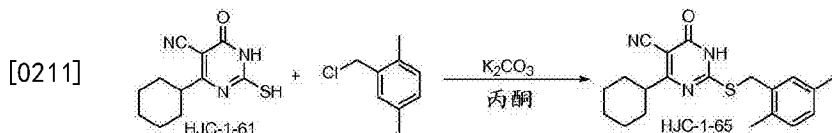


[0207] 向环丙基甲醛 (500mg, 7.13mmol)、氰基乙酸甲酯 (706mg, 7.13mmol) 和硫脲 (543mg, 7.13mmol) 的纯乙醇 (15mL) 溶液中添加吡啶 (1.21g, 14.27mmol)。将混合物在回流下加热6小时, 然后冷却至室温。将溶液浓缩, 然后用乙酸乙酯 (100mL) 和2N HCl (水溶液, 20mL) 萃取残余物。分离有机层, 用盐水洗涤, 并经无水Na₂SO₄干燥。在减压下蒸发溶剂, 用EtOAc (5mL) 洗涤产物以获得作为黄色固体的纯产物 (250mg, 18%)。

[0208] ^1H NMR (600MHz, DMSO-d₆) δ 12.84 (s, 1H), 12.50 (bs, 1H), 2.01-1.99 (m, 1H), 1.32-1.30 (m, 2H), 1.17-1.16 (m, 2H)。

[0209] 实施例7

[0210] 4-环己基-2-(2,5-二甲基-苄基硫烷基)-6-氧代-1,6-二氢-嘧啶-5-甲腈 (HJC-1-65)

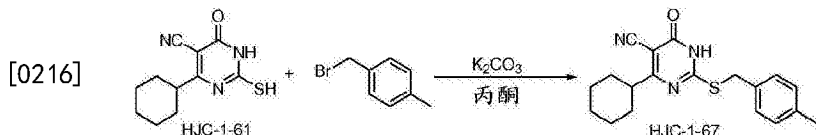


[0212] 在0°C下向HJC-1-61 (100mg, 0.425mmol) 和K₂CO₃ (88mg, 0.637mmol) 的丙酮 (10mL) 溶液中添加2-氯甲基-1,4-二甲苯 (66mg, 0.425mmol)。将混合物在室温 (r. t.) 下搅拌48小时。溶液用EtOAc (100mL) 稀释, 用1N HCl (水溶液) (10mL) 和盐水 (10mL) 洗涤。有机层经无水Na₂SO₄干燥, 在减压下浓缩, 并用EtOAc (3mL) 洗涤残余物以获得作为白色固体的期望产物 (120mg, 80%)。

[0213] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 7.19 (s, 1H), 7.08 (d, 1H, $J=7.2\text{Hz}$), 7.03 (d, 1H, $J=8.4\text{Hz}$), 4.49 (s, 2H), 3.02-2.98 (m, 1H), 2.34 (s, 3H), 2.30 (s, 3H), 1.88-1.77 (m, 5H), 1.71-1.63 (m, 2H), 1.45-1.39 (m, 2H), 1.31-1.26 (m, 1H).

[0214] 实施例8

[0215] 4-环己基-2-(4-甲基-苄基硫烷基)-6-氧代-1,6-二氢-嘧啶-5-甲腈 (HJC-1-67)

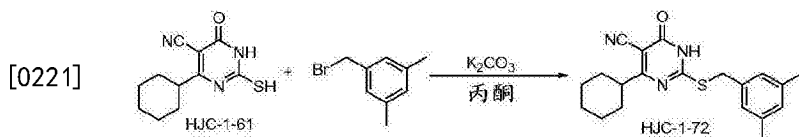


[0217] 在 0°C 下向HJC-1-61 (150mg, 0.64mmol) 和 K_2CO_3 (132mg, 0.96mmol) 的丙酮(10mL) 溶液中添加1-溴甲基-4-甲苯 (124mg, 0.67mmol)。将混合物在 0°C 下搅拌1小时。溶液用EtOAc (100mL) 稀释, 用1N HCl (水溶液) (10mL) 和盐水 (10mL) 洗涤。有机层经无水 Na_2SO_4 干燥, 然后在减压下浓缩。经硅胶柱色谱(己烷/EtOAc=1/1至1/3) 纯化残余物以得到作为白色固体的期望产物 (200mg, 93%)。

[0218] ^1H NMR (600MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 2:1) δ 7.19 (d, 2H, $J=7.8\text{Hz}$), 6.99 (d, 2H, $J=7.8\text{Hz}$), 4.24 (s, 2H), 2.69-2.65 (m, 1H), 2.22 (s, 3H), 1.74-1.72 (m, 2H), 1.67-1.63 (m, 3H), 1.59-1.53 (m, 2H), 1.30-1.24 (m, 2H), 1.20-1.16 (m, 1H). ^{13}C NMR (150MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 2:1) δ 177.5, 173.4, 173.1, 136.6, 135.2, 129.0 (2C), 128.8 (2C), 119.4, 90.0, 44.9, 34.8, 30.9 (2C), 26.0 (2C), 25.8, 20.9.

[0219] 实施例9

[0220] 4-环己基-2-(3,5-二甲基-苄基硫烷基)-6-氧代-1,6-二氢-嘧啶-5-甲腈 (HJC-1-72)

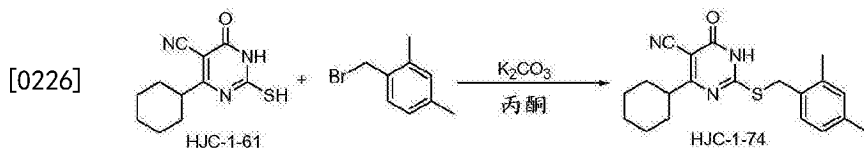


[0222] 在 0°C 下向HJC-1-61 (100mg, 0.43mmol) 和 K_2CO_3 (88mg, 0.64mmol) 的丙酮(10mL) 溶液中添加1-溴甲基-3,5-二甲苯 (85mg, 0.43mmol)。将混合物在 0°C 下搅拌1小时。溶液用EtOAc (100mL) 稀释, 用1N HCl (水溶液) (10mL) 和盐水 (10mL) 洗涤。有机层经无水 Na_2SO_4 干燥, 然后在减压下浓缩。经硅胶柱色谱(己烷/EtOAc=1/1至1/3) 纯化残余物以得到作为白色固体的期望产物 (130mg, 87%)。

[0223] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 7.02 (s, 2H), 6.92 (s, 1H), 4.40 (s, 2H), 3.01-2.97 (m, 1H), 2.30 (s, 6H), 1.88-1.86 (m, 2H), 1.81-1.79 (m, 3H), 1.70-1.64 (m, 2H), 1.46-1.39 (m, 2H), 1.32-1.26 (m, 1H). ^{13}C NMR (150MHz, CDCl_3) δ 179.9, 165.8, 162.9, 138.5 (2C), 135.4, 129.7, 127.0 (2C), 114.0, 94.8, 45.4, 35.4, 30.8 (2C), 25.8, 25.7 (2C), 21.3 (2C).

[0224] 实施例10

[0225] 4-环己基-2-(2,4-二甲基-苄基硫烷基)-6-氧代-1,6-二氢-嘧啶-5-甲腈 (HJC-1-74)

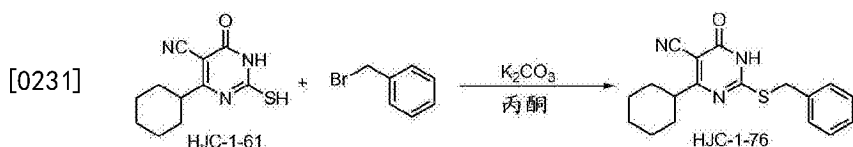


[0227] 在0℃下向HJC-1-61 (100mg, 0.43mmol) 和K₂CO₃ (88mg, 0.64mmol) 的丙酮(10mL) 溶液中添加1-溴甲基-2,4-二甲苯(85mg, 0.43mmol)。将混合物在0℃下搅拌1小时。溶液用EtOAc (100mL) 稀释, 用1N HCl (水溶液) (10mL) 和盐水(10mL) 洗涤。有机层经无水Na₂SO₄干燥, 然后在减压下浓缩。经硅胶柱色谱(己烷/EtOAc=1/1至1/3) 纯化残余物以得到作为白色固体的期望产物(136mg, 91%)。

[0228] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃/CD₃OD 1:2) δ7.21 (d, 1H, J=7.2Hz), 6.99 (s, 1H), 6.93 (d, 1H, J=7.2Hz), 4.46 (s, 2H), 2.92-2.88 (m, 1H), 2.33 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 1.86-1.84 (m, 2H), 1.80-1.74 (m, 3H), 1.70-1.63 (m, 2H), 1.42-1.36 (m, 2H), 1.29-1.23 (m, 1H). ¹³C NMR (150MHz, CDCl₃/CD₃OD 1:2) δ179.5, 167.3, 162.7, 138.6, 138.2, 137.3, 131.9, 130.5, 127.4, 115.2, 94.6, 45.8, 33.8, 31.2, 31.1, 26.2, 26.1, 21.2, 21.1, 19.5.

[0229] 实施例11

[0230] 2-苄基硫烷基-4-环己基-6-氧代-1,6-二氢-嘧啶-5-甲腈(HJC-1-76)

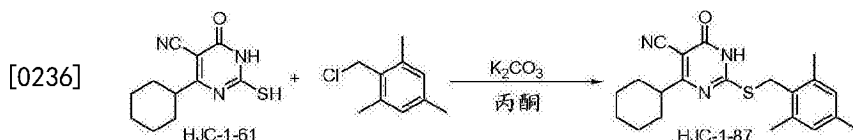


[0232] 在0℃下向HJC-1-61 (100mg, 0.43mmol) 和K₂CO₃ (88mg, 0.64mmol) 的丙酮(10mL) 溶液中添加溴甲基苯(73mg, 0.43mmol)。将混合物在0℃下搅拌1小时。溶液用EtOAc (100mL) 稀释, 用1N HCl (水溶液) (10mL) 和盐水(10mL) 洗涤。有机层经无水Na₂SO₄干燥, 然后在减压下浓缩。经硅胶柱色谱(己烷/EtOAc=1/1至1/3) 纯化残余物以得到作为白色固体的期望产物(130mg, 94%)。

[0233] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ7.33-7.32 (m, 3H), 7.25-7.22 (m, 2H), 4.39 (s, 2H), 2.88-2.86 (m, 1H), 1.80-1.78 (m, 2H), 1.76-1.69 (m, 3H), 1.60-1.56 (m, 2H), 1.36-1.33 (m, 2H), 1.22-1.20 (m, 1H). ¹³C NMR (150MHz, CDCl₃) δ179.2, 167.5, 165.2, 136.3, 129.3, 129.2, 129.1, 128.8, 127.8, 115.3, 93.9, 45.2, 35.3, 30.8 (2C), 25.8 (2C), 25.8.

[0234] 实施例12

[0235] 4-环己基-6-氧代-2-(2,4,6-三甲基-苄基硫烷基)-1,6-二氢-嘧啶-5-甲腈(HJC-1-87)

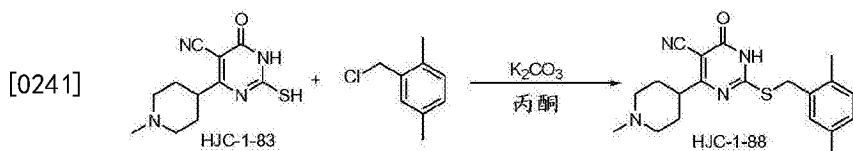


[0237] 在0℃下向HJC-1-61 (100mg, 0.43mmol) 和K₂CO₃ (88mg, 0.64mmol) 的丙酮(10mL) 溶液中添加2-氯甲基-1,3,5-三甲苯(72mg, 0.43mmol)。将混合物在室温下搅拌36小时。溶液用EtOAc (100mL) 稀释, 用1N HCl (水溶液) (10mL) 和盐水(10mL) 洗涤。有机层经无水Na₂SO₄干燥, 然后在减压下浓缩。经硅胶柱色谱(己烷/EtOAc=1/1至1/3) 纯化残余物以得到作为白色固体的期望产物(150mg, 95%)。

[0238] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 6.84 (s, 2H), 4.50 (s, 2H), 2.93-2.90 (m, 1H), 2.32 (s, 6H), 2.26 (s, 3H), 1.84-1.73 (m, 5H), 1.66-1.61 (m, 2H), 1.42-1.35 (m, 2H), 1.27-1.21 (m, 1H). ^{13}C NMR (150MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 1:1) δ 178.9, 167.1, 162.4, 137.7, 137.5 (2C), 129.2 (2C), 127.1, 114.6, 94.0, 45.1, 30.6, 30.6 (2C), 25.6 (2C), 25.5, 20.7, 19.4 (2C).

[0239] 实施例13

[0240] 2-(2,5-二甲基-苄基硫烷基)-4-(1-甲基-哌啶-4-基)-6-氧代-1,6-二氢-嘧啶-5-甲腈 (HJC-1-88)

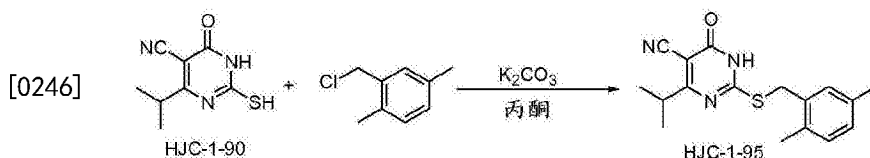


[0242] 在0℃下向HJC-1-83 (125mg, 0.50mmol) 和 K_2CO_3 (104mg, 0.75mmol) 的丙酮 (10mL) 溶液中添加2-氯甲基-1,4-二甲苯 (77mg, 0.50mmol)。将混合物在室温下搅拌24小时。浓缩溶液, 并经硅胶柱色谱 (己EtOAc/MeOH/ Et_3N =8/1/1) 纯化残余物以得到作为白色固体的期望产物 (120mg, 65%)。

[0243] ^1H NMR (600MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 1:1) δ 6.70 (s, 1H), 6.62 (d, 1H, $J=7.8\text{Hz}$), 6.55 (d, 1H, $J=7.8\text{Hz}$), 3.92 (s, 2H), 3.15-3.11 (m, 2H), 2.63-2.59 (m, 1H), 2.56-2.53 (m, 2H), 2.39 (s, 3H), 1.91 (s, 3H), 1.86 (s, 3H), 1.85-1.81 (m, 2H), 1.50-1.48 (m, 2H). ^{13}C NMR (150MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 1:1) δ 174.5, 173.3, 172.4, 135.4, 134.8, 133.6, 130.5, 130.2, 128.1, 117.8, 90.4, 54.4 (2C), 44.5, 33.3 (2C), 28.4 (2C), 20.7, 18.6.

[0244] 实施例14

[0245] 2-(2,5-二甲基-苄基硫烷基)-4-异丙基-6-氧代-1,6-二氢-嘧啶-5-甲腈 (HJC-1-95)

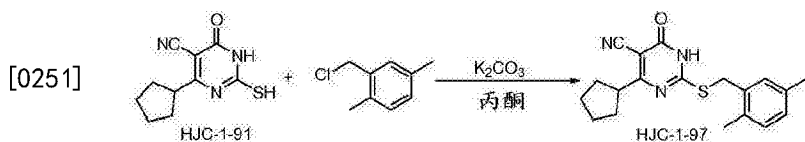


[0247] 在0℃下向HJC-1-90 (100mg, 0.51mmol) 和 K_2CO_3 (106mg, 0.77mmol) 的丙酮 (10mL) 溶液中添加2-氯甲基-1,4-二甲苯 (79mg, 0.51mmol)。将混合物在65℃下搅拌2小时。溶液用EtOAc (100mL) 稀释, 用1N HCl (水溶液) (10mL) 和盐水 (10mL) 洗涤。有机层经无水 Na_2SO_4 干燥, 然后在减压下浓缩。经硅胶柱色谱 (己烷:EtOAc=1/1至1/3) 纯化残余物以得到作为淡黄色固体的期望产物 (120mg, 75%)。

[0248] ^1H NMR (600MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1) δ 7.12 (s, 1H), 7.01 (d, 1H, $J=7.2\text{Hz}$), 6.96 (d, 1H, $J=7.2\text{Hz}$), 4.43 (d, 2H), 3.28-3.24 (m, 1H), 2.28 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 1.26 (d, 6H, $J=6.6\text{Hz}$). ^{13}C NMR (150MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 3:1) δ 180.0, 166.0, 161.2, 135.8, 133.7, 132.6, 130.7, 130.6, 129.1, 114.1, 94.6, 35.1, 33.5, 20.7, 20.6 (2C), 18.7.

[0249] 实施例15

[0250] 4-环戊基-2-(2,5-二甲基-苄基硫烷基)-6-氧代-1,6-二氢-嘧啶-5-甲腈 (HJC-1-97)

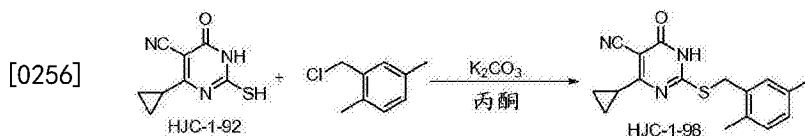


[0252] 在0℃下向HJC-1-91 (120mg, 0.54mmol) 和K₂CO₃ (112mg, 0.81mmol) 的丙酮(10mL) 溶液中添加2-氯甲基-1,4-二甲苯(84mg, 0.54mmol)。将混合物在65℃下搅拌1小时。溶液用EtOAc (100mL) 稀释, 用1N HCl (水溶液) (10mL) 和盐水(10mL) 洗涤。有机层经无水Na₂SO₄干燥, 然后在减压下浓缩。经硅胶柱色谱(己烷/EtOAc=1/1至1/3) 纯化残余物以得到作为白色固体的期望产物(170mg, 92%)。

[0253] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ13.00 (bs, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.08 (d, 1H, J=7.8Hz), 7.30 (d, 1H, J=7.2Hz), 4.47 (s, 2H), 3.48-3.44 (m, 1H), 2.34 (s, 3H), 2.25 (s, 3H), 2.08-2.05 (m, 2H), 1.92-1.87 (m, 4H), 1.76-1.74 (m, 2H). ¹³C NMR (150MHz, CDCl₃) δ180.0, 165.9, 162.6, 136.0, 133.9, 132.4, 130.8, 130.8, 129.3, 114.2, 95.4, 46.0, 33.8, 32.7 (2C), 26.8 (2C), 20.9, 19.0.

[0254] 实施例16

[0255] 4-环丙基-2-(2,5-二甲基苄基硫烷基)-6-氧代-1,6-二氢-嘧啶-5-甲腈(HJC-1-98)

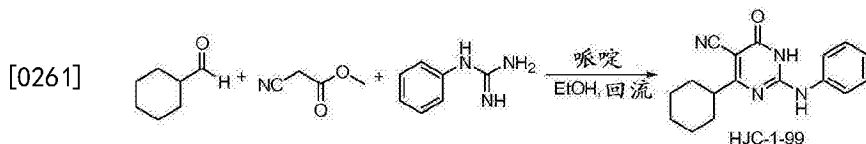


[0257] 在0℃下向HJC-1-92 (70mg, 0.36mmol) 和K₂CO₃ (75mg, 0.54mmol) 的丙酮(10mL) 溶液中添加2-氯甲基-1,4-二甲苯(56mg, 0.36mmol)。将混合物在室温下搅拌16小时。溶液用EtOAc (100mL) 稀释, 用1N HCl (水溶液) (10mL) 和盐水(10mL) 洗涤。有机层经无水Na₂SO₄干燥, 然后在减压下浓缩。经硅胶柱色谱(己烷/EtOAc=1/1至1/3) 纯化残余物以得到作为淡黄色固体的期望产物(90mg, 80%)。

[0258] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃/CD₃OD 1:2) δ6.89 (s, 1H), 6.86 (d, 1H, J=7.8Hz), 6.80 (d, 1H, J=7.8Hz), 4.15 (s, 2H), 2.12-2.08 (m, 1H), 2.11 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 1.14-1.12 (m, 2H), 1.05-1.02 (m, 2H). ¹³C NMR (150MHz, CDCl₃/CD₃OD 1:3) δ176.4, 165.6, 160.3, 135.6, 133.5, 132.0, 130.3, 130.3, 128.8, 114.7, 94.1, 33.3, 20.3, 18.3, 16.6, 11.4 (2C).

[0259] 实施例17

[0260] 4-环己基-6-氧代-2-苯基氨基-1,6-二氢-嘧啶-5-甲腈(HJC-1-99)

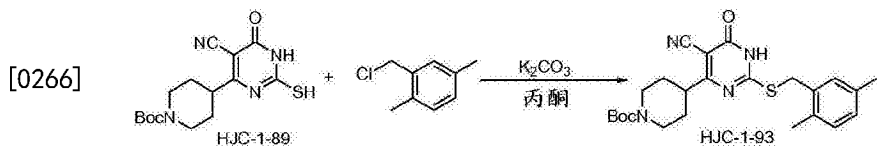


[0262] 向环己基甲醛(99mg, 1.0mmol)、氰基乙酸甲酯(112mg, 1.0mmol) 和N-苯基胍(197mg, 1.0mmol) 的纯乙醇(10mL) 溶液中添加胍啉(213mg, 2.5mmol)。将混合物在回流下加热1.5小时, 然后冷却至室温。将溶液浓缩, 然后用乙酸乙酯(100mL) 和2N HCl (水溶液) (20mL) 萃取残余物。分离有机层, 用盐水洗涤, 并经无水Na₂SO₄干燥。在减压下蒸发溶剂。经硅胶柱色谱(DCM/MeOH=10/1) 纯化残余物以获得作为白色固体的纯产物(140mg, 48%)。

[0263] ^1H NMR (600MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 1:2) δ 7.56 (d, 2H, $J=7.2\text{Hz}$), 7.37 (t, 2H, $J=7.8\text{Hz}$), 7.17 (t, 1H, $J=7.2\text{Hz}$), 2.87 (t, 1H, $J=10.8\text{Hz}$), 1.86-1.80 (m, 4H), 1.75-1.73 (m, 1H), 1.64-1.56 (m, 2H), 1.42-1.36 (m, 2H), 1.29-1.25 (m, 1H).

[0264] 实施例18

[0265] 4-[5-氰基-2-(2,5-二甲基苄基硫烷基)-6-氧代-1,6-二氢-嘧啶-4-基]-哌啶-1-羧酸叔丁酯 (HJC-1-93)

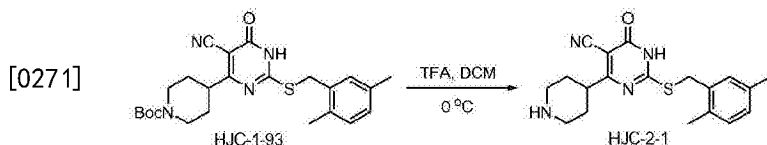


[0267] 在 0°C 下向HJC-1-89 (150mg, 0.45mmol) 和 K_2CO_3 (92mg, 0.67mmol) 的丙酮 (10mL) 溶液中添加2-氯甲基-1,4-二甲苯 (70mg, 0.45mmol)。将混合物在 75°C 下搅拌18小时。溶液用EtOAc (100mL) 稀释, 用1N HCl (水溶液) (10mL) 和盐水 (10mL) 洗涤。有机层经无水 Na_2SO_4 干燥, 然后在减压下浓缩。经硅胶柱色谱 (己烷/EtOAc=1/1至1/3) 纯化残余物以得到作为淡黄色固体的期望产物 (156mg, 77%)。

[0268] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 6.97 (s, 1H), 6.88 (d, 1H, $J=8.4\text{Hz}$), 6.83 (d, 1H, $J=7.2\text{Hz}$), 4.26 (s, 2H), 4.16-4.14 (m, 2H), 4.06-4.05 (m, 2H), 2.93-2.90 (m, 1H), 2.69-2.64 (m, 2H), 2.14 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 1.71-1.66 (m, 2H), 1.61-1.59 (m, 2H), 1.28 (s, 9H).

[0269] 实施例19

[0270] 2-(2,5-二甲基苄基硫烷基)-6-氧代-4-哌啶-4-基-1,6-二氢-嘧啶-5-甲腈 (HJC-2-1)

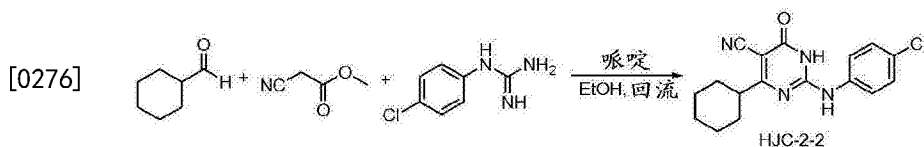


[0272] 在 0°C 下向HJC-1-93 (70mg, 0.15mmol) 的DCM (4mL) 溶液中添加TFA (1mL)。将混合物在 0°C 下搅拌2小时。浓缩反应混合物, 并使残余物在EtOAc (100mL) 与1N NaHCO_3 (水溶液) (10mL) 之间分配。沉淀并通过过滤获得淡黄色固体 (50mg, 92%)。

[0273] ^1H NMR (600MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.56 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.16 (s, 1H), 7.05 (d, 1H, $J=7.2\text{Hz}$), 6.96 (d, 1H, $J=6.6\text{Hz}$), 4.24 (s, 2H), 3.04-3.03 (m, 2H), 2.97-2.95 (m, 2H), 2.27-2.19 (m, 1H), 2.22 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 1.99-1.93 (m, 2H), 1.83-1.81 (m, 2H). ^{13}C NMR (150MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 173.3, 171.7, 170.0, 135.9, 134.7, 133.2, 130.4, 130.0, 127.7, 119.1, 89.3, 43.6 (2C), 32.3 (2C), 27.7 (2C), 20.5, 18.5.

[0274] 实施例20

[0275] 2-(4-氯-苯基氨基)-4-环己基-6-氧代-1,6-二氢-嘧啶-5-甲腈 (HJC-2-2)



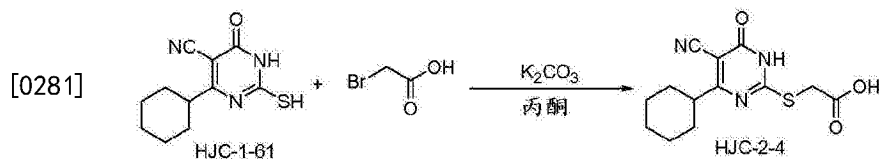
[0277] 向环己基甲醛 (99mg, 1.0mmol)、氰基乙酸甲酯 (112mg, 10mmol) 和N-(4-氯-苯基)

胍 (232mg, 1.0mmol) 的纯乙醇 (10mL) 溶液中添加哌啶 (213mg, 2.5mmol)。将混合物在回流下加热3小时, 然后冷却至室温。将溶液浓缩, 然后用乙酸乙酯 (75mL) 和 2N HCl (水溶液) (20mL) 萃取残余物。分离有机层, 用盐水洗涤, 并经无水 Na₂SO₄ 干燥。在减压下蒸发溶剂。经硅胶柱色谱 (DCM/MeOH=10/1) 纯化残余物以获得作为白色固体的纯产物 (160mg, 49%)。

[0278] ¹H NMR (600MHz, DMSO-d₆) δ 11.60 (bs, 1H), 9.61 (s, 1H), 7.62 (d, 2H, J=6.6Hz), 7.42 (d, 2H, J=7.8Hz), 2.75-2.72 (m, 1H), 1.79-1.77 (m, 2H), 1.74-1.72 (m, 2H), 1.69-1.67 (m, 1H), 1.53-1.47 (m, 2H), 1.34-1.28 (m, 2H), 1.22-1.16 (m, 1H)。

[0279] 实施例21

[0280] (5-氰基-4-环己基-6-氧代-1,6-二氢-嘧啶-2-基硫烷基)-乙酸 (HJC-2-4)

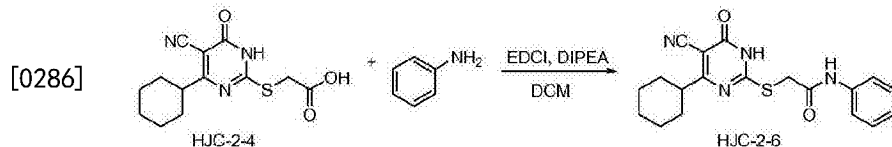


[0282] 在 0°C 下向 HJC-1-61 (235mg, 1.0mmol) 和 K₂CO₃ (207mg, 1.5mmol) 的丙酮 (10mL) 溶液中添加溴乙酸 (139mg, 1.0mmol)。将混合物在 0°C 下搅拌3小时。溶液用 EtOAc (100mL) 稀释, 用 1N HCl (水溶液) (10mL) 和盐水 (10mL) 洗涤。有机层经无水 Na₂SO₄ 干燥, 在减压下浓缩, 并且用 EtOAc (10mL) 和己烷 (10mL) 洗涤残余物以得到作为淡黄色固体的期望产物 (250mg, 85%)。

[0283] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃/CD₃OD 1:2) δ 3.93 (s, 2H), 2.86 (t, 1H, J=10.8Hz), 1.82-1.80 (m, 2H), 1.72-1.70 (m, 3H), 1.64-1.58 (m, 2H), 1.39-1.32 (m, 2H), 1.28-1.24 (m, 1H)。

[0284] 实施例22

[0285] 2-(5-氰基-4-环己基-6-氧代-1,6-二氢-嘧啶-2-基硫烷基)-N-苯基-乙酰胺 (HJC-2-6)

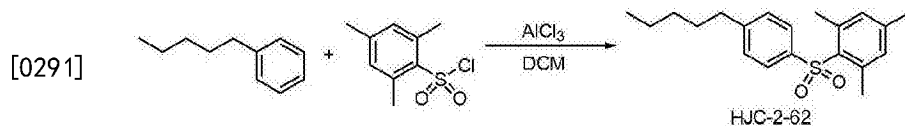


[0287] 向 HJC-2-4 (80mg, 0.27mmol) 和苯胺 (31mg, 0.33mmol) 的 10mL DCM 溶液中添加 DIPEA (105mg, 0.81mmol)。在 0°C 下添加 EDCI (51mg, 0.33mmol)。将所得混合物在室温下搅拌2小时。溶液用 DCM (50mL) 稀释, 用 1N HCl (水溶液) (10mL) 和盐水 (10mL) 洗涤。有机层经无水 Na₂SO₄ 干燥, 然后在减压下浓缩。经硅胶柱色谱 (EtOAc) 纯化残余物以得到作为白色固体的期望产物 (90mg, 91%)。

[0288] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃/CD₃OD 1:3) δ 7.56 (d, 2H, J=7.8Hz), 7.28 (t, 2H, J=7.2Hz), 7.07 (t, 2H, J=7.2Hz), 4.04 (s, 2H), 2.79 (t, 1H, J=11.4Hz), 1.64-1.58 (m, 4H), 1.55-1.53 (m, 3H), 1.27-1.21 (m, 2H), 0.93-0.87 (m, 1H)。

[0289] 实施例23

[0290] 1,3,5-三甲基-2-(4-戊基-苯磺酰基)-苯 (HJC-2-62)

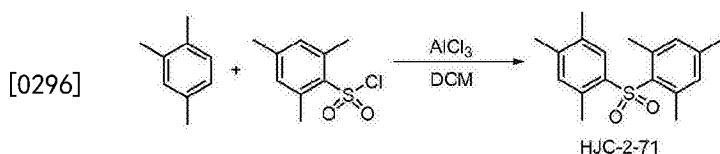


[0292] 将DCM(3mL)中**菜**基磺酰氯(mesitylsulfonyl chloride,147mg,0.68mmol)、戊基苯(100mg,0.68mmol)和AlCl₃(181mg,1.36mmol)的混合物在室温下搅拌2小时。然后将混合物倒入10mL的5% HCl(水溶液)中,并通过DCM(30mL)萃取。有机相通过水性KHCO₃、盐水洗涤,并经无水Na₂SO₄干燥。将所得溶液蒸发,并经硅胶柱色谱(己烷/EtOAc=10/1)纯化残余物以得到作为淡黄色油的期望产物(200mg,90%)。

[0293] ¹H NMR(600MHz,CDCl₃) δ7.68(d,2H,J=7.2Hz),7.25(d,2H,J=6.6Hz),6.93(s,2H),2.63(t,2H,J=7.2Hz),2.49(s,6H),2.28(s,3H),1.57-1.62(m,2H),1.28-1.32(m,4H),0.88(t,2H,J=6.6Hz)。¹³C NMR(150MHz,CDCl₃) δ148.4,143.3,140.9,140.1,134.3,132.3,128.9,126.4,35.9,31.5,30.8,22.9,22.6,21.1,14.1。

[0294] 实施例24

[0295] 1,3,5-三甲基-2-(2,4,5-三甲基-苯磺酰基)-苯(HJC-2-71)

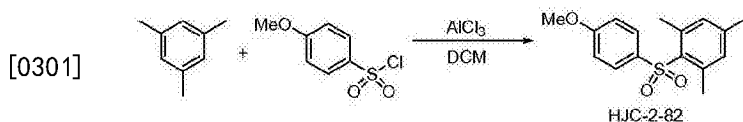


[0297] 将DCM(5mL)中**菜**基磺酰氯(219mg,1.0mmol)、1,2,4-三甲基-苯(125mg,1.05mmol)和AlCl₃(266mg,2.0mmol)的混合物在室温下搅拌2小时。然后将混合物倒入10mL的5% HCl(水溶液)中,并通过DCM(30mL)萃取。有机相通过水性KHCO₃、盐水洗涤,并经无水Na₂SO₄干燥。将所得溶液蒸发,并经硅胶柱色谱(己烷/EtOAc=10/1)纯化残余物以得到作为白色固体的期望产物(290mg,96%)。

[0298] ¹H NMR(600MHz,CDCl₃) δ7.81(s,1H),6.95(s,1H),6.90(s,2H),2.48(s,6H),2.28(s,6H),2.25(s,3H),2.17(s,3H)。¹³C NMR(150MHz,CDCl₃) δ142.9,142.1,139.5,139.0,134.9,134.3,134.1,133.8,132.1,129.1,22.6,21.1,19.7,19.4,18.6。

[0299] 实施例25

[0300] 2-(4-甲氧基-苯磺酰基)-1,3,5-三甲基-苯(HJC-2-82)

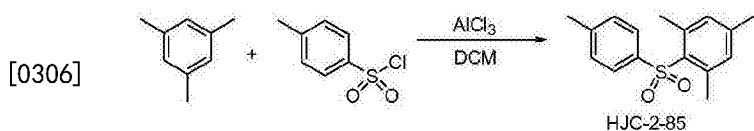


[0302] 将DCM(5mL)中4-甲氧基-苯磺酰氯(206mg,1.0mmol)、均三甲苯(mesitylene,120mg,1.0mmol)和AlCl₃(200mg,1.5mmol)的混合物在室温下搅拌2小时。然后将混合物倒入10mL的5% HCl(水溶液)中,并通过DCM(30mL)萃取。有机相通过水性KHCO₃、盐水洗涤,并经无水Na₂SO₄干燥。将所得溶液蒸发,并经硅胶柱色谱(己烷/EtOAc=10/1)纯化残余物以得到作为白色固体的期望产物(250mg,86%)。

[0303] ¹H NMR(600MHz,CDCl₃) δ7.74(s,2H),6.94(s,4H),3.85(s,3H),2.61(s,6H),2.29(s,3H)。¹³C NMR(150MHz,CDCl₃) δ162.9,143.1,139.9,135.4,134.7,132.3,128.6,114.1,55.7,23.0,21.1。

[0304] 实施例26

[0305] 1,3,5-三甲基-2-(甲苯-4-磺酰基)-苯(HJC-2-85)

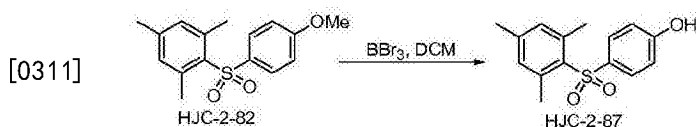


[0307] 将DCM (10mL) 中4-甲基-苯磺酰氯 (191mg, 1.0mmol)、均三甲苯 (120mg, 1.0mmol) 和 AlCl_3 (200mg, 1.5mmol) 的混合物在室温下搅拌2小时。然后将混合物倒入10mL的5% HCl (水溶液) 中, 并通过DCM (30mL) 萃取。有机相通过水性 KHCO_3 、盐水洗涤, 并经无水 Na_2SO_4 干燥。将所得溶液蒸发, 并经硅胶柱色谱 (己烷/EtOAc = 10/1) 纯化残余物以得到作为白色固体的期望产物 (220mg, 80%)。

[0308] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 7.68 (d, 2H, $J=7.8\text{Hz}$), 7.27 (d, 2H, $J=7.2\text{Hz}$), 6.94 (s, 2H), 2.60 (s, 6H), 2.41 (s, 3H), 2.30 (s, 3H)。

[0309] 实施例27

[0310] 4-(2,4,6-三甲基-苯磺酰基)-苯酚 (HJC-2-87)

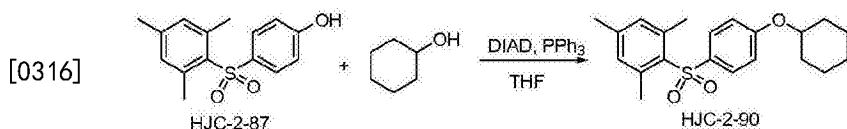


[0312] 在0℃下向HJC-2-82 (350mg, 1.2mmol) 的10mL DCM溶液中添加1N BBr_3/DCM (1.45mL, 1.45mmol)。将所得混合物在室温下搅拌16小时。将溶液用EtOAc (50mL) 稀释, 用 H_2O (10mL) 和盐水 (10mL) 洗涤。有机层经无水 Na_2SO_4 干燥, 然后在减压下浓缩。经硅胶柱色谱 (己烷/EtOAc = 3/1) 纯化残余物以得到作为白色固体的期望产物 (306mg, 92%)。

[0313] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 7.67 (d, 2H, $J=8.4\text{Hz}$), 6.93 (s, 2H), 6.86 (d, 2H, $J=8.4\text{Hz}$), 5.82 (s, 1H), 2.59 (s, 6H), 2.29 (s, 3H)。

[0314] 实施例28

[0315] 2-(4-环己基氧基-苯磺酰基)-1,3,5-三甲基-苯 (HJC-2-90)

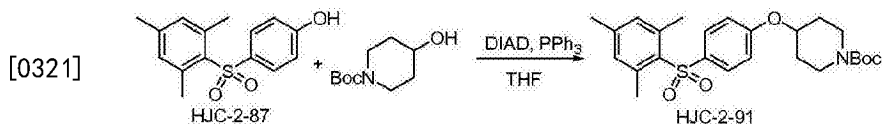


[0317] 向HJC-2-87 (50mg, 0.18mmol) 和 PPh_3 (58mg, 0.22mmol) 的THF (5mL) 溶液中添加环己醇 (36mg, 0.36mmol) 和DIAD (44mg, 0.22mmol)。将反应混合物在室温下搅拌16小时。然后使其在EtOAc (50mL) 与 H_2O (20mL) 之间分配。有机层用盐水 (10mL) 洗涤, 经无水 Na_2SO_4 干燥并浓缩以得到粗制产物。用硅胶柱 (己烷/EtOAc = 7/1) 纯化该残余物以获得作为无色油的期望产物 (50mg, 77%)。

[0318] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 7.69 (d, 2H, $J=7.2\text{Hz}$), 6.91 (s, 2H), 6.91 (d, 2H, $J=6.6\text{Hz}$), 4.30 (s, 1H), 2.60 (s, 6H), 2.27 (s, 3H), 1.93-1.95 (m, 2H), 1.75-1.77 (m, 2H), 1.47-1.57 (m, 3H), 1.29-1.39 (m, 3H)。 ^{13}C NMR (150MHz, CDCl_3) δ 161.4, 143.1, 139.9, 134.8, 134.8, 132.3, 128.6, 115.6, 75.8, 31.6, 25.6, 23.7, 23.0, 21.1。

[0319] 实施例29

[0320] 4-[4-(2,4,6-三甲基-苯磺酰基)-苯氧基]-哌啶-1-羧酸叔丁酯 (HJC-2-91)

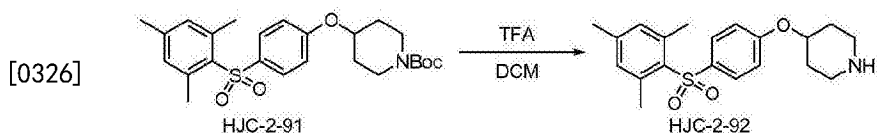


[0322] 向HJC-2-87 (138mg, 0.5mmol) 和PPh₃ (262mg, 1.0mmol) 的THF (5mL) 溶液中添加4-羟基-哌啶-1-羧酸叔丁酯 (201mg, 1.0mmol) 和DIAD (202mg, 1.0mmol) 。将反应混合物在室温下搅拌16小时, 然后使其在EtOAc (50mL) 与H₂O (20mL) 之间分配。有机层用盐水 (10mL) 洗涤, 经无水Na₂SO₄干燥并浓缩以得到粗制产物。用硅胶柱 (己烷/EtOAc=2/1) 纯化该残余物以获得作为无色油的期望产物 (207mg, 90%) 。

[0323] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ7.71 (d, 2H, J=9.0Hz) , 6.93 (s, 2H) , 6.91 (d, 2H, J=8.4Hz) , 4.52-4.54 (m, 1H) , 3.65-3.69 (m, 2H) , 3.33-3.37 (m, 2H) , 2.60 (s, 6H) , 2.29 (s, 3H) , 1.90-1.93 (m, 2H) , 1.73-1.77 (m, 2H) , 1.46 (s, 9H) .

[0324] 实施例30

[0325] 4-[4-(2,4,6-三甲基-苯磺酰基)-苯氧基]-哌啶 (HJC-2-92)

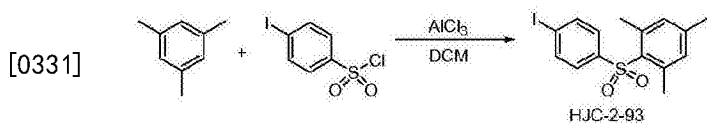


[0327] 在0℃下向HJC-2-91 (128mg, 0.28mmol) 的DCM (5mL) 溶液中添加TFA (1mL) 。将混合物在0℃下搅拌1小时。浓缩反应混合物, 并使其在EtOAc (50mL) 与1N NaHCO₃ (10mL) 之间分配。有机层用盐水 (10mL) 洗涤, 经无水Na₂SO₄干燥并浓缩以得到粗制产物。用硅胶柱 (DCM/MeOH=10/1) 纯化该残余物以提供作为白色固体的HJC-2-92 (100mg, 99%) 。

[0328] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ8.55 (bs, 1H) , 7.70 (d, 2H, J=7.2Hz) , 6.92 (d, 2H, J=9.0Hz) , 6.91 (s, 2H) , 4.67 (s, 1H) , 3.28 (t, 2H, J=8.4Hz) , 3.12-3.14 (m, 2H) , 2.57 (s, 6H) , 2.27 (s, 3H) , 2.17 (t, 2H, J=7.8Hz) , 2.02-2.04 (m, 2H) . ¹³C NMR (150MHz, CDCl₃) δ159.8, 143.4, 139.8, 136.1, 134.2, 132.3, 128.7, 115.6, 68.9, 40.2, 27.2, 22.9, 21.0.

[0329] 实施例31

[0330] 2-(4-碘-苯磺酰基)-1,3,5-三甲基-苯 (HJC-2-93)

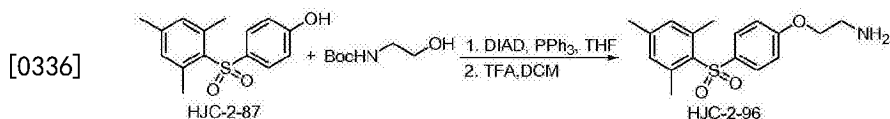


[0332] 将DCM (5mL) 中4-碘-苯磺酰氯 (302mg, 1.0mmol) 、均三甲苯 (120mg, 1.0mmol) 和AlCl₃ (150mg, 1.2mmol) 的混合物在室温下搅拌2小时。然后将混合物倒入10mL的5% HCl (水溶液) 中, 并通过DCM (30mL) 萃取。有机相通过水性KHCO₃、盐水洗涤, 并经无水Na₂SO₄干燥。将所得溶液蒸发, 并经硅胶柱色谱 (己烷/EtOAc=10/1) 纯化残余物以得到作为白色固体的期望产物 (266mg, 69%) 。

[0333] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ7.82 (d, 2H, J=7.8Hz) , 7.48 (d, 2H, J=7.8Hz) , 6.94 (s, 2H) , 2.57 (s, 6H) , 2.30 (s, 3H) .

[0334] 实施例32

[0335] 2-[4-(2,4,6-三甲基-苯磺酰基)-苯氧基]-乙胺 (HJC-2-96)

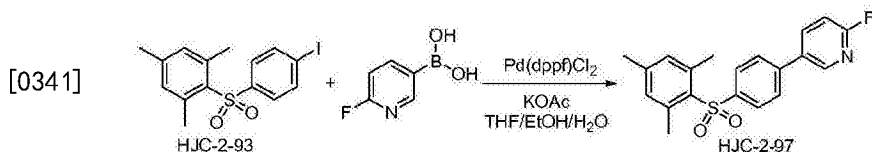


[0337] 向HJC-2-87 (100mg, 0.36mmol) 和PPh₃ (188mg, 0.72mmol) 的THF (5mL) 溶液中添加(2-羟基-乙基)-氨基甲酸叔丁酯 (117mg, 0.72mmol) 和DIAD (145mg, 0.72mmol)。将反应混合物在室温下搅拌16小时, 然后使其在EtOAc (50mL) 与H₂O (20mL) 之间分配。有机层用盐水 (10mL) 洗涤, 经无水Na₂SO₄干燥并浓缩以得到粗制产物。用硅胶柱 (己烷/EtOAc=2/1) 纯化该残余物以获得作为无色油的期望产物 (130mg, 87%)。在0℃下向期望产物 (130mg, 0.32mmol) 的DCM (4mL) 溶液中添加TFA (1mL)。将混合物在0℃下搅拌1小时。浓缩反应混合物, 并使残余物在EtOAc (50mL) 与1N NaHCO₃ (10mL) 之间分配。有机层用盐水 (10mL) 洗涤, 经无水Na₂SO₄干燥并浓缩以得到粗制产物。用硅胶柱 (DCM/MeOH=10/1) 纯化该残余物以提供作为淡红色油的HJC-2-96 (100mg, 98%)。

[0338] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ7.64 (d, 2H, J=7.2Hz), 6.89 (s, 2H), 6.88 (d, 2H, J=7.2Hz), 5.40-5.48 (bs, 2H), 4.02-4.03 (m, 2H), 3.10-3.12 (m, 2H), 2.52 (s, 6H), 2.23 (s, 3H). ¹³C NMR (150MHz, CDCl₃) δ161.6, 143.4, 139.8, 135.7, 134.2, 132.3, 128.5, 114.7, 67.1, 40.0, 22.8, 21.1.

[0339] 实施例33

[0340] 2-氟-5-[4-(2,4,6-三甲基-苯磺酰基)-苯基]-吡啶 (HJC-2-97)

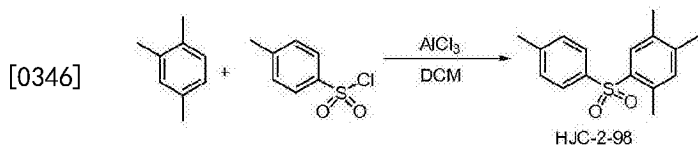


[0342] 向HJC-2-93 (77mg, 0.2mmol) 和2-氟吡啶-5-硼酸 (28mg, 0.2mmol) 的THF/EtOH/H₂O (1mL/1mL/1mL) 溶液中添加KOAc (59mg, 0.6mmol), 然后添加Pd (dppf) Cl₂ (16mg, 0.02mmol)。通过五次真空/N₂-再填充循环使所得混合物脱氧。将混合物在80℃下搅拌18小时, 然后在真空下浓缩。使残余物在EtOAc (50mL) 与H₂O (20mL) 之间分配。分离有机层并用盐水 (10mL) 洗涤, 经无水Na₂SO₄干燥, 过滤并浓缩以得到油残余物。用硅胶柱 (己烷/EtOAc=3/1) 纯化该残余物以获得作为红色固体的HJC-2-97 (50mg, 70%)。

[0343] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ8.39-8.41 (m, 1H), 7.95-7.98 (m, 1H), 7.88 (d, 2H, J=8.4Hz), 7.62-7.65 (m, 2H), 7.03 (d, 1H, J=8.4Hz), 6.96 (s, 2H), 2.61 (s, 6H), 2.30 (s, 3H). ¹³C NMR (150MHz, CDCl₃) δ164.5, 162.9, 146.3, 143.8, 143.3, 141.0, 140.2, 140.1, 133.6, 133.2, 132.4, 127.6, 127.2, 110.1, 109.9, 23.0, 21.1.

[0344] 实施例34

[0345] 1,2,4-三甲基-5-(甲苯-4-磺酰基)-苯 (HJC-2-98)



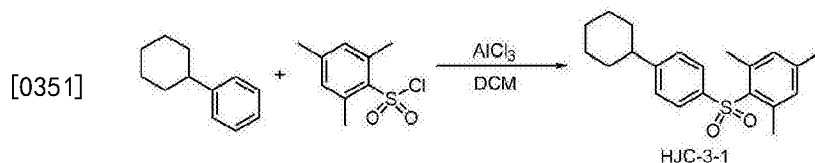
[0347] 将DCM (10mL) 中4-甲基-苯磺酰氯 (191mg, 1.0mmol)、1,2,4-三甲基-苯 (120mg, 1.0mmol) 和AlCl₃ (200mg, 1.5mmol) 的混合物在室温下搅拌2小时。然后将混合物倒入10mL

的5% HCl (水溶液) 中, 并通过DCM (30mL) 萃取。有机相通过水性 KHCO_3 、盐水洗涤, 并经无水 Na_2SO_4 干燥。将所得溶液蒸发, 并经硅胶柱色谱 (己烷/EtOAc=10/1) 纯化残余物以得到作为白色固体的期望产物 (200mg, 73%)。

[0348] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 7.96 (s, 1H), 7.73 (d, 2H, $J=7.8\text{Hz}$), 7.26 (d, 2H, $J=7.8\text{Hz}$), 6.97 (s, 1H), 2.39 (s, 3H), 2.34 (s, 3H), 2.31 (s, 3H), 2.28 (s, 3H). ^{13}C NMR (150MHz, CDCl_3) δ 143.7, 143.0, 139.0, 136.2, 135.0, 134.0, 130.3, 129.7, 129.7, 127.6, 21.7, 21.6, 19.7, 19.4.

[0349] 实施例35

[0350] 2-(4-环己基-苯磺酰基)-1,3,5-三甲基-苯 (HJC-3-1)

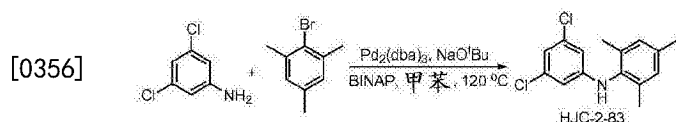


[0352] 将DCM (10mL) 中苯基磺酰氯 (219mg, 1.0mmol)、环己基-苯 (160mg, 1.0mmol) 和 AlCl_3 (200mg, 1.5mmol) 的混合物在室温下搅拌2小时。然后将混合物倒入10mL的5% HCl (水溶液) 中, 并通过DCM (30mL) 萃取。有机相通过水性 KHCO_3 、盐水洗涤, 并经无水 Na_2SO_4 干燥。将所得溶液蒸发, 并经硅胶柱色谱 (己烷/EtOAc=10/1) 纯化残余物以得到作为白色固体的期望产物 (255mg, 75%)。

[0353] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 7.69 (d, 2H, $J=8.4\text{Hz}$), 7.27 (d, 2H, $J=8.4\text{Hz}$), 6.93 (s, 2H), 2.60 (s, 6H), 2.52-2.55 (m, 1H), 2.27 (s, 3H), 1.82-1.83 (m, 4H), 1.73-1.75 (m, 1H), 1.34-1.41 (m, 4H), 1.22-1.26 (m, 1H). ^{13}C NMR (150MHz, CDCl_3) δ 153.3, 143.2, 141.0, 140.0, 134.3, 132.2, 127.4, 126.4, 44.6, 34.2, 26.7, 26.0, 22.9, 21.0.

[0354] 实施例36

[0355] (3,5-二氯-苯基)-(2,4,6-三甲基-苯基)-胺 (HJC-2-83)

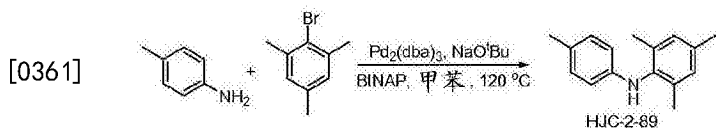


[0357] 将 NaOtBu (115mg, 1.2mmol)、 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (92mg, 0.1mmol) 和BINAP (124mg, 0.2mmol) 放入烧瓶中并溶解在经蒸馏的甲苯 (5mL) 中。向该溶液中逐滴添加苯基溴 (995mg, 5.0mmol) 和3,5-二氯-苯胺 (162mg, 1.0mmol) 并在室温下搅拌, 使混合物在 120°C 下回流24小时。在混合物冷却之后, 添加10mL的5% HCl (水溶液) 并用EtOAc (50mL) 萃取。用 NaHCO_3 洗涤组合的有机层并经无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤并在真空下浓缩。经硅胶柱色谱 (己烷/EtOAc=10/1) 纯化残余物以得到作为淡黄色固体的期望产物 (190mg, 68%)。

[0358] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 7.00 (s, 2H), 6.73 (s, 1H), 6.37 (s, 2H), 5.21 (s, 1H), 2.36 (s, 3H), 2.20 (s, 6H). ^{13}C NMR (150MHz, CDCl_3) δ 148.8, 136.7, 136.4, 135.7, 133.9, 129.6, 117.7, 111.3, 21.0, 18.2.

[0359] 实施例37

[0360] 对甲苯基-(2,4,6-三甲基-苯基)-胺 (HJC-2-89)

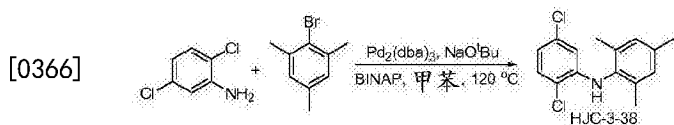


[0362] 将NaOtBu (115mg, 1.2mmol)、Pd₂(dba)₃ (92mg, 0.1mmol) 和BINAP (124mg, 0.2mmol) 放入烧瓶中并溶解在经蒸馏的甲苯 (5mL) 中。向该溶液中逐滴添加**菜**基溴 (995mg, 5.0mmol) 和对甲苯基胺 (107mg, 1.0mmol) 并在室温下搅拌, 使混合物在120℃下回流24小时。在混合物冷却之后, 添加10mL的5% HCl (水溶液) 并用EtOAc (50mL) 萃取。用NaHCO₃洗涤合并的有机层并经无水Na₂SO₄干燥, 过滤并在真空下浓缩。经硅胶柱色谱 (己烷/EtOAc = 10/1) 纯化残余物以得到作为淡黄色油的期望产物 (210mg, 93%)。

[0363] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ 7.11 (d, 2H, J = 7.8Hz), 7.09 (s, 2H), 6.57 (d, 2H, J = 7.8Hz), 5.12 (s, 1H), 2.47 (s, 3H), 2.40 (s, 3H), 2.33 (s, 6H). ¹³C NMR (150MHz, CDCl₃) δ 144.4, 136.1, 135.7, 135.1, 129.8, 129.3, 127.1, 113.5, 21.0, 20.5, 18.3.

[0364] 实施例38

[0365] (2,5-二氯-苯基)-(2,4,6-三甲基-苯基)-胺 (HJC-3-38)

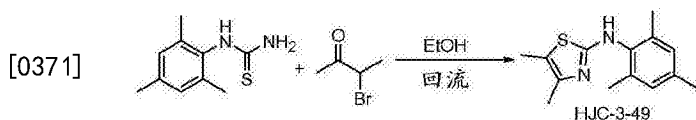


[0367] 将NaOtBu (58mg, 0.6mmol)、Pd₂(dba)₃ (46mg, 0.05mmol) 和BINAP (62mg, 0.1mmol) 放入烧瓶中并溶解在经蒸馏的甲苯 (5mL) 中。向该溶液中逐滴添加**菜**基溴 (500mg, 2.5mmol) 和2,5-二氯-苯胺 (81mg, 0.5mmol) 并在室温下搅拌, 使混合物在120℃下回流24小时。在混合物冷却之后, 添加10mL的5% HCl (水溶液) 并用EtOAc (50mL) 萃取。用NaHCO₃洗涤组合的有机层并经无水Na₂SO₄干燥, 过滤并在真空下浓缩。经硅胶柱色谱 (己烷/EtOAc = 10/1) 纯化残余物以得到作为淡黄色固体的期望产物 (87mg, 62%)。

[0368] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ 7.22 (d, 1H, J = 8.4Hz), 6.98 (s, 2H), 6.62 (dd, 1H, J₁ = 7.8Hz, J₂ = 1.8Hz), 6.14 (d, 1H, J = 2.4Hz), 5.67 (s, 1H), 2.33 (s, 3H), 2.16 (s, 6H). ¹³C NMR (150MHz, CDCl₃) δ 143.8, 136.9, 136.5, 133.9, 133.8, 130.1, 129.6, 117.8, 117.2, 112.1, 21.1, 18.1.

[0369] 实施例39

[0370] (4,5-二甲基-噻唑-2-基)-(2,4,6-三甲基-苯基)-胺 (HJC-3-49)



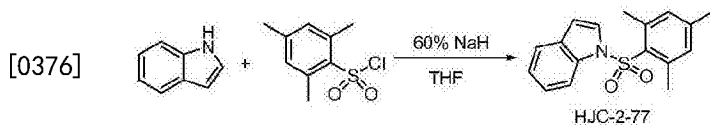
[0372] 向(2,4,6-三甲基-苯基)-硫脲 (49mg, 0.25mmol) 的EtOH (5mL) 溶液中添加3-溴-丁-2酮 (38mg, 0.25mmol)。将混合物在90℃下搅拌1小时。溶液用EtOAc (30mL) 稀释, 用H₂O (10mL) 和盐水 (10mL) 洗涤。有机层经Na₂SO₄干燥, 然后在减压下浓缩。经硅胶柱色谱 (己烷/EtOAc = 3/1) 纯化残余物以得到作为淡黄色固体的期望产物 (40mg, 65%)。

[0373] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ 7.70-8.00 (bs, 1H), 6.94 (s, 2H), 2.30 (s, 3H), 2.27 (s, 6H), 2.09 (s, 3H), 2.02 (s, 3H). ¹³C NMR (150MHz, CDCl₃) δ 167.4, 143.1, 137.4, 136.9, 135.5,

129.5, 113.2, 21.1, 18.2, 14.5, 11.1.

[0374] 实施例40

[0375] 1-(2,4,6-三甲基-苯磺酰基)-1H-吡咯 (HJC-2-77)

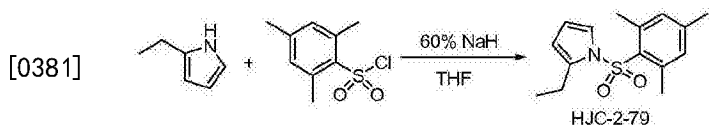


[0377] 在0℃下向1H-吡咯 (117mg, 1.0mmol) 和 **菜**基磺酰氯 (219mg, 1.0mmol) 的5mL THF溶液中添加60%NaH (50mg, 1.25mmol)。将所得混合物在室温下搅拌16小时。溶液用EtOAc (50mL) 稀释, 用1N HCl (水溶液) (10mL) 和盐水 (10mL) 洗涤。有机层经无水Na₂SO₄干燥, 然后在减压下浓缩。经硅胶柱色谱 (己烷/EtOAc=10/1) 纯化残余物以得到作为白色固体的期望产物 (250mg, 84%)。

[0378] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ7.59-7.61 (m, 1H), 7.54-7.55 (m, 1H), 7.34-7.35 (m, 1H), 7.17 (s, 2H), 6.93 (s, 2H), 6.61-6.62 (m, 1H), 2.52 (s, 6H), 2.26 (s, 3H). ¹³C NMR (150MHz, CDCl₃) δ144.1, 140.3, 134.7, 133.1, 132.5, 130.3, 126.8, 124.2, 122.8, 121.5, 112.5, 106.5, 22.7, 21.1.

[0379] 实施例41

[0380] 2-乙基-1-(2,4,6-三甲基-苯磺酰基)-1H-吡咯 (HJC-2-79)

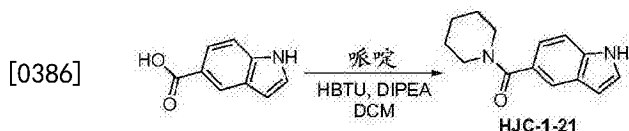


[0382] 在0℃下向2-乙基-1H-吡咯 (纯度为~80%) (24mg, 0.25mmol) 和 **菜**基磺酰氯 (110mg, 0.5mmol) 的5mL THF溶液中添加60%NaH (24mg, 0.6mmol)。将所得混合物在室温下搅拌16小时。溶液用EtOAc (50mL) 稀释, 用1N HCl (水溶液) (10mL) 和盐水 (10mL) 洗涤。有机层经无水Na₂SO₄干燥, 然后在减压下浓缩。经硅胶柱色谱 (己烷/EtOAc=10/1) 纯化残余物以得到作为淡黄色油的期望产物 (20mg, 36%)。

[0383] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ7.29-7.30 (m, 1H), 6.95 (s, 2H), 6.13-6.14 (m, 1H), 5.96-5.98 (m, 1H), 2.46 (s, 6H), 2.34-2.38 (m, 2H), 2.31 (s, 3H), 1.07 (t, 3H, J=7.2Hz). ¹³C NMR (150MHz, CDCl₃) δ144.0, 140.2, 136.5, 133.5, 132.3, 122.3, 110.0, 109.1, 22.4, 21.2, 19.3, 12.4.

[0384] 实施例42

[0385] (1H-吡咯-5-基)-哌啶-1-基-甲酮 (HJC-1-21)



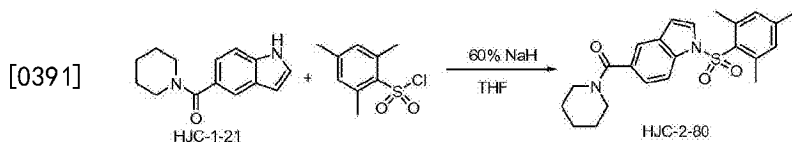
[0387] 向1H-吡咯-5-羧酸 (323mg, 2.0mmol) 的10mL DCM溶液中添加DIPEA (1.29g, 10.0mmol) 和哌啶 (852mg, 10.0mmol)。在0℃下添加HBTU (1.14g, 3.0mmol)。将所得混合物在室温下搅拌18小时。TLC指示起始材料消失。混合物用DCM (100mL) 稀释并用水 (30mL) 洗涤。分离有机层并经无水Na₂SO₄干燥。浓缩溶液以得到粗制产物, 用硅胶柱 (DCM/EtOAc/己烷=

1/1/1) 纯化以获得作为白色固体的HJC-1-21 (410mg, 90%)。

[0388] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 8.85 (s, 1H), 7.70 (s, 1H), 7.28-7.34 (m, 1H), 7.19-7.24 (m, 2H), 6.54-6.56 (m, 1H), 3.46-3.74 (m, 4H), 1.48-1.77 (m, 6H)。

[0389] 实施例43

[0390] 哌啶-1-基-[1-(2,4,6-三甲基-苯磺酰基)-1H-吡咯-5-基]-甲酮 (HJC-2-80)

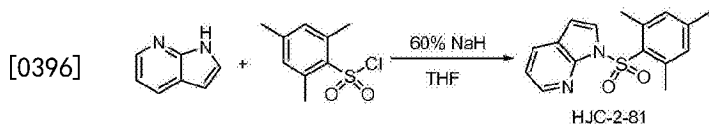


[0392] 在0℃下向HJC-1-21 (42mg, 0.18mmol) 和**菜**基磺酰氯 (40mg, 0.18mmol) 的5mL THF溶液中添加60% NaH (9mg, 0.22mmol)。将所得混合物在室温下搅拌16小时。溶液用EtOAc (50mL) 稀释, 用1N HCl (水溶液) (10mL) 和盐水 (10mL) 洗涤。有机层经无水 Na_2SO_4 干燥, 然后在减压下浓缩。经硅胶柱色谱 (己烷/EtOAc=1/1) 纯化残余物以得到作为白色固体的期望产物 (70mg, 93%)。

[0393] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 7.63-7.64 (m, 1H), 7.61-7.62 (m, 1H), 7.32-7.34 (m, 1H), 7.20-7.21 (m, 1H), 6.95 (s, 2H), 6.64-6.66 (m, 1H), 3.65-3.70 (m, 2H), 3.30-3.36 (m, 2H), 2.50 (s, 6H), 2.28 (s, 3H), 1.51-1.67 (m, 6H)。 ^{13}C NMR (150MHz, CDCl_3) δ 170.6, 144.4, 140.3, 134.9, 132.7, 132.6, 131.3, 130.0, 127.7, 123.1, 120.3, 112.4, 106.7, 49.0, 43.3, 26.6, 25.8, 24.7, 22.7, 21.1。

[0394] 实施例44

[0395] 1-(2,4,6-三甲基-苯磺酰基)-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶 (HJC-2-81)

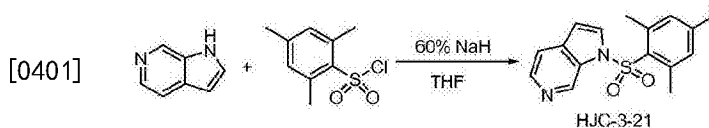


[0397] 在0℃下向1H-吡咯并[2,3-b]吡啶 (59mg, 0.5mmol) 和**菜**基磺酰氯 (110mg, 0.5mmol) 的4mL THF溶液中添加60% NaH (24mg, 0.6mmol)。将所得混合物在室温下搅拌16小时。溶液用EtOAc (50mL) 稀释, 用1N HCl (水溶液) (10mL) 和盐水 (10mL) 洗涤。有机层经无水 Na_2SO_4 干燥, 然后在减压下浓缩。经硅胶柱色谱 (己烷/EtOAc=7/1) 纯化残余物以得到作为白色固体的期望产物 (130mg, 87%)。

[0398] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 8.22 (d, 1H, $J=4.2\text{Hz}$), 7.85 (d, 1H, $J=3.0\text{Hz}$), 7.83 (d, 1H, $J=7.8\text{Hz}$), 7.08-7.11 (m, 1H), 6.93 (s, 2H), 6.57 (d, 1H, $J=3.0\text{Hz}$), 2.71 (s, 6H), 2.27 (s, 3H)。 ^{13}C NMR (150MHz, CDCl_3) δ 147.6, 144.7, 144.0, 141.3, 132.8, 132.1, 129.3, 126.9, 122.4, 118.6, 103.8, 23.0, 21.2。

[0399] 实施例45

[0400] 1-(2,4,6-三甲基-苯磺酰基)-1H-吡咯并[2,3-c]吡啶 (HJC-3-21)



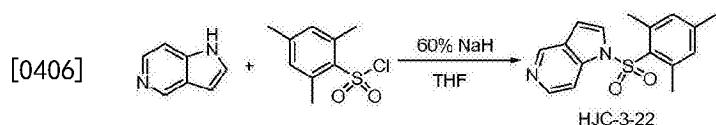
[0402] 在0℃下向1H-吡咯并[2,3-c]吡啶 (35mg, 0.3mmol) 和**菜**基磺酰氯 (66mg, 0.3mmol)

的4mL THF溶液中添加60%NaH(16mg,0.4mmol)。将所得混合物在室温下搅拌16小时。溶液用EtOAc(50mL)稀释,用1N HCl(水溶液)(10mL)和盐水(10mL)洗涤。有机层经无水Na₂SO₄干燥,然后在减压下浓缩。经硅胶柱色谱(己烷/EtOAc=1/1)纯化残余物以得到作为白色固体的期望产物(78mg,87%)。

[0403] ¹H NMR(600MHz,CDCl₃) δ8.69(s,1H),8.35(d,1H,J=5.4Hz),7.73(d,1H,J=3.6Hz),7.48(d,1H,J=5.4Hz),6.96(s,2H),6.63(d,1H,J=3.0Hz),2.53(s,6H),2.28(s,3H)。¹³C NMR(150MHz,CDCl₃) δ144.9,142.1,140.6,135.8,135.1,132.8,132.4,131.8,130.0,115.9,105.5,22.7,21.2。

[0404] 实施例46

[0405] 1-(2,4,6-三甲基-苯磺酰基)-1H-吡咯并[3,2-c]吡啶(HJC-3-22)

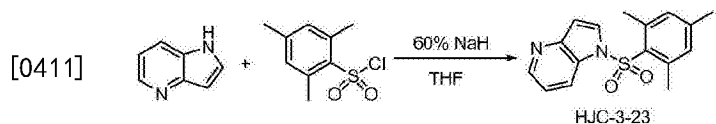


[0407] 在0℃下向1H-吡咯并[3,2-c]吡啶(35mg,0.3mmol)和**菜**基磺酰氯(66mg,0.3mmol)的4mL THF溶液中添加60%NaH(16mg,0.4mmol)。将所得混合物在室温下搅拌16小时。溶液用EtOAc(50mL)稀释,用1N HCl(水溶液)(10mL)和盐水(10mL)洗涤。有机层经无水Na₂SO₄干燥,然后在减压下浓缩。经硅胶柱色谱(己烷/EtOAc=1/1)纯化残余物以得到作为白色固体的期望产物(76mg,84%)。

[0408] ¹H NMR(600MHz,CDCl₃) δ8.88(s,1H),8.33(d,1H,J=6.0Hz),7.54(d,1H,J=3.6Hz),7.29(d,1H,J=5.4Hz),6.95(s,2H),6.68(d,1H,J=3.6Hz),2.50(s,6H),2.26(s,3H)。¹³C NMR(150MHz,CDCl₃) δ144.8,144.3,143.6,140.4,139.0,132.6,132.3,127.2,126.4,107.6,105.1,22.6,21.1。

[0409] 实施例47

[0410] 1-(2,4,6-三甲基-苯磺酰基)-1H-吡咯并[3,2-b]吡啶(HJC-3-23)

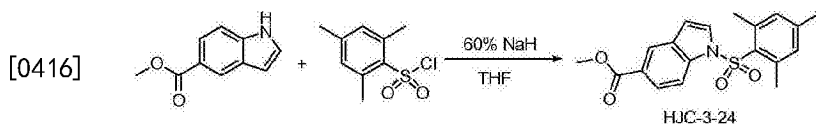


[0412] 在0℃下向1H-吡咯并[3,2-b]吡啶(35mg,0.3mmol)和**菜**基磺酰氯(88mg,0.4mmol)的4mL THF溶液中添加60%NaH(16mg,0.4mmol)。将所得混合物在室温下搅拌16小时。溶液用EtOAc(50mL)稀释,用1N HCl(水溶液)(10mL)和盐水(10mL)洗涤。有机层经无水Na₂SO₄干燥,然后在减压下浓缩。经硅胶柱色谱(己烷/EtOAc=1/1)纯化残余物以得到作为白色固体的期望产物(86mg,96%)。

[0413] ¹H NMR(600MHz,CDCl₃) δ8.48(d,1H,J=3.6Hz),7.74-7.75(m,1H),7.71(d,1H,J=8.4Hz),7.09-7.11(m,1H),6.94(s,2H),6.81(d,1H,J=3.0Hz),2.50(s,6H),2.25(s,3H)。¹³C NMR(150MHz,CDCl₃) δ148.1,145.8,144.7,140.4,132.6,132.5,129.6,128.3,119.8,118.7,107.8,22.7,21.1。

[0414] 实施例48

[0415] 1-(2,4,6-三甲基-苯磺酰基)-1H-吡啶-5-羧酸甲酯(HJC-3-24)

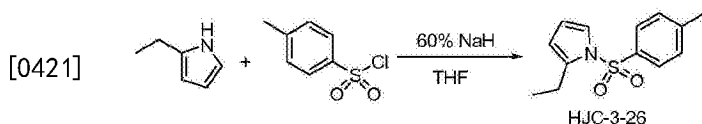


[0417] 在0℃下向1H-吲哚-5-羧酸甲酯(88mg, 0.5mmol)和**菜**基磺酰氯(131mg, 0.6mmol)的5mL THF溶液中添加60%NaH(24mg, 0.6mmol)。将所得混合物在室温下搅拌16小时。溶液用EtOAc(50mL)稀释,用1N HCl(水溶液)(10mL)和盐水(10mL)洗涤。有机层经无水Na₂SO₄干燥,然后在减压下浓缩。经硅胶柱色谱(己烷/EtOAc=3/1)纯化残余物以得到作为白色固体的期望产物(150mg, 84%)。

[0418] ¹H NMR(600MHz, CDCl₃) δ8.30(s, 1H), 7.88(d, 1H, J=9.0Hz), 7.64(d, 1H, J=3.6Hz), 7.40(d, 1H, J=8.4Hz), 6.95(s, 2H), 6.70(d, 1H, J=3.6Hz), 3.90(s, 3H), 2.51(s, 6H), 2.28(s, 3H)。 ¹³C NMR(150MHz, CDCl₃) δ167.3, 144.6, 140.4, 137.3, 132.8, 132.6, 130.0, 128.0, 125.6, 125.1, 123.9, 112.3, 107.1, 52.2, 22.7, 21.2。

[0419] 实施例49

[0420] 2-乙基-1-(4-磺酰基)-1H-吡咯(HJC-3-26)

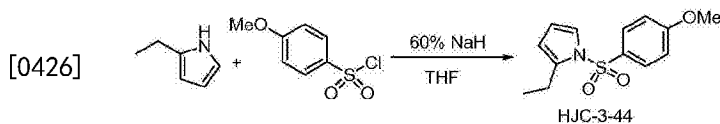


[0422] 在0℃下向2-乙基-1H-吡咯(纯度~80%)(24mg, 0.25mmol)和4-甲基-苯磺酰氯(95mg, 0.5mmol)的5mL THF溶液中添加60%NaH(24mg, 0.6mmol)。将所得混合物在室温下搅拌16小时。溶液用EtOAc(50mL)稀释,用1N HCl(水溶液)(10mL)和盐水(10mL)洗涤。有机层经无水Na₂SO₄干燥,然后在减压下浓缩。经硅胶柱色谱(己烷/EtOAc=10/1)纯化残余物以得到作为无色油的期望产物(15mg, 30%)。

[0423] ¹H NMR(600MHz, CDCl₃) δ7.64(d, 2H, J=8.4Hz), 7.28(d, 2H, J=8.4Hz), 7.27(d, 1H, J=8.4Hz), 6.20(t, 1H, J=3.0Hz), 5.99(d, 1H, J=3.0Hz), 2.68(q, 2H, J=7.2Hz), 2.40(s, 3H), 1.16(t, 3H, J=7.2Hz)。 ¹³C NMR(150MHz, CDCl₃) δ144.8, 137.5, 136.7, 130.1, 126.9, 122.4, 111.3, 111.1, 21.7, 20.6, 12.8。

[0424] 实施例50

[0425] 2-乙基-1-(4-甲氧基-苯磺酰基)-1H-吡咯(HJC-3-44)



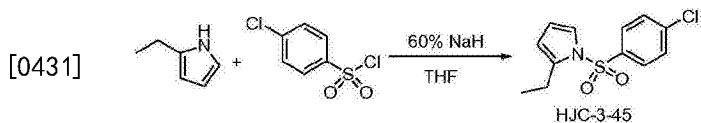
[0427] 在0℃下向2-乙基-1H-吡咯(纯度~80%)(24mg, 0.25mmol)和4-甲氧基-苯磺酰氯(153mg, 0.75mmol)的5mL THF溶液中添加60%NaH(32mg, 0.8mmol)。将所得混合物在室温下搅拌16小时。溶液用EtOAc(50mL)稀释,用1N HCl(水溶液)(10mL)和盐水(10mL)洗涤。有机层经无水Na₂SO₄干燥,然后在减压下浓缩。经硅胶柱色谱(己烷/EtOAc=10/1)纯化残余物以得到作为淡红色固体的期望产物(20mg, 38%)。

[0428] ¹H NMR(600MHz, CDCl₃) δ7.72(d, 2H, J=10.2Hz), 7.28(t, 1H, J=1.2Hz), 6.95(d, 2H, J=11.4Hz), 6.19(t, 1H, J=3.0Hz), 5.99(d, 1H, J=1.8Hz), 3.85(s, 3H), 2.69(q, 2H, J=7.8Hz), 1.16(t, 3H, J=7.2Hz)。 ¹³C NMR(150MHz, CDCl₃) δ163.7, 137.4, 131.1, 129.2,

122.2, 114.7, 111.2, 111.0, 55.8, 20.6, 12.8.

[0429] 实施例51

[0430] 1-(4-氯-苯磺酰基)-2-乙基-1H-吡咯 (HJC-3-45)

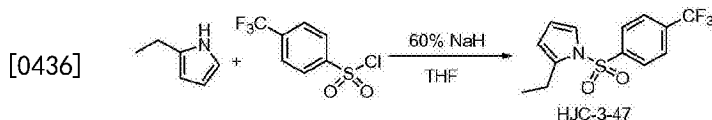


[0432] 在0℃下向2-乙基-1H-吡咯(纯度~80%) (24mg, 0.25mmol) 和4-氯-苯磺酰氯 (211mg, 1.0mmol) 的5mL THF溶液中添加60%NaH (40mg, 1.0mmol)。将所得混合物在室温下搅拌16小时。溶液用EtOAc (50mL) 稀释, 用1N HCl (水溶液) (10mL) 和盐水 (10mL) 洗涤。有机层经无水Na₂SO₄干燥, 然后在减压下浓缩。经硅胶柱色谱(己烷/EtOAc=10/1) 纯化残余物以得到作为淡红色固体的期望产物 (41mg, 76%)。

[0433] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ 7.68 (d, 2H, J=7.2Hz), 7.47 (d, 2H, J=7.2Hz), 7.27 (d, 1H, J=3.6Hz), 6.23 (t, 1H, J=3.6Hz), 6.02 (d, 1H, J=3.6Hz), 2.68 (q, 2H, J=7.2Hz), 1.18 (t, 3H, J=7.2Hz). ¹³C NMR (150MHz, CDCl₃) δ 140.4, 138.1, 137.6, 129.8, 128.3, 122.4, 111.9, 111.6, 20.7, 12.8.

[0434] 实施例52

[0435] 2-乙基-1-(4-三氟甲基-苯磺酰基)-1H-吡咯 (HJC-3-47)

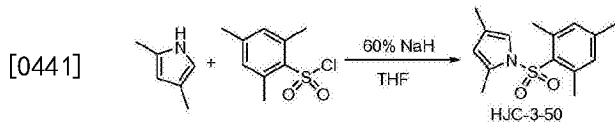


[0437] 在0℃下向2-乙基-1H-吡咯(纯度~80%) (24mg, 0.25mmol) 和4-三氟甲基-苯磺酰氯 (245mg, 1.0mmol) 的5mL THF溶液中添加60%NaH (40mg, 1.0mmol)。将所得混合物在室温下搅拌16小时。溶液用EtOAc (50mL) 稀释, 用1N HCl (水溶液) (10mL) 和盐水 (10mL) 洗涤。有机层经无水Na₂SO₄干燥, 然后在减压下浓缩。经硅胶柱色谱(己烷/EtOAc=10/1) 纯化残余物以得到作为淡红色固体的期望产物 (35mg, 58%)。

[0438] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ 7.86 (d, 2H, J=7.8Hz), 7.76 (d, 2H, J=7.8Hz), 7.28-2.30 (m, 1H), 6.25 (d, 1H, J=1.8Hz), 6.03-6.05 (m, 1H), 2.68 (q, 2H, J=7.2Hz), 1.18 (t, 3H, J=7.8Hz).

[0439] 实施例53

[0440] 2,4-二甲基-1-(2,4,6-三甲基-苯磺酰基)-1H-吡咯 (HJC-3-50)



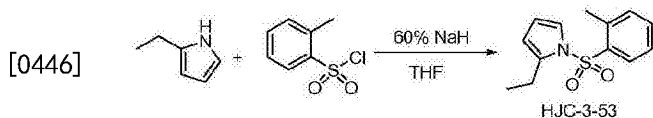
[0442] 在0℃下向2,4-二甲基-1H-吡咯 (24mg, 0.25mmol) 和 2,4,6-三甲基-苯磺酰氯 (218mg, 1.0mmol) 的5mL THF溶液中添加60%NaH (40mg, 1.0mmol)。将所得混合物在室温下搅拌16小时。溶液用EtOAc (50mL) 稀释, 用1N HCl (水溶液) (10mL) 和盐水 (10mL) 洗涤。有机层经无水Na₂SO₄干燥, 然后在减压下浓缩。经硅胶柱色谱(己烷/EtOAc=10/1) 纯化残余物以得到作为淡红色固体的期望产物 (40mg, 58%)。

[0443] ¹H NMR (600MHz, CDCl₃) δ 7.01 (s, 1H), 6.95 (s, 2H), 5.77 (s, 1H), 2.49 (s, 6H), 2.31

(s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.99 (s, 3H). ^{13}C NMR (150MHz, CDCl_3) δ 143.8, 140.2, 133.8, 132.2, 130.2, 119.7, 119.2, 114.5, 23.4, 21.1, 12.6, 11.8.

[0444] 实施例54

[0445] 2-乙基-1-(甲苯-2-磺酰基)-1H-吡咯 (HJC-3-53)

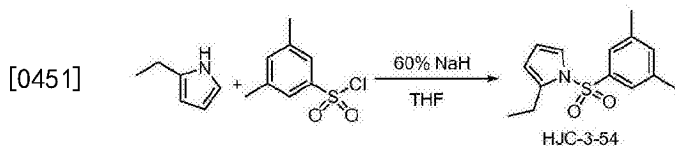


[0447] 在0℃下向2-乙基-1H-吡咯(纯度~80%) (48mg, 0.5mmol) 和2-甲基-苯磺酰氯 (191mg, 1.0mmol) 的5mL THF溶液中添加60%NaH (40mg, 1.0mmol)。将所得混合物在室温下搅拌16小时。溶液用EtOAc (50mL) 稀释, 用1N HCl (水溶液) (10mL) 和盐水 (10mL) 洗涤。有机层经无水 Na_2SO_4 干燥, 然后在减压下浓缩。经硅胶柱色谱(己烷/EtOAc=10/1) 纯化残余物以得到作为淡红色固体的期望产物 (73mg, 73%)。

[0448] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 7.50 (d, 2H, $J=7.2\text{Hz}$), 7.31-7.36 (m, 3H), 6.24-6.26 (m, 1H), 6.07-6.09 (m, 1H), 2.55 (q, 2H, $J=7.2\text{Hz}$), 2.54 (s, 3H), 1.13 (t, 3H, $J=7.2\text{Hz}$). ^{13}C NMR (150MHz, CDCl_3) δ 138.6, 138.0, 137.6, 133.7, 132.9, 128.3, 126.5, 123.0, 110.7, 110.3, 20.3, 20.0, 12.6.

[0449] 实施例55

[0450] 1-(3,5-二甲基-苯磺酰基)-2-乙基-1H-吡咯 (HJC-3-54)

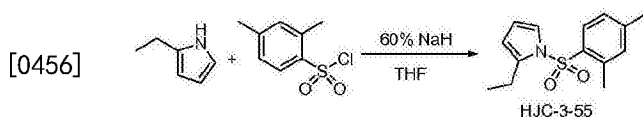


[0452] 在0℃下向2-乙基-1H-吡咯(纯度~80%) (48mg, 0.5mmol) 和3,5-二甲苯磺酰氯 (150mg, 0.75mmol) 的5mL THF溶液中添加60%NaH (40mg, 1.0mmol)。将所得混合物在室温下搅拌16小时。溶液用EtOAc (50mL) 稀释, 用1N HCl (水溶液) (10mL) 和盐水 (10mL) 洗涤。有机层经无水 Na_2SO_4 干燥, 然后在减压下浓缩。经硅胶柱色谱(己烷/EtOAc=10/1) 纯化残余物以得到作为淡红色固体的期望产物 (70mg, 67%)。

[0453] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 7.36 (s, 2H), 7.29 (s, 1H), 7.19 (s, 1H), 6.21 (t, 1H, $J=3.0\text{Hz}$), 6.00 (s, 1H), 2.70 (q, 2H, $J=7.2\text{Hz}$), 2.35 (s, 6H), 1.17 (t, 3H, $J=7.2\text{Hz}$). ^{13}C NMR (150MHz, CDCl_3) δ 139.6, 139.4, 137.5, 135.5, 124.3, 122.4, 111.2, 111.0, 21.4, 20.6, 12.9.

[0454] 实施例56

[0455] 1-(2,4-二甲基-苯磺酰基)-2-乙基-1H-吡咯 (HJC-3-55)



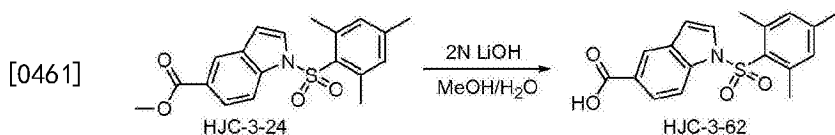
[0457] 在0℃下向2-乙基-1H-吡咯(纯度~80%) (48mg, 0.5mmol) 和2,4-二甲苯磺酰氯 (150mg, 0.75mmol) 的5mL THF溶液中添加60%NaH (40mg, 1.0mmol)。将所得混合物在室温下搅拌16小时。溶液用EtOAc (50mL) 稀释, 用1N HCl (水溶液) (10mL) 和盐水 (10mL) 洗涤。有机层经无水 Na_2SO_4 干燥, 然后在减压下浓缩。经硅胶柱色谱(己烷/EtOAc=10/1) 纯化残余物以

得到作为白色固体的期望产物 (80mg, 76%)。

[0458] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 7.46 (d, 1H, $J=7.2\text{Hz}$), 7.33-7.35 (m, 1H), 7.10-7.12 (m, 2H), 6.22-6.24 (m, 1H), 6.04-6.06 (m, 1H), 2.55 (q, 2H, $J=7.2\text{Hz}$), 2.47 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 1.13 (t, 3H, $J=7.2\text{Hz}$). ^{13}C NMR (150MHz, CDCl_3) δ 144.7, 137.9, 137.4, 135.5, 133.6, 128.7, 127.1, 122.9, 10.6, 110.1, 21.4, 20.3, 19.8, 12.6.

[0459] 实施例57

[0460] 1-(2,4,6-三甲基-苯磺酰基)-1H-吡啶-5-羧酸 (HJC-3-62)

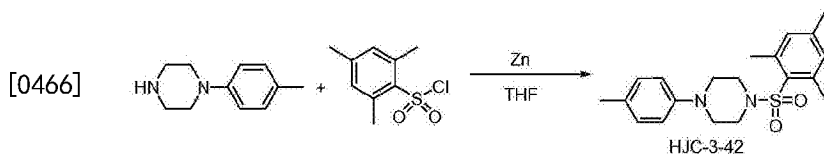


[0462] 向HJC-3-24 (72mg, 0.2mmol) 的MeOH/ H_2O (4mL/1mL) 溶液中添加2N LiOH (0.4mL, 0.8mmol)。将混合物在室温下搅拌16小时。溶液用EtOAc (30mL) 稀释, 用1N HCl (水溶液) (10mL) 和盐水 (10mL) 洗涤。有机层经 Na_2SO_4 干燥, 然后在减压下浓缩。经硅胶柱色谱 (己烷/EtOAc=1/1) 纯化残余物以得到作为淡黄色固体的期望产物 (45mg, 66%)。

[0463] ^1H NMR (600MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12.80 (bs, 1H), 8.27-8.29 (m, 1H), 7.85-7.86 (m, 2H), 7.40-7.42 (m, 1H), 7.15-7.17 (m, 2H), 6.93-6.95 (m, 1H), 2.45 (s, 6H), 2.28 (s, 3H)。

[0464] 实施例58

[0465] 1-对甲苯基-4-(2,4,6-三甲基-苯磺酰基)-哌嗪 (HJC-3-42)

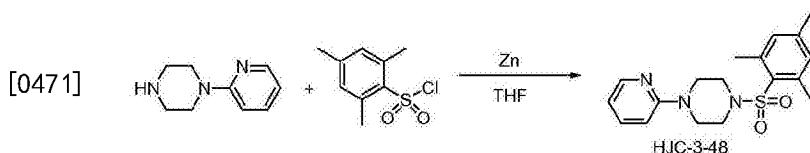


[0467] 在 0°C 下向1-对甲苯基-哌嗪 (44mg, 0.25mmol) 和苯基磺酰氯 (55mg, 0.25mmol) 的5mL THF溶液中添加Zn (32mg, 0.5mmol)。将所得混合物在室温下搅拌16小时, 然后在减压下浓缩。经硅胶柱色谱 (己烷/EtOAc=3/1) 纯化残余物以得到作为淡红色固体的期望产物 (80mg, 89%)。

[0468] ^1H NMR (600MHz, CDCl_3) δ 7.08 (d, 2H, $J=8.4\text{Hz}$), 6.98 (s, 2H), 6.82 (d, 2H, $J=7.8\text{Hz}$), 3.32 (t, 4H, $J=4.8\text{Hz}$), 3.13 (t, 4H, $J=4.8\text{Hz}$), 2.66 (s, 6H), 2.32 (s, 3H), 2.27 (s, 3H). ^{13}C NMR (150MHz, CDCl_3) δ 148.9, 142.8, 140.7, 132.1, 131.5, 130.3, 129.9, 117.2, 49.8, 44.5, 23.1, 21.1, 20.5.

[0469] 实施例59

[0470] 1-吡啶-2-基-4-(2,4,6-三甲基-苯磺酰基)-哌嗪 (HJC-3-48)



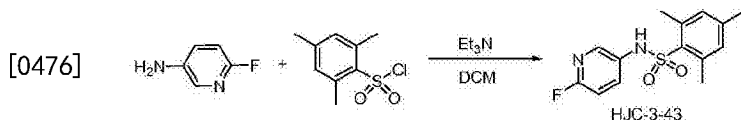
[0472] 在 0°C 下向1-吡啶-2-基-哌嗪 (41mg, 0.25mmol) 和苯基磺酰氯 (55mg, 0.25mmol) 的5mL THF溶液中添加Zn (33mg, 0.5mmol)。将所得混合物在室温下搅拌16小时, 然后在减压下浓缩。经硅胶柱色谱 (己烷/EtOAc=3/1) 纯化残余物以得到作为淡红色固体的期望产物

(85mg, 99%)。

[0473] $^1\text{H NMR}$ (600MHz, CDCl_3) δ 8.17–8.18 (m, 1H), 7.46–7.49 (m, 1H), 6.96 (s, 2H), 6.62–6.66 (m, 2H), 3.58 (t, 4H, $J=4.8\text{Hz}$), 3.27 (t, 4H, $J=4.8\text{Hz}$), 2.65 (s, 6H), 2.30 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (150MHz, CDCl_3) δ 150.1, 148.1, 142.9, 140.7, 137.7, 132.1, 131.4, 114.1, 107.4, 45.0, 44.2, 23.0, 21.1.

[0474] 实施例60

[0475] N-(6-氟-吡啶-3-基)-2,4,6-三甲基-苯磺酰胺 (HJC-3-43)

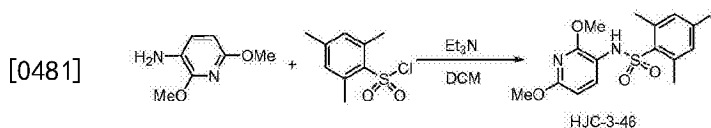


[0477] 在 0°C 下向6-氟-吡啶-3-基胺 (56mg, 0.5mmol) 和**菜**基磺酰氯 (109mg, 0.5mmol) 的 5mL DCM溶液中添加 Et_3N (79mg, 1.0mmol)。将所得混合物在室温下搅拌16小时。溶液用EtOAc (50mL) 稀释, 用1N HCl (水溶液) (10mL) 和盐水 (10mL) 洗涤。有机层经无水 Na_2SO_4 干燥, 然后在减压下浓缩。经硅胶柱色谱 (己烷/EtOAc=3/1) 纯化残余物以得到作为白色固体的期望产物 (100mg, 68%)。

[0478] $^1\text{H NMR}$ (600MHz, CDCl_3) δ 10.35 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.53–7.56 (m, 1H), 7.09–7.11 (m, 1H), 7.02 (s, 2H), 2.50 (s, 6H), 2.23 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (150MHz, CDCl_3) δ 160.3, 158.7, 142.4, 139.1, 139.0, 138.6, 134.3, 134.2, 133.1, 132.4, 132.4, 131.8, 110.1, 109.8, 22.3, 20.3.

[0479] 实施例61

[0480] N-(2,6-二甲氧基-吡啶-3-基)-2,4,6-三甲基-苯磺酰胺 (HJC-3-46)

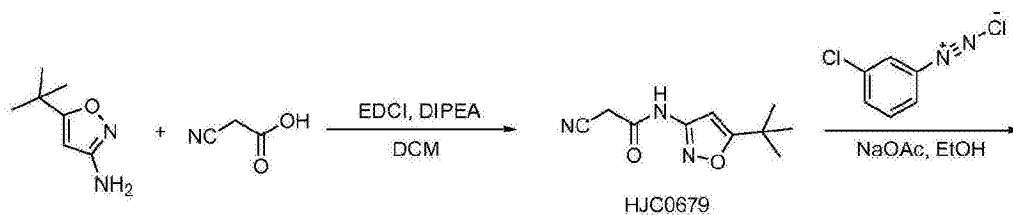


[0482] 在 0°C 下向2,6-二甲氧基-吡啶-3-基胺 (48mg, 0.25mmol) 和**菜**基磺酰氯 (65mg, 0.3mmol) 的 2mL EtOAc和2mL H_2O 溶液中添加 Na_2CO_3 (80mg, 0.75mmol)。将所得混合物在室温下搅拌16小时。溶液用EtOAc (50mL) 稀释, 用1N HCl (水溶液) (10mL) 和盐水 (10mL) 洗涤。有机层经无水 Na_2SO_4 干燥, 然后在减压下浓缩。经硅胶柱色谱 (己烷/EtOAc=3/1) 纯化残余物以得到作为淡红色固体的期望产物 (83mg, 99%)。

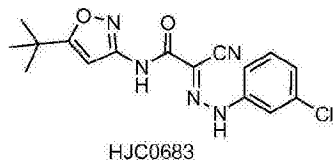
[0483] $^1\text{H NMR}$ (600MHz, CDCl_3) δ 7.57 (d, 1H, $J=8.4\text{Hz}$), 6.86 (s, 2H), 6.57 (s, 1H), 6.22 (d, 1H, $J=9.0\text{Hz}$), 3.81 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 2.55 (s, 6H), 2.25 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (150MHz, CDCl_3) δ 160.5, 155.0, 142.4, 139.7, 135.6, 133.7, 131.8, 112.8, 101.0, 53.8, 53.5, 23.1, 21.0.

[0484] 实施例62

[0485] N-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(3-氯苯基)-亚肼基]-2-氰基乙酰胺 (HJC0683)



[0486]



[0487] 向5-叔丁基-异噁唑-3-基胺(140mg, 1.0mmol)和氰基乙酸(85mg, 1.0mmol)的10mL DCM溶液中添加DIPEA(258mg, 2.0mmol)。在0℃下添加EDCI(191mg, 1.0mmol)。将所得混合物在室温下搅拌16小时。溶液用DCM(50mL)稀释,用1N HCl(水溶液)(10mL)和盐水(10mL)洗涤。有机层经无水Na₂SO₄干燥,然后在减压下浓缩。经硅胶柱色谱(己烷/EtOAc=1/1)纯化残余物以得到作为白色固体的期望产物HJC0679(163mg, 90%)。

[0488] ¹H NMR(600MHz, CDCl₃) δ10.59(s, 1H), 6.70(s, 1H), 3.65(s, 2H), 1.36(s, 9H)。¹³C NMR(150MHz, CDCl₃) δ182.9, 159.8, 157.6, 113.4, 93.7, 33.4, 28.7, 26.9。

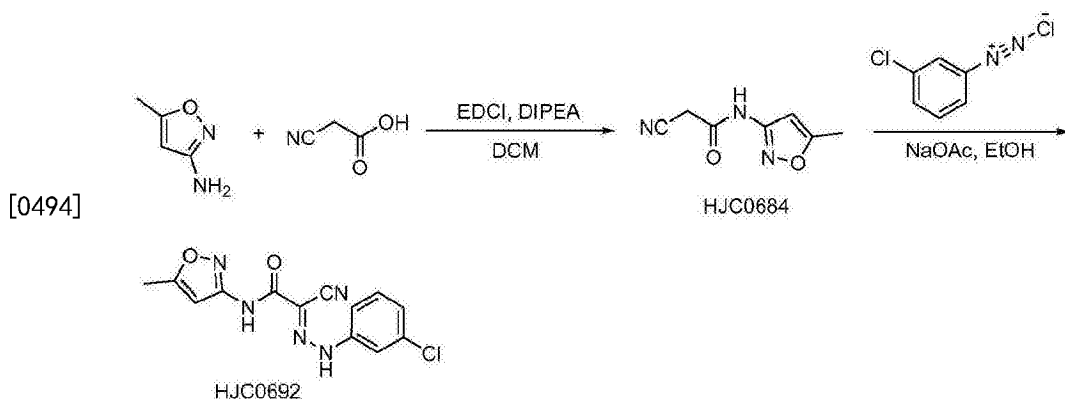
[0489] 向3-氯苯胺(25mg, 0.2mmol)的H₂O(1mL, 冷却到-5℃)溶液中添加0.2mL的1N HCl(水溶液)。向所得的酸性苯胺溶液中逐滴添加1mL亚硝酸钠(14mg, 0.2mmol)的H₂O溶液以生成芳基重氮盐溶液。向芳基重氮盐溶液中添加乙酸钠(33mg, 0.4mmol), 然后添加1mL HJC0679(29mg, 0.14mmol)的乙醇溶液。将反应混合物在0℃下搅拌5分钟, 然后倒在H₂O(2mL)上并用乙酸乙酯(20mL)萃取。有机层经Na₂SO₄干燥, 过滤并在减压下浓缩。在硅胶上用己烷/乙酸乙酯(2/1)洗脱经短柱色谱纯化残余物以提供作为黄色固体的期望产物HJC0683(32mg, 66%)。HPLC纯度96.7%(t_R=20.97分钟)。

[0490] ¹H NMR(600MHz, DMSO-d₆) δ12.04(s, 1H), 11.22(s, 1H), 7.98(s, 1H), 7.69(d, 1H, J=9.0Hz), 7.40(t, 1H, J=7.8Hz), 7.17(d, 1H, J=7.8Hz), 6.63(s, 1H), 1.32(s, 9H)。¹³C NMR(150MHz, DMSO-d₆) δ180.2, 159.5, 157.2, 143.0, 133.6, 130.4, 123.8, 115.8, 115.0, 110.6, 107.9, 93.6, 32.2, 28.1。

[0491] HRMS(ESI): C₁₆H₁₇ClN₅O₂的计算值346.1065(M+H)⁺, 实测值346.1074。

[0492] 实施例63

[0493] 2-[(3-氯苯基)-亚肼基]-2-氰基-N-(5-甲基-异噁唑-3-基)乙酰胺(HJC0692)



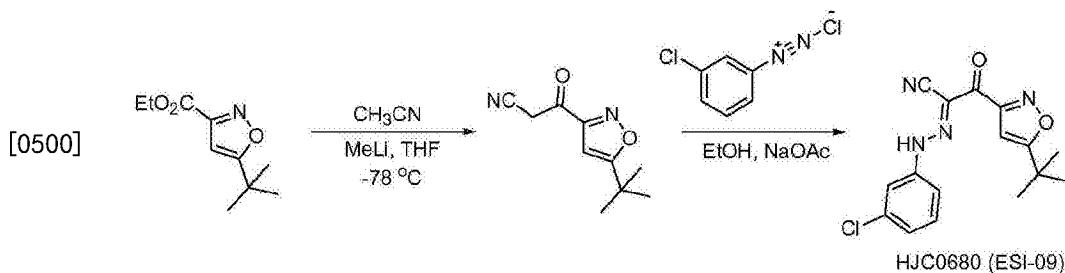
[0495] 通过与用于制备化合物HJC0683的方法类似的方法制备化合物HJC0692,产率为53% (两步)。获得作为黄色固体的标题化合物。HPLC纯度98.5% ($t_R=18.55$ 分钟)。

[0496] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 12.03 (s, 1H), 11.19 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.69 (d, 1H, $J=8.4\text{Hz}$), 7.39 (t, 1H, $J=7.8\text{Hz}$), 7.18 (d, 1H, $J=6.6\text{Hz}$), 6.67 (s, 1H), 2.43 (s, 3H). ^{13}C NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ 169.6, 159.8, 157.9, 143.4, 133.9, 130.7, 124.1, 116.1, 115.3, 110.9, 108.3, 97.0, 12.2.

[0497] HRMS (ESI): $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{ClN}_5\text{O}_2$ 的计算值304.0596 (M+H) $^+$, 实测值304.0606。

[0498] 实施例64

[0499] 3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(3-氯苯基)-亚肼基]-3-氧代-丙腈 (HJC0680, ESI-09)



[0501] 在 -78°C 下在氮气下向 CH_3CN (0.41g, 10.0mmol) 的无水THF (5mL) 溶液中添加乙醚中的1.6M甲基锂 (3.1mL, 5.0mmol)。将混合物在 -78°C 下搅拌0.5小时,然后逐滴添加THF (5mL) 中的5-叔丁基异噁唑-3-羧酸乙酯 (0.5g, 2.5mmol)。将溶液在 -78°C 下搅拌1小时,然后用乙酸 (0.3g, 5.0mmol) 淬灭。使混合物升温至 0°C ,倒入冰/水 (10mL) 中并用乙酸乙酯 (50mL) 萃取。有机层经 Na_2SO_4 干燥,过滤并在减压下浓缩。获得作为黄色油的粗制残余物 (490mg),其直接用于下一步而不进行进一步纯化。

[0502] 向3-氯苯胺 (30mg, 0.24mmol) 的 H_2O (1mL, 冷却到 -5°C) 溶液中添加0.24mL的1N HCl (水溶液)。向所得的酸性苯胺溶液中逐滴添加1mL亚硝酸钠 (16mg, 0.24mmol) 的 H_2O 溶液以生成芳基重氮盐溶液。向芳基重氮盐溶液中添加乙酸钠 (33mg, 0.4mmol),然后添加1mL粗制3-(5-叔丁基异噁唑-3-基)-3-氧代-丙腈 (38mg, 0.2mmol) 的乙醇溶液。将反应混合物在 0°C 下搅拌5分钟,然后倒在 H_2O (2mL) 上并用乙酸乙酯 (20mL) 萃取。有机层经 Na_2SO_4 干燥,过滤并在减压下浓缩。在硅胶上用己烷/乙酸乙酯 (2/1) 洗脱经短柱色谱纯化残余物以提供作

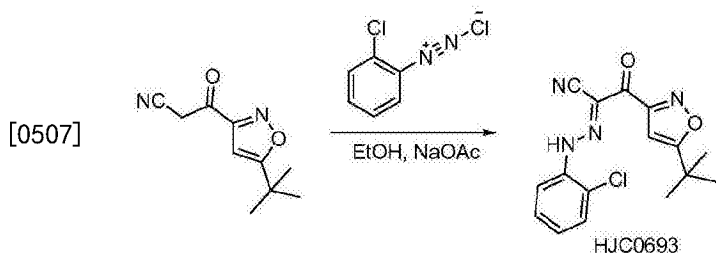
为黄色固体的期望产物ESI-09 (40mg, 61%, 由5-叔丁基-异噁唑-3-羧酸乙酯经两步得到) (mp 146°C至147°C)。HPLC纯度99.6% (t_R =21.72分钟)。

[0503] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 12.70 (br s, 1H), 7.44-7.47 (m, 3H), 7.25-7.26 (m, 1H), 6.70 (s, 1H), 1.39 (s, 9H). ^{13}C NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ 181.1, 179.4, 160.1, 143.6, 134.0, 131.2, 125.1, 116.2, 115.8, 113.4, 110.5, 100.4, 32.5, 28.5.

[0504] HRMS (ESI): $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{ClN}_4\text{O}_2$ 的计算值331.0956 (M+H) $^+$, 实测值331.0969.

[0505] 实施例65

[0506] 3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(2-氯苯基)-亚肼基]-3-氧代-丙腈 (HJC0693)



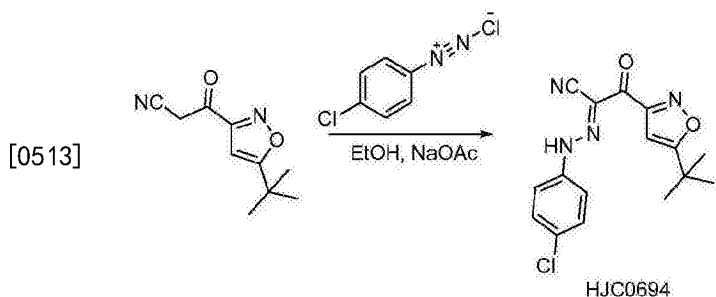
[0508] 通过与用于制备化合物HJC0680的方法类似的方法制备化合物HJC0693, 产率为76% (由5-叔丁基-异噁唑-3-羧酸乙酯经两步得到)。获得作为黄色固体的标题化合物。HPLC纯度96.6% (t_R =22.77分钟)。

[0509] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 7.53-7.60 (m, 1H), 7.47-7.52 (m, 1H), 7.37-7.46 (m, 1H), 7.22-7.36 (m, 1H), 6.66 (s, 1H), 1.34 (s, 9H). ^{13}C NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ 180.8, 178.6, 159.9, 139.3, 129.9, 128.1, 126.9, 123.5, 119.6, 114.4, 110.7, 99.9, 32.3, 28.2.

[0510] HRMS (ESI): $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{ClN}_4\text{O}_2$ 的计算值331.0956 (M+H) $^+$, 实测值331.0969.

[0511] 实施例66

[0512] 3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(4-氯苯基)-亚肼基]-3-氧代-丙腈 (HJC0694)



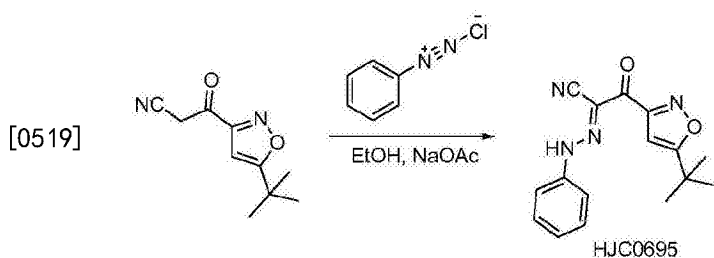
[0514] 通过与用于制备化合物HJC0680的方法类似的方法制备化合物HJC0694, 产率为75% (由5-叔丁基-异噁唑-3-羧酸乙酯经两步得到)。获得作为黄色固体的标题化合物。HPLC纯度98.1% (t_R =21.74分钟)。

[0515] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 7.46-7.60 (m, 4H), 6.64 (s, 1H), 1.36 (s, 9H). ^{13}C NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ 181.5, 179.6, 160.8, 142.5, 130.1, 129.9, 119.2, 113.3, 111.6, 100.8, 33.0, 29.0.

[0516] HRMS (ESI): $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{ClN}_4\text{O}_2$ 的计算值331.0956 (M+H) $^+$, 实测值331.0963.

[0517] 实施例67

[0518] 3-(5-叔丁基-异恶唑-3-基)-3-氧代-2-(苯基-亚肼基)-丙腈 (HJC0695)



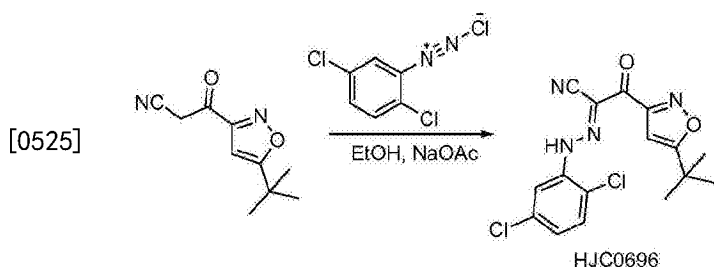
[0520] 通过与用于制备化合物HJC0680的方法类似的方法制备化合物HJC0695,产率为76% (由5-叔丁基-异恶唑-3-羧酸乙酯经两步得到)。获得作为黄色固体的标题化合物。HPLC纯度99.4% ($t_R=20.50$ 分钟)。

[0521] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 12.60 (bs, 1H), 7.49 (d, 2H, $J=7.8$ Hz), 7.42 (d, 2H, $J=7.8$ Hz), 7.20-7.23 (m, 1H), 6.66 (s, 1H), 1.37 (s, 9H). ^{13}C NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ 180.8, 179.2, 160.0, 142.1, 129.3, 125.6, 116.8, 112.2, 110.7, 100.2, 32.4, 28.3.

[0522] HRMS (ESI): $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_2$ 的计算值297.1346 (M+H) $^+$,实测值297.1355。

[0523] 实施例68

[0524] 3-(5-叔丁基-异恶唑-3-基)-2-[(2,5-二氯苯基)-亚肼基]-3-氧代-丙腈 (HJC0696)



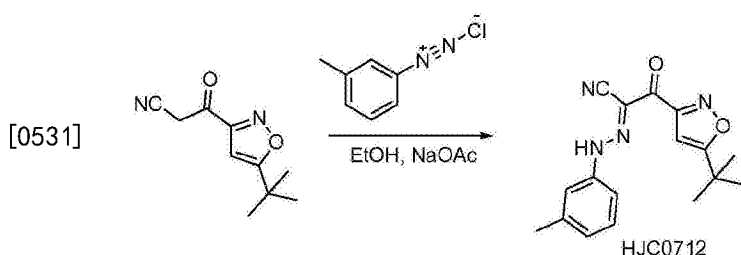
[0526] 通过与用于制备化合物HJC0680的方法类似的方法制备化合物HJC0696,产率为62% (由5-叔丁基-异恶唑-3-羧酸乙酯经两步得到)。获得作为黄色固体的标题化合物。HPLC纯度97.1% ($t_R=23.69$ 分钟)。

[0527] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 7.45-7.54 (m, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.13-7.22 (m, 1H), 6.56 (s, 1H), 1.37 (s, 9H). ^{13}C NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ 180.4, 179.6, 162.1, 147.3, 132.8, 132.0, 125.7, 125.4, 118.7, 114.4, 113.7, 100.8, 31.2, 29.0.

[0528] HRMS (ESI): $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_2$ 的计算值365.0567 (M+H) $^+$,实测值365.0576。

[0529] 实施例69

[0530] 3-(5-叔丁基-异恶唑-3-基)-3-氧代-2-(间甲苯基-亚肼基)丙腈 (HJC0712)



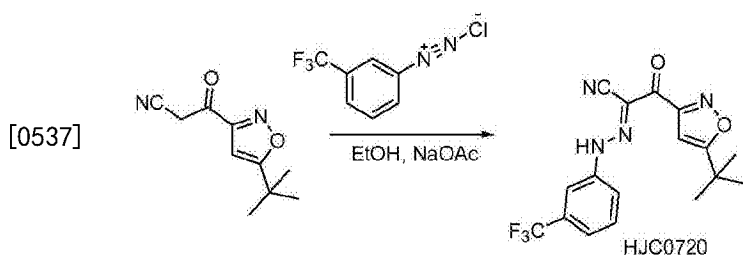
[0532] 通过与用于制备化合物HJC0680的方法类似的方法制备化合物HJC0712,产率为50% (由5-叔丁基-异恶唑-3-羧酸乙酯经两步得到)。获得作为黄色固体的标题化合物。HPLC纯度99.0% ($t_R=21.29$ 分钟)。

[0533] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 12.74 (s, 1H), 7.29-7.35 (m, 2H), 7.28 (s, 1H), 7.03-7.05 (m, 1H), 6.68 (s, 1H), 2.30 (s, 3H), 1.37 (s, 9H). ^{13}C NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ 180.9, 179.4, 160.0, 142.0, 138.9, 129.3, 126.5, 117.0, 114.4, 112.3, 110.7, 100.3, 32.4, 28.4, 21.1.

[0534] HRMS (ESI): $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_2$ 的计算值311.1503 (M+H) $^+$, 实测值311.1514.

[0535] 实施例70

[0536] 3-(5-叔丁基-异恶唑-3-基)-3-氧代-2-[(3-三氟甲基-苯基)-亚肼基]丙腈 (HJC0720)



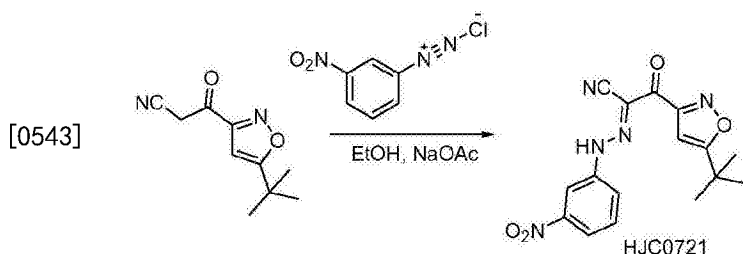
[0538] 通过与用于制备化合物HJC0680的方法类似的方法制备化合物HJC0720,产率为33% (由5-叔丁基-异恶唑-3-羧酸乙酯经两步得到)。获得作为黄色固体的标题化合物。HPLC纯度96.0% ($t_R=21.80$ 分钟)。

[0539] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 7.72-7.73 (m, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.61-7.64 (m, 1H), 7.49-7.50 (m, 1H), 6.61 (s, 1H), 1.35 (s, 9H). ^{13}C NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ 180.7, 179.3, 160.7, 130.6, 130.2, 130.0, 124.9, 123.1, 122.0, 121.4, 113.3, 111.8, 100.3, 100.2, 32.5, 28.6, 28.5.

[0540] HRMS (ESI): $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_2$ 的计算值365.1220 (M+H) $^+$, 实测值365.1230.

[0541] 实施例71

[0542] 3-(5-叔丁基-异恶唑-3-基)-2-[(3-硝基苯基)-亚肼基]-3-氧代-丙腈 (HJC0721)



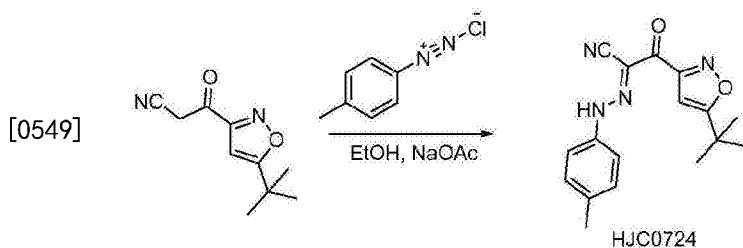
[0544] 通过与用于制备化合物HJC0680的方法类似的方法制备化合物HJC0721,产率为29% (由5-叔丁基-异恶唑-3-羧酸乙酯经两步得到)。获得作为黄色固体的标题化合物。HPLC纯度96.4% ($t_R=20.33$ 分钟)。

[0545] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 12.03 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.97 (d, 1H, $J=8.4\text{Hz}$), 7.85 (d, 1H, $J=7.8\text{Hz}$), 7.67 (t, 1H, $J=7.8\text{Hz}$), 6.62 (s, 1H), 1.37 (s, 9H). ^{13}C NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ 180.5, 179.0, 171.9, 160.8, 148.5, 130.7, 124.6, 119.1, 113.4, 112.1, 111.2, 100.1, 32.4, 28.4.

[0546] HRMS (ESI): $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_4$ 的计算值342.1197 (M+H) $^+$, 实测值342.1207.

[0547] 实施例72

[0548] 3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-3-氧代-2-(对甲苯基-亚肼基)丙腈 (HJC0724)



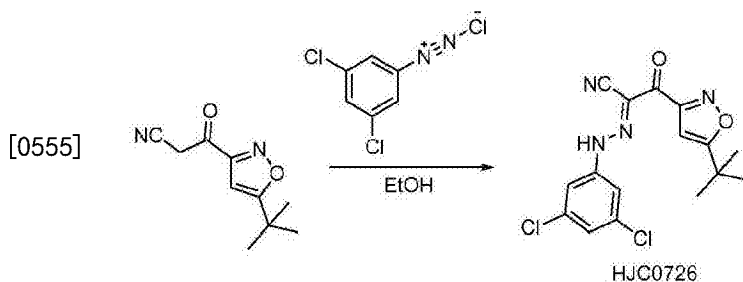
[0550] 通过与用于制备化合物HJC0680的方法类似的方法制备化合物HJC0724, 产率为31% (由5-叔丁基-异噁唑-3-羧酸乙酯经两步得到)。获得作为黄色固体的标题化合物。HPLC纯度98.6% ($t_{\text{R}}=21.36$ 分钟)。

[0551] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 12.70 (bs, 1H), 7.38 (d, 2H, $J=7.8\text{Hz}$), 7.22 (d, 2H, $J=8.4\text{Hz}$), 6.64 (s, 1H), 2.29 (s, 3H), 1.36 (s, 9H). ^{13}C NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ 181.0, 179.5, 160.3, 140.0, 135.5, 130.0, 117.0, 112.0, 111.0, 100.4, 32.6, 28.6, 20.6.

[0552] HRMS (ESI): $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_2$ 的计算值311.1503 (M+H) $^+$, 实测值311.1515.

[0553] 实施例73

[0554] 3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(3,5-二氯苯基)-亚肼基]-3-氧代-丙腈 (HJC0726)



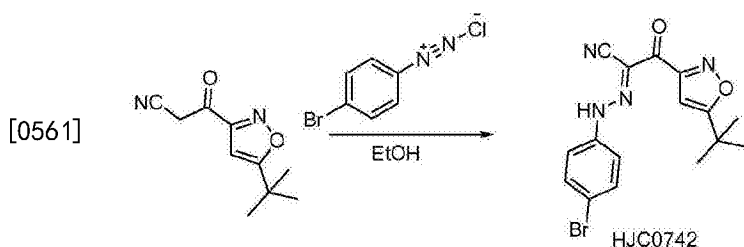
[0556] 通过与用于制备化合物HJC0680的方法类似的方法制备化合物HJC0726, 产率为41% (由5-叔丁基-异噁唑-3-羧酸乙酯经两步得到)。获得作为黄色固体的标题化合物。HPLC纯度99.0% ($t_{\text{R}}=23.20$ 分钟)。

[0557] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 12.90 (s, 1H), 7.41 (s, 2H), 7.38 (s, 1H), 6.68 (s, 1H), 1.37 (s, 9H). ^{13}C NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ 180.9, 179.2, 160.2, 145.7, 134.8, 124.1, 115.6, 114.0, 110.8, 100.3, 32.4, 28.4.

[0558] HRMS (ESI): $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_2$ 的计算值365.0567 (M+H) $^+$, 实测值365.0563.

[0559] 实施例74

[0560] 2-[(4-溴苯基)-亚肼基]-3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-3-氧代-丙腈(HJC0742)



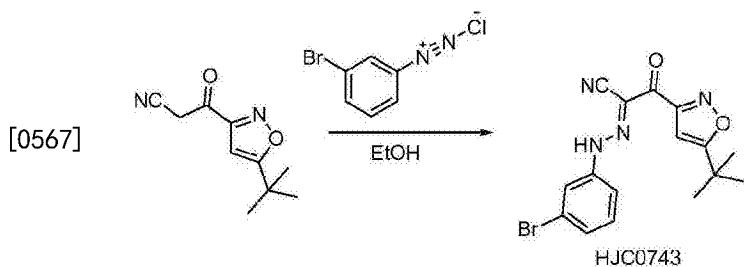
[0562] 通过与用于制备化合物HJC0680的方法类似的方法制备化合物HJC0742,产率为53%(由5-叔丁基-异噁唑-3-羧酸乙酯经两步得到)。获得作为黄色固体的标题化合物。HPLC纯度98.9%($t_R=22.01$ 分钟)。

[0563] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 12.81 (s, 1H), 7.57-7.63 (m, 2H), 7.38-7.44 (m, 2H), 6.63 (s, 1H), 1.36 (s, 9H). ^{13}C NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ 180.8, 178.9, 160.3, 142.7, 132.1, 119.1, 117.7, 112.7, 111.3, 100.2, 32.4, 28.4.

[0564] HRMS (ESI): $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{BrN}_4\text{O}_2$ 的计算值375.0451 (M+H) $^+$,实测值375.0455。

[0565] 实施例75

[0566] 2-[(3-溴苯基)-亚肼基]-3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-3-氧代-丙腈(HJC0743)



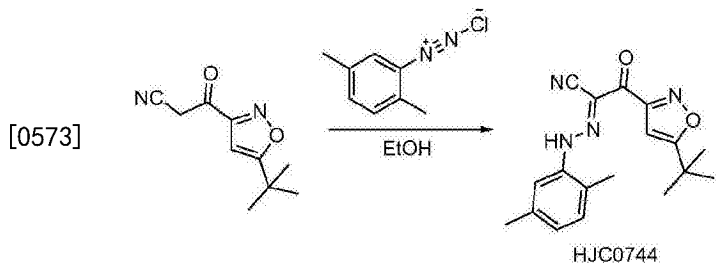
[0568] 通过与用于制备化合物HJC0680的方法类似的方法制备化合物HJC0743,产率为75%(由5-叔丁基-异噁唑-3-羧酸乙酯经两步得到)。获得作为黄色固体的标题化合物。HPLC纯度98.3%($t_R=21.93$ 分钟)。

[0569] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 12.84 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.48-7.52 (m, 1H), 7.36-7.40 (m, 2H), 6.69 (s, 1H), 1.38 (s, 9H). ^{13}C NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ 181.0, 179.3, 160.0, 143.8, 131.5, 127.9, 122.4, 119.1, 116.2, 113.4, 110.5, 100.3, 32.5, 28.4.

[0570] HRMS (ESI): $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{BrN}_4\text{O}_2$ 的计算值375.0451 (M+H) $^+$,实测值375.0456。

[0571] 实施例76

[0572] 3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(2,5-二甲基苯基)-亚肼基]-3-氧代-丙腈(HJC0744)



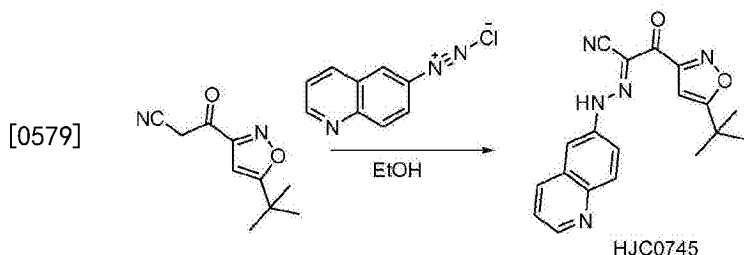
[0574] 通过与用于制备化合物HJC0680的方法类似的方法制备化合物HJC0744,产率为68% (由5-叔丁基-异恶唑-3-羧酸乙酯经两步得到)。获得作为黄色固体的标题化合物。HPLC纯度98.6% ($t_R=23.01$ 分钟)。

[0575] $^1\text{H NMR}$ (600MHz, DMSO-d_6) δ 11.82 (s, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.14 (d, 1H, $J=7.2\text{Hz}$), 6.99 (d, 1H, $J=7.2\text{Hz}$), 6.68 (s, 1H), 2.30 (s, 3H), 2.26 (s, 3H), 1.35 (s, 9H)。

[0576] HRMS (ESI) : $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_2$ 的计算值325.1659 ($\text{M}+\text{H}^+$), 实测值325.1664。

[0577] 实施例77

[0578] 3-(5-叔丁基-异恶唑-3-基)-3-氧代-2-(喹啉-6-基-亚肼基)丙腈 (HJC0745)



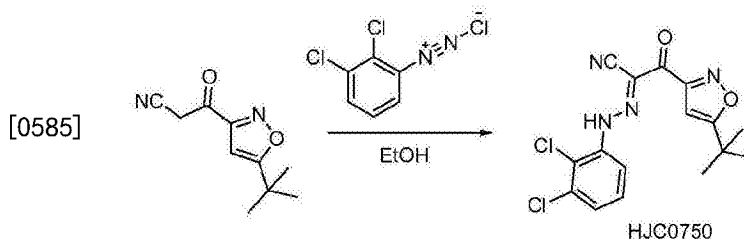
[0580] 通过与用于制备化合物HJC0680的方法类似的方法制备化合物HJC0745,产率为86% (由5-叔丁基-异恶唑-3-羧酸乙酯经两步得到)。获得作为黄色固体的标题化合物。HPLC纯度97.8% ($t_R=16.06$ 分钟)。

[0581] $^1\text{H NMR}$ (600MHz, DMSO-d_6) δ 13.27 (s, 1H), 8.86 (dd, 1H, $J=4.2\text{Hz}$, $J=1.8\text{Hz}$), 8.33 (d, 1H, $J=8.4\text{Hz}$), 8.06 (d, 1H, $J=8.4\text{Hz}$), 7.94-7.98 (m, 2H), 7.58 (dd, 1H, $J=8.4\text{Hz}$, $J=4.2\text{Hz}$), 6.70 (s, 1H), 1.40 (s, 9H)。 $^{13}\text{C NMR}$ (150MHz, DMSO-d_6) δ 180.9, 179.1, 160.3, 149.5, 145.1, 141.5, 136.3, 130.0, 128.2, 122.3, 120.3, 114.3, 113.1, 111.2, 100.4, 32.5, 28.5。

[0582] HRMS (ESI) : $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_2$ 的计算值348.1455 ($\text{M}+\text{H}^+$), 实测值348.1458。

[0583] 实施例78

[0584] 3-(5-叔丁基-异恶唑-3-基)-2-[(2,3-二氯苯基)-亚肼基]-3-氧代-丙腈 (HJC0750)



[0586] 通过与用于制备化合物HJC0680的方法类似的方法制备化合物HJC0750,产率为

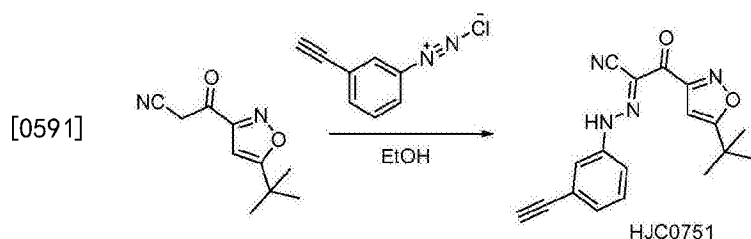
68% (由5-叔丁基-异恶唑-3-羧酸乙酯经两步得到)。获得作为黄色固体的标题化合物。HPLC纯度97.5% ($t_R=23.74$ 分钟)。

[0587] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 14.80 (s, 1H), 7.35-7.62 (m, 3H), 6.64 (s, 1H), 1.35 (s, 9H). ^{13}C NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ 181.0, 178.9, 160.5, 142.9, 132.6, 128.8, 127.0, 122.9, 118.2, 115.2, 111.5, 100.3, 32.6, 28.6.

[0588] HRMS (ESI): $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_2$ 的计算值365.0567 (M+H) $^+$, 实测值365.0568.

[0589] 实施例79

[0590] 3-(5-叔丁基-异恶唑-3-基)-2-[(3-乙炔基-苯基)-亚肼基]-3-氧代-丙腈 (HJC0751)



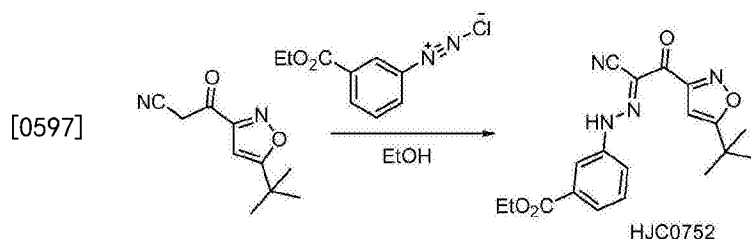
[0592] 通过与用于制备化合物HJC0680的方法类似的方法制备化合物HJC0751, 产率为69% (由5-叔丁基-异恶唑-3-羧酸乙酯经两步得到)。获得作为黄色固体的标题化合物。HPLC纯度96.2% ($t_R=20.83$ 分钟)。

[0593] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 12.80 (s, 1H), 7.54 (d, 1H, J=8.4Hz), 7.50 (s, 1H), 7.44 (t, 1H, J=7.8Hz), 7.30 (d, 1H, J=7.8Hz), 6.69 (s, 1H), 4.27 (s, 1H), 1.38 (s, 9H). ^{13}C NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ 181.2, 179.7, 160.2, 142.4, 130.1, 128.8, 123.0, 119.5, 117.9, 113.2, 110.7, 100.6, 82.9, 81.6, 32.7, 28.7.

[0594] HRMS (ESI): $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_2$ 的计算值321.1346 (M+H) $^+$, 实测值321.1350.

[0595] 实施例80

[0596] 3-{N'-[2-(5-叔丁基-异恶唑-3-基)-1-氰基-2-氧代-亚乙基]-肼基}苯甲酸乙酯 (HJC0752)



[0598] 通过与用于制备化合物HJC0680的方法类似的方法制备化合物HJC0752, 产率为74% (由5-叔丁基-异恶唑-3-羧酸乙酯经两步得到)。获得作为黄色固体的标题化合物。HPLC纯度98.8% ($t_R=21.53$ 分钟)。

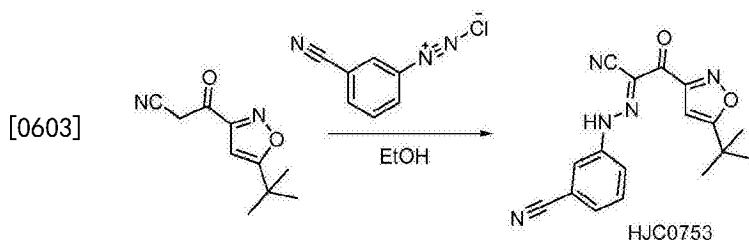
[0599] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 12.89 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.76 (d, 1H, J=7.8Hz), 7.74 (d, 1H, J=8.4Hz), 7.57 (t, 1H, J=8.4Hz), 6.67 (s, 1H), 4.32 (q, 2H, J=7.2Hz), 1.37 (s, 9H), 1.34 (t, 3H, J=7.2Hz). ^{13}C NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ 181.1, 179.2, 165.1, 159.9, 142.4,

131.2, 129.8, 125.9, 121.0, 117.3, 113.2, 110.5, 100.1, 61.0, 32.5, 28.4, 14.1.

[0600] HRMS (ESI) : $C_{19}H_{21}N_4O_4$ 的计算值 369.1557 (M+H)⁺, 实测值 369.1558.

[0601] 实施例 81

[0602] 3- $\{N'-[2-(5\text{-叔丁基-异噁唑-3-基})-1\text{-氰基-2-氧代-亚乙基}]\text{-胍基}\}$ 苄腈 (HJC0753)



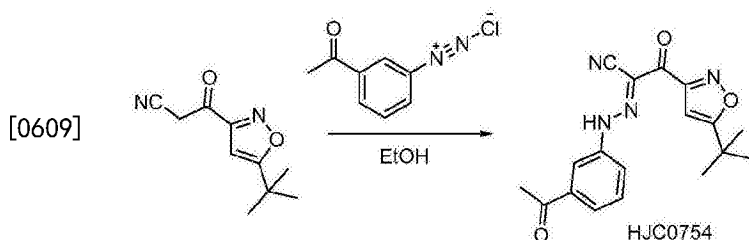
[0604] 通过与用于制备化合物 HJC0680 的方法类似的方法制备化合物 HJC0753, 产率为 58% (由 5-叔丁基-异噁唑-3-羧酸乙酯经两步得到)。获得作为黄色固体的标题化合物。HPLC 纯度 99.3% ($t_R = 19.87$ 分钟)。

[0605] 1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 7.75-7.77 (m, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.61-7.63 (m, 2H), 6.69 (s, 1H), 1.36 (s, 9H). ^{13}C NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ 181.3, 179.5, 160.3, 143.8, 131.0, 128.7, 122.0, 119.8, 118.4, 113.9, 112.4, 110.8, 100.5, 32.7, 28.6.

[0606] HRMS (ESI) : $C_{17}H_{16}N_5O_2$ 的计算值 322.1299 (M+H)⁺, 实测值 322.1303.

[0607] 实施例 82

[0608] 2- $[(3\text{-乙酰基-苯基})\text{-亚胍基}]\text{-3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-3-氧代-丙腈}$ (HJC0754)



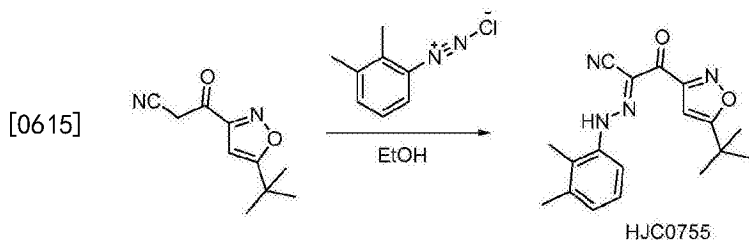
[0610] 通过与用于制备化合物 HJC0680 的方法类似的方法制备化合物 HJC0754, 产率为 68% (由 5-叔丁基-异噁唑-3-羧酸乙酯经两步得到)。获得作为黄色固体的标题化合物。HPLC 纯度 98.2% ($t_R = 19.80$ 分钟)。

[0611] 1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 8.05 (s, 1H), 7.79 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.72 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 7.57 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz), 6.66 (s, 1H), 2.57 (s, 3H), 1.37 (s, 9H). ^{13}C NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ 197.4, 181.4, 179.6, 160.2, 142.7, 138.0, 130.1, 125.6, 121.3, 116.0, 113.3, 100.7, 100.3, 32.7, 28.6, 26.8.

[0612] HRMS (ESI) : $C_{18}H_{19}N_4O_3$ 的计算值 339.1452 (M+H)⁺, 实测值 339.1459.

[0613] 实施例 83

[0614] 3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2- $[(2,3\text{-二甲基苯基})\text{-亚胍基}]\text{-3-氧代-丙腈}$ (HJC0755)



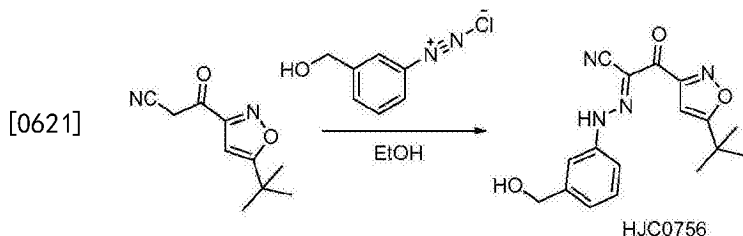
[0616] 通过与用于制备化合物HJC0680的方法类似的方法制备化合物HJC0755,产率为54% (由5-叔丁基-异噁唑-3-羧酸乙酯经两步得到)。获得作为黄色固体的标题化合物。HPLC纯度95.7% ($t_R=22.69$ 分钟)。

[0617] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 7.19-7.22 (m, 1H), 7.13-7.16 (m, 1H), 7.12-7.13 (m, 1H), 6.63 (s, 1H), 2.27 (s, 3H), 2.24 (s, 3H), 1.33 (s, 9H)。

[0618] HRMS (ESI) : $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_2$ 的计算值325.1659 (M+H) $^+$, 实测值325.1666。

[0619] 实施例84

[0620] 3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(3-羟甲基苯基)-亚肼基]-3-氧代-丙腈 (HJC0756)



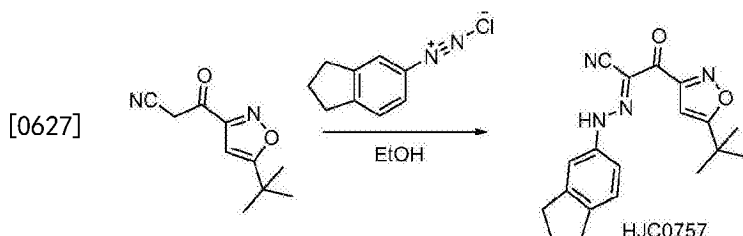
[0622] 通过与用于制备化合物HJC0680的方法类似的方法制备化合物HJC0756,产率为63% (由5-叔丁基-异噁唑-3-羧酸乙酯经两步得到)。获得作为黄色固体的标题化合物。HPLC纯度99.6% ($t_R=17.86$ 分钟)。

[0623] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 12.87 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.35-7.40 (m, 1H), 7.13-7.18 (m, 1H), 6.65 (s, 1H), 4.49 (s, 2H), 1.36 (s, 9H)。 ^{13}C NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ 180.9, 179.4, 160.0, 144.2, 142.0, 129.1, 123.6, 115.4, 114.5, 112.4, 110.7, 100.2, 62.5, 32.4, 28.4。

[0624] HRMS (ESI) : $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_3$ 的计算值327.1452 (M+H) $^+$, 实测值327.1457。

[0625] 实施例85

[0626] 3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-(茚满-5-基-亚肼基)-3-氧代-丙腈 (HJC0757)



[0628] 通过与用于制备化合物HJC0680的方法类似的方法制备化合物HJC0757,产率为57% (由5-叔丁基-异噁唑-3-羧酸乙酯经两步得到)。获得作为黄色固体的标题化合物。HPLC纯度99.6% ($t_R=22.47$ 分钟)。

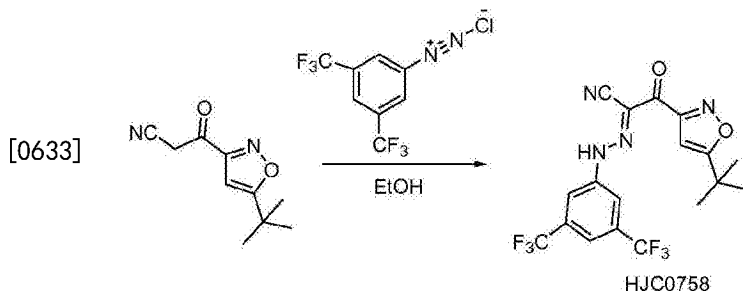
[0629] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 12.75 (s, 1H), 7.28-7.30 (m, 2H), 7.23-7.25 (m, 1H),

6.65 (s, 1H), 2.82–2.84 (m, 4H), 2.01–2.03 (m, 2H), 1.37 (s, 9H). ^{13}C NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ 181.0, 179.6, 160.3, 145.4, 141.9, 140.8, 125.0, 115.6, 112.7, 111.8, 111.0, 100.6, 32.6, 32.5, 31.9, 28.6, 25.2.

[0630] HRMS (ESI): $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_2$ 的计算值 337.1659 (M+H) $^+$, 实测值 337.1664.

[0631] 实施例 86

[0632] 2-[(3,5-双-三氟甲基-苯基)-亚肼基]-3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-3-氧代-丙腈 (HJC0758)



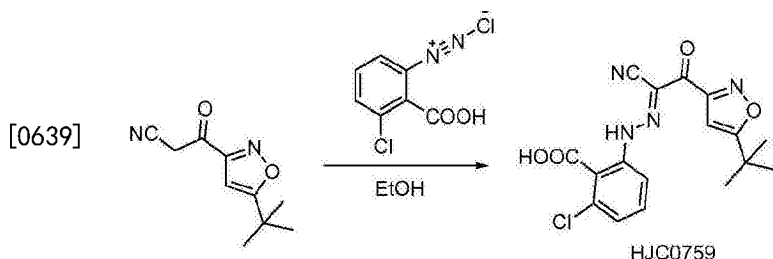
[0634] 通过与用于制备化合物 HJC0680 的方法类似的方法制备化合物 HJC0758, 产率为 43% (由 5-叔丁基-异噁唑-3-羧酸乙酯经两步得到)。获得作为黄色固体的标题化合物。HPLC 纯度 96.4% (t_{R} = 22.96 分钟)。

[0635] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 7.91 (s, 2H), 7.76 (s, 1H), 6.58 (s, 1H), 1.33 (s, 9H).

[0636] HRMS (ESI): $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{F}_6\text{N}_4\text{O}_2$ 的计算值 433.1094 (M+H) $^+$, 实测值 433.1098.

[0637] 实施例 87

[0638] 2-{N'-[2-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-1-氰基-2-氧代-亚乙基]-肼基}-6-氯-苯甲酸 (HJC0759)



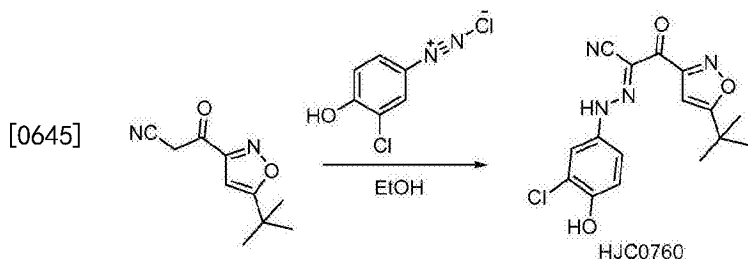
[0640] 通过与用于制备化合物 HJC0680 的方法类似的方法制备化合物 HJC0759, 产率为 60% (由 5-叔丁基-异噁唑-3-羧酸乙酯经两步得到)。获得作为黄色固体的标题化合物。HPLC 纯度 96.5% (t_{R} = 20.02 分钟)。

[0641] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 13.29 (s, 1H), 7.21–7.24 (m, 2H), 7.11–7.12 (m, 1H), 6.37 (s, 1H), 1.34 (s, 9H). ^{13}C NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ 179.1, 178.5, 167.3, 162.9, 152.3, 130.3, 129.8, 129.3, 124.5, 115.7, 114.4, 112.2, 100.3, 32.4, 28.8.

[0642] HRMS (ESI): $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{ClN}_4\text{O}_4$ 的计算值 375.0855 (M+H) $^+$, 实测值 375.0858.

[0643] 实施例 88

[0644] 3-(5-叔丁基-异噁唑-3-基)-2-[(3-氯-4-羟基-苯基)-亚肼基]-3-氧代-丙腈 (HJC0760)



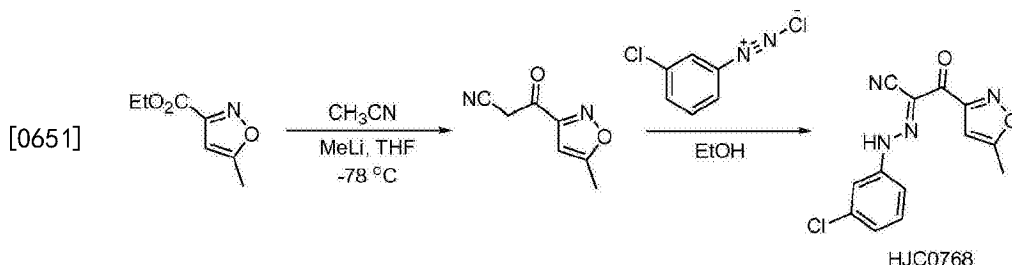
[0646] 通过与用于制备化合物HJC0680的方法类似的方法制备化合物HJC0760,产率为43% (由5-叔丁基-异噁唑-3-羧酸乙酯经两步得到)。获得作为黄色固体的标题化合物。HPLC纯度99.0% ($t_R=18.89$ 分钟)。

[0647] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 12.78 (s, 1H), 10.32 (s, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.28-7.30 (m, 1H), 6.98-7.01 (m, 1H), 6.60 (s, 1H), 1.37 (s, 9H)。

[0648] HRMS (ESI): $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{ClN}_4\text{O}_3$ 的计算值347.0905 (M+H) $^+$, 实测值347.0909。

[0649] 实施例89

[0650] 2-[(3-氯-苯基)-亚肼基]-3-(5-甲基-异噁唑-3-基)-3-氧代-丙腈 (HJC0768)



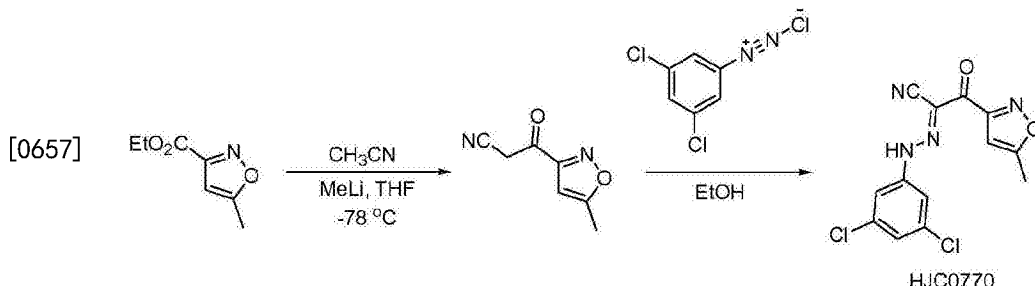
[0652] 通过与用于制备化合物HJC0680的方法类似的方法制备化合物HJC0768,产率为42% (由5-叔丁基-异噁唑-3-羧酸乙酯经两步得到)。获得作为黄色固体的标题化合物。HPLC纯度98.4% ($t_R=19.18$ 分钟)。

[0653] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 7.51 (s, 1H), 7.41-7.45 (m, 2H), 7.20-7.25 (m, 1H), 6.63 (s, 1H), 2.51 (s, 3H). ^{13}C NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ 179.3, 170.3, 160.6, 144.4, 134.1, 131.3, 125.2, 116.8, 115.9, 113.3, 111.0, 103.0, 11.8。

[0654] HRMS (ESI): $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{ClN}_4\text{O}_2$ 的计算值289.0487 (M+H) $^+$, 实测值289.0492。

[0655] 实施例90

[0656] 2-[(3,5-二氯苯基)-亚肼基]-3-(5-甲基-异噁唑-3-基)-3-氧代-丙腈 (HJC0770)



[0658] 通过与用于制备化合物HJC0680的方法类似的方法制备化合物HJC0770,产率为35% (由5-叔丁基-异噁唑-3-羧酸乙酯经两步得到)。获得作为黄色固体的标题化合物。HPLC纯度98.4% ($t_R=20.79$ 分钟)。

[0659] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 12.78 (s, 1H), 7.45 (s, 2H), 7.36 (s, 1H), 6.63 (s, 1H), 2.49 (s, 3H). ^{13}C NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ 179.1, 170.2, 160.8, 146.4, 134.9, 124.1, 116.0, 113.9, 111.2, 103.0, 11.8.

[0660] HRMS (ESI): $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_2$ 的计算值 323.0097 (M+H) $^+$, 实测值 323.0103。

[0661] 实施例91

[0662] EPAC特异性抑制剂的发现

[0663] A. 结果

[0664] EPAC拮抗剂的生物化学表征——为了确定初步筛选中鉴定的EPAC拮抗剂(图1)的相对结合亲和力,进行剂量依赖性滴定以测试这些化合物与8-NBD-cAMP竞争结合EPAC2的能力。当将不同浓度的cAMP或EPAC2拮抗剂添加到具有固定浓度的EPAC2和8-NBD-cAMP的反应混合物中后,观察到8-NBD-cAMP荧光的剂量依赖性降低(图7A)。虽然cAMP与8-NBD-cAMP竞争结合的表现 IC_{50} 为 $39\mu\text{M}$,但是所有所选择的EPAC2拮抗剂都显示出增强的效力,并且表现 IC_{50} 为 $0.48\mu\text{M}$ 至 $18\mu\text{M}$ (表1)。为了确定EPAC2拮抗剂的这种表现高亲和力结合是否可转化为抑制EPAC2 GEF活性相当的功效,本发明人还确定了这些EPAC2拮抗剂中三种的Rap1-GDP交换活性的抑制曲线。如图7B所示,化合物ESI-05、ESI-07和ESI-09抑制cAMP介导的EPAC2 GEF活性,并且表现 IC_{50} 分别为 $1.4\mu\text{M}$ 、 $0.43\mu\text{M}$ 或 $0.7\mu\text{M}$ (表2)。因为这些拮抗剂是使用EPAC2作为靶标鉴定的,所以本发明人测试了这些化合物在抑制cAMP介导的EPAC1 GEF活性方面是否也是有效的。虽然化合物ESI-09以与EPAC2类似的剂量依赖性方式抑制EPAC1介导的Rap1-GDP交换活性并且表现 IC_{50} 为 $3.2\mu\text{M}$,但是化合物ESI-05和ESI-07在抑制EPAC1 GEF活性方面是完全无效的(图7B)。为了测试ESI-05、ESI-07和ESI-09的特异性,进行了逆筛选测定,分别测量了I型和II型PKA全酶活性。 $25\mu\text{M}$ 的ESI-05、ESI-07和ESI-09不显著改变cAMP诱导的I型和II型PKA全酶活化,而H89(选择性PKA抑制剂)完全阻断了I型和II型PKA活性(图8)。

[0665] 表1:ESI与8-NBD-cAMP竞争结合EPAC2的表现 IC_{50} 值。

[0666]

化合物	表现 IC_{50} (μM)	相对效力 (RA) *
cAMP	39 ± 2.0	1.0
ESI-04	6.7 ± 0.7	5.8
ESI-05	0.48 ± 0.03	81
ESI-06	1.0 ± 0.2	39
ESI-07	0.67 ± 0.03	57
ESI-08	8.7 ± 1.1	4.5
ESI-09	10 ± 1.2	3.9
ESI-10	18 ± 2.0	2.2

[0667] * $\text{RA} = \text{IC}_{50, \text{cAMP}} / \text{IC}_{50, \text{化合物}}$

[0668] 表2:ESI抑制EPAC1和EPAC2 GEF活性的表现 IC_{50} 值。

[0669]

化合物	EPAC1 IC_{50} (μM)	EPAC2 IC_{50} (μM)
ESI-05	NMA*	0.43 ± 0.06

ESI-07	NMA*	0.72±0.08
ESI-09	3.2±0.4	1.4±0.1

[0670] *NMA:无可测量活性

[0671] EPAC拮抗剂的细胞表征——为了测试新鉴定的EPAC拮抗剂是否能够调节活细胞中的EPAC活化,监测了这些化合物在抑制EPAC介导的Rap1细胞活化方面的能力。如图8A所示,当用EPAC选择性cAMP类似物8-(4-氯苯硫基)-2'-O-甲基腺苷-3',5'-环单磷酸乙酰氧基甲酯(007-AM)处理异位表达全长EPAC2蛋白的HEK293细胞,观察到GTP结合的细胞Rap1的级分提高。用10 μ M化合物ESI-05、ESI-07和ESI-09对HEK293/EPAC2细胞进行预处理导致007-AM诱导的Rap1活化显著降低,而ESI-08效果小得多。另一方面,当使用异位表达全长EPAC1蛋白的HEK293细胞时,仅化合物ESI-09有效阻断007-AM诱导的Rap1活化,而化合物ESI-05和ESI-07无效(图8B)。这些结果与图7B所示的生物化学Rap1交换数据相一致,进一步确定了化合物ESI-05和ESI-07是EPAC2特异性拮抗剂,而化合物ESI-09是泛EPAC(pan-EPAC)拮抗剂。

[0672] 除了介导cAMP诱导的Rap1活化之外,还已知EPAC蛋白活化Akt/PKB信号传导途径,而PKA抑制Akt/PKB活化(Mei等.(2002) J. Biol. Chem. 277:11497-11504)。为了确定ESI-09是否能够阻断EPAC1或EPAC2介导的Akt活化,使用抗磷酸化-Akt抗体追踪HEK293/EPAC1或HEK293/EPAC2细胞中以及表达内源性水平EPAC的血管平滑肌细胞(VSMC)中Akt的T308和S473的磷酸化状态。正如预期的,007-AM导致T308和S473二者的Akt磷酸化提高。在施用007-AM之前用10 μ MESI-09进行预处理完全阻断了EPAC1和EPAC2介导的Akt磷酸化。使用人血管平滑肌细胞中内源性表达的EPAC1和EPAC2获得了类似结果(图10)。这些结果证明,ESI-09能够抑制EPAC1和EPAC2介导的细胞功能。

[0673] ESI-09抑制胰腺癌迁移——新型EPAC特异性抑制剂的发现为操纵cAMP信号传导途径和研究EPAC蛋白的生理学功能提供了新的工具。最近报道称EPAC1在胰腺癌中是过表达的(Lorenz等.(2008) Pancreas 37:102-103)。但是,这种肿瘤中EPAC1升高的功能作用并不清楚。本发明人试图采用ESI-09来确定EPAC1信号传导在胰腺癌中的作用。用ESI-09处理乙酰胺细胞不显著影响细胞增殖和存活力(图11)。另一方面,用10.0 μ M ESI-09进行预处理后,使用转板迁移/侵袭和伤口愈合迁移测定在三个胰腺癌细胞系AsPC-1、BxPC-3和PANC-1中观察到细胞迁移的显著降低(图12A&12B)。为了确定所观察到的对细胞迁移的影响是否是EPAC1特异性的,使用RNAi检查了抑制EPAC1表达对AsPC-1和PANC-1迁移的作用。如图12C & 12D所示,shEPAC1克隆C28导致EPAC1表达接近完全的敲低(knockdown),并且显著抑制了两个细胞系的迁移,而shEPAC1克隆C32的EPAC1表达的略微降低对其迁移能力没有影响。这些结果与ESI-09抑制胰腺癌迁移的事实一起表明EPAC1促进胰腺癌细胞迁移。为了进一步确定ESI-09如何抑制PDA细胞迁移和侵袭,使用I型胶原基质进行细胞粘附测定。如图13所示,007-AM导致AsPC-1和PANC-1细胞二者的细胞粘附提高,而用ESI-09进行预处理以剂量依赖方式使007-AM诱导的细胞粘附降低。为了确定ESI-09的体内抗转移作用,将稳定表达荧光素酶的MIA PaCa-2原位移植到无胸腺裸鼠的胰腺内。将小鼠随机地分为两组并分别用载体或ESI-09(50mg/kg/天,经口管饲法)处理。使用IVIS生物发光成像系统进行每周的生物发光成像来监测肿瘤的生长和转移。如图14所示,ESI-09处理使PDA转移降低。

[0674] B. 实验步骤

[0675] Rap1活化测定——如较早期 (Mei和Cheng (2005) *Molecular Biosystems* 1:325-331) 所述的,采用Ral-GDS-RBD-GST亲和珠进行来源于稳定表达EPAC1或EPAC2的人血管平滑肌细胞和HEK293细胞的裂解物的下拉实验 (pull-down) 确定了Rap1的细胞活化。

[0676] Akt的磷酸化——通过SDS-PAGE分离经多种试剂处理的细胞裂解物中的细胞蛋白质并将其转移至聚偏二氟乙烯膜。使用抗磷酸T308 PKB抗体 (1:1000) 和抗磷酸S473 PKB抗体 (1:1000) 通过免疫印迹分析探测Akt活化的水平。每个Western印迹进行至少三次独立实验。

[0677] 胰岛素分泌测定——将INS-1细胞以 1×10^5 个细胞/孔的密度平板接种到用聚赖氨酸预包被的96孔板中。过夜孵育之后,将培养基替换为包含2.9mM葡萄糖的Krebs-Ringer缓冲液 (KRB)。在另外的两小时孵育之后,在包含16.7mM葡萄糖的新鲜KRB中用受试化合物或作为对照的DMSO载剂将细胞预处理10分钟,然后通过 $10 \mu\text{M}$ 的007-am刺激30分钟。收集上清液并使用来自Crystal Chem Inc的超敏大鼠胰岛素ELISA试剂盒 (Ultra Sensitive Rat Insulin ELISA kit) 使其经历胰岛素定性。

[0678] 转板迁移/侵袭测定——用BD Matrigel™基底膜基质 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 涂覆8微米插入件 (Costar Inc) 的顶室。将经 $10.0 \mu\text{M}$ ESI-09预处理24小时的细胞 (2×10^5 个) 添加到包含0.25%BSA的无血清RPMI培养基中的插入件顶室中。底室填充有600.0 μL 包含10%FBS和 $10.0 \mu\text{M}$ ESI-09的RPMI。然后将细胞在37 $^{\circ}\text{C}$ 下在5%CO₂中孵育20小时。将细胞从顶室中移出,使迁移细胞在甲醇中固定并用结晶紫染色。从四个不同视野中对迁移细胞的数目进行计数。

[0679] 伤口愈合测定——在制造刮伤之前使细胞生长至95%至100%汇合率。将培养基更换为包含 $10.0 \mu\text{M}$ ESI-09的RPMI 10%FBS。然后将细胞在37 $^{\circ}\text{C}$ 下在5%CO₂中孵育。在更换培养基后0小时和22小时对创伤进行成像。根据以下公式计算以1.0mm伤口归一化的伤口闭合百分比来确定愈合速率: %伤口闭合 = (用ES-09处理之前伤口边缘之间的距离 - 用ES-09处理后22小时伤口边缘之间的距离) / 1.0×100 。

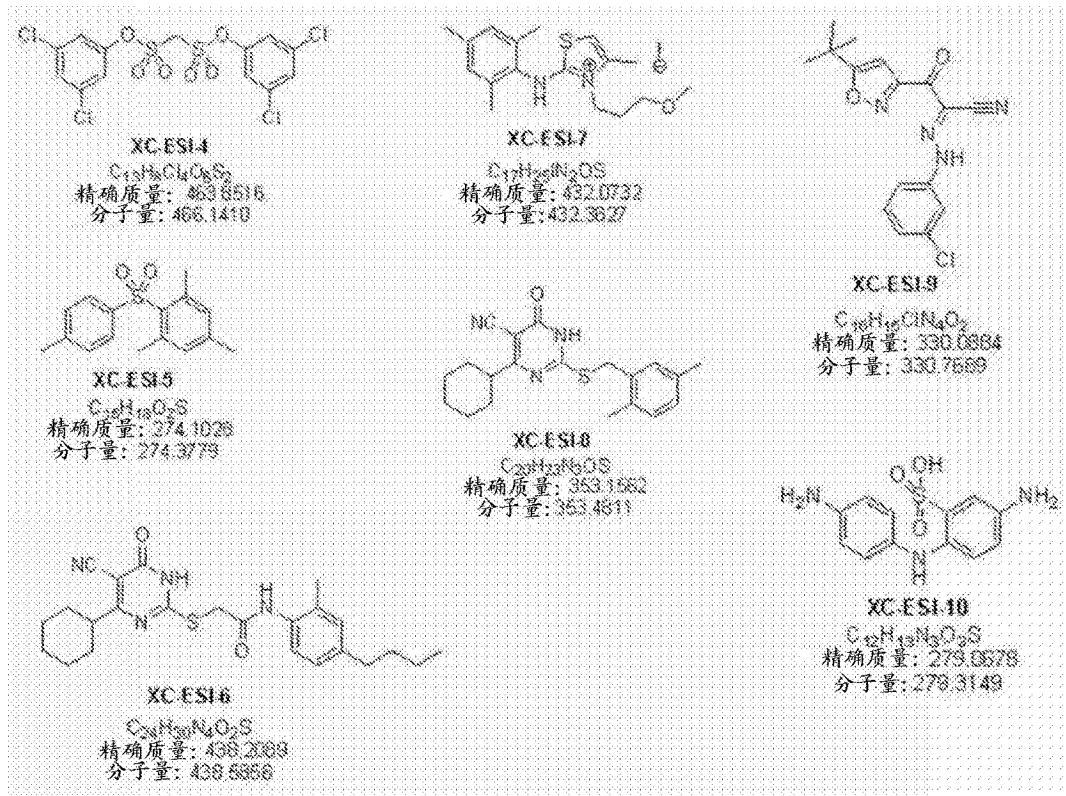


图1

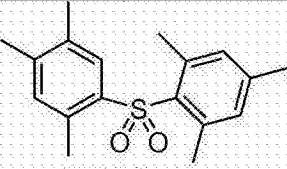
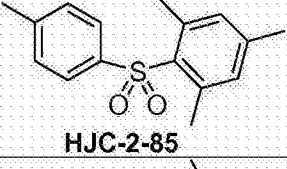
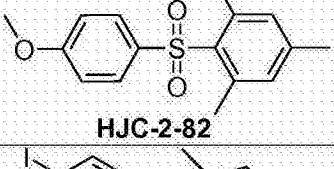
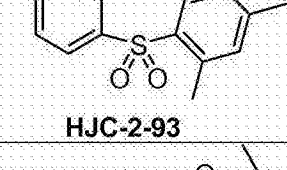
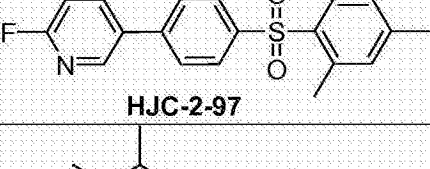
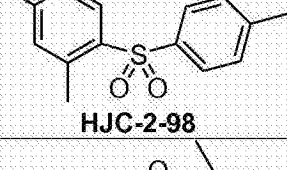
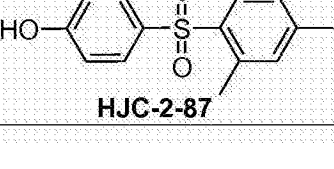
化学结构	IC ₅₀ (μM)
 HJC-2-71	0.7
 HJC-2-85	1.0
 HJC-2-82	1.9
 HJC-2-93	4-10 ^{*a}
 HJC-2-97	3-10 ^{*a}
 HJC-2-98	9-30 ^{*a}
 HJC-2-87	14

图2

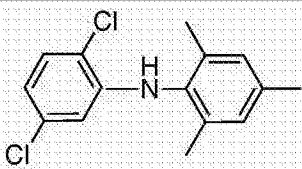
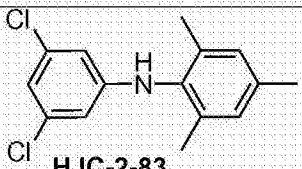
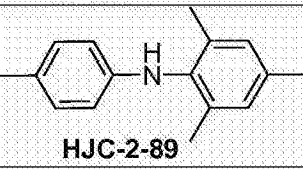
化学结构	IC ₅₀ (μM)
 HJC-3-38	0.4
 HJC-2-83	0.9
 HJC-2-89	3.8-10 ^{*a}

图3

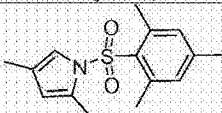
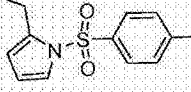
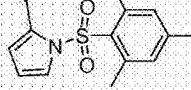
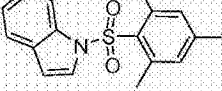
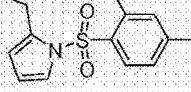
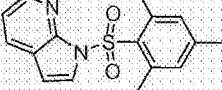
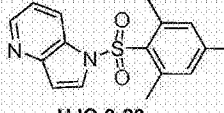
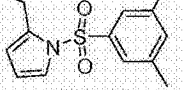
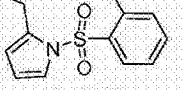
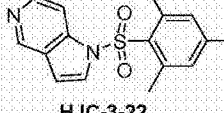
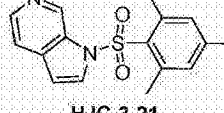
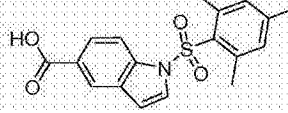
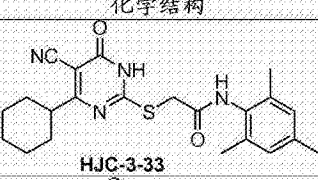
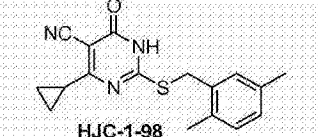
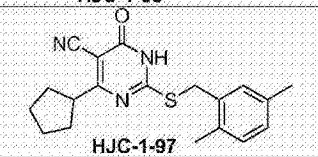
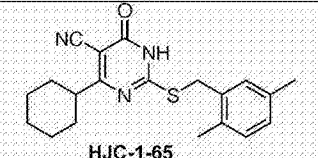
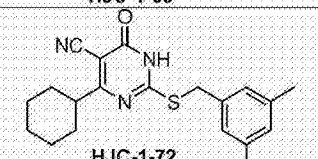
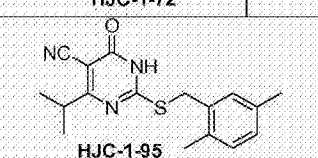
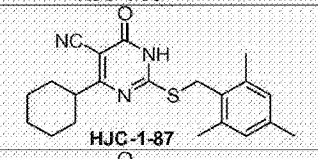
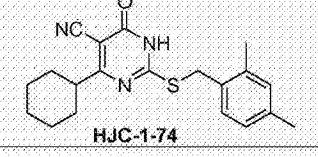
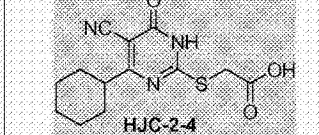
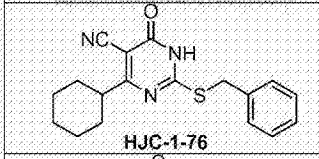
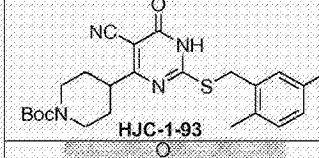
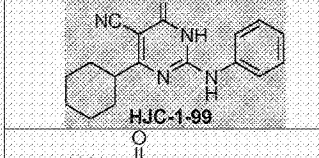
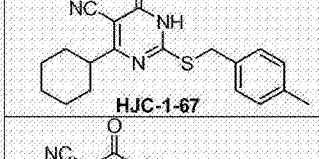
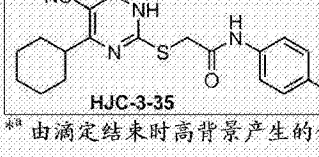
化学结构	IC ₅₀ (μM)
 HJC-3-50	0.4* ^a
 HJC-3-26	0.4* ^a
 HJC-2-79	0.5
 HJC-2-77	1.2
 HJC-3-55	1.3* ^a
 HJC-2-81	2.4
 HJC-3-23	3.8* ^a
 HJC-3-54	4.7* ^a
 HJC-3-53	5.3* ^a
 HJC-3-22	8.9* ^a
 HJC-3-21	13* ^a
 HJC-3-62	11* ^a

图4

化学结构	IC ₅₀ (μM)	
 HJC-3-33	4	
 HJC-1-98	4.0 ^{*a}	
 HJC-1-97	5.9	
 HJC-1-65	8.3	
 HJC-1-72	7.0	
 HJC-1-95	13	
 HJC-1-87	12	
 HJC-1-74	16	
 HJC-2-4		高, CND ^{*b}
 HJC-1-76		31
 HJC-1-93		29
 HJC-1-99		30-100
 HJC-1-67		38
 HJC-3-35		30-100

^{*a} 由滴定结束时高背景产生的估计IC₅₀

^{*b} IC₅₀ 太高而不能测定

图5

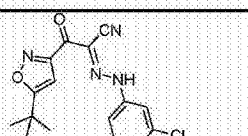
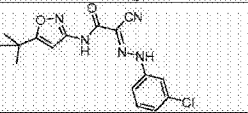
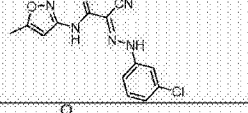
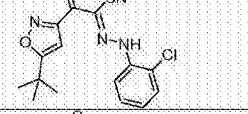
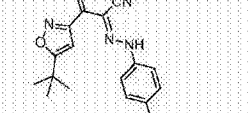
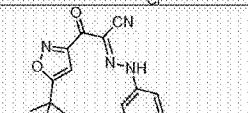
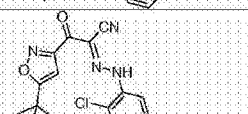
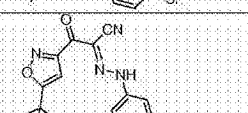
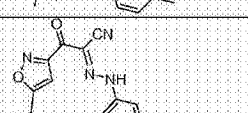
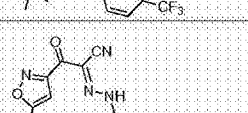
编号	结构	HPLC	HRMS	IC ₅₀ (μ M)
ESI-09		$t_R = 21.72$ 分钟 99.6%	331.0969	4.4
HJC0683		$t_R = 20.97$ 分钟 96.7%	346.1074	>300
HJC0692		$t_R = 18.55$ 分钟 98.5%	304.0606	>300
HJC0693		$t_R = 22.77$ 分钟 96.6%	331.0969	34
HJC0694		$t_R = 21.74$ 分钟 98.1%	331.0963	20
HJC0695		$t_R = 20.50$ 分钟 99.4%	297.1355	73
HJC0696		$t_R = 23.69$ 分钟 97.1%	365.0576	7.7
HJC0712		$t_R = 21.29$ 分钟 99.0%	311.1514	22.7
HJC0720		$t_R = 21.80$ 分钟 96.0%	365.1230	15.6
HJC0721		$t_R = 20.33$ 分钟 96.4%	342.1207	30

图6

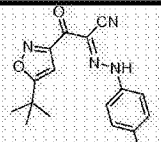
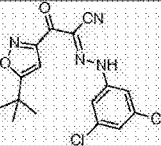
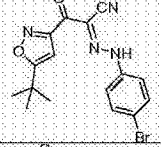
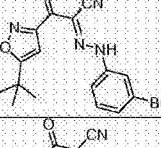
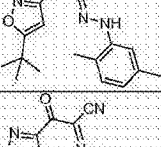
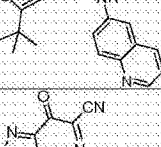
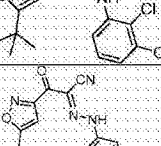
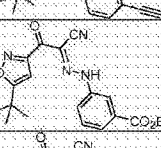
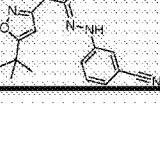

HJC0724		$t_R = 21.36$ 分钟 98.6%	311.1515	57
HJC0726		$t_R = 23.20$ 分钟 99.0%	365.0563	1.0
HJC0742		$t_R = 22.01$ 分钟 98.9%	375.0455	16
HJC0743		$t_R = 21.93$ 分钟 98.3%	375.0456	11
HJC0744		$t_R = 23.01$ 分钟 98.6%	325.1664	>300
HJC0745		$t_R = 16.09$ 分钟 97.8%	348.1458	77
HJC0750		$t_R = 23.74$ 分钟 97.5%	365.0568	25
HJC0751		$t_R = 20.83$ 分钟 96.2%	321.1350	72
HJC0752		$t_R = 21.53$ 分钟 98.8%	369.1558	85
HJC0753		$t_R = 19.87$ 分钟 99.3%	322.1303	72

图6 (续)

HJC0754		$t_R = 19.80$ 分钟 98.2%	339.1459	>300
HJC0755		$t_R = 22.69$ 分钟 95.7%	325.1666	270
HJC0756		$t_R = 17.86$ 分钟 99.6%	327.1457	>300
HJC0757		$t_R = 22.47$ 分钟 99.6%	337.1664	27
HJC0758		$t_R = 22.96$ 分钟 96.4%	433.1098	6.8
HJC0759		$t_R = 20.02$ 分钟 96.5%	375.0858	>300
HJC0760		$t_R = 18.89$ 分钟 99.0%	347.0909	>300
HJC0768		$t_R = 19.18$ 分钟 98.4%	289.0492	106
HJC0770		$t_R = 20.79$ 分钟 98.4%	323.0103	18

图6(续)

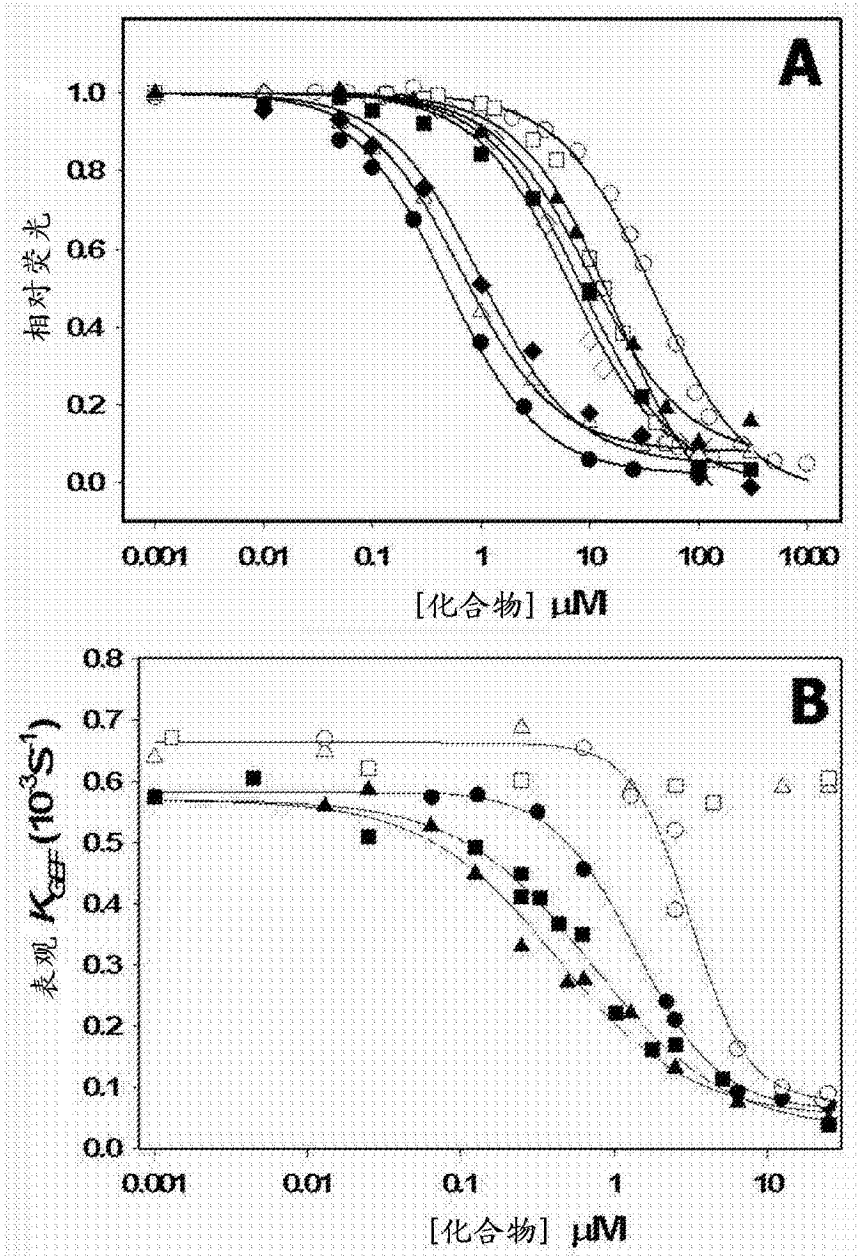


图7A-7B

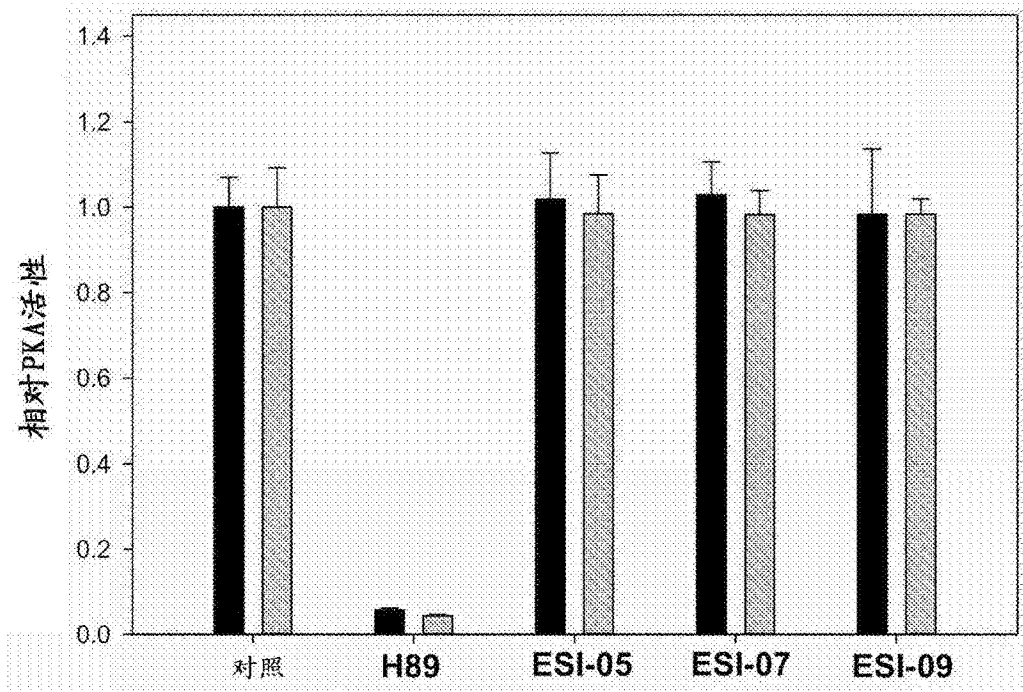


图8

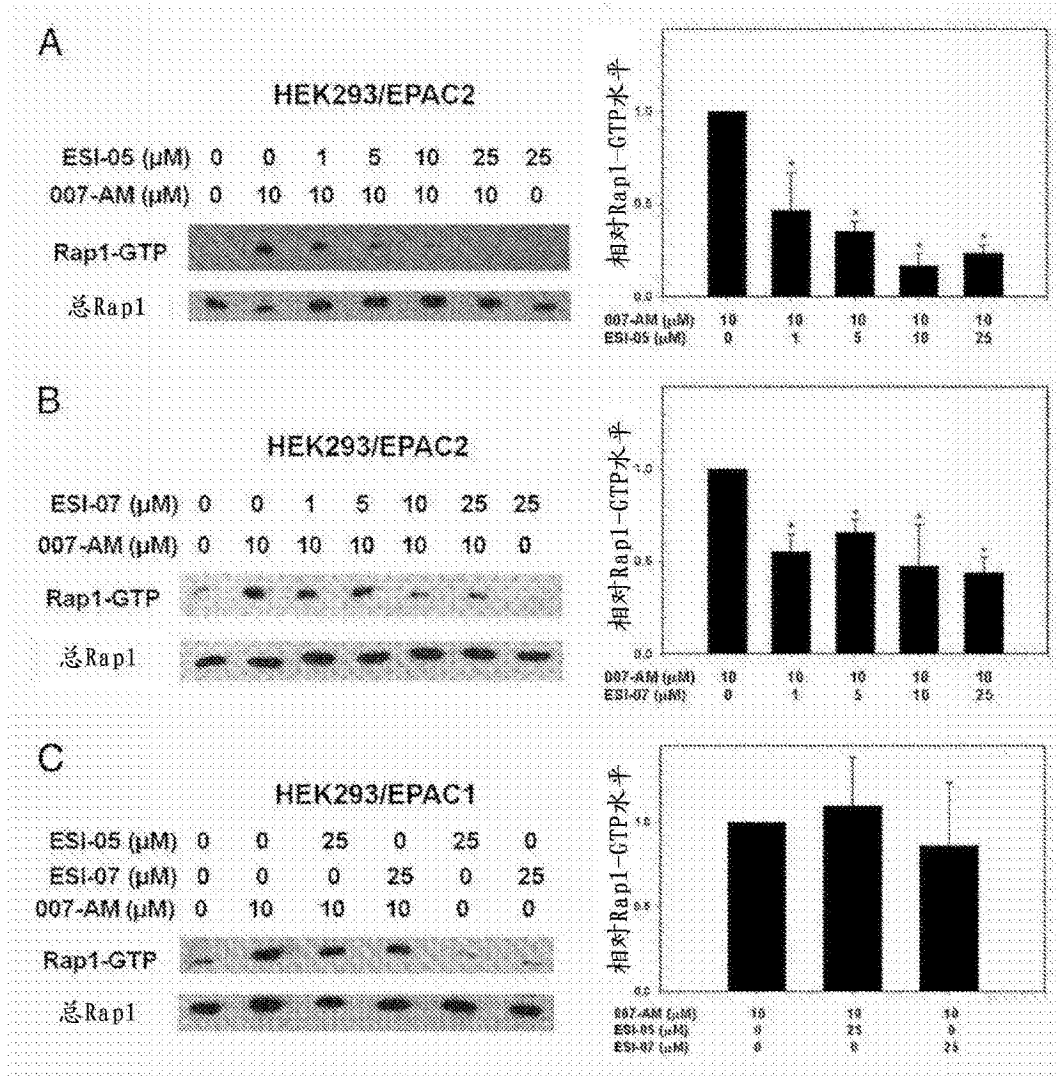


图9A-9B

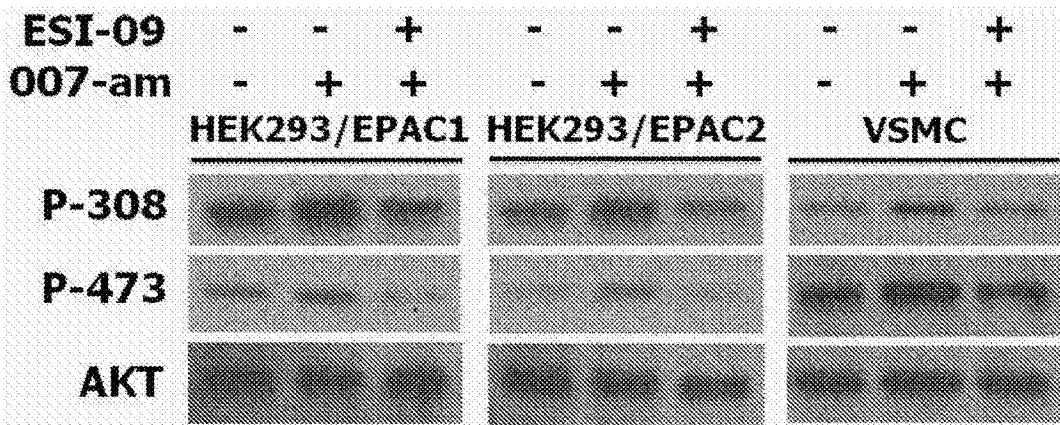


图10

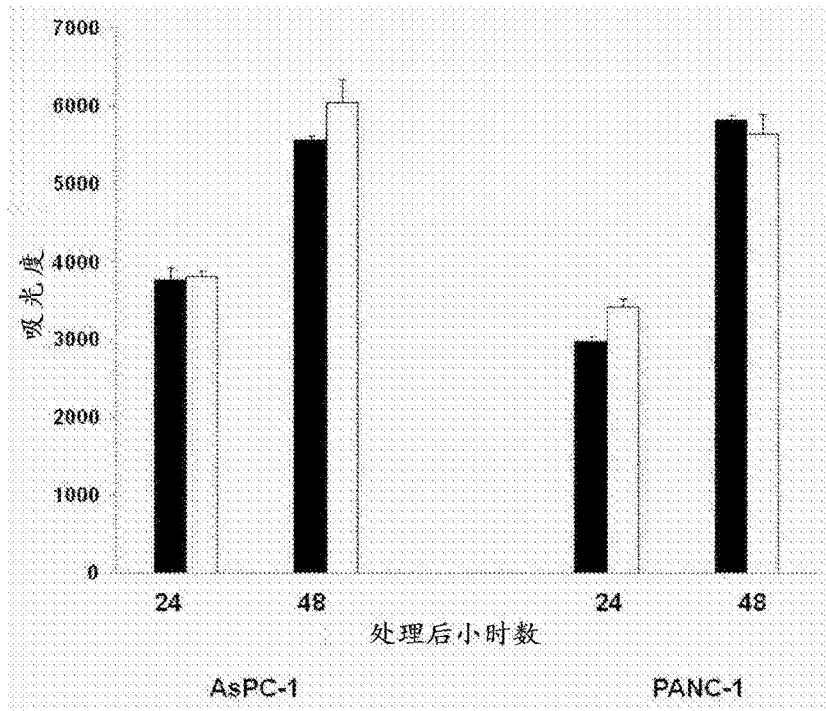


图11

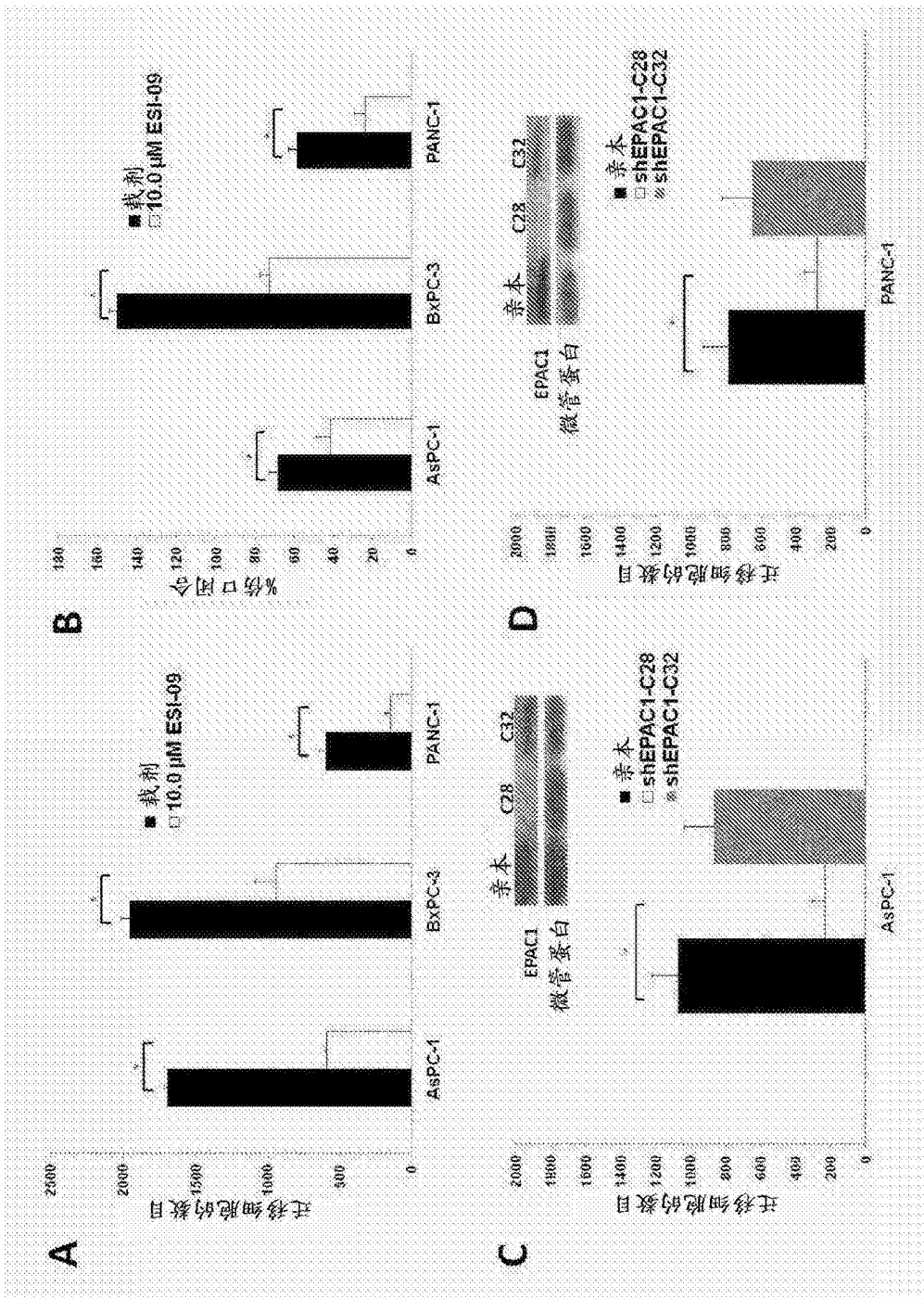


图12A-12D

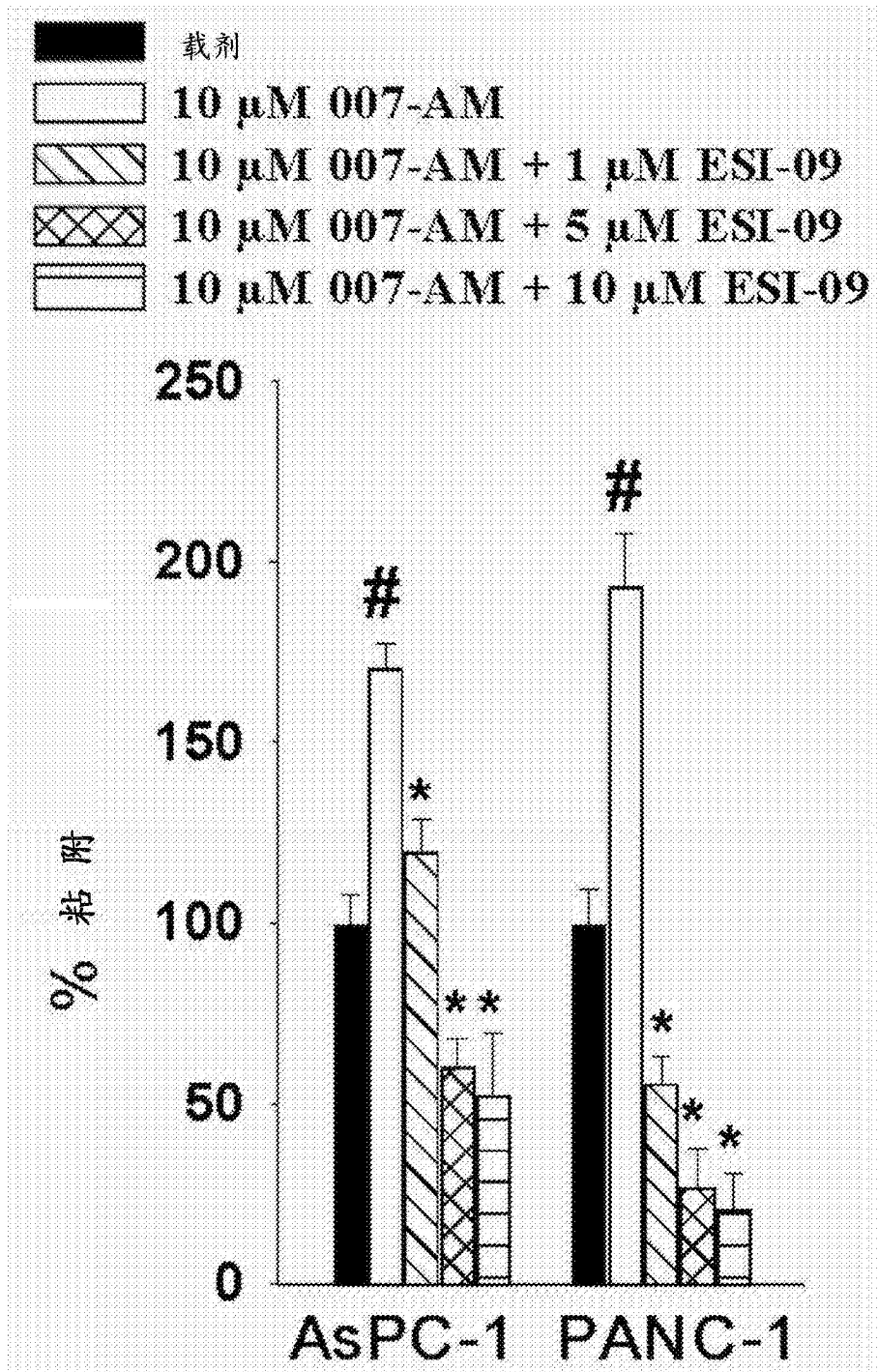


图13

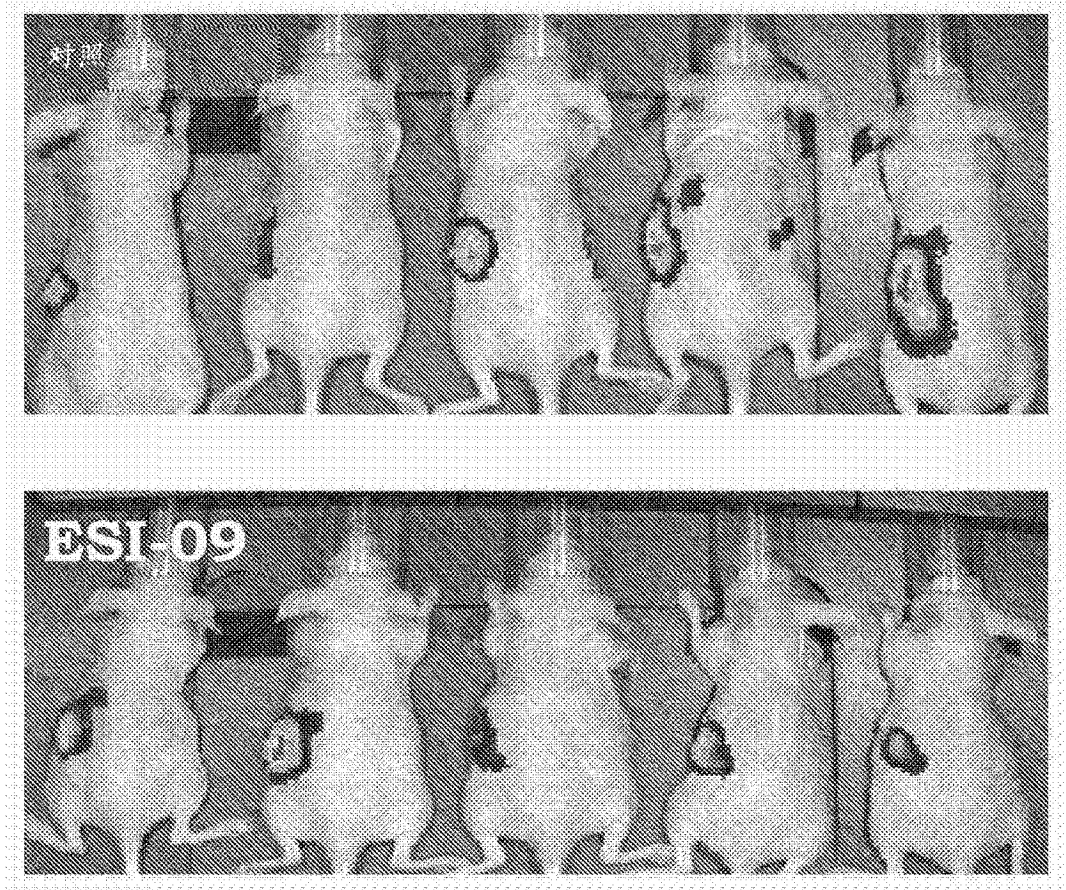


图14

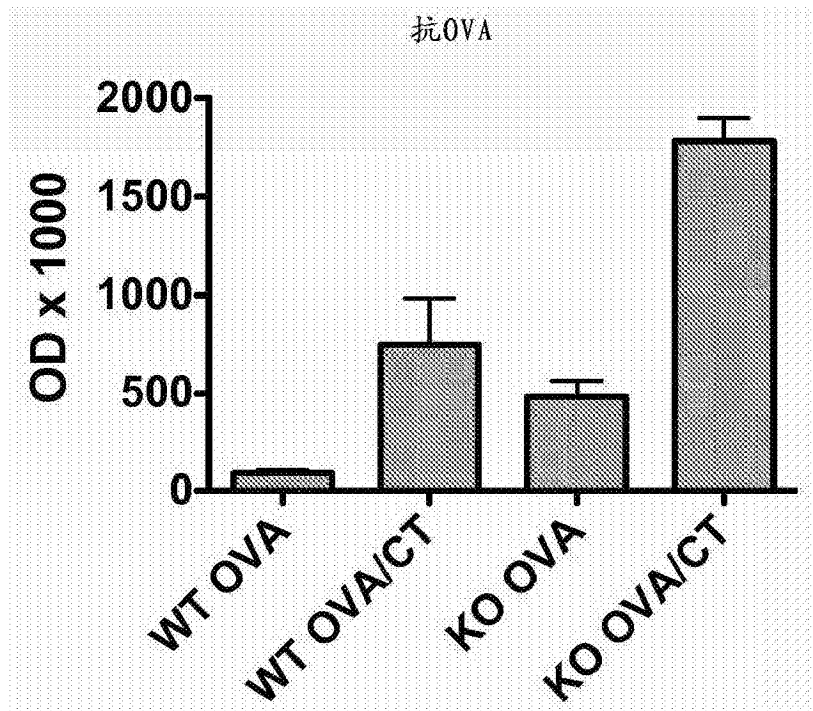


图15

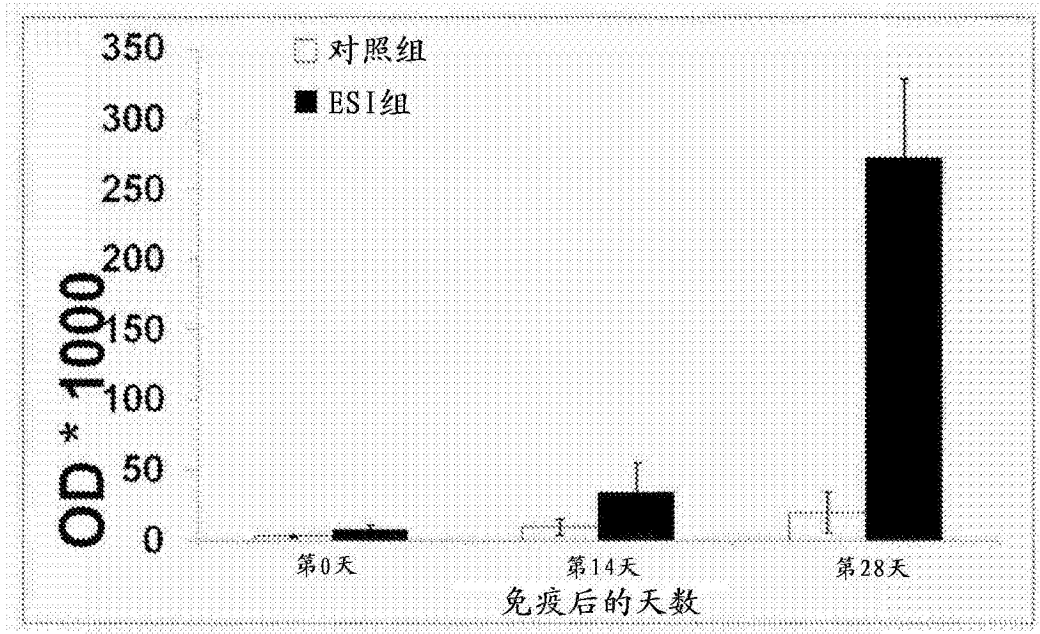


图16

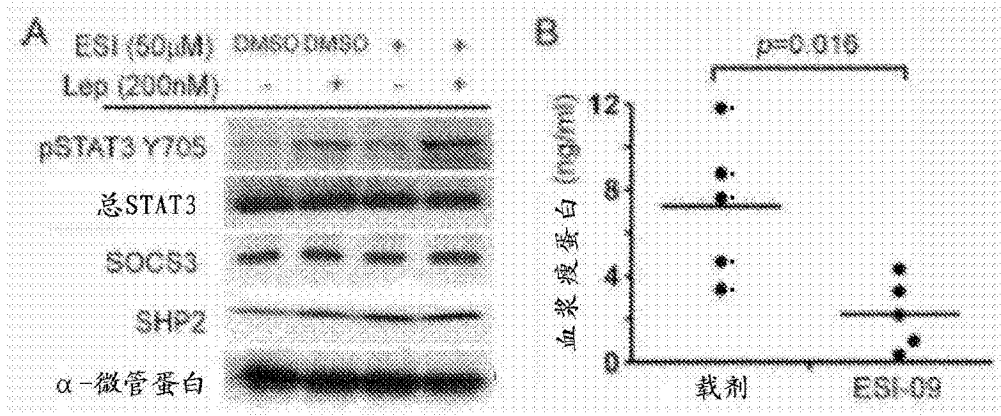


图17A-17B

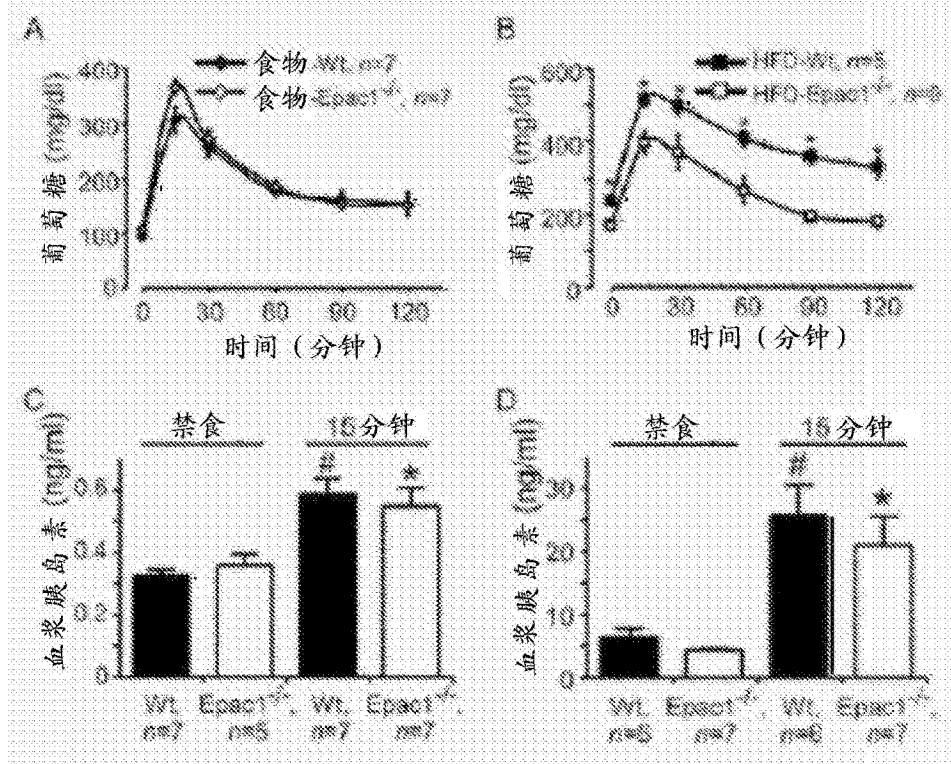


图18A-18D

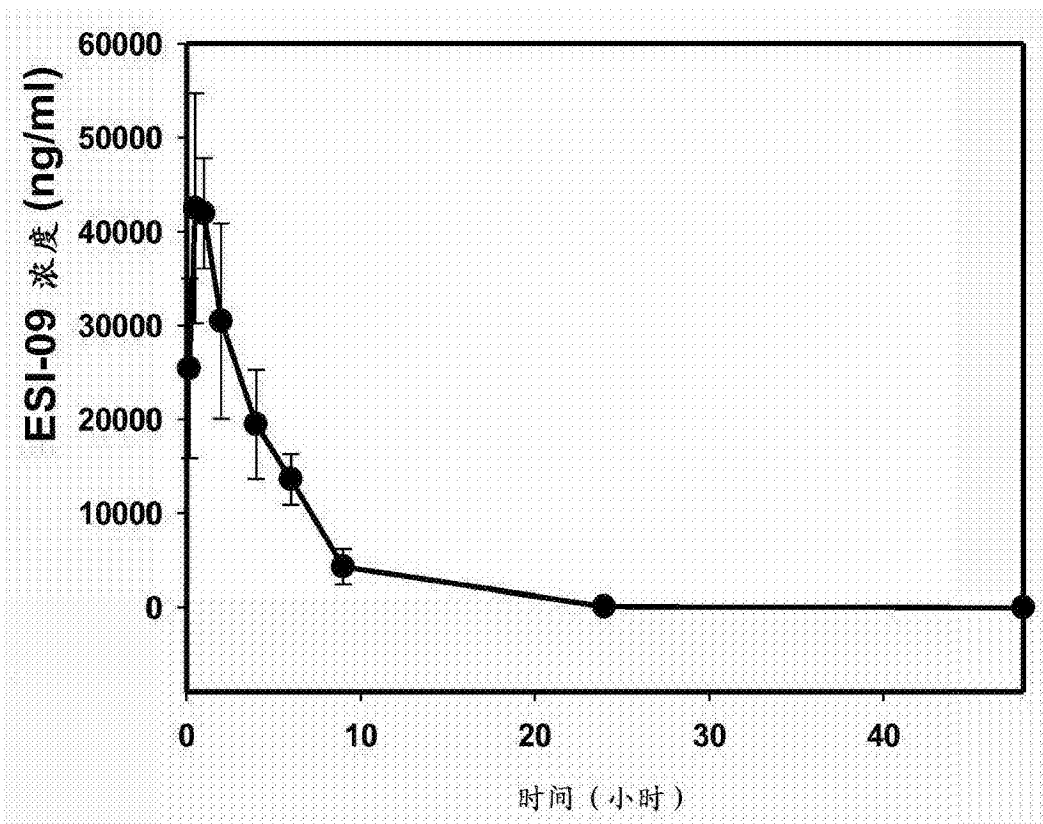


图19

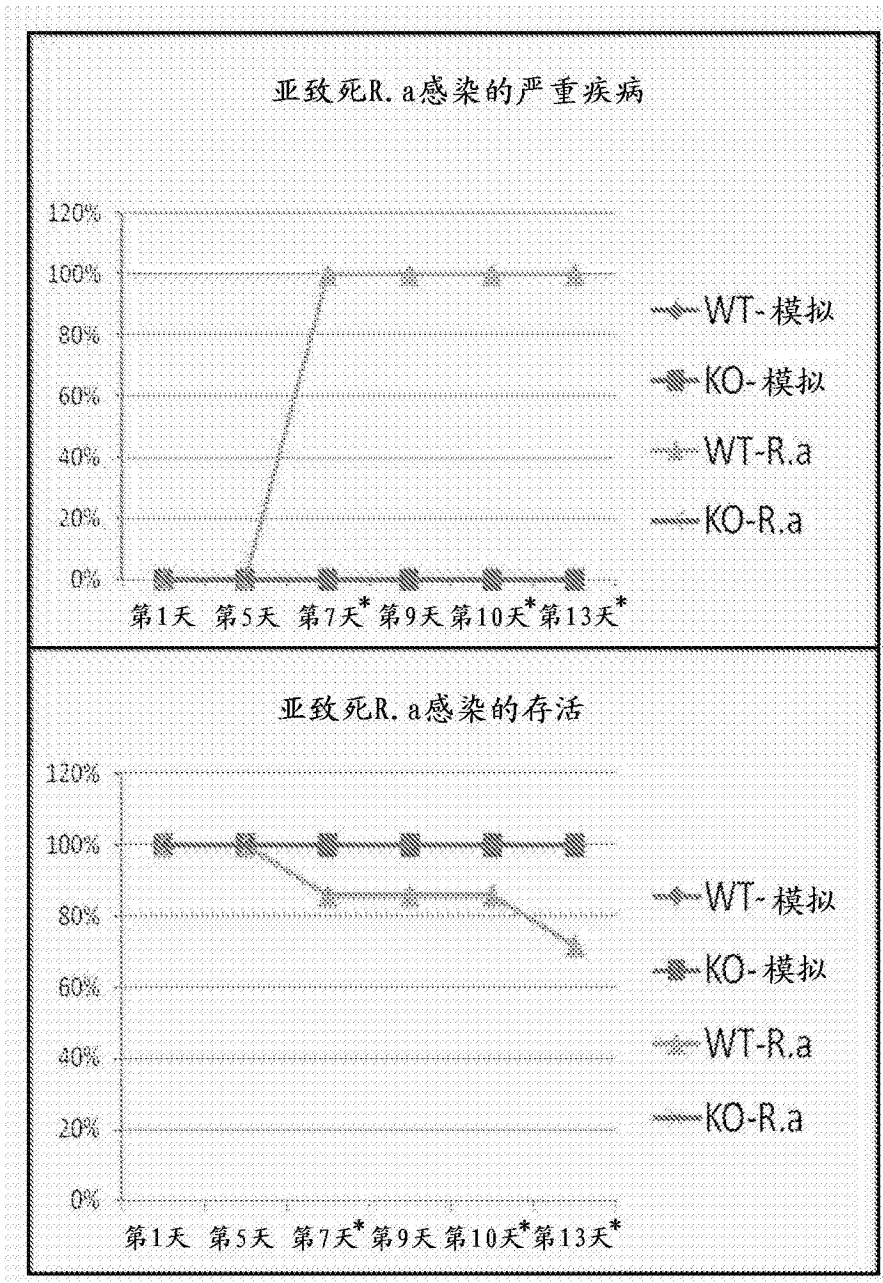


图20

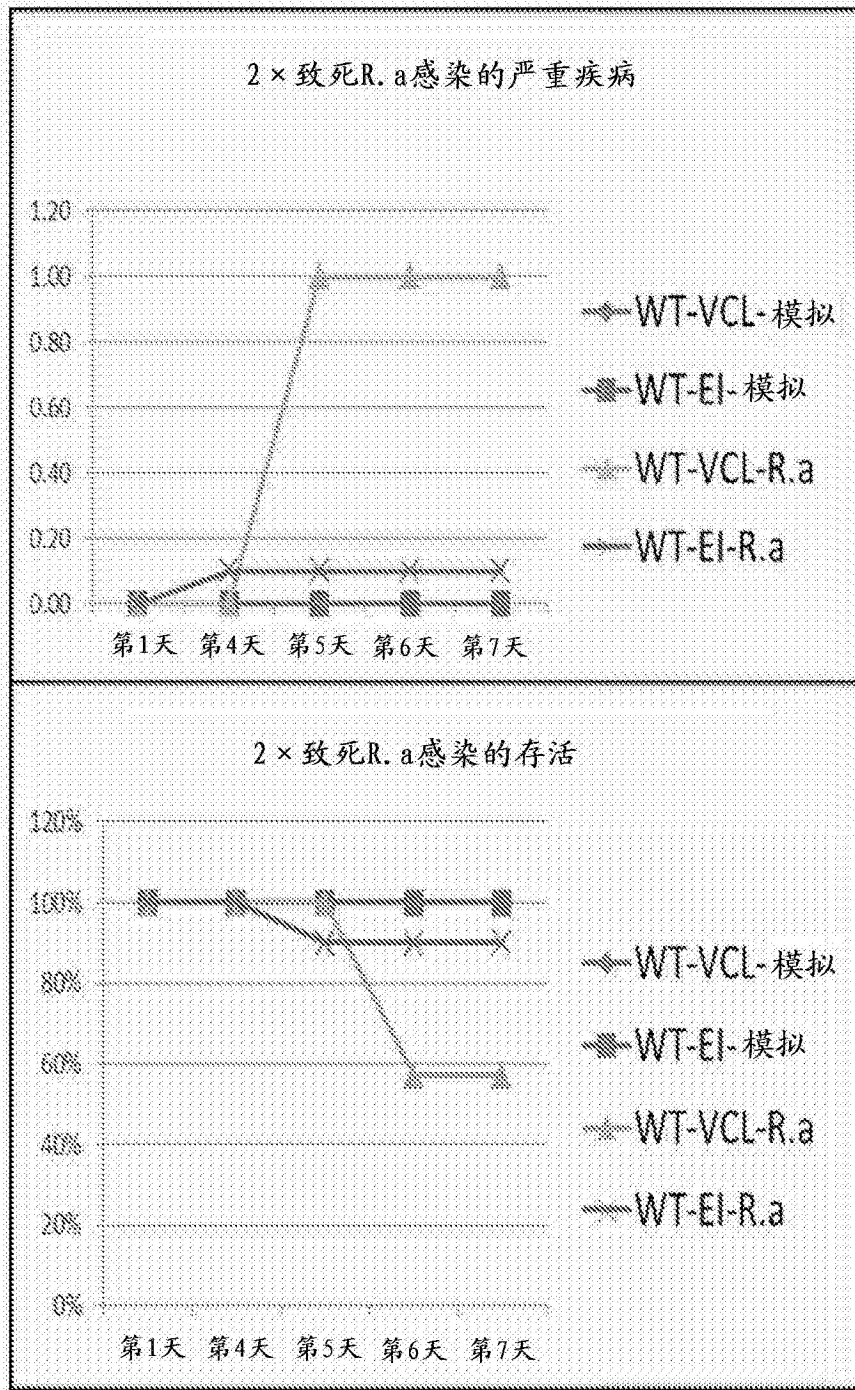


图21

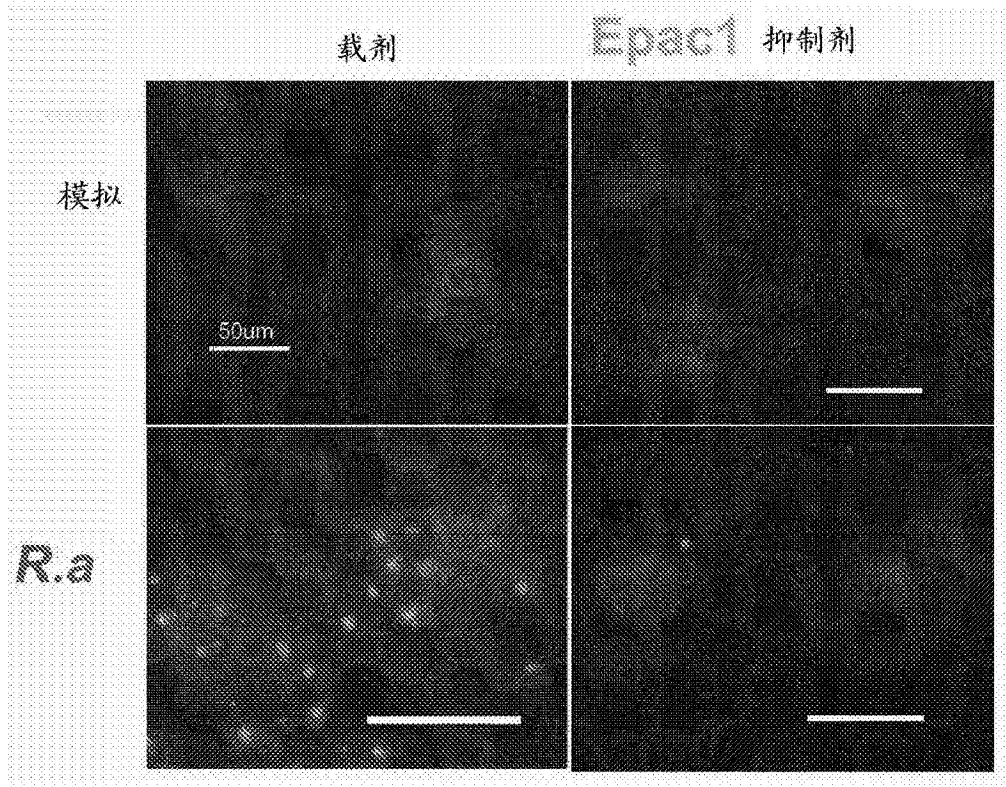


图22