

说明书

发明名称: 吡唑并喹啉类化合物 的立体异构体和氘代衍生物及应用

[0001] 本申请要求于2023年01月17日提交的中国专利申请第202310083163.X号、于2023年4月20日提交的中国专利申请第202310430237.2的优先权，在此通过引用将其全文并入本文。

技术领域

[0002] 本公开涉及吡唑并喹啉类化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物，或其药学上可接受的盐、溶剂化物。本公开还涉及包含一种或更多种此类立体异构体和衍生物或其药学上可接受的盐、溶剂化物作为活性成分的药物组合物。本公开还涉及此类立体异构体和衍生物或其药学上可接受的盐、溶剂化物，以及包含此类立体异构体衍生物或其药学上可接受的盐、溶剂化物作为polo样激酶抑制剂的用途。

背景技术

[0003] 哺乳动物polo样激酶(PLK)由五个丝氨酸/苏氨酸激酶(PLKs1-5)家族组成，在哺乳动物细胞中具有不同的功能和表达模式。大多数PLK具有识别底物的C端polo-box结构域(PBD)，以及磷酸化底物的N端激酶结构域。在PLK中，PLK1是研究最广泛的家族成员，在细胞周期进程中具有关键功能，尤其是在G2-M检查点、有丝分裂和胞质分裂中。PLK1活性在细胞周期进程中通过与其他磷酸化支架蛋白结合而受到严格调节。

[0004] 到目前为止，PLK1作为癌症治疗中一个有吸引力的靶点得到了广泛的研究，并且在过去十几年中已经开发了几种小分子PLK1抑制剂。既有白血病、淋巴瘤这种液体瘤，也有胰腺癌、乳腺癌、前列腺癌等在内的实体瘤。然而，尽管PLK1抑制剂在临床前癌症模型中显示出抗肿瘤作用，并且在临床试验中也初步显示出有希望的结果，但由于剂量限制性毒性，它们迄今尚未取得令人满意的治疗效果(Translational Oncology Volume 16, February 2022, 101332)。临床在研，

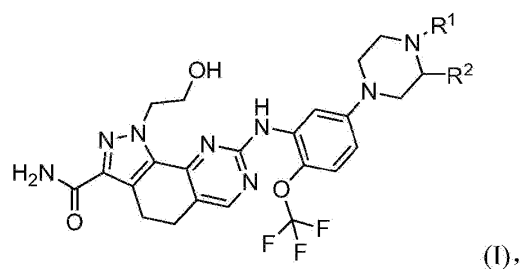
靶向PLK1为主的ATP竞争性抑制剂,其中onvansertib(NMS-P937、NMS12869 37)的选择性高,有较好的临床开发前景。然而, onvansertib系列衍生物中(Bioorg Med Chem Lett.2011 May 15; 21(10):2969-74、Bioorg Med Chem Lett.2010 Nov 15; 20(22):6489-94),多数衍生物分子在小鼠中的口服吸收、生物利用度非常差,文献(Mol Cancer Ther; 11(4)April 2012, Supplementary table S4)披露的同为onvansertib在不同物种的吸收、生物利用度也差别极大,不具有规律性,为选择性PLK1抑制剂的开发带来挑战。

[0005] 本研究的项目人员,意外发现通过onvansertib N-甲基哌嗪处的立体环化修饰、氘代、立体环化加氘代,能够很好的调节其口服吸收、生物利用度、组织分布等参数,在多个动物实验上可以看出修饰后的分子较onvansertib有更低的毒性及更好的药效,为不同类型的疾病提供更丰富的有效分子选择。

[0006] 发明内容

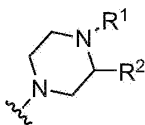
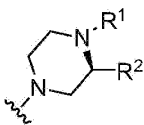
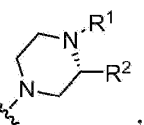
[0007] 本文公开了作为polo样激酶抑制剂的吡唑并喹啉类化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物,或其药学上可接受的盐、溶剂化物。因此,本公开的化合物特别适用于靶向PLK1,可用于治疗PLK1活性失调导致的疾病和病状和/或与PLK1相关的疾病和病状,包括但不限于白血病、淋巴瘤、胰腺癌、乳腺癌、前列腺癌、肺癌、卵巢癌、结直肠癌、肝癌、胃癌、食管癌、黑色素瘤、多发性骨髓瘤,和脓毒血症等在内的疾病和病状。

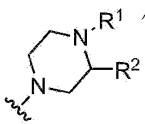
[0008] 在一方面,本公开涉及式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物:



[0009] 或其药学上可接受的盐、溶剂化物,

[0010] 其中, R^1 和 R^2 各自独立地选自氢、氘、氘代或未氘代的 C_{1-6} 烷基;或者 R^1 和 R^2 与其所连接的N原子、C原子共同形成5元杂环;

[0011]  任选地是  和/或  ；

[0012]  任选地被一个或多个氘取代。

[0013] 在另一方面，本公开涉及一种药物组合物，该药物组合物包含如本文提供的式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物，或其药学上可接受的盐、溶剂化物，以及药学上可接受的载体或辅料。

[0014] 在还一方面，本公开涉及一种治疗有需要的受试者的PLK1活性失调导致的疾病和病状和/或与PLK1相关的疾病和病状的方法，该方法包括向受试者施用治疗有效量的如本文提供的式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物，或其药学上可接受的盐、溶剂化物。

[0015] 在还一方面，本公开涉及如本文提供的式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物，或其药学上可接受的盐、溶剂化物用于治疗PLK1活性失调导致的疾病和病状和/或与PLK1相关的疾病和病状。

[0016] 在还一方面，本公开涉及如本文提供的式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物，或其药学上可接受的盐、溶剂化物在制备用于治疗PLK1活性失调导致的疾病和病状和/或与PLK1相关的疾病和病状的药物中的用途。

[0017] 在还一方面，本公开涉及用于治疗PLK1活性失调导致的疾病和病状和/或与PLK1相关的疾病和病状的试剂盒，该试剂盒包含：如本文提供的式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物，或其药学上可接受的盐、溶剂化物，或包含如本文提供的式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物，或其药学上可接受的盐、溶剂化物和药学上可接受的载体或辅料的药物组合物，容器和任选的指示治疗的包装插页或标签。

[0018] 所述PLK1活性失调导致的疾病和病状和/或与PLK1相关的疾病和病状包括但不限于白血病、淋巴瘤、胰腺癌、乳腺癌、前列腺癌、肺癌、卵巢癌、结直肠癌、肝癌、胃癌、食管癌、黑色素瘤、多发性骨髓瘤，和脓毒血症等。

附图说明

- [0019] 图1示出了本公开实施例化合物和阳参化合物对胰腺癌细胞系(PSN1)抑制生长作用的 IC_{50} 。其中，A为本公开CPD02；B为本公开CPD03；C为阳参化合物NMS-P937；D为本公开CPD04；和为本公开CPD06。
- [0020] 图2示出了使用本公开化合物治疗开始后测试药物在HCT116皮下移植瘤小鼠模型的肿瘤生长曲线图。
- [0021] 图3示出了使用本公开化合物治疗开始后测试药物在HCT116皮下移植瘤小鼠模型的实验动物体重变化曲线。
- [0022] 图4示出了使用本公开化合物治疗开始后测试药物在BxPC-3皮下移植瘤小鼠模型的肿瘤生长曲线图。
- [0023] 图5示出了使用本公开化合物治疗开始后测试药物在BxPC-3皮下移植瘤小鼠模型的实验动物体重变化曲线。
- [0024] 图6示出了使用本公开化合物治疗开始后测试药物PSN1皮下移植瘤小鼠模型的肿瘤生长曲线图。
- [0025] 图7示出了使用本公开化合物治疗开始后测试药物在PSN1皮下移植瘤小鼠模型的实验动物体重变化曲线。

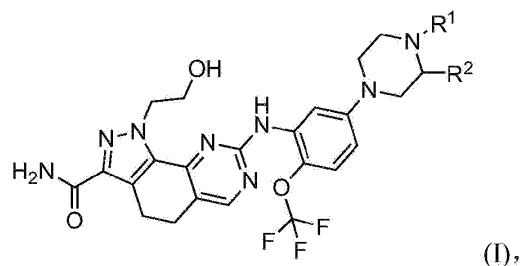
具体实施方式

- [0026] 现在将详述某些实施方案，其实例在随附的具体实施方式中说明。虽然将描述列举的实施方案，但应理解它们并非旨在将本公开限制于这些实施方案。相反，本公开旨在涵盖所有可选方案、修改和等同方案，它们可以包括在由权利要求限定的本公开的范围内。本领域技术人员将认识到许多与本文所述的方法和材料相似或等同的方法和材料，它们可用于本公开的实践。本公开决不限于所描述的方法和材料。如果一个或多个并入的文献和类似材料与本公开不同或相矛盾，包括但不限于定义的术语、术语用法、描述的技术等，以本公开为准。

[0027] 可以理解, 本公开的某些特征, 为了清楚, 在单独实施方案的背景下进行描述, 也可以在单个实施方案中组合提供。相反, 为了简洁, 在单个实施方案的背景下描述的本公开的各种特征也可以单独提供或以任何合适的子组合提供。

[0028] 本文提供以下内容。

[0029] 项1. 一种式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物:



[0030] 或其药学上可接受的盐、溶剂化物,

[0031] 其中, R^1 和 R^2 各自独立地选自氢、氘、氘代或未氘代的 C_{1-6} 烷基; 或者 R^1 和 R^2 与其所连接的N原子、C原子共同形成任选取代的氘代或未氘代的5元杂环;

[0032] 任选地是 和/或

[0033] 任选地被一个或多个氘取代。

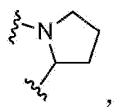
[0034] 项2. 根据项1的式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物, 或其药学上可接受的盐、溶剂化物, 其中

[0035] R^1 是氘代或未氘代的 C_{1-6} 烷基, 优选为甲基或氘代甲基, 更优选为全氘代甲基;

[0036] R^2 是氢或氘。

[0037] 项3. 根据项1的式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物, 或其药学上可接受的盐、溶剂化物, 其中

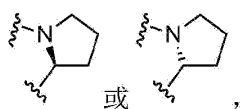
[0038] R^1 和 R^2 与其所连接的N原子、C原子共同形成任选取代的如下所述的5元杂环:



[0039] 其中，该5元杂环任选地被1-7个氘取代。

[0040] 项4.根据项3的式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物，或其药学上可接受的盐、溶剂化物，其中

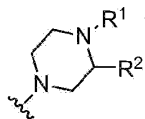
[0041] R^1 和 R^2 与其所连接的N原子、C原子共同形成任选取代的选自如下所述的5元杂环：



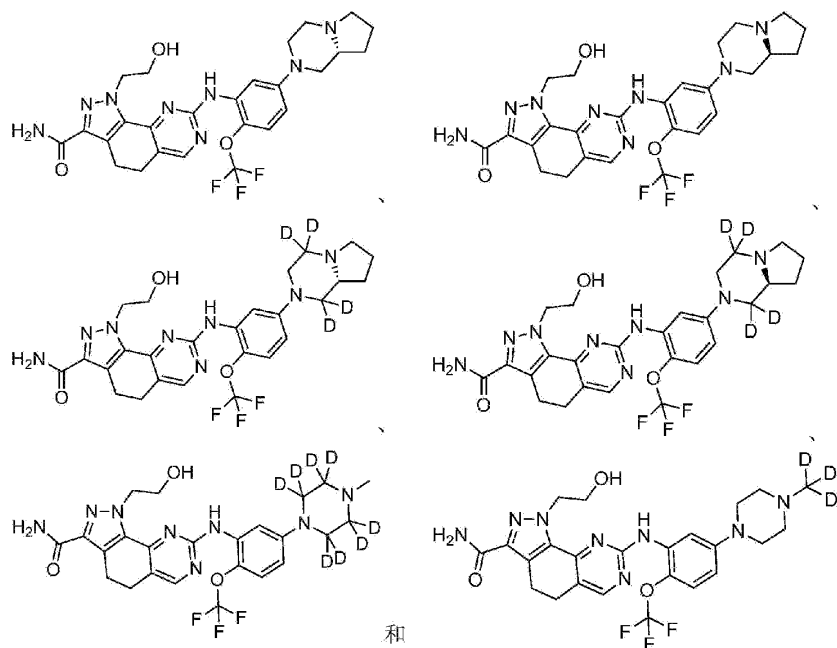
[0042] 其中，该5元杂环任选地被1-7个氘取代。

[0043] 项5.根据前述任一项的(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物，或其药学上可接受的盐、溶剂化物，其中

[0044] 任选取地被1-8个氘取代。



[0045] 项6.根据项1的式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物，或其药学上可接受的盐、溶剂化物，其中所述式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物选自以下：



- [0046] 项7.一种药物组合物,所述药物组合物包含根据项1至6中任一项的式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物,或其药学上可接受的盐、溶剂化物,以及药学上可接受的载体或辅料。
- [0047] 项8.一种治疗有需要的受试者的PLK1活性失调导致的疾病和病状和/或与PLK1相关的疾病和病状的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的根据项1至6中任一项的式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物,或其药学上可接受的盐、溶剂化物。
- [0048] 项9.根据项8的方法,其中所述PLK1活性失调导致的疾病和病状和/或与PLK1相关的疾病和病状选自由以下组成的组:白血病、淋巴瘤、胰腺癌、乳腺癌、前列腺癌、肺癌、卵巢癌、结直肠癌、肝癌、胃癌、食管癌、黑色素瘤、多发性骨髓瘤,和脓毒血症。
- [0049] 项10.根据项1至6中任一项的式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物,或其药学上可接受的盐、溶剂化物用于治疗PLK1活性失调导致的疾病和病状和/或与PLK1相关的疾病和病状。
- [0050] 项11.根据项10的用于治疗PLK1活性失调导致的疾病和病状和/或与PLK1相关的疾病和病状的式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物,或

其药学上可接受的盐、溶剂化物，其中所述PLK1活性失调导致的疾病和病状和/或与PLK1相关的疾病和病状选自以下组成的组：白血病、淋巴瘤、胰腺癌、乳腺癌、前列腺癌、肺癌、卵巢癌、结直肠癌、肝癌、胃癌、食管癌、黑色素瘤、多发性骨髓瘤，和脓毒血症。

[0051] 项12.根据项1至6中任一项的式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物，或其药学上可接受的盐、溶剂化物在制备用于治疗PLK1活性失调导致的疾病和病状和/或与PLK1相关的疾病和病状的药物中的用途。

[0052] 项13.根据项12的用途，其中所述PLK1活性失调导致的疾病和病状和/或与PLK1相关的疾病和病状选自以下组成的组：白血病、淋巴瘤、胰腺癌、乳腺癌、前列腺癌、肺癌、卵巢癌、结直肠癌、肝癌、胃癌、食管癌、黑色素瘤、多发性骨髓瘤，和脓毒血症。

[0053] 项14.一种用于治疗PLK1活性失调导致的疾病和病状和/或与PLK1相关的疾病和病状的试剂盒，所述试剂盒包括

[0054] 根据项1至6中任一项的式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物，或其药学上可接受的盐、溶剂化物，或根据项7的药物组合物；

[0055] 容器；和

[0056] 任选的指示治疗的包装插页或标签。

[0057] 项15.根据项14的试剂盒，其中所述PLK1活性失调导致的疾病和病状和/或与PLK1相关的疾病和病状选自以下组成的组：白血病、淋巴瘤、胰腺癌、乳腺癌、前列腺癌、肺癌、卵巢癌、结直肠癌、肝癌、胃癌、食管癌、黑色素瘤、多发性骨髓瘤，和脓毒血症。

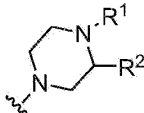
[0058] 定义

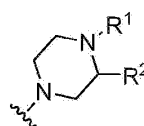
[0059] 本文使用但未定义的术语具有其通常含义，并且此类术语的含义在其每次出现时均是独立的。然而，除非另有说明，否则以下定义适用于整个说明书和权利要求。

[0060] 如本文所用，术语“包含”和“包括”旨在指定存在所述特征、整体、组件或步骤，但它们不排除存在或添加一个或更多个其他特征、整体、组件、步骤或它们的组。

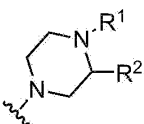
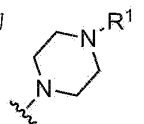
- [0061] 下文更详细地描述了特定官能团和化学术语的定义。出于本公开的目的，化学元素根据元素周期表，CAS版，化学和物理手册，第75版，内封面进行鉴定，并且特定官能团通常如其中所述定义。此外，有机化学的一般原理以及特定官能部分和反应性描述于Organic Chemistry, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito, 1999; Smith和March, March's Advanced Organic Chemistry, 第5版, John Wiley&Sons, Inc., New York, 2001; Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers, Inc., New York, 1989; Carruthers, Some Modern Methods of Organic Synthesis, 第3版, Cambridge University Press, Cambridge, 1987。
- [0062] 除非另有明确说明，否则包含本文引用的所有范围。
- [0063] 当列出一系列值时，旨在涵盖该范围内的每个值和子范围。例如，“C₁₋₆”旨在涵盖C₁、C₂、C₃、C₄、C₅、C₆、C₁₋₆、C₁₋₅、C₁₋₄、C₁₋₃、C₁₋₂、C₂₋₆、C₂₋₅、C₂₋₄、C₂₋₃、C₃₋₆、C₃₋₅、C₃₋₄、C₄₋₆、C₄₋₅和C₅₋₆。
- [0064] 当任何变量在任何成分中或在式(I)中或在描绘和描述本公开的化合物的任何其他式中出现多于一次时，它在每次出现时的定义均独立于它在每隔一次出现时的定义。此外，仅当此类组合产生稳定的化合物时，才允许使用取代基和/或变量的组合。
- [0065] 如本文所用，术语“氕代”是指化合物或基团上的一个或多个氢被氕取代。当化合物或基团被氕代时，化合物或基团上的一个、两个、三个甚至更多个氢原子可以被氕取代，直至化合物或基团上的所有氢原子都被氕取代，此时可称为“全氕代化合物或基团”。
- [0066] 在有些实施方案中，在氕代的位置的上，氕同位素丰度是大于天然氕同位素丰度(0.015%)，优选为大于50%，更优选为大于60%、大于70%、大于80%、大于90%、大于95%、大于96%、大于97%、大于98%、大于99%、大于99.5%，或者为100%。
- [0067] 在一些情况中，例如在表述中出现“氢”和“氕”作为并列的可选项时或者表述中出现“氢”被“氕”取代时，术语“氢”代表氢同位素“¹氢(¹H)”，而术语“氕”代表氢同位素“²氢(²H)”；或者理解为化合物的该位置处，氢以其

各种同位素的天然丰度存在的状态被其中氘以大于天然氘同位素丰度存在的状态(例如氘丰度为大于50%、大于60%、大于70%、大于80%、大于90%、大于95%、大于96%、大于97%、大于98%、大于99%、大于99.5%、或者为100%)所取代。

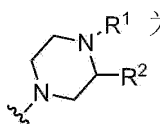
[0068] 在有些实施方案中， 任选地被一个氘取代时，氘可以取代在任意一

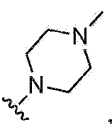
个环碳原子上。在有些实施方案中， 任选地被两个或更多个氘取代

时，这些两个或更多个氘可以取代在同一环碳原子上，也可以取代在不同环碳原子上。

[0069] 在有些实施方案中，当R²是氢时， 为  此时，包括R²在

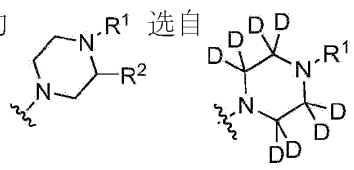
内的环碳原子上的氢可以被1-8个氘，例如1、2、3、4、5、6、7或8个氘所取代。这些氘可以取代在相同的或不同的环碳原子上。

[0070] 在有些实施方案中，当R¹是未氘代甲基且R²是氢时， 为

 此时，包括R²在内的环碳原子上的至少一个氢被氘取代，例如被

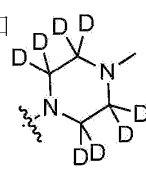
1、2、3、4、5、6、7或8个氘所取代。这些氘可以取代在相同的或不同的环碳原子上。

[0071] 在优选实施方案中, 任选地被氘代的

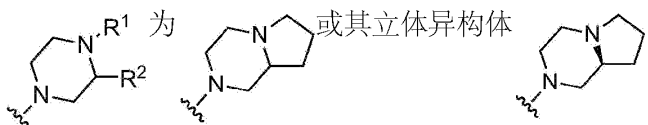


R^1 任选地是

未氘代的例如未氘代甲基, 或氘代的例如全氘代甲基, 例如



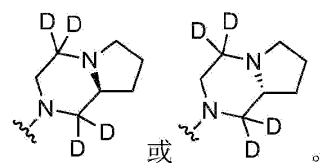
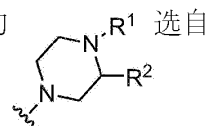
[0072] 在有些实施方案中, 当

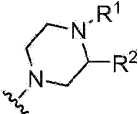
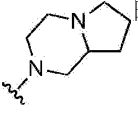


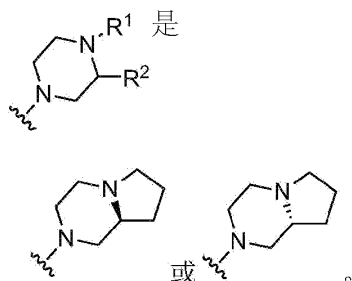
时, 一个或多个氘可以取代在任意环碳原子上; 当存在两个或更多个

氘时, 这些两个或更多个氘可以取代在同一环碳原子上, 也可以取代在不同环碳原子上。在有些实施方案中, 当存在两个或更多个氘时, 这些两个或更多个氘可以取代在稠环结构中的一个环上, 也可以取代在稠环结构中的两个环上。在有些实施方案中, 一个或多个氘可以取代在稠环结构中为两个环所共有的碳原子上。

[0073] 在优选实施方案中, 任选地被氘代的



[0074] 在有些实施方案中，当  是未被氘取代的  时，



[0075] 如本文所用，术语“烷基”是指直链或支链饱和烃基。术语“C_{i-j}烷基”是指具有i至j个碳原子的烷基。除非另有说明，否则烷基可以含有1至10个碳原子。在某些实施方案中，烷基含有1至6个碳原子，例如1至5个碳原子、1至4个碳原子、1至3个碳原子或1至2个碳原子。烷基的非限制性实例包括甲基、乙基、正丙基和异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基和叔丁基、新戊基等。

[0076] 如本文所用，术语“氘代烷基”是烷基上的一个或多个氢被氘取代得到的取代基。当烷基被氘代时，烷基上的一个、两个、三个甚至更多个氢原子可以被氘取代，直至烷基上的所有氢原子都被氘取代，此时可称为“全氘代烷基”。在有些实施方案中，氘代烷基的非限制实例包括氘代甲基，例如一氘代甲基、二氘代甲基、三氘代甲基(全氘代甲基)、一氘代乙基、二氘代乙基、三氘代乙基、四氘代乙基、五氘代乙基(全氘代以及)等。

[0077] 如本文所用，术语“环烷基”是指非芳族、饱和单环和多环环系统，其中所有成环原子均是碳。除非另有说明，否则环烷基基团可以含有3至10个成环碳原子(即C₃₋₁₀环烷基)。在某些实施方案中，环烷基基团可以包含3至9个、3至8个、3至7个、3至6个、4至10个、4至9个、4至8个、4至7个、4至6个、4至5个、5至10个、5至9个、5至8个、5至7个、5至6个成环碳原子等。特别地，环烷基可以是单环或双环的。可选地，双环环烷基基团可以包括稠合、螺环和桥接环烷基结构。

[0078] 在另一方面，还包括其中1、2或3个杂原子替换成环碳原子的环烷基环。此类基团被称为“杂环基”或“杂环”，其是指如上定义但带有选自N、O和S的至

少一个杂原子作为成环原子的环烷基基团。除非另有说明，否则杂环基基团可以含有3至10个成环原子(即3至10元杂环基)。在某些实施方案中，杂环基基团可以含有3至9个、3至8个、3至7个、3至6个、4至10个、4至9个、4至8个、4至7个、4至6个、4至5个、5至10个、5至9个、5至8个、5至7个、5至6个成环原子等。特别地，杂环基基团可以是单环或双环的。可选地，双环杂环基基团可以包括稠合、螺环和桥接杂环基结构。杂环基基团的非限制性实例包括环氧乙烷基、吡咯烷基、哌啶基、四氢吡喃基、哌嗪基、吡咯烷基和吗啉基。杂环基基团还可以通过使用碳数来描述。例如，C₃₋₆杂环基是指含有三至六个成环碳原子的杂环基基团，还可以含有至少一个杂原子，例如1、2或3个杂原子作为成环原子。在某些实施方案中，杂环基基团或杂环含有1或2个杂原子作为成环原子。在某些实施方案中，杂环基基团可以是单环或双环的，例如稠合双环和螺双环。在本公开的背景下，术语“杂环基”和“杂环”可以互换使用。

[0079] 如本文所用，术语“氘代杂环基”是杂环基上的一个或多个氢被氘取代得到的取代基。当杂环基被氘代时，杂环基上的一个、两个、三个甚至更多个氢原子可以被氘取代，直至杂环基上的所有氢原子都被氘取代，此时可称为“全氘代杂环基”。

[0080] 如本文所用，术语“卤代”或“卤素”是指氟化物、氯化物、溴化物和碘化物。在某些实施方案中，卤代的非限制性实例包括氟化物、氯化物和溴化物，更特别地是氟化物和氯化物。

[0081] 如本文所用，术语“杂原子”是指氮(N)、氧(O)和硫(S)，并且可以包括氮和硫的任何氧化形式，以及碱性氮的任何季铵化形式，除非另有说明。

[0082] 如本文所用，术语“取代的”在指化学基团时是指该化学基团具有一个或更多个氢原子，该氢原子被取代基除去和替换。如本文所用，术语“取代基”具有本领域已知的普通含义并且是指共价附接至母基团或如果合适，稠合至母基团的化学部分。可以理解，给定原子的取代受化合价的限制。应理解取代基可以被进一步取代。

- [0083] 当在式(I)或其任何实施方案中指出部分被“任选地”取代时，这表示式(I)或其实施方案涵盖在该部分上被所指出的取代基取代的化合物和在该部分上不含有所指出的取代基(即，其中该部分未被取代)的化合物。
- [0084] 参考通式和具体化合物描述本文提供的化合物。此外，本公开的化合物可以以多种不同的形式或衍生物存在，所有均在本公开的范围。这些包括例如药学上可接受的盐、互变异构体、立体异构体、外消旋混合物、位置异构体、前药、溶剂化形式、不同晶型或多晶型物以及活性代谢物等。
- [0085] 如本文所用，除非另有说明，否则术语“药学上可接受的盐”包括保持特定化合物的游离酸/碱形式的生物学有效性并且在生物学或其他方面不是非期望的盐。药学上可接受的盐可以包括与无机碱或酸和有机碱或酸形成的盐。在本公开的化合物含有一个或多个酸性或碱性基团的情况下，本公开还包括它们相应的药学上可接受的盐。因此，含有酸性基团(例如羧基基团)的本公开的化合物可以盐形式存在，并且可以根据本公开使用，例如，碱金属盐、碱土金属盐、铝盐或铵盐。此类盐的更多非限制性实例包括锂盐、钠盐、钾盐、钙盐、镁盐、钡盐或与氨或有机胺(例如乙胺、乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、哌啶、N-甲基谷氨酰胺、或氨基酸)的盐。例如，通过使具有酸性基团的化合物与合适的碱(例如氢氧化锂、氢氧化钠、丙醇钠、氢氧化钾、乙醇钾、氢氧化镁、氢氧化钙或氢氧化钡)反应，这些盐是容易获得的。本公开的化合物的其他碱盐包括但不限于铜(I)、铜(II)、铁(II)、铁(III)、锰(II)和锌盐。本公开的化合物含有一个或多个碱性基团，例如可以质子化的基团，可以以盐的形式存在，并且可以根据本公开以它们与无机酸或有机酸的加成盐的形式使用。合适的酸的实例包括氯化氢、溴化氢、碘化氢、磷酸、硫酸、硝酸、甲磺酸、对甲苯磺酸、萘二磺酸、磺基乙酸、三氟乙酸、草酸、乙酸、酒石酸、乳酸、水杨酸、苯甲酸、碳酸、甲酸、丙酸、新戊酸、二乙基乙酸、丙二酸、琥珀酸、庚二酸、富马酸、丙二酸、马来酸、苹果酸、帕莫酸、扁桃酸、氨基磺酸、苯丙酸、葡萄糖酸、抗坏血酸、异烟酸、柠檬酸、己二酸、牛磺胆酸、戊二酸、硬脂酸、谷氨酸或天冬氨酸，以及本领域技术人员已知的其他酸。所形成的盐尤其是盐酸盐、氯化物、氢溴酸盐、溴化物、碘化物、硫酸盐、磷酸盐、甲基磺酸盐(甲磺酸

盐)、甲苯磺酸盐、碳酸盐、碳酸氢盐、甲酸盐、乙酸盐、磺基乙酸盐、三氟甲磺酸盐、草酸盐、丙二酸盐、马来酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、苹果酸盐、帕莫酸盐、扁桃酸盐、富马酸盐、乳酸盐、柠檬酸盐、戊二酸盐、硬脂酸盐、天冬氨酸盐和谷氨酸盐。此外,由本公开的化合物形成的盐的化学计量可以是1的整数倍或非整数倍。

[0086] 含有碱性含氮基团的本公开的化合物可以使用试剂例如 C_{1-4} 卤代烷进行季铵化,例如,甲基、乙基、异丙基和叔丁基氯、溴和碘;二 C_{1-4} 烷基硫酸盐,例如硫酸二甲酯、二乙酯和二戊酯; C_{10-18} 烷基卤化物,例如癸基、十二烷基、月桂基、肉豆蔻基和硬脂基氯化物、溴化物和碘化物;以及芳基 C_{1-4} 烷基卤化物,例如苄基氯和苯乙基溴。

[0087] 如果本公开的化合物在分子中同时含有酸性基团和碱性基团,则除了上述盐形式外,本公开还包括内盐或甜菜碱(两性离子)。相应的盐可以通过本领域技术人员已知的常规方法获得,例如通过将它们与有机或无机酸或碱在溶剂或分散剂中接触,或通过与其他盐的阴离子交换或阳离子交换。本公开还包括本公开的化合物的所有盐,由于低生理相容性,它们不直接适用于药物,但可用于,例如,作为化学反应的中间体或用于制备药学上可接受的盐。有关更合适的盐的综述,参见Stahl和Wermuth,药用盐手册:特性、选择和使用(Wiley-VCH,2002)。

[0088] 式(I)化合物及其药学上可接受的盐可以以非溶剂化和溶剂化形式存在。如本文所用,术语“溶剂化物”是指包含式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物或其药学上可接受的盐和一种或更多种药学上可接受的溶剂分子的分子复合物。例如,当溶剂是水时使用术语“水合物”。

[0089] 式(I)化合物可以具有一个或更多个手性(不对称)中心。本公开涵盖式(I)化合物的所有立体异构形式。存在于式(I)化合物中的不对称中心可以彼此独立地具有(R)或(S)构型。当手性碳的键在本公开的结构式中被描述为直线时,或当化合物名称在没有手性碳的(R)或(S)手性名称的情况下被描述时,应当理解,每种此类手性碳的(R)和(S)构型以及因此每种对映异构体或非对映异构体及其混合物均包含在该式或名称中。特定立体异构体或其混合物的产生可以在获得此类立体异

构体或混合物的实例中进行鉴定，但这绝不限制所有立体异构体及其混合物被包括在本公开的范围。当手性碳的键在本公开的结构式中被描述为三角实线或虚线时，或当化合物名称在有手性碳的(R)或(S)手性名称的情况下被描述时，应当理解此时的结构式或名称所代表的化合物在该手性碳位置处具有确定的立体构型，而将与其他立体异构体或对映异构体或非对映异构体或其混合物相区分。

[0090] 本公开包括所有可能的对映异构体和非对映异构体以及两种或更多种立体异构体的混合物，例如所有比例的对映异构体和/或非对映异构体的混合物。因此，对映异构体是本公开主题的对映异构体纯形式(作为左旋和右旋对映体)、外消旋体形式和两种对映异构体以所有比例的混合物形式。在顺式/反式异构体的情况下，本公开包括顺式形式和反式形式以及这些形式的所有比例的混合物。如有需要，可以通过常规方法(例如通过色谱或结晶、通过使用立体化学均一的合成起始材料或通过立体选择性合成)分离混合物来制备单个立体异构体。任选地，可以在立体异构体分离之前进行衍生化。立体异构体混合物的分离可以在式(I)化合物合成期间的中间步骤中进行，或者可以在最终外消旋产物上进行。绝对立体化学可以通过结晶产物或结晶中间体的X-射线晶体学来确定，如有需要，用含有已知构型的立体中心的试剂衍生这些结晶产物或结晶中间体。可选地，绝对立体化学可以通过振动圆二色性(VCD)光谱分析来确定。

[0091] 除非另有说明，否则本文描述的结构还意在包括仅存在一种或更多种同位素富集原子时不同的化合物，换言之，其中一个或更多个原子被具有相同原子序数的原子替换，但原子质量或质量序数不同于自然界中占优势的原子质量或质量序数的化合物。此类化合物被称为“同位素变体”。本公开旨在包括式(I)化合物的所有药学上可接受的同位素变体。适合包括在本公开的化合物中的同位素的实例包括但不限于氢的同位素，例如²H(即，D，氘)和³H(即氚)；碳，例如¹¹C、¹³C和¹⁴C；氯，例如³⁶Cl；氟，例如¹⁸F；碘，例如¹²³I和¹²⁵I；氮，例如¹³N和¹⁵N；氧，例如¹⁵O、¹⁷O和¹⁸O；磷，例如³²P；和硫，例如³⁵S。式(I)化合物的某些同位素变体，例如掺入放射性同位素的那些，可用于药物和/或底物组织分布研究。特别地，具有仅在用较重同位素替换(例如用氘(²H或D)替换氢)中不同的所

描绘结构的化合物可以提供某些治疗优势，例如，由于更高的代谢稳定性、增加的体内半衰期或减少的剂量要求，因此可以在一些特定情况下使用。式(I)化合物的同位素变体通常可以通过本领域技术人员已知的常规技术或通过与所附实施例中描述的那些类似的方法以及使用适当的同位素标记试剂代替先前采用的非标记试剂合成进行制备。

- [0092] 当在本文中描述化合物的结构时，所示出的结构式中未标明氢原子是D(即， ^2H)时，一般应理解为此位置的氢以氢同位素“ ^1H ”的形式存在或者以具有天然状态下天然同位素丰度的形式存在。所示出的结构中标明氢原子是D(即， ^2H ，氘)时，应理解为此位置的氢以氢同位素“ ^2H ，D，氘”的形式存在或者以其中氘以大于天然氘同位素丰度的形式存在(例如氘丰度为大于50%，大于60%、大于70%、大于80%、大于90%、大于95%、大于96%、大于97%、大于98%、大于99%、大于99.5%，或者为100%)。
- [0093] 根据本公开的药学上可接受的溶剂化物可以包括其中结晶溶剂可以被同位素取代的那些，例如 D_2O 、 d_6 -丙酮、 d_6 -DMSO。
- [0094] 实施本公开的一种方式是以前药的形式施用式(I)化合物。因此，式(I)化合物的某些衍生物可能本身具有很少或没有药理活性，当施用于体内或身体上时，例如通过水解切割，特别是由酯酶或肽酶促进的水解切割，其被转化成具有期望活性的式(I)化合物。此类衍生物被称为“前药”。有关前药使用的更多信息可见于，例如，T.Higuchi和W.Stella, “Pro-drugs as Novel Delivery Systems”, Vol.14, ACS Symposium Series, 和E.B.Roche(Ed.), “Bioreversible Carriers in Drug Design”, Pergamon Press, 1987, American Pharmaceutical Association。还可以参考Nature Reviews/Drug Discovery, 2008, 7, 355, 和Current Opinion in Drug Discovery and Development, 2007, 10, 550。
- [0095] 根据本公开的前药可以例如通过用本领域技术人员已知的某些部分替换式(I)化合物中存在的适当官能团来制备，例如，H.Bundgaard, “Design of Prodrugs”, Elsevier, 1985, 以及Y.M.Choi-Sledeski和C.G.Wermuth, “Designing Prodrugs and Bioprecursors”, Practice of Medicinal Chemistry, 第4版, Chapter 28, 657-696, Elsevier, 2015中所述的“前部分”。因此，根据本公开的前药可以包

括但不限于(a)式(I)化合物中羧酸的酯或酰胺衍生物, 如果有; (b)式(I)化合物中氨基的酰胺、亚胺、氨基甲酸酯或胺衍生物; (c)式(I)化合物中羰基的肟或亚胺衍生物, 如果有; 或(d)可以在式(I)化合物中代谢氧化成羧酸的甲基、伯醇或醛基, 如果有。

[0096] 提及式(I)化合物包括化合物本身及其前药。本公开包括此类式(I)化合物以及此类化合物的药学上可接受的盐和所述化合物和盐的药学上可接受的溶剂化物。

[0097] 使用和施用

[0098] 本公开的化合物(式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物)-或其药学上可接受的盐、溶剂化物, 包括其所有比例的混合物-可用作药物。发现它们表现出抑制PLK1的药理活性。假设通过这种活性, 本公开的化合物可以预防或逆转PLK1活性失调。通过预防其PLK1活性失调, 能够发挥其作为肿瘤抑制因子的作用。除了预防或逆转PLK1活性失调之外, 本公开的化合物的药理活性还可用于抑制PLK1将是有益的其他病理生理情况。

[0099] 因此, 作为PLK1抑制剂的本公开的化合物特别适用于治疗PLK1活性失调导致的疾病和病状和/或与PLK1相关的疾病和病状, 例如癌症, 所述PLK1活性失调导致的疾病和病状和/或与PLK1相关的疾病和病状包括但不限于以下各项: 癌症例如白血病、淋巴瘤、胰腺癌、乳腺癌、前列腺癌、肺癌、卵巢癌、结直肠癌、肝癌、胃癌、食管癌、黑色素瘤、多发性骨髓瘤, 和脓毒血症等。不希望承诺任何具体的理论或解释, 可以假设这些化合物可能能够通过直接作用于癌细胞和/或间接地通过调节免疫系统对肿瘤的反应来实现这一目标。

[0100] 本公开的化合物可以以有效治疗本文所述的疾病或病状的量施用。本公开的化合物可以作为化合物本身施用, 或可选地, 作为药学上可接受的盐施用。为了施用和给药目的, 本公开的化合物本身(式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物)或其药学上可接受的盐、溶剂化物将被简称为本公开的化合物。

[0101] 本公开的化合物通过任何合适的途径以适合这种途径的药物组合物的形式施用, 并且以对预期治疗有效的剂量施用。本公开的化合物可以口服、直肠、阴道、肠胃外或外用施用。

- [0102] 如本文所用，术语“施用”是指吸收、摄取、注射、吸入、植入或以其他方式引入本公开的化合物或其药物组合物。术语“治疗”是指逆转、减轻、延迟本文所述的“病理状况”(例如，疾病、病症或病状，或其一种或更多种体征或症状)的发作或抑制其进展。在某些实施方案中，可以在疾病或病状的一种或更多种体征或症状已经发展或已经观察到之后施用治疗。在其他实施方案中，可以在没有疾病或病状的体征或症状的情况下进行治疗。例如，可以在症状发作之前对易感个体进行治疗(例如，根据症状史和/或根据遗传或其他易感性因素)。在症状消退后也可以继续治疗，例如延迟或预防复发。如本文所用，术语“疾病”、“病症”、“病状”和“病理状况”可互换使用。
- [0103] 本领域技术人员可以通过常规实验确定施用的剂量水平。本公开的化合物和/或包含所述化合物的组合物的剂量方案基于多种因素，包括患者的类型、年龄、体重、性别和医疗状况；病状的严重程度；施用途径；和所用特定化合物的活性。因此，剂量方案可以有很大的不同。例如，本公开的化合物的剂量水平可以是每天约0.001至约100mg/kg(即mg/kg体重)。在某些实施方案中，以单次或分次施用的本公开的化合物的总日剂量可以为约0.001至约10mg/kg。本公开的化合物的施用可以在一天内重复多次的情况并不少见。
- [0104] 药物组合物
- [0105] 在一些方面，本公开涉及药物组合物，其包含如本文提供的式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物，或其药学上可接受的盐、溶剂化物，以及至少一种药学上可接受的载体或辅料。
- [0106] 如本文所用，术语“药学上可接受的载体或辅料”是指可用于制备药物组合物的载体或辅料，其通常是安全的、无毒的并且在生物学上或其他方面均不是非期望的，并且包括可接受用于兽医用途以及人药物用途的载体或辅料。如本文所用的药学上可接受的载体或辅料包括一种和多于一种此类载体或辅料。使用的具体载体或辅料将取决于应用本公开的化合物的方式和目的。合适的载体和辅料是本领域技术人员所熟知，并详述于，例如，Ansel, Howard C等人，Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2004；Gennaro, Alfonso

R.等人, Remington:The Science and Practice of Pharmacy.Philadelphia:Lippincott, Williams&Wilkins,2000; 和Rowe,Raymond C.Handbook of Pharmaceutical Excipients.Chicago,Pharmaceutical Press,2005。还可以包括缓冲剂、稳定剂、表面活性剂、润湿剂、润滑剂、乳化剂、混悬剂、防腐剂、抗氧化剂、遮光剂、助流剂、加工助剂、着色剂、甜味剂、加香剂、调味剂、稀释剂和其他已知的添加剂中的一种或更多种,以提供药物(即本文提供的化合物或药物组合物)的精致表现或有助于生产药物产品(即药物)。

[0107] 本公开的组合物可以制剂成多种形式。这些包括,例如,液体、半固体和固体剂型,例如液体溶液(例如,可注射和可输注的溶液)、分散体或混悬剂、片剂、丸剂、粉剂、脂质体、栓剂等。形式取决于预期施用的方式和治疗应用。

[0108] 本公开的药物组合物可以通过任何熟知的药学技术(例如有效制剂和施用程序)制备。上述关于有效制剂和施用程序的考虑是本领域熟知的,并且在标准教科书中有所描述。例如,在Hoover,John E.,Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Co.,Easton,Pennsylvania,1975; Liberman等人,编辑, Pharmaceutical Dosage Forms,Marcel Decker,New York,N.Y.,1980; 和Kibbe等人,编辑, Handbook of Pharmaceutical Excipients,第3版,American Pharmaceutical Association,Washington,1999中讨论了药物产品的制剂。

[0109] 在还一方面,本公开涉及用于治疗PLK1活性失调导致的疾病和病状和/或与PLK1相关的疾病和病状的试剂盒,其包含如本文提供的式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物,或其药学上可接受的盐、溶剂化物,或如本文提供的包含式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物,或其药学上可接受的盐、溶剂化物的药物组合物,容器和任选的指示治疗的包装插页或标签。

[0110] 治疗方法

[0111] 在还一方面,本公开涉及一种治疗有需要的受试者的PLK1活性失调导致的疾病和病状和/或与PLK1相关的疾病和病状的方法,由于本公开的化合物的PLK1抑制活性,该方法包括向受试者施用治疗有效量的如本文提供的式(I)化合物的立

体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物，或其药学上可接受的盐、溶剂化物。

[0112] 如本文所用，术语“有需要的受试者”是患有PLK1活性失调导致的疾病和病状和/或与PLK1相关的疾病和病状的受试者，或相对于整个人群具有增加的发展PLK1相关疾病或病状的风险的受试者。在某些实施方案中，受试者是温血动物。在某些实施方案中，温血动物是哺乳动物。在某些实施方案中，温血动物是人。

[0113] 如本文所用，术语“PLK1活性失调导致的疾病和病状和/或与PLK1相关的疾病和病状”是指PLK1的抑制将是有益的任何病理生理情况。在某些实施方案中，PLK1活性失调导致的疾病和病状和/或与PLK1相关的疾病和病状是癌症。在某些实施方案中，PLK1活性失调导致的疾病和病状和/或与PLK1相关的疾病和病状是选自由以下组成的组的疾病和病状：白血病、淋巴瘤、胰腺癌、乳腺癌、前列腺癌、肺癌、卵巢癌、结直肠癌、肝癌、胃癌、食管癌、黑色素瘤、多发性骨髓瘤，和脓毒血症。

[0114] 在还一方面，本公开涉及如本文提供的式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物，或其药学上可接受的盐、溶剂化物用于治疗PLK1活性失调导致的疾病和病状和/或与PLK1相关的疾病和病状。

[0115] 在还一方面，本公开涉及如本文提供的式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物，或其药学上可接受的盐、溶剂化物在制备用于治疗PLK1活性失调导致的疾病和病状和/或与PLK1相关的疾病和病状的药物中的用途。

[0116] 合成

[0117] 本公开的化合物可以使用合成有机化学领域技术人员的公知常识，通过下文描述的一般和特定方法制备。这种公知常识可见于标准参考书，例如，Barton和Ollis(编辑)，综合有机化学，Elsevier；Richard Larock，综合有机转化：官能团制备指南，John Wiley and Sons；和有机合成方法纲要，I–XII卷，Wiley–Interscience。

[0118] 下文描述的方案旨在提供用于制备本公开的化合物的方法的一般描述。本公开的一些化合物可以含有单个或多个具有立体化学名称(R)或(S)的手性中心。对本领域技术人员显而易见的是，无论材料是对映体富集的还是外消旋的，所有合成转化均可以以类似的方式进行。此外，期望的光学活性材料的解析可以使用公知的方法，例如本文和化学文献中描述的那些方法，在程序中的任何期望点进行。

[0119] 实施例

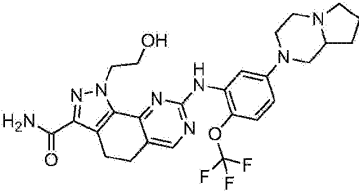
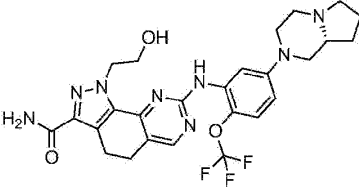
[0120] 为了更详细地描述本公开，提出以下实施例。本文描述的实施例用于说明本文提供的化合物、方法和组合物，并且不应以任何方式解释为限制它们的范围。

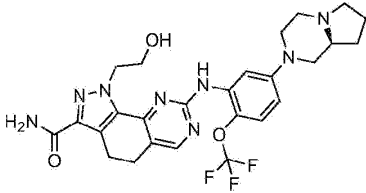
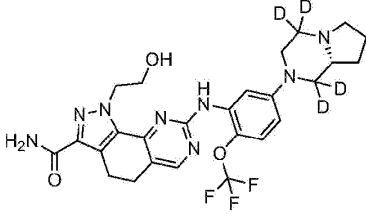
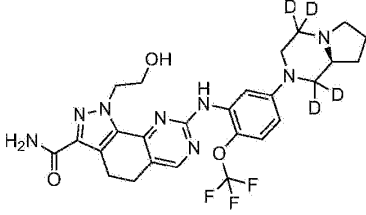
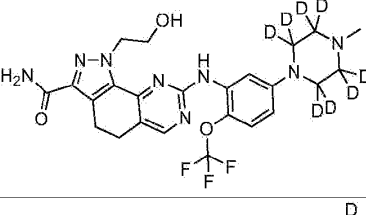
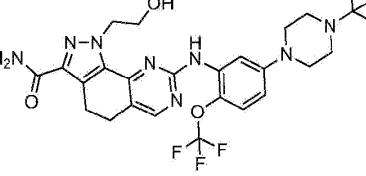
[0121] 在合成过程中，可能需要和/或期望保护任何相关分子上的敏感或反应性基团。这可以通过常规保护基团来实现，例如在T.W.Greene和P.G.M.Wutts，有机合成中的保护基团，第4版，John Wiley and Sons中所述的那些。使用本领域熟知的方法在方便的后续阶段任选地去除保护基团。

[0122] 本公开的化合物可以根据以下反应方案和实施例或其修改，使用容易获得的起始材料、试剂和常规合成程序容易地制备。在这些反应中，也可以使用本领域技术人员已知但未更详细提及的变体。此外，根据本文所述的反应方案和实施例，制备本公开的化合物的其他方法对于本领域技术人员将是显而易见的。除非另有说明，否则所有变量均如上定义。一般而言，化学程序中，所有试剂和起始材料均可购自商业供应商或可由本领域技术人员容易地制备。

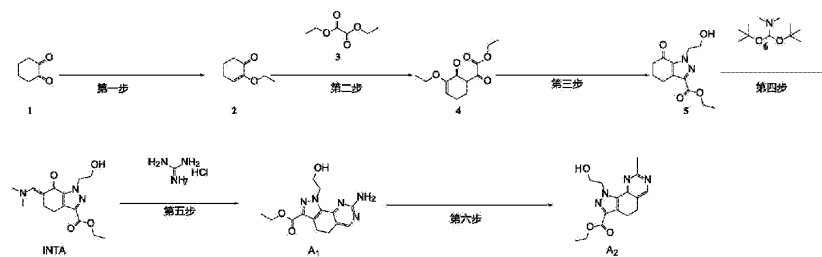
[0123] 示例性化合物如表1所示。

[0124] 表1

化合物 ID	结构
CPD01	 Chemical structure of CPD01: A complex molecule featuring a central pyrazolo[1,5-a]pyridine core. The core is substituted with a hydroxymethyl group (-CH ₂ OH) at position 4, a trifluoromethoxy group (-OCF ₃) at position 7, and a 4-(1,2,3,4-tetrahydropyridin-1-yl)phenyl group at position 8. The core is also substituted with a trifluoromethyl group (-CF ₃) at position 3 and a trifluoromethyl group (-CF ₃) at position 6.
CPD02	 Chemical structure of CPD02: A complex molecule featuring a central pyrazolo[1,5-a]pyridine core. The core is substituted with a hydroxymethyl group (-CH ₂ OH) at position 4, a trifluoromethoxy group (-OCF ₃) at position 7, and a 4-(1,2,3,4-tetrahydropyridin-1-yl)phenyl group at position 8. The core is also substituted with a trifluoromethyl group (-CF ₃) at position 3 and a trifluoromethyl group (-CF ₃) at position 6.

CPD03	
CPD04	
CPD05	
CPD06	
CPD07	

[0125] 中间体的制备



[0126] 第1步，化合物2的合成

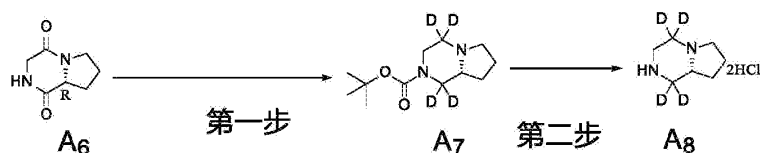
- [0127] 室温下, 化合物1(40.0g, 408.2mmol, 1.0eq)溶于EtOH(40mL)中, 加入对甲苯磺酸PTSA(7.0g, 40.8mmol, 0.1eq), 然后将混合物搅拌回流过夜。TLC显示没有化合物1残留后, 将混合物浓缩。残余物用EtOAc(200mL)溶解, 用饱和碳酸氢钠溶液(100mL×3)、无水Na₂SO₄洗涤, 并浓缩得到粗品, 残余物通过硅胶柱层析(石油醚/EtOAc=100:1)得黄色油状物化合物2(30.0g, 60.1%)。¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆): δ ppm 5.98(t, J=4.5Hz, 1H), 3.67(q, J=6.9Hz, 2H), 2.46–2.24(m, 4H), 1.95–1.77(m, 2H), 1.22(t, J=6.9Hz, 3H)。LCMS: 141.1([M+H]⁺)。
- [0128] 第2步, 化合物4的合成
- [0129] 化合物2(20.0g, 142.7mmol, 1.0eq)溶于THF(250mL), 氮气保护, -50℃下滴加LiHMDS(171mL, 171.2mmol, 1.2eq, 1M in THF), 滴加完毕, 在此温度下继续搅拌30分钟, 保持-50℃下滴加化合物3(22.2mL, 157.0mmol, 1.1eq), 滴加完毕, 恢复至室温, 搅拌过夜。LC-MS显示化合物2完全消失后, 冰水浴下, 以1N HCl(约180mL)调节pH至4, 混合物乙酸乙酯萃取3次, 每次300mL, 合并有机相, 并以无水硫酸钠干燥, 旋转蒸发除去溶剂得到残留物, 进一步以柱色谱纯化, 得到黄色油状物化合物4(20.0g, 58.3%)。¹H NMR(300MHz, CDCl₃): δ ppm 14.93(s, 1H), 5.88(d, J=4.8Hz, 1H), 4.34(q, J=6.9Hz, 2H), 3.82(q, J=6.9Hz, 2H), 2.89(t, J=6.9Hz, 2H), 2.40(q, J=5.1Hz, 2H), 1.50–1.32(m, 6H)。
- [0130] 第3步, 化合物5的合成
- [0131] 化合物4(20.0g, 83.3mmol, 1.0eq)溶于乙酸(200mL), 室温搅拌下加入2-羟乙基肼(6.3g, 83.3mmol, 1.0eq), 室温继续搅拌2小时, 至LCMS监测化合物4完全消失, 浓缩反应液, 残留物溶于500mL乙酸乙酯, 水洗、饱和碳酸氢钠洗涤3次, 饱和食盐水洗涤3次, 无水硫酸钠干燥后, 滤除干燥剂, 旋转蒸发除去溶剂, 得到淡黄色化合物5(16.0g, 76.2%)。¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆): δ ppm 4.86(t, J=5.7Hz, 1H), 4.54(t, J=5.7Hz, 2H), 4.29(q, J=6.9Hz, 2H), 3.72(q, J=5.7Hz, 2H), 2.93(t, J=6.0Hz, 2H), 2.62–2.42(m, 2H), 2.13–1.95(m, 2H), 1.30(t, J=7.2Hz, 3H)。LCMS: 253.1([M+H]⁺)。
- [0132] 第4步, 中间体Int-A的合成

- [0133] 化合物5(20.0g,79.3mmol,1.0eq)溶于DMF(180mL)加入化合物6(48.3g,237.9mmol,3.0eq),混合物60℃下搅拌2小时。LCMS监测显示化合物5完全消失后,将混合物冷却至室温,反应液倒入1000mL水中,乙酸乙酯萃取6次,合并有机相,饱和食盐水洗涤、无水硫酸钠干燥,滤除干燥剂,旋转蒸发出去溶剂得到淡黄色中间体Int-A(13.0g,66.7%),无需进一步纯化,¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆): δ ppm 7.48(s,1H),4.84(brs,1H),4.60(t,J=6.0Hz,2H),4.27(q,J=7.2Hz,2H),3.78-3.65(m,2H),3.11(s,6H),2.96-2.86(m,2H),2.86-2.76(m,2H),1.29(t,J=7.2Hz,3H)。
- [0134] 第5步,中间体A1的合成
- [0135] 中间体Int-A(6.0g,0.7mmol,1.0eq)溶于DMF(60mL),加入化合物7(4.7g,48.8mmol,2.5eq)。N₂保护下110℃反应12小时,LCMS监测反应至INT-A无残留,将混合物冷却至室温,反应液倒入180mL水中,乙酸乙酯萃取3次,合并有机相,饱和食盐水洗涤、无水硫酸钠干燥,滤除干燥剂,旋转蒸发出去溶剂得到粗品,柱色谱纯化得到淡黄色中间体(3.6g,60.8%)。 ¹H NMR(400MHz,CDCl₃): δ ppm 8.20(s,1H),5.10(s,2H),4.93(t,J=4.8Hz,2H),4.42(q,J=7.2Hz,2H),4.13(t,J=4.8Hz,2H),3.06(t,J=7.6Hz,2H),2.81(t,J=7.6Hz,2H),1.40(t,J=7.2Hz,3H)。LCMS:304.1([M+H]⁺)。
- [0136] 第6步,中间体A2的合成
- [0137] 将中间体A1(4.0g,13.2mmol,1.0eq)溶于DME(320mL)中,加入CsI(6.9g,26.4mmol,2.0eq), I₂(3.3g,13.2mmol,1.0eq), CuI(1.0g,5.3mmol,0.4eq)和亚硝酸异戊酯(4.6g,39.6mmol,3.0eq),反应液在80℃反应3小时,冷却至室温,析出白色固体,将白色固体滤除,200mL二氯甲烷溶解,溶液分别氨水洗涤、硫代硫酸钠溶液洗涤、饱和食盐水洗涤一次,无水硫酸钠干燥。滤除干燥剂,旋转蒸发出去溶剂得到粗品,柱色谱纯化得到黄色中间体A2(2.0g,36.6%)。 ¹H NMR(400MHz,CDCl₃): δ ppm 8.30(s,1H),4.92(t,J=4.8Hz,2H),4.42(q,J=7.2Hz,2H),4.14(t,J=4.8Hz,2H),3.15(t,J=7.2Hz,2H),2.94(t,J=8.0Hz,2H),1.41(t,J=7.2Hz,3H)。LCMS:415.1([M+H]⁺)。
- [0138] 中间体A4的合成



[0139] HOBt(4.0g,29.6mmol,1.0eq)溶于甲醇(40mL),加入氨水(2.4mL)室温搅拌5小时,析出固体,过滤得到白色固体,石油醚洗涤,晾干得到中间体A₄(3.6g,79.9%)。

[0140] 中间体A₈的合成



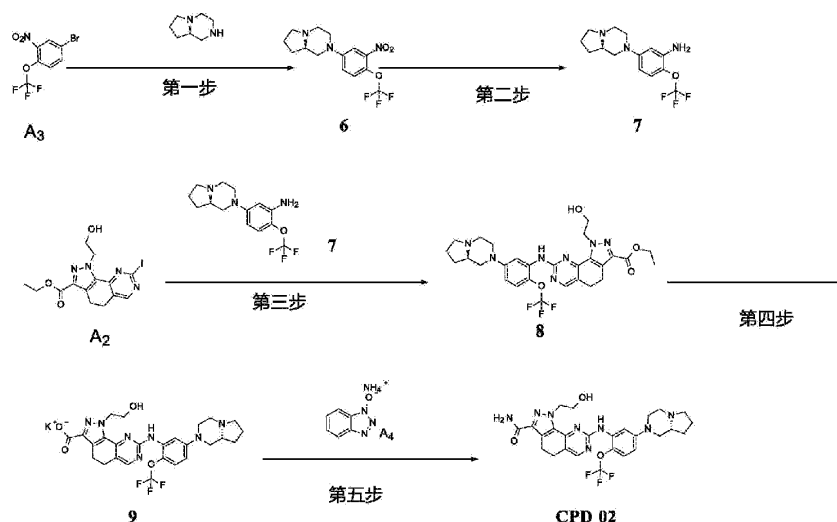
[0141] 第一步,合成A₇((R)-叔丁基六氢吡咯并[1,2-a]吡嗪-2(1H)-羧酸酯-1,1,4,4-d₄)

[0142] 将A₆(12g,77.4mmol)溶于CD₃OD(25mL)和DCM(500mL)混合溶液,加热回流8h,旋转蒸发除去溶剂,残留物重新溶解于CD₃OD(25mL)和DCM(500mL)中,回流8小时,除去溶剂得到白色固体。溶于THF(200mL),室温下加入LiAlD₄(8.13g,193.5mmol)。回流1小时,冷却至0℃,加入DCM(500mL)、水(8.13mL)和15%NaOH(8.13mL)。(Boc)₂O(33.75g,154.9mmol)和TEA(23.46g,232.2mmol)加入反应液,室温搅拌8小时,滤除不溶物,浓缩滤液,硅胶柱色谱纯化,得到棕色油状物A₇,粗品(12.7g,71%),LCMS:231.2[M+H]⁺

[0143] 第2步,合成A₈

[0144] 将上述中间体A₇溶于MeOH(10mL),加入二氧六环氯化氢溶液(4N,10mL)室温反应16小时,除去溶剂,不经进一步纯化,得到粗品A₈(1.26g)。

[0145] 合成实施例1.化合物CPD02、CPD03的合成



[0146] 第1步，合成化合物6

[0147] 中间体A3(550.0mg,1.9mmol,1.0eq)，X-phos(190.7mg,0.4mmol,0.2eq)，(R)-八氢吡咯并[1,2-A]吡嗪(718mg,5.7mmol, 3eq)和Cs₂CO₃(1.2g,3.8mmol,2.0eq)混合物中加入1,4-二氧六环(55mL)，室温下加入Pd₂(dba)₃(183.1mg,0.2mmol,0.1eq)，N₂置换反应体系气体3次，N₂保护下加热至90℃反应6小时，冷却至室温，浓缩反应液，并加入15mL水，二氯甲烷萃取3次，有机相饱和食盐水洗涤3次，无水硫酸钠干燥。滤除干燥剂，旋转蒸发出去溶剂得到粗品，柱色谱纯化得到淡黄色固体化合物6(370mg,58.1%)，LCMS:332.1([M+H]⁺)。

[0148] 第2步，合成化合物7

[0149] 化合物6(370.0mg,1.1mmol,1.0eq)溶于乙酸乙酯(7.4mL)，加入Pd/C(148.0mg,40%wt)。H₂下室温反应过夜，滤除催化剂，浓缩得到化合物7粗品(300mg)，粗品不经纯化，直接用于后续反应。LCMS:302.7([M+H]⁺)。

[0150] 第3步，合成化合物8

[0151] 在手套箱中，中间体A2(120.0mg,0.29mmol,1.0eq)，化合物7(174.6mg,0.58mmol,2.0eq)，K₂CO₃(120.1mg,0.87mmol,3.0eq)，BINAP(72.2mg,0.12mmol,0.4eq)以及Pd(OAc)₂(9.7mg,0.06mmol,0.2eq)的混合物中加入DMF(2mL)，加毕，N₂保护下120℃反应4小时，LCMS监测至中间体A2完全反应完，反应恢复至室温，加入水(10mL)，EtOAc萃取3次，有机相饱和食盐水洗涤3次，无水硫酸钠干燥。

滤除干燥剂，旋转蒸发出去溶剂得到粗品，柱色谱纯化得到棕色油状物化合物8(100mg,58.7%)。LCMS:588.2([M+H]⁺)。

[0152] 第4步，合成化合物9

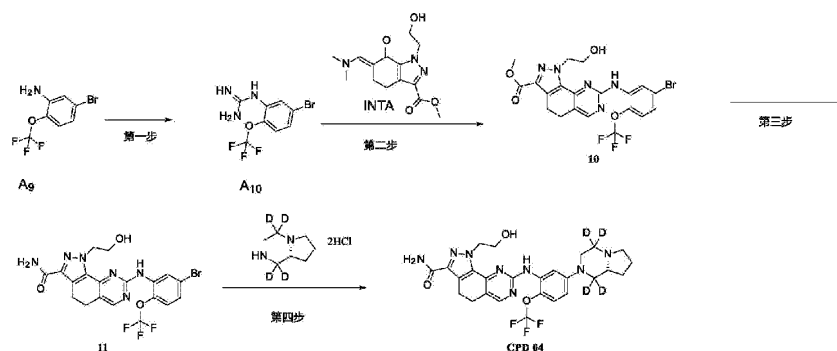
[0153] 化合物8(100mg,0.17mmol,1.0eq)溶于MeOH(1mL)、THF(1mL)和H₂O(1mL)，加入KOH(19.0mg,0.34mmol,2.0eq)，室温搅拌2小时，反应液浓缩，向残余物中加入5mL水，乙酸乙酯萃取3次。冻干水相得到化合物9(80mg)粗品，灰色。LCMS:560.2([M-K+H+H]⁺,酸形式的信号)。

[0154] 第5步，合成化合物CPD02

[0155] 将上述化合物9(80mg,0.14mmol,1.0eq)溶于DMF(2mL)，加入EDCI(80.2mg,0.42mmol,3.0eq)，中间体A4(63.8mg,0.42mmol,3.0eq)。室温搅拌4小时。HPLC监测至化合物9耗尽，加入10mL水，乙酸乙酯萃取3次，合并有机相，有机相无水硫酸钠干燥。滤除干燥剂，旋转蒸发出去溶剂得到粗品，经过制备液相Prep-HPLC(流动相：乙腈，0.1%甲酸，水从5%至35%)，冻干得到黄色固体粉末CPD02(10.0mg,2步综合产率10.5%)。¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆): δ ppm 8.85(s,1H),8.33(s,1H),7.43(s,1H),7.31-7.23(m,3H),6.80(dd,J=9.2,2.1Hz,1H),4.62(t,J=5.2Hz,2H),3.76(d,J=9.6Hz,1H),3.70-3.58(m,3H),3.10-2.90(m,4H),2.85-2.69(m,3H),2.42(t,J=10.4Hz,1H),2.21(td,J=11.2,3.2Hz,1H),2.13-1.95(m,2H),1.90-1.76(m,1H),1.76-1.60(m,2H),1.45-1.27(m,1H)。LCMS:559.1([M+H]⁺)。

[0156] 化合物CPD03的合成类似CPD02，结构谱图为¹H NMR(300MHz,DMSO-d₆): δ ppm 8.86(brs,1H),8.34(s,1H),7.44(s,1H),7.29-7.15(m,3H),6.80(dd,J=9.1,2.9Hz,1H),4.66-4.54(m,3H),3.80-3.70(m,1H),3.68-3.54(m,3H),3.08-2.93(m,4H),2.83-2.69(m,3H),2.31-2.22(m,1H),2.22-2.14(m,1H),2.09-1.96(m,2H),1.86-1.64(m,3H),1.43-1.29(m,1H)。LCMS:559.3([M+H]⁺)。

[0157] 合成实施例2.化合物CPD04的合成



[0158] 第一步，合成A10

[0159] 5-溴-2-三氟甲氧基苯胺A9(10.0g, 39.0mmol)溶于EtOH(30mL)，滴加含氰胺(3.28g, 78mmol)、EtOH(10mL)和H₂O(2mL)的溶液中，将37%的HCl(6.5mL)和EtOH(20mL)混合液滴加到混合物中，回流5天，反应液冷却至室温，浓缩后用水稀释；加入1N的NaOH至反应液呈碱性，用乙酸乙酯萃取数次，用硫酸钠干燥并浓缩，得到A10(3.2g, 27%)。

[0160] 第二步，合成中间体10

[0161] 将A10(29.3g, 98.3mmol, 1.2eq)溶于DMF(400mL)，加入中间体INT-A(24g, 81.9mmol, 1.0eq)的DMF溶液(200mL)。反应液在110℃下反应16小时冷却至室温，倒入冰水中，过滤不溶物得到白色固体化合物10(21.2g, 50%)。LCMS: 528.2, 530.2([M+H]⁺)。

[0162] 第三步，合成中间体化合物11

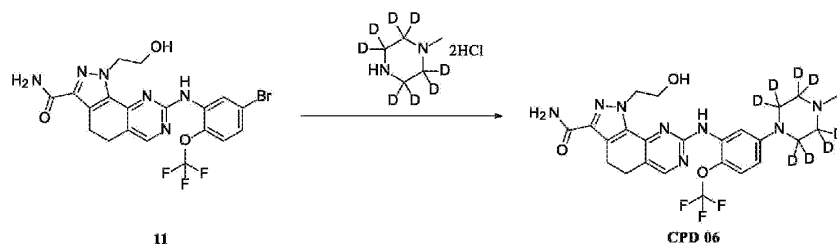
[0163] 化合物10(21.2g, 40.1mmol, 1.0eq)溶于THF(500mL)，加入NH₄Cl(6.44g, 120mmol, 3.0eq)和LiHMDS(240mmol, 6.0eq)，室温搅拌30分钟。旋转蒸发除去溶剂，残留物水洗涤，烘干得到白色固体化合物11(16.8g, 81.8%)，LCMS: 513.1, 515.1([M+H]⁺)。

[0164] 第四步，合成CPD04

[0165] 化合物11(2.0g, 3.9mmol, 1.0eq)、中间体A8(1.26g, 6.25mmol, 1.6eq)、Pd₂(dba)₃(285mg, 0.312mmol, 0.08eq)和Davephos(123mg, 0.312mmol, 0.08eq)的混合物中加入THF(100mL)和LiHMDSLi(40mL, 40mmol)，混合物100℃下反应2小时，加入水淬灭反应，EtOAc(50mL × 3)萃取反应液，合并有机相，旋转蒸发除去溶剂，残留

物硅胶柱色谱纯化得到目标产物白色固体CPD04(1g, 45.6%)。LCMS:563.3[M+H]⁺。 ¹H NMR(400MHz,Methanol-d₄) δ 8.30(s,1H),7.57(d,1H),7.26(dd,1H),6.85(dd,1H),4.79(t,2H),3.84(t,2H),3.69(d,1H),3.47(dt,1H),3.23(d,1H),3.07(q,3H),2.88(t,2H),2.20(dt,1H),2.14–2.05(m,2H),1.97(s,1H),1.85(q,1H)。

[0166] 合成实施例3.化合物CPD06的合成



[0167] 化合物11(2.0g,3.9mmol),1.0eq)、N-甲基哌嗪-2,2,3,3,5,5,6,6-D8盐酸盐(1.13g,6.25mmol,1.6eq)、Pd₂(dba)₃(285mg,0.312mmol,0.08eq)和Davephos(123mg,0.312mmol,0.08eq)的混合物中,加入THF(100mL)和LiHMDS(40mL,40mmol)。混合物100℃下反应2小时,加入水淬灭反应,EtOAc(50mL×3)萃取反应液,合并有机相,旋转蒸发除去溶剂,残留物硅胶柱色谱纯化得到目标产物白色固体CPD06(1g,47.4%)。LCMS:541.3[M+H]⁺, ¹H NMR(400MHz,DMSO-d₆) δ ppm 8.92(s,1H),8.34(s,1H),7.45(bs,1H),7.27–7.21(m,3H),6.80(dd,1H),4.62(q,3H),3.62(q,2H),2.97(t,2H),2.79(t,2H),2.49–2.32(m,3H)。

[0168] 试验实施例1.在小鼠中的药代动力学研究

[0169] 本研究的目的是研究本公开化合物在雌性CD1小鼠尾静脉注射(Intravenous Injections, IV)和口服给药(Oral administration, PO)后的药代动力学特性。小鼠给药后收集0小时、0.083小时、0.25小时、0.5小时、1小时、2小时、4小时、7小时和24小时的血浆,用LC-MS/MS检测不同时间点血浆的药物浓度,并使用WinNonlin软件计算相关药代动力学参数。

[0170] 1.1.试验材料

[0171] 1.1.1本实施例中使用的试剂和仪器信息如下所示:

[0172] 表2.试剂信息

试剂	货号	批号	品牌
DMSO	A00878	KDGLA04	Innochem
SBE-β-CD	C830138	C14707121	Macklin
MC	M0262	SLCL7954	Sigma-Aldrich
Tween-20	P1379	WXBD5553V	Sigma-Aldrich
NMS-P937	S81189	A03IS21133	上海源叶生物科技有限公司

[0173] 表3.仪器信息

仪器	品牌	型号
液相色谱仪	沃特世	ACQUITY SHIMADZU LC-30AD
质谱仪	沃特世	Xevo TQ-S Micro Sciex Triple Quad 5500
微量分析天平	赛多利斯科学仪器(北京)有限公司	SQP
涡旋振荡器	艾卡	IKA MS3 basic
高速冷冻离心机	艾本德中国有限公司	5810R

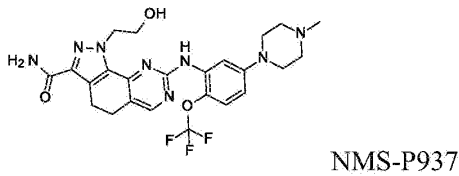
[0174] 1.1.2试验动物：

[0175] 实验用雌性CD1小鼠购自斯贝福实验动物技术有限公司，周龄6-8周，体重20-30g。将雌性CD1小鼠安置在可控环境中(设置温度为20-25℃和相对湿度为40-70%)。除因研究相关事件中断外，将维持12小时的光照/12小时的暗循环。

[0176] 1.2.试验步骤

[0177] 1.2.1实验化合物溶液配制

[0178] 本实施例中使用的阳性参照化合物为NMS-P937，其具有以下式所示结构：



[0179] 化合物溶液的配制在超净工作台中进行，现配现用，使用前混匀，确保制剂是均一的。具体的化合物配制方法见下表：

[0180] 5mg/mL化合物CPD02和CPD03储备液配制

受试化合物	浓度 (mg/mL)	质量 (mg)	DMSO (mL)
CPD02	5	1.18	0.234
CPD03	5	1.37	0.271
NMS-P937	5	1.33	0.263

[0181] 20mg/mL化合物CPD04、CPD06和NMS-P937储备液配制

受试化合物	浓度 (mg/mL)	质量 (mg)	DMSO (mL)
CPD04	20	1.79	0.090
CPD06	20	1.87	0.091
NMS-P937	20	2.06	1.03

- [0182] 1.2.2给药方式：
- [0183] 给药方式：IV
- [0184] 溶媒配比：10%DMSO+90%(20%SBE-β-CD)
- [0185] 表4.IV给药方式中所使用剂量

受试化合物	剂量 (mg/kg)	体积 (mL/kg)	浓度 (mg/mL)	储备液 (mL)	DMSO (mL)	20% SBE-β-CD (mL)
CPD02	2	5	0.4	0.080	0.020	0.900
CPD03	2	5	0.4	0.096	0.024	1.080
NMS-P937	2	5	0.4	0.096	0.024	1.080
CPD04	10	5	2	0.935	0.094	0.842
CPD06	10	5	2	0.895	0.090	0.806
NMS-P937	10	5	2	1.030	0.103	0.773

- [0186] 给药方式：PO
- [0187] 溶媒配比：10%DMSO+90%(20%SBE-β-CD)
- [0188] 表5.PO给药方式中所使用剂量

受试化合物	剂量 (mg/kg)	体积 (mL/kg)	浓度 (mg/mL)	储备液 (mL)	20% SBE-β-CD (mL)
CPD02	5	10	0.5	0.100	0.900
CPD03	5	10	0.5	0.120	1.080
NMS-P937	5	10	0.5	0.120	1.080

- [0189] 溶媒配比：0.5%MC+1%Tween-20
- [0190] 表6.PO给药方式中所使用剂量

受试化合物	剂量 (mg/kg)	体积 (mL/kg)	浓度 (mg/mL)	储备液 (mL)	0.5% MC +1% Tween-20 (mL)
CPD04	10	10	1	1.510	1.510
CPD06	10	10	1	1.430	1.430
NMS-P937	10	10	1	1.440	1.440

- [0191] 1.2.3药物施用和血液样品采集方案
- [0192] 实验开展前对所用动物进行随机分组。给药前小鼠禁食12小时，给药后4小时恢复自由进食。动物分组及采血时间点安排见下表。
- [0193] 表7.动物分组及采血时间点安排

化合物	给药方式	剂量 (mg/kg)	浓度 (mg/mL)	体积 (mL/kg)	动物数量 (只)	采血时间点
CPD02、CPD03 和 NMS-P937	IV	2	0.4	5	N=3	0 分钟、5 分钟、15 分钟、30 分钟、1 小时、2 小时、4 小时、7 小时、24 小时

	PO	5	0.5	10	N=3	0 分钟、5 分钟、15 分钟、30 分钟、1 小时、2 小时、4 小时、7 小时、24 小时
CPD04、CPD06 和 NMS-P937	IV	10	1	10	N=3	0 分钟、5 分钟、15 分钟、30 分钟、1 小时、2 小时、4 小时、7 小时、24 小时
	PO	10	1	10	N=3	0 分钟、5 分钟、15 分钟、30 分钟、1 小时、2 小时、4 小时、7 小时、24 小时

[0194] 将所有血液样品移入含抗凝剂(EDTA-K₂)的塑料微型离心管中，然后在4℃下，以4000g离心5分钟，将上清液移入不含抗凝剂的微型离心管中，将血浆保存在-75 ± 15℃冰箱中待检测。

[0195] 1.3.数据和结果

[0196] 将采血得到的样品经HPLC纯化和质谱检测分析得到本公开化合物血浆浓度-时间曲线。

[0197] 其中，针对化合物CPD02和CPD03，使用HPLC仪器沃特世ACQUITY，HPLC纯化条件如下表：

[0198] 表8.HPLC纯化条件

色谱柱:	XSelect Hss T3 2.5µm (2.1×50 mm) Column XP		
柱温:	40°C		
运行时间:	2 min		
流动相 A:	水 (含 0.1% 甲酸)		
流动相 B:	乙腈 (含 0.1% 甲酸)		
进样量:	10µL		
时间 (min)	流速 (mL/min)	水 (含 0.1% FA)	乙腈 (含 0.1% FA)
初始	0.5	95.0	5.00
0.30	0.5	95.0	5.00
0.80	0.5	5.00	95.0
1.20	0.5	5.00	95.0
1.50	0.5	95.0	5.00
2.00	0.5	95.0	5.00

[0199] 其中，针对化合物CPD04和CPD06，使用HPLC仪器AB SHIMADZU LC-30AD，HPLC纯化条件如下表：

[0200] 表9.HPLC纯化条件

色谱柱：	XSelect Hss T3 2.5μm (2.1×50 mm) Column XP		
柱温：	40°C		
运行时间：	2 min		
流动相 A：	水 (含 0.1% 甲酸)		
流动相 B：	乙腈 (含 0.1% 甲酸)		
进样量：	10μL		
时间 (min)	流速 (mL/min)	水 (含 0.1% FA)	乙腈 (含 0.1% FA)
初始	0.8	95.0	5.00
0.30	0.8	95.0	5.00
1.00	0.8	2.00	98.0
1.48	0.8	2.00	98.0
1.51	0.8	95.0	5.00
2.00	0.8	95.0	5.00

[0201] 非房室模型法估算药代动力学参数(采用Phoenix WinNonlin软件计算)。IV药代动力学参数包括CL、T_{1/2}、C₀、AUC、MRT、V_{ss}；PO药代动力学参数包括T_{1/2}、T_{max}、C_{max}、AUC、MRT等。

[0202] 生物利用度F的计算公式如下：

$$F=\left[\frac{AUC_{PO}\times剂量_{IV}}{AUC_{IV}\times剂量_{PO}}\right]\times100\%$$

[0203] 在本实施例中获得的本公开化合物的药代动力学参数总结如下：

[0204] 表10.SD小鼠静脉注射给药药代动力学参数

化合物	剂量 (mg/kg)	t _{1/2} (hr)	AUC _{last} (hr*ng/mL)	V _{ss} (L/kg)	CL (mL/min/kg)
CPD02	2	1.36	404	3.05	81.7
CPD03	2	3.76	433	4.29	79.1
NMS-P937	2	1.52	353	5.71	95.7
CPD04	10	1.06	3341	2.31	50.1
CPD06	10	1.05	3051	3.02	55.1
NMS-P937	10	3.52	4539	3.22	36.9

[0205] 表11.SD小鼠灌胃给药药代动力学参数

化合物	剂量 (mg/kg)	t _{1/2} (hr)	t _{max} (hr)	C _{max} (ng/mL)	AUC _{last} (hr*ng/mL)	F (%)
CPD02	5	2.71	0.500	169	359	38.0
CPD03	5	3.03	0.417	62.7	144	16.2
NMS-P937	5	2.62	0.833	55	167	20.5
CPD04	10	1.44	0.667	613	1397	42.8
CPD06	10	1.16	0.333	510	1288	43.1
NMS-P937	10	1.14	0.333	599	1212	27.1

[0206] 由药代动力学数据可知，本公开化合物在小鼠体内具有合适的半衰期，立体化的设计R构型分子CPD02口服生物利用度显著高于S构型CPD03，且高于NMS-P937，氕代化合物的生物利用度显著高于非氕代分子(CPD04对比CPD02，CPD06对比NMS-P937)。

[0207] 试验实施例2.对细胞系PSN1的增殖抑制活性

[0208] 2.1.试验材料

[0209] 本实施例中使用的试剂和仪器信息如下所示：

[0210] 表12细胞系信息

细胞系	厂家	培养基
PSN1	南京科柏	RPMI 1640+10%FBS

[0211] 表13.主要试剂耗材信息

名称	供应商	货号
CellTiter-Glo®	Promega	G7572
RPMI-1640	VivaCell	C3010-0500
DMEM	VivaCell	C3113-0500
IMDM	ATCC	ATCC®30-2005
胎牛血清	ExCellBio	FND500
胰岛素	BasalMedia	S454T0
胰蛋白酶 (2.5%)	Gibco	15090-046
马血清	LIFE	16050122
96 孔板	Agilent Technologies	204626-100

[0212] 表14.仪器和软件信息

目录	供应商	货号
恒温箱	RADOBIO	Herocell 180
生物安全柜	AIRTECH	BSC-1304 II A2
自动细胞计数器	Thermo	Countess III
多标签阅读器	PE	Ensign
GraphPad Prism 8.0 软件	/	/

[0213] 表15.化合物信息及储备液配制

化合物	MW	质量 (mg)	储备浓度 (mM)	DMSO 体积 (μL)
CPD02	558.57	1.10	20	98.5
CPD03	558.57	1.08	20	96.7
CPD04	562.59	2.01	20	178.6
CPD06	540.58	2.1	20	194.2
NMS-P937	532.53	2	20	187.8

[0214] 2.2试验方法

[0215] 第0日：铺板

[0216] a)贴壁细胞需要消化离心，悬浮细胞直接离心即可；

[0217] b)用完全培养基重悬，使用自动细胞计数器计数；

[0218] c)PSN1每孔铺板6000个细胞，将细胞悬浮液稀释至所需密度；

[0219] d)每孔铺100 μ L细胞，37℃，5 % CO₂培养箱过夜培养以稳定平衡细胞。

[0220] 第1日：化合物配制和加入

[0221] a)化合物用DMSO配制为终浓度200倍的溶液；

[0222] b)用完全培养基将200倍的化合物稀释到终浓度3倍；

[0223] c)每孔加50 μ L化合物，以加入同样体积的培养基孔作为对照，在37℃，5 %

[0224] CO₂培养箱中继续培养72小时。

[0225] 第4日：检测

[0226] a)细胞板和CTG试剂平衡至室温；

[0227] b)每孔加30 μ L CellTiter-Glo® 试剂；

[0228] c)室温静置15分钟；

[0229] d)酶标仪检测。

[0230] 数据分析

[0231] 1)使用GraphPad Prism 8计算IC₅₀；

[0232] 2) % Inh = (1 - (Raw data - Mean_{min}) / (Mean_{max} - Mean_{min})) × 100；

[0233] 3)Mean_{max}为阳性对照孔，只有细胞和同等体积的培养基；

[0234] 4)Mean_{min}为阴性对照孔，只有培养基；

[0235] 5)Raw data添加化合物孔的信号值，若是2个复孔，则表示为Raw1和Raw2。

[0236] 2.3.试验结果

[0237] 本公开化合物对PSN1细胞增殖的半数抑制浓度IC₅₀见表16

[0238] 表16本公开化合物对PSN1细胞增殖的IC₅₀

化合物编号	最大抑制抑制百分比	最大抑制抑制百分比	IC ₅₀ (nM)
CPD02	80.8	6.7	67.6
CPD03	73.6	-3.1	255.9
CPD04	87.6	1.3	105.0
CPD06	93.7	13.7	57.0
NMS-P937	85.9	2.3	53.7

[0239] 由细胞增殖抑制试验结果可知，本公开化合物对胰腺癌细胞系(PSN1)有明显的抑制生长的作用，立体化的设计R构型分子CPD02敏感性高于S构CPD03，氘代化合物与非氘代分子的生物学活性(PSN1)没有显著差别(CPD04对CPD02，CPD06对比NMS-P937)。

[0240] 试验实施例3.肝微粒体代谢稳定性评价

[0241] 3.1.试验材料

[0242] 本实施例中使用的材料如下表17-19所示：

[0243] 表17.化合物信息

化合物名称	质量	分子量	浓度	溶剂 (μL) -DMSO	配制日期
CPD04	1.80mg	562.59	10mM	320	20230510
CPD06	3.13mg	540.58	10mM	579	20230510
NMS-P937	2.65mg	523.53	10mM	498	20230510
CPD02	1.73mg	558.57	10mM	310	20230510

[0244] 表18.微粒体信息

名称	品牌或供应商	货号	批号
人类肝脏微粒体，男性和女性	Gentest	452117	38297
雄性小鼠肝微粒体，雄性 CD-1	Gentest	452701	1313002

[0245] 表19.试剂信息

名称	品牌或供应商	货号	批号
NADPH	Solarbio	N8100	812P021
ketoprofen	MCE	HY-B0227	105978
Labetalol hydrochloride	MCE	HY-B1108	108780
Alprazolam	sigma	A-903-1ML	FE12172003
MeOH	Fisher	A452-4	213476
ACN	Honeywell	LC015-1-1	EB072-CN
DMSO	Solarbio	D8372	1121C0310
MgCl ₂	Solarbio	M8161	111D031
UDPGA	源叶	S18073	O11GS162290
NADPH*	solarbio	N8100	812P021
Alamethicin	MCE	HY-N6708	133878

[0246] 3.2.试验方法

[0247] 3.2.1试剂配制

名称	储液浓度	体积 (μL)	终浓度
Phosphate Buffer	100mM	266	100mM
Saline			
MgCl ₂	50mM	40	5mM
NADPH	10mM	40	1mM
UDPGA	20mM	40	2mM
Liver Microsomes	20mg/mL	10	0.5mg/mL
Alamethicin	5mg/mL	2	0.025mg/mL
Test compound	400μM	2	2μM
Total		400	

[0248] 3.2.2实验操作

- [0249] 1)用PBS配制0.6289mg/ml的微粒体溶液。
- [0250] 2)向96孔孵育板中每孔加入318 μ L 0.6289mg/mL微粒体溶液。
- [0251] 3)在孵育板中加入40 μ L 10mM NADPH溶液和40 μ L 20mM UDPGA溶液，对于阴性样品，加入80 μ L PBS(100mM,pH=7.4)溶液，800转/分涡旋10秒后于37℃水浴中预孵育10分钟。
- [0252] 4)预孵育后，每孔加入2 μ L对照药或者待测化合物启动反应，反应在37℃水浴，60转/分下进行。
- [0253] 5)分别在0.5,15,30,45,60分钟时，每孔取出50 μ L反应体系，加入到200 μ L冷的含内标甲醇溶液中，使反应终止。
- [0254] 6)混匀，在4℃，4000rpm离心30分钟。
- [0255] 7)取100 μ L上清液与100 μ L超纯水混匀后用于液质分析
- [0256] *内标:50nM alprazolam，50nM labetalol和100nM ketoprofen

- [0257] 3.2.3数据处理
- [0258] 采用内标法，样品峰面积与内标峰面积比值用于计算剩余百分数(以0.5分钟样品与内标峰面积比值为100%)
- [0259] 剩余百分数的自然对数与孵育时间作图，直线斜率即为消除速率常数k

$$t_{1/2}(\text{min})=-\frac{0.693}{k}$$
$$CL_{int}(\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg 蛋白})=\frac{\text{孵育体积}(\mu\text{L})}{\text{孵育蛋白}(\text{mg})}\times\frac{0.693}{t_{1/2}}$$

- [0260] 3.3.试验结果
- [0261] 本公开化合物肝微粒体代谢稳定性评价结果见表20
- [0262] 表20.肝微粒体代谢稳定性数据汇总

化合物	种属	剩余量 (%)					T _{1/2} (min)	CL _{int} (μL/min/mg 蛋白)
		0.5 分钟	15 分钟	30 分钟	45 分钟	60 分钟		
Diclofenac	人	100.00	10.78	5.62	3.65	2.93	7.13	194.50
		100.00	105.89	102.20	104.38	91.57		
Diclofenac	小鼠	100.00	61.24	56.66	51.87	45.26	20.49	67.63
		100.00	114.45	108.86	109.75	114.70		
CPD04	人	100.00	52.72	28.62	21.10	13.41	20.95	66.17
		100.00	86.71	108.16	107.82	102.03		
CPD04	小鼠	100.00	61.30	39.18	34.10	26.56	31.93	43.41
		100.00	103.15	96.04	101.86	109.33		
CPD06	人	100.00	86.05	73.64	68.37	63.15	89.92	15.41
		100.00	93.25	90.15	89.75	91.37		
CPD06	小鼠	100.00	81.80	68.21	64.96	57.01	76.33	18.16
		100.00	87.75	92.85	96.22	89.24		
NMS-P937	人	100.00	80.23	73.16	69.74	58.94	86.35	16.05
		100.00	102.54	96.00	101.77	90.35		
NMS-P937	小鼠	100.00	82.56	69.31	61.60	53.17	66.38	20.88
		100.00	93.89	92.17	88.22	85.68		
CPD02	人	100.00	54.16	32.53	22.97	13.71	21.38	64.82
		100.00	103.64	103.22	102.41	97.08		
CPD02	小鼠	100.00	56.76	39.33	30.29	26.56	31.53	43.95
		100.00	103.87	96.01	95.65	88.91		

- [0263] 结论：本公开化合物体外清除率中等
- [0264] 试验实施例4.待测物渗透性及转运体底物试验评价
- [0265] 4.1.试验材料
- [0266] 4.1.1化合物信息

化合物名称	质量	批号	分子量	浓度	溶剂 (μL) DMSO	配制日期
CPD04	1.80mg	-	562.59	10mM	320	2023/05/10
CPD06	3.13mg	-	540.58	10mM	579	2023/05/10
NMS-P937	2.65mg	-	532.53	10mM	498	2023/05/10
CPD02	1.73mg	-	558.57	10mM	310	2023/05/10

[0267] 4.1.2阳性对照药信息

化合物	货号	批号	来源	分子量	工作液浓度
普萘洛尔	HY-B0573	26496	MCE	295.80	10 mM

地高辛	HY-B1049	121301	MCE	780.94	10 mM
哌唑嗪	HY-B0193A	15874	MCE	419.86	10 mM

[0268] 4.2.试验方法

[0269] 4.2.1 Caco-2细胞培养

[0270] a)在Transwell板每孔的上室和下室中分别加入50 μ L和25mL的细胞培养基；

[0271] b)种细胞前将Transwell板在37℃，5 %CO₂条件下预孵育1小时；

[0272] c)将密度为2 × 10⁵cells/mL的细胞悬液50 μ L种于上室内，在37℃、5 %CO₂、95 %相对湿度的细胞培养箱中培养14-21天，每隔两天换液一次；

[0273] d)7天内每隔一天更换一次细胞培养基，7天后每天更换一次；

[0274] e)用EVOM3测量单层膜上的电阻值(TEER)。

[0275] 4.2.2 ABBA测试过程

[0276] a)用预热HBSS(10mM HEPES,pH 7.4)清洗transwell板2次，然后在37℃孵育30分钟；

[0277] b)准备试验化合物的1mM DMSO储备液，并用缓冲液(pH 7.2 ~ 7.4)稀释200倍至5 μ M；

[0278] c)A到B侧：向上室加入75 μ L 5 μ M工作液，向下室加入235 μ L HBSS(10mM HEPES,pH 7.4)；

[0279] d)B到A侧：下室加入235 μ L 5 μ M工作溶液，上室加75 μ L HBSS(10mM HEPES，pH 7.4)；

- [0280] e)将50 μ L 5 μ M的工作液转移到含有200 μ L预冷的甲醇内标的样品板上作为零点；
- [0281] f)在37℃，5% CO₂,95%相对湿度条件下培养2小时；
- [0282] g)孵育2小时后，每个孔转移50 μ L到含有200 μ L带甲醇内标的样品板上；
- [0283] h)样品板于4000rpm离心30分钟；
- [0284] i)将100 μ L上清液转移到含有100 μ L水的分析板上，离心10min后进行LC-MS/MS分析
- [0285] 4.2.3数据分析
- [0286] 利用Microsoft Excel计算表观渗透系数(P_{app},cm/s)和外排比。

$$P_{app} = \frac{V_A \times C_{acceptor} \times 100}{\text{面积} \times \text{时间} \times C_{initial,donor}}$$

$$\text{外排比} = \frac{P_{app(B-A)}}{P_{app(A-B)}}$$

$$\text{Recovery}\% = \frac{V_{acceptor} \times C_{acceptor} + V_{donor} \times C_{donor}}{V_{donor} \times C_{initial,donor}} \times 100$$

- [0287] V_{acceptor}=0.235mL，对于A→B，以及0.075mL，对于B→A
- [0288] V_{donor}=0.075mL，对于A→B，以及0.235mL，对于B→A
- [0289] 面积=膜表面积,cm²(0.143，对于Corning 3391)
- [0290] 时间=总转运时间，s
- [0291] 4.3.分类标准

参数	分类	标准
渗透性	低渗透性	P _{app} (A -B) < 2E-6 cm/s
	中渗透性	2E-6 cm/s <P _{app} (A -B) < 20E-6 cm/s
	高渗透性	P _{app} (A -B)> 20E-6 cm/s
外排转运体底物	可能是	ERa≧2
	可能性很小或不是	ERa<2

- [0292] 4.4.试验结果
- [0293] 本公开化合物在Caco-2细胞的渗透性结果见表21

[0294] 表21.Caco-2细胞的渗透性结果

化合物	平均 P _{app} (1E-6 cm/s)		外排率 (ERa)	渗透性	分类
	Papp A-B	Papp B-A			
普萘洛尔	22.32	14.73	0.66	61.61	可能性很小或不是
地高辛	0.94	26.07	27.84	78.46	可能是
哌唑嗪	8.97	29.57	3.30	71.80	可能是
CPD04	4.20	25.15	5.98	53.35	可能是
CPD06	5.18	34.74	6.71	79.65	可能是
NMS-P937	6.09	34.16	5.61	71.57	可能是
CPD02	7.83	23.78	3.04	67.07	可能是

[0295] 试验实施例5.待测物溶解度试验评价

[0296] 5.1.试验材料

名称	品牌或供应商	货号	批号
PBS	ICE	-	20230509
Progesterone	MCE	57-83-0	16163
FaSSIF/FeSSIF/FaSSGF Powder	Biorelevant	FFF02	FFF-0421-E
1.5mL MTP System-(Topas)	JG Finneran	9915LC-812FT	436021308MTP
DMSO	Solarbio	D8372	1121C0310

[0297] 5.2.试验方法

[0298] 5.2.1溶液(buffer)配制

[0299] 称取7.098g Na₂HPO₄(溶液A)溶于500mL超纯水，超声溶解；称取3.40g KH₂PO₄(溶液B)于250mL超纯水，超声溶解。将B溶液缓慢滴加到A中，调节pH至7.40±0.05。

[0300] 5.2.2试验操作

- [0301] a)在三个单独的1.5mL玻璃小瓶中称取约1.0mg化合物(一个小瓶用于制备标准溶液，另外两个用于测试溶解度)；
- [0302] b)将适当体积(约1000 μ L)的测定缓冲液加入到每瓶溶解度样品中，终浓度为1mg/mL；
- [0303] c)将PTFE封装的不锈钢棒式搅拌器放入每个小瓶中，然后使用PTDE/SIL硅胶塞密封小瓶；
- [0304] d)将溶解度样品板转移到Thermomixer Comfort plate shaker板振荡器中，1100rpm，25℃，震荡24小时；
- [0305] e)24小时后，使用磁铁取出搅拌棒；
- [0306] f)移取200 μ L样品至过滤板中，抽滤，接收滤液；

- [0307] g)将10 μ L过滤后的样品和10 μ L DMSO加入到980 μ L甲醇中，进一步用甲醇:水(1:1)稀释10倍作为过滤样品用于LC-MS/MS分析；
- [0308] h)对于标准样品，加DMSO至终浓度为1.0mg/mL。以1100rpm，25℃摇动5分钟；
- [0309] i)将10 μ L的1mg/mL DMSO样品和10 μ L缓冲液加入到980 μ L甲醇中，然后用甲醇:水(1:1)稀释10倍作为标准样品进行LC-MS/MS分析。

[0310] 5.2.3数据处理

[0311] 使用Excel计算溶解度。

$$\text{Solubility } (\mu\text{M}) = \frac{\text{Area}_{\text{filtered}} \times \text{DF}_{\text{filtered}}}{\text{Area}_{\text{std}} \times \text{DF}_{\text{std}}} \times [\text{std}] \times \text{DF}_{\text{std}}$$

[0312] 5.3.试验结果

[0313] 本公开化合物溶解度结果见表22

[0314] 表22热力学溶解度数据汇总

化合物	溶剂	溶解度 (mg/mL)
CPD04	pH 7.4	0.0030
CPD06	pH 7.4	0.0226
NMS-P937	pH 7.4	0.0248
CPD02	pH 7.4	0.0021

[0315] 5.4.试验结论

[0316] 本公开的化合物与NMS-P937溶解度相当。

[0317] 试验实施例6.化合物在小鼠体内结直肠癌药效学研究

[0318] 6.1.试验材料

[0319] Balb/c nude小鼠，SPF级，雌性，周龄6-8w，体重16-20g，购于斯贝福(北京)生物技术有限公司

[0320] HCT116细胞：购于ATCC；

[0321] 体内药效实验所用试剂及仪器见表23、表24。

[0322] 表23.体内药效实验所用试剂

名称	规格	生产厂家	批号
PBS (磷酸盐缓冲液)	500mL/瓶	大连美仑生物技术有限公司	MA0015-Sep-27G
RPMI1640 培养基	500mL/瓶	大连美仑生物技术有限公司	MA0215-Dec-17G
胎牛血清 (FBS)	500mL/瓶	ExcellBio	12A222
胰蛋白酶-EDTA 消化液 (0.25%)	100mL/瓶	Solarbio	20220328
青链霉素	100mL/瓶	Solarbio	20211027
灭菌注射用水	500mL/瓶	大连美仑生物技术有限公司	PWL093-Mar-25H

[0323] 表24.体内药效实验所用仪器设备

名称	型号	生产厂家	应用
----	----	------	----

CO ₂ 培养箱	3111	Thermo	细胞培养
显微镜	IX53	Olympus	细胞培养
超净工作台	YT-CJ-1N	北京亚泰科隆仪器技术有限公司	细胞培养
超净工作台	SW-CJ-1FD	苏州净化设备有限公司	配药
超净工作台	YT-CJ-2NH	北京亚泰科隆仪器技术有限公司	体内实验操作
电子天平	EJ-1201C	北京朗科兴业称重设备有限公司	体内实验操作

[0324] 6.2.试验方法

[0325] 6.2.1细胞培养

[0326] 用含有灭活的10%胎牛血清，100U/mL的青霉素和100 μg/mL的链霉素以及2mM谷氨酰胺的RPMI-1640培养基在37℃、5% CO₂的培养箱中培养HCT116细胞待细胞长满后分瓶传代，将处于对数生长期的肿瘤细胞用于体内肿瘤的接种。

[0327] 6.2.2肿瘤细胞接种与分组

[0328] 肿瘤细胞用PBS洗涤两次，调整细胞浓度为5 × 10⁷/ml重悬的肿瘤细胞接种至实验动物的右侧肋部皮下，100 μl/小鼠，即5 × 10⁶/小鼠。待肿瘤生长至平均肿瘤体积达到100 ~ 150mm³时，根据肿瘤体积分组给药，共7组，每组8只动物，具体给药方案见表25。以分组给药第1天记为PG-D0。

[0329] 表25.给药方案表

组别	动物数	治 疗	剂量 (mg/kg)	给药途径	给药频率	给药周期
1	8	溶媒	--	p.o.	q.d.	连续 10 天
2	8	CPD04	30	p.o.	q.d.	连续 10 天
3	8	CPD04	60	p.o.	q.d.	连续 10 天
4	8	CPD06	30	p.o.	q.d.	连续 10 天
5	8	CPD06	60	p.o.	q.d.	连续 10 天
6	8	NMS-P937	30	p.o.	q.d.	连续 10 天
7	8	NMS-P937	60	p.o.	q.d.	连续 10 天

- [0330] 注：给药容积为10μl/g。p.o.：灌胃给药。q.d.：每天给药一次，连续给药10天。
- [0331] 6.2.3剂量调整或暂停
- [0332] 给药期间注意观察动物健康状态，若出现以下任何一项情况时，将暂停给药：
- [0333] 1)动物体重降低至开始药物处理时体重的85%以下，停止给药，至体重恢复到开始药物处理时的90%后继续给药；
- [0334] 2)给药后，动物出现进行性行动迟缓或异常(例如体温降低、呼吸困难、腹泻、弓背、惊厥等)将暂停给药，至动物行动及一般状态恢复正常后继续给药。
- [0335] 6.2.4实验动物人道终点
- [0336] 在实验过程中，若出现以下任何一项情况时，应对动物采用CO₂实施安乐死：
- [0337] 1)动物出现行动异常或瘫痪，不能自行摄食饮水；
- [0338] 2)动物体重降低超过开始药物处理时体重的20%，兽医认为严重影响动物福利和/或实验正常进行。
- [0339] 6.2.5实验动物安乐死
- [0340] 实验结束或实施人道终点时，使用CO₂将动物执行安乐死。
- [0341] 6.2.6检测指标
- [0342] 一般观察
- [0343] 分组后直至实验结束时，每天观察1次，观察内容包括但不限于肿瘤接种部位、动物精神状态、饮食、运动情况等。
- [0344] 体重检测
- [0345] 分组后直至实验结束时，每3天1次使用电子天平称量小鼠体重。
- [0346] 肿瘤体积

- [0347] 分组后直至实验结束时，每3天1次使用电子游标卡尺测量小鼠肿瘤的长径和短径，其体积计算公式为：体积(TV)=0.5×长径×短径²。
- [0348] 肿瘤瘤体拍照
- [0349] 实验结束时，将小鼠安乐死，剥离肿瘤，并将对照组和受试组剥离的肿瘤摆放整齐进行拍照。
- [0350] 6.2.7药物评价指标
- [0351] 肿瘤生长抑制率TGI_{TV}(%)
- [0352] 肿瘤生长抑制率(%)=(1-T/C)×100%
- [0353] T/C=治疗组平均RTV/对照组平均RTV
- [0354] RTV为相对肿瘤体积，即给药后与给药前的肿瘤体积比值
- [0355] 肿瘤生长抑制率≥30%，并经统计学处理p<0.05为有效。
- [0356] 瘤重抑制率TGIT_w(%)
- [0357] 瘤重抑制率(%)=(1-T/C)×100%
- [0358] T/C=治疗组平均TW/对照组平均TW
- [0359] TW为肿瘤重量
- [0360] 瘤重抑制率≥30%，并经统计学处理p<0.05为有效。
- [0361] 6.2.8统计学分析
- [0362] 利用Graphpad prism 8统计学软件，应用One-Way ANOVA检验(方差齐性)对肿瘤体积和肿瘤重量进行组间统计学分析，p<0.05认为有显著性差异。
- [0363] 6.3.试验结果
- [0364] 6.3.1测试药物对HCT116皮下移植瘤小鼠模型的抑瘤作用
- [0365] 如图2所示：小鼠经口服给药10天，实验结束时(PG-D22)，与溶媒组相比，60mg/kg的CPD04给药组，以及30mg/kg和60mg/kg的CPD06、NMS-P937给药组均能显著抑制小鼠肿瘤生长，各CPD04、CPD06和NMS-P937剂量组对肿瘤的抑制呈现出剂量依赖效应，各组的肿瘤生长抑制率(TGI_{TV})见表26
- [0366] 表26.试验终点各组的肿瘤生长抑制率(TGI_{TV})

治疗	剂量 (mg/kg)	TGI (%)	显著性 (p值)
CPD04	30	7.6	p<0.01
CPD04	60	30.5	p<0.0001
CPD06	30	42.4	p<0.0001
CPD06	60	75.6	p<0.0001
NMS-P937	30	44.1	p<0.0001
NMS-P937	60	64.2	p<0.0001

- [0367] 6.3.2测试药物在HCT116皮下移植瘤小鼠模型上的安全性
- [0368] 如图3所示，治疗期间，NMS-P937 60mg/kg组3只小鼠分别死于PG-D12和PG-D16，NMS-P937组小鼠体重波动较大，体重下降可能是由于荷瘤鼠对NMS-P937耐受性不佳所致，在停药后，个别动物状态未能及时缓解导致死亡，而其他组在治疗期间体重下降范围小于10%。
- [0369] 6.4.试验结论
- [0370] 综上所述，在HCT116皮下移植瘤小鼠模型中，各CPD04、CPD06和NMS-P937剂量组呈剂量依赖性抑制小鼠肿瘤生长。CPD06 60mg/kg给药组抑制肿瘤生长作用显著优于其他各治疗组，TGI_{TV}达到75.6%，并且显示出明显优于同剂量NMS-P937(等剂量NMS-P937组8只小鼠死亡3只)的毒性优势
- [0371] 试验实施例7.化合物在小鼠体内胰腺癌药效学研究
- [0372] 7.1.试验材料
- [0373] 胰腺癌细胞系BxPC-3：购于ATCC，其余试验材料仪器与实施例9相同
- [0374] 7.2.试验方法
- [0375] 给药方案见表27，其余试验方法与实施例9相同
- [0376] 表27.给药方案表

组别	动物数	治疗	剂量 (mg/kg)	给药途径	给药频率	给药周期
1	8	溶媒	—	p.o.	q.d.	连续 10 天
2	8	CPD04	90	p.o.	q.d.	连续 10 天
3	8	CPD06	30	p.o.	q.d.	连续 10 天
4	8	CPD06	60	p.o.	q.d.	连续 10 天
5	8	NMS-P937	60	p.o.	q.d.	连续 10 天

- [0377] 7.3.试验结果
- [0378] 7.3.1测试药物对BxPC-3皮下移植瘤小鼠模型的抑瘤作用

[0379] 如图4所示：小鼠经口服给药10天，实验结束时，与溶媒组相比，各给药组均能显著($p<0.0001$)抑制小鼠肿瘤生长，CPD06不同剂量给药对胰腺肿瘤抑制呈现出剂量依赖效应，各组的肿瘤生长抑制率(TGI_{TV})见表28

[0380] 表28.试验终点各组的肿瘤生长抑制率(TGI_{TV})

治疗	剂量 (mg/kg)	TGI (%)	小鼠死亡率 (%)
CPD04	90	53	0

CPD06	30	33	0
CPD06	60	71	0
NMS-P937	60	61	25

[0381] 7.3.2测试药物在BxPC-3皮下移植瘤小鼠模型上的安全性

[0382] 如图5所示，治疗期间，NMS-P937 60mg/kg组2只小鼠分别死于PG-D9和PG-D19，NMS-P937 60mg/kg组小鼠体重波动较大，体重下降可能是由于荷瘤鼠对NMS-P937耐受性不佳所致，在停药后，个别动物状态未能及时缓解导致死亡，而其他组在治疗期间体重相对平稳，下降范围小于10%，且停药后体重恢复较快。

[0383] 7.4.试验结论

[0384] 综上所述，在BxPC-3皮下移植瘤小鼠模型中CPD06各剂量组呈剂量依赖性抑制小鼠肿瘤生长。CPD06 60mg/kg给药组抑制肿瘤生长作用显著优于其他各治疗组，TGI_{TV}达到了71%，显示出药效明显优于同剂量NMS-P937，且毒性明显优于等剂量的NMS-P937组，CPD06在治疗期间未发现明显的毒性症状，但是等剂量NMS-P937组8只小鼠死亡2只。

[0385] 试验实施例8.化合物在小鼠体内胰腺癌药效学研究

[0386] 8.1.试验材料

[0387] M-NSG小鼠，SPF级，雌性，周龄6-8w，体重16-20g，购于上海南方模式生物科技股份有限公司

[0388] PSN1细胞：购于ATCC；

[0389] 体内药效实验所用仪器见表29。

[0390] 表29.试剂及仪器

试剂/仪器名称	供货单位	货号	保存条件
电子天平	上海精天电子仪器有限公司	JT201N	室温
游标卡尺	Mitutoyo	500-171	室温
一次性注射器	上海康德莱企业发展集团股份有限公司	批 K20190705	室温
PBS	BIOLOGICAL INDUSTRIES	C3580-0500	4℃

[0391] 8.2.试验方法

[0392] 8.2.1 药物配制

样品名称	配制方法	工作液浓度 (mg/mL)	储存 条件
NMS-P937 30mg/kg	称取 15.0mg NMS-P937 于 5.0mL Ep 管内，并加入 2.5mL 溶媒，混匀后得到浓度为 6mg/mL 的溶液。	6	2-8℃
CPD04 90mg/kg	称取 22.5mg CPD04 于 5.0mL EP 管内，并加入 2.5mL 溶媒，混匀后得到浓度为 9mg/mL 的溶液。	9	2-8℃
CPD06 60mg/kg	称取 15.0mg CPD06 于 5.0mL EP 管内，并加入 2.5mL 溶媒，混匀后得到浓度为 6mg/mL 的溶液。	6	2-8℃

[0393] 8.2.2细胞培养

[0394] PSN1细胞培养在37℃、5% CO₂的培养箱中，培养基为含10%灭活胎牛血清的 RPMI-1640培养基，细胞每隔2至3天长满即分皿传代。

[0395] 8.2.3肿瘤细胞接种与分组

[0396] 8.2.3.1取对数生长期PSN1，重悬于PBS中；用1mL注射器将细胞悬液接种于M-NSG小鼠的右侧肋部皮下，(接种细胞数：5E6/只+30%M)，隔天观察小鼠生存状态及皮下成瘤情况。

[0397] 8.2.3.2分组当天，根据平均肿瘤体积(~190mm³)和小鼠体重将小鼠被随机分成8组，每组8只；

[0398] 8.2.3.3按照分组方案开始给药，均采用灌胃给药，给药体积均为10mL/kg，每天给药1次，共给药6次，每周两次观察小鼠毛发、状态、记录体重、肿瘤大小，计算TGI%。

[0399] 8.2.3.4试验动物分组

[0400] 当平均肿瘤体积达到~190mm³时，挑选个体肿瘤体积适中的小鼠入组，将动物按肿瘤体积和小鼠体重随机分配到各实验组中，每组8只，分组1天后开始给药。具体给药方案见下表：

组	n	治疗	剂量 (mg/kg)	给药体积 (μL/g)	给药途径	时间表
1	8	0.5% MC + 1% Tween20	-	--	p.o.	QD*6 次
2	8	CPD04	90	10	p.o.	QD*6 次
3	8	CPD06	60	10	p.o.	QD*6 次
4	8	NMS-P937	60	10	p.o.	QD*6 次

- [0401] 8.2.4计算公式
- [0402] 肿瘤体积(Tumor volume,TV)
- [0403] $TV=1/2\times a\times b^2$
- [0404] 其中：a表示肿瘤长径；b表示肿瘤短径。
- [0405] 相对肿瘤体积(Relative tumor volume,RTV)
- [0406] $RTV=V_t/V_{initial}\times 100(\%)$
- [0407] 其中， $V_{initial}$ 为分组给药时(即 $d_{initial}$)测量所得肿瘤体积， V_t 为每次测量时的肿瘤体积。
- [0408] 相对肿瘤增值率T/C(%)
- [0409] $T/C(\%)=(T_{RTV}/C_{RTV})\times 100\%$
- [0410] 其中， T_{RTV} 表示治疗组的相对肿瘤体积， C_{RTV} 表示溶剂组的相对肿瘤体积。
- [0411] 肿瘤体积抑瘤率(TGI)
- [0412] $TGI=[1-(TV_t-TV_{initial})/(CV_t-CV_{initial})]\times 100\%$
- [0413] 其中， TV_t 表示治疗组每次测量时的肿瘤体积； $TV_{initial}$ 表示分组给药时治疗组的肿瘤体积； CV_t 表示对照组每次测量时的肿瘤体积； $CV_{initial}$ 表示分组给药时对照组的肿瘤体积。
- [0414] 8.2.5动物体重变化率(BWC)
- [0415] $体重变化率=(BW_{final}-BW_{initial})/BW_{initial}\times 100\%$
- [0416] 其中， $BW_{initial}$ 表示分组给药时动物体重； BW_{final} 表示每次测量时的动物体重。
- [0417] 8.2.6数据分析
- [0418] 测定和观察的原始数据必须进行记录。基于原始数据进行分析处理，结果分析用平均数和标准误表示(Mean±SEM)，使用T-test分析对照组和给药组的肿瘤体积差异， $P<0.05$ 表示存在统计学差异
- [0419] 8.3.试验结果

[0420] 8.3.1测试药物对PSN1皮下移植瘤小鼠模型的抑瘤作用

[0421] 如图6所示：小鼠经口服给药6天，试验结束时(第31天)，与溶媒组相比，各给药组均能显著($p<0.0001$)抑制小鼠肿瘤生长，NMS-P937 60mg/kg组体重下降严重，小鼠死亡一半，导致TGI无法统计，各组的肿瘤生长抑制率(TGI_{TV})见表30

[0422] 表30.试验终点各组的肿瘤生长抑制率(TGI_{TV})

治疗	剂量 (mg/kg)	TGI (%)	小鼠死亡率 (%)
CPD04	90	40	0
CPD06	60	53	0
NMS-P937	60	NA	50%

[0423] 8.3.2测试药物在PSN1皮下移植瘤小鼠模型上的安全性

[0424] 如图7所示，治疗期间，NMS-P937 60mg/kg组4只小鼠分别死于D27和D31，试验终点时NMS-P937 60mg/kg组小鼠体重只有两只稍微一点恢复，体重下降可能是由于荷瘤鼠对NMS-P937耐受性不佳所致，CPD06 60mg/kg组未发生小鼠死亡，给药期间发生体重下降不超过15%，停药后小鼠体重恢复。CPD04 90mg/kg组，未发现小鼠死亡且一直未发现体重下降。

[0425] 8.4.试验结论

[0426] 综上所述，在PSN1皮下移植瘤小鼠模型中CPD06 60mg/kg与CPD04 90mg/kg能明显抑制小鼠肿瘤生长。CPD06 60mg/kg给药组抑制肿瘤生长作用显著优于其他各治疗组，TGI_{TV}达到了53%，NMS-P937 60mg/kg在免疫高度缺陷的小鼠上毒性远远大于CPD0660mg/kg和CPD04 90mg/kg，NMS-P937 60mg/kg 8只死亡4只。

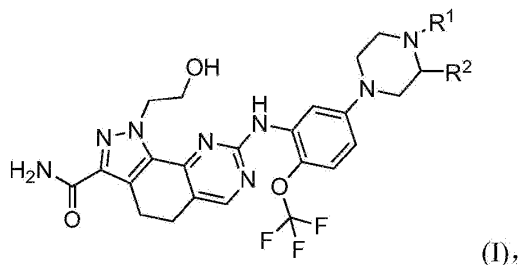
[0427] 前面的描述被认为仅是对本公开原理的说明。此外，由于对本领域技术人员而言许多修改和变化将是显而易见的，因此不希望将本公开限制于如上所述的确切构造和过程。因此，所有合适的修改和等同物均可以被认为是落入由所附权利要求限定的本公开的范围。

[0428] 本文引用的所有出版物、专利和专利申请均通过引用以其全文并入本公开。

权利要求书

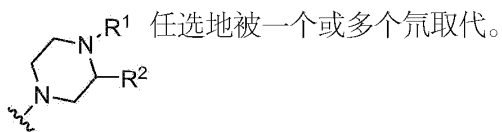
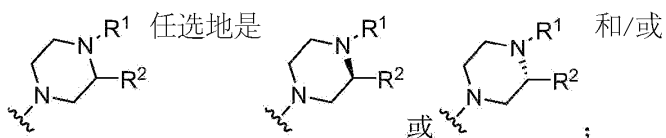
[权利要求 1]

一种式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物:



或其药学上可接受的盐、溶剂化物,

其中, R^1 和 R^2 各自独立地选自氢、氘、氘代或未氘代的 C_{1-6} 烷基;
或者 R^1 和 R^2 与其所连接的N原子、C原子共同形成任选取代的氘代或未氘代的5元杂环;

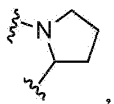


[权利要求 2]

根据权利要求1所述的式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物,或其药学上可接受的盐、溶剂化物,其中
 R^1 是氘代或未氘代的 C_{1-6} 烷基,优选为甲基或氘代甲基,更优选为全氘代甲基;和/或
 R^2 是氢或氘。

[权利要求 3]

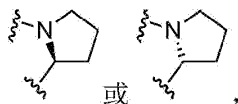
根据权利要求1所述的式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物,或其药学上可接受的盐、溶剂化物,其中
 R^1 和 R^2 与其所连接的N原子、C原子共同形成任选取代的如下所述的5元杂环:



其中，该5元杂环任选地被1-7个氘取代。

[权利要求 4]

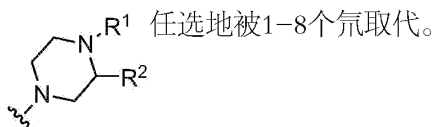
根据权利要求3所述的式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物，或其药学上可接受的盐、溶剂化物，其中 R^1 和 R^2 与其所连接的N原子、C原子共同形成任选取代的选自如下所述的5元杂环：



其中，该5元杂环任选地被1-7个氘取代。

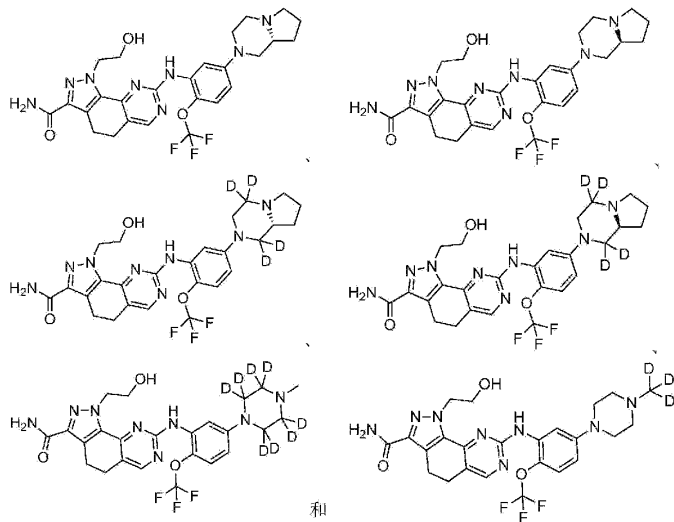
[权利要求 5]

根据前述任一项所述的(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物，或其药学上可接受的盐、溶剂化物，其中



[权利要求 6]

根据权利要求1所述的式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物，或其药学上可接受的盐、溶剂化物，其中所述式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物选自以下：



[权利要求 7]

一种药物组合物，所述药物组合物包含根据权利要求1至6中任一项所述的式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物

物，或其药学上可接受的盐、溶剂化物，以及药学上可接受的载体或辅料。

[权利要求 8] 一种治疗有需要的受试者的PLK1活性失调导致的疾病和病状和/或与PLK1相关的疾病和病状的方法，所述方法包括向受试者施用治疗有效量的根据权利要求1至6中任一项所述的式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物，或其药学上可接受的盐、溶剂化物。

[权利要求 9] 根据权利要求8的方法，其中所述PLK1活性失调导致的疾病和病状和/或与PLK1相关的疾病和病状选自由以下组成的组：白血病、淋巴瘤、胰腺癌、乳腺癌、前列腺癌、肺癌、卵巢癌、结直肠癌、肝癌、胃癌、食管癌、黑色素瘤、多发性骨髓瘤，和脓毒血症。

[权利要求 10] 根据权利要求1至6中任一项所述的式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物，或其药学上可接受的盐、溶剂化物用于治疗PLK1活性失调导致的疾病和病状和/或与PLK1相关的疾病和病状。

[权利要求 11] 根据权利要求10所述的用于治疗PLK1活性失调导致的疾病和病状和/或与PLK1相关的疾病和病状的式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物，或其药学上可接受的盐、溶剂化物，其中所述PLK1活性失调导致的疾病和病状和/或与PLK1相关的疾病和病状选自由以下组成的组：白血病、淋巴瘤、胰腺癌、乳腺癌、前列腺癌、肺癌、卵巢癌、结直肠癌、肝癌、胃癌、食管癌、黑色素瘤、多发性骨髓瘤，和脓毒血症。

[权利要求 12] 根据权利要求1至6中任一项所述的式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物，或其药学上可接受的盐、溶剂化物在制备用于治疗PLK1活性失调导致的疾病和病状和/或与PLK1相关的疾病和病状的药物中的用途。

细则 26,
04.02.2024

[权利要求 13] 根据权利要求12所述的用途，其中所述PLK1活性失调导致的疾病和病状和/或与PLK1相关的疾病和病状选自由以下组成的组：白血

病、淋巴瘤、胰腺癌、乳腺癌、前列腺癌、肺癌、卵巢癌、结直肠癌、肝癌、胃癌、食管癌、黑色素瘤、多发性骨髓瘤，和脓毒血症。

[权利要求 14] 一种用于治疗PLK1活性失调导致的疾病和病状和/或与PLK1相关的疾病和病状的试剂盒，所述试剂盒包括根据权利要求1至6中任一项所述的式(I)化合物的立体异构体、氘代衍生物或立体异构氘代衍生物，或其药学上可接受的盐、溶剂化物，或根据权利要求7所述的药物组合物；容器；和任选的指示治疗的包装插页或标签。

[权利要求 15] 根据权利要求14所述的试剂盒，其中所述PLK1活性失调导致的疾病和病状和/或与PLK1相关的疾病和病状选自以下组成的组：白血病、淋巴瘤、胰腺癌、乳腺癌、前列腺癌、肺癌、卵巢癌、结直肠癌、肝癌、胃癌、食管癌、黑色素瘤、多发性骨髓瘤，和脓毒血症。