

作为 ERK 抑制剂的噻唑并内酰胺类化合物及其应用

本申请主张如下优先权

CN201911244773.3, 申请日: 2019 年 12 月 06 日;

CN201911257990.6, 申请日: 2019 年 12 月 10 日;

CN202010107001.1, 申请日: 2020 年 02 月 20 日;

CN202011138526.8, 申请日: 2020 年 10 月 22 日;

CN202011402966.X, 申请日: 2020 年 12 月 02 日。

技术领域

本发明涉及一类噻唑并内酰胺类化合物, 及其在制备治疗 ERK 相关疾病的药物中的应用。具体涉及式 (III) 所示化合物或其药学上可接受的盐。

背景技术

Ras/Raf/MEK/ERK 通路是一条经典的有丝分裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)信号级联通路, 参与各种生长因子、细胞因子、丝裂原以及激素受体活化后的信号转导, 是控制细胞生长、分化和存活最重要的信号转导途径之一。

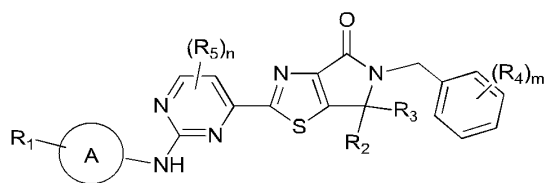
研究表明, 突变或扩增引起的 Ras/Raf/MEK/ERK 通路异常活化是多种癌症发生的决定因素。在人类肿瘤中, RAS 突变发生率约为 22%, BRAF 突变发生率约为 7%, MEK 突变发生率约为 1%, 因此, 该通路上的关键节点蛋白已成为癌症治疗的重要靶点(*Cancer Discov.* **2019**, *9*, 329-341)。目前, 已有多个 BRAF 抑制剂和 MEK1/2 抑制剂, 以及它们的联用方案, 被美国 FDA 批准用于黑色素瘤、BRAFV600E 突变型非小细胞肺癌等癌症的治疗。然而, 使用这些上游节点的 BRAF 和 MEK 抑制剂后, 由于突变或通路重新激活, 会快速导致耐药性问题, 极大地限制了它们的临床应用。

细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK), 特别是 ERK1 和 ERK2 激酶, 是 Ras/Raf/MEK/ERK 通路的主要参与者和下游关键节点, 在许多人类的癌症中都可发现它们的过度激活。ERK 作为该通路的末端信号激酶, 目前尚未发现有耐药突变, 因此, 靶向 ERK 激酶的药物有望克服上游靶点抑制剂治疗后产生的耐药性问题, 成为更具潜力的治疗策略。但迄今为止, 关于 ERK 抑制剂的研究仍处于临床阶段, 还没有 ERK 抑制剂作为药物批准上市。

综上所述, 迫切需要研发出安全、有效的 ERK 抑制剂药物满足肿瘤治疗的需要。

发明内容

本发明提供了式 (III) 所示化合物或其药学上可接受的盐,



(III)

其中,

R_1 选自 H、 C_{1-3} 烷基和 C_{3-5} 环烷基, 其中, 所述 C_{1-3} 烷基和 C_{3-5} 环烷基任选被 1、2 或 3 个 R_a 取代;

R_2 和 R_3 分别独立地选自 C_{1-3} 烷基, 其中, 所述 C_{1-3} 烷基任选被 1、2 或 3 个 R_b 取代;

R_4 选自 H、F、Cl、Br、I 和 C_{1-3} 烷基, 其中, 所述 C_{1-3} 烷基任选被 1、2 或 3 个 R_c 取代;

R_5 选自 F、Cl、Br、I 和 C_{1-3} 烷基, 其中, 所述 C_{1-3} 烷基任选被 1、2 或 3 个 R_c 取代;

m 选自 0、1 和 2;

n 选自 0、1 和 2;

环 A 选自吡唑基和四氢吡喃基, 其中, 所述吡唑基和四氢吡喃基任选被 1、2 或 3 个 R_d 取代;

R_a 、 R_b 、 R_c 和 R_d 分别独立地选自 D、F、Cl、Br、I、OH 和 OCH_3 ;

R_d 选自 F、Cl、Br、I、 CH_3 和 OCH_3 。

本发明的一些方案中, 上述 R_1 选自 H、 CH_3 和环丙基, 所述 CH_3 和环丙基任选被 1、2 或 3 个 R_a 取代, 其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中, 上述 R_1 选自 H、 CH_3 、 CHF_2 、 CD_3 、 $CH_2CH_2OCH_3$ 和环丙基, 其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中, 上述 R_2 和 R_3 分别独立地选自任选 CH_3 和 CH_2CH_3 , 所述 CH_3 和 CH_2CH_3 任选被 1、2 或 3 个 R_b 取代, 其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中, 上述 R_2 和 R_3 分别独立地选自 CH_3 , 其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中, 上述 R_4 选自 H、F、Cl、Br、I 和 CH_3 , 所述 CH_3 任选被 1、2 或 3 个 R_c 取代, 其他变量如本发明所定义。

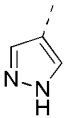
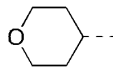
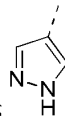
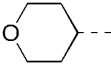
本发明的一些方案中, 上述 R_4 选自 H、F、Cl、Br、I 和 CH_3 , 其他变量如本发明所定义。

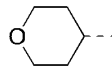
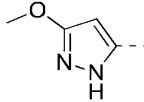
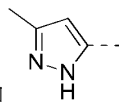
本发明的一些方案中, 上述 R_5 选自 F、Cl、Br、I 和 CH_3 , 所述 CH_3 任选被 1、2 或 3 个 R_c 取代, 其他变量如本发明所定义。

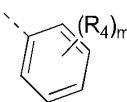
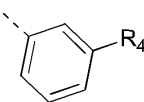
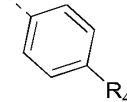
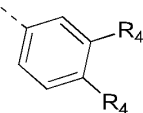
本发明的一些方案中, 上述 R_5 选自 F、Cl、Br、I 和 CH_3 , 其他变量如本发明所定义。

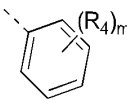
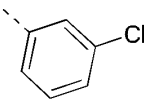
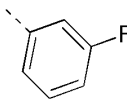
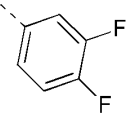
本发明的一些方案中, 上述 R_5 选自 H、F、Cl、Br、I 和 CH_3 , 所述 CH_3 任选被 1、2 或 3 个 R_c 取代, 其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中, 上述 R_5 选自 H、F、Cl、Br、I 和 CH_3 , 其他变量如本发明所定义。

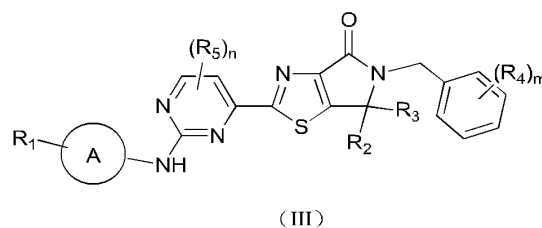
本发明的一些方案中，上述环 A 选自 、 和 ，所述 、 和  任选被 1、2 或 3 个 R_d 取代，其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中，上述环 A 选自 、、 和 ，其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中，上述结构单元  选自 、 和 ，其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中，上述结构单元  选自 、 和 ，其他变量如本发明所定义。

本发明提供了式 (I II) 所示化合物或其药学上可接受的盐，



其中，

R_1 选自 H 和 C_{1-3} 烷基，其中，所述 C_{1-3} 烷基任选被 1、2 或 3 个 R_a 取代；

R_2 和 R_3 分别独立地选自 C_{1-3} 烷基，其中，所述 C_{1-3} 烷基任选被 1、2 或 3 个 R_b 取代；

R_4 选自 H、F、Cl、Br、I 和 C_{1-3} 烷基，其中，所述 C_{1-3} 烷基任选被 1、2 或 3 个 R_c 取代；

R_5 选自 F、Cl、Br、I 和 C_{1-3} 烷基，其中，所述 C_{1-3} 烷基任选被 1、2 或 3 个 R_e 取代；

m 选自 0、1 和 2；

n 选自 0、1 和 2；

环 A 选自吡唑基和四氢吡喃基，其中，所述吡唑基和四氢吡喃基任选被 1、2 或 3 个 R_d 取代；

R_a 、 R_b 、 R_c 和 R_e 分别独立地选自 F、Cl、Br、I 和 OH；

R_d 选自 F、Cl、Br、I 和 CH_3 。

本发明的一些方案中，上述 R_1 选自 H 和 CH_3 ，所述 CH_3 任选被 1、2 或 3 个 R_a 取代，其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中，上述 R_1 选自 CH_3 ，其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中，上述 R_2 和 R_3 分别独立地选自任选 CH_3 和 CH_2CH_3 ，所述 CH_3 和 CH_2CH_3 任选被 1、2 或 3 个 R_b 取代，其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中，上述 R_2 和 R_3 分别独立地选自 CH_3 ，其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中，上述 R_4 选自 H、F、Cl、Br、I 和 CH_3 ，所述 CH_3 任选被 1、2 或 3 个 R_c 取代，其他变量如本发明所定义。

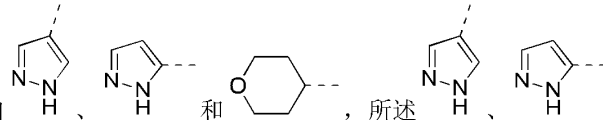
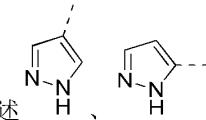
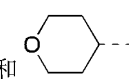
本发明的一些方案中，上述 R_4 选自 H、F、Cl、Br、I 和 CH_3 ，其他变量如本发明所定义。

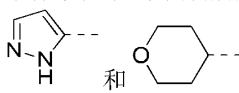
本发明的一些方案中，上述 R_5 选自 F、Cl、Br、I 和 CH_3 ，所述 CH_3 任选被 1、2 或 3 个 R_e 取代，其他变量如本发明所定义。

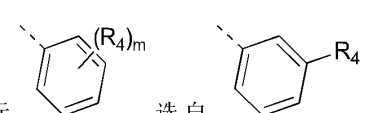
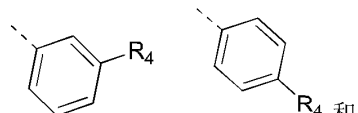
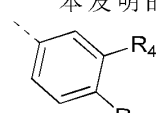
本发明的一些方案中，上述 R_5 选自 F、Cl、Br、I 和 CH_3 ，其他变量如本发明所定义。

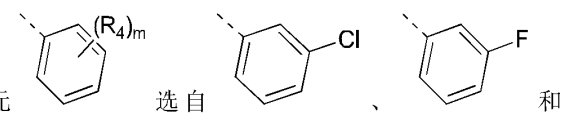
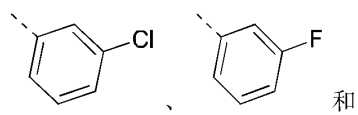
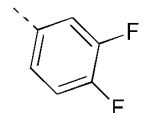
本发明的一些方案中，上述 R_5 选自 H、F、Cl、Br、I 和 CH_3 ，所述 CH_3 任选被 1、2 或 3 个 R_e 取代，其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中，上述 R_5 选自 H、F、Cl、Br、I 和 CH_3 ，其他变量如本发明所定义。

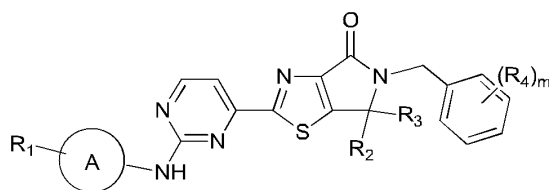
本发明的一些方案中，上述环 A 选自 ，所述  和  任选被 1、2 或 3 个 R_d 取代，其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中，上述环 A 选自 ，其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中，上述结构单元  选自  和 ，其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中，上述结构单元  选自  和 ，其他变量如本发明所定义。

本发明提供了式 (I) 所示化合物或其药学上可接受的盐，



(I)

其中，

R_1 选自 H 和 C_{1-3} 烷基，其中所述 C_{1-3} 烷基任选被 1、2 或 3 个 R_a 取代；

R_2 和 R_3 分别独立地选自 C_{1-3} 烷基，所述 C_{1-3} 烷基任选被 1、2 或 3 个 R_b 取代；

R_4 选自 H、F、Cl、Br、I 和 C_{1-3} 烷基，其中所述 C_{1-3} 烷基任选被 1、2 或 3 个 R_c 取代；

m 选自 0、1 和 2；

环 A 选自吡唑基和四氢吡喃基，所述吡唑基和四氢吡喃基任选被 1、2 或 3 个 R_d 取代；

R_a 、 R_b 和 R_c 分别独立地选自 F、Cl、Br、I 和 OH；

R_d 选自 F、Cl、Br、I 和 CH_3 。

本发明的一些方案中，上述 R_1 选自 H 和 CH_3 ，所述 CH_3 任选被 1、2 或 3 个 R_a 取代，其他变量如本发明所定义。

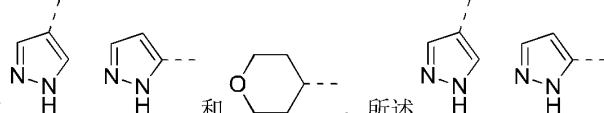
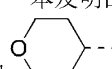
本发明的一些方案中，上述 R_1 选自 CH_3 ，其他变量如本发明所定义。

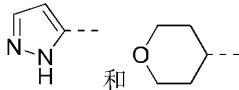
本发明的一些方案中，上述 R_2 和 R_3 分别独立地选自任选 CH_3 和 CH_2CH_3 ，所述 CH_3 和 CH_2CH_3 任选被 1、2 或 3 个 R_b 取代，其他变量如本发明所定义。

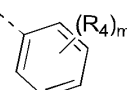
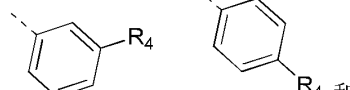
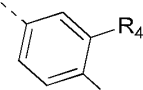
本发明的一些方案中，上述 R_2 和 R_3 分别独立地选自 CH_3 ，其他变量如本发明所定义。

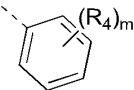
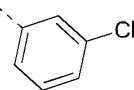
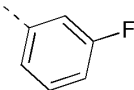
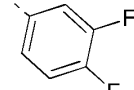
本发明的一些方案中，上述 R_4 选自 H、F、Cl、Br、I 和 CH_3 ，所述 CH_3 任选被 1、2 或 3 个 R_c 取代，其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中，上述 R_4 选自 H、F、Cl、Br、I 和 CH_3 ，其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中，上述环 A 选自  和  任选被 1、2 或 3 个 R_d 取代，其他变量如本发明所定义。

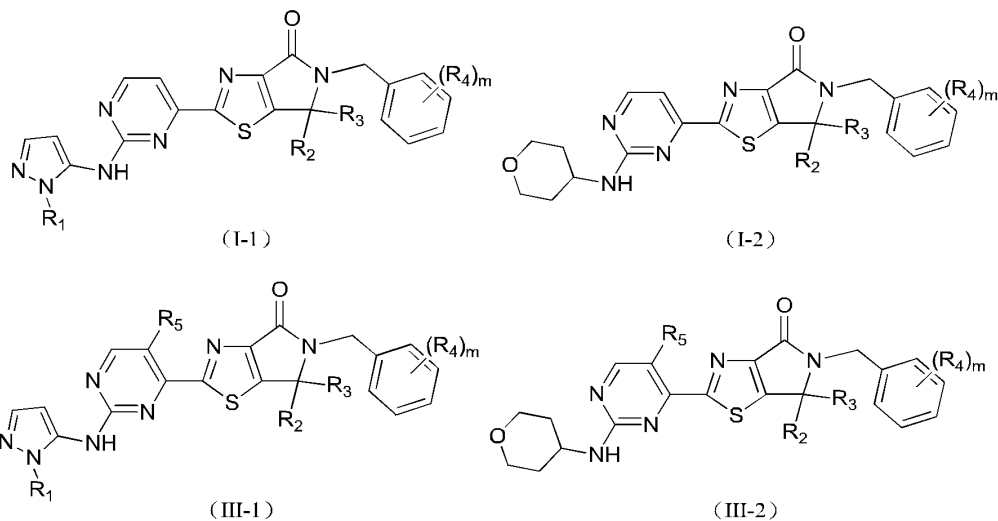
本发明的一些方案中，上述环 A 选自 ，其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中，上述结构单元  选自  和 ，其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中，上述结构单元  选自 、 和 ，其他变量如本发明所定义。

本发明还有一些方案由上述变量任意组合而来。

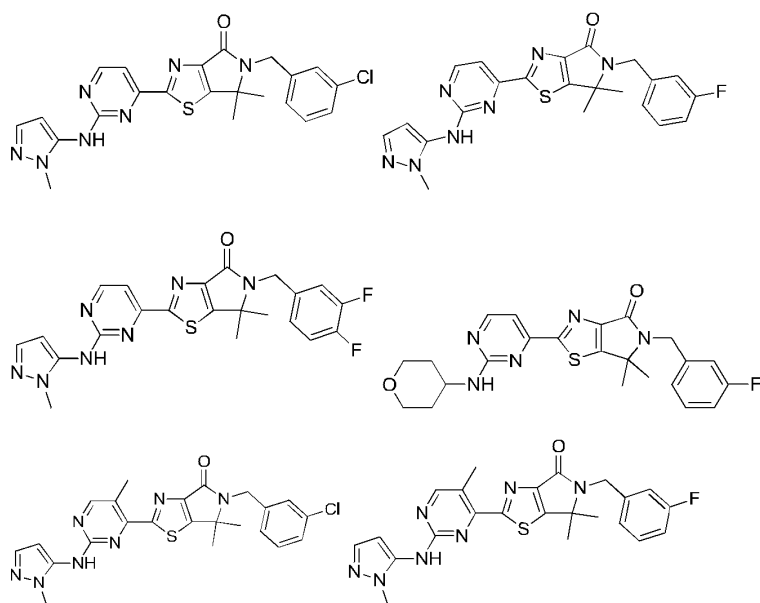
本发明的一些方案中，上述化合物或其药学上可接受的盐，其选自：

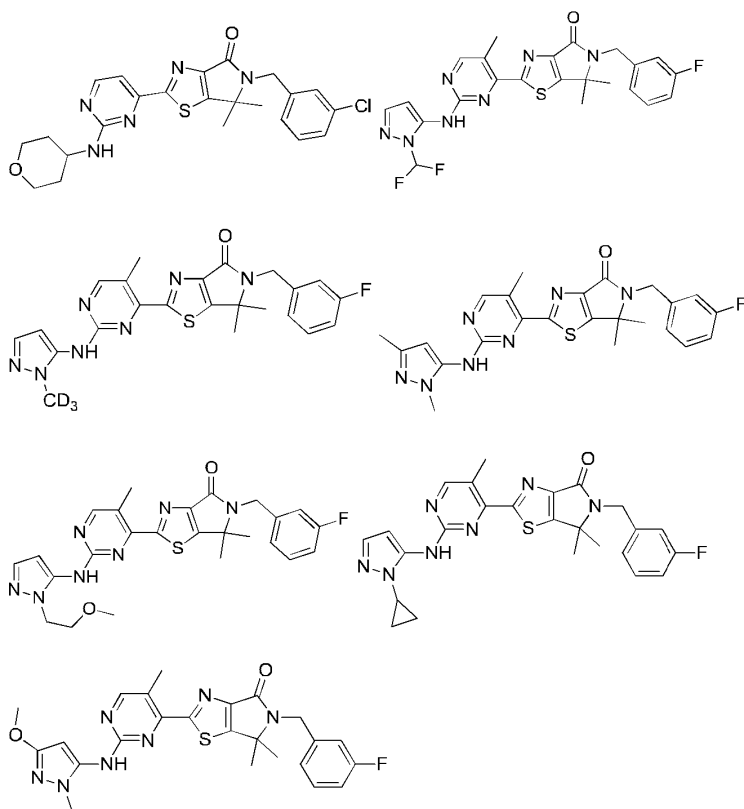


其中，

R₁、R₂、R₃、R₄、R₅ 和 m 如本发明所定义。

本发明还提供了下式所示化合物或其药学上可接受的盐，





本发明的一些方案中，上述化合物或其药学上可接受的盐在制备治疗 ERK 相关疾病的药物中的应用。

本发明的一些方案中，上述应用，其特征在于，所述 ERK 抑制剂相关药物是用于治疗实体瘤的药物。

技术效果

本发明化合物表现出较优的对 ERK2 酶的抑制活性；同时，表现出较优的对 HT29 细胞增殖抑制活性。本发明化合物展现了优良的口服暴露量和生物利用度；本发明化合物能显著抑制肿瘤生长，给药过程中动物的体重未见明显下降，耐受性好。

定义和说明

除非另有说明，本文所用的下列术语和短语旨在具有下列含义。一个特定的术语或短语在没有特别定义的情况下不应该被认为是不确定的或不清楚的，而应该按照普通的含义去理解。当本文中出現商品名时，意在指代其对应的商品或其活性成分。

这里所采用的术语“药学上可接受的”，是针对那些化合物、材料、组合物和/或剂型而言，它们在可靠的医学判断的范围之内，适用于与人类和动物的组织接触使用，而没有过多的毒性、刺激性、过敏性反应或其它问题或并发症，与合理的利益/风险比相称。

术语“药学上可接受的盐”是指本发明化合物的盐，由本发明发现的具有特定取代基的化合物与

相对无毒的酸或碱制备。当本发明的化合物中含有相对酸性的功能团时，可以通过在纯的溶液或合适的惰性溶剂中用足够量的碱与这类化合物接触的方式获得碱加成盐。药学上可接受的碱加成盐包括钠、钾、钙、铵、有机胺或镁盐或类似的盐。当本发明的化合物中含有相对碱性的官能团时，可以通过在纯的溶液或合适的惰性溶剂中用足够量的酸与这类化合物接触的方式获得酸加成盐。药学上可接受的酸加成盐的实例包括无机酸盐，所述无机酸包括例如盐酸、氢溴酸、硝酸、碳酸，碳酸氢根，磷酸、磷酸一氢根、磷酸二氢根、硫酸、硫酸氢根、氢碘酸、亚磷酸等；以及有机酸盐，所述有机酸包括如乙酸、丙酸、异丁酸、马来酸、丙二酸、苯甲酸、琥珀酸、辛二酸、反丁烯二酸、乳酸、扁桃酸、邻苯二甲酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、柠檬酸、酒石酸和甲磺酸等类似的酸；还包括氨基酸（如精氨酸等）的盐，以及如葡萄糖醛酸等有机酸的盐。本发明的某些特定的化合物含有碱性和酸性的官能团，从而可以被转换成任一碱或酸加成盐。

本发明的药学上可接受的盐可由含有酸根或碱基的母体化合物通过常规化学方法合成。一般情况下，这样的盐的制备方法是：在水或有机溶剂或两者的混合物中，经由游离酸或碱形式的这些化合物与化学计量的适当的碱或酸反应来制备。

除非另有说明，术语“异构体”意在包括几何异构体、顺反异构体、立体异构体、对映异构体、旋光异构体、非对映异构体和互变异构体。

本发明的化合物可以存在特定的几何或立体异构体形式。本发明设想所有的这类化合物，包括顺式和反式异构体、(-)-和(+)-对映体、(R)-和(S)-对映体、非对映异构体、(D)-异构体、(L)-异构体，及其外消旋混合物和其他混合物，例如对映异构体或非对映体富集的混合物，所有这些混合物都属于本发明的范围之内。烷基等取代基中可存在另外的不对称碳原子。所有这些异构体以及它们的混合物，均包括在本发明的范围之内。

除非另有说明，术语“对映异构体”或者“旋光异构体”是指互为镜像关系的立体异构体。

除非另有说明，术语“顺反异构体”或者“几何异构体”系由因双键或者成环碳原子单键不能自由旋转而引起。

除非另有说明，术语“非对映异构体”是指分子具有两个或多个手性中心，并且分子间为非镜像的关系的立体异构体。

除非另有说明，“(+)”表示右旋，“(-)”表示左旋，“(±)”表示外消旋。

除非另有说明，用楔形实线键（）和楔形虚线键（）表示一个立体中心的绝对构型，用直形实线键（）和直形虚线键（）表示立体中心的相对构型，用波浪线（）表示楔形实线键（）或楔形虚线键（），或用波浪线（）表示直形实线键（）或直形虚线键（）。

除非另有说明，术语“富含一种异构体”、“异构体富集”、“富含一种对映体”或者“对映体富集”指其中一种异构体或对映体的含量小于 100%，并且，该异构体或对映体的含量大于等于 60%，或者大于等于 70%，或者大于等于 80%，或者大于等于 90%，或者大于等于 95%，或者大于等于 96%，或者大于等于 97%，或者大于等于 98%，或者大于等于 99%，或者大于等于 99.5%，或者大于等于

99.6%，或者大于等于 99.7%，或者大于等于 99.8%，或者大于等于 99.9%。

除非另有说明，术语“异构体过量”或“对映体过量”指两种异构体或两种对映体相对百分数之间的差值。例如，其中一种异构体或对映体的含量为 90%，另一种异构体或对映体的含量为 10%，则异构体或对映体过量（ee 值）为 80%。

可以通过的手性合成或手性试剂或者其他常规技术制备光学活性的(R)-和(S)-异构体以及 D 和 L 异构体。如果想得到本发明某化合物的一种对映体，可以通过不对称合成或者具有手性助剂的衍生作用来制备，其中将所得非对映体混合物分离，并且辅助基团裂开以提供纯的所需对映异构体。或者，当分子中含有碱性官能团（如氨基）或酸性官能团（如羧基）时，与适当的光学活性的酸或碱形成非对映异构体的盐，然后通过本领域所公知的常规方法进行非对映异构体拆分，然后回收得到纯的对映体。此外，对映异构体和非对映异构体的分离通常是通过使用色谱法完成的，所述色谱法采用手性固定相，并任选地与化学衍生法相结合（例如由胺生成氨基甲酸盐）。

本发明的化合物可以在一个或多个构成该化合物的原子上包含非天然比例的原子同位素。例如，可用放射性同位素标记化合物，比如氚（ ^3H ），碘-125（ ^{125}I ）或 C-14（ ^{14}C ）。又例如，可用重氢取代氢形成氘代药物，氘与碳构成的键比普通氢与碳构成的键更坚固，相比于未氘化药物，氘代药物有降低毒副作用、增加药物稳定性、增强疗效、延长药物生物半衰期等优势。本发明的化合物的所有同位素组成的变换，无论放射性与否，都包括在本发明的范围之内。

术语“任选”或“任选地”指的是随后描述的事件或状况可能但不是必需出现的，并且该描述包括其中所述事件或状况发生的情况以及所述事件或状况不发生的情况。

术语“被取代的”是指特定原子上的任意一个或多个氢原子被取代基取代，可以包括重氢和氢的变体，只要特定原子的价态是正常的并且取代后的化合物是稳定的。当取代基为氧（即=O）时，意味着两个氢原子被取代。氧取代不会发生在芳香基上。术语“任选被取代的”是指可以被取代，也可以不被取代，除非另有规定，取代基的种类和数目在化学上可以实现的基础上可以是任意的。

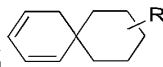
当任何变量（例如 R）在化合物的组成或结构中出现一次以上时，其在每一种情况下的定义都是独立的。因此，例如，如果一个基团被 0-2 个 R 所取代，则所述基团可以任选地至多被两个 R 所取代，并且每种情况下的 R 都有独立的选项。此外，取代基和/或其变体的组合只有在这样的组合会产生稳定的化合物的情况下才是被允许的。

当一个连接基团的数量为 0 时，比如-(CRR)₀，表示该连接基团为单键。

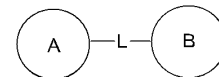
当一个取代基数量为 0 时，表示该取代基是不存在的，比如-A-(R)₀表示该结构实际上是-A。

当一个取代基为空缺时，表示该取代基是不存在的，比如 A-X 中 X 为空缺时表示该结构实际上是 A。

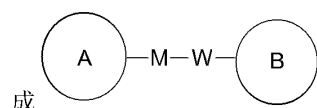
当其中一个变量选自单键时，表示其连接的两个基团直接相连，比如 A-L-Z 中 L 代表单键时表示该结构实际上是 A-Z。

当一个取代基的键可以交叉连接到一个环上的两个以上原子时，这种取代基可以与这个环上的任意原子相键合，例如，结构单元  或  表示其取代基 R 可在环己基

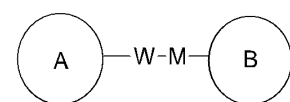
或者环己二烯上的任意一个位置发生取代。当所列举的取代基中没有指明其通过哪一个原子连接到被取代的基团上时，这种取代基可以通过其任何原子相键合，例如，吡啶基作为取代基可以通过吡啶环上任意一个碳原子连接到被取代的基团上。



当所列举的连接基团没有指明其连接方向，其连接方向是任意的，例如，中连接基团 L 为 -M-W-，此时 -M-W- 既可以按与从左往右的读取顺序相同的方向连接环 A 和环 B 构成



，也可以按照与从左往右的读取顺序相反的方向连接环 A 和环 B 构成



。所述连接基团、取代基和/或其变体的组合只有在这样的组合会产生稳定的化合物的情况下才是被允许的。

除非另有规定，当某一基团具有一个或多个可连接位点时，该基团的任意一个或多个位点可以通过化学键与其他基团相连。当该化学键的连接方式是不定位的，且可连接位点存在 H 原子时，则连接化学键时，该位点的 H 原子的个数会随所连接化学键的个数而对应减少变成相应价数的基团。所述位点与其他基团连接的化学键可以用直形实线键（）、直形虚线键（）、或波浪线（）

表示。例如 -OCH₃ 中的直形实线键表示通过该基团中的氧原子与其他基团相连； 中的直形虚

线键表示通过该基团中的氮原子的两端与其他基团相连； 中的波浪线表示通过该苯基基

团中的 1 和 2 位碳原子与其他基团相连； 表示该哌啶基上的任意可连接位点可以通过 1 个

化学键与其他基团相连，至少包括 、、、 这 4 种连接方

式，即使 -N- 上画出了 H 原子，但是 仍包括 这种连接方式的基团，只是在连接 1 个化学键时，该位点的 H 会对应减少 1 个变成相应的一价哌啶基。

除非另有规定，环上原子的数目通常被定义为环的元数，例如，“5-7 元环”是指环绕排列 5-7 个原子的“环”。

除非另有规定，术语“C₁₋₃ 烷基”用于表示直链或支链的由 1 至 3 个碳原子组成的饱和碳氢基团。所述 C₁₋₃ 烷基包括 C₁₋₂ 和 C₂₋₃ 烷基等；其可以是一价（如甲基）、二价（如亚甲基）或者多价（如次

甲基)。C₁₋₃ 烷基的实例包括但不限于甲基 (Me)、乙基 (Et)、丙基 (包括 *n*-丙基和异丙基)等。

除非另有规定,“C₃₋₅ 环烷基”表示由 3 至 5 个碳原子组成的饱和环状碳氢基团,其为单环体系,所述 C₃₋₅ 环烷基包括 C₃₋₄ 和 C₄₋₅ 环烷基等;其可以是一价、二价或者多价。C₃₋₅ 环烷基的实例包括,但不限于,环丙基、环丁基、环戊基等。

术语“保护基”包括但不限于“氨基保护基”、“羟基保护基”或“巯基保护基”。术语“氨基保护基”是指适合用于阻止氨基氮位上副反应的保护基团。代表性的氨基保护基包括但不限于: 甲酰基; 酰基,例如链烷酰基(如乙酰基、三氯乙酰基或三氟乙酰基); 烷氧基羰基,如叔丁氧基羰基(Boc); 芳基甲氧羰基,如苄氧羰基(Cbz)和 9-苄基甲氧羰基(Fmoc); 芳基甲基,如苄基 (Bn)、三苯甲基(Tr)、1,1-二-(4'-甲氧基苯基)甲基; 甲硅烷基,如三甲基甲硅烷基 (TMS) 和叔丁基二甲基甲硅烷基 (TBS) 等等。术语“羟基保护基”是指适合用于阻止羟基副反应的保护基。代表性羟基保护基包括但不限于: 烷基,如甲基、乙基和叔丁基; 酰基,例如链烷酰基(如乙酰基); 芳基甲基,如苄基 (Bn), 对甲氧基苄基 (PMB)、9-苄基甲基(Fm)和二苯基甲基 (二苯甲基, DPM); 甲硅烷基,如三甲基甲硅烷基 (TMS) 和叔丁基二甲基甲硅烷基 (TBS) 等等。

本发明的化合物可以通过本领域技术人员所熟知的多种合成方法来制备,包括下面列举的具体实施方式、其与其他化学合成方法的结合所形成的实施方式以及本领域技术上人员所熟知的等同替换方式,优选的实施方式包括但不限于本发明的实施例。

本发明的化合物可以通过本领域技术人员所熟知的常规方法来确认结构,如果本发明涉及化合物的绝对构型,则该绝对构型可以通过本领域常规技术手段予以确证。例如单晶X射线衍射法 (SXRD),把培养出的单晶用Bruker D8 venture衍射仪收集衍射强度数据,光源为CuK α 辐射,扫描方式: ϕ/ω 扫描,收集相关数据后,进一步采用直接法(Shelxs97)解析晶体结构,便可以确证绝对构型。

本发明所使用的溶剂可经市售获得。

本发明采用下述缩略词: aq 代表水; eq 代表当量、等量; 二氯甲烷代表二氯甲烷; PE 代表石油醚; DMSO 代表二甲亚砜; EtOAc 代表乙酸乙酯; 乙醇代表乙醇; MeOH 代表甲醇; Cbz 代表苄氧羰基,是一种胺保护基团; BOC 代表叔丁氧羰基是一种胺保护基团; r.t.代表室温; O/N 代表过夜; 四氢呋喃代表四氢呋喃; Boc₂O 代表二叔丁基二碳酸酯; TFA 代表三氟乙酸; DIPEA 代表二异丙基乙基胺; iPrOH 代表 2-丙醇; mp 代表熔点。

化合物依据本领域常规命名原则或者使用 ChemDraw®软件命名,市售化合物采用供应商目录名称。

说明书附图

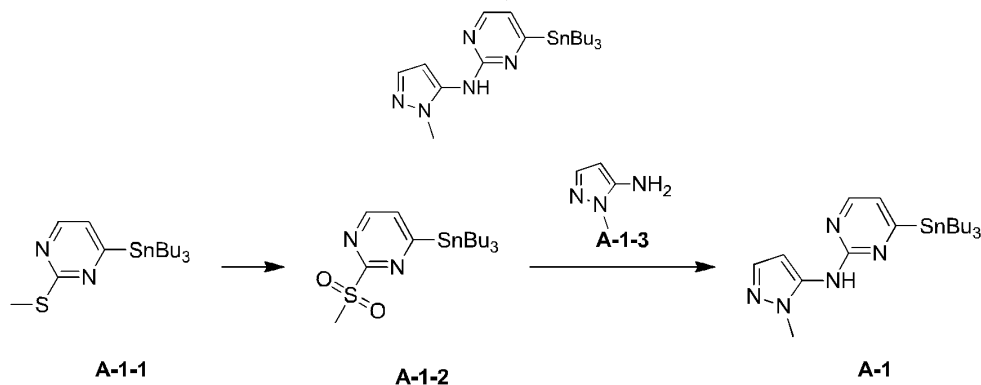
图 1: 人非小细胞肺癌 H358 模型动物在分别给予溶剂和 **WX006** 后的肿瘤生长曲线。

图 2: 人非小细胞肺癌 H358 模型动物在给药过程中的体重变化率 (%)。

具体实施方式

下面通过实施例对本发明进行详细描述，但并不意味着对本发明任何不利限制。本文已经详细地描述了本发明，其中也公开了其具体实施方式，对本领域的技术人员而言，在不脱离本发明精神和范围的情况下针对本发明具体实施方式进行各种变化和改进行将是显而易见的。

参考例 1：片段 A-1



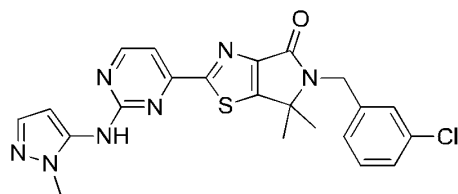
步骤 1：化合物 A-1-2 的合成

在预先干燥过的单口瓶中加入乙酸钠 (4.64 g, 56.60 mmol, 5 eq)、单过硫酸氢钾(13.92 g, 22.64 mmol, 2eq)和水(47 mL) 的溶液，降温至 0℃，滴加 **A-1-1** (4.7 g, 11.32 mmol, 1 eq)、溶剂四氢呋喃 (47 mL) 和甲醇(47 mL) 的溶液，并在 0℃ 搅拌 1 小时。29℃ 油浴搅拌 15 小时。反应结束后将该反应液倒入水(200 mL)中，水相用乙酸乙酯萃取(50 mL*3)。合并有机相，有机相依次用饱和食盐水洗涤(200 mL)，无水硫酸钠干燥，过滤收集滤液，减压浓缩得到残余物。残余物通过快速柱层析分离，纯化得到 **A-1-2**。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 8.67 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 7.64 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 3.37 (s, 3H), 1.63 - 1.53 (m, 6H), 1.39 - 1.30 (m, 6H), 1.26 - 1.12 (m, 6H), 0.90 (t, *J* = 7.3 Hz, 9H)。

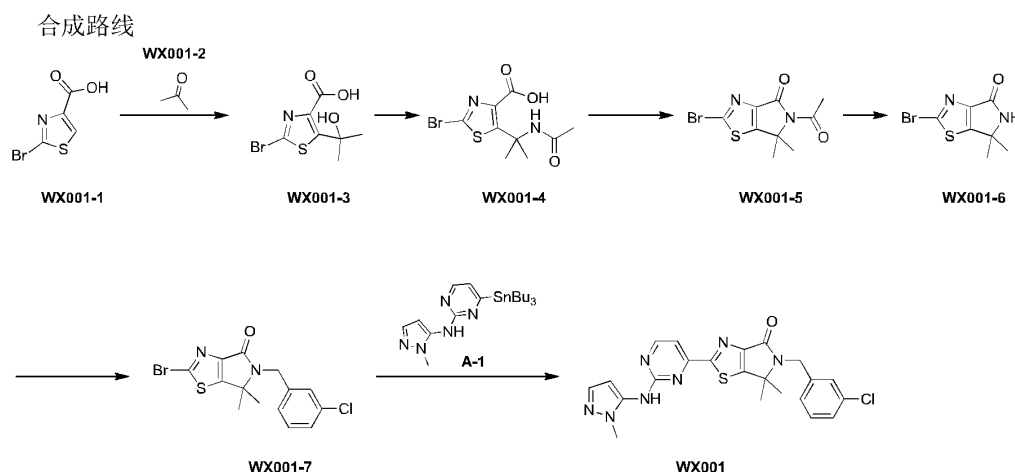
步骤 2：化合物 A-1 的合成

向反应瓶中加入 **A-1-2** (3.9 g, 8.72 mmol, 1 eq)、**A-1-3** (1.02 g, 10.46 mmol, 1.2 eq) 和四氢呋喃 (117 mL)，抽换氮气后-35℃滴加入六甲基二硅基胺基锂(1 M, 18.31 mL, 2.1 eq)，-35℃下混合液反应 10 分钟，反应结束后将反应液用饱和氯化铵水溶液 (100 mL) 淬灭，乙酸乙酯 (100 mL * 2) 和二氯甲烷 (100 mL) 萃取，有机相用无水硫酸钠干燥，过滤旋干得粗品。粗品用柱层析纯化得到 **A-1**。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 8.17 (d, *J* = 4.85 Hz, 1 H), 7.46 (d, *J* = 1.76 Hz, 1 H), 6.91 (d, *J* = 4.63 Hz, 1 H), 6.60 (s, 1 H), 6.32 (d, *J* = 1.98 Hz, 1 H), 3.79 (s, 3 H), 1.52 - 1.61 (m, 6 H), 1.28 - 1.40 (m, 6 H), 1.03 - 1.20 (m, 6 H), 0.89 (t, *J* = 7.28 Hz, 9 H)。

实施例 1



WX001



步骤 1: WX001-3 的合成

氮气保护, 在 -78°C 下向反应瓶中加入二异丙基胺基锂 (2 M, 2.88 mL, 2.4 eq) 的四氢呋喃 (5 mL) 溶液, 随后慢慢加入 WX001-1 (500 mg, 2.40 mmol, 1 eq), 四甲基乙二胺 (418.94 mg, 3.61 mmol, 544.08 μL , 1.5 eq) 的四氢呋喃 (1 mL), -78°C 反应 0.5 小时, 然后再加入 WX001-2 (279.18 mg, 4.81 mmol, 353.40 μL , 2 eq), -78°C 继续反应 2 小时。反应完毕后, 在 0°C 下将反应液缓慢倒入 30 mL 饱和氯化铵水溶液中, 用盐酸 (2 mol/L) 调节 pH 至 3-4 左右, 用乙酸乙酯 (20 mL*3) 萃取, 合并有机相, 并用饱和食盐水 (20 mL*3) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液用水泵在 45°C 下减压浓缩得到 WX001-3。

步骤 2: WX001-4 的合成

向反应瓶中加入 WX001-3 (250 mg, 939.45 μmol , 1 eq) 和乙腈 (8 mL), 抽换氮气后 0°C 加入浓硫酸 (110.57 mg, 1.13 mmol, 60.09 μL , 1.2 eq), 25°C 下混合液反应 16 小时。反应完毕后, 向反应液中加入 10 mL 水稀释, 乙酸乙酯 (30 mL*3) 萃取, 合并有机相, 并用饱和食盐水 (30 mL*3) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液用水泵在 45°C 下减压浓缩得到 WX001-4。

步骤 3: WX001-5 的合成

向干燥的反应瓶中加入 WX001-4 (200 mg, 651.12 μmol , 1 eq), 醋酸酐 (2 mL) 抽换氮气, 90°C 反应 16 小时。反应完毕后, 反应液用油泵在 45°C 下减压浓缩得到 WX001-5。

步骤 4: WX001-6 的合成

向干燥的反应瓶中加入 WX001-5 (60 mg, 207.51 μmol , 1 eq), 盐酸 (2 M, 2 mL, 19.28 eq), 和乙醇 (2 mL), 50°C 反应 16 小时。 70°C 反应 4 小时。反应完毕后, 反应液用水泵在 45°C 下减压浓缩,

用乙酸乙酯(30 mL*3)萃取合并有机相,并用饱和食盐水(30 mL*3)洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,滤液用水泵在 45℃下减压浓缩,粗产品通过薄层制备色谱板纯化得到 **WX001-6**。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8.85 (br s, 1H), 1.48 (s, 6H)。

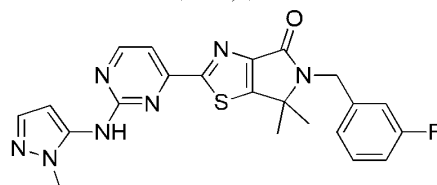
步骤 5: **WX001-7** 的合成

向干燥的反应瓶中加入 **WX001-6** (60 mg, 242.80 μmol, 1 *eq*) 和 *N,N*-二甲基甲酰胺 (1 mL), 抽换氮气, 0℃加入钠氢 (14.57 mg, 364.21 μmol, 60% 纯度, 1.5 *eq*), 在 0℃下反应 0.5 小时, 然后再加入 3-氯苄溴(49.89 mg, 242.80 μmol, 31.78 μL, 1 *eq*), 反应液慢慢升到 25℃继续反应 2 小时。反应完毕后, 反应液加入 20 mL 水, 用乙酸乙酯 (10 mL*3) 萃取, 合并有机相, 并用饱和食盐水 (10 mL*3) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液用水泵在 45℃下减压浓缩。粗品通过薄层制备色谱板纯化得到 **WX001-7**。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.26 (s, 1H), 7.17 (s, 3H), 4.62 (s, 2H), 1.37 (s, 6H)。

步骤 6: **WX001** 的合成

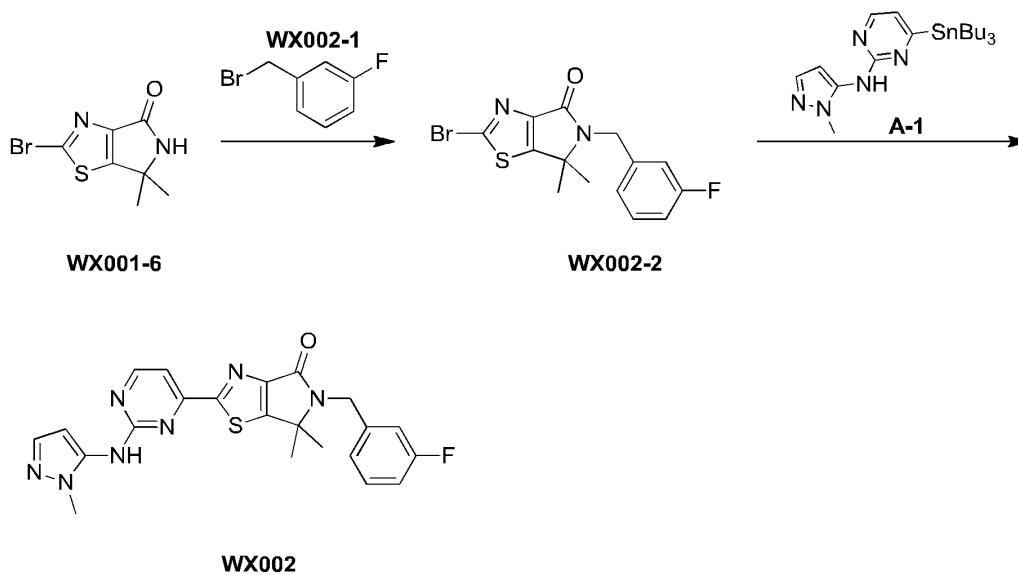
向反应瓶中加入 **WX001-7** (35 mg, 94.17 μmol, 1 *eq*), **A-1** (56.28 mg, 103.58 μmol, 1.1 *eq*), 甲苯 (2 mL), 抽换氮气, 加热到 125℃, 然后慢慢加入四三苯基膦钯(21.76 mg, 18.83 μmol, 0.2 *eq*)。125℃反应 48 小时。反应完毕后, 反应液用水泵在 45℃下减压浓缩。粗产品通过薄层制备色谱板纯化得到 **WX001**。

实施例 2



WX002

合成路线



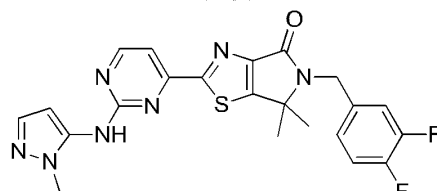
步骤 1: **WX002-2** 的合成

向干燥的反应瓶中加入 **WX001-6** (50 mg, 202.34 μmol , 1 *eq*) 和二甲基甲酰胺 (1 mL), 抽换氮气, 0°C 加入钠氢 (12.14 mg, 303.51 μmol , 60% 纯度, 1.5 *eq*), 在 0°C 下反应 0.5 小时, 然后再加入 **WX002-1** (38.25 mg, 202.34 μmol , 24.84 μL , 1 *eq*), 反应液慢慢升到 20°C 继续反应 2 小时。反应完毕后, 向反应液加入 20 mL 水, 用乙酸乙酯 (10 mL*3) 萃取, 合并有机相, 并用饱和食盐水 (10 mL*3) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液用水泵在 45°C 下减压浓缩。粗产品通过薄层制备色谱板纯化得到 **WX002-2**。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 7.32-7.40 (m, 1H), 7.15-7.23 (m, 2H), 7.03-7.11 (m, 1H), 4.67 (s, 2H), 1.48 (d, *J* = 3.8 Hz, 6H)。

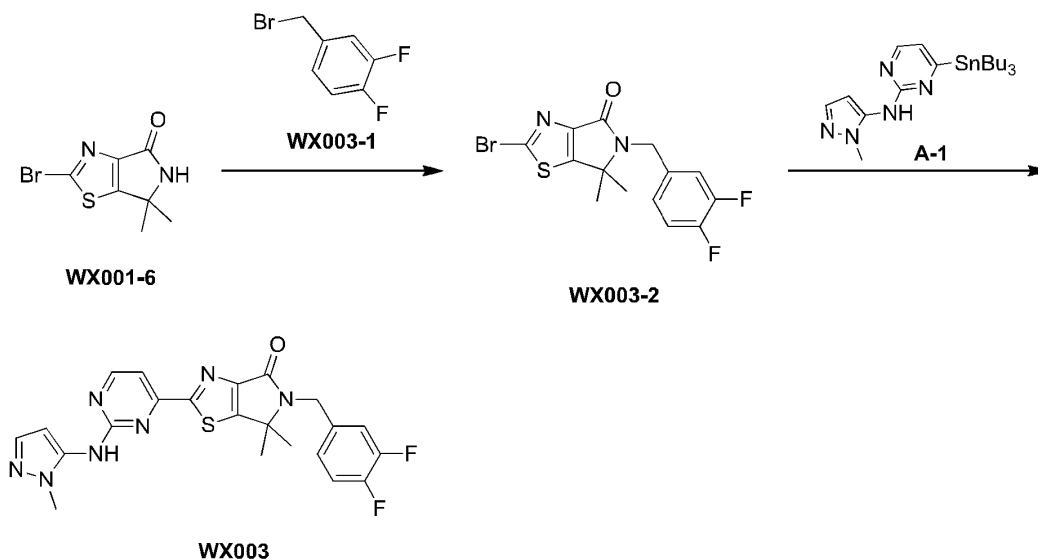
步骤 2: **WX002** 的合成

向反应瓶中加入 **WX002-2** (60 mg, 168.91 μmol , 1 *eq*), **A-1** (100.94 mg, 185.80 μmol , 1.1 *eq*), 甲苯 (1 mL), 抽换氮气, 加热到 125°C, 然后慢慢加入四三苯基磷钼 (39.04 mg, 33.78 μmol , 0.2 *eq*)。125°C 反应 48 小时。反应完毕后, 反应液用水泵在 45°C 下减压浓缩。粗品通过薄层制备色谱板纯化得到 **WX002**。

实施例 3

**WX003**

合成路线

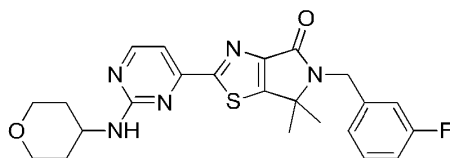
步骤 1: **WX003-2** 的合成

向干燥的反应瓶中加入 **WX001-6** (80 mg, 325.04 μmol , 1 *eq*) 和二甲基甲酰胺 (4 mL), 抽换氮气, 0°C 加入钠氢 (19.50 mg, 487.56 μmol , 60% 纯度, 1.5 *eq*), 在 0°C 下反应 0.5 小时, 然后再加入 **WX003-1** (67.29 mg, 325.04 μmol , 41.54 μL , 1 *eq*), 反应液慢慢升到 25°C 继续反应 2 小时。反应完毕后, 向反应液中加入 10 mL 水, 用乙酸乙酯 (20 mL*3) 萃取, 合并有机相, 并用饱和食盐水 (20 mL*3) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液用水泵在 45°C 下减压浓缩。粗产品通过柱分离纯化得到 **WX003-2**。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 7.33-7.47 (m, 2H), 7.23 (m, 1H), 4.65 (s, 2H), 1.41-1.52 (m, 6H)。

步骤 2: **WX003** 的合成

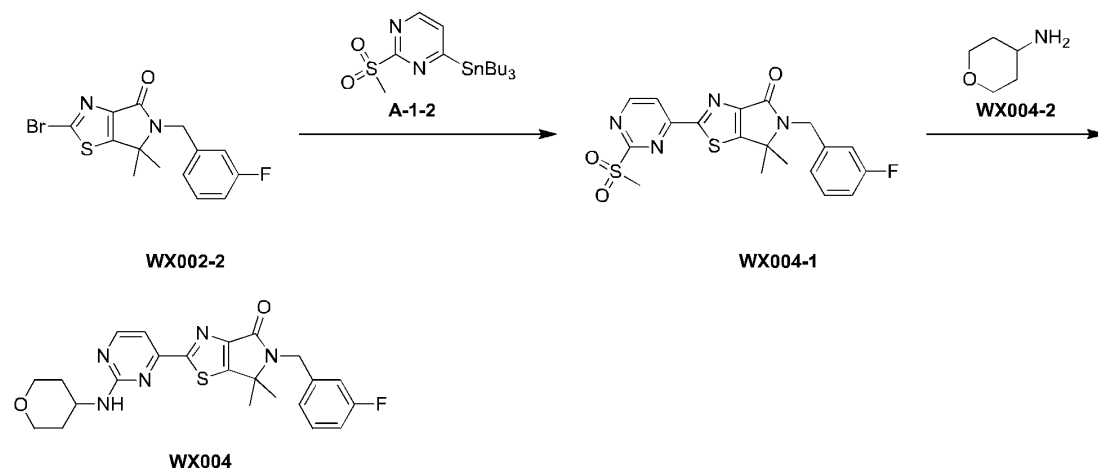
向反应瓶中加入 **WX003-2** (70 mg, 187.56 μmol , 1 *eq*), **A-1** (112.09 mg, 206.32 μmol , 1.1 *eq*), 甲苯 (2 mL), 抽换氮气, 加热到 125°C, 然后慢慢加入四三苯基磷钯 (43.35 mg, 37.51 μmol , 0.2 *eq*)。125°C 反应 48 小时。反应完毕后, 反应液用水泵在 45°C 下减压浓缩。粗品通过薄层制备色谱板纯化得到 **WX003**。

实施例 4



WX004

合成路线



步骤 1: **WX004-1** 的合成

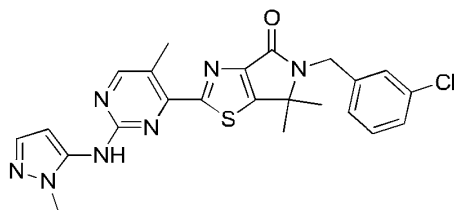
向反应瓶中加入 **WX002-2** (70 mg, 197.06 μmol , 1 *eq*), **A-1-2** (113.45 mg, 216.76 μmol , 1.1 *eq*), 甲苯 (2 mL), 抽换氮气, 加热到 125°C, 然后慢慢加入四三苯基磷钯 (45.54 mg, 39.41 μmol , 0.2 *eq*)。125°C 反应 48 小时。反应完毕后, 反应液用水泵在 45°C 下减压浓缩。粗品通过薄层制备色谱板纯化得到 **WX004-1**。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 9.26 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 8.43 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H),

7.33-7.42 (m, 1H), 7.16-7.28 (m, 2H), 7.08 (td, $J = 8.6, 2.0$ Hz, 1H), 4.73 (s, 2H), 3.50 (s, 3H), 1.55 (s, 6H)。

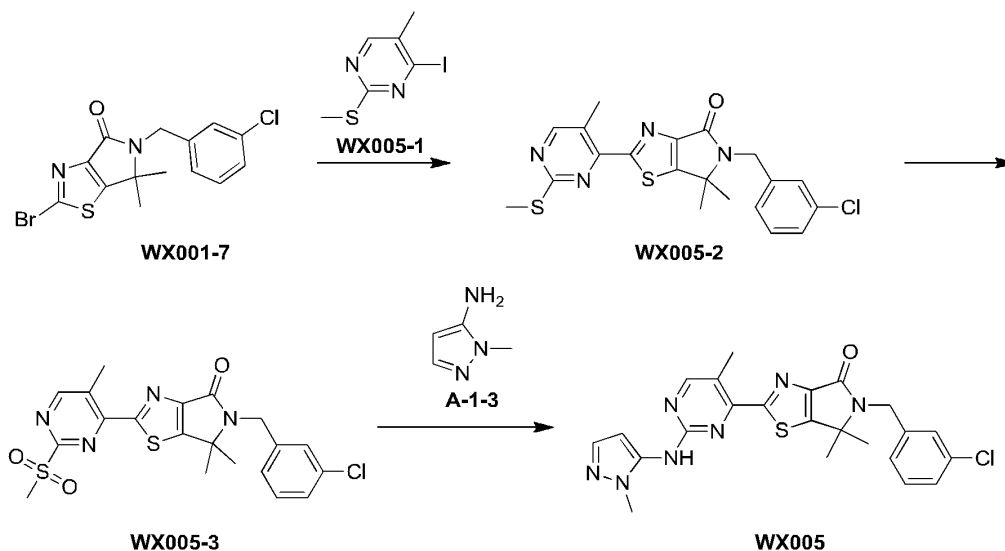
步骤 2: WX004 的合成

在预先干燥的反应瓶中加入 **WX004-1** (50 mg, 115.61 μ mol, 1 eq), **WX004-2** (11.69 mg, 115.61 μ mol, 1 eq), 之后用二甲基亚砜 (1 mL) 溶解, 100°C 搅拌反应 14 小时。反应完毕, 反应液浓缩后用薄层制备色谱板纯化得到 **WX004**。

实施例 5



合成路线



步骤 1: WX005-2 的合成

向反应瓶中加入 **WX001-7** (530 mg, 1.43 mmol, 1 eq)、氯化锌 (0.7 M, 1.83 mL, 0.9 eq) 和四氢呋喃 (3.5 mL), 抽换氮气后 -25°C 加入正丁基锂 (2.5 M, 855.58 μ L, 1.5 eq), 20°C 下混合液反应 1 小时。-25°C 滴加 **WX005-1** (379.45 mg, 1.43 mmol, 1 eq) 和三二亚苄基丙酮二钯 (65.29 mg, 71.30 μ mol, 0.05 eq)、三 (2-呋喃基) 膦 (33.11 mg, 142.60 μ mol, 0.1 eq) 和四氢呋喃 (0.5 mL) 的溶液, 20°C 反应 10 小时。补加四三苯基膦钯 (82.5 mg, 71.5 μ mol, 0.05 eq), 65°C 反应 20 小时。反应完毕后, 反应液用甲醇淬灭, 浓缩获得粗品。粗品用制备薄层色谱纯化得到 **WX005-2**。¹H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) 8.75 (s, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.26-7.41 (m, 3H), 4.72 (s, 2H), 2.65 (s, 3H), 2.59 (s, 3H), 1.53 (s, 6H)。

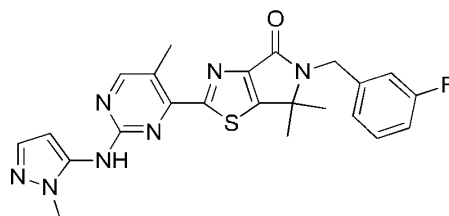
步骤 2: WX005-3 的合成

向反应瓶中加入 **WX005-2** (140 mg, 324.85 μmol , 1 eq) 和二氯甲烷 (6 mL), 抽换氮气后 0°C 加入间氯过氧苯甲酸 (210.22 mg, 974.54 μmol , 80% 纯度 3 eq), 缓慢升温至 20°C 下混合液反应 10 小时。反应完毕后, 反应液用饱和亚硫酸钠 (15 mL) 和饱和碳酸氢钠水溶液 (15 mL) 淬灭至 pH 到碱性和 KI 试纸不变色。二氯甲烷 (3 mL * 3) 萃取, 有机相在 45°C 用水泵减压浓缩干得棕色固体。乙酸乙酯 (3 mL) 打浆得到 **WX005-3**。 ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) 9.18 (s, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.30-7.39 (m, 3H), 4.73 (s, 2H), 3.48 (s, 3H), 2.83 (s, 3H), 1.55 (s, 6H)。

步骤 3: **WX005** 的合成

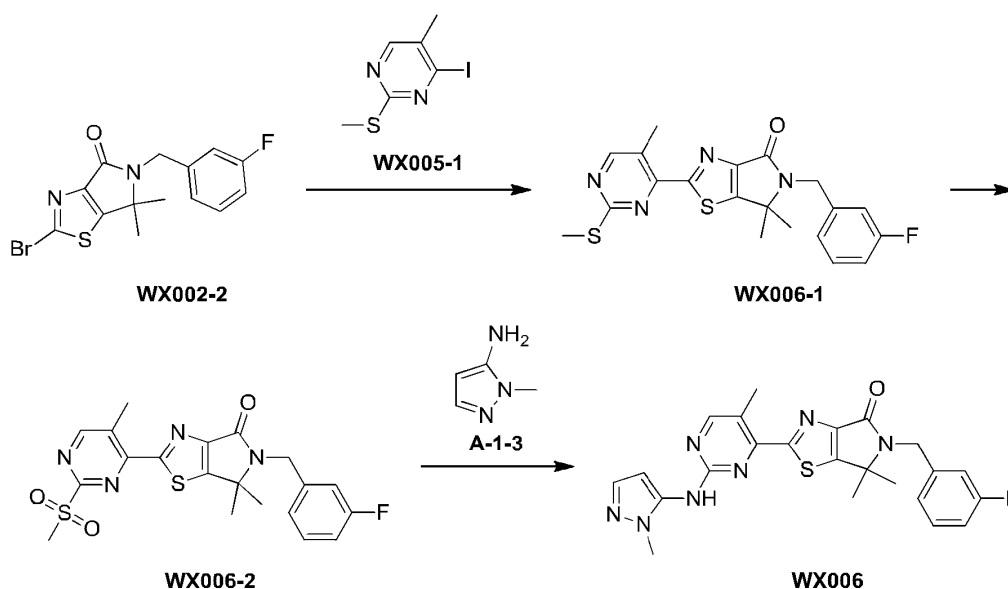
向反应瓶中加入 **A-1-3** (15.73 mg, 162.00 μmol , 1.5 eq) 和 *N,N*-二甲基甲酰胺 (1 mL), 抽换氮气后 0°C 加入钠氢 (6.48 mg, 162.00 μmol , 60% 纯度, 1.5 eq), 0.5 小时后加入 **WX005-3** (50 mg, 108.00 μmol , 1 eq) 和 *N,N*-二甲基甲酰胺 (1 mL) 的溶液, 20°C 下混合液反应 10 小时。反应完毕后, 反应液用饱和氯化铵水溶液 (5 mL) 淬灭, 二氯甲烷 (1 mL * 3) 萃取, 有机相在 45°C 用水泵减压浓缩干。粗品用薄层层析纯化得到 **WX005**。

实施例 6



WX006

合成路线



步骤 1: **WX006-1** 的合成

在预先干燥的反应瓶中加入 **WX002-2** (0.456 g, 1.28 mmol, 1 eq), 氯化锌 (0.7 M, 1.65 mL, 0.9 eq),

四氢呋喃 (10.5 mL), 抽换氮气后, 将反应体系降至-25℃, 加入正丁基锂 (2.5 M, 770.22 μ L, 1.5 eq), 20℃混合液搅拌反应 1 小时, -25℃下加入 **WX005-1**(341.59 mg, 1.28 mmol, 1 eq), 四三苯基膦钯 (74.17 mg, 64.18 μ mol, 0.05 eq) 的四氢呋喃 (1.5 mL)溶液, 60℃搅拌反应 12 小时。反应完毕后, 向反应液中加入甲醇 3 mL 淬灭, 直接旋干得粗品。粗产品通过薄层层析硅胶板纯化得到 **WX006-1**。

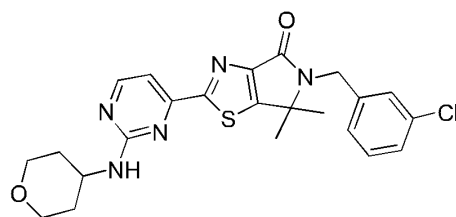
步骤 2: **WX006-2** 的合成

在预先干燥的反应瓶中加入 **WX006-1**(210 mg, 506.61 μ mol, 1 eq)和二氯甲烷 (5 mL, 将反应体系降至 0℃, 加入间氯过氧苯甲酸(327.85 mg, 1.52 mmol, 80% 纯度, 3 eq), 缓慢升温至室温 (20℃) 搅拌反应 12 小时。反应完毕后, 用碳酸氢钠水溶液 (5 mL) 调节反应液 pH 至 8 左右, 加入饱和的亚硫酸钠溶液至淀粉 KI 试纸不显蓝色, 加入二氯甲烷 (10 mL*3) 萃取, 合并有机相, 并用饱和食盐水 (10 mL*2) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液用水泵在 45℃下减压浓缩。粗产品通过薄层层析硅胶板纯化得到 **WX006-2**。

步骤 3: **WX006** 的合成

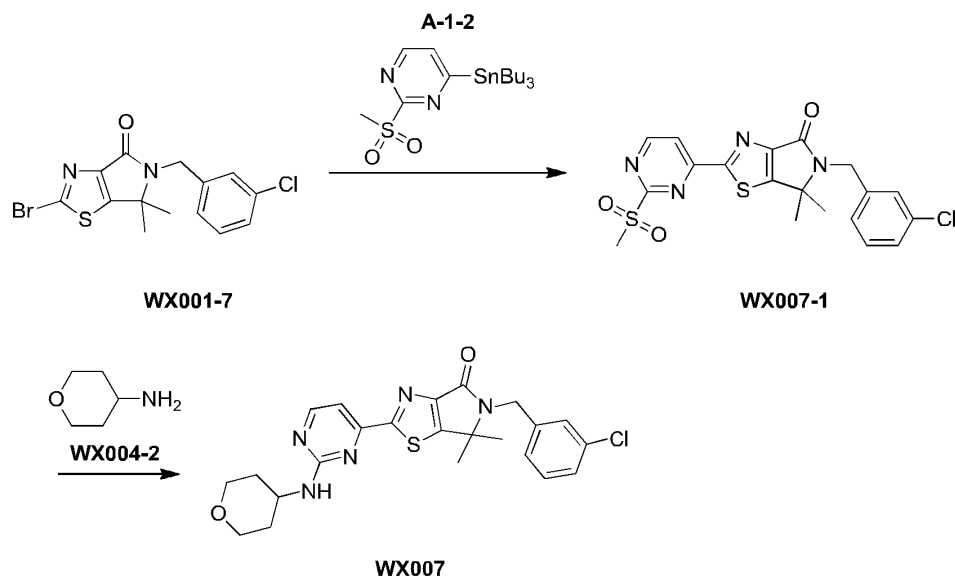
在预先干燥的反应瓶中加入 **A-1-3**(26.10 mg, 268.75 μ mol, 1.2 eq)和 *N,N*-二甲基甲酰胺 (3 mL), 将反应体系降至 0℃, 加入钠氢(13.44 mg, 335.93 μ mol, 60% 纯度, 1.5 eq), 0℃搅拌反应 0.5 小时, 加入 **WX006-2** (100 mg, 223.96 μ mol, 1 eq), 0℃搅拌反应 0.5 小时。反应完毕后, 加水 (5 mL) 淬灭反应, 加入乙酸乙酯 (5 mL*3) 萃取, 合并有机相, 并用饱和食盐水 (5 mL*4) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液用水泵在 45℃下减压浓缩。粗产品通过薄层层析硅胶板纯化得到 **WX006**。

实施例 7



WX007

合成路线



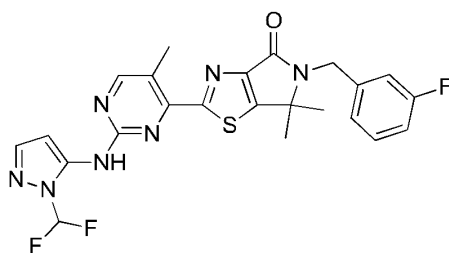
步骤 1: **WX007-1** 的合成

向反应瓶中加入 **WX001-7** (50 mg, 134.52 μmol , 1 *eq*), **A-1-2** (77.45 mg, 147.98 μmol , 1.1 *eq*), 甲苯 (2 mL), 抽换氮气, 加热到 125°C 然后慢慢加入四三苯基膦铯 (31.09 mg, 26.90 μmol , 0.2 *eq*)。125°C 反应 48 小时。反应完毕, 反应液用水泵在 45°C 下减压浓缩。粗产品通过薄层层析硅胶板纯化得到 **WX007-1**。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) 9.26 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 8.43 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.28-7.39 (m, 3H), 4.73 (s, 2H), 3.50 (s, 3H), 1.55 (s, 6H)。

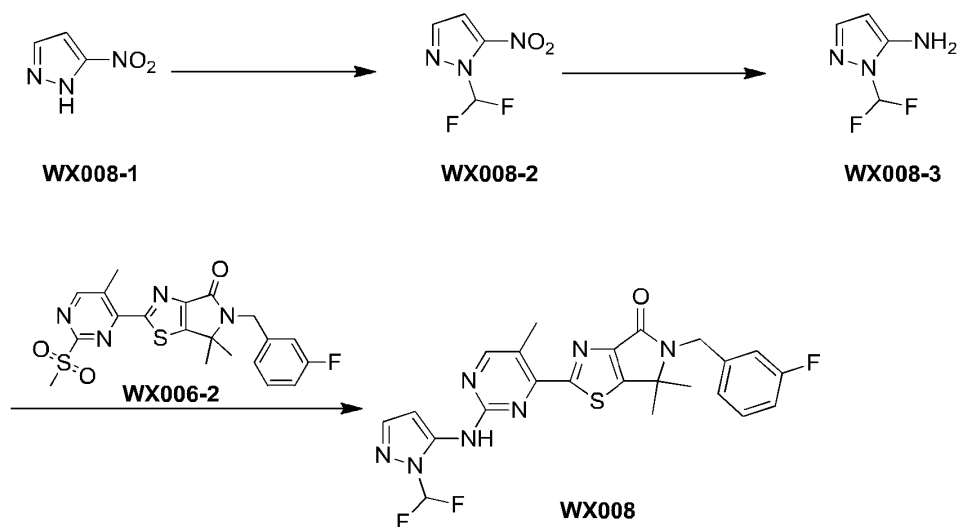
步骤 2: **WX007** 的合成

在预先干燥的反应瓶中加入 **WX007-1** (30 mg, 66.82 μmol , 1 *eq*), **WX004-2** (6.76 mg, 66.82 μmol , 1 *eq*), 之后用二甲基亚砜 (1 mL) 溶解, 100°C 搅拌反应 16 小时。反应完毕, 反应液浓缩后用薄层制备色谱板纯化得到 **WX007**。

实施例 8



合成路线



步骤 1: WX008-2 的合成

向反应瓶中加入 **WX008-1** (9 g, 79.59 mmol, 1 *eq*)、碳酸钾(13.20 g, 95.51 mmol, 1.2 *eq*)和 *N,N*-二甲基甲酰胺(100 mL)，抽换氮气后加热至 120℃，搅拌 10 分钟，随后分批加入 2-氯-2,2-二氟乙酸钠 (24.27 g, 159.19 mmol, 2 *eq*)，120℃ 下混合液反应 20 分钟。反应完毕后，反应液用水 (800 mL) 稀释，乙酸乙酯 (200 mL*3) 萃取，有机相用饱和食盐水 (300 mL) 洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液用水泵减压浓缩，通过薄层层析硅胶板纯化得到 **WX008-2**。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) 7.96-8.28 (m, 2H), 7.50 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H)。

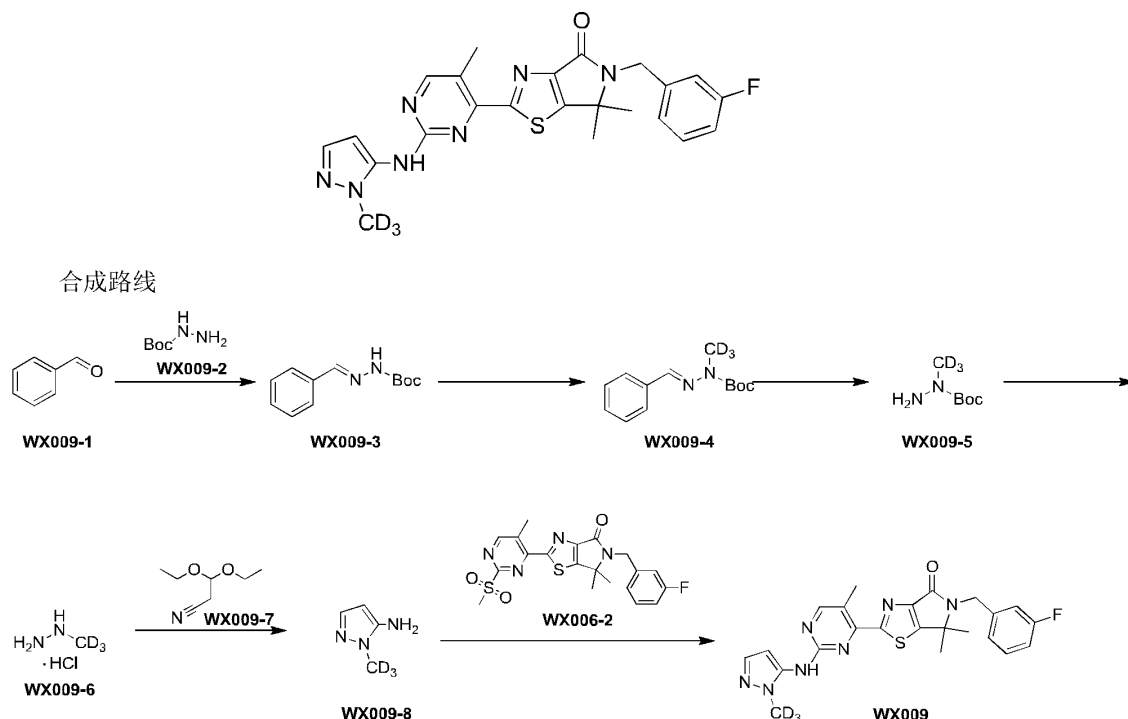
步骤 2: WX008-3 的合成

向反应瓶中加入钨碳(50 mg, 367.91 μmol, 10%纯度, 1 *eq*)和甲醇(1 mL)，抽换氮气后加入 **WX008-2** (60 mg, 367.91 μmol, 1 *eq*)，抽换氢气，在氢气(741.67 μg, 367.91 μmol, 1 *eq*)氛围下，15 psi 压力下，25℃ 下混合液反应 1 小时。反应完毕后，反应液用硅藻土过滤，滤液用水泵减压浓缩干得 **WX008-3**。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) 7.36-7.69 (m, 1H), 7.33 (s, 1H), 5.84 (br s, 2H), 5.31 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H)。

步骤 3: WX008 的合成

向反应瓶中加入 **WX008-3** (17.88 mg, 134.37 μmol, 1.5 *eq*)、**WX006-2** (40 mg, 89.58 μmol, 1 *eq*)、二氯甲烷 (0.5 mL) 和四氢呋喃 (0.5 mL)，抽换氮气后降温至 0℃，缓慢滴入六甲基二硅基胺基锂 (1 M, 188.12 μL, 2.1 *eq*)，0℃ 下混合液反应 0.5 小时。反应完毕，反应液浓缩后用薄层制备色谱板纯化得到 **WX008**。

实施例 9



步骤 1: WX009-3 的合成

向反应瓶中加入 **WX009-1** (8.03 g, 75.67 mmol, 7.65 mL, 1 eq)、**WX009-2** (10 g, 75.67 mmol, 1 eq) 和四氢呋喃(100 mL)，抽换氮气，25℃下混合液反应 4 小时。反应完毕后，反应液旋干得 **WX009-3**。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) 10.86 (br s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.59 (br d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 7.31-7.45 (m, 3H), 1.47 (s, 9H)。

步骤 2: WX009-4 的合成

向反应瓶中加入 **WX009-3** (10 g, 45.40 mmol, 1 eq)、叔丁醇钾(6.11 g, 54.48 mmol, 1.2 eq)和四氢呋喃(160 mL)，抽换氮气后缓慢滴入氘代碘甲烷(7.90 g, 54.48 mmol, 3.39 mL, 1.2 eq)，25℃下混合液反应 16 小时。反应完毕后，反应液用水 (50 mL) 稀释，乙酸乙酯 (100 mL * 3) 萃取，有机相用饱和食盐水 (100 mL) 洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液用水泵减压浓缩得到 **WX009-4**。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) 7.81 (s, 1H), 7.64-7.72 (m, 2H), 7.32-7.46 (m, 3H), 1.50 (s, 9H)。

步骤 3: WX009-5 的合成

向反应瓶中加入湿钨碳(2 g, 10%纯度)和甲醇(100 mL)，抽换氮气后加入 **WX009-4** (10.5 g, 44.25 mmol, 1 eq)，50 psi 压力下，氢气(89.19 mg, 44.25 mmol, 1 eq)气氛中，50℃下混合液反应 48 小时。反应完毕后，反应液用硅藻土过滤，甲醇 (20 mL * 2) 洗涤，滤液用水泵减压浓缩干得到 **WX009-5**。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) 4.48 (s, 2H), 1.40 (s, 9H)。

步骤 4: WX009-6 的合成

向反应瓶中加入 **WX009-5** (6.6 g, 44.23 mmol, 1 eq)和盐酸乙酸乙酯溶液(4 M, 33.18 mL, 3 eq)，

25℃下混合液反应 16 小时。反应液旋干得到 **WX009-6**。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 4.95 (br s, 3 H)。

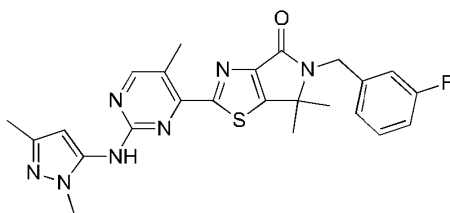
步骤 5: **WX009-8** 的合成

向反应瓶中加入 **WX009-6** (1.5 g, 17.53 mmol, 1 eq, HCl)、**WX009-7** (2.51 g, 17.53 mmol, 2.63 mL, 1 eq)、乙酸(2.11 g, 35.07 mmol, 2.01 mL, 2 eq)、硫酸镁(5.02 g, 41.73 mmol, 2.38 eq)和乙醇 (75 mL), 抽换氮气, 90℃下混合液反应 2 小时。反应完毕后, 反应液用饱和碳酸氢钠水溶液 (50 mL) 稀释, 二氯甲烷 (50 mL *3) 萃取, 有机相用饱和食盐水 (50 mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液在 45℃用水泵减压浓缩, 粗品用柱层析纯化得到 **WX009-8**。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) 6.98 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 5.24 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 5.09 (br s, 2H)。

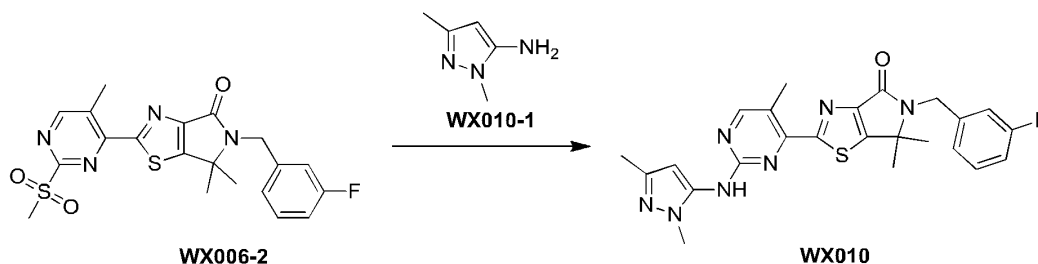
步骤 6: **WX009** 的合成

向反应瓶中加入 **WX009-8** (13.46 mg, 134.37 μmol, 1.5 eq)、**WX006-2** (40 mg, 89.58 μmol, 1 eq)、二氯甲烷 (0.5 mL) 和四氢呋喃(0.5 mL), 抽换氮气后降温至 0℃, 缓慢滴入 六甲基二硅基胺基锂 (1 M, 188.12 μL, 2.1 eq), 0℃下混合液反应 0.5 小时。反应完毕后, 反应液用饱和氯化铵水溶液 (5 mL) 稀释, 二氯甲烷 (5 mL *3) 萃取, 有机相用饱和食盐水 (5 mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液在 45℃用水泵减压浓缩, 用薄层制备色谱板纯化得到 **WX009**。

实施例 10



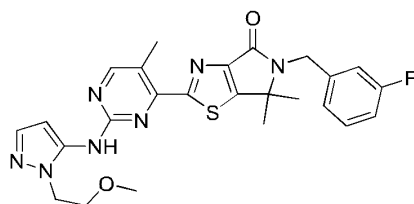
合成路线



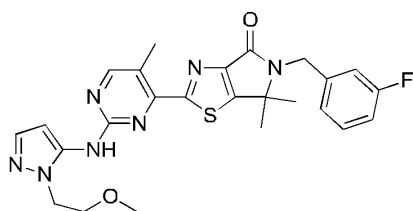
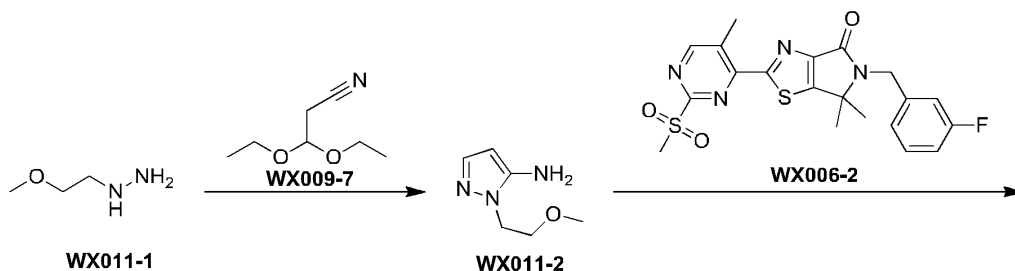
步骤 1: **WX010** 的合成

在干燥的反应瓶中, 将 **WX006-2** (30 mg, 67.19 μmol, 1 eq)、**WX010-1** (15.68 mg, 141.09 μmol, 2.1 eq) 加入到四氢呋喃(1.5 mL)和二氯甲烷 (1.5 mL) 的混合溶液, 置换氮气, 降温至 0℃, 加入六甲基二硅基胺基锂 (1 M, 134.37 μL, 2 eq), 在 0℃条件下搅拌 0.5 小时, 升温至 25℃, 搅拌 1.5 小时。反应完毕后, 加入水 (10mL) 稀释, 加二氯甲烷 (10mL *3) 萃取, 分液后收集有机相, 依次用饱和食盐水溶液(10mL *3), 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 用薄层制备色谱板纯化得到 **WX010**。

实施例 11



合成路线



WX011

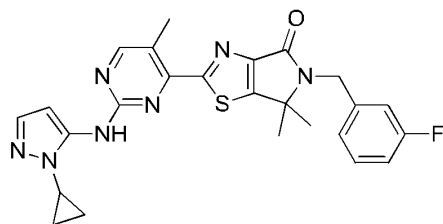
步骤 1: WX011-2 的合成

向干燥的反应瓶中加入 **WX009-7** (226.22 mg, 1.58 mmol, 237.13 μ L, 1 *eq*)、硫酸镁(452.63 mg, 3.76mmol, 2.38 *eq*)、乙酸(189.75 mg, 3.16 mmol, 180.72 μ L, 2 *eq*)、乙醇(2.5 mL), 抽换氮气, 25 $^{\circ}$ C 反应 1 小时, 然后加入 **WX011-1** (200 mg, 1.58 mmol, 1 *eq*, HCl), 80 $^{\circ}$ C 反应 2 小时, 90 $^{\circ}$ C 反应 12 小时。反应完毕后, 将反应液倒 3mL 入饱和碳酸氢钠水溶液中。用二氯甲烷 3mL*2 萃取, 合并有机相, 有机相用 3mL 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩得到粗品。粗产品通过薄层层析硅胶板纯化得到 **WX011-2**。 ^1H NMR ($\text{CH}_3\text{Cl}-d$, 400 MHz): δ (ppm) 7.25 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 5.50 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 4.15-4.22 (m, 2H), 3.83-4.11 (m, 2H), 3.68-3.73 (m, 2H), 3.34 (s, 3H)。

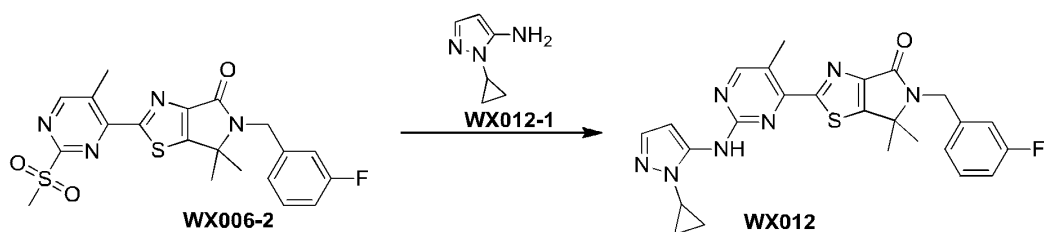
步骤 2: WX011 的合成

在干燥的反应瓶中, 将 **WX006-2** (40 mg, 89.58 μ mol, 1 *eq*)、**WX011-2** (26.56 mg, 188.12 μ mol, 2.1 *eq*)加入到四氢呋喃(2 mL)和二氯甲烷(2 mL)的混合溶液, 置换氮气, 降温至 0 $^{\circ}$ C, 加入六甲基二硅基胺基锂 (1 M, 179.16 μ L, 2 *eq*), 在 0 $^{\circ}$ C 条件下, 搅拌 0.5 小时, 升温至 25 $^{\circ}$ C, 搅拌 1 小时。反应完毕后, 加入水 (5mL) 稀释, 二氯甲烷 (5mL*3) 萃取, 分液后收集有机相, 依次用饱和食盐水溶液 (5mL*3), 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 用薄层制备色谱板纯化得到 **WX011**。

实施例 12



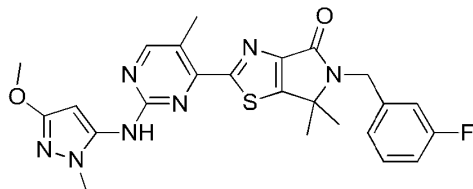
合成路线



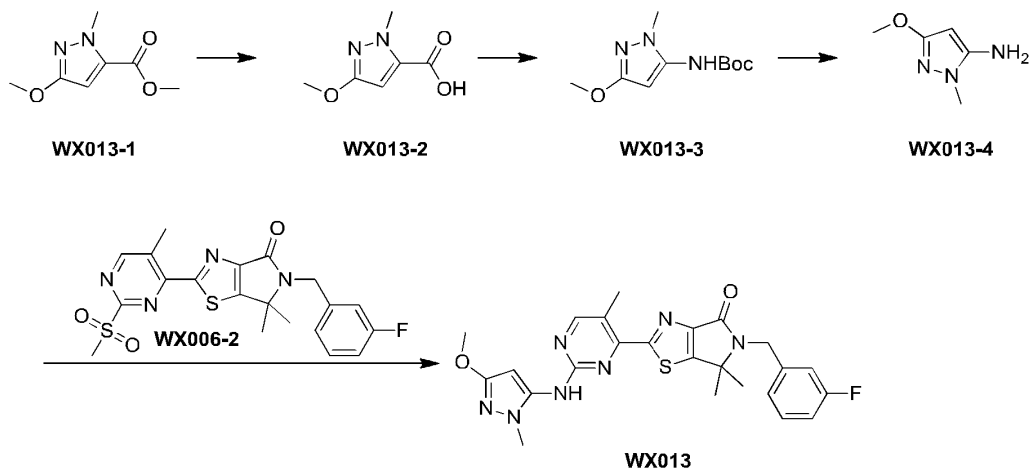
步骤 1: WX012 的合成

向反应瓶中加入 **WX006-2** (40 mg, 89.58 μmol , 1 *eq*)、**WX012-1** (16.55 mg, 134.37 μmol , 1.5 *eq*)、二氯甲烷 (1 mL) 和四氢呋喃 (1 mL)，抽换氮气后降温至 0°C ，缓慢滴入六甲基二硅基胺基锂 (1 M, 188.12 μL , 2.1 *eq*)， 0°C 下混合液反应 0.5 小时。反应完毕后，反应液浓缩后用薄层制备色谱板纯化得到 **WX012**。

实施例 13



合成路线



步骤 1: WX013-2 的合成

将 WX013-1 (800 mg, 4.70 mmol, 1 eq) 与一水合氢氧化锂(986.42 mg, 23.51 mmol, 5 eq)溶于水(8 mL)与四氢呋喃(8 mL)的混合溶液中, 在 25℃下搅拌 2 小时。反应完毕后, 将反应液直接旋干, 然后加入水(10mL)和二氯甲烷(10mL*3)进行萃取, 收集有机相, 用饱和食盐水洗, 用无水硫酸钠干燥, 过滤并旋干得到 WX013-2。

步骤 2: WX013-3 的合成

将 WX013-2 (500 mg, 3.20 mmol, 1 eq)、叠氮磷酸二苯酯(889.00 mg, 3.23 mmol, 700 μ L, 1.01 eq)、三乙胺 (1.45 g, 14.37 mmol, 2 mL, 4.49 eq)溶于叔丁醇(10 mL)中, 氮气置换三次后, 在 85℃下搅拌 16 小时。反应完毕后, 将反应液旋干。粗品通过柱层析法纯化得到 WX013-3。¹H NMR (400 MHz, CD₃Cl) δ ppm 1.50 (s, 9 H) 3.58 (s, 3 H) 3.84 (s, 3 H) 5.61 (br s, 1 H)。

步骤 3: WX013-4 的合成

将 WX013-3 (520 mg, 2.29 mmol, 1 eq)加入到反应瓶中, 加入盐酸乙酸乙酯溶液(4 M, 5 mL, 8.74 eq), 在 25℃搅拌 2 小时。反应完毕后, 向反应液中加入水(10mL), 萃取并收集水相, 然后旋干得到粗品。粗品通过柱层析法进行纯化得到 WX013-4。¹H NMR (400 MHz, CD₃Cl) δ ppm 3.53 (s, 3 H) 3.82 (s, 3 H) 5.01 (s, 1 H)。

步骤 4: WX013 的合成

向干燥的反应瓶中加入 WX006-2 (50 mg, 111.98 μ mol, 1 eq), WX013-4 (29.90 mg, 235.15 μ mol, 2.1 eq), 二氯甲烷(1 mL)和四氢呋喃(1 mL), 抽换氮气, 将反应降温至 0℃, 滴加六甲基二硅基胺基锂(1 M, 223.96 μ L, 2 eq), 0℃反应 0.5 小时, 25℃反应 1 小时。反应完毕后, 加入 10mL 水淬灭, 加入 20mL 二氯甲烷萃取, 分液后收集有机相, 水相用二氯甲烷萃取(20mL*3)。合并有机相, 依次用饱和食盐水洗涤(20mL*3), 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩。浓缩后用薄层制备色谱板纯化得到 WX013。

各实施例的氢谱和质谱数据如表 1 所示。

表 1

实施例	化合物	NMR	MS m/z
1	WX001	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 9.82 (br s, 1H), 8.70 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 7.56 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.41 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.36 (s, 3H), 6.35 (s, 1H), 4.72 (s, 2H), 3.74 (s, 3H), 1.53 (s, 6H)。	466 [M+H] ⁺
2	WX002	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz) δ (ppm) 9.78 (br s, 1H), 8.68 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 7.54 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 7.31-7.42 (m, 2H), 7.16-7.24 (m, 2H), 7.07 (td, J = 8.6, 2.2 Hz, 1H), 6.33 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 4.71 (s, 2H), 3.72 (s, 3H), 1.52 (s, 6H)。	450 [M+H] ⁺
3	WX003	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz) δ (ppm) 9.80 (br s, 1H), 8.69 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 7.54 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 7.32-7.50 (m, 3H), 7.25 (m,	468 [M+H] ⁺

		1H), 6.33 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 4.68 (s, 2H), 3.72 (s, 3H), 1.52 (s, 6H)。	
4	WX004	^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 8.52 (br d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 7.61 (br s, 1H), 7.33-7.48 (m, 1H), 7.18-7.30 (m, 3H), 7.04-7.15 (m, 1H), 4.73 (s, 2H), 3.83-4.05 (m, 3H), 3.43 (m, 2H), 1.89 (br s, 2H), 1.49-1.64 (m, 8H)。	454 [M+H] ⁺
5	WX005	^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm) 9.61 (s, 1H), 8.60 (s, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.39 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.30-7.38 (m, 3H), 6.34 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 4.71 (s, 2H), 3.72 (s, 3H), 2.59 (s, 3H), 1.51 (s, 6H)。	480 [M+1] ⁺
6	WX006	^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 9.61 (s, 1H), 8.60 (s, 1H), 7.40 - 7.33 (m, 2H), 7.25 - 7.18 (m, 2H), 7.04 - 7.11 (m, 1H), 6.31 - 6.35 (m, 1H), 4.71 (s, 2H), 3.72 (s, 3H), 2.59 (s, 3H), 1.52 (s, 6H)。	464 [M+1] ⁺
7	WX007	^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm) 8.51 (br d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 7.51-7.64 (m, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.30-7.40 (m, 3H), 7.26 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H), 4.71 (s, 2H), 3.85-4.04 (m, 3H), 3.42 (br t, $J = 11.2$ Hz, 2H), 1.89 (br d, $J = 4.5$ Hz, 2H), 1.48-1.64 (m, 8H)。	470 [M+1] ⁺
8	WX008	^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm) 10.04 (br s, 1H), 8.65 (s, 1H), 7.59-7.94 (m, 2H), 7.31-7.42 (m, 1H), 7.16-7.27 (m, 2H), 7.08 (br t, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.54 (s, 1H), 4.72 (s, 2H), 2.61 (s, 3H), 1.52 (s, 6H)。	500 [M+1] ⁺
9	WX009	^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm) 9.62 (s, 1H), 8.60 (s, 1H), 7.32-7.41 (m, 2H), 7.17-7.26 (m, 2H), 7.07 (td, $J = 8.5, 2.4$ Hz, 1H), 6.34 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 4.71 (s, 2H), 2.59 (s, 3H), 1.51 (s, 6H)。	467 [M+1] ⁺
10	WX010	^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ (ppm) 9.52 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 7.31-7.42 (m, 1H), 7.17-7.27 (m, 2H), 7.02-7.13 (m, 1H), 6.08 (s, 1H), 4.72 (s, 2H), 3.63 (s, 3H), 2.59 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 1.53 (s, 6H)。	478 [M+1] ⁺
11	WX011	^1H NMR (400MHz, DMSO- d_6) δ 9.47 (s, 1H), 8.60 (s, 1H), 7.43 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.40 - 7.32 (m, 1H), 7.25 - 7.16 (m, 2H), 7.07 (dt, $J = 2.0, 8.6$ Hz, 1H), 6.40 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 4.71 (s, 2H), 4.25 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 3.67 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.21 (s, 3H), 2.59 (s, 3H), 1.51 (s, 6H)。	508 [M+1] ⁺
12	WX012	^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 0.88 - 0.95 (m, 2 H), 0.96 - 1.03 (m, 2 H), 1.51 (s, 6 H), 2.59 (s, 3 H), 3.54 (tt, $J = 7.24, 3.71$ Hz,	490 [M+1] ⁺

		1 H), 4.71 (s, 2 H), 6.35 (d, $J=1.63$ Hz, 1 H), 7.02 - 7.12 (m, 1 H), 7.17 - 7.26 (m, 2 H), 7.32 - 7.41 (m, 2 H), 8.61 (s, 1 H), 9.54 (s, 1 H)。	
13	WX013	^1H NMR (DMSO- d_6 , 400MHz) δ (ppm) 9.66 (s, 1H), 8.61 (s, 1H), 7.31-7.43 (m, 1H), 7.15-7.27 (m, 2H), 7.03-7.12 (m, 1H), 5.81 (s, 1H), 4.72 (s, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.57 (s, 3H), 2.59 (s, 3H), 1.52 (s, 6H)。	494 [M+1] ⁺

实验例一、体外酶活性测试：

1. 实验目的：

测量化合物抑制 ERK2 激酶活性的能力。

2. 实验缓冲液：

20 mM Hepes (pH 7.5), 10 mM MgCl_2 , 1 mM 乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸(EGTA), 0.02% Brij35, 0.02 mg/mL 牛血清白蛋白(BSA), 0.1 mM Na_3VO_4 , 2 mM 二硫苏糖醇(DTT), 1% DMSO。

3. 化合物处理：

将测试化合物溶于 100% DMSO 中，配制特定浓度的母液。利用 Integra Viaflo Assist 智能移液器将化合物连续稀释在 DMSO 溶液中。

3. 实验方法

- 1) 在新制备的反应缓冲液中配置底物 MBP；
- 2) 将 ERK2 激酶加入到上述 MBP 溶液中并轻轻混合；
- 3) 运用超声技术 (Echo550; 纳升范围) 将溶于 100% DMSO 中的化合物加入到激酶反应体系中，在室温下孵育 20 分钟；
- 4) 将 ^{33}P -ATP (特定浓度 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$) 加入到反应体系中，此时开始发生反应；
- 5) 在室温下孵育 2 小时；
- 6) 通过过滤-结合方法检测放射性的量；
- 7) ERK2 激酶活性计算方式为测试样品中剩余激酶活性占对照组 (二甲基亚砷处理) 激酶活性的比值。使用 Prism (GraphPad 软件) 进行曲线拟合并计算 IC_{50} 值。

4. 实验结果见表 2：

表 2 体外酶活性测试结果

化合物	ERK2
	IC_{50} (nM)
WX001	0.24
WX002	0.35
WX003	0.37

WX004	0.25
WX005	0.05
WX006	0.30
WX007	0.39
WX008	0.52
WX009	0.64
WX0010	0.14
WX0011	0.98
WX0012	0.48
WX0013	0.19

结论：本发明化合物表现出较优的对 ERK2 酶抑制活性。

实验例二、体外细胞增殖抑制实验：

1. 实验目的：

测量化合物抑制 HT29 肿瘤细胞增值的能力。

2. 化合物处理：

将测试化合物溶于 100% DMSO 中，配制成 10mM 的母液。

3. 实验步骤与方法：

- 1) 开启生物安全柜紫外灯，倒计时 30 分钟；
- 2) 37 度水浴锅中，预热 RPMI1640 培养基和胰酶；
- 3) 紫外照射完毕，开启生物安全柜，将预热培养基，胰酶，磷酸缓冲盐溶液(PBS)等用酒精擦拭并放入生物安全柜中；
- 4) 将 HT29 细胞从培养箱中取出，在生物安全柜中去除旧培养基，加入 10 毫升 PBS，轻轻摇晃，并去除 PBS；
- 5) 加入预热 0.25%胰酶 1.5 毫升，水平晃动培养瓶，使其均匀覆盖到底部的细胞，置培养箱中 2 分钟；
- 6) 用完全培养基终止细胞消化，并吹打至均匀的细胞悬液计数；
- 7) 根据细胞计数结果，调整细胞悬液密度为 1500 细胞每孔，50 微升每孔进行种板；
- 8) 将化合物母液连续稀释在 DMSO 溶液中，并使用 Tecan 将化合物加入细胞板中；
- 9) 将加过化合物的细胞板和 CellTiterGlo 放到室温平衡，后加 CellTiterGlo 25 微升至每孔，震荡 1-2 分钟，静置 10 分钟后检测信号值，并用 XL-Fit 分析数据，计算各化合物的 IC₅₀。

4. 实验结果见表 3：

表 3 体外细胞活性测试结果

化合物	HT29
	IC ₅₀ (nM)

WX001	14
WX002	24
WX003	27
WX004	35
WX005	8
WX006	7
WX007	26
WX008	58
WX009	6
WX010	27
WX011	26
WX012	37
WX013	18

结论：本发明化合物表现出较优的对 HT29 细胞增殖抑制活性。

实验例三、体内 DMPK 研究：

小鼠体内 DMPK 研究

1. 实验目的：

以雌性 BALB/c 小鼠为受试动物，单次给药后测定化合物血药浓度并评估药代动力学行为。

2. 实验操作：

选择健康成年雌性 BALB/c 小鼠 8 只，4 只为静注组，4 只为口服组。静注组溶媒为 5%DMSO+95%(20% HP- β -CD)，待测化合物与适量静注溶媒混合，涡旋并超声，制备得到 0.5 mg/mL 澄清溶液，微孔滤膜过滤后备用；口服组溶媒为 5%DMSO+95%(20% HP- β -CD)，待测化合物与溶媒混合后，涡旋并超声，制备得到 0.3 mg/mL 溶液。小鼠 1 mg/kg 静脉给药或 3 mg/kg 口服给药后，收集一定时间的全血，制备得到血浆，以 LC-MS/MS 方法分析药物浓度，并用 Phoenix WinNonlin 软件(美国 Pharsight 公司)计算药代参数。

注 DMSO：二甲基亚砜；HP- β -CD：羟丙基- β -环糊精。

3. 实验结果见表 4：

表 4 化合物 PK 测试结果

化合物	C _{max} (nM)	F%	口服 DNAUC (nM.h/mpk)	Vd _{ss} (L/kg)	Cl (mL/min/kg)	T _{1/2} (h)
WX001	3355	86%	2153	1.1	14.3	0.9
WX005	1029	NA	468	NA	NA	NA

WX006	1035	34%	530	1.7	23.0	1.0
WX009	1170	67%	820	1.7	28.0	1.7

备注: $C_{\max}$ 为最大浓度; F%为口服生物利用度; $DNAUC = AUC_{PO}/Dose$, AUC_{PO} 为口服暴露量, Dose 为药物剂量; Vd_{ss} 为分布容积; Cl 为清除率; $T_{1/2}$ 为半衰期; NA 指未检测。

结论: 本发明化合物展现了优良的口服暴露量和生物利用度。

实验例四、小鼠 H358 模型体内药效研究:

1. 实验目的:

使用人非小细胞肺癌 H358 细胞皮下异种移植肿瘤裸小鼠模型, 评价 **WX006** 的抗肿瘤作用。

2. 实验动物:

种属: 小鼠

品系: BALB/c 裸小鼠

周龄: 6-7 周龄

性别: 雌性

体重: 20 克

供应商: 上海西普尔-必凯实验动物有限公司

动物合格证号: 20180006017149

3. 饲养环境:

动物在 SPF 级动物房以 IVC (独立送风系统, 恒温恒湿) 笼具饲养 (每笼 4 只), 温度: 20-26℃, 湿度: 40-70 %;

笼具: 以聚碳酸酯制成, 体积 300 mm × 180 mm × 150 mm, 垫料为玉米芯, 每周更换一次;

食物: 实验动物在整个实验阶段中可自由进食 (照射灭菌, 干颗粒状食物);

饮水: 实验动物可自由饮用灭菌水;

笼具标识: 每笼动物信息卡应注明笼内动物数目, 性别, 品系, 接收日期, 给药方案实验编号, 组别以及实验开始日期;

动物标识: 实验动物以耳标进行标识。

4. 实验内容:

1) 实验细胞及培养: 人非小细胞肺癌 H358 细胞体外单层培养, 培养条件为 1640 培养基中加 10% 胎牛血清, 37℃ 5%CO₂ 孵箱培养。一周三次用胰酶-EDTA 进行常规消化处理传代。当细胞饱和度为 80%-90%, 数量到达要求时, 收取细胞, 计数, 接种;

2) 肿瘤组织接种及分组: 0.1 mL (5×10^5 个) H358 细胞皮下接种于每只小鼠的右侧腋下, 肿瘤平均体积达到 100 mm³ 时, 将动物随机分为 2 组, 开始给药。实验分组和给药方案见表 5;

表 5 实验动物分组及给药方案

组别	动物数量	药物	剂量 (mg/kg)	给药周期	给药途径和频次
----	------	----	------------	------	---------

1	6	溶剂对照 (Vehicle)	--	28 天	口服给药(PO), 每天一次(QD)
2	6	WX006	30	28 天	口服给药(PO), 每天一次(QD)

3) 实验动物日常观察: 本实验方案的拟定及任何修改均通过了实验动物管理与使用委员会(IACUC)的评估核准。实验动物的使用及福利遵照国际实验动物评估和认可委员会(AAALAC)的规定执行。每天监测动物的健康状况及死亡情况, 例行检查包括观察肿瘤生长和药物治疗对动物日常行为表现的影响如行为活动, 摄食摄水量(仅目测), 体重变化(每周测量两次体重), 外观体征或其它不正常情况。基于各组动物数量记录了组内动物死亡数和副作用。

4) 受试物的配制

- a) 溶媒组: 5%DMSO+95%(20%HP- β -CD)。
- b) 待测化合物组: 称量定量的受试化合物于配药瓶内, 加入相应体积的DMSO后涡旋, 得到澄清溶液, 在加入相应体积的20%HP- β -CD后涡旋, 得到均一混悬液。化合物三天配制一次。

5) 肿瘤测量和实验指标:

- a) 每周两次用游标卡尺测量肿瘤直径。肿瘤体积的计算公式为: $TV = 1/2 \times a \times b^2$, a和b分别表示肿瘤的长径和短径;
- b) 化合物的抑瘤疗效用TGI(%)评价。TGI(%), 反映肿瘤生长抑制率。TGI(%)的计算: $TGI(\%) = \{[1 - (\text{某处理组给药结束时平均瘤体积} - \text{该处理组开始给药时平均瘤体积})] / (\text{溶剂对照组治疗结束时平均瘤体积} - \text{溶剂对照组开始治疗时平均瘤体积})\} \times 100\%$ 。

5. 实验结果:

- 1) 如表6和图1所示, 在人非小细胞肺癌H358细胞皮下异种移植肿瘤裸小鼠模型上, 口服给药至第28天, **WX006** 30 mg/kg具有明显的抑制肿瘤生长作用, TGI为94%。
- 2) 实验动物的体重作为间接测定药物毒性的参考指标。如图2所示, 给药至第28天时, 溶剂对照组和**WX006**组所有动物的体重均未有明显下降, 无发病或死亡现象。

表 6: 小鼠 H358 模型体内药效实验结果

药物	TGI
WX006 (30 mg/kg, PO, QD)	94%

6. 实验结论: **WX006** 在给药剂量的下, 能显著抑制肿瘤生长; 给药过程中动物的体重未见明显下降, 耐受性好。