

噻唑并内酰胺并螺杂环类化合物及其应用

本申请主张如下优先权：

CN202110722003.6，申请日：2021 年 06 月 28 日；

CN202111673614.2，申请日：2021 年 12 月 31 日；

CN202210693548.3，申请日：2022 年 06 月 17 日。

技术领域

本发明涉及一类噻唑并内酰胺并螺杂环类化合物，及其在制备治疗相关疾病的药物中的应用。具体涉及式 (I) 所示化合物及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传导，是控制细胞生长、分化和存活最重要的信号传导途径之一。

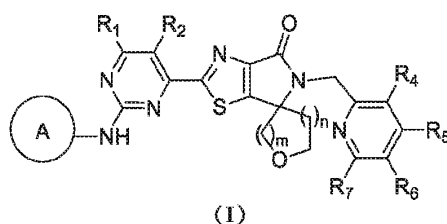
研究表明，突变或扩增引起的 Ras/Raf/MEK/ERK 通路异常活化是多种癌症发生的决定因素。在人类肿瘤中，RAS 突变发生率约为 22%，BRAF 突变发生率约为 7%，MEK 突变发生率约为 1%，因此，该通路上的关键节点蛋白已成为癌症治疗的重要靶点(*Cancer Discov.* **2019**, *9*, 329-341)。目前，已有多数 BRAF 抑制剂和 MEK1/2 抑制剂，以及它们的联用方案，被美国 FDA 批准用于黑色素瘤、BRAFV600E 突变型非小细胞肺癌等癌症的治疗。然而，使用这些上游节点的 BRAF 和 MEK 抑制剂后，由于突变或通路重新激活，会快速导致耐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



其中，

R_1 和 R_2 分别独立地选自 H 和 C_{1-3} 烷基，所述 C_{1-3} 烷基任选被 1、2 或 3 个 R_a 取代；

R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 分别独立地选自 H、F、Cl、Br、I 和 C_{1-3} 烷基，所述 C_{1-3} 烷基任选被 1、2 或 3 个 R_c 取代；

n 为 0 或 1；

m 为 1 或 2；

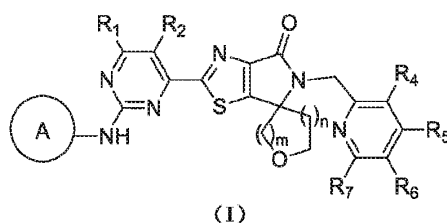
环 A 选自吡啶基和四氢吡喃基，所述吡啶基和四氢吡喃基任选被 1、2 或 3 个 R_d 取代；

R_a 和 R_c 分别独立地选自 D、F、Cl、Br 和 I；

R_d 选自 F、Cl、Br、I、 C_{1-3} 烷基和 C_{1-3} 烷氧基，所述 C_{1-3} 烷基和 C_{1-3} 烷氧基任选被 1、2 或 3 个 R 取代；

R 选自 F、Cl、Br 和 I。

本发明提供了式 (I) 所示化合物或其药学上可接受的盐，



其中，

R_1 和 R_2 分别独立地选自 H 和 C_{1-3} 烷基，所述 C_{1-3} 烷基任选被 1、2 或 3 个 R_a 取代；

R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 分别独立地选自 H、F、Cl、Br、I 和 C_{1-3} 烷基，所述 C_{1-3} 烷基任选被 1、2 或 3 个 R_c 取代；

n 为 0 或 1；

m 为 1 或 2；

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

R_a 和 R_c 分别独立地选自 D、F、Cl、Br 和 I；

R_d 选自 F、Cl、Br、I、 C_{1-3} 烷基和 C_{1-3} 烷氧基，所述 C_{1-3} 烷基和 C_{1-3} 烷氧基任选被 1、2 或 3 个 R 取代；

R 选自 F、Cl 和 Br。

本发明的一些方案中, 上述 R_1 和 R_2 分别独立地选自 H、 CH_3 和 CH_2CH_3 , 所述 CH_3 和 CH_2CH_3 任选被 1、2 或 3 个 R_3 取代, 其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中，上述 R₁ 和 R₂ 分别独立地选自 H、CH₃、CHF₂、CD₃ 和 CH₂CH₃，其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中, 上述 R₄、R₅、R₆ 和 R₇ 分别独立地选自 H、F、Cl、Br、I 和 CH₃, 所述 CH₃ 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 R₄、R₅、R₆ 和 R₇ 分别独立地选自 H、F、Cl、Br、I 和 CH₃，其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中, 上述 R_d 选自 F、Cl、Br、I、 CH_3 和 OCH_3 , 所述 CH_3 和 OCH_3 任选被 1、2 或 3 个 R 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_d 选自 CH_3 和 OCH_3 ，其他变量如本发明所定义。

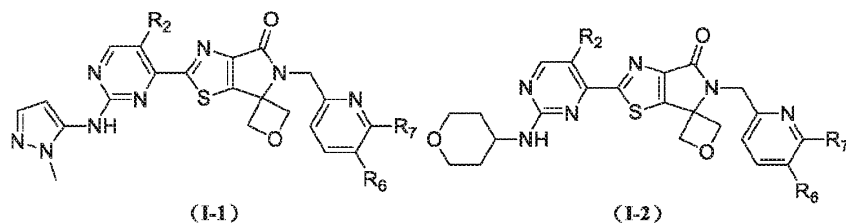
本发明的一些方案中，上述环 A 选自 、 和 ，所述 、 和  任选被 1、2 或 3 个 R_d 取代，其他变量如本发明所定义。

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 ，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。

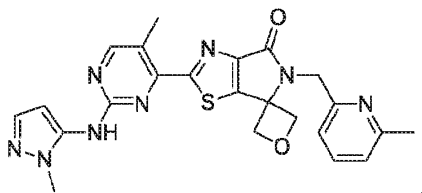
本发明的一些方案中，上述化合物或其药学上可接受的盐，其选自：



其中,

R_2 、 R_6 和 R_7 如本发明所定义。

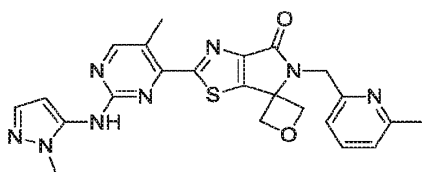
本发明还提供了下式所示化合物或其药学上可接受的盐,



本发明还提供了述化合物或其药学上可接受的盐在制备治疗实体瘤的药物中的应用。

本发明提供了 WX001 的晶型 A，其特征在于其 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰：

10.2080±0.2000°，18.8429±0.2000°，20.6217±0.2000°；



WX001

本发明的一些实施方案中，上述晶型 A，其 X 射线粉末衍射图谱中，用 2θ 角表示，至少包含选自下述中的 4 或 5 个衍射峰：10.2080±0.2000°，18.8429±0.2000°，20.6217±0.2000°，25.0767±0.2000°，25.4797±0.2000°。

在本发明的一些方案中，上述晶型 A 的 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰：10.2080±0.2000°，18.8429±0.2000°，20.6217±0.2000°，25.0767±0.2000°，25.4797±0.2000°。

本发明的一些实施方案中，上述晶型 A，其 X 射线粉末衍射图谱中，用 2θ 角表示，至少包含选自下述中的 6、7 或 8 个衍射峰：10.2080±0.2000°，15.2687±0.2000°，17.6747±0.2000°，18.8429±0.2000°，20.6217±0.2000°，21.0531±0.2000°，25.0767±0.2000°，25.4797±0.2000°。

在本发明的一些方案中，上述晶型 A 的 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰：10.2080±0.2000°，15.2687±0.2000°，17.6747±0.2000°，18.8429±0.2000°，20.6217±0.2000°，21.0531±0.2000°，25.0767±0.2000°，25.4797±0.2000°。

本发明的一些实施方案中，上述晶型 A，其 X 射线粉末衍射图谱中，用 2θ 角表示，至少包含选自下述中的 9、10、11 或 12 个衍射峰：10.2080±0.2000°，14.4684±0.2000°，15.2687±0.2000°，17.6747±0.2000°，18.8429±0.2000°，20.6217±0.2000°，21.0531±0.2000°，21.5713±0.2000°，22.0420±0.2000°，22.4540±0.2000°，25.0767±0.2000°，25.4797±0.2000°。

在本发明的一些方案中，上述晶型 A 的 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰：10.2080±0.2000°，14.4684±0.2000°，15.2687±0.2000°，17.6747±0.2000°，18.8429±0.2000°，20.6217±0.2000°，21.0531±0.2000°，21.5713±0.2000°，22.0420±0.2000°，22.4540±0.2000°，25.0767±0.2000°，25.4797±0.2000°。

本发明的一些方案中，上述晶型 A 的 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰：
 10.2080±0.2000°，18.8429±0.2000°，和/或 20.6217±0.2000°，和/或 9.4003±0.2000°，和/或 10.4856±0.2000°，
 和/或 14.4684±0.2000°，和/或 15.0133±0.2000°，和/或 15.2687±0.2000°，和/或 15.6003±0.2000°，和/或
 15.9518±0.2000°，和/或 16.6214±0.2000°，和/或 17.6747±0.2000°，和/或 17.9514±0.2000°，和/或
 18.4703±0.2000°，和/或 19.1531±0.2000°，和/或 19.6571±0.2000°，和/或 21.0531±0.2000°，和/或
 21.2894±0.2000°，和/或 21.5713±0.2000°，和/或 22.0420±0.2000°，和/或 22.4540±0.2000°，和/或
 23.1098±0.2000°，和/或 24.5027±0.2000°，和/或 25.0767±0.2000°，和/或 25.4797±0.2000°，和/或
 25.8919±0.2000°，和/或 26.3255±0.2000°，和/或 26.9544±0.2000°，和/或 28.3997±0.2000°，和/或
 29.0345±0.2000°，和/或 29.3507±0.2000°，和/或 33.5390±0.2000°，和/或 34.2457±0.2000°，和/或
 37.9776±0.2000°。

在本发明的一些方案中，上述晶型 A 的 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰：10.2080°，
 10.4856°，14.4684°，15.0133°，15.2687°，15.9518°，16.6214°，17.6747°，17.9514°，18.4703°，18.8429°，
 19.1531°，20.6217°，21.0531°，21.2894°，21.5713°，22.0420°，22.4540°，25.0767°，25.4797°，26.3255°，
 26.9544°。

在本发明的一些方案中，上述晶型 A，其 XRPD 图谱基本上如图 1 所示。

在本发明的一些方案中，上述晶型 A 的 XRPD 图谱解析数据如表 1 所示：

表 1 WX001 晶型 A 的 XRPD 图谱解析数据

编号	2θ 角(°)	面间距(Å)	相对强度(%)	编号	2θ 角(°)	面间距(Å)	相对强度(%)
1	9.4003	9.41	4.31	18	21.2894	4.17	12.24
2	10.2080	8.67	100.00	19	21.5713	4.12	16.68
3	10.4856	8.44	18.12	20	22.0420	4.03	18.34
4	14.4684	6.12	12.63	21	22.4540	3.96	15.00
5	15.0133	5.90	18.36	22	23.1098	3.85	2.96
6	15.2687	5.80	19.23	23	24.5027	3.63	4.08
7	15.6003	5.68	7.48	24	25.0767	3.55	37.76
8	15.9518	5.56	11.70	25	25.4797	3.50	23.82
9	16.6214	5.33	11.12	26	25.8919	3.44	9.21
10	17.6747	5.02	19.86	27	26.3255	3.39	12.81
11	17.9514	4.94	10.14	28	26.9544	3.31	7.34
12	18.4703	4.80	10.70	29	28.3997	3.14	5.21
13	18.8429	4.71	56.52	30	29.0345	3.08	7.36
14	19.1531	4.63	10.90	31	29.3507	3.04	4.04
15	19.6571	4.52	8.63	32	33.5390	2.67	3.43

16	20.6217	4.31	41.16	33	34.2457	2.62	7.39
17	21.0531	4.22	18.31	34	37.9776	2.37	2.33

在本发明的一些方案中，上述晶型 A 的差示扫描量热曲线在 241.0±3.0℃处有一个吸热峰的起始点。

在本发明的一些方案中，上述晶型 A 的 DSC 图谱如图 2 所示。

在本发明的一些方案中，上述晶型 A 的热重分析曲线在 150.0±3.0℃时失重达 0.83%。

在本发明的一些方案中，上述晶型 A 的 TGA 图谱如图 3 所示。

本发明还提供了上述晶型 A 在制备治疗实体瘤的药物中的应用。

技术效果

本发明化合物表现出较优的对 ERK1 和 ERK2 酶抑制活性；本发明化合物表现出较优的对 HT29 细胞增殖抑制活性；本发明化合物在不同 pH 条件下具有较好的溶解度；本发明化合物具有优异的药代动力学性质和抑瘤效果。

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。当本文中出现商品名时，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。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。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“互变异构体”或“互变异构体形式”是指在室温下，不同官能团异构体处于动态平衡，并能很快的相互转化。若互变异构体是可能的（如在溶液中），则可以达到互变异构体的化学平衡。例如，质子互变异构体 (proton tautomer) (也称质子转移互变异构体 (prototropic tautomer)) 包括通过质子迁移来进行的互相转化，如酮-烯醇异构化和亚胺-烯胺异构化。价键异构体 (valence tautomer) 包括一些成键电子的重组来进行的相互转化。其中酮-烯醇互变异构化的具体实例是戊烷-2,4-二酮与 4-羟基戊-3-烯-2-酮两个互变异构体之间的互变。

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，取代基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。

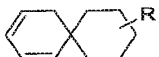
当任何变量（例如 R）在化合物的组成或结构中出现一次以上时，其在每一种情况下的定义都是独立的。因此，例如，如果一个基团被 0-2 个 R 所取代，则所述基团可以任选地至多被两个 R 所取代，并且每种情况下的 R 都有独立的选项。此外，取代基和/或其变体的组合只有在这样的组合会产生稳定的化合物的情况下才是被允许的。

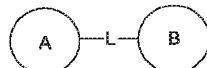
当一个连接基团的数量为 0 时，比如 $-(\text{CRR})_0-$ ，表示该连接基团为单键。

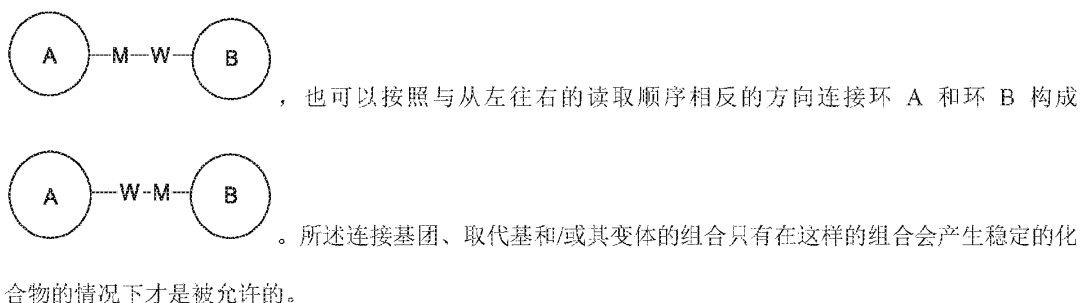
当一个取代基数量为 0 时，表示该取代基是不存在的，比如 $-\text{A}-(\text{R})_0$ 表示该结构实际上是 $-\text{A}$ 。

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

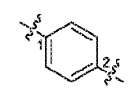
当其中一个变量选自单键时，表示其连接的两个基团直接相连，比如 $\text{A}-\text{L}-\text{Z}$ 中 L 代表单键时表示该结构实际上是 $\text{A}-\text{Z}$ 。

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。

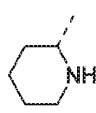
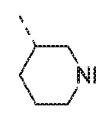
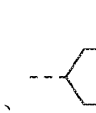
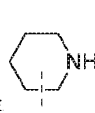
当所列举的连接基团没有指明其连接方向，其连接方向是任意的，例如， 中连接基团 L 为 $-\text{M}-\text{W}-$ ，此时 $-\text{M}-\text{W}-$ 既可以按与从左往右的读取顺序相同的方向连接环 A 和环 B 构成



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,术语“C₁₋₃ 烷氧基”表示通过一个氧原子连接到分子的其余部分的那些包含 1 至 3 个碳原子的烷基基团。所述 C₁₋₃ 烷氧基包括 C₁₋₂、C₂₋₃、C₃ 和 C₂ 烷氧基等。C₁₋₃ 烷氧基的实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、丙氧基 (包括正丙氧基和异丙氧基)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。

在整个本说明书中提到的“一实施方案”或“实施方案”或“在另一实施方案中”或“在某些实施方案中”意指在至少一实施方案中包括与该实施方案所述的相关的具体参考要素、结构或特征。因此，在整个说明书中不同位置出现的短语“在一实施方案中”或“在实施方案中”或“在另一实施方案中”或“在某些实施方案中”不必全部指同一实施方案。此外，具体要素、结构或特征可以任何适当的方式在一个或多个实施方案中结合。

本发明中 DSC 图谱的 Exo Up 表示向上放热。

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。

下面会通过实施例具体描述本发明，这些实施例并不意味着对本发明的任何限制。

本发明所使用的所有溶剂是市售的，无需进一步纯化即可使用。

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；DCM 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；EtOH 代表乙醇；MeOH 代表甲醇；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；THF 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。

本发明粉末 X-射线衍射 (X-ray powder diffractometer, XRPD) 方法

仪器型号：PANalytical (帕纳科)公司的 X'Pert³ 型 X-射线衍射仪

测试方法：大约 10 mg 样品用于 XRPD 检测。

表 1 XRPD 测试参数

参数	设定值
型号	X'Pert ³
X 射线	Cu, $k\alpha$, $K\alpha_1$ (Å): 1.540598; $K\alpha_2$ (Å): 1.544426; $K\alpha_2/K\alpha_1$: 0.50
X 射线光管设定	45 kV, 40 mA
发散狭缝	1/8°
扫描模式	连续

参数	设定值
扫描范围($^{\circ}2\theta$)	3~40
每步扫描时间(s)	46.7
扫描步长($^{\circ}2\theta$)	0.0263
测试时间	约 5 分钟

本发明差热分析 (Differential Scanning Calorimeter, DSC) 方法

仪器型号: TA 2500 差示扫描量热仪

表3 DSC 仪器参数和测试方法

参数	设定值
方法	线性升温
样品盘	铝盘, 压盖/不压盖
温度范围	25 $^{\circ}\text{C}$ -设置终点温度
扫描速率($^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$)	10
保护气体	氮气

本发明热重分析 (Thermal Gravimetric Analyzer, TGA) 方法

仪器型号: TA 5500 热重分析仪

表4 TGA 仪器参数和测试方法

参数	设定值
方法	线性升温
样品盘	铝盘, 敞开
温度范围	室温-设置终点温度
扫描速率($^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$)	10
保护气体	氮气

本发明动态蒸汽吸附分析 (Dynamic Vapor Sorption, DVS) 方法

动态水分吸附(DVS)曲线在SMS(Surface Measurement Systems)公司的DVS Intrinsic plus上采集。在25 $^{\circ}\text{C}$ 时的相对湿度用LiCl, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 和KCl的潮解点校正。

表 5 DVS 测试参数

参数	设定值
温度	25 $^{\circ}\text{C}$

参数	设定值
样品量	10-20 mg
保护气体及流量	N ₂ , 200 mL/min
dm/dt	0.002 %/min
最小 dm/dt 平衡时间	10 分钟
最大平衡时间	180 分钟
RH 测试范围	0%RH-95%RH
RH 梯度	10% (0%RH-90%RH, 90%RH-0%RH) 5% (90%RH-95%RH, 95%RH-90%RH)

表 6 引湿性评价分类

吸湿性分类	ΔW%
潮解	吸收足量水分形成液体
极具吸湿性	ΔW%≥15%
有吸湿性	15%>ΔW%≥2%
略有吸湿性	2%>ΔW%≥0.2%
无或几乎无吸湿性	ΔW% <0.2%

注：ΔW%表示受试品在 25 ±1℃和 80 ±2%RH 下的吸湿增重。

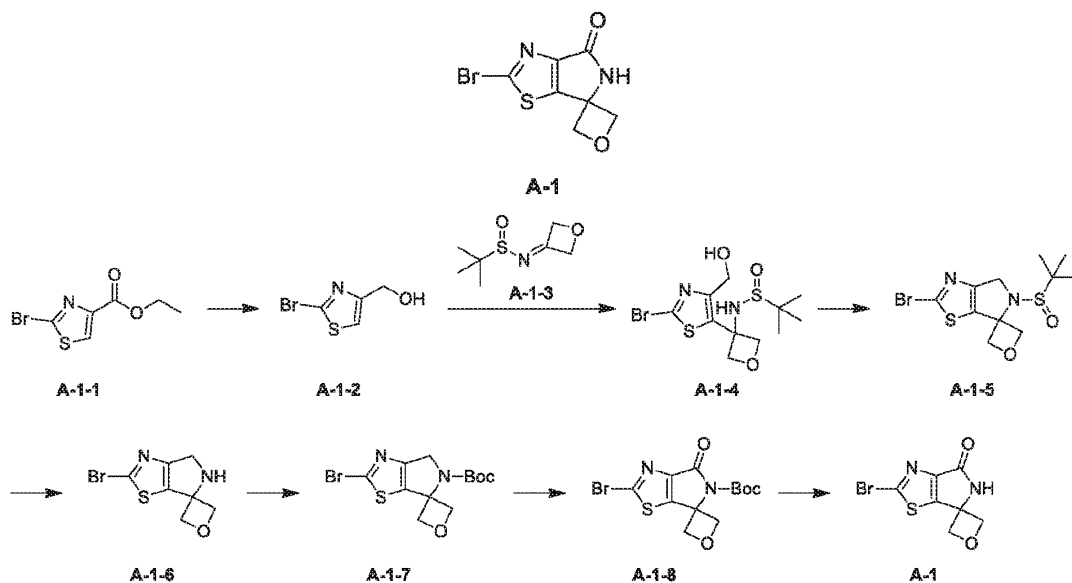
说明书附图

- 图 1: WX001 晶型 A 的 Cu-Kα 辐射的 XRPD 谱图;
- 图 2: WX001 晶型 A 的 DSC 谱图;
- 图 3: WX001 晶型 A 的 TGA 谱图;
- 图 4: WX001 晶型 A 的 DVS 谱图;
- 图 5: 人黑色素瘤 A375 模型动物在分别给予溶剂和 WX001 后的肿瘤生长曲线;
- 图 6: 人黑色素瘤 A375 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将是显而易见的。

参考例 1



步骤 1: 化合物 **A-1-2** 的合成。

向反应瓶中加入 **A-1-1** (150 g, 635.36 mmol, 1 *eq*)、氯化钙(70.51 g, 635.36 mmol, 1 *eq*)、四氢呋喃 (500 mL)和乙醇 (1000 mL)。氮气保护下, 加入硼氢化钠(48.07 g, 1.27 mol, 2 *eq*), 20°C下混合液反应 15 小时。反应完毕后, 反应液减压浓缩, 浓缩物用 15%柠檬酸水溶液(4000 mL)稀释, 乙酸乙酯(4000 mL x 3)萃取。合并有机相, 用饱和食盐水(2000 mL)洗涤、无水硫酸钠干燥。过滤, 滤液减压浓缩干得粗品。粗品用柱层析分离纯化得到 **A-1-2**。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 7.47 (s, 1H), 5.58 (br s, 1H), 4.52 (s, 2H)。

步骤 2: 化合物 **A-1-4** 的合成。

向反应瓶中加入 **A-1-2** (102 g, 525.64 mmol, 1 *eq*) 和 2-甲基四氢呋喃(1000 mL)。抽换氮气后降温至-70°C, 缓慢滴入二异丙基胺基锂(2 M, 525.64 mL, 2.0 *eq*)。在-70 °C下搅拌 30 分钟, 随后缓慢滴入 **A-1-3** (138.18 g, 788.46 mmol, 1.5 *eq*)的 2-甲基四氢呋喃(400 mL)溶液, 在-70 °C 下继续反应 1 小时。反应完毕后, 反应液用饱和氯化铵水溶液(2000 mL)淬灭, 乙酸乙酯(2000 mL x 4)萃取, 分液合并得有机相。有机相用饱和食盐水(1000 mL)洗涤、无水硫酸钠干燥。过滤, 滤液减压浓缩干得粗品。粗品先用柱分离纯化, 再经甲基叔丁基醚打浆纯化得到 **A-1-4**。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 6.41 (s, 1H), 5.43 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 5.00 - 4.84 (m, 4H), 4.38 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 1.12 (s, 9H)。

步骤 3: 化合物 **A-1-5** 的合成。

向反应瓶中加入 **A-1-4** (50 g, 135.39 mmol, 1 *eq*)、偶氮二甲酰二哌啶(40.99 g, 162.47 mmol, 1.2 *eq*)和四氢呋喃(500 mL)。抽换氮气后降温至 0°C, 缓慢滴入三丁基膦(32.87 g, 162.47 mmol, 40.09 mL, 1.2 *eq*)的四氢呋喃(100 mL)溶液, 0°C下混合液反应 1 小时。反应完毕后, 反应液中依次加入水(500 mL)和饱和食盐水 (500 mL), 然后乙酸乙酯(500 mL x 2)萃取, 分液合并得有机相。有机相用饱和食盐水(300 mL)洗涤、无水硫酸钠干燥。过滤, 滤液减压浓缩干得粗品。向粗品中加入 500 mL 甲基叔丁基醚打浆, 过滤, 收集滤液,

滤液浓缩得到粗品。粗品再加入 50 mL 正己烷打浆，过滤，收集滤饼干燥得到 **A-1-5**。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 5.29 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.88 - 4.75 (m, 3H), 4.60 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H), 4.22 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H), 1.26 (s, 9H)。

步骤 4: 化合物 **A-1-6** 的合成。

向反应瓶中加入 **A-1-5** (29 g, 82.55 mmol, 1 *eq*)、四氢呋喃 (250 mL) 和水 (50 mL)。抽换氮气后加入碘 (2.10 g, 8.26 mmol, 1.66 mL, 0.1 *eq*)，在 50 °C 下混合液反应 18 小时。然后再补加碘 (2.10 g, 8.26 mmol, 1.66 mL, 0.1 *eq*)，50 °C 下继续反应 6 小时。反应完毕后，得到 **A-1-6** 的粗品溶液直接用于下一步。

步骤 5: 化合物 **A-1-7** 的合成。

向装有 **A-1-6** 的粗品溶液中，加入碳酸钠 (17.50 g, 165.11 mmol, 2 *eq*)，抽换氮气后加入碳酸二叔丁酯 (27.03 g, 123.83 mmol, 28.45 mL, 1.5 *eq*)。在 20 °C 下混合液反应 12 小时。反应完毕，反应液倒入水 (200 mL) 中，用乙酸乙酯 (300 mL x 3) 萃取，分液合并得有机相。有机相用饱和食盐水 (300 mL x 3) 洗涤、无水硫酸钠干燥。过滤，滤液减压浓缩得粗品。粗品通过柱层析分离纯化得到 **A-1-7**。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 5.46 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H), 5.32 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H), 4.64 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H), 4.55 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 4.49 (d, *J* = 9.4 Hz, 2H), 1.53 (s, 9H)。

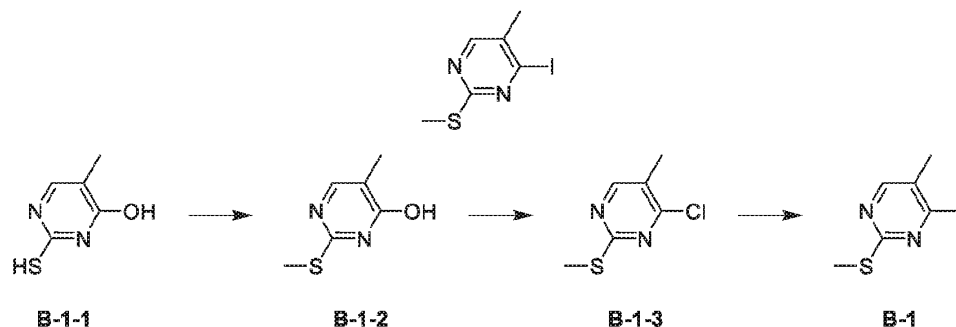
步骤 6: 化合物 **A-1-8** 的合成。

向反应瓶中加入 **A-1-7** (26.5 g, 76.32 mmol, 1 *eq*)、冰乙酸 (1.37 g, 22.90 mmol, 1.31 mL, 0.3 *eq*) 和乙腈 (260 mL)，抽换氮气后加热至 50 °C，滴入亚氯酸钠 (32.48 g, 305.28 mmol, 85% 纯度, 4 *eq*) 的水 (70 mL) 溶液，滴加完毕后，在 50 °C 下继续反应 12 小时。然后再补加亚氯酸钠 (8.97 g, 99.21 mmol, 1.3 *eq*)、冰乙酸 (458.31 mg, 7.63 mmol, 436.49 μ L, 0.1 *eq*)，在 50 °C 下继续反应 6 小时。反应完毕后，反应液用饱和亚硫酸钠水溶液 (150 mL) 淬灭，再加入水 (90 mL)，静置分出有机相，水相用乙酸乙酯 (90 mL) 萃取。合并有机相用饱和食盐水 (90 mL) 洗涤、无水硫酸钠干燥。过滤，滤液浓缩得粗品。粗品用乙酸乙酯 : 正己烷 (1:5, 120 mL) 搅拌均匀浆，过滤，收集滤饼干燥得到 **A-1-8**。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 5.61 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 4.76 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.66 (s, 9H)。

步骤 7: 化合物 **A-1** 的合成。

在干燥的反应瓶中加入 **A-1-8** (10 g, 27.68 mmol, 1 *eq*) 和二氯甲烷 (100 mL)，0 °C 下加入三氟乙酸 (41.04 g, 359.90 mmol, 26.65 mL, 13 *eq*)，随后在 0 °C 下反应 0.5 小时。反应完毕，将反应液缓慢倒入饱和碳酸氢钠水溶液 (1000 mL) 中，调节 pH 至 7~8。用二氯甲烷 (1000 mL x 3) 萃取，分液合并得有机相。有机相用无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩得到 **A-1**。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 9.59 (s, 1H), 4.99-4.78 (m, 4H)。

参考例 2



步骤 1: 化合物 **B-1-2** 的合成。

向反应瓶中加入氢氧化钠(590.8 g, 14.8 mol, 1.05 eq)和冰水(20 L)、**B-1-1** (2000.00 g, 14.07mol, 1 eq), 然后加入碘甲烷(2495.80 g, 17.59mol, 1.25 eq), 在 25°C下反应 2 小时。反应完毕后, 将 6N 的冰盐酸水溶液缓慢加入反应瓶中, 调节 pH 至 6~7, 搅拌 0.5 小时。过滤, 收集滤饼。向滤饼中加入乙腈(500 mL), 搅拌 0.5 小时, 过滤, 收集滤饼, 烘干得到 **B-1-2**。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 12.69 (br s, 1H), 7.74 (br s, 1H), 2.45 (s, 3H), 1.86 (s, 3H)。

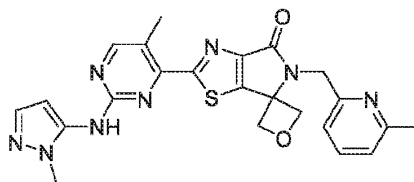
步骤 2: 化合物 **B-1-3** 的合成。

25°C下向反应瓶中加入乙腈(15 L)、**B-1-2** (1500.00 g, 9.60mol, 1 eq), 然后再加入三氯氧磷(1840.00 g, 12.0mol, 1.25 eq), 缓慢升温至 62°C, 在 62°C下反应 12 小时。将反应液倒入水(10.5 L)中, 加入固体碳酸氢钠调节 pH 至 6-7。用乙酸乙酯 (10.5 L)萃取, 分液得有机相。有机相用饱和食盐水(7.5 L)洗涤、无水硫酸钠干燥。过滤, 滤液减压浓缩得到 **B-1-3**。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 8.54 (s, 1H), 2.50 (s, 3H), 2.22 (s, 3H)。

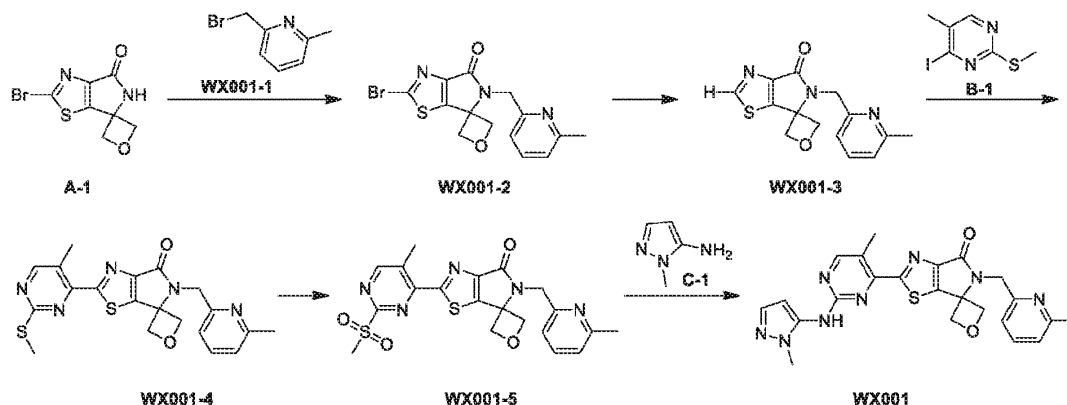
步骤 3: 化合物 **B-1** 的合成。

向反应瓶中加入 **B-1-3** (100 g, 572.57 mmol, 1 eq)、水(24.76 g, 1.37 mol, 24.76 mL, 2.4 eq)和乙腈(1000 mL)。抽换氮气后依次加入碘化钠(571.59 g, 3.81 mol, 6.66 eq)、三甲基氯硅烷(186.61 g, 1.72 mol, 218.00 mL, 3 eq), 20°C下混合液反应 14 小时。反应完毕后, 反应液中依次加入二氯甲烷(800 mL)和用水(1200 mL)。然后加碳酸氢钠固体调 pH 至 6-7, 分液, 水相用二氯甲烷(500 mL)萃取一次, 合并有机相, 有机相依次用饱和亚硫酸钠水溶液(500 mL)和饱和食盐水(500 mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥。过滤, 滤液减压浓缩得粗品。粗品中加入正庚烷(0.5 L), 搅拌 1 小时, 过滤, 收集滤饼得到 **B-1**。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 8.34 (s, 1H), 2.48 (s, 3H), 2.21 (s, 3H)。

实施例 1



合成路线:



步骤 1: WX001-2 的合成

向反应瓶中加入 **A-1** (500 mg, 1.92 mmol, 1 eq)、**WX001-1** (427.54 mg, 2.30 mmol, 1.2 eq) 和 *N,N*-二甲基甲酰胺 (3 mL)。抽换氮气后加入碳酸铯 (935.92 mg, 2.87 mmol, 1.5 eq), 25°C 反应 16 小时。反应完毕后, 将反应液倒入水 (20 mL) 中, 用乙酸乙酯 (30 mL x 3) 萃取, 分液合并得有机相。有机相用饱和食盐水 (30 mL x 3) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得粗品。粗品通过薄层层析硅胶板纯化得到 **WX001-2**。LCMS (*m/z*): 366, 368 [*M*+H]⁺。

步骤 2: WX001-3 的合成

在预先干燥的反应瓶中置换氩气加入湿钯碳 (0.1 g, 819.15 μmol, 10% 纯度, 1 eq)、乙醇 (20 mL), 然后加入 **WX001-2** (300 mg, 819.15 μmol, 1 eq), 置换氩气三次, 在 50°C, 50 Psi 下搅拌反应 24 小时。反应完毕后, 将反应液过滤, 滤液减压浓缩得粗品。粗品通过薄层层析硅胶板纯化得到 **WX001-3**。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 8.96 (s, 1H), 7.58 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.19 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.09 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.26 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 5.14 (s, 2H), 4.80 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.55 (s, 3H)。

步骤 3: WX001-4 的合成

向干燥的反应瓶中加入 **WX001-3** (60 mg, 208.81 μmol, 1 eq)、四氢呋喃 (1 mL)、氯化铍溶液 (0.7 M, 298.31 μL, 1 eq)。降温至 -78°C 加入六甲基二硅基胺基锂 (1 M, 417.63 μL, 2 eq), 20°C 反应 1 小时, 得到反应液 1。

氮气保护下, 将 **B-1** (55.57 mg, 208.81 μmol, 1 eq)、四三苯基磷铯 (7.24 mg, 6.26 μmol, 0.03 eq) 的 *N,N*-二甲基乙酰胺 (1 mL) 的混合液升温至 50°C, 随后滴加反应液 1, 滴加完毕后在 50°C 下混合液继续反应 1 小

时。反应完毕，将反应液倒入水(5 mL)中，用二氯甲烷(30 mL x 3)萃取，分液合并得有机相。有机相用饱和食盐水(30 mL x 3)洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩得粗品。粗品通过薄层层析硅胶板纯化得到 **WX001-4**。LCMS (m/z): 426.0 [M+H]⁺。

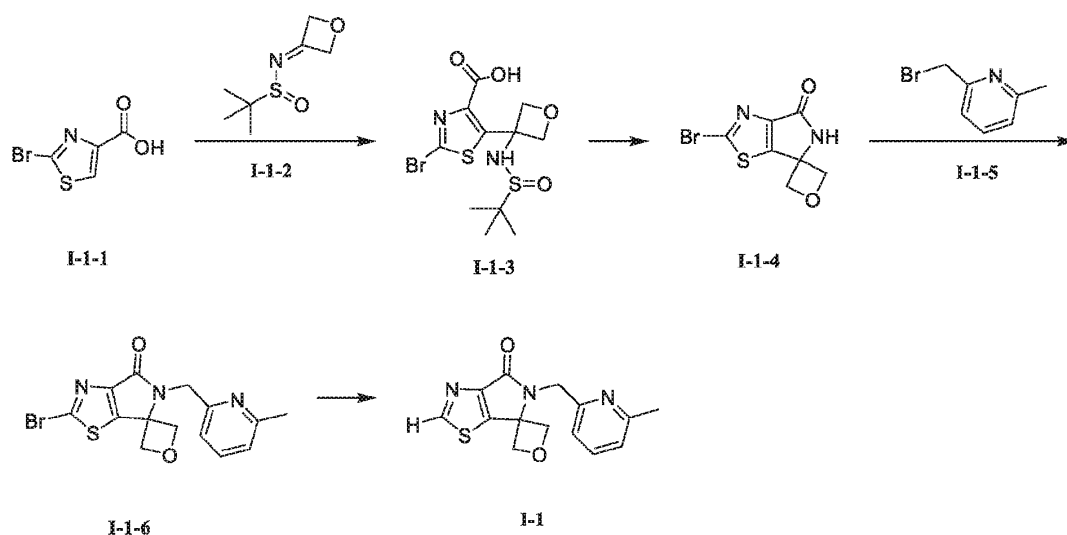
步骤 4: **WX001-5** 的合成

向反应瓶中加入 **WX001-4** (100 mg, 235.00 μmol, 1 eq)、乙腈(1 mL)和水(0.5 mL)，抽换氮气三次，然后加入单过硫酸氢钾(288.95 mg, 470.01 μmol, 2 eq)，在 20°C 混合液反应 14 小时。反应完毕，将反应液倒入饱和硫代硫酸钠水溶液中(5 mL)，用二氯甲烷(30 mL x 3)萃取，分液合并得有机相。有机相分别用饱和碳酸氢钠水溶液(20 mL)和饱和食盐水(30 mL x 3)洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩得粗品。粗品通过薄层层析硅胶板纯化得到 **WX001-5**。LCMS (m/z): 458.0 [M+H]⁺。

步骤 5: **WX001** 的合成

向干燥的反应瓶中加入 **WX001-5** (40 mg, 87.43 μmol, 1 eq)、**C-1** (16.98 mg, 174.85 μmol, 2 eq) 和四氢呋喃 (0.5 mL)。置换氮气，降温至 0°C 滴加六甲基二硅基胺基锂(1 M, 166.11 μL, 1.9 eq)，0°C 反应 1 小时。反应完毕，将反应液倒入水中(5 mL)，用二氯甲烷(30 mL x 3)萃取，分液合并得有机相。有机相用饱和食盐水(30 mL x 3)洗涤、无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩得粗品。粗品通过高效液相制备色谱(色谱柱: Waters Xbridge BEH C18 100*25mm*5μm; 流动相: [水(10mM 碳酸氢铵)-乙腈]; B(乙腈)%: 20%-50%, 10 分钟)纯化得 **WX001**。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 9.67 (br s, 1H), 8.62 (s, 1H), 7.64 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.43 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.14 (dd, *J* = 2.9, 7.7 Hz, 2H), 6.37 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 5.12 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 5.02 (s, 2H), 4.85 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.74 (s, 3H), 2.57 (s, 3H), 2.42 (s, 3H); LCMS (m/z): 475.0 [M+H]⁺。

实施例 2: **WX001** 晶型 A 的制备



步骤 1: 化合物 **I-1-3** 的合成。

将四氢呋喃 (12 L)、**I-1-1** (1200 g, 5.69 mol) 加入到反应釜中。将四甲基乙二胺 (661.59 g, 5.69 mol) 缓慢加入到反应釜中, 抽换氮气后降温至 -70 °C(内温)。缓慢滴入二异丙基胺基锂 (2 M, 6.83 L), -70 °C 搅拌 0.5 小时。缓慢滴入 **I-1-2** (1.76 kg, 9.39 mol) 的四氢呋喃 (4.8 L) 溶液 (滴加 1.5 小时), 混合液在 -70 °C 下反应 1 小时。反应完毕后, 向反应液中滴加水 (6 L) 淬灭反应, 用水 (2.4 L) 清洗反应瓶, 合并混合液, 搅拌。待温度升至 10 °C 后, 先分液, 水相用乙酸乙酯 (6 L) 萃取。剩余水相用硫酸氢钾水溶液 (15.6 L) 调节 pH 至 3~4 后, 用乙酸乙酯 (6 L) 萃取三次。合并有机相, 用饱和食盐水 (6 L) 洗涤。有机相用无水硫酸钠 1200 g(m/m=1:1) 干燥, 有机相在 45 °C 下经减压浓缩得粗品。粗品加入二氯甲烷 (2.4 L) 和异丙醚 (7.2 L) 室温搅拌半小时。过滤, 收集滤饼得 **I-1-3**。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 13.18 (br s, 1H), 6.20 (br s, 1H), 4.93 - 4.82 (m, 4H), 1.09 (s, 9H)。

步骤 2: 化合物 **I-1-4** 的合成。

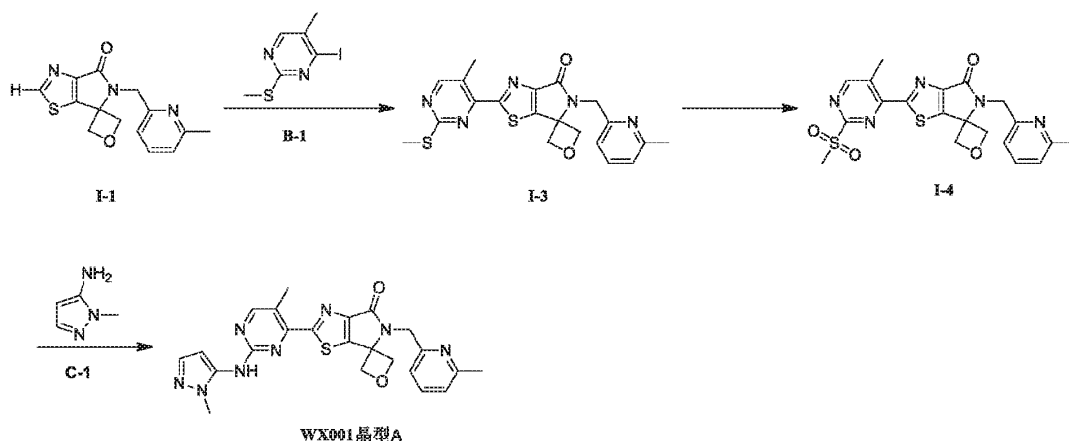
向反应釜中依次加入二氯甲烷 (1330 mL)、**I-1-3** (1330 g, 1.99 mol 粗品)、4-二甲氨基吡啶 (41.37 g, 338.61 mmol)。分批加入 N,N'-羰基二咪唑 (419.86 g, 2.59 mol), 50 °C 下混合液反应 36 小时。反应完毕后, 反应液加入 2 N 盐酸水溶液 (5.32 L) 调节 pH 至 3-4, 搅拌 0.5 小时, 随后加入水 (5.32 L) 浓缩除去有机溶剂, 残余物经过滤得滤饼。滤饼经碳酸氢钠水溶液 (5.32 L) 搅拌 0.5 小时, 过滤, 用水 (2.66 L) 洗涤滤饼, 收集滤饼。粗品中加入无水乙醇 (10.64 L), 搅拌 2 小时, 过滤, 用无水乙醇 (1.3 L) 洗涤滤饼, 收集滤饼, 干燥后得到 **I-1-4**。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 9.58 (br s, 1H), 4.94 - 4.84 (m, 4H)。

步骤 3: 化合物 **I-1-6** 的合成。

向反应瓶中加入 **I-1-4** (283 g, 1.03 mol)、碳酸铯 (505.36 g, 1.55 mol) 和 N,N'-二甲基甲酰胺 (2800 mL), 抽换氮气后加入 **I-1-5** (221.24 g, 1.19 mol), 20 °C 混合液反应 12 小时。反应完毕后, 反应液缓慢倒入冰水 (14 L) 中, 搅拌 1 小时, 过滤收集滤饼。粗产物中加入甲基叔丁基醚 (5 L) 搅拌 2 小时, 过滤, 收集滤饼, 干燥得到 **I-1-6**。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 7.63 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.13 (dd, J = 2.8, 7.7 Hz, 2H), 5.04 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 4.98 (s, 2H), 4.86 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 2.41 (s, 3H)。

步骤 4: 化合物 **I-1** 的合成。

平行三个反应, 向反应瓶中加入 **I-1-6** (183 g, 468.60 mmol) 和四氢呋喃 (2745 mL), 抽换氮气后, 20 °C 缓慢滴入二异丙基乙胺 (181.69 g, 1.41 mol) 和亚磷酸二乙酯 (194.14 g, 1.41 mol), 40 °C 下混合液反应 16 小时。反应完毕后, 反应液用水 (915 mL) 稀释, 二氯甲烷 (1830 mL*3) 萃取, 有机相用饱和食盐水 (915 mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液在 45 °C 经浓缩干燥得粗品。粗品加入甲叔醚和正己烷混合溶剂 (总 1098 mL, 二者体积比 1:5), 搅拌 1 小时, 过滤, 收集滤饼, 干燥。滤饼加入水 (5400 mL), 搅拌 1 小时, 过滤, 收集滤饼, 干燥得 **I-1**。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 9.32 (s, 1H), 7.64 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.13 (t, J = 8.4 Hz, 2H), 5.10 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 4.99 (s, 2H), 4.81 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 2.42 (s, 3H)。



步骤 5: 化合物 I-3 的合成。

向两个反应瓶中分别加入 **I-1** (120 g, 403.05 mmol)、氯化锌 (0.7 M, 575.79 mL) 的四氢呋喃溶液 (1200 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, 806.11 mL), 自然升温至 20 °C, 搅拌 1 小时, 此为反应液 1。向另一反应瓶中加入 **B-1** (107.25 g, 403.05 mmol、四三苯基膦钯 (13.97 g, 12.09 mmol) 和 N,N' -二甲基甲酰胺 (600 mL) 反应液升温至 50 °C, 为反应液 2。向反应液 2 中缓慢滴入反应液 1, 50 °C 下混合液反应 1 小时。反应完毕后, 用 0.1M 的乙二胺四乙酸二钠盐 (10800 mL) 淬灭反应, 搅拌 30 min。加入正庚烷 (4800 mL), 搅拌 0.5 小时。过滤, 收集滤饼, 干燥得到粗品。粗品用乙醇 (7200 mL) 在 20 °C 打浆 2 小时, 过滤, 收集滤饼, 滤饼晾干得到 **I-3**。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 8.54 (s, 1H), 7.54 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.19 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.07 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 5.29 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 5.11 (s, 2H), 4.84 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 2.73 (s, 3H), 2.66 (s, 3H), 2.52 (s, 3H)。

步骤 6: 化合物 I-4 的合成。

向反应瓶中加入 **I-3** (120 g, 282.00 mmol)、乙腈 (110 mL) 和水 (550 mL)。抽换氮气后加入单过硫酸氢钾 (329.40 g, 535.81 mmol), 30 °C 下混合液反应 12 小时。反应完毕后, 向反应液中加入 200 mL 冰水混合物, 随后加入饱和碳酸氢钠水溶液和饱和硫代硫酸钠水溶液各 600 mL, 随后加入 600 mL 水。过滤, 收集滤饼, 干燥, 得到粗品。粗品加入 600 mL 无水乙醇, 搅拌 1 小时, 过滤, 收集滤饼得到 **I-4**。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8.90 (s, 1H), 7.55 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.20 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.06 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 5.31 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 5.11 (s, 2H), 4.84 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 3.44 (s, 3H), 2.92 (s, 3H), 2.50 (s, 3H)。

步骤 7: WX001 晶型 A 的合成。

向反应瓶中加入 **I-4** (47 g, 102.73 mmol)、**C-1** (25.94 g, 267.09 mmol)、二氯甲烷 (470 mL) 和四氢呋喃 (470 mL)。抽换氮气后 -5°C (控制内温在 -5~3°C) 滴加六甲基二硅基胺基锂 (1 M, 246.54 mL, 2.4 eq), 0°C 下混合液反应 0.5 小时。反应完毕后, 加入去离子水 (470 mL) 淬灭。浓缩除去有机溶剂。过滤收集滤饼。滤饼用去离子水 (1000 mL) 室温搅拌 30 分钟。过滤收集滤饼。滤饼用乙腈 (1000 mL) 室温搅拌 30 min,

过滤收集滤饼得到 **WX001 晶型 A**。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8.44 (s, 1H), 7.60 - 7.50 (m, 2H), 7.18 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.06 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.88 (s, 1H), 6.42 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 5.27 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 5.12 (s, 2H), 4.85 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 3.85 (s, 3H), 2.69 (s, 3H), 2.52 (s, 3H)。WX001 晶型 A 的 XRPD 谱图如图 1 所示, DSC 谱图如图 2 所示, TGA 谱图如图 3 所示。

实施例 3: WX001 的多晶型筛选

1. 气固渗透

称取约 20 mg 每份的 WX001 晶型 A 于 3 mL 小瓶中, 另在 20 mL 小瓶中加入约 4 mL 溶剂, 将 3 mL 小瓶敞口置于 20 mL 小瓶中后, 将 20 mL 小瓶密封。样品吸附溶剂部分溶解或者室温下静置 7 天后收集固体并进行 XRPD 测试。试验结果如表 7 所示。

表 7 气固渗透试验小结

溶剂	试验结果
MeOH	晶型 A
丙酮	晶型 A
EtOAc	晶型 A
MTBE	晶型 A
ACN	晶型 A
甲苯	晶型 A
1,4-二氧六环	晶型 A
H ₂ O	晶型 A

2. 气液扩散

称取约 20 mg 每份的 WX001 晶型 A 至 3 mL 小瓶中, 加入 1.2~1.8 mL 溶剂溶解, 另取 20 mL 的小瓶向其中加入约 4 mL 的反溶剂, 将装有清液的 3 mL 小瓶敞口置于 20 mL 小瓶后, 密封 20 mL 的小瓶并于室温下静置。收集得到的固体并进行 XRPD 测试。试验结果如表 8 所示。

表 8 气液渗透试验小结

溶剂	反溶剂	试验结果
CHCl ₃	丙酮	晶型 A
DMSO	EtOAc	晶型 A*
	甲苯	晶型 A*

*表示固体在室温挥发得到。

3. 缓慢挥发

称取 15~20 mg 的 WX001 晶型 A 至 3 mL 小瓶中, 加入 1.0~3.0 mL 的溶剂溶解, 用封口膜封住小瓶,

并在上面扎 4 个针孔，放置在室温下缓慢挥发。收集所得固体并进行 XRPD 测试。试验结果如表 9 所示。

表 9 缓慢挥发试验小结

溶剂(v/v)	试验结果
MeOH/DCM (1:1)	晶型 A
THF/ H ₂ O (1:1)	晶型 A
CHCl ₃	晶型 A
1,4-二氧六环	晶型 A

4. 缓慢降温

称取 15~35 mg 每份的 WX001 晶型 A 于 3 mL 小瓶中，加入 1.0~3.0 mL 的溶剂，在 50 °C 下搅拌平衡约 3.5 小时后过滤取上清液。将所得上清液放置在生化培养箱中，以 0.1 °C/分钟从 50 °C 降温至 5 °C 后并在 5 °C 保持恒温。收集析出的固体并进行 XRPD 测试。试验结果见表 10。

表 10 缓慢降温试验小结

溶剂(v/v)	试验结果
CHCl ₃	晶型 A*
THF/ H ₂ O (1:1)	晶型 A*
ACN/ H ₂ O (1:1)	晶型 A*

*表示样品在 5 °C 和 -20 °C 下澄清，固体在室温挥发得到。

5. 温度循环搅拌

称量约 25 mg 每份的 WX001 晶型 A 至 HPLC 小瓶中，分别加入 0.5 mL 的溶剂，得到的悬浮液在温度循环下(将样品加热至 50 °C 后以 0.1 °C/分钟的速率降温至 5 °C，然后重复这一循环，最后样品保持在 5 °C)磁力搅拌(1000 rpm)，离心收集固体并进行 XRPD 测试。试验结果见表 11。

表 11 温度循环搅拌试验小结

溶剂(v/v)	试验结果
MeOH	晶型 A
MIBK	晶型 A
EtOAc	晶型 A
THF/ H ₂ O (1:1)	晶型 A
ACN/ H ₂ O (1:1)	晶型 A
DMAc/ H ₂ O (1:1)	晶型 A

6. 室温悬浮搅拌

称量约 25 mg 每份的 WX001 晶型 A 至 HPLC 小瓶中, 分别加入 0.5 mL 的溶剂, 得到的浑浊液置于室温下磁力搅拌(1000 rpm) 3 天后, 离心收集固体并进行 XRPD 测试。试验结果见表 12。

表 12 室温悬浮搅拌试验小结

溶剂(v/v)	试验结果
EtOH	晶型 A
EtOAc	晶型 A
THF	晶型 A
DCM	晶型 A
正庚烷	晶型 A
H ₂ O	晶型 A
EtOH/H ₂ O (0.97:0.03, a _w ~0.2)	晶型 A
EtOH/ H ₂ O (0.93:0.07, a _w ~0.4)	晶型 A
EtOH/ H ₂ O (0.86:0.14, a _w ~0.6)	晶型 A
EtOH/ H ₂ O (0.71:0.29, a _w ~0.8)	晶型 A
ACN	晶型 A

7. 50 °C 悬浮搅拌

称量约 25 mg 每份的 WX001 晶型 A 至 HPLC 小瓶中, 分别加入 0.5 mL 的溶剂, 得到的悬浮液在 50 °C 下磁力搅拌(1000 rpm) 3 天后, 离心收集固体并进行 XRPD 测试。试验结果见表 13。

表 13 50 °C 悬浮搅拌试验小结

溶剂(v/v)	试验结果
IPA	晶型 A
丙酮/H ₂ O (1:1)	晶型 A
IPAc	晶型 A
MTBE	晶型 A
2-MeTHF	晶型 A
1,4-二氧六环	晶型 A
CHCl ₃ /正庚烷 (1:1)	晶型 A
甲苯	晶型 A
DMSO/H ₂ O (1:1)	晶型 A
ACN	晶型 A

8. 反溶剂添加法

分别称取约 15 mg 的 WX001 晶型 A 加至 20 mL 的小瓶内，用 0.7~1.0 mL 的溶剂将固体完全溶解。向该澄清溶液中边搅拌(1000 rpm)边滴加中的反溶剂，直至有固体析出，或当反溶剂总体积加至 10 mL 后，无固体析出的样品在 5 °C 下悬浮搅拌，澄清样品转移至-20 °C 下悬浮搅拌，仍澄清的样品转至室温挥发。分离析出的固体并进行 XRPD 测试，结果如表 14 所示。

表 14 反溶剂添加试验小结

溶剂(v/v)	反溶剂	试验结果
CHCl ₃	MeOH	晶型 A*
	丙酮	晶型 A
	EtOAc	晶型 A
	MTBE	晶型 A
	2-MeTHF	晶型 A
	ACN	晶型 A
	正庚烷	晶型 A
	甲苯	晶型 A
MeOH/DCM (1:1)	MIBK	晶型 A
	IPAc	晶型 A
	MTBE	晶型 A
THF/H ₂ O (1:1)	H ₂ O	晶型 A
NMP	H ₂ O	晶型 A
DMAc	H ₂ O	晶型 A

*表示样品在室温下澄清，固体在 5 °C 搅拌得到。

实施例4：WX001晶型A的吸湿性研究

实验材料：

SMS DVS Advantage 动态蒸汽吸附仪

实验方法：

取 WX001 晶型 A 10~30 mg 置于 DVS 样品盘内进行测试。

实验结果：

WX001 晶型 A 的 DVS 谱图如图 4 所示， $\Delta W=0.1134\%$ 。

实验结论：

WX001 晶型 A 在 25°C和 80 % RH 下的吸湿增重为 0.1134%，几乎无引湿性。

实施例 5: WX001 晶型 A 的稳定性试验

平行称取 WX001 晶型 A 样品 12 份, 每份大约 5 mg, 置于 HPLC 小瓶的底部, 摊成薄薄一层。将放置在 60°C/75%湿度条件恒温恒湿箱以及 92.5%RH 干燥器中的样品用封口膜封住瓶口, 并扎些小孔, 保证样品能与环境空气充分接触。将放置在 60 °C、光照及遮光条件下的样品盖紧瓶盖(其中遮光条件下的样品用锡箔纸包裹)。试验结果见下表 15 所示:

表 15 WX001 晶型 A 的固体稳定性试验结果

试验条件	取点条件	晶型
0 天	--	晶型 A
60 °C	5 天	晶型 A
	10 天	晶型 A
92.5%RH	5 天	晶型 A
	10 天	晶型 A
可见光 [#]	照度达到 1.2E+06 Lux·hrs	晶型 A
遮光对照组	与可见光组同时取点	晶型 A
可见光+紫外 [#]	照度达到 200 W·hrs/m ²	晶型 A
遮光对照组	与可见光+紫外组同时取点	晶型 A
60 °C/75%RH	1 月	晶型 A
	2 月	晶型 A
	3 月	晶型 A

[#]: ICH 条件

结论: WX001 晶型 A 具有良好的稳定性。

实验例一、体外酶活性测试

1. 实验目的:
测量化合物抑制 ERK1 和 ERK2 激酶活性的能力。
2. 实验缓冲液:
20 mM Hepes (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 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 Na₃VO₄, 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, 配制成特定浓度的母液。利用 Integra Viaflo Assist 智能移液器将化合物连续稀释在 DMSO 溶液中。

4. 实验方法:

- 1) 在新制备的反应缓冲液中配置底物 MBP;
- 2) 将 ERK1 (或 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 ³³P-ATP (特定浓度 10 μCi/μL) 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) ERK1 (或 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 IC₅₀ 值。

5. 实验结果见表 16 和表 17:

表 16 ERK1 酶活性测试结果

化合物	ERK1
	IC ₅₀ (nM)
WX001	1.4

结论: 本发明化合物表现出较优的对 ERK1 酶抑制活性。

表 17 ERK2 酶活性测试结果

化合物	ERK2
	IC ₅₀ (nM)
WX001	0.54

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°C 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 18:

表 18 体外细胞活性测试结果

化合物	HT29
	IC ₅₀ (nM)
WX001	66

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、小鼠体内 PK 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 4 只, 2 只为静注组, 2 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 19:

表 19 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	4790	154	2935	1.23	18.9	1.1

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; V_{dss} 为分布容积; Cl 为清除率; $T_{1/2}$ 为半衰期; NA 为未测试。

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、溶解度研究

1. 实验目的:

测定化合物的溶解度, 评估化合物的溶解性。

2. 测试溶液:

1) 缓冲液 A (pH 2.0): 50 mM 磷酸盐缓冲液, pH 2.0; 缓冲液 B (pH 6.5): 50 mM 磷酸盐缓冲液, pH 6.5; 缓冲液 C 液 (pH 7.4): 50 mM 磷酸盐缓冲液, pH 7.4;

2) 标准溶液的制备:

- 将 50% 的乙腈溶液和 50% 的缓冲溶液混合, 得到稀释液;
- 10 mM (10 μ L/化合物) 化合物储备液加入稀释液 (490 μ L/化合物) 混合为 200 μ M 的检测标准溶液;
- 以 10 倍和 200 倍量的稀释液稀释 200 μ M 的紫外检测标准液, 得到 20 μ M, 1 μ M 的紫外标准溶液;
- 1 μ M、20 μ M、200 μ M 的紫外标准溶液作为溶解性实验的标准溶液。

3. 实验方法:

- DMSO 溶解化合物配制成 10 mM 的储备液。盐酸胺碘酮, 卡马西平, 氯霉素作为溶解度实验的对照;
- 被测试化合物和对照的储备液 (各 10 μ L) 放入 96 孔板中, 分别加入三种不同的溶解介质 (缓冲液 A, B, C) 490 μ L, 对应溶解度溶液的 pH 分别为 2.0, 6.5 和 7.4。实验化合物的理论最大浓度为 200 μ M, 含 DMSO 2%;
- 在室温 (25 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C) 下以每分钟 600 转的转速, 在摇床中振荡 24 小时;
- 吸取 200 μ L 的溶液于 96 孔板真空抽滤装置中抽滤后取至新 96 孔板中作为测试样品;
- 用 HPLC-UV 测试化合物浓度, HPLC 条件如表 20。

表 20 HPLC 条件

试验方法	HPLC-UV 检测
仪器	Agilent 1200
流动相	A: 水+0.37%三氟乙酸 B: 乙腈+0.19%三氟乙酸
色谱柱	Waters Xbridge RP-C18 (2.1 $\times$ 50 mm, 5 μ m)

比例	时间(min)	B%	流速(mL/min)
	0.00	5	1.0
	2.00	90	1.0
	2.50	90	1.0
	3.01	5	1.0
	4.00	5	1.0

6) 从低浓度到高浓度（1 μM, 20 μM, 200 μM）注入 3 个紫外标准液至 HPLC 中，然后注入待测化合物的测试样品；

7) 对紫外色谱峰进行积分，计算样品的溶解度。

4. 实验结果见表 21：

表 21 化合物溶解度测试结果

化合物	不同 pH 的溶解度		
	pH=2.0	pH=6.5	pH=7.4
WX001	199.5 μM	2.94 μM	2.64 μM

结论：本发明化合物在不同 pH 条件下具有较好的溶解度。

实验例五、人黑色素瘤 A375 小鼠模型体内药效研究

1. 实验目的：

使用人黑色素瘤 A375 细胞皮下异种移植肿瘤裸小鼠模型，评价 WX001 的抗肿瘤作用。

2. 实验动物：

种属：小鼠

品系：BALB/c 裸小鼠

周龄：6-8 周龄

性别：雌性

体重：18-22 克

供应商：维通利华实验动物技术有限公司

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 3 只），温度：20-26℃，湿度：40-70 %；

笼具：以聚碳酸酯制成，体积 375 mm x 215 mm x 180mm，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: 人黑色素瘤A375细胞体外单层培养, 培养条件为DMEM培养基中加10%胎牛血清, 37°C 5%CO₂孵箱培养。一周两次用胰酶-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 (5×10⁵个) A375细胞皮下接种于每只小鼠的右侧腋下, 肿瘤平均体积达到170 mm³时, 将动物随机分为4组, 开始给药。实验分组和给药方案见表22;

表 22 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)	--	21 天	口服给药(PO), 每天两次(BID)
2	6	WX001	12.5	21 天	口服给药(PO), 每天两次(BID)
3	6	WX001	25	21 天	口服给药(PO), 每天两次(BID)
4	6	WX001	50	21 天	口服给药(PO), 每天两次(BID)

- 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。

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23和图5所示, 在人黑色素瘤A375细胞皮下异种移植肿瘤裸小鼠模型上, 口服给药至第21天, WX001能够剂量依赖性地抑制肿瘤生长, 在12.5 mg/kg、25 mg/kg和50 mg/kg三个剂量下, TGI分别为

45%、58%和102%。

- 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6所示，给药至第21天时，溶剂对照组和WX001组所有动物的体重均未有明显下降，耐受性良好。

表 23 小鼠 A375 模型体内药效实验结果

药物	TGI
WX001 (12.5 mg/kg, PO, BID)	45%
WX001 (25 mg/kg, PO, BID)	58%
WX001 (50 mg/kg, PO, BID)	102%

实验结论：WX001 在 12.5 mg/kg、25 mg/kg 和 50 mg/kg 三个给药剂量下，能够剂量依赖性地抑制肿瘤生长；给药过程中动物的体重未见明显下降，耐受性好。

实验例六、SD 大鼠体内 PK 研究

1. 实验目的：

以雄性 SD 大鼠为受试动物，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：

选择健康成年雄性 SD 大鼠 6 只，3 只为静注组，3 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 0.2 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 1 mg/mL 溶液。SD 大鼠 1 mg/kg 静脉给药或 10 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 24：

表 24 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	2500	49%	1445.79	1.08	13.4	3.77

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。

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。

实验例七、食蟹猴体内 PK 研究

1. 实验目的：

以雄性食蟹猴为受试动物，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：

选择健康成年雄性食蟹猴 5 只，2 只为静注组，3 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，搅拌溶解，制备得到 0.4 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，搅拌溶解，制备得到 0.3 mg/mL 溶液。食蟹猴 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 25：

表 25 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	921	50%	1152.35	1.98	16.1	2.41

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。

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。

实验例八、比格犬体内 PK 研究

1. 实验目的：

以雄性比格犬为受试动物，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：

选择健康成年雄性比格犬 5 只，2 只为静注组，3 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，搅拌溶解，制备得到 0.4 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，搅拌溶解，制备得到 0.3 mg/mL 溶液。食蟹猴 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 26：

表 26 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	1769	60%	2307.32	1.29	10.1	3.48

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。

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。

实验例九、hERG 测试

1. 试验目的：

使用全自动膜片钳方法测试化合物对 hERG 钾通道(human Ether-a-go-go Related Gene potassium channel)电流的影响。

2. 实验方法：

2.1 细胞准备

CHO-hERG 细胞培养于 175 cm² 培养瓶中，待细胞密度生长到 60~80%，移走培养液，用 7 mL PBS (Phosphate Buffered Saline 磷酸盐缓冲液) 洗一遍，然后加入 3 mL Detachin 消化。待消化完全后加入 7 mL 培养液中和，然后离心，吸走上清液，再加入 5 mL 培养液重悬，以确保细胞密度为 2~5×10⁶/mL。

2.2 溶液配制

细胞外液配方 (mM)：140 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl₂, 1.25 MgCl₂, 10 HEPES and 10 Glucose，用 NaOH 调节 pH 至 7.4。

细胞内液配方 (mM)：140 KCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 EGTA and 10 HEPES，用 KOH 调节 pH 至 7.2。

2.3 电生理记录过程

单细胞高阻抗封接和全细胞模式形成过程全部由 Qpatch 仪器自动完成，在获得全细胞记录模式后，细胞钳制在-80 毫伏，在给予一个 5 秒的+40 毫伏去极化刺激前，先给予一个 50 毫秒的-50 毫伏前置电压，然后复极化到-50 毫伏维持 5 秒，再回到-80 毫伏。每 15 秒施加此电压刺激，记录 2 分钟后给予细胞外液记录 5 分钟，然后开始给药过程，化合物浓度从最低测试浓度开始，每个测试浓度给予 2.5 分钟，连续给完所有浓度后，给予阳性对照化合物 3 M Cisapride。每个浓度至少测试 3 个细胞 (n ≥ 3)。

2.4 化合物准备

将化合物 20.00 mM 母液用 DMSO 进行稀释，取 10 μL 化合物母液加入至 20 μL DMSO 溶液中，3 倍连续稀释至 6 个 DMSO 浓度。分别取 4 μL 6 个 DMSO 浓度的化合物，加入至 396 μL 的细胞外液中，100 倍稀释至 6 个中间浓度，再分别取 80 μL 的 6 个中间浓度化合物，加入至 320 μL 的细胞外液中，5 倍稀释至需要测试的最终浓度。最高测试浓度为 40 μM，依次分别为 40, 13.3, 4.4, 1.48, 0.494, 0.165 μM 共 6

个浓度。最终测试浓度中的 DMSO 含量不超过 0.2%，此浓度的 DMSO 对 hERG 钾通道没有影响。化合物准备由 Bravo 仪器完成整个稀释过程。

2.5 数据分析

实验数据由 GraphPad Prism 5.0 软件进行分析。

2.6 质量控制

环境：湿度 20~50%，温度 22~25℃

试剂：所用实验试剂购买于 Sigma 公司，纯度>98%

报告中的实验数据必须满足以下标准：

全细胞封接阻抗> 100 MΩ

尾电流幅度> 300 pA

药理学参数：

多浓度 Cisapride 对 hERG 通道的抑制效应设为阳性对照。

3. 实验结果见表 27：

表 27 化合物 hERG 测试结果

化合物	IC50 (μM)
WX001	> 40

结论：本发明化合物对 hERG 钾通道电流抑制作用弱，心脏毒性风险更低，安全性更高。

实验例十、血浆蛋白结合度测试 (PPB)

1. 实验目的：

研究受试化合物与人/小鼠/大鼠/犬/猴血浆蛋白的结合度。

2. 实验操作：

- 1) 基质准备：实验当天，将血浆在冷水中解冻，并以 3220 rpm 的速度离心 5 min，以去除所有血块。
测量得到的血浆的 pH 值，并根据需要使用 1%的磷酸或 1N 的氢氧化钠将其 pH 调整到 7.4±0.1。
- 2) 测试化合物的稀释步骤：测试化合物溶解在二甲亚砜 (DMSO) 中，以制备浓度分别为 10 mM 和 2 mM 的原液。用 98 μL DMSO 稀释 2 μL 原液 (2 mM)，制得 40 μM 的工作溶液。用 240 μL DMSO 稀释 10 μL 原液，制得 400 μM 对照化合物的工作溶液。将化合物的工作溶液 (5 μL) 与空白基质 (995 μL) 按 1:200 的比例混合均匀以制备负载基质。
- 3) 分析步骤：
 - a) 将等量的 30 μL 负载基质 (n=2) 转移至样品采集板，制备待测时间 0 (T0)样品用于残留测定。样品立即与相应的空白缓冲液进行匹配，最终体积为 60 μL，每孔中血浆与缓冲液的体积比为 1:1。然后，测试化合物的 T0 样品分别加入 60μL 的 4% H_3PO_4 的 H_2O 和 480 μL 含有内标物的终止液。然后将它们与其他样品一起储存在 2-8℃下等待进一步处理。

- b) 将剩余的血浆样品放在 37±1℃的二氧化碳培养箱预培养 30 min。准备无蛋白样品 (F 样品), 负载基质的样品 (230μL) 都被转移到聚碳酸酯管 (n=2) 中, 并在 37℃和 155000×g (35000 rpm) 条件下超速离心 4 h。
- c) 为了制备 T 样品 (测试样品), 额外一份含基质样品转移到单独的 96 孔板(样品培育板)上, 并在 37℃下培育 4 h。
- d) 离心结束后, 从上清液第二层 (上层以下) 取 30 μL 的无蛋白样品和 30 μL 的 T 样品转移到新的样品收集板中。每个样品与相应的空白缓冲液或基质混合, 最终体积为 60 μL, 基质:缓冲液体积比 1:1。在所有样品加入 60μL 4%的 H₃PO₄ 水溶液和 480 μL 的终止溶液 (含内标)。混合物在转速 4000 rpm 下离心 20 min, 取各样品上清液 100μL 进行 LC-MS/MS 分析。

3. 实验结果见表 28:

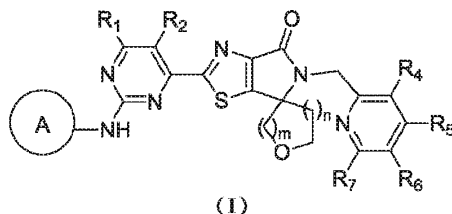
表 28 化合物血浆蛋白结合度测试结果

化合物	血浆蛋白结合率 (unbound%)				
	人	小鼠	大鼠	犬	猴
WX001	15.9%	11.7%	8.4%	14.3%	14.2%

结论: 本发明化合物具有中等血浆蛋白结合度。

权 利 要 求

1. 式 (I) 所示化合物或其药学上可接受的盐,



其中,

R₁ 和 R₂ 分别独立地选自 H 和 C₁₋₃ 烷基, 所述 C₁₋₃ 烷基任选被 1、2 或 3 个 R₃ 取代;

R₄、R₅、R₆ 和 R₇ 分别独立地选自 H、F、Cl、Br、I 和 C₁₋₃ 烷基，所述 C₁₋₃ 烷基任选被 1、2 或 3 个 R_c 取代；

n 为 0 或 1;

m 为 1 或 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 和 R_c 分别独立地选自 D、F、Cl、Br 和 I;

R_d 选自F、Cl、Br、I、 C_{1-3} 烷基和 C_{1-3} 烷氧基, 所述 C_{1-3} 烷基和 C_{1-3} 烷氧基任选被1、2或3个R取代;

R 选自 F、Cl、Br 和 I。

2. 根据权利要求 1 所述化合物或其药学上可接受的盐, 其中, R_1 和 R_2 分别独立地选自 H、 CH_3 和 CH_2CH_3 , 所述 CH_3 和 CH_2CH_3 任选被 1、2 或 3 个 R_3 取代。

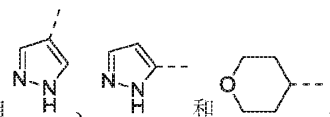
3. 根据权利要求 2 所述化合物或其药学上可接受的盐, 其中, R_1 和 R_2 分别独立地选自 H、 CH_3 、 CHF_2 、 CD_3 和 CH_2CH_3 。

4. 根据权利要求 1 所述化合物或其药学上可接受的盐, 其中, R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 分别独立地选自 H、F、Cl、Br、I 和 CH_3 , 所述 CH_3 任选被 1、2 或 3 个 R_6 取代。

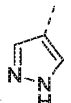
5. 根据权利要求 4 所述化合物或其药学上可接受的盐, 其中, R_4 、 R_5 、 R_6 和 R_7 分别独立地选自 H、F、Cl、Br、I 和 CH_3 。

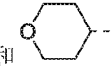
6. 根据权利要求1所述化合物或其药学上可接受的盐, 其中, R_d 选自 F、Cl、Br、I、 CH_3 和 OCH_3 , 所述 CH_3 和 OCH_3 任选被 1、2 或 3 个 R 取代。

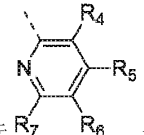
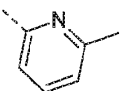
7. 根据权利要求6所述化合物或其药学上可接受的盐, 其中, R_d 选自 CH_3 和 OCH_3 。



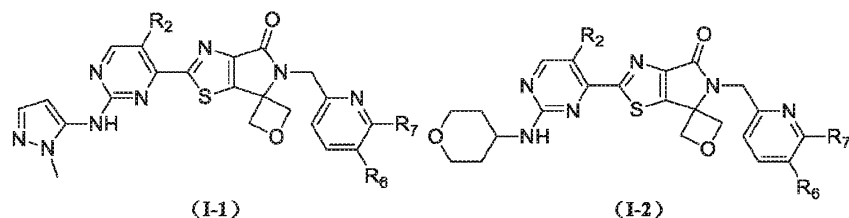
8. 根据权利要求 1 所述化合物或其药学上可接受的盐, 其中, 环 A 选自 、 和 ,

所述 、 和  任选被 1、2 或 3 个 R_d 取代。

9. 根据权利要求 8 所述化合物或其药学上可接受的盐, 其中, 环 A 选自 、 和 。

10. 根据权利要求 1 所述化合物或其药学上可接受的盐, 其中, 结构单元  选自 。

11. 根据权利要求 1~5 任意一项所述化合物或其药学上可接受的盐, 其选自

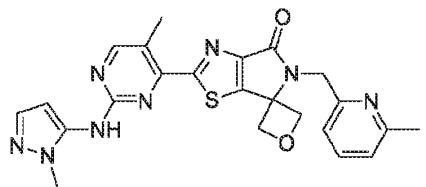


其中,

R₂ 如权利要求 1~3 任意一项所定义;

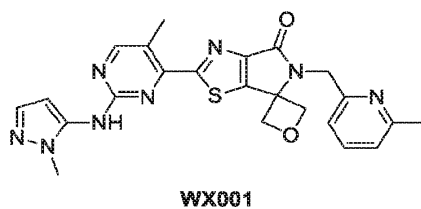
R₆ 和 R₇ 如权利要求 1、4 或 5 任意一项所定义。

12. 下式所示化合物或其药学上可接受的盐,



13. WX001 的晶型 A, 其特征在于其 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰: 10.2080±0.2000°, 18.8429±0.2000°, 20.6217±0.2000°;

18.8429±0.2000°, 20.6217±0.2000°;



14. 根据权利要求 13 所述的晶型 A, 其 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰:

10.2080±0.2000°, 18.8429±0.2000°, 20.6217±0.2000°, 25.0767±0.2000°, 25.4797±0.2000°。

15. 根据权利要求 14 所述的晶型 A，其 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰： $10.2080\pm0.2000^\circ$ ， $15.2687\pm0.2000^\circ$ ， $17.6747\pm0.2000^\circ$ ， $18.8429\pm0.2000^\circ$ ， $20.6217\pm0.2000^\circ$ ， $21.0531\pm0.2000^\circ$ ， $25.0767\pm0.2000^\circ$ ， $25.4797\pm0.2000^\circ$ 。
16. 根据权利要求 15 所述的晶型 A，其 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰： $10.2080\pm0.2000^\circ$ ， $14.4684\pm0.2000^\circ$ ， $15.2687\pm0.2000^\circ$ ， $17.6747\pm0.2000^\circ$ ， $18.8429\pm0.2000^\circ$ ， $20.6217\pm0.2000^\circ$ ， $21.0531\pm0.2000^\circ$ ， $21.5713\pm0.2000^\circ$ ， $22.0420\pm0.2000^\circ$ ， $22.4540\pm0.2000^\circ$ ， $25.0767\pm0.2000^\circ$ ， $25.4797\pm0.2000^\circ$ 。
17. 根据权利要求 16 所述的晶型 A，其 X 射线粉末衍射图谱在下列 2θ 角处具有特征衍射峰： 10.2080° ， 10.4856° ， 14.4684° ， 15.0133° ， 15.2687° ， 15.9518° ， 16.6214° ， 17.6747° ， 17.9514° ， 18.4703° ， 18.8429° ， 19.1531° ， 20.6217° ， 21.0531° ， 21.2894° ， 21.5713° ， 22.0420° ， 22.4540° ， 25.0767° ， 25.4797° ， 26.3255° ， 26.9544° 。
18. 根据权利要求 17 所述的晶型 A，其 XRPD 图谱基本上如图 1 所示。
19. 根据权利要求 13~18 任意一项所述的晶型 A，其差示扫描量热曲线在 $241.0\pm3.0^\circ\text{C}$ 处有一个吸热的起始点。
20. 根据权利要求 19 所述的晶型 A，其 DSC 图谱如图 2 所示。
21. 根据权利要求 13~18 任意一项所述的晶型 A，其热重分析曲线在 $150.0\pm3.0^\circ\text{C}$ 时失重达 0.83%。
22. 根据权利要求 21 所述的晶型 A，其 TGA 图谱如图 3 所示。
23. 根据权利要求 1~12 任意一项所述化合物或其药学上可接受的盐或根据权利要求 13~22 任意一项所述的晶型 A 在制备治疗实体瘤的药物中的应用。