

稠环化合物、包含其的药物组合物及其用途

发明领域

本发明涉及稠环化合物、包含其的药物组合物、及其用于预防或治疗疾病的用途。

发明背景

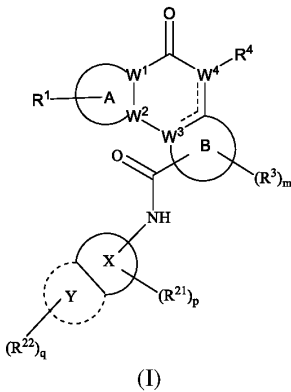
微卫星不稳定性(MSI)是一种由错配修复缺陷(dMMR)引起的基因组损伤。尽管在治疗微卫星高度不稳定(MSI-H)癌症方面已经取得了进展，肿瘤演变和耐药性仍是导致癌症患者治疗失败和死亡的主要原因。例如，在接受 PD-1 和 PD-L1 检查点抑制剂治疗的 dMMR 结直肠癌患者中，约一半的患者经历了原发性耐药。参见例如 Overman MJ 等人，J Clin Oncol. 2018 Mar 10;36(8):773-779。对于目前可用的治疗方法难以治疗的患者，仍然存在新的治疗选择尚未满足的临床需求。

Werner 解旋酶(WRN)被认为是 MSI-H 癌症的合成致死靶点(参见例如 Chan EM 等人，Nature. 2019 Apr;568(7753):551-556)。WRN 是 DNA 解旋酶 RecQ 家族成员之一，在维持基因组稳定性、DNA 修复、复制、转录和端粒维持方面具有重要的作用。在对 WRN 依赖性机制的研究中发现，二核苷酸 TA 重复序列在 MSI 细胞中发生大规模扩增，这些扩增的 TA 重复序列形成二级 DNA 结构，需要 WRN 解旋酶进行解链(参见例如 van Wietmarschen N 等人，Nature. 2020 Oct;586(7828):292-298)。在没有 WRN 的情况下(或在 WRN 解旋酶抑制的情况下)，MSI 细胞中扩增的 TA 重复序列受到核酸酶切割最终导致染色体断裂。因此，抑制 WRN 解旋酶是治疗以微卫星高度不稳定(MSI-H)或错配修复缺陷(dMMR)为特征的癌症，包括结直肠癌、胃癌或子宫内膜癌一种有效的策略。

发明概述

本申请提供用作 WRN 抑制剂的化合物，其可用于预防或治疗以微卫星高度不稳定(MSI-H)或错配修复缺陷(dMMR)为特征的癌症。此外，本发明的化合物还具有好的物理化学性质(例如溶解度、物理和/或化学稳定性)、好的药物代谢动力学性质(例如改善的生物利用度、好的代谢稳定性、合适的半衰期和作用持续时间)、好的安全性(较低的毒性(例如降低的心脏毒性)和/或较少的副作用)、较不易产生耐药性等优异的性质。

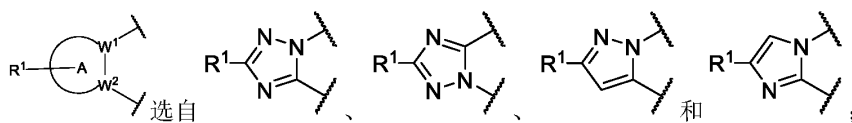
本发明的一个方面提供化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、阻转异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、代谢物、同位素标记的化合物或前药，其中所述化合物具有式(I)的结构：



其中：

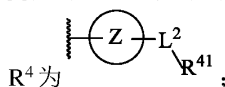
---表示单键或双键，条件是两个双键不直接相连；

W¹、W²、W³ 和 W⁴ 各自独立地为 C 或 N，条件是 C 与一个双键连接；优选地，W¹ 和 W² 中的至少一者为 N，和/或 W³ 和 W⁴ 中的至少一者为 N；



R^1 、 R^3 、 R^{21} 和 R^{22} 在每次出现时各自独立地选自 H、氘原子、卤素、-OH、-NH₂、-CN、-NO₂、-SF₅、=CH₂、C₁₋₆ 烷基、氘代 C₁₋₆ 烷基、卤代 C₁₋₆ 烷基、C₂₋₆ 烯基、C₂₋₆ 炔基、C₃₋₆ 环烷基、3-10 元杂环基、C₆₋₁₀ 芳基、5-14 元杂芳基、C₆₋₁₂ 芳烷基、-C(=O)R^a、-OC(=O)R^a、-C(=O)OR^a、-OR^a、-SR^a、-S(=O)R^a、-S(=O)₂R^a、-S(=O)₂NR^aR^b、-S(=O)(=NR^a)R^b、-NR^aR^b、-C(=O)NR^aR^b、-NR^a-C(=O)R^b、-NR^a-C(=O)OR^b、-NR^a-S(=O)₂-R^b、-NR^a-C(=O)-NR^aR^b、-P(=O)R^aR^b、-C₁₋₆ 亚烷基-R^a、-C₁₋₆ 亚烷基-OR^a、-C₁₋₆ 亚烷基-NR^aR^b、-O-C₁₋₆ 亚烷基-NR^aR^b、(-C₃₋₆ 亚环烷基)-CN 和 (-C₃₋₆ 亚环烷基)-C₁₋₆ 烷基；

当 m 大于 1 时，位于同一环原子或者相邻环原子的两个 R^3 连同其所连接的基团任选地共同构成 C₃₋₆ 环、3-10 元杂环、C₆₋₁₀ 芳环或 5-14 元杂芳环；



R^4 为

L^2 选自 -O-、-C(=O)-、-NRC(=O)-、-S-、-S(=O)-、-S(=O)₂-、C₁₋₆ 亚烷基和 -O-(C₁₋₆ 亚烷基)-；

R^{41} 选自 C₃₋₆ 环、3-10 元杂环、C₆₋₁₀ 芳环和 5-14 元杂芳环；

R、R^a 和 R^b 在每次出现时各自独立地选自 H、C₁₋₆ 烷基、C₃₋₁₀ 环烷基、3-10 元杂环基、C₆₋₁₀ 芳基、5-14 元杂芳基和 C₆₋₁₂ 芳烷基；

环 B、环 X 和环 Z 各自独立地选自 C₃₋₆ 环、3-10 元杂环、C₆₋₁₀ 芳环和 5-14 元杂芳环；

环 Y 不存在或者选自 C₃₋₆ 环、3-10 元杂环、C₆₋₁₀ 芳环和 5-14 元杂芳环；当环 Y 不存在时， R^{22} 也不存在；

上述亚烷基、烷基、烯基、炔基、亚环烷基、环烷基、环、杂环基、杂环、芳基、芳环、杂芳基、杂芳环和芳烷基在每次出现时各自任选地被一个或多个独立地选自下列的取代基取代：氘原子、卤素、-OH、=O、-NH₂、-CN、-NO₂、=CH₂、C₁₋₆ 烷基、氘代 C₁₋₆ 烷基、C₂₋₆ 烯基、C₂₋₆ 炔基、C₃₋₆ 环烷基、3-10 元杂环基、C₆₋₁₀ 芳基、5-14 元杂芳基、C₆₋₁₂ 芳烷基、-C(=O)R^c、-OC(=O)R^c、-C(=O)OR^c、-OR^c、-SR^c、-S(=O)R^c、-S(=O)₂R^c、-S(=O)₂NR^cR^d、-NR^cR^d、-C(=O)NR^cR^d、-NR^c-C(=O)R^d、-NR^c-C(=O)OR^d、-NR^c-S(=O)₂-R^d、-NR^c-C(=O)-NR^cR^d、-C₁₋₆ 亚烷基-OR^c、-C₁₋₆ 亚烷基-NR^cR^d 和 -O-C₁₋₆ 亚烷基-NR^cR^d，所述亚烷基、烷基、烯基、=CH₂、炔基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基和芳烷基各自进一步任选地被一个或多个独立地选自下列的取代基取代：卤素、-OH、=O、-C(=O)O-叔丁基、-NH₂、-CN、-NO₂、C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 卤代烷基、C₃₋₆ 环烷基、3-10 元杂环基、C₆₋₁₀ 芳基、5-14 元杂芳基、C₆₋₁₂ 芳烷基、-C₁₋₆ 亚烷基-C₃₋₆ 环烷基、-O-C₁₋₆ 亚烷基和 -C₁₋₆ 亚烷基-O-C₁₋₆ 烷基；

R^c 和 R^d 在每次出现时各自独立地选自 H、C₁₋₆ 烷基、C₃₋₁₀ 环烷基、3-10 元杂环基、C₆₋₁₀ 芳基、5-14 元杂芳基和 C₆₋₁₂ 芳烷基，所述烷基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基和芳烷基进一步任选地被一个或多个独立地选自下列的取代基取代：卤素、-OH、=O、-C(=O)O-叔丁基、-NH₂、-CN、-NO₂、C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 卤代烷基、C₃₋₆ 环烷基、3-10 元杂环基、C₆₋₁₀ 芳基、5-14 元杂芳基、C₆₋₁₂ 芳烷基和 -C₁₋₆ 亚烷基-O-C₁₋₆ 烷基；并且

p、q 和 m 各自独立地为选自 1、2 或 3 的整数。

本发明的另一方面提供药物组合物，其包含预防或治疗有效量的本发明的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、代谢物、同位素标记的化合物或前药以及一种或多种药学上可接受的载体。

本发明的另一方面提供本发明的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、代谢物、同位素标记的化合物或前药或者本发明的药物组合物在制备用作 WRN 抑制剂的药物中的用途。

本发明的另一方面提供本发明的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、代谢物、同位素标记的化合物或前药或者本发明的药物组合物，其用作 WRN 抑制剂。

本发明的另一方面提供预防或治疗癌症(优选以微卫星高度不稳定(MSI-H)或错配修复缺陷(dMMR)为特征的癌症)的方法，所述方法包括向需要其的个体给药有效量的本发明的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、代谢物、同位素标记的化

合物或前药或者本发明的药物组合物。

发明详述

定义

除非在下文中另有定义，本文中所用的所有技术术语和科学术语的含义意图与本领域技术人员通常所理解的相同。提及本文中使用的技术意图指在本领域中通常所理解的技术，包括那些对本领域技术人员显而易见的技术的变化或等效技术的替换。虽然相信以下术语对于本领域技术人员很好理解，但仍然阐述以下定义以更好地解释本发明。

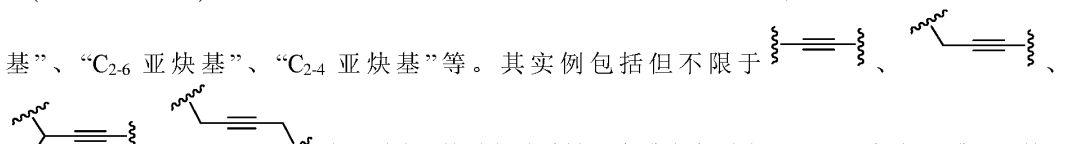
术语“包括”、“包含”、“具有”、“含有”或“涉及”及其在本文中的其它变体形式为包含性的(inclusive)或开放式的，且不排除其它未列举的元素或方法步骤。

如本文中所使用，术语“亚烷基”表示饱和二价烃基，优选表示具有 1、2、3、4、5 或 6 个碳原子的饱和二价烃基，例如亚甲基、亚乙基、亚丙基或亚丁基。

如本文中所使用，术语“烷基”定义为直链或支链饱和脂肪族烃。在一些实施方案中，烷基具有 1 至 12 个，例如 1 至 6 个碳原子。例如，如本文中所使用，术语“C₁₋₆ 烷基”指 1 至 6 个碳原子的线性或支化的基团(例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基或正己基)，其任选地被 1 或多个(诸如 1 至 3 个)适合的取代基如卤素取代(此时该基团被称作“卤代烷基”) (例如 CF₃、C₂F₅、CHF₂、CH₂F、CH₂CF₃、CH₂Cl 或 -CH₂CH₂CF₃ 等)。术语“C₁₋₄ 烷基”指 1 至 4 个碳原子的线性或支化的脂肪族烃链(即甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基或叔丁基)。

如本文中所使用，术语“烯基”意指线性的或支化的单价烃基，其包含一个或多个双键，且具有 2-6 个碳原子(“C₂₋₆ 烯基”)。所述烯基为例如 -CH=CH₂、-CH₂CH=CH₂、-C(CH₃)=CH₂、-CH₂-CH=CH-CH₃、2-戊烯基、3-戊烯基、4-戊烯基、2-己烯基、3-己烯基、4-己烯基、5-己烯基、2-甲基-2-丙烯基和 4-甲基-3-戊烯基。当本发明的化合物含有烯基时，所述化合物可以纯 E (异侧(entgegen)) 形式、纯 Z (同侧(zusammen)) 形式或其任意混合物形式存在。术语“亚烯基”为相应的二价基团，包括例如“C₂₋₆ 亚烯基”、“C₂₋₄ 亚烯基”等，其具体实例包括但不限于：-CH=CH-、-CH₂CH=CH-、-C(CH₃)=CH-、亚丁烯基、亚戊烯基、亚己烯基等。

如本文中所使用，术语“炔基”表示包含一个或多个三键的单价烃基，其优选具有 2、3、4、5 或 6 个碳原子，例如乙炔基、2-丙炔基、2-丁炔基、1,3-丁二炔基等。所述炔基任选地被一个或多个(诸如 1 至 3 个)相同或不同的取代基取代。术语“亚炔基”为相应的二价基团，包括例如“C₂₋₈ 亚炔基”、“C₂₋₆ 亚炔基”、“C₂₋₄ 亚炔基”等。其实例包括但不限于

等，所述亚炔基任选地被一个或多个(诸如 1 至 3 个)相同或不同的取代基取代。

如本文中所使用，术语“并环”或“稠环”指由两个或两个以上环状结构彼此共用两个相邻的原子所形成的环系。

如本文中所使用，术语“螺环”指由两个或两个以上环状结构彼此共用一个环原子所形成的环系。

如本文中所使用，术语“桥环”指由两个或两个以上环状结构彼此共用两个不直接相连的原子所形成的环系。

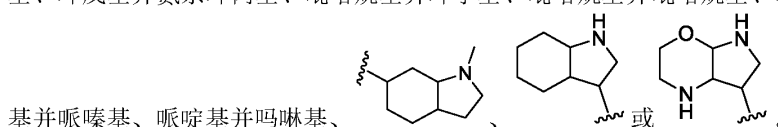
如本文中所使用，术语“亚环烃基”、“环烃基”和“环”是指具有例如 3-10 个(适合地具有 3-8 个，更适合地具有 3-6 个)环碳原子的饱和(即，“亚环烷基”和“环烷基”)或部分不饱和的(即在环内具有一个或多个双键和/或三键)单环或多环烃环(包括螺环、并环(稠环)或桥环系统)，其包括但不限于(亚)环丙基(环)、(亚)环丁基(环)、(亚)环戊基(环)、(亚)环己基(环)、(亚)环庚基(环)、(亚)环辛基(环)、(亚)环壬基(环)、(亚)环癸基(环)等。

如本文中所使用，术语“环烷基”指饱和单环或多环(诸如双环)烃环(例如单环，诸如环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基、环壬基，或双环，包括螺环、稠合或桥连系统(诸如双环[1.1.1]戊基、双环[2.2.1]庚基、双环[3.2.1]辛基或双环[5.2.0]壬基、十氢化萘基等)，其任选地被 1 或多个(诸如 1 至 3 个)适合的取代基取代。所述环烷基具有 3 至 15 个碳原子。例如，术语“C₃₋₆ 环烷基”指 3 至 6 个成环碳原子的饱和单环或多环(诸如双环)烃环(例如环丙基、环丁基、环戊基或环己基)，

其任选地被1或多个(诸如1至3个)适合的取代基取代,例如甲基取代的环丙基。

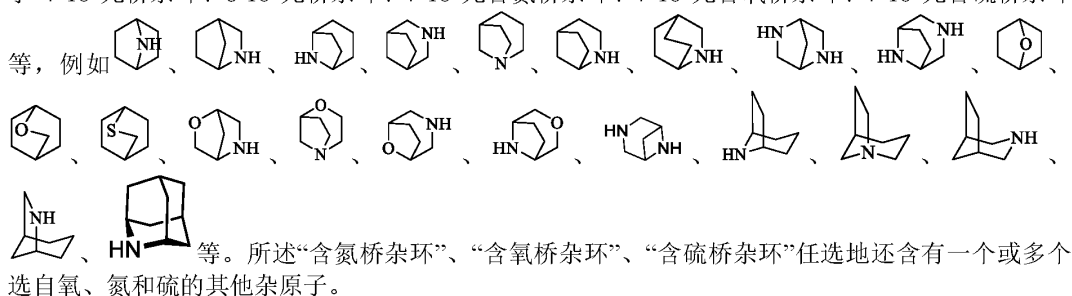
如本文中所使用,术语“杂环基”(或“杂环”)指饱和或部分不饱和的单环或双环基团,其在环中具有2、3、4、5、6、7、8、9或10个碳原子和一个或多个(例如一个、两个、三个或四个)选自O、S、N和P的杂原子,并且所述“杂环基”(或“杂环”)可包含-C(=O)-作为环成员。所述杂环基可以通过所述碳原子和/或杂原子(如果存在的话)与分子的其余部分连接。特别地,3-10元杂环基为在环中具有3-10个碳原子及杂原子的基团,例如但不限于环氧乙烷基、氮丙啶基、氮杂环丁烷基(azetidiny)、氧杂环丁烷基(oxetany)、四氢呋喃基、二氧杂环戊烯基(dioxoliny)、吡咯烷基、吡咯烷酮基、咪唑烷基、吡唑烷基、吡咯啉基、四氢吡喃基、哌啶基、吗啉基、二噻烷基(dithianyl)、硫吗啉基、哌嗪基或三噻烷基(trithianyl)。

如本文中所使用,术语“杂环基”(或“杂环”)涵盖并环结构,所述并环结构与其他基团的连接点可以在并环结构中的任一环上。因此,本发明的杂环基还包括但不限于杂环基并杂环基、杂环基并环烷基、单杂环基并单杂环基、单杂环基并单环烷基、芳基并杂环基、杂芳基并杂环基,例如3-7元(单)杂环基并3-7元(单)杂环基、3-7元(单)杂环基并(单)环烷基、3-7元(单)杂环基并C₄₋₆(单)环烷基、C₆₋₁₀芳基并3-7元杂环基、5-6元杂芳基并3-7元杂环基,其实例包括但不限于吡咯烷基并环丙基、环戊基并氮杂环丙基、吡咯烷基并环丁基、吡咯烷基并吡咯烷基、吡咯烷基并哌啶基、吡咯烷

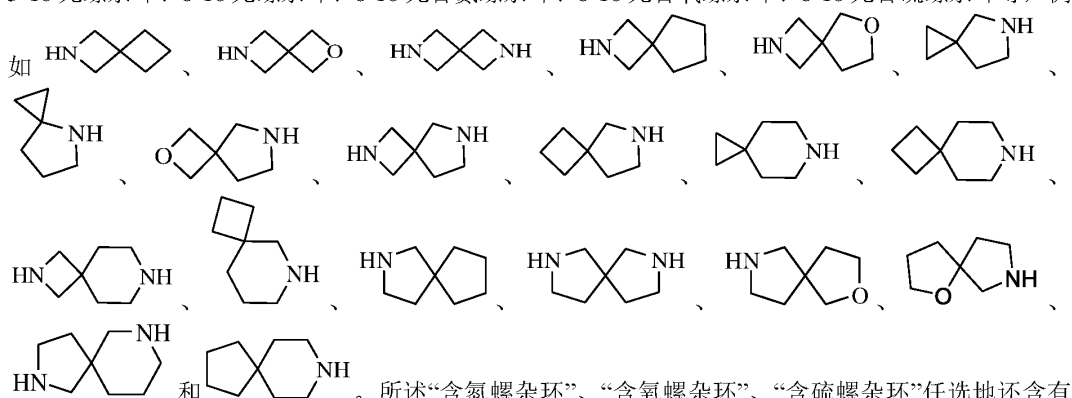


如本文中所使用,术语“杂环基”(或“杂环”)涵盖桥杂环基(桥杂环)和螺杂环基(螺杂环)。

如本文中所使用,术语“桥杂环”是指两个环共用两个不直接相连的环原子形成的含有一个或多个(例如1个、2个、3个或4个)杂原子(例如氧原子、氮原子和/或硫原子)的环状结构,包括但不限于7-10元桥杂环、8-10元桥杂环、7-10元含氮桥杂环、7-10元含氧桥杂环、7-10元含硫桥杂环



如本文中所使用,术语“螺杂环”是指由两个或两个以上环共用一个环原子形成的含有一个或多个(例如1个、2个、3个或4个)杂原子(例如氧原子、氮原子、硫原子)的环状结构,包括但不限于5-10元螺杂环、6-10元螺杂环、6-10元含氮螺杂环、6-10元含氧螺杂环、6-10元含硫螺杂环等,例



如本文中所使用,术语“(亚)芳基”和“芳环”指具有共轭 π 电子系统的全碳单环或稠合环多环芳族基团。例如,如本文中所使用,术语“C₆₋₁₀(亚)芳基”和“C₆₋₁₀芳环”意指含有6至10个碳原子的芳族基

团, 诸如(亚)苯基(苯环)或(亚)萘基(萘环)。(亚)芳基和芳环任选地被1或多个(诸如1至3个)适合的取代基(例如卤素、-OH、-CN、-NO₂、C₁₋₆烷基等)取代。

术语“芳烷基”表示芳基取代的烷基, 其中所述芳基和所述烷基如本文中所定义。通常, 所述芳基可具有 6-14 个碳原子, 并且所述烷基可具有 1-6 个碳原子。示例性芳烷基包括但不限于苄基、苯基乙基、苯基丙基、苯基丁基。

如本文中所使用, 术语“(亚)杂芳基”和“杂芳环”指单环、双环或三环芳族环系, 其具有 5、6、7、8、9、10、11、12、13 或 14 个环原子, 特别是 1 或 2 或 3 或 4 或 5 或 6 或 9 或 10 个碳原子, 且其包含至少一个可以相同或不同的杂原子(所述杂原子是例如氧、氮或硫), 并且, 另外在每一种情况下可为苯并稠合的。特别地, “(亚)杂芳基”或“杂芳环”选自(亚)噻吩基(环)、(亚)呋喃基(环)、(亚)吡咯基(环)、(亚)噁唑基(环)、(亚)噻唑基(环)、(亚)咪唑基(环)、(亚)吡唑基(环)、(亚)异噁唑基(环)、(亚)异噻唑基(环)、(亚)噁二唑基(环)、(亚)三唑基(环)、(亚)噻二唑基(环)等, 以及它们的苯并衍生物; 或(亚)吡啶基(环)、(亚)哒嗪基(环)、(亚)嘧啶基(环)、(亚)吡嗪基(环)、(亚)三嗪基(环)等, 以及它们的苯并衍生物。

如本文中所使用, 术语“卤代”或“卤素”基团定义为包括F、Cl、Br或I。

如本文中所使用, 术语“烷基硫基”意指通过硫原子连接至母体分子部分的如上文所定义的烷基。C₁₋₆烷基硫基的代表性实例包括但不限于甲硫基、乙硫基、叔丁硫基及己硫基。

如本文中所使用, 术语“含氮杂环”指饱和或部分不饱和的单环或双环基团, 其在环中具有 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 或 13 个碳原子和至少一个氮原子, 其还可任选地包含一个或多个(例如一个、两个、三个或四个)选自 N、O、S、S=O 和 S(=O)₂ 的环成员; 所述含氮杂环通过任一环成员与分子的其余部分连接。所述含氮杂环优选为饱和含氮单环。特别地, 3 至 14 元含氮杂环为在环中具有 3-14 个碳原子及杂原子(其中至少一个为氮原子)的基团, 其包括但不限于三元含氮杂环(如氮丙啶基)、四元含氮杂环(如氮杂环丁烷基)、五元含氮杂环(如吡咯基、吡咯烷基(吡咯烷环)、吡咯啉基、吡咯烷酮基、咪唑基、咪唑烷基、咪唑啉基、吡唑基、吡唑啉基)、六元含氮杂环(如哌啶基(哌啶环)、吗啉基、硫吗啉基、哌嗪基)、七元含氮杂环等。

术语“取代”指所指定的原子上的一個或多个(例如一个、两个、三个或四个)氢被从所指出的基团的选择代替, 条件是未超过所指定的原子在当前情况下的正常原子价并且所述取代形成稳定的化合物。取代基和/或变量的组合仅仅当这种组合形成稳定的化合物时才是允许的。

如果取代基被描述为“任选地被取代”, 则取代基可(1)未被取代或(2)被取代。如果取代基的碳被描述为任选地被取代基列表中的一个或多个取代, 则碳上的一个或多个氢(至存在的任何氢的程度)可单独和/或一起被独立地选择的任选的取代基替代。如果取代基的氮被描述为任选地被取代基列表中的一个或多个取代, 则氮上的一个或多个氢(至存在的任何氢的程度)可各自被独立地选择的任选的取代基替代。

如果取代基被描述为“独立地选自”一组, 则各取代基独立于另一者被选择。因此, 各取代基可与另一(其他)取代基相同或不同。

如本文中所使用, 术语“一个或多个”意指在合理条件下的 1 个或超过 1 个, 例如 2 个、3 个、4 个、5 个或 10 个。

除非指明, 否则如本文中所使用, 取代基的连接点可来自取代基的任意适宜位置。

当取代基的键显示为穿过环中连接两个原子的键时, 则这样的取代基可键连至该可取代的环中的任一成环原子。

本发明还包括所有药学上可接受的同位素标记的化合物, 其与本发明的化合物相同, 除了一个或多个原子被具有相同原子序数但原子质量或质量数不同于在自然界中占优势的原子质量或质量数的原子替代。适合包含入本发明的化合物中的同位素的实例包括(但不限于)氢的同位素(例如氘(D, ²H)、氚(T, ³H)); 碳的同位素(例如¹¹C、¹³C及¹⁴C); 氯的同位素(例如³⁶Cl); 氟的同位素(例如¹⁸F); 碘的同位素(例如¹²³I及¹²⁵I); 氮的同位素(例如¹³N及¹⁵N); 氧的同位素(例如¹⁵O、¹⁷O及¹⁸O); 磷的同位素(例如³²P); 及硫的同位素(例如³⁵S)。某些同位素标记的本发明的化合物(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(例如分析)中。放射性同位素氚(即³H)及碳-14 (即¹⁴C)因易于掺入且容易检测而特别可用于该目的。用正电子发射同位素(例如¹¹C、¹⁸F、¹⁵O及¹³N)进行取代可在正电子发射断层显像术(PET)研究中用于检验底物受体占据情况。被同位素标记的本发明的化合物可通过与描述于随附路线和/或实施例及制备中的那些类似的方法通过使用适当的被同位素标记的试剂代替之前采用的非标记的试剂来制备。本发明的药学上可接受的溶剂合物包括其中结晶溶剂可被同位素取代的那些, 例如, D₂O、丙酮-d₆或DMSO-d₆。

术语“立体异构体”表示由于至少一个不对称中心形成的异构体。在具有一个或多个(例如一个、两个、三个或四个)不对称中心的化合物中,其可产生外消旋混合物、单一对映异构体、非对映异构体混合物和单独的非对映异构体。特定个别分子也可以几何异构体(顺式/反式)存在。类似地,本发明的化合物可以两种或更多种处于快速平衡的结构不同的形式的混合物(通常称作互变异构体)存在。互变异构体的代表性实例包括酮-烯醇互变异构体、苯酚-酮互变异构体、亚硝基-肟互变异构体、亚胺-烯胺互变异构体等。要理解,本申请的范围涵盖所有这样的以任意比例(例如60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%)的异构体或其混合物。

本文中可使用实线(——)、实楔形(▲)或虚楔形(▼)描绘本发明的化合物的碳-碳键。使用实线以描绘键连至不对称碳原子的键欲表明,包括该碳原子处的所有可能的立体异构体(例如,特定的对映异构体、外消旋混合物等)。使用实或虚楔形以描绘键连至不对称碳原子的键欲表明,存在所示的立体异构体。当存在于外消旋混合物中时,使用实及虚楔形以定义相对立体化学,而非绝对立体化学。除非另外指明,否则本发明的化合物意欲可以立体异构体(其包括顺式及反式异构体、光学异构体(例如 R 及 S 对映异构体)、非对映异构体、几何异构体、旋转异构体、构象异构体、阻转异构体及其混合物)的形式存在。本发明的化合物可表现一种以上类型的异构现象,且由其混合物(例如外消旋混合物及非对映异构体对)组成。

阻转异构体是指可以分离成旋转受限异构体的化合物。

还应当理解,本发明的某些化合物可以游离形式存在用于治疗,或适当时,以其药学上可接受的衍生物形式存在。在本发明中,药学上可接受的衍生物包括但不限于,药学上可接受的盐、酯、溶剂合物、代谢物或前药,在将它们向需要其的患者给药后,能够直接或间接提供本发明的化合物或其代谢物或残余物。因此,当在本文中提及“本发明的化合物”时,也意在涵盖化合物的上述各种衍生物形式。

本发明的化合物的药学上可接受的盐包括其酸加成盐及碱加成盐。

适合的盐的综述参见 Stahl 及 Wermuth 的“Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use” (Wiley-VCH, 2002)。用于制备本发明的化合物的药学上可接受的盐的方法为本领域技术人员已知的。

如本文中所使用,术语“酯”意指衍生自本申请中各个通式化合物的酯,其包括生理上可水解的酯(可在生理条件下水解以释放游离酸或醇形式的本发明的化合物)。本发明的化合物本身也可以是酯。

本发明的化合物可以溶剂合物(优选水合物)的形式存在,其中本发明的化合物包含作为所述化合物晶格的结构要素的极性溶剂,特别是例如水、甲醇或乙醇。极性溶剂特别是水的量可以化学计量比或非化学计量比存在。

在本发明的范围内还包括本发明的化合物的代谢物,即在给药本发明的化合物时体内形成的物质。这样的产物可由例如被给药的化合物的氧化、还原、水解、酰胺化、脱酰胺化、酯化、脱脂化、酶解等产生。因此,本发明包括本发明的化合物的代谢物,包括通过使本发明的化合物与哺乳动物接触足以产生其代谢产物的时间的方法制得的化合物。

本发明在其范围内进一步包括本发明的化合物的前药,其为自身可具有较小药理学活性或无药理学活性的本发明的化合物的某些衍生物当被给药至身体中或其上时可通过例如水解裂解转化成具有期望活性的本发明的化合物。通常这样的前药会是所述化合物的官能团衍生物,其易于在体内转化成期望的治疗活性化合物。关于前药的使用的其他信息可参见“Pro-drugs as Novel Delivery Systems”,第14卷,ACS Symposium Series (T. Higuchi 及 V. Stella) 及“Bioreversible Carriers in Drug Design,” Pergamon Press, 1987 (E. B. Roche 编辑, American Pharmaceutical Association)。本发明的前药可例如通过用本领域技术人员已知作为“前-部分(pro-moiety)” (例如“Design of Prodrugs”, H. Bundgaard (Elsevier, 1985) 中所述) 的某些部分替代本发明的化合物中存在的适当官能团来制备。

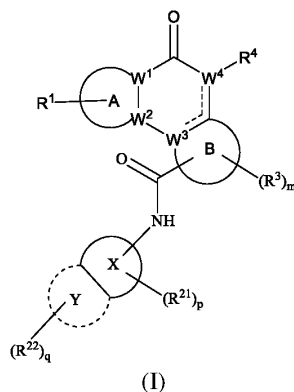
本发明还涵盖含有保护基的本发明的化合物。在制备本发明的化合物的任何过程中,保护在任何有关分子上的敏感基团或反应基团可能是必需的和/或期望的,由此形成本发明的化合物的化学保护的形式。这可以通过常规的保护基实现,例如,在 Protective Groups in Organic Chemistry, ed. J.F.W. McOmie, Plenum Press, 1973; 和 T.W. Greene & P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, 1991 中所述的那些保护基,这些参考文献通过援引加入本文。使用本领域已知的方法,在适当的后续阶段可以移除保护基。

如本文中所使用,术语“约”是指在所述数值的 $\pm 10\%$ 范围内,优选 $\pm 5\%$ 范围内,更优选 $\pm 2\%$ 范围

内。

化合物

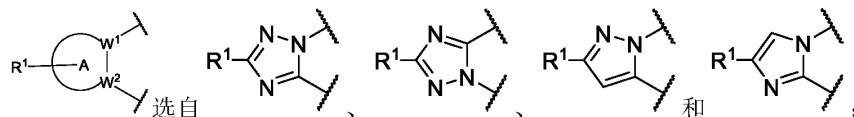
在一些实施方案中，本公开提供化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、阻转异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、代谢物、同位素标记的化合物或前药，其中所述化合物具有式(I)的结构：



其中：

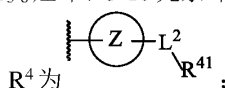
---表示单键或双键，条件是两个双键不直接相连；

W¹、W²、W³和 W⁴各自独立地为 C 或 N，条件是 C 与一个双键连接；优选地，W¹和 W²中的至少一者为 N，和/或 W³和 W⁴中的至少一者为 N；



R¹、R³、R²¹和 R²²在每次出现时各自独立地选自 H、氘原子、卤素、-OH、-NH₂、-CN、-NO₂、-SF₅、=CH₂、C₁₋₆烷基、氘代 C₁₋₆烷基、卤代 C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₃₋₆环烷基、3-10 元杂环基、C₆₋₁₀芳基、5-14 元杂芳基、C₆₋₁₂芳烷基、-C(=O)R^a、-OC(=O)R^a、-C(=O)OR^a、-OR^a、-SR^a、-S(=O)R^a、-S(=O)₂R^a、-S(=O)₂NR^aR^b、-S(=O)(=NR^a)R^b、-NR^aR^b、-C(=O)NR^aR^b、-NR^a-C(=O)R^b、-NR^a-C(=O)OR^b、-NR^a-S(=O)₂-R^b、-NR^a-C(=O)-NR^aR^b、-P(=O)R^aR^b、-C₁₋₆亚烷基-R^a、-C₁₋₆亚烷基-OR^a、-C₁₋₆亚烷基-NR^aR^b、-O-C₁₋₆亚烷基-NR^aR^b、(-C₃₋₆亚环烷基)-CN 和(-C₃₋₆亚环烷基)-C₁₋₆烷基；

当 m 大于 1 时，位于同一环原子或者相邻环原子的两个 R³连同其所连接的基团任选地共同构成 C₃₋₆环、3-10 元杂环、C₆₋₁₀芳环或 5-14 元杂芳环；



R⁴为

L²选自 -O-、-C(=O)-、-NRC(=O)-、-S-、-S(=O)-、-S(=O)₂-、C₁₋₆亚烷基和 -O-(C₁₋₆亚烷基)-；

R⁴¹选自 C₃₋₆环、3-10 元杂环、C₆₋₁₀芳环和 5-14 元杂芳环；

R、R^a和 R^b在每次出现时各自独立地选自 H、C₁₋₆烷基、C₃₋₁₀环烷基、3-10 元杂环基、C₆₋₁₀芳基、5-14 元杂芳基和 C₆₋₁₂芳烷基；

环 B、环 X 和环 Z 各自独立地选自 C₃₋₆环、3-10 元杂环、C₆₋₁₀芳环和 5-14 元杂芳环；

环 Y 不存在或者选自 C₃₋₆环、3-10 元杂环、C₆₋₁₀芳环和 5-14 元杂芳环；当环 Y 不存在时，R²²也不存在；

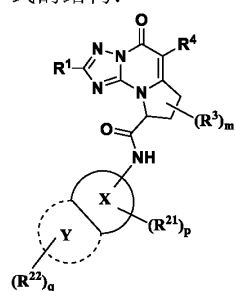
上述亚烷基、烷基、烯基、炔基、亚环烷基、环烷基、杂环基、杂环、芳基、芳环、杂芳基、杂芳环和芳烷基在每次出现时各自任选地被一个或多个独立地选自下列的取代基取代：氘原子、卤素、-OH、=O、-NH₂、-CN、-NO₂、=CH₂、C₁₋₆烷基、氘代 C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₃₋₆环烷基、3-10 元杂环基、C₆₋₁₀芳基、5-14 元杂芳基、C₆₋₁₂芳烷基、-C(=O)R^c、-OC(=O)R^c、-C(=O)OR^c、-OR^c、-SR^c、-S(=O)R^c、-S(=O)₂R^c、-S(=O)₂NR^cR^d、-NR^cR^d、-C(=O)NR^cR^d、-NR^c-C(=O)R^d、-NR^c-C(=O)OR^d、-NR^c-S(=O)₂-R^d、-NR^c-C(=O)-NR^cR^d、-C₁₋₆亚烷基-OR^c、-C₁₋₆亚烷基-NR^cR^d和 -O-C₁₋₆亚烷基-NR^cR^d，所述亚烷基、烷基、烯基、=CH₂、炔基、环

基、杂环基、芳基、杂芳基和芳烷基各自进一步任选地被一个或多个独立地选自下列的取代基取代：卤素、-OH、=O、-C(=O)O-叔丁基、-NH₂、-CN、-NO₂、C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 卤代烷基、C₃₋₆ 环烷基、3-10 元杂环基、C₆₋₁₀ 芳基、5-14 元杂芳基、C₆₋₁₂ 芳烷基、-C₁₋₆ 亚烷基-C₃₋₆ 环烷基、-O-C₁₋₆ 烷基和-C₁₋₆ 亚烷基-O-C₁₋₆ 烷基；

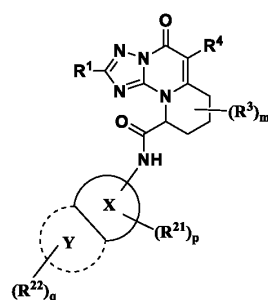
R^c 和 R^d 在每次出现时各自独立地选自 H、C₁₋₆ 烷基、C₃₋₁₀ 环烷基、3-10 元杂环基、C₆₋₁₀ 芳基、5-14 元杂芳基和 C₆₋₁₂ 芳烷基，所述烷基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基和芳烷基进一步任选地被一个或多个独立地选自下列的取代基取代：卤素、-OH、=O、-C(=O)O-叔丁基、-NH₂、-CN、-NO₂、C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 卤代烷基、C₃₋₆ 环烷基、3-10 元杂环基、C₆₋₁₀ 芳基、5-14 元杂芳基、C₆₋₁₂ 芳烷基和-C₁₋₆ 亚烷基-O-C₁₋₆ 烷基；并且

p、q 和 m 各自独立地为选自 1、2 或 3 的整数。

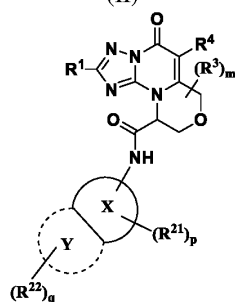
在优选的实施方案中，本公开提供化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、阻转异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、代谢物、同位素标记的化合物或前药，其中所述化合物具有下式的结构：



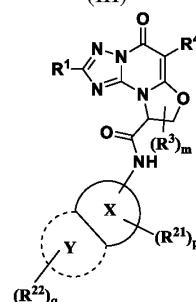
(II)



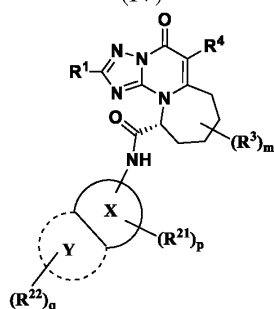
(III)



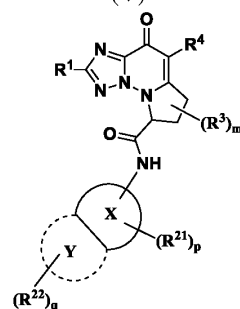
(IV)



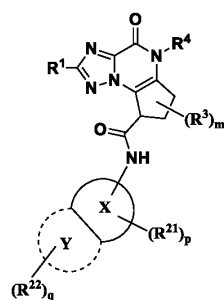
(V)



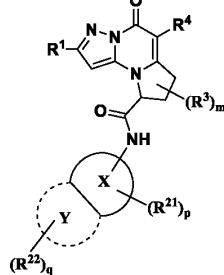
(VI)



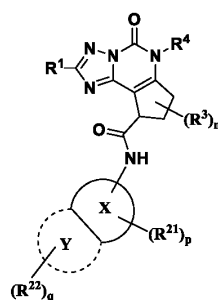
(VII)



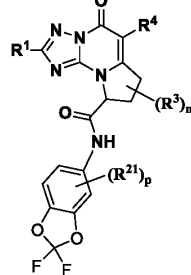
(VIII)



(X)



(IX)



(XI)

在一些的实施方案中，环 B 为 C₃₋₆ 环或 3-10 元杂环。

在优选的实施方案中，环 B 为环戊烯环、环己烯环、吡咯烷环、噁唑烷环、哌啶环、吗啉环或氮杂环庚烷环。

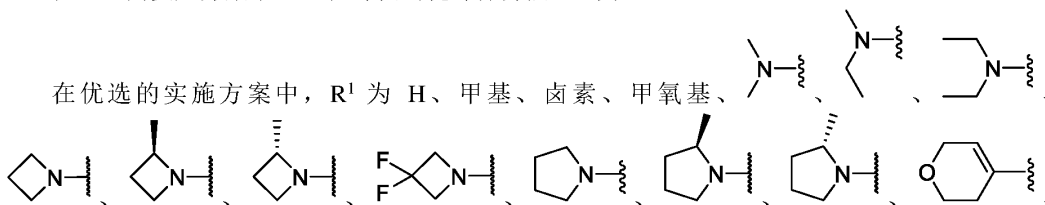
在一些的实施方案中，R¹ 在每次出现时各自独立地选自 H、卤素、C₁₋₆ 烷基、C₃₋₆ 环烷基、3-10 元杂环基、C₆₋₁₀ 芳基、5-14 元杂芳基、-S(=O)₂R^a、-OR^a 和 -NR^aR^b，R^a 和 R^b 在每次出现时各自独立地选自 H、C₁₋₆ 烷基、C₃₋₁₀ 环烷基、3-10 元杂环基、C₆₋₁₀ 芳基、5-14 元杂芳基和 C₆₋₁₂ 芳烷基；优选地，R¹ 在每次出现时各自独立地选自 3-10 元杂环基、C₆₋₁₀ 芳基、5-14 元杂芳基和 -NR^aR^b；其中所述烷基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基各自任选地被一个或多个独立地选自下列的取代基取代：卤素、-S(=O)₂R^c、C₁₋₆ 烷基、C₂₋₆ 烯基、=CH₂、C₃₋₆ 环烷基、3-10 元杂环基、C₆₋₁₀ 芳基和 5-14 元杂芳基；所述烷基、烯基、=CH₂、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基各自进一步任选地被一个或多个独立地选自下列的取代基取代：卤素、C₁₋₆ 烷基、C₃₋₆ 环烷基、3-10 元杂环基和 -C₁₋₆ 亚烷基-C₃₋₆ 环烷基。

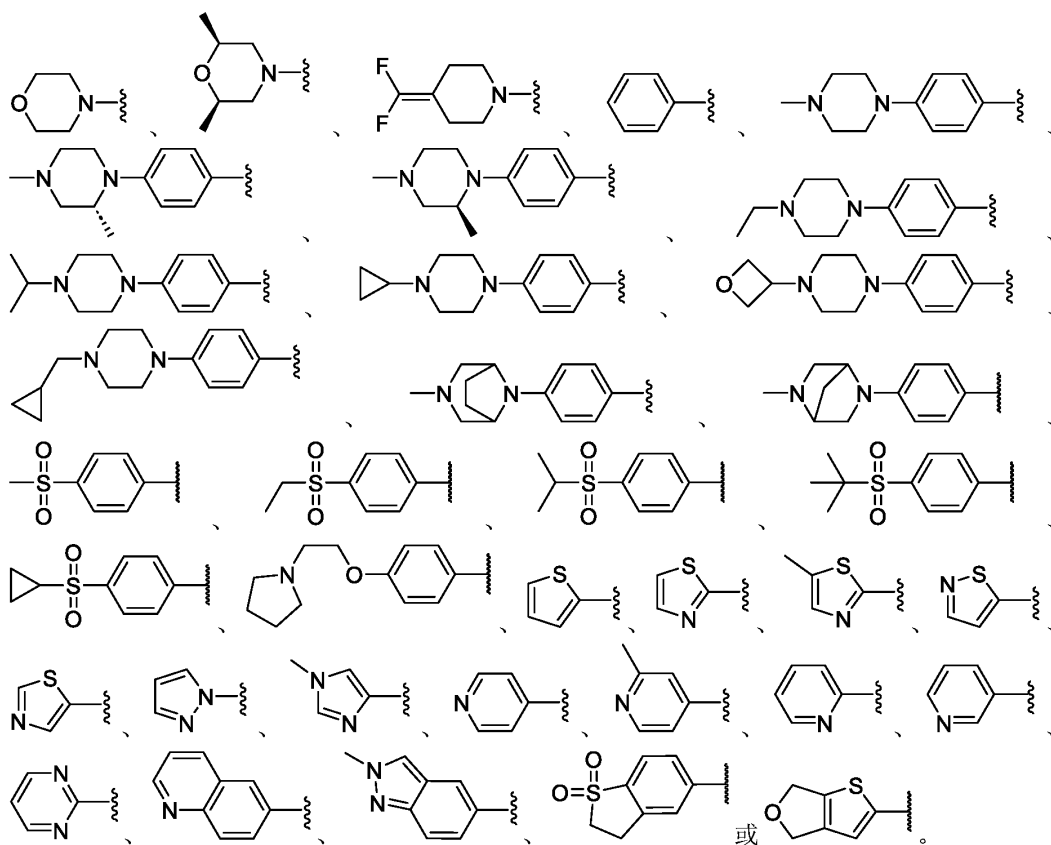
在一些的实施方案中，R¹ 在每次出现时各自独立地选自 H、卤素、C₁₋₆ 烷基、C₃₋₆ 环烷基、3-10 元杂环基、C₆₋₁₀ 芳基、5-14 元杂芳基、-OR^a 和 -NR^aR^b，优选地，R¹ 在每次出现时各自独立地选自 3-10 元杂环基、C₆₋₁₀ 芳基、5-14 元杂芳基和 -NR^aR^b；其中所述烷基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基各自任选地被一个或多个独立地选自下列的取代基取代：卤素、C₁₋₆ 烷基、C₂₋₆ 烯基、=CH₂、C₃₋₆ 环烷基、3-10 元杂环基、C₆₋₁₀ 芳基和 5-14 元杂芳基；所述烷基、烯基、=CH₂、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基各自进一步任选地被一个或多个独立地选自下列的取代基取代：卤素、C₁₋₆ 烷基、C₃₋₆ 环烷基、3-10 元杂环基和 -C₁₋₆ 亚烷基-C₃₋₆ 环烷基。

在一些的实施方案中，R¹ 在每次出现时各自独立地为 C₆₋₁₀ 芳基、-NR^aR^b。

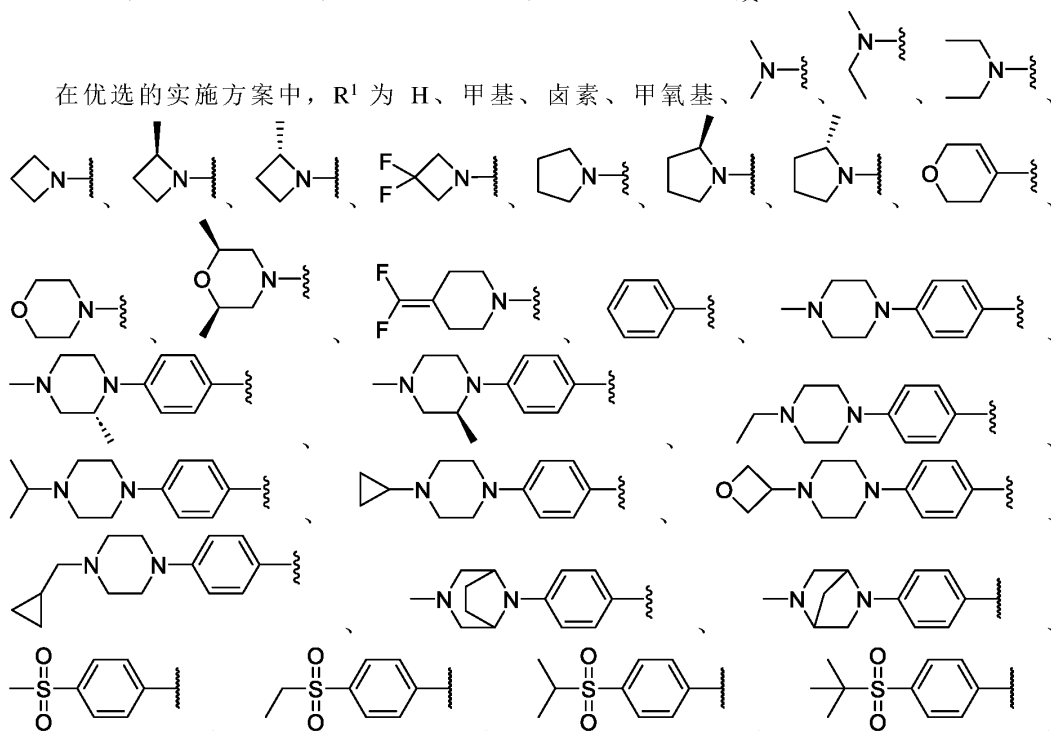
在一些的实施方案中，R¹ 在每次出现时各自独立地为 -NR^aR^b。

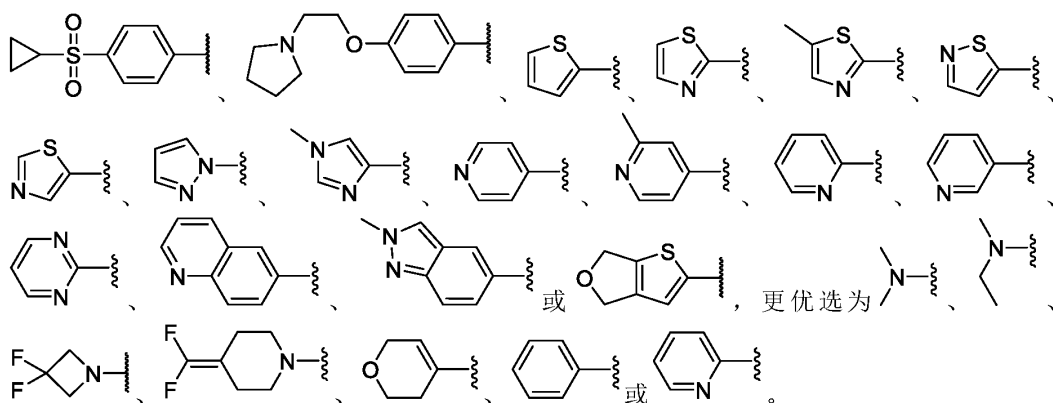
在优选的实施方案中，R¹ 为 H、甲基、卤素、甲氧基、



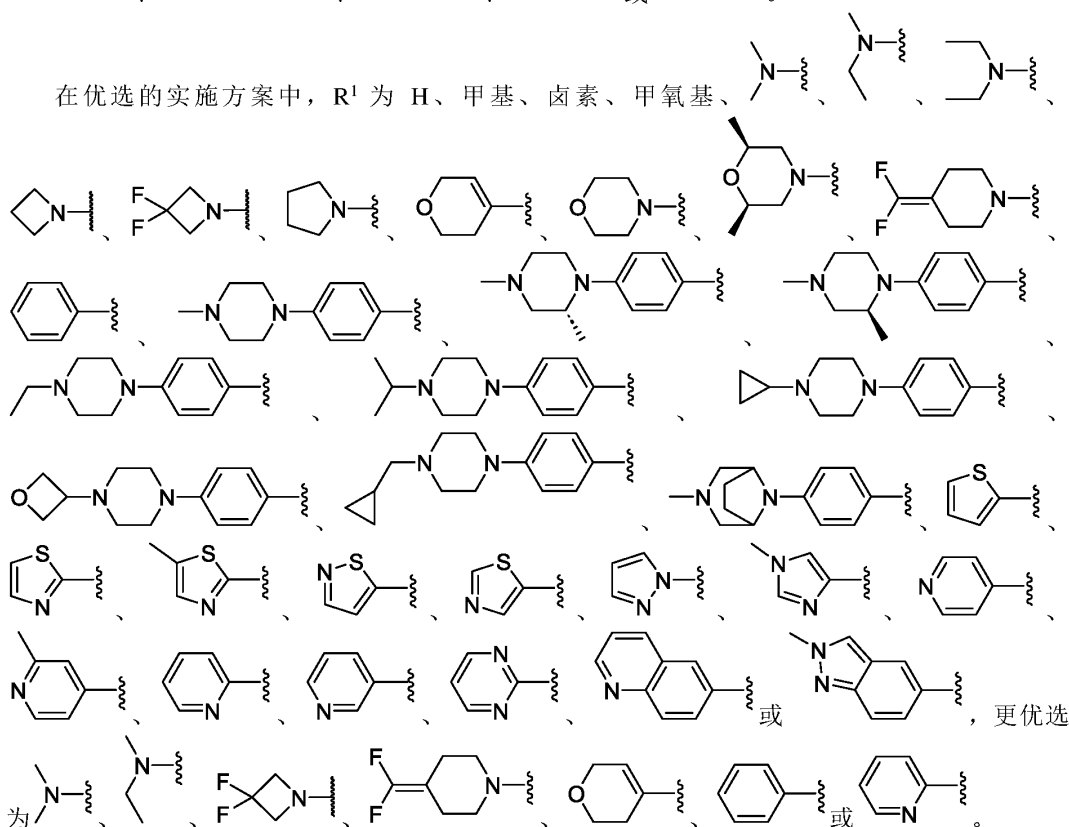


在优选的实施方案中，R¹ 为 H、甲基、卤素、甲氧基、

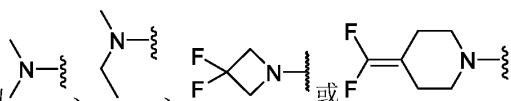




在优选的实施方案中，R¹ 为 H、甲基、卤素、甲氧基、

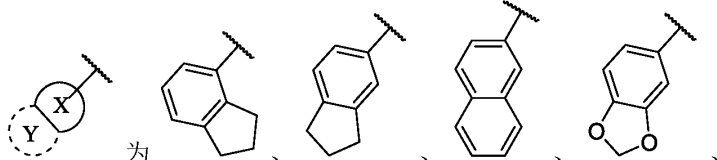


在一些实施方案中， R^1 为

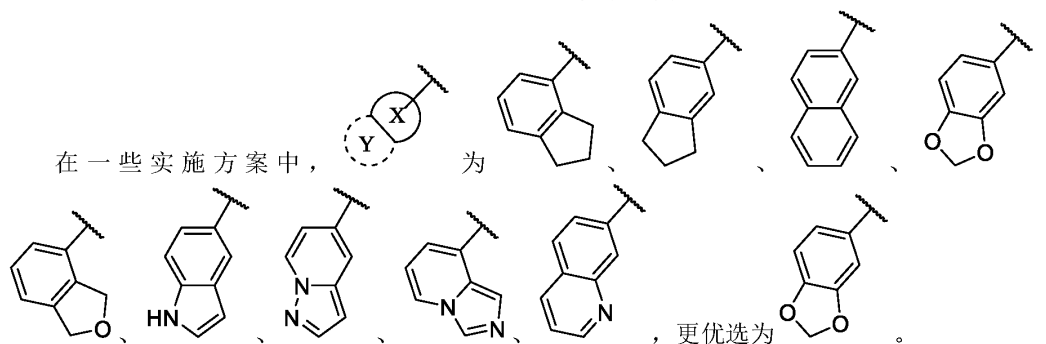
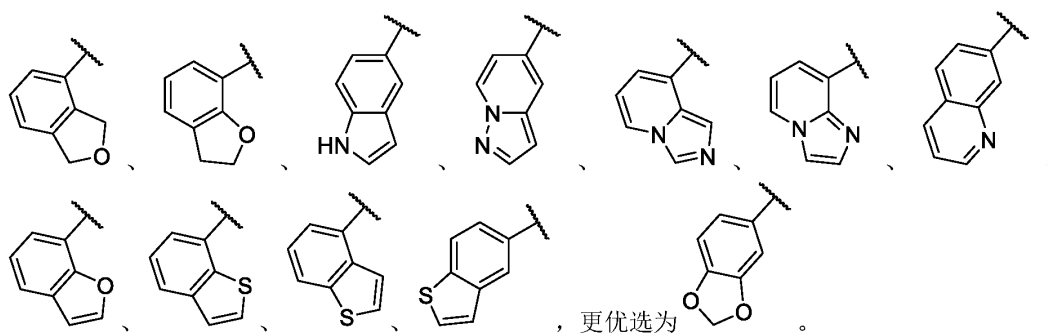


在一些实施方案中，环 X 为苯环、5-6 元杂环或 5-6 元杂芳环且环 Y 不存在。

在一些实施方案中，环 X 为苯环且环 Y 为 C₃₋₆ 烃环、苯环、5-6 元杂环或 5-6 元杂芳环。

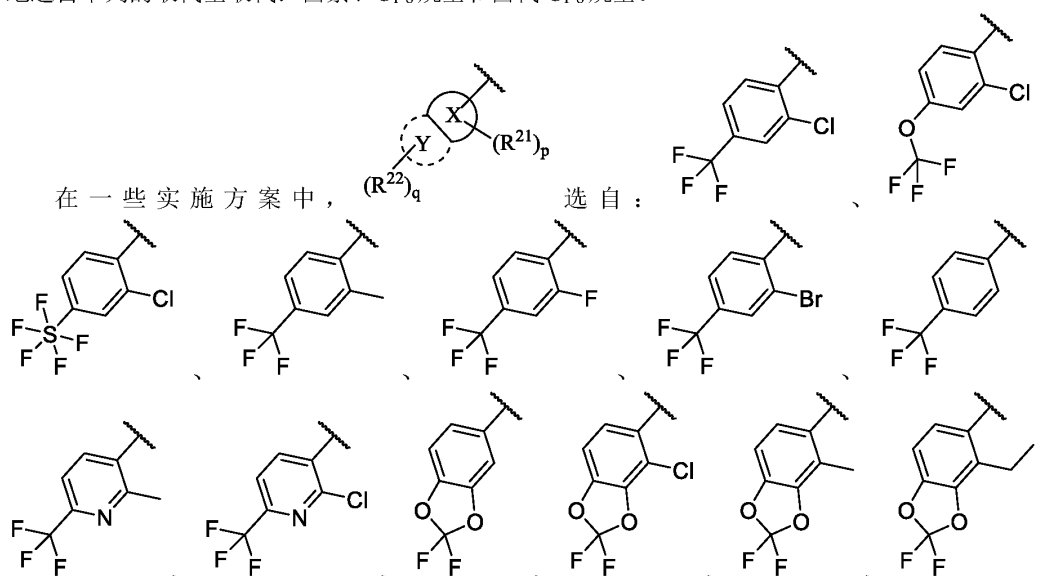


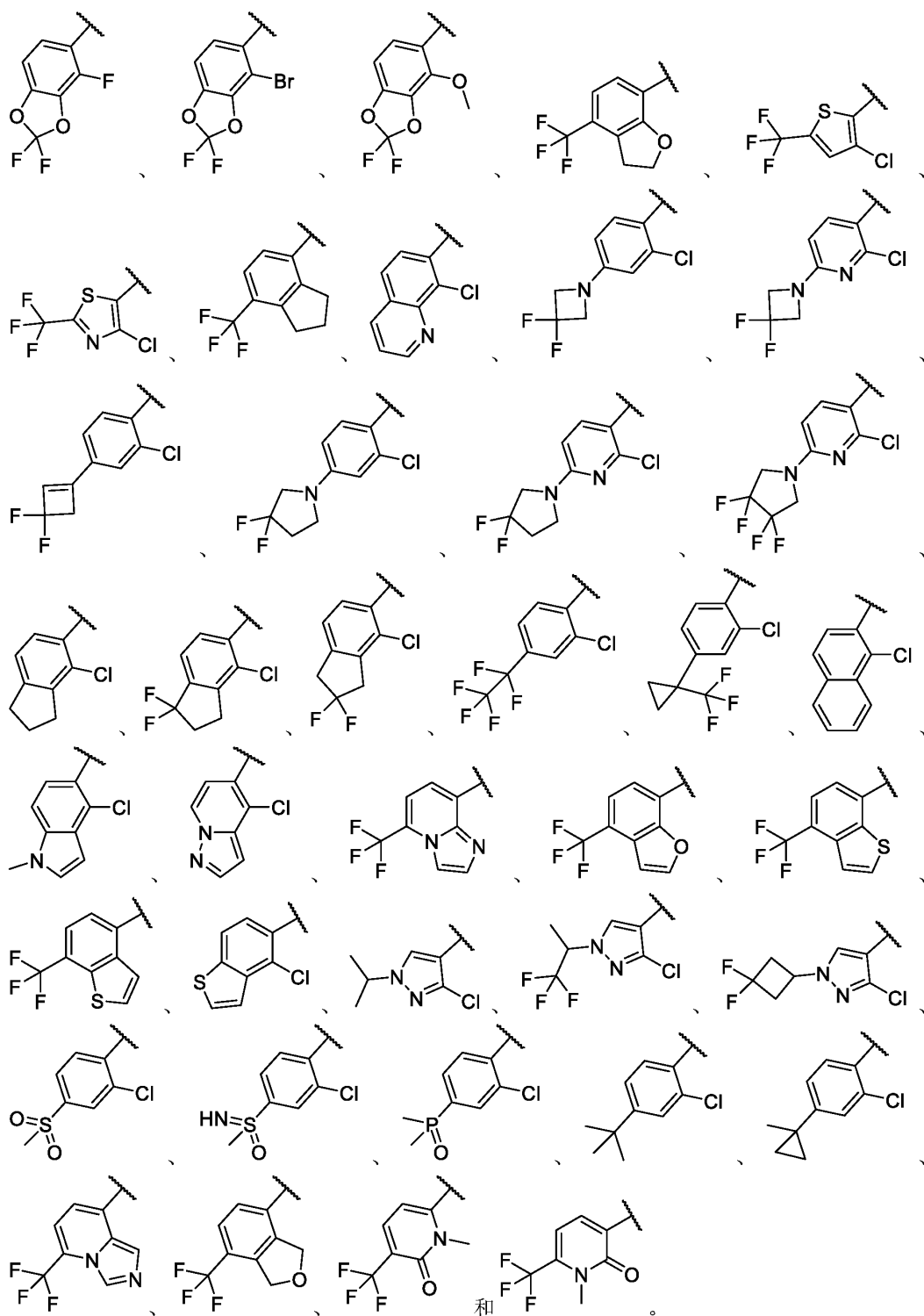
在一些实施方案中， 为

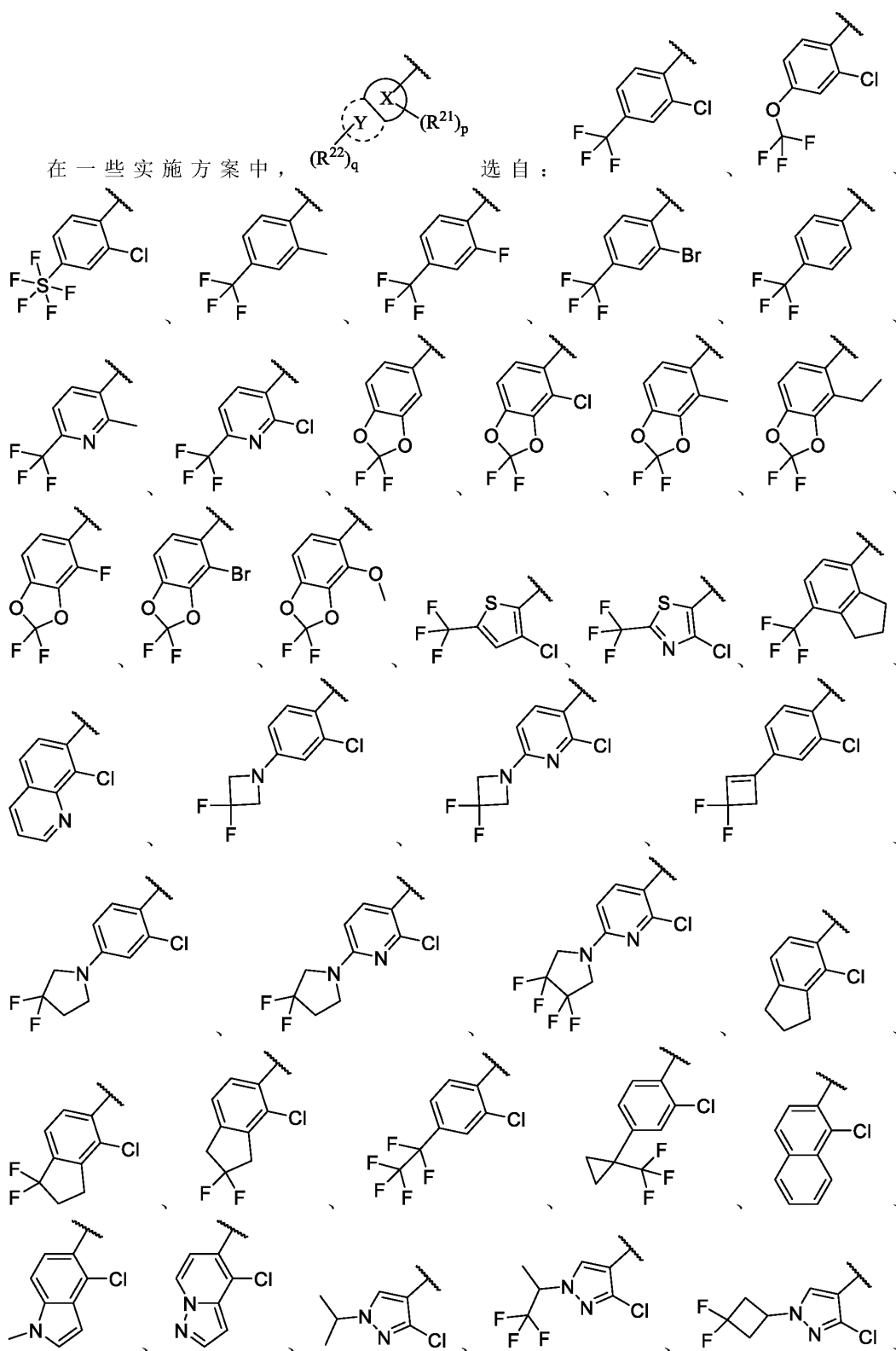


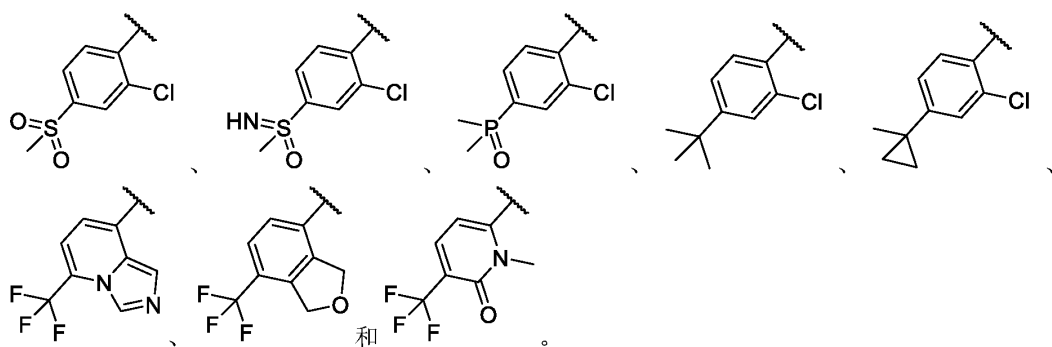
在一些实施方案中， R^{21} 和 R^{22} 在每次出现时各自独立地选自 H、卤素、 $-SF_5$ 、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-6} 环烷基、3-10 元杂环基、 $-O-(C_{1-6}$ 烷基)、 $-S(=O)_2-(C_{1-6}$ 烷基)、 $-S(=O)_2-(C_{3-6}$ 环烷基)、 $-S(=O)(=NR^a)R^b$ 、 $-P(=O)(C_{1-6}$ 烷基) $_2$ 、 $-(C_{3-6}$ 亚环烷基)-CN 和 $-(C_{3-6}$ 亚环烷基)- C_{1-6} 烷基，所述烷基、亚环烷基、环烷基和杂环基各自任选地被一个或多个独立地选自下列的取代基取代：卤素、 C_{1-6} 烷基和卤代 C_{1-6} 烷基。

在优选的实施方案中， R^{21} 和 R^{22} 在每次出现时各自独立地选自 H、卤素、 $-SF_5$ 、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-6} 环烷基、3-10 元杂环基和 $-O-(C_{1-6}$ 烷基)，所述烷基、环烷基和杂环基各自任选地被一个或多个独立地选自下列的取代基取代：卤素、 C_{1-6} 烷基和卤代 C_{1-6} 烷基。









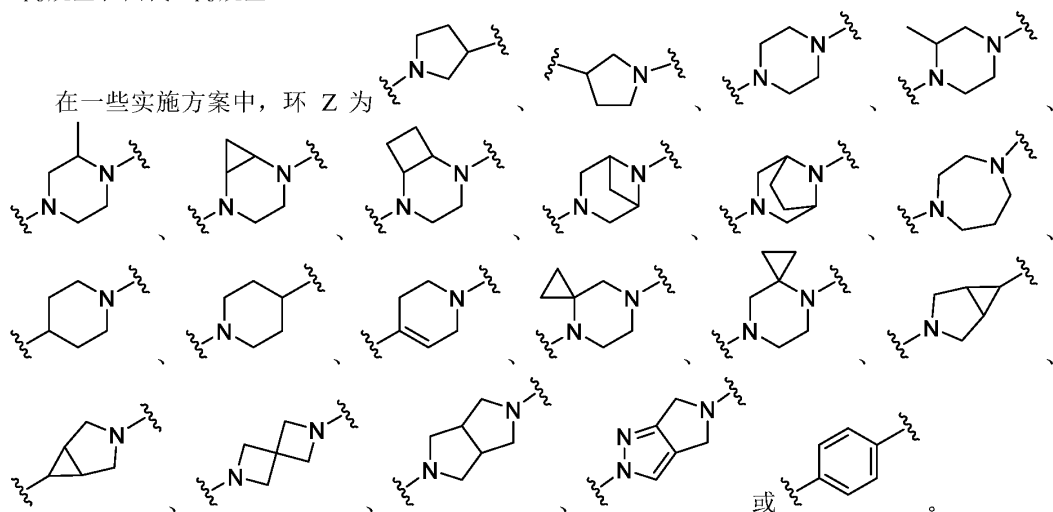
在一些实施方案中, R^3 为 H、 C_{1-6} 烷基、 $-OR^a$ 或 $-SR^a$; 优选地, R^3 为 H 或 C_{1-6} 烷基。

在优选的实施方案中, R^3 为 H、甲基、乙基、 $-O-CH_3$ 或 $-S-CH_3$; 最优选地, R^3 为 H 或甲基。

在优选的实施方案中, 当 m 大于 1 时, 位于同一环原子或者相邻环原子的两个 R^3 连同其所连接的基团任选地共同构成 C_{3-6} 烃环(优选环丙基环), 所述烃环任选地被一个或多个独立地选自下列的取代基取代: 卤素、 C_{1-6} 烷基和卤代 C_{1-6} 烷基。

在一些实施方案中, 环 Z 为 3-10 元杂环或苯环; 优选为 5-10 元杂环; 更优选为 5-6 元杂环; 并且

所述杂环和苯环在每次出现时各自任选地被一个或多个独立地选自下列的取代基取代: 卤素、 C_{1-6} 烷基和卤代 C_{1-6} 烷基。



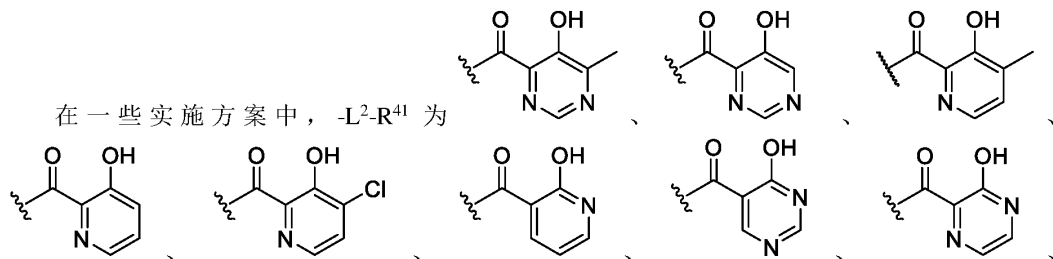
在一些实施方案中, L^2 为 $-C(=O)-$ 、 C_{1-6} 亚烷基或 $-NRC(=O)-$, 其中 R 为 H 或 C_{1-6} 烷基。

在一些实施方案中, L^2 为 $-C(=O)-$ 或 $-NRC(=O)-$, 其中 R 为 H 或 C_{1-6} 烷基。

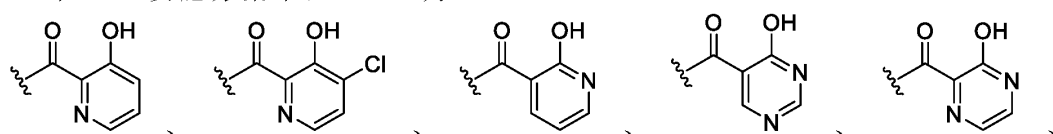
在优选的实施方案中, L^2 为 $-C(=O)-$ 、 $-CH_2-$ 、 $-CD_2-$ 。

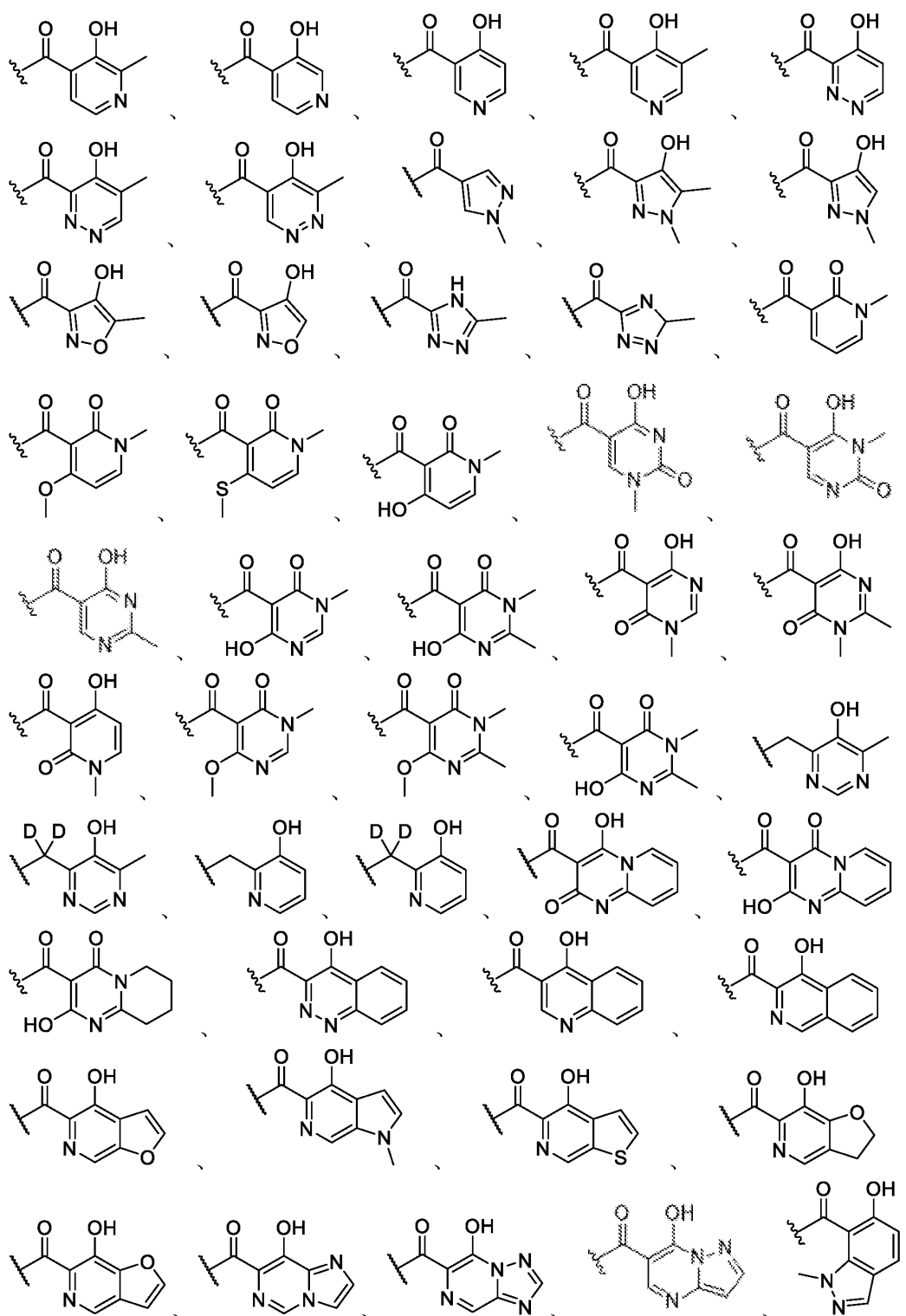
在优选的实施方案中, L^2 为 $-C(=O)-$ 。

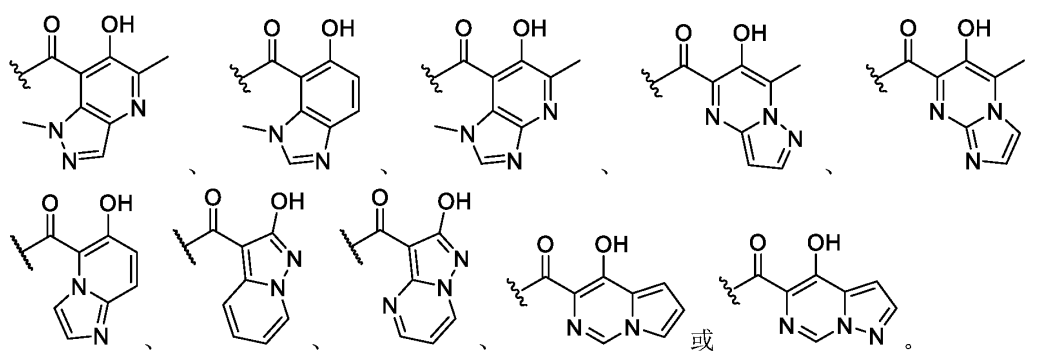
在一些实施方案中, R^{41} 选自 3-10 元杂环、 C_{6-10} 芳环和 5-14 元杂芳环, 所述杂环、芳环和杂芳环各自任选地被一个或多个独立地选自下列的取代基取代: 卤素、 $-OH$ 、 C_{1-6} 烷基、 $-O-C_{1-6}$ 烷基和 $-S-C_{1-6}$ 烷基, 优选地, 所述杂环、芳环和杂芳环至少被 $-OH$ 或 $-O-C_{1-6}$ 烷基取代。



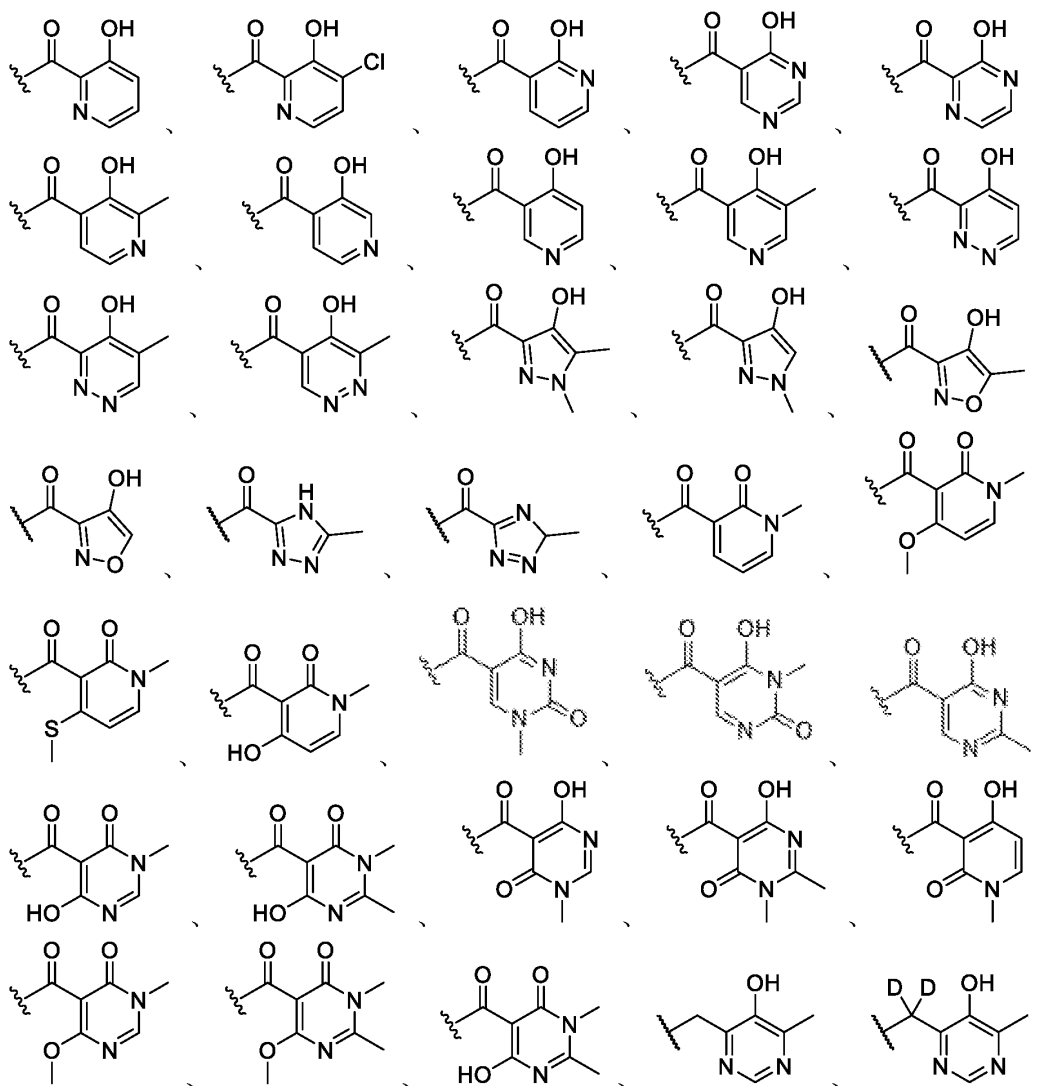
在一些实施方案中, $-L^2-R^{41}$ 为

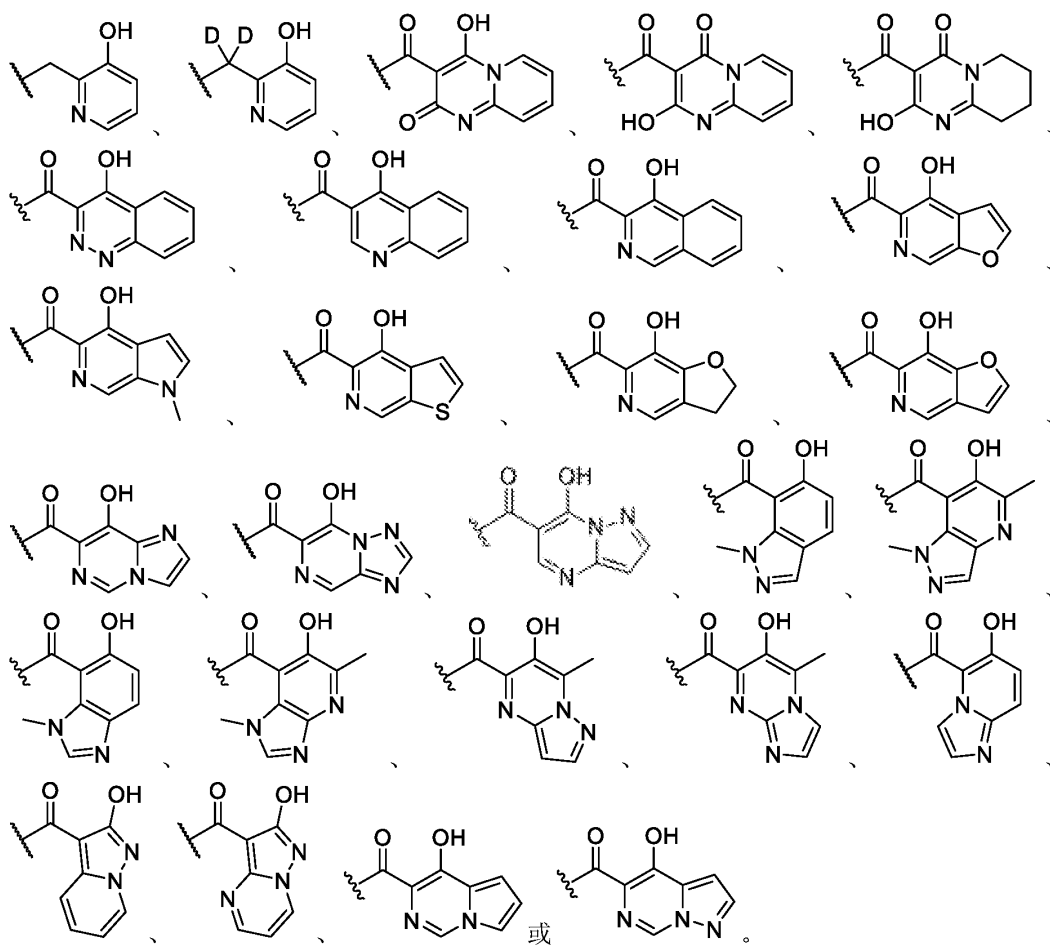




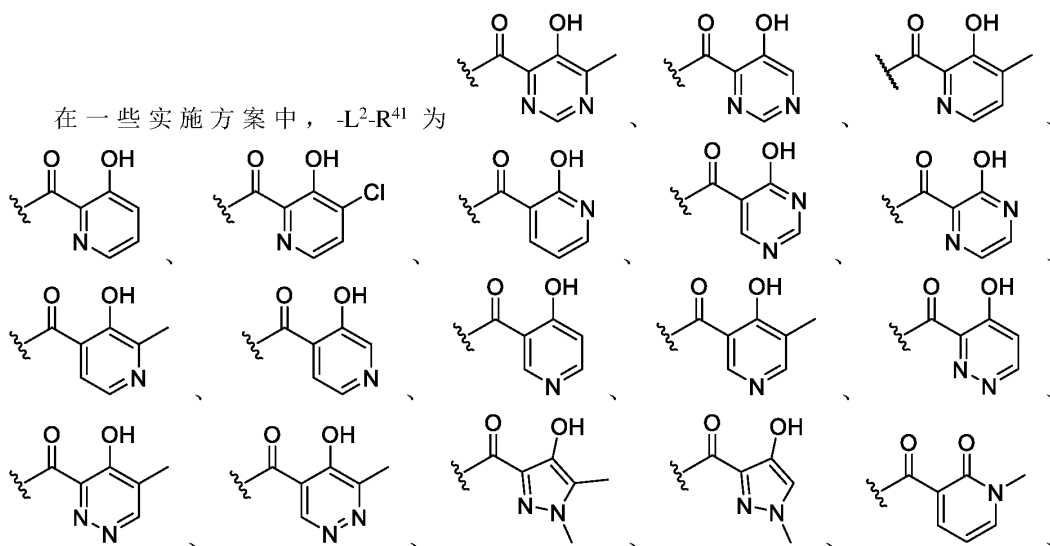


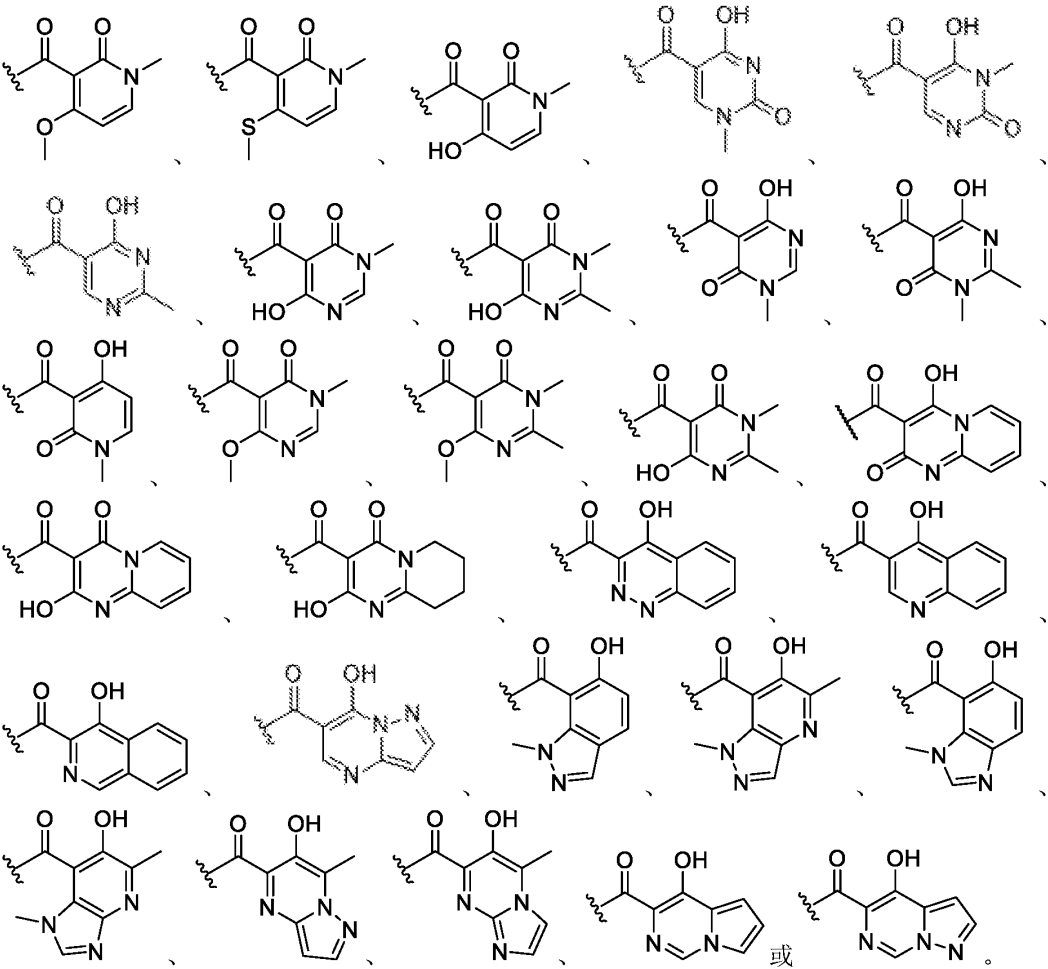
在一些实施方案中， L^2-R^{41} 为



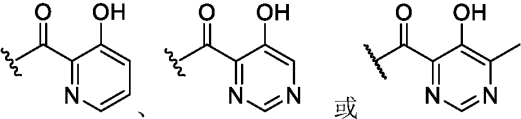


在一些实施方案中， $-L^2-R^{41}$ 为





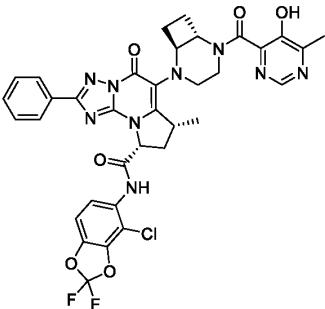
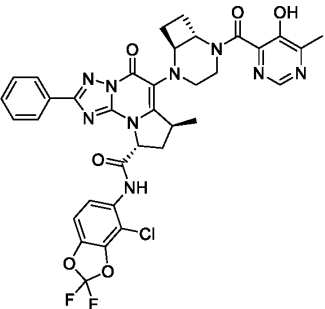
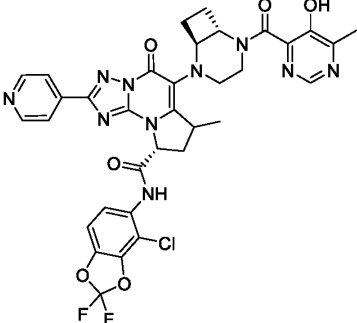
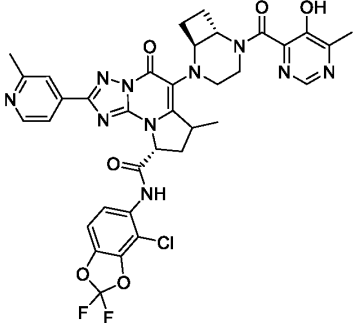
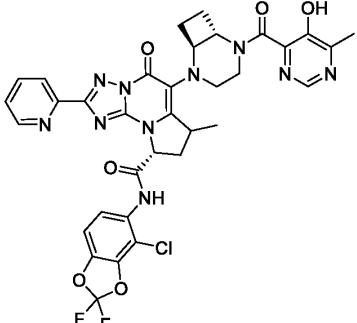
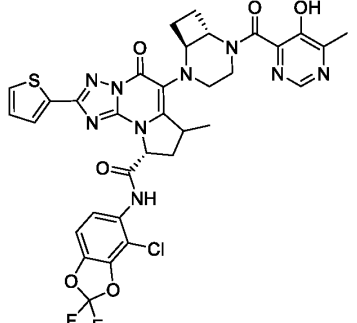
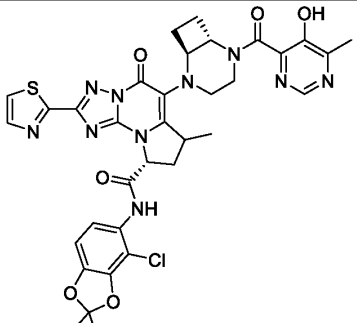
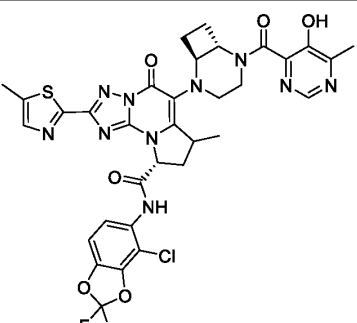
在一些实施方案中，R⁴¹ 为 5-6 元杂芳环，优选为 6 元杂芳环，更优选为吡啶环或嘧啶环，其至少被一个-OH 取代。

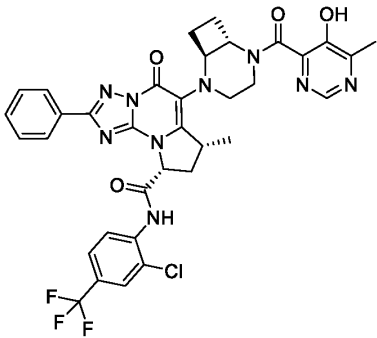
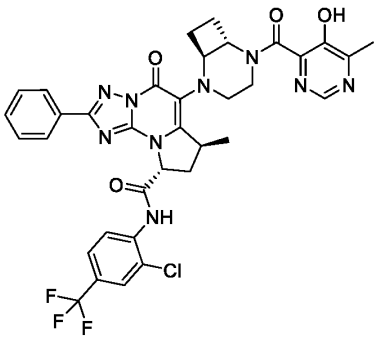
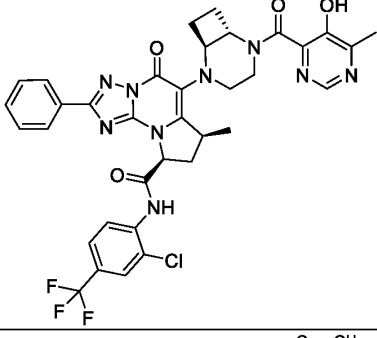
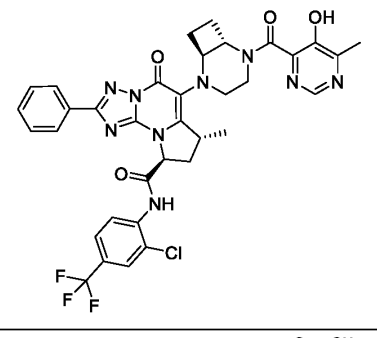
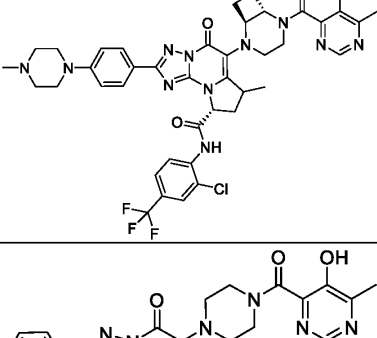
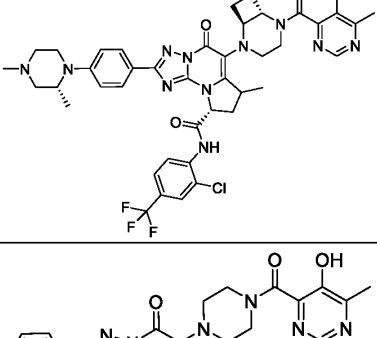
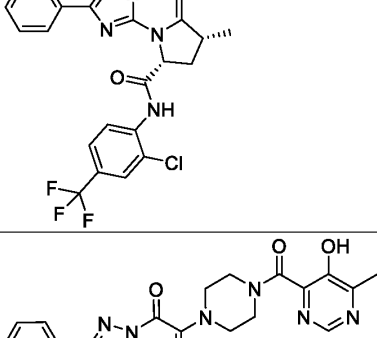
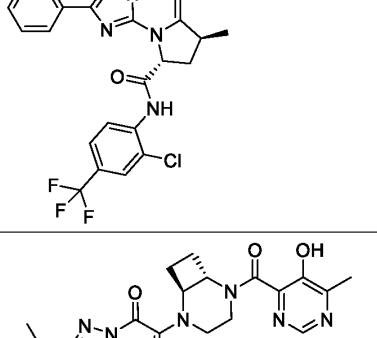
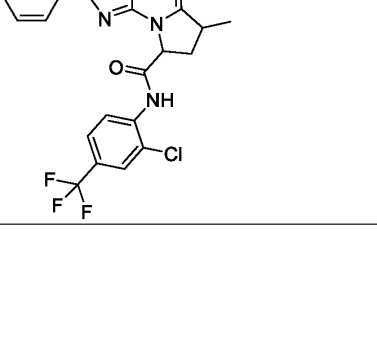
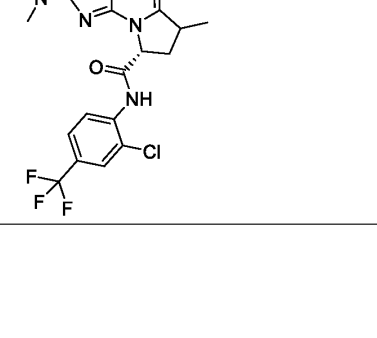


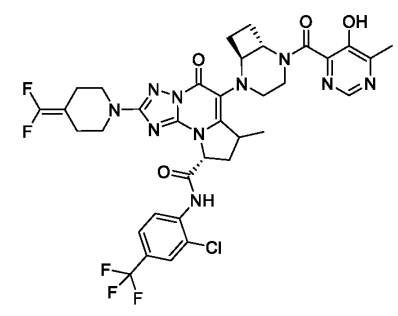
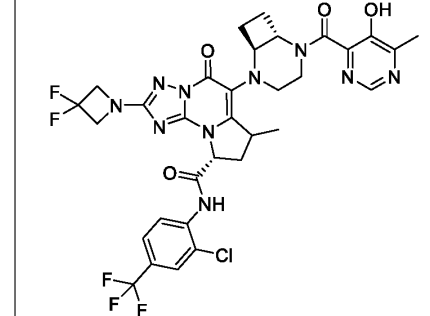
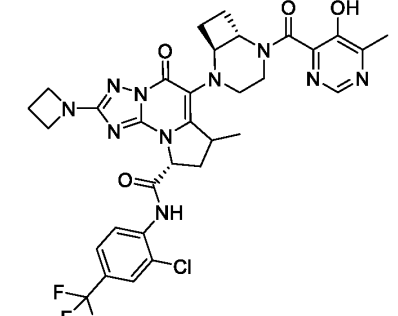
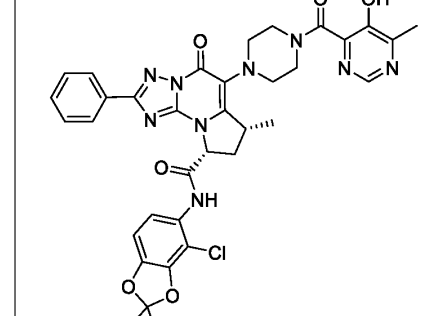
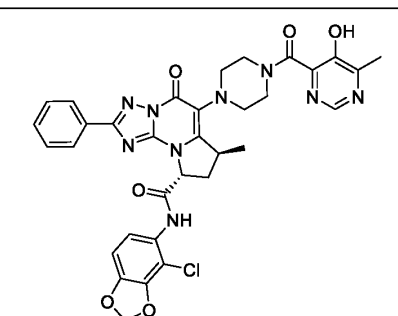
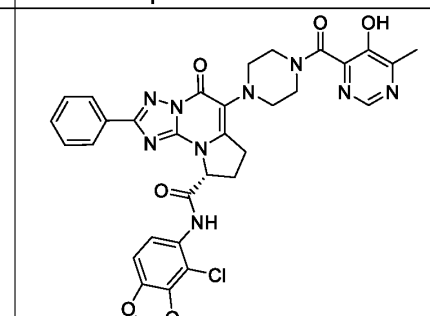
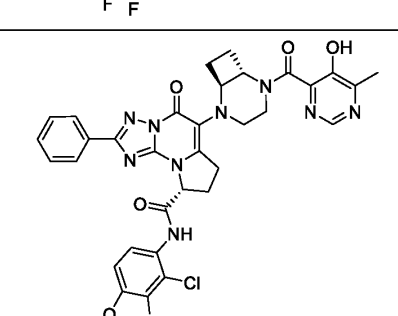
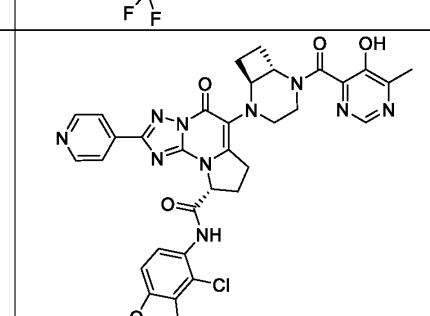
在一些实施方案中，-L²-R⁴¹ 为
本公开涵盖对各个实施方案进行任意组合所得的技术方案/化合物。

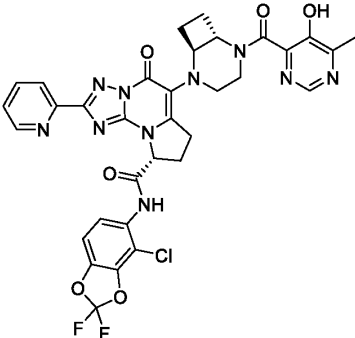
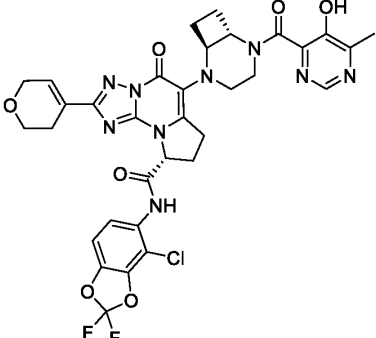
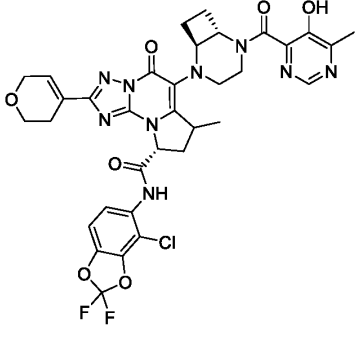
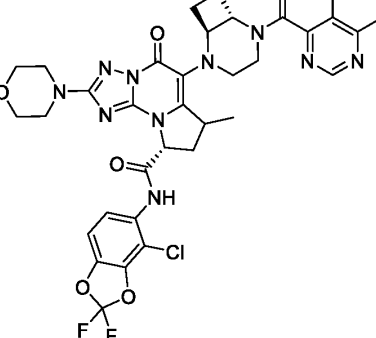
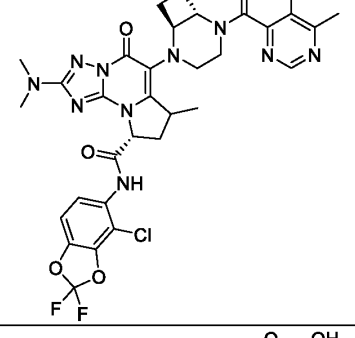
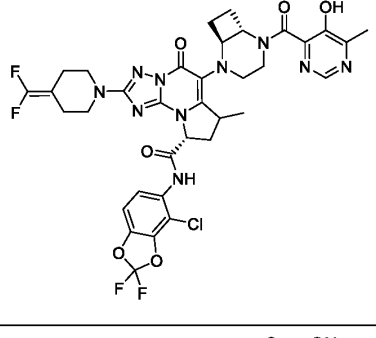
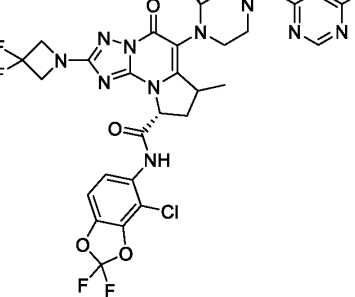
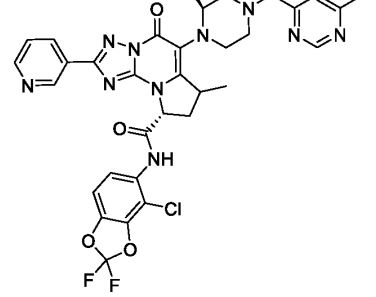
在优选的实施方案中，本公开提供化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、阻转异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、代谢物、同位素标记的化合物或前药，其中所述化合物选自：

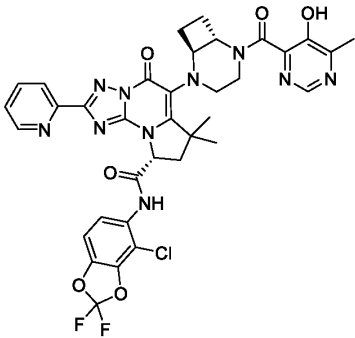
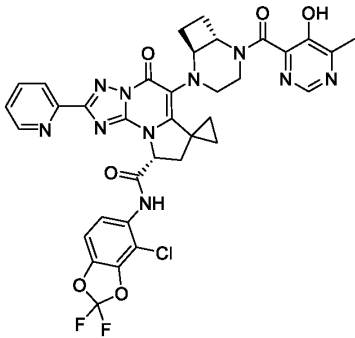
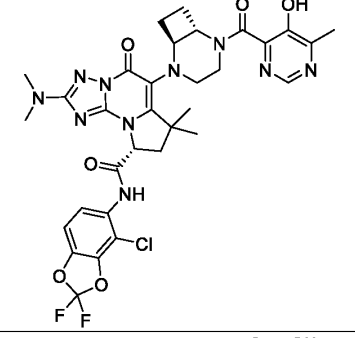
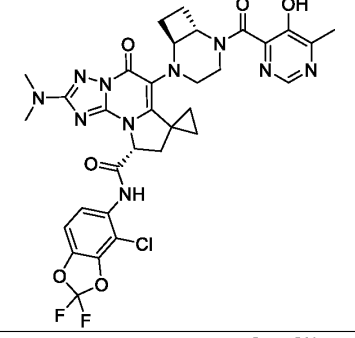
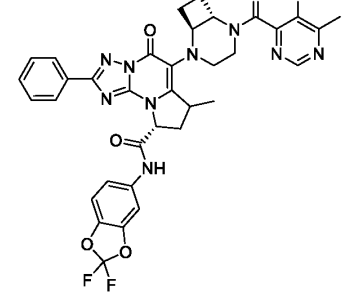
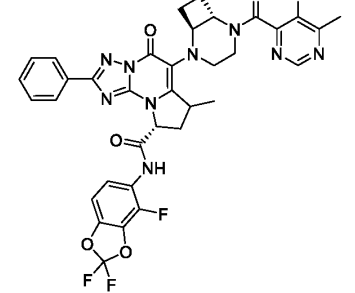
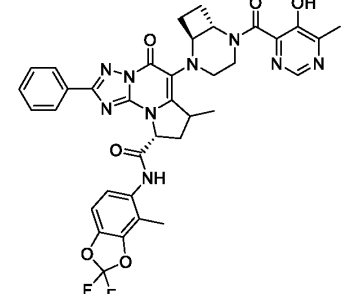
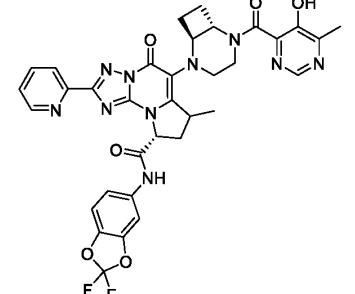
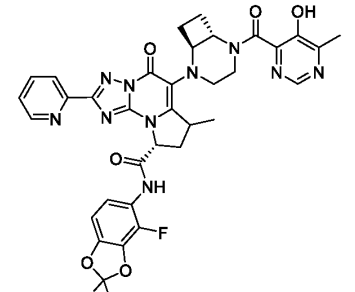
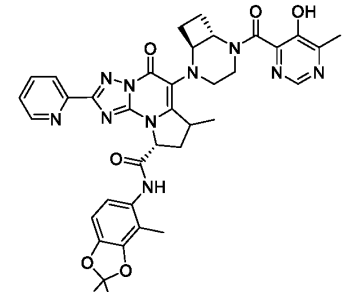
化合物 编号	结构	化合物 编号	结构
-----------	----	-----------	----

C1		C2	
C3		C4	
C5		C6	
C7		C8	

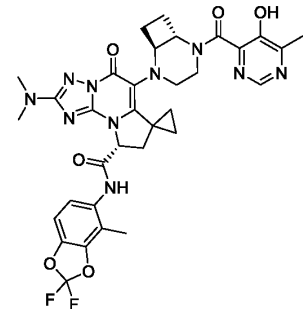
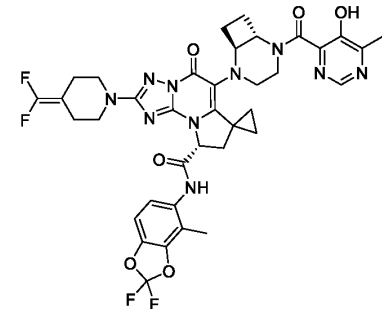
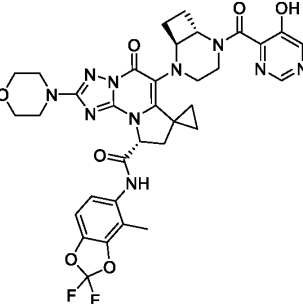
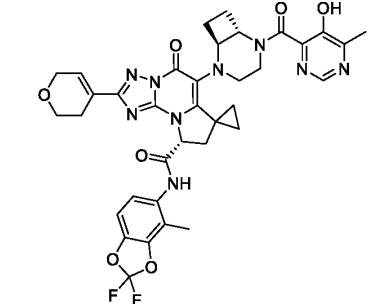
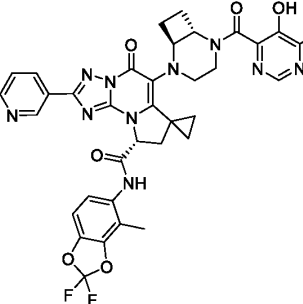
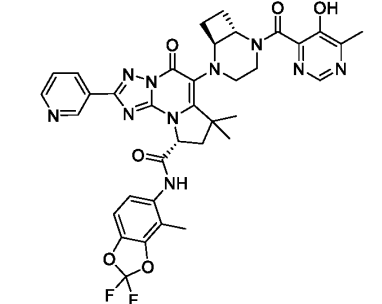
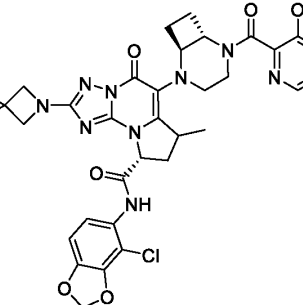
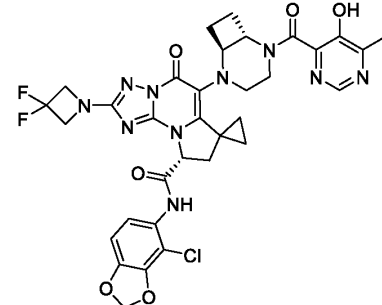
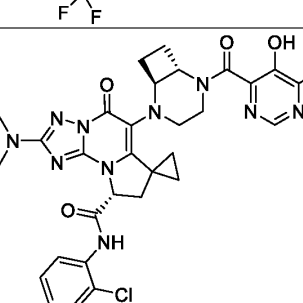
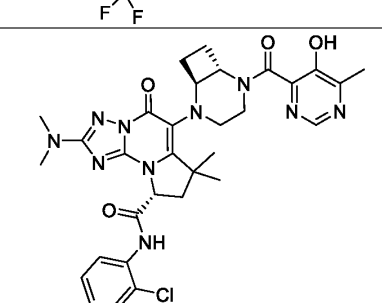
C9		C10	
C11		C12	
C17		C18	
C19		C20	
C21		C22	

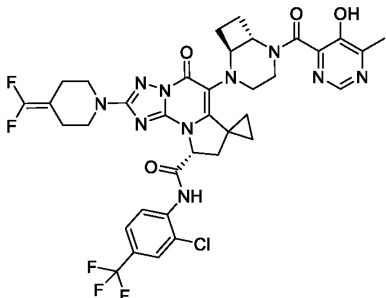
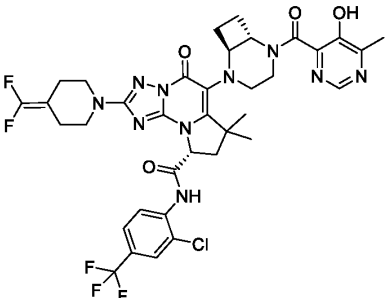
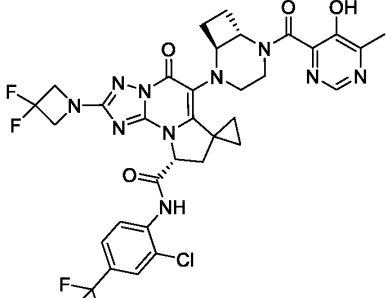
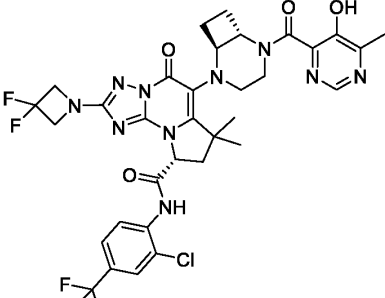
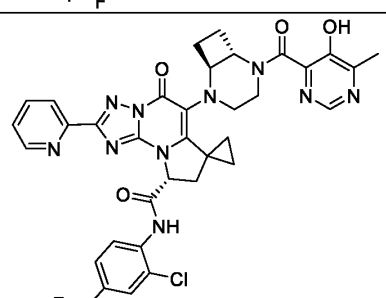
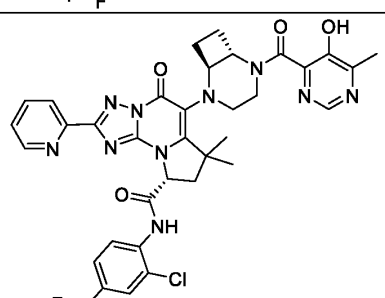
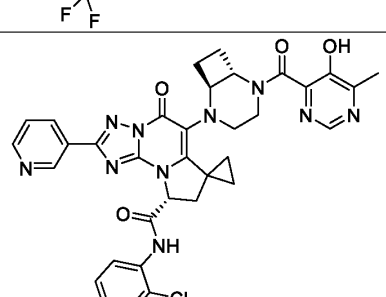
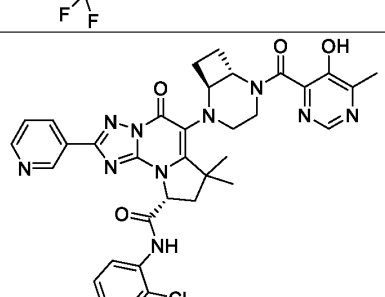
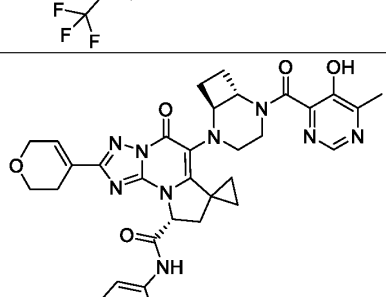
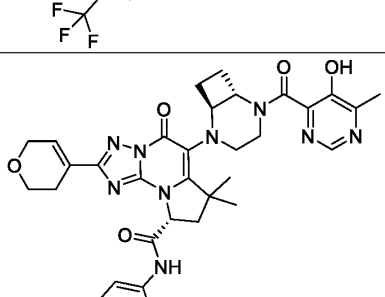
C23		C24	
C25		C26	
C27		C28	
C29		C30	

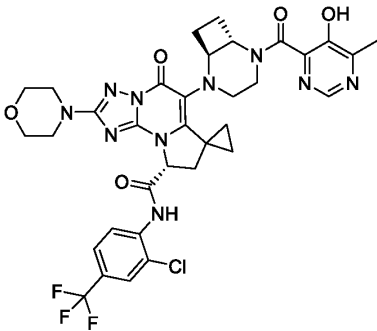
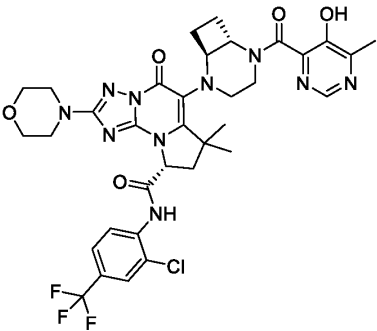
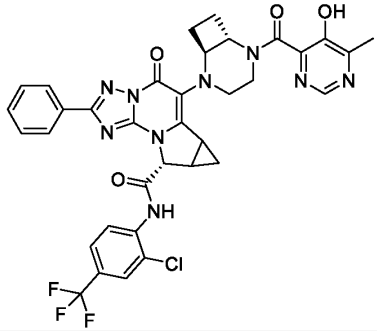
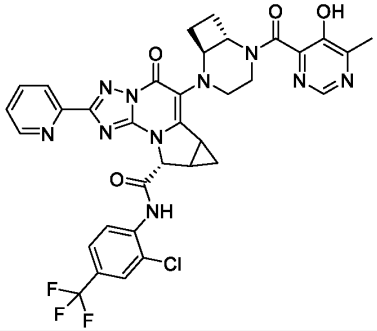
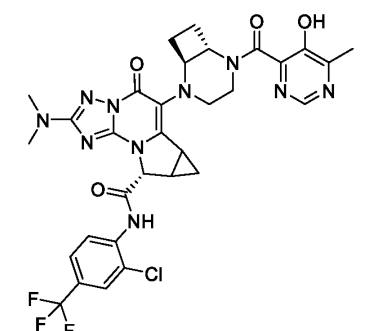
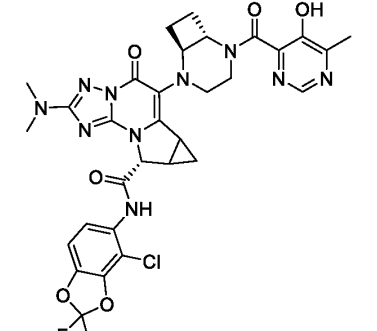
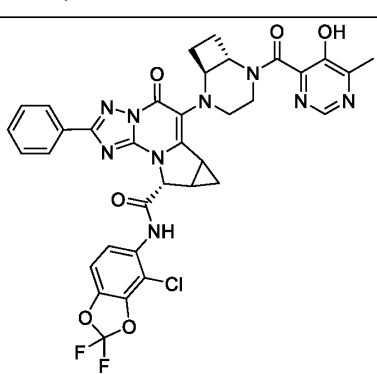
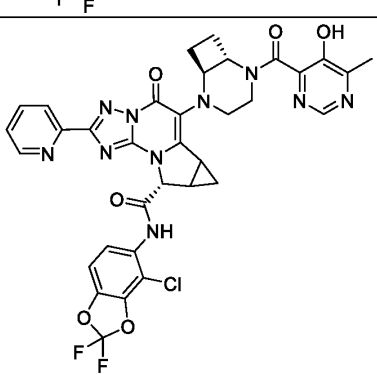
C31		C32	
C33		C34	
C35		C36	
C37		C38	

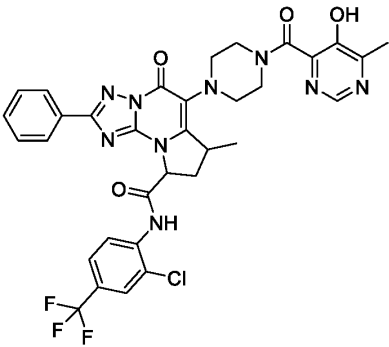
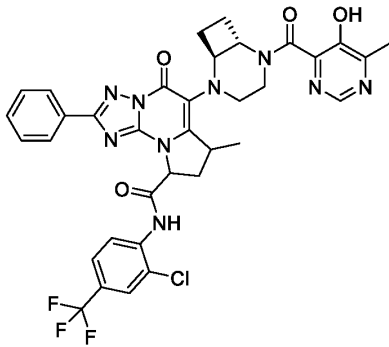
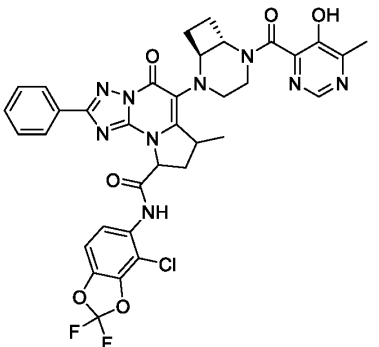
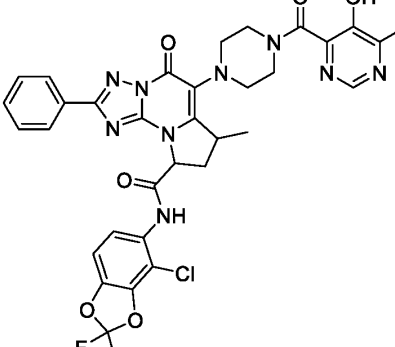
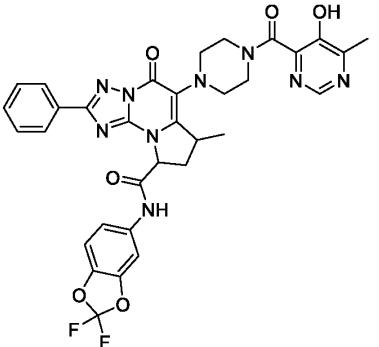
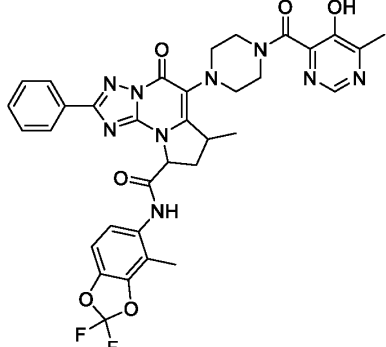
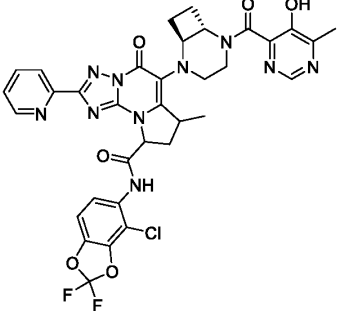
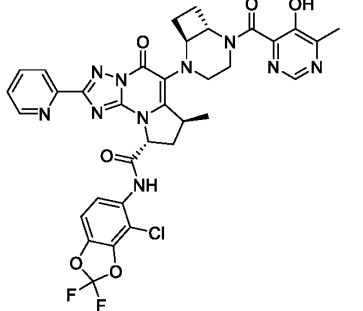
C39		C40	
C41		C42	
C43		C44	
C45		C46	
C47		C48	

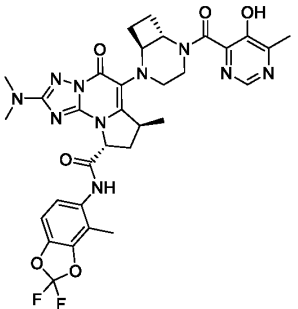
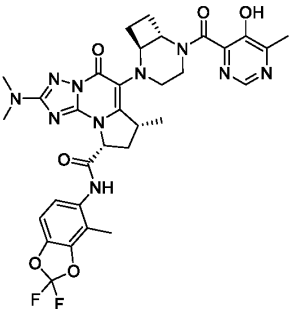
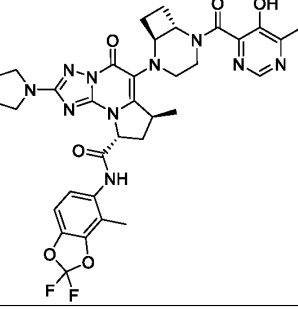
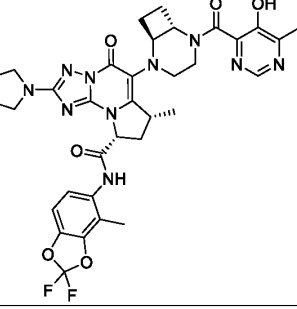
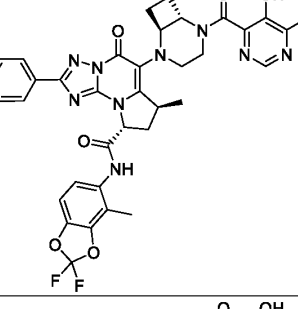
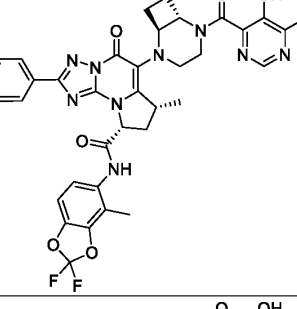
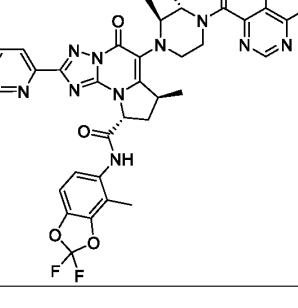
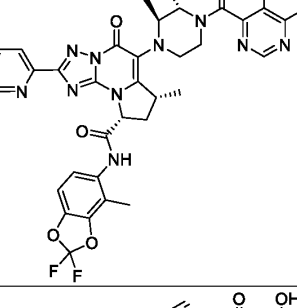
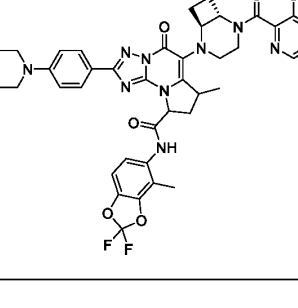
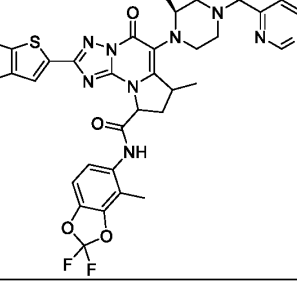
C49		C50	
C51		C52	
C53		C54	
C55		C56	
C57		C58	

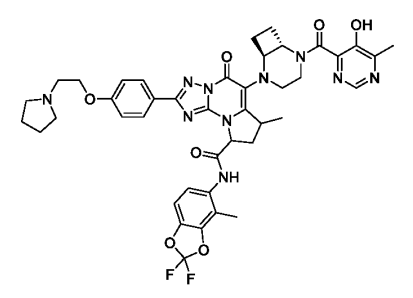
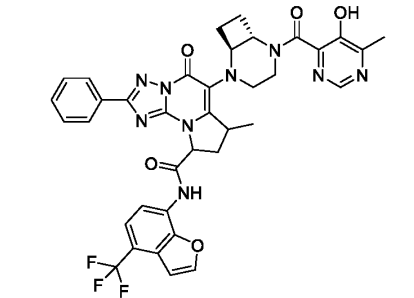
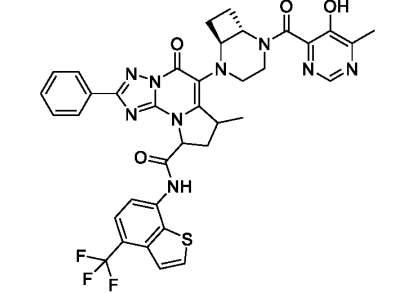
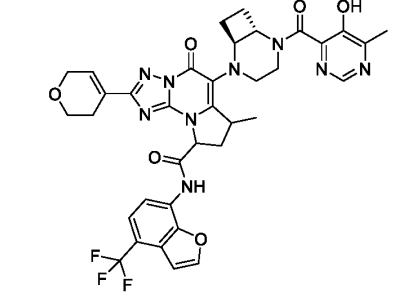
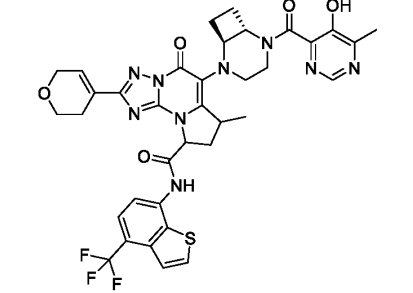
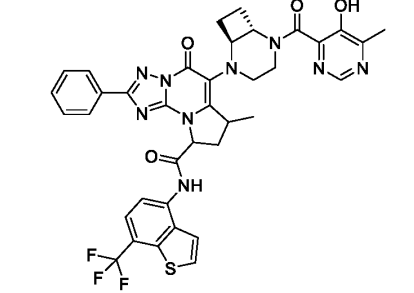
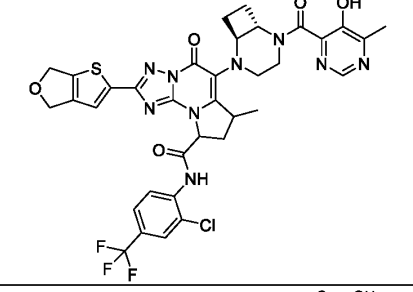
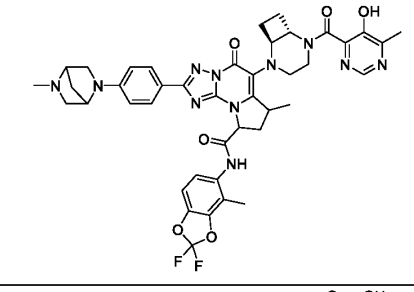
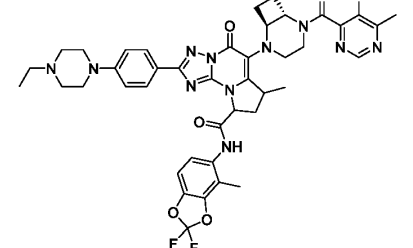
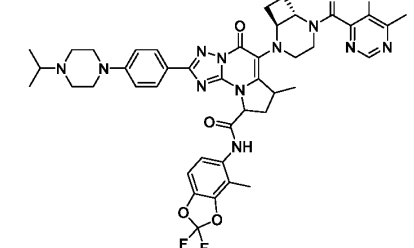
C59		C60	
C61		C62	
C63		C64	
C65		C66	
C67		C68	

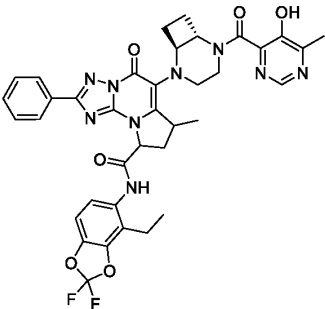
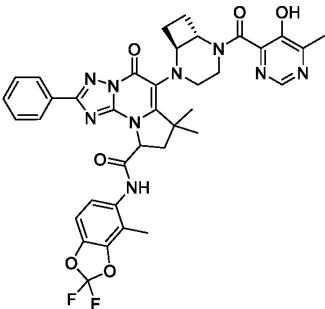
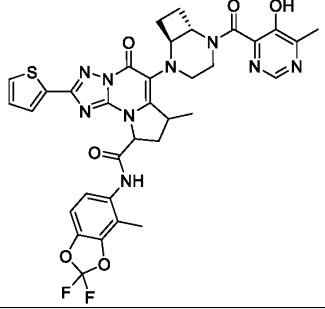
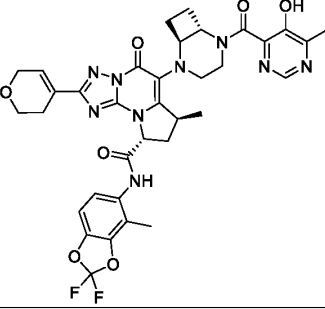
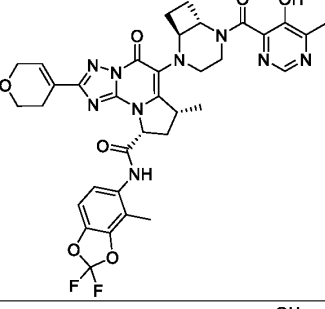
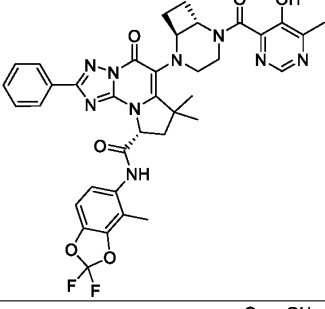
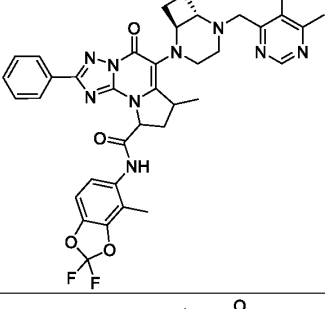
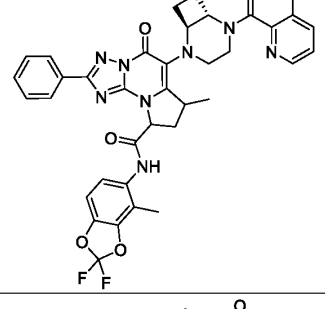
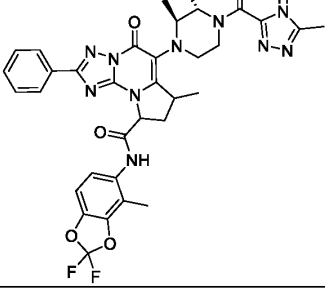
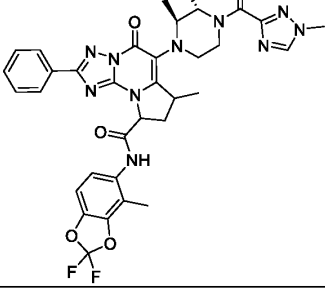
C69		C70	
C71		C72	
C73		C74	
C75		C76	
C77		C78	

C79		C80	
C81		C82	
C83		C84	
C85		C86	

C87		C88	
C89		C90	
C91		C92	
C93		C94	

C95		C96	
C97		C98	
C99		C100	
C101		C102	
C103		C104	

C105		C106	
C107		C108	
C109		C110	
C111		C112	
C113		C114	

C115		C116	
C117		C118	
C119		C120	
C121		C122	
C123		C124	

C125		C126	
C127		C128	
C129		C130	
C131		C132	
C133		C134	

C135		C136	
C137		C138	
C139		C140	
C141		C142	
C143		C144	

C145		C146	
C147		C148	
C149		C150	

药物组合物 and 治疗方法

在一些实施方案中，本发明提供药物组合物，其包含预防或治疗有效量的本发明的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、代谢物、同位素标记的化合物或前药以及一种或多种药学上可接受的载体。所述药物组合物优选为固体制剂、半固体制剂、液体制剂或气态制剂。在一些实施方案中，所述药物组合物还可包含一种或多种其它治疗剂。

在一些实施方案中，本发明提供本发明的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、代谢物、同位素标记的化合物或前药或者本发明的药物组合物在制备用作 WRN 抑制剂的药物中的用途。

在一些实施方案中，本发明提供本发明的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、代谢物、同位素标记的化合物或前药或者本发明的药物组合物，其用作 WRN 抑制剂。

在一些实施方案中，本发明提供预防或治疗癌症(优选以微卫星高度不稳定(MSI-H)或错配修复缺陷(dMMR)为特征的癌症)的方法，所述方法包括向需要其的个体给药有效量的本发明的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、代谢物、同位素标记的化合物或前药或者本发明的药物组合物。

在一些实施方案中，所述癌症包括结肠癌、胃癌、子宫内膜癌、子宫癌、肾上腺皮质癌、宫颈癌、食道癌、乳腺癌、肾癌、前列腺癌和卵巢癌。

本发明中“药学上可接受的载体”是指与治疗剂一同给药的稀释剂、辅剂、赋形剂或媒介物，并且其在合理的医学判断的范围内适于接触人类和/或其它动物的组织而没有过度的毒性、刺激、过敏反应或与合理的益处/风险比相应的其它问题或并发症。

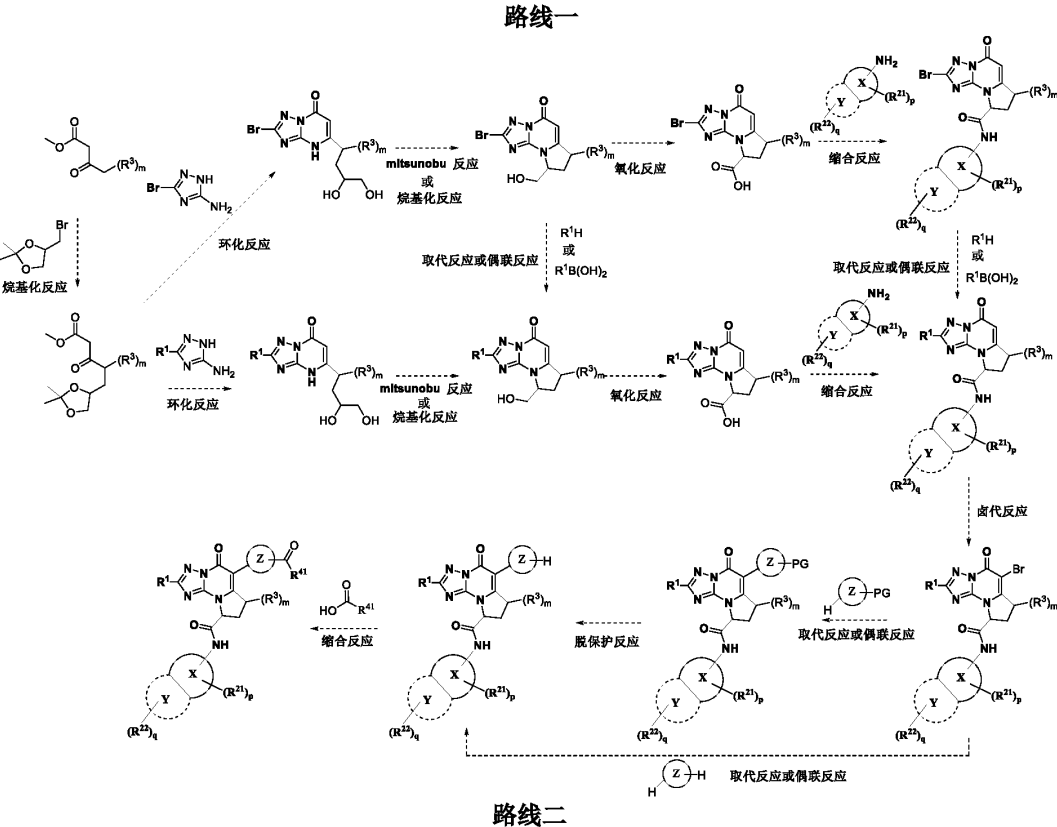
除非另外说明，否则如本文中所使用，术语“治疗”意指逆转、减轻、抑制这样的术语所应用的

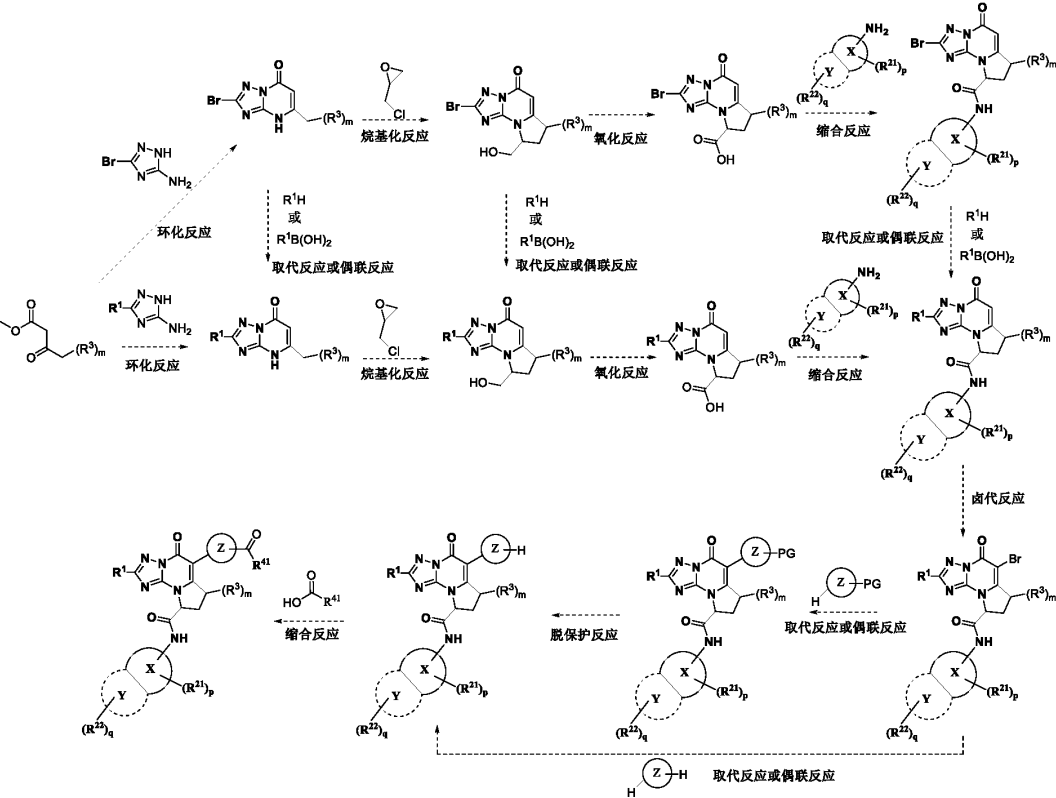
病症或病况或者这样的病症或病况的一或多种症状的进展，或预防这样的病症或病况或者这样的病症或病况的一或多种症状。

如本文所使用的“个体”包括人或非人动物。示例性人个体包括患有疾病(例如本文所述的疾病)的人个体(称为患者)或正常个体。本发明中“非人动物”包括所有脊椎动物，例如非哺乳动物(例如鸟类、两栖动物、爬行动物)和哺乳动物，例如非人灵长类、家畜和/或驯化动物(例如绵羊、犬、猫、奶牛、猪等)。

在另一种实施方案中，本发明的药物组合物还可以包含一种或多种另外的治疗剂或预防剂。

通用合成路线：





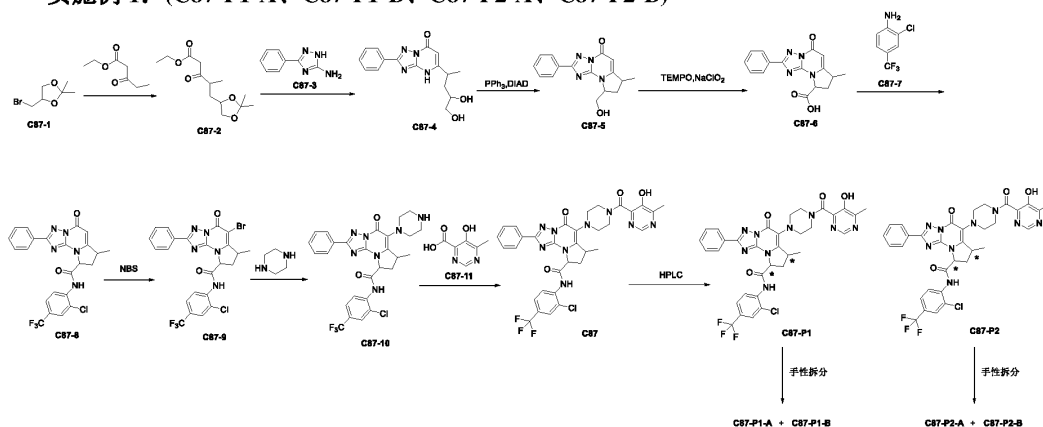
实施例

以下结合实施例进一步描述本发明，但提供这些实施例并非意在限制本发明的范围。
本发明中的缩写具有以下含义：

缩写	含义
ACN	乙腈
AgBF ₄	四氟硼酸银
Boc	叔丁氧羰基
CMPI	2-氯-1-甲基吡啶鎓碘化物
DCE	1,2-二氯乙烷
DCM	二氯甲烷
DIAD	偶氮二羧酸二异丙酯
DIEA/DIPEA	N,N-二异丙基乙胺
Diox/dioxane	1,4-二氧六环
DMF	N,N-二甲基甲酰胺
DMSO	二甲基亚砷
DPPA	叠氮磷酸二苯酯
EDCI	1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺
Et	乙基
Et ₃ N/NEt ₃	三乙胺
EtOAc/EA	乙酸乙酯
EtOH	乙醇
FA	甲酸
h/hrs	小时
HCl	盐酸

Hex	己烷
HOAt	N-羟基-7-氮杂苯并三氮唑
HOBT	1-羟基苯并三唑
HPLC	高效液相色谱法
K ₂ CO ₃	碳酸钾
LCMS	液相色谱质谱联用
LDA	二异丙基氨基锂
MeOH	甲醇
min	分钟
NaOH	氢氧化钠
NBS	N-溴代琥珀酰亚胺
NCS	N-氯代琥珀酰亚胺
n-BuLi	正丁基锂
O.N	过夜
PE	石油醚
p-TsOH	对甲苯磺酸
Pd(dppf)Cl ₂	1,1'-双(二苯基膦)二茂铁二氯化钯
t-BuOH	叔丁醇
TEA	三乙胺
TEMPO	2,2,6,6-四甲基哌啶氧化物
TFA	三氟乙酸
THF	四氢呋喃
TLC	薄层色谱法
r.t./rt	室温

实施例 1: (C87-P1-A、C87-P1-B、C87-P2-A、C87-P2-B)



1) 中间体 **C87-2** 的合成:

将化合物 **C87-1** (18.46 g, 128.2 mmol) 加入到四氢呋喃(600 mL)中, 冷却到 0°C, 慢慢加入氢氧化钠(5.12 g, 128.2 mmol), 氮气置换三次, 0°C 搅拌反应半小时。然后慢慢滴加正丁基锂溶液(80 mL, 128.2 mmol), 氮气保护下 0°C 搅拌反应半小时, 接着将丙酰乙酸乙酯(25 g, 128.2 mmol) 加入到反应液中, 0°C 搅拌反应半小时后慢慢升至室温反应过夜。TLC 显示原料基本反应完全, 反应液用饱和氯化铵溶液淬灭, 乙酸乙酯萃取, 有机相再用饱和食盐水洗后用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩, 剩余物经柱层析(PE/EA=90/10)纯化得到黄色油状物 **C87-2** (11.96 g, 收率 36.2%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 4.21-4.10 (m, 2H), 4.05-3.98 (m, 2H), 3.77 (s, 2H), 3.71-3.65 (m, 1H), 2.83-2.76 (m, 1H), 1.94-1.85 (m, 1H), 1.60-1.51 (m, 1H), 1.35 (s, 3H), 1.28 (m, 3H), 1.23 (t, *J*=9.6 Hz, 3H), 1.11 (d, *J*=9.6 Hz, 3H)。

2) 中间体 **C87-4** 的合成:

将化合物 **C87-2** (11.96 g, 46.3 mmol)、**C87-3** (7.4 g, 46.3 mmol)和无水对甲苯磺酸(0.80 g,

4.63 mmol)加入到正丁醇(15 mL)中,反应液在氮气保护下 140°C下搅拌反应 16 小时,LC-MS 显示原料反应完全,反应液冷却后减压浓缩,剩余物经柱层析(DCM/MeOH=85/15)纯化得到白色固体 **C87-4** (10.1 g, 收率 69.6%)。LCMS (ESI) m/z: 315.0 [M+H]⁺。

3) 中间体 **C87-5** 的合成:

将化合物 **C87-4** (10.1 g, 32.1 mmol)和三苯基膦(12.6 g, 48.2 mmol)加入到四氢呋喃(300 mL)中,冷却到 0°C,然后慢慢滴加 DIAD (9.57 g, 48.2 mmol),氮气氛围下慢慢升至室温,搅拌反应过夜。LC-MS 显示原料反应完全,反应液冷却后减压浓缩,剩余物经柱层析(DCM/MeOH=85/15)纯化得到白色固体 **C87-5** (7.46 g, 收率 78.3%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.14-8.12 (m, 2H), 7.55-7.52 (m, 3H), 5.95-5.95 (m, 1H), 5.03-5.98 (m, 1H), 4.76-4.74 (m, 1H), 4.49-4.10 (m, 1H), 3.72-3.67 (m, 1H), 3.54-3.36 (m, 1H), 2.62-2.45 (m, 1H), 2.11-1.90 (m, 1H), 1.39-1.31 (m, 3H)。

4) 中间体 **C87-6** 的合成:

将 TEMPO (0.83 g, 5.3 mmol)加入到 NaH₂PO₄ (200 mL, 133.1 mmol, 0.67M)的水溶液中,然后加入化合物 **C87-5** (7.88 g, 26.6 mmol)的乙腈(50 mL)悬浊液,最后加入 NaClO₂ (4.79 g, 53.2 mmol)和 NaClO 溶液(0.8 mL)的水溶液(40 mL),氮气置换三次,然后升温至 50°C,氮气氛围下搅拌反应过夜。LC-MS 显示原料反应完全,反应液冷却至室温经反相柱层析(H₂O/ACN=85/15)纯化得到白色固体 **C87-6** (5.0 g, 收率 61.1%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.15-8.12 (m, 2H), 7.58-7.53 (m, 3H), 7.31-7.05 (m, 2H), 5.97 (s, 1H), 4.84-4.80 (m, 1H), 2.83-2.73 (m, 1H), 2.02-1.97 (m, 1H), 1.34 (d, *J*=9.6 Hz, 3H)。

5) 中间体 **C87-8** 的合成:

将化合物 **C87-6** (500 mg, 1.61 mmol)和两滴 DMF 加入到 DCE (15 mL)中,然后慢慢滴加 POCl₃ (500 mg, 3.22 mmol),氮气置换三次,升温至 80°C,氮气氛围下搅拌反应 1 小时,LC-MS 显示原料反应完全,反应液降至室温,慢慢加入化合物 **C87-7** (1.58 g, 8.06 mmol)的吡啶(2 mL)溶液,升温至 80°C,氮气氛围下继续搅拌反应 1 小时,LC-MS 显示原料反应完全,反应液降至室温,用饱和碳酸氢钠水溶液洗涤,乙酸乙酯萃取,有机相再用饱和食盐水洗后用无水硫酸钠干燥,过滤,滤液减压浓缩,剩余物经柱层析(PE/EA=50/50)纯化得到黄色固体 **C87-8** (340 mg, 收率 43.3%)。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.60 (s, 1H), 8.23-8.10 (m, 2H), 8.04-8.02 (m, 2H), 7.77-7.75 (m, 1H), 7.61-7.54 (m, 4H), 5.70 (d, *J*=10.8 Hz, 1H), 3.56-3.45 (m, 1H), 2.78-2.71 (m, 1H), 2.48-2.41 (m, 1H), 1.41 (d, *J*=9.2 Hz, 3H)。

6) 中间体 **C87-9** 的合成:

将化合物 **C87-8** (340 mg, 0.70 mmol)加入到氯仿(15 mL)中,室温下慢慢加入 NBS (248 mg, 1.39 mmol),氮气置换三次,反应液加热至 50°C,氮气氛围下搅拌反应过夜,LC-MS 显示原料反应完全,反应液冷却至室温,减压浓缩,剩余物经柱层析(PE/EA=65/35)纯化得到黄色固体 **C87-9** (360 mg, 收率 74.7%)。LCMS (ESI) m/z: 566.0 [M+H]⁺。

7) 中间体 **C87-10** 的合成:

将化合物 **C87-9** (218 mg, 0.38 mmol)、哌嗪(664 mg, 7.7 mmol)和 AgBF₄ (150 mg, 0.77 mmol)加入到 DMSO (5 mL)中,氮气置换三次,反应液加热至 120°C,氮气氛围下搅拌反应 2 小时,LC-MS 显示原料反应完全,反应液降至室温,加水洗涤,乙酸乙酯萃取,有机相再用饱和食盐水洗后用无水硫酸钠干燥,过滤,滤液减压浓缩,剩余物经柱层析(DCM/MeOH=85/15, 0.5% NH₃·H₂O)纯化得到黄色固体 **C87-10** (123 mg, 收率 55.9%)。LCMS (ESI) m/z: 572.2 [M+H]⁺。

8) **C87-P1** 和 **C87-P2** 的合成:

将化合物 **C87-11** (24 mg, 0.15 mmol)加入到 DMF (2 mL)中,室温下加入 HOBT (17 mg, 0.12 mmol)和 EDCI (32 mg, 0.16 mmol),氮气保护下室温搅拌 2 小时,然后加入化合物 **C87-10** (63 mg, 0.11 mmol)和 DIEA (43 mg, 0.32 mmol),氮气置换三次,氮气保护下室温搅拌 2 小时,LC-MS 显示原料反应完全,反应液减压浓缩,剩余物经制备型高效液相色谱纯化(RP-PREP-3 SunFire C18 5μm 19*150mm 18min-55-65B, A: H₂O (0.2% FA), B: ACN, UV: 214 nm, 流速 15 ml/min)得到 **C87-P1** (8.0 mg, 收率 10.2%, 保留时间 10.79 分钟)和 **C87-P2** (10.2 mg, 收率 13.0%, 保留时间 11.59 分钟)。

C87-P1 ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.56 (s, 1 H), 8.55 (s, 1 H), 8.08-8.06 (m, 2 H), 7.98-7.96 (m, 2 H), 7.74-7.72 (m, 1 H), 7.51-7.50 (m, 3 H), 5.71-5.67 (m, 1 H), 3.78-3.73 (m, 1 H), 3.38-3.10 (m, 9 H), 2.65-2.62 (m, 1 H), 2.44-2.41 (m, 4 H), 1.52 (d, *J*=7.2 Hz, 3 H)。LCMS (ESI) m/z: 707.9 [M+H]⁺。

C87-P2 ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.56 (s, 1 H), 8.55 (s, 1 H), 8.10-8.07 (m, 2 H), 7.98-7.94 (m, 2 H), 7.75-7.73 (m, 1 H), 7.52-7.50 (m, 3 H), 5.62-5.59 (m, 1 H), 3.77-3.73 (m, 1 H), 3.34-3.10 (m, 9 H), 3.07-2.99 (m, 1 H), 2.44 (s, 3 H), 2.15 (d, *J*=13.6 Hz, 1 H), 1.44 (d, *J*=7.2 Hz, 3 H)。LCMS (ESI) m/z:

707.9 [M+H]⁺.

9) **C87-P1-A**、**C87-P1-B**、**C87-P2-A**、**C87-P2-B**的合成:

化合物**C87-P1** (8.0 mg)经手性拆分(IBN, ACN:IPA:TFA=90:10:0.3, 25 ml/min, 254 nm)得到**C87-P1-A** (2.8 mg, 收率35.0%, 保留时间6.98分钟)和**C87-P1-B** (2.6 mg, 收率32.5%, 保留时间12.46分钟)。

C87-P1-A ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.75 (s, 1 H), 8.15 (s, 2 H), 8.08 (d, *J*=7.6 Hz, 1 H), 7.82 (s, 1 H), 7.60 (d, *J*=7.2 Hz, 1 H), 7.46 (s, 3 H), 5.70 (s, 1 H), 3.87 (s, 1 H), 3.87-3.31 (m, 4 H), 2.78 (s, 1 H), 2.78-2.61 (m, 3 H), 2.52 (s, 1 H), 1.99-1.65 (m, 4 H), 1.28 (s, 3 H). LCMS (ESI) *m/z*: 707.4 [M+H]⁺.

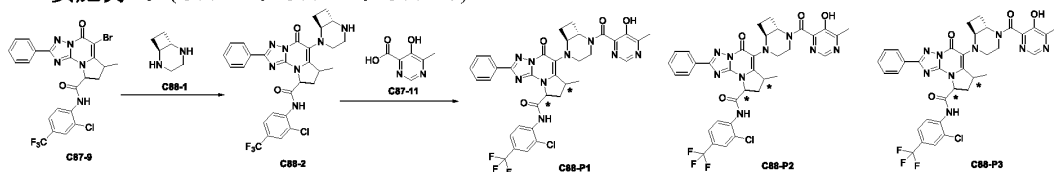
C87-P1-B ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.74 (s, 1 H), 8.14 (d, *J*=7.2 Hz, 2 H), 8.08 (d, *J*=8.4 Hz, 1 H), 7.82 (s, 1 H), 7.60 (d, *J*=8.0 Hz, 1 H), 7.46-7.44 (m, 3 H), 5.71-5.69 (m, 1 H), 3.86 (s, 1 H), 3.85-3.31 (m, 4 H), 2.77 (s, 1 H), 2.76-2.60 (m, 3 H), 2.52 (s, 1 H), 1.99-1.65 (m, 4 H), 1.29 (d, *J*=8.4 Hz, 3 H). LCMS (ESI) *m/z*: 707.4 [M+H]⁺.

化合物**C87-P2** (10.2 mg)经手性拆分(IBN, ACN:IPA:TFA=70:30:0.3, 25ml/min, 254nm)得到**C87-P2-A** (3.4 mg, 收率33.3%, 保留时间6.02分钟)和**C87-P2-B** (3.2 mg, 收率31.3%, 保留时间12.52分钟)。

C87-P2-A ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.57 (s, 1 H), 8.17-8.16 (m, 2 H), 8.08 (d, *J*=8.4 Hz, 1 H), 7.82 (s, 1 H), 7.62 (d, *J*=8.4 Hz, 1 H), 7.47-7.46 (m, 3 H), 5.63 (d, *J*=8.8 Hz, 1 H), 3.87-3.84 (m, 1 H), 3.51-3.30 (m, 8 H), 3.13-3.08 (m, 1 H), 2.52 (s, 3 H), 2.32 (d, *J*=13.6 Hz, 1 H), 1.55 (d, *J*=7.2 Hz, 3 H). LCMS (ESI) *m/z*: 707.5 [M+H]⁺.

C87-P2-B ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.40 (s, 1 H), 8.08-8.06 (m, 2 H), 7.98 (d, *J*=8.4 Hz, 1 H), 7.73-7.72 (m, 1 H), 7.54-7.52 (m, 1 H), 7.37-7.35 (m, 3 H), 5.55-5.51 (m, 1 H), 3.78-3.74 (m, 1 H), 3.38-3.20 (m, 8 H), 3.06-2.98 (m, 1 H), 2.41 (s, 3 H), 2.24-2.20 (m, 1 H), 1.46 (d, *J*=7.6 Hz, 3 H). LCMS (ESI) *m/z*: 707.5 [M+H]⁺.

实施例 2: (C88-P1、C88-P2、C88-P3)



1) 中间体 **C88-2** 的合成:

将化合物 **C87-9** (35 mg, 0.062 mmol)、化合物 **C88-1** (104.07 mg, 0.93 mmol)和四氟硼酸银 (24.18 mg, 0.124 mmol)加入到二甲基亚砜(4 mL)中, 反应液加热至 120°C, 反应 2 小时, LC-MS 显示原料反应完全, 滴加水溶液淬灭, 乙酸乙酯萃取, 有机相再用饱和食盐水洗, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩, 剩余物经柱层析(DCM/MeOH=10/1)纯化得到灰白色固体化合物 **C88-2** (15 mg, 收率 40%)。LCMS (ESI) *m/z* = 598.1 [M+H]⁺.

2) **C88-P1**、**C88-P2**、**C88-P3** 的合成:

将化合物 **C87-11** (8.78 mg, 0.06 mmol)加入到 DMF (2 mL)中, 室温下加入 HOBT (5.94 mg, 0.044 mmol)和 EDCI (11.52 mg, 0.06 mmol), 氮气保护下室温搅拌 2 小时, 然后加入化合物 **C88-2** (25 mg, 0.04 mmol)和 DIEA (15.48 mg, 0.12 mmol), 加入到反应液中, 然后在室温下再继续搅拌 2 小时, LC-MS 显示原料反应完全, LC-MS 显示原料反应完全, 反应液减压浓缩, 剩余物经制备型高效液相色谱纯化(Waters-PREP-8 SunFire C18 5um 19*150mm 18min-60-75B, A: H₂O (0.2% FA), B: ACN, UV: 214 nm, 流速 15 ml/min)得到 **C88-P1** (1.3 mg, 收率 4.2%, 保留时间 9.57 分钟)、**C88-P2** (3.0 mg, 收率 9.8%, 保留时间 10.65 分钟)和 **C88-P3** (4.2 mg, 收率 13.7%, 保留时间 11.27 分钟)。**C88-P1** 和 **C88-P2** 均为单一构型化合物, **C88-P3** 为两个非对映异构体的混合物。

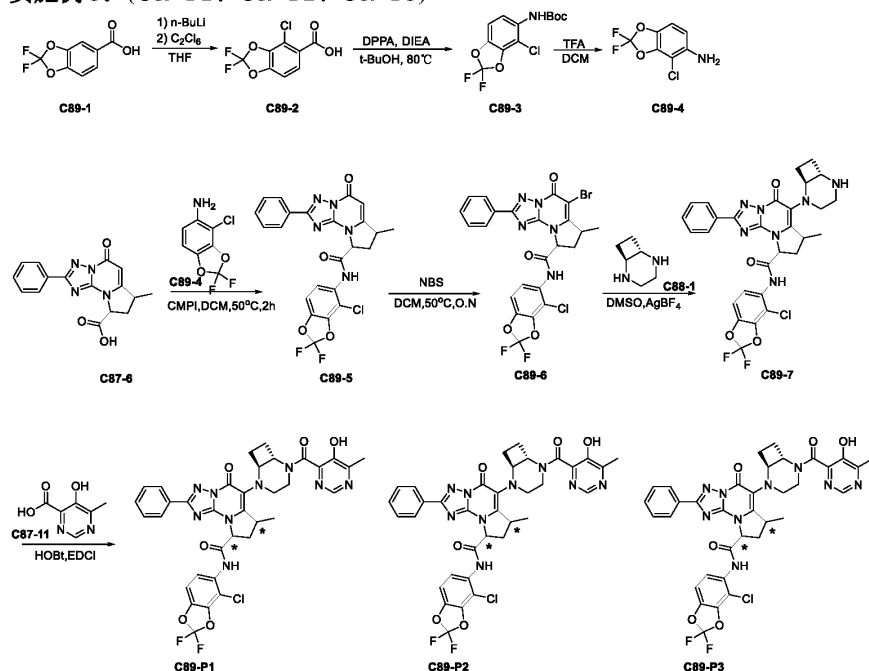
C88-P1 (经晶体结构确认构型, **C88-P1** 为化合物 **C10**): LCMS (ESI) *m/z*= 734.2 [M+H]⁺. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.51 (s, 1H), 8.17-8.14 (m, 2H), 8.10 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.62 (d, *J*=9.2 Hz, 1H), 7.47-7.45 (m, 3H), 5.69-5.66 (m, 1H), 4.58-4.56 (m, 1H), 3.86-3.51 (m, 6H), 2.79-2.76 (m, 1H), 2.50 (s, 3H), 2.18-2.17 (m, 1 H), 1.62-1.59 (m, 7 H).

C88-P2: LCMS (ESI) *m/z* = 734.2 [M+H]⁺. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.49 (s, 1H), 8.17-8.15 (m, 2H), 8.06 (d, *J*=8.8 Hz, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.62 (d, *J*=8.8 Hz, 1H), 7.47-7.43 (m, 3H), 5.59-5.56 (m, 1H), 4.74-4.60 (m, 1H), 3.96-3.59 (m, 6H), 3.13-3.05 (m, 1H), 2.49 (s, 3H), 2.34-2.30 (m, 1 H), 2.21-2.17 (m, 1 H), 1.56-1.53 (m, 6 H).

C88-P3: LCMS (ESI) *m/z*=734.1 [M+H]⁺. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.53 (s, 1H), 8.18-8.14 (m, 2H), 8.10-8.07 (m, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.64-7.59 (m, 1H), 7.47-7.44 (m, 3H), 4.76-4.60 (m, 1H), 5.70-5.60

(m, 1H), 3.87-3.52 (m, 6H), 3.23-3.10 (m, 0.5H), 2.78-2.67 (m, 0.5H), 2.47 (s, 3H), 2.28-2.20 (m, 1H), 1.71-1.59 (m, 7H).

实施例 3: (C89-P1、C89-P2、C89-P3)



1) 中间体 C89-2 的合成:

1000 mL 三口瓶中依次加入 **C89-1** (9.0 g, 44.53 mmol) 和无水四氢呋喃(225 mL), 氮气保护下-70 到-75 °C 下搅拌, 缓慢加入正丁基锂的正己烷溶液(2.5 mol/L, 48 mL, 120 mmol), -70 到-75 °C 下搅拌 20 分钟, 缓慢升温到-5~0°C, -5~0°C 下搅拌 70 分钟, 降温到-70 到-75 °C, -70 到-75 °C 下再加入六氯乙烷(31.6 g, 133.6 mmol), -70 到-75 °C 下搅拌 40 分钟后缓慢恢复到室温, 继续搅拌 40 分钟。用 10% w/w 柠檬酸水溶液淬灭反应, 乙酸乙酯萃取两次, 合并有机相, 有机相用无水硫酸钠干燥, 减压浓缩, 柱层析得到 **C89-2** (3.5 g, 33%)。

2) 中间体 C89-3 的合成:

向 **C89-2** (3 g, 12.68 mmol) 的无水叔丁醇(30 mL)溶液中加入叠氮磷酸二苯酯(4.08 g, 14.84 mmol), 加毕, 向反应液中加入 N,N-二异丙基乙胺(1.92 g, 19.02 mmol)。将反应液升温至 80°C 搅拌过夜。将反应液减压浓缩, 残余物加入饱和碳酸氢钠溶液, 乙酸乙酯(3 × 50 mL)萃取, 有机相用盐水(30 mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩得粗产物。粗产物通过柱层析纯化得白色固体化合物 **C89-3** (2.8 g, 71%)。

3) 中间体 C89-4 的合成:

将 **C89-3** (450 mg, 1.46 mmol) 溶解在二氯甲烷(3 mL)溶液中, 并将三氟乙酸(1 mL)加入其中, 反应液在 25 °C 下搅拌反应 2 小时。LCMS 显示反应完成, 将反应液浓缩, 得到褐色油状物 **C89-4** (300 mg, 混合物, 收率: 98.8%)。LCMS (ESI) m/z = 208.1 [M+H]⁺。

4) 中间体 C89-5 的合成:

将化合物 **C87-6** (240 mg, 0.77 mmol) 加入到二氯甲烷(10 mL)中, 在 0°C 下加入 CMPI (217.16 mg, 0.85 mmol)、DIEA (299.61 mg, 2.32 mmol) 和 **C89-4** (281.82 mg, 1.16 mmol), 反应液加热到 50°C, 反应 2 小时, LC-MS 显示原料反应完全, 缓慢滴加水溶液淬灭, 乙酸乙酯萃取, 有机相再用饱和食盐水洗, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩, 剩余物经柱层析(DCM/MeOH=100/1)纯化得到黄色固体化合物 **C89-5** (180 mg, 收率 47%)。LCMS (ESI) m/z = 500.1 [M+H]⁺。

5) 中间体 C89-6 的合成:

将 **C89-5** (180 mg, 0.36 mmol) 加入到二氯甲烷(15 mL)中, 在 0°C 下加入 NBS (128.16 mg, 0.72 mmol), 然后升温至 50°C, 搅拌反应过夜。LC-MS 显示原料反应完全, 滴加水溶液淬灭, 乙酸乙酯萃取, 有机相再用饱和食盐水洗, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩, 剩余物经柱层析(DCM/MeOH=100/1)纯化得到淡黄色固体化合物 **C89-6** (160 mg, 收率 77%)。LCMS (ESI) m/z =

579.8 [M+H]⁺.

6) 中间体 **C89-7** 的合成:

将化合物 **C89-6** (160 mg, 0.28 mmol)、化合物 **C88-1** (464.25 mg, 4.15 mmol)和四氟硼酸银 (109.2 mg, 0.56 mmol)加入到二甲基亚砜(4 mL)中,反应液加热至 120℃,反应 2 小时,LC-MS 显示原料反应完全,滴加水溶液淬灭,乙酸乙酯萃取,有机相再用饱和食盐水洗,无水硫酸钠干燥,过滤,滤液减压浓缩,剩余物经柱层析(DCM/MeOH/H₂O.NH₃=10/1/0.01)纯化得到灰白色固体化合物 **C89-7** (100 mg, 收率 59%)。LCMS (ESI) m/z= 610.1 [M+H]⁺.

7) **C89-P1、C89-P2、C89-P3 的合成:**

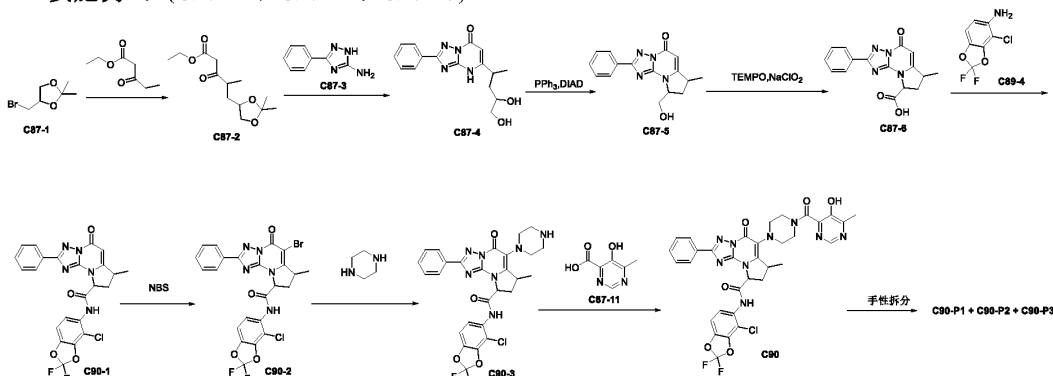
将化合物 **C87-11** (34.5 mg, 0.23 mmol) 加入到 DMF (5 mL) 中, 室温下加入 HOBT (23.76 mg, 0.18 mmol) 和 EDCI (46.08 mg, 0.24 mmol), 氮气保护下室温搅拌 2 小时, 然后加入化合物 **C89-7** (100 mg, 0.16 mmol) 和 DIEA (61.92 mg, 0.48 mmol), 氮气置换三次, 氮气保护下室温搅拌 4 小时, LC-MS 显示原料反应完全, 反应液减压浓缩, 剩余物经制备型高效液相色谱纯化(RP-PREP-3 SunFire C18 5um 19*150mm 18min-55-70B, A: H₂O (0.2% FA), B: ACN, UV: 214 nm, 流速 15 ml/min) 得到白色固体 **C89-P1** (10.5 mg, 收率 8.6%, 保留时间 10.52 分钟)、**C89-P2** (11.2 mg, 收率 9.2%, 保留时间 11.31 分钟) 和 **C89-P3** (16.6 mg, 收率 13.6%, 保留时间 12.56 分钟)。**C89-P1** 和 **C89-P2** 均为单一构型化合物, **C89-P3** 为两个非对映异构体的混合物。

C89-P1 (经晶体结构确认构型, **C89-P1** 为化合物 **C2**): LCMS (ESI) m/z = 744.1 $[M-H]^-$. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 10.49 (brs, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.10-8.08 (m, 2H), 7.53-7.52 (m, 3H), 7.43 (d, J =8.8 Hz, 1H), 7.35 (d, J =8.8 Hz, 1H), 5.59-5.58 (m, 1H), 4.45-4.40 (m, 1H), 3.71-3.69 (m, 2H), 3.08-2.71 (m, 5H), 2.41 (s, 3H), 2.09-2.01 (m, 1H), 1.68-1.63 (m, 1H), 1.60-1.51 (m, 6H).

C89-P2: LCMS (ESI) $m/z = 744.1$ $[M-H]^+$. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 10.54 (brs, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.11-8.09 (m, 2H), 7.54-7.53 (m, 3H), 7.44 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.35 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 5.48-5.46 (m, 1H), 4.43-4.39 (m, 1H), 3.72-3.71 (m, 2H), 3.08-3.05 (m, 5H), 2.43 (s, 3H), 2.02-1.96 (m, 1H), 1.68-1.61 (m, 1H), 1.60-1.51 (m, 6H).

C89-P3: LCMS (ESI) m/z = 744.1 [M-H]⁻. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.53 (brs, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.11-8.09 (m, 2H), 7.54-7.53 (m, 3H), 7.42 (d, J =8.8 Hz, 1H), 7.33 (d, J =8.8 Hz, 1H), 5.56-5.53 (m, 1H), 4.46-4.43 (m, 1H), 3.81-3.69 (m, 2H), 3.09-3.01 (m, 5H), 2.42 (s, 3H), 2.03-2.01 (m, 1H), 1.64-1.53 (m, 6H).

实施例 4: (C90-P1、C90-P2、C90-P3)



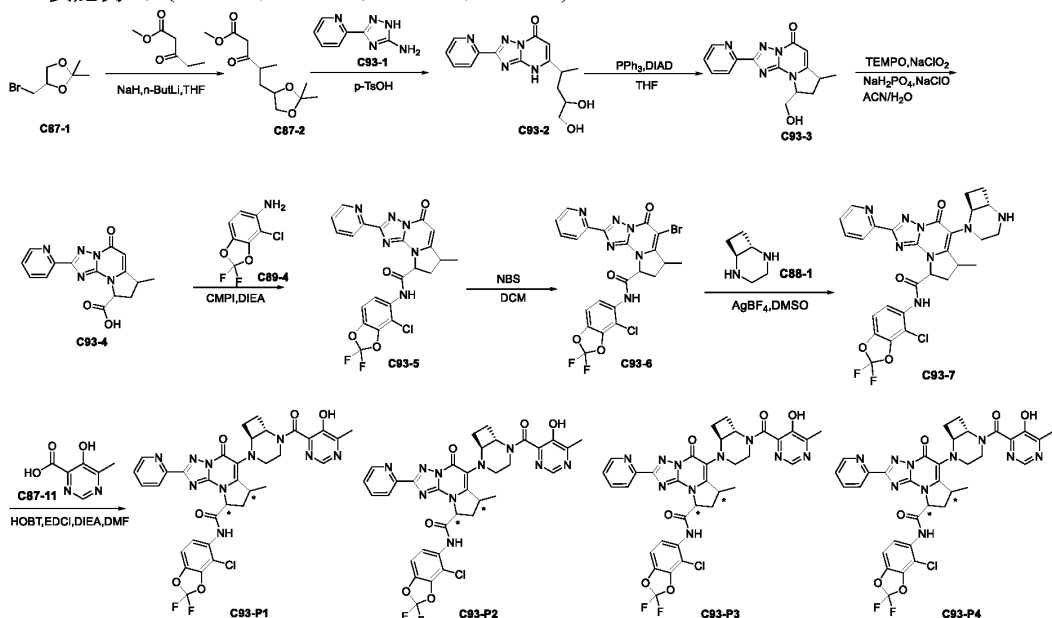
参考实施例 1 化合物 **C87-P1** 和 **C87-P2** 的合成方法, 用 **C89-4** 代替 **C87-7**, 合成得到 **C90**。**C90** 经手性拆分 (IBN, MeOH:EtOH:FA=50:50:0.3, 25 ml/min, 254 nm) 得到 **C90-P1** (2.0 mg, 保留时间 9.55 分钟)、**C90-P2** (2.3 mg, 保留时间 23.31 分钟) 和 **C90-P3** (2.1 mg, 保留时间 32.67 分钟)。**C90-P1** 为两个非对映异构体的混合物, **C90-P2** 和 **C90-P3** 均为单一构型化合物。

C90-P1: LCMS (ESI) $m/z = 720.1$ $[M+H]^+$. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 10.48 (brs, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.12-8.08 (m, 2H), 7.55-7.52 (m, 3H), 7.44 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.36 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 5.48-5.46 (m, 1H), 3.77-3.73 (m, 1H), 3.08-3.02 (m, 6H), 2.51-2.50 (m, 1H), 2.46-2.44 (m, 4H), 2.01-1.99 (m, 2H), 1.53-1.44 (m, 3H).

C90-P2: LCMS (ESI) $m/z = 720.1$ $[M+H]^+$. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 10.50 (brs, 1H), 8.49 (s, 1H), 8.33 (brs, 1H), 8.11-8.09 (m, 2H), 7.53-7.52 (m, 3H), 7.43 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.36 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 5.56-5.33 (m, 1H), 3.78-3.72 (m, 1H), 3.15-2.94 (m, 6H), 2.75-2.66 (m, 2H), 2.47 (s, 3H), 2.03-1.96 (m, 2H), 1.52-1.46 (m, 3H).

C90-P3: LCMS (ESI) $m/z = 720.1$ $[M+H]^+$. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 10.49 (brs, 1H), 8.47 (s, 1H), 8.35 (brs, 1H), 8.12-8.10 (m, 2H), 7.54-7.53 (m, 3H), 7.44 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.34 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 5.49-5.47 (m, 1H), 3.77-3.75 (m, 1H), 3.08-2.97 (m, 6H), 2.53-2.49 (m, 2H), 2.41 (s, 3H), 2.03-1.96 (m, 2H), 1.46-1.44 (m, 3H).

实施例 5: (C93-P1、C93-P2、C93-P3、C93-P4)



参考实施例 4 的合成方法, 用 **C93-1** 代替 **C87-3**, 用 **C88-1** 代替哌嗪, 最后一步经制备型高效液相色谱纯化(Waters-PREP-8 SunFire C18 5um 19*150mm 18min-45-55B, A: H₂O (0.2% FA), B: ACN, UV: 214nm, 流速 15 ml/min), 得到 **C93-P1** (1.4 mg, 收率 2.9%, 保留时间 9.83 min)、**C93-P2** (1.9 mg, 收率 3.9%, 保留时间 10.70 min)、**C93-P3** (1.6 mg, 收率 3.3%, 保留时间 11.57 min)和 **C93-P4** (1.2 mg, 收率 2.5%, 保留时间 12.03 min)。

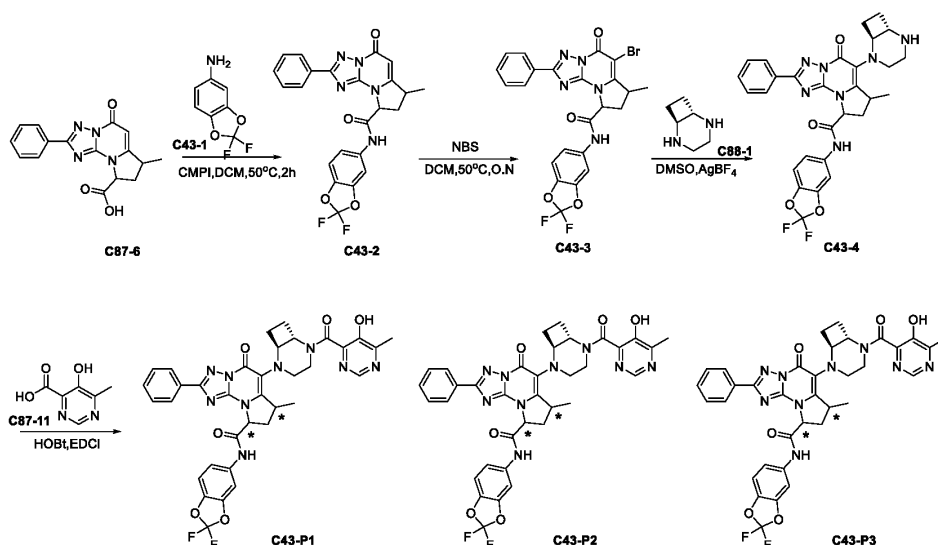
C93-P1: LCMS (ESI) $m/z = 747.0$ $[M+H]^+$. 1H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.69 (d, $J=4.4$ Hz, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.30 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 8.00-7.96 (m, 1H), 7.55-7.48 (m, 2H), 7.18 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 5.64-5.61 (m, 1H), 5.35-5.33 (m, 1H), 3.35-3.33 (m, 7H), 2.80-2.76 (m, 1H), 2.53 (s, 3H), 2.03-2.01 (m, 1H), 1.79-1.65 (m, 6H).

C93-P2: LCMS (ESI) $m/z = 747.0$ $[M+H]^+$. 1H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.69 (d, $J=3.6$ Hz, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.30 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 8.00-7.96 (m, 1H), 7.55-7.52 (m, 1H), 7.46 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.19 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 5.58-5.55 (m, 1H), 5.35-5.33 (m, 1H), 3.35-3.33 (m, 7H), 2.48 (s, 3H), 2.37-2.36 (m, 1H), 2.03-2.01 (m, 1H), 1.52-1.50 (m, 6H).

C93-P3: LCMS (ESI) $m/z = 747.0$ $[M+H]^+$. 1H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.69 (d, $J=4.4$ Hz, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.31 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 8.00-7.97 (m, 1H), 7.55-7.52 (m, 1H), 7.47 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.20 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 5.61-5.58 (m, 1H), 5.35-5.33 (m, 1H), 3.32-3.31 (m, 7H), 2.49 (s, 3H), 2.34-2.31 (m, 1H), 2.03-1.97 (m, 1H), 1.58-1.56 (m, 6H).

C93-P4: LCMS (ESI) $m/z = 747.0$ $[M+H]^+$. 1H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.60 (d, $J=3.2$ Hz, 1H), 8.43 (s, 1H), 8.21 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.91-7.87 (m, 1H), 7.45-7.42 (m, 1H), 7.38 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.07 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 5.55-5.52 (m, 1H), 5.25-5.23 (m, 1H), 3.32-3.31 (m, 7H), 2.66-2.69 (m, 1H), 2.41 (s, 3H), 1.94-1.92 (m, 1H), 1.57-1.49 (m, 6H).

实施例 6: (C43-P1、C43-P2、C43-P3)



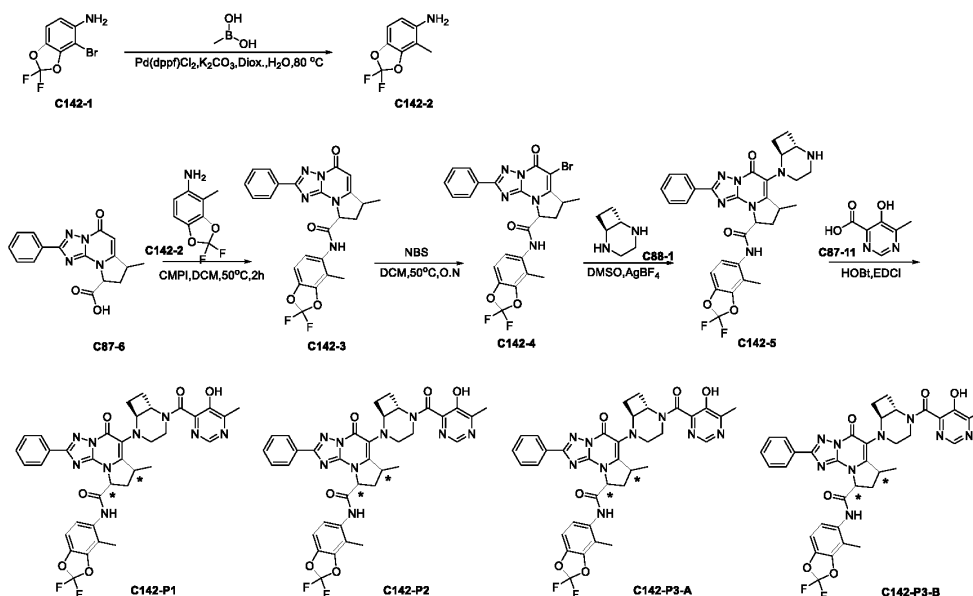
参考实施例 3 的合成方法, 用 **C43-1** 代替 **C89-4**, 最后一步经制备型高效液相色谱(Waters-PREP-8 SunFire C18 5um 19*150mm 18min-42-78 B, A: H₂O (0.2% FA), B: ACN, UV: 214 nm, 流速 15 ml/min) 纯化得到 **C43-P1** (11.1 mg, 收率 5.7%, 保留时间 11.82 min)、**C43-P3** (14.1 mg, 收率 7.3%, 保留时间 13.25 min) 和 **C43-P2** 粗品(30 mg, 保留时间 12.82 min)。**C43-P2** 粗品经手性拆分(IBN, Hex:EtOH:DEA=50:50:0.3, 25 ml/min, 230 nm)纯化得到 **C43-P2** (12 mg, 收率 6.2%, 保留时间 7.997 min)。

C43-P1 (盐酸盐, 单一构型化合物): ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.80 (s, 1 H), 8.12-8.10 (m, 2 H), 7.68 (s, 1 H), 7.47-7.41 (m, 3 H), 7.31-7.28 (m, 1 H), 7.18-7.16 (m, 1 H), 5.50-5.47 (m, 1 H), 4.62-4.59 (m, 1 H), 4.00-3.44 (m, 6 H), 2.71-2.70 (m, 1 H), 2.64 (s, 3 H), 2.52-2.45 (m, 1 H), 1.83-1.62 (m, 6 H), 1.42-1.39 (m, 1 H). LCMS (ESI) m/z=712.1 [M+H]⁺.

C43-P2 (游离碱, 单一构型化合物): ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.86 (s, 1 H), 8.54 (s, 1 H), 8.05-8.03 (m, 2 H), 7.74 (s, 1 H), 7.50-7.48 (m, 3 H), 7.41-7.39 (m, 1 H), 7.32-7.29 (m, 1 H), 5.36 (d, *J*=9.2 Hz, 1 H), 4.40-4.38 (m, 1 H), 3.71-3.70 (m, 2 H), 3.24-2.95 (m, 6 H), 2.43 (s, 3 H), 2.10 (d, *J*=13.6 Hz, 1 H), 1.75-1.34 (m, 6 H), 1.23-1.17 (m, 1 H). LCMS (ESI) m/z=712.1 [M+H]⁺.

C43-P3 (盐酸盐, 两个非对映异构体的混合物): ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8.86 (s, 1 H), 8.13-8.10 (m, 2 H), 7.68-7.66 (m, 1 H), 7.47-7.41 (m, 3 H), 7.30-7.26 (m, 1 H), 7.18-7.15 (m, 1 H), 5.49-5.42 (m, 1 H), 4.71-4.68 (m, 1 H), 3.79-3.54 (m, 6 H), 3.13-3.03 (m, 1 H), 2.69 (s, 3 H), 2.50-2.43 (m, 1 H), 2.01-1.55 (m, 6 H), 1.40-1.37 (m, 1 H). LCMS (ESI) m/z=712.1 [M+H]⁺.

实施例 7: (C142-P1、C142-P2、C142-P3-A、C142-P3-B)



1) 中间体 **C142-2** 的合成:

将化合物 **C142-1** (0.6 g, 2.38 mmol, 根据专利申请 WO2008082484 中公开的合成方法制备) 和甲基硼酸 (1.42 g, 23.8 mmol) 溶解在 1,4-二氧六环 (5 mL) 和水 (0.5 mL) 的混合溶液中, 在搅拌状态下加入碳酸钾 (0.99 g, 7.14 mmol), 置换气三次后加入 1,1-双(二苯基膦)二茂铁二氯化钯(II) (0.17 g, 0.24 mmol), 在 80°C 下搅拌反应 16 小时。LCMS 显示反应完成, 将反应液浓缩, 通过柱层析(乙酸乙酯/石油醚)纯化, 得到白色固体 **C142-2** (0.4 g, 收率: 89.8%)。m/z $[\text{M}+\text{H}]^+ = 188.1$ 。

2) 产物的合成:

参考实施例 3 的合成方法, 用 **C142-2** 代替 **C89-4**, 最后一步经制备型高效液相色谱纯化(RP-PREP-3 SunFire C18 5um 19*150mm 18min-50-75B, A: H_2O (0.2% FA), B: ACN, UV: 214nm, 流速 15ml/min), 得到 **C142-P1** (33.6 mg, 收率 12.4%, 保留时间 10.13 min)、**C142-P2** (25.2 mg, 收率 9.3%, 保留时间 10.74 min) 和 **C142-P3** (54.1 mg, 收率 19.9%, 保留时间 11.53 min)。**C142-P1** 和 **C142-P2** 均为单一构型化合物, **C142-P3** 为两个非对映异构体的混合物。**C142-P3** 经手性拆分(IBN, Hex:EtOH:TFA=50:50:0.2, 25 ml/min, 254 nm) 得到 **C142-P3-A** (10.7 mg, 保留时间 11.1 min) 和 **C142-P3-B** (14.1 mg, 保留时间 37.7 min)。

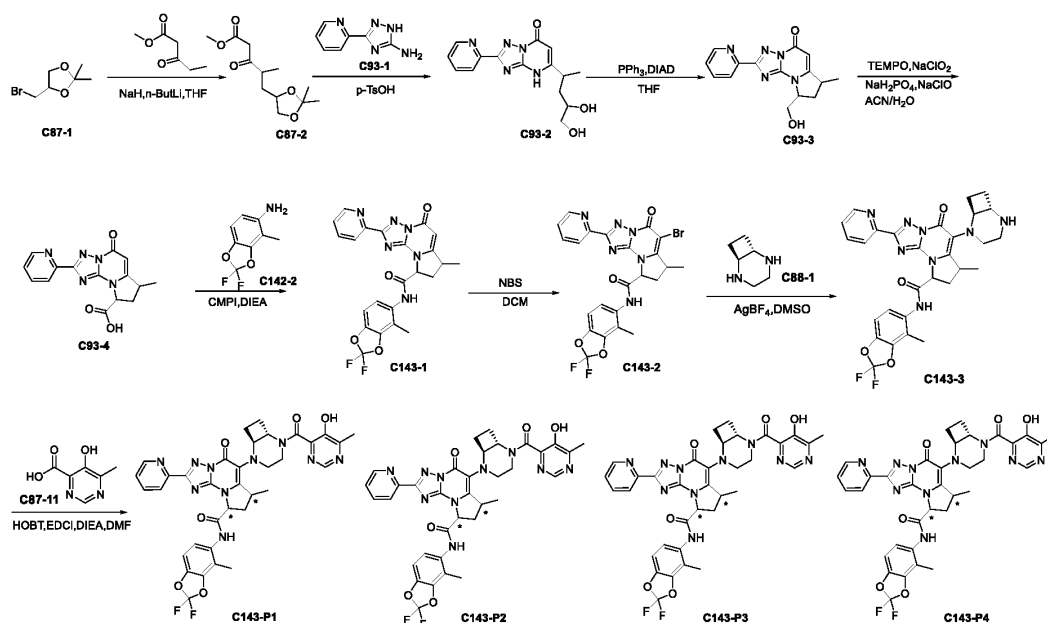
C142-P1: LCMS (ESI) m/z = 726.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 10.24 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.10-8.02 (m, 2H), 7.56-7.48 (m, 3H), 7.23 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.10 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 5.49-5.45 (m, 1H), 4.40-4.38 (m, 1H), 3.76-3.73 (m, 2H), 3.35-3.17 (m, 4H), 2.67-2.52 (m, 1H), 2.51-2.47 (m, 1H), 2.45 (s, 3H), 2.22 (s, 3H), 1.67-1.66 (m, 1H), 1.65-1.57 (m, 3H), 1.49-1.42 (m, 2H), 1.23-1.22 (m, 2H)。

C142-P2: LCMS (ESI) m/z = 726.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 10.28 (s, 1H), 8.50 (s, 1H), 8.10-8.08 (m, 2H), 7.54-7.52 (m, 3H), 7.24 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.10 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 5.41-5.38 (m, 1H), 4.40-4.38 (m, 1H), 3.74-3.72 (m, 2H), 3.31-3.23 (m, 4H), 3.04-3.01 (m, 1H), 2.42 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 2.41-2.11 (m, 1H), 1.68-1.66 (m, 1H), 1.51-1.40 (m, 5H), 1.23-1.22 (m, 2H)。

C142-P3-A: LCMS (ESI) m/z = 726.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 10.28 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.12-8.05 (m, 2H), 7.58-7.50 (m, 3H), 7.25-7.21 (m, 1H), 7.11 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 5.50-5.45 (m, 1H), 4.45-4.42 (m, 1H), 3.76-3.71 (m, 1H), 3.61-3.45 (m, 5H), 2.63-2.58 (m, 1H), 2.50-2.35 (m, 4H), 2.21 (s, 3H), 1.66-1.63 (m, 1H), 1.49 (d, $J=6.8$ Hz, 3H), 1.44-1.16 (m, 4H)。

C142-P3-B (经晶体结构分析确认构型, **C142-P3-B** 为化合物 **C100**): LCMS (ESI) m/z = 726.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 10.26 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.12-8.05 (m, 2H), 7.58-7.50 (m, 3H), 7.24 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.08 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 5.41 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 4.47-4.42 (m, 1H), 3.80-3.73 (m, 2H), 3.61-3.45 (m, 4H), 3.10-3.02 (m, 1H), 2.44 (s, 3H), 2.22 (s, 3H), 2.10 (d, $J=13.6$ Hz, 1H), 1.68-1.63 (m, 1H), 1.48 (d, $J=6.8$ Hz, 3H), 1.44-1.16 (m, 4H)。

实施例 8: (C143-P1、C143-P2、C143-P3、C143-P4)



参考实施例 5 的合成方法, 用 **C142-2** 代替 **C89-4**, 最后一步经制备型高效液相色谱纯化(Waters-PREP-8 SunFire C18 5um 19*150mm 18min-45-50B, A: H₂O (0.2% FA), B: ACN, UV: 214nm, 流速 15ml/min), 得到 **C143-P1** (2.4 mg, 收率 3%, 保留时间 9.88 min)、**C143-P2** (2.1 mg, 收率 2.6%, 保留时间 10.25 min)、**C143-P3** (3.6 mg, 收率 4.5%, 保留时间 12.07 min)和 **C143-P4** (3.6 mg, 收率 4.5%, 保留时间 12.55 min)。

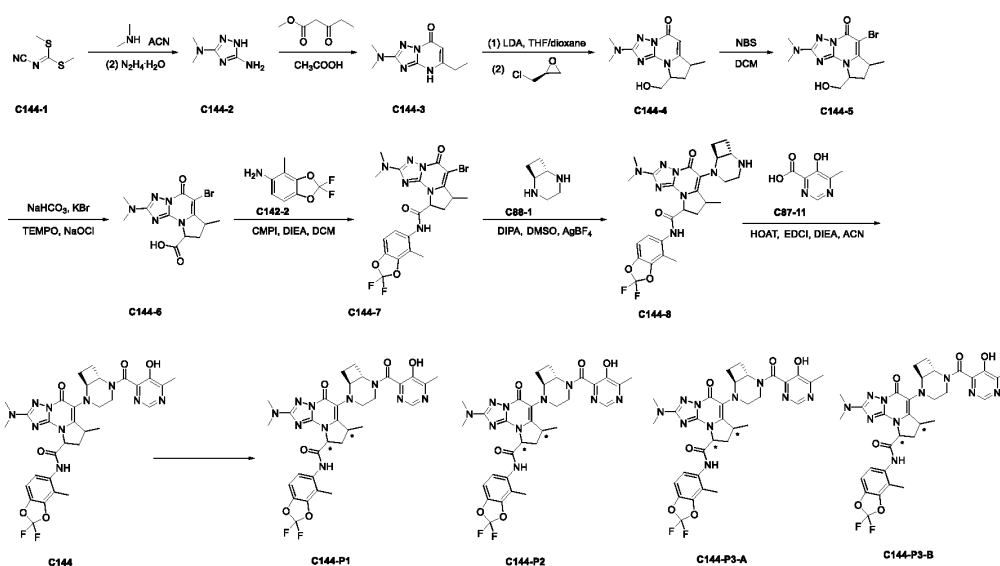
C143-P1: LCMS (ESI) $m/z=727.1$ [M+H]⁺. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.28 (s, 1H), 8.73 (d, *J*=4.0 Hz, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.14 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 8.01-7.97 (m, 1H), 7.55-7.52 (m, 1H), 7.23-7.20 (m, 1H), 7.16-7.13 (m, 1H), 5.51-5.47 (m, 1H), 4.48-4.46 (m, 1H), 3.76-3.64 (m, 2H), 2.99-2.96 (m, 4H), 2.67-2.58 (m, 1H), 2.33 (s, 3H), 2.21 (s, 3H), 2.03-1.97 (m, 1H), 1.55-1.35 (m, 7H).

C143-P2: LCMS (ESI) $m/z=727.1$ [M+H]⁺. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.33 (s, 1H), 8.72 (d, *J*=4.0 Hz, 1H), 8.47 (s, 1H), 8.14 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 8.01-7.96 (m, 1H), 7.54-7.51 (m, 1H), 7.24-7.20 (m, 1H), 7.16-7.12 (m, 1H), 5.50-5.44 (m, 1H), 4.41-4.40 (m, 1H), 3.73-3.64 (m, 2H), 3.17-3.05 (m, 4H), 2.44 (s, 3H), 2.40-2.39 (m, 1H), 2.27 (s, 3H), 2.03-1.89 (m, 1H), 1.59-1.45 (m, 7H).

C143-P3: LCMS (ESI) $m/z=727.1$ [M+H]⁺. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.32 (s, 1H), 8.73 (d, *J*=4.4 Hz, 1H), 8.43 (s, 1H), 8.15 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 8.00-7.96 (m, 1H), 7.55-7.52 (m, 1H), 7.25-7.23 (m, 1H), 7.15-7.11 (m, 1H), 5.46-5.44 (m, 1H), 4.45-4.40 (m, 1H), 3.80-3.64 (m, 2H), 3.17-3.01 (m, 4H), 2.46-2.44 (m, 1H), 2.34 (s, 3H), 2.21 (s, 3H), 2.03-1.90 (m, 1H), 1.53-1.40 (m, 7H).

C143-P4: LCMS (ESI) $m/z=727.1$ [M+H]⁺. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.28 (s, 1H), 8.74 (d, *J*=4.0 Hz, 1H), 8.49 (s, 1H), 8.14 (d, *J*=8.0 Hz, 1H), 8.01-7.97 (m, 1H), 7.55-7.52 (m, 1H), 7.23-7.20 (m, 1H), 7.16-7.13 (m, 1H), 5.51-5.47 (m, 1H), 4.45-4.43 (m, 1H), 3.76-3.67 (m, 2H), 3.10-2.93 (m, 4H), 2.64-2.59 (m, 1H), 2.41 (s, 3H), 2.20 (s, 3H), 2.03-1.97 (m, 1H), 1.56-1.34 (m, 7H).

实施例 9: (C144-P1、C144-P2、C144-P3-A、C144-P3-B)



1) 中间体 C144-2 的合成:

将化合物 C144-1 (50 g, 341.9 mmol) 加入到乙腈(500 mL)中, 再加入 2 mol/L 的二甲胺四氢呋喃溶液(200 mL), 50°C 反应 4 个小时。再加入水合肼(51.35 g, 820.6 mmol), 回流反应过夜。LCMS 显示反应完成, 反应液恢复到室温, 减压浓缩至剩余 230 mL, 有固体析出, 过滤得到滤饼, 滤饼干燥得到 C144-2 (39 g, 收率: 89.7%)。m/z [M+H]⁺ = 128.0。

2) 中间体 C144-3 的合成:

将化合物 C144-2 (32 g, 251.7 mmol) 加入到醋酸(210 mL)中, 再加入丙酰乙酸甲酯(39.3 g, 302.0 mmol), 90°C 反应过夜。LCMS 显示反应完成, 反应液恢复到室温, 减压浓缩除去醋酸, 再加入乙酸乙酯(180 mL)和石油醚(110 mL), 研磨搅拌 1 个小时, 过滤得到滤饼, 滤饼干燥得到 C144-3 (50 g, 收率: 95.9%)。m/z [M+H]⁺ = 208.1。

3) 中间体 C144-4 的合成:

将化合物 C144-3 (4.5 g, 21.72 mmol) 加入到四氢呋喃(110 mL)和 1,4-二氧六环(110 mL)中, 氮气保护下加入 LDA (2M, 14 mL), 室温反应 30 分钟, 0°C 下再次加入 LDA (2M, 14 mL), 0°C 下搅拌 30 分钟, 室温继续搅拌 30 分钟, 室温下加入 S-环氧氯丙烷(5.22 g, 56.47 mmol), 室温搅拌过夜。LCMS 显示反应完成, 反应液加入氯化铵水溶液中, 分液得到有机相, 水相再用二氯甲烷萃取两次, 合并有机相, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩, 柱层析得到 C144-4 (4 g, 收率: 69.96%)。m/z [M+H]⁺ = 264.2。

4) 中间体 C144-5 的合成:

将化合物 C144-4 (3.5 g, 13.29 mmol) 加入到二氯甲烷(40 mL)中, 0°C 下加入 NBS (2.60 g, 14.62 mmol), 室温反应 6 个小时。LCMS 显示反应完成, 反应液用二氯甲烷稀释, 加入 10% 亚硫酸钠溶液, 分液萃取, 二氯甲烷萃取两次, 合并有机相, 有机相再用饱和食盐水洗两遍, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩得到 C144-5 (4 g, 收率: 87.94%)。m/z [M+H]⁺ = 342.1。

5) 中间体 C144-6 的合成:

将化合物 C144-5 (4 g, 11.69 mmol) 加入到二氯甲烷(80 mL)中, 加入碳酸氢钠(9.82 g, 116.90 mmol)的水溶液(100 mL)、溴化钾(0.14 g, 1.17 mmol)、三辛基甲基氯化铵(0.24 g, 0.58 mmol), TEMPO (0.091 g, 0.58 mmol), 0°C 下加入质量分数 10% 的次氯酸钠水溶液(43.51 g, 58.45 mmol), 室温反应 2.5 个小时。LCMS 显示反应完成, 反应液加入二氯甲烷, 萃取分液后得到水相, 水相再加入二氯甲烷萃取分液, 合并有机相, 合并的有机相中再加入 10% 碳酸氢钠水溶液, 萃取分液得到水相, 将两次水相合并, 水相中再加入二氯甲烷, 用稀盐酸将 pH 调到 3~4, 二氯甲烷萃取三次, 合并二氯甲烷相, 二氯甲烷相用饱和食盐水洗一次, 二氯甲烷相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩至干得到 C144-6 (2.5 g, 收率: 60.05 %)。m/z [M+H]⁺ = 356.1。

6) 中间体 C144-7 的合成:

将化合物 C144-6 (2.15 g, 6.04 mmol) 加入到二氯甲烷(40 mL), 随后加入 2-氯-1-甲基吡啶鎓碘化物(1.70 g, 6.64 mmol)、DIEA (3.51 g, 27.18 mmol) 和 C142-2 (1.76 g, 7.85 mmol), 室温搅拌 4 个

时。LCMS 显示反应完成，反应液中加入二氯甲烷和水，分液萃取，二氯甲烷萃取两次，合并有机相，有机相用稀盐酸洗两次，有机相用无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩，柱层析得到 C144-7 (2.6 g, 收率: 82.0%)。m/z [M+H]⁺ = 525.1.

7) 中间体 C144-8 的合成:

将化合物 C144-7 (700 mg, 1.33 mmol), 加入到 DMSO (3 mL) 中, 再加入 C88-1 (0.75 g, 6.65 mmol) 和 DIPA (0.67 g, 6.65 mmol), 氮气保护下加入四氟硼酸银 (0.39 g, 2.00 mmol), 氮气保护下 105°C 微波反应 2 个小时。LCMS 显示反应完成, 反应液恢复至室温, 加入二氯甲烷稀释, 过滤, 滤液减压浓缩, 反相柱纯化得到 C144-8 (270 mg, 收率: 36.41 %)。m/z [M+H]⁺ = 557.2

8) 产物 C144 的合成:

将化合物 C144-8 (0.10 g, 0.66 mmol) 和 HOAT (0.10 g, 0.76 mmol) 加入到乙腈 (3 mL) 中, 加入 EDCI (0.19 g, 0.98 mmol), 室温搅拌 1 个小时。再加入 C87-11 (270 mg, 0.49 mmol) 和 DIEA (0.22 g, 1.71 mmol), 室温搅拌 30 分钟。LCMS 显示反应完成, 反应液过滤, 滤液通过反相柱纯化得到 C144 (110 mg, 收率: 32.74%), 经制备型高效液相色谱纯化 (SHIMADZU LC 20, Agilent 10 Prep-C18, 250*21.2 mm, 10 μm, A: H₂O (0.1% FA), B: ACN, UV: 214 nm, 流速 20 ml/min) 得到 **C144-P1** (19.8 mg, 收率 4.3%, 保留时间 13.1 min)、**C144-P2** (7.3 mg, 收率 1.6 %, 保留时间 14.0 min) 和 **C144-P3** (保留时间 16.2 min)。**C144-P1** 和 **C144-P2** 均为单一构型化合物, **C144-P3** 为两个非对映异构体的混合物。**C144-P3** 经手性拆分 (Waters SFC-150mgm, Daicel OJ, 30*250mm, 10 μm, CO₂/MeOH=75/25, 50 ml/min, 254 nm) 得到 **C144-P3-A** (8 mg, 保留时间 12.01 min) 和 **C144-P3-B** (19.7 mg, 保留时间 16.19 min)。

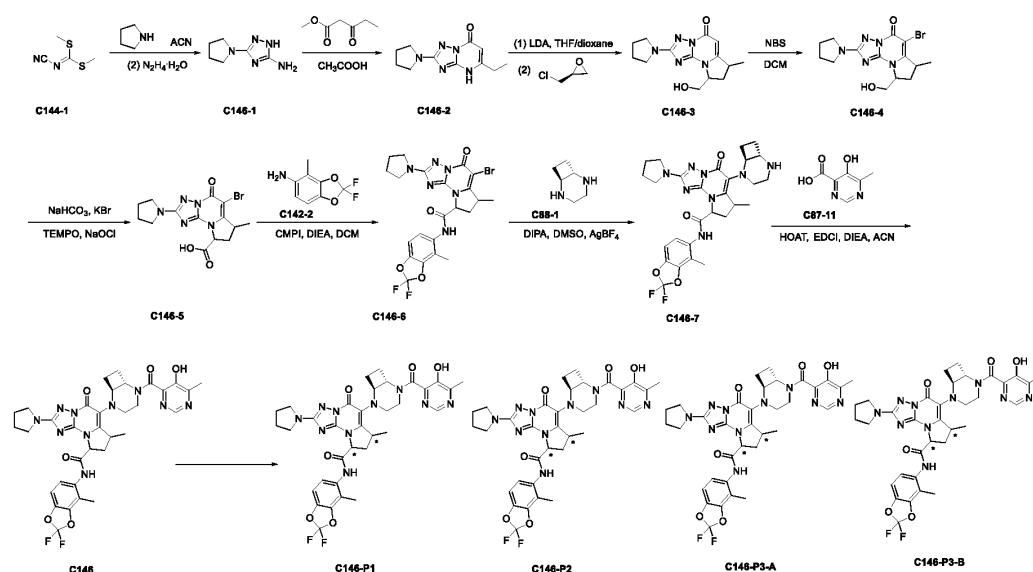
C144-P1: LCMS m/z [M+H]⁺ = 693.3。 ¹H NMR (400 MHz, 氯仿-*d*) δ 11.46 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.87 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 5.20 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 4.66 (s, 1H), 4.12 (d, *J* = 66.5 Hz, 2H), 3.70 (dd, *J* = 15.7, 6.7 Hz, 2H), 3.08 (s, 6H), 3.06 – 2.98 (m, 1H), 2.54 (s, 3H), 2.43 – 2.27 (m, 1H), 2.24 – 2.16 (m, 1H), 2.14 (s, 3H), 2.07 – 1.95 (m, 1H), 1.68 – 1.57 (m, 1H), 1.55 – 1.38 (m, 4H), 1.37 – 1.28 (m, 1H), 1.20 – 1.09 (m, *J* = 9.7 Hz, 1H)。

C144-P2: LCMS m/z [M+H]⁺ = 693.3。 ¹H NMR (400 MHz, 氯仿-*d*) δ 11.46 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 6.87 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 5.20 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 4.66 (s, 1H), 4.12 (d, *J* = 66.5 Hz, 2H), 3.70 (dd, *J* = 15.7, 6.7 Hz, 2H), 3.08 (s, 6H), 3.06 – 2.98 (m, 1H), 2.54 (s, 3H), 2.43 – 2.27 (m, 1H), 2.24 – 2.16 (m, 1H), 2.14 (s, 3H), 2.07 – 1.95 (m, 1H), 1.68 – 1.57 (m, 1H), 1.55 – 1.38 (m, 4H), 1.37 – 1.28 (m, 1H), 1.20 – 1.09 (m, *J* = 9.7 Hz, 1H)。

C144-P3-A: LCMS m/z [M+H]⁺ = 693.3。 ¹H (400 MHz, 氯仿-*d*) δ 11.49 (s, 1H), 9.20 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 7.22 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.88 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 5.23 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 4.71 (s, 1H), 4.09 (s, 2H), 3.74 – 3.50 (m, 2H), 3.10 (s, 6H), 2.81 (d, *J* = 13.1 Hz, 1H), 2.68 (dd, *J* = 20.1, 8.8 Hz, 1H), 2.54 (s, 3H), 2.35 (q, *J* = 9.6 Hz, 1H), 2.16 (s, 3H), 2.06 – 1.97 (m, 1H), 1.68 – 1.57 (m, 1H), 1.55 – 1.38 (m, 4H), 1.37 – 1.28 (m, 1H), 1.20 – 1.09 (m, *J* = 9.7 Hz, 1H)。

C144-P3-B: LCMS m/z [M+H]⁺ = 693.3。 ¹H (400 MHz, 氯仿-*d*) δ 11.49 (s, 1H), 9.20 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 7.22 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.88 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 5.23 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 4.71 (s, 1H), 4.09 (s, 2H), 3.74 – 3.50 (m, 2H), 3.10 (s, 6H), 2.81 (d, *J* = 13.1 Hz, 1H), 2.68 (dd, *J* = 20.1, 8.8 Hz, 1H), 2.54 (s, 3H), 2.35 (q, *J* = 9.6 Hz, 1H), 2.16 (s, 3H), 2.06 – 1.97 (m, 1H), 1.68 – 1.57 (m, 1H), 1.55 – 1.38 (m, 4H), 1.37 – 1.28 (m, 1H), 1.20 – 1.09 (m, *J* = 9.7 Hz, 1H)。

实施例 10: (C146-P1、C146-P2、C146-P3-A、C146-P3-B)



参考实施例 9 的合成方法, 在第一步用四氢吡咯代替二甲胺盐酸盐, 最后一步经制备型高效液相色谱纯化(SHIMADZU LC 20, Agilent 10 Prep-C18, 250*21.2 mm, 10 μ m, A: H₂O (0.1% FA), B: ACN, UV: 214 nm, 流速 20ml/min) 得到 **C146-P1** (保留时间 10.5 min)、**C146-P2** (保留时间 11.3 min) 和 **C146-P3** (保留时间 12.6 min)。**C146-P1** 和 **C146-P2** 均为单一构型化合物, **C146-P3** 为两个非对映异构体的混合物。**C146-P3** 经手性拆分(Waters SFC-150mgm, Daicel OD, 30*250mm, 10 μ m, CO₂/MeOH=65/35, 50 ml/min, 214 nm)得到 **C146-P3-A** (5.81 min)和 **C146-P3-B** (11.14 min)。

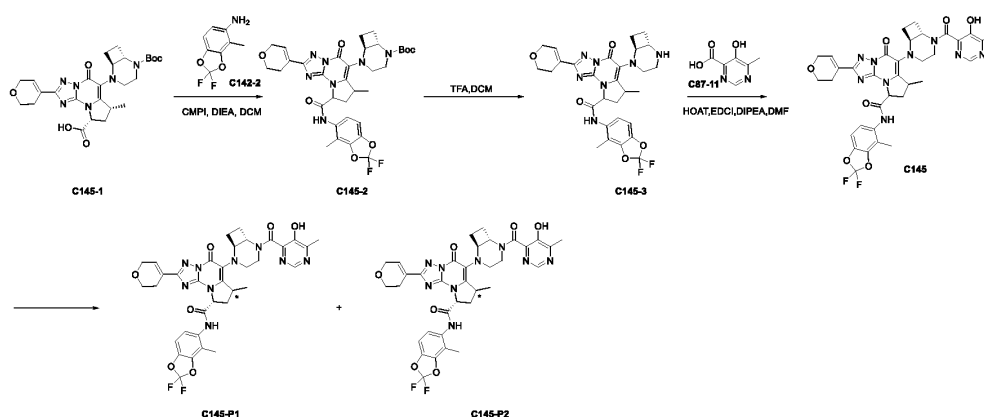
C146-P1: LCMS m/z $[M+H]^+ = 719.3$, ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.17 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 7.23 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.07 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 5.30 (dq, $J = 8.3, 5.0$ Hz, 1H), 4.36 (d, $J = 13.0$ Hz, 1H), 3.65 (dq, $J = 22.0, 7.2$ Hz, 3H), 3.54 – 3.43 (m, 4H), 3.25 – 3.10 (m, 3H), 2.96 (dt, $J = 13.5, 9.9$ Hz, 1H), 2.42 (s, 3H), 2.35 (ddd, $J = 12.6, 8.1, 5.9$ Hz, 1H), 2.19 (s, 3H), 1.99 (dt, $J = 13.0, 7.0$ Hz, 1H), 1.90 (t, $J = 5.9$ Hz, 4H), 1.61 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 1.51 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 1.39 (dd, $J = 20.7, 10.2$ Hz, 3H), 1.15 (t, $J = 8.9$ Hz, 1H)。

C146-P2: LCMS m/z $[M+H]^+ = 719.3$, ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.17 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 7.23 (dd, $J = 8.6, 1.9$ Hz, 1H), 7.06 (dd, $J = 11.0, 8.6$ Hz, 1H), 5.31 – 5.22 (m, 1H), 4.38 (t, $J = 16.1$ Hz, 1H), 3.65 (dq, $J = 22.0, 7.2$ Hz, 3H), 3.54 – 3.43 (m, 4H), 3.25 – 3.10 (m, 3H), 2.96 (dt, $J = 13.5, 9.9$ Hz, 1H), 2.42 (s, 3H), 2.35 (ddd, $J = 13.2, 8.8, 6.2$ Hz, 1H), 2.19 (s, 3H), 2.01 (d, $J = 13.7$ Hz, 1H), 1.93 – 1.86 (m, 4H), 1.61 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 1.51 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 1.39 (dd, $J = 20.7, 10.2$ Hz, 3H), 1.15 (t, $J = 8.9$ Hz, 1H)。

C146-P3-A: LCMS m/z $[M+H]^+ = 719.3$, ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.19 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 7.22 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.07 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 5.31 (dt, $J = 9.0, 5.1$ Hz, 1H), 4.47 – 4.29 (m, 1H), 3.66 – 3.57 (m, 3H), 3.54 – 3.43 (m, 4H), 3.25 – 3.10 (m, 3H), 2.96 (dt, $J = 13.5, 9.9$ Hz, 1H), 2.42 (s, 3H), 2.35 (ddd, $J = 13.2, 8.8, 6.2$ Hz, 1H), 2.19 (s, 3H), 1.99 (dt, $J = 13.0, 6.8$ Hz, 1H), 1.93 – 1.86 (m, 4H), 1.61 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 1.51 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 1.39 (dd, $J = 20.7, 10.2$ Hz, 3H), 1.15 (t, $J = 8.9$ Hz, 1H)。

C146-P3-B: LCMS m/z $[M+H]^+ = 719.3$, ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.18 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 7.24 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.05 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 5.24 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H), 4.42 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 3.75 – 3.48 (m, 3H), 3.54 – 3.43 (m, 4H), 3.27 – 3.12 (m, 3H), 3.09 – 2.90 (m, 1H), 2.43 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 2.04 – 1.98 (m, 1H), 1.90 (t, $J = 6.5$ Hz, 4H), 1.62 (dd, $J = 15.1, 7.2$ Hz, 1H), 1.52 – 1.47 (m, 1H), 1.42 (d, $J = 7.3$ Hz, 3H), 1.34 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 1.16 (t, $J = 8.6$ Hz, 1H)。

实施例 11: (C145、C145-P1、C145-P2)



1) 中间体 **C145-2** 的合成:

将化合物 **C145-1** (0.1 g, 0.19 mmol, 根据专利申请 WO2024079623 中公开的合成方法制备得到) 加入到二氯甲烷(2 mL), 然后加入 2-氯-1-甲基吡啶鎓碘化物(0.053 g, 0.21 mmol)、DIEA (0.11 g, 0.85 mmol) 和 **C142-2** (0.55 g, 0.25 mmol), 室温搅拌 4 个小时。LCMS 显示反应完成, 反应液中加入二氯甲烷和水, 分液萃取, 二氯甲烷萃取两次, 合并有机相, 有机相用稀盐酸洗两次, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩, 柱层析得到 **C145-2** (70 mg, 收率: 54.0%)。m/z [M+H]⁺ = 696.1。

2) 中间体 **C145-3** 的合成:

将化合物 **C145-2** (0.7 g, 0.1 mmol) 溶解在二氯甲烷(1 mL) 溶液中, 滴加三氟乙酸(1 mL), 反应液在 25 °C 下搅拌反应 1 小时。LCMS 显示反应完成, 反应液过滤, 浓缩, 得到黄色油状物粗品 **C145-3** (100 mg, 三氟乙酸盐, 收率: 100%)。m/z [M+H]⁺ = 596.3。

3) 产物 **C145** 的合成:

将化合物 **C87-11** (23 mg, 0.15 mmol) 和 HOAT (22 mg, 0.16 mmol) 加入到 DMF (1 mL) 中, 加入 EDCI (35 mg, 0.18 mmol), 室温搅拌 1 个小时。再加入 **C145-3** (0.10 g 粗品, 0.1 mmol) 和 DIEA (39 mg, 0.3 mmol), 室温搅拌 30 分钟。LCMS 显示反应完成, 反应液过滤, 滤液通过反相柱纯化得到 **C145** (40 mg, 收率: 54.5%)。LCMS m/z [M+H]⁺ = 732.4。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.18 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.55 (s, 1H), 7.27 – 7.19 (m, 1H), 7.06 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.80 (dd, *J* = 4.6, 2.6 Hz, 1H), 5.35 (ddd, *J* = 21.9, 9.5, 4.3 Hz, 1H), 4.40 (t, *J* = 15.3 Hz, 1H), 4.26 (q, *J* = 2.9 Hz, 2H), 3.86 – 3.65 (m, 4H), 3.55 – 3.43 (m, 2H), 3.17 (s, 2H), 3.05 – 2.94 (m, 1H), 2.54 – 2.50 (m, 1H), 2.43 (s, 3H), 2.42 – 2.38 (m, 1H), 2.18 (s, 3H), 2.06 (dt, *J* = 12.9, 2.6 Hz, 1H), 1.62 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 1.53 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 1.45 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.37 – 1.30 (m, 1H), 1.21 – 1.11 (m, 1H)。

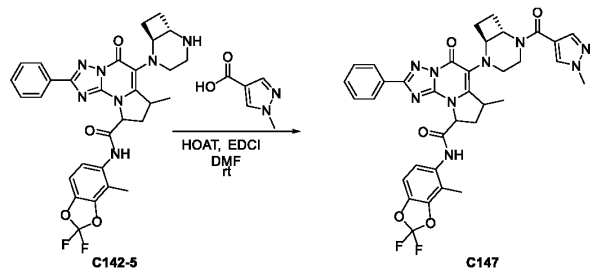
4) 产物 **C145-P1** 和 **C145-P2** 的合成:

C145 经制备型高效液相色谱纯化(SHIMADZU LC 20, Agilent 10 Prep-C18, 250*21.2 mm, 10 μm, A: H₂O (0.1% FA), B: ACN, UV: 214 nm, 流速 20ml/min), 得到 **C145-P1** (8 mg, 保留时间 10.675 min) 和 **C145-P2** (18 mg, 保留时间 11.147 min)。

C145-P1: LCMS m/z [M+H]⁺ = 732.4。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.16 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 7.23 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.08 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.85 – 6.72 (m, 1H), 5.38 (dd, *J* = 8.5, 5.7 Hz, 1H), 4.37 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H), 4.31 – 4.22 (m, 2H), 3.81 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.74 – 3.65 (m, 2H), 3.56 – 3.45 (m, 2H), 3.35 – 3.15 (m, 4H), 2.58 (q, *J* = 7.2 Hz, 1H), 2.43 (s, 3H), 2.38 (dd, *J* = 8.0, 5.3 Hz, 1H), 2.18 (s, 3H), 2.00 (dq, *J* = 13.0, 6.1 Hz, 1H), 1.71 – 1.60 (m, 1H), 1.54 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.48 – 1.40 (m, 1H), 1.21 – 1.12 (m, 1H)。

C145-P2: LCMS m/z [M+H]⁺ = 732.4。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.22 (s, 1H), 8.48 (s, 1H), 7.24 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.06 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.80 (s, 1H), 5.33 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H), 4.40 (d, *J* = 13.1 Hz, 1H), 4.26 (d, *J* = 3.1 Hz, 2H), 3.85 – 3.65 (m, 4H), 3.51 (dd, *J* = 16.8, 7.4 Hz, 2H), 3.20 – 3.10 (m, 4H), 3.07 – 2.93 (m, 1H), 2.54 – 2.50 (m, 1H), 2.41 (s, 3H), 2.18 (s, 3H), 2.06 (d, *J* = 13.5 Hz, 1H), 1.63 (q, *J* = 6.6, 5.4 Hz, 1H), 1.45 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.40 – 1.27 (m, 1H), 1.19 – 1.10 (m, 1H)。

实施例 12: (C147)



将化合物 (100 mg, 0.88 mmol)和 HOAT (100 mg, 0.73 mmol)加入到 DMF (1 mL)中, 加入 EDCI (150 mg, 0.78 mmol), 室温搅拌 1 个小时。再加入 **C142-5** (0.08g, 0.14 mmol)和 DIEA (78 mg, 0.6 mmol), 室温搅拌 30 分钟。LCMS 显示反应完成, 反应液过滤, 滤液经反相柱纯化得到 **C147** (25 mg, 收率: 26.5%)。LCMS m/z [M+H]⁺ = 698.4. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.30 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 8.21 – 8.03 (m, 3H), 7.71 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.57 (dd, *J* = 5.2, 2.0 Hz, 3H), 7.30 (dd, *J* = 23.9, 8.6 Hz, 1H), 7.14 (dd, *J* = 23.1, 8.6 Hz, 1H), 5.56 – 5.33 (m, 1H), 4.47 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.80 – 3.69 (m, 1H), 3.65 – 3.49 (m, 2H), 3.43 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 3.08 (dt, *J* = 13.3, 9.8 Hz, 1H), 2.25 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 2.11 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 1.60 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 1.50 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.46 – 1.36 (m, 1H), 1.21 – 1.11 (m, 1H).

生物测试部分
实验例 1 生物活性测试
WRN 解旋酶的 ATPase 活性测定

采用商业化的 ADP-Glo 检测试剂盒(Promega, #V9102), 检测 ATP 经 WRN 解旋酶水解所产生的 ADP 含量, 可反映 WRN 解旋酶的 ATPase 活性。

45 nt 寡 DNA 单链 FLAP26 (TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCAAAGTAAAACGACGCCAGTGC)由安升达公司合成。参见例如 Brosh RM Jr 等人, J Biol Chem, 2002 Jun;277(26):23236-45。配制反应缓冲液(30 mM Tris pH 7.5, 2 mM MgCl₂, 0.02% BSA, 50 mM NaCl, 0.1% pluronic F127), 在 384 孔透明板中依次加入 5 μL 3 × 待测化合物(在反应缓冲液中稀释至 0.5% DMSO, 最终的起始浓度为 10 μM, 1:3 倍比稀释, 共 9 个梯度), 5 μL 3 × WRN 重组蛋白和 3 × ATP 底物溶液(反应缓冲液稀释, WRN 和 ATP 终浓度分别为 10 nM 和 300 μM), 振荡混匀, 37°C 孵育 3 小时。接着, 用反应缓冲液配制 3 × FLAP26 溶液, 取 5 μL 溶液(FLAP26 的终浓度为 0.4 nM)加入到 384 孔透明板中, 振荡混匀, 启动酶促反应, 室温孵育 30 分钟。

取 5 μL 上述混合液转移至 384 孔白板中, 加入 5 μL ADP-Glo 试剂, 振荡混匀, 避光室温孵育 40 分钟。在上述溶液中加入 10 μL 激酶检测试剂, 振荡混匀, 避光室温孵育 30 分钟后, 记录化学发光读值。计算化合物对酶活性的抑制率, 将抑制率数值和化合物浓度对数值采用非线性回归(剂量响应-可变斜率)拟合得到待测化合物的 IC₅₀ 值。

表 1 本申请实施例化合物的 WRN ATPase 活性数据

化合物	WRN ATPase 活性抑制 IC ₅₀ (μM)
C89-P1	0.001
C89-P2	0.273
C89-P3	0.003
C88-P1	0.002
C88-P2	0.134
C88-P3	0.011
C87-P1-B	0.02
C87-P2-B	0.006
C90-P2	0.01
C90-P3	0.013
C93-P1	0.009
C93-P3	0.009

C43-P1	0.004
C43-P3	0.004
C142-P1	0.001
C142-P3-B	0.001
C143-P1	0.014
C143-P3	0.017
C144-P1	0.022
C144-P3-B	0.005
C145	0.002
C145-P1	0.007
C145-P2	0.005
C147	0.001

由表 1 可见，本申请化合物对 WRN 蛋白 ATPase 活性有良好的抑制活性。

肿瘤细胞增殖抑制活性测定

细胞株	货号	厂商
HCT116	CBP60028	南京科佰
SW48	FH0526	富衡
DLD1	FH0017	富衡

利用 CRISPR/Cas9 技术在 DLD1 细胞中稳定敲除 WRN 基因构建 DLD1-WRN-KO 细胞株，用于评估化合物潜在的脱靶效应。

人结肠腺癌细胞 SW48 细胞体外单层培养，培养条件：含 10%胎牛血清、1%青霉素和链霉素的 DMEM 培养基，37℃ 5% CO₂ 培养。人结肠腺癌细胞 HCT116 细胞体外单层培养，培养条件：含 10%胎牛血清、1%青霉素和链霉素的 McCoy's5A 培养基，37℃ 5% CO₂ 培养。DLD1-WRN-KO 细胞体外单层培养，培养条件：含 10%胎牛血清、1%青霉素和链霉素的 1640 培养基，37℃ 5% CO₂ 培养。一周两次用胰酶消化传代。

将待测化合物处理微卫星不稳定的 SW48 细胞株和 HCT116 细胞株以及对照细胞 DLD1-WRN-KO 细胞株 4 天后，使用诺唯赞公司的 CellCounting-Lite 试剂盒检测 ATP 水平，以评估待测化合物对于肿瘤细胞株生长的抑制情况。

在本申请中，将 SW48 细胞株、HCT116 细胞株及 DLD1-WRN-KO 细胞株以适当的细胞密度接种于 96 孔细胞培养板中。24 小时之后，使用待测化合物以最高浓度 10 μM，1:3 倍比稀释 9 个梯度处理细胞，另外设置 DMSO 处理组。在 37℃/5% CO₂ 培养箱中培养 4 天。为测试待测化合物对于肿瘤细胞的增殖抑制，将细胞于室温平衡 30 分钟，随后每孔加入 100 μL 细胞增殖检测试剂 CellCounting-Lite (CCL)，振荡 5 分钟后避光孵育 10 分钟。使用 Thermo Varioskan LUX-3020 多功能酶标仪读取化学发光值，以转化为增殖指数从而计算化合物对肿瘤细胞增殖的抑制率，将抑制率数值和化合物浓度对数值采用非线性回归(剂量响应-可变斜率)拟合得到化合物的 IC₅₀ 值。

表 2 本申请实施例化合物的肿瘤细胞增殖抑制活性数据

化合物	SW48 增殖抑制 IC ₅₀ (μM)	HCT116 增殖抑制 IC ₅₀ (μM)	DLD1-WRN-KO 增殖抑制 IC ₅₀ (μM)
C89-P1	0.0002		>10
C89-P2	0.24		>10
C89-P3	0.0002		>10
C88-P1	0.0004		>10
C88-P2	0.087		>10
C88-P3	0.002		>10
C87-P1-B	0.109		>10
C87-P2-B	0.001		>10
C90-P2	0.148		>10
C90-P3	0.029		>10
C93-P1	0.010	0.019	>10
C93-P3	0.0042	0.0054	>10
C43-P1	0.010	0.009	>10

C43-P3	0.011	0.004	>10
C142-P1	0.001	0.0025	>10
C142-P3-B	0.0002	0.0001	>10
C143-P1	0.012	0.0097	>10
C143-P3	0.0027	0.0072	>10
C144-P1	0.018		>10
C144-P3-B	0.006		>10
C146-P1	0.011		>10
C146-P3-B	0.008		>10
C145	0.014		>10
C145-P1	0.018	0.015	>10
C145-P2	0.012	0.007	>10
C147	0.2	0.11	>10

由表 2 可见，本申请化合物对对微卫星不稳定的 SW48 细胞和 HCT116 细胞有较好的增殖抑制活性，而对 WRN 敲除的 DLD1 细胞无显著的增殖抑制活性，有较好的选择性。

实验例2 肝微粒体稳定性测试

评定受试化合物在 CD-1 小鼠、Sprague-Dawley 大鼠、比格犬、食蟹猴和人的肝微粒体中的一相代谢稳定性。

实验体系：

该测试体系所用到的动物和人肝微粒体购买自 Xenotech、Corning 或其他有资质的供应商，在使用前储存在低于 -60℃冰箱内。

实验简介：

供试品和对照化合物在 37±1℃条件下，分别与动物和人肝微粒体孵育一定的时间，最长孵育时间为 60 分钟，在指定的时间点取出样品，用含有内标的乙腈或其他有机溶剂终止反应。离心后，所产生的上清液用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)方法进行检测。

实验方法：

1. 缓冲液的配制

用 4000 mL 的超纯水溶解 73.21 g 三水磷酸氢二钾和 10.78 g 磷酸二氢钾。使用 10%磷酸或者 1 M 氢氧化钾调整溶液 pH 值在 7.40±0.10 之间，其终浓度为 100 mM。

2. 工作液的配制

供试品粉末用 DMSO 或其他的有机溶剂配制成一定浓度的储备液，然后用合适的有机溶剂进行进一步的稀释。

对照化合物睾酮、双氯芬酸和普罗帕酮用 DMSO 配制成 10 mM 的储备液，然后用合适的有机溶剂进行进一步的稀释。

3. 肝微粒体溶液的配制

用 100 mM 磷酸钾盐缓冲液将各种属的微粒体稀释成 2×的工作液。在反应体系中微粒体的终浓度为 0.5 mg/mL。

4. 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADPH)再生体系的配制

称量适量的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADP)和异柠檬酸(ISO)粉末，溶于氯化镁溶液中，振荡混匀。加入适量的异柠檬酸脱氢酶(IDH)，轻轻地上下颠倒混合均匀。在反应体系中终浓度分别为：1 mM NADP、1 mM 氯化镁、6 mM ISO 和 1 unit/mL IDH。

5. 终止液的配制

终止液用含有内标(甲苯磺丁脲或其他合适的化合物)的乙腈或其他有机溶剂来配制。配制好的终止液储存于 2-8℃冰箱。

6. 孵育过程

孵育将在 96 孔板中完成。准备 8 块孵育板，分别命名为 T0、T5、T15、T30、T45、T60、Blank60 和 NCF60。前 6 块板对应反应时间点分别为 0、5、15、30、45 和 60 分钟。Blank60 板中不加入供试品或对照化合物，并在孵育 60 分钟后取样。NCF60 板中用磷酸钾盐缓冲液代替 NADPH 再生体系溶液进行孵育 60 分钟。所有条件样品为三个平行。

将微粒体和供试品或对照化合物混合，然后将除 T0 和 NCF60 外的孵育板 Blank60、T5、

T15、T30、T45 和 T60 放置于 37℃ 水浴锅中预孵育大约 10 分钟。孵育板 T0 中先加入终止液后再添加 NADPH 再生体系工作液，孵育板 NCF60 每个样品孔内添加 98 μL 磷酸钾盐缓冲液以启动反应。孵育板 Blank60、T5、T15、T30、T45 和 T60 预孵育结束后，每个样品孔内添加 98 μL NADPH 再生体系工作液以启动反应。反应的温度为 37±1℃，反应的最终体积是 200 μL，反应体系中包括 0.5 mg/mL 的微粒体、1.0 μM 的底物、1 mM NADP、6 mM ISO 和 1 unit/mL IDH。

分别在 5、15、30、45 和 60 分钟时，将含有内标的冷的终止液加入到反应板中以终止反应。

将终止后的所有反应板摇匀，并在 4℃，3220 ×g，离心 20 分钟。将上清液稀释一定比例后进行 LC-MS/MS 分析。

样品分析

样品分析采用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)方法进行，不含标准曲线和质控样品。使用分析物峰面积与内标峰面积的比值进行半定量测定。分析物和内标的保留时间、色谱图采集和色谱图的积分采用软件 Analyst (Sciex, Framingham, Massachusetts, USA)进行处理。

每个分析批中每种基质中的内标峰面积的 CV 应在 20%之内。

数据分析

通过下面公式中化合物与内标峰面积的比值转化成剩余率求得化合物的体外消除速率常数 ke：

剩余率 (%) = $\frac{\text{任一时间点化合物与内标的峰面积比值}}{\text{0分钟时化合物与内标的峰面积比值}} \times 100$

$C_t = C_0 \bullet e^{-k_e \bullet t}$

when $C_t = \frac{1}{2} C_0$,

$T_{1/2} = \frac{Ln2}{k_e} = \frac{0.693}{k_e}$

CL_{int} (mic) = 0.693/ T_{1/2} /微粒体蛋白含量(孵育时微粒体浓度 mg/mL)

CL_{int} (liver) = CL_{int} (mic) ×肝脏中微粒体蛋白量(mg/g)× 肝重体重比

根据充分搅拌模型(well stir model)，肝固有清除率和肝清除率可以通过如下公式换算。

CL_(liver) = (CL_{int(liver)} * Q_h) / (CL_{int(liver)} + Q_h)

公式中的参数参见下表。

数据分析公式中的参数

种属	肝重体重比 (g/kg 体重)	肝血流量(Q _h) (mL/min/kg)	微粒体蛋白量 (mg/g 肝重)
小鼠	88	90.0	45
大鼠	40	55.2	
犬	32	30.9	
猴	30	43.6	
人	20	20.7	

实验例 3 肝细胞代谢稳定性测试

本实验例用于测试化合物在肝细胞中的代谢稳定性。

用预热的培养基制备 0.5x10⁶/mL 的肝细胞悬液，随后将 198 μL 预热的细胞悬液加入至 96 孔板中。在 96 孔板的每个孔中加入 2 μL 待测化合物，使得终浓度为 1 μM，设置 2 复孔。对于 T=0 分钟的样品，将化合物与细胞充分混匀 1 分钟，随后立即取 25 μL 样品加入到冰浴的 125 μL 终止溶液(含 200 ng/mL 甲苯磺丁脲和 200 ng/mL 拉贝洛尔的乙腈溶液)并混匀。同时，将所有板放置于 37℃ 5% CO₂ 的培养箱中，摇床设置为 600 rpm。分别在孵育 15、30、60 和 90 分钟时混匀样品，取 25 μL 样品加入到冰浴的 125 μL 终止溶液(含 200 ng/mL 甲苯磺丁脲和 200 ng/mL 拉贝洛尔的乙腈溶液)，混匀后于 500 rpm 振荡 10 分钟。随后，4 °C 条件下，3220×g 离心 20 分钟。离心结束后，从每孔中分别取 80 μL 上清转移至另一个含有 240 μL 超纯水的 96 孔板中。随后用 LC-MS/MS 分析并计算内在清除率(CL_{int})和半衰期(T_{1/2})。

实验例4 大鼠药代动力学测试

本实验例中测试化合物经静脉注射(IV)和灌胃(PO)给药后在SD大鼠体内的药代动力学行为。

给药当天称量大鼠实际体重并计算给药体积。每组 3 只大鼠，每个化合物进行两组测试，一组单次静脉注射给药，另一组单次灌胃给药。通过颈静脉采血方式在规定的时间内(给药后 0.25、0.5、1、2、4、8、24h)采集全血样品。血样采集以后，立即转移至贴有标签的含 K2-EDTA (0.85-1.15 mg) 的商品化样品管中，随后离心处理(3200 x g, 4°C, 10 分钟)并取血浆。将血浆转移至预冷的离心管，在干冰中速冻，随后储存在-60°C 或更低的超低温冰箱中，直到进行 LC-MS/MS 分析。

血浆浓度使用LC-MS/MS方法进行测定。使用WinNonlin Version 6.3 (Pharsight, Mountain View, CA)药动学软件，以非房室模型对化合物的血浆药物浓度数据进行处理。使用线性对数梯形法计算相关药代动力学参数。

实验例5 小鼠药代动力学测试

本实验例中测试化合物经静脉注射(IV)和灌胃(PO)给药后在BALB/c小鼠体内的药代动力学行为。

给药当天称量小鼠实际体重并计算给药体积。每组 9 只小鼠，每个化合物进行两组测试，一组单次静脉注射给药，另一组小鼠单次灌胃给药。通过眼眶采血方式在规定的时间内(给药后 0.083、0.25、0.5、1、2、4、8、24h)采集全血样品。血样采集以后，立即转移至贴有标签的含 K2-EDTA (0.85-1.15 mg) 的商品化样品管中，随后离心处理(3200 x g, 4°C, 10 分钟)并取血浆。将血浆转移至预冷的离心管，在干冰中速冻，随后储存在-60°C 或更低的超低温冰箱中，直到进行 LC-MS/MS 分析。

血浆浓度使用LC-MS/MS方法进行测定。使用WinNonlin Version 6.3 (Pharsight, Mountain View, CA)药动学软件，以非房室模型对化合物的血浆药物浓度数据进行处理。使用线性对数梯形法计算相关药代动力学参数。

化合物编号	给药途径	给药剂量 (mg/kg)	AUC _{0-t} (ng*h/mL)	IV C _{0h} 或者PO C _{max} (ng/mL)	T _{1/2} (h)
C142-P3-B	IV	2	9224	2360	5.6
	PO	10	55042	6096	6.5
C146-P3-B	IV	2	4530	2013	3.5
	PO	10	28222	5299	4.1

实验例 6 hERG 抑制测试

将 HEK293 细胞在含有 10%胎牛血清及 0.8 mg/mL G418 的 DMEM 培养基中培养，培养温度为 37°C，CO₂ 浓度为 5%。细胞用 TrypLE™ Express 消化后离心，调整细胞密度为 2×10⁶ 个细胞/mL，然后用室温平衡摇床轻混细胞 15-20 min，上机进行膜片钳检测。将制备好的细胞的培养基置换为细胞外液。从液体池中吸取细胞内、外液分别加到 QPlate 芯片的细胞内液池、细胞与受试物池中。全细胞膜片钳记录全细胞 hERG 钾电流的电压刺激，并将试验数据由 Qpatch 进行采集并储存。化合物以 30 μM 起始，3 倍稀释，设置 6 个浓度点，每个药物浓度设定为两次给药，时间至少为 5 分钟。将每一个细胞在不含化合物的外液中检测到的电流作为自己的对照组，每个浓度至少使用两个细胞独立重复检测两次。所有电生理试验在室温下进行。

数据分析，首先将每一个药物浓度作用后的电流和空白对照电流标准化($\frac{\text{Peak tail current}_{\text{compound}}}{\text{Peak tail current}_{\text{vehicle}}}$)，然

后计算每一个药物浓度对应的抑制率($1 - \frac{\text{Peak tail current}_{\text{compound}}}{\text{Peak tail current}_{\text{vehicle}}}$)。对每一个浓度计算平均数和标准误，并

计算每种化合物的半抑制浓度： $Y = \text{Bottom} + \frac{\text{Top-Bottom}}{1 + 10^{-(\text{LogIC}_{50} - C) * \text{HillSlope}}}$ 用以上方程对剂量依赖效应进行

非线性拟合，其中 Y 代表抑制率、C 代表受试物浓度，IC₅₀ 为半抑制浓度，HillSlope 代表希尔系数。曲线拟合以及 IC₅₀ 的计算利用 Graphpad 软件完成。

实验例 7 细胞色素氧化酶 P450 抑制测试

1) 缓冲液的配制：

100 mM K-Buffer：将 9.5 mL 原液 A 混合到 40.5 mL 原液 B 中，用超纯水将总体积调至 500 mL，用 KOH 或 H₃PO₄ 滴定缓冲液至 pH 7.4。

原料 A (1 M 磷酸二氢钾):136.5 g 磷酸二氢钾在 1 L 水中；

储备 B (1 M 磷酸二氢钾):174.2 g 磷酸二氢钾在 1 L 水。

2) 受试物的配制

受试物粉末用 DMSO 或其他的有机溶剂配制成一定浓度的储备液，然后用合适的有机溶剂进行进一步的稀释。

3) 体外孵育

CYP450 酶代谢表型研究的肝微粒体体外孵育体系，是由制备的肝微粒体辅以氧化还原型辅酶，再加入酶特异的选择性抑制剂，在模拟生理温度及生理环境的条件下进行的生化反应。

4) 原型药物或代谢产物的检测

采用 LC-MS/MS 测定温孵液中原型药物或其代谢产物的浓度。

实验例 8 小鼠肿瘤药效学模型

本实验例中测试化合物经灌胃(PO)给药后在小鼠移植瘤模型中的体内药效。

人结肠腺癌细胞 SW48 细胞体外单层培养，培养条件：含 10%胎牛血清、1%青霉素和链霉素的 DMEM 培养基，37℃ 5% CO₂ 培养。一周两次用胰酶消化传代。当细胞饱和度为 80%-90%时，收取细胞，计数，接种。将 0.1 mL (10⁷ 个) SW48 细胞皮下接种于每只小鼠的右后背。接种细胞后第 14 天，瘤体积平均值达到 200 mm³ 左右，随机分组给药，每天一次灌胃给药，并记录体重和肿瘤体积变化。给药一定天数后，结束实验。统计并分析肿瘤体积变化和小鼠体重变化。结果显示本申请中的化合物具有优异的肿瘤抑制效果。

实验例 9 PXR 激活测试

本实验例中测试化合物对 PXR 的激活作用。

96 孔细胞培养板每孔接 100 μL 体积 DPX2 稳转细胞(4.5×10⁵ 个细胞/mL，用 Puracyp 培养基配制)，随后将 96 孔板置于 37℃ 培养箱。24 小时后，将 96 孔板从培养箱中取出，培养基换成 100 μL 待测化合物(终浓度为 10 μM 和 30 μM)、阳性对照化合物利福平(终浓度为 10 μM)和 DMSO 处理组(终浓度为 0.1%)，设置 3 复孔。将待测板放回培养箱中。24 小时后，将培养基更换为新鲜配制的待测化合物和利福平溶液，再次将待测板放回培养箱中。化合物处理 48 小时后，将待测板从培养箱中取出，弃去孔中的培养基，用 PBS 洗两遍，加入 50 μL 含 1x CellTiter-Fluor™ 细胞活力测定试剂的培养基，37℃ 孵育 30 分钟。取出待测板，平衡至室温，酶标仪检测 400 nm 激发光/505 nm 发射光条件下的荧光信号。随后，每孔加入 50 μL 含有 ONE-Glo 测定试剂的培养基，振荡混匀，室温孵育 5 分钟，酶标仪检测化学发光。分析数据，以评价待测化合物对 PXR 的激活作用。结果显示本申请中化合物没有明显的 PXR 激活活性。

实验例 10：样品在 FaSSIF 溶液中饱和溶解度的测试

1. 实验过程

1.1 FaSSIF 溶液配制

缓冲液(pH 6.5)配制：

称取氢氧化钠约 0.21 g、磷酸二氢钠二水合物约 2.24 g、氯化钠 3.09 g，加水 500 mL，溶解后，用 1N 氢氧化钠或 1N 盐酸调节 pH 至 6.5。

称取 FaSSIF 固体 112 mg 于 50 mL 容量瓶中，加入上述缓冲液溶解，并稀释至刻度，摇匀，室温静置 2h 以上。

1.2 样品配制

供试品：取供试品约 1 mg，加 FaSSIF 溶液 1 mL，室温搅拌过夜，离心，取上清液进行分析。

对照品溶液：精密称取供试品约 1.5 mg 于 50 mL 容量瓶中，加入 DMF 溶解并稀释至刻度，混匀，得到对照品溶液。

1.3 流动相配制

流动相 A：准确量取纯化水 1000 mL，加入甲酸 1 mL，混匀，超声脱气，得到流动相 A。

流动相 B：乙腈。

1.4 色谱条件

仪器	HPLC
色谱柱	Waters XBridge C18, 4.6*50 mm 3.5 um
样品盘(°C)	off
柱温(°C)	30
UV 波长(nm)	254
洗针溶液	MeOH

流速(mL/min)	1.0	
运行时间(min)	6	
梯度洗脱表		
时间(min)	流动相 A (%)	流动相 B(%)
0	90	10
0.5	90	10
6	10	90
7	10	90
7.1	90	10
10	90	10

实验例 11：小分子与 WRN 蛋白共晶

纯化的重组 WRN (500-945)蛋白(储存缓冲液：50 mM HEPES, 500 mM NaCl, 0.5 mM TCEP, pH 7.5, 5%甘油), 浓缩到 7 mg/ml, 与相应的溶于 100% DMSO 的化合物混合, 使得化合物终浓度为 2mM, 混合后于 4℃孵育 2 小时, 于桌面冷冻离心机 eppendorf 5418 R 上 12000 rpm, 4℃离心 10 分钟, 然后在 Mosquito Xtal3 或者 Formulatrix NT8 移液机器人上进行结晶, 结晶所使用的试剂盒为商业化试剂盒如 Hampton Research 的 Crystal Screen/Crystal Screen 2, Index, PEG/Ion, PEGRx HT 等。获得的初始晶体围绕相应的条件进行优化, 最终在 0.1 M 柠檬酸钠 pH 5.0; 8-12% w/v PEG 6,000, 或 0.2 M 酒石酸钾钠; 0.1 M BIS-TRIS pH 6.5; 8-12% w/v PEG 10,000, 或 0.1 M 柠檬酸钠 pH 5.0; 16-20% w/v PEG 20,000 条件下获得了可用于衍射的晶体, 晶体在以结晶条件加 20%-25%的甘油进行冷冻保护后速冻于液氮中, 送往同步辐射光源进行数据收集工作。

实验例 12：CYP 诱导测试

1) 人肝细胞的制备与铺板

培养基制备

在生物安全柜中制备以下培养基, 并在使用前于 4℃ 储存:

肝细胞解冻培养基(通过混合以下成分制备: Williams E 培养基、等渗 Percoll、DPBS、谷氨酰胺、HEPES、胎牛血清、人重组胰岛素和地塞米松)。

铺板培养基(通过混合以下成分制备: Williams E 培养基、胎牛血清、地塞米松、青霉素/链霉素、人重组胰岛素、谷氨酰胺和 HEPES)。

孵育培养基(通过混合以下成分制备: Williams E 培养基、地塞米松、ITS、青霉素/链霉素、谷氨酰胺和 HEPES、无血清)。

肝细胞解冻与处理

将一小瓶冷冻保存的人肝细胞在 37℃ 水浴中解冻 2 分钟。在生物安全柜中用 70%酒精擦拭小瓶。使用宽口移液管尖端将肝细胞转移到 50 mL 预热的肝细胞解冻培养基中。加入约 500 μL 肝细胞解冻培养基彻底冲洗小瓶, 盖好盖子, 颠倒几次。

在室温下以 150 g 离心 10 分钟。小心吸取上清液, 并用铺板培养基稀释至接种密度为 0.55×10⁶ 个细胞/mL。将 100 μL 转移到胶原蛋白 I 包被的 96 孔板的每个孔中。将板置于培养箱中, 在 37℃、5% CO₂/95%空气环境和 95%相对湿度下孵育 4 - 6 小时。

后续处理

孵育后, 在显微镜下观察细胞形态。轻轻晃动板以松动碎片, 并用孵育培养基稀释的 0.25 mg/mL Matrigel 替换 125 μL 培养基。将板放回培养箱中再孵育 18 小时。此时培养物即可用于诱导研究。

2) 与测试化合物共孵育

化合物配制

将测试化合物在 DMSO 中配制成 1000×最高工作浓度, 并在孵育培养基中配制成最高工作浓度, 通过目视检查确定化合物在两种溶液中的溶解性。然后在 DMSO 中制备测试化合物、阴性对照和阳性对照诱导剂的 1000×终浓度储备液, 并使用 37℃ 预热的孵育培养基稀释至各自的工作浓度。通过向 5 mL 温热的孵育培养基中加入 5 μL DMSO 制备阴性对照。有时测试化合物可能使用更高浓度的 DMSO 配制, 或直接在含 0.1% DMSO 的培养基中配制成终浓度。

测试化合物和阳性对照诱导剂(利福平)浓度: 10 μM。

处理操作

从培养箱中取出肝细胞板。在显微镜下观察细胞形态。用 DMSO 对照、诱导剂或测试化合物

溶液替换相应孔中的培养基，每种处理设置三个重复。

孵育与换液

在 24 小时和 48 小时后，从培养箱中取出肝细胞板并在显微镜下观察细胞形态。用从 DMSO 储备液新鲜稀释的测试化合物更换培养基。将板放回培养箱。总孵育时间为 72 小时。

3) mRNA 制备与 RT - PCR

mRNA 制备

使用从 Life Technologies 购买的 Cells - to - Ct 试剂盒制备和测量 mRNA。吸去剩余的 CellTiter 细胞活力检测试剂，用 125 μL 磷酸盐缓冲液洗涤细胞单层两次，然后将板置于冰上。按照说明向裂解液中加入 DNA 酶。向肝细胞板的每个孔中加入 50 μL 裂解液，通过上下吹吸 5 次混合裂解反应。在室温下孵育裂解反应 8 分钟，然后向每个裂解反应中加入 5 μL 终止液，通过上下吹吸 5 次混合。在室温下再孵育 2 分钟。裂解物在 RT 反应前可在 -20°C 或 -80°C 储存长达 5 个月。

逆转录反应

对 QPCR 系统进行逆转录编程：逆转录(保持)，1 个循环，37°C，60 分钟；RT 失活(保持)，1 个循环，95°C，5 分钟；保持，1 个循环，4°C，无限时。

在 15 mL 管中制备 106 个反应的混合物，然后分配到 96 孔 PCR 板的相应孔中。每个板制备一管混合物。

逆转录酶主混合液：2 $\times$ RT 缓冲液，每个反应 25 μL ；20 $\times$ RT 酶混合物，每个反应 2.5 μL ；无核酸酶水，每个反应 7.5 μL ；逆转录主混合液终体积：35 μL 。

向每个逆转录主混合液等分试样中加入 15 μL 样品裂解物，使最终反应体积为 50 μL 。阴性对照(NC)通过加入 15 μL 上一步的混合物(未与细胞孵育)制备。组装完成后，轻轻混合反应，然后短暂离心以将内容物收集在反应容器底部。

使用 QPCR 系统在 37°C 下孵育样品 60 分钟，然后在 95°C 下孵育 5 分钟以失活 RT 酶。将制备好的 RT 样品在 -20°C 储存，直到进行 QPCR 反应。

实时 PCR 循环

对 QPCR 系统进行实时 PCR 循环编程：酶激活(保持)，1 个循环，95°C，5 分钟。PCR (循环)，45 个循环，95°C，15 秒；60°C，1 分钟。

为 CYP 3A4 制备单独的 PCR 鸡尾酒；每个鸡尾酒包含 CYP 特异性探针组和作为内源性对照基因的 ACTB 探针组。

PCR 鸡尾酒：Taqman 基因表达主混合液(2 $\times$)，每个反应 10 μL ；Taqman 基因表达检测探针(20 $\times$ ，CYP3A4，FAM 标记)，每个反应 1 μL ；Taqman 基因表达检测探针(20 $\times$ ，ACTB，VIC 标记)：每个反应 1 μL ；无核酸酶水，每个反应 4 μL ；PCR 鸡尾酒终体积，16 μL 。

在室温下将 PCR 鸡尾酒分配到实时 PCR 板的孔中。用无核酸酶水将 cDNA 样品稀释 3 倍。向每个 PCR 鸡尾酒等分试样中加入 4 μL 稀释的 cDNA 样品，使最终体积为 20 μL ，盖板上，轻轻混合。然后短暂离心以将内容物收集在孔底部。在每个 PCR 板的 2 个孔中，将 4 μL 不含细胞裂解物的 RT 混合物加入到 PCR 鸡尾酒中作为阴性对照。标准曲线模板由相应利福平诱导样品的 cDNA 样品混合物的 3 倍连续稀释液制备，浓度为最高浓度。

将反应置于 QPCR 系统中，并使用实时 PCR 循环程序开始运行。

4) 数据分析：mRNA 水平测定

所有计算均使用 Microsoft Excel 进行。每个小瓶中的 mRNA 含量表示为 2Ct (ACTB)-Ct (CYP)。诱导倍数 mRNA 水平通过以下公式确定：诱导倍数 = mRNA (诱导)/mRNA (溶剂对照)。结果显示本申请中的化合物没有明显的 CYP 诱导活性。

实验例 13: Caco-2 渗透性测试

1) 细胞培养：

试验用 Caco-2 细胞于 DMEM 基础培养液在中在 37°C，5% CO₂ 的条件下培养。其中，DMEM 基础培养液含 10% 胎牛血清、青霉素-链霉素溶液(100 U/mL 和 0.1 mg/mL)、1% MEM 非必需氨基酸和 25 μM HEPES。细胞接种于 Transwell-24 孔细胞板里，接种密度为 1.00×10^5 细胞/mL。细胞置于二氧化碳培养箱中培养 21 天后用于转运实验，期间每隔三天更换一次培养基。

2) 溶液配制：

给药溶液分别为高外排对照品罗红霉素溶液、高渗对照品美托洛尔溶液、低渗对照品阿替洛尔溶液和待测化合物溶液。用 HBSS 配制给药和接收溶液。

药物从顶端到基底转运实验(Apical to Basal, A-B)的溶液配制：A 端 10 μM 给药溶液均含 5 μM

荧光黄和 0.4% DMSO; B 端接收溶液含 0.4% DMSO。

药物从基底到顶端转运实验(Basal to Apical, B-A)的溶液配制: A 端接收溶液 5 uM 荧光黄和 0.4% DMSO; B 端 10 μM 给药溶液含 0.4% DMSO。

3) 孵育步骤:

① 渗透性试验前质量控制试验:

在试验开始前,用电阻仪测定细胞跨膜电阻值,计算单层细胞膜的跨膜表观电阻值。

② 渗透性试验:

实验前,吸去培养板中的细胞培养液后加入 37°C 预温的 HBSS 缓冲液清洗 3 次(Apical 端和 Basal 端)。

药物 A-B 转运实验:吸去板内缓冲液,在 B 端加入 800 μL 37°C 预温的 HBSS 缓冲液,分别在 A 端加入 600 μL 37°C 预温的罗红霉素溶液、美托洛尔溶液、阿替洛尔溶液和待测化合物溶液,并在 A 端取出 100 μL 溶液作为 0 分钟 A 端样本,保存于-20°C 待测。

药物 B-A 转运实验:吸去板内缓冲液,在 A 端加入 500 μL 37°C 预温的 HBSS 缓冲液,分别在 B 端加入 900 μL 37°C 预温的罗红霉素溶液、美托洛尔溶液、阿替洛尔溶液和待测化合物溶液,并在 B 端取出 100 μL 溶液作为 0 分钟 B 端样本,保存于-20°C 待测。

将培养板放入细胞培养箱内孵育 90 分钟。

孵育结束后,分别从所有样本的 A 端和 B 端各取出 100 μL 溶液作为 90 分钟的样本,保存于-20°C 待测。

配制罗红霉素、美托洛尔、阿替洛尔和待测物的标准曲线。所有样本与含内标的乙腈混匀,采用 LC-MS/MS 方法进行检测。

③ 渗透性试验质量控制试验(检查细胞膜的完整性):

在 0 分钟,分别从 A-B 和 B-A 的 A 端取出 100 μL 溶液至于黑色 96 孔板;孵育 90 分钟后,分别从 A-B 和 B-A 的 B 端取出 100 μL 溶液至于黑色 96 孔板。用荧光酶标仪在激发波长 485 nm 发射波长 527 nm 处测量荧光强度。

4) 数据分析

药物渗透性:表观渗透系数(P_{app})=(接收端溶液体积/(膜表面积×时间))×(90 分钟时接收端的药物浓度×稀释倍数)/(0 分钟时给药端的药物浓度×稀释倍数)

其中,时间是以秒为单位的总转运时间。

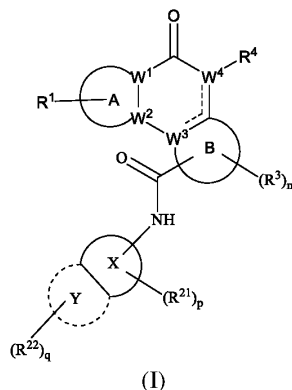
回收率:回收率%=100×(90 分钟时接收端的药物浓度×接收端溶液体积×稀释倍数+90 分钟时给药端的药物浓度×给药端溶液体积×稀释倍数)/(0 分钟时给药端的药物浓度×给药端溶液体积×稀释倍数)。

外排比率(ER)=从 B-A 方向的表观渗透系数(P_{app})/从 A-B 的表观渗透系数(P_{app})

除本文中描述的那些外,根据前述描述,本发明的多种修改对本领域技术人员而言会是显而易见的。这样的修改也意图落入所附权利要求书的范围内。本申请中所引用的各参考文献(包括所有专利、专利申请、期刊文章、书籍及任何其它公开)均以其整体援引加入本文。

权利要求书

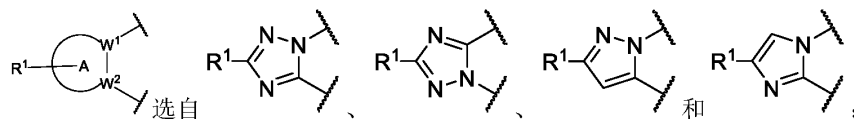
1. 化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、阻转异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、代谢物、同位素标记的化合物或前药，其中所述化合物具有式(I)的结构：



其中：

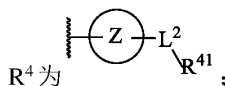
---表示单键或双键，条件是两个双键不直接相连；

W¹、W²、W³和W⁴各自独立地为C或N，条件是C与一个双键连接；优选地，W¹和W²中的至少一者为N，和/或W³和W⁴中的至少一者为N；



R¹、R³、R²¹和R²²在每次出现时各自独立地选自H、氘原子、卤素、-OH、-NH₂、-CN、-NO₂、-SF₅、=CH₂、C₁₋₆烷基、氘代C₁₋₆烷基、卤代C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₃₋₆环烷基、3-10元杂环基、C₆₋₁₀芳基、5-14元杂芳基、C₆₋₁₂芳烷基、-C(=O)R^a、-OC(=O)R^a、-C(=O)OR^a、-OR^a、-SR^a、-S(=O)R^a、-S(=O)₂R^a、-S(=O)₂NR^aR^b、-S(=O)(=NR^a)R^b、-NR^aR^b、-C(=O)NR^aR^b、-NR^a-C(=O)R^b、-NR^a-C(=O)OR^b、-NR^a-S(=O)₂-R^b、-NR^a-C(=O)-NR^aR^b、-P(=O)R^aR^b、-C₁₋₆亚烷基-R^a、-C₁₋₆亚烷基-OR^a、-C₁₋₆亚烷基-NR^aR^b、-O-C₁₋₆亚烷基-NR^aR^b、(-C₃₋₆亚环烷基)-CN和(-C₃₋₆亚环烷基)-C₁₋₆烷基；

当m大于1时，位于同一环原子或者相邻环原子的两个R³连同其所连接的基团任选地共同构成C₃₋₆环、3-10元杂环、C₆₋₁₀芳环或5-14元杂芳环；



L²选自-O-、-C(=O)-、-NRC(=O)-、-S-、-S(=O)-、-S(=O)₂-、C₁₋₆亚烷基和-O-(C₁₋₆亚烷基)-；

R⁴¹选自C₃₋₆环、3-10元杂环、C₆₋₁₀芳环和5-14元杂芳环；

R、R^a和R^b在每次出现时各自独立地选自H、C₁₋₆烷基、C₃₋₁₀环烷基、3-10元杂环基、C₆₋₁₀芳基、5-14元杂芳基和C₆₋₁₂芳烷基；

环B、环X和环Z各自独立地选自C₃₋₆环、3-10元杂环、C₆₋₁₀芳环和5-14元杂芳环；

环Y不存在或者选自C₃₋₆环、3-10元杂环、C₆₋₁₀芳环和5-14元杂芳环；当环Y不存在时，R²²也不存在；

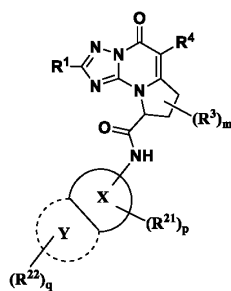
上述亚烷基、烷基、烯基、炔基、亚环烷基、环烷基、烃基、杂环基、杂环、芳基、芳环、杂芳基、杂芳环和芳烷基在每次出现时各自任选地被一个或多个独立地选自下列的取代基取代：氘原子、卤素、-OH、=O、-NH₂、-CN、-NO₂、=CH₂、C₁₋₆烷基、氘代C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₃₋₆环烷基、3-10元杂环基、C₆₋₁₀芳基、5-14元杂芳基、C₆₋₁₂芳烷基、-C(=O)R^c、-OC(=O)R^c、-C(=O)OR^c、-OR^c、-SR^c、-S(=O)R^c、-S(=O)₂R^c、-S(=O)₂NR^cR^d、-NR^cR^d、-C(=O)NR^cR^d、-NR^c-C(=O)R^d、-NR^c-C(=O)OR^d、-NR^c-S(=O)₂-R^d、-NR^c-C(=O)-NR^cR^d、-C₁₋₆亚烷基-OR^c、-C₁₋₆亚烷基-NR^cR^d和-O-C₁₋₆亚烷基-NR^cR^d，所述亚烷基、烷基、烯基、=CH₂、炔基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基和芳烷基各自进一步任选地被一个或多个独立地选自下列的取代基取代

代：卤素、-OH、=O、-C(=O)O-叔丁基、-NH₂、-CN、-NO₂、C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 卤代烷基、C₃₋₆ 环烷基、3-10 元杂环基、C₆₋₁₀ 芳基、5-14 元杂芳基、C₆₋₁₂ 芳烷基、-C₁₋₆ 亚烷基-C₃₋₆ 环烷基、-O-C₁₋₆ 烷基和-C₁₋₆ 亚烷基-O-C₁₋₆ 烷基；

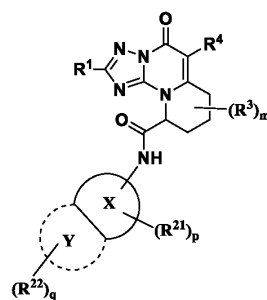
R^c 和 R^d 在每次出现时各自独立地选自 H、C₁₋₆ 烷基、C₃₋₁₀ 环烷基、3-10 元杂环基、C₆₋₁₀ 芳基、5-14 元杂芳基和 C₆₋₁₂ 芳烷基，所述烷基、环烷基、杂环基、芳基、杂芳基和芳烷基进一步任选地被一个或多个独立地选自下列的取代基取代：卤素、-OH、=O、-C(=O)O-叔丁基、-NH₂、-CN、-NO₂、C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 卤代烷基、C₃₋₆ 环烷基、3-10 元杂环基、C₆₋₁₀ 芳基、5-14 元杂芳基、C₆₋₁₂ 芳烷基和-C₁₋₆ 亚烷基-O-C₁₋₆ 烷基；并且

p、q 和 m 各自独立地为选自 1、2 或 3 的整数。

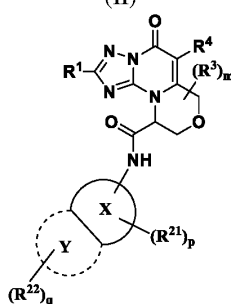
2. 权利要求 1 的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、阻转异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、代谢物、同位素标记的化合物或前药，其中所述化合物具有下式的结构：



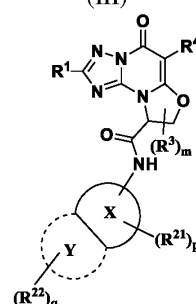
(II)



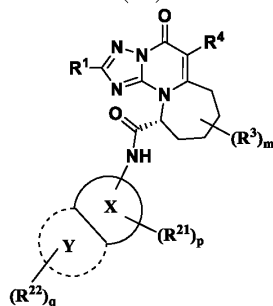
(III)



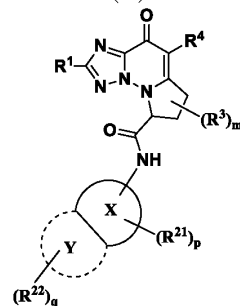
(IV)



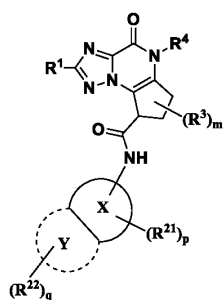
(V)



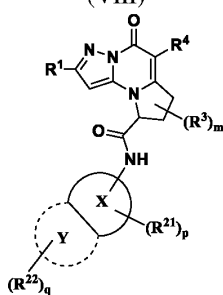
(VI)



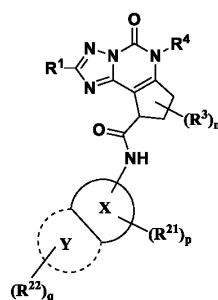
(VII)



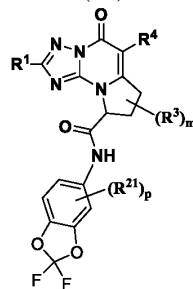
(VIII)



(X)



(IX)



(XI)

3. 权利要求 1 的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、阻转异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、代谢物、同位素标记的化合物或前药，其中：

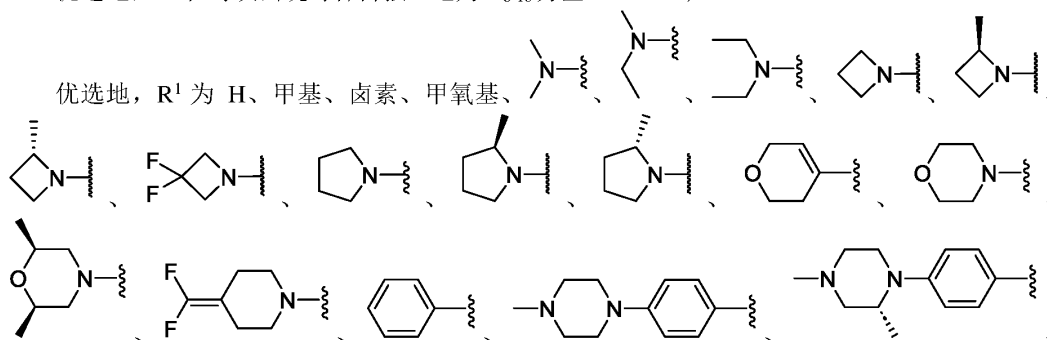
环 B 为 C₃₋₆ 烃环或 3-10 元杂环；

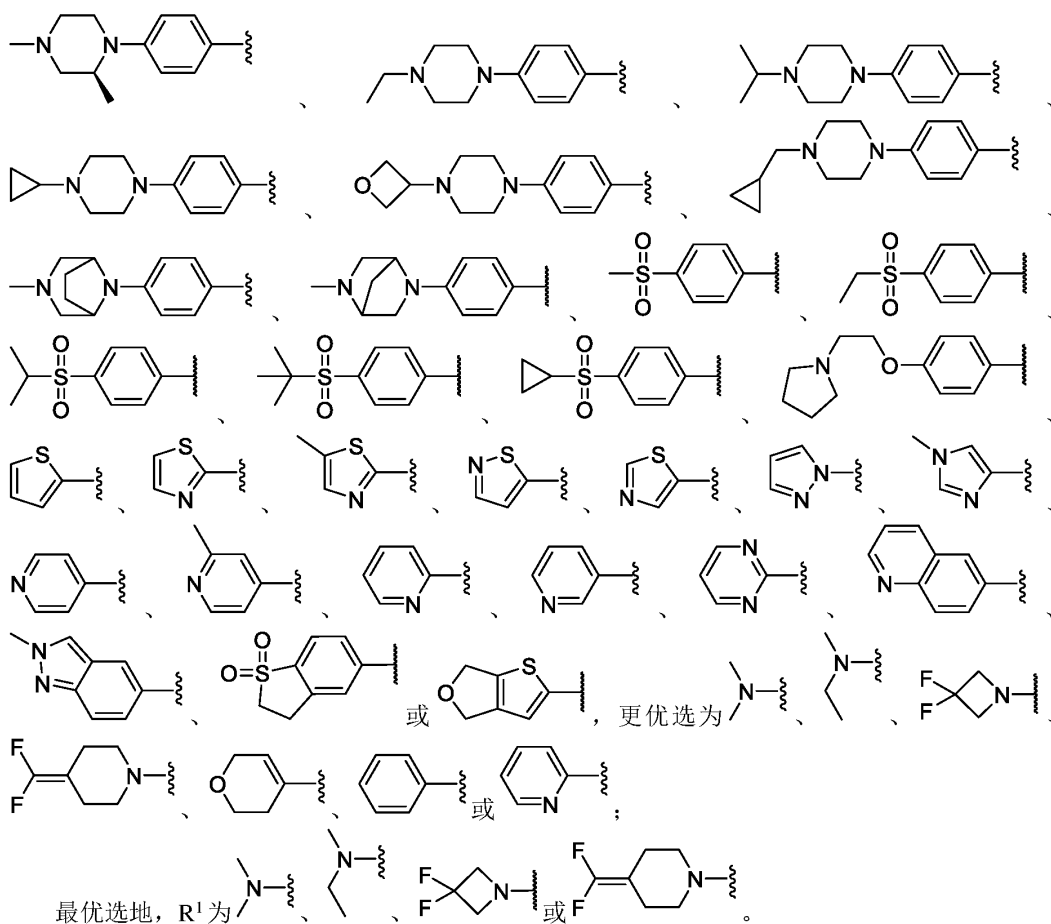
优选地，环 B 为环戊烯环、环己烯环、吡咯烷环、噁唑烷环、哌啶环、吗啉环或氮杂环庚烷环。

4. 权利要求 1-3 中任一项目的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、阻转异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、代谢物、同位素标记的化合物或前药，其中：

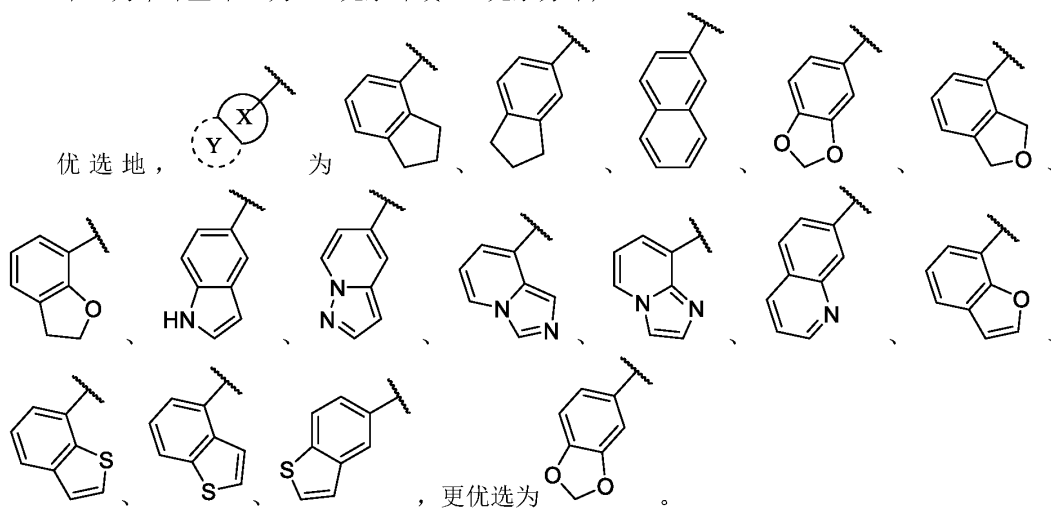
R¹ 在每次出现时各自独立地选自 H、卤素、C₁₋₆ 烷基、C₃₋₆ 环烷基、3-10 元杂环基、C₆₋₁₀ 芳基、5-14 元杂芳基、-S(=O)₂R^a、-OR^a 和 -NR^aR^b，R^a 和 R^b 在每次出现时各自独立地选自 H、C₁₋₆ 烷基、C₃₋₁₀ 环烷基、3-10 元杂环基、C₆₋₁₀ 芳基、5-14 元杂芳基和 C₆₋₁₂ 芳烷基；优选地，R¹ 在每次出现时各自独立地选自 3-10 元杂环基、C₆₋₁₀ 芳基、5-14 元杂芳基和 -NR^aR^b；其中所述烷基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基各自任选地被一个或多个独立地选自下列的取代基取代：卤素、-S(=O)₂R^c、C₁₋₆ 烷基、C₂₋₆ 烯基、=CH₂、C₃₋₆ 环烷基、3-10 元杂环基、C₆₋₁₀ 芳基和 5-14 元杂芳基；所述烷基、烯基、=CH₂、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基各自进一步任选地被一个或多个独立地选自下列的取代基取代：卤素、C₁₋₆ 烷基、C₃₋₆ 环烷基、3-10 元杂环基和 -C₁₋₆ 亚烷基-C₃₋₆ 环烷基；

优选地，R¹ 在每次出现时各自独立地为 C₆₋₁₀ 芳基、-NR^aR^b；





5. 权利要求 1-4 中任一项的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、阻转异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、代谢物、同位素标记的化合物或前药, 其中环 X 为苯环、5-6 元杂环或 5-6 元杂芳环且环 Y 不存在; 或者
环 X 为苯环且环 Y 为 5-6 元杂环或 5-6 元杂芳环;

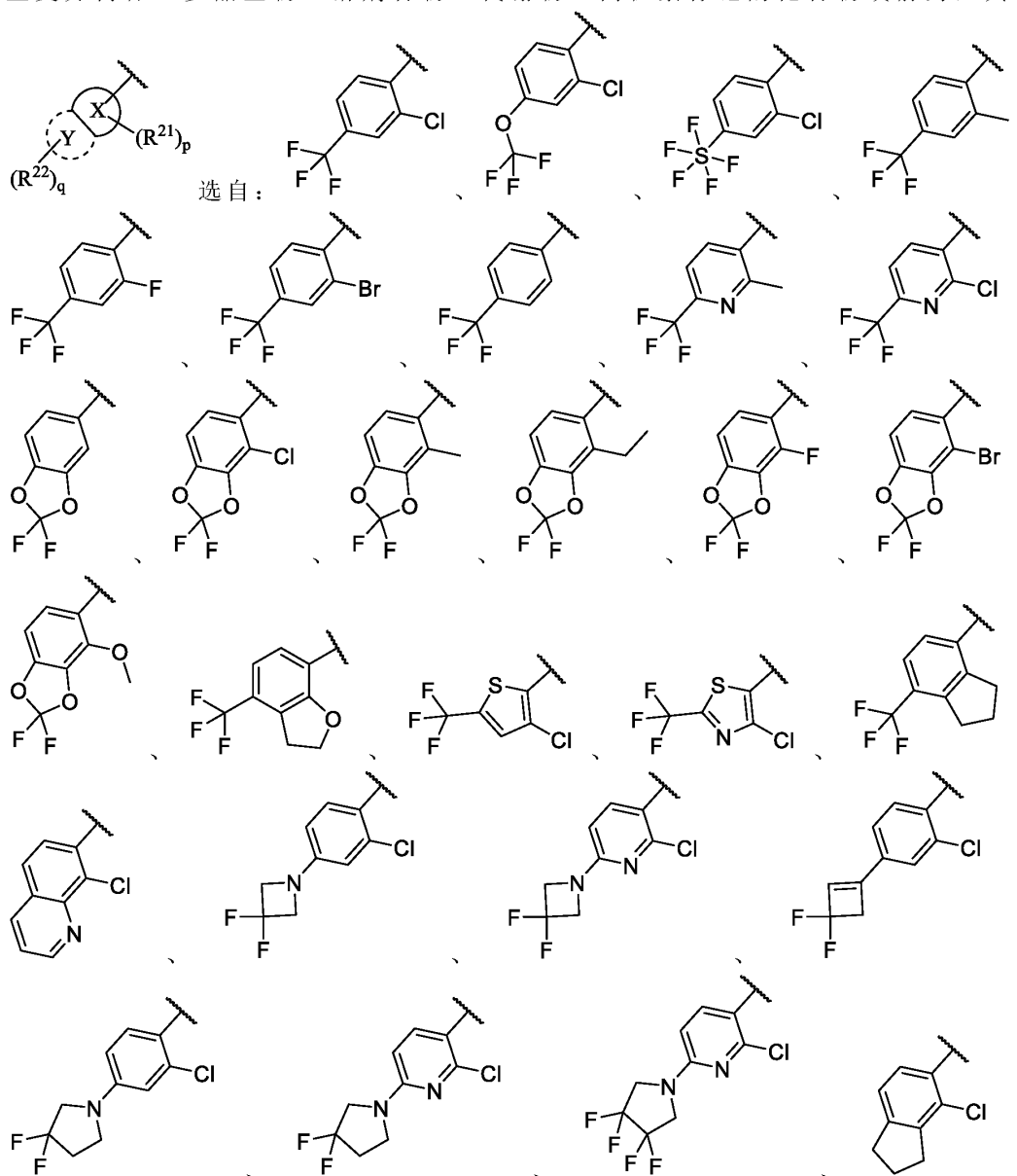


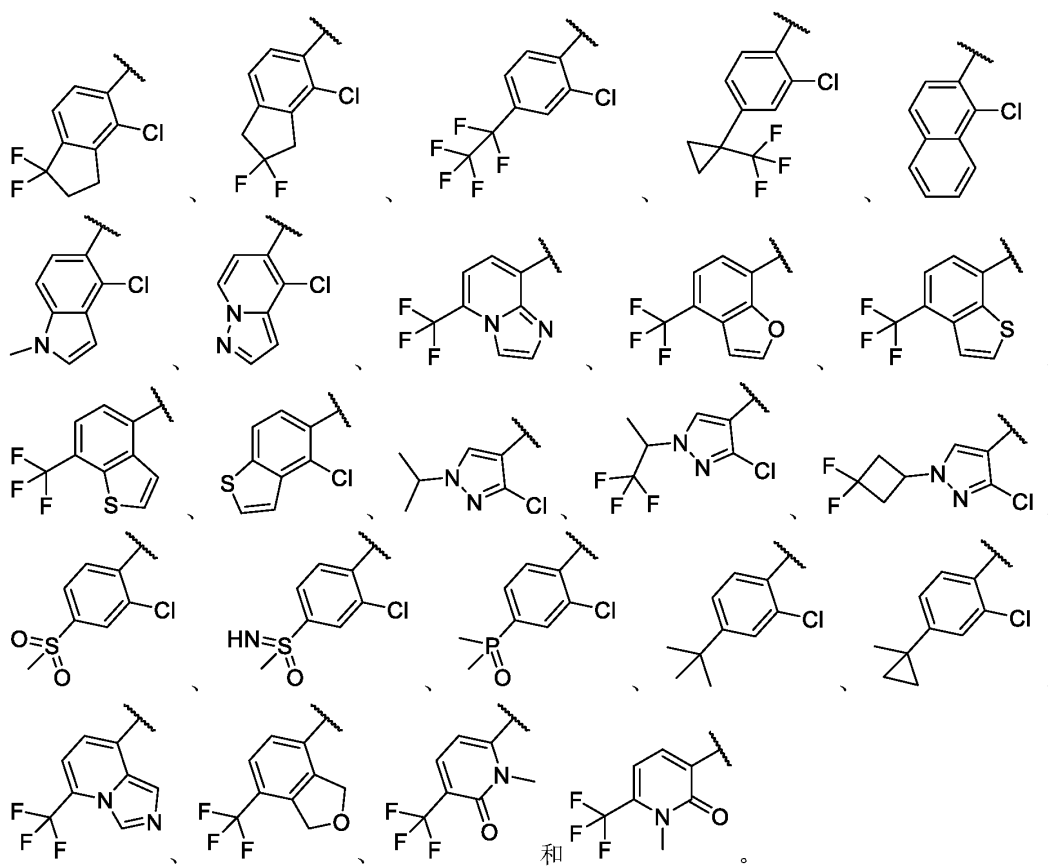
6. 权利要求 1-5 中任一项的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、阻转异构体、

互变异构体、多晶型物、溶剂合物、代谢物、同位素标记的化合物或前药，其中 R^{21} 和 R^{22} 在每次出现时各自独立地选自 H、卤素、 $-SF_5$ 、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-6} 环烷基、3-10 元杂环基、 $-O-(C_{1-6}$ 烷基)、 $-S(=O)_2-(C_{1-6}$ 烷基)、 $-S(=O)_2-(C_{3-6}$ 环烷基)、 $-S(=O)(=NR^a)R^b$ 、 $-P(=O)(C_{1-6}$ 烷基) $_2$ 、 $-(C_{3-6}$ 亚环烷基)-CN 和 $-(C_{3-6}$ 亚环烷基)- C_{1-6} 烷基，所述烷基、亚环烷基、环烷基和杂环基各自任选地被一个或多个独立地选自下列的取代基取代：卤素、 C_{1-6} 烷基和卤代 C_{1-6} 烷基；

优选地， R^{21} 和 R^{22} 在每次出现时各自独立地选自 H、卤素、 $-SF_5$ 、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-6} 环烷基、3-10 元杂环基和 $-O-(C_{1-6}$ 烷基)，所述烷基、环烷基和杂环基各自任选地被一个或多个独立地选自下列的取代基取代：卤素、 C_{1-6} 烷基和卤代 C_{1-6} 烷基。

7. 权利要求 1-6 中任一项的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、阻转异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、代谢物、同位素标记的化合物或前药，其中





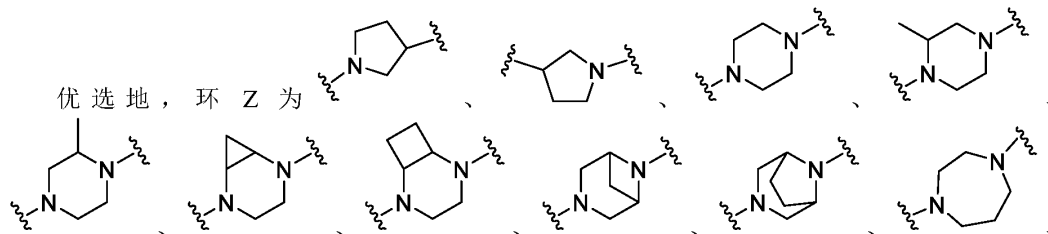
8. 权利要求 1-7 中任一项的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、阻转异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、代谢物、同位素标记的化合物或前药, 其中 R^3 为 H、 C_{1-6} 烷基、 $-OR^a$ 或 $-SR^a$; 优选地, R^3 为 H 或 C_{1-6} 烷基;

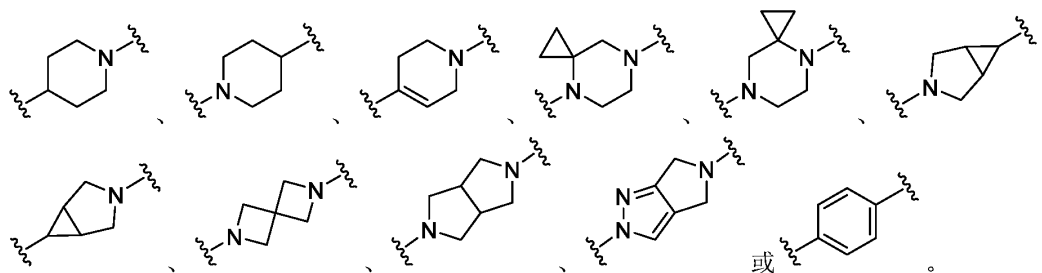
更优选地, R^3 为 H、甲基、乙基、 $-O-CH_3$ 或 $-S-CH_3$; 最优选地, R^3 为 H 或甲基;

当 m 大于 1 时, 位于同一环原子或者相邻环原子的两个 R³ 连同其所连接的基团任选地共同构成 C₃₋₆ 烃环(优选环丙基环), 所述烃环任选地被一个或多个独立地选自下列的取代基取代: 卤素、C₁₋₆ 烷基和卤代 C₁₋₆ 烷基。

9. 权利要求 1-8 中任一项的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、阻转异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、代谢物、同位素标记的化合物或前药，其中环 Z 为 3-10 元杂环或苯环；优选为 5-10 元杂环；更优选为 5-6 元杂环；并且

所述杂环和苯环在每次出现时各自任选地被一个或多个独立地选自下列的取代基取代：卤素、C₁₋₆烷基和卤代 C₁₋₆烷基；

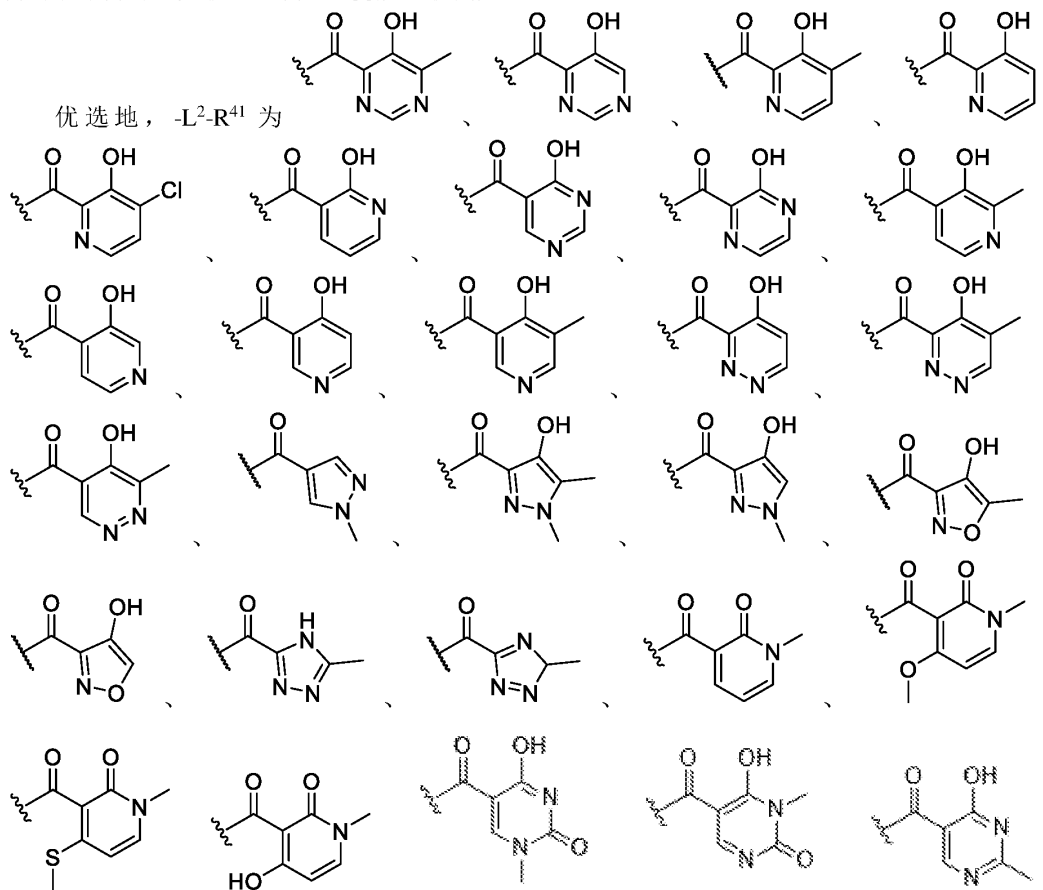


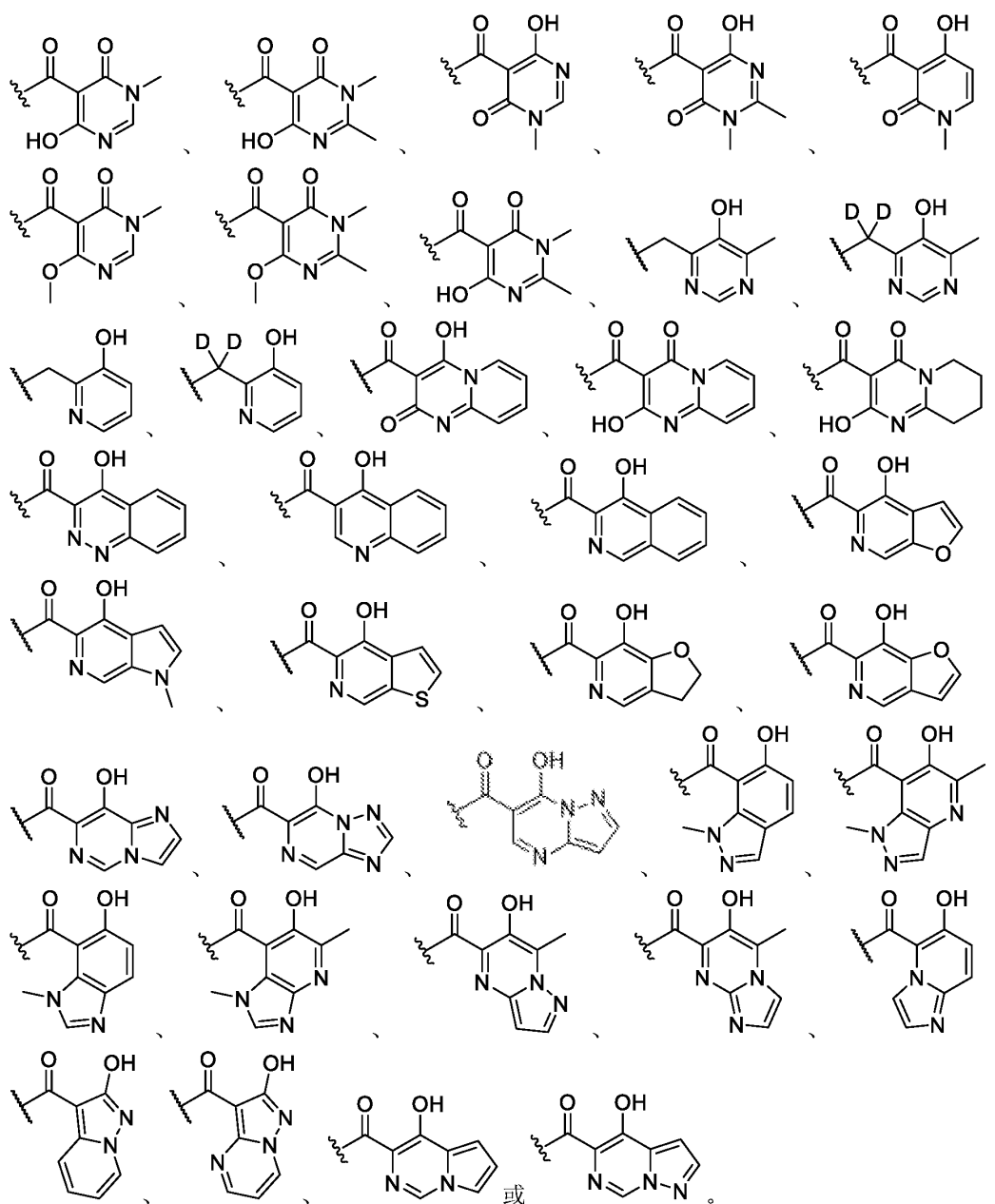


10. 权利要求 1-9 中任一化合物的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、阻转异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、代谢物、同位素标记的化合物或前药，其中 L^2 为 $-C(=O)-$ 、 C_{1-6} 亚烷基或 $-NRC(=O)-$ ，其中 R 为 H 或 C_{1-6} 烷基；

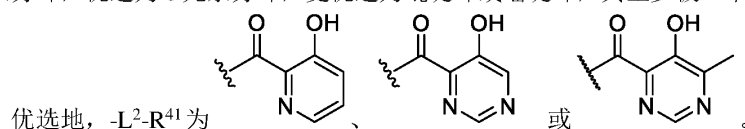
优选地， L^2 为 $-C(=O)-$ 、 $-CH_2-$ 、 $-CD_2-$ 。

11. 权利要求 1-10 中任一化合物的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、阻转异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、代谢物、同位素标记的化合物或前药，其中 R^{41} 选自 3-10 元杂环、 C_{6-10} 芳环和 5-14 元杂芳环，所述杂环、芳环和杂芳环各自任选地被一个或多个独立地选自下列的取代基取代：卤素、 $-OH$ 、 C_{1-6} 烷基、 $-O-C_{1-6}$ 烷基和 $-S-C_{1-6}$ 烷基，优选地，所述杂环、芳环和杂芳环至少被 $-OH$ 或 $-O-C_{1-6}$ 烷基取代；



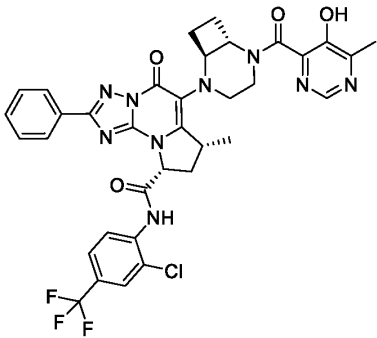
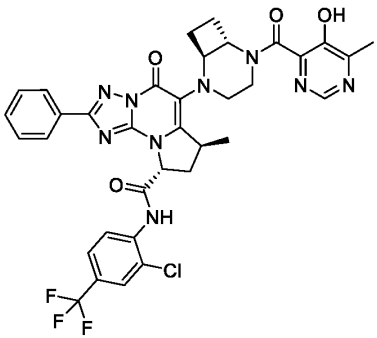
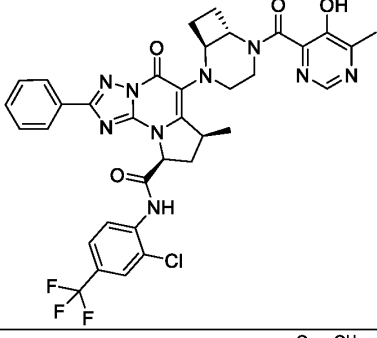
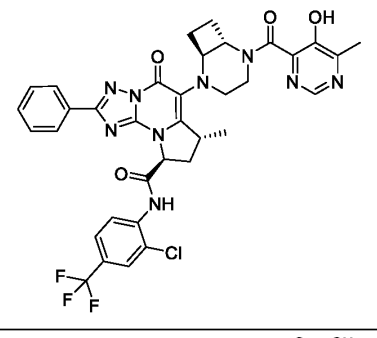
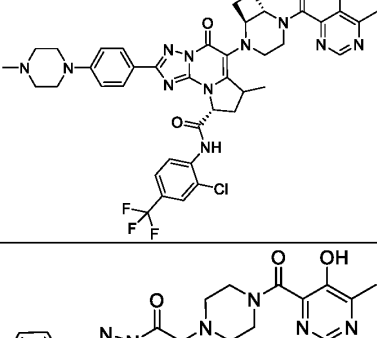
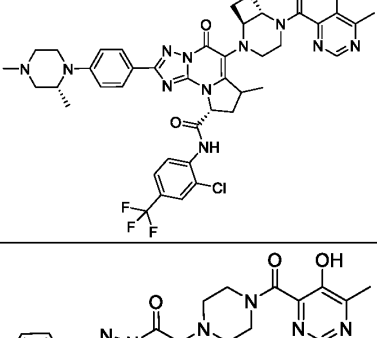
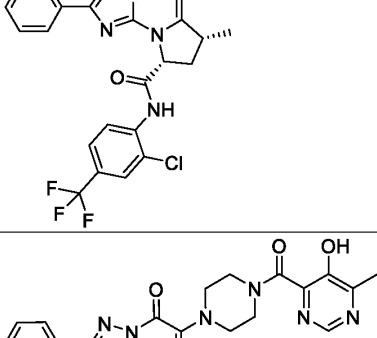
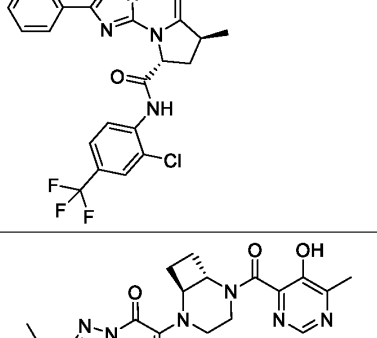
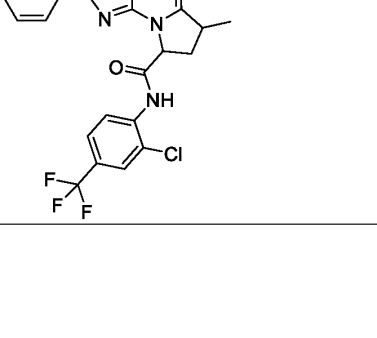
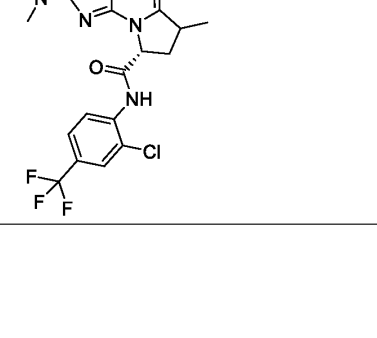


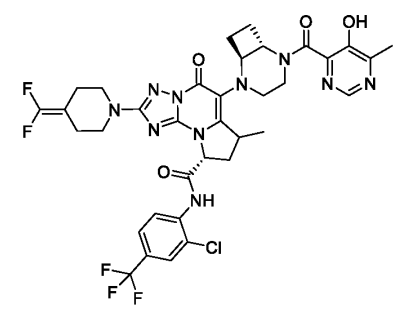
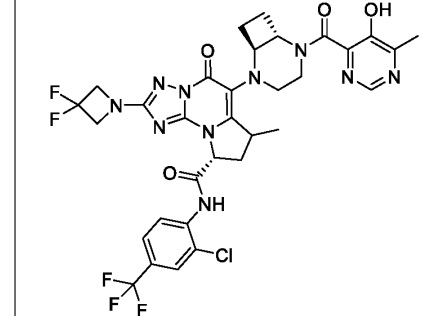
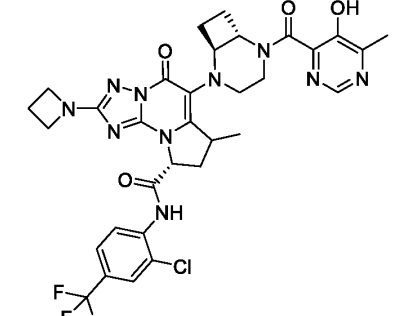
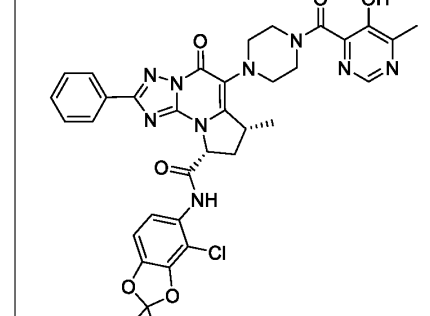
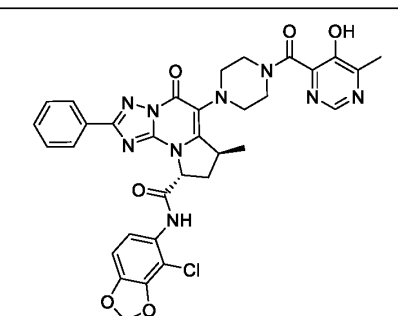
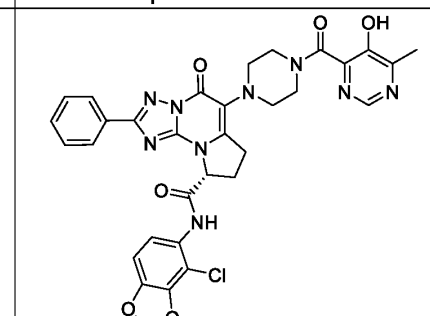
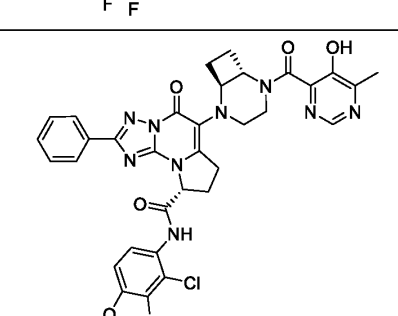
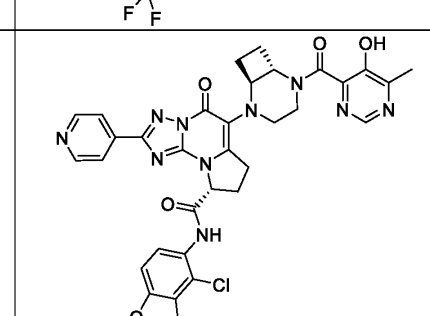
12. 权利要求 1-11 中任一项的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、阻转异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、代谢物、同位素标记的化合物或前药，其中 R^{41} 为 5-6 元杂芳环，优选为 6 元杂芳环，更优选为吡啶环或嘧啶环，其至少被一个 -OH 取代；

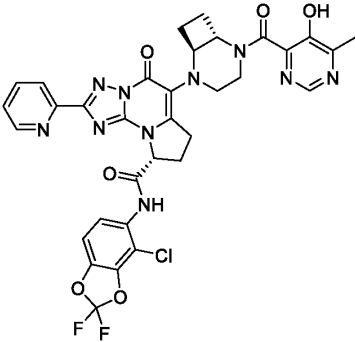
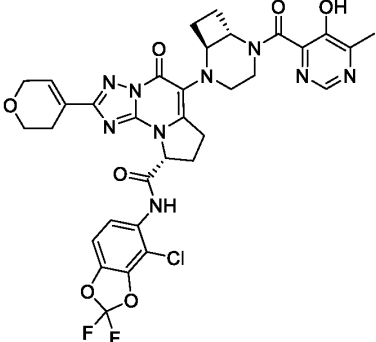
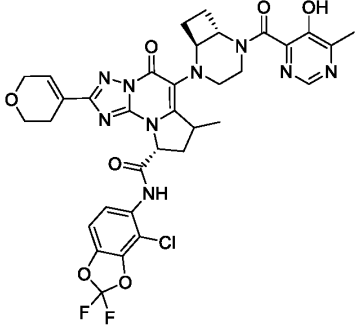
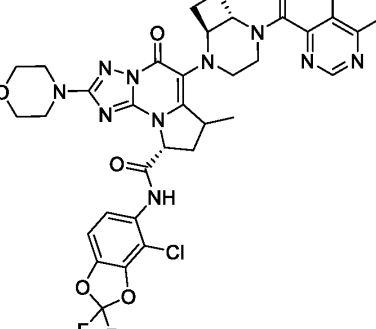
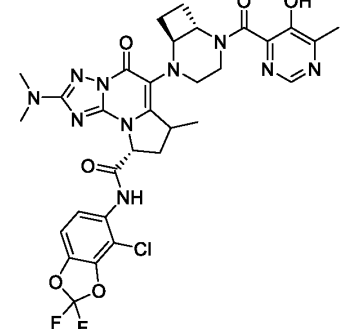
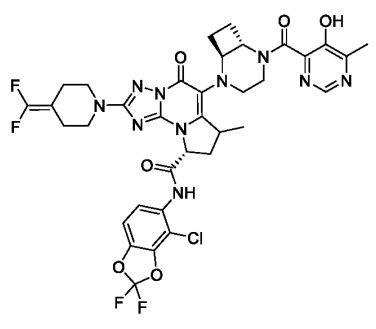
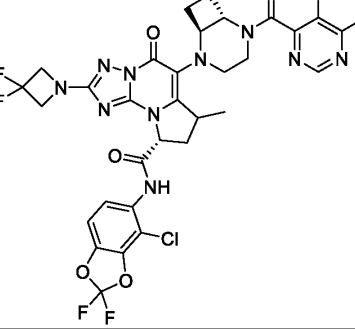
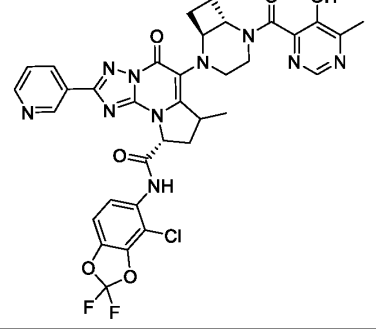


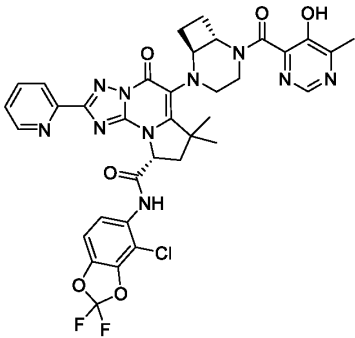
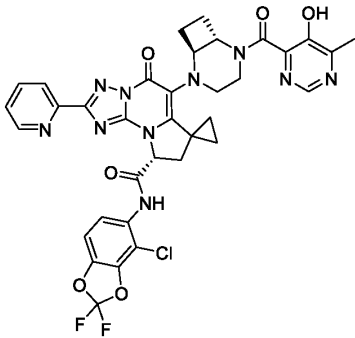
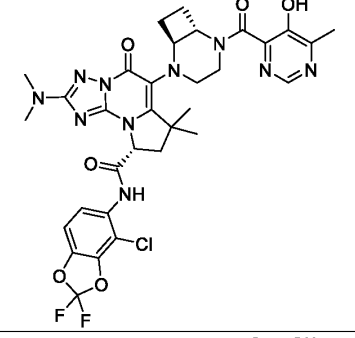
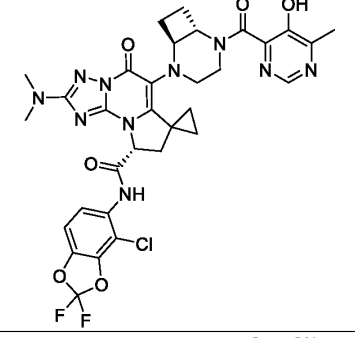
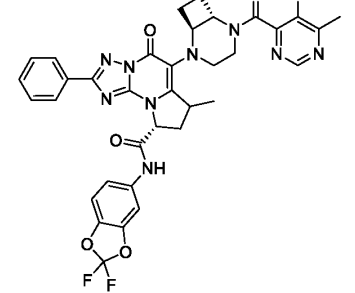
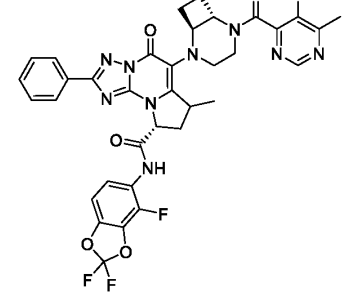
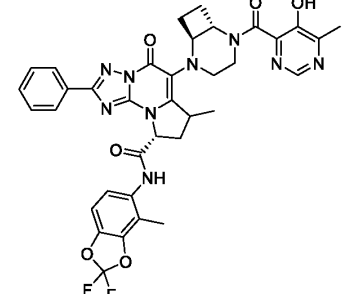
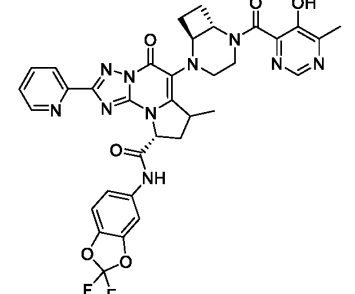
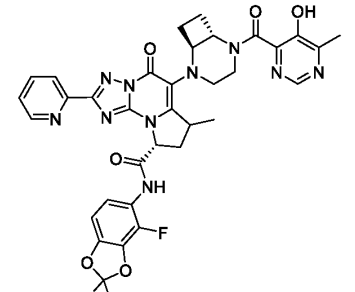
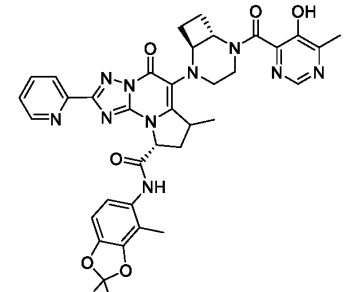
13. 权利要求 1-12 中任一项的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、阻转异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、代谢物、同位素标记的化合物或前药，其中所述化合物选自：

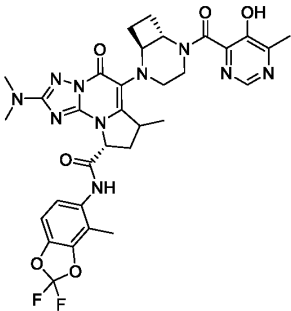
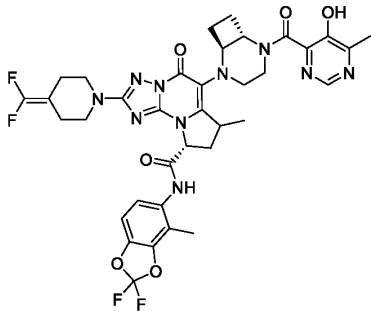
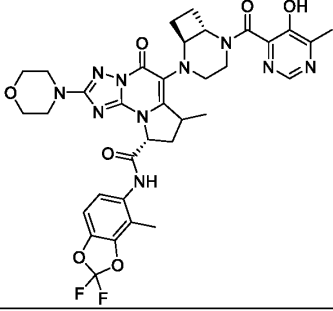
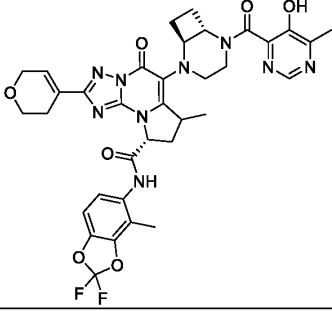
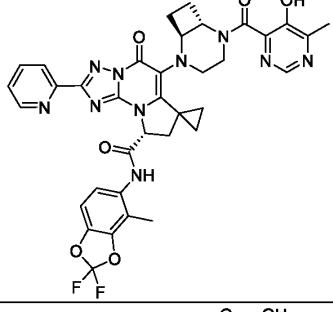
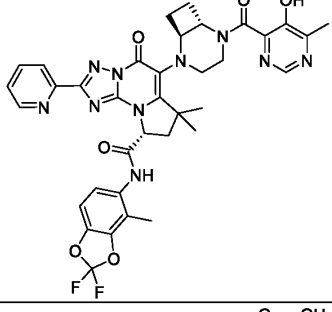
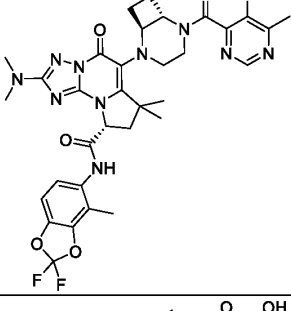
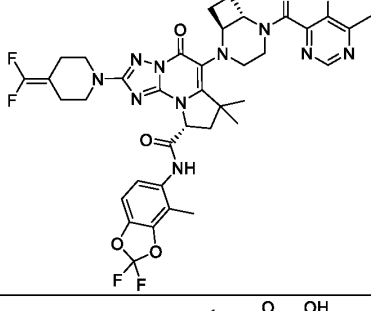
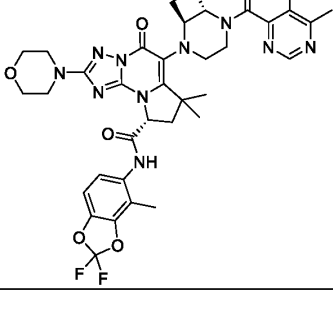
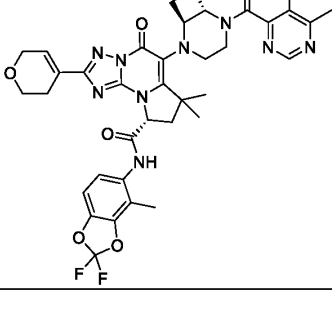
化合物 编号	结构	化合物 编号	结构
C1		C2	
C3		C4	
C5		C6	
C7		C8	

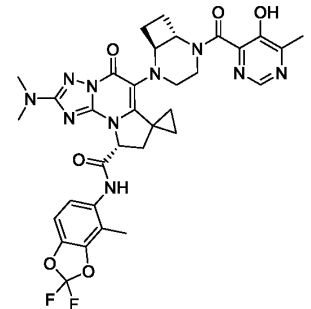
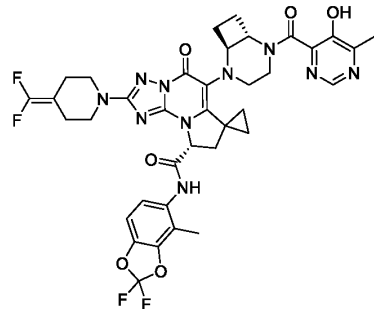
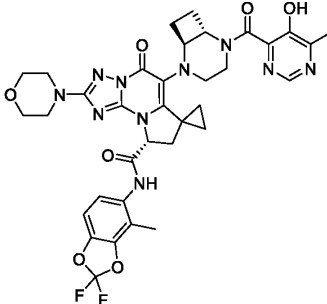
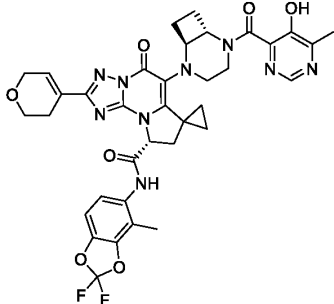
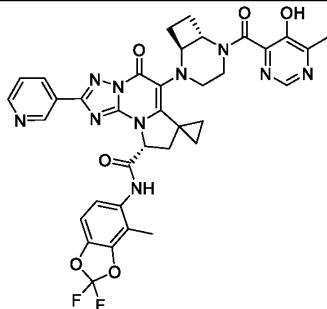
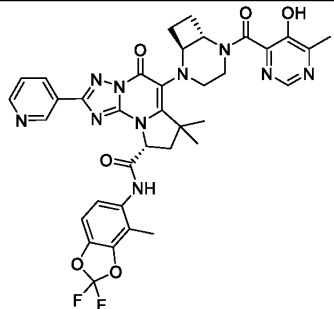
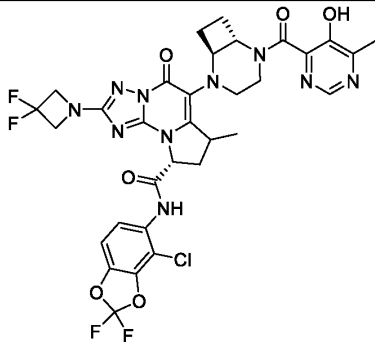
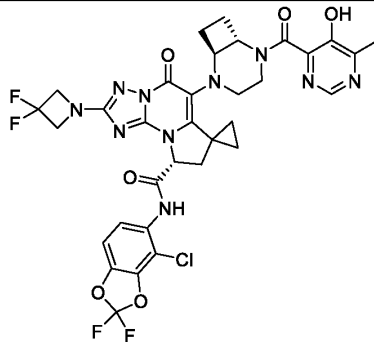
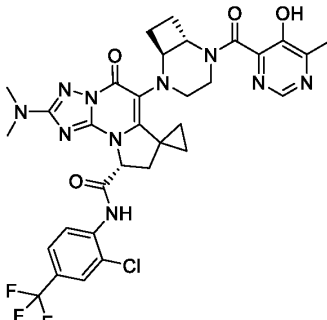
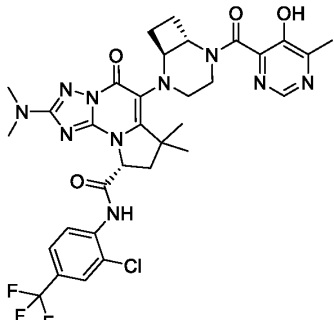
C9		C10	
C11		C12	
C17		C18	
C19		C20	
C21		C22	

C23		C24	
C25		C26	
C27		C28	
C29		C30	

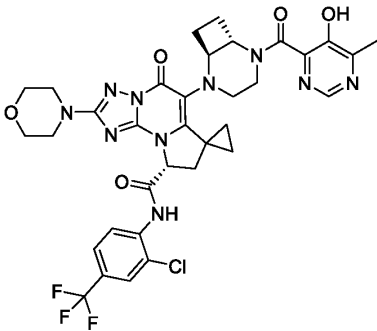
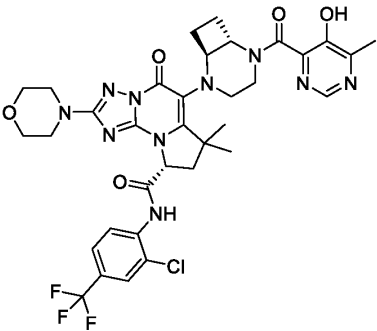
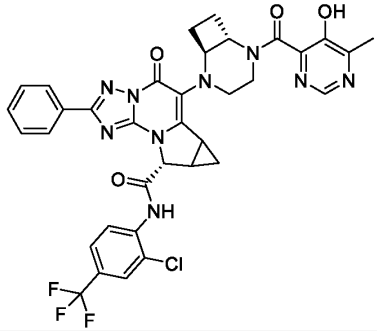
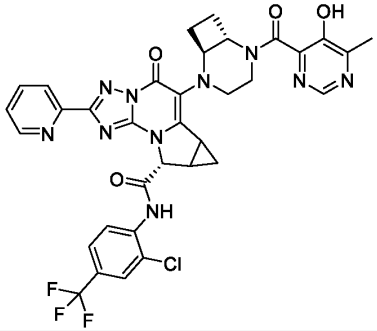
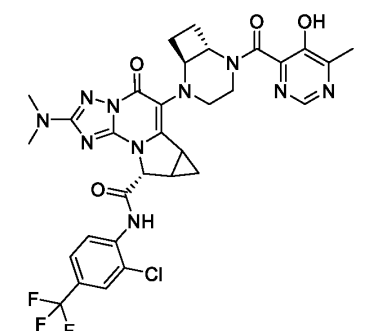
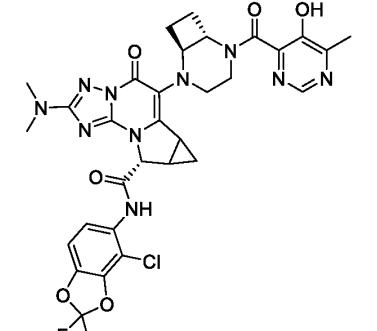
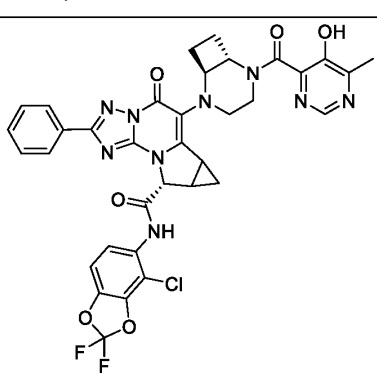
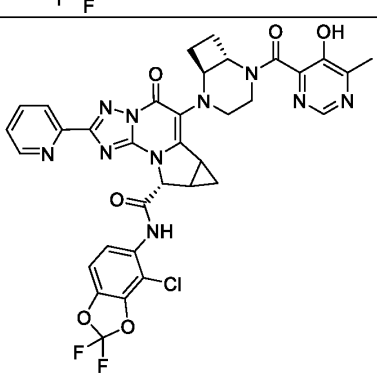
C31		C32	
C33		C34	
C35		C36	
C37		C38	

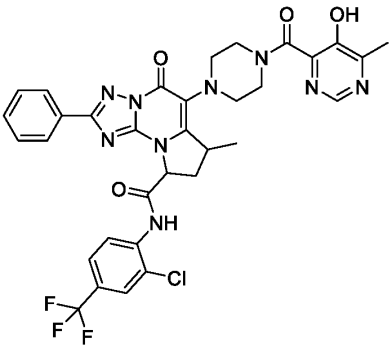
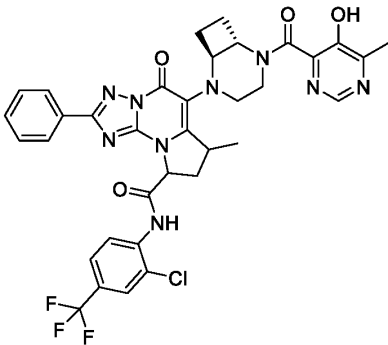
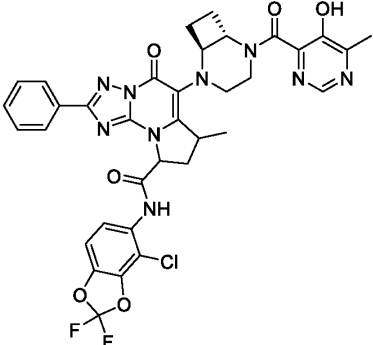
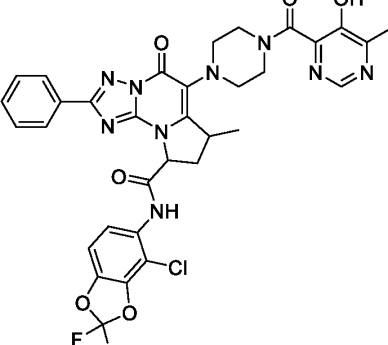
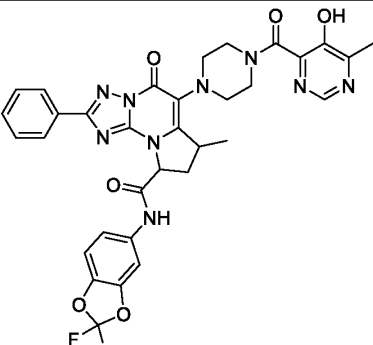
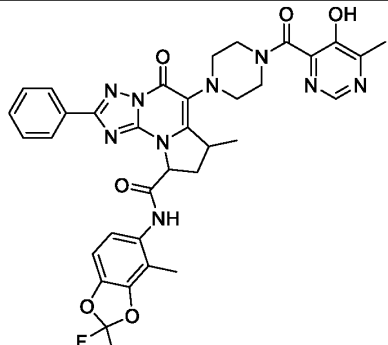
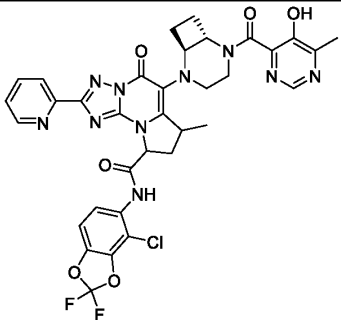
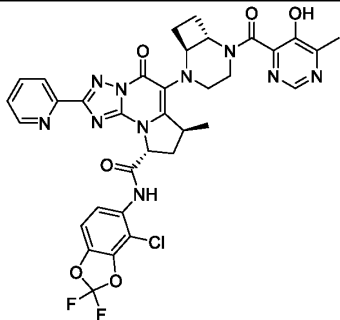
C39		C40	
C41		C42	
C43		C44	
C45		C46	
C47		C48	

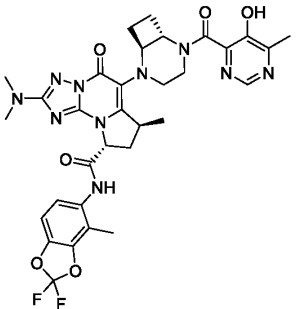
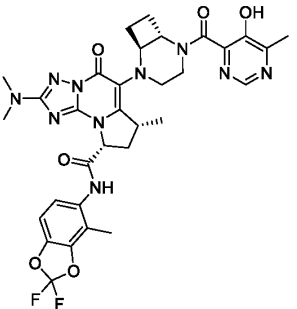
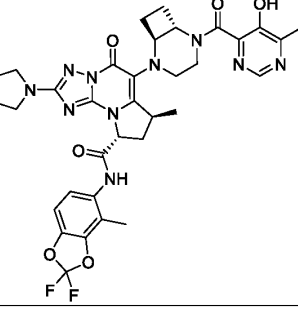
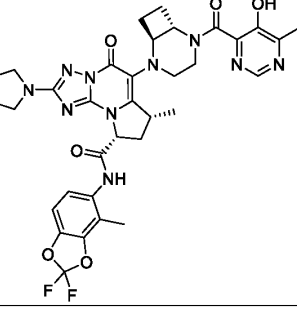
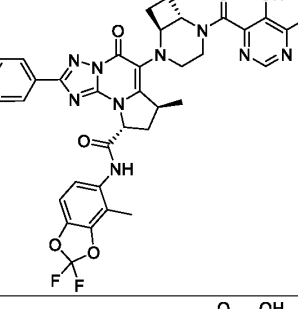
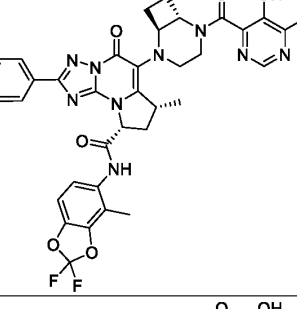
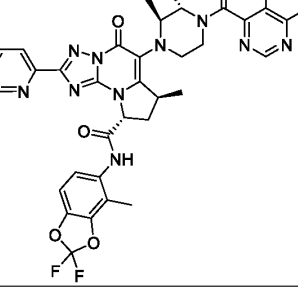
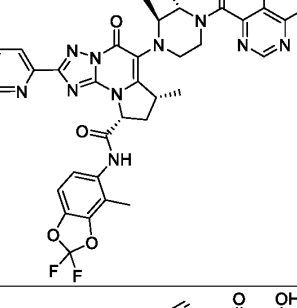
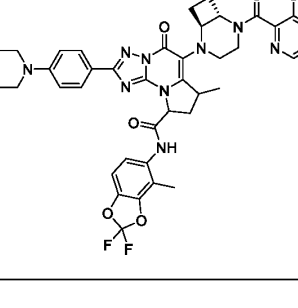
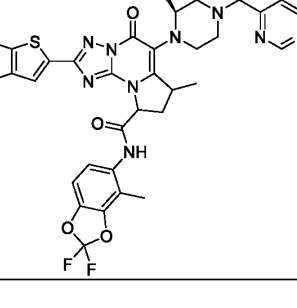
C49		C50	
C51		C52	
C53		C54	
C55		C56	
C57		C58	

C59		C60	
C61		C62	
C63		C64	
C65		C66	
C67		C68	

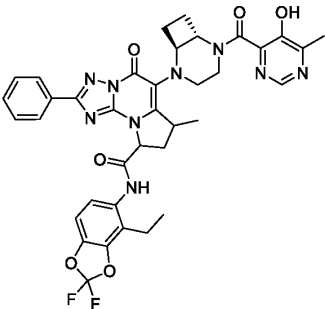
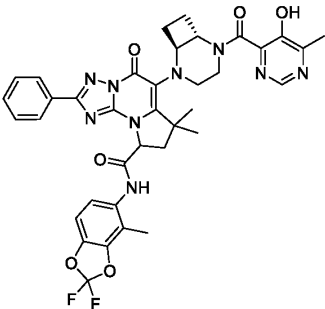
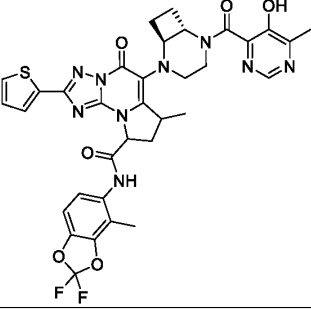
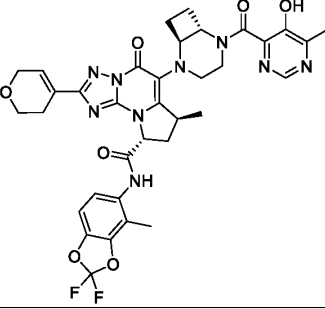
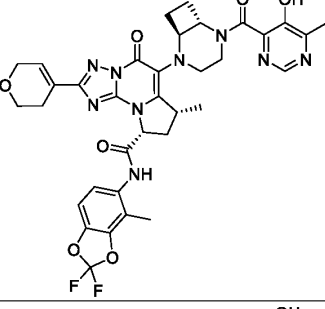
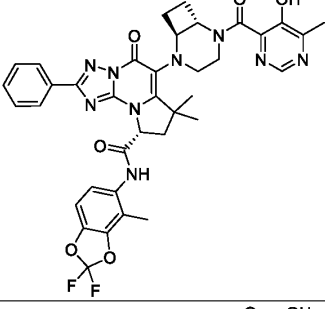
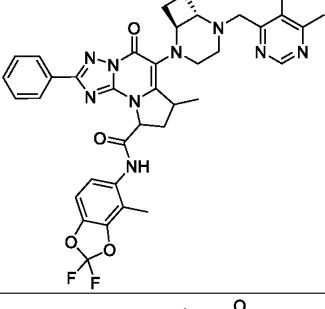
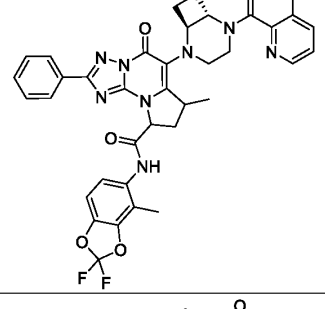
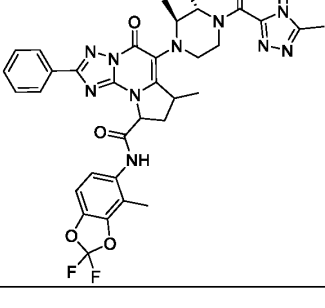
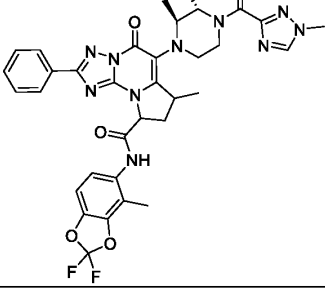
C69		C70	
C71		C72	
C73		C74	
C75		C76	
C77		C78	

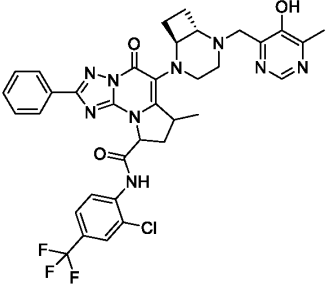
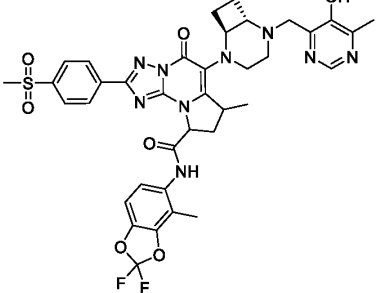
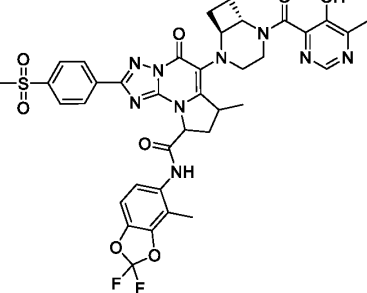
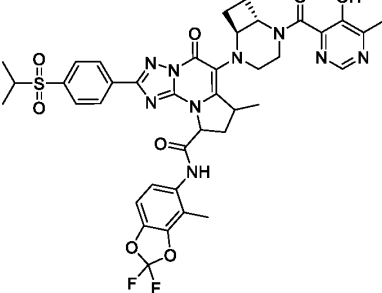
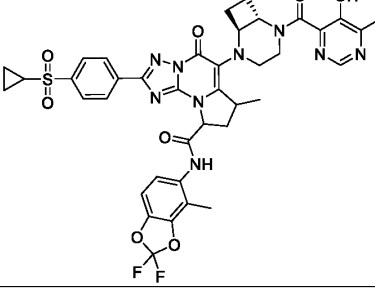
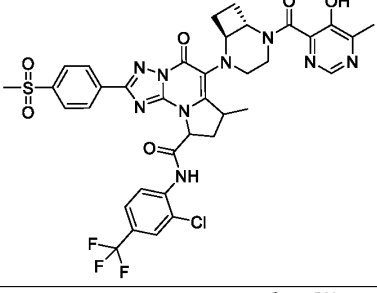
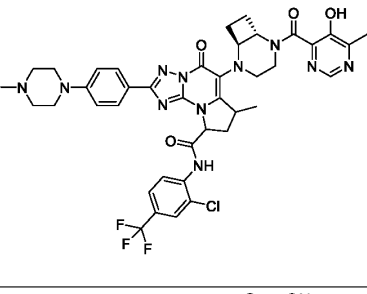
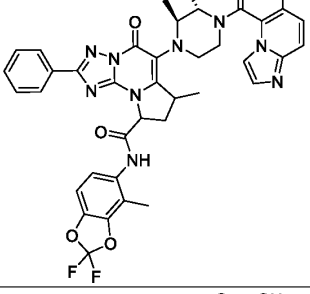
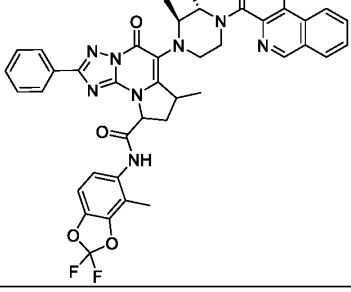
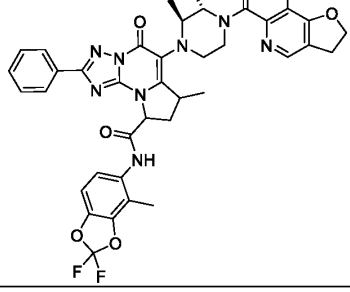
C79		C80	
C81		C82	
C83		C84	
C85		C86	

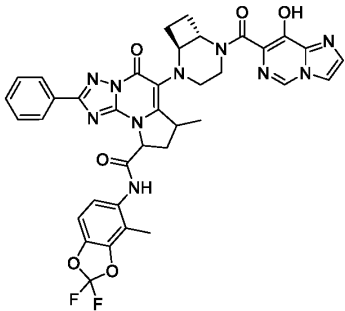
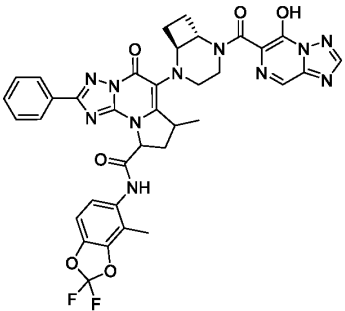
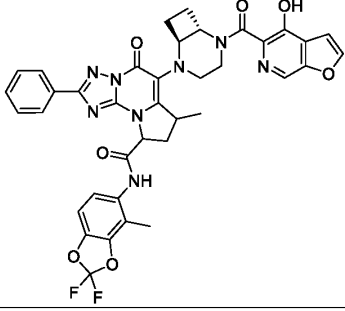
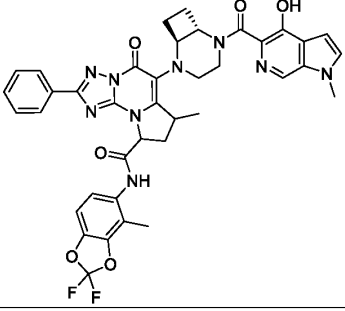
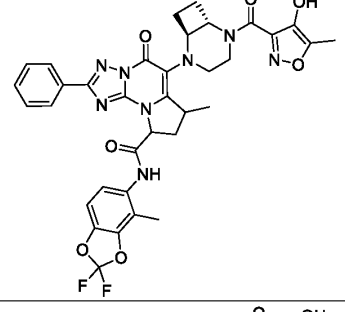
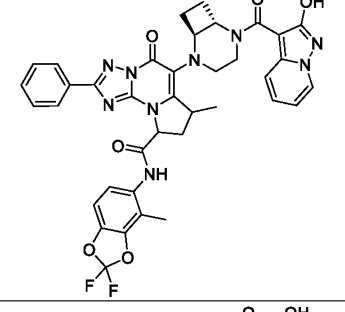
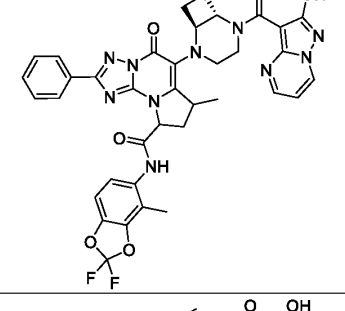
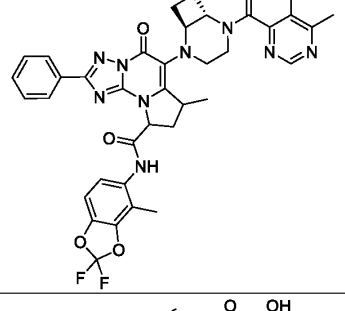
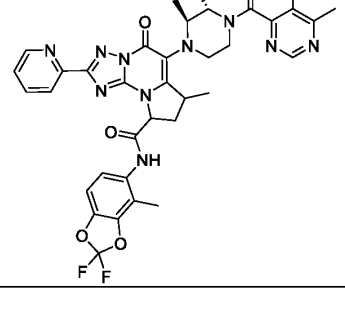
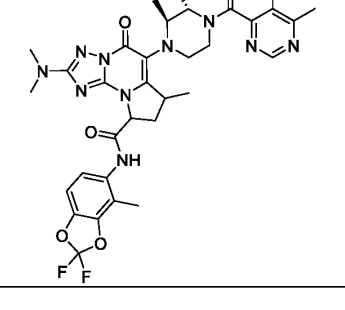
C87		C88	
C89		C90	
C91		C92	
C93		C94	

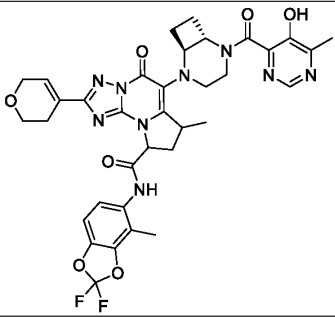
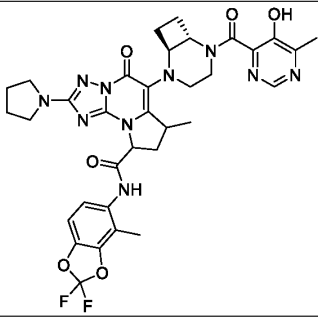
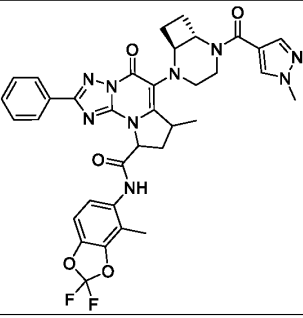
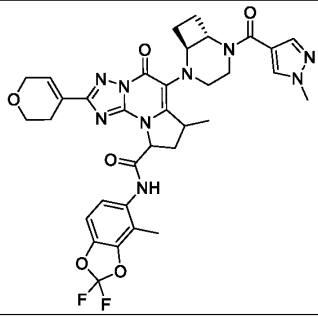
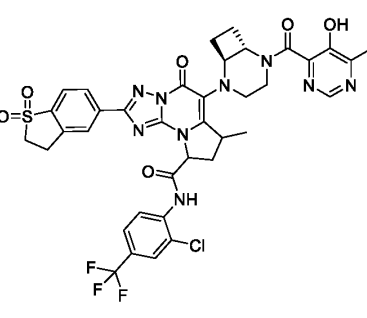
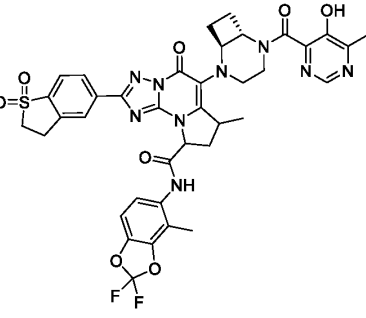
C95		C96	
C97		C98	
C99		C100	
C101		C102	
C103		C104	

C105		C106	
C107		C108	
C109		C110	
C111		C112	
C113		C114	

C115		C116	
C117		C118	
C119		C120	
C121		C122	
C123		C124	

C125		C126	
C127		C128	
C129		C130	
C131		C132	
C133		C134	

C135		C136	
C137		C138	
C139		C140	
C141		C142	
C143		C144	

C145		C146	
C147		C148	
C149		C150	

14. 药物组合物，其包含预防或治疗有效量的权利要求 1-13 中任一项的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、代谢物、同位素标记的化合物或前药，以及药学上可接受的载体。

15. 权利要求 1-13 中任一项的化合物或其药学上可接受的盐、酯、立体异构体、互变异构体、多晶型物、溶剂合物、代谢物、同位素标记的化合物或前药或者权利要求 14 的药物组合物在制备用作 WRN 抑制剂的药物中的用途，优选地，所述药物用于预防或治疗癌症(优选地，所述癌症特征在于微卫星高度不稳定(MSI-H)或错配修复缺陷(dMMR))；优选地，所述癌症选自结直肠癌、胃癌、子宫内膜癌、子宫癌、肾上腺皮质癌、宫颈癌、食道癌、乳腺癌、肾癌、前列腺癌和卵巢癌。