

卤素取代的吡嗪酮类化合物及其应用

本发明主张如下优先权：

CN 202111064358.7，申请日 2021 年 09 月 10 日；

CN202210119219.8，申请日 2022 年 02 月 08 日。

技术领域

本发明涉及一种卤素取代的吡嗪酮类化合物及其应用，具体涉及式 (I) 所示化合物或其药学上可接受的盐。

背景技术

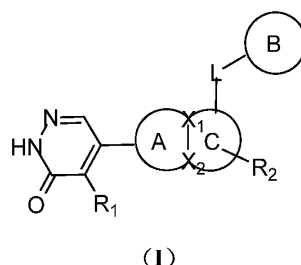
2017年，全球有近7亿慢性肾脏病（CKD）患者，占全球人口的9.1%。其中，中国约有1.32亿。2017年因CKD及其导致的心血管疾病供260万人，占全球总死亡人数的4.6%。在过去的近30年间，其他非传染性疾病的死亡率出现了明显的下降，如癌症下降了14.9%，慢阻肺下降了41.3%，心血管疾病下降了30.4%，而CKD却没有出现类似的下降，死亡率变化为+2.8%。预计到2040年，CKD将导致220~400万人死亡。

蛋白尿是肾脏病的常见表现之一，慢性肾病由于肾脏组织损伤的原因，多数患者在早期出现尿蛋白症状。蛋白尿的形成与肾小球的屏障功能有着密不可分的关系。由于肾小球滤过膜的滤过作用和肾小管的重吸收作用，健康人尿中蛋白质(多指分子量较小的蛋白质)的含量很少(每日排出量小于150 mg)，肾小球滤过膜的滤过作用受损，肾小管重吸收作用受阻，大量蛋白质从尿液排出，如果尿蛋白含量 $\geq 3.5\text{g}/24\text{h}$ ，则称为大量蛋白尿。长时间的蛋白质泄露会导致肾衰竭。因此，需要更有效的方法来治疗或降低蛋白尿，降低发展成肾脏疾病的风险。

离子通道的TRP超家族在肾脏生理学中很重要。TRP通道通常是具有高 Ca^{2+} 渗透性的非选择性阳离子通道。根据序列同源性，TRP超家族可进一步分为六个亚家族功能：TRPC，TRPV，TRPA1，TRPM1，TRPM2，TRPM3，TRPM4，TRPM5和TRPM6。据报道有几种TRP蛋白在肾脏的多种细胞中表达：TRPC1，TRPC3，TRPC4，TRPC5，TRPC6，TRPV1，TRPV4，TRPV5，TRPV6，TRPM2，TRPM3，TRPM4，TRPM5和PKD2。足细胞（podocyte），即肾小囊脏层上皮细胞，它附着于肾小球基底膜（GBM）的外侧，连同血管内皮细胞和肾小球基膜一起构成了肾小球血液滤过屏障。表达在足细胞上的TRPC5，主要介导 Ca^{2+} 内流，Ras相关蛋白1 (Rac1)信号激活导致TRPC5 迁移至足细胞质膜表面，使离子通道能够被血管紧张素II型受体(AT1R)激活，激活的离子通道导致瞬时 Ca^{2+} 流入足细胞，进一步激活足细胞内Rac1，促使诱导肌动蛋白骨架结构重塑，使足细胞受损后从肾小球基底膜解离，脱落的足细胞影响肾小球滤过率，引起蛋白尿。TRPC5敲除或者被抑制剂如ML204或AC1903抑制后显著减少LPS诱导的尿蛋白，并且抑制鱼精蛋白硫酸盐诱导的足细胞损伤，保护足细胞骨架重构。因此，TRPC5是潜在的治疗肾脏病的靶点。

发明内容

本发明提供了式 (I) 所示化合物或其药学上可接受的盐，



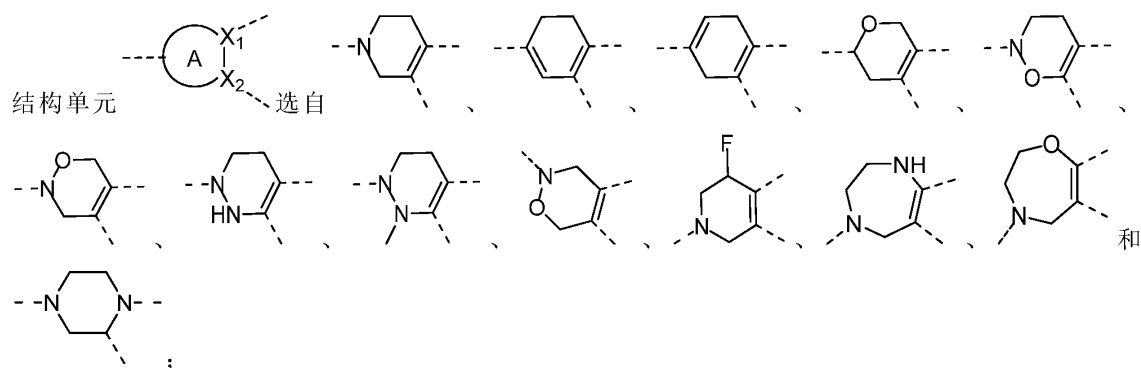
其中，

X₁ 和 X₂ 分别独立地选自 C 和 N；

L 选自 -O-、-S-、-S(=O)-、-C(=O)-、-CF₂-、-CH(OCH₃)-、-N(OCH₃)-、 和 C₂₋₃ 烯基，所述 -CH(OCH₃)-、 和 C₂₋₃ 烯基任选被 1、2 或 3 个 R_a 取代；

R₁ 选自 F、Cl、Br 和 I；

R₂ 选自 H、F、Cl、Br、I、OH、NH₂、CN、COOH、CONH₂、C₁₋₃ 烷基、C₁₋₃ 烷氧基和 C₁₋₃ 烷基-C₁₋₃ 烷氧基，所述 C₁₋₃ 烷基、C₁₋₃ 烷氧基和 C₁₋₃ 烷基-C₁₋₃ 烷氧基分别独立地任选被 1、2 或 3 个 R_b 取代；



环 B 选自苯基和 5-6 元杂芳基，所述苯基和 5-6 元杂芳基分别独立地被 1、2 或 3 个 R_c 取代；

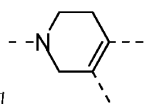
环 C 选自 6 元杂芳基；

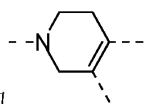
R_a 选自 F、Cl、Br、I 和 C₁₋₃ 烷基；

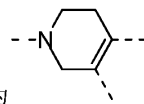
R_b 选自 F、Cl、Br、I、OH、NH₂、CN、COOH 和 CONH₂；

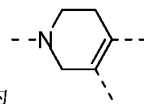
R_c 选自 F、Cl、Br、I、CONH₂、C₁₋₃ 烷基、C₁₋₃ 烷氧基和 C₂₋₃ 烯基，所述 C₁₋₃ 烷基、C₁₋₃ 烷氧基和 C₂₋₃ 烯基分别独立地任选被 1、2 或 3 个卤素取代；

条件是：



1) 当 R_1 为 Cl、环 A 为 , L 为 O, 环 B 为苯基时, 环 B 上至少一个取代基为 Br、 CONH_2 、 CF_2CH_3 、 C_{1-3} 烷氧基或 C_{2-3} 烯基, 或者, 环 B 被 3 个 R_c 取代;

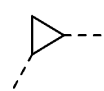


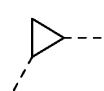
2) 当 R_1 为 Cl、环 A 为 , L 为 O, 环 B 为 2-三氟甲基-4-氟苯基时, R_2 为 CN 、 COOH 、 CONH_2 、 CH_3 、 CH_2CN 、 CH_2COOH 、 CH_2CONH_2 或 CH_2OCH_3 。

在本发明的一些方案中, 上述 5-6 元杂芳基或 6 元杂芳基的“杂”分别独立地表示 1、2 或 3 个独立选自 N、NH、O 和 S 的杂原子或杂原子团。

在本发明的一些方案中, 上述 R_c 选自 F、Cl、Br、I、 CONH_2 、 CH_3 、 CH_2CH_3 、 OCH_3 和 $-\text{CH}=\text{CH}_2$, 所述 CH_3 、 CH_2CH_3 、 OCH_3 和 $-\text{CH}=\text{CH}_2$ 分别独立地任选被 1、2 或 3 个卤素取代, 其他变量如本发明所定义。

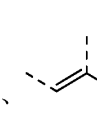
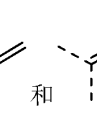
在本发明的一些方案中, 上述 R_c 选自 F、Cl、Br、I、 CONH_2 、 CH_3 、 CH_2F 、 CHF_2 、 CF_3 、 CH_2CH_3 、 CF_2CH_3 、 OCH_3 、 OCF_3 和 $-\text{CF}=\text{CH}_2$, 其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中, 上述 L 选自 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{S}(=\text{O})-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{CF}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{OCH}_3)-$ 、 $-\text{N}(\text{OCH}_3)-$ 、、、 和 , 所述 $-\text{CH}(\text{OCH}_3)-$ 、、、 和  分别独立地任选被 1、2 或 3 个 R_a 取代, 其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中, 上述 L 选自 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{S}(=\text{O})-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{CF}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{OCH}_3)-$ 、 $-\text{N}(\text{OCH}_3)-$ 、、、、、 和 , 其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中, 上述 L 选自 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{S}(=\text{O})-$ 和 $-\text{C}(=\text{O})-$, 其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中, 上述 L 选自 $-\text{O}-$ 和 $-\text{S}-$, 其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中, 上述 L 选自 、、、 和 , 其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中, 上述 L 选自 $-\text{CF}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{OCH}_3)-$ 、 $-\text{N}(\text{OCH}_3)-$ 和 , 其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中, 上述 R_2 选自 H、F、Cl、Br、I、OH、 NH_2 、 CN 、 COOH 、 CONH_2 、 CH_3 、 CH_2CH_3 、 OCH_3 和 CH_2OCH_3 , 所述 CH_3 、 CH_2CH_3 、 OCH_3 和 CH_2OCH_3 分别独立地任选被 1、2 或 3 个 R_b 取代, 其他变量

如本发明所定义。

在本发明的一些方案中，上述 R_2 选自H、F、Cl、Br、I、OH、NH₂、CN、COOH、CONH₂、CH₃、CH₂CN、CH₂COOH、CH₂CONH₂、CH₂OH、CH₂CH₃、CH(OH)CH₃、CH(OH)CH₂OH、OCH₃和CH₂OCH₃，其他变量如本发明所定义。

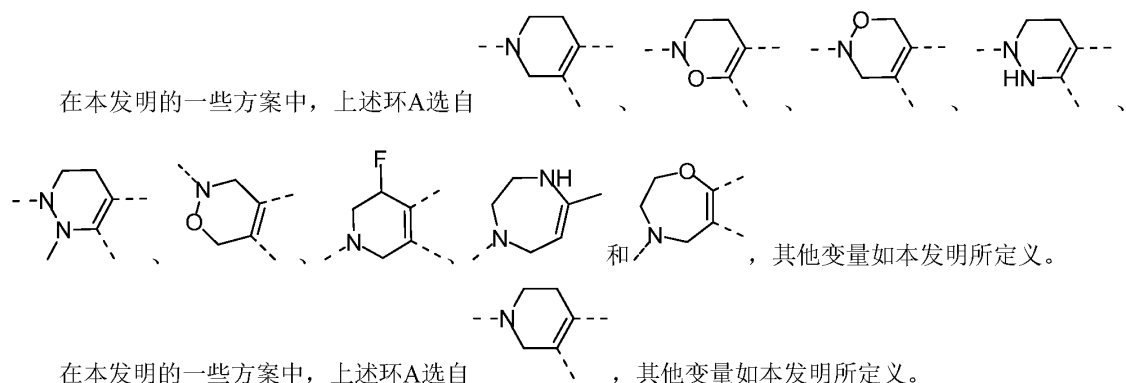
在本发明的一些方案中，上述 R_2 选自CN、COOH、CONH₂、CH₃、CH₂CN、CH₂COOH、CH₂CONH₂和CH₂OCH₃，其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中，上述 R_2 选自CH₃、CH₂CN、CH₂COOH、CH₂CONH₂和CH₂OCH₃，其他变量如本发明所定义。

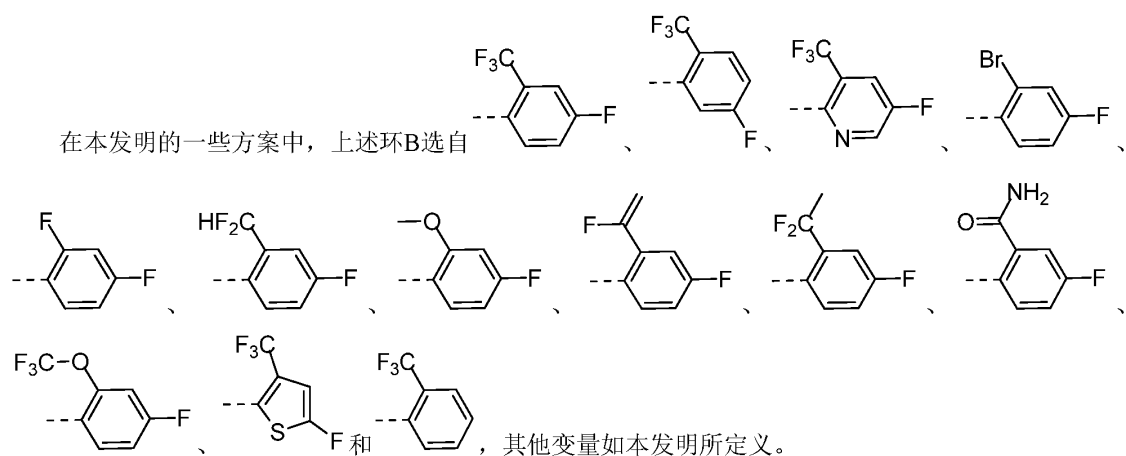
在本发明的一些方案中，上述 R_2 选自CN、COOH和CONH₂，其他变量如本发明所定义。

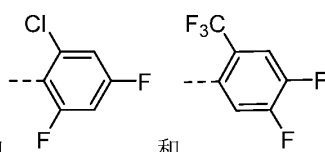
在本发明的一些方案中，上述 R_2 选自H，其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中，上述 R_2 选自CH₂OCH₃，其他变量如本发明所定义。



在本发明的一些方案中，上述环B选自苯基、噻吩基和吡啶基，所述苯基、噻吩基和吡啶基分别独立地任选被1、2或3个 R_c 取代，其他变量如本发明所定义。





在本发明的一些方案中，上述环B选自

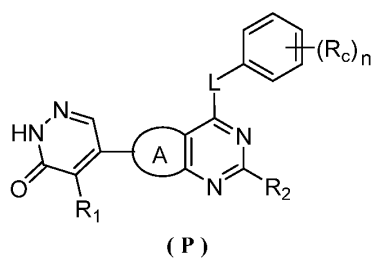
和

，其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中，上述环C选自吡啶基和嘧啶基，其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中，上述环C选自嘧啶基，其他变量如本发明所定义。

在本发明的一些方案中，上述化合物或其药学上可接受的盐，其选自，

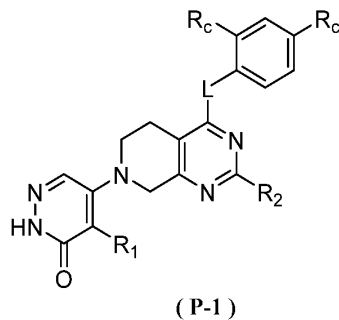


其中，

n 选自 0、1、2 和 3；

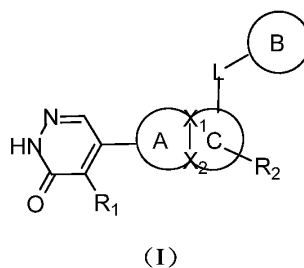
R₁、R₃、R_c、L 和环A如本发明所定义。

在本发明的一些方案中，上述化合物或其药学上可接受的盐，其选自，



其中，R₁、R₃和R_c如本发明所定义。

本发明还提供了式 (I) 所示化合物或其药学上可接受的盐，



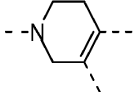
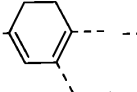
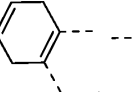
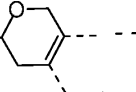
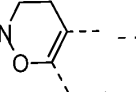
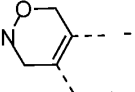
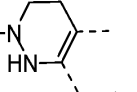
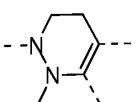
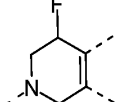
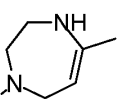
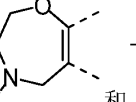
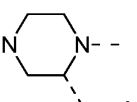
其中，

X₁ 和 X₂ 分别独立地选自 CH 和 N;

L 选自 -O-、-S-、-S(=O)-、-C(=O)-、-CF₂-、-CH(OCH₃)-、-N(OCH₃)-、 和 C₂₋₃ 烯基, 所述 -CH(OCH₃)-、 和 C₂₋₃ 烯基任选被 1、2 或 3 个 R_a 取代;

R₁ 选自 F、Cl、Br 和 I;

R₂ 选自 H、F、Cl、Br、I、OH、NH₂、CN、COOH、CONH₂、C₁₋₃ 烷基、C₁₋₃ 烷氧基和 C₁₋₃ 烷基-C₁₋₃ 烷氧基, 所述 C₁₋₃ 烷基、C₁₋₃ 烷氧基和 C₁₋₃ 烷基-C₁₋₃ 烷氧基分别独立地任选被 1、2 或 3 个 R_b 取代;

环 A 选自 、、、、、、、、、、 和 ;

环 B 选自苯基和 5-6 元杂芳基, 所述苯基和 5-6 元杂芳基分别独立地被 1、2 或 3 个 R_c 取代;

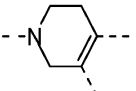
环 C 选自 6 元杂芳基;

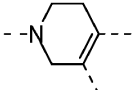
R_a 选自 F、Cl、Br、I 和 C₁₋₃ 烷基;

R_b 选自 F、Cl、Br、I、OH、NH₂、CN、COOH 和 CONH₂;

R_c 选自 F、Cl、Br、I、CONH₂、C₁₋₃ 烷基、C₁₋₃ 烷氧基和 C₂₋₃ 烯基, 所述 C₁₋₃ 烷基、C₁₋₃ 烷氧基和 C₂₋₃ 烯基分别独立地任选被 1、2 或 3 个卤素取代;

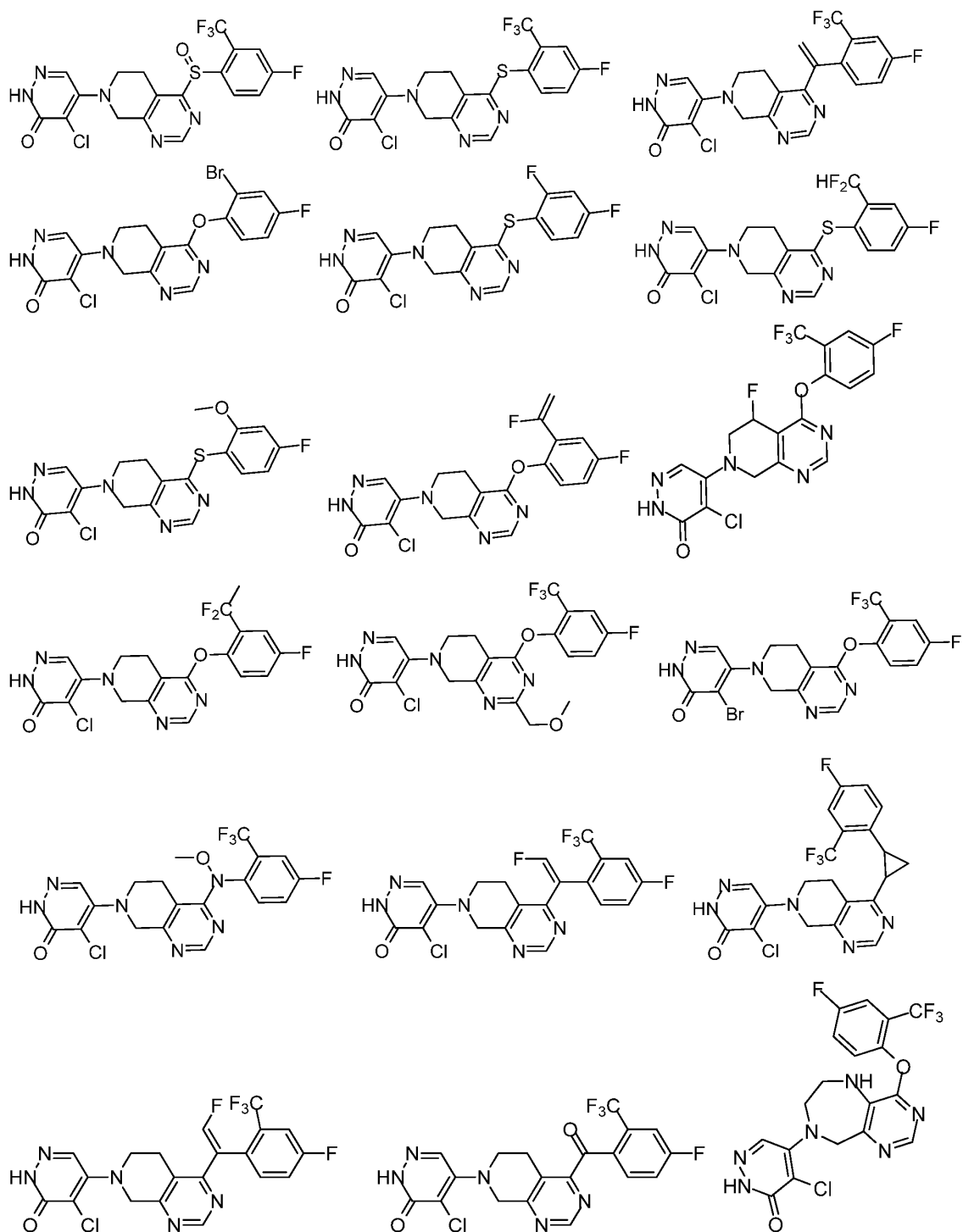
条件是:

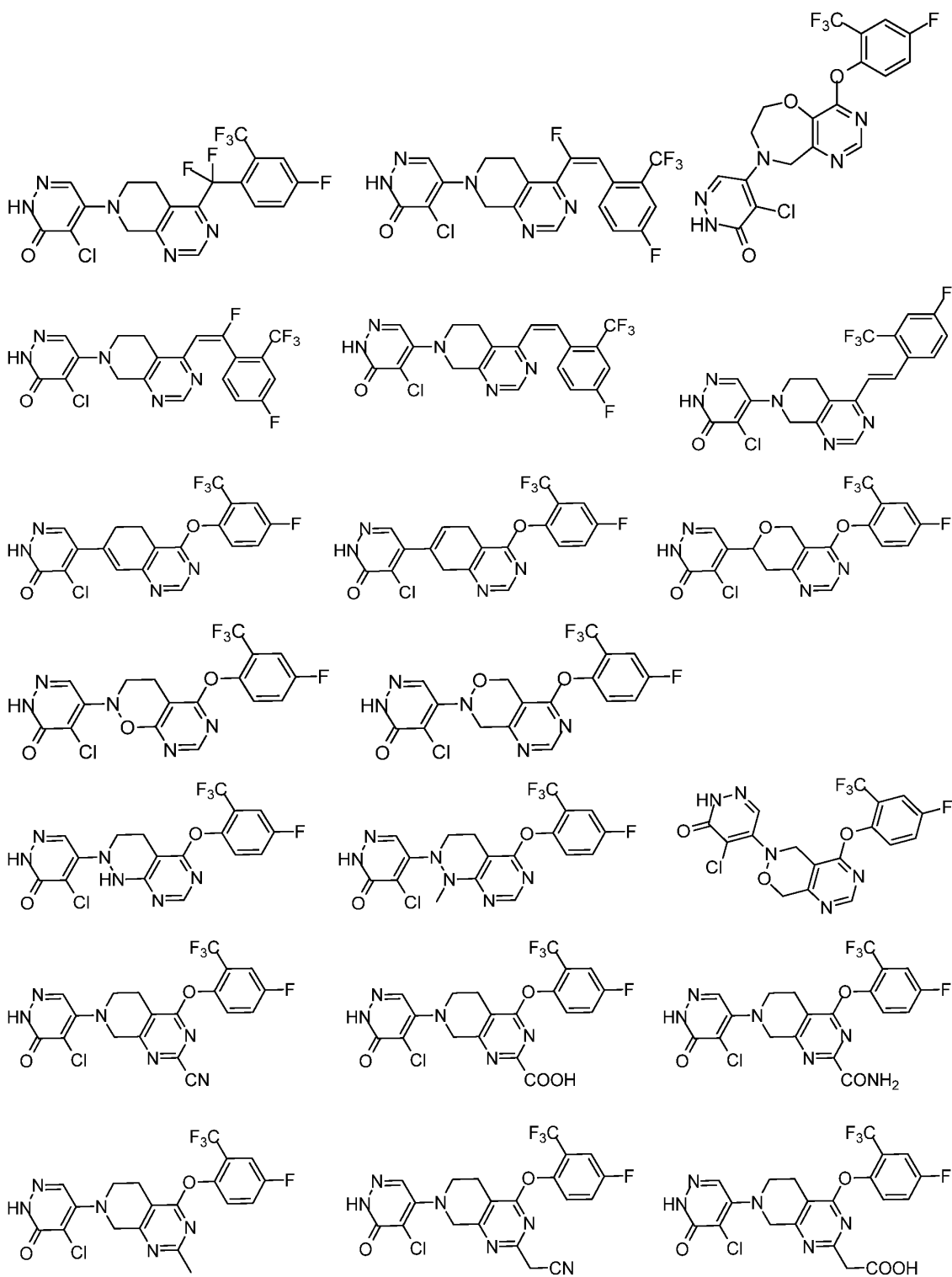
1) 当 R₁ 为 Cl、环 A 为 、L 为 O、环 B 为苯基时, 环 B 上至少一个取代基为 Br、CONH₂、CF₂CH₃、C₁₋₃ 烷氧基或 C₂₋₃ 烯基;

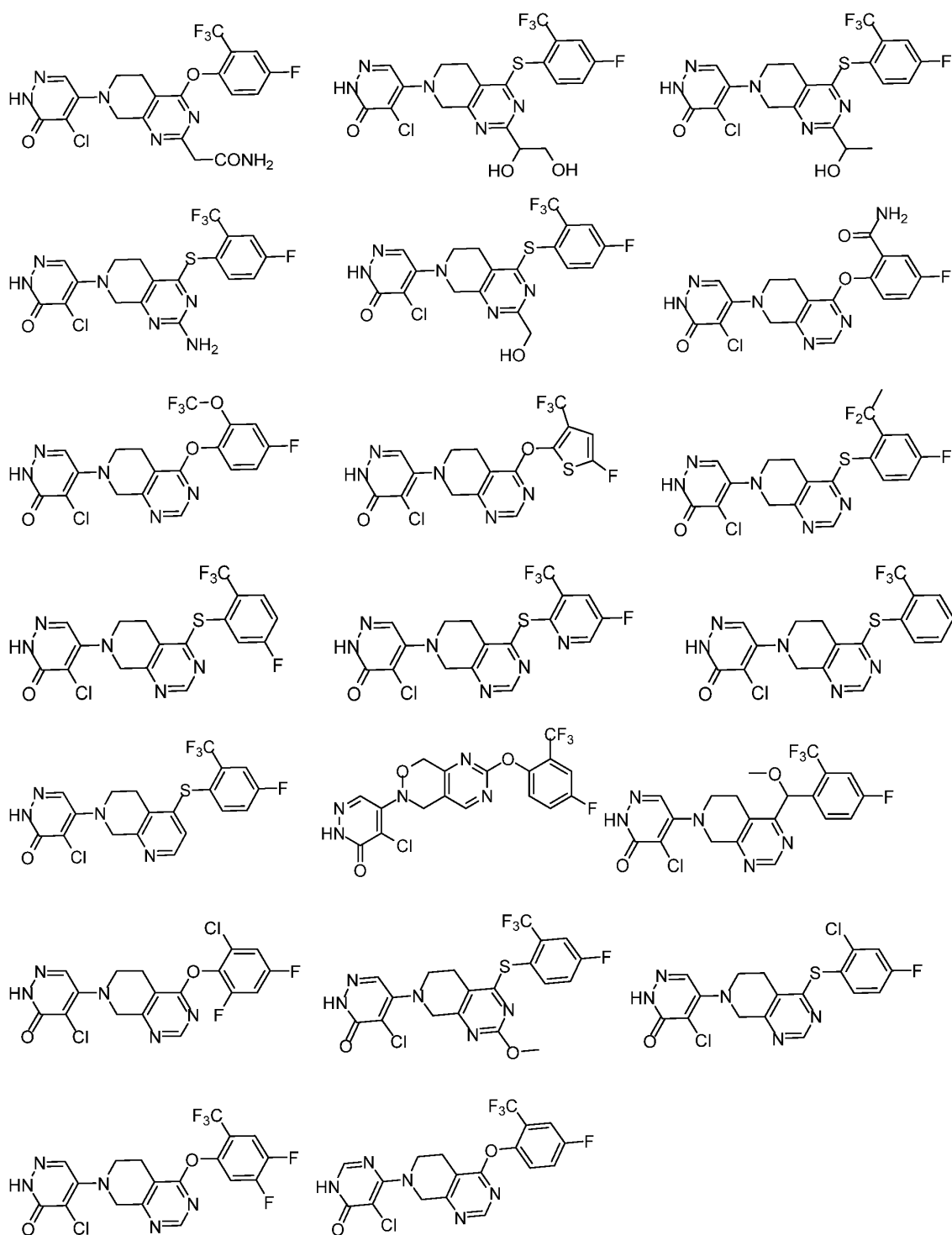
当 R₁ 为 Cl、环 A 为 、L 为 O、环 B 为 2-三氟甲基-4-氟苯基时, R₂ 为 CN、COOH、CONH₂、CH₃、CH₂CN、CH₂COOH、CH₂CONH₂ 或 CH₂OCH₃。

本发明还有一些方案由上述变量任意组合而来。

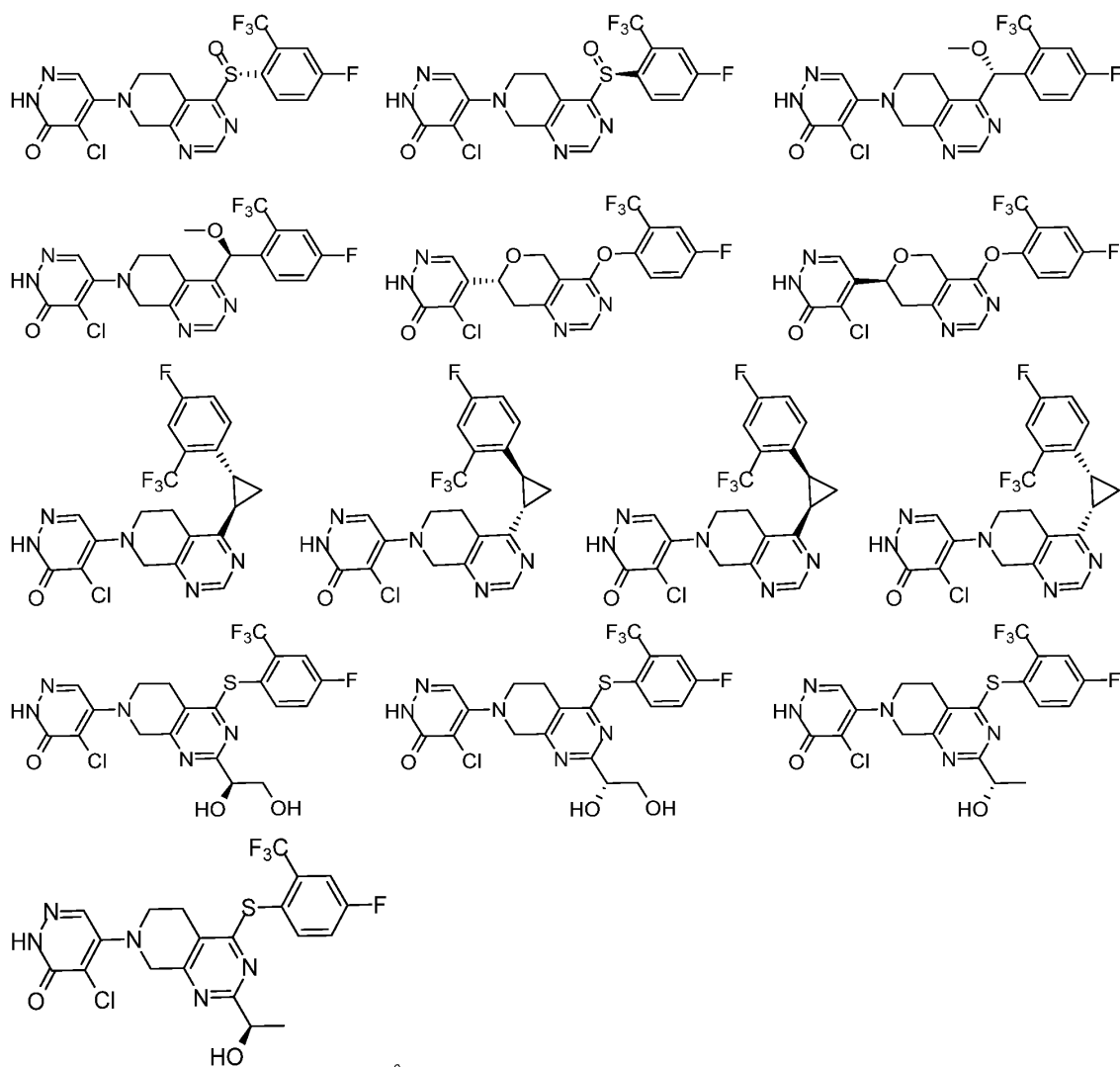
本发明提供了下式所示化合物或其药学上可接受的盐,







在本发明的一些方案中，上述化合物或其药学上可接受的盐，其选自：



本发明还提供了上述化合物或其药学上可接受的盐在 TRPC5 抑制剂相关药物上的应用。

技术效果

本发明化合物对 TRPC5 具有显著的抑制作用，在大鼠体内表现出良好的药代动力学性质，且本发明化合物在肾脏、肝脏有较高分布，在脑部分布较少；还可以显著降低大鼠高血压肾病模型尿液白蛋白水平，且剂量依赖性地降低大鼠高血压肾病模型尿液 Rac1 表达。

定义和说明

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

这里所采用的术语“药学上可接受的”，是针对那些化合物、材料、组合物和/或剂型而言，它们在可靠

的医学判断的范围之内，适用于与人类和动物的组织接触使用，而没有过多的毒性、刺激性、过敏反应或其它问题或并发症，与合理的利益/风险比相称。

术语“药学上可接受的盐”是指本发明化合物的盐，由本发明发现的具有特定取代基的化合物与相对无毒的酸或碱制备。当本发明的化合物中含有相对酸性的功能团时，可以通过在纯的溶液或合适的惰性溶剂中用足够量的碱与这类化合物接触的方式获得碱加成盐。当本发明的化合物中含有相对碱性的官能团时，可以通过在纯的溶液或合适的惰性溶剂中用足够量的酸与这类化合物接触的方式获得酸加成盐。本发明的某些特定的化合物含有碱性和酸性的官能团，从而可以被转换成任一碱或酸加成盐。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

者大于等于 98%，或者大于等于 99%，或者大于等于 99.5%，或者大于等于 99.6%，或者大于等于 99.7%，或者大于等于 99.8%，或者大于等于 99.9%。

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

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

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

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

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

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

当一个连接基团的数量为 0 时，比如-(CRR)₀，表示该连接基团为单键。

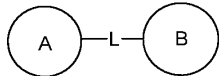
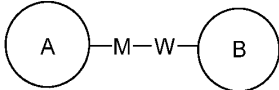
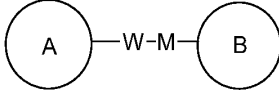
当一个取代基数量为 0 时，表示该取代基是不存在的，比如-A-(R)₀表示该结构实际上是-A。

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

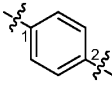
当其中一个变量选自单键时,表示其连接的两个基团直接相连,比如 A-L-Z 中 L 代表单键时表示该结构实际上是 A-Z。

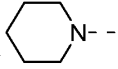
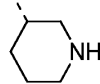
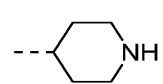
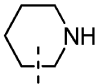
当一个取代基的键可以交叉连接到一个环上的两个以上原子时,这种取代基可以与这个环上的任意

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

当所列举的连接基团没有指明其连接方向,其连接方向是任意的,例如,  中连接基团 L 为 -M-W-, 此时 -M-W- 既可以按与从左往右的读取顺序相同的方向连接环 A 和环 B 构成 , 也可以按照与从左往右的读取顺序相反的方向连接环 A 和环 B 构成 。所述连接基团、取代基和/或其变体的组合只有在这样的组合会产生稳定的化合物的情况下才是被允许的。

除非另有规定,当某一基团具有一个或多个可连接位点时,该基团的任意一个或多个位点可以通过化学键与其他基团相连。当该化学键的连接方式是不定位的,且可连接位点存在 H 原子时,则连接化学键时,该位点的 H 原子的个数会随所连接化学键的个数而对应减少变成相应价数的基团。所述位点与其他基团连接的化学键可以用直形实线键 (—)、直形虚线键 (---)、或波浪线 (~~~~) 表示。例如 -OCH₃ 中的直形实线键表示通过该基团中的氧原子与其他基团相连;  中的直形虚线键表示通过该基团中的氮原子的

两端与其他基团相连;  中的波浪线表示通过该苯基基团中的 1 和 2 位碳原子与其他基团相连;

 表示该哌啶基上的任意可连接位点可以通过 1 个化学键与其他基团相连,至少包括 、、、 这 4 种连接方式,即使 -N- 上画出了 H 原子,但是  仍包括  这种连接方式的基团,只是在连接 1 个化学键时,该位点的 H 会对应减少 1 个变成相应的一价

哌啶基。

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

除非另有规定，术语“卤代素”或“卤素”本身或作为另一取代基的一部分表示氟、氯、溴或碘原子。

除非另有规定，术语“C₁₋₃ 烷基”用于表示直链或支链的由 1 至 3 个碳原子组成的饱和碳氢基团。所述 C₁₋₃ 烷基包括 C₁₋₂ 和 C₂₋₃ 烷基等；其可以是一价（如甲基）、二价（如亚甲基）或者多价（如次甲基）。C₁₋₃ 烷基的实例包括但不限于甲基 (Me)、乙基 (Et)、丙基 (包括 *n*-丙基和异丙基)等。

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

除非另有规定，“C₂₋₃ 烯基”用于表示直链或支链的包含至少一个碳-碳双键的由 2 至 3 个碳原子组成的碳氢基团，碳-碳双键可以位于该基团的任何位置上。所述 C₂₋₃ 烯基包括 C₃ 和 C₂ 烯基；所述 C₂₋₃ 烯基可以是一价、二价或者多价。C₂₋₃ 烯基的实例包括但不限于乙烯基、丙烯基等。

除非另有规定，本发明术语“5-6 元杂芳环”和“5-6 元杂芳基”可以互换使用，术语“5-6 元杂芳基”表示由 5 至 6 个环原子组成的具有共轭 π 电子体系的单环基团，其 1、2、3 或 4 个环原子为独立选自 O、S 和 N 的杂原子，其余为碳原子。其中氮原子任选地被季铵化，氮和硫杂原子可任选被氧化（即 NO 和 S(O)_p，p 是 1 或 2）。5-6 元杂芳基可通过杂原子或碳原子连接到分子的其余部分。所述 5-6 元杂芳基包括 5 元和 6 元杂芳基。所述 5-6 元杂芳基的实例包括但不限于吡咯基 (包括 *N*-吡咯基、2-吡咯基和 3-吡咯基等)、吡唑基 (包括 2-吡唑基和 3-吡唑基等)、咪唑基 (包括 *N*-咪唑基、2-咪唑基、4-咪唑基和 5-咪唑基等)、噁唑基 (包括 2-噁唑基、4-噁唑基和 5-噁唑基等)、三唑基 (1*H*-1,2,3-三唑基、2*H*-1,2,3-三唑基、1*H*-1,2,4-三唑基和 4*H*-1,2,4-三唑基等)、四唑基、异噁唑基 (3-异噁唑基、4-异噁唑基和 5-异噁唑基等)、噻唑基 (包括 2-噻唑基、4-噻唑基和 5-噻唑基等)、呋喃基 (包括 2-呋喃基和 3-呋喃基等)、噻吩基 (包括 2-噻吩基和 3-噻吩基等)、吡啶基 (包括 2-吡啶基、3-吡啶基和 4-吡啶基等)、吡嗪基或嘧啶基 (包括 2-嘧啶基和 4-嘧啶基等)。

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

基（二苯甲基，DPM）；甲硅烷基，如三甲基甲硅烷基（TMS）和叔丁基二甲基甲硅烷基（TBS）等等。

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

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

本发明采用下述缩略词：aq 代表水；eq 代表当量、等量；DCM 代表二氯甲烷；PE 代表石油醚；DMSO 代表二甲亚砜；EA 或 EtOAc 代表乙酸乙酯；EtOH 代表乙醇；MeOH 代表甲醇；DMF 代表 N,N-二甲基甲酰胺；Cbz 代表苄氧羰基，是一种胺保护基团；Boc 代表叔丁氧羰基是一种胺保护基团；r.t.代表室温；O/N 代表过夜；THF 代表四氢呋喃；Boc₂O 代表二叔丁基二碳酸酯；TFA 代表三氟乙酸；HCl 代表盐酸；iPrOH 代表 2-丙醇；mp 代表熔点；Pd(PPh₃)₄ 代表四(三苯基膦)钯；Pd(dppf)Cl₂ 代表[1,1'-双(二苯膦基)二茂铁]二氯化钯；DIBAL-H 代表二异丁基氢化铝；FA 代表甲酸；ACN 代表乙腈；DEA 代表二乙胺；THP 代表 2-四氢吡喃醚基；prep-TLC 代表薄层色谱法制备分离；DIEA 代表 N,N-二异丙基乙胺；DMA 代表 N,N-二甲基乙酰胺；DBU 代表 1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一-7-烯。

本发明所使用的溶剂可经市售获得。化合物依据本领域常规命名原则或者使用 ChemDraw® 软件命名，市售化合物采用供应商目录名称。

附图说明

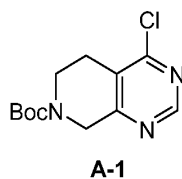
图 1 醋酸脱氧皮质-氯化钠(DOCA-NaCl)诱导雄性大鼠高血压肾病模型终点尿液白蛋白结果。

图 2 醋酸脱氧皮质-氯化钠(DOCA-NaCl)诱导雄性大鼠高血压肾病模型终点尿液 Rac1 / 肌酐结果。

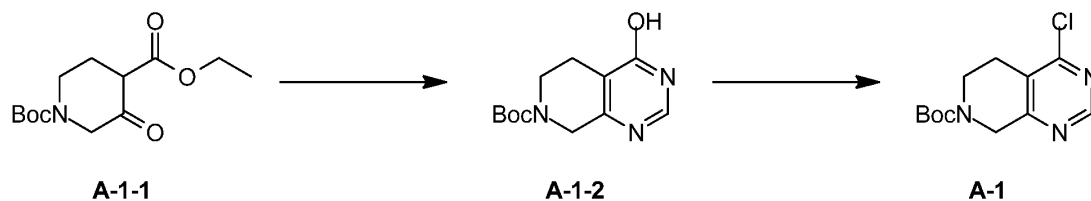
具体实施方式

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

参考例 1：片段 A-1



合成路线:



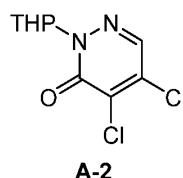
步骤 1: 化合物 **A-1-2** 的合成

将乙醇钠(3.2 g, 47.02 mmol, 2.55 eq) 溶于乙醇(100 mL), 氮气保护下, 加入化合物 **A-1-1** (5 g, 18.43 mmol, 1 eq) 和醋酸甲脒 (2.9 g, 27.86 mmol, 1.51 eq), 反应于 100°C 搅拌 5 小时。反应冷却后, 加入 250 mL 水, 用二氯甲烷萃取 (3×250 mL), 合并有机相, 用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥后减压浓缩得粗品。粗品中加入乙酸乙酯(75 mL), 搅拌 2 小时, 过滤。滤饼使用 5 mL 乙酸乙酯洗涤后干燥, 得到化合物 **A-1-2**。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.42 - 1.56 (m, 9 H), 2.64 (br s, 2 H), 3.65 (t, *J*=5.77 Hz, 2 H), 4.43 (br s, 2 H), 8.07 (s, 1 H), 12.62 (br s, 1 H)。

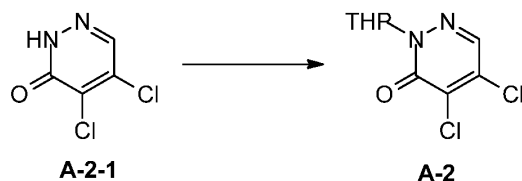
步骤 2: 化合物 **A-1** 的合成

将化合物 **A-1-2** (18 g, 71.63 mmol, 1 eq), 三氯乙腈(15.55 g, 107.71 mmol, 1.5 eq) 悬浮于甲苯 (250 mL) 中, 加入三苯基膦 (56.00 g, 213.51 mmol, 2.98 eq), 氮气保护下, 120°C 搅拌 1.5 小时。反应液减压浓缩, 剩余物中加入 250 mL 水, 用二氯甲烷萃取 (3×150 mL), 合并有机相, 用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥后减压浓缩得粗品。粗品经柱层析(石油醚:乙酸乙酯=10:1)纯化, 得到化合物 **A-1-3**。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.50 (s, 9 H), 2.88 (t, *J*=5.52 Hz, 2 H), 3.75 (t, *J*=5.77 Hz, 2 H), 4.65 (s, 2 H), 8.80 (s, 1 H)。

参考例 2: 片段 A-2



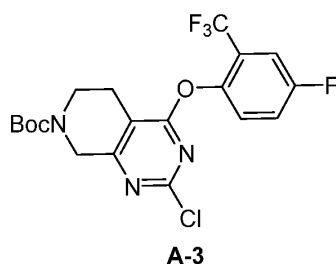
合成路线:



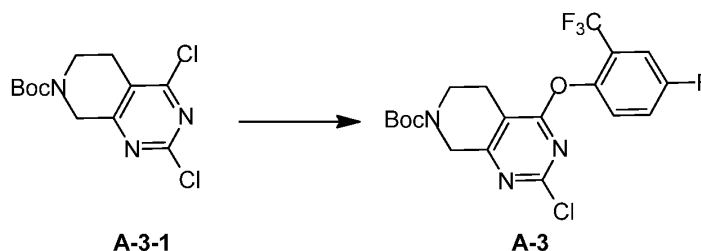
将 **A-2-1** (186 g, 1.13 mol, 1 eq) 加入到含有四氢呋喃(1116 mL)的反应瓶中, 加入对甲苯磺酸吡啶盐(56.66 g, 225.49 mmol, 0.2 eq), 3,4-二氢-2H-吡喃(142.25 g, 1.69 mol, 154.62 mL, 1.5 eq), 于 100°C 下反应 5 小时;

然后加入 3,4-二氢-2H-吡喃(94.83 g, 1.13 mol, 103.08 mL, 1 eq), 于 100°C下反应 12 小时。反应液浓缩后加入乙酸乙酯溶解, 有机相依次用 2M 的氢氧化钠溶液和饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩得粗品。粗品经柱层析(石油醚:乙酸乙酯=1:0-15:1-10:1-5:1-2.5:1)初步纯化后, 经石油醚打浆得化合物 **A-2**。LCMS: m/z $[M+23]^+=271$ 。

参考例 3: 片段 A-3

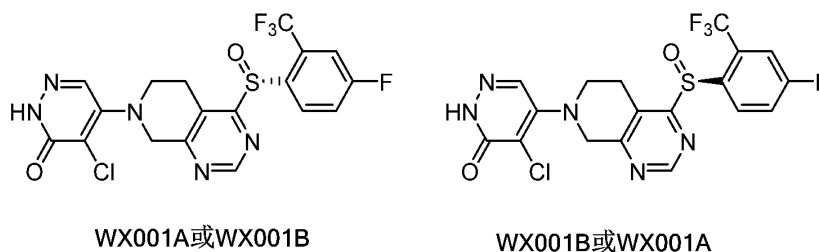


合成路线:

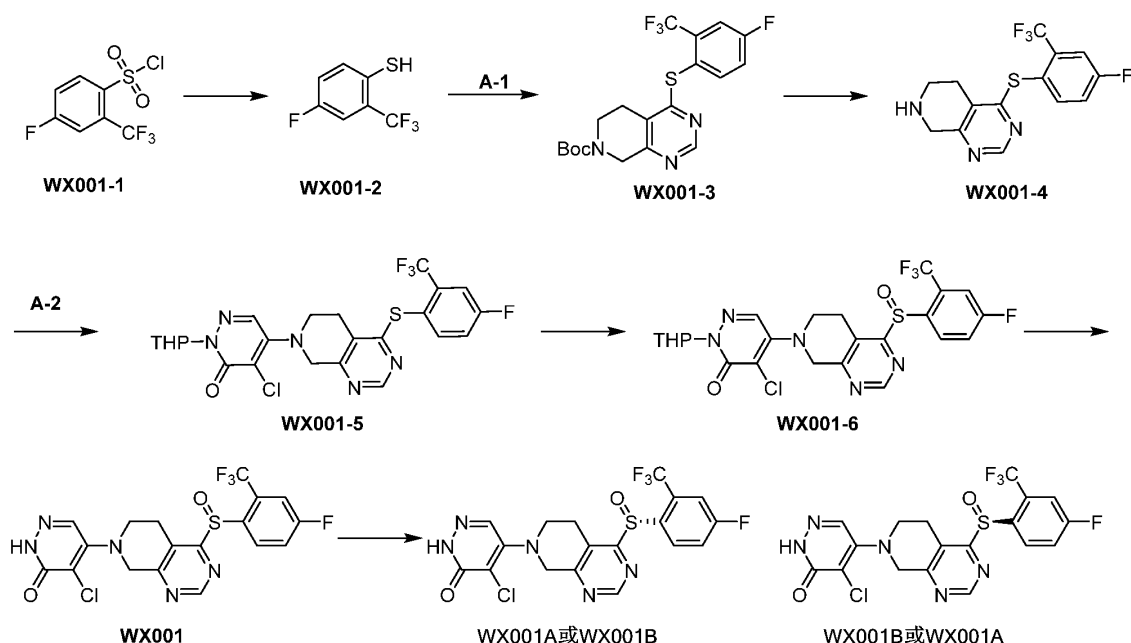


将 **A-3-1** (35 g, 115.07 mmol, 1 eq) 加入到含有乙腈(300 mL)的反应瓶中, 加入碳酸钾 (31.81 g, 230.13 mmol, 2 eq), 再加入 4-氟-2-(三氟甲基)苯酚(24.87 g, 138.08 mmol, 1.2 eq) 的乙腈 (240 mL) 溶液, 于 50°C 反应 16 小时。于反应液中加入 300 mL 水, 用乙酸乙酯(3×300 mL)萃取, 合并有机相, 用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 抽滤浓缩得粗品。粗品中加入混合溶剂(石油醚:乙酸乙酯=9:1)搅拌, 然后抽滤, 滤饼用混合溶剂(石油醚:乙酸乙酯=9:1)洗涤后浓缩得滤饼, 滤饼经柱层析(石油醚:乙酸乙酯=1:0-9:1-4:1-0:1) 纯化, 得化合物 **A-3**。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.51 (s, 9 H), 2.86 (br t, J=5.02 Hz, 2 H), 3.76 (t, J=5.77 Hz, 2 H), 4.63 (s, 2 H), 7.31 - 7.38 (m, 2 H), 7.40 - 7.48 (m, 1 H); LCMS: m/z $[M-55]^+=391.9$ 。

实施例 1



合成路线:



步骤 1: 化合物 **WX001-2** 合成

氮气保护下, 将 **WX001-1** (5 g, 19.04 mmol, 1 eq) 加入到含有 1,4-二氧六环 (30 mL) 的反应瓶中, 随后加入水 (7.5 mL) 和三(2-羧乙基)膦盐酸盐 (21.83 g, 76.14 mmol, 4 eq), 于 120°C 下反应 2 小时。冷至室温, 加入 75 mL 水, 用二氯甲烷 (3×100 mL) 萃取, 合并有机相, 用饱和食盐水洗, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩得粗品。粗品经减压柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯=10:1) 纯化, 得到化合物 **WX001-2**。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 6.13 (br s, 1 H), 7.33 - 7.97 (m, 3 H)。

步骤 2: 化合物 **WX001-3** 合成

将 **A-1** (2.47 g, 9.16 mmol, 1 eq) 和 **WX001-2** (1.89 g, 9.62 mmol, 1.05 eq) 加入到含有 N,N-二甲基甲酰胺 (27 mL) 的反应瓶中, 加入 1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯 (2.79 g, 18.31 mmol, 2.76 mL, 2 eq), 于 100°C 下反应 0.5 小时。冷至室温, 加入 300 mL 乙酸乙酯, 依次用半饱和食盐水 (5×30 mL) 和食盐水洗涤有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩得粗品。粗品经柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯=1:0.4:1) 纯化, 得到化合物 **WX001-3**。LCMS: *m/z* [M+1]⁺=430。

步骤 3: 化合物 **WX001-4** 合成

将 **WX001-3** (1.64 g, 3.82 mmol, 1 eq) 加入到含有二氯甲烷 (76 mL) 的反应瓶中, 加入三氟乙酸 (13.06 g, 114.57 mmol, 8.48 mL, 30 eq), 于 20°C 下反应 0.5 小时。于反应液中加入 70 mL 水, 加入碳酸钠调至 pH=8, 用二氯甲烷 (3×70 mL) 萃取, 合并有机相, 用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩, 得 **WX001-4**。LCMS: *m/z* [M+1]⁺=330。

步骤 4: 化合物 **WX001-5** 合成

将 **WX001-4**(2.87 g, 8.72 mmol, 1 eq)加入到含有 N,N-二异丙基乙胺(64.75 g, 500.96 mmol, 87.26 mL, 57.48 eq)的反应瓶中, 加入 **A-2**(2.39 g, 9.59 mmol, 1.1 eq), 于 100°C下反应 16 小时。反应液直接浓缩得粗品。粗品经柱层析(石油醚:乙酸乙酯=1:0-1:1)纯化, 得化合物 **WX001-5**。LCMS: m/z [M+1]⁺=542。

步骤 5: 化合物 **WX001-6** 合成

将 **WX001-5**(100 mg, 184.52 μmol, 1 eq)加入到含有二氯甲烷(4.4 mL)的反应瓶中, 0°C下, 加入 3-氯过氧苯甲酸(44.95 mg, 221.42 μmol, 85%纯度, 1.2 eq)的二氯甲烷(2.2 mL)溶液, 于 0°C下反应 3 小时。于反应液中加入饱和硫代硫酸钠溶液, 淬灭反应(湿润淀粉碘化钾试纸不变蓝), 随后加入碳酸钠调 pH=8, 用二氯甲烷萃取(3×4mL), 合并有机相, 用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩得粗品。粗品经柱层析(石油醚:乙酸乙酯=1:0-2:3)纯化, 得化合物 **WX001-6**。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.60 - 1.82 (m, 4 H), 2.04 - 2.21 (m, 2 H), 3.33 - 3.51 (m, 1 H), 3.54 - 3.68 (m, 1 H), 3.77 (br t, J=11.54 Hz, 1 H), 3.81 - 3.95 (m, 2 H), 4.12 - 4.17 (m, 1 H), 4.71 (d, J=4.52 Hz, 2 H), 6.01 - 6.15 (m, 1 H), 7.48 (dd, J=8.03, 2.51 Hz, 1 H), 7.53 - 7.63 (m, 1 H), 7.79 (s, 1 H), 8.38 - 8.45 (m, 1 H), 8.94 (s, 1 H); LCMS: m/z [M+1]⁺=558。

步骤 6: 化合物 **WX001** 合成

将 **WX001-6**(1.23 g, 2.20 mmol, 1 eq)加入到含有二氯甲烷(22 mL)的反应瓶中, 加入三氟乙酸(7.54 g, 66.14mmol, 4.90 mL, 30 eq), 于 20°C下反应 0.5 小时。于反应液中加入 22mL 水, 加入碳酸钠调 pH=8, 用二氯甲烷(3×22mL)萃取, 合并有机相, 用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩得粗品。于粗品中加入 5mL 二氯甲烷, 超声 2 分钟; 抽滤, 滤饼中加入 3mL 甲醇, 超声 2 分钟; 抽滤, 滤饼干燥得化合物 **WX001**。LCMS: m/z [M+1]⁺=474。

步骤 7: 化合物 **WX001A** 和 **WX001B** 的合成

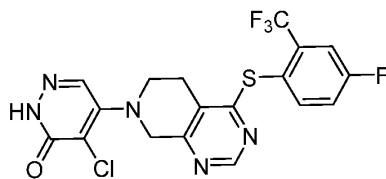
WX001-7 经 SFC (色谱柱: DAICEL CHIRALPAK IG (250mm*30mm,10μm);流动相:A 为 CO₂, B 为 [0.1%NH₃H₂O-EtOH];梯度 B%: 60%-60%)拆分, 得到 **WX001A** 和 **WX001B**。

WX001A: (保留时间为 3.558 分钟, ee=100%)。¹H NMR (400 MHz, CD₃CN) δ ppm 3.24 - 3.36 (m, 1 H), 3.40 - 3.51 (m, 1 H), 3.80 (t, J=5.77 Hz, 2 H), 4.70 (s, 2H), 7.59 - 7.71 (m, 2 H), 7.80 (s, 1 H), 8.29 (dd, J=8.78, 5.27 Hz, 1 H), 8.88 (s, 1 H), 10.92 (br s, 1 H); LCMS: m/z [M+1]⁺=474。

WX001B: (保留时间为 1.738 分钟, ee=100%)。¹H NMR (400 MHz, CD₃CN) δ ppm 3.19 - 3.38 (m, 1 H), 3.39 - 3.53 (m, 1 H), 3.80 (t, J=5.77 Hz, 2 H), 4.70 (s, 2 H), 7.54 - 7.73 (m, 2 H), 7.80 (s, 1 H), 8.29 (dd, J=8.78, 5.27 Hz, 1 H), 8.88 (s, 1 H), 10.93 (br s, 1 H); LCMS: m/z [M+1]⁺=474。

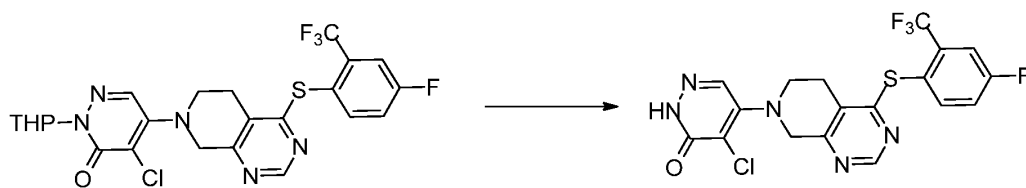
SFC分析检测条件: 色谱柱: Chiralpak IG-3 50×4.6mm I.D., 3μm; 流动相: A相为CO₂; B相为乙醇(0.05% DEA); 梯度B%: 40%。

实施例 2



WX002

合成路线:

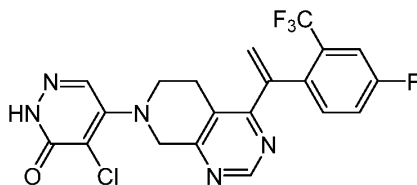


WX001-5

WX002

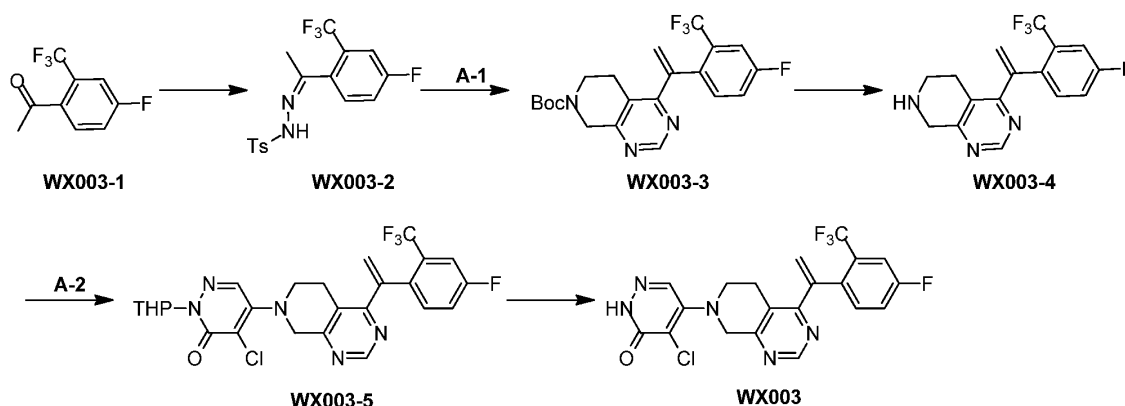
将 **WX001-5** (16 g, 29.52 mmol, 1 *eq*) 加入到含二氯甲烷 (160 mL) 的反应瓶中, 加入三氟乙酸 (100 mL), 25°C 下搅拌 0.5 小时。冷却至 0°C, 向反应液中滴加饱和碳酸钠溶液调 pH=8, 抽滤得滤饼。滤饼用二氯甲烷洗涤, 再干燥得化合物 **WX002**。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.90 (br t, *J*=5.27 Hz, 2 H), 3.80 (t, *J*=5.52 Hz, 2 H), 4.63 (s, 2 H), 7.71 (td, *J*=8.47, 2.89 Hz, 1 H), 7.84 - 7.93 (m, 2 H), 8.00 (s, 1 H), 8.61 (s, 1 H), 13.00 (br s, 1 H); LCMS: *m/z* [M+]⁺=458。

实施例 3



WX003

合成路线:



步骤 1: 化合物 WX003-2 合成

将 WX003-1 (8 g, 38.81 mmol, 1 eq) 加入到含有乙醇 (160 mL) 的反应瓶中, 置换氮气, 分批加入对甲基苯磺酰肼 (7.23 g, 38.81 mmol, 1 eq), 于 90°C 下反应 12 小时。浓缩得粗品。于粗品中加入 10 mL 甲醇, 搅拌 5 分钟, 抽滤, 滤饼干燥得化合物 WX003-2。LCMS: m/z $[M+1]^+ = 375$ 。

步骤 2: 化合物 WX003-3 合成

氮气保护下, 将 WX003-2 (3.74 g, 10.00 mmol, 1 eq), 三二亚苄基丙酮二钯 (915.72 mg, 1.00 mmol, 0.1 eq), 2-二环己基磷-2',4',6'-三异丙基联苯 (953.43 mg, 2.00 mmol, 0.2 eq) 加入到含有 1,4-二氧六环 (60 mL) 的反应瓶中, 加入叔丁醇锂 (1.76 g, 22.00 mmol, 1.98 mL, 2.2 eq), 搅拌 1 分钟; 加入 A-1 (2.70 g, 10 mmol, 1 eq), 于 100°C 下反应 12 小时。冷至室温, 加入乙酸乙酯, 经硅藻土过滤, 浓缩得粗品。粗品经柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯 = 1:0-4:1) 纯化, 得化合物 WX003-3。LCMS: m/z $[M+1]^+ = 424$ 。

步骤 3: 化合物 WX003-4 合成

将 WX003-3 (1.82 g, 4.30 mmol, 1 eq) 加入到含有二氯甲烷 (6.5 mL) 的反应瓶中, 加入三氟乙酸 (2.60 g, 22.78 mmol, 1.69 mL, 5.3 eq), 于 20°C 下反应 12 小时。加入 10 mL 水, 用碳酸钠调 pH=8, 用二氯甲烷 (3×10 mL) 萃取, 合并有机相, 用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩得粗品。粗品经柱层析 (二氯甲烷: 甲醇 = 1:0-9:1) 纯化, 得化合物 WX003-4。LCMS: m/z $[M+1]^+ = 324$ 。

步骤 4: 化合物 WX003-5 合成

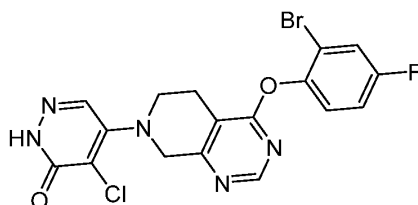
将 WX003-4 (986.1 mg, 2.81 mmol, 92.07% 纯度, 1 eq) 加入到含有 N,N-二异丙基乙胺 (25.25 g, 195.34 mmol, 34.02 mL, 69.56 eq) 的反应瓶中, 加入 A-2 (839.45 mg, 3.37 mmol, 1.2 eq), 于 100°C 下反应 16 小时。浓缩得粗品。粗品经柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯 = 1:0-0:1) 纯化, 得化合物 WX003-5。LCMS: m/z $[M+1]^+ = 536$ 。

步骤 5: 化合物 WX003 合成

将 WX003-5 (0.3 g, 559.78 μ mol, 100% 纯度, 1 eq) 加入到含有二氯甲烷 (10 mL) 的反应瓶中, 加入三氟乙

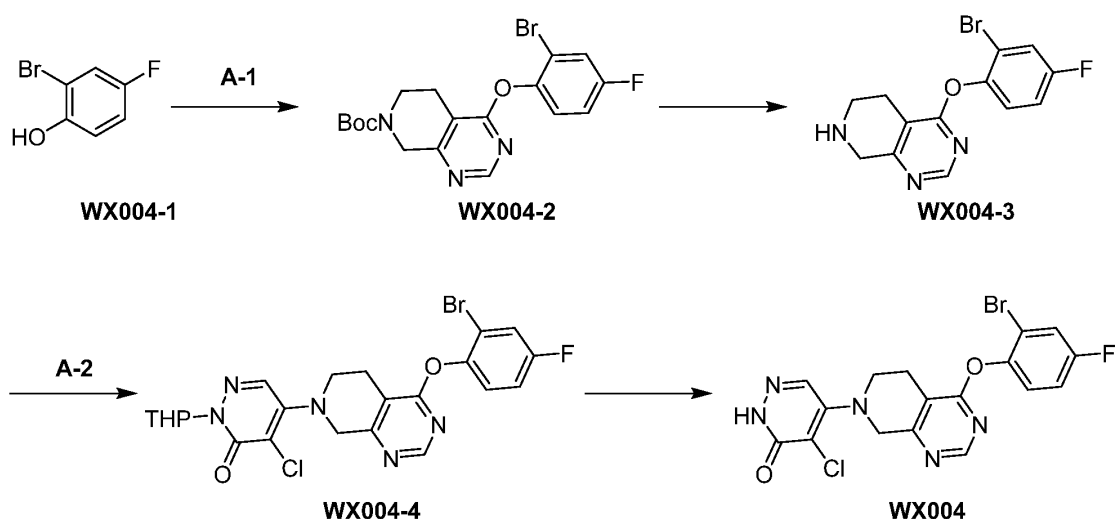
酸 (1.91 g, 16.79mmol, 1.24 mL, 30 eq), 于 20°C 下反应 0.5 小时。加入 10mL 水, 用碳酸钠调 pH=8, 此时有机相中有固体析出, 用混合溶剂 (DCM:MeOH=20:1) 萃取水相, 合并有机相, 用饱和食盐水洗涤, 浓缩得粗品。于粗品中加入 5mL 二氯甲烷和 5mL 甲醇, 搅拌 10 分钟; 抽滤, 滤饼干燥得化合物 **WX003**。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.07 (br s, 2 H), 3.70 (br s, 2 H), 4.73 (s, 2 H), 5.94 (s, 1 H), 6.12 (s, 1 H), 7.52 - 7.73 (m, 3 H), 8.00 (s, 1 H), 8.87 (s, 1 H), 12.97 (br s, 1 H); LCMS: m/z [M+1]⁺=452。

实施例 4



WX004

合成路线:



步骤 1: 化合物 **WX004-2** 合成

将 **A-1** (34 g, 126.05 mmol, 1 eq) 加入到含有 N,N-二甲基甲酰胺 (328 mL) 的反应瓶中, 待完全溶解后加入 **WX004-1** (25.28 g, 132.36 mmol, 1.05 eq), 再加入 1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯 (38.38 g, 252.11 mmol, 38.00 mL, 2 eq), 于 100°C 反应 1.5 小时。搅拌状态下将反应液缓慢加入 3500 mL 水中, 此时有固体析出, 经硅藻土抽滤, 滤饼用水洗涤后用二氯甲烷溶解, 然后抽滤, 滤液浓缩得粗品。粗品经层析柱 (石油醚: 乙酸乙酯=1:1) 纯化, 得化合物 **WX004-2**。LCMS: m/z [M+1]⁺=424, 426。

步骤 2: 化合物 **WX004-3** 合成

将 **WX004-2** (51 g, 120.21 mmol, 1 eq) 加入反应瓶中, 然后加入二氯甲烷 (500 mL), 三氟乙酸 (255.64 g,

2.24 mol, 166.00 mL, 18.65 eq), 于 20°C 下反应 0.5 小时。于反应液中加入 500 mL 水, 然后加碳酸钠调节 pH=7, 用二氯甲烷(3×500 mL)萃取, 合并有机相, 用饱和食盐水(500 mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩得化合物 **WX004-3**。LCMS: m/z [M+1]⁺=324, 326。

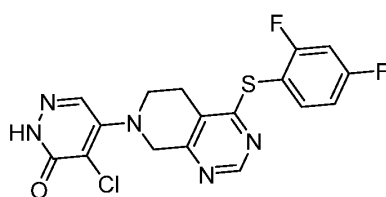
步骤 3: 化合物 **WX004-4** 合成

氮气保护下, 将 **WX004-3**(20 g, 61.70 mmol, 1 eq)加入到含有 N,N-二异丙基乙胺(371.00 g, 2.87 mol, 500 mL, 46.52 eq)的反应瓶中, 加入 **A-2**(16.91 g, 67.87 mmol, 1.1 eq), 于 100°C 下反应 16 小时。直接浓缩得粗品。粗品经柱层析(石油醚:乙酸乙酯=1:4)纯化, 得化合物 **WX004-4**。LCMS: m/z [M+1]⁺=536, 538。

步骤 4: 化合物 **WX004** 合成

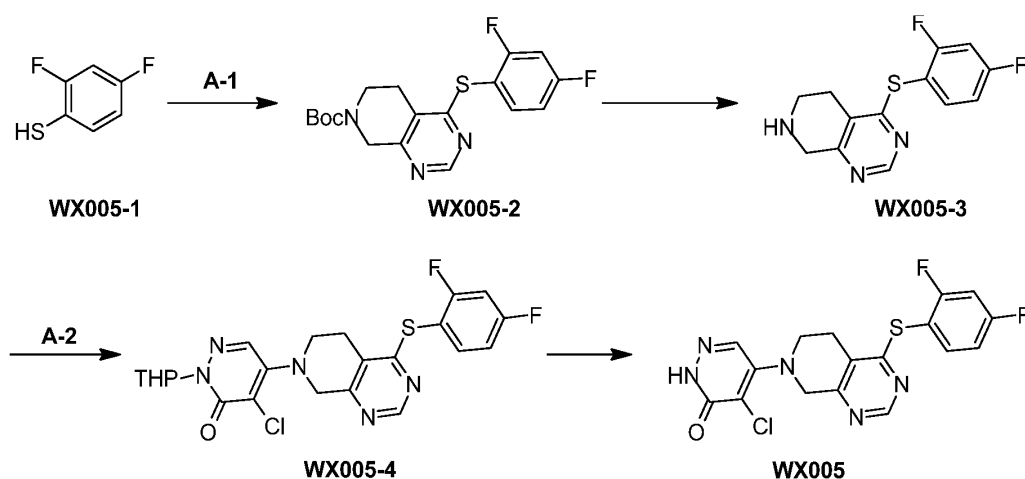
将 **WX004-4**(24 g, 44.71 mmol, 1 eq)加入到含有二氯甲烷(238 mL)的反应瓶中, 再加入三氟乙酸(244.86 g, 2.15 mol, 159 mL, 48.03 eq), 于 20°C 下反应 0.5 小时。于反应液中加入 500 mL 水, 加入碳酸钠调节 pH=7, 用混合溶剂(二氯甲烷:甲醇=20:1)(2×500 mL)萃取, 减压浓缩至剩余约 500 mL 溶剂后, 抽滤, 滤饼干燥得化合物 **WX004**。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.01 (br s, 2 H), 3.73 - 3.82 (m, 2 H), 4.66 (s, 2 H), 7.37 (td, J=8.53, 2.51 Hz, 1 H), 7.43 - 7.53 (m, 1 H), 7.74 (br dd, J=8.03, 2.51 Hz, 1 H), 8.02 (s, 1 H), 8.53 (s, 1 H), 11.21 -13.86(m, 1 H); LCMS: m/z [M+1]⁺=452, 454。

实施例 5



WX005

合成路线:



步骤 1: 化合物 **WX005-2** 合成

将 **A-1** (1.5 g, 5.56 mmol, 1 eq) 和 **WX005-1** (812.81 mg, 5.56 mmol, 630.08 μ L, 1 eq) 加入到 N,N-二甲基甲酰胺 (15 mL) 中, 加入 1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯 (1.69 g, 11.12 mmol, 1.68 mL, 2 eq), 于 100°C 下反应 1.5 小时。向反应液中加入 150 mL 乙酸乙酯, 依次用半饱和食盐水 (6×50 mL) 和饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩得粗品。粗品经柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯=1:0-3: 1) 分离纯化, 得化合物 **WX005-2**。LCMS: m/z $[M+1]^+=380$ 。

步骤 2: 化合物 **WX005-3** 合成

将 **WX005-2** (1 g, 2.64 mmol, 1 eq) 加入到含有二氯甲烷 (50 mL) 的反应瓶中, 加入三氟乙酸 (11.59 g, 101.63 mmol, 7.52 mL, 38.56 eq), 于 20°C 下反应 0.5 小时。向反应液中加入 50 mL 水, 用碳酸钠调节 pH=9, 用二氯甲烷萃取 (3×50 mL), 合并有机相, 用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩得化合物 **WX005-3**。LCMS: m/z $[M+1]^+=280$ 。

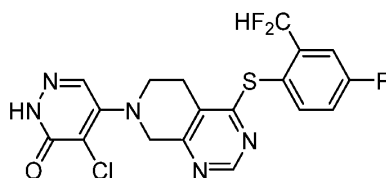
步骤 3: 化合物 **WX005-4** 合成

将 **WX005-3** (570 mg, 2.04 mmol, 1 eq) 加入到含有 N,N-二异丙基乙胺 (18.35 g, 141.96 mmol, 24.73 mL, 69.56 eq) 的反应瓶中, 加入 **A-2** (508.34 mg, 2.04 mmol, 1 eq), 于 100°C 下反应 16 小时。反应液浓缩后加入 30 mL 水, 用二氯甲烷萃取 (3×30 mL), 合并有机相, 用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩得粗品。粗品经柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯=1:0-3:1) 分离纯化, 得化合物 **WX005-4**。LCMS: m/z $[M+1]^+=492$ 。

步骤 4: 化合物 **WX005** 合成

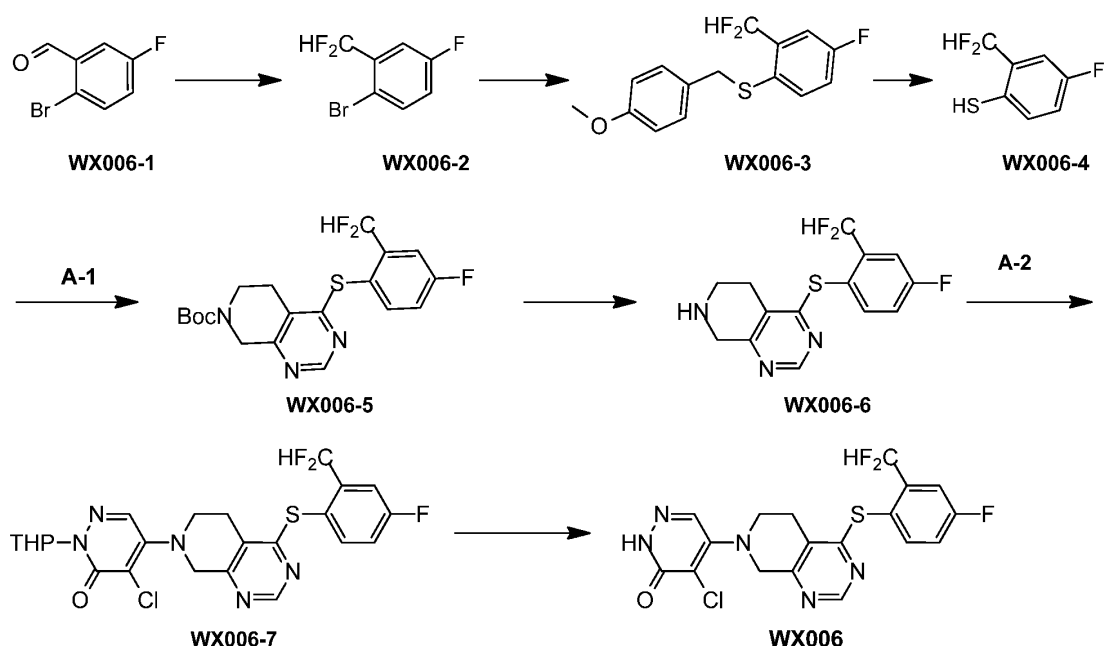
将 **WX005-4** (0.43 g, 874.09 μ mol, 1 eq) 加入到含有二氯甲烷 (10 mL) 的反应瓶中, 加入三氟乙酸 (2.99 g, 26.22 mmol, 1.94 mL, 30 eq), 于 20°C 下反应 0.5 小时。向反应液中加入 20 mL 水, 加入碳酸钠调节 pH=9, 用二氯甲烷 (3×20 mL) 萃取, 浓缩后先加入 7 mL 二甲基亚砜溶解, 然后加入 7 mL 水, 析出固体, 抽滤得滤饼。向滤饼中加入 1 mL 甲醇和 1 mL 乙酸乙酯, 搅拌后抽滤, 滤饼干燥得化合物 **WX005**。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.91 (br t, $J=5.40$ Hz, 2 H), 3.81 (br t, $J=5.65$ Hz, 2 H), 4.63 (s, 2 H), 7.26 (td, $J=8.34, 2.38$ Hz, 1 H), 7.52 (td, $J=9.22, 2.64$ Hz, 1 H), 7.66 - 7.80 (m, 1 H), 8.00 (s, 1 H), 8.64 (s, 1 H), 12.98 (s, 1 H); LCMS: m/z $[M+1]^+=408$ 。

实施例 6



WX006

合成路线:



步骤 1: 化合物 **WX006-2** 合成

将二乙胺基三氟化硫(1.19 g, 7.39 mmol, 976.23 μ L, 1.5 *eq*)的二氯甲烷(5 mL)溶液在 0°C 下向 **WX006-1** (1 g, 4.93 mmol, 1 *eq*)的二氯甲烷(10 mL)溶液中滴加, 反应液自然升温至 25°C 搅拌 18 小时。将反应液滴加入饱和碳酸氢钠溶液(40 mL)中, 搅拌 10 分钟, 加入二氯甲烷(20 mL), 有机相用水(2 $\times$ 20 mL)和饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩滤液得化合物 **WX006-2**。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 6.72 - 7.04 (m, 1 H), 7.11 (br dd, *J*=2.01, 1.00 Hz, 1 H), 7.41 (dd, *J*=8.66, 2.89 Hz, 1 H), 7.60 (dd, *J*=8.78, 5.02 Hz, 1 H)。

步骤 2: 化合物 **WX006-3** 合成

向 **WX006-2** (2 g, 8.89 mmol, 1 *eq*), N,N-二异丙基乙胺(3.45 g, 26.67 mmol, 4.64 mL, 3 *eq*)的 1,4-二氧六环(20 mL)溶液中加入 4-甲氧基苄硫醇(1.51 g, 9.78 mmol, 1.36 mL, 1.1 *eq*)。氮气置换后加入三(二亚苄基丙酮)二钯(244.19 mg, 266.66 μ mol, 0.03 *eq*)和 4,5-双二苯基膦-9,9-二甲基氧杂蒽(360.02 mg, 622.21 μ mol, 0.07 *eq*), 再次氮气置换后于 90°C 下反应 2 小时。反应液浓缩后溶于乙酸乙酯(20 mL), 用水(3 $\times$ 10 mL)和饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩滤液后得粗品。粗品经柱层析(石油醚:乙酸乙酯=1:0-19:1)纯化, 得化合物 **WX006-3**。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.71 (s, 3 H), 4.14 (s, 2 H), 6.82 - 6.88 (m, 3 H), 7.14 - 7.19 (m, 2 H), 7.25 (d, *J*=8.53 Hz, 1 H), 7.41 (br d, *J*=9.29 Hz, 1 H), 7.63 (br dd, *J*=8.16, 5.40 Hz, 1 H)。

步骤 3: 化合物 **WX006-4** 合成

将 **WX006-3** (2.5 g, 8.38 mmol, 1 *eq*)溶解在三氟乙酸(10 mL)和苯甲醚(5 mL)中, 80°C 搅拌 1 小时。反应液冷却至 25°C, 加入冰水中, 用乙酸乙酯(50 mL)萃取, 有机相用 5M 氢氧化钠水溶液萃取(3 $\times$ 30 mL),

合并水相后用 2M 盐酸调 pH 值为 2, 用二氯甲烷 (2×50 mL) 萃取, 合并有机相, 用水和饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩滤液得化合物 **WX006-4**。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.75 (s, 1 H), 6.79 - 6.98 (m, 1 H), 7.26 - 7.37 (m, 1 H), 7.39 - 7.45 (m, 1 H), 7.55 - 7.67 (m, 1 H)。

步骤 4: 化合物 **WX006-5** 合成

将 **WX006-4** (450.84 mg, 2.53 mmol, 1.05 eq), 1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯 (733.74 mg, 4.82 mmol, 726.47 μL, 2 eq), **A-1** (650 mg, 2.41 mmol, 1 eq) 加入至 N,N-二甲基甲酰胺 (6.5 mL) 中, 在 100°C 下搅拌 0.5 小时。反应液冷却至 25°C, 加入 10 mL 乙酸乙酯, 有机相用水 (3×5 mL) 和饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩得粗品。粗品经柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯=1:0-5:1) 纯化, 得化合物 **WX006-5**。LCMS: m/z [M+1]⁺=412。

步骤 5: 化合物 **WX006-6** 合成

将 **WX006-5** (550 mg, 1.34 mmol, 1 eq) 加入到含有三氟乙酸 (2 mL) 和二氯甲烷 (5 mL) 的反应瓶中, 于 25°C 下反应 1 小时。加入饱和碳酸钠溶液调 pH=8, 加入二氯甲烷 (5 mL), 用水 (3×3 mL) 和饱和食盐水洗, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩滤液得化合物 **WX006-6**。LCMS: m/z [M+1]⁺=312。

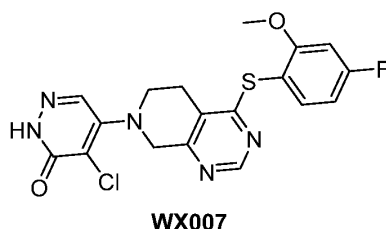
步骤 6: 化合物 **WX006-7** 合成

将 **WX006-6** (330 mg, 739.02 μmol, 69.72% 纯度, 1 eq) 和 **A-2** (202.49 mg, 812.92 μmol, 1.1 eq) 加入到含有 N,N-二异丙基乙胺 (6 mL) 的反应瓶中, 于 100°C 下反应 16 小时。反应液浓缩得粗品。粗品经柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯=1:1-1:3) 纯化, 得化合物 **WX006-7**。LCMS: m/z [M+1]⁺=524。

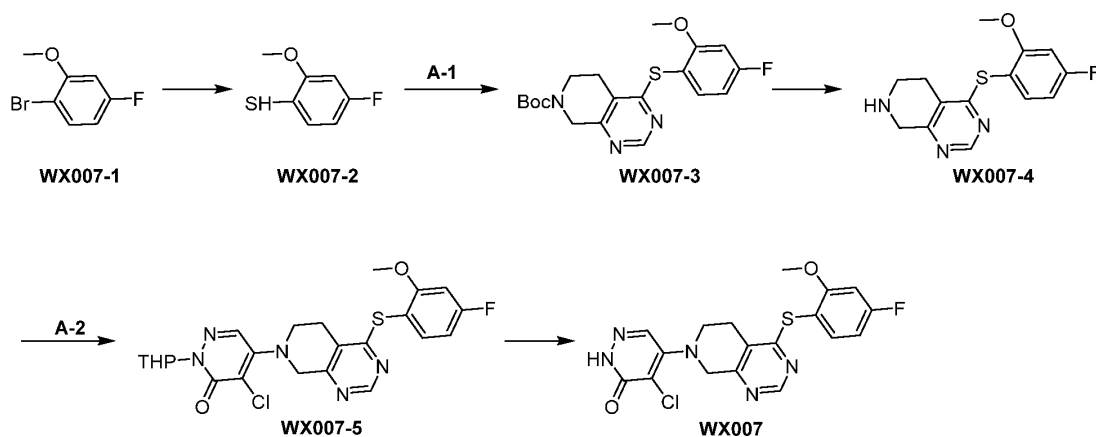
步骤 7: 化合物 **WX006** 合成

将 **WX006-7** (357 mg, 681.35 μmol, 1 eq) 加入到含二氯甲烷 (3.5 mL) 的反应瓶中, 加入三氟乙酸 (2 mL), 25°C 下搅拌 0.5 小时。冷却至 0°C, 向反应液中滴加饱和碳酸钠溶液调 pH=8, 抽滤, 滤饼用水和二氯甲烷洗涤后干燥得化合物 **WX006**。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.92 (br t, *J*=5.40 Hz, 2 H), 3.77 (t, *J*=5.65 Hz, 1 H), 3.83 - 3.88 (m, 1 H), 4.59 (s, 2 H), 7.12 (s, 1 H), 7.53 - 7.62 (m, 1 H), 7.64 - 7.71 (m, 1 H), 7.73 - 7.84 (m, 1 H), 7.99 (s, 1 H), 8.61 (s, 1 H), 12.95 (br s, 1 H); LCMS: m/z [M+1]⁺=440。

实施例 7



合成路线:



步骤 1: 化合物 WX007-2 合成

氮气保护下, 将 **WX007-1** (2 g, 9.75 mmol, 1 eq), 硫粉 (469.19 mg, 14.63 mmol, 1.5 eq) 加入到含有四氢呋喃 (50 mL) 的反应瓶中, 将反应瓶置于干冰丙酮浴中, 搅拌 10 分钟; 然后缓慢滴加叔丁基锂 (1.3 M, 16.51 mL, 2.2 eq), 于干冰丙酮浴下反应 1 小时。反应结束后, 将反应液滴加到 80 mL 饱和氯化铵溶液中, 用乙酸乙酯 (2×80 mL) 萃取, 合并有机相, 用 2M 盐酸 (40 mL) 洗涤有机相, 经无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩滤液得粗品。粗品经柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯=1:0-10:1) 纯化, 得化合物 **WX007-2**。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.83 (s, 3 H), 4.83 (s, 1 H), 6.71 (td, *J*=8.41, 2.76 Hz, 1 H), 6.90 - 6.97 (m, 1 H), 7.32 (dd, *J*=8.53, 6.53 Hz, 1 H)。

步骤 2: 化合物 WX007-3 合成

将 **A-1** (2.65 g, 9.82 mmol, 1 eq) 溶解在 N,N-二甲基甲酰胺 (20 mL) 中, 滴加 1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯 (2.99 g, 19.65 mmol, 2.96 mL, 2 eq), 加入 **WX007-2** (1.55 g, 9.82 mmol, 1 eq), 于 100°C 下反应 1.5 小时。加入 200 mL 乙酸乙酯, 用半饱和食盐水 (6×50 mL) 和 1M 盐酸洗涤有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩滤液得粗品。粗品经柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯=1:0-4:1) 分离纯化, 得化合物 **WX007-3**。LCMS: *m/z* [M+1]⁺=392。

步骤 3: 化合物 WX007-4 合成

将 **WX007-3** (1.55 g, 3.96 mmol, 1 eq) 溶解在含有二氯甲烷 (20 mL) 的反应瓶中, 滴加三氟乙酸 (17.41 g, 152.68 mmol, 11.30 mL, 38.56 eq), 于 20°C 下反应 0.5 小时。冰浴下, 向反应液中滴加饱和碳酸钠溶液, 调节 pH=8, 用二氯甲烷萃取 (3×50 mL), 合并有机相, 经饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩滤液得化合物 **WX007-4**。LCMS: *m/z* [M+1]⁺=292。

步骤 4: 化合物 WX007-5 合成

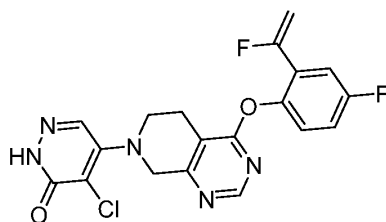
将 **WX007-4** (1.1 g, 3.78 mmol, 1 eq) 加入到含有 N,N-二异丙基乙胺 (46 mL) 的反应瓶中, 加入 **A-2** (1.13 g, 4.53 mmol, 1.2 eq), 于 100°C 下反应 16 小时。反应液浓缩后加入 50 mL 水, 用二氯甲烷萃取 (3×50 mL),

合并有机相,用饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤浓缩滤液得粗品。粗品经柱层析(石油醚:乙酸乙酯=1:2)纯化,得化合物 **WX007-5**。LCMS: m/z $[M+1]^+=504$ 。

步骤 5: 化合物 **WX007** 合成

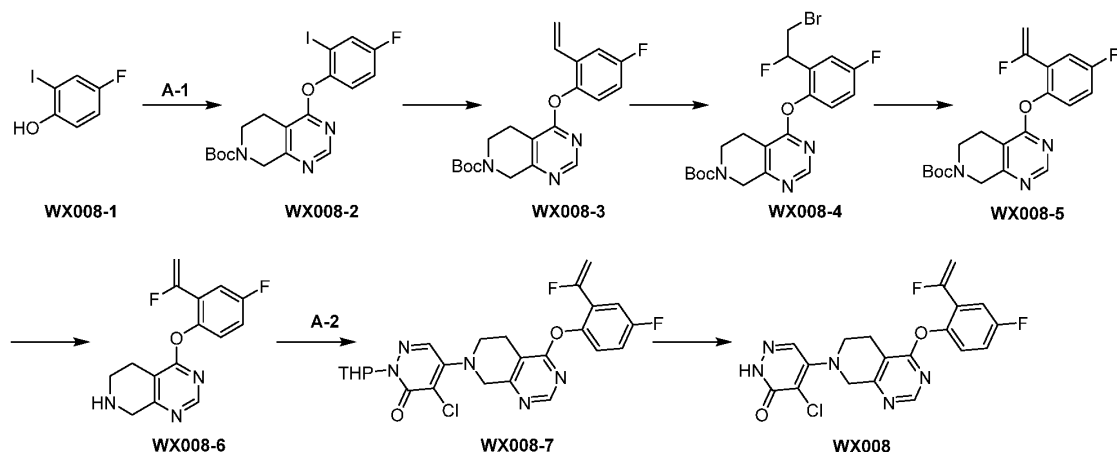
将 **WX007-5**(1 g, 1.98 mmol, 1 *eq*)加入到含有二氯甲烷(30 mL)的反应瓶中,滴加三氟乙酸(6.79 g, 59.53 mmol, 4.41 mL, 30 *eq*),于 20°C下反应 0.5 小时。冰浴下,用饱和食盐水调节 pH=9,用二氯甲烷萃取(3×40 mL),合并有机相,用饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤浓缩滤液得粗品。粗品用制备高效液相色谱(色谱柱: Phenomenex C18 80*40mm*3 μ m;流动相: [水(NH₃H₂O)-ACN];梯度(ACN%): 31%-61%)分离纯化,得化合物 **WX007**。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.88 (br t, *J*=5.14 Hz, 2 H), 3.76 (s, 3 H), 3.79 (br t, *J*=5.65 Hz, 2 H), 4.60 (s, 2 H), 6.90 (td, *J*=8.41, 2.26 Hz, 1 H), 7.11 (dd, *J*=11.17, 2.38 Hz, 1 H), 7.47 - 7.65 (m, 1 H), 8.00 (s, 1 H), 8.58 (s, 1 H), 12.96 (br s, 1 H); LCMS: m/z $[M+1]^+=420$ 。

实施例 8



WX008

合成路线:



步骤 1: 化合物 **WX008-2** 合成

将 **A-1**(5 g, 18.54 mmol, 1 *eq*)溶解在 *N,N*-二甲基甲酰胺(500 mL)中,加入 1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯(5.64 g, 37.07 mmol, 5.59 mL, 2 *eq*),然后加入 **WX008-1**(5.29 g, 22.24 mmol, 1.2 *eq*),于 100°C下反应 1.5 小时。向反应液中加入 1000mL 乙酸乙酯,用半饱和食盐水(6×100 mL)和饱和食盐水洗涤,无水硫

酸钠干燥, 过滤浓缩得粗品。粗品经柱层析(石油醚:乙酸乙酯=4:1)纯化, 得化合物 **WX008-2**。LCMS: m/z [M+1]⁺=472。

步骤 2: 化合物 **WX008-3** 合成

氮气保护下, 将 **WX008-2**(5 g, 10.61 mmol, 1 eq)溶解在 N,N-二甲基甲酰胺(50 mL)和 H₂O (10 mL)的混合溶液中, 加入乙烯基硼酸频哪醇酯(5.72 g, 37.13 mmol, 6.30 mL, 3.5 eq), 四(三苯基膦)钯(1.23 g, 1.06 mmol, 0.1 eq)和碳酸钠(6.75 g, 63.66 mmol, 6 eq), 于 80°C下反应 1 小时。向滤液中加入 1000mL 乙酸乙酯, 用半饱和食盐水洗涤(6×100mL)和饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩得粗品。粗品经柱层析(石油醚:乙酸乙酯=6:1)纯化, 得化合物 **WX008-3**。LCMS: m/z [M+1]⁺=372。

步骤 3: 化合物 **WX008-4** 合成

在 0°C下, 将 **WX008-3**(3.4 g, 9.15 mmol, 1 eq)溶解在二氯甲烷(60 mL)中, 向其中滴加 N-溴代丁二酰亚胺 (1.79 g, 10.07 mmol, 1.1 eq), 然后加入三乙胺三氢氟酸盐(2.95 g, 18.31 mmol, 2.98 mL, 2 eq), 让其缓慢升至 20°C反应 16 小时。将反应液倒入冰水(50mL)和氨水(10mL)的混合溶液中, 用二氯甲烷萃取(3×60mL), 合并有机相, 用 1M 盐酸洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩得粗品。粗品经柱层析(石油醚:乙酸乙酯=1:0.5:1)纯化, 得化合物 **WX008-4**。LCMS: m/z [M+1]⁺=470。

步骤 4: 化合物 **WX008-5** 合成

将 **WX008-4**(2.54 g, 5.40 mmol, 1 eq)溶解在含有二氯甲烷(30 mL)的反应瓶中, 滴加 1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯(1.15 g, 7.56 mmol, 1.14 mL, 1.4 eq), 于 60°C下反应 16 小时。反应液直接浓缩得粗品。粗品经柱层析(石油醚:乙酸乙酯=1:0.3:1)纯化, 得化合物 **WX008-5**。LCMS: m/z [M+1]⁺=390。

步骤 5: 化合物 **WX008-6** 合成

将 **WX008-5**(1.71 g, 4.39 mmol, 1 eq)溶解在含有二氯甲烷(20 mL)的反应瓶中, 滴加三氟乙酸(19.31 g, 169.33 mmol, 12.54 mL, 38.56 eq), 于 20°C下反应 0.5 小时。冰浴下, 向反应液中滴加饱和碳酸钠溶液, 调节 pH=8, 用二氯甲烷萃取(3×20mL), 合并有机相, 用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩得化合物 **WX008-6**。LCMS: m/z [M+1]⁺=290。

步骤 6: 化合物 **WX008-7** 合成

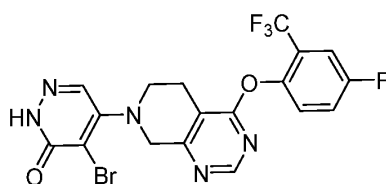
将 **WX008-6**(1.14 g, 3.94 mmol, 1 eq)加入到含有 N,N-二异丙基乙胺(48 mL)的反应瓶中, 加入 **A-2**(1.18 g, 4.73 mmol, 1.2 eq), 于 100°C下反应 16 小时。反应液浓缩后加入 50mL 水, 用二氯甲烷萃取(50mL×3), 合并有机相, 用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩得粗品。粗品经柱层析(石油醚:乙酸乙酯=1:2)纯化, 得化合物 **WX008-7**。LCMS: m/z [M+1]⁺=502。

步骤 7: 化合物 **WX008** 合成

将 **WX008-7**(1 g, 1.99 mmol, 1 eq)加入到含有二氯甲烷(15 mL)的反应瓶中, 滴加三氟乙酸(6.82 g, 59.77

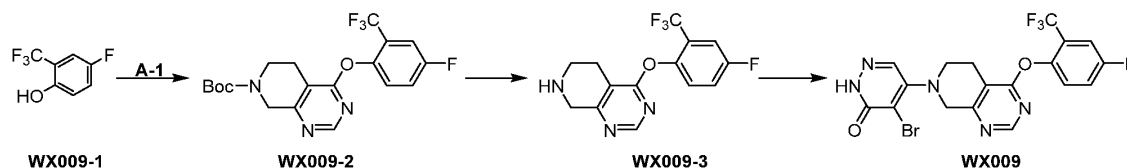
mmol, 4.43 mL, 30 eq), 于 20°C 下反应 0.5 小时。冰浴下, 用饱和碳酸钠溶液调节 pH=9, 用二氯甲烷萃取 (3×15mL), 合并有机相, 用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩得粗品。粗品用制备高效液相色谱 (色谱柱 Phenomenex C18 80*40mm*3μm; 流动相: [水(NH₃H₂O)-ACN]; 梯度 (ACN%): 33%-63%) 纯化, 得化合物 **WX008**。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.00 (br t, *J*=5.27 Hz, 2 H), 3.79 (br t, *J*=5.52 Hz, 2 H), 4.66 (s, 2 H), 5.06 - 5.11 (m, 1 H), 5.11 - 5.24 (m, 1 H), 7.39 - 7.43 (m, 2 H), 7.50 (dd, *J*=9.16, 2.38 Hz, 1 H), 8.03 (s, 1 H), 8.53 (s, 1 H), 12.56 - 13.07 (m, 1 H); LCMS: *m/z* [M+1]⁺=418。

实施例 9



WX009

合成路线:



步骤 1: 化合物 **WX009-2** 合成

将 **A-1** (3 g, 11.12 mmol, 1 eq) 加入到含有 N,N-二甲基甲酰胺 (30 mL) 的反应瓶中, 加入 1,8-二氮杂二环 [5.4.0] 十一碳-7-烯 (3.39 g, 22.24 mmol, 3.35 mL, 2 eq), 再加入 **WX009-1** (2.20 g, 12.23 mmol, 1.1 eq), 于 100°C 反应 0.5 小时。然后向反应液中加入 800 mL 乙酸乙酯, 用半饱和食盐水 (5×250 mL) 洗涤有机相, 然后用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩得化合物 **WX009-2**。LCMS: *m/z* [M+1]⁺=414。

步骤 2: 化合物 **WX009-3** 合成

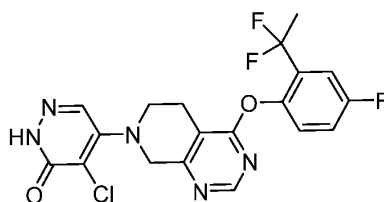
将 **WX009-2** (2 g, 4.84 mmol, 1 eq) 加入到反应瓶中, 然后加入二氯甲烷 (20 mL), 再加入三氟乙酸 (10.29 g, 90.23 mmol, 6.68 mL, 18.65 eq), 于 20°C 下反应 0.5 小时。反应液中加 20 mL 水, 然后加入碳酸钠调节 pH=7, 用二氯甲烷 (2×20 mL) 萃取, 合并有机相, 用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩得化合物 **WX009-3**。LCMS: *m/z* [M+1]⁺=314。

步骤 3: 化合物 **WX009** 合成

氮气保护下, 将 **WX009-3** (1 g, 3.19 mmol, 1 eq) 加入到含有 N,N-二异丙基乙胺 (19.19 g, 148.51 mmol, 25.87 mL, 46.52 eq) 的反应瓶中, 再加入 4,5-二溴吡嗪-3-酮 (891.52 mg, 3.51 mmol, 1.1 eq), 于 100°C 反应 24

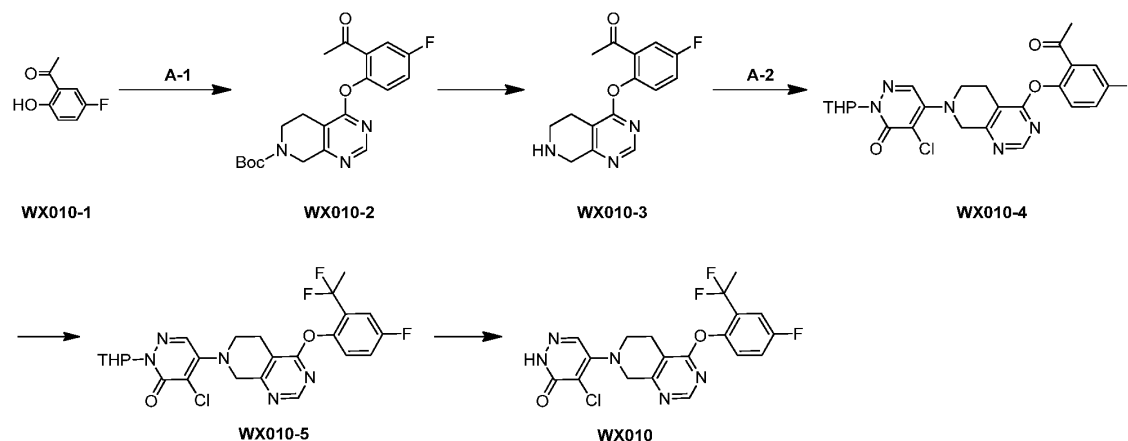
小时。反应液直接浓缩，然后加入 20 mL 混合溶剂(二氯甲烷:甲醇=20:1)，用水和饱和食盐水依次洗涤有机相，无水硫酸钠干燥，过滤浓缩得粗品。经制备高效液相色谱(色谱柱: Xtimate C18 150*40mm*10 μ m; 流动相: [水(FA)-ACN]; ACN%) : 35%-65%)分离得到粗品，加入 2 mL DCM 于 20℃搅拌 16 小时，然后抽滤，滤饼用 1 mL DCM 洗涤后再干燥得到化合物 **WX009**。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 3.12 (t, J=5.77 Hz, 2 H), 3.88 (t, J=5.77 Hz, 2 H), 4.66 (s, 2 H), 7.32 - 7.38 (m, 2 H), 7.45 (br d, J=7.53 Hz, 1 H), 7.77 (s, 1 H), 8.55 (s, 1 H); LCMS: m/z [M+1]⁺=486。

实施例 10



WX010

合成路线:



步骤 1: 化合物 **WX010-2** 合成

将 **A-1** (5 g, 18.54 mmol, 1 eq) 和 **WX010-1** (4.29 g, 27.81 mmol, 1.5 eq) 溶于 N,N-二甲基甲酰胺 (40 mL) 中，然后加入碳酸钾 (7.69 g, 55.61 mmol, 3 eq)，反应经氮气置换 3 次后于 60℃ 下搅拌 20 小时。加入 100 mL 乙酸乙酯，用水 (100 mL) 洗涤有机相，二氯甲烷萃取水相 (3×50 mL)，合并有机相，饱和食盐水 (50 mL) 洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤浓缩得粗品。粗品经柱层析纯化(石油醚:乙酸乙酯=1:0-15:1)，得化合物 **WX010-2**。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.52 (s, 9 H), 2.47 (s, 3 H), 2.92 (br t, J=5.4 Hz, 2 H), 3.79 (t, J=5.8 Hz, 2 H), 4.65 (s, 2 H), 7.14 (dd, J=8.8, 4.5 Hz, 1 H), 7.28 - 7.35 (m, 1 H), 7.56 (dd, J=8.7, 3.1 Hz, 1 H), 8.49 (s, 1 H); LCMS: m/z [M+1]⁺=388。

步骤 2: 化合物 **WX010-3** 合成

将 **WX010-2**(2.3 g, 5.94 mmol, 1 eq)溶于二氯甲烷 (100 mL)中, 然后加入三氟乙酸(25.72 g, 225.60 mmol, 16.70 mL, 38 eq), 反应于 20°C下搅拌 1 小时。于反应液中加入 100 mL 水, 加入碳酸钠调至 pH=9, 用二氯甲烷萃取水相(3×50 mL), 合并有机相, 经饱和食盐水洗涤(100 mL), 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩得化合物 **WX010-3**。LCMS: m/z [M+1]⁺=288。

步骤 3: 化合物 **WX010-4** 合成

将 **WX010-3**(2.25 g, 7.83 mmol, 1 eq) 溶于 N,N-二异丙基乙胺(70.85 g, 548.23 mmol, 95.49 mL, 70 eq) 中, 加入 **A-1**(2.34 g, 9.40 mmol, 1.2 eq), 然后反应于 100°C下搅拌 16 小时。减压蒸馏得到粗品。粗品经柱层析(石油醚:乙酸乙酯=1:0-5:1)纯化, 得化合物 **WX010-4**。LCMS: m/z [M+1]⁺=500。

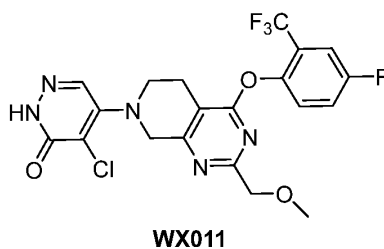
步骤 4: 化合物 **WX010-5** 合成

将 **WX010-4**(0.5 g, 1.00 mmol, 1 eq)溶于二氯甲烷(20 mL)中, 然后缓慢加入双(2-甲氧基乙基)氨基三氟化硫(2.21 g, 10.00 mmol, 2.19 mL, 10 eq), 反应于 40°C下搅拌 20 小时。将反应液缓慢加入 50 mL 饱和碳酸氢钠溶液中搅拌 5 分钟, 二氯甲烷萃取(2×30 mL)水相, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 滤液浓缩得到粗品。粗品经制备高效液相色谱(色谱柱: Phenomenex C18 150*40mm*5μm;流动相: [水(HCl)-ACN];梯度 (ACN%): 50%-60%)分离, 得化合物 **WX010-5**。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.55 - 1.62 (m, 1 H), 1.70 - 1.82 (m, 3 H), 2.00 - 2.07 (m, 1 H), 2.09 - 2.20 (m, 1 H), 2.49 (s, 3 H), 3.11 (br t, J=5.5 Hz, 2 H), 3.70 - 3.94 (m, 3 H), 4.09 - 4.20 (m, 1 H), 4.62 (s, 2 H), 6.08 (dd, J=10.7, 1.6 Hz, 1 H), 7.17 (dd, J=9.0, 4.5 Hz, 1 H), 7.28 - 7.36 (m, 1 H), 7.57 (dd, J=8.5, 3.0 Hz, 1 H), 7.81 (s, 1 H), 8.50 (s, 1 H); LCMS: m/z [M+23]⁺=544。

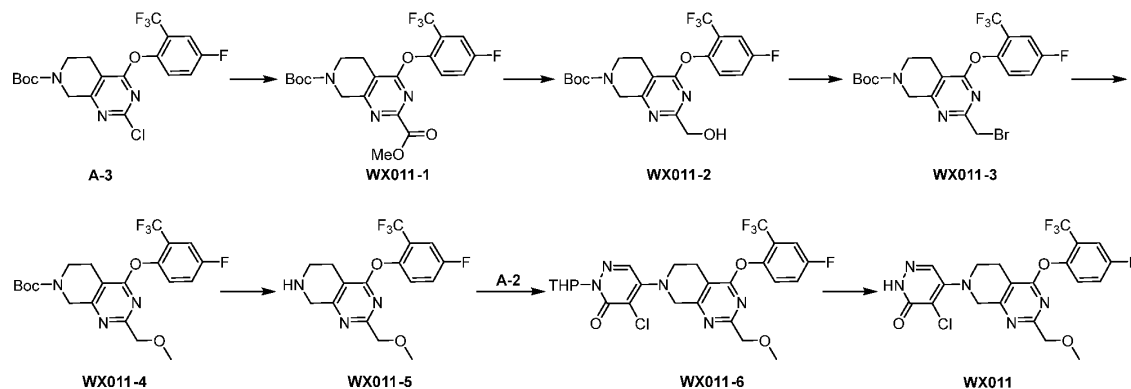
步骤 5: 化合物 **WX010** 合成

将 **WX010-5**(0.088 g, 168.61 μmol, 1 eq)溶于乙酸乙酯 (1 mL)中, 然后加入氯化氢-4M 乙酸乙酯溶液(2 mL), 反应于 20°C下搅拌 1 小时。反应液浓缩得到粗品。将粗品溶于 50 mL 水中, 缓慢加入饱和碳酸钠溶液调至 pH=9, 过滤, 干燥。然后向其中加入 2 mL 二氯甲烷, 搅拌 0.5 小时, 然后过滤, 用 0.5 mL 二氯甲烷洗涤滤饼, 滤饼干燥得化合物 **WX010**。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.97 (br t, J=19.1 Hz, 3 H), 3.00 (br s, 2 H), 3.79 (br s, 2 H), 4.66 (br s, 2 H), 7.47 (br s, 3 H), 8.03 (s, 1 H), 8.54 (s, 1 H), 13.00 (br s, 1 H); LCMS: m/z [M+1]⁺=438。

实施例 11



合成路线:



步骤 1: 化合物 **WX011-1** 合成

将 **A-3** (10 g, 22.33 mmol, 1 eq), [1,1'-双(二苯基膦)二茂铁]二氯化钯 (326.79 mg, 446.62 μmol , 0.02 eq) 和三乙胺 (44.66 mmol, 6.22 mL, 2 eq) 加入至含有甲醇 (400 mL) 的高压釜中, 在一氧化氮 (150 Psi) 气氛下反应, 100°C 反应 18 小时。反应液浓缩得粗品。粗品经柱层析 (二氯甲烷: 甲醇=1:0-9:1) 纯化, 得化合物 **WX011-1**。LCMS: m/z $[M+1]^+=472$ 。

步骤 2: 化合物 **WX011-2** 合成

将 **WX011-1** (0.20 g, 424.27 μmol , 1 eq), 叔丁醇 (5 mL) 加入到反应瓶中, 室温下加入硼氢化钠 (50 mg, 1.32 mmol, 3.12 eq), 缓慢升温至 70°C, 在 70°C 下搅拌 3 小时。向反应液中滴加饱和氯化铵溶液 (10 mL) 淬灭反应, 用乙酸乙酯萃取 (3×10 mL), 合并有机相, 用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩得粗品。粗品经制备薄层层析 (石油醚: 乙酸乙酯=3:1) 分离纯化, 得化合物 **WX011-2**。LCMS: m/z $[M+1]^+=444$ 。

步骤 3: 化合物 **WX011-3** 合成

将 **WX011-2** (60 mg, 135.32 μmol , 1 eq), 无水四氢呋喃 (1 mL), 加入到反应瓶中, 0°C 下加入三溴化磷 (270.64 μmol , 25.44 μL , 2 eq), 反应体系在 0°C 下搅拌 1 小时。向反应液中加入饱和碳酸钠溶液 (5 mL) 淬灭反应, 用乙酸乙酯萃取 (3×5 mL), 合并有机相, 用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩得粗品。粗品经制备薄层层析 (石油醚: 乙酸乙酯=3:1) 分离纯化, 得化合物 **WX011-3**。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.51 (s, 9 H), 2.89 (br s, 2 H), 3.77 (br t, J=5.77 Hz, 2 H), 4.32 (s, 2 H), 4.64 (s, 2 H), 7.30 - 7.40 (m, 2 H),

7.43 (dd, J=8.16, 2.64 Hz, 1 H); LCMS: m/z [M+1]⁺=506。

步骤 4: 化合物 **WX011-4** 合成

将 **WX011-3**(40 mg, 79.01 μmol, 1 eq), 无水甲醇(0.5 mL)加入到反应瓶中, 加入甲醇钠(42.68 mg, 790.06 μmol, 10 eq), 在室温下搅拌 1 小时。向反应液中滴加柠檬酸溶液 (1M) 调节反应液 pH 约为 7, 浓缩除去甲醇, 加入水 (5mL), 用乙酸乙酯萃取 (3×5mL), 合并有机相, 有机相用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩得化合物 **WX011-4**。LCMS: m/z [M+1]⁺=458。

步骤 5: 化合物 **WX011-5** 合成

将 **WX011-4**(60 mg, 131.17 μmol, 1 eq), 无水二氯甲烷(1 mL)加入到反应瓶中, 加入三氟乙酸(4.05 mmol, 0.3 mL, 30.89 eq), 在室温下搅拌 1 小时。向反应液中滴加饱和碳酸氢钠溶液调节反应液 pH 约为 7, 分液, 水相用二氯甲烷萃取 (2×5mL), 合并有机相, 有机相用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩得化合物 **WX011-5**。LCMS: m/z [M+1]⁺=358。

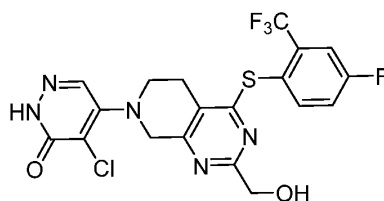
步骤 6: 化合物 **WX011-6** 合成

将 **WX011-5**(60 mg, 167.93 μmol, 1 eq), **A-2** (50 mg, 200.73 μmol, 1.20 eq), N,N-二异丙基乙胺(5.74 mmol, 1 mL, 34.19 eq)加入到反应瓶中, 在 90°C 下搅拌 16 小时。向反应液中加入水(5mL), 用乙酸乙酯萃取(3×5mL), 合并有机相, 用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩得粗品。粗品经制备薄层层析 (石油醚: 乙酸乙酯=1:1) 分离纯化, 得化合物 **WX011-6**。LCMS: m/z [M+1]⁺=570。

步骤 7: 化合物 **WX011** 合成

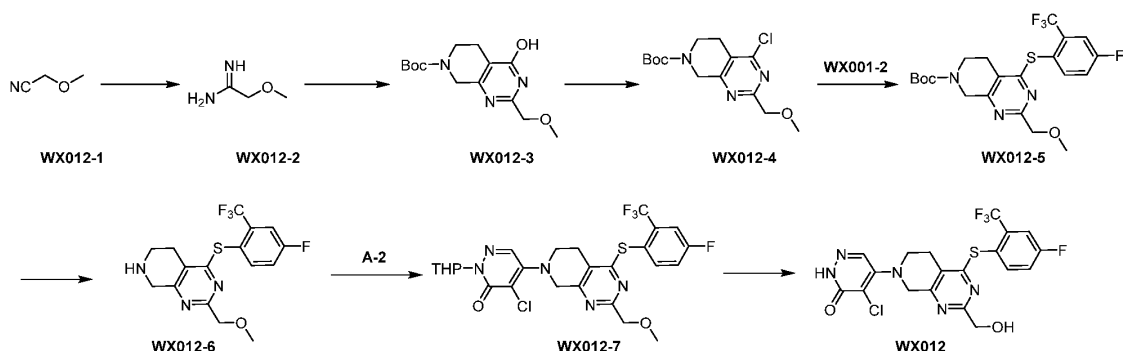
将 **WX011-6**(30 mg, 52.64 μmol, 1 eq), 无水二氯甲烷(0.5 mL)加入到反应瓶中, 加入三氟乙酸(2.70 mmol, 0.20 mL, 51.32 eq), 在室温下搅拌 1 小时。反应液浓缩得粗品。粗品经制备高效液相色谱 (色谱柱: Welch Xtimate C18 150*25mm*5μm; 流动相: [水(NH₄HCO₃)-ACN]; 梯度 (ACN%): 23%-53%) 分离纯化得化合物 **WX011**。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 3.09 (s, 2H), 3.45 (s, 3 H), 3.87 (t, J=5.65 Hz, 2 H), 4.43 (s, 2 H), 4.69 (s, 2 H), 7.32 - 7.39 (m, 2 H), 7.42 - 7.46 (m, 1 H), 7.73 (s, 1 H), 10.33 (br s, 1 H); LCMS: m/z [M+1]⁺=486。

实施例 12



WX012

合成路线:



步骤 1: 化合物 **WX012-2** 合成

将 **WX012-1** (478.35 mmol, 35.56 mL, 1 eq), MeOH (170 mL), 甲醇钠 (3.40 g, 62.94 mmol, 0.13 eq) 加入到反应瓶中, 反应体系在室温 (20°C) 下搅拌 1 小时。再加入氯化铵 (25.84 g, 483.07 mmol, 1.01 eq), 反应体系在 40°C 下搅拌 3 小时。将反应液过滤, 滤液浓缩得 **WX012-2** 的盐酸盐粗品, 直接用于下一步。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 3.35 (s, 3H), 4.24 (s, 2H), 8.86 (br s, 4 H)。

步骤 2: 化合物 **WX012-3** 合成

将 1-BOC-3-氧代-4-哌啶甲酸乙酯 (2.00 g, 7.37 mmol, 1 eq), **WX012-2** (2.20 g, 盐酸盐粗品), 乙醇钠 (1.11 g, 16.33 mmol, 2.21 eq), 无水乙醇 (30 mL) 加入到反应瓶中, 反应体系在 100°C 下搅拌 4 小时。将反应液浓缩, 加入水 (20 mL), 用盐酸 (1M) 调节 pH 约为 6, 用乙酸乙酯萃取 (3*20 mL), 合并有机相, 用饱和食盐水 (20 mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液浓缩得粗品。向粗品中加入石油醚: 乙酸乙酯 (20:1, 20 mL), 在室温 (20°C) 下搅拌 0.2 小时, 过滤, 滤饼干燥得 **WX012-3**。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.49 (s, 9H), 2.62 (br s, 2H), 3.52 (s, 3H), 3.62 (br t, J=5.57 Hz, 2H), 4.35 (br s, 2H), 4.38 (s, 2H), 9.69 (br s, 1 H); LCMS: m/z [M+1]⁺=295.9。

步骤 3: 化合物 **WX012-4** 合成

将 **WX012-3** (1.60 g, 5.42 mmol, 1 eq), 三苯基膦 (2.85 g, 10.87 mmol, 2.01 eq), 无水甲苯 (20 mL) 加入到反应瓶中, 氮气氛围下加入 2,2,2-三氯乙腈 (1.18 g, 8.18 mmol, 0.82 mL, 1.51 eq), 反应体系在 100°C 下搅拌 1.5 小时。将反应液过滤, 滤液浓缩得粗品。向粗品中加入混合溶剂 (石油醚: 乙酸乙酯=10:1, 30 mL), 在室温 (20°C) 下搅拌 0.2 小时, 过滤, 滤液浓缩, 粗品经柱层析 (石油醚: 乙酸乙酯=1:0.5:1) 分离纯化得 **WX012-4**。LCMS: m/z [M+1]⁺=313.9。

步骤 4: 化合物 **WX012-5** 合成

将 **WX012-5** (0.65 g, 2.07 mmol, 1 eq)、**WX001-2** (0.45 g, 2.29 mmol, 1.11 eq), 碳酸钾 (0.56 g, 4.05 mmol, 1.96 eq), 无水 DMF (10 mL) 加入到反应瓶中, 反应体系在 100°C 下搅拌 1 小时。向反应液中加入水 (20 mL), 用乙酸乙酯萃取 (3*20 mL), 合并有机相, 有机相用饱和食盐水 (2*20 mL) 洗涤, 无水硫

酸钠干燥，过滤，滤液浓缩得粗品。粗品经柱层析（PE:EA=1:0-2:1）分离纯化得 **WX012-5**。LCMS: m/z [M+1]⁺=473.9。

步骤 5: 化合物 **WX012-6** 合成

将 **WX012-5** (0.30 g, 633.60 μmol, 1 eq)，无水 DCM (3 mL) 加入到反应瓶中，加入三氟乙酸 (20.26 mmol, 1.50 mL, 31.98 eq)，反应体系在室温 (20°C) 下搅拌 2 小时。向反应液中滴加饱和碳酸氢钠溶液调节反应液 pH 约为 7，分液，水相用 DCM 萃取 (2*10mL)，合并有机相，有机相用饱和食盐水 (10 mL) 洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液浓缩得粗品 **WX012-6**，直接用于下一步反应。LCMS: m/z [M+1]⁺=373.9。

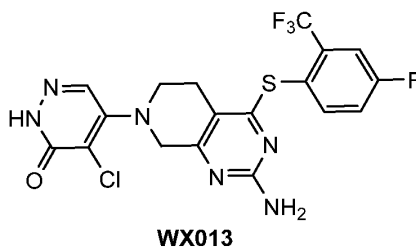
步骤 6: 化合物 **WX012-7** 合成

将 **WX012-6** (0.15 g, 401.75 μmol, 1 eq)，**A-2** (0.10 g, 401.46 μmol, 1 eq)，N,N-二异丙基乙胺 (1.44 mmol, 0.25 mL, 3.57 eq)，DMA (1.5 mL) 加入到反应瓶中，反应体系在 100°C 下搅拌 3 小时。向反应液中加入水 (10mL)，用乙酸乙酯萃取 (3*10mL)，合并有机相，用饱和食盐水 (2*10mL) 洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液浓缩得粗品，粗品经 prep-TLC (PE:EA=1:1) 分离纯化得 **WX012-7**。LCMS: m/z [M+23]⁺=607.8。

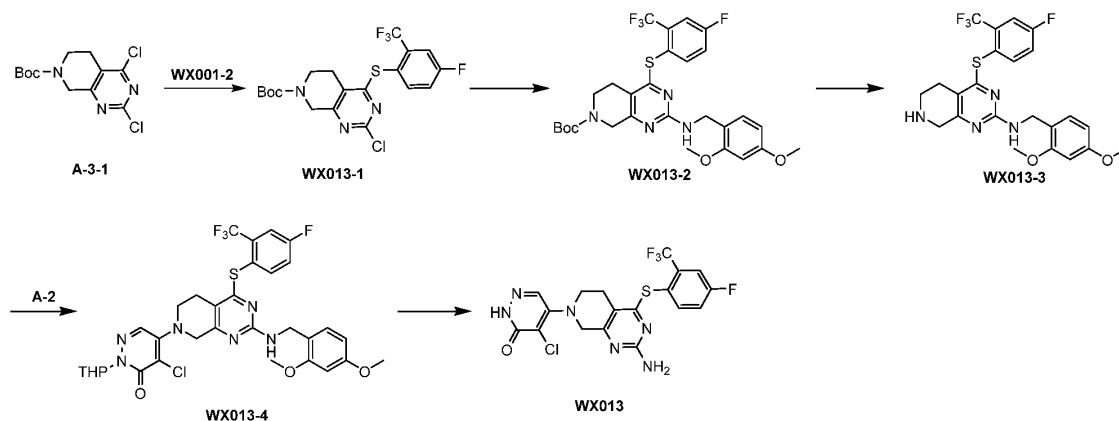
步骤 7: 化合物 **WX012** 合成

将 **WX012-7** (0.12 g, 204.78 μmol, 1 eq)，无水 DCM (2 mL) 加入到反应瓶中，加入三溴化硼 (830.26 μmol, 80 μL, 4.05 eq)，反应体系在室温 (20°C) 下搅拌 1 小时。向反应液中滴加饱和碳酸钠溶液淬灭反应，调节溶液 pH 约为 7，浓缩得粗品，向粗品中加入混合溶剂 (DCM:MeOH=10:1, 5mL) 搅拌均匀后，过滤，滤液浓缩。粗品经制备板分离 (DCM:MeOH=20:1) 分离纯化，进一步经制备高效液相色谱 (色谱柱: Phenomenex C18 80*40mm*3μm; 流动相: [水(氨水)-ACN]; 梯度 (ACN)%: 35%-65%) 分离纯化得 **WX012**。
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 2.96 - 3.15 (m, 3H), 3.89 (br t, J=5.40 Hz, 2H), 4.52 (br d, J=4.02 Hz, 2H), 4.61 (s, 2H), 7.37 (br t, J=6.90 Hz, 1H), 7.59 (dd, J=8.66, 2.38 Hz, 1H), 7.69 (br dd, J=8.41, 5.40 Hz, 1H), 7.76 (s, 1H), 11.38 (br s, 1 H); LCMS: m/z [M+1]⁺=488.0。

实施例 13



合成路线:



步骤 1: 化合物 **WX013-1** 合成

将 **A-3-1** (18 g, 59.18 mmol, 0.95 eq) 和 **WX001-2** (15.27 g, 62.29 mmol, 80% 纯度, 1 eq) 溶解在 ACN (200 mL) 中, 加入碳酸钾 (25.83 g, 186.88 mmol, 3 eq), 反应在 50°C 搅拌 4 小时。冷却至室温, 过滤, 滤液减压浓缩得粗品。粗品经柱层析(石油醚:乙酸乙酯=20:1 至 10:1)得 **WX013-1**。LCMS: m/z $[M+1]^+=464.0$ 。

步骤 2: 化合物 **WX013-2** 合成

将 **WX013-1** (13g, 28.02 mmol, 1 eq), ACN (100 mL), 2,4-二甲氧基苯胺 (23.43 g, 140.12 mmol, 21.11 mL, 5 eq) 加入到反应瓶中, 80 氮气下搅拌 12 小时。将反应液冷却至室温, 过滤, 滤饼单独取出, 滤液减压浓缩后经柱层析(PE:EA=3:1)分离纯化得粗品, 粗品与滤饼合并后加入 MeOH 15 mL 中, 室温 (20) 搅拌 1 小时, 过滤, 收集滤饼得到 **WX013-2**。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.49 (s, 9H), 2.64 (br s, 2H), 3.70 (br s, 2H), 3.79 (s, 6H), 4.04 (br s, 2H), 4.41 (br s, 2H), 6.29 (br d, $J=8.78$ Hz, 1H), 6.34 - 6.57 (m, 2H), 7.18 (br s, 1H), 7.45 (br d, $J=8.03$ Hz, 1H), 7.59 (dd, $J=8.41, 5.65$ Hz, 1H); LCMS: m/z $[M+1]^+=595$ 。

步骤 3: 化合物 **WX013-3** 合成

将 **WX013-2** (10 g, 16.82 mmol, 1 eq), 氯化氢的二氧六环溶液 (4M, 100 mL) 加入到反应瓶中, 反应体系在室温 (20° C) 下搅拌 3 小时。向反应液中加入饱和碳酸氢钠饱和溶液, 将 pH 调至 8 左右, 加入 DCM (100 mL*3) 萃取, 合并有机相, 使用饱和食盐水(100 mL)洗涤, 加入无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩得 **WX013-3**, 直接用于下一步。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 2.63 (br t, $J=5.65$ Hz, 2H), 3.21 (t, $J=5.77$ Hz, 2H), 3.79 (d, $J=4.27$ Hz, 6H), 3.83 (s, 2H), 4.04 (br s, 2H), 6.29 (br d, $J=8.28$ Hz, 1H), 6.41 (d, $J=2.26$ Hz, 1H), 6.59 (br s, 1H), 7.15 (br t, $J=8.03$ Hz, 1H), 7.43 (dd, $J=9.16, 2.89$ Hz, 1H), 7.59 (dd, $J=8.53, 5.52$ Hz, 1H); LCMS: m/z $[M+1]^+=494.9$ 。

步骤 4: 化合物 **WX013-4** 合成

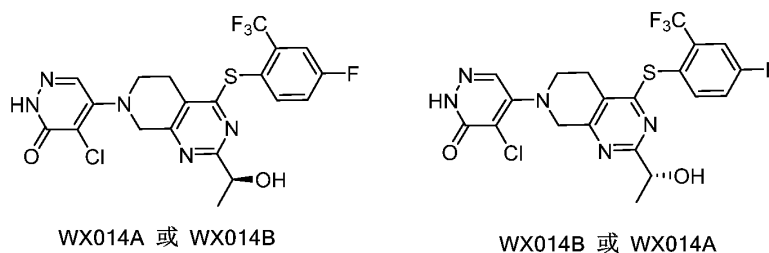
将 **WX013-3** (11 g, 22.24 mmol, 1 eq), **A-2** (4.99 g, 20.02 mmol, 0.9 eq), N,N-二异丙基乙胺(110 mL) 混合升温至 100°C 搅拌 12 小时。将反应液减压浓缩后, 粗品经柱层析 (PE:EA, EA 的比例=0-60%) 分离

纯化得 **WX013-4**。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.72 (br s, 6H), 2.81 (br t, J=5.52 Hz, 2H), 3.79 (d, J=1.76 Hz, 8H), 3.92 - 4.20 (m, 4H), 4.37 (s, 2H), 6.04 - 6.14 (m, 1H), 6.30 (br d, J=7.78 Hz, 1H), 6.36 - 6.53 (m, 2H), 7.15 - 7.22 (m, 1H), 7.46 (dd, J=8.78, 2.76 Hz, 1H), 7.60 (dd, J=8.41, 5.40 Hz, 1H), 7.75 (s, 1H), ; LCMS: m/z [M+1]⁺= 707。

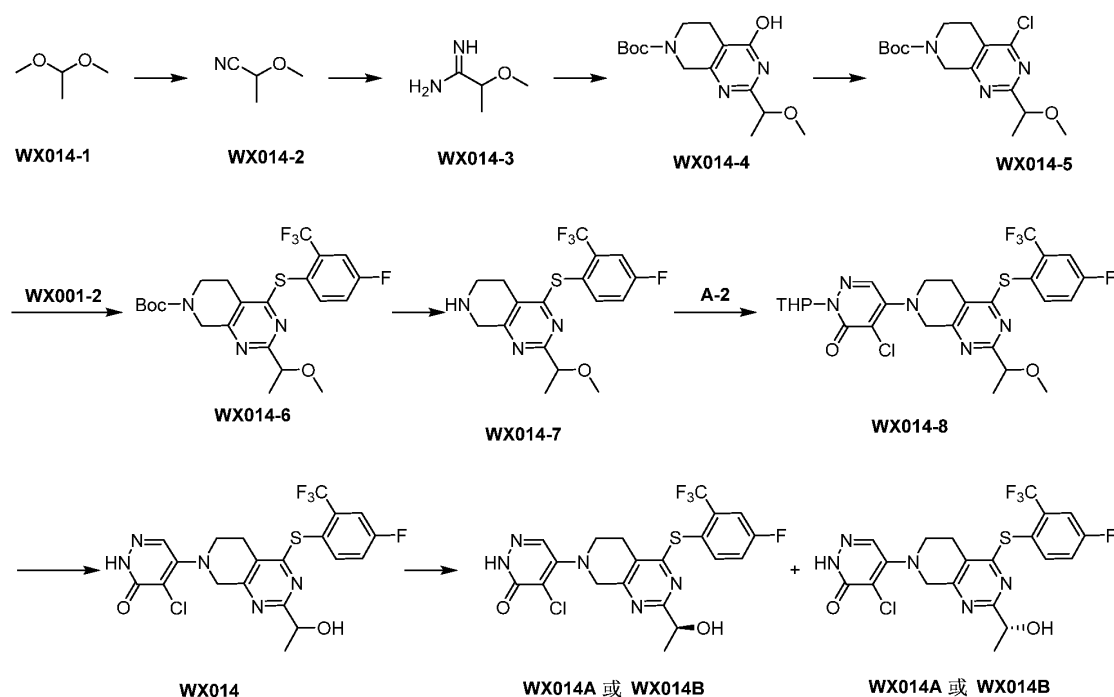
步骤 4: 化合物 **WX013** 合成

将 **WX013-4** (5 g, 7.07 mmol, 1 eq) , DCM (50 mL) 加入到反应瓶中, 滴加三氟乙酸 (16.12 g, 141.42 mmol, 10.47 mL, 20 eq) , 反应体系在 35° C 下搅拌 12 小时。将反应液浓缩, 加入 MeOH (50 mL) 后再浓缩得到粗品。向粗品中加入 50 mL DCM, 室温下搅拌 1 小时, 过滤, 向滤饼中加入乙酸乙酯 (15 mL) 室温下搅拌 3 小时, 过滤, 滤饼干燥得到 **WX013**。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 2.88 (t, J=5.65 Hz, 2H), 3.86 (t, J=5.77 Hz, 2H), 4.58 (s, 2H), 7.53 (td, J=8.22, 2.64 Hz, 1H), 7.70 (dd, J=9.03, 2.76 Hz, 1H), 7.81 (dd, J=8.53, 5.27 Hz, 1H), 7.97 (s, 1H); LCMS: m/z [M+1]⁺=472.9。

实施例 14



合成路线:



步骤 1: 化合物 **WX014-2** 合成

将 **WX014-1** (30 g, 332.89 mmol, 35.21 mL, 1 eq), 三甲基氰硅烷 (33.02 g, 332.89 mmol, 41.64 mL, 1 eq) 加入到反应瓶中, 0 °C 下缓慢滴加三氯化硼乙醚溶液 (3.45 g, 24.31 mmol, 3.00 mL, 0.073 eq), 滴加完毕后, 在 20 °C 搅拌 16 小时。反应液中加入 20 mL 饱和碳酸氢钠溶液淬灭反应, 然后用 DCM (3×50 mL) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥后, 室温 25 °C 减压浓缩得到 **WX014-2**, 直接用于下一步。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1.45 (s, 3H), 3.37 (s, 3H), 4.44 (q, J=6.78 Hz, 1H)。

步骤 2: 化合物 **WX014-3** 合成

将 **WX014-2** (20 g, 235.01 mmol, 1 eq) 加入到含有乙醇 (100 mL) 的反应瓶中, 在 -5 °C 下通入氨气 15 分钟, 反应于 25 °C 搅拌 16 小时。反应液减压浓缩, 除去部分氨气, 得 **WX014-3** 的乙醇溶液, 直接投下一步。

步骤 3: 化合物 **WX014-4** 合成

将乙醇钠 (3.45 g, 50.68 mmol, 2.5 eq) 加入到步骤 2 中得到的 **WX014-3** 的乙醇溶液中, 然后加入 1-Boc-3-氧代-4-哌啶甲酸乙酯 (5.5 g, 20.27 mmol, 1 eq), 氮气保护下在 100 °C 搅拌反应 6 小时。反应液减压浓缩后, 加入 100 mL 水溶解, 用 1 M 的盐酸水溶液调节 pH=6, 然后用乙酸乙酯 (2×100 mL) 萃取, 有机相合并后用 100 mL 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 然后减压浓缩滤液得粗品。粗品经柱层析 (MeOH/DCM, MeOH 比例=0%-6%) 纯化得到 **WX014-4**。LCMS: m/z [M+1]⁺=309.9。

步骤 4: 化合物 **WX014-5** 合成

将 **WX014-4** (4.16 g, 13.45 mmol, 1 eq) 和三苯基膦 (10.58 g, 40.34 mmol, 3 eq) 加入到无水甲苯 (50 mL) 中, 氮气保护下, 加入 2,2,2-三氯乙腈 (2.91 g, 20.17 mmol, 2.02 mL, 1.5 eq), 反应在 100 °C 反应 1 小时。反应液冷却后, 加 80 mL 饱和碳酸氢钠溶液淬灭反应。水相用乙酸乙酯(2×80 mL)萃取, 合并有机相, 用 100 mL 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 浓缩得粗品。粗品中加入 100 mL 混合溶剂 (PE:EA=3:1) 搅拌 1 小时, 然后过滤, 滤饼用混合溶剂(PE:EA=3:1) 50 mL 洗涤, 合并滤液浓缩得粗品, 粗品经柱层析 (EA/PE, EA 比例=0%-20%)纯化后得 **WX014-5**。LCMS: m/z [M+1]⁺=327.9。

步骤 5: 化合物 **WX014-6** 合成

氮气保护下, 将 **WX014-5** (1.62 g, 4.94 mmol, 1 eq) 和 **WX001-2** (1.51 g, 4.94 mmol, 64% 纯度, 1 eq) 加入到含有 DMF (16 mL) 的反应瓶中, 然后加入 1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一十一烷-7-烯 (1.50 g, 9.88 mmol, 1.49 mL, 2 eq), 于 120 °C 搅拌 1 小时。反应液降至室温后加入 30 mL 乙酸乙酯, 用 30 mL 饱和食盐水洗涤后, 有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得粗品。粗品经柱层析(EA/PE, EA 比例=0%-25%)纯化后得 **WX014-6**。LCMS: m/z [M+1]⁺=488.1。

步骤 6: 化合物 **WX014-7** 合成

将 **WX014-6** (1.79 g, 3.67 mmol, 1 eq) 加入到含有 DCM (18 mL) 的反应瓶中, 然后加入三氟乙酸 (5 mL), 反应在 25 °C 反应 1 小时。反应液中加入 20 mL 水, 然后加入碳酸钠调节 pH=8, 水相用 DCM(2×20 mL)萃取, 合并有机相, 用 20 mL 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 滤液减压浓缩得粗品 **WX014-7**, 直接用于下一步。LCMS: m/z [M+1]⁺= 388.0。

步骤 7: 化合物 **WX014-8** 合成

将 **WX014-7** (1.5 g, 3.87 mmol, 1 eq) 加入到含有 N,N-二异丙基乙胺 (30 mL) 的反应瓶中, 然后加入 **A-2** (1.06 g, 4.26 mmol, 1.1 eq), 反应在 100 °C 搅拌 16 小时。反应液直接减压浓缩得粗品。粗品经柱层析 (MeOH/DCM, MeOH 比例=0%-8%)纯化得到 **WX014-8**。LCMS: m/z [M+1]⁺= 600.1。

步骤 8: 化合物 **WX014** 合成

将 **WX014-8** (400 mg, 666.64 μmol, 1 eq) 加入到含有无水DCM (10 mL) 的反应瓶中, 冷却至0°C后缓慢滴加三溴化硼 (1.67 g, 6.67 mmol, 642.33 μL, 10 eq) 的无水DCM (5 mL) 溶液, 滴加完毕后反应在25 °C 反应16 小时。反应液加入到0 °C的碳酸钠水溶液(10 mL)中淬灭反应, 水相用DCM(2×10 mL)萃取, 合并有机相, 用饱和食盐水(10 mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩得粗品, 粗品经制备高效液相色谱(色谱柱:Phenomenex C18 150*40mm*5μm;流动相:[水(HCl)-ACN];梯度(ACN)%: 35%-55%) 纯化, 得到**WX014**。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1.08 (d, J=6.53 Hz, 3H), 2.87 (br t, J=5.27 Hz, 2H), 3.79 (br t, J=5.52 Hz, 2H), 4.41 (q, J=6.53 Hz, 1H), 4.62 (s, 2H), 7.69 (td, J=8.47, 2.89 Hz, 1H), 7.82 - 7.91 (m, 2H), 7.98 (s, 1H), 12.96 (s, 1 H); LCMS: m/z [M+1]⁺= 502.0。

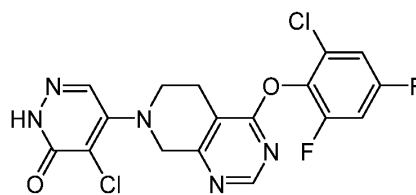
步骤9: 化合物 **WX014A** 和 **WX014B** 的合成

WX014 (230mg) 经手性制备分离(色谱柱: DAICEL CHIRALPAK AD(250mm*30mm,10 μ m);流动相:A: CO₂, B: MeOH (0.1%氨水);梯度 (B%): 35%-35%), 得**WX014A**和**WX014B**。

WX014A: SFC分析方法为: 色谱柱: ChiralPak AD-3 150 $\times$ 4.6mm I.D., 3 μ m; 流动相: A: CO₂, B: MeOH (0.05% DEA); 梯度B为40%, 保留时间为3.356 分钟, ee=100%, ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1.09 (d, J=6.53 Hz, 3H), 2.87 (br t, J=5.27 Hz, 2H), 3.80 (t, J=5.77 Hz, 2H), 4.37 - 4.46 (m, 1H), 4.63 (s, 2H), 4.88 (d, J=5.27 Hz, 1H), 7.70(td, J=8.41, 2.76 Hz, 1H), 7.83 - 7.93 (m, 2H), 7.99 (s, 1H), 12.96 (br s, 1 H); LCMS: m/z [M+1]⁺= 502.0。

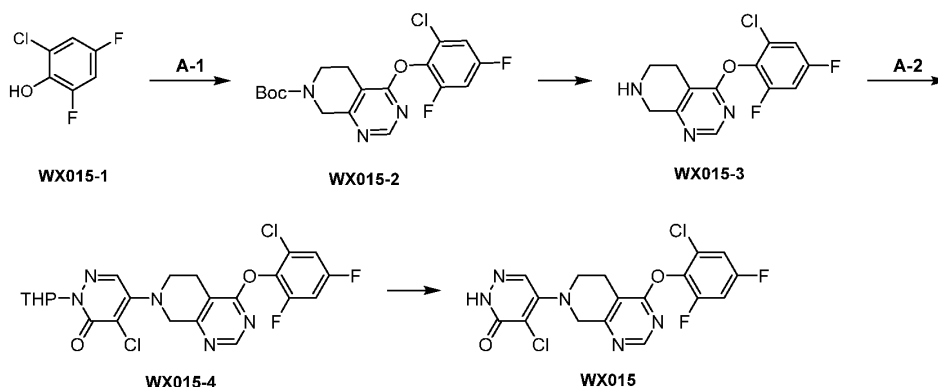
WX014B: SFC 分析方法为: 色谱柱: ChiralPak AD-3 150 $\times$ 4.6mm I.D., 3 μ m; 流动相: A: CO₂, B:MeOH (0.05% DEA); 梯度 B 为 40%, 保留时间为 3.859 分钟, ee=97.5%, ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 1.09 (d, J=6.53 Hz, 3H), 2.87 (br t, J=5.52 Hz, 2H), 3.80 (br t, J=5.40 Hz, 2H), 4.42 (quin, J=6.21 Hz, 1H), 4.63 (s, 2H), 4.87 (d, J=5.27 Hz, 1H), 7.66 - 7.74 (m, 1H), 7.84 - 7.92 (m, 2H), 7.99 (s, 1H), 12.90 (s, 1 H); LCMS: m/z [M+1]⁺= 502.0。

实施例15



WX015

合成路线:



步骤1: 化合物 **WX015-2** 合成

将 **WX015-1**(4.58 g, 27.81 mmol, 1.5 eq)和 **A-1** (5 g, 18.54 mmol, 1 eq)溶解在 DMA (50 mL)中, 加入 DBU (5.64 g, 37.07 mmol, 2 eq)。反应在 100 $^{\circ}$ C 反应 1.5 小时。反应冷却至室温, 加入 500mL 半饱和食盐水后用

乙酸乙酯萃取 (100 mL*3), 合并有机相用饱和食盐水 (50 mL) 洗涤后无水硫酸钠干燥, 过滤后, 滤液经减压浓缩得粗品。粗品经柱层析 (石油醚:乙酸乙酯=1:0 至 8:1) 得 **WX015-2**, 直接用于下一步。LCMS: m/z [M+1]⁺=398.1。

步骤 2: 化合物 **WX015-3** 合成

将 **WX015-2** (5.4 g, 13.57 mmol, 1 eq) 溶解于无水 DCM (120 mL) 中, 加入 TFA (20 mL)。反应在 20°C 下反应 1 小时。反应液中加入饱和碳酸钠水溶液调节 pH 至 9, 然后用 DCM (50 mL*3) 萃取, 有机相合并后用饱和食盐水 (50 mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥后过滤, 滤液减压浓缩得粗品 **WX015-3**。LCMS: m/z [M+1]⁺= 298.0。

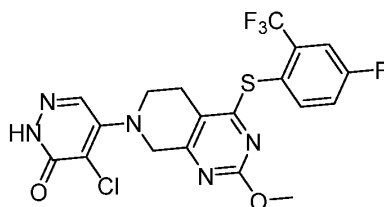
步骤 3: 化合物 **WX015-4** 合成

将 **WX015-3** (2.0 g, 5.81 mmol, 1 eq) 和 **A-2** (1.59 g, 6.39 mmol, 1.1 eq) 加入反应瓶, 加入 DIEA (229.64 mmol, 40 mL, 39.53 eq), 氮气保护下, 反应在 100°C 搅拌 16 小时。反应冷却至室温, 减压浓缩后得到粗品。粗品经柱层析 (石油醚:乙酸乙酯=4:1 至 1:2) 纯化得 **WX015-4**。LCMS: m/z [M+1]⁺= 510.0。

步骤 4: 化合物 **WX015** 合成

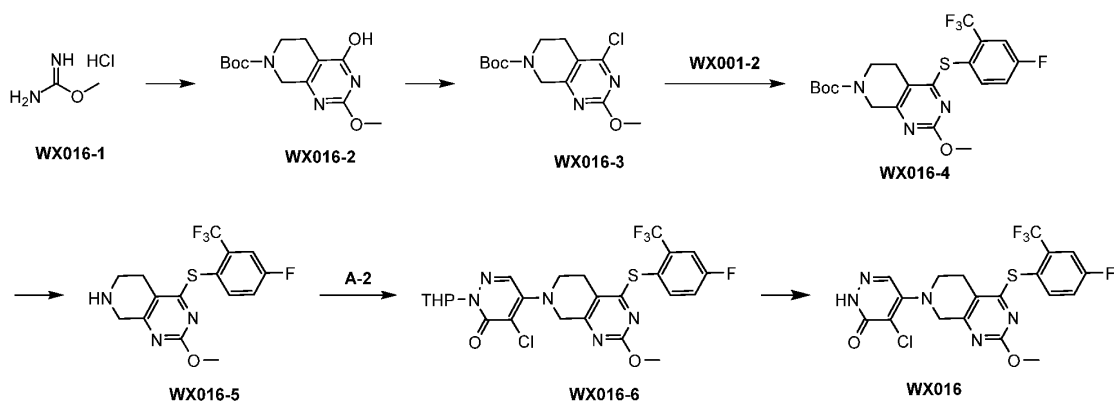
将 **WX015-4** (1.59 g, 3.12 mmol, 1 eq) 溶解在无水 DCM (20 mL) 中, 加入 TFA (9 mL)。反应在 20°C 搅拌 2 小时。反应中加入饱和碳酸钠水溶液调节 pH 值约 9, 过滤, 滤饼干燥后得到 **WX015**。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 3.03 (br t, J=5.27 Hz, 2 H) 3.79 (t, J=5.77 Hz, 2 H) 4.68 (s, 2 H) 7.57 - 7.65 (m, 2 H) 8.01 (s, 1 H) 8.58 (s, 1 H) 12.95 (s, 1 H); LCMS: m/z [M+1]⁺= 425.9。

实施例 16



WX016

合成路线:



步骤 1: 化合物 **WX016-2** 合成

将 **WX016-1** (2.93 g, 26.54 mmol, 2.4 eq) 和 1-Boc-3-氧代-4-哌啶甲酸乙酯 (3 g, 11.06 mmol, 1 eq) 溶解在 MeOH (30 mL) 中, 加入甲醇钠甲醇溶液 (4.36 mL, 24.33 mmol, 2.2 eq, 30wt%), 反应在 100°C 搅拌 4 小时。反应冷却至室温后减压浓缩, 剩余物中加入 100 mL 水, 用 1M HCl 调节 pH 至 6 左右, 加乙酸乙酯萃取 (30 mL*2), 有机相合并后用饱和食盐水 (15 mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥后过滤, 滤液减压浓缩得粗品。粗品经柱层析 (石油醚:乙酸乙酯=2:1 至 DCM:MeOH=5:1) 纯化后, 再加入石油醚:乙酸乙酯=15:1 (30 mL) 在室温搅拌 30 分钟后过滤, 收集滤饼得到 **WX016-2**。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.50 (s, 9 H) 2.57 (br t, 2 H) 3.60 (br t, J=5.57 Hz, 2 H) 3.97 (s, 3 H) 4.29 (br s, 2 H) 11.14 (br s, 1 H)。

步骤 2: 化合物 **WX016-3** 合成

将 **WX016-2** (1.5 g, 5.33 mmol, 1 eq) 混合在无水甲苯 (35 mL) 中, 依次加入三苯基膦 (2.80 g, 10.66 mmol, 2 eq) 和 2,2,2-三氯乙腈 (8.00 mmol, 801.99 μL, 1.5 eq), 氮气保护下, 反应在 100°C 下搅拌 1.5 小时。反应冷却至室温后减压浓缩, 剩余物经柱层析纯化 (PE:EA=1:0 至 5:1) 得 **WX016-3**。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.46 (s, 9 H) 2.74 (br t, J=5.77 Hz, 2 H) 3.68 (t, J=5.90 Hz, 2 H) 3.97 (s, 3 H) 4.52 (s, 2 H)。

步骤 3: 化合物 **WX016-4** 合成

将 **WX016-3** (1.27 g, 4.24 mmol, 1 eq) 和 **WX001-2** (1.30 g, 4.24 mmol, 1 eq) 溶于 ACN (13 mL) 中, 加入碳酸钾 (1.76 g, 12.71 mmol, 3 eq), 反应在 50°C 搅拌 4 小时。反应冷却至室温后过滤, 滤液减压浓缩后, 剩余物经柱层析 (石油醚:乙酸乙酯=1:0 至 10:1) 纯化得 **WX016-4**。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.48 (s, 9 H) 2.71 (br t, J=5.63 Hz, 2 H) 3.55 (s, 3 H) 3.74 (br t, J=5.75 Hz, 2 H) 4.50 (s, 2 H) 7.31 (td, J=8.13, 2.75 Hz, 1 H) 7.53 (dd, J=8.82, 2.81 Hz, 1 H) 7.67 (dd, J=8.63, 5.38 Hz, 1 H)。

步骤 4: 化合物 **WX016-5** 合成

将 **WX016-4** (1.39 g, 3.03 mmol, 1 eq) 溶于 DCM (14 mL) 中, 滴加 TFA (2.50 mL), 滴加完毕后, 反应在 25°C 搅拌 1 小时。反应中加入饱和碳酸钠溶液调节 pH 至 9, DCM (15 mL*3) 萃取, 有机相合并后用饱和食盐水 (15 mL) 洗涤后无水硫酸钠干燥, 有机相减压浓缩得粗品 **WX016-5**, 直接用于下一步。LCMS:

$m/z [M+1]^+ = 360.3$ 。

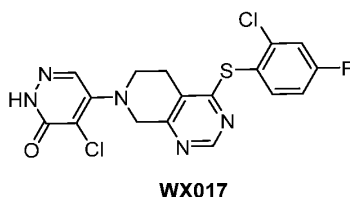
步骤 5: 化合物 **WX016-6** 合成

将 **WX016-5** (1.01 g, 2.81 mmol, 1 eq) 和 **A-2** (700.13 mg, 2.81 mmol, 1 eq) 置于 100mL 单口瓶中, 加入 DIEA (196.75 mmol, 34.27 mL, 70 eq), 氮气保护下反应在 100℃ 下搅拌 16 小时。反应冷却至室温, 减压浓缩后, 剩余物经柱层析 (石油醚:乙酸乙酯=4:1 至 1:1) 得 **WX016-6**。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.60 - 1.70 (m, 6 H) 2.92 (br t, J=5.69 Hz, 2 H) 3.60 (s, 3 H) 3.70 - 3.95 (m, 4 H) 4.49 - 4.53 (m, 2 H) 6.06 - 6.12 (m, 1 H) 7.36 (td, J=8.10, 2.69 Hz, 1 H) 7.57 (dd, J=8.82, 2.69 Hz, 1 H) 7.72 (dd, J=8.38, 5.50 Hz, 1 H) 7.77 (s, 1 H); LCMS: $m/z [M+1]^+ = 572.1$ 。

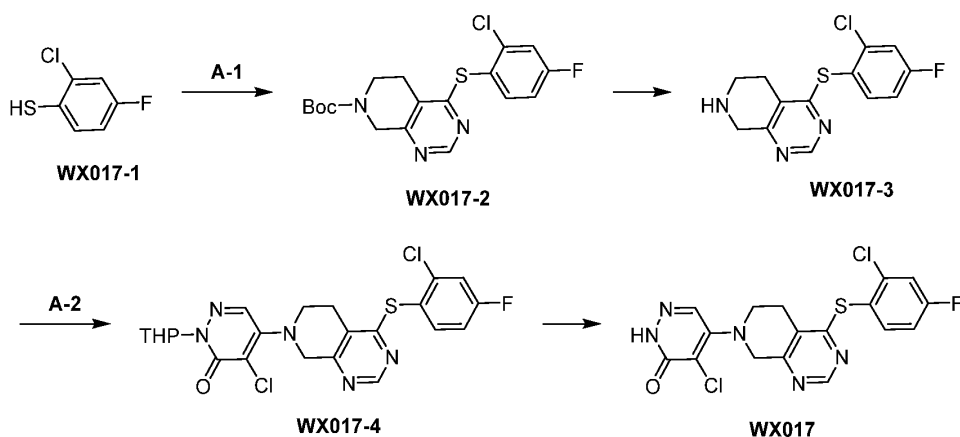
步骤 6: 化合物 **WX016** 合成

将 **WX016-6** (400 mg, 699.33 μmol, 1 eq) 溶于 DCM (3 mL) 中, 滴加 TFA (570 μL), 滴加完毕后, 反应在 25℃ 下反应 1 小时。反应中加入饱和碳酸钠水溶液调节 pH 约 8-9, 过滤, 滤饼用 2mL 二氯甲烷洗涤后干燥得 **WX016**。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.75 - 2.86 (m, 2 H) 3.55 (s, 3 H) 3.77 (br t, J=5.57 Hz, 2 H) 4.54 (s, 2 H) 7.71 (td, J=8.38, 2.75 Hz, 1 H) 7.90 (dd, J=9.13, 3.25 Hz, 2 H) 7.97 (s, 1 H) 12.97 (br s, 1 H); LCMS: $m/z [M+1]^+ = 488.1$ 。

实施例 17



合成路线:



步骤 1: 化合物 **WX017-2** 合成

氮气保护下, 将 **A-1** (2.5 g, 9.27 mmol, 1 eq) 和 **WX017-1** (1.51 g, 9.27 mmol, 1 eq) 加入到 DMF (25

mL), 然后加入 DBU (18.54 mmol, 2.79 mL, 2 eq), 反应在 120°C 搅拌 1 小时。反应冷却至室温后, 加入 50 mL 乙酸乙酯, 依次用半饱和食盐水(30 mL×3)洗涤, 30 mL 饱和食盐水洗涤, 再用无水硫酸钠干燥, 有机相减压浓缩后的粗品经柱层析(EA/PE, EA 的比例: 0%-30%)纯化得到 **WX017-2**。LCMS: m/z [M+1]⁺=396.0

步骤 2: 化合物 **WX017-3** 合成

将 **WX017-2** (2.9 g, 7.33 mmol, 1 eq) 加入到 DCM (29 mL) 中, 然后加入 TFA (9.67 mL), 反应在 25°C 搅拌 1 小时。反应中加入 30 mL 水, 然后加入无水碳酸钠调节 pH=8, 水相用二氯甲烷(30 mL×2)萃取, 有机相合并后用 30 mL 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 再减压浓缩得粗品 **WX017-3**, 直接进行下一步。LCMS: m/z [M+1]⁺=295.9。

步骤 3: 化合物 **WX017-4** 合成

将 **WX017-3** (1.5 g, 3.87 mmol, 1 eq) 加入到 DIEA (40 mL) 中, 然后加入 **A-2** (1.95 g, 7.81 mmol, 1.05 eq), 反应在 100°C 搅拌 3 小时。反应冷却后减压浓缩得粗品。粗品经柱层析(DCM: MeOH, MeOH 比例为 0%-6%)纯化得 **WX017-4**。LCMS: m/z [M+23]⁺=530.0。

步骤 4: 化合物 **WX017** 合成

将 **WX017-4** (2.8 g, 5.51 mmol, 1 eq) 加入到含有 DCM (30 mL) 的反应瓶中, 然后加入 TFA (7.34 mL), 反应在 25°C 搅拌 1 小时。反应中加入 30 mL 水, 然后加入无水碳酸钠调节 pH=8 后过滤, 滤饼依次用 30 mL DCM 和 10 mL 水洗涤, 干燥后得粗品, 粗品经制备高效液相色谱(色谱柱: Phenomenex C18 150*40mm*5μm; 流动相: [水(HCl)-ACN]; 梯度(乙腈) %: 30%-60%)得 **WX017**。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 2.90 (br t, J=5.13 Hz, 2 H) 3.80 (br t, J=5.50 Hz, 2 H) 4.62 (s, 2 H) 7.37 (td, J=8.47, 2.69 Hz, 1 H) 7.72 (dd, J=8.75, 2.63 Hz, 1 H) 7.80 (dd, J=8.63, 6.13 Hz, 1 H) 8.00 (s, 1 H) 8.62 (s, 1 H) 13.00 (br s, 1 H); LCMS: m/z [M+1]⁺=424.1。

生物测试数据

实验例 1: hTRPC5-T478C_FLIPR 钙流 IC₅₀ 检测

实验方法:

细胞培养: hTRPC5-T478C-HEK 细胞在 5% CO₂ 的湿润环境下, 37°C 培养。

细胞培养基成分:

DMEM, 供应商 Gibco, 货号 11965-092;

FBS, 供应商 Gibco, 货号 10099-141C, 浓度 10%;

Pen/Strep, 供应商 Invitrogen, 货号 15140-122, 浓度 1%;

Zeocin, 供应商 Invitrogen, 货号 R25005, 浓度 200 μg/mL;

Blasticidin S, 供应商 Invitrogen, 货号 R21001, 浓度 5µg/mL。

细胞传代

TRPC5-T478C 细胞系通常一周传代三次, 每次传代稀释倍数为 1:3。一旦细胞在 T-75 烧瓶中达到 80% 左右的融合度, 则使用胰酶消化细胞系约 1 分钟, 再用移液管将细胞悬液从烧瓶中移出。根据稀释比例, 移出的细胞悬液将转移到另一个含有细胞培养基的 T-75 烧瓶中。注意, 为了保持细胞的对数增长, 细胞的融合度应保持在亚融合阶段, 根据细胞系的增殖速度, 每 2 到 3 天传代一次。

FLIPR 钙流步骤

(1) 细胞板的制备: 按上述传代分离细胞, 使用细胞计数仪测定细胞密度和活力。用细胞培养基调节细胞悬液体积至铺板密度后, 加入 1µg/mL 四环素诱导 hTRPC5-T478C 通道表达。然后将诱导的 hTRPC5-T478C 细胞以 20000 个细胞/孔(30µL/孔)的密度接种到多聚赖氨酸(poly-D-lysine, PDL)包被的 384 孔板上。然后在细胞培养箱中过夜培养。

(2) 化合物板的制备: 化合物通常用 DMSO 稀释, 配置成母液并保存在-20 度的冰箱中。在 ECHO 处理器上设置化合物打板程序, 使用 ECHO 将化合物按照设置浓度梯度打板, 通常最高 10µM, 3 倍稀释, 9 个浓度, 2 个复孔。通道激动剂使用 Englerin A。

(3) 上机测试: 按上述方法制备细胞板和化合物板。待细胞板的细胞融合度达到 80-90%后, 从培养箱中取出细胞开始测试。使用测试缓冲液配置 Ca5 染料(Molecular Devices # R8185), 用 Bravo 吸去细胞板培养基后, 每孔加 Ca5 染料 25µL, 孵育 1 小时。1 小时后将细胞板、化合物板置于 FLIPR^{TETRA} (Molecular Devices, 美国)中, 进行 FLIPR 检测。

数据分析:

数据分析使 Excel 2013(微软, 美国)软件和 GraphPad Prism 6.01 软件进行。最大信号由 FLIPR 软件生成。使用 Excel(2013)和 Prism 6.01 进行数据分析。使用 S/B>2.50 和 Z 因子>0.50 控制数据质量以及数据稳定性。计算公式如下: $S/B = Avg100\%/Avg0\%$; $Z \text{ 因子} = 1 - (3*SD100\% + 3 * SD0\%)/| Avg100\%-Avg0\% |$ 。

实验结果: 实验结果见表 1。

表 1 本发明化合物 hTRPC5-T478C _FLIPR 钙流 IC₅₀ 检测结果

受试品	FLIPR 钙流 IC ₅₀ (nM)
化合物 WX002	27
化合物 WX003	70
化合物 WX004	40
化合物 WX009	37
化合物 WX010	71
化合物 WX011	80

化合物 WX012	24
化合物 WX013	55.7
化合物 WX014	12
化合物 WX017	56

结论：本发明化合物对 TRPC5 具有显著的抑制作用。

实验例 2：hTRPC5-T478C 膜片钳 IC₅₀ 检测

实验方法：

细胞培养：hTRPC5-T478C-HEK 细胞在 5% CO₂ 的湿润环境下，37℃培养。

细胞培养基成分：

- DMEM，供应商 Gibco，货号 11965-092；
- FBS，供应商 Gibco，货号 10099-141C，浓度 10%；
- Pen/Strep，供应商 Invitrogen，货号 15140-122，浓度 1%；
- Zeocin，供应商 Invitrogen，货号 R25005，浓度 200µg/mL；
- Blasticidin S，供应商 Invitrogen，货号 R21001，浓度 5µg/mL。

细胞传代：

TRPC5-T478C 细胞系通常一周传代三次，每次传代稀释倍数为 1:3。一旦细胞在 T-75 烧瓶中达到 80% 左右的融合度，则使用胰酶消化细胞系约 1 分钟，再用移液管将细胞悬液从烧瓶中移出。根据稀释比例，移出的细胞悬液将转移到另一个含有细胞培养基的 T-75 烧瓶中。注意，为了保持细胞的对数增长，细胞的融合度应保持在亚融合阶段，根据细胞系的增殖速度，每 2 到 3 天传代一次。

溶液：

- (1)细胞外液：氯化钠(145 mmol/L)，氯化钾(4 mmol/L)，氯化镁(1.5 mmol/L)，葡萄糖(10 mmol/L)，羟乙基哌嗪乙硫磺酸（HEPES，10 mmol/L）。细胞外液的 pH 使用 NaOH 调至 7.4，渗透压使用纯水或蔗糖调至 305 mOsm/L 左右。
- (2)细胞内液：氯化铯（140 mmol/L），乙二醇二乙醚二胺四乙酸（EGTA，1 mmol/L），氯化镁（2 mmol/L），葡萄糖（10 mmol/L），羟乙基哌嗪乙硫磺酸（HEPES，10 mmol/L）。细胞内液的 pH 使用 HCl 调至 7.2，渗透压使用纯水或蔗糖调至 295 mOsm/L 左右。
- (3)细胞外液需要每周配备一次，细胞内液配备之后需要在-20℃进行分装保存。

化合物的准备：

阳性参照化合物恩格林 A(Englerin A)和 2-氨基乙氧基苯硼酸(2-aminoethoxydiphenyl borate, 2-APB)使用 100%DMSO 进行溶解，配置为 10mM 工作液保存。待测化合物使用 100%DMSO 进行溶解，配置为

10mM 工作液保存。测试溶液中 DMSO 终浓度需小于 0.3%。

全细胞电压钳记录：

全细胞膜片钳在室温下进行钳制。使用 EPC 10 USB 放大器(HEKA Elektronik,德国)记录到的电信号通过 3kHz 低通滤波后，最后记录在 PatchMaster 2×90.5 软件(HEKA Elektronik,德国)中。在此步骤，质控标准为细胞高阻封接大于 500 MOhms，检测电流大于 0.3nA。

记录电极使用硼硅酸盐玻璃毛细管(GC150tF-10, Harvard Apparatus Co., 英国)通过垂直拉制仪(NARISHIGE PC-10,日本)中拉出并抛光。在此步骤，质控标准为电极电阻 2 ~ 5 MΩ 之间。

全细胞膜片钳在记录过程中，会使用连续灌流系统(BT100-2J, LongerPump, 中国)持续灌注细胞外液。灌注系统安装在立式显微镜(FN-S2N, 尼康, 日本)的载物台上，在显微镜下人工定位灌注头。

hTRPC5-T478C 电流幅度检测的电压指令如下：细胞从-40mV 的钳制电位，阶跃至-80mV，持续 50ms；然后钳制电压倾斜上升至+80mV，整个过程持续 200ms；之后在+80mV 下钳制 50ms，最后，电压回到钳制电位-40mV。检测电压指令每 5000 毫秒重复一次，该指令在化合物测试期间持续执行。化合物作用稳定性的质控标准为连续 3 次电压指令下的电流幅度，其变异系数<5%。如果化合物对 hTRPC5-T478C 电流幅度无任何作用，需要持续监测 5 分钟。

数据分析：

数据分析使用 PatchMaster 2×90.5 软件(HEKA Elektronik,德国)、Excel 2013(微软, 美国)软件和 GraphPad Prism 6.01 软件进行分析。每一个细胞的膜片钳记录，需得出 hTRPC5 激动剂 Englerin A 激动的 hTRPC5-T478C 通道电流幅度(I_{unblock})、hTRPC5 抑制剂 2-APB 抑制后的 hTRPC5-T478C 通道电流幅度(I_{block})以及测试化合物浓度所对应的 hTRPC5-T478C 通道电流幅度(I_{test})。I_{test} 减去细胞本底电流(I_{block})为化合物作用后剩余的通道电流，除以细胞整体通道电流(I_{unblock}-I_{block})之后可以得到剩余电流百分比，用 100%减去剩余电流百分即为化合物抑制效率。即化合物抑制效率= 100%- (I_{test}- I_{blocked})/(I_{unblocked}- I_{blocked})。

实验结果：见表 1。

表 1 本发明化合物 hTRPC5-T478C 膜片钳 IC₅₀ 检测结果

受试品	膜片钳 IC ₅₀ (nM)
化合物 WX002	114.70
化合物 WX003	89.40
化合物 WX004	91.40
化合物 WX009	304.40
化合物 WX010	196.50
化合物 WX011	190.50
化合物 WX012	16.63

化合物 WX013	15.33
-----------	-------

实验结论：本发明化合物对 TRPC5 具有显著的抑制作用。

实验例 3：体内 PK 研究

实验目的：

以雄性 SD 大鼠为受试动物，静脉注射后测定化合物血药浓度并评估药代动力学行为。

实验操作：

选择健康成年雄性 SD 大鼠 3 只，待测化合物与适量静注组溶媒混合制备得到 0.5 或 1 mg/mL 澄清溶液，0.22μM 微孔滤膜过滤后备用；大鼠 0.5 或 1 mg/kg 静脉给药后，于给药后 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24 小时采集全血置于 EDTA-K2 抗凝管中，将混合物充分涡旋混合并在 4℃ 下 3200 g 离心 10 分钟得血浆；采用 LC-MS/MS 法测定药物浓度，使用 Phoenix WinNonlin 6.3 药动学软件，以非房室模型线性对数梯形法计算相关药代动力学参数。

溶媒 1：10% DMSO/10% Kolliphor® HS 15 /80%(20% 磺丁基-β-环糊精)；

溶媒 2：10% DMSO+20% 聚氧乙烯蓖麻油+70%水；

溶媒 3：5% DMSO+10% Kolliphor® HS 15 +85% 生理盐水；

溶媒 4：10%DMSO+60% 聚乙二醇 400+30%（10%羟丙基-β-环糊精水溶液）。

实验结果见表 2：

表 2 本发明化合物 PK 测试结果

化合物	溶媒	剂量(mpk)	Vd _{ss} (L/kg)	Cl (mL/min/kg)	T _{1/2} (h)	AUC _{0-last} (nM.h)
WX002	溶媒 1	1	2.28	18.2	1.83	1969
WX004	溶媒 2	1	0.77	4.6	2.02	8260
WX009	溶媒 3	0.5	1.37	6.52	2.59	2375
WX010	溶媒 2	1	1.13	7.81	1.73	4755
WX011		1	1.06	8.29	1.46	4053
WX012	溶媒 4	1	1.62	10.1	2.31	3331
WX013		1	0.88	3.94	2.65	9126

备注：Vd_{ss} 为分布容积；Cl 为清除率；T_{1/2} 为半衰期；AUC_{0-last} 为暴露量。

结论：本发明化合物在大鼠体内表现出较大的表观分布容积、较低的体内清除率及较高的暴露量，药代动力学性质良好。

实验例 4：大鼠组组织分布试验

实验目的：

本研究受试动物选用 SD 雄性大鼠，应用 LC/MS/MS 法定量测定大鼠口服给予测试化合物不同时间点的血浆、脑脊液、脑、肝、肾中的药物浓度，以评价受试药物在大鼠体内的组织分布。

实验方法：

实验材料：Sprague Dawley (SD) 大鼠 (雄性, 200-300g, 7~10周龄，北京维通利华)。

实验操作：

将测试化合物的澄清或悬浮溶液灌胃给予到 SD 大鼠体内（禁食）（溶媒： 5%DMSO/10% Kolliphor® HS 15 /85% 水），于给药后 1、 4 和 24 h，从颈静脉采血约 0.2 mL，置于 EDTA-K2 抗凝管中，将混合物充分涡旋混合并在 4℃下 3200 g 离心 10 分钟得血浆；采集脑脊液约 0.02 mL；采集脑、肝、肾用预冷的生理盐水润洗并吸干后，按照 1:4 的比例（1 g 组织：4 mL 的 15 mM 磷酸缓冲生理盐水 /MeOH (2:1)）匀浆。采用 LC-MS/MS 法测定药物浓度，使用 Phoenix WinNonlin 6.3 药动学软件，以非房室模型线性对数梯形法计算相关药代动力学参数。

实验结果见表 3。

表 3 本发明化合物在大鼠组组织中的分布试验结果

组织	时间点 (h)	平均药物浓度 (nM) n=3	
		化合物 12	化合物 13
脑	1	282	139
	4	373	197
	12	BQL	86.0
肝	1	5117	2612
	4	5817	3358
	12	570	945
肾	1	2633	1258
	4	3437	1468
	12	276	590
血浆	1	773	536
	4	1079	716
	12	82.7	272

注：BQL 为低于检测限。

结论：本发明中化合物在肾脏，肝脏有较高分布，在脑部分布较少。

实验例 5：药效学研究

实验目的：

对本发明化合物在醋酸脱氧皮质-氯化钠(DOCA-NaCl)诱导雄性 SD 大鼠高血压模型的 PD 和药效学研究。

实验方案:

雄性 SD 大鼠 7-8 周适应一周后开始手术，手术当天使用消毒剂对手术区域台面进行消毒，2-5%异氟烷麻醉保定，去除腹部毛发，消毒术部皮肤，剪开皮肤及腹壁，暴露右肾，结扎肾门附近动静脉，确认无出血点后钝性分离肾脏血管及周围韧带，取出右肾，确认无出血点，缝合腹壁肌肉及皮肤；动物苏醒后放回笼内，观察动物；皮下注射美洛昔注射液止痛，每天一次，连续 3 天。

切除单侧肾脏后 1 周，依据体重/血压随机分组，分成溶媒组、低剂量组和高剂量组，所有组别动物饮用水换为 1%氯化钠+0.2%氯化钾水连续自由饮用四周，皮下注射 20mg/kg DOCA（醋酸脱氧皮质）连续 4 周，每周 2 次。除溶媒组以外，其余组别按照剂量每天一次灌胃给药，持续 28 天。给药 28 天后将动物放代谢笼过夜收集尿液，检测尿液白蛋白和生物标志物 Rac1 水平。

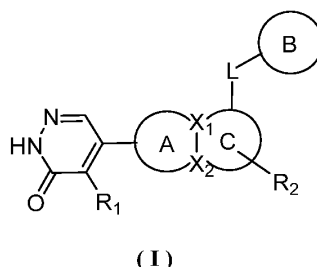
实验结果:

化合物 WX002 以 30 mg/kg 和 60 mg/kg 的给药量进行给药 28 天情况下，相比溶媒对照组，两种剂量均可以明显降低大鼠高血压肾病模型尿液白蛋白水平（如图 1 所示）；进一步对生物标志物尿液 Rac1 含量进行检测，结果表明化合物 WX002 可以剂量依赖性地降低大鼠高血压肾病模型尿液 Rac1 表达（如图 2 所示）。* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ vs 溶媒组，数据显示为平均值 $\pm$ 标准误 (Mean $\pm$ SEM)。

结论: 本发明化合物可以显著降低大鼠高血压肾病模型尿液白蛋白水平，且可以剂量依赖性地降低大鼠高血压肾病模型尿液 Rac1 表达。

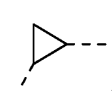
权 利 要 求

1. 式 (I) 所示化合物或其药学上可接受的盐,



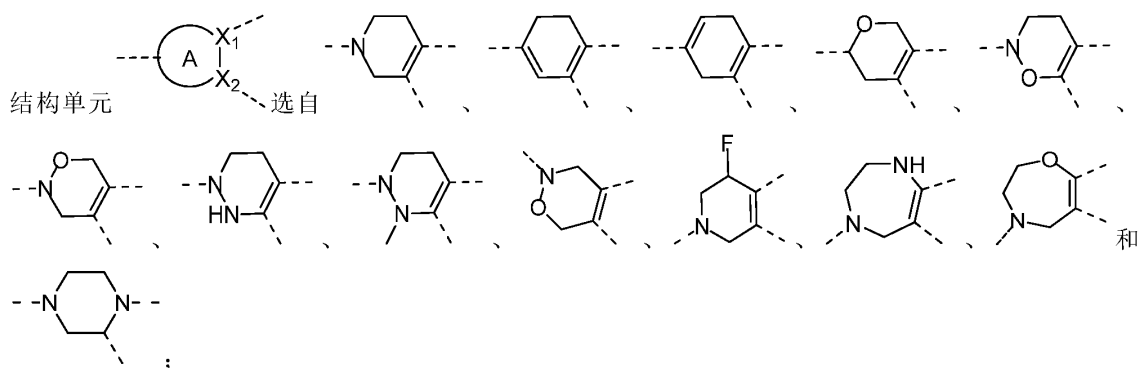
其中,

X₁ 和 X₂ 分别独立地选自 C 和 N;

L 选自 -O-、-S-、-S(=O)-、-C(=O)-、-CF₂-、-CH(OCH₃)-、-N(OCH₃)-、 和 C₂₋₃ 烯基, 所述 -CH(OCH₃)-、 和 C₂₋₃ 烯基任选被 1、2 或 3 个 R_a 取代;

R₁ 选自 F、Cl、Br 和 I;

R₂ 选自 H、F、Cl、Br、I、OH、NH₂、CN、COOH、CONH₂、C₁₋₃ 烷基、C₁₋₃ 烷氧基和 C₁₋₃ 烷基-C₁₋₃ 烷氧基, 所述 C₁₋₃ 烷基、C₁₋₃ 烷氧基和 C₁₋₃ 烷基-C₁₋₃ 烷氧基分别独立地任选被 1、2 或 3 个 R_b 取代;



环 B 选自苯基和 5-6 元杂芳基, 所述苯基和 5-6 元杂芳基分别独立地被 1、2 或 3 个 R_c 取代;

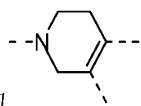
环 C 选自 6 元杂芳基;

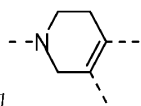
R_a 选自 F、Cl、Br、I 和 C₁₋₃ 烷基;

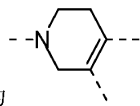
R_b 选自 F、Cl、Br、I、OH、NH₂、CN、COOH 和 CONH₂;

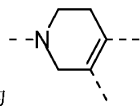
R_c 选自 F、Cl、Br、I、CONH₂、C₁₋₃ 烷基、C₁₋₃ 烷氧基和 C₂₋₃ 烯基, 所述 C₁₋₃ 烷基、C₁₋₃ 烷氧基和 C₂₋₃ 烯基分别独立地任选被 1、2 或 3 个卤素取代;

条件是:



1) 当 R_1 为 Cl、环 A 为 , L 为 O, 环 B 为苯基时, 环 B 上至少一个取代基为 Br、 CONH_2 、 CF_2CH_3 、 C_{1-3} 烷氧基或 C_{2-3} 烯基, 或者, 环 B 被 3 个 R_c 取代;

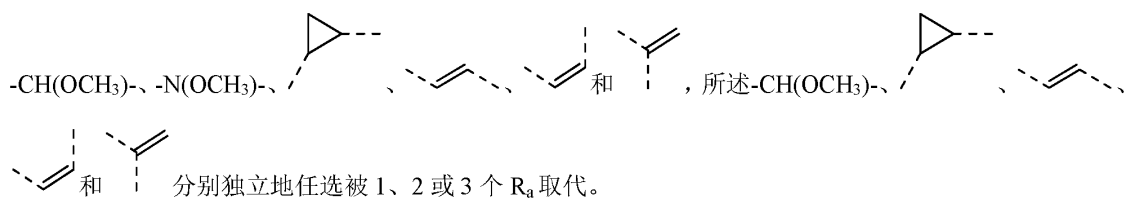


2) 当 R_1 为 Cl、环 A 为 , L 为 O, 环 B 为 2-三氟甲基-4-氟苯基时, R_2 为 CN 、 COOH 、 CONH_2 、 CH_3 、 CH_2CN 、 CH_2COOH 、 CH_2CONH_2 或 CH_2OCH_3 。

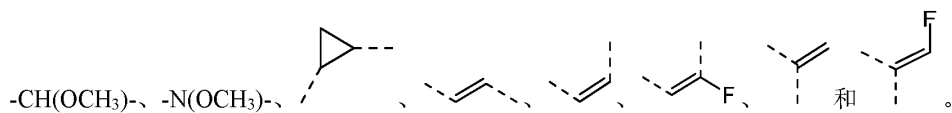
2. 根据权利要求 1 所述化合物或其药学上可接受的盐, 其中, R_c 选自 F、Cl、Br、I、 CONH_2 、 CH_3 、 CH_2CH_3 、 OCH_3 和 $-\text{CH}=\text{CH}_2$, 所述 CH_3 、 CH_2CH_3 、 OCH_3 和 $-\text{CH}=\text{CH}_2$ 分别独立地任选被 1、2 或 3 个卤素取代。

3. 根据权利要求 2 所述化合物或其药学上可接受的盐, 其中, R_c 选自 F、Cl、Br、I、 CONH_2 、 CH_3 、 CH_2F 、 CHF_2 、 CF_3 、 CH_2CH_3 、 CF_2CH_3 、 OCH_3 、 OCF_3 和 $-\text{CF}=\text{CH}_2$ 。

4. 根据权利要求 1 所述化合物或其药学上可接受的盐, 其中, L 选自 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{S}(=\text{O})-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{CF}_2-$ 、



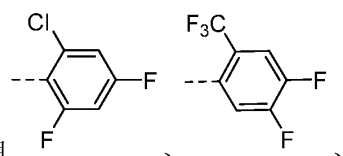
5. 根据权利要求 4 所述化合物或其药学上可接受的盐, 其中, L 选自 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{S}(=\text{O})-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{CF}_2-$ 、



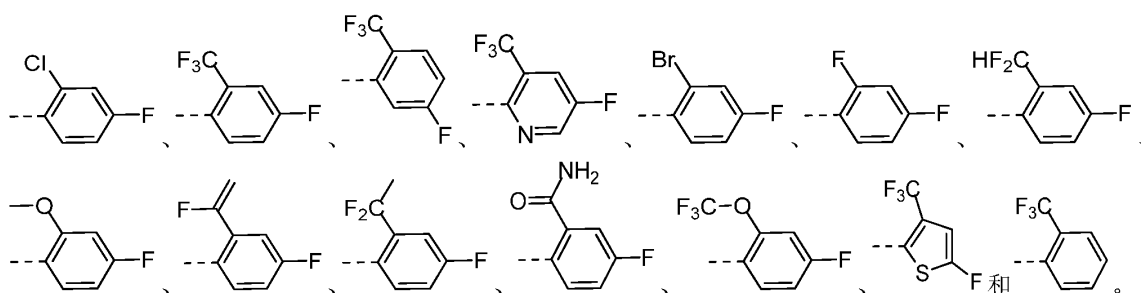
6. 根据权利要求 1 所述化合物或其药学上可接受的盐, 其中, R_2 选自 H、F、Cl、Br、I、OH、 NH_2 、 CN 、 COOH 、 CONH_2 、 CH_3 、 CH_2CH_3 、 OCH_3 和 CH_2OCH_3 , 所述 CH_3 、 CH_2CH_3 、 OCH_3 和 CH_2OCH_3 分别独立地任选被 1、2 或 3 个 R_b 取代。

7. 根据权利要求 6 所述化合物或其药学上可接受的盐, 其中, R_2 选自 H、F、Cl、Br、I、OH、 NH_2 、 CN 、 COOH 、 CONH_2 、 CH_3 、 CH_2CN 、 CH_2COOH 、 CH_2CONH_2 、 CH_2OH 、 CH_2CH_3 、 $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ 、 $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$ 、 OCH_3 和 CH_2OCH_3 。

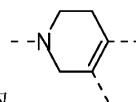
8. 根据权利要求 1 所述化合物或其药学上可接受的盐, 其中, 环 B 选自苯基、噻吩基和吡啶基, 所述苯基、噻吩基和吡啶基分别独立地任选被 1、2 或 3 个 R_c 取代。



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

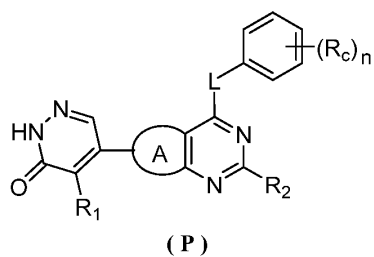


10. 根据权利要求 1 所述化合物或其药学上可接受的盐, 其中, 环 C 选自吡啶基和嘧啶基。



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

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

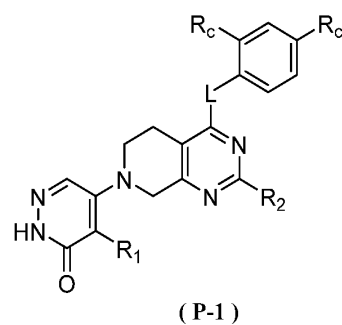


其中,

n 选自 0、1、2 和 3;

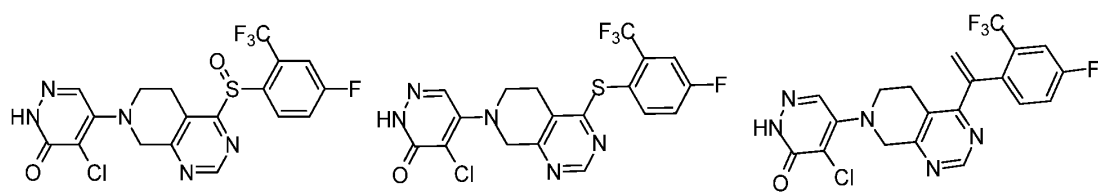
R₁、R₃、R_c、L 和环 A 如权利要求 1~11 任意一项所定义。

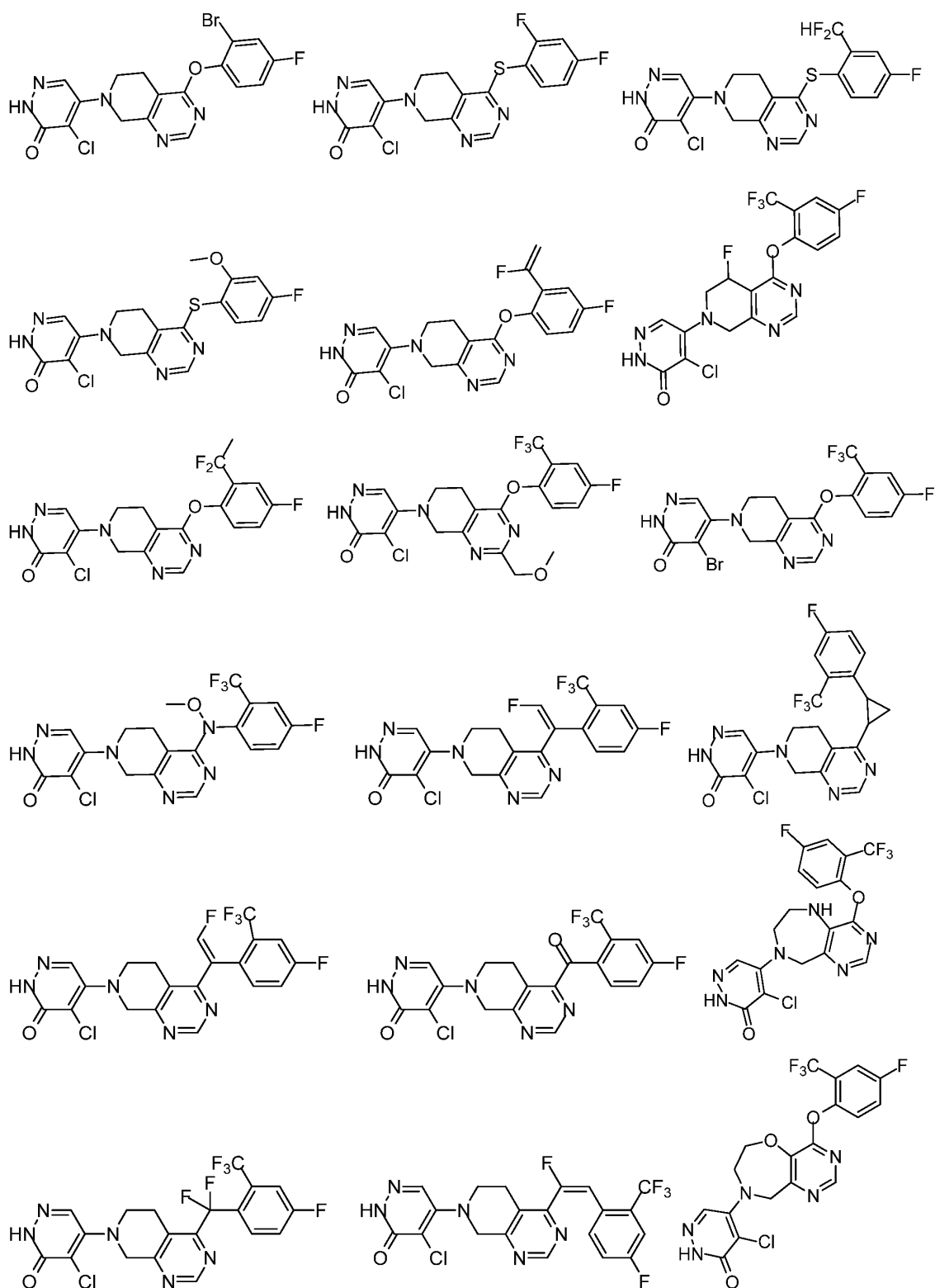
13. 根据权利要求 12 所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其选自,

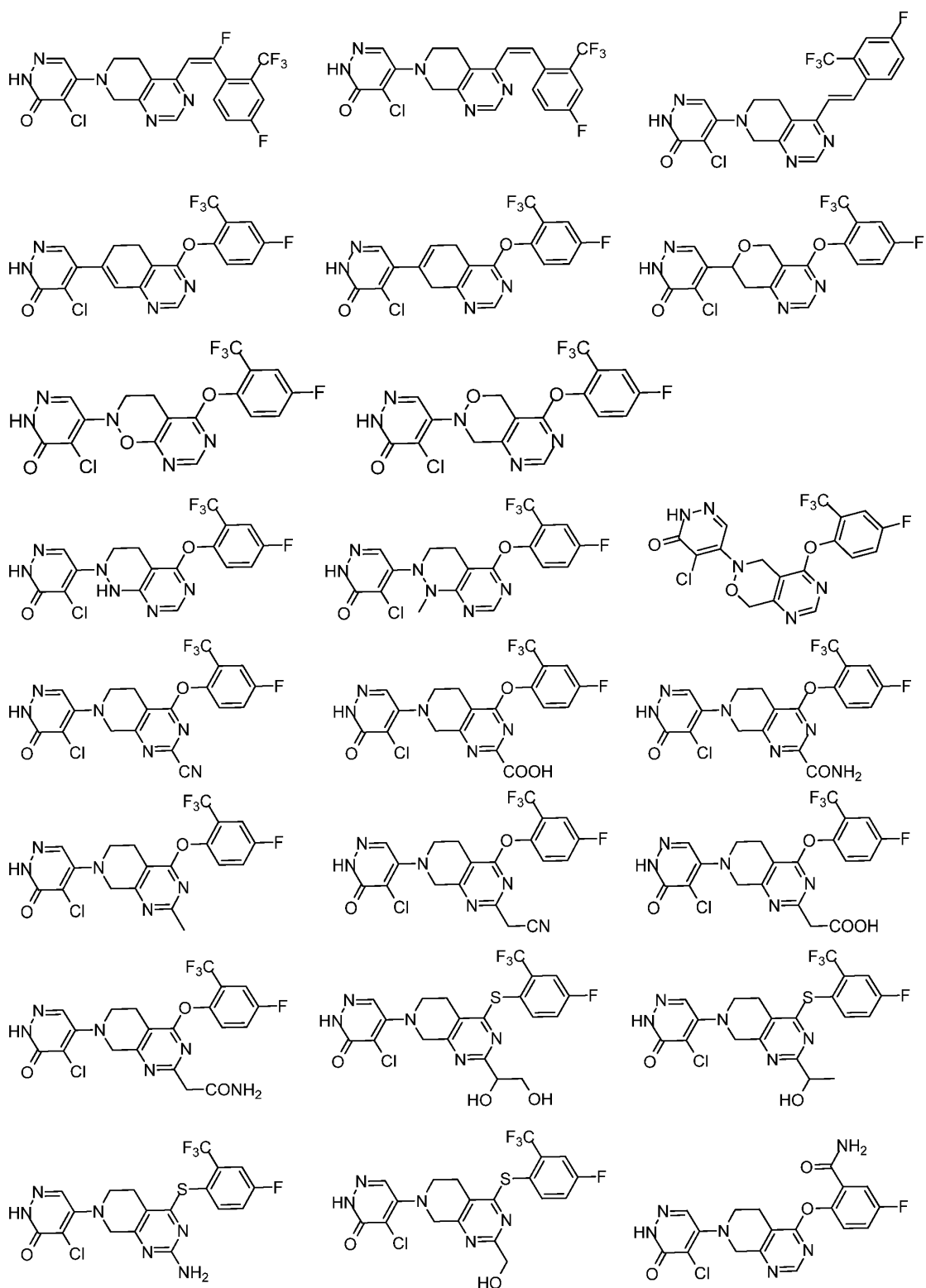


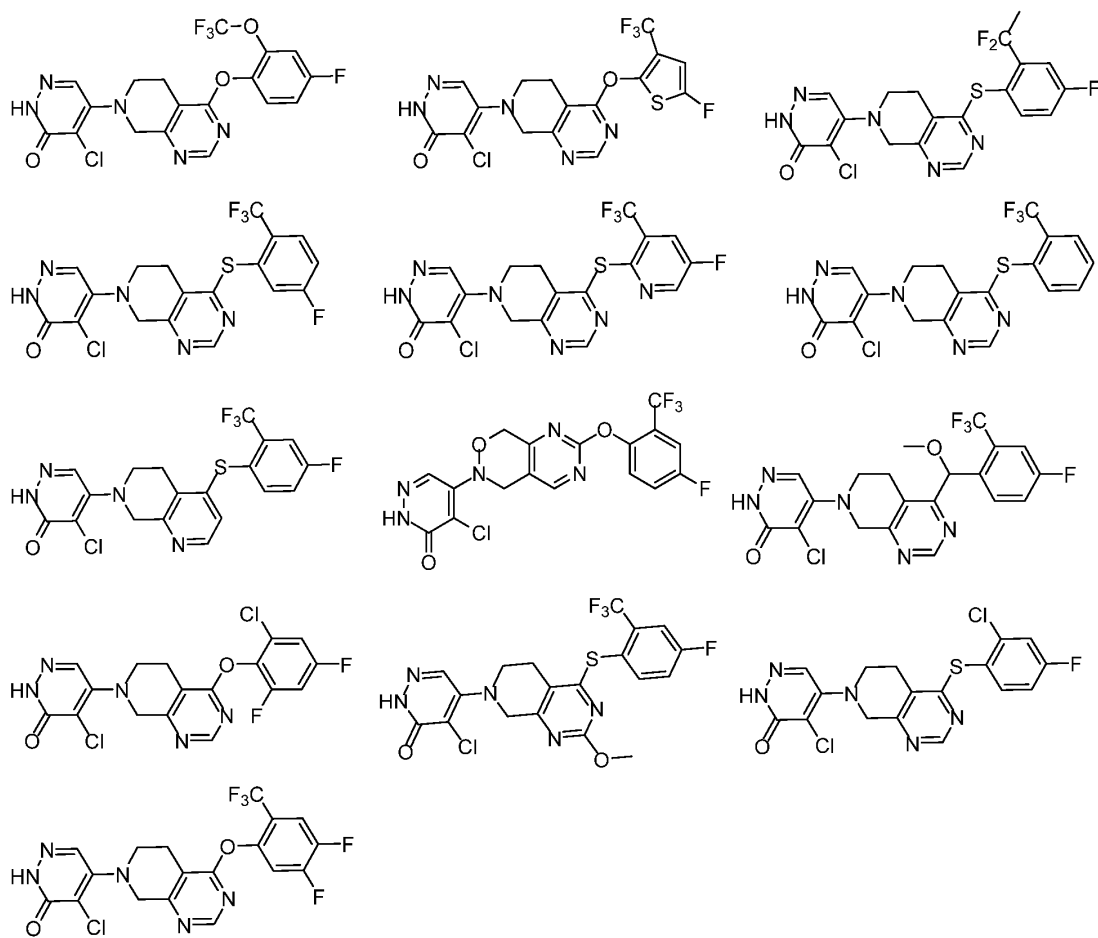
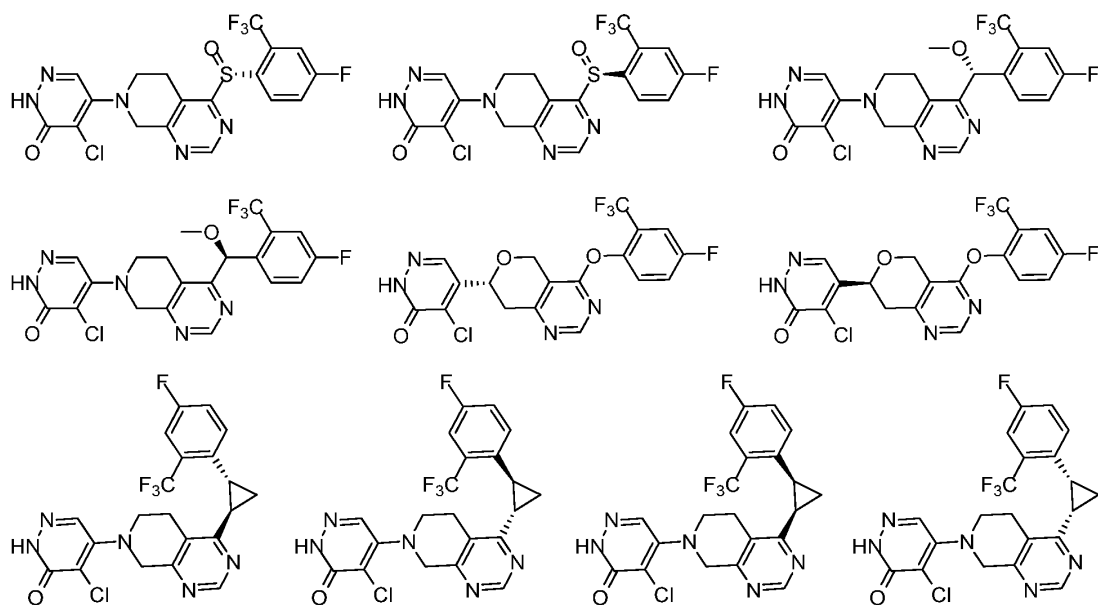
其中, R₁、R₃ 和 R_c 如权利要求 1~11 任意一项所定义。

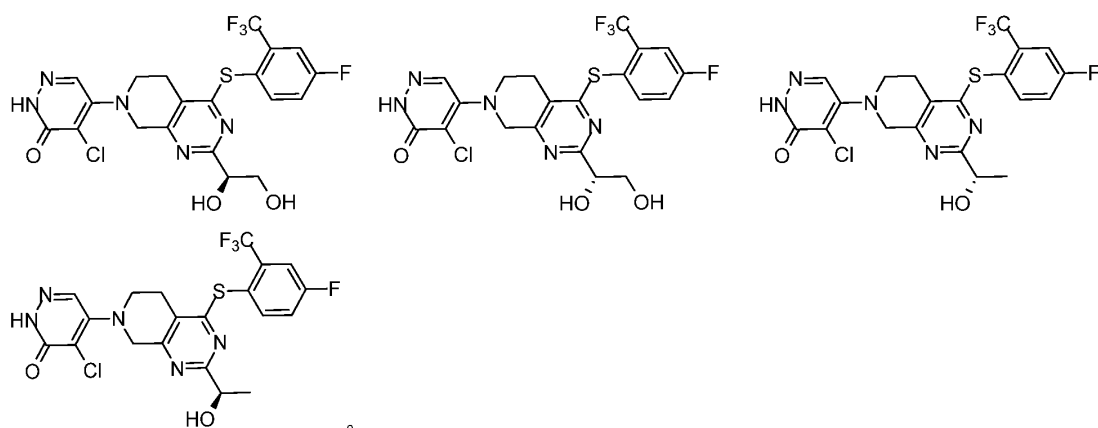
14. 下式所示化合物或其药学上可接受的盐,











16. 根据权利要求 1~15 所述化合物或其药学上可接受的盐在 TRPC5 抑制剂相关的药物上的应用。