

作为 ERK 抑制剂的螺环类化合物及其应用

本申请主张如下优先权：

申请号：CN201911244788.X，申请日：2019 年 12 月 06 日；

申请号：CN201911257998.2，申请日：2019 年 12 月 10 日；

申请号：CN202010106897.1，申请日：2020 年 02 月 20 日；

申请号：CN202011068937.4，申请日：2020 年 09 月 30 日；

申请号：CN202011410488.7，申请日：2020 年 12 月 03 日。

技术领域

本发明涉及作为 ERK 抑制剂的螺环类化合物，及其在制备治疗 ERK 相关疾病的药物中的应用。具体涉及式（III）所示化合物或其药学上可接受的盐。

背景技术

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

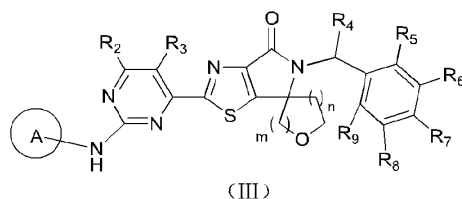
研究表明，突变或扩增引起的 Ras/Raf/MEK/ERK 通路异常活化是多种癌症发生的决定因素。在人类肿瘤中，RAS 突变发生率约为 22%，BRAF 突变发生率约为 7%，MEK 突变发生率约为 1%，因此，该通路上的关键节点蛋白已成为癌症治疗的重要靶点(*Cancer Discov.* 2019, 9, 329-341)。目前，已有多个 BRAF 抑制剂和 MEK1/2 抑制剂，以及它们的联用方案，被美国 FDA 批准用于黑色素瘤、BRAFV600E 突变型非小细胞肺癌等癌症的治疗。然而，使用这些上游节点的 BRAF 和 MEK 抑制剂后，由于突变或通路重新激活，会快速导致耐药性问题，极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

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

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

发明内容

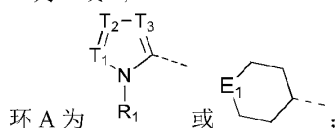
本发明提供了式（III）化合物或其药学上可接受的盐，



其中,

n 为 0 或 1;

m 为 1 或 2:



T_1 、 T_2 和 T_3 分别独立地选自 N 和 CH ;

E_1 为 O、S 或 NH:

R₁ 选自 H 和 C₁₋₃ 烷基，其中所述 C₁₋₃ 烷基任选被 1、2 或 3 个 R_a 取代；

R₂ 和 R₃ 分别独立地选自 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、NH₂ 和 C₁₋₃ 烷基, 其中所述 C₁₋₃ 烷基任选被 1、2 或 3 个 R_b 取代;

R₄选自H;

R₅、R₆、R₇、R₈ 和 R₉ 分别独立地选自 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、NH₂ 和 C₁₋₃ 烷基，其中所述 C₁₋₃ 烷基任选被 1、2 或 3 个 R_c 取代；

R_a 、 R_b 和 R_c 分别独立地选自 F、Cl、Br、I、OH、CN 和 NH_2 。

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

本发明的一些方案中，上述 R_1 为 CH_3 ，其他变量如本发明所定义。

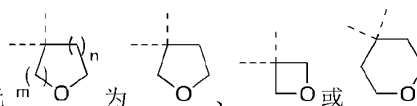
本发明的一些方案中, 上述 R_2 和 R_3 分别独立地选自 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、 NH_2 和 CH_3 , 其中所述 CH_3 任选被 1、2 或 3 个 R_b 取代, 其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中，上述 R₂ 和 R₃ 分别独立地选自 H 和 CH₃，其他变量如本发明所定义。

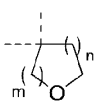
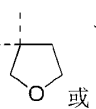
本发明的一些方案中，上述 R_2 和 R_3 分别独立地选自 H，其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中，上述 R₅、R₆、R₇、R₈ 和 R₉ 分别独立地选自 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、NH₂、CH₃ 和 -CH₂-CH₃，其中所述 CH₃ 和 -CH₂-CH₃ 任选被 1、2 或 3 个 R_c 取代，其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中，上述 R₅、R₆、R₇、R₈ 和 R₉ 分别独立地选自 H、F、Cl、Br、I、OH、CN 和 NH₂，其他变量如本发明所定义。

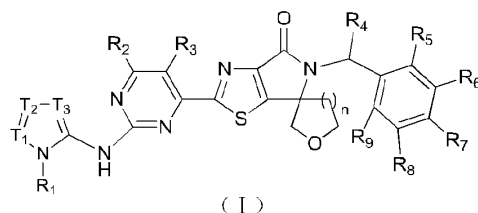


本发明的一些方案中，上述结构单元^m为、或，其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中，上述结构单元 m 为  或 ，其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中，上述环 A 为  或 ，其他变量如本发明所定义。

本发明提供了式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐，



其中，

n 为 0 或 1；

T_1 、 T_2 和 T_3 分别独立地选自 N 和 CH；

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

R_2 和 R_3 分别独立地选自 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、 NH_2 和 C_{1-3} 烷基，其中所述 C_{1-3} 烷基任选被 1、2 或 3 个 R_b 取代；

R_4 选自 H；

R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 和 R_9 分别独立地选自 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、 NH_2 和 C_{1-3} 烷基，其中所述 C_{1-3} 烷基任选被 1、2 或 3 个 R_c 取代；

R_a 、 R_b 和 R_c 分别独立地选自 F、Cl、Br、I、OH、CN 和 NH_2 。

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

本发明的一些方案中，上述 R_1 为 CH_3 ，其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中，上述 R_2 和 R_3 分别独立地选自 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、 NH_2 和 CH_3 ，其中所述 CH_3 任选被 1、2 或 3 个 R_b 取代，其他变量如本发明所定义。

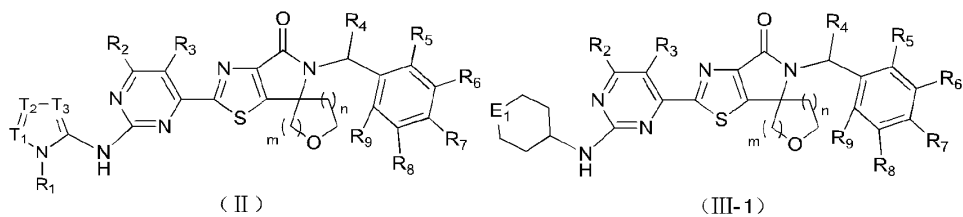
本发明的一些方案中，上述 R_2 和 R_3 分别独立地选自 H，其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中，上述 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 和 R_9 分别独立地选自 H、F、Cl、Br、I、OH、CN、 NH_2 、 CH_3 和 $-CH_2-CH_3$ ，其中所述 CH_3 和 $-CH_2-CH_3$ 任选被 1、2 或 3 个 R_c 取代，其他变量如本发明所定义。

本发明的一些方案中，上述 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 和 R_9 分别独立地选自 H、F、Cl、Br、I、OH、CN 和 NH_2 ，其他变量如本发明所定义。

本发明还有一些方案是由上述各变量任意组合而来。

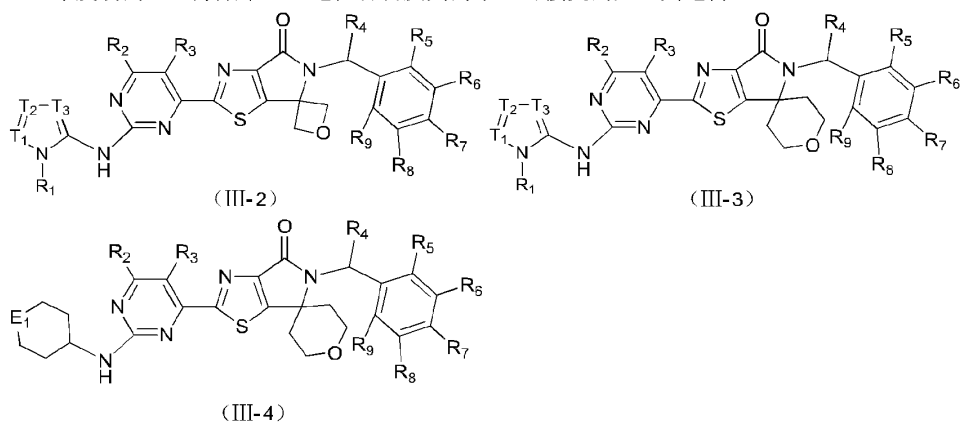
本发明的一些方案中，上述化合物及其药学上可接受的盐，其选自



其中,

m、n、E₁、T₁、T₂、T₃、R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇、R₈和R₉如本发明所定义。

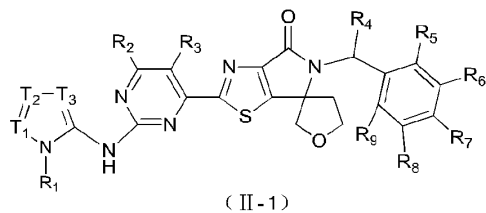
本发明的一些方案中,上述化合物及其药学上可接受的盐,其选自



其中,

R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇、R₈、R₉、E₁、T₁、T₂和T₃如本发明所定义。

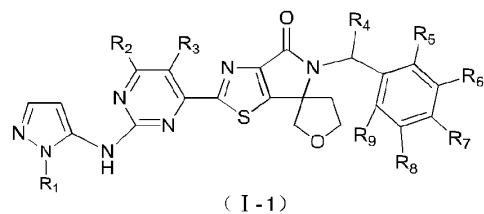
本发明的一些方案中,上述化合物及其药学上可接受的盐,其选自



其中,

T₁、T₂、T₃、R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇、R₈和R₉如本发明所定义。

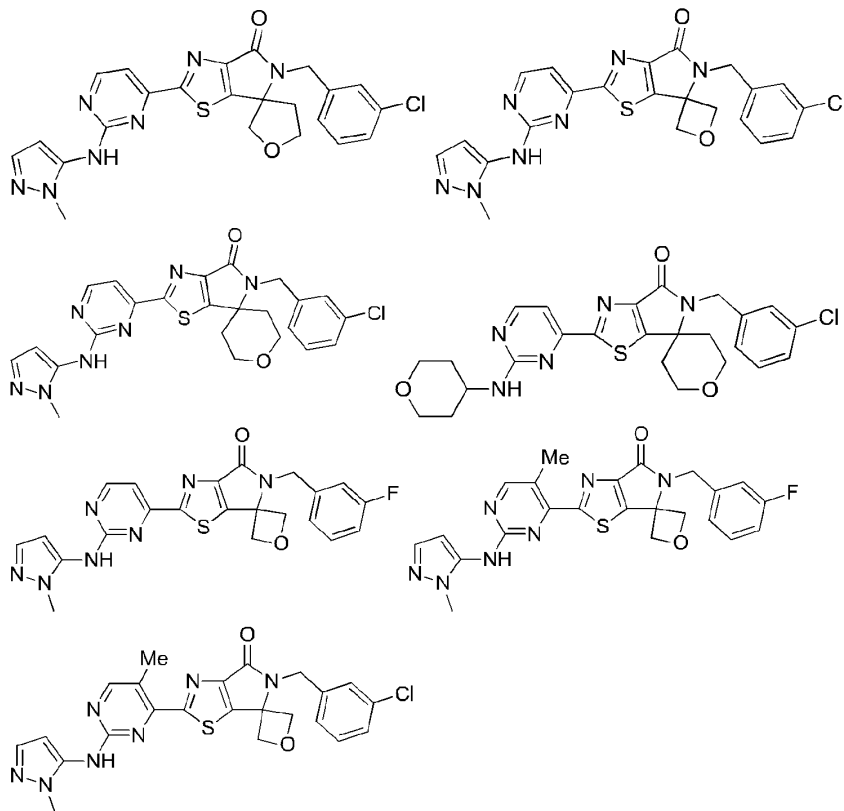
本发明的一些方案中,上述化合物及其药学上可接受的盐,其选自



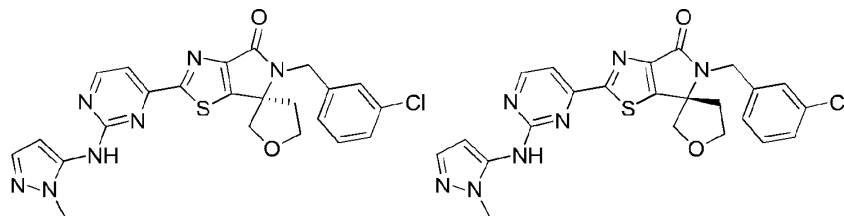
其中,

R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆、R₇、R₈ 和 R₉ 如本发明所定义。

本发明还提供了下列化合物及其药学上可接受的盐，



本发明的一些方案中，上述化合物及其药学上可接受的盐，其选自



本发明还提供了上述化合物、其异构体及其药学上可接受的盐在制备治疗 ERK 相关疾病的药物中的应用。

技术效果

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

定义和说明

除非另有说明，本文所用的下列术语和短语旨在具有下列含义。一个特定的术语或短语在没有

特别定义的情况下不应该被认为是不确定的或不清楚的，而应该按照普通的含义去理解。当本文中
出现商品名时，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、
过敏性反应或其它问题或并发症，与合理的利益/风险比相称。

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

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

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。

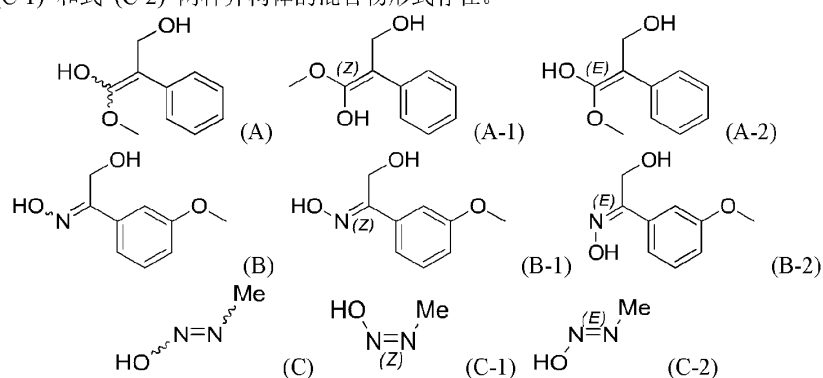
除非另有说明，术语“非对映异构体”是指分子具有两个或多个手性中心，并且分子间为非镜像
的关系的立体异构体。

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（）和直形虚线键（）。

除非另有说明，当化合物中存在双键结构，如碳碳双键、碳氮双键和氮氮双键，且双键上的各

个原子均连接有两个不同的取代基时 (包含氮原子的双键中, 氮原子上的一对孤对电子视为其连接的一个取代基), 如果该化合物中双键上的原子与其取代基之间用波浪线 (~~~~) 连接, 则表示该化合物的 (Z) 型异构体、(E) 型异构体或两种异构体的混合物。例如下式 (A) 表示该化合物以式 (A-1) 或式 (A-2) 的单一异构体形式存在或以式 (A-1) 和式 (A-2) 两种异构体的混合物形式存在; 下式 (B) 表示该化合物以式 (B-1) 或式 (B-2) 的单一异构体形式存在或以式 (B-1) 和式 (B-2) 两种异构体的混合物形式存在。下式 (C) 表示该化合物以式 (C-1) 或式 (C-2) 的单一异构体形式存在或以式 (C-1) 和式 (C-2) 两种异构体的混合物形式存在。



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

除非另有说明, 术语“富含一种异构体”、“异构体富集”、“富含一种对映体”或者“对映体富集”指其中一种异构体或对映体的含量小于 100%, 并且, 该异构体或对映体的含量大于等于 60%, 或者大于等于 70%, 或者大于等于 80%, 或者大于等于 90%, 或者大于等于 95%, 或者大于等于 96%, 或者大于等于 97%, 或者大于等于 98%, 或者大于等于 99%, 或者大于等于 99.5%, 或者大于等于 99.6%, 或者大于等于 99.7%, 或者大于等于 99.8%, 或者大于等于 99.9%。

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

可以通过的手性合成或手性试剂或者其他常规技术制备光学活性的 (R)-和 (S)-异构体以及 D 和 L 异构体。如果想得到本发明某化合物的一种对映体, 可以通过不对称合成或者具有手性助剂的衍生作用来制备, 其中将所得非对映体混合物分离, 并且辅助基团裂开以提供纯的所需对映异构体。或者, 当分子中含有碱性官能团 (如氨基) 或酸性官能团 (如羧基) 时, 与适当的光学活性的酸或碱形成非对映异构体的盐, 然后通过本领域所公知的常规方法进行非对映异构体拆分, 然后回收得到

纯的对映体。此外，对映异构体和非对映异构体的分离通常是通过使用色谱法完成的，所述色谱法采用手性固定相，并任选地与化学衍生法相结合（例如由胺生成氨基甲酸盐）。

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

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

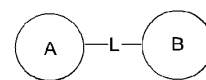
术语“被取代的”是指特定原子上的任意一个或多个氢原子被取代基取代，可以包括重氢和氢的变体，只要特定原子的价态是正常的并且取代后的化合物是稳定的。当取代基为氧（即 $=\text{O}$ ）时，意味着两个氢原子被取代。氧取代不会发生在芳香基上。术语“任选被取代的”是指可以被取代，也可以不被取代，除非另有规定，取代基的种类和数目在化学上可以实现的基础上可以是任意的。

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

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

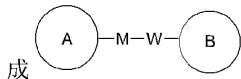
当其中一个变量选自单键时，表示其连接的两个基团直接相连，比如 A-L-Z 中 L 代表单键时表示该结构实际上是 A-Z。

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。

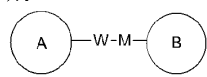


当所列举的连接基团没有指明其连接方向，其连接方向是任意的，例如，

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

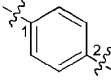


，也可以按照与从左往右的读取顺序相反的方向连接环 A 和环 B 构成



。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。所述位点与其他基团连接的化学键可以用直形实线键（ $\diagup$ ）、直形虚线键（ $\cdots$ ）、或波浪线（ $\sim$ ）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。

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，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，C_{n-n+m} 或 C_n-C_{n+m} 包括 *n* 至 *n+m* 个碳的任何一种具体情况，例如 C₁₋₁₂ 包括 C₁、C₂、C₃、C₄、C₅、C₆、C₇、C₈、C₉、C₁₀、C₁₁、和 C₁₂，也包括 *n* 至 *n+m* 中的任何一个范围，例如 C₁₋₁₂ 包括 C₁₋₃、C₁₋₆、C₁₋₉、C₃₋₆、C₃₋₉、C₃₋₁₂、C₆₋₉、C₆₋₁₂、和 C₉₋₁₂ 等；同理，*n* 元至 *n+m* 元表示环上原子数为 *n* 至 *n+m* 个，例如 3-12 元环包括 3 元环、4 元环、5 元环、6 元环、7 元环、8 元环、9 元环、10 元环、11 元环、和 12 元环，也包括 *n* 至 *n+m* 中的任何一个范围，例如 3-12 元环包括 3-6 元环、3-9 元环、5-6 元环、5-7 元环、6-7 元环、6-8 元环、和 6-10 元环等。

术语“离去基团”是指可以被另一种官能团或原子通过取代反应（例如亲核取代反应）所取代的官能团或原子。例如，代表性的离去基团包括三氟甲磺酸酯；氯、溴、碘；磺酸酯基，如甲磺酸酯、甲苯磺酸酯、对溴苯磺酸酯、对甲苯磺酸酯等；酰氧基，如乙酰氧基、三氟乙酰氧基等等。

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

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

本发明的化合物可以通过本领域技术人员所熟知的常规方法来确认结构，如果本发明涉及化合物的绝对构型，则该绝对构型可以通过本领域常规技术手段予以确证。例如单晶 X 射线衍射法

(SXRD), 把培养出的单晶用 Bruker D8 venture 衍射仪收集衍射强度数据, 光源为 CuK α 辐射, 扫描方式: φ/ω 扫描, 收集相关数据后, 进一步采用直接法(Shelxs97)解析晶体结构, 便可以确证绝对构型。

本发明所使用的溶剂可经市售获得。本发明采用下述缩略词: aq 代表水。

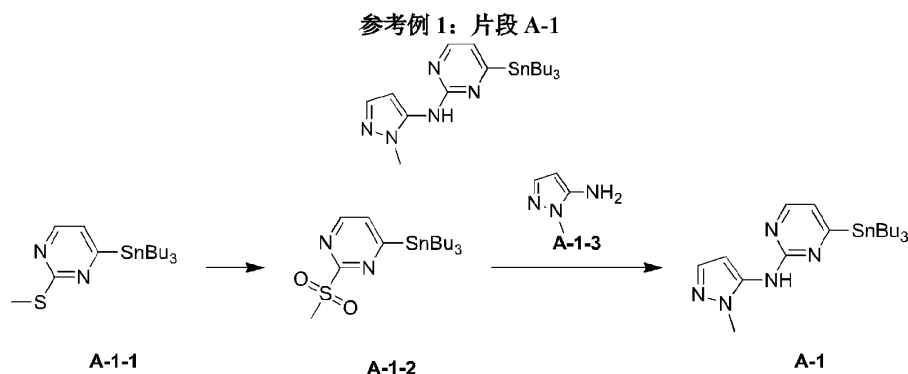
附图说明

图 1: 人结直肠癌 HCT116 模型动物在分别给予溶剂和 WX007 后的肿瘤生长曲线。

图2: 人结直肠癌HCT116模型动物在给药过程中的体重变化率(%)。

具体实施方式

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



步骤 1: 化合物 A-1-2 的合成。

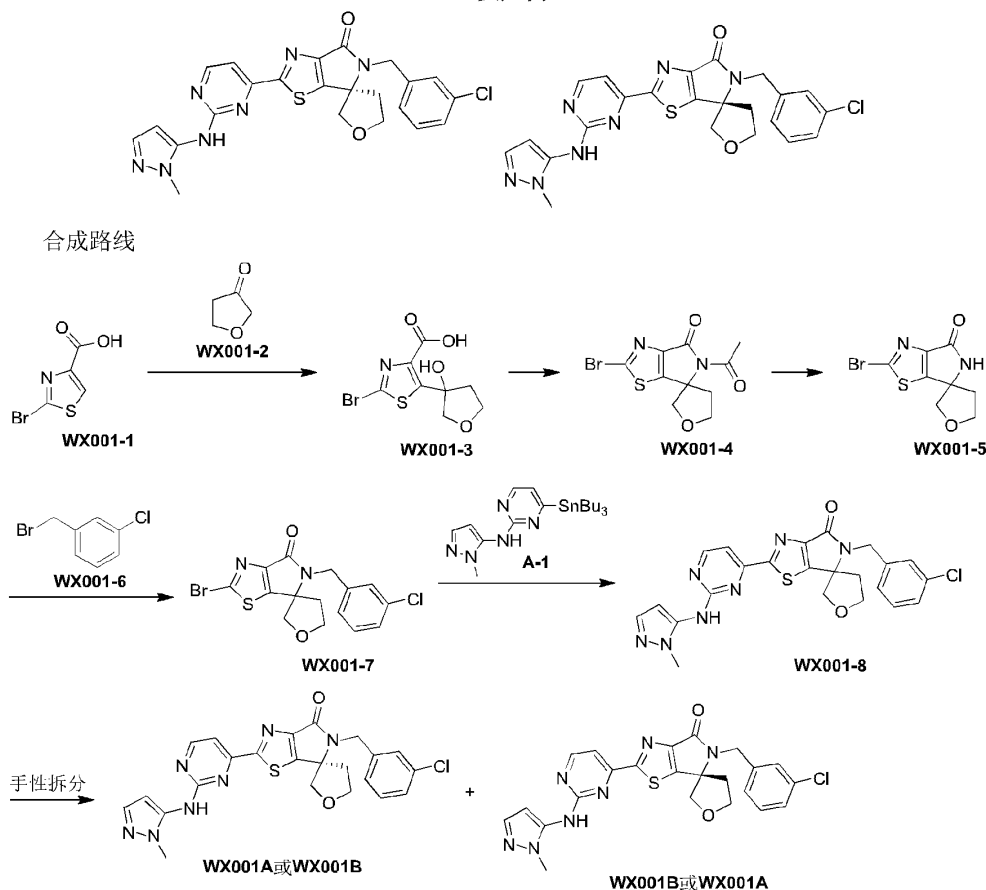
在预先干燥过的单口瓶中加入乙酸钠 (4.64 g, 56.60 mmol, 5 eq)、单过硫酸氢钾(13.92 g, 22.64 mmol, 2eq)和水(47 mL) 的溶液, 降温至 0℃, 滴加 A-1-1 (4.7 g, 11.32 mmol, 1 eq)、溶剂四氢呋喃 (47 mL) 和甲醇(47 mL) 的溶液, 并在 0℃搅拌 1 小时。29℃油浴搅拌 15 小时。反应结束后将该反应液倒入水(200 mL)中, 水相用乙酸乙酯萃取(50 mL×3)。合并有机相, 有机相依次用饱和食盐水洗涤(200 mL), 无水硫酸钠干燥, 过滤收集滤液, 减压浓缩得到残余物。残余物通过快速柱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

步骤 2: 化合物 A-1 的合成。

向反应瓶中加入 A-1-2 (3.9 g, 8.72 mmol, 1 eq)、A-1-3 (1.02 g, 10.46 mmol, 1.2 eq) 和四氢呋喃 (117 mL), 抽换氮气后-35℃滴加入六甲基二硅基胺基锂(1 M, 18.31 mL, 2.1 eq), -35℃下混合液反应 10 分钟, 反应结束后将反应液用饱和氯化铵水溶液 (100 mL) 淬灭, 乙酸乙酯 (100 mL × 2) 和二氯甲烷 (100 mL) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤旋干得粗品。粗品用柱层析纯化得到 A-

1. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 8.17 (d, $J=4.85$ Hz, 1 H), 7.46 (d, $J=1.76$ Hz, 1 H), 6.91 (d, $J=4.63$ Hz, 1 H), 6.60 (s, 1 H), 6.32 (d, $J=1.98$ Hz, 1 H), 3.79 (s, 3 H), 1.52 - 1.61 (m, 6 H), 1.28 - 1.40 (m, 6 H), 1.03 - 1.20 (m, 6 H), 0.89 (t, $J=7.28$ Hz, 9 H)。

实施例 1



步骤 1: WX001-3 的合成

向反应瓶中加入 **WX001-1** (5 g, 24.03 mmol, 1 eq) 和四氢呋喃 (200 mL), 抽换氮气后降温至 -78°C , 缓慢滴入二异丙基胺基锂 (2 mol/L, 28.84 mL, 2.4 eq) 和 四甲基乙二胺 (4.19 g, 36.05 mmol, 5.44 mL, 1.5 eq), -78°C 搅拌 0.5 小时, 随后加入 **WX001-2** (3.10 g, 36.05 mmol, 1.5 eq), -78°C 下混合液反应 2 小时。反应完毕后, 反应液用饱和氯化铵水溶液 (250 mL) 淬灭, 用 2 mol/L 的盐酸调节 pH 至 2~3, 加入乙酸乙酯 (100 mL * 3) 萃取, 有机相用饱和食盐水 (100 mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液在 45°C 用水泵减压浓缩得到 **WX001-3**。

步骤 2: WX001-4 的合成

向反应瓶中加入 **WX001-3** (1 g, 3.40 mmol, 1 eq) 和乙腈 (10 mL), 抽换氮气后降温至 0°C , 缓慢滴加三氟化硼乙醚 (579.06 mg, 4.08 mmol, 503.53 μL , 1.2 eq), 20°C 下混合液反应 2 小时, 升温至 50°C ,

继续反应 16 小时，升温至 60℃，继续反应 8 小时。反应完毕后，反应液用水（20 mL）稀释，乙酸乙酯（20 mL * 3）萃取，有机相用饱和食盐水（20 mL）洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液在 45℃ 用水泵减压浓缩至干。粗品用柱分离纯化得到 **WX001-4**。¹H NMR (400MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 4.18 (d, *J*=8.6 Hz, 1H), 4.06-4.13 (m, 2H), 3.76 (d, *J*=8.6 Hz, 1H), 2.76-2.87 (m, 1H), 2.52 (s, 3H), 2.16 (dt, *J*=12.9, 7.5 Hz, 1H).

步骤 3: **WX001-5** 的合成

向反应瓶中加入 **WX001-4** (250 mg, 788.25 μmol, 1 eq)、盐酸 (2 mol/L, 1.97 mL, 5 eq) 和乙醇 (2 mL)，70℃ 下混合液反应 16 小时。反应完毕后，反应液用水（2 mL）稀释，乙酸乙酯（5 mL * 3）萃取，有机相用饱和食盐水（2 mL）洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液在 45℃ 用水泵减压浓缩干。粗品通过薄层层析硅胶板纯化得到 **WX001-5**。¹H NMR (400MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 9.23 (br s, 1H), 3.97-4.14 (m, 2H), 3.84-3.95 (m, 1H), 3.76 (br d, *J*=8.7 Hz, 1H), 2.17-2.33 (m, 1H).

步骤 4: **WX001-7** 的合成

向反应瓶中加入 **WX001-5** (150 mg, 545.21 μmol, 1 eq) 和 *N,N*-二甲基甲酰胺 (2 mL)，抽换氮气后降温至 0℃，加入钠氢 (26.17 mg, 654.25 μmol, 60% 纯度, 1.2 eq)，搅拌 0.5 小时，随后加入 **WX001-6** (134.44 mg, 654.25 μmol, 85.63 μL, 1.2 eq)，缓慢升温至 20℃ 下反应 0.5 小时。反应完毕后，反应液用水（20 mL）稀释，乙酸乙酯（10 mL * 3）萃取，有机相用饱和食盐水（10 mL）洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液在 45℃ 用水泵减压浓缩干。粗品使用通过薄层层析硅胶板纯化得到 **WX001-7**。¹H NMR (400MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 7.30-7.39 (m, 3H), 7.23-7.29 (m, 1H), 4.62-4.79 (m, 2H), 4.02-4.11 (m, 1H), 3.95 (q, *J*=8.4 Hz, 1H), 3.72-3.82 (m, 2H), 2.30-2.38 (m, 2H).

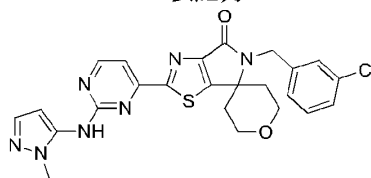
步骤 5: **WX001-8** 的合成

向反应瓶中加入 **WX001-7** (100 mg, 250.19 μmol, 1 eq)、**A-1** (127.76 mg, 275.21 μmol, 1.1 eq) 和甲苯 (2 mL)，抽换氮气后加入四三苯基磷钼 (57.82 mg, 50.04 μmol, 0.2 eq)，125℃ 下混合液反应 14 小时。反应完毕后，反应液直接旋干。粗品用薄层层析硅胶板纯化得到 **WX001-8**。

步骤 6: **WX001A** 或 **WX001B**

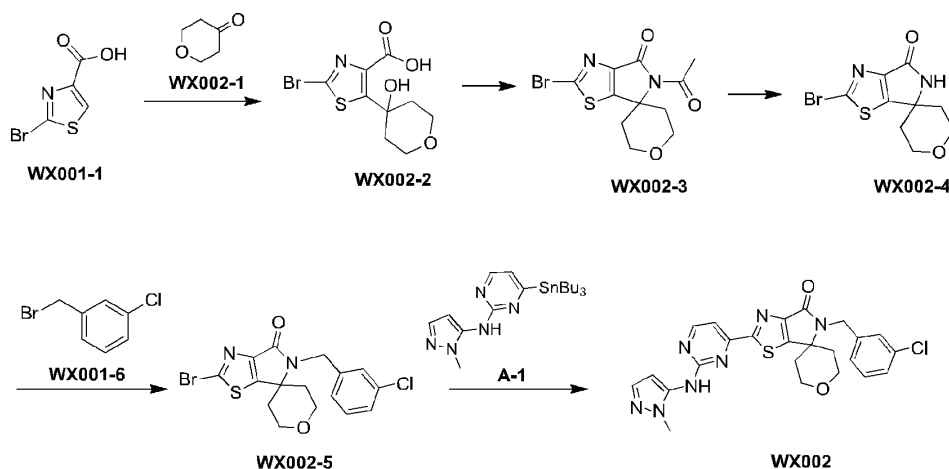
将 **WX001-8** 通过超临界流体色谱手性拆分（分离条件色谱柱：DAICEL CHIRALCEL OJ (250*30mm i.d. 10μm)；流动相：A 为 CO₂，B 为乙醇 (0.1% NH₃H₂O)，B%=50%；流速：70 mL/min) 得到 **WX001A** 或 **WX001B**。**WX001A** 的保留时间为 1.782 分钟，**WX001B** 的保留时间为 1.969 分钟。

实施例 2



WX002

合成路线



步骤 1: WX002-2 的合成

氮气保护, 向反应瓶中加入 **WX001-1** (5 g, 24.03 mmol, 1 eq) 的四氢呋喃 (250 mL), -78°C 慢慢加入二异丙基胺基锂 (2 M, 28.84 mL, 2.4 eq), 四甲基乙二胺 (4.19 g, 36.05 mmol, 5.44 mL, 1.5 eq), -78°C 反应 0.5 小时, 然后再加入 **WX002-1** (4.81 g, 48.07 mmol, 4.42 mL, 2 eq) 的四氢呋喃 (10 mL) 溶液, -78°C 反应 2 小时。反应完毕后, 在 0°C 下将反应液缓慢倒入 100 mL 饱和氯化铵水溶液中, 用盐酸 (2 M) 调节 pH 至 3-4 左右, 用乙酸乙酯 (200 mL*3) 萃取, 合并有机相, 并用饱和食盐水 (200 mL*3) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液用水泵在 45°C 下减压浓缩得到 **WX002-2**。

步骤 2: WX002-3 的合成

向反应瓶中加入 **WX002-2** (1 g, 3.25 mmol, 1 eq) 和乙腈 (20 mL), 抽换氮气后加入三氯化硼乙醚 (552.70 mg, 3.89 mmol, 480.61 μL , 1.2 eq), 60°C 下混合液反应 16 小时。反应完毕后, 向反应液中加入饱和碳酸氢钠 (20 mL), 用乙酸乙酯 (30 mL*3) 萃取, 合并有机相, 用饱和食盐水 (30 mL*3) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液用水泵在 45°C 下减压浓缩。粗品用乙酸乙酯 (10 mL) 打浆得到 **WX002-3**。

步骤 3: WX002-4 的合成

向干燥的反应瓶中加入 **WX002-3** (260 mg, 785.06 μmol , 1 eq), 盐酸 (2 M, 4 mL, 10.19 eq) 和乙醇 (6 mL), 50°C 反应 16 小时, 然后升温至 70°C 反应 4 小时。反应完毕后, 反应液用乙酸乙酯 (50 mL*3) 萃取, 合并有机相, 并用饱和食盐水 (50 mL*3) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液用水泵在 45°C 下减压浓缩。粗品用乙酸乙酯 (10 mL) 打浆得到 **WX002-4**。 ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) 9.32 (s, 1H), 3.73-3.79 (m, 2H), 3.56-3.63 (m, 2H), 2.27-2.34 (m, 1H), 1.86-1.91 (m, 2H), 1.80-1.82 (m, 1H)。

步骤 4: WX002-5 的合成

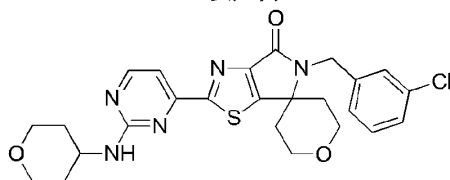
向干燥的反应瓶中加入 **WX002-4** (50 mg, 172.92 μmol , 1 eq) 和 *N,N*-二甲基甲酰胺 (2 mL), 抽换氮气, 0°C 加入钠氢 (10.37 mg, 259.38 μmol , 60% 纯度, 1.5 eq), 在 0°C 下反应 0.5 小时, 然后再加入 **WX001-6** (35.53 mg, 172.92 μmol , 22.63 μL , 1 eq), 反应液慢慢升到 25°C 继续反应 1.5 小时。反应完毕后, 将反应液加入 30 mL 水, 用乙酸乙酯 (50 mL*3) 萃取, 合并有机相, 并用饱和食盐水 (50 mL*3)。

洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液用水泵在 45℃ 下减压浓缩。粗产品通过薄层层析硅胶板纯化得到 **WX002-5**。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) 7.42 (s, 1H), 7.29-7.38 (m, 3H), 4.77 (s, 2H), 4.03 (br dd, *J* = 12.3, 4.1 Hz, 2H), 3.45 (br t, *J* = 12.0 Hz, 2H), 2.17-2.25 (m, 4.8 Hz, 2H), 1.38 (br d, *J* = 13.0 Hz, 2H)。

步骤 5: **WX002** 的合成

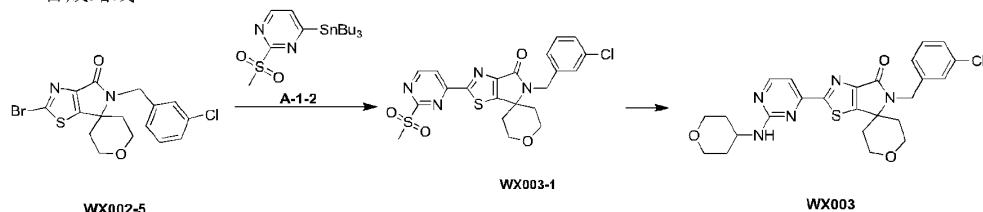
向反应瓶中加入 **WX002-5**(50 mg, 120.86 μmol, 1 eq), **A-1** (65.66 mg, 120.86 μmol, 1 eq), 甲苯 (1 mL), 抽换氮气, 加热到 125℃, 然后慢慢加入四三苯基膦钯(27.93 mg, 24.17 μmol, 0.2 eq)。125℃ 反应 48 小时。反应完毕后, 反应液用水泵在 45℃ 下减压浓缩。粗产品通过高效液相色谱法 (色谱柱: Waters Xbridge BEH C18 100*30mm*10μm; 流动相: [水(10mM 碳酸氢铵)-乙腈]; 乙腈: 28%-58%, 8min) 纯化得到 **WX002**。

实施例 3



WX003

合成路线



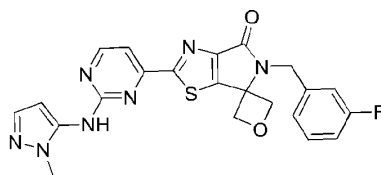
步骤 1: **WX003-1** 的合成

在预先干燥的反应瓶中加入 **WX002-5**(100 mg, 241.71 μmol, 1 eq), **A-1-2**(108.10 mg, 241.71 μmol, 1 eq)和甲苯(2 mL), 置换氮气, 125℃加入四三苯基膦钯(55.86 mg, 48.34 μmol, 0.2 eq), 搅拌反应 48 小时。反应完毕, 反应液用水泵在 45℃ 下减压浓缩。粗产品通过薄层层析硅胶板纯化得到 **WX003-1**。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) 9.29 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 8.48 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.31-7.39 (m, 3H), 4.83 (s, 2H), 4.07 (m, *J* = 12.3, 4.4 Hz, 2H), 3.64 (m, *J* = 12.0 Hz, 2H), 3.54 (s, 3H), 2.24-2.31 (m, 2H), 1.43 (m, *J* = 12.9 Hz, 2H)

步骤 2: **WX003** 的合成

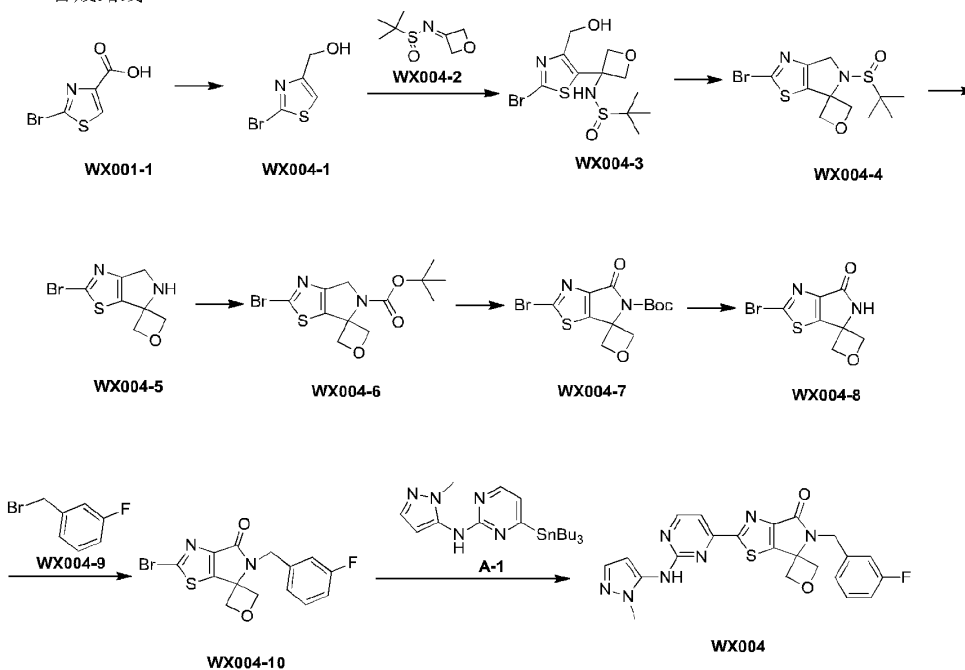
在预先干燥的反应瓶中加入 **WX003-1**(50 mg, 101.84 μmol, 1 eq), 四氢吡喃-4-胺(10.30 mg, 101.84 μmol, 1 eq)和二甲基亚砜(1 mL), 100℃搅拌反应 16 小时。反应完毕后。反应液用高效液相色谱 (色谱柱: Waters Xbridge BEH C18 100*30mm*10μm; 流动相: [水(10mM 碳酸氢铵)-乙腈]; 乙腈: 32%-62%, 8min) 纯化得到 **WX003**。

实施例 4



WX004

合成路线



步骤 1: WX004-1 的合成

向反应瓶中加入 **WX001-1** (10 g, 48.07 mmol, 1 *eq*) 和四氢呋喃 (200 mL), 置换氮气后, 在氮气流保护下缓慢滴加硼烷四氢呋喃络合物溶液 (1 M, 144.21 mL, 3 *eq*), 25℃ 反应 5 小时。反应完毕后, 在氮气流下向反应液中缓慢滴加甲醇 (100 mL), 25℃ 搅拌 16 小时后, 在 40℃ 旋干得到粗品。粗品通过柱层析纯化得到 **WX004-1**。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) 7.47 (s, 1H), 4.52 (d, *J* = 1.0 Hz, 2H).

步骤 2: WX004-3 的合成

向反应瓶中加入 **WX004-1** (7.86 g, 40.51 mmol, 1 *eq*) 和四氢呋喃 (78.6 mL) 置换氮气, 降温至 -78℃、缓慢加入二异丙基烷基锂 (2 M, 48.61 mL, 2.4 *eq*), 然后加入四甲基乙二胺 (7.06 g, 60.76 mmol, 9.17 mL, 1.5 *eq*), -78℃ 反应 0.5 小时, 加入 **WX004-2** (10.65 g, 60.76 mmol, 1.5 *eq*) 和四氢呋喃 (10 mL) 的混合溶液, -78℃ 反应 1 小时。反应完毕后, 反应液用饱和氯化铵 (100 mL) 淬灭, 乙酸乙酯 (50 mL*3) 萃取, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液在 45℃ 旋干。粗品通过柱层析纯化得到 **WX004-3**。¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) 6.39 (s, 1H), 5.42 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.84-5.03 (m, 4H), 4.38 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 1.12 (s, 9H).

步骤 3: **WX004-4** 的合成

向反应瓶中加入四氢呋喃 (56 mL)、**WX004-3** (5.6 g, 11.07 mmol, 73%纯度, 1 eq)和三丁基膦 (4.48 g, 22.14 mmol, 5.46 mL, 2 eq), 溶解完全后, 置换氮气, 降温至 0℃缓慢加入偶氮二羧酸二异丙基酯 (4.48 g, 22.14 mmol, 4.30 mL, 2 eq), 逐渐升温至 20℃反应 2 小时。反应完毕后, 向反应液中加入水 (60 mL) 后, 乙酸乙酯 (30 mL*3) 萃取, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液在 45℃旋干。粗品通过柱层析纯化得到 **WX004-4**。¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) 5.30 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.75-4.87 (m, 3H), 4.61 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 4.22 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 1.27 (s, 9H)。

步骤 4: **WX004-5** 的合成

向反应瓶中加入 **WX004-4** (500 mg, 1.42 mmol, 1 eq)、四氢呋喃 (8.3 mL)、水(1.6 mL)和碘(72.25 mg, 284.67 μmol, 57.34 μL, 0.2 eq), 置换氮气, 30℃反应 16 小时。反应完毕后, 得到 **WX004-5** 反应液直接用于下一步。

步骤 5: **WX004-6** 的合成

向步骤 4 中得到的 **WX004-5** 反应液中依次加入四氢呋喃(8.3 mL)、水(1.6 mL)、碳酸二叔丁酯 (465.00 mg, 2.13 mmol, 489.47 μL, 1.5 eq)和碳酸钠(301.10 mg, 2.84 mmol, 2 eq), 25℃反应 4 小时。反应完毕后, 反应液用水 (10 mL) 淬灭, 乙酸乙酯 (5 mL*3) 萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液在 45℃旋干。粗品通过柱层析纯化得到 **WX004-6**。¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) 5.46 (br d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 5.32 (br d, *J* = 6.3 Hz, 1H), 4.64 (br d, *J* = 6.3 Hz, 1H), 4.55 (br d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 4.49 (br d, *J* = 9.5 Hz, 2H), 1.47-1.57 (m, 9H)。

步骤 6: **WX004-7** 的合成

向干燥的反应瓶中加入 **WX004-6** (150 mg, 431.99 μmol, 1eq), 三氧化铬(86.39 mg, 863.99 μmol, 32.00 μL, 2 eq), 乙酸(3 mL), 25℃反应 12 小时。反应完毕后, 反应液用水(3mL)稀释, 用二氯甲烷 (5mL)萃取 3 次, 合并有机相, 用饱和食盐水(5mL)洗涤有机相, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液用水泵减压浓缩。粗品通过柱层析纯化得到 **WX004-7**。

步骤 7: **WX004-8** 的合成

向干燥的反应瓶中加入 **WX004-7** (70 mg, 193.79 μmol, 1 eq), 二氯甲烷 (1 mL), 三氟乙酸(287.47 mg, 2.52 mmol, 186.67 μL, 13.01 eq), 25℃反应 1 小时。反应完毕后, 将反应液直接浓缩, 粗产品通过薄层层析硅胶板纯化得到 **WX004-8**。¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz): δ (ppm) 9.59(br, s, 1H), 4.89 (s, 4H)。

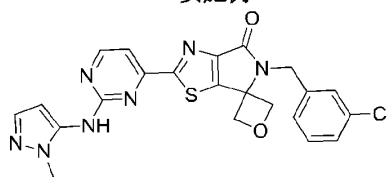
步骤 8: **WX004-10** 的合成

向干燥的反应瓶中加入 **WX004-8** (45 mg, 172.35 μmol, 1 eq), *N,N*-二甲基甲酰胺 (2mL), 碳酸铯(84.23 mg, 258.53 μmol, 1.5 eq), **WX004-9** (39.09 mg, 206.82 μmol, 25.39 μL, 1.2eq)。抽换氮气, 25℃反应 12 小时。反应完毕后, 反应液用水(2mL)稀释, 用二氯甲烷(2mL)萃取 3 次, 合并有机相, 用饱和食盐水(20mL)洗涤有机相, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液用水泵减压浓缩, 粗产品通过薄层层析硅胶板纯化得到 **WX004-10**。

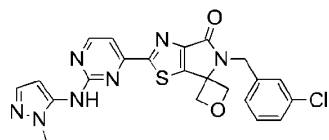
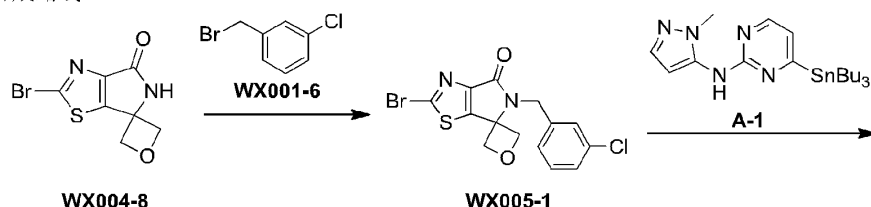
步骤 9: **WX004-10** 的合成

向干燥的反应瓶中加入 **WX004-10** (45 mg, 121.88 μmol , 1 eq), **A-1** (62.24 mg, 134.07 μmol , 1.1 eq), 甲苯(1 mL), 抽换氮气, 然后加入四三苯基膦钯(28.17 mg, 24.38 μmol , 0.2 eq), 加热到 125 $^{\circ}\text{C}$ 反应 16 小时。反应完毕后, 反应液直接浓缩。粗产品通过薄层层析硅胶板纯化, 再通过用高效液相色谱 (色谱柱: Waters Xbridge BEH C18100*30mm*10 μm ; 流动相: [H₂O(10mM 碳酸氢铵)-乙腈]; 乙腈%: 25%-45%, 8min) 纯化得到 **WX004**。

实施例 5

**WX005**

合成路线

**WX005**步骤 1: **WX005-1** 的合成

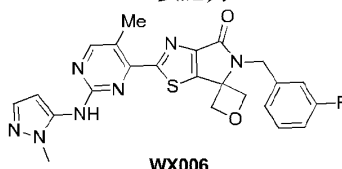
向干燥的反应瓶中加入 **WX004-8** (300 mg, 1.15 mmol, 1 eq), *N,N*-二甲基甲酰胺(6 mL), 碳酸铯 (561.55 mg, 1.72 mmol, 1.5 eq), **WX001-6** (283.32 mg, 1.38 mmol, 180.46 μL , 1.2 eq), 抽换氮气, 25 $^{\circ}\text{C}$ 反应 16 小时。反应完毕后, 反应液用水(10 mL)稀释, 用乙酸乙酯(20 mL)萃取 3 次, 合并有机相, 用饱和食盐水(20 mL*5)洗涤有机相, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液用水泵减压浓缩。粗产品通过柱层析纯化得到 **WX005-1**。¹H NMR (DMSO-d₆, 400MHz): δ (ppm) 7.42 (s, 1H), 7.32-7.40 (m, 2H), 7.26-7.32 (m, 1H), 4.98 (s, 2H), 4.79-4.89 (m, 4H)

步骤 2: **WX005** 的合成

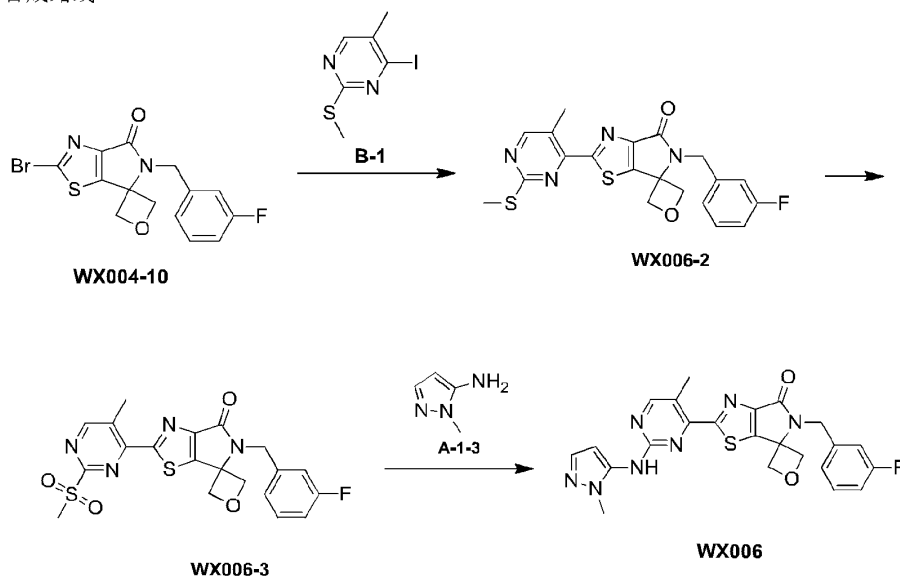
向干燥的反应瓶中加入 **WX005-1** (30 mg, 77.79 μmol , 1 eq), **A-1** (39.72 mg, 85.57 μmol , 1.1 eq), 甲苯(1 mL), 抽换氮气, 然后加入四三苯基膦钯(17.98 mg, 15.56 μmol , 0.2 eq), 加热到 125 $^{\circ}\text{C}$ 反应 16 小时。补加四三苯基膦钯 (8.99 mg, 7.78 μmol , 0.1 eq), 125 $^{\circ}\text{C}$ 反应 3 小时。反应完毕后, 反应液直

接浓缩。粗产品通过薄层层析硅胶板纯化，再经高效液相色谱(色谱柱: Waters Xbridge BEH C18 100*30mm*10 μ m;流动相: [水(10mM 碳酸氢铵)-乙腈];乙腈%: 25%-55%,8min)分离纯化得到 **WX005**。

实施例 6



合成路线



步骤 1: **WX006-2** 的合成

向干燥的反应瓶中加入 **WX004-10** (105 mg, 284.39 μ mol, 1 *eq*)，四氢呋喃 (1 mL)，氯化锌 (0.7 M, 406.27 μ L, 1 *eq*)，抽换氮气，-30 $^{\circ}$ C加入正丁基锂 (2.5 M, 170.64 μ L, 1.5 *eq*)，25 $^{\circ}$ C搅拌 1 小时，然后将反应温度降到-30 $^{\circ}$ C，加入 **B-1** (75.68 mg, 284.39 μ mol, 1 *eq*) 和四三苯基膦钯(16.43 mg, 14.22 μ mol, 0.05 *eq*) 的四氢呋喃 (0.5 mL)溶液，将温度升到 60 $^{\circ}$ C，继续反应 16 小时。反应完毕后，向反应液中加入 2mL 的饱和氯化铵水溶液，用乙酸乙酯 (5mL*3) 萃取，合并有机相，用饱和食盐水 (20mL)洗涤有机相，有机相用无水硫酸钠干燥，过滤，滤液用水泵减压浓缩。粗品用 2mL 的甲基叔丁基醚打浆纯化得到 **WX006-2**。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) 8.77 (s, 1H), 7.37-7.42 (m, 1H), 7.20 (br d, *J* = 8.6 Hz, 3H), 5.04 (s, 2H), 4.94 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 4.86 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.64 (s, 3H), 2.62 (s, 3H)。

步骤 2: **WX006-3** 的合成

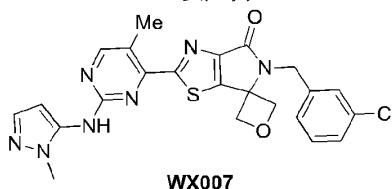
向干燥的反应瓶中加入 **WX006-2** (20 mg, 46.67 μ mol, 1 *eq*)，二氯甲烷 (1 mL)，抽换氮气，0 $^{\circ}$ C加入间氯过氧苯甲酸(30.20 mg, 140.02 μ mol, 80% 纯度, 3 *eq*)，将温度缓慢升到 25 $^{\circ}$ C，反应 3 小时。反应完毕后，向反应液中加入饱和硫代硫酸钠溶液 (10mL) 至淀粉碘化钾试纸不显蓝色，加入二氯

甲烷 (10mL) 稀释, 分液要有有机相, 有机相分别用饱和碳酸氢钠 10mL, 用饱和食盐水 10mL 洗涤, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液旋干。粗产品通过薄层层析硅胶板纯化得到 **WX006-3**。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ (ppm) 9.20 (s, 1H), 7.37-7.45 (m, 1H), 7.21 (br d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.09-7.15 (m, 1H), 5.05(s, 2H), 4.93-4.96 (m, 2H), 4.89-4.91 (m, 2H), 3.51 (s, 3H), 2.82 (s, 3H).

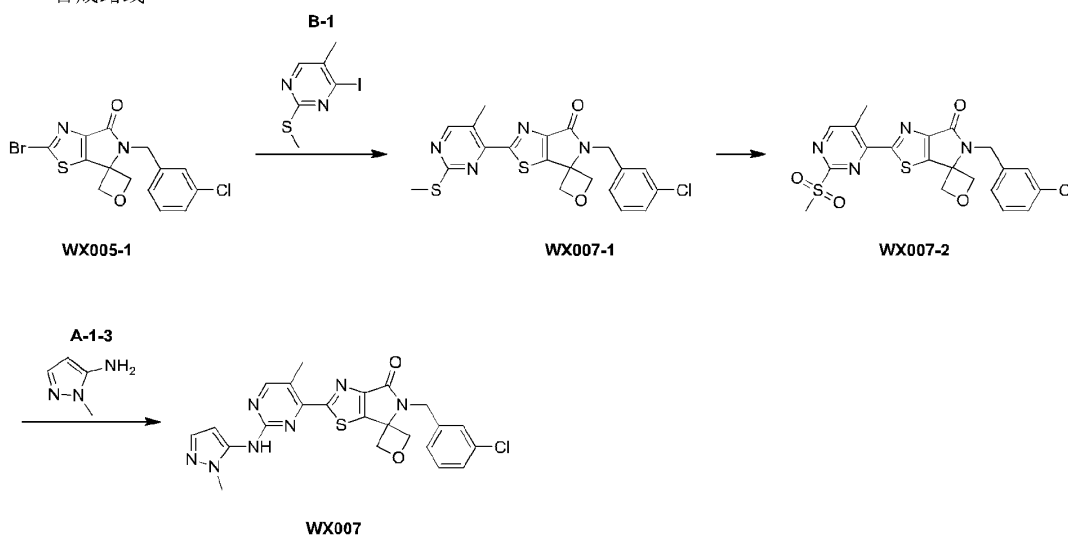
步骤 3: **WX006** 的合成

向干燥的反应瓶中加入 **WX006-3** (28 mg, 60.80 μ mol, 1 eq), **A-1-3** (11.81 mg, 121.61 μ mol, 2 eq), 二氯甲烷 (1mL), 四氢呋喃 (1 mL), 抽换氮气, -30℃加六甲基二硅基胺基锂(1 M, 127.69 μ L, 2.1 eq), 25℃反应 1 小时。反应完毕后, 向反应液中加入 1 mL 的水, 旋出体系中的有机溶剂, 有固体产生, 过滤, 收集固体得到粗品。粗品用高效液相色谱 (色谱柱: Waters XbridgeBEH C18 100*25mm*5 μ m; 流动相: [H₂O(10mM 碳酸氢铵)-乙腈];乙腈%: 25%-60%,10min) 纯化得到 **WX006**。

实施例 7



合成路线



步骤 1: **WX007-1** 的合成

向干燥的反应瓶中加入 **WX005-1** (100 mg, 259.29 μ mol, 1 eq), 氯化锌(0.7 M, 370.42 μ L, 1 eq), 四氢呋喃(1.5 mL), 抽换氮气降温至-30℃, 加入正丁基锂 (2.5 M, 155.58 μ L, 1.5 eq), 20℃反应 1 小时。然后降温到-30℃, 缓慢滴入加入四三苯基膦钾(14.98 mg, 12.96 μ mol, 0.05 eq), **B-1** (69.00 mg, 259.29 μ mol, 1 eq)的四氢呋喃 (0.5 mL)溶液, 60℃反应 15 小时。反应完毕后, 反应液用 5mL 饱和

氯化铵溶液淬灭,用乙酸乙酯(10 mL)萃取3次,合并有机相,用饱和食盐水(10 mL)洗涤有机相,有机相用无水硫酸钠干燥,过滤,滤液用水泵减压浓缩。粗产品通过薄层层析硅胶板纯化得到 **WX007-1**。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400MHz): δ(ppm) 8.78 (s, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.30-7.42 (m, 3H), 5.03 (s, 2H), 4.91-4.96 (m, 2H), 4.83-4.89 (m, 2H), 2.59-2.71 (m, 6H)。

步骤 2: **WX007-2** 的合成

向干燥的反应瓶中加入 **WX007-1** (40 mg, 89.90 μmol, 1 eq), 二氯甲烷 (1 mL), 抽换氮气, 0℃加入间氯过氧苯甲酸(58.18 mg, 269.69 μmol, 80%纯度, 3 eq), 将温度缓慢升到 25℃, 反应 3 小时。反应完毕后, 向反应液中加入饱和硫代硫酸钠溶液(10 mL)至淀粉 KI 试纸不显蓝色, 加入二氯甲烷(10 mL)稀释, 分液要有机相, 有机相分别用饱和碳酸氢钠 10 mL, 用饱和食盐水 10 mL 洗涤, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液旋干。粗产品通过薄层层析硅胶板纯化得到 **WX007-2**。

步骤 3: **WX007** 的合成

向干燥的反应瓶中加入 **WX007-2** (35 mg, 73.38 μmol, 1 eq), **A-1-3** (14.97 mg, 154.10 μmol, 2.1 eq), 二氯甲烷 (0.5 mL), 四氢呋喃 (0.5 mL), 抽换氮气, 将反应降温至 0℃滴加六甲基二硅基胺基锂 (1 M, 146.76 μL, 2 eq), 0℃反应 0.5 小时, 25℃反应 1 小时。反应完毕后, 加入 10 mL 水淬灭, 加入 20 mL 二氯甲烷萃取, 分液后收集有机相, 水相用二氯甲烷萃取(3* 20 mL)。合并有机相, 依次用饱和食盐水洗涤(3* 20 mL), 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩得到残余物。粗品经用高效液相色谱(色谱柱: Phenomenex Gemini-NX C18 75*30mm*3μm;流动相: [H₂O(10mM 碳酸氢铵)-乙腈];乙腈%: 35%-55%,8min)纯化得到 **WX007**。

各实施例的氢谱和质谱数据如表 1 所示。

表 1

实施例	化合物	NMR	MS <i>m/z</i>
1	WX001A	¹ H NMR (400MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ (ppm) 9.81 (br s, 1H), 8.70 (d, <i>J</i> =4.9 Hz, 1H), 7.55 (d, <i>J</i> =5.0 Hz, 1H), 7.25-7.45 (m, 5H), 6.32 (s, 1H), 4.67-4.83 (m, 2H), 3.99-4.13 (m, 2H), 3.82-3.88 (m, 1H), 3.76-3.81 (m, 1H), 3.72 (s, 3H), 2.35-2.45 (m, 2H).	494.2 [M+H] ⁺
	WX001B	¹ H NMR (400MHz, DMSO- <i>d</i> ₆): δ (ppm) 9.80 (br s, 1H), 8.69 (d, <i>J</i> =4.9 Hz, 1H), 7.55 (d, <i>J</i> =4.9 Hz, 1H), 7.25-7.46 (m, 5H), 6.32 (d, <i>J</i> =1.6 Hz, 1H), 4.67-4.84 (m, 2H), 3.98-4.14 (m, 2H), 3.83-3.88 (m, 1H), 3.76-3.81 (m, 1H), 3.72 (s, 3H), 2.33-2.45 (m, 2H).	494.1 [M+H] ⁺
2	WX002	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 400 MHz): δ (ppm) 9.81 (s, 1H), 8.71 (d, <i>J</i> = 4.9 Hz, 1H), 7.58 (d, <i>J</i> = 5.0 Hz, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.42 (d, <i>J</i> = 1.9 Hz, 1H), 7.30-7.40 (m, 3H), 6.34 (d, <i>J</i> = 1.5 Hz, 1H), 4.81 (s, 2H), 4.07 (br dd, <i>J</i> = 12.1, 4.0 Hz, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.57	508.3 [M+1] ⁺

		(br t, $J = 12.0$ Hz, 2H), 2.23-2.31 (m, 4.5 Hz, 2H), 1.40 (br d, $J = 12.7$ Hz, 2H).	
3	WX003	^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) 8.54 (br d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 7.51-7.69 (m, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.30-7.39 (m, 3H), 7.28 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H), 4.80 (s, 2H), 4.06 (br dd, $J = 12.9, 3.9$ Hz, 3H), 3.90 (br d, $J = 11.0$ Hz, 2H), 3.53-3.64 (m, 2H), 3.37-3.51 (m, 2H), 2.22-2.29 (m, 4.6 Hz, 2H), 1.82-1.94 (m, 2H), 1.51-1.63 (m, 2H), 1.40 (br d, $J = 12.7$ Hz, 2H).	512.3 [M+1] ⁺
4	WX004	^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) 9.84 (br s, 1H), 8.70 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 7.55 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H), 7.36-7.44 (m, 2H), 7.15-7.21 (m, 2H), 7.06-7.15 (m, 1H), 6.35 (s, 1H), 5.03 (s, 2H), 4.89-4.95 (m, 2H), 4.83-4.88 (m, 2H), 3.74 (s, 3H).	464.0 [M+1] ⁺
5	WX005	^1H NMR (DMSO- d_6 , 400MHz): δ (ppm) 9.84 (br s, 1H), 8.71 (d, $J=4.9$ Hz, 1H), 7.55 (d, $J=5.0$ Hz, 1H), 7.29-7.46 (m, 5H), 6.35 (d, $J=1.5$ Hz, 1H), 5.02 (s, 2H), 4.89-4.94 (m, 2H), 4.84-4.89 (m, 2H), 3.74 (s, 3H).	480.1 [M+1] ⁺
6	WX006	^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ (ppm) 9.68 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 7.37-7.43 (m, 2H), 7.16-7.21 (m, 2H), 7.08-7.15 (m, 1H), 6.36 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 5.03 (s, 2H), 4.94 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 4.83 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 3.73 (s, 3H), 2.58 (s, 3H).	478.1 [M+1] ⁺
7	WX007	^1H NMR (DMSO- d_6 , 400MHz): δ (ppm) 9.66 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 7.28-7.46 (m, 5H), 6.36 (s, 1H), 5.02 (s, 2H), 4.94 (d, $J=7.3$ Hz, 2H), 4.83 (d, $J=7.3$ Hz, 2H), 3.73 (s, 3H), 2.59 (s, 3H).	494.1 [M+1] ⁺

实验例一、体外酶活性测试:

1. 实验目的:

测量化合物抑制 ERK2 激酶活性的能力。

2. 实验缓冲液:

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

3. 化合物处理:

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

4. 实验方法

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

表 2 体外酶活性测试结果

化合物	ERK2
	IC_{50} (nM)
WX001A	0.31
WX001B	0.32
WX002	0.4
WX003	0.29
WX004	1.1
WX005	0.36
WX006	0.94
WX007	0.48

结论: 本发明化合物表现出较优的对 ERK2 酶抑制活性。

实验例二、体外细胞增殖抑制实验:

1. 实验目的:

测量化合物抑制 HT29 肿瘤细胞增值的能力。
2. 化合物处理:

将测试化合物溶于 100% DMSO 中, 配制成 10mM 的母液。
3. 实验步骤与方法:
 - 1) 开启生物安全柜紫外灯, 倒计时 30 分钟;
 - 2) 37°C 水浴锅中, 预热 RPMI1640 培养基和胰酶;
 - 3) 紫外照射完毕, 开启生物安全柜, 将预热培养基, 胰酶, 磷酸缓冲盐溶液(PBS)等用酒精擦拭并放入生物安全柜中;
 - 4) 将 HT29 细胞从培养箱中取出, 在生物安全柜中去除旧培养基, 加入 10 毫升 PBS, 轻轻摇晃, 并去除 PBS;

- 5) 加入预热 0.25%胰酶 1.5 毫升, 水平晃动培养瓶, 使其均匀覆盖到底部的细胞, 置培养箱中 2 分钟;
 - 6) 用完全培养基终止细胞消化, 并吹打至均匀的细胞悬液计数;
 - 7) 根据细胞计数结果, 调整细胞悬液密度为 1500 细胞每孔, 50 微升每孔进行种板;
 - 8) 将化合物母液连续稀释在 DMSO 溶液中, 并使用 Tecan 将化合物加入细胞板中;
 - 9) 将加过化合物的细胞板和 CellTiterGlo 放到室温平衡, 后加 CellTiterGlo 25 微升至每孔, 震荡 1-2 分钟, 静置 10 分钟后检测信号值, 并用 XL-Fit 分析数据, 计算各化合物的 IC₅₀。
4. 实验结果见表 3:

表 3 体外细胞活性测试结果

化合物	HT29
	IC ₅₀ (nM)
WX001A	21
WX001B	26
WX002	73
WX003	69
WX004	125
WX005	49
WX006	14
WX007	11

结论: 本发明化合物表现出较优的对 HT29 细胞增殖抑制活性。

实验例三、体内 DMPK 研究:

小鼠体内 DMPK 研究

1. 实验目的:

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

2. 实验操作:

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

注 DMSO: 二甲基亚砜; HP-β-CD: 羟丙基-β-环糊精。

3. 实验结果见表 4:

表 4 化合物 PK 测试结果

化合物	C _{max} (nM)	F%	口服 DNAUC (nM.h/mpk)	Vd _{ss} (L/kg)	Cl (mL/min/kg)	T _{1/2} (h)
WX006	1400	70%	1356	1.7	17.2	1.4
WX007	595	46%	1086	1.7	14.4	1.3

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

结论: 本发明化合物展现了优良的口服暴露量和生物利用度。

实施例四: 人结肠癌 HCT116 细胞皮下异种移植肿瘤 BALB/c 裸小鼠模型的体内药效学研究

1. 实验目的:

使用人结肠癌 HCT-116 细胞皮下异种移植肿瘤裸小鼠模型, 评价 **WX007** 的抗肿瘤作用。

2. 实验动物:

种属: 小鼠

品系: BALB/c 裸小鼠

周龄: 6-8 周龄

性别: 雌性

体重: 17-23 克

供应商: 上海市计划生育科学研究所实验动物经营部

动物合格证号: 20180006020214

3. 实验内容:

1) 实验细胞及培养: 人结肠癌 HCT-116 细胞体外单层培养, 培养条件为 McCoy's 5a 培养基中加 10% 胎牛血清, 37°C 的 5% CO₂ 孵箱培养。一周三次用胰酶-乙二胺四乙酸进行常规消化处理传代。当细胞饱和度为 80%-90%, 数量到达要求时, 收取细胞, 计数, 接种;

2) 肿瘤组织接种及分组: 0.2 mL (5×10⁶个) HCT-116 细胞皮下接种于每只小鼠的右侧腋下, 肿瘤平均体积达到 149 mm³ 时, 将动物随机分为两组, 开始给药。实验分组和给药方案见表 5:

表 5 实验动物分组及给药方案

组别	动物数量	药物	剂量 (mg/kg)	给药周期	给药途径和频次
1	6	溶剂对照 (Vehicle)	--	18 天	口服给药(PO), 每天一次 (QD)
2	6	WX007	15	18 天	口服给药(PO), 每天一次 (QD)

3) 实验动物日常观察: 本实验方案的拟定及任何修改均通过了实验动物管理与使用委员会 (IACUC) 的评估核准。实验动物的使用及福利遵照国际实验动物评估和认可委员会 (AAALAC) 的规定执行。每天监测动物的健康状况及死亡情况, 例行检查包括观察肿瘤生长和药物治疗对动物

日常行为表现的影响如行为活动，摄食摄水量（仅目测），体重变化（每周测量两次体重），外观体征或其它不正常情况。基于各组动物数量记录了组内动物死亡数和副作用。

- 4) 受试物的配制
- a) 溶媒组：玉米油。
- b) 待测化合物组：称量定量的受试化合物于配药瓶内，加入相应体积的玉米油后涡旋，得到澄清溶液。化合物一周配制一次。
- 5) 肿瘤测量和实验指标：
- a) 每周两次用游标卡尺测量肿瘤直径。肿瘤体积的计算公式为： $TV=1/2 \times a \times b^2$ ，a和b分别表示肿瘤的长径和短径；
- b) 化合物的抑瘤疗效用TGI (%)评价。TGI(%), 反映肿瘤生长抑制率。TGI(%)的计算： $TGI(\%) = \{ [1 - (\text{某处理组给药结束时平均瘤体积} - \text{该处理组开始给药时平均瘤体积})] / (\text{溶剂对照组治疗结束时平均瘤体积} - \text{溶剂对照组开始治疗时平均瘤体积}) \} \times 100\%$ 。
4. 实验结果：
- 1) 如表6和图1所示，在人结肠癌HCT-116细胞皮下异种移植肿瘤裸小鼠模型上，口服给药至第18天，WX007 15 mg/kg给药组具有明显的抑制肿瘤生长作用，TGI为62%。
- 2) 实验动物的体重作为间接测定药物毒性的参考指标。如图2所示，给药至第18天时，溶剂对照组和WX007 15 mg/kg给药组所有动物的体重均未有明显下降，无发病或死亡现象。

表 6 小鼠 HCT116 模型体内药效实验结果

组别	药物	TGI
2	WX007 (15 mg/kg, PO, QD)	62%

结论： 本发明化合物能显著抑制肿瘤生长，给药过程中动物的体重未见明显下降，耐受性好。